

Fyziologie buněčných systémů 2012

**Důležitost rovnováhy mezi signálními drahami  
regulujícími apoptózu a přežívání -  
ukázka na modelu nádoru tlustého střeva**

RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

Oddělení cytokinetiky

Biofyzikální ústav AV ČR

přednáška 21.11.2012

# Apoptóza

- geneticky kontrolovaný komplexní proces programované buněčné smrti
- cílená sebedestrukce buňky
- obrovský význam ve vývoji a udržení homeostáza mnohobuněčného organismu
- od 70. let intenzivní výzkum apoptózy a její regulace

# Apoptóza - morfologické znaky

- bobtnání cytoplazmatické membrány, integrita membrány není porušena
- zmenšení velikosti buňky
- kondenzace a specifická fragmentace jaderného chromatinu
- udržení integrity intracelulárních organel
- formace tzv. apoptotických bodies

# Apoptóza - biochemické změny

- Aktivace specifických molekul - kaspázy, nukleázy atd.
- Nutné dodání energie ve formě ATP
- Specifická fragmentace jaderné DNA
- Uvolnění specifických regulátorů z mitochondrií
- Změny symetrie membrán

# Apoptóza - fyziologický význam

- Týká se jednotlivých buněk
  - Indukována fyziologickými stimuly
  - Fagocytóza makrofágy
  - Není zánět
- 
- Eliminace nepotřebných, poškozených, nebezpečných, mutovaných či jinak pozměněných buněk za účelem udržení homeostázy mnohobuněčného organismu

# Induktory apoptózy

- Nedostatek růstových faktorů
- Hormonální změny
- Specifické signály smrti - „death ligandy“
- Chemoterapie
- UV-záření
- Ztráta kontaktu s prostředím

# Studium apoptózy v mnohobuněčném organismu

- Caenorhabditis elegans (Nematoda) - první a velmi sofistikovaný model studia PCD

Přesně řízený vývoj - organismus z 1090 buněk, z nich během vývoje 131 buněk umírá apoptózou - nutno přesné načasování a lokalizace, jinak vážné malformace

Jeden z nejvíce studovaných organismů z hlediska popisu mechanismů apoptózy, podobnost s obratlovci (výskyt analogických apoptotických genů a proteinů)

# Apoptóza ve vývoji mnohobuněčného organismu

- Metamorfóza hmyzu - vývoj imaga z larvy
- Metamorfóza obojživelníků a plazů - ztráta ocasu pulců během proměny v žábu (postupná řízená indukce apoptózy a proměna tvaru těla)



# Apoptóza ve vývoji mnohobuněčného organismu

- odumírání některých neuronů při vytváření CNS
- formace tvaru orgánů a struktur - prsty a interdigitální prostory
- odstranění abnormalit během embryogeneze (včetně spontánních abortů)

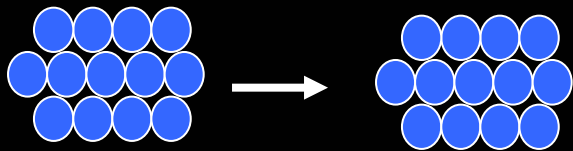
# Apoptóza v regulaci homeostázy organismu

- Eliminace starých diferencovaných nepotřebných buněk (krevní, střevní, kožní...)
- Eliminace již nepotřebných buněk mléčné žlázy po ukončení laktace
- Regulace endometria během menstruačního cyklu
- Odumření poškozených zárodečných buněk

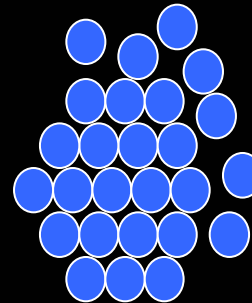
# Apoptóza versus proliferace

- Pro udržení homeostázy organismu je nutná dokonalá rovnováha mezi procesy proliferace a apoptózy
- Porušení této rovnováhy má dalekosáhlé důsledky, které se odrazí na zdraví organismu
- Obzvláště nutné pro intenzivně proliferující tkáně (krev, střevo...)

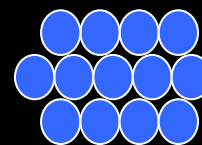
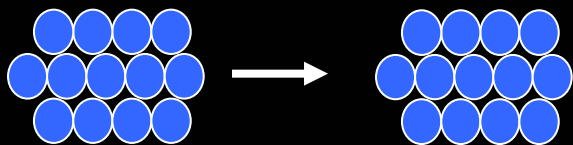
**proliferace**



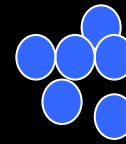
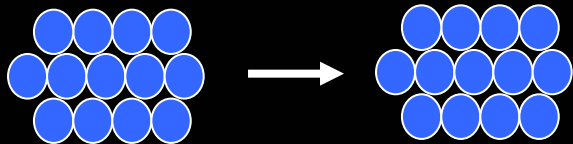
**apoptóza**



**Rakovina  
AIO**



**homeostáza**



**AIDS  
neurodegenerativní  
onemocnění**

# Apoptóza a nemoci - stimulovaná vs. inhibovaná apoptóza

- AIDS
- Neurodegenerativní onemocnění (Alzheimer, Parkinson)
- Myelodysplastický syndrom
- Ischemické poškození (infarkt, reperfuze)
- Intoxikace jater
- Nádorové onemocnění
- Autoimunitní onemocnění
- Virové infekce (Herpes, Adenovirus)

# Modelový systém pro studium apoptózy

- **Střevní epitel - druhá nejintenzivněji proliferující tkáň v lidském organismu**
  - Extrémní důležitost přísné regulace cytokinetických procesů a jejich rovnováhy pro udržení homeostázy
  - Deregulace - vývoj nádorového onemocnění
- **Nádorové onemocnění tlustého střeva**
  - studium mechanismů regulace apoptózy v naší laboratoři

## Nádorové onemocnění tlustého střeva

Nerovnováha mezi buněčnou proliferací, diferenciací a apoptózou  
- porušení homeostázy tkáně - podmínky pro rozvoj nádorového  
onemocnění - kolorektální karcinom

vyvíjí se pomalu - nejprve benigní polypy - pak akumulace  
mutací (díky vysoké míře proliferace) a maligní zvrát

počáteční stádia - dobře léčitelná (chirurgie, v raných  
fázích jedno z nejlépe léčitelných nádorových onemocnění)

polovina nádorů CRC však zjištěna až v pokročilém stádiu  
(nedostatečný screening)

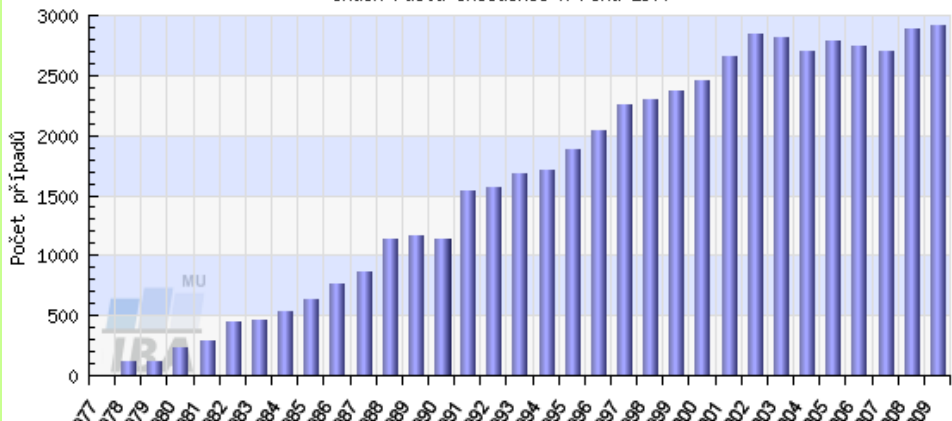
vysoká incidence CRC v ČR - přední místo ve statistikách,  
neustálý alarmující nárůst

možnost významně ovlivnit vývoj onemocnění složením výživy

obrovský význam prevence!

### C18 - ZN tlustého střeva

index růstu incidence k roku 1977



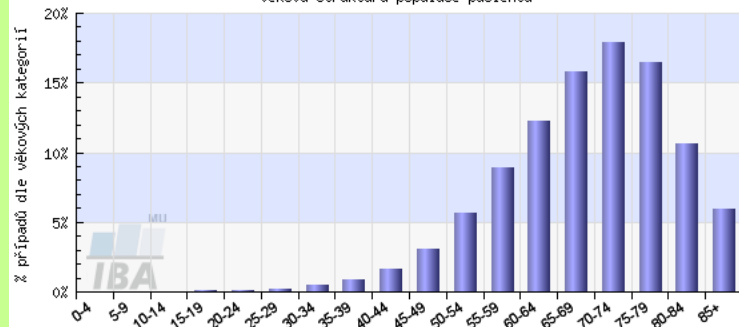
Analyzovaná data: N=113194

<http://www.svod.cz>

Zdroj dat: ÚZIS

### C18 - ZN tlustého střeva - Incidence

věková struktura populace pacientů



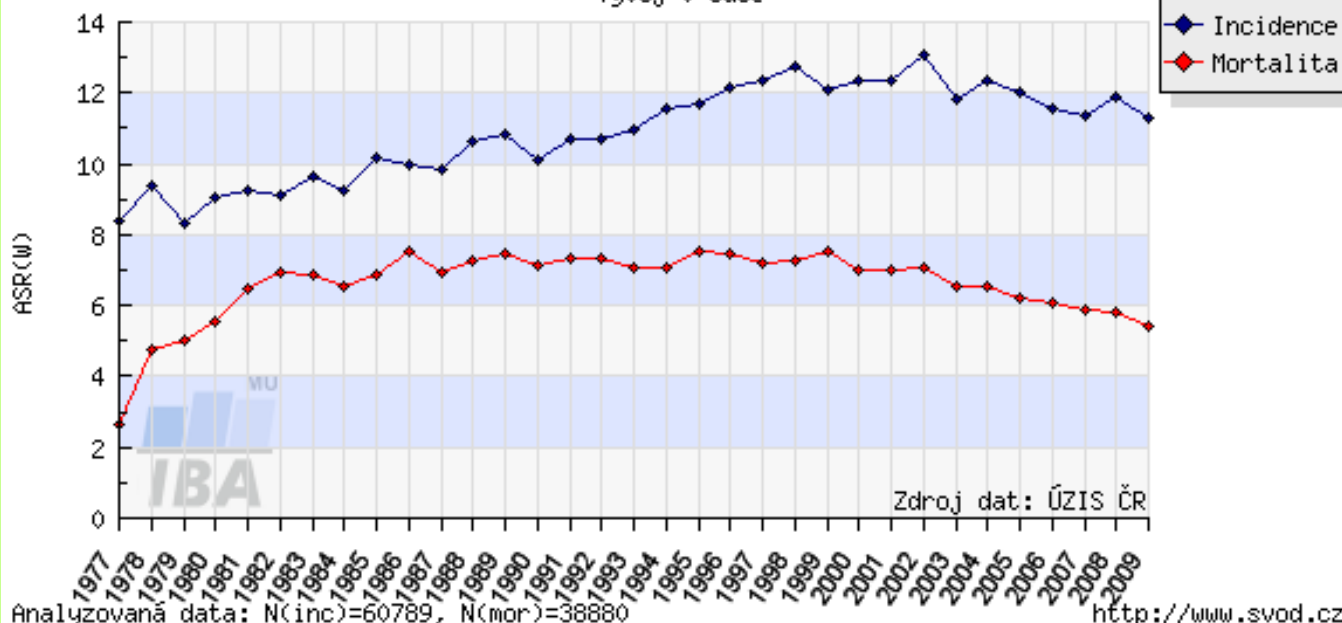
Analyzovaná data: N=113194

<http://www.svod.cz>

Zdroj dat: ÚZIS ČR

### C28 - ZN konečníku - recta

Vývoj v čase



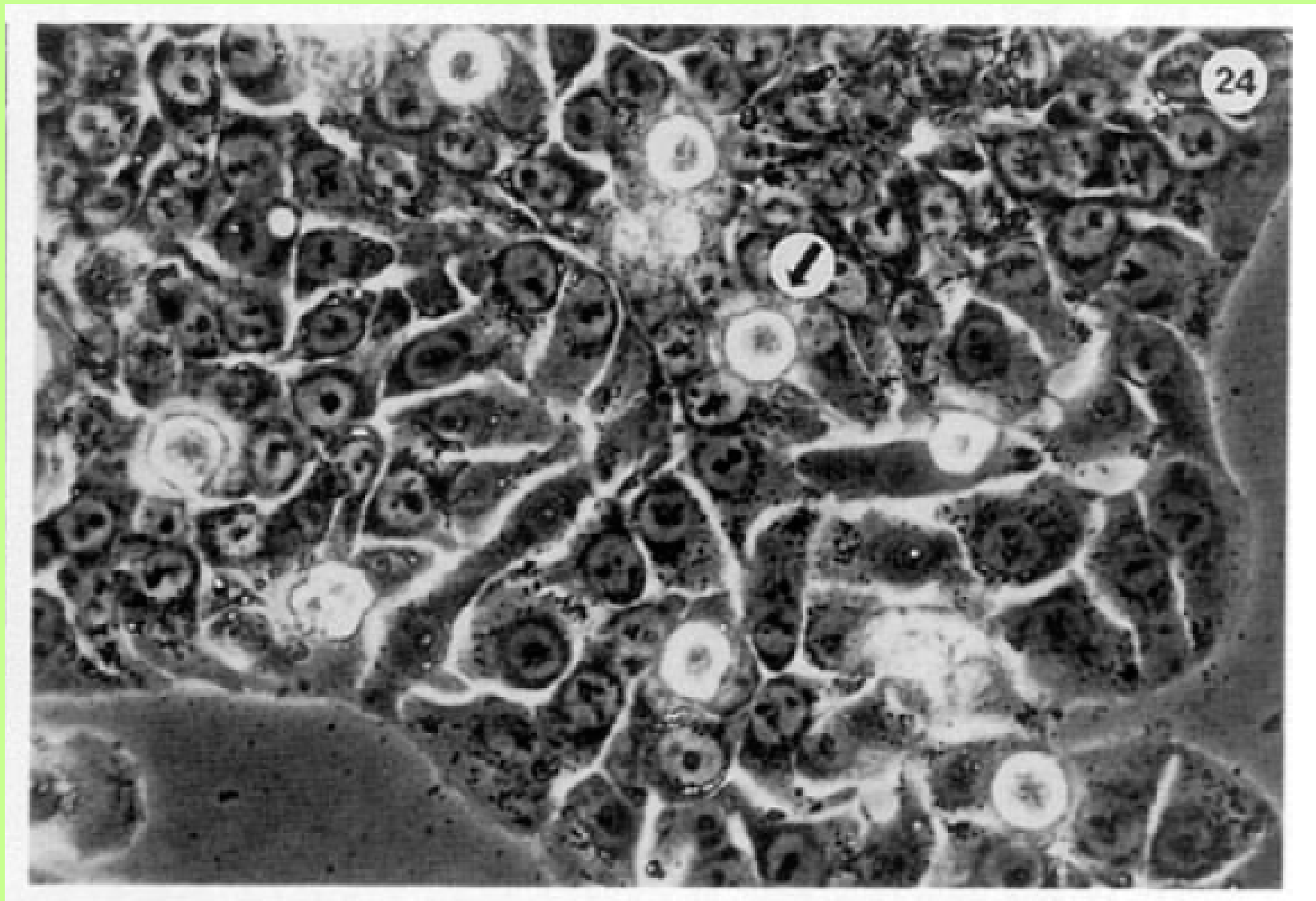
Analyzovaná data: N(inc)=60789, N(mor)=38880

<http://www.svod.cz>



# Modelový systém pro studium apoptózy - *in vitro*

- Buněčná kultura na Petriho misce - adherentní epitheliální buňky kolonu
- Postupné uvolňování původně přisedlých buněk do média, apoptóza, apoptotická tělíka
- v umělé *in vitro* kultuře nejsou přítomny fagocyty, aby je pohltily, může proto docházet k tzv. sekundární nekróze



# Kolorektální karcinogeneze

Maligní transformace normální střevní tkáně -  
charakteristika:

- **Genetické změny:** akumulace mutací
- **Abnormální dynamika střevní krypty:** porušení rovnováhy mezi proliferací, diferenciací a apoptózou
- **Deformace střevní krypty:** nadměrné hromadění buněk vede k výrazným změnám morfolgie krypty
- **Formace polypů:** nahromadění buněk, benigní útvary
- **Progrese nádoru:** další akumulace genetických změn, zvyšování malignity a invazivity
- **Metastázování:** CRC metastázuje převážně do jater

# Kolorektální karcinogeneze

- Nahromadění mutací nádorových supresorových genů a protoonkogenů během kolorektální karcinogeneze

(Vogelstein *et al.* 1988, Fearon & Vogelstein 1990)

Pro rozvoj maligního onemocnění je třeba kombinace několika různých mutací - např. geny APC, DCC, p53....

(Hamilton *et al.* 1998)

# Významné změny střevních buněk během vývoje nádorového onemocnění

- Zvýšená aktivace proliferačních a antiapoptotických signálních drah, zvýšená exprese některých antiapoptotických proteinů
- Změny citlivosti buněk k apoptóze, např. apoptóze indukované TRAILem - v procesu kolorektální karcinogeneze

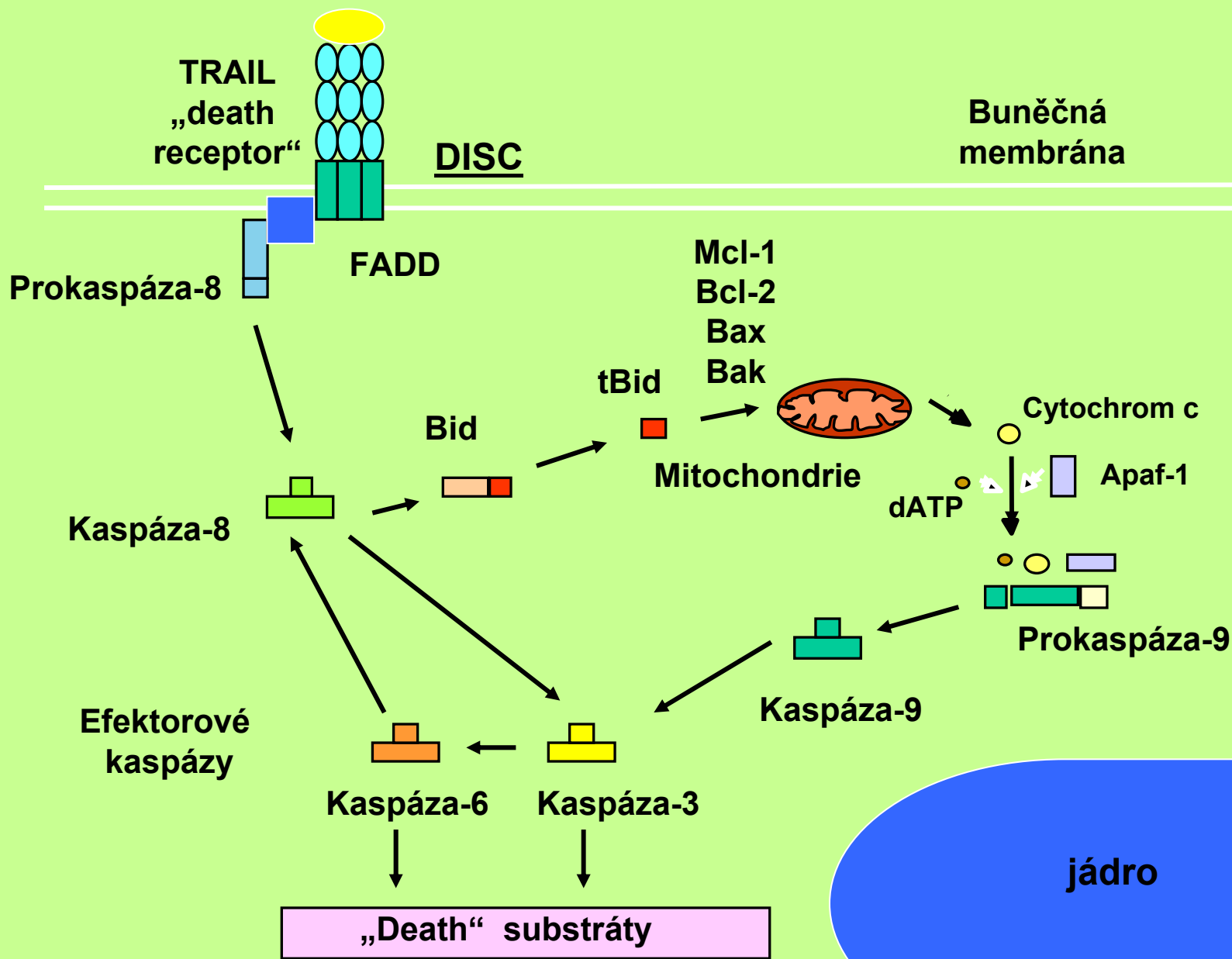
# Význam TRAILu

- 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 TRAILu je proto velmi důležitý pro pochopení mechanismu působení, mechanismů rezistence a pro správné zacílení protinádorové terapie



# Působení TRAILu na nádorové buňky tlustého střeva

- TRAIL indukuje apoptózu nádorových buněk střeva *in vitro*
- v průběhu kolorektální karcinogeneze roste citlivost buněk k apoptotickým účinkům TRAILu (adenom vs. karcinom)

*(Hague et al., 2005)*

- Popsána účinnost TRAILu rovněž v systému *in vivo* - inhiboval růst xenograftů (karcinom kolonu) u myší, bez vedlejších projevů systémové toxicity

*(Walczak et al., 1999)*



# Důležitost ROVNOVÁH

Signální dráhy indukující

- buněčnou smrt

- přežití buněk

Co rozhodne o výsledném osudu buňky?

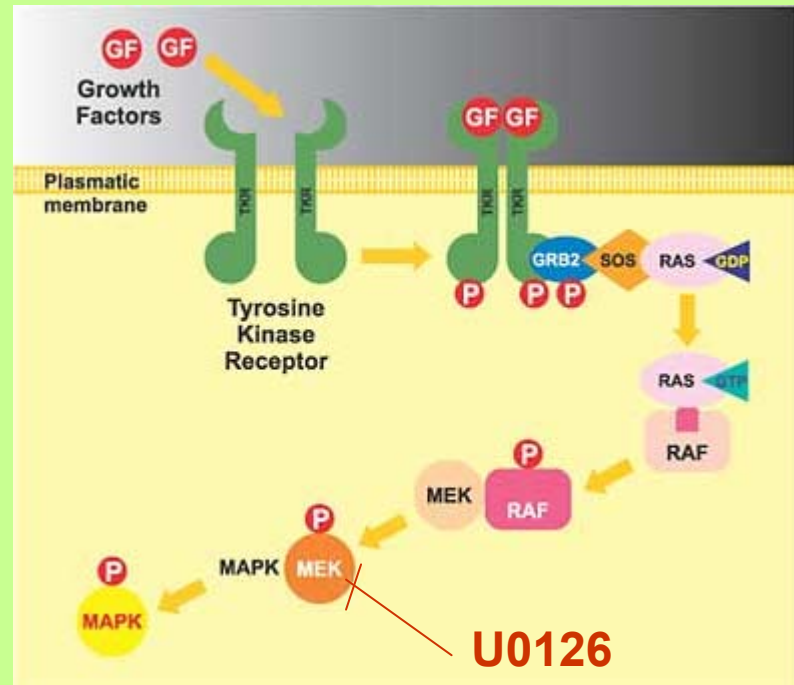
# Dráha Ras/Raf/MEK/ERK

- MAPK - mitogen-activated protein kinase (MAPK)
- Klíčová dráha přenášející signály z receptorů růstových faktorů do jádra
- Molekuly této dráhy mají důležitou funkci v regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy
- Deregulace této dráhy mají dalekosáhlé důsledky a byly pozorovány u řady onemocnění včetně nádorových
- **Konstitutivní aktivace této dráhy u vysokého procenta nádorů**
- Inhibitory těchto kináz jako protinádorově působící léčiva - testování různých typů, klinické zkoušky

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

## Regulace

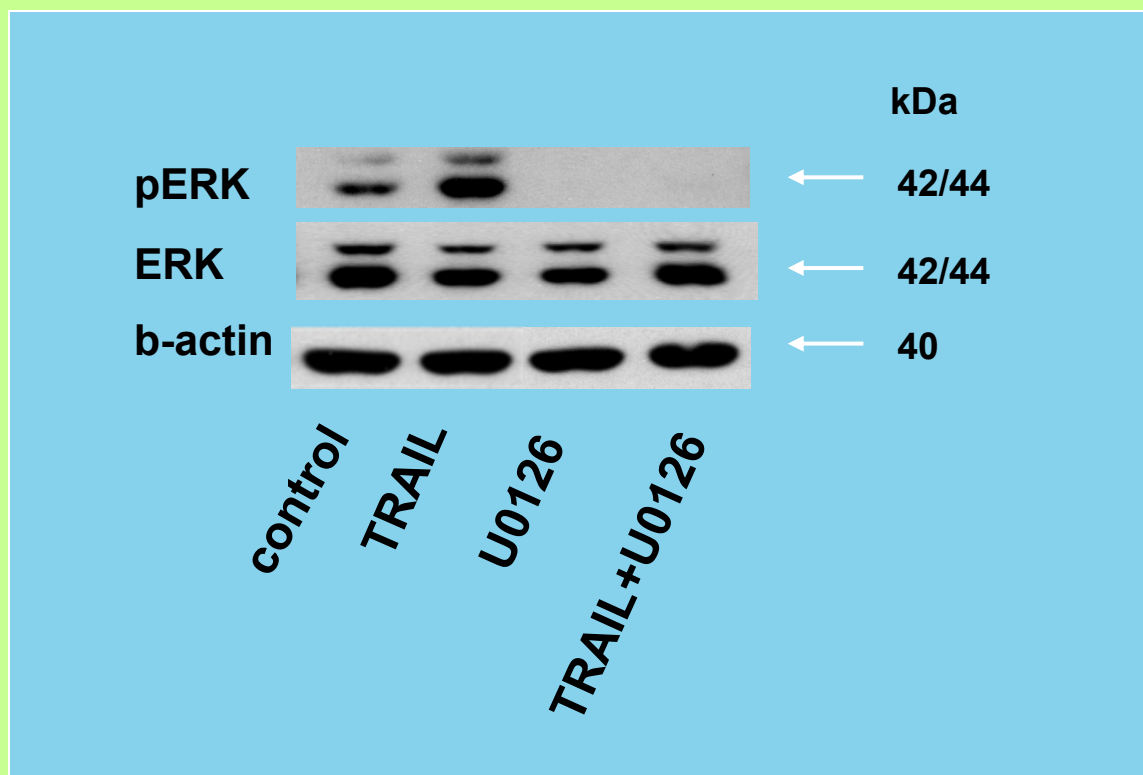
- proliferace
- diferenciace
- apoptózy



(Sorbera et al., 2002)

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

- ERK1/2 konstitutivně aktivní u nádorových buněk kolonu
- TRAIL významně indukuje fosforylaci ERK1/2 u buněk HT-29
- U0126 - inhibice bazální i TRAIEm indukované fosforylace ERK1/2



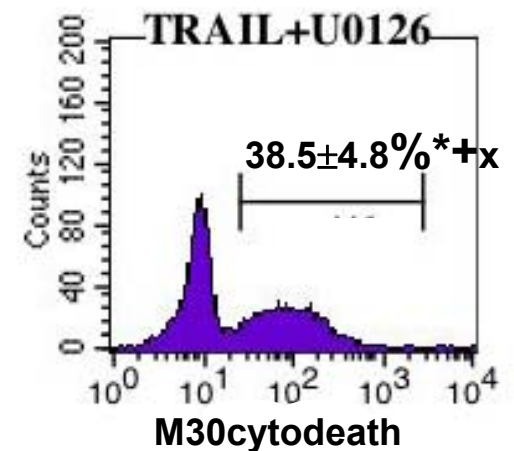
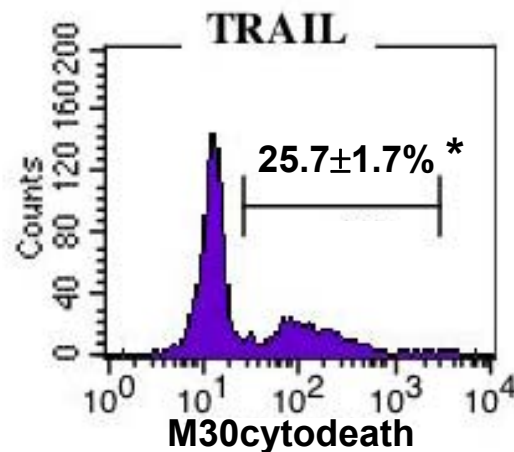
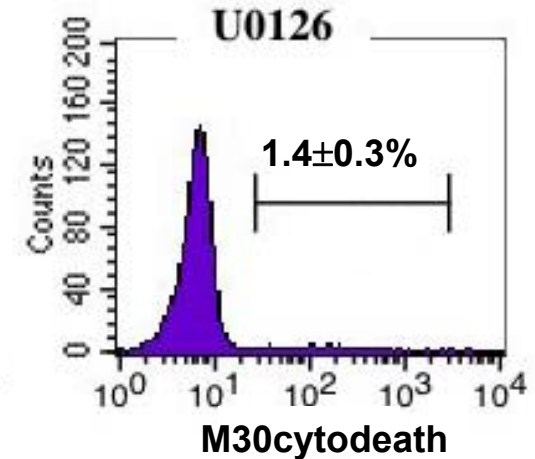
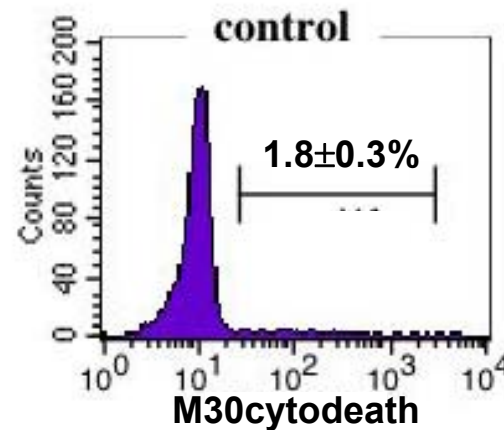
# Posílení apoptózy indukované TRAILem v podmínkách specifické inhibice dráhy MEK/ERK

Štěpení CK18 (M30cytodeath, FCM)

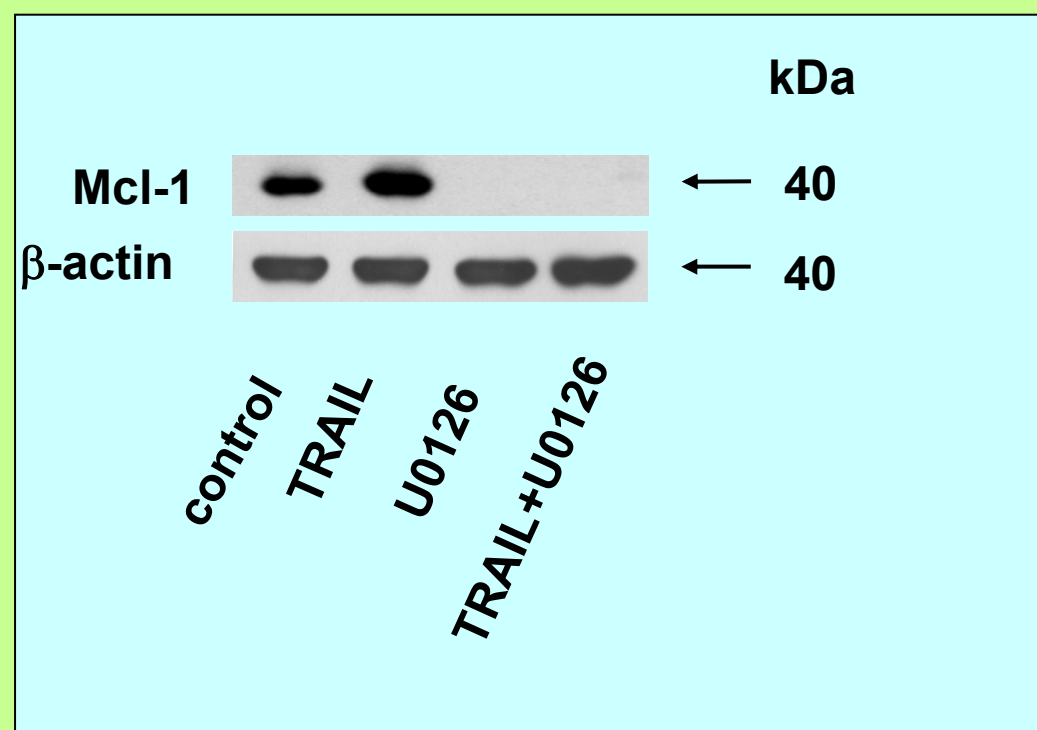
Štěpení PARP



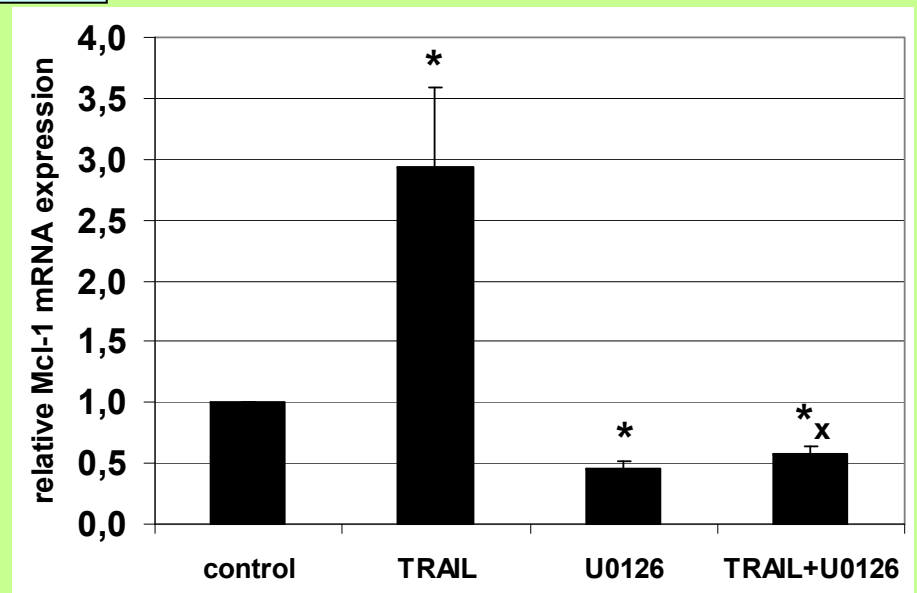
control  
TRAIL  
U0126  
TRAIL+U0126



## Mcl-1 protein



## Mcl-1 mRNA



Blokace dráhy MEK/ERK -  
inhibice exprese mcl-1  
mRNA a proteinu

# Mcl-1

- myeloid cel leukemia-1 protein, poprvé identifikovaný u diferencujících myeloidních buněk linie ML-1 (Kozopas et al., 1993)
- Antiapoptotický protein z rodiny Bcl-2
- Důležitý regulátor mitochondriální dráhy indukce apoptózy
- Interaguje s proapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2, inhibice apoptotických změn na úrovni mitochondrií (vylití cytochromu c atd.)

# Mcl-1

- Protein s velmi krátkým poločasem rozkladu - 30 minut až několik hodin (x např. protein Bcl-2)
- Časný kritický regulátor apoptózy, krátkodobá ochrana buňky před spuštěním buněčné smrti
- Účinná regulace Mcl-1 na mnoha úrovních v buňce



# Mcl-1 a nádorová onemocnění

- Overexprese proteinu Mcl-1 u řady nádorů (NSCLC, hepatocelulární karcinom, cholangiokarcinom, jaterní metastázy CRC)

*(Song et al. 2005, Sieghart et al. 2006, Okaro et al. 2001, Backus et al. 2001)*

- Zde zvýšená exprese Mcl-1 může chránit nádorové buňky před apoptózou
- Úloha proteinu Mcl-1 v rezistenci buněk k protinádorové terapii (CHT, záření...)
  - Mcl-1 anti-sense, siRNA - terapeutické strategie

# Úloha proteinu Mcl-1 v regulaci citlivosti buněk k apoptóze

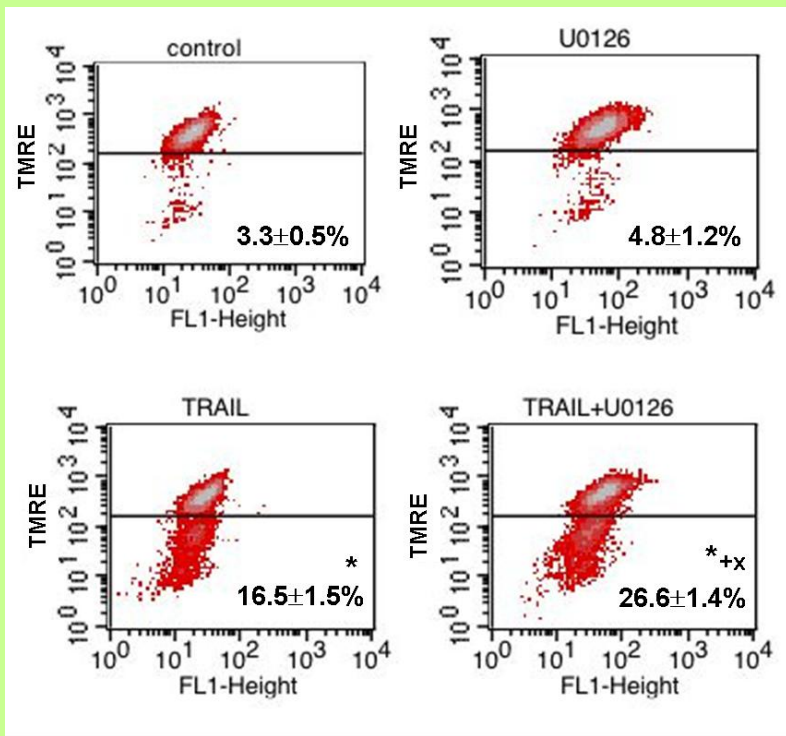
- Mcl-1 RNAi - zcitlivění buněk hepatocelulárního karcinomu k apoptóze indukované působením chemoterapie a inhibitorů dráhy PI3K/Akt, ale ne k apoptóze indukované TRAILem

*(Schulze-Bergkammen et al., 2006)*

- Mcl-1 si RNA - zcitlivění buněk cholangiokarcinomu k apoptóze indukované TRAILem

*(Tanai et al., 2004)*

**Protein Mcl-1 hraje roli v regulaci citlivosti nádorových buněk kolonu k apoptóze indukované TRAILem**

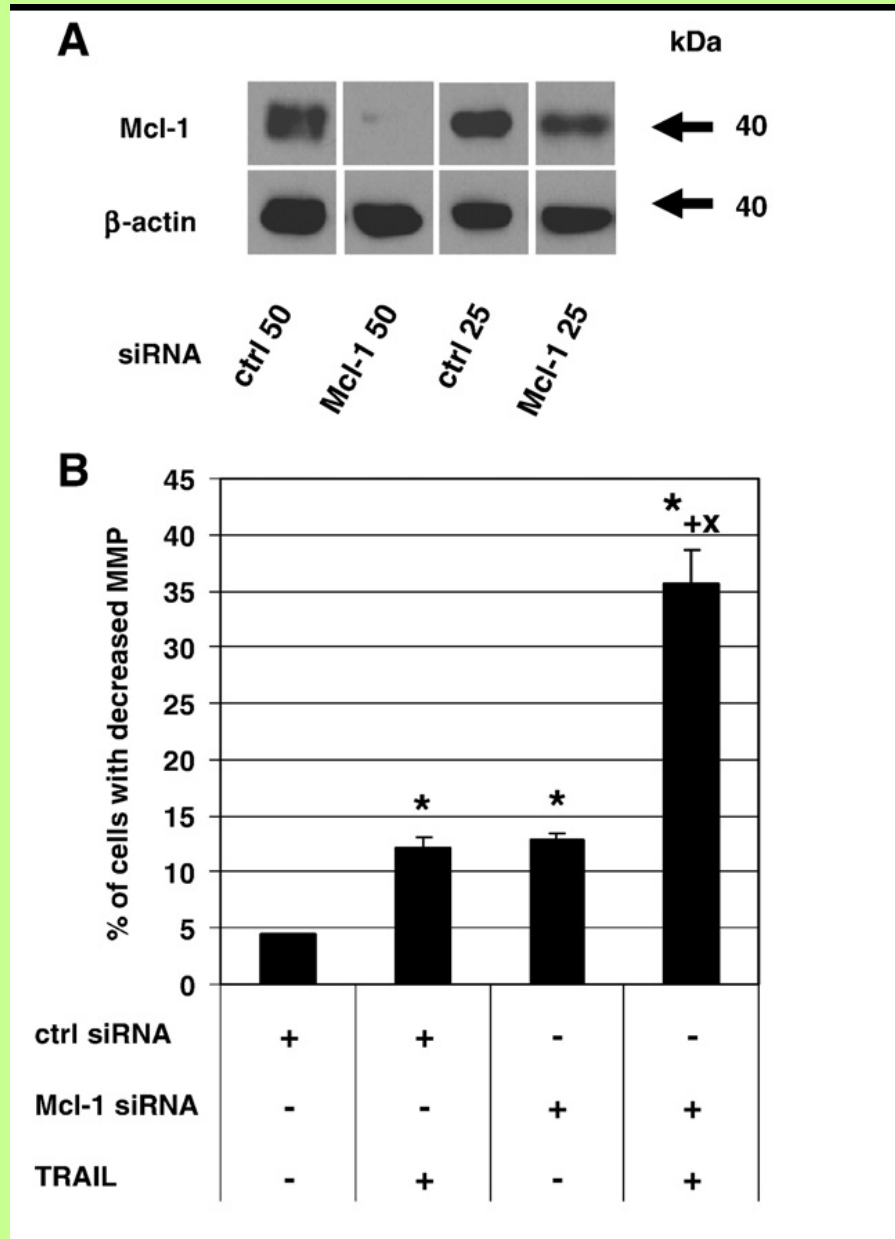


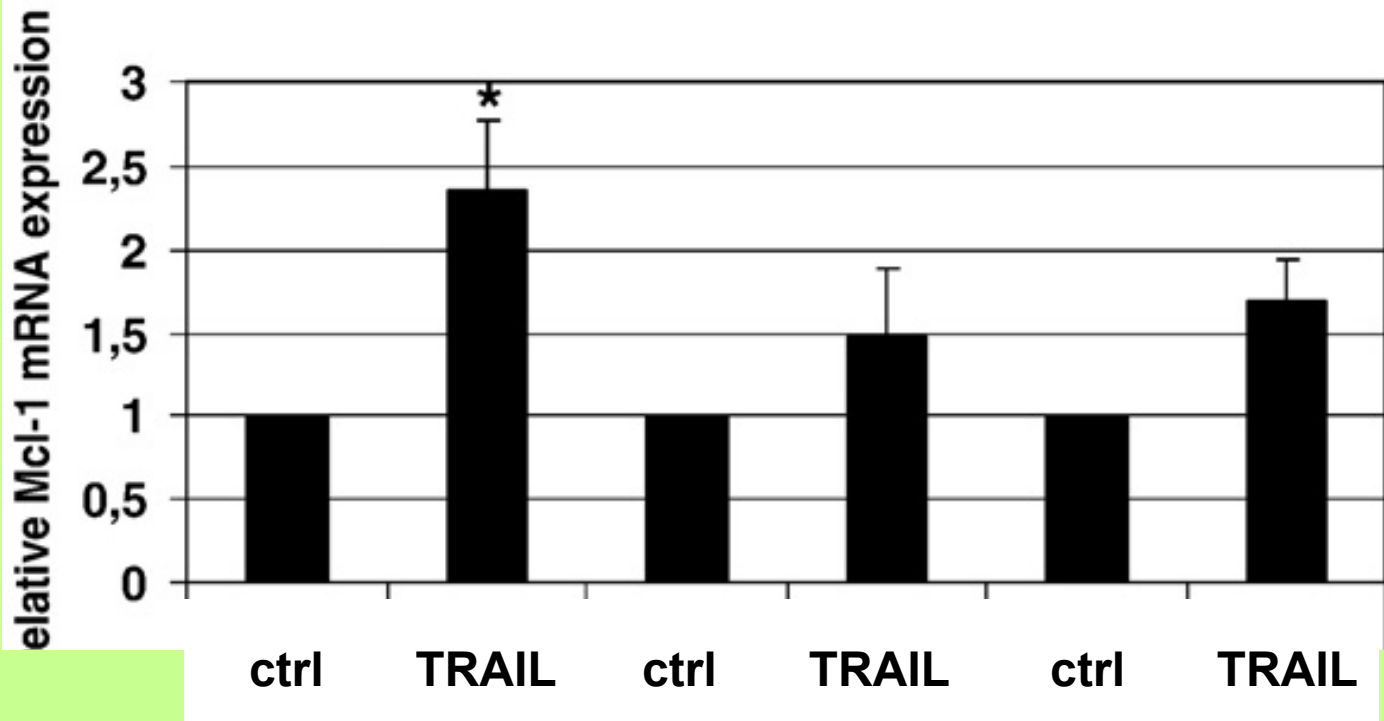
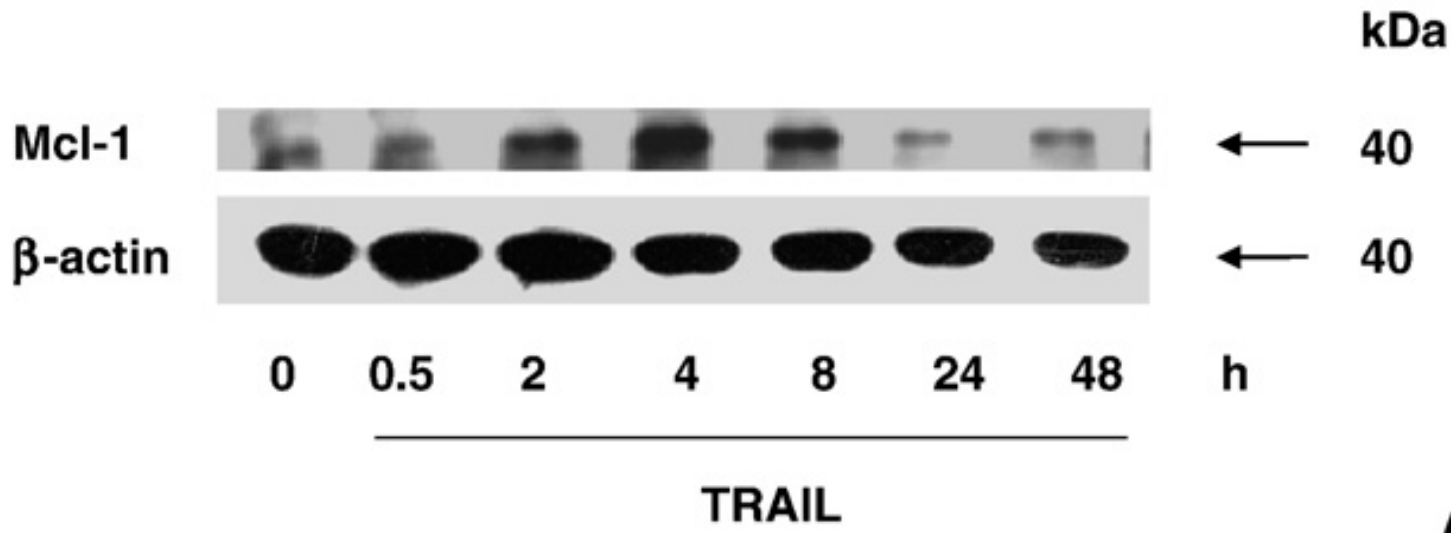
posílení apoptózy  
indukované TRAILem

prostřednictvím U0126  
na úrovni mitochondrií

prostřednictvím  
eliminace Mcl-1

(Vaculova et al., 2009)





(Vaculova et al., 2009)

2h

4h

8h

- Specifická inhibice signální dráhy ERK1/2 významně zcitlivuje nádorové buňky tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem
- TRAIL rovněž může aktivovat dráhu ERK1/2 a nárůst množství proteinu Mcl-1 v buňkách (antiapoptotické působení!!), tyto efekty lze účinně inhibovat v podmínkách inhibice MEK/ERK
- Úloha ERK v regulaci Mcl-1



ELSEVIER

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)



## Research Article

# Differences in TRAIL-induced changes of Mcl-1 expression among distinct human colon epithelial cell lines

*Alena Vaculová, Jiřina Hofmanová, Jiřina Zatloukalová, Alois Kozubík\**

*Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic*

# TRAIL a Mcl-1

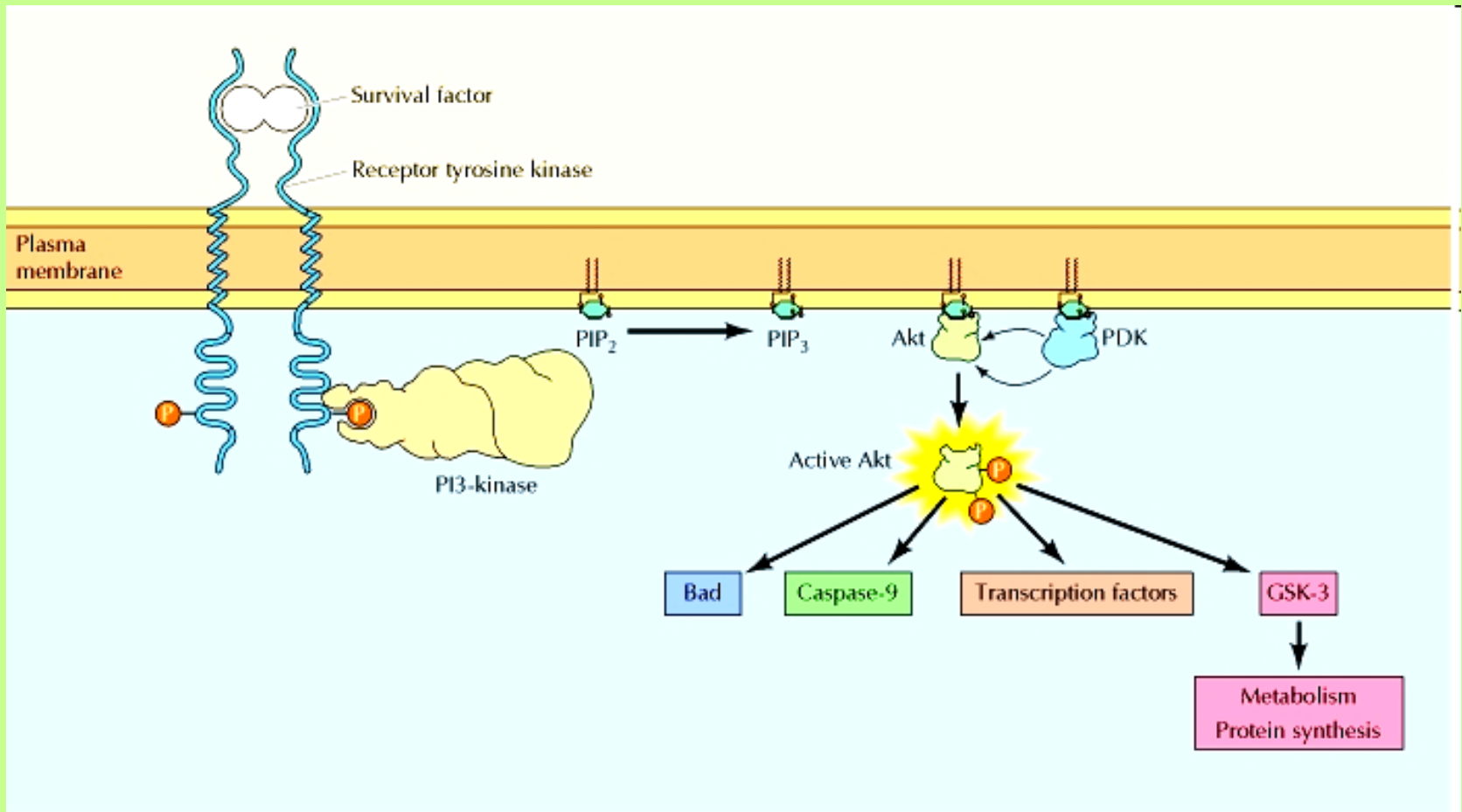
- Specifická downregulace proteinu Mcl-1 - cesta k úspěšnému překonání rezistence k apoptóze indukované TRAILe
- Snaha připravit a použít inhibitory s minimem vedlejších účinků
- **Sorafenib** - inhibitor kináz, specifická inhibice syntézy proteinu Mcl-1

(Ricci et al., 2008)

# PI3K/Akt

- PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) - lipidová kináza, součástí signální dráhy tyrosinkinázových receptorů
- 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





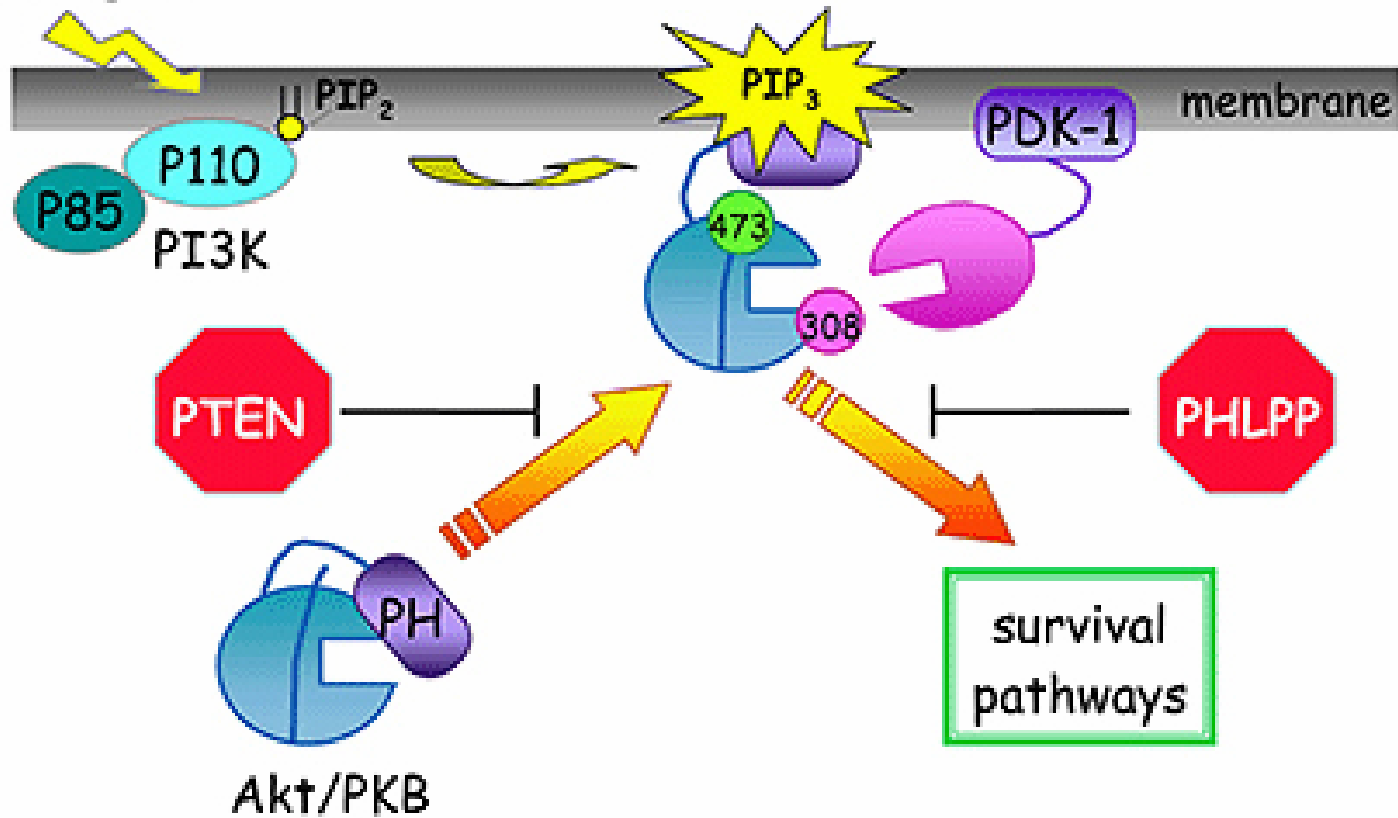
Phosphatidylinositol 4,5-BisPhosphate (PIP<sub>2</sub>)

Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>)

phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1)

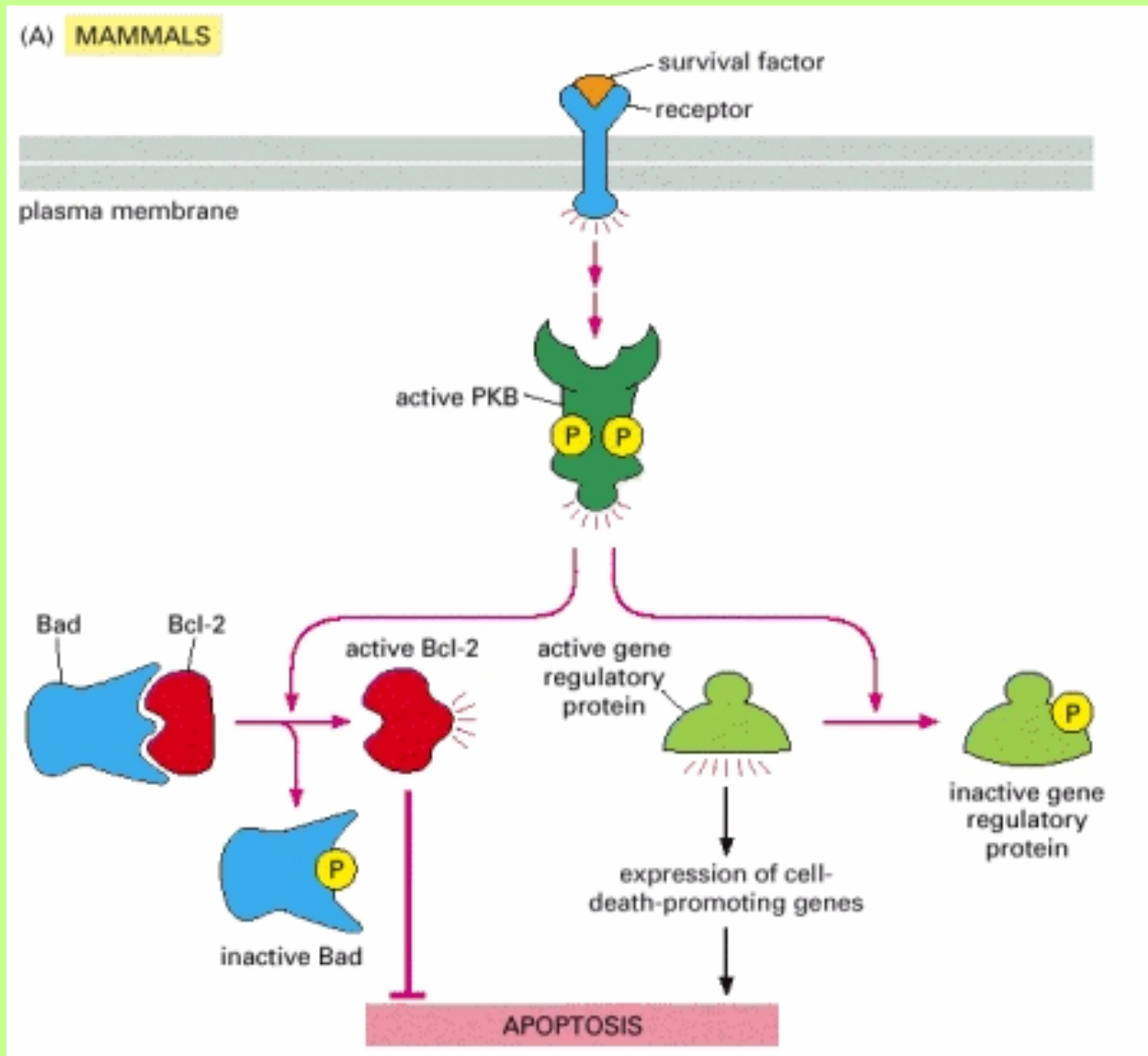
(Cooper GM, The Cell: A Molecular Approach.)

Mitogens



(Pondrom et al., 2005)

# Akt in regulation of cell survival/death



# 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

# PI3K/Akt

- Velmi důležitá dráha v regulaci proliferace a diferenciaci střevních buněk, zprostředkování signálů pro přežití

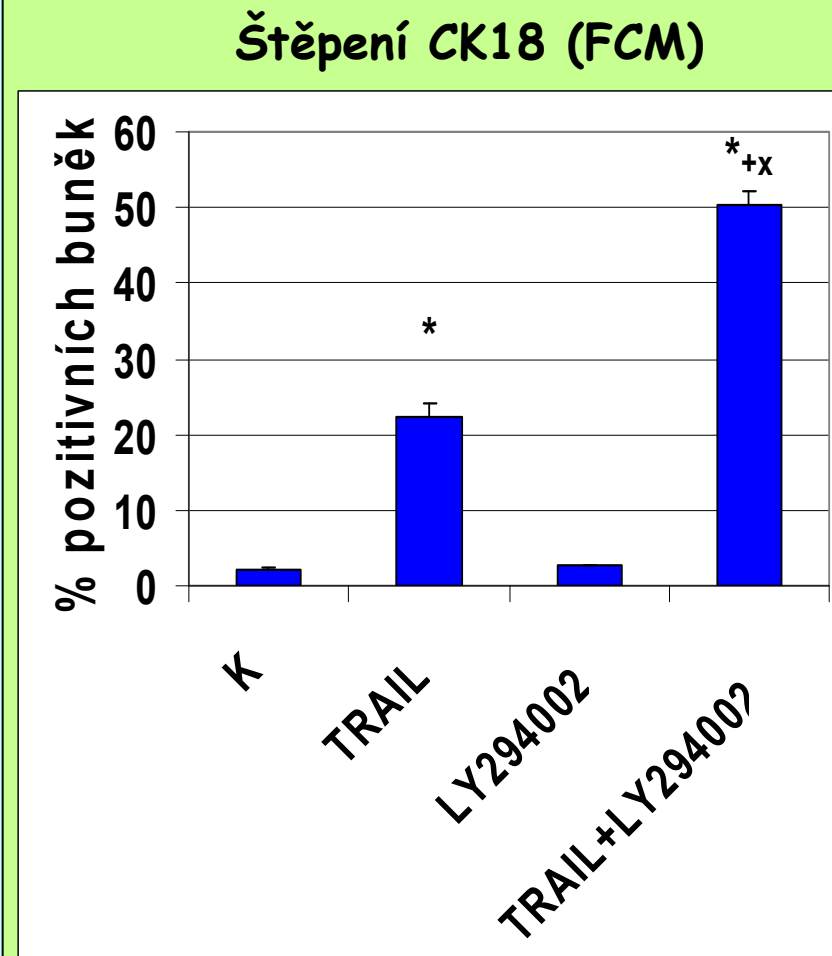
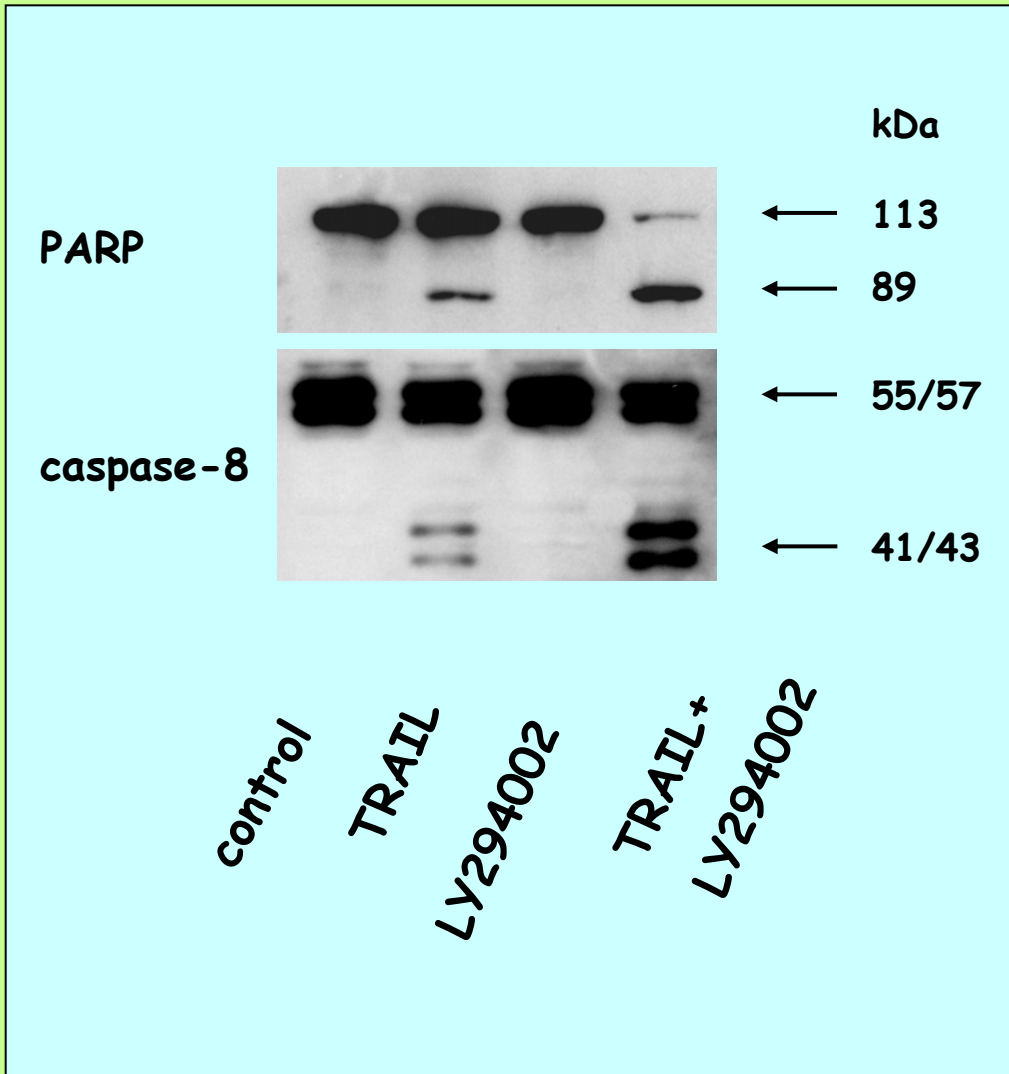
*(Sheng et al., 2003)*

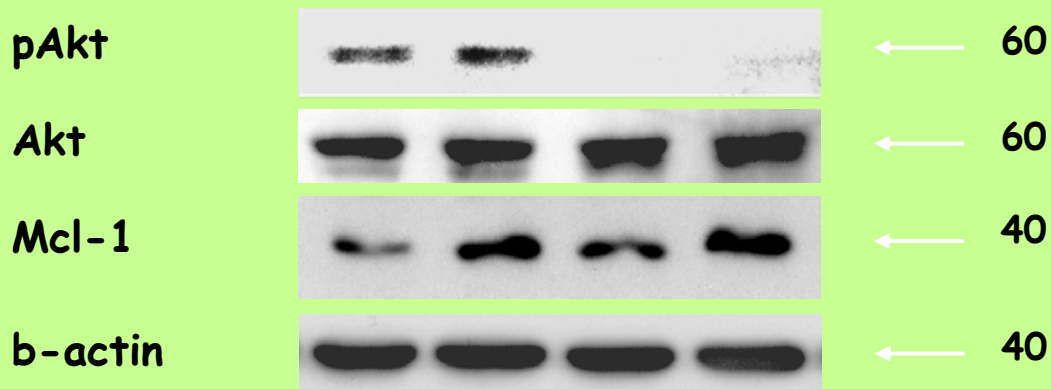
- významná role PI3K/Akt dráhy v regulaci citlivosti buněk k apoptóze indukované TRAILem

- melanocyty *(Larribere et al., 2004)*

- colon *(Rychahou et al., 2005)*

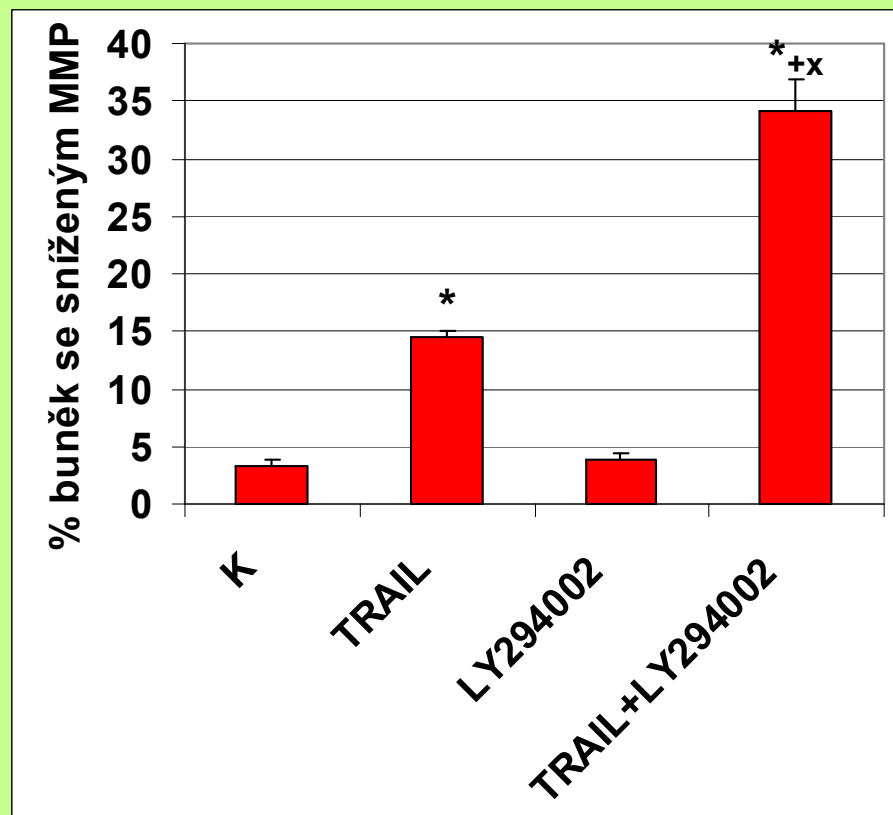
# Posílení apoptózy indukované TRAILem v podmínkách specifické inhibice dráhy PI3K/Akt





MMP (TMRE, FCM)

control  
TRAIL  
LY294002  
TRAIL+LY294002



- **Specifická inhibice signální dráhy PI3K/Akt významně zcitlivuje nádorové buňky tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem**
- **V podmínkách inhibice PI3K/Akt se nemění bazální, ani TRAILem indukovaná hladina proteinu Mcl-1 v buňkách**
  - jiný mechanismus zcitlivění k apoptotickým účinkům TRAILu ve srovnání s úlohou dráhy MEK/ERK



FEBS Letters 580 (2006) 6565–6569

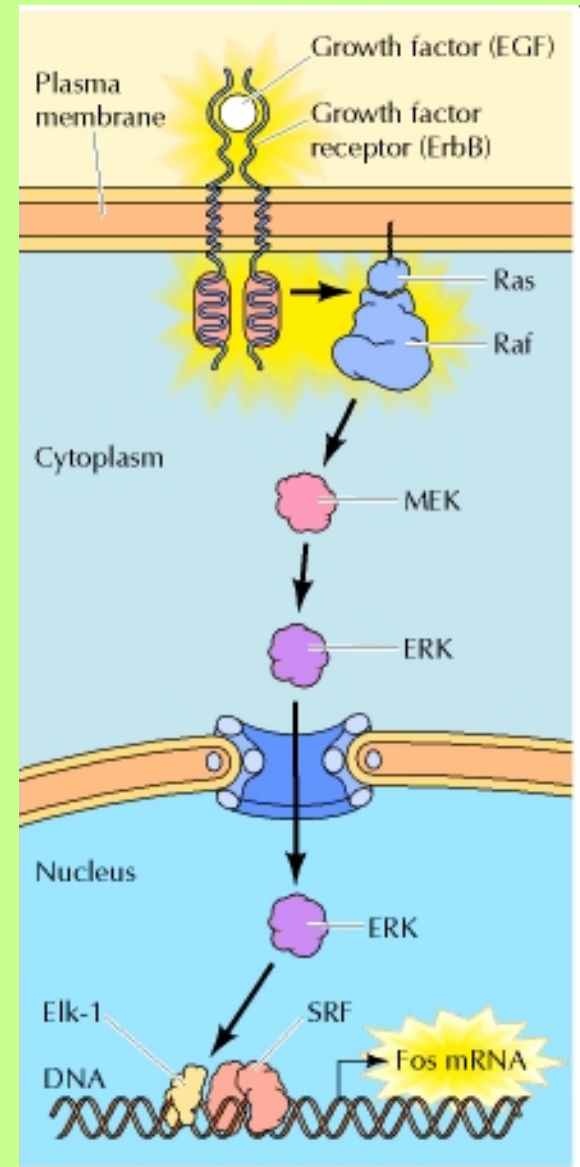
## Different modulation of TRAIL-induced apoptosis by inhibition of pro-survival pathways in TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant colon cancer cells

Alena Vaculová, Jiřina Hofmanová, Karel Souček, Alois Kozubík\*

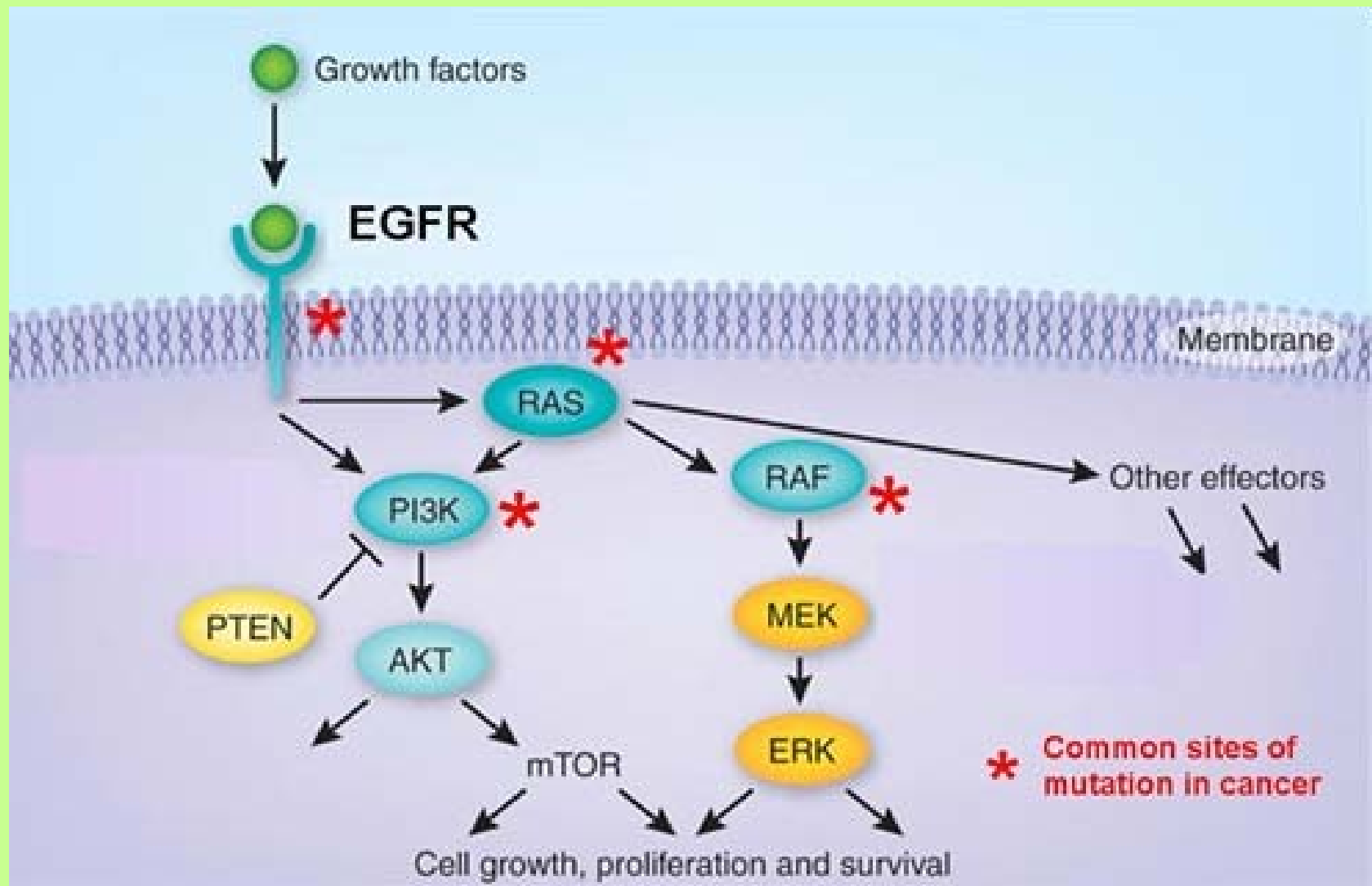
*Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic*

# EGF

- Epidermální růstový faktor
- Vazba na povrchový receptor EGFR
- Stimulace proliferace a antiapoptotických signálních drah
- Aktivace drah MEK/ERK a PI3K/Akt
- Nadměrná stimulace této dráhy během nádorových onemocnění
- Inhibitory EGFR dráhy - potenciálně využitelná léčiva, aplikace v kombinované terapii
  - monoklonální protilátky proti EGFR



(Cooper GM, The Cell: A Molecular Approach.)



<http://healthcare.sourcebioscience.com/diagnostic-tests/egfr>

# Molekuly zapojené v signální dráze EGFR, deregulované u CRC

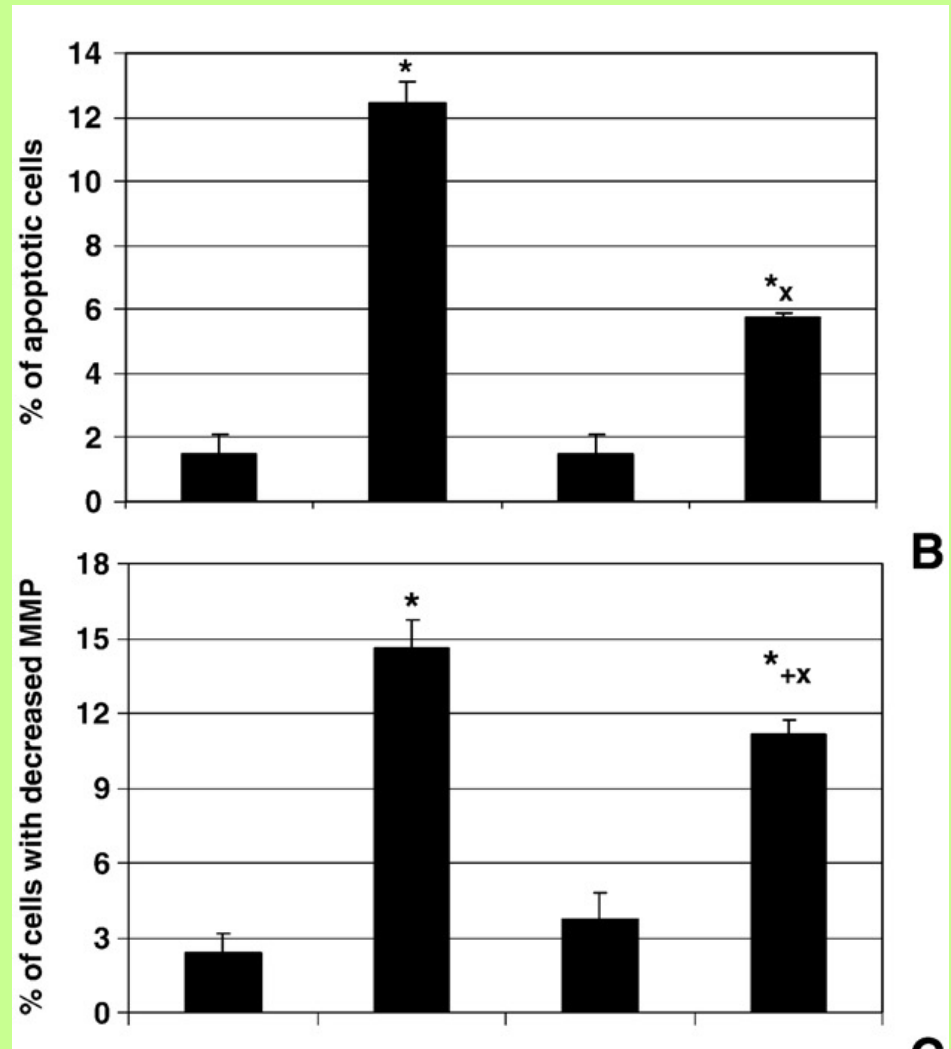
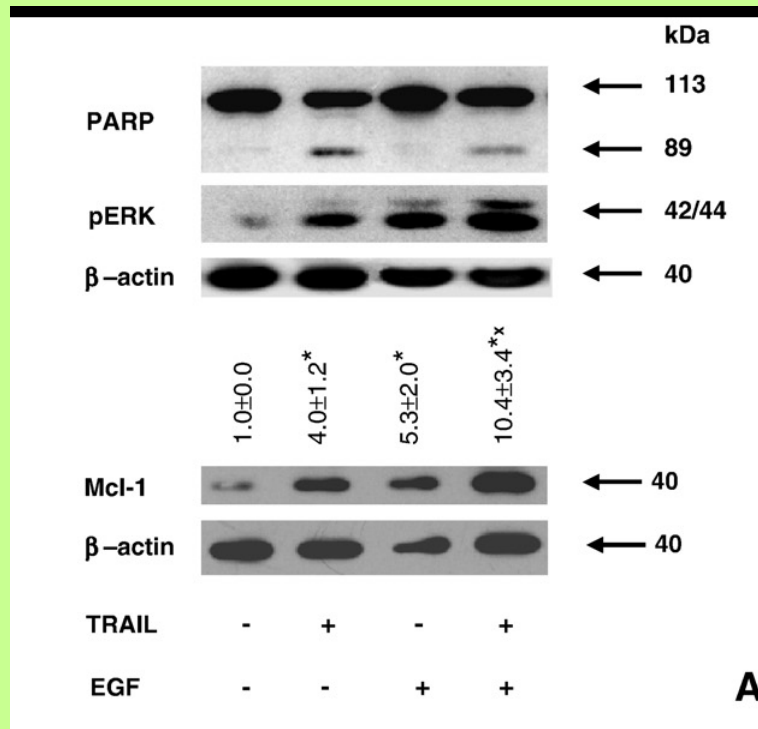
**Table 1:** Components of the EGFR signaling pathway important in colorectal cancer.

Component (gene/protein)	Protein function	Defect in CRC	Frequency	Prognostic	Impact Predictive (to anti-EGFR therapy)
<i>EGFR/EGFR</i>	Transmembrane tyrosine kinase receptor	Protein expression Mutation Increased copy number	25–90% Rare 0–50%*	Controversial Unknown Uncertain	No correlation Unknown Uncertain
<i>KRas/KRas</i>	GDP-/GTP-binding protein; facilitates ligand-dependent signaling	Activating mutation (codons 12, 13, 61, 146); leads to activation of MAPK pathway	30–40%	Controversial	No response (if <i>KRas</i> is mutated)
<i>BRAF/B-Raf</i>	Serine-threonine protein kinase downstream of <i>KRas</i>	Activating mutation (V600E)	5–12%	Poor prognosis in MSS tumors	No response (if <i>BRAF</i> is mutated)
<i>PIK3CA/PI3K</i>	A key signal transducer in the PI3K-AKT pathway	Activating mutation (exons 9 and 20)	14–18%	Poor prognosis in <i>KRas</i> wt tumors	No response (if exon 20 is mutated)
<i>PTEN/PTEN</i>	A protein tyrosine phosphatase enzyme; inactivates PI3K pathway	Loss of protein expression; mutation; LOH	13–19%	Poor prognosis in <i>KRas</i> wt tumors	No response (possibly)

CRC: colorectal cancer; LOH: loss of heterozygosity; wt: wild-type.

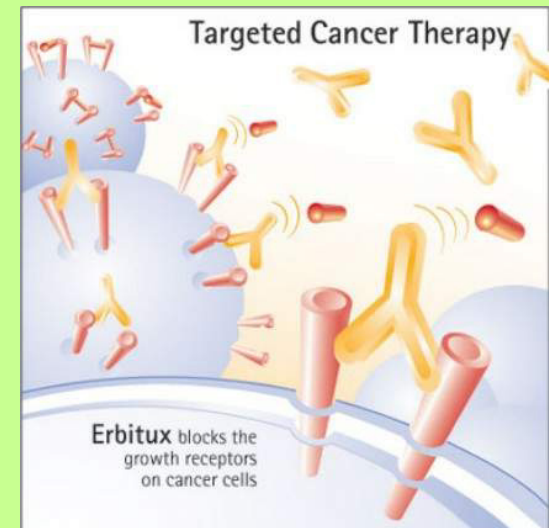
\*Low % for high (>10 copies) amplification; higher % for low number of copies (3–5 copies).

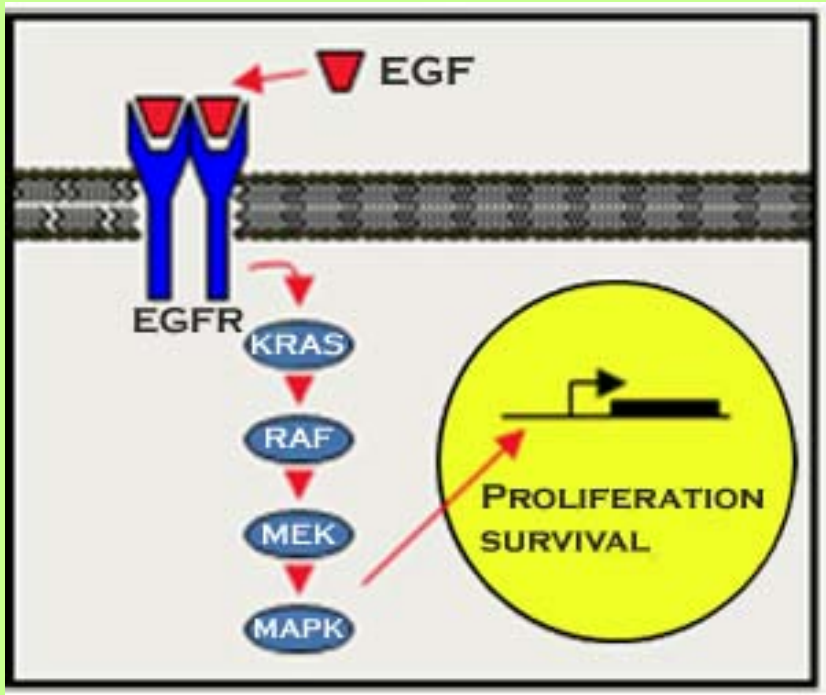
# EGF snižuje citlivost nádorových buněk tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem



# Dráha EGFR vs. nádorové onemocnění

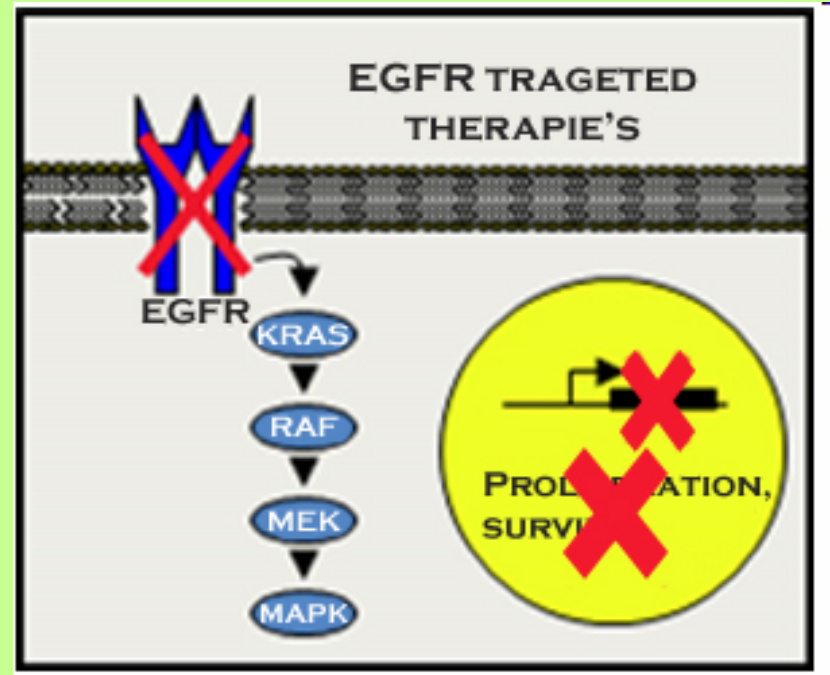
- **Vysoká exprese EGFR a posílená aktivace dráhy EGFR**
  - během progresu nádorových onemocnění
  - přispívá k rezistenci nádorů k chemo- a radioterapii, ke zvýšené proliferaci nádorových buněk
- ***Stimulace EGFR vede také k podpoře neoangionegeze a migrace buněk***
- **Blokace EGFR dráhy -**
  - využití v protinádorové terapii
    - syntetické inhibitory EGFR
    - monoklonální protilátky - Erbitux

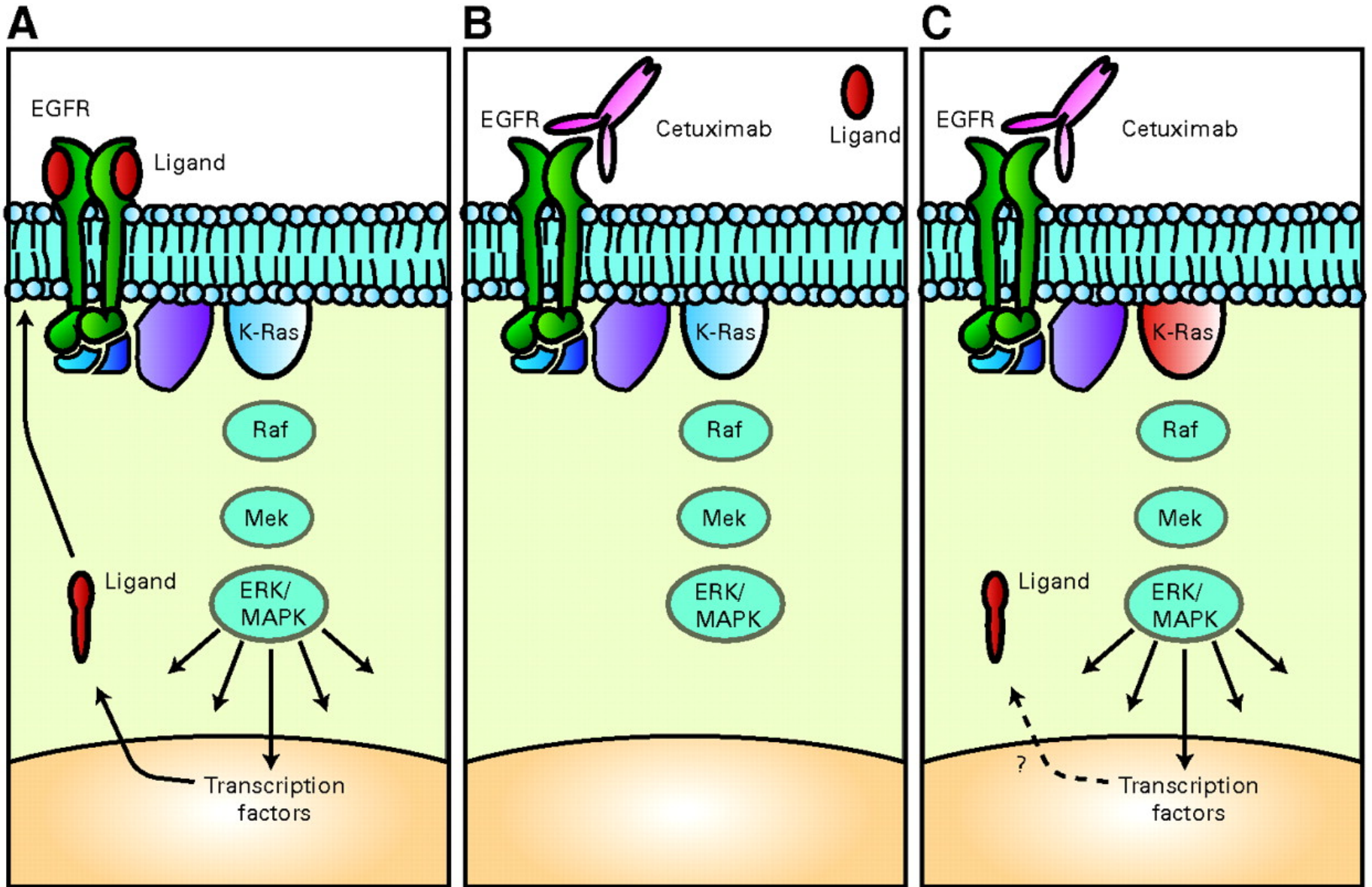




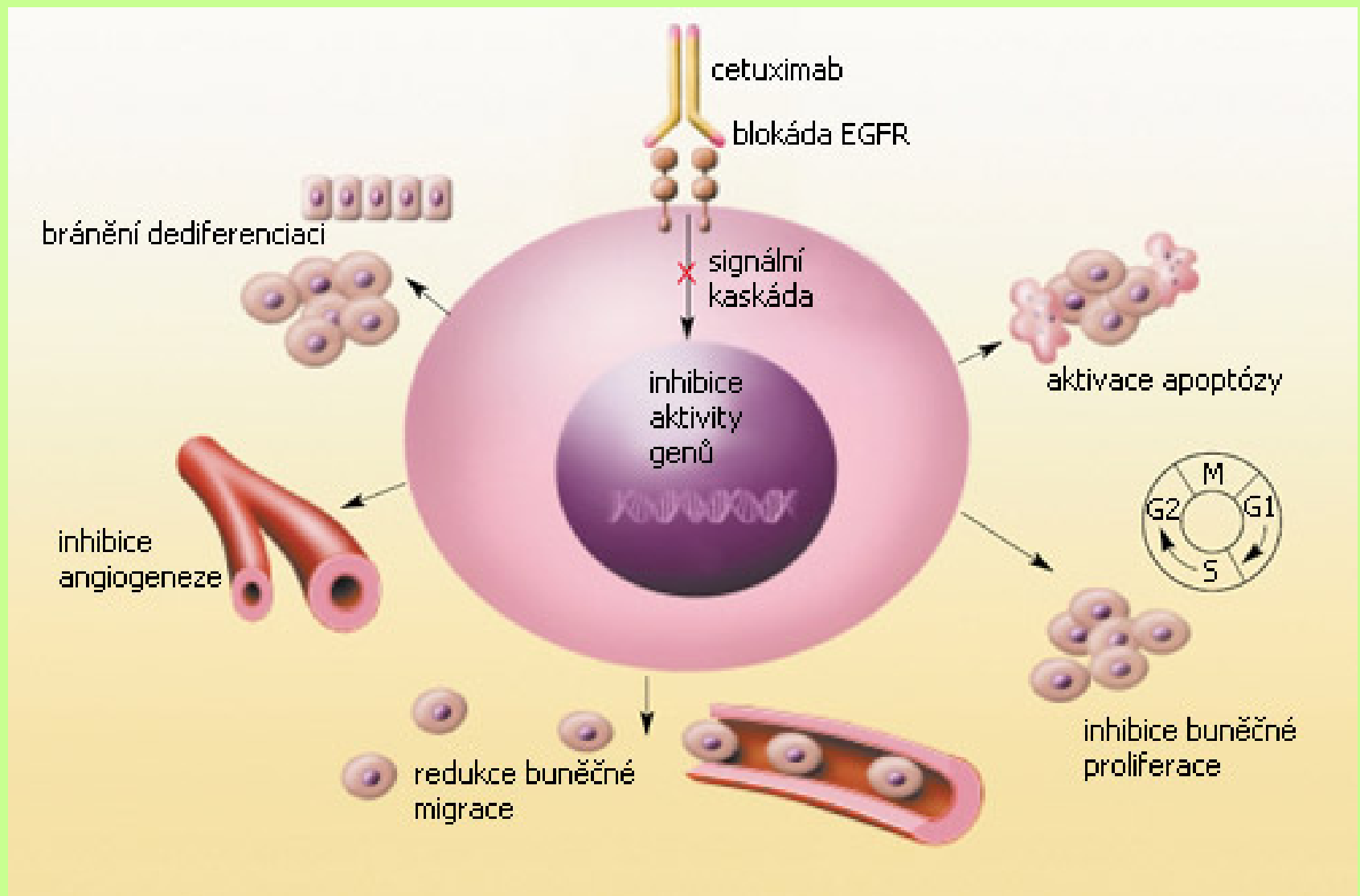
In cancer cells, activation of the EGFR or related pathways induces genes implicated in tumor progression.

EGFR targeted therapies block the activation of this signaling pathway.





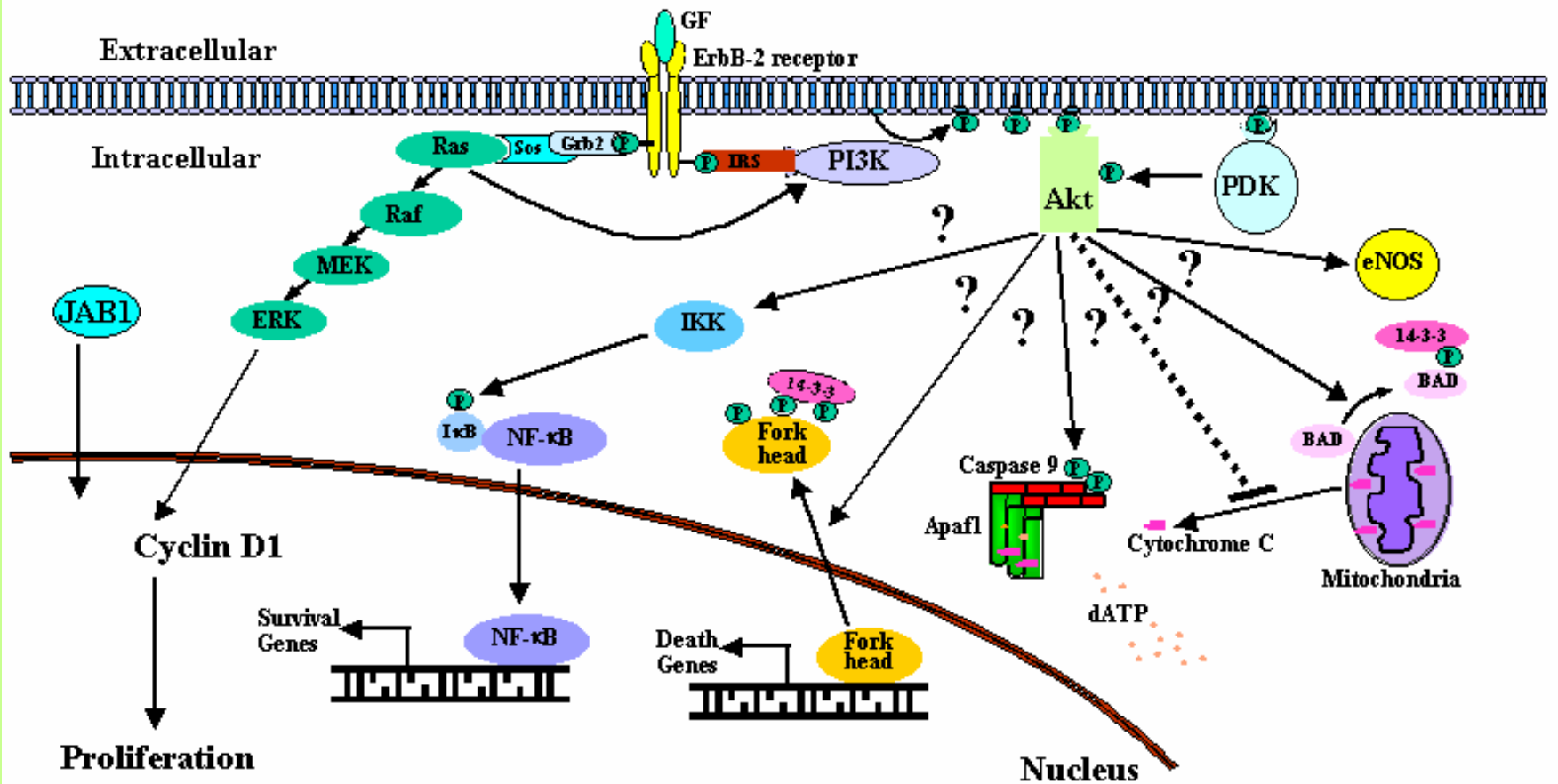




# Cetuximab (marketed under the name Erbitux)

- a monoclonal antibody, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor
- given by intravenous infusion for treatment of metastatic colorectal cancer
- manufactured and distributed in North America by ImClone and Bristol-Myers Squibb, while in the rest of the world distribution is by Merck KGaA
- treatment of patients with EGFR-expressing, KRAS wild-type metastatic colorectal cancer (CRC), in combination with chemotherapy, and as a single agent in patients who have failed oxaliplatin- and irinotecan-based therapy and who are intolerant to irinotecan.
- in mCRC, biomarkers, including KRAS, are indicative of response to cetuximab (Erbitux). 60% of patients express the KRAS wild-type tumor and data have shown that these patients are significantly more likely to benefit from treatment with cetuximab or a combination of cetuximab plus chemotherapy

# ErbB-2 Receptor Pathway Cell Survival/Proliferation



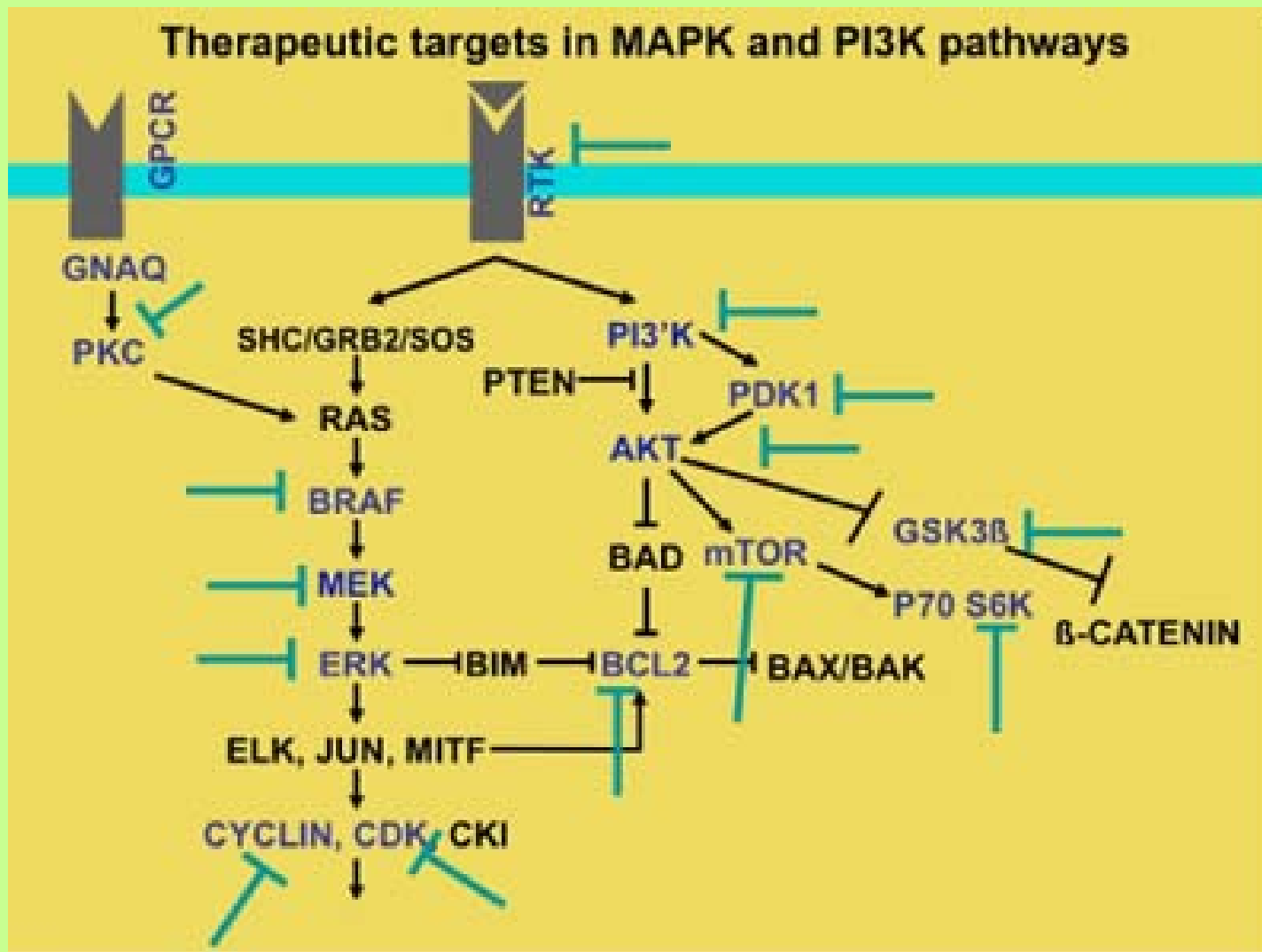
(Zaftonte et al., 2000)

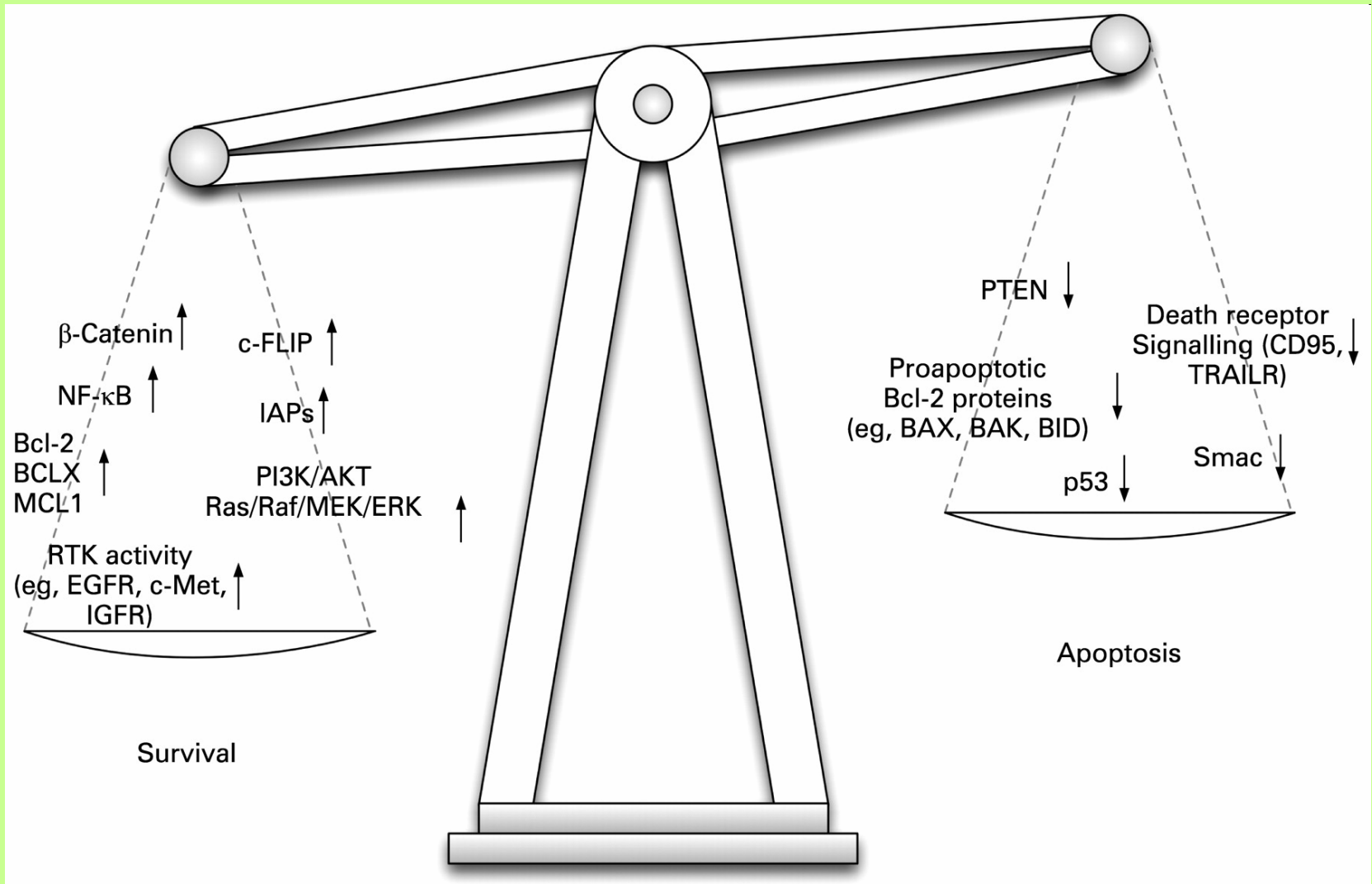
- osud buňky jasně závisí na rovnováze proapoptotických a antiapoptotických drah
- roli hrají jak konstitutivně aktivované kinázy, tak ty, které jsou indukované působením apoptotického stimulu

# Modulace aktivity signálních drah MEK/ERK a PI3K/Akt má významnou úlohu v regulaci citlivosti nádorových buněk k působení induktorů apoptózy

- Inhibitory signálních drah MEK/ERK a PI3K/Akt

## Therapeutic targets in MAPK and PI3K pathways





(Schulze-Bergkammen, 2009)

Hyršlová Vaculová A., 2012

- **důležitost klasifikace nádorových buněk s ohledem na odpověď k TRAILu před jeho terapeutickou aplikací**
- **důležitost současné aplikace inhibitorů „pro-survival“ kináz a TRAILu v protinádorové terapii pro optimální výsledek terapie u některých typů nádorů**



# Apoptóza vs. léčba rakoviny

- Možnost spustit apoptózu nádorové buňky je základní podmínkou úspěšné protinádorové terapie
- Řada nádorových buněk je však vůči apoptóze rezistentní
- Je nutné objasnit mechanismy rezistence a překonat ji (nová léčiva, spuštění alternativních mechanismů, kombinovaná terapie, genová terapie...)