

# Apoptóza

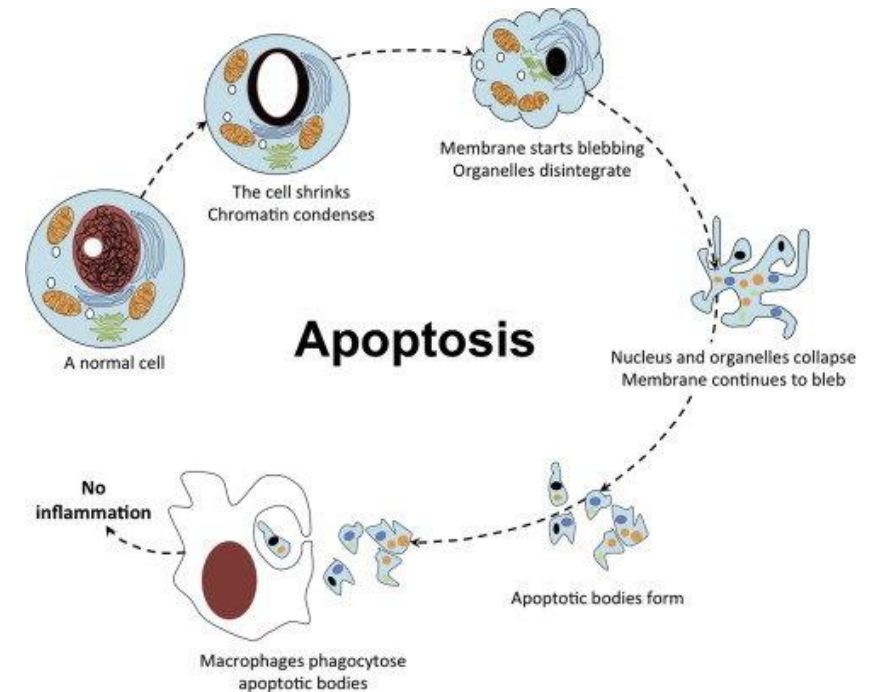
PharmDr. Zuzana Soldánová

# Obsah

- [https://www.youtube.com/watch?v=DR80Huxp4y8&ab\\_channel=WEHImovies](https://www.youtube.com/watch?v=DR80Huxp4y8&ab_channel=WEHImovies)
- [https://www.youtube.com/watch?v=-vmtK-bAC5E&ab\\_channel=ElvireThouvenot-Nitzan](https://www.youtube.com/watch?v=-vmtK-bAC5E&ab_channel=ElvireThouvenot-Nitzan)

# Mechanismy buněčné smrti

- udržení homeostázy
  - balancování mezi množením a zánikem buněk
- buněčná smrt
  - smrt neregulovaná
    - energeticky pasivní
      - **nekróza**
  - smrt geneticky kontrolovaná
    - programovaná buněčná smrt
      - **apoptóza**



Zdroj: online dostupné z  
[https://www.researchgate.net/figure/Cytology-of-apoptosis-The-different-stages-of-apoptotic-cell-death-start-by-cellular\\_fig3\\_274013152](https://www.researchgate.net/figure/Cytology-of-apoptosis-The-different-stages-of-apoptotic-cell-death-start-by-cellular_fig3_274013152)

# Druhy buněčné smrti

## – Apoptóza

- kaspázy
- stárnutí nebo jako odezva na specifické podněty

## – Anoikis

- programovaná buněčná smrt způsobená ztrátou kontaktu
- důsledek poruchy interakcí, které buňku ukotvují v matrix

## – Autofagie

- katabolický mechanismus pro degradaci buňky a recyklaci buněčných komponent
- rozklad buněčných složek v lysozomech

# Druhy buněčné smrti

## – Aponekróza

- nedochází k dokončení buněčné smrti apoptózou
  - ke konci se objevují známky nekrózy

## – Paraptóza

- nemá nic společného s apoptózou
- dochází k nápadné tvorbě vakuol a nabobtnání mitochondrií

## – Nekroptóza

- podobnost s apoptózou
- nekroza indukovaná externími stimuly (specifickými) přes receptory smrti, v případě, kdy nemůže dojít k apoptóze (bez dominantní účasti kaspáz)

# Druhy buněčné smrti

## – Pyroptóza

- programovaná buněčná smrt spojená s antimikrobiální odpovědí

## – Mitotická katastrofa

- souvisí s poruchami mitózy
- mechanismus blízký apoptóze
- závislá na p53 / nezávislá na p53
  - porucha aktivace cyklinu B a Cdk1

## – Kornifikace

- buněčná smrt keratinocytů důležitá pro vznik *stratum corneum epidermis*
- inhibice transglutaminázy či kaspázy

# Druhy buněčné smrti

## – Excitotoxicita

- smrt nervových buněk v důsledku přílišné aktivace receptorů pro nervové přenašeče

## – Nekróza

- indukovaná nespecifickým traumatem
- důsledkem je uvolnění prozánětlivých signálů

# Nekróza

- neregulovaný a náhodný proces
- vede k odumření buňky způsobené
  - akutním fyzickým poškozením
  - infekcí
  - extrémním stresem (neslučitelný s životem buňky)
- zvětšování objemu buňky → ztráta integrity buňky → uvolnění buněčného obsahu do extracelulárního prostoru → akutní zánětlivá odpověď



# Apoptóza

## – Apoptóza

### – původ ve starořeckém slově

- podzimní opadávání listů (apoptotické odumření vrstvy buněk v řapíku)/plešatění
- *apo* – dolů
- *ptosis* - pád

## – historie

### – 1842: C. Ch. Vogt

- první pozorování a popis apoptózy (přeměna pulce v žábu)

### – 1972: John F. R. Kerr

- poprvé použit termín apoptóza
- komplementární role k mitóze
- udržení homeostázy

### – James Cormack

- katedra řečtiny Aberdeenské univerzity

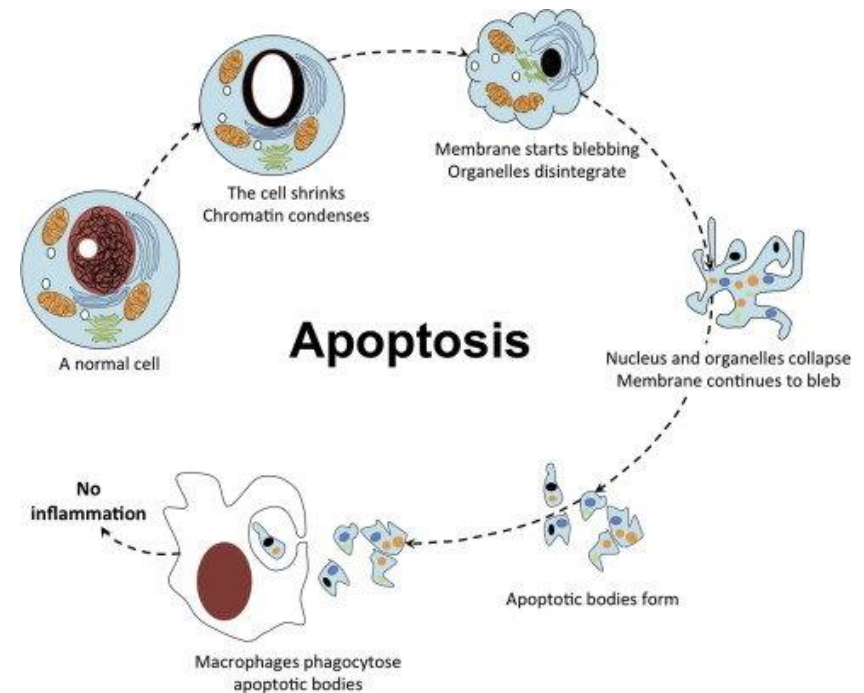
# Apoptóza

- programovaná buněčná smrt
- aktivně řízená
- podílí se na udržení homeostázy
- je aktivována a tlumena specifickými geny a signálními dráhami
- dochází k aktivaci proteáz a endonukleáz a destrukci buňky
- apoptotické odstranění buněk mezi prsty v průběhu embryogeneze

# Apoptóza

## – typické morfologické změny

- ztráta asymetrie fosfolipidů buněčné membrány
- externalizace fosfatidylserinu
- kondenzace chromatinu
- srašťování jádra
- srašťování celé buňky
- štěpení DNA v internukleozomálních sekvencích
- fragmentace jádra
- vznik výdutí cytoplazmatické membrány
- rozpad buňky na apoptotická tělíška
- fagocytóza a odstranění tělíšek bez rozvoje zánětlivé odpovědi



Zdroj: online dostupné z

[https://www.researchgate.net/figure/Cytology-of-apoptosis-The-different-stages-of-apoptotic-cell-death-start-by-cellular\\_fig3\\_274013152](https://www.researchgate.net/figure/Cytology-of-apoptosis-The-different-stages-of-apoptotic-cell-death-start-by-cellular_fig3_274013152)

# Rozdíly mezi apoptózou a nekrózou

## Apoptóza

- programovaný proces
- poškození DNA, řízená remodelace tkáně, udržování tkáňové homeostázy, hypoxie
- v rámci **jednotlivých** buněk
- objem buňky se **zmenšuje**
- **kondenzace** chromatinu
- vznikají **apoptická tělíka**
- **aktivace genů** je nezbytná pro zahájení
- DNA je **štěpena specificky mezi nukleozomy**
- koncentrace vápníku intracelulárně je **zvýšena**
- iontové pumpy **fungují**
- **aktivní proces – spotřeba ATP**

## Nekróza

- náhodný proces
- poranění, působení toxických látek, infekce
- týká se celé **skupiny** buněk
- objem buňky se **zvětšuje**
- chromatin se **fragmentuje**
- mitochondrie jsou morfologicky **pozměněné**
- **zánětlivá odpověď**
- **lýze buněk** a uvolnění obsahu do okolí
- DNA je **náhodně štěpena**
- iontové kanály **nefungují**
- **pasivní proces – nevyžaduje ATP**

# Poruchy na úrovni apoptózy

## Nadměrná inhibice

- **nádorová onemocnění**
  - téměř u všech nádorových buněk
  - jedna ze základních získaných vlastností
- **autoimunitní onemocnění**
  - lupénka
  - revmatoidní artritida

## Nadměrná stimulace

- **AIDS**
  - CD4 a CD8 T-lymfocyty
- **neurodegenerativní onemocnění**
  - Alzheimerova choroba
  - Parkinsonova choroba
  - Huntingtonova choroba
- **myelodysplastický syndrom**
- **chronická ischemická poškození**
- **chronická toxická poškození**

# Apoptóza

## – indukce apoptózy

- radiace
- hypertermie
- cytostatika
- cytokiny
- interakce T lymfocytů s cílovými buňkami
- hypoxie, kyslíkové radikály a další

## – aktivace efektorů apoptózy

## – fáze degradace

# Apoptóza

## Vnitřní apoptotická dráha

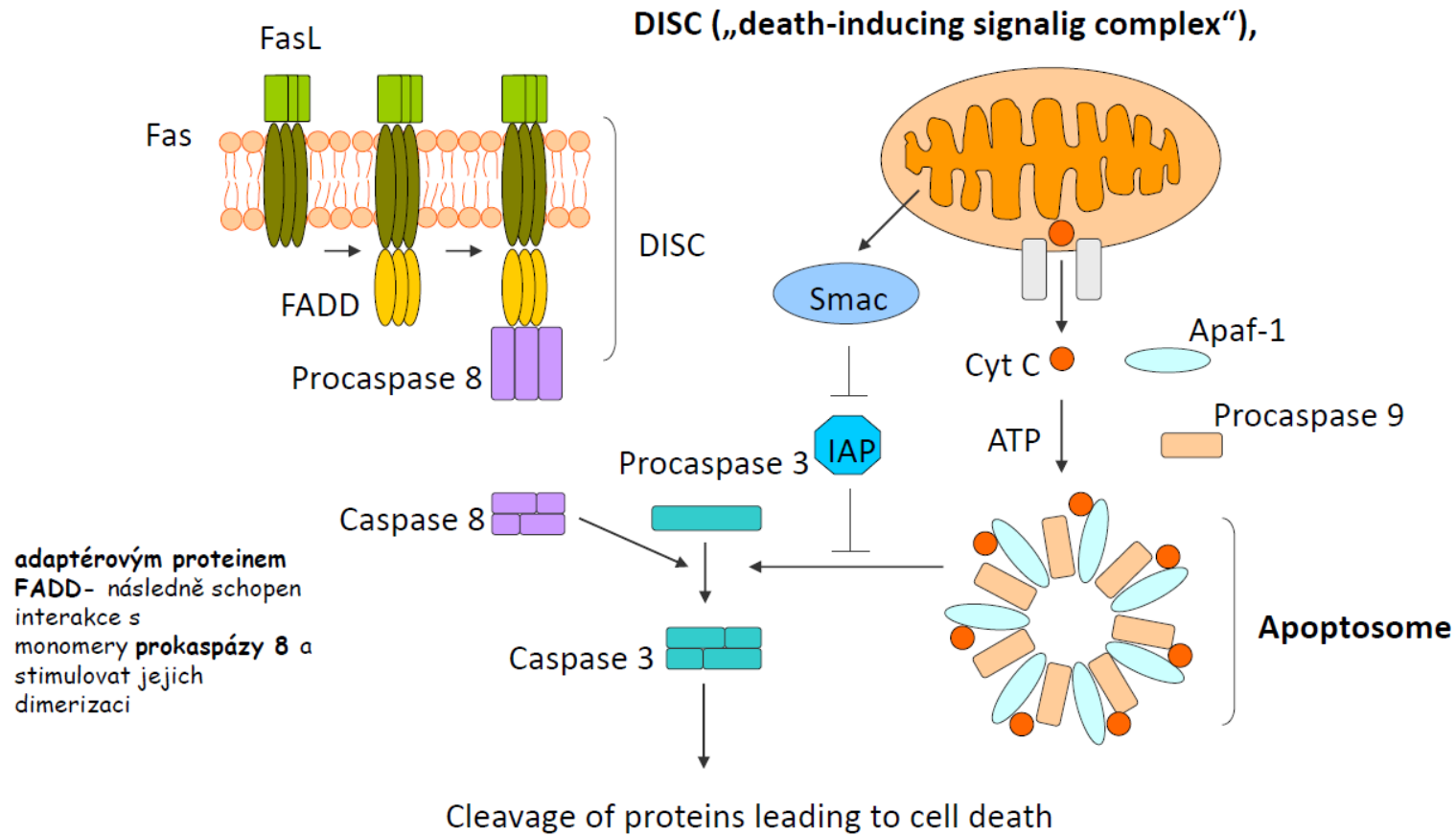
- signalizace např. prostřednictvím **p53**
- **mitochondrie**
- **Bcl-2 / Bax**
- tvoří se komplex **apoptozóm**
- aktivace **prokaspázy-9**

## Vnější apoptotická dráha

- ligand se naváže na **receptor smrti**
- vzniká proapoptotický signál
- aktivace **domény smrti** a dalších proteinů
- aktivace **prokaspázy-8**

# Vnitřní a vnější apoptotická dráha

Caspase activation by the extrinsic and intrinsic pathways





# Apoptóza

Vnitřní apoptotická dráha

## – intracelulární stresové stimuly

- poškození DNA
- oxidační stres
- aktivace onkogenů

– iniciační kaspáza: **kaspáza-9**

Vnější apoptotická dráha

## – extracelulární stimuly

- přes receptory smrti
  - hormonů
  - cytokinů

– iniciační kaspáza: **kaspáza-8**

**může docházet k aktivaci nefunkčních forem proteáz → destrukce**

# Kaspázy

- caspases (cystein-rich aspartate proteases)
- 13 savčích kaspáz
- proteázy
- fungují jako molekulární nůžky
- štěpí intracelulární proteiny na aspartátových zbytcích
- jsou centrálními **efektorovými proteiny** vnější i vnitřní apoptotické dráhy

# Prokaspázy

- **inaktivní proenzymy kaspáz**
- nejsou zcela neaktivní (2 % aktivity kaspáz)
- jsou aktivovány proteolytickým štěpením ve specifických aspartátových zbytcích
  - kaspáza štěpí proteiny na aspartátových zbytcích
  - aktivace jiné kaspázy štěpením její prokaspázové formy
  - následné štěpení další
  - řetězová reakce
  - mohutná amplifikace apoptotického signálu

# Kaspázy

## Iniciační (apikální) kaspázy

- kaspáza-1
- kaspáza-2
- kaspáza-4
- kaspáza-5
- kaspáza-8
- kaspáza-9
- kaspáza-10
  - aktivovány nejdříve
  - aktivují efektorové kaspázy

## Efaktorové kaspázy

- kaspáza-3
- kaspáza-6
- kaspáza-7
  - vlastní provedení apoptózy

# Vnější apoptotická dráha

- membránová či receptorová apoptotická dráha
- zahájena **navázáním ligandů na povrchové receptory**
- faktory smrti se vážou na receptory smrti
- ligandy rodiny tumor nekrotizujícího faktoru (TNF)
  - TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  TNFR1
  - TRAIL  $\rightarrow$  TRAILR1
  - Fas  $\rightarrow$  CD95R
- oligomerizace ligandů po navázání
- **transdukce signálu dovnitř buňky**

# Vnější apoptotická dráha

- konformační změna → odkrytí **domén smrti** na cytoplazmatických doménách receptorů
- navázání intracelulárních adaptorových proteinů
  - TRADD (TNF receptor associated death domain protein)
  - FADD (Fas-associated death domain protein)
- vytvoření komplexů prokaspáz a efektorových domén smrti
  - DED – death effector domains

# Vnější apoptotická dráha

- smrt indukující signální komplex
  - DISC – death inducing signaling complex
  - komplex faktorů smrti, receptorů, adaptorových proteinů a iniciačních kaspáz
- **prokaspázy-8** se navzájem proteolyticky štěpí
  - kaskáda kaspázové aktivace
  - aktivace efektorových kaspáz
    - kaspáza-3
    - kaspáza-6
    - kaspáza-7
- **apoptóza**

# Vnější apoptotická dráha

## – cílové proteiny efektorových kaspáz

- jaderné lamininy
- cytoskeletální proteiny
  - aktin
  - intermediární filamenta
- specifické kinázy
- kaspázami-aktivovaná Dnáza
  - štěpení internukleozomálního chromatinu

## – inhibice vnější apoptotické dráhy

### – antiapoptotický **protein c-FLIP**

- cellular FLICE (FADD like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein
- váže se na adaptorový protein FADD skrze doménu DED → znemožňuje navázání a aktivaci prokaspázy-8



# Vnější apoptotická dráha

## Receptory smrti

- transmembránové povrchové receptory
- přenáší apoptotické signály indukované **ligandy smrti**
- patří do rodiny **receptorů TNF** (tumor necrosis factor)
- mohou aktivovat **kaspázy** během sekund po vazbě **ligandů** a způsobit odstranění buňky během několika hodin
- obsahují homologní **cytoplasmatickou doménu smrti**, která jim umožňuje přímo interagovat s apoptotickým aparátem

# Vnější apoptotická dráha

## Receptory smrti

### – CD95

- Fas, Apo1
  - ligandy: CD95L, FASL

### – TNFR1

- p55, CD120a
  - ligandy: TNF, lymphotoxin

### – DR3

- Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD
  - ligandy: Apo3L (TWEAK)

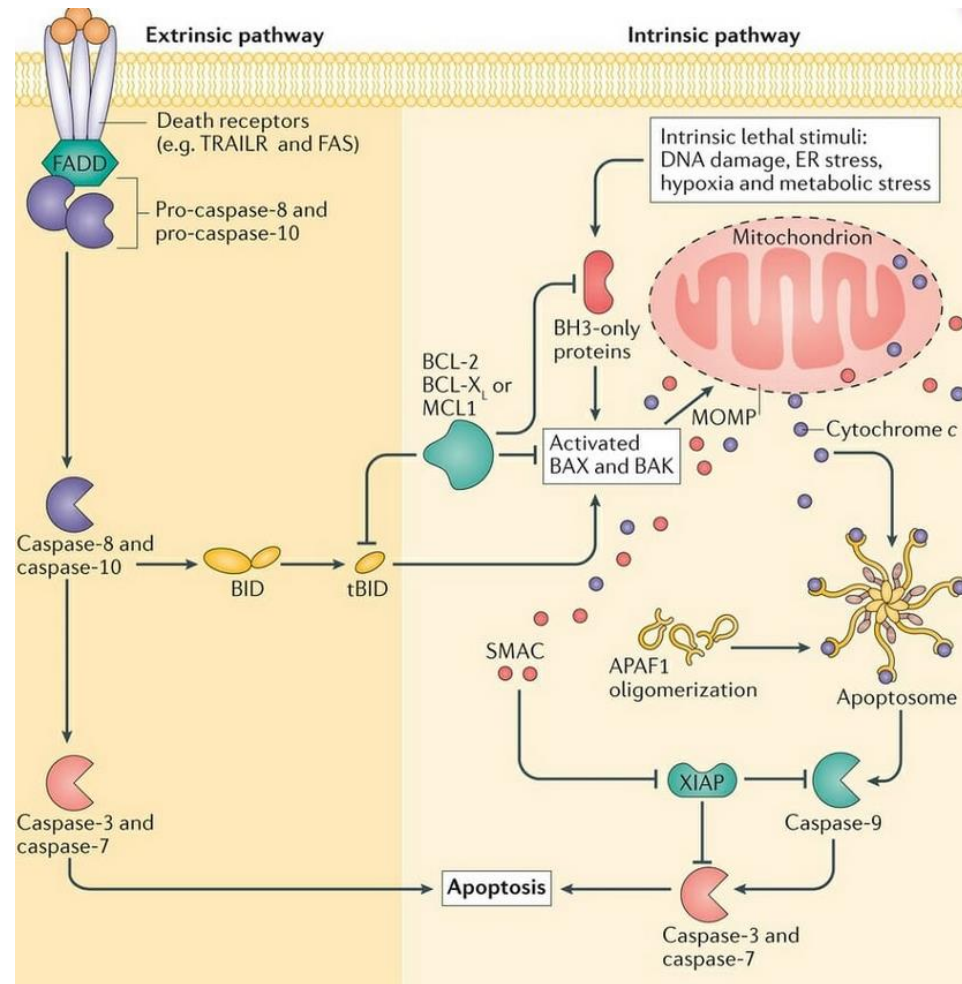
### – DR4

- ligandy: Apo2L (TRAIL)

### – DR5

- Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2, KILLER
  - ligandy: Apo2L (TRAIL)

# Vnější apoptotická dráha



Zdroj: online dostupné z <https://biologydictionary.net/apoptosis/#foobox-1/0/Extrinsic-and-intrinsic-apoptotic-signalling-pathways.jpg>

# Vnitřní apoptotická dráha

- mitochondriální apoptotická dráha
- není závislá na vnějších stimulech
  - faktory smrti
- řízena signály zevnitř buňky
  - poškození DNA
  - oxidační stres
- regulace
  - **proteiny rodiny Bcl-2**
    - více než 20
    - udržování mitochondriální integrity
    - dělíme je na 3 podskupiny

# Proteiny rodiny Bcl-2

Antiapoptoticky působící **Bcl-2-like** faktory přežití

- Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo
- 3 – 4 domény homologní s Bcl-2 (BH)
  - BH1
  - BH2
  - BH3
  - BH4
- brání členům druhé proapoptotické rodiny narušit integritu mitochondriální membrány → spuštění vnitřní apoptotické dráhy

# Proteiny rodiny Bcl-2

Proapoptoticky působící **Bax-like** faktory smrti

- Bax, Bak, Bok, Bcl-x<sub>S</sub>
- strukturně podobné Bcl-2-like faktorům
- podílí se
  - na permeabilizaci mitochondriální membrány
  - indukci apoptózy

# Proteiny rodiny Bcl-2

Proapoptoticky působící faktory smrti **obsahující pouze BH3 doménu**

- Bad, Bik, Bim, Bmf, BNIP3, NOXA, PUMA
- mediátory apoptotické signalizace v závislosti na integritě buňky
  - u buněk s narušenou integritou jsou mohutně aktivovány

# Proteiny rodiny Bcl-2

- členové rodiny spolu interagují prostřednictvím homologní domény
  - vzájemné poměry ovlivňují výslednou funkci
- **zvýšená aktivita** proapoptotických faktorů způsobená **sníženým inhibičním působením** antiapoptotických faktorů vede ke spuštění **apoptózy**
- tvoří nebo blokuje tvorbu pórů ve vnější mitochondriální membráně
  - mezi mitochondriálními membránami významný zásobník proteinů → nastartování apoptózy
  - regulace uvolňování regulátorů apoptózy z mitochondrií



# Permeabilizace vnější mitochondriální membrány

- MOMP = mitochondrial outer membrane permeabilization
- proapoptické působení proteinů Bax a Bak
  - normálně blokovány antiapoptickými proteiny
    - Bcl-2
    - Bcl-x<sub>L</sub>
  - tvoří heterodimerické komplexy
- vnitřní apoptotický signál → indukce / aktivace proteinů Bid a Bim → neutralizace antiapoptického působení proteinů Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> → potenciace následných změn na úrovni proapoptických proteinů Bax a Bak

# MOMP

- proapoptotické proteiny Bax a Bak
  - uvolněny a translokovány z cytoplazmy k mitochondriím
  - jsou ukotveny ve vnější mitochondriální membráně
  - oligomerizace 6-8 molekul
  - vznikají kanály umožňující uvolnění proapoptotických faktorů z mitochondrií
- oligomery Bax a Bak mohou dále polymerovat → celkové rozrušení mitochondriální membrány

# MOMP

- vzniká deregulací v hladinách jednotlivých zástupců proteinové rodiny Bcl-2
- uvolnění klíčových proteinů → nastartování vnitřní mitochondriální dráhy → uvolnění **prokaspázy-9 a cytochromu c**
  - účastní se transportu elektronů v dýchacím řetězci
  - společně s dATP se váže na cytoplazmatický protein **Apaf-1** (apoptosis protease-activating factor 1)
    - vytvoří se apoptozom
      - heptametrický kruhový komplex (wheel of death)
    - aktivace prokaspázy-9
    - aktivace kaspázy-3, -6, -7

# Další mitochondriální proteiny

Rodina proteinů inhibujících apoptózu

- **IAPs** (inhibitors of apoptosis proteins)
  - regulace apoptózy
  - 8 členů
  - inhibují kaspázy
  - IAP
    - je vázán na chromozom X (XIAP)
    - inhibuje kaspázu-3 a kaspázu-7
  - transkripčně aktivovány jaderným faktorem  $\kappa$ B

# Další mitochondriální proteiny

## – protein Smac/DIABLO

- second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI
- inhibitor IAPs
  - váže se na ně
  - znemožňuje vazbu na cílové kaspázy

## – serinová proteáza HtrA2

- vyvazuje a štěpí XIAP a další členy rodiny IAPs

# Další mitochondriální proteiny

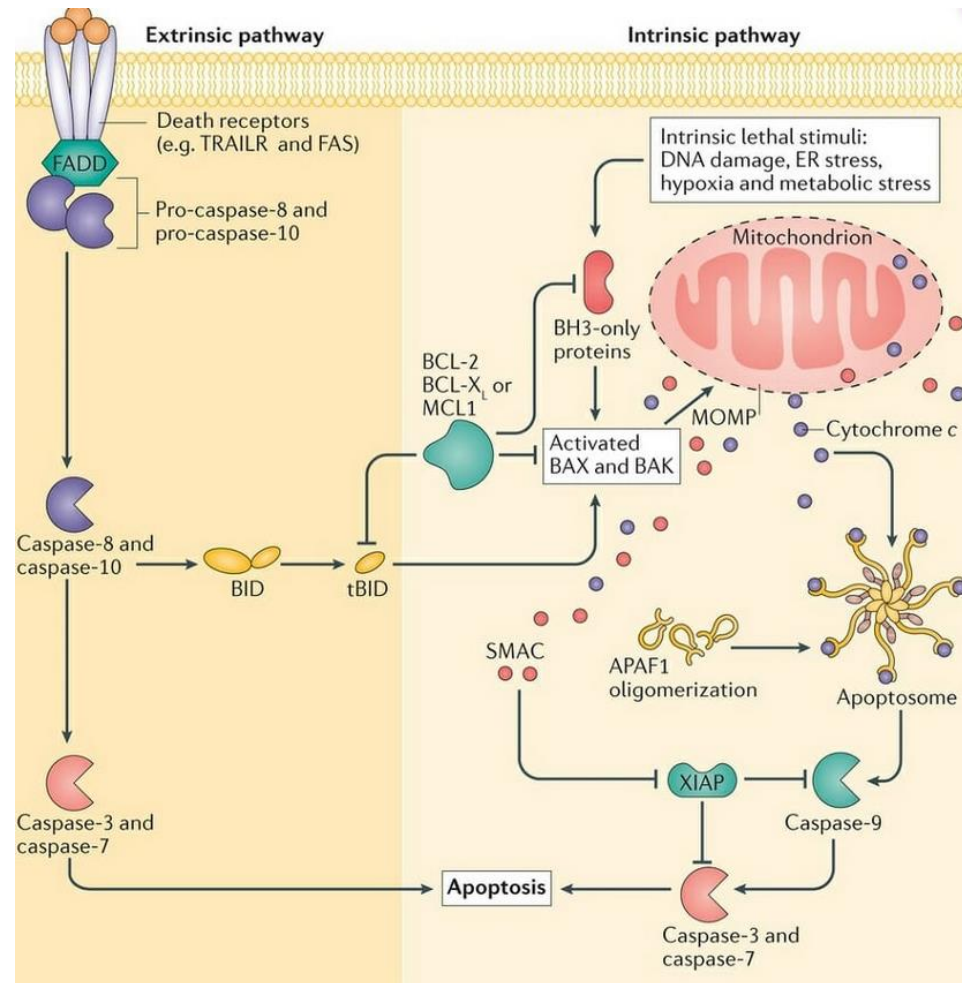
## – AIF

- apoptosis inducing factor
- po translokaci do jádra spouští kondenzaci a fragmentaci chromatinu

## – endonukleáza G

- po translokaci do jádra spouští kondenzaci a fragmentaci chromatinu

# Vnitřní apoptotická dráha



Zdroj: online dostupné z <https://biologydictionary.net/apoptosis/#foobox-1/0/Extrinsic-and-intrinsic-apoptotic-signalling-pathways.jpg>

# Propojení obou apoptotických drah

- na úrovni **efektorových kaspáz**
- vnější dráha může aktivovat dráhu vnitřní
  - kaspáza-8 může proteolyticky štěpit a aktivovat proapoptotický faktor Bid
  - inhibice antiapoptotických proteinů Bcl-2
  - aktivace proapoptotických proteinů Bax a Bak
  - spuštění vnitřní apoptotické dráhy



# Apoptóza a p53

## – p53

- strážce genomu
- indukce apoptózy na základě neopravitelného poškození DNA
- spousta molekulárních mechanismů
- rozdělení
  - závislé na ovlivnění transkripce
  - nezávislé na ovlivnění transkripce

# Apoptóza a p53

## – p53 transkripčně aktivuje

- transkripci proapoptotických členů rodiny Bcl-2
  - Bax
  - Bak
- proapoptotických faktorů obsahujících pouze doménu BH3
  - Bid
  - PUMA (p53 up-regulated mediator of apoptosis)
  - NOXA
- strukturního proteinu apoptozomu Apaf-1

## – p53 transkripčně tlumí

- exprese proteinů inhibujících apoptózu IAPs
  - survivin

# Apoptóza a p53

## – PUMA a NOXA

- spouští vnitřní apoptotickou dráhu
- aktivují proteiny
  - Bax
  - MOMP

## – nezávisle na transkripci

- p53 se váže na antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-xL
- inhibice jejich účinku

## – ovlivňuje i vnější apoptotickou dráhu

- transkripčně aktivuje receptor pro Fas
- dokáže zvýšit transport Fas z cytoplasmatických zásob → interakce Fas-FADD → zvýšení citlivosti buněk k apoptóze (ligand Fas)

# Poškození apoptózy

- nádorové buňky
- hlavní získaný znak nádorové buňky
- poškození DNA nebo aktivace onkogenů → indukce apoptózy
  - mutace
  - buňky nereagují díky získaným mutacím
  - buňky přežívají a dále proliferují
  - akumulují další mutace

# Poškození apoptózy

## Vnější apoptotická dráha

### – na úrovni receptorů smrti

- Fas
- TRAIL

### – receptor i ligand Fas

- indukce UV zářením
- indukce apoptózy v keratinocytech po spálení kůže na slunci
  - zajišťují ochranu před vznikem nádorů kůže
- somatické mutace v genu *Fas* nebo změny na úrovni jeho exprese
  - leukémie
  - neuroblastom
- nádorové buňky exprimují ligand Fas a buňky imunitního systému, které mají na povrchu receptor pro Fas → indukce apoptózy
  - nádor uniká před imunitním systémem

# Poškození apoptózy

## Vnější apoptotická dráha

- exprese receptorů smrti TRAIL-R1 a TRAIL-R2
  - potlačena delecemi jejich genů nebo epigeneticky hypermetylací jejich promotorů
- některé nádory
  - zvýšená exprese TRAIL-R3 a TRAIL-R4
  - bránění buněk indukci apoptózy
  - nepředávají signály smrti
    - mutační inaktivace cytoplazmatické domény (TRAIL-R3)
    - zkrácení proteinu v oblasti domény smrti (TRAIL-R4)
  - extracelulární doména má zachovanou schopnost vychytávat ligandy smrti
  - proapoptotický signál není transdukován do cytoplazmy

# Poškození apoptózy

## Vnější apoptotická dráha

### – některé nádory

#### – vysoká hladina proteinu c-FLIP

- váže se na adaptorový protein FADD
- brání navázání a aktivaci prokaspázy-8

#### – mutace genů kódujících kaspázy

- gen pro kaspázu-8
  - mutačně inaktivován u kolorektálního karcinomu
  - epigeneticky umlčen metylací promotoru u nemalobuněčného karcinomu plic nebo nádoru dětského věku neuroblastomu
- geny pro kaspázu-7 a kaspázu-10
  - inaktivačně mutovány u některých hematologických malignit
    - nádory žaludku

#### – široké spektrum poškození kaspáz

- delece
- inaktivační mutace
- epigenetické umlčení

# Poškození apoptózy

## Vnitřní apoptotická dráha

- mnohem častější
- mutace jsou výsledky přirozené selekce a následných klonálních expanzí
- mutace ovlivňující dráhu p53
  - nejčastější mutace v nádorových buňkách
  - funkční poškození či deregulace hladin nádorového supresoru p53 (jiné komponenty signalizační dráhy)
  - výhoda nádorové buňky
  - nedochází k apoptóze v důsledku poškození DNA
  - přenos do dalších generací



# Poškození apoptózy

## Vnitřní apoptotická dráha

### – proteiny p63 a p73

- sekvenční homology p53
- transkripční doménu, DNA-vazebnou doménu a oligomerizační doménu
- aktivují řadu genů regulovaných také p53 → potlačení buněčného růstu nebo indukce apoptózy

#### – p63

- funkce ve vývoji různých typů tkání
- zárodečné mutace jsou spojeny s různými malformačními syndromy

#### – p73

- nádorový supresor
- abnormální metylace nebo ztráta heterozygotnosti genu pro p73
  - lymfomy
- některé varianty p73 se chovají jako onkogeny
  - $\Delta Np73$ 
    - inhibitor proteinu p53
    - nádory prsu
    - gynekologické nádory

# Poškození apoptózy

Vnitřní apoptotická dráha

- **mutace genů signálně nadřazených p53**
  - *ATM*
  - *CHK2*
- **nádory s wild-type p53**
  - mutace a poškození na úrovni proteinu MDM2
- **na úrovni genů**
  - nejlépe popsán *BCL2*
  - gen pro Apaf-1

**MUNI**  
**PHARM**

**Děkuji za pozornost**

[SoldanovaZ@pharm.muni.cz](mailto:SoldanovaZ@pharm.muni.cz)