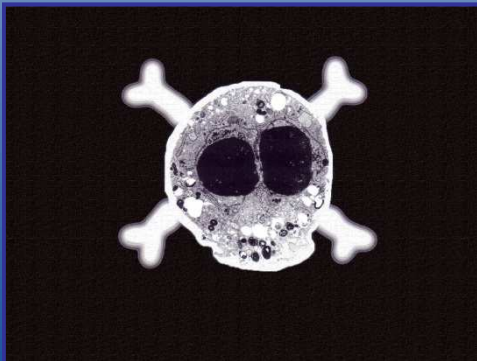


Buněčná smrt

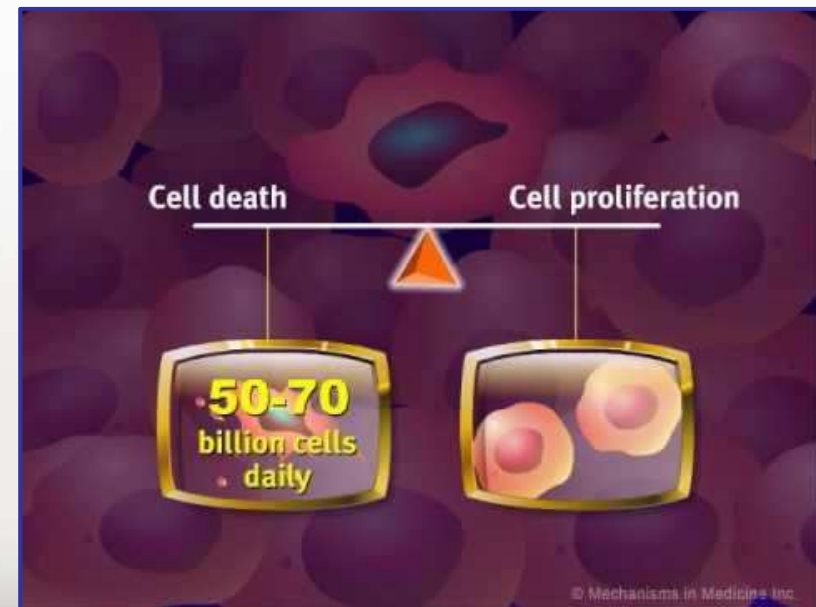
Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU



Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot
21.11.2019

Umírání je přirozené

- každý den v našem těle odumírají desítky miliard buněk
- každý rok odumře a vymění se tolik buněk, kolik odpovídá zhruba počtu buněk v celém těle
- zdravá buňka je vždy připravena zemřít, sebedestrukční mechanismus se spustí pouhou absencí signálů „pro-survival“



Buněčná smrt

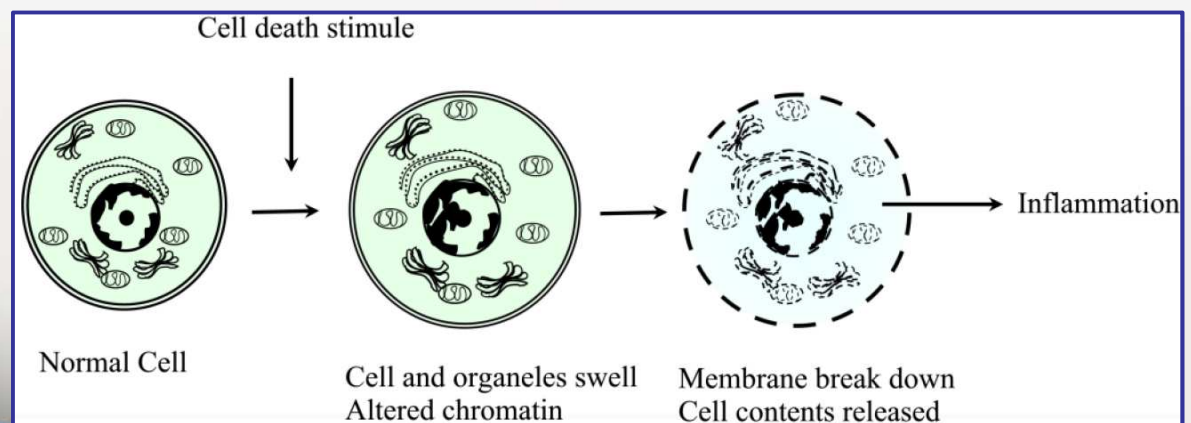
- přirozený jev, jehož výsledkem je nevratné ukončení funkcí buňky, jako jsou růst, dělení a metabolická homeostáze

Programovaná

- zprostředkovaná specifickým signálním systémem
- prospěšná pro organismus, jehož je umírající buňka součástí
- popsána u rostlin i mnohobuněčných živočichů

Neprogramovaná (nekróza)

- nastává neregulovaně z vnějších příčin
- otok a rozpad buňky
- záněť



Typy buněčné smrti

- **apoptóza:** zprostředkovaná kaspázami během vývoje, stárnutí nebo jako odezva na specifické podněty
- **autofagie:** rozklad buněčných složek v lysosomech
- **excitotoxicita:** smrt nervových buněk v důsledku přílišné aktivace receptorů pro nervové přenašeče
- **anoikis:** důsledek poruchy interakcí, které buňku ukotvují v matrix
- **nekróza:** indukovaná nespecifickým traumatem
- **nekroptóza:** nekróza s prvky regulace indukovaná specifickým stimulem, bez účasti kaspáz, spoluúčast kináz RIP, pomoc při obraně proti patogenům



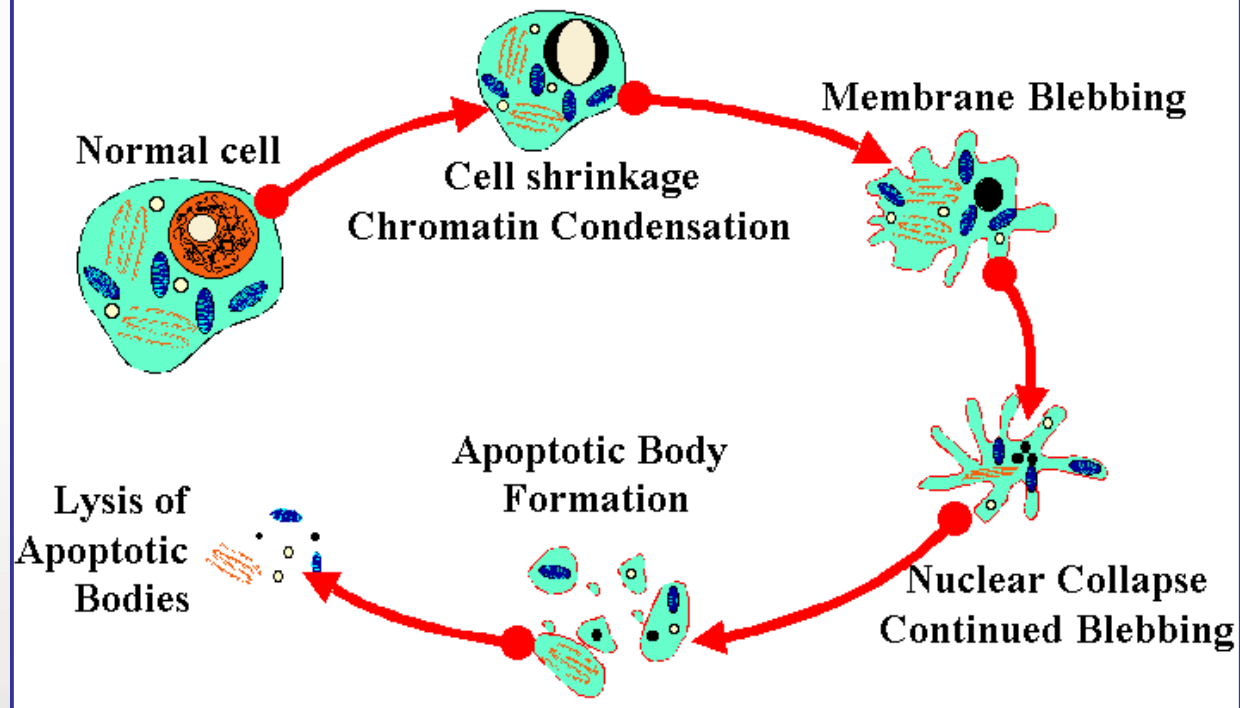
Nekróza:

- nepřírozený proces
- obvykle důsledek zranění
- postihuje současně soubory buněk
- bez požadavků na energii
- zvětšení buňky
- poškození mitochondrií
- poškození membrán
- celková dezintegrace
- uvolnění nitrobuněčných komponent
- fagocytóza odumřelých buněk neutrofily a makrofágy
- vznik zánětu

Apoptóza:

- přirozená a programovaná eliminace nepotřebných nebo poškozených buněk
- postihuje jednotlivé buňky
- vyžaduje energii
- zmenšení buňky
- mitochondrie dlouho intaktní
- integrita membrán nepoškozena
- postupný rozklad buněčných struktur
- kondenzace chromatinu
- fragmentace jádra
- odbourání cytoskeletu
- fragmentace DNA mezi nukleozomy
- pohlcení apoptotických tělísek okolními buňkami

Apoptosis (Programmed Cell Death)



Historie objevu buněčné smrti

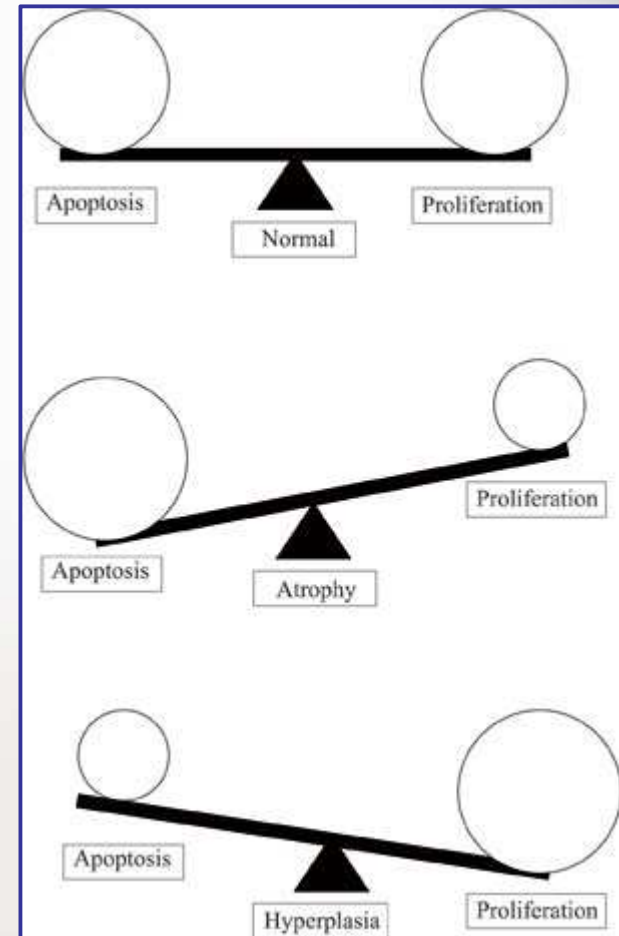
- objevitelem principu je německý vědec **Karl Vogt** (1842) studující metamorfózu obojživelníků
- přesnější vhléd: **Walther Flemming** (1882) zdůrazňuje fyziologickou povahu buněčné smrti
- strukturní změny doprovázející apoptózu a odlišnosti od nekrózy popisuje australský patolog **John Kerr** (1972)
- molekulární mechanismus odhalují **Sydney Brenner, Robert Horvitz** a **John Sulston** (Nobelova cena 2002)



John Kerr
(*1934)

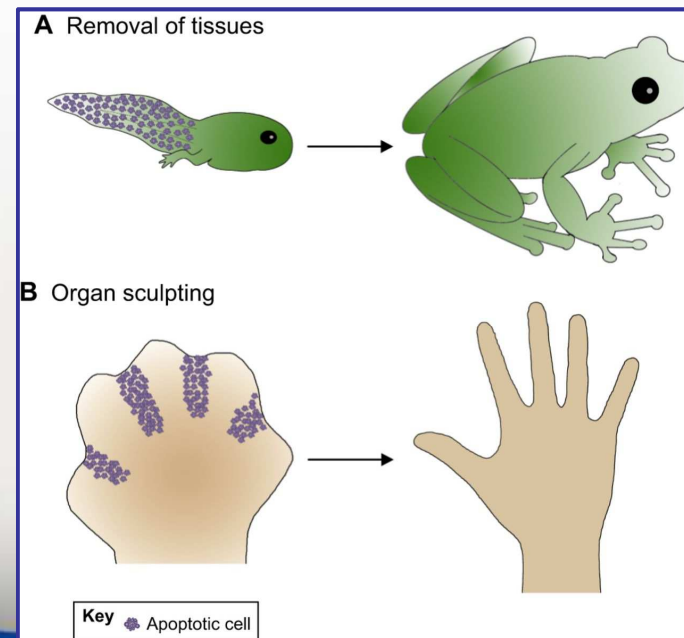
Význam apoptózy

- embryonální vývoj
- tvorba nervových spojení
- formování orgánů („sculpting“)
- udržování homeostáze
- fyziologické funkce u dospělých orgánů (retrakce mléčné žlázy)
- eliminace poškozených nebo geneticky aberantních buněk (reakce na silné, neopravitelné poškození genomové DNA, extrémní kyslíková deprivace, významná signální nerovnováha, apod.)



Apoptóza a formování orgánů

- apoptózou jsou během morfogeneze odstraňovány nežádoucí buňky – tvorba funkčních tkání a orgánů
- geneticky pozměněné myši, které postrádají klíčové složky apoptotického aparátu vykazují typické vývojové poruchy: nadbytek neuronů v mozku, obličejové abnormality, poruchy formování prstů, atd.



Apoptóza a likvidace nežádoucích buněk

nežádoucí jsou všechny buňky představující riziko pro integritu organismu:

- buňky infikované viry
- buňky s poškozenou DNA
- buňky s nahromaděnými chybně složenými proteiny
- nádorové buňky

Nežádoucí procesy spojené s deregulovanou apoptózou

- přílišná apoptóza poškozuje tkáně (degenerativní procesy)
- nedostatečná apoptóza buňky predisponuje k hromadění genetických poruch a tvorbě nádorů



Table 1. Apoptosis in disease

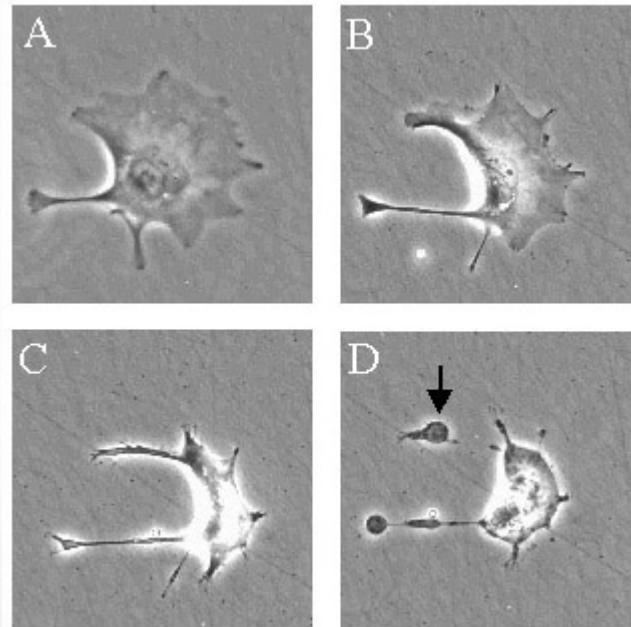
Too much	Too little
AIDS	Canale–Smith syndrome
Liver failure	(CSS; autoimmune lymphoproliferative syndrome)
Wilson disease	Lymphoma
Myelodysplastic syndromes	Leukemia
Neurodegenerative diseases	Solid tumors
Multiple sclerosis	Autoimmune diseases
Aplastic anemia	(e.g., hypereosinophilia syndrome, lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Graves disease)
Chronic neutropenia	
Type I diabetes mellitus	
Hashimoto thyroiditis	
Ulcerative colitis	

Listed are diseases in which dysregulation of apoptosis has been shown or is currently being discussed as being involved.

Induktory programované buněčné smrti

- vývojové signály
- nedostatek základních růstových faktorů a živin
- vysoký stupeň poškození DNA
- teplotní šok, ionizující záření a jiné stresové podněty
- infekce virem
- buňky imunitního systému, které splnily svou úlohu
- ztráta přichycení k substrátu (anoikis)
- útok cytotoxickým lymfocylem

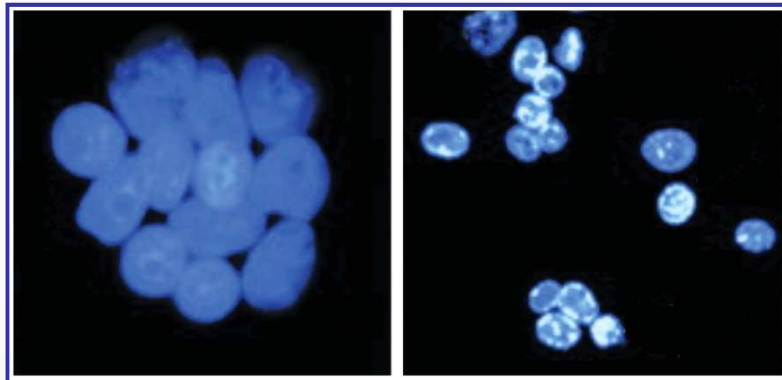
Průběh apoptózy



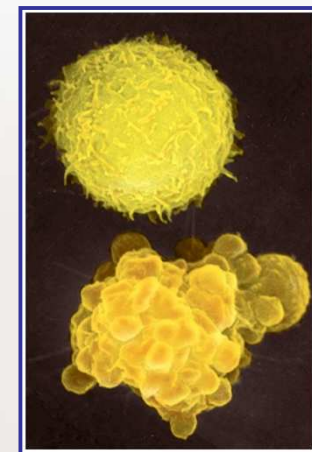
<https://www.youtube.com/watch?v=NwkHcwloBRg>
<https://vimeo.com/173473536>

Průběh apoptózy

- jádro: zahuštění a fragmentace

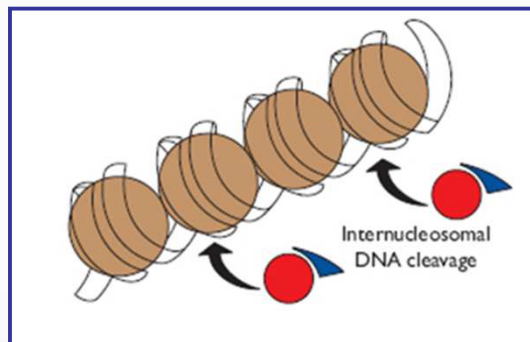


- plazmatická membrána: vychlípeniny

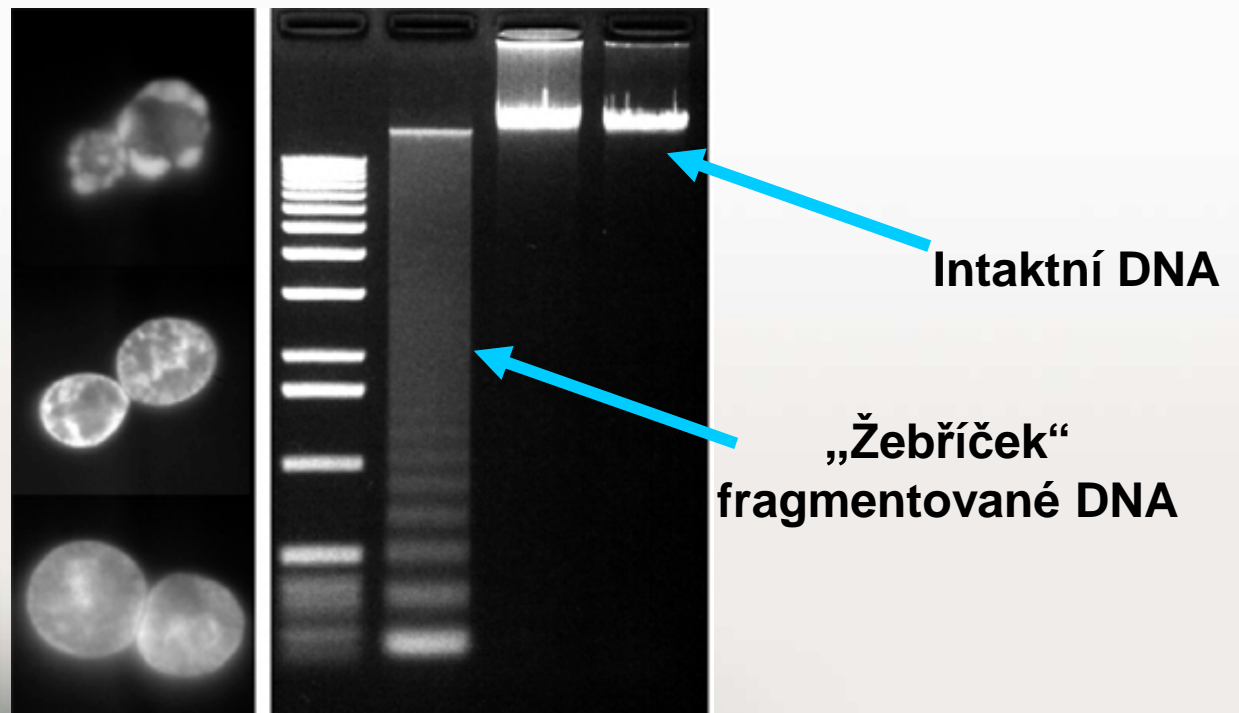


Průběh apoptózy

- chromozomová DNA: štěpení mezi nukleozomy



- snadná detekce agarózovou elektroforézou



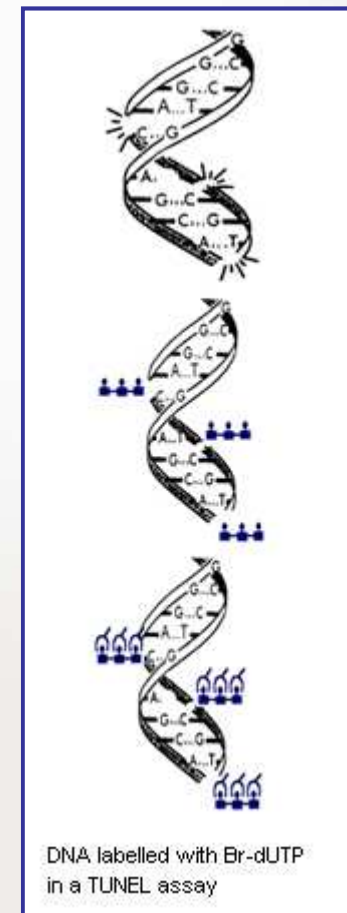
Markery apoptózy

- aktivace DNázy - internukleozomální fragmentace DNA
- dimerizace proteinů rodiny Bcl-2
- uvolnění cytochromu c
- aktivace kaspáz
- translokace fosfatidylserinu
- přetrvávající produkce ATP
- absence zánětu

Detekce apoptózy

Fragmentaci DNA např. technikou **TUNEL** (**T**erminal deoxynucleotide transferase **d**UTP **N**ick **E**nd **L**abeling)

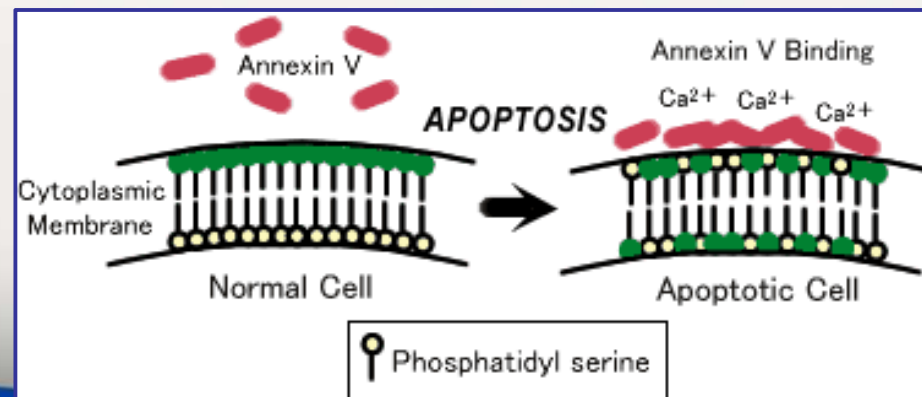
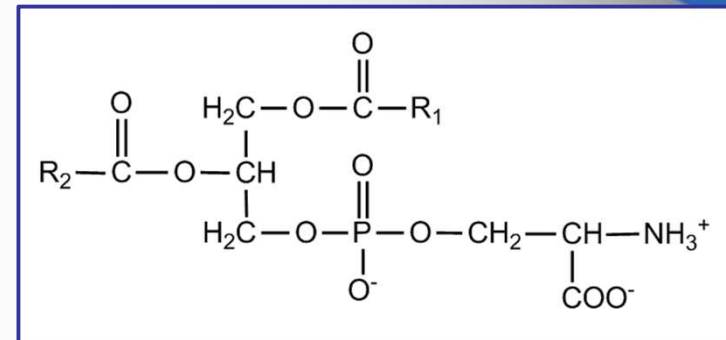
- připojení značených „bromovaných“ nukleotidů Br-dUTP k volným 3' OH koncům fragmentované DNA **terminální deoxynukleotidyl transferázou**
- detekce nukleotidů Br-dUTP začleněných do DNA značenou monoklonální protilátkou
- detekce průtokovou cytometrií nebo imunohistochemicky



Detekce apoptózy

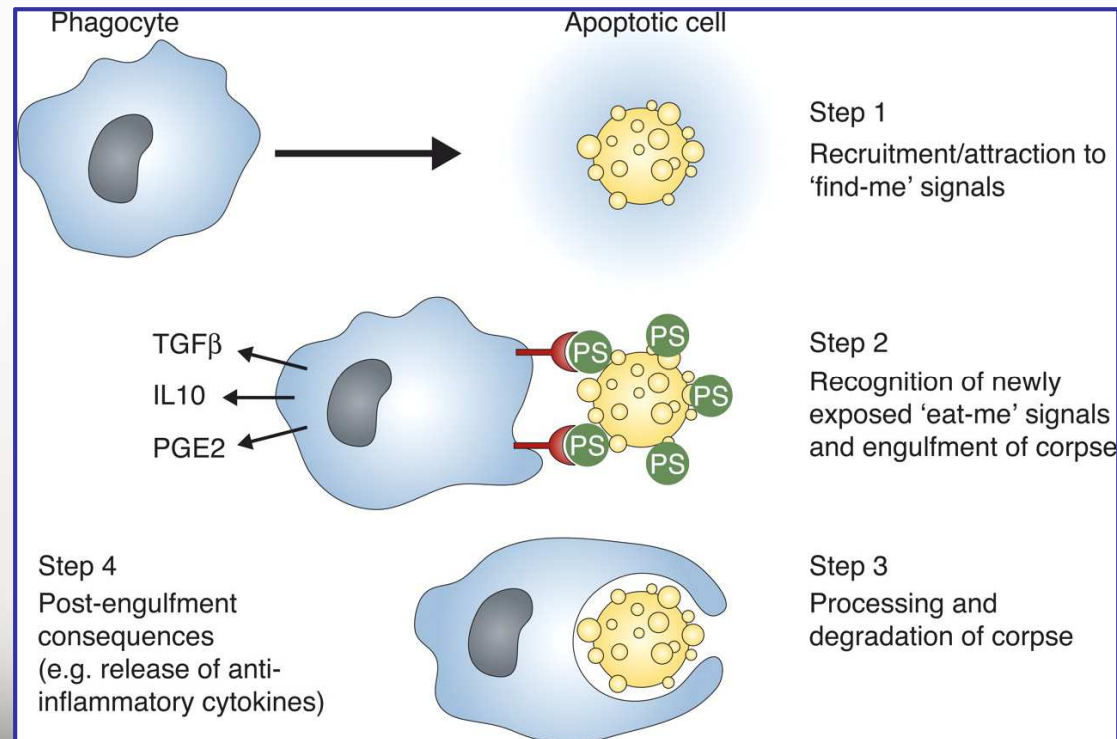
Změna pozice fosfolipidu **fosfatidylserinu**

- složka buněčných membrán
- nese záporný náboj
- v plazmatické membráně není rozložen rovnoměrně, ale jen ve vnitřní vrstvě
- umístění ve vnější vrstvě membrány nastává u apoptotických buněk a představuje signál pro makrofágy, aby je pozřely
- detekce pomocí Annexinu V (který se na PS váže) konjugovaného s fluorescenční značkou fluorescenční mikroskopií nebo průtokovou cytometrií

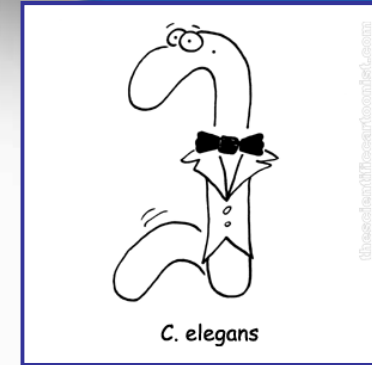


Zakončení apoptózy

apoptotická tělíska pohlcena fagocytózou

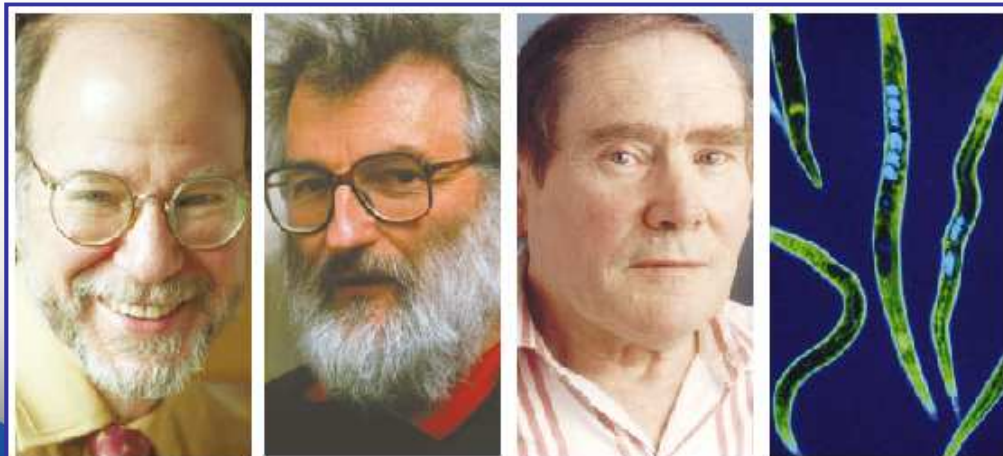


Objev mechanismu apoptózy



v 80. letech 20. stol. na modelu *C. elegans* (Hád'átko obecné)

Robert Horvitz, John Sulston, Sydney Brenner



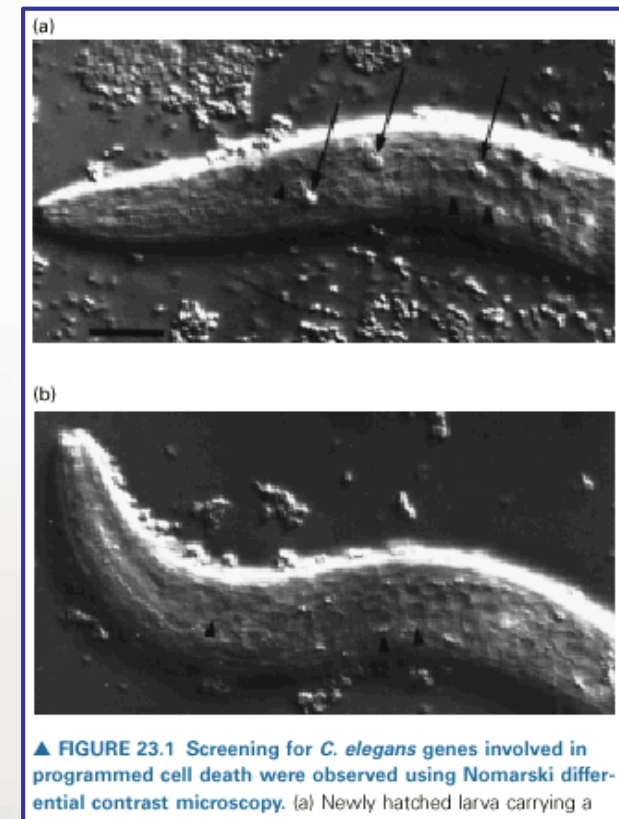
Developing a theme: (from left) Robert Horvitz, John Sulston and Sydney Brenner have won the 2002 physiology Nobel for their work on the biology of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

**Nobelova cena
2002**

Objev mechanismu apoptózy

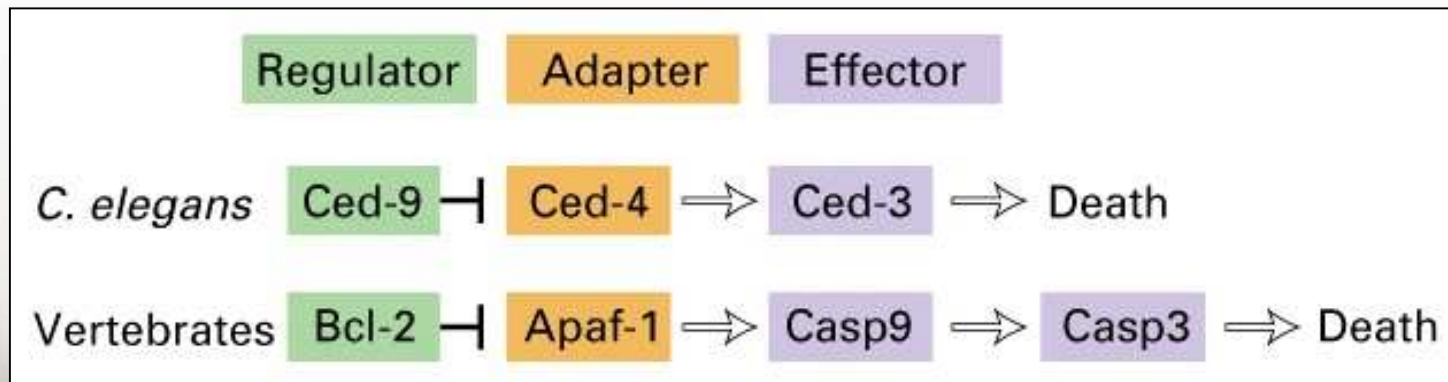
Horvitz a kol.

- odhalení mutace *ced-1* u vyvíjející se larvy, která brání odstranění mrtvých buněk
- následuje objev mutace *ced-3* u mutantů *ced-1*, která brání buněčné smrti
- gen *ced-3* kóduje kaspázu - klíčový enzym apoptózy



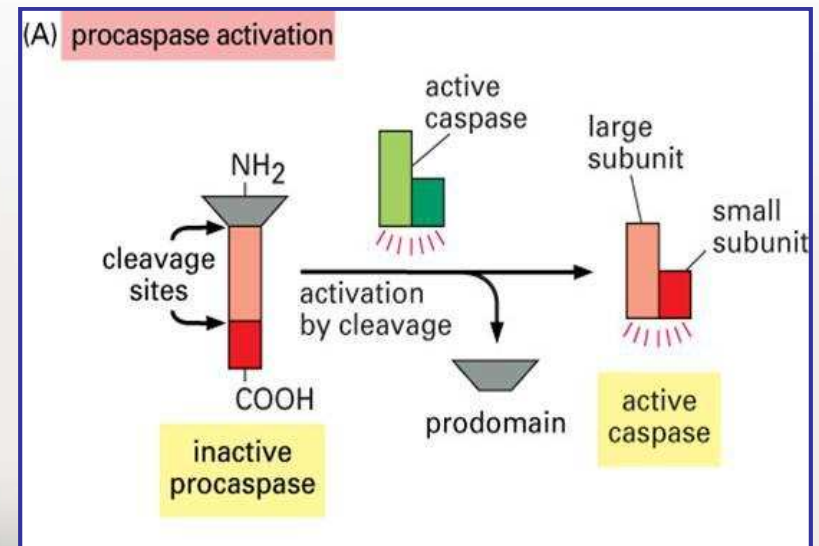
V apoptotické signalizaci se uplatňují tři skupiny proteinů

- regulátory
- adaptéry
- efektory



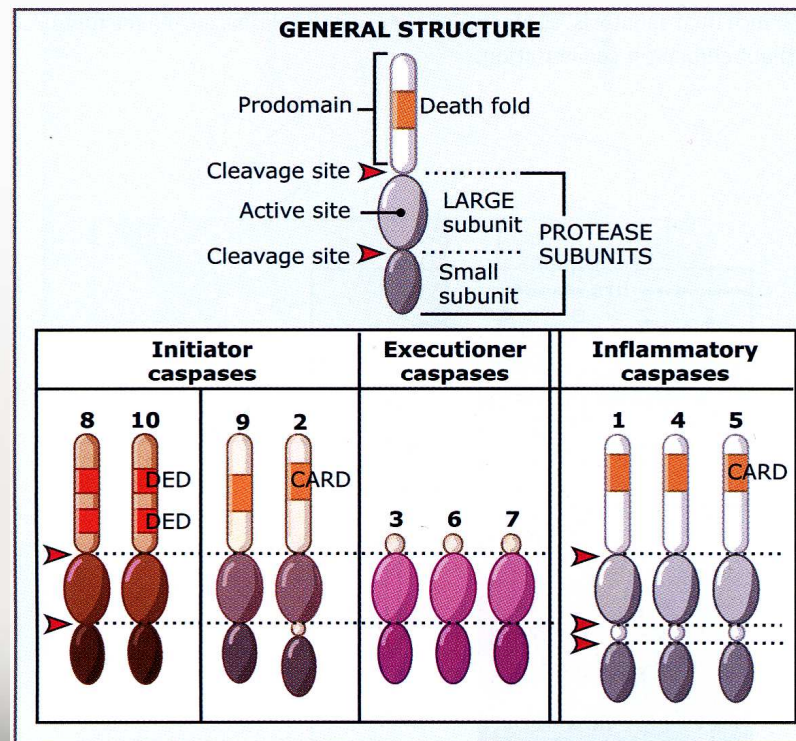
Kaspázy- výkonné složky apoptózy

- cysteinyl **asp**artát-specifické proteázy (cystein je přítomen v aktivním místě enzymu; kyselina asparagová je přítomna v cílovém místě štěpeného substrátu)
- syntetizovány jako inaktivní zymogeny – **prokaspázy**
- obsahují N-koncovou pro-doménu, malou a velkou podjednotku
- aktivují se odštěpením pro-domény



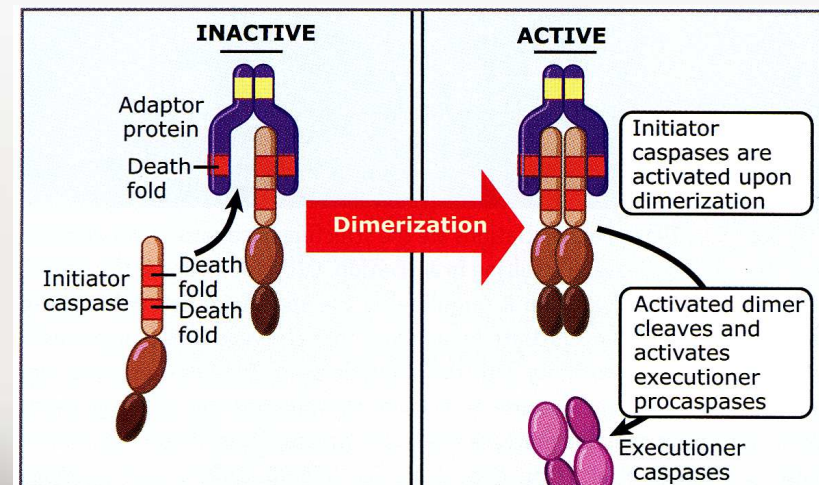
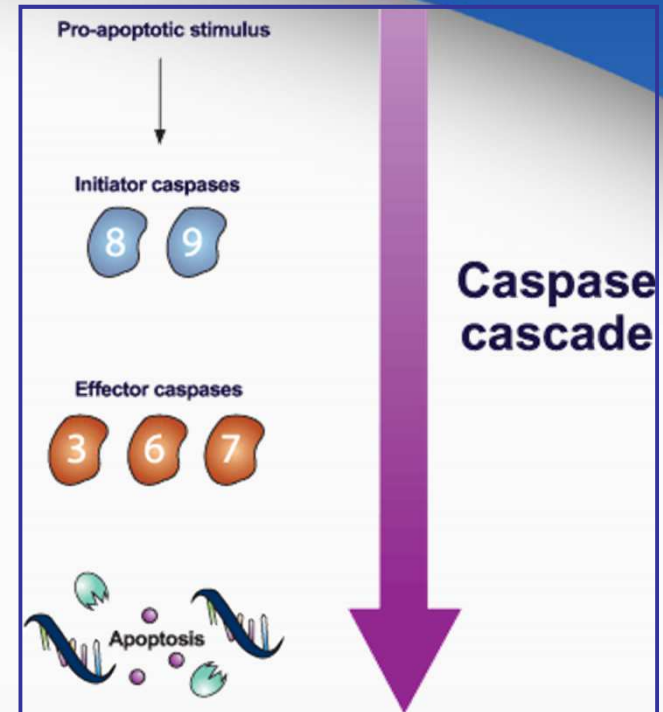
Kaspázy

- degradují klíčové buněčné struktury
- mohou se uplatnit jako iniciátory i efekторы
- dosud známo 13 členů rodiny kaspáz, které se dělí na iniciační, exekuční a záněťové



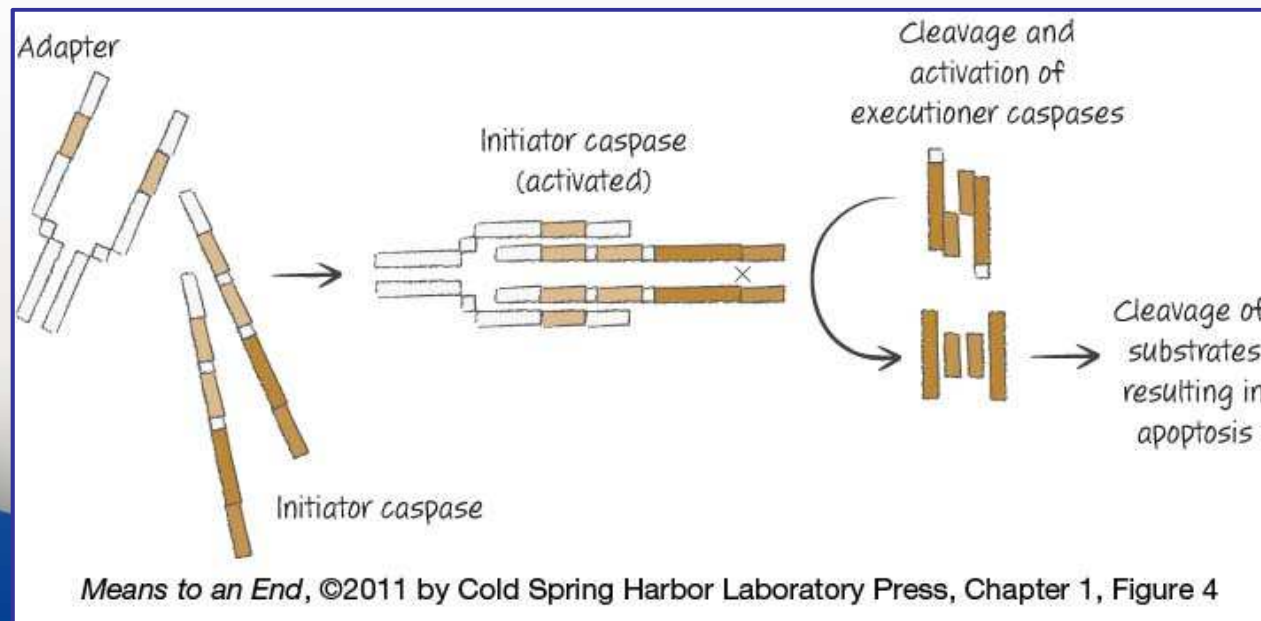
Iniciační kaspázy 2, 8, 9, 10

- velká pro-doména na N-konci pro meziproteinové interakce
- fungují jako iniciátory procesů buněčné smrti – aktivují exekuční kaspázy
- v inaktivní formě monomerní
- při aktivaci pomocí adaptérových molekul dimerizují



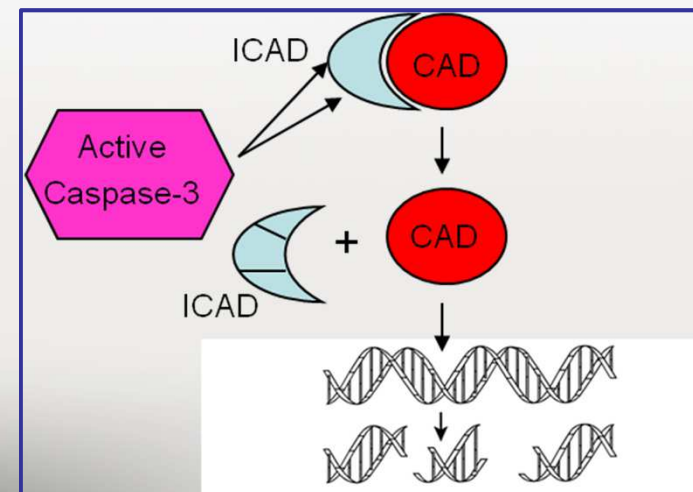
Exekuční kaspázy 3, 6, 7

- malá pro-doména na N-konci
- aktivují se štěpením ve specifických místech – vytvoří se přístupné aktivní místo
- štěpí různé substráty, které přímo způsobují morfologické a biochemické změny v apoptotických buňkách



Příklady substrátů exekučních kaspáz

- **FAK** (focal adhesion kinase): stimuluje adhezi buněk
- **jaderná lamina** (kondenzace chromatinu a pyknóza jádra)
- **aktin, plektin, vimentin, gelsolin** (intermediární filamenta): kolaps cytoskeletu a tvorba vychlípenin plazmatické membrány: tvorba apoptotických tělísek
- **inhibitor kaspázou-aktivované DNázy (ICAD)** uvolňuje DNázu CAD (caspase-aktivované DNáze), která pak fragmentuje DNA
- proteiny související s regulací **buněčného cyklu** (Wee1, cyklin A), **replikací** (topoizomeráza I), **transkripcí** (Sp-1), **signalizací** (kináza C)
- enzymy zapojené do **opravy DNA**



Jak jsou kaspázy aktivovány?

specifickými induktory:

- vnitřními podněty: abnormalitami ve struktuře DNA, nitrobuňčným stresem
- vnějšími podněty: absencí růstových faktorů, přítomností specifických cytokinů aktivujících receptory smrti (TNF, ligand Fas)
- vysokou teplotou, zářením, chemickými látkami

geneticky naprogramovanými jevy v průběhu embryogeneze

Dvě signální dráhy apoptózy: vnitřní a vnější

vnitřní dráha



cytochrom c



kaspázy



buněčná smrt

vnější dráha



receptory smrti



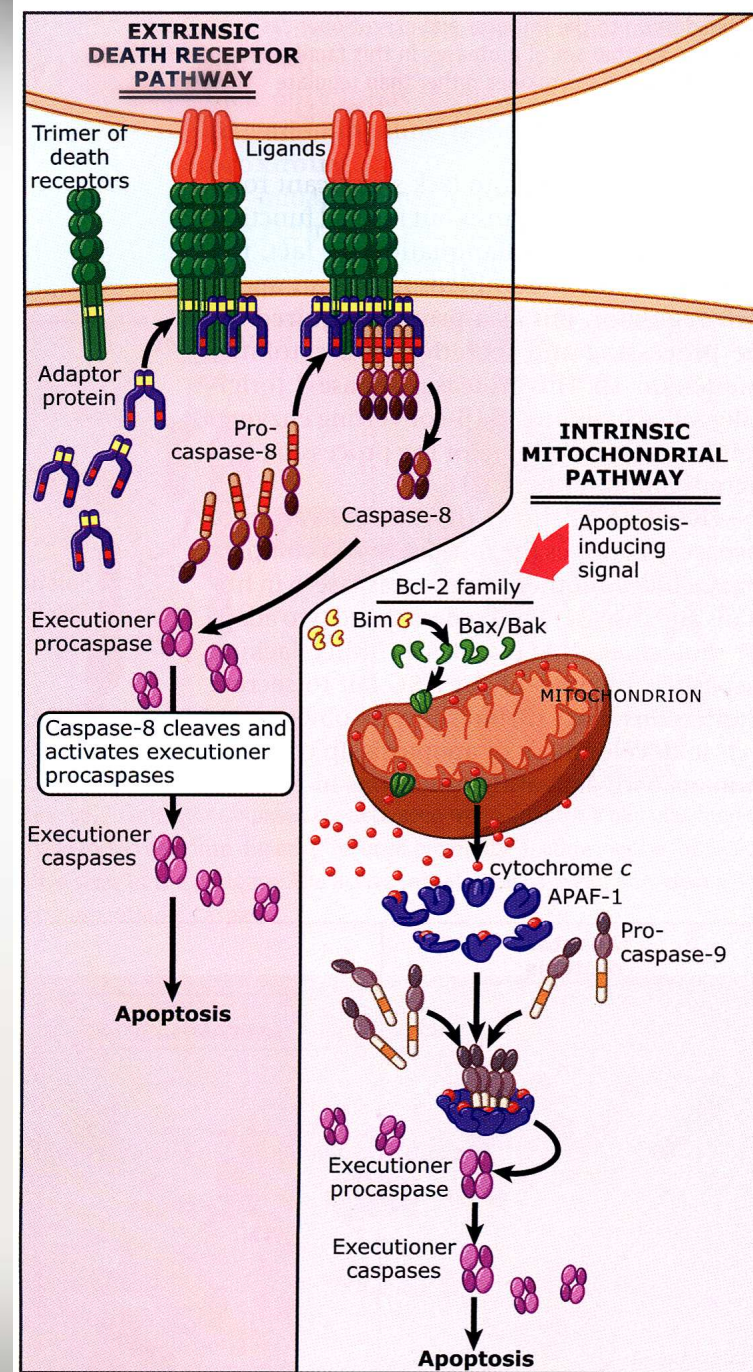
kaspázy



buněčná smrt

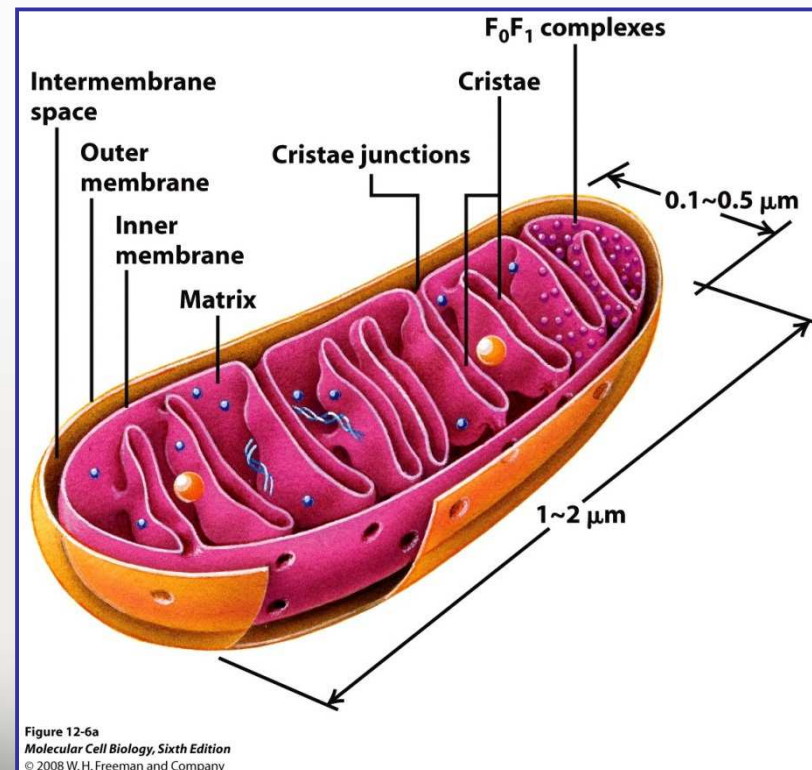
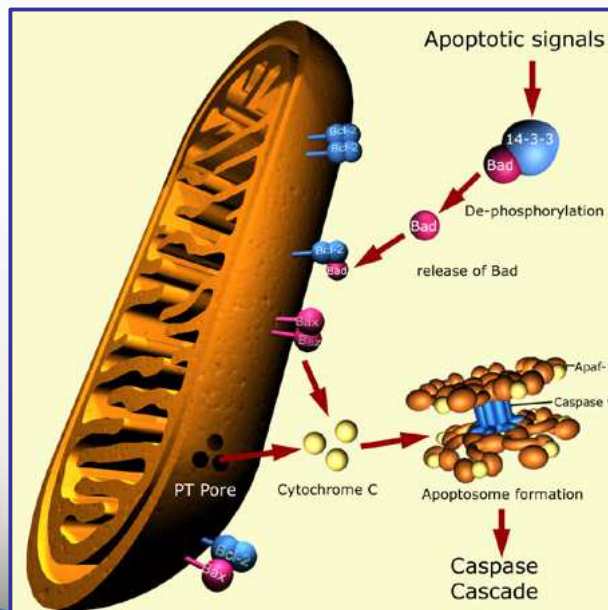
Signální dráhy apoptózy

- **mitochondriální (vnitřní)** aktivovaná změnou permeability vnější mitochondriální membrány
- **receptorová (vnější)** aktivovaná vazbou ligandů smrti na příslušné membránové receptory



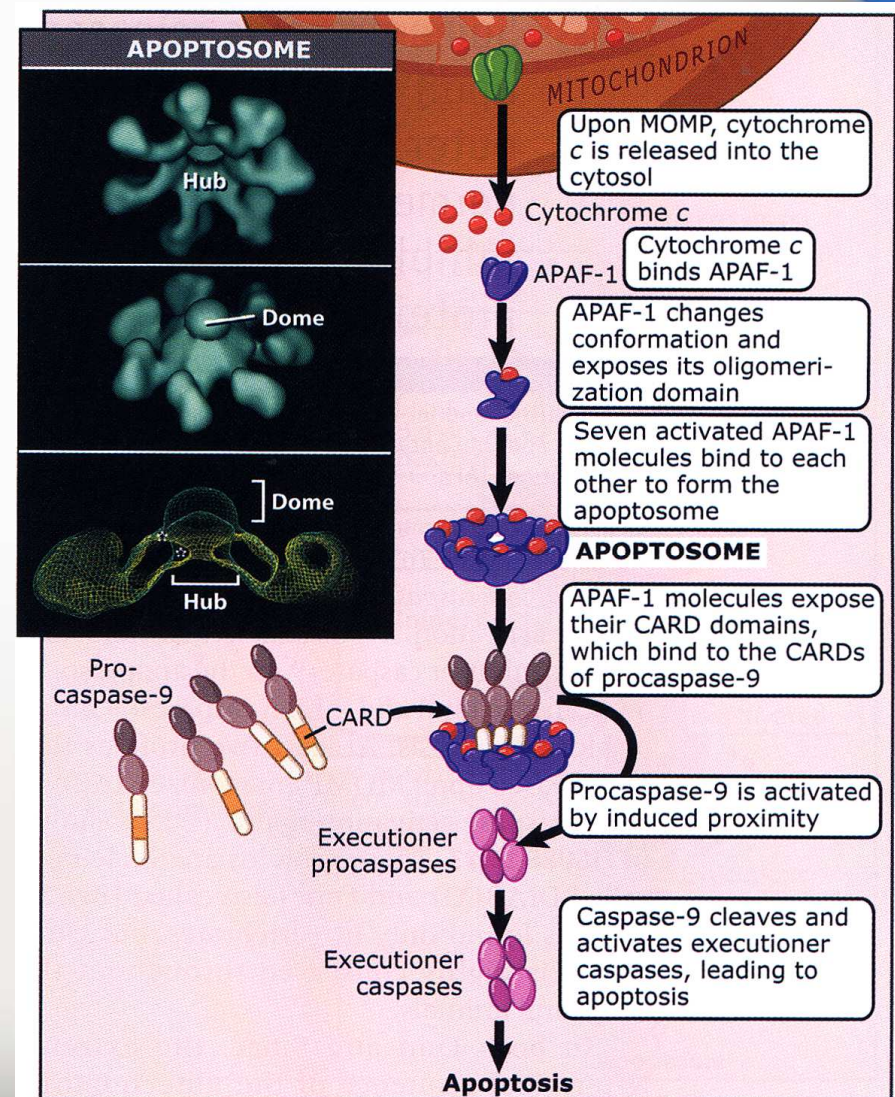
Vnitřní signální dráha

- jádrem jsou **mitochondrie** a **cytochrom c** obsažený v prostoru mezi vnější a vnitřní membránou
- kritická je translokace cytochromu c do cytozolu



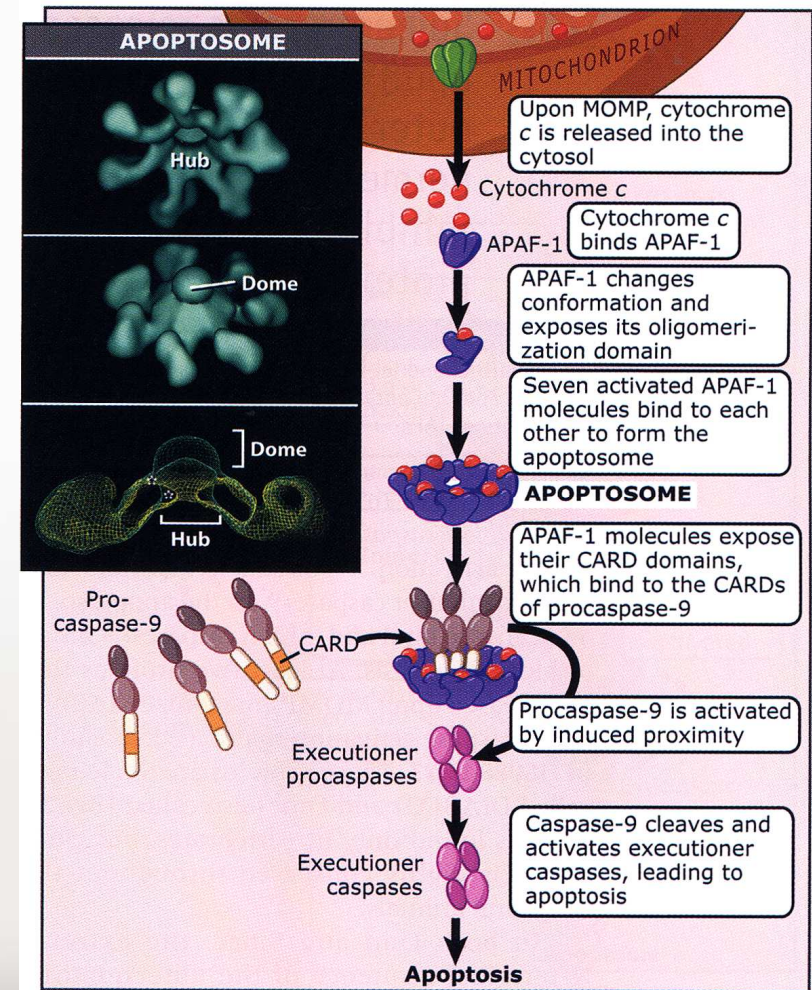
Cytochrom c

- mitochondriální protein zapojený do dýchacího řetězce jako elektronový přenašeč
- permeabilizovanou vnější membránou mitochondrie proniká z mezimembránového prostoru do cytozolu
- váže se na **Apaf-1** („Apoptotic protease activating factor“)
- Apaf-1 mění konformaci - vazba dATP
- vazbou dATP se konformace Apaf-1 mění znovu, obnaží oligomerizační doménu



Cytochrom c

- 7 molekul Apaf-1 se spojuje do komplexu - **apoptozomu**
- apoptozom váže iniciační **prokaspázu 9**
- molekuly prokaspázy 9 se v apoptozomu dostávají do těsné blízkosti, následkem je jejich aktivace
- aktivovaná kaspáza 9 aktivuje **exekuční kaspázy** (kaspázy 3 a 7)
- štěpením svých substrátů navodí běžné morfologické a biochemické znaky apoptózy



Co rozhoduje o uvolnění cytochromu c?

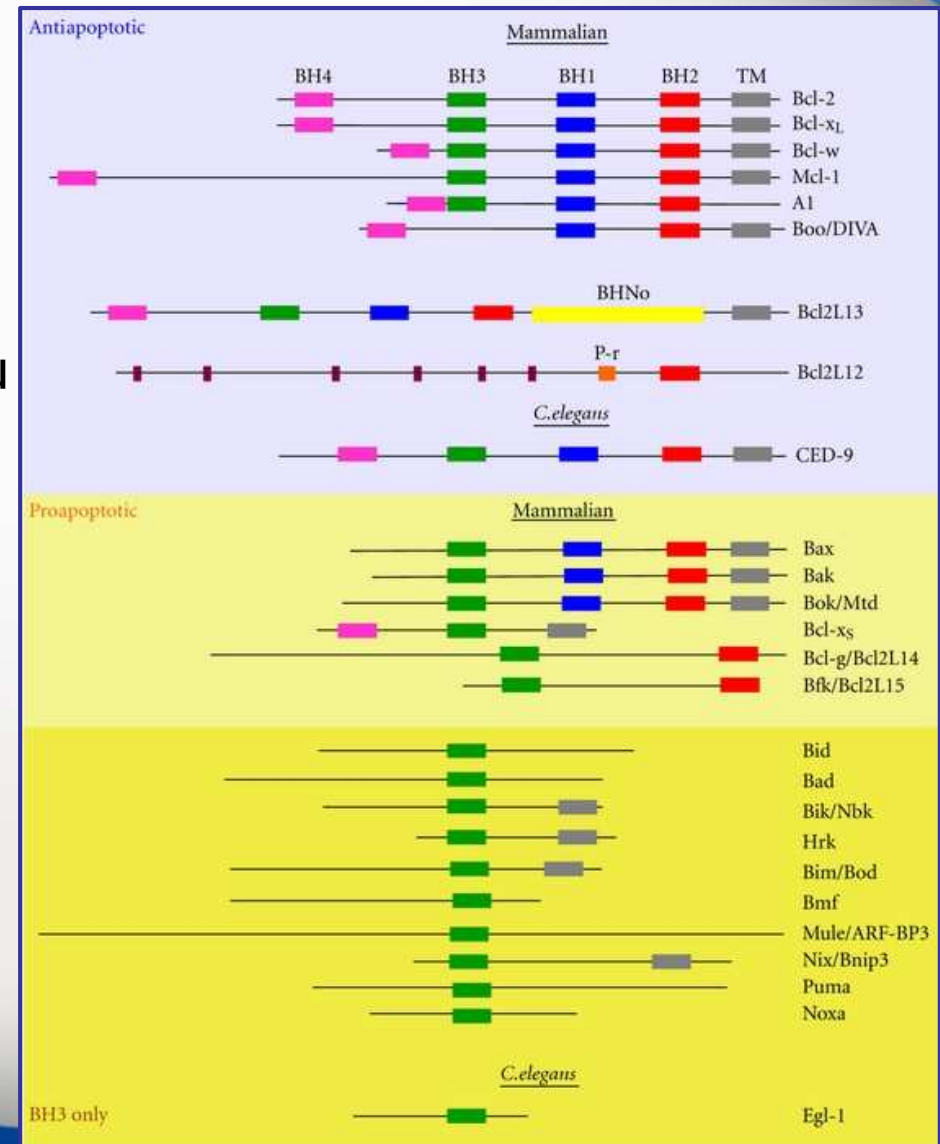
- proteiny rodiny Bcl-2 (první z nich objeven u lymfomu B-buněk)
- 6 anti-apoptotických („pro-survival“) členů
- 18 pro-apoptotických členů

Table 4.1. Selected proteins in the Bcl-2 superfamily

Pro-apoptotic	Anti-apoptotic
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-X _L
BOK	Bcl-W
BIM	MCL-1
BID	Bcl-B
BAD	+ viral homologs
NOXA	
PUMA	

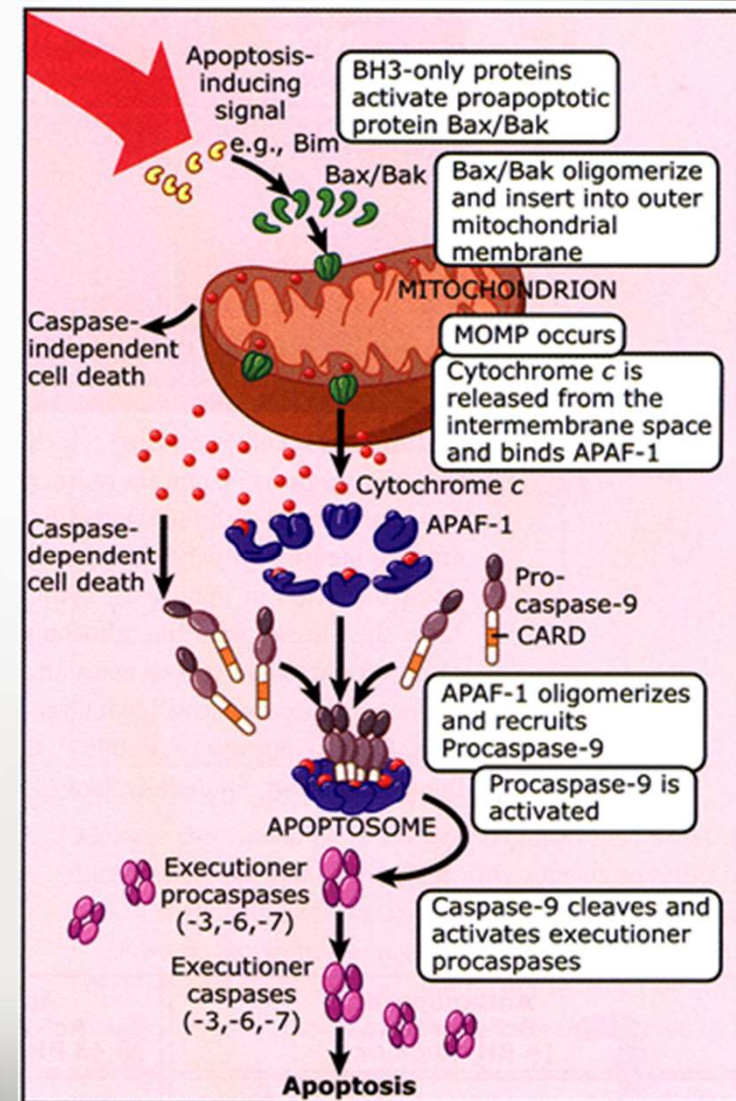
Proteiny Bcl-2 tvoří dimery

- pomocí domény **BH3** homo- nebo heterodimerizují
- homodimery Bax indukují apoptózu
- heterodimery Bcl-2/Bax inhibují apoptózu
- poměry faktorů „pro-death“ a „pro-survival“ rodiny Bcl-2 rozhodují o životě a smrti buněk



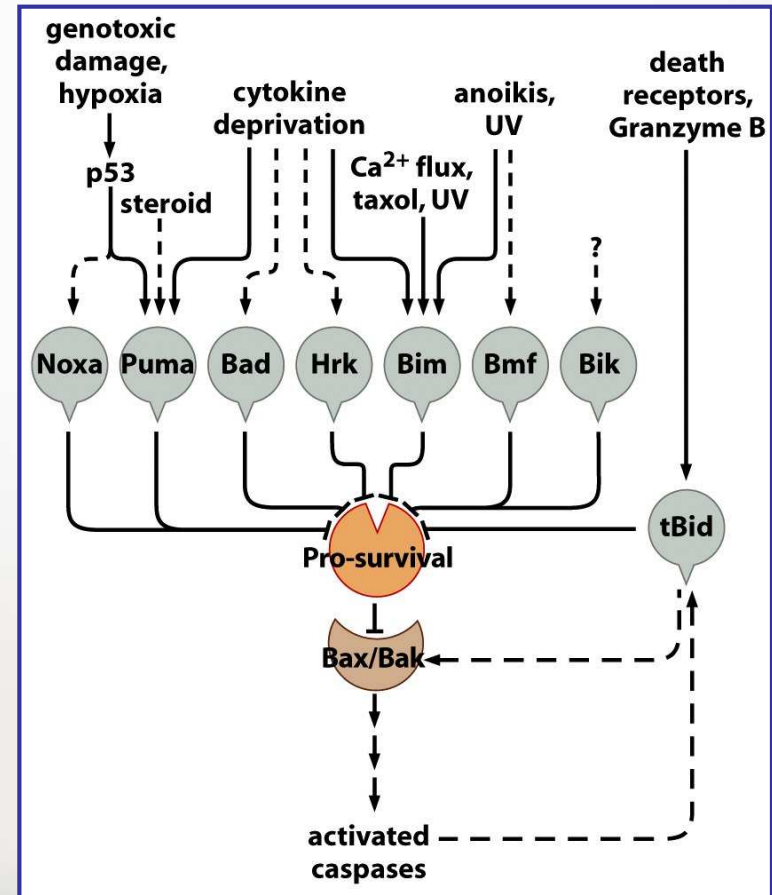
Vnitřní signální dráha

- apoptotický signál způsobí změnu permeability vnější mitochondriální membrány pomocí proteinů rodiny **Bcl-2**
- proteiny Bcl-2 se účastní tvorby pórů v mitochondriální membráně
- antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 brání zvýšení permeability mitochondriální membrány, proapoptotické proteiny Bcl-2 (Bax, Bak) ji stimulují
- cytochrom c permeabilizovanou membránou proniká do cytozolu



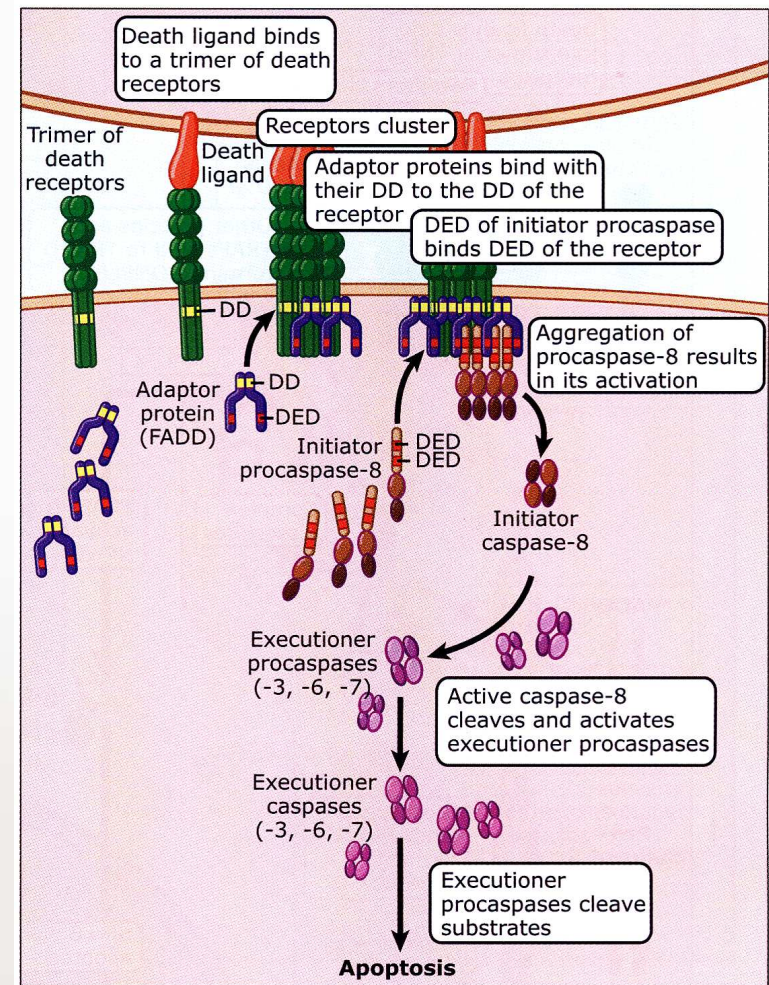
O smrti rozhodují pro- a anti-apoptotické proteiny

- o tom, zda cytochrom c bude uvolněn rozhodují relativní hladiny pro- a anti-apoptotických proteinů Bcl-2 na mitochondriální membráně
- různé stimuly ovlivňují různé proteiny rodiny Bcl-2
- ústředními členy rodiny jsou pro- a antiapoptotické proteiny Bax a Bak
- každý pro-apoptotický protein má svého opačně působícího partnera, který může jeho účinky neutralizovat



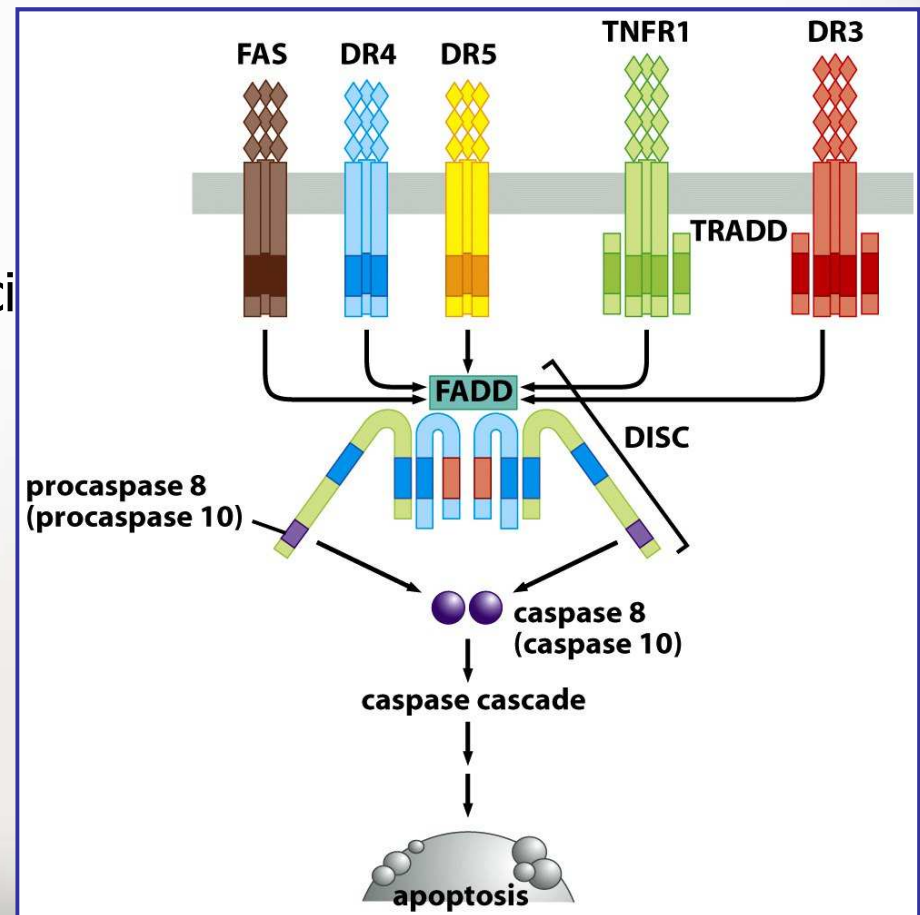
Vnější dráha apoptózy

- aktivovaná vnějšími („death“) ligandy
- registrace ligandů povrchovými receptory (rodina receptorů pro TNF) – Fas a TRAIL
- receptory po aktivaci tvoří trimery
- dva nebo tři trimery se prostřednictvím ligandů propojují
- nitrobuněčné domény smrti těchto receptorů se tak aktivují – jsou schopny interakce s dalšími proteiny – např. **adaptérovým proteinem FADD**
- FADD je následně schopen interakce s monomery **prokaspázy 8** a zajistí jejich dimerizaci a aktivaci
- iniciační kaspáza 8 aktivuje exekuční kaspázy



Receptory smrti

- transmembránové proteiny schopné vyvolat apoptózu
- napojují se na kaspázovou signalizaci

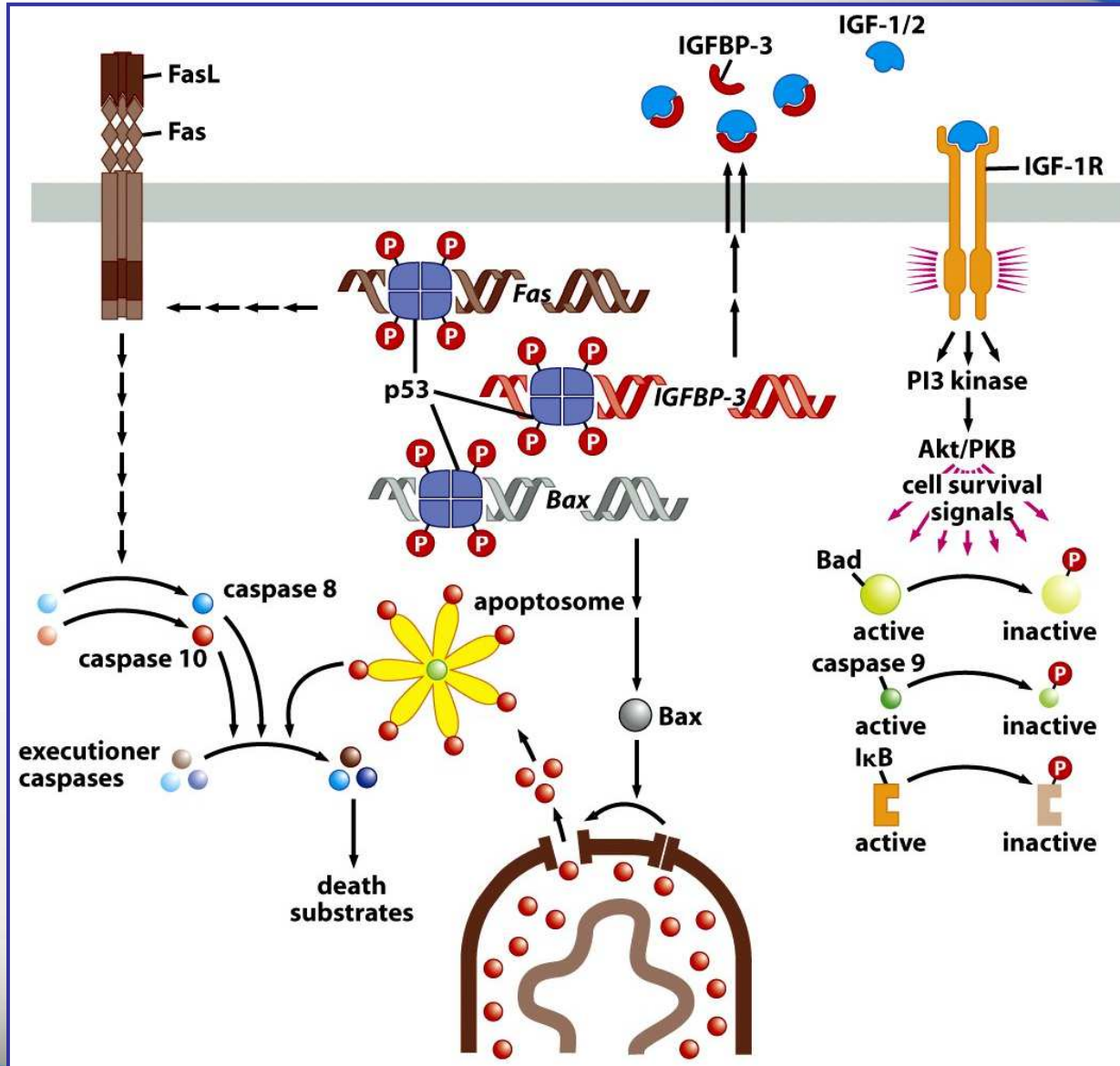


Apoptóza a p53

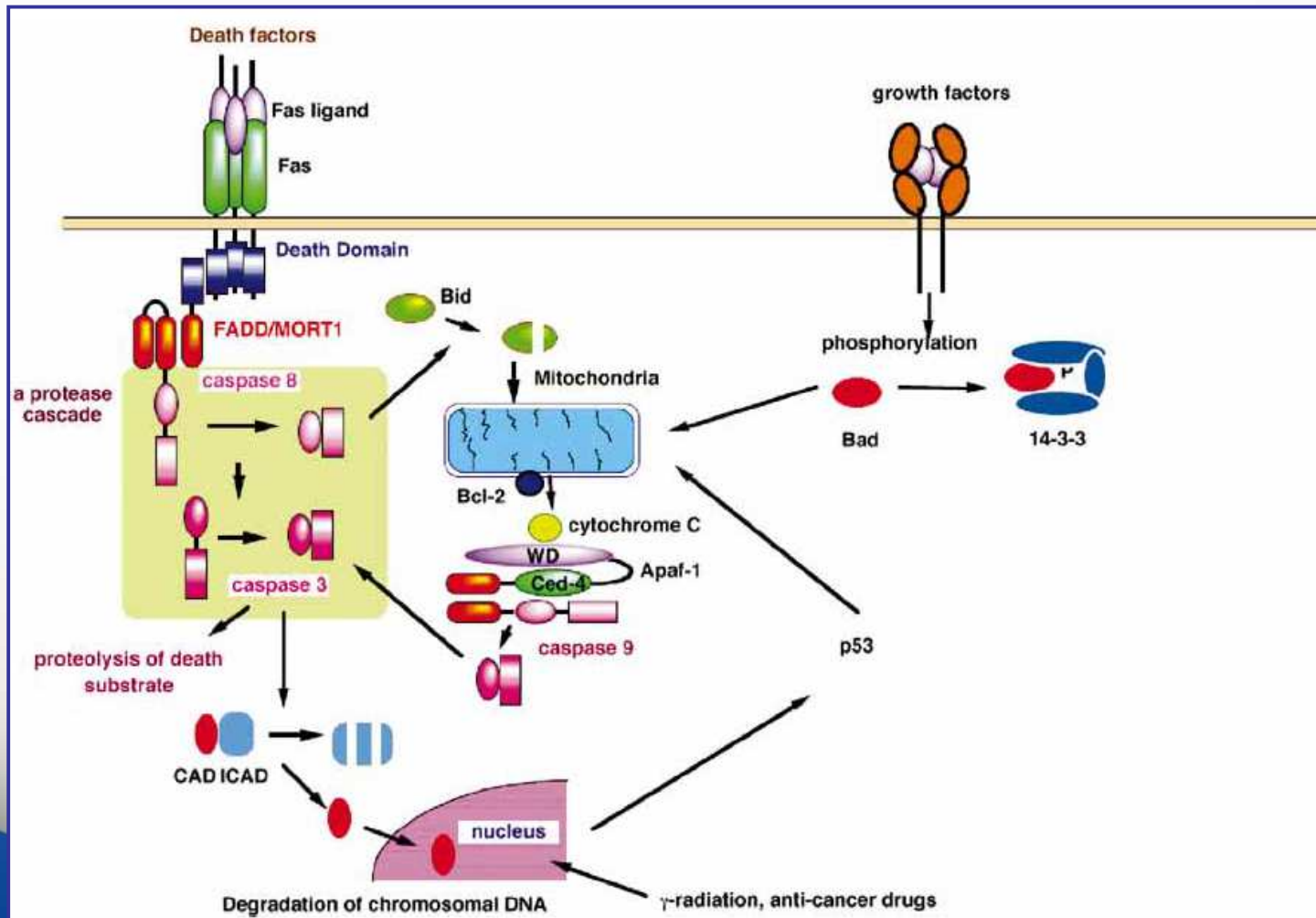
- poškození DNA, nedostatek růstových faktorů a další podněty mohou indukovat apoptózu zprostředkovanou p53

p53 se podílí na:

- aktivaci exprese **bax**, kódujícího pro-apoptotický protein schopný uvolnit cytochrom c z mitochondrií a zajistit tak aktivaci kaspáz 9 a 3
- aktivaci exprese genu kódujícího **receptor Fas**, tím zvyšuje citlivost buňky k FasL
- aktivaci exprese genu kódujícího **IGF-binding protein 3** a jeho uvolnění do mimobuněčného prostoru, kde vychytává anti-apoptotické ligandy IGF-1 a IGF-2



Propojení vnitřní a vnější dráhy apoptózy



Apoptóza vyvolaná perforinem a granzymem B

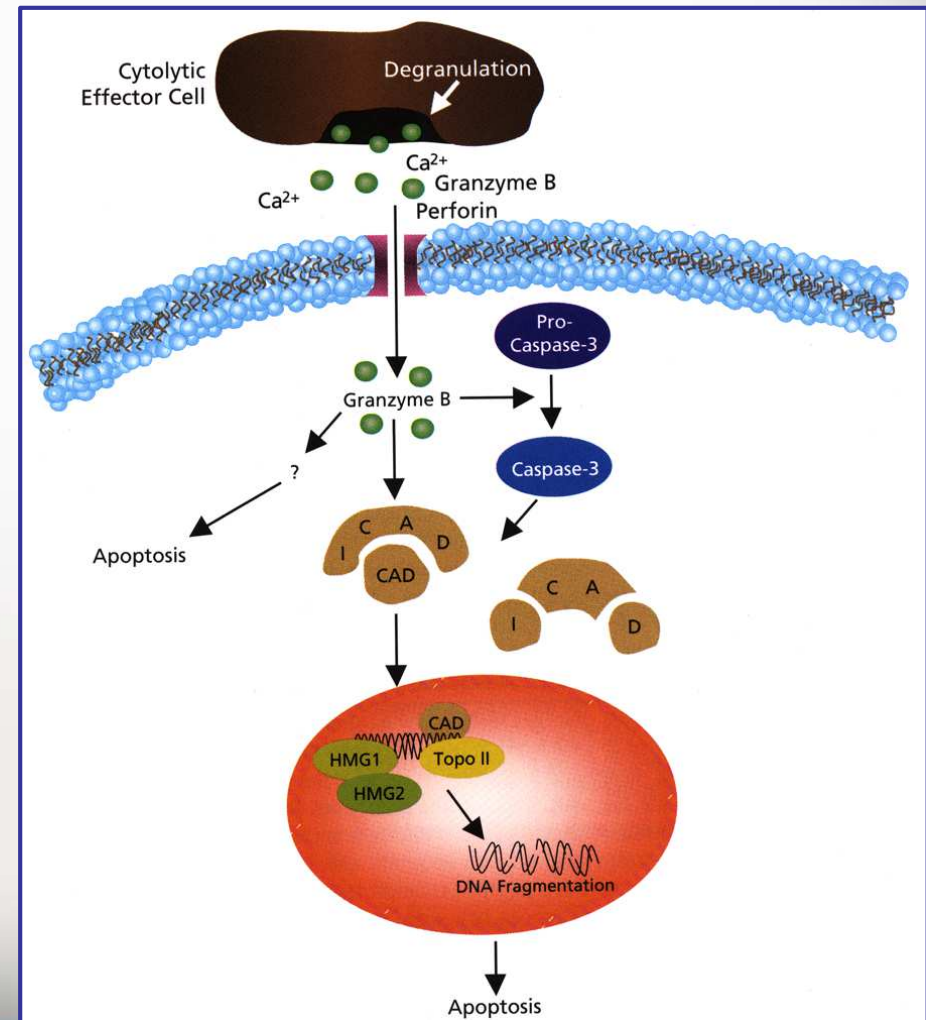
- oba proteiny jsou uvolňovány cytotoxickými T-buňkami

Perforin

- tvorba transmembránových pórů pro zajištění průniku granzymu do buňky

Granzym B

- štěpení efektorových prokaspáz (kaspáza 3)
- štěpení inhibitoru DNázy CAD



Apoptóza: neurodegenerativní onemocnění

- neurony jsou v postmitotickém stavu – nemohou se obnovovat, diferenciace z neuronálních kmenových buněk je neúčinná

Indukce apoptózy neuronů

- ztráta růstových faktorů (např. NGF)
- ztráta správných spojení
- poškození (zvláště oxidativní)

Důsledky neuronální dysfunkce/poškození

- ztráta synapsí
- ztráta buněk

Projevy

- Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc, Huntigtonova nemoc, atd.

Apoptóza a rakovina

- apoptóza eliminuje poškozené buňky (prevence rakoviny)
- nádorový supresor **p53** indukuje apoptózu v reakci na poškození buněk
- většina nádorových buněk má díky mutacím narušenou schopnost vyvolat apoptózu poškozených buněk

Riziko zvyšuje

- vysoká hladina anti-apoptotických proteinů
- nízká hladina pro-apoptotických proteinů

Apoptóza a rakovina

leukemie B buněk a lymfomy

- vysoká exprese **Bcl-2**
- důsledek translokace přenášející gen *bcl-2* z chromozomu 18 do oblasti kódující těžké imunoglobulinové řetězce chromozomu 14

melanom

- v kožních buňkách inhibována exprese genu kódujícího **Apaf-1**

Apoptóza a rakovina

rakovina plic a střeva

- některé nádorové buňky ve vysoké míře sekretují rozpustné návnadové molekuly, které se vážou k FasL, takže ztratí schopnost vazby na Fas receptor
- schopnost indukce apoptózy slábne

Apoptóza a rakovina indukovaná viry

lidské papilomaviry

- zvyšují riziko rakovinu děložního čípku
- důsledek přítomnosti virového proteinu E6, který váže a inaktivuje p53

virus Epstein Barrové (herpetický virus)

- způsobuje mononukleózu a zvyšuje riziko některých lymfomů
- kóduje protein podobný Bcl-2
- indukuje infikovanou buňku ke zvýšení produkce vlastního proteinu Bcl-2

Apoptóza - video

- <http://www.dnatube.com/video/1188/Apoptosis-animation>
- <http://www.dnatube.com/video/4137/Apoptosis-process>

