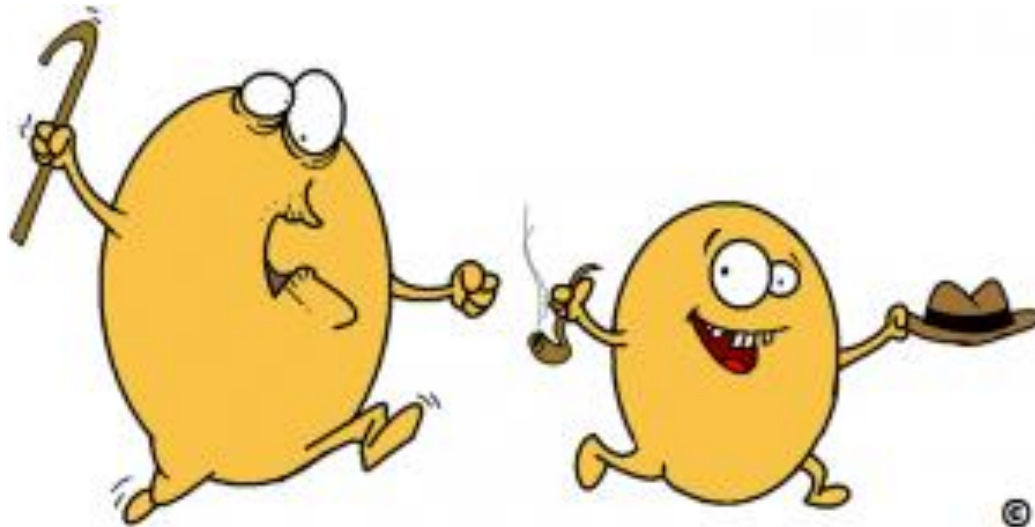


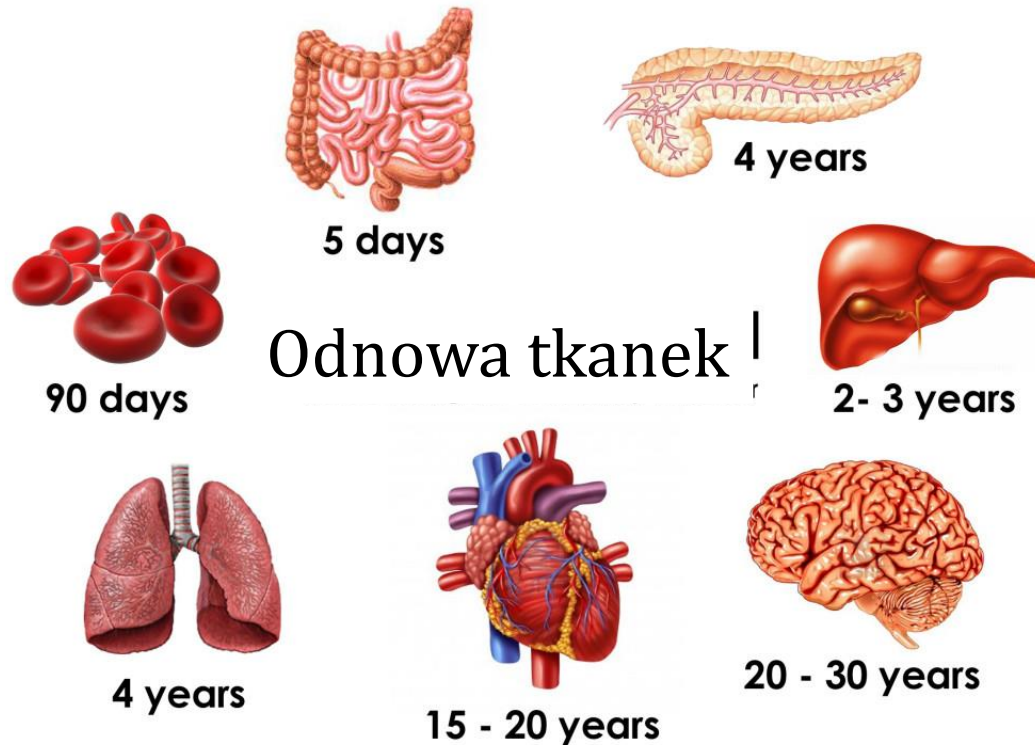
Starzenie



śmierć komórek

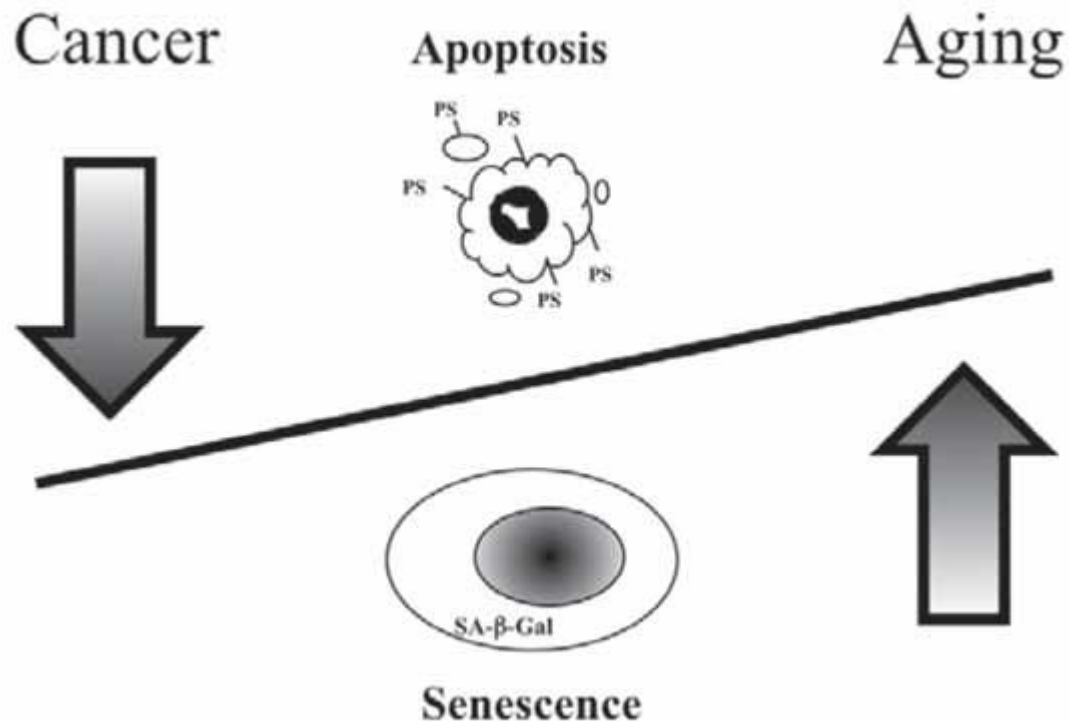


STARZENIE I APOPTOZA



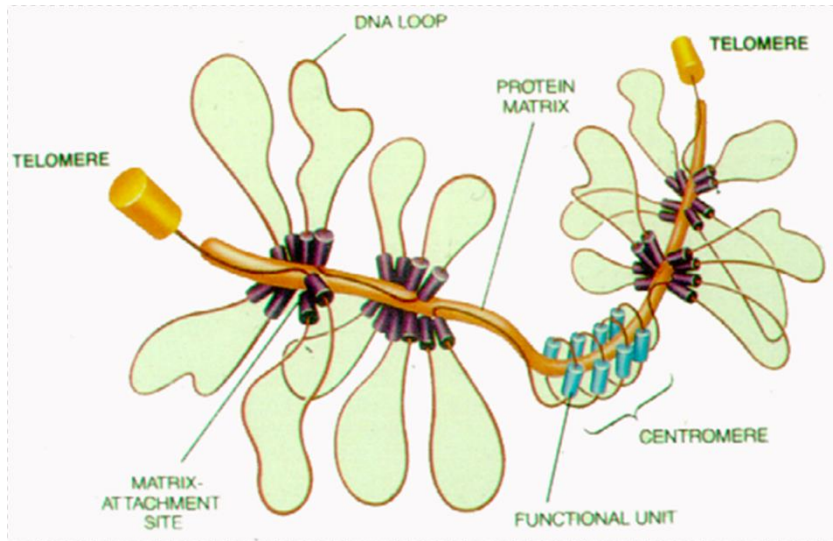
Odnowa tkanek jest konieczna u organizmów wielokomórkowych, takich jak ssaki, lecz proliferacja komórek niesie ryzyko rozwoju nowotworu

STARZENIE I APOPTOZA



Zagrożenie życia przez rozwijające się nowotwory zostało częściowo zmniejszone dzięki mechanizmom supresorowym powstałym w trakcie ewolucji. Jednym z nich jest starzenie komórkowe, które zatrzymuje proliferację zmienionych komórek, drugim - programowana śmierć komórek - apoptoza, która eliminuje zmienione komórki z organizmu.

Starzenie replikacyjne



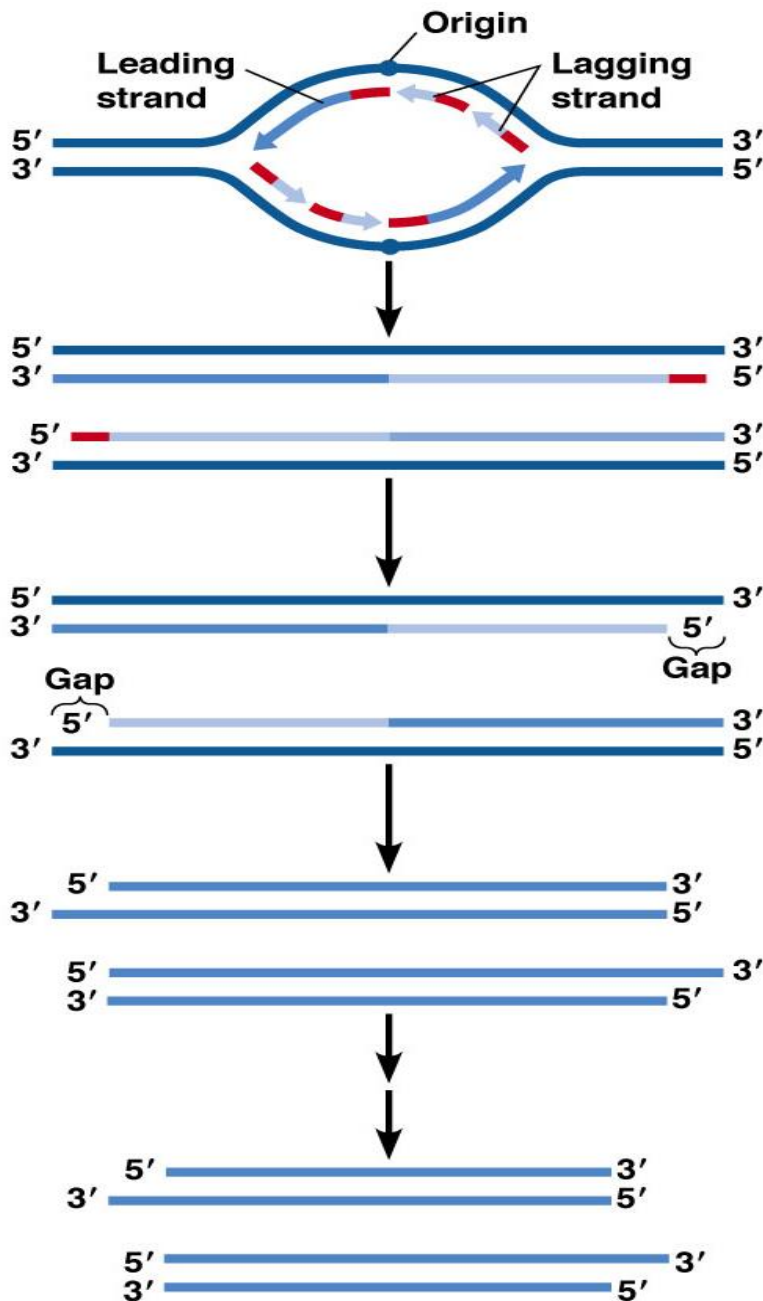
STRUKTURA CHROMOSOMU

Końce chromosomów są podatne na działanie enzymów degradujących DNA, a także chromosomy mogą ulegać fuzji (mniej stabilne niż koliste DNA, lecz umożliwiają rekombinację).

Starzenie telomerowe.

Uszkodzeniom chromosomów zapobiegają – TELOMERY-
powtarzające się sekwencje
niekodującego DNA (TTAGGG)
na końcach chromosomów.

Tworzą one wraz z
towarzyszącymi im białkami
czapeczki. Ludzkie telomery u
noworodka mają długość
25 000 bp.

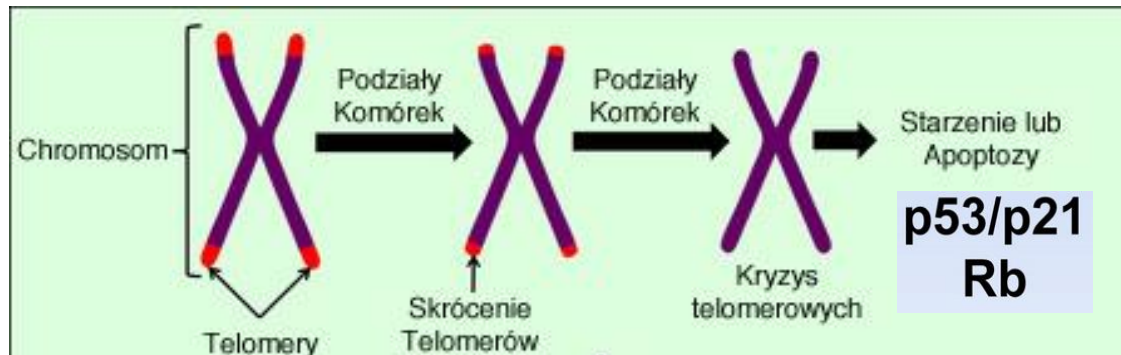


Problem replikacji końców

Polimeraza DNA może czytać i syntetyzować nową nić DNA tylko w jednym kierunku, zaczynając od startera. Ponieważ startery muszą być przyłączone przed miejscem syntezy, chromosomy tracą część telomerowego DNA (50-200 bp) w każdym cyklu replikacyjnym.

STARZENIE REPLIKACYJNE

Dysfunkcjonalne (zbyt krótkie) telomery włączają program starzenia się lub apoptozy poprzez **białko p53**.

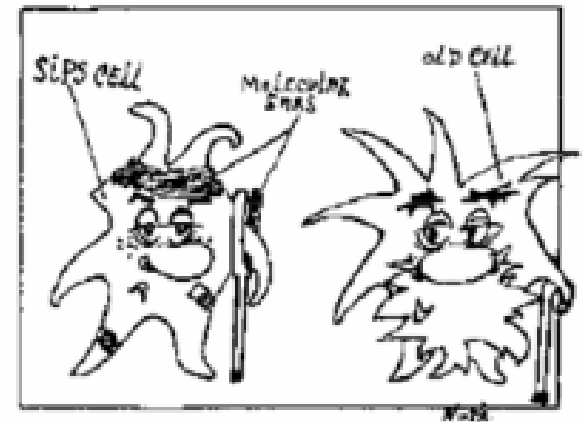
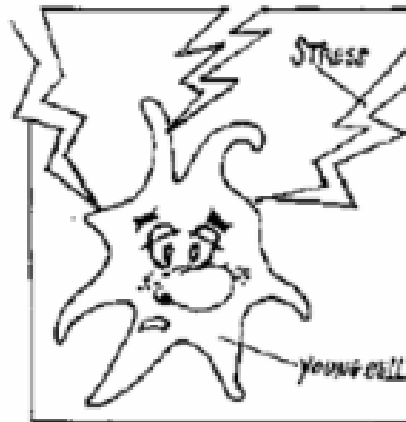
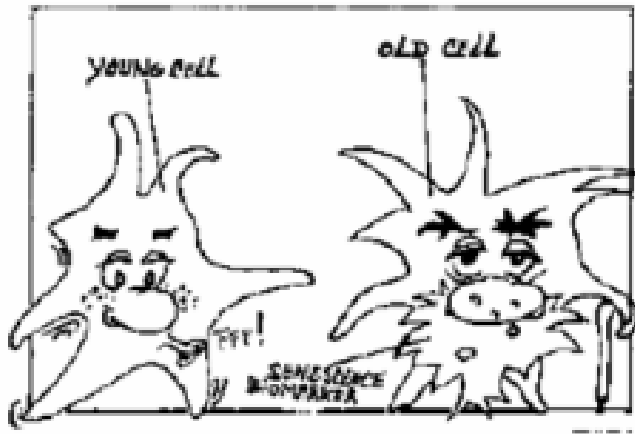


Nie są znane czynniki decydujące czy komórki ulegną procesowi starzenia czy apoptozie. Uszkodzone fibroblasty oraz komórki nabłonkowe zwykle ulegają starzeniu, podczas gdy uszkodzone limfocyty mają tendencję do apoptozy.

Systemy regulujące apoptozę i proces starzenia się komunikują się ze sobą, prawdopodobnie poprzez białko p53.

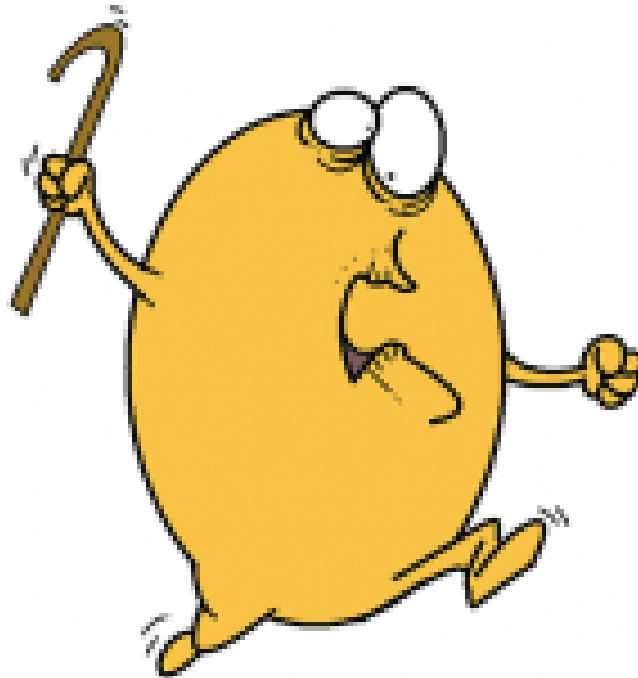
STARZENIE REPLIKACYJNE

Starzenie replikacyjne niezależne od skracania telomerów, spowodowane stresem (np. oksydacyjnym) powoduje zwiększenie **ekspresji p16 (inhibitor CDK4 i 6)** i uruchomiony zostaje szlak **p16-pRB**. Takie starzenie nazywane jest **indukowanym przez stres przedwczesnym starzeniem (SIPS - stress induced premature senescence)**.



Komórka, która uległa starzeniu replikacyjnemu

Mitotyczna komórka niezdolna do podziałów, lecz
żywa i metabolicznie aktywna.



Charakterystyka komórek ulegających procesowi starzenia

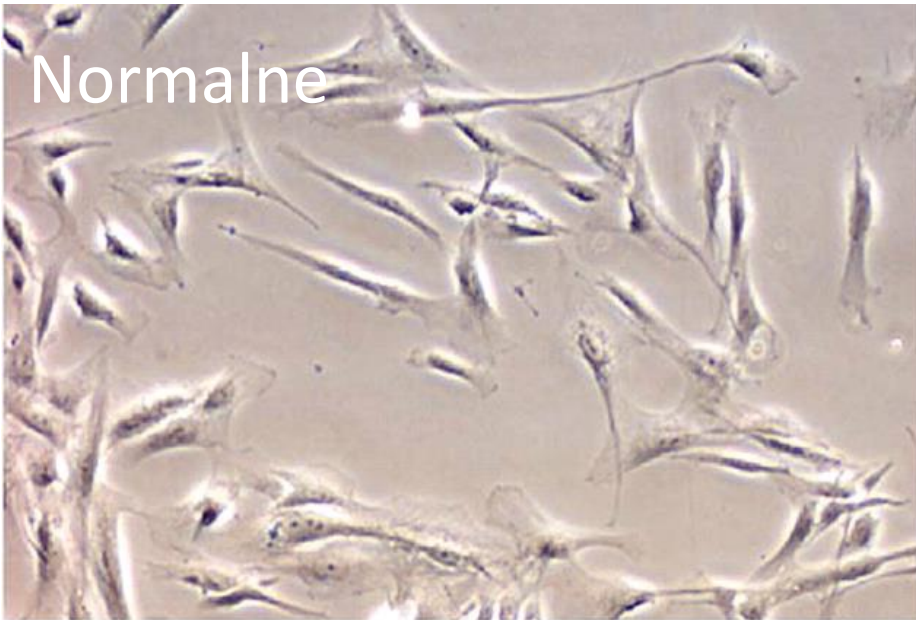
Młode komórki wykazują ekspresję lizosomalnej galaktozydazy (optimum pH 4.5).

Komórki ulegające procesowi starzenia wykazują ekspresję β -galaktozydazy, o optimum aktywności przy pH 6 (sa- β -gal – senescence-associated).

Ten marker jest obecny wyłącznie w komórkach, które uległy procesowi starzenia.

Komórki mięśni gładkich w hodowli z wyznakowaną sa- β -gal (pH 6)

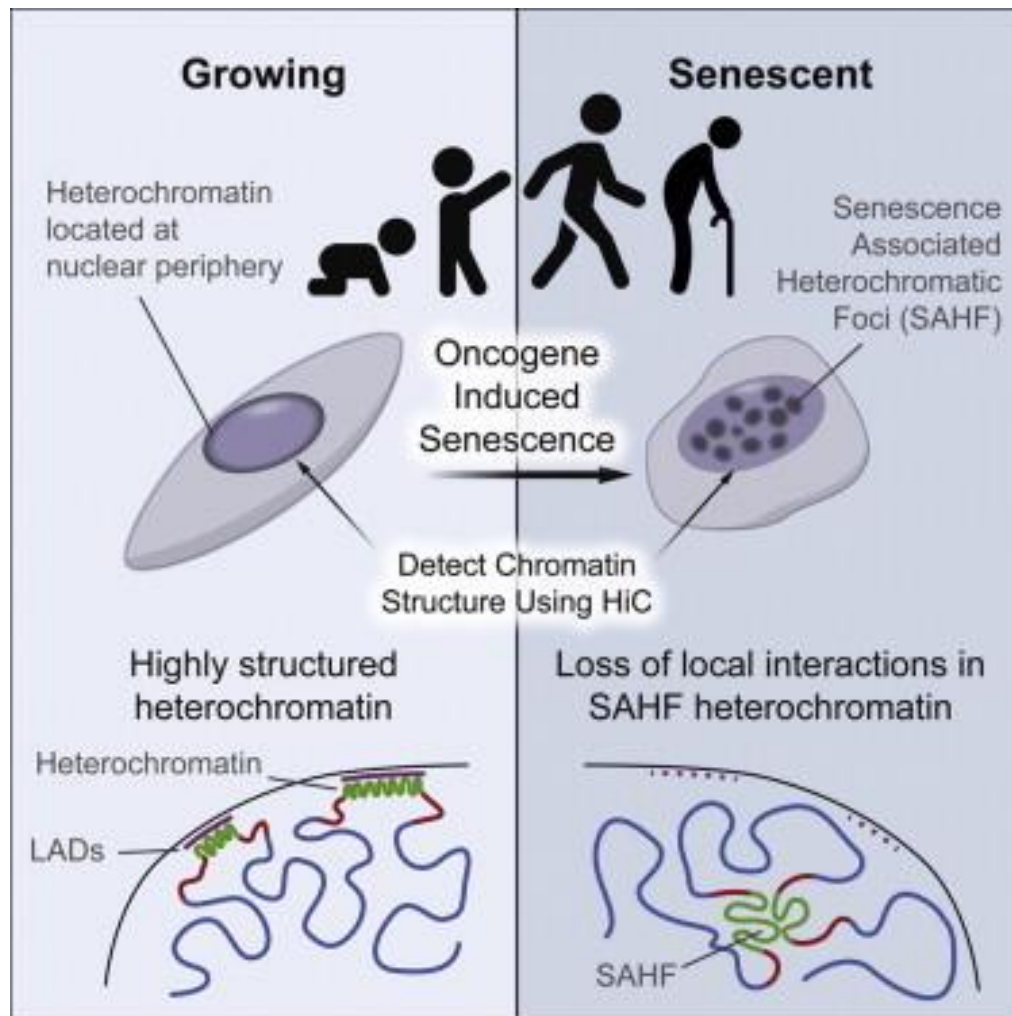
Normalne



Ulegające procesowi starzenia



Ogniska heterochromatyny związane ze starzeniem (SAHF)



SAHF wiążą loci genów kodujących propodziałowe białka w struktury heterochromatynowe, co zapobiega ich transkrypcji.

Profil wydzielniczy komórek związany ze starzeniem

(SASP senescence associated secretory phenotype)

Czynniki SASP - interleukiny, chemokiny, czynniki wzrostu, proteazy i składniki ECM.

Czynniki te mogą oddziaływać na otaczające komórki poprzez aktywację receptorów powierzchniowych i szlaki sygnałowe prowadząc do wielu stanów patologicznych, włączając proces nowotworzenia.

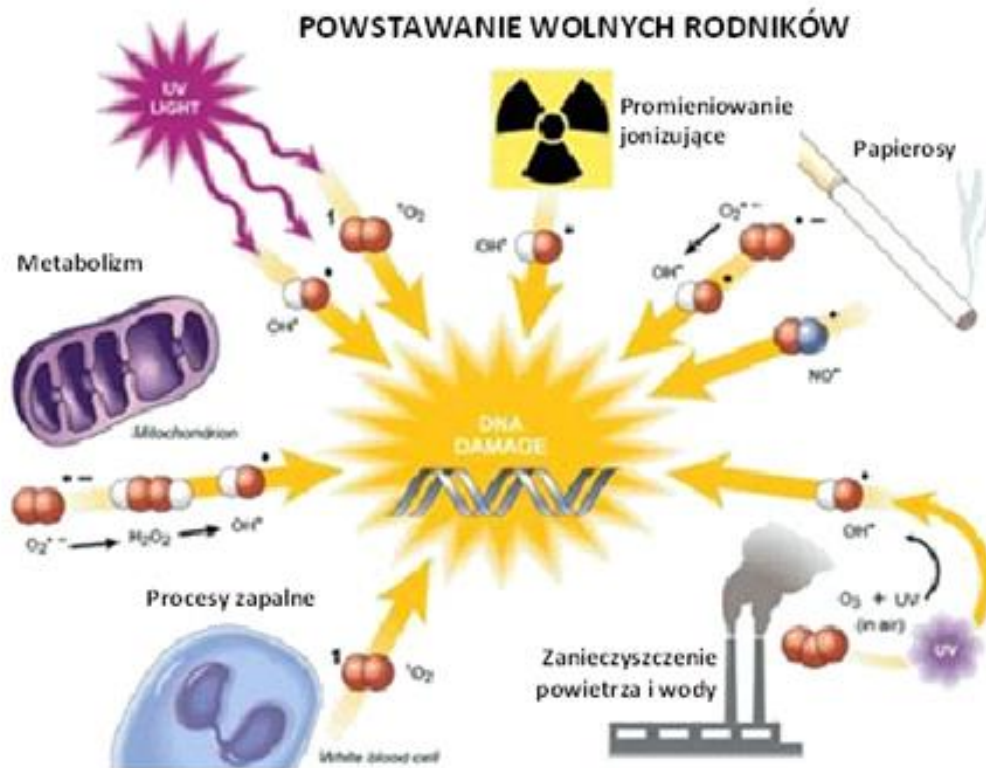
Komórki ulegające procesowi starzenia mogą modyfikować otaczające tkanki.

Wolnorodnikowa teoria starzenia się

Wolne rodniki (O_2^- , OH^- , H_2O_2) działają jako wewnątrzkomórkowe informatory (kontrola transkrypcji, regulacja aktywności kinaz i fosfataz, procesów metylacji DNA).

Zachodzący wraz z wiekiem wzrost stężenia wolnych rodników zmienia ich regulatorową aktywność prowadząc do starzenia entropowego.

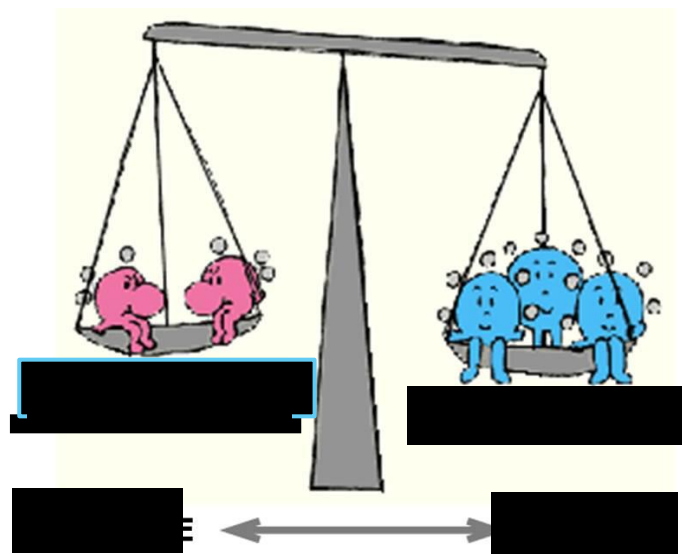
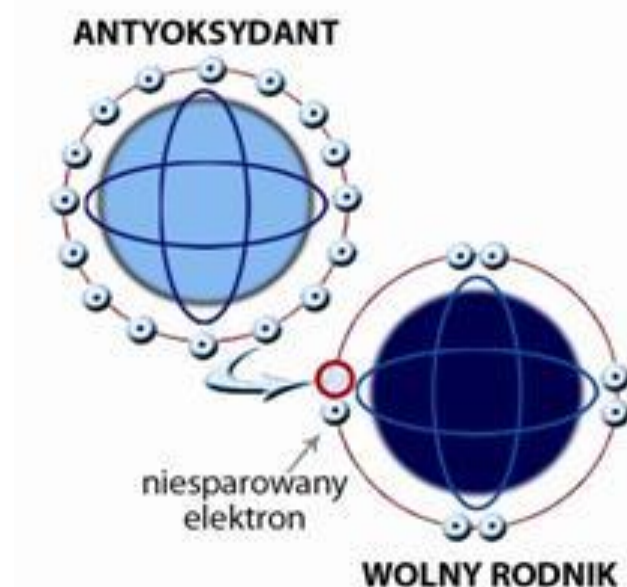
Wolne rodniki łatwo wchodzi w reakcje z białkami, lipidami i kwasami nukleinowymi. Efektem tego jest karbonylacja białek ($C=O$), oksydacja grup SH, wstępna peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz zmiany w DNA (stres oksydacyjny).



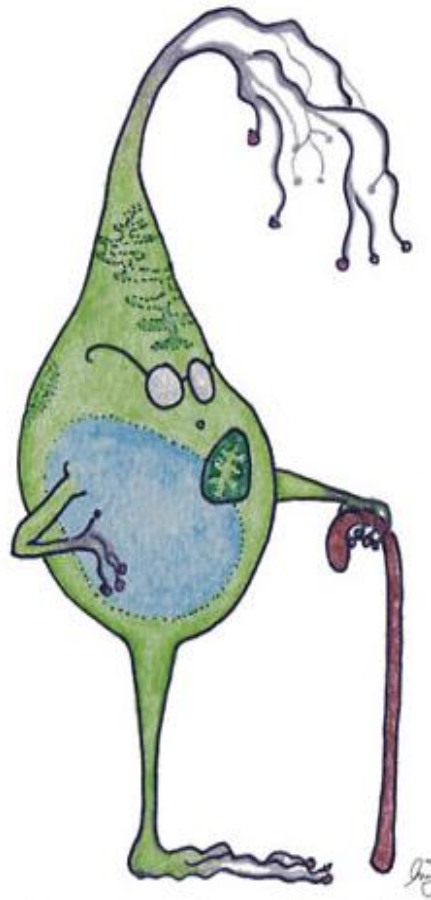
Antyoksydanty

U młodych wolne rodniki są skutecznie neutralizowane przez antyoksydanty (dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę, peroksydazę glutationową, peroksyredoksynę 1, β -karoten, kwas foliowy, kwas moczowy, witaminy A, C, E).

Wraz z wiekiem aktywność i ilość antyoksydantów zmniejsza się, prowadząc do nadmiaru wolnych rodników i stresu oksydacyjnego, a w komórkach gromadzą się uszkodzenia spowodowane przez wolne rodniki.



Terminalnie zróżnicowane komórki i starzenie



SENESCENT NEURONS

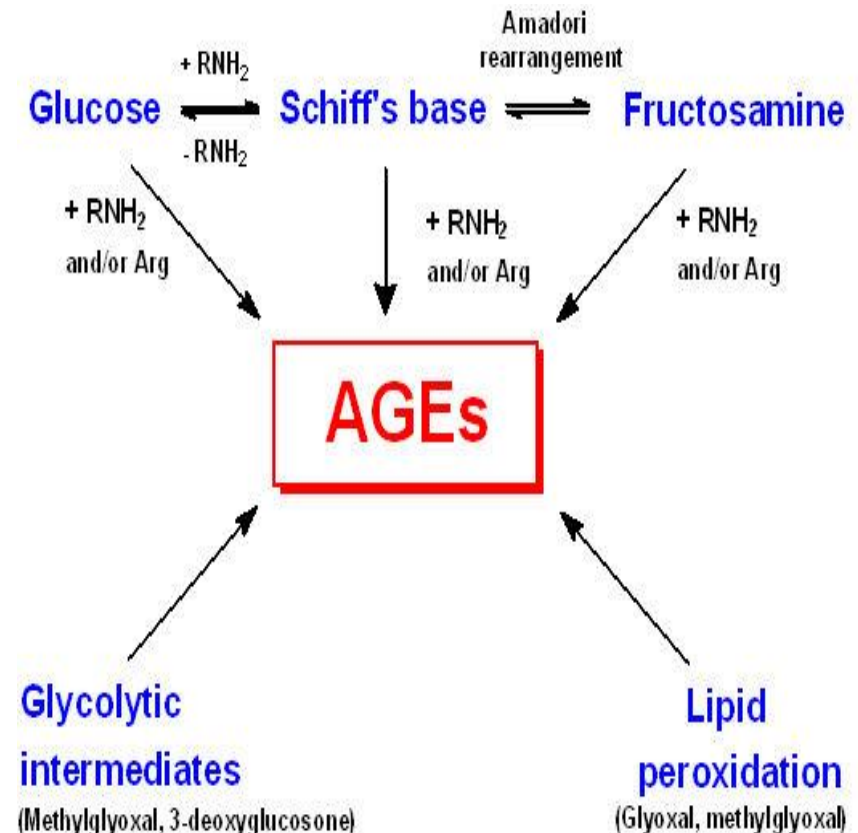
Neurony w starzejącym się mózgu i na obwodzie gromadzą różne formy uszkodzeń DNA. Z powodu dużej aktywności metabolicznej i stosunkowo małej aktywności antyoksydacyjnej neuronów, poziom wolnych rodników tlenowych (RFT), w tych komórkach jest wysoki. RFT uszkodzają DNA w trakcie niepatologicznego starzenia mózgu, jak również w patogenezie zaburzeń neurologicznych związanych ze starzeniem się. Odpowiedź neuronów na uszkodzenia DNA jest związana z markerami starzejących się komórek: produkcją RFT, wydzielaniem interleukin, aktywnością sa-b-Gal i heterochromatinizacją.

Glikacja i starzenie

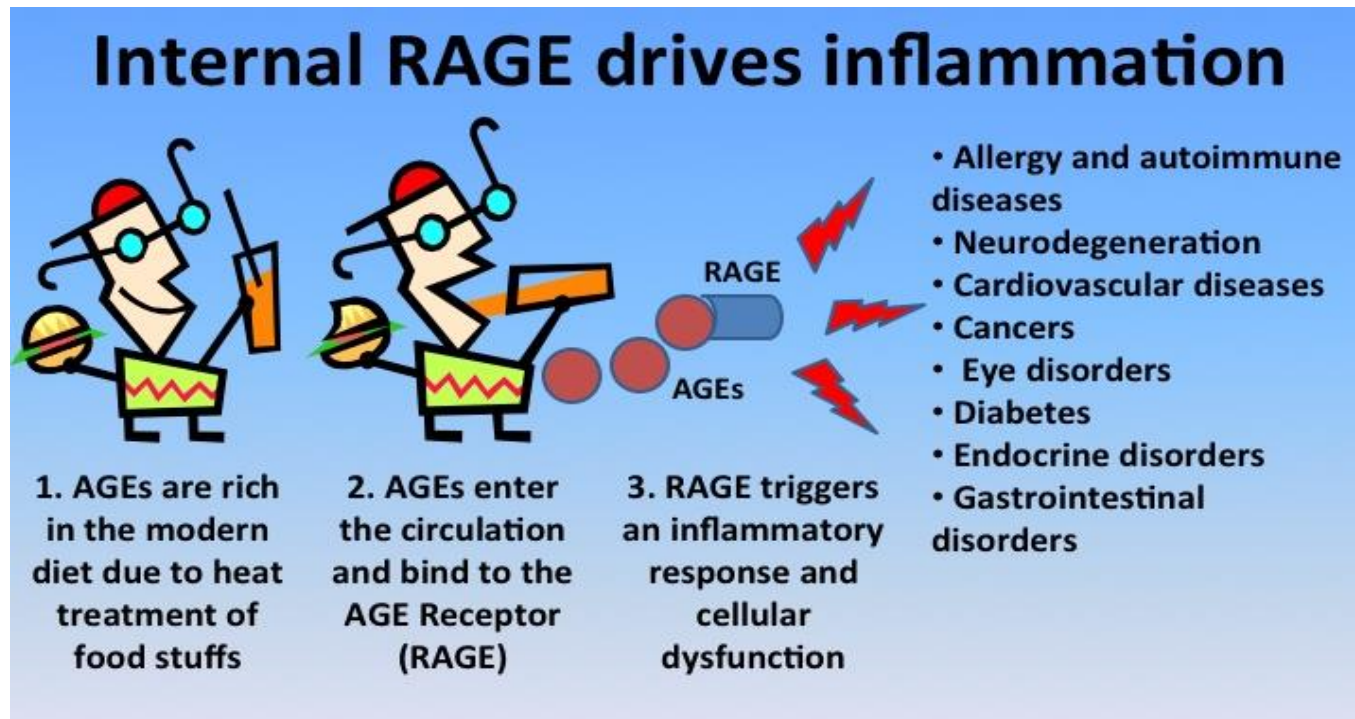
Glikacja jest wynikiem kowalencyjnego wiązania białka, lipidów lub cząsteczek DNA z cząsteczką cukru bez udziału enzymów, przypadkowy proces, który upośledza funkcjonowanie cząsteczek.

Skomplikowany szereg reakcji prowadzi do powstawania zaawansowanych produktów końcowych glikacji (AGE age glycation end products).

Niektóre AGE są nieszkodliwe, inne są zaangażowane w wiele chorób związanych z wiekiem, np.: choroby układu sercowo-naczyniowego, chorobę Alzheimera, głuchota.



Glikacja i starzenie

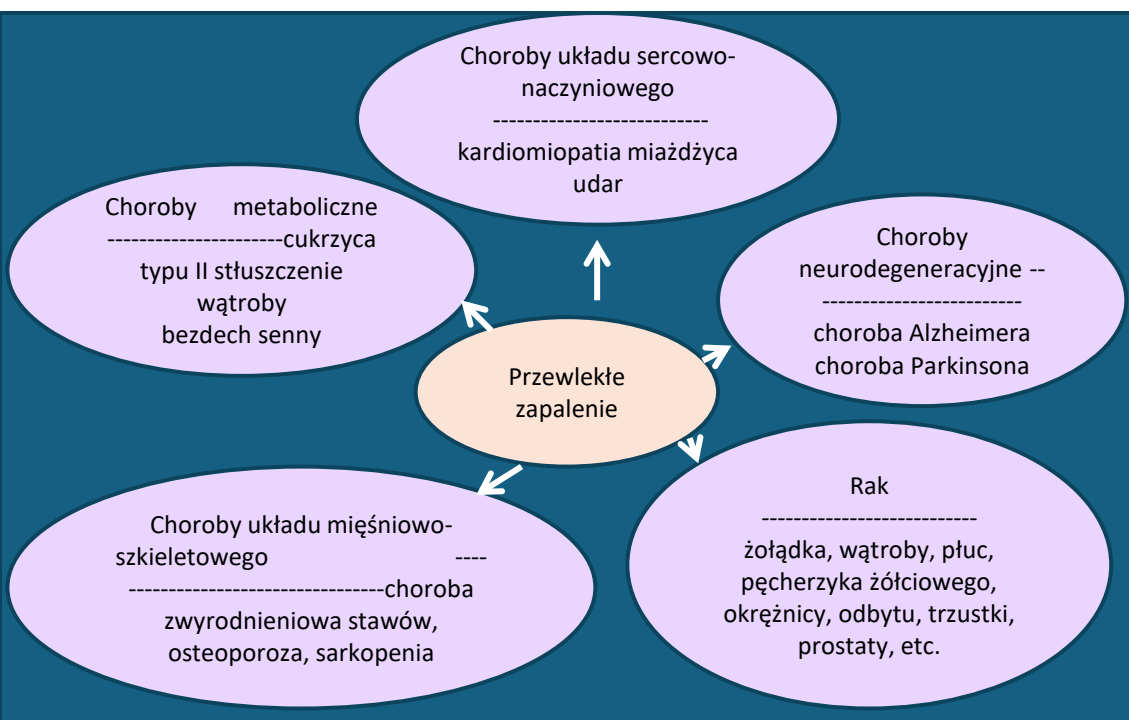


Niektóre typy komórek (komórki śródbłónka, komórki układu immunologicznego) posiadają receptory dla AGE - RAGE. Liczba RAGE zwiększa się wraz z wiekiem, w przebiegu chorób zwyrodnieniowych i cukrzycy. AGEs gromadzą się w komórkach i stymulują produkcję wolnych rodników, aktywność NFkB i zapalenie starcze (inflammaging).

Zapalenie starcze (Inflammaging) przewlekłe

ogólne zapalenie - proces o umiarkowanym nasileniu rozwijający się w przebiegu starzenia

Zmienione poziomy prozapalnych cytokin (np.: IL-6 i TNF), białek ostrej fazy (białka C-reaktywnego), zmniejszony poziom cytokin przeciwzapalnych np. IL-10 zaburza działanie układu immunologicznego.



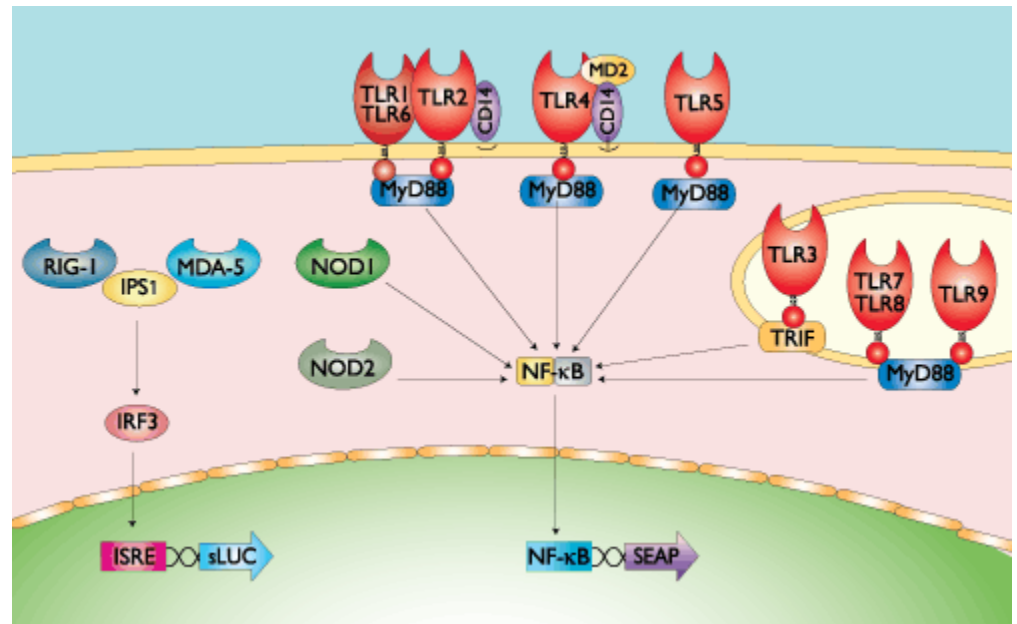
Zapalenie starcze -
przyczyna rozwoju wielu
chorób związanych z
wiekiem.

Toll- and NOD-like receptors

Rozpoznają PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), i DAMPs (damage-associated molecular patterns) uwalniane z komórki w wyniku jej uszkodzenia.

Toll-like receptors (TLR)

Białka transbłonowe. Interakcja TLR ze specyficznym PAMP indukuje NF- κ B, a tym samym wydzielanie cytokin prozapalnych i cząsteczek kostymulujących.



NOD-like receptors (NLRs)

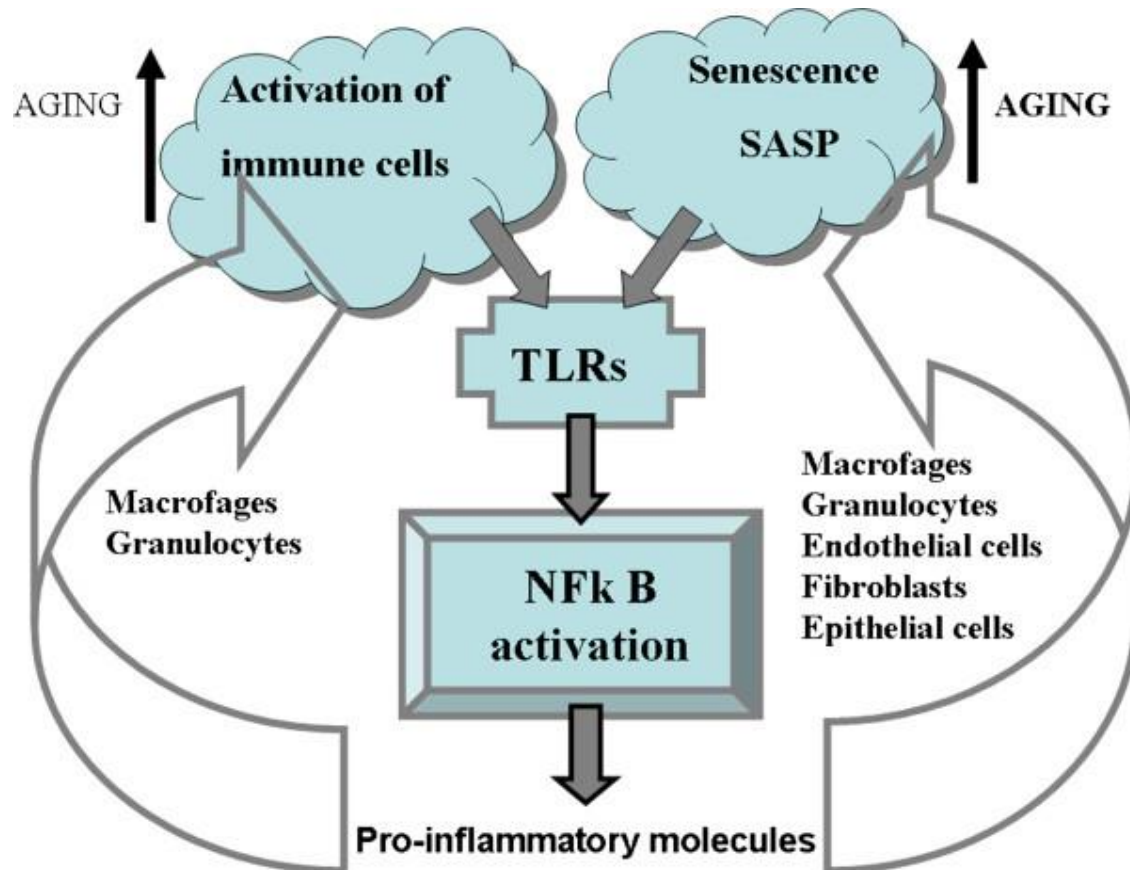
Cytoplazmatyczne białka regulujące odpowiedź zapalną i apoptozę. Po interakcji z rozpoznanymi wzorcami molekularnymi aktywują NF- κ B i produkcję czynników prozapalnych.

Czynnik transkrypcyjny NF-κB i starzenie

nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

kompleks białkowy kontrolujący produkcję cytokin i przeżycie komórek.

Promuje przeżycie komórek i reguluje odpowiedź odpornościową na infekcje. Nieprawidłowa regulacja NF-κB występuje w przebiegu nowotworów, chorób autoimmunizacyjnych, wstrząsie septycznym, i zapaleniach, w tym zapalenia starczego (**inflammaging**).





APOPTOZA

1842 – Vogt, 1885 – Flemming, 1965 – Kerr,
2002 - Brenner, Horvitz, Sulston – Nagroda Nobla - medycyna.

Typ I programowanej śmierci komórki - apoptoza

gr. „opadanie liści”



Apoptoza uczestniczy w różnych procesach biologicznych, takich jak rozwój, utrzymanie homeostazy tkanek i eliminacji komórek nowotworowych.

Apoptoza wymaga włączenia odpowiedniego szlaku biochemicznego.

Apoptoza

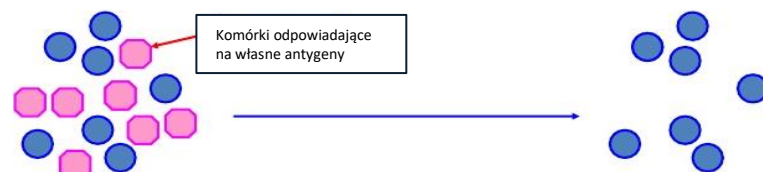
W czasie embriogenezy wiele komórek ulega procesowi apoptozy.

Różnicowanie palców spowodowane jest apoptozą komórek pomiędzy przyszłymi palcami.

Także przez resztę życia musi być utrzymana równowaga pomiędzy proliferacją a śmiercią komórek. Około 50 do 70 miliardów komórek ulega apoptozie u dorosłego człowieka. U dziecka w wieku pomiędzy 8 a 14 lat - około 20 - 30 miliardów komórek (np.: w szpiku kostnym, przewodzie pokarmowym).

Apoptoza w embriogenezie

Odporność: eliminacja zakazanych klonów



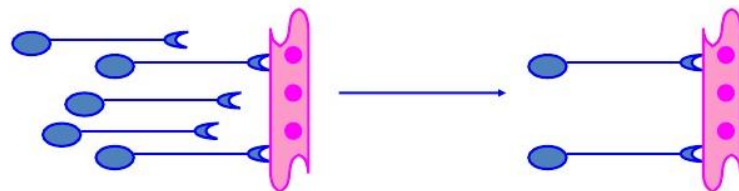
Rozmiar organu: eliminacja nadmiarowych komórek



Morfogeneza: eliminacja nadmiarowych komórek



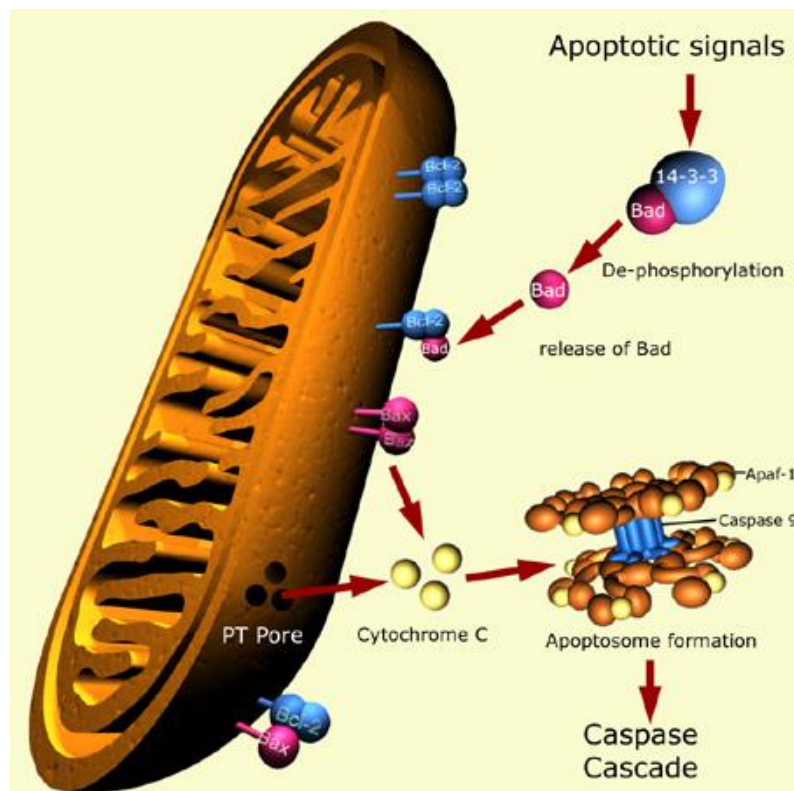
Selekcja: eliminacja нефunkcjonalnych komórek



Apoptoza

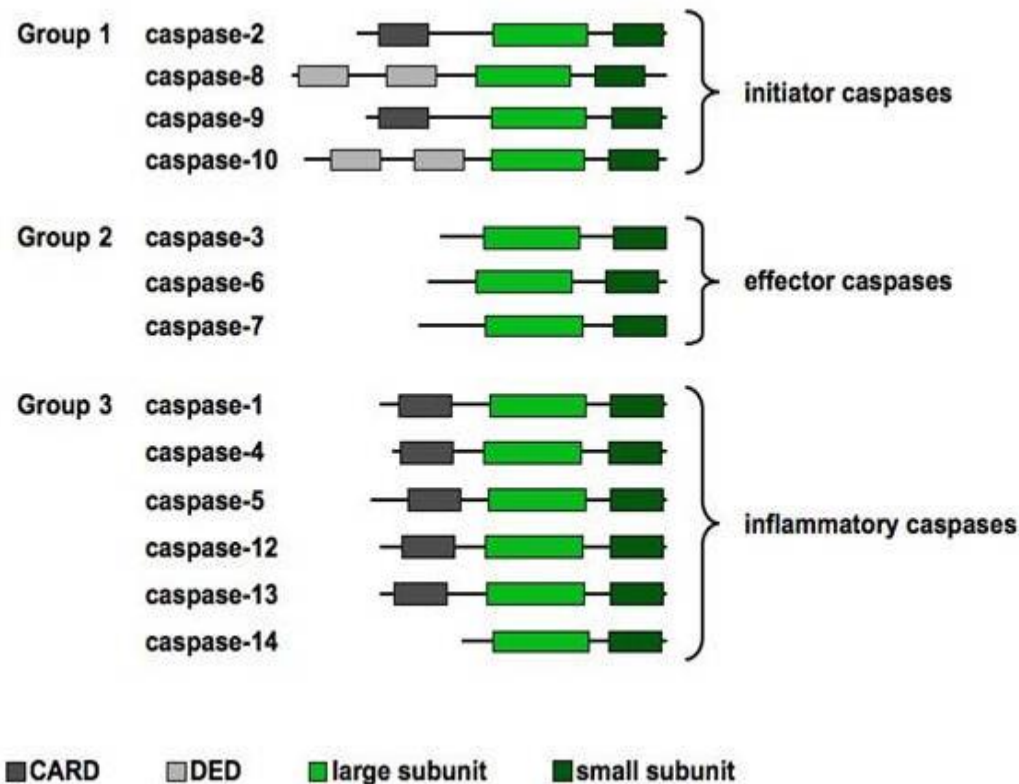
Włączana przez wiele szlaków sygnałowych, regulowanych przez wiele zewnętrznych i wewnętrznych ligandów wpływających na los komórek, determinujących ich śmierć lub przeżycie.

Wyróżnia się dwa główne szlaki apoptozy zależny i niezależny od kaspaz. Mitochondria, to organelle, w których łączą się różne szlaki apoptozy.



Kaspazy

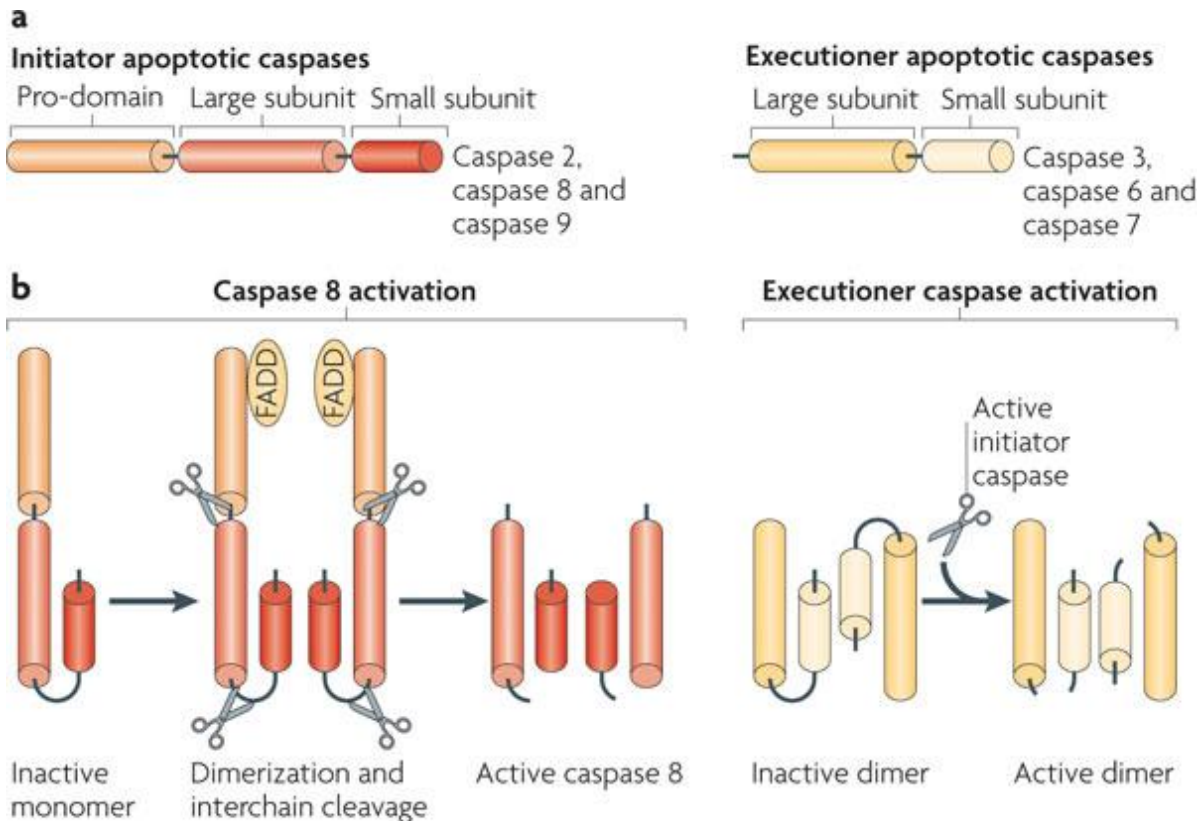
proteazy cysteinowe tnące wiązania peptydowe od strony karboksylowej reszty kwasu asparaginowego



Kaspazy są endoproteazami, które posiadają reszty cyteinowe w miejscu aktywnym.

Kaspazy

Apoptotyczne kaspazy dzielą się na dwie klasy: inicjatorowe (2, 8, 9 i 10) i egzekutorowe (3, 6, 7) (efektorowe).



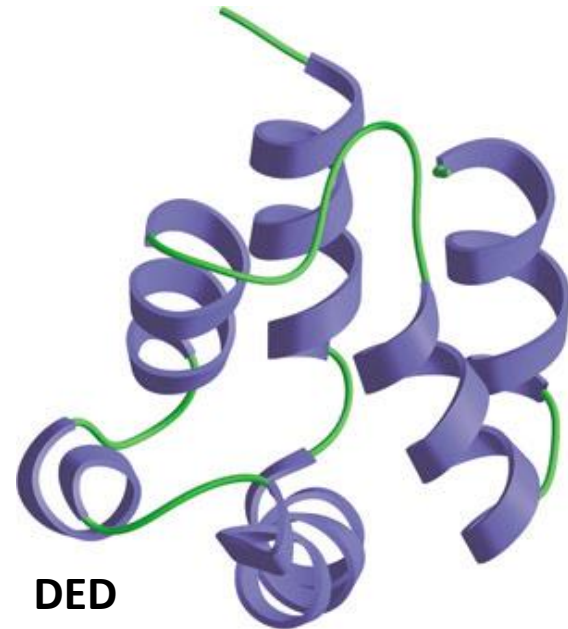
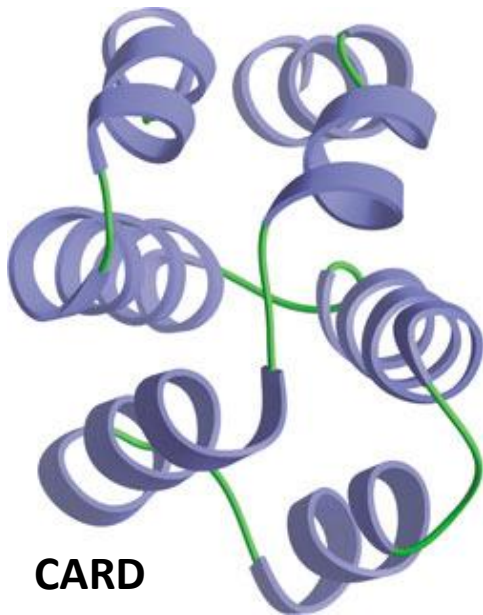
Enzymy te są obecne w cytoplazmie w postaci nieaktywnych proenzymów, które są aktywowane w wyniku proteolizy i tworzenia aktywnych tetramerów.

Kaspazy inicjatorowe

rekrutują kaspazy egzekutorowe

Kaspazy inicjatorowe 2 i 9 posiadają domenę rekrutacji i aktywacji kaspaz (CARD). Białka zawierające CARD, zwykle wiążą się z innymi białkami posiadającymi tę domenę.

Kaspazy inicjatorowe 8 i 10 posiadają efektorową domenę śmierci (DED). Białka zawierające DED, zwykle wiążą się z innymi białkami posiadającymi tę domenę.



Kaspazy egzekutorowe 3, 6, 7

koordynowanie fazy realizacji apoptozy przez rozkład wielu białek strukturalnych i naprawczych.

Głównym egzekutorem apoptozy jest kaspaza 3

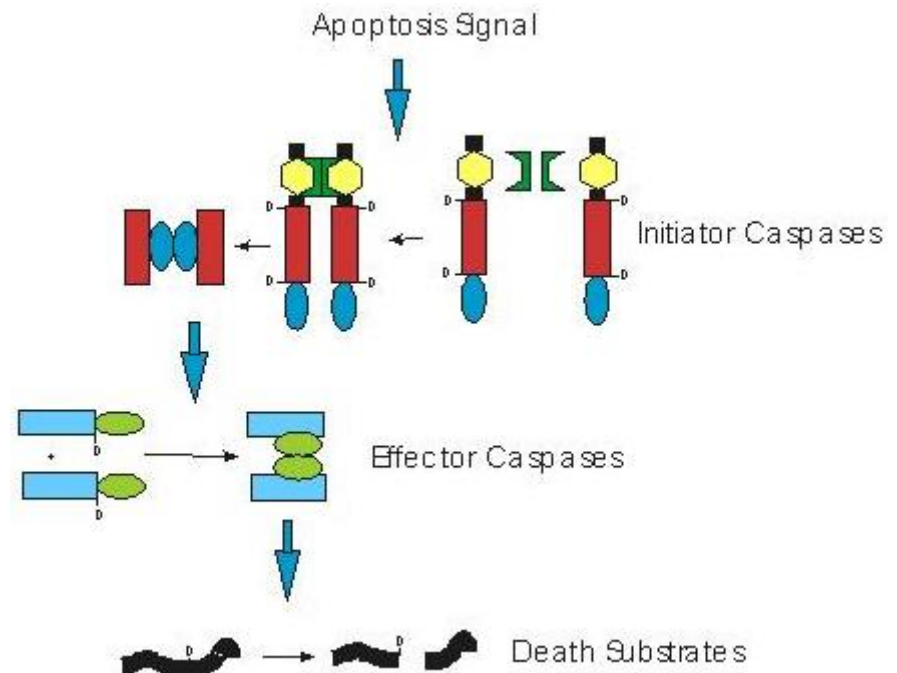
Substraty :

Liczne białka strukturalne i regulatorowe e. g.:

Gelsolina

Laminy jądrowe

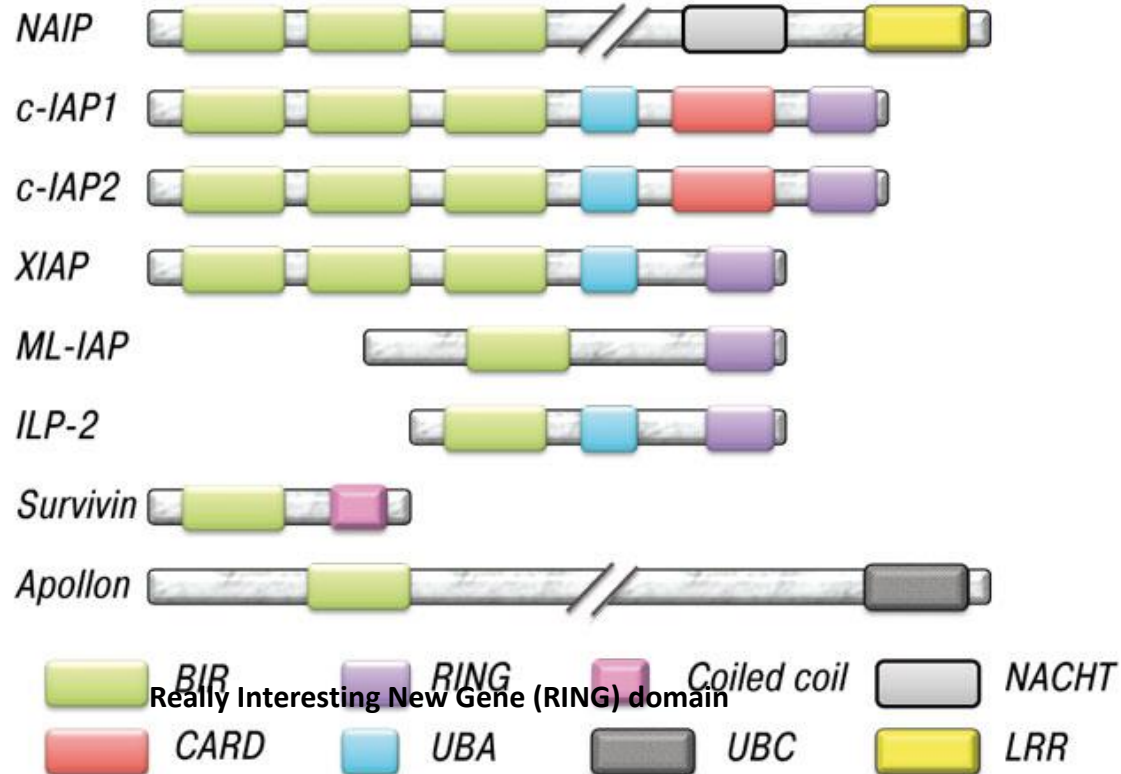
ICAD – inhibitor DNA-zy zależnej kaspaz (CAD). Po aktywacji CAD przecina DNA.



Białka inhibitorowe apoptozy (IAP)

rodzina białek - inhibitorów kaspaz

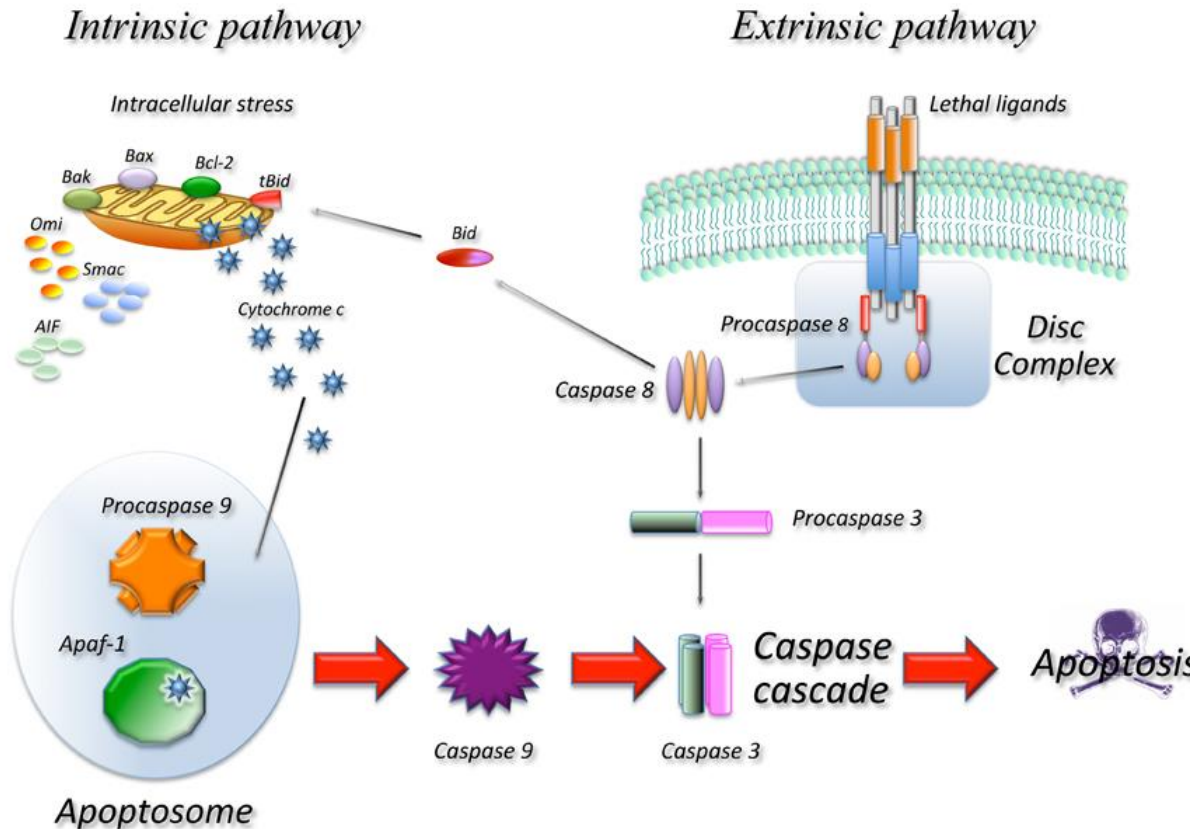
Niektóre białka IAP wiążą i hamują kaspazy. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) wiąże kaspazy 9, 3 i 7 i poprzez hamowanie ich aktywacji zapobiega apoptozie.



Zależny od kaspaz szlak apoptozy

Szlak wewnątrzpochodny

włączany przez czynniki powodujące uszkodzenia DNA, brak czynników wzrostu, brak prawidłowej interakcji z ECM (anoikis).

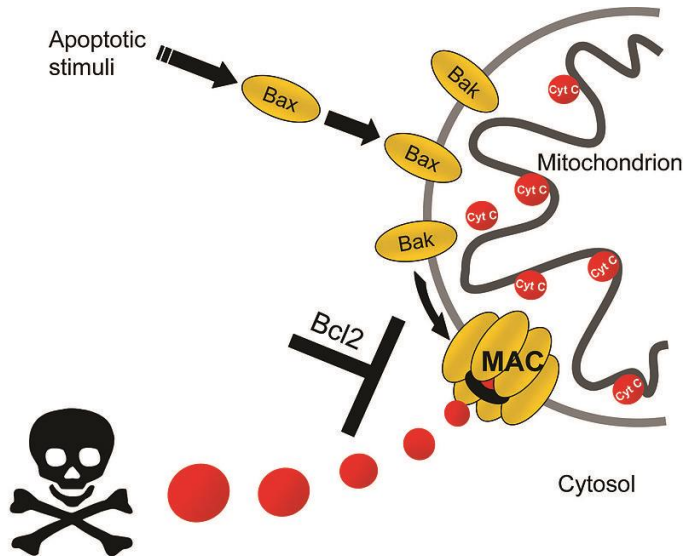


Szlak

zewnątrzpochodny
włączany wskutek
aktywności innych
komórek i ich
mediatorów – TNF,
FAS-ligand (CD95L) i
TRAIL (TNF-related
apoptosis-inducing
ligand)

Wewnątrzpochodny szlak apoptozy

Bcl-2 (B-cell lymphoma) – rodzina białek obejmująca białka regulatorowe apoptozy. Rodzina ta zawiera białka pro- i antyapoptotyczne



Białka antyapoptotyczne: Bcl-2 i Bcl-XL (extra large) hamują tworzenie mitochondrialnego kanału w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, a zatem hamują uwalnianie czynników proapoptotycznych z tych organelli.



Białka proapoptotyczne BAX (Bcl-2-associated X protein) i BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) powodują otwarcie kanałów w błonie mitochondriów.

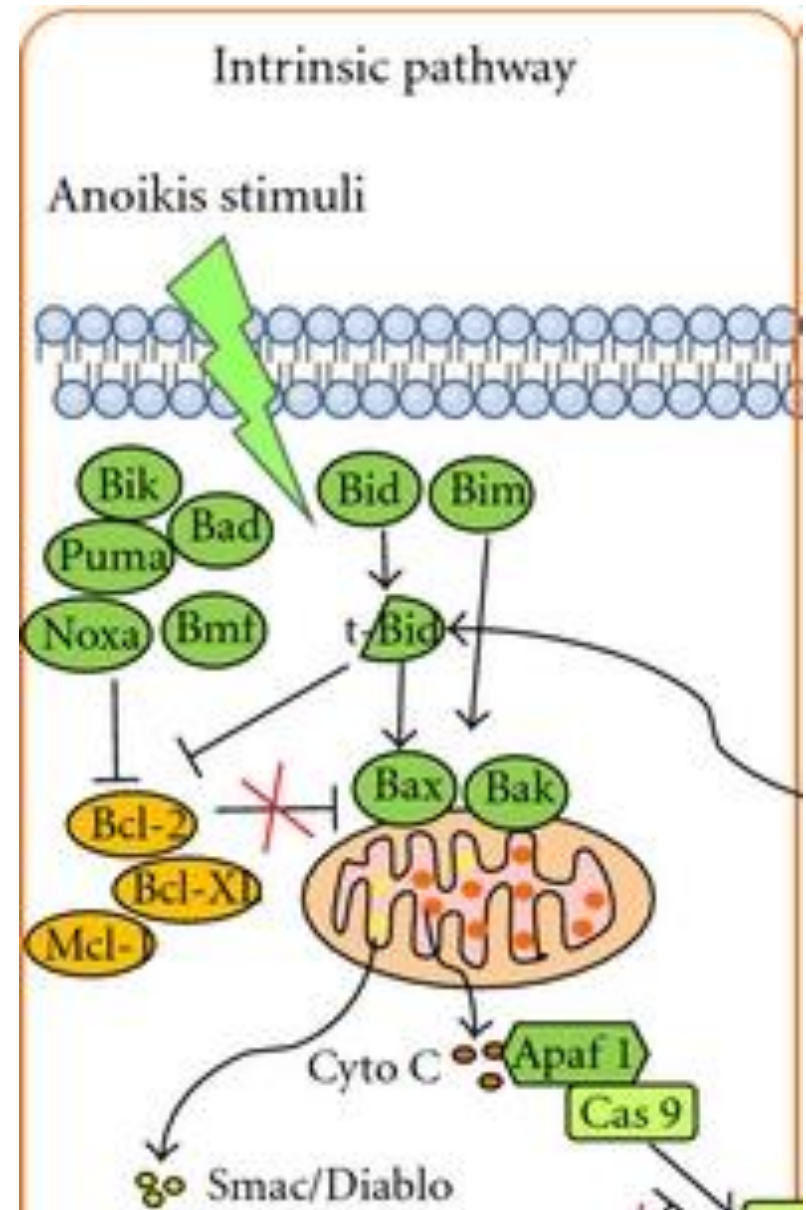
BAX
BAK



Wewnątrzpochodny szlak apoptozy

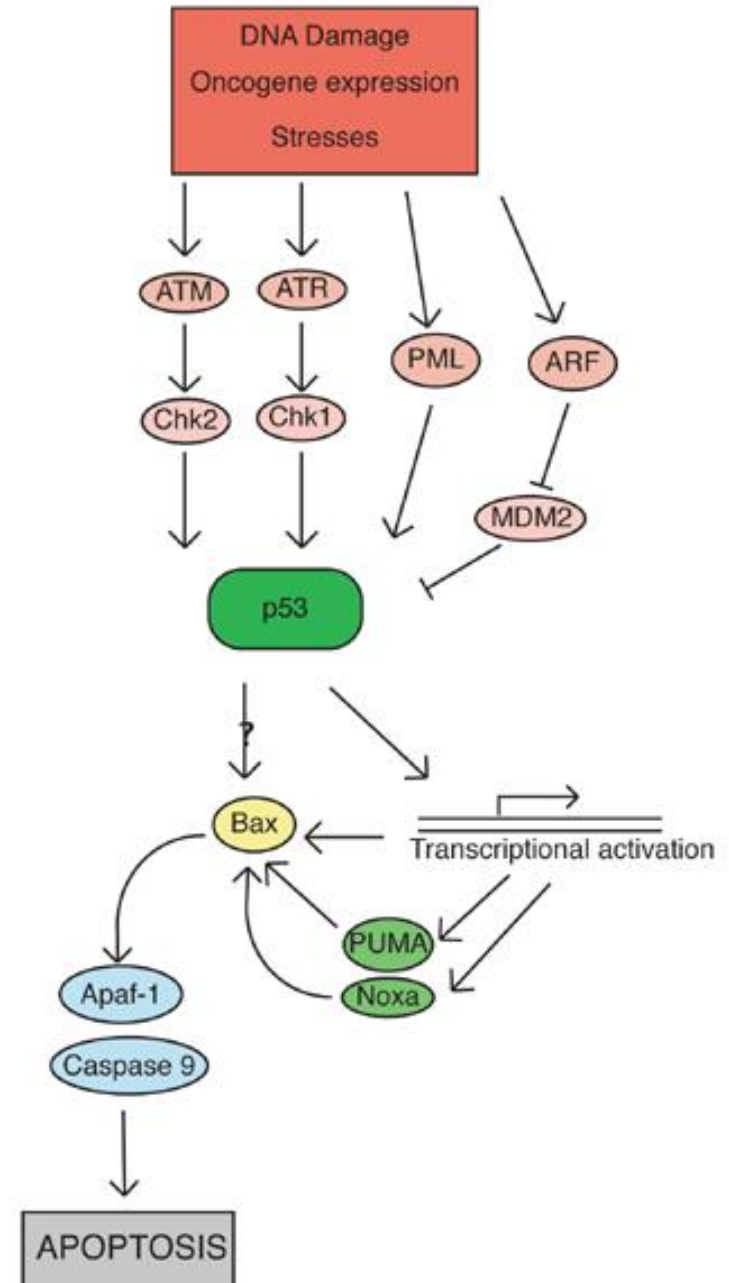
Nieprawidłowe interakcje między komórkami i ECM powodują uwolnienie białka **Bim** (Bcl-2L11) z cytoszkieletu.

BIM przez oddziaływanie z Bcl-2 i Bcl-XL, BAX i BAK umożliwia otwarcie kanałów mitochondrialnych, co prowadzi do uwolnienia cytochromu C i czynnika Diablo (anoikis).



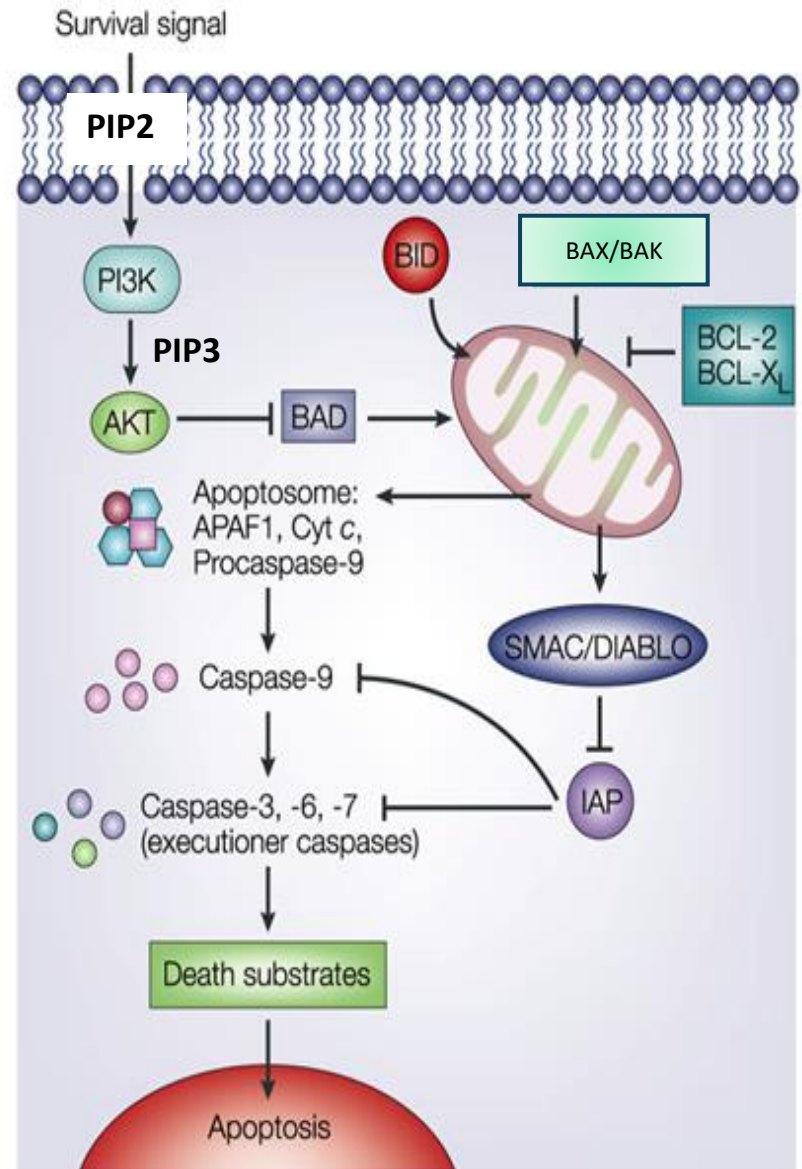
Wewnątrzpochodny szlak apoptozy

Uszkodzenia DNA powodują aktywację białka p53, które (jeśli naprawa DNA jest niemożliwa) zwiększa ekspresję białek Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) i (lub) Noxa. Podobnie do Bim powodują one uwolnienie cytochromu c i czynnika Diablo z mitochondriów.

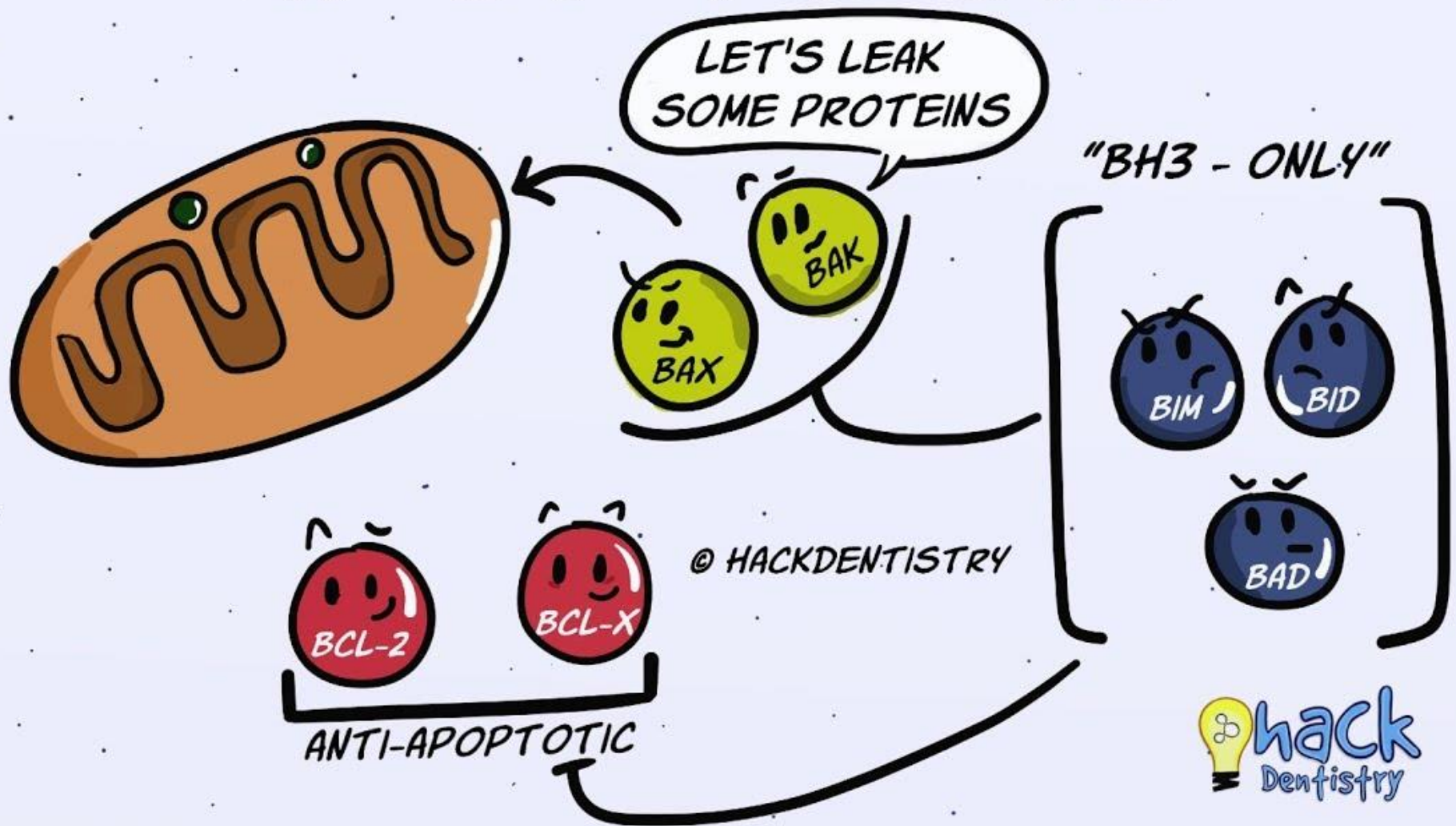


Wewnątrzpochodny szlak apoptozy

Brak czynników wzrostu powoduje aktywację białka BAD (Bcl-2-associated death promoter), które tworzy heterodimer z Bcl-2 i Bcl-X_L, inaktywując je i pozwalając aby BAX/BAK otworzyły kanały. Gdy BAD jest ufosforylowane przez kinazę Akt/białko B (aktywowaną przez PIP3) jest nieaktywne. To pozwala białkom Bcl-2 hamować apoptozę indukowaną przez BAX. Fosforylacja BAD jest więc antyapoptotyczna, a defosforylacja jest proapoptotyczna.

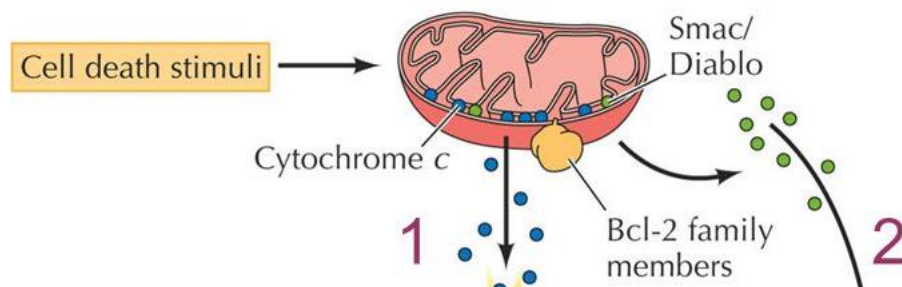


APOPTOSIS



Wewnątrzpochodny szlak apoptozy

Polega na uwolnieniu cytochromu c i czynnika Smac/Diablo z międzybłonowej przestrzeni mitochondriów

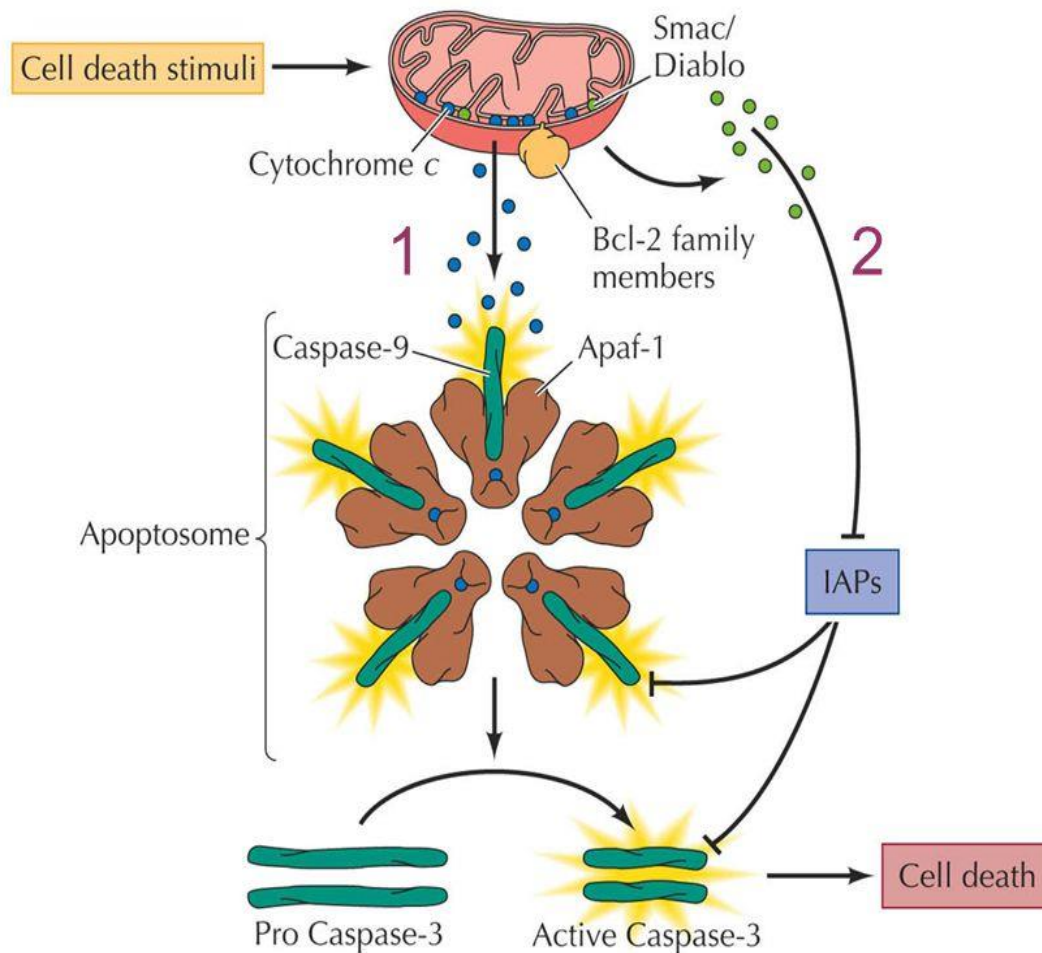


Cytochrom c jest hemoproteiną związaną z kardiolipiną wewnętrznego błony mitochondrialnej. We wczesnej fazie apoptozy zwiększa się produkcja RFT w mitochondriach i kardiolipina ulega oksydacji. Cyt c jest wówczas odłączany i może być uwalniany do cytoplazmy przez pory w zewnętrznej błonie mitochondrium.

DIABLO jest białkiem mitochondrialnym nazywanym SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases). To białko wiąże IAP, tym samym uwalniając kaspazy i przyczyniając się do aktywacji apoptozy.

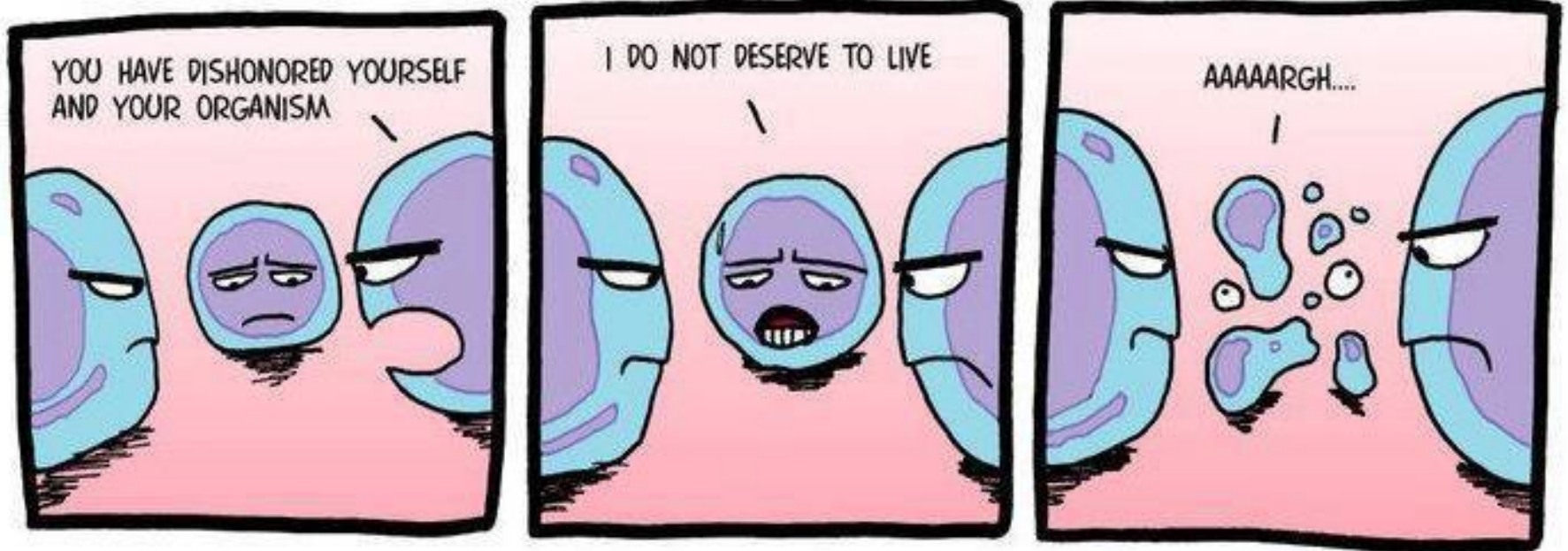
Wewnątrzpochodny szlak apoptozy

Cytochrom c wiąże cytoplazmatyczne białko Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), które posiada domenę CARD



Takie kompleksy agregują i tworzą apoptosomy. Apoptosomy wiążą i aktywują kaspazę-9. Kaspaza-9 aktywuje kaspazy efektorowe. Diablo wiąże białka inhibitorowe apoptozy (IAPs).

Szlak zewnątrzpochodny (aktywność innych komórek)



APOPTOSIS
cellular
harakiri

U2010

Zewnątrzpo pochodny szlak apoptozy

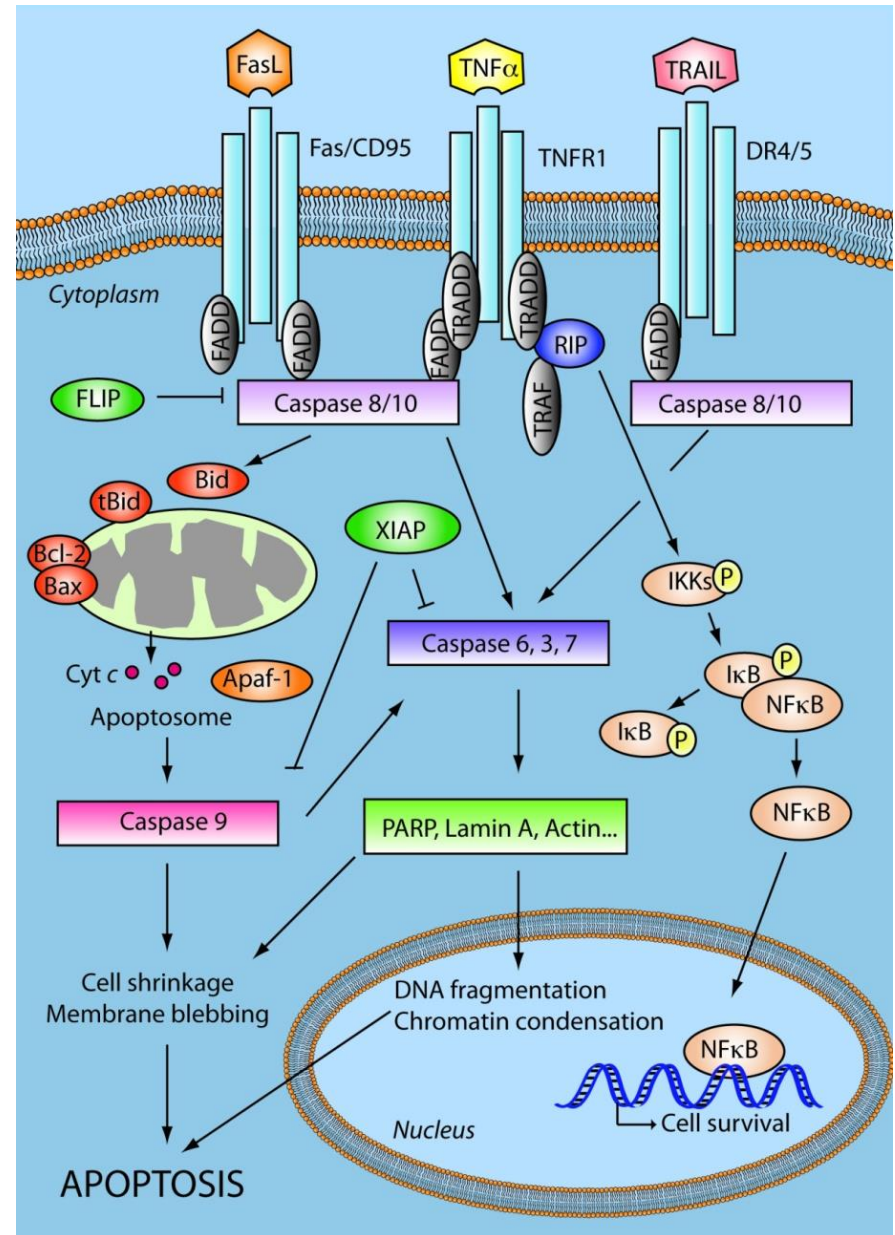
Aktywacja receptorów śmierci (DRs), należących do rodziny TNFR.

Fas wiąże Fas ligand, transbłonowe białko obecne na cytotoksycznych limfocytach T.

TNFR1 (DR3) wiąże TNF.

DR4 and DR5 wiąże TRAIL.

Cytoplazmatyczny fragment DRs zawiera domenę śmierci – DD. Po związaniu liganda DRs ulegają trimeryzacji i przez DD wiążą DD białek adaptorowych, które zawierają także efektorową domenę śmierci (DED), przez którą rekrutują kaspazy inicjatorowe - 8 lub (i) 10 tworząc DISC (death-inducing signaling complex).



Zewnątrzpo pochodny szlak apoptozy

Białka adaptorowe z domenami DD i DED:

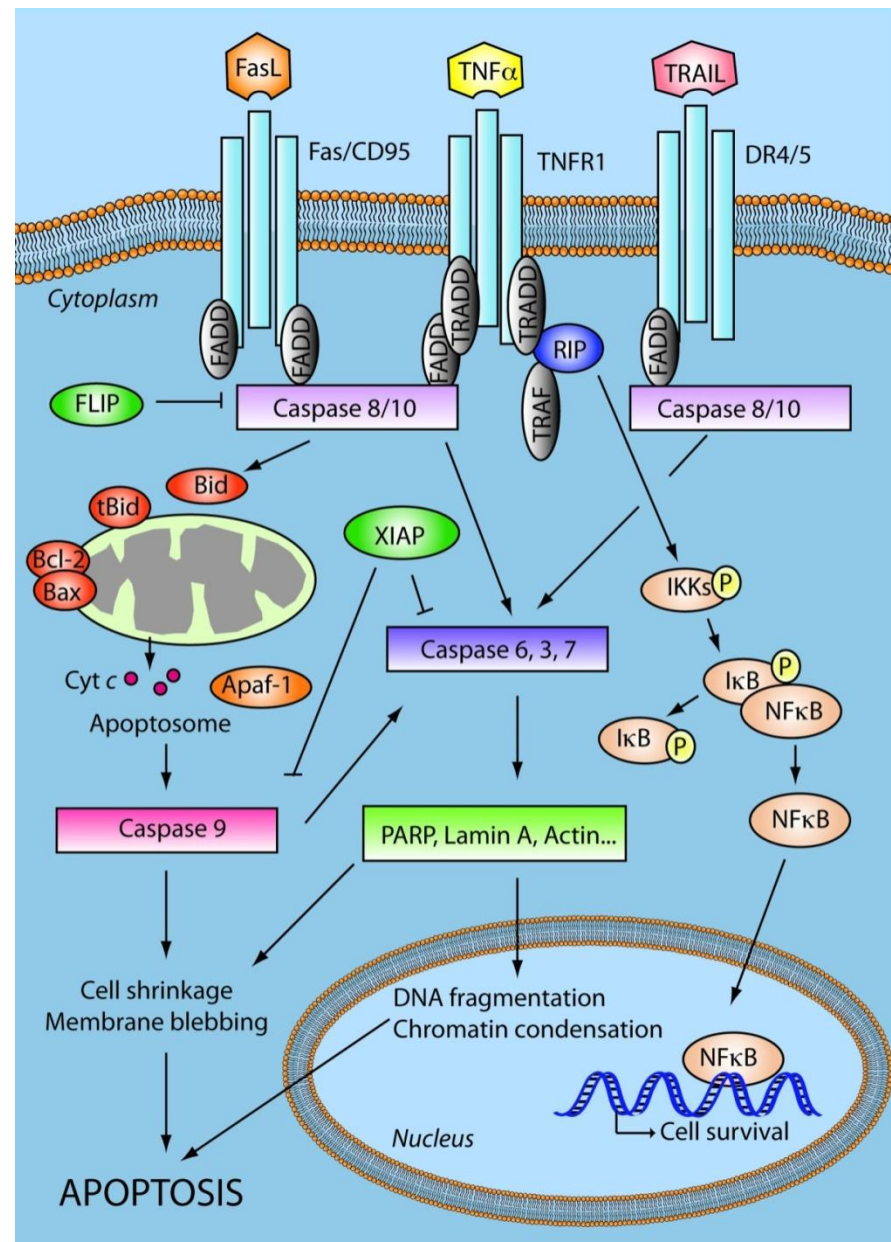
TRADD -Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein

FADD -Fas-associated protein with death domain

Czynniki antyapoptotyczne:

TRAF1 i 2 - TNF receptor associated factors, współdziałające z IAPs.

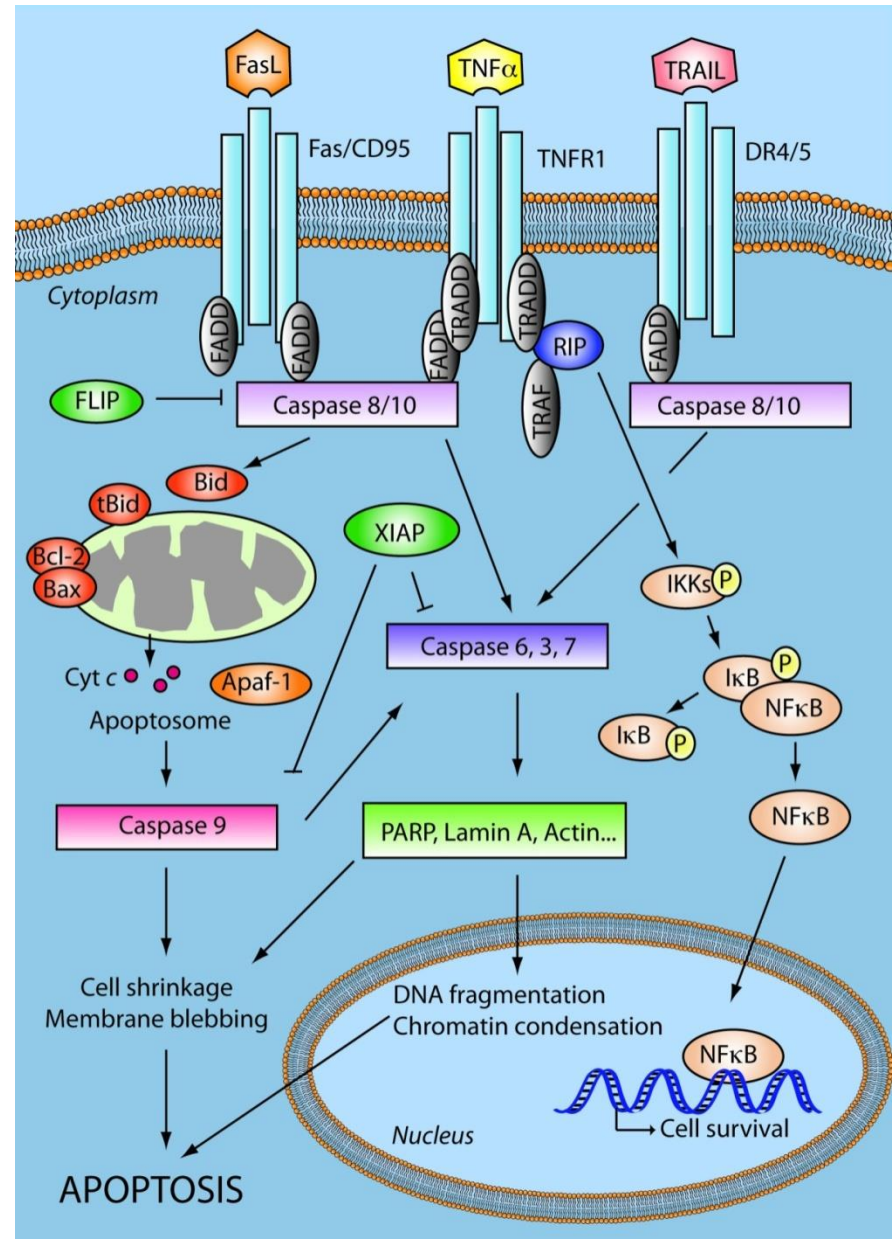
Kinaza RIP1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) z domeną DD współdziała z FADD, TRADD i TRAF2 i promuje aktywację NF κ B, który indukuje produkcję IAPs i hamuje apoptozę.



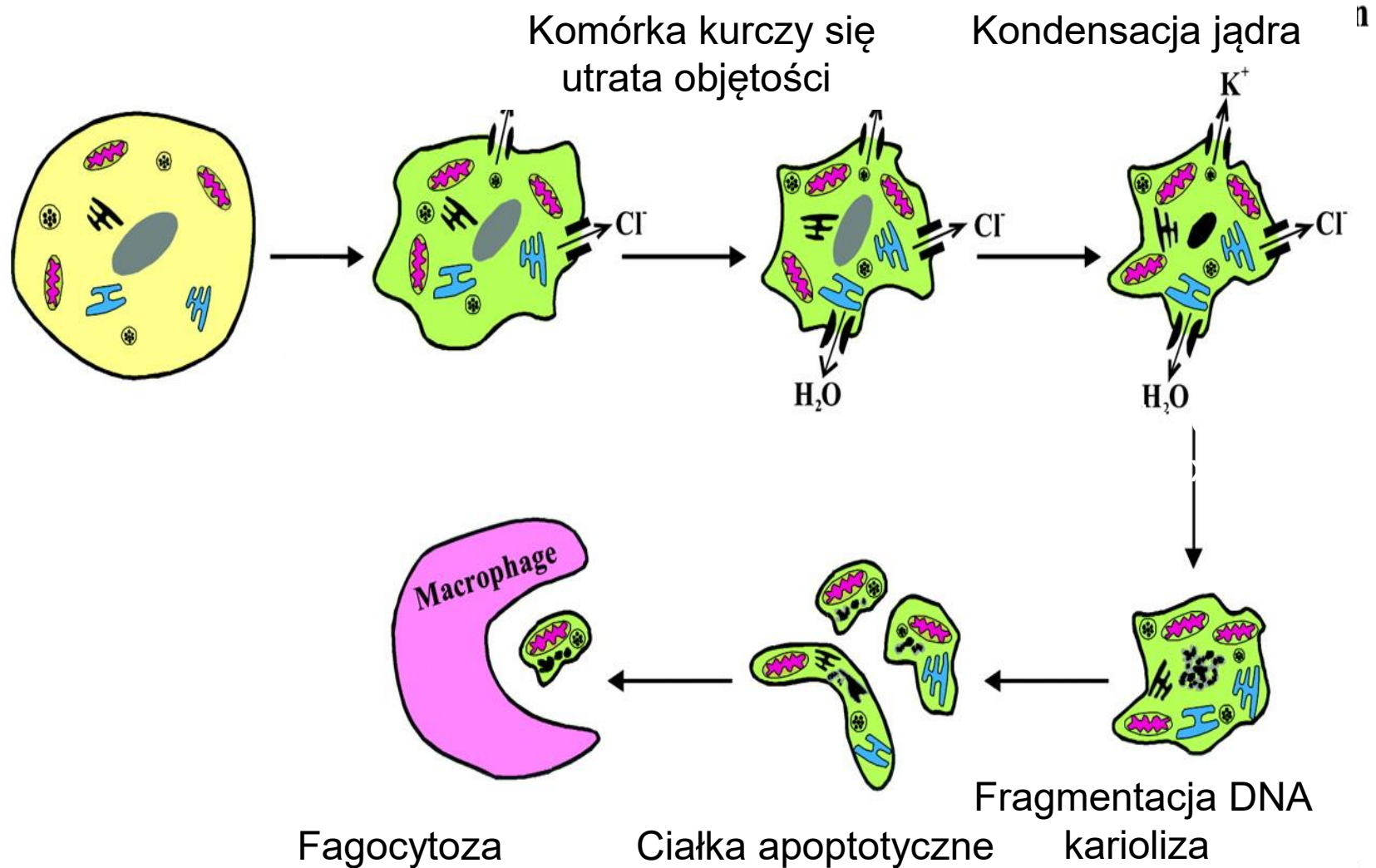
Zewnątrzpochodny szlak apoptozy

Receptory śmierci po związaniu ligandu mogą również stymulować mitochondria do uwalniania cytochromu c i czynnika Diabło poprzez białko BID (BH3 interacting-domain death agonist). BID powoduje wbudowanie Bax w zewnętrzną błonę mitochondrialną, i otwarcie kanałów mitochondrialnych.

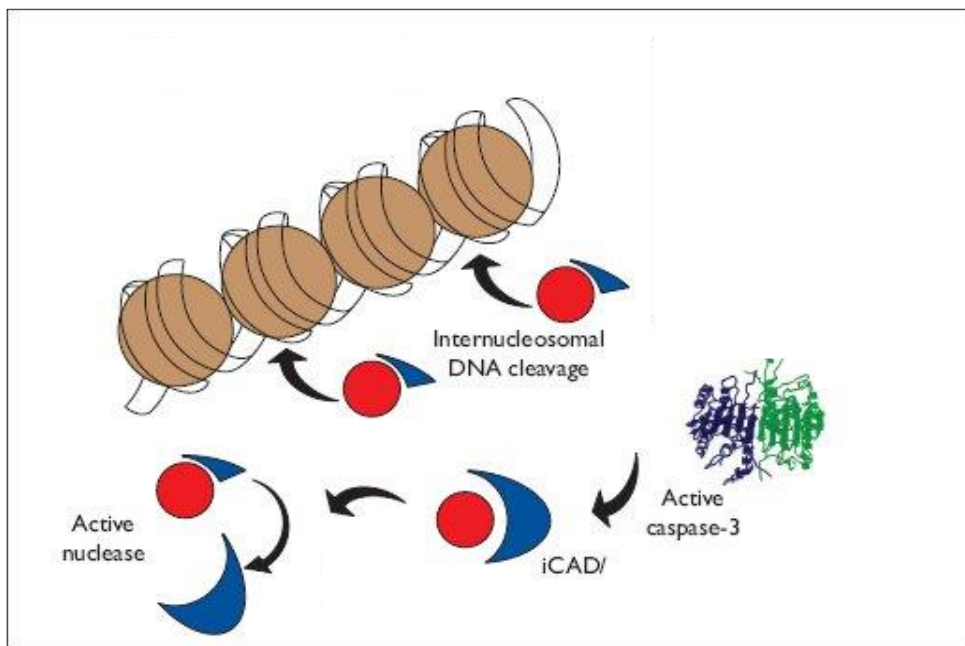
Receptory wabikowe konkurują z receptorami śmierci. Wiążą ligandy, lecz nie przekazują proapoptotycznego sygnału (nie mają odpowiednich domen).



Egzekucja apoptozy



Fragmentacja DNA podczas apoptozy

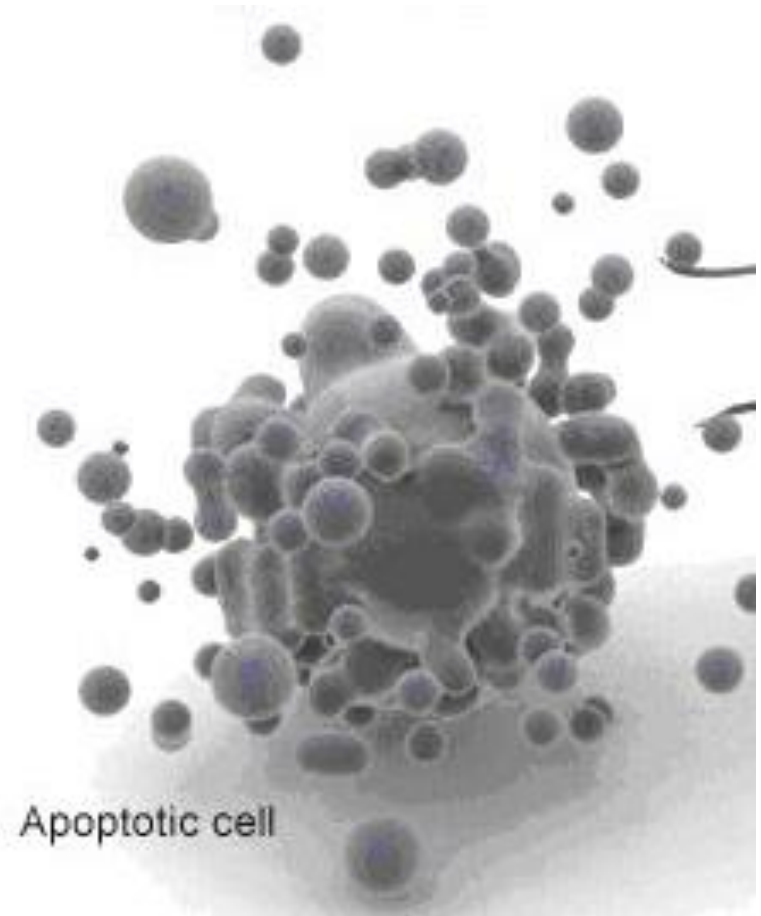


Enzymem odpowiedzialnym za fragmentację DNA w apoptozie jest DNA-za zależna od kaspaz (CAD). CAD jest zwykle hamowana przez inhibitor - ICAD. Podczas apoptozy kaspaza 3 rozkłada ICAD i tym samym aktywuje CAD.

CAD przecina DNA w odcinkach usytuowanych pomiędzy nukleosomami, zatem co ~ 180 -bp, dlatego że DNA jest zwykle ciasno owinięte wokół histonów. DNA łączące to fragmenty łatwo dostępne dla CAD. Fragmenty DNA mogą obejmować odcinki liczące 180 lub wielokrotność 180 bp (360, 540, 720 etc)

Powstawanie ciałek apoptotycznych

Ciałka apoptotyczne – małe pęcherzyki otoczone błoną. Tworzenie ciałek apoptotycznych jest mechanizmem zabezpieczającym przed wydostaniem się potencjalnie toksycznych lub immunogennych składników wnętrza umierającej komórki na zewnątrz i przeciwdziałanie procesom zapalnym, autoimmunizacyjnym i destrukcji tkanek.



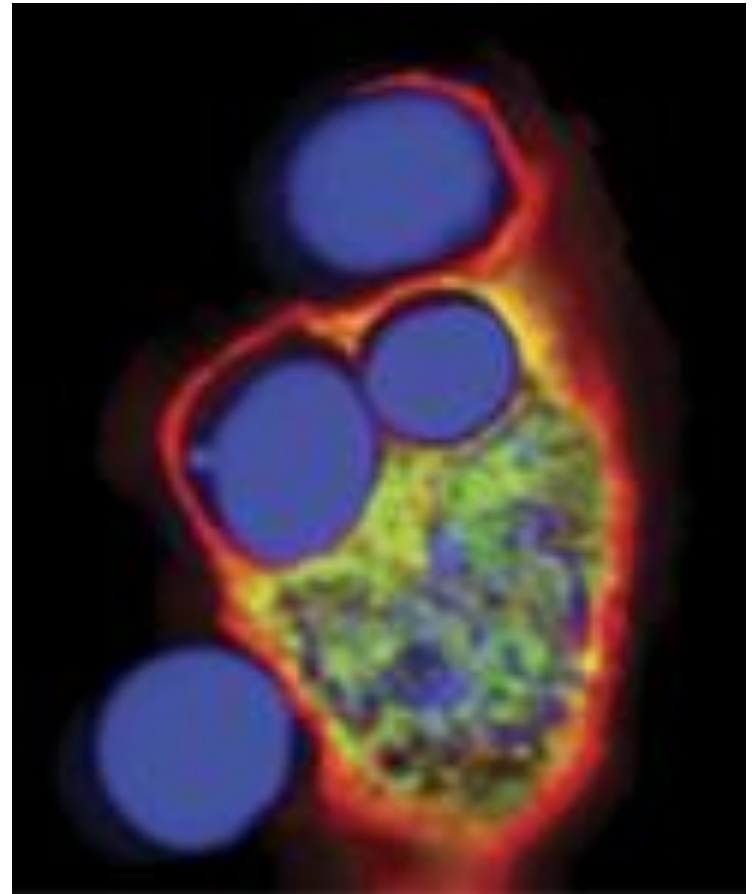
Apoptotic cell

Fagocytoza - efferocytoza

(efferre, łac. „składać do grobu”, „pogrzebać”), proces, w którym umierające/martwe komórki są usuwane przez komórki fagocytyjące.

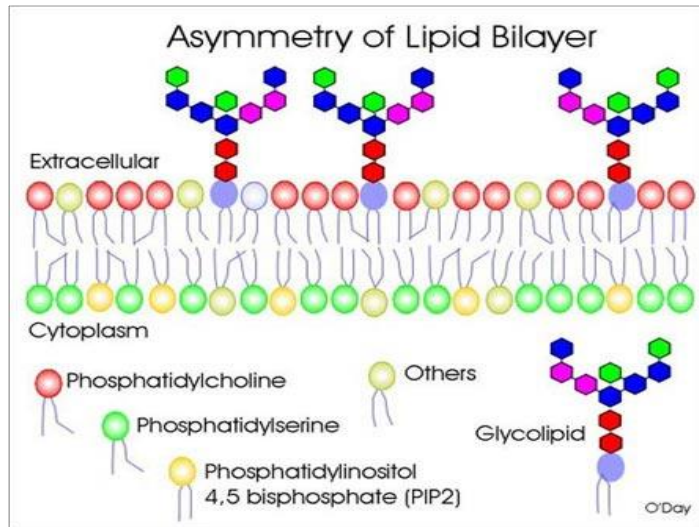
W efferocytozie uczestniczą makrofagi, komórki dendrytyczne, nabłonkowe i fibroblasty.

Podczas efferocytozy komórki żerne pochłaniają ciała apoptotyczne, formując duże pęcherzyki zwane – efferosomami.

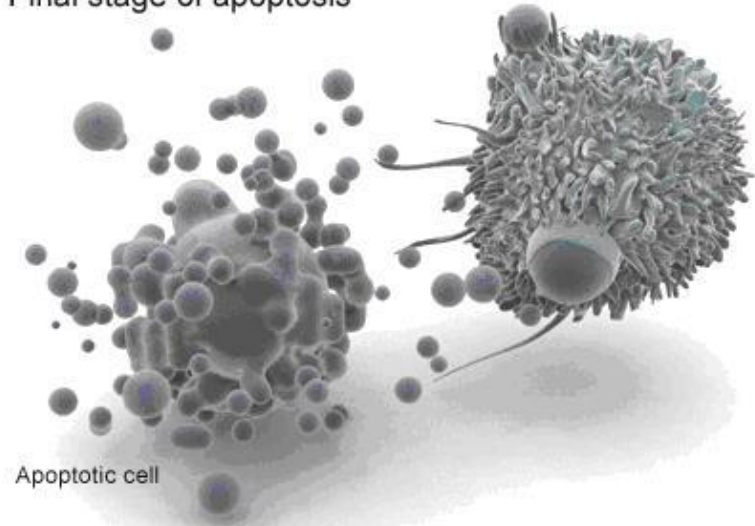


Fagocytoza - efferocytoza

Komórki apoptotyczne mają specjalny sygnał dla fagocytów – obecność fosfatydyloseryny w warstwie zewnętrznej błony komórkowej. Zwykle fosfatydyloseryna występuje w warstwie wewnętrznej błony komórkowej.



Final stage of apoptosis



Enzym - floppaza przenosi fosfatydyloserynę z warstwy wewnętrznej do zewnętrznej (flip-flop).

Komórki fagocytyjace mają receptory dla fosfatydyloseryny.

SENOLITYKI

FOXO4-related peptides, Wiązanie FOXO4 z białkiem p53 zapobiega apoptozie. Peptyd wiążący się z FOXO4 zakłóca interakcję p53-FOXO4, uwalniając p53 i wywołując śmierć komórki.

Inhibitory różnych białek antyapoptotycznych z rodziny bcl-2. Fisetyna i kwercetyna indukują apoptozę poprzez hamowanie białka antyapoptotycznego Bcl-xL.

Inhibitory kinazy tyrozynowej Src: dasatinib z kwercetyną I faza badań klinicznych

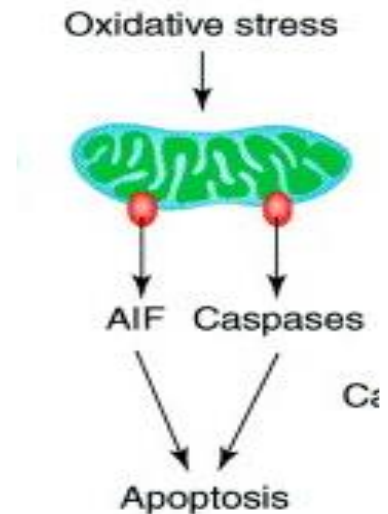
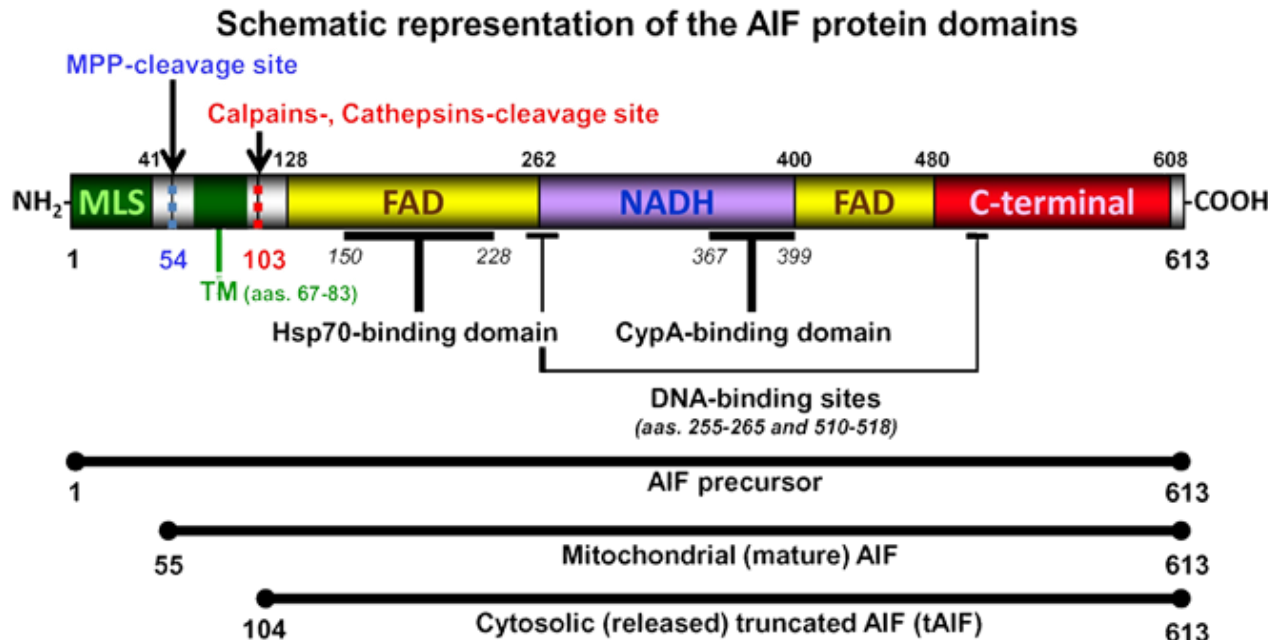
Gemcytabina (cytotoksyczny chemoterapeutyk), prolek aktywowany przez lizosomalną β -galaktozydazę (powszechny marker starzenia).

Inhibitory glutaminazy typu nerkowego 1 (GLS1). Komórki starzejące mają niskie pH ze względu na wysoką zawartość lizosomów i przeciekające błony lizosomalne.

Aby zneutralizować niskie pH, komórki te produkują dużo GLS1; Hamowanie aktywności tego enzymu naraża komórki na letalnie niskie pH, co prowadzi do śmierci komórki

Niezależny od kaspaz szlak apoptozy

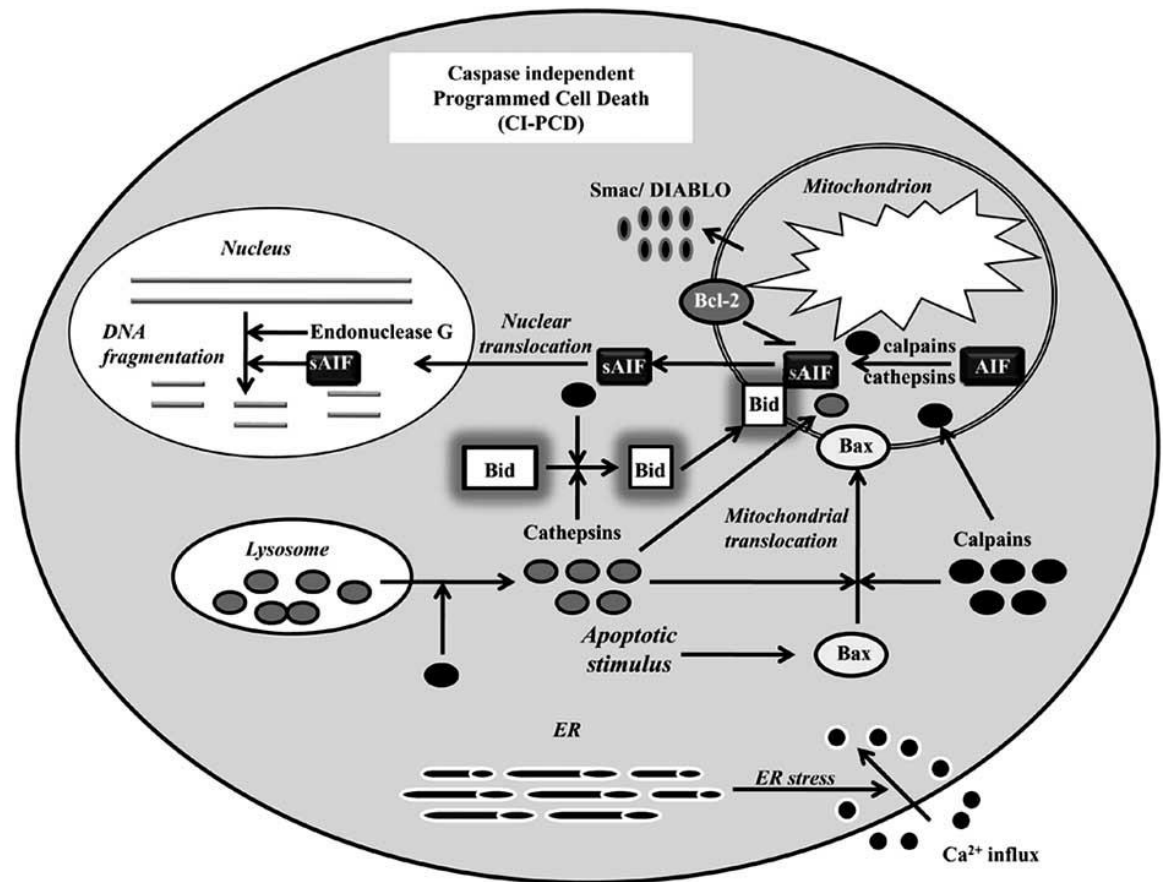
AIF (Apoptosis-inducing factor) mitochondrialna flawoproteina o aktywności oksydazy NADH. AIF przemieszcza się z mitochondriów do cytozolu i do jądra w wyniku indukcji apoptozy. AIF indukuje kondensację chromatyny i fragmentację DNA. AIF może być uwalniany z mitochondriów procesie zależnym i niezależnym od kaspaz.



Niezależny od kaspaz szlak apoptozy

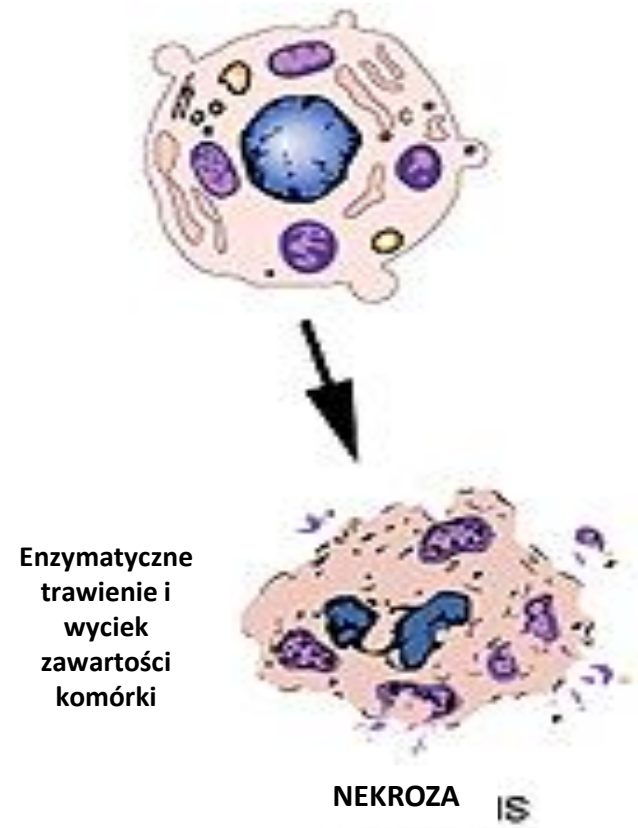
Enzymami egzekutorowymi w tym szlaku są katepsyny, kalpainsy. Katepsyny są uwalniane z lizosomów, a kalpainsy są aktywowane przez napływ jonów Ca^{2+} do komórki spowodowany stresem ER.

Katepsyny i kalpainsy uczestniczą w cięciu i translokacji Bax i Bid do mitochondriów i cięciu AIF. Białka Bax i Bid powodują uwolnienie AIF z mitochondriów. AIF indukuje fragmentację DNA.

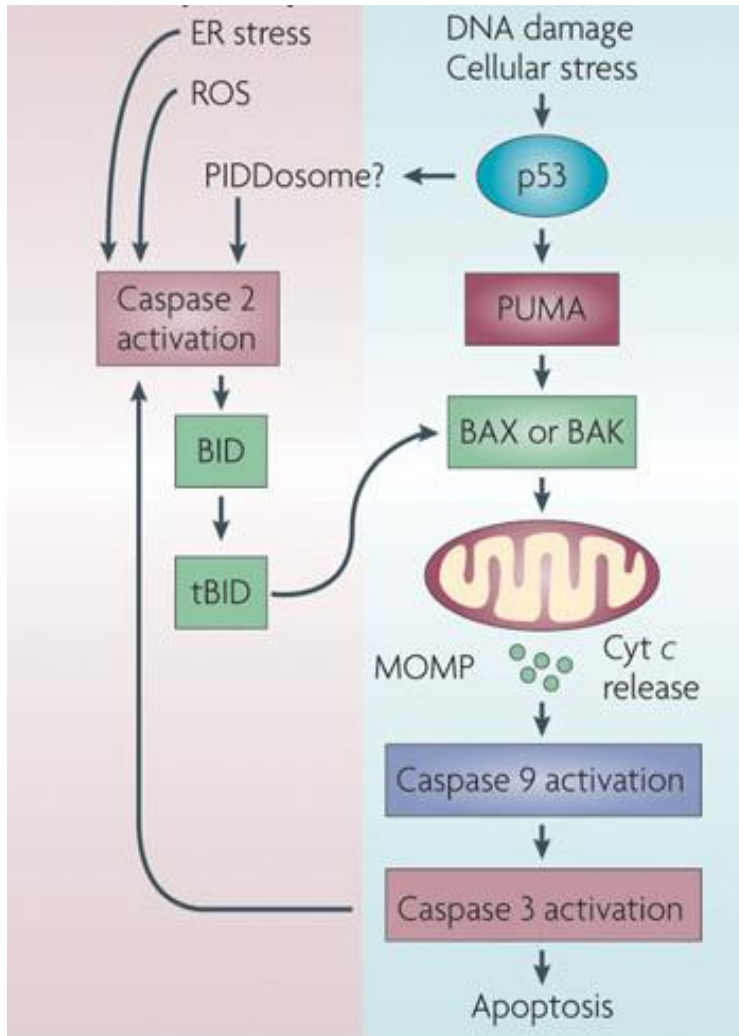


Nekroza

Martwica (gr., łac. -martwy) – zmiany morfologiczne zachodzące po śmierci komórki w żywym organizmie. Są to nieodwracalne zmiany w jądrze (rozpad jądra, karioliza) i cytoplazmie (kondensacja, utrata struktury, fragmentacja). To cechy martwych komórek, niezależnie od mechanizmu, który do śmierci doprowadził. W fizycznie uszkodzonych komórkach lub w martwej tkance destrukcja komórek jest wynikiem **autolizy**, przeprowadzanej przez enzymy uwolnione z lizosomów. Enzymy te zostały uwolnione wskutek ustania aktywnych życiowych procesów w komórce. Dlatego, choć autoliza przypomina aktywny proces jednak nim nie jest.

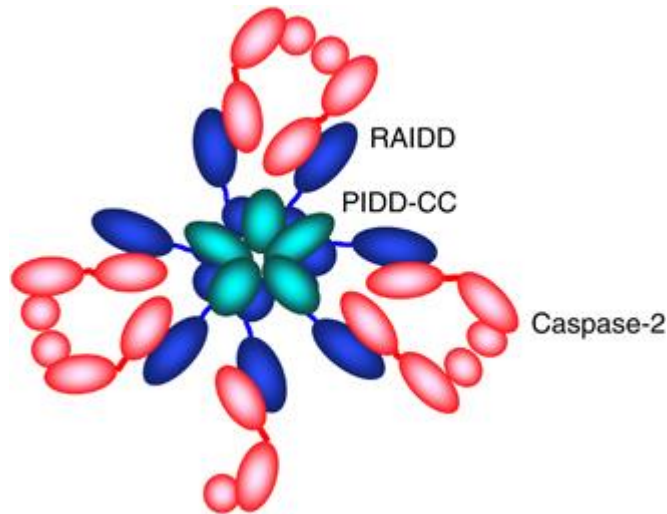


Zależny od kaspazy 2 szlak apoptozy

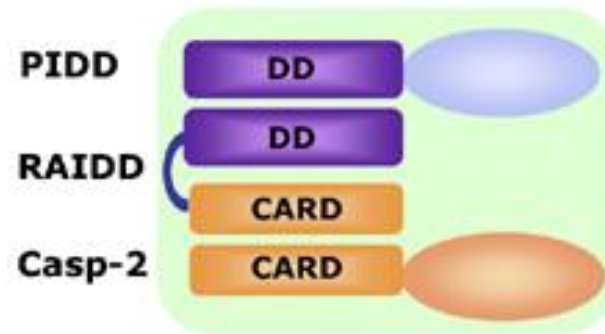


W odpowiedzi na uszkodzenie DNA lub inny rodzaj stresu, p53 aktywuje apoptozę przez białka Puma, NOXA, aktywację BAX/BAK, uwalnianie cyt c. W alternatywnym szlaku p53 aktywuje śmierć komórkową przez PIDD - składnik PIDDosomu uaktywniający kaspazę 2 (kaspaza 2 może być również aktywowana przez DISC i kaspazę 8). Kaspaza 2 aktywuje białko BID, a to powoduje, uwolnienie cyt c. Kaspaza 3 może aktywować kaspazę 2. Kaspaza 2 indukuje również apoptozę wywołaną przez RFT i stres ER. Droga kaspazy 2 może zatem być zapasowym mechanizmem apoptozy zależnym od p53.

Zależny od kaspazy 2 szlak apoptozy



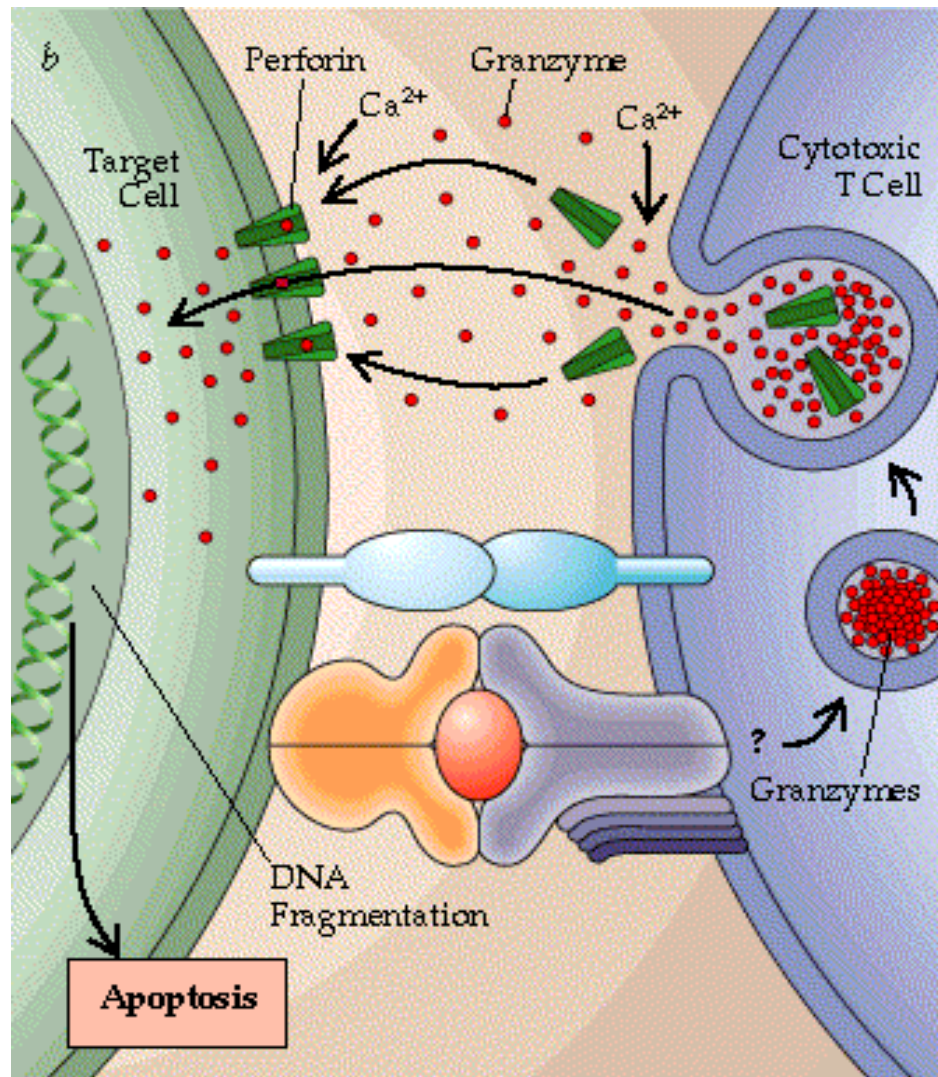
PIDDosom jest strukturą zbudowaną z białek PIDD, RAIDD i kaspazy 2. Piddosom uczestniczy w aktywacji tej kaspazy.



PIDD - p53-induced protein with a death domain
RAIDD - RIP-associated Ich-1/Ced-3 homologous protein with a death domain. To białko zawiera także domenę CARD, podobnie jak kaspaza 2.

Perforynowo/granzymowy szlak of apoptozy

Cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK mają ziarnistości zawierające perforyny i granzymy

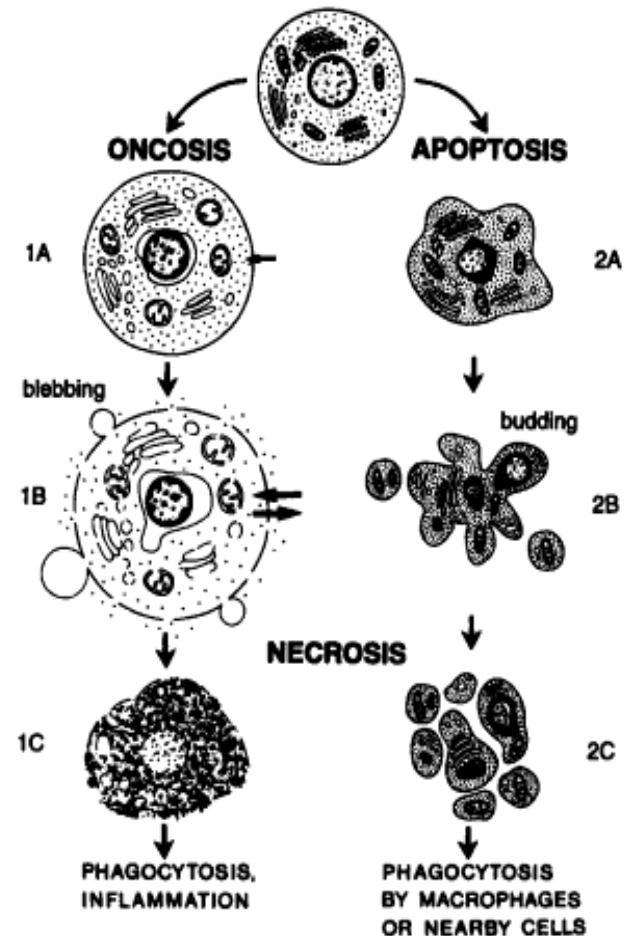


Po degranulacji perforyny wbudowują się w błonę komórki docelowej i oligomeryzują tworząc pory (proces Ca^{2+} zależny). Pory te pozwalają na dyfuzję proapoptotycznych proteaz serynowych zwanych granzymami.

Granzym B indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspaz - inicjatorowych 8, 10, egzekutorowych 3, 7, białka BID oraz ICAD.

Onkoza – pasywna, przypadkowa śmierć komórki

Spowodowana, zwykle, przez niedokrwienie, charakteryzuje się pęcznieniem jądra, cytoplazmy i mitochondriów, wakuolizacją cytoplazmy, tworzeniem pęcherzyków oraz wzrostem przepuszczalności błon spowodowanym uszkodzeniem pomp jonowych. Zwykle zmianom tym towarzyszy karioliza. DNA jest cięte w niespecyficzny sposób. Onkozie towarzyszy proces zapalny.

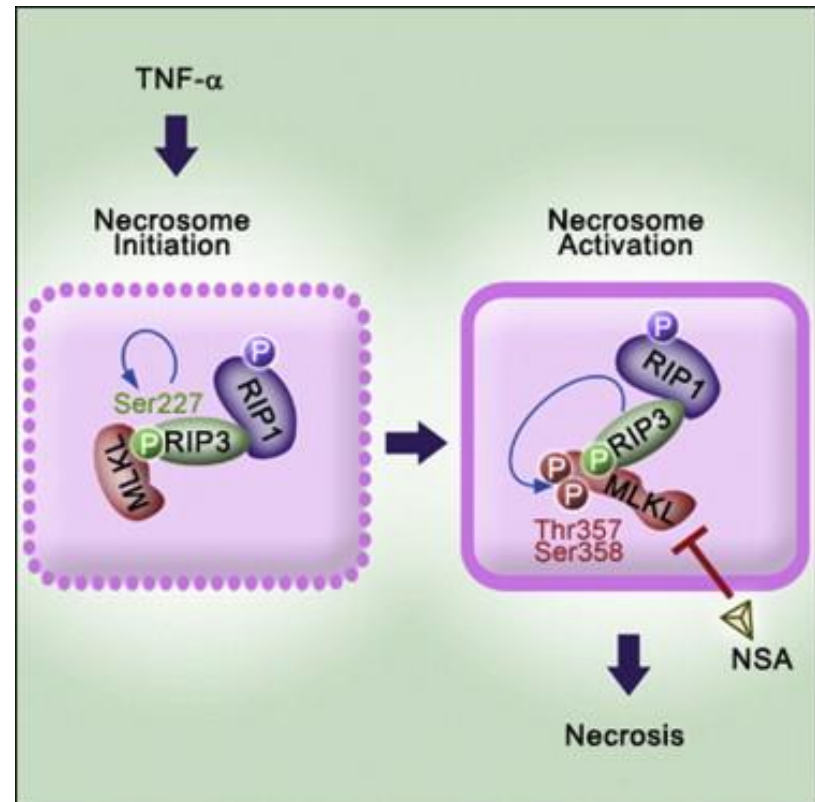


Porimina (pro-oncosis receptor inducing membrane injury) białko należące do rodziny mucyn prawdopodobnie jest receptorem powierzchniowym pośredniczącym w procesie onkozy.

Nekroptoza – programowana śmierć komórki w wyniku zapalenia

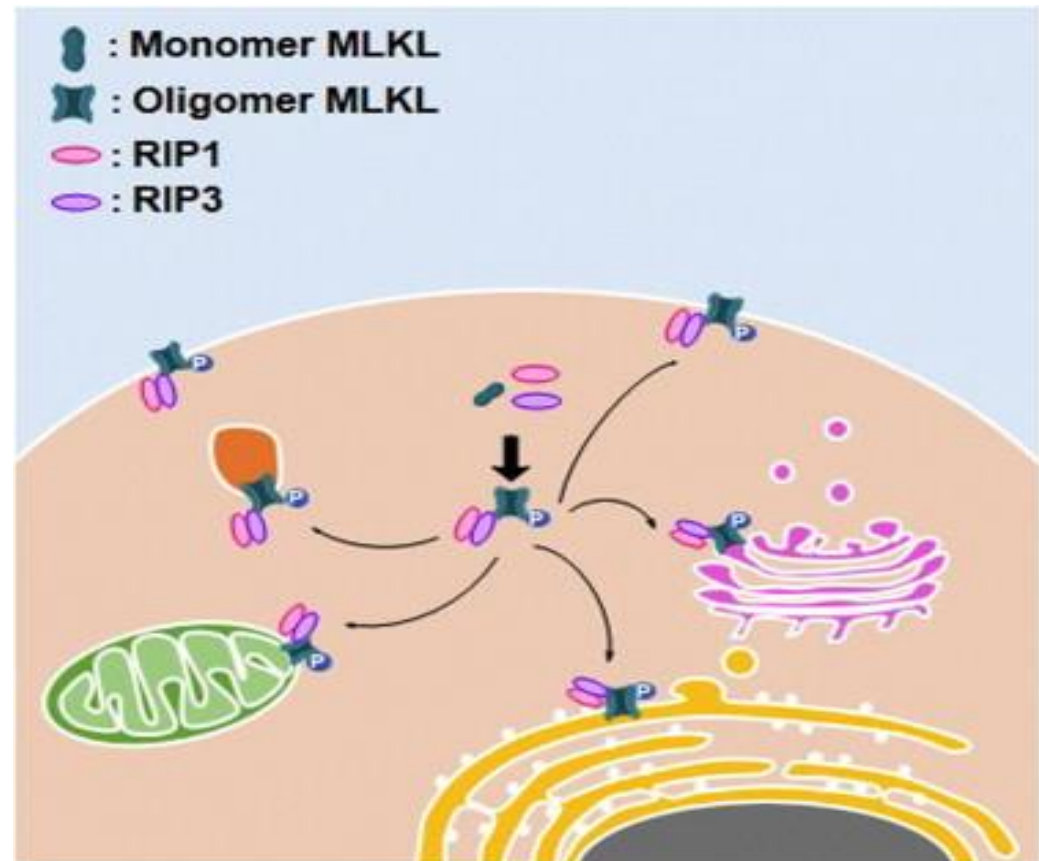
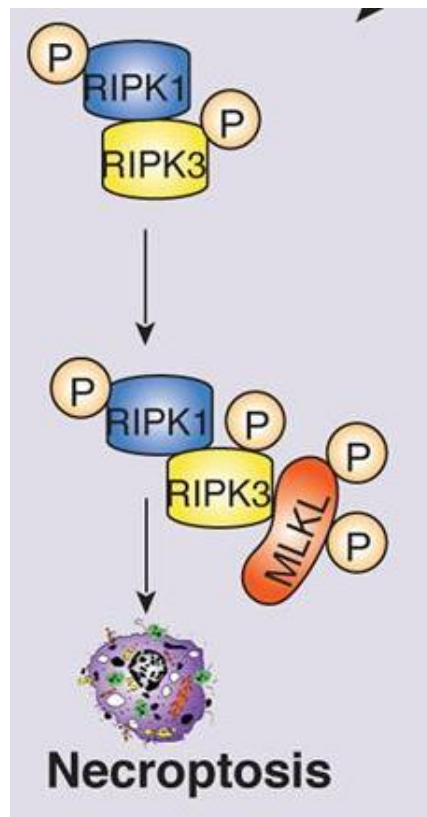
mechanizm obronny przed wirusami, pozwalający na "komórkowe samobójstwo" w sposób niezależny od kaspaz w obecności wirusowych inhibitorów kaspaz.

Produkcja TNF podczas infekcji wirusowej prowadzi do stymulacji receptora TNFR1. TRADD związany z TNFR1 pobudza RIPK1, który rekrutuje RIPK3 tworząc nekrosom. Nekrosom zawiera RIPK1, RIPK2, MLKL (mixed lineage kinase domain-like).



Nekroptoza – programowana śmierć komórki w wyniku zapalenia

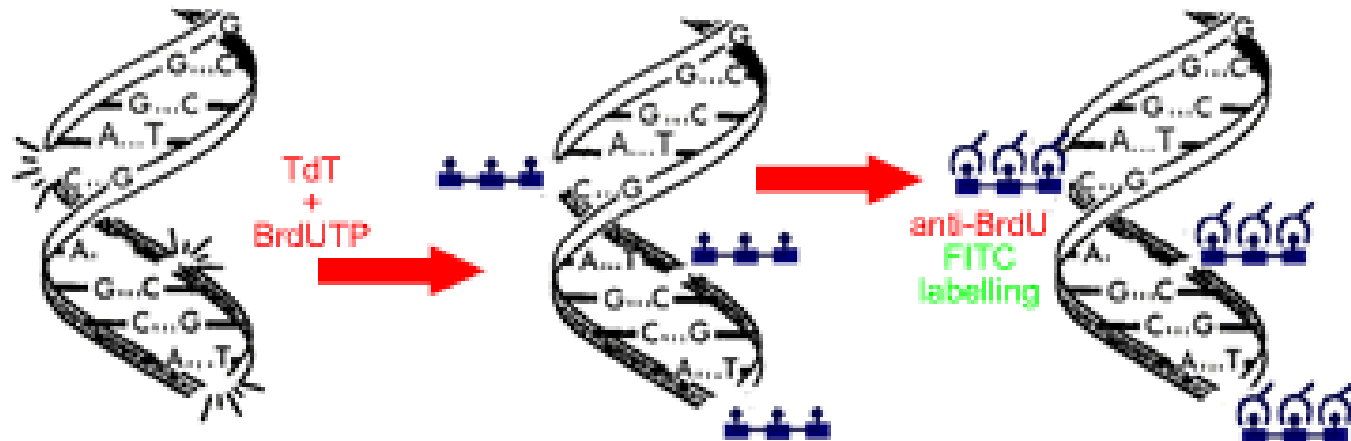
Fosforylacja MLKL przez RIPK3 powoduje oligomerizację MLKL, co prowadzi do inkorporacji MLKL do błony komórkowej i wzrostu jej przepuszczalności. Integracja MLKL prowadzi do uwolnienia DAMPs, które indukują odpowiedź immunologiczną.



METODA TUNELOWA

(terminal deoxynucleotidyl transferase dependent nick end labeling) metoda wykrywania fragmentacji DNA w apoptozie.

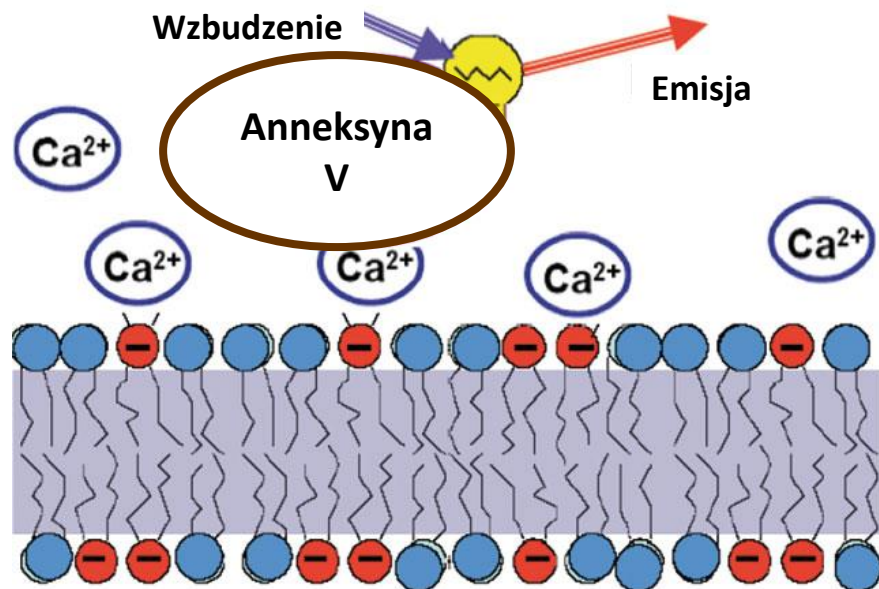
dzięki aktywności terminalnej transferazy deoksynukleotydów - TdT, enzymu katalizującego dodawanie znakowanych dUTPs (trójfosforan deoksyurydyny) lub syntetycznego nukleozydu BrdU, - bromodeoksyurydyny do 3'-OH końców przerwanych nici DNA.



Test wiązania aneksyny V

Anneksyna V – białko uczestniczące w procesie hamowania krzepnięcia krwi poprzez konkutowanie z protrombiną o wiązanie fosfatydyloseryny i hamujące aktywność fosfolipazy A1.

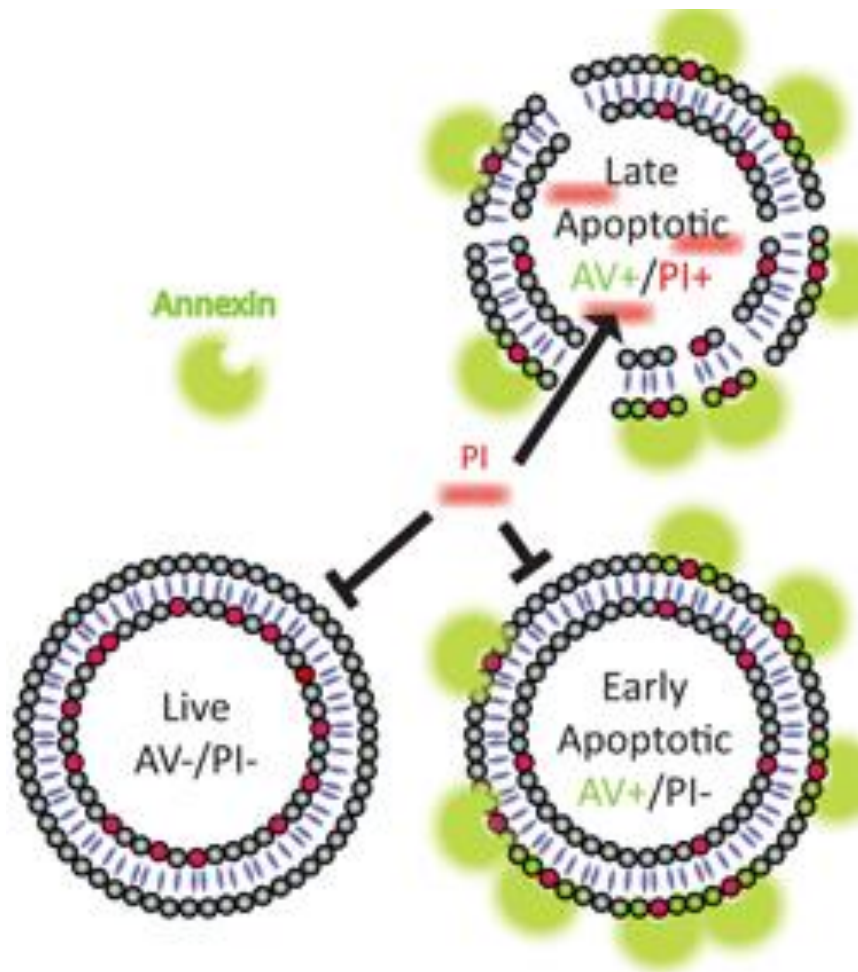
Test wiązania aneksyny V jest stosowany do wykrywania apoptotycznych komórek *via* wiązanie aneksyny V z fosfatydyloseryną obecną na powierzchni komórek w apoptozie. Cechą takich komórek jest ekspozycja fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony komórkowej w odróżnieniu od prawidłowych komórek.



Anneksyna V preferencyjnie wiąże fosfatydyloserynę w obecności jonów Ca^{2+} . Anneksyna V jest znakowana fluorochromem. Po wzbudzeniu barwnika światłem UV komórki apoptotyczne stają się widoczne.

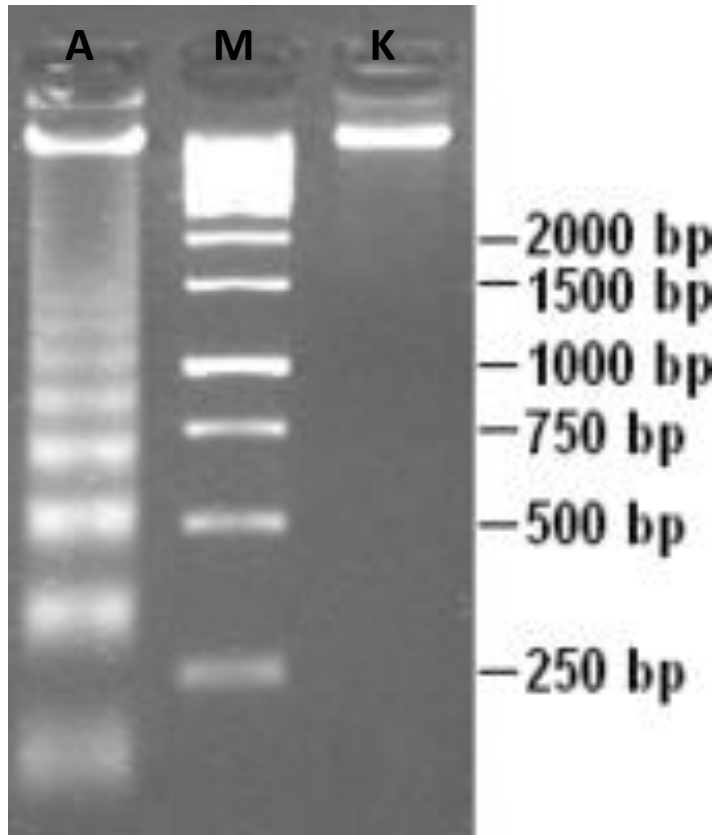
Test wiązania anneksyny V z jodkiem propidyny

Translokacja fosfatydyloseryny towarzyszy także śmierci komórek wynikającej z innych procesów niż apoptoza.



W teście tym stosuje się barwnik przyżyciowy – jodek propidyny (PI) aby zidentyfikować komórki na wczesnym i późnym etapie apoptozy. Żywe komórki usuną PI, w odróżnieniu od martwych i mocno uszkodzonych. Dlatego żywe komórki nie barwią się żadnym z barwników, komórki we wczesnej apoptozie barwią się wyłącznie anneksyną V, a komórki z nieciągłą błoną (martwe) reagują z obydwojema barwnikami.

Apoptotyczna drabinka DNA



Drabinę apoptotyczną DNA obserwuje się, gdy fragmenty DNA powstałe wskutek działania CAD w trakcie apoptozy są uwidocznione po elektroforezie w żelu agarozowym. Drabinka DNA to wyróżnik apoptozy. CAD tnie genomowe DNA wyłącznie w regionach łącznikowych pomiędzy nukleosomami, co daje fragmenty DNA, które są wielokrotnościami 180–185bp. Rozdzielenie tych fragmentów na żelu, a następnie ich wizualizacja (bromek etydydy) pozwala na wykrycie apoptozy.

INDUKCJA APOPTOZY W TERAPII

Heterogeniczność i ewolucyjna złożoność nowotworów leży u podstaw niepowodzenia leczenia mimo rozwoju wielu ukierunkowanych terapii. Nowa strategia opiera się na wykorzystaniu różnych sposobów leczenia celem pokonania złożoności ewolucyjnej nowotworu.

Większość chemioterapeutyków niszczy komórki mitotyczne przez indukcję szlaków odpowiedzi na uszkodzenie DNA lub zmianę regulacji cyklu komórkowego. Chemioterapeutyki indukują apoptozę. Aktywacja apoptozy w komórkach nowotworowych przyczynia się do wywierania efektu cytotoksycznego przez te leki (szlak wewnątrzpochodny p53)

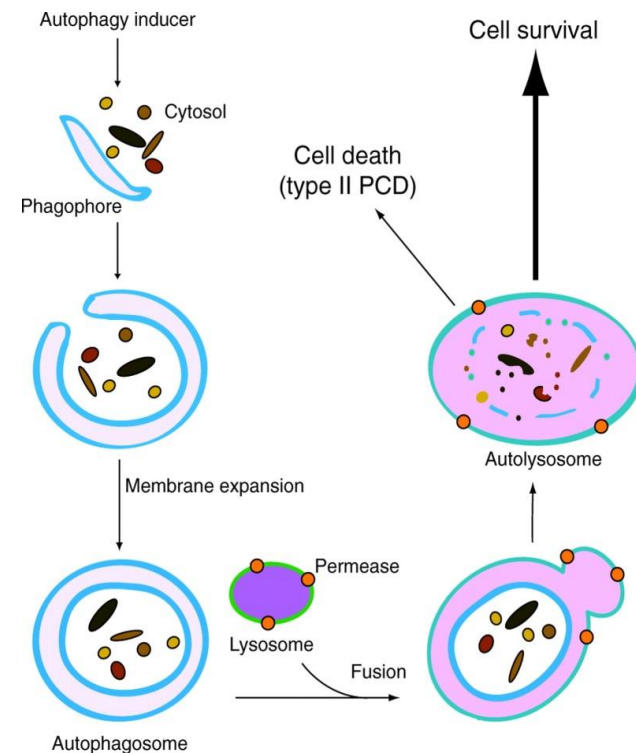
INDUKCJA APOPTOZY W TERAPII

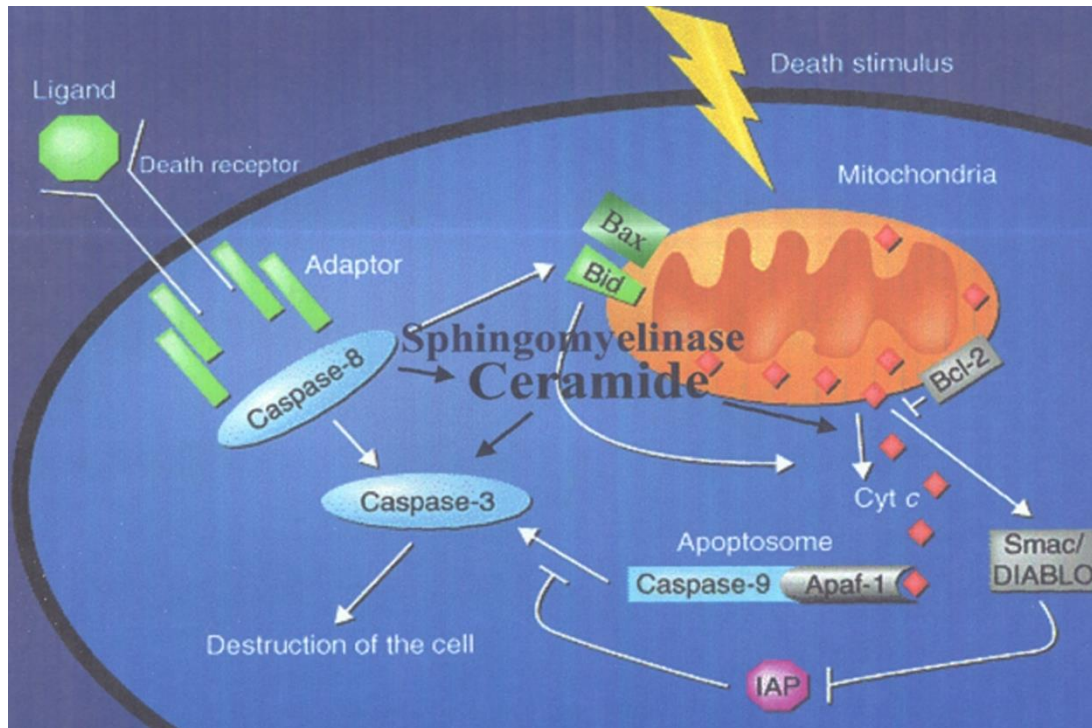
Promieniowanie jonizujące może powodować śmierć komórek poprzez generowanie jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. Udział indukowanej przez promieniowanie apoptozy w hamowaniu wzrostu nowotworu jest kontrowersyjny, ale ostatnio problem ten jest intensywnie badany.

Rekombinowany TRAIL selektywnie indukuje apoptozę w stransformowanych lub uszkodzonych komórkach ale nie w komórkach prawidłowych. U chorych na raka, badania kliniczne z zastosowaniem agonistycznych przeciwciał monoklonalnych, które wiążą receptory TRAIL DR4 i DR5 przyniosły zachęcające wyniki. Wykazano również, że TRAIL hamuje rozwój chorób autoimmunizacyjnych w różnych doświadczalnych modelach zwierzęcych.

Typ II programowanej śmierci komórki - Autofagia

Konstytutywna autofagia może zabić komórkę. Zatem autofagia w umierających komórkach to **przyczyna śmierci czy próba jej zapobieżenia?**. Morfologiczne i histologiczne badania nie potwierdziły związku autofagii z programowaną śmiercią komórki. Uważa się, że autofagia jest mechanizmem przetrwania.





Sfingomielinowo-ceramidowy szlak apoptozy

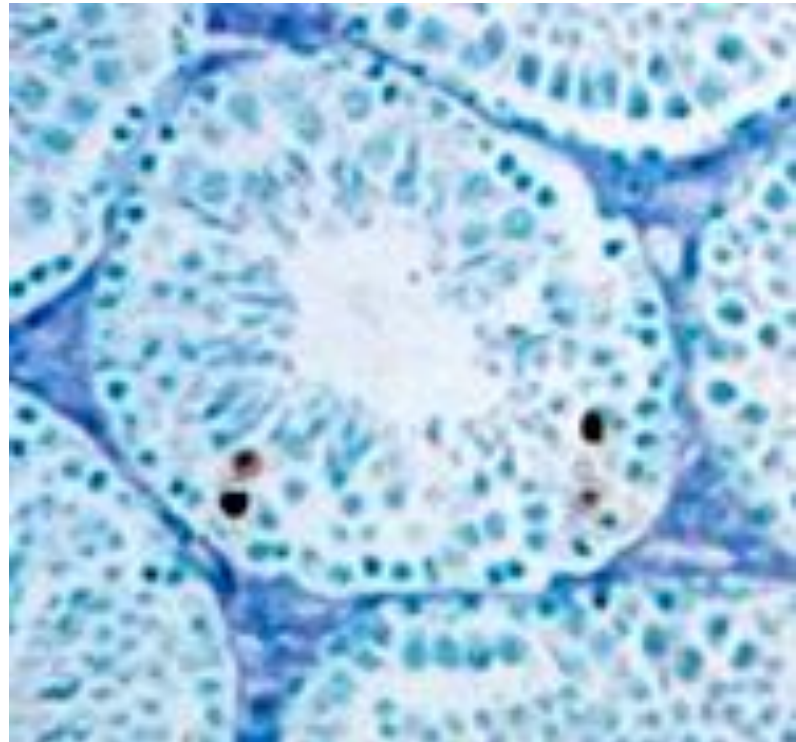
Sfingomielina jest typem sfingolipidów obecnych w błonach komórkowych. Składa się z fosfocholiny i ceramidu. Po stymulacji bodźcem proapoptotycznym np.: Fas ligandem lub TNF sfingomielina jest rozkładana przez sfingomielinazę i ceramidazę do ceramidu i sfingozyny. Ceramid jest również generowany *de novo* przez syntazę ceramidu. Sfingozyna i ceramid indukują apoptozę przez szlak mitochondrialny (aktywacja białek Bid i Bad)

TUNEL

(terminal deoxynucleotid transferase nick-end labeling)

Metoda TUNELowa wykrywa nie tylko apoptotyczne komórki, ale także uszkodzenia DNA w komórkach umierających na drodze innych szlaków oraz komórki, w których DNA ulega intensywnej naprawie.

Dlatego metoda ta jest stosowana ogólnie do wykrywania uszkodzeń DNA (jego fragmentacji)



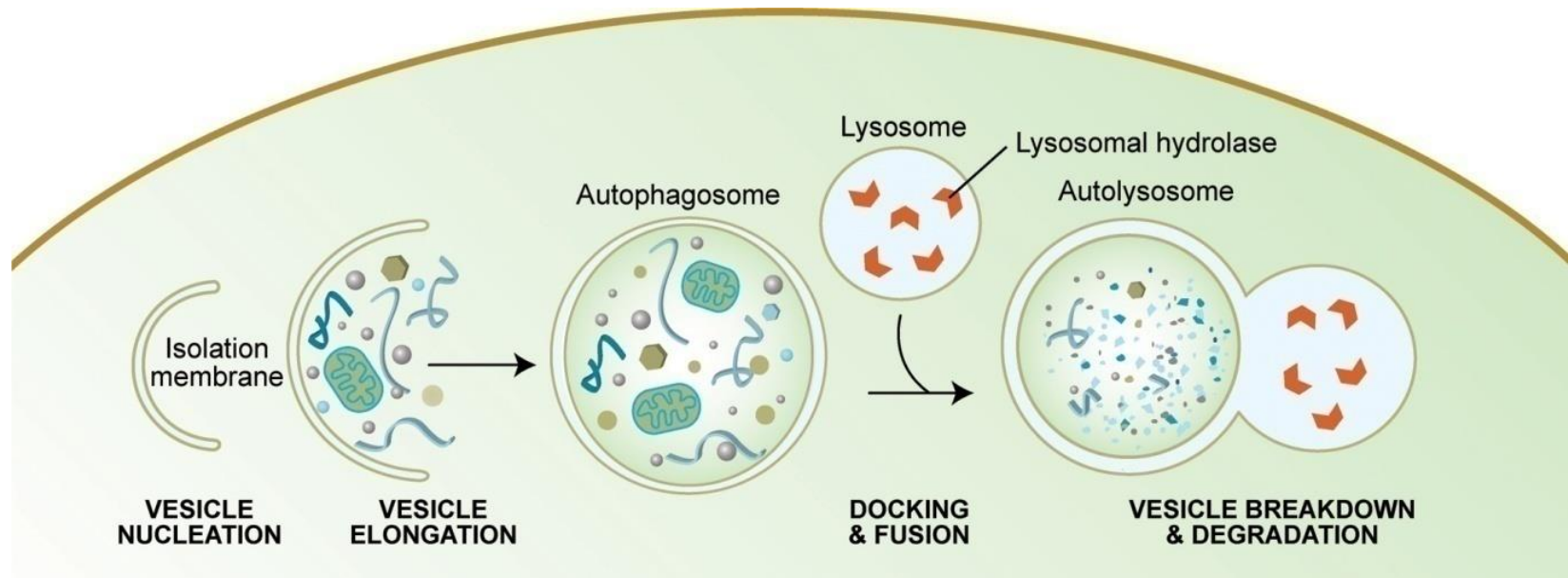
Rola kinazy mTOR w starzeniu

Kinaza mTOR powoduje

1. Akumulację niesfałdowanych białek i stres ER
2. Zwiększoną produkcję RFT, oksydacyjne uszkodzenia białek, lipidów i DNA
3. Hamowanie autofagii, zredukowanie odnowy składników komórkowych.

Autofagia

mechanizm degradacji zbędnych lub patologicznych składników komórkowych w lizosomach

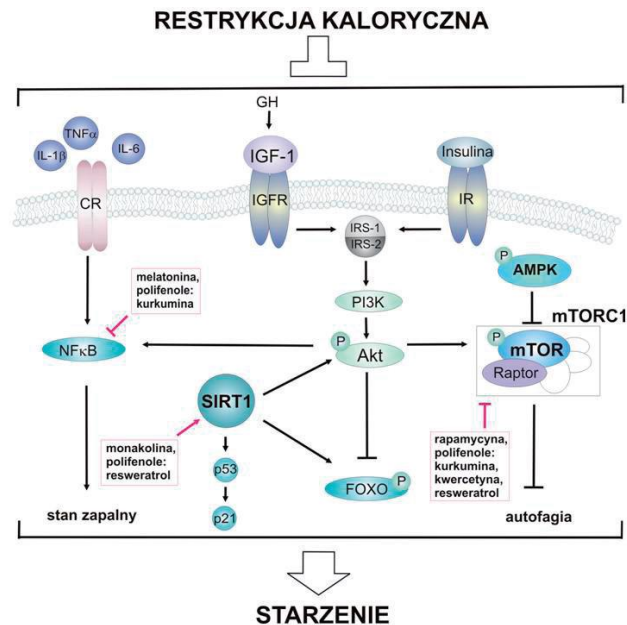


Autofagia umożliwia komórce przetrwanie okresów głodu oraz umożliwia degradację i odzyskiwanie elementów komórkowych.

Autofagia jest najbardziej prawdopodobną przyczyną zwiększenia długości życia w przypadku ograniczenia kalorycznego.

Ograniczenie kaloryczne

dieta, która opiera się na niskim spożyciu kalorii

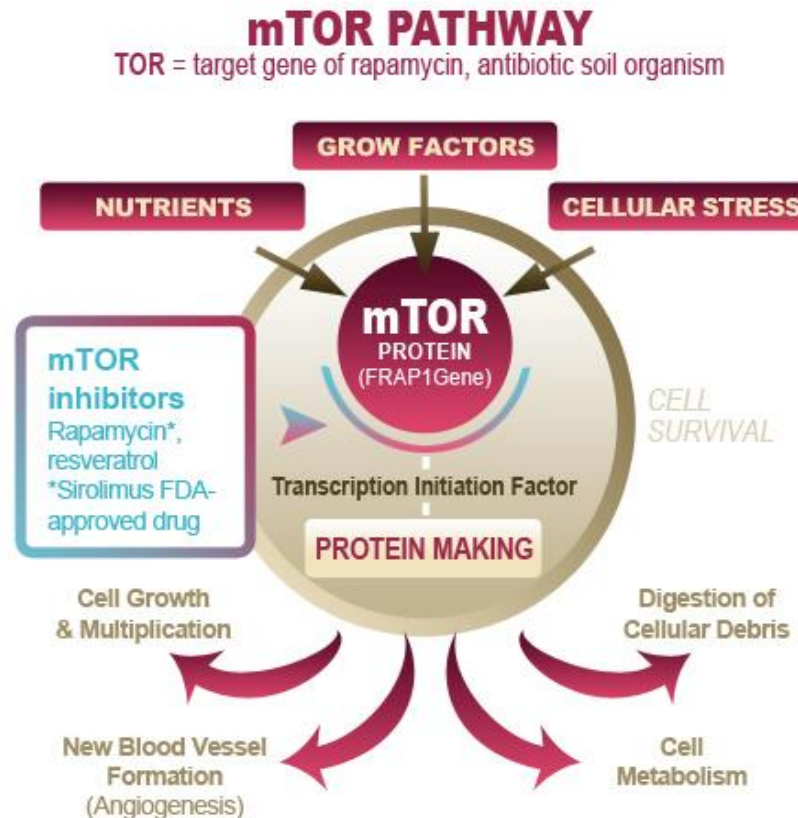


Wykazano, że ograniczenie kaloryczne (bez niedożywienia) spowalnia proces starzenia u różnych gatunków – drożdży, ryb, gryzoni i psów. Przyczynia się także do dłuższego utrzymania zdrowia i zwiększenia maksymalnej długości życia.

U ludzi długoterminowe skutki zdrowotne ograniczenia kalorycznego są jeszcze nieznane.

Kinaza mTOR i starzenie

ssaczy cel rapamycyny



mTOR - kinaza serynowo-treoninowa regulująca przeżycie komórek i autofagię.



Mutacje i starzenie

Nienaprawione mutacje, zwłaszcza genów kodujących białka związane z obróbką DNA, gromadzą się w komórkach i są odpowiedzialne za proces zwany starzeniem entropowym.



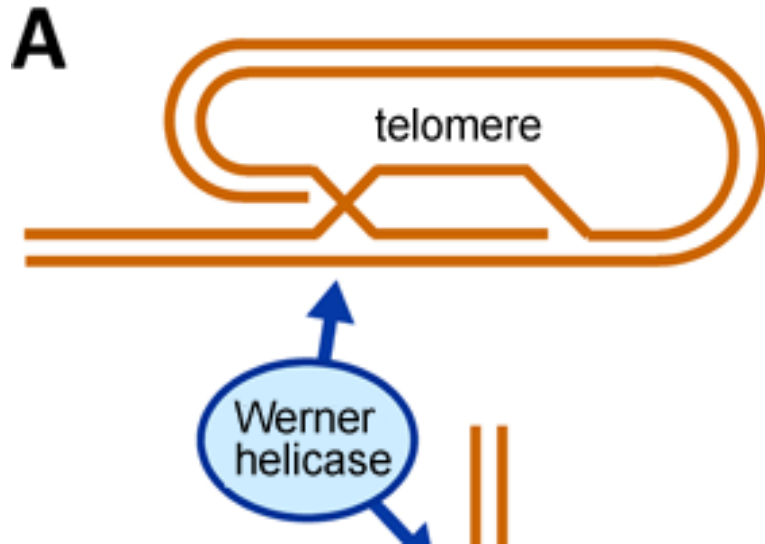
Embarrassing moments at gene parties

Zespół Wernera

Progeria dorosłych, dziedziczona w sposób autosomalny recesywny.

Przedwczesne starzenie, zwykle pojawia się około 2 dekadę życia.

Brak wzrostu w okresie pokwitania, siwienie, łysienie, zmarszczki, zanik gruczołów płciowych, co prowadzi do zmniejszenia płodności, zaćma, miażdżyca, cukrzyca typu 2, osteoporoza i nowotwory złośliwe..



Helikaza WRN wchodzi do wąskich przestrzeni w strukturze DNA, do których inne helikazy nie mają dostępu.

Mutacje w genie WRN, kodującym białko **WRNp, helikazę**, działającą w procesach naprawczych uszkodzeń obu nici DNA.

WRNp bierze udział w odwijaniu DNA w trakcie naprawy i replikacji; współdziała z białkiem p53.

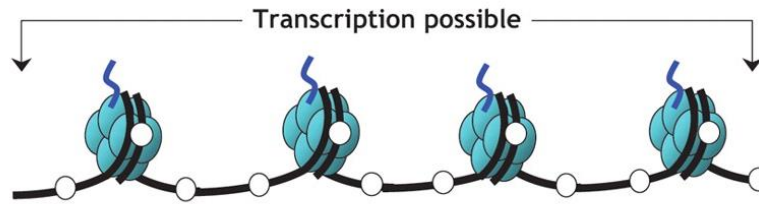
Aktywność helikazy WRN jest istotna dla utrzymania długości i stabilności telomerów.

Epigenom i starzenie

B

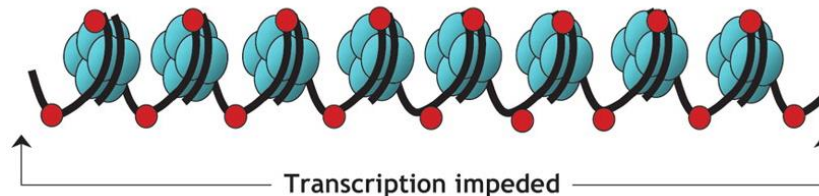
Gene “switched on”

- Active (open) chromatin
- Unmethylated cytosines (white circles)
- Acetylated histones



Gene “switched off”

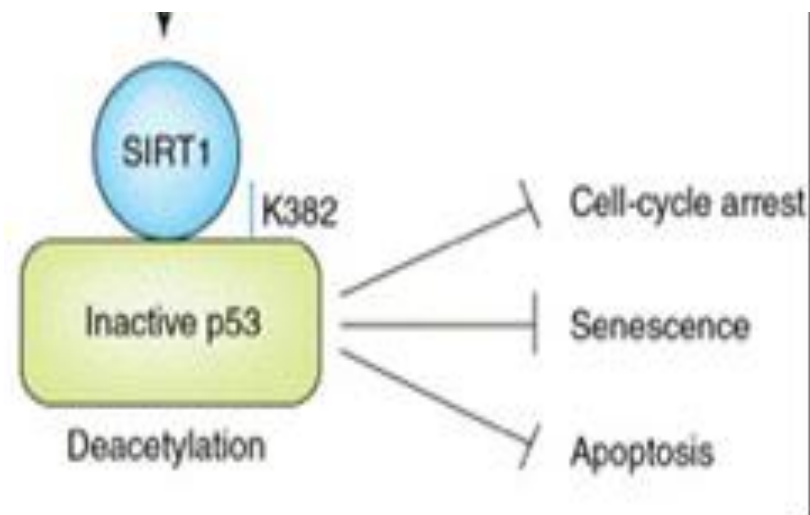
- Silent (condensed) chromatin
- Methylated cytosines (red circles)
- Deacetylated histones



U starzejących się ludzi jednocześnie ze spadkiem ogólnej metylacji DNA, występują lokalne obszary hipermetylacji wysp CpG, które są obecne w promotorach genów. W wyniku starzenia się komórki stopniowo tracą zdolność ekspresji tych genów (np. dla p53, czynników transkrypcyjnych, regulujących biogenezę mitochondriów, produkcję ATP, przeciwutleniaczy, syntazy NO, lipoksygenazy)

SIRT1 (HDAC) I STARZENIE KOMÓRKOWE

SIRT1 deacetyluje p53, co zmniejsza jego aktywność transkrypcyjną. Proces ten zapobiega apoptozie i sprzyja przeżyciu komórek. Deacetyluje też NFκB (supresja odpowiedzi immunologicznej i zapalenia starczego).



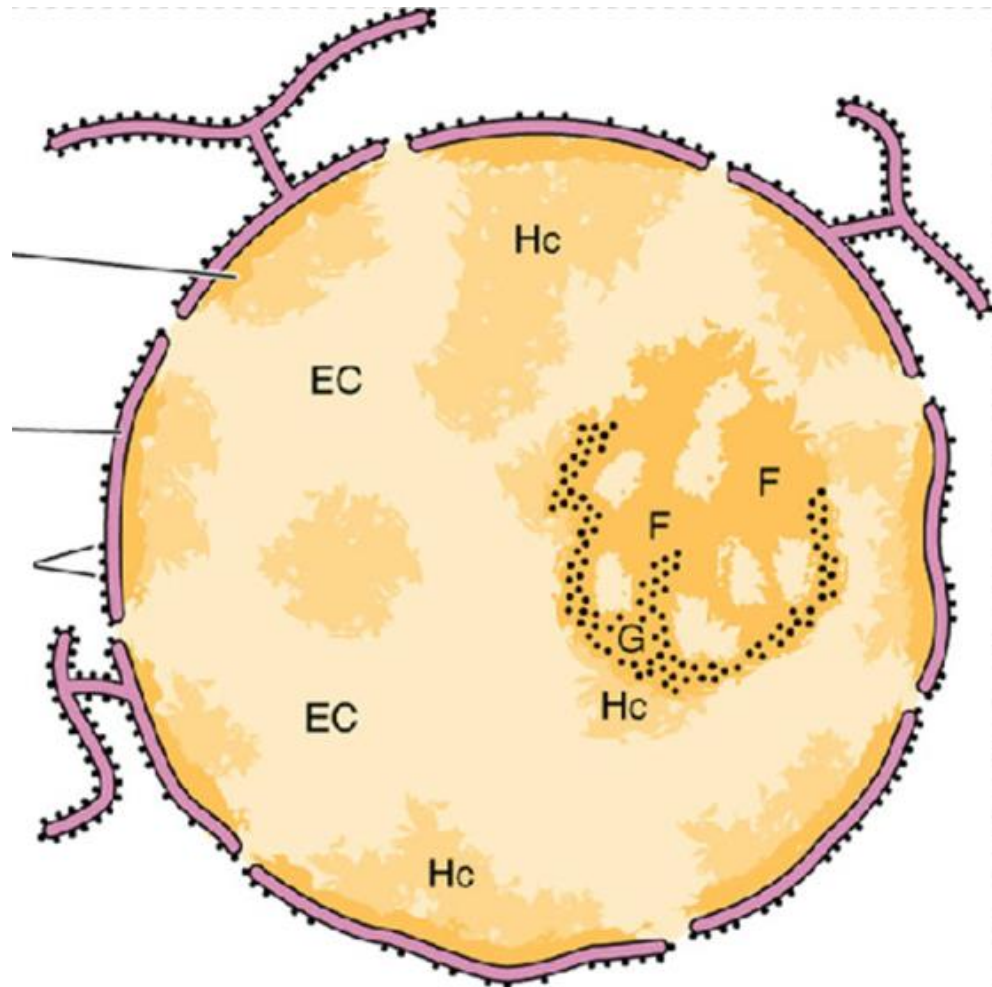
SIRT1 zapobiega wywołanemu stresem przedwczesnemu starzeniu (SIPS) i zapaleniu (inflammaging) płuc, objawom przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) i rozedmy.

SIRT1 zapewnia ochronę przed indukowaną dymem papierosowym rozedmą płuc.

AKTYWATORY SIRTUINY 1

Lamina A jest białkiem, które zostało zidentyfikowane jako bezpośredni aktywator sirtuiny 1.

Blaszka
jądrowa,
zbudowana z
lamin A, B, C
Otoczka jądrowa



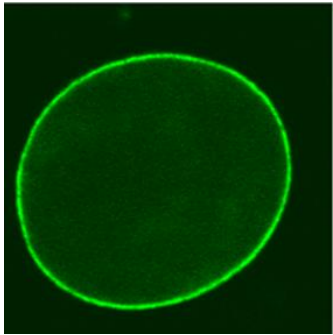
Laminopatia - Zespół progerii Hutchinsona-Gilforda



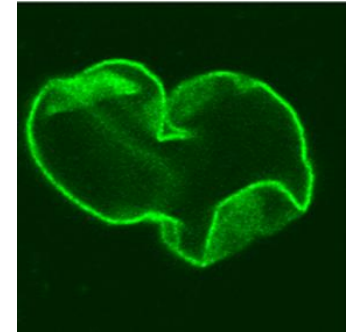
Niezwykle rzadka choroba genetyczna, której objawy przypominają aspekty starzenia, ujawnia się w bardzo młodym wieku. Ludzie z taką progerią zazwyczaj żyją do 20 roku życia. Jest to choroba genetyczna, spowodowana mutacją punktową *de novo*.

U dzieci z progerią pierwsze objawy pojawiają się zwykle w ciągu pierwszych kilku miesięcy. Ścieńczenie skóry, łysienie, ograniczony wzrost, następnie pomarszczona skóra, miażdżyca tętnic, uszkodzenie nerek, utrata wzroku i choroby sercowo-naczyniowe. Pacjenci z tym zespołem zwykle mają małe, delikatne ciała, jak u osób w podeszłym wieku.

Zespół progerii Hutchinsona-Gilforda



Punktowa mutacja w genie kodującym laminę A (LMNA) - cytozyna jest zastępowana przez tyminę.



Etapy w prawidłowej komórce

Gen LMNA koduje białko - prelaminę A.

Prelamina A posiada grupę farnezylową.

Grupa farnezylowa jest **usuwana** z prelamin A.

Postaje prawidłowa forma - **lamina A**.

Prelamina A nie jest inkorporowana w blaszkę jądrową

Prawidłowe jądro komórkowe.

Etapy w komórce z progerią

Gen LMNA koduje białko - prelaminę A.

Prelamina A (50 aminokwasów krótsza) posiada grupę farnezylową.

Grupa farnezylowa pozostaje **związana** z prelaminą A.

Powstaje nieprawidłowa forma laminy A - **progeryna**

Progeryna jest inkorporowana w blaszkę jądrową.

Nieprawidłowe jądro komórkowe