

Apoptóza indukovaná proteiny TNF rodiny (TRAIL) a její modulace

RNDr. Alena Vaculová, Ph.D.

Laboratoř cytokinetiky

Biofyzikální ústav AV ČR Brno

Rodina TNF

- **Unikátní rodina proteinů – ligandů a receptorů – které se významně uplatňují v regulaci proliferace, diferenciaci, apoptózy, zánětu**
- **zprostředkování rychlých, účinných a specifických signálů a odpovědí buňky**
- **receptory – transmembránové proteiny typu I, charakteristická přítomnost tzv. „cysteine-rich domains“ a disulfidických můstků v extracelulární části molekuly**
- **ligandy - transmembránové proteiny typu II, vyskytují se ve formě membránově vázané i „sekretované, rozpustné“**

Významné ligandy a receptory rodiny TNF

- **CD95L (FasL) – CD95, Fas**
- **TNF-alfa – TNF-R1, TNF-R2**
- **TRAIL – DR4, DR5, DcR1, DcR2,
OPG**

TNF- α , FasL, TRAIL

-členové rodiny TNF

-úloha v imunitních a zánětlivých reakcích organismu, v regulace proliferace, diferenciaci a apoptózy

-podobnost apoptotických signálních drah (oligomerizace receptoru, adapterový protein, death doména, iniciační kaspáza)

- vazba na tzv „death receptory“
(TNFR1, Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2)

TNF- α , FasL, TRAIL

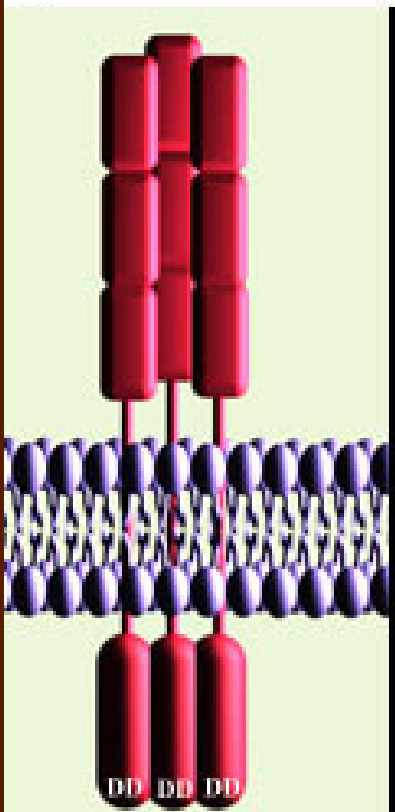
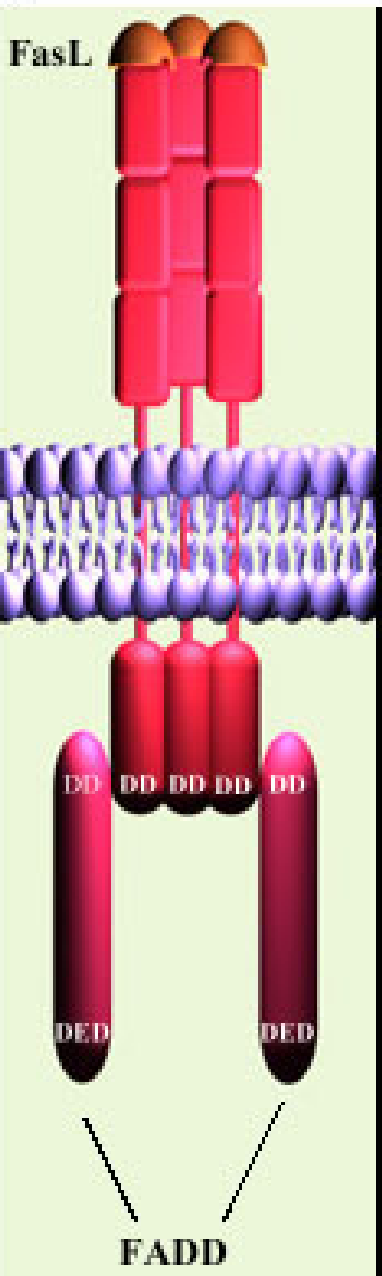
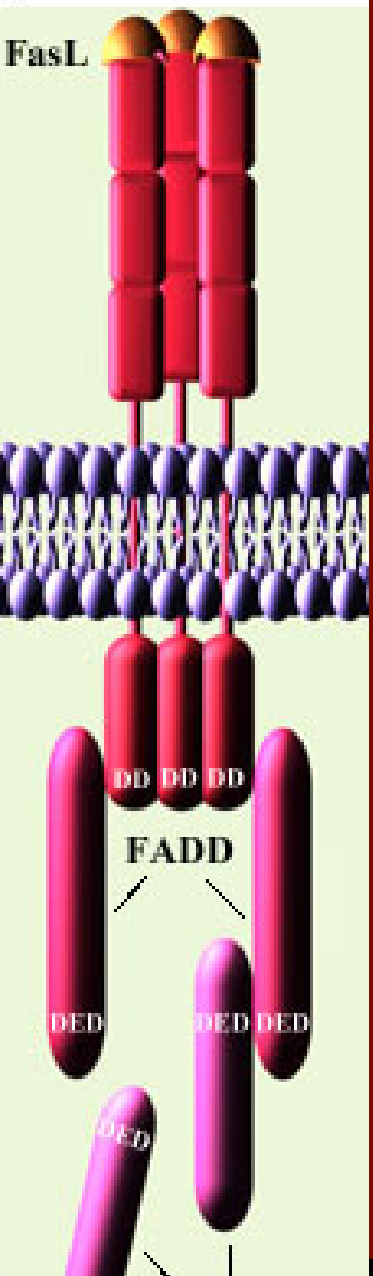
- cytotoxické a antiproliferační působení na řadu buněčných linií
- využití v protinádorové terapii jako důležitá alternativa ke konvenčním léčebným postupům využívajícím chemoterapii a ionizující záření
- omezení: - vedlejší účinky, rezistence

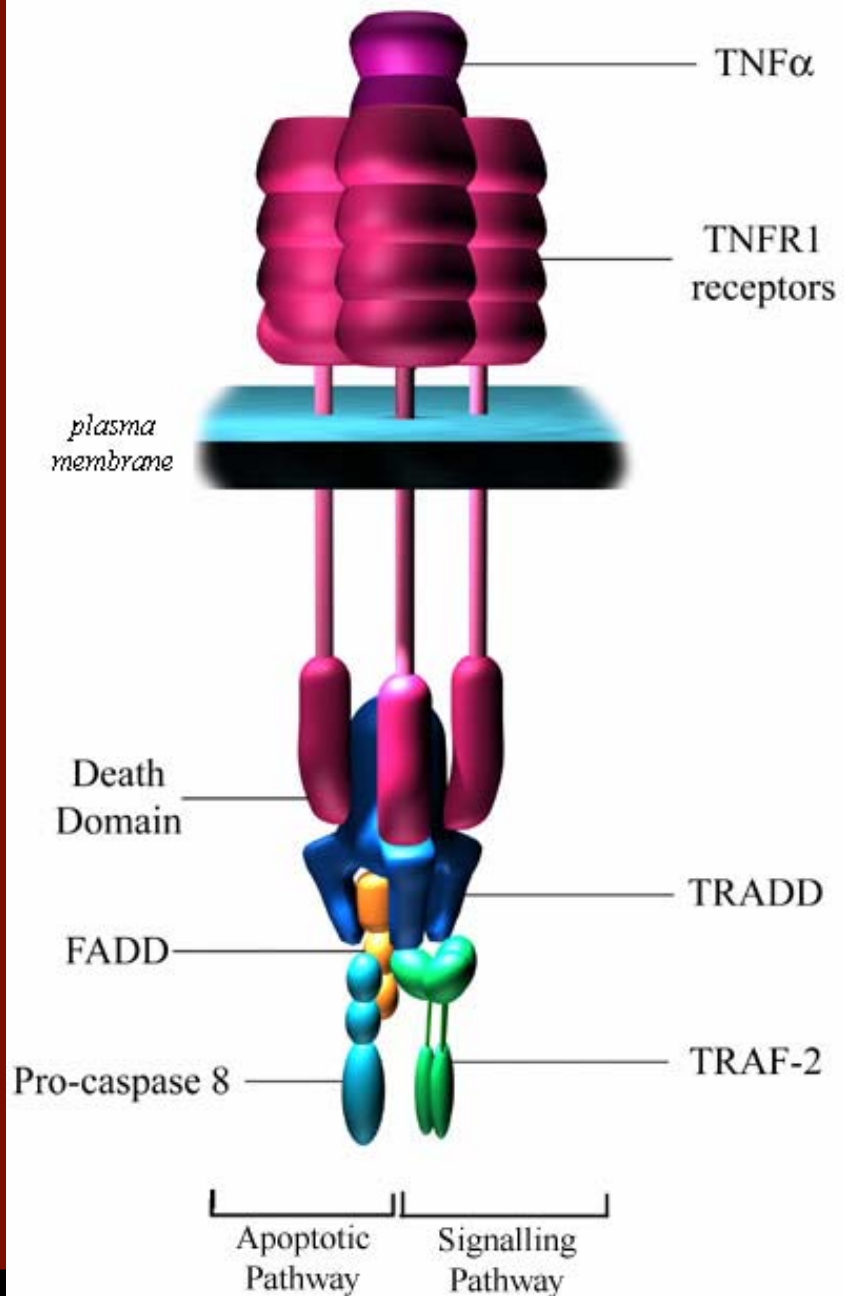
Systemová aplikace - TNF- α , anti-Fas, TRAIL

- TNF- α , anti-Fas – silná zánětlivá odpověď, poškození jaterních buněk
- TRAIL – výhoda, selektivní toxicita, většina normálních buněk rezistentní k jeho účinkům, otázka – hepatocyty
 - in vivo – intravenózní infuze, vysoké dávky – myši, primáti (šimpanzi) – bez toxických vedlejších efektů, co člověk?

Receptory smrti

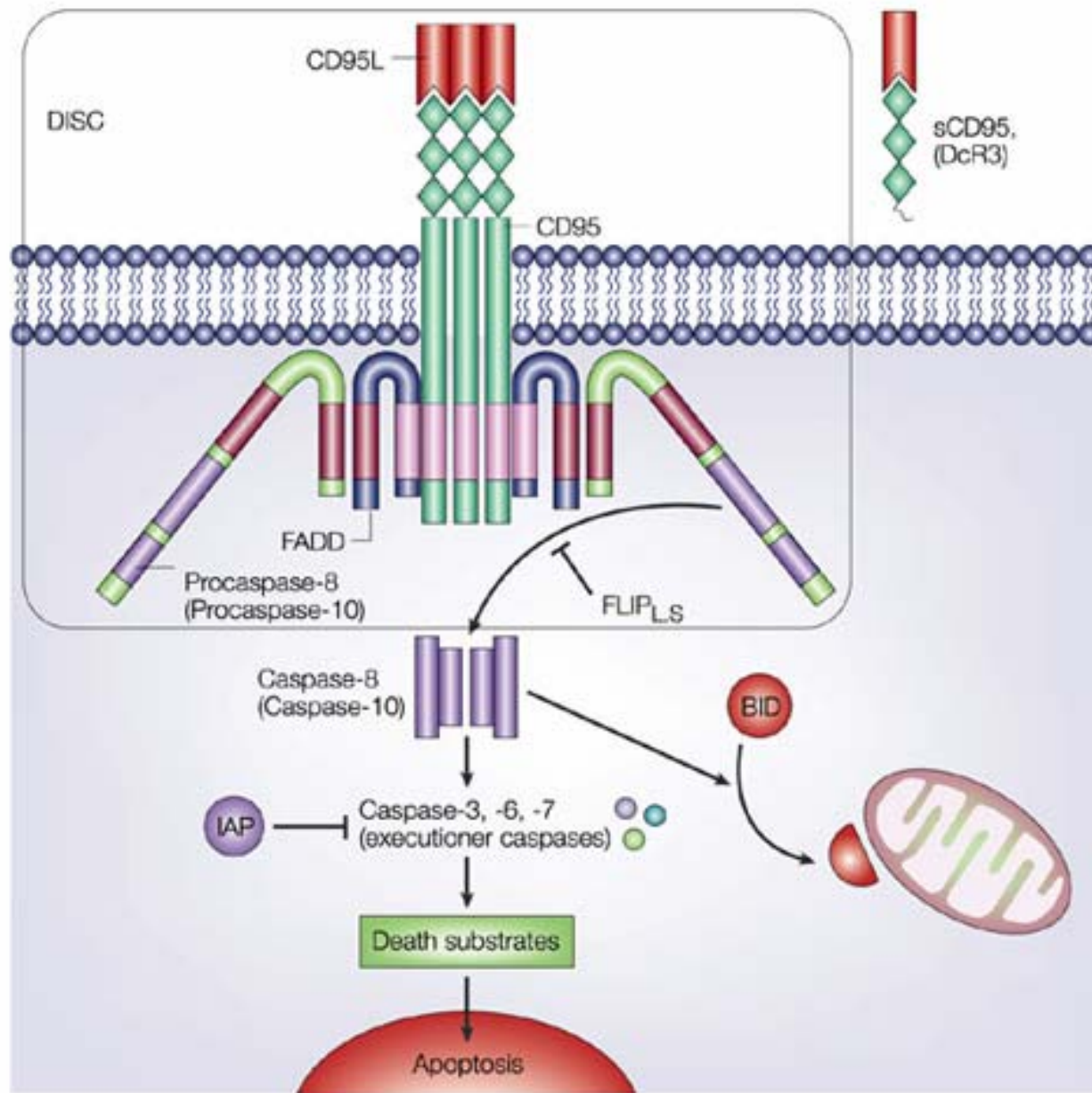
- Povrchové receptory, které přenášejí apoptotické signály vyvolané specifickými ligandy
- Hrají klíčovou roli v apoptóze
- Jejich prostřednictvím dochází k rychlé aktivaci iniciační kaspázy (již za několik sekund od navázání ligandu)
- Patří do rodiny TNF
- Nejznámější jsou TNFR1, CD95 (Fas), TRAIL-R1 (DR4) a TRAIL-R2 (DR5)
- V intracelulární doméně obsahují tzv. „death doménu (DD)” – specifická sekvence, která je klíčová pro přenos apoptotického signálu
 - umožní vazbu adaptérových proteinů (také obsahují tuto doménu) k receptoru
 - přes adaptérový protein se do DISCu váže prokaspáza (prostřednictvím DED domény)

A**B****C**



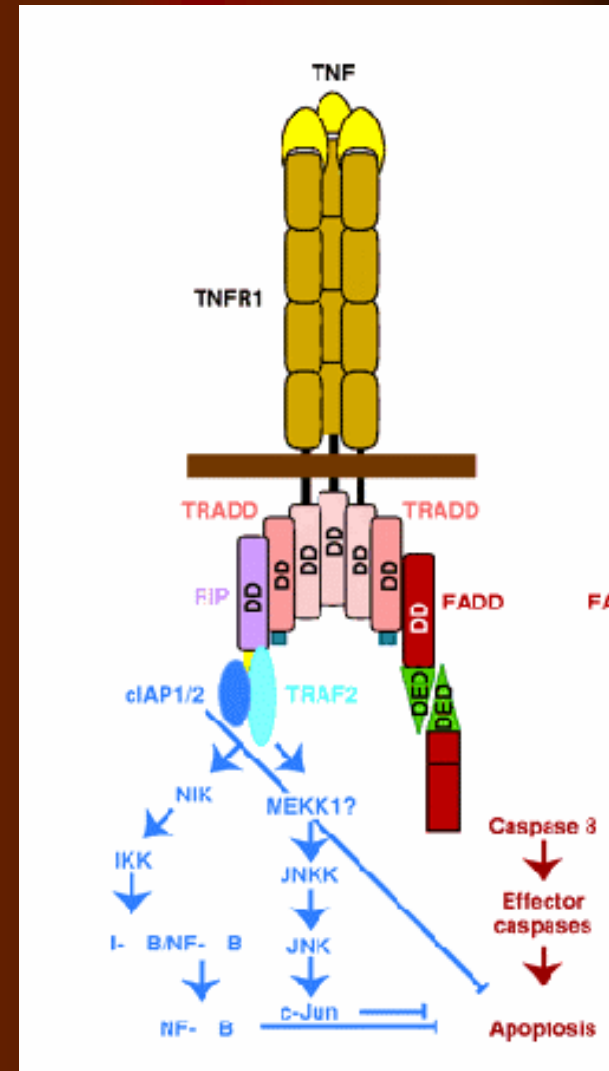
DISC

- Death inducing signaling complex
- Signální komplex na úrovni receptoru
- Aktivace iniciační kaspázy 8
- Receptor + adaptérový protein (FADD) + pro-kaspáza-8
- Inhibice aktivace kaspázy 8 na úrovni DISCu prostřednictvím proteinu FLIP



TNF- α (tumor necrosis factor- α)

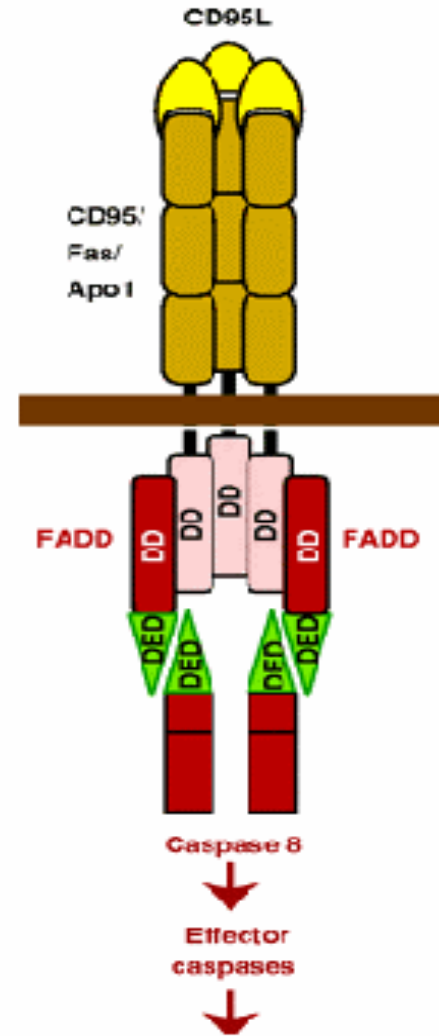
- multifunkční cytokin, významná úloha v imunitních a zánětlivých reakcích, kachexii, regulaci buněčného růstu a smrti, karcinogenezi
- cytotoxické a antiproliferační účinky na řadu nádorových buněk
- využití v léčbě rakoviny, avšak řada nádorových buněk je rezistentních k účinkům TNF- α



(Ashkenazi, Dixit, 1998)

Fas

- Fas receptor identifikován v roce 1989
- Purifikace ligandu v roce 1993, naklonování v roce 1996, exprese převážně v aktivovaných T lymfocytech, NK buňkách a makrofázích
- Klíčová role apoptózy zprostředkované přes FasL – FasR v imunitních reakcích

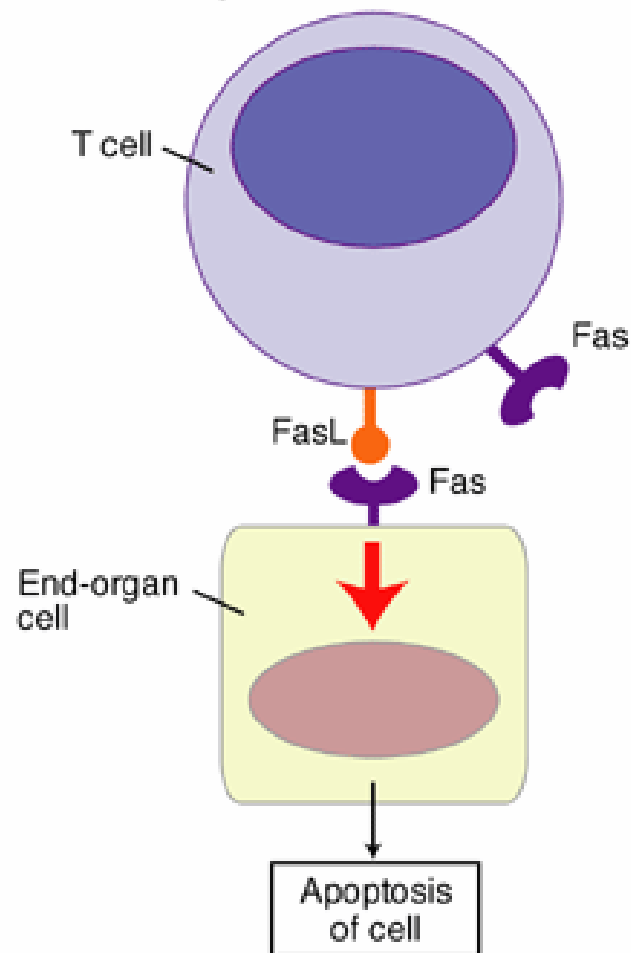


(Thorburn et al., 2004)

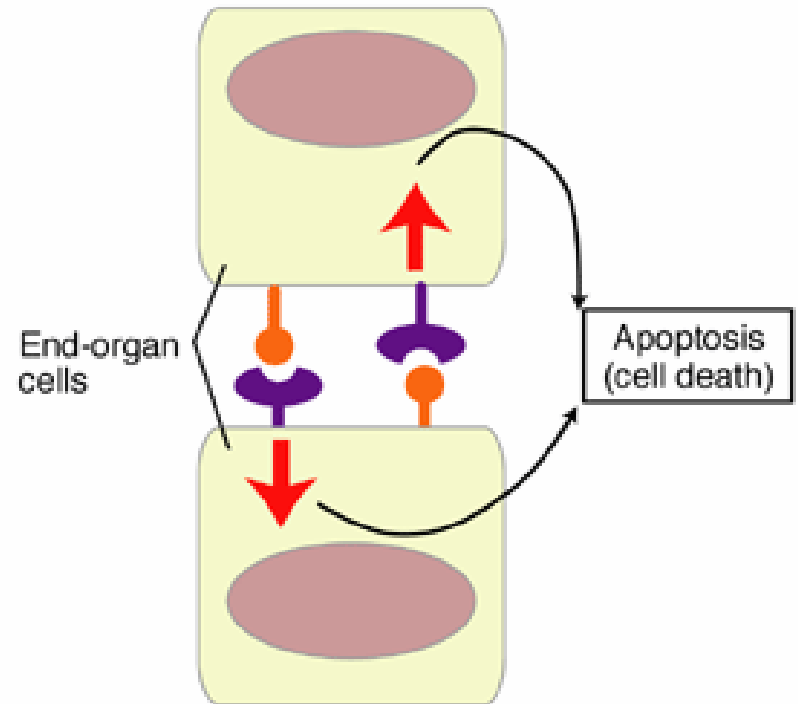
Fas a imunitní systém

- Fas je zodpovědný za eliminaci aktivovaných T lymfocytů po skončení imunitní odpovědi (IO)
- IR – aktivace T lymfocytů, proliferace, diferenciaci – velké namnožení efektorových buněk – zneškodnění patogenů
- Poté nutná eliminace většiny těchto lym, nebo jinak poškození vlastních tkání organismu (autoimunitní onemocnění) a narušení homeostázy
- Up-regulace Fas na povrchu T lym, sekrece FasL – autokrinní (T lym) a parakrinní (cílová buňka)
- Citlivost T lym k působení Fas však až po skončení IO, po několika dnech aktivace (klesá množství Bcl-2 proteinu)
- Mutace Fas – autoimunitní onemocnění
- Terapeutické aplikace Fas – AIDS, diabetes, nádorová onemocnění..

a Direct immune-mediated killing of end-organ cells

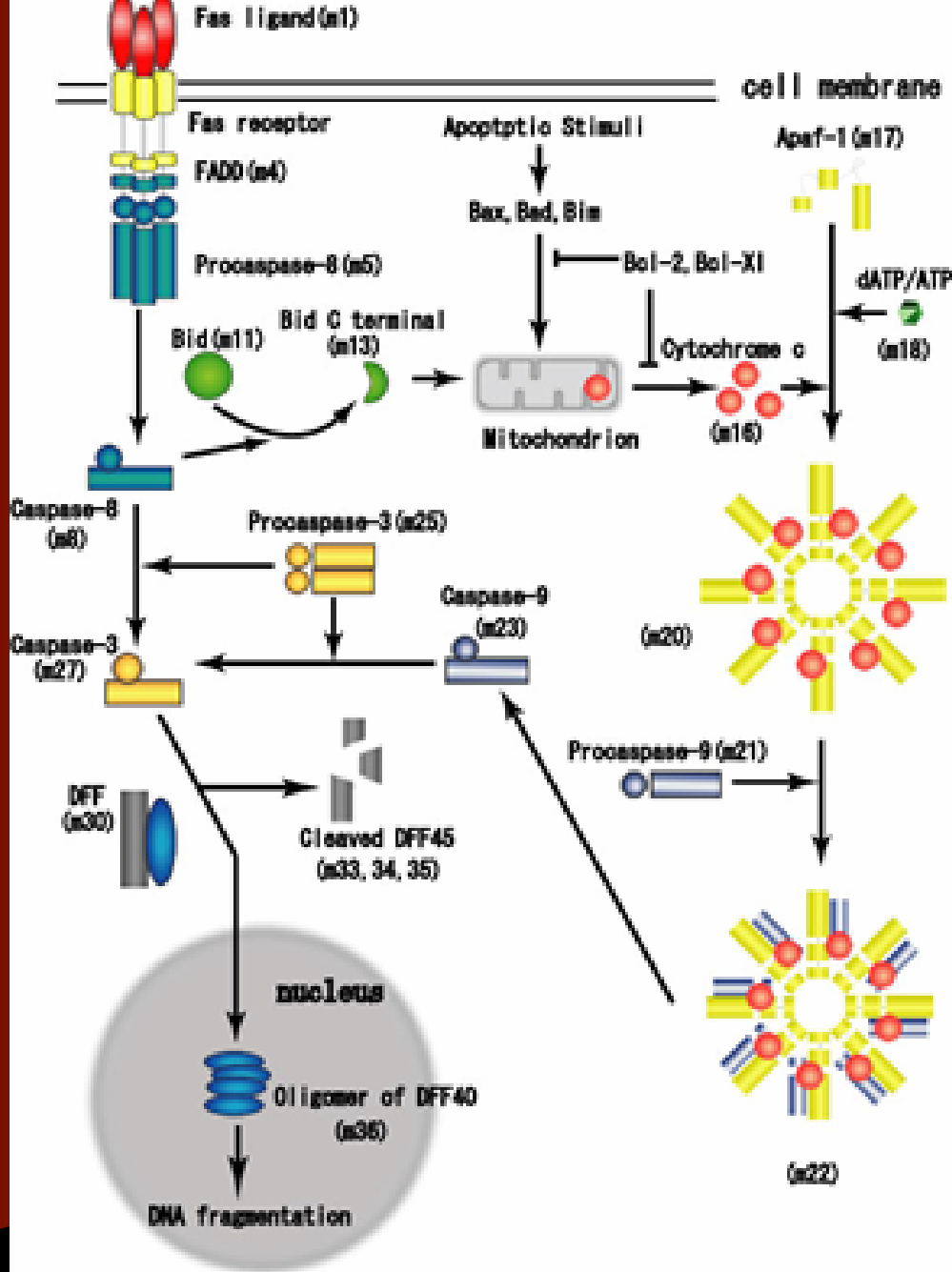


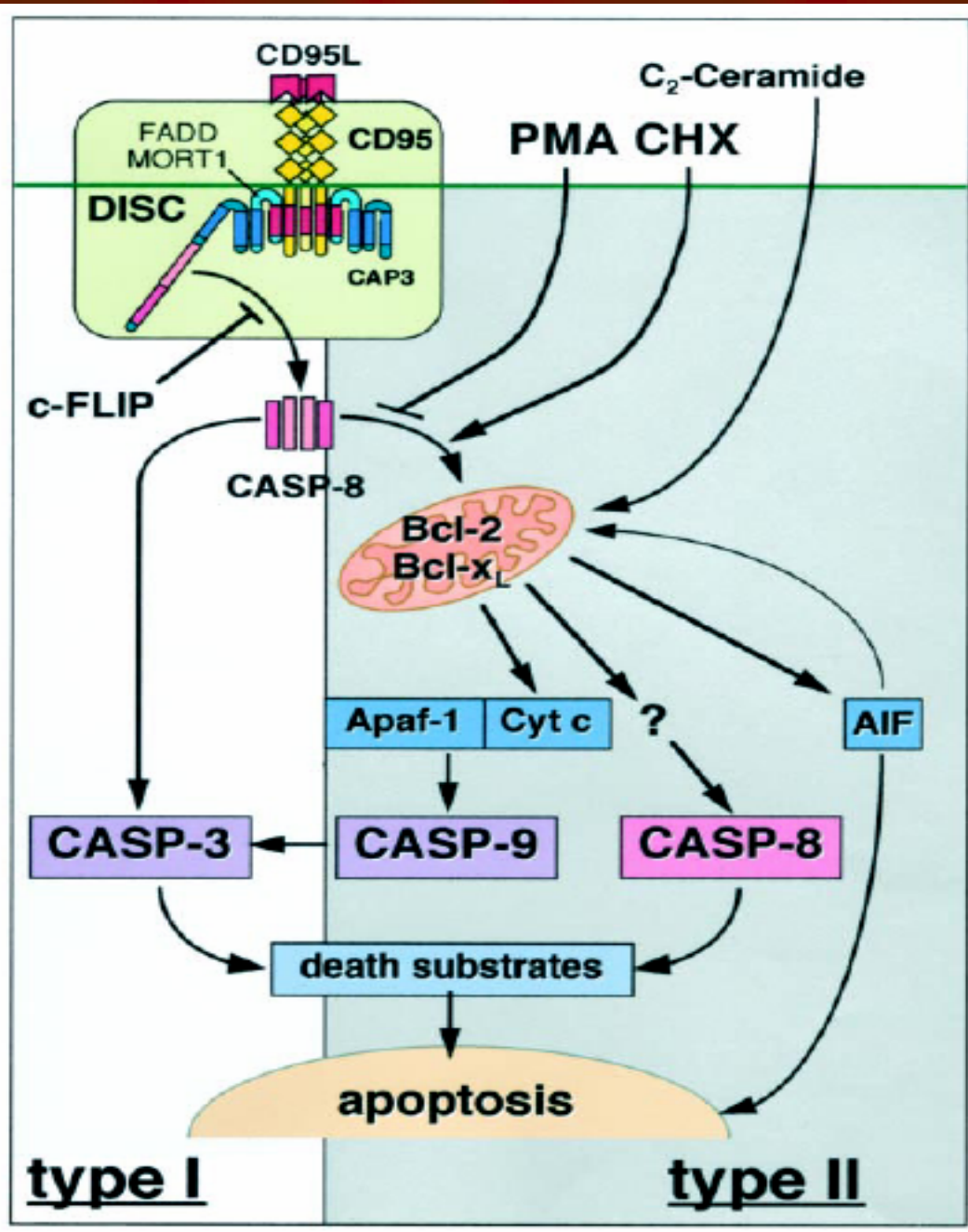
b FasL-mediated autocrine cell suicide or juxtacrine fratricide



Fas ligand (FasL)-mediated apoptosis during inflammation

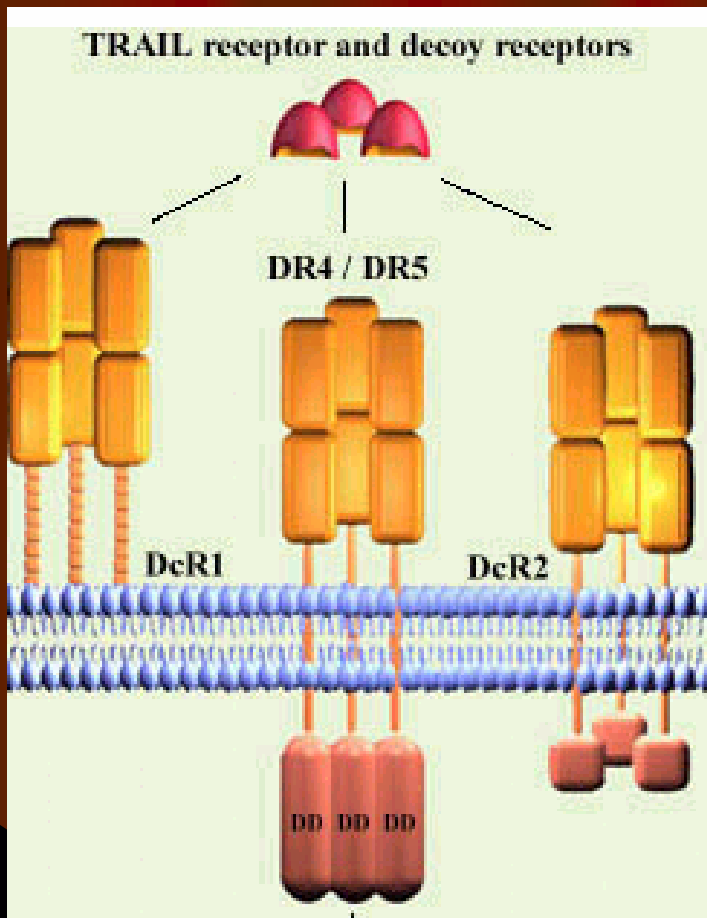
Expert Reviews in Molecular Medicine©2001 Cambridge University Press





TRAIL

- Tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
- selektivní indukce apoptózy u celé řady nádorových buněk, ne však u většiny normálních



(na rozdíl od TNF, Fas)

- možnost interakce s pěti různými receptory

TRAIL-R1 (DR-4, APO-2)

TRAIL-R2 (DR-5, TRICK, Killer

TRAIL-R3 (DcR1)

TRAIL-R4 (DcR2, TRUNDD)

TRAIL-R5 (osteoprotegerin)

Význam TRAILu

- **Velmi výhodné vlastnosti (selektivní působení na nádorové buňky, indukce apoptózy nezávisle na p53)**

využití v protinádorové terapii jako důležitá alternativa ke konvenčním léčebným postupům využívajícím chemoterapii a ionizující záření (řada nádorů rezistentních, dráha přes mitochondrie, overexprese Bcl-2)

- **Některé nádorové buňky jsou však rezistentní k apoptóze indukované TRAIlem**

Popis signálních drah TNF- α , FasL a TRAILu je velmi důležitý pro pochopení mechanismu jejich působení, mechanismů rezistence a pro správné zacílení protinádorové terapie

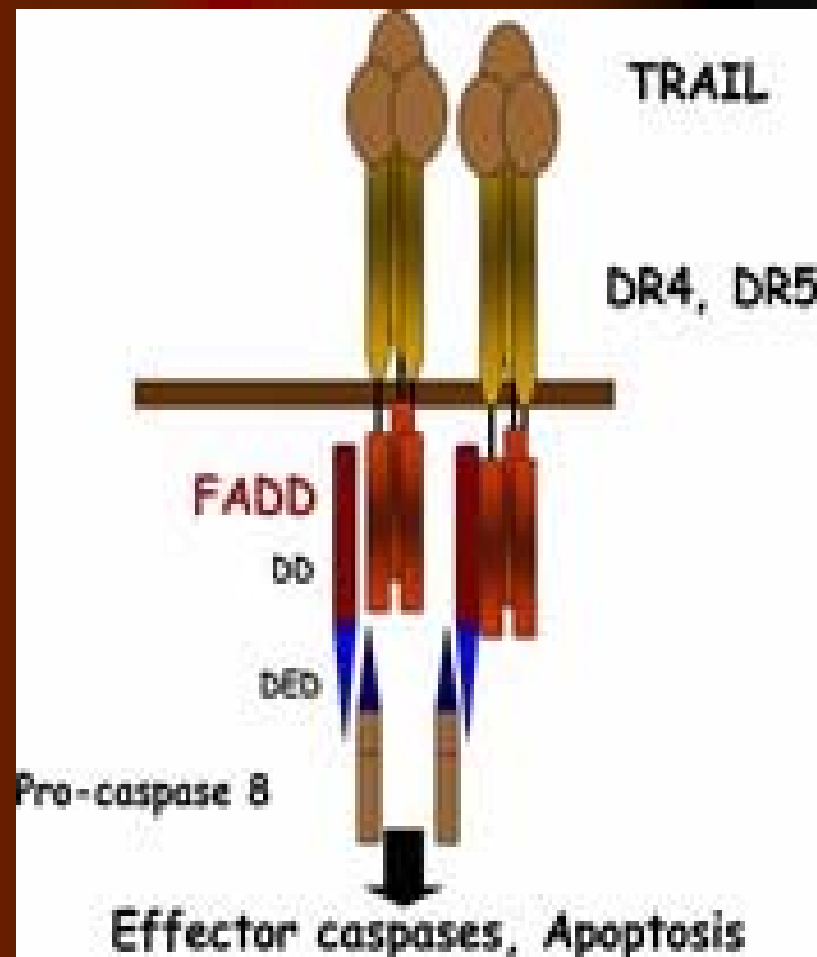
Důležitost srovnání citlivosti normálních a nádorových buněk – rozdíly v signálních drahách? Na kterých úrovních signální dráhy se projevuje rezistence?

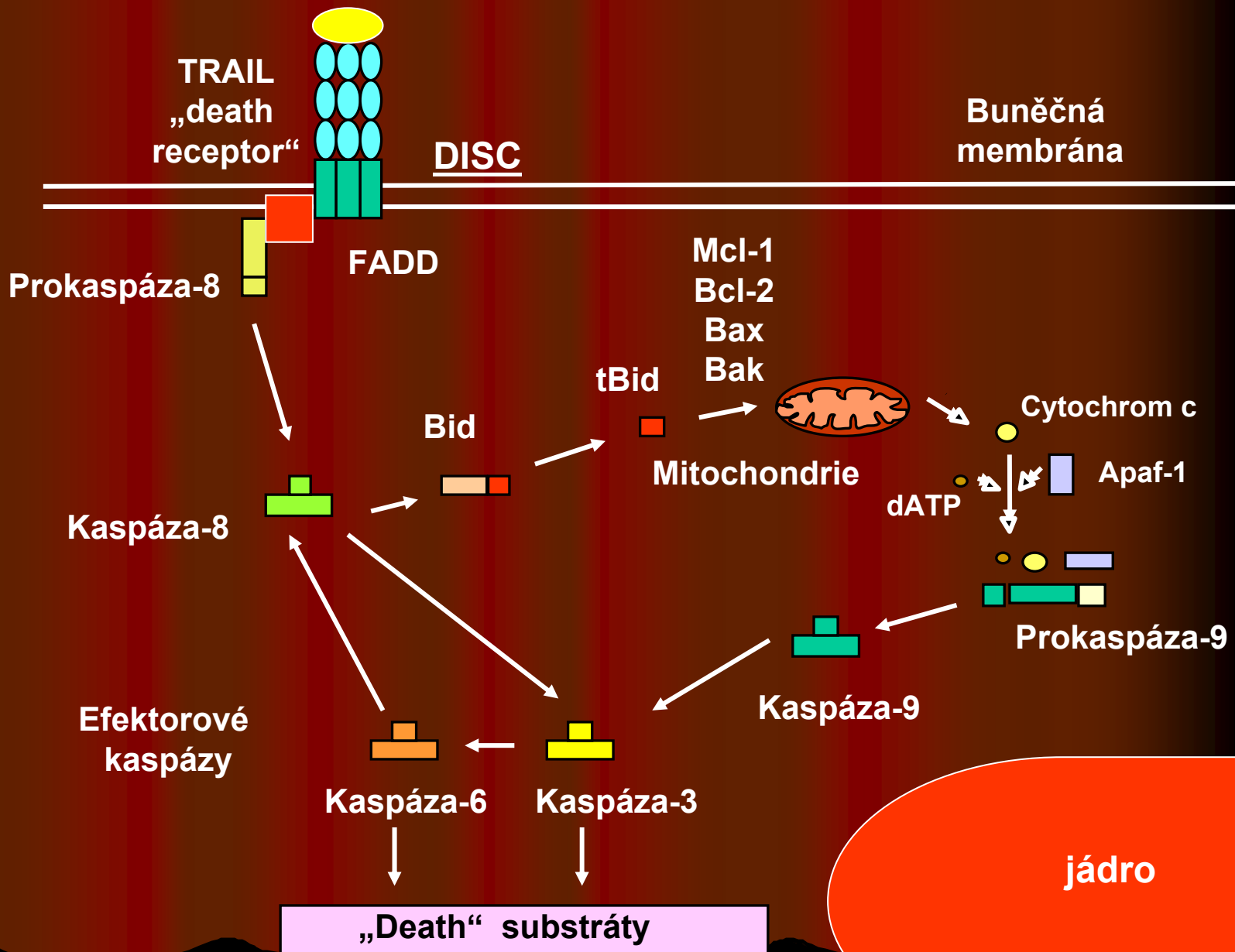
Přinese toto srovnání více informací o tom, proč TRAIL selektivně indukuje apoptózu u nádorových buněk a proč je většina nádorových buněk k jeho působení rezistentní?

Signální dráha TRAILu

Aktivace 2 základních typů drah:

- Dráha na mitochondriích nezávislá - přímá aktivace kaspázy 3 pomocí kaspázy 8
 - buňky typu I - early caspase-8 activation
- Dráha na mitochondriích závislá – amplifikace apoptotického signálu na úrovni mitochondrií, štěpení proteinu Bid prostřednictvím kaspázy 8
 - buňky typu II – delayed caspase-8 activation





Ovlivnění citlivosti / rezistence buněk k účinkům TRAILu:

- **na úrovni receptorů**
 - množství DRs a DcRs, jejich mutace
- **na úrovni jednotlivých proteinů v signální dráze TRAILu**
 - kaspáza-8, FLIP
 - Bcl-2 rodina (Mcl-1, Bcl-2, Bax...)
 - inhibitory apoptózy (IAPs)
 - NF- κ B
 - kinázy
 - atd.....

Mechanismy rezistence - DcR

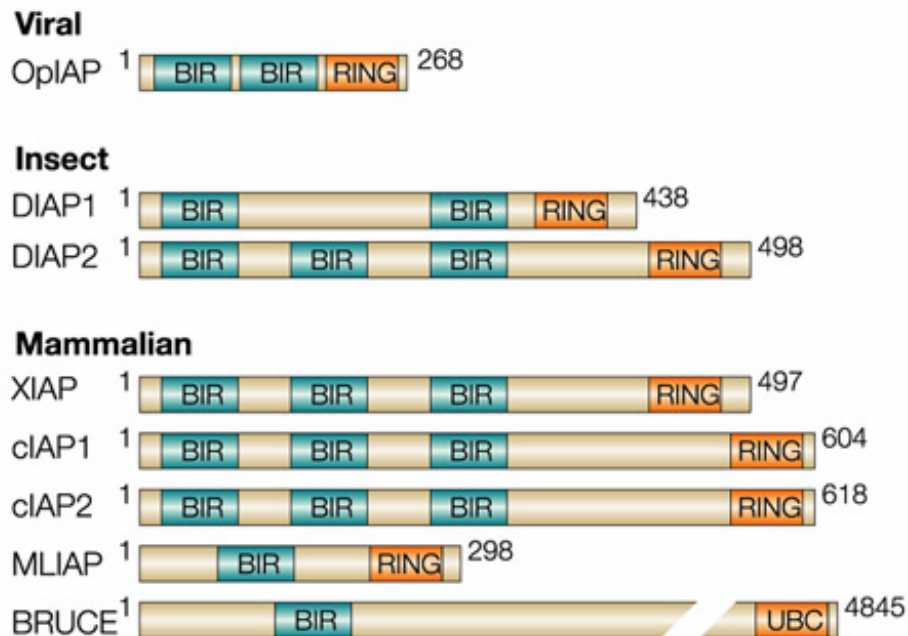
- DcR1, 2 - decoy receptors – soutěží o vazbu ligandu s DR4, 5
- DcR1 – nemá cytoplazmatickou doménu, DcR2 má pouze její část – znemožnění vazby adaptérového proteinu a přenos apoptotického signálu

Mechanismy rezistence – kaspáza 8

- Kaspáza-8 – deficiencie nebo mutace této kaspázy – blokace přenosu apoptotického signálu od receptoru
- cFLIP – kompetitivní inhibice aktivace kaspázy 8, soutěží o místo v DISCu

Mechanismy rezistence – IAPs

- IAP – inhibitor of apoptosis protein – inhibuje aktivitu kaspáz a tím apoptózu
 - IAP1, IAP2, XIAP..



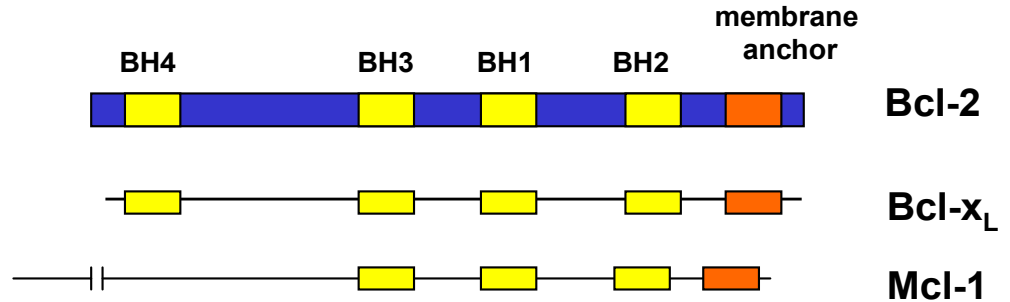
Mechanismy rezistence – Bcl-2 rodina

- Proteiny Bcl-2 rodiny – velmi významná úloha v regulaci rezistence k TRAILu především u buněk typu II!
- Bcl-2, Mcl-1 – overexprese – rezistence k apoptóze indukované TRAIEm

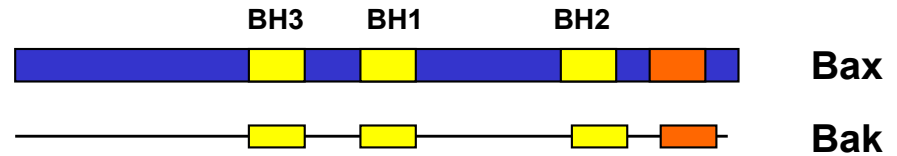
Proteiny rodiny Bcl-2

Regulace
mitochondriální
dráhy indukce
apoptózy

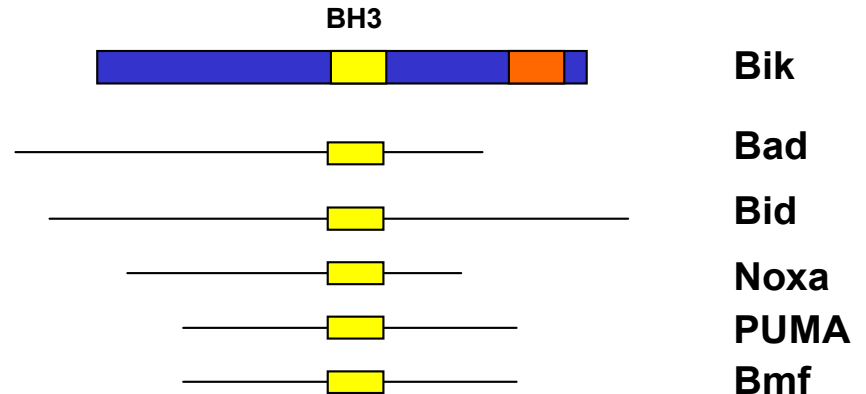
Bcl-2-like survival factors

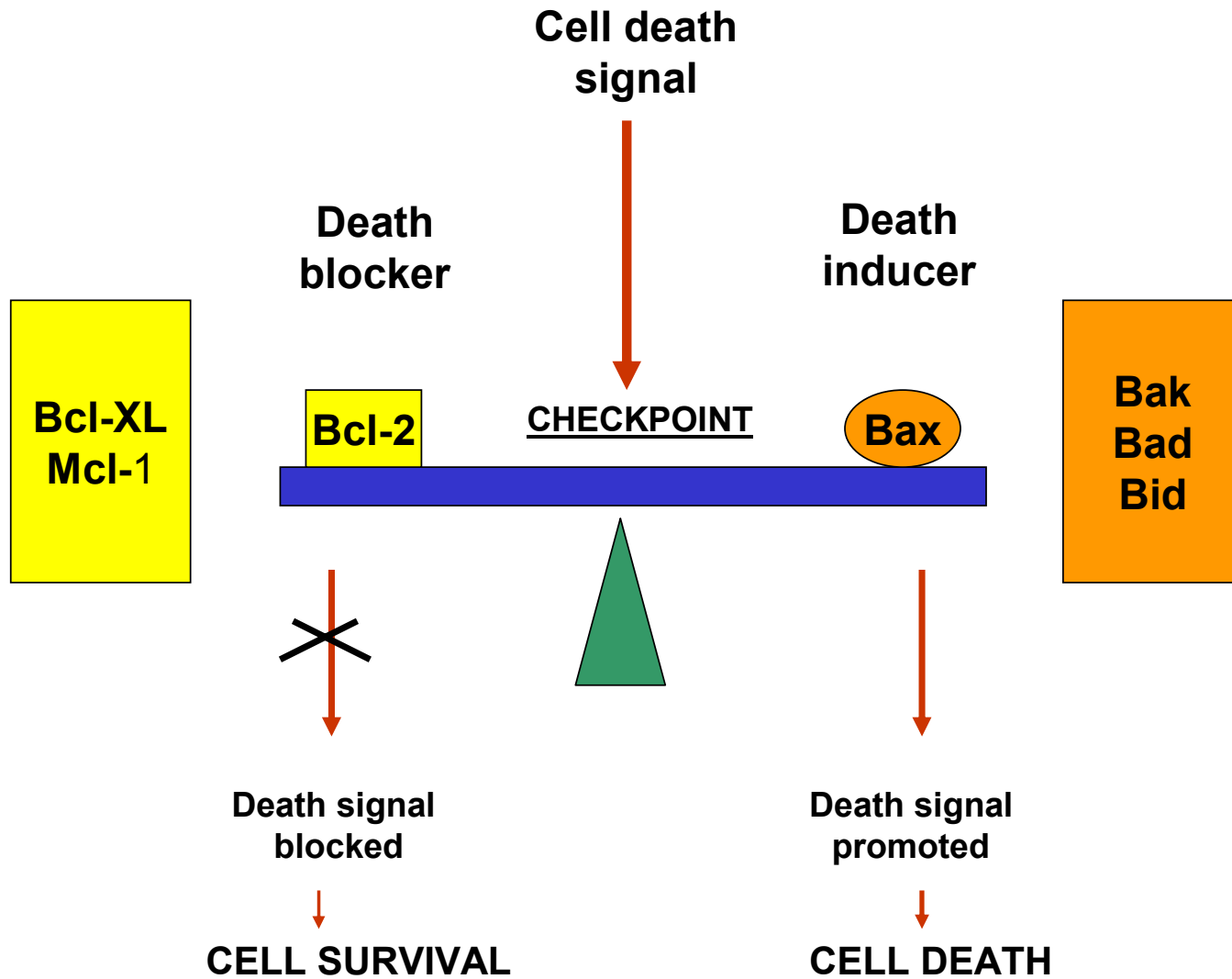


Bax-like death factors



BH3-only death factors





Mechanismy rezistence – „Pro-survival dráhy“

- Důležitá úloha kináz v regulaci citlivosti nádorových buněk k apoptóze zprostředkované přes receptory smrti
 - MAPK/ERK dráha
 - PI3K/Akt dráha

Významná úloha NF-kappa B

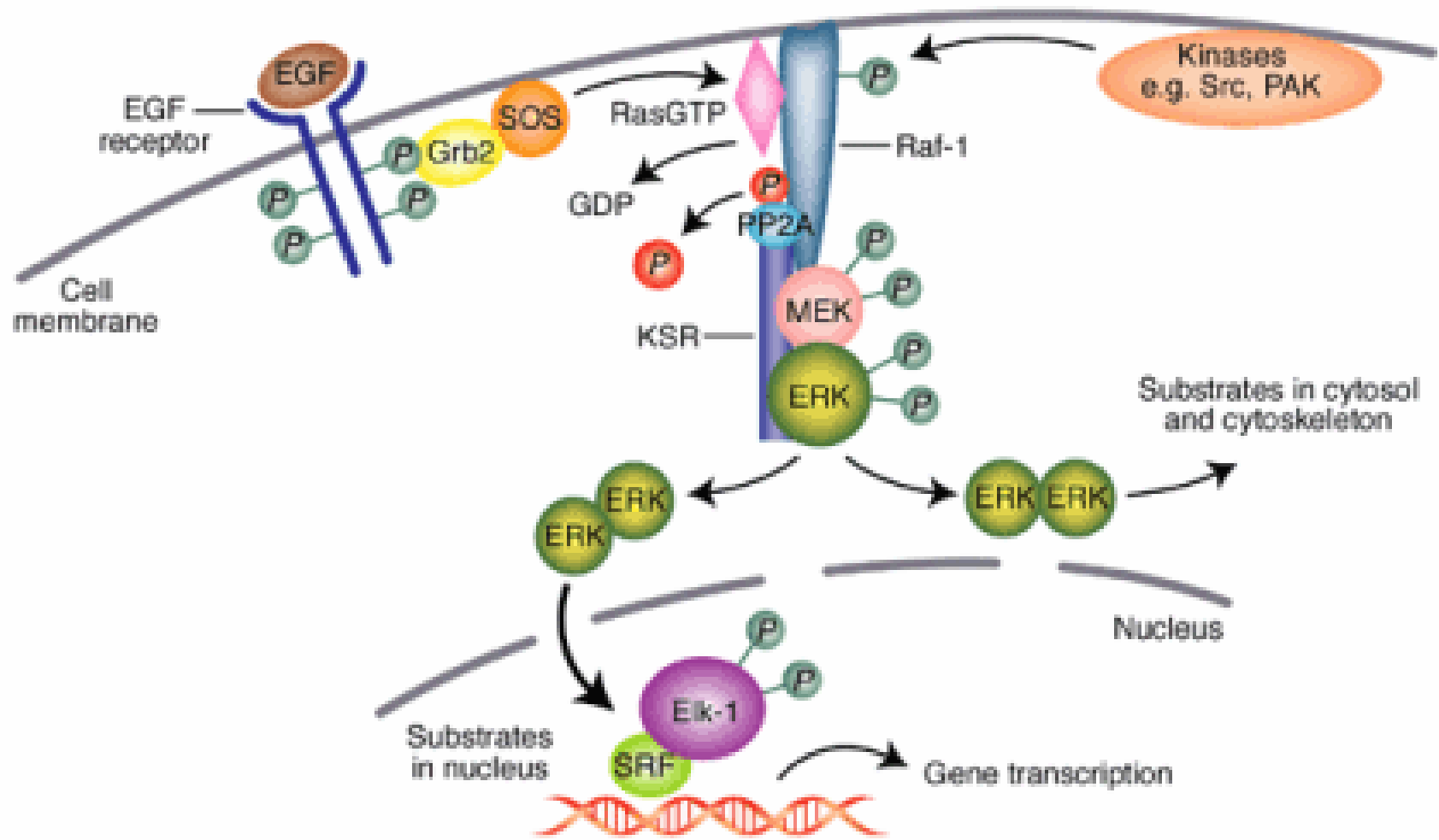
Mechanismy rezistence – NF-kappaB

- **Důležitý transkripční faktor v jádře, podílí se mj. na regulaci proliferace**
- **mutace NF-kappa B – nekontrolovaná proliferace**
- **regulace transkripce ředy genů zapojených v apoptóze – FLIP, IAP, antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny a mnohé další**
- **aktivace NF-kappa B indukovaná přes některé DRs – TNFR1, DcRs pro TRAIL!**

**Úloha „pro-survival“ drah v
regulaci citlivosti nádorových
buněk k apoptóze
zprostředkované přes „death
receptory“**

Dráha MEK/ERK

- MAPK - mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway
- V této dráze dochází k hierarchické fosforylaci zapojených molekul a jejich aktivaci – Ras, Raf, MEK, ERK
- Klíčová dráha přenášející signály z receptorů růstových faktorů do jádra
- Molekuly této dráhy mají důležitou funkci v regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy
- Deregulace této dráhy mají dalekosáhlé důsledky a byly pozorovány u řady onemocnění včetně nádorových
- Konstitutivní aktivace této dráhy u vysokého procenta nádorů (včetně nádorů kolonu)
- Inhibitory těchto kináz jako protinádorově působící léčiva – testování různých typů, klinické zkoušky
- Úloha této dráhy v regulaci citlivosti buněk k induktorům apoptózy – rodiny TNF



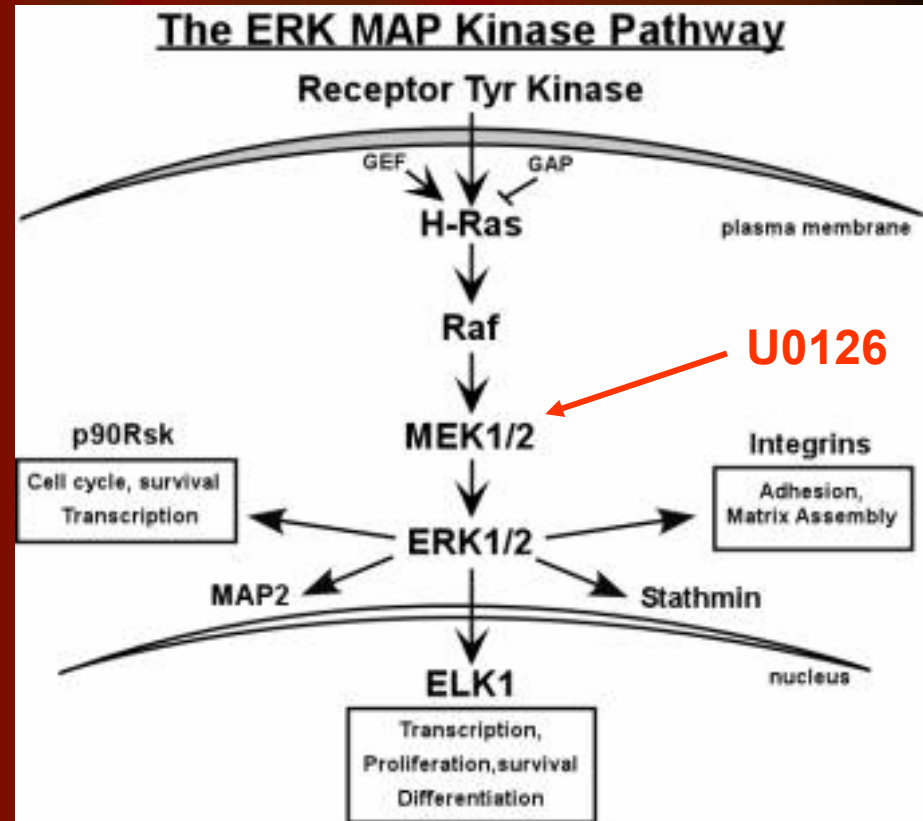
The organisation and function of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2002 Cambridge University Press

ERK – extracellular signal-regulated protein kinase, MAPK (mitogen-activated protein kinase)

Regulace

- proliferace
- diferenciaci
- apoptózy



Konstitutivní aktivace MAPKs je častým jevem u řady nádorových buněčných linií včetně kolonu (Hoshino et al., 1999)

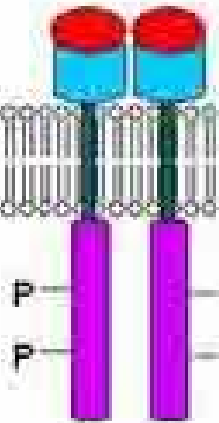
PI3K/Akt

- PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) – lipidová kináza, součástí signální dráhy tyrosinkinázových receptorů
- Tři základní třídy, řada podtypů
- Katalytická a regulační podjednotka
- Stimulace proliferace, inhibice apoptózy
- Konstitutivní aktivace u řady nádorů
- Inhibitory PI3K, Akt jako potenciální protinádorová terapeutika
- Aktivní PI3K fosforyluje a tím aktivuje kinázu Akt (PKB), která má dále celou řadu substrátů, jenž se podílejí na regulaci proliferace a apoptózy

Akt (PKB)

- Akt je jednou z nejčastěji aktivovaných protein kináz u nádorů, Akt může fosforylovat širokou škálu substrátů, z nichž některé hrají důležitou úlohu v karcinogenezi
- Hyperaktivace Akt je spojena s rezistencí k apoptóze a zvýšenou buněčnou proliferací
- buněčný homolog virového onkogenu vAkt
- Akt spouští řadu antiapoptotických signálů – inaktivuje proapoptotický protein Bcl-2 rodiny – Bad, inaktivuje kaspázu 9, brání vylití cytochromu c z mitochondrií, reguluje hladinu proteinu FLIP, fosforyluje NF-kappa B
- Akt se podílí na stimulaci buněčného cyklu - reguluje stabilizaci některých cyklinů a transport inhibitorů kináz do jádra

RPTK

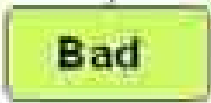


PI3K



PDK1

PDK2



Inhibition of apoptosis



Cell growth and proliferation

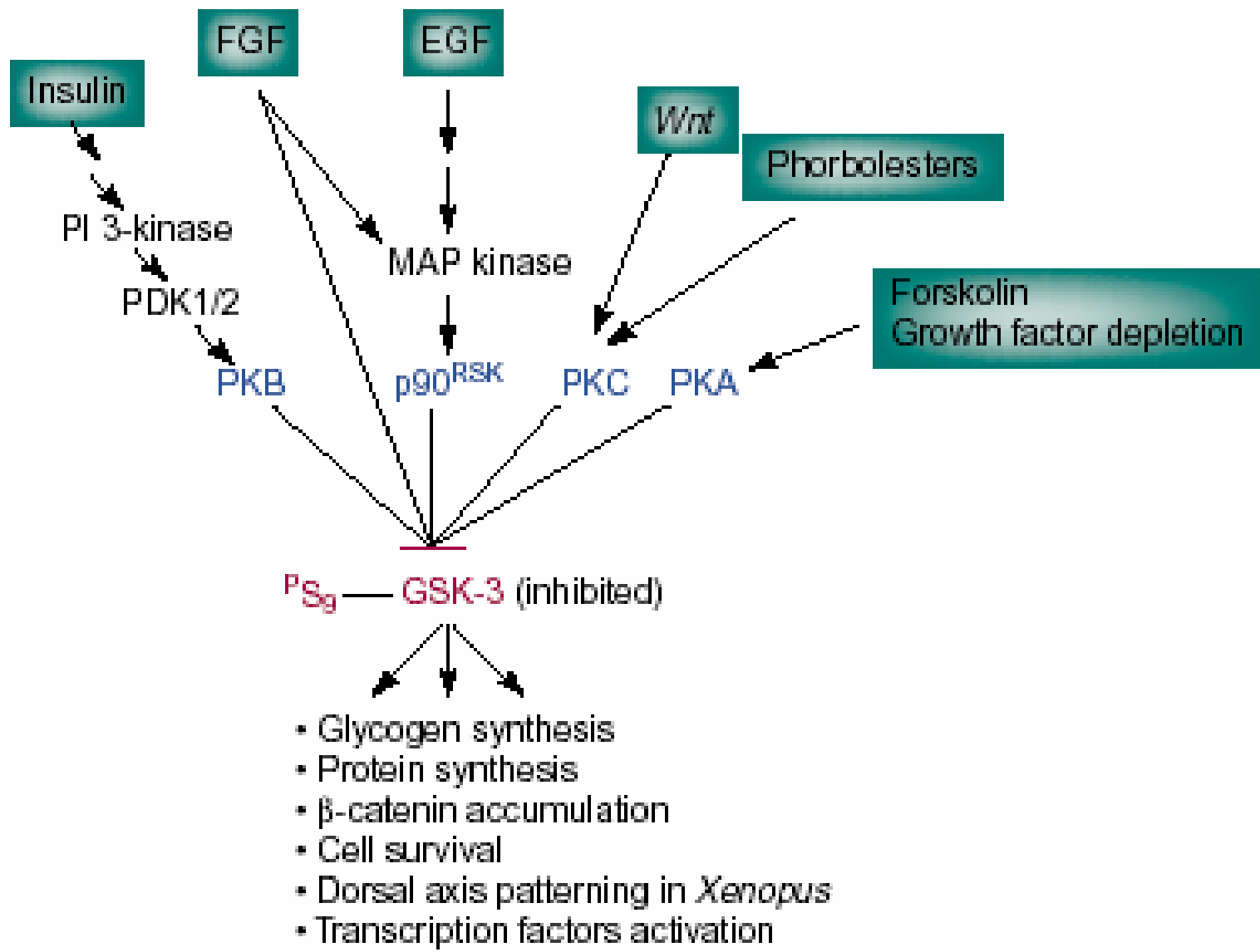


Fosforylace
Bad, kaspázy-9,
některých TFs ...

Kináza důležitá
v indukci
apoptózy

GSK

- Kináza glykogen syntázy
- Ser/Thr kináza, 2 izoformy, substrát pro Akt
- Klíčová molekula v regulaci řady procesů v buňce – regulace metabolismu, apoptózy..
- Fosforyluje více než 40 různých proteinů v buňce
- Významná role v apoptóze (overexprese – podpora buněčné smrti, inhibice – suprese BS)
- Deregulace GSK – onemocnění – diabetes, nádory



TRAIL ... nejen indukce apoptózy, ale i ...

- podpora růstu a přežívání u nenádorových buněk – např. lidské endoteliální buňky (Secchiero et al., 2003)
- účast v regulaci homeostázy ve tkáních
- simultánní aktivace proapoptotických i antiapoptotických signálních drah po ligaci TRAILu na receptory nádorových buněk (Baader et al., 2005)
- regulace proliferace nádorových buněk (A, P, AP, 0 cells)
- TRAILem indukovaná proliferace nádorových buněk může být nebezpečná u nádorů rezistentních k apoptóze indukované TRAILem – posílení nádorového růstu
- nutné sledovat interakce těchto drah, mít možnost klasifikovat buňky z hlediska reakce na tento cytokin a předvídat tak účinek protinádorové terapie využívající TRAIL

TRAIL jako aktivátor pro-survival drah

- Po působení TRAILu byla rovněž popsána aktivace nebo nárůst exprese řady molekul zapojených v regulaci přežití:
 - MEK/ERK
 - Mcl-1
 - NF-kappaB
 - atd.

TRAIL nejen jako induktor apoptózy, ale rovněž faktor schopný stimulace proliferace a přežívání buněk

Důležitost rovnováh

- V modulaci citlivosti buněk k apoptotickým účinkům TRAILu hraje klíčovou úlohu rovnováha mezi pro- a anti-apoptotickými signálními drahami!!!

Modulace apoptózy indukované TRAILem v podmínkách inhibice MEK/ERK dráhy

- **inhibitory:**
 - **U0126 – inhibitor MEK1/2**
 - **LY294002 – inhibitor PI3K**

**Buňky pretreatovány s inhibítorem, pak
treatment s TRAILem a studium
apoptózy**

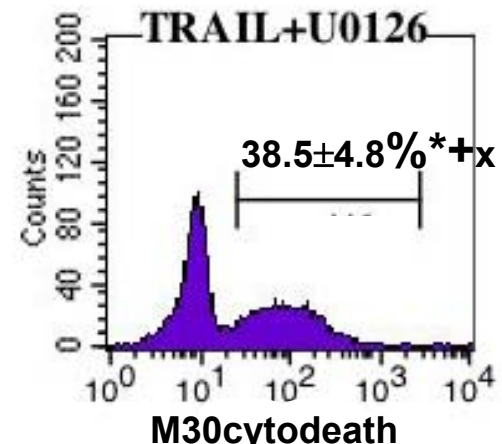
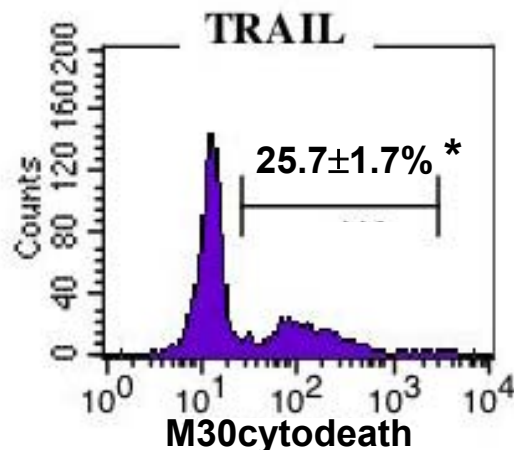
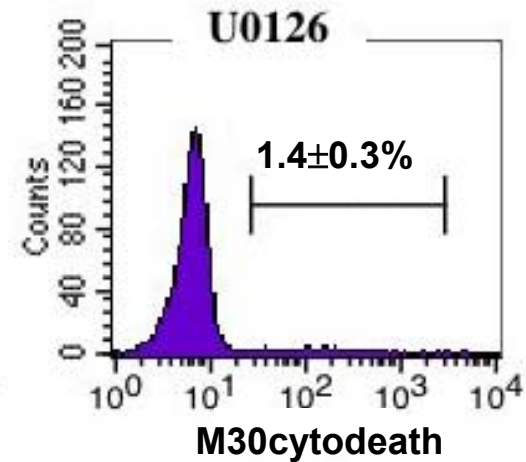
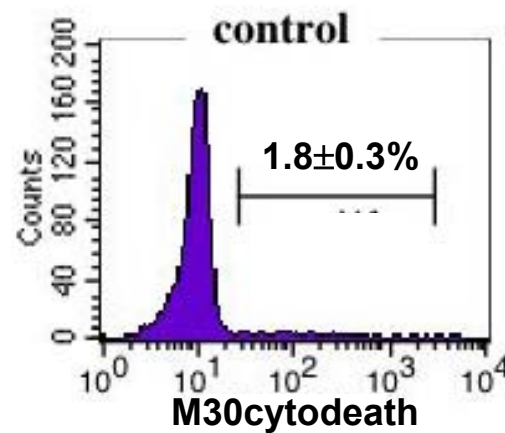
Posílení apoptózy indukované TRAILem v podmínkách specifické inhibice dráhy MEK/ERK

Štěpení PARP



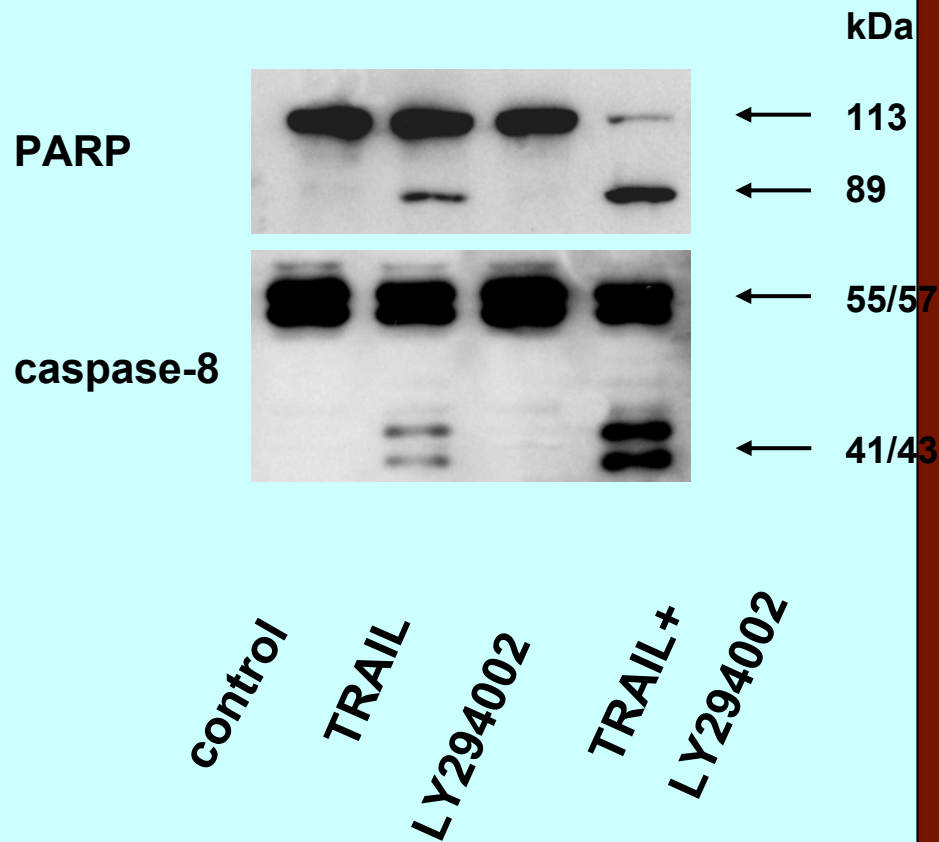
control
TRAIL
U0126
TRAIL+U0126

Štěpení CK18 (M30cytodeath, FCM)

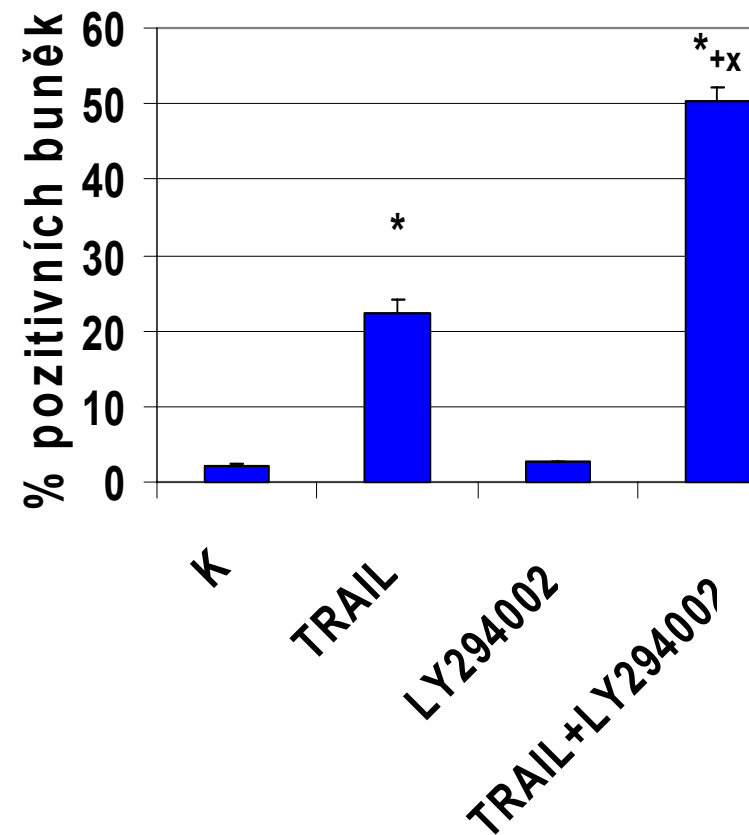


(Vaculova et al., 2006)

Posílení apoptózy indukované TRAILem v podmínkách specifické inhibice dráhy PI3K/Akt

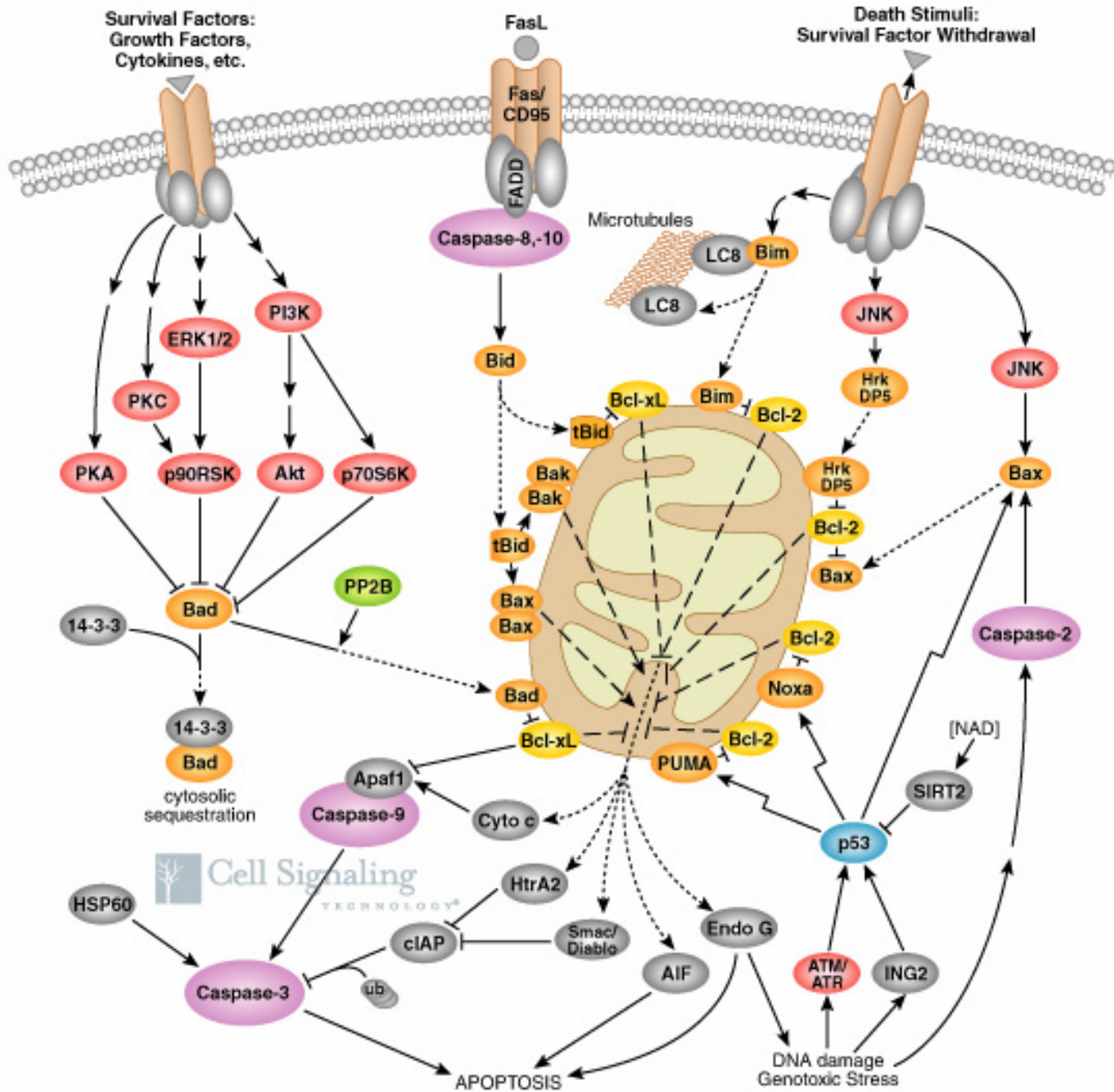


Štěpení CK18 (FCM)



Modulace apoptózy indukované TRAILem prostřednictvím „pro-survival“ kináz

- FLIP
- Kaspáza-8, 9
- Bcl-2 rodina – Mcl-1, Bad, Bcl-2
- Mitochondrie – vylití mediátorů apoptózy
- NF-kappa B
- GSK
- Atd.....



Cell Signaling
TECHNOLOGY

www.cellsignal.jp/reference/pathway/mito_ctrl.php


Rovnováhy

- V podmínkách inhibice drah důležitých pro přežití buňky (MEK/ERK, PI3K/Akt) dochází k posílení apoptózy indukované TRAILem u nádorových buněk tlustého střeva

Kombinovaná terapie

- **Využití specifických inhibitorů kináz zahrnutých v regulaci proliferace a růstu buněk**
- **Kombinovaná terapie – kinázové inhibitory + induktory apoptózy**
- **Tyto inhibitory jsou v současné době intenzívně studovány**
- **Slibné využití v protinádorové terapii**

Děkuji za pozornost!

 **Laboratoř
ytokinetiky**

Biofyzikální ústav AVČR, BNNO