

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie živočichů



# Úloha proteinů Bcl rodiny v onkogynekologii

Bakalářská práce

Vypracovala: Lenka Lidová  
Školitelka: Mgr. Ivana Švandová

V Praze, červen 2010

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití dále uvedené literatury pod vedením školitelky Mgr. Ivany Švandové.

V Praze:

Podpis: .....

## **Abstrakt**

Bcl-2 rodina zahrnuje asi 20 homologních proteinů, které mají stěžejní funkci při stimulaci a inhibici apoptózy. Vzájemný poměr pro- a antiapoptotických složek pak předurčuje definitivní osud buňky. Apoptóza je fyziologická forma buněčné smrti, jež hraje důležitou roli ve vývoji tkáně a také v udržování tkáňové homeostázy. Mechanismem apoptózy jsou eliminovány buňky, které jsou nadpočetné nebo pro organismus škodlivé. Buňky podléhají apoptóze prostřednictvím dvou hlavních signálních drah – vnější nebo vnitřní signální dráhou. Buňky podléhající apoptóze vykazují charakteristické změny – jaderné, cytoplazmatické, mitochondriální aj. Obsah mrtvých buněk je obalen membránou a tvoří apoptotická tělíška. Ta jsou pak rozpoznávána makrofágy a fagocytována.

Dysregulace apoptózy může vést k řadě maligních, autoimunitních či degenerativních onemocnění a k různým vývojovým poruchám. Pochopení mechanismů apoptózy může také hrát důležitou roli v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** apoptóza, proteiny Bcl-2 rodiny, onkogynekologie, hyperplázie, karcinomy

## **Abstract**

The Bcl-2 protein family consists of about 20 homologues important for stimulation and inhibition of apoptosis. The ratio between pro- and antiapoptotic regulators predetermines fate of the cells. Apoptosis is a physiological form of cell death which plays an important role in tissue development and maintenance of tissue homeostasis. By the apoptotic way are eliminated redundant cells and cells which can damage the organism. Cells undergo apoptosis through two major apoptotic pathways – the extrinsic or the intrinsic apoptotic pathway. Apoptotic cells are characterised by specific changes – nuclear, plasma membrane, mitochondrial etc. The contents of dead cells are packaged into apoptotic bodies. These are then recognized by macrophages and cleared by phagocytosis.

Dysregulation of apoptosis may lead to many malignant, autoimmune or degenerative diseases and some developmental defect. Understanding the mechanisms of apoptosis can be an important part of the diagnostics and therapy in oncology.

**Key words:** apoptosis, Bcl-2 family proteins, oncogynaecology, hyperplasia, carcinomas

## Seznam zkratek

AIF	apoptosis inducing factor
AKT	serin-threoninová kinasa
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
ATP, dATP	adenosintrifosfát, deoxyadenosintrifosfát
Bcl	B-cell lymphoma
BH	Bcl-2 homologní (doména)
CARP	cardiac ankyrin repeat protein
CIS	carcinoma in situ
Cyt	cytochrom c
DD	death domain
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECSC	ovarian endometriotic cyst stromal cells
ER	endoplasmatické retikulum
ESCwE	eutopic endometrial stromal cells with endometriosis
FADD	Fas associated death domain
Fas-L	Fas ligand
HDAC	histone deacetylase
HIAP-1	human inhibitor of apoptosis protein
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane)
INF- $\gamma$	interferon- $\gamma$
JNK	jun N-terminal kinase
KSHV	Kaposi sarcoma-associated herpes virus
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NESC	normal endometrial stromal cells
NIAP	neuronal inhibitor of apoptosis protein
NK	natural killer (cells)
OMM	vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane)
PCOS	syndrom polycystických ovárií (polycystic ovarian syndrome)
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
RIP	receptor-interacting protein
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SODD	silencer of death domain
TM	transmembránová doména (transmembrane domain)
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TNFR	TNF receptor
TRADD	TNF-R-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
VDAC	voltage dependent anion channel
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

## **OBSAH**

Abstrakt .....	3
Seznam zkratek.....	4
1. Úvod.....	6
2. Apoptóza .....	7
2.1. Historie apoptózy.....	8
2.2. Znaky apoptózy .....	9
2.3. Nekróza.....	9
2.4. Význam apoptózy .....	10
3. Signální dráhy apoptózy.....	11
3.1. Vnější signální dráha .....	11
3.2. Vnitřní signální dráha .....	14
3.3. Propojení vnější a vnitřní signální dráhy .....	16
3.4. Regulace apoptotických drah.....	17
4. Proteiny Bcl-2 rodiny .....	18
4.1. Skupina I – Bcl-2 a Bcl-2 like antiapoptotické faktory .....	19
4.1.1. Bcl-2.....	20
4.1.2. Bcl-X.....	21
4.1.3. Bcl-w.....	21
4.2. Skupina II – BH123 proteiny.....	21
4.2.1. Bax .....	22
4.2.2. Bak a Bok.....	23
4.3. skupina III – BH3-only proteiny.....	23
4.3.1. Bid.....	24
4.3.2. Bim.....	24
4.3.3. Bmf.....	24
4.3.4. Puma a Noxa .....	24
4.3.5. Bad a Bik.....	25
5. Apoptóza v onkogynekologii .....	26
5.1. Studium apoptózy v gynekologickém materiálu.....	26
5.2. Studium apoptózy v onkogynekologických materiálech .....	26
5.2.1. Endometrióza .....	27
5.2.2. Prekancerózy.....	28
5.2.2.1. Hyperplázie .....	28
5.2.2.2. Syndrom polycystických ovárií (PCOS) .....	29
5.2.3. Karcinomy.....	29
5.2.3.1. Karcinom endometria .....	30
5.2.3.2. Karcinoma in situ (CIS) – intraepiteliální, preinvazivní karcinom .....	32
6. Závěr.....	33
Literatura .....	34

## 1. Úvod

Udržování tkáňové homeostázy a kontrola správné míry proliferace a buněčné smrti je pro život nezbytná. Tuto rovnováhu ve zdravém těle zajišťuje apoptóza. Apoptóza, programovaná buněčná smrt neboli buněčná sebevražda, je fyziologický geneticky řízený proces autodestrukce buňky, aktivovaný zanikající buňkou v situaci, kdy se buňka stala pro tkáň nebo pro organismus nepotřebnou, nežádoucí či škodlivou. Apoptóza se vyskytuje u všech mnohobuněčných a u některých jednobuněčných organismů a má základní význam v obraně proti virům a bakteriím, v morfogenezi, homeostáze, ontogenezi a funkci imunitního systému a v odpovědi na různá poškození, zvláště při degenerativních a nádorových chorobách. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>; Meijerink a kol., 1998; Alberts a kol., 2002).

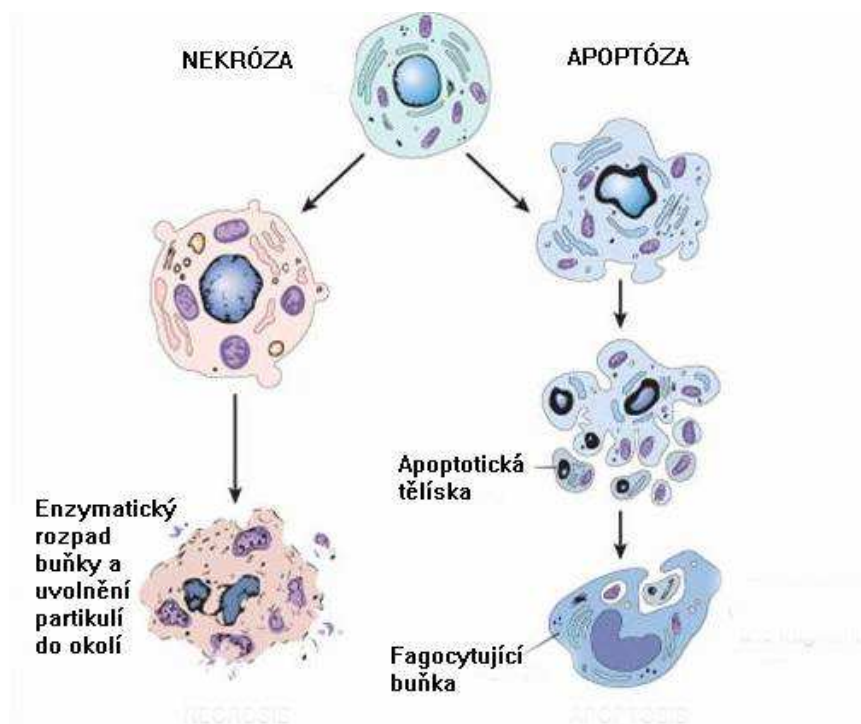
Přestože termín apoptóza ve smyslu programovaná buněčná smrt poprvé použil v roce 1972 Kerr a kol., fenomén programované buněčné smrti byl znám mnohem dříve. Už v roce 1842 popsal německý biolog C. Ch. Vogt apoptózu během vývoje pulců ropušky starostlivé. V roce 1987 vyslovil Wyllie (Wyllie, 1987a; Wyllie, 1987b) dva základní axiomy ve vztahu k apoptóze po účinku toxických látek: 1) Apoptóza je indukována škodlivými stimuly menší síly, než jaké vedou u stejných buněk k nekróze. 2) Apoptózu je snadnější vyvolat v těch buněčných populacích, které za fyziologických podmínek prodělávají rychlou obměnu buněčné populace.

Charakteristické rysy apoptózy zahrnují smršťování buňky, tvorbu měchýřků, kondenzaci chromatinu, štěpení DNA a na závěr pohlcení fagocytujícími buňkami, čímž se zabrání vyvolání zánětlivé reakce. Apoptóza se odlišuje od nekrózy, při které dochází k poškození buňky vedoucí ke ztrátě membránové integrity, edému a popraskání buněk. Porušení membrány vede k nekontrolovanému uvolnění buněčného obsahu do okolí a k poškození okolních buněk (Kirkin a kol., 2004; Jin a El-Deiry, 2005; Dvorská a kol., 2008; Gogvadze a kol., 2009).

Apoptóza může být indukována též ztrátou ukotvení buněk k extracelulární matrix. Pro tento pochod se používá termín „anoikis“, odvozený z řeckého výrazu pro „bezdomovectví“. Anoikis má význam zejména pro apoptózu epitelových buněk (Klener, 2002; Liotta a Kohn, 2004). Zajímavá je role anoikis v metastázování tumorů. Běžné buňky po ztrátě kontaktu s extracelulární matrix a sousedními buňkami stejné tkáně nejsou schopny růstu a/nebo přežít. Metastázující buňky tumoru mohou být proti anoikis chráněny a po odloučení od „mateřského“ nádoru se bez ztráty vitality šířit do dalších orgánů (Zeng a kol., 2002b; Liotta a Kohn, 2004).

V období embryonálního vývoje jsou nadpočetné buňky apoptoticky odstraňovány při tvorbě prstů či tělních dutin. V postnatálním a dospělém období zodpovídá apoptóza za přestavbu fetální cirkulace a fyziologickou buněčnou a tkáňovou obnovu, jak ji známe u povrchových epitelů, např. enterocytů. Typickým příkladem tkáně podléhající cyklické obnově za účasti apoptózy je např. lidské endometrium. Uvádí se, že u průměrného dospělého lidského jedince zanikne denně apoptózou 50 až 70 biliónů buněk (Zeng a kol., 2002a).

V této práci se budu zabývat apoptózou probíhající (nebo spíše neprobíhající) při různých gynekologických patologických stavech. Apoptóza se účastní cyklických změn během reprodukčního období ženy, jako je zánik buněk endometria v průběhu menstruačního cyklu a atrofie mléčné žlázy po menopauze (Neuwirtova, 2001; Kleibl a kol., 2002; Holcik a kol., 2005). Proces apoptózy, proliferace a diferenciace lidského endometria je silně hormonálně ovlivněn a závisí především na hladině estradiolu a progesteronu (Shiozawa a kol., 1996). Poruchy v regulaci apoptózy mohou způsobovat neplodnost a spontánní potraty nebo naopak endometriózu, hyperplázie a různé druhy nádorů.



Obr. 1. Apoptotická a nekrotická smrt buňky  
Cancer 1994; 73: 2013-26.

## 2. Apoptóza

Apoptóza je děj fyziologický i patologický. Za fyziologických podmínek zajišťuje tkáňovou homeostázu. Mechanismem apoptózy jsou eliminovány buňky, které jsou nadpočetné nebo pro organismus škodlivé. Apoptózu může indukovat řada exogenních i endogenních faktorů: protilátky, kyslíkové radikály, ionizující záření, hypoxie, hypoglykémie, kortikoidy, cytokiny, cytotoxické lymfocyty, deplece růstových faktorů, hormonální dysregulace aj. V takovém případě je programovaná smrt buňky dějem patologickým. Na rozdíl od nekrózy si však zachovává svůj geneticky řízený, programovaný charakter a zůstává aktivním procesem vyžadujícím energii (Neuwirtova, 2001; Holcik a kol., 2005; Kumar a kol., 2005).

## 2.1. Historie apoptózy

Slovo „apoptosis“ pochází z řeckého písemnictví. Tento termín navrhl profesor James Cormack z katedry řečtiny na univerzitě v Aberdeenu. Z řeckého pojmu určeného pro opadávání okvětních plátek květů či listů ze stromů mu znovu vrátil jeho medicínské užití, i když s poněkud odlišným významem, než mu dali Řekové před dvěma tisíci lety. Hippokrates totiž používal termín apoptosis pro „opadávání masa z kostí“. Později jej Galén rozšířil i na odlupování strupů a strupovitých útvarů obecně, což Cormack bezpochyby věděl. K použití termínu apoptosis jej možná vedl Kerrem a kol. popisovaný vznik „puchýřků“ na povrchu apoptické buňky. Kerr, Currie a Wyllie v 70. letech 20. století původně použili termín „programmed cell necrosis“ a to v souvislosti s označením jiné formy buněčné smrti, nežli je nekróza. Záhy však ve svých publikacích užívají nového pojmenování, tedy apoptosis. Kerr a kol. ve své publikaci popsali apoptózu jako: „... mechanismus kontrolované buněčné smrti, který hraje komplementární, avšak opačnou roli ve vztahu k mitóze v regulaci buněčných populací živočichů“ (Kerr a kol., 1972).

Ve 40. letech 19. století popsal Vogt předurčenou smrt buněk na modelovém příkladu přeměny pulce v žábu, kdy buňky ocasu v procesu ontogeneze odumřou. Proto u žab, které už ho nepotřebují, ocas neexistuje (Alberts a kol., 2002). Přibližně v 80. letech 19. století popsali Veigert a Conheim zvláštní variantu nekrózy s velmi pomalým rozpadem buněk. Je velmi pravděpodobné, že již v těchto případech šlo také o jedna z prvních pozorování apoptózy (Nečas, 2000; Peiro a kol., 2001). Rozsáhle se studiu apoptózy věnovala a stále věnuje zejména embryologie (Glucksmann, 1951).

V roce 1965 Kerr demonstroval, že podvaz portální žíly u krys vede k involuci buněk periportálního parenchymu, po kterých zbylo množství malých kulatých vezikul, ale bez dalších znaků zánětlivé reakce, která je obvyklá při nekróze. Podrobným studiem tohoto jevu prokázal, že tyto vezikuly obsahují intaktní organely, chromatin a jaderné zbytky. Pro popis tohoto jevu nejprve užil název „shrinkage necrosis“, který o několik let později nahradil pojmem „apoptosis“ (Nečas, 2000; Kudela a kol., 2002; Kumar a kol., 2005).

V 80. letech 20. století došlo k intenzivnímu vědeckému bádání a četné morfologické, biochemické a cytogenetické práce položily základy vědění o apoptóze. Zásadní zvrat v rozlišování apoptózy od nekrózy přinesla cytogenetická a biochemická pozorování. Zjistilo se, že apoptóza je děj spojený se štěpením DNA na mnohočetné fragmenty (Kumar a kol., 2005). V roce 1984 vědci objasnili spojitost mezi štěpením DNA při apoptóze a indukcí endonukleázy. Také prokázali, že její aktivita je závislá na přítomnosti kalciových iontů. V roce 1991 pak Gaido a Cidlowski izolovali jednu z těchto endonukleáz (Gaido a Cidlowski, 1991; Kumar a kol., 2005).

V současnosti je apoptóza intenzivně zkoumána. Počet publikací o apoptóze roste geometrickou řadou. V roce 2002 obdrželi Sydney Brenner, H. Robert Horvitz a John E. Sulston



Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za výzkum v oblasti genetické regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti.

## 2.2. Znaky apoptózy

Buňky podléhající apoptóze vykazují charakteristické morfologické a metabolické znaky, které ji zásadně odlišují od buněčné nekrózy (viz Tab. 1.). Při apoptóze dochází ke smršťování buňky, cytoplazma se stává densnější a organely se shlukují k sobě, dochází ke kondenzaci a hrudkování chromatinu jádra, fragmentaci DNA, vytváření povrchových puchýřků (tzv. „blebs“) a následnému rozpadu buňky na tzv. apoptotická tělíška. Ta jsou pak kanibalisticky pohlcena buňkami schopnými fagocytózy. Okolní tkáň se při tomto ději nepoškozuje, a proto nedochází k zánětlivé reakci okolí (Kerr a kol., 1972; Jin a El-Deiry, 2005).

## 2.3. Nekróza

Druhým typem buněčné smrti je nekróza. Nekróza buňky je považována za děj patologický. Je vyvolána různými vlivy, ať již fyzikálními, jako jsou výkyvy teplot, záření, mechanické poškození atd., nebo chemickými, např. toxiny, jedy či enzymatickými pochody. Nekróza může být taktéž vyvolaná hypoxií, různými bakteriálními toxiny, virovou infekcí buňky nebo náhlým vyčerpáním buněčných energetických zásob (Nečas, 2000). Ukázalo se, že stejný podnět může v buňce indukovat jak nekrózu tak apoptózu. Záleží na intenzitě, délce působení a rychlosti patogenního podnětu. Velmi intenzivní, náhlý podnět způsobí nekrózu buňky, zatímco stejný podnět menší intenzity či opakovaného charakteru může iniciovat apoptózu (Ganong, 2005; Holcík a kol., 2005).

Při nekróze dochází k desintegraci cytoplazmatické membrány, což vede k narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky. To vede k edému buňky i některých organel. Dochází ke kondenzaci chromatinu a zmenšení jádra, k agregaci chromatinu při periferii jádra a ke fragmentaci jaderného chromatinu. Následně se na fragmenty rozpadá i buněčné jádro.

Celý proces nakonec vede k enzymatickému poškození buňky a k jejímu rozpadu. Obsah buňky se uvolní do okolí, přičemž takto uvolněné enzymy mohou poškozovat mezibuněčnou hmotu. Tím indukují nekrózu okolních buněk a způsobí tak řetězovou reakci. To vyvolá místní zánětlivou reakci zprostředkovanou širokou škálou cytokinů (Nečas, 2000).

Genetické analýzy naznačují, že nekrotická smrt buňky může za určitých okolností zastoupit během normálního vývoje smrt apoptotickou. Nekróza může také představovat významnou alternativní cestu likvidace nádorových buněk. Ty totiž mohou být díky mutacím schopny inaktivovat apoptotické signální dráhy. Zánětlivá reakce vyvolaná nekrózou může navíc potenciálně stimulovat imunitní odpověď organismu a dále tak zvyšovat počet usmrcených nádorových buněk (Vande Velde a kol., 2000).

Tab. 1. Základní rozdíly mezi apoptózou a nekrózou

<i>Apoptóza</i>	<i>Nekróza</i>
<p><b><u>hlavní znaky:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Děj fyziologický i patologický</li> <li>■ Aktivní proces vyžadující energii</li> <li>■ Geneticky řízená</li>   <li>■ Síla působící noxy menší</li>   <li>■ Nástup je pomalý /hodiny/</li> <li>■ Odstranění apoptotických buněk je rychlé a diskrétní</li> <li>■ Nevvolává zánětlivou reakci okolí</li> </ul> <p><b><u>sekundární znaky:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Smršťování buňky</li> <li>■ Kondenzace a hrudkování chromatinu jádra</li> <li>■ pouze přechodná desintegrace mitochondriální membrány</li> <li>■ Fragmentace DNA</li> <li>■ Vznik tzv. apoptotických tělísek, která jsou pohlcena fagocyty</li> <li>■ pH buňky – acidifikace</li> <li>■ aktivace kaspáz</li> </ul>	<p><b><u>hlavní znaky:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Děj vždy patologický</li> <li>■ Děj indukovaný</li> <li>■ Je výsledkem neschopnosti buňky udržet svou strukturálně-funkční integritu</li> <li>■ Síla působící noxy větší /vždy intenzivní podnět/</li> <li>■ Nástup je rychlý /minuty, vteřiny/</li> <li>■ Odstranění nekrotických buněk je pomalé</li> <li>■ Vyvolává zánětlivou reakci okolí</li> </ul> <p><b><u>sekundární znaky:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Zvětšení objemu buňky</li> <li>■ Aktivace enzymů vedoucí k poruše buněčných membrán</li> <li>■ trvalá ztráta integrity mitochondrií</li>   <li>■ Rozklad organel a chromatinu DNA</li> <li>■ Narušení okolní mezibuněčné hmoty → zánětlivá reakce okolí</li> <li>■ pH buňky se nemění</li> <li>■ bez aktivace kaspáz</li> </ul>

## 2.4. Význam apoptózy

Apoptóza je významný a naprosto nepostradatelný mechanismus probíhající v tělech organismů. Některé buňky jsou apoptózou eliminovány během vývoje embrya, např. během morfogeneze prstů. Jindy apoptóza umožňuje metamorfózu jako například u žab (Kashiwagi a kol., 1999).

Během vývoje obratlovců vzniká více neuronů, než je potřeba. Následně 20 – 80% z nich zemře apoptózou (Gordon, 1995; Clarke a kol., 1998). Fetální neurony pak soutěží o růstové faktory produkované buňkami. Neurony, které vytvoří synapsi s jinou buňkou, mají růstového faktoru dostatek, ostatní zanikají.

Další fyziologické procesy, kde apoptóza hraje významnou roli, jsou například atrofie mléčné žlázy po ukončení laktace, odlupování endometria během menstruace, smrt neutrofilů během zánětlivé odpovědi a ničení autoreaktivních T-buněk v thymu (Kashiwagi a kol., 1999; Saikumar a kol., 1999).

Za patologických okolností mohou být poruchy programované buněčné smrti příčinou vzniku mnohých onemocnění. Patologickou apoptózu lze rozdělit na excesivní, předčasnou nebo oddálenou, tedy inhibovanou. Příkladem předčasné apoptózy mohou být neurodegenerativní onemocnění, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, dále inzulin-dependentní diabetes mellitus, ateroskleróza či myelodysplastický syndrom. Apoptóza oddálená či inhibovaná je charakteristická především pro maligní onemocnění. Bývá pro ni typická přílišná exprese anti-apoptotických faktorů nebo mutace v genech proteinů zprostředkávajících vnitřní část apoptické kaskády. Defektní apoptóza se také vyskytuje u autoimunitních onemocnění, jako jsou glomerulonefritidy, systémový lupus erythematosus a dále u virových onemocnění způsobených herpesviry, poxviry a adenoviry (Thompson, 1995).

### **3. Signální dráhy apoptózy**

Celý proces apoptózy je velmi složitě a víceúrovňově geneticky kódován. Účastní se ho velký počet genů a jimi regulovaných proteinových cytoplazmatických a membránových makromolekul. Apoptóza je vždy zahájena tzv. signální fází, která představuje ještě reverzibilní okamžik apoptotické kaskády a během níž je ještě možné buněčné smrti zabránit. Proces programované buněčné smrti může být spuštěn vnější a/nebo vnitřní signální dráhou.

#### **3.1. Vnější signální dráha**

Vnější signální dráha je někdy nazývána též cestou přes receptor smrti. Receptory smrti a jejich ligandy mají zásadní úlohu v iniciaci apoptózy. Tyto receptory patří do rodiny receptorů pro TNF (tumor nekrotizující faktor). Jsou charakteristické přítomností domén bohatých na cystein, který zprostředkovává vazbu mezi receptorem a ligandem (Jin a El-Deiry, 2005). Mezi hlavní zástupce receptorů smrti patří TNF receptory, Fas receptory a TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) receptory. Mají funkci senzorů, které po obdržení extracelulárního signálu (prostřednictvím navázání svých ligandů) vedou k rychlé iniciaci apoptózy v buňce. Signální dráhy jednotlivých receptorů se v určitých aspektech liší, stejně jako míra jejich zastoupení ve fyziologické regulaci apoptózy, nicméně jednotící prvky lze vysledovat u všech tří receptorových typů. Obsazení receptoru smrti vede k oligomerizaci receptorů v membráně a aktivaci jejich specifických cytoplazmatických domén. Ty reagují s adaptorovými proteiny obsahujícími tzv. doménu smrti (DD- Death domain), jako jsou FADD (Fas-associated death domain), TRADD (TNFR-associated death domain) či Apaf-1 (apoptotic

protease-activating factor-1). Spojení několika receptorů s adaptorovými proteiny indukuje agregaci proteinů prokaspáz (zejména prokaspázy-8 a -10) a vznik komplexu DISC (Death-inducing signaling complex). Dimerizace prokaspáz v komplexu DISC vede k jejich autoaktivaci. Aktivované kaspázy se uvolňují do cytoplazmy ve formě heterotetrameru. Působením aktivovaných kaspáz následně dochází k aktivaci vlastních efektorových kaspáz apoptózy (kaspáza-3, -6 a -7) a spuštění kaspázové kaskády (Jin a El-Deiry, 2005).

Rozlišujeme tři hlavní vnější apoptotické dráhy podle typu receptoru, který využívají:

- TNF dráha
- Fas dráha
- TRAIL dráha

## **TNF dráha**

TNF je multifunkční pro-zánětlivý cytokin, který je produkován převážně makrofágy. Může vyvolat široké spektrum biologických odpovědí. Existují dva hlavní receptory pro TNF, TNF-R1 a TNF-R2. TNF-R1 je téměř všudypřítomný. Je exprimován téměř ve všech tkáních a je hlavním prostředníkem TNF signální dráhy (viz obr. 2). Receptor TNF-R2 se nachází především v imunitním systému a může být plně aktivován pouze pomocí TNF navázaného na membránu, nikoliv rozpustnou formou TNF (Wajant a kol., 2003). Po spojení receptoru s ligandem dochází k oligomerizaci. Receptory pro TNF tvoří komplex sestávající z adaptorového proteinu TRADD, RIP kinázy (receptor-interacting protein) a proteinu TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) (Wajant, 2003).

TNF-R1 komplexy mají schopnost maskovat se navázáním SODD (silencer of death domain). Navázání TNF způsobí uvolnění SODD. Adaptorový protein TRADD obsahující doménu smrti se pak připojí k doméně smrti receptoru TNF-R1 (Hsu a kol., 1995). RIP a C-terminální doména proteinu TRAF2 také interagují s TNF-R1 prostřednictvím domény smrti (Wajant a kol., 2003).

TNF nespouští buněčnou smrt samovolně. Aktivuje faktor NF- $\kappa$ B tím, že ubikvitinuje a degraduje jeho inhibitor, I $\kappa$ B. Tato aktivace zprostředkuje silnou signalizaci pro přežití buňky (Wajant a kol., 2003). Cytotoxický efekt TNF se projeví pouze v případě, kdy je aktivace NF- $\kappa$ B blokována, např. inhibicí syntézy proteinu NF- $\kappa$ B (Wang a kol., 1996).

Apoptóza indukovaná prostřednictvím TNF-R1 je založena na dvou signálních komplexech. První komplex aktivuje NF- $\kappa$ B, následně dojde k inhibici kaspázy-8 prostřednictvím FLIP a buňka přežívá. V druhém komplexu TRADD a RIP interagují s FADD a kaspázou-8 (Micheau a kol., 2002). Aktivace kaspázy-8 podněcuje další kroky apoptózy.

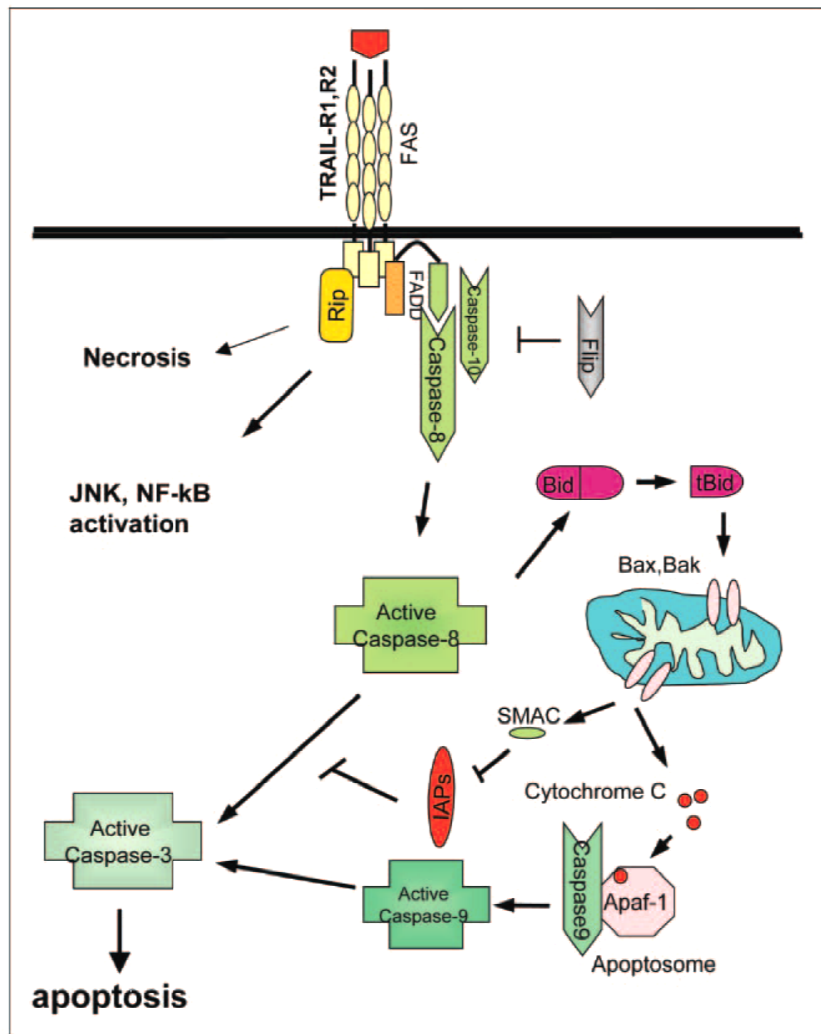
## **Fas dráha**

Fas má významnou roli ve fyziologické regulaci apoptózy. Účastní se ničení zánětlivých buněk a zabíjení buněk prostřednictvím cytotoxických T-lymfocytů (např. virem infikovaných buněk). Některé typy nádorů jsou schopné exprimovat Fas-L (Fas Ligand). Tento mechanismus zřejmě vyvinuly, aby unikly pozornosti útočících lymfocytů (Jin a El-Deiry, 2005).

Navázáním Fas-L dojde k trimerizaci receptoru, která vzápětí způsobí shlukování domén smrti. Tato doména, FADD a kaspáza-8 jsou klíčové komponenty komplexu DISC. Navázání Fas-L, trimerizace Fas a seskupení FADD a dimeru kaspázy-8 vede k autoprotolytickému štěpení kaspázy-8, následovaného uvolněním aktivních proteáz. Výsledkem je uvolnění kaspázy-8 z DISC komplexu ve formě aktivního heterotetrameru (Jin a El-Deiry, 2005).

## **TRAIL dráha**

Role TRAIL receptoru (TRAIL-R) není stále ještě dokonale prozkoumána. Stejně jako Fas, i TRAIL se podílí na imunitní odpovědi. Data nasvědčují tomu, že TRAIL hraje roli v zabíjení nádorových buněk pomocí NK buněk (Natural Killer) a makrofágů. Bylo identifikováno pět různých TRAIL receptorů. Všechny tyto receptory vykazují vysokou homologii svých extracelulárních domén. Můžeme je rozdělit do dvou skupin, receptory indukující smrt (TRAIL-R1 a TRAIL-R2) a receptory inhibující smrt (TRAIL-R3, TRAIL-R4 a osteoprotegerin). Navázání TRAIL k receptorům indukujícím smrt formuje komplex DISC. Následně dochází k aktivaci kaspázy-8 a -3 a rychlé apoptóze. TRAIL-indukovaná apoptóza může být stejně jako Fas-indukovaná apoptóza propojená s vnitřní apoptotickou dráhou (Thomas a Hersey, 1998; Jin a El-Deiry, 2005).



Obr. 2. Zjednodušené schéma vnější signální dráhy jdoucí přes Fas/TRAIL receptory smrti. Čáry zakončené plnou šipkou představují pozitivní interakce jednotlivých členů apoptotické kaskády, čáry zakončené kolmicí interakce negativní. Podle Jin a El-Deiry, 2005.

### 3.2. Vnitřní signální dráha

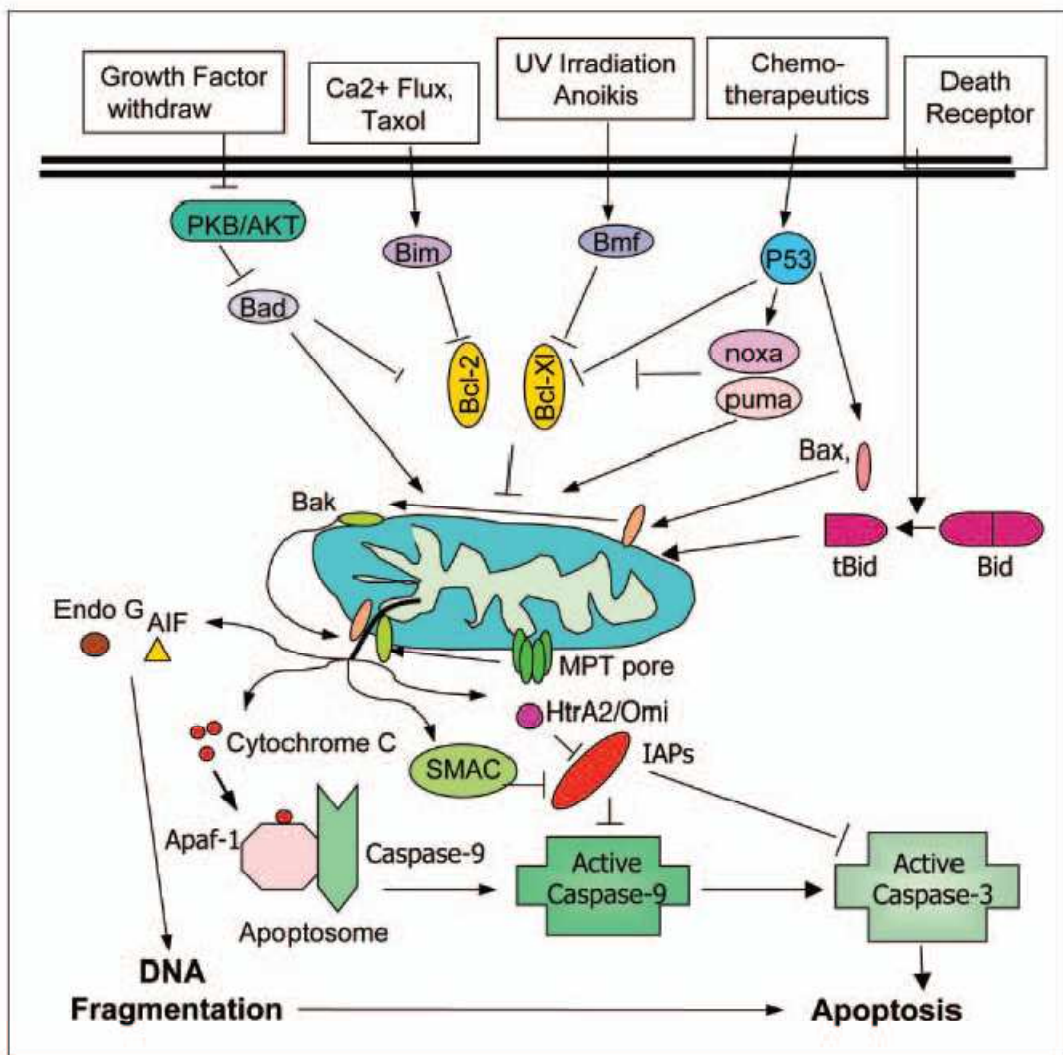
Vnitřní signální dráha začíná uvnitř buňky. Nejdůležitějším bodem této dráhy je mitochondrie (Jin a El-Deiry, 2005). Je v zásadě aktivována dvěma způsoby: permeabilizací vnější mitochondriální membrány navozenou různými událostmi nebo přímým poškozením jaderné DNA vlivem různých metabolitů, toxinů, volných radikálů a jiných mutagenních sloučenin. Gogvadze a kol., (2009) uvádí, že volné kyslíkové radikály se také podílí na permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. V případě poškození DNA a spuštění apoptózy hraje klíčovou roli gen p53 a jím kódovaný stejnojmenný protein. V případě mitochondriální vnitřní signální dráhy je dominantní událostí uvolnění cytochromu c (cyt c) do cytoplazmy a spuštění řady následných kroků. Protein p53

transkripčně reguluje několik proapoptotických genů. Jeho mutaci můžeme najít u velkého množství nádorů (Muller a kol., 1998).

Permeabilizace vnější mitochondriální membrány je zprostředkována a kontrolována převážně proteiny Bcl-2 rodiny. Vzájemný poměr pro- a antiapoptotických proteinů v buňce udává míru vnímavosti k apoptóze (Jin a El-Deiry, 2005). Pokud převáží exprese proapoptotických proteinů, dojde k jejich oligomerizaci a následné inzerci do OMM (outer mitochondrial membrane), což způsobí její permeabilizaci a vylití cyt c z intermembránového prostoru do cytoplazmy. To vede k otevření velkých iontových kanálů ve vnitřní (IMM-inner mitochondrial membrane) i vnější mitochondriální membráně. Dochází ke vtoku iontů a vody do matrix, mitochondrie bobtná a ztrácí svůj membránový potenciál. Mitochondriální membrána praská a dochází k uvolnění matrix do cytoplazmy buňky. Mitochondrie tak ztrácí svou základní úlohu, tedy produkci ATP v dýchacím řetězci. Současně se zvyšuje tvorba volných kyslíkových radikálů, které zbylé mitochondrie dále poškozují (Kleibl a kol., 2002; Holcik a kol., 2005).

Cyt c uvolněný do cytoplazmy se váže na protein Apaf-1 a za přítomnosti ATP/dATP vzniká komplex známý jako apoptozóm. Apaf-1 je adaptorová molekula vážící prokaspázu-9. Oligomerizací aktivovaná prokaspáza-9 posléze už jako kaspáza-9 aktivuje další, v rámci apoptotické kaskády konečné výkonné kaspázy (kaspázu-3, -6 a -7) (Jin a El-Deiry, 2005). Skrze póry v OMM se uvolňují do cytoplazmy také tzv. IAP antagonisté (IAP-inhibitors apoptosis proteins). Tito antagonisté se váží na IAP proteiny, a tím je inaktivují. IAP proteiny pak ztrácejí svoji funkci, tedy schopnost inhibovat apoptózu, neboť vazebné místo pro kaspázu je již obsazené. Mezi hlavní IAP antagonisty stimulující apoptózu patří proteiny Smac (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO, HtrA2/Omi a GSPT<sub>1</sub>/eRF<sub>3</sub>. Signální fáze apoptózy je ukončena aktivací proteinů nazývaných kaspázy. Ty jsou zodpovědné za proteolytickou degradaci intracelulárních proteinů. Kaspázy mají klíčový význam v celém procesu programované buněčné smrti a jejich aktivace zahajuje ireversibilní neboli rozkladovou fázi apoptózy („point of no return“) (Dvorská a kol., 2008).

Kromě proteinů aktivujících kaspázy uvolňují mitochondrie také proapoptotické proteiny, které s aktivací kaspáz nesouvisejí, např. protein AIF (apoptosis inducing factor). Je-li protein AIF uvolněn do cytoplazmy, translokuje do jádra, kde způsobí kondenzaci periferního chromatinu a fragmentaci DNA. V asociaci s teplotně labilním cytosolickým faktorem může AIF také permeabilizovat mitochondriální membránu (Susin a kol., 2000). AIF je nezbytný v první vlně programované buněčné smrti, důležité pro tvorbu tělních dutin a morfogenezi embrya. Protein endoG je také uvolňován z mitochondrie do cytosolu, translokuje do jádra a způsobuje fragmentaci DNA, aniž by byly přítomny aktivní kaspázy (Li a kol., 2001).



Obr. 3. Zjednodušené schéma vnitřní signální dráhy zprostředkované mitochondriemi. Čáry zakončené plnou šipkou představují pozitivní interakce jednotlivých členů apoptotické kaskády, čáry zakončené kolmicí interakce negativní. Bližší podrobnosti viz text. Podle Jin a El-Deiry, 2005.

### 3.3. Propojení vnější a vnitřní signální dráhy

V závislosti na požadavcích signální dráhy můžeme buňky rozdělit na dva typy. Buňkám I. typu stačí k iniciaci apoptózy aktivace kaspázy-8 v komplexu DISC. Buňky II. typu vyžadují k iniciaci apoptózy spolupráci vnitřní signální dráhy, kvůli nedostatečnému množství funkčního DISC komplexu. Přestože signály přes receptory smrti nejsou dostačující pro spuštění apoptózy, mohou aktivovat vnitřní signální dráhu přes proapoptotický protein Bid. Kaspáza-8 štěpí protein Bid. Ten se pak ve formě tBid přemístí do mitochondrie, což způsobí ztrátu její funkce, vylití apoptotických proteinů a formování apoptozómu (Gross a kol., 1999; Jin a El-Deiry, 2005).



Dalšími molekulami, propojujícími vnější a vnitřní signální dráhu, jsou proteiny uvolňované po permeabilizaci mitochondriální membrány. Typickým příkladem je protein Smac/DIABLO, uvolňovaný z mitochondrií při apoptóze navozené signalizací přes receptory smrti. Tento protein interaguje s jedním z inhibičních proteinů apoptózy, proteinem XIAP, a sekvestruje jej. XIAP následně nemůže inhibovat kaspázy-3 a -9, které tak podstoupí svou plnou proteolytickou aktivaci (Jin a El-Deiry, 2005).

Dalším příkladem je protein p53. Ten jako odpověď na poškození DNA aktivuje jak mitochondriální apoptotickou dráhu přes proteiny Puma (p53 up-regulated modulator of apoptosis) a Bax, tak vnější signální dráhu zvýšením exprese receptorů smrti a jejich ligandů (Taskiran a kol., 1997; Le a kol., 1999; Soda a kol., 1999).

Zajímavou roli v propojení obou signálních drah má kaspáza-8, jinak dominantní signalizační kaspáza vnější dráhy. V in vivo studiích se ukázalo, že jejím hlavním aktivátorem může být kaspáza-6, neboť inhibice této kaspázy výrazně snížila aktivitu kaspázy-8 a celkové nastartování apoptózy.

Jin a El-Deiry, (2005) uvádějí, že propojení vnější a vnitřní signální dráhy nasvědčuje tomu, že mnoho chemoterapeutik a stres-indukujících faktorů může způsobit větší citlivost buněk k signálům přicházejících skrz receptory smrti.

### 3.4. Regulace apoptotických drah

V průběhu celé apoptotické kaskády existuje několik kontrolních mechanismů. Vzájemný poměr pro- a antiapoptotických složek pak předurčuje definitivní osud buňky (viz obr. 3.).

Z hlediska spuštění či zastavení apoptózy jsou stěžejní proteiny Bcl-2 rodiny (Reed, 1994; Reed a kol., 1996).

Dalším faktorem, ovlivňujícím nástup buněčné smrti, jsou IAP proteiny. Jedná se o malé molekuly, které zabraňují aktivaci prokaspáz, a tak blokují nástup apoptózy těsně před zahájením rozkladové fáze. U člověka bylo popsáno osm typů těchto proteinů: HIAP-1 (Human inhibitor of apoptosis protein), HIAP-2, XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein), NIAP (Neuronal inhibitor of apoptosis protein), c-IAP1, cIAP2, survivin a livin. Nejlépe charakterizovaným a z hlediska inhibice apoptózy nejpotentnějším proteinem se zdá být XIAP. Tyto proteiny blokují apoptózu přímou vazbou a inhibicí některých kaspáz (LaCasse a kol., 1998).

Inhibitory těchto IAP proteinů byly již zmíněny výše. Během apoptózy jsou uvolňovány spolu s cyt c. Smac/DIABLO působí jako inhibitor vyvázáním IAP proteinů, kdežto Omi/HtrA2 proteiny IAP ireverzibilně štěpí. Proto je Omi/HtrA2 jako supresor apoptózy účinnější.

Další skupinou antiapoptotických proteinů jsou tzv. CARP proteiny. Jde o apoptotické inhibitory vážící a negativně regulující kaspázy-8 a -10. Apoptózu inhibují některé proteiny využívané virem pro obranu proti ataku hostitelským organismem. Patří mezi ně negativní regulátory kaspáz, jako

jsou proteiny crmA, P35 nebo v-FLIP. FLIP protein může například inhibovat TRAIL-indukovanou apoptózu (Micheau a kol., 2002; Jin a El-Deiry, 2005).

Zatímco iniciace apoptotické kaskády je závislá na aktivaci vnější a/nebo vnitřní signální dráhy, vlastní průběh apoptózy může být ovlivněn mnohými dalšími signálními kaskádami. Mezi nejdůležitější takové kaskády patří dráhy spojené s proteiny Myc, NF- $\kappa$ B, MAPK/JNK (mitogen-activated protein kinase / jun N-terminal kinase) a PI-3K/AKT (Le a kol., 1999). JNK, může fosforylovat proapoptotický protein Bad na threoninu 201, a tím zabránit jeho asociaci s antiapoptotickými proteiny. AKT má podobnou funkci, s tím rozdílem, že fosforyluje Bad na serinu 136 (Kirkin a kol., 2004).

Regulace apoptózy je velmi složitý děj a podílí se na ní ještě mnoho dalších molekul s různými funkcemi.

#### **4. Proteiny Bcl-2 rodiny**

Proteiny Bcl-2 rodiny mají stěžejní funkci v regulaci apoptózy. Antiapoptotický protein Bcl-2 byl primárně nalezen v B-buňkách maligního lymfomu (B-cell lymphoma), odtud tedy pramení i jeho označení (Dvorská a kol., 2008). Okolo 20-ti členů této rodiny nacházejících se v savčích buňkách je rozděleno do tří skupin – dvě skupiny apoptotických a jedna skupina antiapoptotických proteinů. Všechny proteiny obsahují alespoň jednu ze čtyř konzervovaných BH (Bcl-2 homologní) domén. BH domény korespondují s  $\alpha$ -helikálními segmenty, které určují strukturu a funkci těchto proteinů. Kromě BH domén vlastní někteří zástupci také transmembránovou doménu (TM). Díky tomu mohou být lokalizováni ve vnitrobuněčných membránách. 3D struktura členů Bcl-2 rodiny se skládá ze dvou centrálních převážně hydrofobních  $\alpha$ -helixů obklopených šesti nebo sedmi amfipatickými  $\alpha$ -helixy různých délek. Struktura Bcl-2 proteinů vykazuje podobnost s celkovým složením póry-formujících domén bakteriálních toxinů. (Reed, 1994; Chhieng a kol., 1996; Shimizu a kol., 1999; Jin a El-Deiry, 2005)

Antiapoptotičtí zástupci, zahrnující Bcl-2 protein a jemu příbuzné proteiny (Bcl-X1, Bcl-w, A1 a Mcl-1) podporují přežití buňky. Další dvě skupiny proapoptotických zástupců místo toho vyvolávají buněčnou smrt. Proteiny Bax, Bak a Bok, sdílejí s Bcl-2 proteinem tři BH domény, proto jsou označovány jako BH123 proteiny (Dvorská a kol., 2008). Další 10 (možná více) různorodých BH3-only proteinů dosud identifikovaných u savců, jako např. Bid, Bad a Bim, obsahuje pouze jednu krátkou BH3 doménu, nezbytnou a pravděpodobně dostačující pro indukci apoptózy. Antiapoptotické proteiny mohou zabránit buněčné smrti vyvázáním (sekvestrací) či neutralizací BH123 proteinů. V jejich struktuře najdeme tzv. hydrofobní „kapsičku“, která naváže BH3-doménu proapoptotických proteinů, a tím je inaktivuje (Danial a Korsmeyer, 2004).

Tab. 2. Přehled proteinů Bcl-2 rodiny

Skupina	Charakter	Domény	Zástupci
I	anti - apoptotické	BH1, BH2, BH3, (BH4), TM	Mcl-1
			Bcl-2
			Bcl-Xl
			Bcl-B
			Bcl-w
II	pro - apoptotické	BH1, BH2, BH3, TM	Bfl-1/A1
			Bok/MTD
			Bak
			Bax
III	pro - apoptotické	BH3, TM	Bcl-Xs
			Bcl-Rambo
			Bcl-G
			Bim
			Bid
			Puma
			Bmf
			Bad
			Bik
			Hrk
			Noxa
Spike			

#### 4.1. Skupina I – Bcl-2 a Bcl-2-like antiapoptotické faktory

Tato skupina zahrnuje proteiny Bcl-Xl, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-B či Mcl-1. Bcl-2-like antiapoptotické faktory jsou popisovány jako „k membráně připojené zametače“ proapoptotických proteinů (Kirkin a kol., 2004; Nishida a kol., 2005; Padmanabhan a kol., 2008). Obsahují tři až čtyři BH domény, nezbytné pro jejich antiapoptotickou funkci. Domény BH1 – BH4 zprostředkují interakci s dalšími proteiny a molekulami lokalizovanými na cytoplazmatické straně intracelulárních membrán, jako jsou OMM, endoplazmatické retikulum (ER) a jaderná membrána. Domény BH1 – BH3 tvoří hydrofobní kapsičku. N-terminální BH4 doména stabilizuje tuto strukturu zamaskováním ostatních hydrofobních částí. Mutační studie nasvědčují tomu, že BH4 doména je pro antiapoptotickou funkci nezbytně nutná. Nestrukturovaná smyčka mezi doménami BH3 a BH4 je předmětem fosforylace, vedoucí k inaktivaci jejich antiapoptotické funkce. Dalším posttranslačním regulačním mechanismem je kaspázou mediované proteolytické štěpení, čímž se odstraní N-terminální BH4 doména (Jin a El-Deiry, 2005). Tím jsou Bcl-2-like antiapoptotické faktory konvertovány na proapoptotické proteiny. BH3 domény proteinů I. skupiny jsou součástí jejich hydrofobní kapsy, což vysvětluje např. proč Bcl-2 a Bcl-Xl nemohou oligomerizovat. Mohou ale tvořit apoptózu-inhibující heterodimery s Bax a Bak (Jin a El-Deiry, 2005).

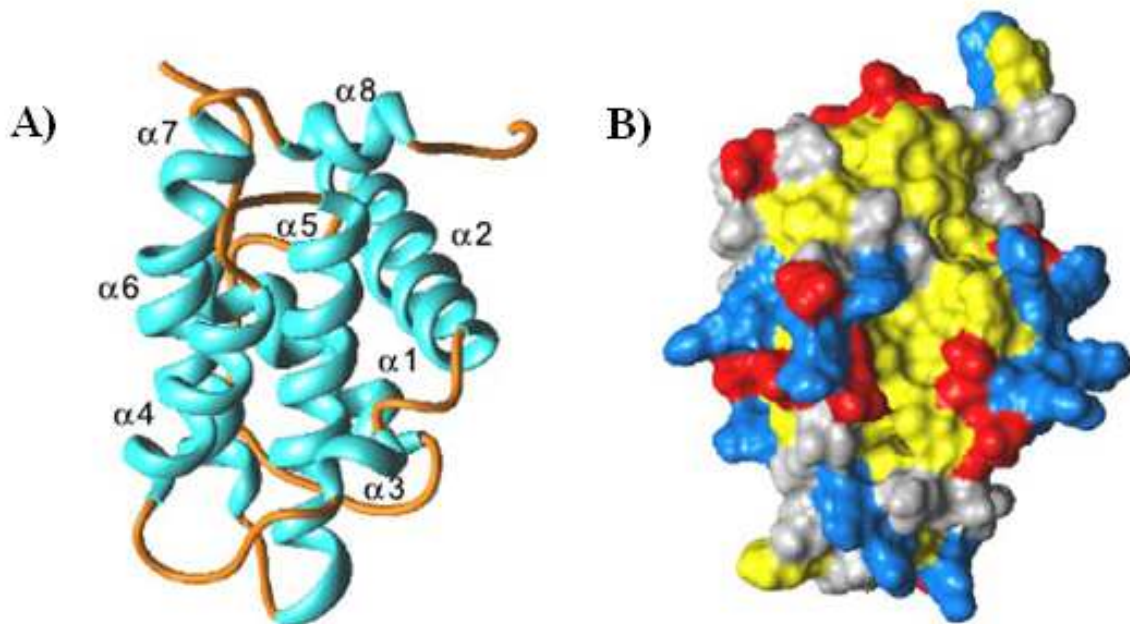
Na rozdíl od jiných onkogenů Bcl-2-like antiapoptotické faktory nepodporují proliferaci, ale spíše aktivně blokují apoptózu (Danial, 2007).

#### 4.1.1. Bcl-2

Bcl-2 protein je tvořen osmi  $\alpha$ -helixy a na svém povrchu má hydrofobní kapsu (obr.4). Tato hydrofobní kapsa je větší než u proteinu Bcl-Xl (Petros a kol., 2004). Bcl-2 se vyskytuje ve velkém množství různých tkání fétu, ale u dospělého člověka je jeho exprese zřejmě omezená jen na rychle se dělící a diferencující buňky. Jako Bax a Bak, je Bcl-2 také inzertován do OMM, ale zda za fyziologických podmínek přímo tyto proteiny váže, je zatím nejasné. Jisté ale je, že nějakým způsobem zabraňuje Bax/Bak oligomerizaci, která by jinak vedla k vylití apoptogenních molekul z mitochondrie (Danial, 2007).

Funkce Bcl-2 lokalizovaného v jaderné membráně je zatím nejasná. Jeho akumulace v ER ovlivňuje uskladňování  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Intracelulární množství  $\text{Ca}^{2+}$  iontů má vliv na průběh apoptózy (Danial, 2007). Výdej  $\text{Ca}^{2+}$  z ER je totiž často spojen s jeho vychytáváním mitochondrií a následnou inhibicí oxidativní fosforylace zvýšenou asociací inhibiční podjednotky ATP syntázy (Gogvadze a kol., 2009). Nadměrná exprese Bcl-2 je běžná u mnoha typů rakoviny a přispívá ke zvýšení resistance k chemoterapii.

Protein Bcl-2 se vyskytuje také v lidském endometriu, kde se cyklicky exprimuje, a to naopak než proapoptotické faktory. To znamená, že exprese Bcl-2 je nejvyšší během proliferativní fáze a během fáze sekreční je nejnižší (Ioffe a kol., 1998).



Obr. 4. (A) Stuhkový model Bcl-2 a (B) model povrchu Bcl-2 molekuly podle Connollyho v rozlišení 1,4 Å. Leucin, valin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, methionin a alanin jsou označeny žlutě; arginin, lysin, a histidin jsou modré; kyselina asparagová a glutamová jsou červené. Hydrofobní kapsa je znázorněna žlutě a tvořena aminokyselinovými zbytky uvedenými výše. Podle Petros a kol., 2004.

#### 4.1.2. Bcl-X

Pro Bcl-X existují dvě sestřihové varianty. Bcl-Xl (long form), který chrání buňky před apoptózou, a Bcl-Xs (short form), který nejspíš působí jako negativní regulátor Bcl-2, Bcl-Xl nebo obou (Kirkin a kol., 2004). Bcl-Xl je tvořen osmi  $\alpha$ -helixy spojenými různě dlouhými smyčkami. Dva centrální helixy ( $\alpha 5$  a  $\alpha 6$ ) tvoří jádro proteinu.  $\alpha 5$  i  $\alpha 6$  jsou převážně hydrofobní helixy a jsou obklopeny ostatními helixy ( $\alpha 1-4$ ). Nestrukturovaná smyčka mezi prvními dvěma helixy pravděpodobně nehraje roli v antiapoptotické aktivitě tohoto proteinu, na rozdíl od analogické smyčky u Bcl-2 proteinu (Petros a kol., 2004).

Studie mutací Bcl-Xl proteinu ukazují, že domény BH1 a BH2 jsou nutné pro heterodimerizaci s proapoptotickými členy rodiny (Petros a kol., 2004).

Pokles či vyřazení exprese Bcl-2 a Bcl-Xl stejně tak jako posílení exprese Bax způsobují nejen ústup nádoru, ale také umožňují vyšší citlivost k apoptózu-indukující léčbě, jako je např. chemoterapie nebo radioléčba (Kirkin a kol., 2004).

#### 4.1.3. Bcl-w

Stejně jako ostatní členy rodiny je Bcl-w také tvořen dvěma hydrofobními  $\alpha$ -helixy obklopenými amfipatickými helixy (Petros a kol., 2004).

U proteinu Bcl-w může být hydrofobní kapsa obsazená jeho vlastním C-koncem. V takové situaci BH3 ligand nejprve potřebuje tento C-konec odstranit. Tím může Bcl-w regulovat svou antiapoptotickou funkci. Ne všechny proteiny obsahující BH3 doménu tedy mohou za fyziologických podmínek interagovat s hydrofobní kapsou antiapoptotických Bcl-2 faktorů. Experimenty u myši ukázaly, že tento protein je nezbytný pro spermatogenezi (Kirkin a kol., 2004).

### 4.2. Skupina II – BH123 proteiny

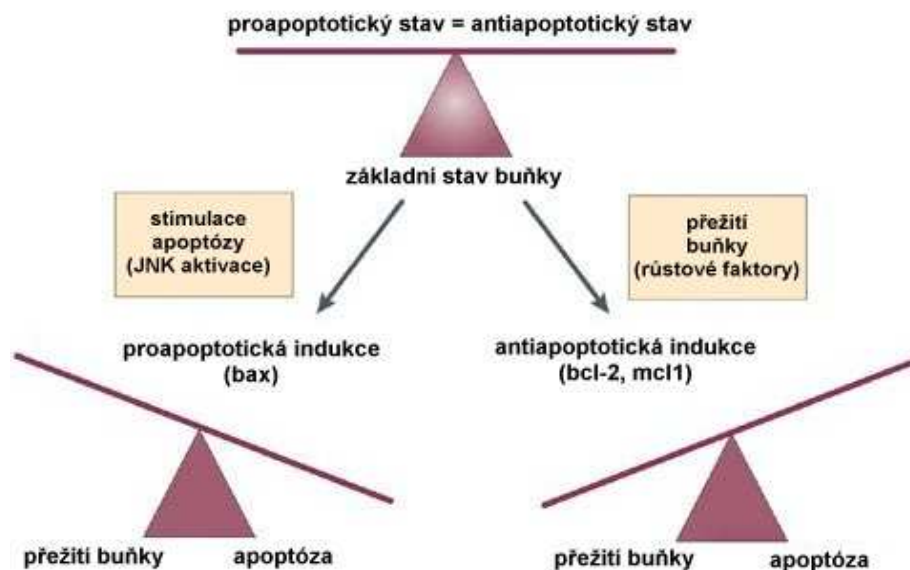
Proteiny této třídy obsahují domény BH1 – BH3. Tato podrodina Bcl-2 homologů hraje exkluzivně proapoptotickou roli a tvoří ji proteiny Bax, Bak a Bok, kdy Bax a Bak jsou exprimovány v mnohem větší míře (rozsáhleji). Exprese Bok se zdá být omezená pouze na reprodukční tkáň. Genetická data naznačují, že přítomnost Bax nebo Bak je nezbytná pro průběh apoptózy u většiny buněčných typů (Kirkin a kol., 2004). Buňky postrádající proteiny Bak i Bax nemohou uvolnit do cytoplazmy cyt c a odolávají všem apoptotickým podnětům, které aktivují vnitřní apoptotickou dráhu. Některé studie poukazují na autoaktivaci těchto proteinů, tedy že aktivní konformery proteinů Bax a Bak mohou následovně aktivovat další Bax a Bak molekuly (Danial, 2007).

#### 4.2.1. Bax

Bax je tvořen ze sedmi amfipatických helixů seskupených okolo dvou centrálních, převážně hydrofobních  $\alpha$ -helixů (Petros a kol., 2004). V buňkách zdravé primární tkáně se Bax vyskytuje jako monomerní cytosolický protein, který po apoptotickém stimulu mění svoji konformaci a translokuje do mitochondrie (Kirkin a kol., 2004; Nishida a kol., 2005; Padmanabhan a kol., 2008). Zajímavé je, že u většiny buněčných kultur je nezanedbatelná část Bax přítomna v mitochondrii i bez apoptotického podnětu. Bax je schopný složit svůj C-terminální konec do své hydrofobní kapsy a předstírat tak vazbu na Bcl-2 protein. Tím se chrání před vazbou na membránu (Kirkin a kol., 2004).

Stresové signály pak přimějí C-konec k uvolnění se z kapsy a zprostředkují integraci Bax do mitochondriální membrány a jeho následnou oligomerizaci. Bylo zjištěno, že translokace Bax proteinu do mitochondrie může být spuštěna zvýšením intracelulárního pH, navozeného např. vyčerpáním cytokinů (Petros a kol., 2004). Zda Bax oligomery tvoří póry nebo ovlivňují již existující mitochondriální kanály, zůstává otevřenou otázkou, ale v každém případě dochází k uvolnění apoptogenních faktorů jako např. cyt c. I to, zda BH123 proteiny vůbec potřebují ke své funkci oligomerizovat, je předmětem diskuze. Kuwana a kol. na příklad vyvodili ze svých studií, že výdej mitochondriálních proteinů během apoptózy může být zprostředkovaný supramolekulárními otvory v OMM. Bax je podle nich aktivovaný BH3-only proteinem Bid a pro mitochondrii specifickým lipidem kardiolipinem (Kuwana a kol., 2002; Kuwana a kol., 2005). Zdá se, že oligomerizace není pro funkci proteinu Bax nezbytně nutná (Kirkin a kol., 2004). Existují i další alternativní mechanismy tvorby membránových pórů. Bax pravděpodobně snižuje stabilitu lipidové dvojvrstvy snížením napětí uvnitř membrány, což ústí v tvorbu hydrofilních pórů (Danial, 2007).

BH3 doména Bax proteinu je sbalená do hydrofobní kapsy méně než u Bcl-Xl. Díky této flexibilitě se BH3 doména (C-konec) může navázat do hydrofobní kapsy Bcl-2-like antiapoptotických faktorů (Kirkin a kol., 2004). Takto je možné inhibovat Bax Bcl-2 proteinem. Při zvýšené expresi Bax však vznikají homodimery Bax/Bax, které naopak apoptózu usnadňují. Právě poměr Bcl-2 a Bax, někdy nazývaný „Bcl-2/Bax reostat“ (viz obr. 5.), je kontrolním bodem, po jehož překročení je proces apoptózy již ireverzibilní (Danial a Korsmeyer, 2004). Bax je transkripčně pozitivně ovlivňován tumor-supresorovým proteinem p53, avšak ten je u značné části kancerózních stavů mutovaný (Kirkin a kol., 2004).



Obr. 5. Apoptotický reostat. Základní stav buňky, při kterém je její pro- i antiapoptotické vyladění stejné a v rovnováze, závisí na vybalancování počtu proapoptotických (Bax) a antiapoptotických (Bcl-2) proteinů Bcl-2 proteinové rodiny. Podle Clarke a Tyler, 2009.

#### 4.2.2. Bak a Bok

Proteiny Bak a Bok jsou ve zdravých buňkách výhradně vázány k vnější mitochondriální membráně (případně membráně ER) a nevyžadují další přemístování v apoptotické buňce. Jakmile jsou volně připojené k membráně, podstoupí tyto BH123 proteiny aktivační konformační změnu, vedoucí k trvalé inzerci do membrány. Po zahájení buněčné smrti Bak podléhá dalším konformačním změnám a tvoří větší shluky. Tyto molekuly pak utvářejí kanály nebo interagují s kanál-formujícími proteiny a zvyšují permeabilitu OMM (Petros a kol., 2004). Protože se Bax i Bak nacházejí také v membráně ER, mohou hrát roli v  $\text{Ca}^{2+}$  homeostáze (Kirkin a kol., 2004).

Oligomerizace Bak monomerů je inhibována napětově ovládaným aniontovým kanálem (VDAC - Voltage dependent anion channel). BH3-only proteiny mohou VDAC navázat a odstavit ho od Bak proteinu. Následují konformační změny nutné pro aktivaci Bak proteinu (Danial, 2007).

#### 4.3. Skupina III – BH3-only proteiny

Do III. skupiny patří proteiny Bid, Bim, Bmf, Bad, Bik, Puma a Noxa. BH3-only proteiny sdílejí s dalšími členy Bcl-2 rodiny pouze BH3 doménu. S výjimkou proteinů Bid a asi i Bim pravděpodobně fungují tak, že váží a neutralizují Bcl-2-like antiapoptotické faktory. Mohou být aktivovány různými mechanismy, např. regulací na úrovni transkripce nebo proteolytickým

rozštěpením. Spouští apoptózu jako odpověď na nedostatek výživy, intracelulární poškození nebo v rámci ontogeneze (Petros a kol., 2004; Jin a El-Deiry, 2005).

Po indukci a oligomerizaci Bax a Bak nezůstávají tyto proteiny dále asociovány se svými aktivačními molekulami (Danial, 2007).

#### **4.3.1. Bid**

Bid může také inaktivovat Bcl-2-like antiapoptotické faktory, ale navíc tvoří v mitochondriální membráně homotrimery, což může způsobit oligomerizaci Bak a Bax (Kirkin a kol., 2004). Bid se normálně vyskytuje v cytosolu v neaktivní formě. Jako odpověď na stimulus vnější apoptotické dráhy je proteolyticky štěpen kaspázou-8, odhalí svou BH3 doménu (Jin a El-Deiry, 2005), a tím je aktivován. Aktivovaná forma, tBid, je pak schopná translokovat do mitochondrie (Petros a kol., 2004). Protein Bid je tvořen dvěma centrálními hydrofobními  $\alpha$ -helixy obklopenými šesti amfipatickými helixy. Oproti Bcl-XL obsahuje Bid jeden hydrofobní helix navíc. Je lokalizován na povrchu, kde tvoří jakousi záplatu, na rozdíl od Bcl-2 a Bcl-XL, které mají ve stejném místě štěrbinu. Tato odlišnost by mohla vysvětlit, proč neštěpený Bid nemůže formovat homo- ani heterodimery. Aktivovaný fragment, tBid, postrádá první helix, malý pomocný helix a část nestrukturované smyčky (Petros a kol., 2004).

#### **4.3.2. Bim**

Bim váže proteiny Bcl-2 a Bcl-XL, a tím ruší jejich funkci. Pravděpodobně ale není schopný interagovat s Bax nebo Bak. Místo toho interaguje s napětově ovládaným iontovým kanálem VDAC, a tím ho aktivuje. Bim nachází uplatnění především při apoptóze lymfocytů (Kirkin a kol., 2004).

#### **4.3.3. Bmf**

Bmf je protein potřebný při apoptóze spouštěné oddělením buňky od jejího tkáňového okolí (anoikis) (Kirkin a kol., 2004). Bim a Bmf se za normálních podmínek váží na lehké řetězce dyneinu. V případě ozáření UV světlem (Puthalakath a kol., 1999) či při nedostatku cytokinů (Bim) nebo extracelulární matrix (Bmf) obě molekuly opouštějí své vazebné partnery a mohou neutralizovat Bcl-2-like antiapoptotické proteiny (Kirkin a kol., 2004).

#### **4.3.4. Puma a Noxa**

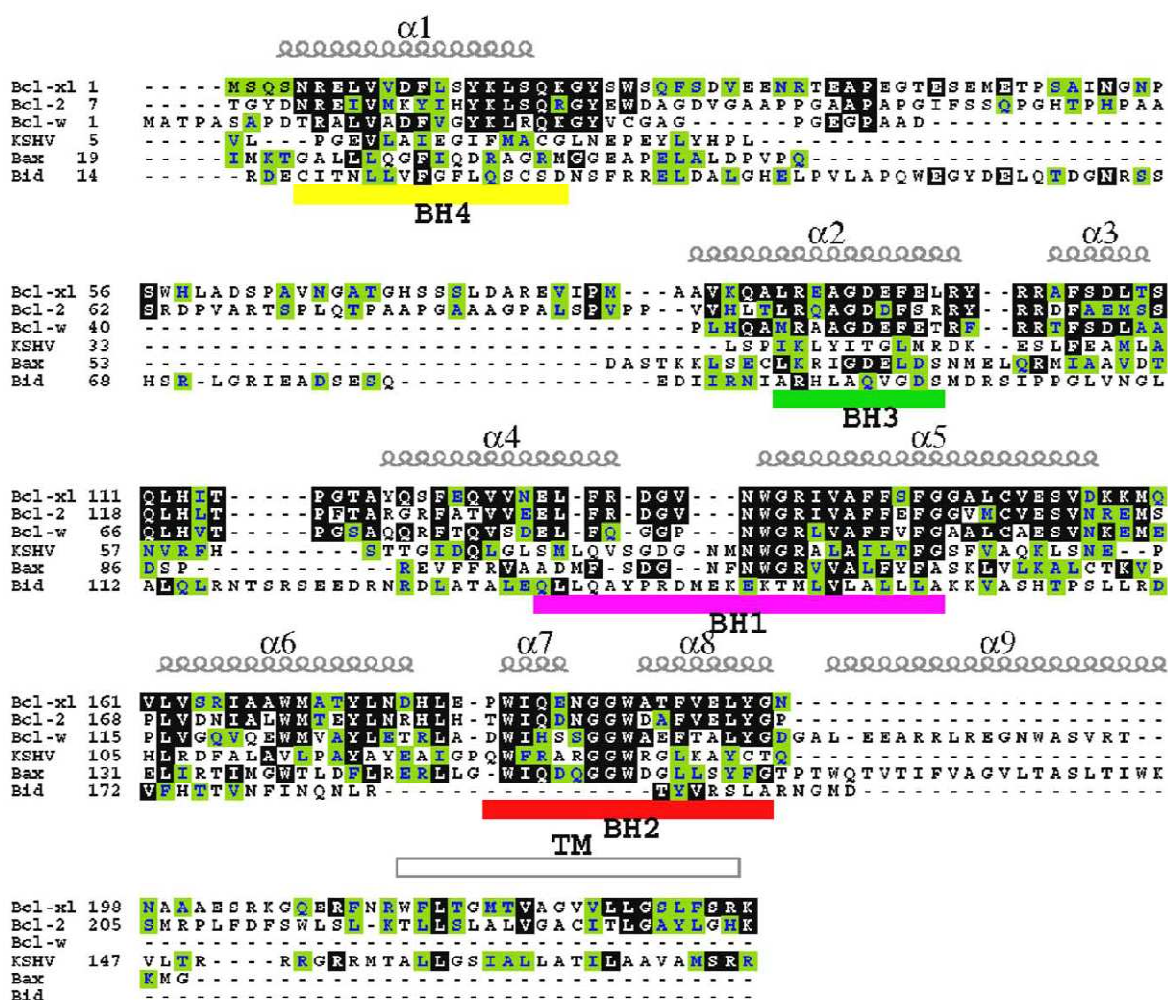
Aktivace proteinů Puma a Noxa je transkripčně regulována přímo proteinem p53. To odpovídá jejich roli specializovaných smrtících strážců během poškození DNA (Danial, 2007). Puma je aktivována apoptotickými stimuly souvisejícími s proteinem p53, tedy zejména s poškozením jaderné DNA. Může však být aktivována i stimuly na p53 nezávislými, jako jsou např. deplece růstových faktorů či podávání glukokortikoidů nebo forbolesteru (Ekoff a kol., 2007). Uvolňuje Bax a/nebo Bak



z inhibice antiapoptotickými Bcl-2 proteiny. Rovněž protein Noxa je aktivován p53-dependetním genotoxickým poškozením DNA a po své translokaci do OMM navodí výlev cytochromu c a následnou aktivaci kaspázy-9 (Seo a kol., 2003).

#### 4.3.5. Bad a Bik

Bad a Bik jsou dva BH3-only proteiny, které jsou regulovány fosforylací. Fosforylace Bad vede k sekvestraci navázáním 14-3-3 proteinu. Při vyčerpání cytokinů nebo extracelulární matrix je Bad defosforylován a uvolněn z vazby na protein 14-3-3. Pak je schopen interagovat s Bcl-2-like antiapoptotickými proteiny a bránit tak jejich interakci s BH123 proteiny (Kirkin a kol., 2004).



Obr. 6. Znamé sekvence proteinů Bcl-2 rodiny. Jednotlivé BH domény jsou znázorněny barevnými obdélníky. Vysoce konzervované aminokyselinové zbytky jsou vyznačeny černě, aminokyselinové zbytky, které mohou být nahrazeny jinými, zeleně. Spirálou jsou znázorněny  $\alpha$ -helixy, které mohou sloužit k ukotvení do membrány. Podle Petros a kol., 2004.

## **5. Apoptóza v onkogynekologii**

### **5.1. Studium apoptózy v gynekologickém materiálu**

Apoptóza byla poprvé popsána v lidském endometriu Hopwoodem a Lewisonem v roce 1975 (Kvasnička a Petrášek, 1995; Okano a kol., 2007). Na jejich poznatky navazuje řada dalších autorů. Shodně pak uvádí, že apoptóza je zcela ojedinělá v proliferacním endometriu, počet apoptotických buněk prudce stoupá v sekreční fázi a maxima dosahuje během fáze menstruační (Kvasnička a Petrášek, 1995; Okano a kol., 2007; Villavicencio a kol., 2007; Dvorská a kol., 2008).

Regulace apoptózy v tkáních ženských pohlavních orgánů je velice důležitá. Cyklicky probíhající apoptóza v endometriu je fyziologickým mechanismem důležitým pro regulaci remodelace této tkáně. Během menstruace nebo implantace blastocysty se eliminují nepotřebné a/nebo dysfunkční buňky. Apoptóza tak zajišťuje buněčnou homeostázu v lidském endometriu (Nishida a kol., 2005)

Studium apoptózy v gynekologii se nezabývá jen nádorovými stavy, ale nachází široké uplatnění také během implantace blastocysty a v průběhu gravidity. Studie prokázaly vliv choriového gonadotropinu a prostaglandinů na oddálení průběhu apoptózy během menstruačního cyklu a tím možnosti načasování při léčbě poruch plodnosti (Meijerink a kol., 1998; Okano a kol., 2007). Také je známo, že mnoho spontánních potratů v časně graviditě je způsobeno poruchou implantace (Tabibzadeh a Babaknia, 1995; Tabibzadeh a kol., 1995; Banaszak a kol., 2000).

Vědci rovněž zkoumali stupeň apoptózy v děložním myometriu, a to především v průběhu gravidity, kdy dochází k hypertrofii a hyperplasii buněk myometria. V publikaci Shynlova a kol. z roku 2006 byla provázena hyperplasia myocytů vzestupem antiapoptotických proteinů v první polovině gestace a hypertrofie buněk v druhé polovině gestace. Během třetího trimestru gravidity pak docházelo k nárůstu počtu apoptotických buněk a zvýšené expresi proapoptotických proteinů (Shynlova a kol., 2006).

Studium apoptózy v placentární tkáni informuje o rostoucím počtu apoptotických buněk v placentě v souvislosti s rostoucím gestačním stářím (Shynlova a kol., 2006). Smith a kol. ve své publikaci uvádí významný nárůst výskytu apoptotických buněk v placentární tkáni během třetího trimestru gravidity. Ve vzorcích odebraných z placentární tkáně u pacientek po 40. týdnu těhotenství byl nález aktivace mechanismu apoptózy téměř dvojnásobný (Smith a kol., 1997a; Smith a kol., 1997b).

### **5.2. Studium apoptózy v onkogynekologických materiálech**

Většina autorů prací o apoptóze v onkogynekologii využívá ve svých studiích znalostí exprese pro- a antiapoptotických proteinů (nejvíce proteinů Bcl-2 a Bax), jejich detekce imunohistochemickými metodami, a dále pak znalostí změn buněčné DNA. Nejčastější metodou

k detekci apoptózy ve světové literatuře je metoda TUNEL a elektroforéza DNA. Velkou neznámou však stále zůstává otázka role velmi složitých hormonálních regulací.

Waggoner a kol. (1998) se ve vzorcích světlobuněčného adenokarcinomu pochvy a čípku zabýval vztahem exprese (protoonkogenního) proteinu Bcl-2, inhibujícího apoptózu, a proapoptotického proteinu p53. Ve všech 21 zkoumaných vzorcích detekoval jak přirozenou formu proteinu p53, tak expresi proteinu Bcl-2, přičemž 18 z 21 zkoumaných vzorků bylo Bcl-2 silně pozitivních. Navzdory ve všech vzorcích exprimovanému proapoptotickému proteinu p53, známky apoptózy vykazovaly jen 4 z 21 zkoumaných nádorů. Světlobuněčné karcinomy často nadměrně produkují protein p53, což bez mutace jeho genu vede k indukci apoptózy a omezení maligního potenciálu nádoru. Výsledky Wagonnera a kol. naznačují, že zvýšená exprese proteinu Bcl-2 může inhibovat apoptózu zprostředkovanou proteinem p53, což umožňuje některým nádorům (např. primárnímu karcinomu pochvy) vzniknout i bez mutace genu pro protein p53.

Kokawa ve své práci z roku 2001 poprvé zavádí detekci proteinu Bax u hyperplazie a karcinomu endometria. Zvýšená exprese proteinu Bax byla průkazná u hyperplazií, jeho extrémně pozitivní exprese pak u karcinomů endometria. Z hlediska malignity nádoru byla exprese proteinu Bax vyšší při gradingu G3 než gradingu G1 a G2. Z této práce vyplývá, že zvýšená exprese Bax může indukovat Bcl-2 řízenou inhibici apoptózy (Kokawa a kol., 2001b).

Různí autoři se ve svých publikacích postupně zabývali účinkem progestinů, a to především v terapii hyperplasií endometria jako možného prekursoru karcinomu endometria. Progestiny indukovaná apoptóza v hyperplastických buňkách hraje důležitou roli především v prvních dnech terapie, poté tento efekt pozvolna klesá. Dysregulace exprese Fas/FasL v hyperplastickém endometriu se pravděpodobně podílí na nedostatečné odpovědi pacientů na terapii progestiny. Intermitentní, nikoliv kontinuální podávání gestagenů by podle těchto autorů mělo být při léčbě hyperplasií endometria mnohem účinnější (Watanabe a kol., 1997; Abe a kol., 2006).

### **5.2.1. Endometrióza**

Ačkoliv endometrióza nepatří mezi onkogynekologické stavy, většina prací věnovaných studiu apoptózy byla založena právě na endometrióze, a proto se zde o ní zmiňují.

Endometrióza, nemoc postihující 3-10% žen reprodukčního věku, je charakterizována ektopickým růstem endometriální tkáně (Watanabe a kol., 1997; Nishida a kol., 2005), tzn., že se endometrium vyskytuje mimo svou normální lokalizaci, tedy mimo vnitřní vrstvu děložní dutiny. Široce přijímaná teorie patogeneze endometriózy je ta, že endometrióza vzniká následkem implantace životaschopné endometriální tkáně v oblasti malé pánve cestou retrográdní menstruace (Nishida a kol., 2005). Retrográdní proud krve může do peritonea odklánět překážka odtoku krve z dělohy (polyp, stenóza hrdla děložního, změna polohy dělohy) nebo nešetrné vyšetřování. I neopatrný postup při operacích v oblasti dutiny břišní může způsobit rozšíření endometriálních buněk do okolí.

Retrográdní šíření endometriálních buněk bylo opakovaně prokázáno v mnoha klinických studiích. Tento jev se ale zdá být fyziologickým fenoménem, který se vyskytuje u všech žen bez ohledu na přítomnost endometriózy.

Endometriální buňky vyplavené během menstruace mimo děložní sliznici u zdravých žen nepřežijí díky programované buněčné smrti. Snížení apoptózy může vést k přežití těchto buněk implantovaných mimo dělohu a k rozvoji endometriózy. Endometriální buňky u žen s endometriózou vykazují zvýšenou proliferaci a zvýšenou schopnost implantace a přežití v ektopických oblastech. K abnormální implantaci a růstu endometria v ektopických oblastech přispívá snížená citlivost endometriální tkáně ke spontánní apoptóze. Neschopnost endometriálních buněk propustit smrtící signály i jejich schopnost vyhnout se buněčné smrti jsou spojené se zvýšenou expresí antiapoptotických faktorů a sníženou expresí proapoptotických faktorů. Nishida a kol. (2004) uvádějí, že apoptóza eutopických endometriálních buněk u endometriózy (ESCwE) a normálních endometriálních buněk (NESC) je významně indukována přidáváním rostoucího množství IFN- $\gamma$ . U ECSC (ovarian endometriotic cyst stromal cells) ale léčba IFN- $\gamma$  nemá žádný zřejmý efekt ani na progresi endometriózy, ani na apoptózu. Zajímavé je, že receptor pro IFN- $\gamma$  byl nalezen ve všech třech buněčných typech ECSC. Dále byla popsána zvýšená exprese antiapoptotických faktorů Bcl-2 rodiny (Bcl-2 a Bcl-X1) v ECSC. Ačkoliv přesný mechanismus resistance ECSC vůči IFN- $\gamma$ -indukované apoptóze není jasný, přítomnost receptoru pro IFN- $\gamma$  naznačuje dysregulaci následné intracelulární signální dráhy u těchto buněk. Bylo prokázáno, že IFN- $\gamma$  indukuje apoptózu mnoha buněčných typů regulací exprese apoptotických proteinů.

Ektopická i eutopická endometria žen s endometriózou vykazují některé základní odlišnosti od normálních endometrií. Tyto odlišnosti zahrnují strukturní anomálie, adhezní molekuly, proliferace, modulaci imunitního systému, proteolytických enzymů a jejich inhibitorů, produkce steroidů a cytokinů a schopnost na ně reagovat, genové exprese a produkce genů. Tyto odlišnosti mohou mít podíl na přežívání endometriálních buněk vyvržených do břišní dutiny a na vývoj endometriózy. Buňky a části tkáně odvozené z takto pozmeněného eutopického endometria mají vyšší potenciál pro implantaci a růst na povrchu peritonea.

## **5.2.2. Prekancerózy**

### **5.2.2.1. Hyperplázie**

Hyperplázie bývají označovány jako předstupeň kancerózní modifikace tkáně (prekancerózy). Hyperplázie se dělí v závislosti na abnormální architektuře žlázek na simplexní a komplexní. V závislosti na přítomnosti cytologických abnormalit se dělí na hyperplázii s atypii či bez atypii. Na procesu vzniku hyperplázie se účastní jak složka glandulární tak stromální (Danial a Korsmeyer, 2004; Cibula a Petruželka, 2009).

**Simplexní hyperplazie bez atypií** (prostá, cystická) je nejčastějším typem. Vyskytuje se především u premenopausálních žen, často ve spojení s anovulačními cykly. Histopatologicky je patrné zvětšení počtu žlázek, které jsou malé, uniformní, někdy cysticky dilatované, nepravidelně ohraničené, mitotická aktivita je srovnatelná jako v časně proliferální fázi menstruačního cyklu. Riziko progresse v karcinom endometria u simplexní hyperplazie bez atypií je velmi nízké, kolem 0-1% (DiSaia a Tewari, 2001).

**Komplexní hyperplazie bez atypií** (adenomatózní) se vyskytuje častěji u peri- a postmenopausálních žen. Histopatologicky jsou charakteristické velmi nepravidelně ohraničené, strukturálně složité a různorodé žlázy s minimálním množstvím stromatu. Riziko malignizace komplexní hyperplazie bez atypií se udává 1-3,4% (DiSaia a Tewari, 2001).

**Atypická hyperplazie** je nejčastěji diagnostikována u žen v perimenopauze. Podle histologické architektury se dělí na simplexní a komplexní. Pro histologickou diagnostiku je určující přítomnost buněčných atypií (jaderné atypie, anizokaryóza, nepravidelnosti mitóz atd.). Riziko progresse v karcinom endometria je relativně vysoké, udává se u simplexní hyperplazie s atypiiemi kolem 8%. U komplexní hyperplazie s atypiiemi se riziko progresse v karcinom udává 22-34%. Histopatologicky je často popsána koexistence atypické hyperplazie a karcinomu endometria.

#### **5.2.2.2. Syndrom polycystických ovárií (PCOS)**

Funkce endometria u žen s PCOS se liší od normálního endometria a je v souladu s nízkým reprodukčním potenciálem, vysokým stupněm spontánních potratů a s predispozicí k hyperpláziím a karcinomům. Endometriální buňky žen s PCOS bez a s hyperplázií exprimující Bcl-2 mohou mít větší schopnost přežít než endometriální buňky pacientek s hyperplázií samotnou. (Watanabe a kol., 1997; Villavicencio a kol., 2007)

#### **5.2.3. Karcinomy**

Rodidla ženy jsou náchylná na vznik benigních a maligních nádorů. Souvisí to s progresivními a regresivními změnami, které v nich probíhají účinkem hormonů a neurohumorálních faktorů. Jejich výkyvy mohou lehce překročit fyziologické hranice. Vznik nádorů mohou podmiňovat exogenní faktory, zejména v souvislosti s ontogenezí. Určitý podíl na jejich etiopatogeneze mají i záněty. Nádory lze rozdělit podle lokalizace na nádory vulvy, pochvy, dělohy, vejcovodů a vaječnicků. Podle klinických projevů se dělí na benigní a maligní.

### 5.2.3.1. Karcinom endometria

Karcinom endometria je nejčastějším zhoubným nádorem děložního těla a po karcinomu prsu druhou nejčastěji se vyskytující onkogynekologickou malignitou. Jeho incidence má v naší zemi, stejně jako v ostatních vyspělých zemích, trvale vzestupný charakter. V České republice je ročně diagnostikováno kolem 1700 nových onemocnění, incidence se pohybuje kolem 32/100 000 žen za rok. I přes zvyšující se incidenci je však patrná stagnace, ba mírný pokles mortality. Mortalita je v porovnání s incidencí relativně nízká (6,7/100 000 žen za rok). Ročně tedy zemře v České republice na toto onemocnění kolem 390 žen (Cibula a Petruželka, 2009). Zhoubné nádory děložního těla jsou hlavně onemocněním vyššího věku s maximem výskytu po menopauze. Věkový medián při stanovení diagnózy je 61 let, při maximu výskytu mezi 50.-59. rokem věku. S prodlužující se délkou života narůstá také absolutní počet žen v rizikové skupině. Stoupající incidenci tohoto onemocnění lze vysvětlit nárůstem počtu žen v období postmenopausy a zvýšenou expozicí rizikovým faktorům (Cibula a Petruželka, 2009; DiSaia a Tewari, 2001; Kokawa a kol., 2001a). Většina endometriálních karcinomů se vyskytuje náhodně, ale odhaduje se, že 5% žen, které byly diagnostikovány na karcinom endometria ve věku nižším než 55 let, mělo tento druh rakoviny v rodině. V 10 – 15% všech případů karcinomu endometria se vyskytuje rozšíření karcinomu i na hrdlo děložní (DiSaia a Tewari, 2001).

Patogeneze karcinomu endometria, stejně jako všech zhoubných novotvarů, je procesem multifaktoriálním. Známé rizikové faktory zahrnují obezitu, hypertenzi, diabetes mellitus, pozdní menopauzu, užívání estrogenů (Bansal a kol., 2009) a bezdětnost. Zajímavostí, která úzce koreluje se znalostmi o rizikových faktorech vzniku karcinomu endometria je, že průměrný BMI u žen s karcinomem endometria je 30,5 – tedy pásmo I. stádia obezity (Cibula a Petruželka, 2009). Histopatologicky karcinom endometria rozdělujeme do dvou základních typů:

Typ I. (80%) je hormonálně dependentním typem karcinomu se vztahem k absolutnímu či relativnímu hyperestrismu. Postihuje převážně ženy v období perimenopausy. Vzniká v terénu hyperplastického endometria. Většinou se jedná o dobře diferencovaný adenokarcinom. Tento typ má relativně dobrou prognózu. Tyto karcinomy jsou charakterizovány různými genetickými alternacemi (viz obr. 7.), z nichž nejčastější je mutace genu pro PTEN (phosphatase and tensin homolog). Gen pro PTEN je změněn ve více než 83% karcinomech I. typu (viz tab. 3.). Zatímco mutace v genech PTEN, MSI a K-ras se často objevují společně, mutace v  $\beta$ -kateninu bývají často viděny samostatně.  $\beta$ -katenin (cadherin-associated protein), člen skupiny E-kadherinů, je nezbytný pro buněčnou diferenciaci a údržbu normální tkáňové architektury. Výsledkem mutace v genu pro  $\beta$ -katenin je stabilizace tohoto proteinu, který pak odolává degradaci, hromadí se v jádře a v cytoplazmě a váže se na transkripční faktory, kde slouží jako protoonkogen (Bansal a kol., 2009).

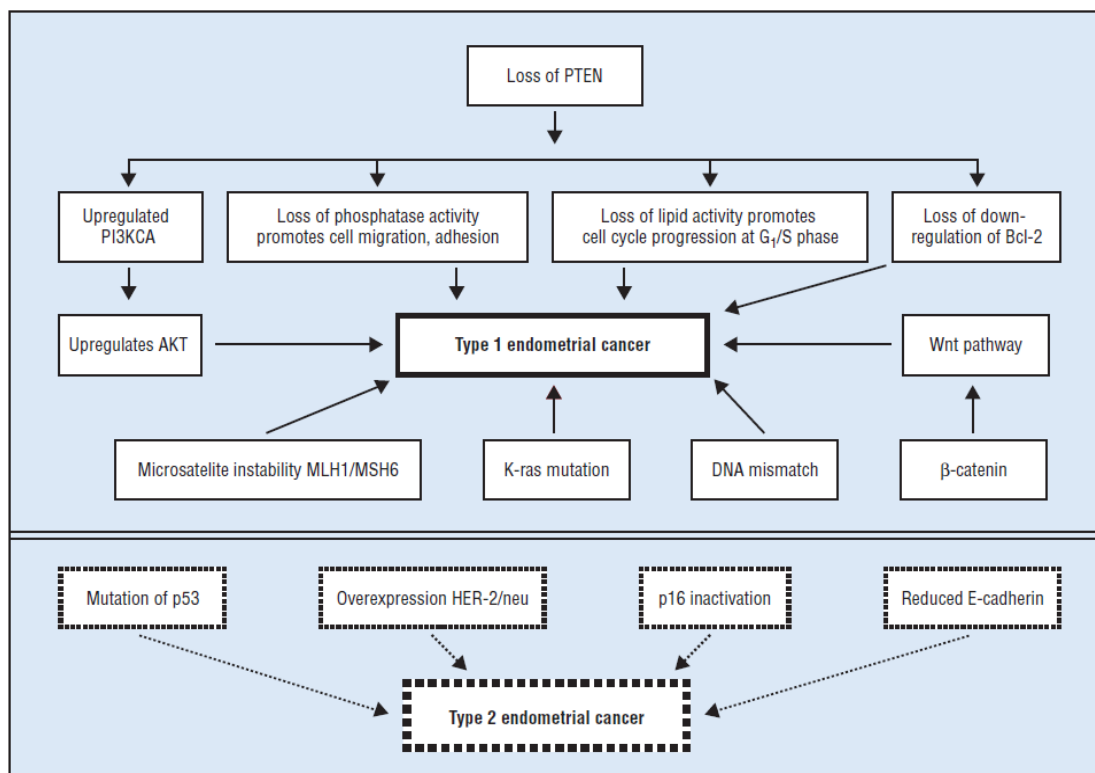
Typ II. (15%) vzniká na podkladě atrofického endometria a bez spojitosti s estrogenní expozicí. Postihuje především starší ženy. Většinou jde o jiný typ než adenokarcinom, např. serózní a světlobuněčný adenokarcinom. Jedná se o agresivnější variantu, jejíž invaze bývá hlubší. Prognóza u tohoto typu karcinomu je mnohonásobně horší. U tohoto typu karcinomu je nejčastěji se vyskytující alternací mutace genu p53. Ta se vyskytuje asi v 90% serózního karcinomu (Bansal a kol., 2009) (viz tab. 3.).

Genetic Alteration	Type 1 Carcinoma (%)	Type 2 Carcinoma (%)
PTEN inactivation	50–80	10
K-ras mutation	15–30	0–5
β-catenin mutation	20–40	0–3
Microsatellite instability	20–40	0–5
p53 mutation	10–20	80–90
HER-2/neu	10–30	40–80
p16 inactivation	10	40
E-cadherin	10–20	60–90

Tab. 3. Genetické změny karcinomu endometria: frekvence genetických mutací identifikovaných u typu I a II karcinomu endometria v procentech. Podle Bansal a kol., 2009.

Jiang a kol. (2007) ve své práci uvádějí, že u obou typů endometriálního karcinomu jsou schopny indukovat apoptózu inhibitory histon-deacetylázy (HDAC), jako oxamflatin a HDAC inhibitor-1. HDAC inhibitory spouštějí buněčnou smrt obnovením integrity apoptotických drah, které bývají u karcinomů potlačeny nebo úplně blokovány. Aktivují antiapoptotický protein Bid, mediátor porušení mitochondriální membrány. HDAC inhibitory také výrazně snižují expresi genu pro Bcl-2 protein (Jiang a kol., 2007).

Dalším typem je karcinom endometria jako součást hereditárního syndromu (5-10%). Jedná se o familiární či genetický typ, který vzniká jako druhá nejčastější malignita při Lynch syndromu (taktéž HNPCC – hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome). Toto onemocnění se dědí autosomálně dominantně. Ženy nesoucí tuto mutaci mají celoživotní riziko vzniku karcinomu endometria 40-60%. Tento typ karcinomu je příbuzný typu I (Liu, 2007).



Obr. 7. Molekulární podstata endometriálního karcinomu typu I a II. Plné šipky znázorňují příčiny karcinomu endometria I. typu a tečkované šipky příčiny karcinomu II. typu. Podle Bansal a kol., 2008

Kendrick a kol. (2007) ve své práci zkoumali léčbu gynekologických karcinomů pomocí TRAIL. Uvádějí, že buňky léčené pomocí TRAIL podstupují apoptózu snáz než buňky léčené doxorubicinem nebo paclitaxelem. A co je důležité, TRAIL nezabíjí normální endometriální buňky (Kendrick a kol., 2007).

### 5.2.3.2. Karcinoma in situ (CIS) – intraepiteliální, preinvazivní karcinom

CIS endometria je prekancerózou pro karcinom II. typu. Je vzácným nálezem v atrofickém endometriu u postmenopauzálních žen. Roli v etiopatogenezi CIS pravděpodobně hraje kumulace mutací související s věkem (Massad a kol., 2009; Yemelyanova a kol., 2009).



## 6. Závěr

Apoptóza je proces velmi široce ovlivňující fyziologický stav organismu. Čím více je o ní známo, tím více nabývá svého významu. Sice již dnes není studována tak horlivě jako před deseti lety, nicméně stále se její regulací zabývá spousta biologů i lékařů. Vysvětlení je jednoduché. Apoptóza umožňuje, aby v těle přežilo právě tolik buněk, kolik je potřeba, ani moc, ani málo. Je-li však některý z kroků apoptózy porušen, dochází k vážným nemocem. V případě, že apoptóza probíhá v dané tkáni u dospělého člověka rychleji nebo ve zvýšené míře než proliferace, dochází k různým autoimunitním či neurodegenerativním onemocněním. Nadměra apoptózy se vyskytuje také u AIDS. Pokud je naopak apoptóza utlumená a probíhá málo nebo dokonce vůbec, výsledkem je, dnes bohužel už téměř běžná nemoc, rakovina. V ČR je rakovina druhou nejčastější příčinou úmrtí, hned po kardiovaskulárních nemocech, a každý rok na ni v České republice umírá okolo 30 tisíc lidí. Nádorová buňka dostává signály k růstu, je necitlivá k inhibitorům růstu, je schopná vyhnout se apoptóze i obelhat imunitní systém. Proto boj proti rakovině není vůbec jednoduchý.

Regulace apoptózy se účastní obrovské množství různých molekul. Mezi významné regulátory patří proteiny Bcl-2 rodiny, které regulují apoptózu pozitivně i negativně. Ačkoliv se od sebe jednotlivé členy liší jak sekvencí aminokyselin, tak funkcí, mají pozoruhodně podobné uspořádání (3D strukturu). Jednotlivé regulační faktory se vzájemně ovlivňují a jejich působení je často ovlivněno mnoha dalšími vlivy. Proto je studium apoptózy tak komplikované. Nicméně pochopení apoptotických procesů by mohlo v budoucnosti vést k vývoji nových a účinnějších terapeutik. Jak již bylo řečeno, nádorová buňka je vybavena mnoha regulačními mechanismy a odolává mnoha pokusům o její zničení. Proto je třeba léčbu co nejčíleněji diversifikovat a zapojit do ní co největší množství různých apoptotických stimulů.

Zdá se, že proces apoptózy zasahuje do většiny, ne-li do všech buněčných populací v těle. Apoptózou odumírají i pigmentové buňky ve vlasových váčcích, což způsobuje šednutí vlasů a pravděpodobně stojí i za vypadáváním vlasů.

Nezanedbatelný význam má apoptóza v gynekologii. V lidském endometriu probíhá v pravidelně se opakujících cyklech. Možnost načasování apoptózy v endometriu poukazuje na možnou léčbu neplodnosti, s níž se dnes potýká mnoho žen. Nádory endometria jsou často se vyskytující malignitou. Gynekologické nádory mohou mít souvislost především s nejrozšířenější populační nemocí, a to obezitou. Vyhnout se všem rizikovým faktorům je v dnešním světě prakticky nemožné a dědičnost také neovlivníme. O to důležitější je umět propuklé nemoci vyléčit, zastavit nebo alespoň zpomalit.

## Literatura

- Abe, H., M. A. Shibata a Y. Otsuki (2006). **Caspase cascade of Fas-mediated apoptosis in human normal endometrium and endometrial carcinoma cells.** *Mol Hum Reprod* **12**(9): 535-541.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts a P. Walter (2002). **Molecular biology of the cell.** New York, New York: Garland Science.
- Banaszak, S., A. Brudney, K. Donnelly, D. Chai, K. Chwalisz a A. T. Fazleabas (2000). **Modulation of the action of chorionic gonadotropin in the baboon (*Papio anubis*) uterus by a progesterone receptor antagonist (ZK 137. 316).** *Biol Reprod* **63**(3): 820-825.
- Bansal, N., V. Yendluri a R. M. Wenham (2009). **The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies.** *Cancer Control* **16**(1): 8-13.
- Cibula, D. a L. Petruželka (2009). **Onkogynekologie.** Praha, Grada Publishing.
- Clarke, P. G., A. Posada, M. P. Primi a V. Castagne (1998). **Neuronal death in the central nervous system during development.** *Biomed Pharmacother* **52**(9): 356-362.
- Clarke, P. a K. L. Tyler (2009). **Apoptosis in animal models of virus-induced disease.** *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 144-155.
- Danial, N. N. (2007). **BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death.** *Clin Cancer Res* **13**(24): 7254-7263.
- Danial, N. N. a S. J. Korsmeyer (2004). **Cell death: critical control points.** *Cell* **116**(2): 205-219.
- DiSaia, P. J. a K. S. Tewari (2001). **Recent advancements in the treatment of epithelial ovarian cancer.** *J Obstet Gynaecol Res* **27**(2): 61-75.
- Dvorská, M., D. Driák a I. Švandová (2008). **Apoptóza v gynekologii a porodnictví, část I.** *Gynekolog* **17**(4): 132-140.
- Ekoff, M., T. Kaufmann, M. Engstrom, N. Motoyama, A. Villunger, J. I. Jonsson, A. Strasser a G. Nilsson (2007). **The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells.** *Blood* **110**(9): 3209-3217.
- Gaido, M. L. a J. A. Cidlowski (1991). **Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B.** *J Biol Chem* **266**(28): 18580-18585.
- Ganong, W. (2005). **Přehled lékařské fyziologie.** Praha, Galén.
- Glucksmann, A. (1951). **Cell deaths in normal vertebrate ontogenesy.** *Biol Rev* **26**: 59-86.
- Gogvadze, V., S. Orrenius a B. Zhivotovsky (2009). **Mitochondria as targets for cancer chemotherapy.** *Semin Cancer Biol* **19**(1): 57-66.
- Gordon, N. (1995). **Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons.** *Brain Dev* **17**(1): 73-77.

Gross, A., X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst a S. J. Korsmeyer (1999). **Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death.** *J Biol Chem* **274**(2): 1156-1163.

Holcik, M., E. LaCasse, A. E. MacKenzie a R. Korneluk (2005). **Apoptosis in Health and Disease - Clinical and therapeutical aspects.** Cambridge.

Hsu, H., J. Xiong a D. V. Goeddel (1995). **The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.** *Cell* **81**(4): 495-504.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>.

Chhieng, D. C., J. S. Ross a R. A. Ambros (1996). **bcl-2 expression and the development of endometrial carcinoma.** *Mod Pathol* **9**(4): 402-406.

Ioffe, O. B., J. C. Papadimitriou a C. B. Drachenberg (1998). **Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium.** *Hum Pathol* **29**(10): 1150-1159.

Jiang, S., S. C. Dowdy, X. W. Meng, Z. Wang, M. B. Jones, K. C. Podratz a S. W. Jiang (2007). **Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in both Type I and Type II endometrial cancer cells.** *Gynecol Oncol* **105**(2): 493-500.

Jin, Z. a W. S. El-Deiry (2005). **Overview of cell death signaling pathways.** *Cancer Biol Ther* **4**(2): 139-163.

Kashiwagi, A., H. Hanada, M. Yabuki, T. Kanno, R. Ishisaka, J. Sasaki, M. Inoue a K. Utsumi (1999). **Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis.** *Free Radic Biol Med* **26**(7-8): 1001-1009.

Kendrick, J. E., J. M. Estes, J. M. Straughn, Jr., R. D. Alvarez a D. J. Buchsbaum (2007). **Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its therapeutic potential in breast and gynecologic cancers.** *Gynecol Oncol* **106**(3): 614-621.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie a A. R. Currie (1972). **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.

Kirkin, V., S. Joos a M. Zornig (2004). **The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis.** *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 229-249.

Kleibl, Z., M. Raisova, J. Novotny, P. Pohlreich a B. Matous (2002). **[Apoptosis and its importance in the development and therapy of tumors (review)].** *Sb Lek* **103**(1): 1-13.

Klener, P. (2002). **Klinická Onkologie.** Praha, Galén.

Kokawa, K., T. Shikone, T. Otani, R. Nishiyama, Y. Ishii, S. Yagi a M. Yamoto (2001a). **Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium.** *Hum Reprod* **16**(10): 2211-2218.

Kokawa, K., T. Shikone, T. Otani, R. Nishiyama, Y. Ishii, S. Yagi a M. Yamoto (2001b). **Apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in patients with endometrioid, clear cell, and serous carcinomas of the uterine endometrium.** *Gynecol Oncol* **81**(2): 178-183.

- Kudela, M., R. Pilka a P. Dzvincuk (2002). **Risks in hysteroscopy in patients with endometrial carcinoma.** *Česká Gynekologie* **67**: 74-78.
- Kumar, R., P. E. Herbert a A. N. Warrens (2005). **An introduction to death receptors in apoptosis.** *Int J Surg* **3**(4): 268-277.
- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green a D. D. Newmeyer (2005). **BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly.** *Mol Cell* **17**(4): 525-535.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneiter, D. R. Green a D. D. Newmeyer (2002). **Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane.** *Cell* **111**(3): 331-342.
- Kvasnička, J. a J. Petrášek (1995). **[Apoptosis-programmed cell death].** *Cas Lek Cesk* **134**(9): 259-264.
- LaCasse, E. C., S. Baird, R. G. Korneluk a A. E. MacKenzie (1998). **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* **17**(25): 3247-3259.
- Le, M. G., M. C. Mathieu, S. Douc-Rasy, M. L. Le Bihan, H. Adb El All, M. Spielmann a G. Riou (1999). **c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients.** *Int J Cancer* **84**(6): 562-567.
- Li, L. Y., X. Luo a X. Wang (2001). **Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.** *Nature* **412**(6842): 95-99.
- Liotta, L. A. a E. Kohn (2004). **Anoikis: cancer and the homeless cell.** *Nature* **430**(7003): 973-974.
- Liu, F. S. (2007). **Molecular carcinogenesis of endometrial cancer.** *Taiwan J Obstet Gynecol* **46**(1): 26-32.
- Massad, L. S., X. Xie, T. M. Darragh, H. Minkoff, A. M. Levine, G. D'Souza, A. Cajigas, C. Colie, D. H. Watts a H. D. Strickler (2009). **Histologic correlates of glandular abnormalities in cervical cytology among women with human immunodeficiency virus.** *Obstet Gynecol* **114**(5): 1063-1068.
- Meijerink, J. P., E. J. Mensink, K. Wang, T. W. Sedlak, A. W. Sloetjes, T. de Witte, G. Waksman a S. J. Korsmeyer (1998). **Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX.** *Blood* **91**(8): 2991-2997.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand a M. G. Grutter (2002). **The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex.** *J Biol Chem* **277**(47): 45162-45171.
- Muller, M., C. A. Scaffidi, P. R. Galle, W. Stremmel a P. H. Kramer (1998). **The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis.** *Eur Cytokine Netw* **9**(4): 685-686.
- Nečas, E. (2000). **Obecná patologická fyziologie.** Praha, Karolinum.
- Neuwirtova, R. (2001). **[Will knowledge of the mechanisms of apoptosis lead to new therapeutic procedures?].** *Cas Lek Cesk* **140**(15): 460-464.

- Nishida, M., K. Nasu, T. Ueda, J. Fukuda, N. Takai a I. Miyakawa (2005). **Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis.** *Mol Hum Reprod* **11**(1): 29-34.
- Okano, A., H. Ogawa, H. Takahashi a M. Geshi (2007). **Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum.** *J Reprod Dev* **53**(4): 923-930.
- Padmanabhan, A., S. Liu a Z. Song (2008). **Bad plays a more significant role than Bid and Bim in mediating cell death signals in batch cultures of HEK 293 cells.** *Biotechnol Lett* **30**(5): 819-827.
- Peiro, G., J. Diebold, G. B. Baretton, R. Kimmig a U. Lohrs (2001). **Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome.** *Int J Gynecol Pathol* **20**(4): 359-367.
- Petros, A. M., E. T. Olejniczak a S. W. Fesik (2004). **Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.** *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 83-94.. *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 83-94.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King a A. Strasser (1999). **The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.** *Mol Cell* **3**(3): 287-296.
- Reed, J. C. (1994). **Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.** *J Cell Biol* **124**(1-2): 1-6.
- Reed, J. C., T. Miyashita, S. Takayama, H. G. Wang, T. Sato, S. Krajewski, C. Aime-Sempe, S. Bodrug, S. Kitada a M. Hanada (1996). **BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy.** *J Cell Biochem* **60**(1): 23-32.
- Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg a M. A. Venkatachalam (1999). **Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.** *Am J Med* **107**(5): 489-506.
- Seo, Y. W., J. N. Shin, K. H. Ko, J. H. Cha, J. Y. Park, B. R. Lee, C. W. Yun, Y. M. Kim, D. W. Seol, D. W. Kim, X. M. Yin a T. H. Kim (2003). **The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death.** *J Biol Chem* **278**(48): 48292-48299.
- Shimizu, S., M. Narita a Y. Tsujimoto (1999). **Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.** *Nature* **399**(6735): 483-487.
- Shiozawa, T., S. F. Li, K. Nakayama, T. Nikaido a S. Fujii (1996). **Relationship between the expression of cyclins/cyclin-dependent kinases and sex-steroid receptors/Ki67 in normal human endometrial glands and stroma during the menstrual cycle.** *Mol Hum Reprod* **2**(10): 745-752.
- Shynlova, O., A. Oldenhof, A. Dorogin, Q. Xu, J. Mu, N. Nashman a S. J. Lye (2006). **Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation.** *Biol Reprod* **74**(5): 839-849.
- Smith, S. C., P. N. Baker a E. M. Symonds (1997a). **Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction.** *Am J Obstet Gynecol* **177**(6): 1395-1401.
- Smith, S. C., P. N. Baker a E. M. Symonds (1997b). **Placental apoptosis in normal human pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol* **177**(1): 57-65.
- Soda, G., A. Antonaci, D. Bosco, S. Nardoni a M. Melis (1999). **Expression of bcl-2, c-erbB-2, p53, and p21 (waf1-cip1) protein in thyroid carcinomas.** *J Exp Clin Cancer Res* **18**(3): 363-367.

- Susin, S. A., E. Dugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw a G. Kroemer (2000). **Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis.** *J Exp Med* **192**(4): 571-580.
- Tabibzadeh, S. a A. Babaknia (1995). **The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion.** *Hum Reprod* **10**(6): 1579-1602.
- Tabibzadeh, S., Q. F. Kong, A. Babaknia a L. T. May (1995). **Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window.** *Hum Reprod* **10**(10): 2793-2799.
- Taskin, M., T. A. Lallas, H. R. Barber a M. M. Shevchuk (1997). **Bcl-2 and p53 in endometrial adenocarcinoma.** *Mod Pathol* **10**(7): 728-734.
- Thomas, W. D. a P. Hersey (1998). **TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells.** *J Immunol* **161**(5): 2195-2200.
- Thompson, C. B. (1995). **Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.** *Science* **267**(5203): 1456-1462.
- Vande Velde, C., J. Cizeau, D. Dubik, J. Alimonti, T. Brown, S. Israels, R. Hakem a A. H. Greenberg (2000). **BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore.** *Mol Cell Biol* **20**(15): 5454-5468.
- Villavicencio, A., K. Bacallao, F. Gabler, A. Fuentes, J. Albornoz, A. Casals a M. Vega (2007). **Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia.** *Gynecol Oncol* **104**(2): 290-295.
- Waggoner, S.E., A. D. Baunoch, S. A. Anderson, F. Leigh a W. G. Zagaja (1998). **Bcl-2 protein expression associated with resistance to apoptosis in clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix expressing wild-type p53.** *Ann Surg Oncol* **5**(6): 544-547
- Wajant, H. (2003). **Death receptors.** *Essays Biochem* **39**: 53-71.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier a P. Scheurich (2003). **Tumor necrosis factor signaling.** *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo a A. S. Baldwin, Jr. (1996). **TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB.** *Science* **274**(5288): 784-787.
- Watanabe, H., H. Kanzaki, S. Narukawa, T. Inoue, H. Katsuragawa, Y. Kaneko a T. Mori (1997). **Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis.** *Am J Obstet Gynecol* **176**(2): 360-368.
- Wyllie, A. H. (1987a). **Apoptosis: cell death in tissue regulation.** *J Pathol* **153**(4): 313-316.
- Wyllie, A. H. (1987b). **Apoptosis: cell death under homeostatic control.** *Arch Toxicol Suppl* **11**: 3-10.
- Yemelyanova, A., R. Vang, J. D. Seidman, P. E. Gravitt a B. M. Ronnett (2009). **Endocervical adenocarcinomas with prominent endometrial or endomyometrial involvement simulating primary endometrial carcinomas: utility of HPV DNA detection and immunohistochemical expression of p16 and hormone receptors to confirm the cervical origin of the corpus tumor.** *Am J Surg Pathol* **33**(6): 914-924.

Zeng, Q., S. Chen, Z. You, F. Yang, T. E. Carey, D. Saims a C. Y. Wang (2002a). **Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B.** *J Biol Chem* **277**(28): 25203-25208.

Zeng, Q., L. K. McCauley a C. Y. Wang (2002b). **Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein 1-dependent cyclooxygenase-2. Implication in head and neck squamous cell carcinoma progression.** *J Biol Chem* **277**(51): 50137-50142.

## **Poděkování**

Na závěr bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Ivaně Švandové, která mě vedla při psaní této práce a poskytla mi cenné rady i zkušenosti.