

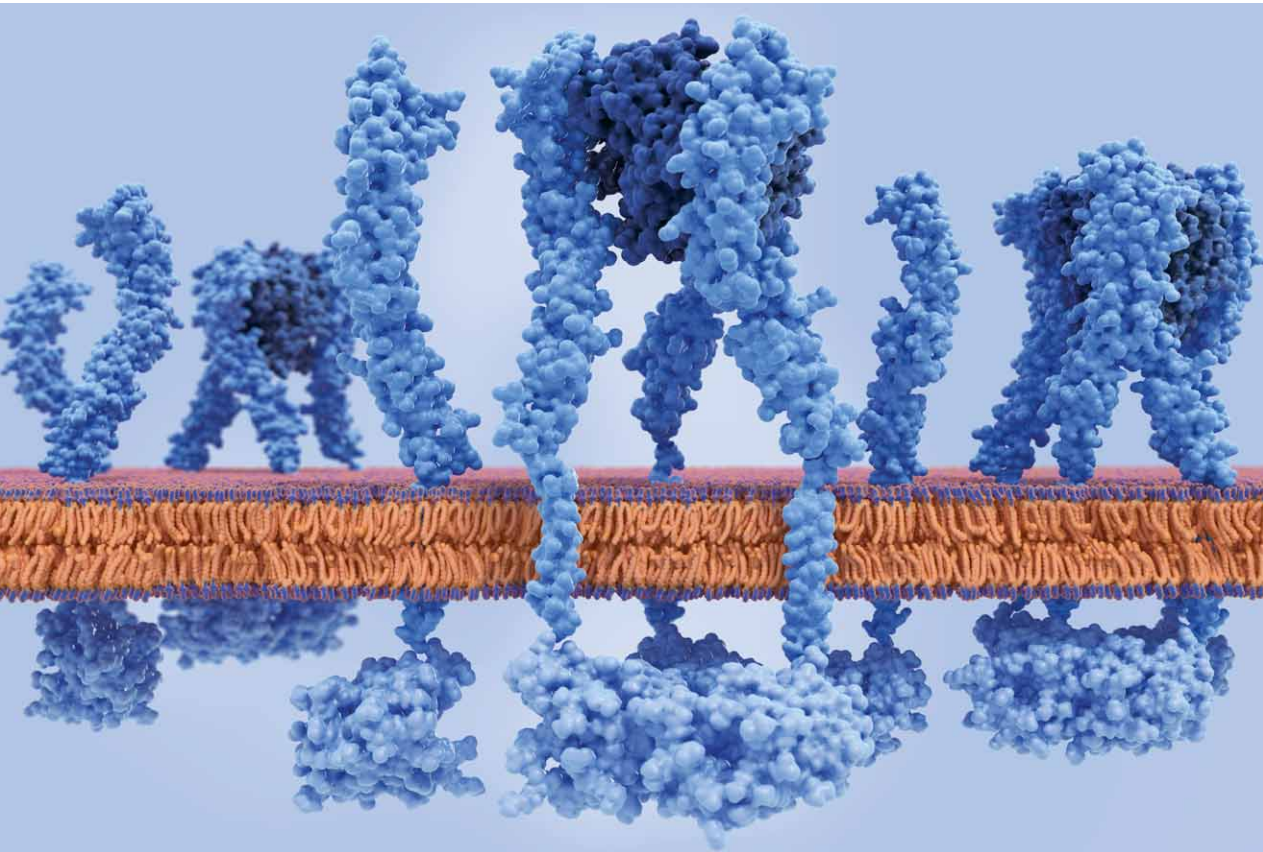
Jan Balvan a kolektiv

---

# Buněčná smrt

její význam ve fyziologii  
a patologické fyziologii

---





Kniha vychází s podporou společností:

BioTech a.s.



Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.



ROCHE s.r.o.



Jan Balvan a kolektiv

---

# Buněčná smrt

**její význam ve fyziologii  
a patologické fyziologii**

---

**Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy**

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude trestně stíháno.

**Jan Balvan a kolektiv**

## Buněčná smrt

### její význam ve fyziologii a patologické fyziologii

**Vedoucí autorského kolektivu:**

RNDr. Jan Balvan, Ph.D., Fyziologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a Ústav patologické fyziologie LF MU v Brně

**Autoři:**

RNDr. Jan Balvan, Ph.D.

Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., Fyziologický ústav LF MU v Brně a Ústav patologické fyziologie LF MU v Brně

Doc. RNDr. Michal Masařík, Ph.D., Fyziologický ústav LF MU v Brně a Ústav patologické fyziologie LF MU v Brně

**Recenzenti:**

Doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

© Grada Publishing, a.s., 2021

Cover Photo © depositphotos.com, 2021

Ilustrace Mgr. Martina Raudenská, Ph.D.

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 7975. publikaci

Odpovědný redaktor Mgr. Michal Zlatoš

Sazba a zlom Antonín Plicka

Počet stran 208

1. vydání, Praha 2021

Vytiskla TISKÁRNA V RÁJI, s.r.o., Pardubice

**Práce na této knize byla podpořena Grantovou agenturou ČR (18-03978S) a Ministerstvem zdravotnictví České republiky (NV18-08-00229 a NU20J-08-00018).**

*Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.*

*Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění však pro autory ani pro nakladatelství nevyplývají žádné právní důsledky.*

ISBN 978-80-271-4155-5 (pdf)

ISBN 978-80-271-1260-9 (print)

# Obsah

Předmluva .....	7
<b>Buněčná smrt a homeostáza organismu .....</b>	<b>9</b>
Adaptivní reakce eliminující poškození makromolekul .....	12
Senescence .....	18
Shrnutí .....	24
<b>Autofagie .....</b>	<b>27</b>
Morfologie a mechanismus autofagie .....	27
Indukce .....	27
Nukleace .....	28
Expanze fagoforu .....	31
Fúze autofagozomu s lyzozomem .....	31
Rozklad obsahu autofagozomu a recyklace .....	31
Regulace autofagie pomocí dostupnosti živin .....	32
Regulace závislá na dostupnosti dusíku .....	33
Regulace závislá na dostupnosti energie/glukózy .....	34
Regulace závislá na dostupnosti lipidů .....	34
Selektivní autofagie .....	35
Agrefagie .....	35
Mitofagie .....	35
Retikulofagie a nukleofagie .....	38
Pexofagie .....	39
Lyzofagie a xenofagie .....	39
Lipofagie .....	41
Ferritinofagie .....	41
Glykofagie .....	41
Fyziologické role autofagie .....	42
Kontrola kvality bílkovin .....	42
Autofagie v ontogenezi .....	42
Sekreční role autofagie .....	43
Autofagie, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	45
Autofagie v rozvoji a progresi nádorových onemocnění .....	46
Autofagie a degenerativní onemocnění nervového systému .....	49
Role autofagie v infekci, zánětu a imunitě .....	52
Autofagie jako buněčná smrt .....	61
Metody stanovení průběhu autofagie .....	62
<b>Apoptóza .....</b>	<b>71</b>
Mechanismus a regulace apoptózy .....	71
Vnitřní – mitochondriální apoptotická dráha .....	72
Vnější – receptorová apoptotická dráha .....	79
Kaspázy .....	84
Apoptóza ve fyziologických procesech .....	86
Apoptóza a imunitní systém .....	89

Autoimunitní onemocnění spojená s deregulací apoptózy .....	91
Apoptóza a šíření buněčných patogenů .....	91
<b>Apoptóza v rozvoji a progresi nádorových onemocnění .....</b>	<b>94</b>
<b>Apoptóza u neurodegenerativních onemocnění .....</b>	<b>95</b>
Apoptóza a akutní mozková ischemie .....	97
<b>Modulace apoptózy .....</b>	<b>97</b>
<b>Metody detekce apoptózy .....</b>	<b>99</b>
Detekce apoptózy elektronovou, světelnou a fluorescenční mikroskopií .....	99
High-throughput přístupy k měření buněčné smrti .....	103
Průtoková cytometrie .....	104
<b>Regulovaná nekróza .....</b>	<b>107</b>
<b>Pyroptóza .....</b>	<b>107</b>
Pyroptóza, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	110
<b>Nekroptóza .....</b>	<b>112</b>
Nekroptóza, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	115
<b>Parthanatos .....</b>	<b>118</b>
Parthanatos, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	120
<b>Ferroptóza a oxytóza .....</b>	<b>120</b>
Ferroptóza, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	123
<b>Nekróza řízená změnou permeability mitochondrií (MPT-driven necrosis) .....</b>	<b>124</b>
Nekróza řízená změnou permeability mitochondrií, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	125
<b>Buněčná smrt závislá na lyzozomech .....</b>	<b>128</b>
Buněčná smrt závislá na lyzozomech, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	129
<b>NETotická buněčná smrt alias NETóza .....</b>	<b>130</b>
NETóza, imunitní systém a modelové patologické stavy .....	132
<b>Detekce regulované nekrózy a možné farmaceutické intervence .....</b>	<b>134</b>
<b>Neautonomní buněčná smrt pramenící z interakce mezi buňkami .....</b>	<b>139</b>
Emperipoléza/emperitóza .....	139
Entóza a kanibalismus .....	141
Efferocytóza a fagoptóza .....	146
Shrnutí .....	149
<b>Modulace buněčné smrti a její využití v klinické praxi .....</b>	<b>151</b>
<b>Závěr .....</b>	<b>159</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>161</b>
<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>193</b>
<b>Rejstřík .....</b>	<b>197</b>
<b>Souhrn .....</b>	<b>205</b>
<b>Summary .....</b>	<b>207</b>

## Předmluva

Buněčná smrt představuje jeden z klíčových fyziologických procesů. Ačkoli pro jednotlivou buňku představuje konečný bod existence, z hlediska mnohobuněčného organismu je proces buněčné smrti jednou z determinant určujících správný vývoj jedince, homeostázu tkání i orgánů a přežití celého organismu. Důležitost procesu buněčné smrti se odráží také v množství chorob, které jsou způsobeny narušením jeho regulace a zdárného průběhu molekulárních mechanismů s ním spojených, ať už se jedná o královnu nemocí – rakovinu, neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova či Parkinsonova choroba, autoimunitní a kardiovaskulární onemocnění nebo traumatické poškození mozku. Díky tomu byla tato oblast biologie v uplynulých několika desetiletích cílem intenzivního výzkumu, který vedl k nesmírně důležitým poznatkům uplatnitelným v mnoha různorodých oborech. I přes velký význam buněčné smrti a její drtivý dopad na patogenezi mnoha onemocnění existuje v české lékařské literatuře jen velmi skromný počet publikací, které se tímto jevem zabývají. I v případě, že je buněčná smrt zmiňována, děje se tak pouze na povrchní úrovni zkreslené mnoha dogmaty. Tato kniha má za cíl alespoň částečně tento stav napravit a osvětlit význam buněčné smrti jakožto fenoménu, který nesmí být při výzkumu chorob opomíjen. Věříme, že poslouží k rozšíření znalostí z této oblasti fyziologie buňky nejen jako studijní materiál pro studenty vysokých škol, ale také pro všechny, které tyto fascinující procesy na pomezí buněčného života a smrti zajímají.

Jan Balvan v Brně dne 29. 4. 2020



## Buněčná smrt a homeostáza organismu

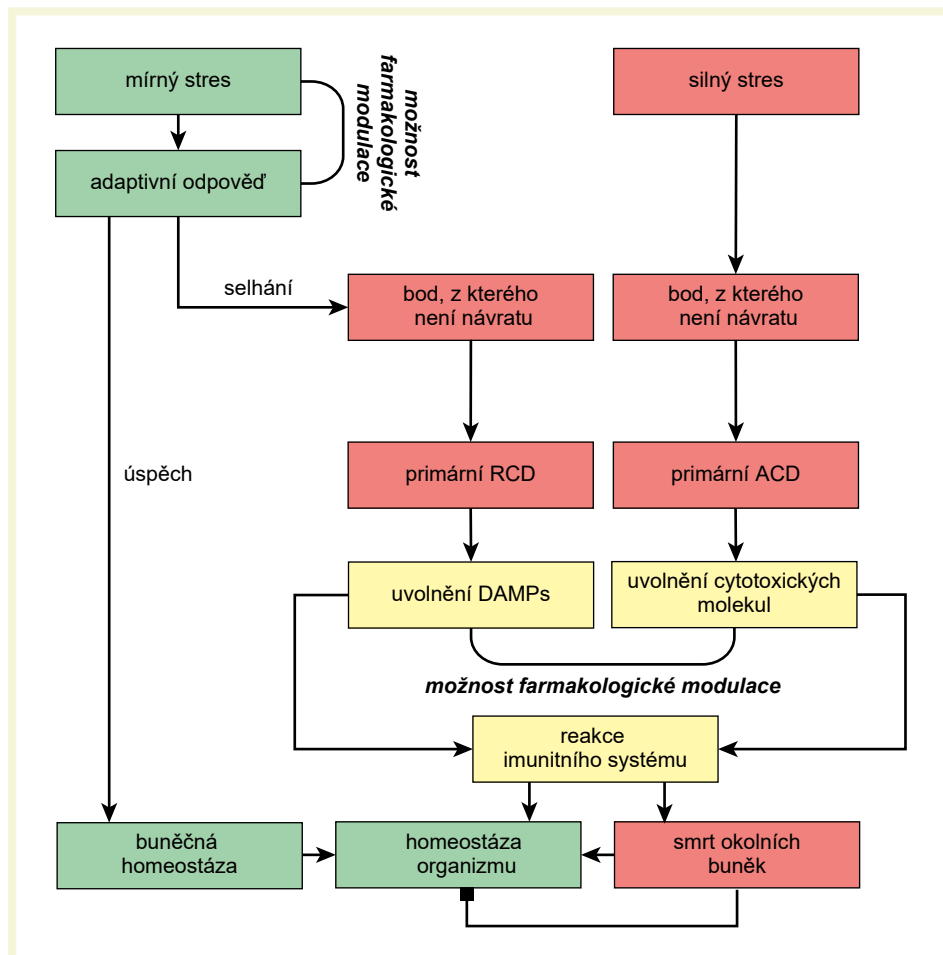
„Smrt je tak strašně konečná, zatímco život je plný možností.“

— TYRION LANNISTER

Jeden z důvodů, které vedly k evolučnímu úspěchu savců (a dalších mnohobuněčných organismů) je jejich schopnost udržet stálost svého vnitřního prostředí, takzvanou **homeostázu**, navzdory měnícímu se vnějšímu prostředí. Homeostáza někdy vyžaduje nepravděpodobného pomocníka, je jím **buněčná smrt**. Buněčná smrt je proces, který je zprostředkovan ukončením normálního buněčného metabolismu a vede k trvalému zániku buněčné aktivity. Tento proces je spouštěn v případě, kdy je cílová buňka pro organismus nadbytečná, příliš nákladná nebo nebezpečná. Některé buňky jsou totiž ve vyvíjejícím se organismu generovány v přebytku a přežívají pouze ty, které se stávají funkčními a řádně se zapojují do požadovaných interakcí. To se děje například v periferní části nervové soustavy. Při vývoji savčího svalu axonové výběžky několika motorických neuronů společně inervují stejné svalové vlákno. Následkem soutěže o růstové faktory však dochází k posílení jednoho nervosvalového spojení a odumření těch ostatních. Za normálních okolností takto zanikne 50–75 % neuronů určených pro inervaci svalů končetin [1]. V některých případech mechanismus, který generuje buňky potřebné, také náhodně generuje buňky nepotřebné. To je případ autoreaktivních klonů T-lymfocytů (buňky, které by spouštěly imunitní reakci proti buňkám vlastního těla), které umírají, stejně jako klony, které naopak reakce s antigenem nejsou schopny vůbec [2]. Během vývoje jsou také odstraňovány struktury, které již nejsou nadále potřebné. Příklady zahrnují evoluční relikty, jako jsou plovací blány mezi prsty či struktury, které jsou vyžadovány pouze u jednoho pohlaví, jako jsou Wolffovy a Müllerovy vývody [3]. Obecněji lze říct, že budování komplexního organismu je jako vytváření mramorové sochy. Buněčné dělení tvoří materiál, zatímco buněčná smrt ho tesá do požadované formy. Důsledkem narušení tohoto procesu je vznik závažných malformací.

Zatímco předchozí příklady zahrnovaly takzvanou **programovanou buněčnou smrt** (programmed cell death; **PCD**), neboť šlo výhradně o fyziologicky se vyskytující případy buněčné smrti, závažné narušení homeostázy prostřednictvím vnějšího vlivu může vést k **regulované** (regulated cell death; **RCD**), nebo **náhodné** (accidental cell death; **ACD**) **buněčné smrti** [4]. ACD představuje katastrofický scénář, při němž buňka není dále schopna kompenzovat dopad škodlivého vnějšího faktoru jako je extrémní pH, vysoký osmotický tlak, vysoká teplota nebo mechanické poškození. Tyto buňky umírají nekontrolovaným způsobem v důsledku bezprostředního poškození jejich struktury. V kontrastu s náhodným typem buněčné smrti je regulovaná buněčná smrt řízena komplexní molekulárnímašinerií, jejíž průběh může být ovlivňován farmakologickými či genetickými zásahy na klíčová místa těchto molekulárních kaskád. Průběh regulované buněčné smrti je relativně pomalý. **Je-li RCD spouštěna jako součást fyziologických procesů, pak mluvíme o PCD.** V užším slova smyslu je RCD aktivována při neúspěšné adaptaci na změny v důsledku závažného narušení homeostázy. Významné příklady faktorů, které vyvolávají buněčný stres, zahrnují činnidla poškozující DNA, eroze telomer, tepelný šok nebo xenobiotika, která působí denaturaci proteinů, hypoxie, respirační jedy, které interferují s dýchacím řetězcem v mitochondriích, infekční agens a v neposlední řadě také nedostatek živin, který vede k aktivaci autofagie, což umožňuje buňkám katabolizovat jejich vlastní komponenty.

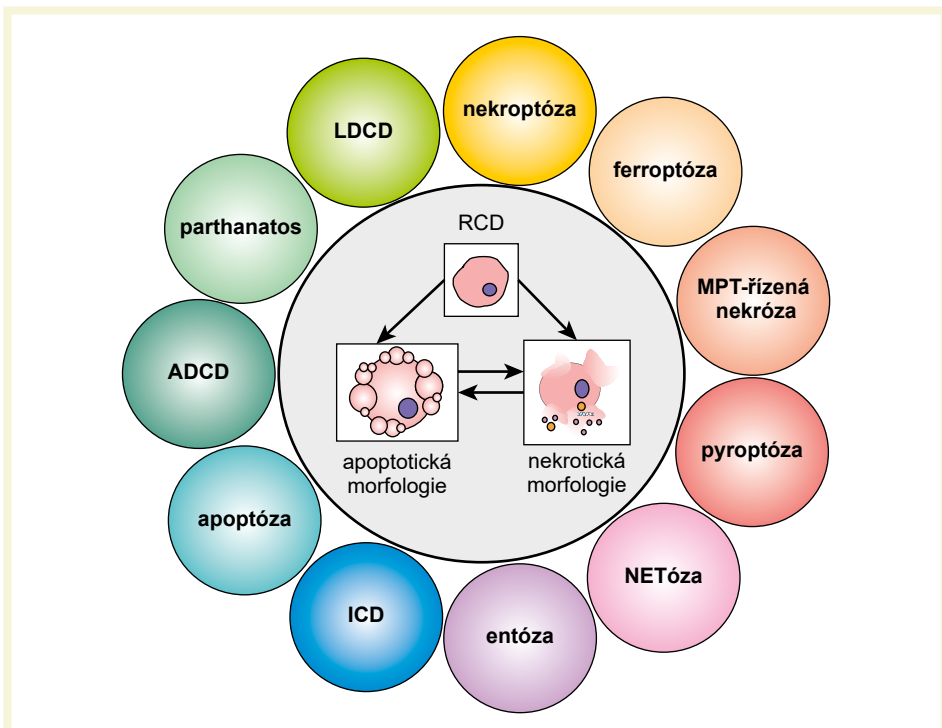
Lze tedy shrnout, že narušení buněčné homeostázy a tím vznikající buněčný stres vede buď k přechodným změnám buněčného metabolismu, opravám vzniklého poškození a následnému návratu k homeostáze, nebo kulminuje k buněčné senescenci a regulované buněčné smrti, pokud je obnova normálních buněčných funkcí nemožná (obr. 1). RCD je tedy mechanismem pro zachování homeostázy organismu, při němž jsou odstraňovány buňky vážně poškozené, nevratně infikované, nebo buňky potenciálně onkogenní.



**Obr. 1** Následky buněčného stresu a narušení homeostázy

Buňky vystavené velmi nepříznivým podmínkám prostředí umírají prakticky okamžitě, nekontrolovatelným způsobem – procesem, který se označuje jako náhodná buněčná smrt (ACD). Naopak poměrně mírné narušení homeostázy exogenního nebo endogenního původu podporuje adaptivní stresové odezvy. Pokud adaptivní reakce selžou, buňky aktivují mechanismy vedoucí k regulované buněčné smrti (RCD). Pokud jsou následkem zvoleného podtypu buněčné smrti uvolňovány cytotoxické molekuly, může nastat rovněž vlna sekundárních regulovaných buněčných smrtí v okolí primárně zasažené buňky, které mohou, ale nemusí přispívat k homeostáze organismu. Upraveno na motivy [4].

Nežádoucí buňky jsou odstraňovány pomocí různých typů RCD v závislosti na typu poškození a míře žádoucí imunitní odpovědi. V dospělém lidském organismu je každý den pomocí PCD či RCD odstraněno  $10^{11}$  buněk a množství buněk, které každoročně ztrácíme při fyziologicky normální míře buněčné smrti, se blíží celkové tělesné hmotnosti [5]. Pokud by všechny typy RCD vyvolávaly silnou imunitní reakci, byla by výsledná míra imunitní odpovědi pro organismus neúnosná. Proto mohou buňky zemřít pomocí aktivace jedné z mnoha různých RCD kaskád. Každý z takových režimů regulované buněčné smrti je iniciován a propagován pomocí specifických molekulárních mechanismů. V důsledku toho se RCD může projevovat celým spektrem morfologických rysů, od úplně nekrotického až po plně apoptotický, a spektrem imunomodulačních profilů, které se mohou pohybovat od protizánětlivých a vyvolávajících toleranci až po prozánětlivé a imunogenní (obr. 2). Je logické, že většina typů RCD



**Obr. 2** Hlavní podprogramy regulované buněčné smrti

Buňky, které jsou vystaveny nevratným poruchám intracelulárního nebo extracelulárního mikroprostředí, mohou aktivovat jednu z mnoha kaskád, které nakonec vedou k jejich zániku. Každý z takových režimů regulované buněčné smrti (RCD) je iniciován a propagován pomocí molekulárních mechanismů, které vykazují značný stupeň vzájemné propojenosti. Kromě toho se RCD může projevovat celým spektrem morfologických rysů, od úplně nekrotického až po plně apoptotický. ADCD (autophagy-dependent cell death): buněčná smrt závislá na autofagii; ICD (immunogenic cell death): imunogenní buněčná smrt; LDCD (lysosome-dependent cell death): buněčná smrt závislá na lysozomech; MPT (mitochondrial permeability transition): smrt spojená se zvýšením mitochondriální permeability. Upraveno na motivy [4].

generuje parakrinní a endokrinní signály, které nesou informaci o potenciální hrozbě pro organismus, čímž přispívají k brzkému obnovení systémové homeostázy.

## Adaptivní reakce eliminující poškození makromolekul

Mnoho potenciálně škodlivých výkyvů v intracelulárním nebo extracelulárním mikroprostředí bývá úspěšně zvládnuto po aktivaci buněčných stresových reakcí, které umožňují zachovat buněčné funkce a opravit vzniklá poškození. Nejzávažnější formou stresu, se kterým se musí buňka vypořádat, je poškození významných makromolekul jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Za účelem oprav poškození nukleových kyselin, zejména pak DNA, slouží kaskáda dějů, které lze shrnout pod názvem **DNA damage response (DDR)**, neboli odpověď na poškození DNA. Stresová reakce související s poškozením proteinů pak zahrnuje stres endoplazmatického retikula a **unfolded protein response (UPR)**, neboli odpověď na nesbalené nebo špatně sbalené proteiny [6].

**Odpověď na poškození DNA (DDR)** je síť buněčných signálních drah, které detekují, signalizují a opravují léze v DNA. Proteiny, které monitorují integritu DNA, mohou v reakci na poškození DNA aktivovat kontrolní body buněčného cyklu a dráhy oprav DNA, aby se zabránilo vzniku potenciálně škodlivých mutací. Pokud je odpověď na poškození DNA neúspěšná, stejná mašinerie nakonec iniciuje senescenci nebo RCD. Do množiny s názvem DDR patří několik typů opravných mechanismů. Jedním z nich je **bázová excizní reparace (BER)**. Při BER jsou odstraněny poškozené báze, které jsou rozeznány pomocí specifické glykosylázy. Ta katalyzuje hydrolýzu N-glykosidových vazeb spojujících báze s páteří DNA a působí uvolnění poškozené báze. Dalšími typy DDR jsou: **nukleotidová excizní reparace (NER)**, která koriguje široké spektrum DNA lézí včetně pyrimidinových dimerů, které narušují strukturu dvojité šroubovice; **reparace chybného párování bází (mismatch repair; MMR)**, která opravuje chybně spárované nukleotidy a odstraňuje malé inserce a delece; **nehomologní oprava přímým spojením konců (nonhomologous end joining; NHEJ)**, což je hlavní cesta, kterou savčí buňky opravují dvouřetězcové zlomy (DSBs) a **homologní rekombinace (HR)**, která rovněž slouží k opravě DSBs, ale je aktivní pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu [7]. Klíčovými DDR signalizačními komponentami jsou proteinkinázy **ATM** (ataxia telangiectasia mutated) a **ATR** (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein). Dva z nejlépe prostudovaných ATM/ATR cílů jsou proteinové kinázy **CHEK1** (checkpoint kinase 1) a **CHEK2** (checkpoint kinase 2), které spolu s ATM a ATR působí na snížení aktivity cyklin-dependentních kináz (CDKs) a navozují tak zástavu buněčného cyklu. To se děje různými mechanismy, z nichž některé jsou zprostředkovány aktivací **transkripčního faktoru p53** [8, 9]. Díky aktivaci ATM dochází rovněž k **fosforylaci histonu H2AX ze vzniku jeho fosforylované formy  $\gamma$ -H2AX**. Jakmile je DNA opravena,  $\gamma$ -H2AX je opět defosforylován, proto je detekce  $\gamma$ -H2AX v současné době využívána jako marker poškození DNA [10]. Dalším významným proteinem signalizujícím poškození DNA je polymeráza **PARP-1** (poly ADP-ribose polymerase-1) [11]. Mezi četnými proteiny, které se účastní DDR jsou nejznámější nádorové supresory **BRCA1** a **2** (breast cancer 1 a 2), **DNA-dependentní protein kináza (DNA-PK)** a **sirtuiny**. Proteiny BRCA1 a 2 jsou zapojeny do obou hlavních mechanismů opravy dvouřetězcových zlomů HR a NHEJ. DNA-PK hraje ústřední roli v NHEJ prostřednictvím autofosforylačních dějů. Součástí DNA-PK je

protein Ku, který se váže na volné konce DNA zlomu a rekrutuje katalytickou podjednotku za vzniku aktivního proteinkinázového komplexu. Tento komplex spolupracuje s XRCC4, DNA ligázou IV a dalšími faktory, které provádějí opravu DSB [12]. Sirtuiny jsou rodinou histonových deacetyláz, která hraje roli při udržování genomové stability. SIRT1 působí jako negativní regulátor funkce p53, čímž potlačuje apoptózu indukovanou poškozením DNA [8].

Pokud je odpověď na poškození DNA neúspěšná, stejné mechanismy nakonec iniciují buněčné stárnutí (senescenci) nebo některý z podtypů regulované buněčné smrti. BRCA1 a DNA PK například hrají roli v indukcii apoptózy [8]. Zatímco DNA PK vyžaduje k aktivaci apoptózy funkční p53, apoptóza vyvolaná pomocí BRCA1 je zřejmě na p53 nezávislá [13]. Zvýšená aktivace PARP je spojená s navozením parthanatos, což je podtyp regulované nekrózy [14]. Důležité je, že DDR je úzce spojena s eliminací poškozených buněk imunitními efekty a vytvořením zánětlivé odpovědi, která vede k udržování místní a systémové homeostázy. Aktivace DDR byla asociována se zvýšenou expresí hlavního histokompatibilního komplexu-I (MHC-I) na povrchu buněk, což vede k větší rozpoznatelnosti poškozených buněk cytotoxickými T-lymfocyty. V některých případech však DDR může přispět k vytvoření patologických stavů, zejména ve spojení s defekty v mechanismech, které fyziologicky tlumí zánět [6]. Zatímco přiměřeně aktivní mechanismy DDR přispívají k homeostáze, jejich hyperaktivace může přispět k aktivaci buněčné smrti a v krajních případech se může podílet na vzniku patologie. Názorným příkladem je ischemicko-reperfúzní poškození spojené s mrtvicí a infarktem myokardu. PARP-1 se v důsledku rozsáhlého poškození DNA stává hyperaktivní, což vede ke zhoršené produkci ATP a smrti buněk [11]. Zděděné defekty v mechanismech DDR mohou také způsobit vznik nádorového onemocnění a závažných neurodegenerativních chorob [11]. (Tab. 1)

Buňky obsahují poměrně přísné systémy řízení kvality zahrnující množství samostatně fungujících proteinů a několik proteolytických systémů, které provádějí proces degradace proteinů. Tyto systémy podléhají komplexní regulaci, která zajišťuje, aby byly proteolytické procesy vysoce selektivní. Na rozdíl od většiny regulačních mechanismů je degradace proteinů nevratná a zásadně ovlivňuje výsledný fenotyp buňky. Degradace proteinu, který se účastní konkrétní signální dráhy, může vést k úplnému ukončení signalizačního procesu, ve kterém je daný protein zahrnut. Rychlá a specifická degradace cílových proteinů tak umožňuje přizpůsobení se novým fyziologickým podmínkám. Většina intracelulárních proteinů je degradována **ubikvitin-proteázovou cestou (UPP)** nebo pomocí **autofagie** za účasti lyzozomů. Degradace proteinů pomocí UPP zahrnuje dva diskrétní a po sobě následující kroky. Prvním z nich je značení substrátového proteinu kovalentním připojením několika molekul ubikvitinu a krokem následným je degradace takto označeného proteinu **proteazomem 26S** [18]. Tato klasická funkce ubikvitinu je spojena s regulací proteinového obrátu a generováním antigenních peptidů v buňkách prezentujících antigen [19]. Degradace proteinů pomocí autofagie bude rozebrána v kapitole týkající se autofagie.

**Zásadním hráčem v kontrole a degradaci špatně sbalených proteinů je endoplazmatické retikulum (ER).** ER je síť rozvětvených kanálků a zploštělých váčků, které řídí syntézu, skládání a zpracování více než třetiny všech buněčných proteinů. Na udržení jedinečného prostředí a funkce ER buňky investují rozsáhlé množství energie. Pro zamezení agregace a při sbalování proteinů je potřebná asistence různých forem **chaperonů** a **proteinů teplotního šoku (HSP)**. Navzdory funkci těchto

**Tab. 1** Příklady závažných onemocnění způsobených defektem v DDR

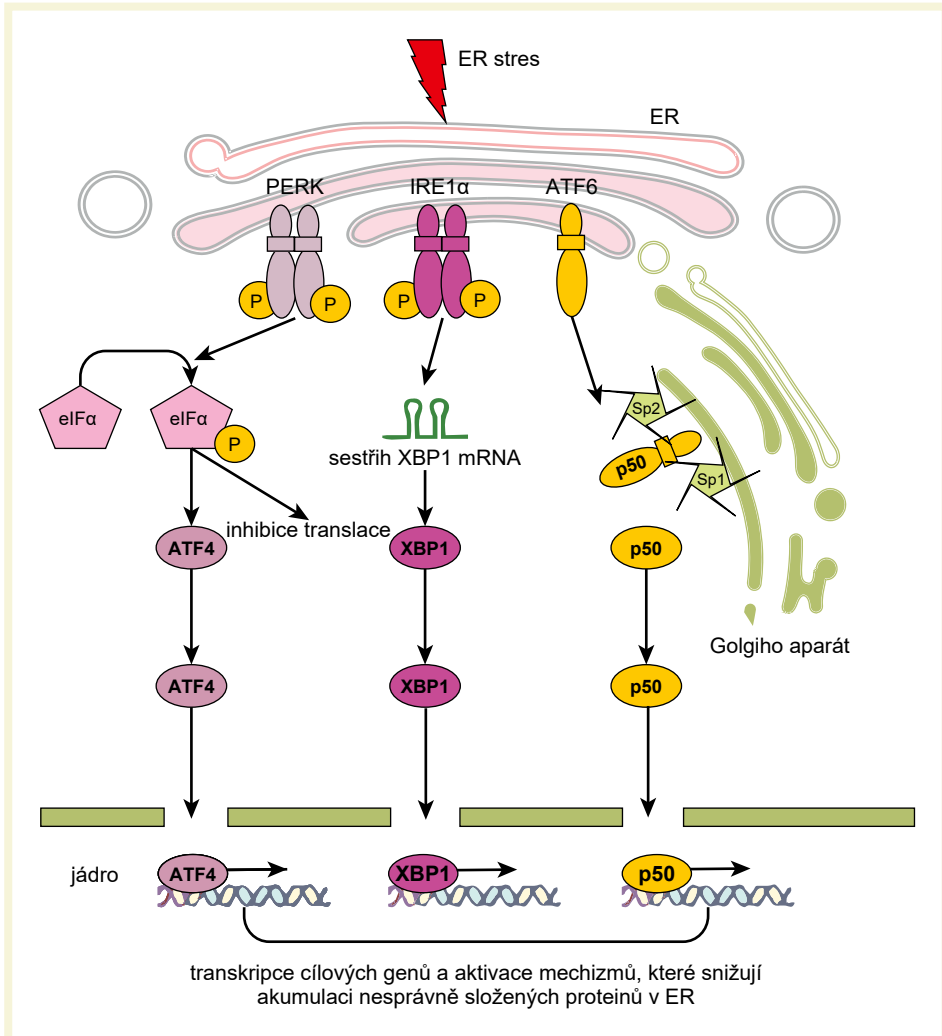
Syndrom	Fenotyp	Mutované geny
<i>defekty NER</i>		
xeroderma pigmentosum	neurodegenerace a mikrocefalie, fotosenzitivita, nádory kůže	XPA-XPG POLH
Cockayneův syndrom	mikrocefalie a demyelinace neuronů	CSA, CSB, XPB, XPD, XPG
<i>defekty DNA helikáz</i>		
Bloomův syndrom	mikrocefalie, poruchy růstu, mentální retardace, náchylnost k infekci, zvýšená predispozice ke všem typům nádorů	BLM
Wernerův syndrom	předčasné stárnutí, zvýšená predispozice ke všem typům nádorů	WRN
<i>defekty HR a NHEJ</i>		
Lig4 syndrom	mikrocefalie, leukémie, imuno-deficience, poruchy růstu	DNA ligáza IV, XLF/cerunnos
radiosenzitivní-SCID	závažná kombinovaná imuno-deficience, lymfomy, hypersenzitivita k ionizujícímu záření	artemis
hereditární karcinom prsu	nádory prsu a vaječníků, predispozice k nádorům prostaty, slinivky břišní a melanomům	BRCA1, BRCA2, Chk2, MRN, ATM BRIP1, PALB2
<i>defekty v opravě kroslinků</i>		
Fanconioho anémie	malý vzrůst, mikrocefalie, abnormální kožní pigmentace, opoždění vývoje, vrozené srdeční vady, selhání kostní dřeně, zvýšené riziko hematologických malignit a solidních tumorů	FANCA-FANCL, BRCA2 (FANCD1)
<i>defekty MMR</i>		
Lynchův syndrom (HNPCC)	časný rozvoj kolorektálního karcinomu, endometriálního karcinomu a dalších malignit	MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, APC
<i>poruchy přenosu signálů poškození</i>		
Liův-Fraumeniho syndrom	sarkomy, nádory prsu a mozku	p53
ataxia telangiectasia	mozečková ataxie, teleangiectasie malých cév, imunitní defekty, zvýšené riziko vzniku různých malignit	ATM
Seckelův syndrom	mikrocefalie, mentální retardace, dysmorfie obličeje, poruchy růstu	ATR, SCKL2, SCKL3
Hutchinsonova-Gilfordova progerie	zrychlené stárnutí	LMNA

Tab. 1 Pokračování

Syndrom	Fenotyp	Mutované geny
<i>choroby spojené s narušenou kinetikou DDR</i>		
Downův syndrom	mentální retardace, predispozice k tvorbě nádorů, zrychlené stárnutí, zvýšená citlivost na látky poškozující DNA [15]	trizomie chromozomu 21
Alzheimerova choroba	progresivní neurodegenerace, demence, kognitivní dysfunkce, absence nebo selhání reparačních enzymů [16]	multifaktoriální onemocnění
Huntingtonova chorea	selektivní ztráta neuronů v bazálních gangliích, ztráta koordinace pohybů, demence, narušení ATM signalizace [17]	HTT

pomocníků je úspěšnost skládání proteinů často poměrně nízká. Nesprávně složené proteiny odhalené pomocí přísných kontrolních mechanismů v ER jsou likvidovány pomocí **degradace související s ER (ERAD)**. Nežádoucí proteiny jsou při tomto procesu transportovány zpět do cytozolu pro následnou ubikvitinaci a degradaci proteasomem 26S. Účinnost skládání proteinů v ER může být narušena mnoha faktory, jako jsou například změny v koncentraci vápníku, nedostatek ATP, redoxní nerovnováha, hypoxie, akumulace lipidů, virová infekce nebo intoxikace etanolem či xenobiotiky. Tyto faktory mohou vést k akumulaci nesprávně složených proteinů v ER a stavu známému jako **ER stres**. Modelová forma ER stresu nastává v  $\beta$ -buňkách pankreatu, pokud nejsou schopny správně složit zvýšené množství inzulínu potřebného k udržení homeostázy glukózy v krvi [20].

Pokud se nesprávně složené proteiny nahromadí, je aktivována UPR. **Odpověď na nesbalené nebo špatně sbalené proteiny (unfolded protein response; UPR)** je síť buněčných signálních drah, které detekují, signalizují a likvidují nefunkční proteiny. Aktivace UPR snižuje syntézu bílkovin a zvyšuje degradaci nesprávně složených proteinů. Doposud byly identifikovány **tři hlavní větve UPR**, jsou to **ATF6** (activating transcription factor 6), **PERK** (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase) a **IRE1** (inositol requiring enzyme 1) (obr. 3). Tyto větve působí paralelně a používají specifické mechanismy přenosu signálu, všechny však vedou k tvorbě transkripčního faktoru, který aktivuje cílové UPR geny. Každá větev je definována třídou transmembránových signalizačních molekul asociovaných s ER a používá jiný mechanismus přenosu signálu: ATF6 regulaci štěpení proteinu, PERK řízení translace a IRE1 nekonvenční sestřih mRNA [21]. Transkripční faktor ATF6 je původně syntetizován jako ER-rezidentní transmembránový protein s velkou doménou zasahující do lumen ER. Při akumulaci špatně sbalených proteinů je odtržen z membrány ER, zabalen do transportních váčků a doručen do Golgiho aparátu, kde je štěpen proteázami S1P a S2P, které odstraní luminální a transmembránovou doménou. Osvozený N-konec ATF6 se pak přesune do jádra a aktivuje cílové UPR geny [21]. Druhá větev UPR je zprostředkována pomocí PERK. V důsledku ER stresu



### Obr. 3 Tři hlavní podprogramy UPR

Všechny tři typy stresových signalizačních receptorů v endoplazmatickém retikulu (PERK, IRE1 $\alpha$  a ATF6) zpočátku aktivují mechanismy, které zvyšují schopnost skládání proteinů a snižují akumulaci proteinů v ER. Využívají k tomu aktivaci transkripčních faktorů, které spouštějí transkripci genů účastnících se UPR. Každá větev používá jiný mechanismus přenosu signálu: ATF6 štěpení proteinu, PERK řízení translace a IRE1 nekonvenční sestřih mRNA. Upraveno na motivy [21].

PERK oligomerizuje a dochází k jeho autofosforylaci a inhibici celkové translace proteinů pomocí fosforylace eukaryotického translačního iniciačního faktoru 2 (eIF2 $\alpha$ ). Tato událost snižuje přetížení ER nově syntetizovanými proteiny, ale také umožňuje selektivní translaci mRNA kódující transkripční faktor ATF4, čímž přispívá k posílení antioxidantní kapacity buňky, zvýšení schopnosti správného skládání proteinů v ER a aktivaci autofagie [22]. Třetí větev zahrnuje dimerizaci a autofosforylaci IRE1, což

aktivuje jeho doménu schopnou štěpit RNA. Následkem toho je z mRNA, která kóduje transkripční faktor XBP1 (X-box binding protein 1), vystřížen úsek o velikosti 26 nukleotidů a dochází k posunu čtecího rámce. Po translaci vzniká stabilní a aktivní XBP1, pod jehož transkripční regulaci spadají geny kódující faktory, které modulují skládání a sekreci proteinů, ERAD, translokaci proteinů do ER a syntézu lipidů [23].

UPR se podobá DDR ve své schopnosti obnovovat buněčnou homeostázu a pokud to není možné navodit RCD spolu s aktivací lokálního zánětu a vrozené imunity. Proapoptotický vliv byl prokázán například u PERK a IRE1. Hyperaktivace PERK aktivuje transkripční faktor CHOP/GADD153, který inhibuje expresi genu kódujícího antiapoptotický BCL2 (B-cell lymphoma 2) a zvyšuje exprese proapoptotického proteinu BIM (BCL-2-like protein 11) [20]. Chronický ER stres či defekty v UPR se podílí na patogenezi mnoha závažných onemocnění, včetně metabolického syndromu, různých typů onkologických malignit či neurodegenerativních a autoimunitních chorob. Kapacita endoplazmatického retikula pro zvládnání ER stresu může být rozhodujícím faktorem při patogenezi chorob spojených s obezitou. Vyřazení funkce XBP1 v neuronech a gliích zvyšuje náchylnost myši k obezitě, neboť způsobuje silnou rezistenci k hormonu sytosti leptinu [24]. Naopak zvýšená exprese XBP1 ve specifických hypotalamických neuronech vede ke zlepšení citlivosti jater k inzulinu a k utlumení endogenní produkce glukózy u myši s vysokým obsahem tuku ve stravě [25]. Zajímavé rovněž je, že ektopická aktivace ATF4 v kosterní svalovině vyvolává sekreci fibroblastového růstového faktoru 21 (FGF21), který má příznivý vliv na kontrolu tělesné hmotnosti [26]. Signální dráha PERK-ATF4-FGF21 může být aktivována například cvičením a chladem [6]. Signalizační složky UPR jsou tedy zajímavými potenciálními cíli pro intervenci a léčbu některých z nejzávažnějších civilizačních chorob. Podrobnější informace o asociaci UPR signálů s patologickými stavy jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tab. 2** Příklady závažných onemocnění způsobených změnou aktivace UPR

Protein	Asociovaná patologie	Citace
IRE1	onkologická onemocnění, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, regulace nádorové angiogeneze	[27, 28]
PERK	diabetes mellitus, Wolcottův-Rallisonův diabetický syndrom, regulace nádorové angiogeneze, obezita	[26–28]
ATF6	diabetes typu II, zvýšené hladiny cholesterolu v plazmě, regulace nádorové angiogeneze	[27–30]
XBP1	mnohočetný myelom, cévní mozková příhoda, regulace nádorové angiogeneze, rezistence k leptinu, obezita	[24, 28, 31, 32]
ATF4	nádorová onemocnění, diabetes mellitus, obezita	[26, 33, 34]
CHOP/GADD 153	nádorová onemocnění, diabetes mellitus	[35, 36]

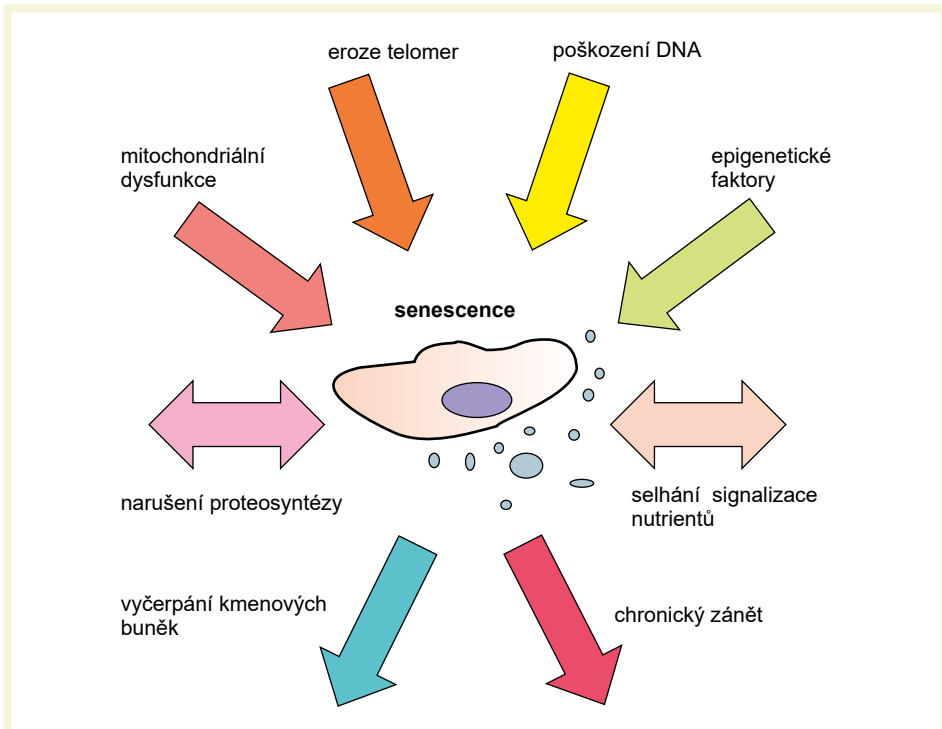
## Senescence

Senescence neboli buněčné stárnutí je stresová reakce aktivovaná poškozením makromolekul, které je neopravitelné, ale přesto nedostatečné pro spuštění RCD. Jde o mechanismus navazující na DDR i UPR [37, 38]. Příkladem senescence předcházené DDR je i limitní zkrácení telomer v důsledku opakovaných buněčných replikací z něhož plyne existence Hayflickova limitu. **Hayflickův limit** stanovuje maximální počet dělení, kterými buňka může projít, než ji dostihne senescence. Lidské fibroblasty v kultuře se mohou dělit maximálně 50–70krát, poté se stávají senescentními. Tento typ senescence je znám jako **replikační senescence**. Charakteristickým znakem senescence je víceméně nevratná zástava buněčného cyklu spojená s expresí proteinů, které znemožňují zdárný průchod buněčným cyklem. Na rozdíl od **quiescence** (G0-fáze) nejde o zástavu buněčného cyklu v důsledku nedostatku růstových faktorů, ale o jeho aktivní blokaci. Senescence je rovněž doprovázena intenzivním **přeprogramováním buněčného metabolismu**, což často zahrnuje zvýšenou spotřebu glukózy, produkci laktátu, aktivaci mTOR (mammalian target of rapamycin) a autofagie [37, 39]. Syntéza proteinů a jejich autofagická degradace jsou regulovány pomocí mTOR opačným způsobem, nicméně při rychlém obratu bílkovin, tj. rychlém střídání syntézy a degradace, je výhodné, aby se aktivace mTOR a autofagie vyskytovaly společně. Tento jev byl pozorován na trans-straně Golgiho aparátu v takzvaném TASC (TOR-autophagy space coupling) kompartmentu, kde docházelo k akumulaci autolyzozomů a mTOR během senescence indukované onkogenem Ras [40].

**Zásadními signálními drahami senescence jsou: p53/p21<sup>CIP1</sup> a p16<sup>INK4a</sup>/pRb.** Některé buňky se v důsledku aktivace p53 podrobí apoptóze, nicméně některé senescentní buňky dlouhodobě přežívají a jsou k apoptóze rezistentní. Spuštění apoptózy je významně ovlivněno typem dané buňky. Zatímco senescentní endotelové buňky jsou náchylnější k apoptóze než jejich nesenescentní protějšky, senescentní fibroblasty a keratinocyty jsou k apoptóze odolné [41]. O výběru signální dráhy vedoucí k apoptóze či senescenci může rozhodovat například rozdílná acetylace proteinu p53. Acetylace lysinu 320 (K320) brání fosforylaci rozhodujících serinů v NH<sub>2</sub>-terminální doméně proteinu p53. Tento stav umožňuje pouze aktivaci genů obsahujících vysoce afinitní vazebná místa pro p53 (např. p21<sup>CIP1</sup>) a podporuje senescenci a přežití buněk. Naproti tomu acetylace K373 vede k hyperfosforylaci NH<sub>2</sub>-terminální domény, což zvyšuje schopnost interakce proteinu p53 s promotory proapoptotických genů, pro které má p53 jinak nízkou vazebnou afinitu [42]. Nejdůležitější antiapoptotické dráhy identifikované v senescentních buňkách zahrnují aktivaci BCL2, BCL-xL, PI3Kδ, AKT, efrinových receptorů, HIF1α, HSP-90 a výraznou modifikaci metabolických drah [43]. Navzdory jejich nedělicímu se stavu jsou senescentní buňky metabolicky aktivní a exprimují širokou škálu genů. Nejvíce exprimované jsou geny kódující cytokiny, chemokiny, faktory remodelující extracelulární matrix a růstové faktory. Uvolněné signály fungují v tkáňovém mikroprostředí, ve kterém mohou propagovat zánětlivou odpověď a předávat informaci sousedním buňkám. Senescentní buňky rovněž uvolňují zvýšené množství exozomů a jiných vezikul, které mohou obsahovat bílkoviny, různé signalizační molekuly a RNA. Tento fenotyp senescentních buněk je nazýván **sekreční fenotyp asociovaný se senescencí** (SASP). Ve zdravé tkáni je SASP součástí procesu obnovy, při kterém poškozené buňky stimulují opravu v okolních tkáních a vydávají tísnivé signály, které vybízí imunitní systém k jejich odstranění. Ačkoli má

SASP důležitou úlohu v embryogenezi a při hojení ran [44, 45], senescence je pevně spojena také se stárnutím (obr. 4). Senescentní buňky vykazují sníženou schopnost odstraňovat poškozené mitochondrie pomocí mitofagie, což vede ke „staré“ defektní mitochondriální síti, která může přispět k metabolické dysfunkci dané tkáně a zrychlenému stárnutí organismu [46].

Dojde-li k nahromadění senescentních buněk, dochází k chronickému zánětu okolní tkáně, ke tkáňové dysfunkci, akceleraci stárnutí a dokonce i k aktivaci senescence ve zdravých okolních buňkách. Tento proces je spojen s problémy, jako je osteoartróza, chronický zánět kloubů a ateroskleróza. Systémová eliminace senescentních buněk v důsledku farmakologické aktivace apoptózy nebo po podání **senolytik**, které specificky eliminují senescentní buňky (např. dasatinib, quercetin či přirozeně se vyskytující piperlongumin a kurkumin), dochází k zastavení stárnutí tkáně [47, 48]. Některá senolytika, například novitoclax, fungují na bázi inhibice antiapoptotických proteinů z rodiny BCL2, které jsou klíčové pro přežití senescentních buněk [49]. Rovněž inhibovaná produkce několika komponent SASP byla u myši dostatečná k potlačení křehkosti



**Obr. 4** Senescence jako centrální znak stárnutí

Zkracování telomer, změny v epigenetické regulaci, narušení proteosyntézy, signalizace pomocí nutrientů, poškození DNA a mitochondriální dysfunkce jsou primárními typy poškození spouštějících senescenci. Senescence může následně vést k vyčerpání kmenových buněk a chronickému zánětu. Akumulace nesprávně sbalených proteinů vedoucí k narušení proteosyntézy a aktivace signálních drah, které zprostředkovávají reakci na přítomnost nutrientů mohou být příčinou i následkem senescence.