Apoptóza nádorových buněk tlustého střeva po působení TRAILu a metody její detekce

Přednáška 6.12.2005

RNDr. Alena Vaculová, Ph.D.

Laboratoř Cytokinetiky

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

VÝZKUM APOPTÓZY

Výzkum zabývající se problematikou apoptózy je stále aktuální a rozvíjející se oblastí vědy.

Má možnosti široké aplikace jak v základním výzkumu, tak v klinické praxi.

Regulace průběhu buněčné smrti patří mezi klíčové funkce nutné pro udržení normálních funkcí organismu.

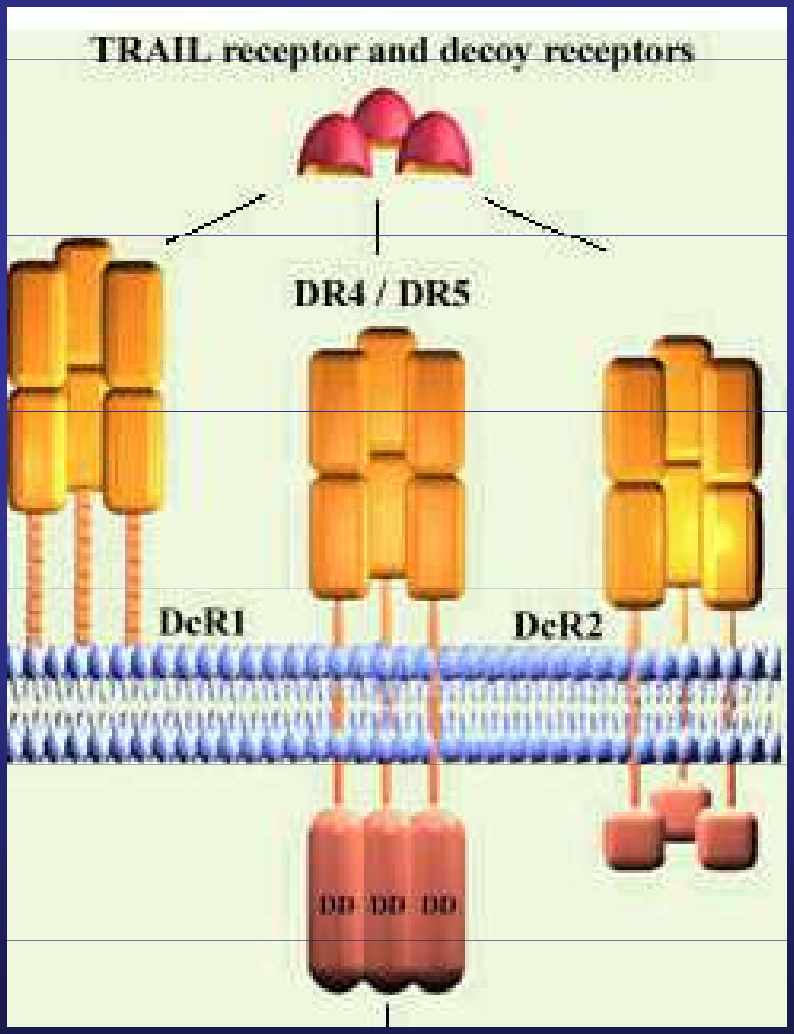
V případě jejího porušení může docházet k nekontrolovatelnému úbytku buněk nebo naopak k jejich akumulaci v organismu (např. při nádorovém onemocnění).

Důkladné pochopení mechanismů apoptózy je proto nutným předpokladem pro úspěšnou terapii řady onemocnění.

TRAIL

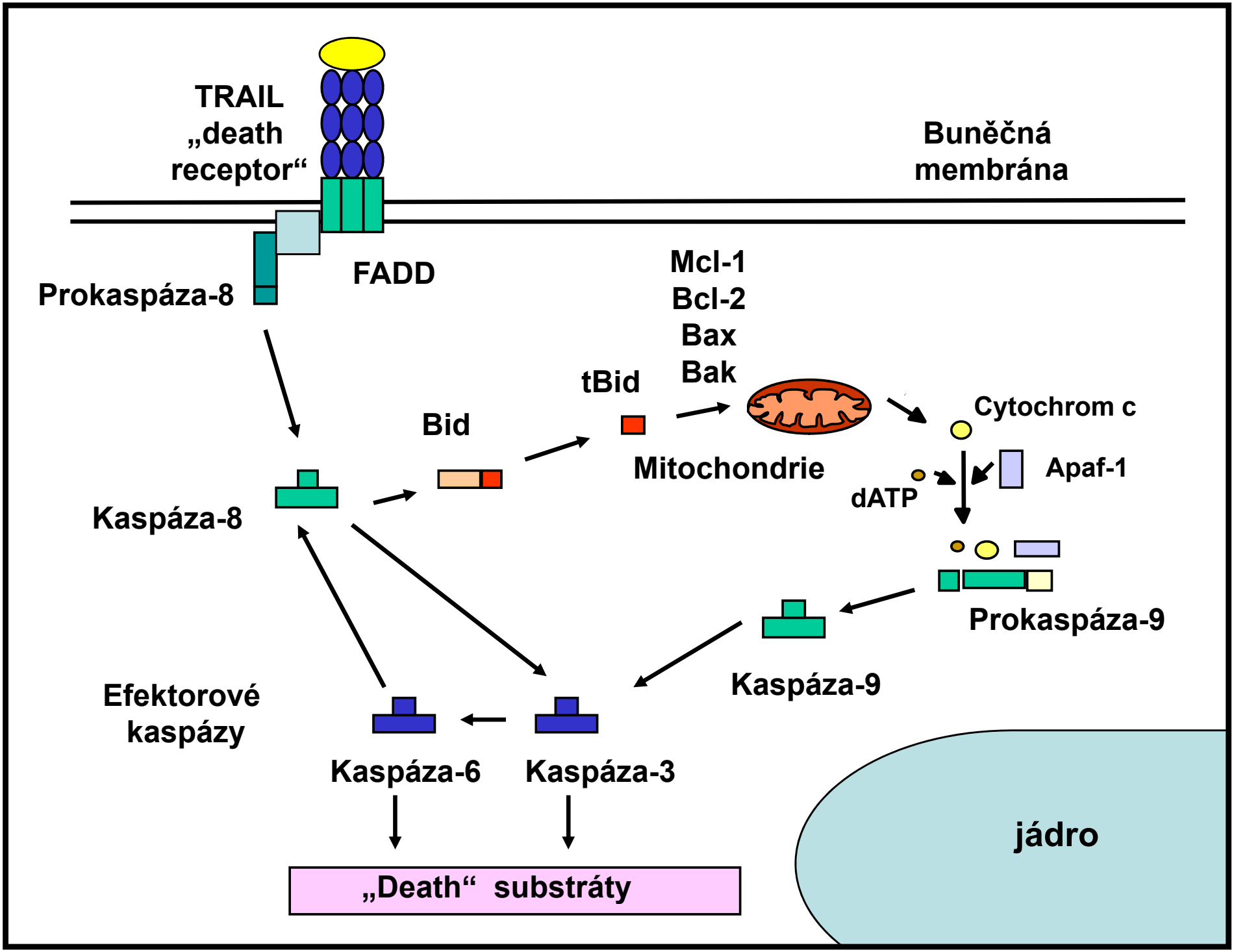
- selektivní indukce apoptózy u celé řady nádorových buněk, ne však u většiny normálních

(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)


TRAIL
„death
receptor“
Buněčná
membrána
FADD
Prokaspáza-8
Mcl-1
Bcl-2
Bax
Bak
tBid
Bid
Cytochrom c
Mitochondrie
Apaf-1
dATP
Kaspáza-8
Prokaspáza-9
Kaspáza-9
Efektorové
kaspázy
Kaspáza-6
Kaspáza-3
jádro
„Death“ substráty

Ovlivnění citlivosti buněk k účinkům TRAILu:

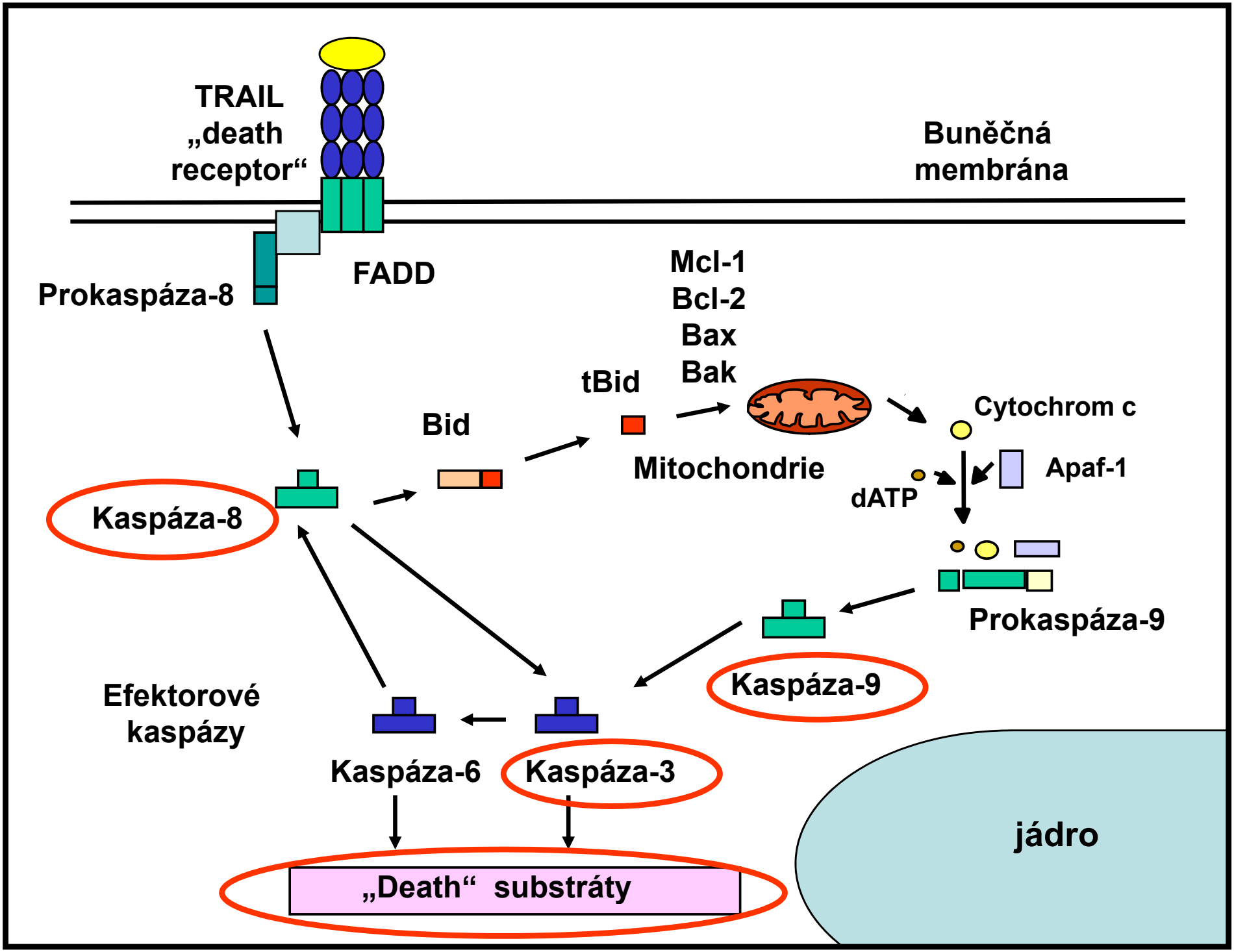
- na úrovni receptorů
  - množství DRs a DcRs, jejich mutace

- na úrovni jednotlivých proteinů v signální dráze TRAILu
  - kaspáza-8, FLIP
  - Smac/DIABLO
  - inhibitory apoptózy (IAPs)
  - NF-kappaB
  - Bcl-2 rodina (Mcl-1, Bcl-2, Bax…)
  - kinázy
  - atd…..

Popis signálních drah TRAILu je velmi důležitý pro pochopení mechanismu jeho 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?


TRAIL
„death
receptor“
Buněčná
membrána
FADD
Prokaspáza-8
Mcl-1
Bcl-2
Bax
Bak
tBid
Bid
Mitochondrie
Cytochrom c
Apaf-1
dATP
Kaspáza-8
Prokaspáza-9
Kaspáza-9
Efektorové
kaspázy
Kaspáza-6
Kaspáza-3
jádro
„Death“ substráty

Kaspázy

- cysteinové proteázy, specificky štěpí proteinové substráty v místě kyseliny asparagové

- klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu

- v inaktivní formě (proenzymy, pro-kaspázy), štěpení – aktivní kaspáza schopná dále štěpit tzv. „death substráty“

- struktura:

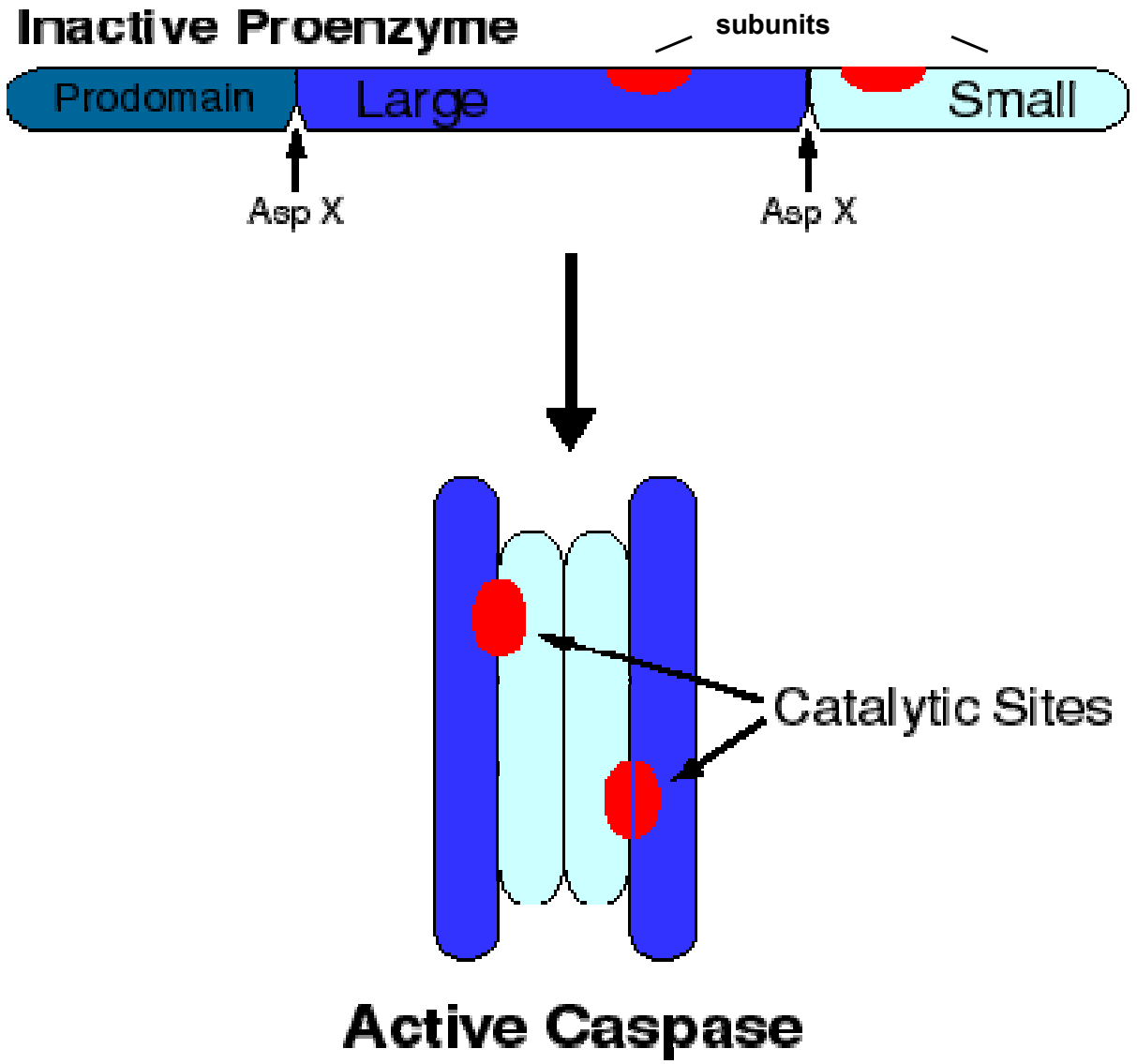
    - Prodoména

    - Katalytické podjednotky – velká a malá (heterotetramer)

-dělení:

    - Iniciační kaspázy (dlouhá prodoména) - kaspázy-8, -9

    - Efektorové (krátká prodoména) – kaspáza-3


Inactive Proenzyme
subunits
Prodomain
Large
Small
Asp X
Asp X
Catalytic Sites
Active Caspase

-Substráty kaspáz:

- PARP – poly(ADP)ribosyl polymeráza
- cytokeratiny (CK18)
-actin, fodrin, lamin
- kaspázy
- proteiny Bcl-2 rodiny – Bid
-kinázy (PKC)
- atd.

Kaspáza-8

- iniciační kaspáza aktivovaná na úrovni signálního komplexu DISC

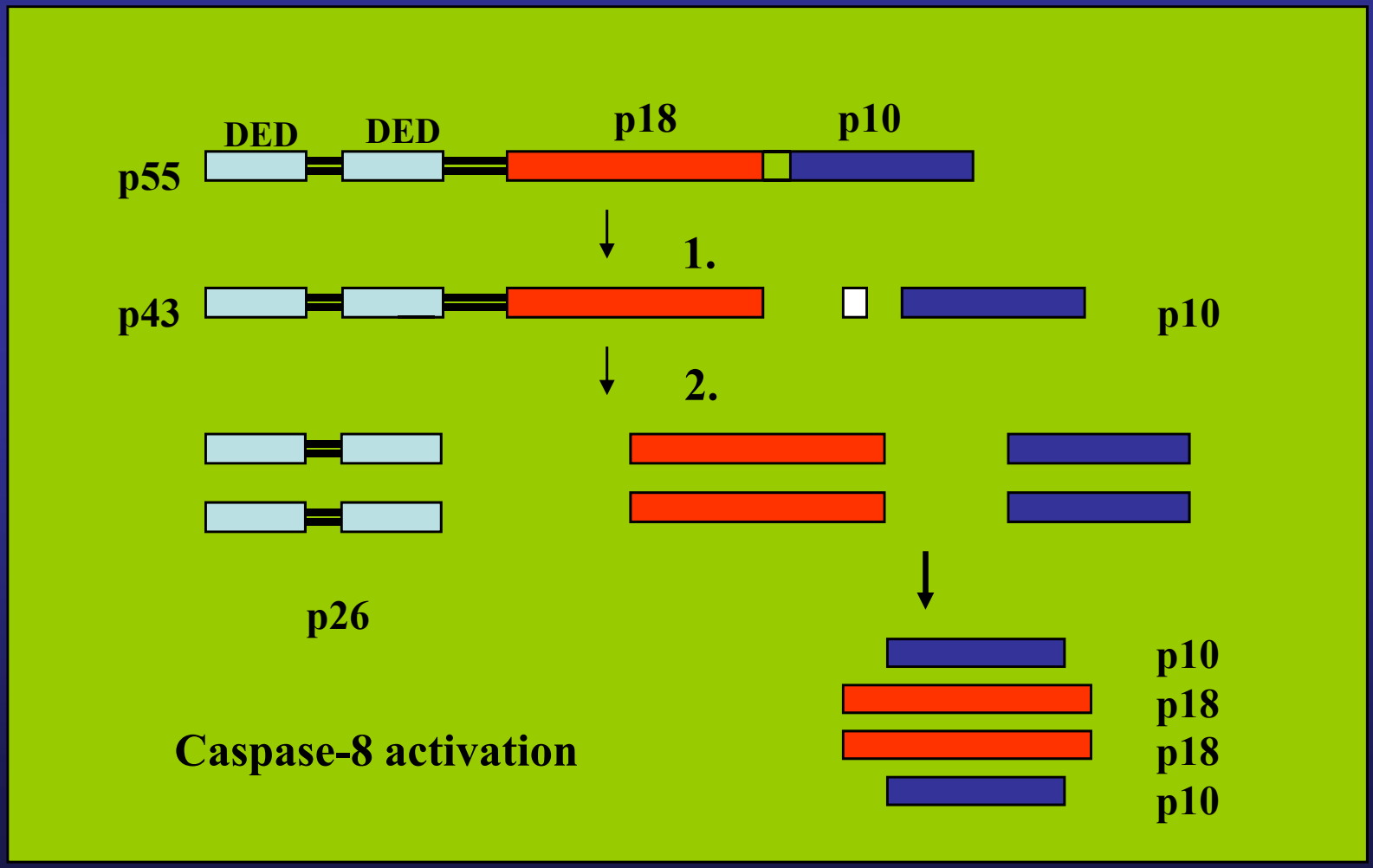
-v DISCu se prokaspáza-8 (55/57) štěpí na kaspázu-8, vznikají fragmenty o velikosti 41/43 a 10/18 kDa (dvoukrokový mechanismus aktivace)

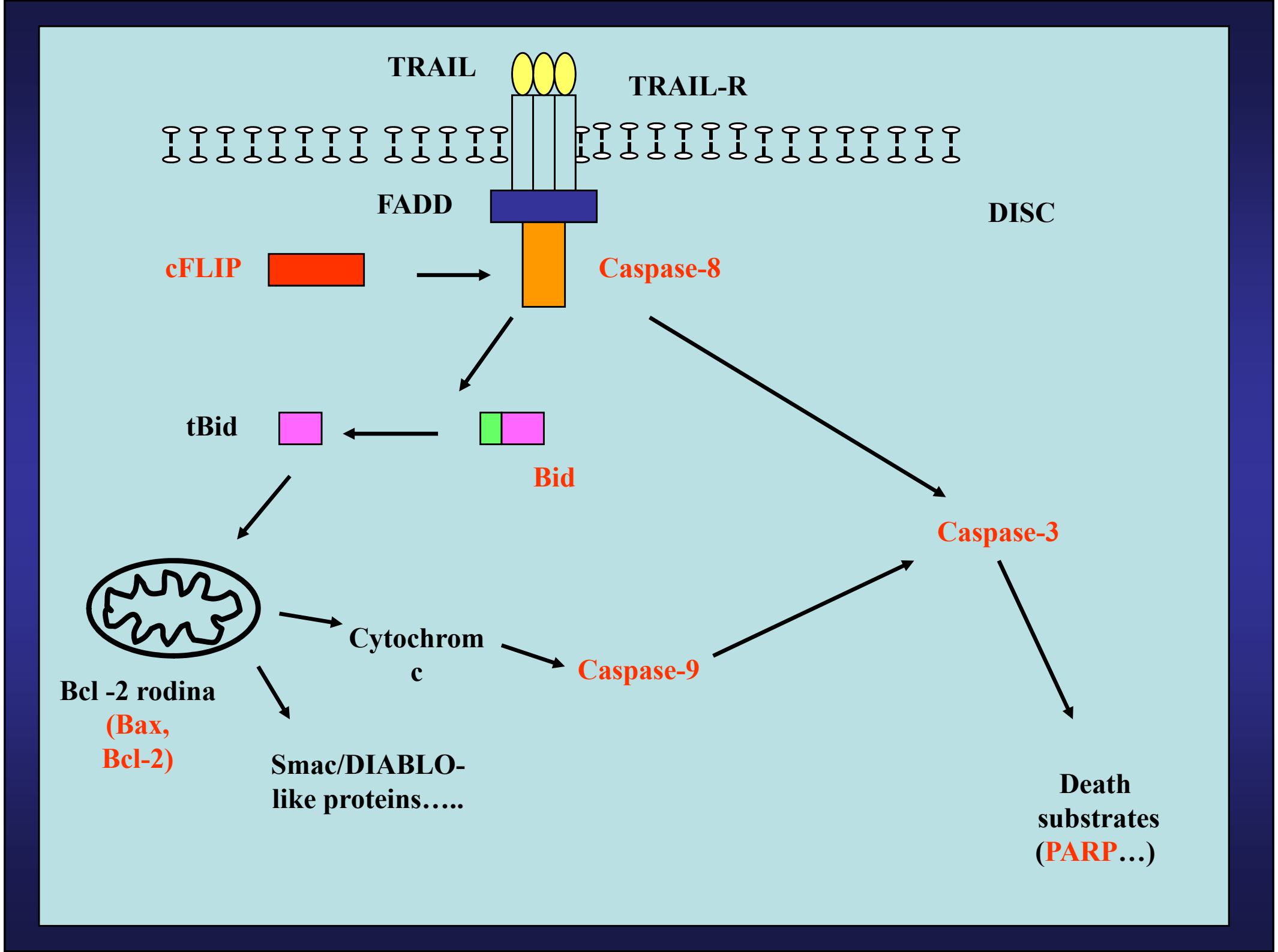
- FLIP – inhibitor kaspázy-8, brání její aktivaci, neboť se sám váže do DISCu

- aktivní kaspáza může dále aktivovat dvě základní dráhy (přímá aktivace kaspázy-3, dráha závislá na mitochondriích – protein Bid)

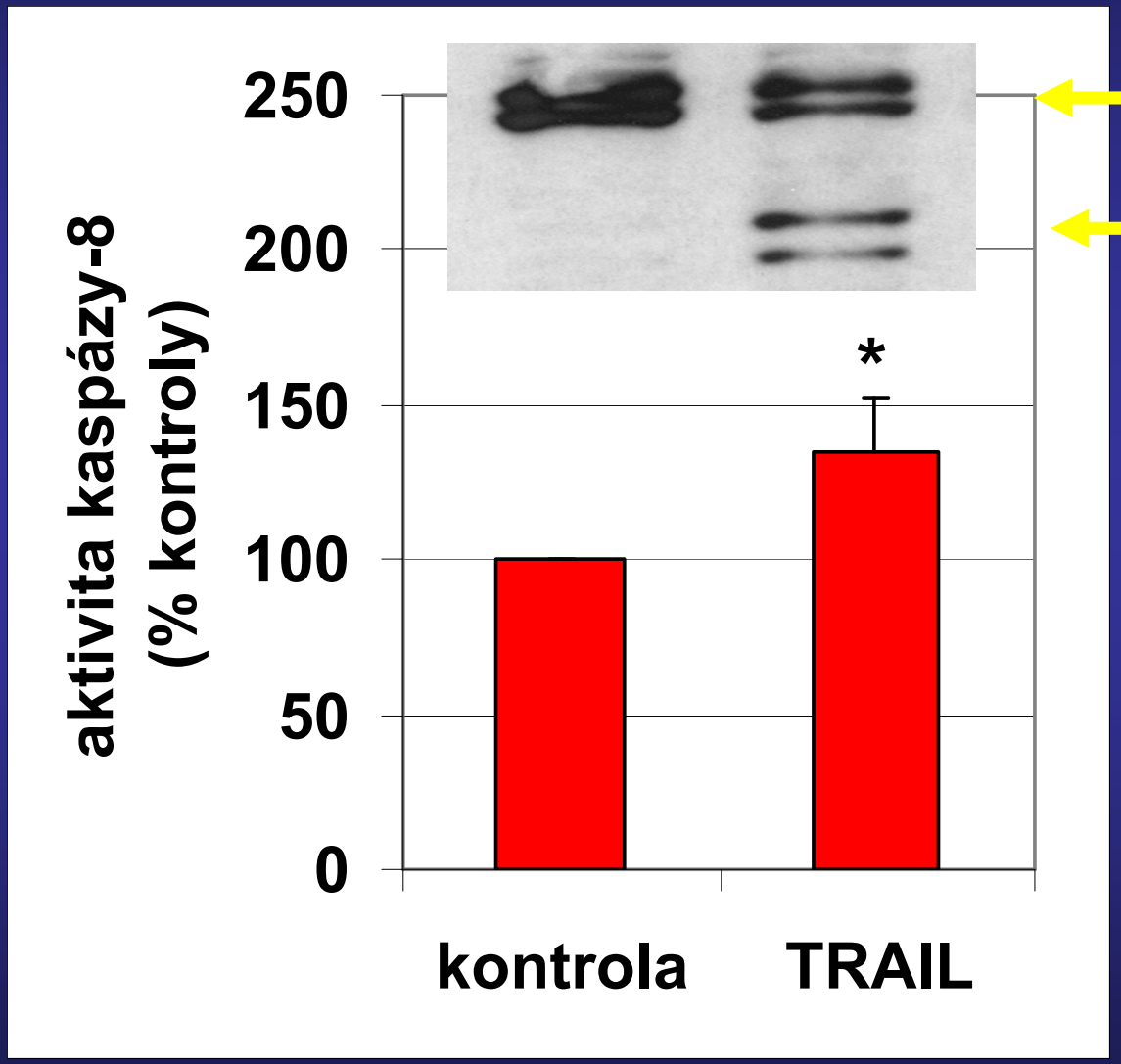
Caspase-8

- initiator caspase
- pro-caspase-8 (55/57 kDa) is activated in the DISC in an autoproteolytic manner by two subsequent cleavage steps




TRAIL
TRAIL-R
FADD
DISC
cFLIP
Caspase-8
tBid
Bid
Caspase-3
Cytochrom
c
Caspase-9
Bcl -2 rodina
(Bax,
Bcl-2)
Smac/DIABLO-
like proteins…..
Death
substrates
(PARP…)

Kaspáza-8 – aktivita a štěpení



+
experimentální
schema

Kaspáza-9

- iniciační kaspáza v mitochondriální dráze indukce apoptózy

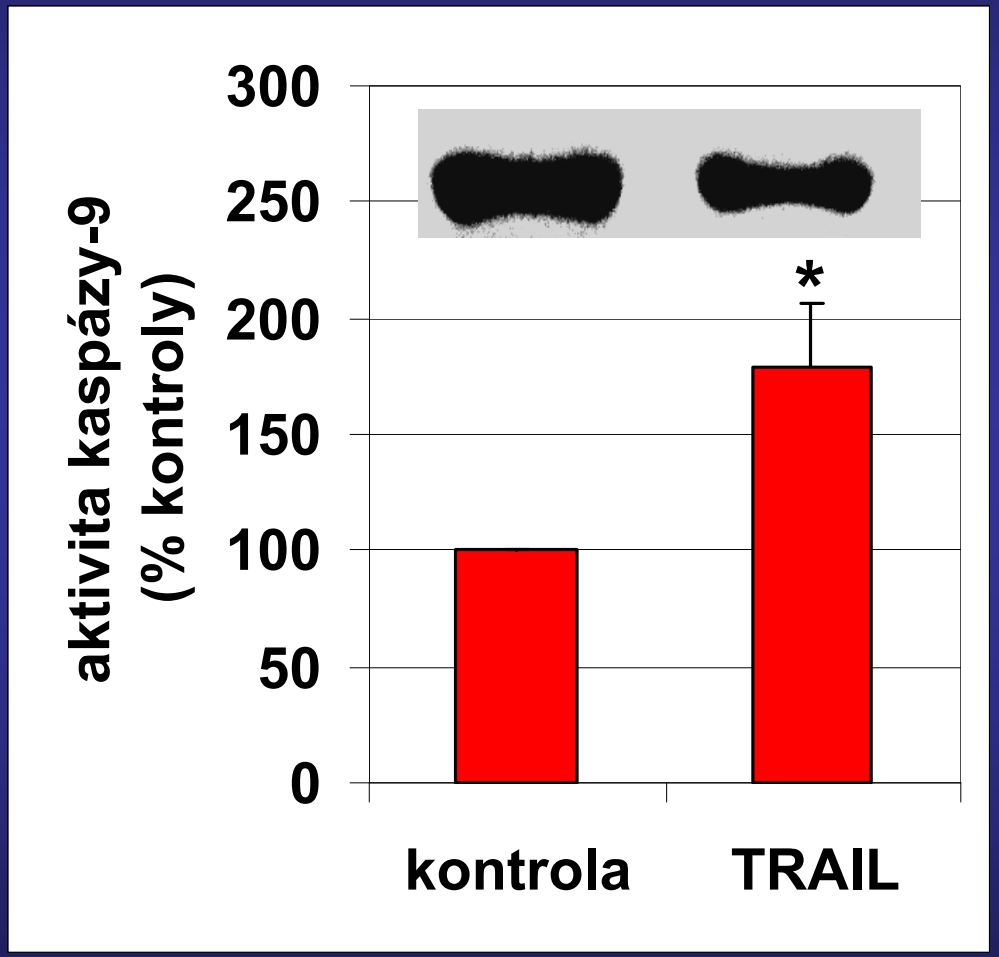
- aktivovaná na úrovni apoptozomu – signální komplex: cytochrom c, Apaf-1, prokaspáza-9

- aktivace prokaspázy-9 – štěpení

- aktivovaná kaspáza-9 dále štěpí (aktivuje) mj. kaspázu-3

Laboratory of cytokinetics

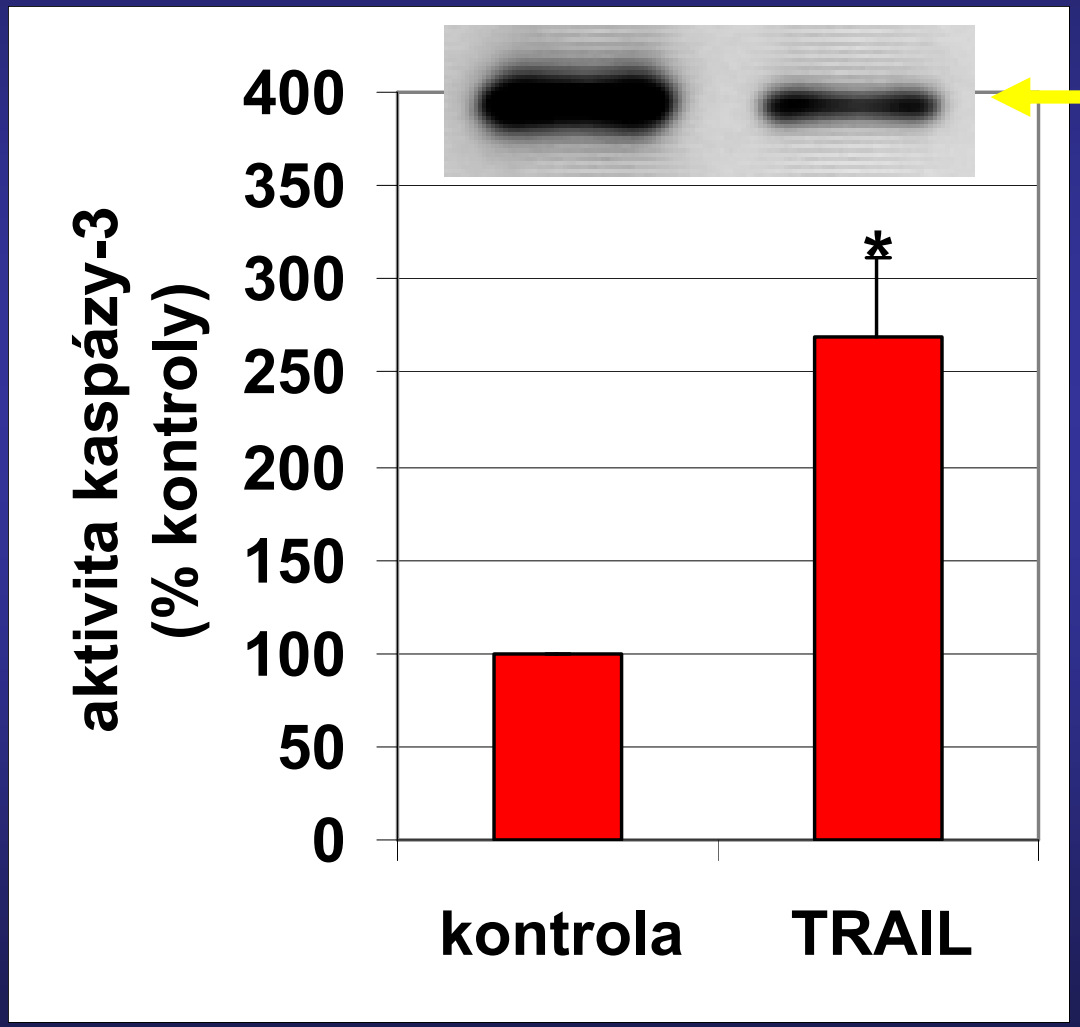
Kaspáza-9 – aktivita a štěpení



kaspáza-3

- cp-3 se nachází v inaktivním stavu ve formě tzv. pro-kaspázy-3 (CPP32, Yama, apopain) o Mr = 32 kDa
- při aktivaci je štěpena na dva fragmenty o Mr přibližně 20 a 12 kDa
- Efektorová kaspáza, po aktivaci je zodpovědná za štěpení celé řady substrátů (PARP, CK18….)

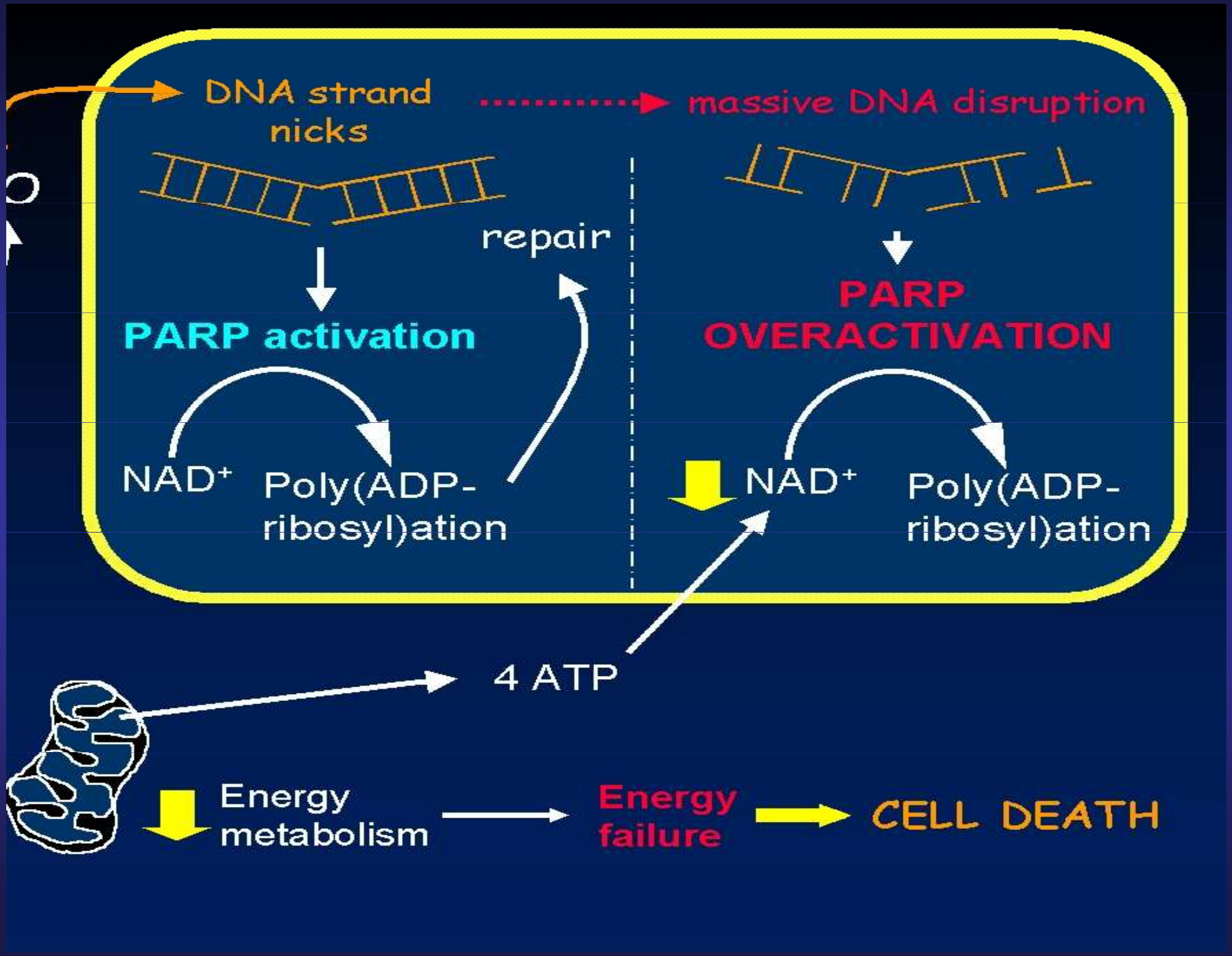
Kaspáza-3 – aktivita a štěpení



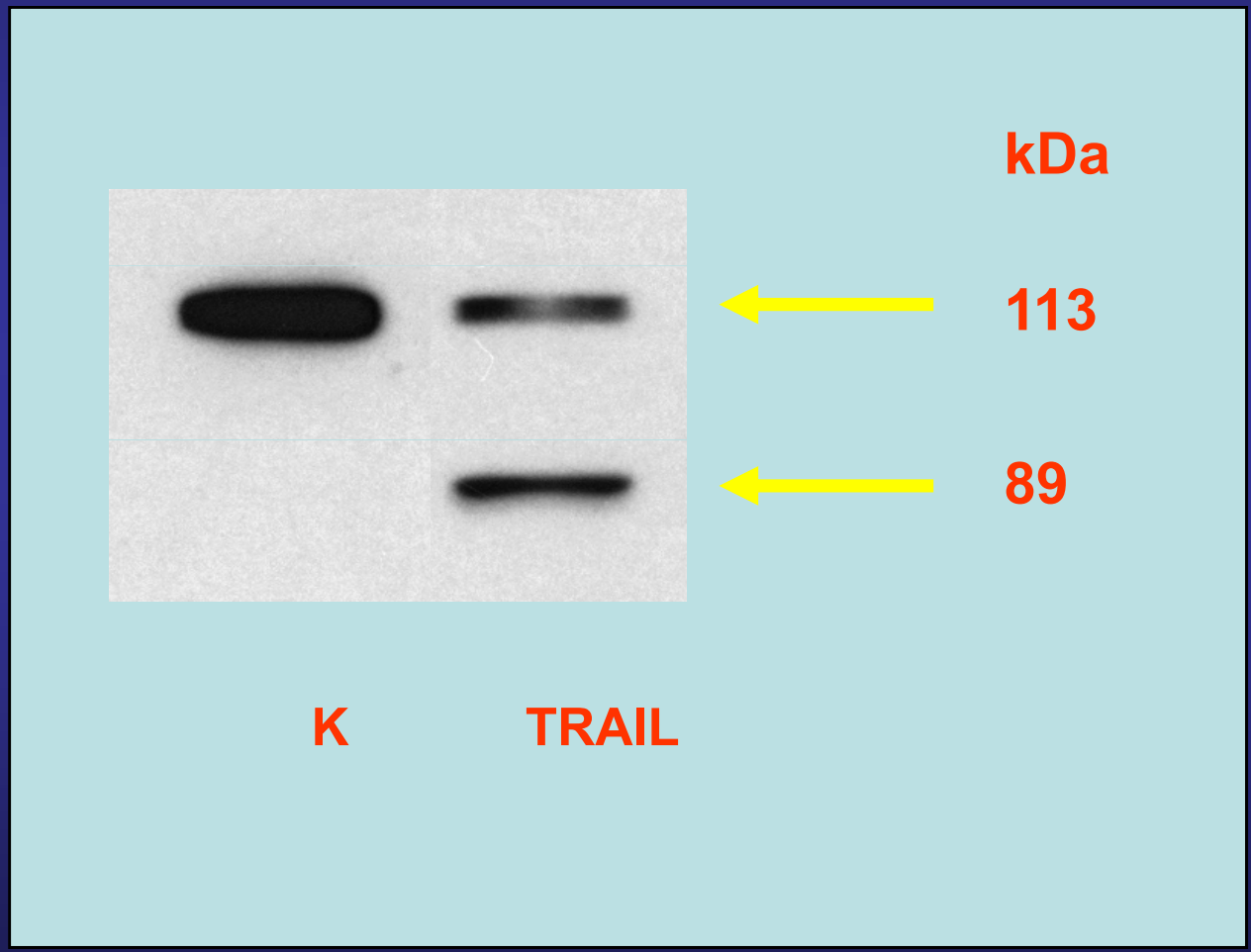
Poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP)

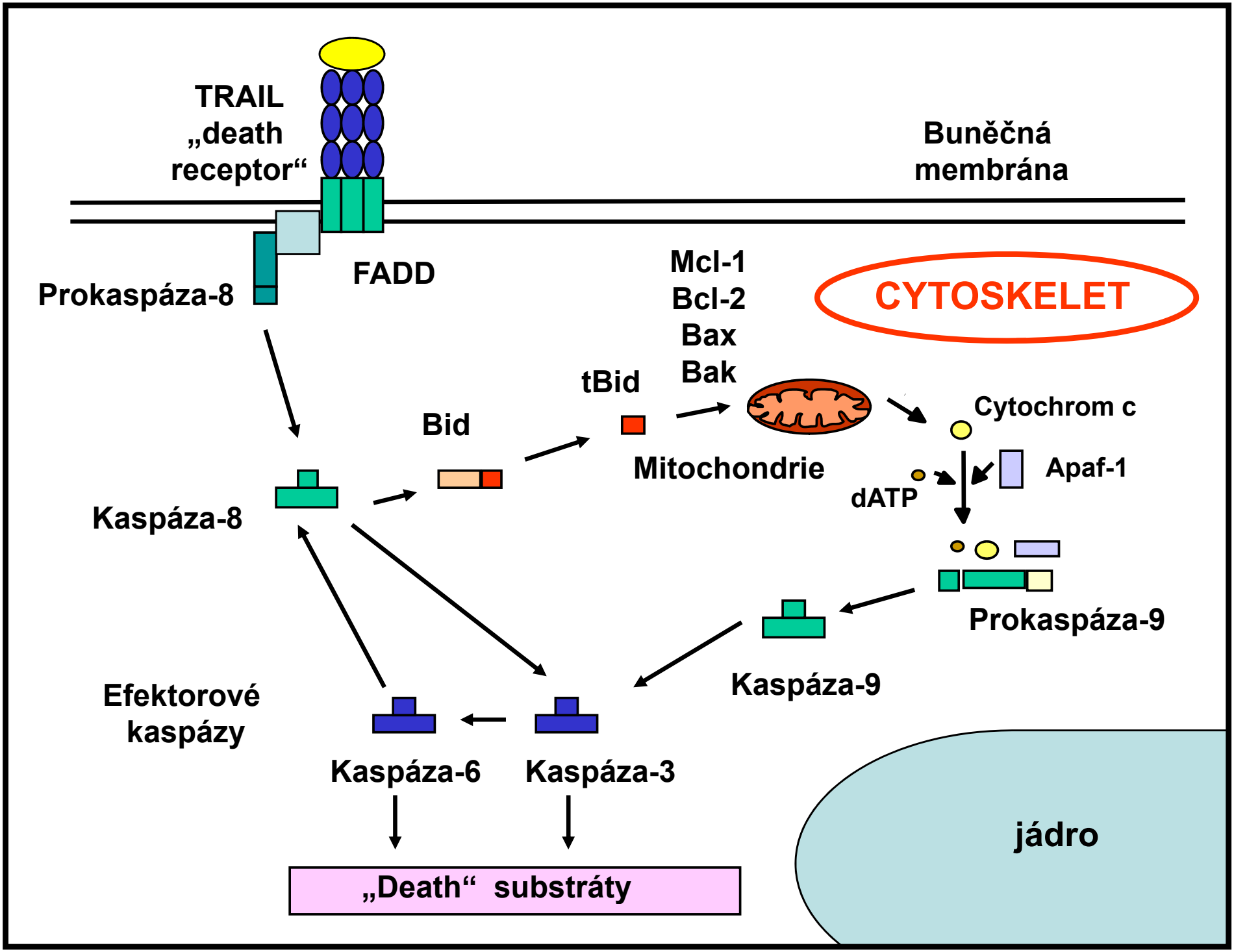
- Jaderný protein (113 kDa), opravy DNA
- Během apoptózy specificky štěpený na fragmenty 89 a 24 kDa
  citlivý marker pro detekci apoptózy
- Inaktivace PARP blokuje opravu DNA, posílení fragmentace DNA

Laboratory of Cytokinetics


DNA strand nicks
massive DNA disruption
repair
PARP activation
PARP OVERACTIVATION
NAD+
Poly(ADP-ribosyl)ation
NAD+
Poly(ADP-ribosyl)ation
4 ATP
Energy metabolism
Energy failure
CELL DEATH

Specifické štěpení PARP




TRAIL
„death
receptor“
Buněčná
membrána
FADD
Prokaspáza-8
Mcl-1
Bcl-2
Bax
Bak
CYTOSKELET
tBid
Bid
Cytochrom c
Mitochondrie
Apaf-1
dATP
Kaspáza-8
Prokaspáza-9
Kaspáza-9
Efektorové
kaspázy
Kaspáza-6
Kaspáza-3
jádro
„Death“ substráty

CYTOSKELET

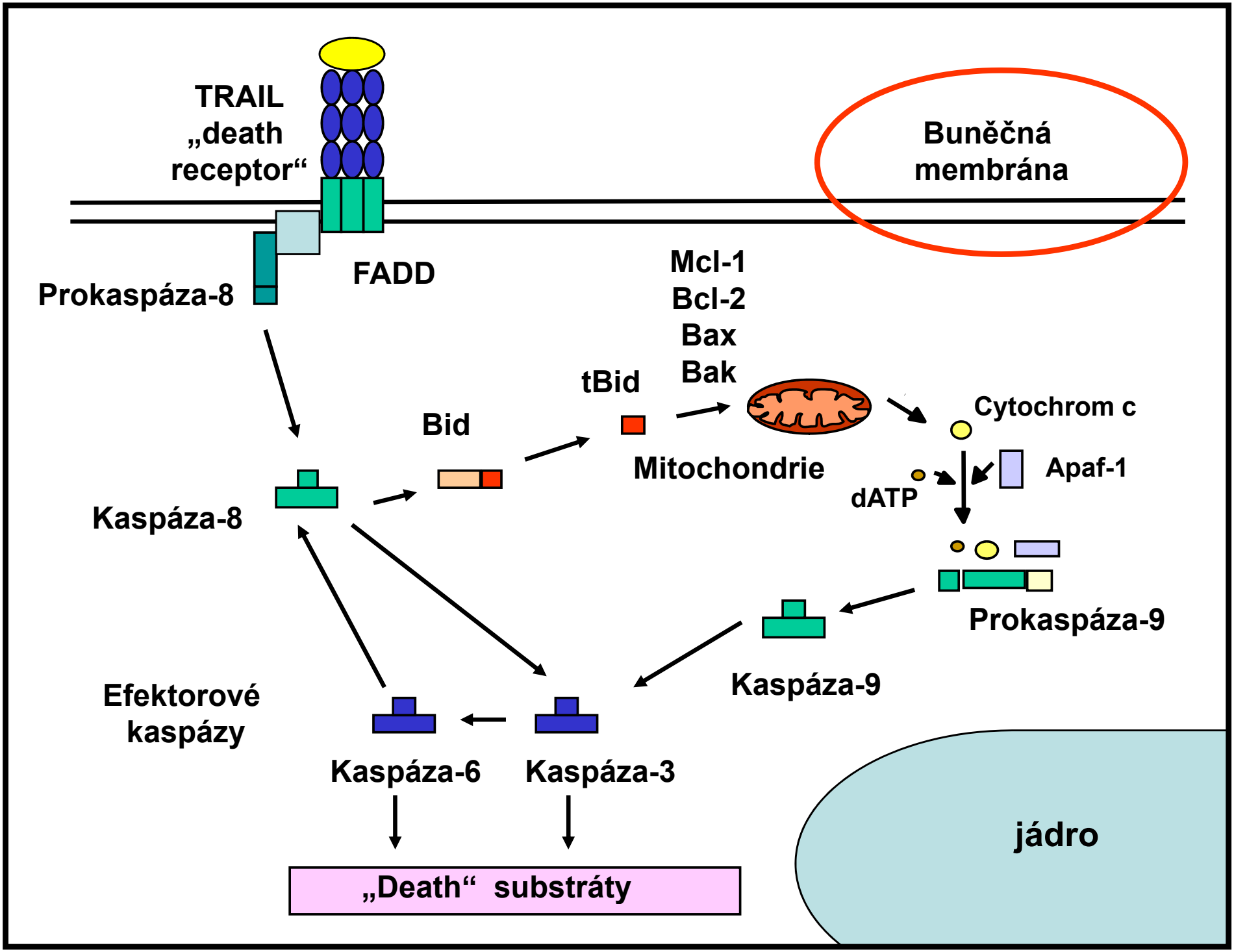
štěpení cytokeratinu 18

- již během raných fází apoptózy dochází ke štěpení důležitých složkek cytoskeletu – cytokeratinů

- detekce štěpení cytokeratinu 18 – velmi citlivá metoda detekce apoptózy, obzvláště určená pro epitheliální buňky!

- štěpení CK18 efektorovými kaspázami - odkrytí specifického epitopu v nolekule CK18 – marker apoptózy – ten detekován pomocí specifické protilátky, která je fluorescenčně značená

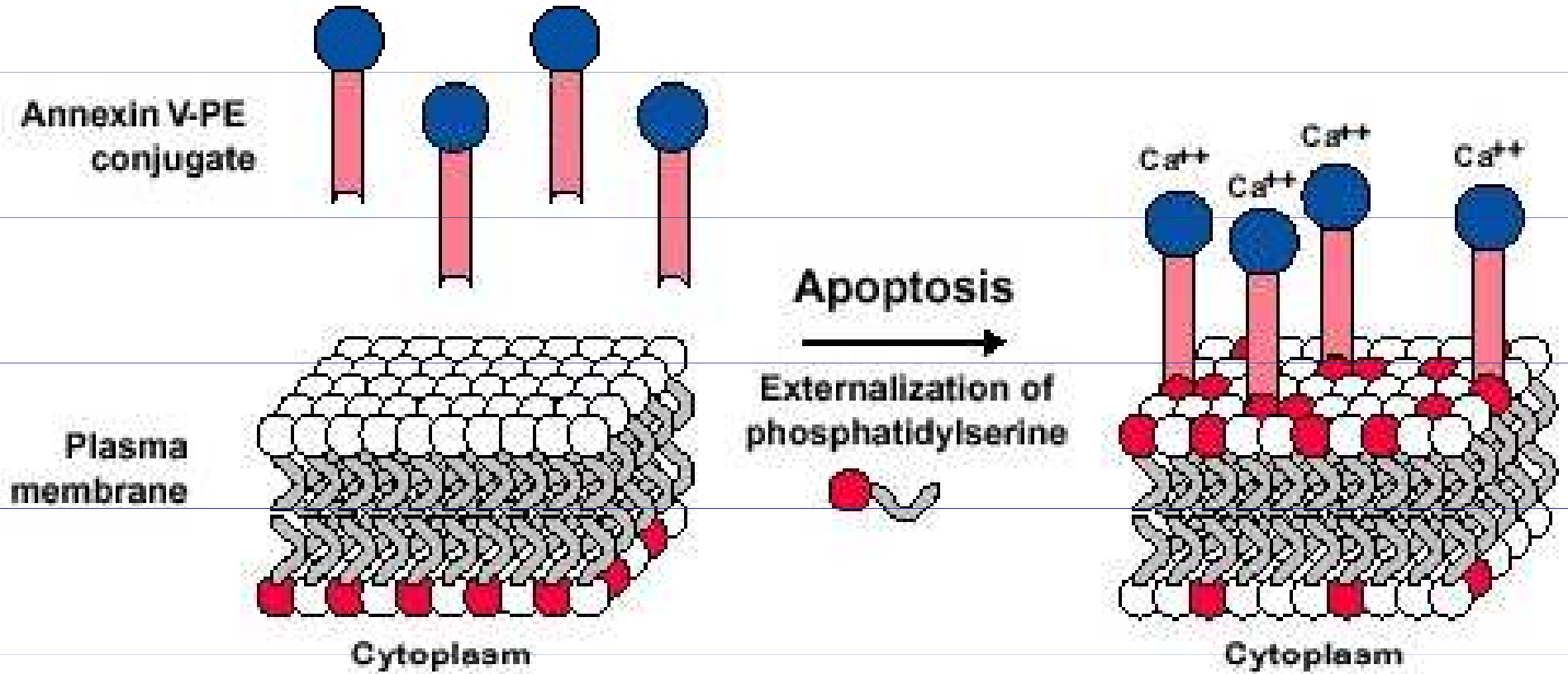
Monoklonální Ab proti specifickému epitopu CK 18, konjugovaná s FITC


TRAIL
„death
receptor“
Buněčná
membrána
FADD
Prokaspáza-8
Mcl-1
Bcl-2
Bax
Bak
tBid
Bid
Cytochrom c
Mitochondrie
Apaf-1
dATP
Kaspáza-8
Prokaspáza-9
Kaspáza-9
Efektorové
kaspázy
Kaspáza-6
Kaspáza-3
jádro
„Death“ substráty

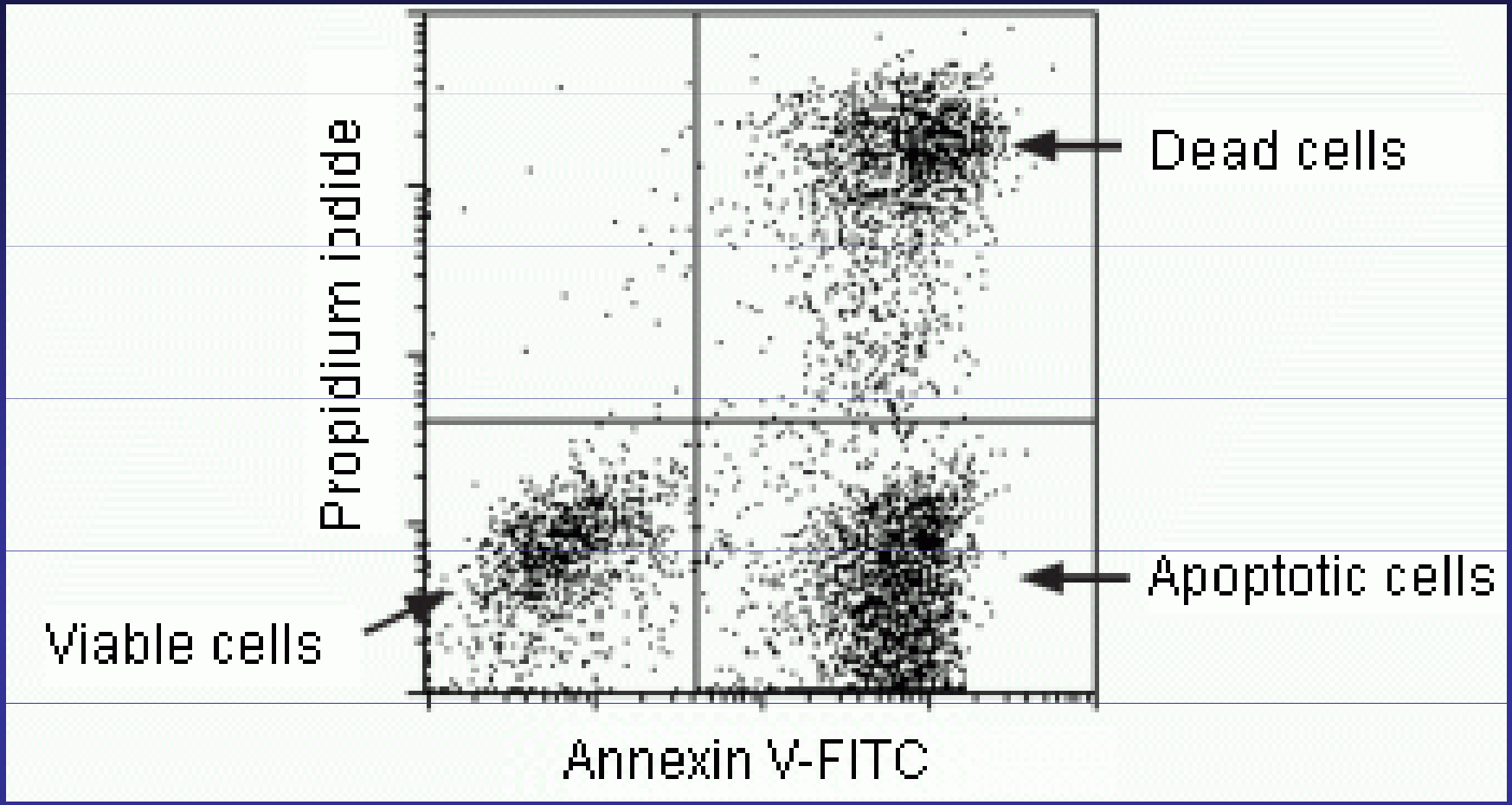
PLAZMATICKÁ MEMBRÁNA

Annexin V assay

- Detekce translokace (externalizace) fosfatidylserinu v plazmatické membráně (odlišná distribuce u „normální“ a apoptotické buňky)
- Detekce raných fází apoptózy
- dvojí barvení annexin V – FITC, propidium jodid (živé buňky)



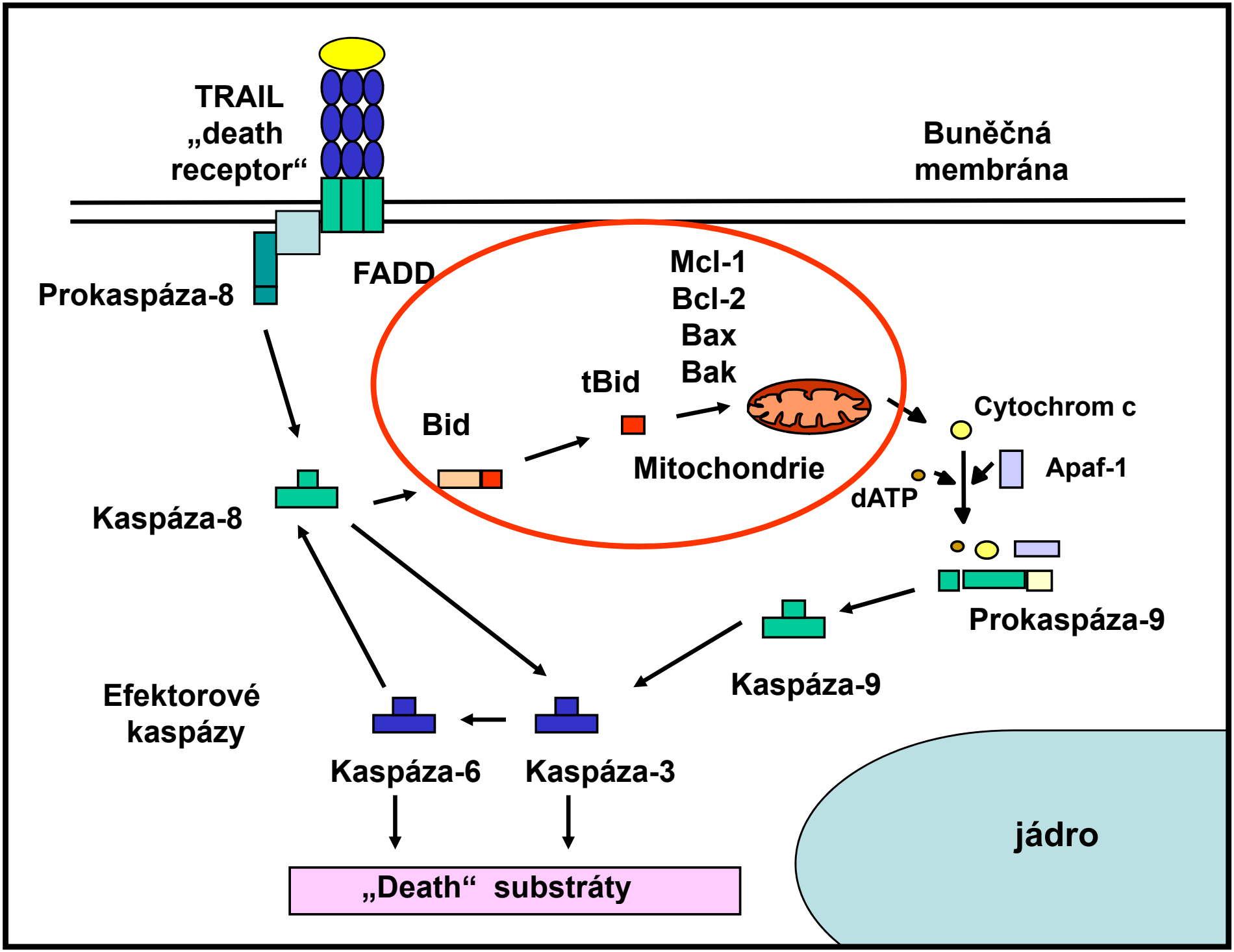
Schematic representation of the Annexin V assay.



- PI – rozlišení živých a mrtvých buněk (integrita plazmatické membrány)

- annexin-V – pozitivní buňky – buňky s translokovaným fosfatidylserinem (apoptotické + nekrotické)

- apoptotické buňky – PI-, annexin-V +


TRAIL
„death
receptor“
Buněčná
membrána
Prokaspáza-8
FADD
Mcl-1
Bcl-2
Bax
Bak
tBid
Bid
Mitochondrie
Cytochrom c
Apaf-1
dATP
Kaspáza-8
Prokaspáza-9
Kaspáza-9
Efektorové
kaspázy
Kaspáza-6
Kaspáza-3
jádro
„Death“ substráty

MITOCHONDRIE

centra buněčného dýchání, energetická centra buňky

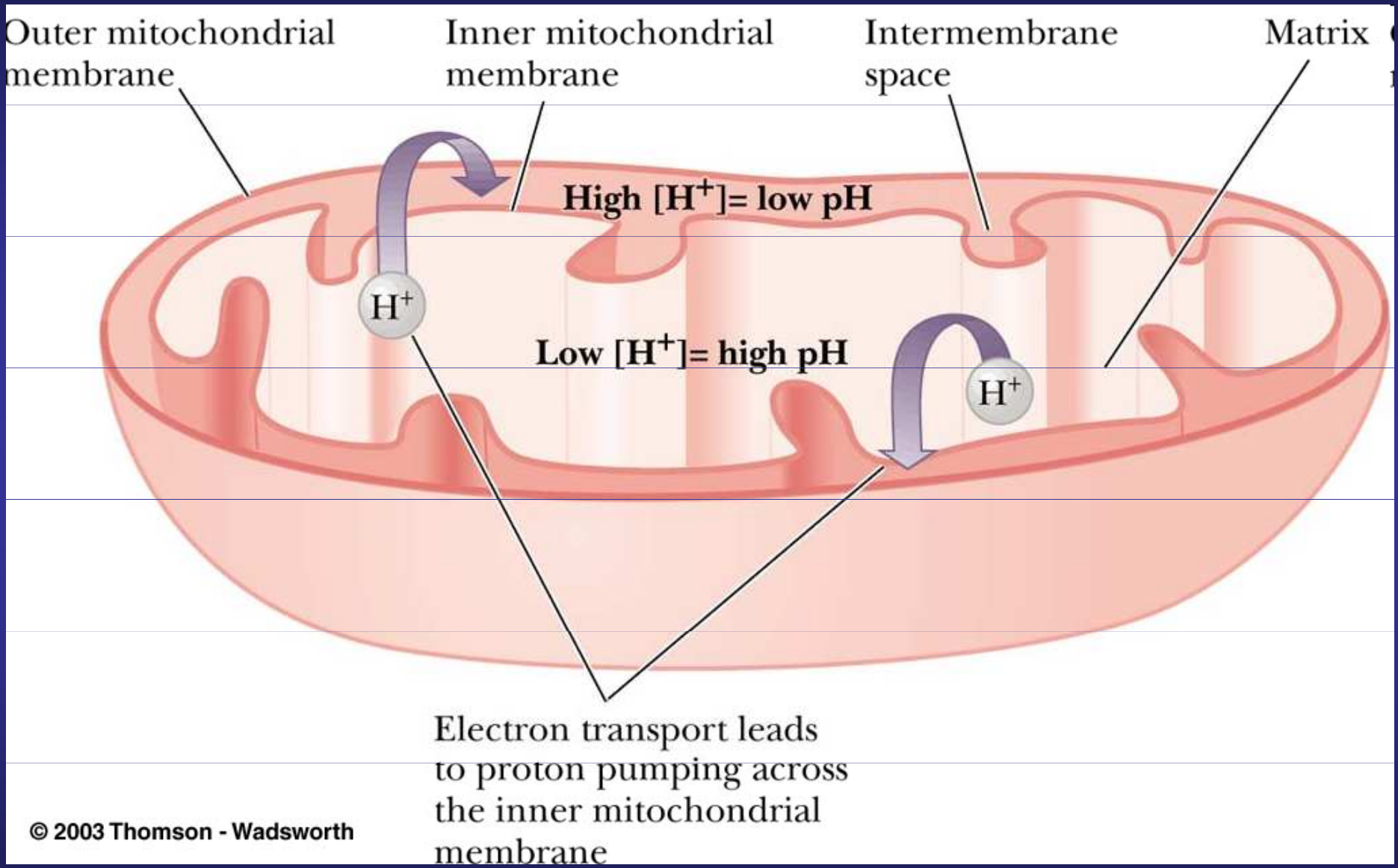
složení:

vnější membrána – semipermeabilní (5 kDa) , kanálky (porin)

vnitřní membrána – nepropustná, pouze selektivní transport, bohatě členěná (kristy – zvětšení povrchu – syntéza ATP), zde ukotveny proteiny – součásti elekron-transportního řetězce, transport elektronů a syntéza ATP

intermembránový prostor (enzymy, proapoptotické proteiny)

matrix – vysoce koncentrovaná směs enzymů, DNA, ribozomy, citrátový cyklus



MMP normální buňka vs. apoptotická

Úloha mitochondrií v apoptóze

- Změny v transportu elektronů
- Změny energetického metabolismu buňky
- Změny v produkci ROS
- Změny mitochondriálního membránového potenciálu
- Účast proteinů rodiny Bcl-2 (Bid, Bak, Bax…)
-Uvolnění proapoptotických proteinů

Apo2.7

- 38 kDa protein na membráně mitochondrií

-exprimován u apoptotických buněk, v raných fázích apoptózy

Měření mitochondriálního membránového potenciálu

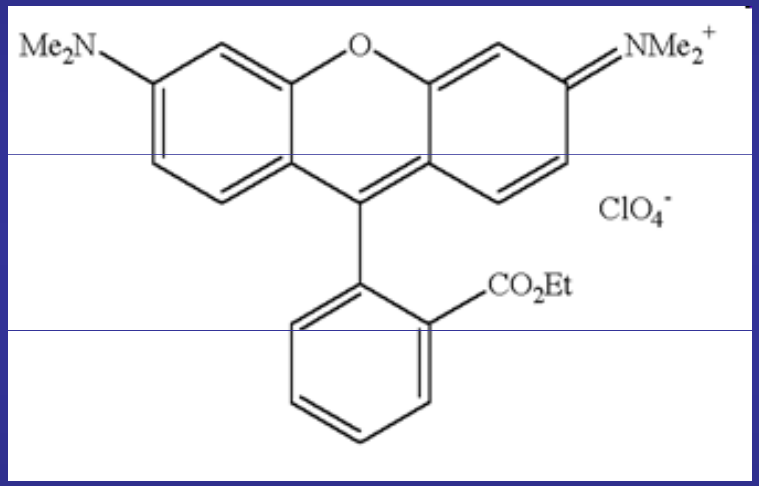
Ztráta MMP se hodnotí jako nepřímý důkaz otevření megapórů a zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány, které hraje úlohu při vylití některých mediátorů apoptózy z těchto organel.

Při analýze MMP se používá fluorescenční lipofilní kation TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester), který se hromadí v mitochondriích v závislosti na MMP.

S využitím průtokové cytometrie lze detekovat posun ve fluorescenci TMRE, podávající informaci o změnách MMP.

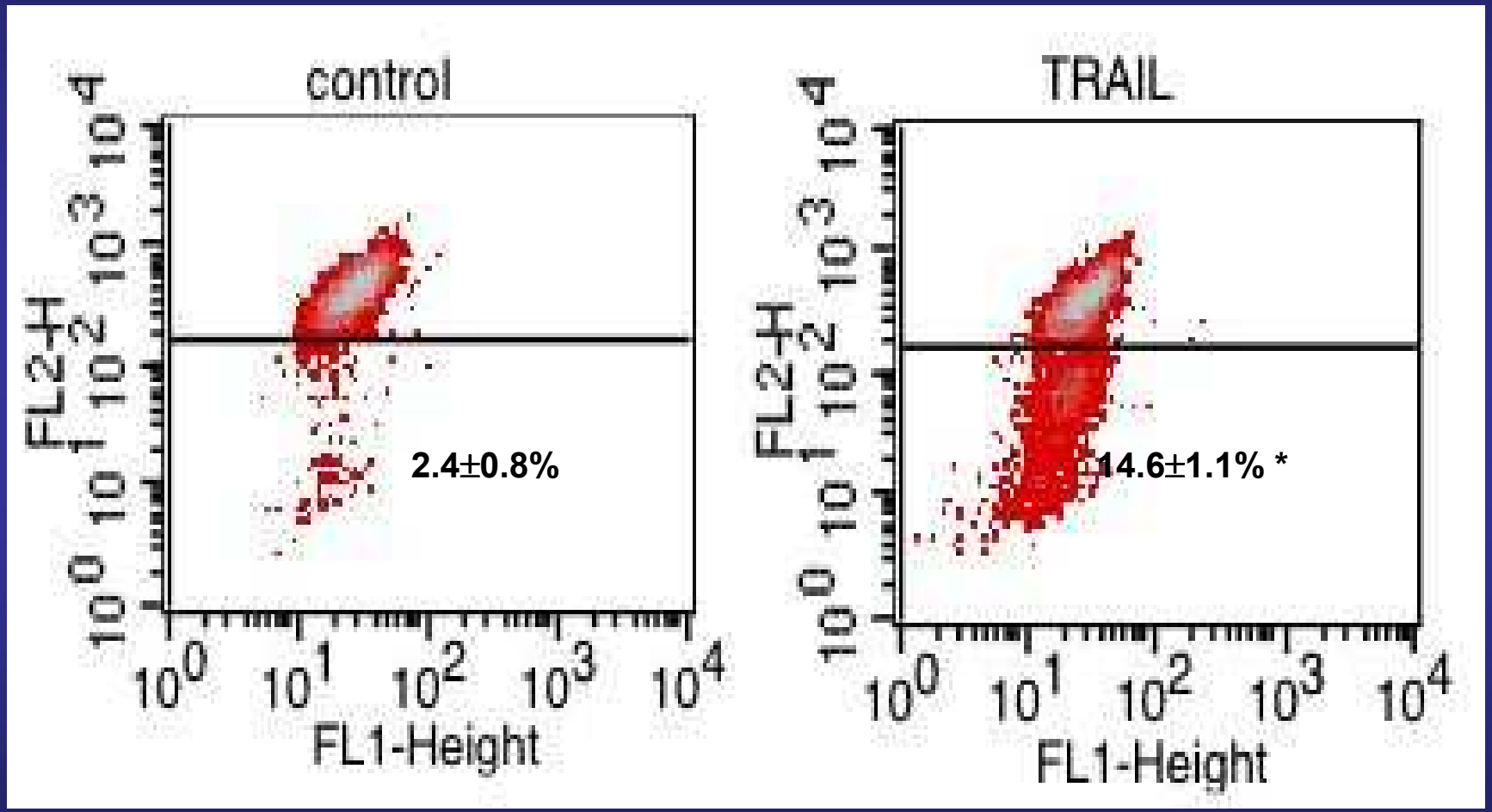
Měření mitochondriálního membránového potenciálu

Flowcytometr – po obarvení TMRE

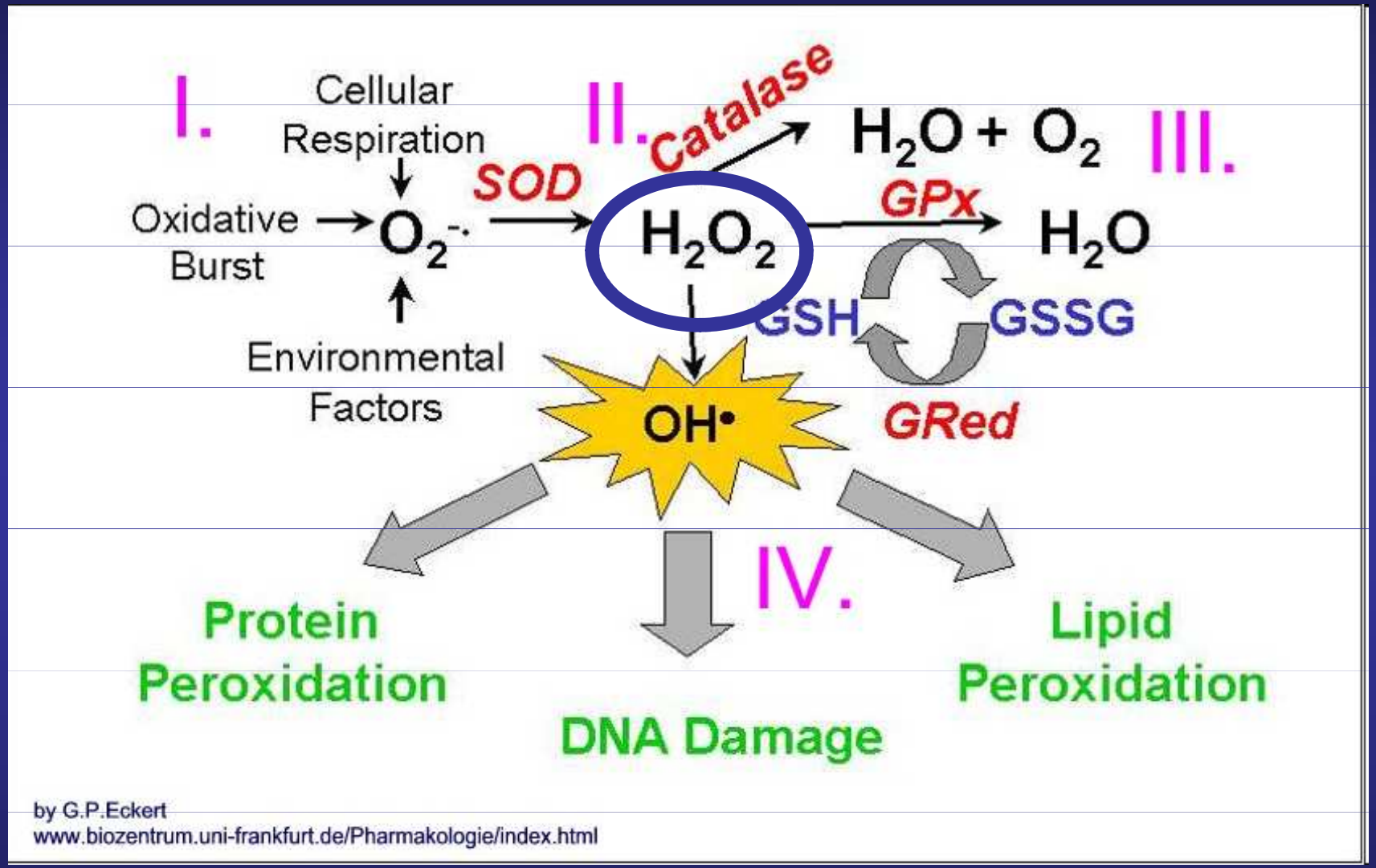


Hodnocení % buněk se sníženým MMP

MMP (TMRE)



Oxidativní stres

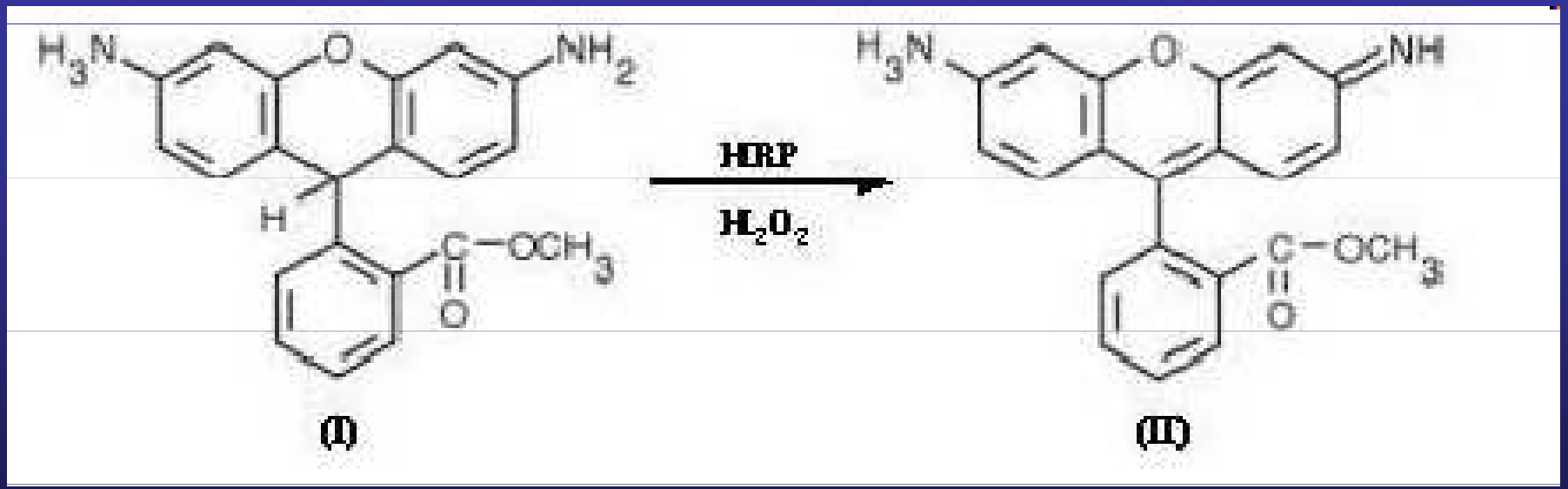


- 2nd messengers vs. oxidativní poškození – rozlišovat!!!!

ROS vs. TRAIL

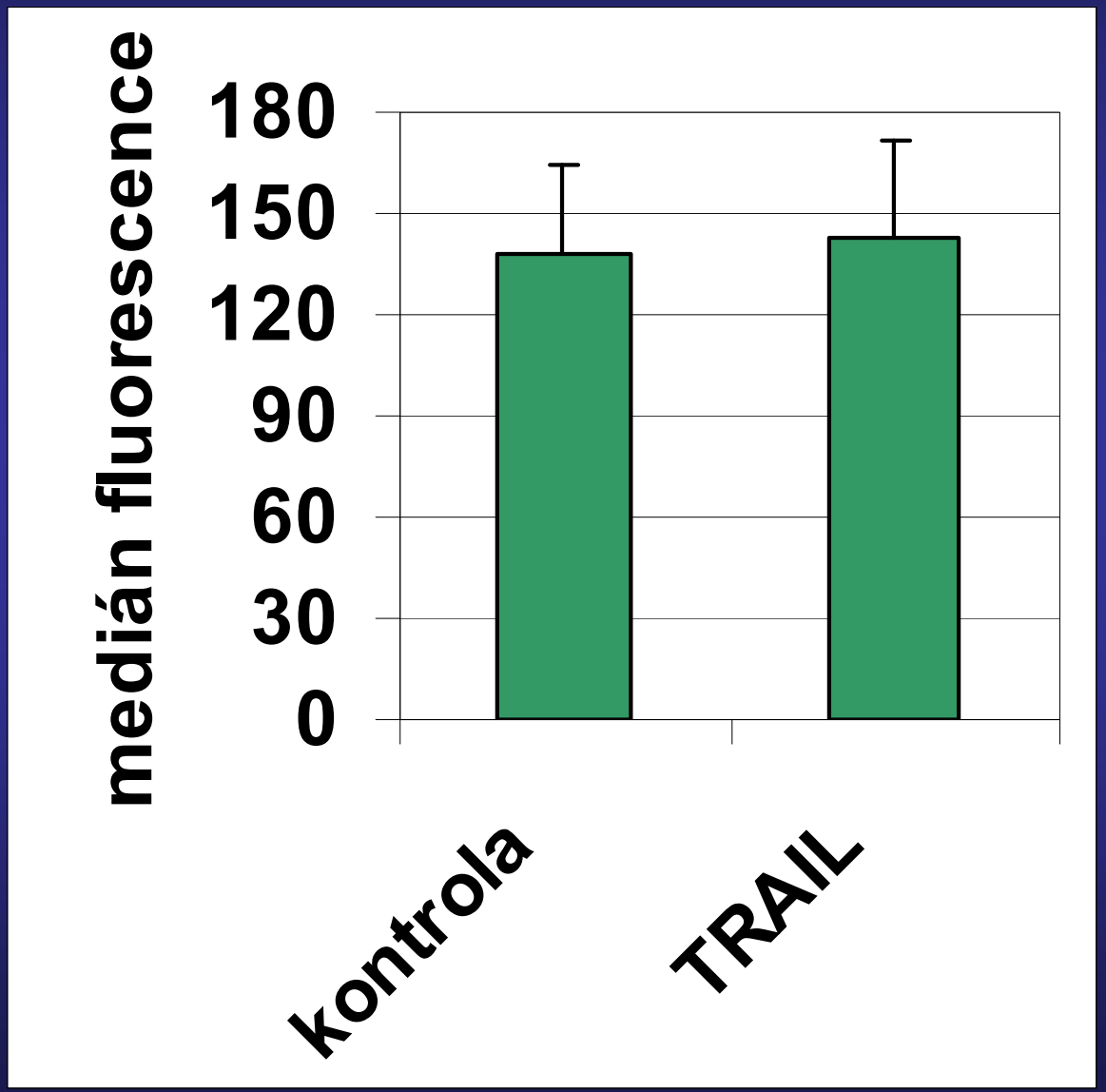
Měření produkce reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS) – průtokový cytometr

- Peroxid vodíku
  - dihydrorhodamin-123 (DHR-123)
  - dichlorofluorescein diacetát (DCFH-DA)
- Superoxid
  - hydroethidin (HE)



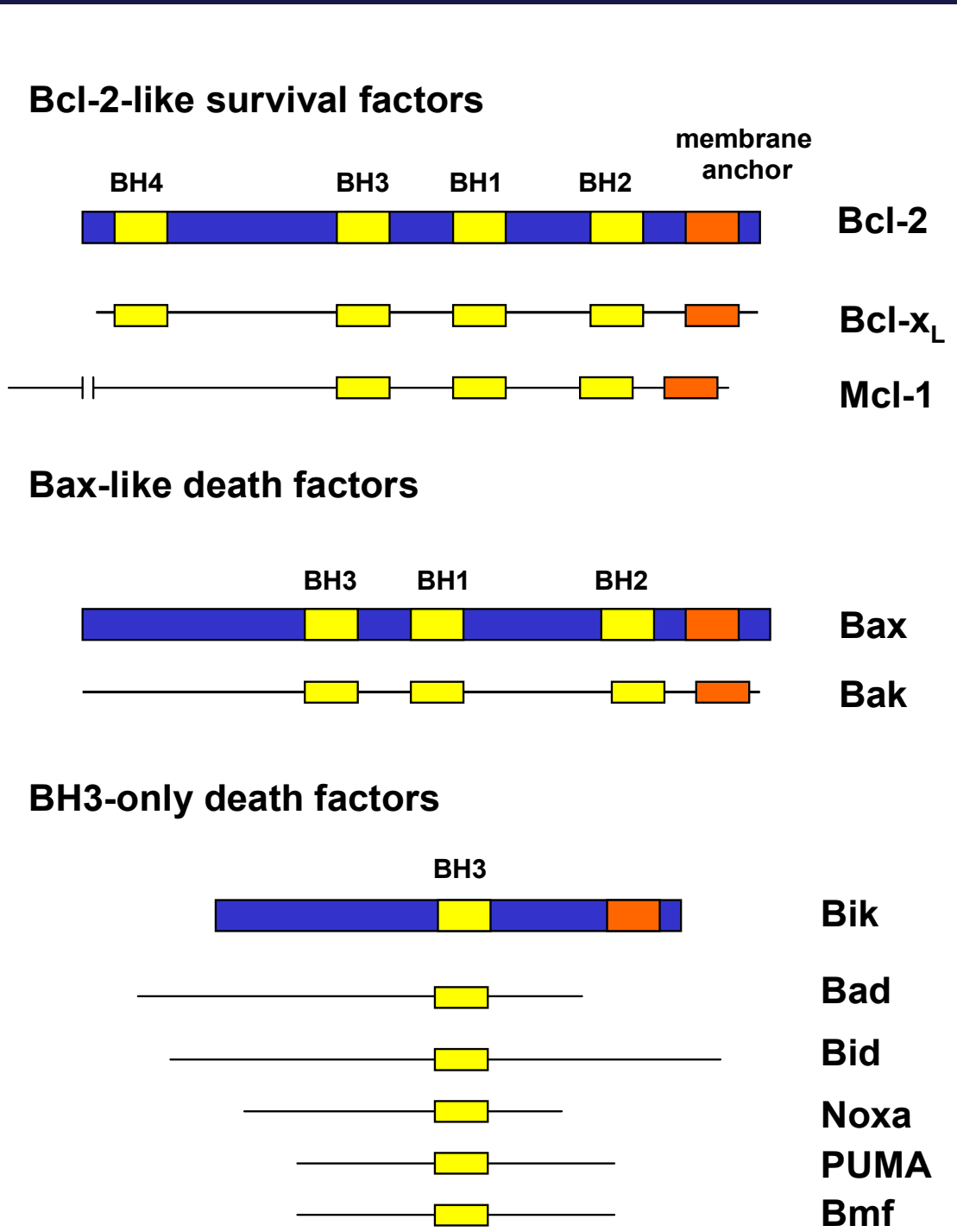
+ naše experimenty

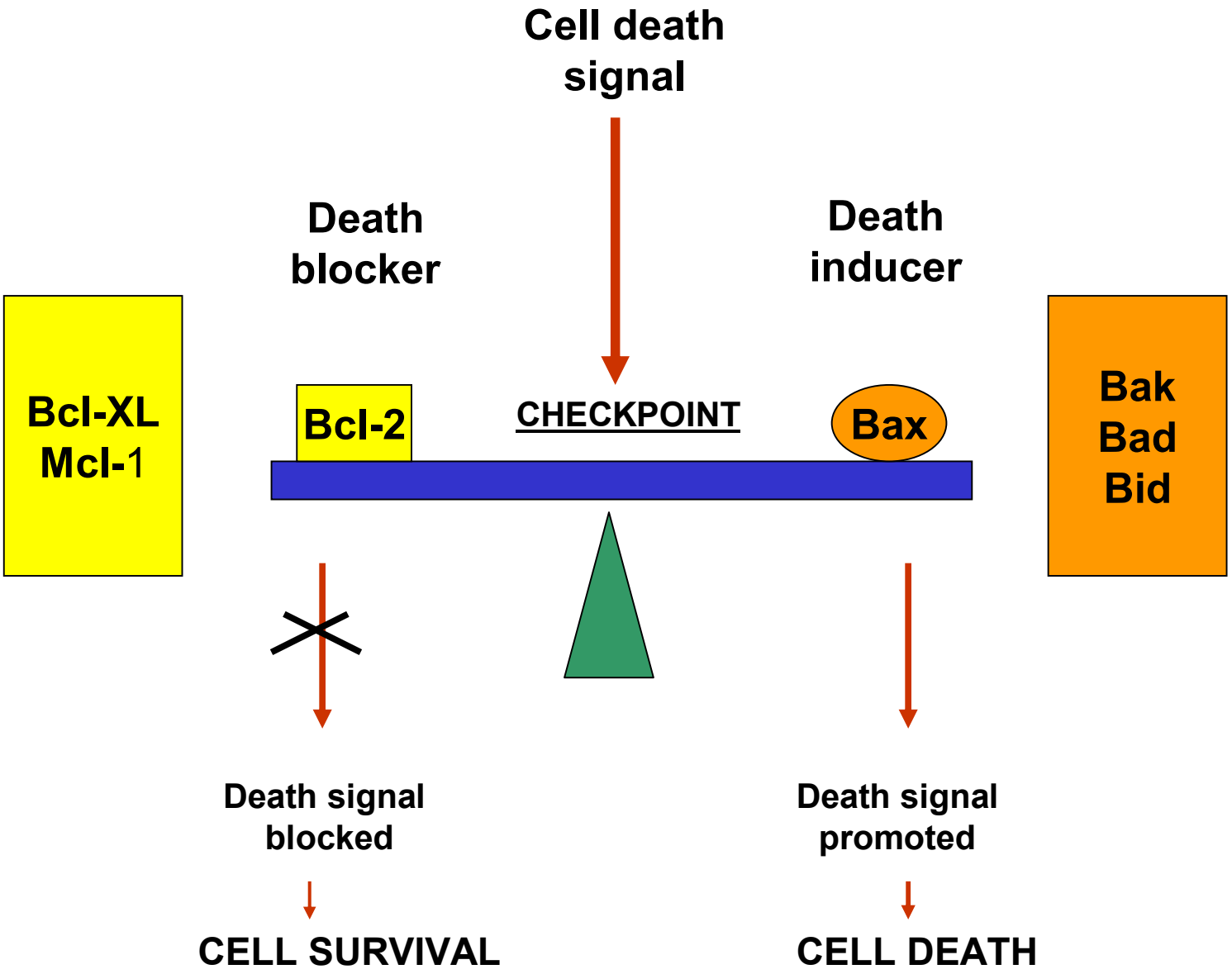
Produkce ROS – DHR-123



Proteiny rodiny Bcl-2

Regulace mitochondriální dráhy indukce apoptózy




Cell death signal
Death blocker
Death inducer
Bcl-XL
Mcl-1
Bcl-2
CHECKPOINT
Bax
Bak
Bad
Bid
Death signal blocked
Death signal promoted
CELL SURVIVAL
CELL DEATH

Mcl-1

-Antiapoptotický protein z Bcl-2 rodiny

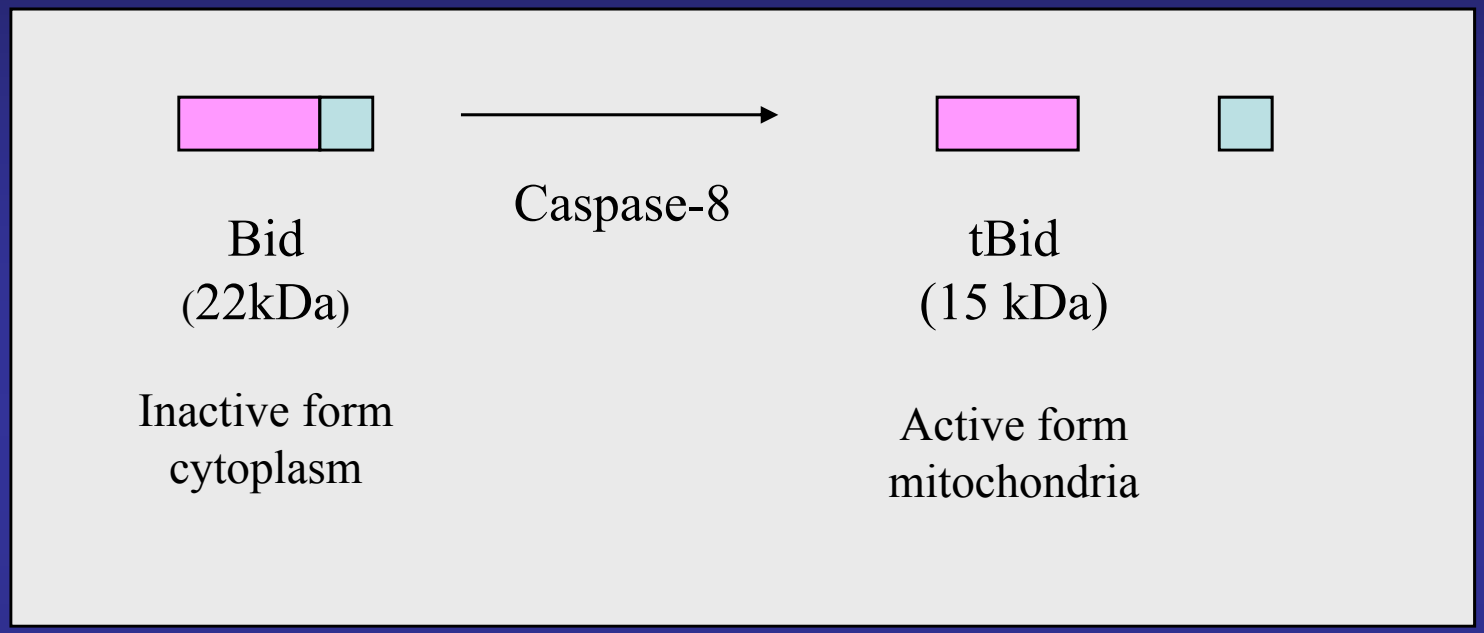
-Transientní indukce exprese po působení některých růstových faktorů a cytokinů

-Úloha v regulaci diferenciace a apoptózy

-Krátký poločas rozpadu, short-term viability protection (odlišná kinetika, předchází Bcl-2), po vstupu do apoptózy jeho hladina v buňce prudce klesá, což může ovlivnit spuštění mitochondriální dráhy indukce apoptózy –translokaci Bax, uvolnění cytochromu c, Smac/DIABLO, aktivaci kaspáz…

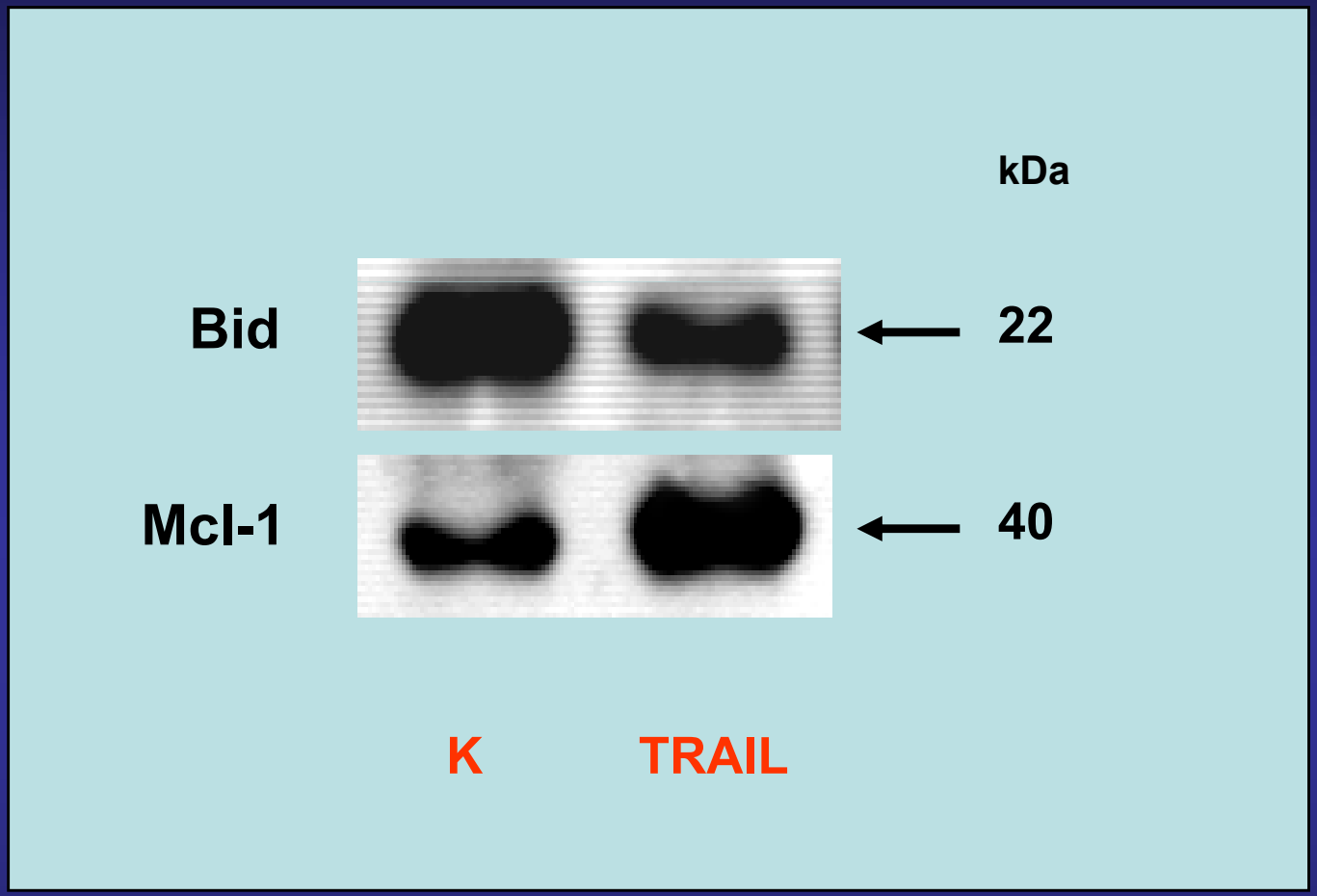
Bid

- **proapoptotic Bcl-2 family member**



- **regulates cytochrome c release from mitochondria by inducing the homo-oligomerization of proapoptotic members of the Bcl-2 family (Bax)**

Laboratory of Cytokinetics


kDa
Bid
22
Mcl-1
40
K
TRAIL

Proteiny Bcl-2 rodiny v signální dráze TRAILu:

(Vaculová A., Hofmanová J., Souček K., Anděra L., Kozubík A.: Ethanol functions as a potent agent sensitizing the colon cancer cells to the TRAIL-induced apoptosis, FEBS Letters, 577, 309-313, 2004)

TRAIL – 100 ng/ml – HT-29 - 4h

Bid - významné štěpení – tBid

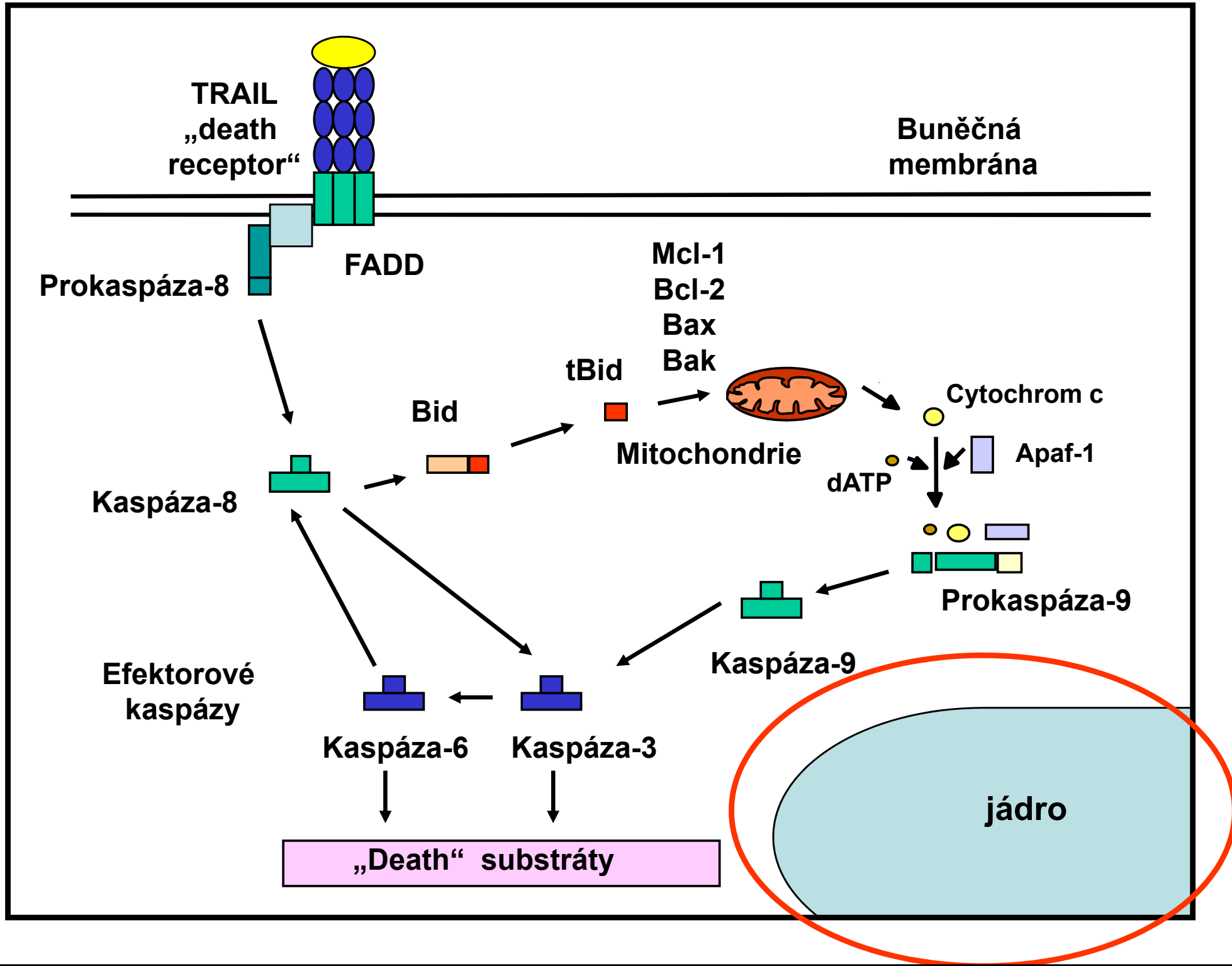
Bax - množství proteinu se nemění

Bak - množství proteinu se nemění

Bcl-2 – není přítomen

Mcl-1 - významný nárůst množství proteinu

úloha proteinu Mcl-1 v rezistenci buněk HT-29 k účinkům TRAILu??


TRAIL
„death
receptor“
Buněčná
membrána
FADD
Prokaspáza-8
Mcl-1
Bcl-2
Bax
Bak
tBid
Bid
Mitochondrie
Cytochrom c
Apaf-1
dATP
Kaspáza-8
Prokaspáza-9
Kaspáza-9
Efektorové
kaspázy
Kaspáza-6
Kaspáza-3
jádro
„Death“ substráty

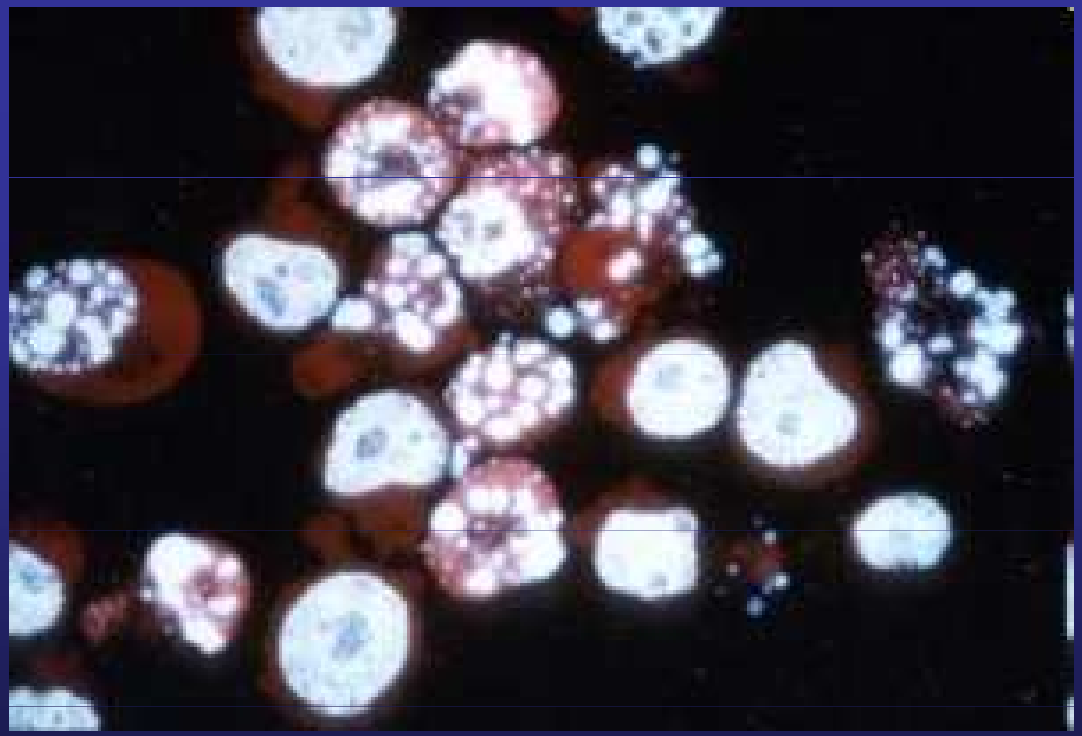
JÁDRO

Charakteristické změny jádra během apoptózy

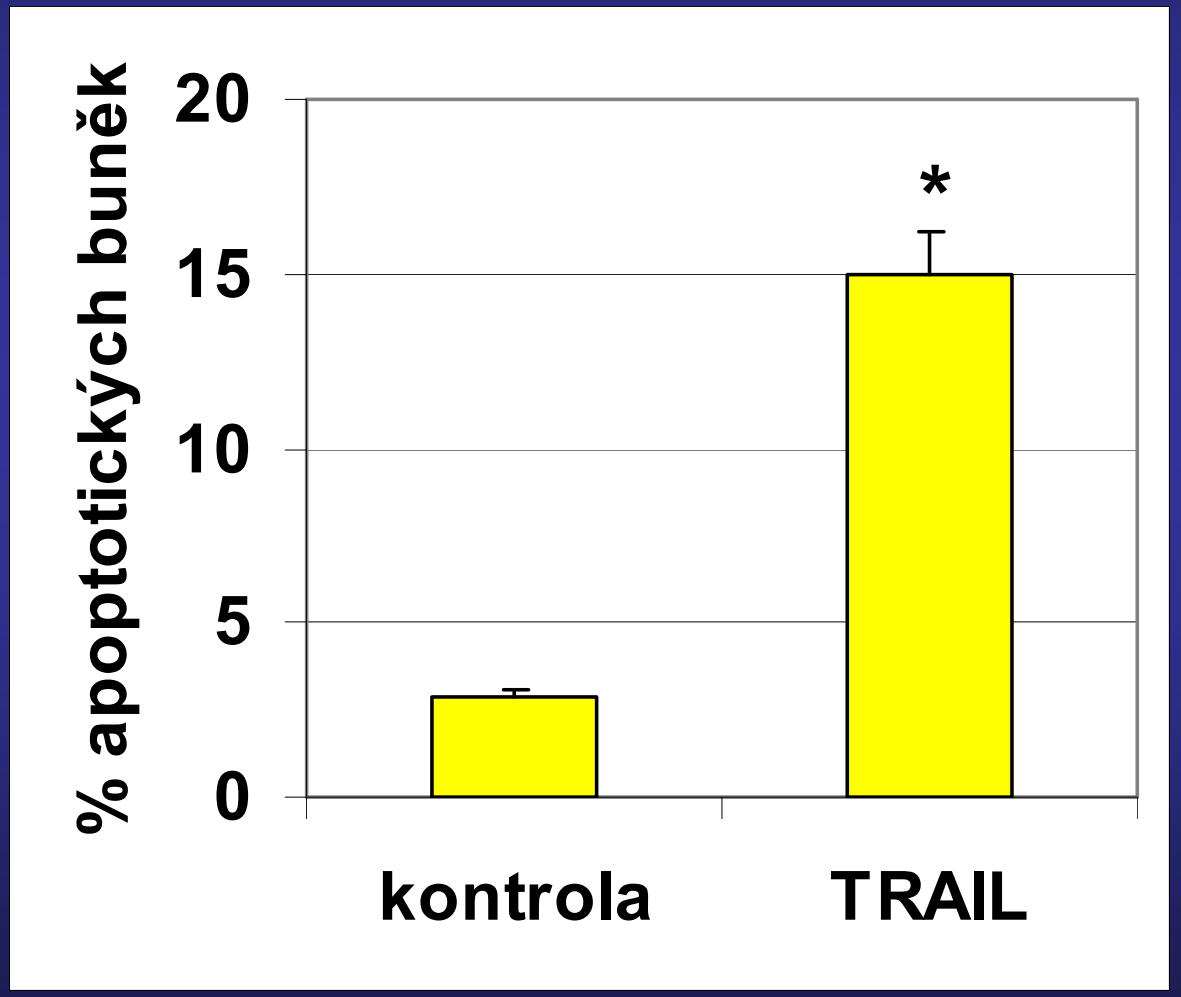
- **kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu (typická morfologie jádra apoptotických buněk)**
- **internukleozomální štěpení DNA (fragmenty o velikosti 180 bp) – tzv. „žebříček“ DNA (agarózová gelová elktroforéza)**

Hodnocení jaderné morfologie buněk

Barvení DNA – DAPI, pak hodnocení – fluorescenční mikroskop – charakteristická apoptotická morfologie jádra – kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu)



Hodnocení jaderné morfologie (fluorescenční mikroskop)



Detekce fragmentace DNA - TUNEL

Pro detekci fragmentace DNA se hojně využívá metody TUNEL (terminal deoxynucleotidyl dUTP-nick labeling).

Vzniklé zlomy DNA lze identifikovat pomocí enzymatického značení jejich 3'OH konců nukleotidy konjugovanými s FITC.

Velmi výhodné je současné obarvení DNA propidium jodidem, což umožní jak určení celkového obsahu DNA, tak detekci zlomů.

Takto lze detekovat, zda indukce fragmentace DNA je specifická pro určité fáze buněčného cyklu.

Závěry – apoptóza nádorových buněk tlustého střeva po působení TRAILu

- plazmatická membrána – změny uspořádání fosfolipidů – fosfatidyl serin

- cytoskelet – štěpení cytokeratinů – cytokeratin 18

- cytoplazma – kaspázy, substráty kaspáz

- mitochondrie – membránový potenciál, produkce ROS, proteiny Bcl-2 rodiny, apoptotické proteiny uvolňované z mitochondrií, Apo2.7 protein

- jádro – jaderná morfologie, internukleozomální štěpení DNA, PARP