

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

BUNĚČNÁ SMRT

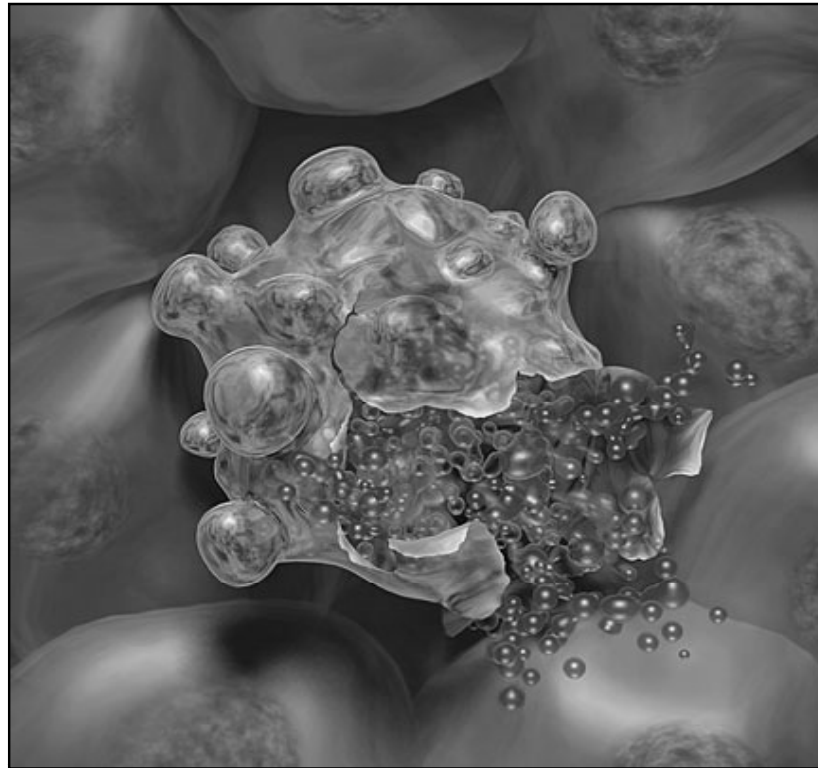
Mgr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

*„For every cell,
there is a time to live and a time to die.“*



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Program přednášky:

- typy buněčné smrti
- nekróza
- autofagie
- apoptóza
- metodické přístupy ke studiu apoptózy
- apoptóza a medicínské aspekty

TYPY BUNĚČNÉ SMRTI

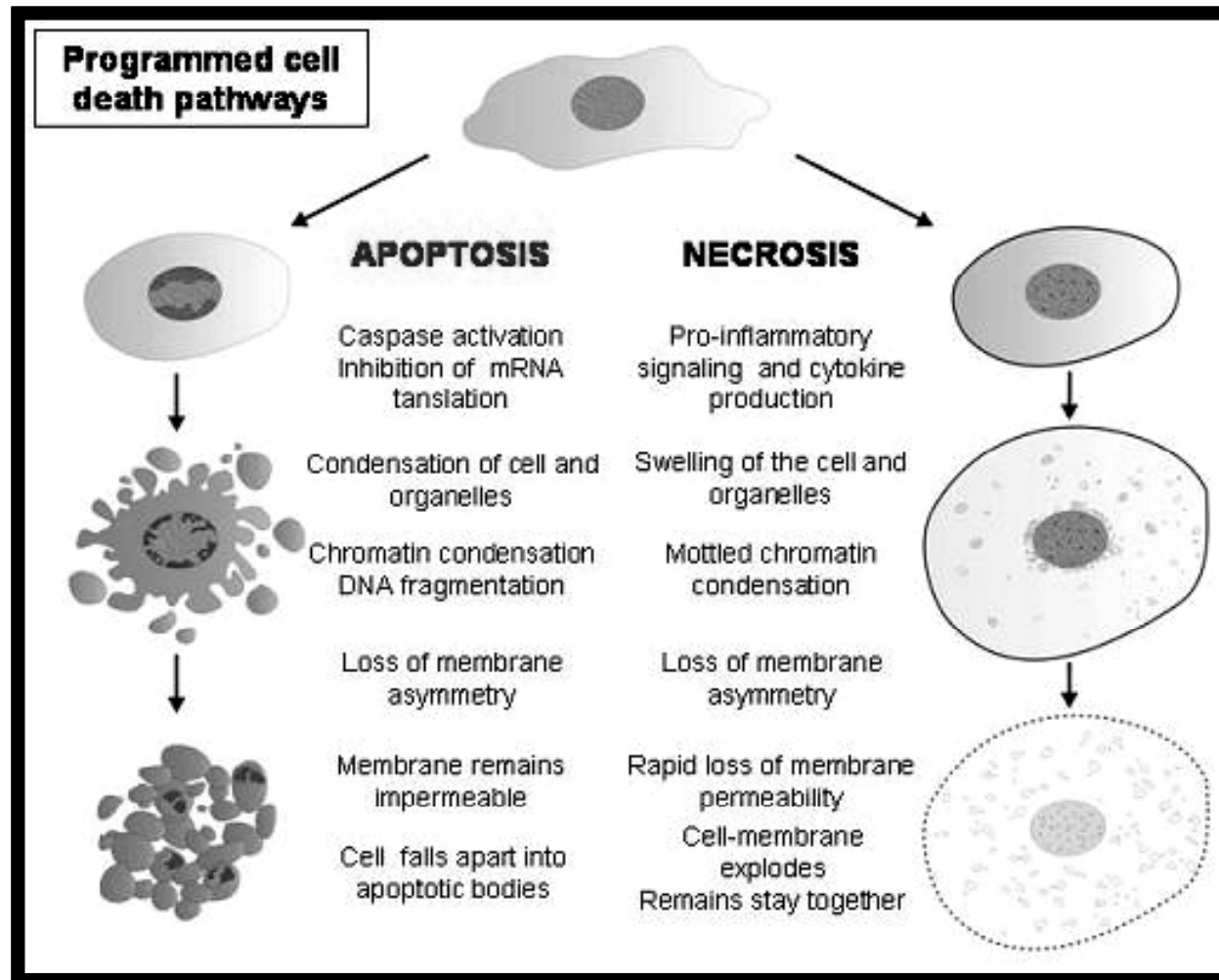
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Původní dělení způsobů buněčné smrti:

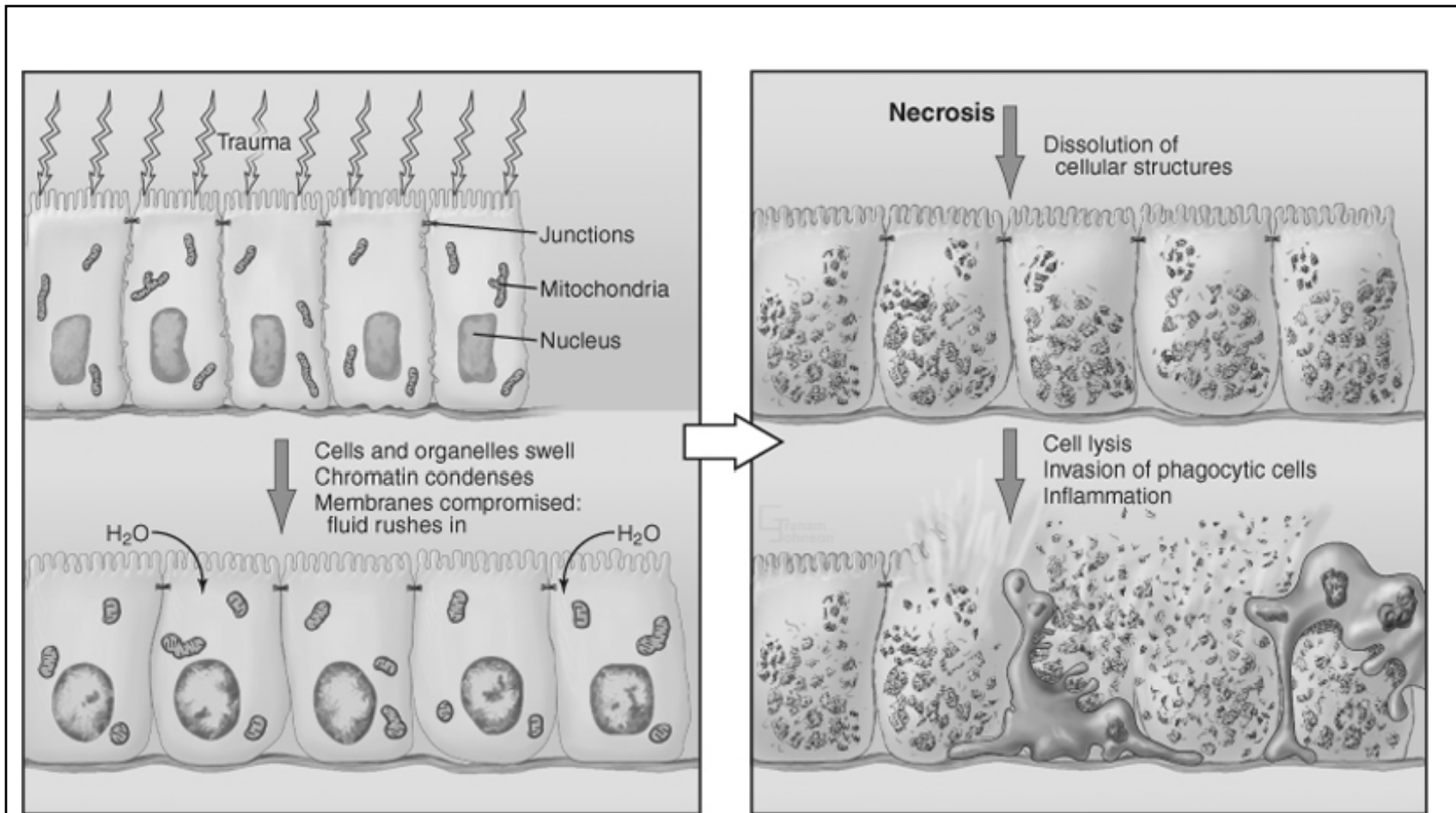
- smrt v důsledku působení škodlivého vnějšího faktoru:
náhodná (accidental) buněčná smrt
= *nekróza*
- smrt jako indukovaná sebevražda:
programovaná (programmed) buněčná smrt
= *apoptóza*
- *onkóza*
- *postapoptotická nekróza*

Buněčná smrt:

- katastrofická buněčná smrt
 - nekróza
- fyziologická buněčná smrt
 - apoptóza
(programmed cell death type I, PCDI)
 - kaspáza-dependentní
 - kaspáza-independentní
 - autofagie
(programmed cell death type II, PCDII)

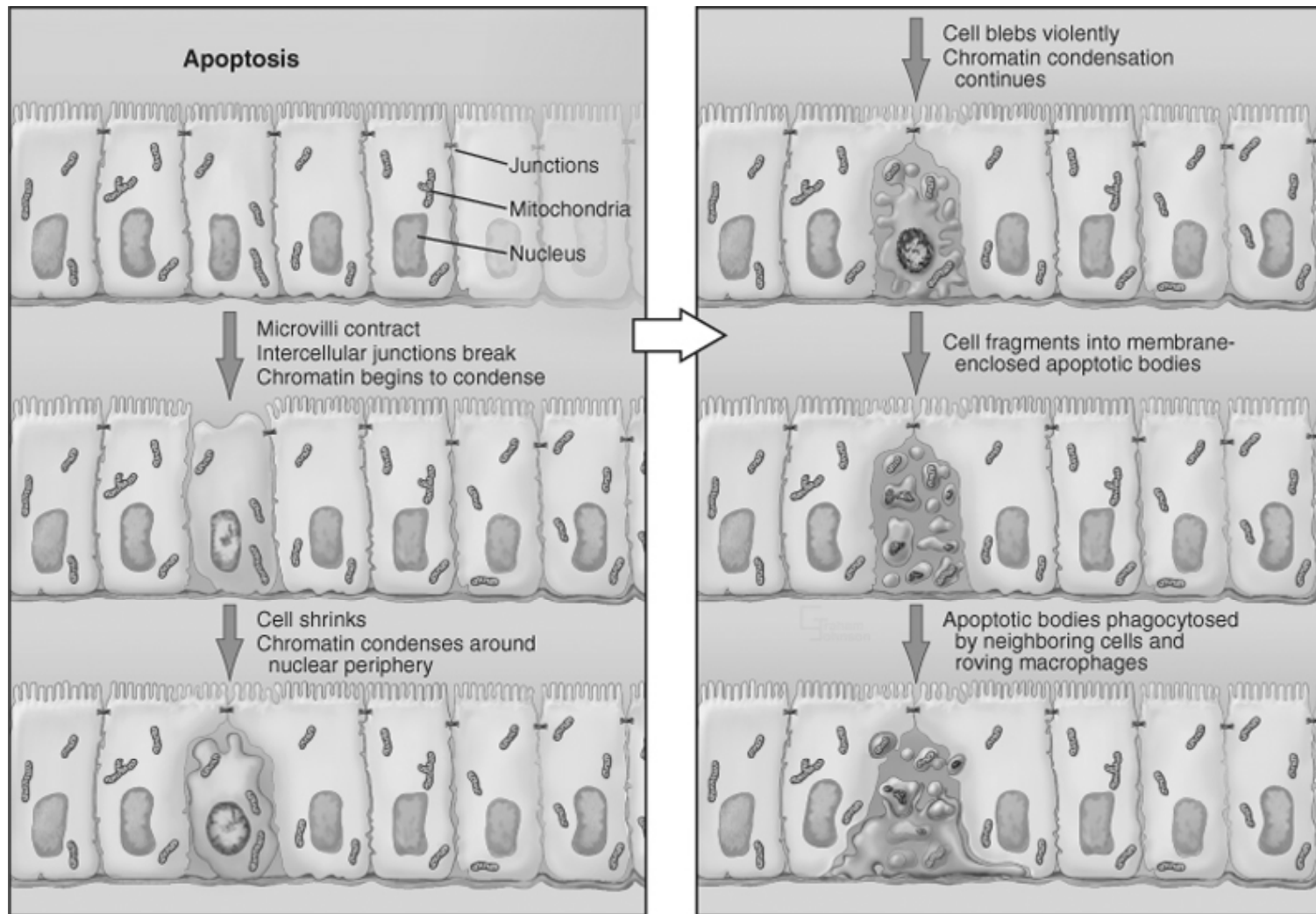


Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

KATASTROFICKÁ (NEPROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

NEKRÓZA

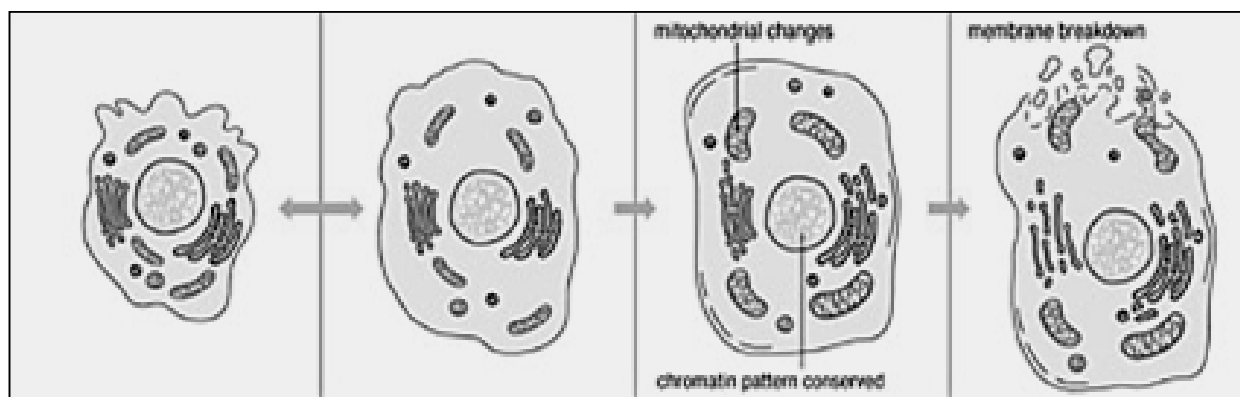
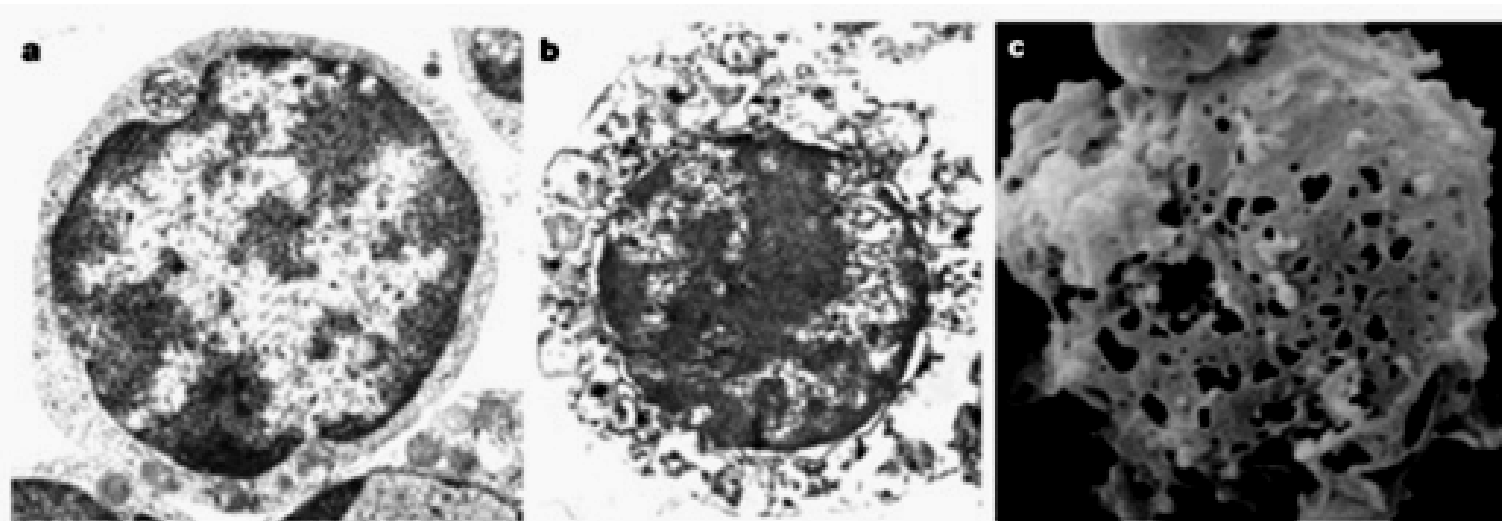
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Indukce nekrózy

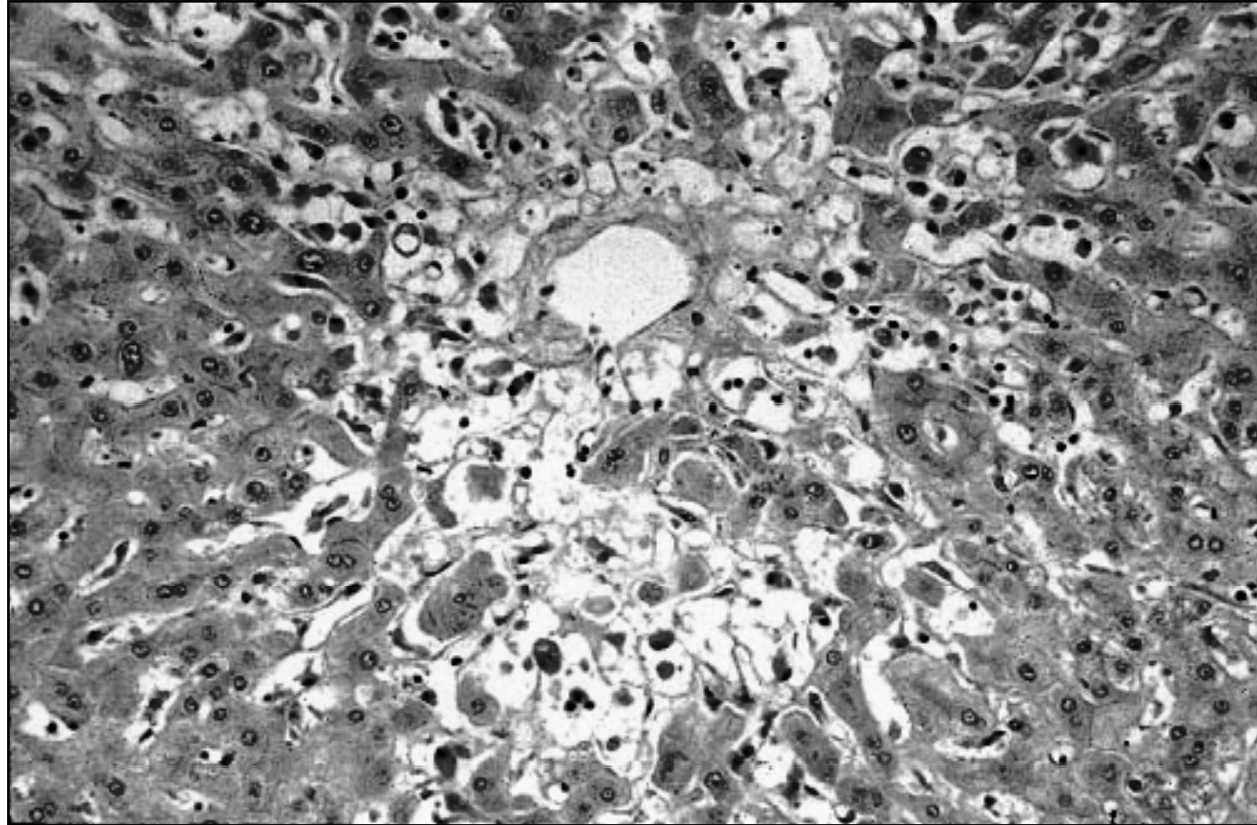
- a) rozsáhlé poškození, při němž už nemohou být aktivovány mechanismy apoptózy
- b) působení stresových faktorů
 - změny koncentrace iontů, pH...
 - vyčerpání zdrojů energie
 - změny teploty
 - poškození buňky nebo jejích organel

Příznaky a průběh nekrózy:

- poškození mitochondriální membrány
- pronikání iontů Ca^{2+} do mitochondrií
- zakulacení a prasknutí mitochondrií
- ztráta regulace transportu iontů
- zakulacení buňky (swelling)
- lýze buňky
- vznik nekrotického ložiska
- invaze makrofágů
- zánětlivá reakce



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



nekrotické ložisko ve tkáni

Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

FYZIOLOGICKÁ (PROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT (Programmed Cell Death, PCD)

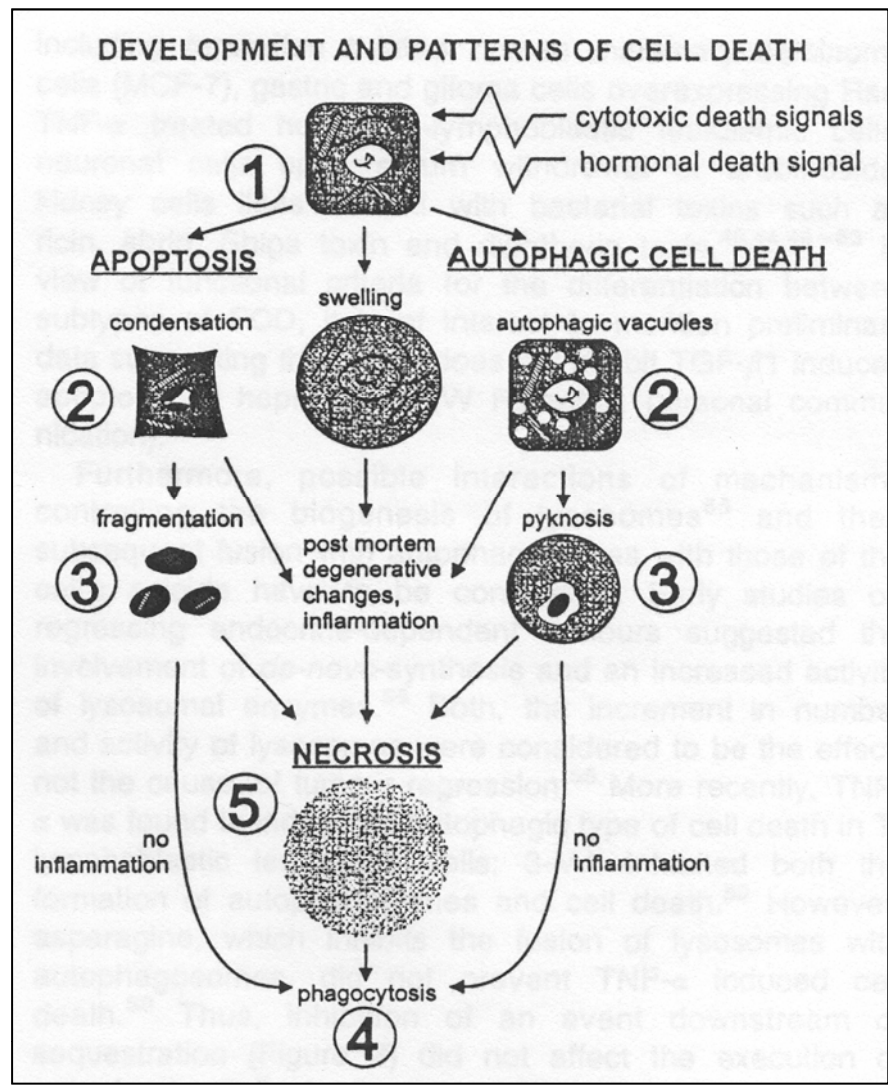
- indukovaný, regulovaný a selektivní proces pro vyřazování určitých buněk

Apoptóza (apoptosis, type I PCD)

- kaspázy
- kalpainy, katepsiny, granzymy

Autofagie (autophagy, type II PCD)

- autofagozomy/autolysozomy
(lysozomální proteázy)



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

AUTOFAGIE (PCDII)

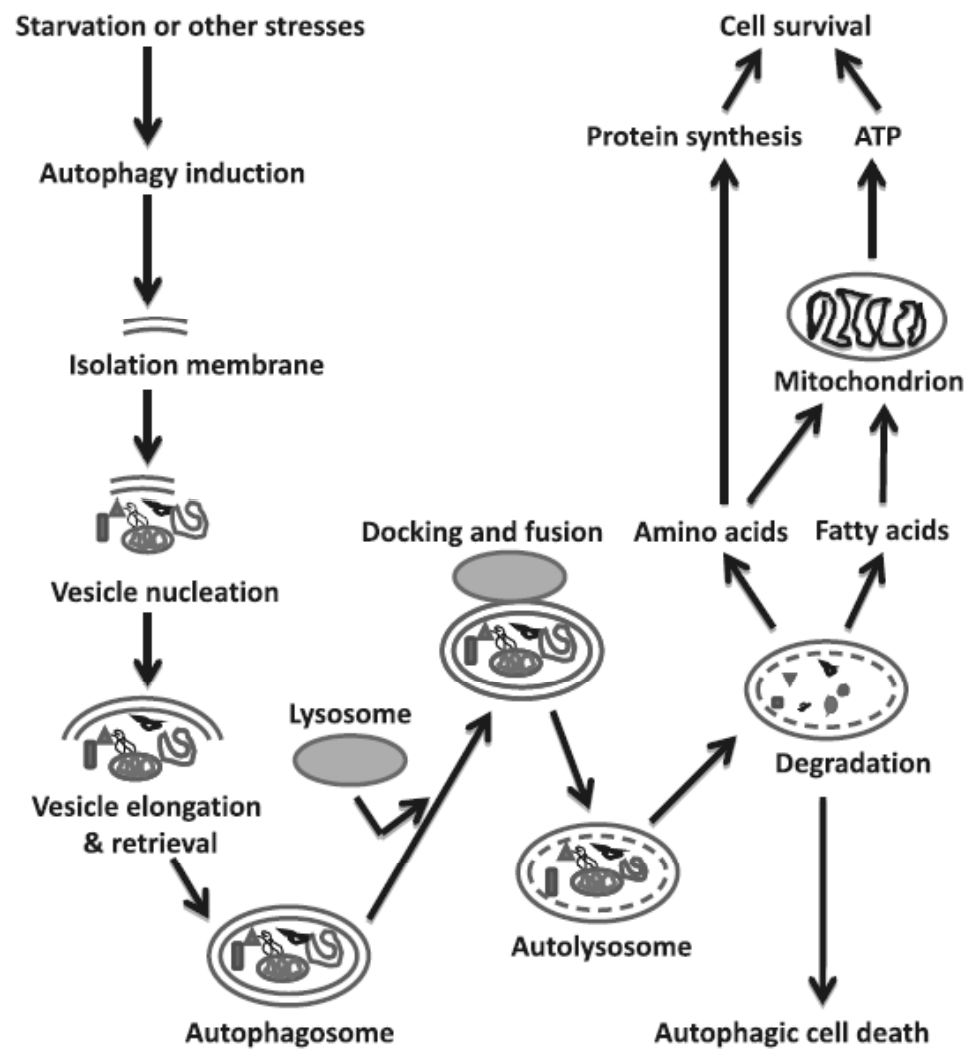
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Průběh autofagie

1. indukce (např. inhibice mTOR signální dráhy)
 2. vytvoření autofagosomu (nejasný původ, ER?)
 3. vazba a fúze s lysosomem
 4. rozpad autolysosomálního veziklu
- účast savčích homologů genů *Atg* (kvasinky)

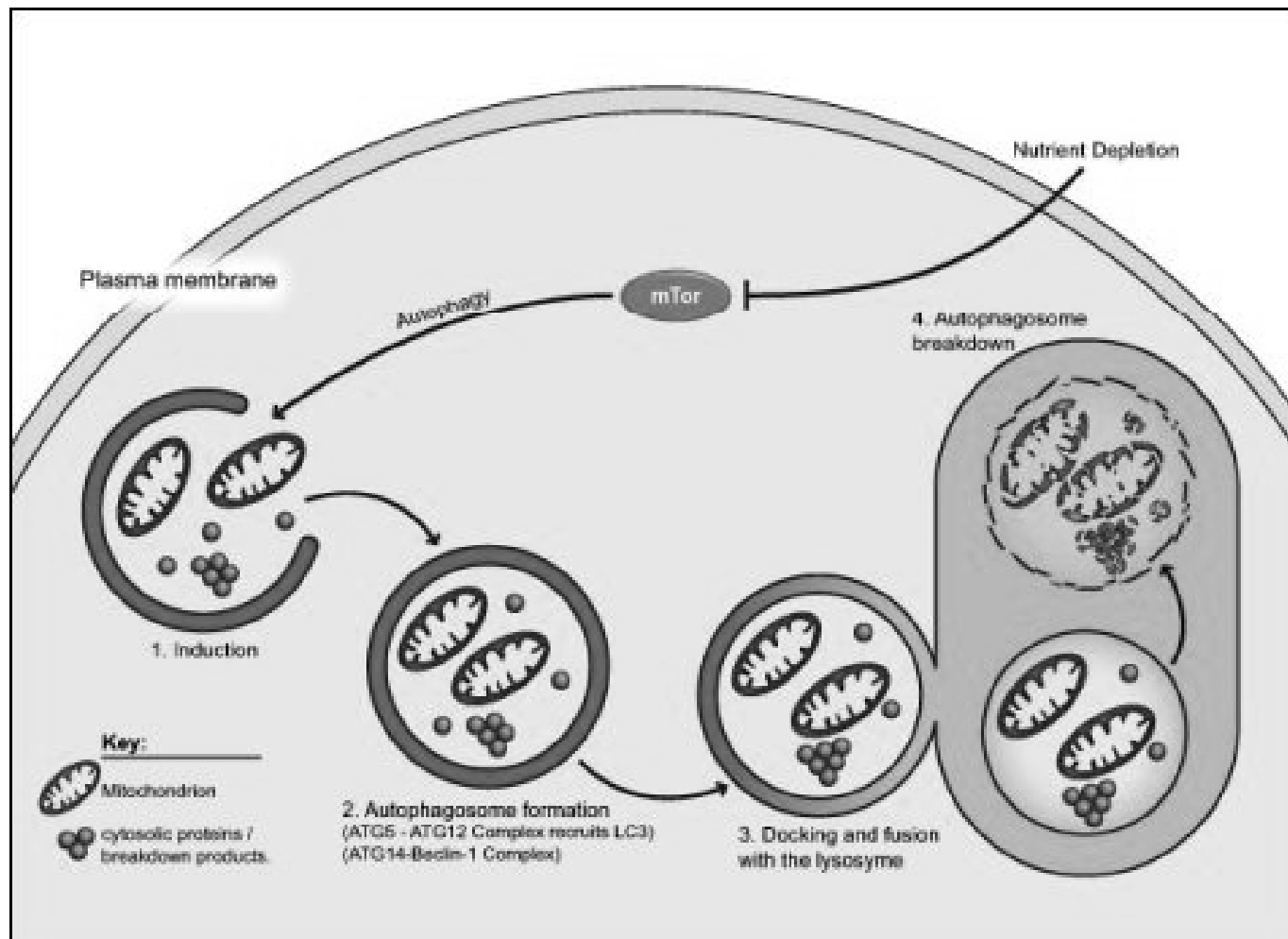
Typy autofagie:

- mikroautofagie (transfer do lysosomu přímou invaginací)
- makroautofagie (vznik autofagosomu)
- chaperon-mediated autofagie (CMA) - selektivní

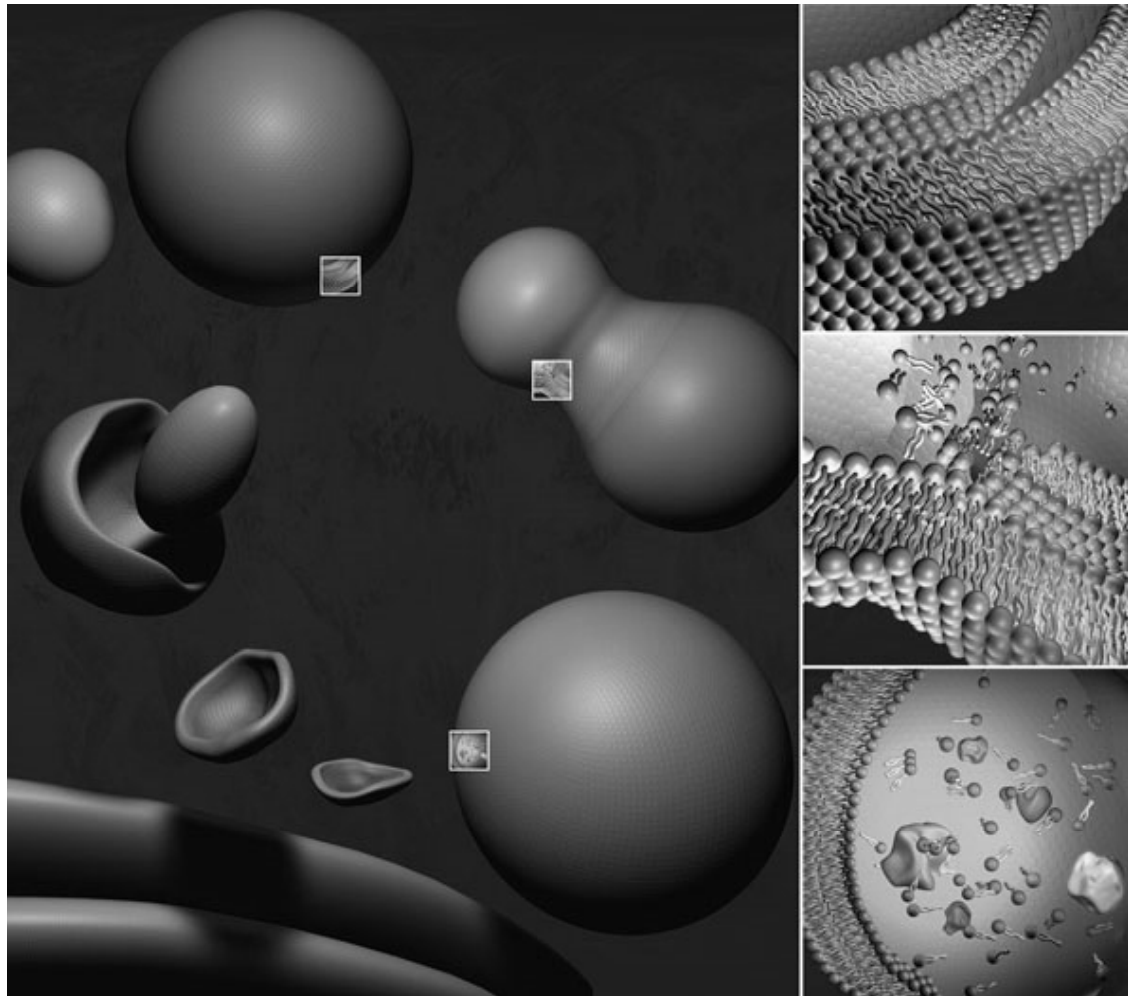


Can. J. Physiol. Pharmacol. 88: 285–295 (2010)

Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



mitochondrie v autofagosomu

APOPTÓZA (PCDI)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

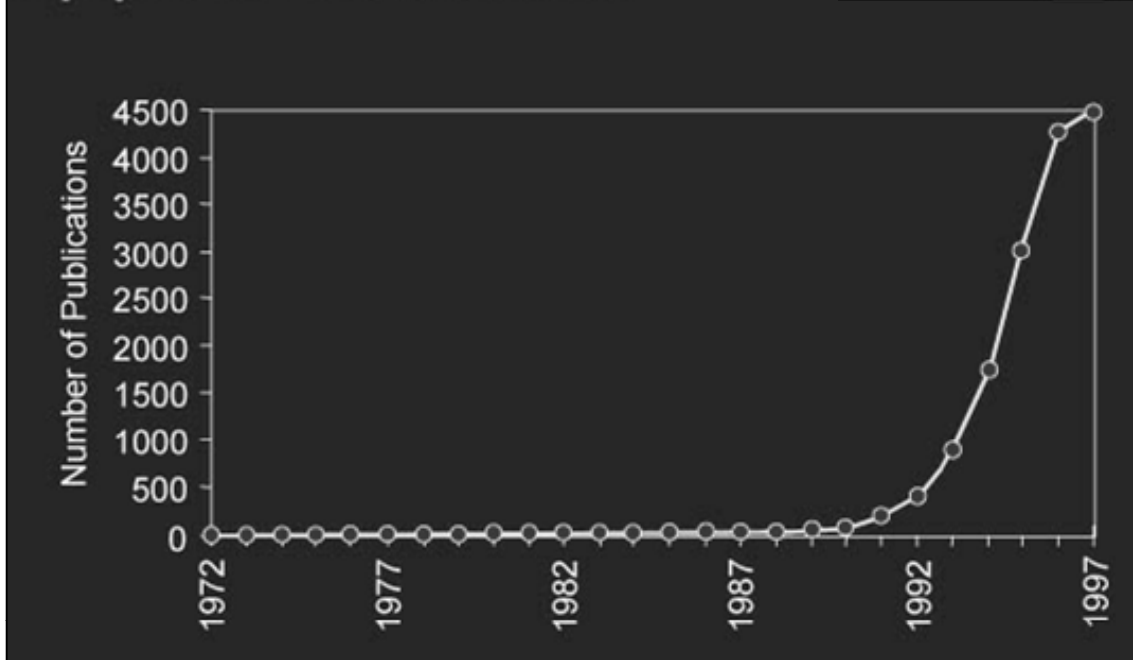
Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.

Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.

British Journal of Cancer (1972) 26, 239.

ΑΠΟΠΤΩΣΙΣ

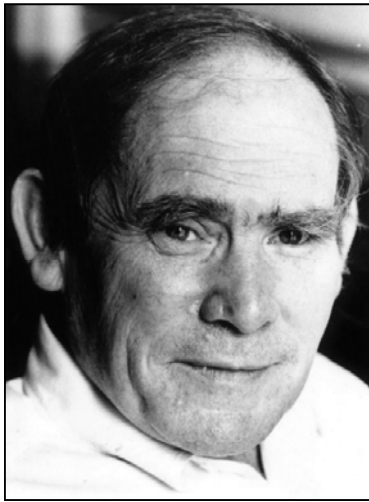
Apoptosis Publications/Year



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

2002 - Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

Sydney Brenner



John E. Sulston



H. Robert Horvitz

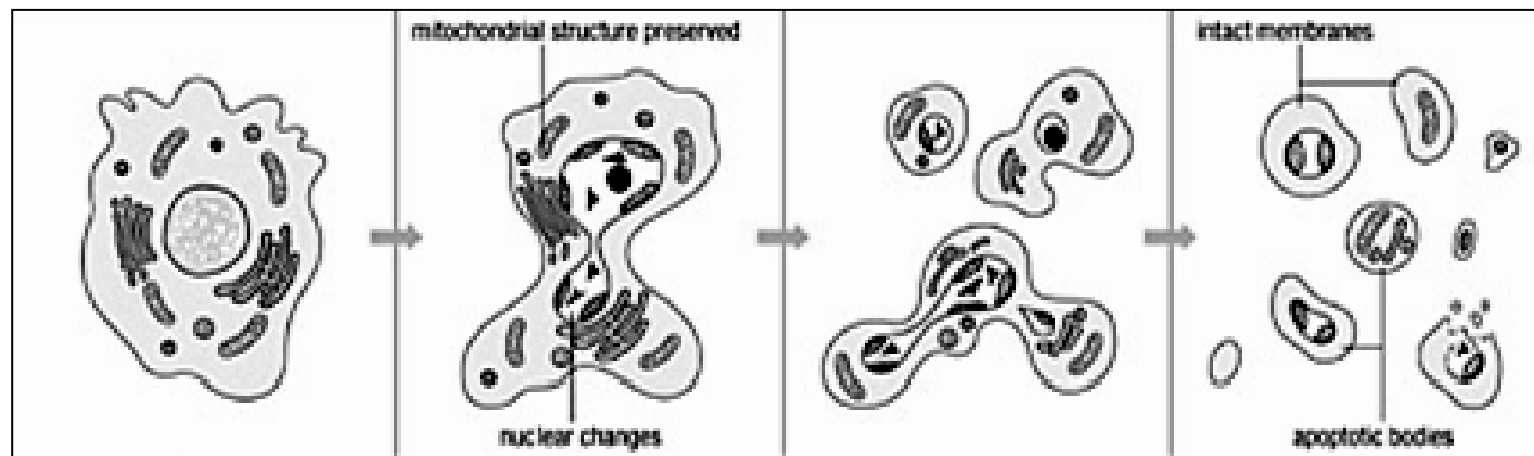
za výzkum genetické regulace vývoje orgánů a
programované buněčné smrti

Caenorhabditis elegans



- 959 somatických buněk = dospělý hermafrodit, z toho 131 podléhá apoptóze
- regulace apoptózy - 14 genů Ced:
Ced-3, Ced-4 - indukce
Ced-9 - represe

Průběh apoptózy:

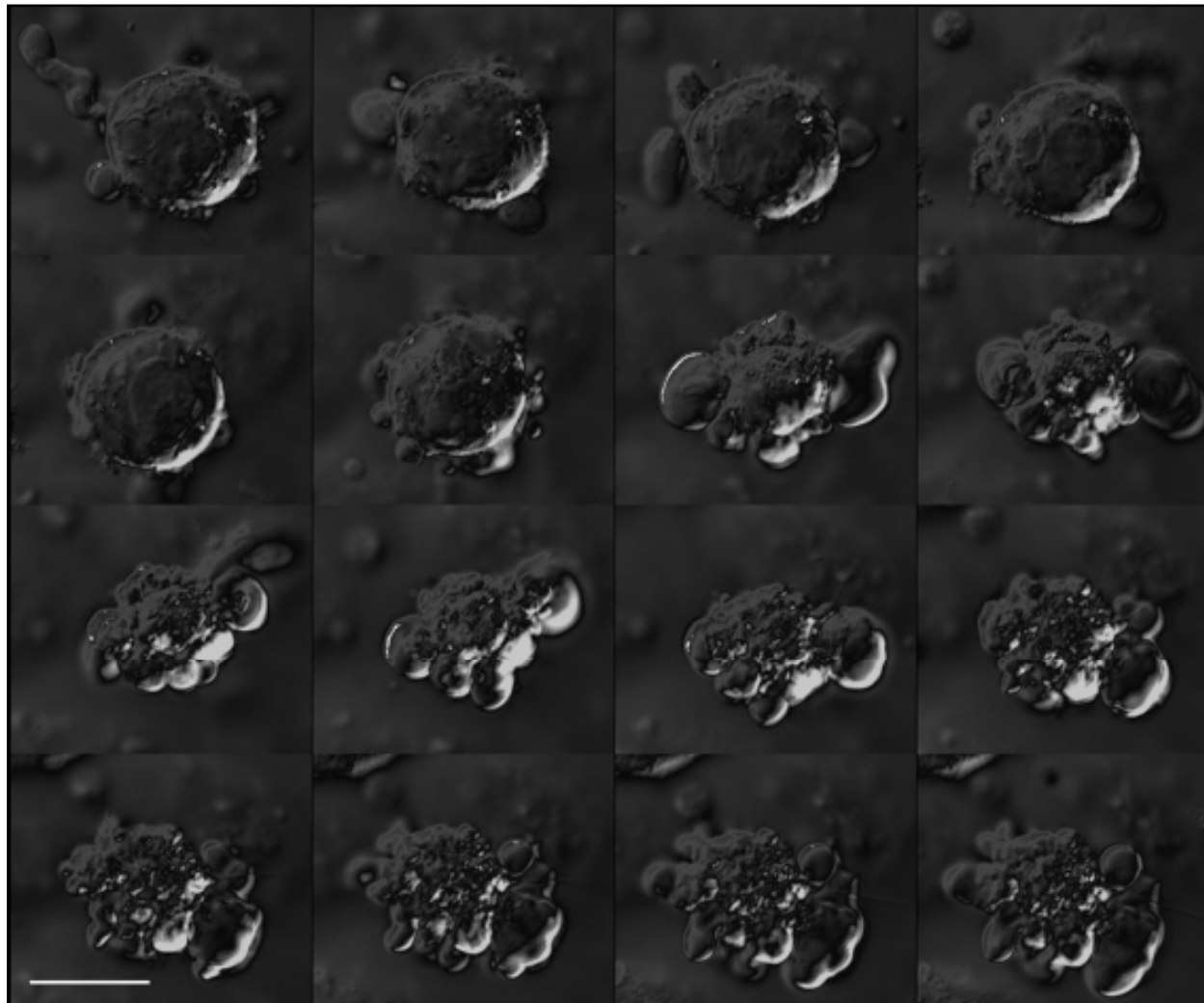


normální
buňka

smršťování

rozpad
(fragmentace)

apoptotická
tělíška
(apo-bodies)

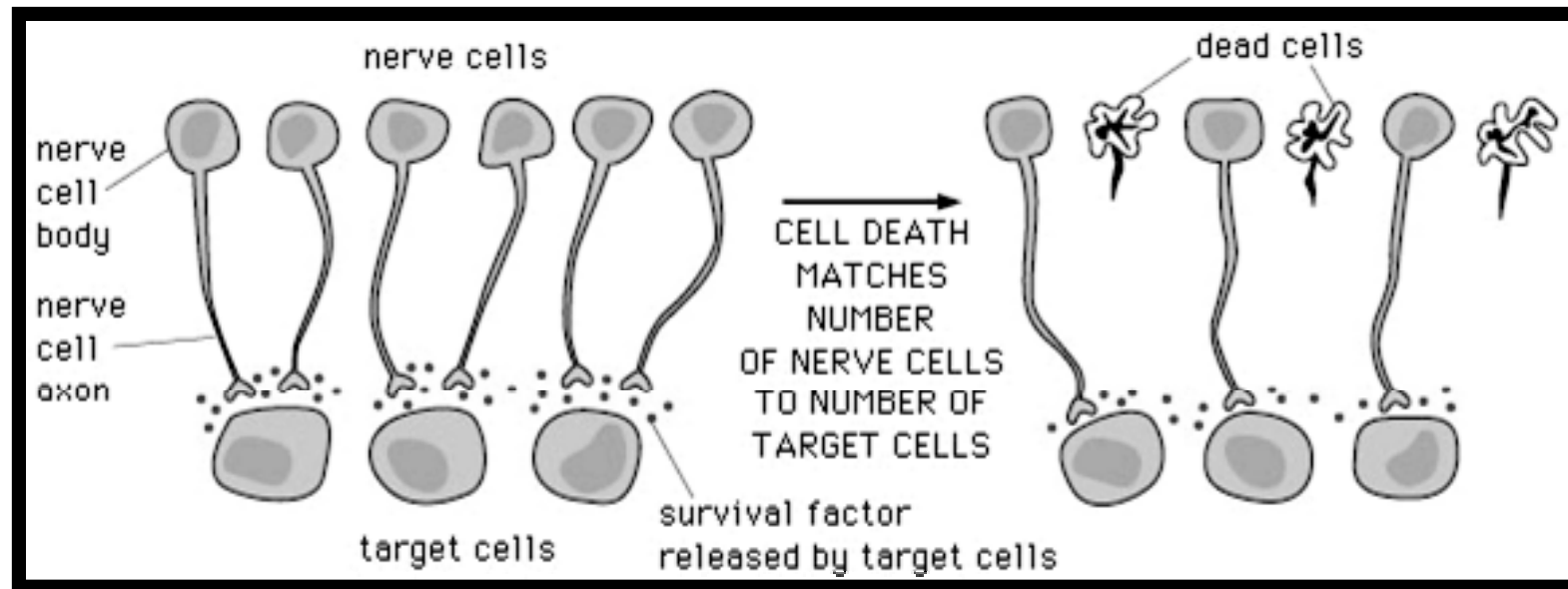


Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

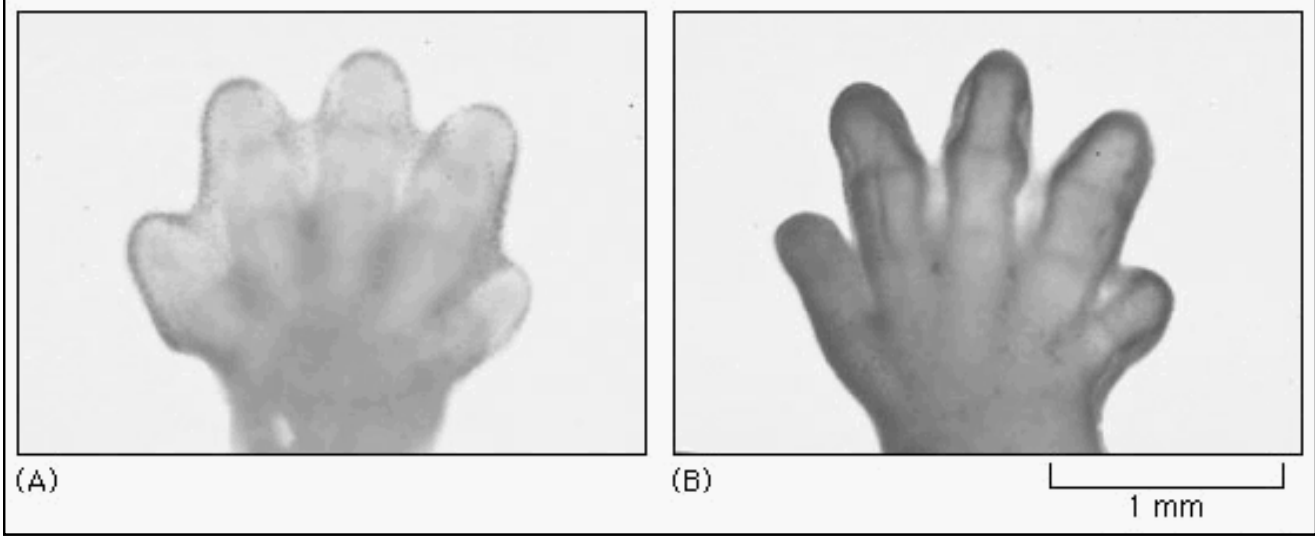
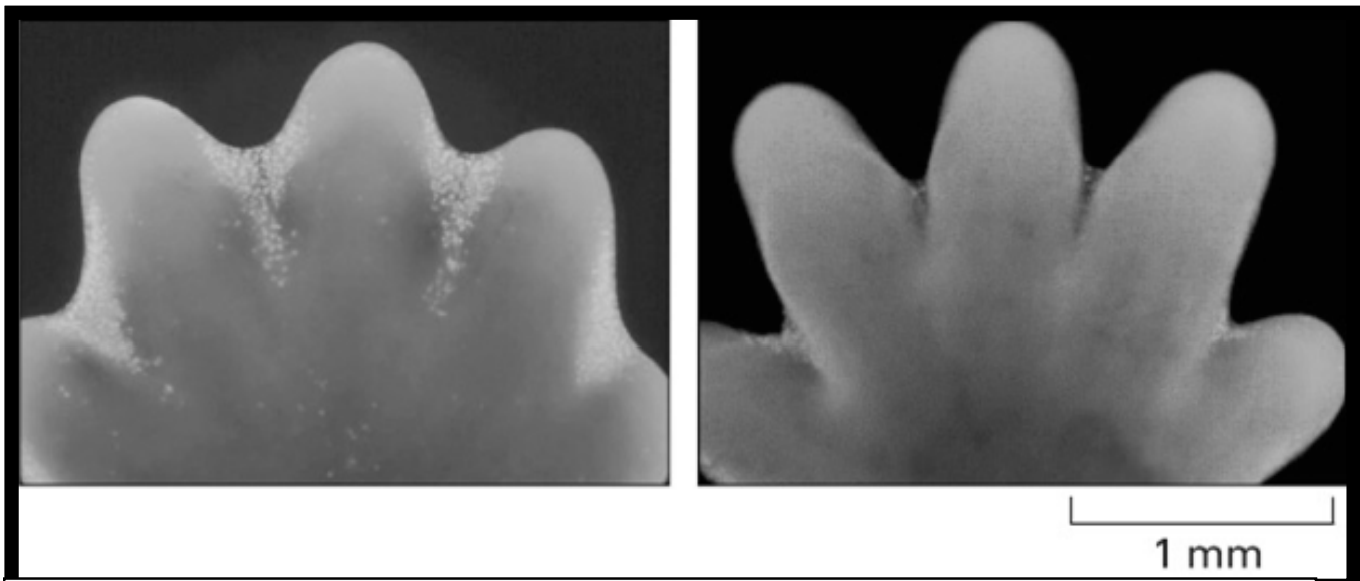
Příčiny apoptózy

1. Apoptóza je nezbytná pro řádný vývoj organismu:

- resorpce ocásku během metamorfózy pulce v žábu
- odstranění tkáně mezi prsty během embryogeneze
- odstranění nadbytečných neuronů při vytváření synapsí v mozku
- uvolňování endometria na počátku menstruace



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



syndaktylie (defekt apoptózy)

Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Příčiny apoptózy

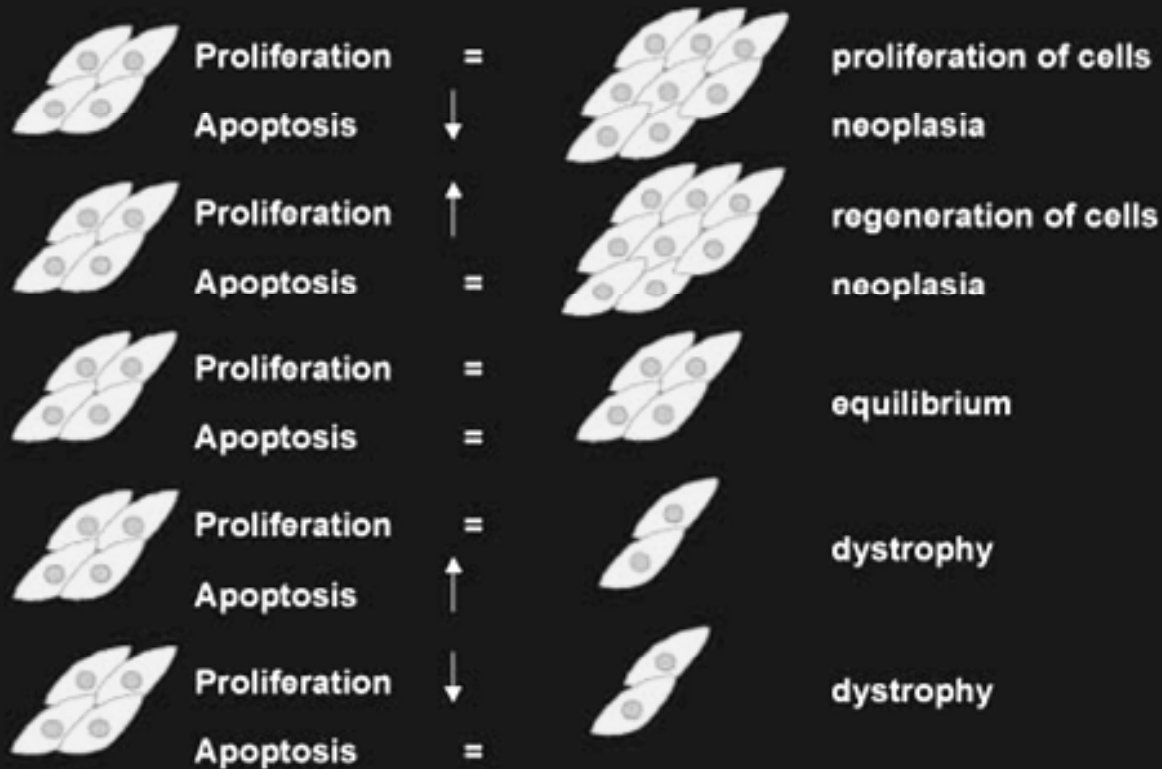
2. Apoptóza je nezbytná pro likvidaci buněk, které představují ohrožení integrity organismu
- buňky infikované viry
 - efektorové buňky imunitního systému po odeznění imunitní odpovědi
 - buňky s poškozením DNA
zvýšená produkce proteinu p53
(induktor apoptózy)
 - nádorově transformované buňky

Morphology



Diagnosics

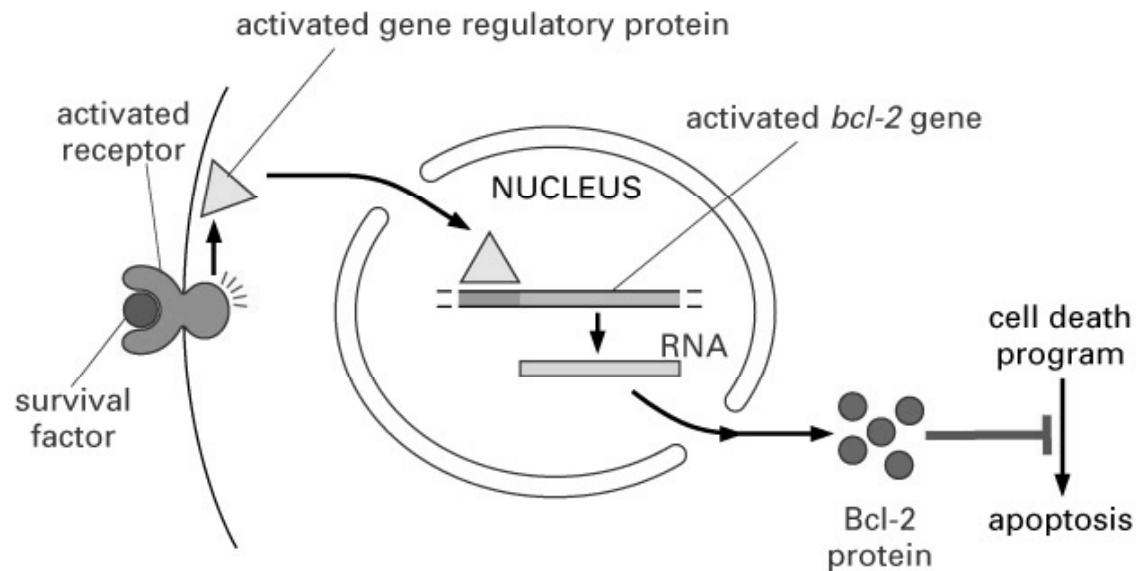
Apoptosis and Cell Proliferation in Tissue Homeostasis



Indukce apoptózy

Odstranění pozitivního signálu

- růstové faktory - neurony
- Interleukin 2 (IL-2) - lymfocyty



Indukce apoptózy

Přijetí negativního signálu

- zvýšení hladiny oxidačních látek v buňce
- poškození DNA (volné radikály, UVR, gama záření, chemoterapeutika)
- molekuly (death activators), které se napojují na specifické receptory (death receptors)

Morfologické a biochemické příznaky apoptózy

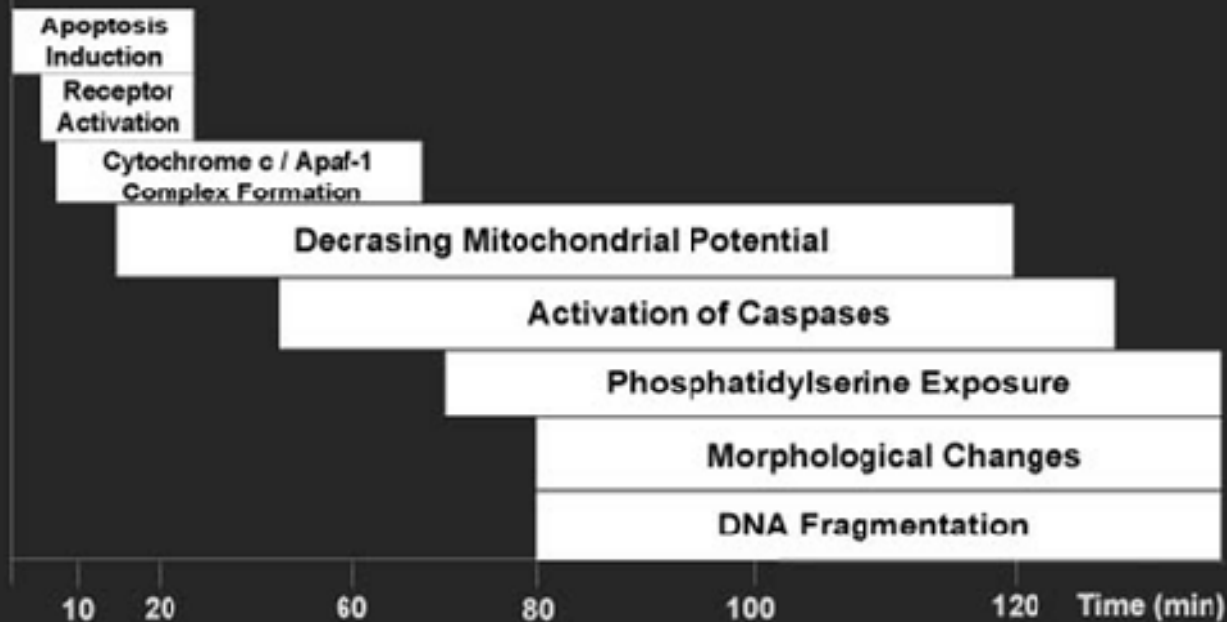
1. zmenšení (smrštění) buňky
2. poruchy mitochondrií a uvolnění cyt-C
3. blebbing plazmatické membrány
4. změny v plazmatické membráně
5. kolaps jádra (degradace chromatinu)
6. zvýšená aktivita transglutaminázy
7. aktivace kaspáz, proteolytické štěpení
8. rozpad buňky na apoptotická tělíska
9. fagocytóza apoptotických tělísek

Roche Molecular Biochemicals



Diagnosics

Hallmarks of Apoptosis



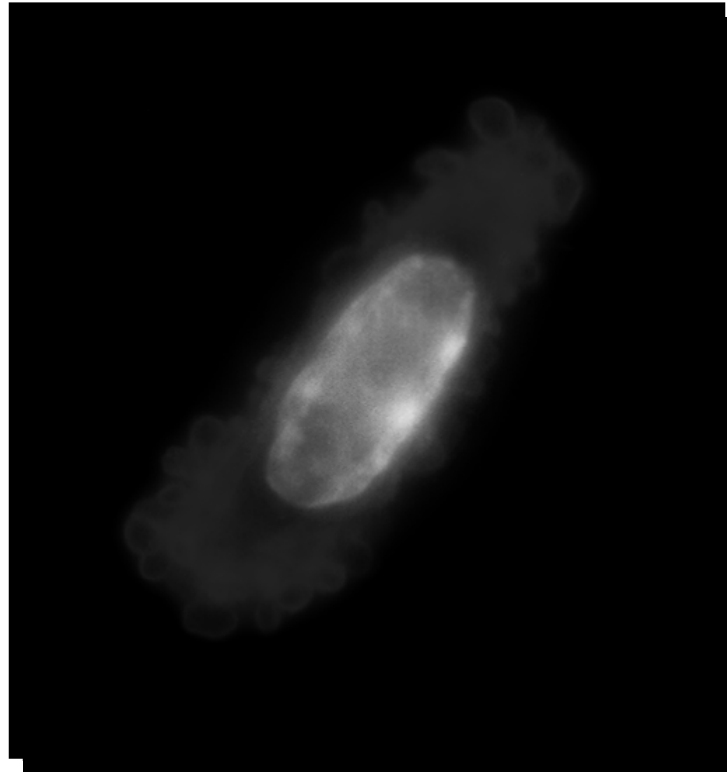
HeLa cells, apoptosis induction with TNF α / Actinomycin D

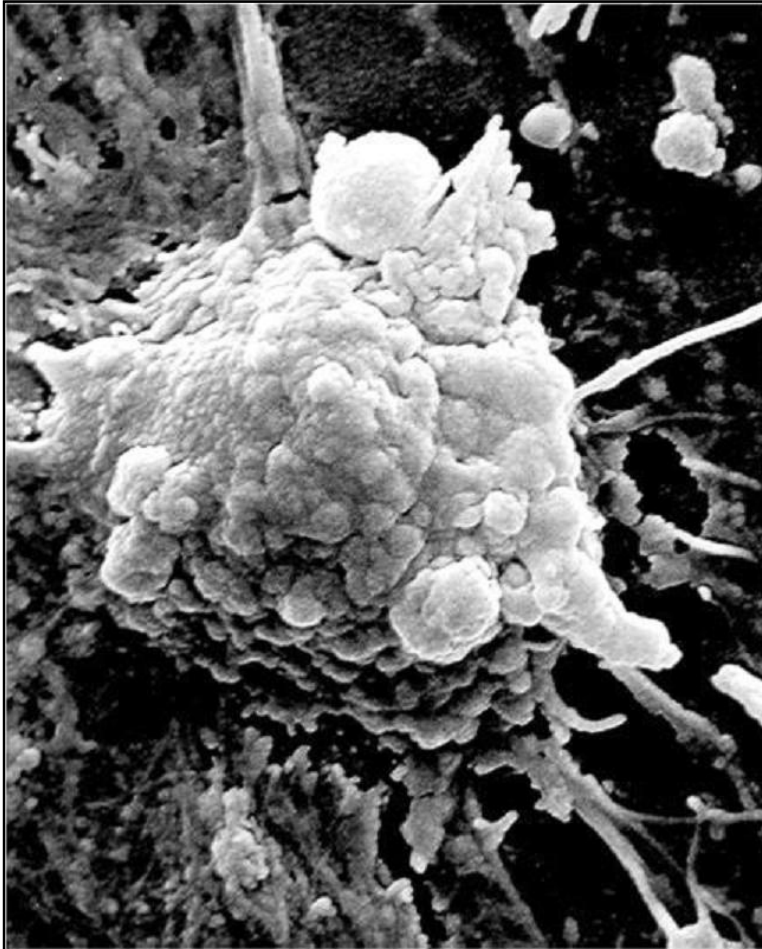
Metodické aspekty studia apoptózy

- morfologické příznaky (1972)
blebbing membrány, kondenzace chromatinu, kolaps jádra, vznik apo-bodies
- fragmentace DNA (1987)
fragmenty: ladder, zlomy v řetězcích: TUNEL
- aktivace proteolytické kaskády (1995)
produkty proteolytického štěpení
- změny plazmatické membrány (1997)
externalizace fosfatidylserinu: annexin-V
- změny mitochondrií (1998)
změny permeability mitochondriální membrány, detekce Cytochomu C a AIF

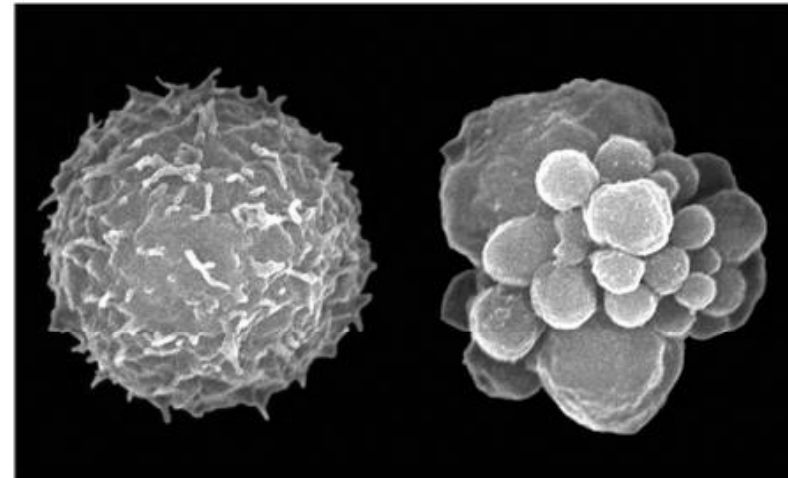
Blebbing plazmatické membrány

- degradace kortikálního cytoskeletu (fodrin, aktin)



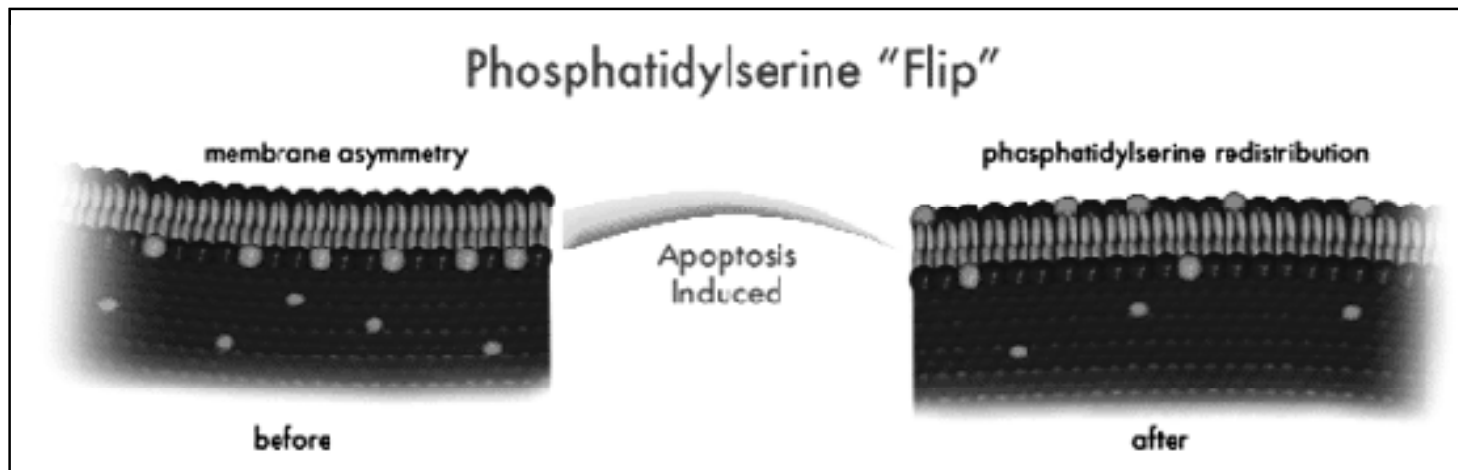


Motoneuron disease: an apoptotic neuron seen by scanning electron microscopy



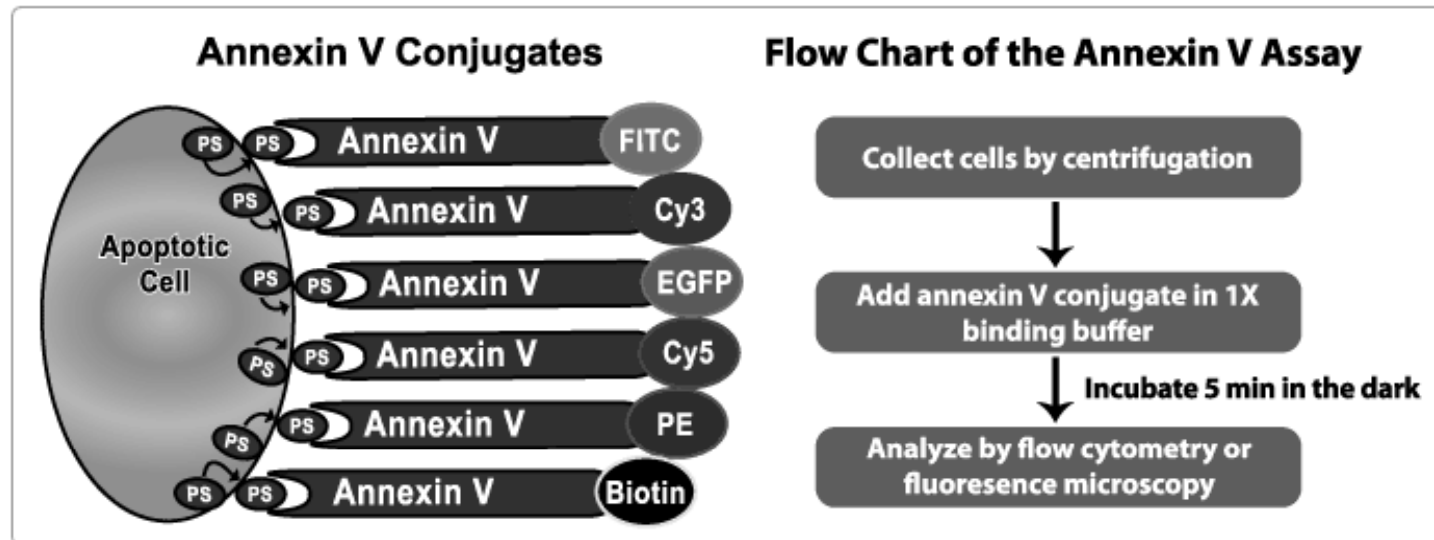
Změny v plazmatické membráně

- externalizace fosfatidylserinu („eat me“ signal)



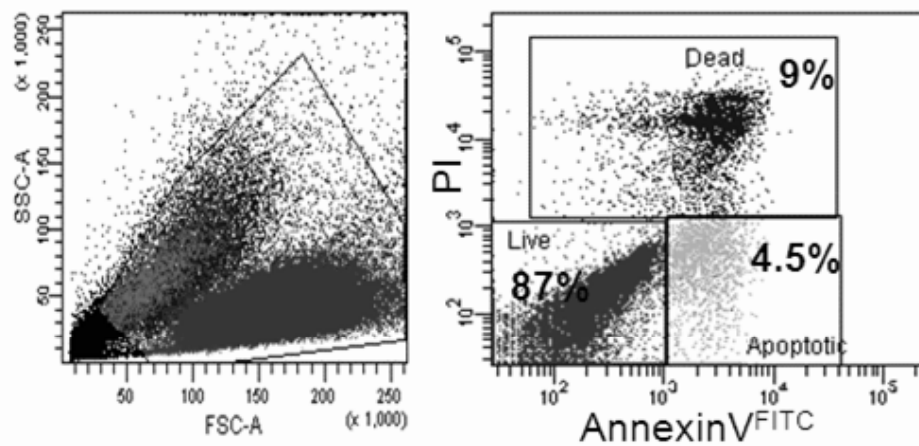
Změny v plazmatické membráně

- detekce fosfatidylserinu – Annexinem V



Změny v plazmatické membráně

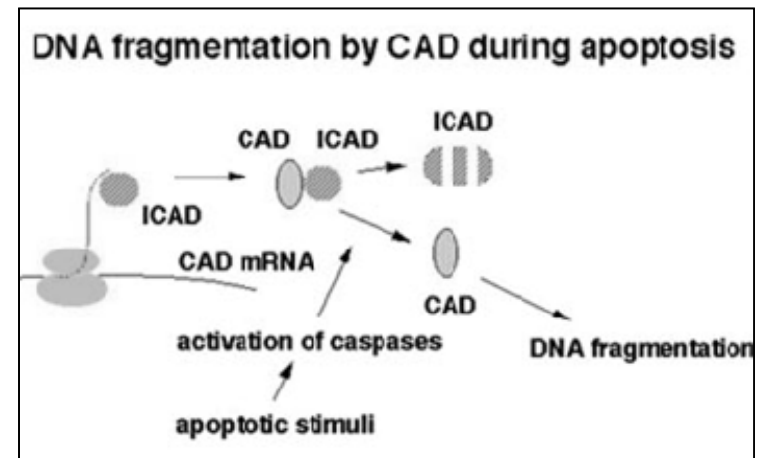
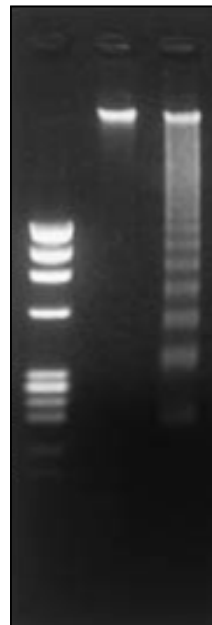
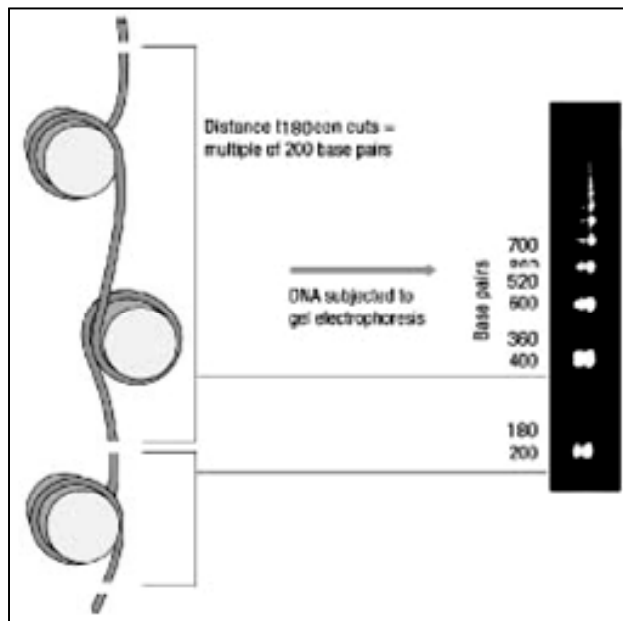
- detekce fosfatidylserinu – Annexinem V
- flow cytometrie



Legend. Jurkat T-cells were **UV-B** irradiated and incubated over night. Cells were labelled with AnnexinV^{FITC} for 15 min at RT with 5 µg/ml PI. Annexin V positive-PI negative events are apoptotic (4.5%) with double positive events showing dead cells (9%) and double negative cells being Alive. Courtesy of the Flow Cytometry Core Facility, ICMS, 4 Newark Street, London E1 2AT.

Kolaps jádra (degradace chromatinu)

- kondenzace chromatinu na periferních oblastech jádra
- internukleosomální štěpení DNA - žebříček (ladder)
- fragmentace jádra

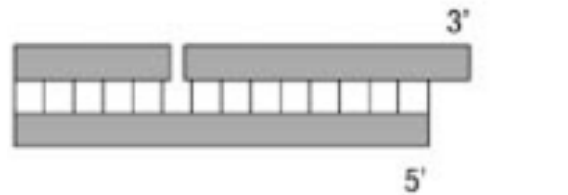


CAD – kaspázou aktivovaná Dnáza
ICAD – inhibitor CAD

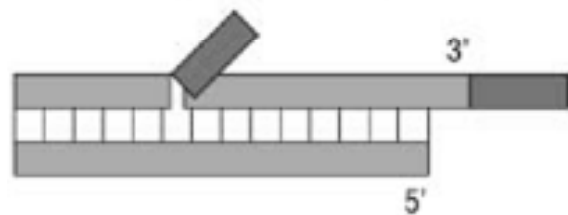
Detekce štěpení DNA:

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase
dUTP nick end labeling

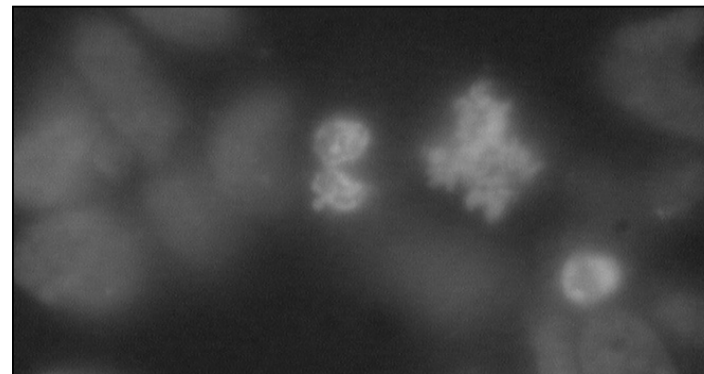
In situ end labeling (TUNEL)
(template independent)



+ Terminal transferase
+ X-dNTP (■)



TUNEL



DAPI

Aktivace proteolytického štěpení

Kaspázy

- cysteinové proteázy, štěpící na karboxyskupině kyseliny asparagové
- caspases = cysteinyl-aspartic-acid-proteases
- 14 druhů kaspáz (u člověka):
 - iniciační (apikální - 8, 9, 10 a 12)
 - efektorové (exekuční - 3, 6 a 7)
 - pro-inflamatorní

Katepsiny, kalpainy, granzymy

Aktivace proteolytického štěpení

Substráty kaspáz

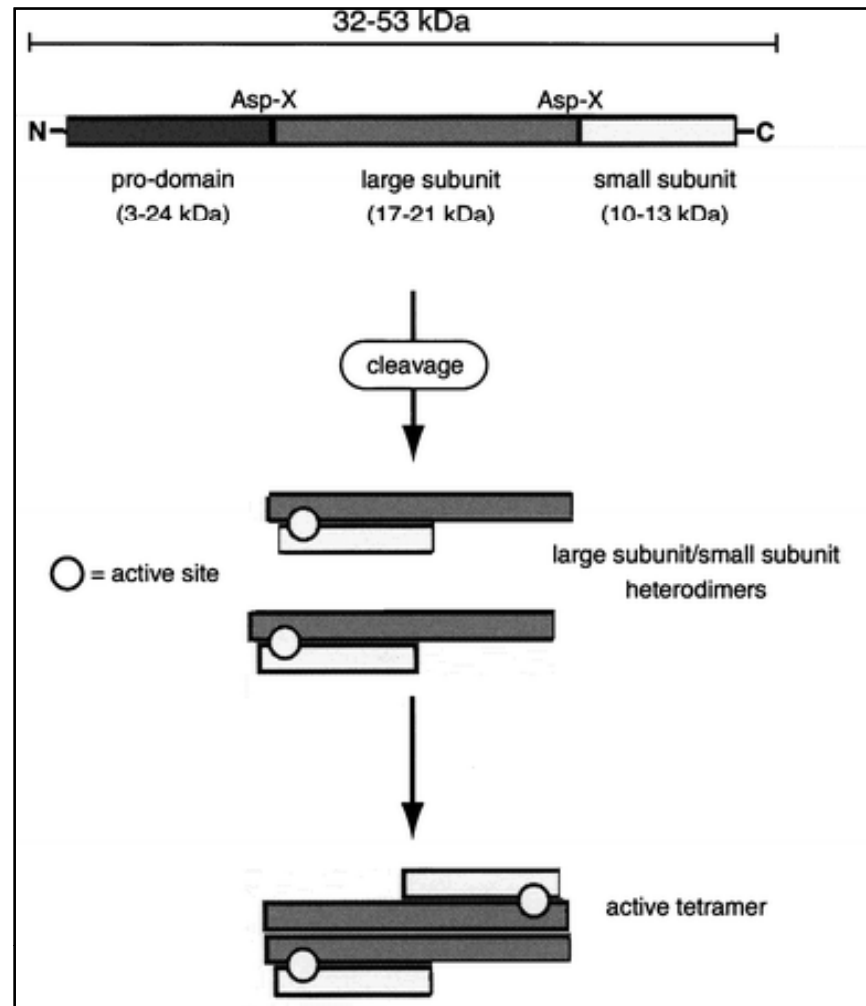
- „cell death“ proteiny (Bcl-2, Bcl-XL, prokaspázy..)
- regulátory b. cyklu (MDM2, p21, Rb, cyklin A..)
- cytoskelet (aktin, fodrin, keratiny, laminy..)
- DNA metabolismus (ICAD, PARP..)
- RNA metabolismus
- signální dráhy
- TF
- proteiny spojené s neurodegenerativními chorobami

Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení

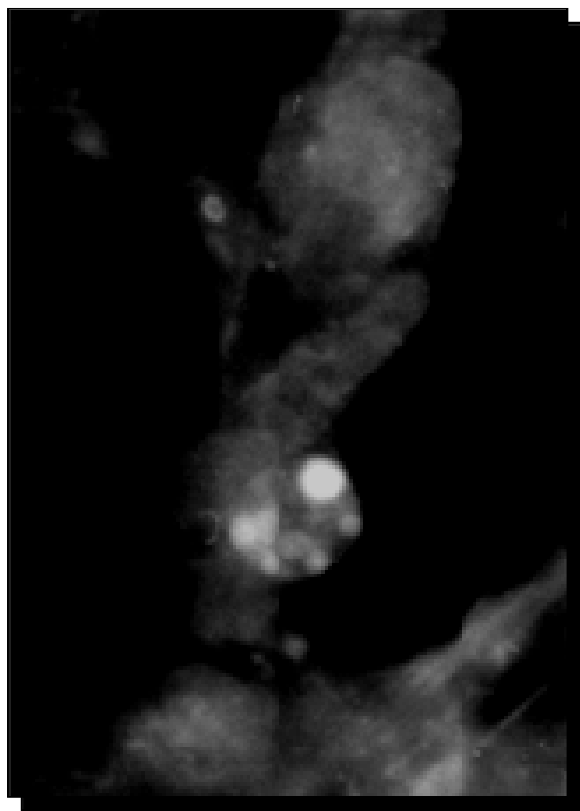
prokaspáza

kaspáza

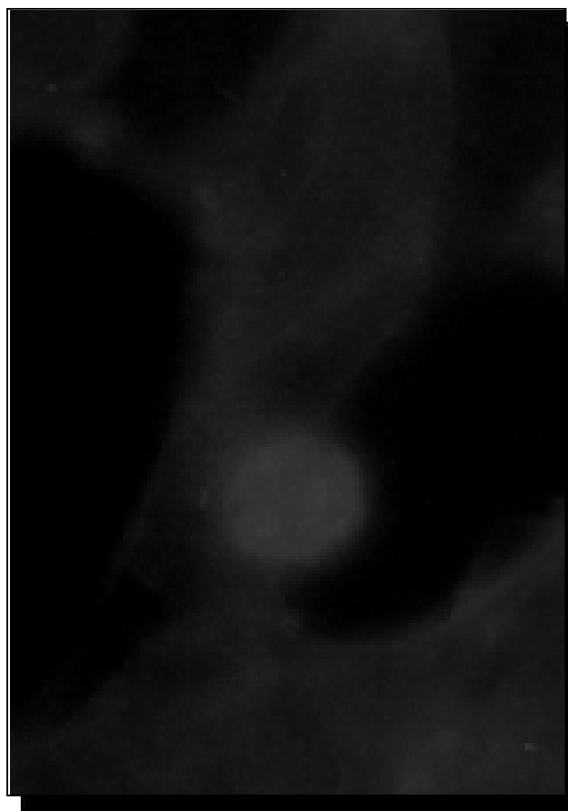
aktivní
kaspáza



Aktivace kaspáz – fluorescenční mikroskopie



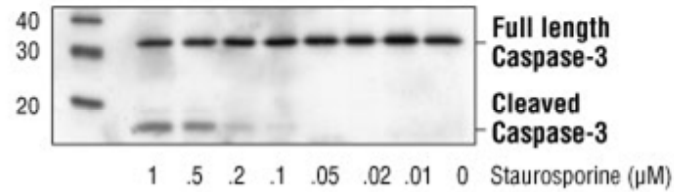
α -tubulin / DAPI



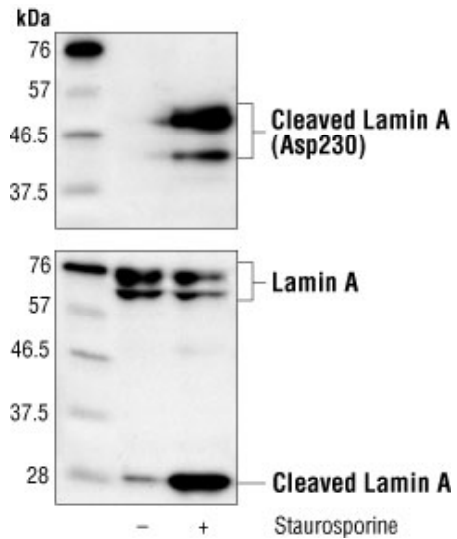
aktivovaná kaspáza 3

Aktivace kaspáz – detekce (WB)

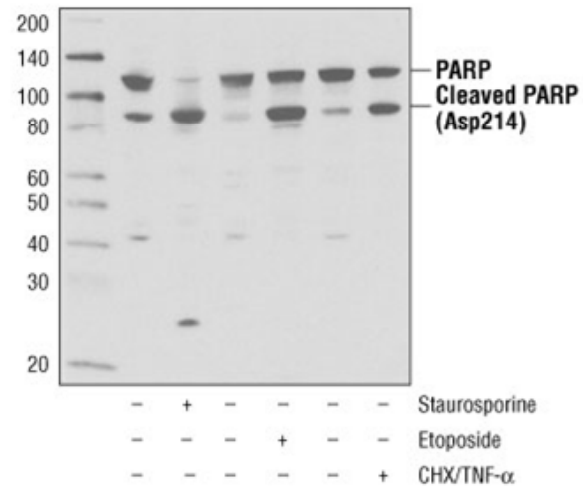
Kaspáza-3



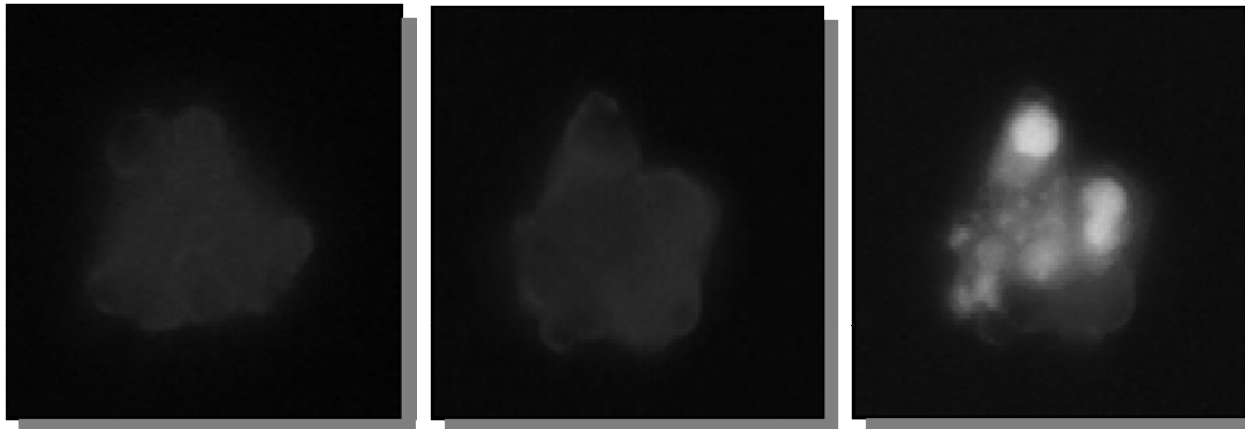
Lamin A



Poly (ADP-ribose) polymerase



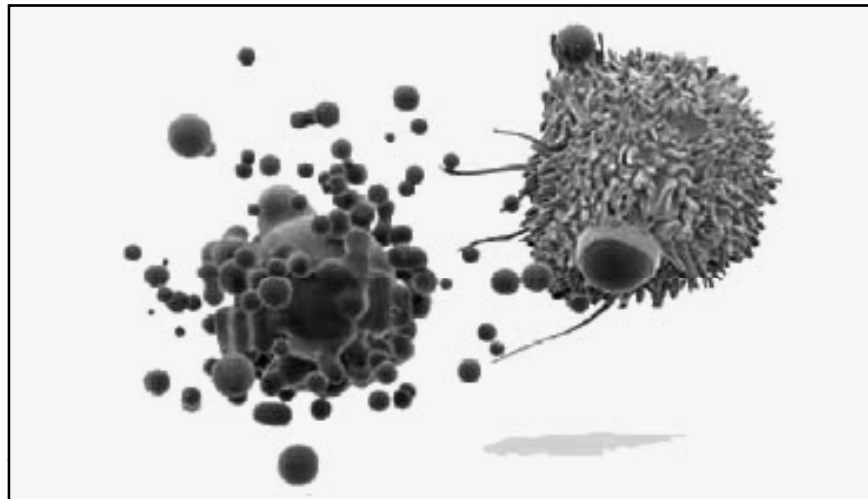
Rozpad buňky na apoptotická tělíška



- účast nově formované aktinové 3D struktury a nesvalového myosinu
- apoptotická tělíška obsahují zbytky jádra, organely a části cytoplazmy

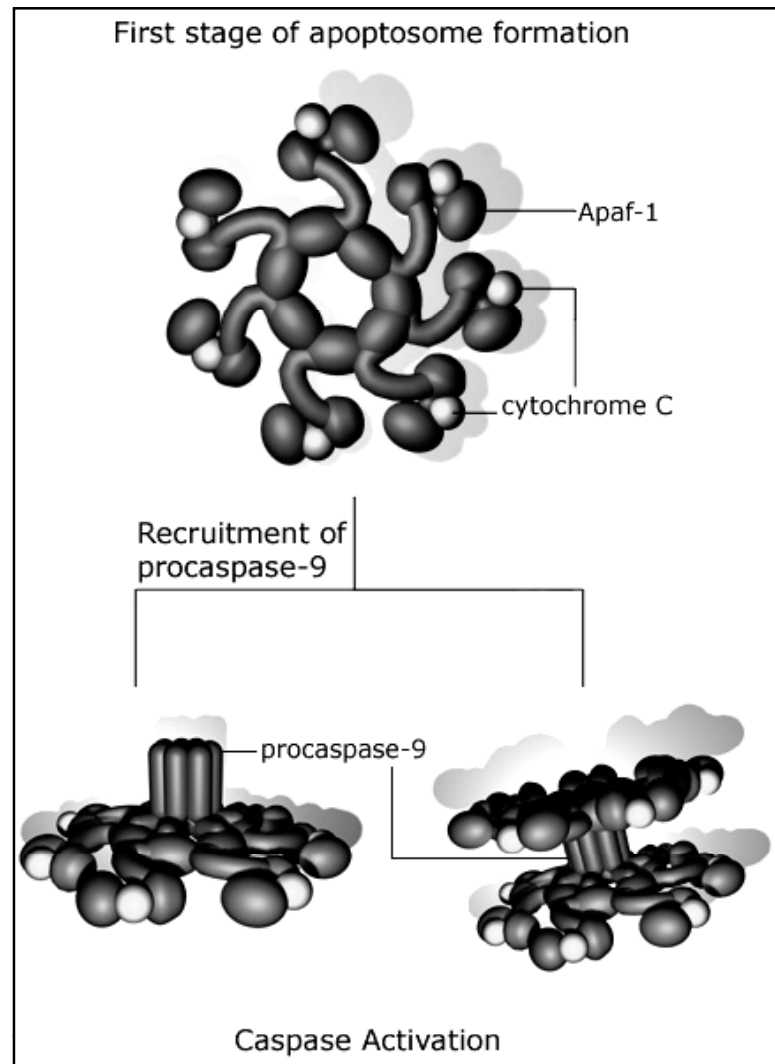
Fagocytóza apoptotických tělísek

- pohlcení apoptotických tělísek okolními buňkami
(makrofágy, dendritické buňky)
- fagocytující buňky vylučují cytokiny, které zabraňují zánětu ve tkáni

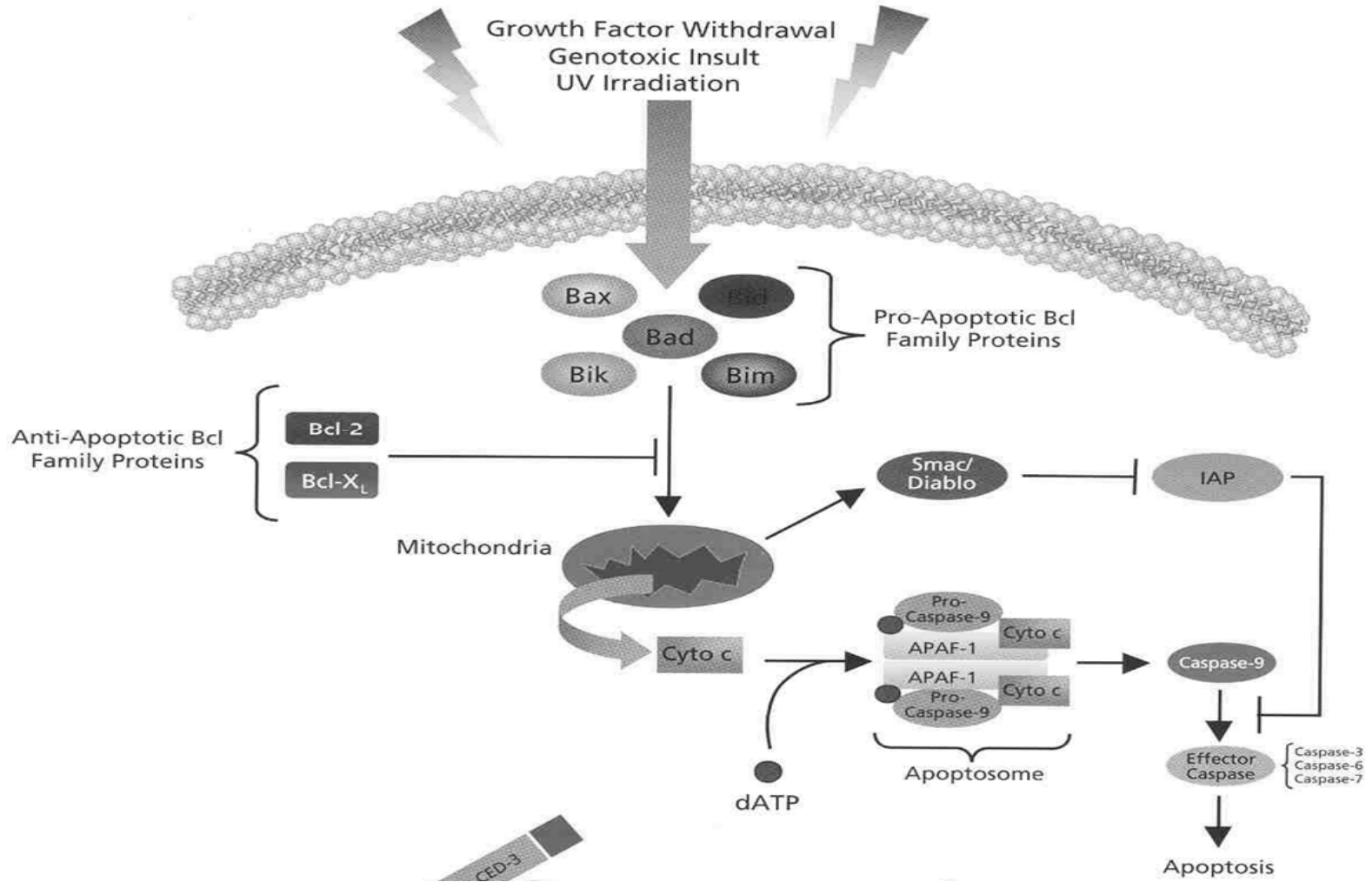


Apoptóza vyvolaná vnitřními signály:

- zdravá buňka exprimuje na vnější membráně mitochondrií protein Bcl-2, vázaný k Apaf-1
- při vnitřním poškození buňky protein Bcl-2:
 - uvolní Apaf-1
 - přestane zadržovat cytochrom c v mitochondriích
- vzniká apoptosom:
 - Apaf-1
 - Cytochrom C (Apaf-2)
 - prokaspáza 9
 - (dATP)
- vzniká aktivní kaspáza 9 (iniciační), která štěpením aktivuje další kaspázy (efektorové)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Změny mitochondrií

změna permeability
mitochondriální
membrány

detekce cytochomu C

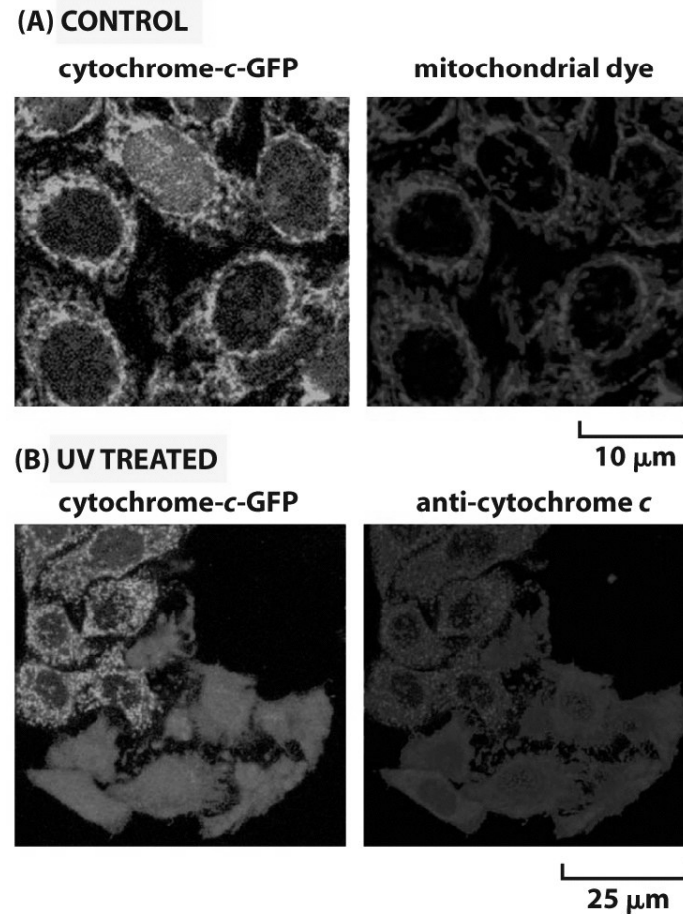


Figure 18-7 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Apoptóza vyvolaná vnějšími signály:

- aktivační molekuly (death activators) se napojují na specifické receptory v plazmatické membráně (death receptors):

Tumor necrosis factor a (TNF-a) - TNF receptor

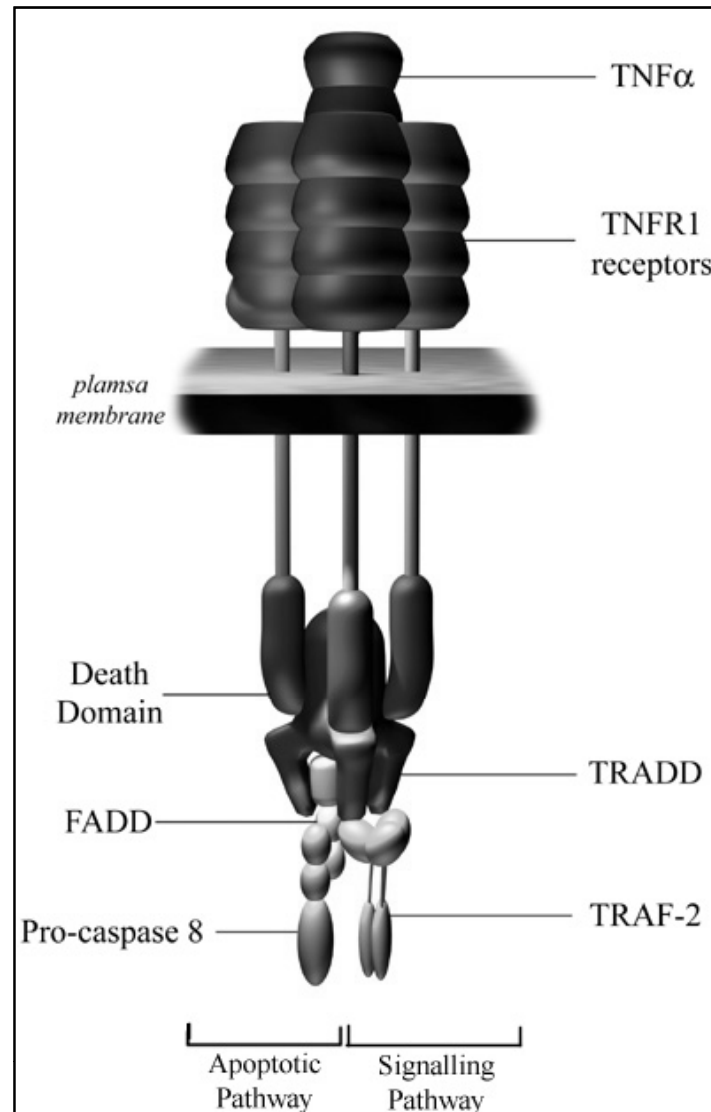
Lymphotoxin (TNF-b) - TNF receptor

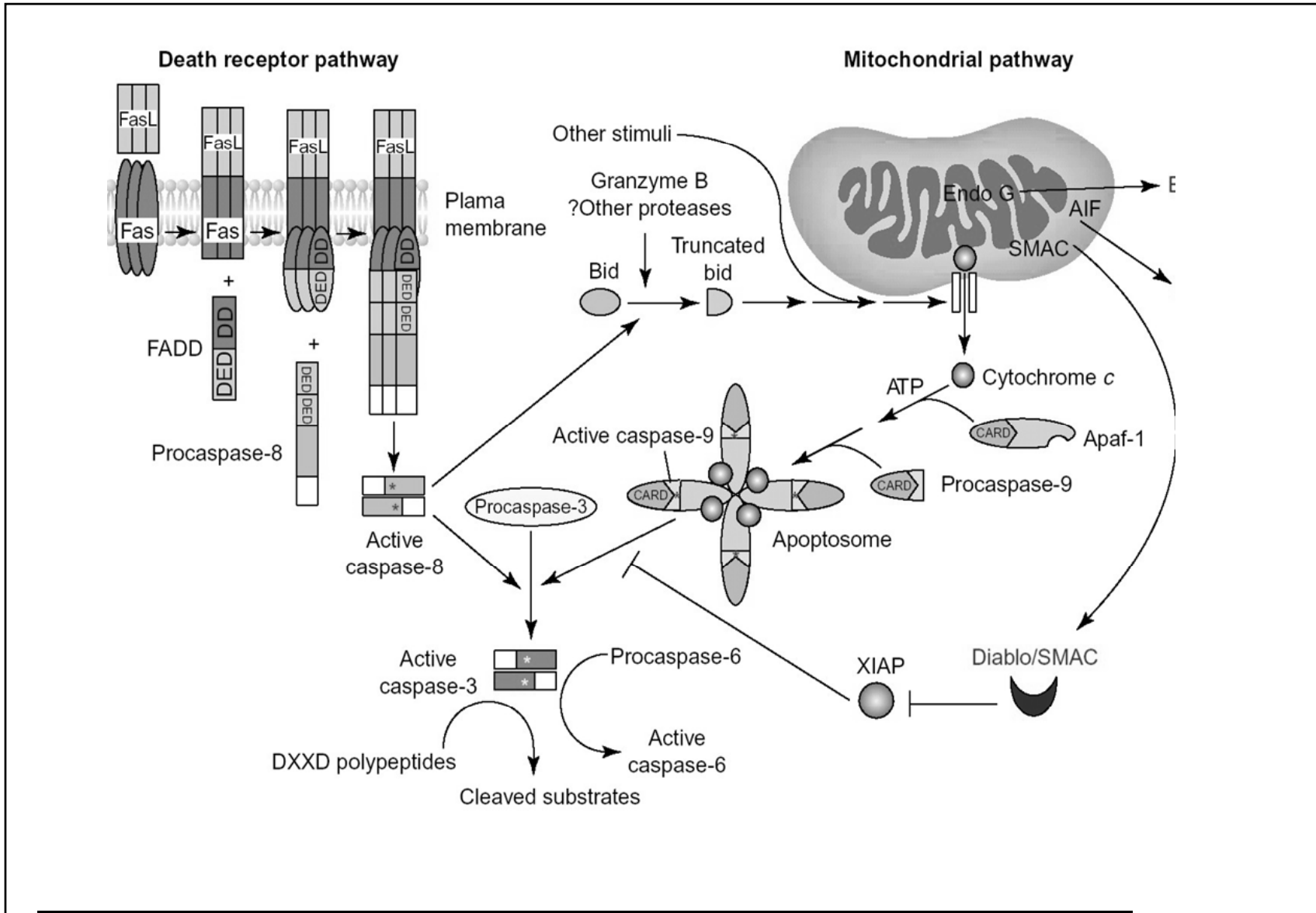
Fas-ligand (FasL) - Fas receptor (CD95)

- přenos signálu do cytoplasmy aktivuje prokaspázu 8 (iniciační),
- aktivovaná kaspáza 8 štěpením dalších prokaspáz spouští proteolytickou kaskádu

DISC death-inducing signaling complex

- ligand
- receptor
- adaptorové proteiny
- prokaspáza-8





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Apoptóza a nádory

Chemo- a radio- terapií indukovaná buněčná smrt

strategie:

- zabránit neregulovanému buněčnému dělení nádorových buněk
- ovlivnění buněčného cyklu a DNA syntézy u rychle se dělících buněk
 - antimetabolity
 - genotoxické látky
 - mitotické inhibitory } způsobují apoptózu
- defekty v apo dráhách negativně ovlivňují léčbu

Chemo- a radio- terapií indukovaná buněčná smrt - signalizace

- indukce poškození DNA – (DNA damage signal)
- přenos z DNA vazebných proteinů na kinázy PI3K rodiny (ATM, ATR) - funkce v kontrolních uzlech
- fosforylují efektorové kinázy (Chk1, Chk2 a c-Abl)
- fosforylace TF - p53, p73, E2F.
- zvýšení exprese genů – skupiny reparace DNA, zástava buněčného cyklu a apoptóza

Vztah p53 a apoptózy

- aktivuje mitochondriální apoptotickou dráhu
upregulace proapoptotických genů (Bax, Bid, Noxa, Puma)
downregulace antiapoptotických genů
(Bcl-2, Mcl-1)
- aktivuje receptorovou apoptotickou dráhu
upregulace death receptorů (Fas, DR4, DR5)
- nezávisle na transkripci
translokace p53 do mitochondrií a vazba na Bcl-2
a Bcl-XL

Apoptóza a nádory

Inhibice apoptózy nádorových buněk bez účasti virů:

- narušení apoptózy aktivované receptory u nádorových buněk
 - nedostatečná aktivita inicičních kaspáz (8,10) – z důvodu metylace promotoru, delece nebo mutace genu pro kaspázu-8 (neuroblastom, plicní karcinom, Ewingův sarkom, melanomy)
 - sekrece „decoy“ molekuly, která se váže na FasL a brání její vazbě na FasR (nádory plic a střeva)
 - sekrece FasL nádorovými buňkami indukuje apoptózu cytotoxických lymfocytů
- narušení apoptózy spouštěné mitochondriemi u nádorových buněk
 - delece a/nebo metylace genu pro Apaf-1 (melanom)
 - nedostatečná aktivita iniciční kaspázy 9 (nádory ovaria)
 - overexprese Bcl-2 z důvodu translokace (leukémie)

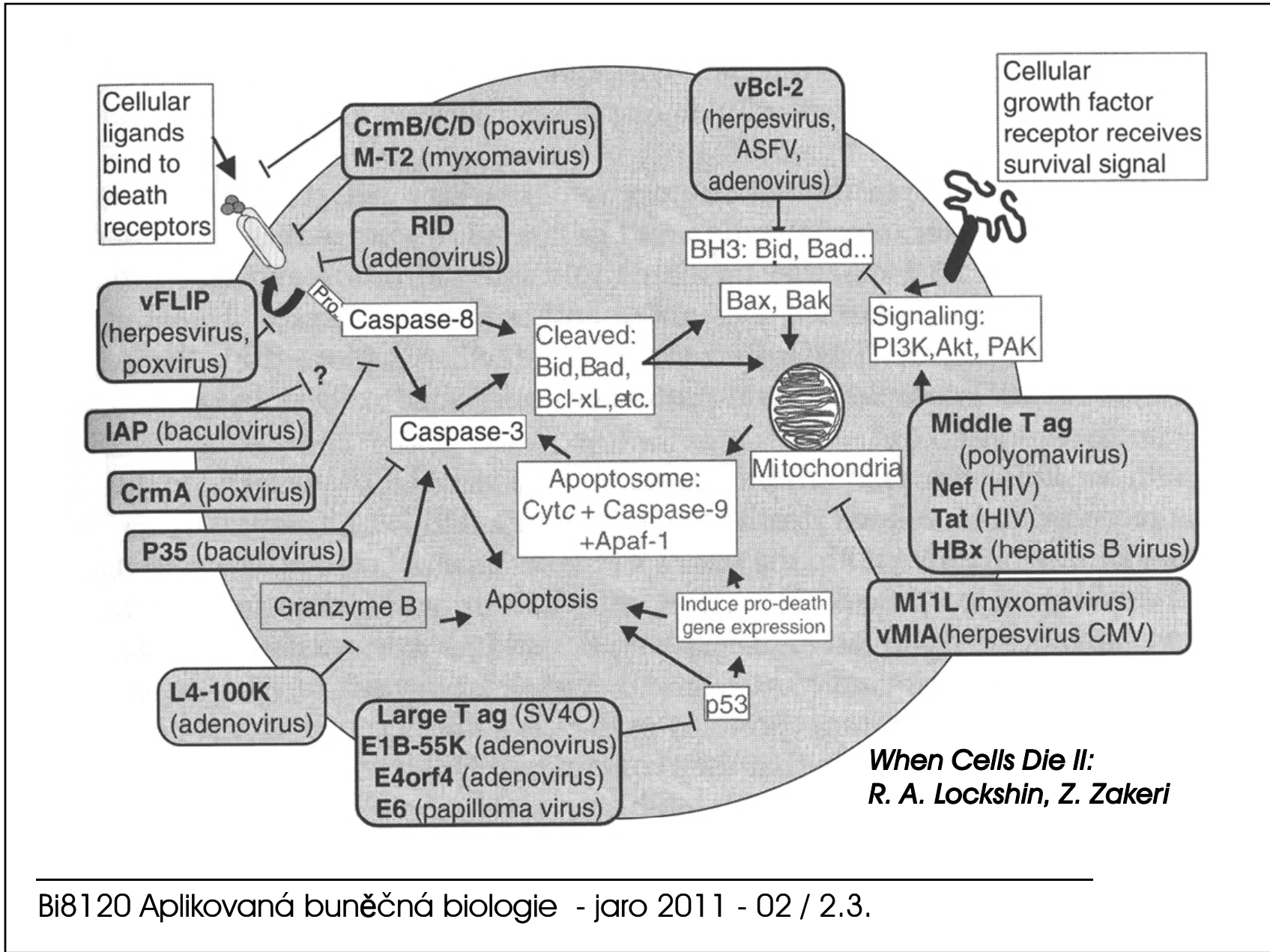
Apoptóza a nádory

Viry, inhibující apoptózu transformovaných buněk:

tvorba proteinů blokujičích apoptózu na různých úrovních

- receptorová apoptóza
- mitochondriální apoptóza
- p53
- podpora proliferačnících signálních drah

- Human papilloma virus (HPV):
exprese proteinu E6 - inaktivátor proteinu p53
- Epstein-Barrové virus (EBV):
produkuje protein, podobný proteinu Bcl-2



Apoptóza a imunitní systém

- nutnost odstranění aktivovaných lymfocytů
- produkují protilátky a cytokiny, jsou cytotoxické

Regulace apoptózy

- omezení růstových faktorů (IL-2) - protiháč Bcl-2 pro T buňky reagující na vnější a přechodné antigeny
- pomocí „death“ molekul (Fas ligand) pro T buňky reagující na vnitřní a trvalé antigeny

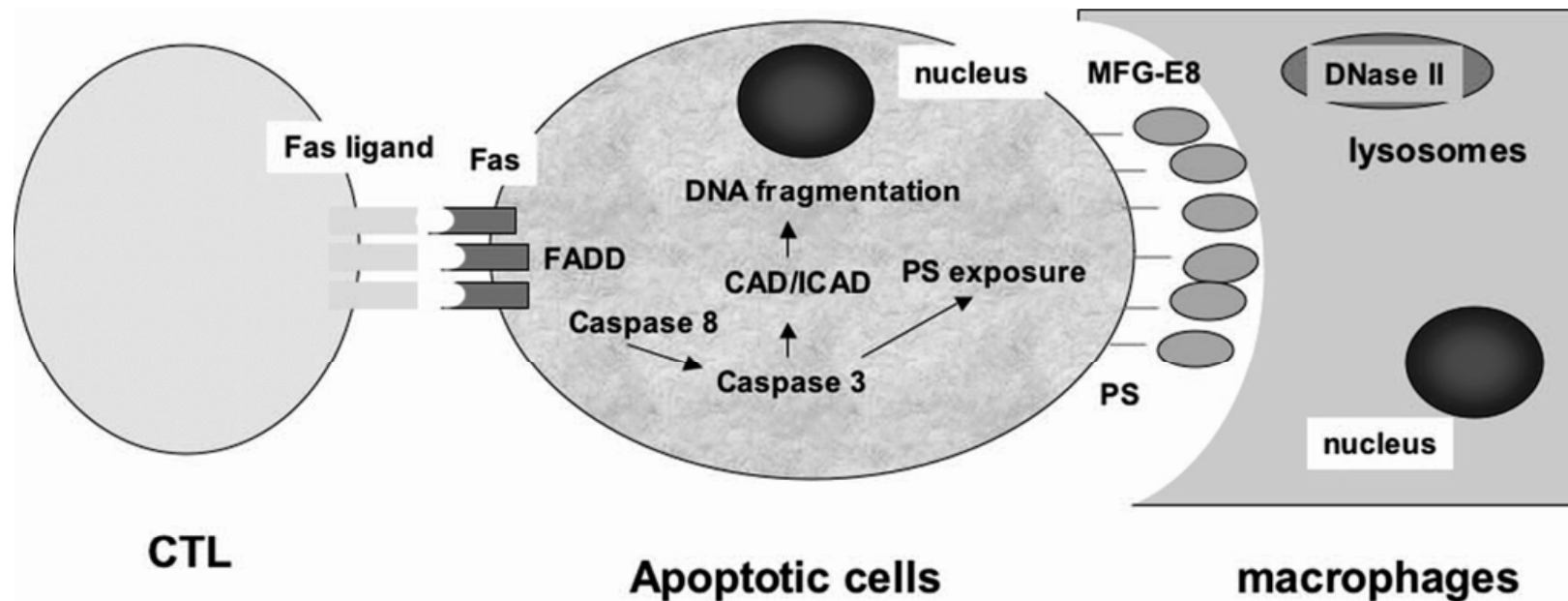
Apoptóza a imunitní systém

defekty v indukci apoptózy a autoimunitní choroby

- neschopnost navození apoptózy a přežívání auto-reaktivních lymfocytů
 - mutace ve Fas receptoru (CD95) nebo Fas ligandu → lymfadenopatie (zvětšení uzlin), akumulace lymfocytů
- účast „death“ receptorů a ligandů v poškození tkáně

Defekty v indukci apoptózy a autoimunitní choroby

systemový lupus erythematoses,
lupenka,
revmatoidní artritida,
Hashimotovo struma...

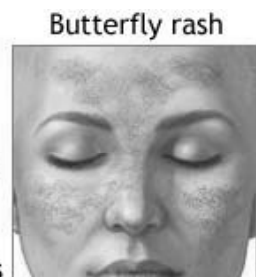
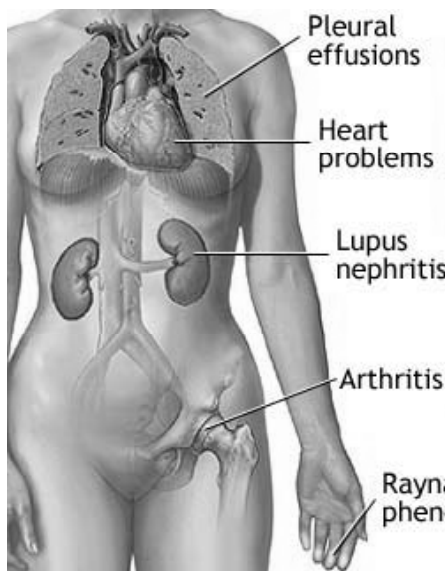


Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.

Apoptóza a imunitní systém

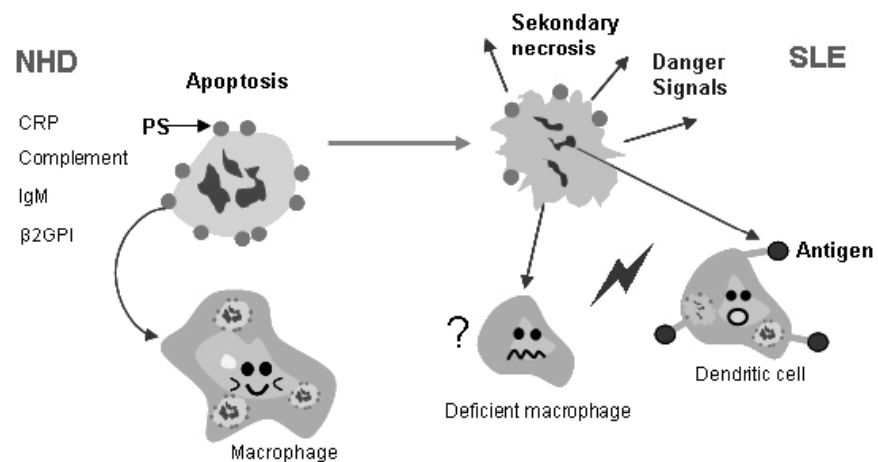
Autoimunitní choroby:

systemový lupus erythematos



Symptoms of systemic lupus erythematosus may vary widely with the individual

ADAM.



- Clearance of apoptotic cells by macrophages is efficient
- Cells don't become secondary necrotic and danger signals are not released
- No establishing of autoantigens and no inflammation

Tolerance

- Clearance of apoptotic cells by Macrophages is impaired
- Danger signals released by secondary necrotic cells
- Accessibility of autoantigens and inflammation

Chronic Autoimmunity

Fig. "Defects in the clearance of apoptotic cells is a possible pathway to autoimmune disease"
 CRP → C-reactive protein, PS → phosphatidylserine, IgM → immunoglobulin M, β2GPI → β2 glycoprotein I,
 SLE → systemic lupus erythematosus, NHD → normal healthy donor

Apoptóza a imunitní systém

AIDS:

pokles CD4+ T-lymfocytů

- pouze část infikována HIV, většina umírá apoptózou
- infikované buňky produkují virové proteiny (Tat, gp120, Nef, Vpu),
- Blokují Bcl-2, aktivují pro-kaspázu 8
- změny v expresi cytokinů (\uparrow IL-4, IL-10; \downarrow IL-12, INF- γ)
- viry a jejich proteiny v extracelulární prostoru aktivují apoptózu v okolních lymfocytech

Apoptóza a degenerativní onemocnění

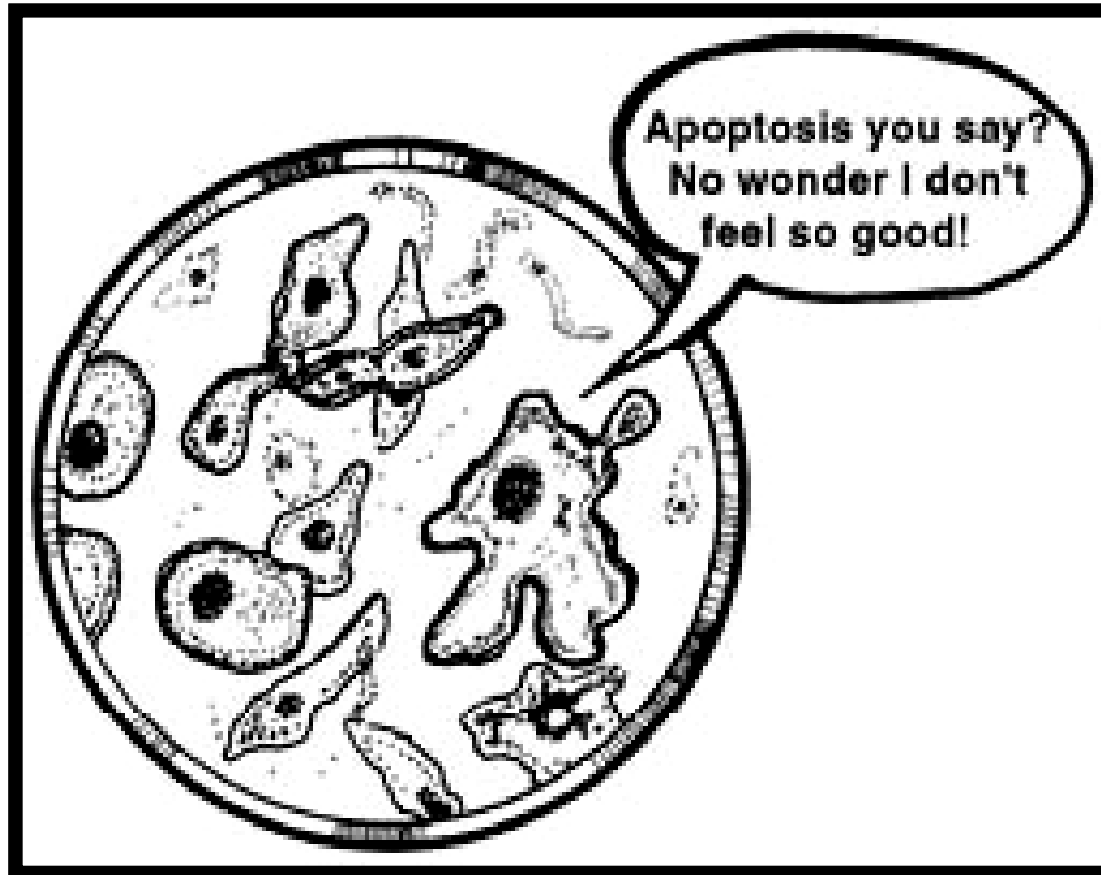
Alzheimerova choroba

Parkinsonova choroba

Huntingtonova choroba

nejasné mechanismy indukce apoptózy:

- volné radikály
- nedostatečná hladina nervových růstových faktorů
- vysoká hladina neurotransmiterů
- vnitrobuněčná akumulace toxických proteinů



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 02 / 2.3.