

# Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

## BUNĚČNÁ SMRT

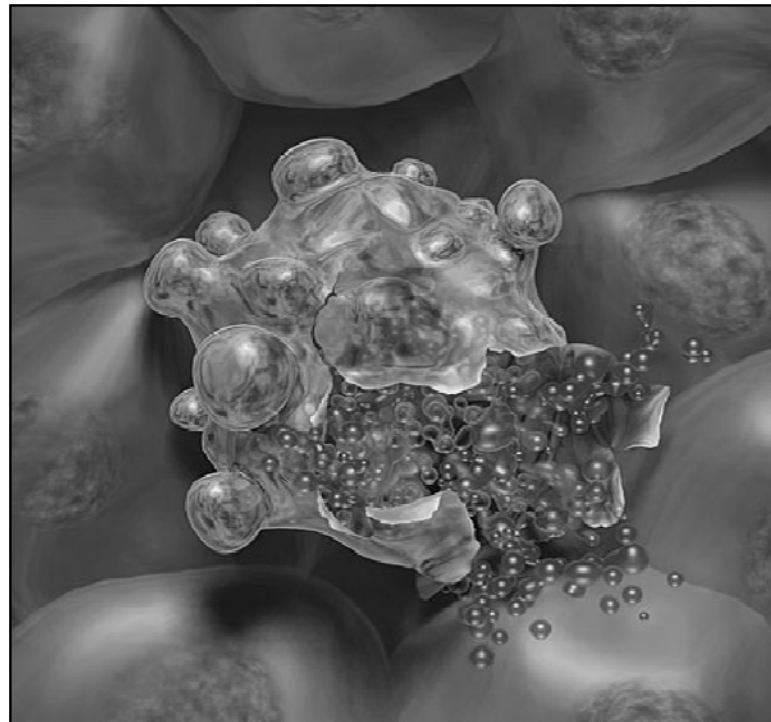
RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



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.“*



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



## 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 2012 - 02 / 29.2.



## 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*

*hodnocení podle morfologických změn*



## 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)

*hodnocení podle biochemických změn*

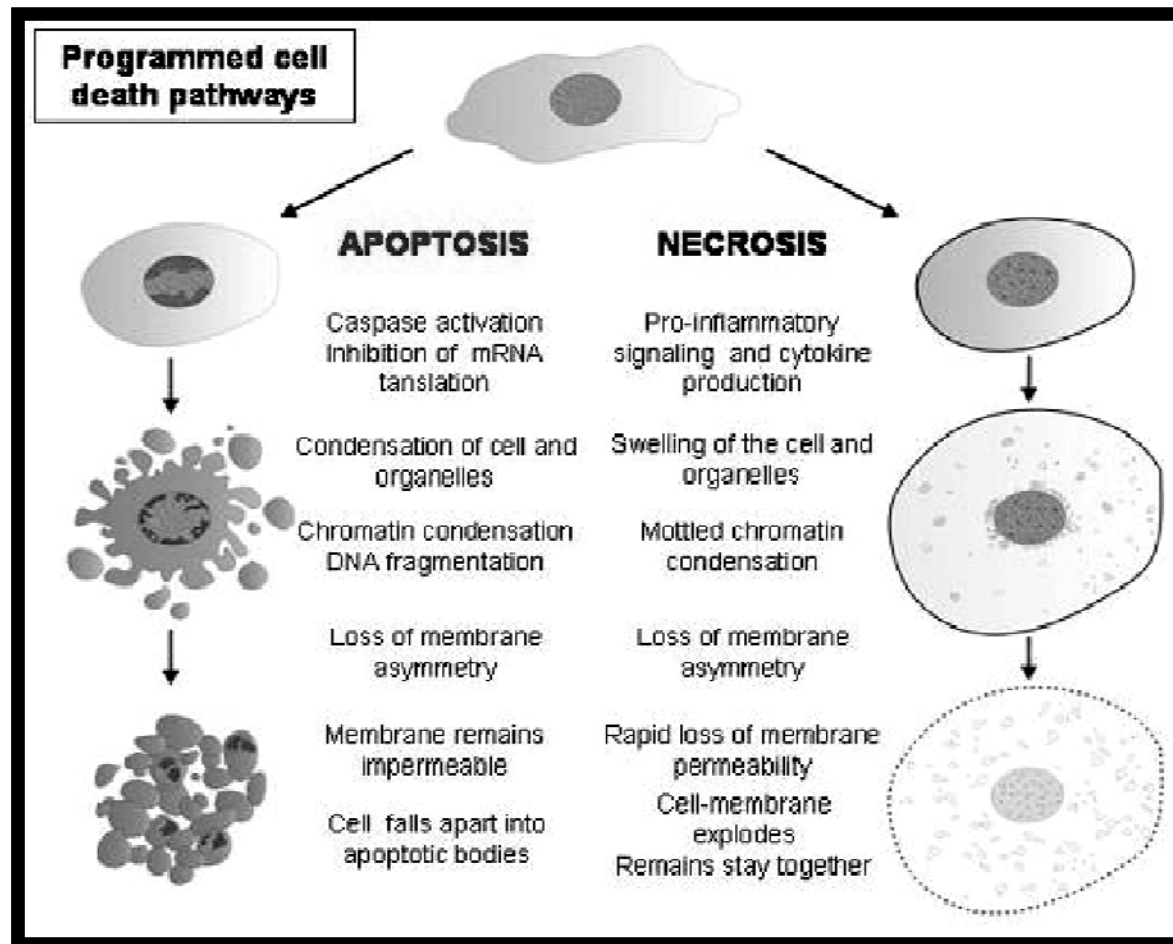


## Kdy je buňka mrtvá?

- rozrušení plasmatické membrány (důkaz např. inkorporace PI *in vitro*)
- rozpad buňky včetně jádra na fragmenty (apobodies)
- fragmenty jsou pohlceny jinými buňkami (*in vivo*)

*rozdíl mezi mrtvou a umírající buňkou*

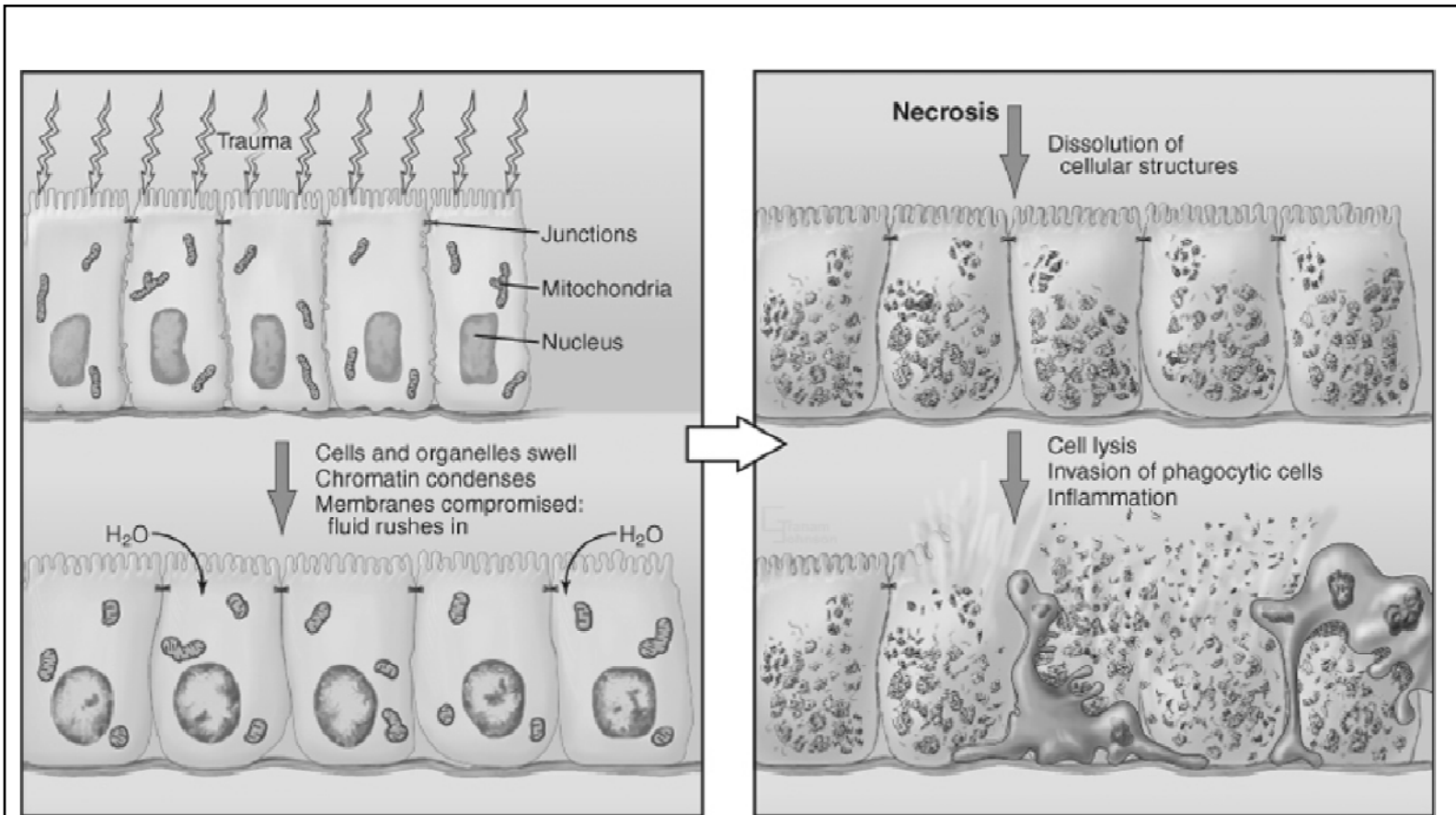




Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



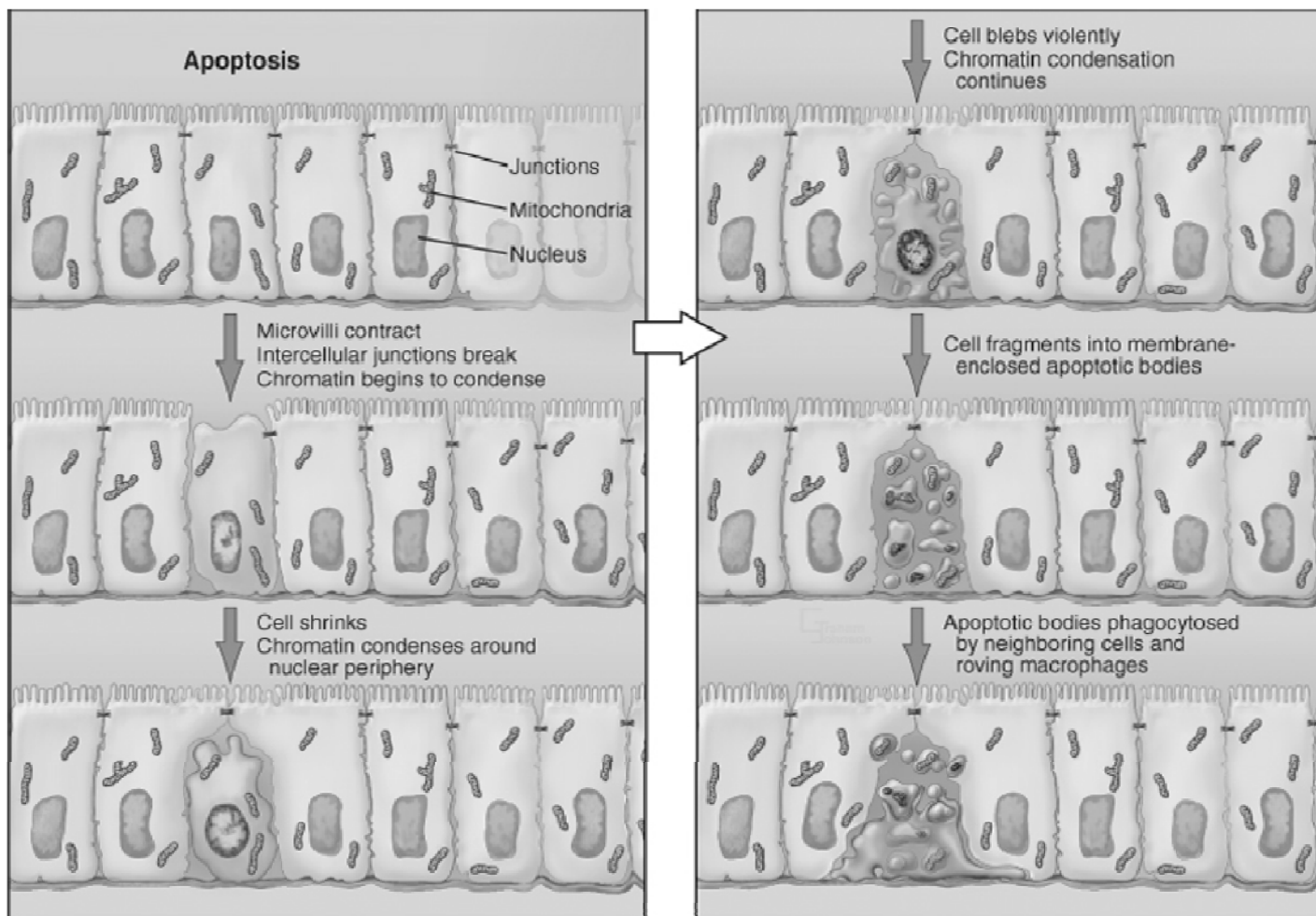




© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



# KATASTROFICKÁ (NEPROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

## NEKRÓZA

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



## Indukce nekrózy

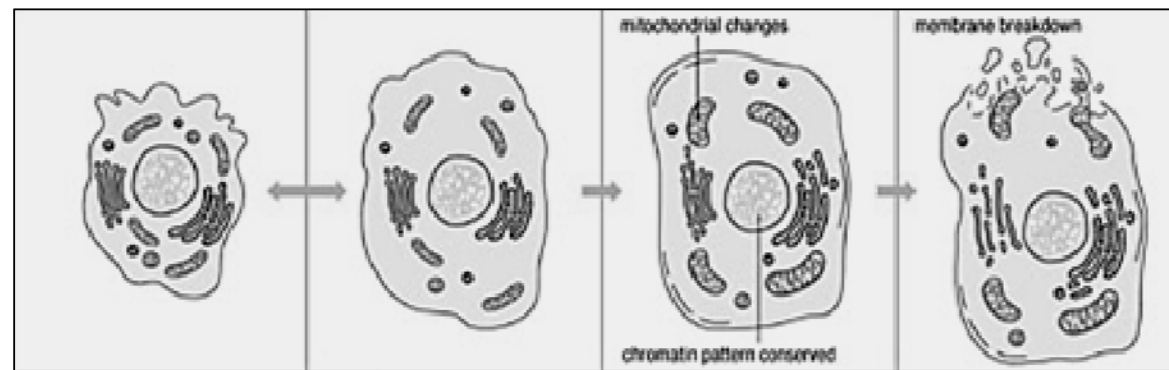
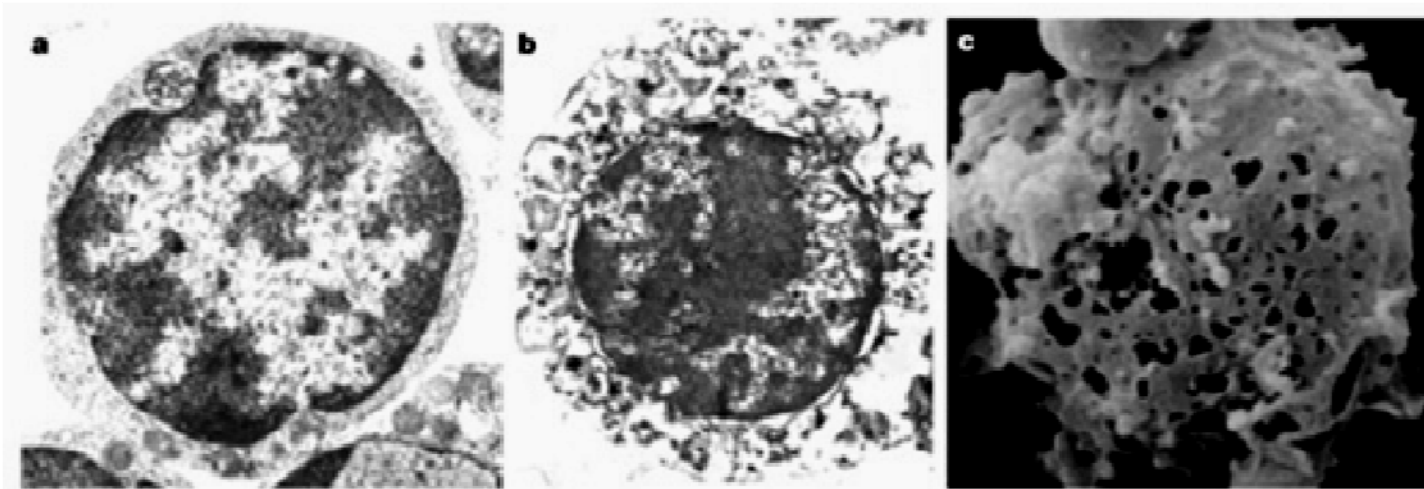
- a) rozsáhlé poškození, při němž už nemohou být aktivovány mechanismy apoptózy
- b) působení stresových faktorů
  - změny koncentrace iontů, pH...
  - vyčerpání zdrojů energie
  - změny teploty
  - poškození buňky nebo jejích organel



## Příznaky a průběh nekrózy:

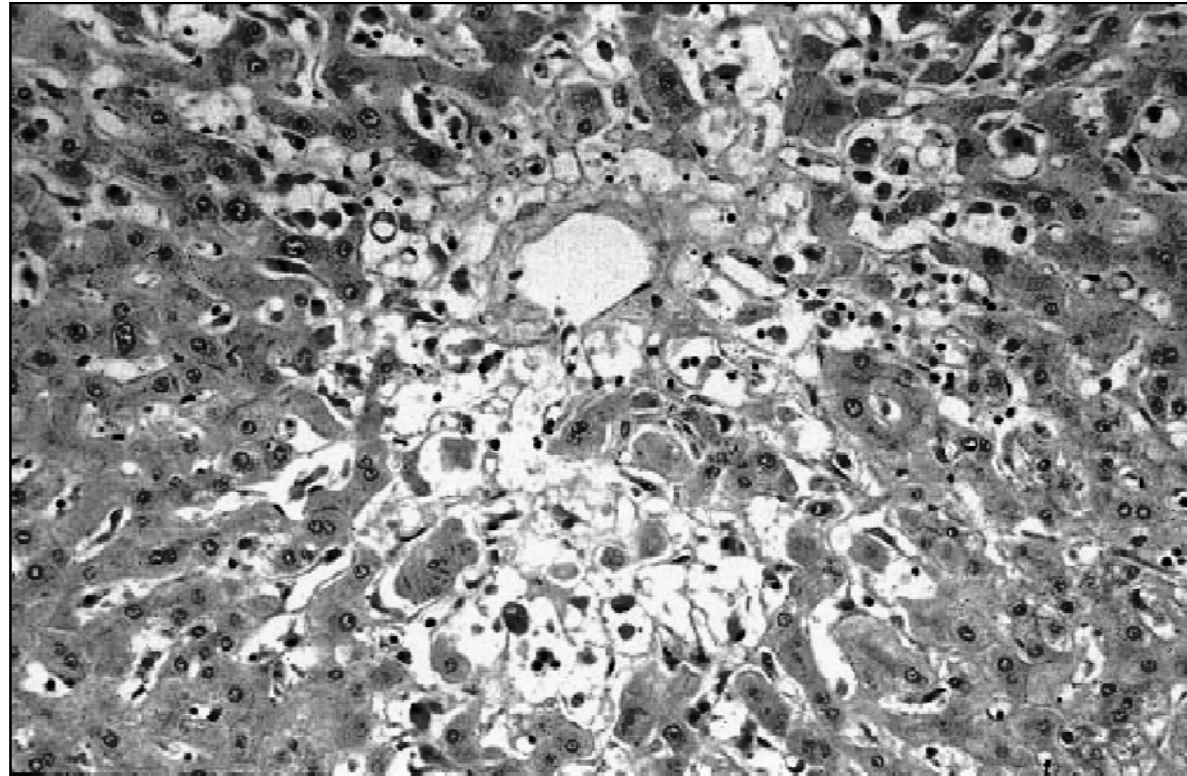
- poškození mitochondriální membrány
- pronikání iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondrií
- zakulacení a prasknutí mitochondrií
- ztráta regulace transportu iontů
- zakulacení buňky (swelling)
- lýze buňky
- vznik nekrotického ložiska
- invaze makrofágů
- zánětlivá reakce





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





nekrotické ložisko ve tkáni

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



# FYZIOLOGICKÁ (PROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





## **PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT (Programmed Cell Death, PCD)**

- indukovaný, regulovaný a selektivní proces pro vyřazování určitých buněk

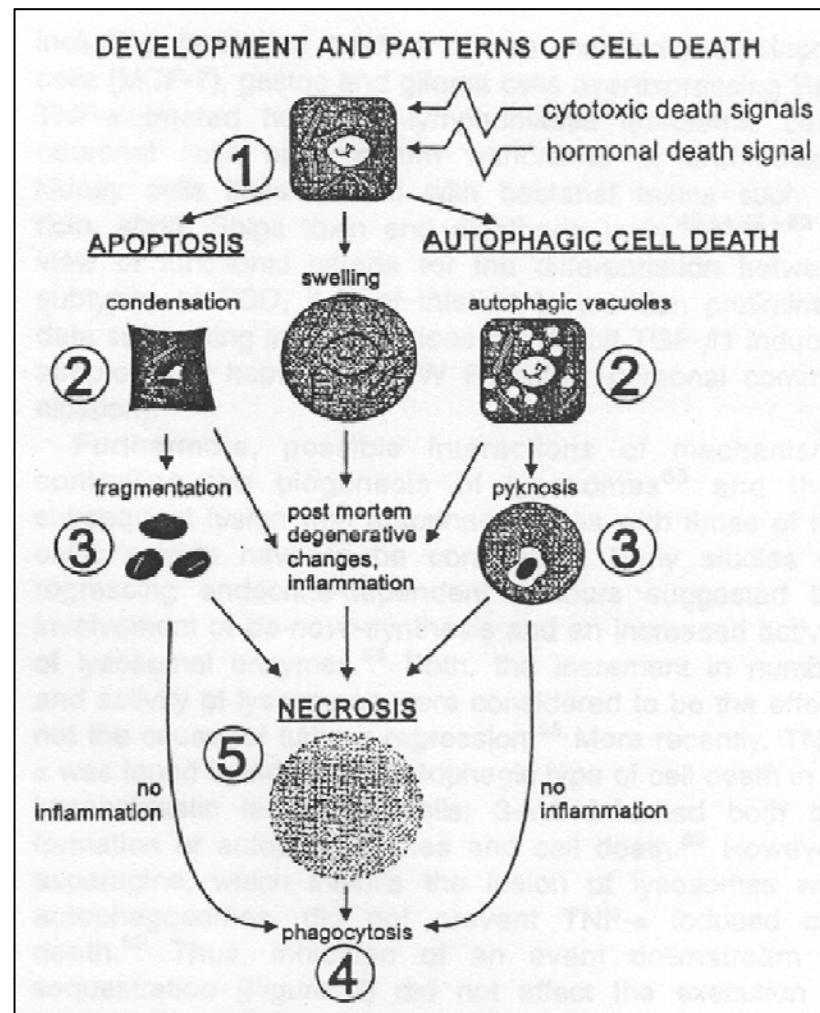
### Apoptóza (apoptosis, type I PCD)

- kaspázy
- kalpainy, katepsiny, granzymy

### Autofagie (autophagy, type II PCD)

- autofagozomy/autolysozomy (lysozomální proteázy)





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



# AUTOFAGIE (PCDII)

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



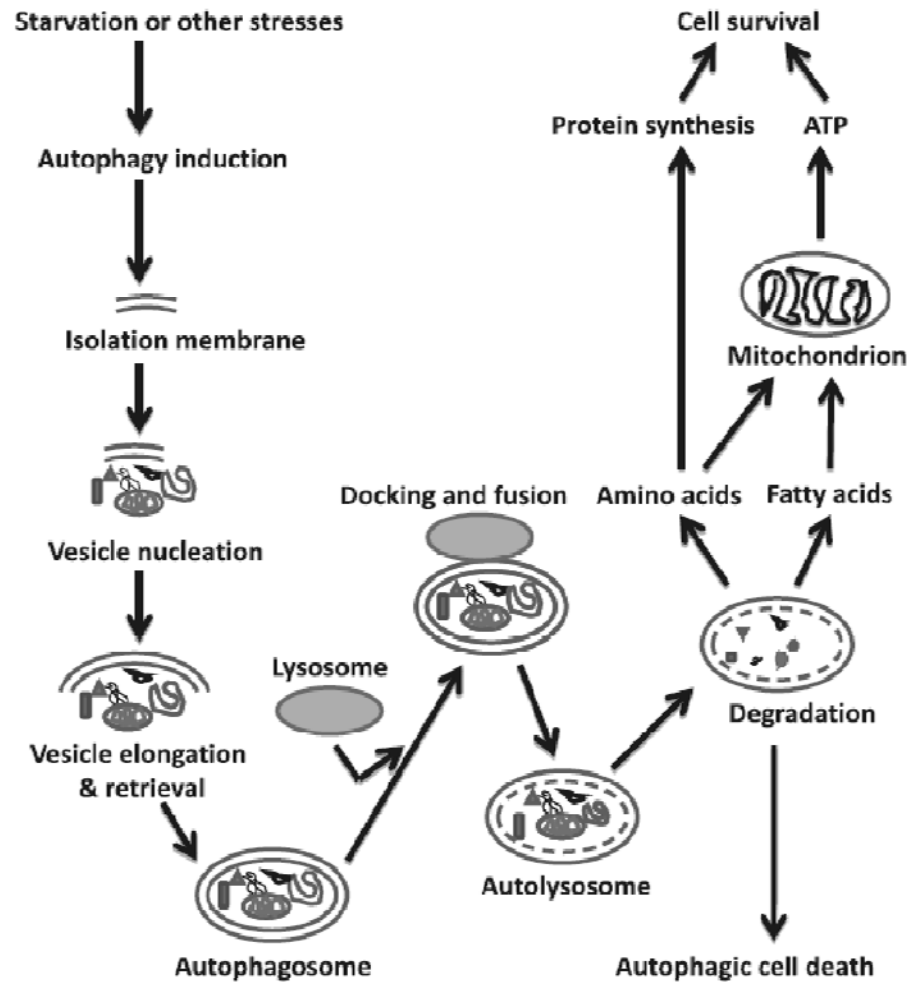
## Průběh autofagie

1. indukce (starvace)
  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

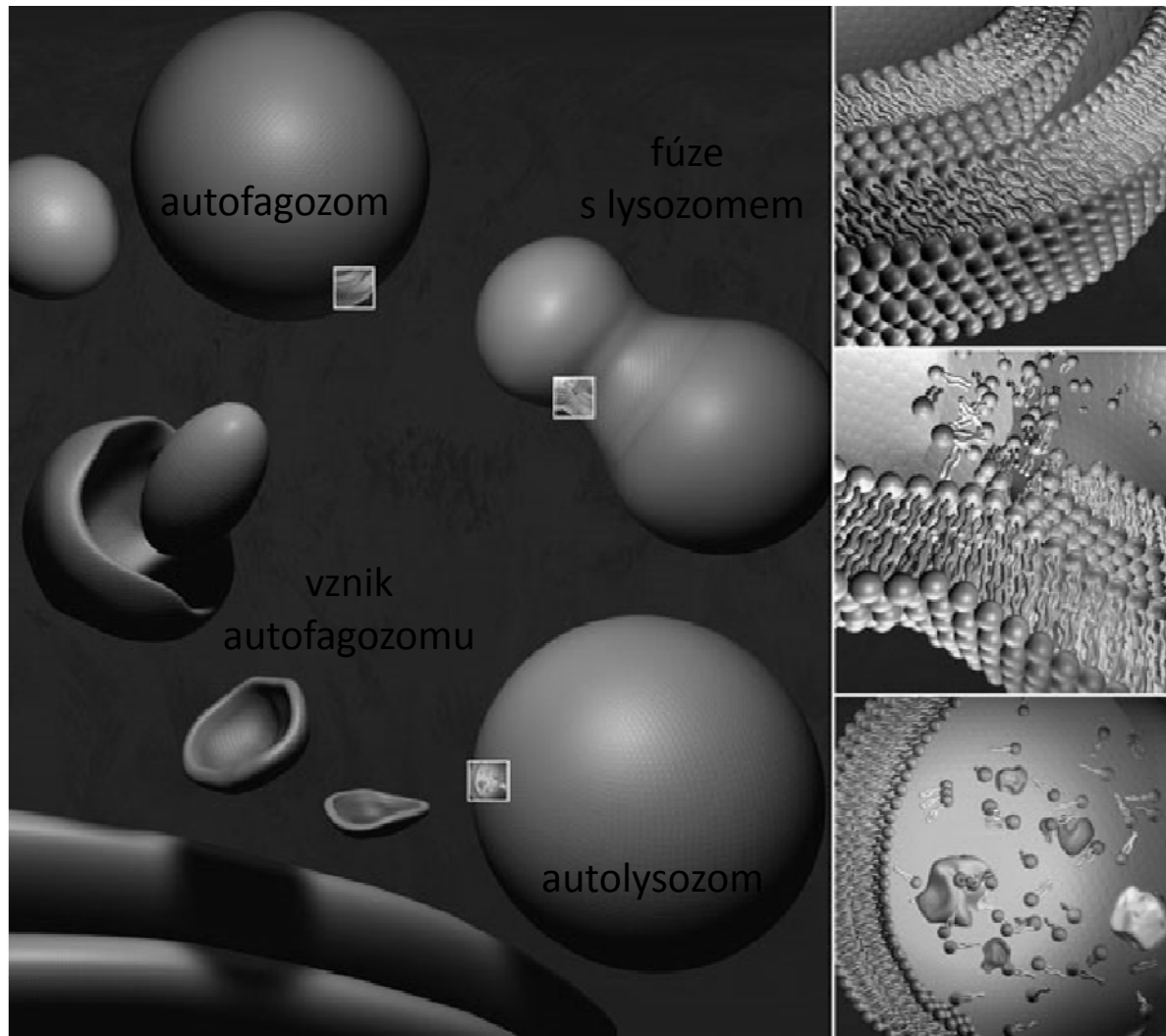




Can. J. Physiol. Pharmacol. 88: 285–295 (2010)

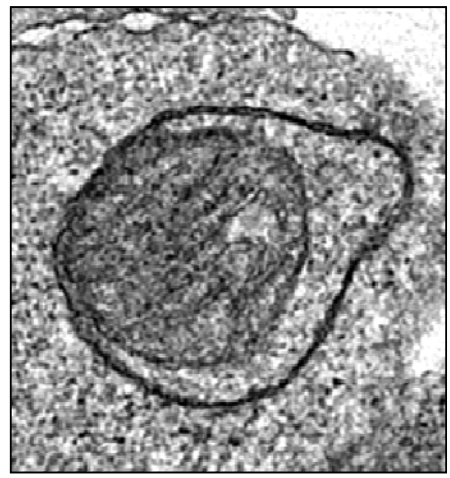
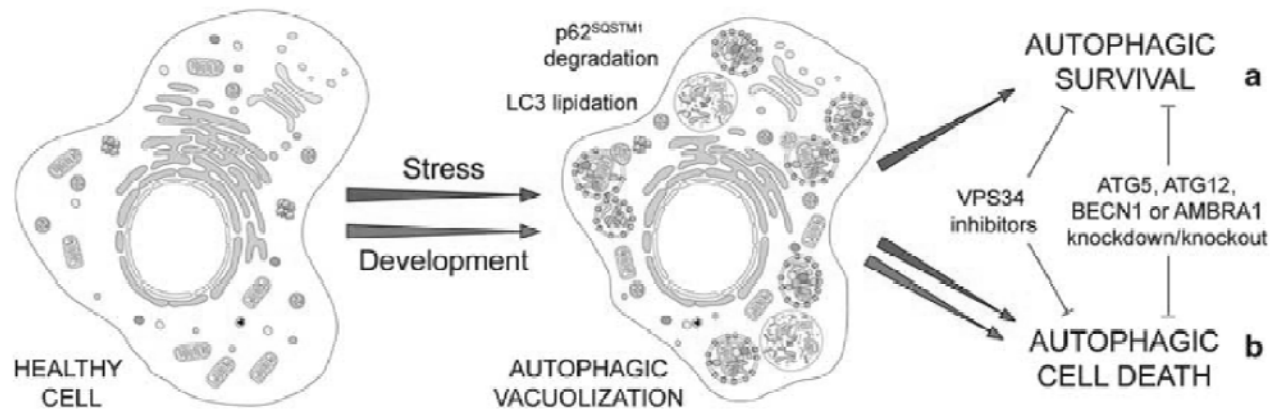
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





mitochondrie v autofagosomu



# APOPTÓZA (PCDI)

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



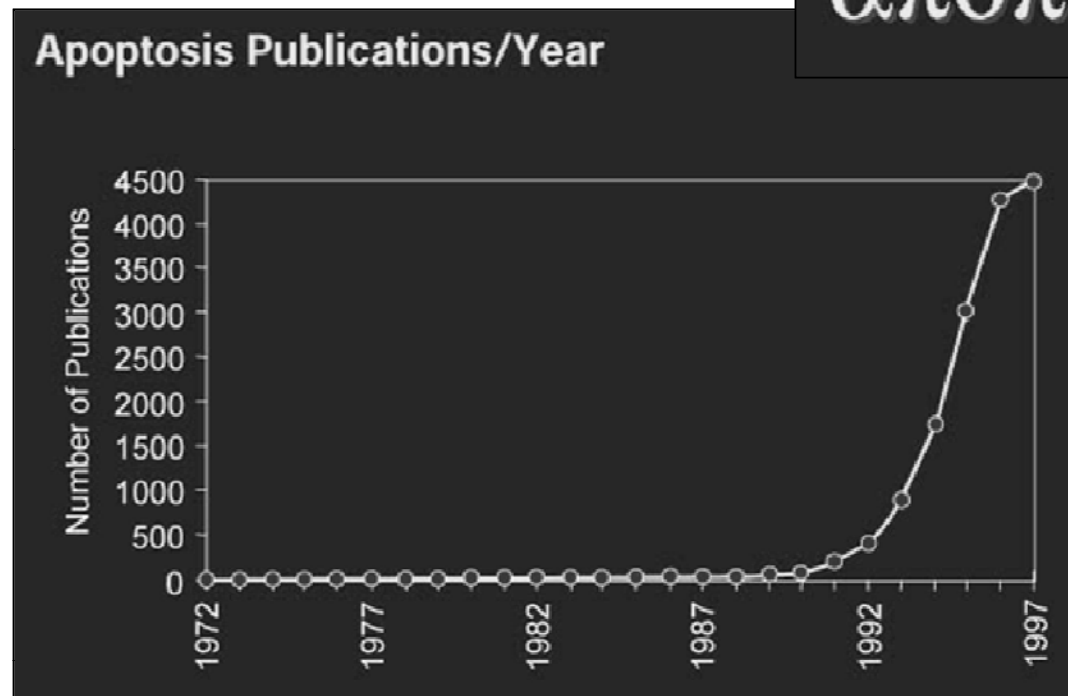


Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.

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

*British Journal of Cancer (1972) 26, 239.*

## ΑΠΟΠΤΩΣΙΣ

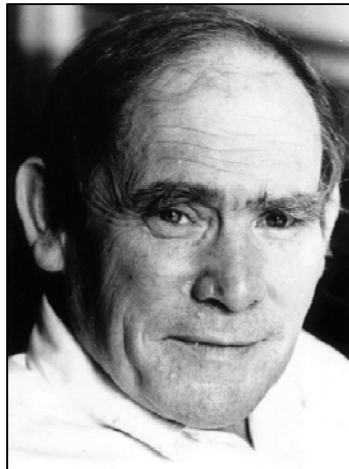


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.

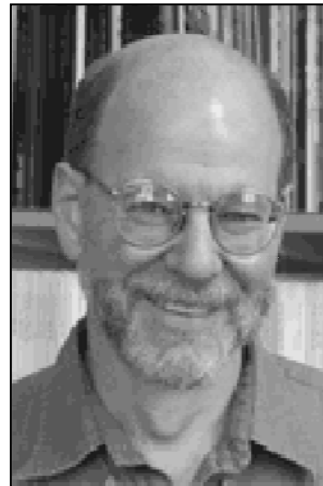
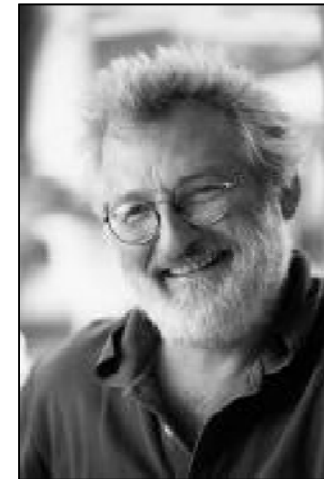


## 2002 - Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

Sydney Brenner



John E. Sulston



H. Robert Horvitz

za výzkum genetické regulace vývoje orgánů a  
programované buněčné smrti

---

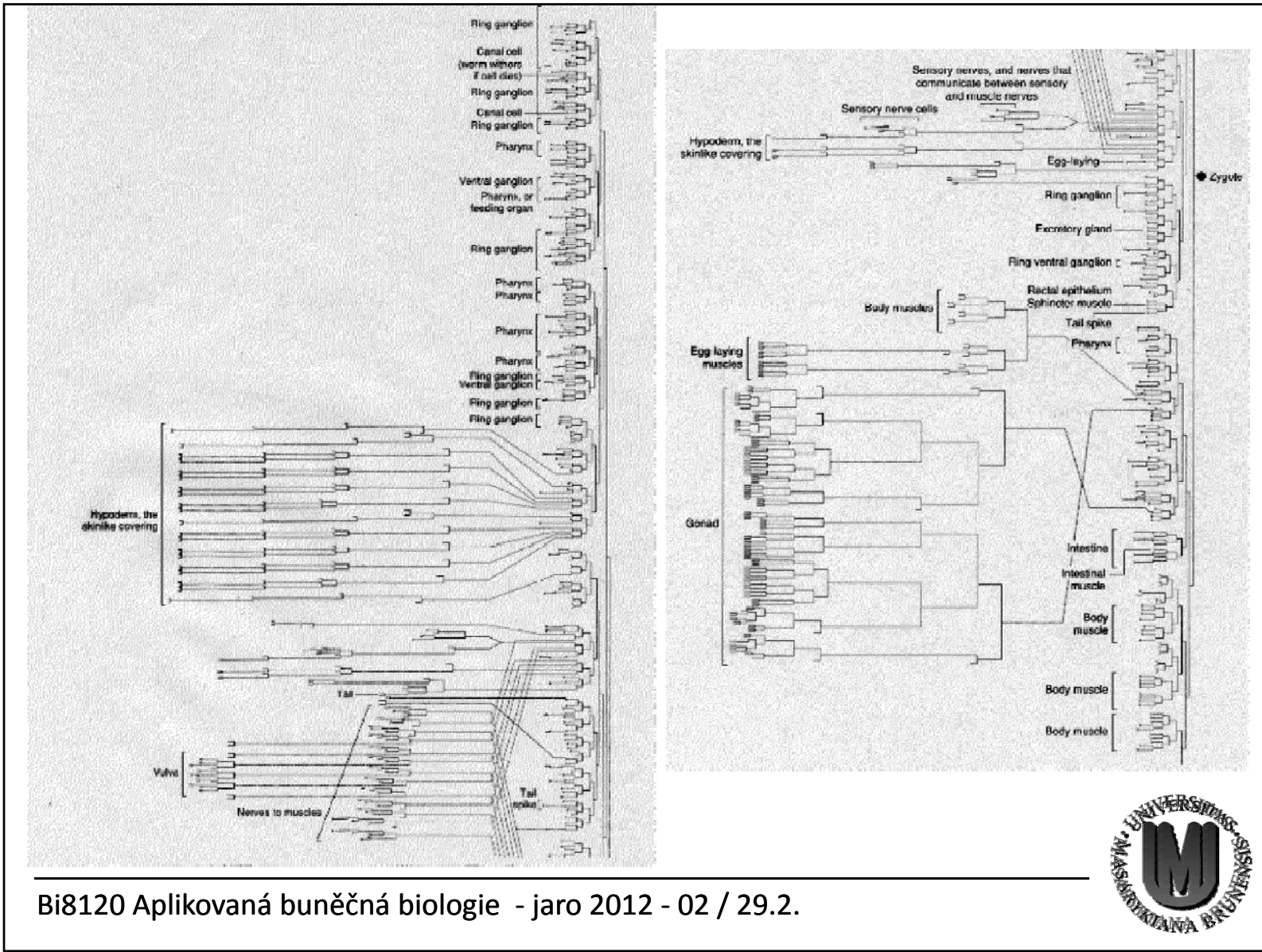
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



## *Caenorhabditis elegans*



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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.

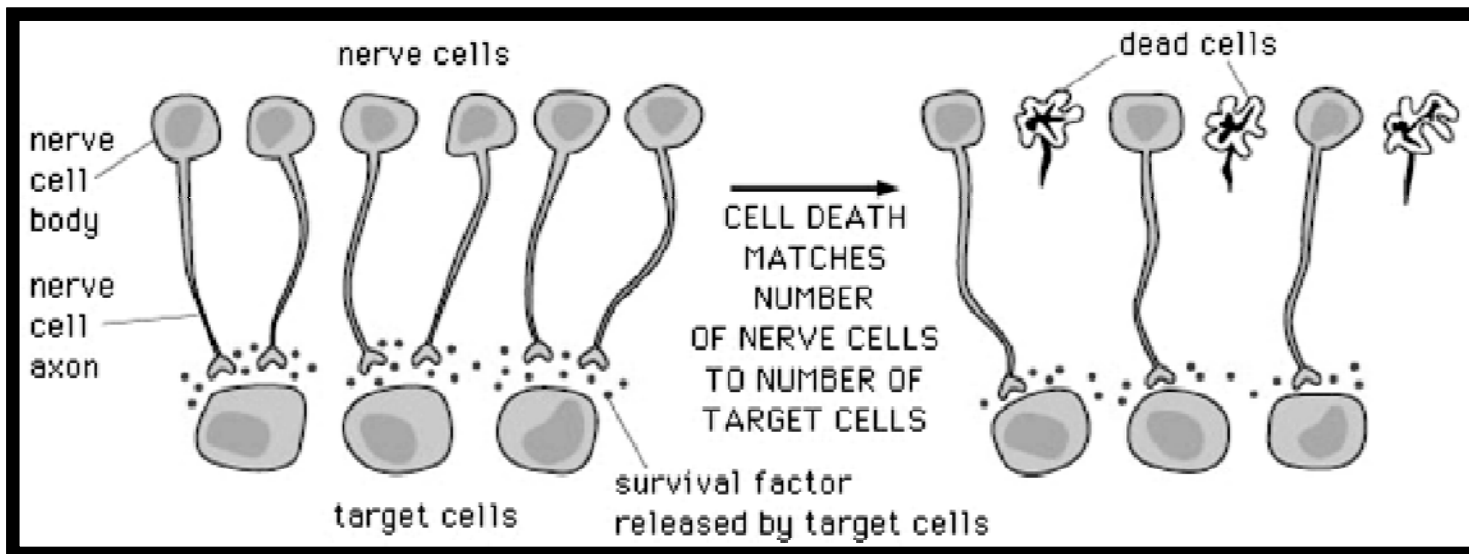


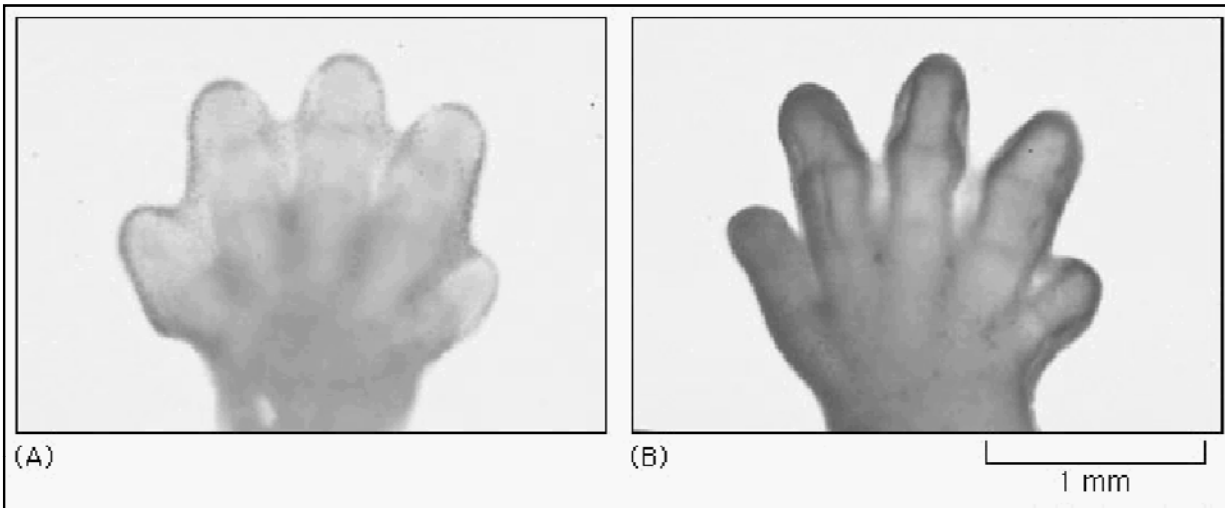
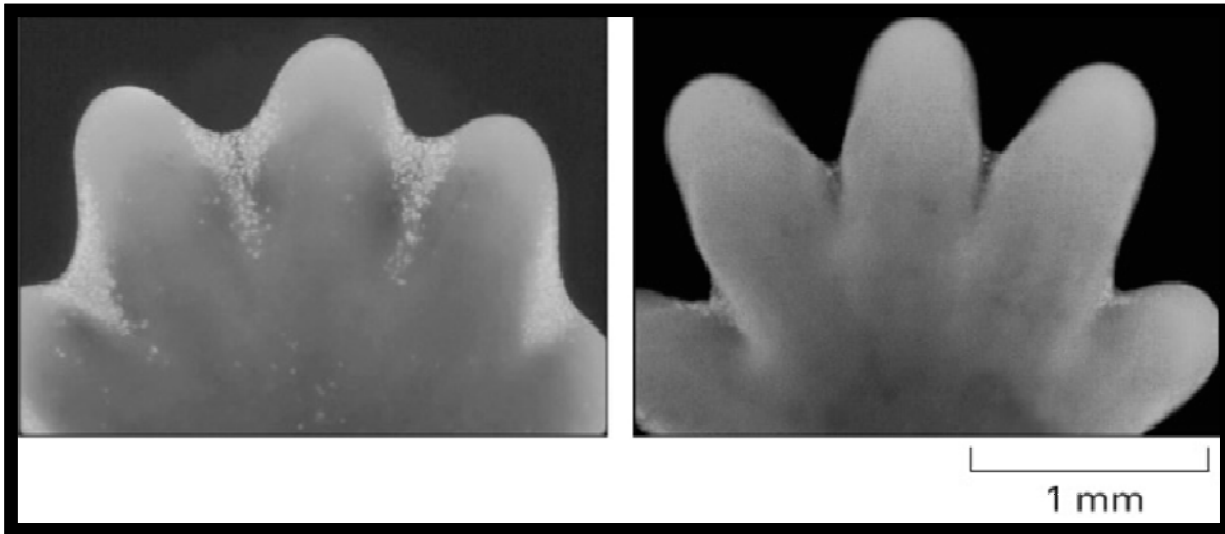
## Příčiny apoptózy

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







Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





syndaktylie (defekt apoptózy)

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





## 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

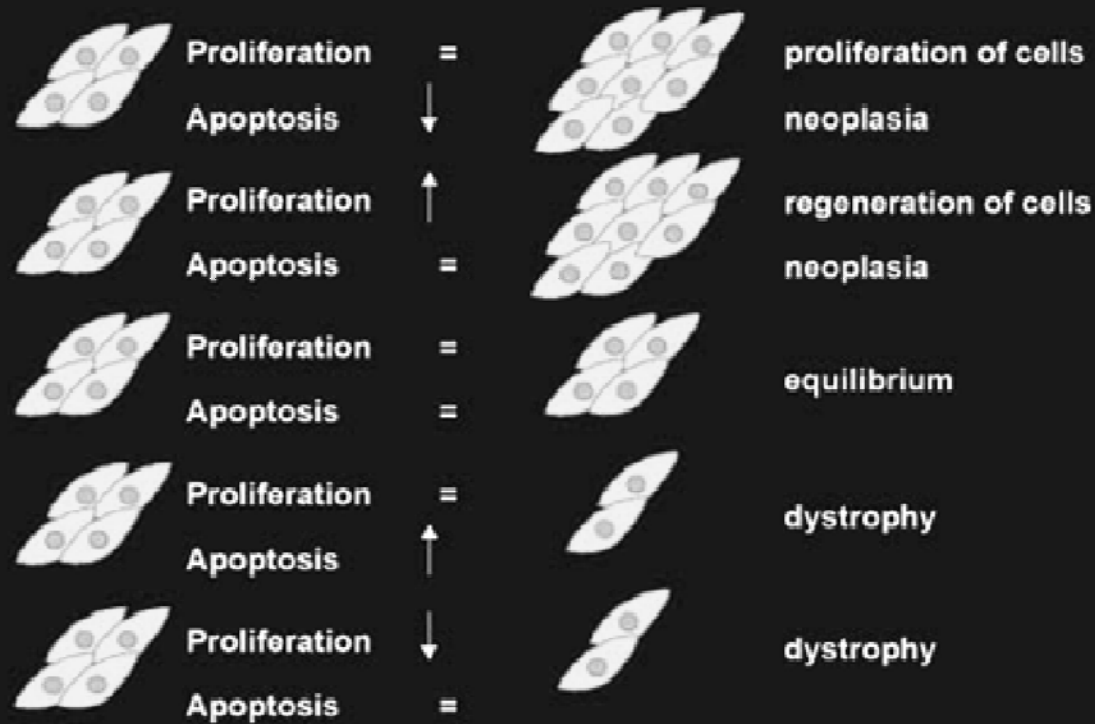


# Morphology



Diagnosics

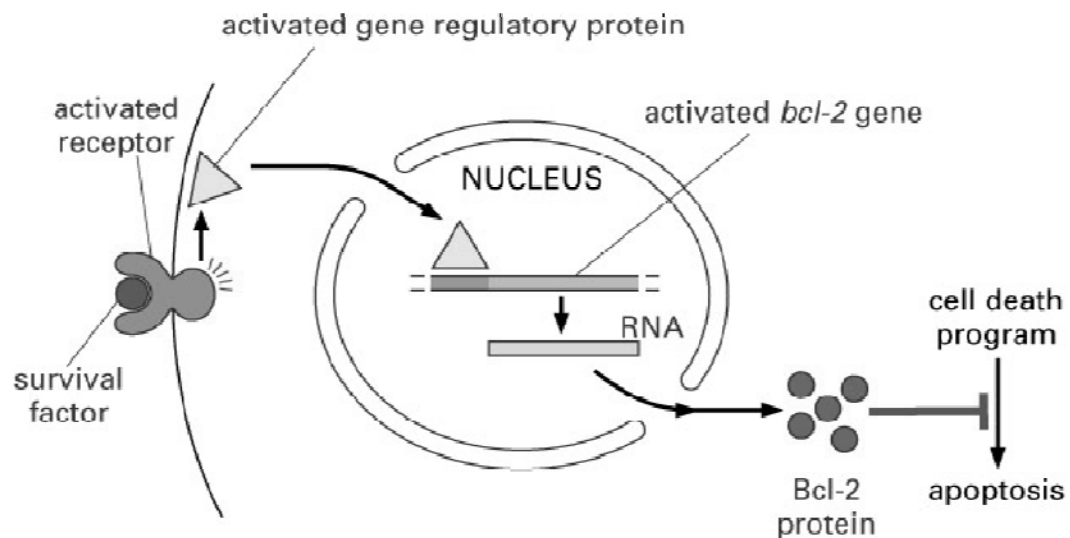
## Apoptosis and Cell Proliferation in Tissue Homeostasis



# Indukce apoptózy

Odstranění pozitivního signálu

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



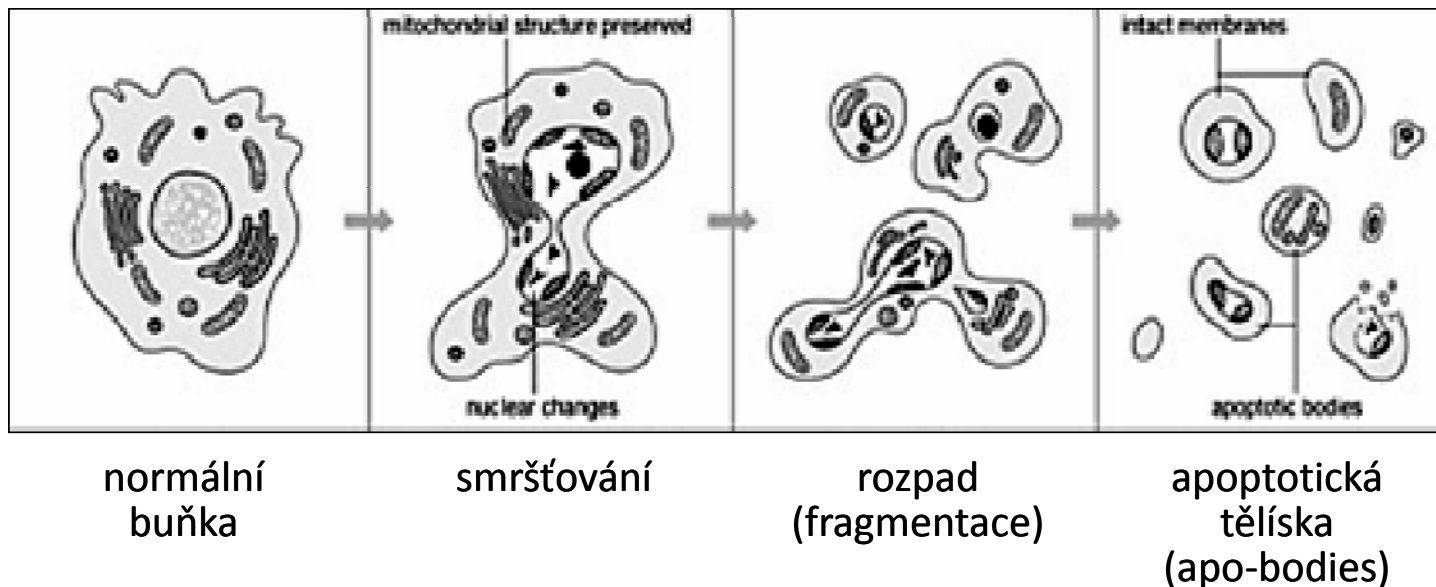
## Indukce apoptózy

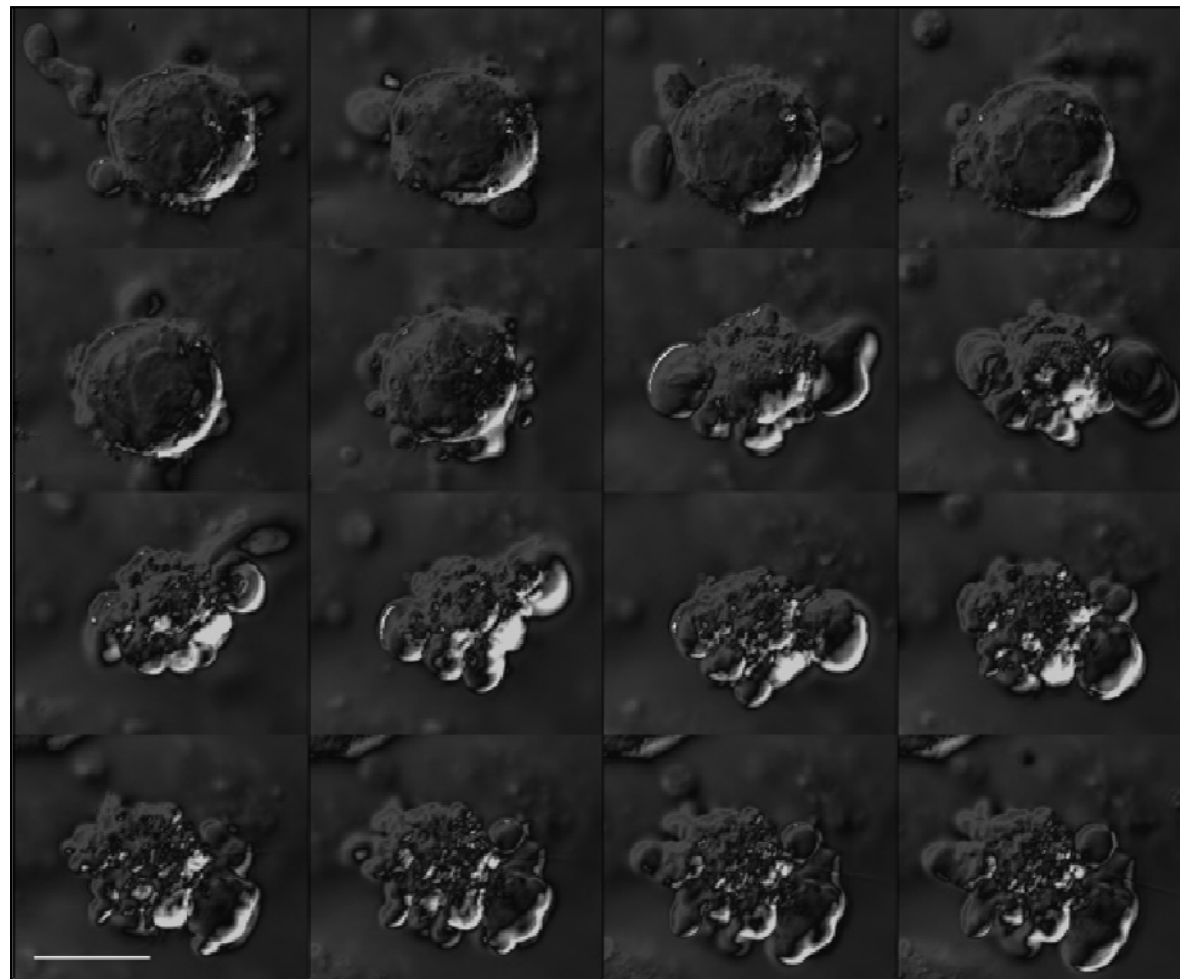
### Přijetí negativního signálu

- 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)



## Průběh apoptózy:





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



## 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 tělíka
9. fagocytóza apoptotických tělísek

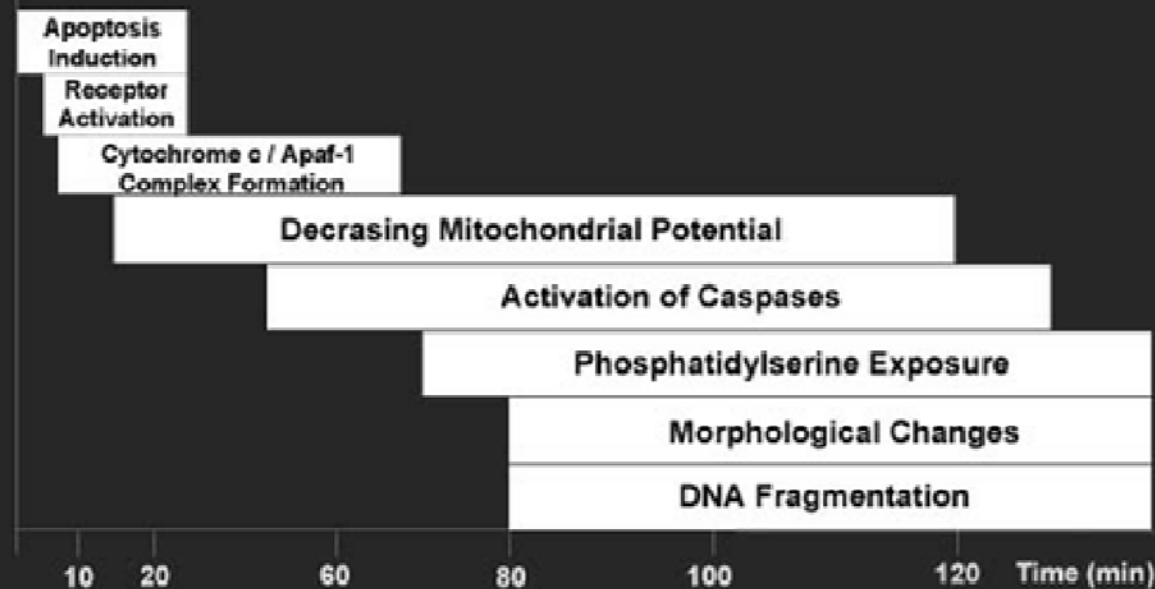


# Roche Molecular Biochemicals

## Hallmarks of Apoptosis



Diagnostics



HeLa cells, apoptosis induction with TNF $\alpha$  / Actinomycin D





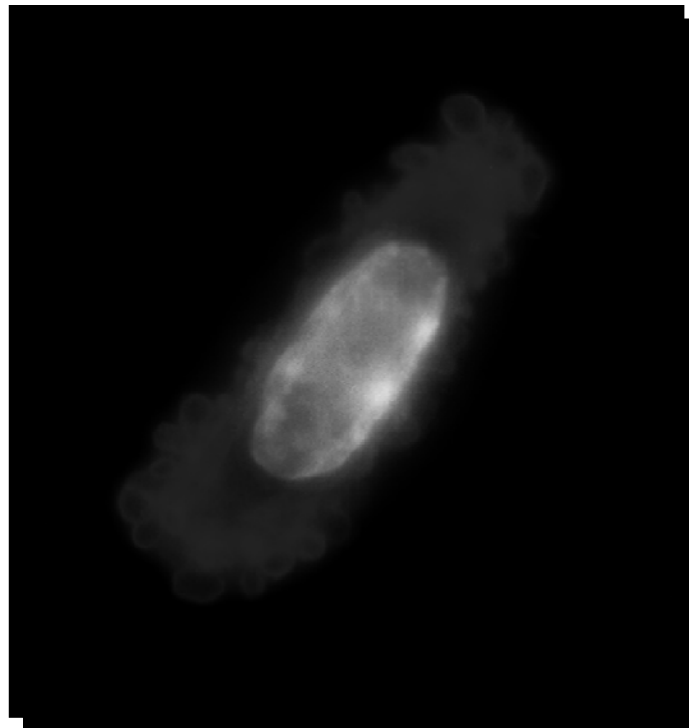
## Metodické aspekty studia apoptózy

- 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



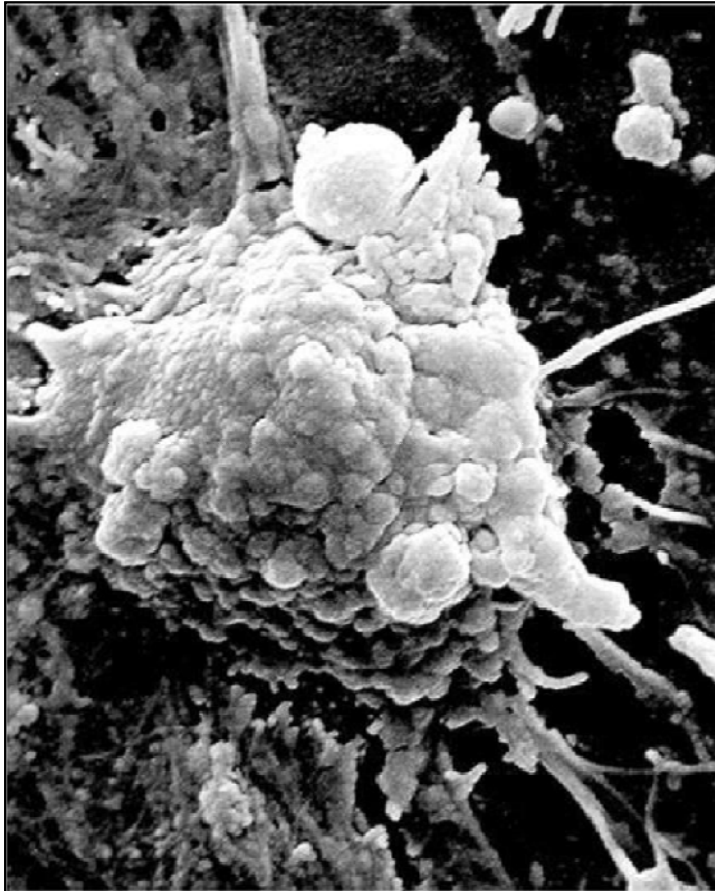
## Blebbing plazmatické membrány

- degradace kortikálního cytoskeletu (fodrin, aktin)

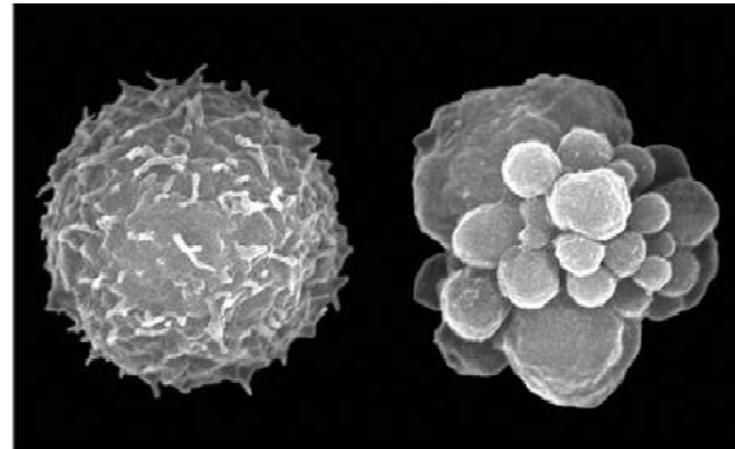


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



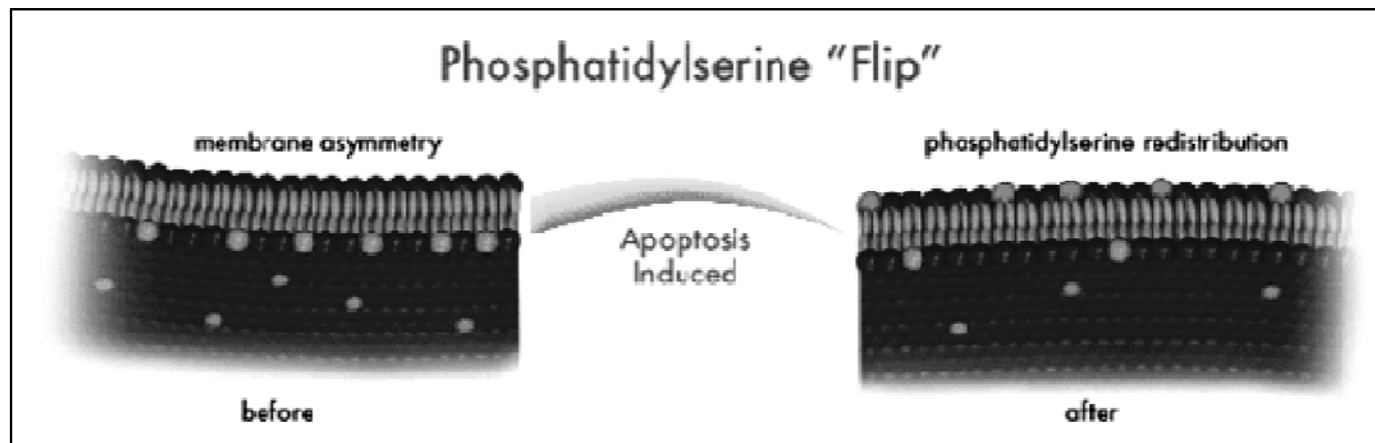


Motoneuron disease: an apoptotic neuron seen by scanning electron microscopy



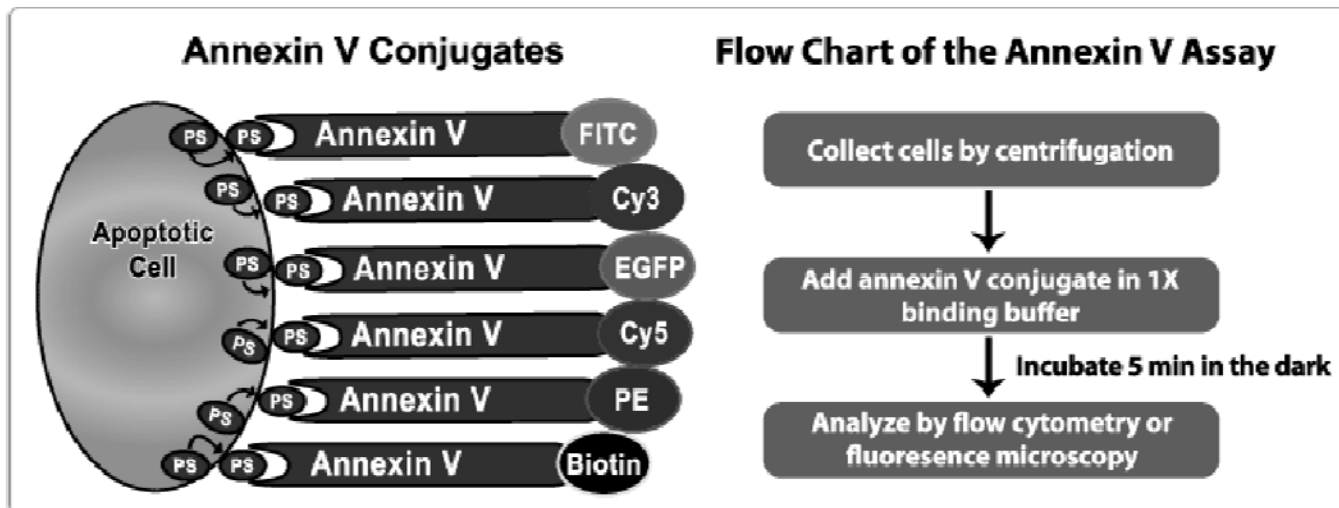
## Změny v plazmatické membráně

- externalizace fosfatidylserinu („eat me“ signal)



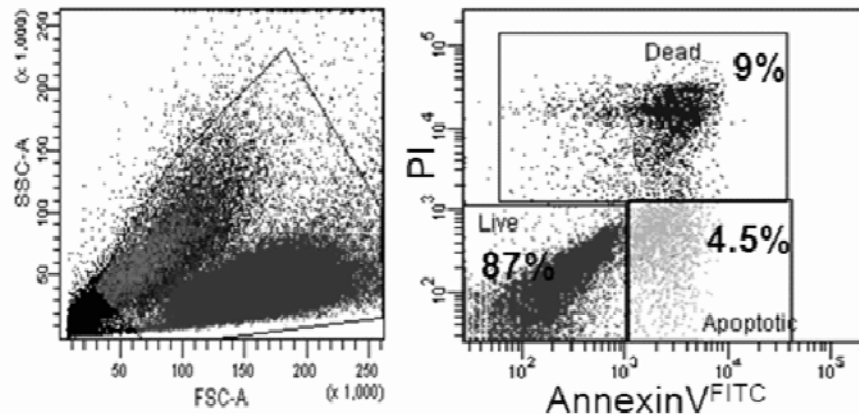
## Změny v plazmatické membráně

- detekce fosfatidylserinu
- Annexin V + fluorochrom



## Změny v plazmatické membráně

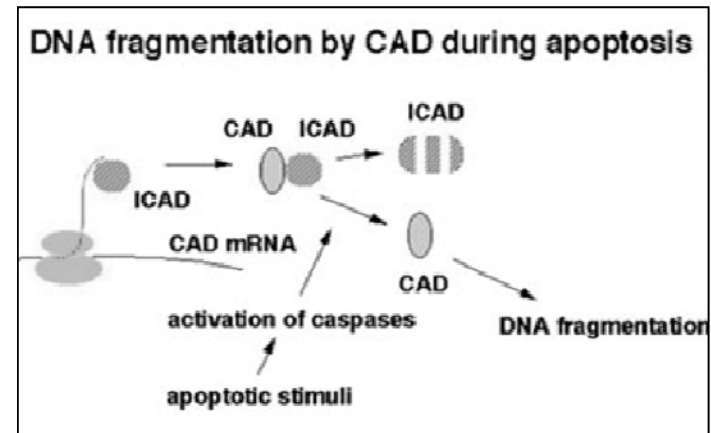
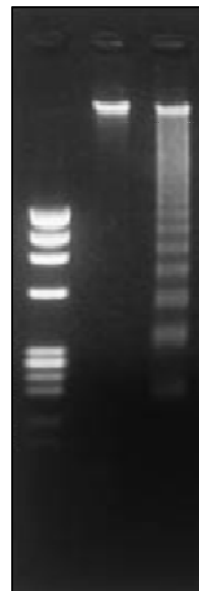
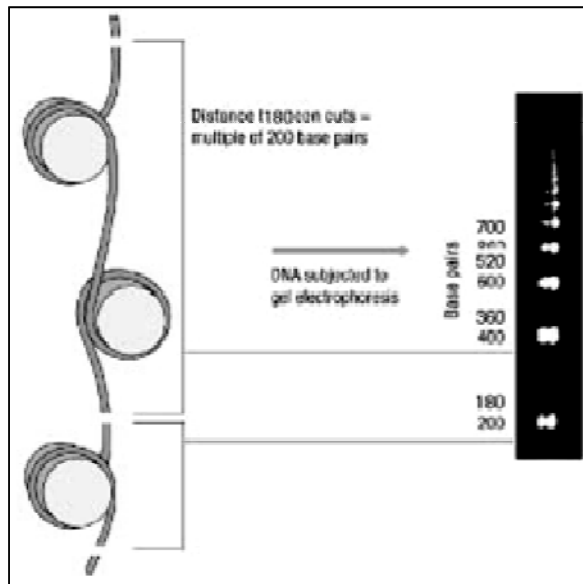
- detekce fosfatidylserinu – Annexinem V
- flow cytometrie



**Legend.** Jurkat T-cells were UV-B irradiated and incubated over night. Cells were labelled with AnnexinV<sup>FITC</sup> for 15 min at RT with 5  $\mu$ g/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

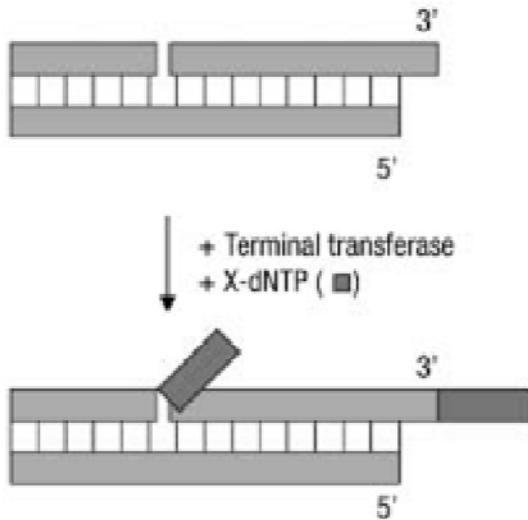


CAD – kaspázou aktivovaná Dnáza  
ICAD – inhibitor CAD

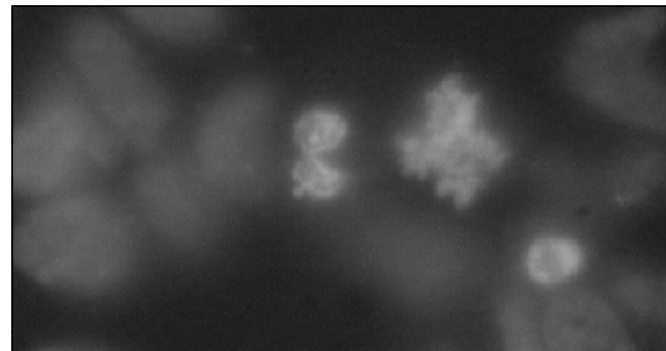
# Detekce štěpení DNA:

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase  
dUTP nick end labeling

*In situ* end labeling (TUNEL)  
(template independent)



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

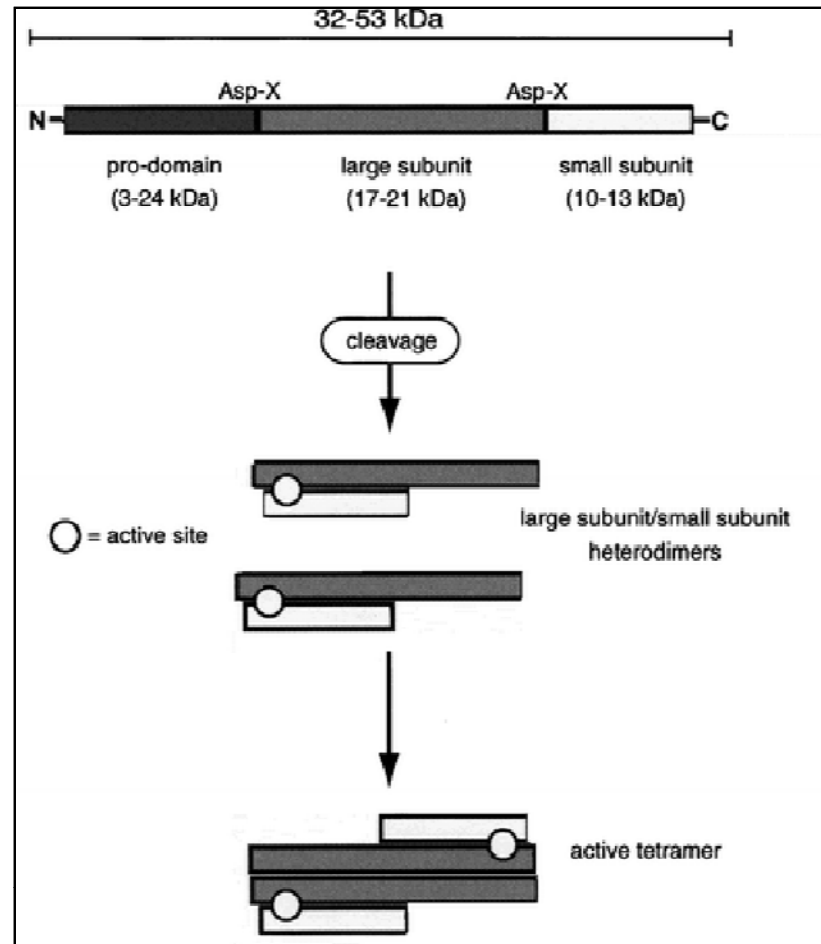


## Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení

prokaspáza

kaspáza

aktivní  
kaspáza



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.



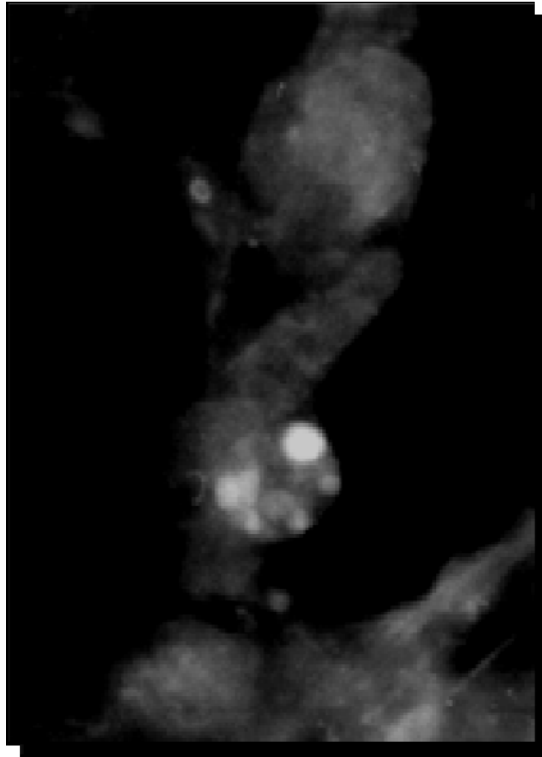
## Aktivace proteolytického štěpení

### Substráty kaspáz - proteiny

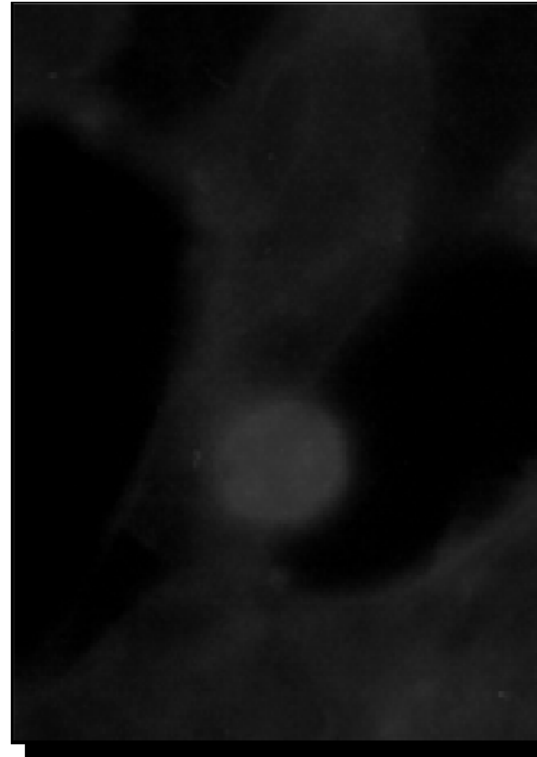
- „cell death“ proteiny (Bcl-2, Bcl-XL, prokaspázy..)
- regulátory b. cyklu (MDM2, p21, Rb, cyklin A..)
- cytoskelet (aktin, fodrin, keratiny, laminy..)
- DNA metabolismus (ICAD, PARP..)
- RNA metabolismus
- signální dráhy
- TF
- proteiny spojené s neurodegenerativními chorobami



## Aktivace kaspáz – fluorescenční mikroskopie



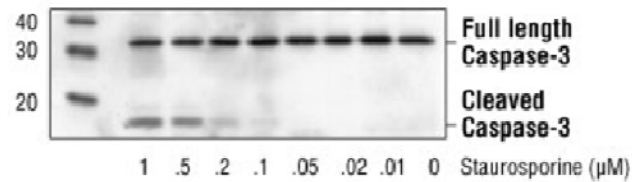
$\alpha$ -tubulin / DAPI



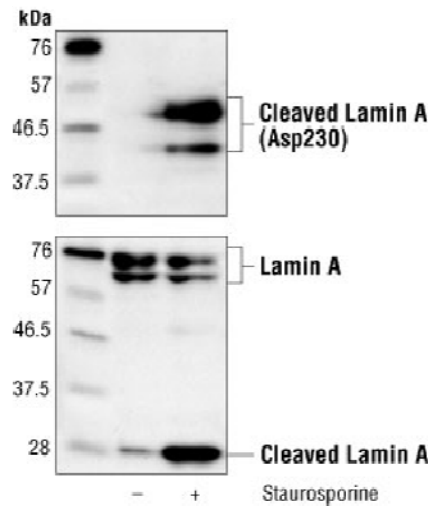
aktivovaná kaspáza 3

## Aktivace kaspáz – detekce (WB)

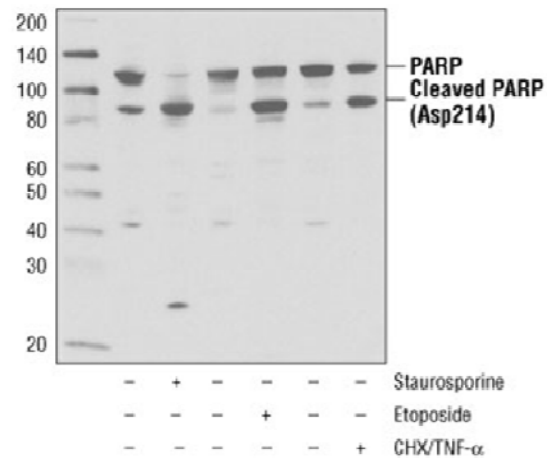
### Kaspáza-3



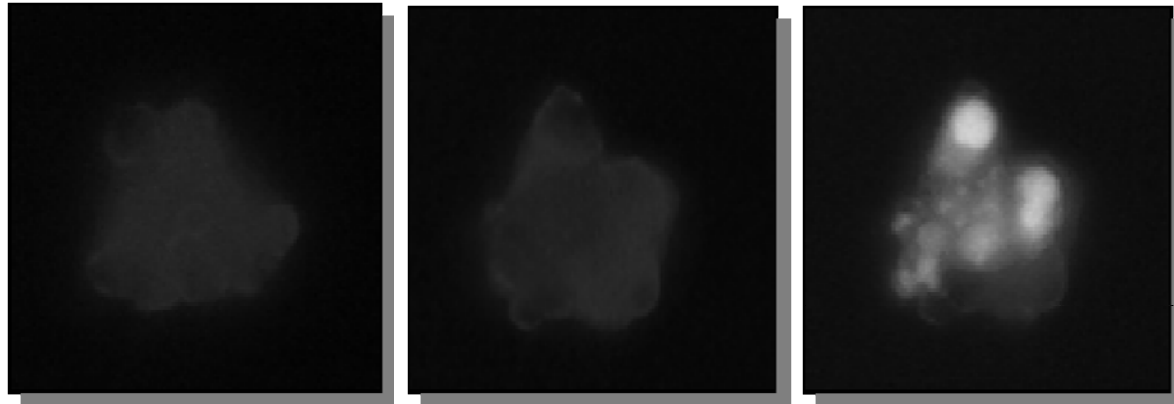
### Lamin A



### Poly (ADP-ribose) polymerase



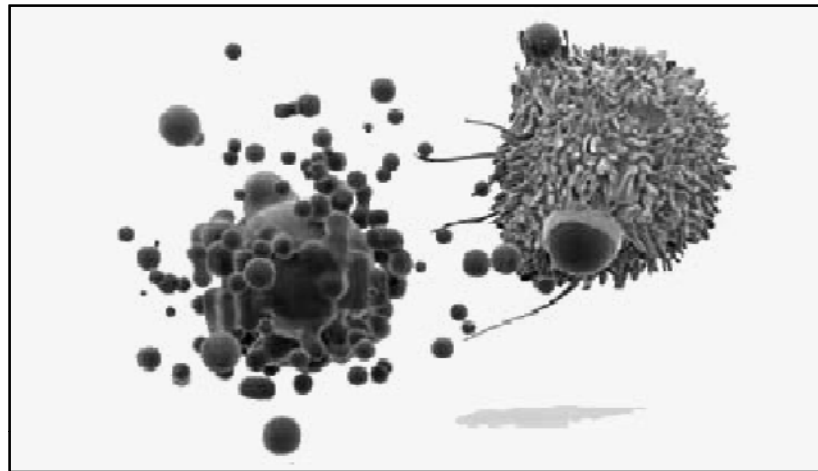
## Rozpad buňky na apoptotická tělíka



- účast nově formované aktinové 3D struktury a nesvalového myosinu
- apoptotická tělíka 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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.

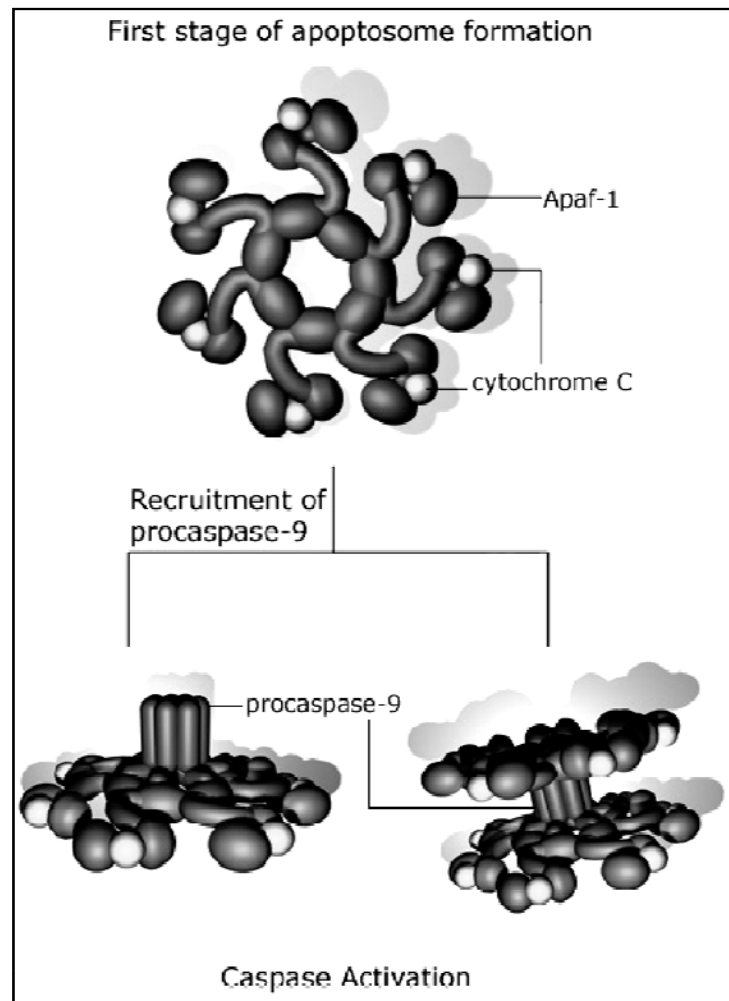


## Apoptóza vyvolaná vnitřními signály:

- 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)

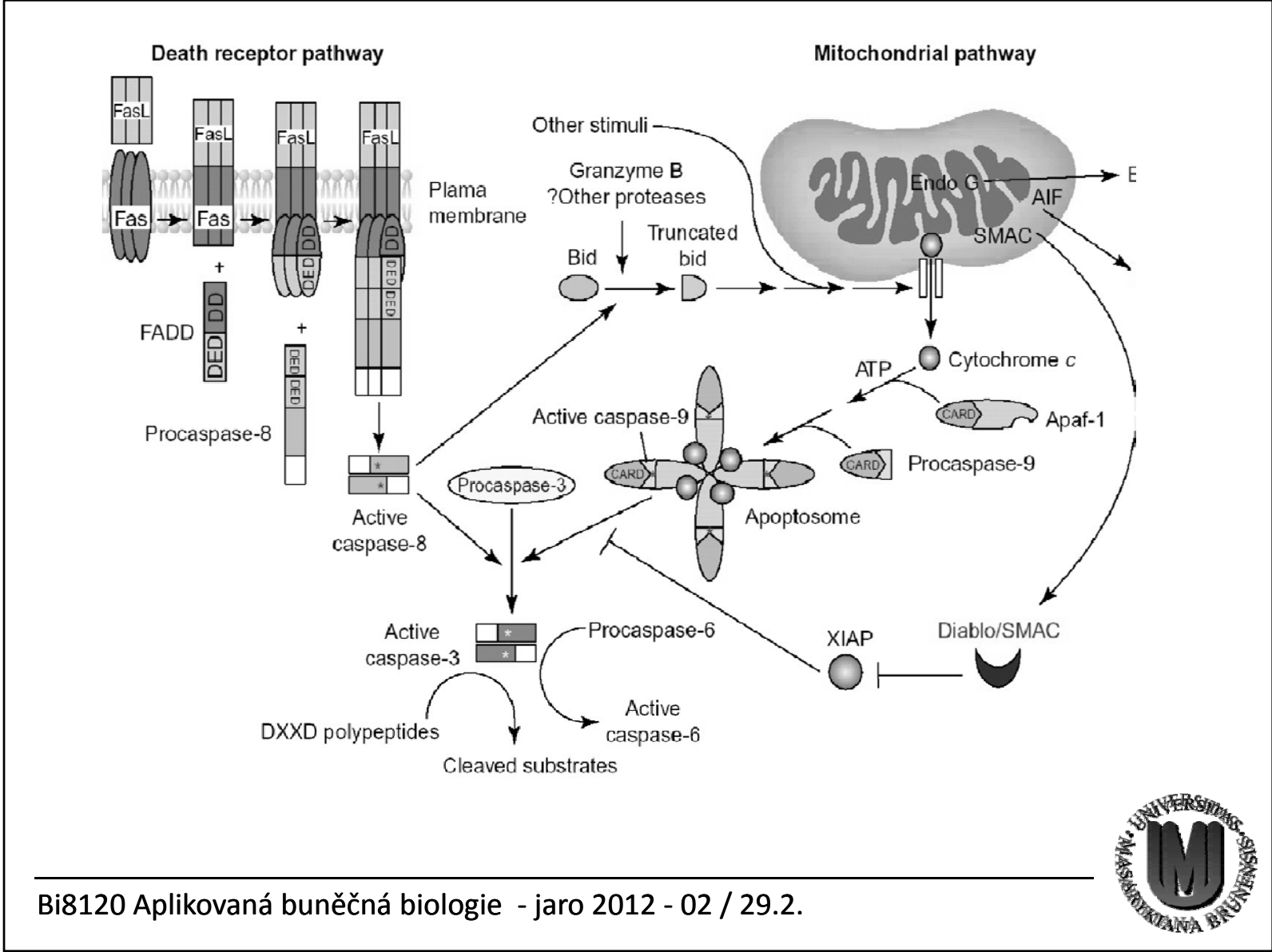






Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





## Změny mitochondrií

změna permeability  
mitochondriální  
membrány

detekce cytochomu C

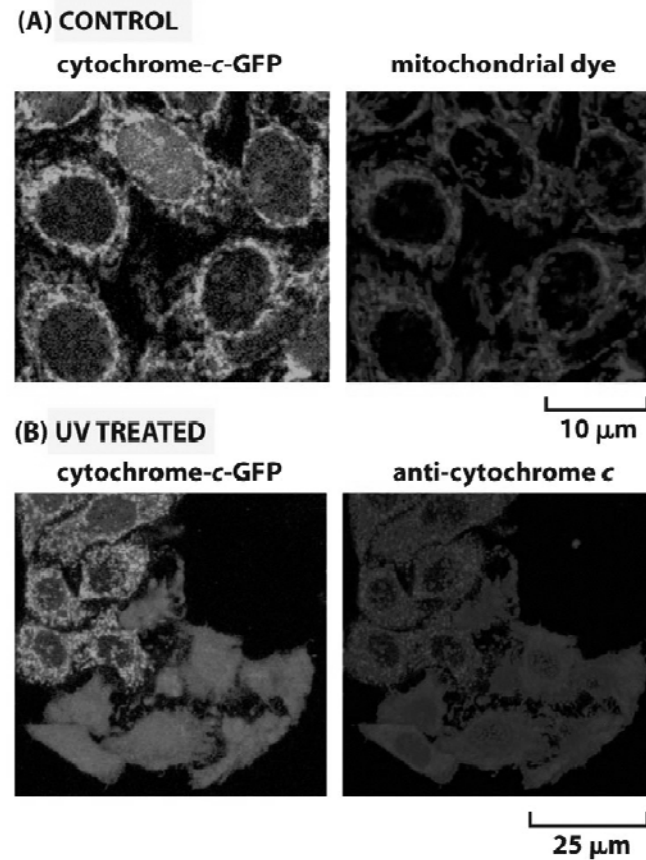
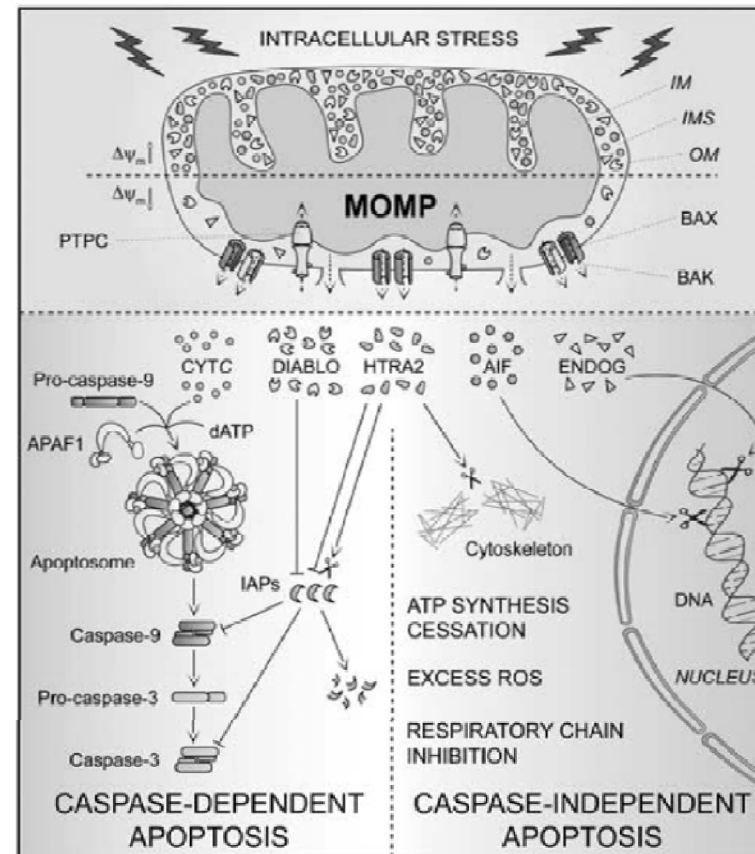


Figure 18-7 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## Apoptóza vyvolaná vnitřními signály, nezávislá na kaspázách

- probíhá i při aplikaci inhibitorů kaspáz
- průběh smrti je delší
- ztráta mitochondriálního transmembránového potenciálu
- inhibice respiračního řetězce
- štěpení DNA pomocí AIF a ENDOG (apoptosis inducing factor, endonukleáza G)



## Apoptóza vyvolaná vnějšími signály:

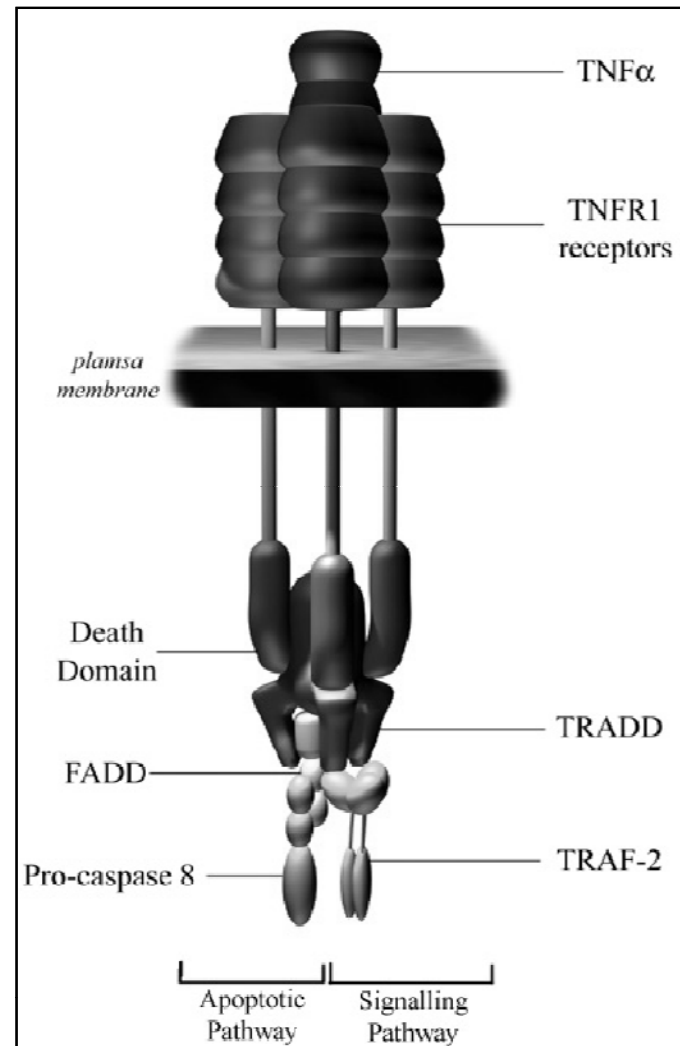
- aktivační molekuly (death activators) se napojují na specifické receptory v plazmatické membráně (death receptors):
  - Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) - TNF receptor
  - Lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) - TNF receptor
  - Fas-ligand (FasL) - Fas receptor (CD95)
- přenos signálu do cytoplasmy aktivuje prokaspázu-8 (-10) (iniciační kapázy)
- aktivovaná kaspáza-8 (-10) štěpením dalších prokaspáz spouští proteolytickou kaskádu



## DISC

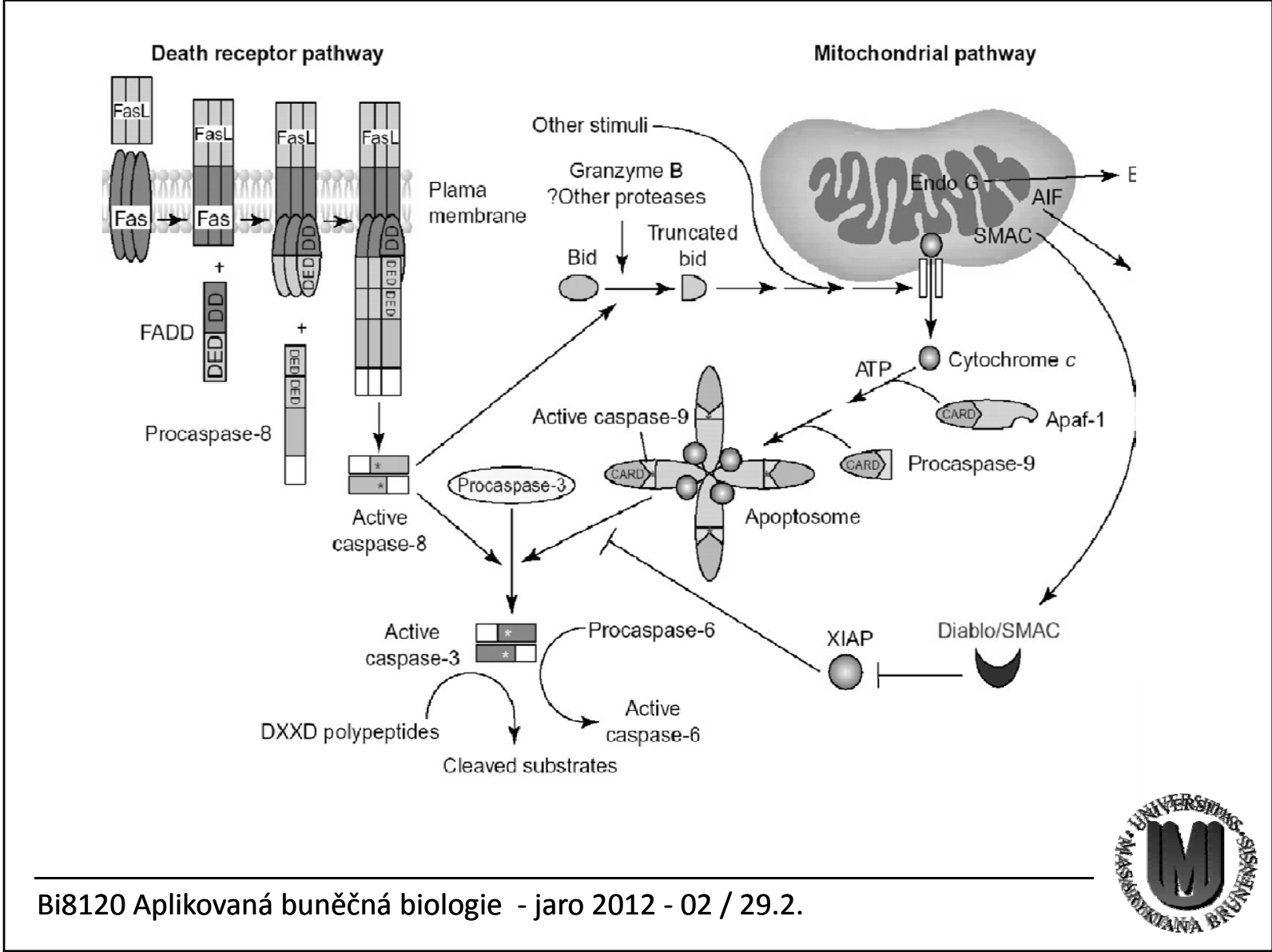
death-inducing  
signaling complex

- ligand
- receptor
- adaptorové proteiny
- prokaspáza-8



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.

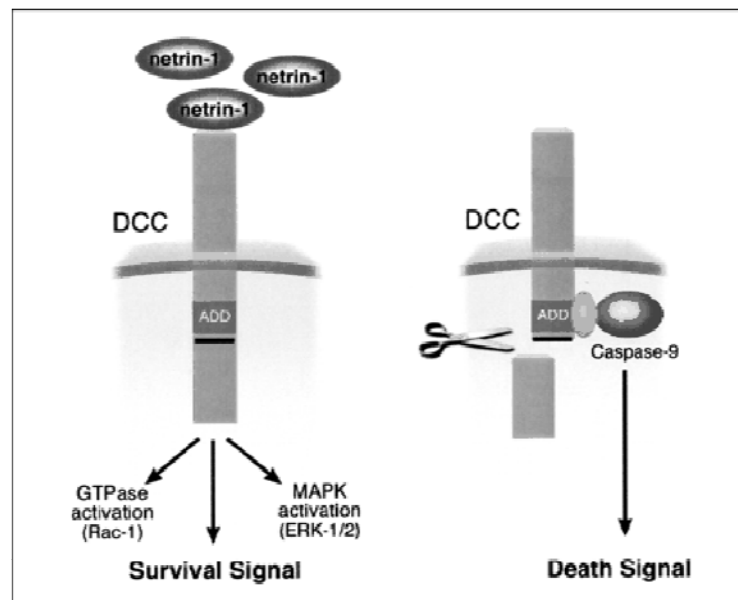




## Apoptóza vyvolaná vnějšími signály:

dependence receptotors (např. DCC)

- rozdílná signalizace:
- při navázaném ligandu -> přežívání buňky
- po uvolnění ligandu -> aktivace kaspázové kaskády



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.





## Současné rozdělení regulované buněčné smrti

a) autofagická buněčná smrt

b) apoptóza vyvolaná vnitřními signály, závislá na kaspázách

c) apoptóza vyvolaná vnitřními signály, nezávislá na kaspázách

d) apoptóza vyvolaná vnějšími signály, aktivací death receptors

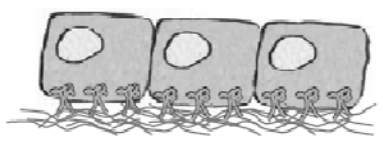
e) apoptóza vyvolaná vnějšími signály, (de)aktivací dependence receptors

f) anoikis – smrt způsobená ztrátou kontaktu k podkladu nebo okolním buňkám (mechanismus vnitřní apoptózy)

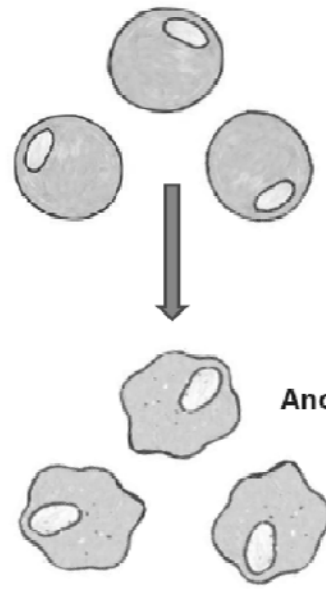
g) cornification (keratinizace) - terminální diferenciace epidermálních buněk, vznik vrstvy mrtvých keratinocytů (=stratum corneum)

h) entosis (buněčný kanibalismus) – pohlcení buňky stejným typem (ne fagocytem), postupná degradace ve fagozomu

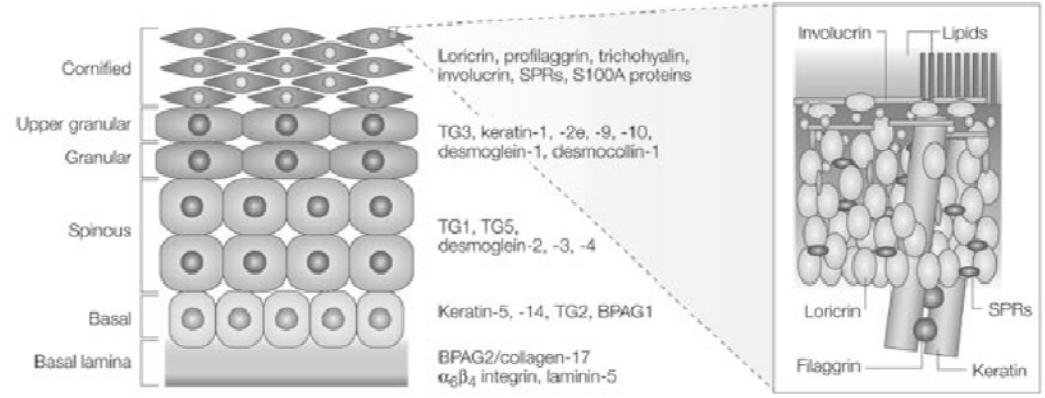




Loss of integrin attachment

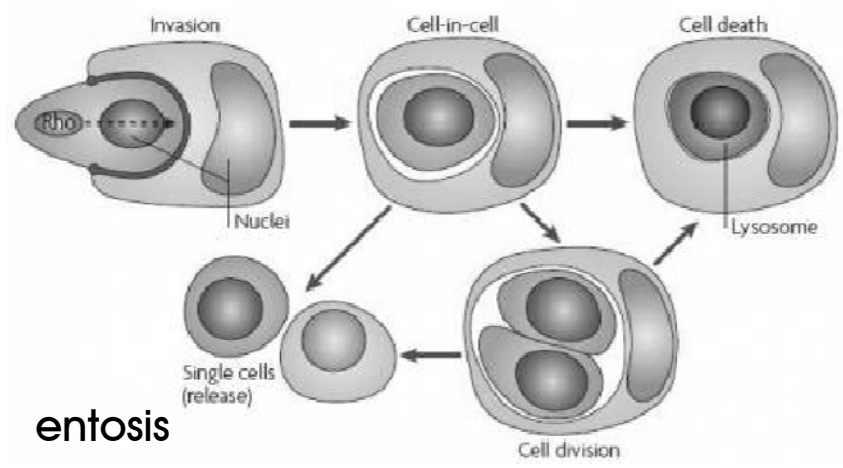


Anoikis



cornification

Nature Reviews | Molecular Cell Biology



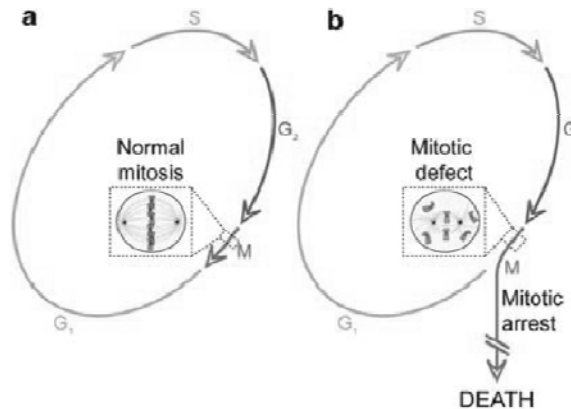
entosis

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407013943>



## Současné rozdělení regulované buněčné smrti

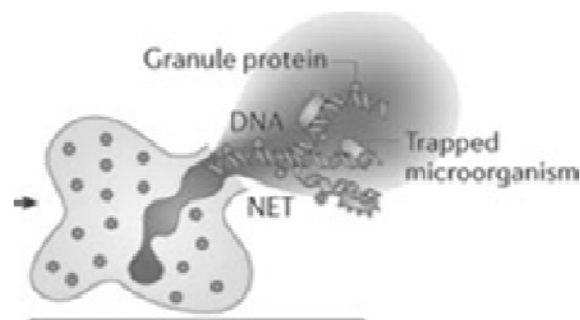
i) mitotická katastrofa – iniciace navození smrti v M-fázi buněčného cyklu vlivem poškození mitotického aparátu



j) necroptosis (regulovaná nekróza) – smrt vyvolána aktivací death receptorů při současné inaktivaci kaspáz (8,10)

k) netosis – odvozeno od NET (Neutrophil Extracellular Trap) = mikrobicidní struktura složená z chromatinu, histonů a antimikrobiálních proteinů produkovaná granulocyty

smrt specifická pro granulocyty, nezávislá na kaspázách; silná vakuolizace cytoplazmy, dekondezace chromatinu, rozpad membrány jádra a granulí – podobnosti s autofagií a regulovanou nekrózou



l) parthanatos – při nadměrné aktivaci PARP (poly ADP-riboza polymeráza), tvorba PAR, následná degradace chromatinu; popsáno u mrtvice, diabetu a neurodegenerativních chorob

m) pyroptosis – původně popsáno u makrofágů po infekci (*S. typhimurium*), typickým příznakem aktivace kaspázy-1->aktivace pyrogenního IL-1 $\beta$

# 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 apoptickou dráhu  
upregulace proapoptických genů (Bax, Bid, Noxa, Puma)  
downregulace antiapoptických genů (Bcl-2, Mcl-1)
- aktivuje receptorovou apoptickou 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
  - a) nedostatečná aktivita inicičních kaspáz (8,10) – z důvodu metylace promotoru, delece nebo mutace genu pro kaspázu-8 (neuroblastom, plicní karcinom, Ewingův sarkom, melanomy)
  - b) sekrece „decoy“ molekuly, která se váže na FasL a brání její vazbě na FasR (nádory plic a střeva)
  - c) sekrece FasL nádorovými buňkami indukuje apoptózu cytotoxických lymfocytů
- narušení apoptózy spouštěné mitochondriemi u nádorových buněk
  - a) delece a/nebo metylace genu pro Apaf-1 (melanom)
  - b) nedostatečná aktivita iniciční kaspázy 9 (nádory ovaria)
  - c) overexprese Bcl-2 z důvodu translokace (leukémie)





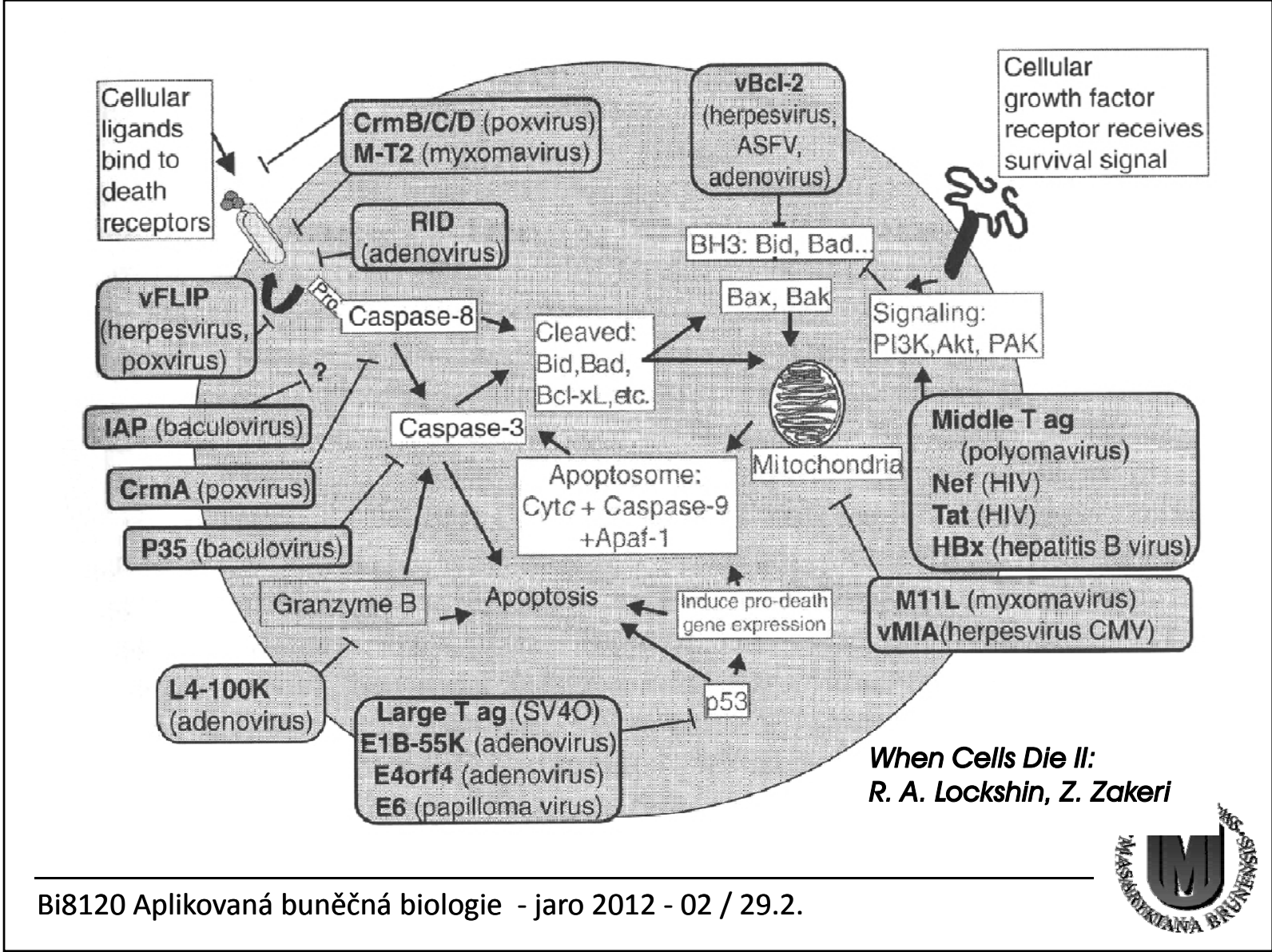
## Apoptóza a nádory

### Viry, inhibující apoptózu transformovaných buněk:

tvorba proteinů blokujících apoptózu na různých úrovních

- receptorová apoptóza
- mitochondriální apoptóza
- p53
- podpora proliferačních 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)  
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

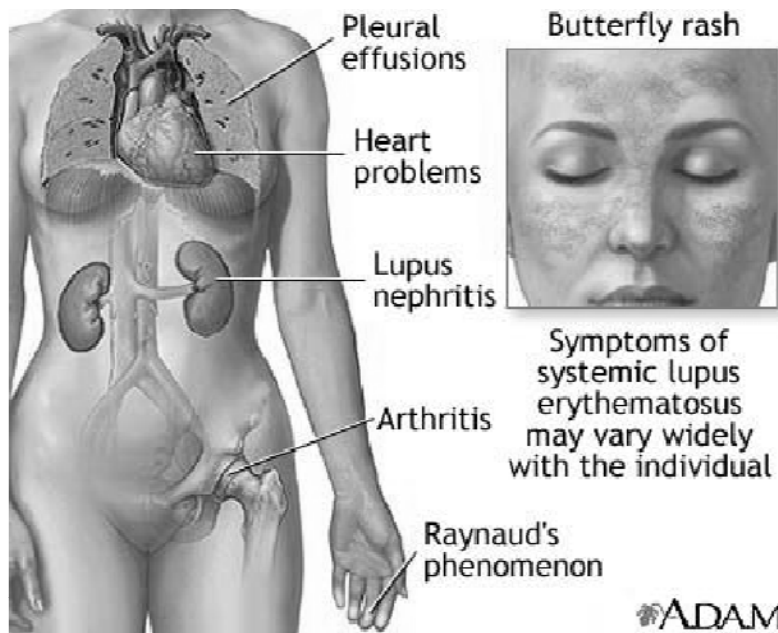
## defekty v indukci apoptózy a autoimunitní choroby

- 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 okolní tkáně místo lymfocytů



## Defekty v indukci apoptózy a autoimunitní choroby

systemový lupus erythematoses (SLE),  
lupenka,  
revmatoidní artritida,  
Hashimotovo struma...



### systemový lupus erythematoses

- častěji u žen (90%)
- motýlový erytém na obličeji
- artritida
- zánět ledvin
- nedokrvení periferii

## Autoimunitní choroby: systémový lupus erythematoses

- porucha funkce makrofágů
- vznik sekundární nekrózy
- uvolnění prozánětlivých látek
- vystavení autoantigenů
- zánět

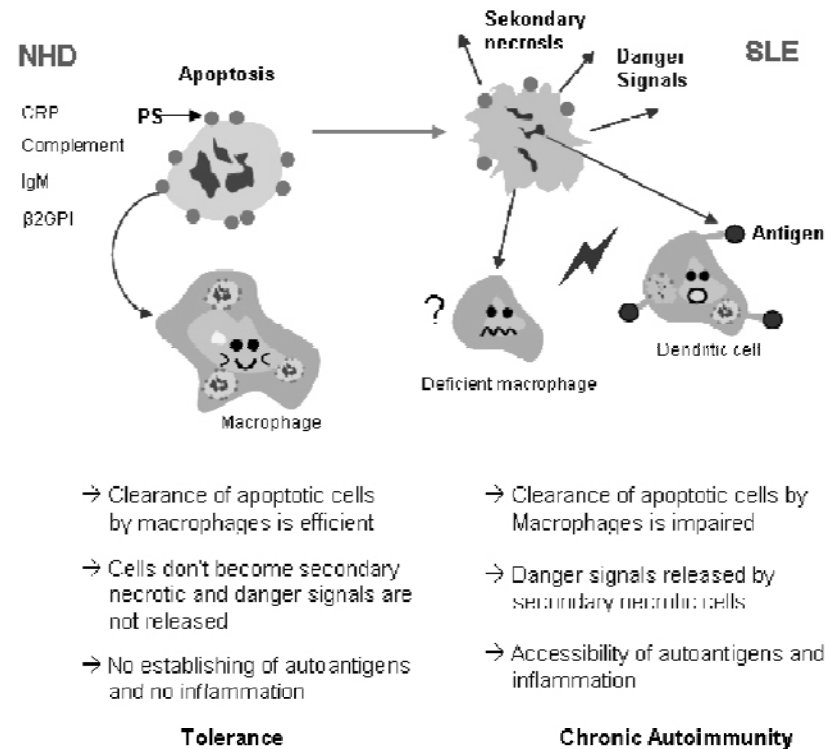


Fig. "Defects in the clearance of apoptotic cells is a possible pathway to autoimmune disease"  
 CRP → C-reactive protein, PS → phosphatidylserine, IgM → immunoglobulin M, β2GPI → β2 glycoprotein I,  
 SLE → systemic lupus erythematosus, NHD → normal healthy donor

## 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- $\gamma$ )
- viry a jejich proteiny v extracelulární prostoru aktivují apoptózu v okolních lymfocytech



## Apoptóza a degenerativní onemocnění

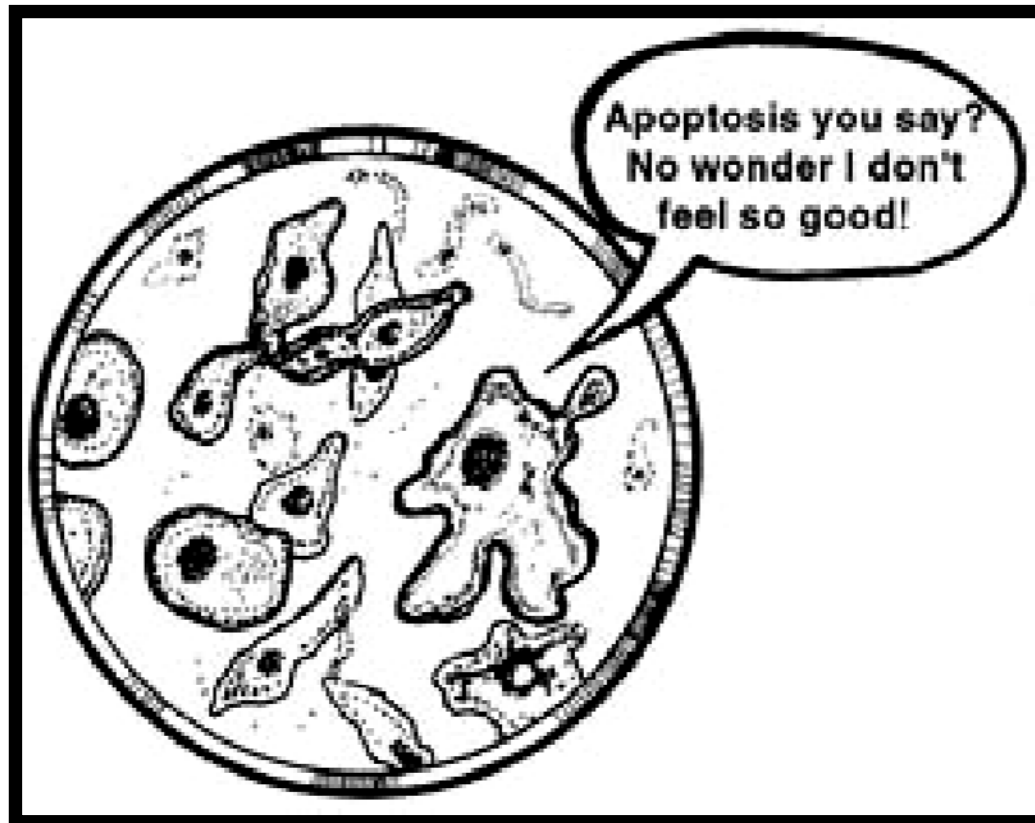
Alzheimerova choroba  
Parkinsonova choroba  
Huntingtonova choroba

nejasné mechanismy indukce apoptózy:

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







Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 02 / 29.2.

