

APOPTÓZA

Karel Souček, Ph.D.

Alena Vaculová, Ph.D.

Oddělení cytokinetiky

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

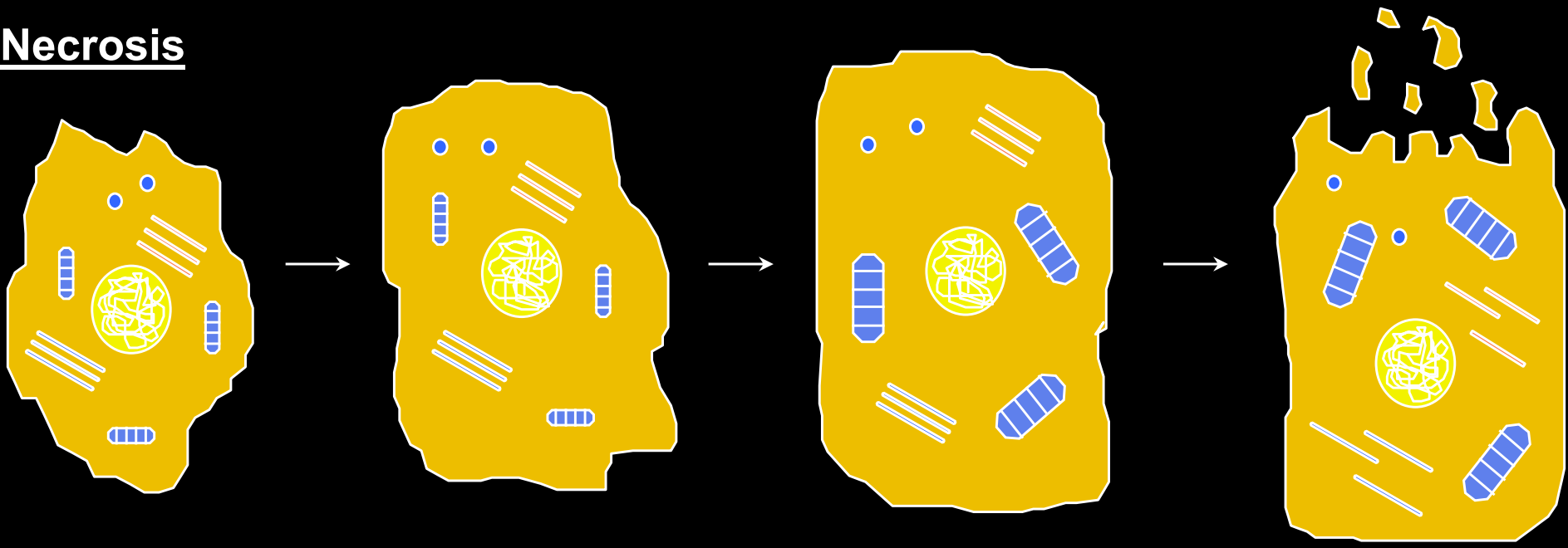
Apoptóza

- **programovaná buněčná smrt**
- **termín poprvé použil australský patolog J. F. Kerr v roce 1972, aby odlišil jinou formu buněčné smrti než je nekróza**
- **název odvozen z řečtiny, znamená „padání listí“**
- **od 70. let intenzivní výzkum apoptózy a její regulace**
- **geneticky kontrolovaný komplexní proces programované buněčné smrti, cílená sebedestrukce buňky**
- **obrovský význam ve vývoji a udržení homeostázy mnohobuněčného organismu**

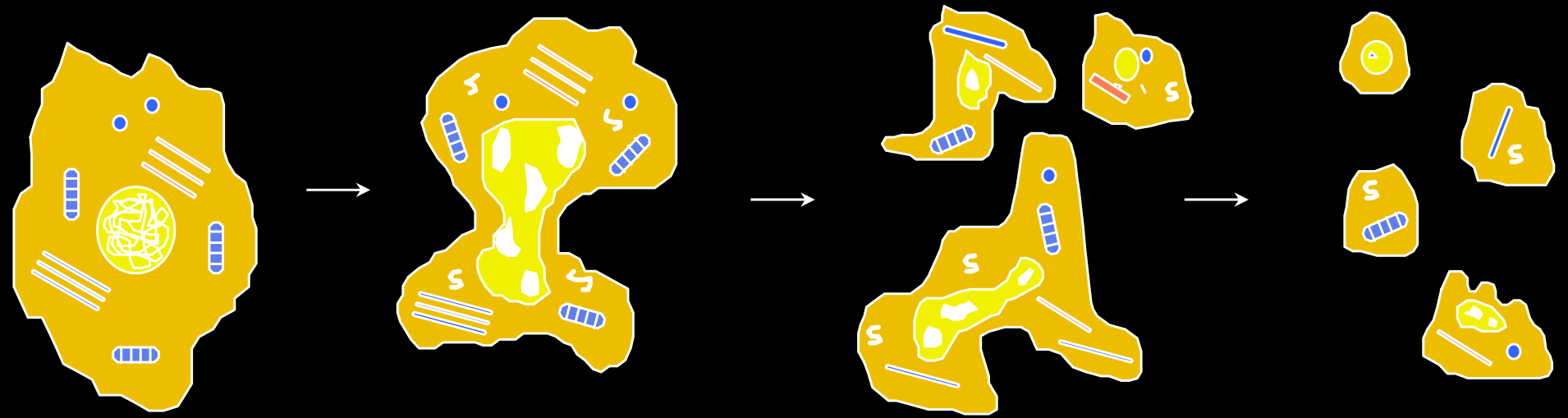
Morfologie – nekróza vs. apoptóza

- ztráta integrity plazmatické membrány
- bobtnání cytoplazmy a zvětšení buňky
- rozbití jádra
- desintegrace buněčných organel
- kompletní lyze buňky
- bobtnání cytoplazmatické membrány, integrita membrány není porušena
- zmenšení velikosti buňky
- kondenzace a specifická fragmentace jaderného chromatinu
- udržení integrity intracelulárních organel
- formace tzv. apoptotických bodies

Necrosis



Apoptosis



a

b

c

d

Biochemie – nekróza vs. apoptóza

- Bez účasti specifických molekul
- Pasivní proces bez dodání energie z ATP
- Neregulovaná destrukce jaderné DNA
- Není specifická role mitochondrií
- Ztráta regulace iontových rovnováh
- Aktivace specifických molekul
- Nutné dodání energie ve formě ATP
- Specifická fragmentace jaderné DNA
- Uvolnění specifických regulátorů z mitochondrií
- Změny symetrie membrán

Fyziologický význam – nekróza vs. apoptóza

- Postihuje skupiny buněk
- Indukována nefyziologickými stimuly
- Poškození okolní tkáně – vylití toxických látek
- Spouští zánět
- Týká se jednotlivých buněk
- Indukována fyziologickými stimuly
- Fagocytóza makrofágy
- Není zánět

Induktory buněčné smrti – nekróza vs. apoptóza

- Hypoxie
- Extrémní výkyvy teploty
- Osmotický tlak
- Silné změny pH
- Lytické viry
- Metabolické jedy
- atd.
- Nedostatek růstových faktorů
- Hormonální změny
- Specifické signály smrti - „death ligandy“
- Chemoterapie
- UV-záření
- Ztráta kontaktu s prostředím

Význam apoptózy

- **Eliminace nepotřebných, poškozených, nebezpečných, mutovaných či jinak pozměněných buněk za účelem udržení homeostázy mnohobuněčného organismu**

Studium apoptózy v mnohobuněčném organismu

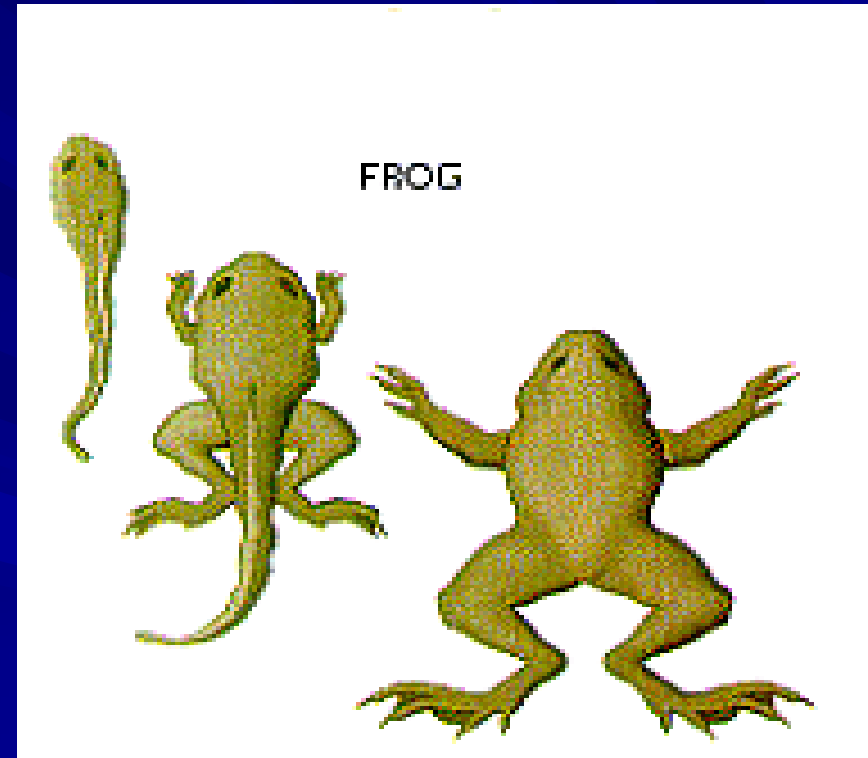
- Caenorhabditis elegans (Nematoda) – první a velmi sofistikovaný model studia PCD

Přesně řízený vývoj – organismus z 1090 buněk, z nich během vývoje 131 buněk umírá apoptózou – nutno přesné načasování a lokalizace, jinak vážné malformace

Jeden z nejvíce studovaných organismů z hlediska popisu mechanismů apoptózy, podobnost s obratlovci (výskyt analogických apoptotických genů a proteinů)

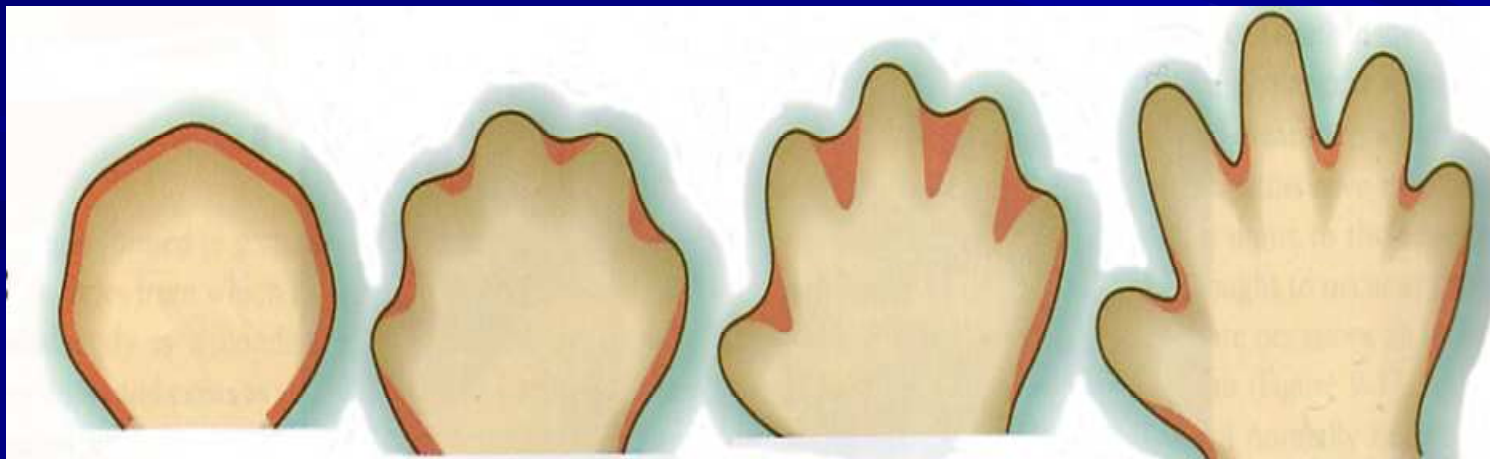
Apoptóza ve vývoji mnohobuněčného organismu

- **Metamorfóza hmyzu**
– vývoj imaga z larvy
- **Metamorfóza obojživelníků a plazů** – ztráta ocasu pulců během proměny v žábu (postupná řízená indukce apoptózy a proměna tvaru těla)



Apoptóza ve vývoji mnohobuněčného organismu

- odumírání některých neuronů při vytváření CNS
- formace tvaru orgánů a struktur – prsty a interdigitální prostory
- odstranění abnormalit během embryogeneze (včetně spontánních abortů)



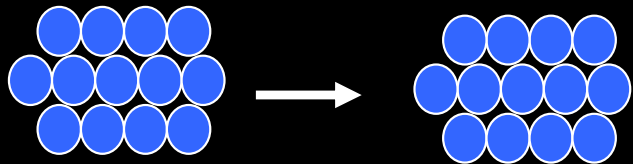
Apoptóza v regulaci homeostázy organismu

- **Eliminace starých diferencovaných nepotřebných buněk (krevní, střevní, kožní...)**
- **Eliminace již nepotřebných buněk mléčné žlázy po ukončení laktace**
- **Regulace endometria během menstruačního cyklu**
- **Odumření poškozených zárodečných buněk**

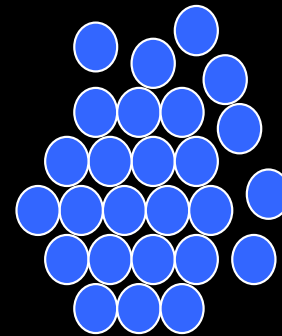
Apoptóza versus proliferace

- Pro udržení homeostázy organismu je nutná dokonalá rovnováha mezi procesy proliferace a apoptózy
- Porušení této rovnováhy má dalekosáhlé důsledky, které se odrazí na zdraví organismu
- Obzvláště nutné pro intenzívné proliferující tkáně (krev, střevo...)

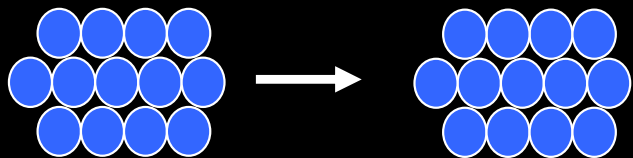
proliferace



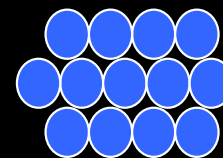
apoptóza



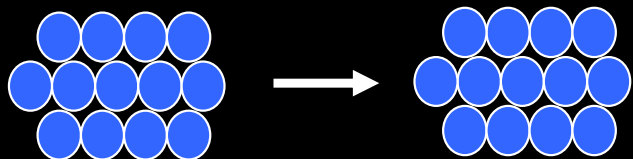
**Rakovina
AIO**



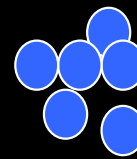
apoptóza



homeostáza



apoptóza



**AIDS
neurodegenerativní
onemocnění**

Apoptóza a nemoci – zvýšená vs. snížená apoptóza

- AIDS
- Neurodegenerativní onemocnění (Alzheimer, Parkinson)
- Myelodysplastický syndrom
- Ischemické poškození (infarkt, reperfuze)
- Intoxikace jater
- Rakovina
- Autoimunitní onemocnění
- Virové infekce (Herpes, Adenovirus)

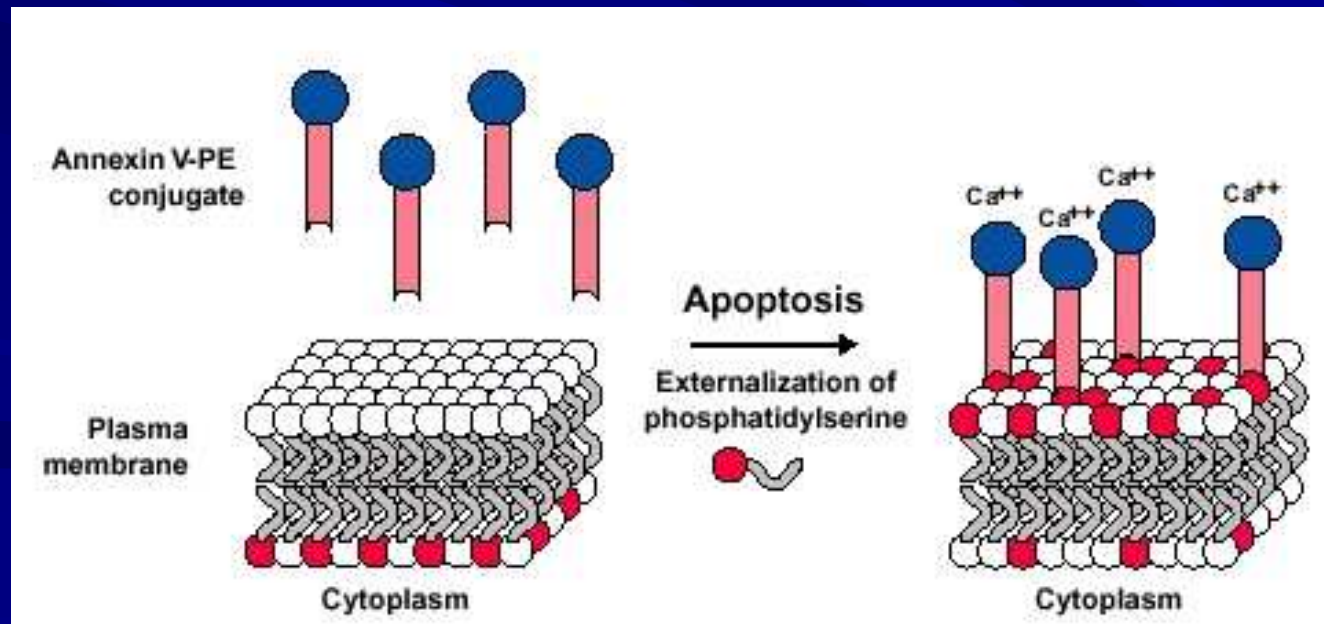
Obecné rysy apoptózy

- **Změny na úrovni membrán**
- **Změny na úrovni jádra**
- **Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy**

Změny na úrovni membrán

■ Plazmatická membrána

- Zachována integrita plazmatické membrány
- Významné změny v symetrii membrány
 - Translokace fosfatidylserinu z vnitřní strany membrány na stranu vnější – signál pro fagocyty, které mají na povrchu specifické receptory pro PS



Změny na úrovni membrán

■ Mitochondriální membrána

- změny propustnosti vnější membrány mitochondrií, tvorba pórů v této membráně
- významné změny mitochondriálního membránového potenciálu
- umožnění vylití některých důležitých mediátorů apoptózy z mitochondrií do cytoplazmy

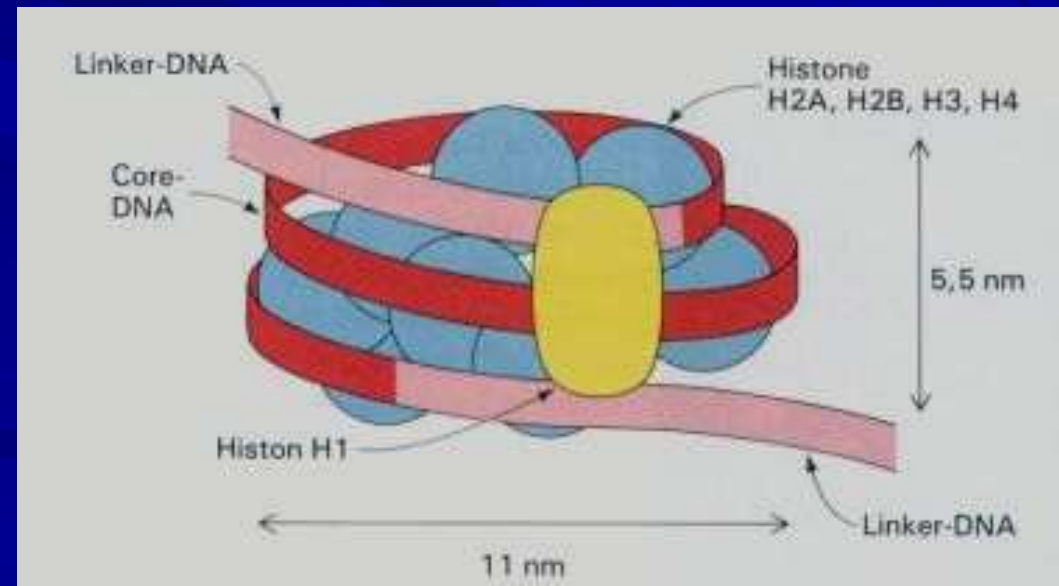
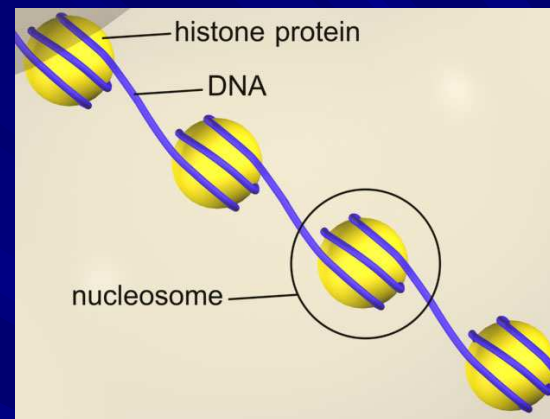
Změny na úrovni jádra

- **Kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu, shlukování jaderné hmoty v okolí jaderné membrány, charakteristická jaderná morfologie**



Změny na úrovni jádra

- **Specifická řízená degradace DNA – internukleozomální štěpení DNA - vznik charakteristických fragmentů DNA o délce 180 bp – účast specifických endonukleáz (Ca- a Mg- dependentních)**



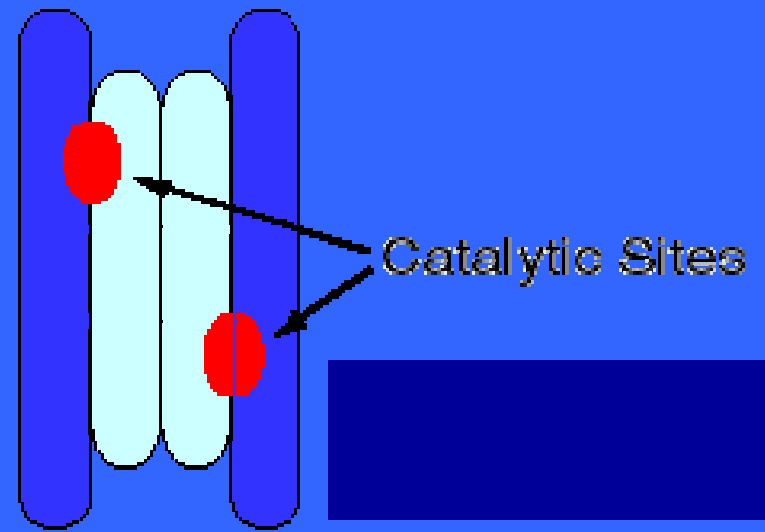
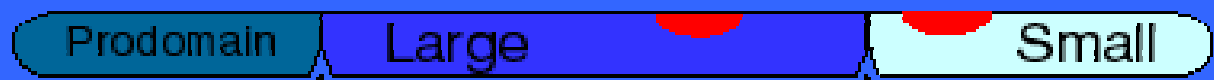
Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy

- Kaspázy
- Inhibitory kaspáz
- Nekaspázové proteázy
- Proteiny rodiny Bcl-2
- Mediátory apoptózy uvolňované z mitochondrií

Kaspázy

- Cysteinové proteázy, specificky štěpí proteinové substráty v místě kyseliny asparagové
- Klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu
- v inaktivní formě (proenzymy, pro-kaspázy) v cytoplazme, štěpení – aktivní kaspáza schopná dále štěpit tzv. „death substráty“ a významně se tak podílet na šíření apoptotického signálu a exekuci apoptózy
- struktura:
 - Prodoména
 - Katalytické podjednotky – velká a malá (heterotetramer)

Inactive Proenzyme



Active Caspase

Dělení kaspáz:

Iniciační kaspázy (dlouhá prodoména) - kaspázy-8, -9

Efektorové kaspázy (krátká prodoména) – kaspáza-3, -6, -7

Kaspázy účastníci se zánětu

Aktivace kaspáz:

iniciační kaspázy:

na úrovni specifických signálních komplexů, zde ukotveny pomocí dlouhé prodomény

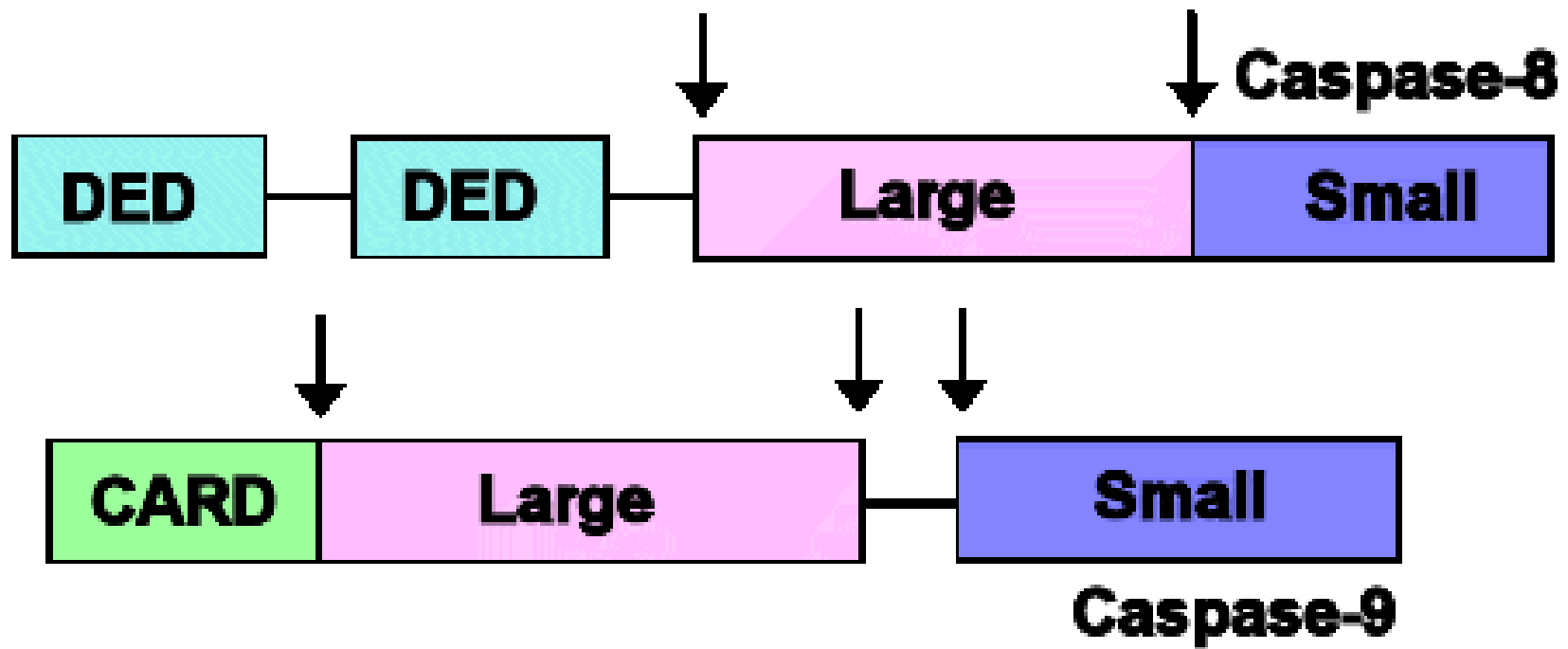
DISC – „death-inducing signaling complex“ – kaspáza-8

apoptozom – kaspáza-9

efektorové kaspázy:

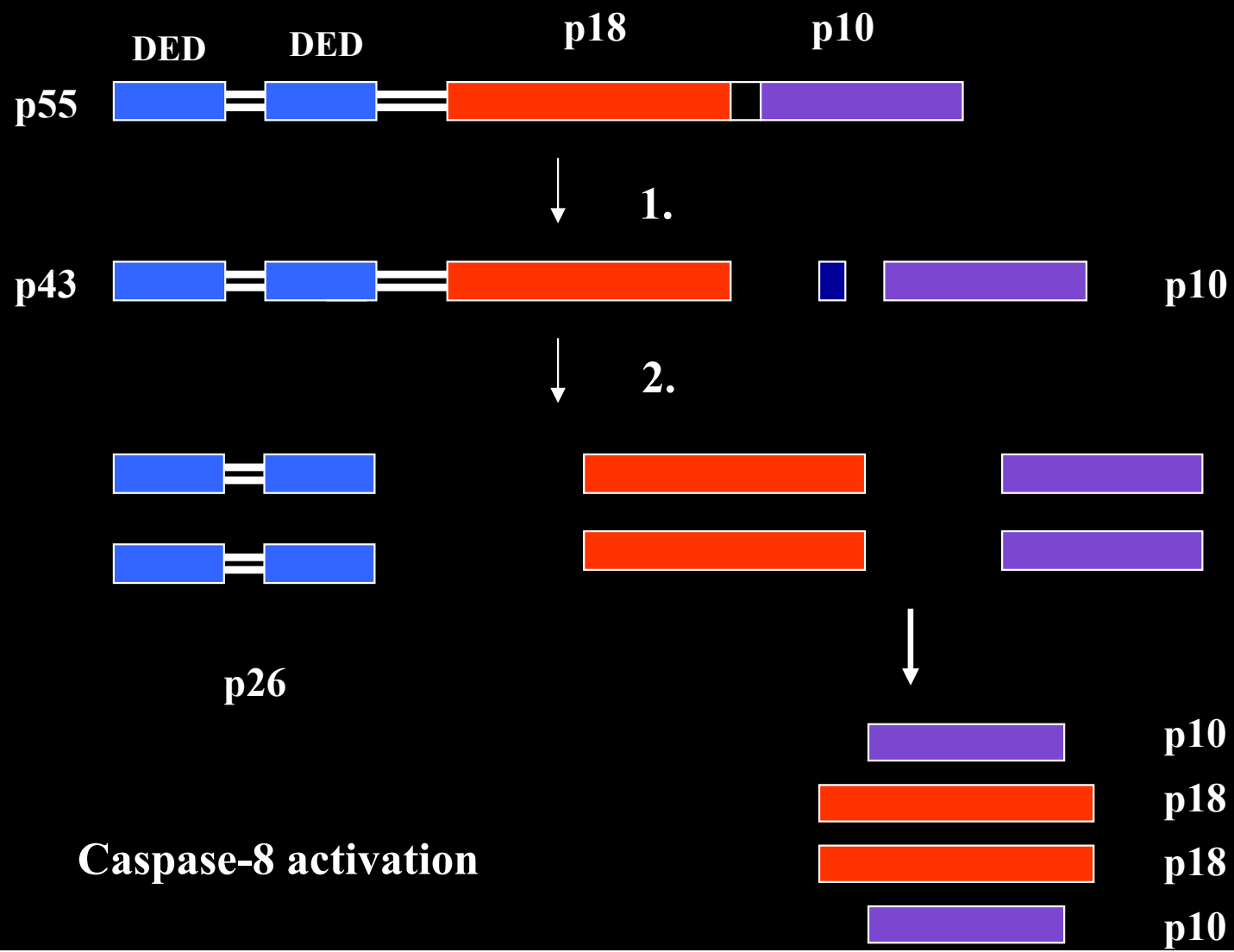
není nutná účast specifických komplexů, proteolytické štěpení pomocí iniciačních kaspáz

Iniciační kaspázy



Kaspáza-8

- iniciační kaspáza aktivovaná na úrovni signálního komplexu DISC
- aktivace tzv. „vnější dráhy indukce apoptózy“
- v DISCu se prokaspáza-8 (55/57) štěpí na kaspázu-8, vznikají fragmenty o velikosti 41/43 a 18 kDa (dvojkrokový mechanismus aktivace)
- FLIP – inhibitor kaspázy-8, brání její aktivaci, neboť se sám váže do DISCu
- aktivní kaspáza může dále aktivovat dvě základní dráhy (přímá aktivace kaspázy-3, dráha závislá na mitochondriích – protein Bid)



Kaspáza-9

- **iniciační kaspáza aktivovaná na úrovni signálního komplexu zvaného apoptozom**
- **Složení apoptozomu – cytochrom c, Apaf-1, prokaspáza-9, ATP**
- **aktivace tzv. „vnitřní dráhy indukce apoptózy“**
- **prokaspáza-9 se štěpí na kaspázu-9, vznikají fragmenty o velikosti 35 a 17 kDa**

Efektorové kaspázy

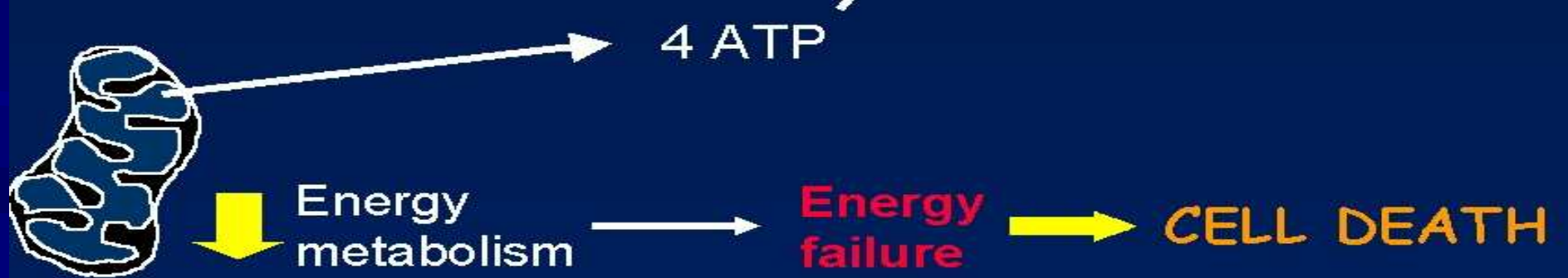
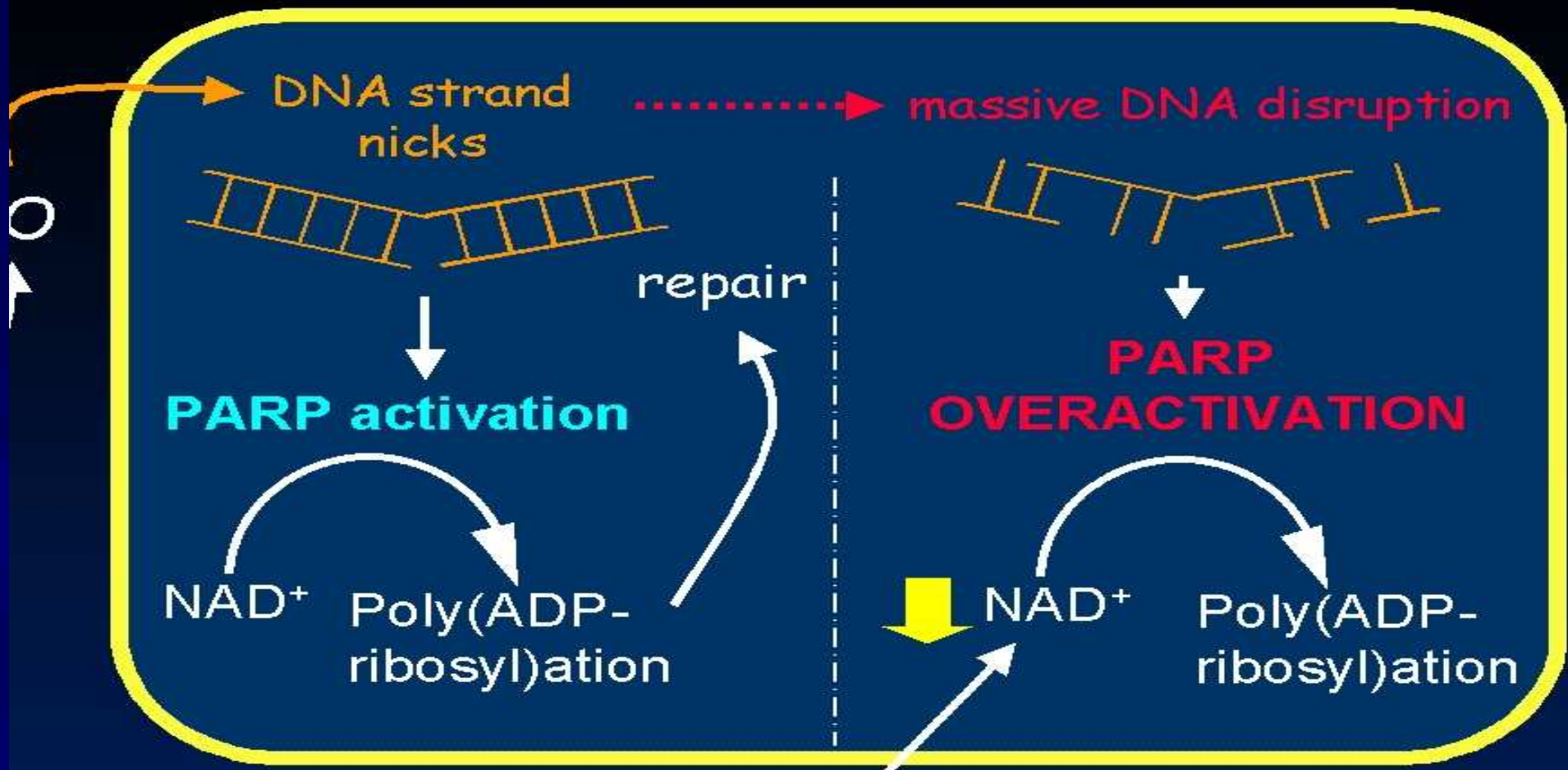
- Podílí se na exekuční fázi apoptózy
- Specificky štěpí celou řadu důležitých substrátů v buňce
- Kaspáza-3, -6, -7

Substráty kaspáz

- **Strukturální proteiny** – laminy (jádro), aktin, fodrin (cytoskelet), keratin 18 (intermediární filamenta)
- **Signální a regulační proteiny** – cPLA2, PKC, některé proteiny rodiny Bcl-2, MEKK-1
- **Transkripční faktory** – MDM2, RB
- **Proteiny v regulaci metabolismu DNA/RNA** – PARP, CAD inhibitor (inaktivace DNázy závislá na kaspázách)

Poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP)

- **Jaderný protein (113 kDa), opravy DNA**
- **Během apoptózy specificky štěpený na fragmenty 89 a 24 kDa citlivý marker pro detekci apoptózy**
- **Inaktivace PARP blokuje opravu DNA, posílení fragmentace DNA**



Inhibitory kaspáz

- **FLIP** - má sekvenci podobnou kaspáze-8, ale bez katalytického místa, kompetitivně inhibuje vazbu kaspázy-8 v DISCu
- **IAPs** – „inhibitor of apoptosis proteins“ - cIAP1, cIAP2, XIAP, survivin – váží se na prokaspázy a kaspázy (prostřednictvím domény BIR) a blokují jejich aktivitu, mohou inhibovat jak iniciační, tak efektorové kaspázy – různé mechanismy

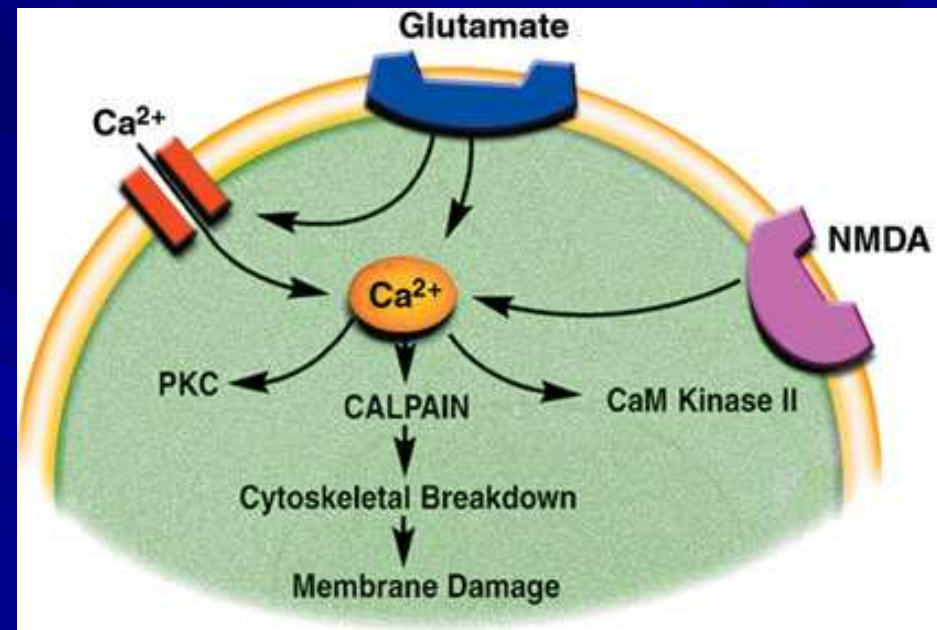
Nekaspázové proteázy

- **Calpainy (I, II, calpastatin)**
- **Cathepsiny (B, D, L)**
- **Granzymy (A, B)**

- **Mohou buď spolupracovat s kaspázami, nebo spouštět buněčnou smrt nezávisle na nich**

Calpains

- Cytosolové cysteinové proteázy
- Aktivace závislá na vápníku (μM , mM), mají vazebné domény pro Ca^{2+} , autolyze a autoaktivace
- μ -calpain (calpain I), m-calpain (calpain II), calpastatin (inhibitor calpainů)



Cathepsiny

- **Lysosomální proteázy**
- **Aktivovány v kyselém pH (lysosom) – autoproteolýza, nebo jinými proteázami**
- **Nejznámější – cathepsin B, D**
- **Během apoptózy translokovány z lysosomů do cytoplazmy – exekuce apoptózy**

Granzymy

- Serinové proteázy T-buněk a NK-buněk
- Spolu s perforinem se podílejí na indukci buněčné smrti (perforin vytvoří póry v buňce, umožní průnik granzymu B)
- Granzym B se může účastnit aktivace kaspáz nebo DNáz

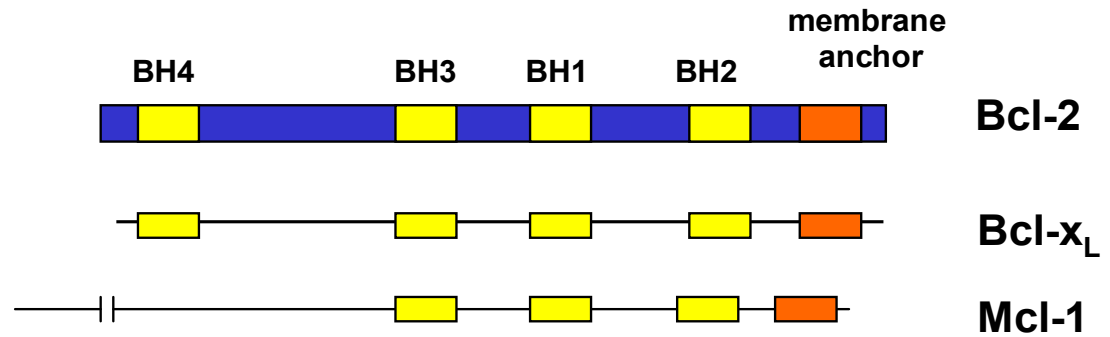
Proteiny rodiny Bcl-2

- **Důležité regulátory apoptózy na úrovni mitochondrií**
- **Rodina asi 30 proteinů, pro něž je charakteristická přítomnost tzv. domény BH (Bcl-2 homology), které zprostředkovávají interakce s jejich vazebnými partnery**
- **Patří sem proteiny jak s proapoptotickou, tak antiapoptotickou funkcí, na jejich rovnováze pak závisí osud buňky**

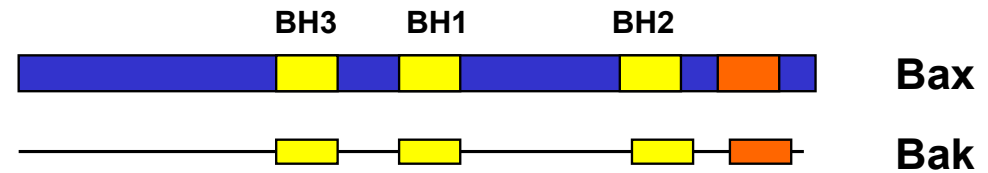
Proteiny rodiny Bcl-2

Regulace
mitochondriální
dráhy indukce
apoptózy

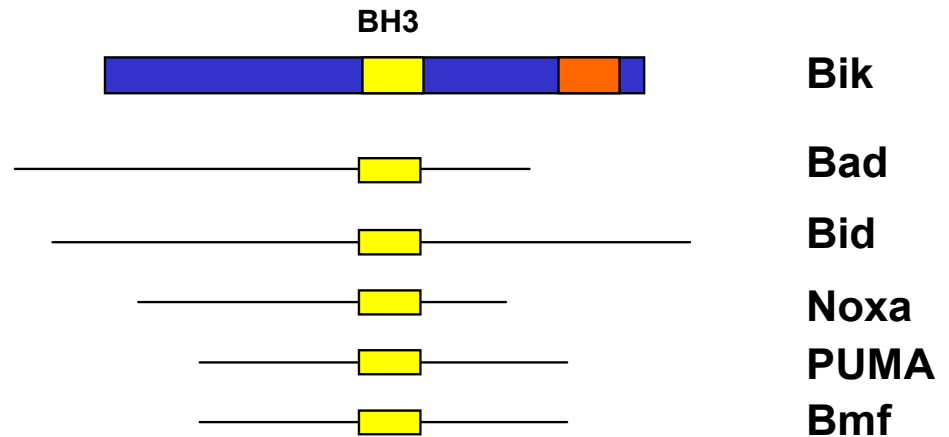
Bcl-2-like survival factors



Bax-like death factors



BH3-only death factors



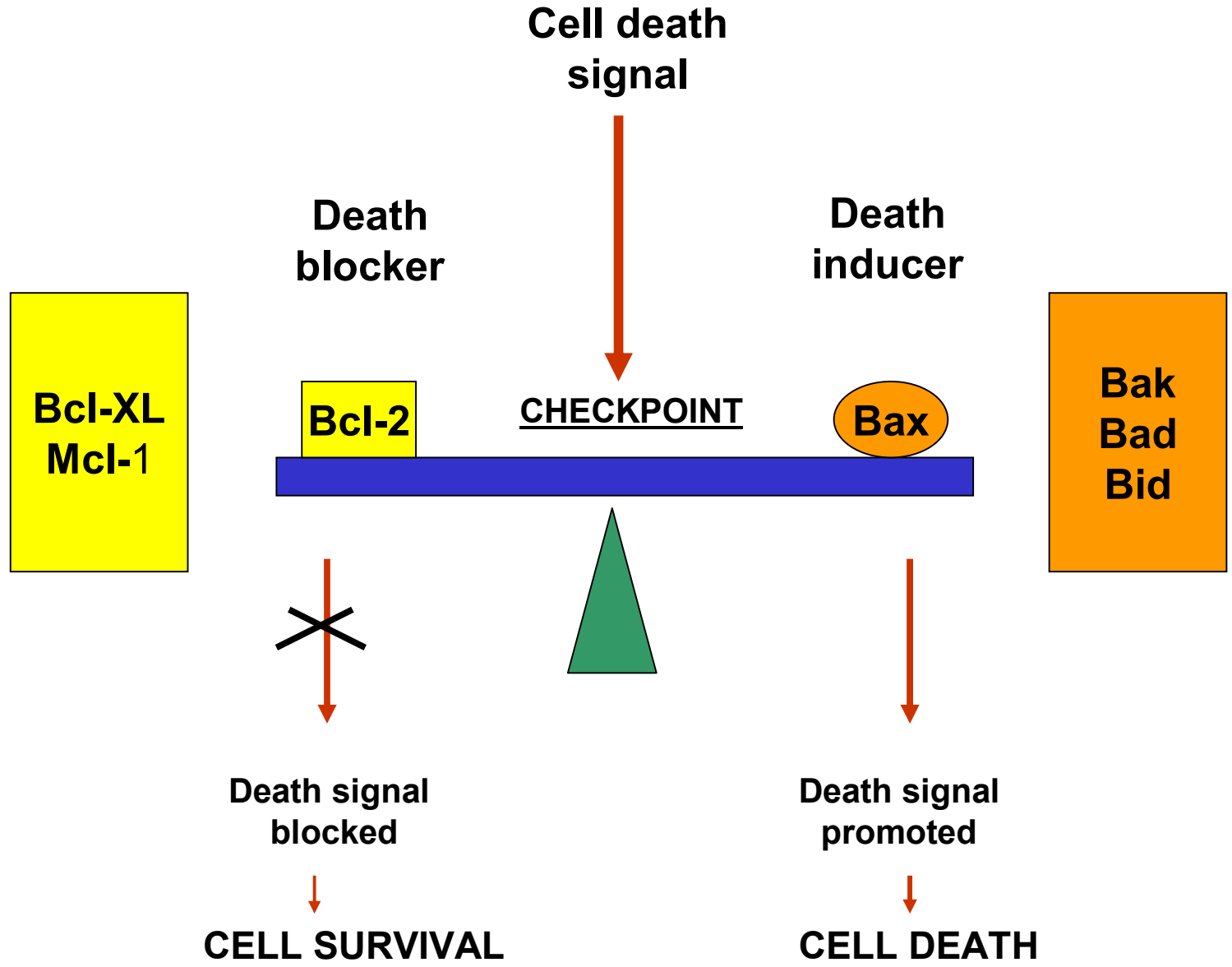
- V nepřítomnosti apoptotického signálu jsou proteiny Bcl-2 rodiny lokalizovány v různých subcelulárních kompartmentech

- antiapoptické proteiny – integrální membránové proteiny – mitochondrie, endoplazmatické retikulum, jádro

- proapoptické proteiny – cytosol, cytoskelet

- apoptický stimulus má za následek jejich konformační změny a translokace, především do mitochondrií – na úrovni mitochondriální membrány pak dochází ke vzájemným interakcím pro- a antiapoptických proteinů této rodiny

- velký význam v regulaci propustnosti membrány, membránového potenciálu a vylití specifických mediátorů apoptózy z mitochondrií do cytosolu



Bcl-2

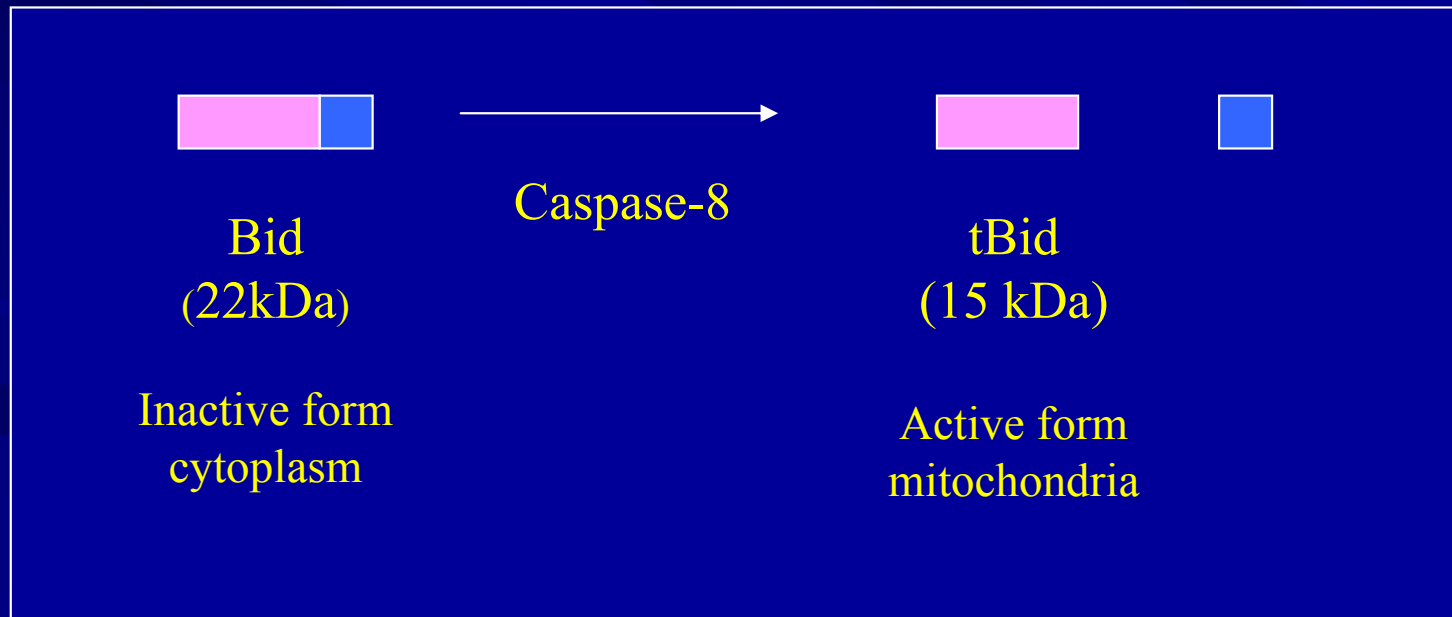
- B-cell lymphoma 2 protein
- Bcl-2 byl první popsáný člen této rodiny (po něm pojmenována) a zároveň první popsáný savčí regulátor apoptózy
- Antiapoptotický protein
- Obrovská úloha v rezistenci nádorových buněk k některým typům chemoterapeutik

Mcl-1

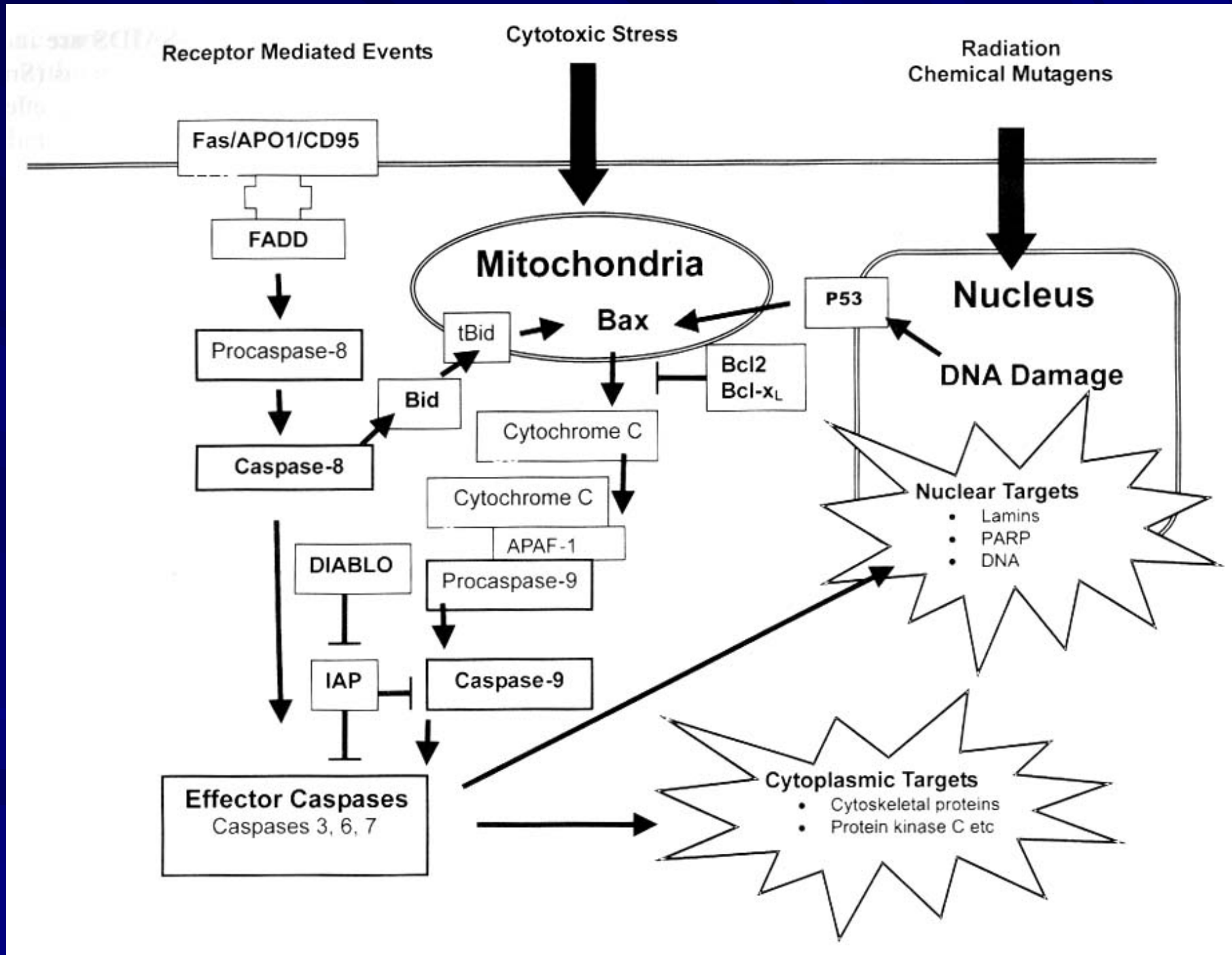
- Myeloid cell leukemia 1 protein
- Antiapoptotický protein z Bcl-2 rodiny
- Úloha v regulaci diferenciaci a apoptózy
- Krátký poločas rozpadu, „short-term viability protection“, po vstupu do apoptózy jeho hladina v buňce prudce klesá, což může ovlivnit spuštění mitochondriální dráhy indukce apoptózy – translokaci Bax, uvolnění cytochromu c, Smac/DIABLO, aktivaci kaspáz...

Bid

- proapoptotický protein
- obrovský význam v integraci signálů dvou základních drah indukce apoptózy – „vnější a vnitřní“
- spojení receptorové dráhy indukce apoptózy a mitochondrií, regulace vylití cytochromu c z těchto organel a následné aktivace mitochondriální dráhy



Initiation and regulation of apoptosis



MITOCHONDRIE

centra buněčného dýchání, energetická centra buňky

složení:

vnější membrána – semipermeabilní (5 kDa) ,
kanálky (porin)

vnitřní membrána – nepropustná, pouze selektivní
transport, bohatě členěná (kristy – zvětšení povrchu –
syntéza ATP), zde ukotveny proteiny – součásti elektron-
transportního řetězce, transport elektronů a syntéza ATP

intermembránový prostor (enzymy,
proapoptické proteiny)

matrix – vysoce koncentrovaná směs enzymů,
DNA, ribozomy, citrátový cyklus

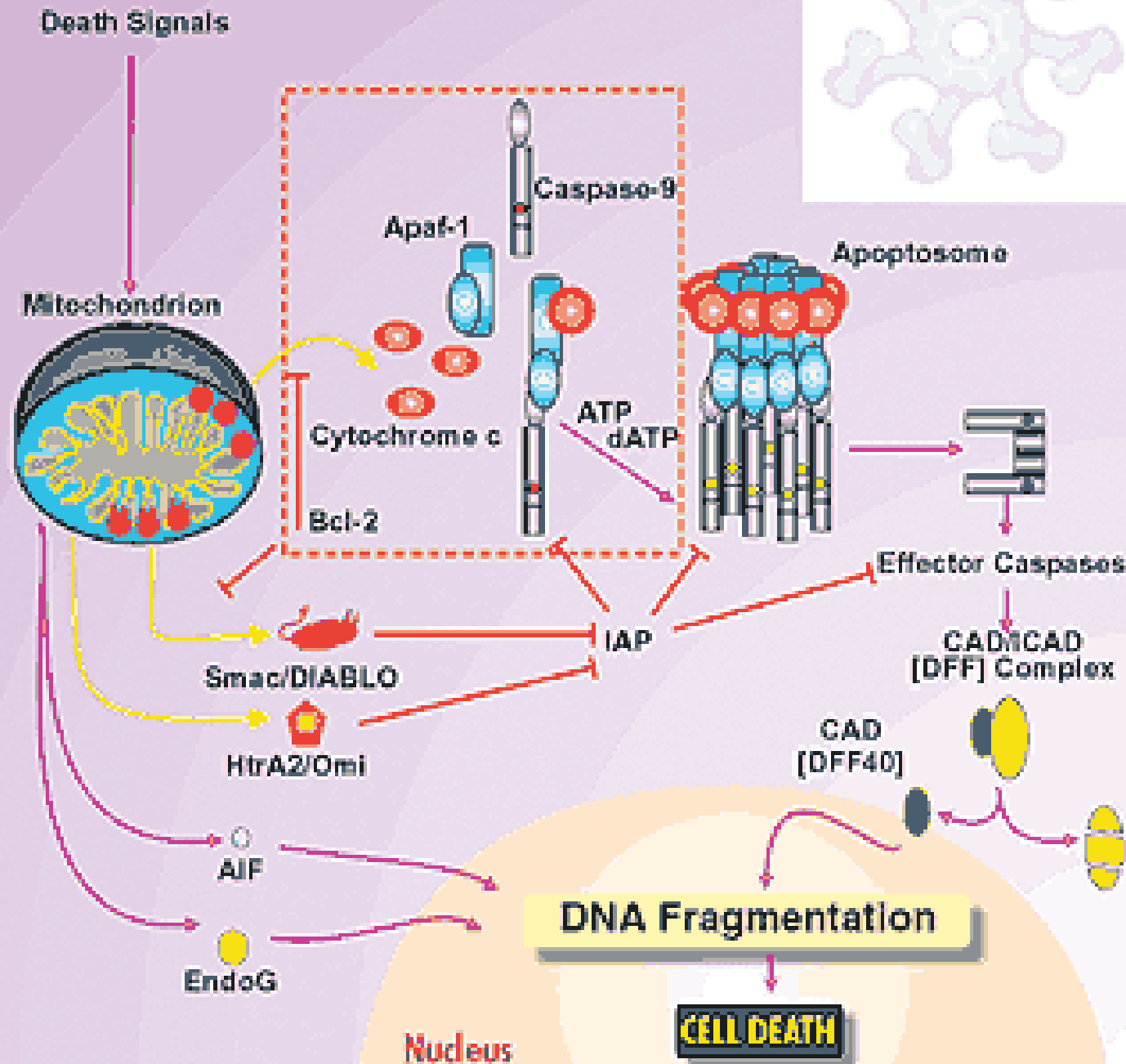
Úloha mitochondrií v apoptóze

- **Změny v transportu elektronů**
- **Změny energetického metabolismu buňky**
- **Změny v produkci ROS**
- **Změny mitochondriálního membránového potenciálu**
- **Účast proteinů rodiny Bcl-2 (Bid, Bak, Bax...)**
- **Uvolnění proapoptických proteinů**

Mediátory apoptózy uvolňované z mitochondrií

- **Cytochrom c** – aktivace kaspázy-9 na úrovni apoptozomu
- **Smac/DIABLO** – inhibuje IAPs – přispívá tak k aktivaci kaspáz
- **endoG** –mitochondriální nukleáza, translokuje se do jádra, kde štěpí DNA
- **Omi/Htra** – serinová proteáza, antagonistka některých IAPs
- **AIF** – translokován do jádra, iniciace řady procesů apoptózy včetně např. kondenzace chromatinu

Cell Death Sensitization



Apoptóza zprostředkovaná přes povrchové receptory

- Tzv. „death receptory“ – receptory smrti, přes ně dochází ke spuštění apoptózy indukované tzv. ligandy smrti
- Patří do rodiny TNF (tumor necrosis factor)
- Obsahují tzv. „death doménu“, která umožní pokračování přenosu apoptotického signálu (vazba s dalšími členy signální dráhy)

Významné ligandy a receptory rodiny TNF

- **CD95L (FasL) – CD95, Fas**
- **TNF-alfa – TNF-R1**
- **TRAIL – DR4, DR5, DcR1, DcR2,
OPG**

TNF- α , FasL, TRAIL

- členové rodiny TNF
- úloha v imunitních a zánětlivých reakcích organismu, v regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy
 - podobnost apoptotických signálních drah (oligomerizace receptoru, adapterový protein, death doména, iniciační kaspáza)
 - vazba na tzv „death receptory“ (TNFR1, Fas -CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2)

TNF- α , FasL, TRAIL

- cytotoxické a antiproliferační působení na řadu buněčných linií
- využití v protinádorové terapii jako důležitá alternativa ke konvenčním léčebným postupům využívajícím chemoterapii a ionizující záření
- omezení: - vedlejší účinky, rezistence

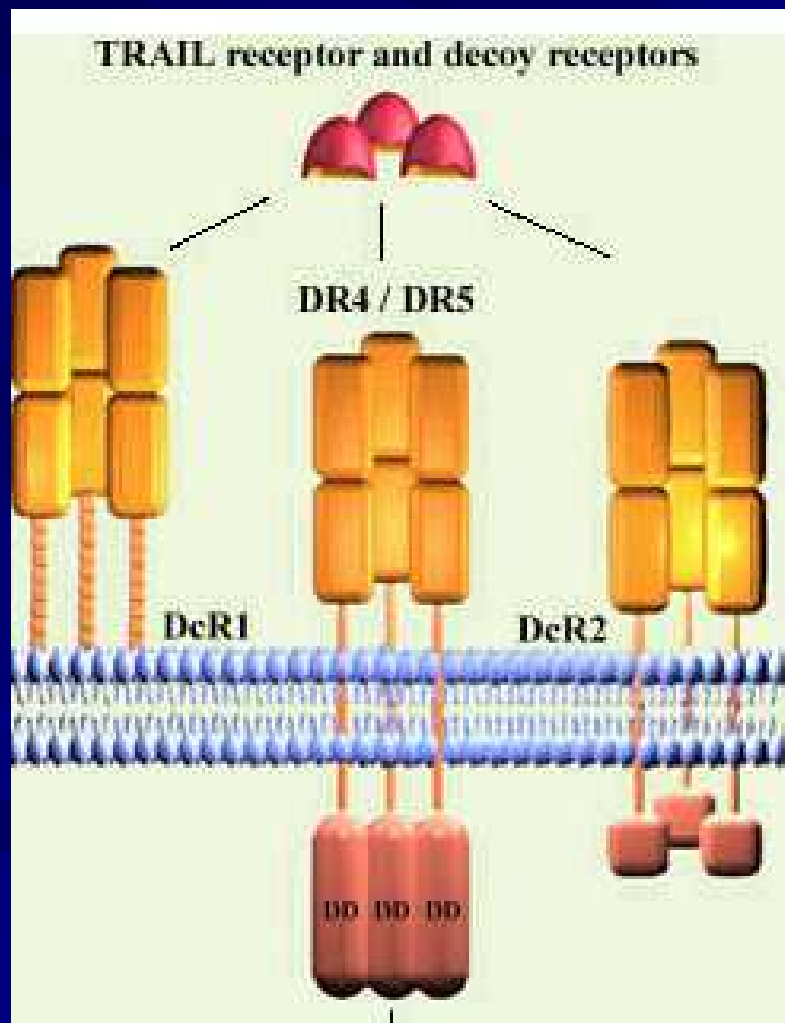
Systemová aplikace - TNF- α , anti-Fas, TRAIL

- TNF- α , anti-Fas – silná zánětlivá odpověď, poškození jaterních buněk
- TRAIL – výhoda, selektivní toxicita, většina normálních buněk rezistentní k jeho účinkům, otázka – hepatocyty
 - in vivo – intravenózní infuze, vysoké dávky – myši, primáti (šimpanzi) – bez toxických vedlejších efektů, co člověk?

TRAIL

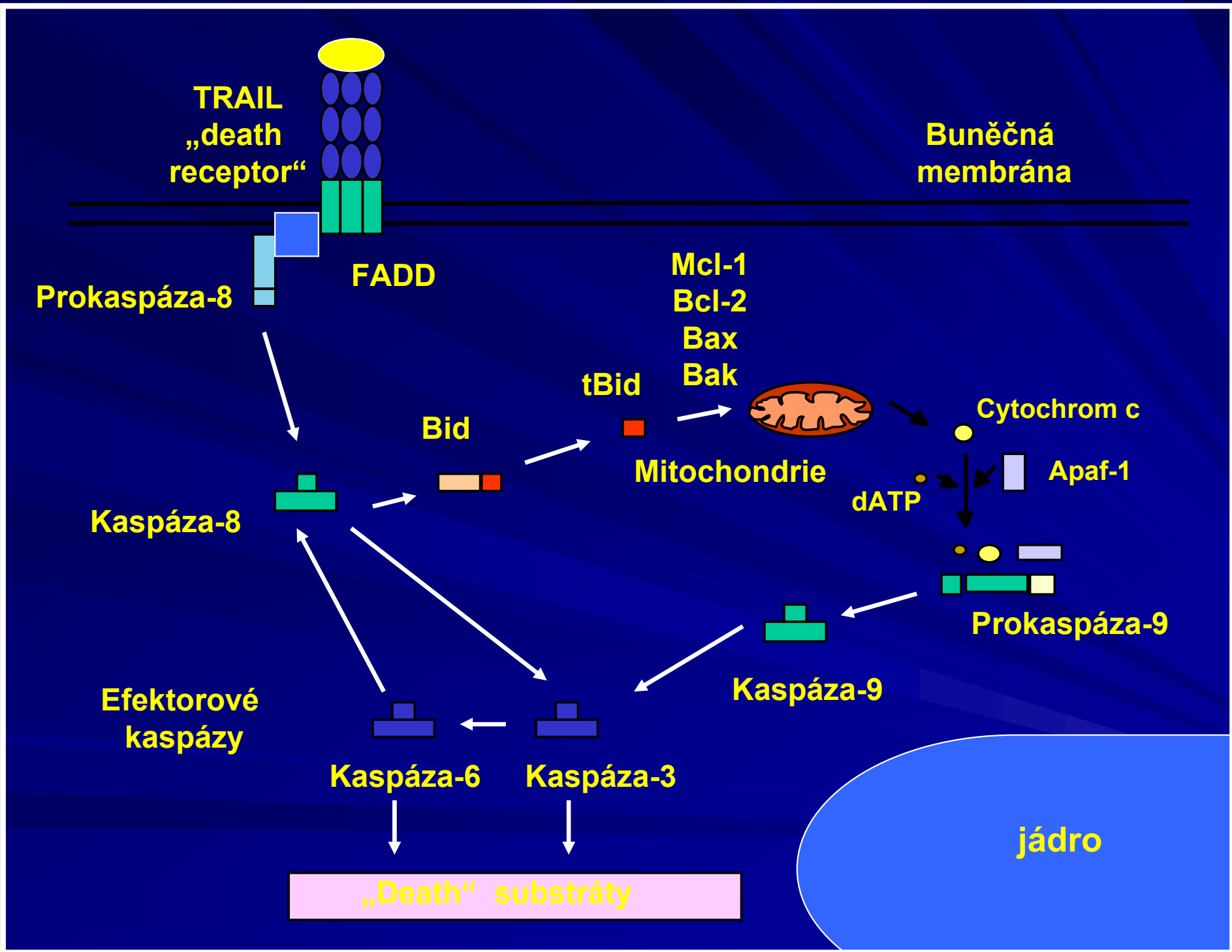
- selektivní indukce apoptózy u celé řady nádorových buněk, ne však u většiny normálních

(na rozdíl od TNF, Fas)



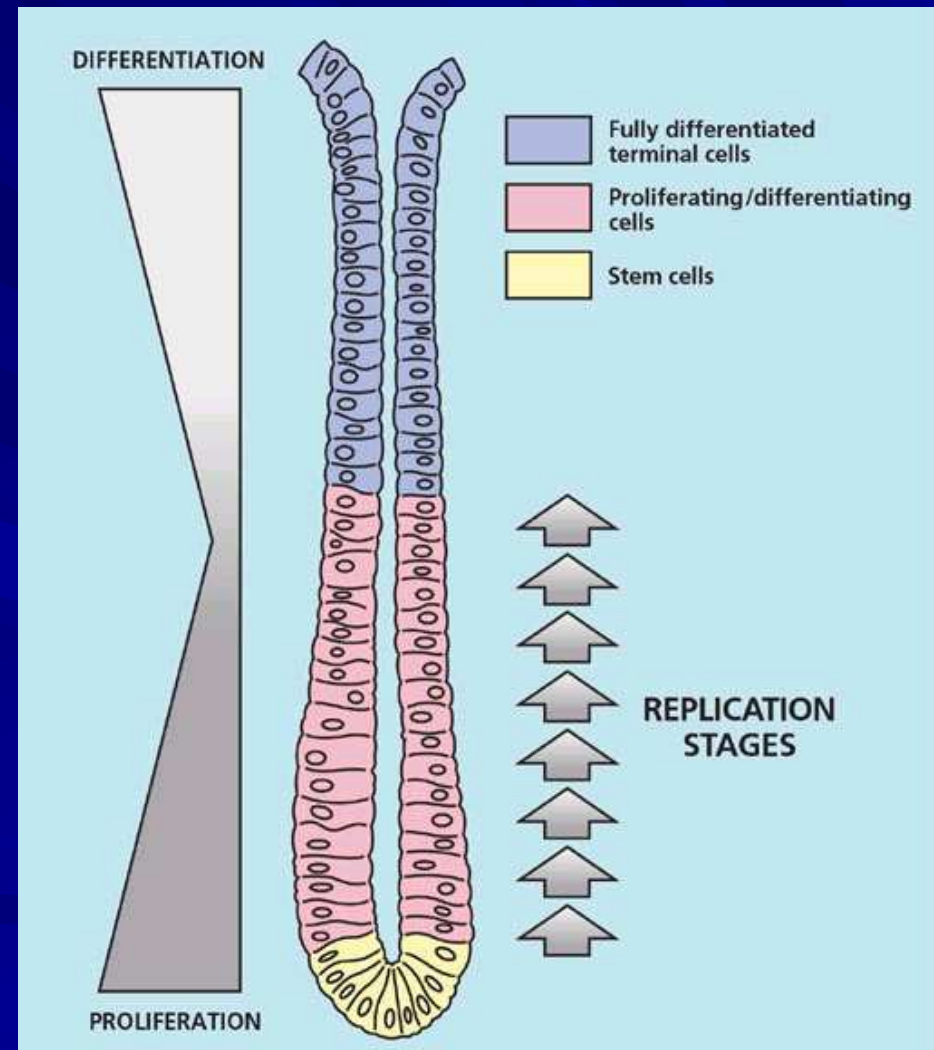
- možnost interakce s pěti různými receptory

TRAIL-R1 (DR-4, APO-2)
TRAIL-R2 (DR-5, TRICK, Killer)
TRAIL-R3 (DcR1)
TRAIL-R4 (DcR2, TRUND)
TRAIL-R5 (osteoprotegerin)



Modelový systém pro studium apoptózy – *in vivo*

- Epitel střeva, střevní krypta



Modelový systém pro studium apoptózy – *in vitro*

- Buněčná kultura na Petriho misce – adherentní epitheliální buňky kolonu
- Postupné uvolňování původně přisedlých buněk do média, apoptóza, apoptotická tělíška
- v umělé *in vitro* kultuře nejsou přítomny fagocyty, aby je pohltily, může proto docházet k tzv. sekundární nekróze

VÝZKUM APOPTÓZY

Výzkum zabývající se problematikou apoptózy je velmi aktuální a rozvíjející se oblastí vědy.

Má možnosti široké aplikace jak v základním výzkumu, tak v klinické praxi.

Regulace průběhu buněčné smrti patří mezi klíčové funkce nutné pro udržení normálních funkcí organismu.

V případě jejího porušení může docházet k nekontrolovatelnému úbytku buněk nebo naopak k jejich akumulaci v organismu (např. při nádorovém onemocnění).

Důkladné pochopení mechanismů apoptózy je proto nutným předpokladem pro úspěšnou terapii řady onemocnění.

Apoptóza vs. léčba rakoviny

- Možnost spustit apoptózu nádorové buňky je základní podmínkou úspěšné protinádorové terapie
- Řada nádorových buněk je však vůči apoptóze rezistentní
- Je nutné objasnit mechanismy rezistence a překonat ji (nová léčiva, spuštění alternativních mechanismů, kombinovaná terapie, genová terapie...)

Tumor Diagnosis → **Biopsy**



Apoptotic Responsiveness
(gene expression of p53, bcl-2, bax, etc.;
sensitivity to apoptotic stimuli;
basal level of apoptosis; etc.)



**Sensitive to
Apoptotic Stimuli**

Resistant to Apoptotic Stimuli

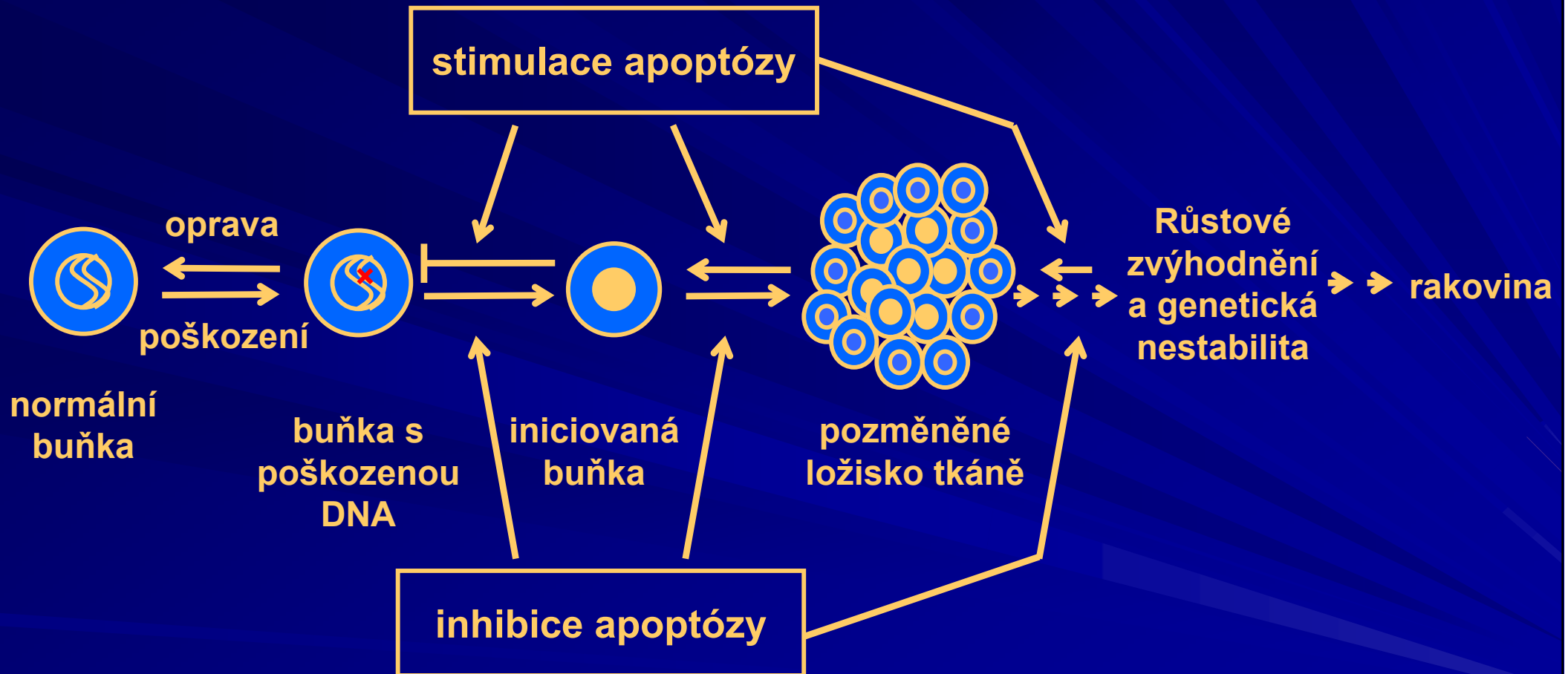


Standard Treatment
(surgery, chemo, radio,
immuno-therapy, etc.)

**Gene Therapy to
Restore sensitivity**
(e.g. p53, bax, etc.)



Vliv narušení (stimulace/inhibice) průběhu apoptózy v rámci procesu vícestupňové karcinogeneze



Děkuji Vám



za pozornost!