



APOPTÓZA

Karel Souček, Ph.D.

Alena Vaculová, Ph.D.

Oddělení cytokinetiky

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.



Apoptóza

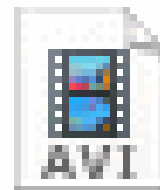
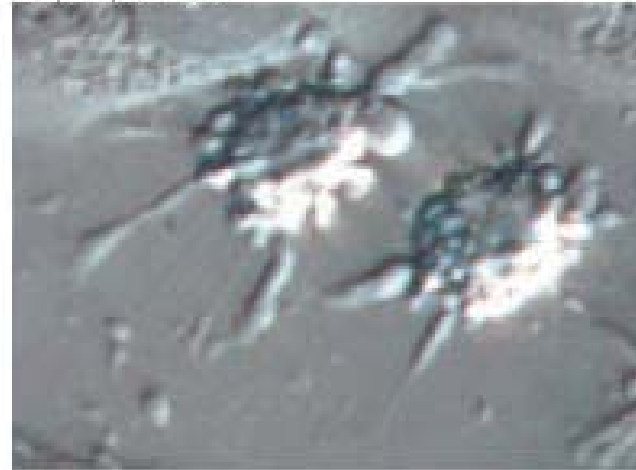
- **programovaná buněčná smrt**
- **termín poprvé použil australský patolog J. F. Kerr v roce 1972, aby odlišil jinou formu buněčné smrti než je nekróza**
- **název odvozen z řečtiny, znamená „padání listí“**
- **od 70. let intenzivní výzkum apoptózy a její regulace**
- **geneticky kontrolovaný komplexní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

Apoptóza

Viable



Apoptotic

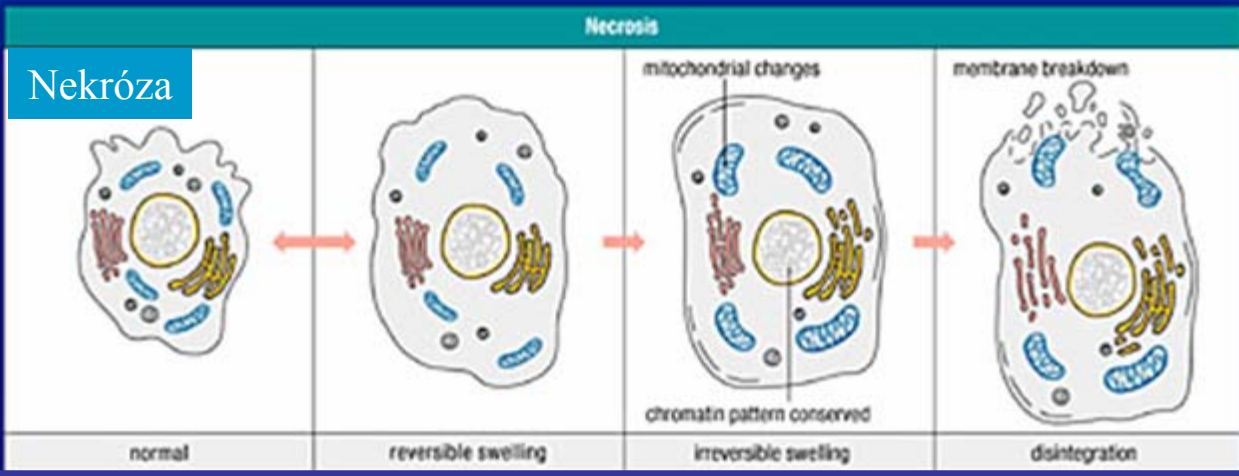


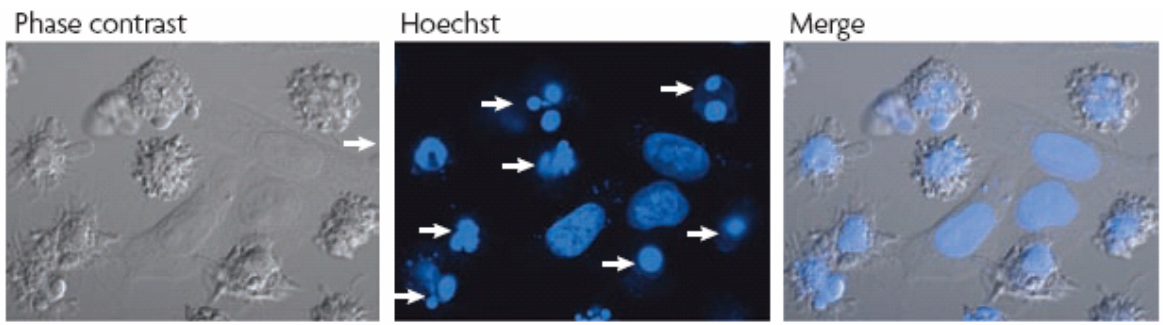


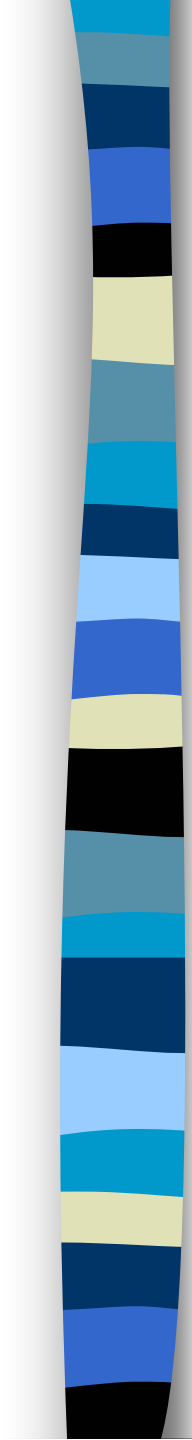
Morfologie – nekróza vs. apoptóza

- 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

Two Different Types of Cell Death







Biochemie – nekróza vs. apoptóza

- **Bez účasti specifických molekul**
- **Pasívní 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**

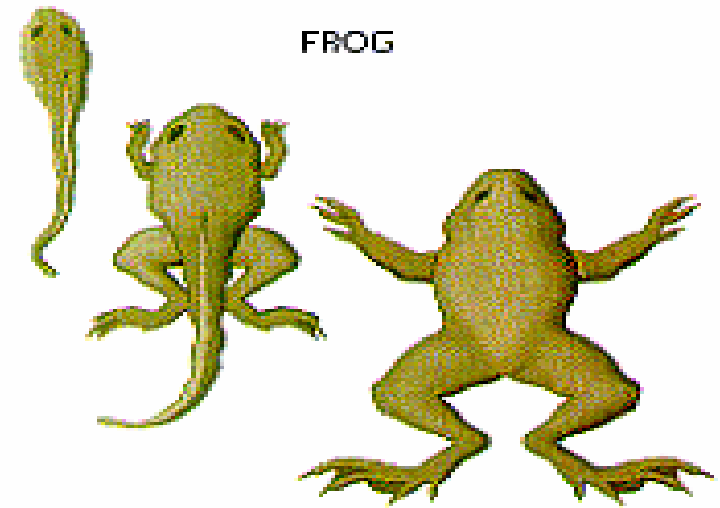
Přesně řízený vývoj – organismus z 1090 buněk, z nich během vývoje 131 buněk umírá apoptózou – nutno přesné načasování a lokalizace, jinak vážné malformace

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



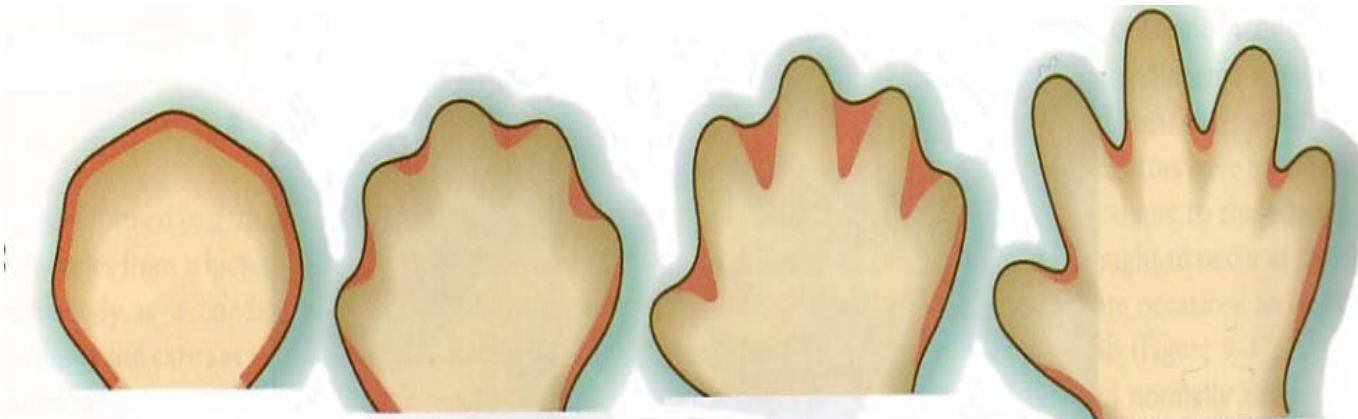
Apoptóza ve vývoji mnohobuněčného organismu

- **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**

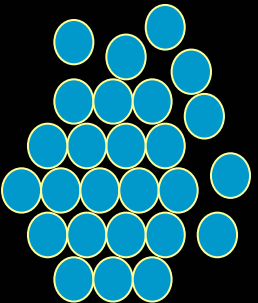
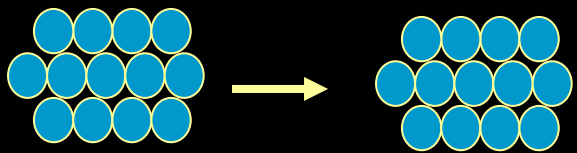


Apoptóza versus proliferace

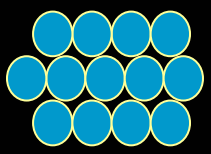
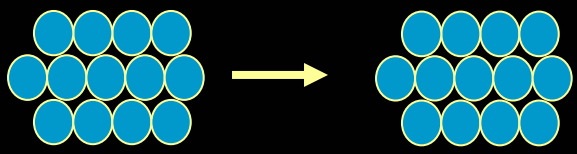
- **Pro udržení homeostázy organismu je nutná dokonalá rovnováha mezi procesy proliferace a apoptózy**
- **Porušení této rovnováhy má dalekosáhlé důsledky, které se odrazí na zdraví organismu**
- **Obzvláště nutné pro intenzívně proliferující tkáně (krev, střevo...)**

proliferace

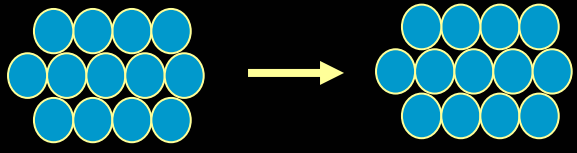
apoptóza



**Rakovina
AIO**



homeostáza



**AIDS
neurodegenerativní
onemocnění**



Apoptóza a nemoci – zvýšená vs. snížená apoptóza

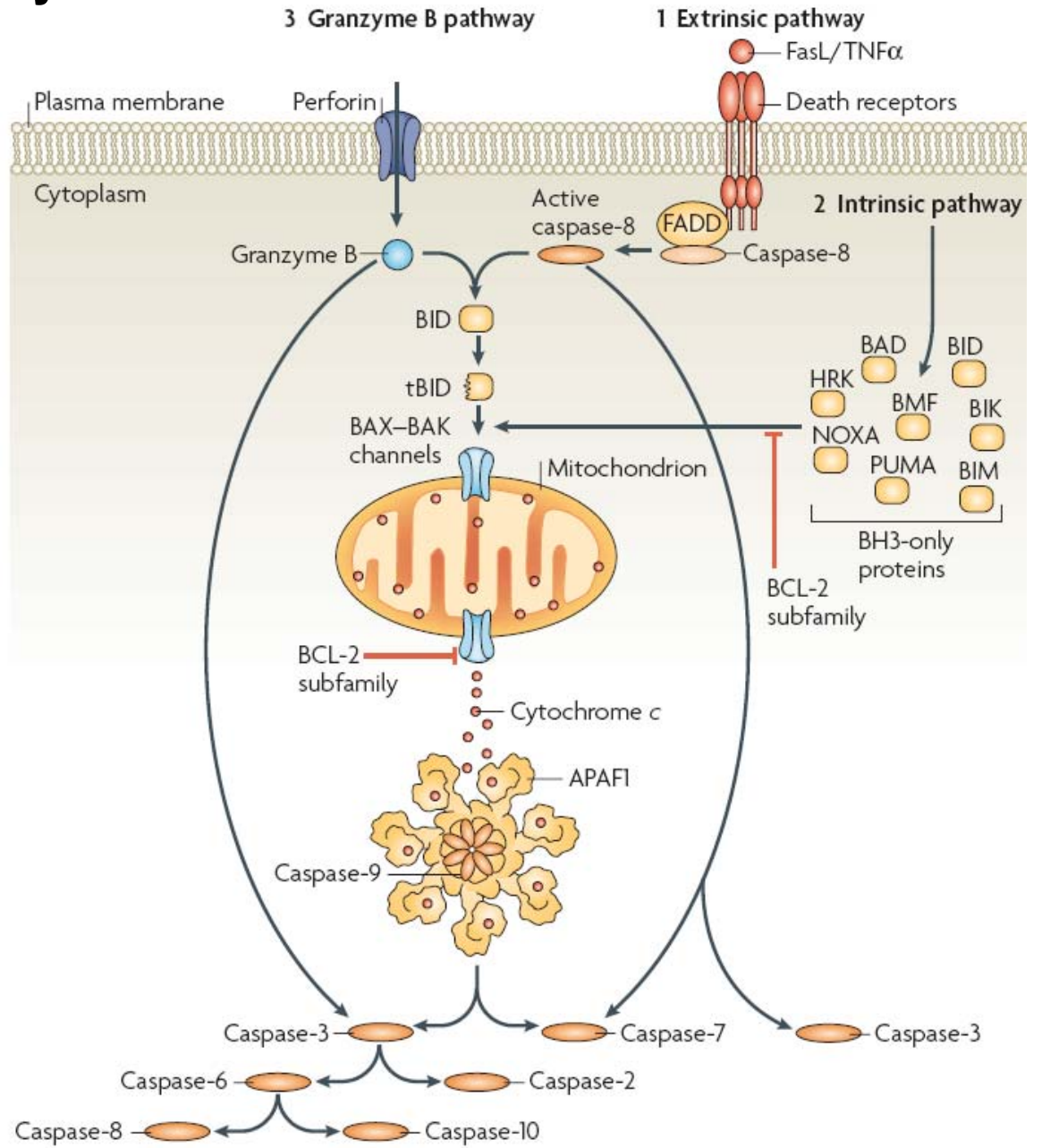
- **AIDS**
- **Neurodegenerativní onemocnění (Alzheimer, Parkinson)**
- **Myelodysplastický syndrom**
- **Ischemické poškození (infarkt, reperfuze)**
- **Intoxikace jater**
- **Rakovina**
- **Autoimunitní onemocnění**
- **Virové infekce (Herpes, Adenovirus)**



Obecné znaky apoptózy

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

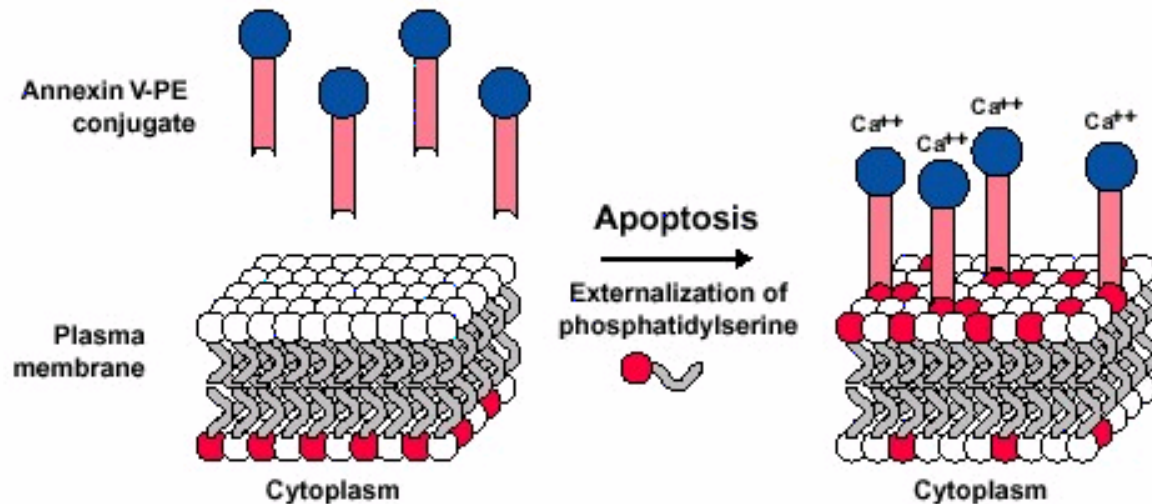
Regulace apoptózy



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





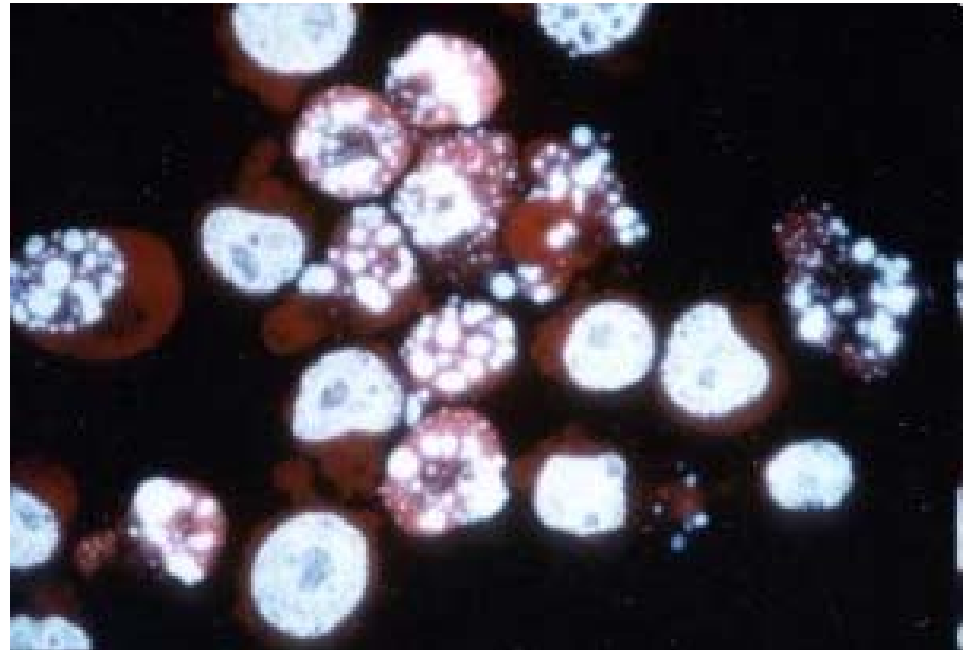
Změny na úrovni membrán

■ 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

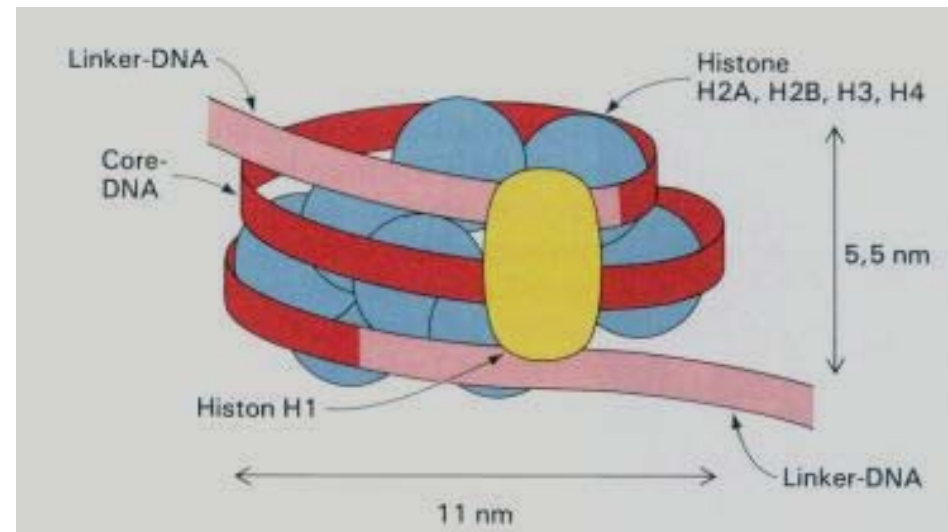
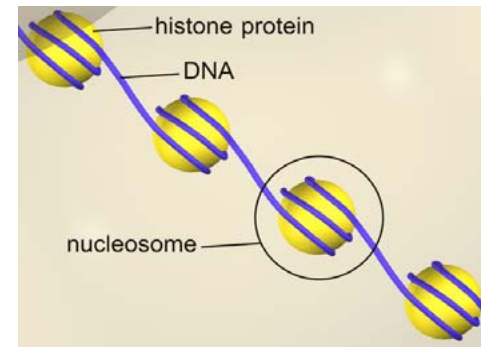
Změny na úrovni jádra

- **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)**





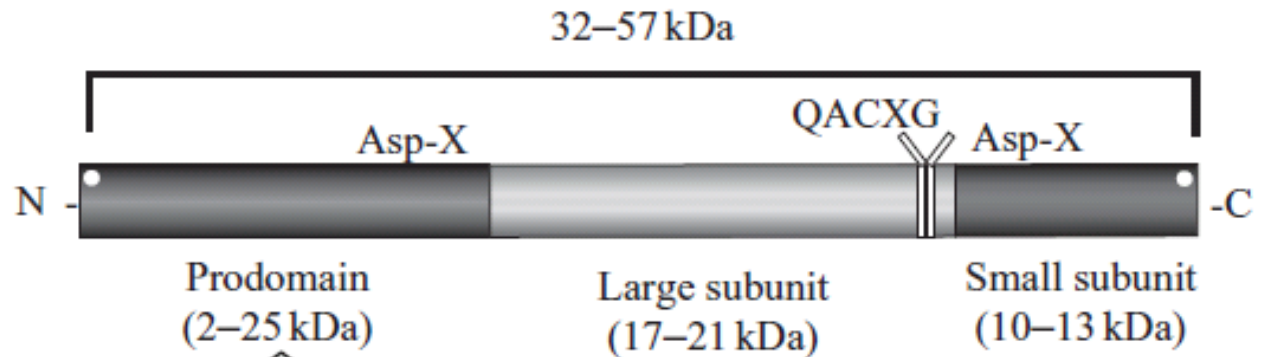
Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy

- **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)



Initiator caspases

Caspase-2 Caspase-8
 Caspase-9 Caspase-10

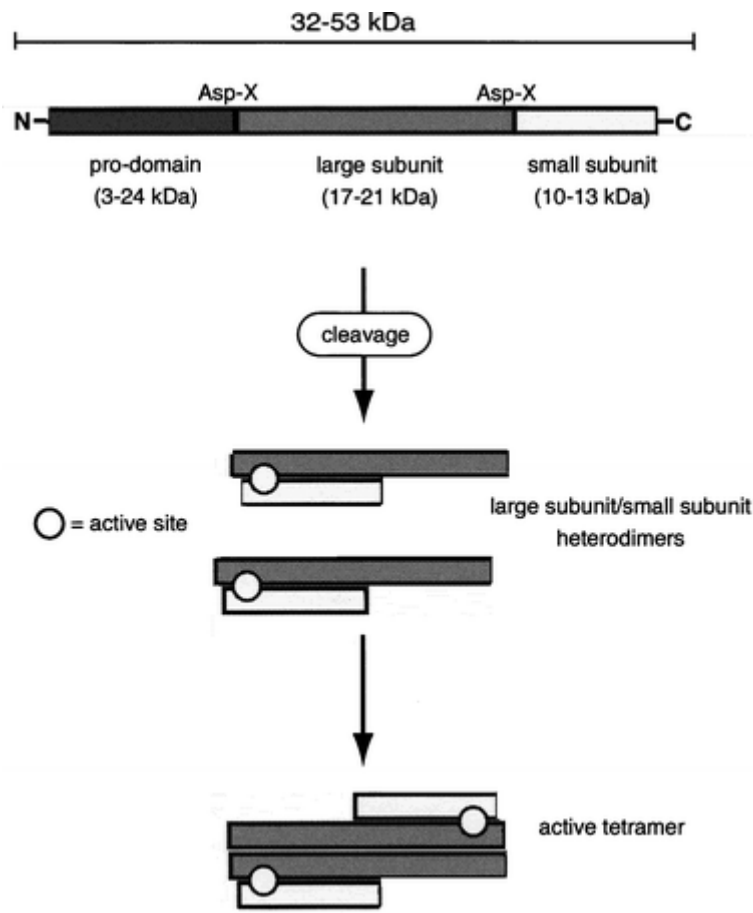
Effector caspases

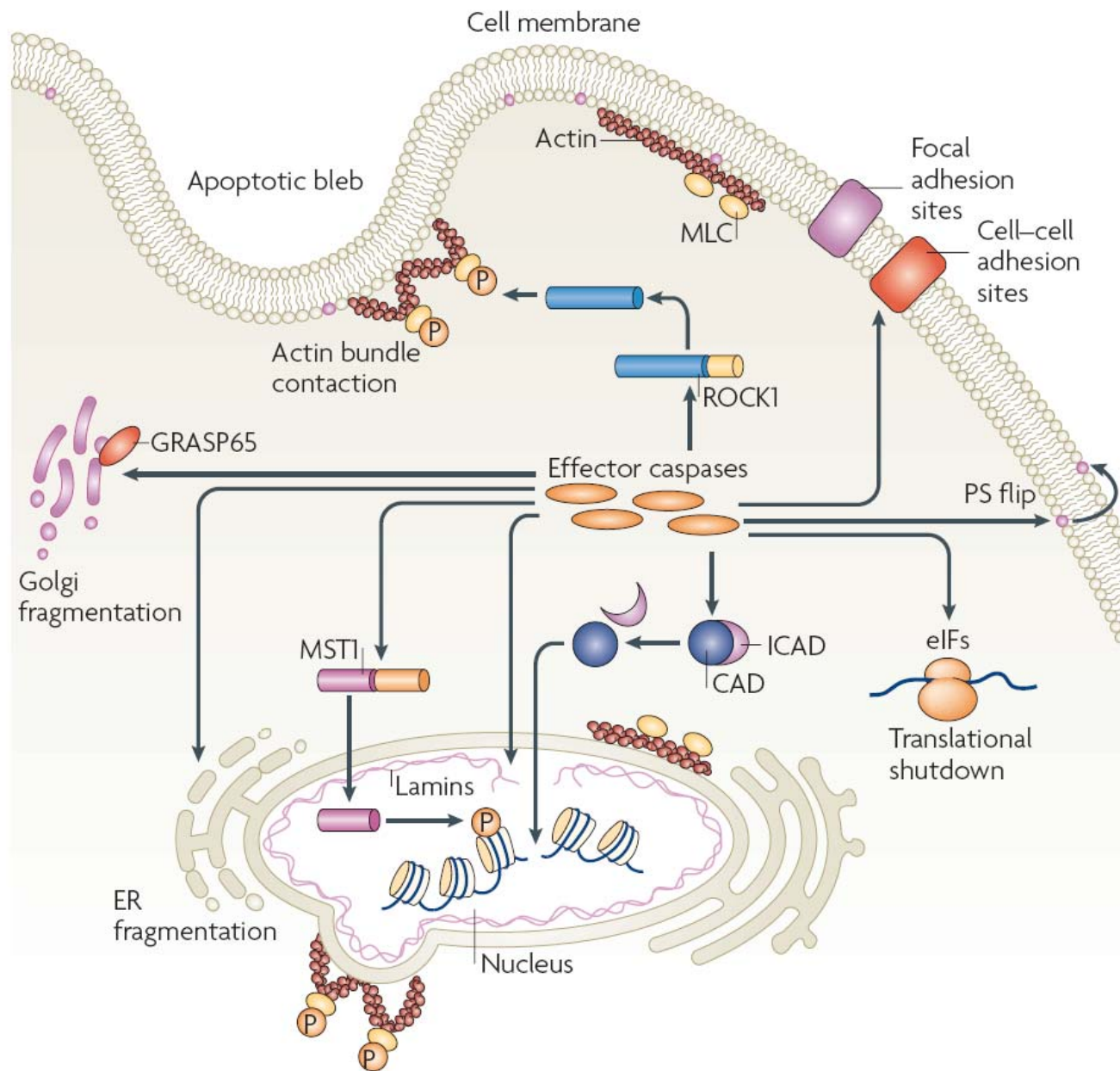
Caspase-3
 Caspase-6
 Caspase-7

Cleavage specificity

Group I (Caspase-1, -4, -5, -13) (Inflammation)	(W/L)EHD
Group II (Caspase-3, -7) (Apoptosis)	DEXD
(Caspase-2) (Apoptosis)	VDVAD
Group III (Caspase-6, -8, -9, -10) (Apoptosis)	(I/L/V)EXD

Activace pro-kaspáz







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)



Metody detekce kaspázové aktivity

- detekce aktivní formy kaspáz
- detekce aktivity pomocí syntetických selektivních substrátů
- analýza pomocí značených inhibitorů kaspáz (fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA))
- detekce štěpení substrátů kaspáz (PARP, CK18)



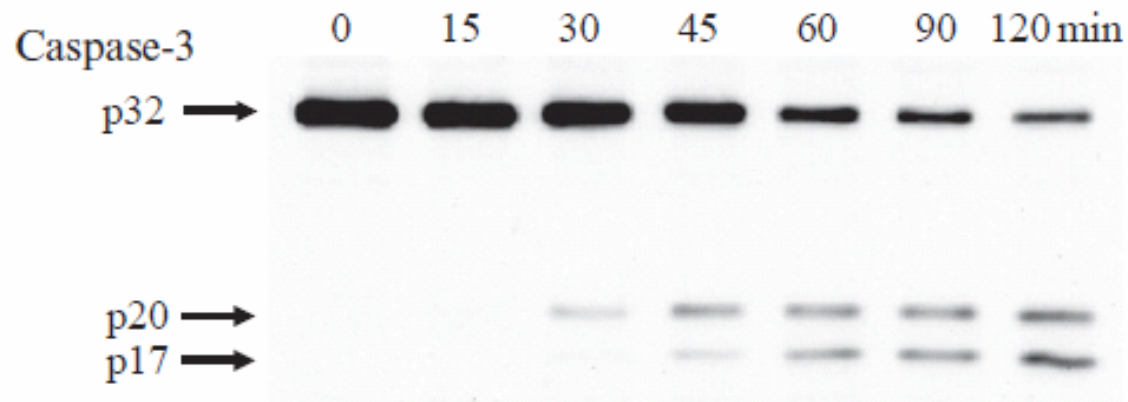
CASPASES: DETERMINATION OF THEIR ACTIVITIES IN APOPTOTIC CELLS

Alena Vaculova *and* Boris Zhivotovsky

Methods in Enzymology, Volume 442

ISSN 0076-6879, DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01408-0

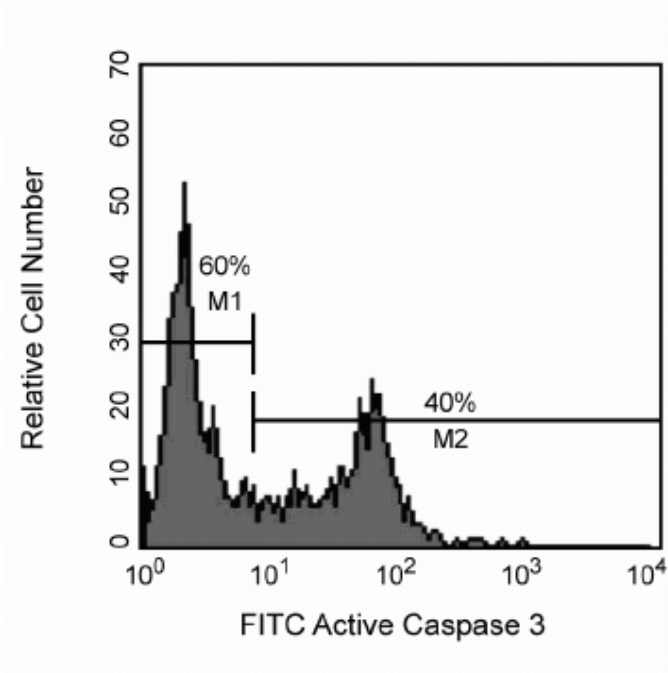
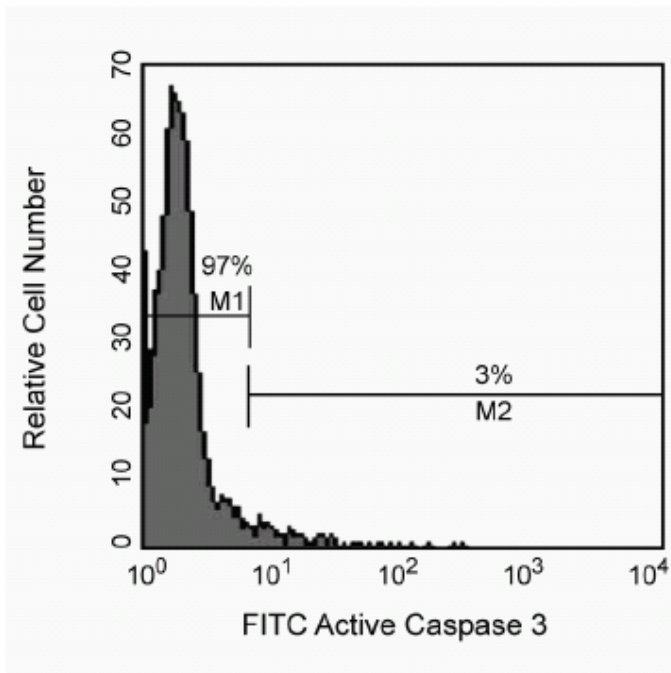
Detekce aktivní formy kaspáz



Alena Vaculova and Boris Zhivotovsky

Detekce aktivní formy kaspáz

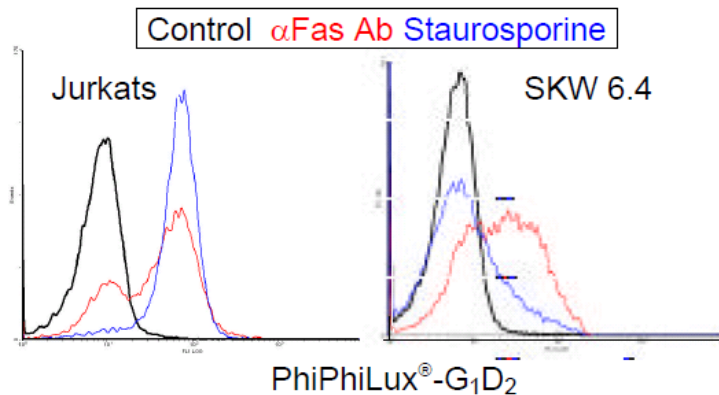
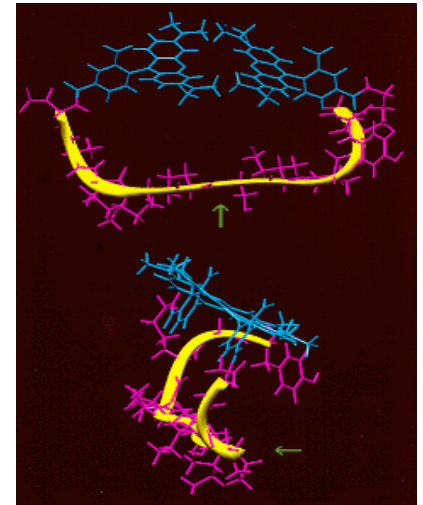
- Intracelulární detekce pomocí protilátek specifických pouze pro **aktivní** formu enzymu
- fixace PFA + permeabilizace

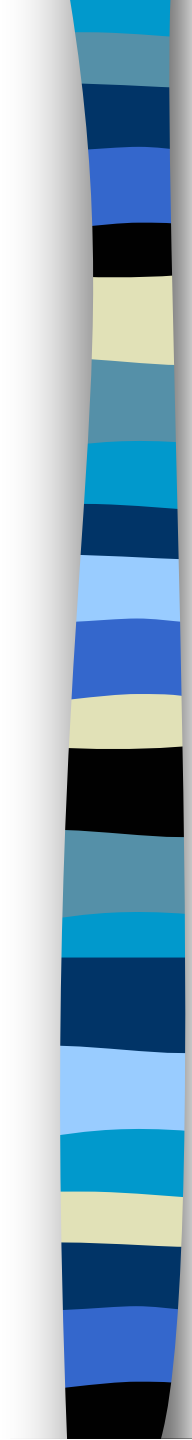


Detekce kaspázové aktivity pomocí syntetických substrátů v živých buňkách

■ PhiPhiLux (Oncolmmunin)

- Permeabilní pár fluorochromů kovalentně spojených linkerem (specifická substrátová sekvence)
- Po stěpení dochází ke změně konformace a nárůstu fluorescence
- buňky nelze dodatečně permeabilizovat !!!
- **Ize snadno studovat dynamiku aktivace**





Detekce kaspázové aktivity pomocí syntetických substrátů v intaktních buňkách

■ výhody

- jednoduchý protokol
- u některých substrátů možnost kombinace s detekcí povrchových antigenů

■ limity

- specifita , nízká toxicita a prostupnost substrátu
- nemožnost fixace a permeabilizace

Detekce kaspázových substrátů

■ Poly(ADP)ribose polymerase (PARP)

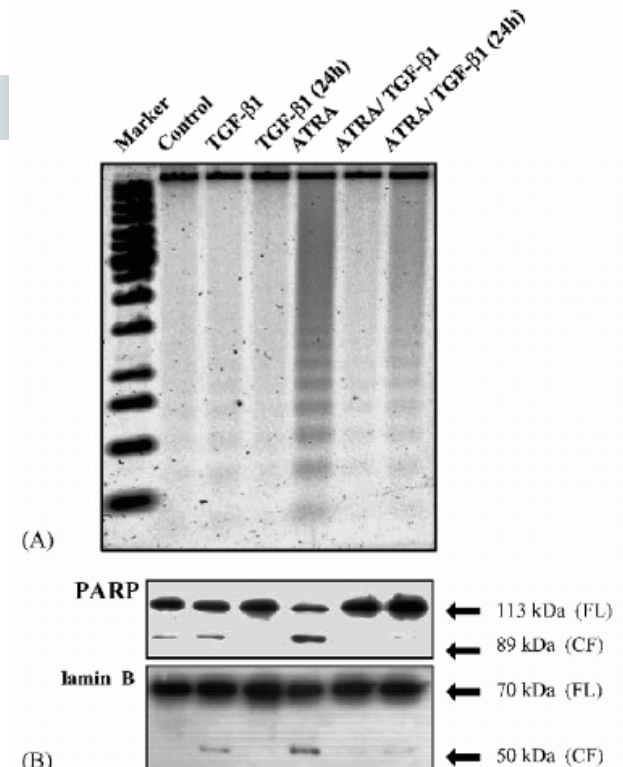
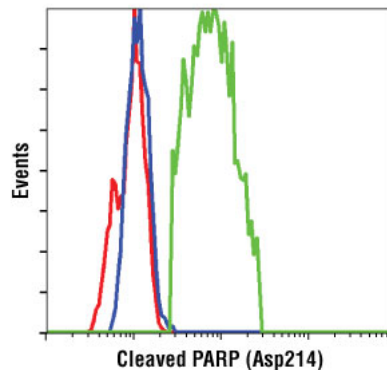
- substrát kaspázy -3, -6
- rutinní detekce fragmentů pomocí Western blotu
- analýza na průtokovém cytometru pomocí protilátek proti štěpeným fragmentům

- PARP (p25; p89)

EPITOMICS
BETTER ANTIBODIES • BETTER SCIENCE

IMGENEX
Antibodies for Preclinical Research

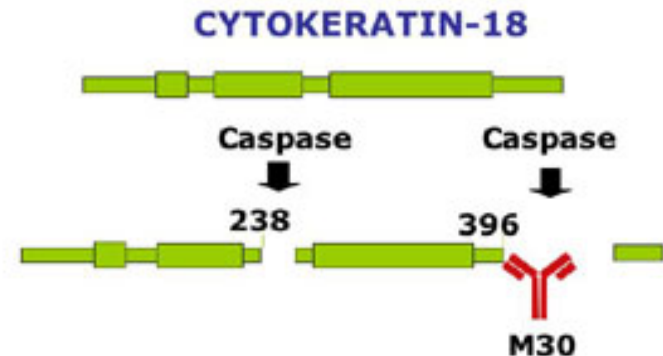
Cell Signaling
TECHNOLOGY



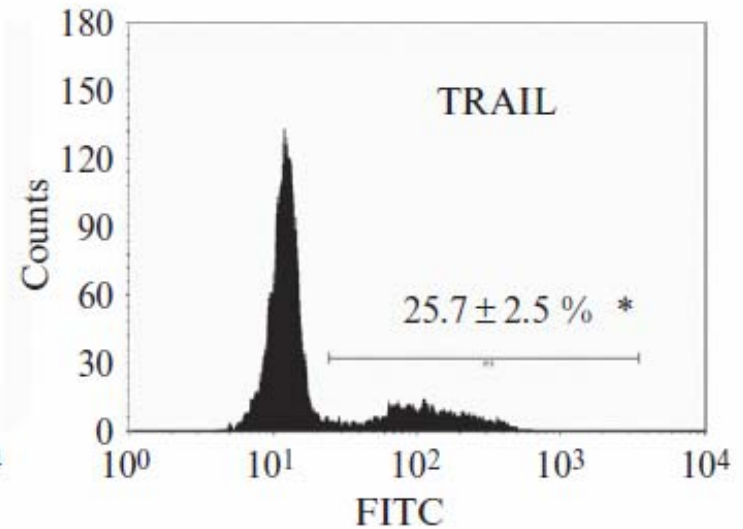
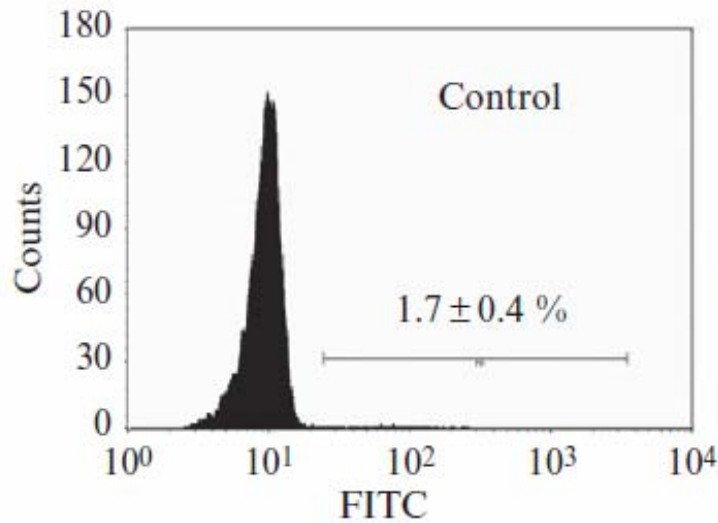
Detekce kaspázových substrátů

■ Cytokeratin 18

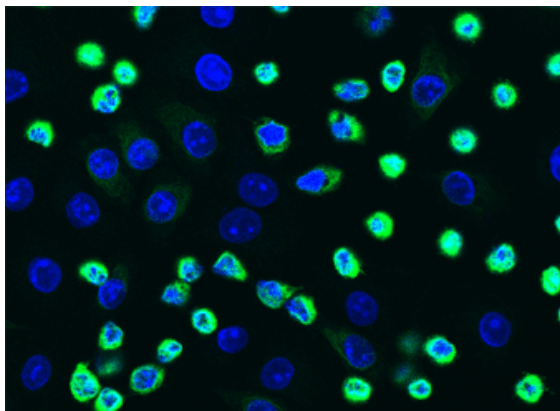
- intermembránová filamenta epitheliálních buněk
- Substrát kaspázy-3, -6, -7, -9
- detekce specifického fragmentu pomocí M30 Cytodeath™ protilátky



Protilátka M30 CytoDEATH™



Alena Vaculova and Boris Zhivotovsky





Detekce kaspázových substrátů

■ výhody

- jednoduchý protokol ~ standardní intracelulární imunodetekce na metanol fixovaných buňkách
- možnost kombinace s detekcí dalších intracelulárních antigenů

■ limity

- kvalita protilátky
- buněčná specifita
- obtížná kombinace analýzy s detekcí povrchových antigenů
- nemožná kombinace s analýzou vitálních funkcí



Jakou metodu použít?

- více než jednu;
- principiálně odlišnou;
- v závislosti na buněčném typu;
- a experimentálním zásahu.



Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy

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



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



Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy

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



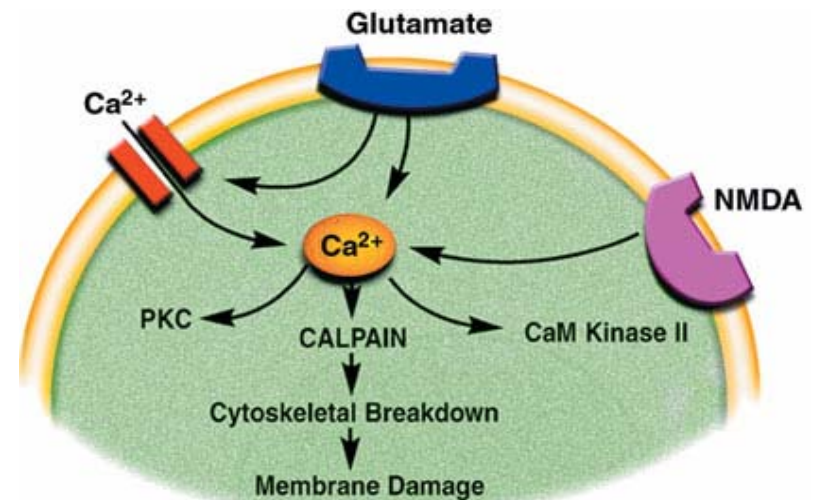
Nekaspázové proteázy

- **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**



Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy

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



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**



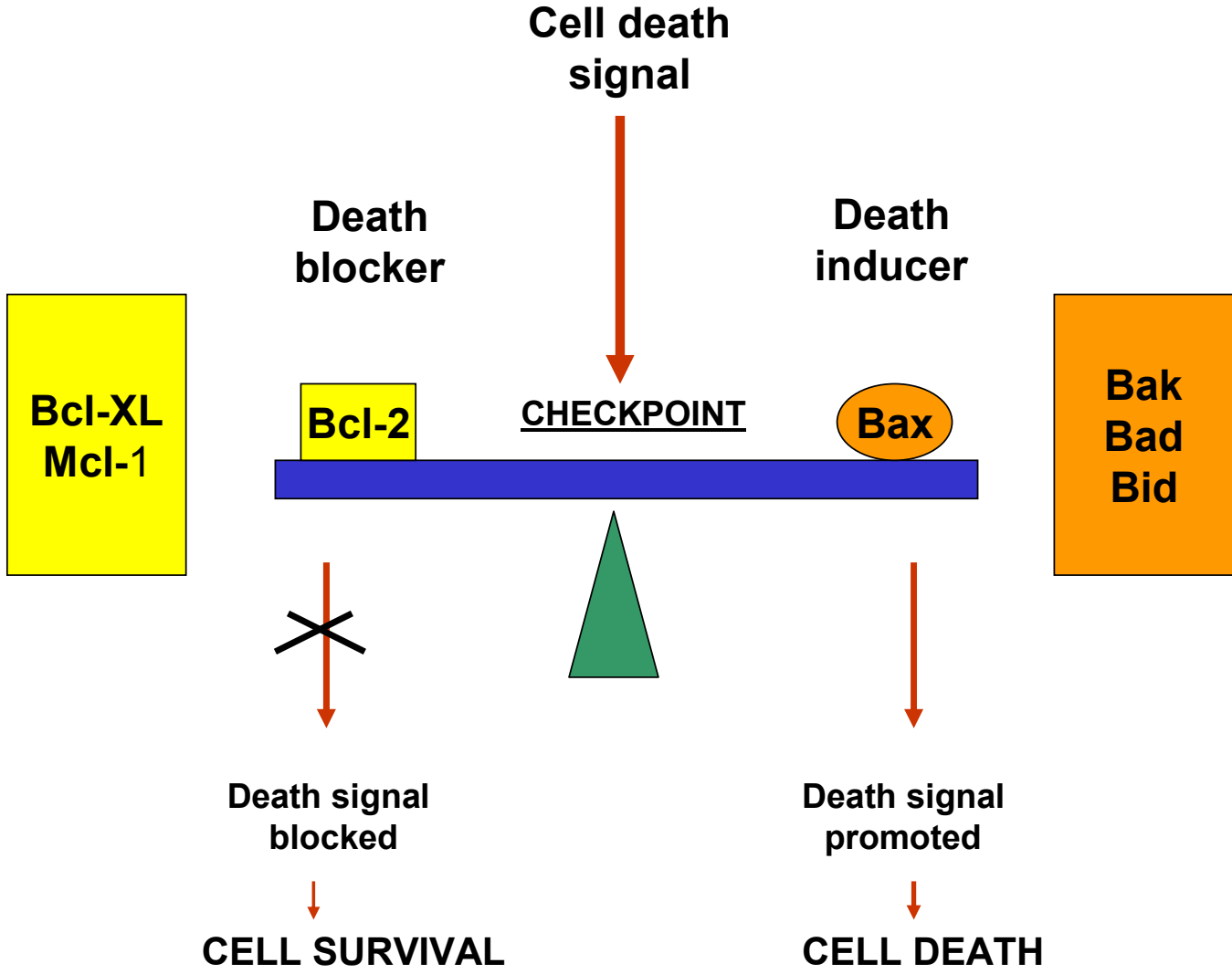
- V nepřítomnosti apoptotického signálu jsou proteiny Bcl-2 rodiny lokalizovány v různých subcelulárních kompartmentech

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

- proapoptické proteiny – cytosol, cytoskelet

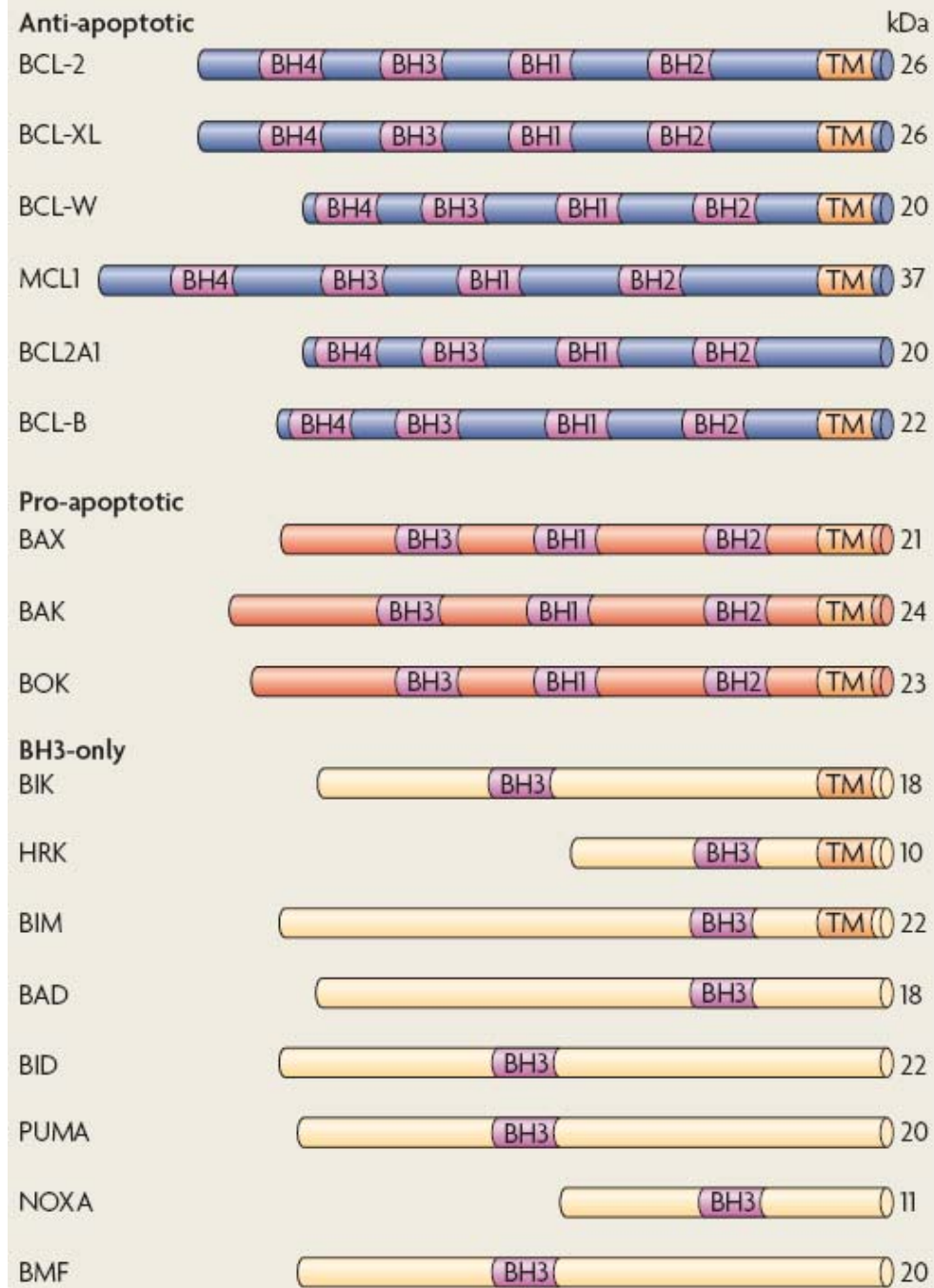
- apoptotický stimulus má za následek jejich konformační změny a translokace, především do mitochondrií – na úrovni mitochondriální membrány pak dochází ke vzájemným interakcím pro- a antiapoptických proteinů této rodiny

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



Proteiny rodiny Bcl-2

**Regulace
mitochondriální
dráhy indukce
apoptózy**





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**
- **Důležitá úloha v rezistenci nádorových buněk k některým typům chemoterapeutik**

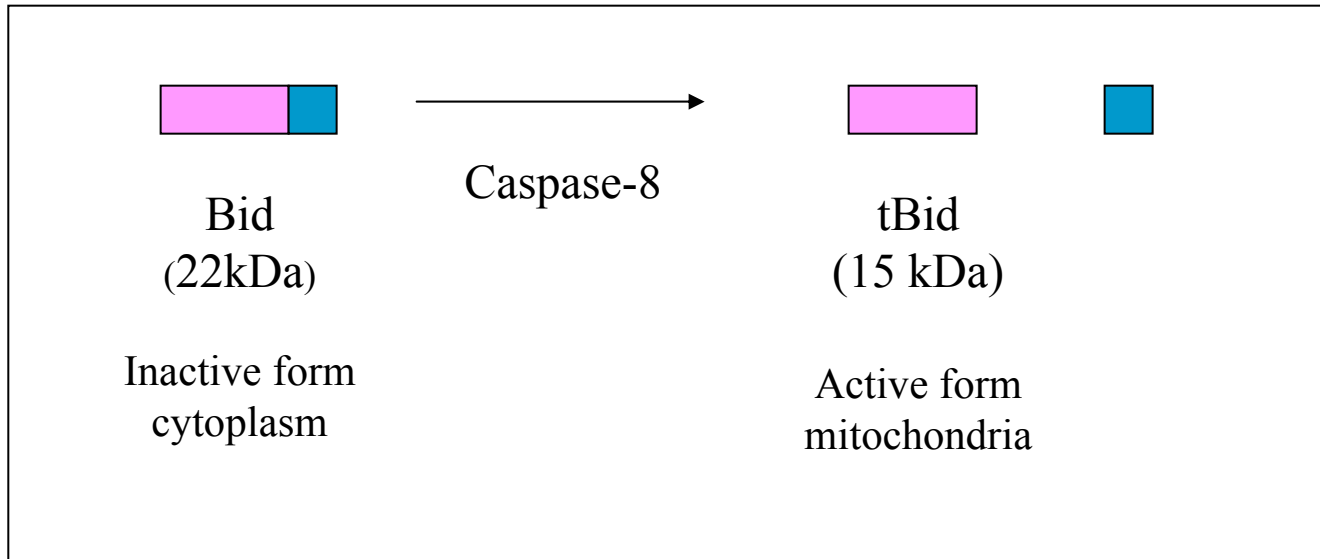


Mcl-1

- Myeloid cell leukemia 1 protein
- Antiapoptotický protein z Bcl-2 rodiny
- Úloha v regulaci diferenciace 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



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, proapoptotické 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**



Účast specifických genů a proteinů v regulaci apoptózy

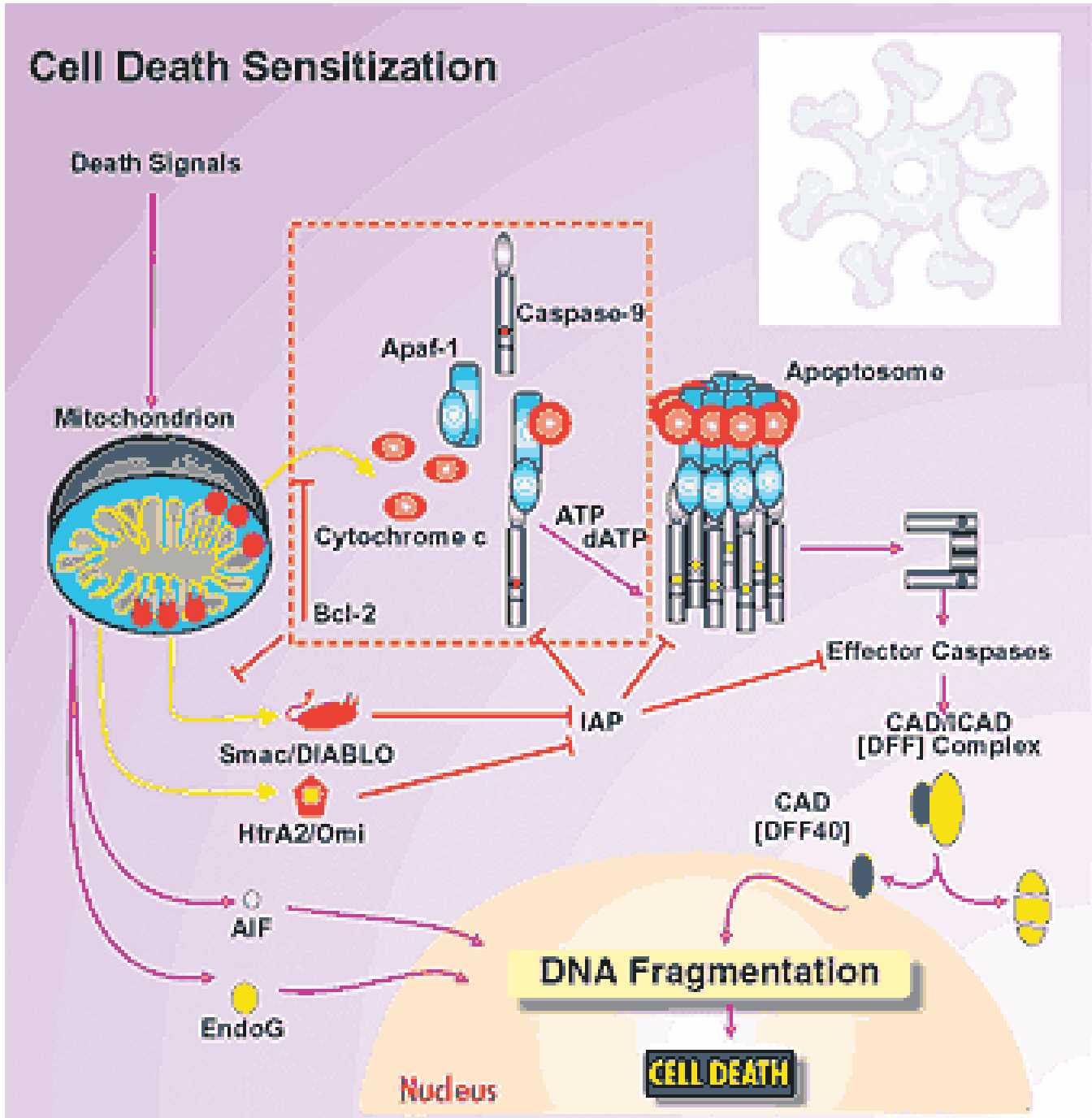
- Kaspázy
- Inhibitory kaspáz
- Nekaspázové proteázy
- Proteiny rodiny Bcl-2
- **Mediátory apoptózy uvolňované z mitochondrií**



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, antagonist 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, diferenciaci 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



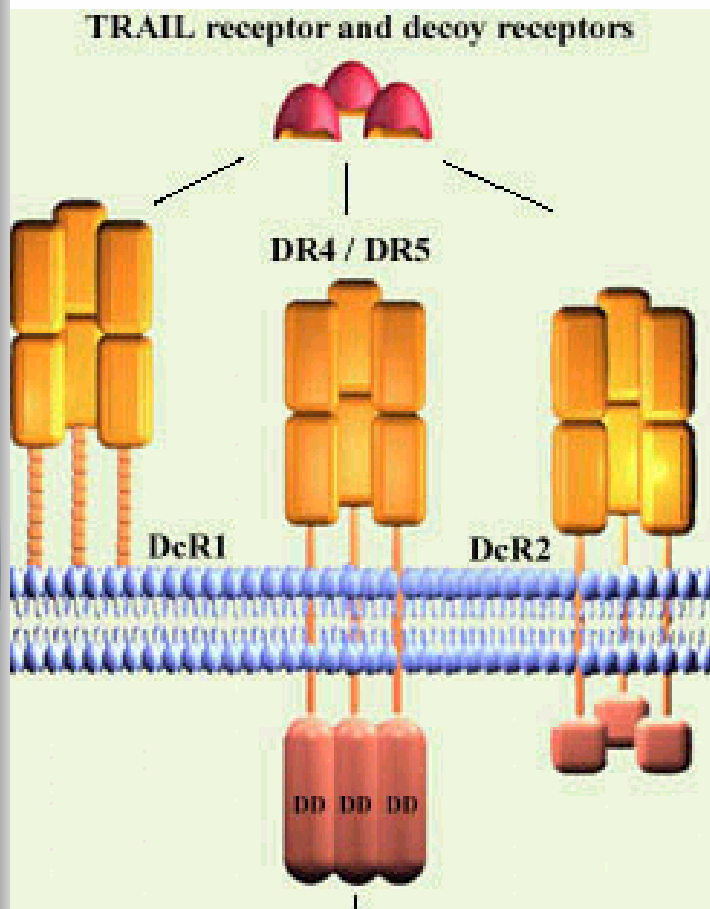
Systemová aplikace - TNF- α , anti-Fas, TRAIL

- 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

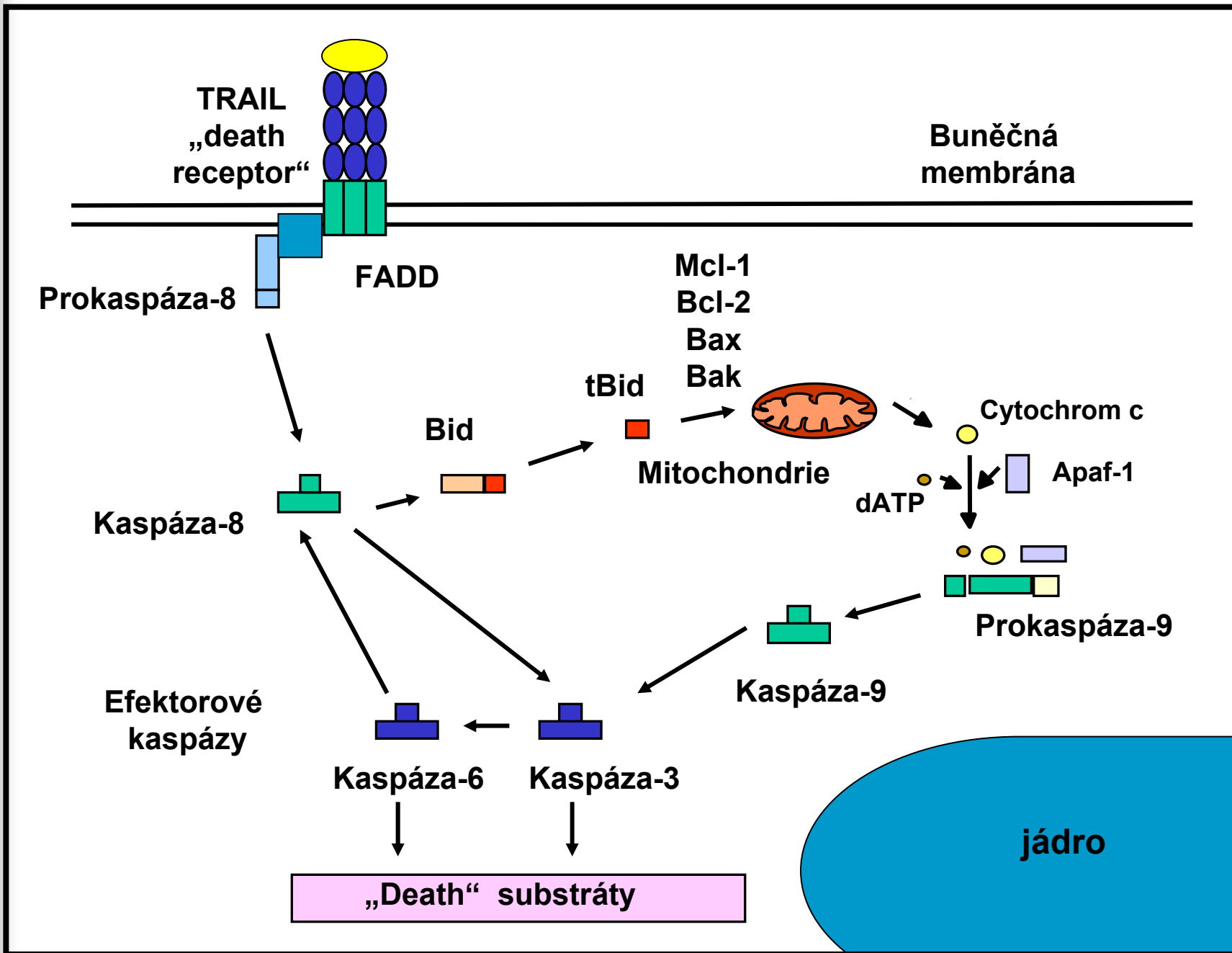
TRAIL-R1 (DR-4, APO-2)

TRAIL-R2 (DR-5, TRICK, Killer)

TRAIL-R3 (DcR1)

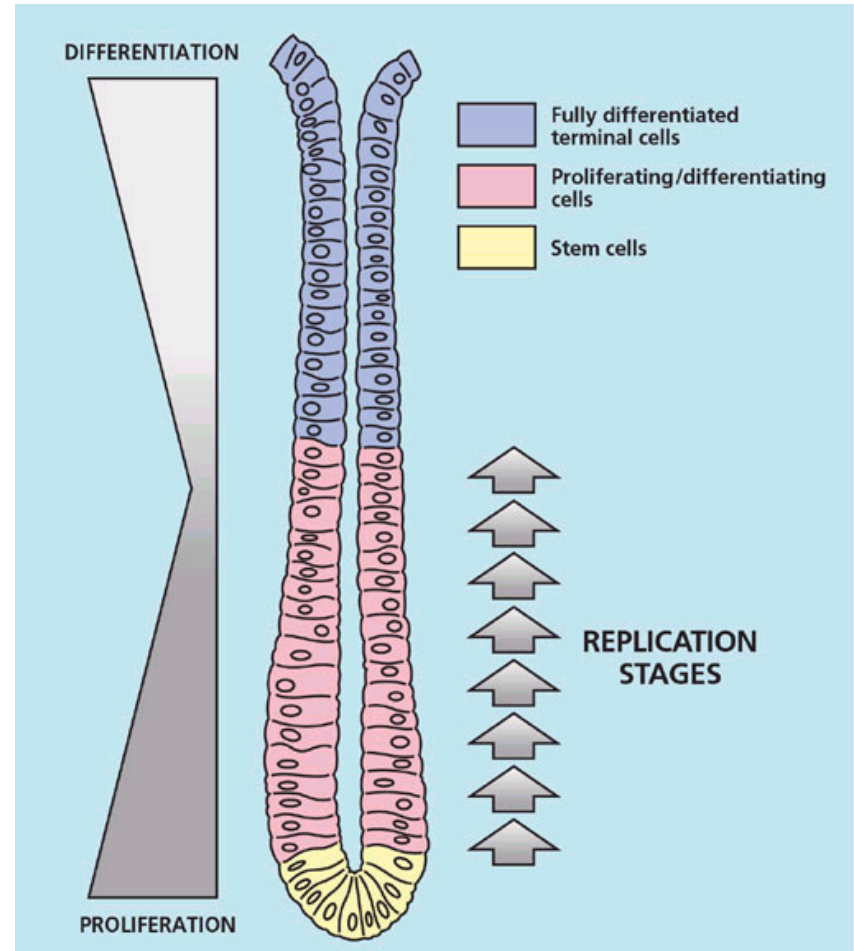
TRAIL-R4 (DcR2, TRUNDD)

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 tělíska**
- **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.)



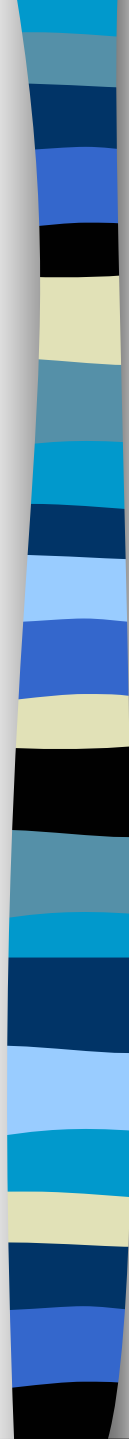
**Sensitive to
Apoptotic Stimuli**

Resistant to Apoptotic Stimuli



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

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



Shrnutí přednášky

- Apoptóza je dominantním způsob buněčné smrti od bezobratlých po člověka
- Kaspázy jsou klíčové enzymy zodpovědné za indukci i exekuci apoptózy
- Bcl-2 proteiny mají klíčové slovo při rozhodování o životě a smrti buňky
- Mitochondrie jsou společným dějištěm těchto procesů
- Narušení procesu apoptózy vede k fatálním poruchám homeostázy a rozvoji patologických stavů

Děkuji Vám



za pozornost!