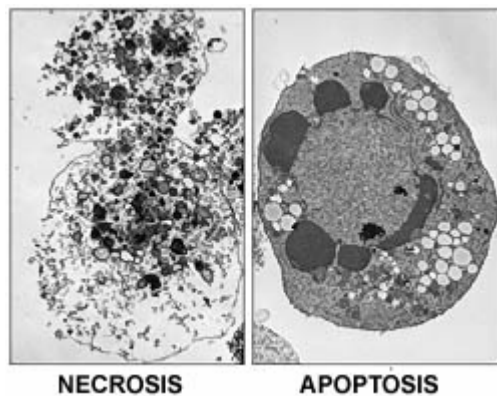
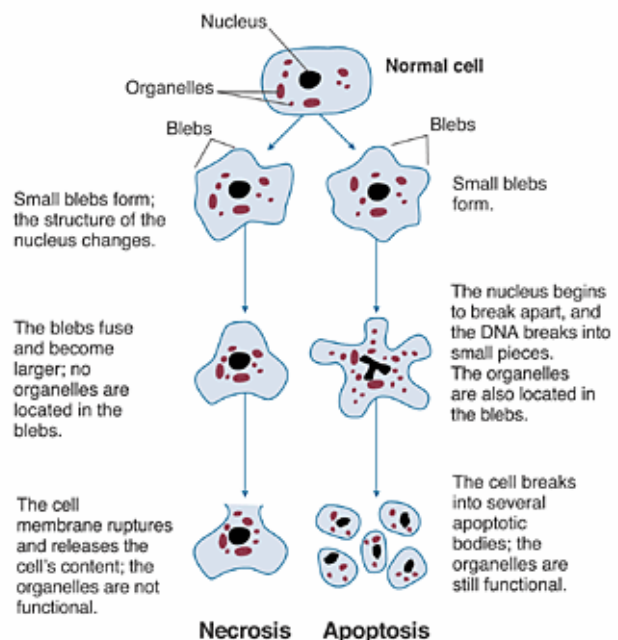


3. Nekróza a programovaná buněčná smrt

Jako **nekróza** se označuje neřízená smrt buňky nebo tkáně, způsobená vnějším neočekávaným zásahem. Narozdíl od apoptózy jako formy programované buněčné smrti, nedochází k aktivaci specifických vnitrobuněčných signálních drah, které řídí rozpad buňky a nejsou produkovány signály, které navádí fagocyty z blízkého okolí k místu zániku buňky. Během neřízené buněčné smrti vlivem zranění, infekce, hypoxie nebo nádorového onemocnění dochází k rozpadu buňky - bortí se cytoplazmatická membrána a do okolí se uvolňuje obsah buňky. Zároveň se rozpadají lysozomy a další buněčné kompartmenty, což vede k uvolnění zejména lysozomálních enzymů a zahájení nekontrolovaného sledu enzymatických reakcí, které poškozují sousedící tkáně. V blízkém okolí se mobilizují imunitní buňky, což může vést k zánětu. Morfologicky lze rozlišit několik typů nekrózy v lidských tkáních – koagulační (vzniká v hypoxickém prostředí – např. infarkt myokardu nebo sleziny), kolikvační (spojená s rozpadem buňky a enzymatickým poškozením tkání – např. zápal plic), hemorhagická (spojená s poruchou krevního zásobení v tkáni a prostoupením nekrotické tkáně krví), tuková (poškození tkání zejména účinkem uvolněných lipáz) a další, typické např. pro tuberkulózu (kaseózní nekróza).



Obr. 28. Srovnání nekrotické a apoptotické buňky. U nekrotické buňky je jasně patrná naprostá absence jakékoliv organizace nebo řízení procesu. Buňka se spontánně rozpadá. Buňka procházející apoptózou má naopak stále nepoškozenou cytoplazmatickou membránu a nedochází u ní tak k samovolnému uvolňování nebezpečného obsahu cytoplazmy nebo buněčných kompartmentů do okolí.

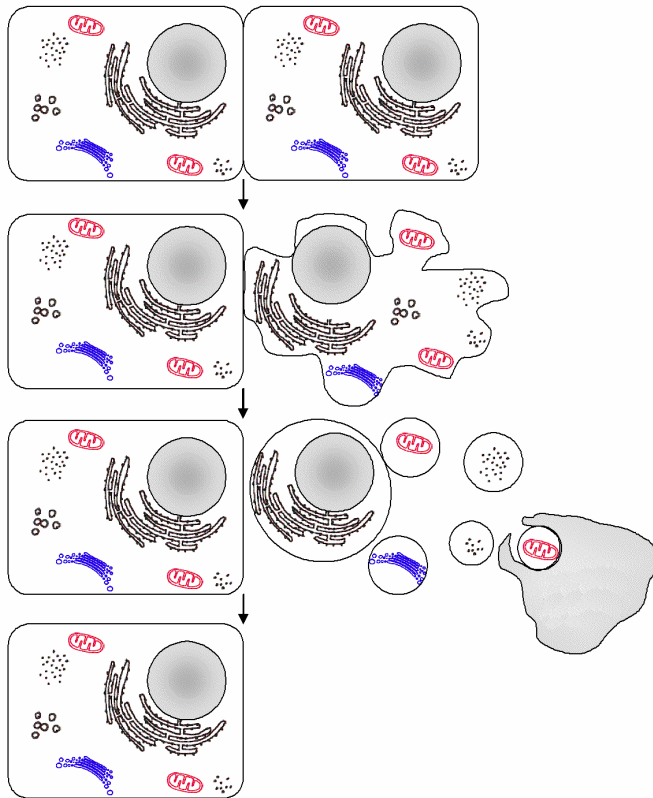


Obr. 29. Hlavní rozdíly v průběhu nekrózy a apoptózy.

→ <http://www.niaaa.nih.gov/Resources/GraphicsGallery/Liver/changes.htm>

Programovaná buněčná smrt (PCD)

Jestliže během nekrózy zaniká buňka nekontrolovaně a představuje pro organismus patologický jev, je programovaná buněčná smrt nezbytným procesem doprovázejícím embryonální vývoj a je i součástí života dospělého organismu.



Obr. 30. Jedna z možných variant programované buněčné smrti:

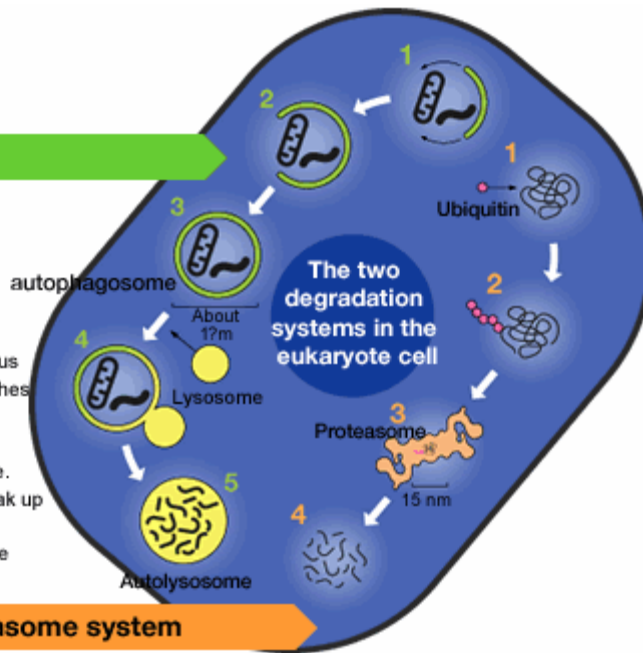
Sousední buňka aktivuje v cílové buňce molekulární dráhy, které vedou k morfoloickým změnám (smršťování cytoplazmatické membrány, kondenzace a fragmentace jaderné DNA, vznik apoptotických tělísek). Umírající buňka zároveň vysílá signály k fagocytům v blízkém okolí, které pohltnou její pozůstatky bez patologické (zánětlivé) reakce a poškození sousedních tkání.

→ <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Apoptose-german.png>

Programovaná buněčná smrt může být aktivována na základě vnitřních stimulů (např. neopravitelným poškozením DNA) nebo okolními buňkami – většinou solubilními cytokiny rodiny TNF. Oba dva způsoby vedou k aktivaci cysteinových proteáz – kaspáz, které celý proces zániku buňky provádí. Dvěma základními typy PCD jsou apoptóza, čili programovaná buněčná smrt v užším smyslu slova, a autofagie, což je vlastně způsob degradace proteinů, bakterií nebo jakéhokoli jiného materiálu obklopeného membránou uvnitř buňky, využitý pro odbourání buněčných organel. Oba způsoby se liší molekulárním mechanismem řízení i fyzického provedení zániku buňky.

Autophagy

1. The barrier membrane that appears in the cell?
2. Surrounds part of the cell?
3. And creates a double-membraned autophagosome.
4. Then, a lysosome with various hydrolytic enzymes approaches and combines with the autophagosome?
5. It becomes an autolysosome. The hydrolytic enzymes break up the internal membrane, organelles, and protein of the autophagosome.



The ubiquitin-proteasome system

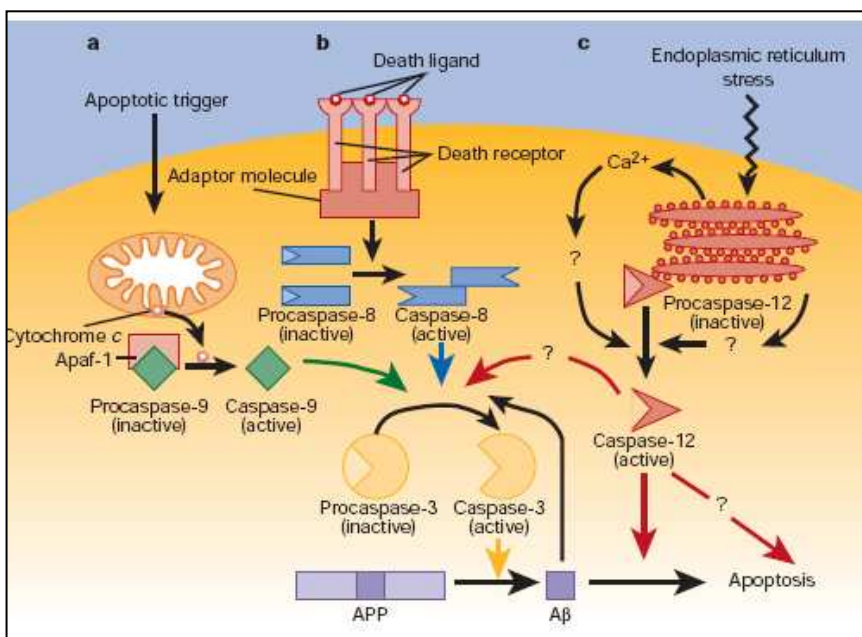
The ubiquitin attaches to the unneeded proteins as a marker and the proteasome breaks them up.

Obr. 31. Autofagie je vedle ubiquitin-dependentních mechanismů významným systémem pro degradaci pohlceného materiálu, bakterií nebo také vlastních proteinů. Za určitých okolností může buňka odbourat tímto způsobem i sama sebe.

→ http://www.brh.co.jp/en/experience/journal/45/img/04_ill1.gif

Apoptóza

Mechanismus iniciace apoptózy shrnuje následující obrázek:



→ Mehmet H.: Caspases find a new place to hide. 2000. Nature 403(6): 29-30.

Obr. 31. (a), (b) a (c) označují tři možné způsoby aktivace apoptózy.

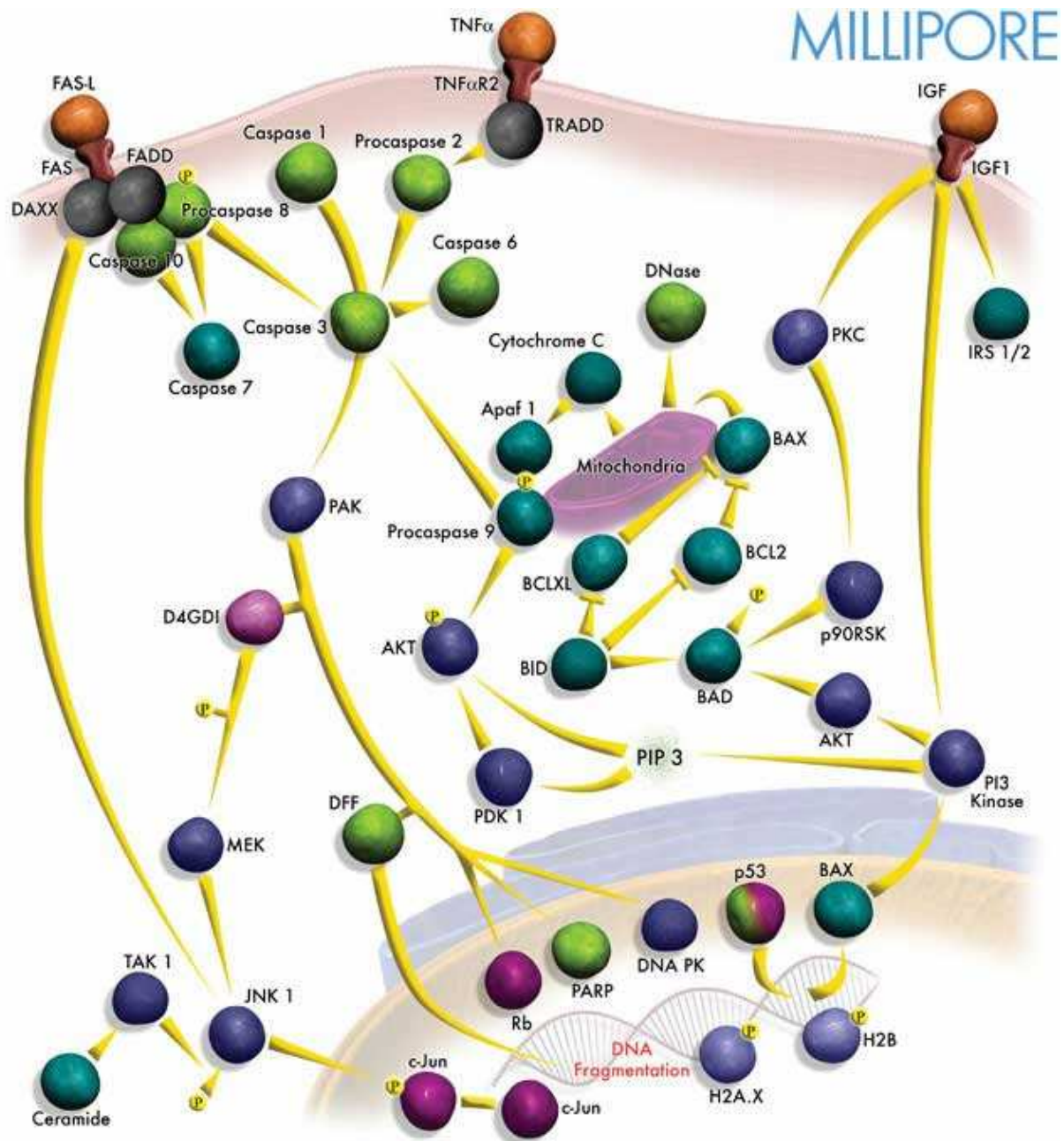
(a): dráha se aktivuje v případě neopravitelného poškození DNA nebo jiného vnitřního stimulu. Cytochrom c a další pro-apoptotické signální molekuly jsou uvolněny do cytosolu, kde se podílí na tvorbě komplexu spolu s Apaf-1 a prokaspázou 9. Výsledkem je aktivní kaspáza 9.

(b): Aktivace a oligomerizace tzv. death-receptorů (např. Fas nebo TNF) vede k aktivaci prokaspázy 8 na její aktivní dimerní formu.

(c): Pokud dojde k uvolnění velkého množství Ca^{2+} např. poškozením endoplazmatického retikula dochází k aktivaci kaspázy 12.

Všechny tři dráhy iniciačních kaspáz 8, 9 a 12 aktivují společný cíl, kterým je kaspáza 3. Kaspáza 3 štěpí β -amyloid precursor protein na amyloid β -peptide, který se zpětnou vazbou podílí na aktivaci dalších molekul kaspázy 3.

Celá signální dráha probíhající od aktivace PCD po zánik buňky je ovšem mnohem složitější, zahrnuje systém pozitivních i negativních zpětných vazeb a je striktně regulovaná. Poškození jednotlivých komponent má klíčový význam v nádorové transformaci.



Apoptosis

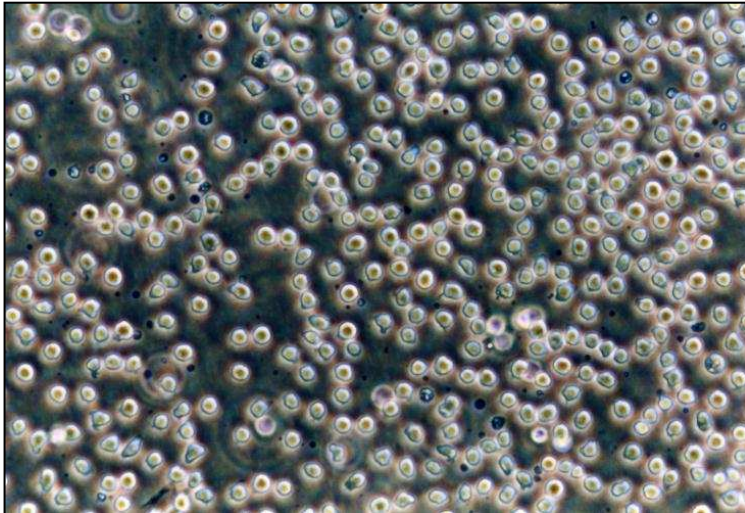
upstate
now part of Millipore

Analýza programované buněčné smrti

Pro studium apoptózy a nekrózy lze využít řadu metod, které sledují např. morfologii buňky, stav degradace DNA, aktivitu kaspáz apod.

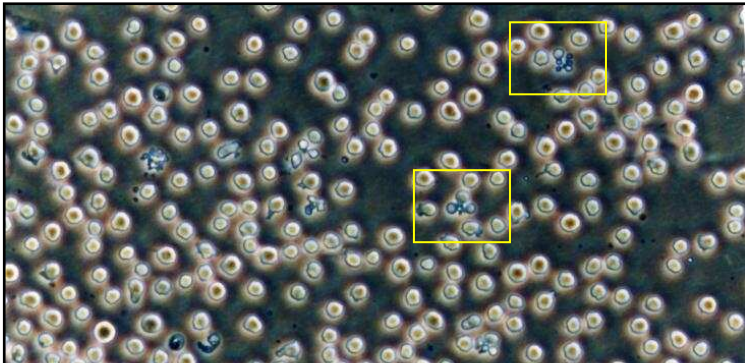
Morfologie apoptotické buňky

1. Světelná mikroskopie



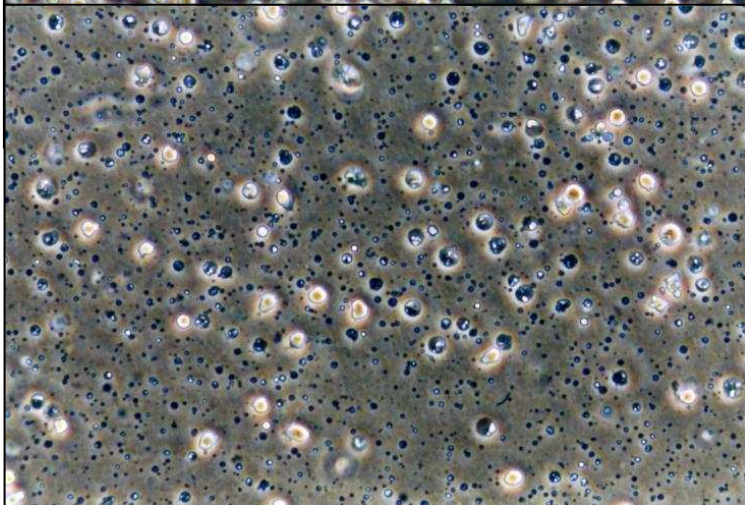
Obr. 32.

Kontrolní, neovlivněné buňky U937



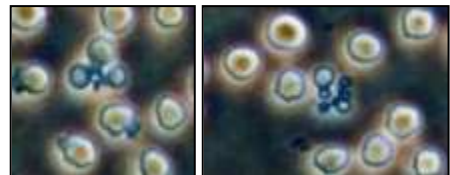
U937 + Kamptotecin, 6 hodin

Kamptotecin ovlivňuje aktivitu topoizomerázy I, čímž dochází ke vzniku jednořetězcových zlomů v DNA. Buňka na toto poškození reaguje iniciací apoptózy. Na výřezech jsou patrná apoptotická tělíška.



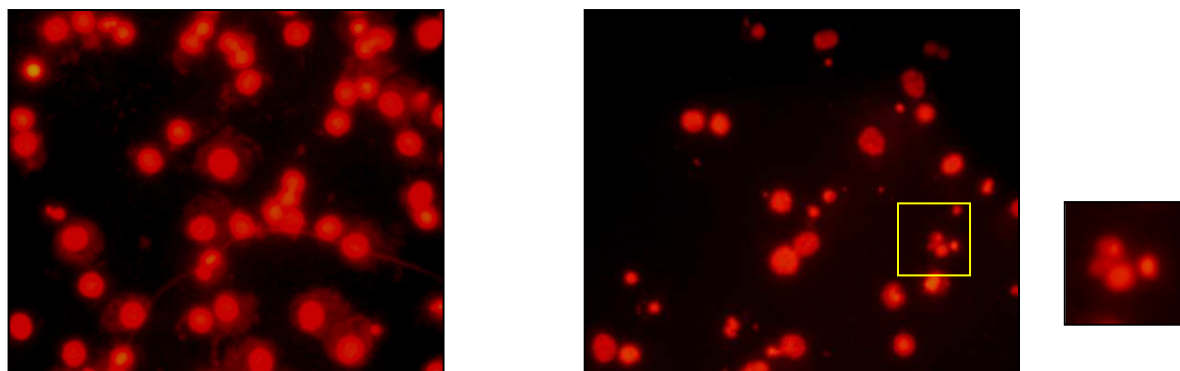
U937 + Kamptotecin, 24 hodin

Většina buněk v populaci již zahynula - tzv. buněčný debris, který je viditelný na tomto obrázku je výsledkem sekundární nekrózy – rozpadu apoptotických tělíšek a mrtvých buněk (ty bývají *in vivo* odstraněny fagocyty)



2. Fluorescenční mikroskopie

Během apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu a štěpení jaderné DNA. Jednou z možností, jak sledovat rozpad jader je jejich obarvení vhodným fluorescenčním barvivem, nejčastěji propidium jodidem (PI) a analýza fluorescenční mikroskopii.



Obr. 33.

Kontrolní buňky BM2 obarvené PI.

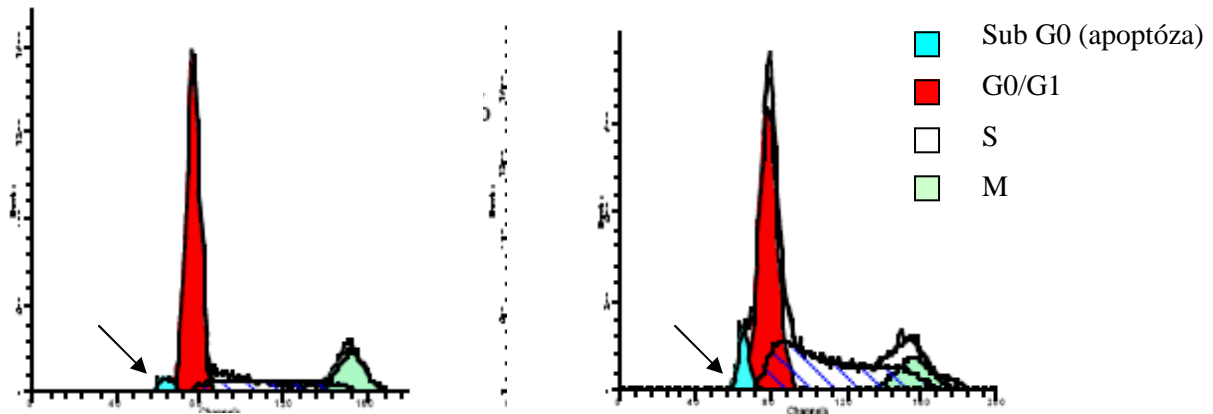
Jeden z derivátů buněčné linie BM2 (BM2cJUN), u kterého byla programovaná buněčná smrt. PCD byla vyvolána indukcí exprese transkripčního faktoru *c-jun* v prostředí s minimem sérových růstových faktorů.

Postup:

1. Buněčnou suspenzi promýt v $1 \times$ PBS, cfg. 1500 rpm/5 min.
2. Fixovat ve směsi methanolu (75%) a kyseliny octové (25%) min. 1hod/-20°C.
3. Cfg. 2000 rpm/5 min.
4. Pelet resuspendovat v cca 100 μ l fixační směsi, v závislosti na hustotě buněk
5. Suspenzi kápnout na podložní sklíčko a nechat krátce zaschnout
6. Obarvit buňky 1 μ l propidium jodidu (20mg/ml) a okamžitě hodnotit min. 200 buněk/vzorek.

Analýza buněčného cyklu – pík subG0

Během apoptózy dochází k degradaci DNA, řada buněk v G1 fázi buněčného cyklu, které procházejí apoptózou, tedy bude obsahovat množství DNA, které neodpovídá ani diploidnímu obsahu. Stanovením množství DNA např. průtokovým cytometrem můžeme tento počet buněk určit – na histogramu se projeví jako tzv. subG0 pík.



Obr. 34.

Kontrolní buňky BM2

Buňky BM2, u nichž byla indukována apoptóza.

Postup:

1. Buněčnou suspenzi (cca 1×10^6) promýt minimálně dvěma objemy $1 \times \text{PBS}$
2. Cfg 1500rpm/5min.
3. Odsát PBS, buňky rozsuspendovat v 0,5ml $1 \times \text{PBS}$
4. Přidat 4ml 70% EtOH (4°C)
5. Fixovat . 24 hod./ 4°C
6. Cfg 1500rpm/5 min./ 4°C
7. Buňky rozsuspendovat v 4 ml $1 \times \text{PBS}$
8. Cfg 1500rpm/5 min./ 4°C
9. Buňky rozsuspendovat v 0,5ml Vindelova roztoku, barvit 30 min.-1hod./ 37°C . Do měření uchovávat na ledu.

Vindelův roztok:

1M Tris (pH 8.0)	1ml	
RNasa	1-7mg	
Triton (ev. NP-40)	100 μl	(pouze pokud buňky nejsou fixovány v EtOH)
NaCl	60 mg	
Propidium jodid	5mg	
Deionizovaná voda	do 100ml.	

Uchovávat při 4°C ; Dlouhodobě alikvoty v -20°C

Podle: Robinson J.P., Handbook of flowcytometry methods, Willey-Liss 1993.

Lokalizace fosfatidylserinu

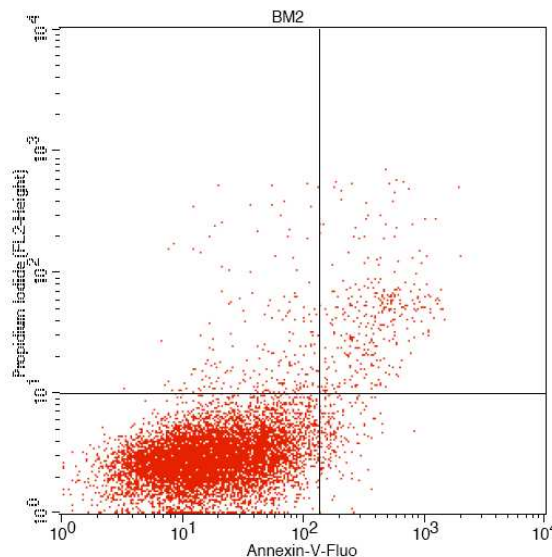
Fosfatidylserin je klíčovou složkou buněčných membrán, který je za běžných okolností lokalizovaný na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Během raných fází apoptózy se mění jeho lokalizace – je transportován na vnější stranu membrány (externalizace), kde slouží jako tzv. „eat me“ signál, který navádí fagocyty k apoptotické buňce. Pro jeho detekci se využívá fluorescenčně označeného proteinu – Annexin V, který se na fosfatidylserin váže. Využitím průtokové cytometrie tak můžeme určit podíl buněk, které exponují fosfatidylserin na vnější straně membrány. Během analýzy se zároveň stanovuje integrita membrány pomocí propidium jodidu, což umožňuje odlišit nekrotické a sekundárně nekrotické buňky.

Levý horní kvadrant:

Buňky s porušenou membránou, přijímající PI, s nezměněnou lokalizací fosfatidylserinu – **nekróza**

Levý dolní kvadrant:

Buňky nepřijímající PI, s nezměněnou lokalizací fosfatidylserinu – **živé buňky**



Pravý horní kvadrant:

Buňky s porušenou membránou, přijímající PI, s fosfatidylserinem na vnější straně membrány – **sekundární nekróza**

Pravý dolní kvadrant:

Buňky nepřijímající PI, s fosfatidylserinem na vnější straně membrány – **apoptóza**

Obr. 35. Analýzy buněčné smrti stanovením externalizovaného fosfatidylserinu.

Postup:

V tomto případě je nutné provést tzv. vitální barvení, které nepoškozuje živé buňky.

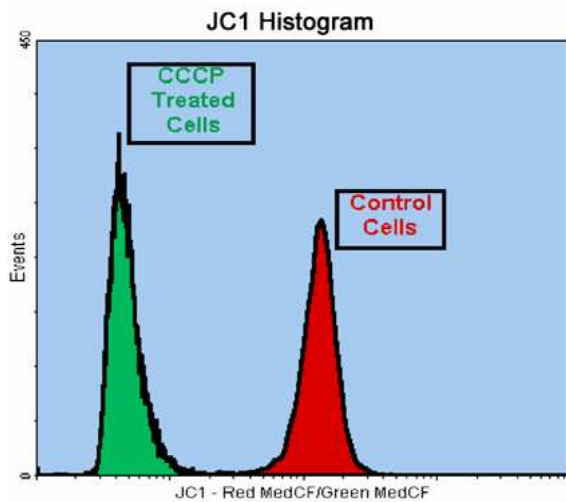
1. Buněčnou suspenzi centrifugovat 1500rpm/5min a promýt 1 × PBS.
2. Pelet dvakrát promýt pracovní roztokem.
3. Přidat FITC-konjugovanou protilátku proti Annexinu V (0.5 µl/vzorek) a propidium jodid (5 µg/ml) v pracovním roztoku.
4. Inkubovat 15 min. bez přístupu světla.
5. Změřit na průtokovém cytometru.

Pracovní roztok (pH 7.4):

10mM HEPES
140mM NaCl
10mM CaCl₂

Detekce mitochondriálního membránového potenciálu

Změny v permeabilitě mitochondriálních membrán jsou detekovatelné již v raných fázích apoptózy. Tento proces se označuje jako kolaps elektrochemického gradientu, který probíhá podél celé mitochondriální membrány a je měřitelný pomocí tzv. membránového potenciálu (Ψ). Ψ se detekuje pomocí fluorescenčního barviva JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzamidazolocarboyanin jodid) pomocí průtokové cytometrie nebo fluorometrie.

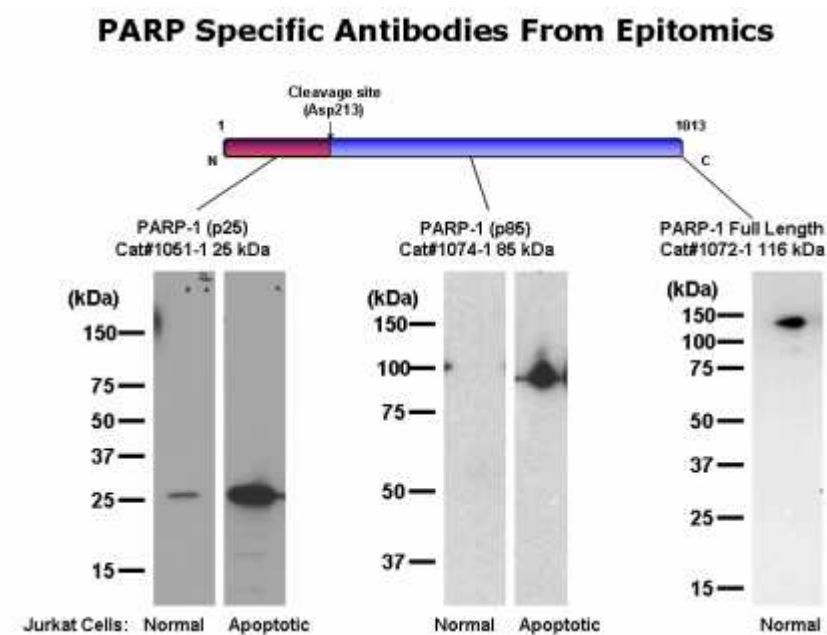


Obr. 36. Ve stabilních mitochondriích fluoreskují monomery JC-1 červeně, při změně parametrů mitochondriální membrány dochází k vyloučení JC-1 a vzniku agregátů, které fluoreskují zeleně. Poměr zeleného signálu k červenému umožňuje kvantifikaci membránového potenciálu.

→ <http://meds.queensu.ca/qcri/flow/apoptosis.htm>

PARP

116kDa protein PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) je reparační enzym, který je v průběhu zániku buňky apoptózou štěpený různými kaspázami. Vznikají dva fragmenty o velikost cca 25kDa a 85kDa. Jeho detekce se provádí westernovým blottingem, pomocí protilátek cílených na různé fragmenty PARP.

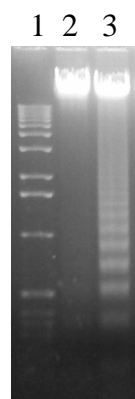


Obr. 37. Imunoblotting a analýza PARP.

→ http://www.epitomics.com/products/parp1_intro.html

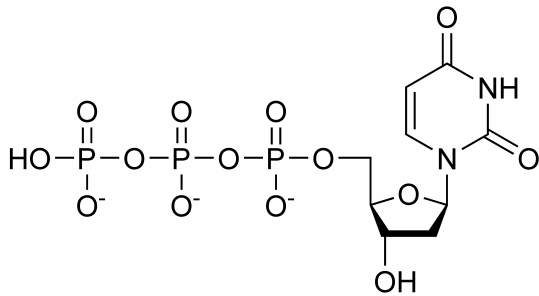
DNA Ladder

V průběhu apoptózy je jaderná DNA štěpená na krátké fragmenty, které lze detekovat Ethidium bromidem a zobrazit na agarózovém gelu. Po elektroforéze tak vzniká typický vzor, označovaný jako „DNA ladder“ (žebřík).

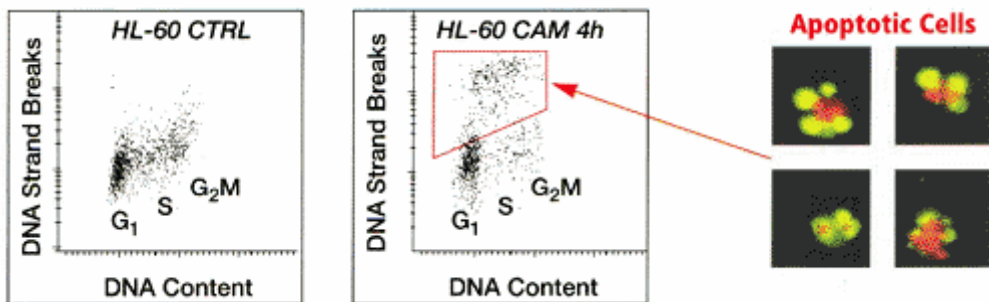


Obr. 38. Dráha č. 1 je 1kb DNA standard, č. 2 genomová DNA z kontrolních buněk BM2, č.3 genomová DNA izolovaná z monoblastů BM2, u nichž byla indukována apoptóza.

Podobnou metodou, která je schopná odhalit fragmenty DNA vznikající během apoptózy je tzv. „TUNEL“ – (Terminal transferase dUTP nick end labeling). Metoda je založena na detekci „nicks“ – zlomů v řetězci DNA, které mohou být identifikovány s využitím terminální transferázy. Enzym terminální transferáza (TdT) katalyzuje adici dUTP na volné 3' OH konce. Pokud jsou dUTP označené např. biotinem nebo fluoresceinem, můžeme sledovat aktivitu TdT.



Obr. 39. dUTP, 2'-Deoxyuridin 5'-Trifosfát



Obr. 40. Výsledek TUNEL assay

→ <http://www.compucyte.com>

Podobně jako TUNEL funguje i tzv. ISNTA (In situ nick translation assay), která detekuje zlomy v DNA pomocí DNA polymerázy. Využívá se zejména v tkáňových řezech.