

Speciální metody fyziologie živočichů

Buněčná smrt a metody její detekce

doc. RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

2022

Buněčná smrt

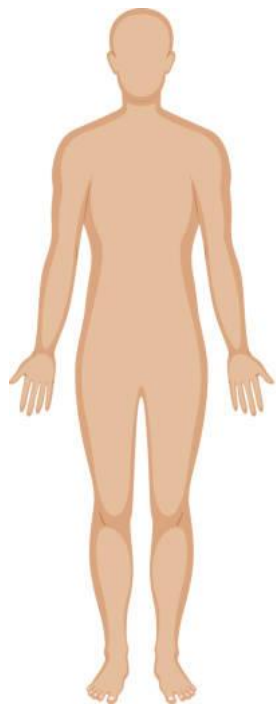
„nevratné poškození základních buněčných funkcí,
které vede ke ztrátě buněčné integrity“

- produkce ATP
- redoxní rovnováhy



... dalekosáhlé důsledky...

- permeabilizace plazmatické membrány
- nebo fragmentace buňky

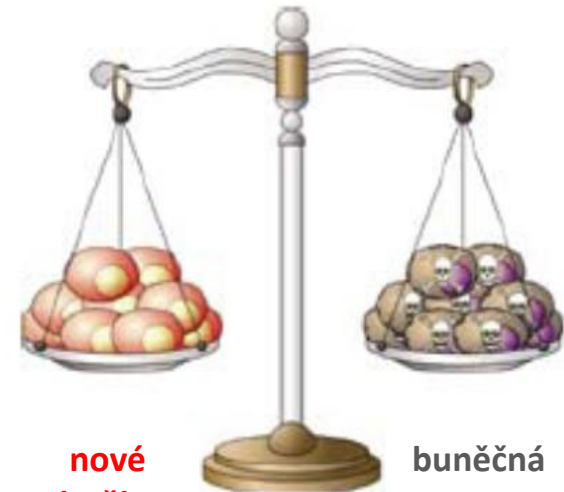


37 trilionů
buněk v těle



... nahrazovány novými
buňkami...

normální tkáň



nové
buňky

buněčná
smrt

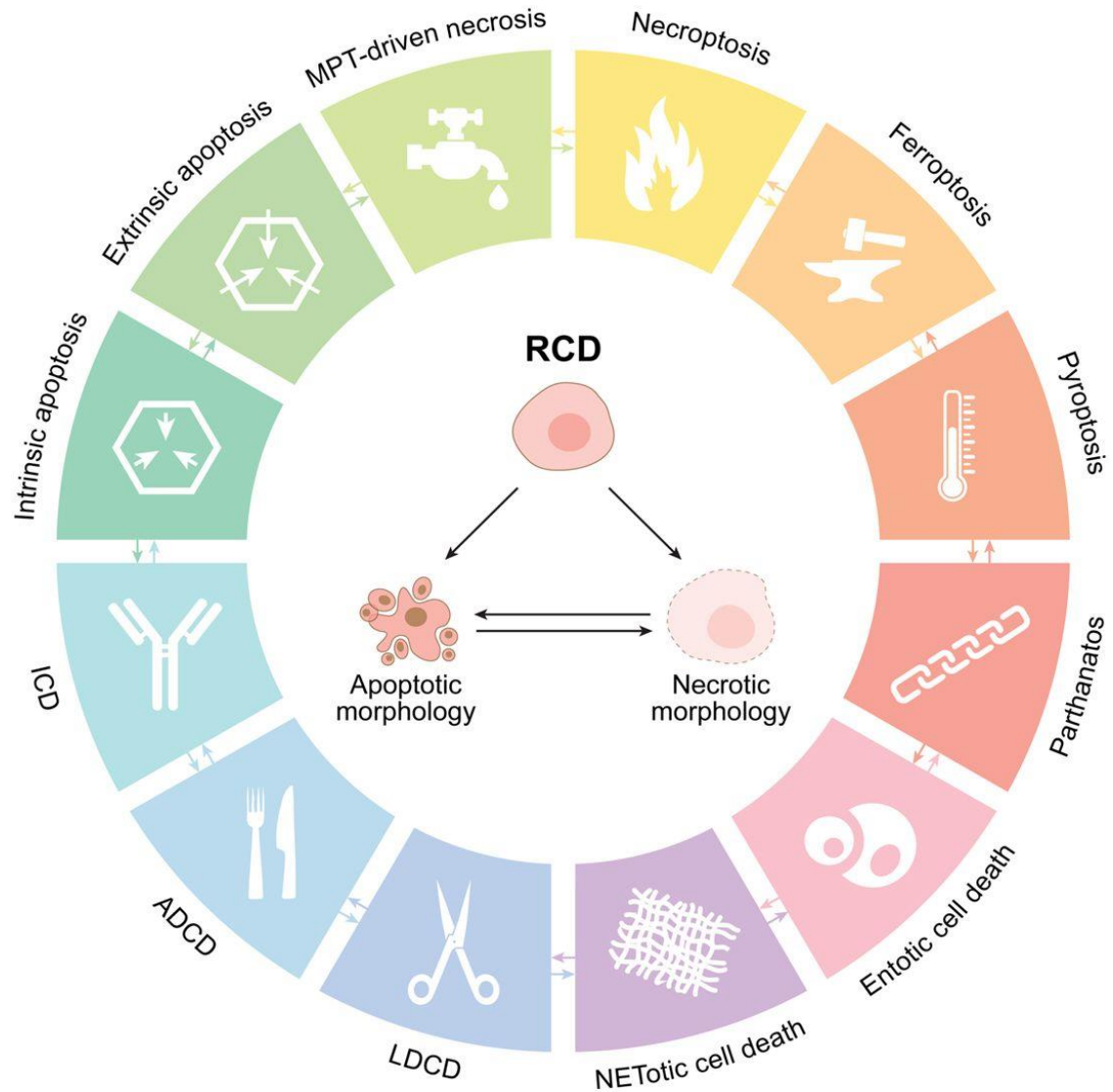
homeostáza

Téma buněčné smrti je vysoce aktuální a intenzívně studované...

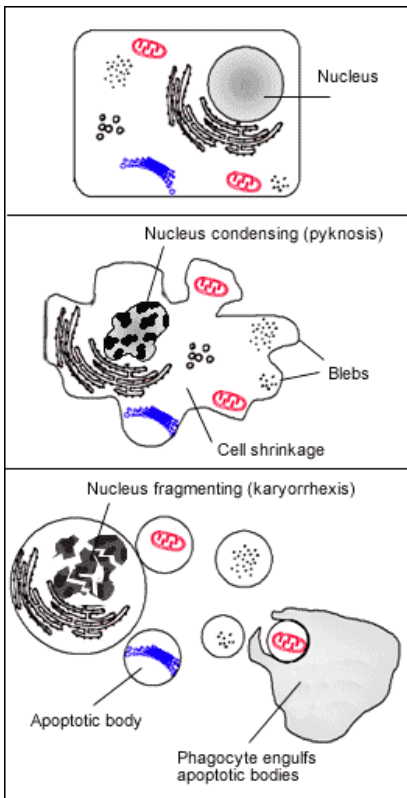
- buněčná smrt ve **vývoji** organismu
 - prenatální i postnatální vývoj
- buněčná smrt - zachování **homeostázy** mnohobuněčného organismu
- buněčná smrt ve **zdraví a nemoci**
 - deregulace buněčné smrti versus vývoj různých typů onemocnění
- využití poznatků a praktické aplikace – řada oborů:
 - vývojová biologie, buněčná a molekulární biologie, fyziologie, patofyziologie, medicína, toxikologie, mikrobiologie... a mnohé další...

Jak buňky umírají?

... řada způsobů a forem buněčné smrti...



Apoptóza - znaky



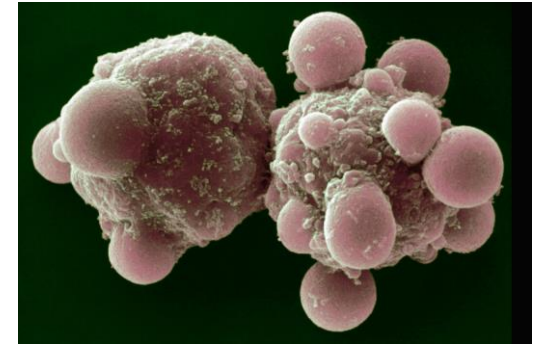
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>)

morfologie:

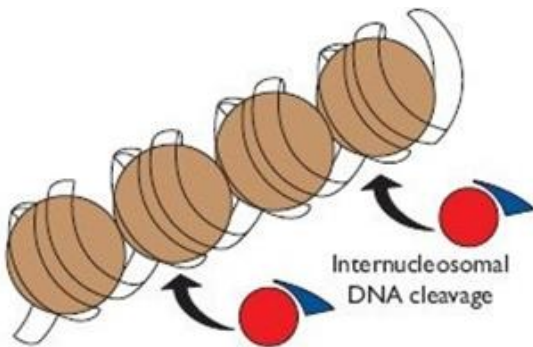
- zmenšení buňky
- bobtnání plazmatické membrány
- kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu
- tvorba apoptotických tělísek
- udržení integrity buněčných organel

biochemie:

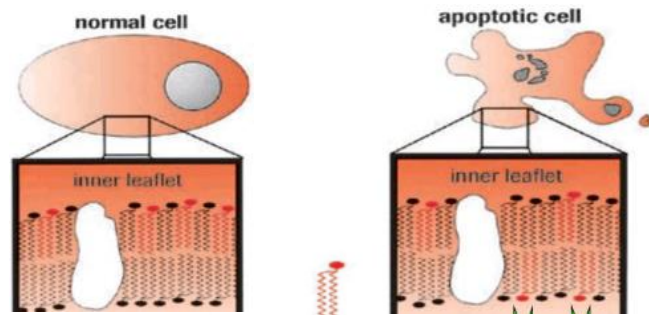
- aktivace specifických enzymů – kaspázy, nukleázy..
- změny ve struktuře a funkci membrán a organel ...



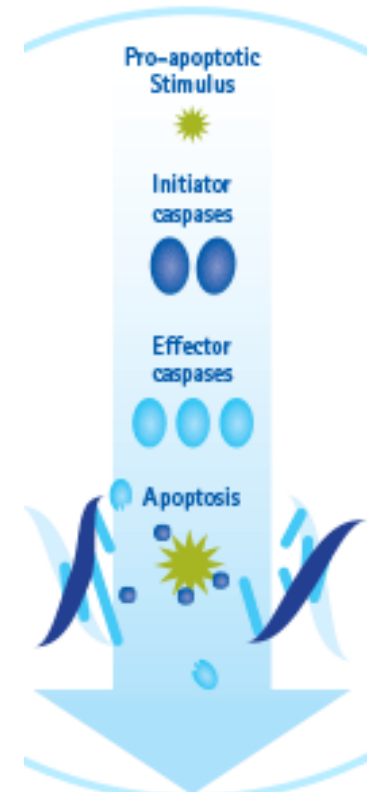
(Grisham et al., 2014)



(Arrora 2017)



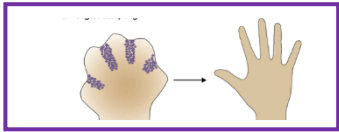
(Podcheko, 2015)



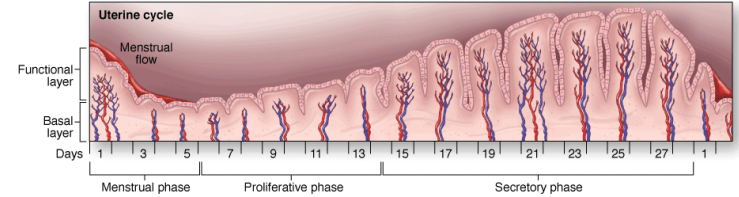
www.merckmillipore.com

Apoptóza v lidském těle

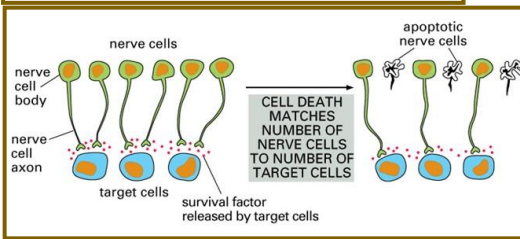
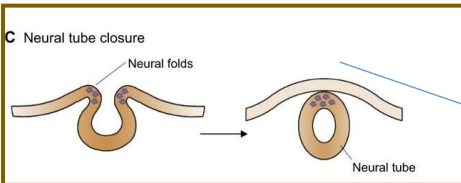
..od embrya po dospělé...



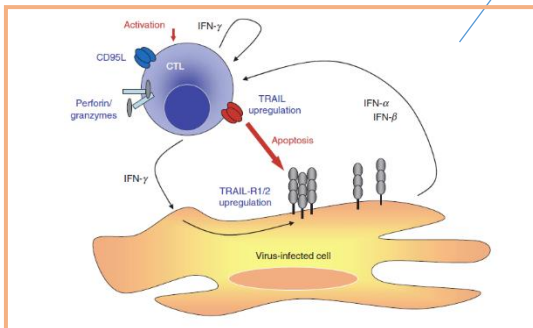
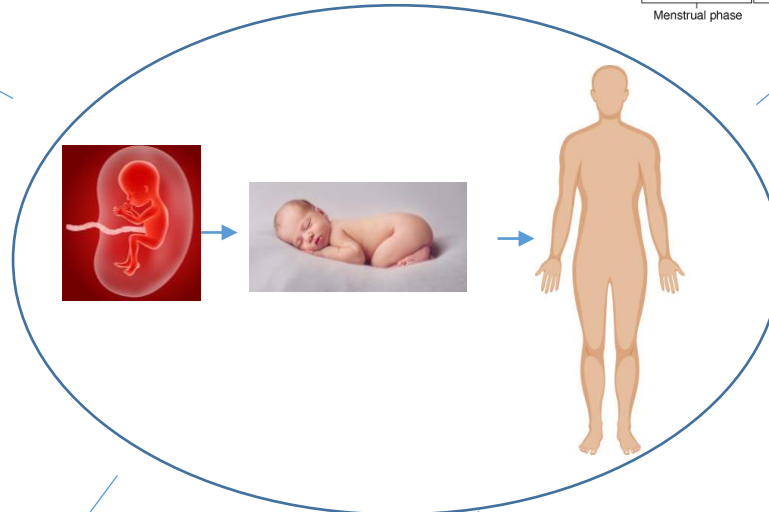
formace prstů



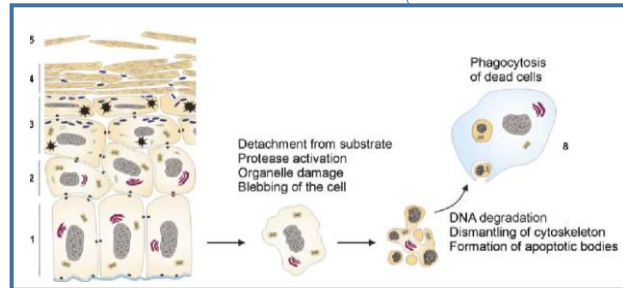
regulace menstruačního cyklu



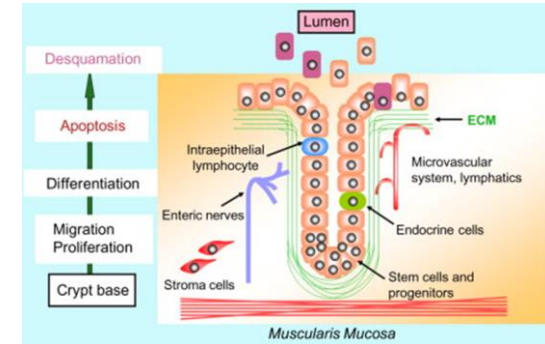
vývoj nervové soustavy



reakce imunitního systému



homeostáza v epidermis



obnova střevního epitelu

(www.vectorstock.com)

(Falschlehner et al. 2009)

(Lippens et al., 2005)

(Perez-Garijo, Steller, 2015)

(http://histonano.com/books)

Apoptóza a nemoci

Neurodegeneration

Alzheimer's Disease
Parkinson's Disease
Huntington's Disease
Spinal Muscular Atrophy
Amyotrophic Lateral Sclerosis



Autoimmune Diseases

Systemic Lupus erythematosus
Rheumatoid Arthritis
Crohn's Disease
Diabetes mellitus
ALPS
Hashimoto Thyroiditis
Hyper eosinophilia

Liver Diseases

Viral Hepatitis
Acute Liver Failure
Alcoholic Hepatitis
Non-Alcoholic Steatohepatitis
Autoimmune Hepatitis
Primary Biliary Cirrhosis
Wilson's Disease

Microbial Infections

Hepatitis-B,C Virus
HIV
Human Herpesviruses
Salmonella spec
Pseudomonas aeruginosa
Yersinia flexneri
Helicobacter pylori
Legionella pneumophila
Staphylococcus spec.

DEREGULACE APOPTÓZY
...nadměrné spuštění vs. potlačení...

Heart Diseases

Myocardial Infarction
Congestive heart failure
Dilative cardiomyopathy

Lung Diseases

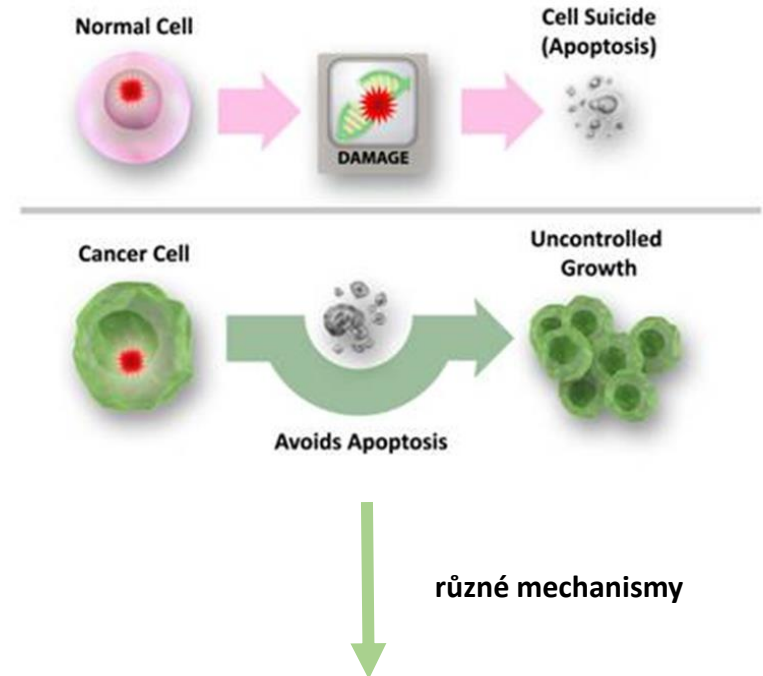
Asthma
Tuberculosis
Pulmonary fibrosis
Acute lung injury
Cystic fibrosis

Tumors

Solid Tumors
Leukemia
Lymphomas

Apoptóza a nádory

<http://holistichealthmastery.com>

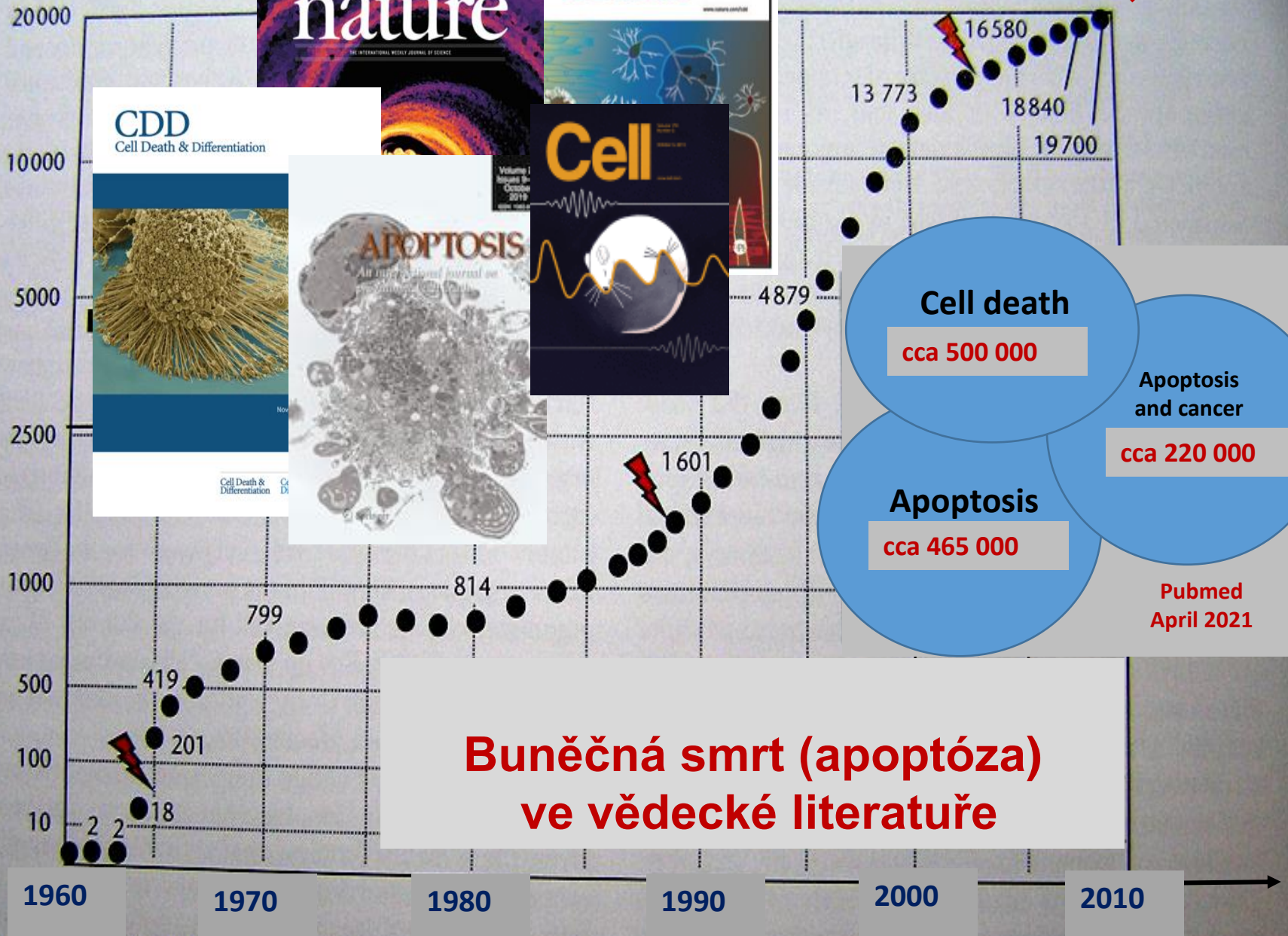


(Hannahan, Weinberg, 2011)

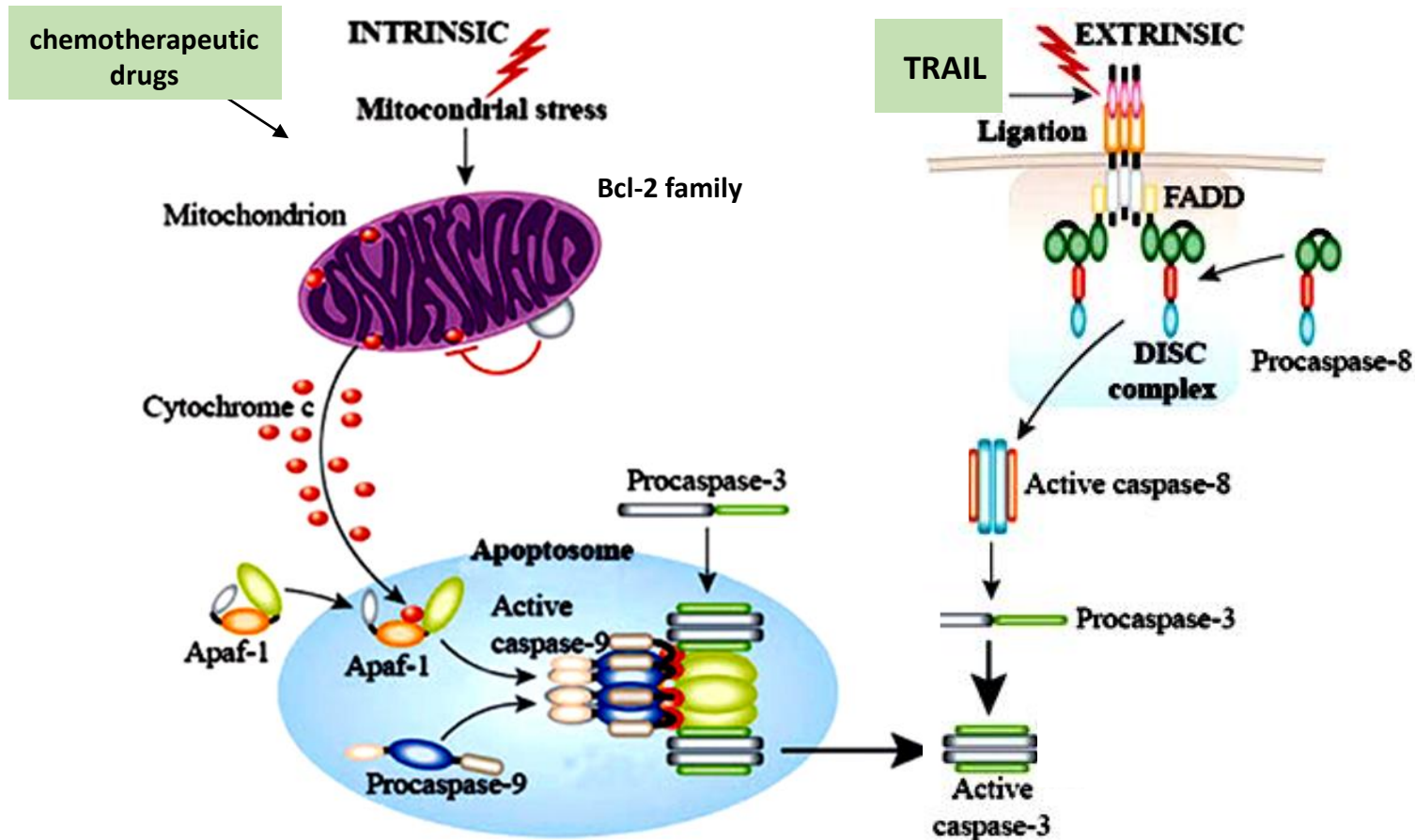
- **podpora vývoje nádoru**
- **rezistence k protinádorové terapii**

intenzivní výzkum apoptózy – nové poznatky - pokroky v léčbě nádorů?

počet publikací za rok



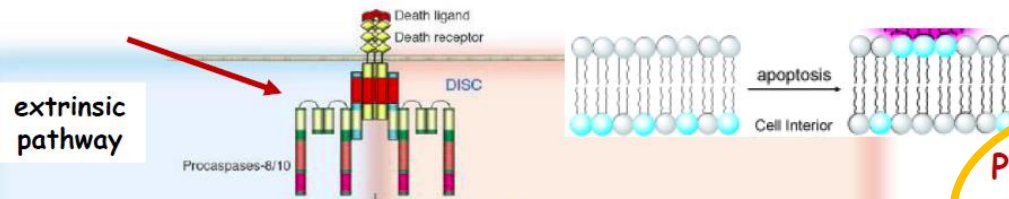
Jaké jsou konkrétní molekulární mechanismy zodpovědné za průběh apoptózy?



Metody detekce apoptózy

Detekce apoptózy na různých úrovních v buňce

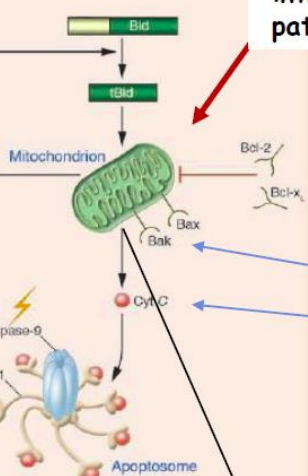
Detection of apoptosis



Plasma membrane-associated changes

- translocation of Phosphatidylserine

intrinsic pathway

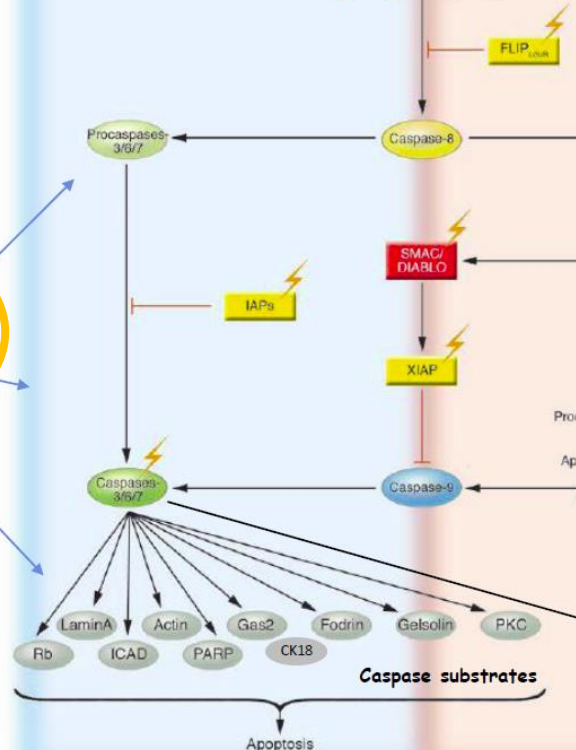


Stimulation of mitochondria

- Bax/Bak activation
- cytochrome c release

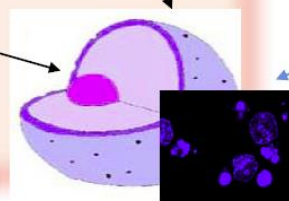
Caspase activation

- caspase cleavage
- endogenous caspase substrate cleavage
- specific exogenous substrate conversion



Nuclear changes

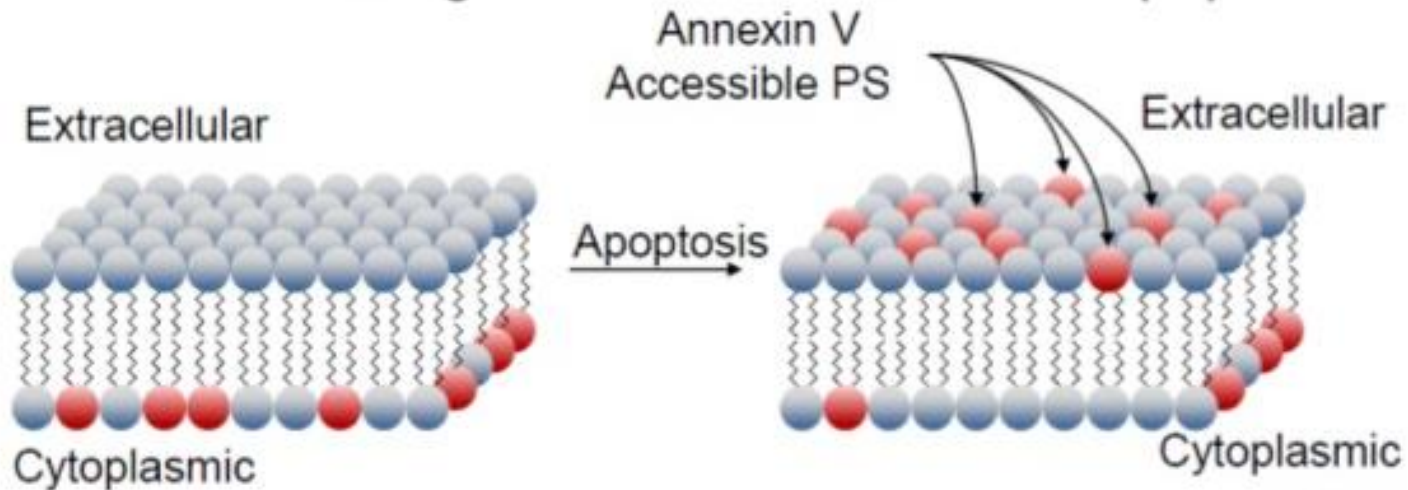
- DNA fragmentation
- activation of specific molecules



(modified according to Lavrik et al., 2005)

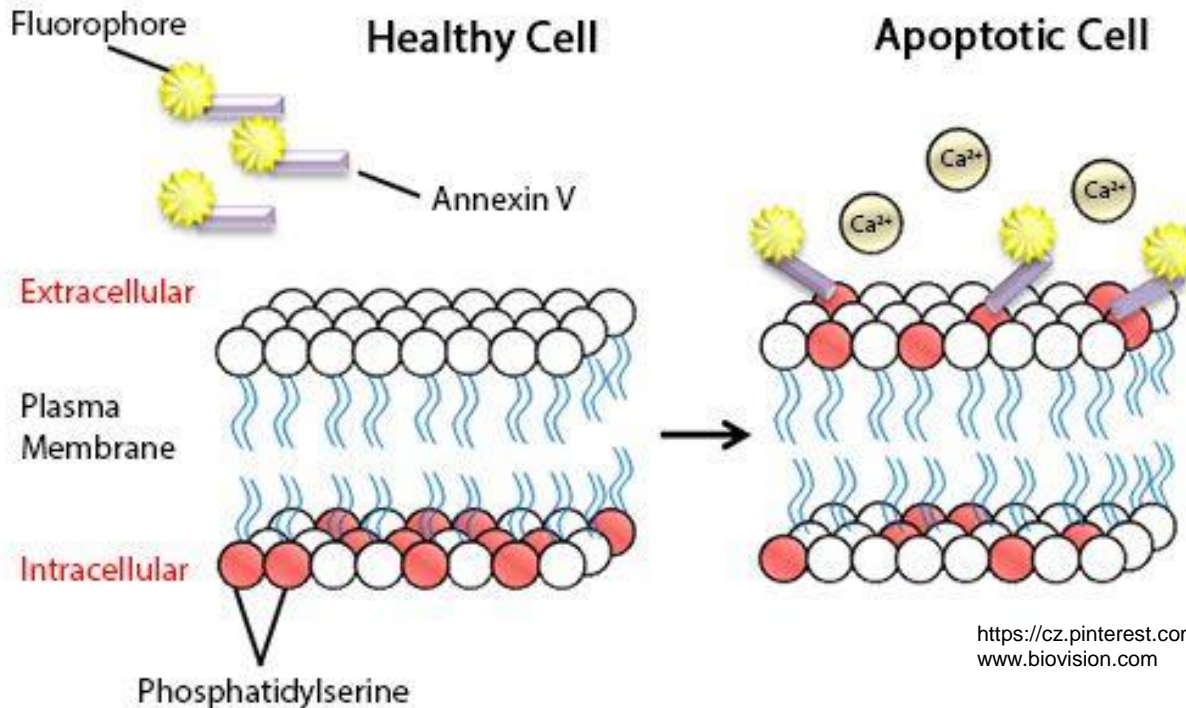
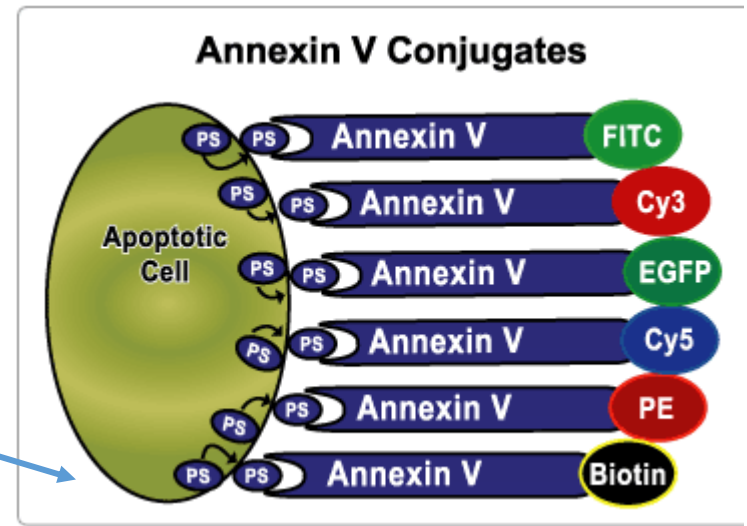
Detekce apoptózy a souvisejících změn na úrovni plazmatické membrány

- během apoptózy dochází k charakteristickým změnám v lokalizaci fosfatidylserinu v plazmatické membráně (translokace z vnitřní strany membrány na vnější)
 - translokovaný PS lze detekovat s využitím annexinu V (fluorescenčně značený)
 - průtoková cytometrie





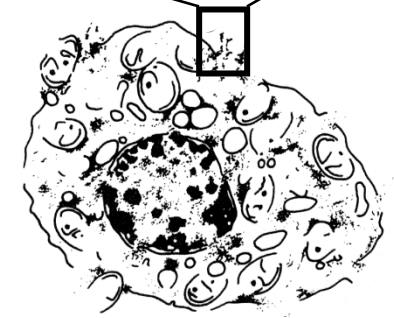
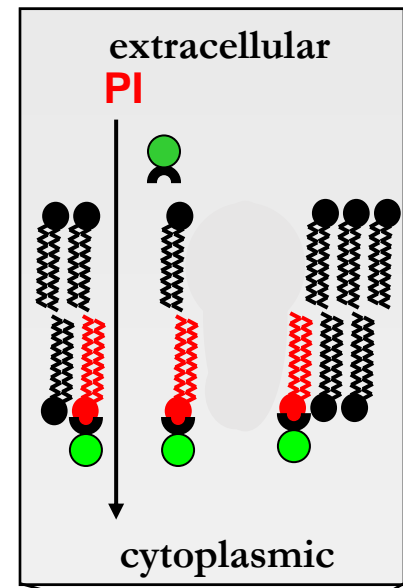
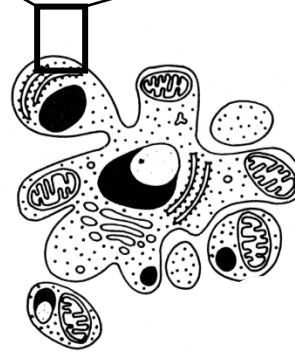
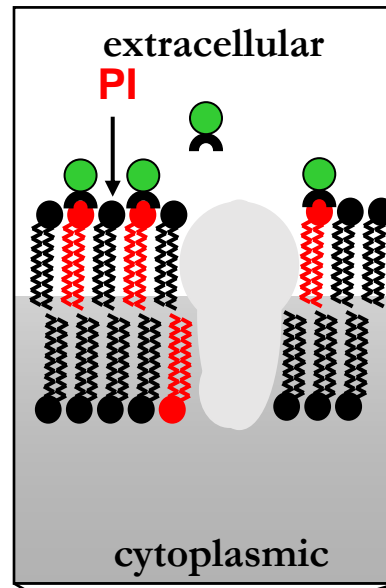
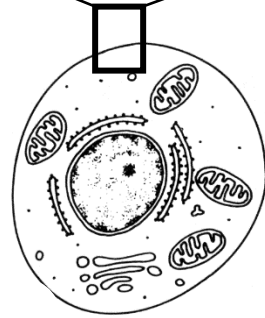
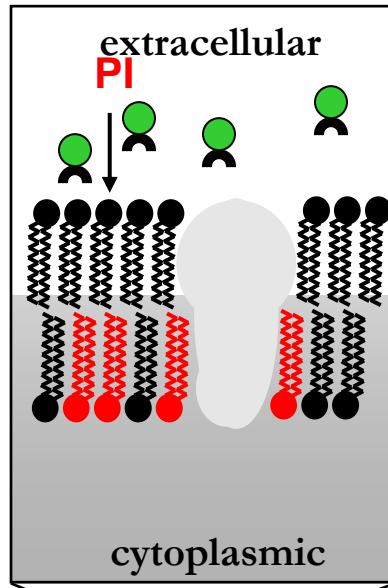
Annexin V

- protein with high affinity for PS
- PS binding dependent on calcium
- detection of membrane PS
- conjugation with fluorescence probes



Annexin V staining: phosphatidylserine exposure

 Annexin V-conjugate
 phosphatidylserine



staining

normal cell

apoptotic cell

necrotic cell

annexin V
 propidium iodide

-

+

+

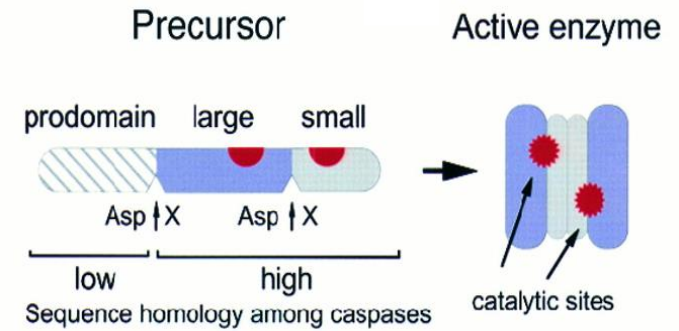
-

-

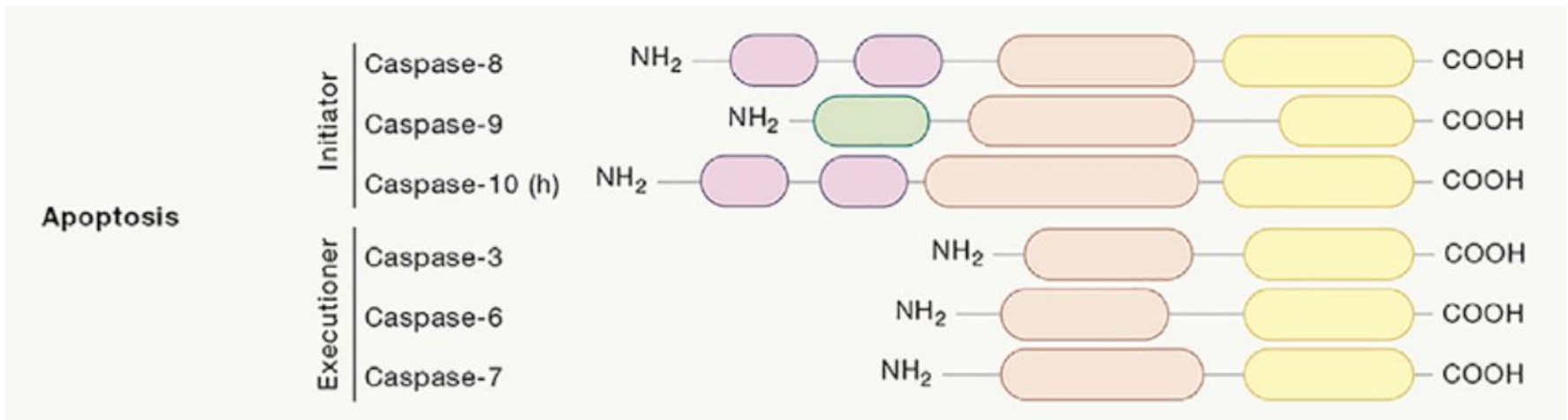
+

Kaspázy

- cysteinové proteázy, specificky štěpí proteinové substráty v místě kyseliny asparagové
- klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu
- v inaktivní formě (proenzymy, pro-kaspázy) v cytoplazmě
 - štěpením vzniká aktivní kaspáza schopná dále štěpit tzv. „death substráty“ a významně se tak podílet na šíření apoptotického signálu a exekuci apoptózy



(Thornberry, Lazebnik, 1999)



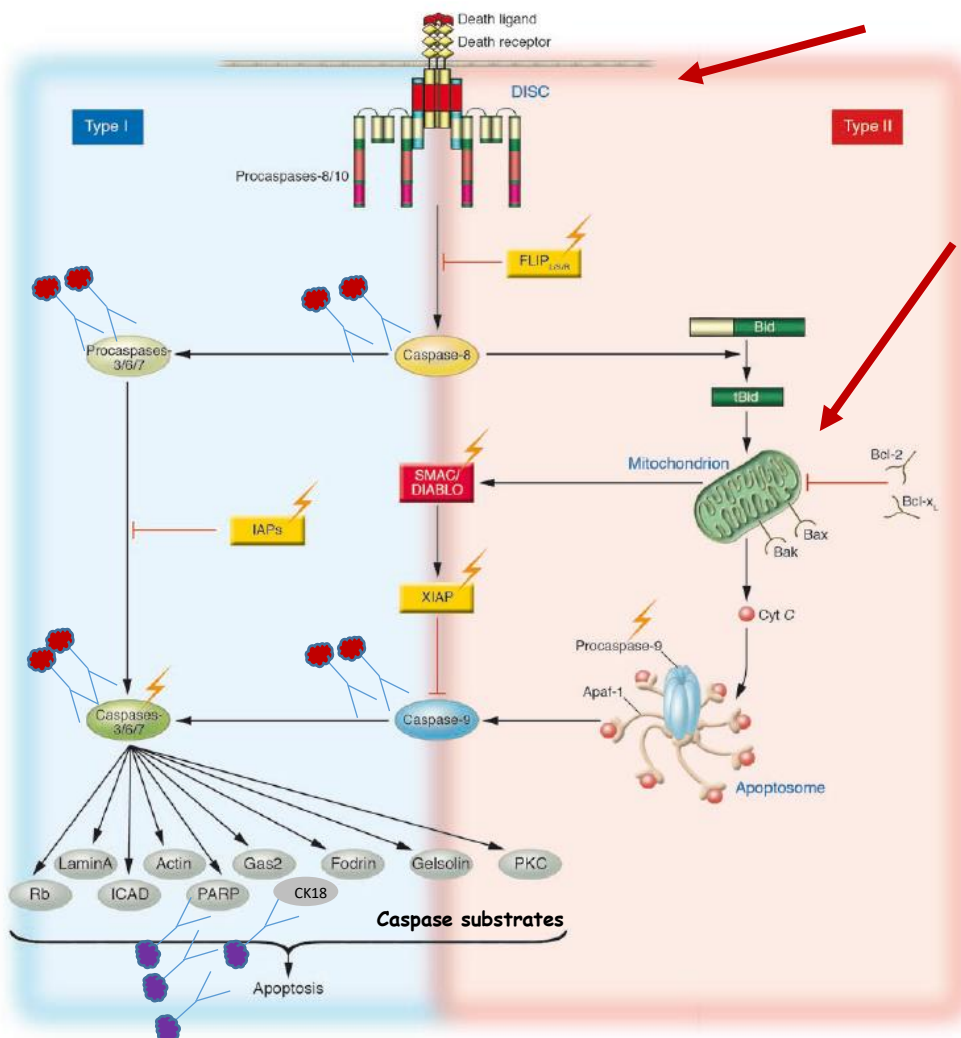
(Opendbosch, Lamkanfi, 2019)

Detekce aktivace kaspáz

ANTIBODIES

1. Antibody-based detection of specific caspase fragments

2. Antibody-based detection of endogenous caspase-substrate cleavage



(Lavrik et al., 2005)

SUBSTRATES/INHIBITORS

3. Labelled synthetic substrate-based detection of caspase activity

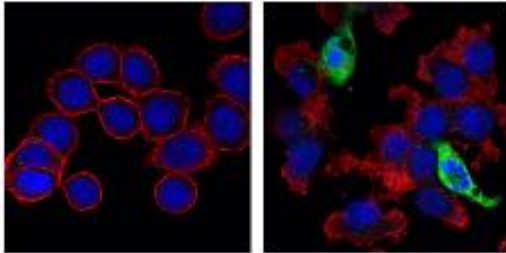
4. Labelled synthetic inhibitor-based detection of caspase activity

průtoková cytometrie
fluorescenční mikroskopie
fluorimetrie

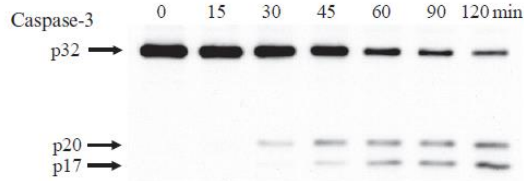
kaspázy jsou klíčové molekuly pro průběh apoptózy, stimulují apoptotické signálování a štěpí řadu substrátů – proteinů důležitých pro život buňky

Detection of caspase-3 cleavage

IF-IC

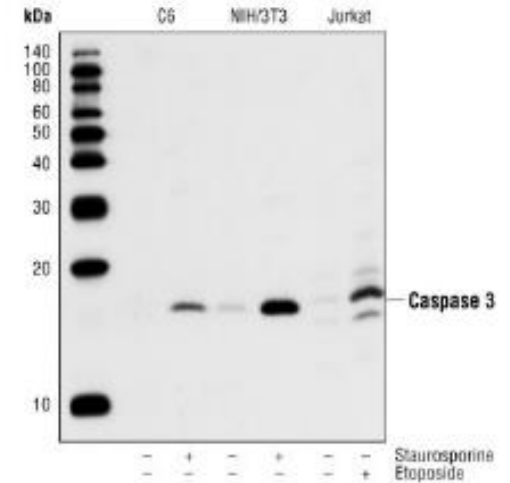


control and STS-treated HT-29 cells, cleaved caspase-3 (green), actin (red), nucleus (blue)



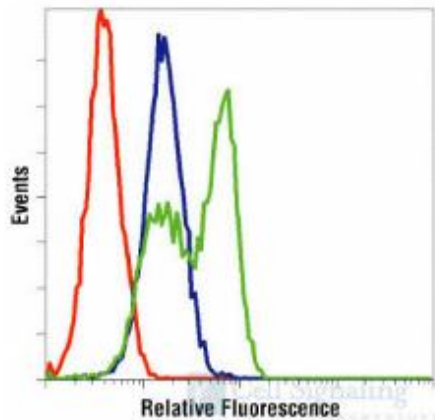
Jurkat cells, anti-Fas antibody

Western Blotting

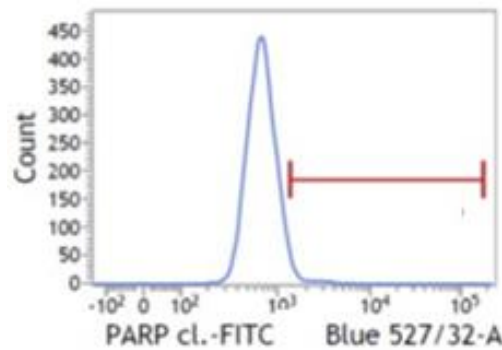


www.cellsignal.com

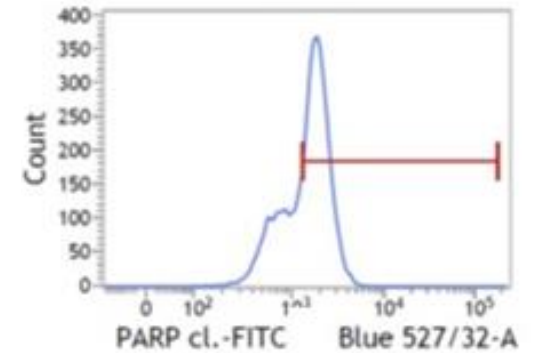
Flow Cytometry



control



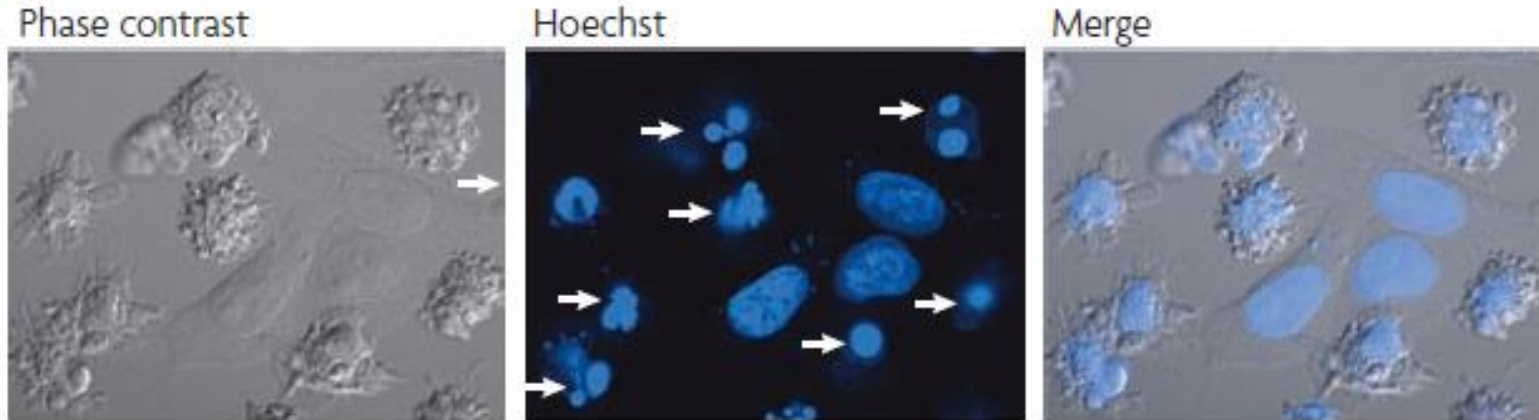
TRAIL



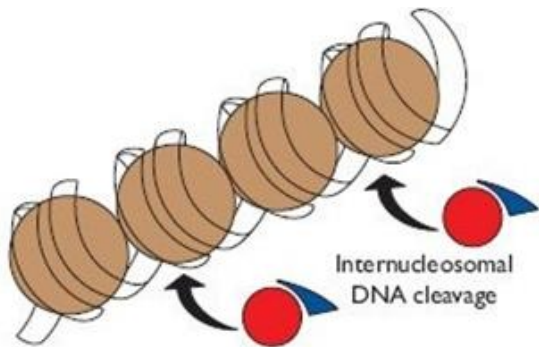
etoposide-treated (green) or untreated (blue) Jurkat cells, negative control (red)

Detekce apoptózy a souvisejících změn na úrovni jádra

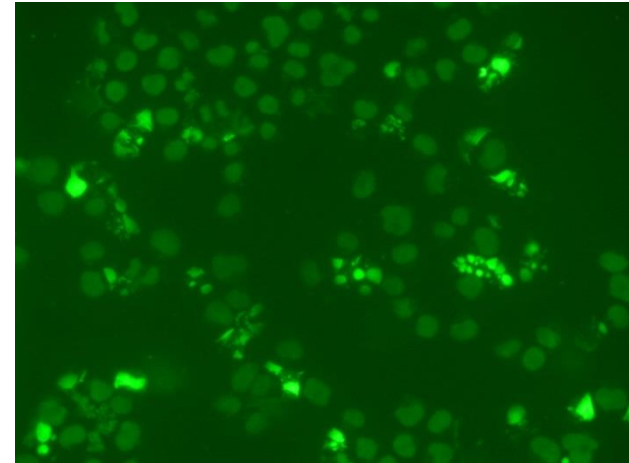
- kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu – morfologie jádra



- fragmentace jaderné DNA - TUNEL

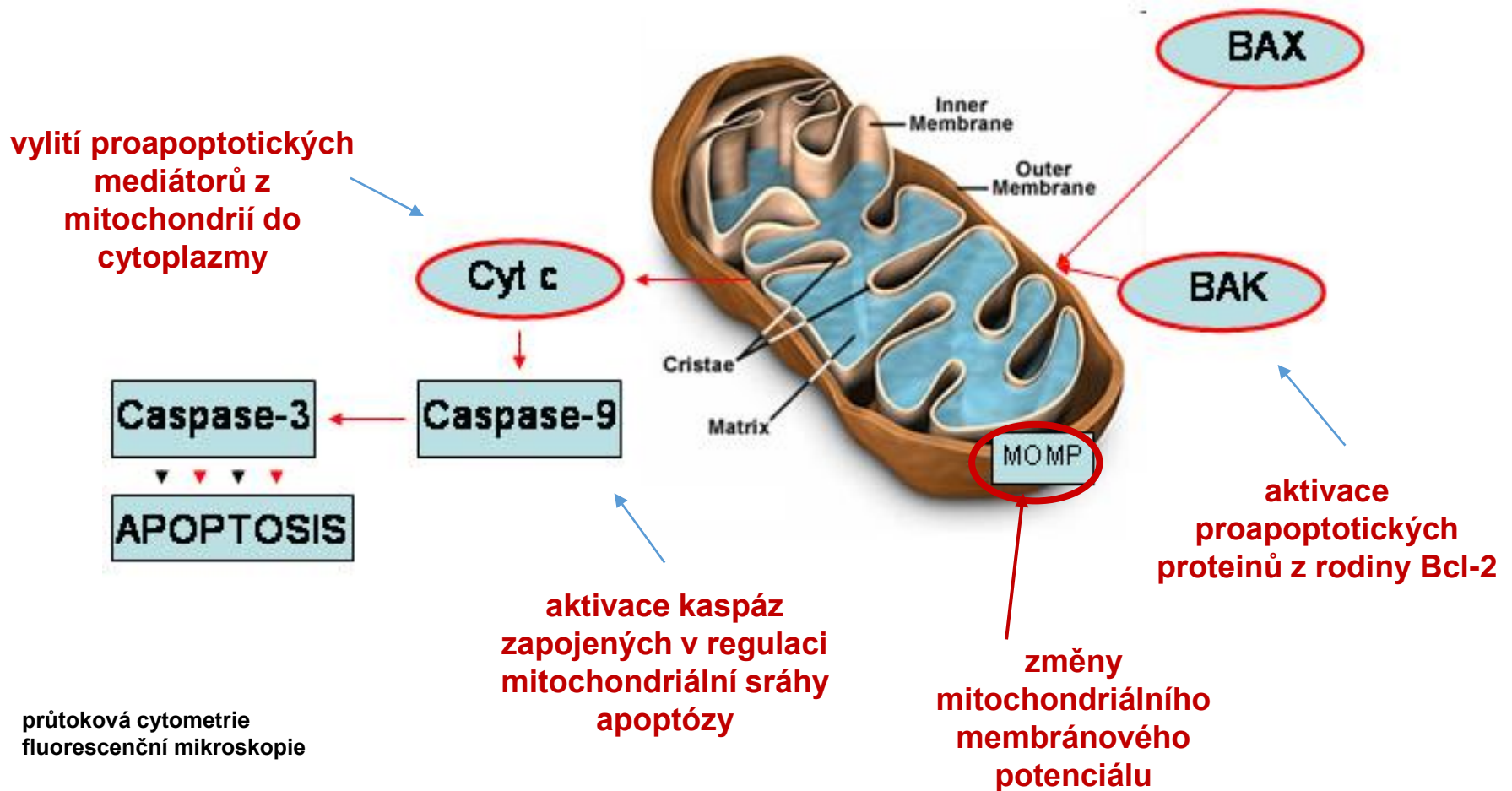


průtoková cytometrie
fluorescenční mikroskopie
agarózová elektroforéza

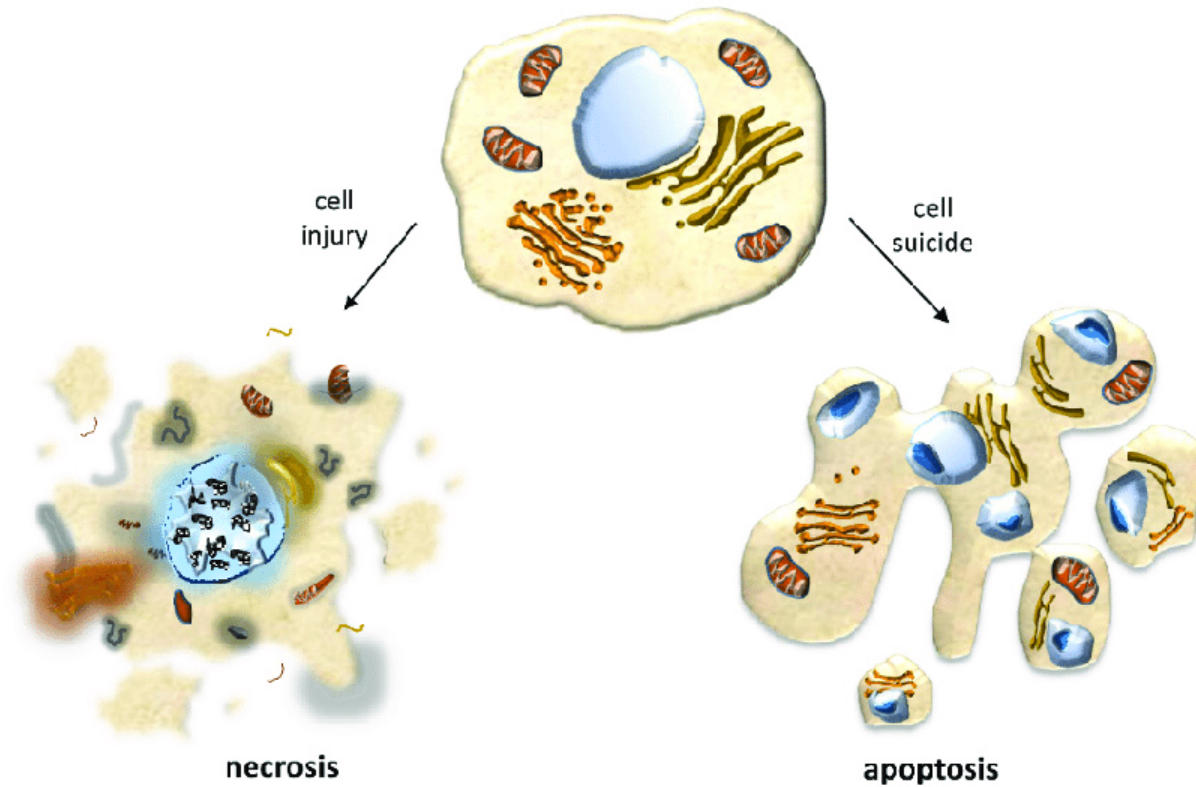


apoptosis of anti-Fas-treated HCT116 cells

Detekce apoptózy a souvisejících změn na úrovni mitochondrií



Nekróza versus apoptóza



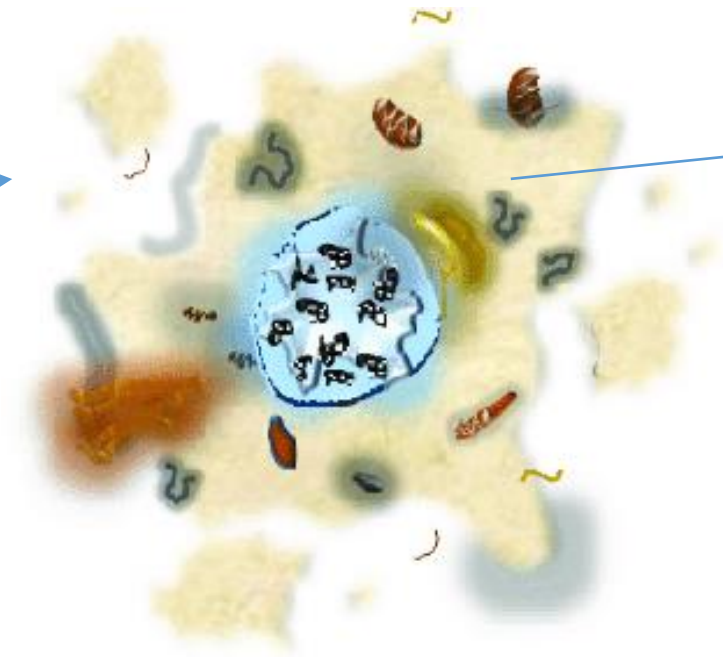
Loss of membrane integrity	Membrane blebbing, no loss of integrity
Begins with swelling of cytoplasm and mitochondria; ends with total cell lysis	Begins with shrinking of cytoplasm and condensation of nucleus; ends with the cell fragmentation into smaller bodies
Blebs form and the structure of the nucleus changes; no organelles are located in the blebs	The nucleus breaks apart, and DNA breaks into small regular pieces. The organelles are located in the blebs
The cell membrane breaks and releases the cell contents.	The cell membrane breaks into several apoptotic bodies.

Nekróza – možnosti detekce

morfologie

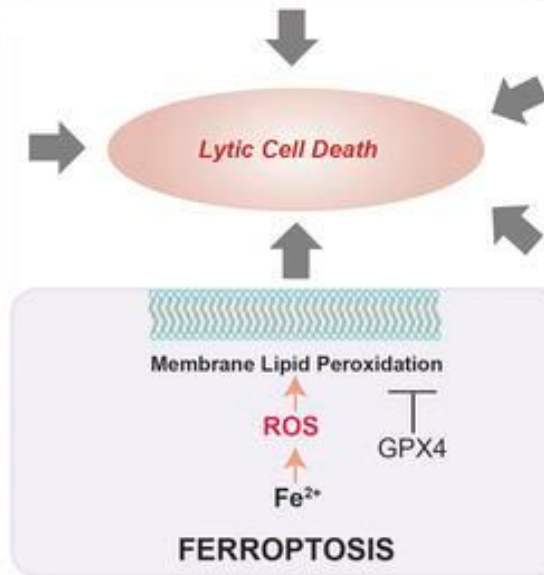
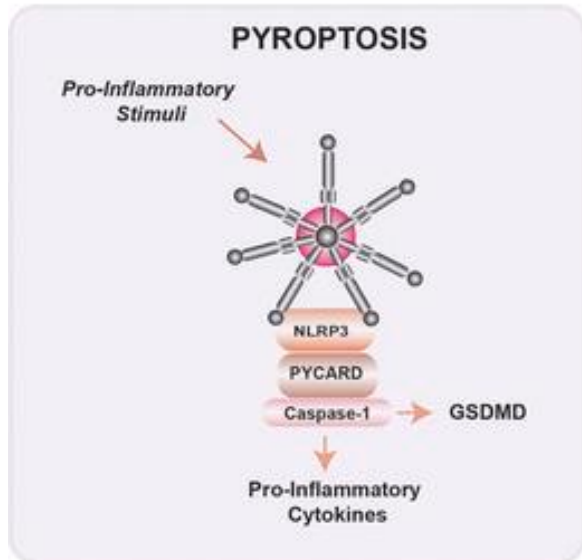
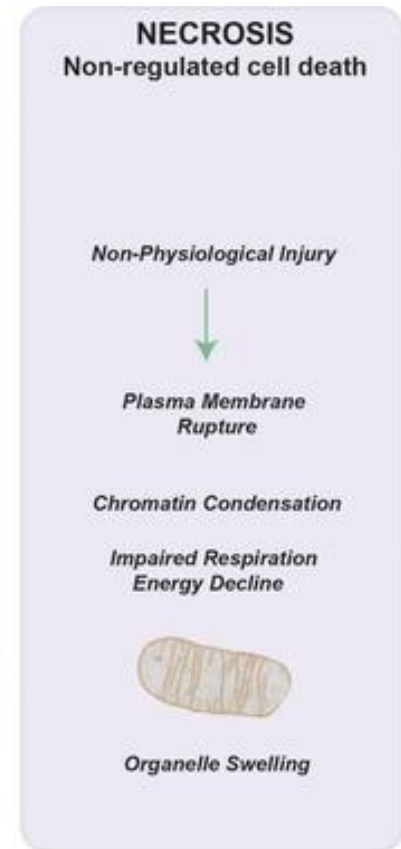
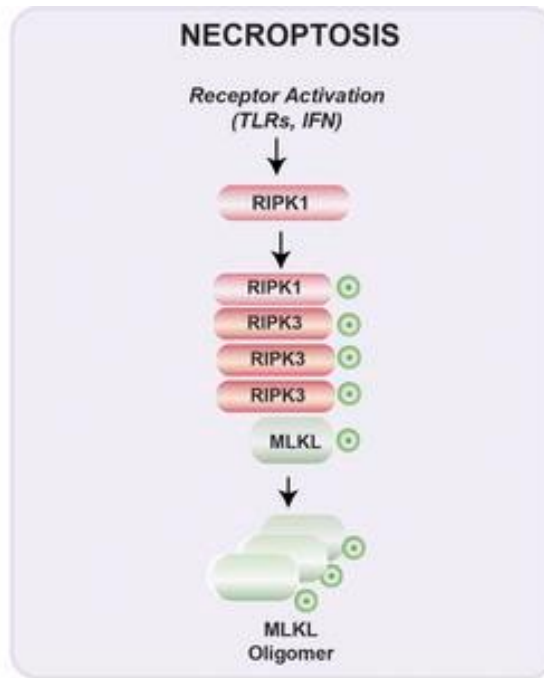
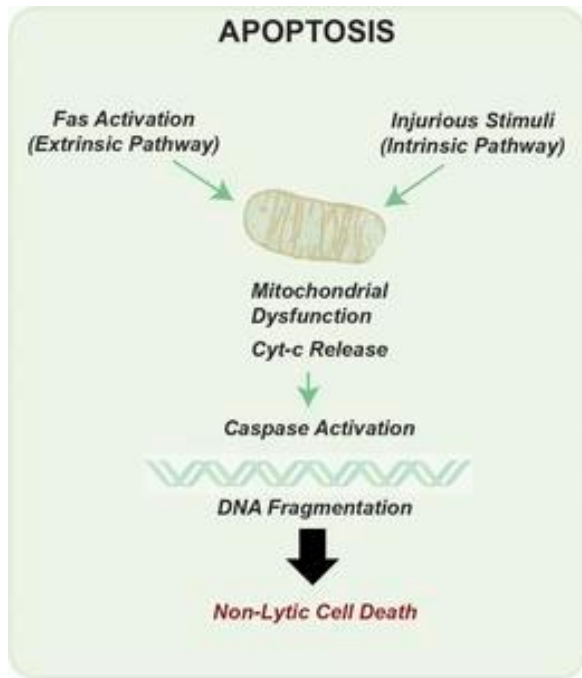
vitální barvení

eosin
trypanová modř
propidium jodid
DAPI
7-AAD
Sytox Blue/Red
Live/Dead
....



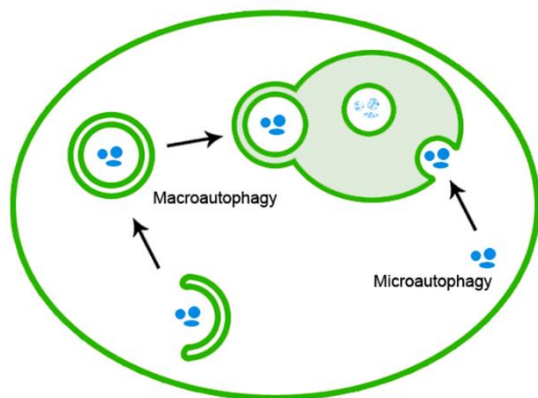
vylití proteinů z buňky

LDH
G6PDH
HMGB1
prokaspázy
substráty
kaspáz
....



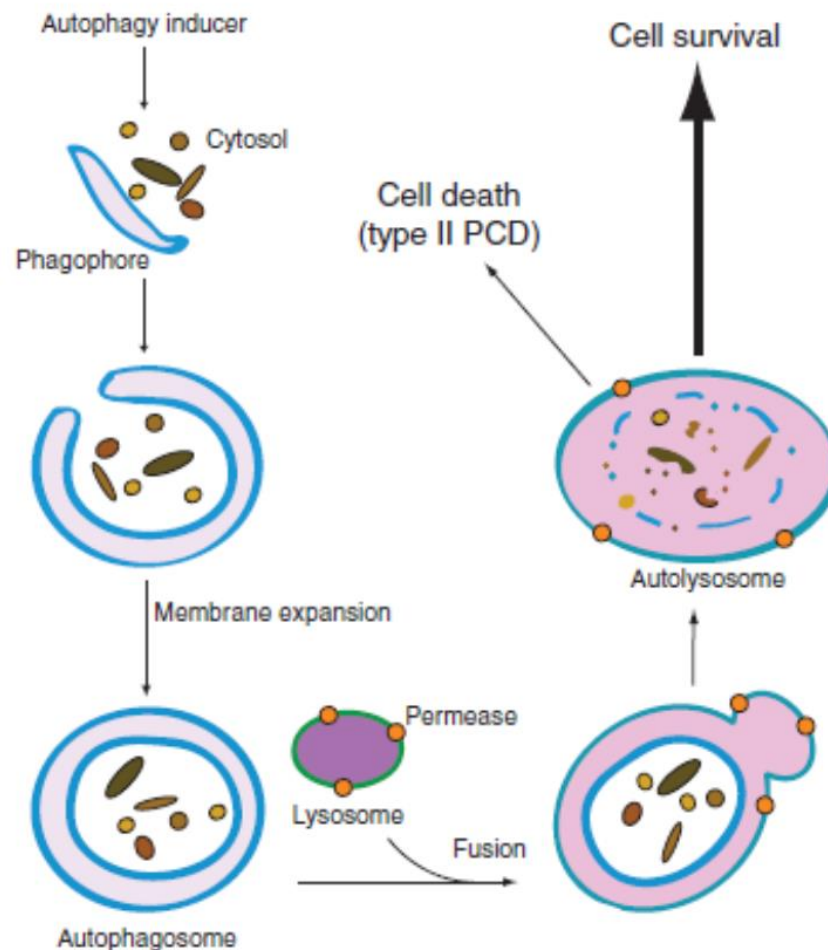
Autofagie (makroautofagie)

- „eating oneself“, katabolický proces, degradace buněčných složek s využitím lysosomů
- dynamický, regulovaný, evolučně konzervovaný proces u eukaryotických buněk (kvasinky – člověk)
- v závislosti na podmínkách může působit jako:
 - **mechanismus zajišťující přežit**
 - **mechanismus buněčné smrti**



(www.wikimedia.org)

(Chen, Klionsky 2012)

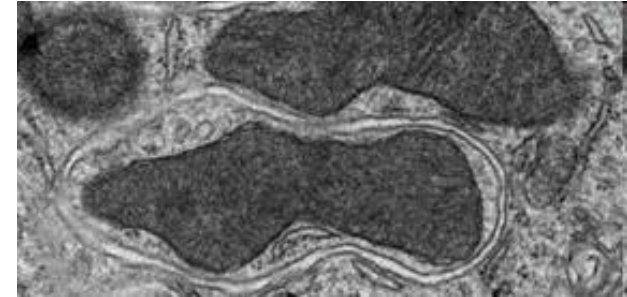
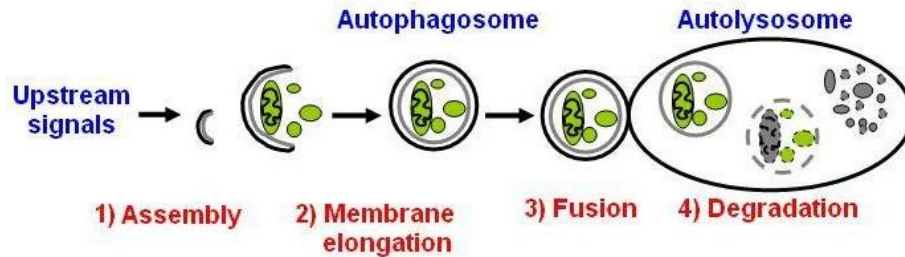


Autofagie

morphologické znaky

■ formace autofagozomů

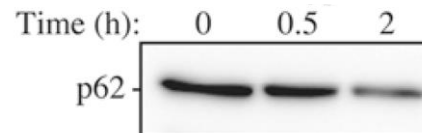
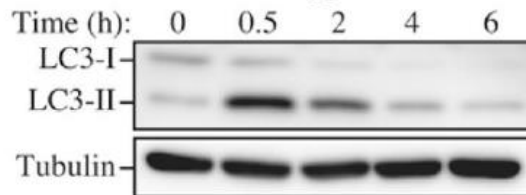
– (dvoumembránové útvary, elektronová mikroskopie)



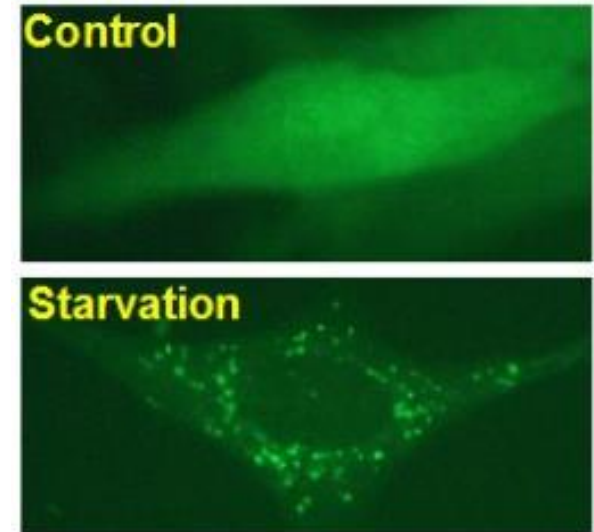
<http://myweb.sabanciuniv.edu/dgozuacik/research/>

biochemické znaky

- **lipidace proteinu LC3** (western blotting)
- **relokalizace LC3-GFP** (fluorescenční mikroskopie)
- **degradace p62** (western blotting)



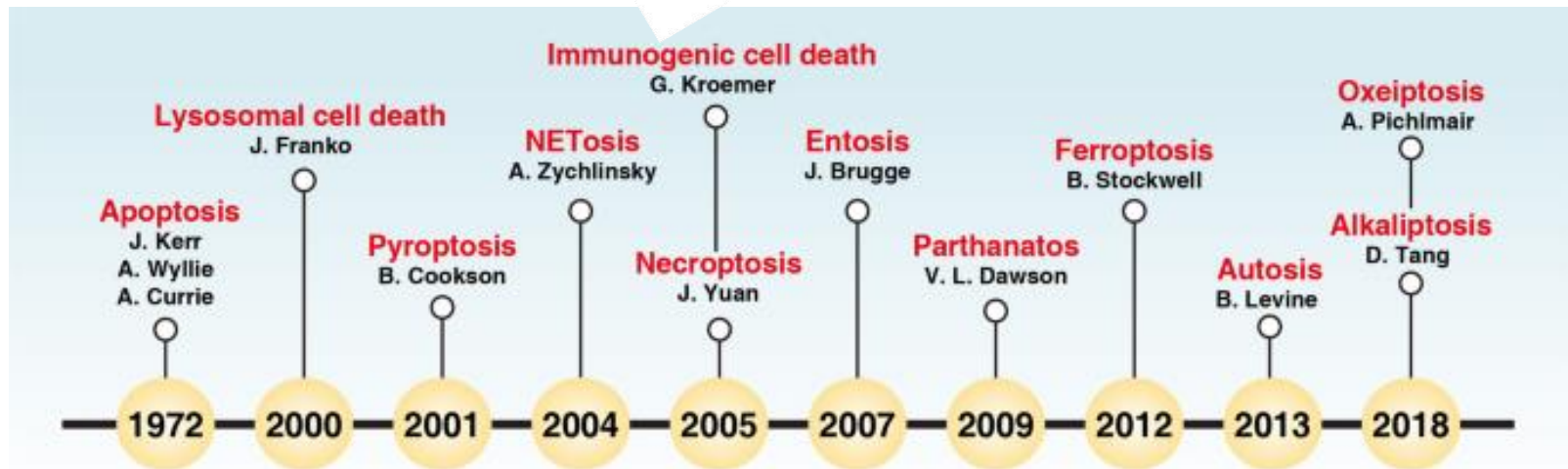
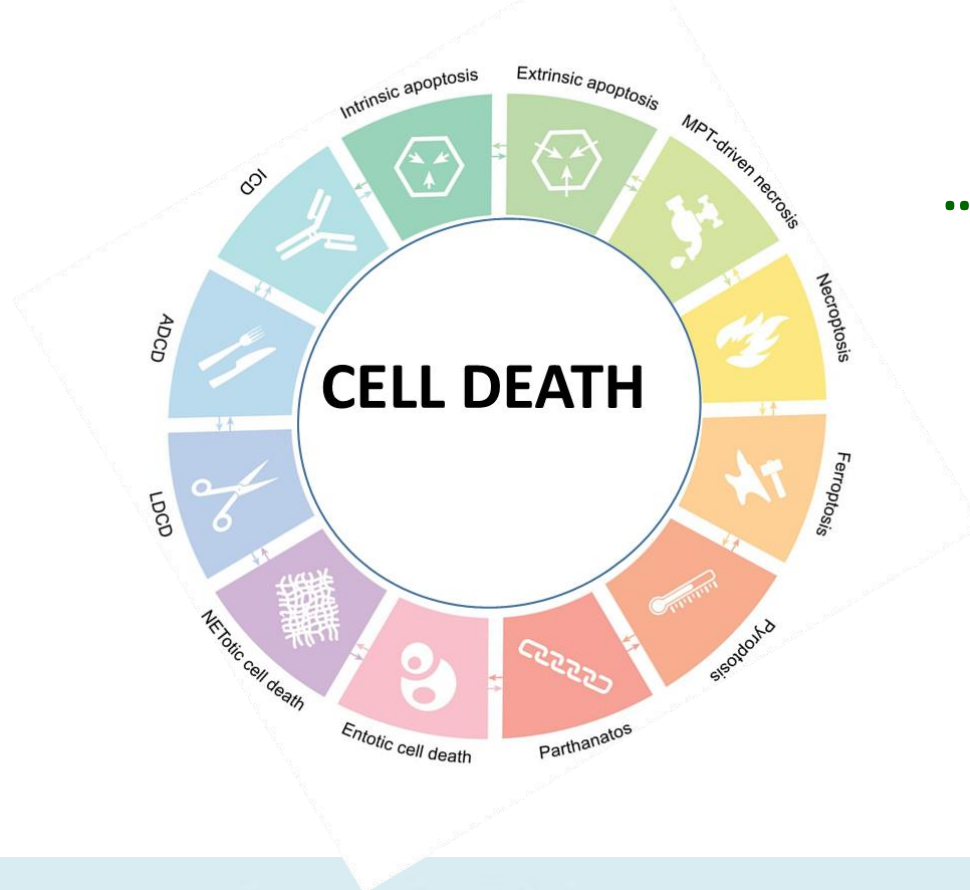
nedostatek živin, hladovění



(Klionsky et al., 2009)

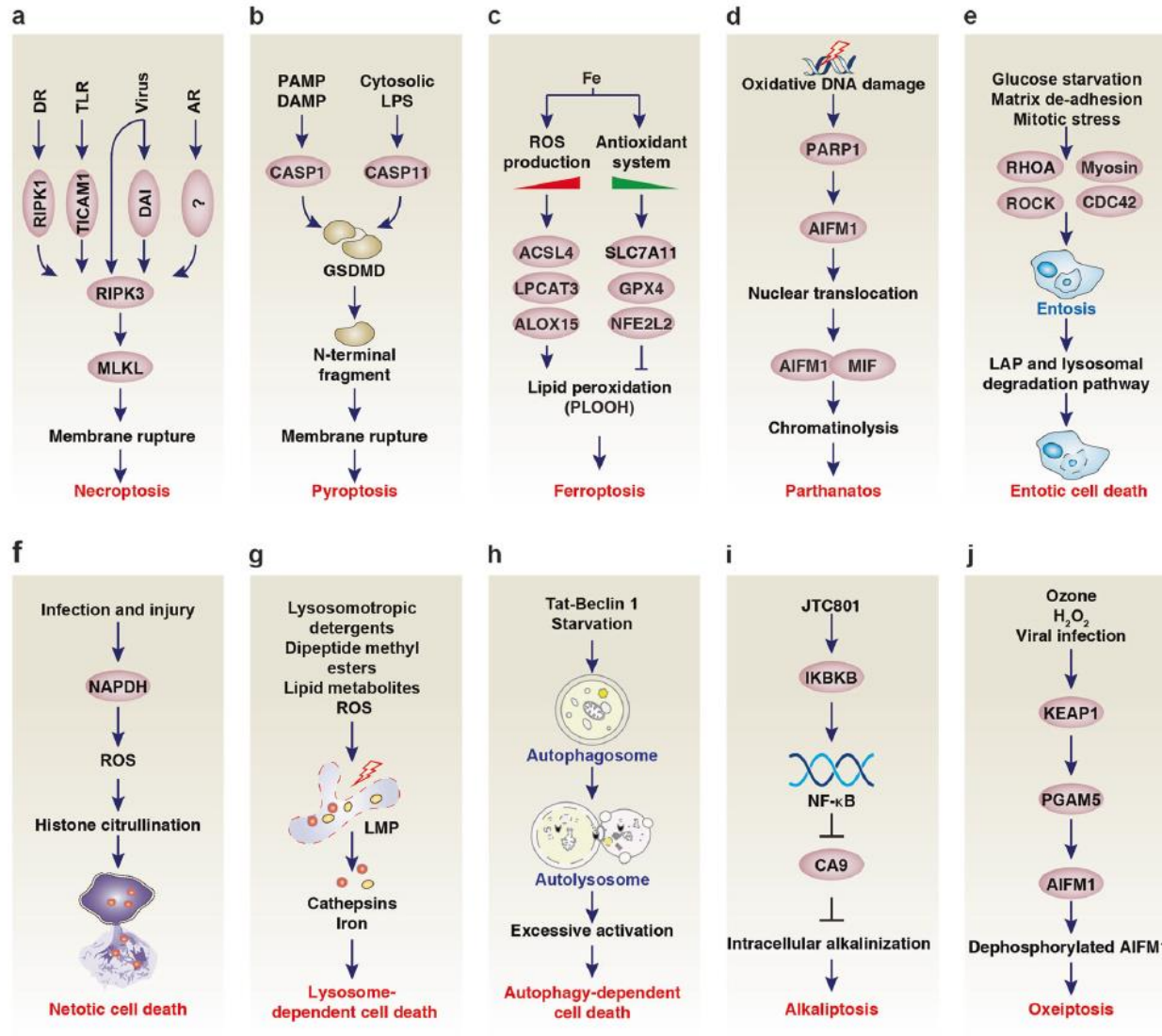
Other types...

...of cell death



Jaké jsou konkrétní molekulární mechanismy zodpovědné za průběh buněčné smrti?

JINÉ NEŽ APOPTÓZA:



Kdy je možné považovat buňku za mrtvou?

- **pokud je splněno alespoň jedno z těchto kritérií:**
 - **poškozená integrita plazmatické membrány**
 - **fragmentace buňky včetně jádra**
 - **buňky nebo jejich fragmenty pohlceny okolními buňkami**

- **za těchto podmínek už není „cesty zpět“ ...**

Jakou zvolit konkrétní metodu?

Oddělení cytogenetiky
(Biofyzikální ústav AV ČR Brno)

modern methods of
cell and molecular biology

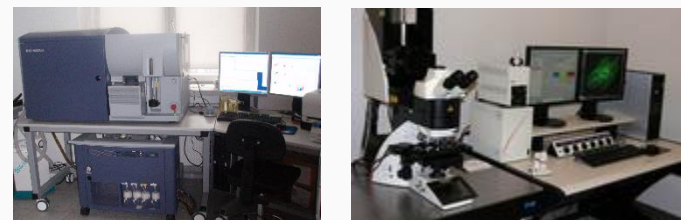


cancer cell

DEATH



modern methods of
analytical cytometry



flow cytometry
confocal microscopy...

molecular mechanisms of:
- cancer cell death
- anticancer drug action



novel therapeutic strategies



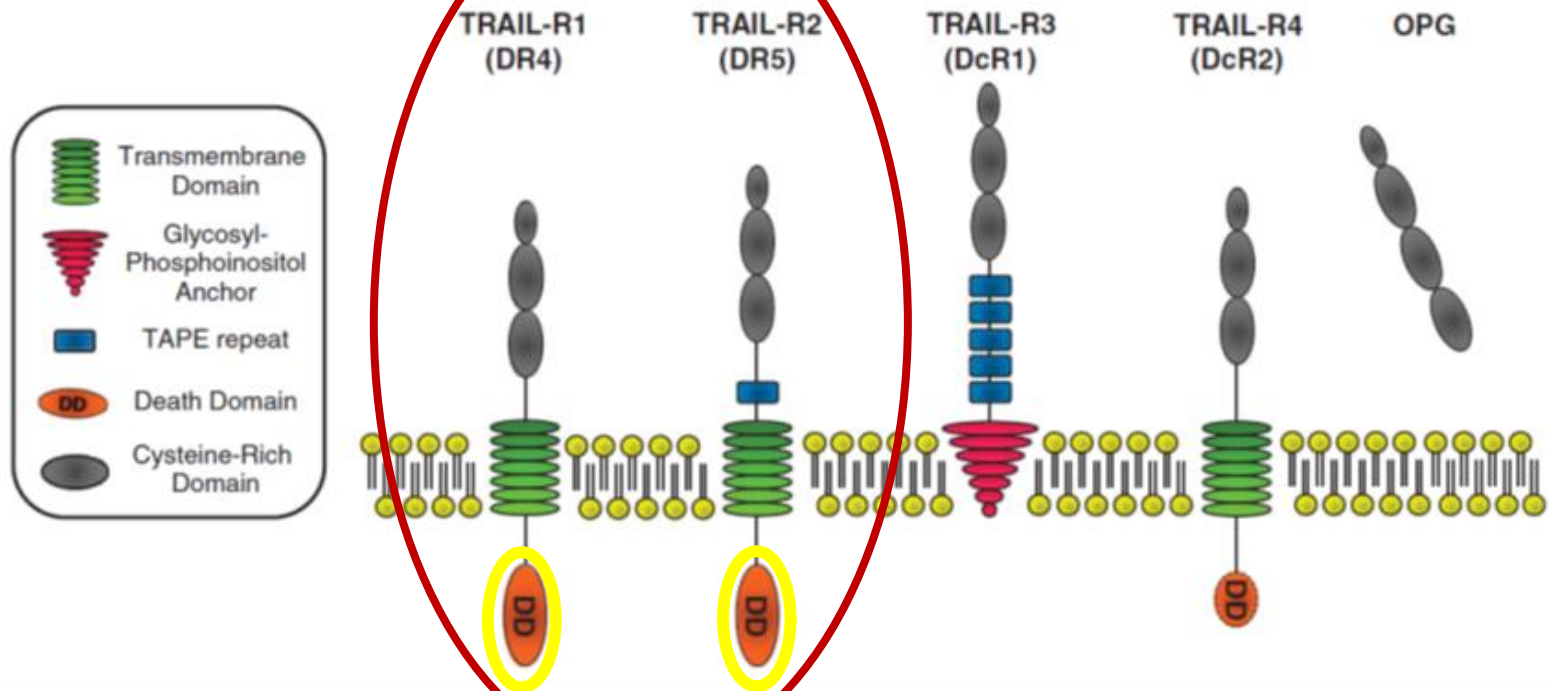
Oddělení cytogenetiky



Modelové příklady

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)

- člen rodiny TNF, objeven v roce 1995, na základě sekvenční homologie s TNF α and CD95L
(Pitti *et al*, 1996; Wiley *et al*, 1995)
- selektivní induktor apoptózy u nádorových buněk, *in vitro* a *in vivo*
(Ashkenazi *et al*, 1999; Walczak *et al*, 1999)
- spuštění apoptózy **nezávisle na p53** (Ravi *et al*, 2004)

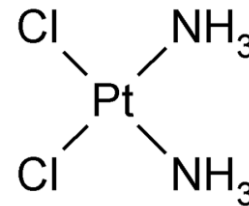


(Lemke & Walczak, 2014)

Platinové komplexy

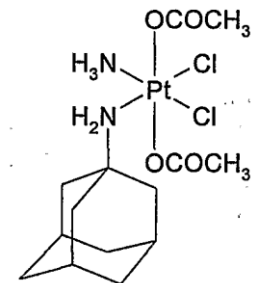
cisplatina

- **cis-diamminedichloroplatinum(II)**
- desetiletí v klinice
 - léčba řady typů nádorů
 - mechanismy ne zcela objasněny
- vážné vedlejší účinky
- problém rezistence některých nádorů



LA-12

- **(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloro platinum(IV)**
- překonává rezistenci k cisplatině u některých typů nádorových buněk
 - (Kozubik et al., 2005; Horváth et al., 2006)
- vyšší účinnost než jiné platinové komplexy u nádorů tlustého střeva
 - (Svihalkova Sindlerova et al., 2010)
- více lipofilní, snadnější vstup do buňky
 - (Kvardova et al., 2010)
- specificky moduluje průchod buněčným cyklem nádorových buněk
 - (Horvath et al., 2007; Vondalova Blanarova et al., 2013)
- úloha specifických molekul v regulaci jejího cytotoxického působení
 - p53, p21 (Vondalova Blanarova et al., 2013; Roubalova et al., 2010)
 - PTEN (Laukova et al., 2015)
 - Chk1 (Herudkova et al., 2017)



(Žák et al., 2004)

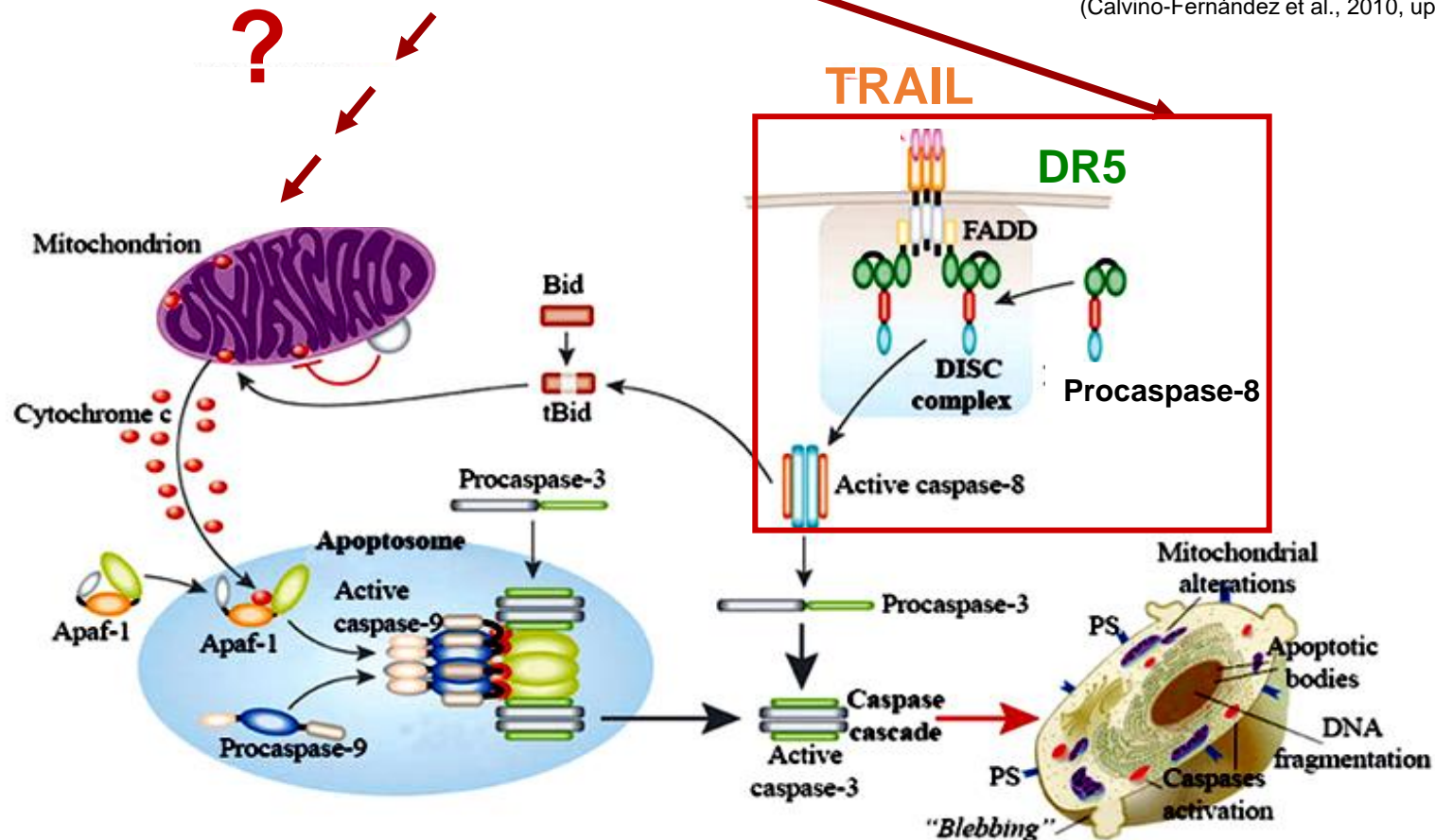
Cisplatin and a potent platinum(IV) complex-mediated enhancement of TRAIL-induced cancer cells killing is associated with modulation of upstream events in the extrinsic apoptotic pathway

Carcinogenesis vol.32 no.1 pp.42–51, 2011
doi:10.1093/carcin/bgq220
Advance Access publication October 29, 2010

Olga Vondálová Blanářová[†], Iva Jelínková[†], Árpád Szöör^{1,†},
Belma Skender, Karel Souček, Viktor Horváth,
Alena Vaculová, Ladislav Anděra², Petr Sova³,
János Szöllösi¹, Jiřina Hofmanová, György Vereb¹ and Alois
Kozubík*

**cisplatin
LA-12**

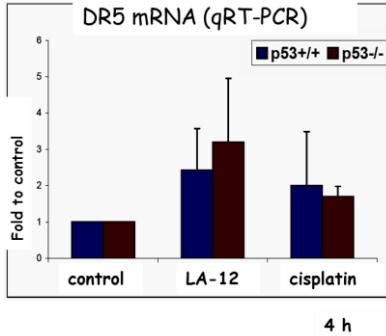
(Calvino-Fernández et al., 2010, upraveno)



LA-12 – zcitlivění nádorových buněk tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem – mechanismus?

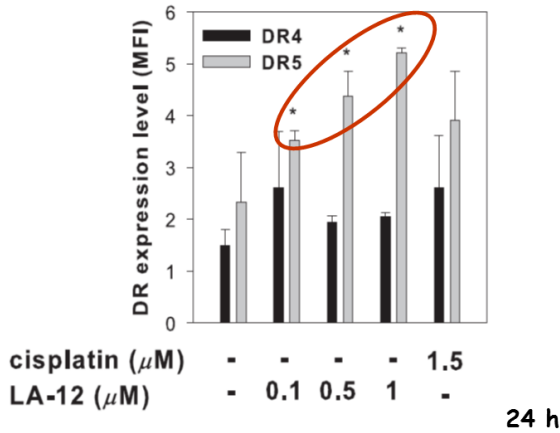
cisplatina LA-12

↑ DR5 mRNA



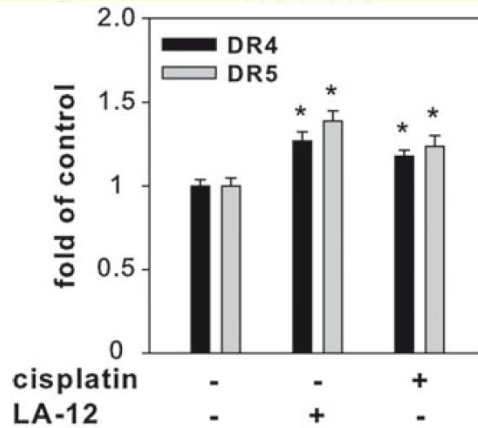
DR5 mRNA, qRT-PCR

↑ DR5 na povrchu buňky

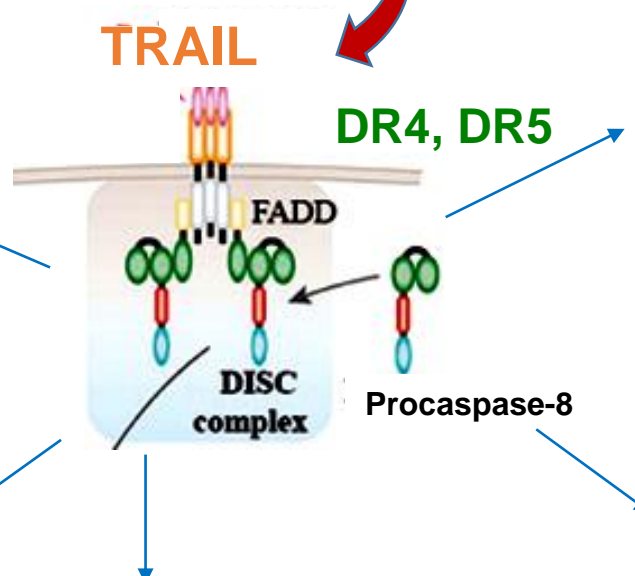


povrchový DR4/5, průtoková cytometrie

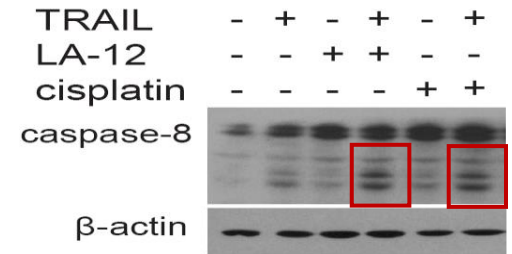
↑ lokalizace DR v lipidových raftech



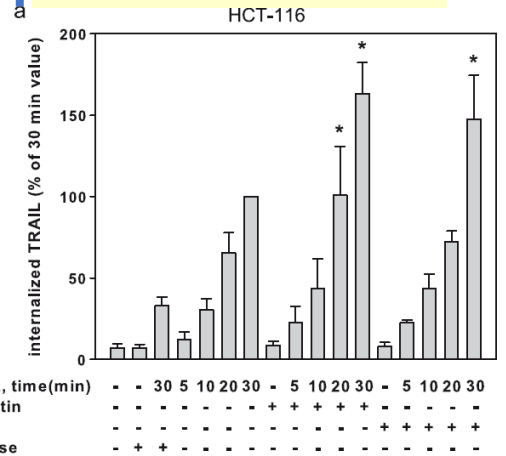
kolokalizace DR4/5 a LR, fluorescenční mikroskopie



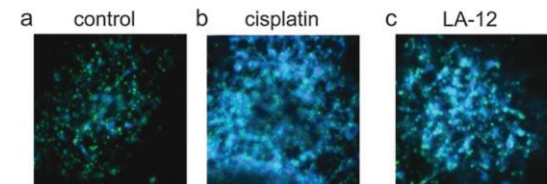
↑ aktivace kaspázy-8 a tvorba komplexu DISC (IPs)



↑ internalizace TRAILu



internalizace značeného TRAILu, průtoková cytometrie

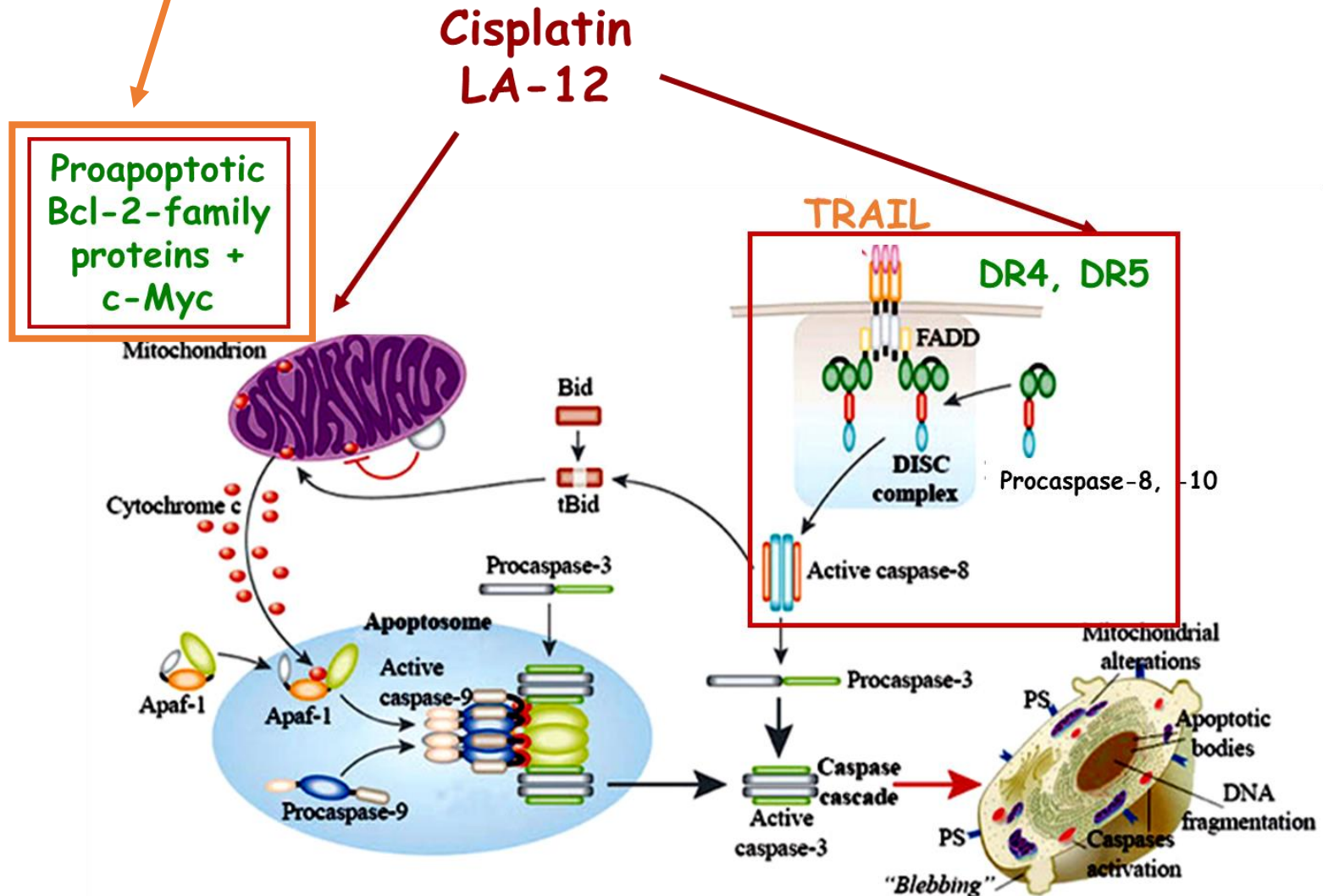


DR5 in LRs

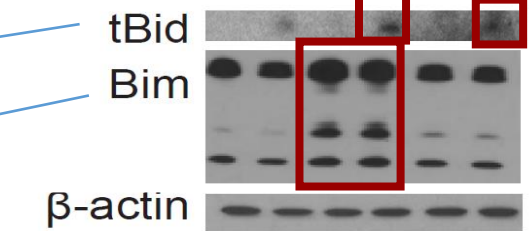
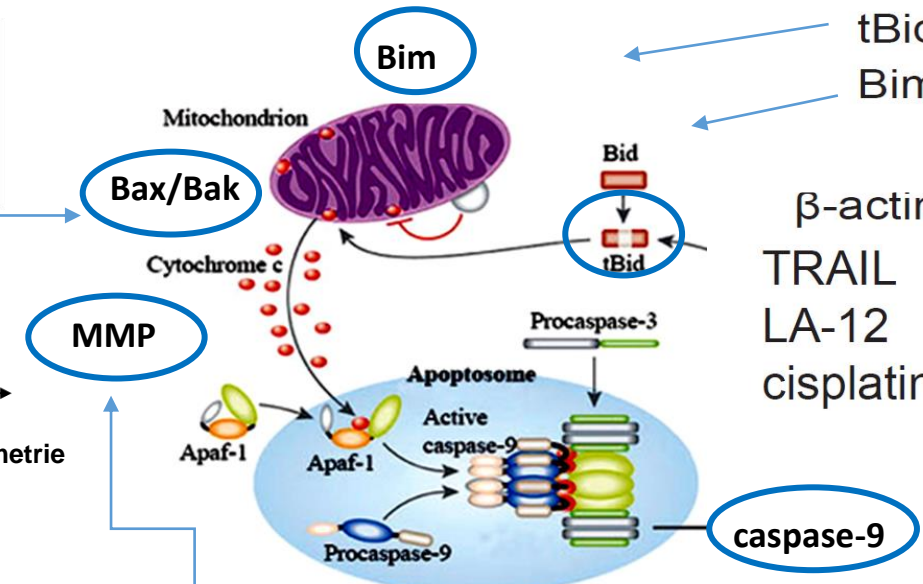
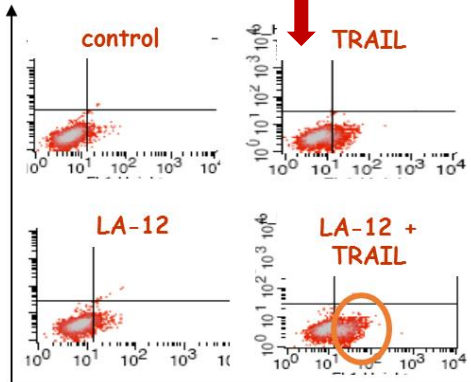
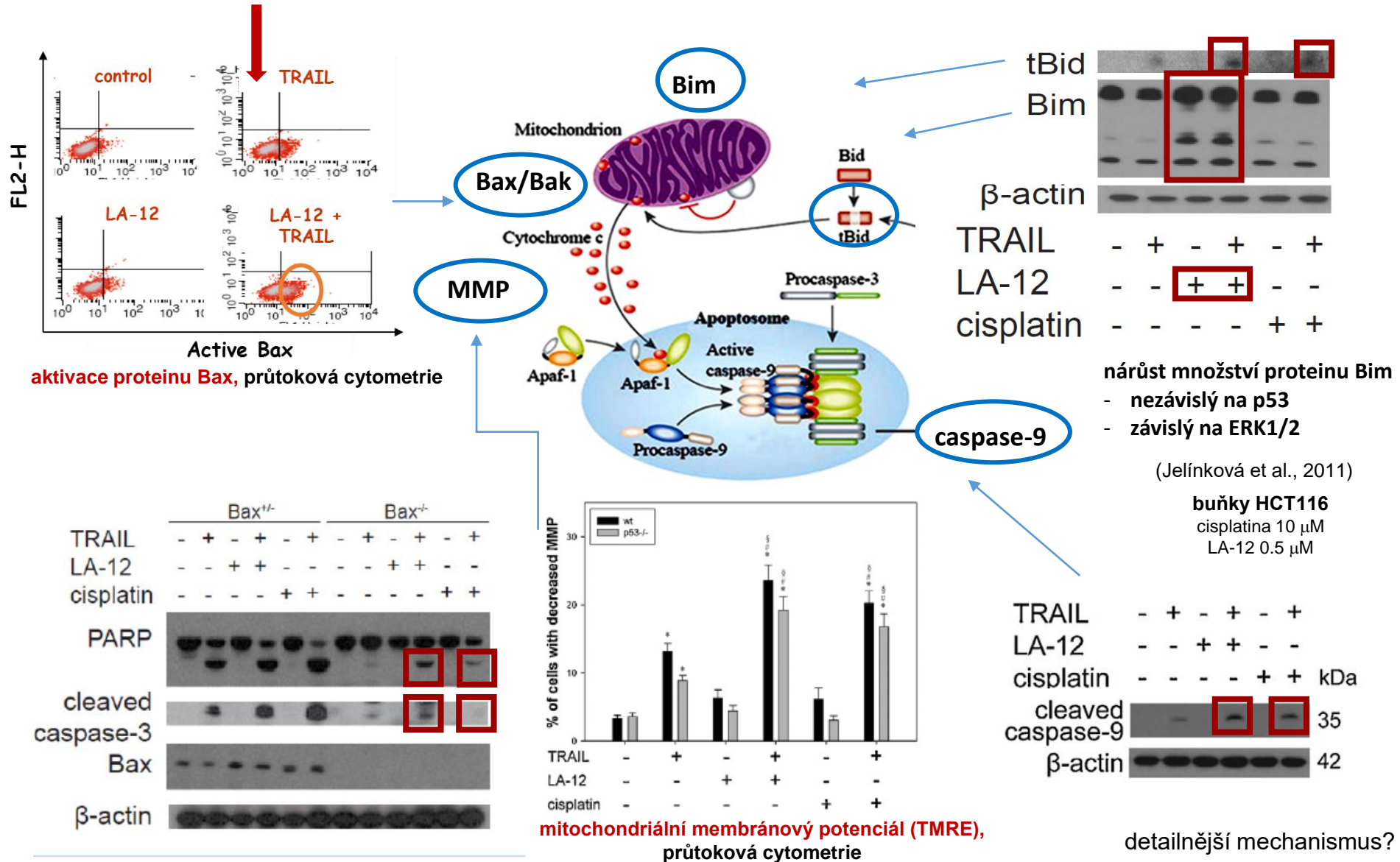


Platinum(IV) complex LA-12 exerts higher ability than cisplatin to enhance TRAIL-induced cancer cell apoptosis via stimulation of mitochondrial pathway

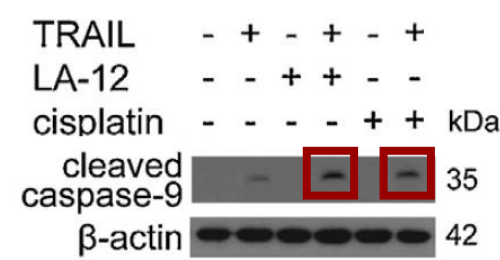
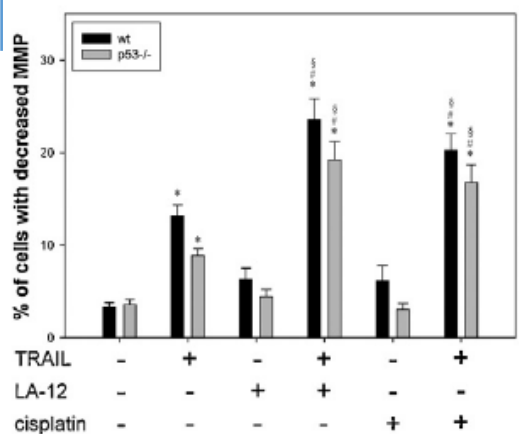
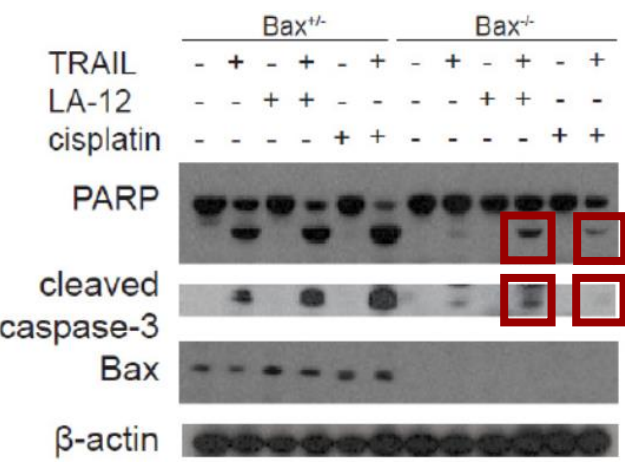
Iva Jelínková^{a,b}, Barbora Šafaříková^{a,b}, Olga Vondálová Blanářová^a, Belma Skender^{a,b}, Jiřina Hofmanová^{a,b}, Petr Sova^c, Mary Pat Moyer^d, Alois Kozubík^{a,b}, Zdeněk Kolář^e, Jiří Ehrmann^e, Alena Hyršlová Vaculová^{a,f,*}



Klíčová úloha mitochondrií a proteinu Bax v posílení apoptózy indukované TRAILem prostřednictvím platinových látek



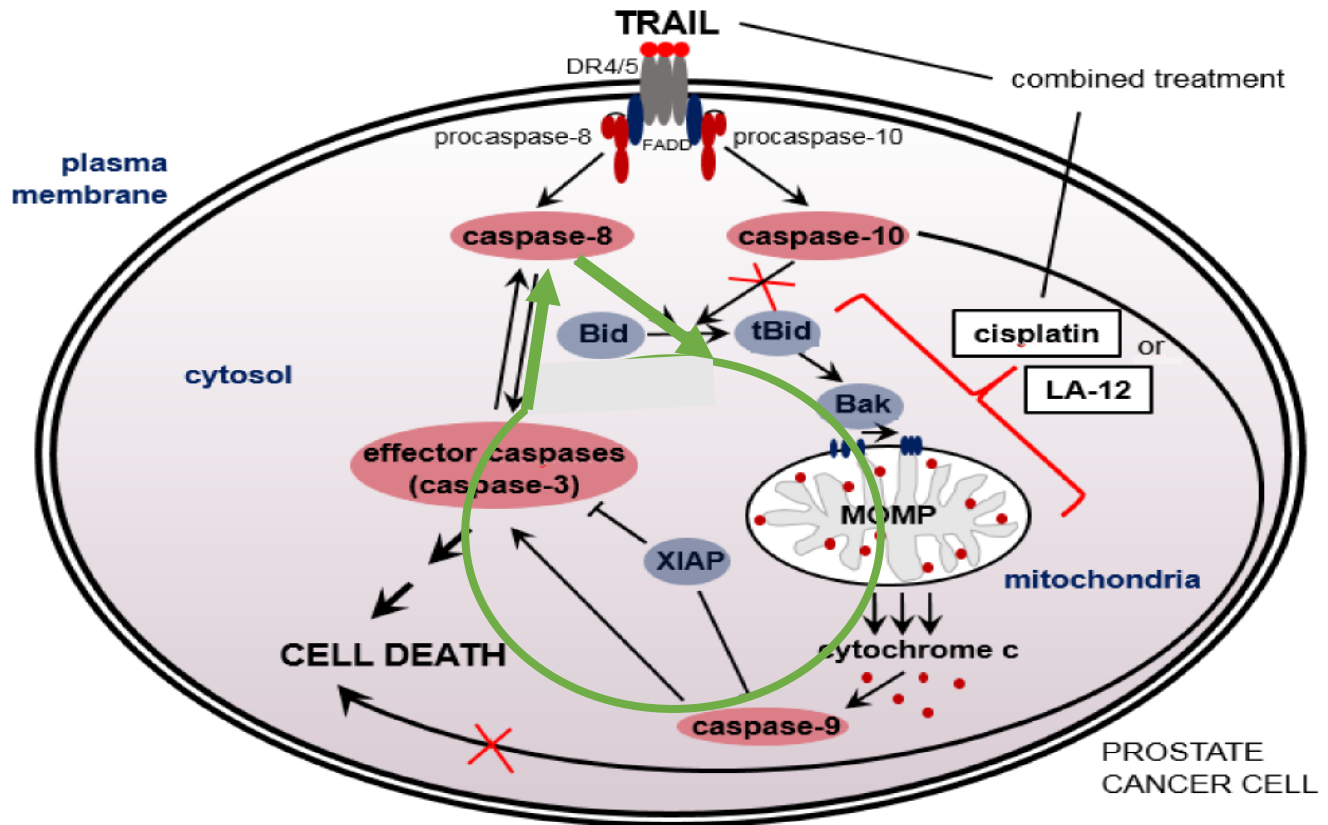
TRAIL	-	+	-	+	-	+
LA-12	-	-	+	+	-	-
cisplatin	-	-	-	-	+	+



RESEARCH ARTICLE

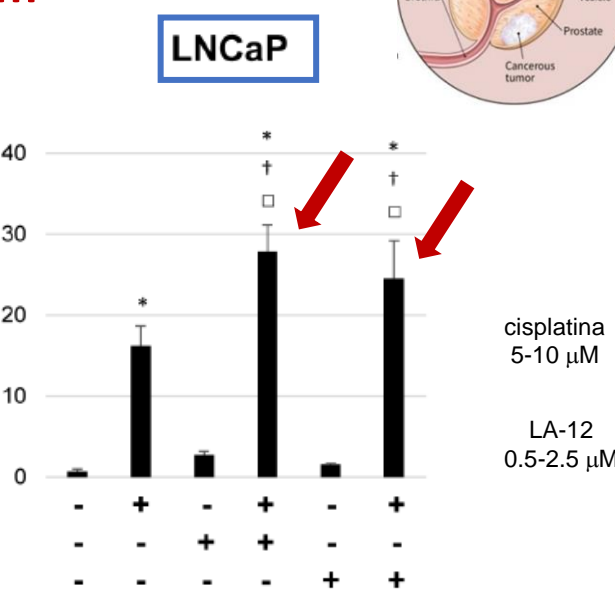
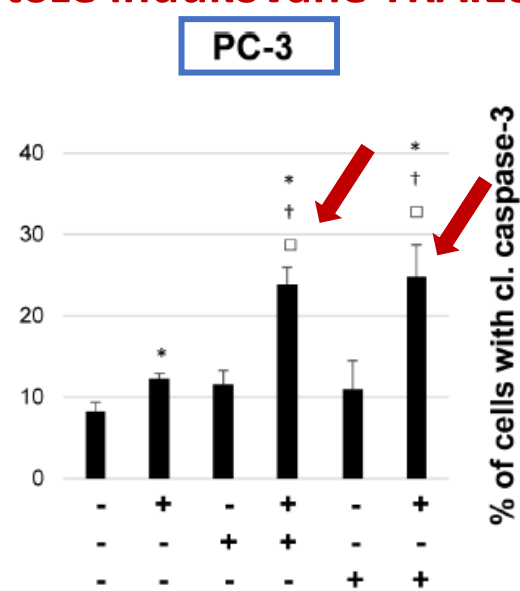
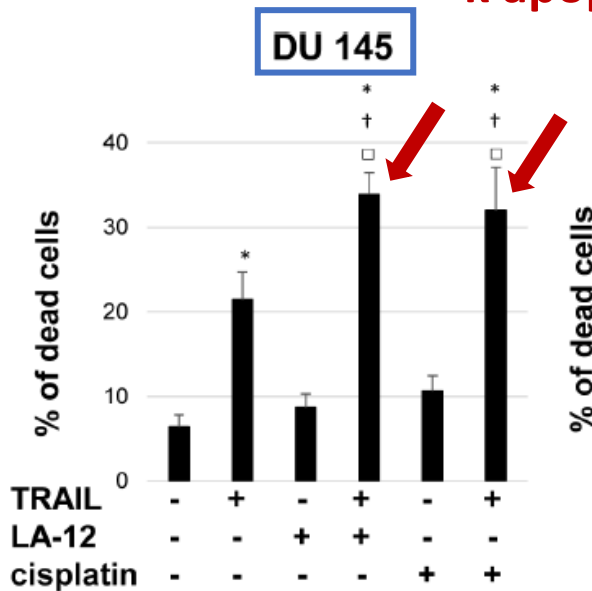
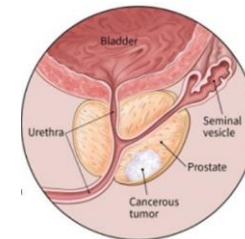
Cisplatin or LA-12 enhance killing effects of TRAIL in prostate cancer cells through Bid-dependent stimulation of mitochondrial apoptotic pathway but not caspase-10

Olga Vondálová Blanářová^{1☯}, Barbora Šafaříková^{1,2☯}, Jarmila Herúdková^{1,2}, Martin Krkoška^{1,2}, Silvie Tománková¹, Zuzana Kahounová^{1,3}, Ladislav Anděra⁴, Jan Bouchal⁵, Gvantsa Kharaiashvili⁵, Milan Král⁶, Petr Sova⁷, Alois Kozubík^{1,2}, Alena Hvršilová Vaculová^{1*}



amplifikace apoptotického signálu přes mitochondrie

Platinové látky zvyšují citlivost nádorových buněk prostaty k apoptóze indukované TRAILem

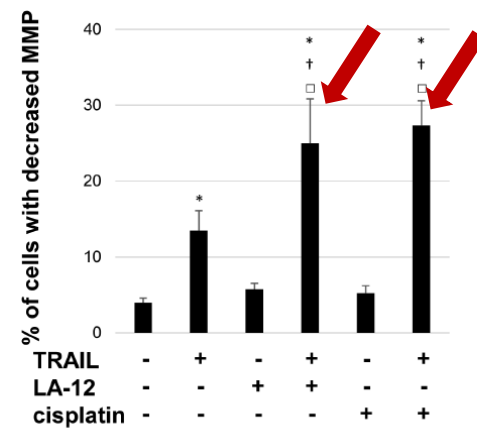
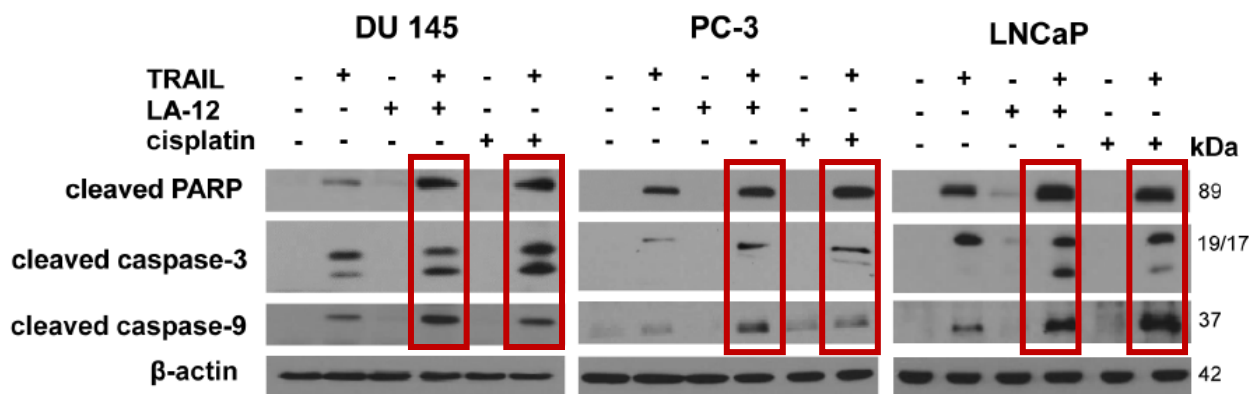


annexin V assay, průtoková cytometrie

štěpení kaspázy-3, průtoková cytometrie

cisplatin
5-10 μ M

LA-12
0.5-2.5 μ M



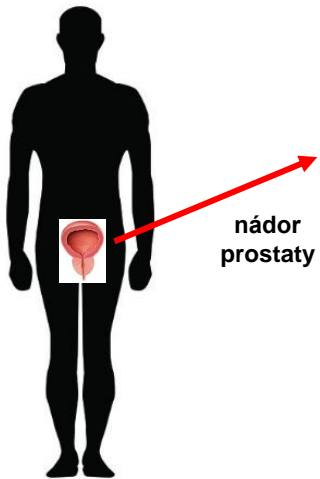
mitochondriální membránový potenciál (TMRE), průtoková cytometrie

aktivace mitochondriální apoptotické dráhy mechanismus?



DU 145
(Vondalova Blanarova et al., 2011)

Kooperativní cytotoxické působení platinových látek a TRAILu – nádorové buňky - biopsie prostaty

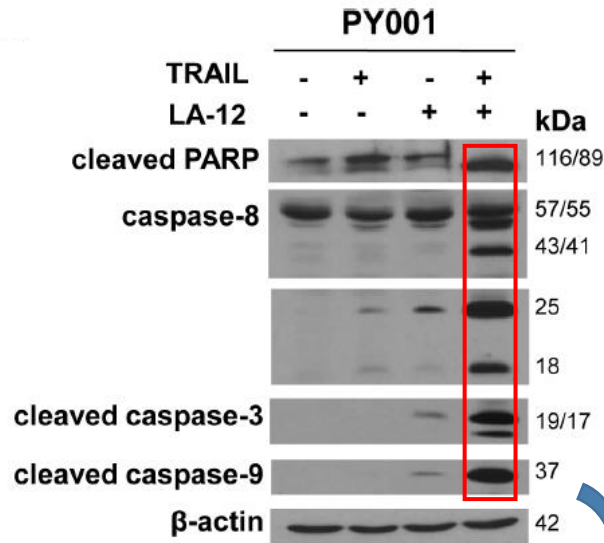


izolace a kultivace buněk

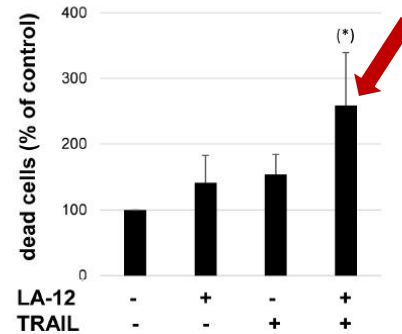
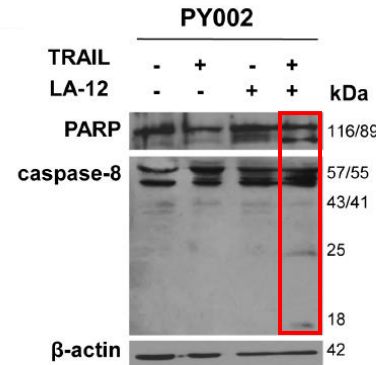


LA-12 ... 5 μ M
TRAIL ... 200 ng/ml

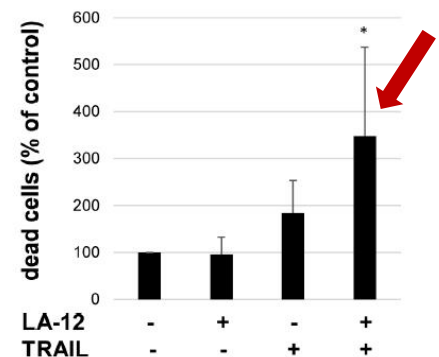
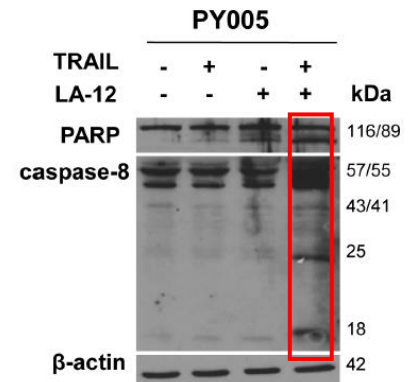
detekce apoptózy



... posílení apoptózy včetně mitochondriální dráhy...



annexin V assay, průtoková cytometrie



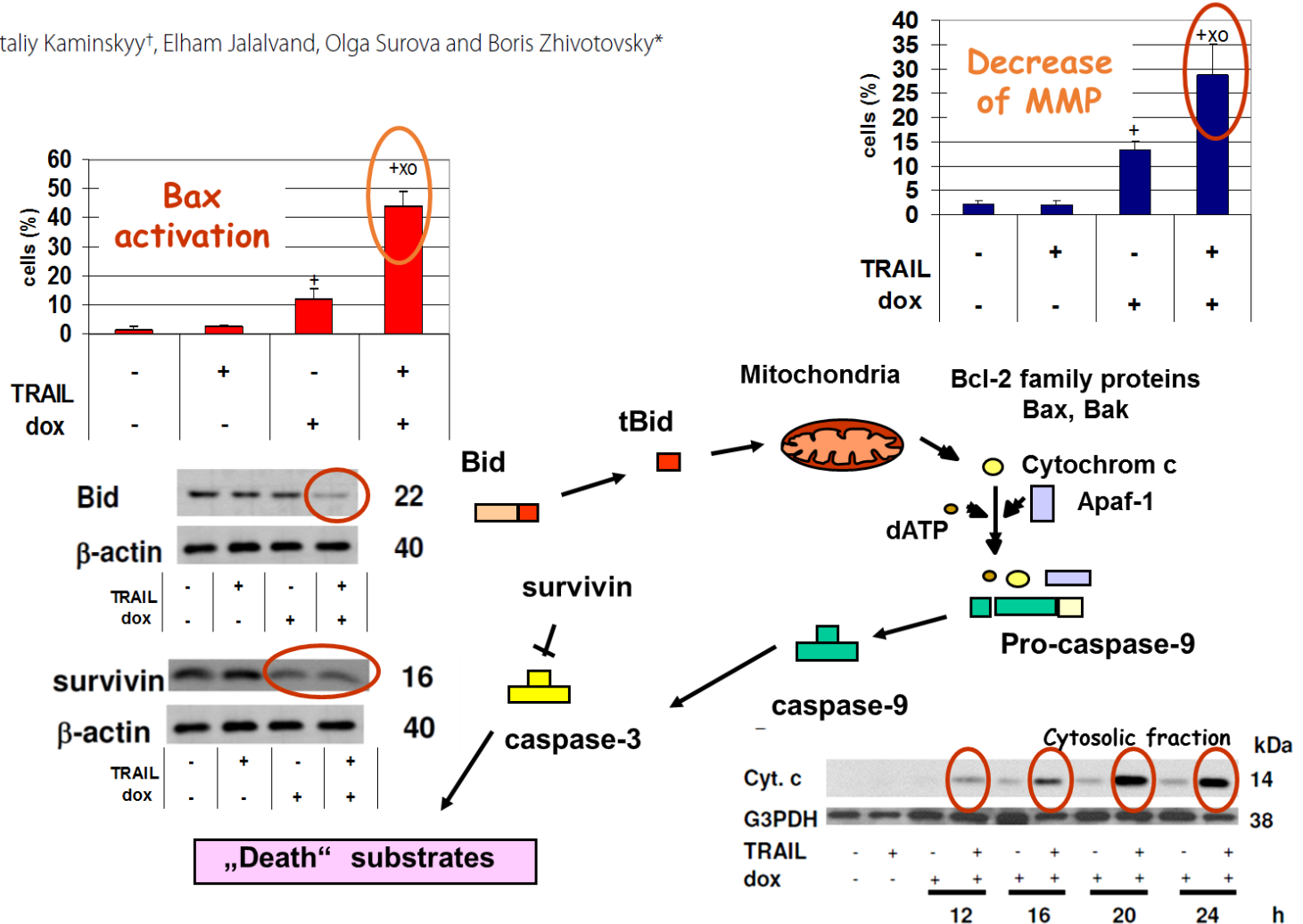
(Vondalova Blanarova et al., 2011)

RESEARCH

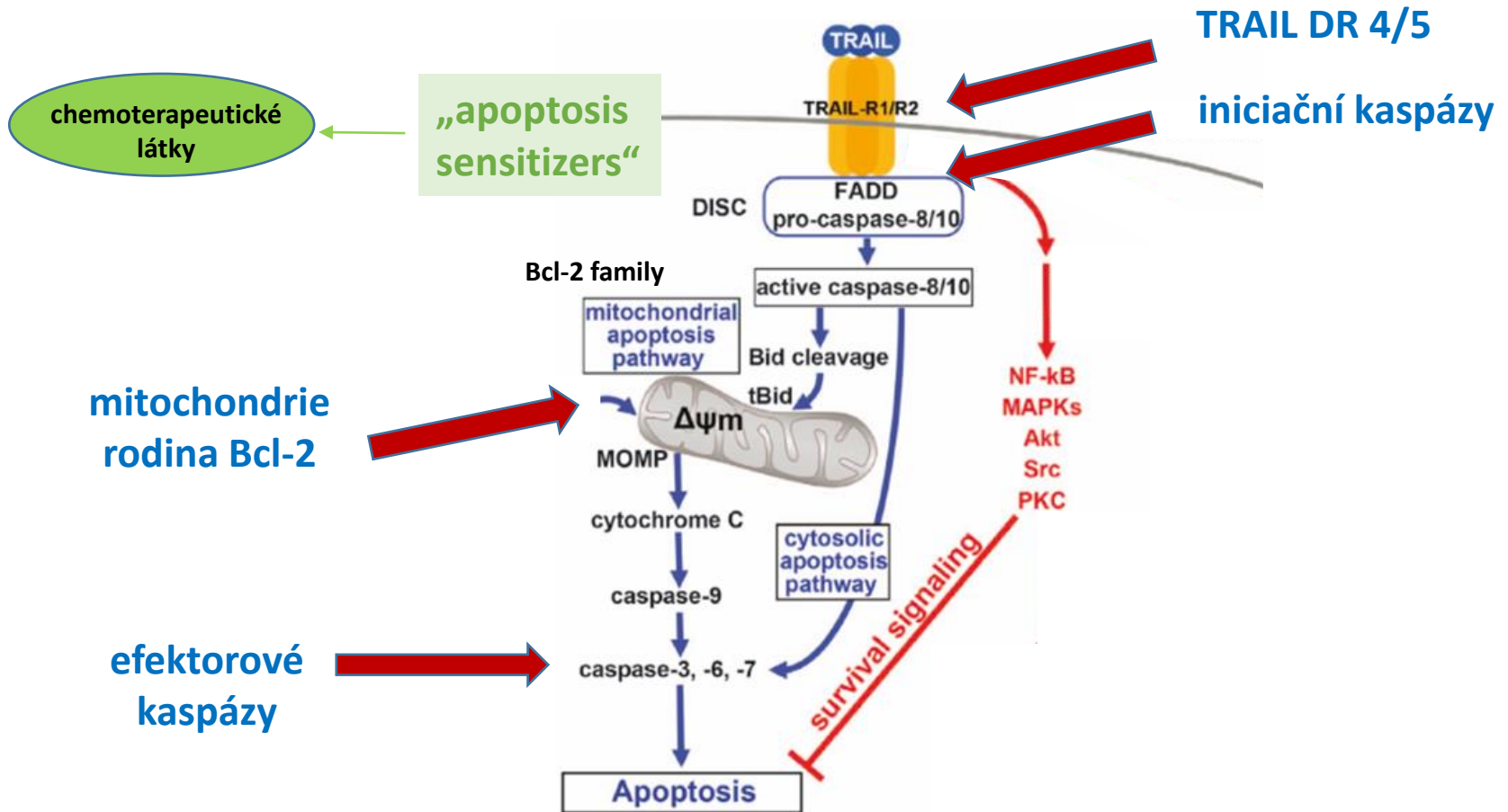
Open Access

Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL

Alena Vaculova[†], Vitaliy Kaminsky[†], Elham Jalalvand, Olga Surova and Boris Zhivotovsky*



Výzkum protinádorového působení TRAILu – náš přínos...



Zaujalo Vás téma buněčné smrti?

více informací v předmětu:

Bi8870

Mechanismy buněčné smrti, význam, metody

vždy v jarním semestru
přednáška – 2 hodiny týdně
praktické cvičení – 12 hodin blokově

- **next year both in Czech and in English!!!**

doc. RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

vaculova@ibp.cz

Děkuji za pozornost!

V případě dotazů nebo zájmu o spolupráci

napište na adresu:

vaculova@ibp.cz