

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

BUNĚČNÁ SMRT

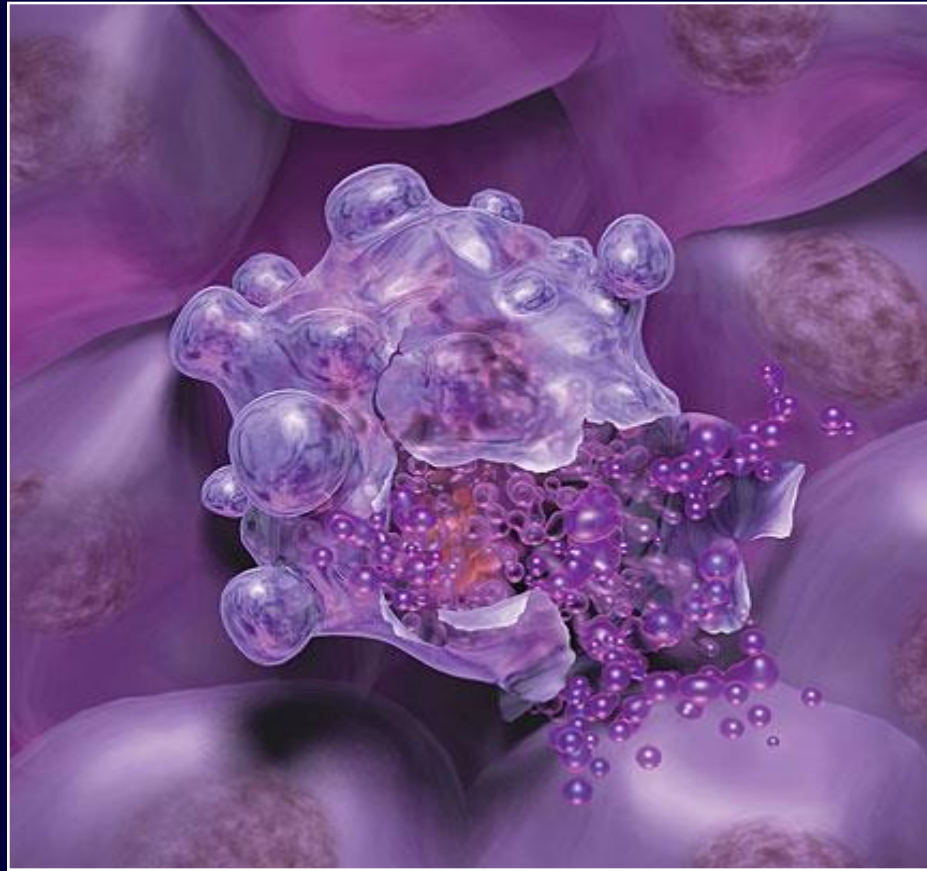
RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



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.“*



Program přednášky:

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



TYPY BUNĚČNÉ SMRTI

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



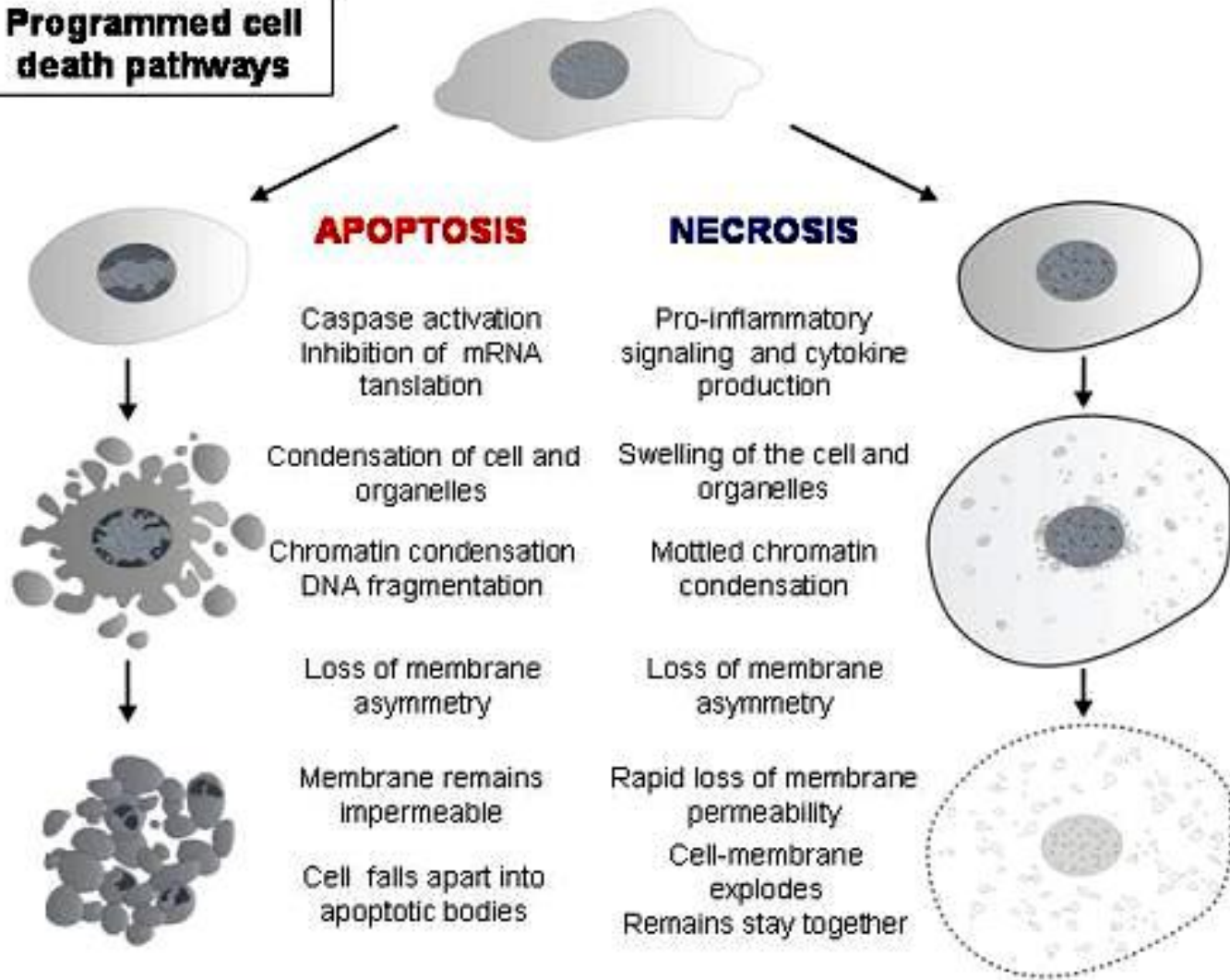
Kdy je buňka mrtvá?

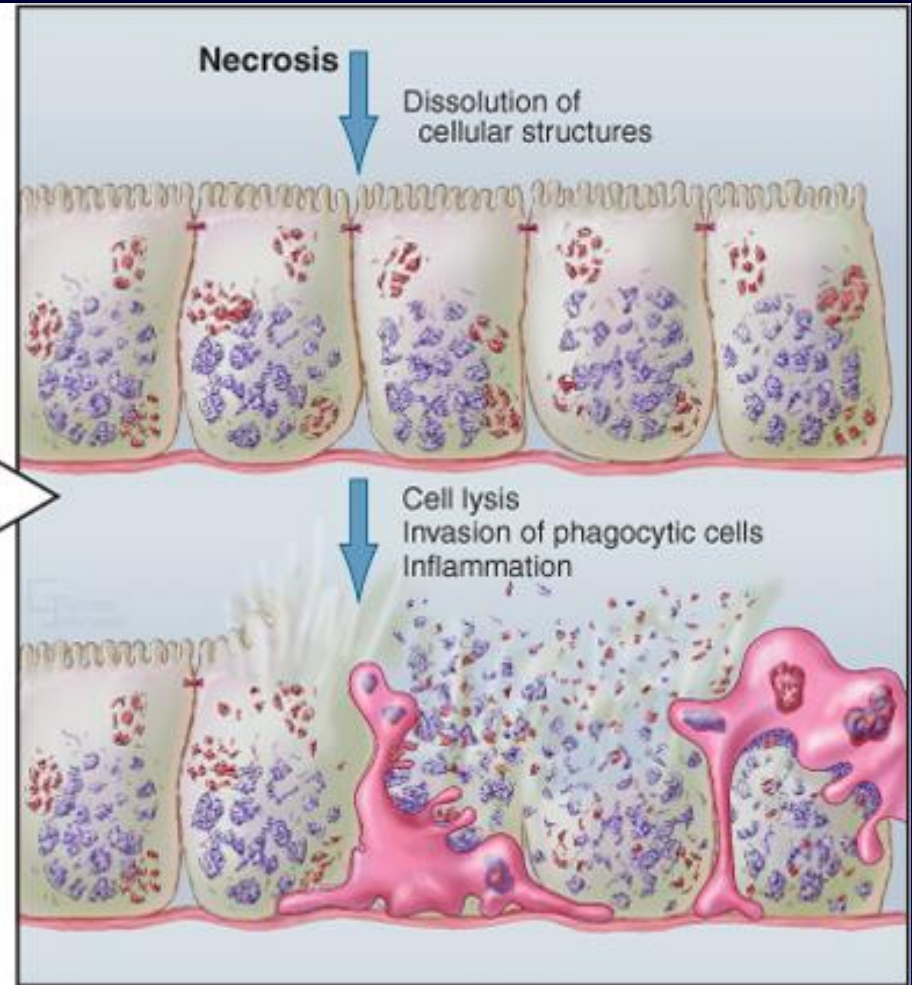
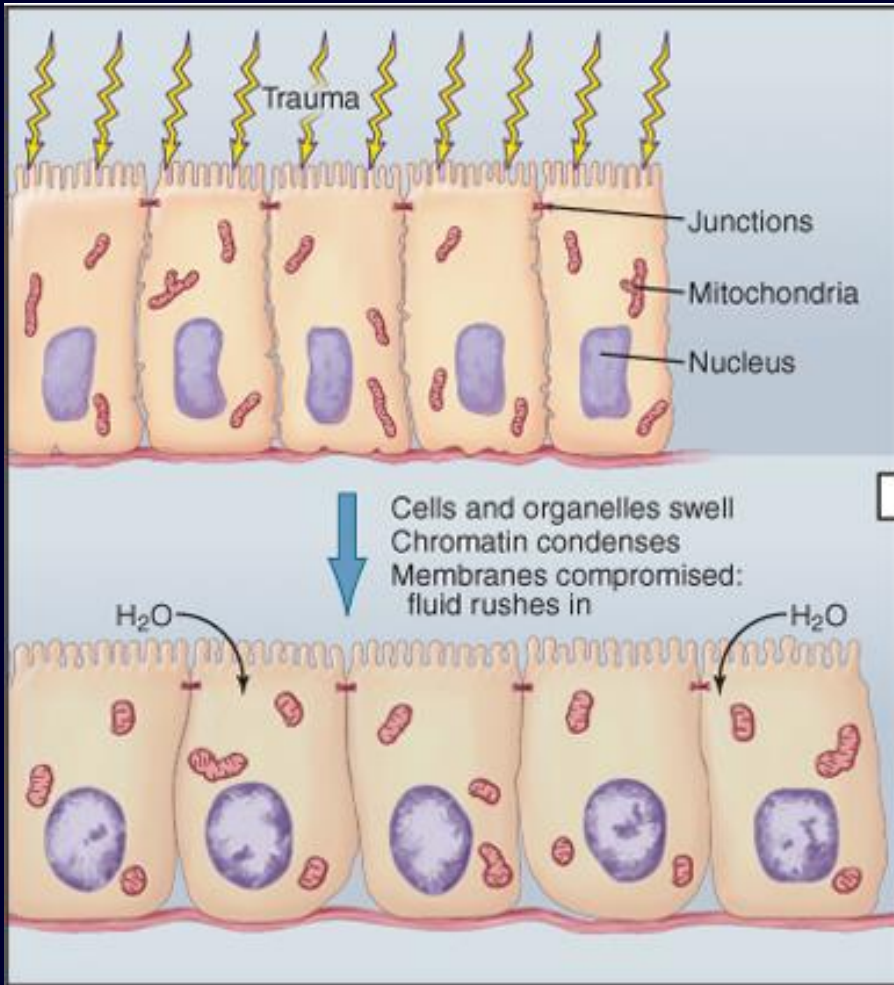
- rozrušení plasmatické membrány (důkaz např. inkorporace PI *in vitro*)
- rozpad buňky včetně jádra na fragmenty (apobodies)
- fragmenty jsou pohlceny jinými buňkami (*in vivo*)

rozdíl mezi mrtvou a umírající buňkou

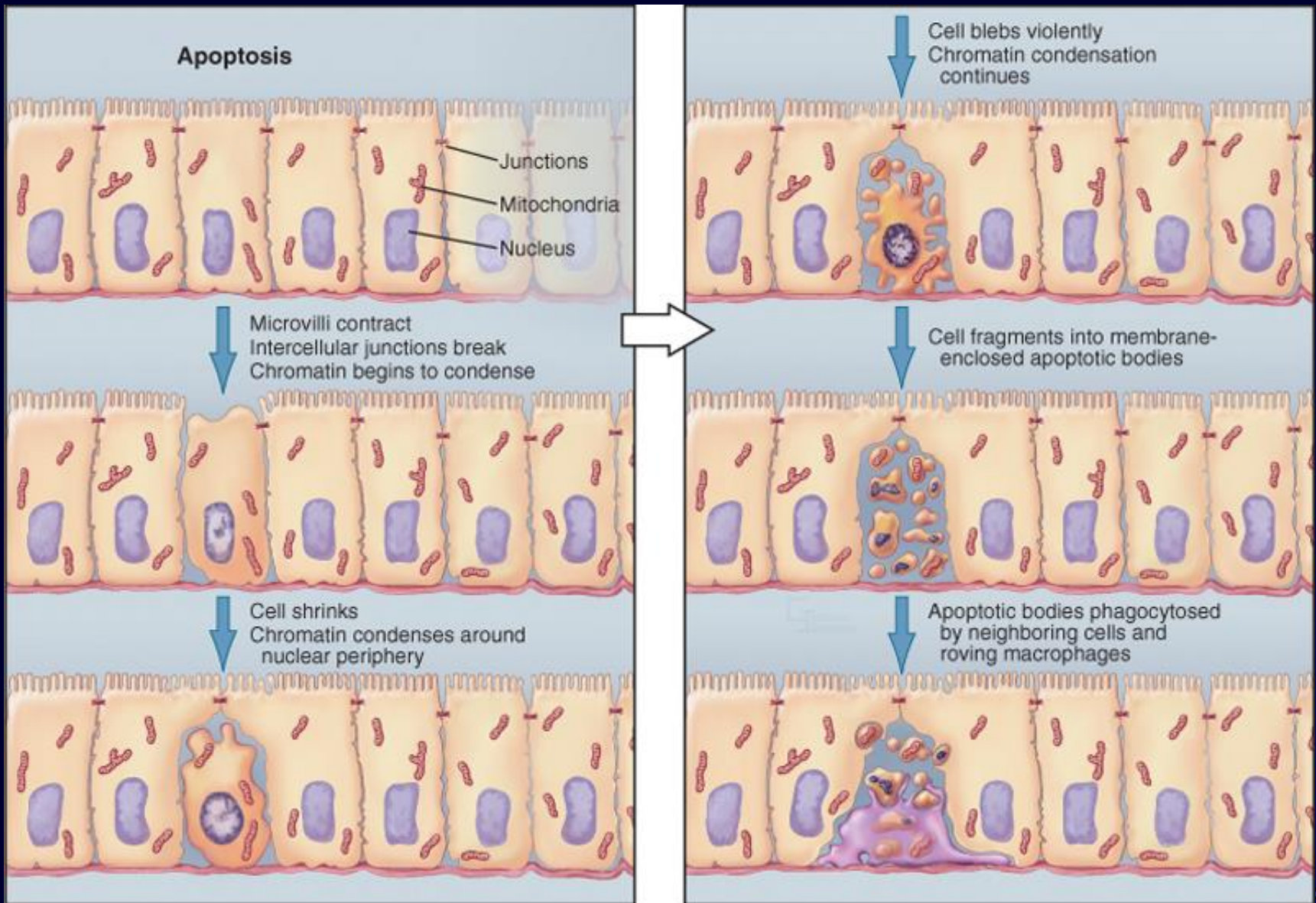


Programmed cell death pathways





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



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

KATASTROFICKÁ (NEPROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT

NEKRÓZA

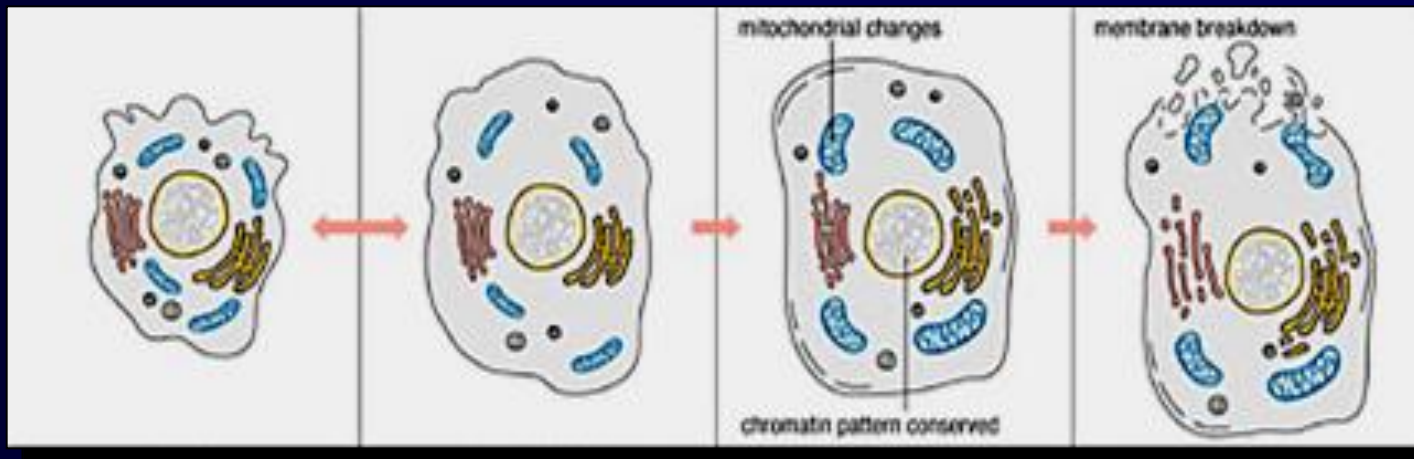
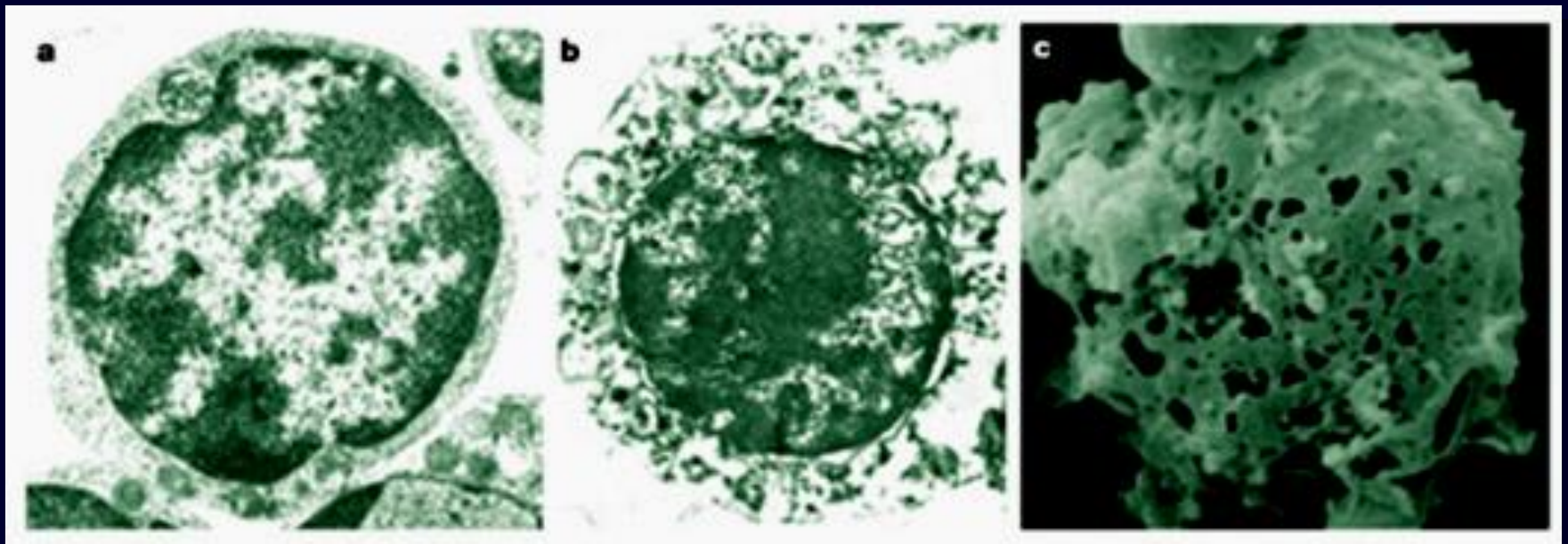


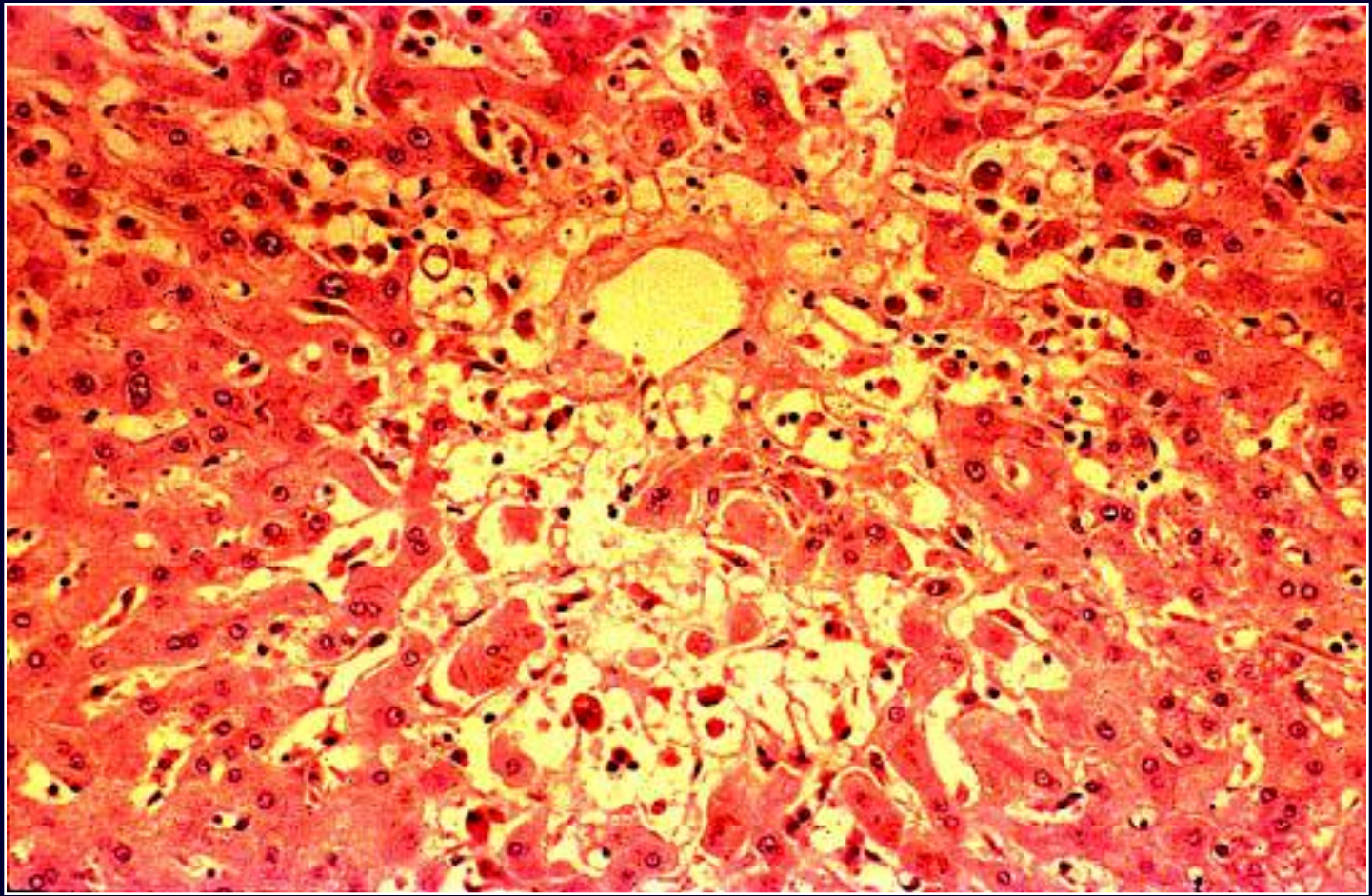
Indukce nekrózy

- 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





nekrotické ložisko ve tkáni

FYZIOLOGICKÁ (PROGRAMOVANÁ) BUNĚČNÁ SMRT



PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT (Programmed Cell Death, PCD)

- indukovaný, regulovaný a selektivní proces pro vyřazování určitých buněk

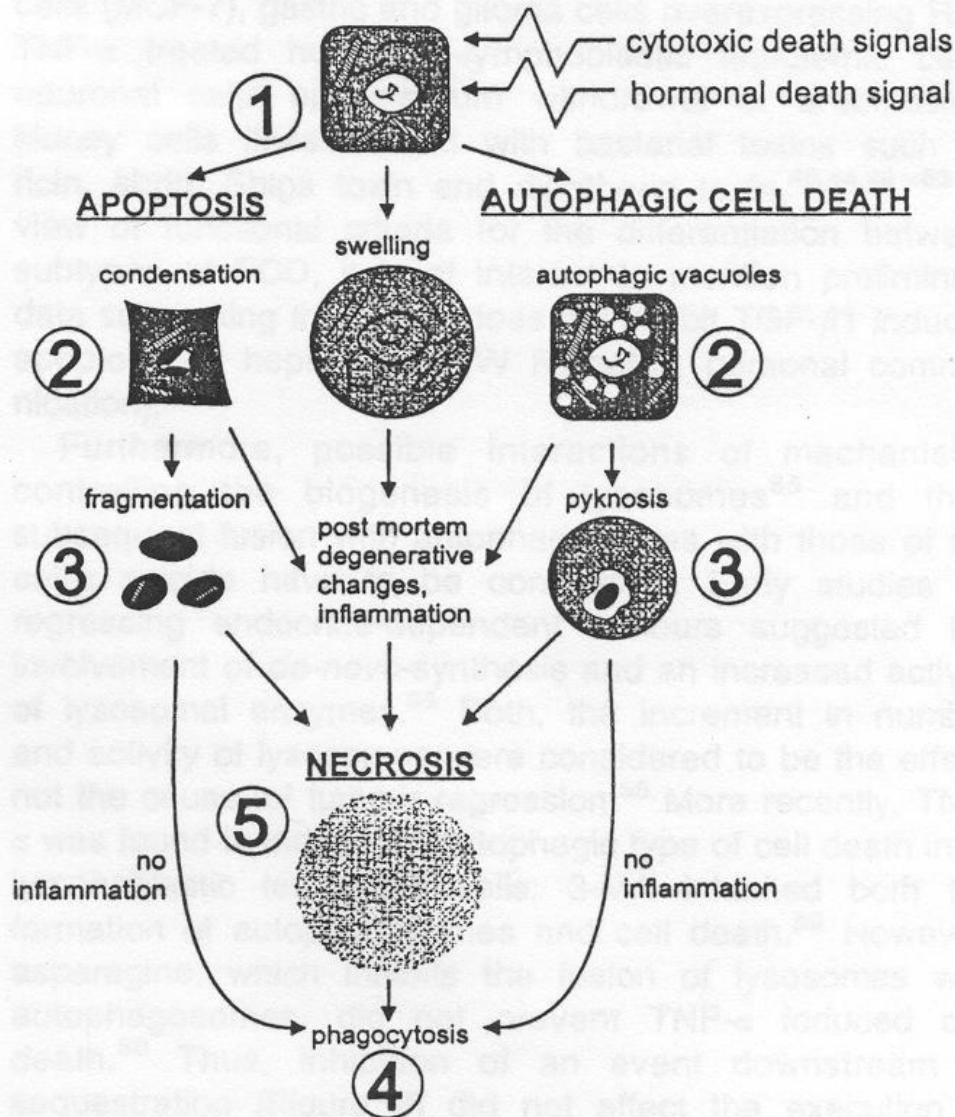
Apoptóza (apoptosis, type I PCD)

- kaspázy
- kalpainy, katepsiny, granzymy

Autofagie (autophagy, type II PCD)

- autofagozomy/autolysozomy (lysozomální proteázy)

DEVELOPMENT AND PATTERNS OF CELL DEATH



AUTOFAGIE (PCDII)

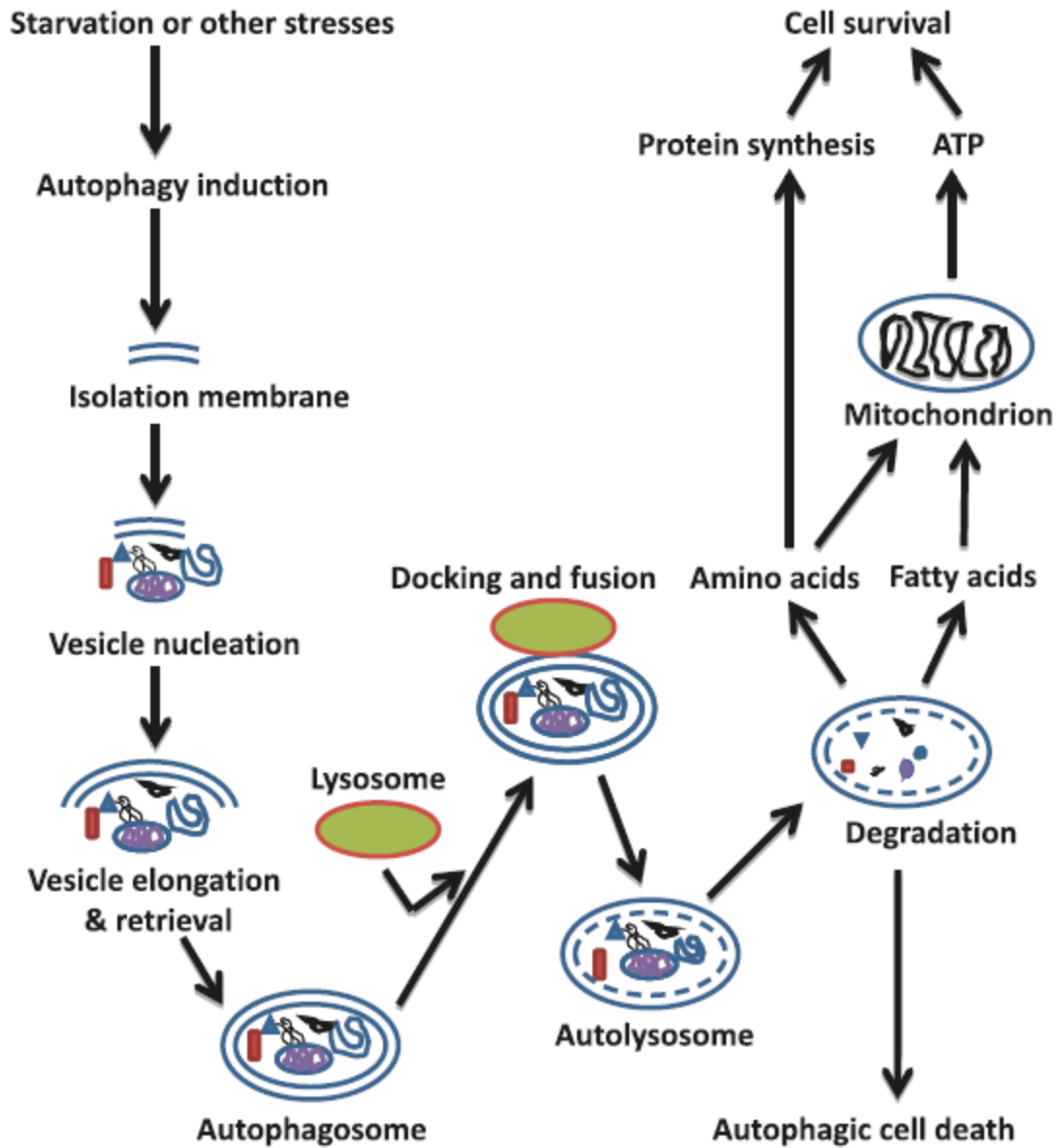


Průběh autofagie

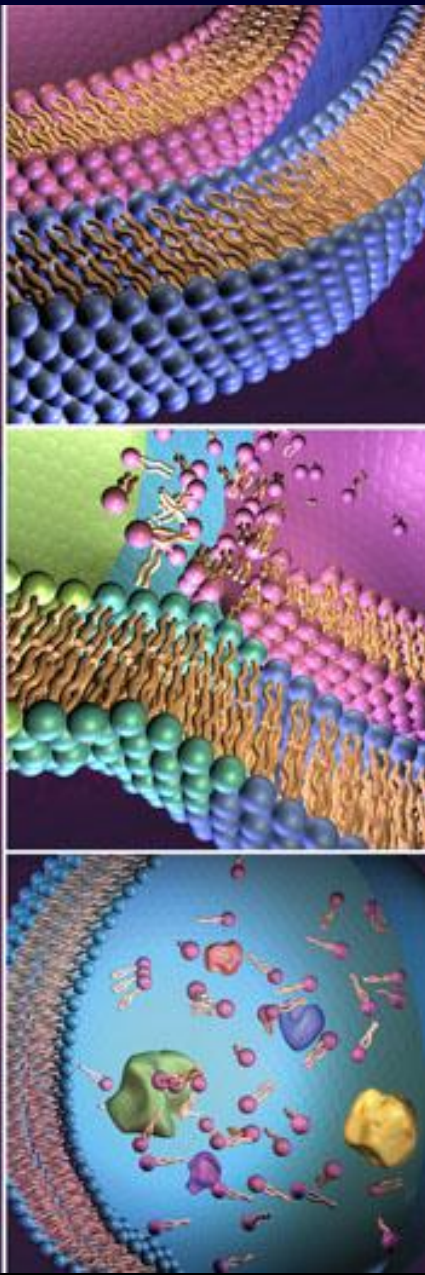
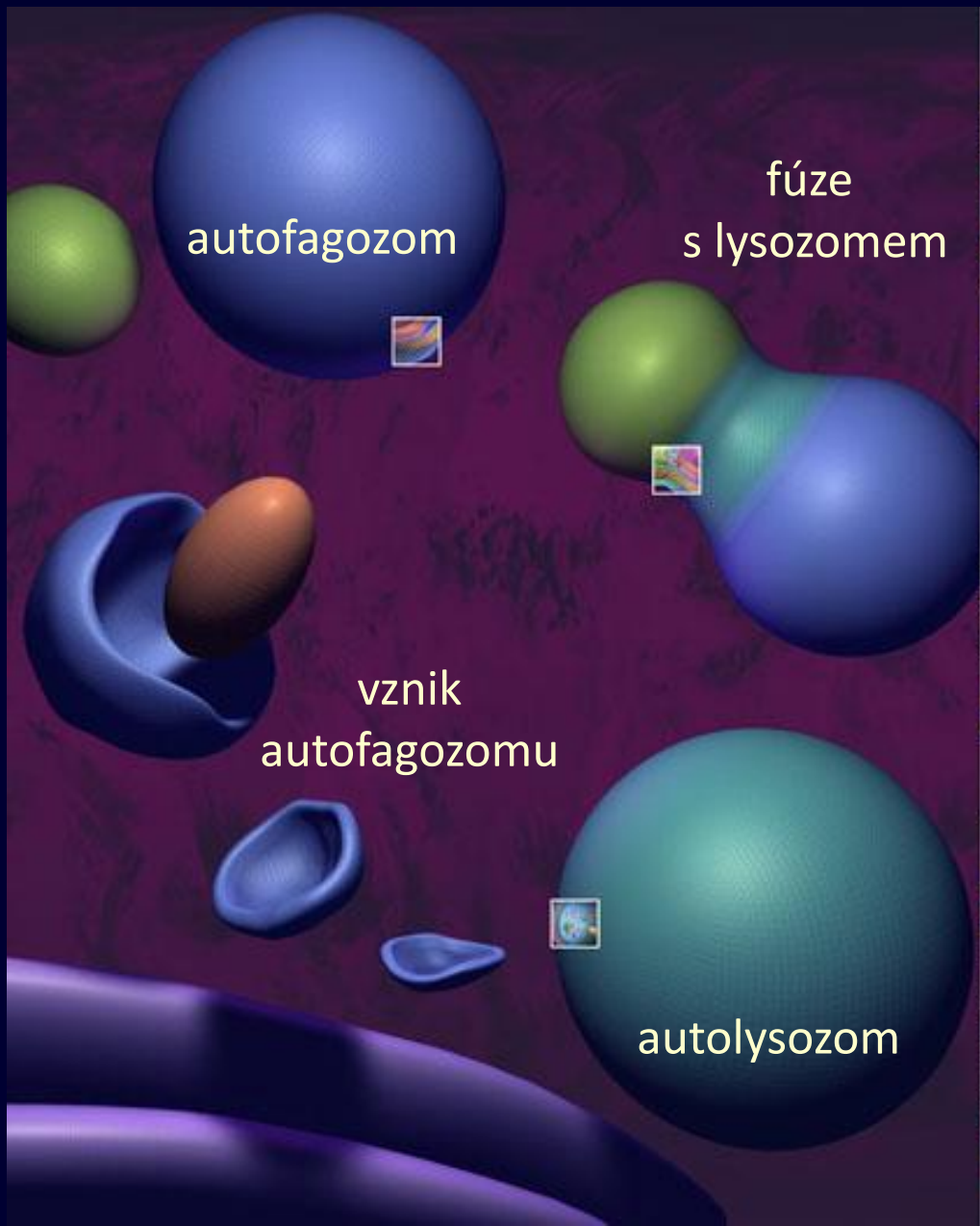
1. indukce (starvace)
 2. vytvoření autofagosomu (nejasný původ, ER?)
 3. vazba a fúze s lysosomem
 4. rozpad autolysosomálního veziklu
- účast **savčích homologů genů *Atg*** (kvasinky)

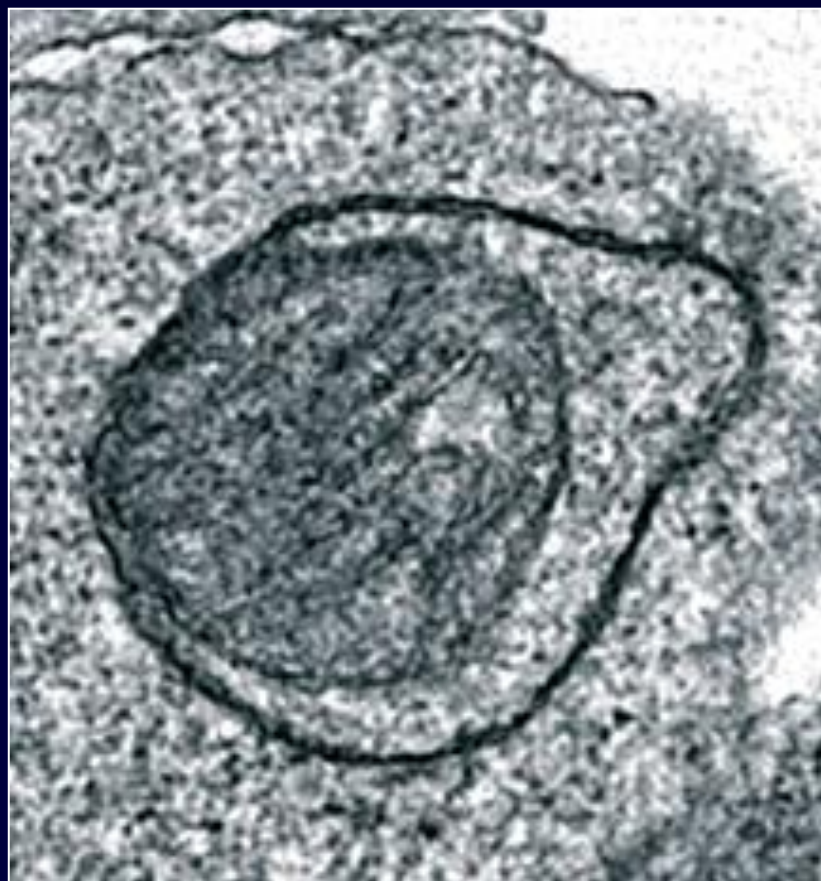
Typy autofagie:

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



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





mitochondrie v autofagosomu

APOPTÓZA (PCDI)



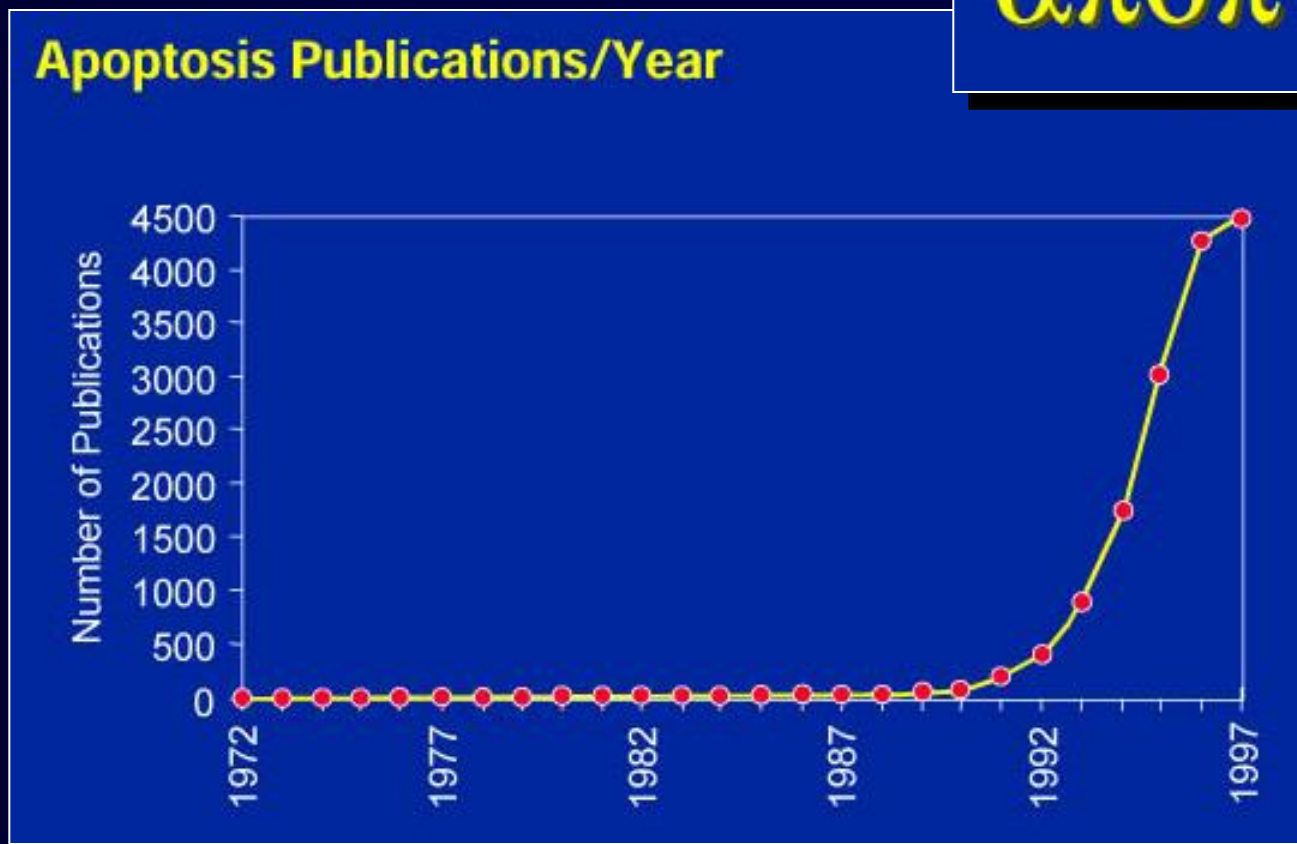
Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.

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

British Journal of Cancer (1972) 26, 239.

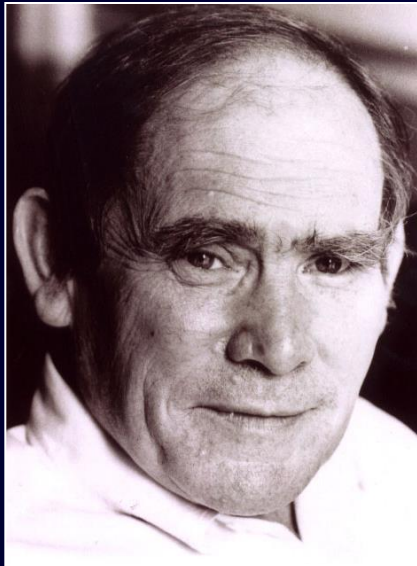
ΑΠΟΠΤΩΣΙΣ

Apoptosis Publications/Year



2002 - Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

Sydney Brenner



John E. Sulston



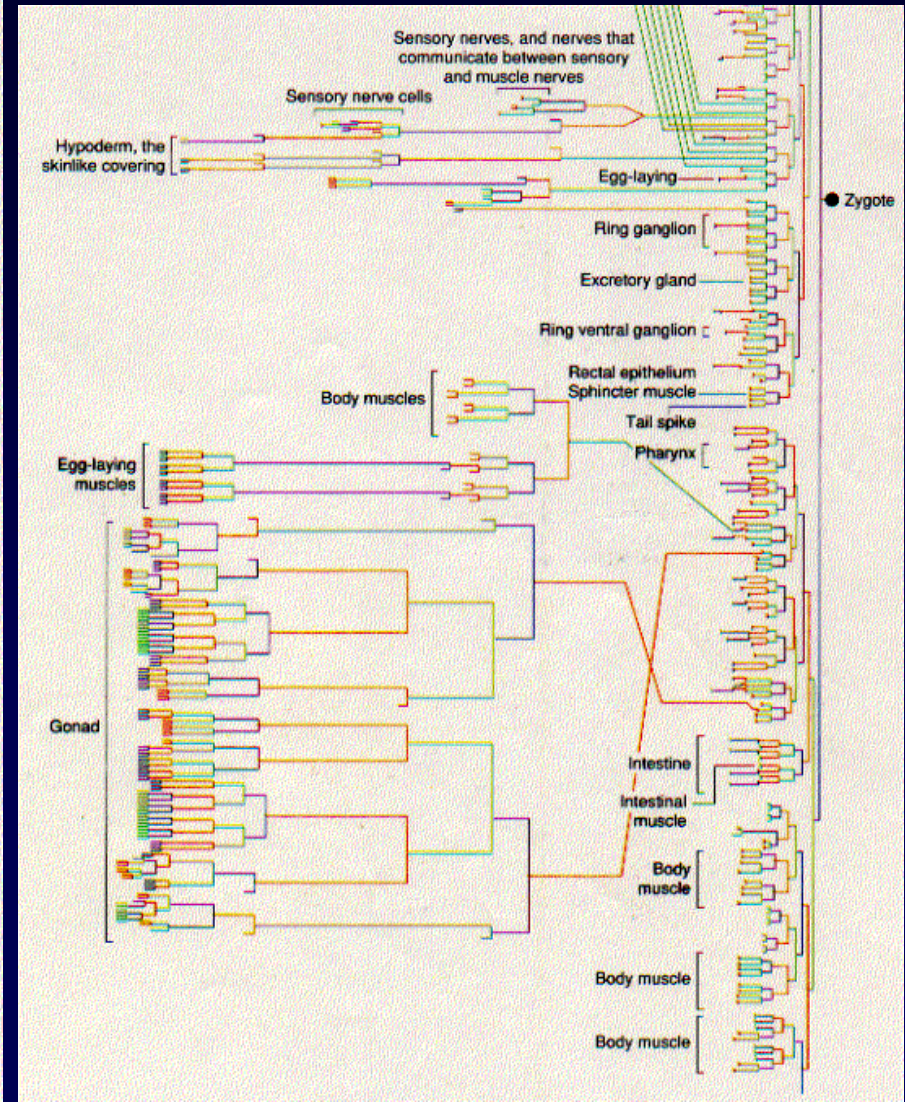
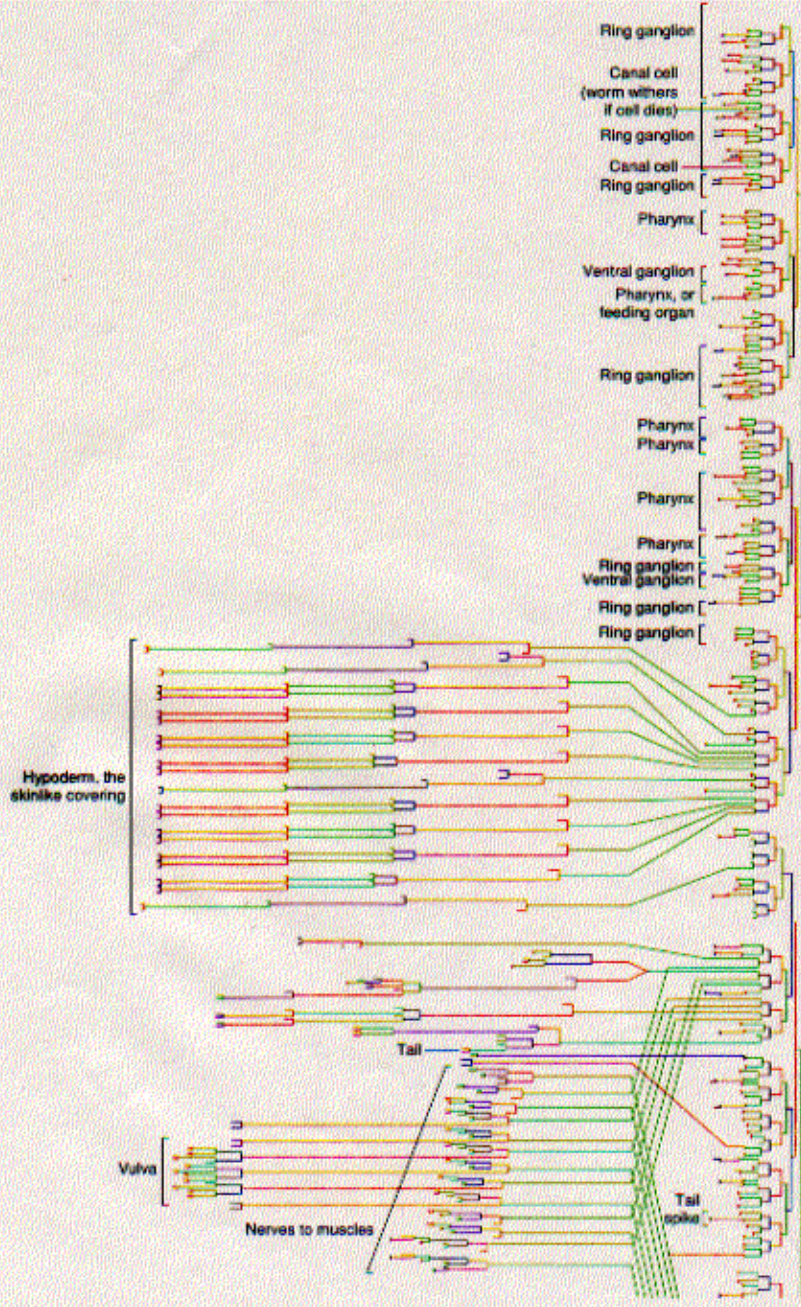
H. Robert Horvitz

za výzkum genetické regulace vývoje orgánů a
programované buněčné smrti

Caenorhabditis elegans



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

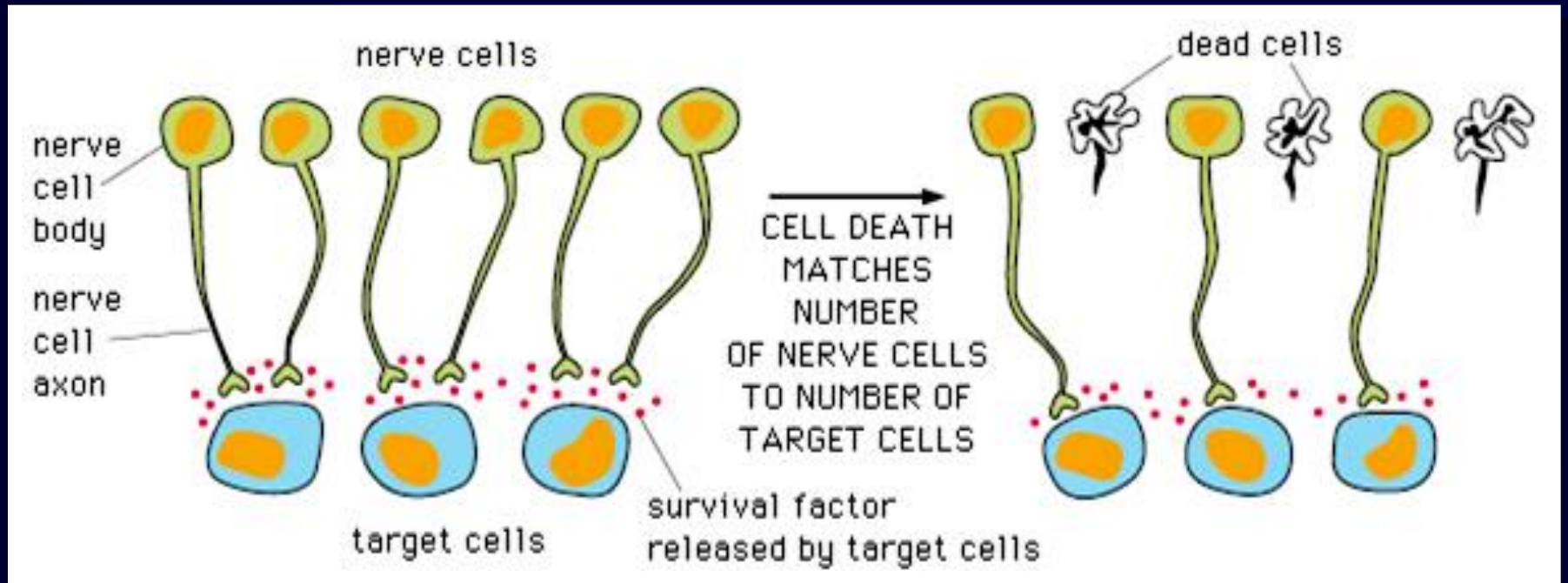


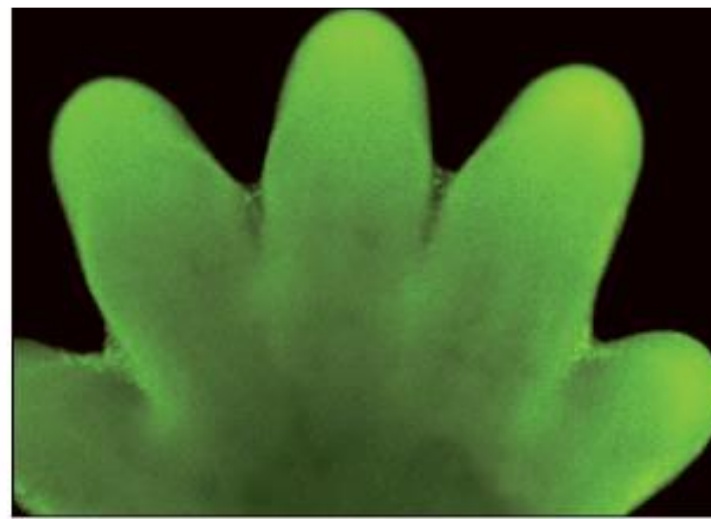
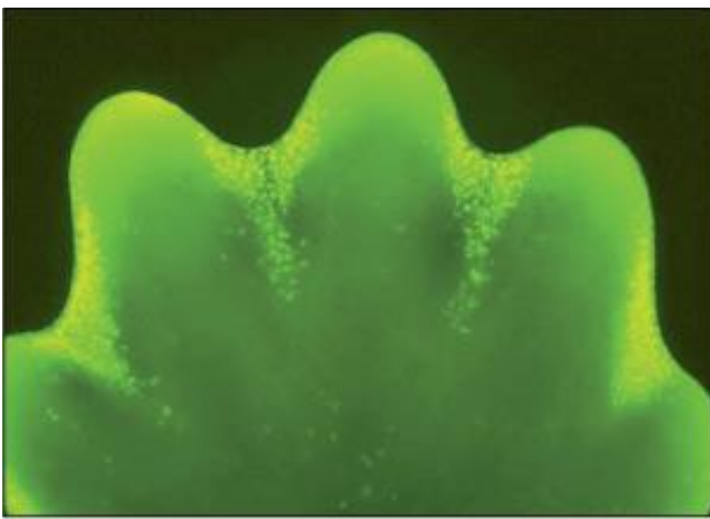
Příčiny apoptózy

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





1 mm



(A)



(B)

1 mm



syndaktylie (defekt apoptózy)

Příčiny apoptózy

2. Apoptóza je nezbytná pro likvidaci buněk, které představují ohrožení integrity organismu

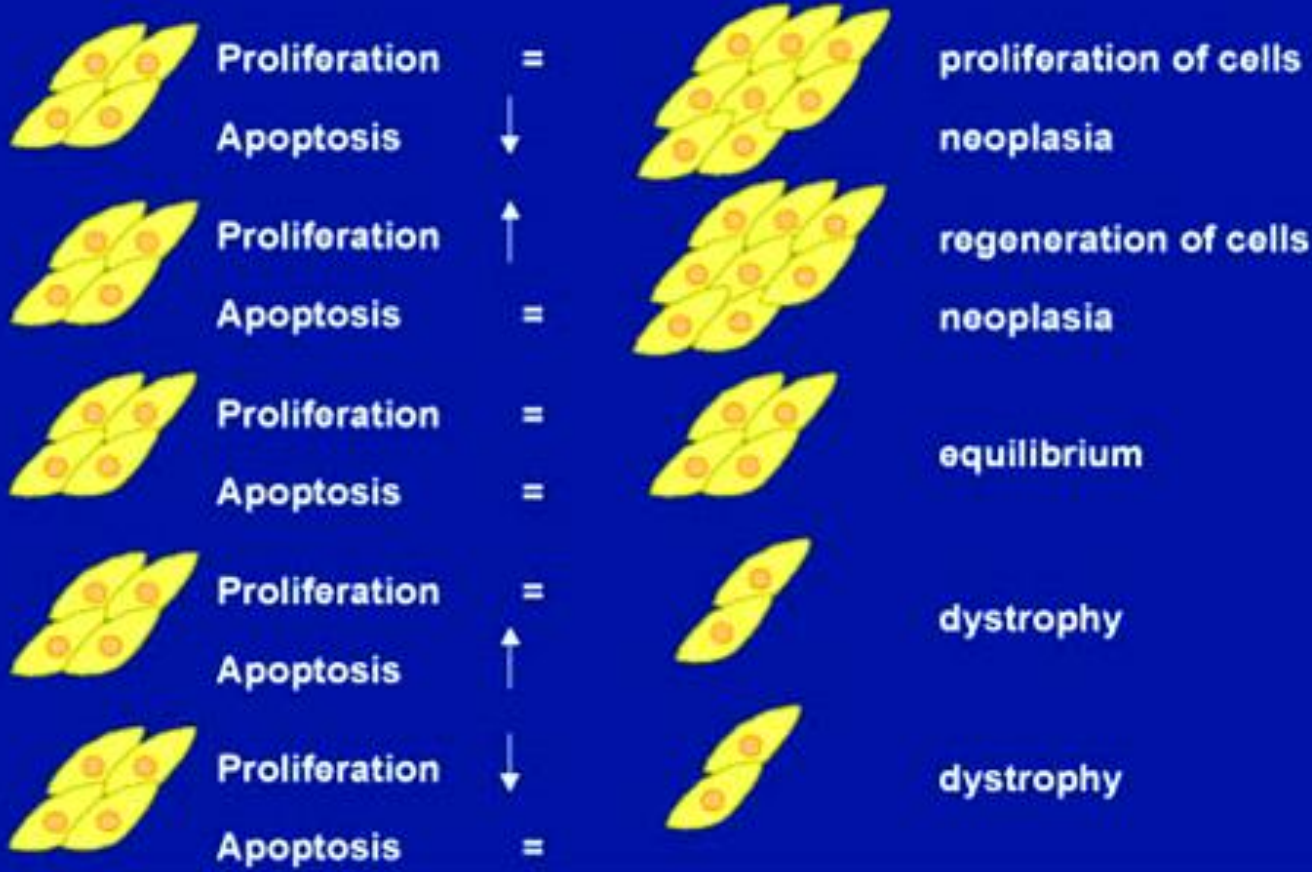
- buňky infikované viry
- efektorové buňky imunitního systému po odeznění imunitní odpovědi
- buňky s poškozením DNA
 - zvýšená produkce proteinu p53
(induktor apoptózy)
- nádorově transformované buňky



Morphology



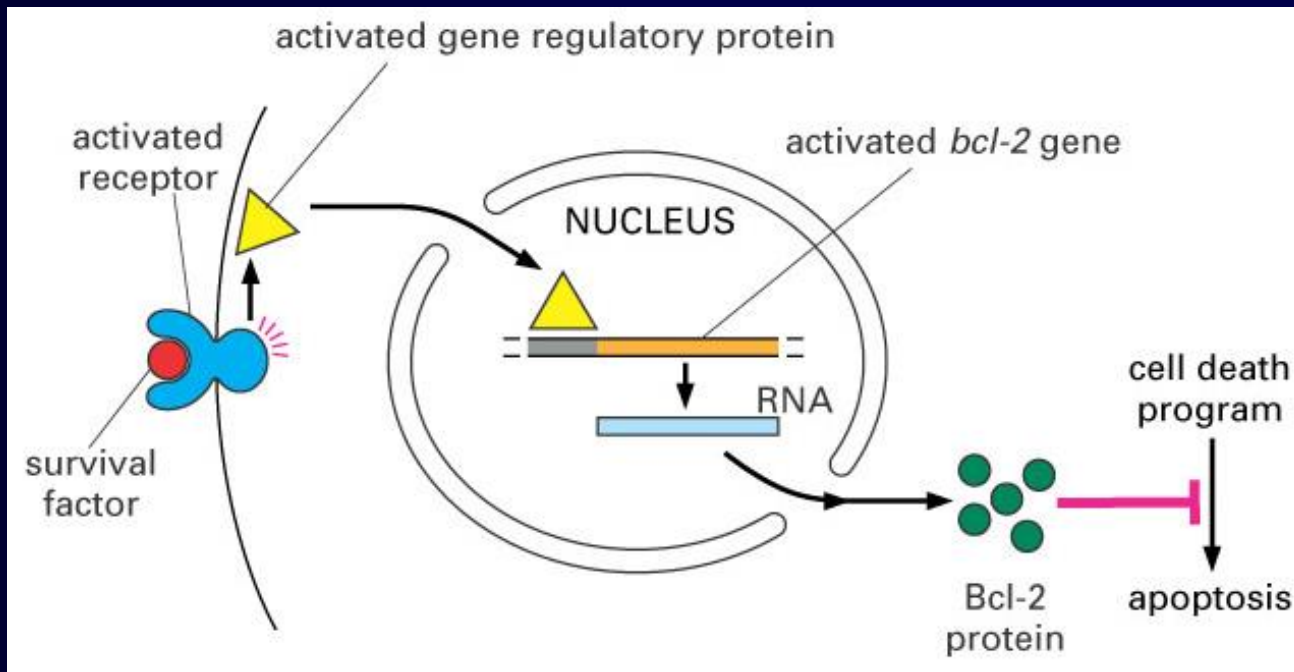
Apoptosis and Cell Proliferation in Tissue Homeostasis



Indukce apoptózy

Odstranění pozitivního signálu

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

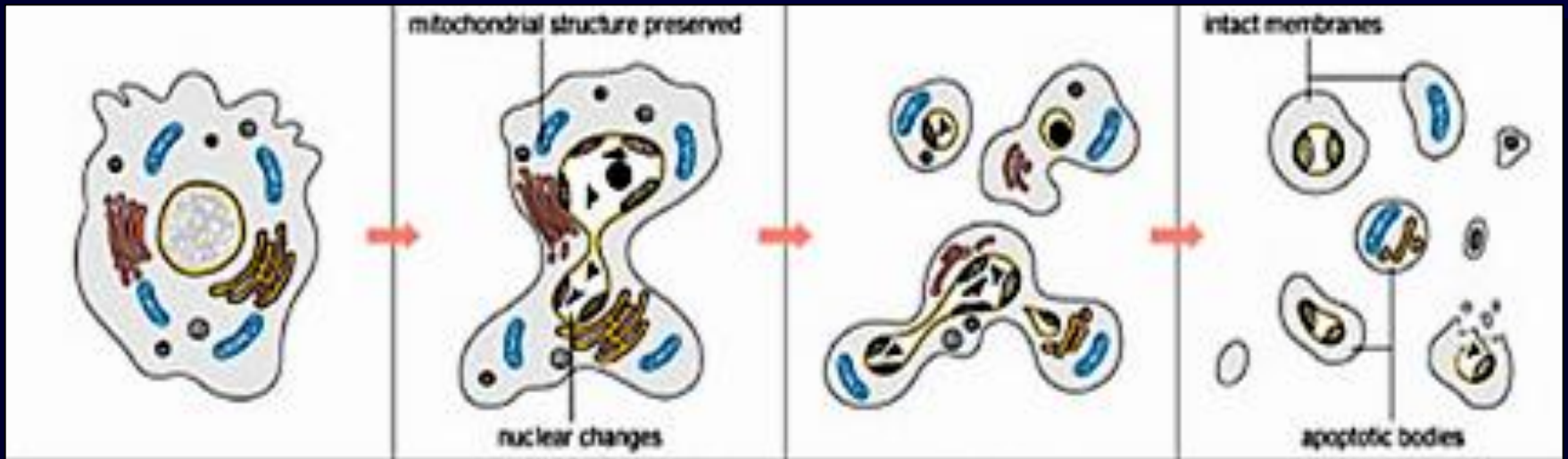


Indukce apoptózy

Přijetí negativního signálu

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

Průběh apoptózy:

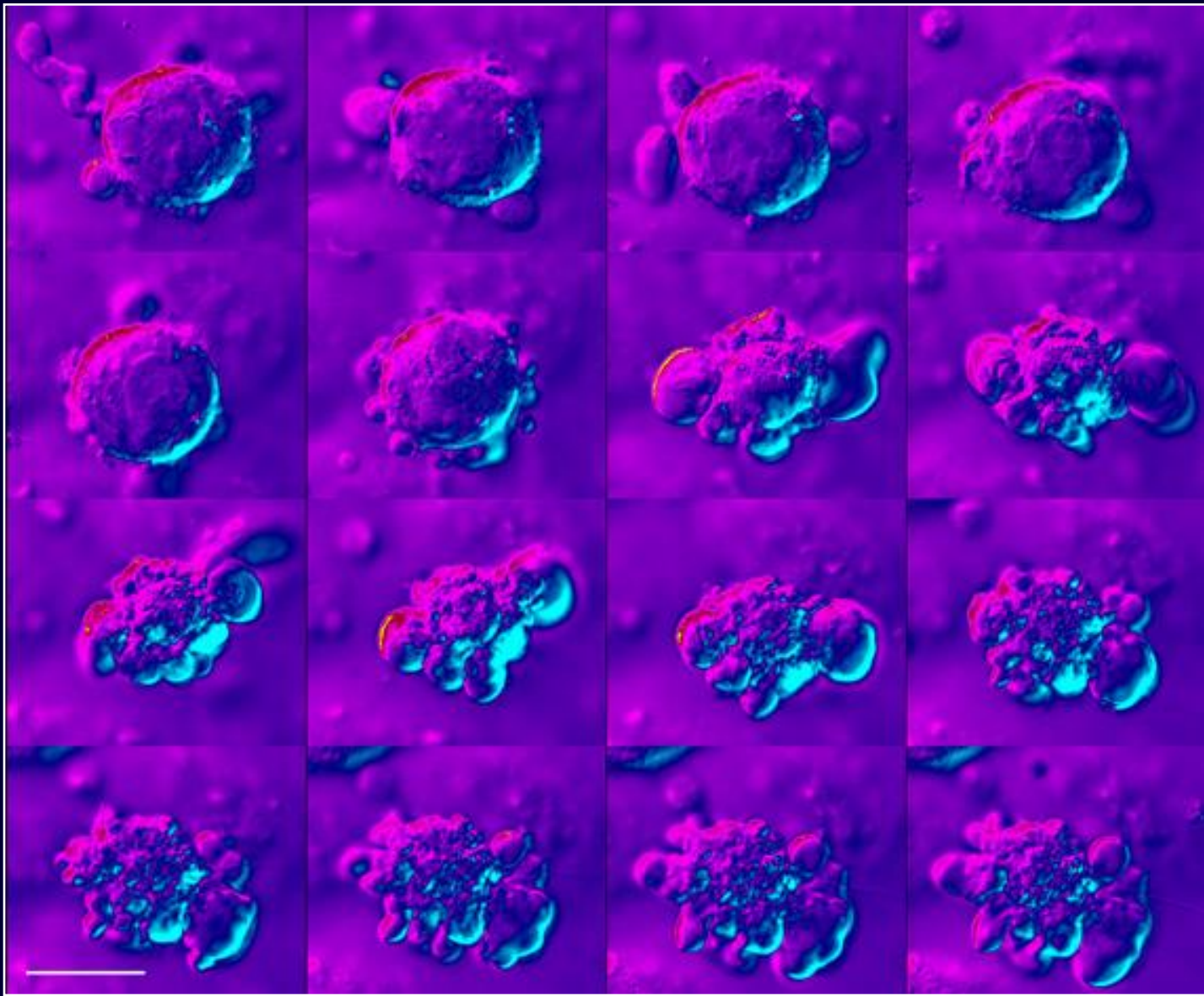


normální
buňka

smršťování

rozpad
(fragmentace)

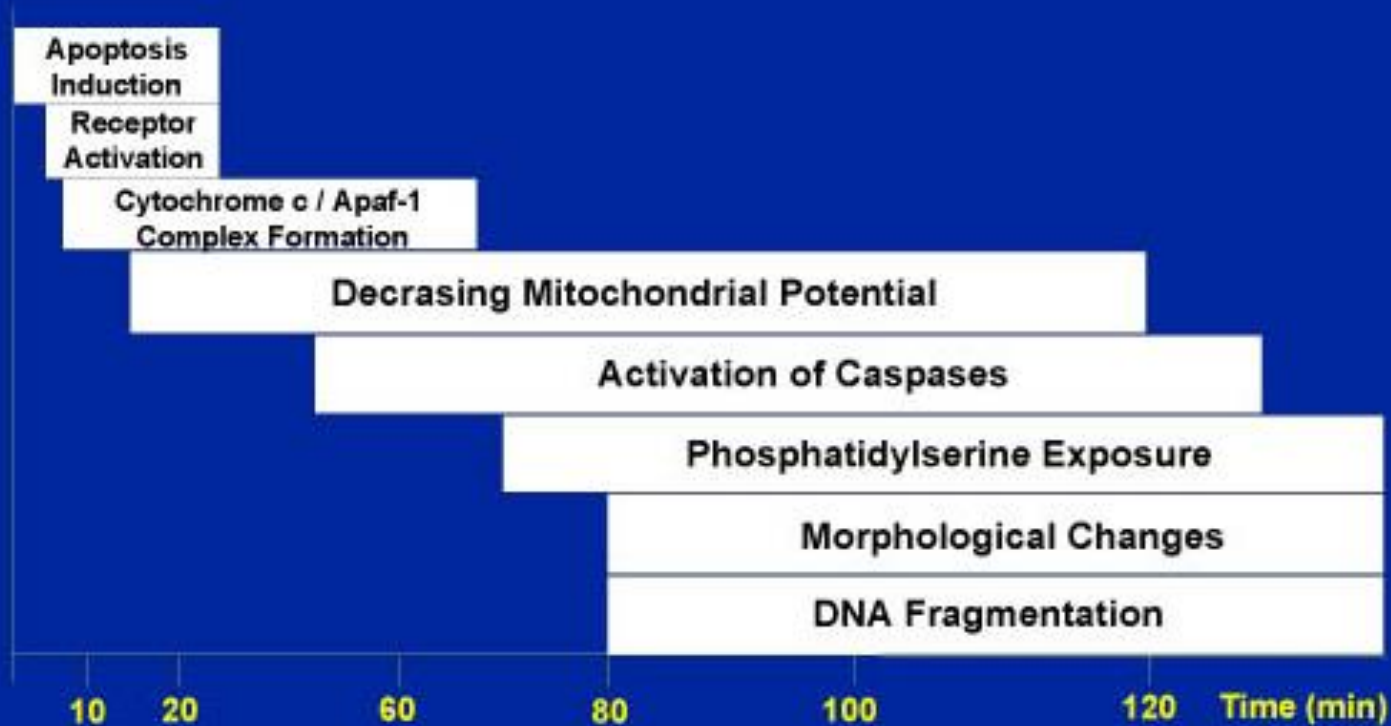
apoptotická
tělíška
(apo-bodies)



Morfologické a biochemické příznaky apoptózy

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

Hallmarks of Apoptosis



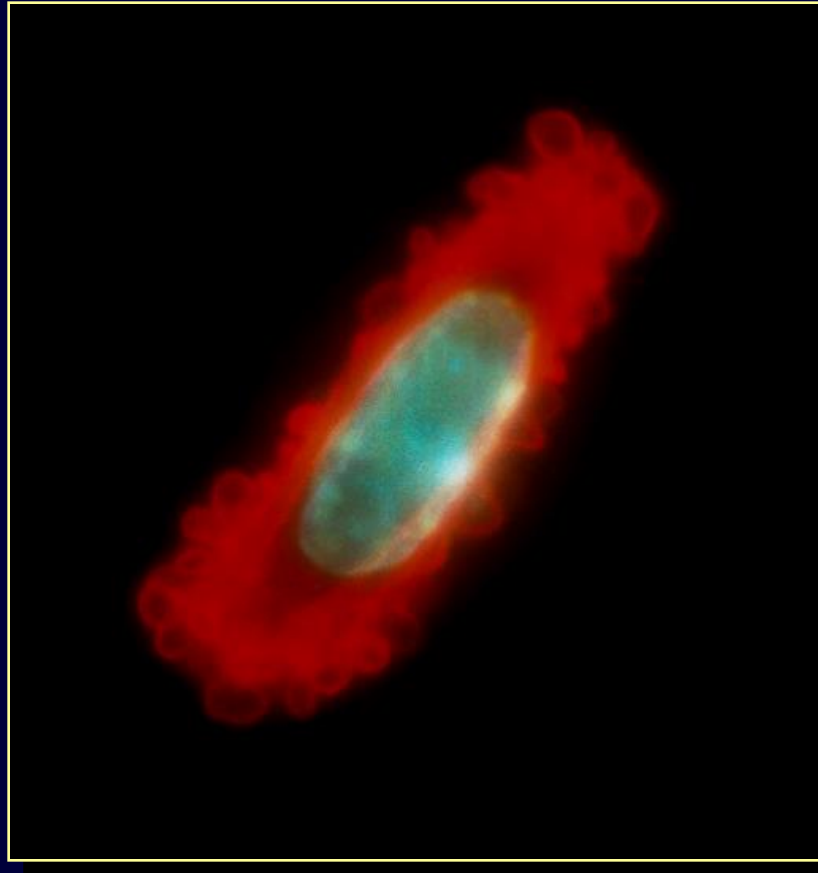
HeLa cells, apoptosis induction with TNF α / Actinomycin D

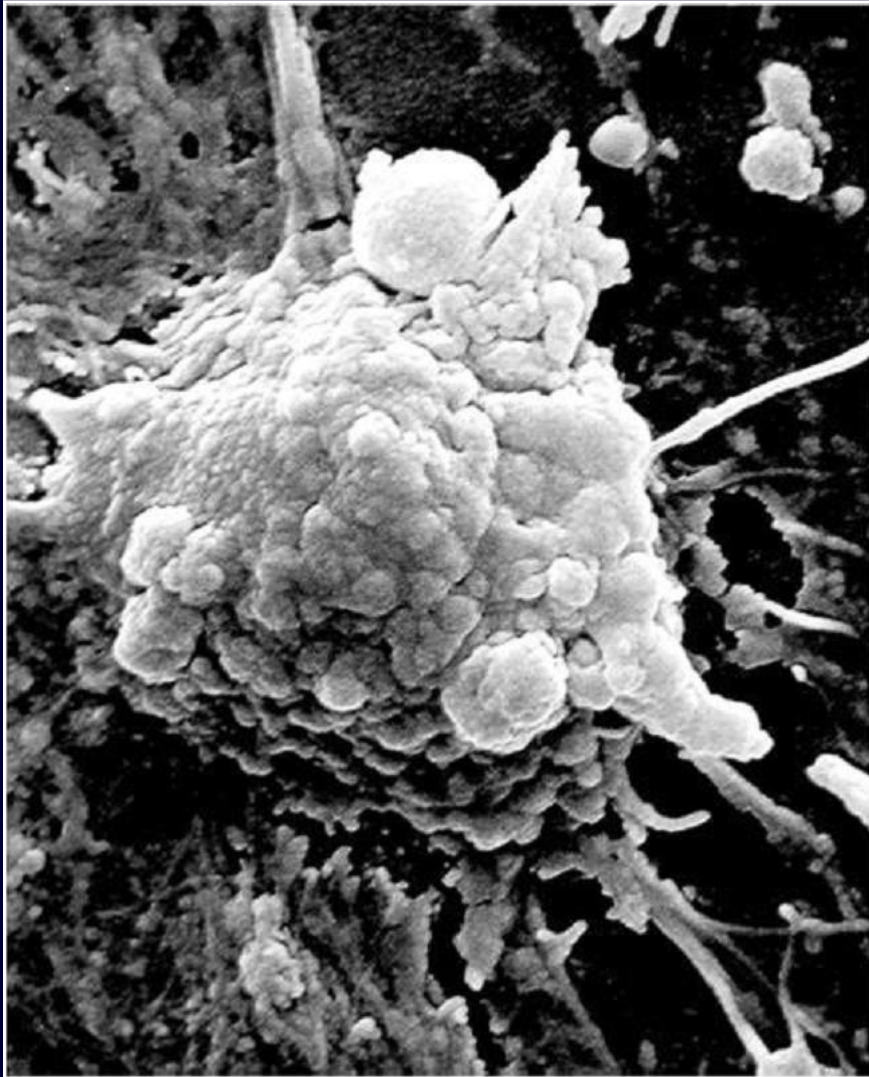
Metodické aspekty studia apoptózy

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

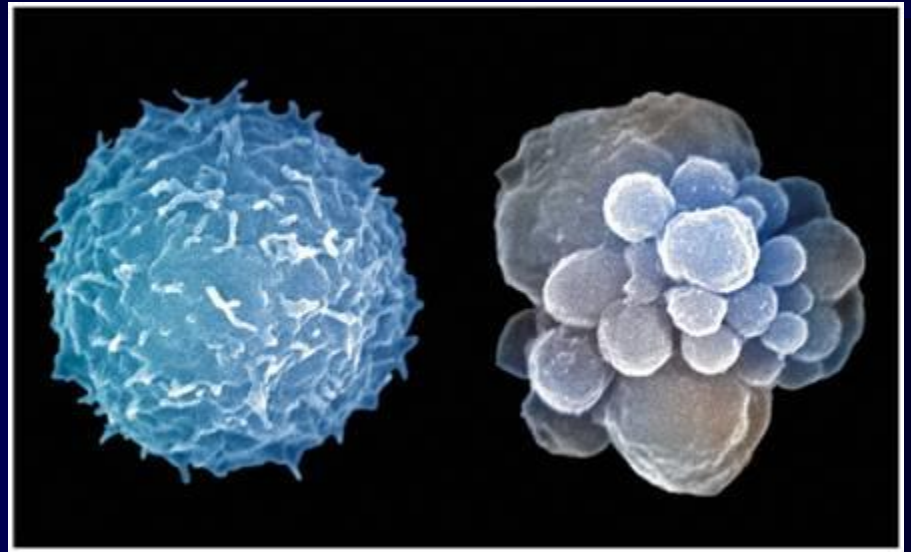
Blebbing plazmatické membrány

- degradace kortikálního cytoskeletu (fodrin, aktin)



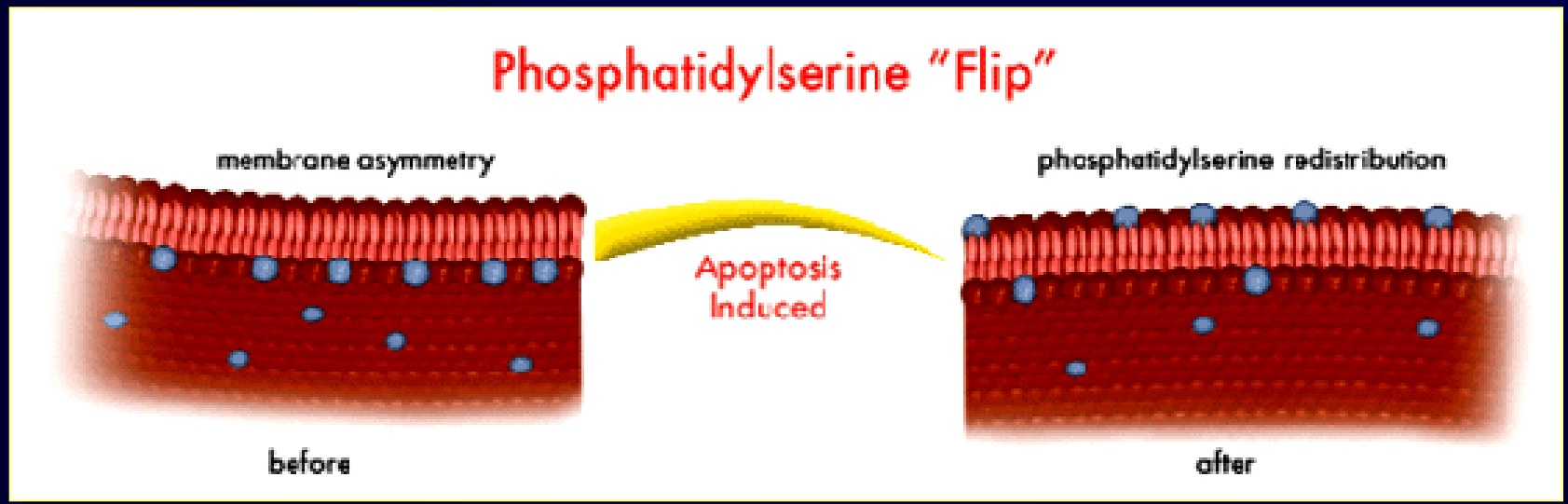


Motoneuron disease: an apoptotic neuron seen by scanning electron microscopy



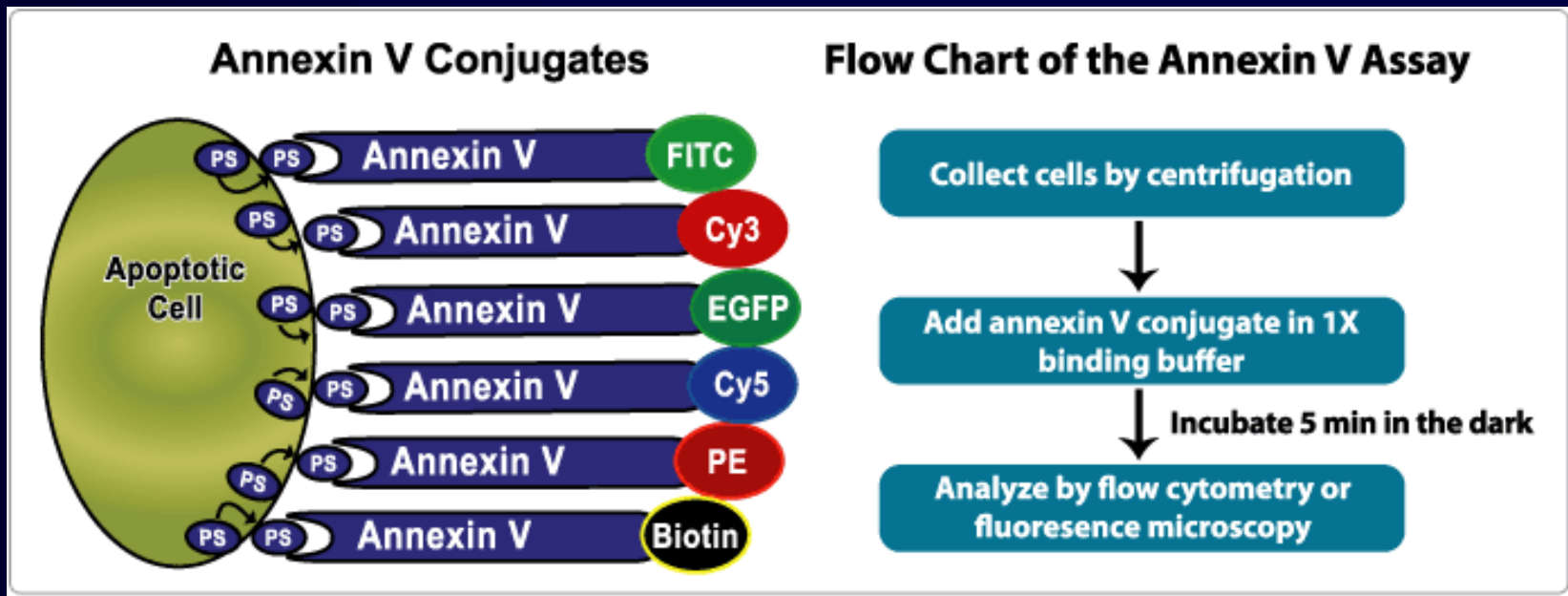
Změny v plazmatické membráně

- externalizace fosfatidylserinu („eat me“ signal)



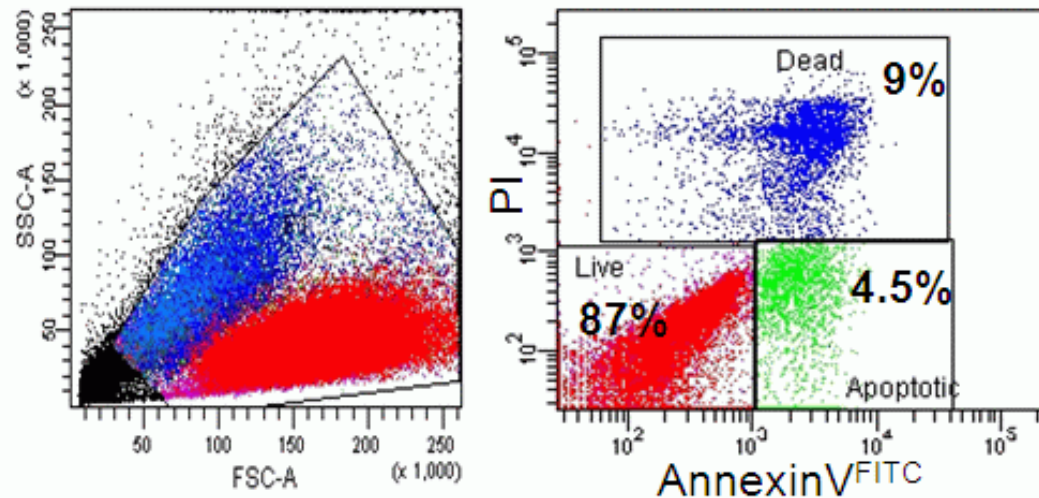
Změny v plazmatické membráně

- detekce fosfatidylserinu
- Annexin V + fluorochrom



Změny v plazmatické membráně

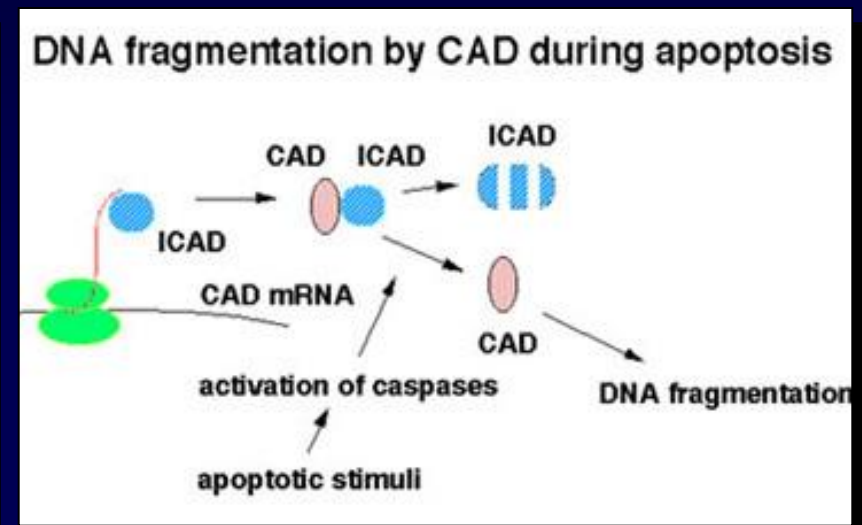
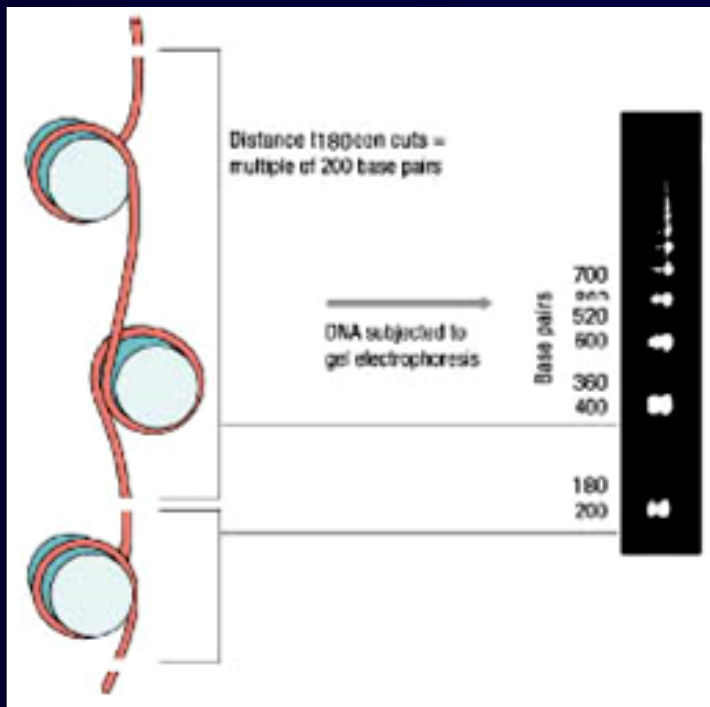
- detekce fosfatidylserinu – Annexinem V
- flow cytometrie



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)

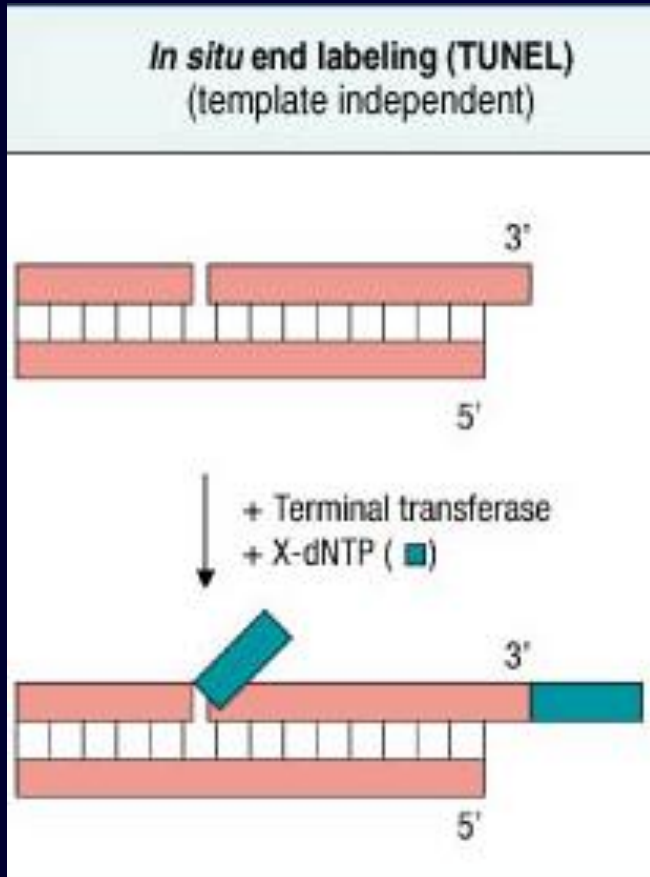
- kondenzace chromatinu na periferních oblastech jádra
- internukleosomální štěpení DNA - žebříček (ladder)
- fragmentace jádra



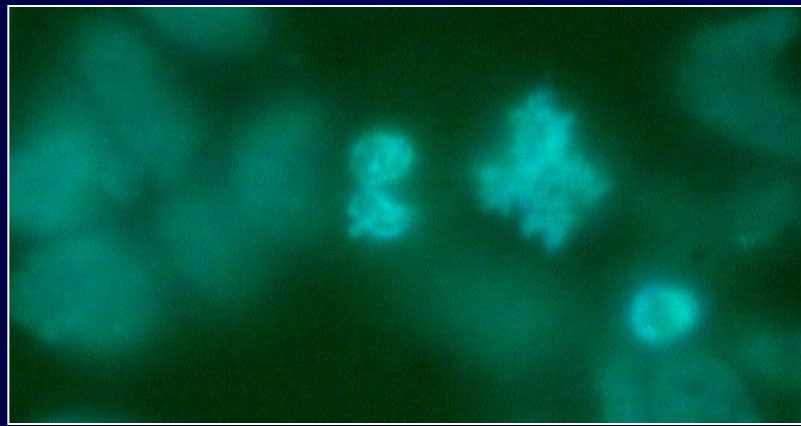
CAD – kaspázou aktivovaná Dnáza
ICAD – inhibitor CAD

Detekce štěpení DNA:

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase
dUTP nick end labeling



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

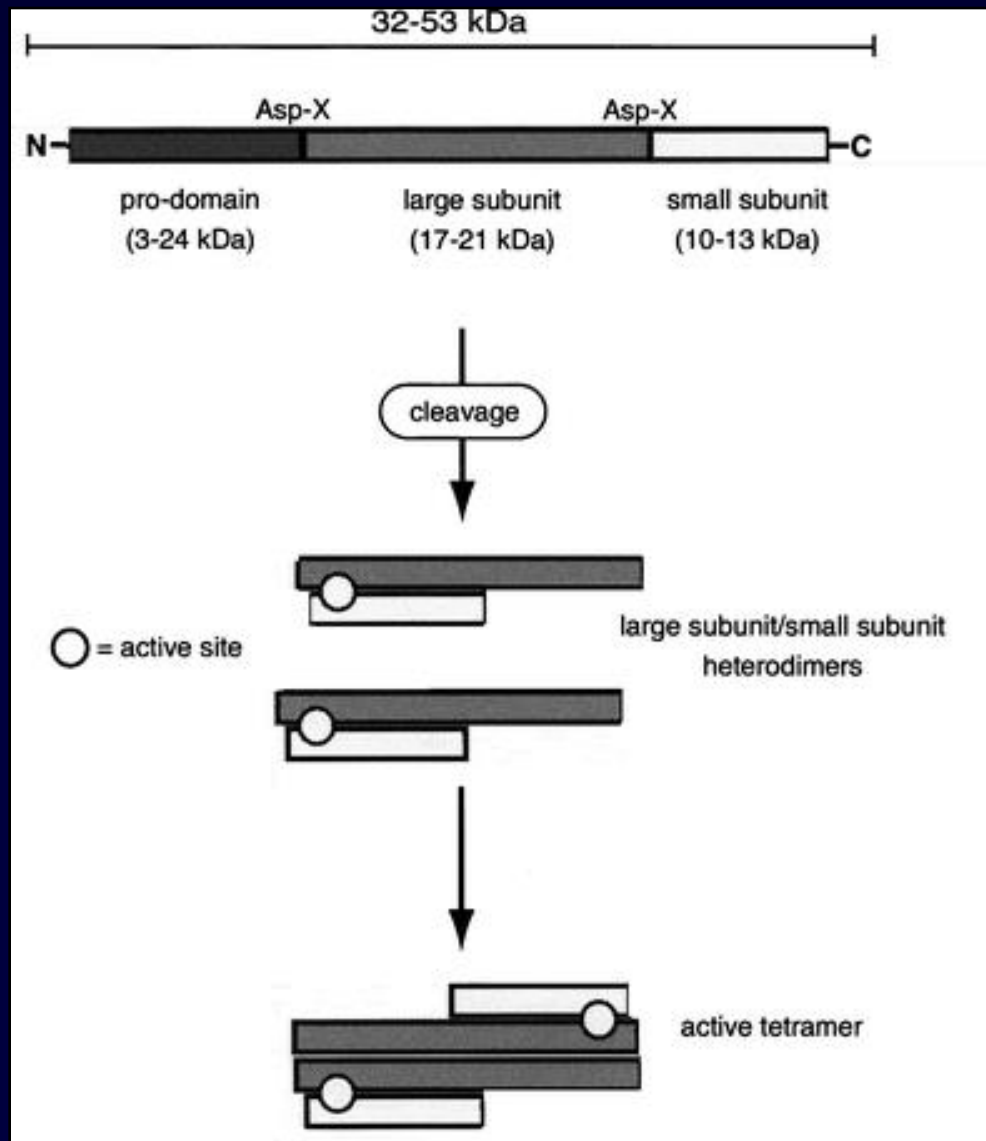
Katepsiny, kalpainy, granzymy

Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení

prokaspáza

kaspáza

aktivní
kaspáza



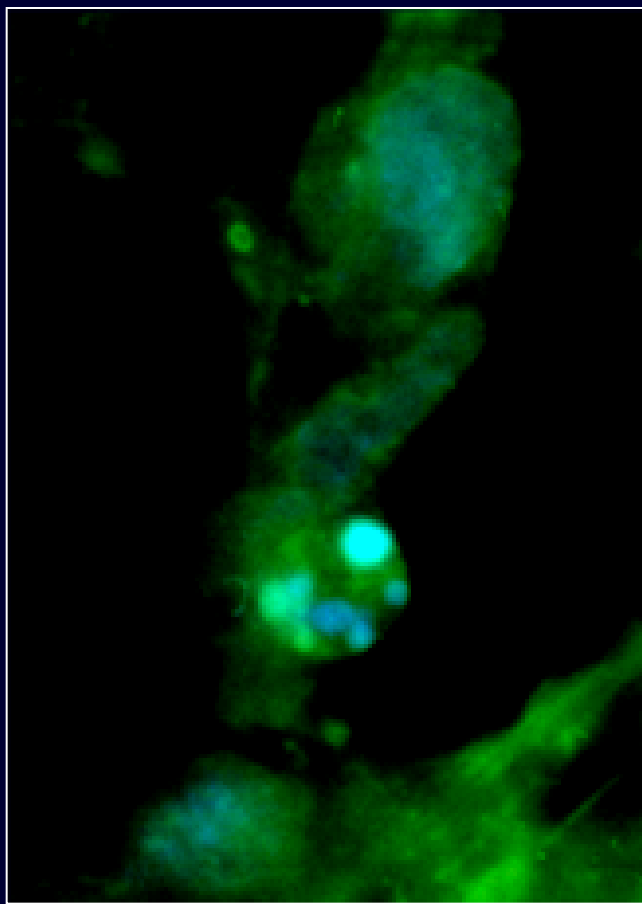
Aktivace proteolytického štěpení

Substráty kaspáz - proteiny

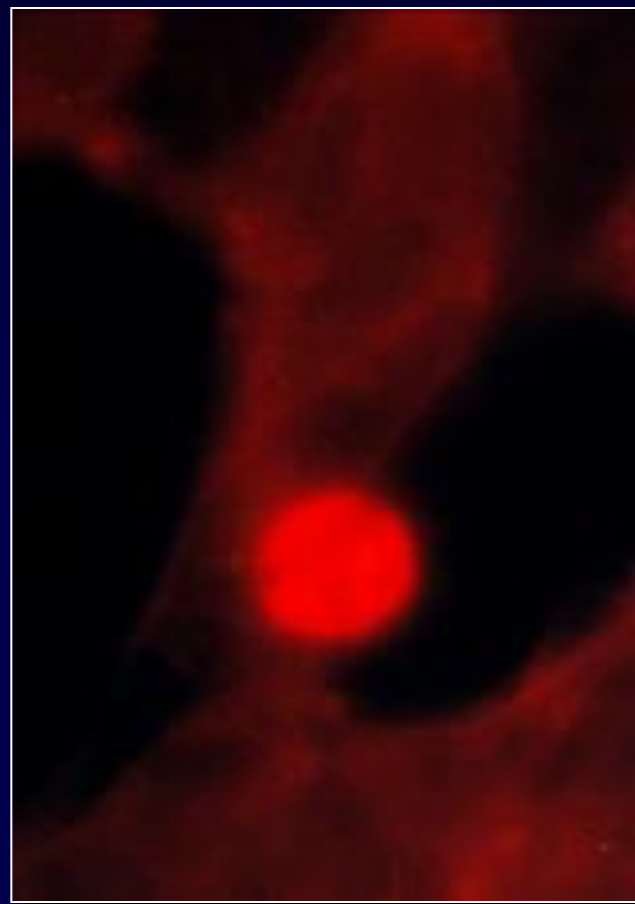
- „cell death“ proteiny (Bcl-2, Bcl-XL, prokaspázy..)
- regulátory b. cyklu (MDM2, p21, Rb, cyklin A..)
- cytoskelet (aktin, fodrin, keratiny, laminy..)
- DNA metabolismus (ICAD, PARP..)
- RNA metabolismus
- signální dráhy
- transkripční faktory
- proteiny spojené s neurodegenerativními chorobami



Aktivace kaspáz – fluorescenční mikroskopie



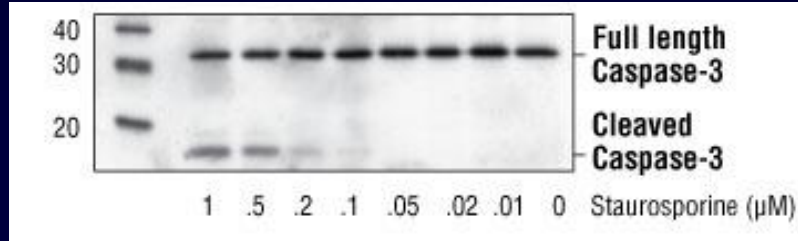
α-tubulin / DAPI



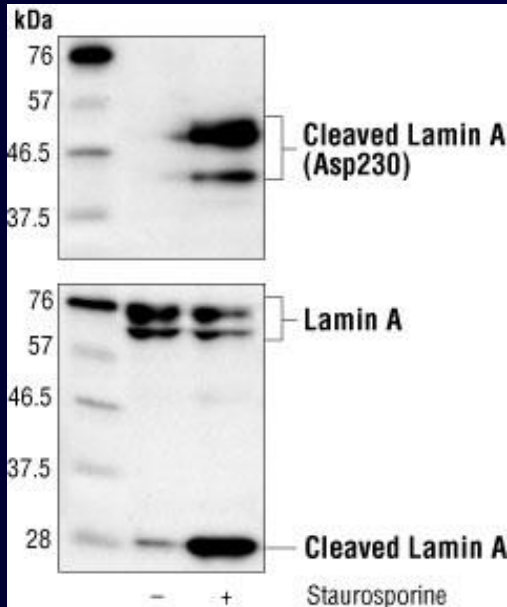
aktivovaná kaspáza 3

Aktivace kaspáz – detekce (WB)

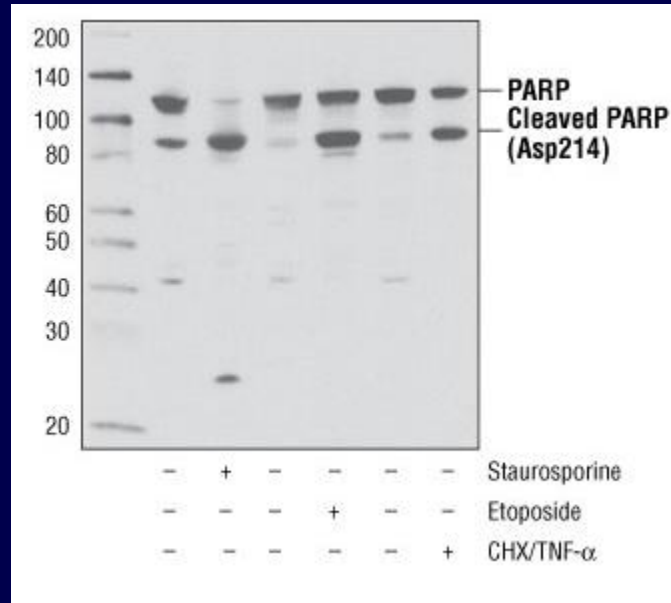
Kaspáza-3



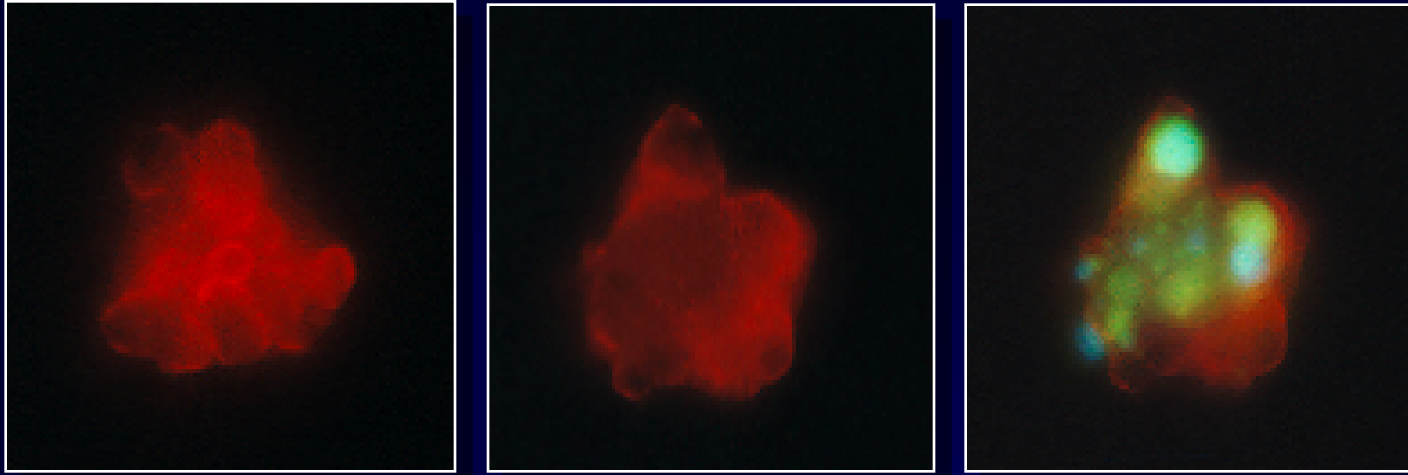
Lamin A



Poly (ADP-ribose) polymerase



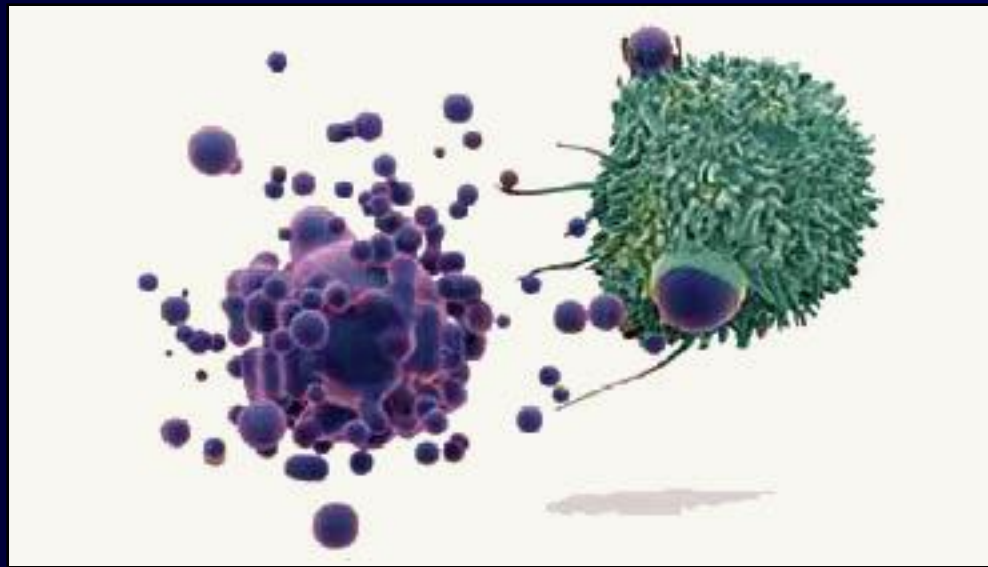
Rozpad buňky na apoptotická tělíka



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

Fagocytóza apoptotických tělísek

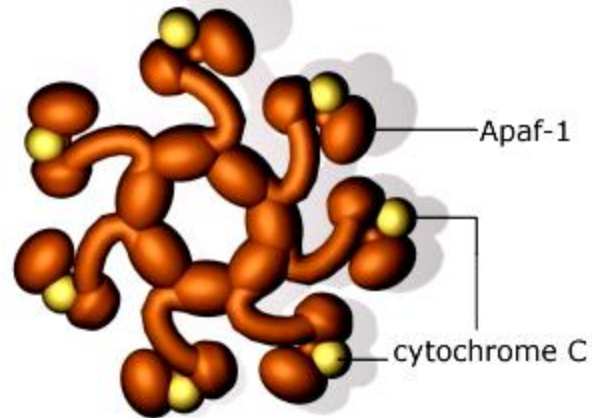
- pohlcení apoptotických tělísek okolními buňkami (makrofágy, dendritické buňky)
- fagocytující buňky vylučují cytokiny, které zabraňují zánětu ve tkáni



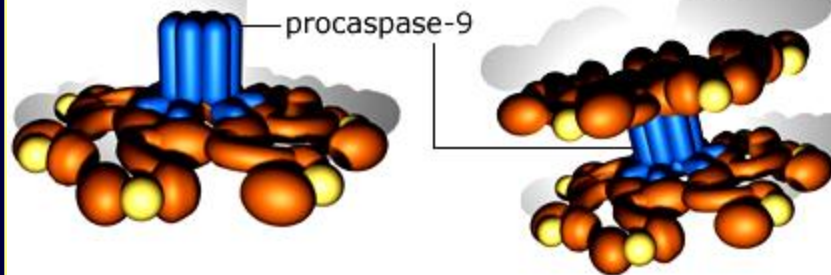
Apoptóza vyvolaná vnitřními signály:

- 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)

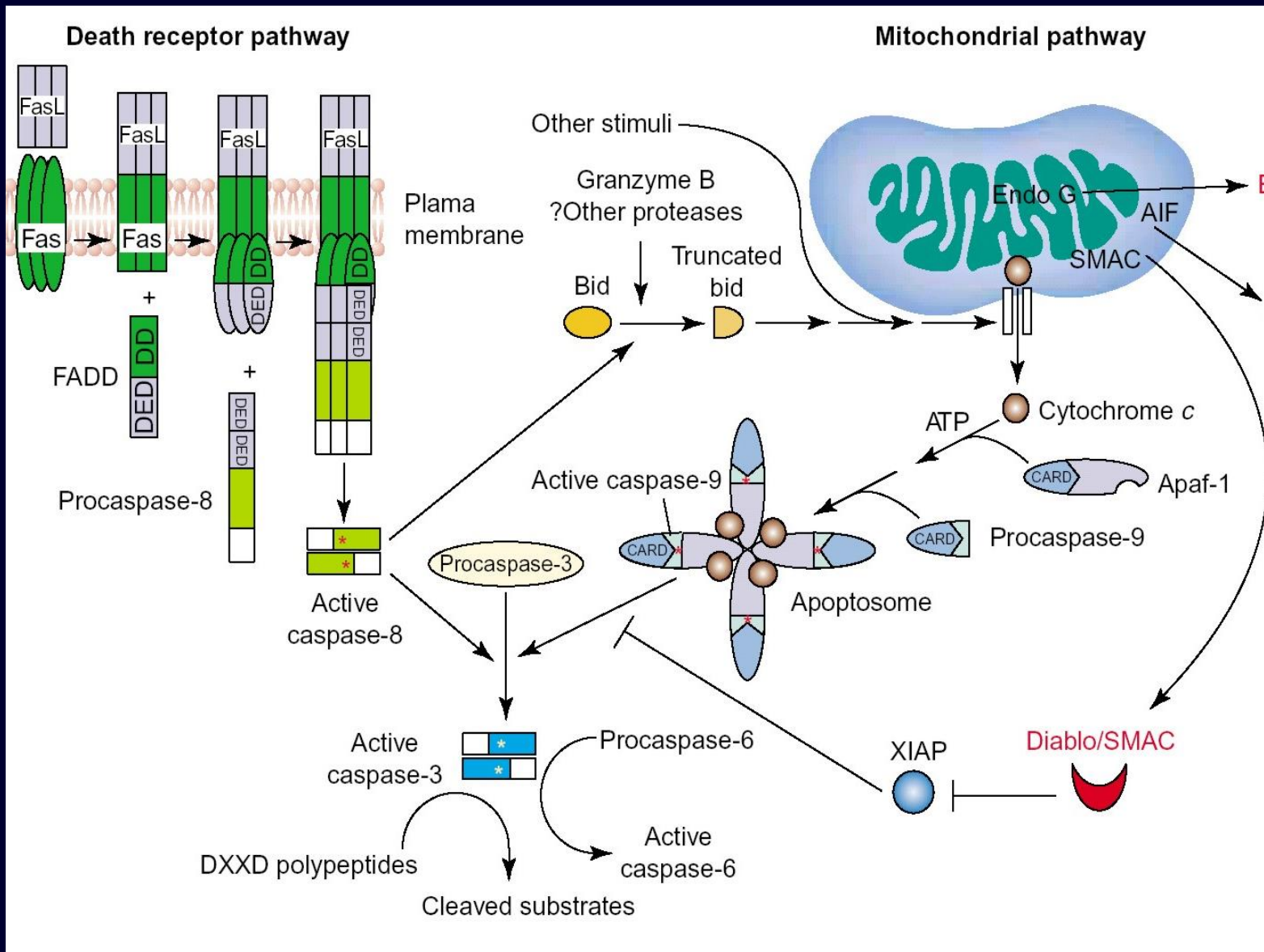
First stage of apoptosome formation



Recruitment of
procaspase-9



Caspase Activation

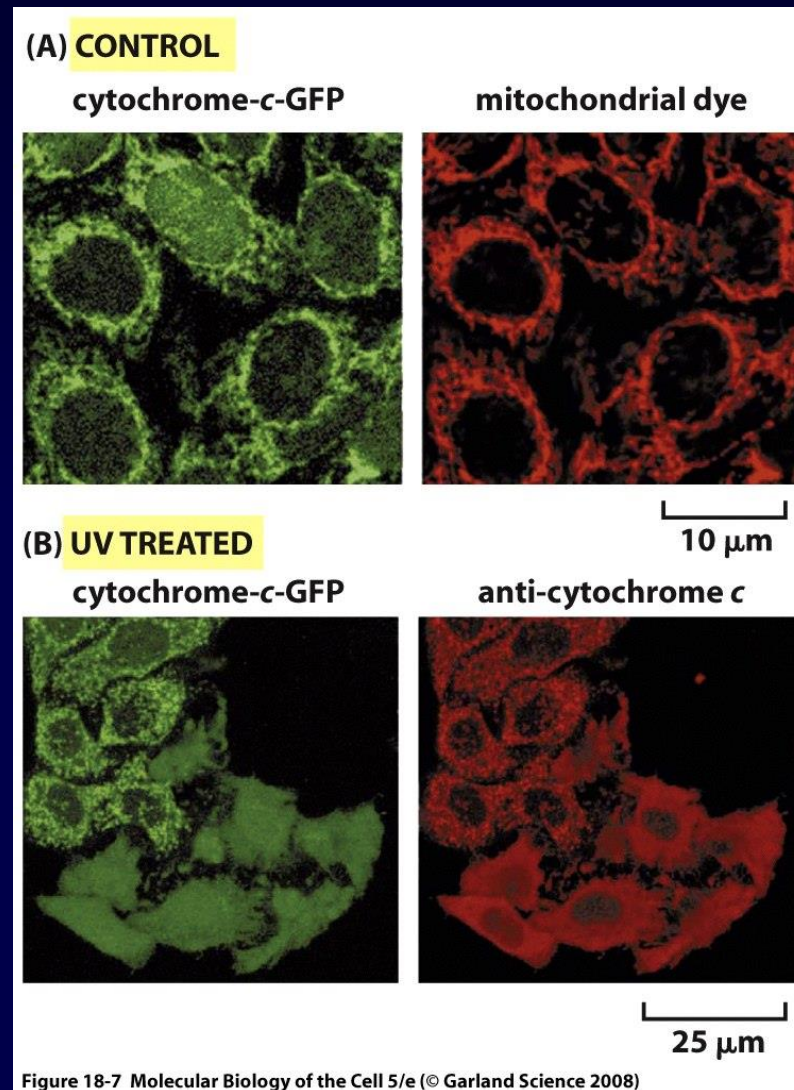


Změny mitochondrií

změna permeability
mitochondriální
membrány

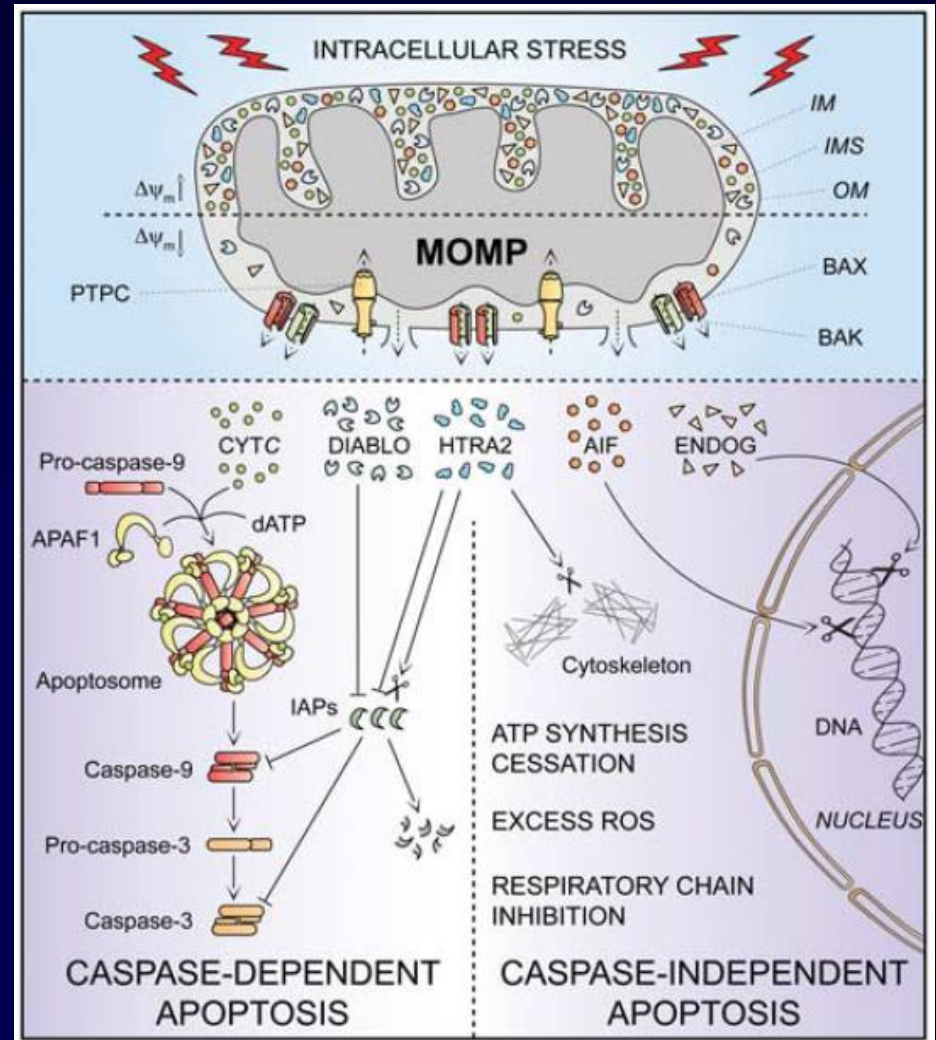
detekce cytochomu-C

- fl. mikroskopie
- flow-cytometrie



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)



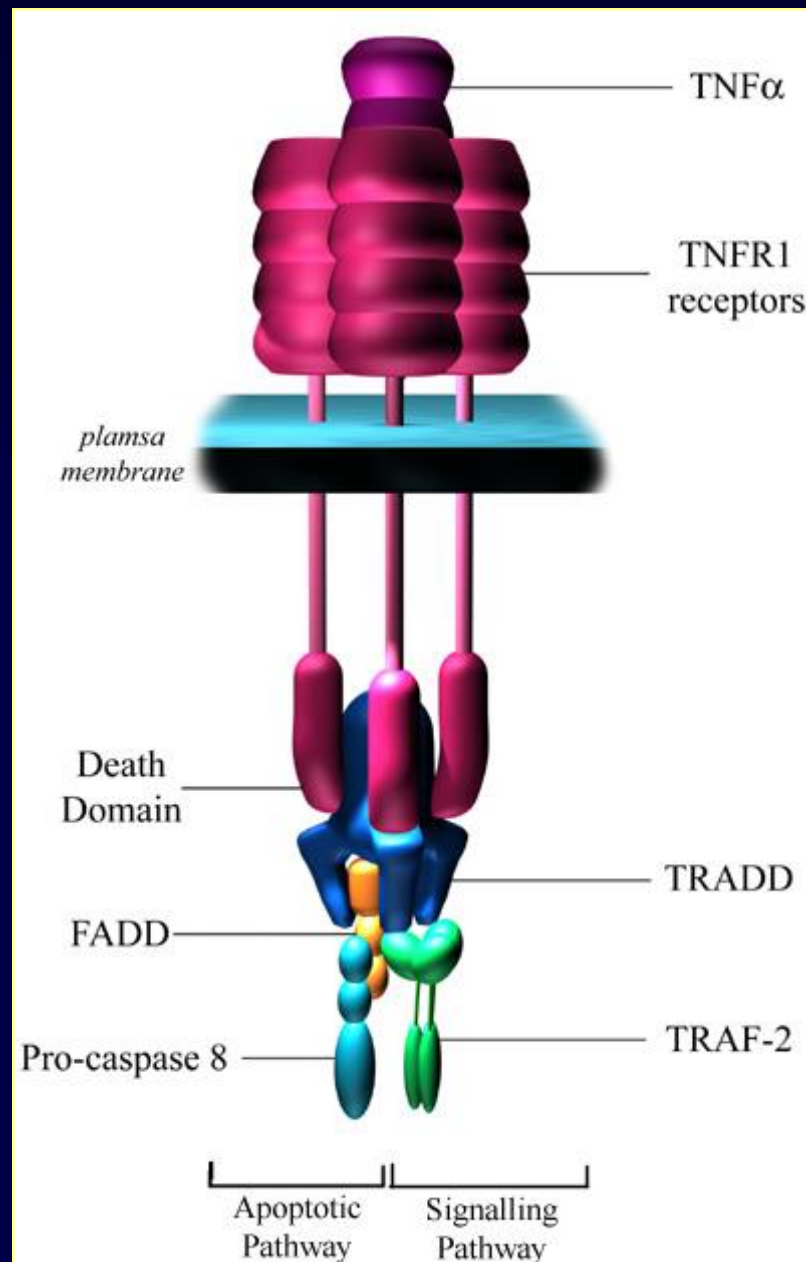
Apoptóza vyvolaná vnějšími signály:

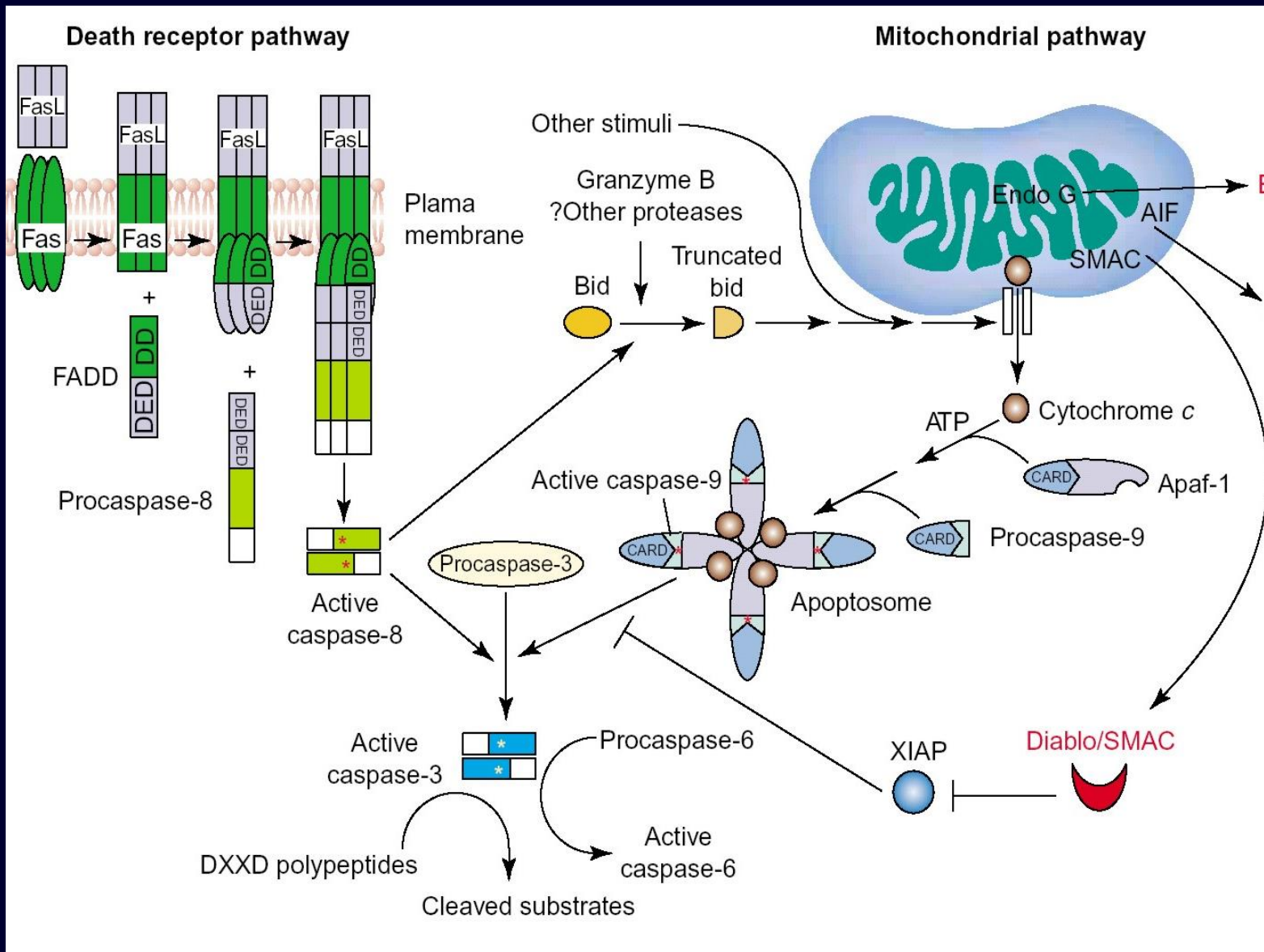
- aktivační molekuly (**death activators**) se napojují na specifické receptory v plazmatické membráně (**death receptors, DR1-5**):
 - Tumor necrosis factor α (TNF- α) - TNF receptor
 - Lymphotoxin (TNF- β) - TNF receptor
 - Fas-ligand (FasL) - Fas receptor (CD95)
- přenos signálu do cytoplasmy aktivuje 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

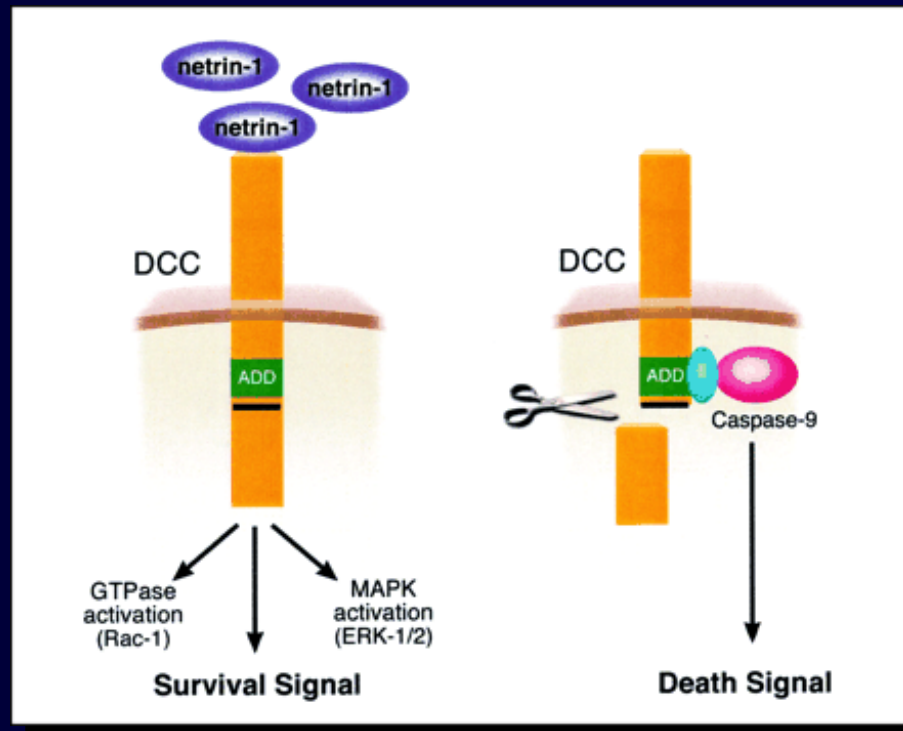




Apoptóza vyvolaná vnějšími signály:

dependence receptors (např. DCC)

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



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

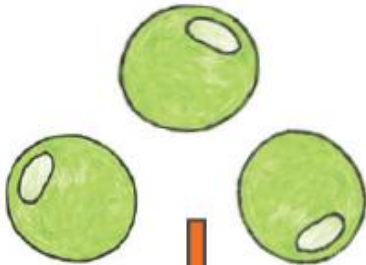
f) anoikis – smrt způsobená ztrátou kontaktu k podkladu nebo okolním buňkám (mechanismus vnitřní apoptózy)

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

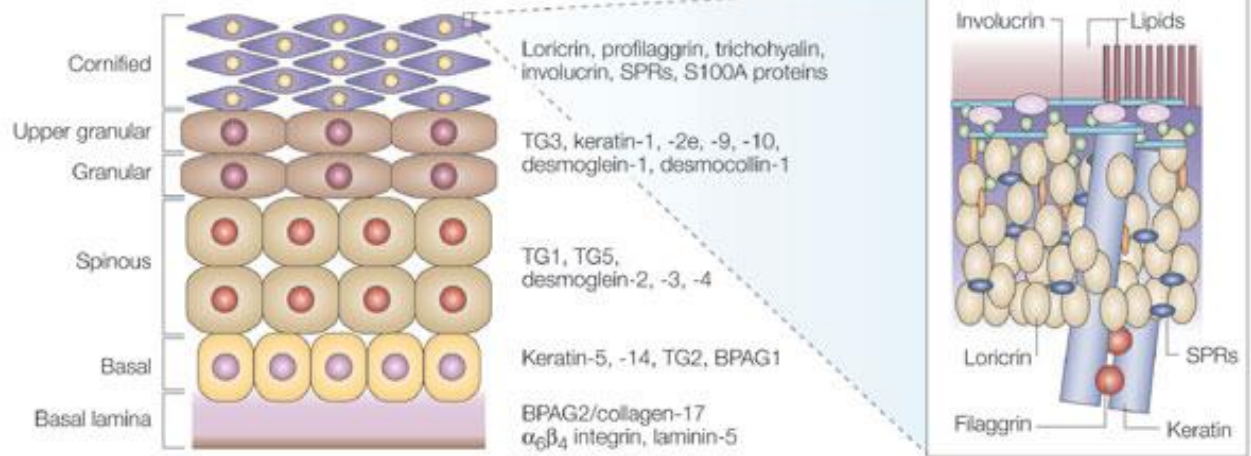
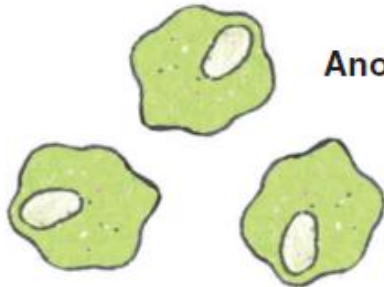
h) entosis (buněčný kanibalismus) – pohlcení buňky stejným typem (ne fagocytem), postupná degradace ve fagozomu



Loss of integrin attachment

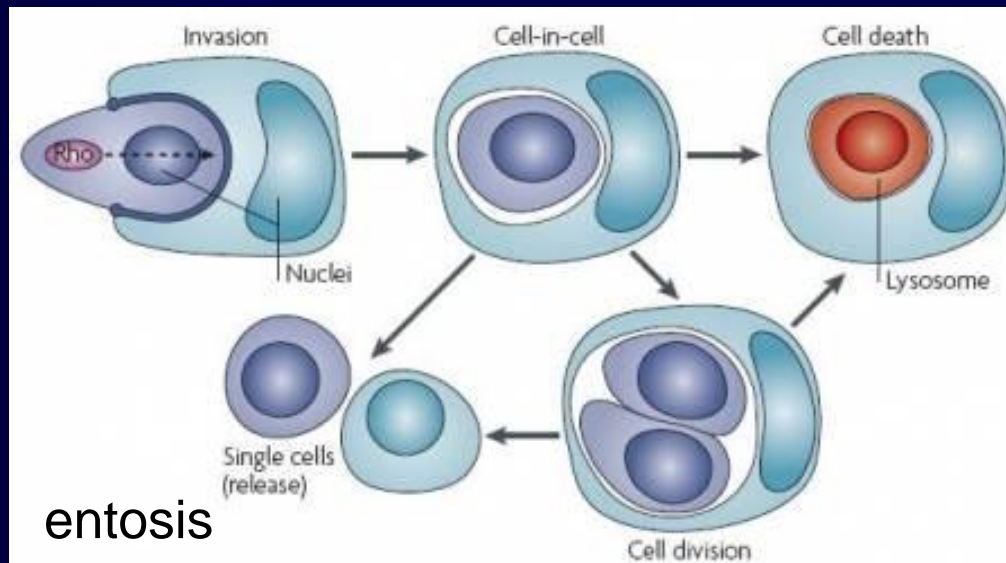


Anoikis



cornification

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

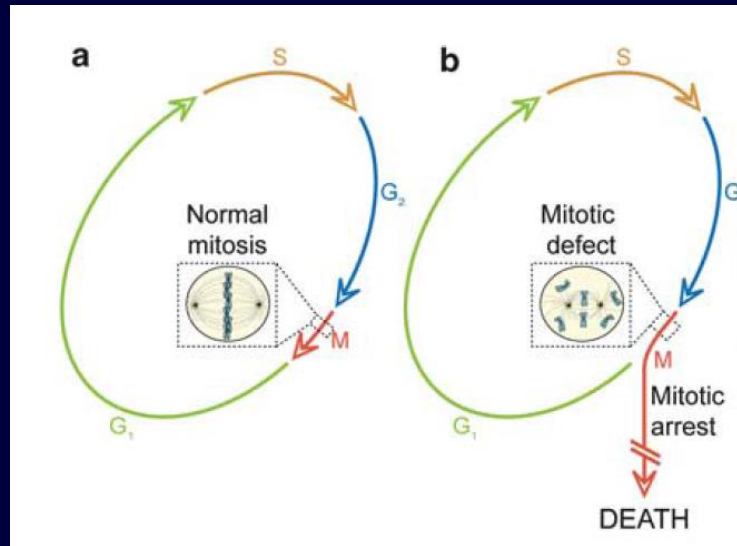


entosis

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

Současné rozdělení regulované buněčné smrti

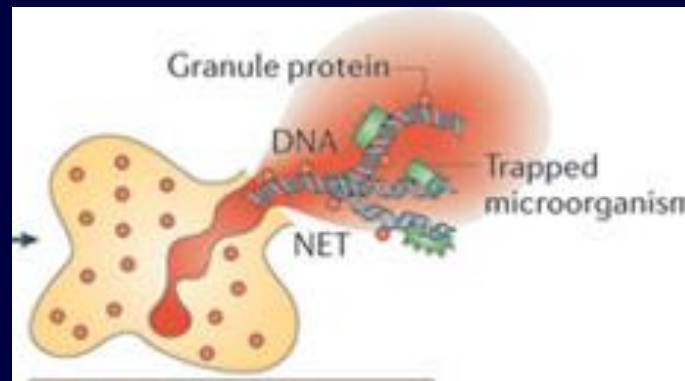
i) mitotická katastrofa – iniciace navození smrti v M-fázi buněčného cyklu vlivem poškození mitotického aparátu



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 **proapoptických** genů (Bax, Bid, Noxa, Puma)
 - **down**regulace **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 (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)

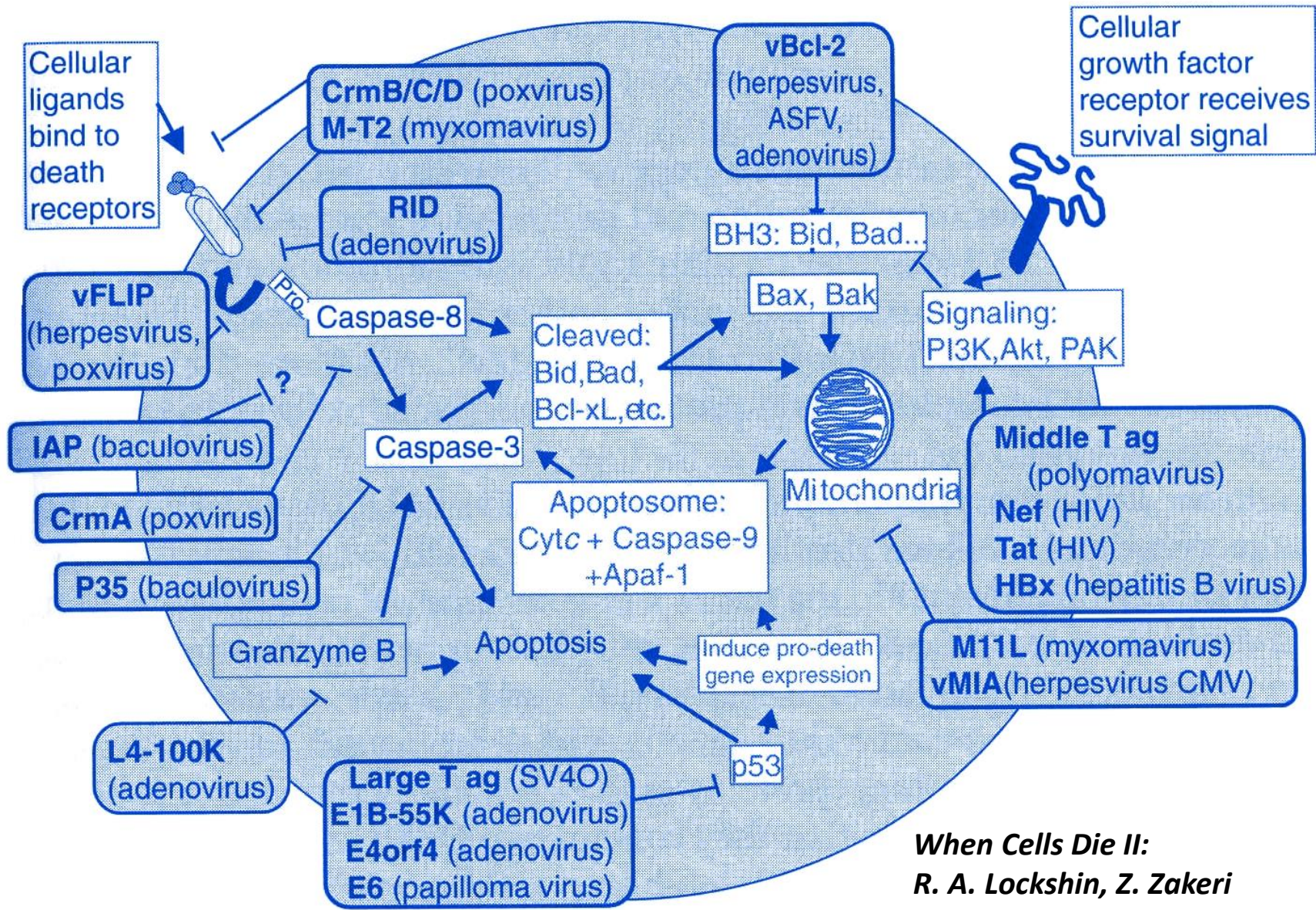
Apoptóza a nádory

Viry, inhibující apoptózu transformovaných buněk:

tvorba proteinů 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



*When Cells Die II:
R. A. Lockshin, Z. Zakeri*



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

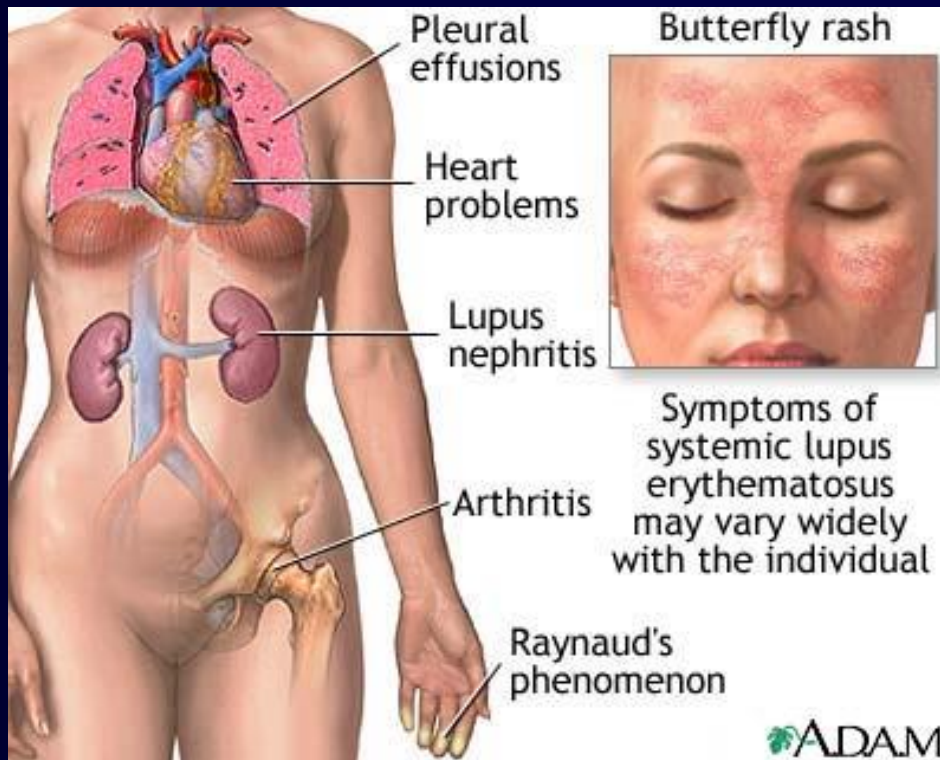
Apoptóza a imunitní systém

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...

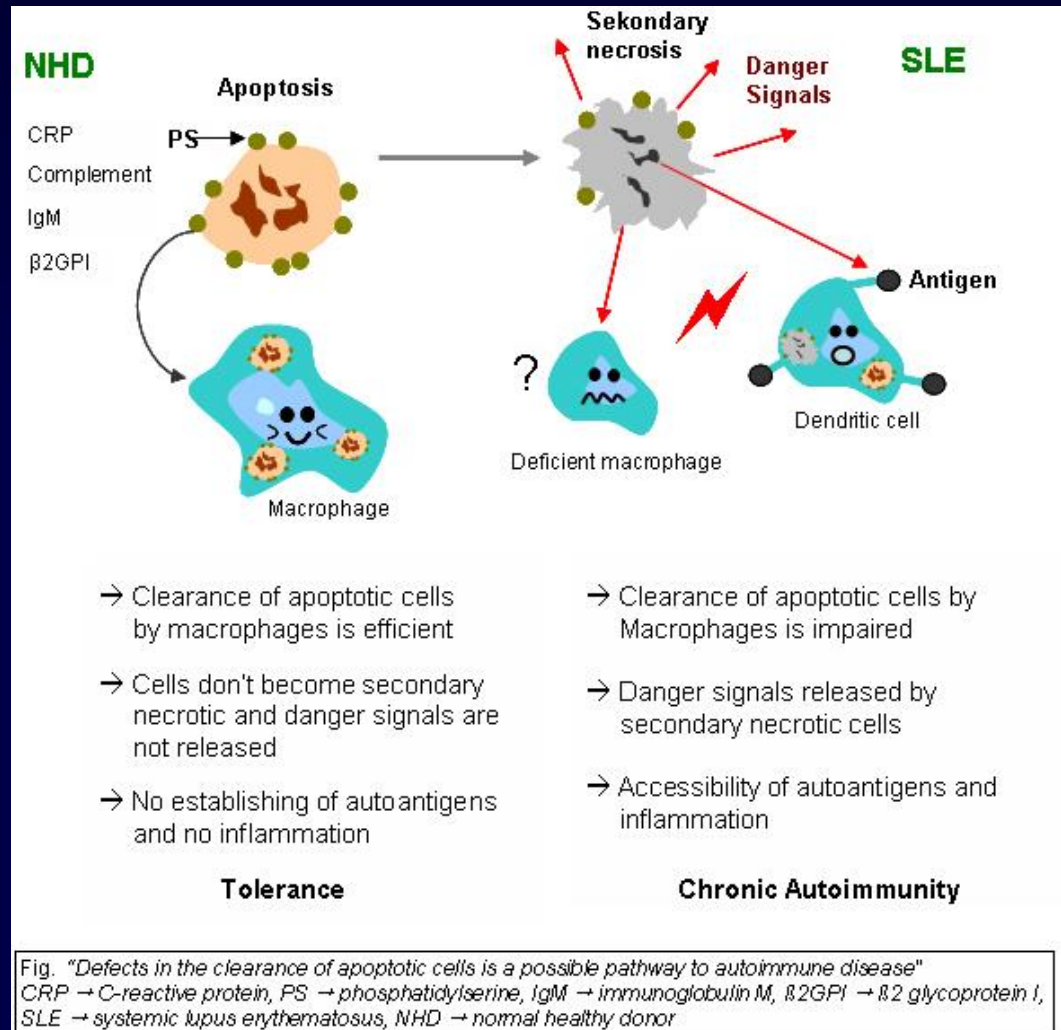


systemový lupus erythematoses

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

Autoimunitní choroby: systémový lupus erythematoses

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



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



