

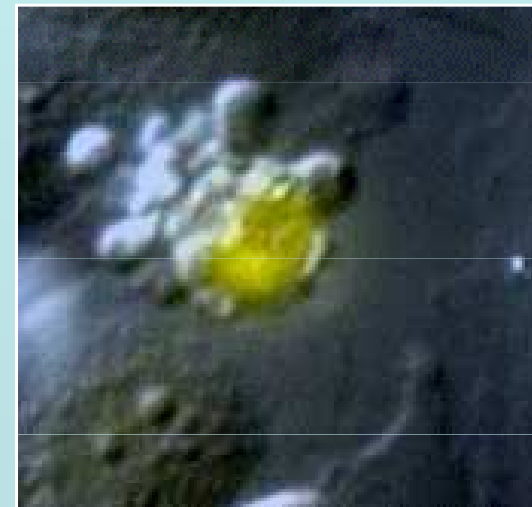
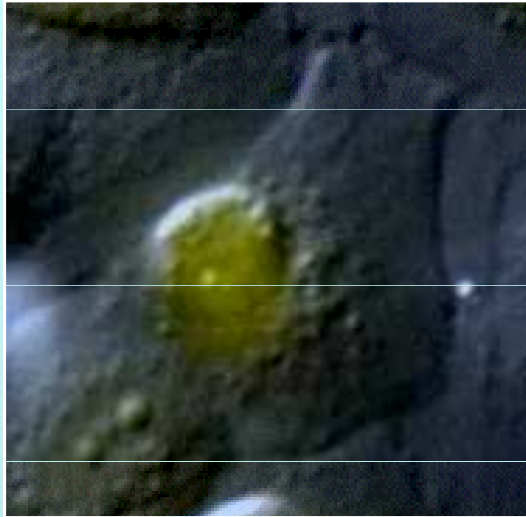
APOPTÓZA

Bc. Hana Zmrzlá

Osnova přednášky

- buněčná smrt
- apoptóza vs. nekróza
- význam apoptózy
- obecné rysy apoptózy
- apoptotická dráha
- regulace apoptózy
- metody studia a detekce apoptózy

Apoptóza – programovaná buněčná smrt



Apoptóza

- 1972 – australský patolog **John F. Kerr** poprvé použil termín apoptóza a popsal tuto podobu smrti jako proces, který vyžaduje aktivní účast samotné odumírající buňky
- název odvozen z řečtiny
- intenzivní výzkum

Poškození a zánik buňky

- poškození – reverzibilní X irreverzibilní
- příčiny poškození – vnitřní X vnější
- faktory **fyzikální** (různé druhy záření)
- faktory **chemické** (endogenní a exogenní chemikálie a toxiny)
- faktory **biologické** (virová infekce)

- nadměrná či nedostatečná stimulace přirozenými podněty
- nedostatek energie
- působení efektorových mechanismů IS
- hromadění metabolitů
- tvorba kyslíkových a jiných radikálů

**Buňky mají schopnost opravovat
různá poškození!**

**Jsou-li vyčerpány reparační
mechanismy → zánik buňky**

Smrt buňky

Dle morfologických a funkčních charakteristik:

- **Nekróza**
- **Apoptóza**

Nekróza

- náhlá, katastrofická smrt buňky („vražda“)
- ***patologický děj***
- výsledek neschopnosti udržet ***strukturálně-funkční vymezení*** od mezibuněčného prostoru a okolních buněk – koncentrační gradienty iontů a kompartmentalizace
- ***zvětšení objemu, ztráta vnitřní struktury, aktivace enzymů***
- místní zánětová reakce

Příčiny nekrózy

- nevratné poškození některé ze základních buněčných funkcí
 - **primární terč** působení letálního faktoru (často biomembrány a syntéza ATP)
 - primární terč → obraz nekrózy
 - letální faktory – akutní nedostatek kyslíku (→nedostatek ATP), osmotické, mechanické, tepelné, enzymatické, toxické
- některé mohou indukovat i apoptózu
- rozhodující je **intenzita, rychlost a doba působení** patogenního podnětu

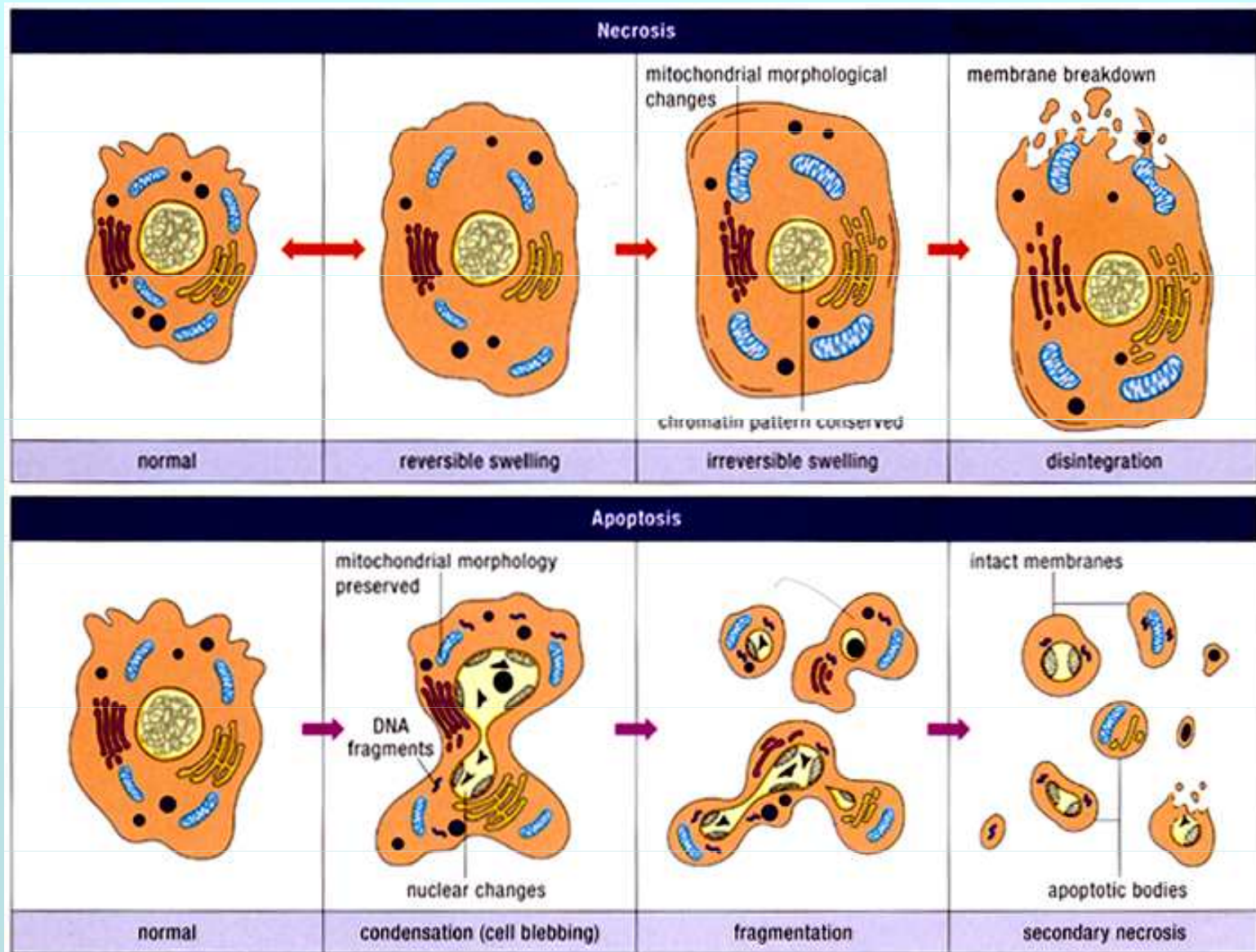
Apoptóza

- programovaná smrt buňky („sebevražda“)
- **fyziologický děj**
- **geneticky kontrolovaný komplexní proces**
- **aktivní forma zániku buňky**
- nezbytná pro udržení **homeostázy**
- **zmenšení objemu, kondenzace chromatinu, apoptotická tělíška** (fagocytována makrofágy)
- není přítomna místní zánětová reakce

Příčiny apoptózy

- stresové podněty z okolního prostředí
- poškození DNA
- vývojové procesy
- reakce na patogeny (viry)

Apoptóza versus nekróza



Induktory

Apoptóza

- nedostatek růstových faktorů
- specifické signály smrti (death ligands)
- hormonální změny
- ztráta kontaktu s prostředím
- UV záření
- chemoterapie

Nekróza

- hypoxie
- extrémní teploty
- silné změny pH
- osmotický tlak
- virová infekce (lytické viry)
- metabolické jedy

Fyziologický význam

Apoptóza

- jednotlivé buňky
- indukce fyziologickými stimuly
- fagocytóza makrofágy
- není zánětová reakce

Nekróza

- skupiny buněk
- indukce nefyziologickými stimuly
- vylití toxických látek – poškození okolní tkáně
- zánětová reakce

Morfologie

Apoptóza

- není porušena integrita membrány
- zmenšení velikosti buňky
- kondenzace a specifická fragmentace jaderného chromatinu
- udržení integrity intracelulárních organel
- formace apoptotických tělísek

Nekróza

- ztráta integrity cytoplazmatické membrány
- bobtnání cytoplazmy a zvětšení objemu buňky
- rozbití jádra
- desintegrace buněčných organel
- kompletní lyze buňky

Biochemie

Apoptóza

- aktivace specifických molekul
- nutné dodání energie (ATP)
- specifická fragmentace jaderné DNA
- uvolnění specifických regulátorů z mitochondrií
- změny symetrie membrán

Nekróza

- bez účasti specifických molekul
- pasivní proces, nevyžaduje dodání energie
- neregulovaná destrukce jaderné DNA
- mitochondrie nemají specifickou roli
- ztráta regulace iontových rovnováh

Význam apoptózy

- kontrola nadměrné proliferace – koordinační role při formování orgánů a tkání
- eliminace přestárých buněk
- eliminace poškozených nebo geneticky aberantních buněk (reakce na neopravitelné poškození genomové DNA, významná signální nerovnováha, extrémní nedostatek kyslíku, aj.)
- ***udržení homeostázy organismu***
- nežádoucí procesy – patogeneze řady onemocnění

Vývoj mnohobuněčného organismu

- odstraňování nežádoucích buněk během ***morfogeneze*** – tvorba funkčních tkání a orgánů
- geneticky pozměněné myši postrádající klíčové složky apoptotického aparátu vykazují typické vývojové poruchy: nadbytek neuronů v mozku, obličejové abnormality, poruchy formování prstů, atd.

Vývoj mnohobuněčného organismu

- metamorfóza hmyzu – přeměna larvy v imago
- metamorfóza obojživelníků a plazů – ztráta ocasu pulců (postupná řízená indukce apoptózy a proměna tvaru těla)

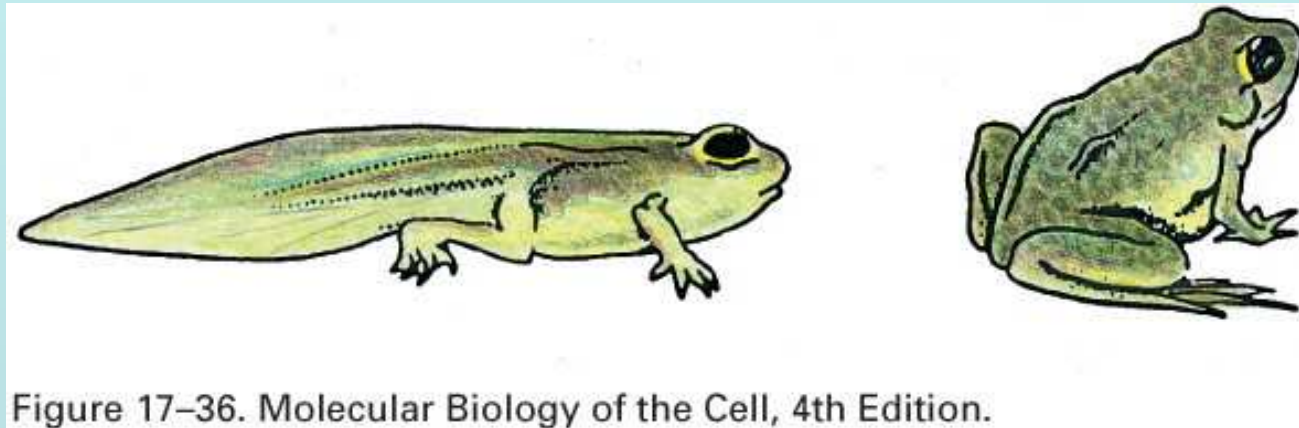
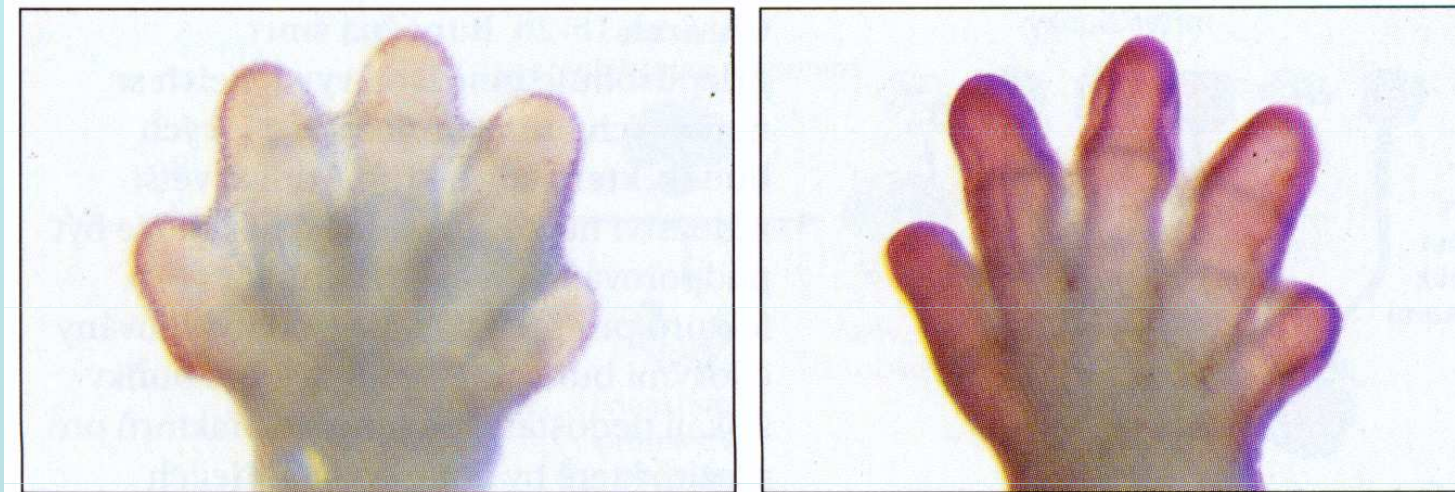


Figure 17–36. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Vývoj mnohobuněčného organismu

- eliminace některých neuronů při vývoji CNS
- formování tvaru orgánů a struktur – prsty a interdigitální prostory
- odstranění abnormalit během embryogeneze (spontánní potraty)



Vyvíjející se končetina myši. Buňky podléhající apoptóze obarveny červeně.

Regulace homeostázy organismu

- regulace počtu buněk v těle
- každý rok se v lidském těle vytvoří a je eliminováno apoptózou („turnover“) asi 3×10^{14} buněk
- eliminace starých nepotřebných buněk (střevní, kožní, krevní..)
- eliminace již nepotřebných buněk mléčné žlázy po ukončení laktace
- eliminace poškozených zárodečných buněk

Regulace homeostázy organismu

- nutná dokonalá ***rovnováha*** mezi procesy ***proliferace a apoptózy***
- porušení této rovnováhy → poškození zdraví organismu
- významné u intenzivně proliferujících tkání (střevní epitel, krev, aj.)
- přílišná apoptóza – degenerativní procesy
- nedostatečná apoptóza – hromadění genetických poruch, vznik nádorů

Onemocnění spojená s poruchou apoptózy

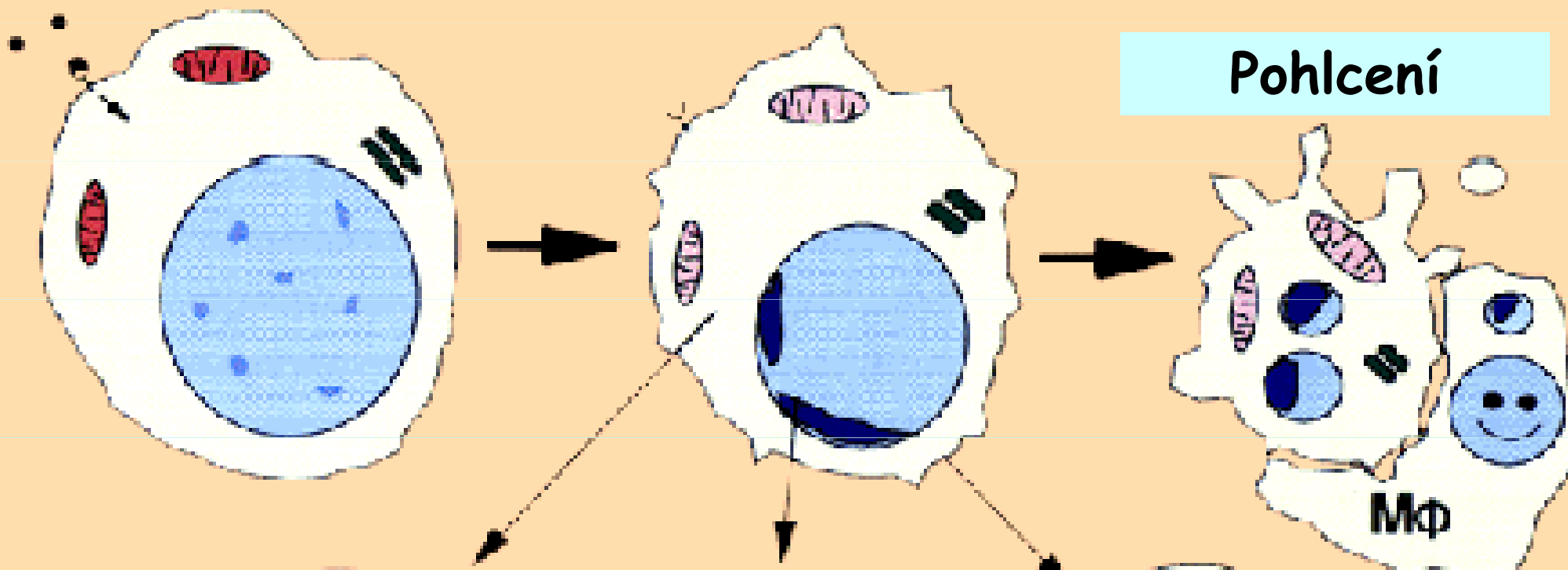
Table 3. Diseases with Dysregulated Apoptosis

Excessive Apoptosis	Deficient Apoptosis
Degenerative neurological diseases (Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's)	Autoimmune lymphoproliferative syndrome (Canale-Smith syndrome)
Aplastic anemia	Graves' disease
Acquired immunodeficiency syndrome	Hypereosinophilia syndrome
Hashimoto's thyroiditis	Hashimoto's thyroiditis
Lupus erythematosus	Lupus erythematosus
Liver failure	Lymphoma
Multiple sclerosis	Leukemia
Myelodysplastic syndrome	Solid tumors
Type I diabetes mellitus	Type I diabetes mellitus
Ulcerative colitis	Osteoporosis
Wilson's disease	Developmental defects
Chronic neutropenia	
Developmental defects	

Obecné rysy apoptózy

- změny na úrovni *membrán*
- změny na úrovni *jádra*
- účast *specifických genů a proteinů* v regulaci apoptózy

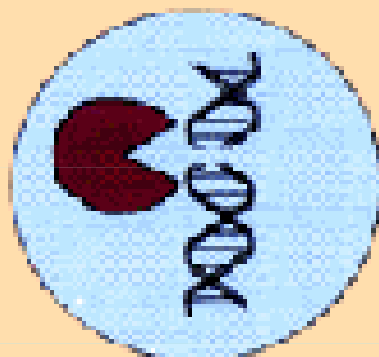
Signál smrti



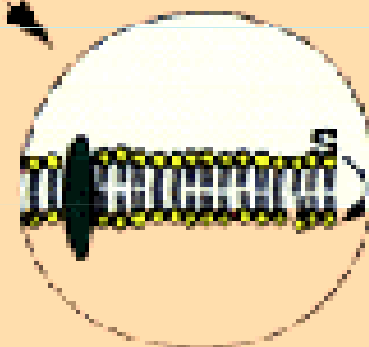
Pohlčení



Aktivace enzymů



Fragmentace chromatinu



Tvorba výběžků, změny povrchových struktur

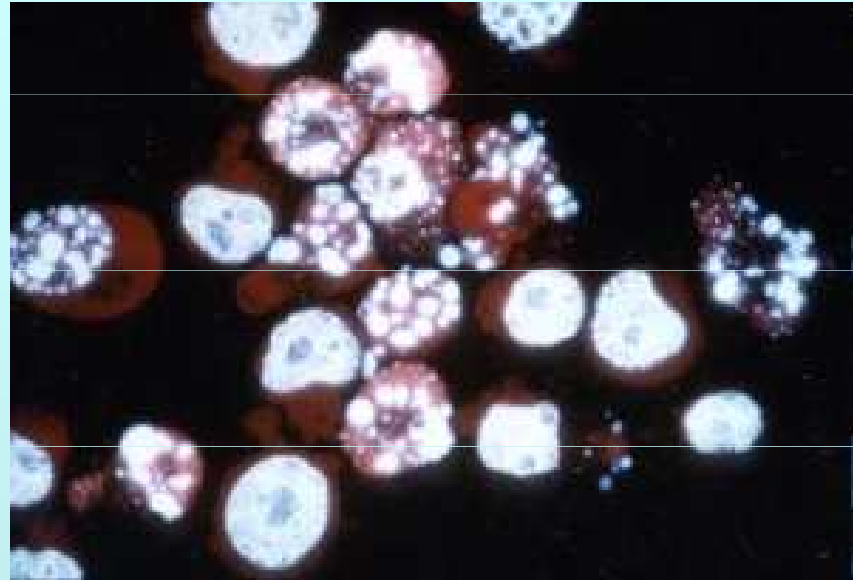
Kinetika buněčných změn

Buněčné změny během apoptózy jsou přísně koordinovány.

- tvorba vychlípenin plazmatické membrány (povrch buňky „vaří“)



- jádro se zahušťuje a fragmentuje (stádium „pyknózy“)

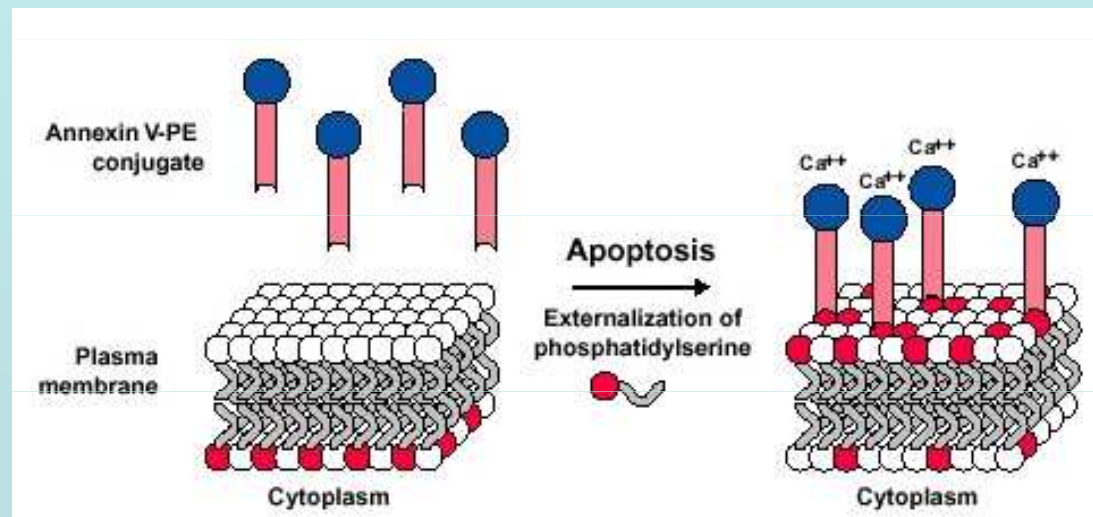


- chromozomální DNA se štěpí na krátké segmenty
- během hodiny se apoptotická buňka rozpadá na malé části (apoptotická tělíška), která jsou pohlcena sousedními buňkami nebo makrofágy fagocytózou

Změny na úrovni membrán

Plazmatická membrána

- integrita je zachována
- významné změny v symetrii membrány
- fosfatidylserin je z vnitřní strany translokován na stranu vnější – signál pro fagocyty (na povrchu nesou specifické receptory pro fosfatidylserin)



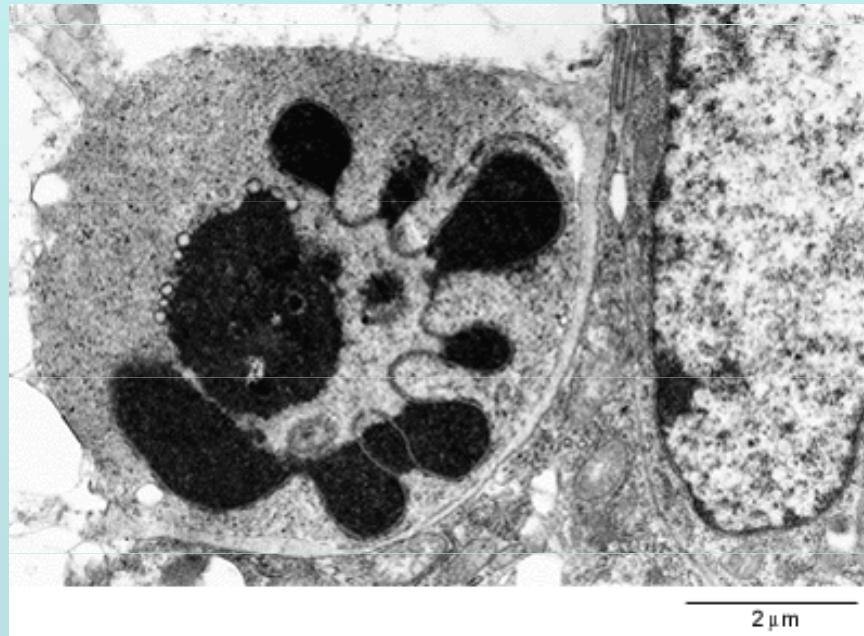
Změny na úrovni membrán

Mitochondriální membrána

- změny membránového potenciálu
- změny propustnosti – vznik pórů
- vylití některých mediátorů apoptózy do cytoplazmy

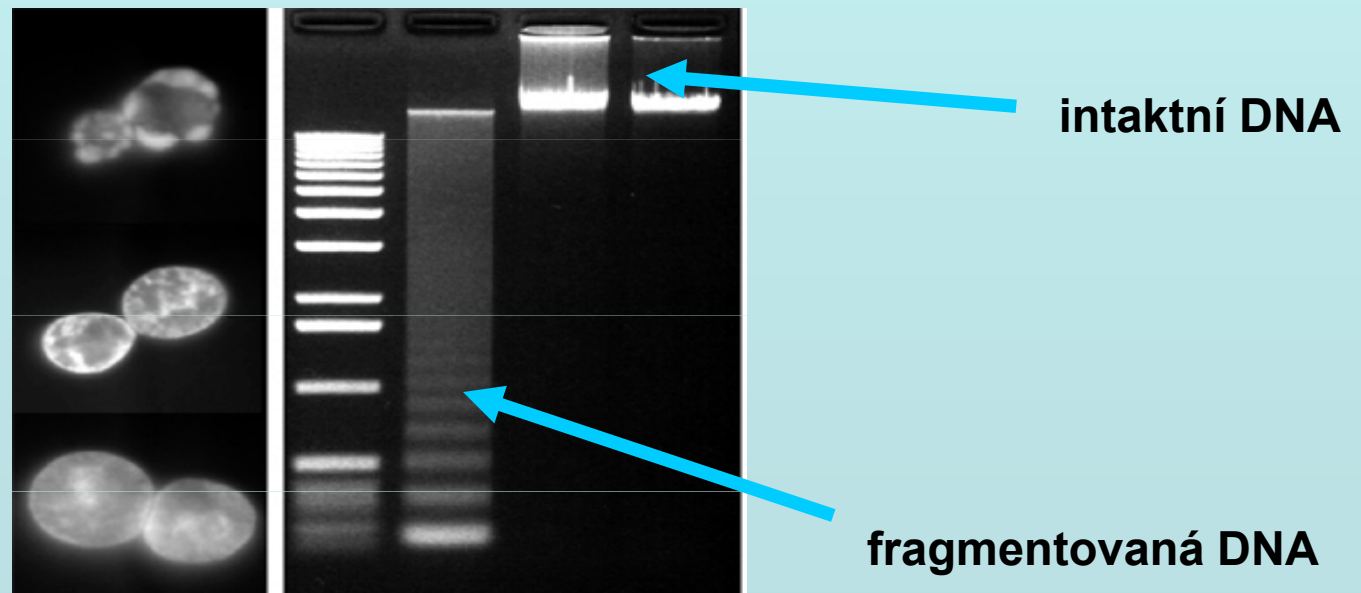
Změny na úrovni jádra

- smrštění jádra
- charakteristická morfologie
- kondenzace a fragmentace chromatinu
- soustředění chromatinu na periferii jádra

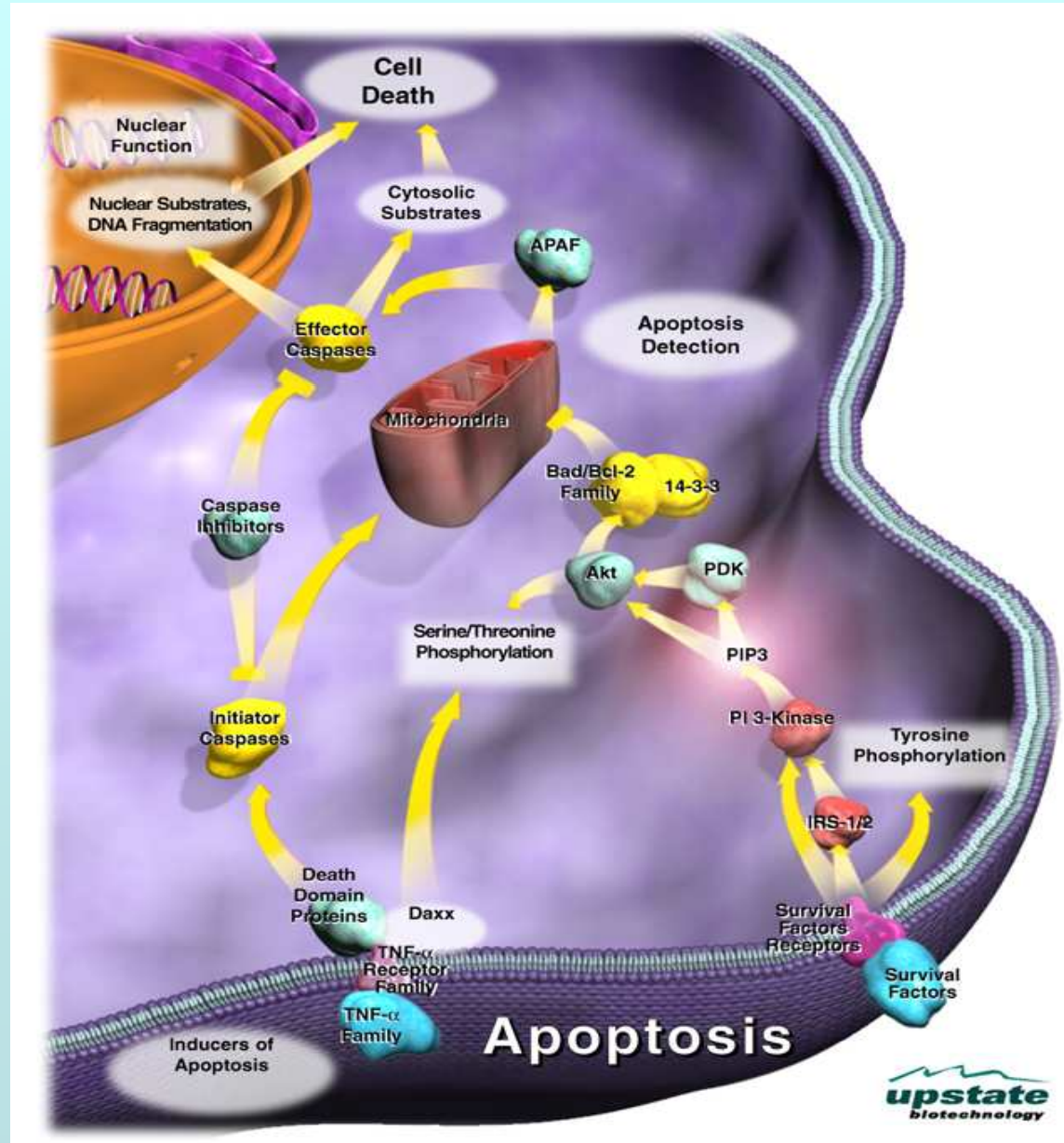


Fragmentace chromatinu

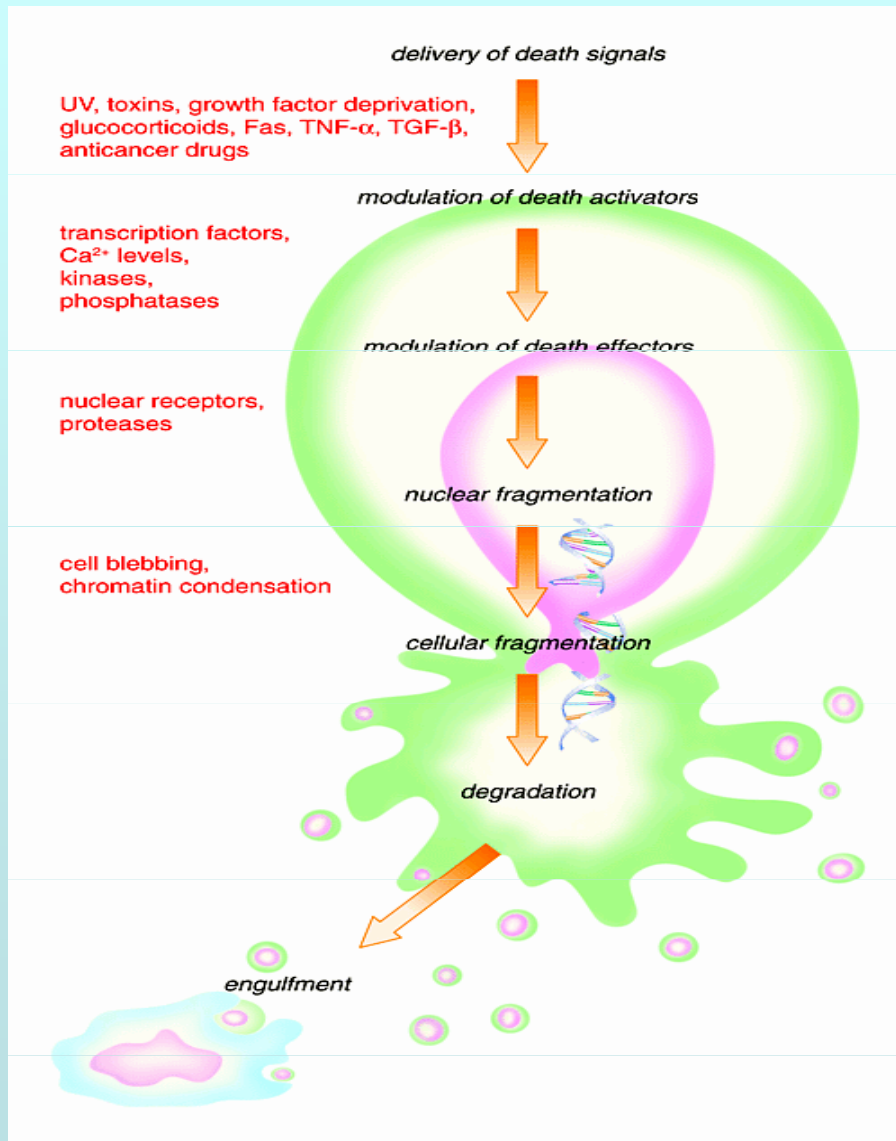
- specifická a řízená degradace DNA
- nukleázy – specifické endonukleázy (Ca- a Mg-dependentní)
- štěpí DNA mezi jednotlivými nukleosomy
- vznikají charakteristické fragmenty DNA (délka 180 bp)



Apoptotická dráha



Procesy spojené s apoptózou



- detekce signálu smrti
- ovlivnění aktivátorů smrti
- ovlivnění efektorů smrti
- fragmentace jádra
- fragmentace buňky
- degradace
- fagocytóza jinými buňkami

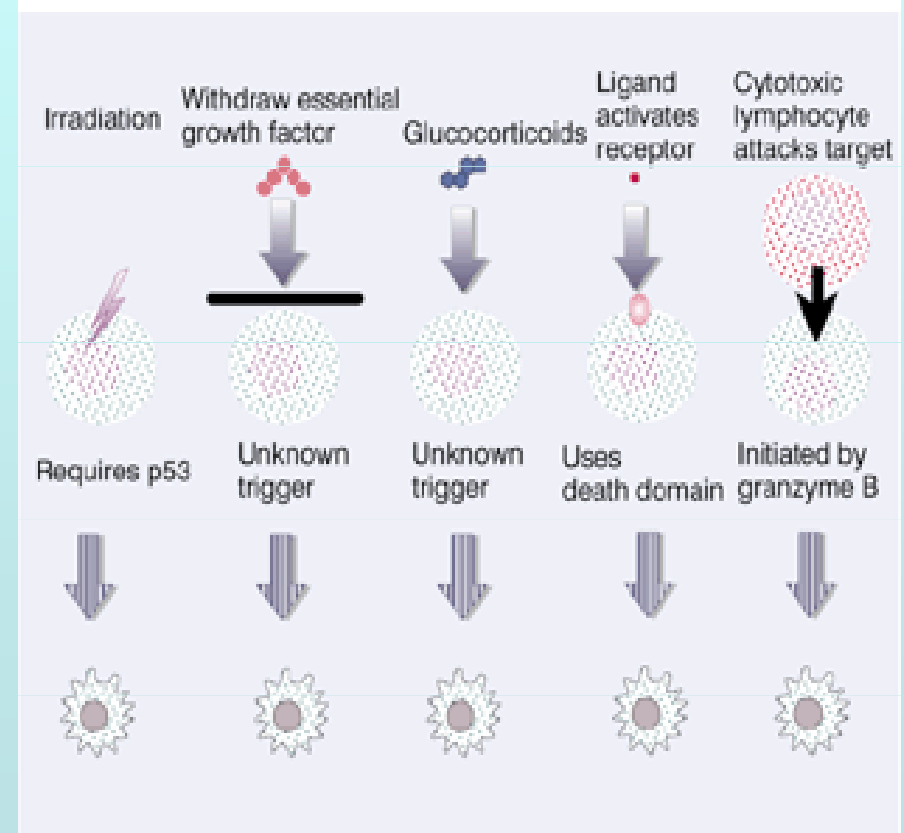
Změny uvnitř buňky vedoucí k její destrukci jsou výsledkem vzájemného působení ***anti-apoptotických*** a ***pro-apoptotických*** buněčných mechanismů.

Aktivace apoptózy

Pro-apoptické stimuly (signály smrti)

- UV a ionizující záření
- nedostatek růstových faktorů
- glukokortikoidy
- specifické ligandy (Fas, TNF)
- cytotoxické lymfocyty
- některé onkogeny a nádorové supresory (p53, Rb)

Figure 27.36 Apoptosis is triggered by a variety of pathways.



Dvě hlavní nitrobuněčné dráhy indukující apoptózu

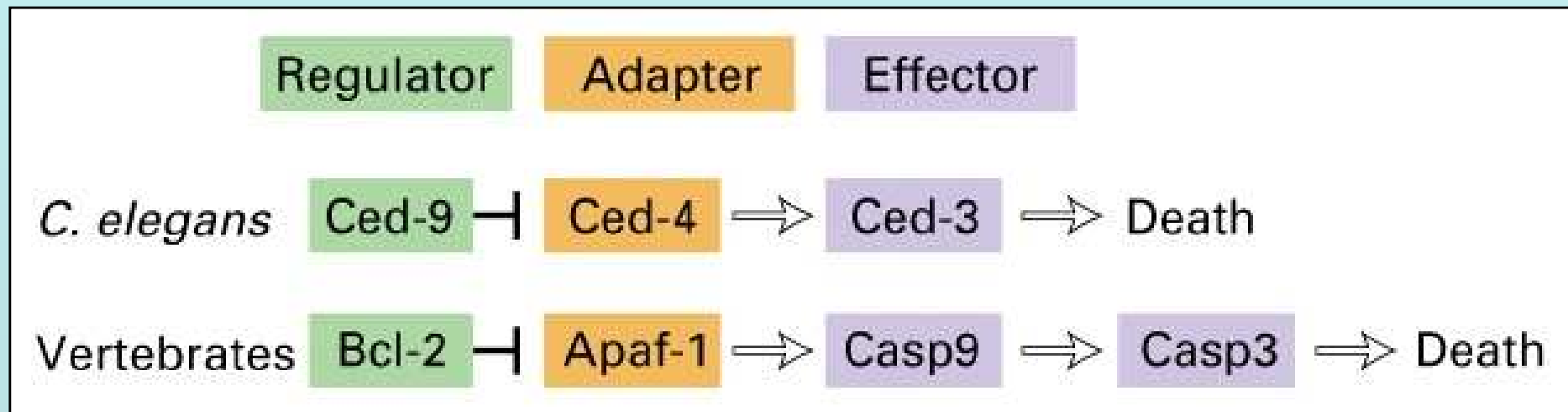
- dráha ***nezávislá na p53*** aktivovaná mimobuněčnými ligandy (Fas nebo TNF α) nebo ztrátou ukotvení k podkladu (tento typ apoptózy se jmenuje anoikis)
- dráha ***závislá na p53*** aktivovaná stresovými faktory (UV záření) a využívající proteiny rodiny Bcl-2

- ***Receptory smrti*** – proteiny, které disponují doménou smrti; konzervativní sekvence 70 aminokyselin
- ***Dráhy smrti*** – paralelní nitrobuněčné signální dráhy (pokud je jedna dráha blokována, schopnost odumírání je jen zpomalena, nikoliv zcela inhibována)

Apoptotická signalizace

tři skupiny proteinů:

- regulátory
- adaptéry
- efektory



Specifické geny a proteiny v regulaci apoptózy

- kaspázy
- inhibitory kaspáz
- nekaspázové proteázy
- proteiny rodiny Bcl-2
- mediátory apoptózy uvolňované z mitochondrií

Kaspázy

- cysteinyl **aspartát**-specifické proteázy
- **enzymy** bohaté na cystein , které štěpí mnohé proteiny v místech, kde jsou lokalizovány zbytky Asp
- syntetizovány jako inaktivní **proenzymy** (prokaspázy)
- po **proteolytické aktivaci** degradují klíčové buněčné struktury → typické morfologické a biochemické znaky apoptózy
- klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu
- mohou se uplatnit jako **iniciátory i efekторы**
- známo 13 členů rodiny, rozděleny do dvou podskupin

Iniciační kaspázy (sk. 1)

- *kaspáza 8, kaspáza 9 a kaspáza 10*
- obsahují velkou pro-doménu na N-konci
- iniciátory procesů buněčné smrti

Aktivace:

- na úrovni ***specifických signálních komplexů***, zde ukotveny pomocí dlouhé prodomény
- ***DISC*** – „death-inducing signaling complex“ – kaspáza 8
- ***apoptozom*** – kaspáza 9

Efektorové kaspázy (sk.2)

- *kaspáza 3, kaspáza 6 a kaspáza 7*
- obsahují malou pro-doménu
- štěpí různé substráty, které **přímo** způsobují řadu morfologických a biochemických změn v apoptotických buňkách

Aktivace:

- není nutná účast specifických komplexů
- proteolytické štěpení **pomocí iniciačních kaspáz**

Kaskáda kaspázových reakcí

(A) procaspase activation

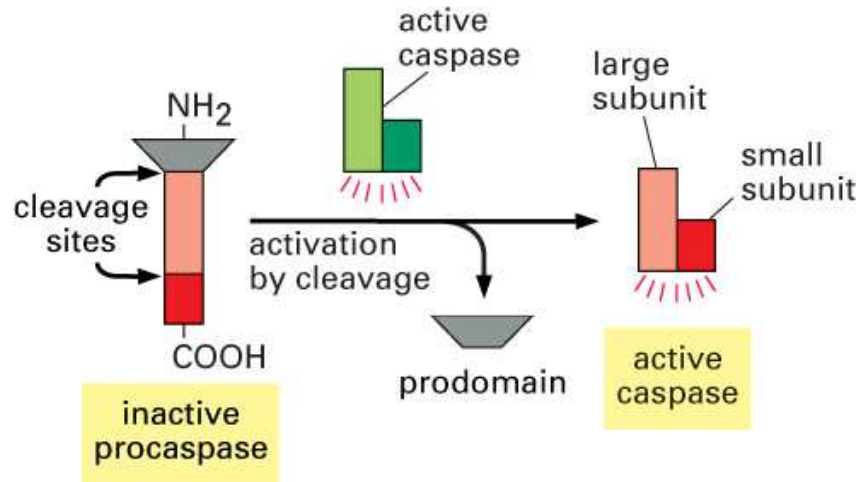


Figure 17-38 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

← Jedna kaspáza může aktivovat jinou

(B) caspase cascade

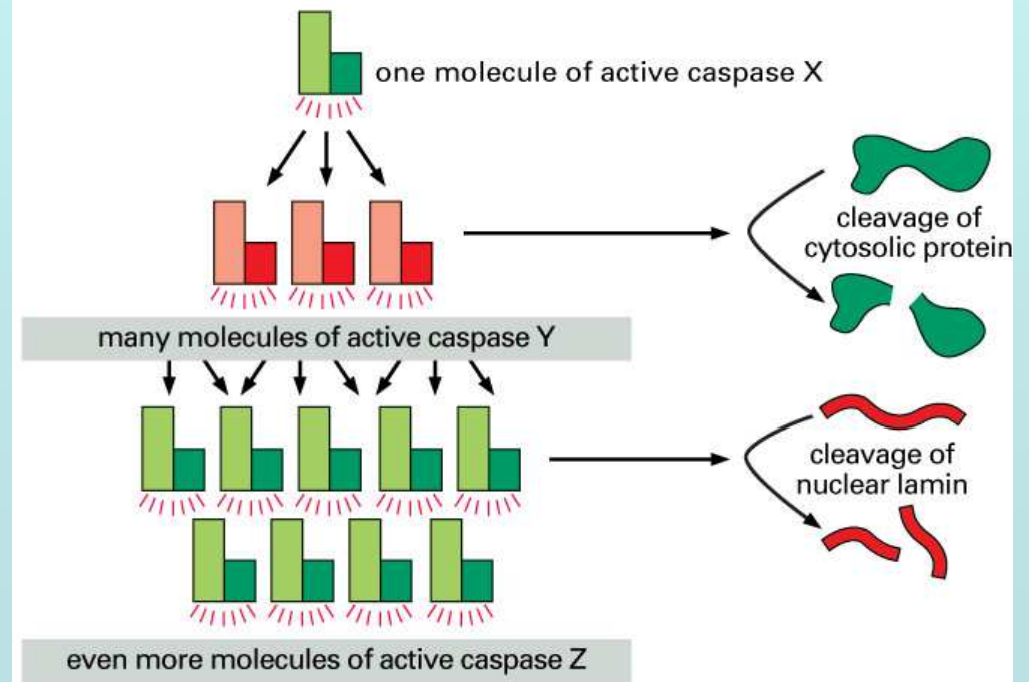


Figure 17-38 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

... což vede ke spuštění kaskády kaspázových reakcí

Kaspáza 8

- **iniciační** kaspáza **aktivovaná** na úrovni signálního komplexu **DISC**
- aktivace tzv. „**vnější dráhy indukce apoptózy**“
- v DISCu se prokaspáza 8 štěpí na kaspázu 8, vznikají fragmenty o velikosti 41 a 18 kDa (dvojkrokový mechanismus aktivace)
- **FLIP** – inhibitor kaspázy 8, brání její aktivaci, neboť se sám váže do DISCu
- aktivní kaspáza 8 může dále **aktivovat dvě základní dráhy** – přímá aktivace **kaspázy 3**, **dráha závislá na mitochondriích** - protein Bid

Kaspáza 9

- ***iniciační*** kaspáza ***aktivovaná*** na úrovni signálního komplexu zvaného ***apoptozom***
- složení apoptozomu – cytochrom c, Apaf-1, prokaspáza 9, ATP
- aktivace tzv. „***vnitřní dráhy indukce apoptózy***“
- prokaspáza 9 se štěpí na kaspázu 9, vznikají fragmenty o velikosti 35 a 17 kDa

Efektorové kaspázy

- *kaspáza 3, kaspáza 6 a kaspáza 7*
- podílí se na exekuční fázi apoptózy
- *specificky* štěpí řadu důležitých substrátů v buňce

Kaspáza 3

- efektor apoptotické signalizace
- štěpí různé buněčné proteiny
- aktivuje specifickou DNázu (**CAD – caspase activated DNase**)
- v proliferujících buňkách je CAD obvykle v komplexu se svým inhibítoem **ICAD**
- **kaspáza 3** v apoptotických buňkách **štěpí ICAD** a umožňuje tak CAD fragmentovat DNA

Substráty kaspáz

- ***Strukturální proteiny*** – laminy (jádro), aktin, fodrin (cytoskelet), keratin 18 (intermediární filamenta)
- ***Signální a regulační proteiny*** – cPLA2, PKC, některé proteiny rodiny Bcl-2, MEKK-1
- ***Transkripční faktory*** – MDM2, RB
- ***Proteiny v regulaci metabolismu DNA/RNA*** – PARP, ICAD

PARP

– poly(ADP-ribosyl) polymeráza

- jaderný protein (113 kDa), ***opravy DNA***
- během apoptózy je ***specificky štěpen*** na fragmenty 89 a 24 kDa
- citlivý marker pro detekci apoptózy
- inaktivace PARP blokuje opravu DNA, posílení fragmentace DNA

Inhibitory kaspáz

- ***FLIP*** – sekvence podobná kaspáze 8, nemá katalytické místo, ***kompetitivně inhibuje vazbu kaspázy 8 v DISCu***
- ***IAPs*** - inhibitor of apoptosis proteins“ -cIAP1, cIAP2, XIAP, survivin – ***váží se na prokaspázy a kaspázy*** (prostřednictvím domény BIR) a ***blokují jejich aktivitu***, mohou inhibovat jak iniciační, tak efektorové kaspázy – různé mechanismy

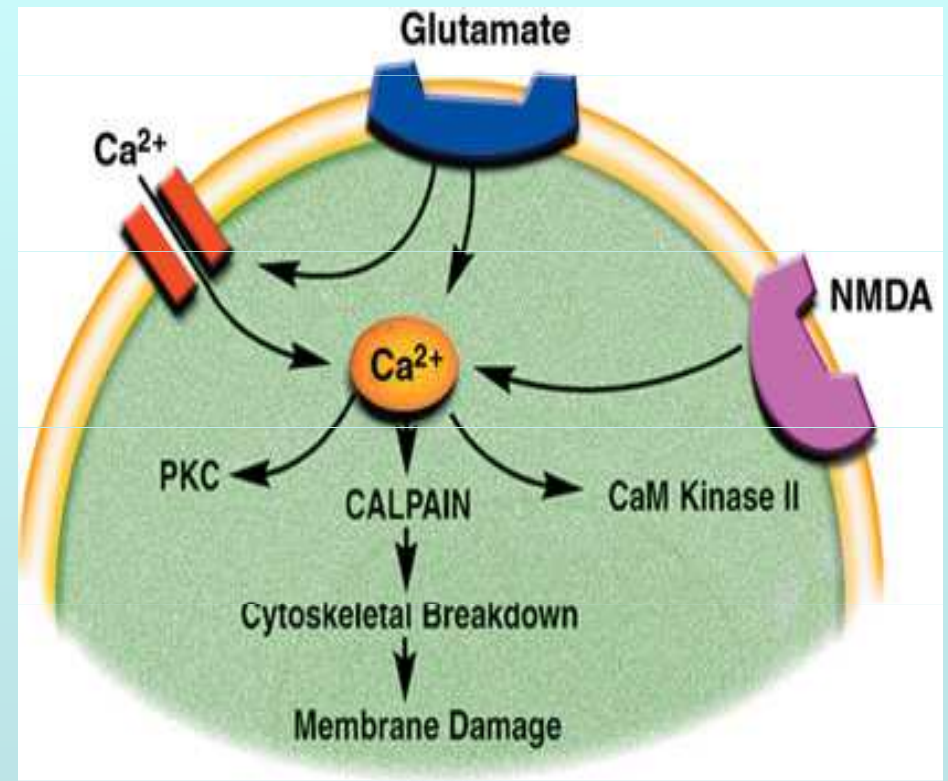
Nekaspázové proteázy

- ***calpainty*** (I, II, calpastatin)
- ***cathepsiny*** (B, D, L)
- ***granzymy*** (A, B)

- mohou buď spolupracovat s kaspázami, nebo spouštět buněčnou smrt nezávisle na nich

Calpains

- **cytosolové** cysteinové proteázy
- aktivace **závislá na vápníku**
- vazebné domény pro Ca^{2+}
- autolyze, autoaktivace
- calpain I, calpain II
- calpastatin – inhibitor calpainů

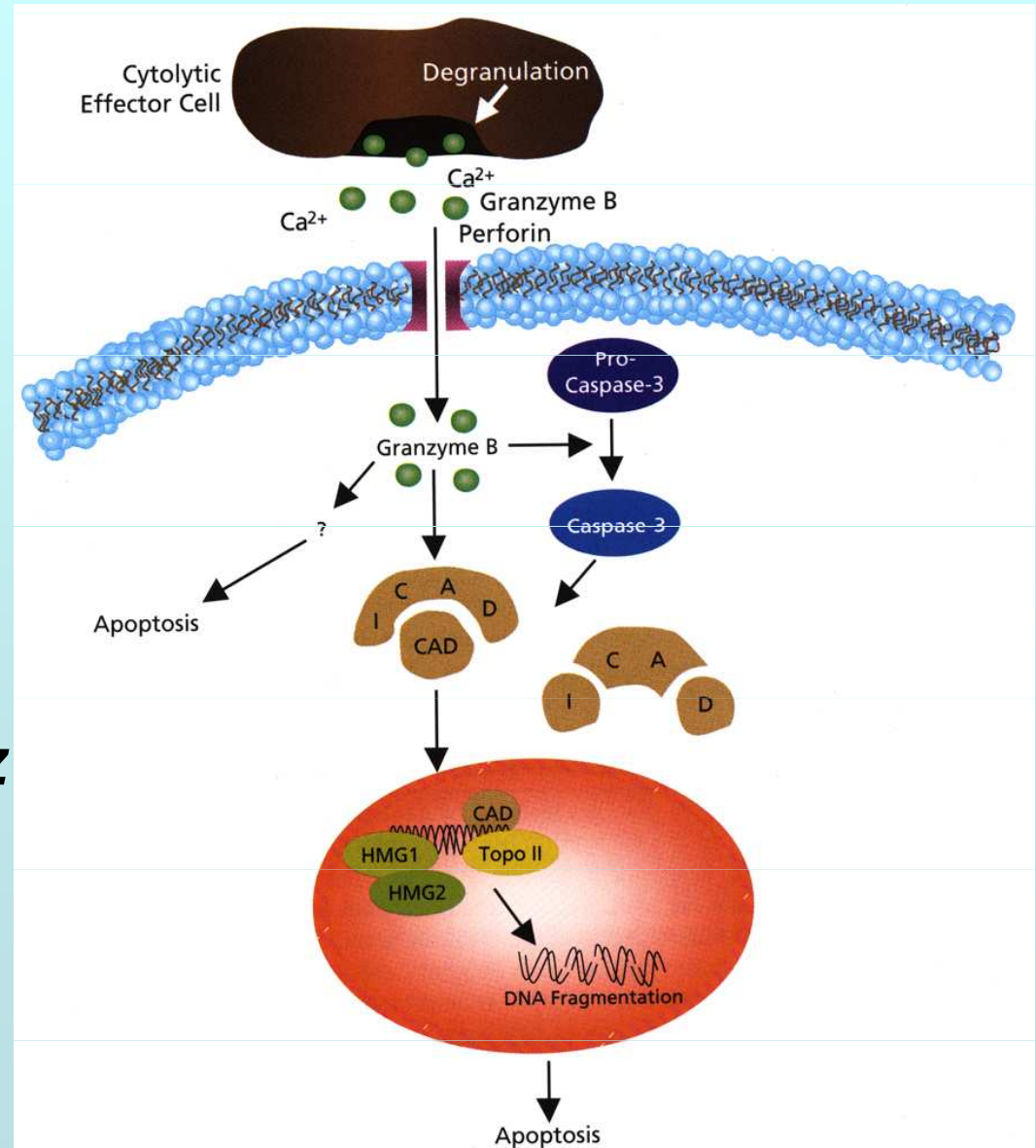


Cathepsiny

- ***lysosomální*** proteázy
- aktivovány v ***kyselém pH*** (lysosom) – autoproteolýza, nebo jinými proteázami
- během apoptózy ***translokovány z lysozomů do cytoplazmy*** – exekuce apoptózy
- cathepsin B, cathepsin D, cathepsin L

Granzymy

- serinové **proteázy T-buněk a NK-buněk**
- spolu s **perforinem** se podílejí na indukci buněčné smrti
- perforin vytvoří póry v buňce → průnik granzymu B
- granzym B se může účastnit **aktivace kaspáz** (kaspáza 3) **nebo DNáz** (štěpí ICAD)
- granzym A, granzym B



Regulátor apoptózy – Apaf-1

- „*apoptotic protease activating factor*“
- spolu s *cytochromem c* a za přítomnosti ATP zodpovídá za zpracování a dozrávání *pro-kaspázy 9*

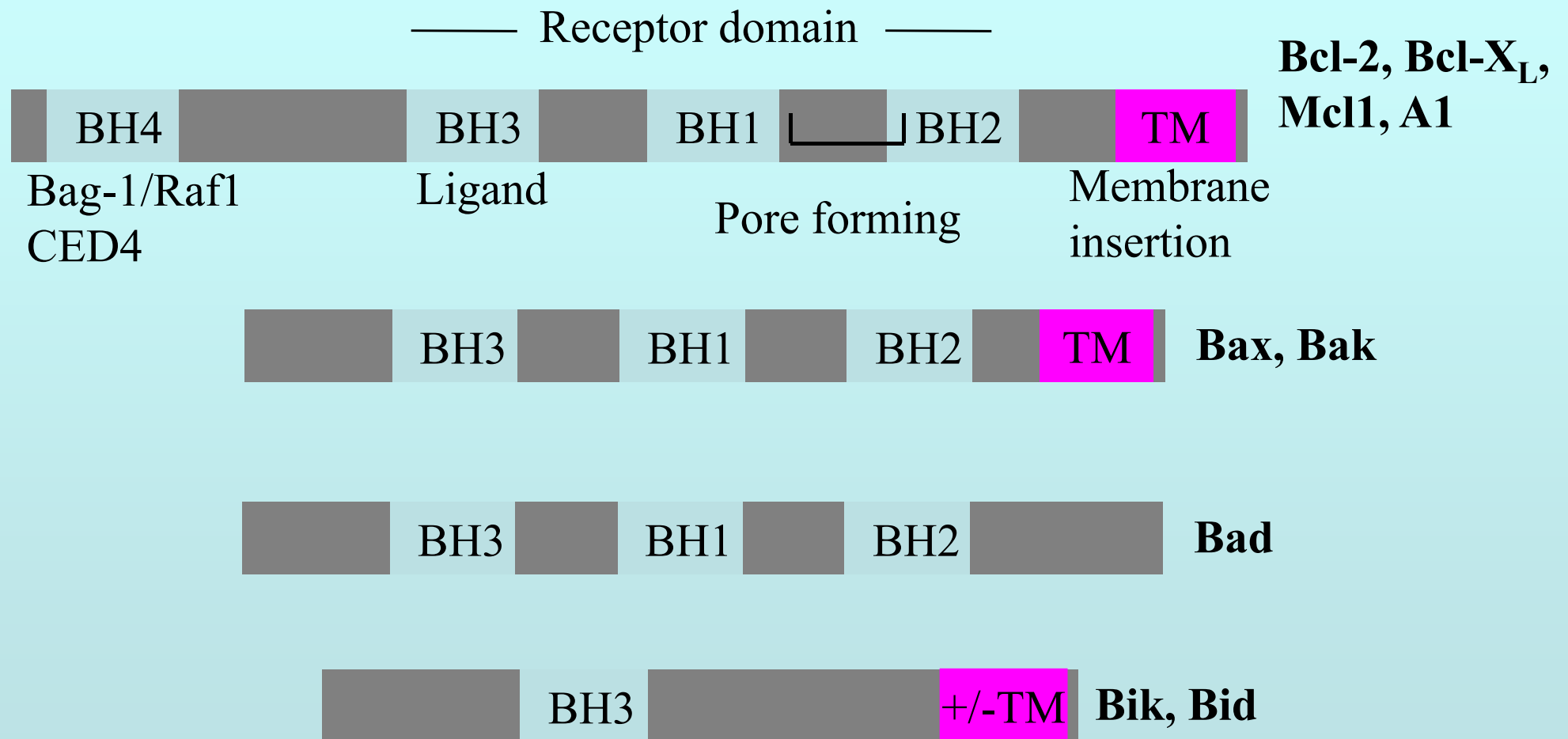
Rodina proteinů Bcl-2

- *regulátory* apoptózy
- skupina proteinů s *pro- nebo anti-apoptickou funkcí*
- rovnováha opačně působících faktorů rozhoduje o osudu buňky při reakci na stres nebo poškození DNA
- evoluční konzervativnost
- *pro-apoptické* členy rodiny Bcl-2 *zvyšují* nitrobuněčnou hladinu *cytochromu c*
- spojeny s membránami, především *mitochondriálními*

Rodina proteinů Bcl-2

- 30 proteinů, **strukturní příbuznost** – obsahují alespoň jednu ze čtyř známých šroubovicových **domén BH** (Bcl-homology) – BH1-BH4
- **BH domény zprostředkovávají interakce s vazebnými partnery**
- BH domény umožňují tvorbu homodimerů/heterodimerů a vzájemnou regulaci
- **pro-apoptické** proteiny **Bax, Bad, Bid, Bik a Bim** obsahují šroubovicovou **doménu smrti** („death domain“), která zapadá do hydrofóbní kapsy ve struktuře **anti-apoptických proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L**

Struktura proteinů Bcl-2



Řada proteinů Bcl-2

Molekuly navozující smrt
(pro-death, PD)

Skupina II

Bax
Bak

Skupina III

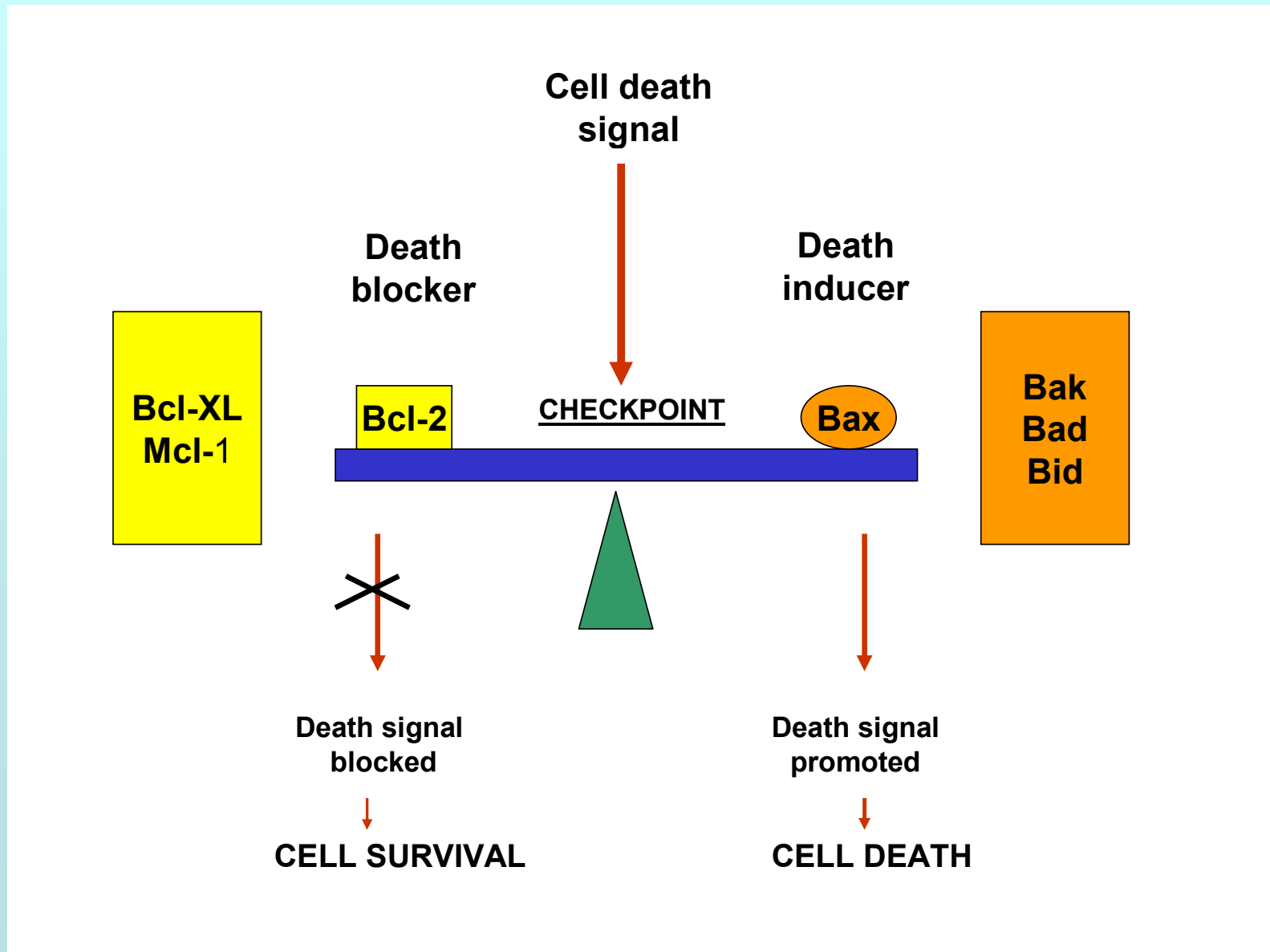
Bad
Bcl-X_S
Bik

Molekuly stimulující přežívání
(pro-survival, PS)

Skupina I

Bcl-2
Bcl-X_L
Mcl-1
A1
Bcl-W

rovnováha opačně působících faktorů rozhoduje o osudu buňky při reakci na stres nebo poškození DNA



Řada proteinů Bcl-2

- *lidský* genom kóduje **24 proteinů** příbuzných Bcl-2, **6** z nich je ***anti-apoptotických***, ostatní jsou pro-apoptotické
- proteiny skupiny I a II mohou vzájemně tvořit homodimery nebo heterodimery, proteiny skupiny III dimerizují pouze se zástupci skupiny I
- Bcl-2, Bcl-X_L (skupina I) stabilizují mitochondriální membránu, inhibují uvolňování cytochromu c a inhibují signály smrti; proteiny typu Bax (skupina II) antagonizují proteiny skupiny I a stimulují apoptózu
- domény BH představují vazebná místa (“docking” sites) pro regulátory apoptózy v proteinech Bcl-2

Rodina proteinů Bcl-2

- v nepřítomnosti apoptotického signálu jsou proteiny Bcl-2 rodiny lokalizovány v různých subcelulárních kompartmentech
 - antiapoptické proteiny – integrální membránové proteiny – mitochondrie, endoplazmatické retikulum, jádro
 - proapoptické proteiny – cytosol, cytoskelet
 - ***apoptický stimulus má za následek jejich konformační změny a translokace***, především ***do mitochondrií*** – na úrovni mitochondriální membrány pak dochází ke vzájemným interakcím pro- a anti-apoptických proteinů této rodiny

Bcl-2

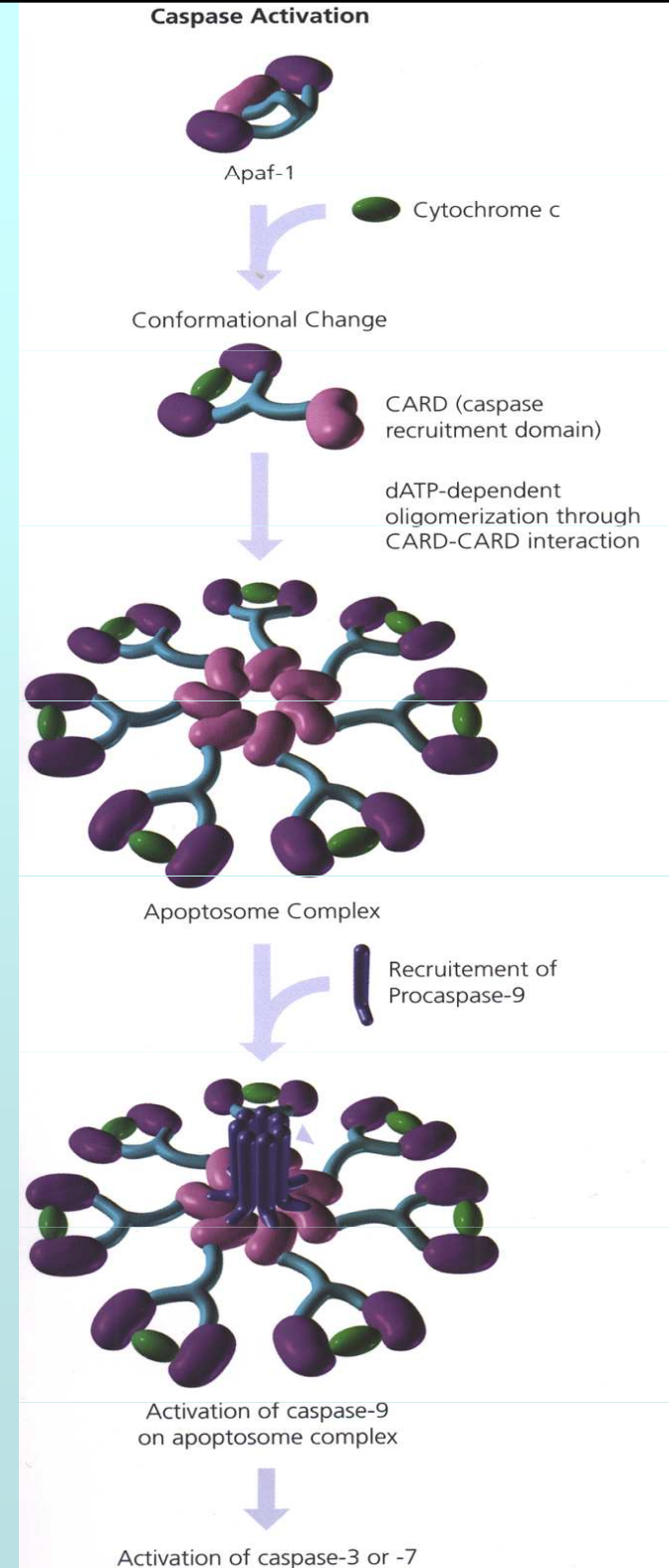
- *B-cell lymphoma 2* protein
- Bcl-2 byl první popsáný člen této rodiny (po něm pojmenována) a zároveň ***první popsáný savčí regulátor apoptózy***
- ***anti-apoptotický protein***
- úloha v rezistenci nádorových buněk k některým typům chemoterapeutik

Souvislost Bcl-2 s cytochromem c

- *proteiny Bcl-2 řídí uvolňování cytochromu c*
- indukovaná exprese anti-apoptotických členů Bcl-2 brání uvolnění cytochromu c z mitochondrií, aktivaci kaspáz a smrti buněk vystavených cytotoxickým látkám
- indukovaná exprese pro-apoptotických členů Bcl-2 (Bax) způsobuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií a smrt buňky i za nepřítomnosti jakéhokoliv cytotoxického signálu
- *pro-apoptotické proteiny Bcl-2 působí na povrchu mitochondriální membrány a fungují tak, že snižují její potenciál a stimulují tak uvolnění cytochromu c*

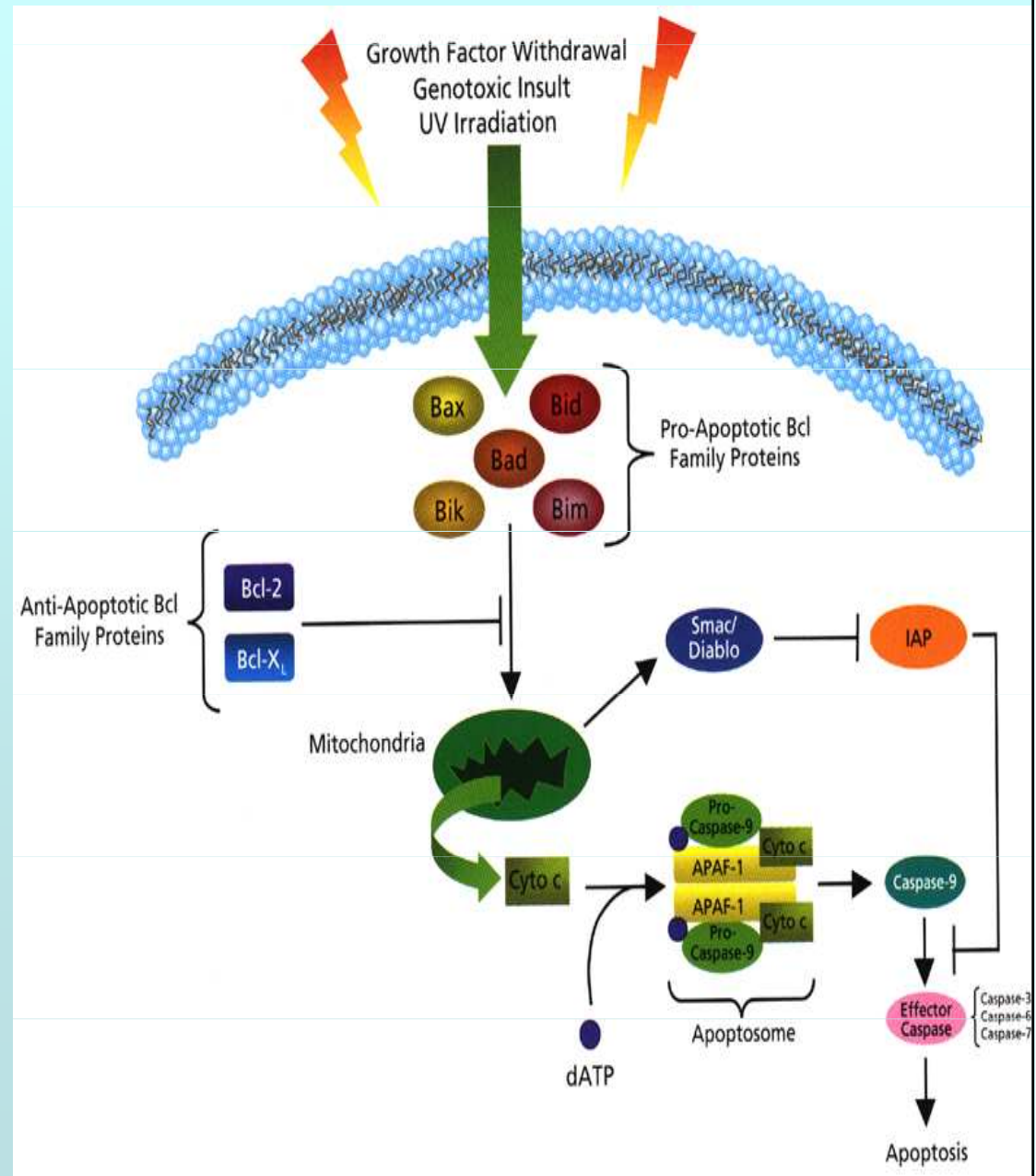
Cytochrom c

- spolu s Apaf-1 a dATP *nutný* faktor pro aktivaci kaspáz
- jakmile se cytochrom c objeví v cytozolu (řízeno Bcl-2), váže se na **Apaf-1**
- Apaf mění konformaci a oligomerizuje
- za přítomnosti dATP komplex cytochrom c/Apaf-1 váže a aktivuje **prokaspázu 9** („apoptozom“)
- aktivovaná kaspáza 9 aktivuje další kaspázy zodpovídající za apoptotickou smrt buňky (kaspázy 3 nebo 7)



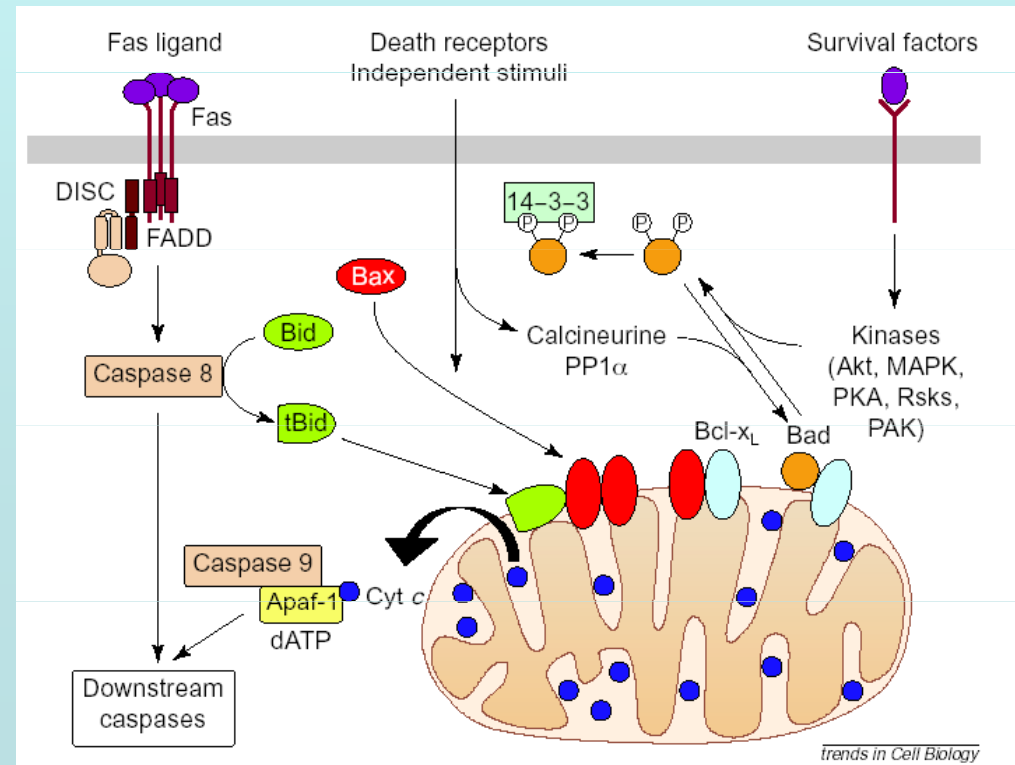
Protein Smac/DIABLO

- uvolňován z mitochondrií spolu s cytochromem c
- **inaktivuje skupinu anti-apoptických proteinů IAP** („inhibitors of apoptosis“)
- IAPs za přítomnosti Smac/DIABLO blokují kaspázy
- bez IAPs jsou kaspázy plně funkční



Faktory řídící aktivitu Bcl-2

- *cytozolické proteiny (Bid, Bad, Bax)*
- během apoptózy *translokují do mitochondrií*
- vážou a ovlivňují aktivitu Bcl-2 nebo přímo řídí uvolňování cytochromu c



Bid

- pro-apoptotický protein, štěpen kaspázou 8
- obrovský význam v ***integraci signálů dvou základních drah indukce apoptózy*** – „vnější a vnitřní“
- spojení receptorové dráhy indukce apoptózy a mitochondrií, regulace vylití cytochromu c z těchto organel a následné aktivace mitochondriální dráhy

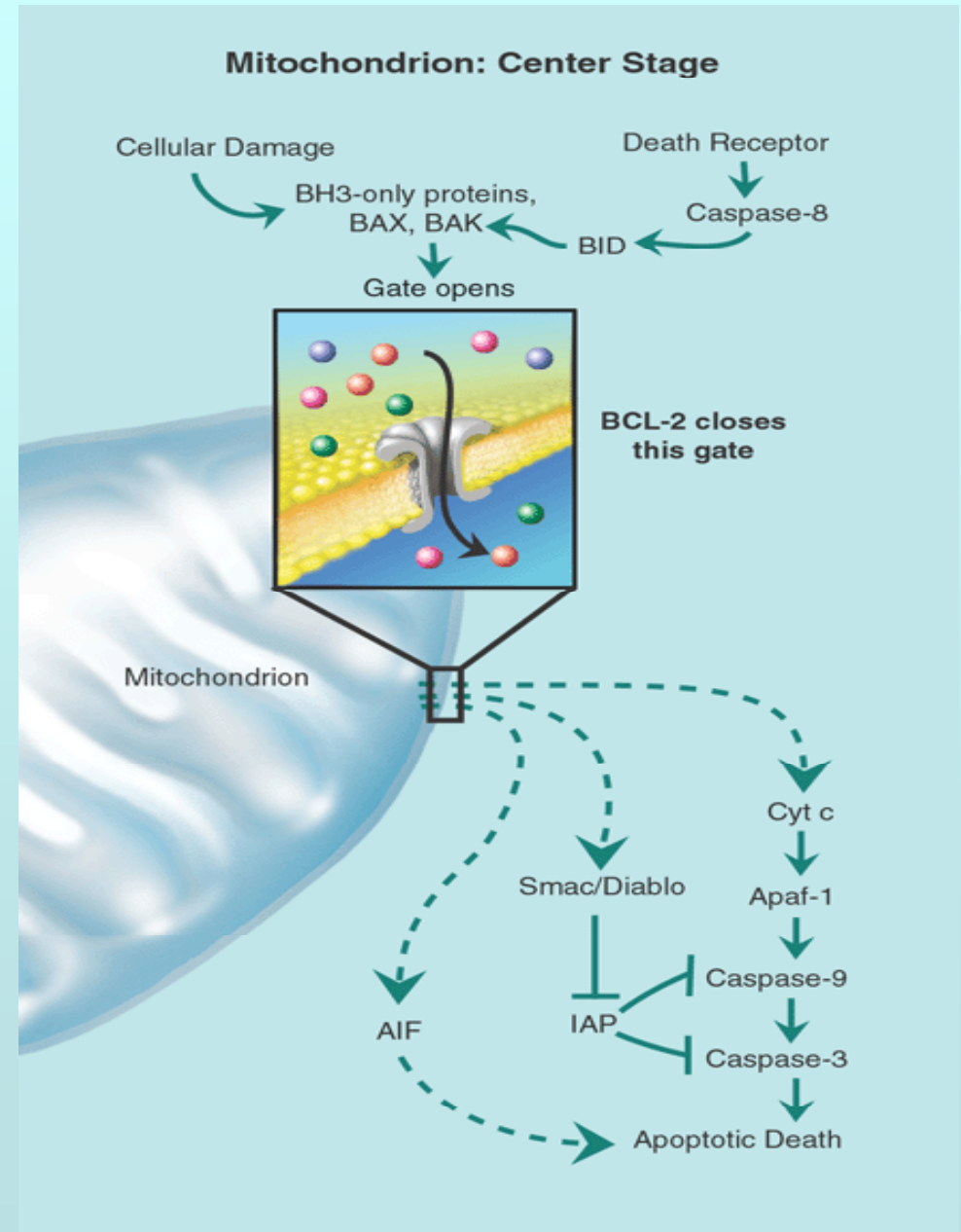
Apoptóza a mitochondrie

Mitochondrie

- centrum buněčného dýchání, energetické centrum buňky
- ***vnější membrána*** – semipermeabilní, kanálky (poriny)
- ***vnitřní membrána*** – nepropustná, selektivní transport, kristy (syntéza ATP)
- ***intermembránový prostor*** – enzymy, pro-apoptické proteiny
- ***matrix*** – směs enzymů, DNA, ribozomy, citrátový cyklus

Apoptóza a mitochondrie

- změny v *transportu elektronů*
- změny *energetického metabolismu* buňky
- změny v *produkci ROS*
- změny mitochondriálního *membránového potenciálu*
- účast proteinů rodiny Bcl-2 (Bid, Bak, Bax...)
- *úvolnění proapoptických proteinů*



Apoptózu spouštějí dvě signální dráhy

1. *Vnitřní dráha závislá na p53*

- stimulována výrazným poškozením genomu, nedostatkem kyslíku, nerovnováhou růstových signálů
- aktivace p53
- ***p53 aktivuje expresi genů zapojených do regulace apoptózy*** (např. bax)
- ***Bax*** otevře mitochondriální kanálky a zvýší tak hladinu ***cytochromu c*** a dalších ***pro-apoptotických proteinů***
- ***aktivace kaspáz***
- existují i takové způsoby uvolnění cytochromu c, které nezahrnují p53 (stres z vysoké koncentrace Ca^{2+} , virové infekce)

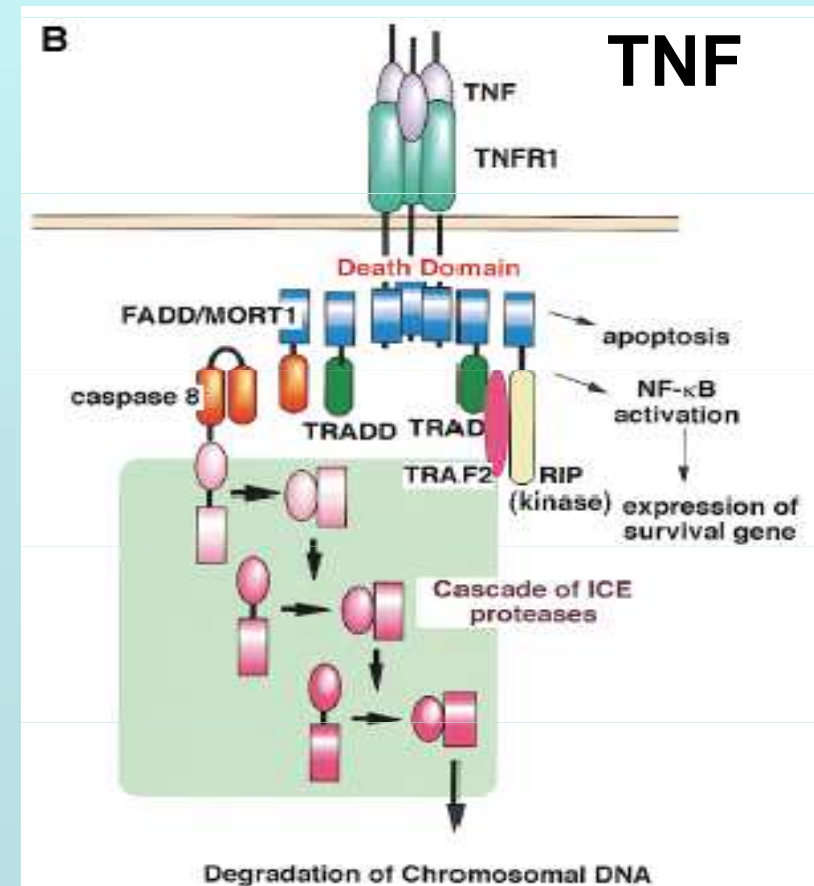
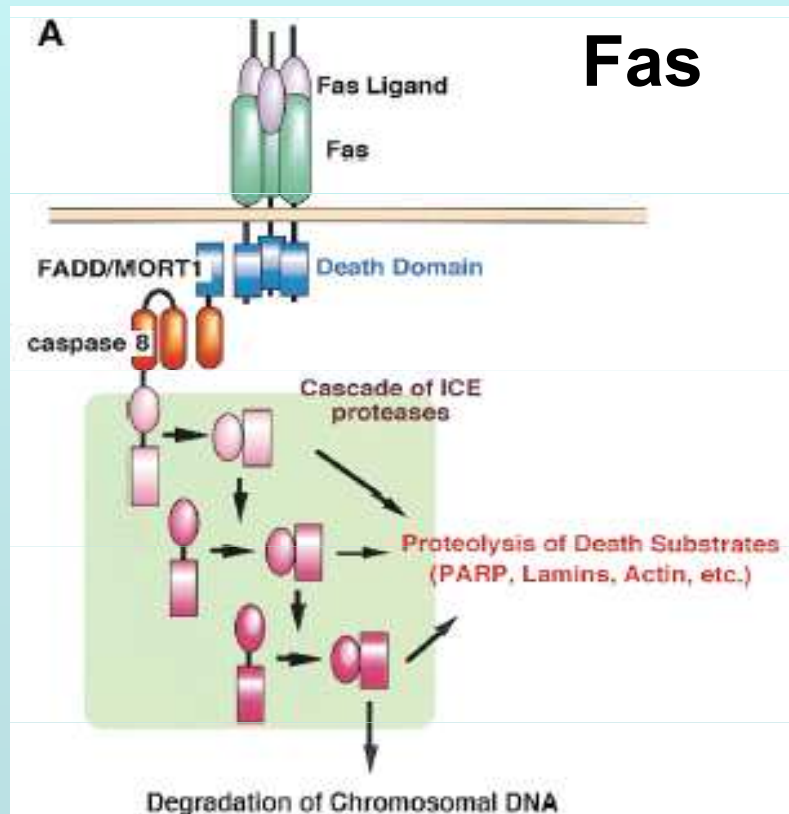
Apoptózu spouštějí dvě signální dráhy

2. *Vnější dráha závislá na povrchových receptorech smrti*

- receptory smrti jsou **transmembránové proteiny** schopné vyvolat apoptózu
- receptory jsou **závislé na vnějších ligandech**
- napojují se na vnitřní (kaspázovou) signalizaci
- stejné projevy jako u vnitřní dráhy

Apoptóza řízená systémem ligand/receptor

- součást signálního systému TNF: TNF/TNF-R1, FAS-L/FAS (CD95), TRAIL/DR4/DR5/DcR1/DcR2, CD40L/CD40, CD30L/CD30, atd.
- aktivovaný **receptor** spolu s adaptérovými molekulami (FLASH) **aktivuje prokaspázu 8** a spouští **kaspázovou kaskádu**



Ligandy receptorů smrti – rodina TNF

(TNF- α , TRAIL, Fas ligand)

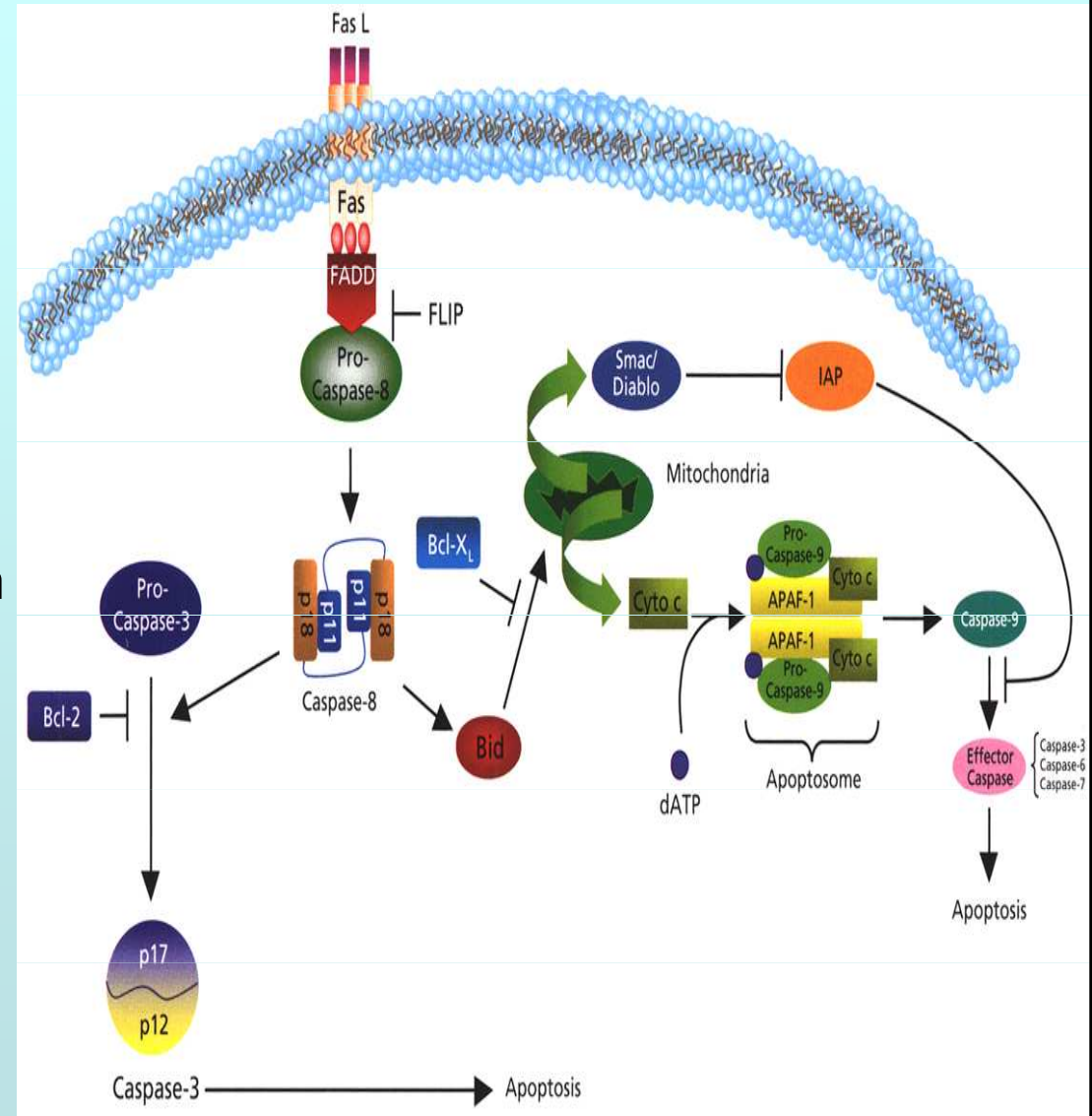
- TNF- α objeven díky schopnosti usmrtit nádorové buňky
- vyvolává smrt rozmanitých buněk vybavených příslušnými receptory
- tyto receptory sdílejí stejnou cytoplazmatickou doménu (**FADD**)
- ligandy způsobují **trimerizaci svých receptorů**
- ligandem může být molekula vázaná na vnější membránu nebo molekula rozpustná

Mechanismus apoptózy zprostředkované ligandem Fas

- vazba faktoru smrti („Fas ligand“) k receptoru vede k tvorbě komplexu **Fas, FADD, pro-kaspáza 8** („**death-inducing signaling complex**“) - **DISC**
- aktivace pro-kaspázy 8
- rozdělení signální dráhy do dvou větví
 - kaspáza 8 aktivuje **kaspázu 3**
 - kaspáza 8 štěpí **Bid**, který následně přechází do mitochondrií a stimuluje uvolnění cytochromu c.
Cytochrom c společně s **Apaf-1** aktivuje **kaspázu 9**, která zodpovídá za zpracování **pro-kaspázy 3** do podoby aktivního enzymu.

Mechanismus účinku FAS

- vazba ligandu indukuje trimerizaci FAS v membráně cílové buňky
- následuje vyvázání proteinu FADD („FAS-associated protein with death domain“)
- komplex FAS/FADD je substrátem, na který se váže prokaspáza 8, která se následkem této interakce aktivuje
- aktivovaná **kaspáza 8** štěpí (aktivuje) 9 dalších prokaspáz, jejichž aktivita vede k apoptóze buňky
- aktivovaná kaspáza 8 aktivuje Bid (uvolnění cytochromu c, Apaf, apoptozom, atd...)

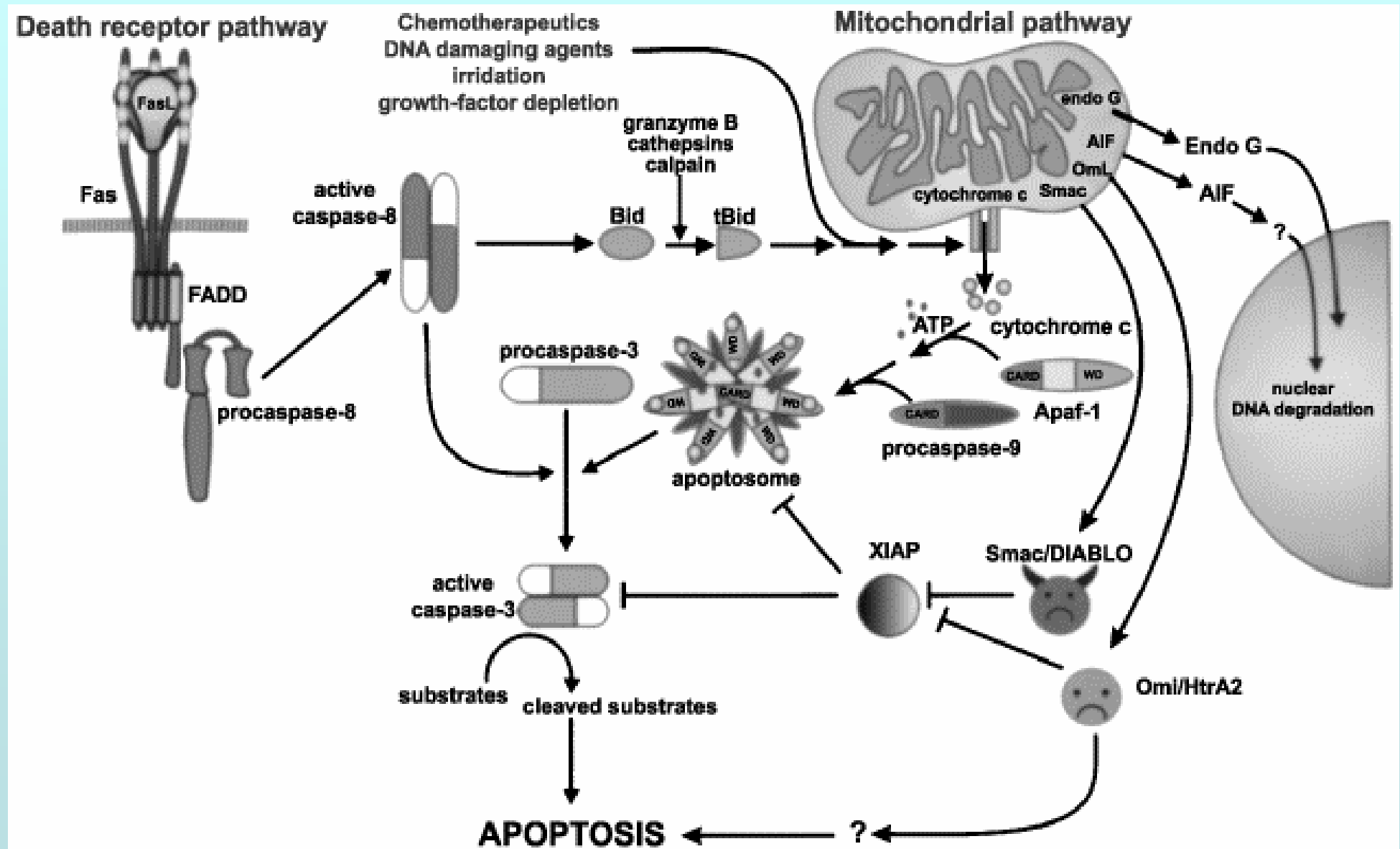


Apoptóza vyvolaná FAS může být blokována:
proteinem FLIP
proteinem Bcl-2

Apoptóza zprostředkovaná proteinem p53

- p53 řídí proliferaci a apoptózu
- poškození DNA, nedostatek růstových faktorů, exprese *myc* nebo E1A mohou indukovat apoptózu
- p53 se podílí na **uvolnění cytochromu c** z mitochondrií a následnou **aktivaci kaspáz 9 a 3**
- p53 **aktivuje expresi genu kódujícího Fas receptor**, tím zvyšuje citlivost buňky k FasL
- p53 **aktivuje expresi IGF-binding proteinu 3** a jeho uvolnění do mimobuněčného prostoru, kde vychytává IGF-1 a IGF-2 (anti-apoptotické ligandy)
- p53 **aktivuje expresi bax**, který kóduje pro-apoptotický protein uvolňující cytochrom c z mitochondrií

Vnitřní a vnější apoptózové dráhy konvergují



Apoptóza a nádorová onemocnění

- ***rakovinné buňky se neřídí regulačními signály pro buněčnou smrt***
- zdravé buňky mohou žít jen za přítomnosti růstových faktorů, jinak odumírají apoptózou x ***nádorové buňky přežívají i bez růstových faktorů***
- zdravé buňky s poškozenou DNA odumírají apoptózou x ***nádorové buňky přežívají i s poškozenou DNA***
- rezistence k apoptóze je jedním z důvodů prodloužené životaschopnosti nádorových buněk

Apoptóza a nádorová onemocnění

- **zvýšená exprese *bcl-2*** zaznamenána u různých pevných nádorů, leukémií i lymfomů
- zvýšená exprese *bcl-2* je nepříznivý faktor: zvýšená odolnost na chemoterapii
- terapie zaměřené na ovlivnění apoptózy se mohou uplatnit při léčbě některých nádorových i nenádorových chorob

Detekce apoptózy

- barvení kondenzovaných jader fluorescenčními barvivy (např. Hoechst, DAPI)
- barvení fosfatidyl-serinu, který apoptotické buňky vystavují na svém povrchu, annexinem V
- detekce fragmentované DNA technikou TUNEL nebo elektroforézou
- měření potenciálu mitochondriální membrány

Výzkum apoptózy

Modelové systémy

- ***In vivo*** – *C. elegans*, epitel střeva
- ***In vitro*** - buněčná kultura
 - (na Petriho misce) – adherentní epitheliální buňky kolonu
 - postupné uvolňování původně přisedlých buněk do média, apoptóza, apoptotická tělíska
 - v umělé in vitro kultuře nejsou přítomny fagocyty, aby je pohltily, může proto docházet k tzv. sekundární nekróze

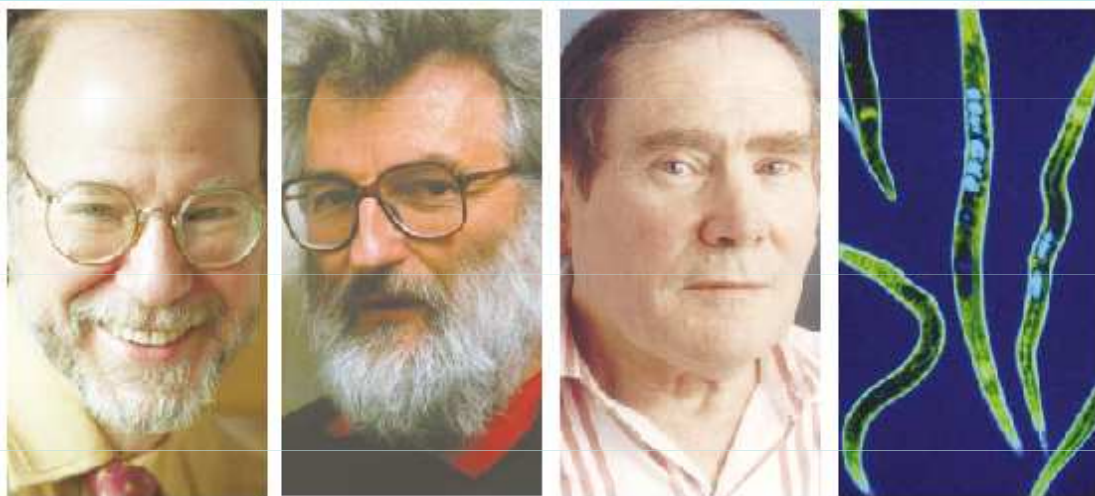
Caenorhabditis elegans – model pro studium apoptózy



- méně než 1000 buněk u dospělé hlístice
- hermafrodit
- krátká generační doba
- známa úplná sekvence genomu

Apoptóza u *C. elegans*

- je eliminováno přesně 131 z 1090 buněk
- buňky odumírající apoptózou jsou 2 minuty refraktilní, což umožňuje jejich sledování světelným mikroskopem
- u mutantů *ced-1* a *ced-2* je rychlé odumírání znemožněno – zůstávají pozorovatelné déle
- mutanty *ced-3* a *ced-4* umožňují přežít **všem** 1090 buňkám



Developing a theme: (from left) Robert Horvitz, John Sulston and Sydney Brenner have won the 2002 physiology Nobel for their work on the biology of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Robert Horvitz
John Sulston
Sydney Brenner

Nobelova cena 2002

Děkuji za pozornost!

