

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

BUNĚČNÁ SMRT

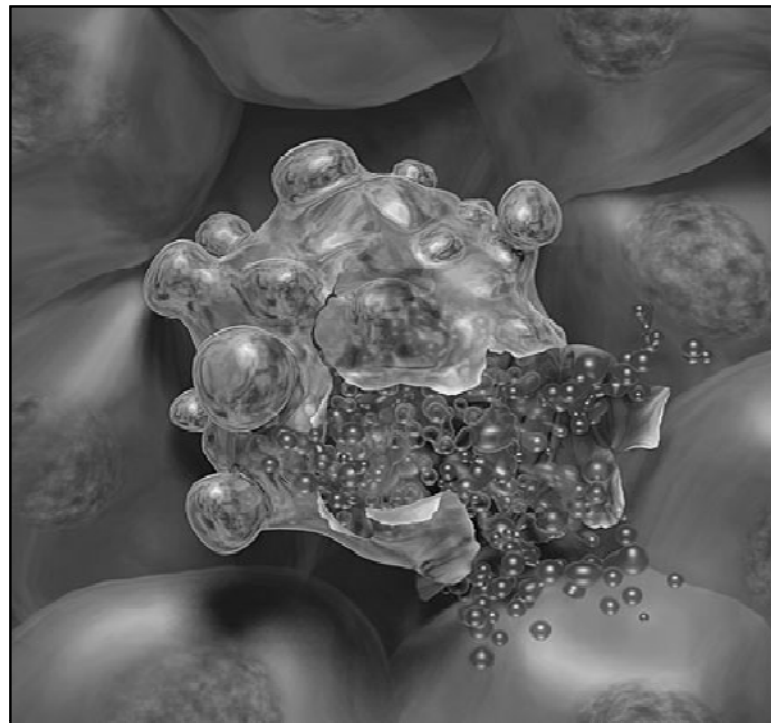
RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



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 2013 - 02 / 27.2.



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 2013 - 02 / 27.2.



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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.

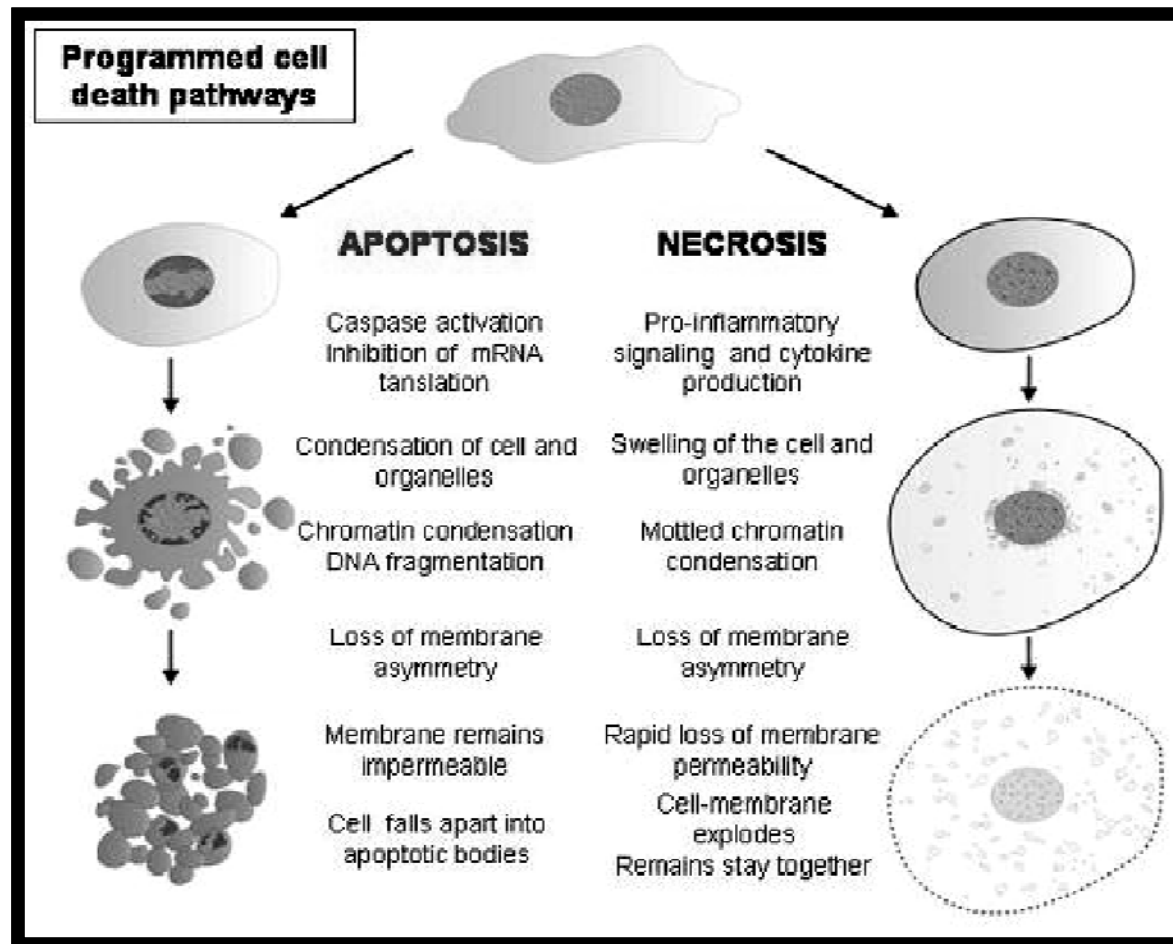


Kdy je buňka mrtvá?

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

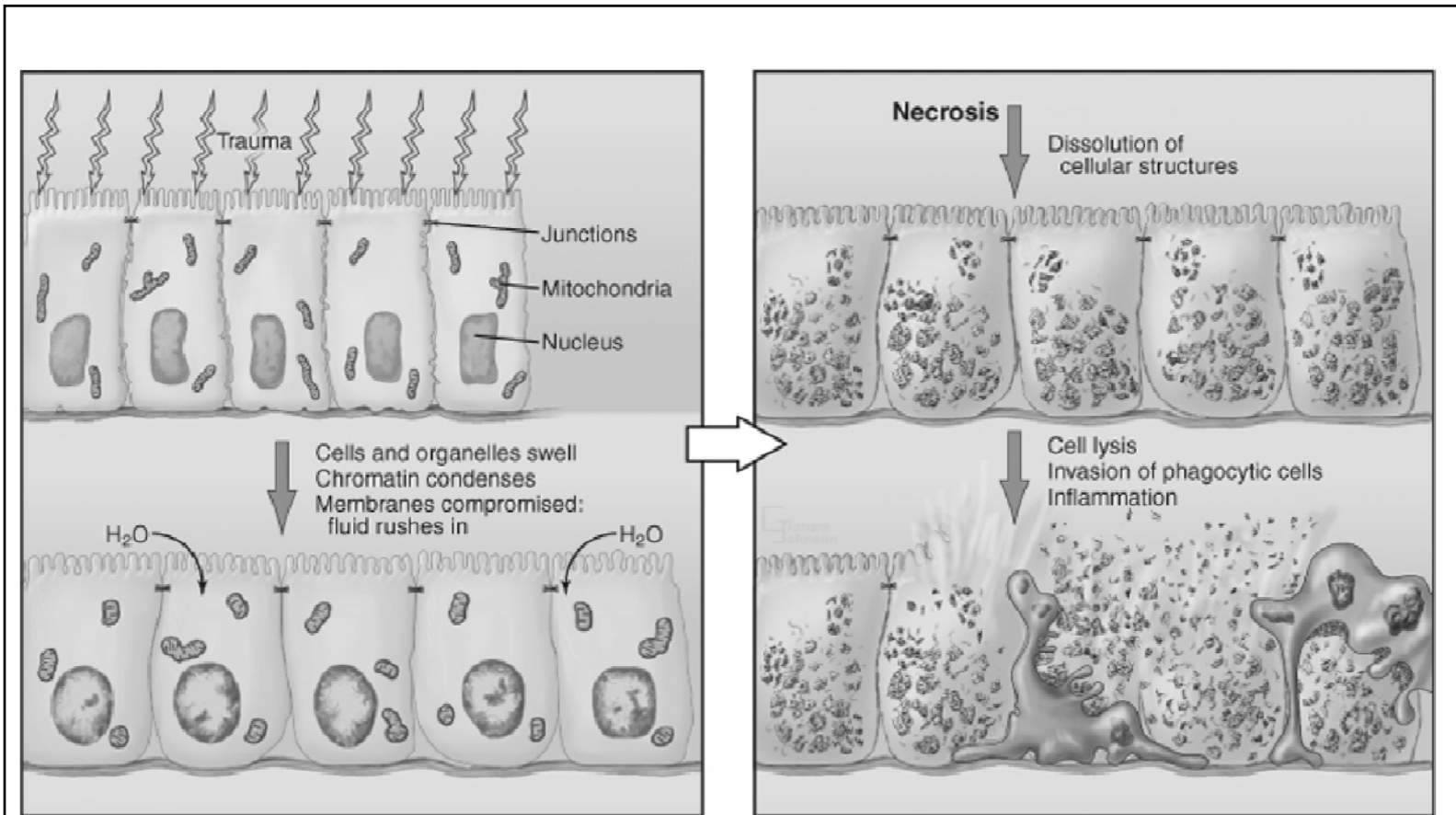
rozdíl mezi mrtvou a umírající buňkou





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.

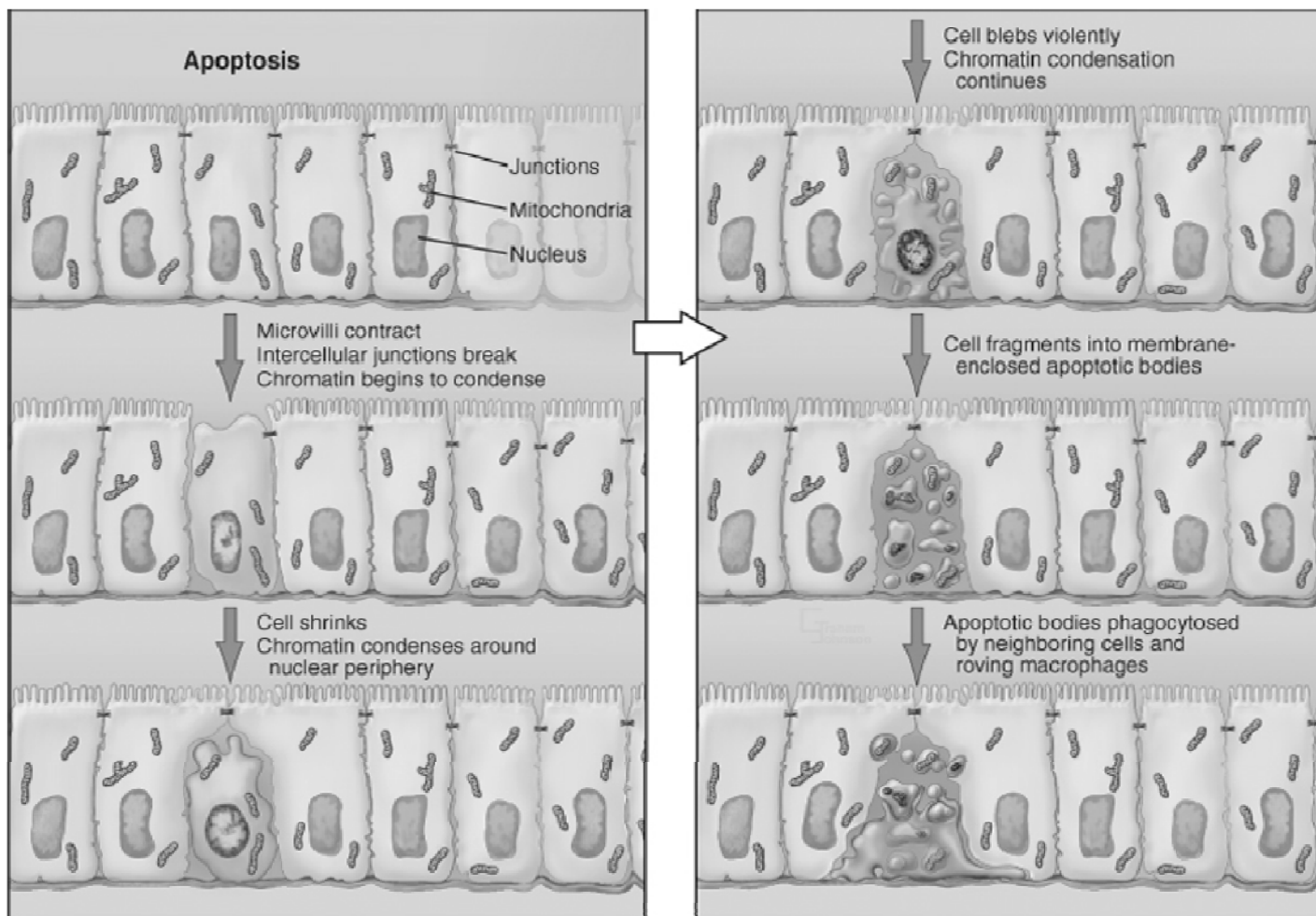




© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



KATASTROFICKÁ (NEPROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

NEKRÓZA

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



Indukce nekrózy

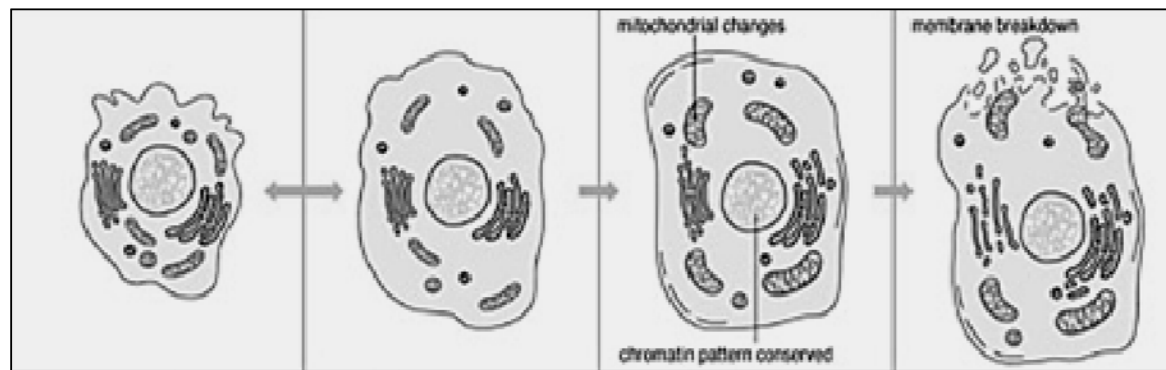
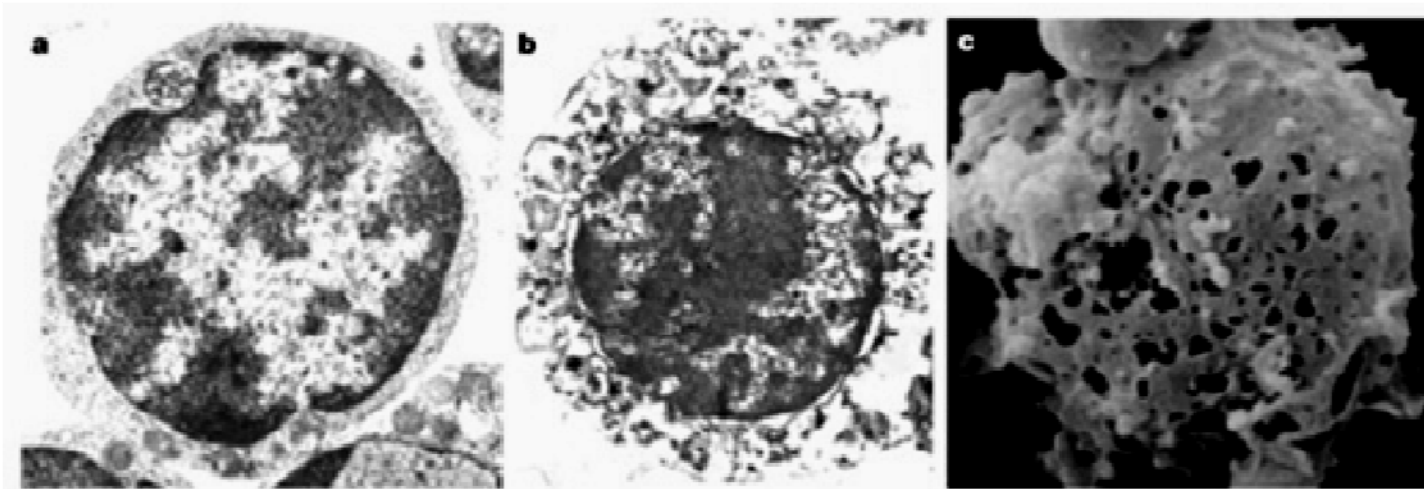
- a) rozsáhlé poškození, při němž už nemohou být aktivovány mechanismy apoptózy
- b) působení stresových faktorů
 - změny koncentrace iontů, pH...
 - vyčerpání zdrojů energie
 - změny teploty
 - poškození buňky nebo jejích organel



Příznaky a průběh nekrózy:

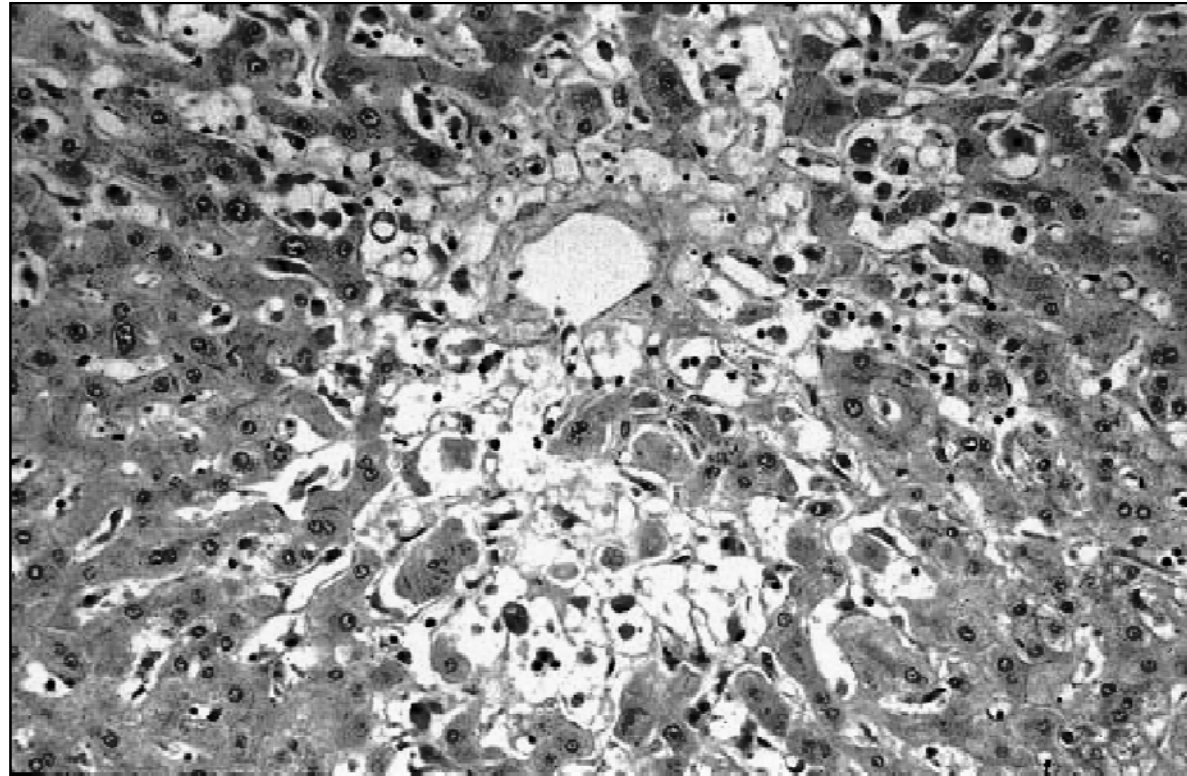
- poškození mitochondriální membrány
- pronikání iontů Ca^{2+} do mitochondrií
- zakulacení a prasknutí mitochondrií
- ztráta regulace transportu iontů
- zakulacení buňky (swelling)
- lýze buňky
- vznik nekrotického ložiska
- invaze makrofágů
- zánětlivá reakce





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





nekrotické ložisko ve tkáni

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



FYZIOLOGICKÁ (PROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT (Programmed Cell Death, PCD)

- indukovaný, regulovaný a selektivní proces pro vyřazování určitých buněk

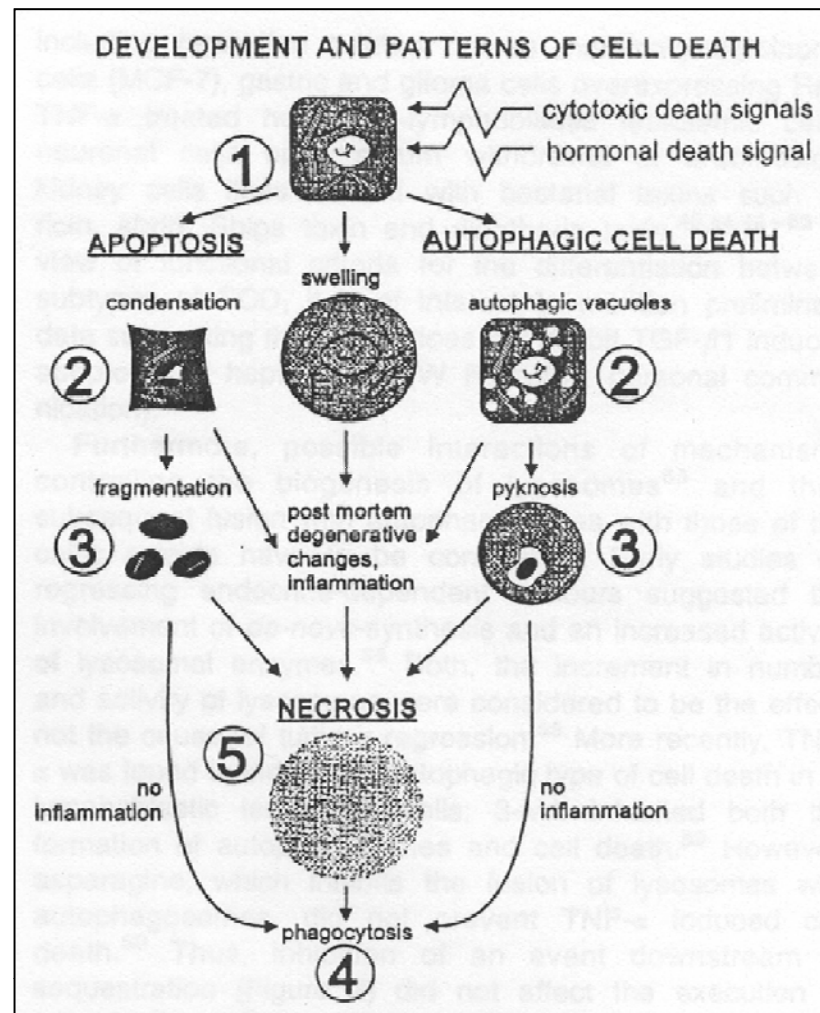
Apoptóza (apoptosis, type I PCD)

- kaspázy
- kalpainy, katepsiny, granzymy

Autofagie (autophagy, type II PCD)

- autofagozomy/autolysozomy (lysozomální proteázy)





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



AUTOFAGIE (PCDII)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



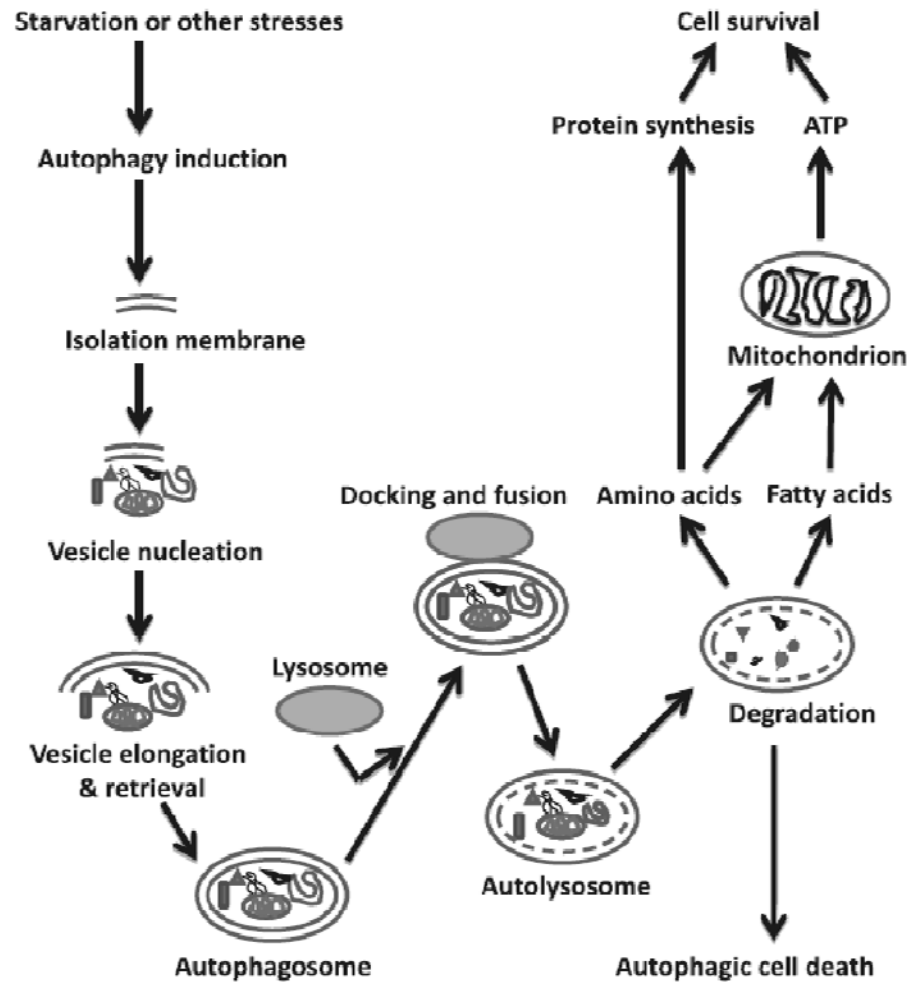
Průběh autofagie

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

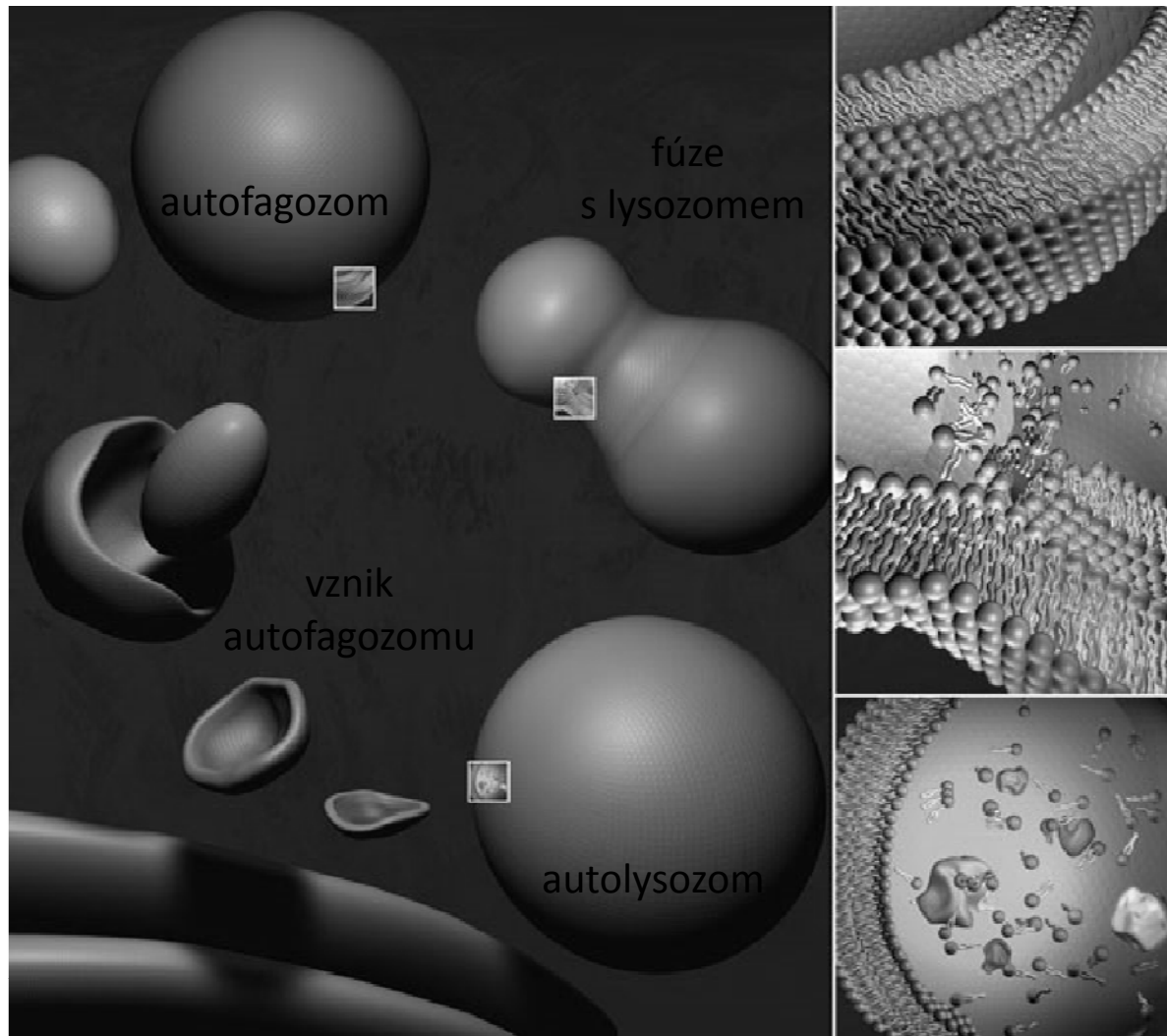




Can. J. Physiol. Pharmacol. 88: 285–295 (2010)

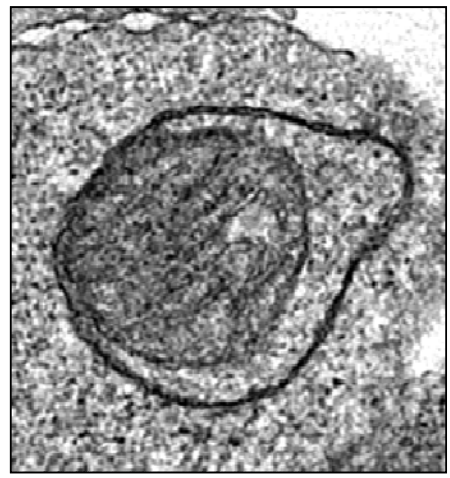
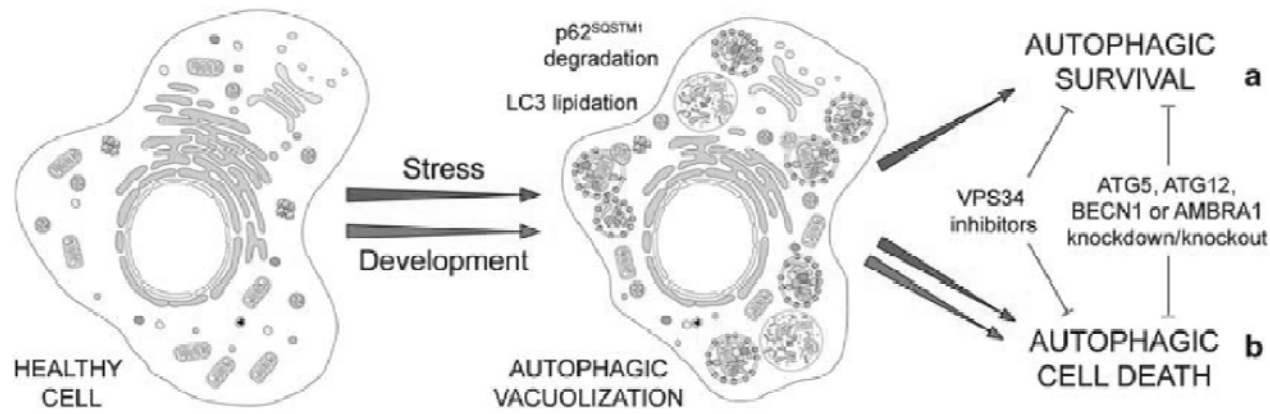
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





mitochondrie v autofagosomu



APOPTÓZA (PCDI)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.

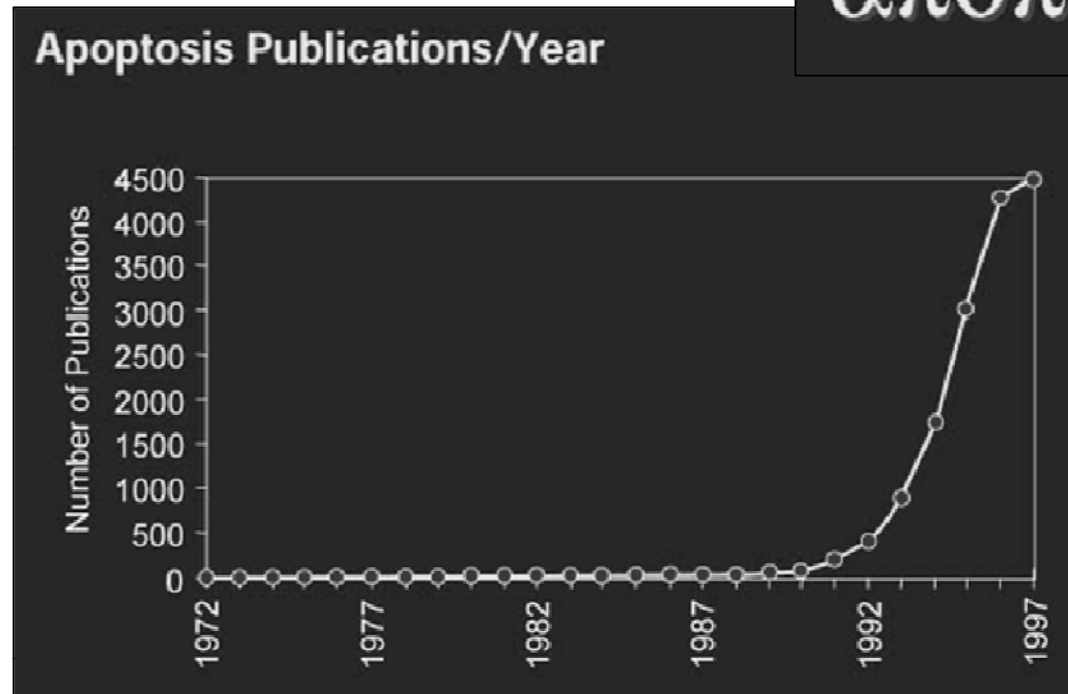


Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.

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

British Journal of Cancer (1972) 26, 239.

ΑΠΟΠΤΩΣΙΣ

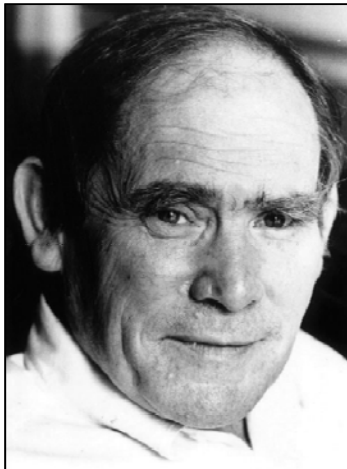


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.

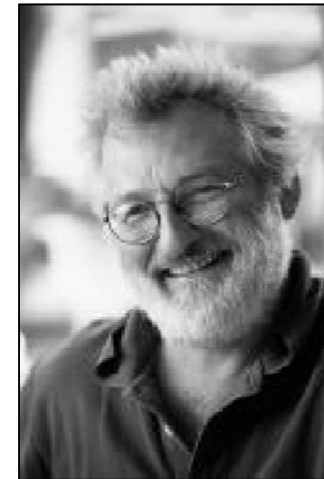


2002 - Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

Sydney Brenner



John E. Sulston



H. Robert Horvitz

za výzkum genetické regulace vývoje orgánů a
programované buněčné smrti

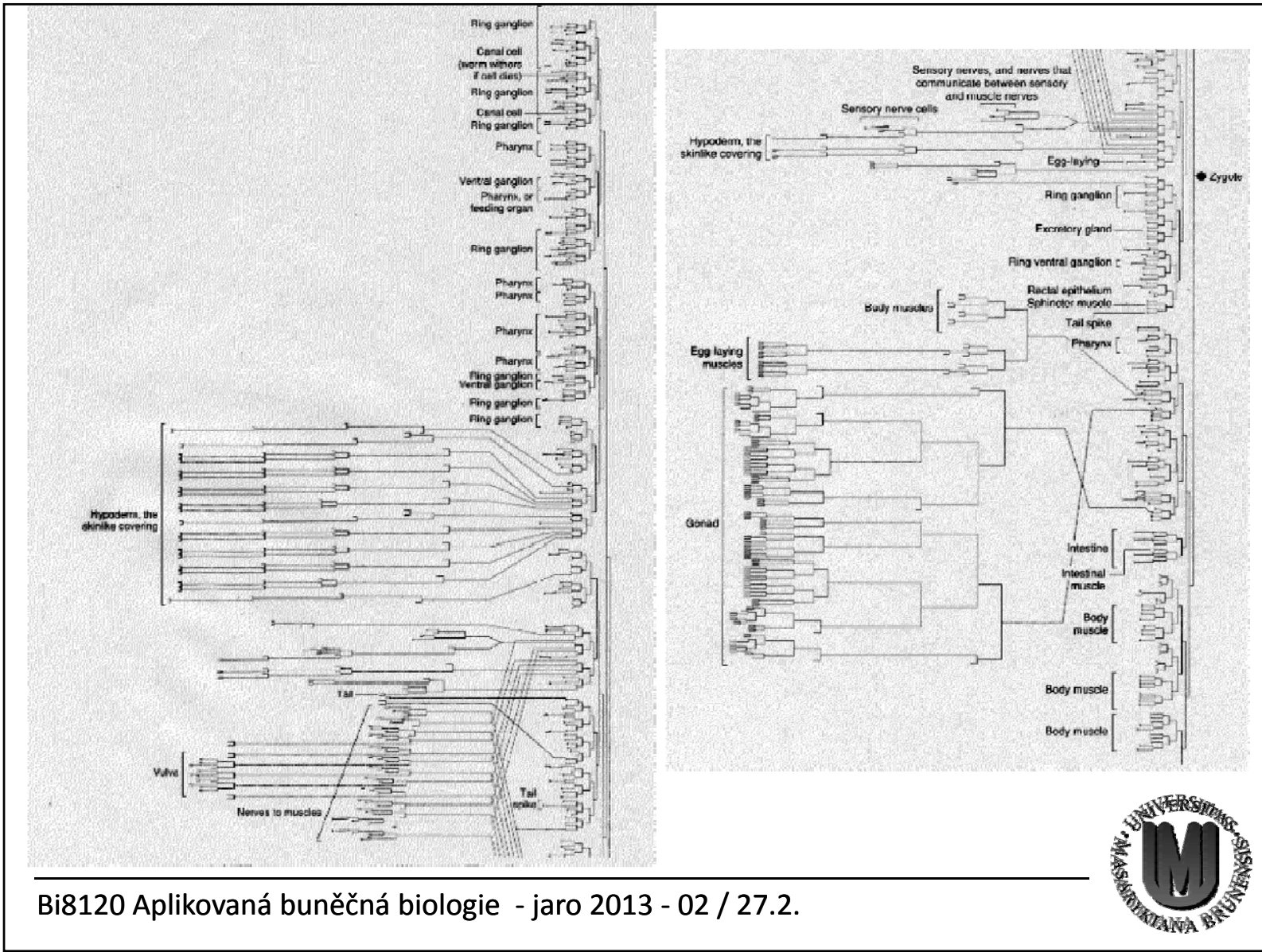
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



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 2013 - 02 / 27.2.

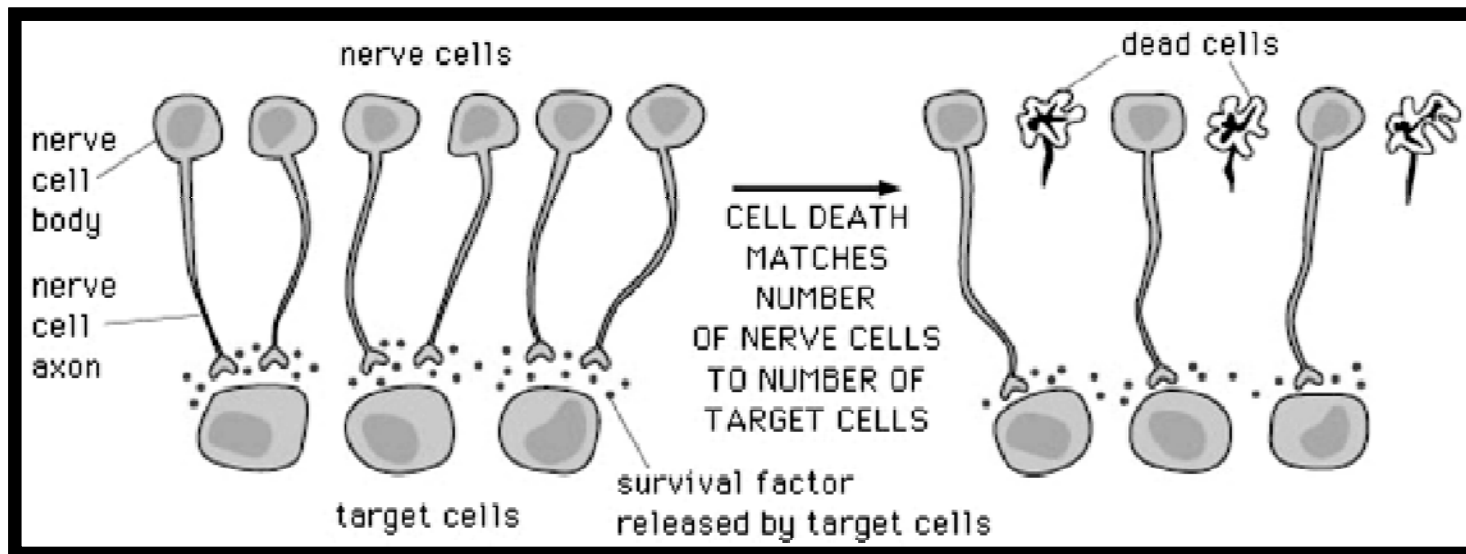


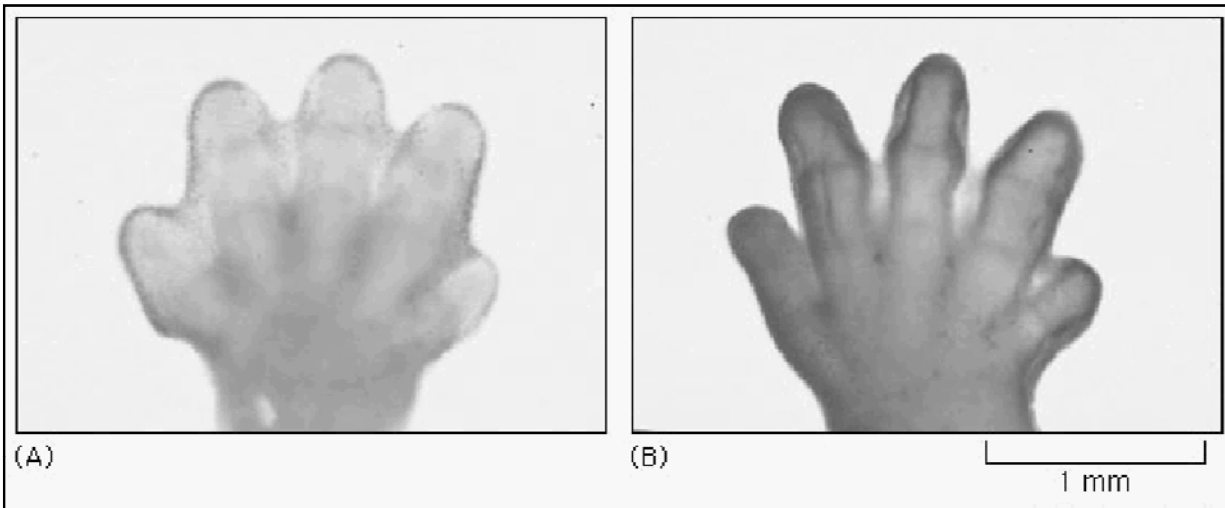
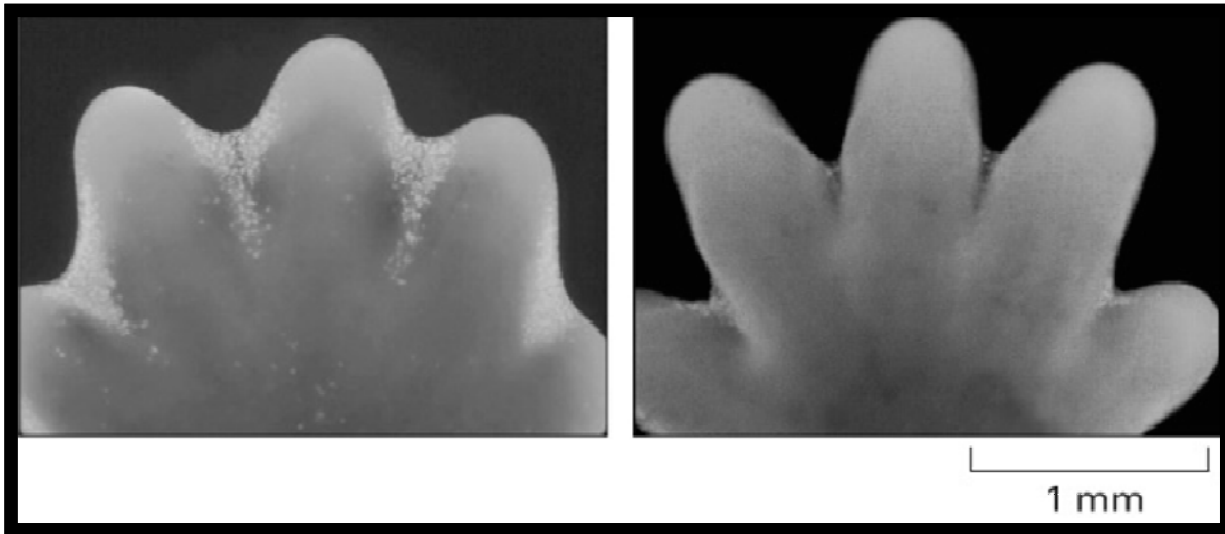
Příčiny apoptózy

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



odstranění nadbytečných neuronů při vytváření synapsí v mozku





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





syndaktylie (defekt apoptózy)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



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

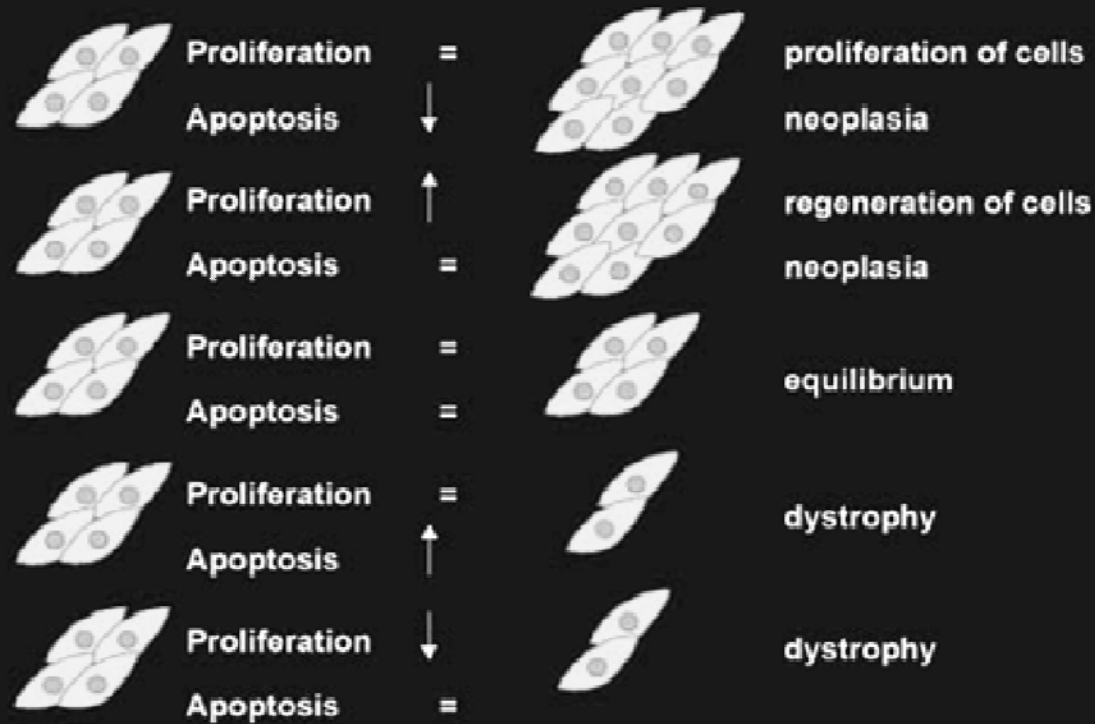


Morphology



Diagnosics

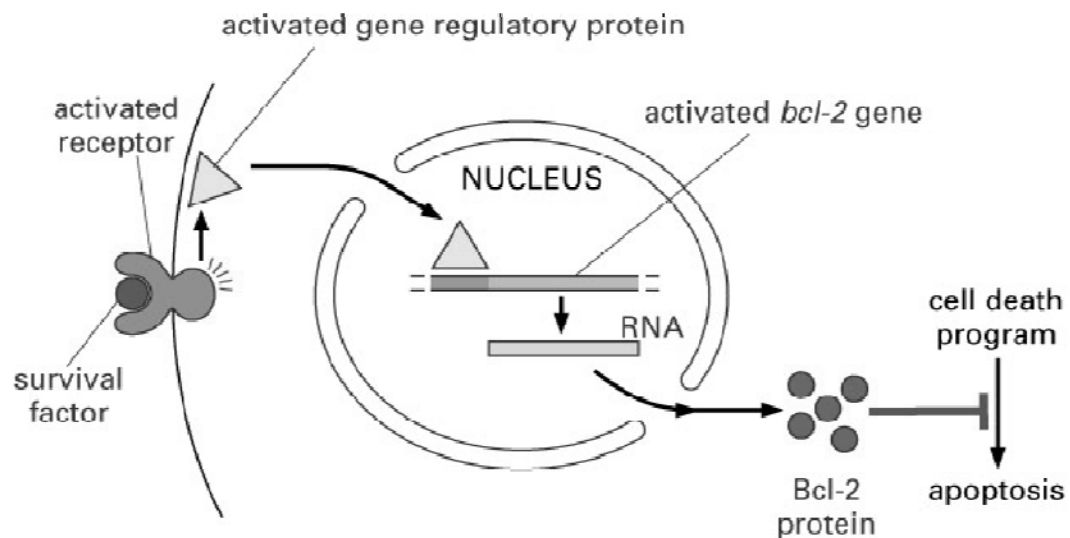
Apoptosis and Cell Proliferation in Tissue Homeostasis



Indukce apoptózy

Odstranění pozitivního signálu

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



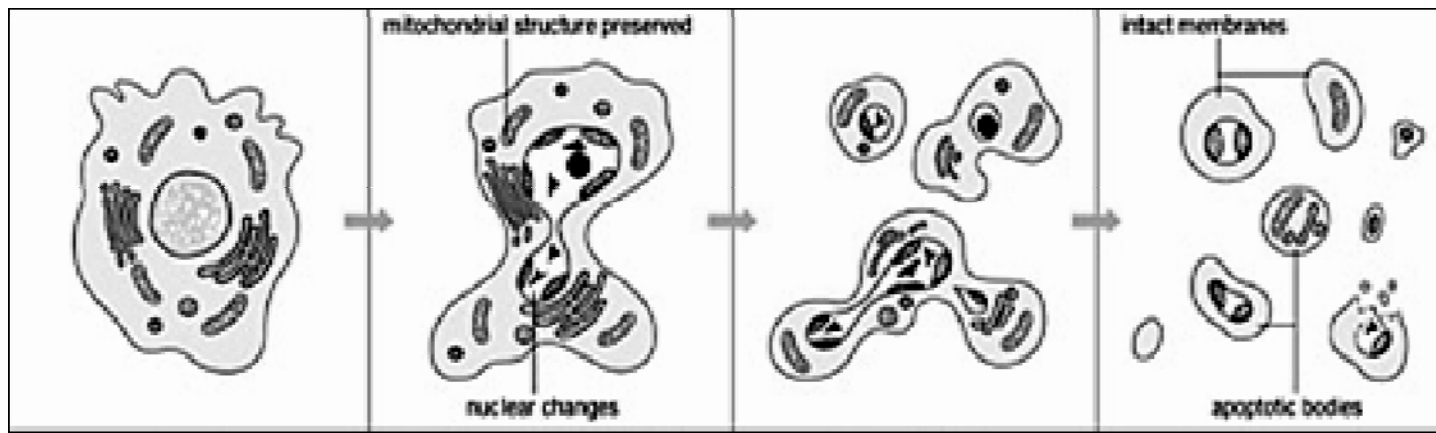
Indukce apoptózy

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:

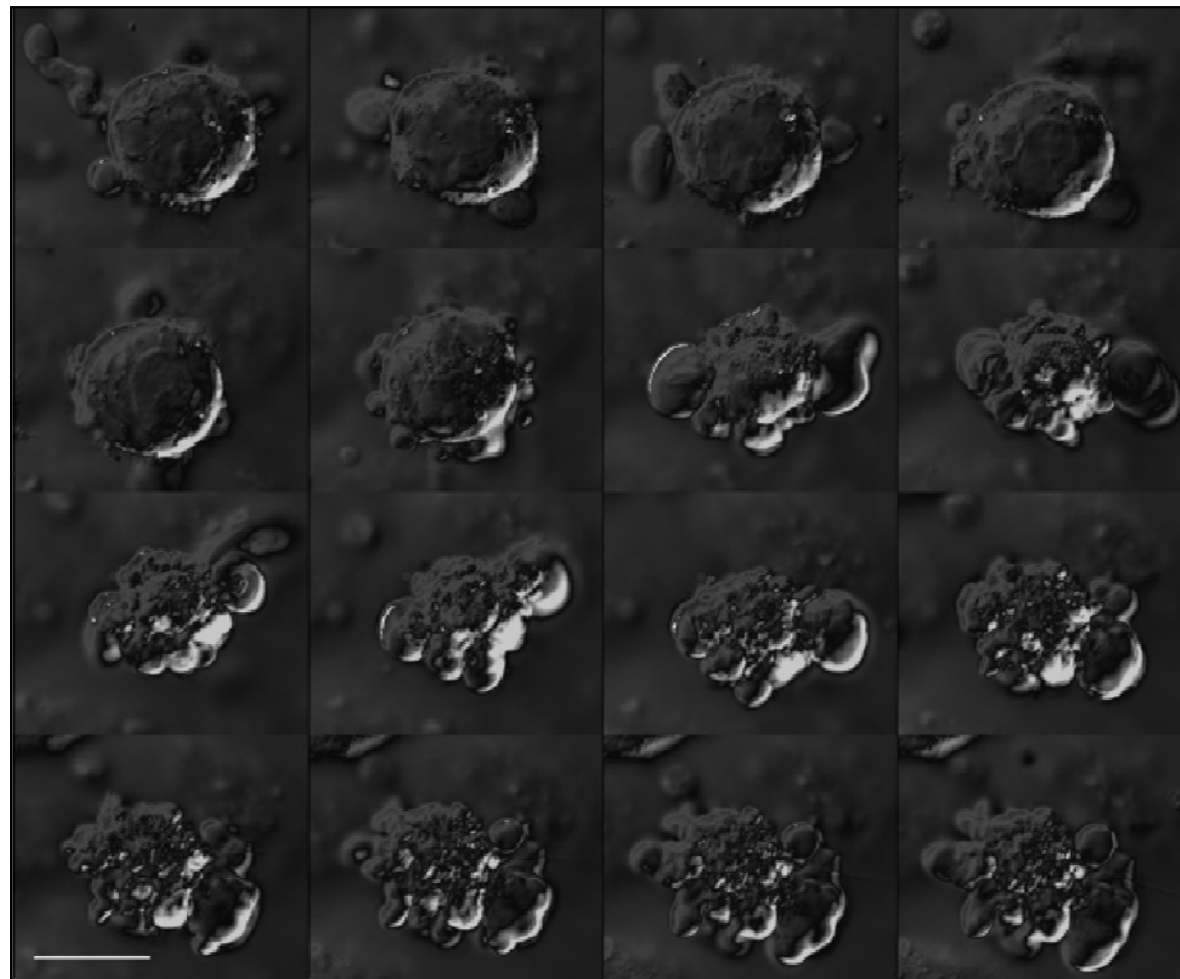


normální
buňka

smršťování

rozpad
(fragmentace)

apoptotická
tělíška
(apo-bodies)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



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

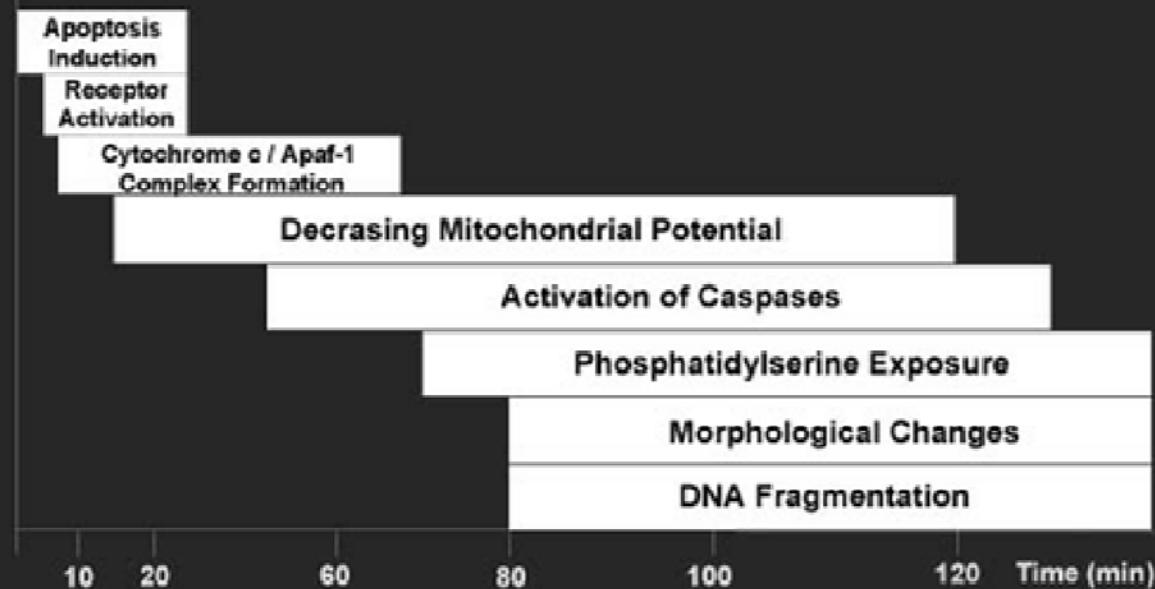


Roche Molecular Biochemicals

Hallmarks of Apoptosis



Diagnosics



HeLa cells, apoptosis induction with TNF α / Actinomycin D



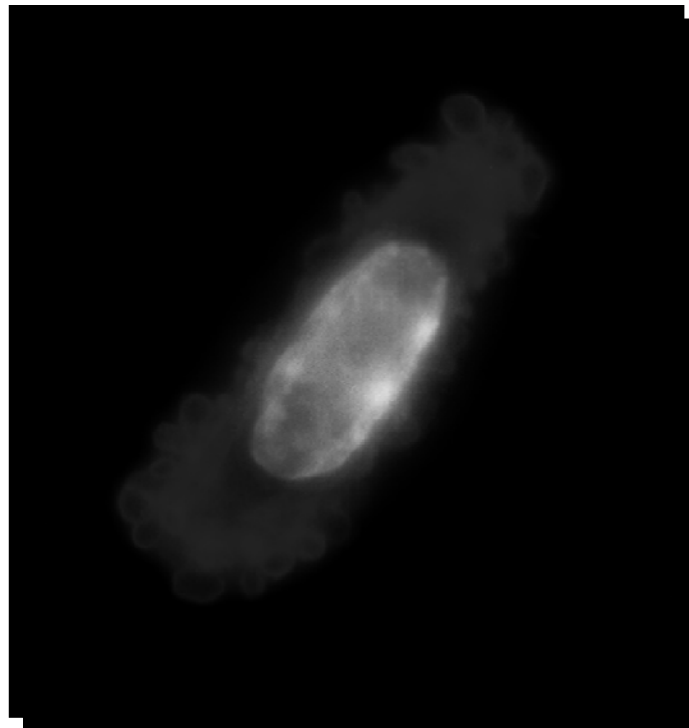
Metodické aspekty studia apoptózy

- 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)

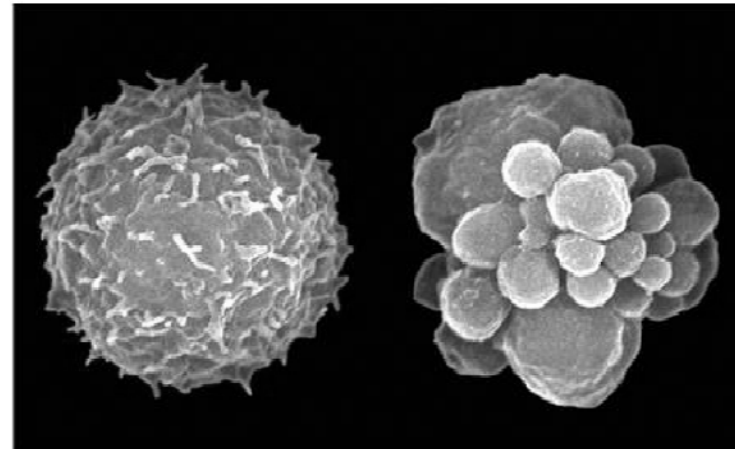


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





Motoneuron disease: an apoptotic neuron seen by scanning electron microscopy

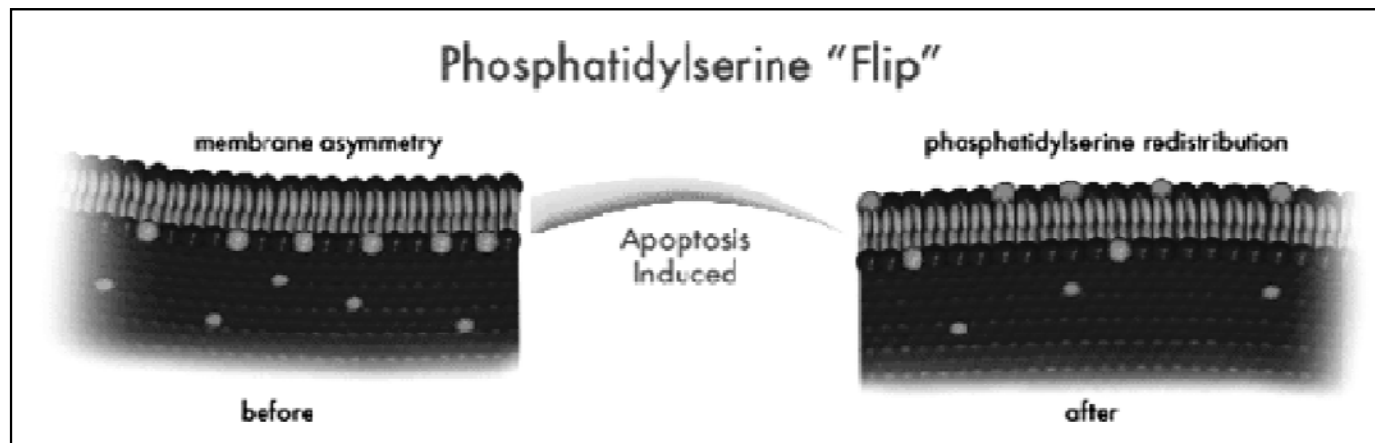


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



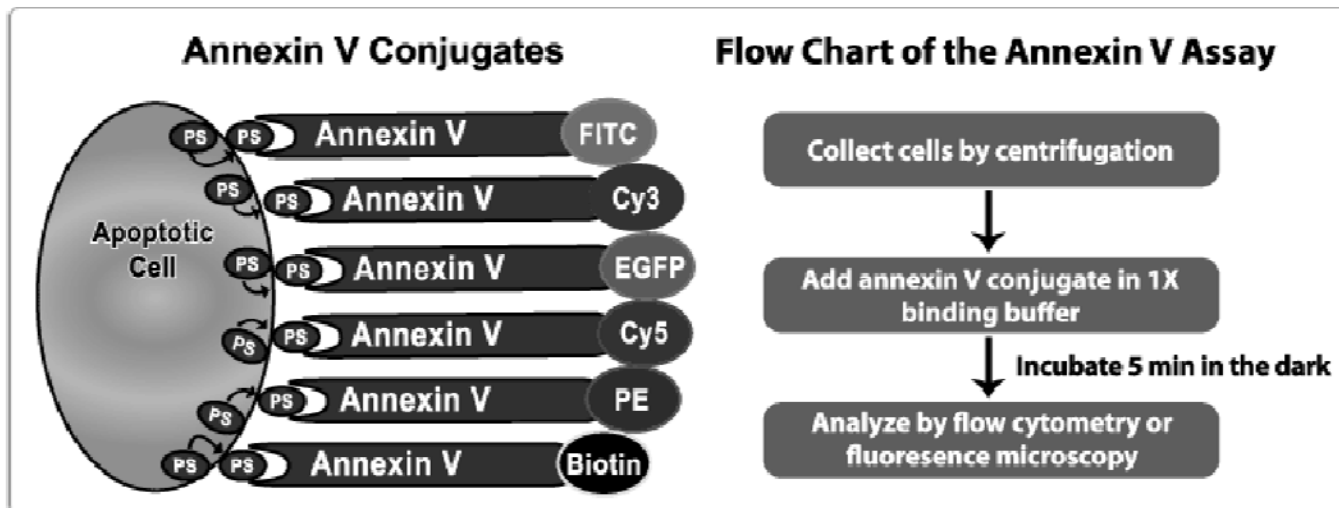
Změny v plazmatické membráně

- externalizace fosfatidylserinu („eat me“ signal)



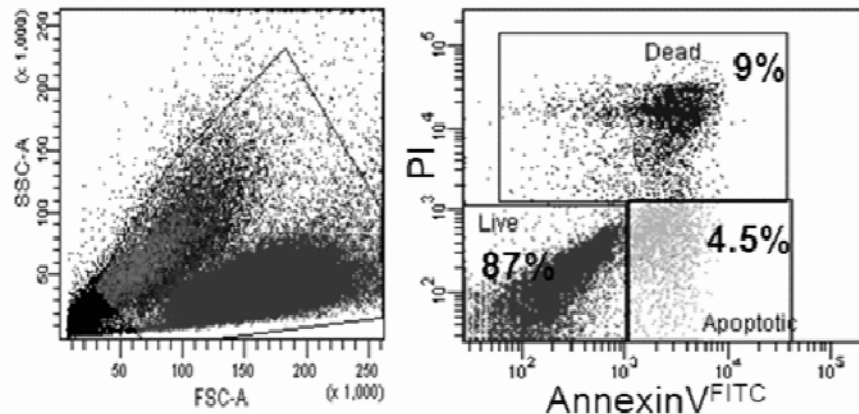
Změny v plazmatické membráně

- detekce fosfatidylserinu
- Annexin V + fluorochrom



Změny v plazmatické membráně

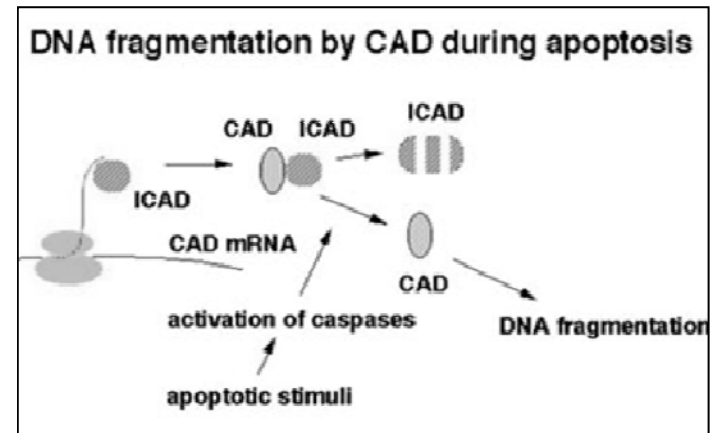
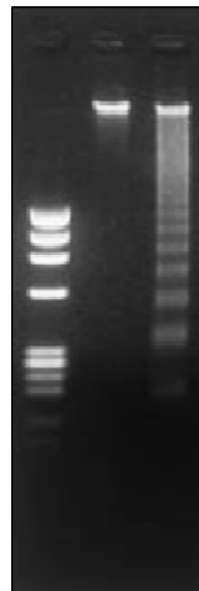
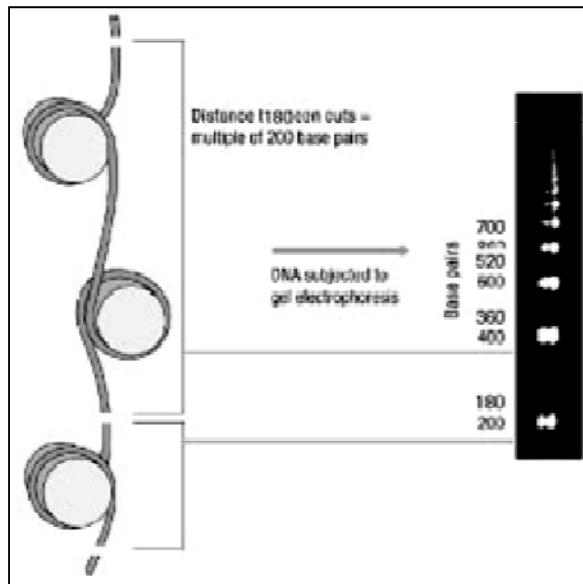
- detekce fosfatidylserinu – Annexinem V
- flow cytometrie



Legend. Jurkat T-cells were UV-B irradiated and incubated over night. Cells were labelled with AnnexinV^{FITC} for 15 min at RT with 5 μ 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

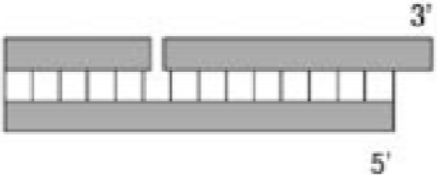


CAD – kaspázou aktivovaná Dnáza
ICAD – inhibitor CAD

Detekce štěpení DNA:

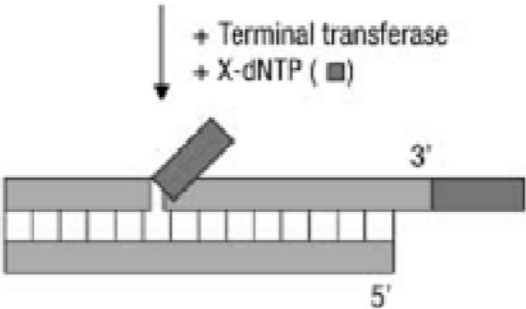
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase
dUTP nick end labeling

In situ end labeling (TUNEL)
(template independent)




3'
5'

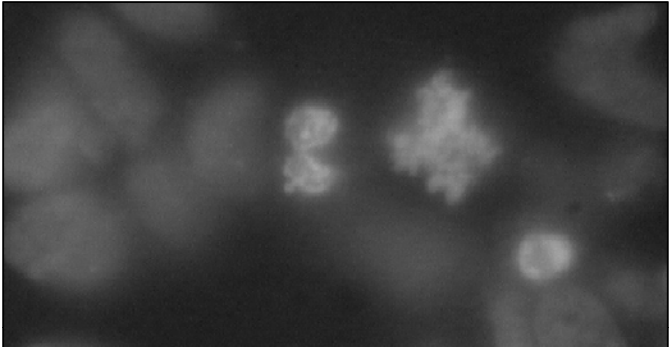
+ Terminal transferase
+ X-dNTP (■)



3'
5'



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

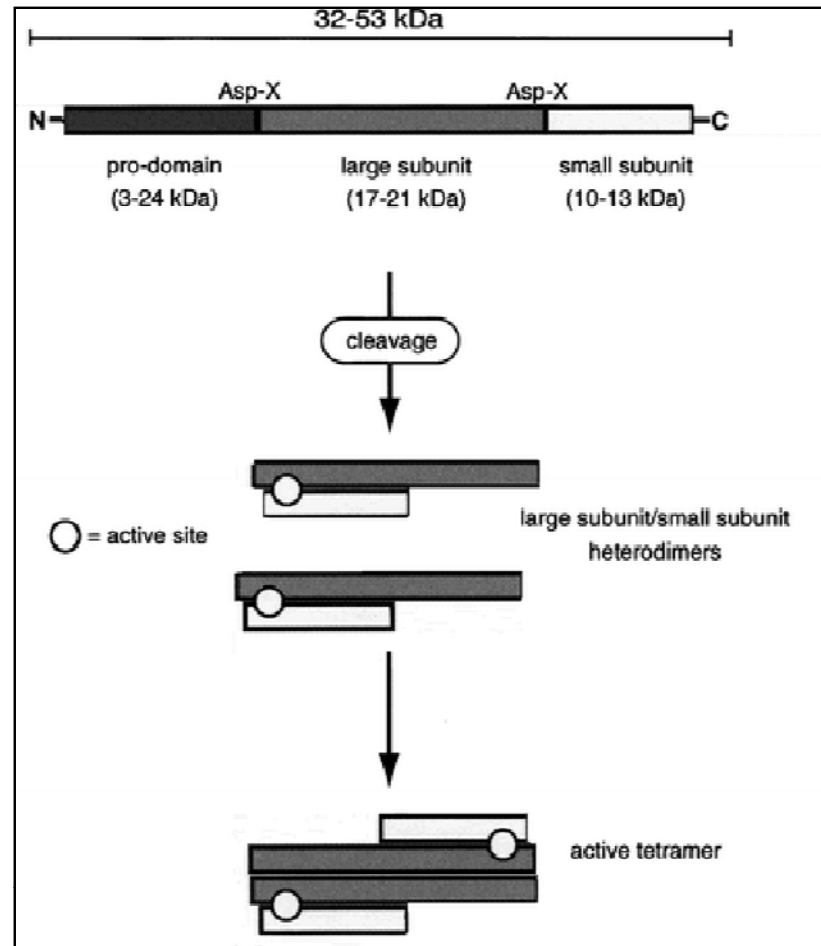


Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení

prokaspáza

kaspáza

aktivní
kaspáza



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



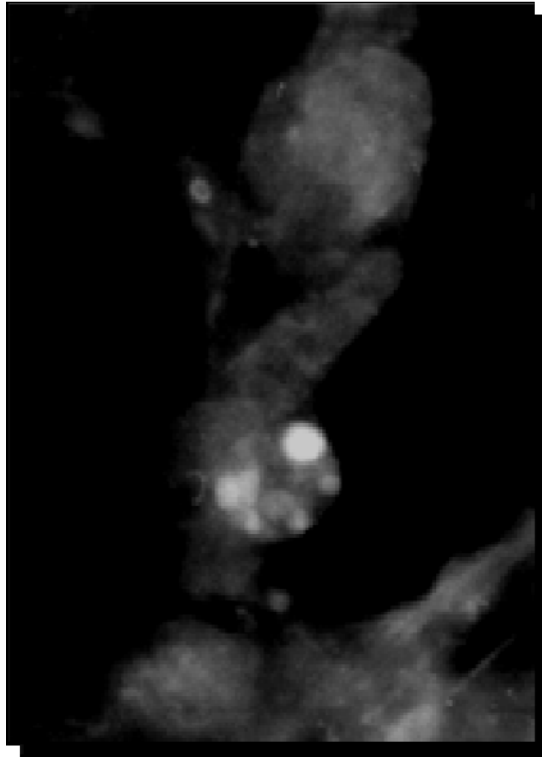
Aktivace proteolytického štěpení

Substráty kaspáz - proteiny

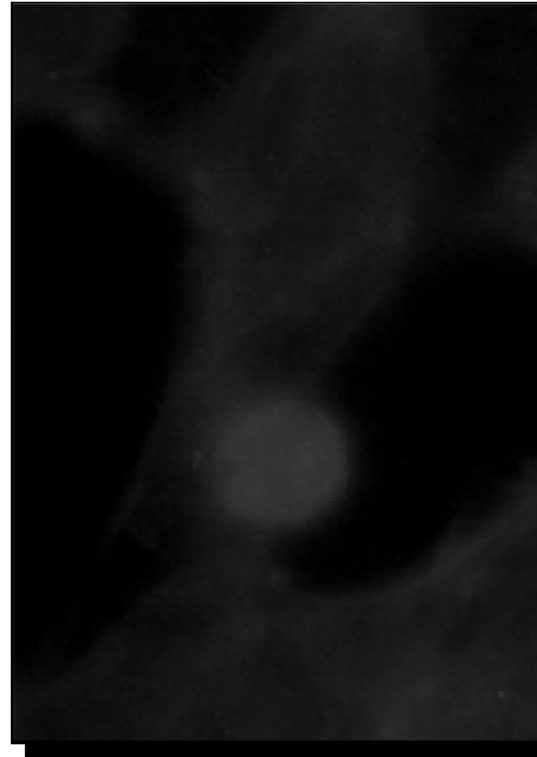
- „cell death“ proteiny (Bcl-2, Bcl-XL, prokaspázy..)
- regulátory b. cyklu (MDM2, p21, Rb, cyklin A..)
- cytoskelet (aktin, fodrin, keratiny, laminy..)
- DNA metabolismus (ICAD, PARP..)
- RNA metabolismus
- signální dráhy
- transkripční faktory
- proteiny spojené s neurodegenerativními chorobami



Aktivace kaspáz – fluorescenční mikroskopie



α -tubulin / DAPI



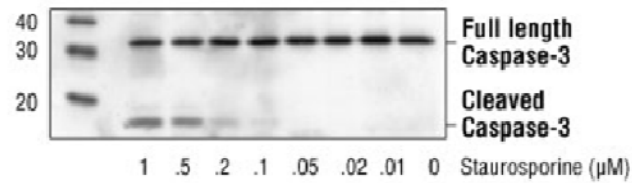
aktivovaná kaspáza 3

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.

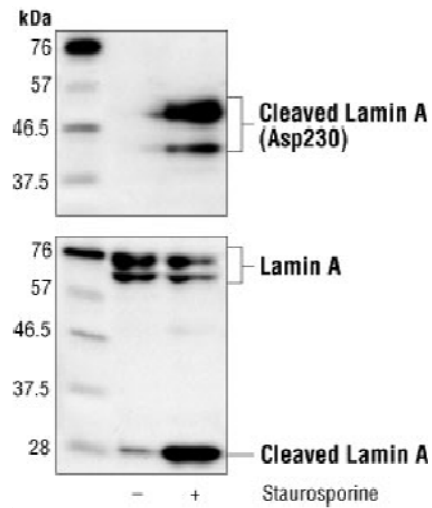


Aktivace kaspáz – detekce (WB)

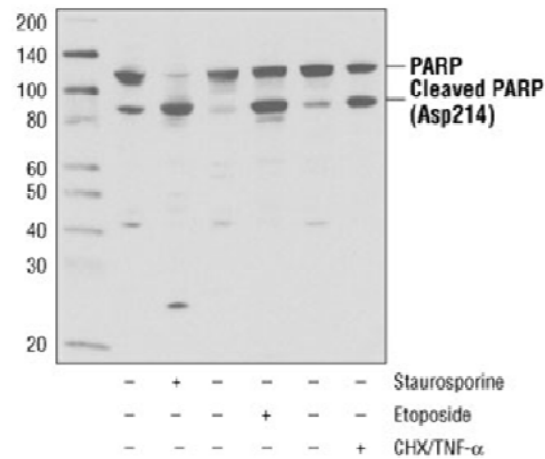
Kaspáza-3



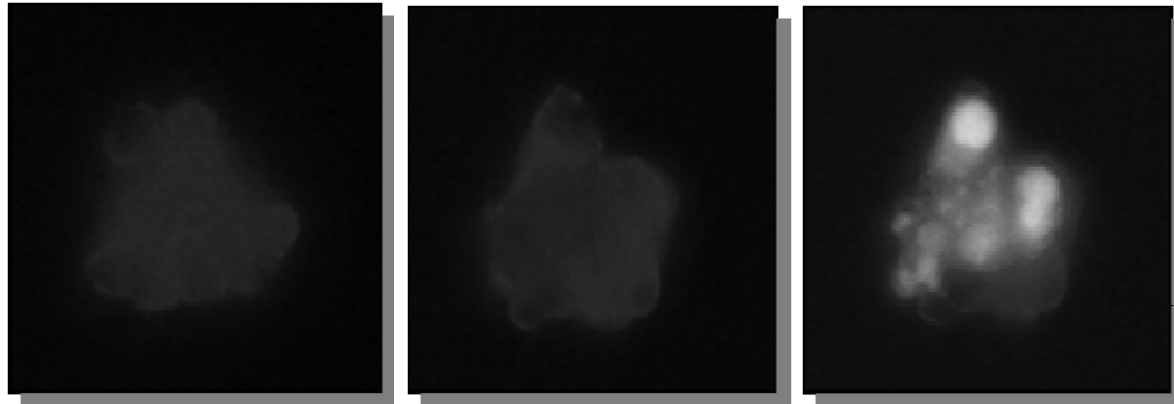
Lamin A



Poly (ADP-ribose) polymerase



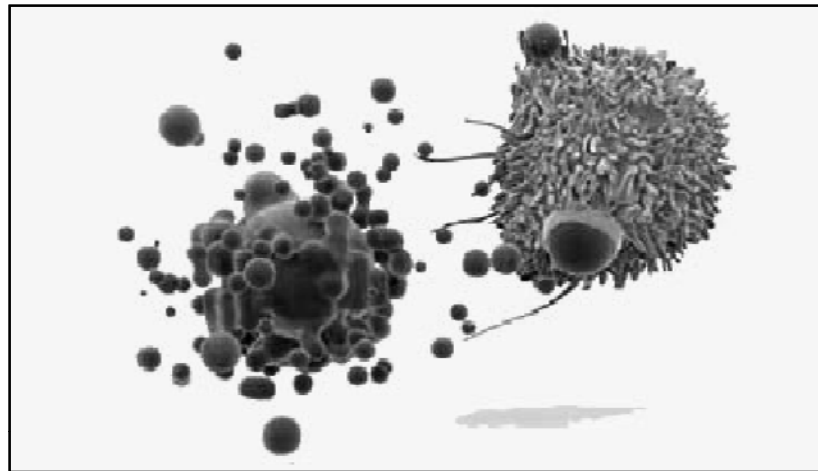
Rozpad buňky na apoptotická tělíka



- 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



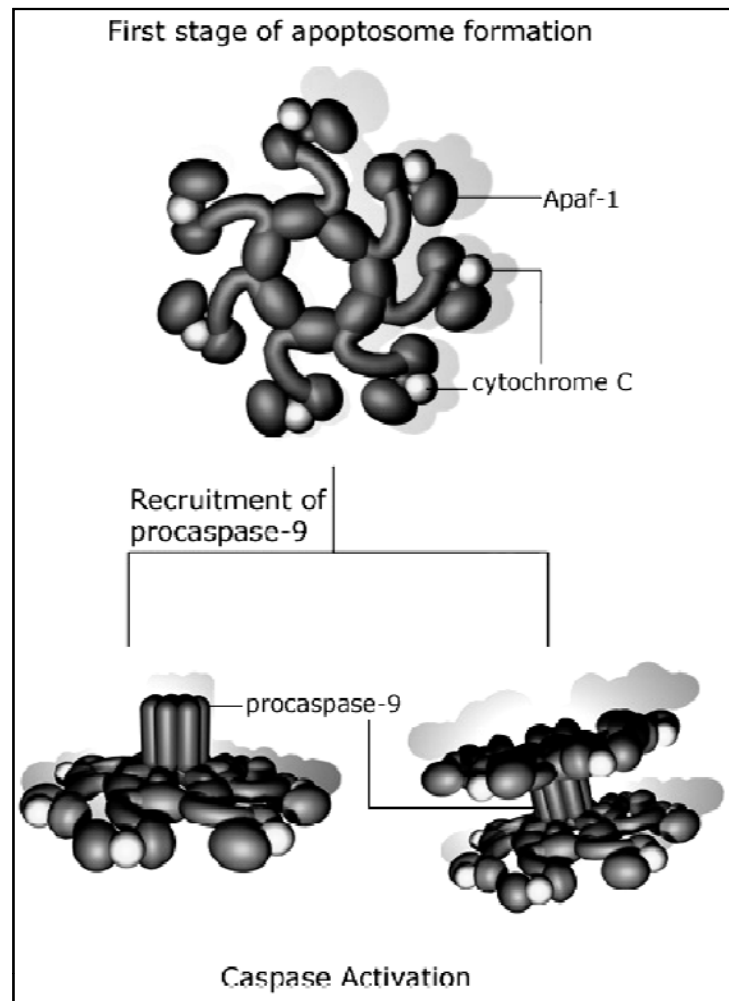
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



Apoptóza vyvolaná vnitřními signály:

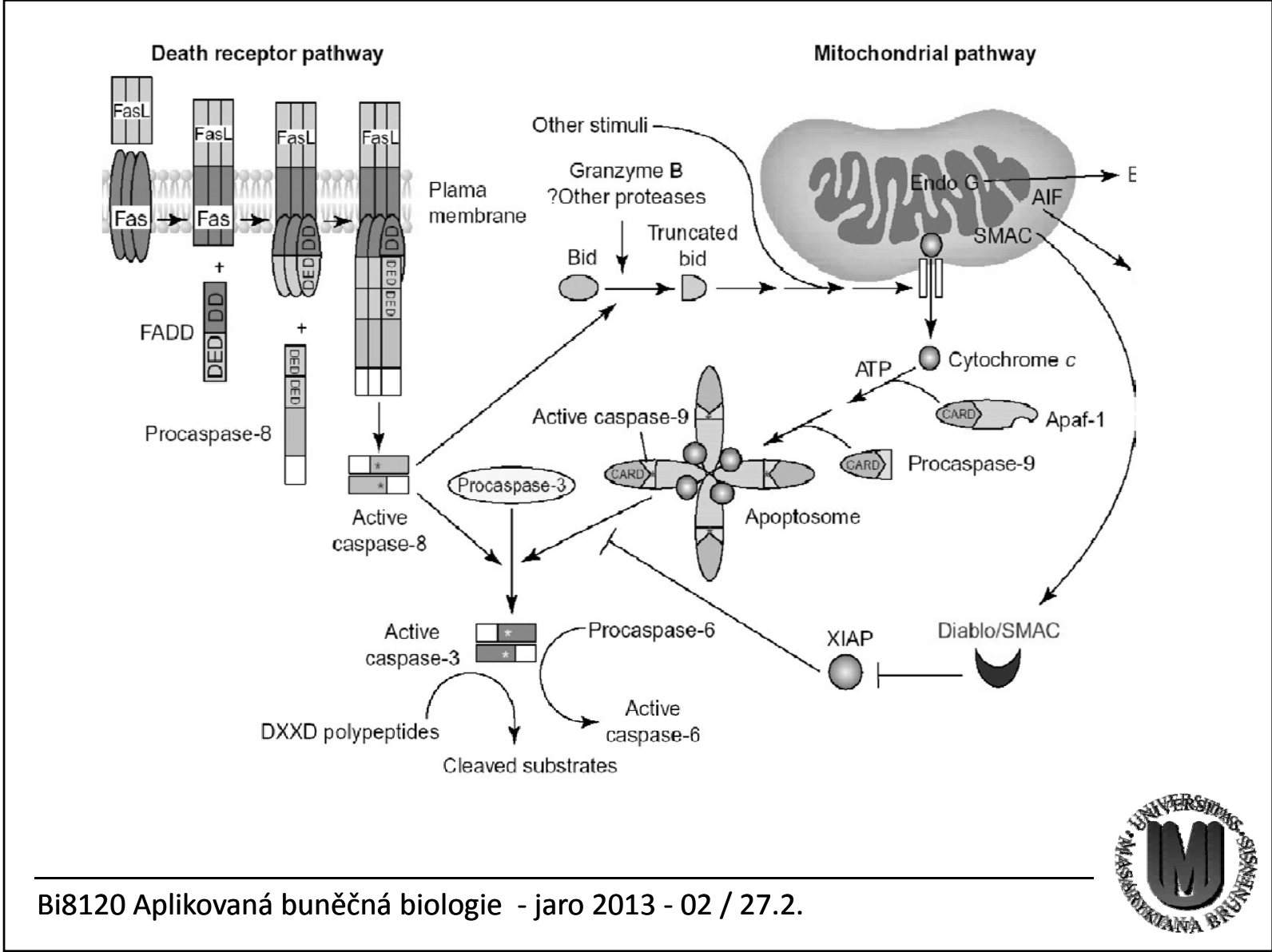
- zdravá buňka exprimuje na vnější membráně mitochondrií BCL-2
 - BCL-2 inhibuje oligomerizaci BAK a BAX
- při vnitřním poškození buňky (poškození DNA, \uparrow c Ca^{2+} ...)
 - permeabilizace vnější membrány (póry z BAK, BAX proteinů)
 - uvolnění cytochromu-c do cytoplasmy
- vzniká apoptosom:
 - APAF-1
 - Cytochrom C
 - prokaspáza 9
 - (dATP)
- vzniká aktivní kaspáza 9 (iniciační), která štěpením aktivuje další kaspázy (efektorové)





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.





Změny mitochondrií

změna permeability
mitochondriální
membrány

detekce cytochromu-C
- fl. mikroskopie
- flow-cytometrie

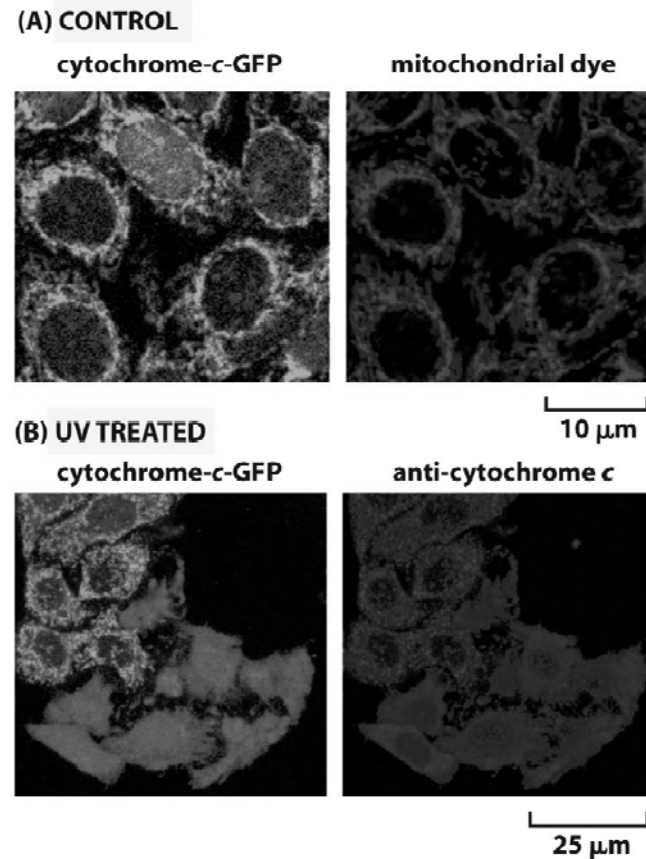
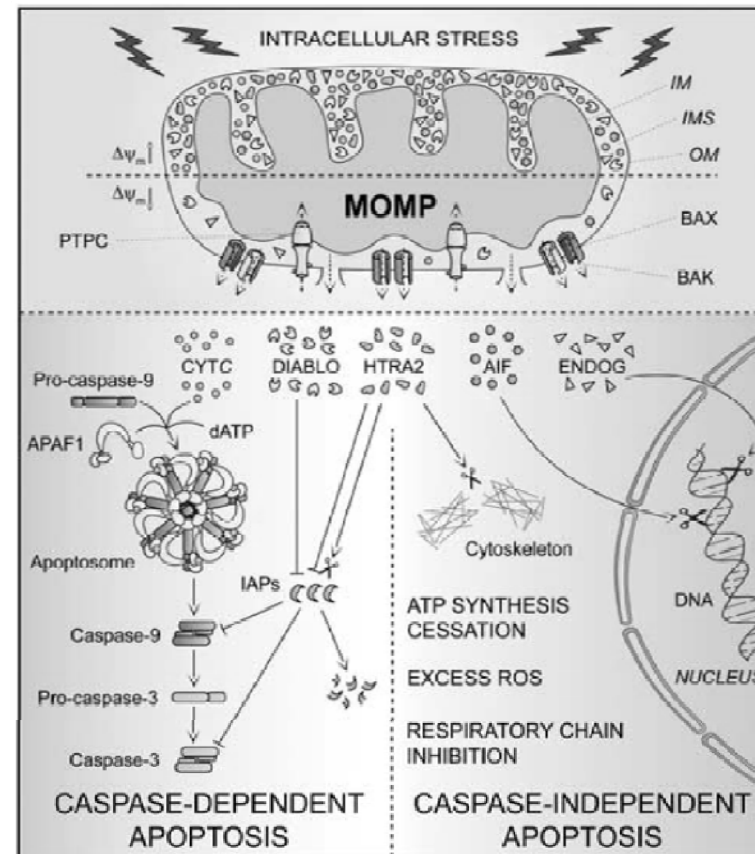


Figure 18-7 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

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:

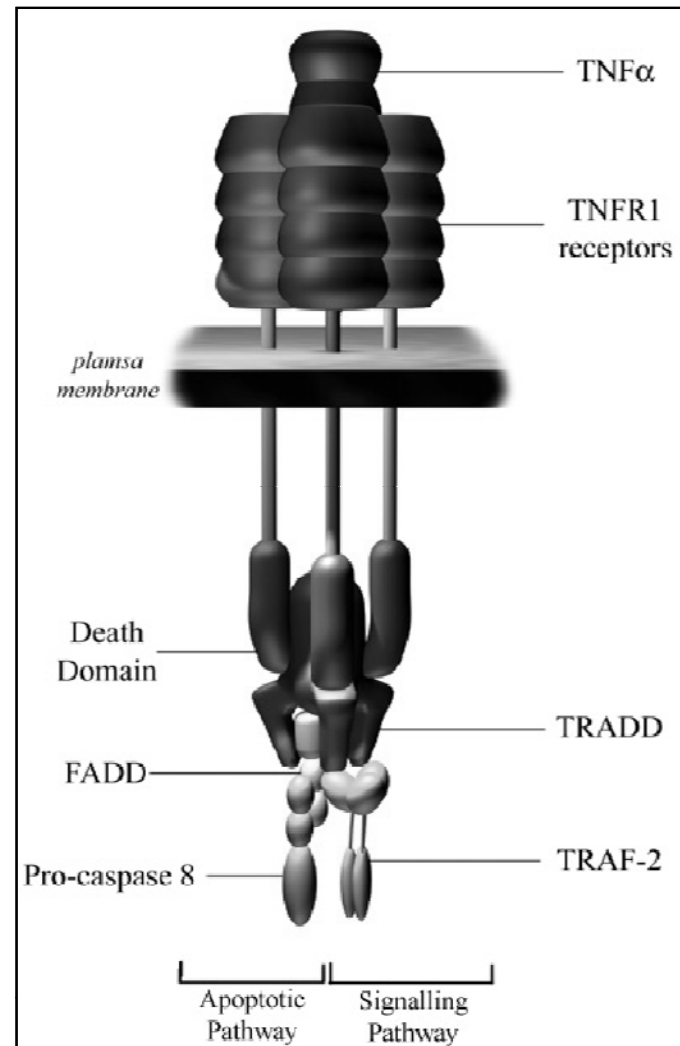
- aktivační molekuly (death activators) se napojují na specifické receptory v plazmatické membráně (death receptors, DR1-5):
 - Tumor necrosis factor α (TNF- α) - TNF receptor
 - Lymphotoxin (TNF- β) - TNF receptor
 - Fas-ligand (FasL) - Fas receptor (CD95)
- přenos signálu do cytoplasmy aktivuje prokaspázu-8 (-10) (iniciační kapázy)
- aktivovaná kaspáza-8 (-10) štěpením dalších prokaspáz spouští proteolytickou kaskádu



DISC

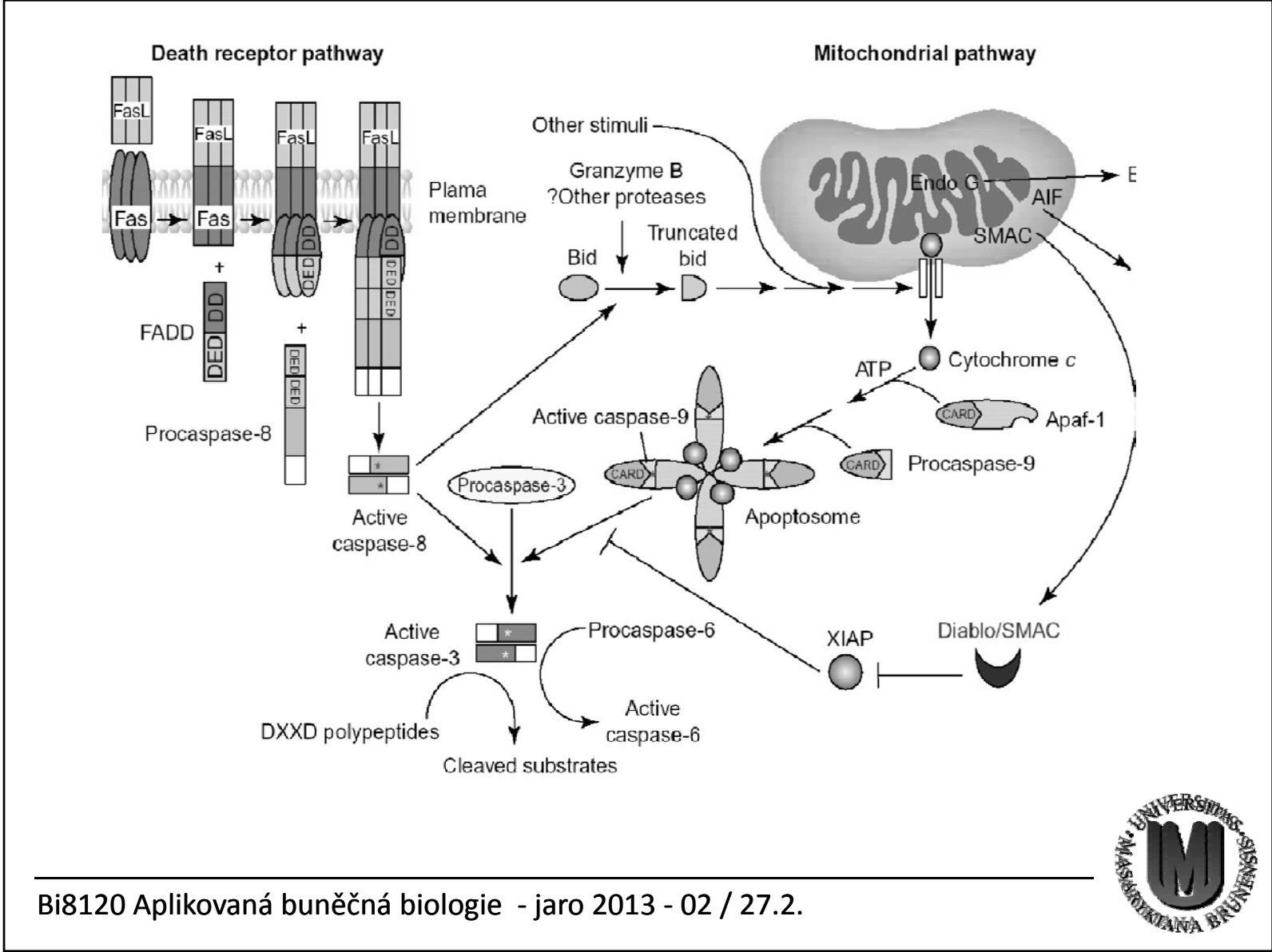
death-inducing
signaling complex

- ligand
- receptor
- adaptorové proteiny
- prokaspáza-8



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.

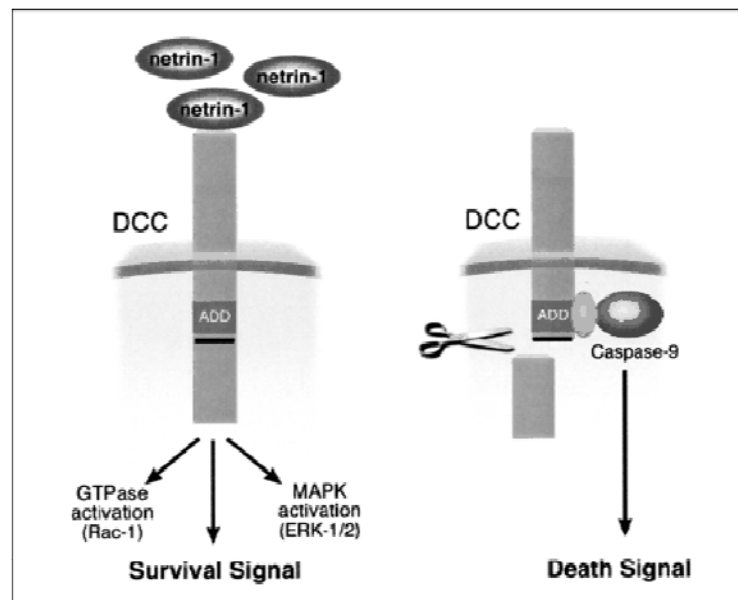




Apoptóza vyvolaná vnějšími signály:

dependence receptotors (např. DCC)

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2013 - 02 / 27.2.



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

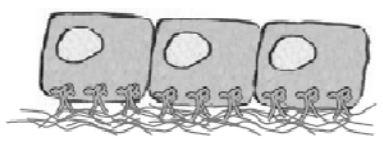
e) apoptóza vyvolaná vnějšími signály, (de)aktivací dependence receptors

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

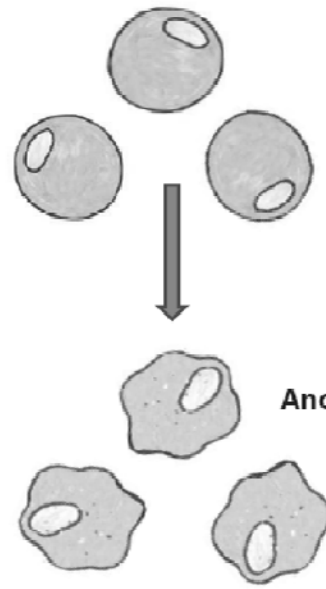
g) cornification (keratinizace) - terminální diferenciacie epidermálních buněk, vznik vrstvy mrtvých keratinocytů (=stratum corneum)

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

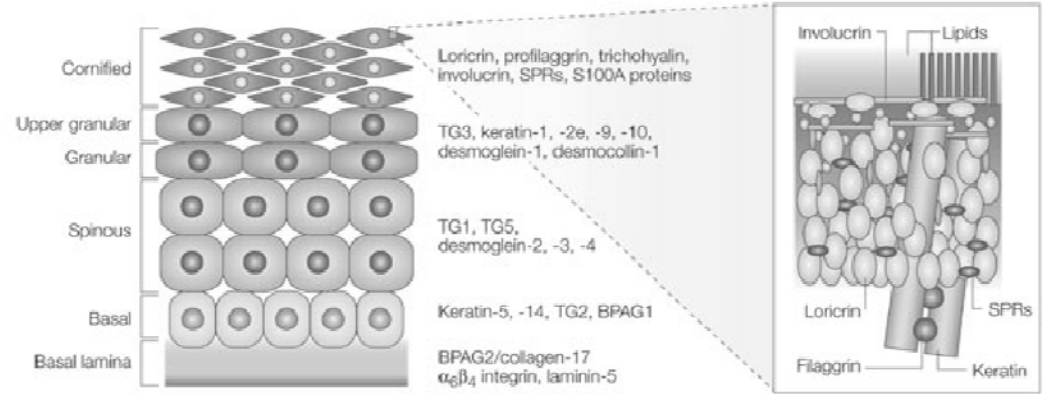




Loss of integrin attachment

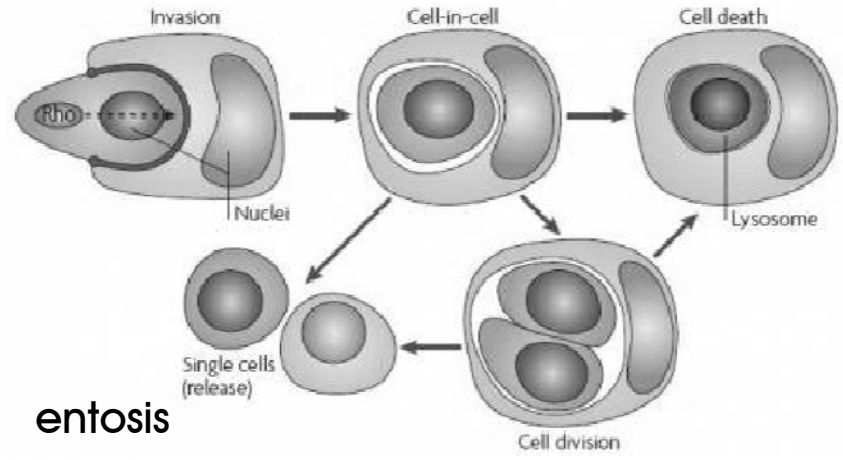


Anoikis



cornification

Nature Reviews | Molecular Cell Biology



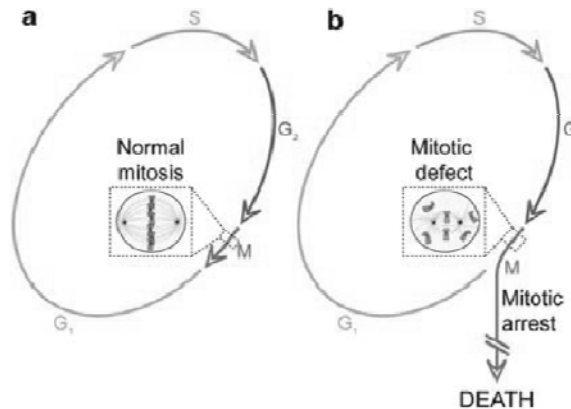
entosis

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



Současné rozdělení regulované buněčné smrti

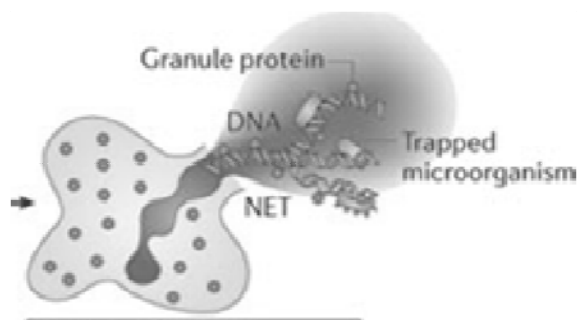
i) mitotická katastrofa – iniciace navození smrti v M-fázi buněčného cyklu vlivem poškození mitotického aparátu



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 β

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 proapoptotických genů (Bax, Bid, Noxa, Puma)
 - downregulace antiapoptotických 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 (např.)
 - 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 (např.)
 - 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

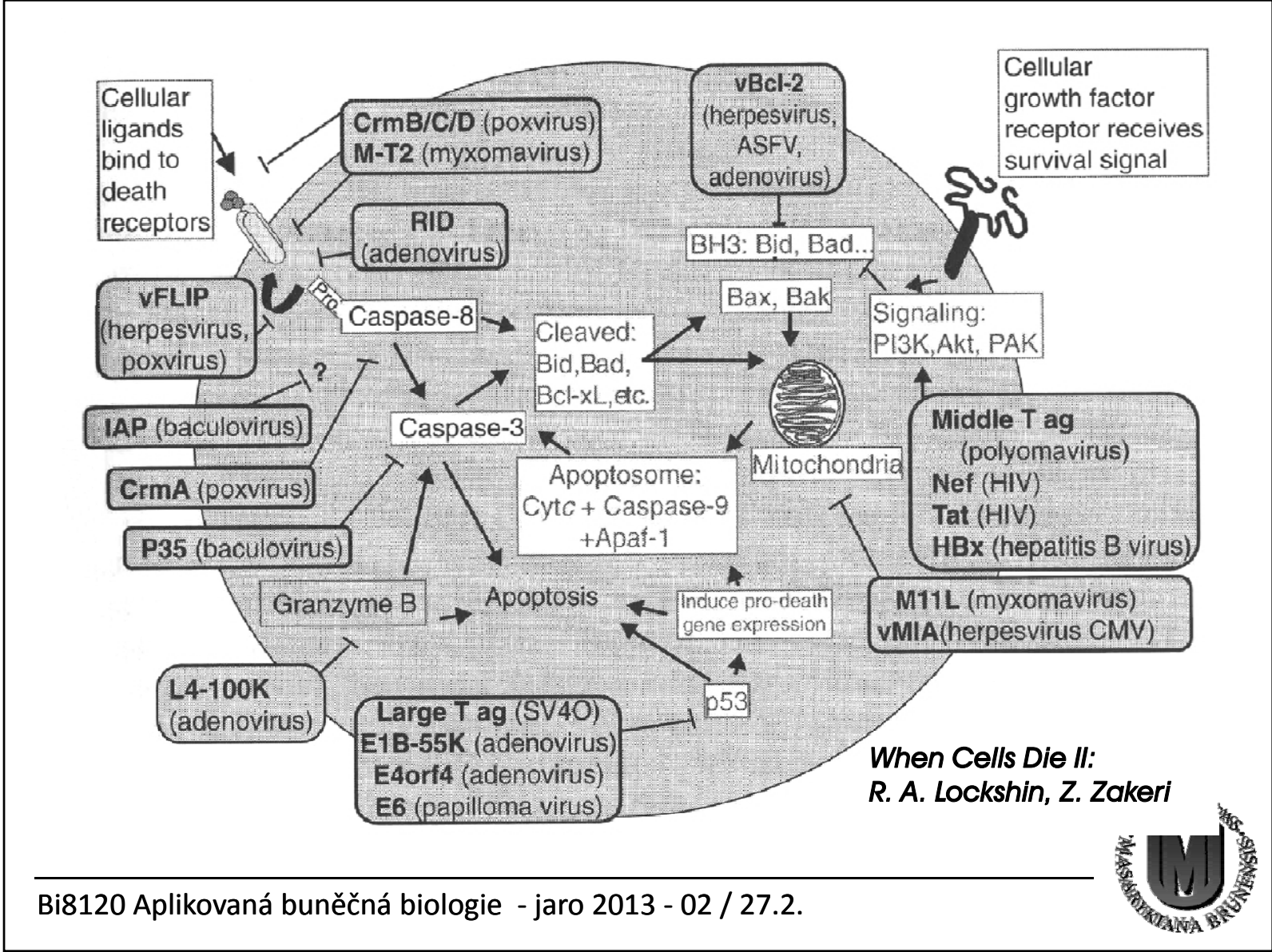
Viry, inhibující apoptózu transformovaných buněk:

tvorba proteinů blokujičích 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

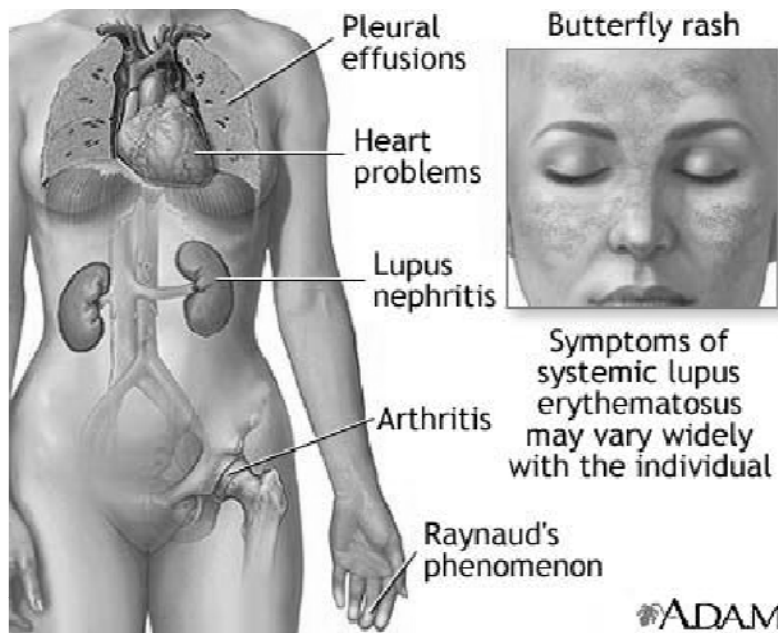
defekty v indukci apoptózy a autoimunitní choroby

- 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

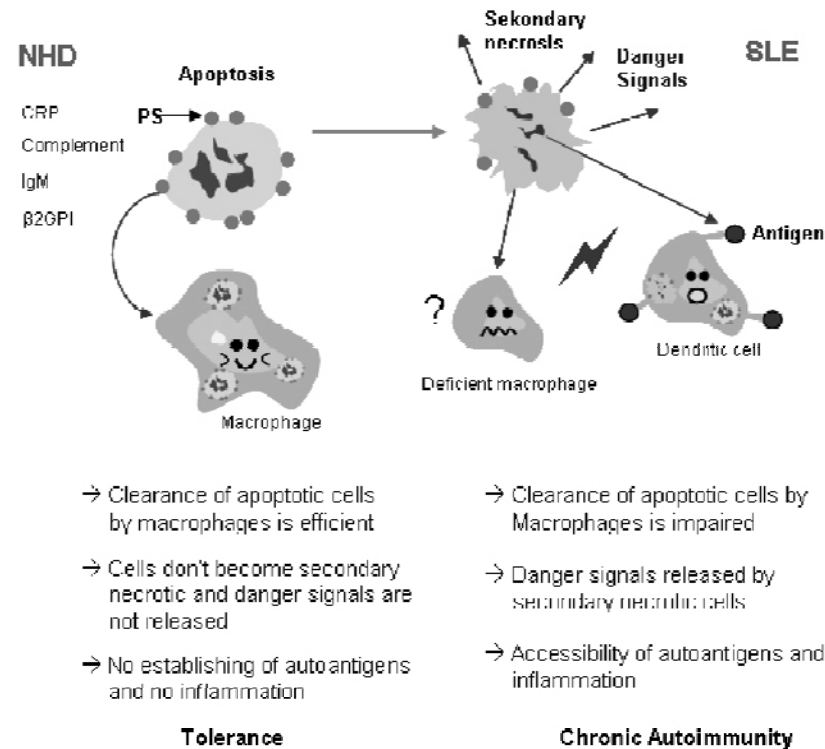


Fig. "Defects in the clearance of apoptotic cells is a possible pathway to autoimmune disease"
 CRP → C-reactive protein, PS → phosphatidylserine, IgM → immunoglobulin M, β2GPI → β2 glycoprotein I,
 SLE → systemic lupus erythematosus, NHD → normal healthy donor

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- γ)
- viry a jejich proteiny v extracelulární prostoru aktivují apoptózu v okolních lymfocytech



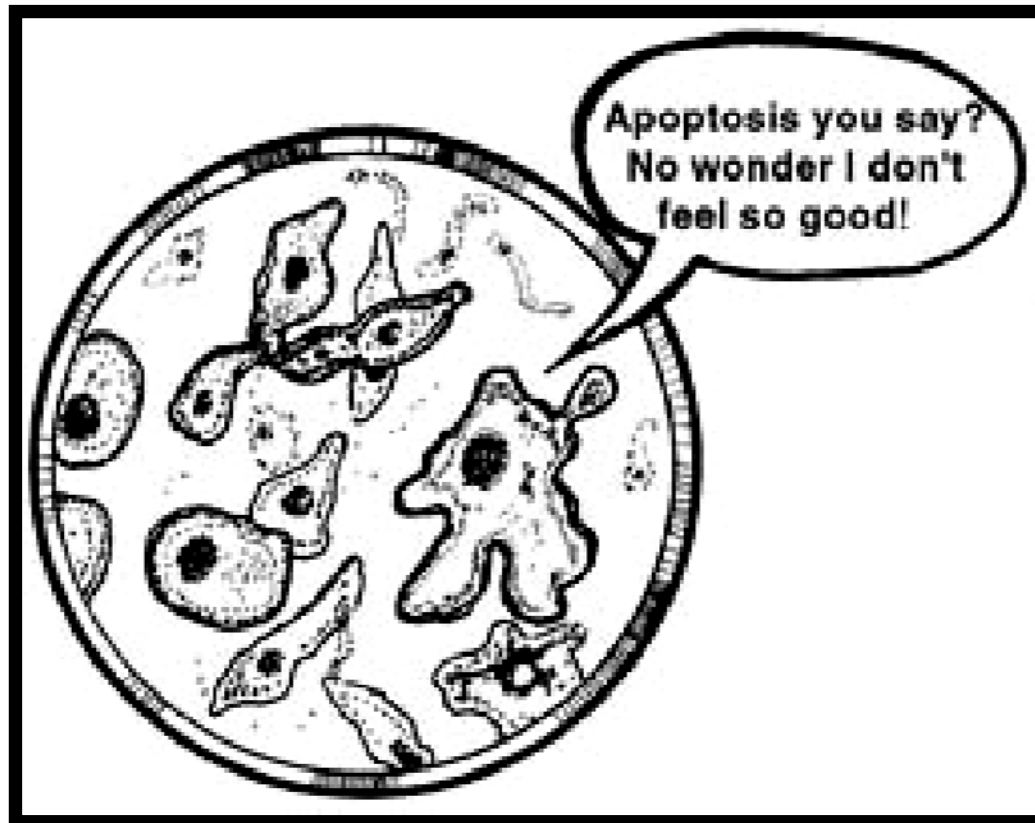
Apoptóza a degenerativní onemocnění

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 2013 - 02 / 27.2.

