

Fyziologie buněčných systémů 2013

**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 6.11.2013

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

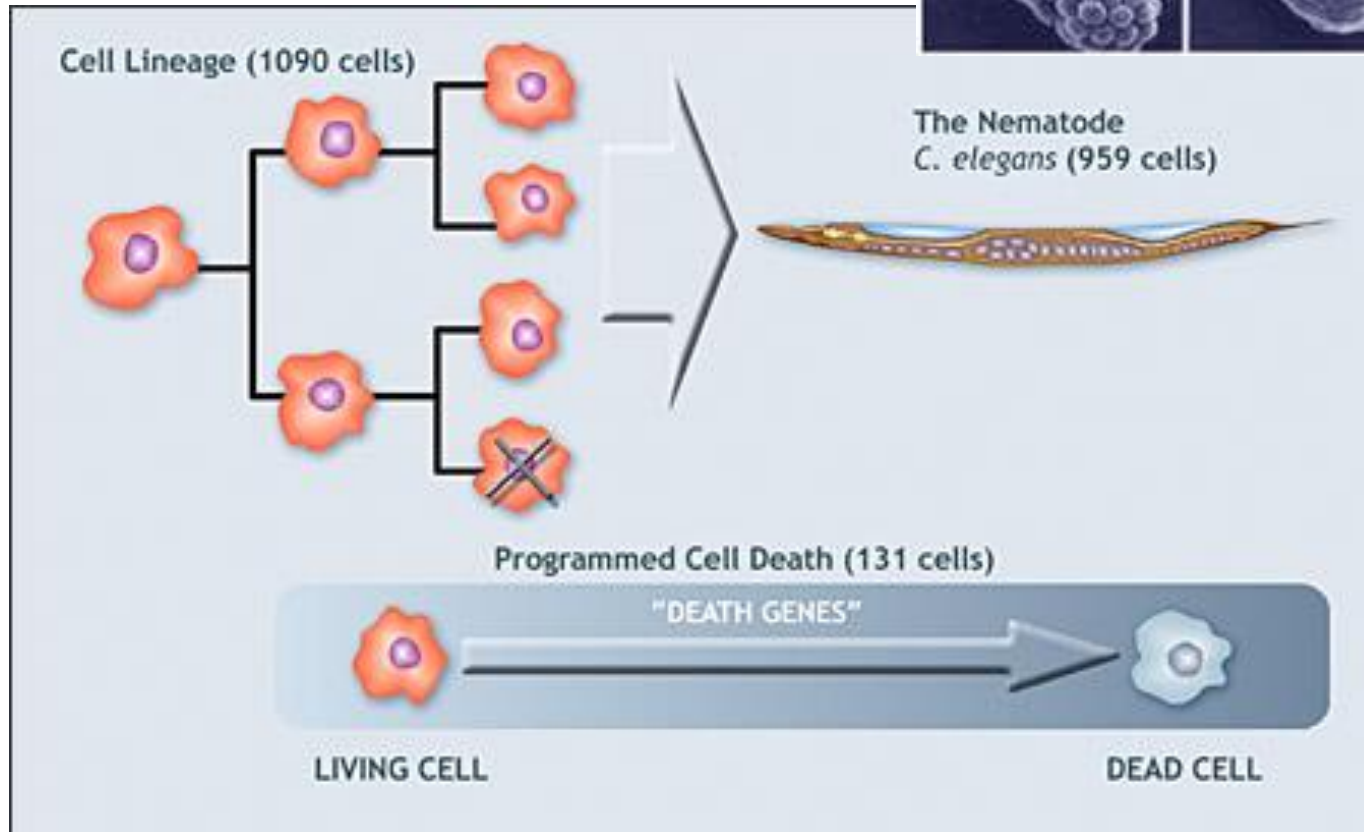
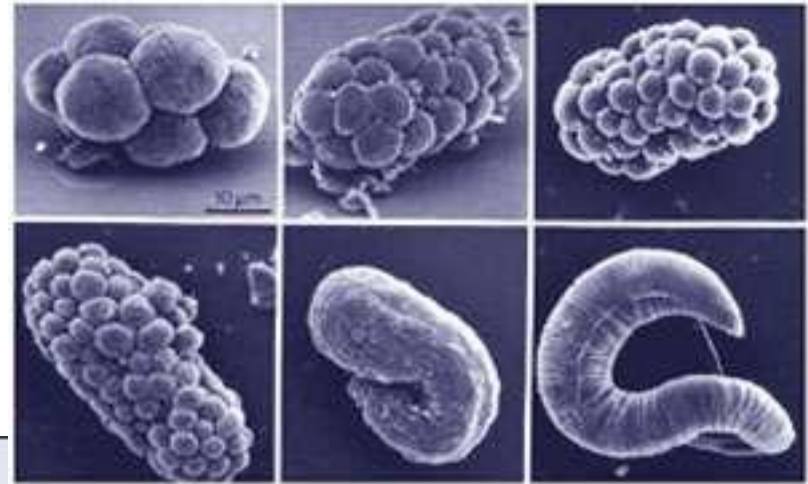
Studium apoptózy v mnohobuněčném organismu

- 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

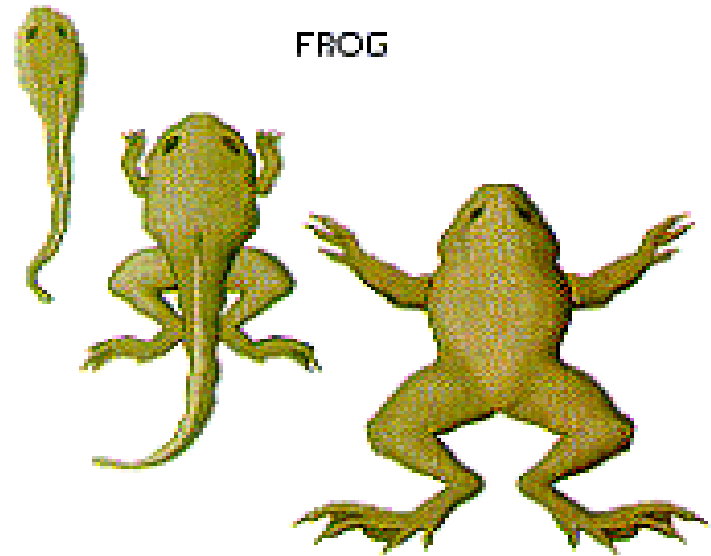
Jeden z nejvíce studovaných organismů z hlediska popisu mechanismů apoptózy, podobnost s obratlovci (výskyt analogických apoptotických genů a proteinů)

C. Elegans (Nematoda)



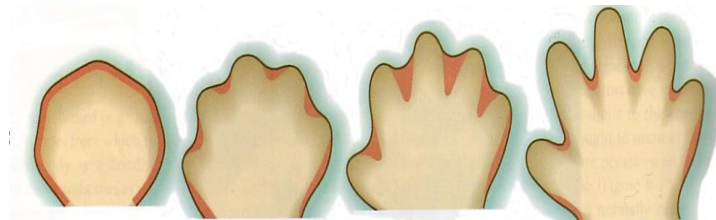
Apoptóza ve vývoji mnohobuněčného organismu

- **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)



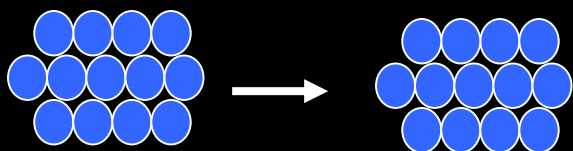
Apoptóza v regulaci homeostázy organismu

- 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

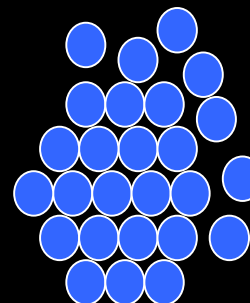
Apoptóza versus proliferace

- 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 intenzívně proliferující tkáně (krev, střevo...)

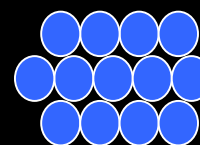
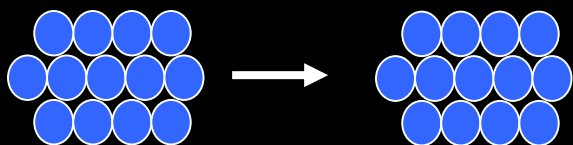
proliferace



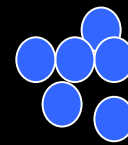
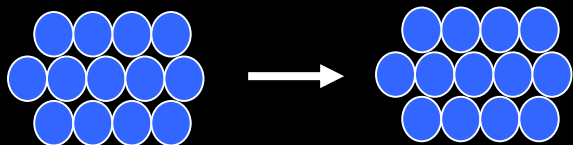
apoptóza



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)

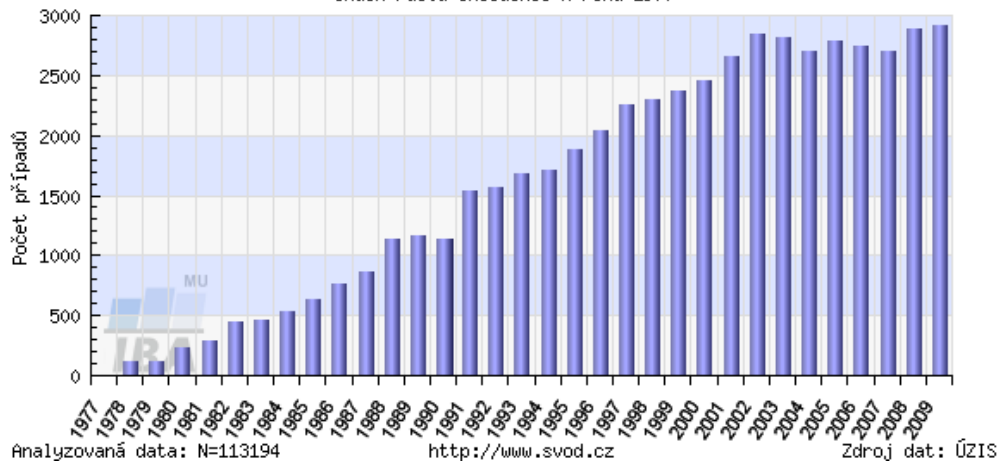
vysoká incidence CRC v ČR - přední místo ve statistikách,
neustálý alarmující nárůst

možnost významně ovlivnit vývoj onemocnění složením výživy

obrovský význam prevence!

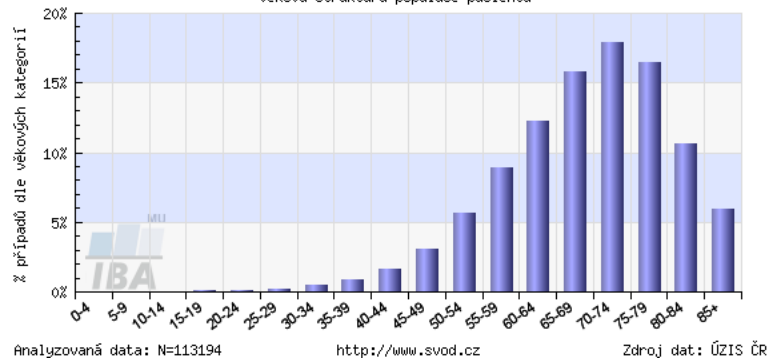
C18 - ZN tlustého střeva

index růstu incidence k roku 1977



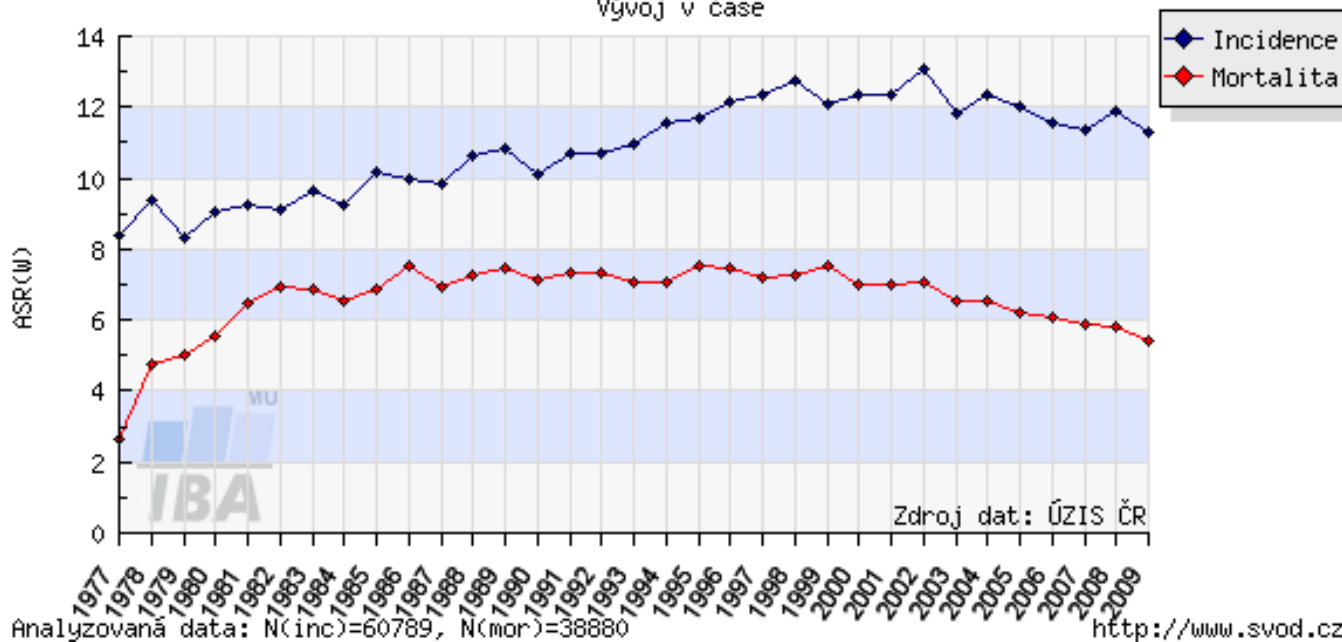
C18 - ZN tlustého střeva - Incidence

věková struktura populace pacientů



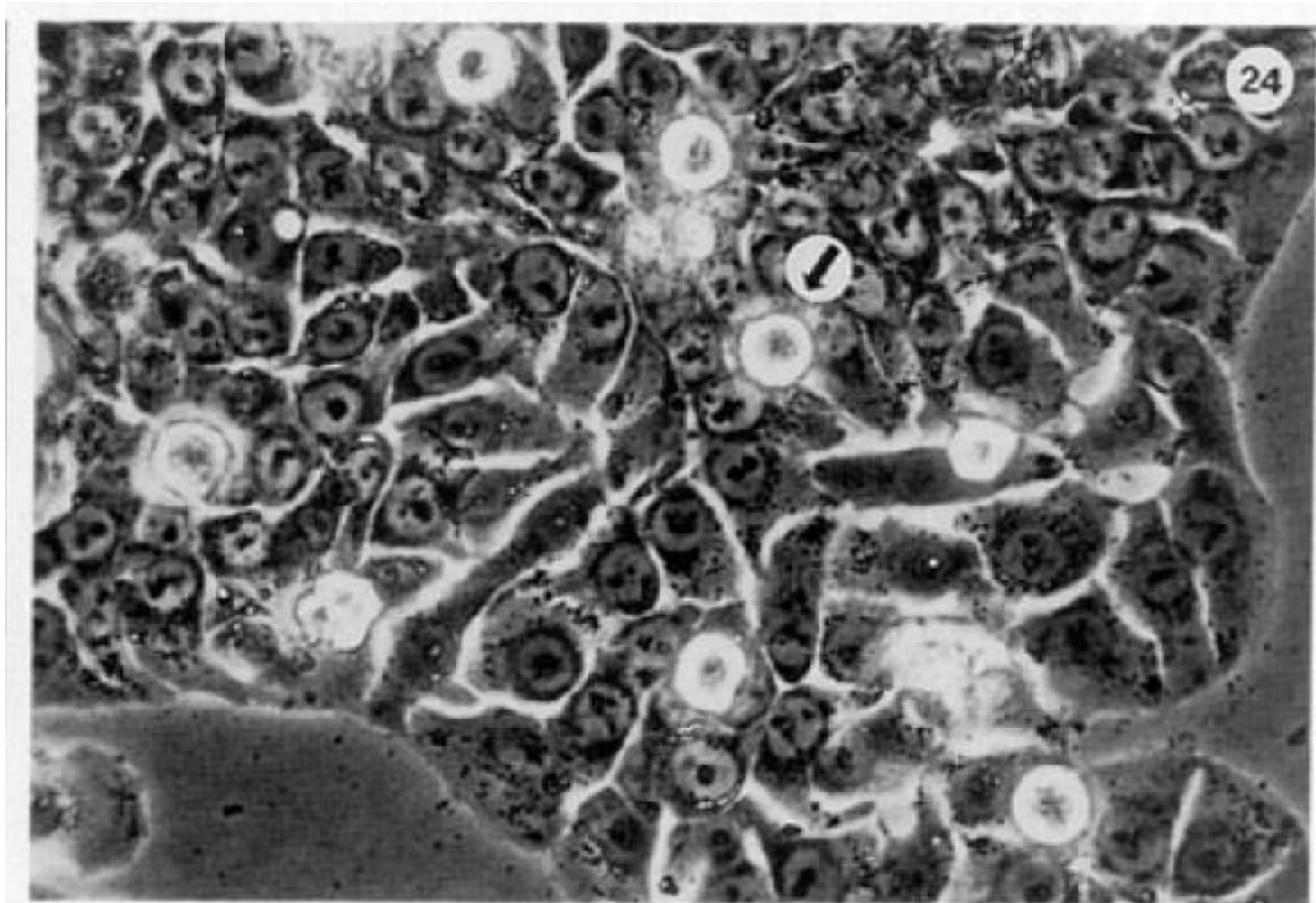
C28 - ZN konečníku - recta

Vývoj v čase



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)

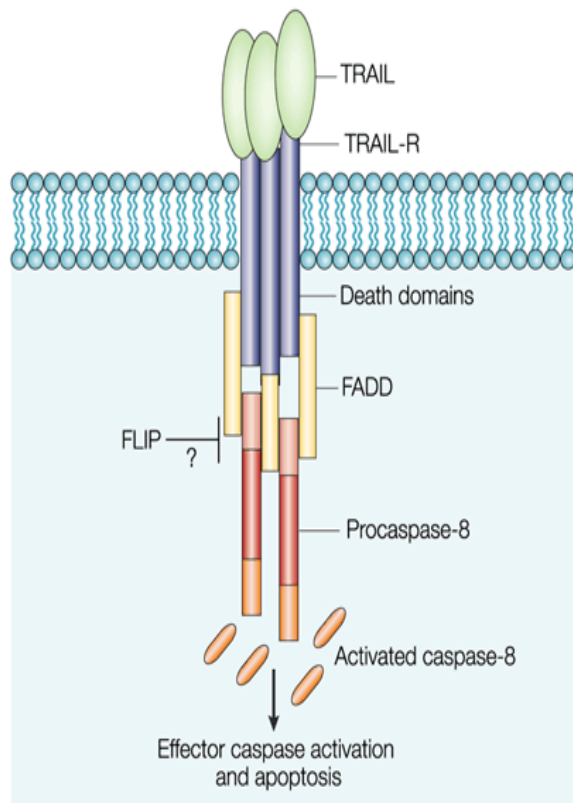
Významné změny střevních buněk během vývoje nádorového onemocnění

- 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

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)

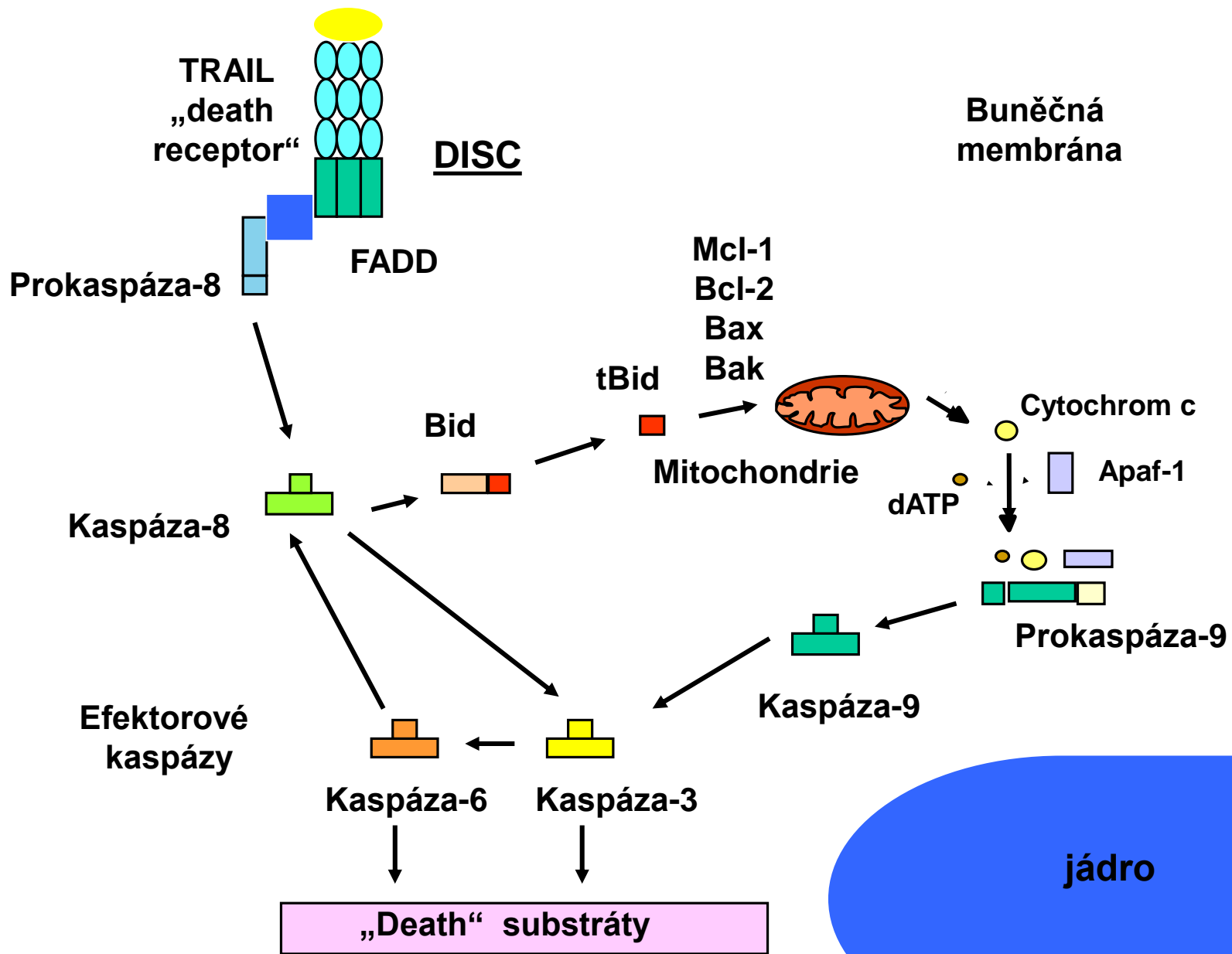
Význam TRAILu

- ❑ 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?

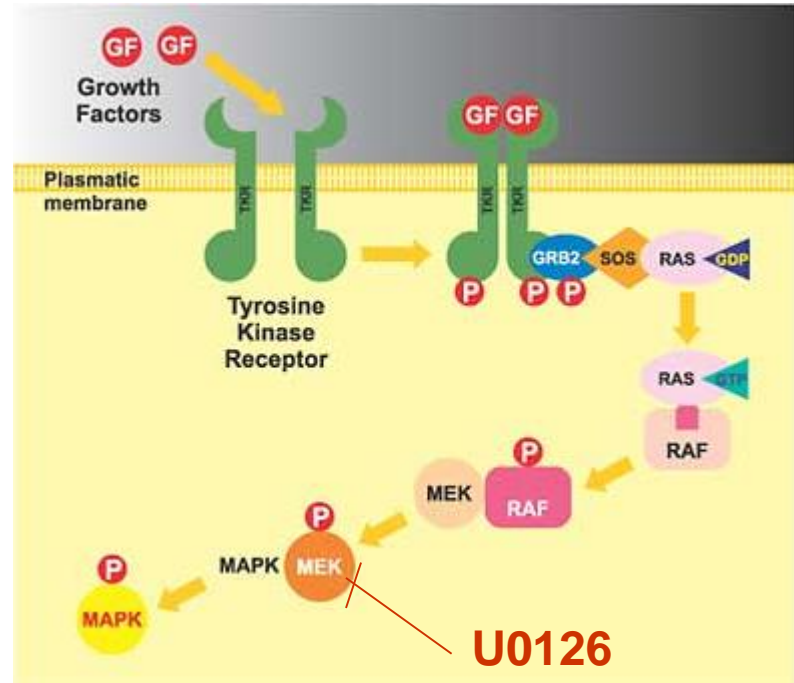
Dráha Ras/Raf/MEK/ERK

- 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

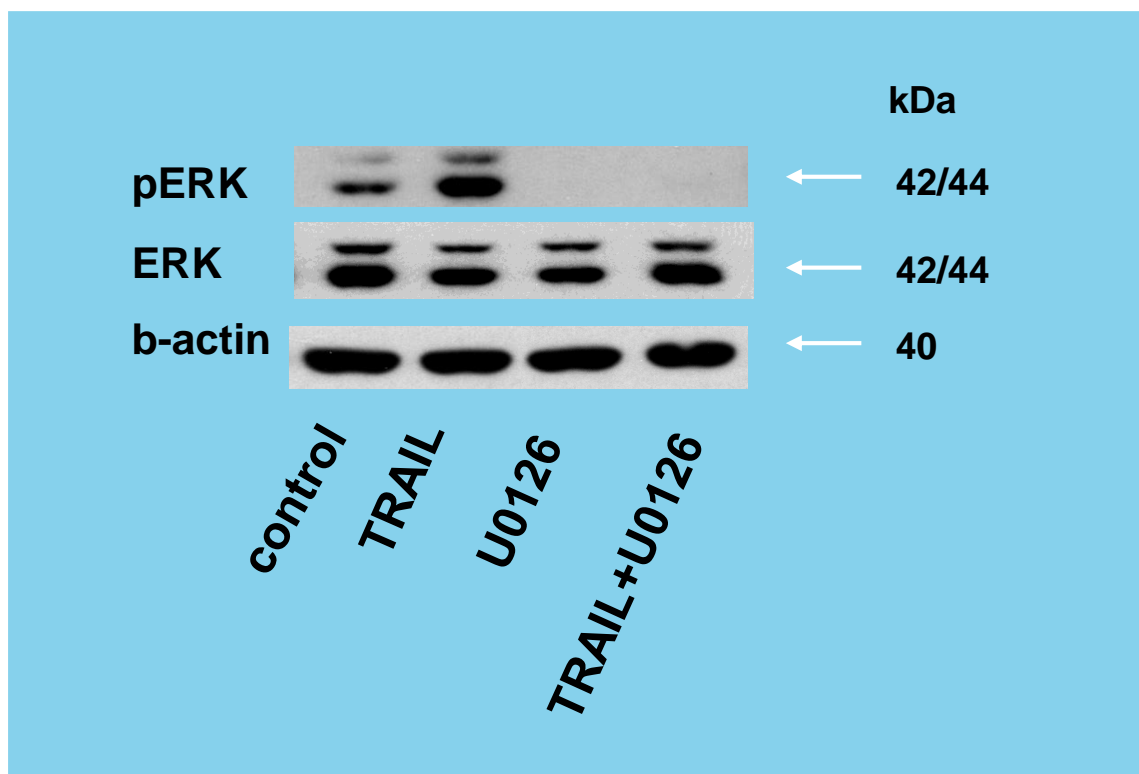
- proliferace
- diferenciace
- apoptózy



(Sorbera et al., 2002)

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

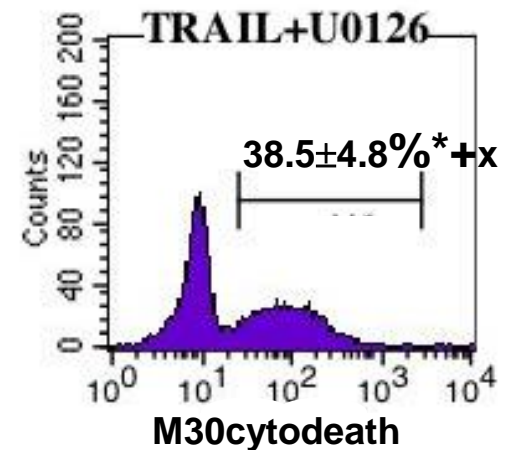
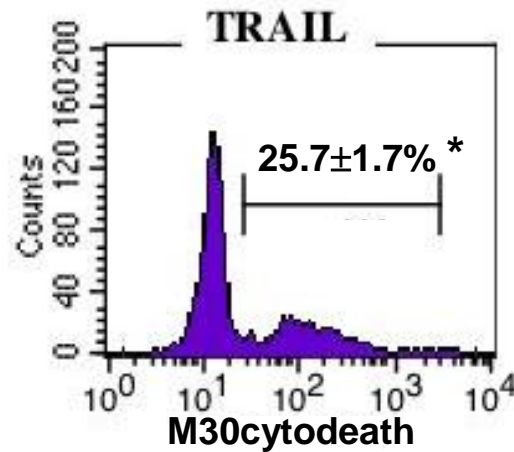
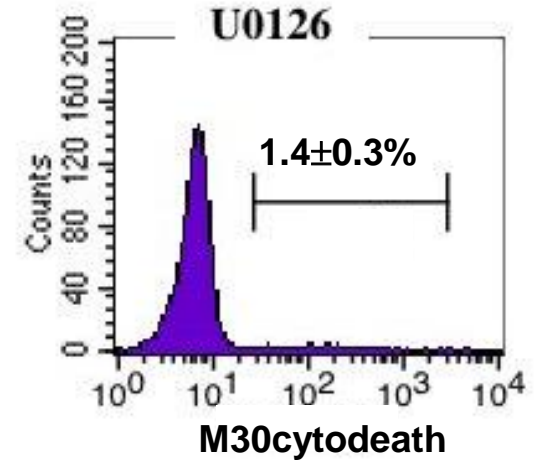
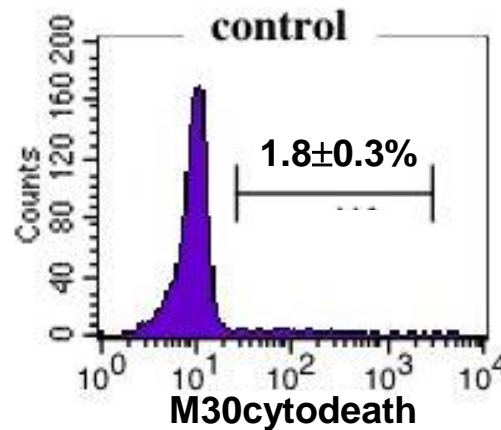
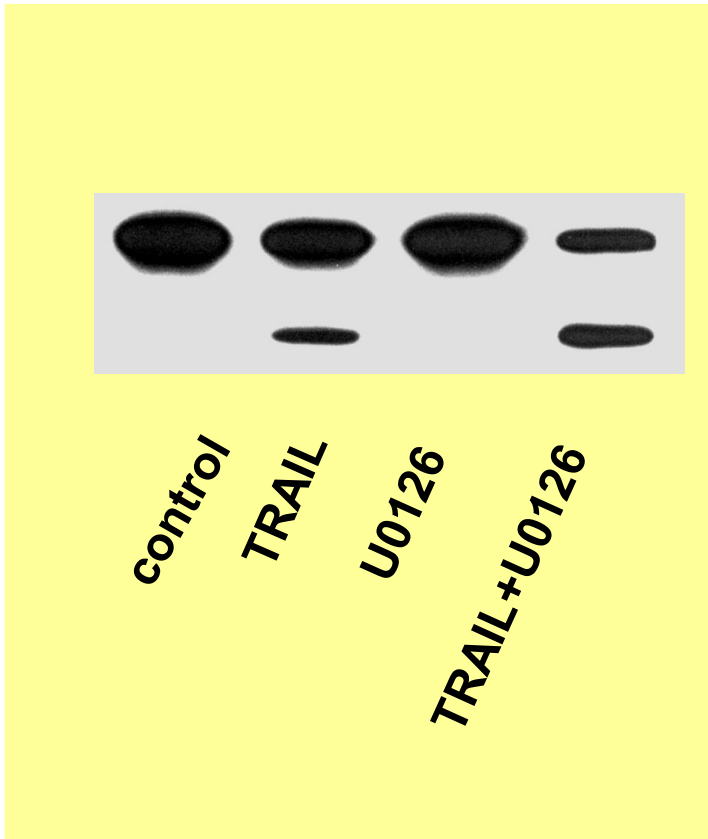
- ERK1/2 konstitutivně aktivní u nádorových buněk kolonu
- TRAIL významně indukuje fosforylaci ERK1/2 u buněk HT-29
- U0126 - inhibice bazální i TRAIEm indukované fosforylace ERK1/2



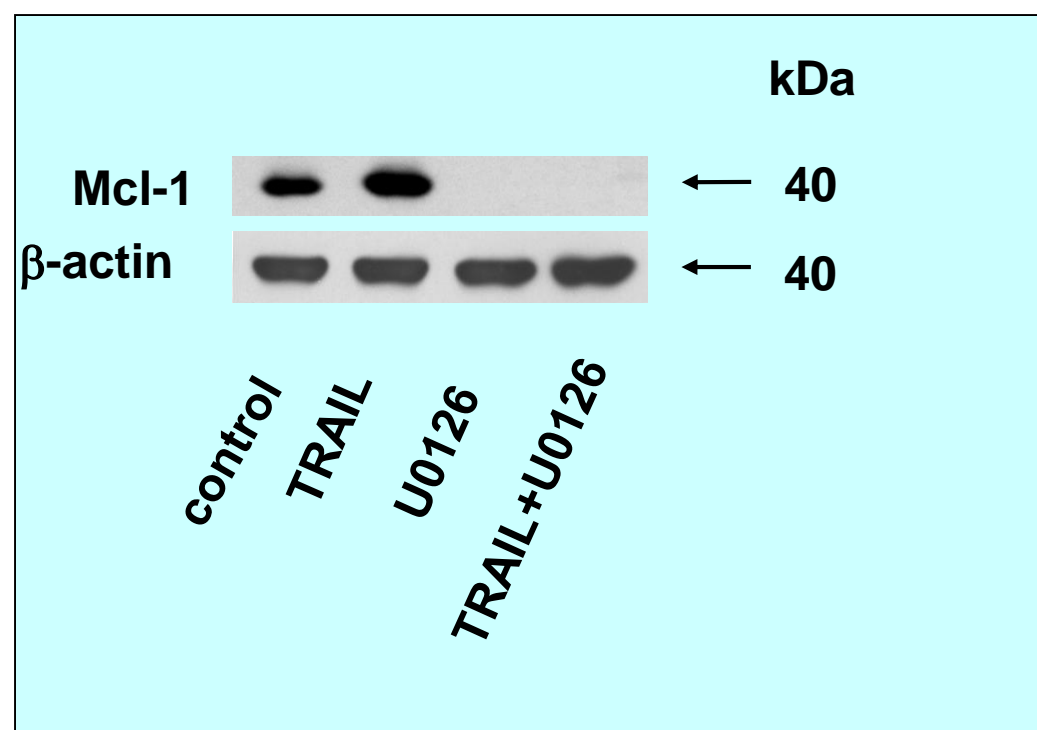
Posílení apoptózy indukované TRAILem v podmínkách specifické inhibice dráhy MEK/ERK

Štěpení CK18 (M30cytodeath, FCM)

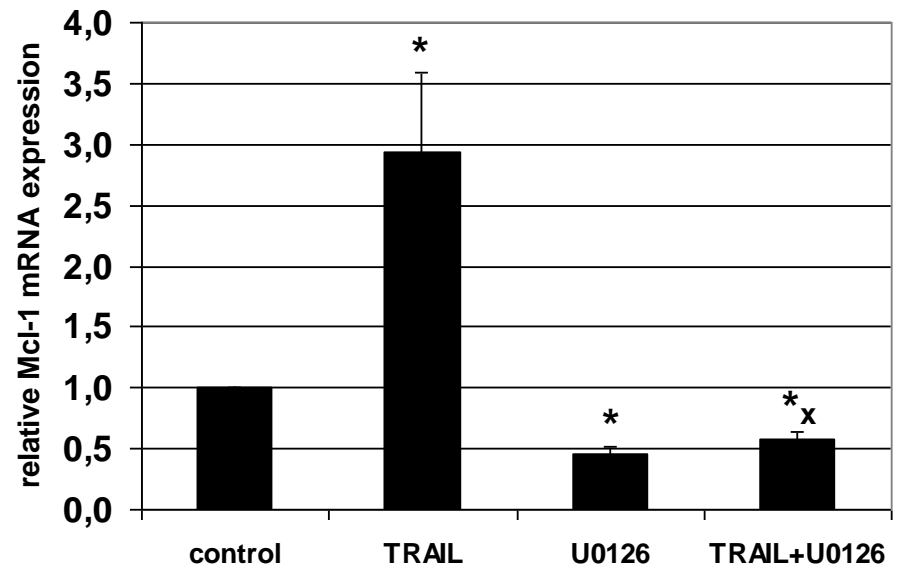
Štěpení PARP



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, hepatocellulární 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

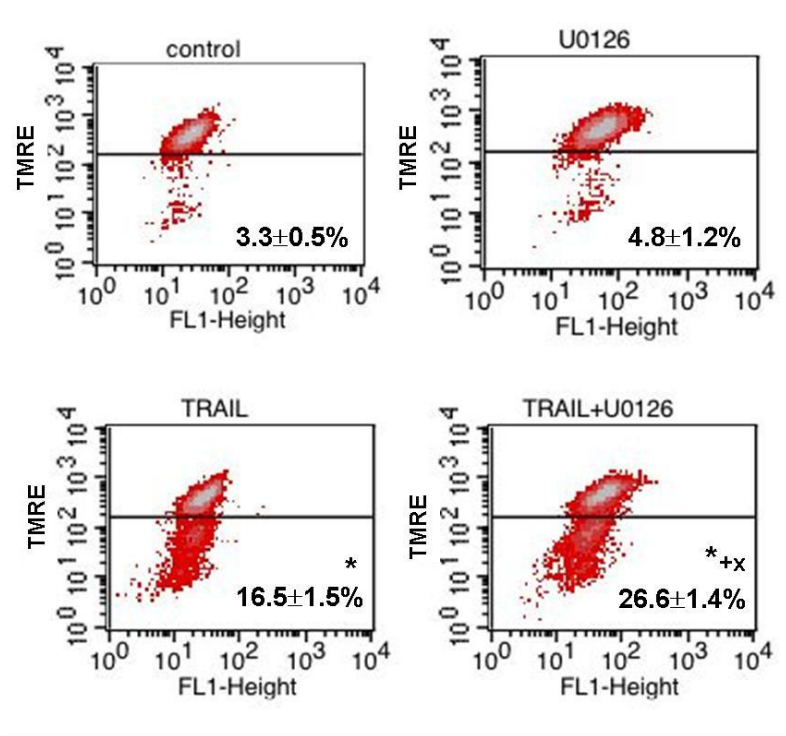
- Mcl-1 RNAi - zcitlivění buněk hepatocelulárního karcinomu k apoptóze indukované působením chemoterapie a inhibitorů dráhy PI3K/Akt, ale ne k apoptóze indukované TRAILem

(Schulze-Bergkammen et al., 2006)

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

(Tanai et al., 2004)

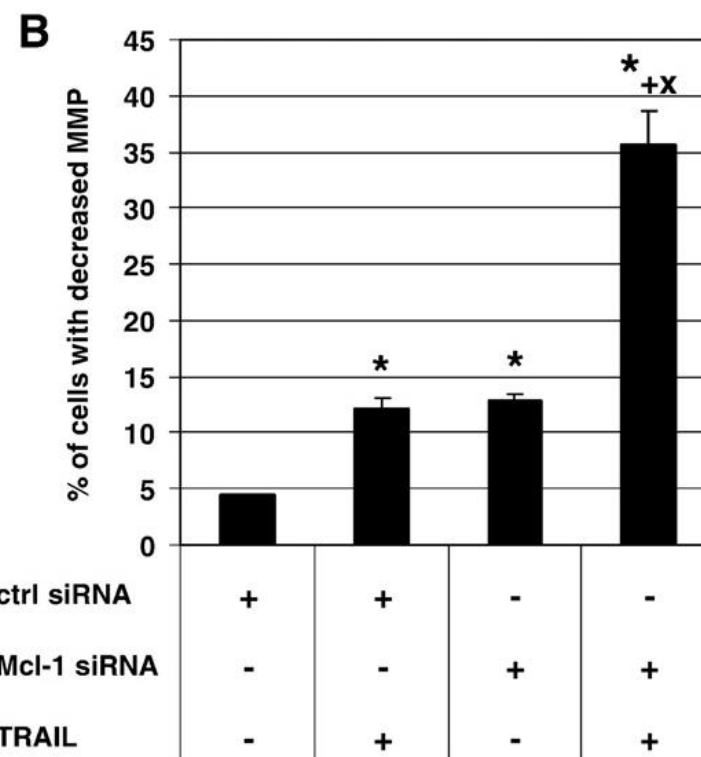
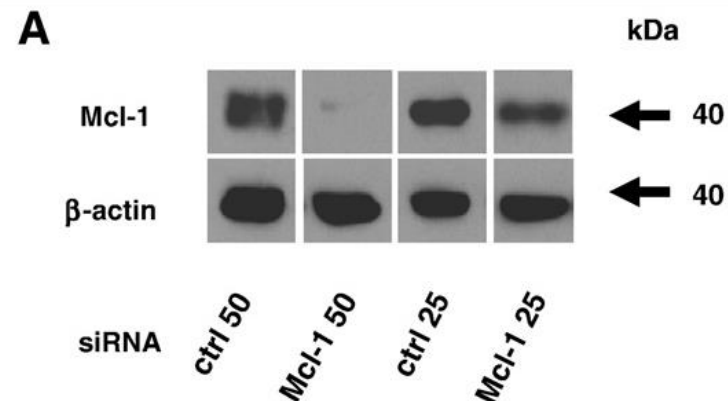
Protein Mcl-1 hraje roli v regulaci citlivosti nádorových buněk kolonu k apoptóze indukované TRAILem



posílení apoptózy
indukované TRAILem

prostřednictvím U0126
na úrovni mitochondrií

prostřednictvím
eliminace Mcl-1



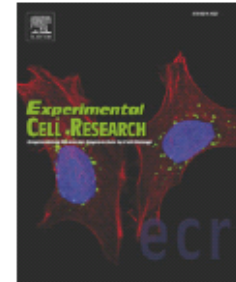
- **Specifická inhibice signální dráhy ERK1/2 významně zcitlivuje nádorové buňky tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem**
- **TRAIL rovněž může aktivovat dráhu ERK1/2 a nárůst množství proteinu Mcl-1 v buňkách (antiapoptotické působení!!), tyto efekty lze účinně inhibovat v podmínkách inhibice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



available at www.sciencedirect.com



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

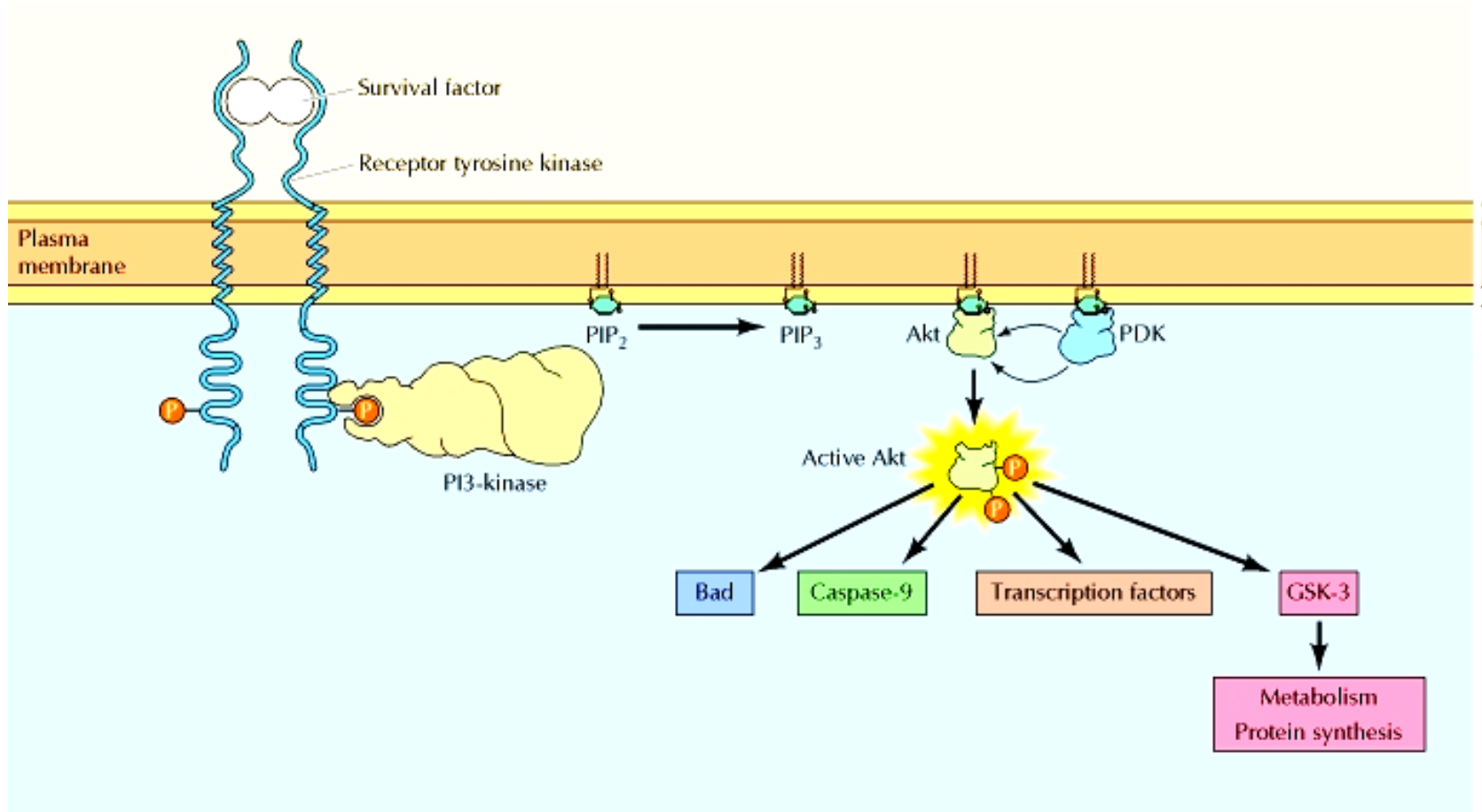
TRAIL a Mcl-1

- 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

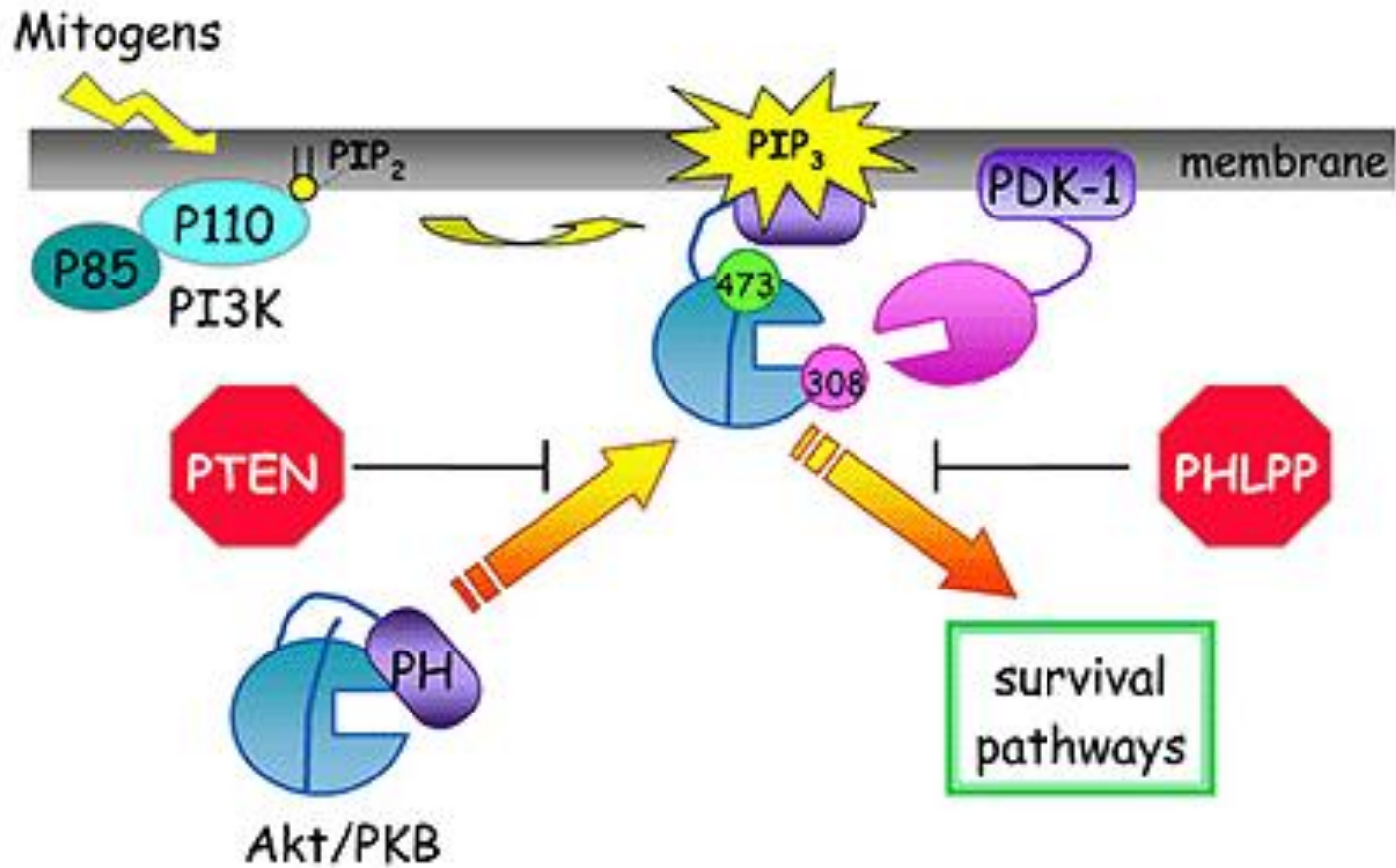


Phosphatidylinositol 4,5-BisPhosphate (PIP₂)

Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃)

phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1)

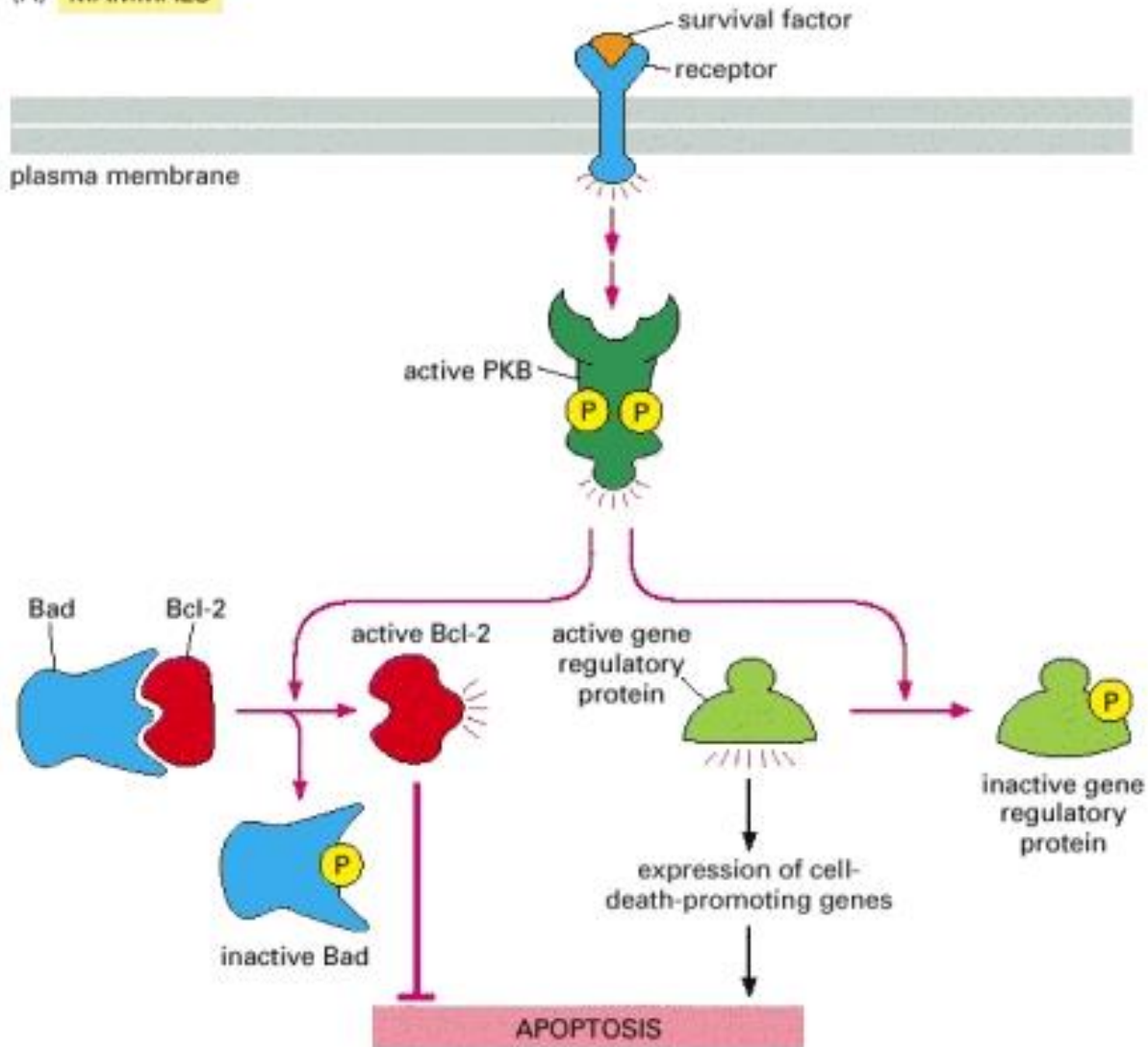
(Cooper GM, The Cell: A Molecular Approach.)



(Pondrom et al., 2005)

Akt in regulation of cell survival/death

(A) MAMMALS



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

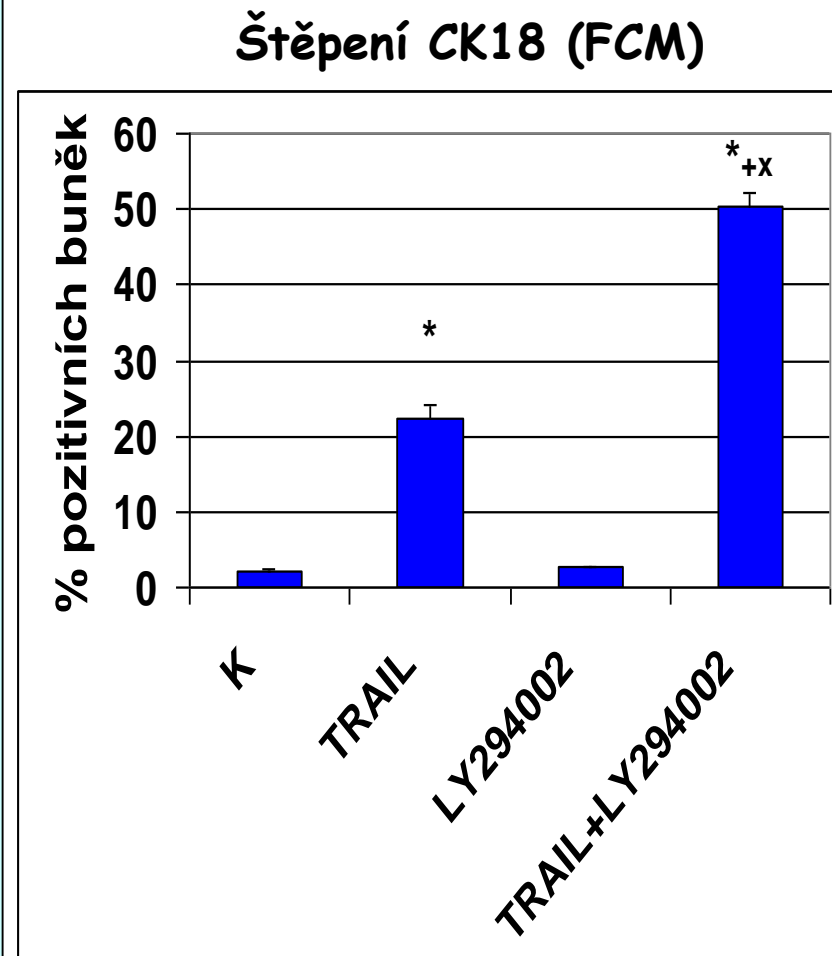
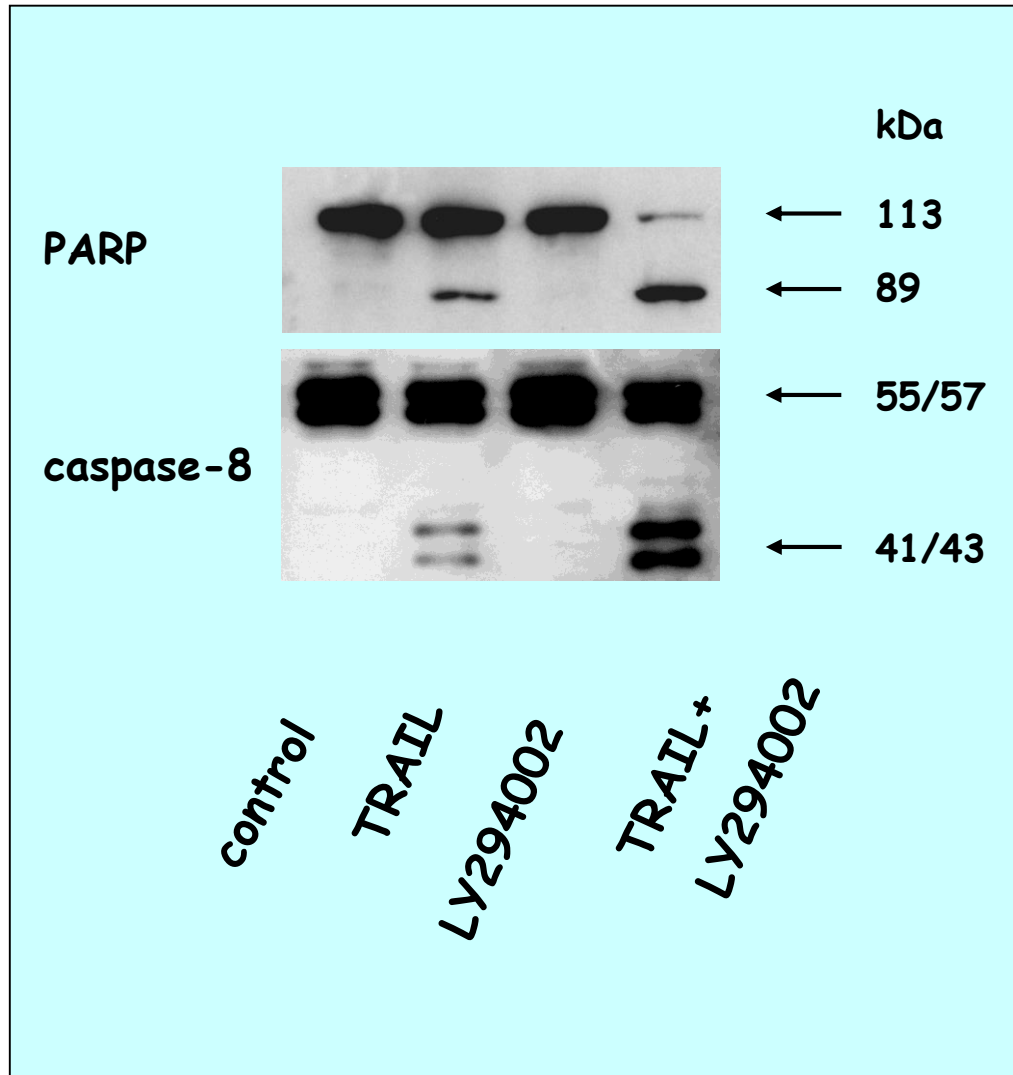
(Sheng et al., 2003)

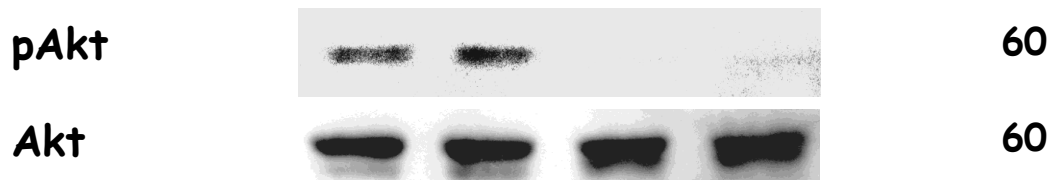
- významná role PI3K/Akt dráhy v regulaci citlivosti buněk k apoptóze indukované TRAILem

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

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

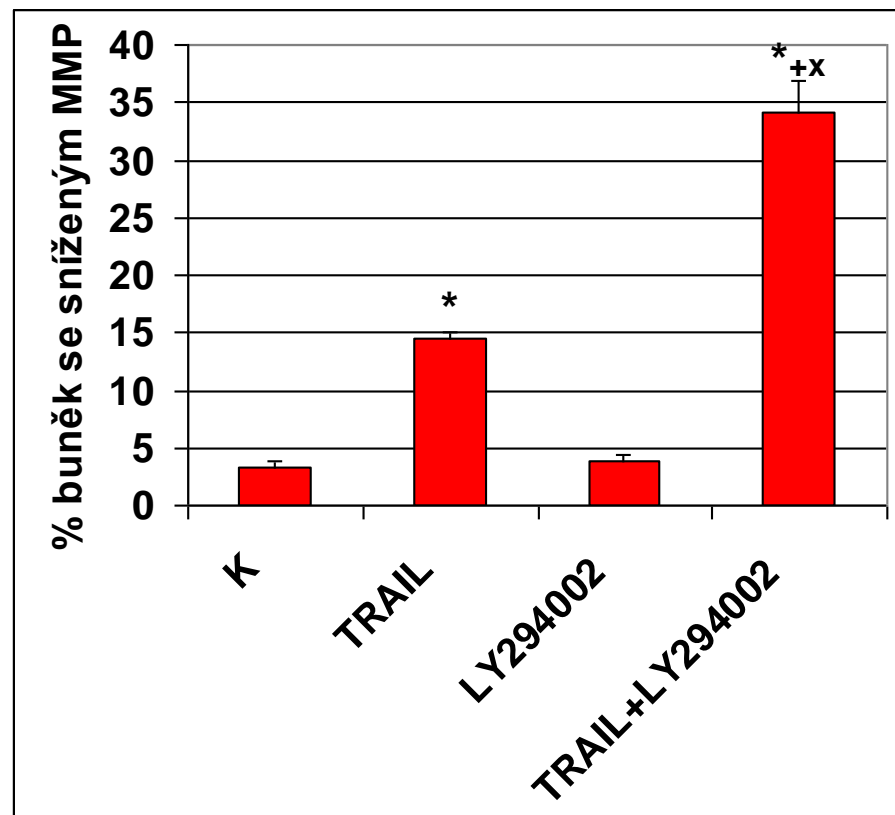
Posílení apoptózy indukované TRAILem v podmínkách specifické inhibice dráhy PI3K/Akt





Specifická inhibice signální dráhy PI3K/Akt významně zcitlivuje nádorové buňky tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem

MMP (TMRE, FCM)



FEBS Letters 580 (2006) 6565–6569

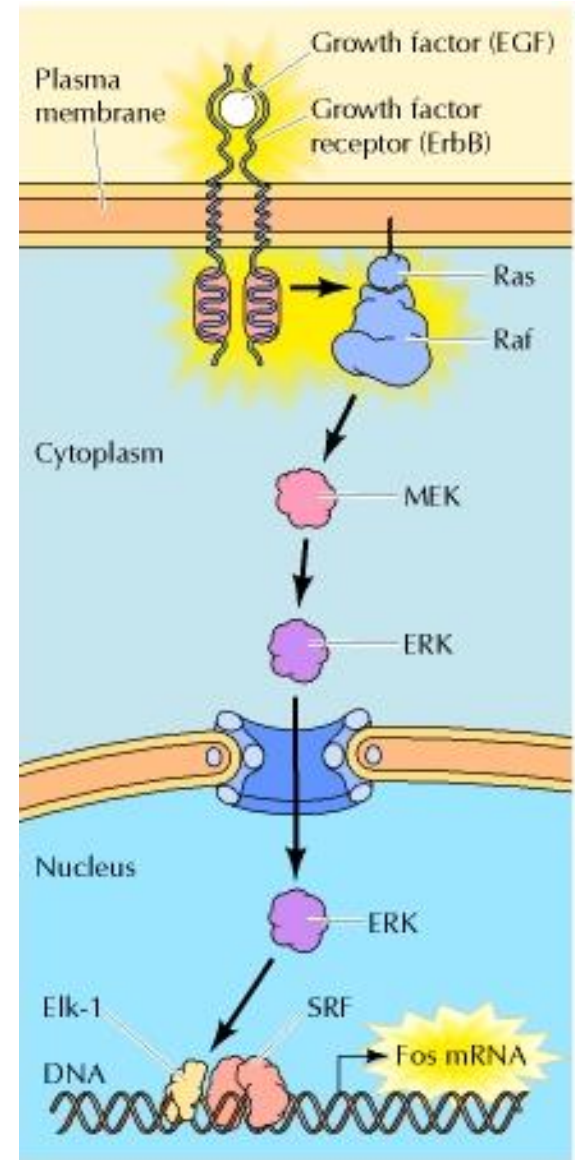
Different modulation of TRAIL-induced apoptosis by inhibition of pro-survival pathways in TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant colon cancer cells

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

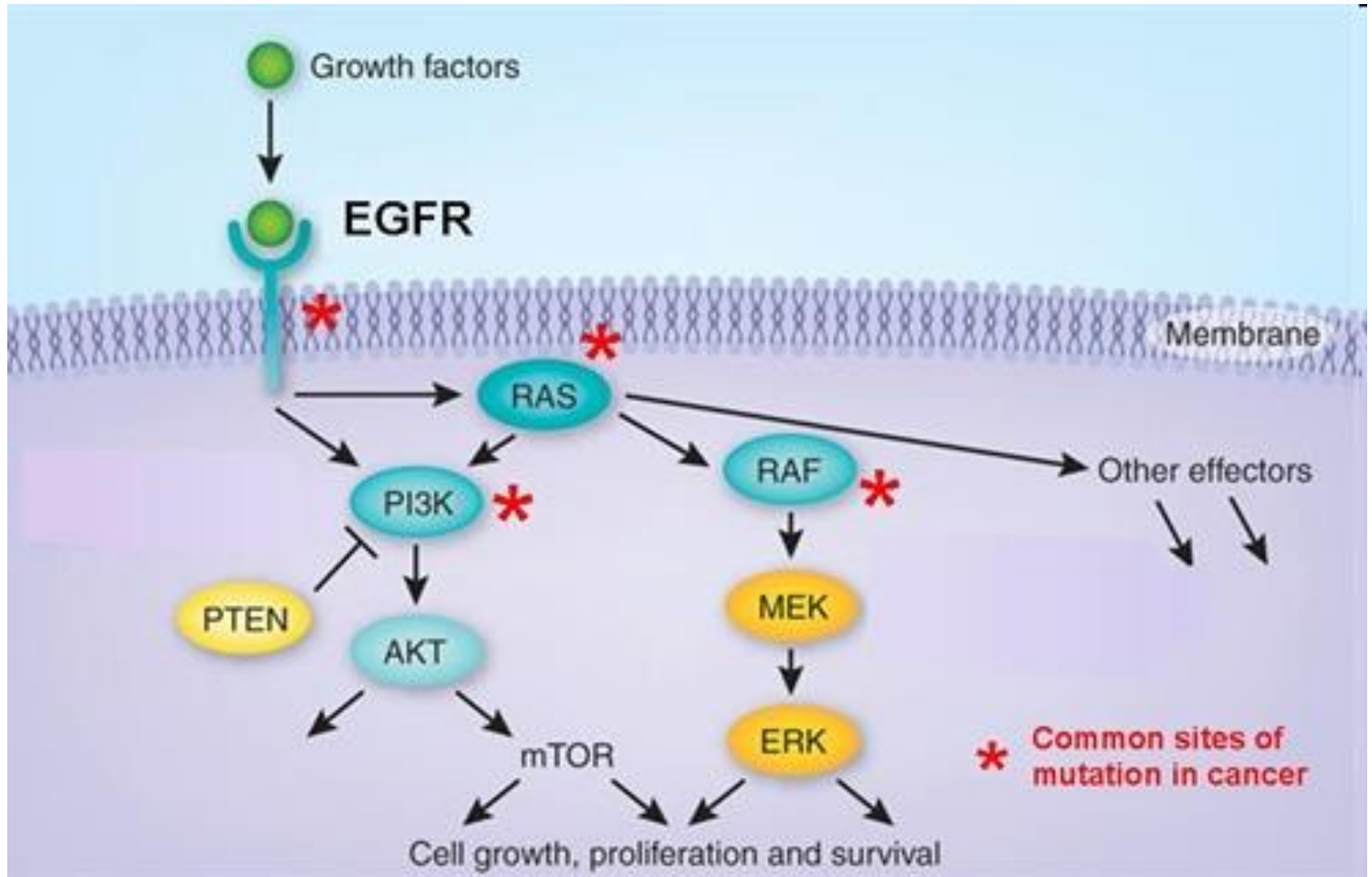
Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

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

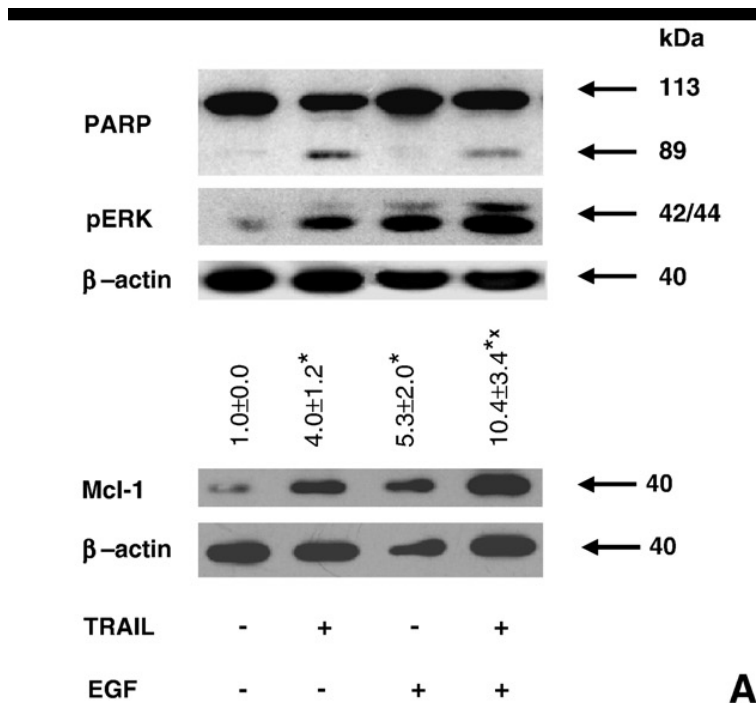
Table 1: Components of the EGFR signaling pathway important in colorectal cancer.

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)

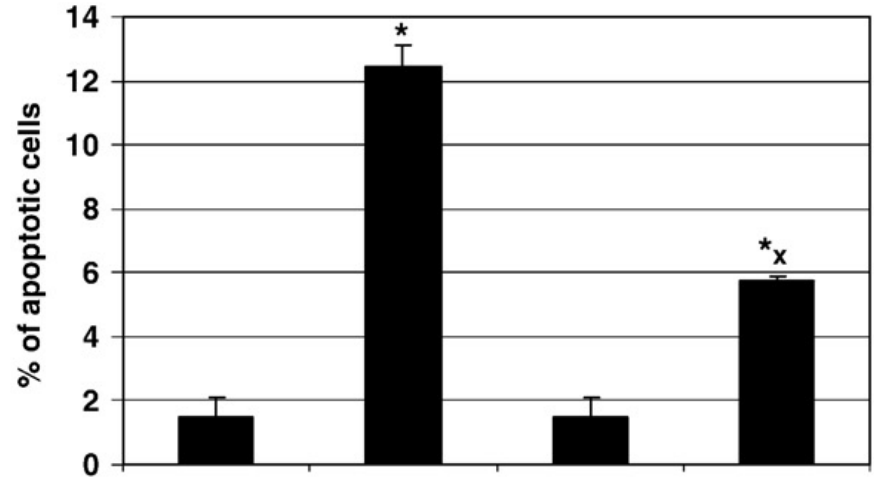
CRC: colorectal cancer; LOH: loss of heterozygosity; wt: wild-type.

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

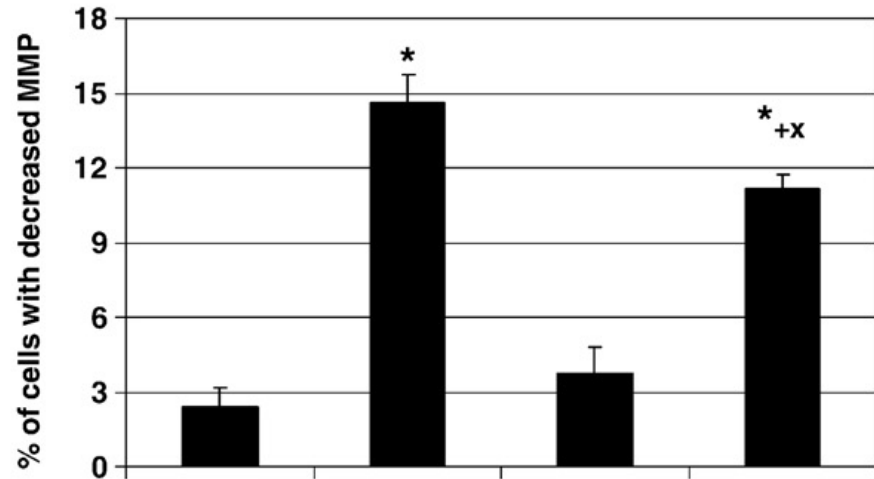
EGF snižuje citlivost nádorových buněk tlustého střeva k apoptóze indukované TRAILem



A



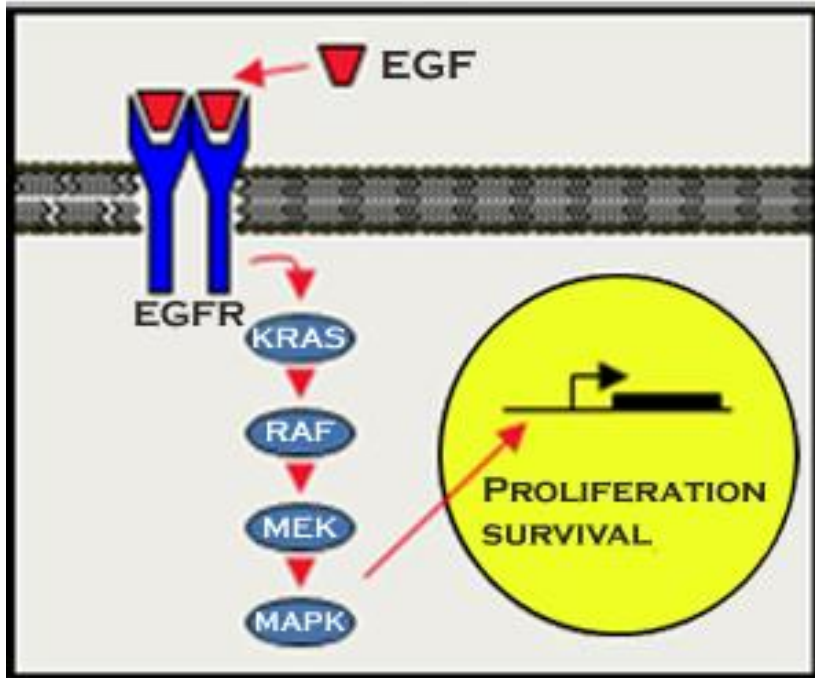
B



C

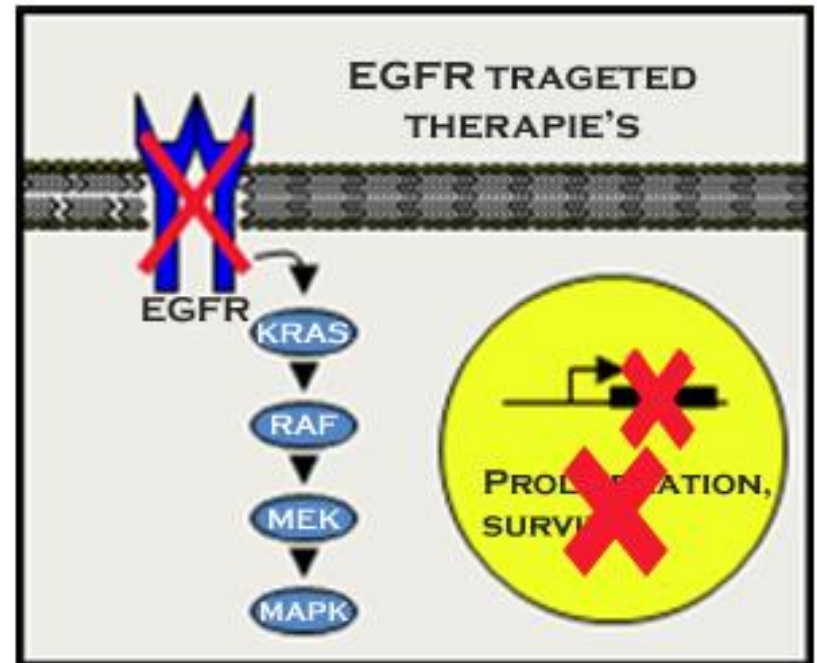
Dráha EGFR vs. nádorové onemocnění

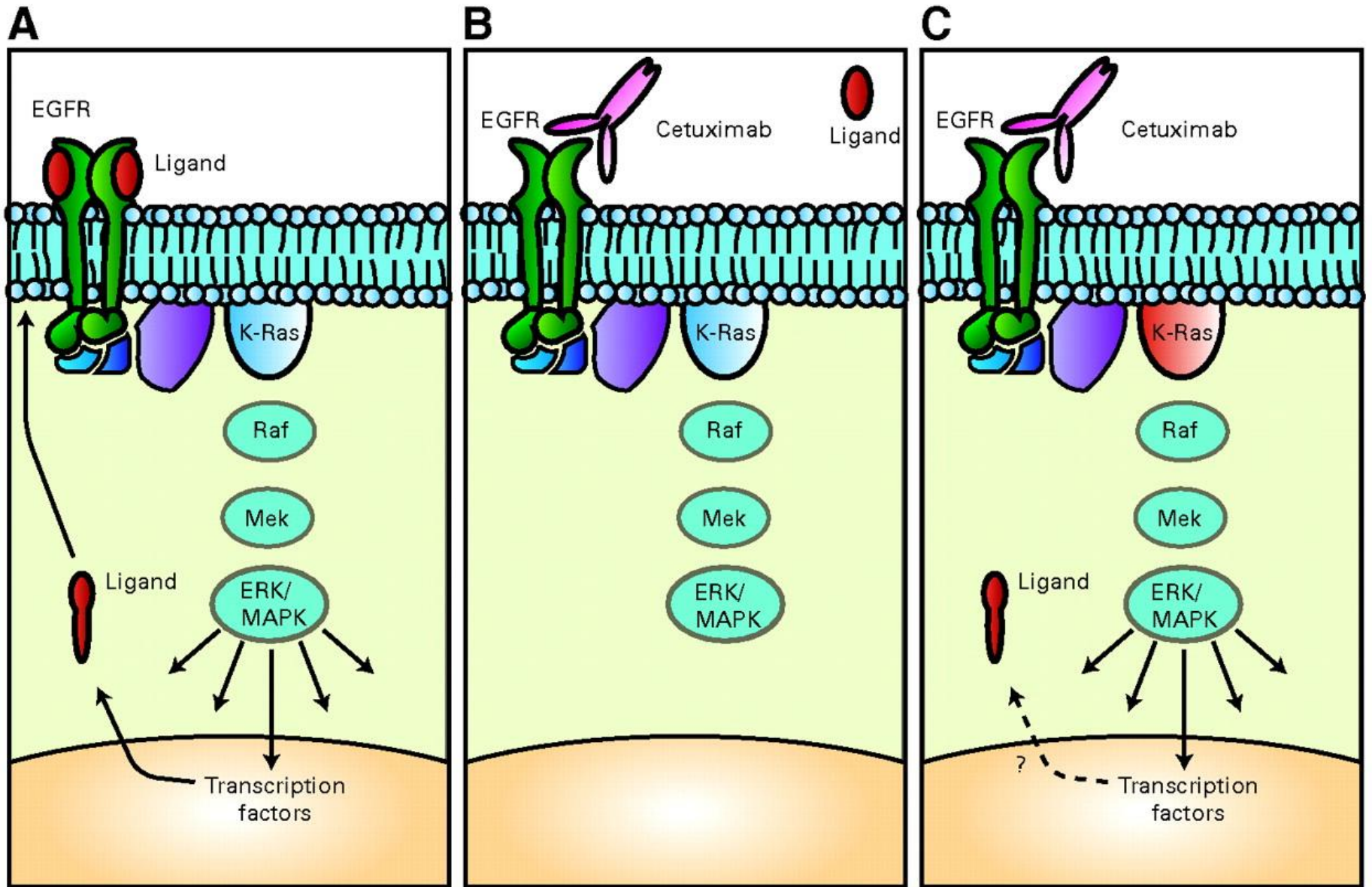
- **Vysoká exprese EGFR a posílená aktivace dráhy EGFR**
 - během progresu nádorových onemocnění
 - přispívá k rezistenci nádorů k chemo- a radioterapii, ke zvýšené proliferaci nádorových buněk
- ***Stimulace EGFR vede také k podpoře neoangionegeze a migrace buněk***
- **Blokace EGFR dráhy -**
 - využití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

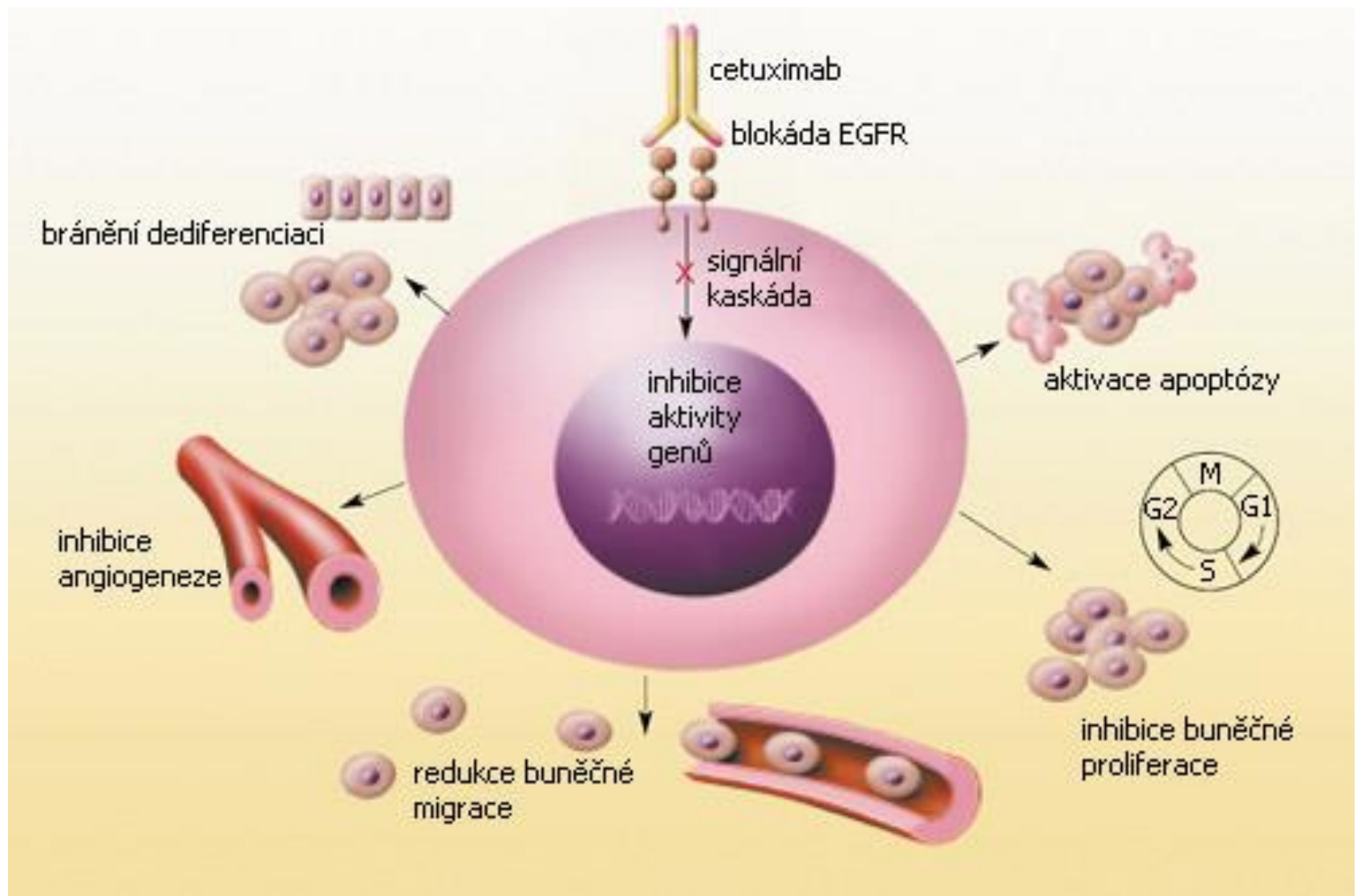


In cancer cells, activation of the EGFR or related pathways induces genes implicated in tumor progression.

EGFR targeted therapies block the activation of this signaling pathway.







Cetuximab (marketed under the name Erbitux)

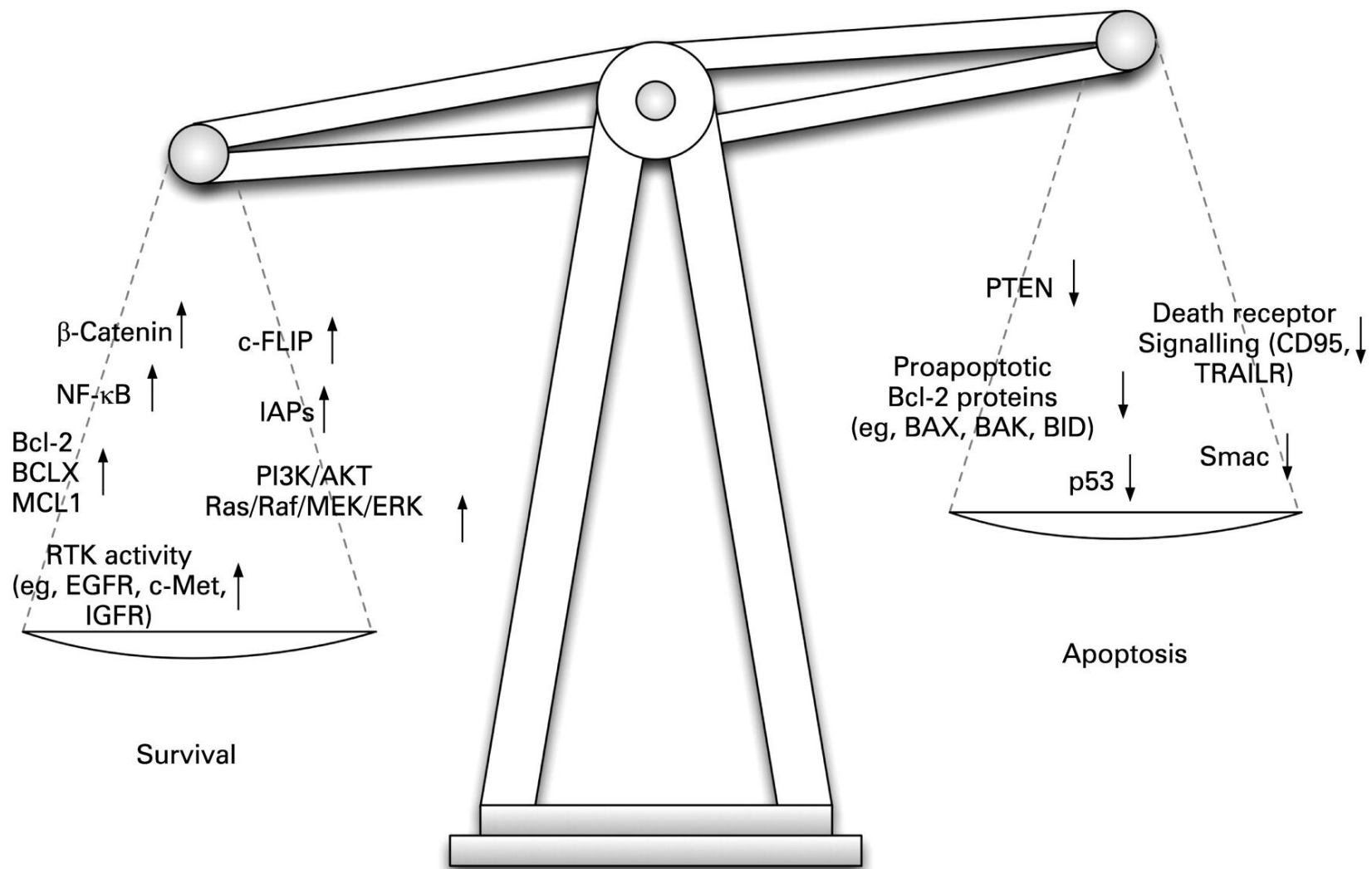
- a monoclonal antibody, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor
- given by intravenous infusion for treatment of metastatic colorectal cancer
- manufactured and distributed in North America by ImClone and Bristol-Myers Squibb, while in the rest of the world distribution is by Merck KGaA
- 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



- 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



(Schulze-Bergkammen, 2009)

Hyršlová Vaculová A., 2013

- **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...)