

# APOPTÓZA

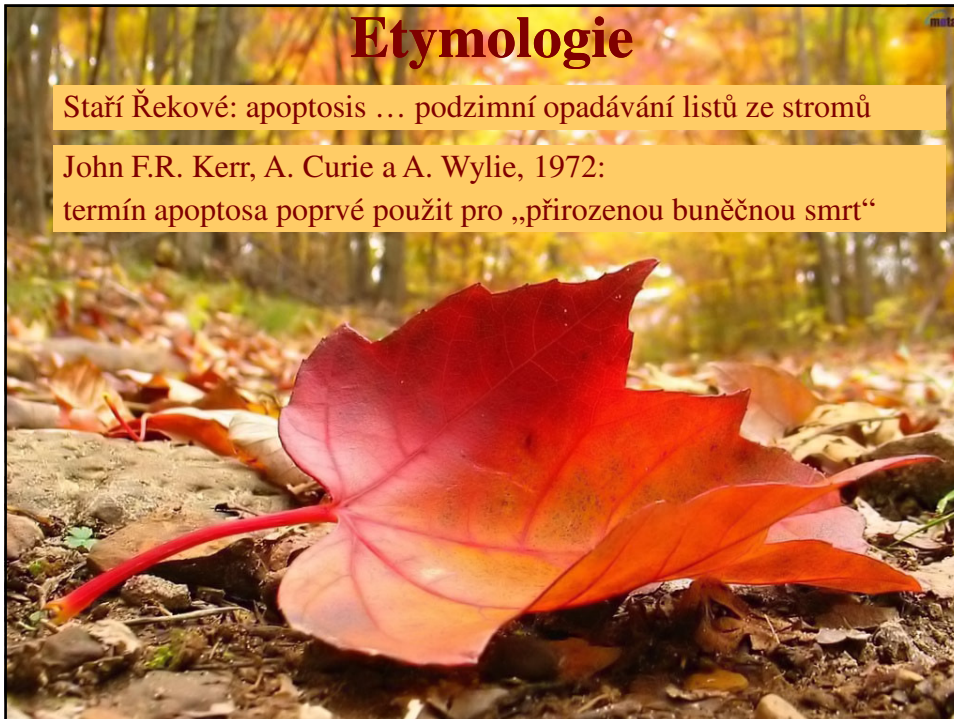
MUDr. Jan Pláteník, PhD.

## Etymologie

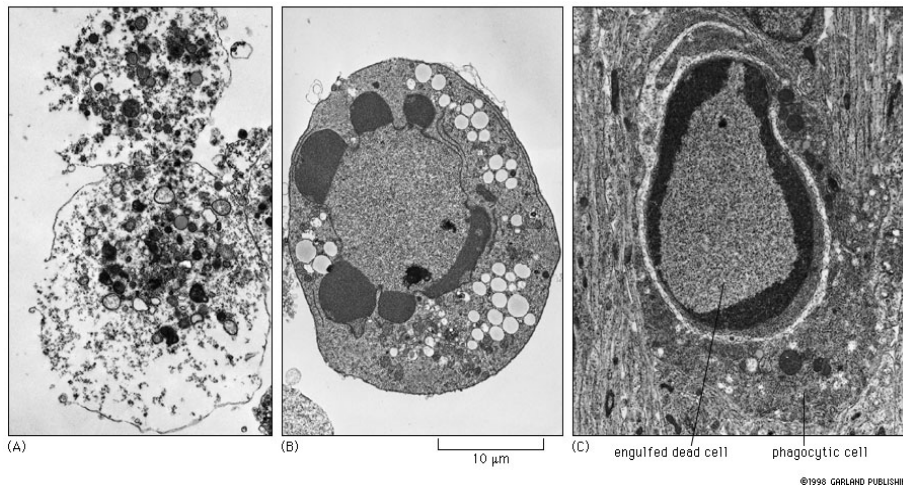
Stáří Řekové: apoptosis ... podzimní opadávání listů ze stromů

John F.R. Kerr, A. Curie a A. Wylie, 1972:

termín apoptosa poprvé použit pro „přirozenou buněčnou smrt“

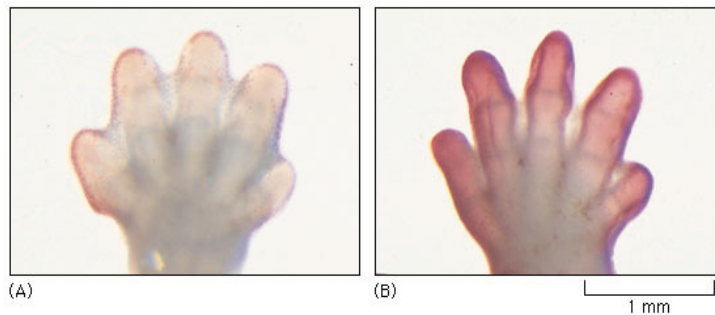


## Nekróza vs. Apoptóza



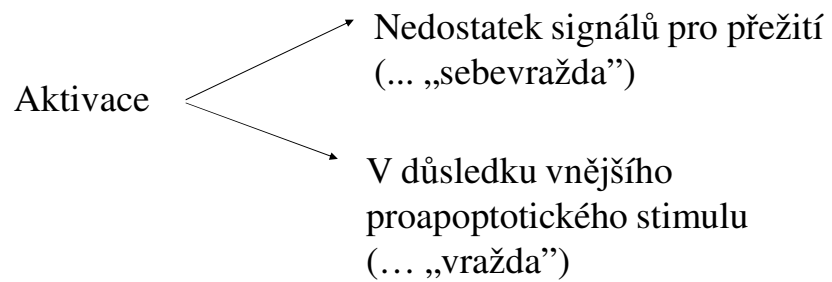
## Programovaná buněčná smrt (apoptóza)

- Nezbytná součást života
  - Regulace druhu a počtu buněk během vývoje i později
  - Eliminace abnormálních, nefunkčních nebo nebezpečných buněk, např. infikovaných, s poškozenou DNA, nadměrně produkujících kyslíkové radikály
  - Eliminace „homeless“ buněk které zabloudily do cizí tkáně
  - Eliminace lymfocytů reagujících proti vlastní tkáni,
  - Eliminace nádorově zvrhlých buněk
- Program vyžadující genovou expresi, proteosyntézu a ATP.

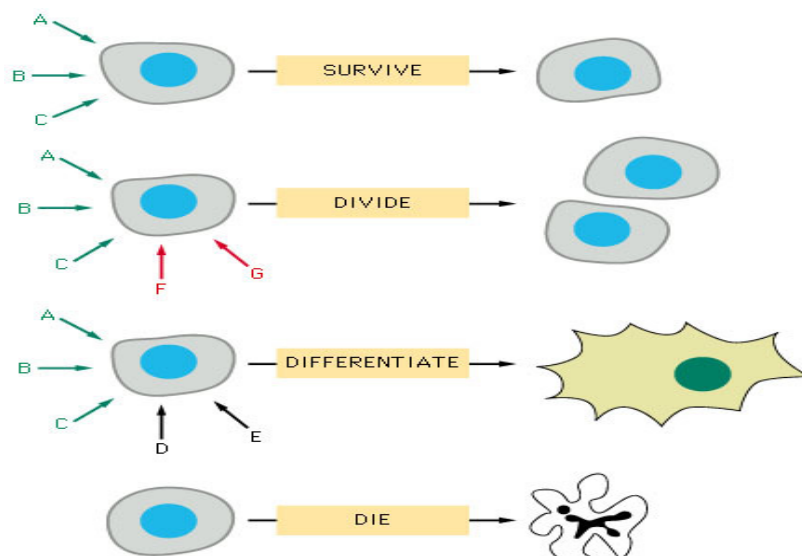


## Apoptotické signální dráhy

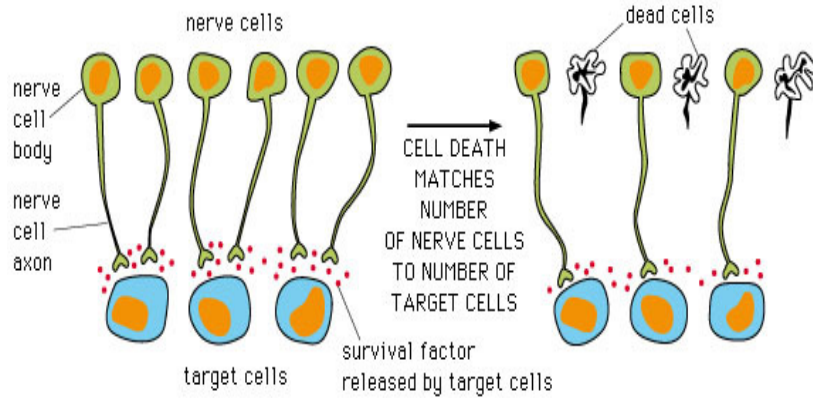
Konstitutivně přítomné v každé buňce



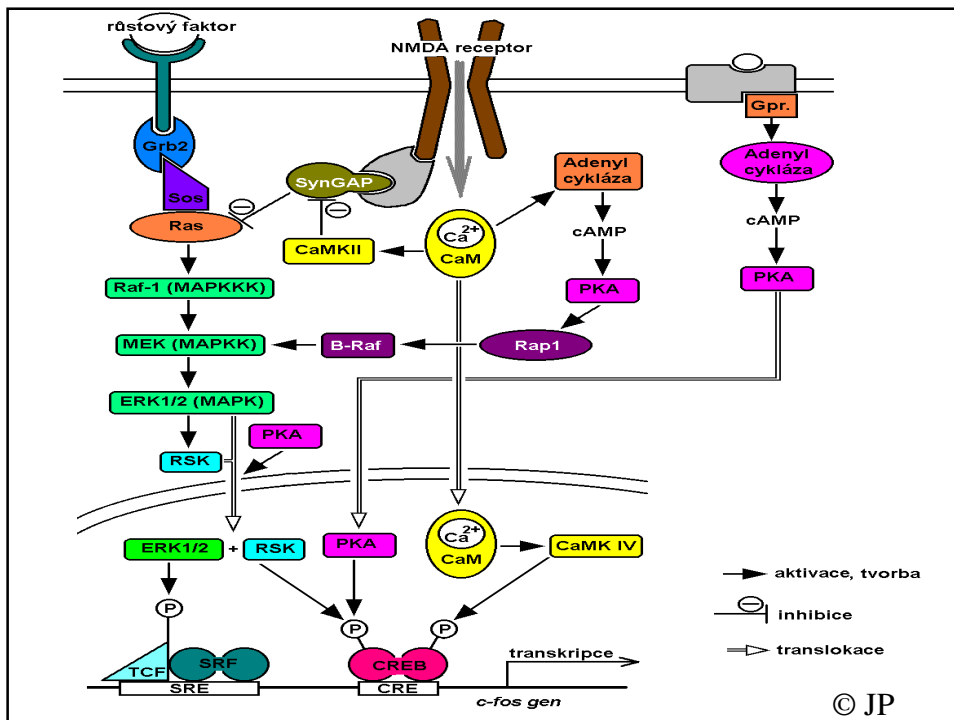
## Buňka reaguje na souhrn signálů:

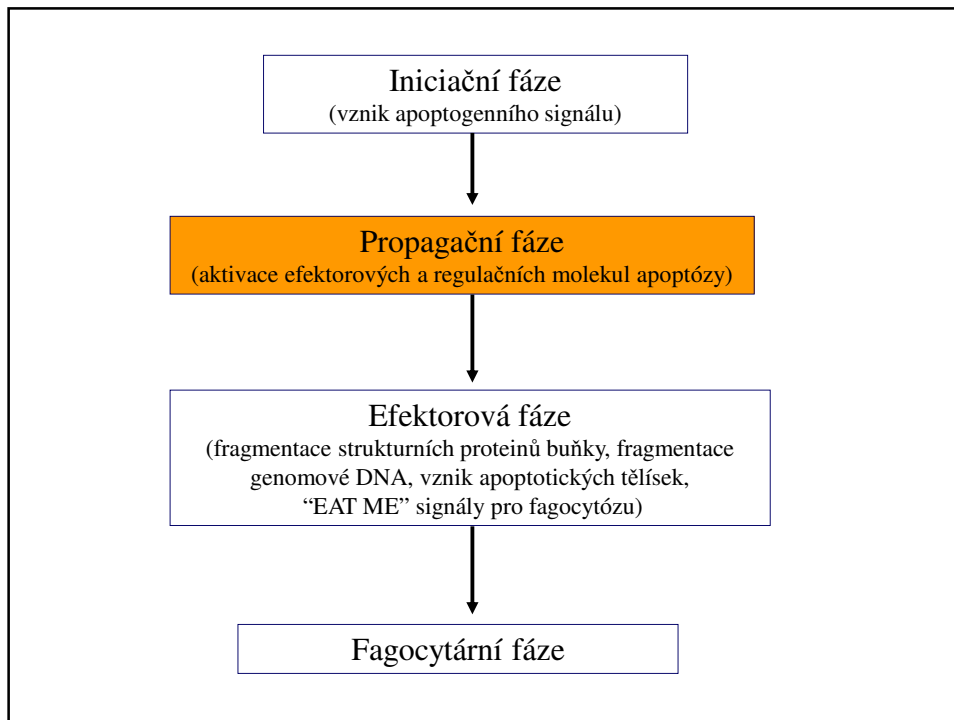


## Ontogeneze nervového systému



©1998 GARLAND PUBLISHING





## Kaspázy (Cysteine ASpartate ProteASES)

- Vlastní vykonavatelé apoptotické smrti
- Proteázy s cysteinem v aktivním místě
- Specificky štěpí cílové proteiny vždy za určitou asparagovou kyselinou
- V každé buňce přítomné jako zymogeny (prokaspázy)

Člověk:

Kaspázy účastníci se zánětu: kaspáza 1 (ICE), 4, 5

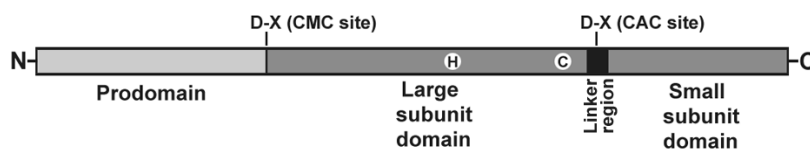
Kaspázy účastníci se apoptosy:

iniciátorové kaspázy: 2, 8, 9, 10

efektorové kaspázy: 3, 6, 7

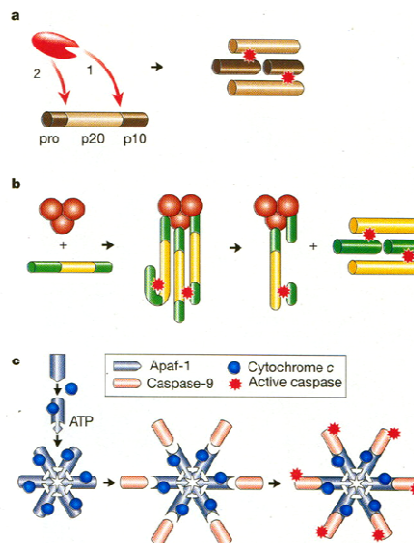
## Kaspázy (Cysteine ASpartate ProteASES)

- Vlastní vykonavatelé apoptotické smrti
- Proteázy s cysteinem v aktivním místě
- Specificky štěpí cílové proteiny vždy za určitou asparagovou kyselinou
- V každé buňce přítomné jako zymogeny (prokaspázy)

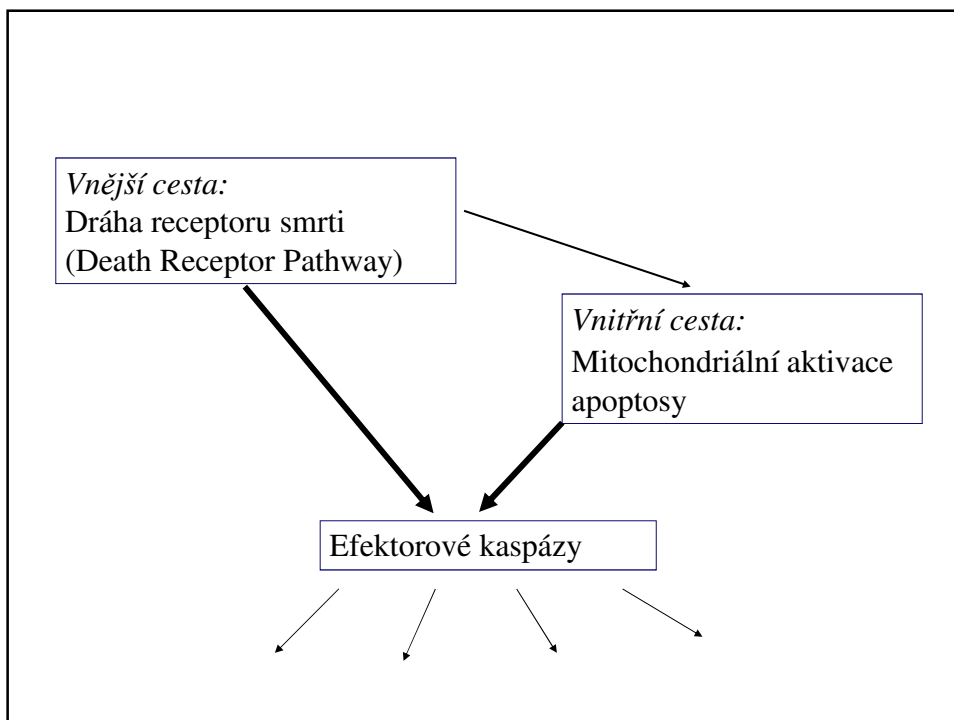
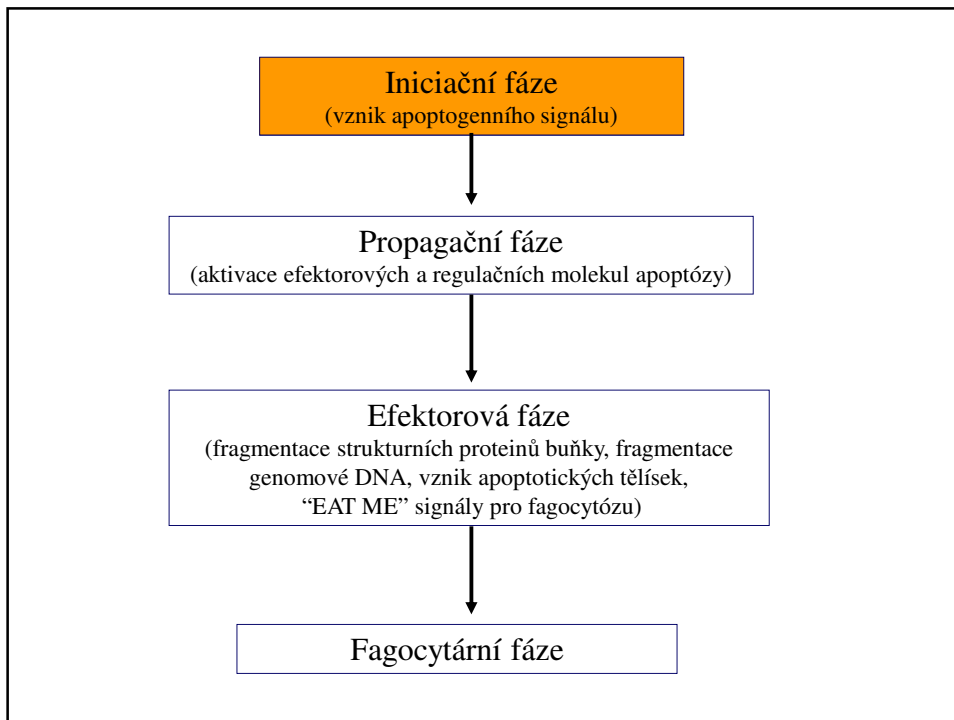


## Aktivace kaspáz

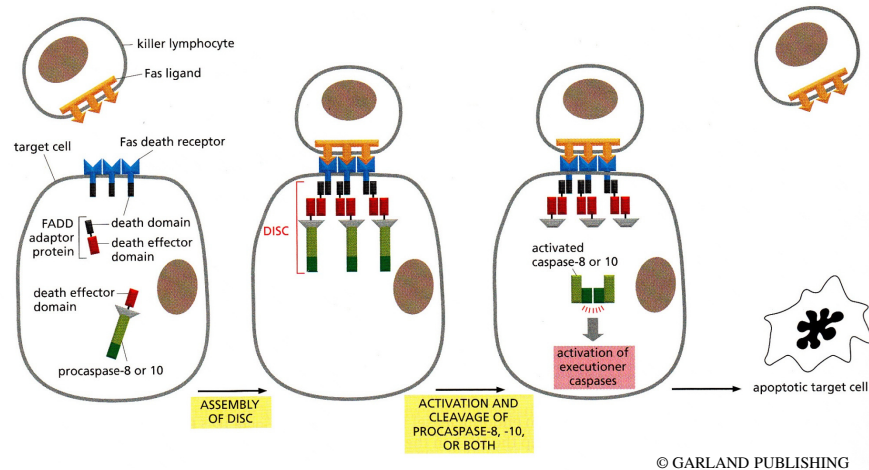
- Proteolýza
  - (efektorové kaspázy, krátká prodoména, př. kaspáza 3, 6, 7)
- Regulované protein-protein interakce
  - (iniciátorové kaspázy, dlouhá prodoména, př. kaspáza 8, 9)
    - DED (death-effector domain)
    - CARD (caspase activation & recruitment domain)



Nature 407 (2000) 770-776.



## Dráha receptoru smrti



FADD: Fas-associated death domain

DISC: death-inducing signaling complex

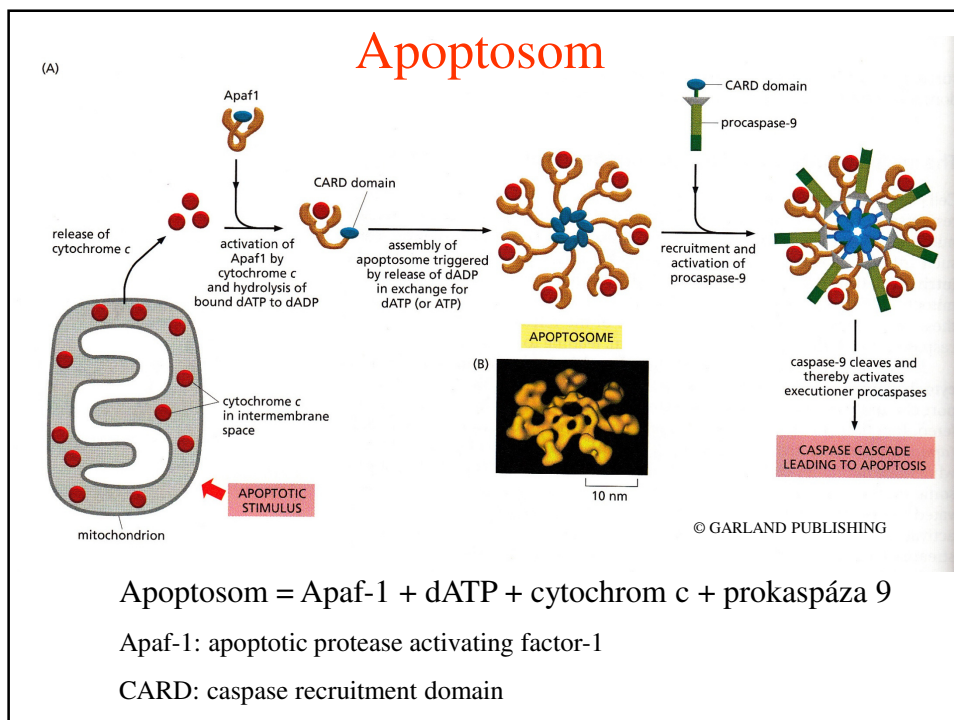
## Když buňky nechtějí zemřít:

- **Decoy receptor:** vazba ligandu jako receptory smrti, ale chybí intracelulární doména smrti
- **FLIPP protein:** vypadá jako iniciátorová kaspáza ale nemá proteolytickou doménu
- **IAPs (Inhibitors of apoptosis):** proteiny které váží a blokují kaspázy, původně nalezené ve virech. Nastavují práh aktivace proteolytické kaskády.
  - ... proti nim ale působí **anti-IAPs** (př. Smac/Diablo)

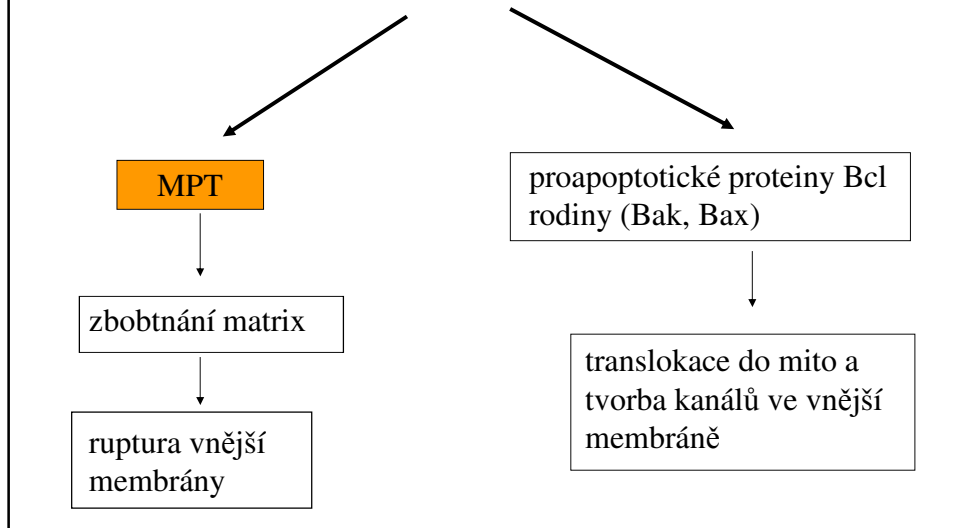


## Úloha mitochondrií v buněčné smrti

- Uvolnění proapoptických faktorů z intermembránového prostoru:
  - **cytochrom c**
    - AIF (apoptosis inducing factor)
    - Smac/Diablo (inhibitor IAPs)
    - prokaspázy
- Narušení buněčné energetiky a produkce ATP (uvolnění cytochromu c, depolarizace)
- Nadprodukce kyslíkových radikálů



## Mechanismus uvolnění cytochromu c z mitochondrie ?



## Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPT)

- Otevření “megakanálu” ve vnitřní mitochondriální membráně
- Propustnost pro všechny molekuly < 1500 Da
- Kolaps potenciálu vnitřní membrány, vyrovnání protonového gradientu a rozpřažení nebo inhibice respirace
- Zbobtnání mitochondrie

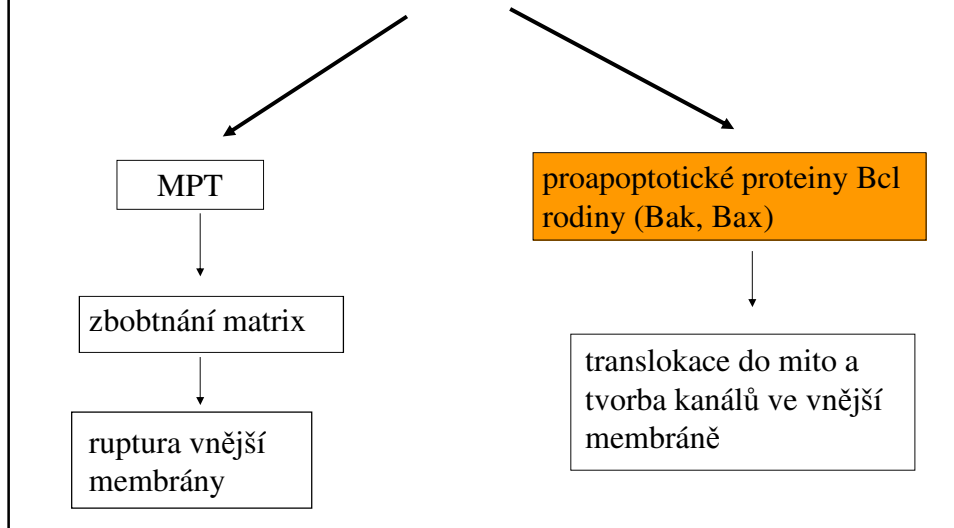
## Otevření “megakanálu” (MPT)

- Spouští: matrix  $\text{Ca}^{2+}$
- Stimulují:
  - Oxidanty
  - Depolarizace
  - Anorganický fosfát
- Inhibují:
  - Protony (nízké pH matrix)
  - Magnesiové ionty
  - ATP a ADP
  - Cyklosporin A

## Funkce MPT:

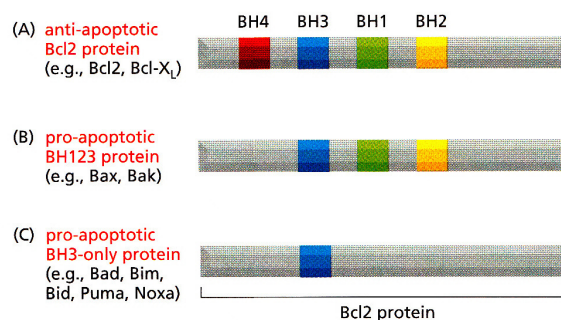
- Fyziologické (reversibilní) otevření MPT:
  - Energeticky výhodný eflux  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondrie?
  - Kalciová signalizace:
    - Uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  indukované kalciumem
    - ....mitochondrie jako “ $\text{Ca}^{2+}$  signalling storing memory device”
- Patologické (ireversibilní):
  - Buněčná smrt (nekróza a apoptóza)
  - Sebevražda starých mitochondrií?
  - Mechanismus jak jsou staré mitochondrie označeny pro autofagii ?

## Mechanismus uvolnění cytochromu c z mitochondrie ?



## Bcl proteiny

- Rodina >10 proteinů, prototypický člen: Bcl-2 (B-cell lymphoma... onkogen)
- 1-4 BH domény... homo/hetero-oligomerizace
- C-terminální hydrofobní úsek ... lokalizace do membrán (vnější mito, jaderná m., ER)
- Schopnost agregovat a tvořit kanály v membránách

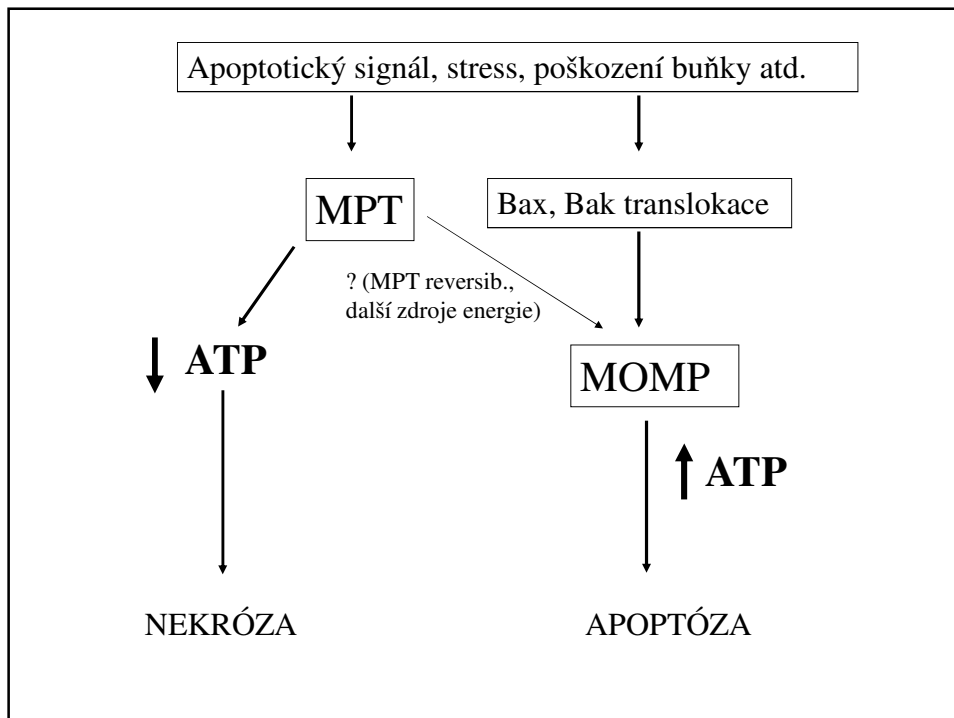


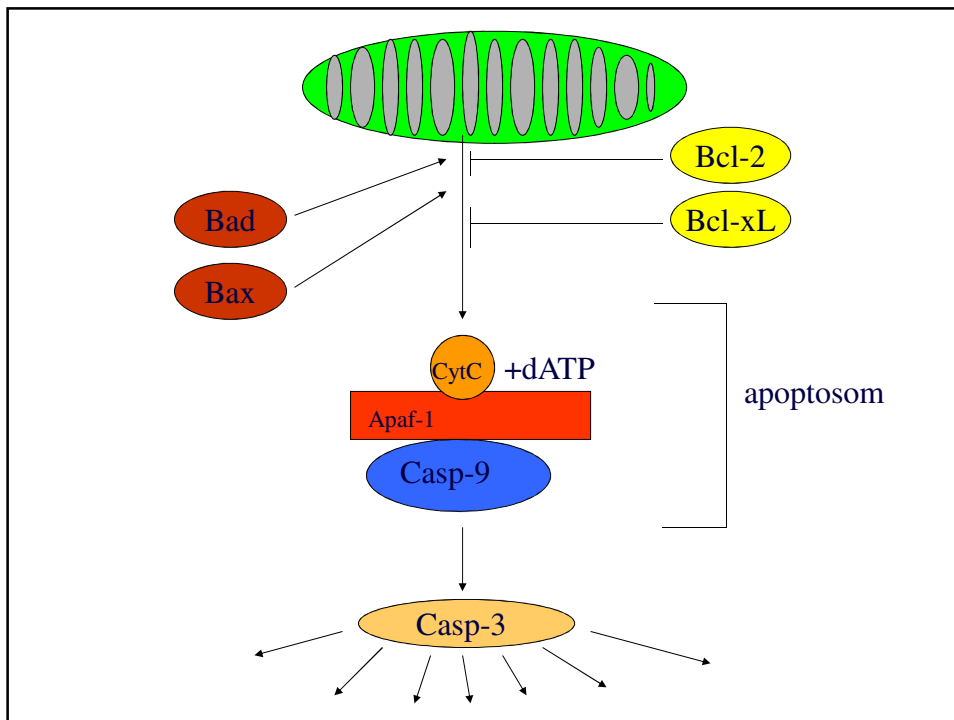
© GARLAND PUBLISHING

Uvolnění cytochromu c z  
mitochondrie:

**MOMP**  
**(Mitochondrial Outer Membrane  
Permeabilisation)**

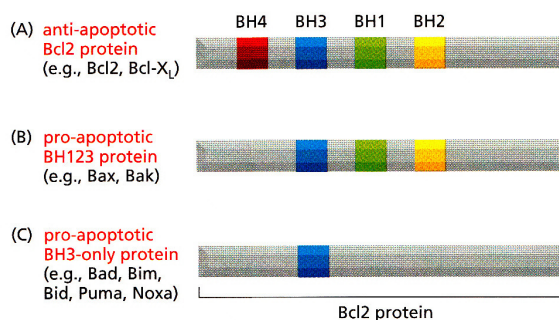
spíše než MPT ?





## Bcl proteiny

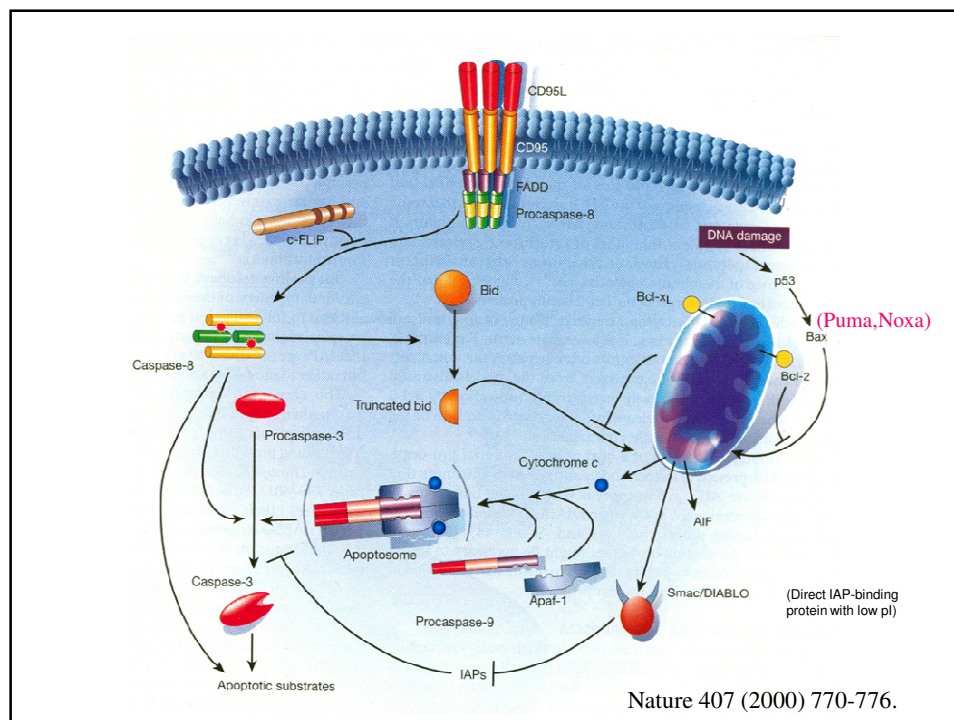
- (A) anti-apoptické (Bcl2, Bcl-X<sub>L</sub>): 4 BH domény, vyvazují a inhibují proapoptické Bcl proteiny
- (B) proapoptické BH123 (Bax, Bak): 3 BH domény, agregují, oligomery tvoří v membránách kanálky
- (C) proapoptické BH3-only proteiny (Bid, Puma, Noxa atd.): jen 1 BH doména, hlavně inhibitory antiapoptických Bcl proteinů

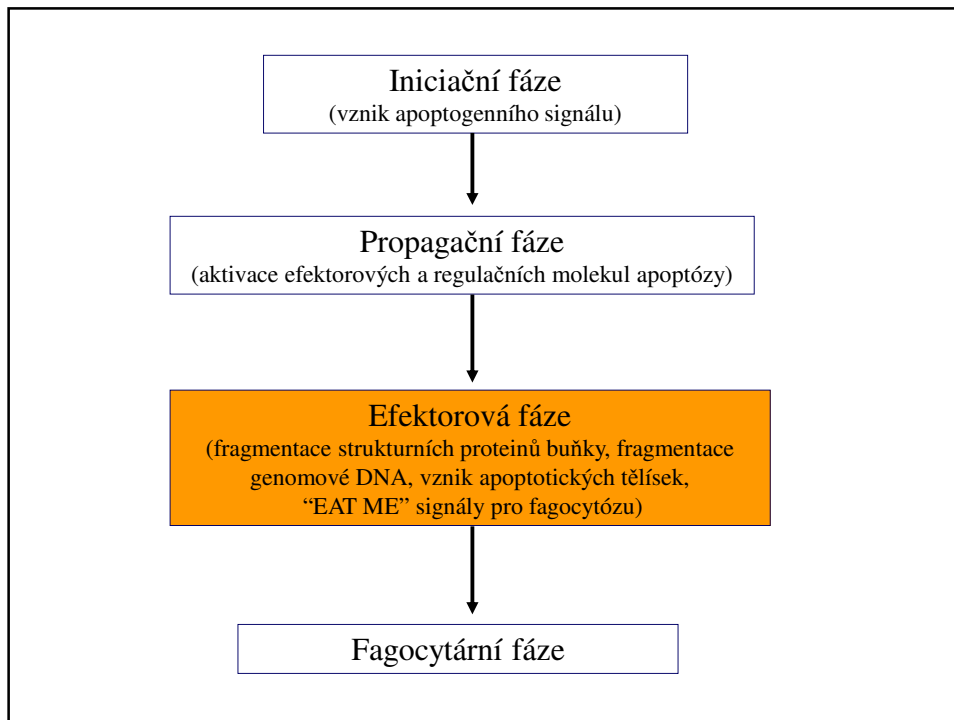


© GARLAND PUBLISHING

## BH3 proteiny propojují apoptózu s jinými signálními drahami:

- Nedostatek vnějších signálů pro přežití:
  - JNK kináza indukuje expresi BH3 proteinu **Bim**
- Poškození DNA:
  - p53 protein indukuje expresi BH3 proteinů **Puma** a **Noxa**
- BH3 protein **Bid** spojuje vnější a vnitřní signální dráhu apoptózy



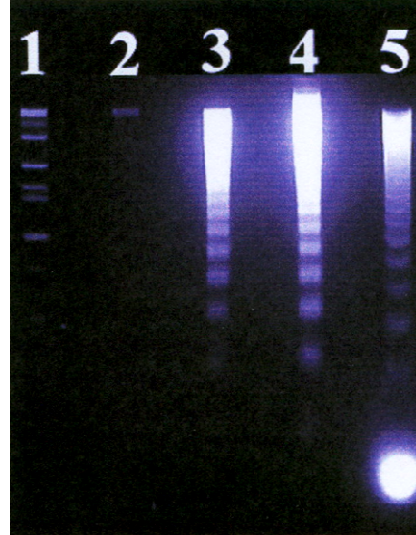
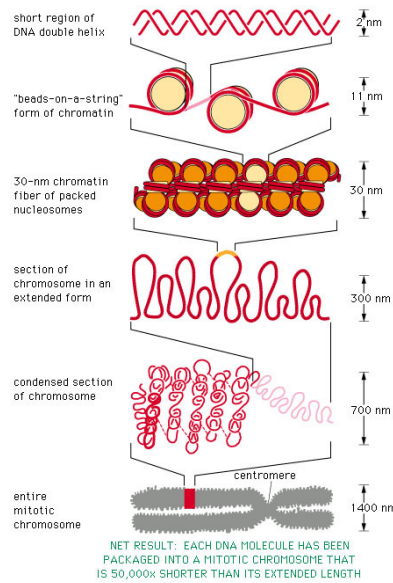


## Cílové proteiny kaspáz

- Vysoce selektivní limitované štěpení souboru >100 cílových buněčných proteinů, např:
  - Cytoskeletální proteiny (fodrin, gelsolin)
  - Jaderné laminy
  - Proteiny mezibuněčných spojů
  - ICAD (inhibitor CAD, caspase-activated DNase)  
... výsledkem je aktivace CAD



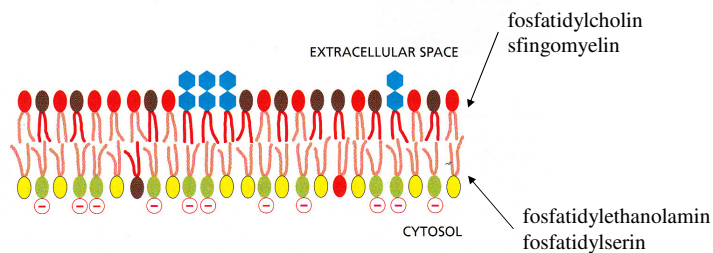
## DNA laddering



BioTechniques 33:734-736 (2002)

## Příklad „EAT ME“ signálu: fosfatidylserin

Zdravá buňka udržuje asymetrickou distribuci fosfolipidů (enzym flippáza):



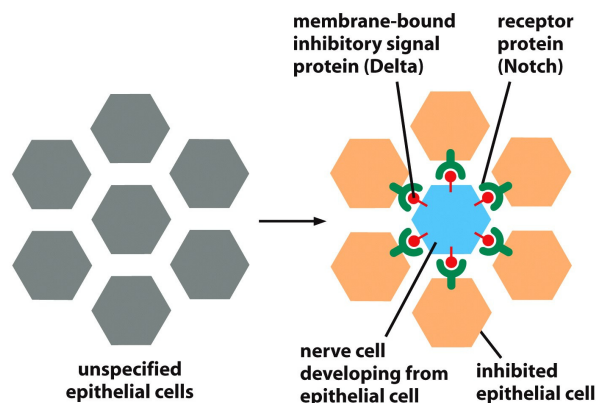
Při apoptose je fosfatidylserin redistribuován do vnější vrstvy buněčné membrány (enzym skrambláza) ... signál pro fagocytosu

## Signální dráhy závislé na proteolýze

- Proteolytická modifikace může být přepínač funkce proteinu - vždy ireverzibilní
- Ne jen buněčná smrt, ale i růst a vývoj tkání
- ...regulovaná proteolýza aktivuje latentní regulátory genové exprese, např.:
  - Notch/Delta
  - Wnt/ $\beta$ -catenin
  - NF-kappaB

## Notch/Delta signalizace

- Signalizace závislá na přímém kontaktu
- Interakce Notch-Delta reguluje buněčnou diferenciaci (laterální inhibice)



## Notch/Delta signalizace

Vazba Notch-Delta

Extracelulární štěpení Notch, internalizace do buňky exprimující protein Delta

Další štěpení zbytku Notch uvnitř membrány

Cytoplasmatická část Notch migruje do jádra a aktivuje transkripci

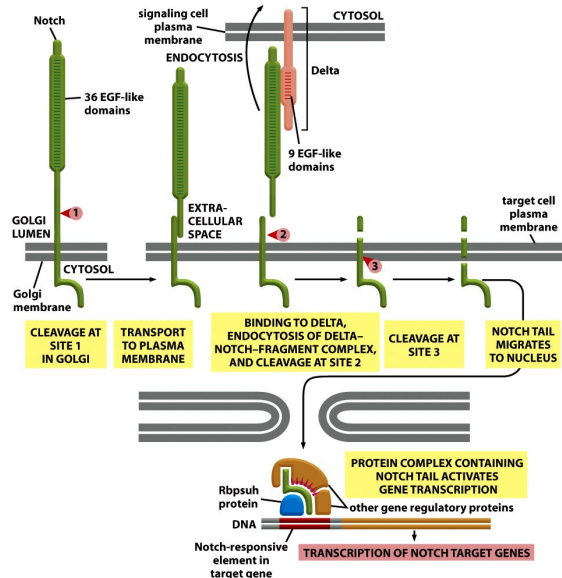
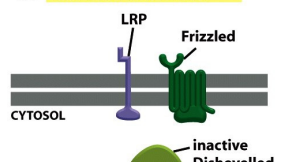


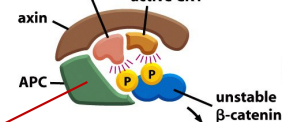
Figure 15-76 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## Wnt/ $\beta$ -katenin signalizace

(A) WITHOUT Wnt SIGNAL



APC:  
Adenomatous polyposis coli



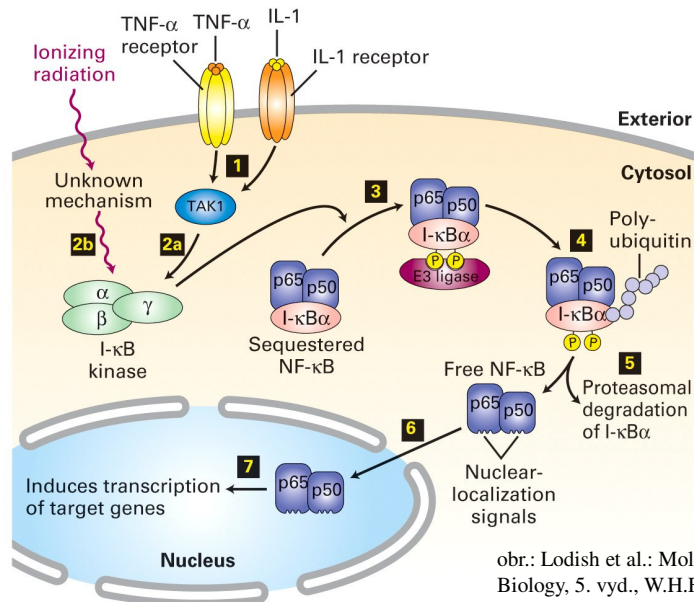
UNPHOSPHORYLATED  $\beta$ -CATENIN ACCUMULATES, MIGRATES TO NUCLEUS, DISPLACES GROUCHO AND ASSOCIATES WITH COACTIVATOR



Buněčné dělení

Figure 15-77 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

## NF-kappaB signalizace



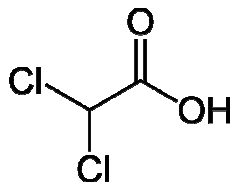
## Patogeneze chorob jako dysregulace apoptózy

?

- Neurodegenerace, ischemie, AIDS: buňky umírají když nemají...
- Autoimunita, nádory: neumírají buňky, které by měly...

Nádorové buňky žijí z glykolýzy (Warburgův fenomén) a mitochondrie „vypínají“ ....

**Dichloracetát:**



inhibice PDH kinasy → aktivace PDH  
→ aktivace mito respirace a produkce oxidantů  
→ aktivace apoptotického programu  
→ a nádorové buňky hynou ...

(Bonnet S et al. Cancer Cell. 2007 Jan;11(1):37-51).

**„Samurai law of biology:  
It is better to die than to be wrong“**

(V.P. Skulachev)

- **Mitoptosis:** program eliminace mitochondrií (= MPT)
- **Apoptosis:** program buněčné smrti
- **Organoptosis**



- **Fenoptosis:**  
...Septický šok, ischemická choroba srdeční, voo-doo?