

APOPTOSIS

Apoptosis vs Muerte celular programada

- La **apoptosis** es una descripción morfológica de células que mueren.
- La **muerte celular programada** es un término usado originalmente para describir a las células que mueren en un tiempo predecible y tiene lugar durante el desarrollo o remodelado tisular.
- Dado que en la mayoría de los casos la muerte celular programada es por apoptosis, ambos términos son a veces, intercambiables.

Ciclo Celular

M (mitosis)- G1 (fase de control)-S (síntesis de ADN)-G2 (fase de control)



Apoptosis

para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis y las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN



Apoptosis

para impedir que las células que no hayan llegado a su madurez entren en mitosis

Balance entre mitosis y apoptosis regulando la población celular

FUNCIONES DE LA APOPTOSIS

-1) Eliminación. muerte celular vs. muerte del organismo. (La muerte de una célula preserva el buen funcionamiento del organismo)

-2) Desarrollo. Esculpir partes del cuerpo. (En el desarrollo de los individuos son fundamentales las reorganizaciones morfológicas)

-3) Regulación del sistema inmune.
Supervivencia de la “mejor” célula

-4) Homeostasis (número constante de células)

1) ELIMINACION de tejidos dañados o infectados

El inicio de la apoptosis puede estar generado por la misma célula, por el tejido circundante o por una reacción del sistema inmune.

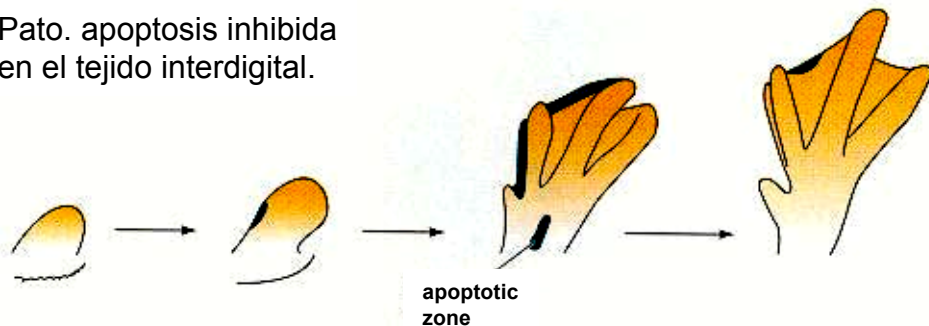
Cuando una célula no puede realizar apoptosis (por mutación o por inicio de la apoptosis bloqueado) la célula dañada se divide sin restricción y comienza la formación de un TUMOR

KO en genes apoptóticos → **No hay sobrevida (malformaciones)
/ aumenta frecuencia de tumores/
no se detiene el crecimiento**

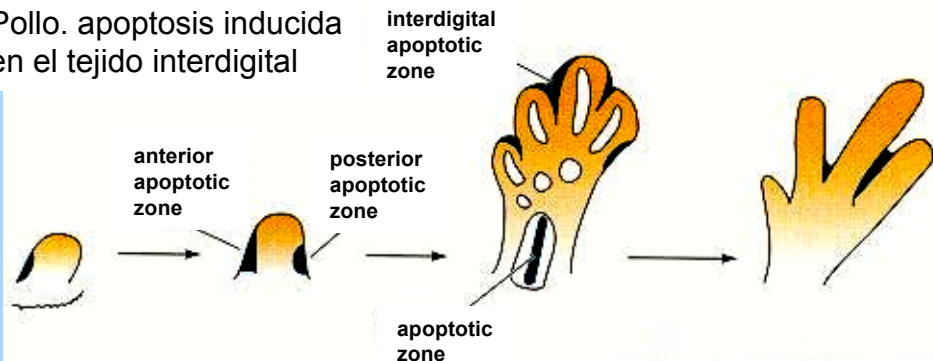
Ejemplo: HPV virus papiloma humano (expresión del gen E6, degradación de P53 que es fundamental para la ruta apoptótica)

2) La apoptosis controlada por factores extracelulares permite remodelar tejidos y órganos durante el DESARROLLO

Pato. apoptosis inhibida en el tejido interdigital.

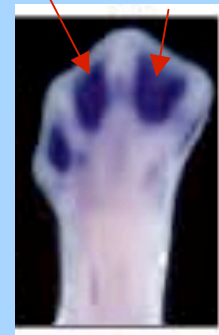


Pollo. apoptosis inducida en el tejido interdigital



el miembro derecho fue infectado con un virus que expresa un receptor dominante negativo de BMP, que inhibe la señalización de BMP y la apoptosis entre los dígitos

expresión del mRNA para BMP4 (en azul)



embriones de pollo

Las proteínas **BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins) inducen **apoptosis** en el tejido interdigital de los miembros de vertebrados. En patos, la apoptosis del tejido interdigital de los miembros es inhibida por **noggin**, una proteína secretada por células del mesénquima y que inhibe a BMP.

3) Regulación del sistema inmune

La mayoría de los linfocitos mueren durante el rearrreglo genético (formación del receptor antigénico), durante la selección negativa o en la periferia.



La apoptosis controla que los linfocitos sean altamente eficientes y funcionales, pero NO reactivos contra lo propio. Por medio de este control mantiene constante el número de linfocitos.

4) Homeostasis

Número constante de células: la relación entre mitosis y muerte celular se encuentra en equilibrio.

Ruptura del equilibrio

**Mayor división
que muerte
celular**



TUMORES

**División celular
enlentecida**



**PERDIDA
CELULAR**

Ambos estados pueden ser fatales o dañinos.

**DEFECTOS EN
APOPTOSIS
(disminución/
inhibición)**



-CANCER (resistencia a la terapia,
acumulación celular)

-ENFERMEDADES AUTOINMUNES
falla en eliminar linfocitos autoreactivos
(lupus eritematoso, glomerulonefritis)

- INFECCIONES VIRALES
PERSISTENTES (Herpesvirus,
Poxvirus)

**APOPTOSIS
DESREGULADA
(aumento)**



-DESORDENES
NEURODEGENERATIVOS
(Alzheimer, Parkinson)

-SIDA (eliminación de linfocitos T)

-ISQUEMIA (infarto de miocardio,
daño hepático)

**señales extracelulares o
intracelulares desencadenan
APOPTOSIS
(stress, falta de nutrientes, daño del DNA)**



**esto permite que el
organismo sobreviva**

Para que una célula entre en apoptosis...

Contexto molecular: señales intracelulares y extracelulares determinadas. (señales pro/antiapoptóticas)

Las señales dependen del tipo celular

Muerte “limpia”: NO inflamatoria (ordenada, prolija)

Existen dos formas de muerte celular que son habituales en el organismo

NECROSIS y APOPTOSIS

Las características morfológicas de ambas permiten establecer diferencias

Necrosis: muerte celular que resulta de un proceso pasivo / accidental (muerte por daño, injuria, traumatismos mecánicos, temperaturas extremas)

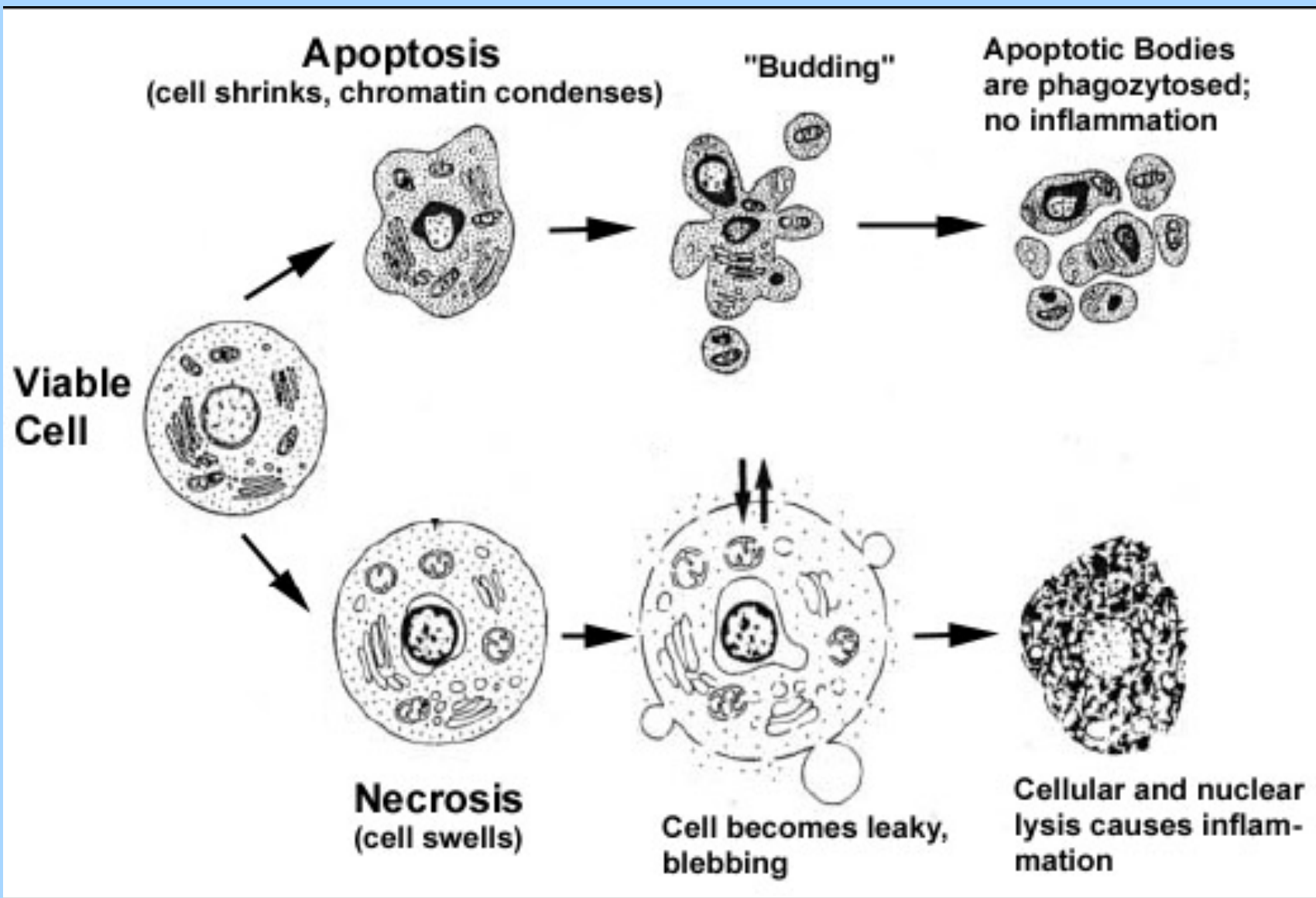
- Ruptura nuclear
- Ruptura celular y liberación de contenido intracelular.

Repuesta inflamatoria

Apoptosis: (muerte por suicidio)

- Reducción del volumen celular
- Compactación de las organelas
- Condensación de la cromatina
- Formación de cuerpos apoptóticos
- No se destruye la membrana celular, proceso silencioso.

No hay inflamación



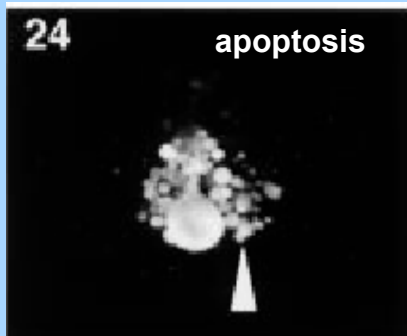
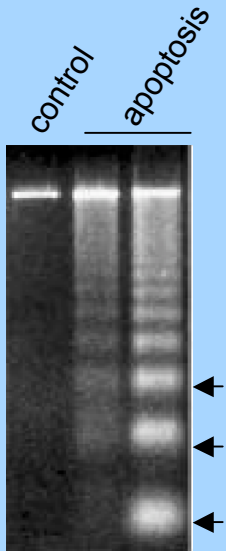
Fenotipo Apoptótico

- 1) Pérdida de volumen celular
- 2) Condensación nuclear
- 3) Fragmentación del ADN
- 4) Flip-flop de fosfatidil serina.(evidencia con anexina)
- 5) “Blebbing” de membrana (desorganización del citoesqueleto)

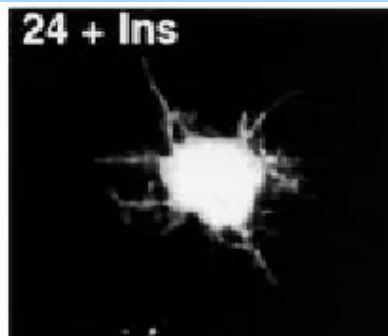
- Alta regulación (irreversible)
- Rapidez en la ejecución

LA APOPTOSIS SE RECONOCE POR CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES CARACTERÍSTICOS

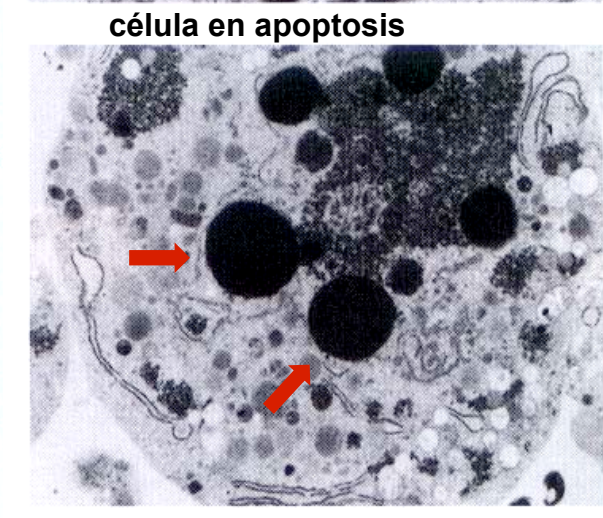
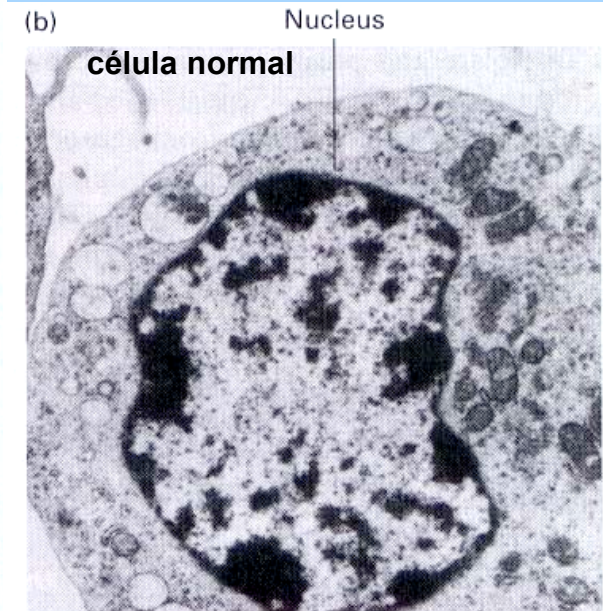
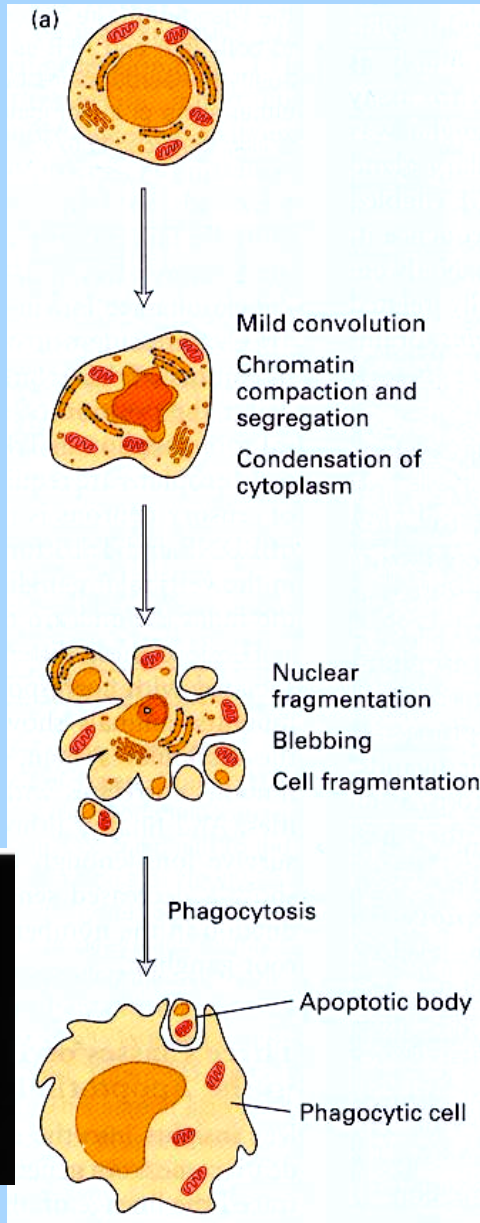
Las células que entran en apoptosis se contraen y fragmentan en vesículas o cuerpos apoptóticos. Los núcleos se condensan y el DNA se fragmenta generando un patrón en escalera o ladder. Cambios en la distribución de fosfolípidos (ej. fosfatidil serina) pueden detectarse con anexina fluorescente.



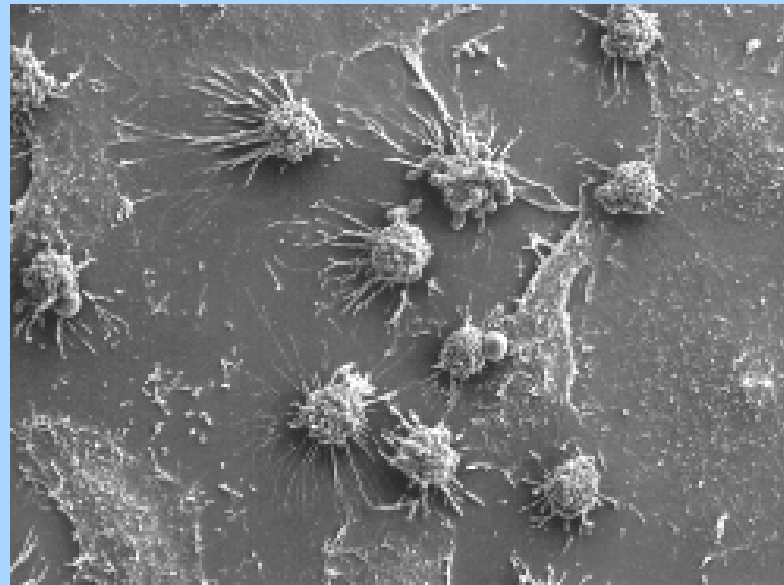
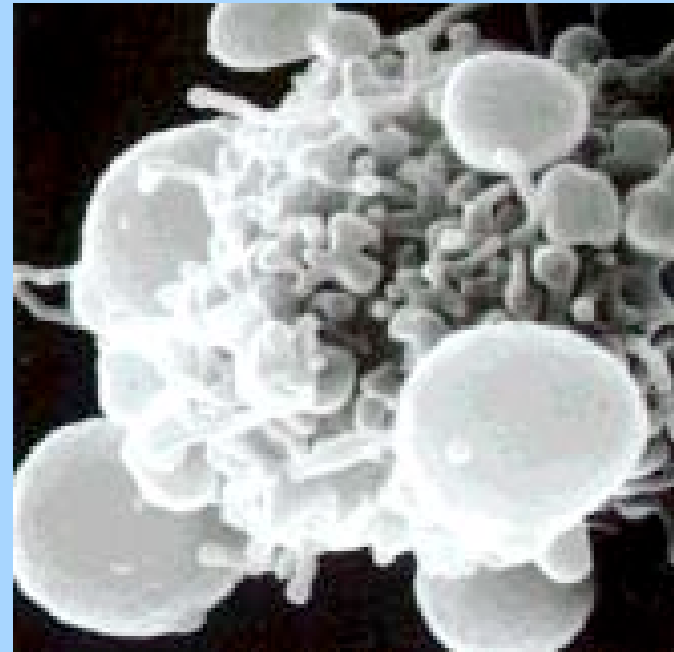
célula deprivada de factores de crecimiento.



célula en presencia de insulina.

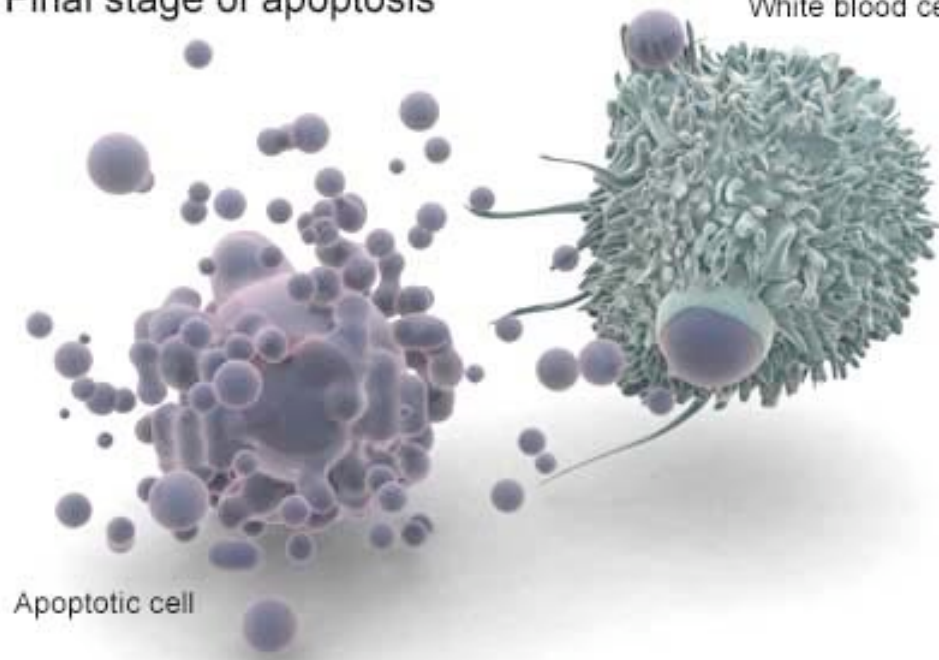


CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS



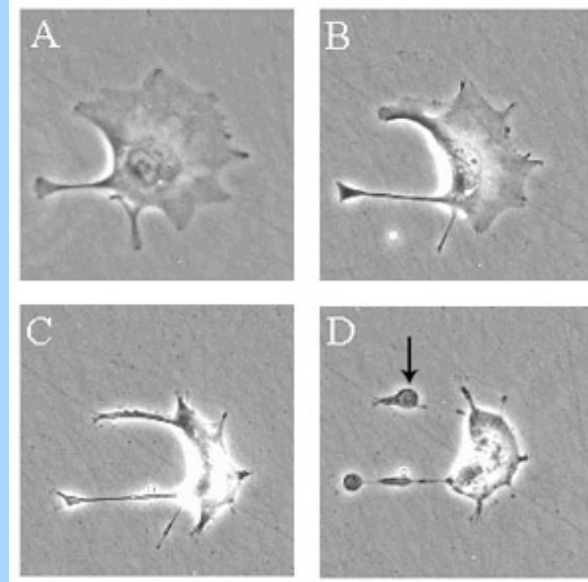
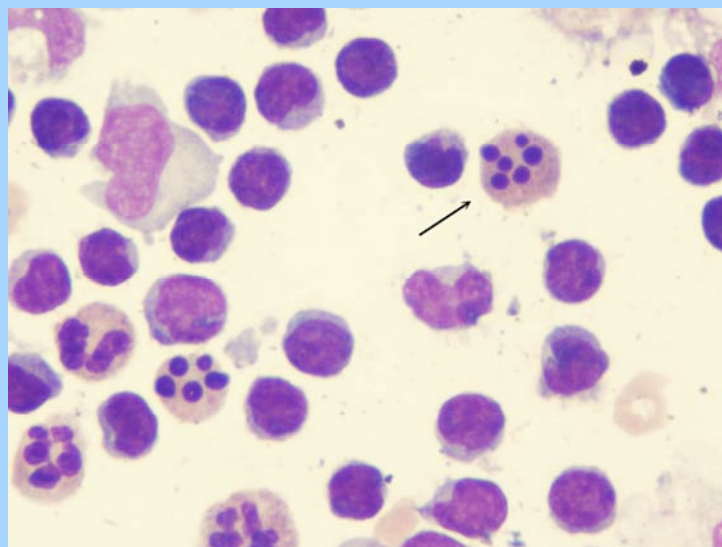
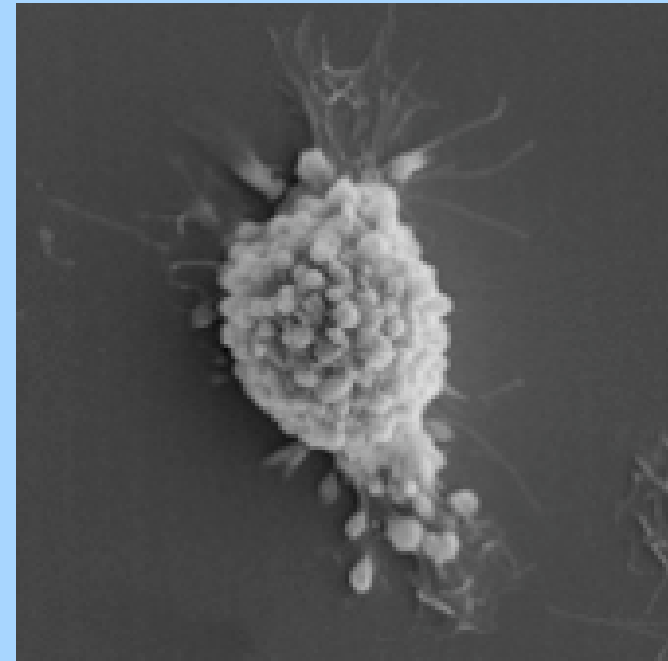
Final stage of apoptosis

White blood cell

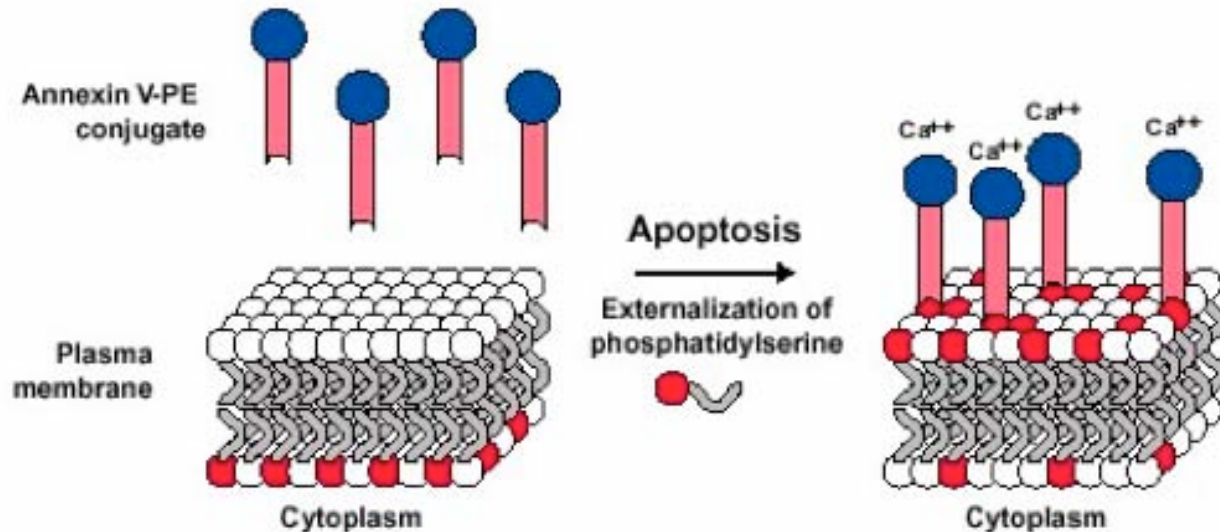
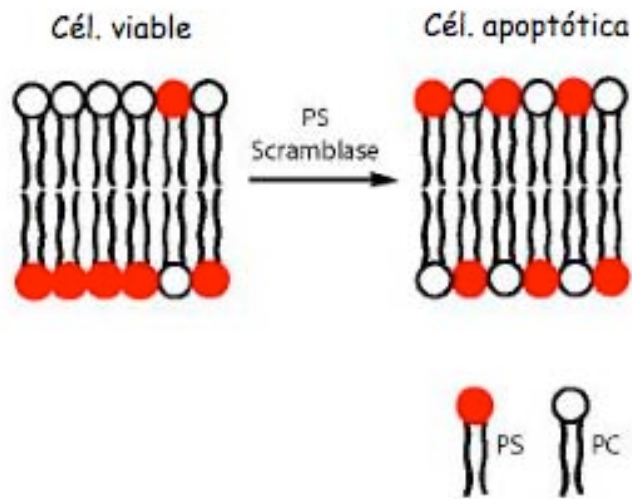


Apoptotic cell

U.S. National Library of Medicine



La aparición de fosfatidil serina (PS) en la célula apoptótica requiere del Flip-Flop no específico mediado por Ca^{++}



Schematic representation of the Annexin V assay.

Película APOPTOSIS

Primer evento: liberación de citocromo C de las mitocondrias (verde).

Condensación del volumen celular

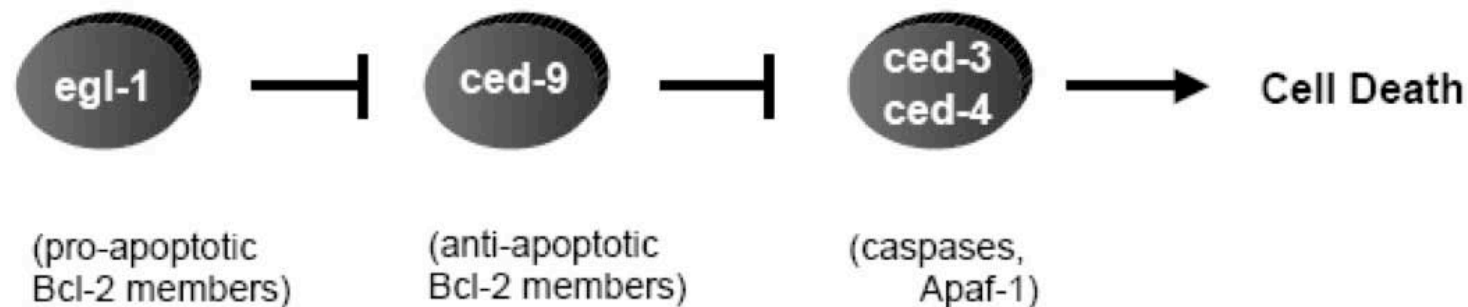
Exposición de fosfatidil serina en la membrana (rojo).

Formación de burbujas membranosas con material celular:
Blebbing

Apoptosis en *Caenorhabditis Elegans*

C. elegans.... el principio....

- 131 de las 1090 células somáticas normalmente mueren por PCD.
(muerte celular programada)



CASPASAS

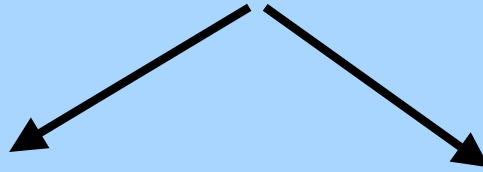
Es el mecanismo molecular mas importante y mas estudiado que controla la apoptosis

Complejo de cisteinil-aspartato proteasas
(caspasas) cisteína en el sitio activo/
aspártico en sitio de clivaje



Provocan degradación proteica hasta la formación de cuerpos apoptóticos.

CASPASAS



**INICIADORAS
o regulatorias**

EFECTORAS



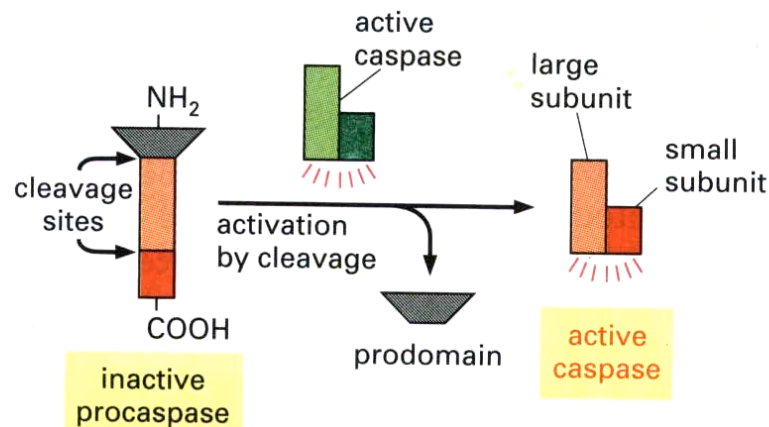
**Actúan sobre
endonucleasas.
Responsables de la
fragmentación de DNA**

La activación de las caspasas (procaspasas inactivas) se produce por diferentes vías. Parte de ellas se autoprocenan.

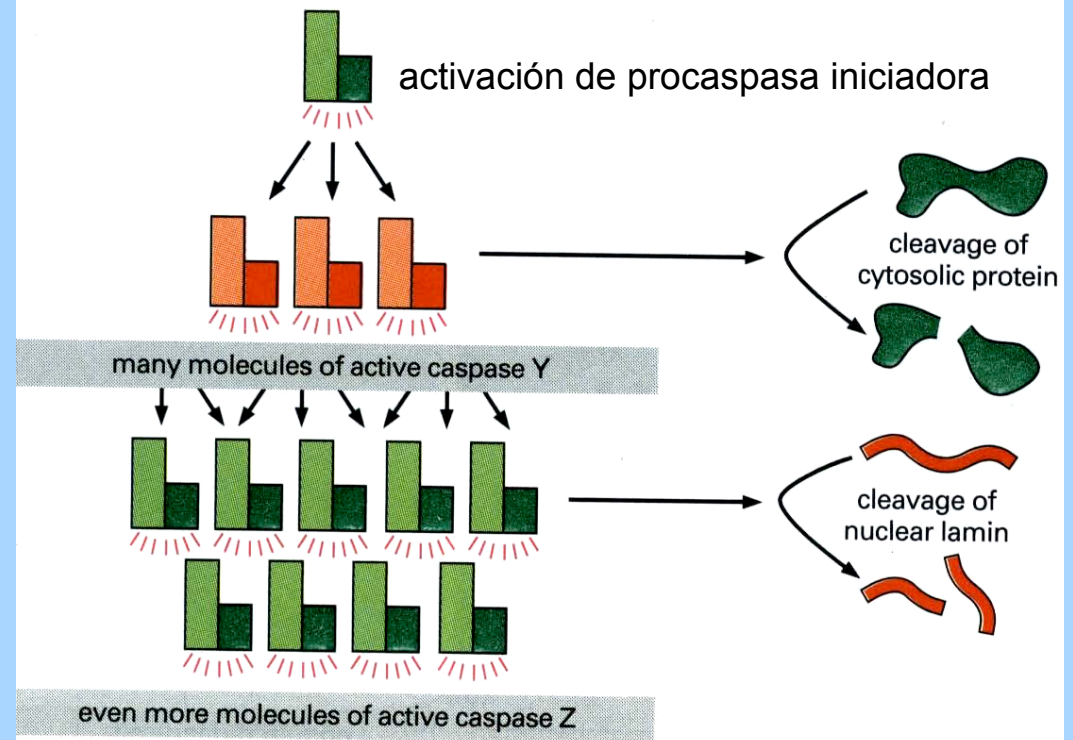
La *apoptosis* involucra la activación en cascada de proteasas intracelulares denominadas *caspasas*

Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos (procaspasas) que deben ser clivadas para su activación. **Estímulos que disparan apoptosis usualmente producen la agregación y autoprosesamiento de caspasas iniciadoras.** Las caspasas iniciadoras activas posteriormente clivan y activan una o varias caspasas efectoras.

procaspase activation



B) caspase cascade



Substratos de caspasas son las laminas de la malla nuclear, proteínas del citoesqueleto, etc.

Genes implicados en Apoptosis

Fas, Trail, TNF (Receptor y Ligando)

Proteínas Mitocondriales

VDAC, ANT, Citocromo C, AIF, SMAC

Bcl-2 family (~25)

Proteasas

Caspasas (~13), Calpaina

Quinasas

AKT, PKA, MapK, etc.

Reguladores de Caspasas

FADD, TRADD, DAD1 (adaptadores)

IAP/ Survivin, APAF1

Factores de Transcripción

p53, myc, Nur77

Sustratos de Caspasas

PARP, Lamina A, Bcl-2, otras Caspasas, BID, GATA-1,

Ejecución - Caspasas

Proteasas

**Substrato: Cisteínas en el sitio activo +
Aspártico en el sitio de clivaje**

**Especificidad similar a la propia secuencia:
autoregulación**

Funciones:

- Activación de DNAsas (CAD + ICAS) + inhibición de maquinaria de síntesis y reparación de DNA
- Degradación de proteínas de la envoltura nuclear y citoesqueleto nuclear
- Degradación de Actina: pérdida de puntos de contacto celular.
- Regulación de apoptosis: clivaje de BID, BCL-2, BCL-XL (pro-apoptóticas)
- Procaspasas constitutivas
- Determinan morfología de apoptosis

Ejecución - Caspasas

ELIMINACION DE CASPASA (KO):

-/- -1, -2, -11: sin efecto sobre apoptosis

-/- 8: inhibe apoptosis por TNF, Fas

-/- 9: inhibe apoptosis por radiación Gama y drogas citotóxicas.

Eectoras

Caspasa 3: cliva ICAD (DNAsas)

Caspasa 6: cliva laminina nuclear

Activación:

Por autoclivaje o clivaje por otras caspasas.

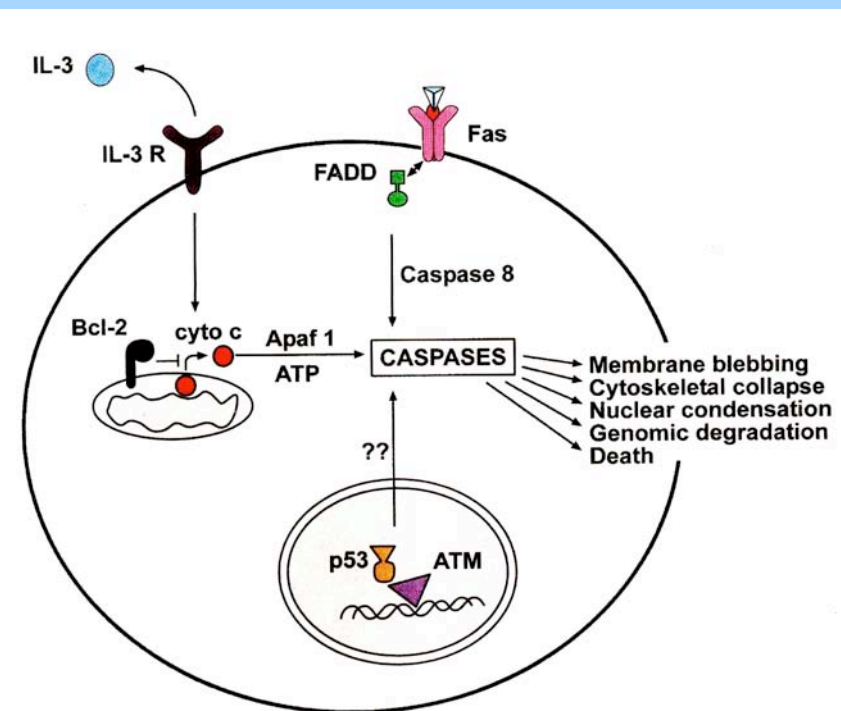


Figure 1 Multiple apoptotic signals converge on caspase activation. Pathways discussed in this review include (1) those derived from cell surface receptor engagement, represented here by Fas receptor signaling, (2) those derived from growth factor withdrawal, represented here by the IL-3 receptor, and (3) those derived from nuclear DNA damage.

Apoptosis - Vías

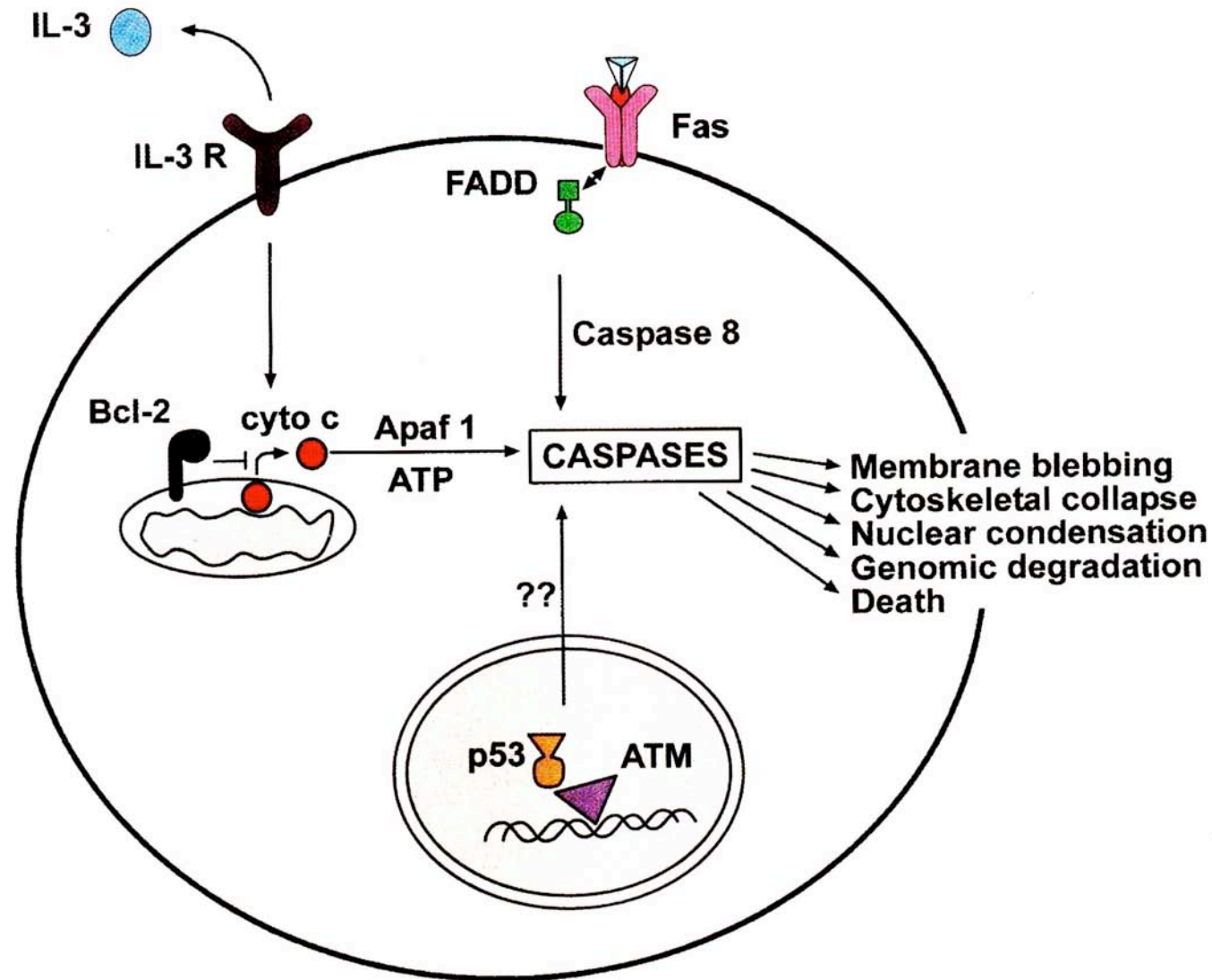
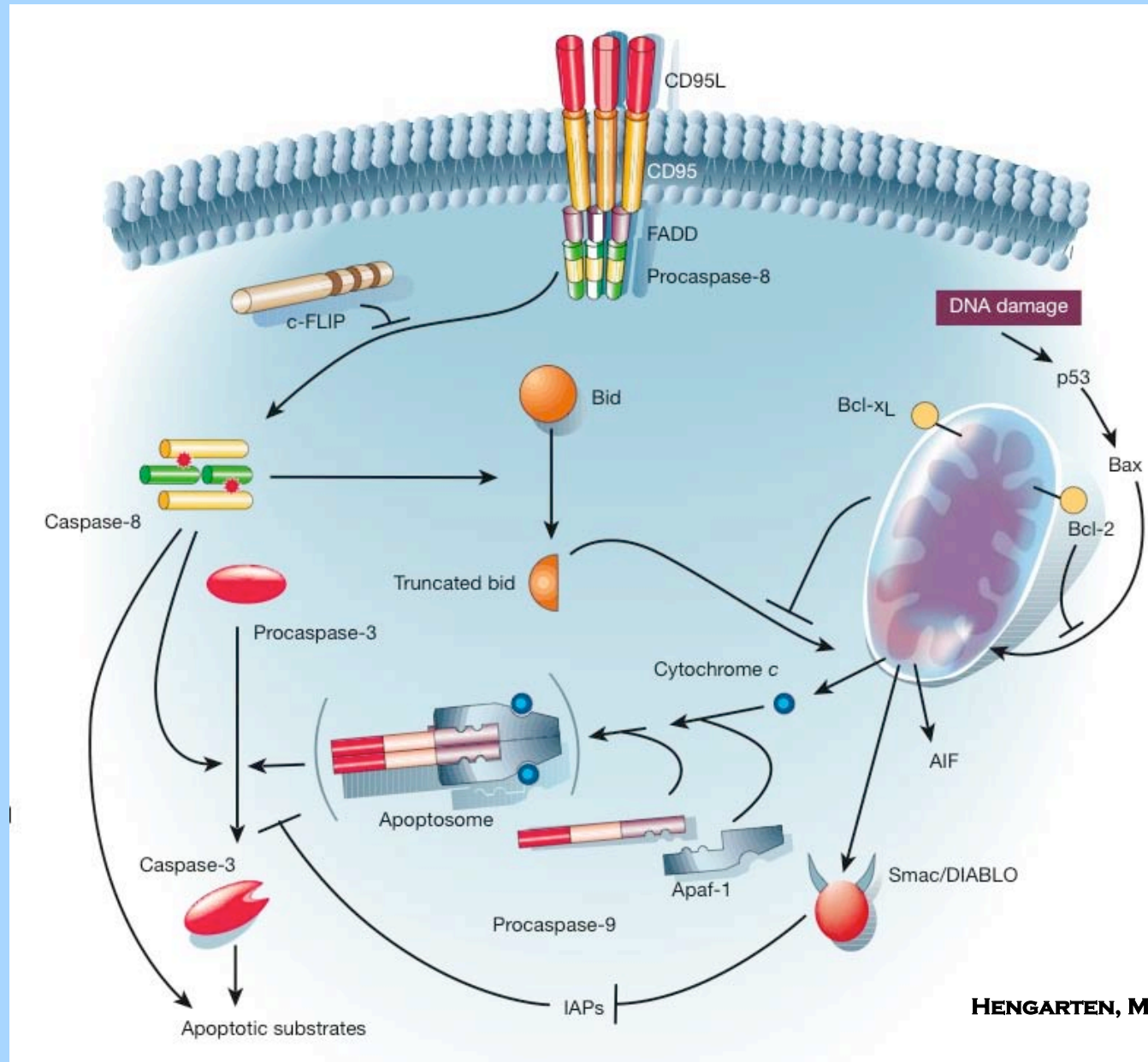


Figure 1 Multiple apoptotic signals converge on caspase activation. Pathways discussed in this review include (1) those derived from cell surface receptor engagement, represented here by Fas receptor signaling. (2) those derived from growth factor withdrawal, represented here by the IL-3 receptor, and (3) those derived from nuclear DNA damage

Vías principales de apoptosis en mamíferos



PRINCIPALES VIAS DE APOPTOSIS

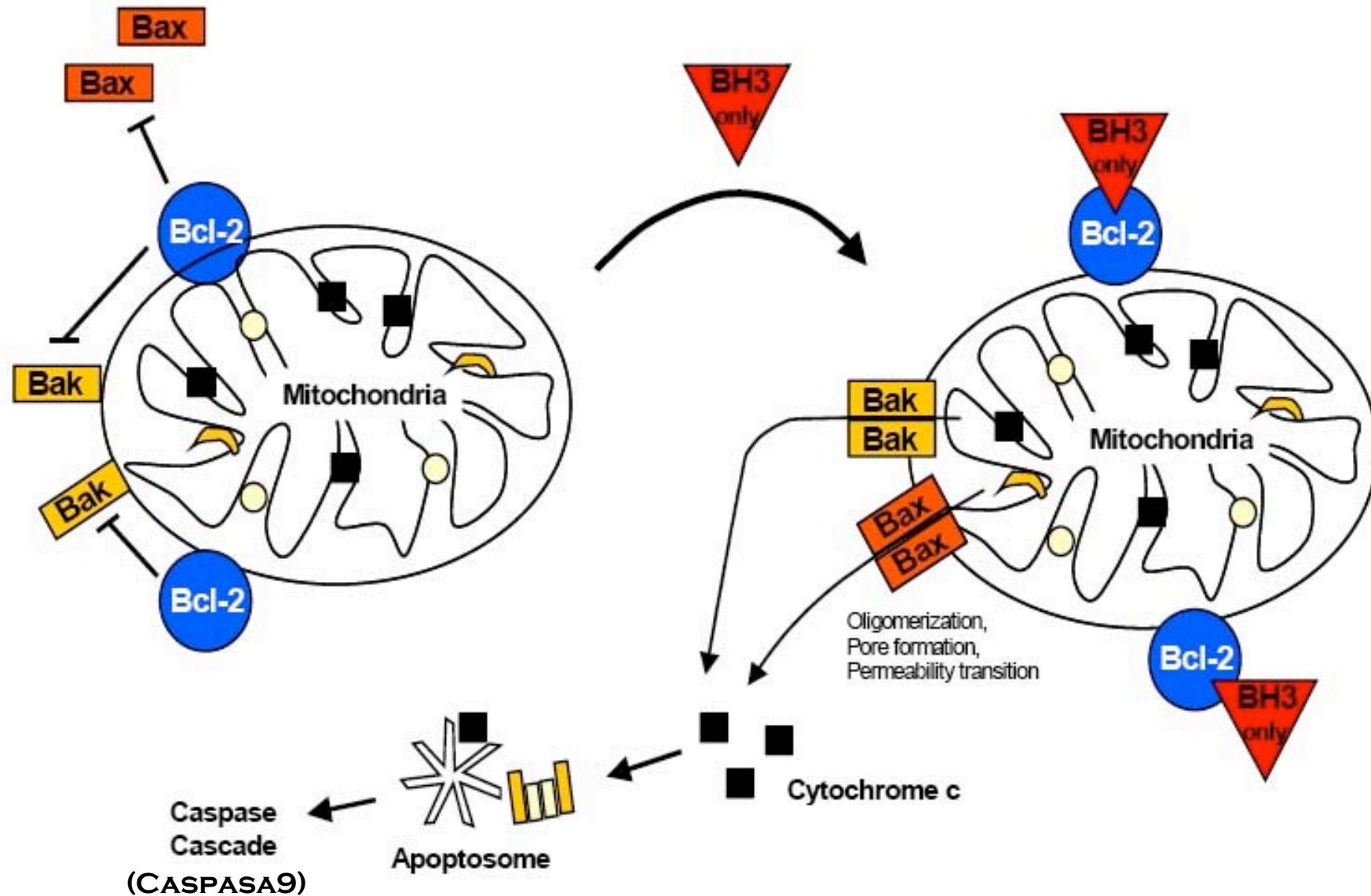
- VIA INTRINSECA o MITOCONDRIAL (deprivación de factores de crecimiento)**
- VIA EXTRINSECA o RECEPTORES DE MUERTE**
- p53 (daño del DNA activa p53, activación de apoptosis)**

y en menor proporción...

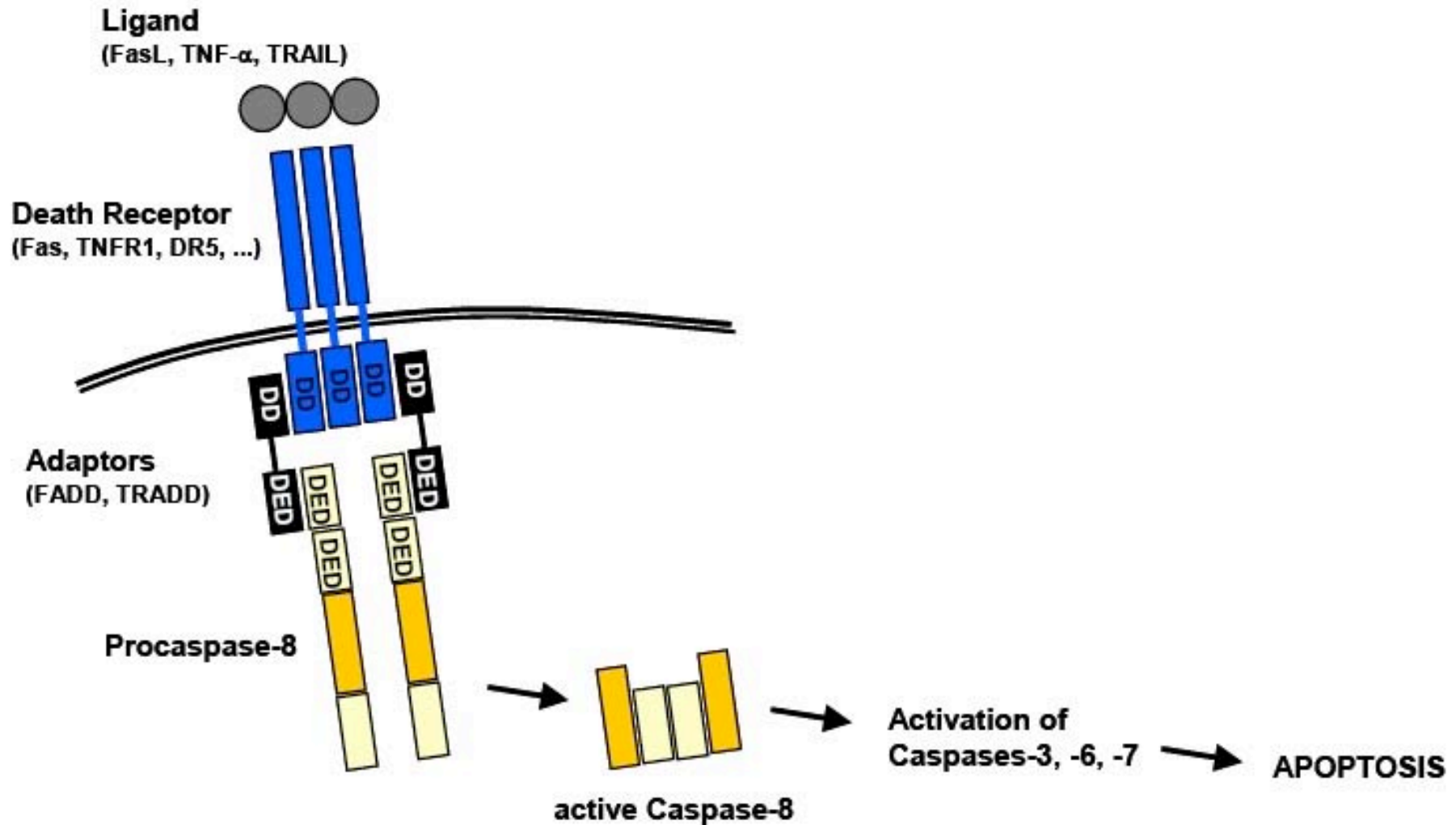
-Via sin intervención de caspasas: APOPTOSIS INDUCING FACTOR (AIF)

AIF es una proteína de membrana de mitocondria, al recibir una señal se libera y migra al núcleo, se une al DNA y lo destruye → MUERTE CELULAR

Eventos mitocondriales - Vía Intrínseca



Activación por receptores de muerte - Vía extrínseca

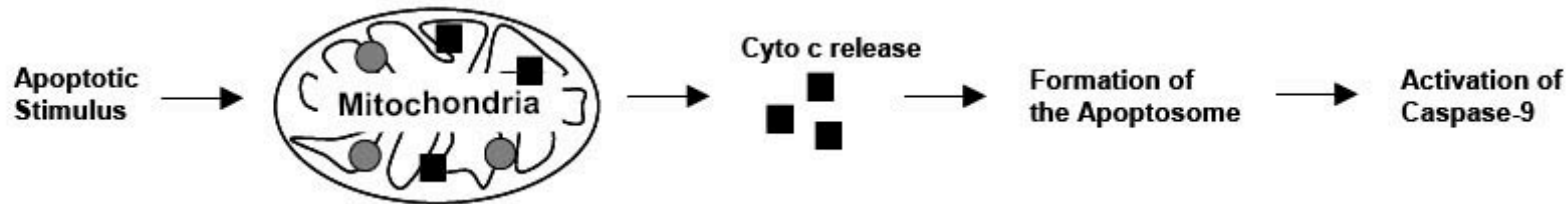


Eventos mitocondriales - Vía Intrínseca

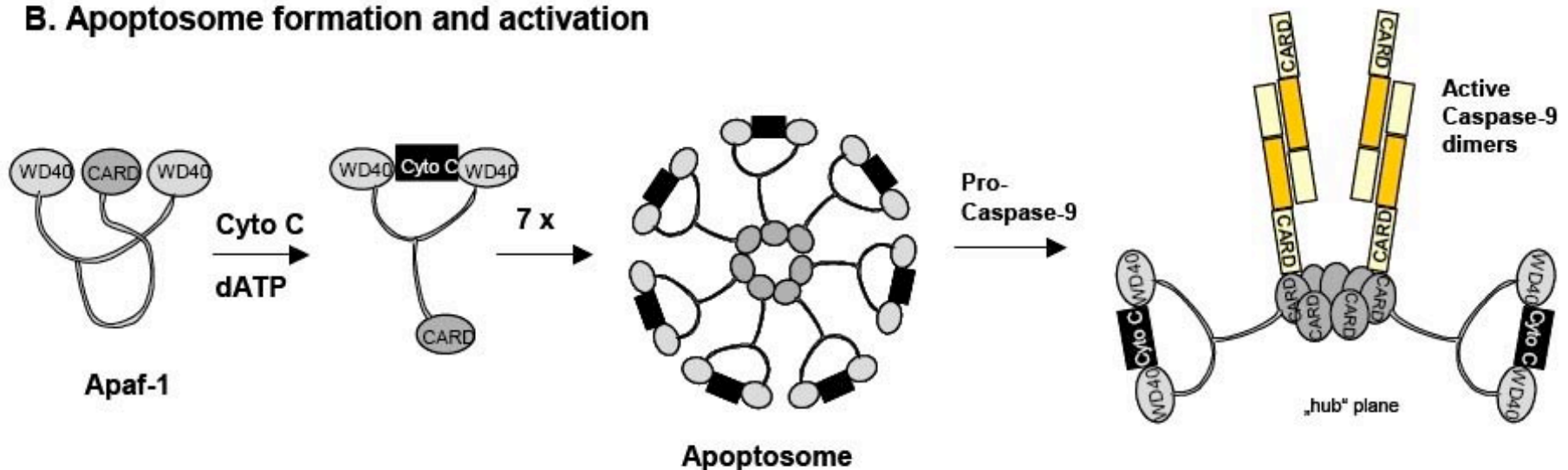
Las proteínas de la familia **BCL-2** regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria.

La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 produce poros en la membrana externa de las mitocondrias permitiendo la liberación de proteínas del espacio intermembrana; entre ellas el **CITOCROMO C**

A. Mitochondrial pathway of caspase activation

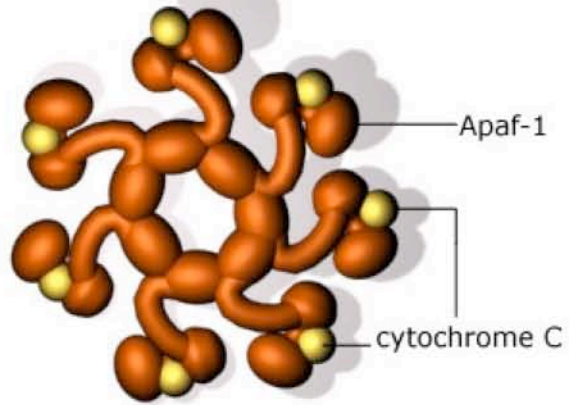


B. Apoptosome formation and activation

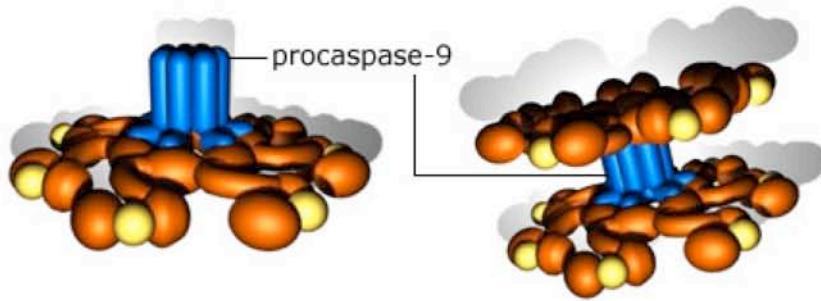


Liberación de citocromo C: Rápido, coordinado, irreversible, completo y cinéticamente constante (en 5 minutos se produce la liberación completa)

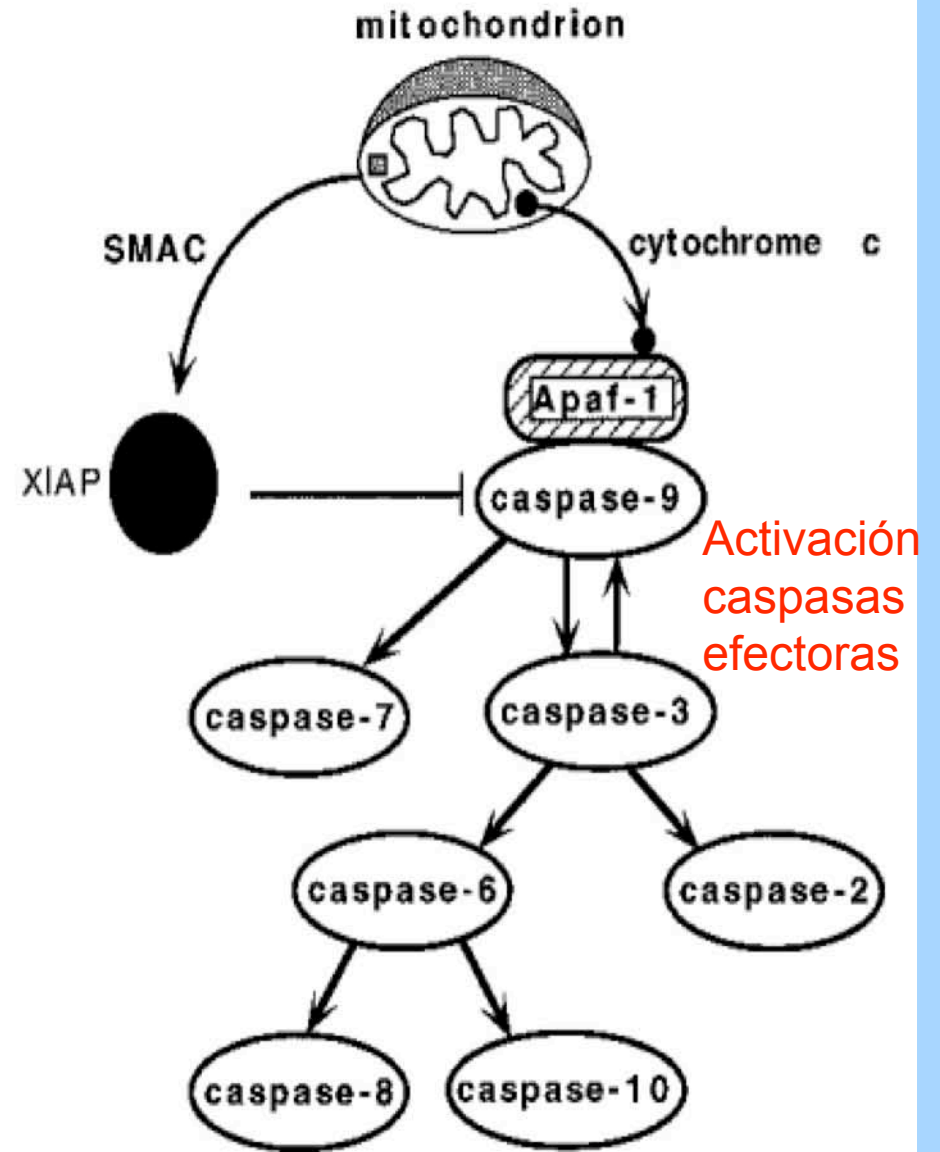
First stage of apoptosome formation



Recruitment of procaspase-9



Caspase Activation



Familia Bcl-2

**Son más de 20 miembros
Funcionan como dímeros**

Se agrupan en 3 Familias

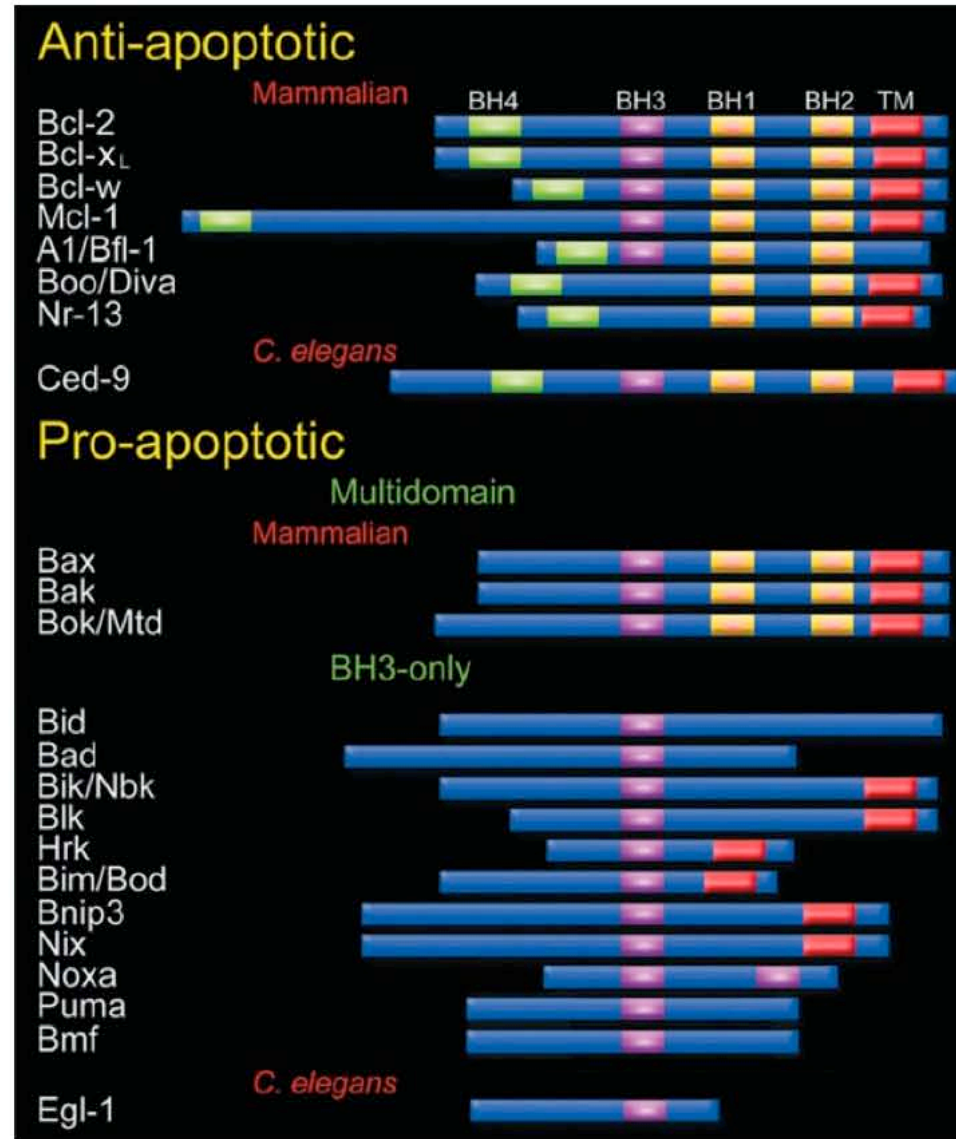
- Familia de proteínas anti-apoptóticas**
- Familia de proteínas pro-apoptóticas de tipo multidominio**
- Familia de proteínas pro-apoptóticas de tipo BH3-only**

Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas, mientras que las de dominio BH3-only activan a estas proteínas. Las anti-apoptóticas inhiben la formación del poro.

Mecanismo de Acción de los miembros de la familia de Bcl-2

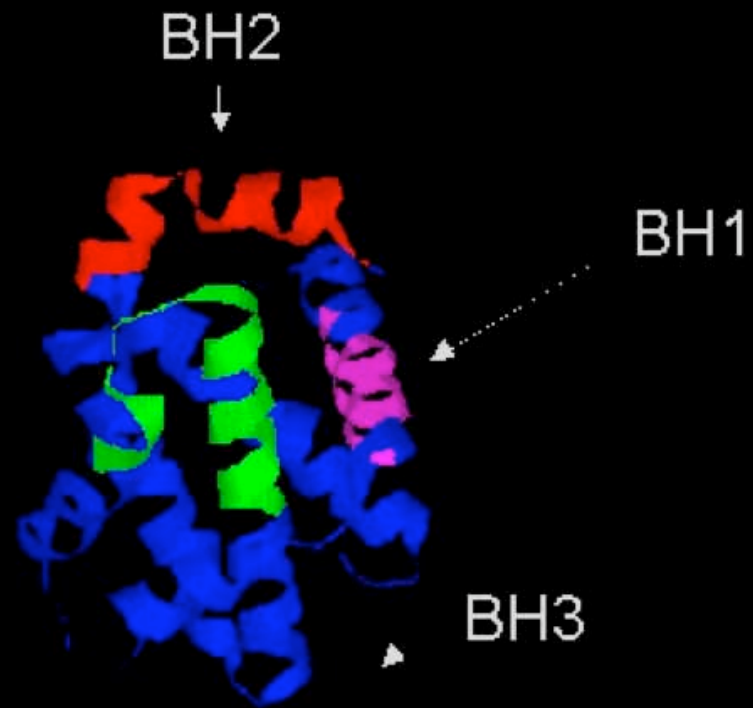
- Los niveles relativos de los miembros anti/pro-apoptóticos determinan el destino celular.
- Los miembros antiapoptóticos se localizan en membranas. Los proapoptóticos principalmente en citoplasma y se translocan a la mitocondria ante un estímulo de muerte.
- Regulan la liberación desde la mitocondria de proteínas que inducen la apoptosis.

Proteínas de la familia de Bcl-2



Bcl-x_L Domains

- **BH1 & BH2**
death repressor domain
areas of highest homology
mutations in Bcl-2 & Bcl-xL
abolish anti-apoptotic &
dimer activity
- **BH3** - death domain
- cytoplasmic tail - not
necessary for activity



Célula sana



BCL-2 en la membrana de la mitocondria, inhibe apoptosis.

Daño interno en la célula



Migración de proteínas relacionadas(Bad/Bax) a la superficie de la mitocondria en donde se unen a BCL-2 bloqueando su efecto protectorio.

Regulación de la apoptosis

Familia Bcl-2

Bcl-2 protege de apoptosis en muchos tipos celulares (timocitos, neuronas, células hematopoyéticas)

Bcl-xl: protege apoptosis en células precursoras de neuronas.

Bcl-w: protege apoptosis en células precursoras de esperma

A1: protege apoptosis en neutrófilos

Mcl-1: implantación eficiente del cigoto.

Medida de acción: homo o heterodímeros (BH3)
Formación de canales iónicos



El dominio BH3 sirve para la unión a otras proteínas

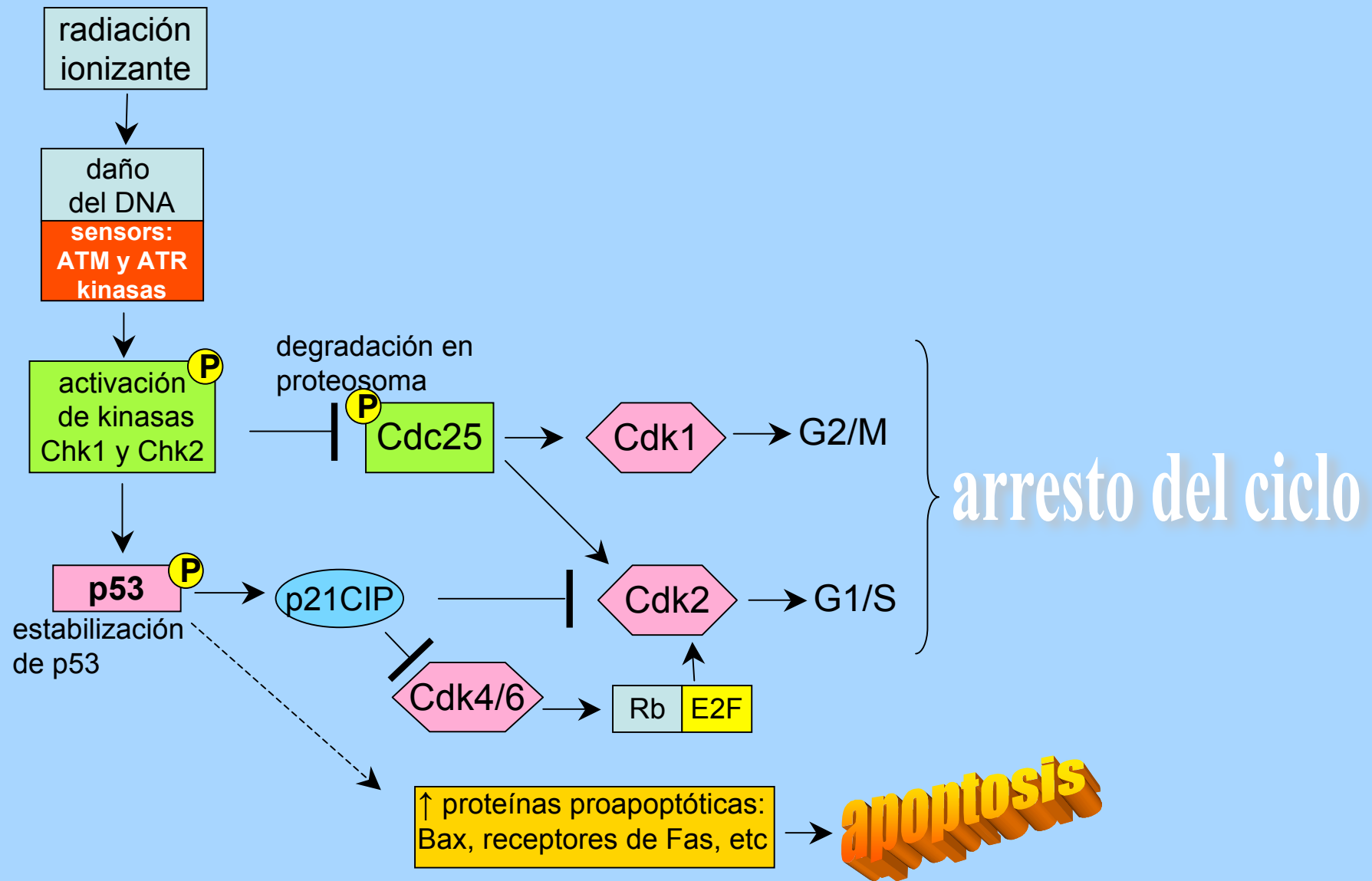
Proteínas que poseen sólo dominio BH3

- Son miembros pro-apoptóticos
- Interactúan tanto con Bcl-2 y Bcl-XL (anti) como con Bax y Bak (pro)

Ejemplos:

- Daño de DNA → p53 → induce expresión de Noxa y Puma (pro-apoptóticas, BH3 only), reprime expresión de Bcl-2, Bcl-XL (anti)
- Deprivación de factores de crecimiento → activa Bim y Bad (pro-apoptóticas BH3 only)
- Activación de caspasa-8 → proteólisis de Bid (pro-apoptóticas)

El daño del DNA y otras alteraciones activan mecanismos que arrestan el ciclo celular o promueven la apoptosis



Regulación de la apoptosis- Familia de Bcl-2

Control de la liberación de citocromo c en mitocondria

Canales de Bcl-2 y Bcl-xl: pequeños, catiónicos y cerrados

Canales de Bax: grandes, aniónicos y abiertos

Regulación:

Modificaciones post-traduccionales que determinan conformaciones activas o inactivas.

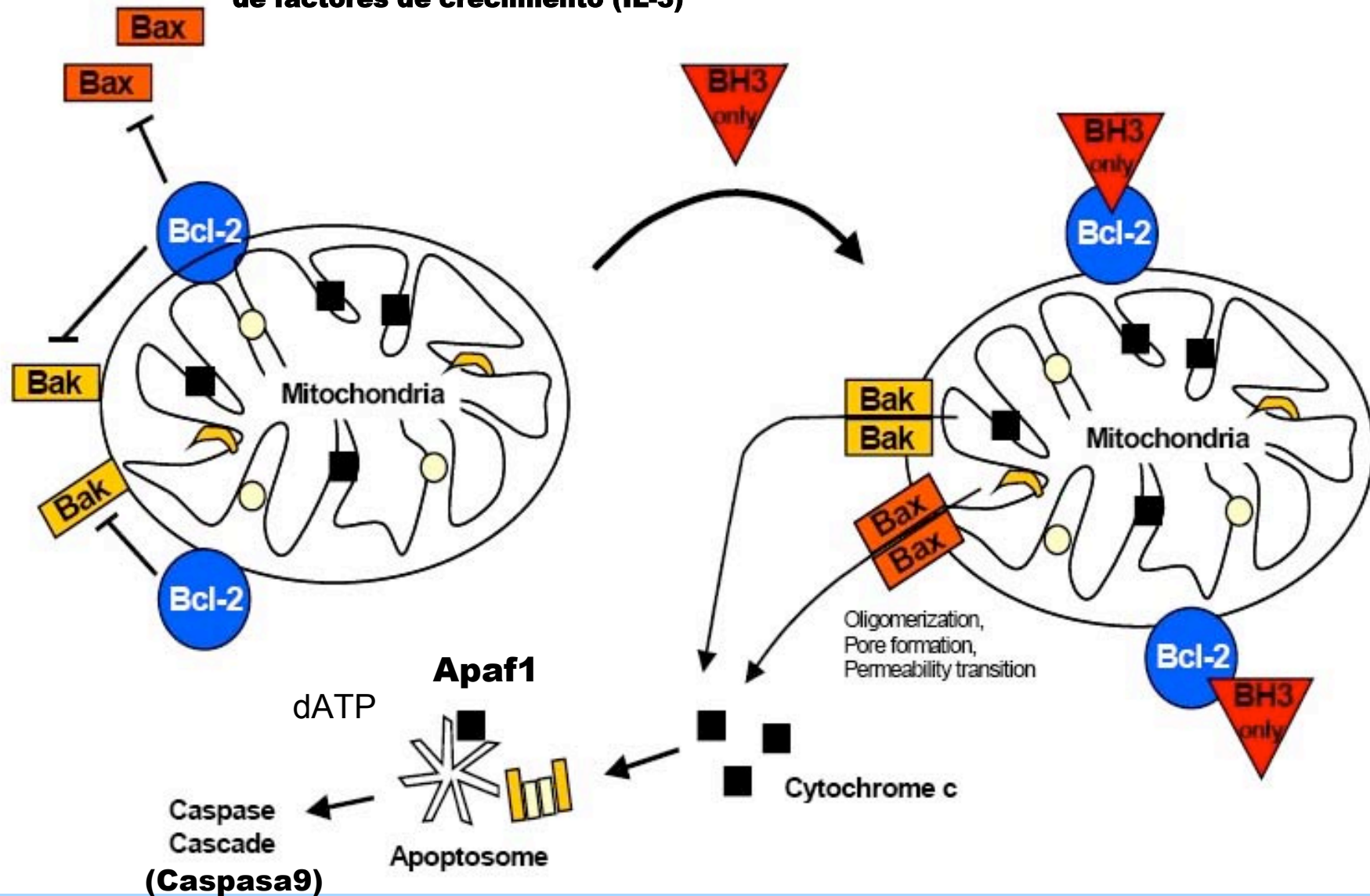
-Dimerización y oligomerización (Bax, Bak)

-Translocación (Bax, Bak, Bim)

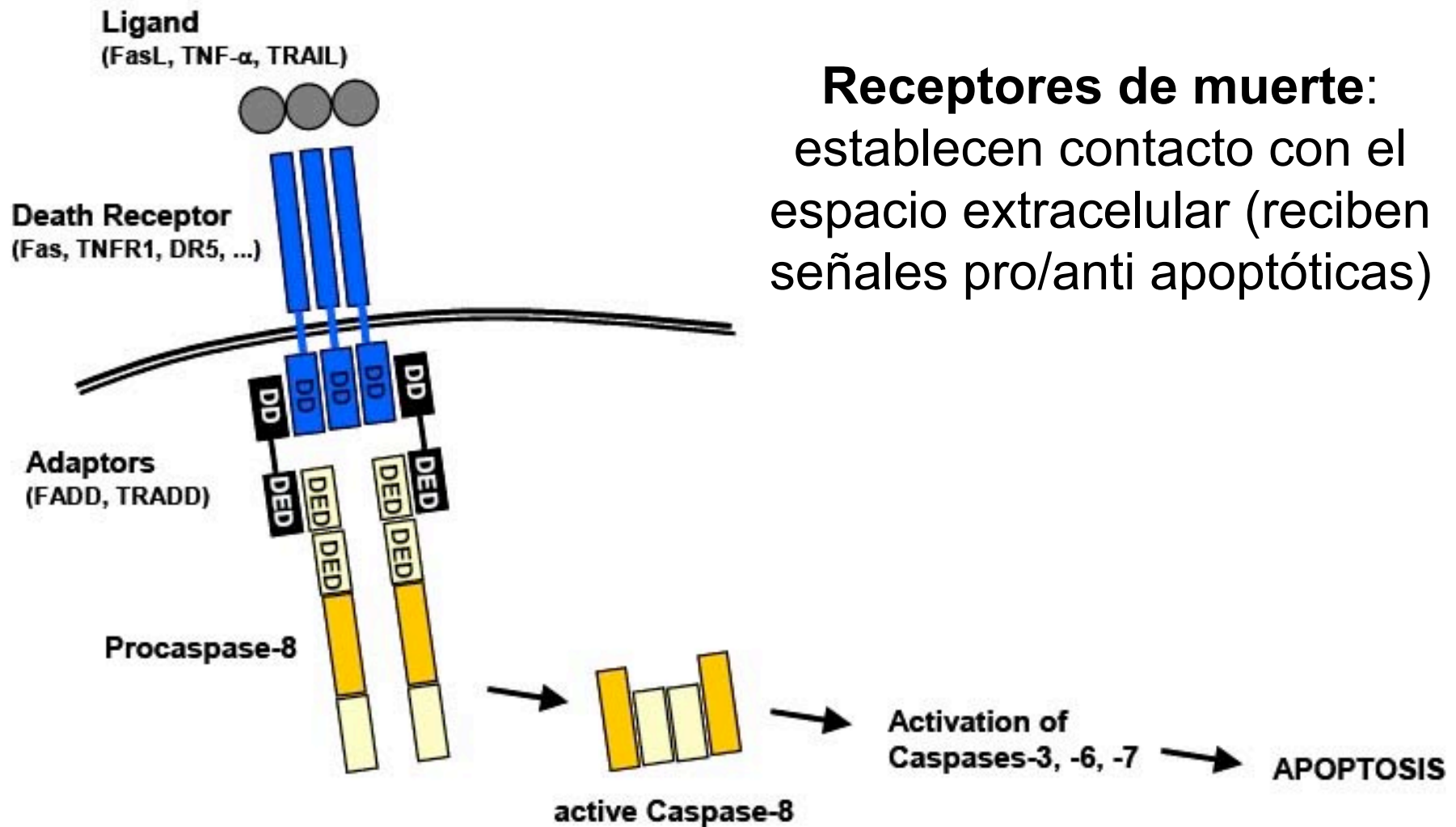
- Fosforilación (Bad, Bcl-2 y Bcl-XL)

Eventos mitocondriales - Vía Intrínseca

Daño interno en la célula (ej. Oxidación por radicales libres). Migración de Bak/Bax, bloquean el efecto protector de Bcl2 generando poros en la membrana. Deprivación de factores de crecimiento (IL-3)



Activación por receptores de muerte - Vía extrínseca

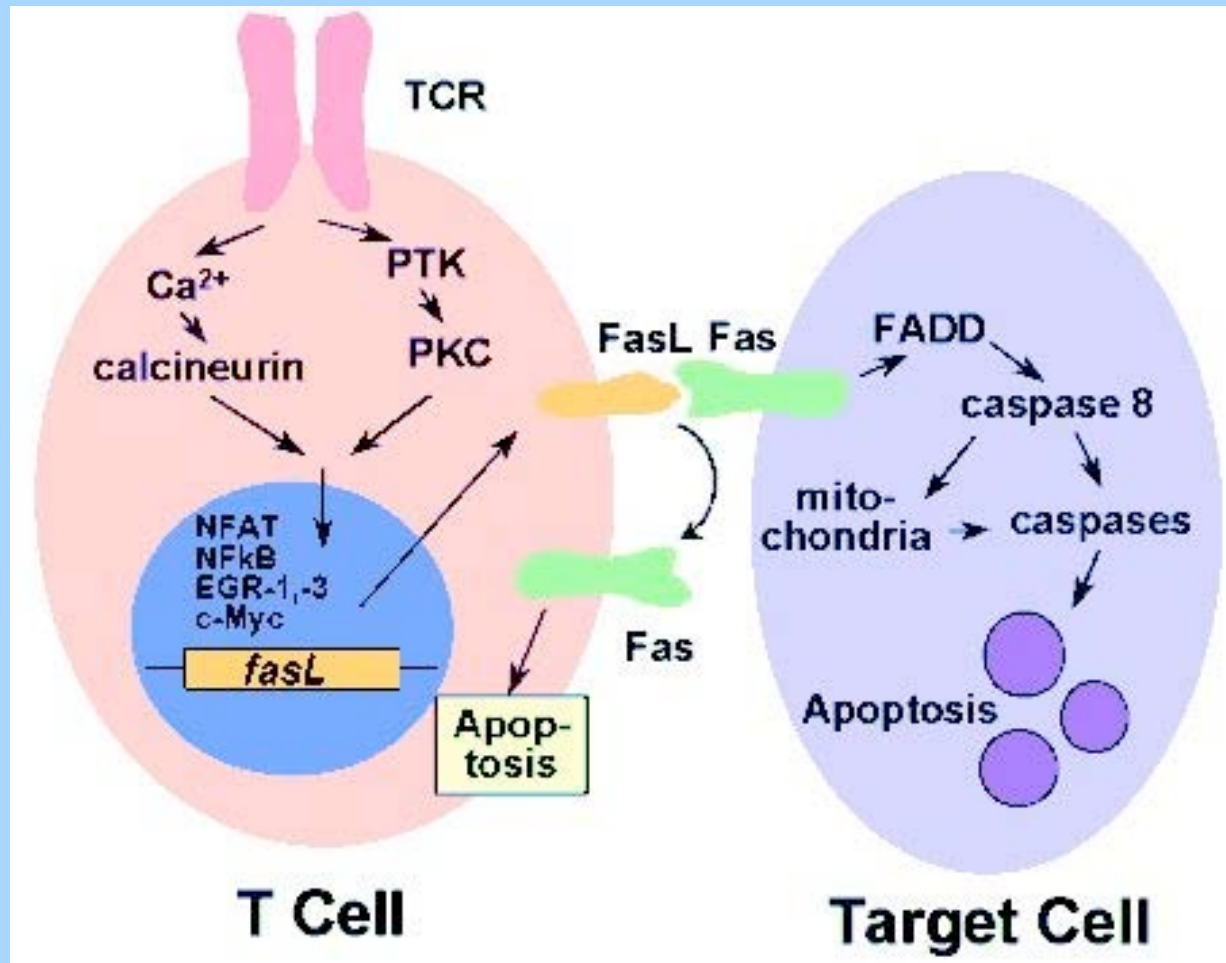


Existen dos familias de receptores

Receptor tipo I: tiene un dominio intracelular que gatilla la señal de apoptosis (receptor Fas o TNF receptor)

Receptor tipo II: no activa caspasas. Señal de sobrevida

Señalización del receptor Fas (tipol)

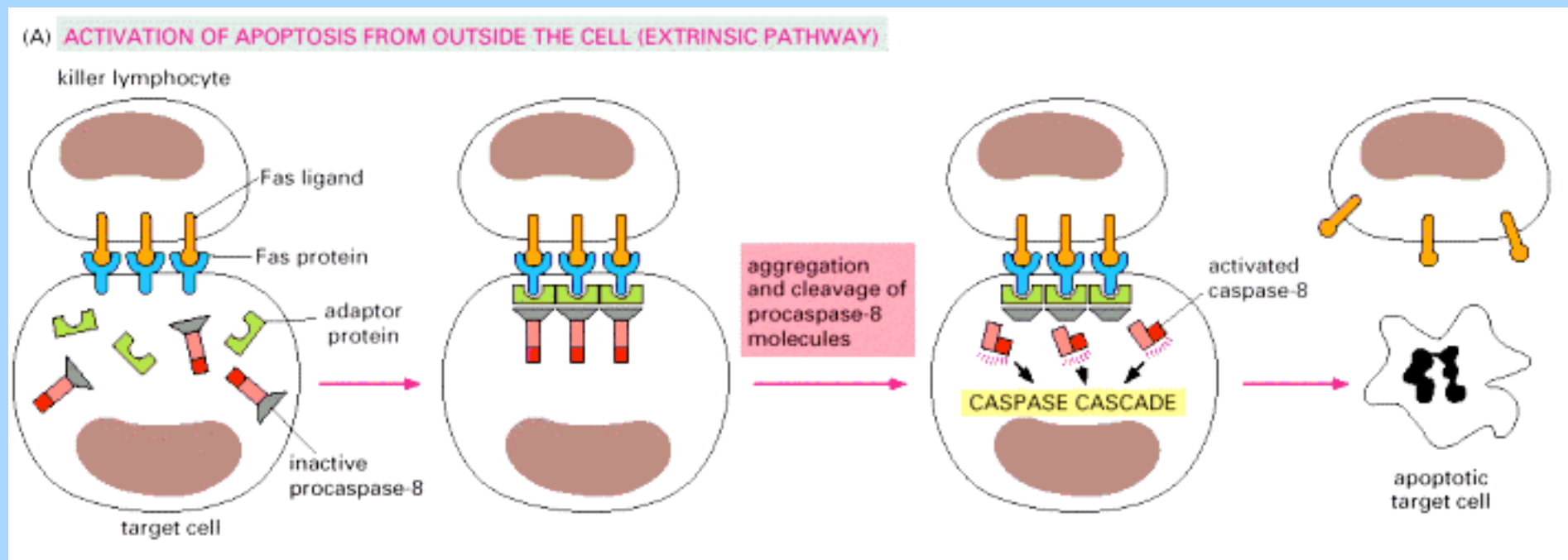


FAAD: factor asociado al dominio de muerte

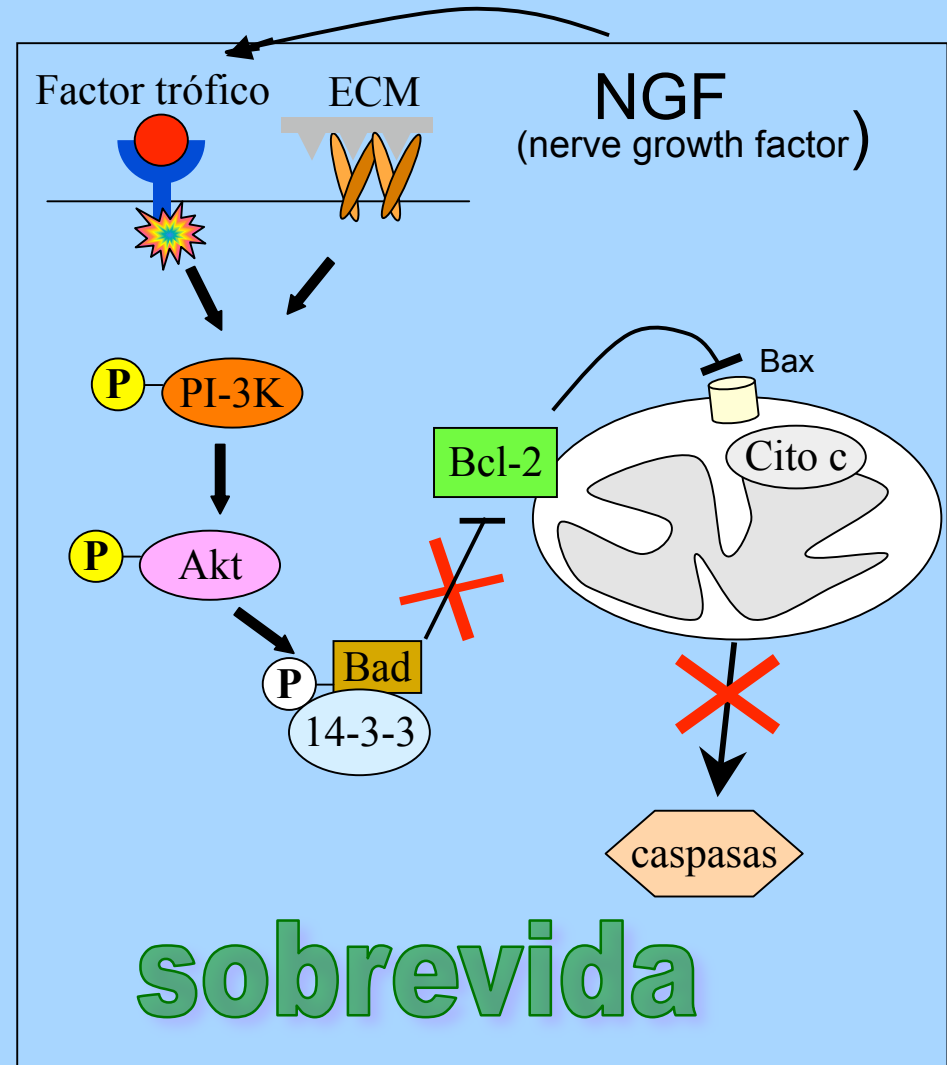
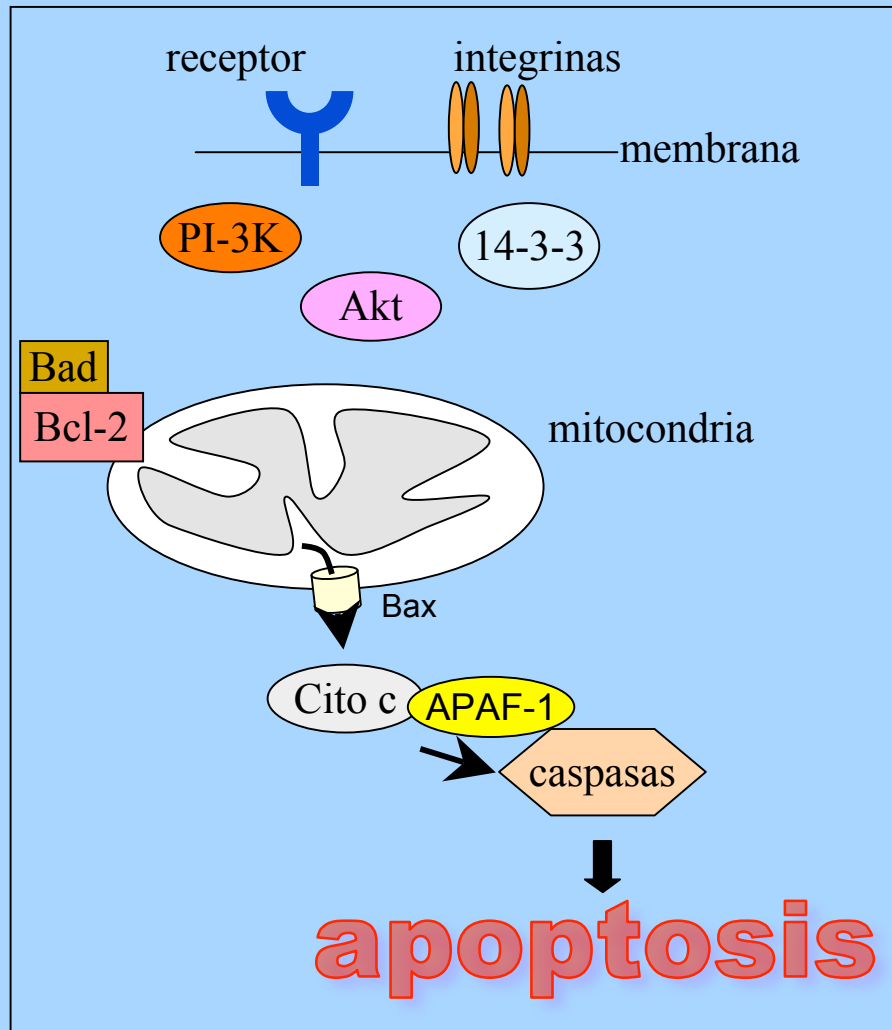
Cuando el receptor se une a su cofactor FasL, el dominio de muerte del receptor se une a la proteína adaptadora FADD recluta caspasa 8, que inicia la activación de caspasas generando fagocitosis de la célula.

La activación de procaspasas también puede ocurrir por estimulación de receptores de superficie proapoptóticos

Receptores proapoptóticos (TNFR1, FAS-CD95, TRAIL, etc) pertenecen a la familia del factor necrótico de tumores o "tumor necrosis factor (TNF). Al unirse se homodimeriza el receptor y recluta caspasa 8.



Los factores de crecimiento y la matriz extracelular inhiben la apoptosis mediada por citocromo C de mitocondrias



Receptor tipo II: no activa caspasas sino gatilla señal de supervivencia

La vía mitocondrial (intrínseca) puede conectarse con la vía de receptores de muerte (extrínseca)

Una vez que se activa la caspasa-8 por los receptores de muerte, esta caspasa activa a la proteína Bid (tBID) provocando la apertura de poros mitocondriales y de esta manera la liberación de citocromo C y posterior activación de la caspasa-9

CRUCE DE VIAS

C. elegans

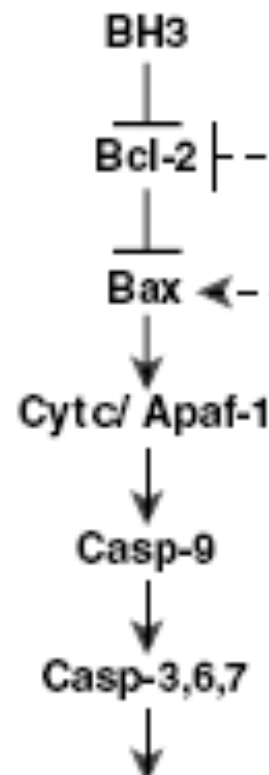
Development



Apoptosis

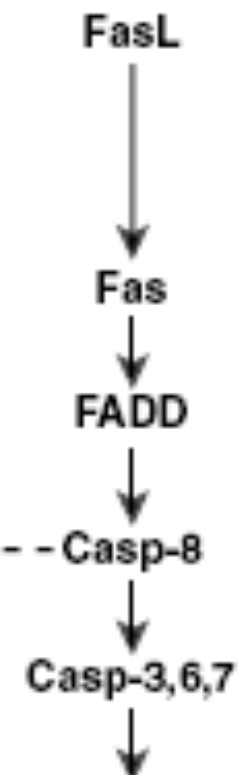
Mammalian

A. Stress

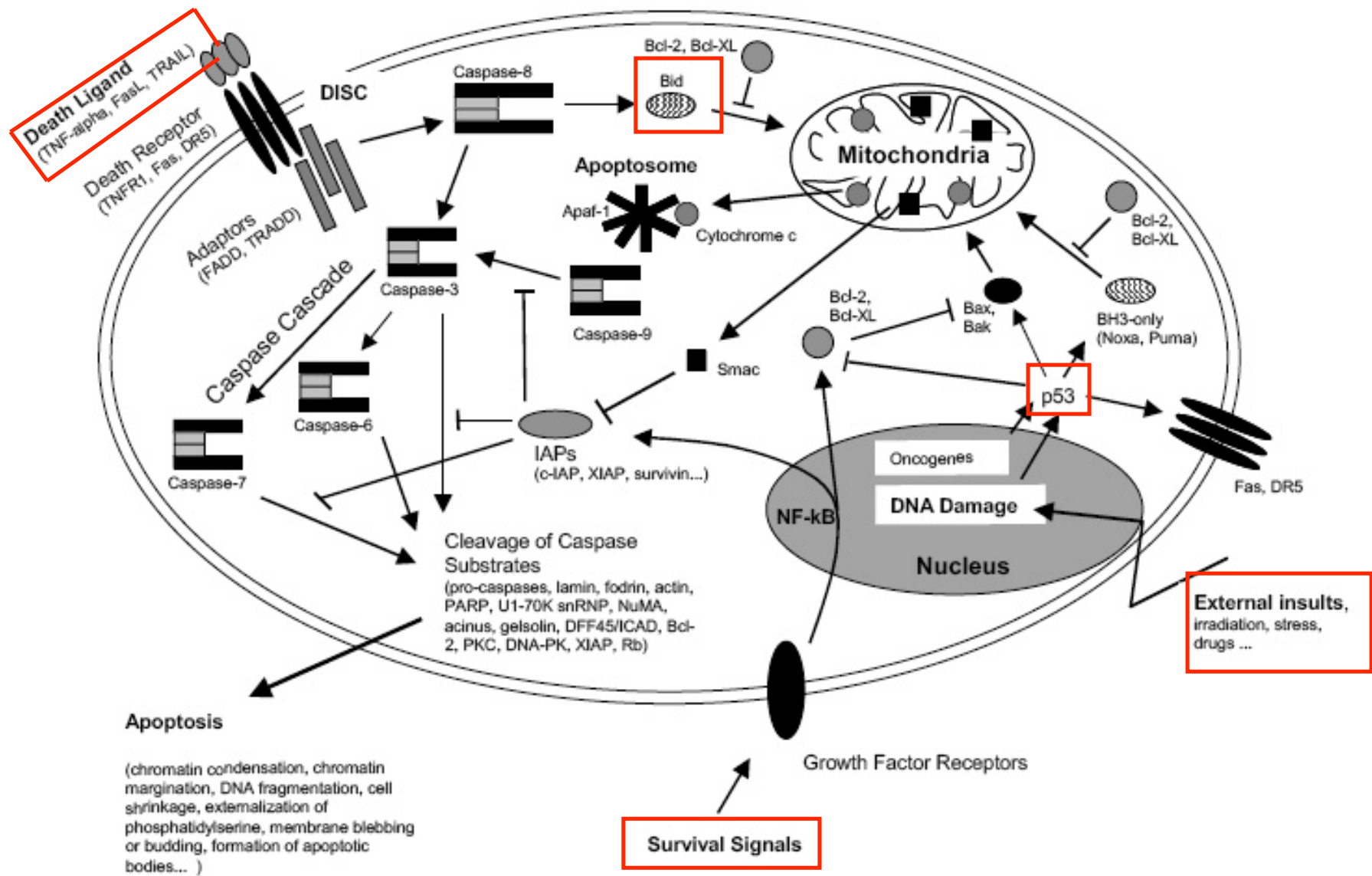


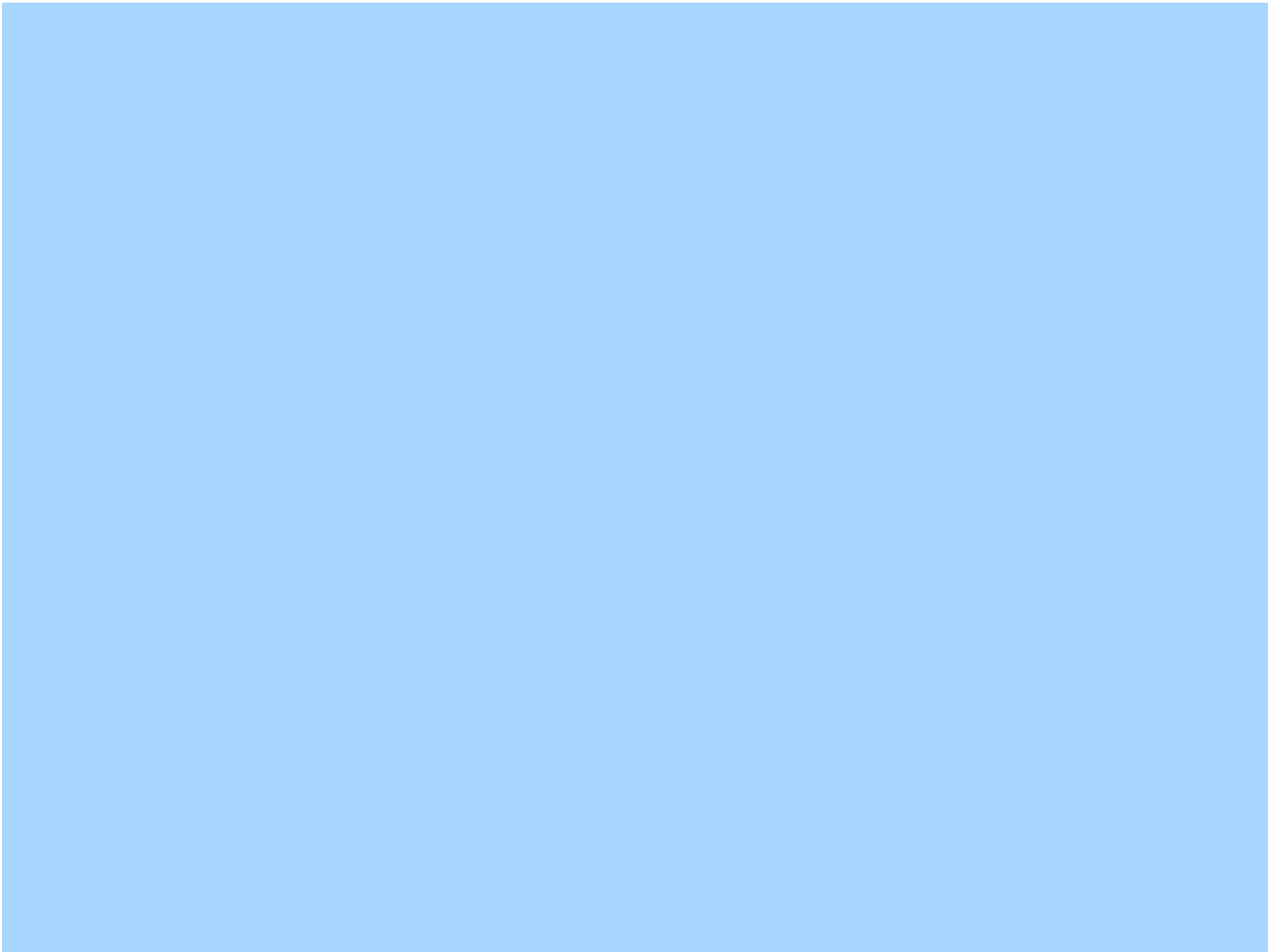
Apoptosis

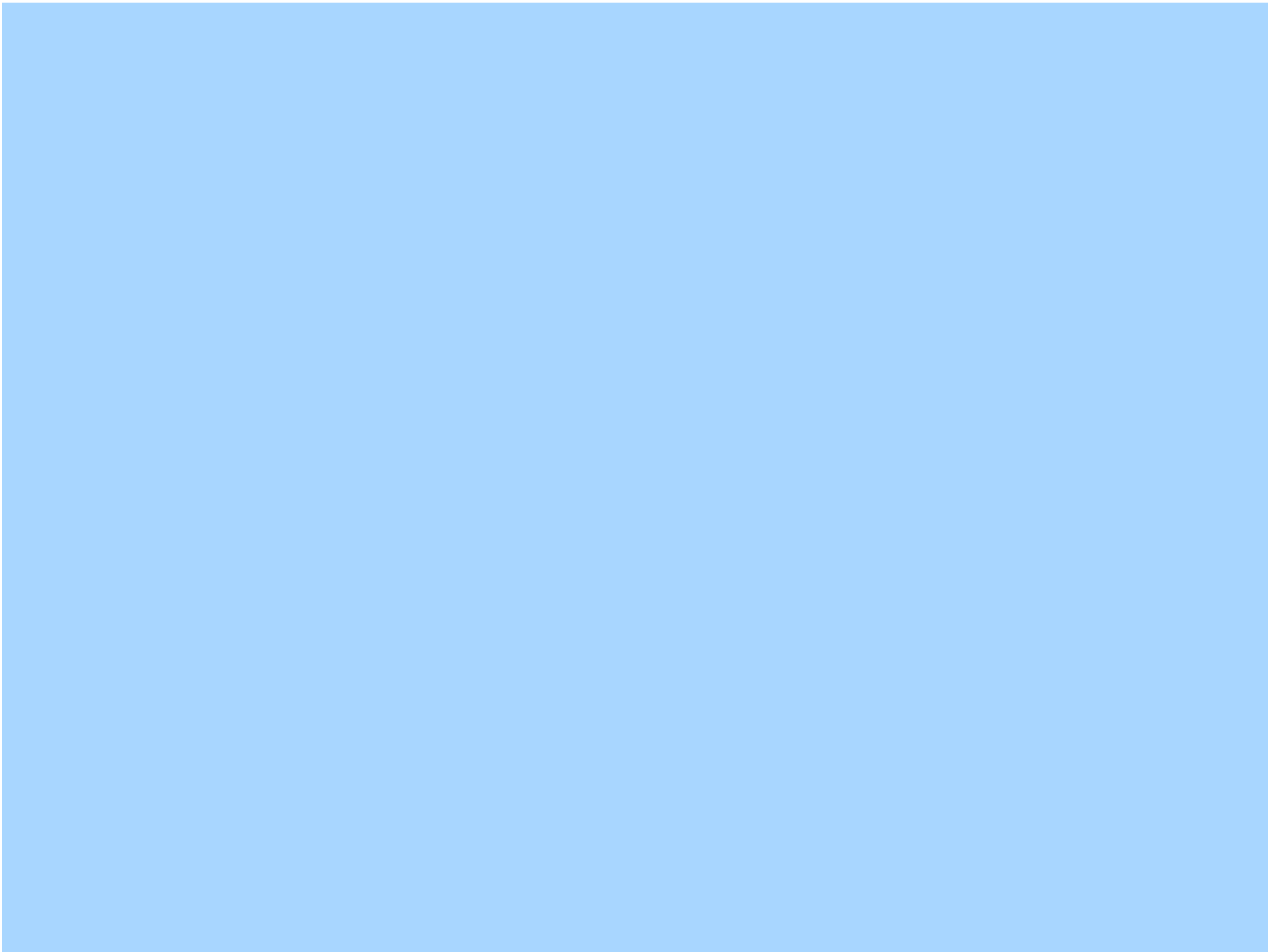
B. Death receptor



Apoptosis

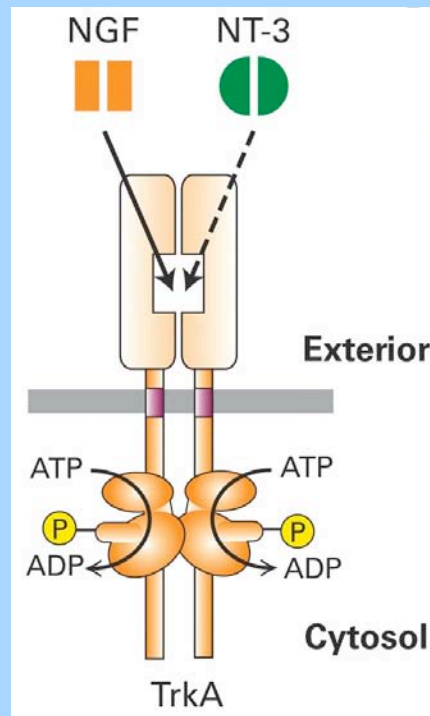




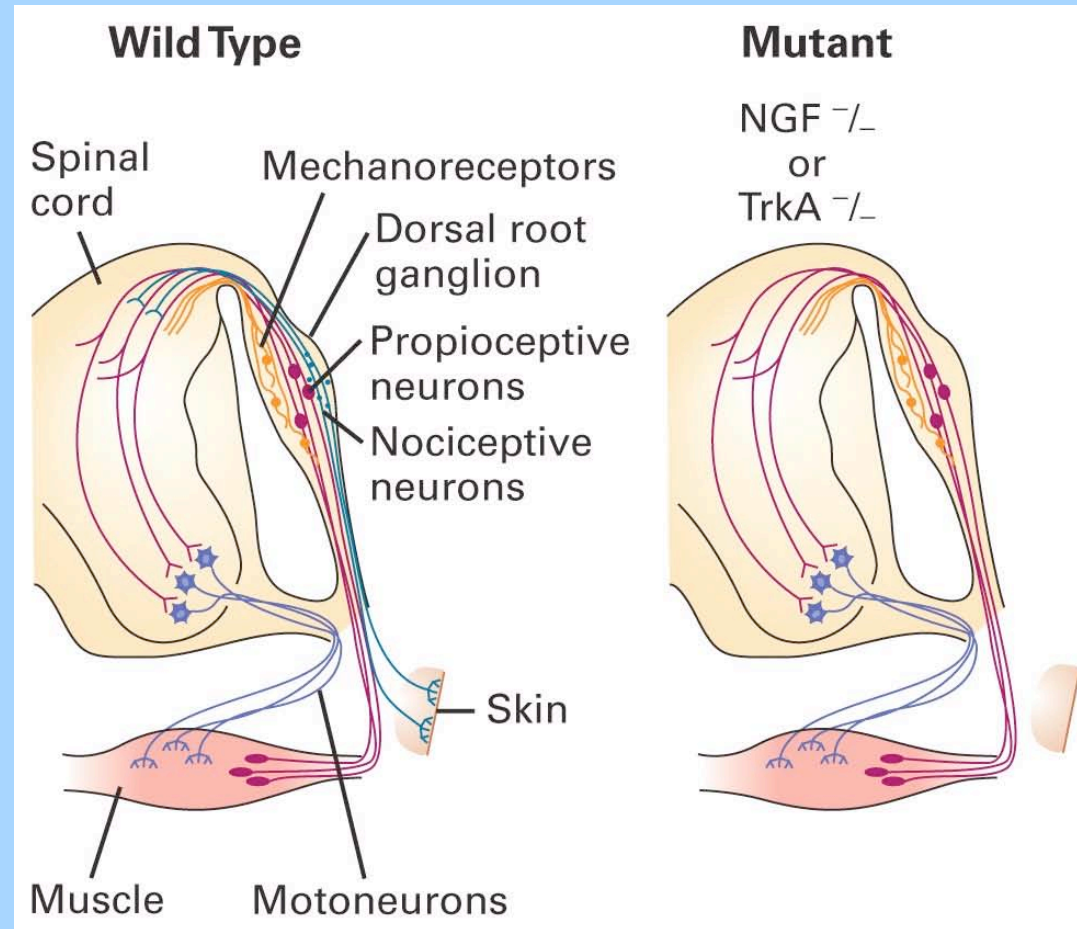


La deficiencia de señalización inducida por factores de crecimiento provoca la apoptosis en varios tipos celulares

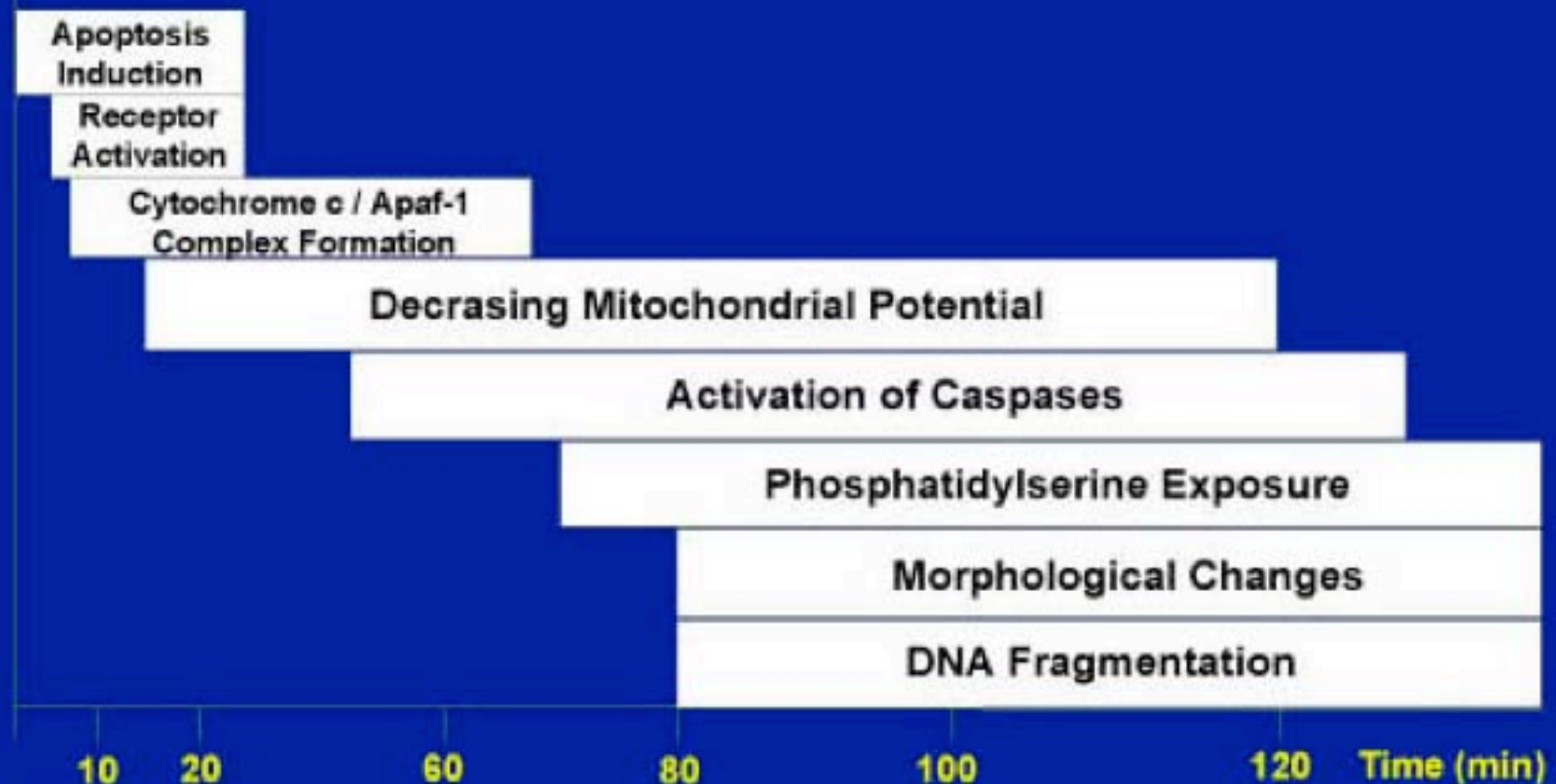
En ratones knockout para el gen del NGF o su receptor TrkA, se observa la ausencia de las neuronas sensoriales que transmiten sensaciones de dolor.



Señal de supervivencia



Hallmarks of Apoptosis



HeLa cells, apoptosis induction with TNF α / Actinomycin D

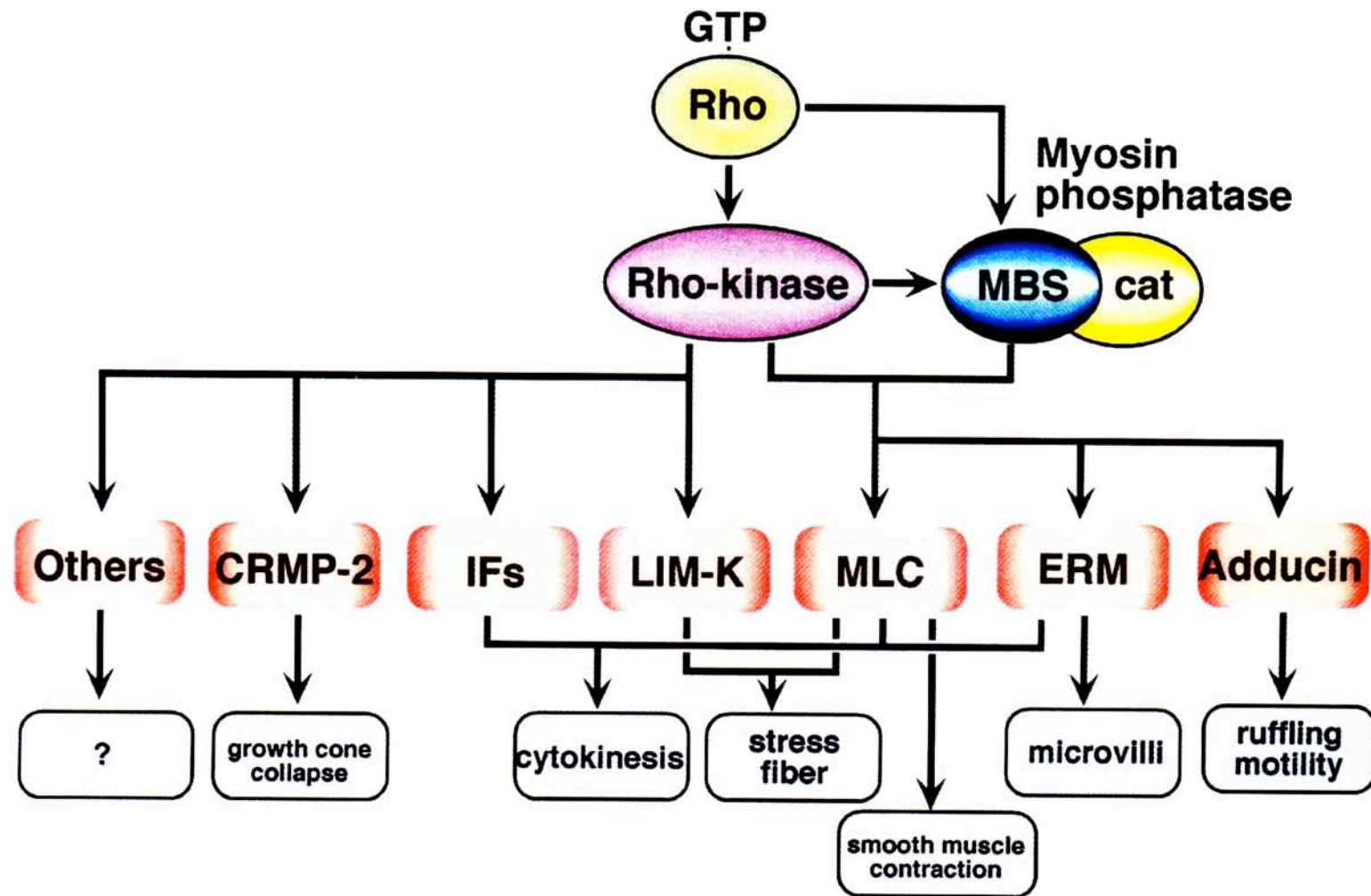


FIG. 2. Substrates for Rho-kinase. cat, catalytic subunit of myosin phosphatase; Ifs, intermediate filaments; LIM-K, LIM-kinase.

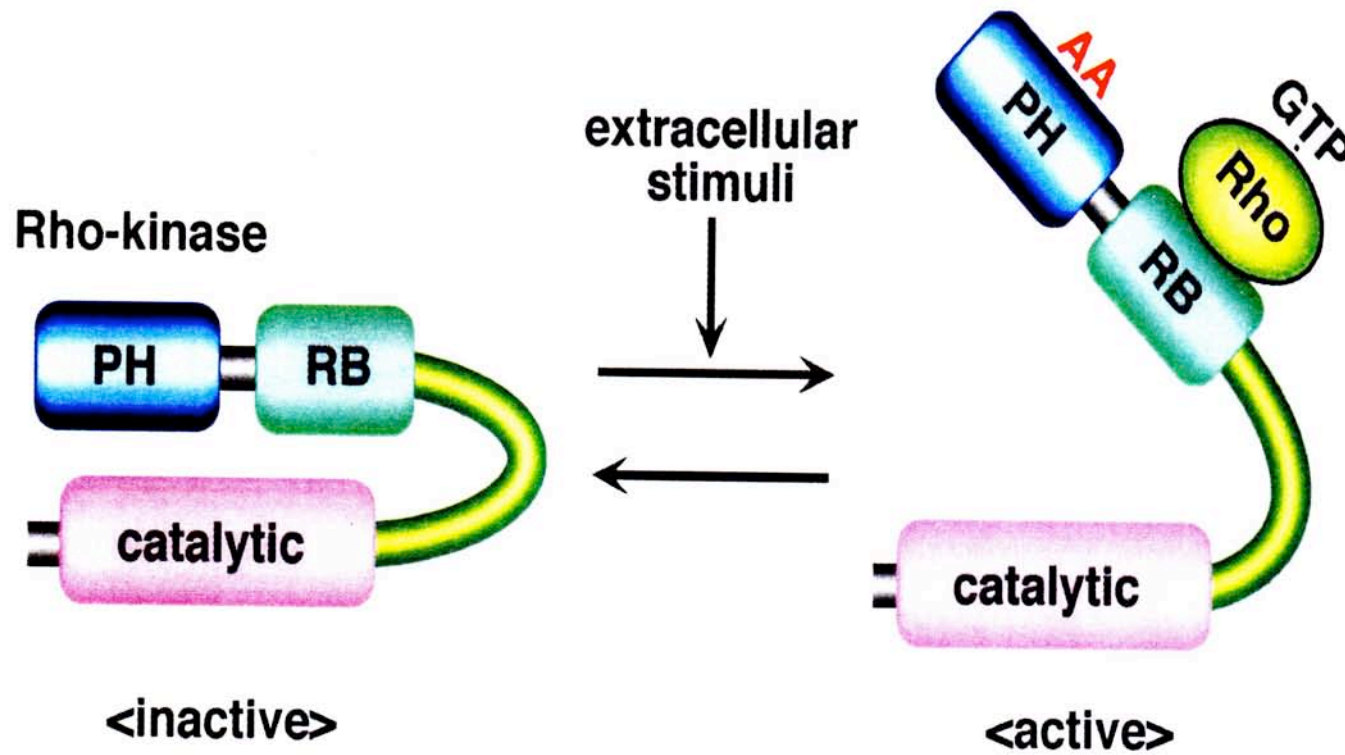


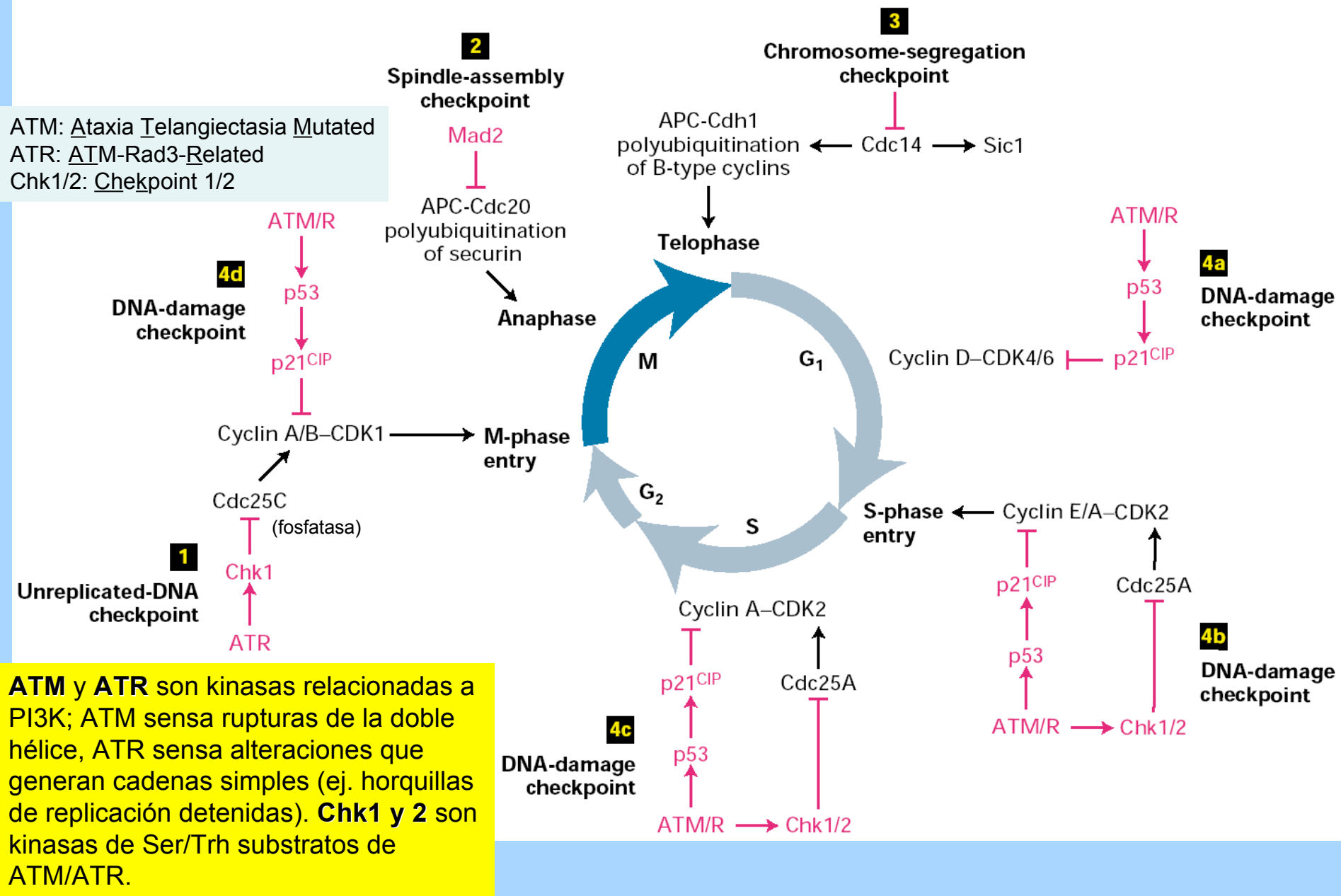
FIG. 1. Model for the regulation of Rho-kinase. RB, Rho-binding domain; PH, pleckstrin homology-like domain; AA, arachidonic acid.

CONTROL O "CHECKPOINTS" EN EL CICLO CELULAR

sensor → mediador → efector

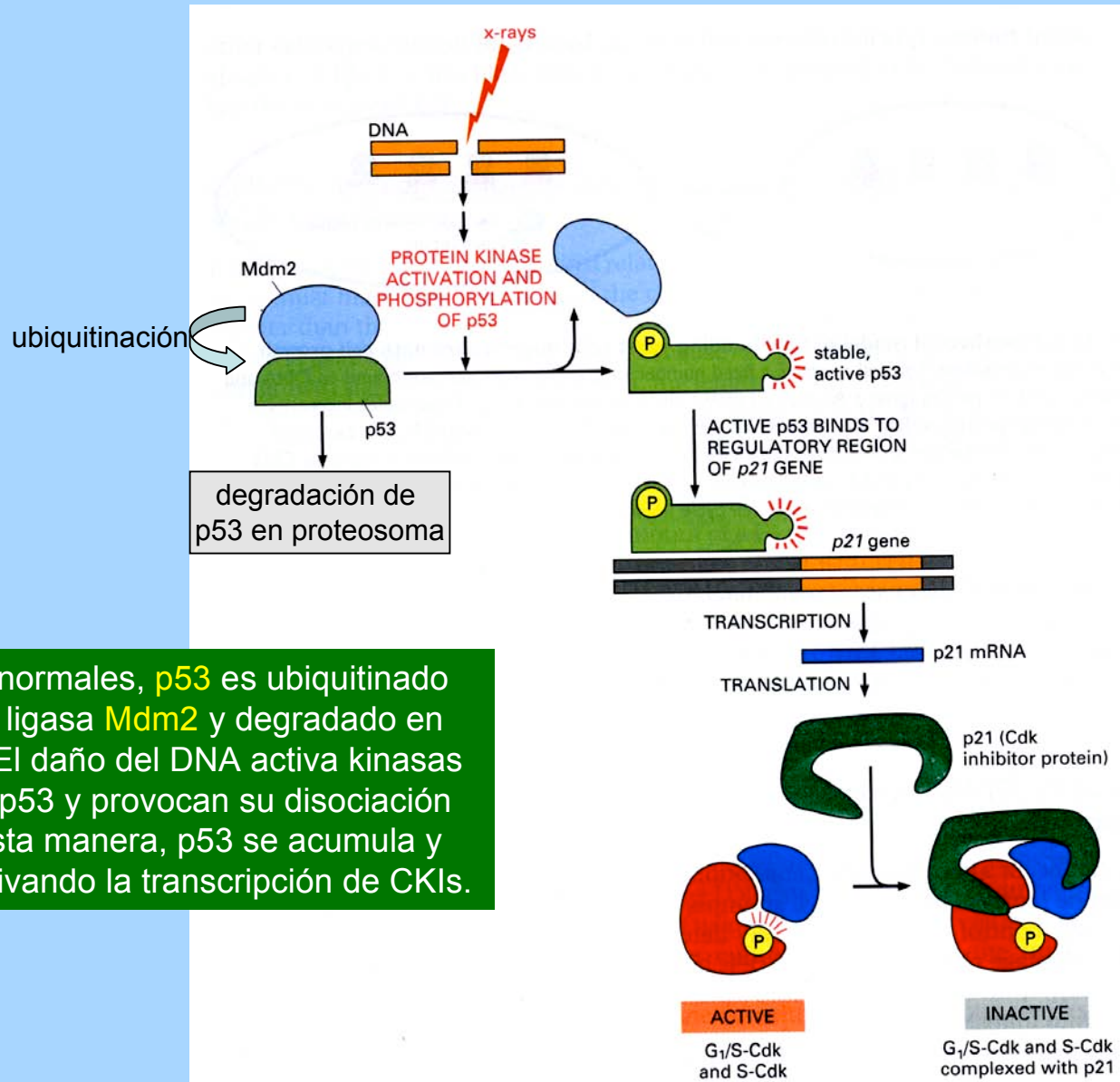
Mecanismos de control o "checkpoints" aseguran la correcta duplicación del DNA, su integridad y distribución a las células hijas

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
 ATR: ATM-Rad3-Related
 Chk1/2: Checkpoint 1/2



ATM y ATR son kinasas relacionadas a PI3K; ATM sensa rupturas de la doble hélice, ATR sensa alteraciones que generan cadenas simples (ej. horquillas de replicación detenidas). **Chk1 y 2** son kinasas de Ser/Trh substratos de ATM/ATR.

La proteína **p53** es un efector clave de la respuesta al daño del DNA ("damage checkpoint")

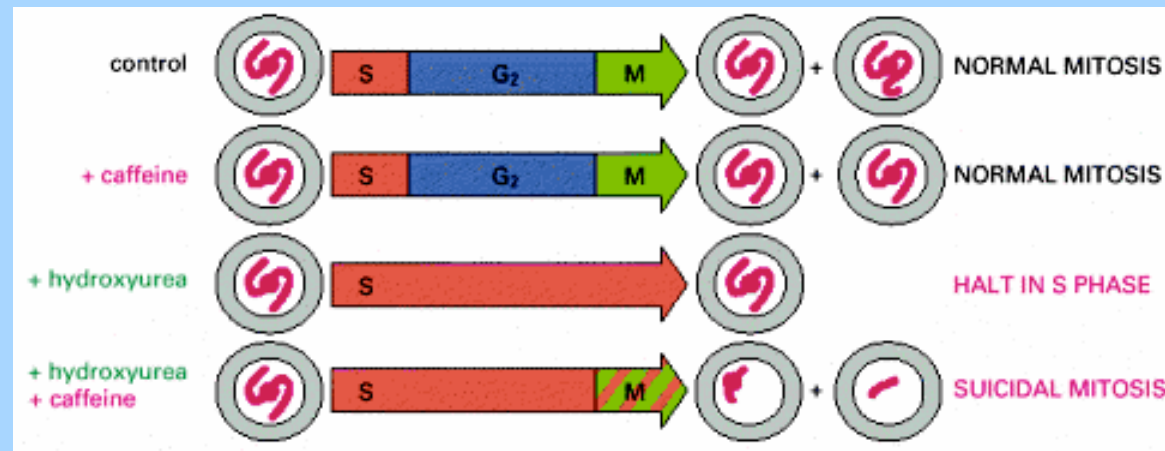


En condiciones normales, **p53** es ubiquitinado por la ubiquitina ligasa **Mdm2** y degradado en el proteosoma. El daño del DNA activa kinasas que fosforilan a p53 y provocan su disociación de Mdm2. De esta manera, p53 se acumula y ejerce su rol activando la transcripción de CKIs.

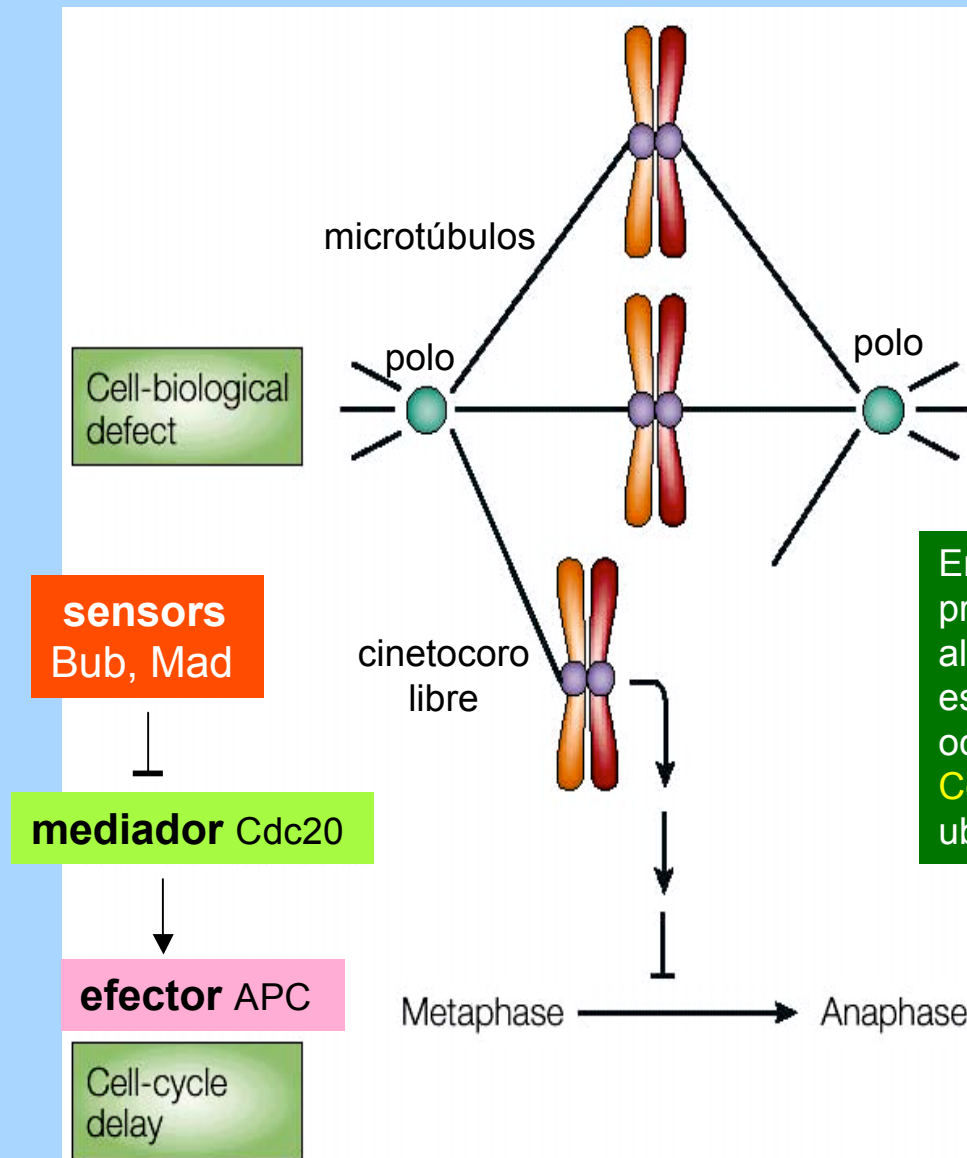
El DNA no replicado activa un mecanismo de control ("DNA replication checkpoint") que inactiva Cdc25

ATR actúa como sensor del DNA no replicado, y se activa al asociarse al DNA simple cadena de horquillas de replicación arrestadas. ATR fosforila y activa la kinasa **Chk1**, la cual a su vez fosforila e inactiva la fosfatasa de Cdks **Cdc25**. La cafeína inhibe este mecanismo de control. La incubación de células con hidroximetilurea, un inhibidor de la síntesis de deoxinucleótidos, activa el mecanismo de control y provoca la detención del ciclo en la fase S. Células incubadas con hidroximetilurea + cafeína no se detienen en la fase S y experimentan errores fatales en la distribución de los cromosomas.

ATR → Chk1 —| Cdc25 → CDK1-ciclA/B



En metafase, cinetocoros libres activan inhibidores del cofactor de APC, Cdc20 (*"metaphase checkpoint"*)



En los cinetocoros libres se asocian y activan proteínas como **Mad** y **Bub**, que bloquean al cofactor **Cdc20**. De este modo, Cdc20 no esta disponible para activar **APC**. La ocupación del último cinetocoro libera **Cdc20** que se une y activa APC. APC-Cdc20 ubiquitina el inhibidor de la anafase securina.

MAD: Mitotic Arrest Defficient
BUB: Budding Uninhibited by Benzimidazole

La disponibilidad de **Cdc20** permite la activación de **APC** y la degradación de las cohesinas

