

APOPTOSIS

Aristides G. Eliopoulos

Professor of Biology & Genetics

Department of Biology, Medical School
National & Kapodistrian University of Athens



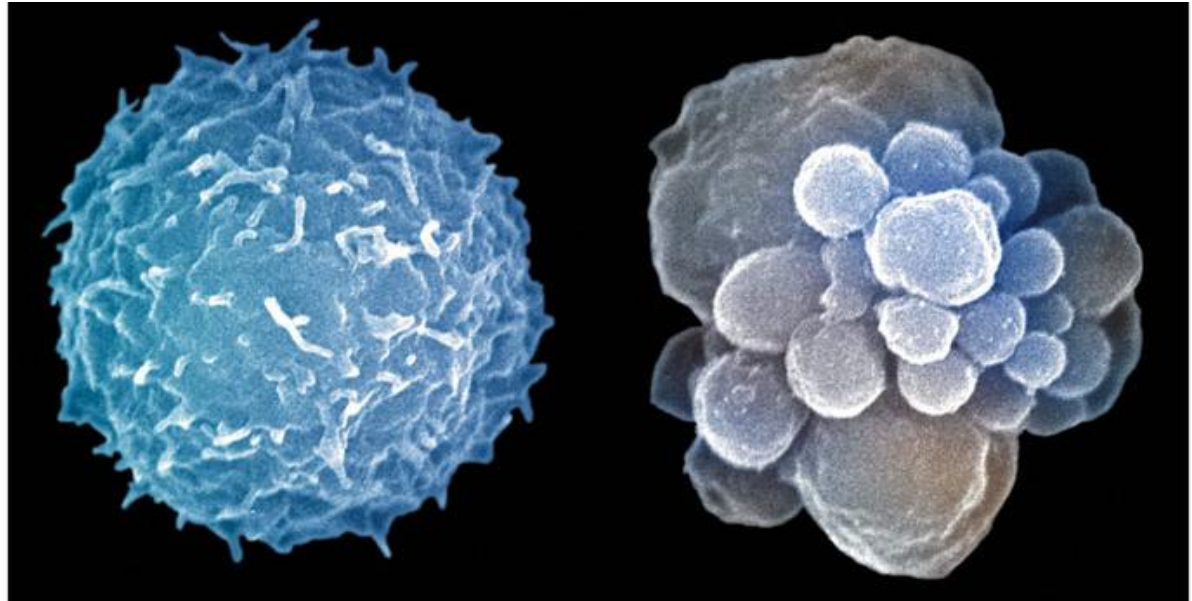
National and Kapodistrian
UNIVERSITY OF ATHENS

Email: eliopag@med.uoa.gr

Facebook: ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ (Εργαστήριο Βιολογίας & Γενετικής)

Characteristics of Apoptosis

- Shrinks
- Blebbing
- Nucleus breaks down, breaks into small membrane wrapped fragments
- Phagocyte signals

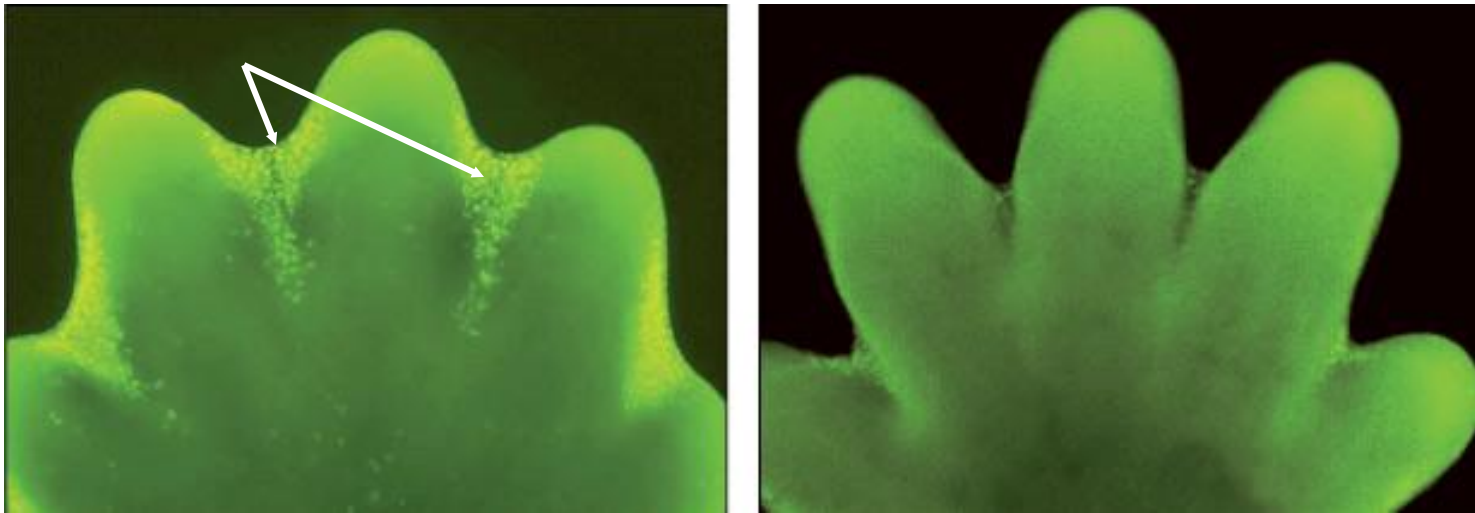


Importance of Apoptosis

- Maturing organisms
- Virus
- Immune System
- DNA damage



Παράδειγμα ρύθμισης φυσιολογικών διαδικασιών μέσω της απόπτωσης: Ανάπτυξη



Dark Green fluorescence indicates apoptotic cells.

Παράδειγμα ρύθμισης φυσιολογικών διαδικασιών μέσω της απόπτωσης: Ανάπτυξη

Syndactyly (1/2500 births)



Mechanisms of apoptosis



Το *C. elegans* είχε κεντρικό ρόλο στην κατανόηση των μηχανισμών της απόπτωσης.

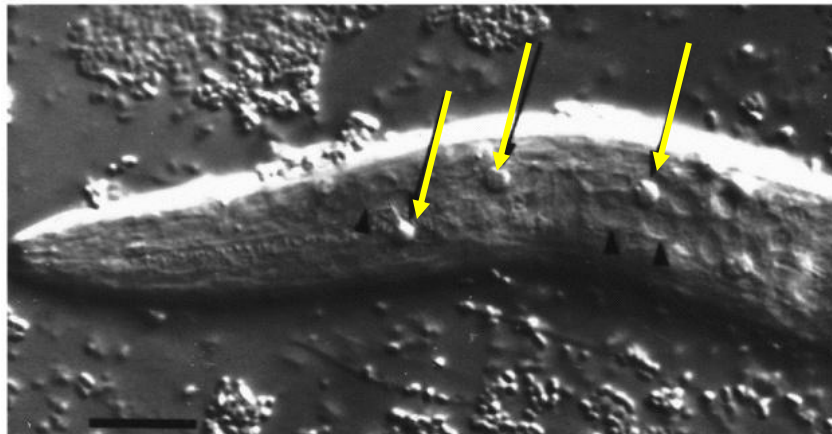
1090 κύτταρα
131 πεθαίνουν

Ced-3=no death

Ced-4=no death

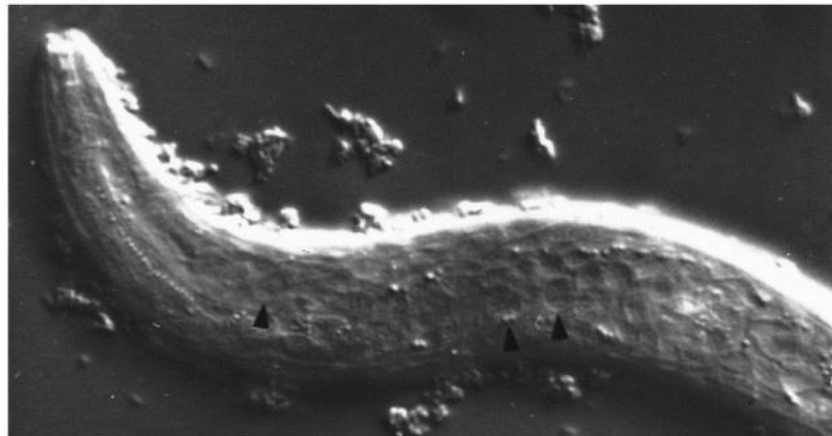
Ced-9=all die

(a)

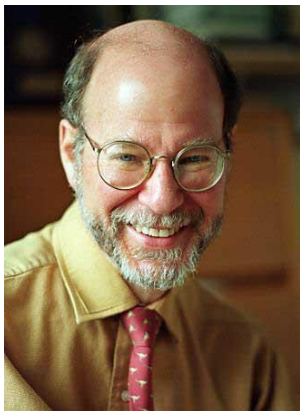


ced-1 mutant
(Καθόλου φαγοκυττάρωση)

(b)

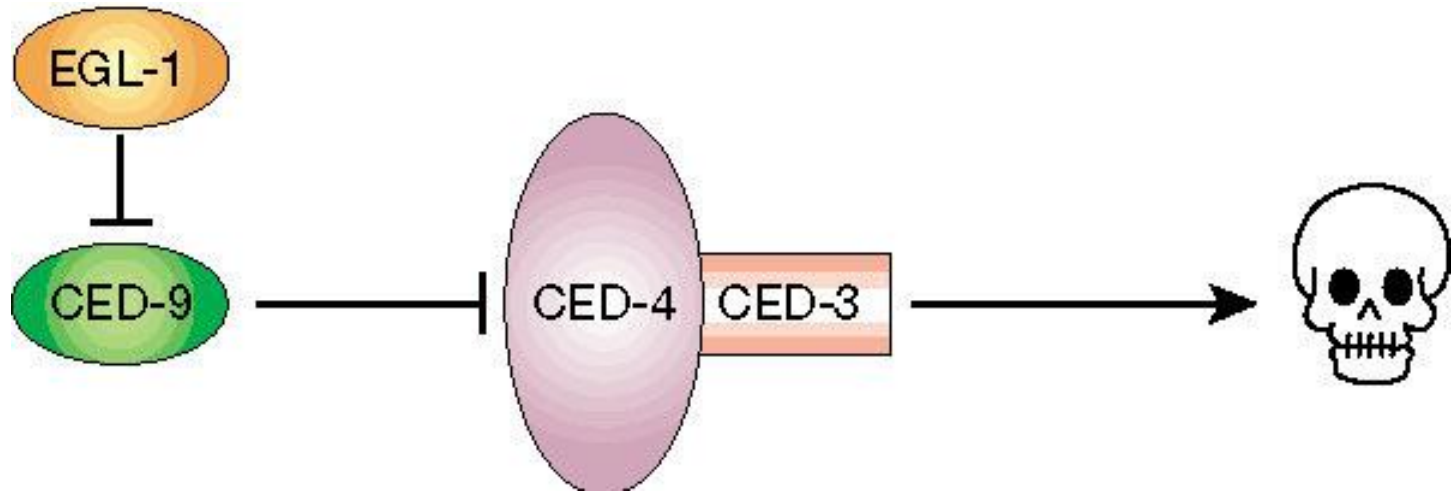


ced-1/ced-3
(Τα κύτταρα δεν αποπίπτουν)



H.R. Horvitz and colleagues responsible for much of this work, 2002 Nobel Prize in Medicine with Sulston and Brenner.

C. elegans apoptosis



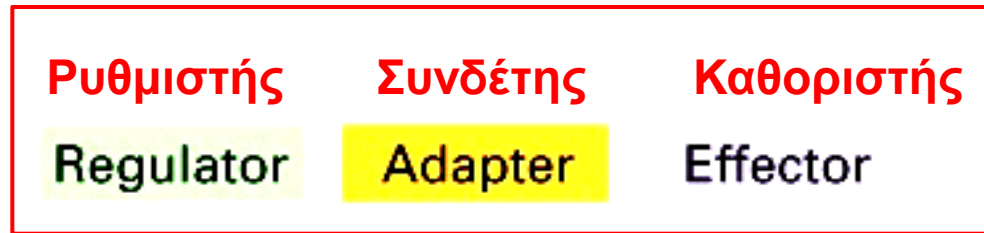
CED-9= καταστέλλει την απόπτωση

CED-4= μόριο-συνδέτης στο σχηματισμό ενεργοποιημένου συμπλόκου με το *CED-3*

CED-3= Προτεάση που εκτελεί το αποπτωτικό πρόγραμμα με την πρωτεόλυση κυτταρικών πρωτεϊνών-στόχων

EGL-1= Προ-αποπτωτική πρωτεΐνη που καταστέλλει τη δράση του *CED-9*.

Τρεις τάξεις πρωτεϊνών είναι ενεργές στην απόπτωση τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά.

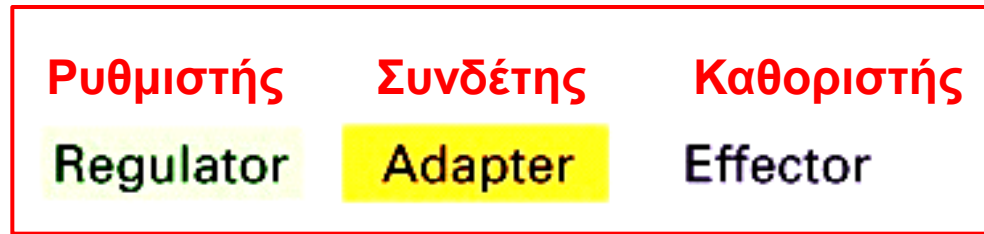


C. elegans Ced-9 ⊣ Ced-4 ⇒ Ced-3 ⇒ Death

Vertebrates Bcl-2 ⊣ Apaf-1 ⇒ Casp9 ⇒ Casp3 ⇒ Death

Το γονίδιο Bcl-2 των θηλαστικών υποκαθιστά το Ced-9 στο *C. elegans*

Τρεις τάξεις πρωτεϊνών είναι ενεργές στην απόπτωση τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά.

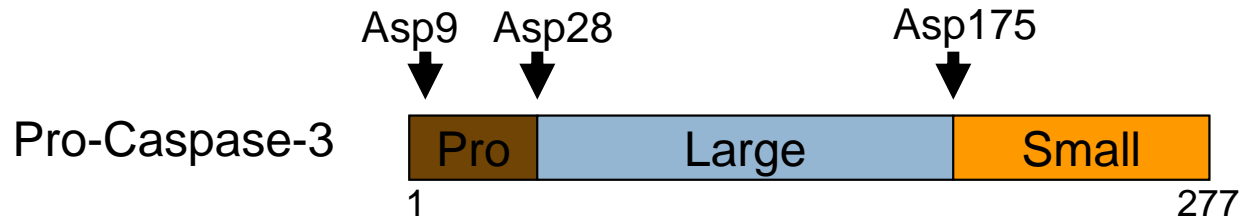


C. elegans Ced-9 ─| Ced-4 ⇒ Ced-3 ⇒ Death

Vertebrates Bcl-2 ─| Apaf-1 ⇒ Casp9 ⇒ Casp3 ⇒ Death

Το γονίδιο Bcl-2 των θηλαστικών υποκαθιστά το Ced-9 στο *C. elegans*

Οι κασπάσες (Caspases) είναι μια οικογένεια πρωτεασών με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης:

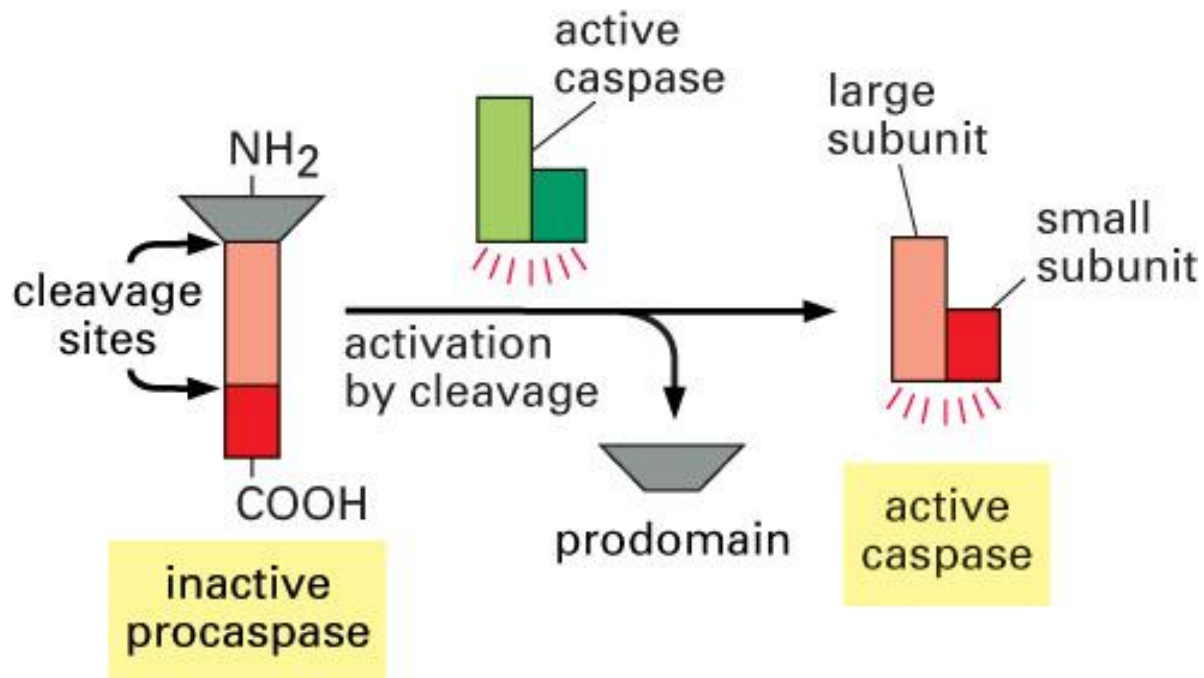


- Είναι πρωτεάσες που αναγνωρίζουν μοτίβα που φέρουν ασπαρτικό οξύ
- Έχουν διατηρηθεί κατά την εξέλιξη
- 14 μέλη από τα οποία τα 11 βρίσκονται στα θηλαστικά
- Κατηγοριοποιούνται ως **εναρκτήριες** (initiator), όπως η caspase-8, και **καθοριστές** (effectors) όπως η caspase-3.
- ποικίλα υποστρώματα (δομικές πρωτεΐνες, ρυθμιστικές, πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης κλπ.)

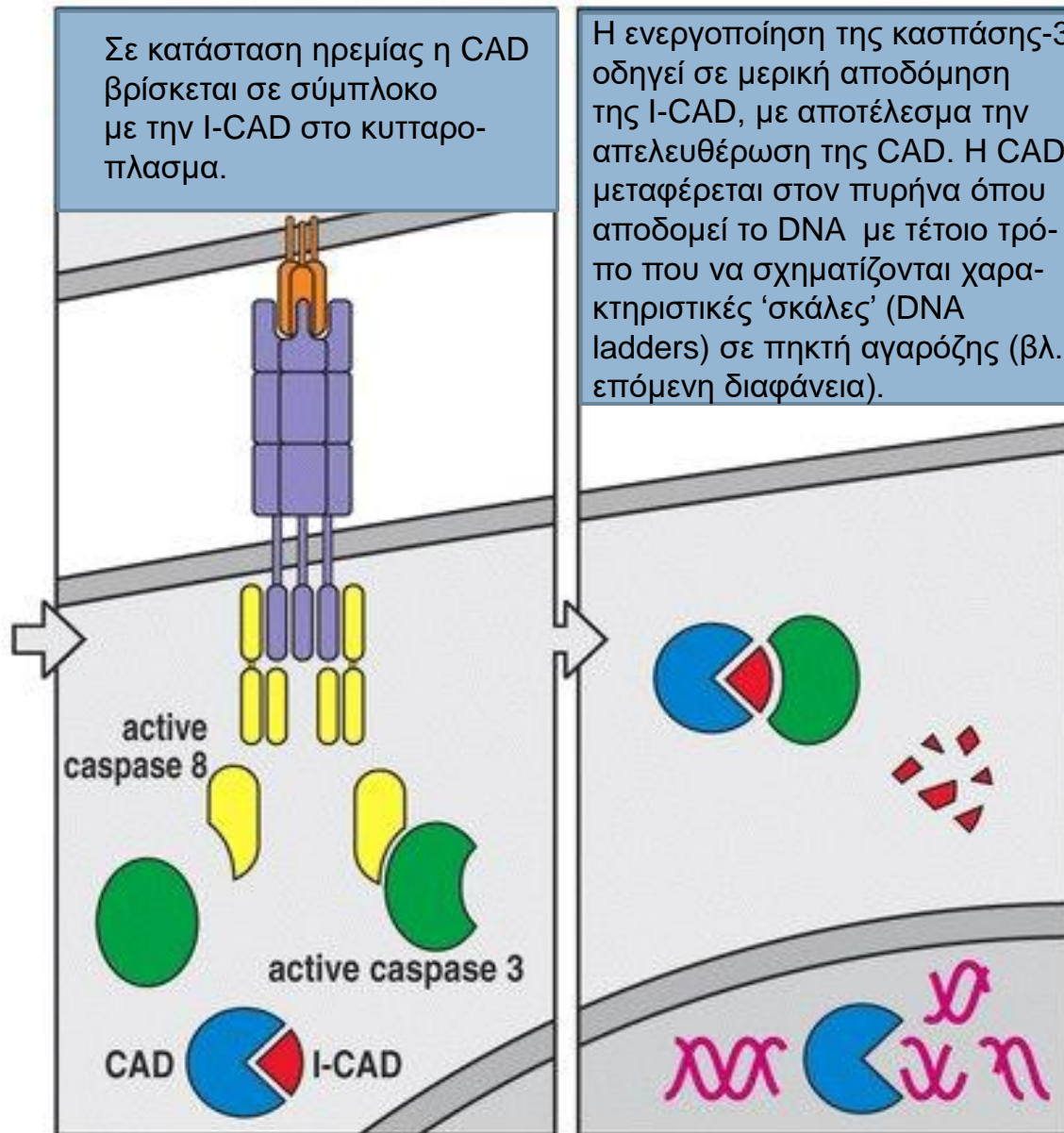
Ενεργοποίηση των κασπασών

Για να ενεργοποιηθεί, η προ-κασπάση πρέπει να υποστεί διάσπαση για την απομάκρυνση της προδρόμου περιοχής (prodomain) και αλληλεπίδραση της μεγάλης και μικρής υπομονάδας της κασπάσης.

(A) procaspase activation



Η δεοξυριβονουκλεάση CAD (Caspase Activated Deoxyribonuclease) είναι υπόστρωμα της ενεργοποιημένης κασπάσης 3



Παράδειγμα χαρακτηριστικής αποδόμησης του DNA (DNA laddering)
σε αποπτωτικά κύτταρα:

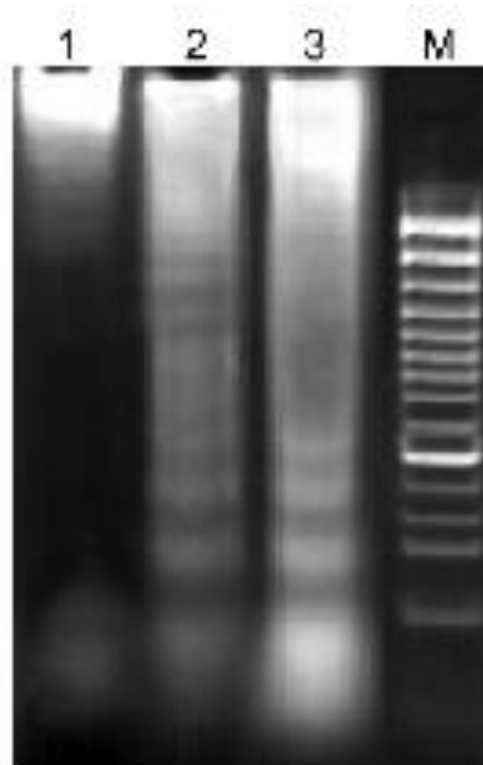


Fig. 5. Fragmentation of DNA in CSE-induced A549 cells. Lanes 1~3, DNA fractions of cells treated with culture medium, 5% or 10% CSE, respectively. M, DNA marker.

Two Caspase Pathways

Extrinsic Pathway



Death Ligand



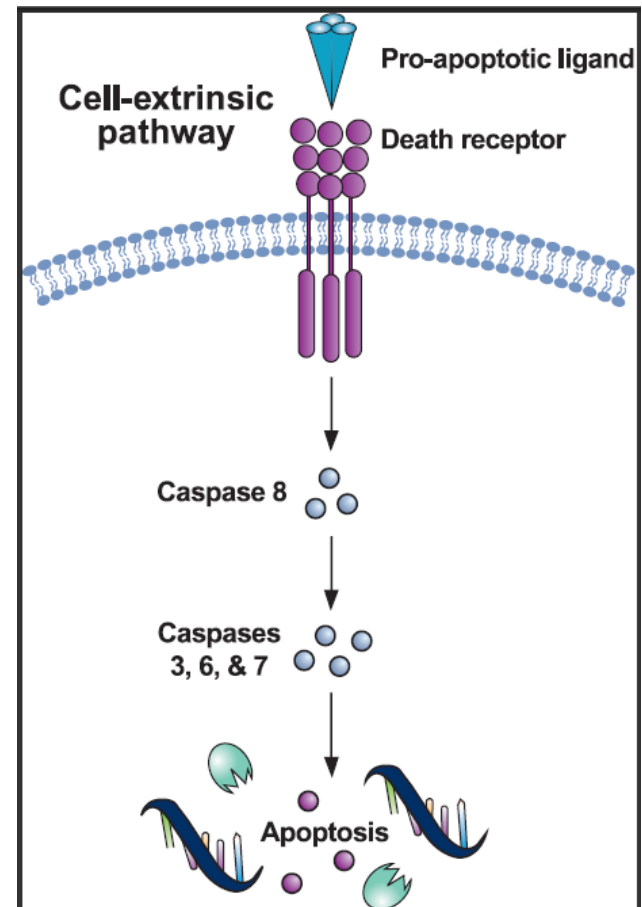
Death Receptors



Caspases



Cell Death



Two Caspase Pathways

Intrinsic Pathway



Mitochondria



Cytochrome C



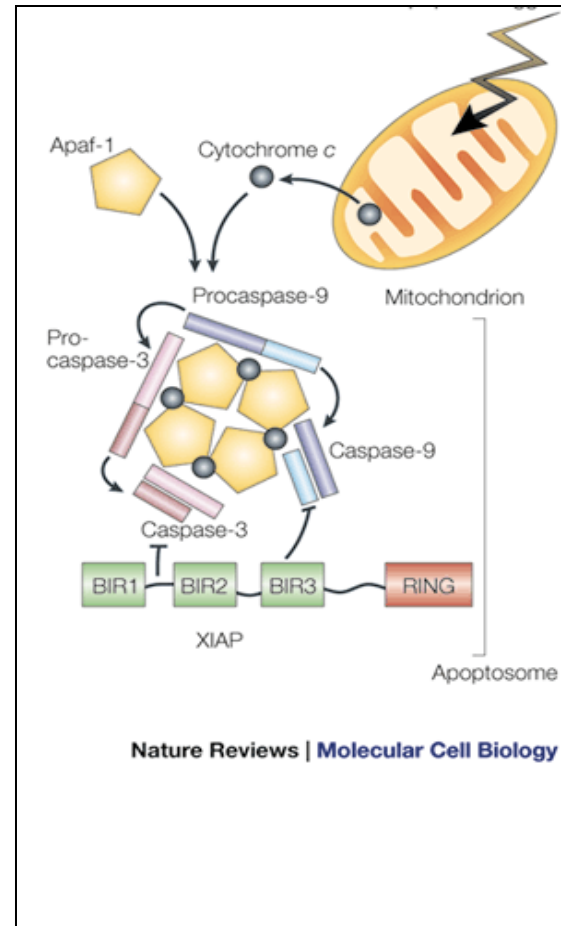
Apoptosome Complex



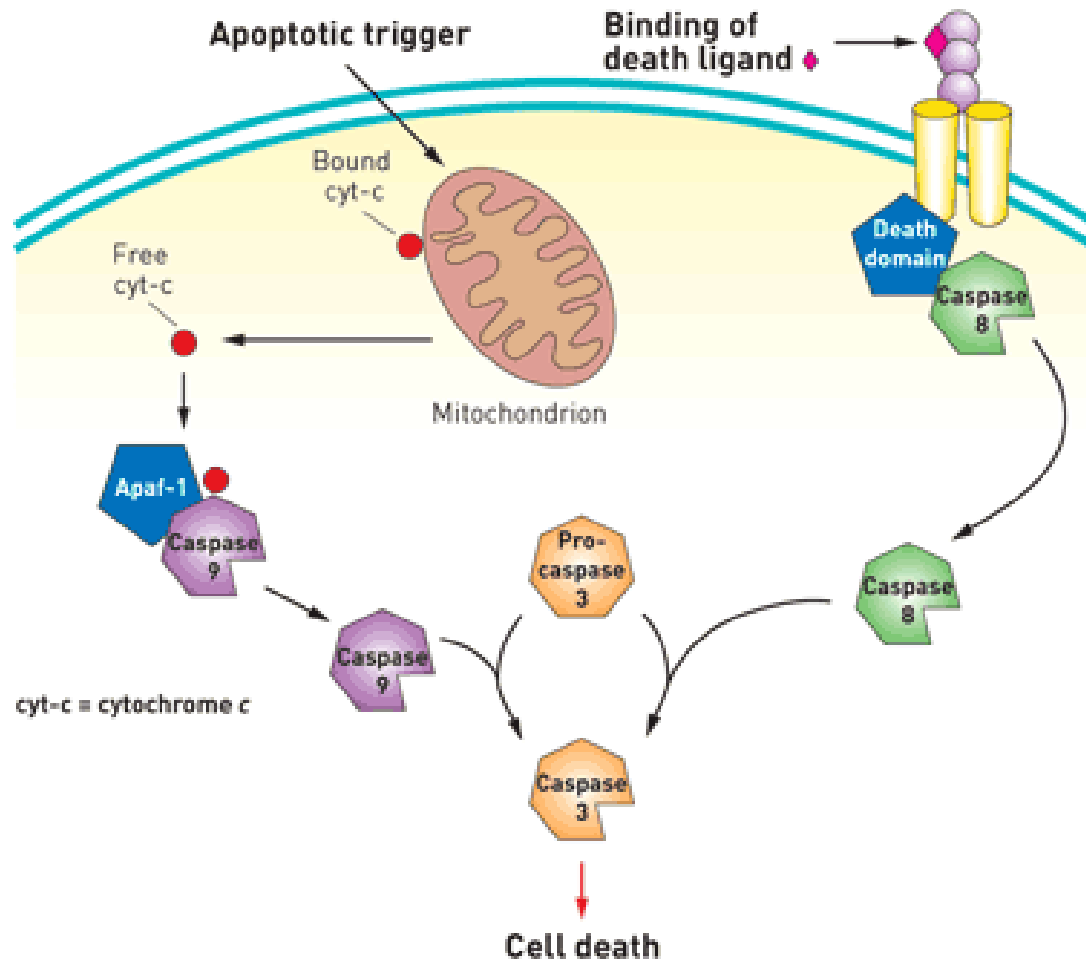
Caspases



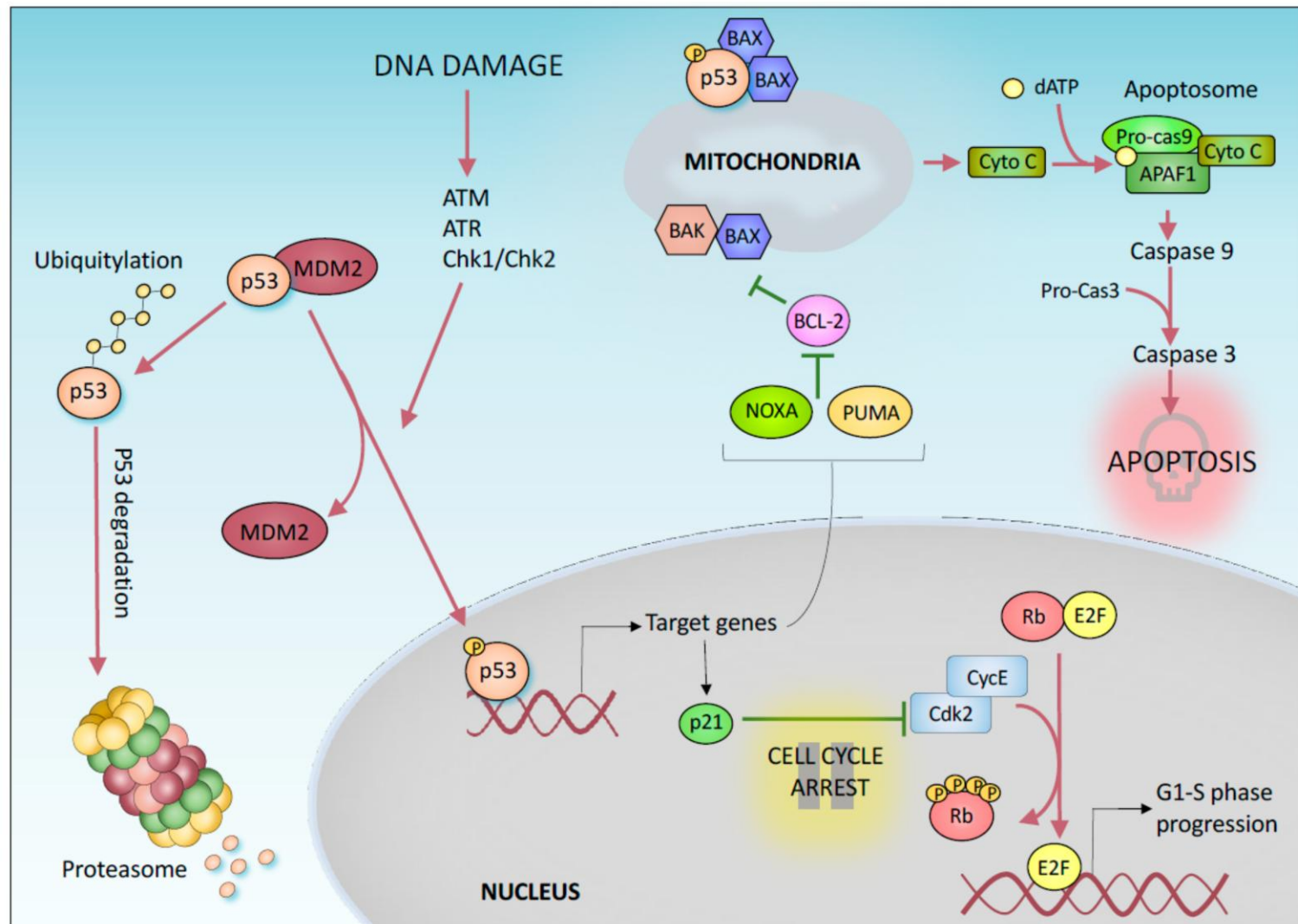
Cell Death



Two Caspase Pathways

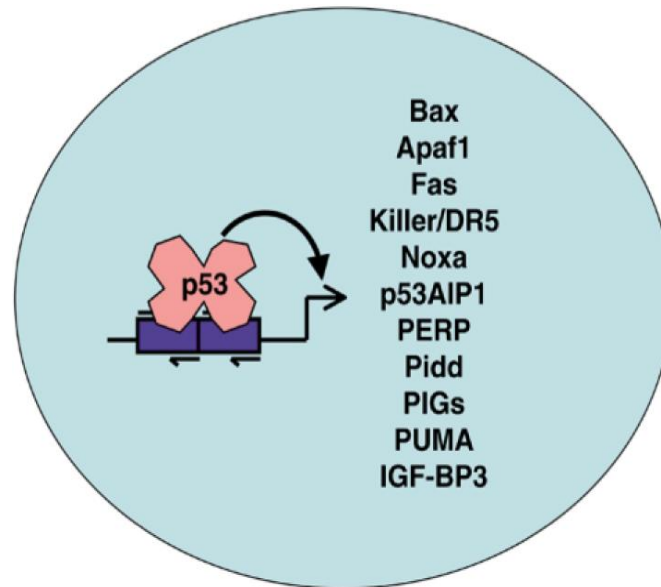


Το μονοπάτι του p53 επάγει την ενδογενή οδό απόπτωσης



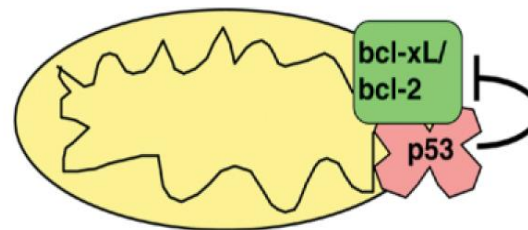
Το μονοπάτι του p53 επάγει την ενδογενή οδό απόπτωσης

1. Μεταγραφική ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών γονιδίων (Puma, Noxa, p53AIP1, Bax, Apaf-1 etc).



.....▶ APOPTOSIS

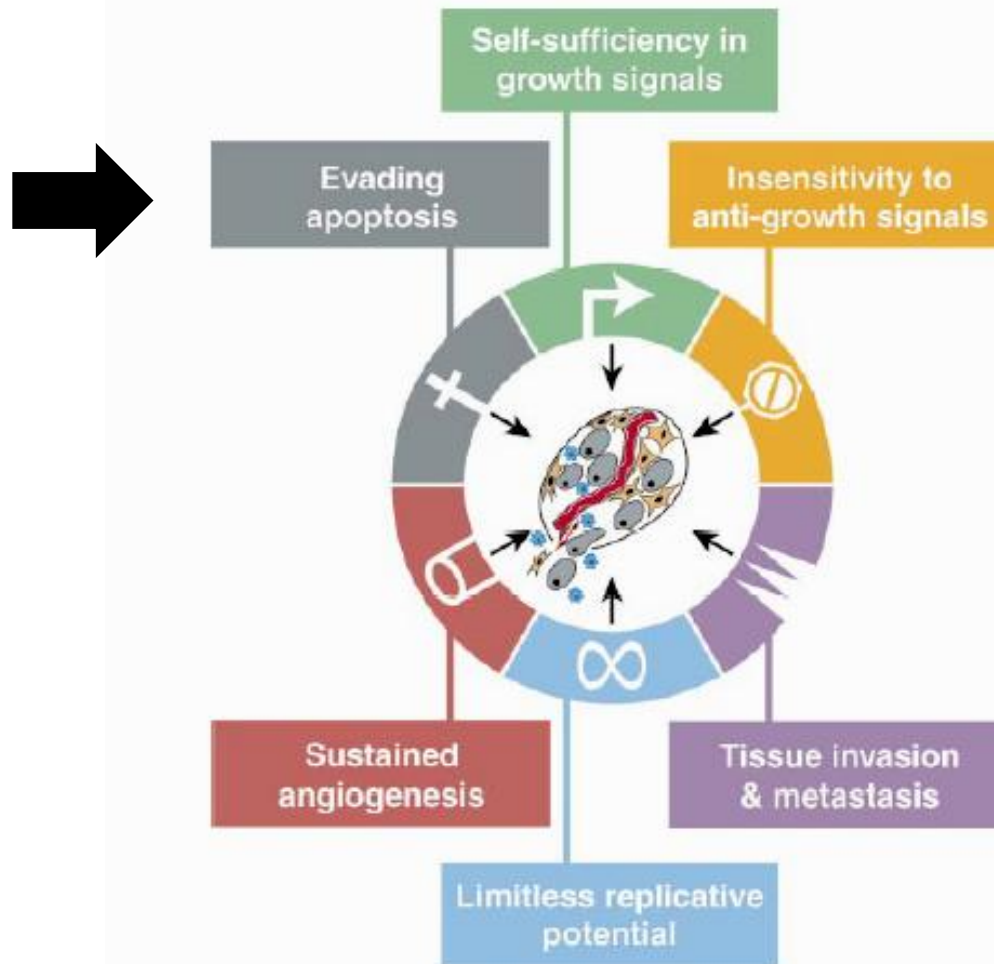
2. Αλληλεπίδραση με μέλη της οικογένειας Bcl-2 στα μιτοχόνδρια.

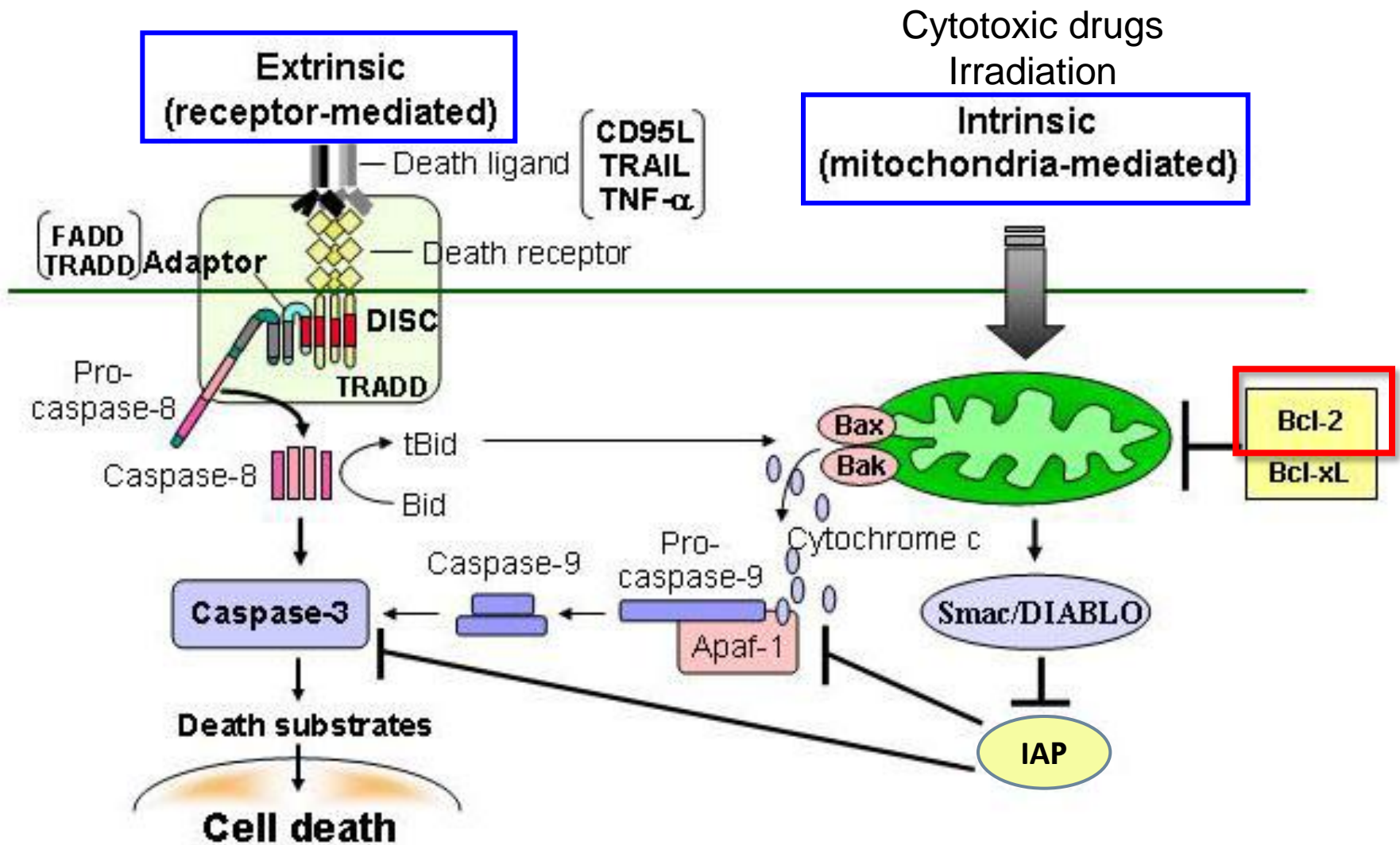


Περίληψη (1)

- Η απόπτωση έχει διακριτά στάδια, έναρξης, εκτέλεσης, αποδόμησης και φαγοκυττάρωσης.
- Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες με κυρίαρχο ρόλο στο εκτελεστικό στάδιο του κυτταρικού θανάτου.
- Οι κασπάσες πρωτεολύουν ποικιλία υποστρωμάτων, όπως δομικές πρωτεΐνες, ρυθμιστές της απόπτωσης και άλλες κασπάσες.
- Δύο μονοπάτια αποπτωτικού θανάτου: εξωγενές – ενδογενές.
 - ενδογενές (intrinsic): καθορίζεται από τη δράση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών
 - εξωγενές (extrinsic): αφορά σε υποδοχείς της οικογένειας του TNF

Cancer and Apoptosis





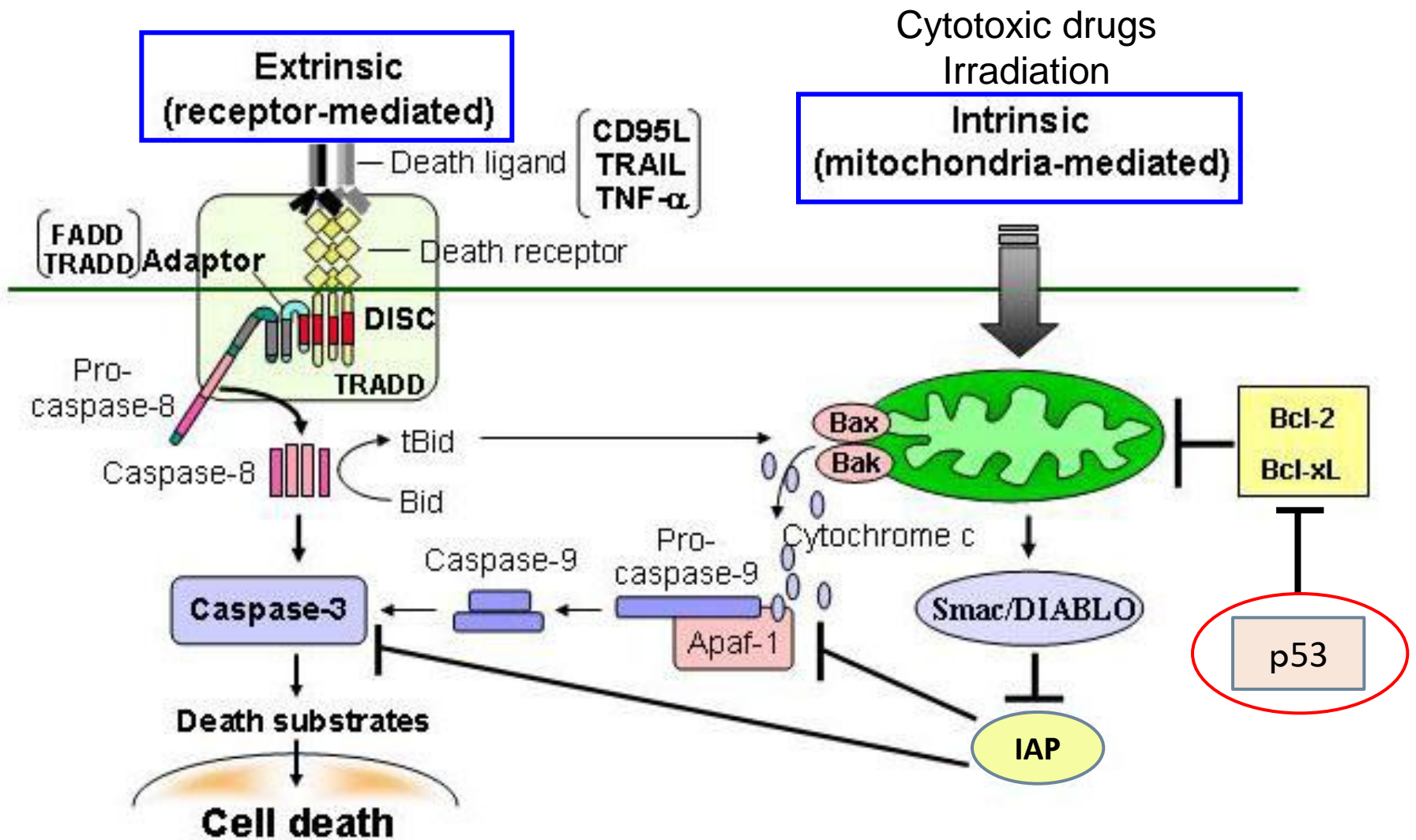
Υπερέκφραση της BCL2 σε κακοήθειες του ανθρώπου

Table 1 | **BCL2 overexpression in various types of cancer**

Type of cancer	New incidences annually (US)	BCL2 overexpression
Hormone-refractory prostate cancer	66,000	90–100%
Malignant melanoma	48,000	90%
Oestrogen-receptor-positive breast cancer	96,000	80–90%
Non-Hodgkin's lymphoma	58,800	50%
Colon cancer	97,000	30–50%
Chronic lymphocytic leukaemia	12,000	25–50%

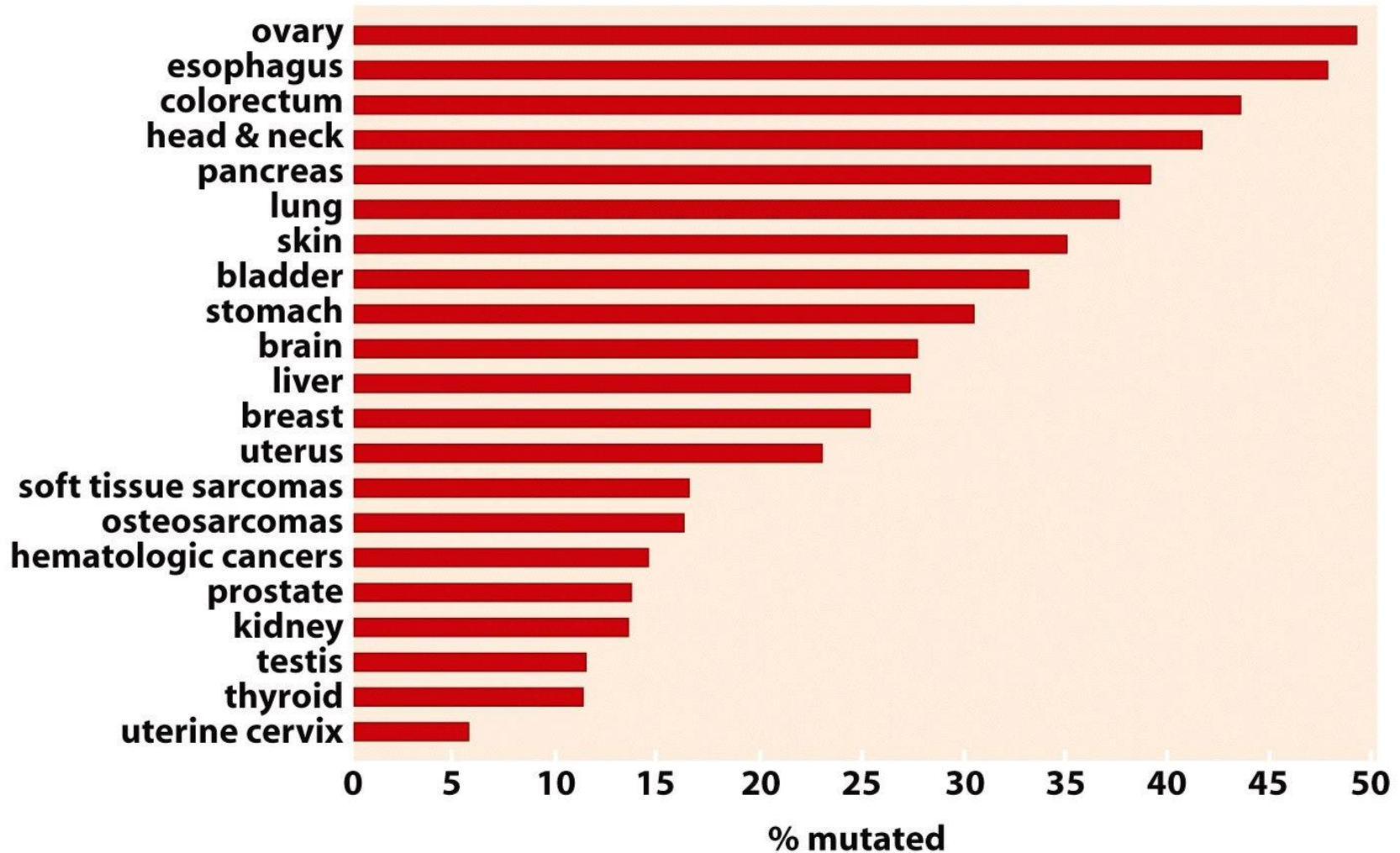
Αναστολείς της BCL2 στη θεραπεία του καρκίνου

Agent/strategy	Group/company	Current status
A. Bcl-2/Bcl-XL antagonists		
Bcl-2 antisense (G3139)	GENTA/Aventis	Phase II and III
Bcl-2/Bcl-XL small-molecule antagonists	IDUN/Abbott	Preclinical
Bcl-2 small-molecule antagonist (GX-01)	Gemin-X	Preclinical
Bcl-2 small-molecule antagonist	Structural Bioinformatics	Preclinical
Bcl-2 small-molecule antagonists	Thomas Jefferson University; Harvard University Washington University	Preclinical
Bcl-2 inhibitory natural product (Tetrocarcin-A)	Kyowa-Hakko Kogyo	Preclinical
Bax adenovirus	MD Anderson Cancer Center; University of South Carolina	Phase I



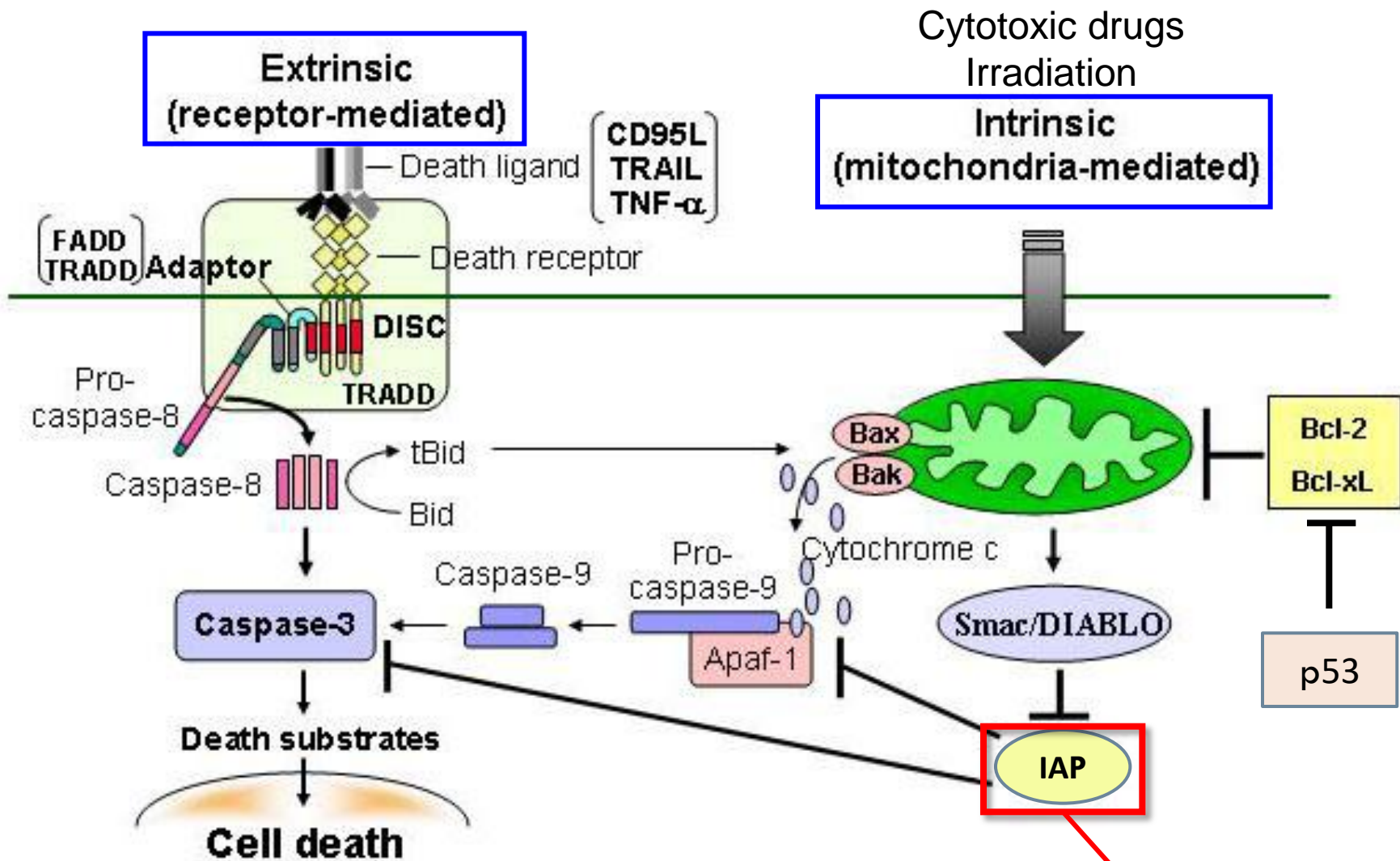
Το P53 είναι μεταλλαγμένο σε >50% των κακοηθειών του ανθρώπου

TP53 mutation prevalence (as recorded in the IARC Database, R7)



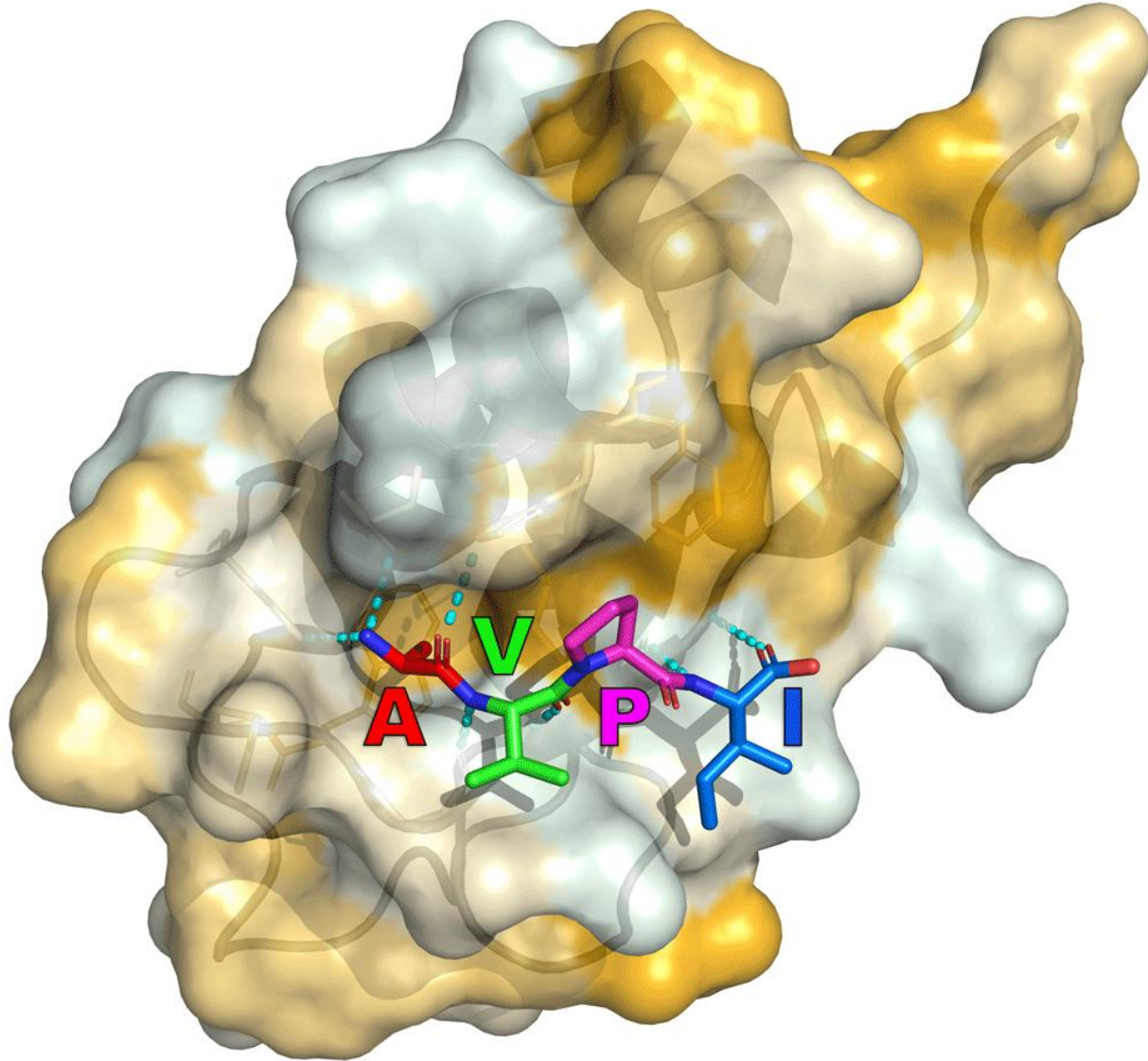
Στόχευση του p53 στον καρκίνο

- Γονιδιακή θεραπεία για την έκφραση αγρίου τύπου (φυσιολογικού) γονιδίου p53 σε καρκινικά κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένο p53.
- Χρήση συνθετικών χημικών μορίων που μετατρέπουν τη δομή του μεταλλαγμένου p53.
- Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι πεπτιδίων του μεταλλαγμένου p53.
- Επιμόλυνση κυττάρων με ιό που μπορεί να αντιγράφεται μόνο σε κύτταρα που ΔΕΝ έχουν αγρίου τύπου p53: ο ιός θανατώνει αυτά τα κύτταρα (ογκολυτική θεραπεία).



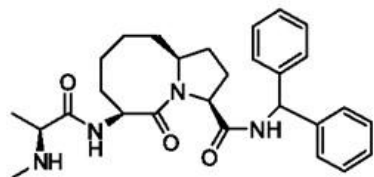
Υπερέκφραση των XIAP, cIAP-1, cIAP-2 και survivin σε πληθώρα κακοηθειών.

Κρυσταλλική δομή του τετραπεπτιδίου Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) του Smac το οποίο προσδένει το XIAP

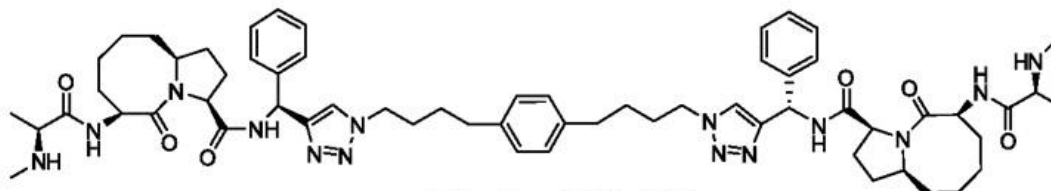


IAPs

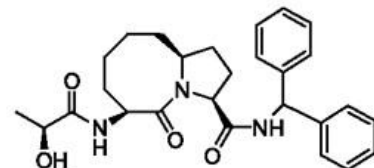
A



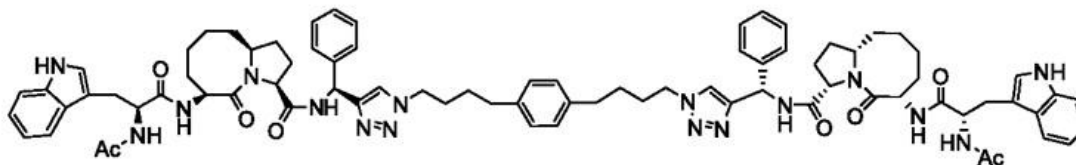
Monovalent SM-122



Bivalent SM-164

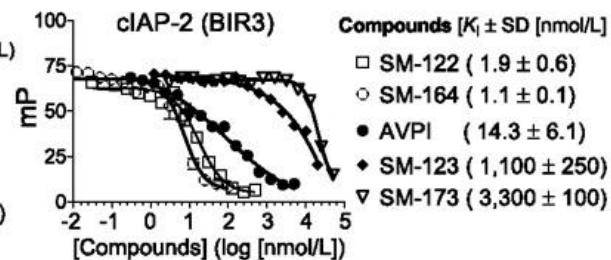
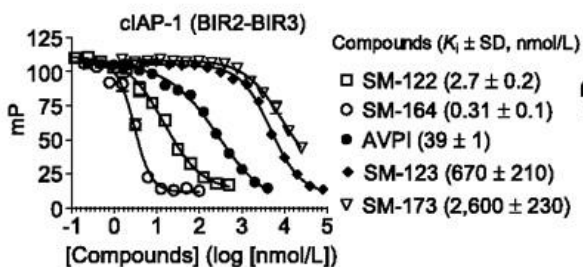
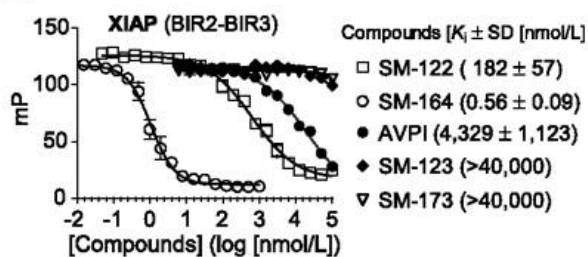


Monovalent SM-123

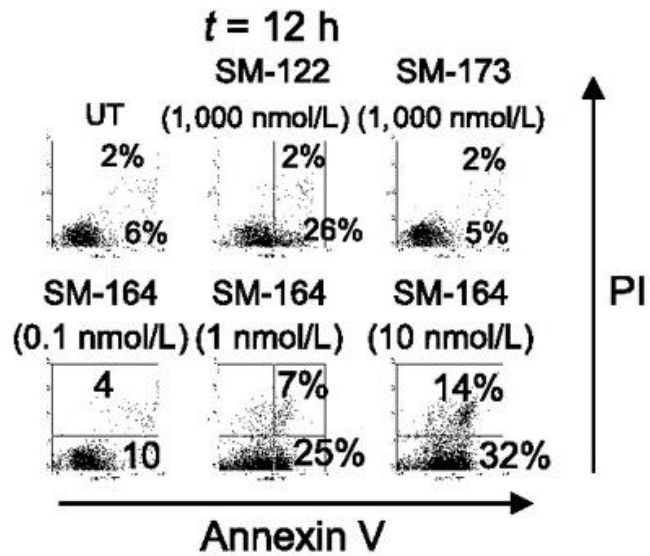


Bivalent SM-173

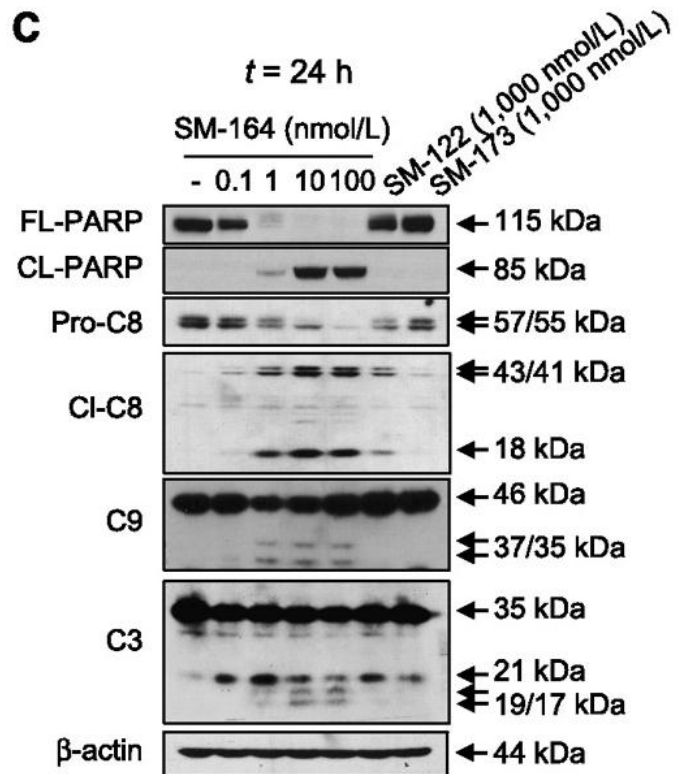
B



IAPs



C



Περίληψη (2)

- Η απόπτωση αποτελεί ανάχωμα στην ανάπτυξη κακοήθειας.
- Η καρκινική εξαλλαγή προϋποθέτει προστατευτικούς μηχανισμούς επιβίωσης (MYC+BCL2 >> MYC).
- Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την υπερέκφραση προστατευτικών ή/και την καταστολή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και μονοπατιών.
- Νέες κατηγορίες φαρμάκων: precision drugs. Στόχος η επανεργοποίηση της διαδικασίας της απόπτωσης.