

# Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno  
Přírodovědecká fakulta MU Brno  
Lékařská fakulta MU Brno  
2011

# 6. Apoptóza a nádory

# Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost	příklad
 Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace H-ras
 Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB
 <b>Poškození apoptózy</b>	produkce IGF
 Neomezený replikační potenciál	aktivace telomerázy
 Posílení angiogeneze	produkce VEGF
 Tvorba metastáz	inaktivace E-kadherinu

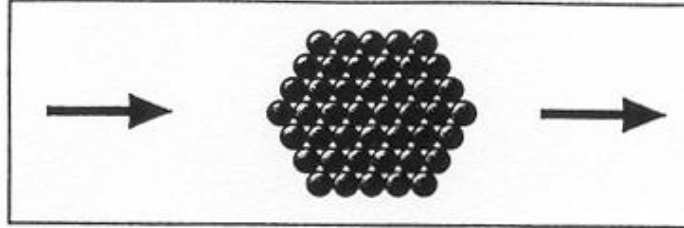
Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn.

# Buněčná smrt a vývoj nádoru

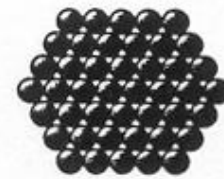
- Rychlost růstu tkání je určována na jedné straně rychlostí **buněčného dělení** a na straně druhé rychlostí **buněčné smrti**.
- Při homeostáze jsou oba procesy v rovnováze.
- U nádoru je rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí porušena.

# Nádory: buněčná smrt a homeostáze

A. Balanced proliferation and death

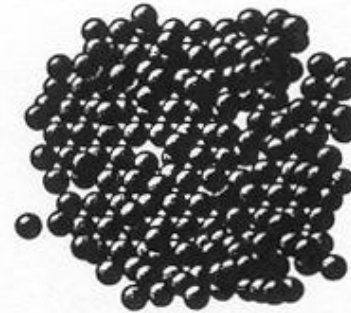
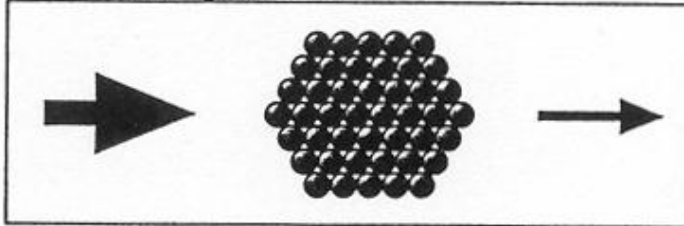


OUTCOME



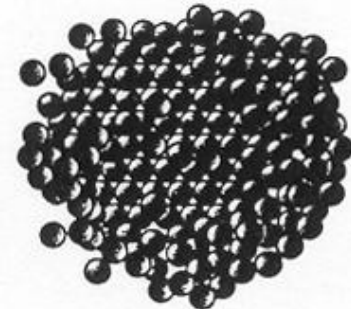
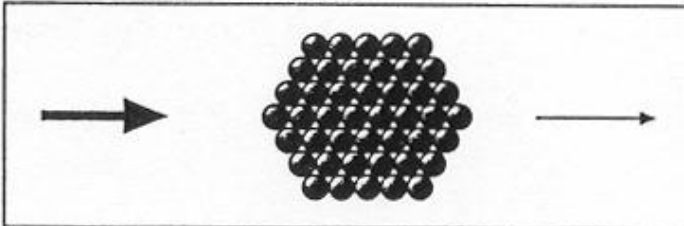
Homeostasis

B. Increased proliferation



Neoplasia

C. Decreased cell death



Neoplasia

# Apoptóza a nekróza

## Nekróza:

- týká se skupiny postižených buněk
- vyvolána nefyziologickým poškozením (virová infekce, hypotermie, hypoxie, metabolické jedy, ..)
- fagocytóza makrofágy
- významná zánětlivá reakce

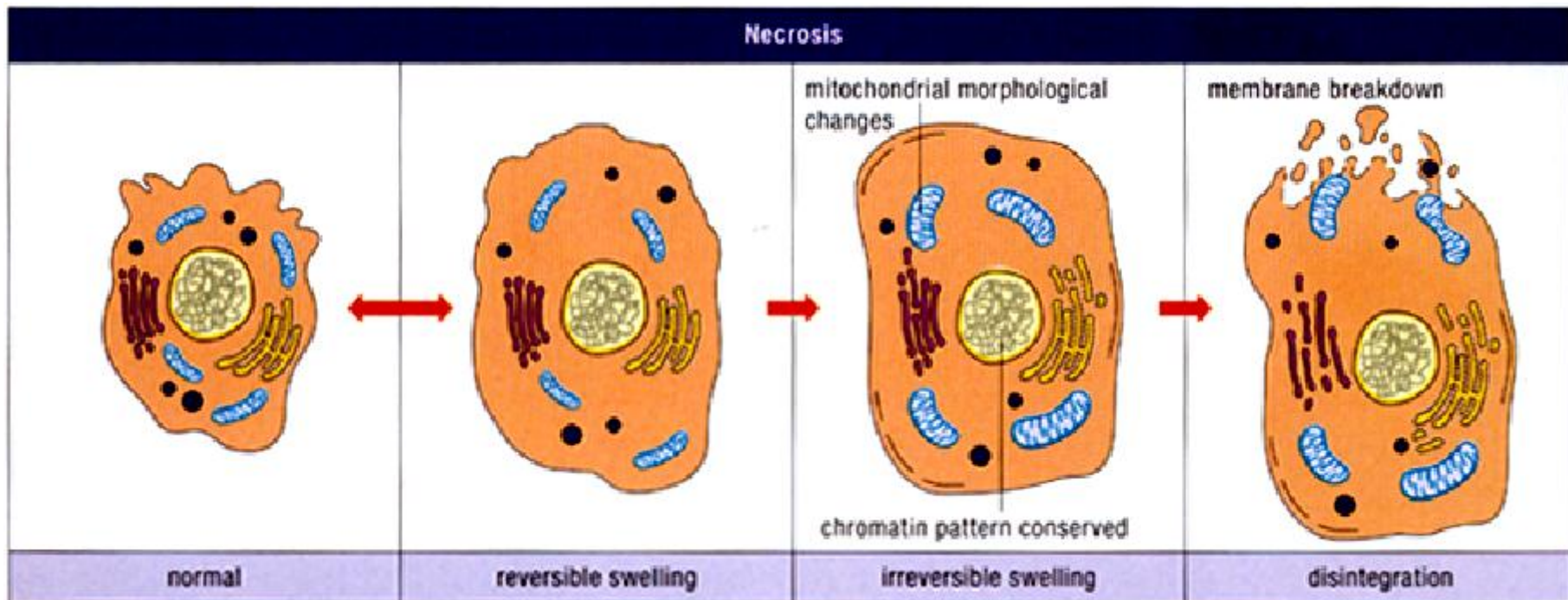
## Apoptóza - programovaná buněčná smrt:

- postihuje jednotlivé buňky
- indukována fyziologickými stimuly (nedostatek růstových faktorů, změny hormonálních hladin, ..)
- fagocytóza okolních buněk nebo makrofágy
- žádná zánětlivá reakce
- na rozdíl od nekrózy je popsáno mnoho příkladů **fyziologické** apoptózy.

# Nekróza

Morfologické znaky: začíná bobtnáním cytoplasmy a mitochondrií a končí úplnou lyzí, netvoří se vesikly, rozpadají se organely, ztráta integrity buněčné membrány

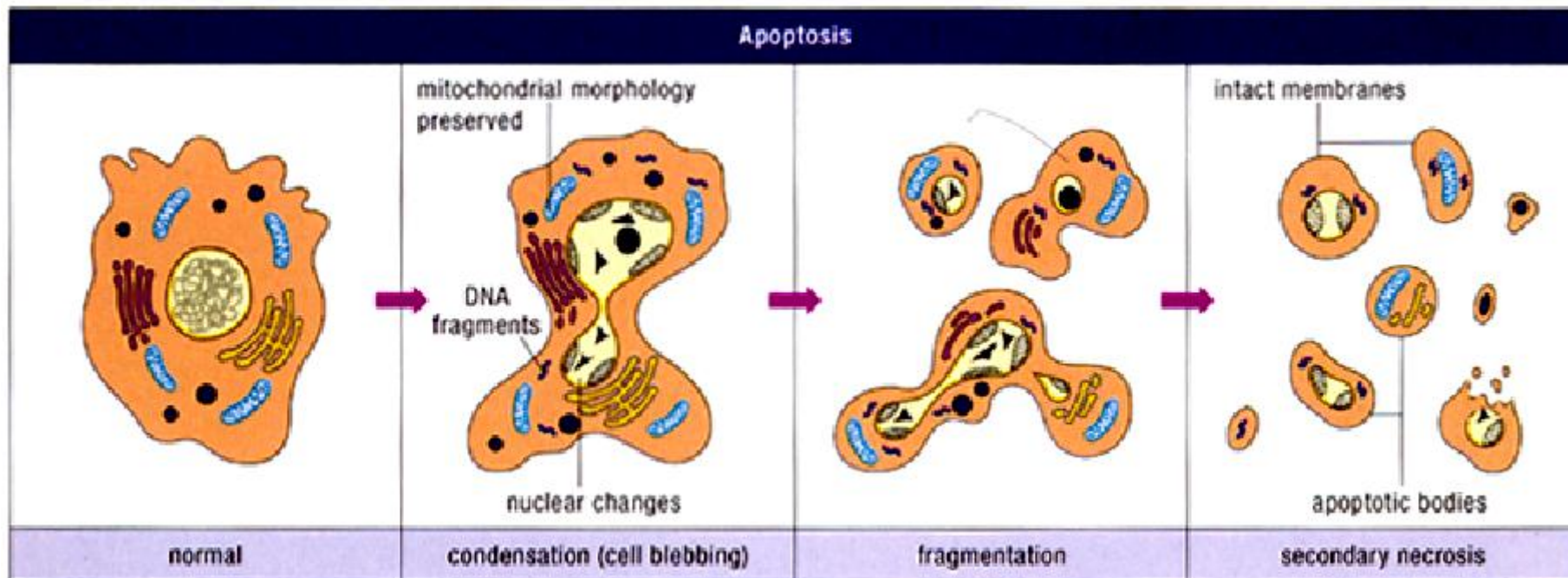
Biochemické znaky: ztráta regulace homeostáze, pasivní proces nevyžadující energii (běží i ve 4°C), nahodilá degradace DNA, postlytická fragmentace DNA (= pozdní událost během nekrózy)



# Apoptóza

Morfologické znaky: kondenzace buňky a jádra, výchlípky membrány („blebs“), kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a rozpad buňky na apoptotická tělíška, membrána neztrácí svou integritu, ..

Biochemické znaky: přísně regulovaný, aktivní proces vyžadující energii (neběží při 4°C), nenahodilá fragmentace DNA (žebřík na ELFO), uvolňování specifických faktorů z mitochondrií do cytoplasmy, aktivace kaskád kaspáz, ..



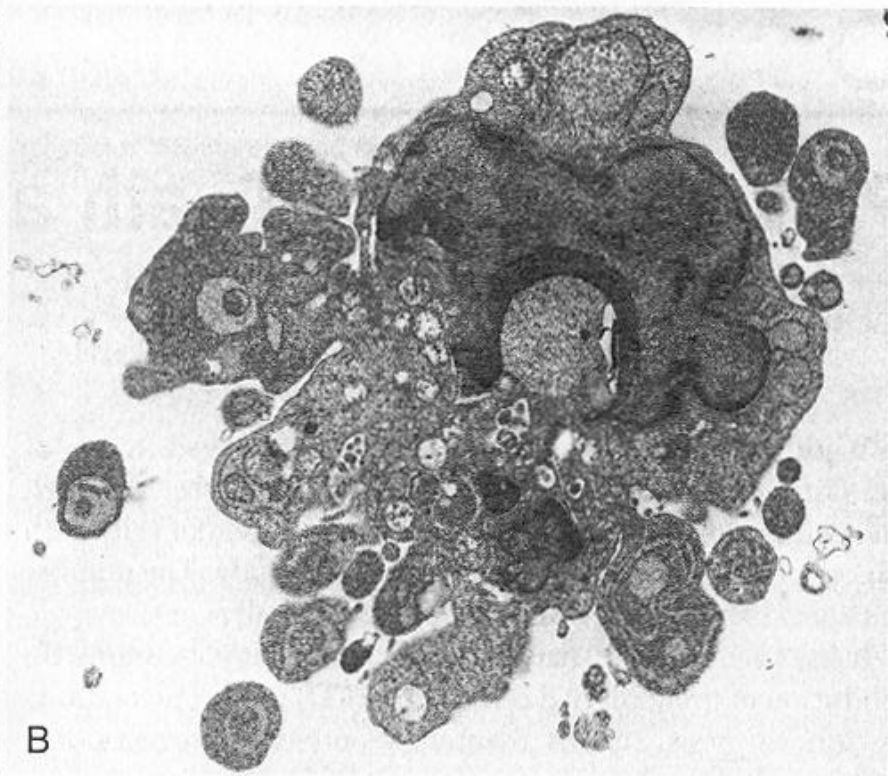
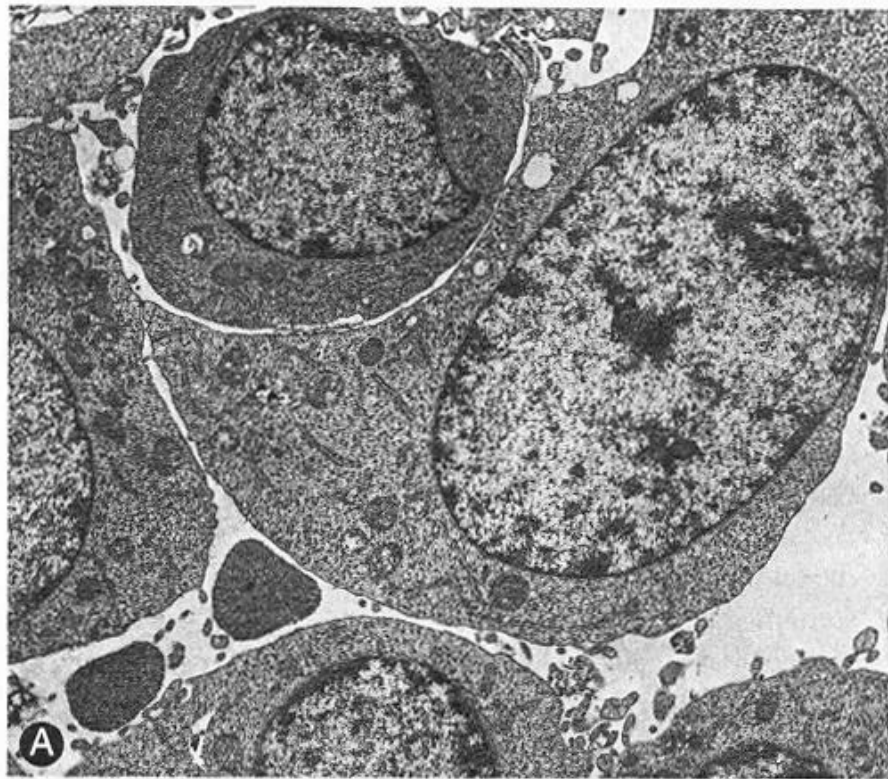


# Buňka procházející apoptózou

## myší fibroblast

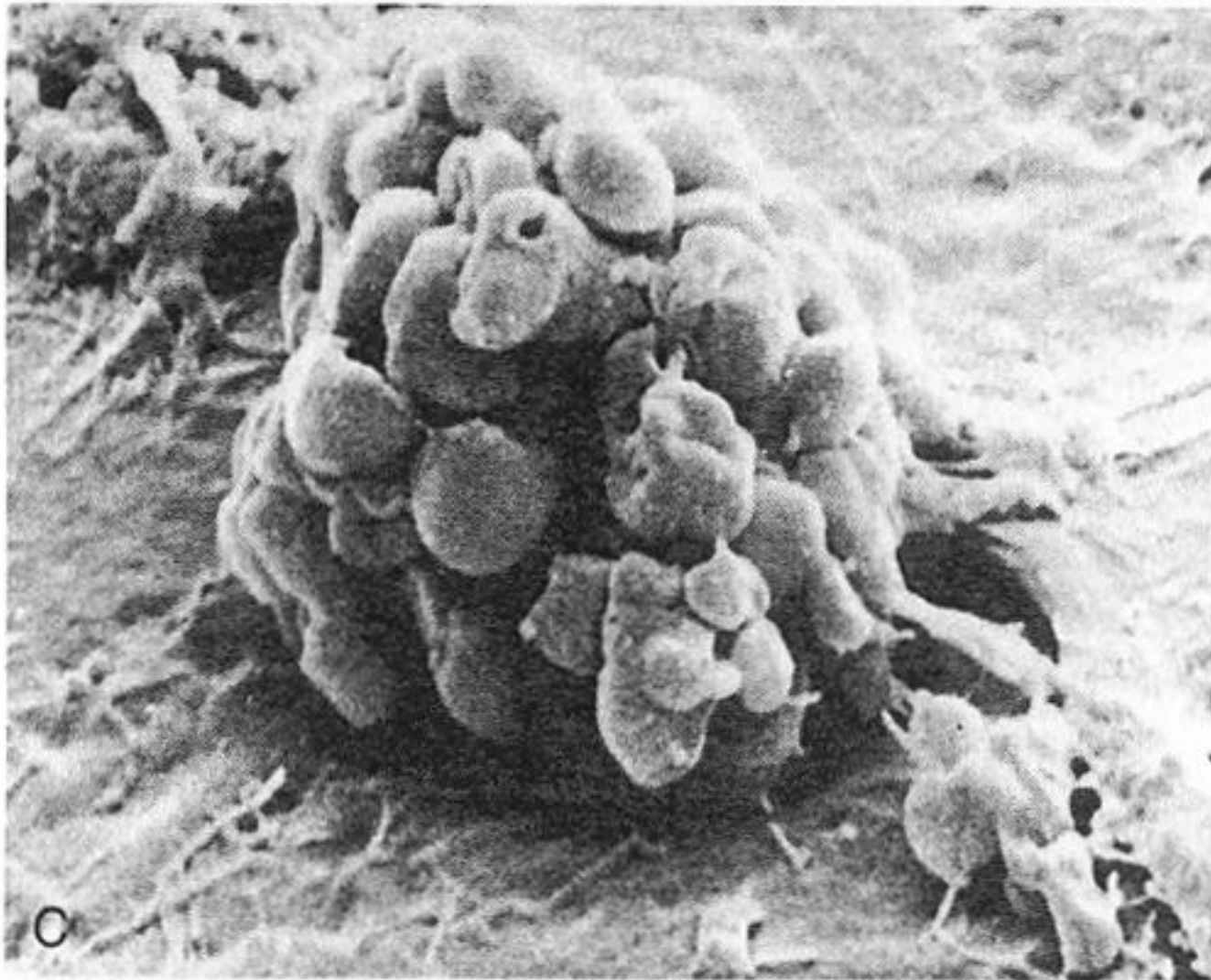
**A.** v přítomnosti séra

**B.** v nepřítomnosti séra



# Buňka procházející apoptózou

HeLa buňka 24 hod po přidání aktinomycinu D



# Další formy buněčné smrti

## Aponekróza

- nedochází k dokončení buněčné smrti, v konečných stádiích se objevují známky nekrózy
- klíčovým momentem je pravděpodobně intracelulární obsah ATP: není-li ATP k dispozici, je zánik buňky dokončen formou nekrózy

## Paraptóza

- nápadná je tvorba vakuol a nabobtnání mitochondrií
- nemá nic společného s apoptózou

## Nekroptóza

- nekróza indukovaná externími stimuly (ligandy) prostřednictvím receptorů smrti, je-li znemožněna apoptóza, např. působením inhibitorů kaspáz

# Apoptóza je fyziologický proces

Buněčná smrt se v mnohobuněčném organismu objevuje během celého vývoje. Je součástí embryogeneze a organogeneze:

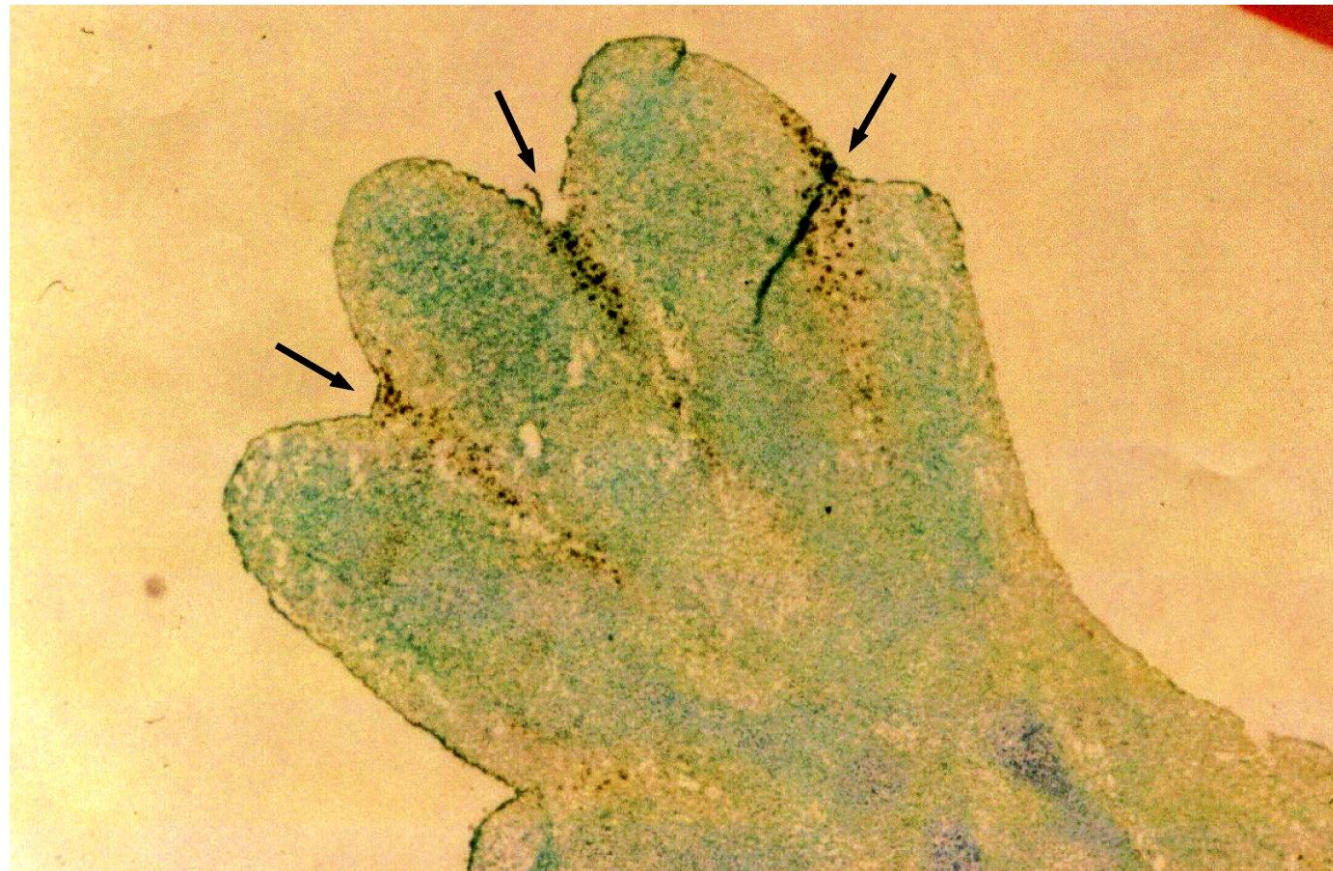
- hormonálně regulovaná involuce „pulčího“ ocasu během vývoje
- odumírání neuronů během vytváření CNS
- odumírání buněk během tvorby končetin,...

Apoptóza odstraňuje škodlivé buňky:

- negativní selekce autoreaktivních lymfocytů
- smrt buněk rozpoznaných jako buněk napadených virem
- buňky s mutací DNA

# Apoptóza je součástí organogeneze

Programovaná buněčná smrt se podílí na tvarování prstů vyvíjející se nohy myši.



# Změny v regulaci apoptózy jsou patologické

## Zvýšená apoptóza

- syndrom získané imunodeficiency AIDS (CD4+ T-buňky)
- neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova choroba)
- myelodysplastický syndrom (hypercelulární dřeň, periferní cytopenie)
- některé autoimunitní nemoci
- spinální svalová atrofie, roztroušená skleróza,...

## Nedostatečná apoptóza

- nádory, MDS,...
- některá autoimunitní onemocnění
- virové infekce

# Regulace apoptózy u hlísty *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans* byl prvním modelem pro studium molekulárních mechanismů apoptózy.

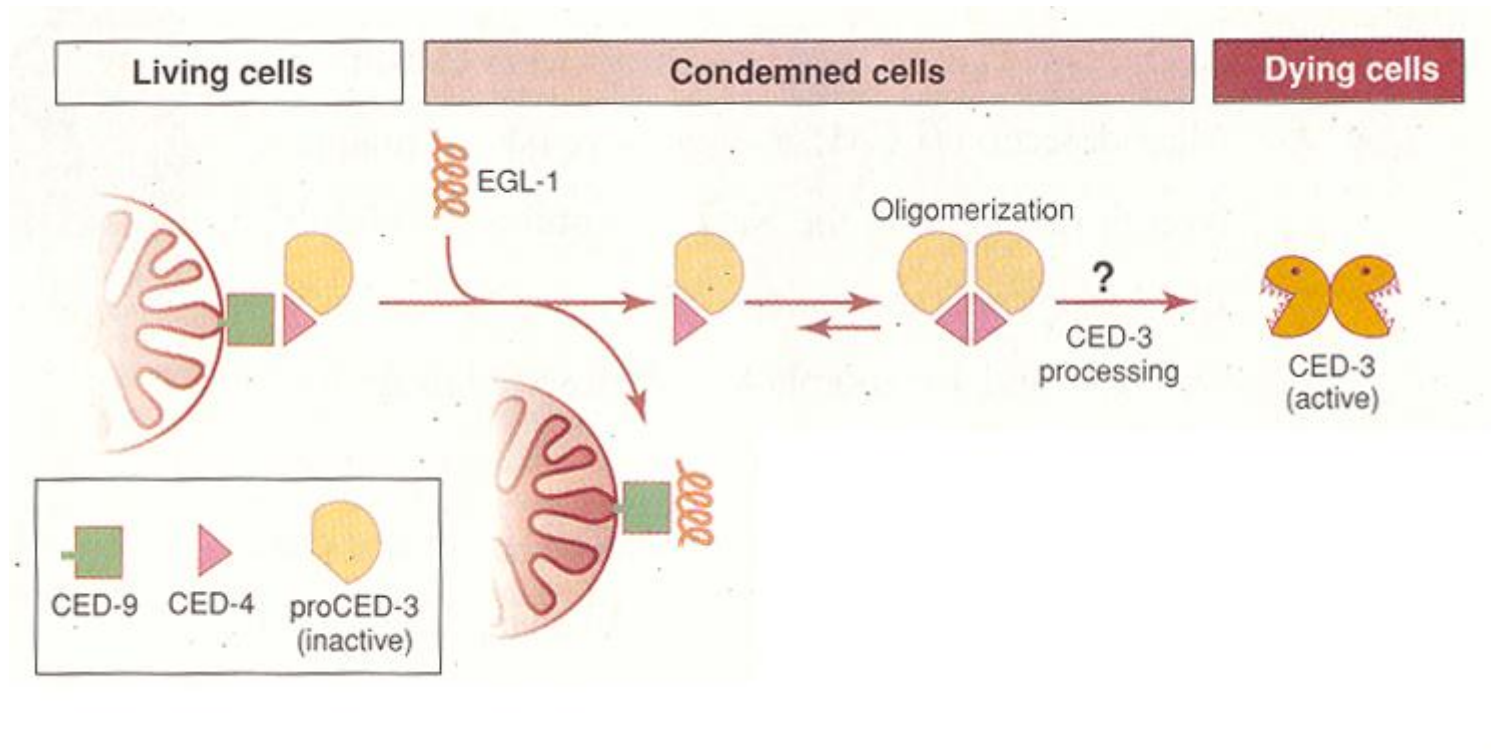
Pro apoptózu *C. elegans* jsou klíčové 3 proteiny:

- **CED-3** je kaspáza - cysteinová proteáza; existuje ve formě zymogenu - neaktivního proenzymu, který je aktivován „by self-cleavage“.
- **CED-4** se váže na CED-3 a iniciuje jeho aktivaci
- **CED-9** se váže na CED-4 a zabraňuje tak aktivaci CED-3

Normálně tvoří CED-9, CED-4 a CED-3 neaktivní komplex.

Apoptóza je stimulována disociací CED-9 a následnou aktivací CED-3.

# Regulace apoptózy u *Caernohabditis elegans*



U buněk určených k apoptóze protein EGL-1 odstraní z komplexu CED-4/CED-3/CED-9 protein CED-9, zbylý komplex oligomerizuje a následně se aktivuje CED-3.



# Regulace apoptózy v buňkách obratlovců

V buňkách obratlovců se vyvinuly celé rodiny genů, které ale odpovídají genům buněčné smrti *C. elegans*.

- **Kaspázy** jsou podobné CED-3.
- Jediný dosud známý homolog CED-4 je **Apaf-1**.
- Proteiny z rodiny **Bcl-2** jsou homologní CED-9, s tím rozdílem, že některé proteiny z rodiny Bcl-2 jsou antiapoptotické, jiné jsou ale proapoptotické.

# Regulace apoptózy

Apoptotická mašinerie je držena pod kontrolou díky signálům přežití, které přicházejí z vnějšího prostředí, a díky vnitřním signálům, které monitorují buněčnou integritu.

Apoptóza je indukována:

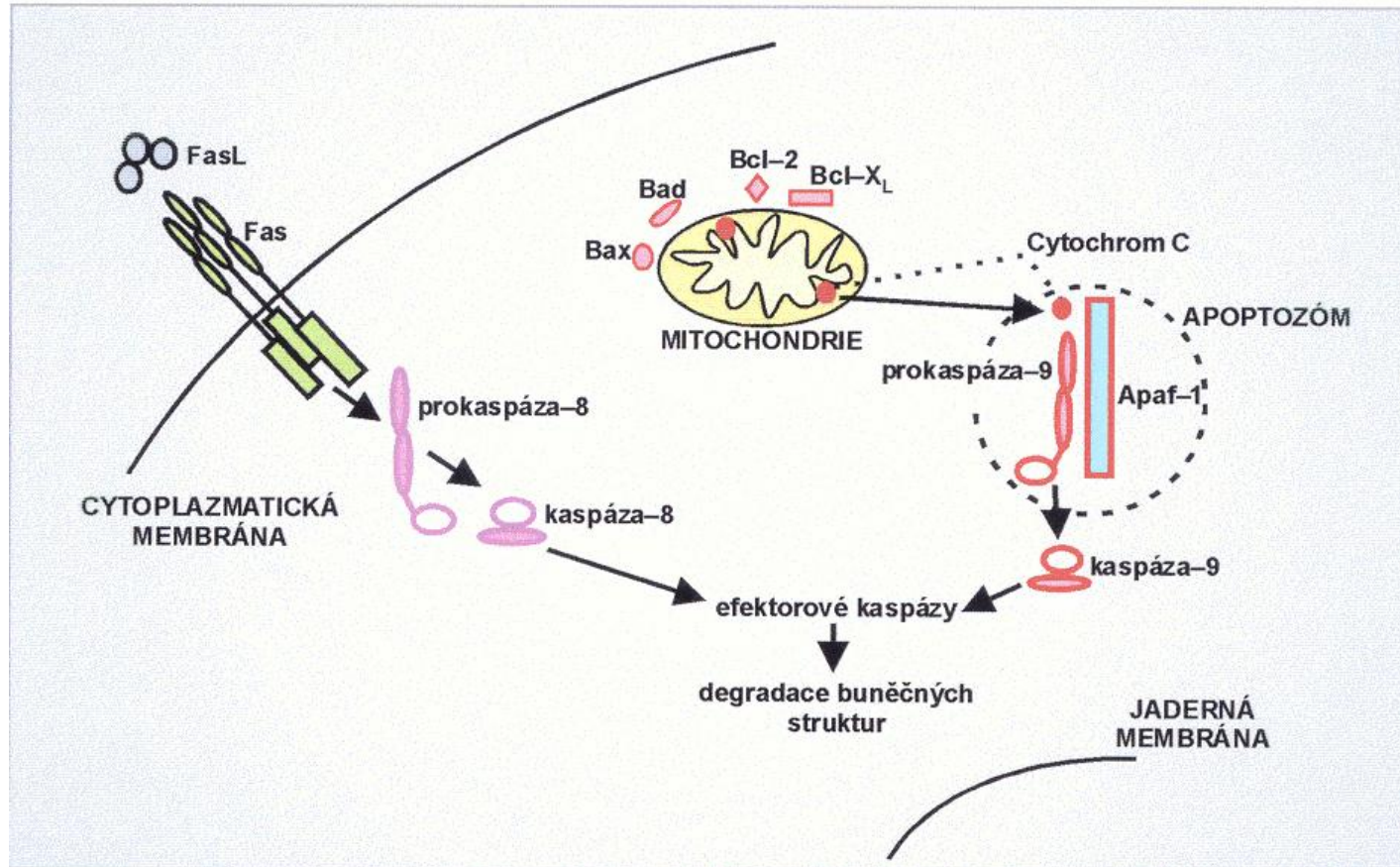
- jestliže buňka ztratí kontakt s vnějším prostředím (anoikis)
- jestliže je buňka neopravitelně poškozena
- jestliže buňka simultánně dostává signály indukující buněčné dělení a apoptózu
- jestliže buňka dostává signály smrti (smrtící signály)

# Regulace a průběh apoptózy

Vnější cesta receptorová: vazbou ligandu na příslušný **receptor smrti** vzniká proapoptotický signál. Ten vede k aktivaci domény smrti za kooperace dalších proteinů. Cílem je aktivace **prokaspázy 8**.

Vnitřní cesta: signalizací (např. přes p53) je zahájen apoptotický děj, jehož složkou je systém **Bcl-2/Bax**, signalizace přes **mitochondrie**, tvorba komplexu nazývaného **apoptozóm** a cílem je aktivace **prokaspázy 9**.

# Regulace a průběh apoptózy



1. Signalizace přes receptory
2. Vnitřní signalizace (mitochondrie)
3. Efektory apoptózy

# Receptory smrti

- Jsou povrchové receptory, které přenášejí proapoptotické signály indukované ligandy smrti.
- Mohou aktivovat kaspázy během sekund po vazbě ligandů a způsobit odstranění buňky během několika hodin.
- Patří do superrodiny **receptoru TNF** („tumor necrosis factor“):
  - mají podobnou strukturu extracelulární domény (bohatou na cystein)
  - obsahují homologní cytoplasmatickou **doménu smrti**, která jim umožňuje přímo interagovat s apoptotickým aparátem

# Receptory smrti a jejich ligandy

- CD95 (Fas, Apo1) - CD95L, FASL
- TNFR1 (p55, CD120a) - TNF, lymphotoxin
- DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD) - Apo3L (TWEAK)
- DR4 - Apo2L (TRAIL)
- DR5 (Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2, KILLER) - Apo2L (TRAIL)

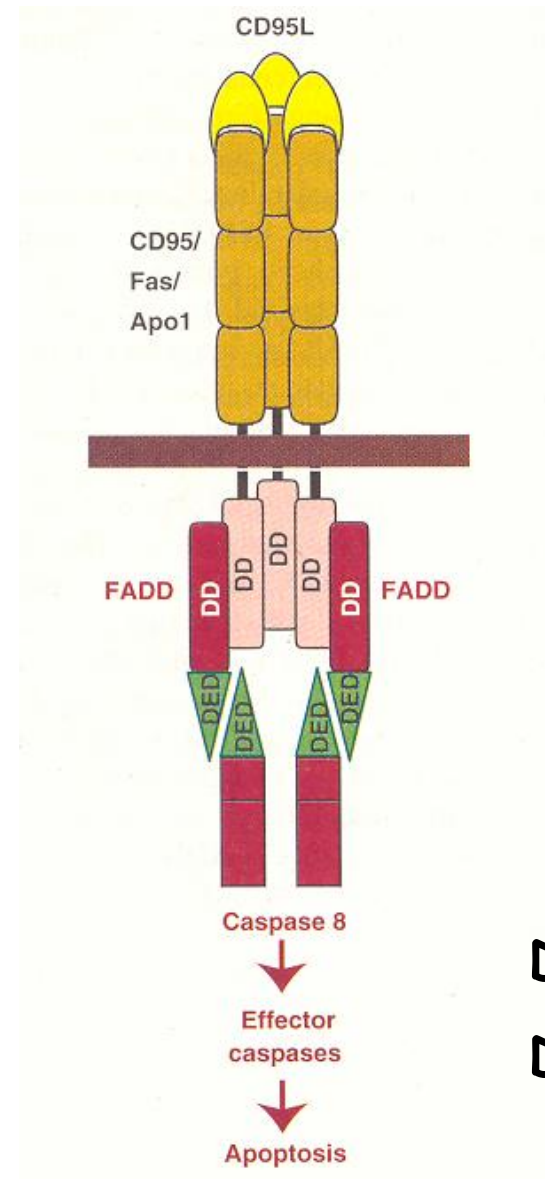
# Fas/CD95 - CD95L

## Fyziologická apoptóza:

- periferních aktivovaných T-buněk na závěr imunitní odpovědi
- odstranění např. virem infikovaných nebo nádorových buněk T-buňkami nebo NK buňkami
- odstranění zánětlivých buněk např. v oku

**CD95L** je homotrimer - váže se na tři receptory **CD95** - a způsobuje jejich „clusterování“ - na tuto strukturu se váže adaptorový protein **FADD** („Fas-associated death domain“; Mort 1) a prostřednictvím vlastní domény smrti interaguje s podobnou doménou na **kaspáze 8**, která je touto interakcí indukována k aktivaci seberoštění a může dále aktivovat další kaspázy, např. kaspázu-10 (amplifikace).

# Apoptotická signalizace receptorem CD95



DD - death domain

DED - death effector domain



## Další způsob regulace receptoru Fas/CD95

- Byla popsána molekula **DcR3** („decoy receptor 3“): tento receptor také váže ligand FasL, a tak blokuje jeho vazbu k receptoru Fas.

# Fas/FasL brzdí kancerogenezi

- Vrozené defekty v expresi nebo funkci Fas způsobují vrozené dispozice k autoimunitním nemocem, ale jsou také spojeny se zvýšeným rizikem vývoje nádoru.
  - Cytotoxické lymfocyty exprimují FasL a mohou tak zabíjet Fas-pozitivní buňky.
  - Některé tkáně (oči, testis) exprimují FasL konstitutivně, v jiných tkáních lze jeho expresi indukovat (např. látkami, které poškozují DNA, ..).
- ⇒ Signalizace Fas/FasL je **nádorově supresivní!**

# Fas/FasL a nádory

- Gen pro **DcR3** je **amplifikován** u některých nádorů plic a kolorektálních karcinomů.
- **Mutace** receptoru Fas.
- **Snížená exprese** receptoru Fas.

# TNFR1 - TNF

**TNF** je produkován hlavně aktivovanými makrofágy a T-buňkami jako odpověď na infekci.

Aktivace TNFR1 vede jednak k zánětlivé odpovědi organismu (aktivaci NF- $\kappa$ B a AP-1), u některých buněčných typů k apoptóze. Na rozdíl od CD95, TNFR1 nevyvolává apoptózu, pokud není blokována syntéza proteinů ( $\rightarrow$  existence proteinů blokujících apoptózu).

Po vazbě **TNF** receptor **TNFR1** tvoří trimery a dochází tak k asociaci jejich domén smrti. Na ně se váže adaptorový protein **TRADD**, který funguje jako platforma pro vazbu dalších proteinů - **TRAF2** a **RIP**, které stimulují aktivaci transkripčních faktorů **NF- $\kappa$ B** a **AP-1**.

Ke komplexu TNFR1-TRADD se může vázat adaptor **FADD**, který potom aktivuje **kaspázu-8**.

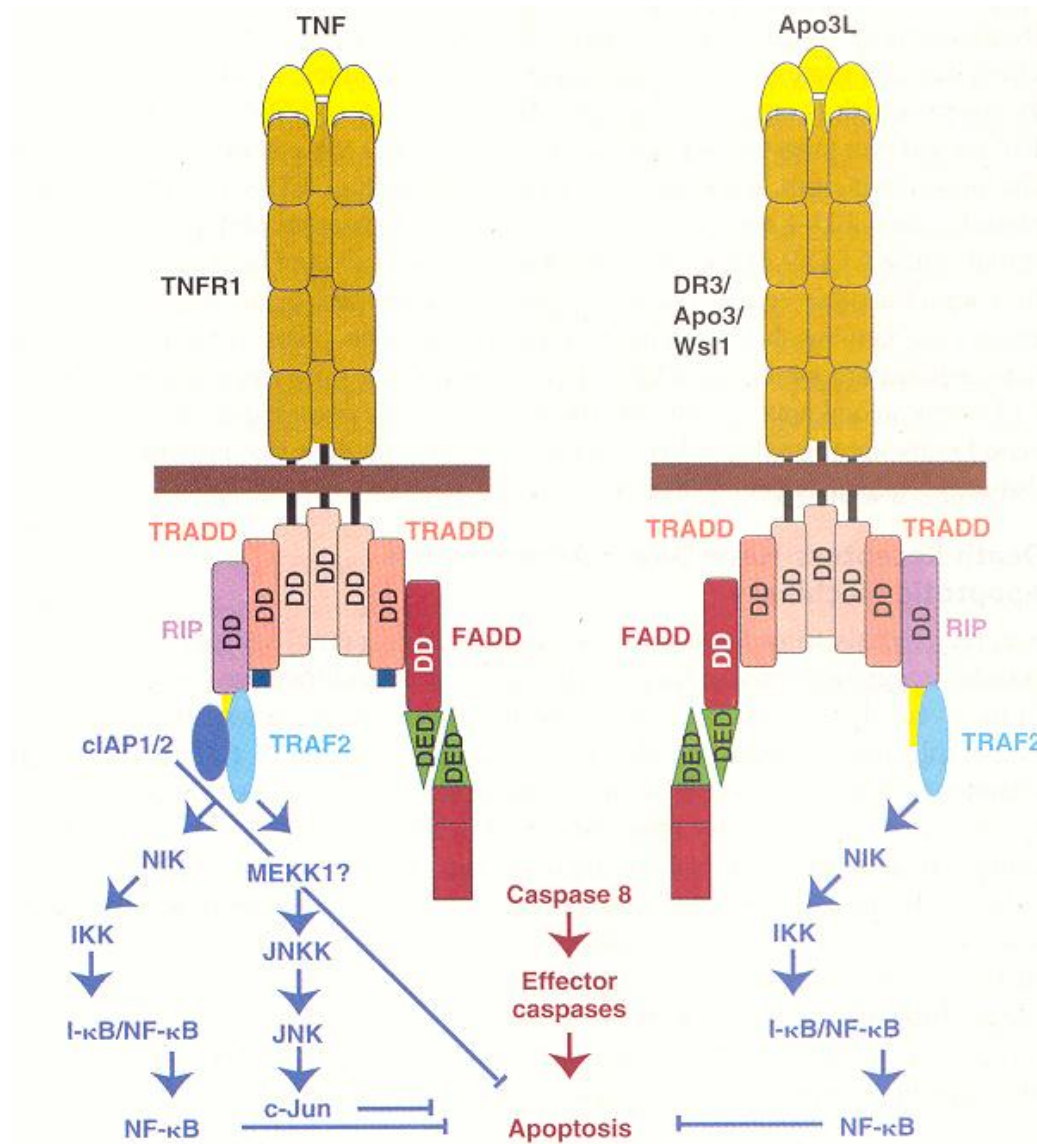
# DR3

Receptor DR3 je velice podobný TNFR1, po stimulaci aktivuje NF- $\kappa$ B přes TRADD, TRAF2 a RIP a indukuje apoptózu přes **TRADD, FADD** a **kaspázu-8**.

Funkčně jsou DR3 a TNFR1 velmi podobné, ale zásadně se liší expresí svou a svých ligandů:

- TNF je exprimován hlavně u aktivovaných makrofágů a lymfocytů, zatímco Apo3L je konstitutivně exprimován téměř ve všech tkáních.
- Naopak TNFR1 je exprimován obecně ve všech tkáních, zatímco DR3 je přítomen hlavně ve slezině, thymu a v periferní krvi a je indukován aktivovanými T-buňkami.

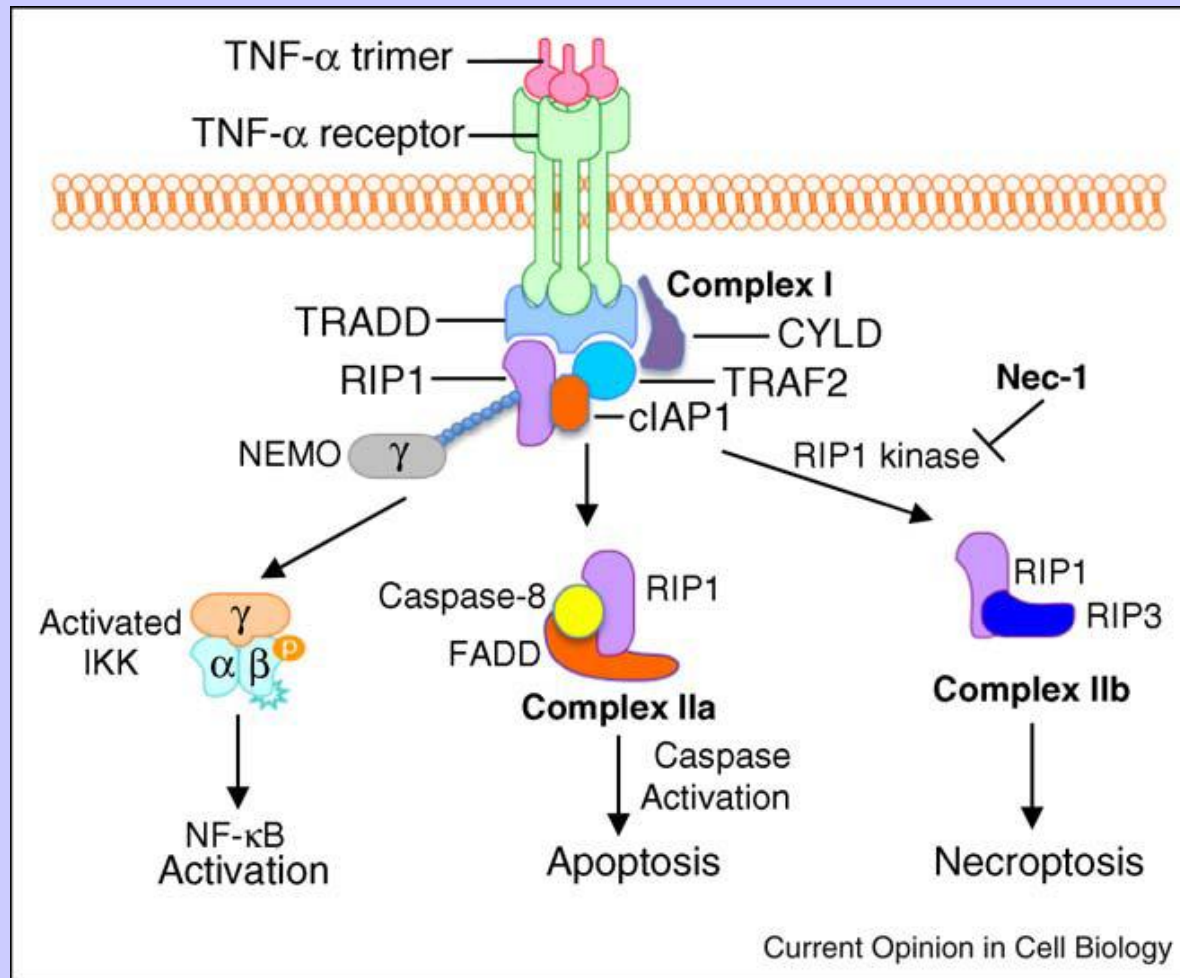
# Apo signalizace receptory TNFR a DR3



# Nekroptóza

- nekróza indukovaná externími stimuly (ligandy) prostřednictvím receptorů smrti, je-li znemožněna apoptóza, např. působením inhibitorů kaspáz
- proces je regulovaný, ale morfologicky shodné znaky s neregulovanou nekrotickou buněčnou smrtí
- klíčovým hráčem regulace je kináza RIP1 (receptor-interacting protein 1)
- inhibitory nekroptózy jsou malé molekuly nekrostatiny. Např. necrostatin-1 je efektivním inhibítorem kinázové aktivity RIP1

# Nekroptóza



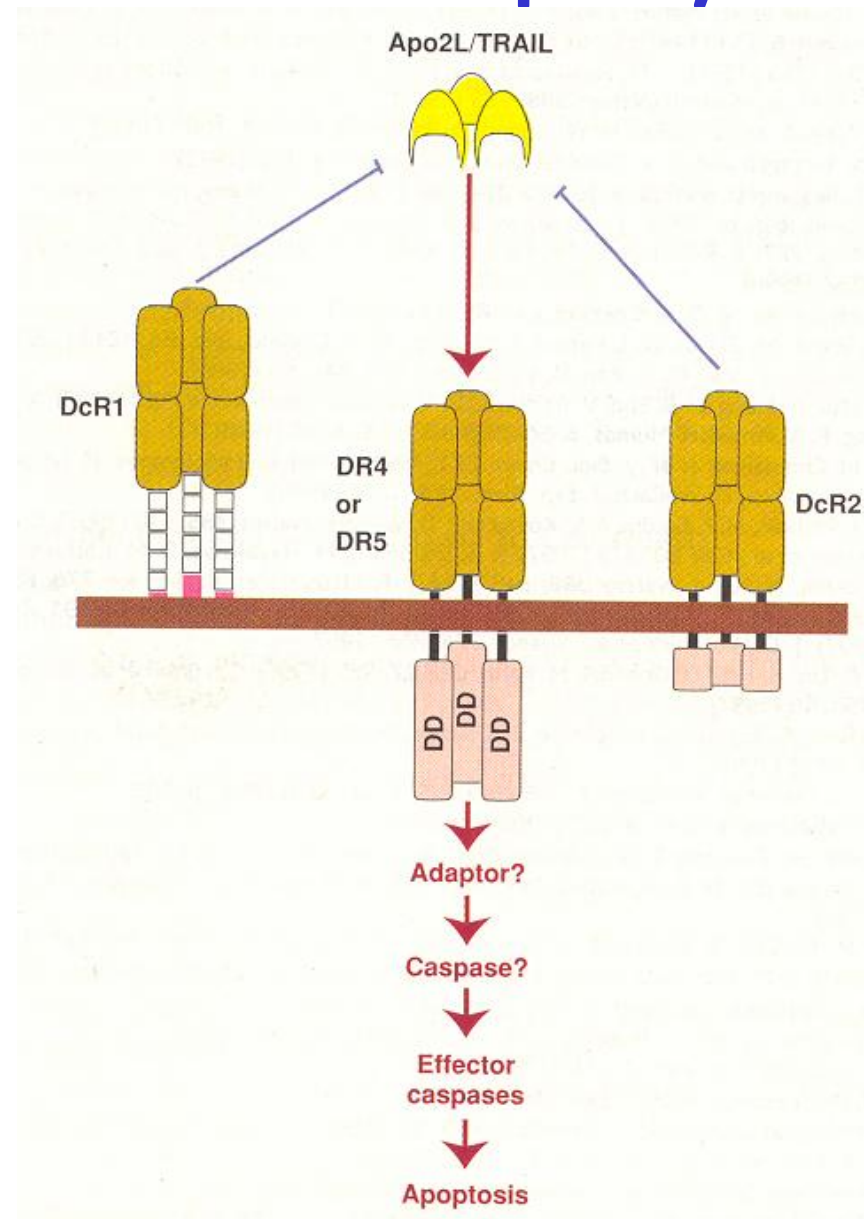


# DR4 a DR5 - TRAIL/Apo2L

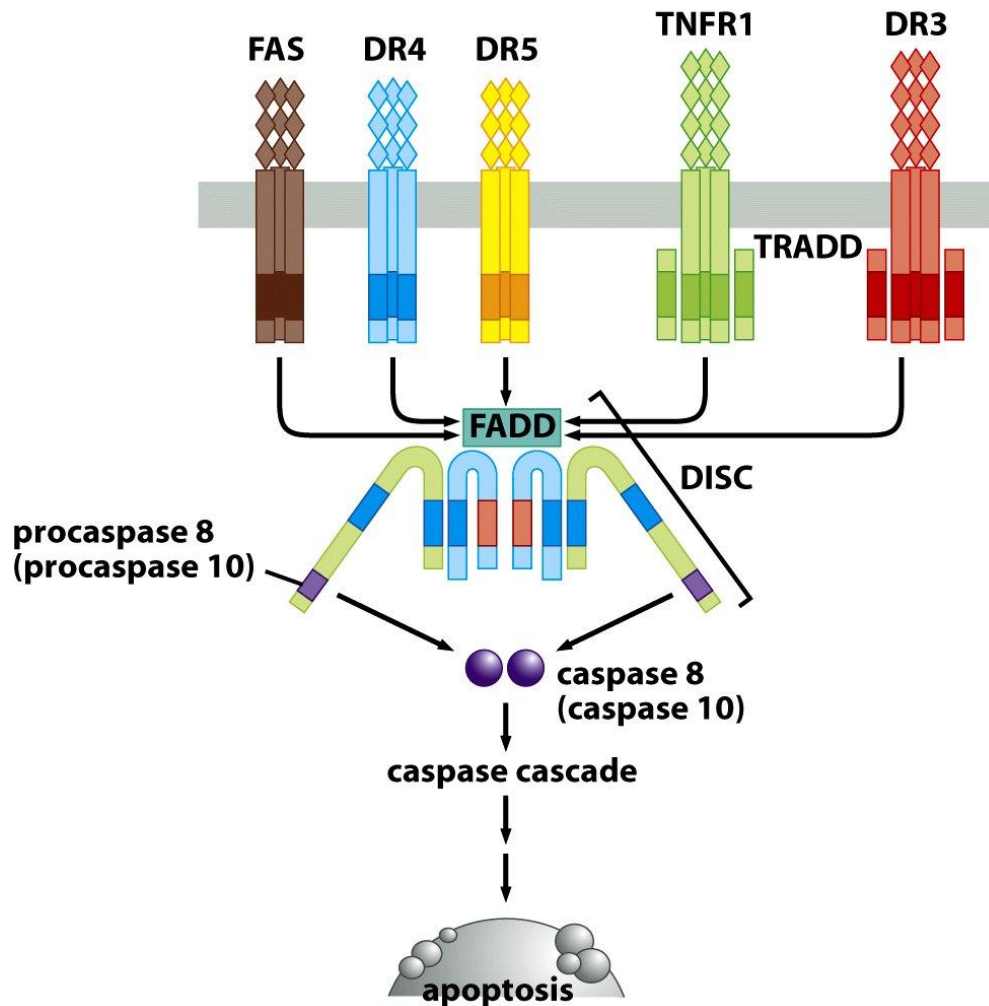
Mechanismus fungování DR4 a DR5 je částečně shodný s ostatními receptory smrti, částečně zatím ne zcela znám (adaptorové proteiny?). Podobá se hodně fungování CD95, ale jeho exprese, stejně jako exprese Apo2L je mnohem méně specifická.

- ⇒ Jaká je ochrana buněk, které exprimují DR4 a 5, před apoptózou vyvolanou Apo2L?
- Expresí **decoy receptorů**: kompetují s DR4 a DR5 o vazbu ligandu - vychytávají ligand
- **DcR1 (TRID, TRAIL-R3, LIT)** - má podobnou strukturu jako DR4 a DR5, ale zcela postrádá cytoplasmatickou část; mají glycosyl-fosfatydilinositolovou skupinu, kterou jsou přichyceny na membránu
- **DcR2 (TRAIL-R4, TRUNDD)** - má zkrácenou cytoplasmatickou část o kritické aminokyseliny nutné k vyvolání odpovědi

# Apo signalizace receptory DR4 a DR5



# Receptory smrti



Pět rodin receptorů smrti je exprimováno/ exponováno na povrchu různých savčích/lidských buněk. Po vazbě ligandů cytoplasmatické části těchto receptorů - prostřednictvím FADD domén - vytvářejí **DISC** („death-inducing signaling complex“), který štěpí prokaspázu 8 na aktivní kaspázu

# Využití receptorů smrti k indukci apoptózy nádorových buněk

## Pro:

- DR mají přímou návaznost na apoptotickou mašinerii
- navozují apo nezávisle na p53 apod.

## Proti:

- silné vedlejší účinky působení **CD95L** a **TNF** - šok připomínající septický šok (indukce zánětlivých odpovědí)
- indukce apo u hepatocytů myši při použití protilátek namířených na **CD95**

## Možná bude úspěšnější využití **Apo2L**:

- DR4 a DR5 aktivují NF- $\kappa$ B, ale APO2L indukuje tuto dráhu jen slabě
- DR4 a DR5 jsou exprimovány u mnoha normálních i nádorových buněk, ale DcR1 a DcR2 jsou exprimovány u normálních, ale jen vzácně u nádorových buněk.

# Úloha mitochondrií v apoptóze

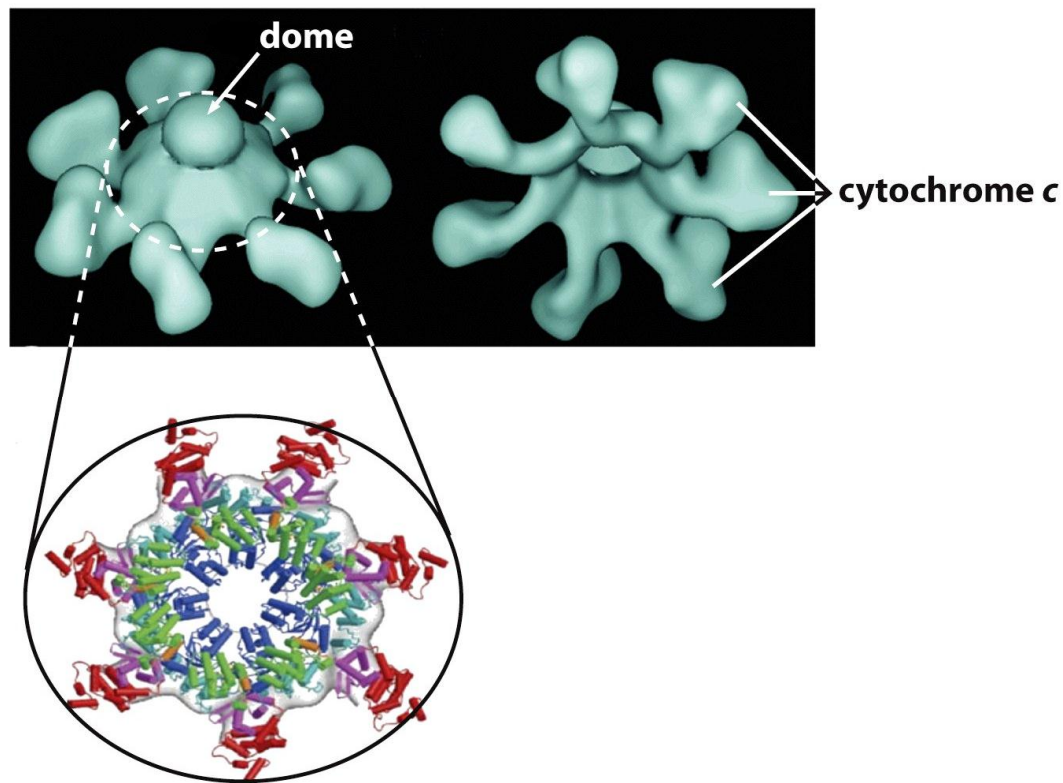
Mitochondrie hrají klíčovou úlohu v regulaci buněčné smrti.

(Endosymbiotický původ mitochondrií a evoluce aerobního metabolismu u eukaryot vytvořily základ pro evoluci aktivní buněčné smrti.)

Pro průběh apoptózy je klíčové vytvoření **apoptozómu**, proteinového komplexu, který je nutný k aktivaci iniciační kaspázy. Apoptozóm je tvořen **cytochromem C**, **Apaf-1** a **prokaspázou-9**. Kritické pro vytvoření apoptozómu je uvolnění cytochromu C z mitochondrií.

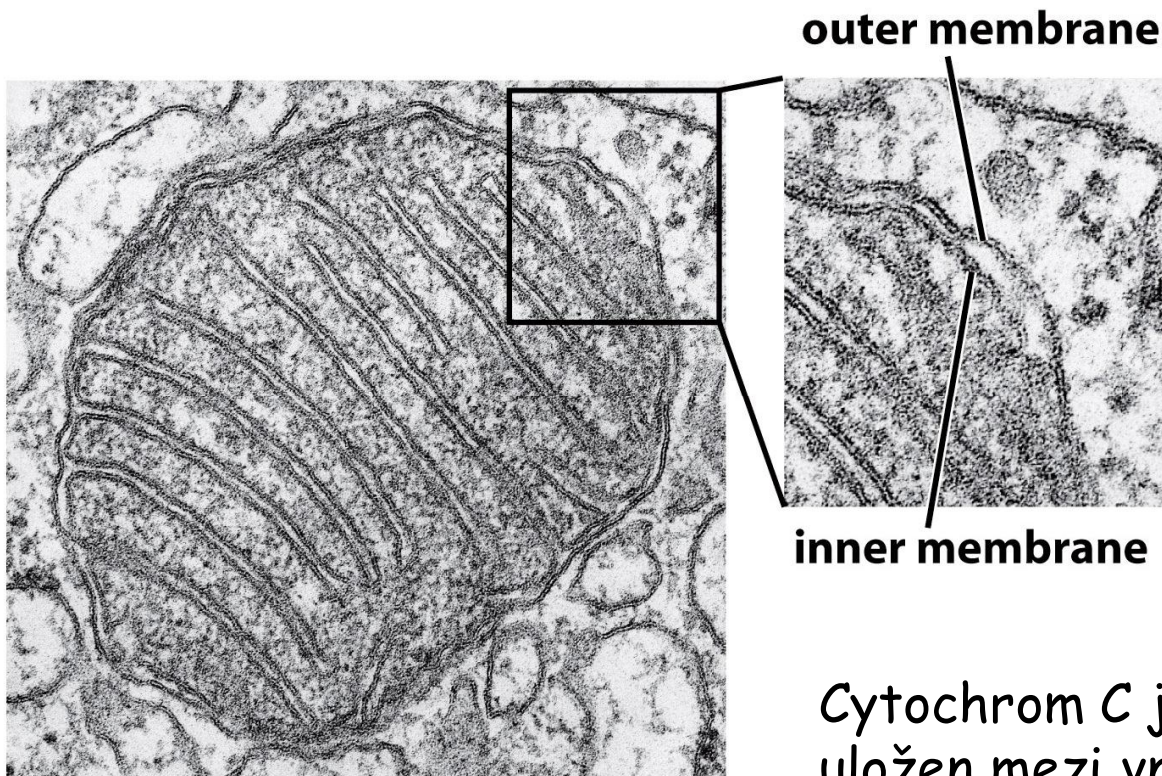
Z mitochondrií uvolněny i další faktory: **AIF** („apoptosis-inducing factor“ / Diablo/SMAC) a intramitochondriální prokaspázy (3).

# Apoptozóm: „kolo smrti“



Apoptozóm se tvoří v cytosolu, je-li uvolněn cytochrom C z mitochondrií a asociuje s Apaf-1. Tak se vytvoří sedmiramenné kolo, kde ramena jsou tvořena sedmi podjednotkami Apaf-1 a jejich vrcholy tvoří cytochrom C (červená). Toto kolo přitahuje prokaspázu 9, která se váže do středu/osy kola (modrá) a je aktivována na kaspázu 9

# Úloha mitochondrií v apoptóze



Cytochrom C je v mitochondriích uložen mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou.

# Regulace permeability mitochondriální membrány

Bylo popsáno mnoho molekul, které ovlivňují permeabilitu mitochondriální membrány - mitochondrie tak fungují jako **integrátory** (pro- a anti-) apoptotických signálů.

- Především proteiny z rodiny **Bcl-2\***. Je to rodina (více než 20) proteinů strukturou a funkcí homologní s proteinem CED-9. Některé proteiny z rodiny Bcl-2 mají antiapoptotickou funkci: **Bcl-2**, **Bcl-X<sub>L</sub>**, **Bcl-W**, některé proapoptotickou funkci: **Bax**, **Bak**, **Bid**, **Bim**.

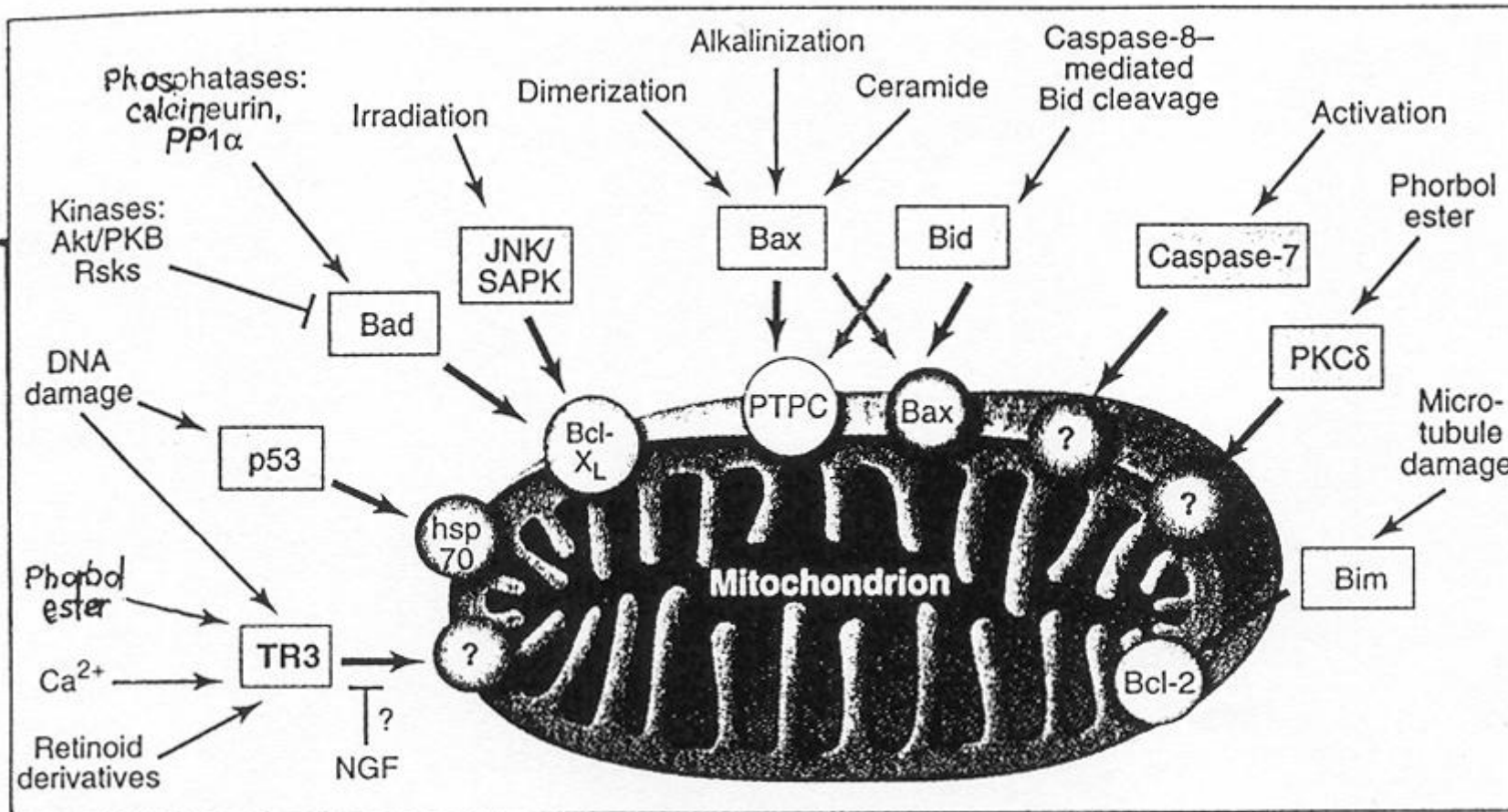
\* Bcl-2 („B-cell lymphoma gene-2“) byl první apoptotický gen objevený v savčích buňkách (1988) díky své roli v maligní přeměně B-buněk - tak také poprvé popsána nová třída **proto-onkogenů**: ne aktivátory buněčné proliferace, ale blok buněčné smrti.

t(14;18) - FL

(identifikace homologie Bcl-2 a CED9 = „Aha! moment“)



# Mitochondrie jako integrátory apoptotických signálů

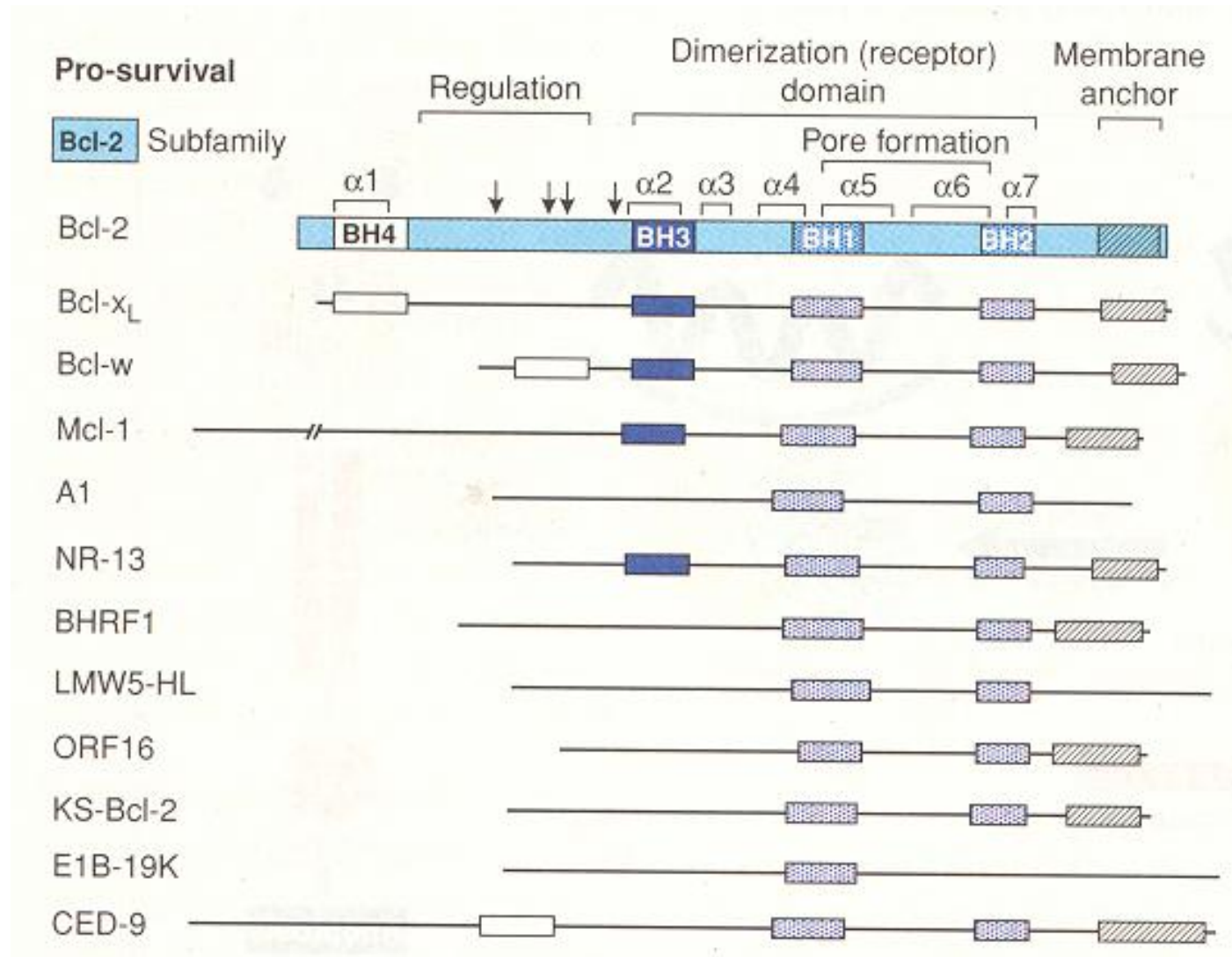


## Proteinová rodina Bcl-2

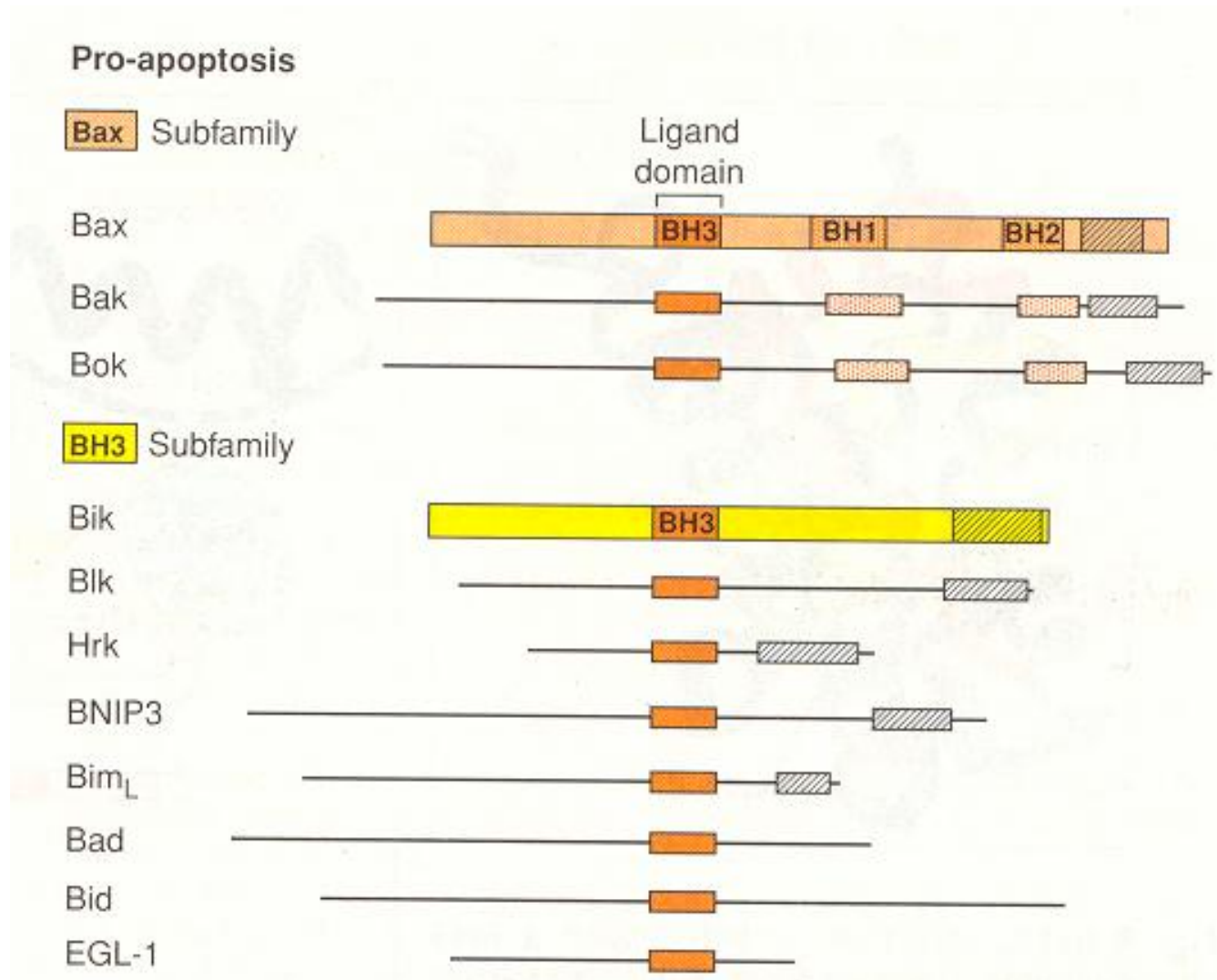
# Struktura proteinů Bcl-2

- Pro všechny proteiny rodiny Bcl-2 je typická konzervovaná sekvence označovaná jako **Bcl-2 homologní motiv**. Každý člen rodiny obsahuje alespoň jednu tuto sekvenci ze čtyř: **BH1** až **BH4**.
- Většina anti-apoptotických členů obsahuje **BH1** a **BH2**, proteiny nejvíce podobné Bcl-2 obsahují všechny čtyři.
- Pro-apoptotické proteiny tvoří dvě podrodiny: jedna (např. Bax, Bak, Bok) je blízce příbuzná Bcl-2 a obsahuje **BH1**, **BH2** a **BH3**, druhá je vzdáleně příbuzná (např. Bik, Blk), obsahuje jen **BH3** a představuje spíše funkční analog proteinu EGL-1 (označují se někdy jako BH3 faktory).  
**BH3** je nezbytná pro funkci pro-apoptotických proteinů.

# Struktura anti-apoptotických proteinů Bcl-2

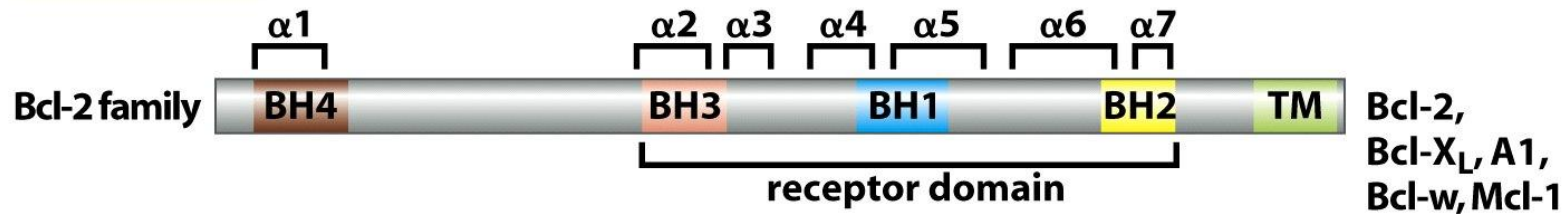


# Struktura pro-apoptických proteinů Bcl-2

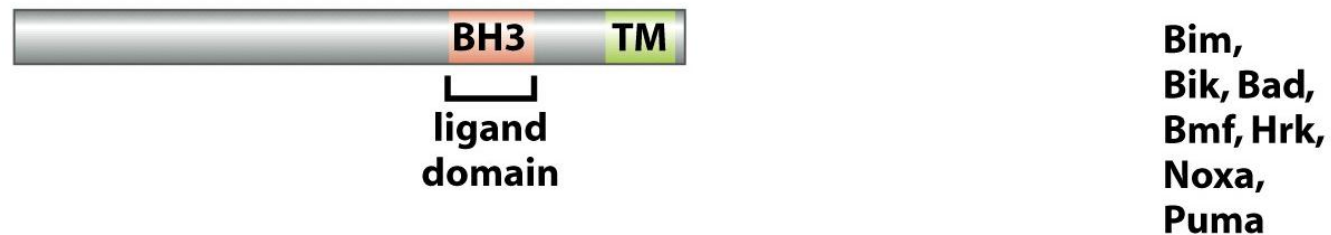
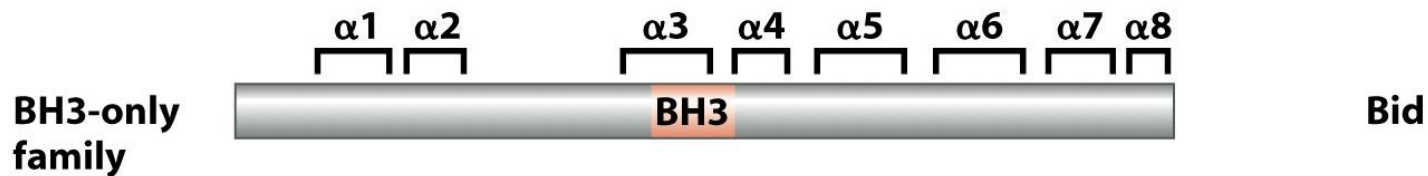
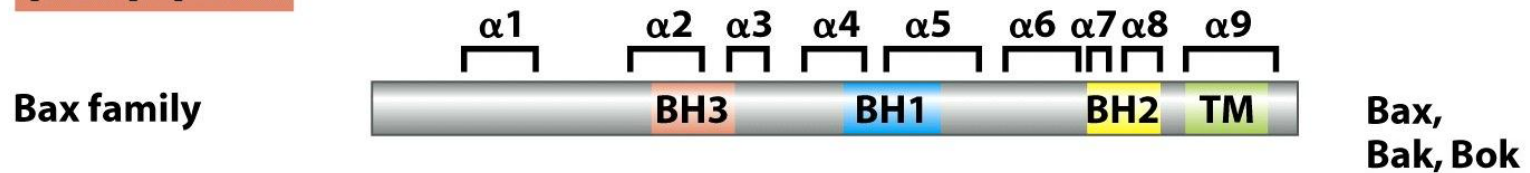


# Proteinová rodina Bcl-2

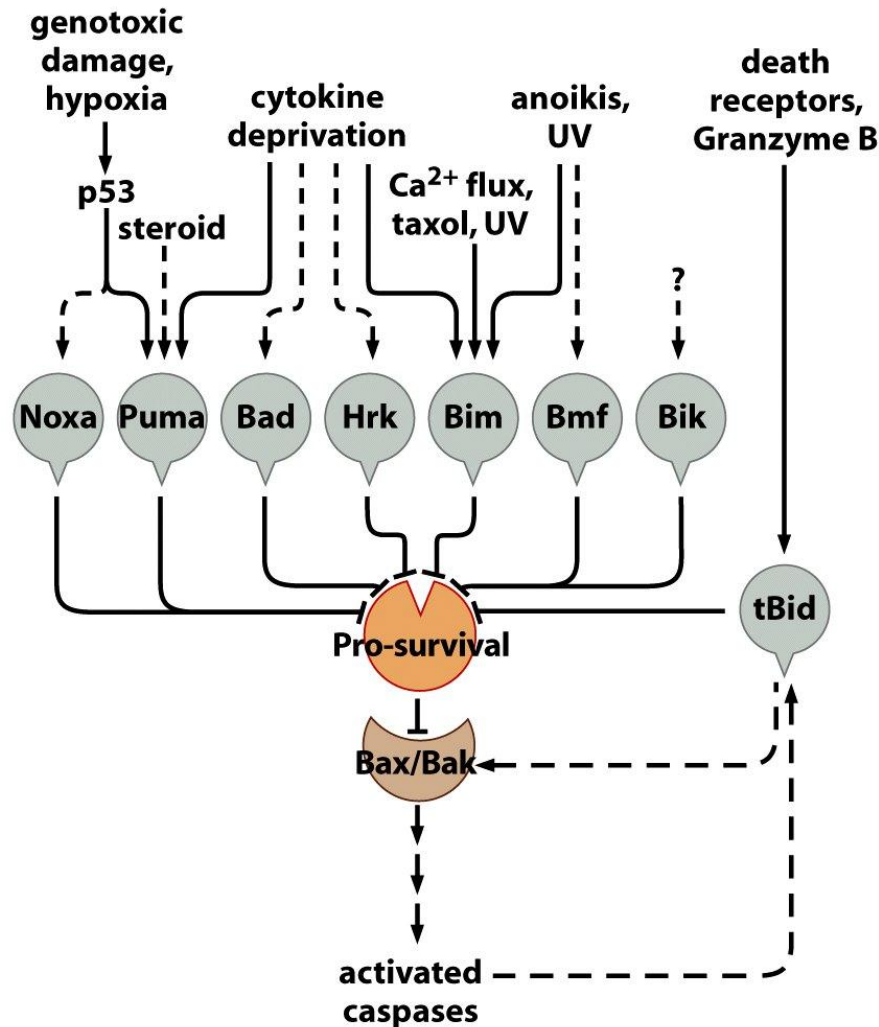
## pro-survival



## pro-apoptosis

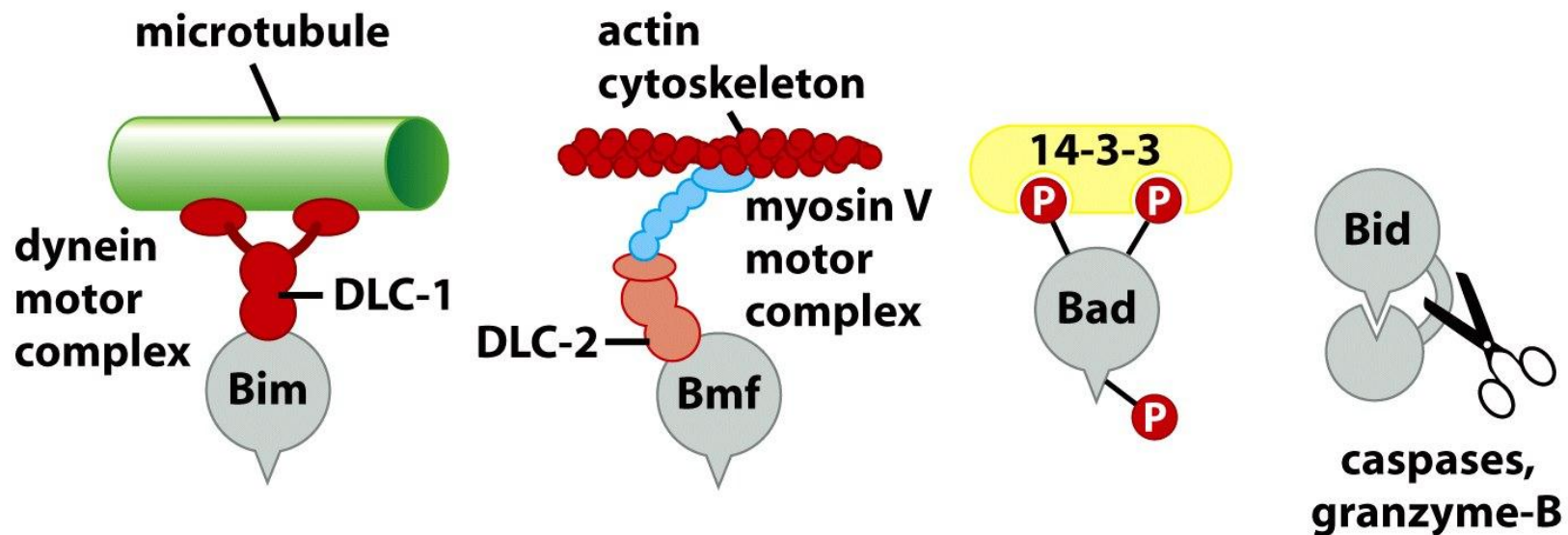


# Význam multiplicity pro-apoptotických proteinů



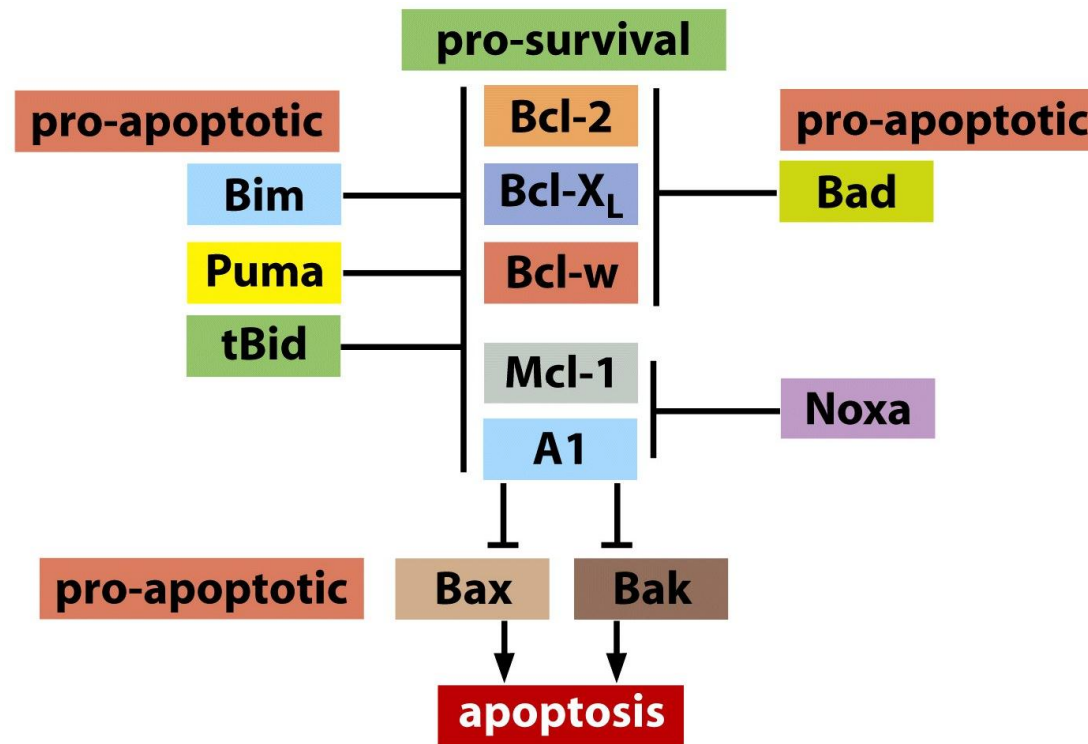
Různé fyziologické stresy/signály fungují prostřednictvím různých proapoptotických proteinů, které mají za úkol antagonizovat anti-apoptotický protein Bcl-2

# Význam multiplicity pro-apoptických signálů



Násobné/paralelní způsoby aktivace pro-apoptických proteinů BH3 souvisí také s jejich rozmanitými způsoby inaktivace přichycením na nejrůznější cytoplasmatické struktury nebo inhibiční komplexy

# „Součinnost“ pro- a anti-apoptických proteinů

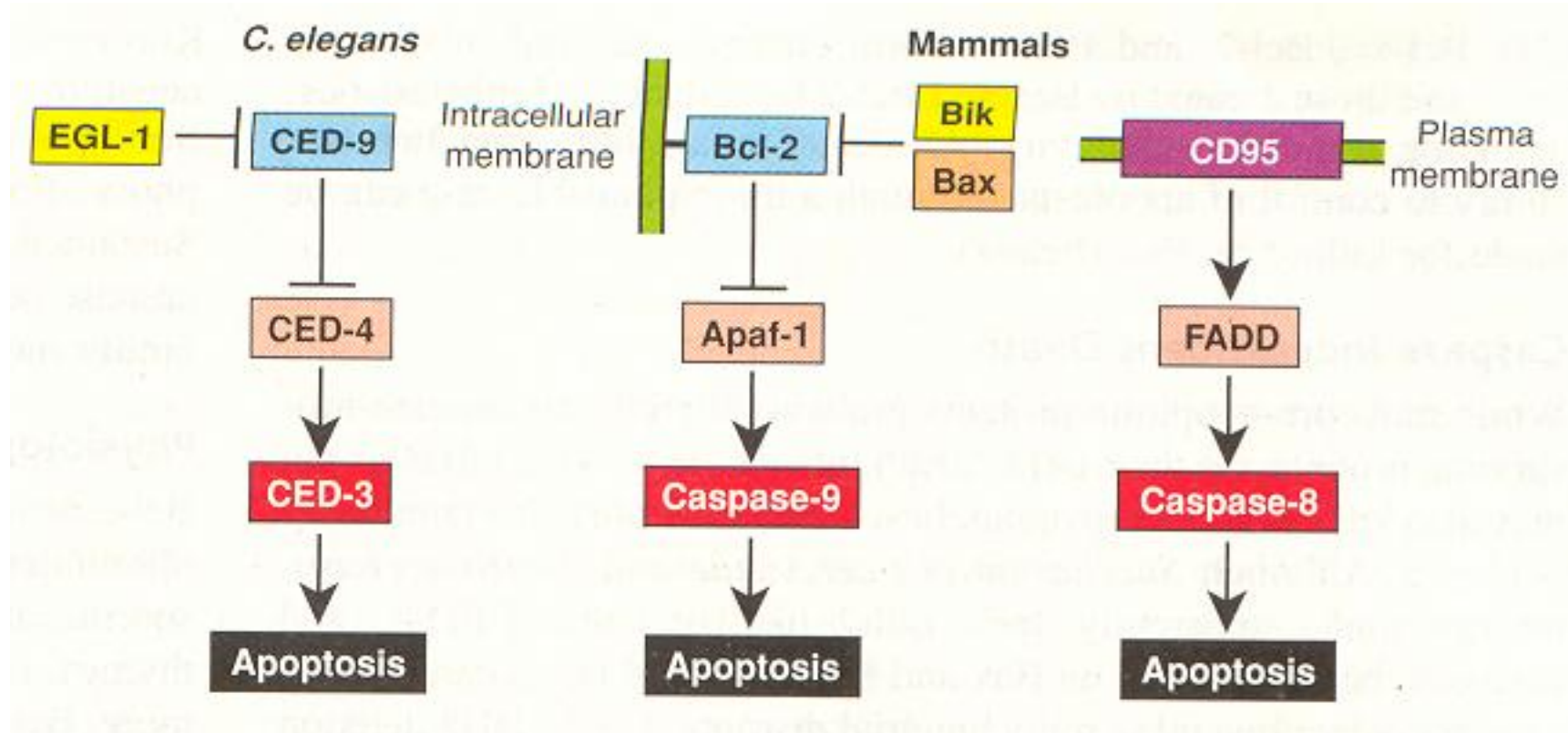


Každý člen rodiny Bcl-2 má svůj vlastní soubor antagonistických proteinů. V centru stojí anti-apoptické proteiny Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w a Mcl-1. Každý má svůj soubor antagonistů.

Proteiny Bax a Bak - pokud nejsou „neutralizovány“ vazbou „opozičních“ proteinů, indukují apoptózu otevřením mitochondriálních vnějších kanálů.



# Apoptotické dráhy u hlísta a savčí buňky



Klíčové rozdíly apoptotické mašinerie nematod a savců: **cytochrom C**, proteiny **IAP** ⇒ savčí apoptóza je **komplexnější**

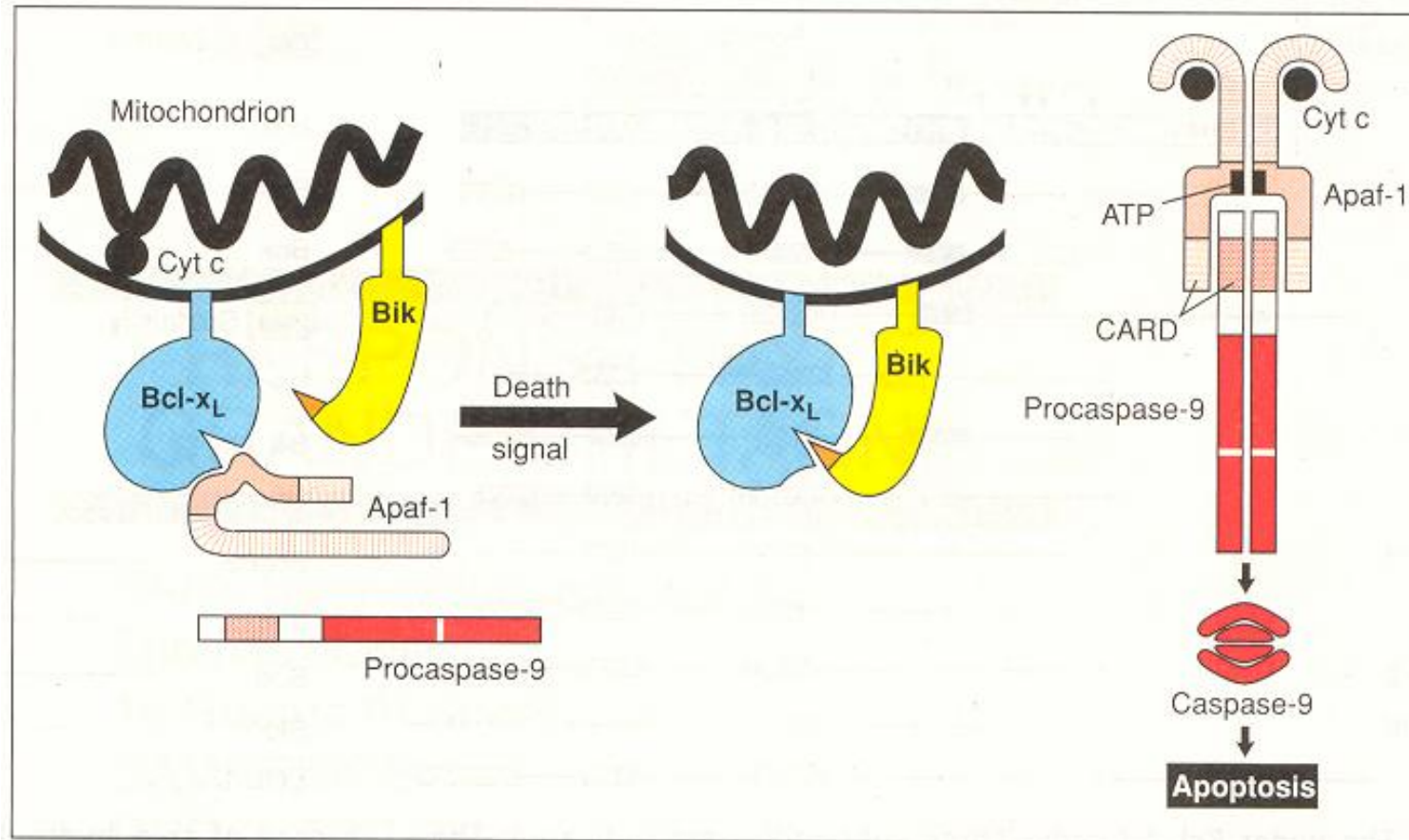
# Struktura proteinů Bcl-2

- Proteiny z rodiny Bcl-2 mohou tvořit **heterodimery** a titrovat, ovlivňovat navzájem svůj účinek: jejich vzájemné koncentrace tak mohou fungovat jako apoptotický **reostat**.
- Sekvence **BH1**, **BH2** a **BH3** ovlivňují schopnost dimerizovat.
- Heterodimerizace není nezbytná pro anti-apoptotické proteiny.
- U pro-apoptotických proteinů je heterodimerizace nezbytná pro BH3 faktory,
- ale postradatelná pro proteiny typu Bax (zřejmě nezávislý cytotoxický efekt).

# Mechanismus účinku proteinů Bcl-2

- Z analogie CED-4/CED-3/CED-9 - **přímá interakce**: Zdá se, že Bcl-X<sub>L</sub> interaguje přímo s Apaf-1 a inhibuje jeho asociaci s prokaspázou-9. Pro-apoptotické proteiny (např. Bik) mohou fungovat tak, že uvolňují tuto interakci.
- Anti-apoptotické proteiny zřejmě **udržují integritu organel** a zabraňují uvolnění cytochromu C z mitochondrií. Zřetelně to ale není jediná jejich funkce (např. Bcl-2 může blokovat apoptózu i po uvolnění cytochromu C).
- Proteiny s motivem BH1 a BH2 zřejmě mohou **tvořit póry** v organelách - mitochondriích (Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2, Bax - *in vitro*)

# Model regulace Apaf-1 proteiny Bcl-2



ÉAnti-apoptotický protein (Bcl-X<sub>L</sub>) zabraňuje Apaf-1 aktivovat prokaspázu-9.

- Pro-apoptotický protein (Bik) může být stimulován k interakci s tímto proteinem a tak zrušit tuto inhibici apoptózy.

# Model fungování BH3 proteinů

- Jsou-li BH3 proteiny („BH3-only“ proteins) aktivní, zanořují se svou BH3 doménou do rozsáhlého hydrofobního žlábků antiapoptotických („pro-life“) proteinů Bcl-2, a tak je neutralizují.
  - To vede k agregaci Bax a Bak na endoplasmatickém retikulu a mitochondriální membráně a k uvolnění apoptotických proteinů, jako cytochrom C.
  - U mnoha nádorů je vysoká exprese *bcl-2* nebo snížená exprese BH3 proteinů
- ⇒ terapeutická strategie: simulace inhibice Bcl-2 malými molekulami

# Proteiny Bcl-2 a nádory

Potenciálně jsou anti-apoptické proteiny **onkogenní**:

- *bcl-2* v translokacích spojených s folikulárními lymfomy a difúzními velkobuněčnými lymfomy a CLL.
- Nepřímá účast v kancerogenezi: Myb, Ras,.. indukují expresi *bcl-2*. Exprese *bcl-2* zvýšena např. u myeloidních leukémií, nádorů žaludku.

Pro-apoptické proteiny jsou potenciálními **nádorovými supresory**:

- *bax* je mutován u některých nádorů trávicího traktu, a některých leukémií.
- Exprese *bax* je redukována u nádorů s mutací p53.

# Signály přežití (X signály smrti)

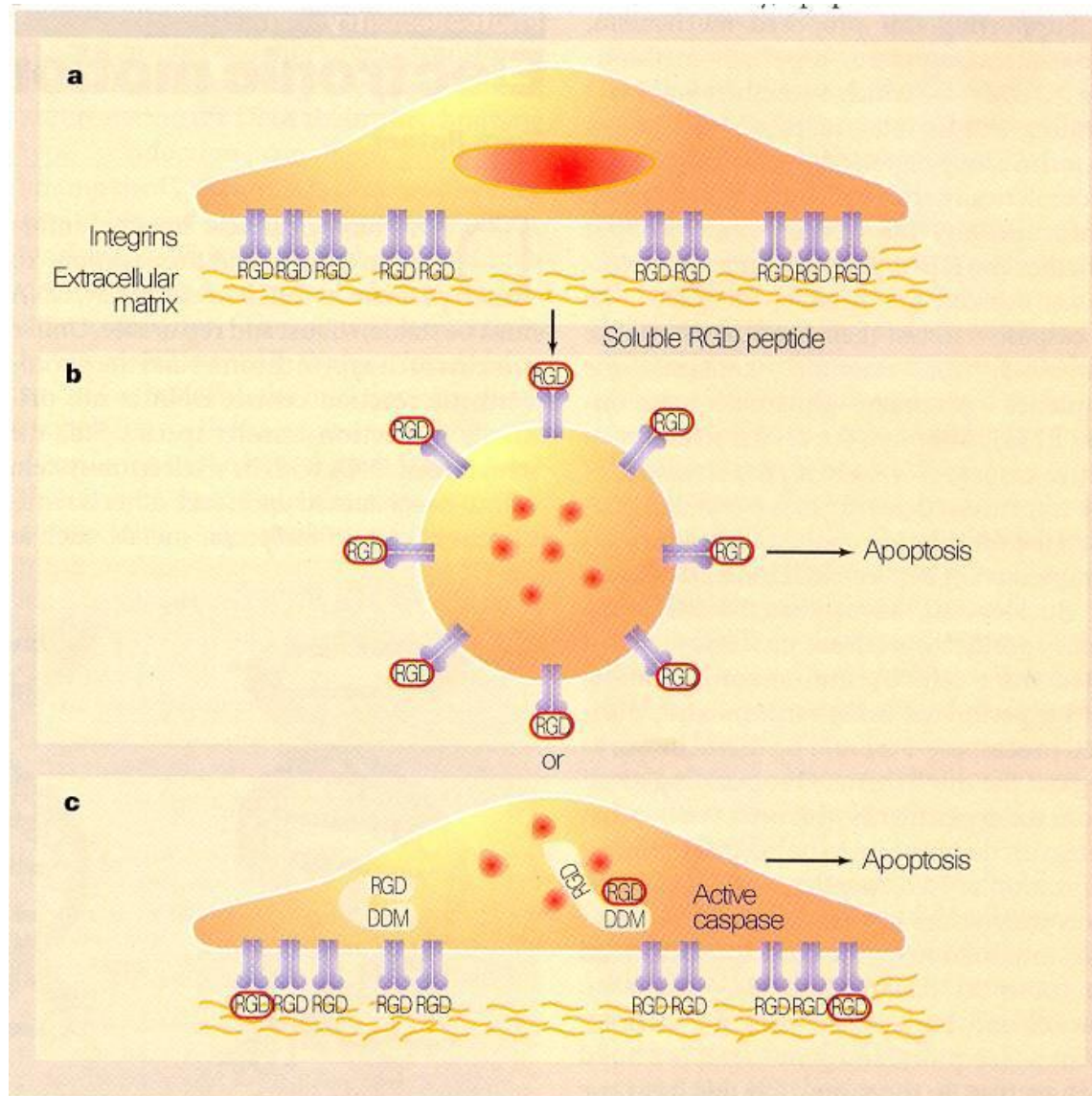
- Některé cytokiny mají povahu signálů přežití (nikoli mitotických signálů!).
- **IGF-I** („insuline-like growth factor“) - jeho signalizace zprostředkována **PI3K** a **c-Akt**.  
c-Akt fosforyluje **Bad** na Ser136, který potom interaguje s proteinem **14-3-3**. Interakce s proteinem 14-3-3 zabraňuje proteinu Bad interagovat s **Bcl-X<sub>L</sub>**.

# Anoikis

- Většina buněk potřebuje být **přichycena** k extracelulární matrix (ECM), aby mohla přežít („anchorage dependent cell survival“). Tuto vazbu zprostředkovávají **integriny**.
- Buňka, která ztratí kontakt s ECM, zahájí apoptózu - tzv. anoikis (z řečtiny - bezdomovectví).
- Integriny rozpoznávají na cílových proteinech ECM sekvenci arginin-glycin-aspartát (**RGD**).
- Vazba integrinů k ECM není o prostém přichycení, ale hlavně o získávání nutných **signálů přežití**.



# Úloha proteinů RGD v apoptóze



Buňky přisedají k ECM vazbou integrinů.

Přidání solubilních RGD proteinů způsobuje apoptózu aktivací kaspázy-3.

Vazbou integrinů k ECM získává buňka signály k přežití.

# Anoikis

- Na zprostředkování „anchorage-dependent cell survival“ se podílí **FAK**.
- FAK je jedním z cílů kaspáz během apoptózy.
- Signalizace FAK je pravděpodobně zprostředkována **PI3K**, a to buď přímou interakcí FAK s podjednotkou p85 nebo aktivací **Ras** a následnou aktivací PI3K.
- Signalizace PI3K potom vede přes **c-Akt** k fosforylaci pro-apoptického proteinu **Bad**.

# Kaspázy - efekторы apoptózy

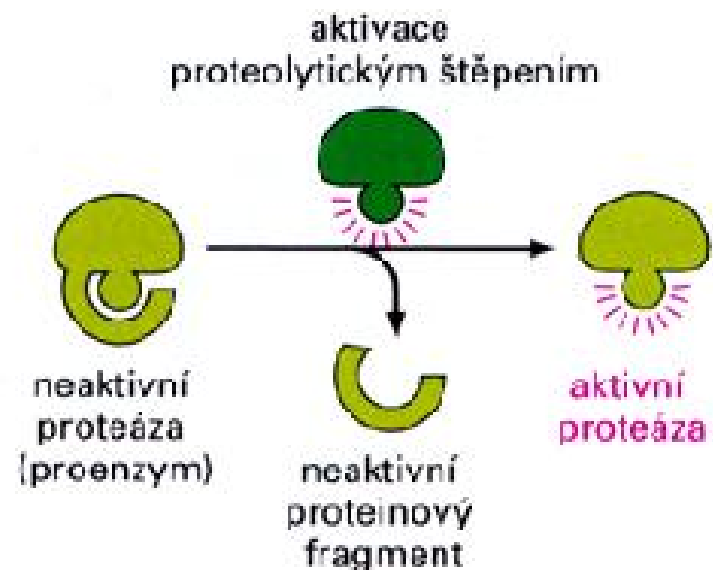
- Rodina cysteinových proteáz, které mají specifitu k aspartátové kyselině na substrátu („cysteine **as**partyl-specific prote**as**es“).
  - Analogy proteinu **CED-3**. První savčí popsaná kaspáza: **ICE\*** („interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“) - **kaspáza-1**
  - Jsou hlavními vykonavateli finální exekuční fáze apoptózy.
  - Jsou konstitutivně přítomny v cytosolu buněk, a to ve formě jednořetězcového proenzymu jako **prokaspázy**.  
Např. prokaspáza-8 má asi 1-2% aktivity plně funkční kaspázy-8.
  - Sdílejí podobnost sekvenční, strukturní a substrátovou.
- \* ICE nemá prokazatelnou úlohu v apoptóze, ale byla to první identifikovaná proteáza celé rodiny proteinů, které mají úlohu v apoptóze a zánětu.

# Aktivace kaspáz

Proenzym má velikost 30 až 50 kD a tři domény: N-terminální, velkou podjednotku (20 kD) a malou podjednotku (10 kD).

Prokaspázy jsou aktivovány dvojím **proteolytickým štěpením**:

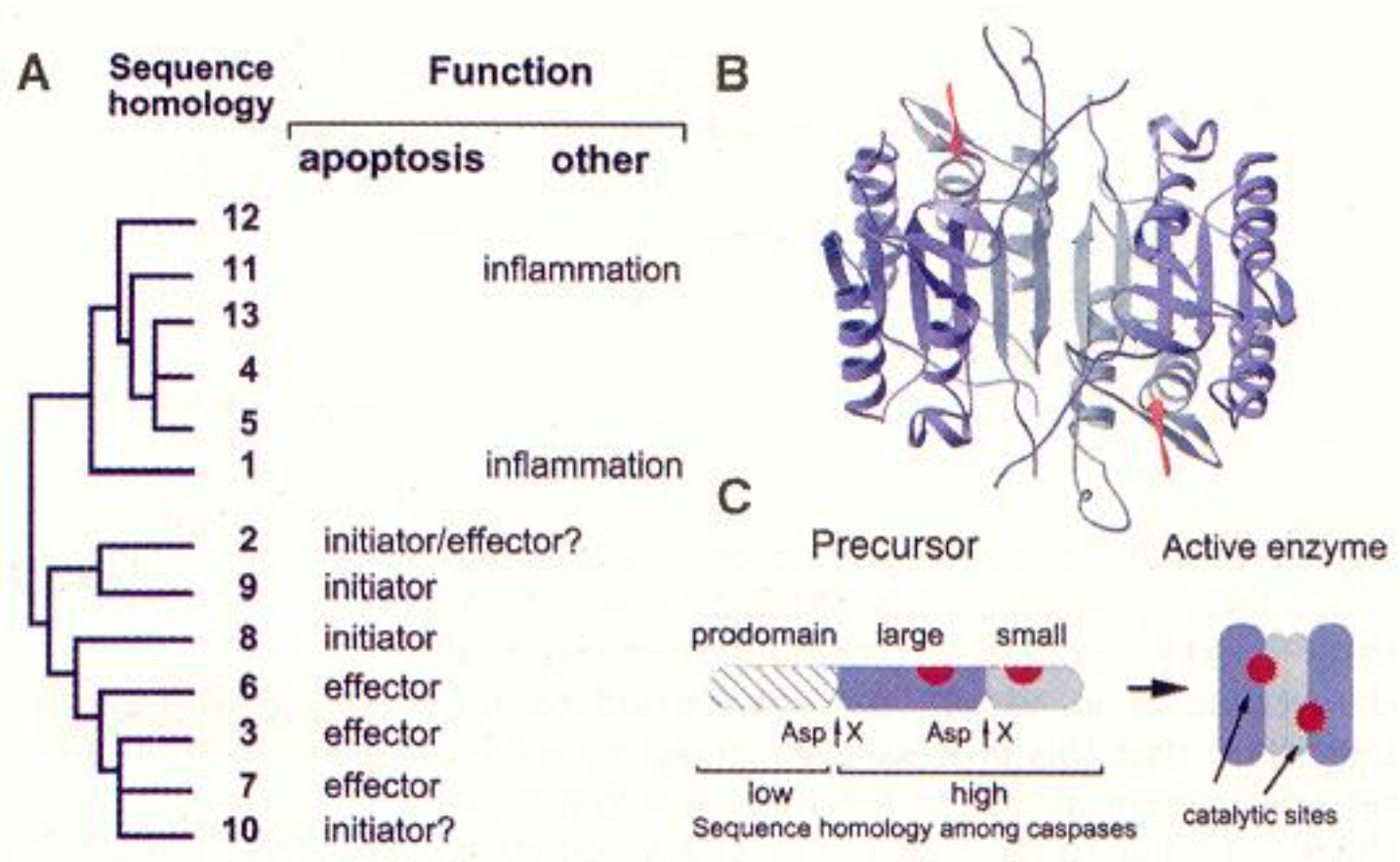
- Molekula prokaspázy je rozštěpena na dvě podjednotky - menší a větší.
- Je odštěpena N-terminální doména.
- Podjednotky vytvoří **tetramer** (2+2 podjednotky) se dvěma aktivními místy.



# Aktivace kaspáz

- Kaspázy patří k proteázám s nejvyšší specifitou a vysokou aktivitou. Ve specifitě jsou mezi kaspázami rozdíly - mají odlišné funkce.
  - Všechny prokaspázy jsou aktivovány štěpením v místě, které je **konsensus sekvencí\*** pro kaspázy.
  - ⇒ kaspázy jsou aktivované autokatalyticky nebo enzymy s podobnou specifitou.
  - Během apoptózy fungují jako **iniciátory** (8 a 9), kdy iniciují řetězec - kaskádu událostí jako odpověď na proapoptotické signály, a jako **efektory** (3, 6 a 7), kdy se podílejí na odstranění buňky (degradaci proteinů).
- \* Štěpí za kyselinou aspartovou a rozpoznávají alespoň další 4 aminokyseliny směrem k N-konci molekuly.

# Struktura a funkce kaspáz



# Regulace kaspáz

Kaspázy jsou v neaktivní formě konstitutivně přítomné v buňce:

⇒ jejich aktivitu lze rychle indukovat

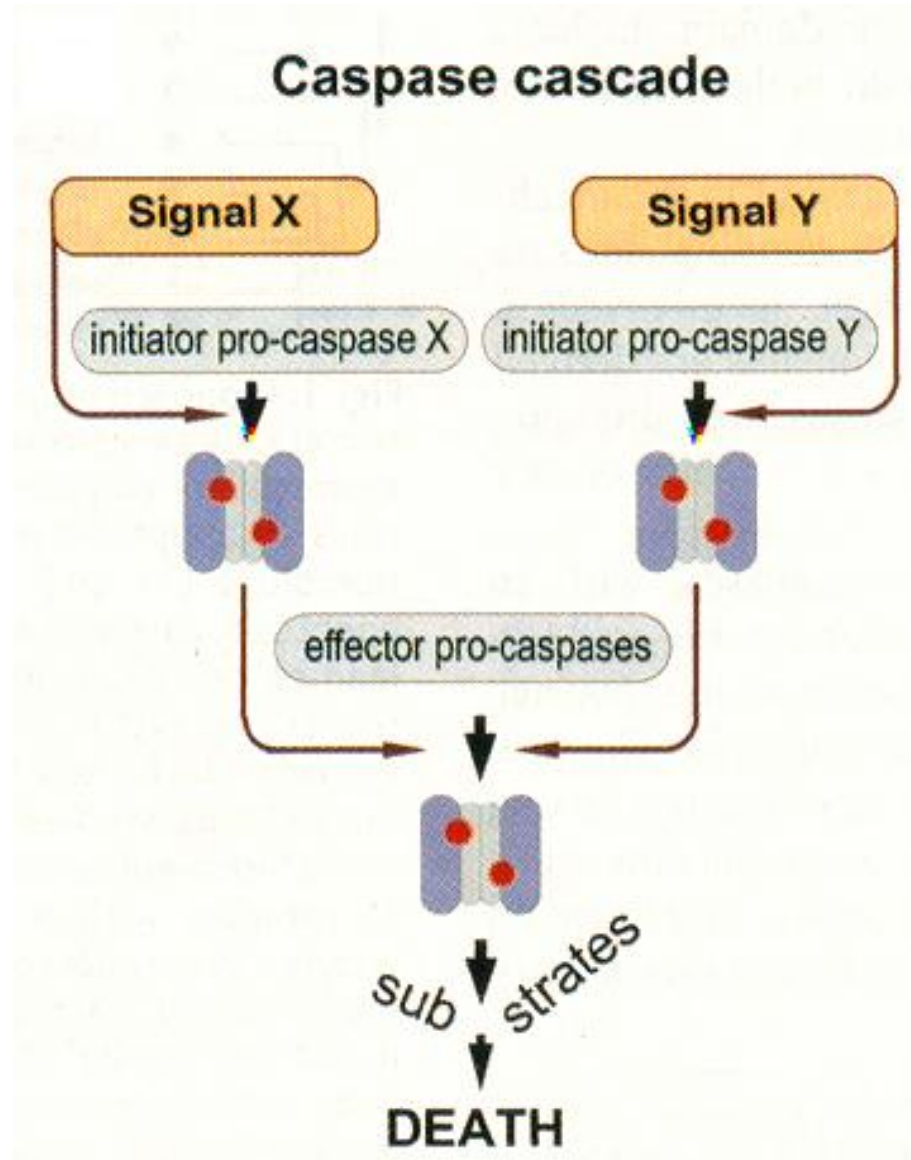
⇒ jejich regulace musí být velmi efektivní

**1. Aktivace iniciačních kaspáz** - především kaspázy-8 a kaspázy-9

**2. Aktivace efektorových kaspáz**

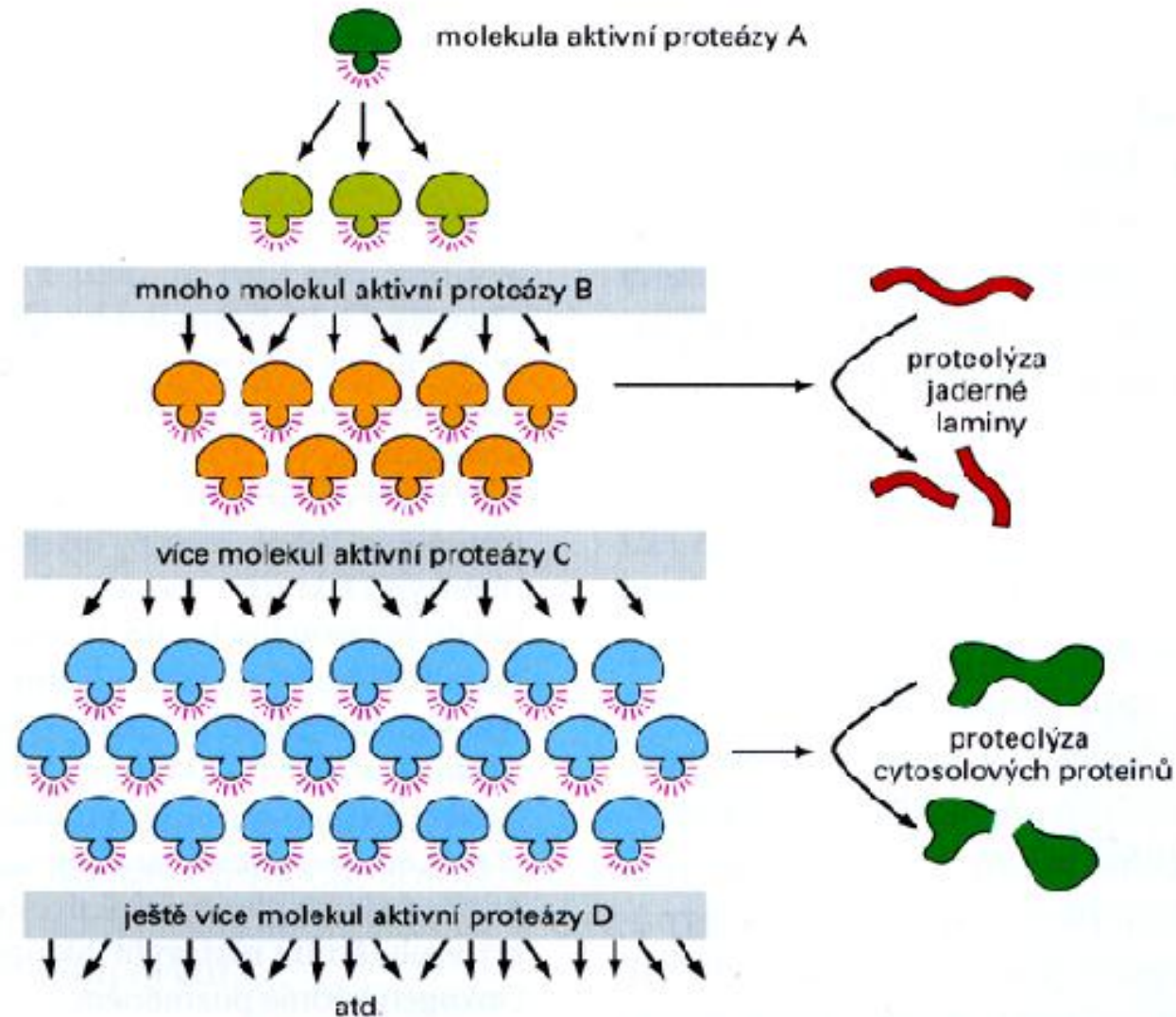
- Různé iniciační kaspázy zprostředkovávají různé signály (receptory smrti - kaspáza-8, cytotoxické látky - kaspáza-9), ale spouštějí stejné následné efektorové kaspázy. Tak je vysvětleno, jak různé apoptotické signály vedou ke stejným biochemickým a morfologickým změnám.
- Proapoptotické signály kulminují aktivací iniciačních kaspáz, které potom následně aktivují efektorové kaspázy - kaskádový model.

# Různé apoptotické signály mají stejný výsledek





# Kaspázy fungují v aktivační kaskádě



# Aktivace iniciačních kaspáz

Kaspázy jsou regulovány pomocí jak aktivátorů, tak inhibitorů. Zdá se, že apoptotické signály iniciují tři dráhy:

## 1. Aktivaci kofaktorů

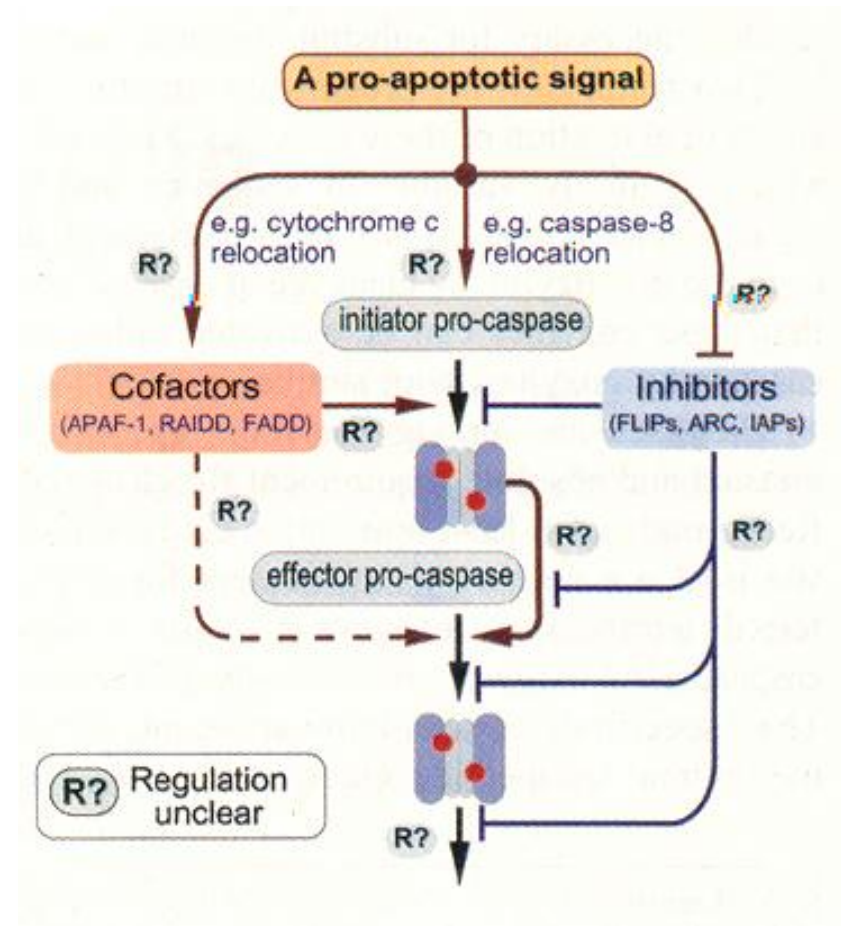
- uvolnění cytochromu C, tvorba komplexu s **APAF-1**, ..
- Aktivace **FADD**, ..

## 2. Modifikace prokaspázy

- např. přemístění prokaspázy-8 k receptorovému komplexu, ..

## 3. Inaktivace inhibitorů

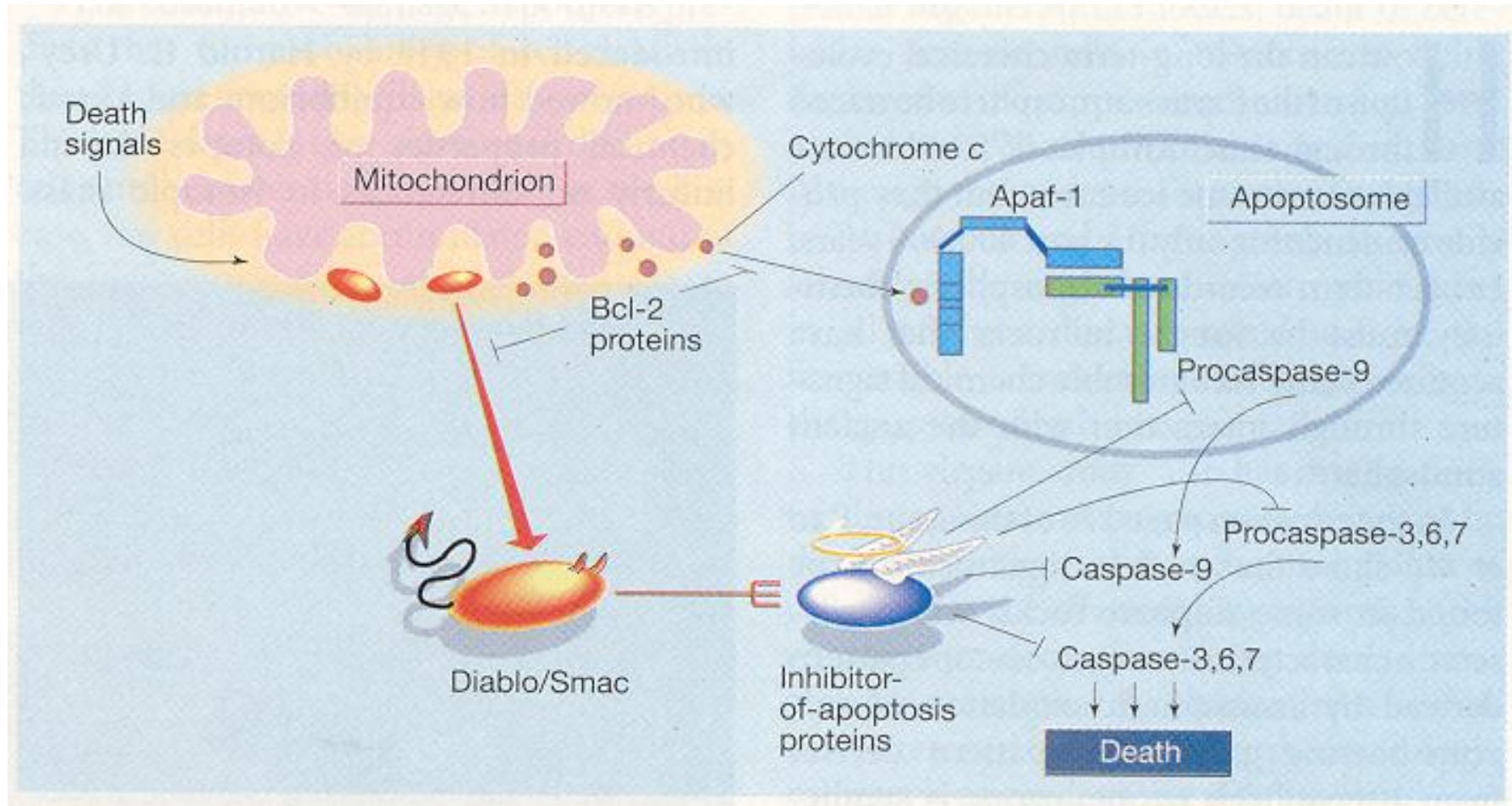
- **FLIP, ARC, IAP**, ..



# Inhibitory kaspáz

- **FLIPs** („FADD-like ICE inhibitory proteins“) - mají sekvenci podobnou prokaspáze-8, ale chybí jim katalytické místo - pravděpodobně kompetují s prokaspázou-8 o kofaktor FADD („decoy“). Na podobném principu funguje **ARC** („apoptosis repressor with caspase recruitment domain“; CARD)
- Nechtěná apoptóza může být blokována působením proteinu z rodiny **IAP** („inhibitor-of-apoptosis protein“): tyto proteiny se váží na prokaspázy a kaspázy a blokují jejich aktivitu.
- Naopak proteiny **DIABLO/Smac** se mohou vázat na proteiny IAP a inhibovat jejich působení. Ovlivňují tak citlivost buněk k apoptotickým signálům.

# Regulace apoptózy: IAP a DIABLO/Smac



# Inhibitory kaspáz IAPs

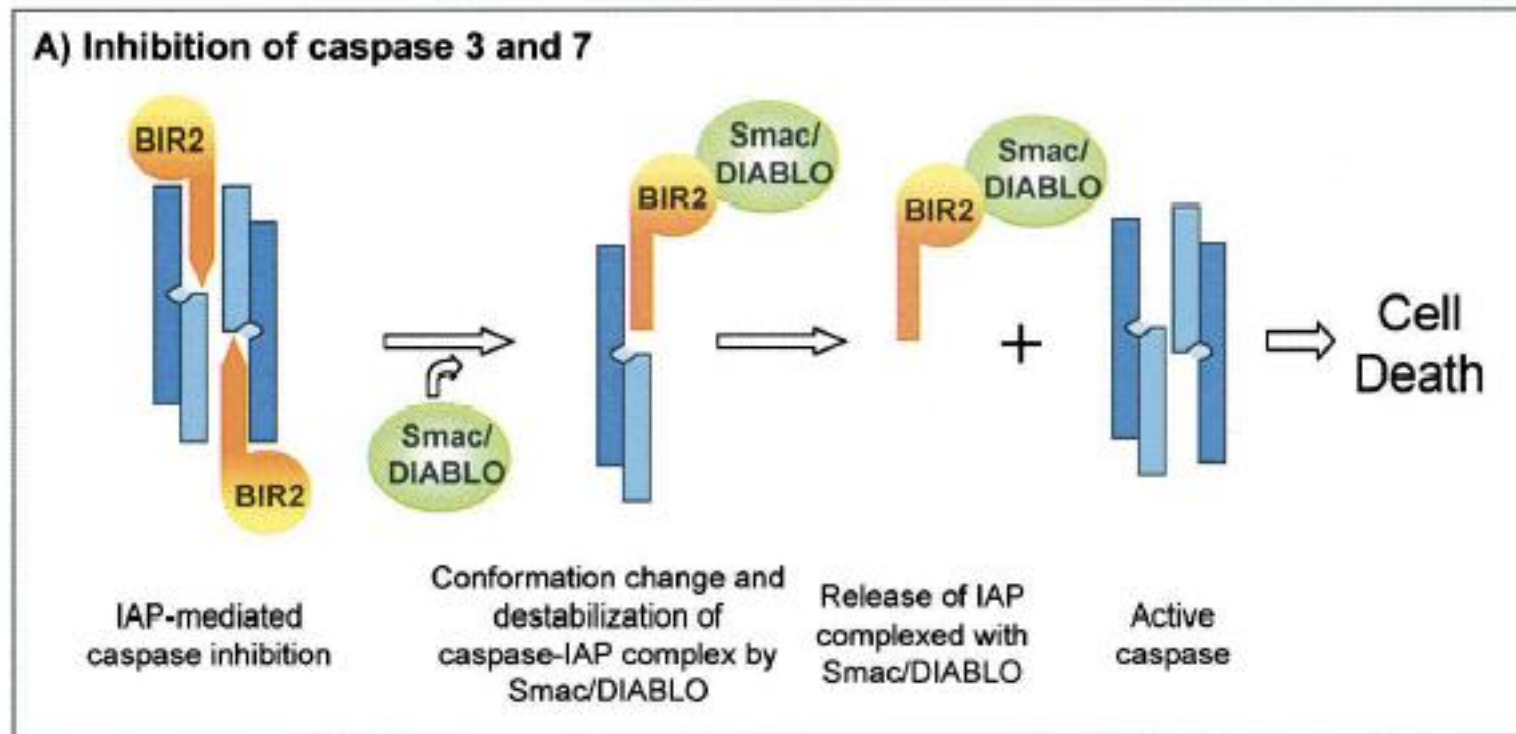
Některé viry si vytvořily nástroje k potlačení apoptózy hostitelských buněk, včetně inhibitorů kaspáz:

- Bakulovirový protein **p35** má širokou specifitu a tvoří kovalentní vazby s katalytickým místem kaspázy-8.
- Protein **crmA** („cytokine response modifier“) některých poxvirů je inhibitorem kaspázy-1 a kaspázy-8 (je to supresor zánětlivé reakce) a funguje podobně jako p35.
- Bakulovirové IAPs jsou charakteristické doménou **BIR** („**b**aculoviral **I**AP **r**epeat“) a jejich analogy nalezeny v mnoha dalších organismech.
- U člověka popsáno alespoň 7 různých IAP - např. **Survivin**, **XIAP**, **cIAP1**, **cIAP2**, ..  
(U některých nádorů je např. zvýšená exprese Survivinu.)

# Inhibitory kaspáz IAPs

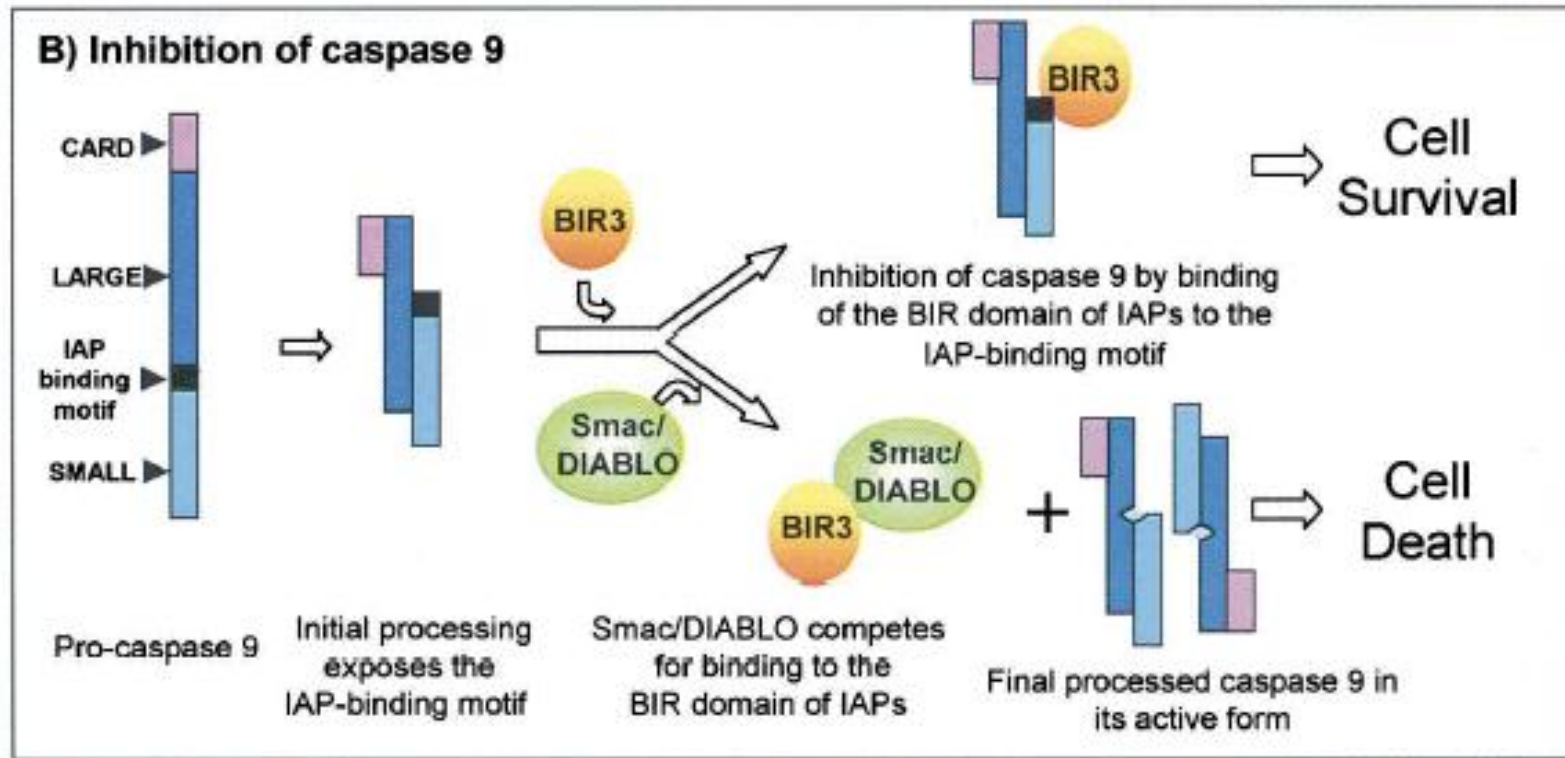
- Pro inhibici proteiny IAP je nezbytná přítomnost domény **BIR** (např. protein XIAP obsahuje 3 BIR domény). Její struktura je konzervovaná mezi proteiny IAP z různých organismů. Může to být obecnější protein-proteinová interakční doména.
- Smac/DIABLO antagonizuje funkci IAPs vazbou do domény BIR.
- IAP blokuje jak iniciační, tak efektorové kaspázy, a tak blokuje apoptózu zprostředkovanou receptory smrti i mitochondriemi.
- Je odlišný mechanismus inhibice iniciačních kaspáz a efektorových kaspáz.

# Inhibice efektorových kaspáz proteinem XIAP



Pro inhibici kaspázy-3 a -7 je nutná doména **BIR2**. Inhibiční komplex je typicky složen ze dvou heterodimerů dvou aktivních kaspáz a dvou molekul XIAP - zprostředkováno doménou BIR2.

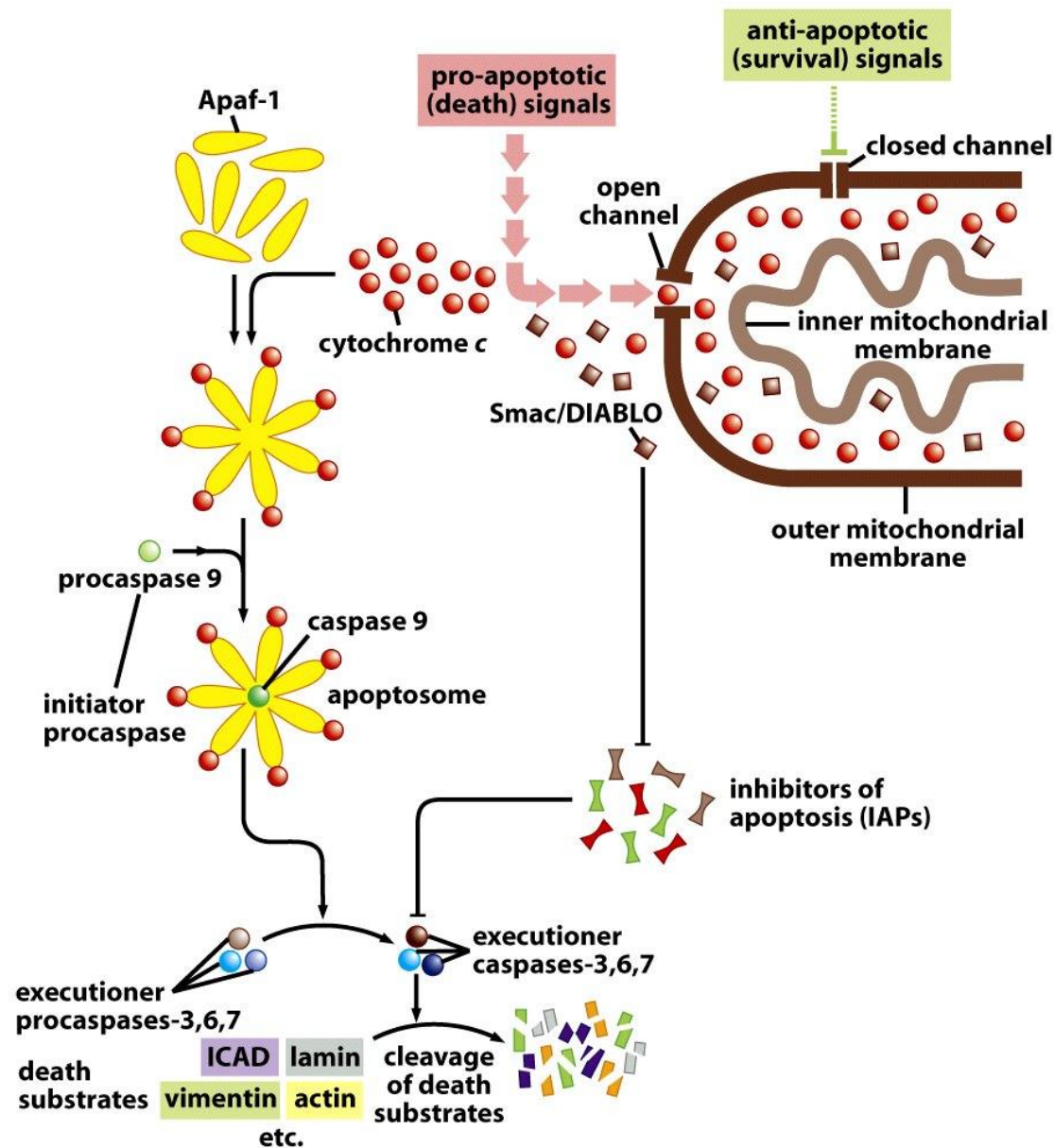
# Inhibice iniciačních kaspáz proteinem XIAP



Pro inhibici kaspázy-9 je nutná doména **BIR3**. Vazebné místo pro BIR3 se na molekule kaspázy-9 odhalí až po iniciační proteolýze.



# Apoptotická kaskáda



- Vnější mitochondriální membrána tvoří kritický vstup do apoptózy. S jejím otevřením je uvolňován cytochrom C, což vede k vytvoření apoptozómu a posléze k aktivaci kaspázy 9, která aktivuje kaspázu 3, která aktivuje...

- Kaspázy/prokaspázy mohou být inhibovány vazbou IAPs. Z mitochondrií jsou ale uvolňovány i faktory Smac/DIABLO, které antagonizují IAPs.

# Úkoly kaspáz

## 1. Inaktivace inhibitorů apoptózy, např.:

- Inaktivace **I<sup>CAD</sup>**, který je inhibitorem **CAD** - nukleázy, která je odpovědná za fragmentaci DNA.
- Inaktivace **Bcl-2** - pravděpodobně je tak nejen inhibován inhibitor apoptózy, ale produkován i fragment, který potencuje apoptózu (amplifikace!).

## 2. Desintegrace buněčných struktur, např.:

- Destrukce jaderné laminy - struktura pod jadernou membránou, která se podílí na kondenzaci chromatinu.

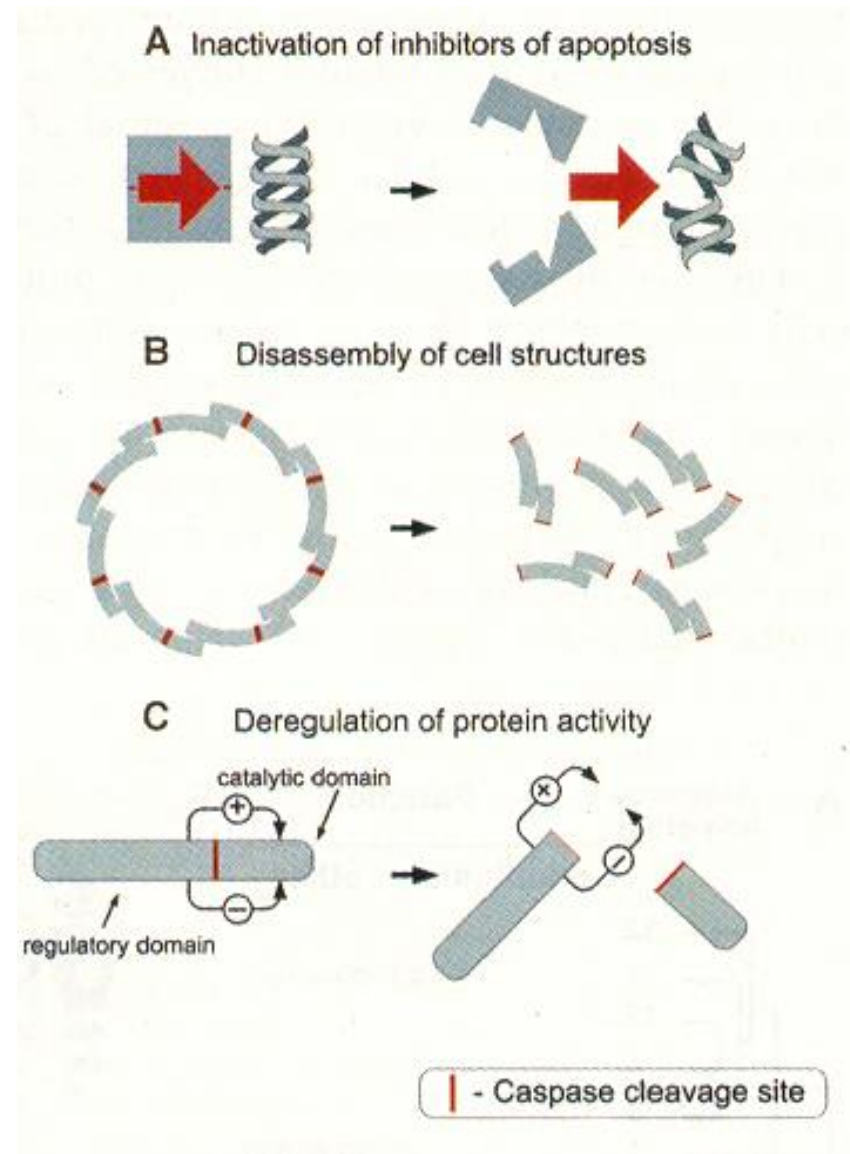
# Úkoly kaspáz

**3. Inaktivace některých proteinů** (separováním regulační a katalytické podjednotky), účastnících se:

- regulace cytoskeletu (FAK, kináza PAK2,..)
- replikace DNA
- oprav DNA
- sestřihu mRNA, ..

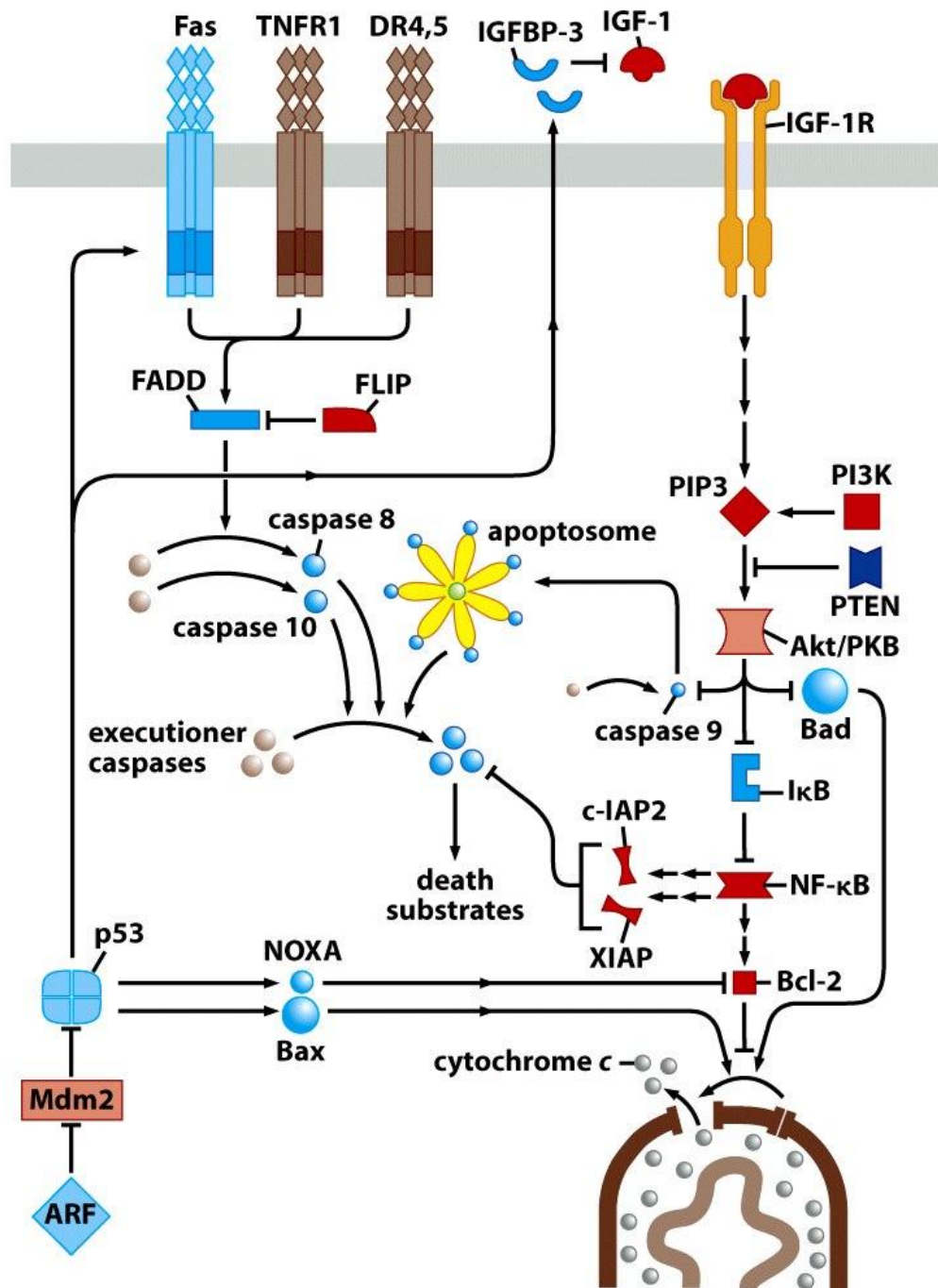
(**4.** Účast kaspáz a dalších „apoptotických“ molekul - např. FADD - v **regulaci buněčného cyklu!**)

# Úkoly kaspáz



# Poškození apoptózy u nádorů

- up-regulace *bcl-2* (chromozomální translokací) v lymfomech
- up-regulace faktorů přežití IGF-1, IGF-2
- mutace receptoru smrti Fas
- down-regulace Fas
- mutace *bax*
- inaktivace p53 (regulace apo přes transaktivaci *bax* a přímá regulace mitochondrií)
- u některých nádorů je zvýšená exprese survivinu (IAP protein obsahující BIR)



# Anti-apoptické strategie nádorů

Nádory používají nejrůznější strategie, jak zmenšit šanci na vstup do apoptózy. Bud' snižují hladinu/aktivitu **proapoptických** (modře) proteinů, nebo zvyšují hladinu/aktivitu **antiapoptických** (červenohnědě) proteinů.

# Využití apoptózy v terapii nádorů

- Aktivací receptorů smrti.
- Propojení onkogenní transformace jako proapoptotických signálů na jedné straně s aktivací kaspáz na druhé straně.

# Autofagie

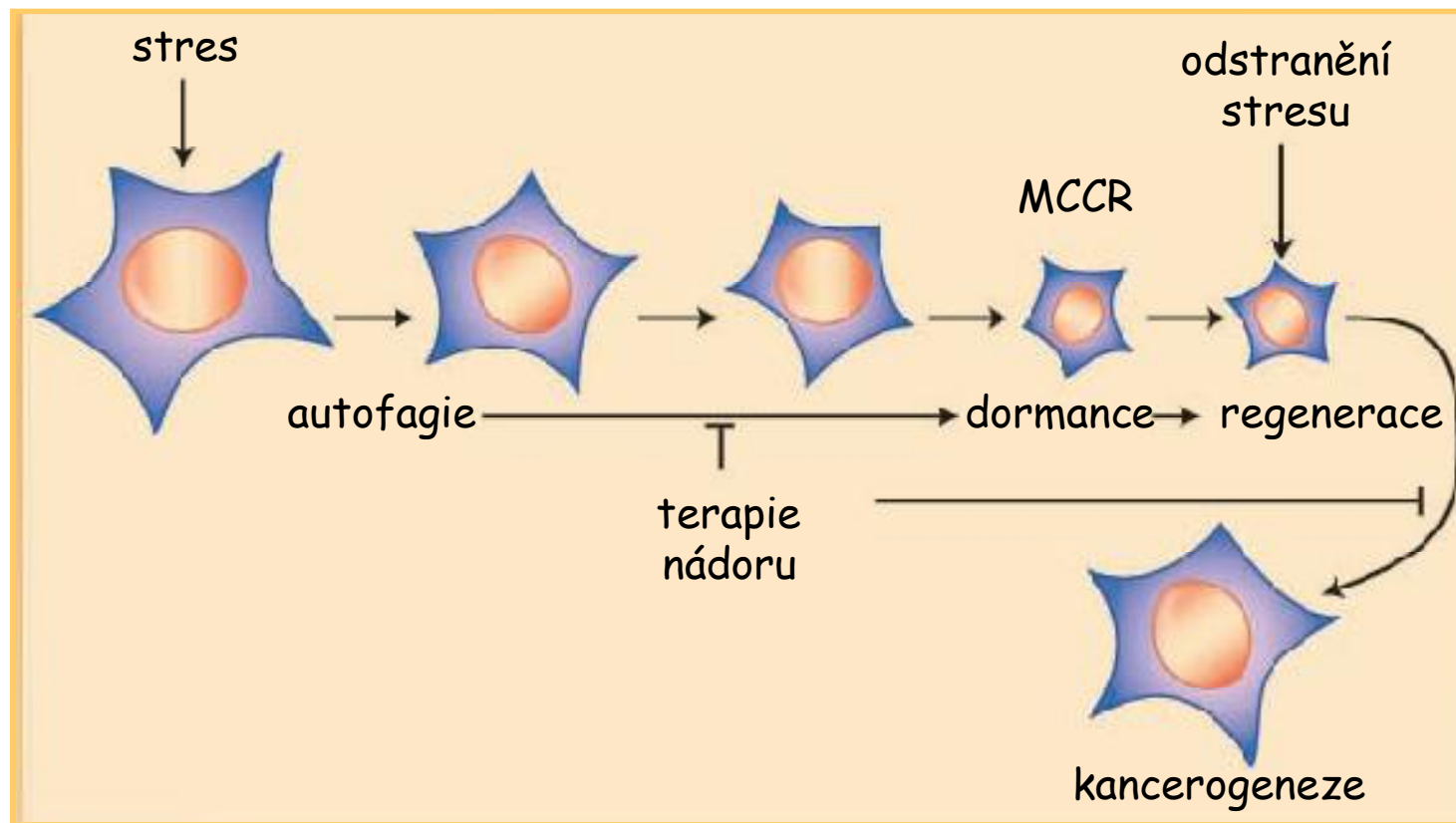
- Fyziologický program autofagie vede k degradaci buněčných organel (např. ribozómů, mitochondrií), což umožňuje využít výsledné katabolity k biosyntéze a metabolismu energie. To stimuluje přežití v podmínkách stresu a hladovění, nedostatku.
- Intracelulární váčky - autofagozomy - pohlcují organely a fúzí s lysozomy, následně probíhá degradace.
- Normálně běží jen na bazální úrovni, ale může být výrazně stimulována stresem a nedostatkem živin.
- Zřejmé propojení regulace autofagie, apoptózy a buněčné homeostáze. Signální síť zahrnuje **PI3-K**, **AKT**, **mTOR**.
- Specifickým regulátorem autofagie je **Beclin-1**, který patří mezi BH3-only proteiny.



# Autofagie

- Indukce autofagie může sloužit jako bariéra proti vývoji nádorů a může fungovat nezávisle na apoptóze, ale také v kooperaci s apoptózou. Možná tak představuje další nezávislou bariéru proti nádorům.
  - Hladovění, radioterapie, některé cytotoxické léky mohou stimulovat autofagii, která má zřetelné cytoprotektivní účinky na nádorové buňky. Může spíše umožňovat jejich poškození než přímo zničení.
  - Těžce stresované buňky se mohou díky autofagii zmenšit a vstoupit do stavu přechodné dormance, což umožní přežití a pozdější (po odeznění účinku terapie) další růst a vývoj.
- ⇒ „dvojsečný meč“ (*double-edged sword*) autofagie při modulaci nádorů

# Autofagie moduluje přežití a regeneraci nádorových buněk



MCCR -minimal cells capable of recovery

# Nekróza

- Nekrotické buňky se zvětšují a prasknou, vylijí svůj obsah do okolního mikroprostředí.
  - Buněčná smrt nekrotickou **JE** v některých případech jasně geneticky řízena (není to nahodilý, neřízený proces).
  - Důsledkem nekrotické smrti (na rozdíl od apoptózy nebo autofagie) je uvolnění pro-zánětlivých signálů a tím vtažení buněk zánětu imunitního systému. Ty mohou aktivně podporovat nádorové buňky: stimulací angiogeneze, proliferace a invazivity.
  - Nekrotické buňky mohou uvolňovat aktivní regulátory (IL-1 $\alpha$ ) stimulující proliferaci sousedních buněk...
- ⇒ Nekróza má dvojí dopad na vývoj nádoru: omezuje ho i stimuluje!! (dvojsečný meč)