

Sejtszintű biológiai szabályozás

Szabályozás élő rendszerekben



2018 ősz

Sejthalál folyamatok

2018. november 12.

Sejthalál útvonalak

NECROSIS NECROPTOSIS
 PYROPTOSIS
 PYRONECROSIS

 APOPTOSIS PHAGOAPOPTOSIS

 CORNIFICATION

 ANOIKIS ENTOSIS

 AUTOPHAGIC CELL DEATH

 NETOSIS ETOSIS

 MITOTIC CATASTROPHE
 EXCITOTOXICITY
 WALLERIAN DEGENERATION

 FERROPTOSIS

Sejthalál útvonalak

NECROSIS NECROPTOSIS
 PYROPTOSIS
 PYRONECROSIS

 APOPTOSIS PHAGOAPOPTOSIS

 CORNIFICATION

 ANOIKIS ENTOSIS

 AUTOPHAGIC CELL DEATH

 Gyulladásserkentő
 (Pro-inflammatory) NETOSIS ETOSIS

 Gyulladásgátló
 (Anti-inflammatory) MITOTIC CATASTROPHE
 EXCITOTOXICITY
 WALLERIAN DEGENERATION

 FERROPTOSIS

Hengartner M. O. (2000) Nature 407:770-776

Apoptózis

Apoptózis (programozott sejthalál)
fejlődésben vagy sejt-kicserélődésben

Számos hatás sejthalált okoz

Apoptózis; nem károsítja a környező szövetet

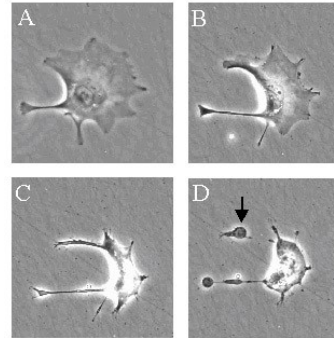
(ellentét: nekrozis: gyulladás, citokinek kibocsátása)

Genetikai program

Rákterápia

A morfológiaért felelős a kaspázok általi citoskeleton hasítás
(lamin, aktin hálózat)

Morfológia:



A: citoplazma összehúzódik
(lamin/aktin hasadások)

B: lópatkó-szerű sejtmag forma alakul
Kromatin/magi fehérjék hasadása

C: Sejt zsugorodás, apoptotikus testek
kialakulása
Ezeket a makrofágok könnyen fel tudják
venni

Segítő hatás: PM változások
Foszfatidil-szerin: belső oldalról kifelé

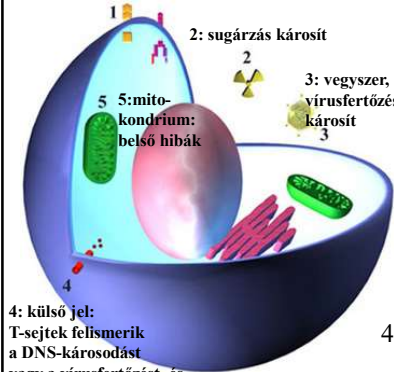
D: membrán hólyagok (blebbing),
végül az apoptotikus testek
lehasadása

Trophoblast apoptózis
(korai embrió külső sejtrétege, ezzel
épül be az embrió a méhfalba –
ebből lesz a méhlepény, apoptózisa
korai vetéléshez vezet)

Mi vezet apoptózishoz?

Számos mechanizmus ismert

1: külső jel: halálligandok



4: külső jel:
T-sejtek felismerik
a DNS-károsodást
vagy a vírusfertőzést, és
granzimmal apoptózist
indukálnak

Döntő tényezők:

1. a pro- és anti-apoptotikus
fehérjék aránya (expressziójuk
szabályozása)
Pro-apoptotikus: Bad, Bax (Bcl-2
fehérjék)
Anti-apoptotikus: Bcl-2, Bcl-X_L, IAP
(inhibitor of apoptosis)
2. Hatás jellege, erőssége
3. Sejtciklus szakasza

4 csoport – 2 fő útvonal (+granzimek)

Granzimek az apoptózisban

Granule serine proteases

Citotoxikus limfociták termelik

(pl. T-sejtek, az immunsejtek egyik típusa)

Ezen T-sejtek a pusztulásra ítélt (pl. vírusfertőzött sejt) való érintkezéskor
granzimeket és perforint tartalmazó elegyet bocsátanak ki a sejtközötti térbe

Ezután: vagy halálreceptor aktiválás

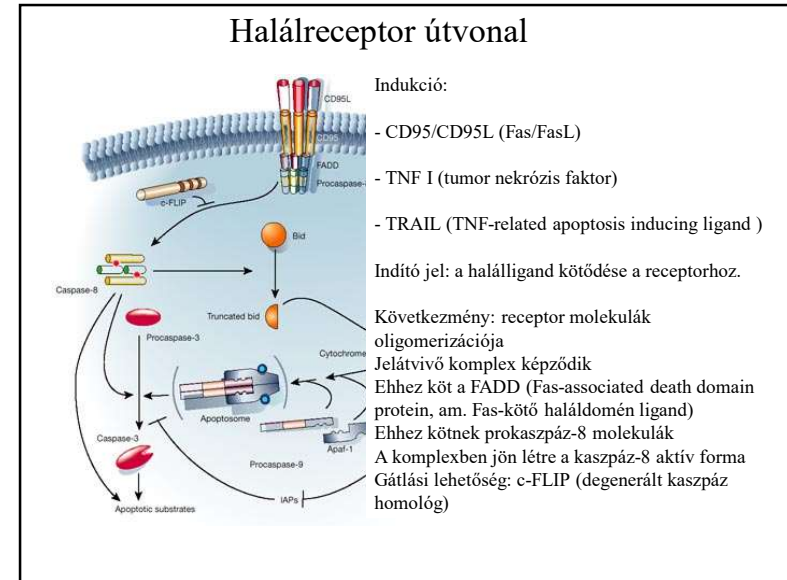
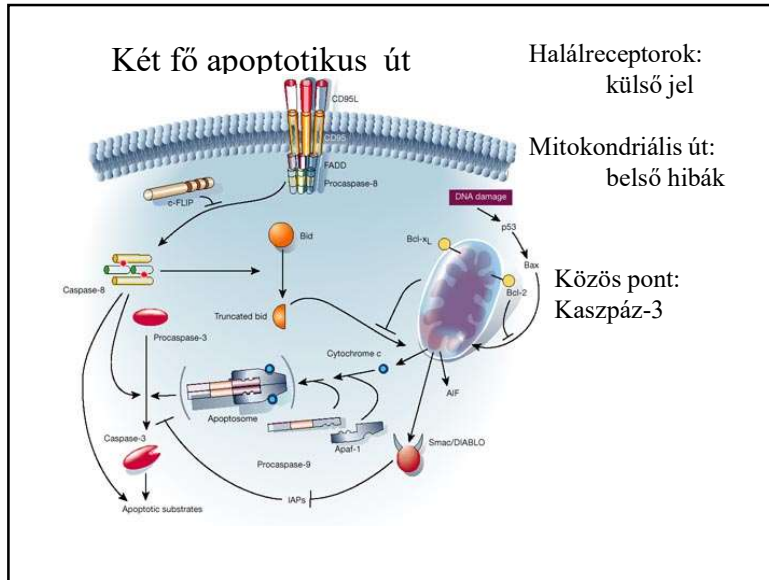
vagy a perforin/granzim endocitózisa

a membrán csomagból a perforin segítségével szabadul ki a granzim

Két fő képviselő: Granzyme A és Granzyme B

GrA: bázikus oldallánc után hasít; nem a szokványos kaspáz aktivitás
nem igényli a kaspázokat, tünet: DNS javítás leáll, DNS törések

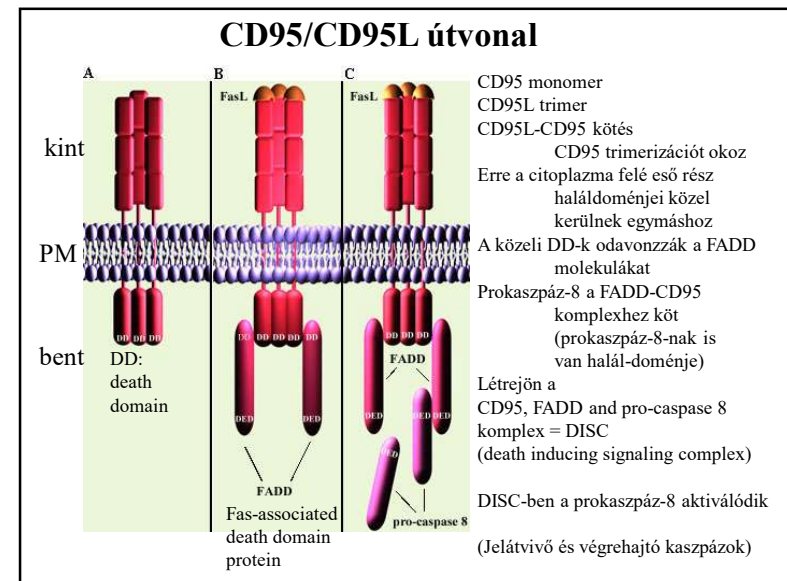
GrB: Asp után (kaspáz-féle) módon hasít, klasszikus apoptózishoz vezet



CD95/CD95L útvonal

CD95: Három fő szerep

1. Citotoxikus T-sejt által előidézett apoptózis (pl. vírusfertőzött sejtek esetén)
2. Aktivált T-sejtek apoptózisának indukciója az immunválasz végén
3. Gyulladásos és immunizációs folyamatokban résztvevő sejtek apoptózisa (autoimmun jelenségek megelőzése)



TNF-1 útvonal

kint

PM plasma membrane

bent

Death Domain

FADD

Pro-caspase 8

TNF α

TNFR1 receptors

TRADD

TRAF-2

Apoptotic Pathway

Signalling Pathway

TNF: T-sejtek termelik, trimer TNFR (TNF-receptor)-hoz való kötődése a receptor trimerizációját okozza
 Erre bekötődik a TRADD (TNRF-associated death domain protein) (eddig analógia a CD95 úttal)

TRADD vagy TRAF-2-t (TNF assoc. factor 2) vagy FADD-ot köt
 Sejtípustól függ, hogy melyik út
Ha TRAF-2-t köt: NFkappaB/Jnk-AP1 (jelátviteli aktiváló út, gyulladásos folyamatok, immun-utak)

Ha FADD-ot köt: prokaspáz-8, DISC APOPTÓZIS
Köthet még: RAIDD-ot (RIP-associated ICH-1 / CED-3 homologous protein with a death domain protein)
 RAIDD kaspáz-2-t köt (CARP=caspase recruitment domain-jével)
 Itt is APOPTÓZIS

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) útvonal

kint

PM

bent

DR4, DR5

TRAIL

Fasl

FADD

pro-caspase 8

Hasonlít a CD95/CD95L-hez
 CD95L=TRAIL
 CD95=DR4,DR5

Különbségek:
 - DR4,DR5 konstitutív, nem mint CD95
 - Nincs szükség FADD-ra vagy TRADD-ra (génkiütés egérben)

Hogyan kerül el a sejt a DR4,DR5 konstitutív jelenléte okozta állandó apoptózist?

Álreceptorok a TRAIL-re (DcR1, DcR2)
 Nincs citoplazmatikus részük, vagy mutánsak

Mitochondriális útvonal

Válasz a belső hibákra
Indukció:
 Cyt-c kiáradás a mitokondriumból
 Cyt-c az APAF-1-hez köt (apoptotic protease activating factor 1)
 Ehhez a komplexhez köt a prokaspáz-9
 Kaspáz-9-é aktiválódik (jelvivő kaspáz)
 Beindul a kaspáz-kaszkádnak

Bcl-2 család

Hogyan jut ki a cyt-c?
Hipotézis: Bax pórust hoz létre a membránon
 Ehhez Bax-oligomer kell
 Ha a Bax Bcl-2-vel (Bcl-X_L) köt, akkor nem lesz pórustermelő komplex

Bax-Bad: nagy pórusokat hoz létre
AIF: apoptózis indukáló faktor

Mitochondriális útvonal

Bax, Bak, Bid, Bim:
 Pro-apoptózis fehérjék,
 Citoplazmában ülnék, míg nem jó a szignál
 Bax: pórust formál (hasonlóan Bak is)

Ezen át cyt-c, AIF és Smac/Diablo is kijut a mitokondriumból

Apoptozóma:
 Cyt-c, APAF1-prokaspáz-9

Bc(ell)l(ymphoma)-család: pro- és anti- egyensúly



B-cell lymphoma – innen izolálták

Kb 1-15 fehérje, három fő család

Group I: ANTI-APOPTOTIKUS

4 konzervált BH (Bcl-2-homológ) domén (pl. Bcl-2, Bcl-XL)

C-terminális hidrofób szegmens: membránba (mito, ER) horgonyozó fehérje nagy része a sejt belseje felé néz

Group II. PRO- APOPTOTIKUS: PL. Bax, Bak,

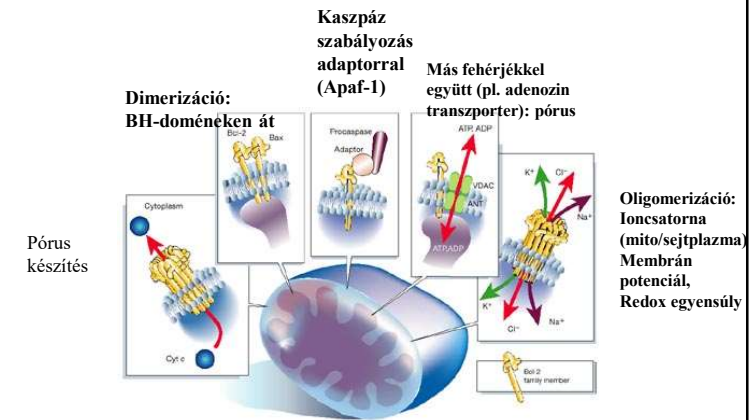
3 konzervált BH (Bcl-2-homológ) domén (pl. Bcl-2, Bcl-XL)

C-terminális hidrofób szegmens: membránba (mito, ER) horgonyozó fehérje nagy része a sejt belseje felé néz

(hatáskülönbség oka: pórus formáló eltérés, hetero vs homo-oligomerizáció)

Group III. Több egyéb fehérje, legalább egy BH3-doménnel (nem szigorú evolúciós kapcsolat)

Bcl-mechanizmus



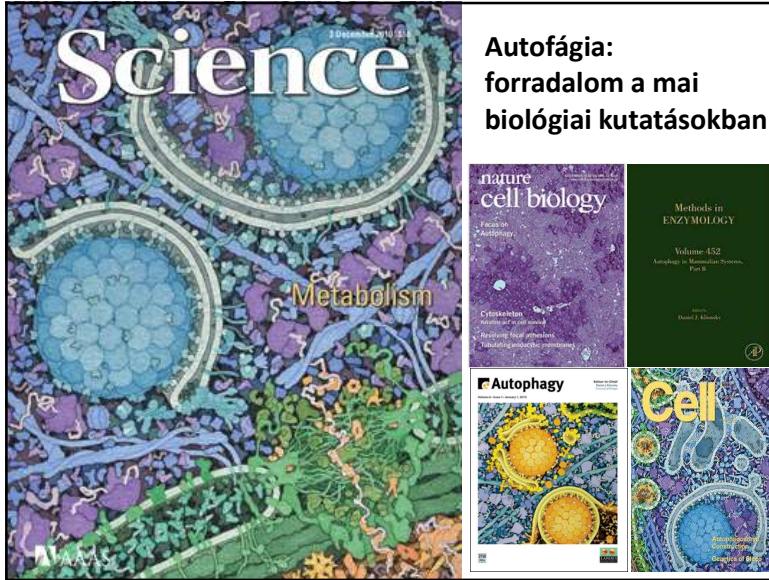
Kaspázok: indukció

Granzim út: első hasítás granzimmal

Halálligand-receptor út
első hasítás a DD
komplexekben

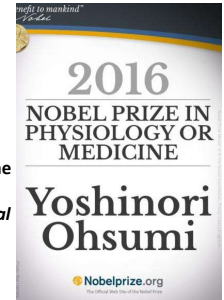
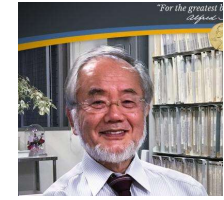
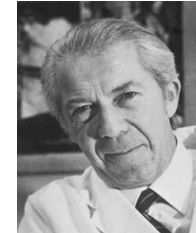
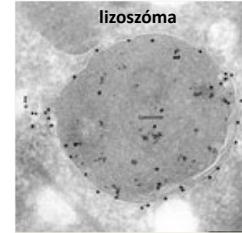
Mitokondriális út:
első hasítás az
apoptozómában

Autofágia



Autofágia: forradalom a mai biológiai kutatásokban

Autofágia: protein degradáció II
Autofágia-sejtes önemésztés:
lizoszóma-függő citoplazma bontás



- Savas hidrolázok:** The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1974 was awarded to Christian de Duve "for discoveries concerning the structural and functional organization of the cell".
- proteázok
 - nukleázok
 - lipázok
 - glikozidázok

Az autofágia leírása: 1956

CELLULAR DIFFERENTIATION IN THE KIDNEYS OF NEWBORN MICE STUDIED WITH THE ELECTRON MICROSCOPE*

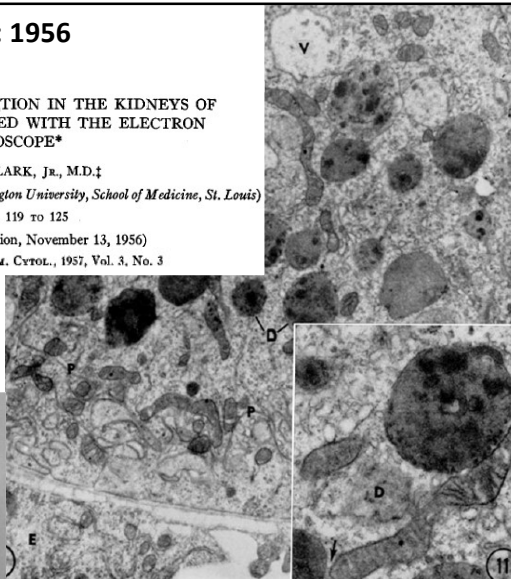
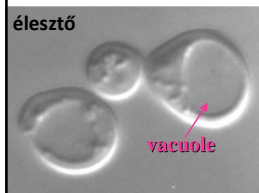
By SAM L. CLARK, JR., M.D.†
 (From the Department of Anatomy, Washington University, School of Medicine, St. Louis)

PLATES 119 TO 125
 (Received for publication, November 13, 1956)
 J. BIOPHYSIC. AND BIOCHEM. CYTOL., 1957, Vol. 3, No. 3

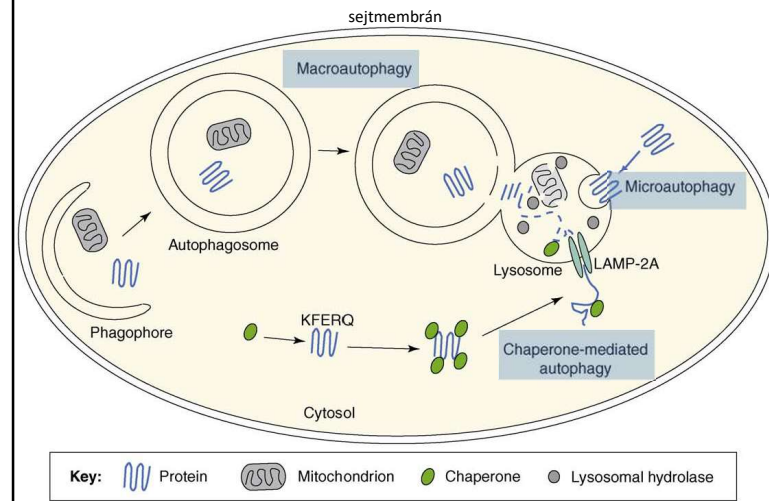
A Sleeping Beauty story

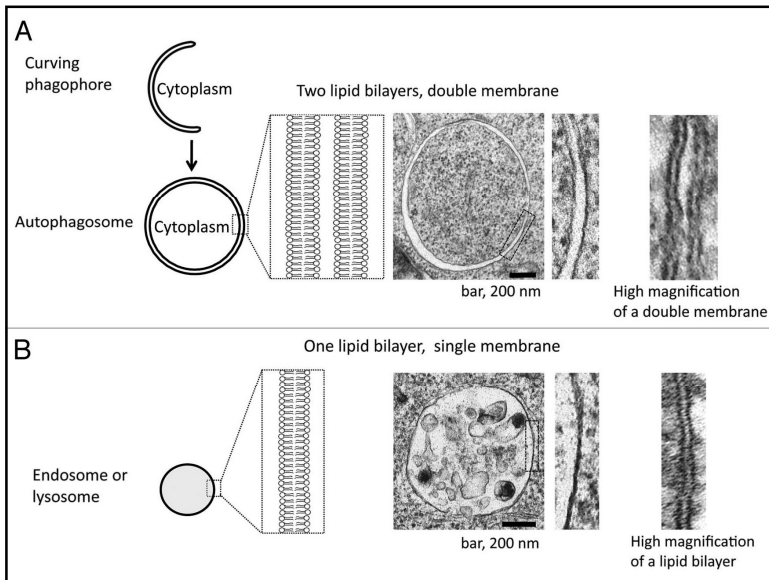
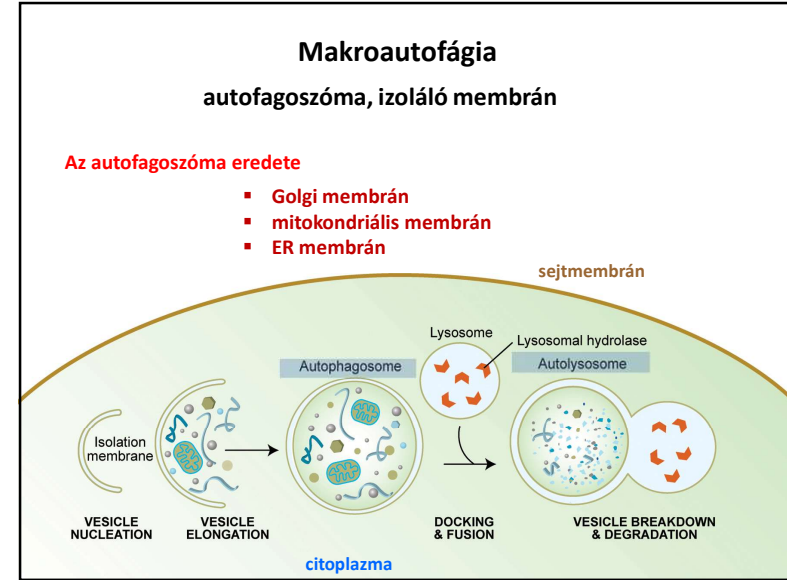
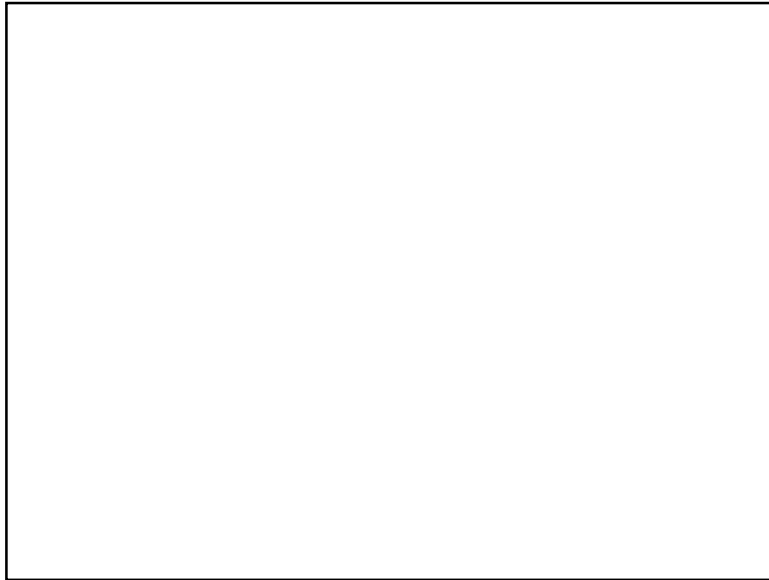
'90-es évek

élesztő



Az autofágia fő típusai





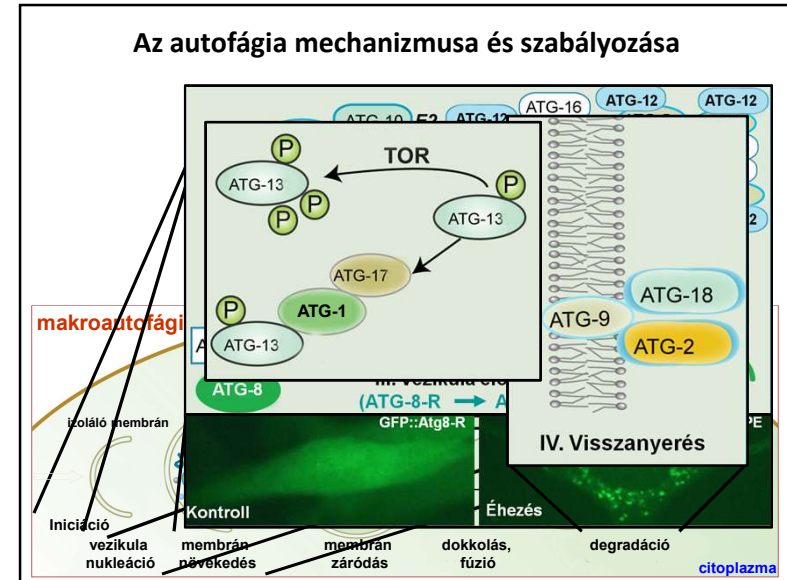
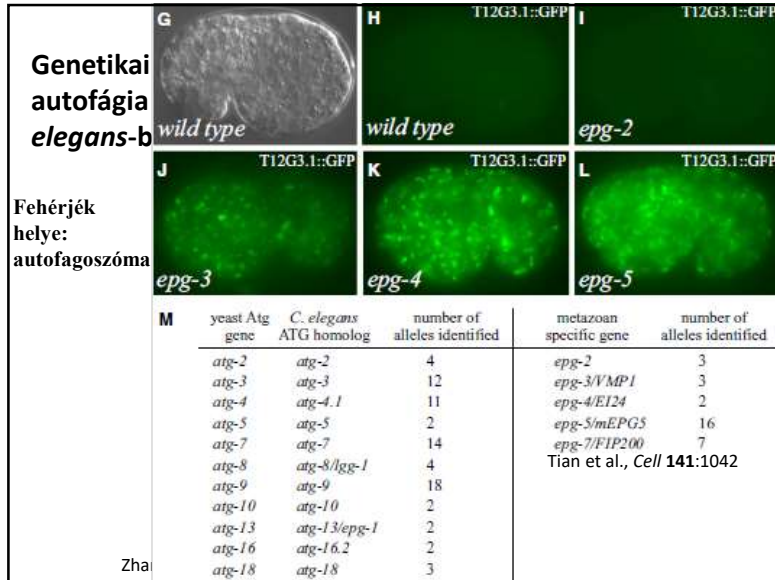
Autofágia gének (ATG)

Yeast	Mammals	Functions
Atg1	ULK1, ULK2	Protein Kinase: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg2	Atg2	Atg9/Atg2-Atg18 complex
Atg3	Atg3	E2-like enzyme for Atg8s-lipidation
Atg4	Atg4A, B, C, D	Cysteine protease: Atg8s-activation and delipidation
Atg5	Atg5	Atg12-Atg5 conjugate: E3-like activity for Atg8s-lipidation
Atg6	Beclin-1	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg7	Atg7	E1-like enzyme for Atg12- and LC3-conjugation
Atg8	LC3, GABARA	
Atg9	Atg9L1, L	
Atg10	Atg10	
Atg12	Atg12	
Atg13	Atg13	
Atg14	Atg14	
Atg16	Atg16L	
Atg17	FIP200	
Atg18	WIPI-1, 2	
Atg29	?	

WT

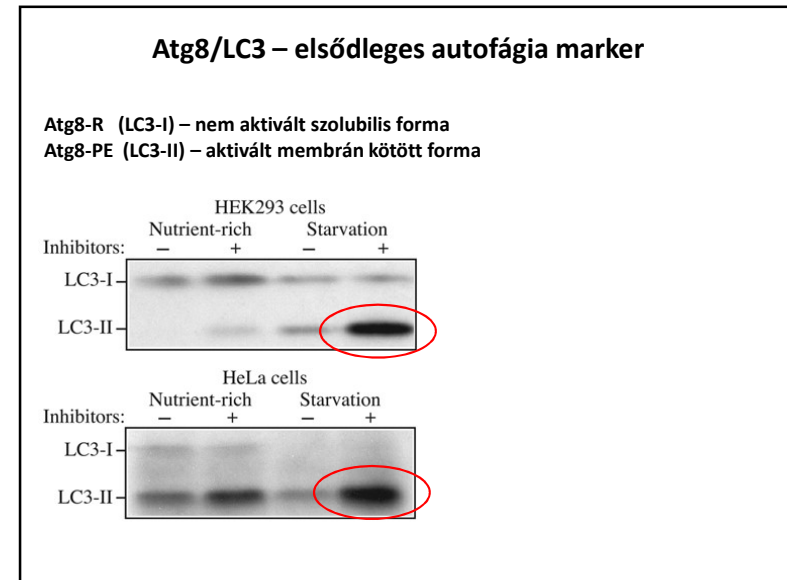
élesztő

atg7Δ



Lefontosabb membránhoz kötődő folyamatok:

- PI3K – foszfatidil-inozitol-3-kináz
- PE – foszfatidil-etanolamin – ráköt az Atg8-ra



Az autofágia funkciói

Makromolekula degradáció

- építőkövek a szintetikus folyamatokhoz
- energia éhezés során (stresszválasz)
- sejtes károsodások eltávolítása (*self-cleaning*)
- intracelluláris patogének eltávolítása

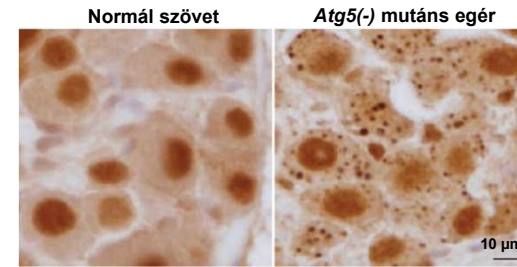
Az autofágia elsődlegesen egy sejtvédő folyamat

- speciális fehérjék és sejt szervecskék eltávolítása (differenciáció)

Szelektív autofágia

Az autofágia elsődlegesen egy sejtvédő folyamat:

pl. neuroprotektív

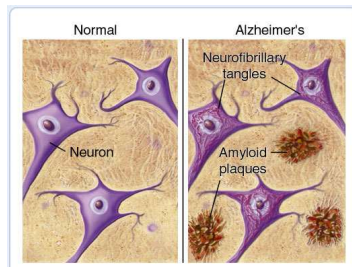
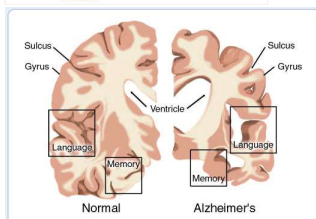
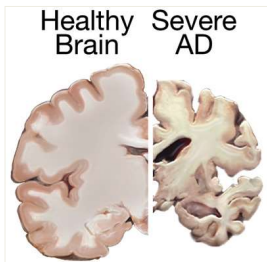


Monoclonal anti-ubiquitin antibody

Humán relevancia

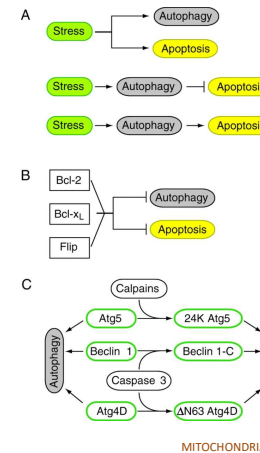
Ubikvitin: PTM
Hershko,
Ciechanover
Hara et al., *Nature* 441:885

Defektív autofágia – Alzheimer’s disease (AD)



Alzheimer’s disease is associated with **plaques (beta-amyloid deposits)** and **tangles (tau neufibrillums)** in the **brain**.

Autofágia és apoptózis együttes szabályozása

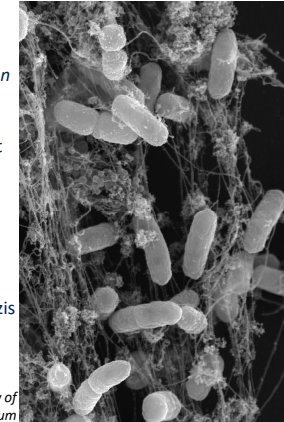


- (A) Egyes stressz állapotok a sejt adott státuszától függően vagy apoptózist, vagy autofágiát indítanak. Az elinduló autofágia folyamatok ismét a sejt adott státuszától függően akár gátolhatják, akár serkenthetik az apoptózist.
- (B) Bcl-2, Bcl-xL és Flip: mindkét utat gátolhatják: univerzális sejthalál gátlók!
- (C) Atg5, Beclin 1 és Atg4D: intakt formájukban autofágiában vesznek részt. Kalpainnal vagy kaspázzal hasított formáik apoptózist indukálhatnak.

NECROSIS	NECROPTOSIS PYROPTOSIS PYRONECROSIS
APOPTOSIS	PHAGOAPOPTOSIS
CORNIFICATION	
ANOIKIS	ENTOSIS
AUTOPHAGIC CELL DEATH	
NETOSIS	ETOSIS
MITOTIC CATASTROPHE EXCITOTOXICITY WALLERIAN DEGENERATION	
FERROPTOSIS	

Neutrophil Extracellular Trap (NET) Neutrofil Extracelluláris Csapda

- NET: neutrofil sejtek bocsájtják ki, a mikrobiális fertőzések ellen – **veleszületett immunválasz** (Brinkmann V,Zychlinsky A. *Science* 2004.)
- NET: mi van benne: főleg már valamennyire degradaált kromatin állomány, ehhez kötődnek fehérjék (sejtzárványokból, citoplazmából, sejtmagból)
- Sejten kívül képes a mikrobákat elpusztítani – **fizikai korlátot jelent**
- Kromatin kibocsájtás és NET háló kialakítás: ez a Netózis definíciója



Scanning electron microscopy of human neutrophil NET with *Salmonella typhimurium*

NETÓZIS alulműködése - Betegségekben

Autoimmun betegségek

Trombózis – mélyvénás trombózis

Atherosclerosis - érlemezésedés

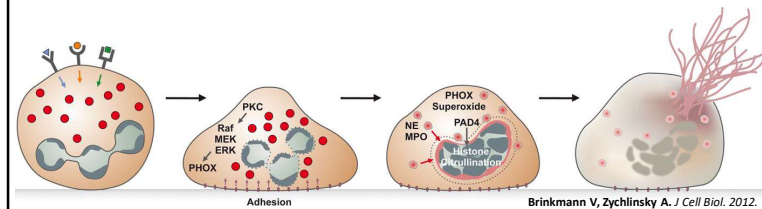
Rák áttétek elősegítése

Cisztás fibrózis

Preeclampsia

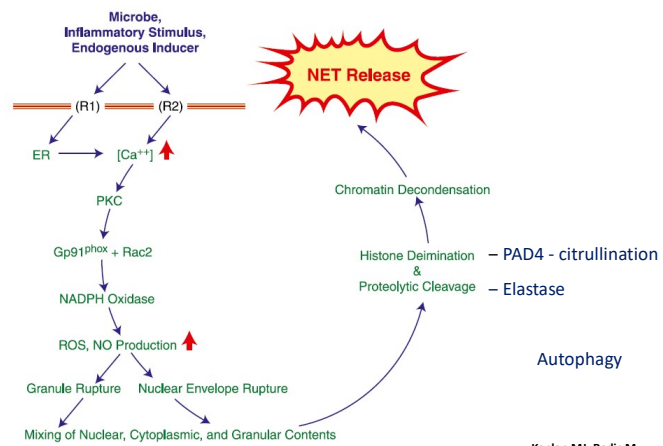
The mechanism of NET formation - Morphological changes

1. cells flatten and firmly **attach** to the substratum (in minutes after activation)
2. the nucleus **loses its lobules**, the **chromatin decondenses**, and the inner and outer nuclear membranes progressively detach from each other (in 1 hour)
3. **disintegration** of the **granules** (in 1 hour)
4. the **nuclear envelope disaggregates** into vesicles and the **nucleoplasm and cytoplasm form a homogenous mass** (1-2 hours)
5. the cells round up and **contract** until the cell membrane **ruptures** and the content of the cell is **ejected** into the extracellular space, forming NETs (2-4 hours)



Brinkmann V, Zychlinsky A. *J Cell Biol.* 2012.

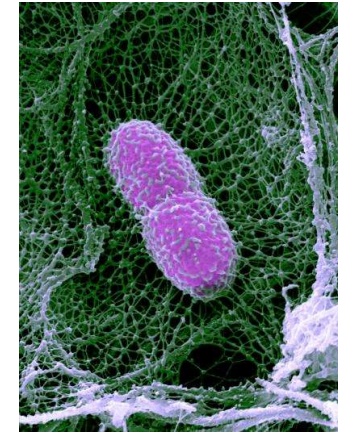
The mechanism of NET formation 2. - Molecular events



Kaplan MJ, Radic M.
J Immunol. 2012 review
 Remijsen et al
. CDD 2011 review.

Important features of NET formation

- NET consist of **stretches of DNA** and **globular protein domains** with diameters of 15-17 nm and 25 nm, respectively.
- These aggregate into **larger threads** with a diameter of 50 nm.
- NETs can form much **larger structures**, hundreds of nanometers in length and width.
- **≈30 proteins** are present in NETs, most of them originate from **granules**, few are from the nucleus and cytoplasmic



Klebsiella pneumonia snared in a NET
 (Papayannopoulos 2010.)