

A sejthalál és különböző formái



Gönczi Mónika
DE ÁOK Élettani Intézet

2018

A sejtek lehetséges sorsa *in vivo* és *in vitro*

- **Osztódás** (utódsejtek létrehozása, regeneráció)
- **Differenciálódás** (adott szövetre jellemző sejtek létrehozása)
- **Elöregedés (szeneszcencia)** az osztódó sejtekre is jellemző a folyamatos öregedés
- **Elhalás** (a differenciálódás is egy programozott sejthalál, ahol a sejt aktívan igénybe veszi saját önmegsemmisítő mechanizmusait - apoptózis)
- A sejtosztódást kontrolláló illetve az alternatív sejtsorsok közötti választást szabályozó mechanizmusok sérülései: kontrollálatlan szaporodás, jó –és rosszindulatú daganatok kialakulása
- Normális vagy rákos eredetű sejtvonalak viselkedése *in vitro* (kontakt gátlás; transzformálódás-fókuszok kialakulása; motilitás és letapadás-függés)
- Sejtciklust szabályozó gének (**protoonkogének**) és az ezekből kialakuló konstitutívan aktív, megváltozott enzimaktivitású fehérjét produkáló **onkogének**; a sejtciklusszabályozó ellenőrző checkpoint mechanizmusok az (onko)**szupresszor gének** működéséhez kötött.

A sejthalál formák osztályozása

- **Morfológia jellemzők**

(apoptózis, nekrozis, autofágia, mitózissal asszociált)

- **Enzimológiai kritériumok**

(nukleázok és proteázok jelenléte pl. kaszpáz, kalpain, katepszin, transzglutamináz)

- **Funkcionális jellemzők**

(programozott vagy véletlenszerű, fiziológiás vagy patológiás)

- **Immunológiai jellemzők**

(immunogén vagy nem-immunogén)

Mikor „halott” a sejt?

(1) Plazma membrán integritása megszűnik

(festék inkorporációval ellenőrizhető in vitro)

(2) A sejt és a sejtmag teljes fragmentálódáson ment keresztül és különálló „testek” jönnek létre

(apoptotic body)

(3) A „testeket” vagy fragmenteket egy szomszédos sejt bekebelezte

HA EZEK KÖZÜL LEGALÁBB AZ EGYIK KRITÉRIUM TELJESÜL!!!

A sejthalál formái

Programozott sejthalál

Specializált sejthalál

Apoptózis

Apoptózis

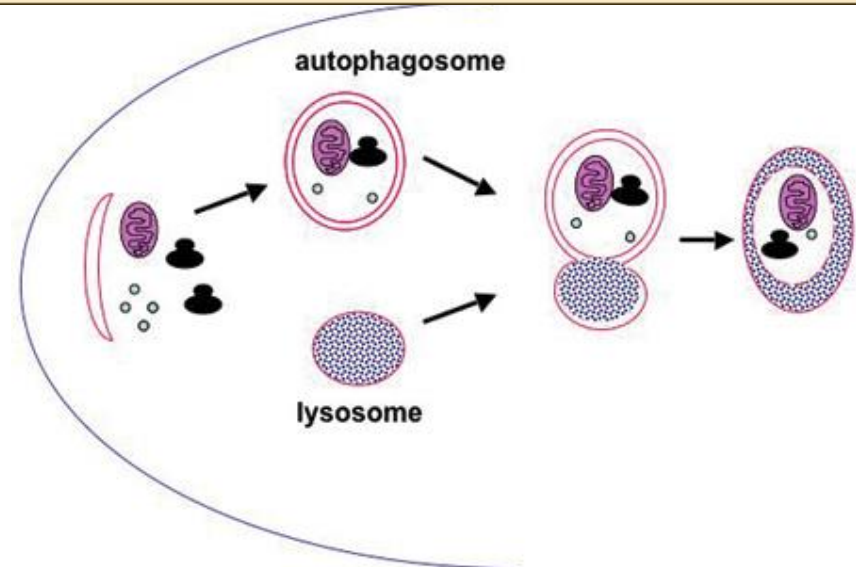
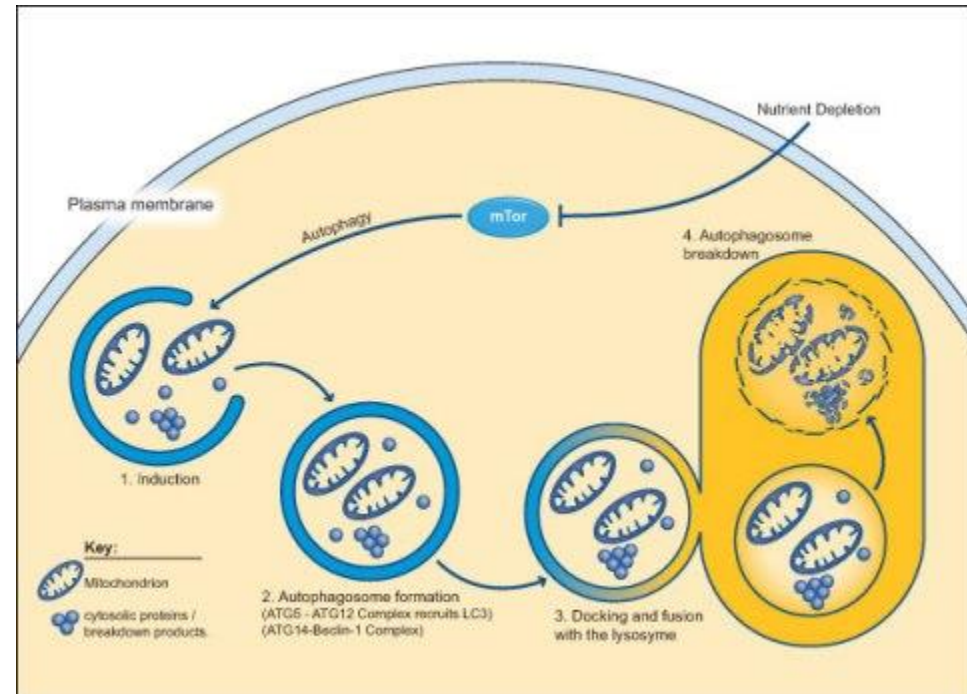
Autofágia

Nekrózis

Kornifikáció

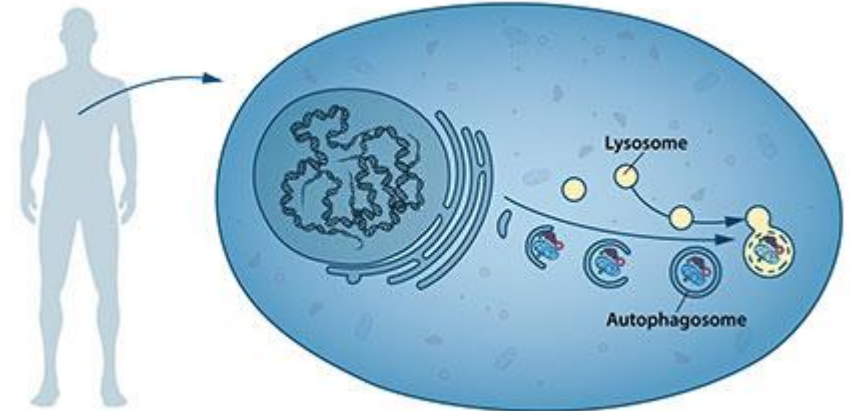
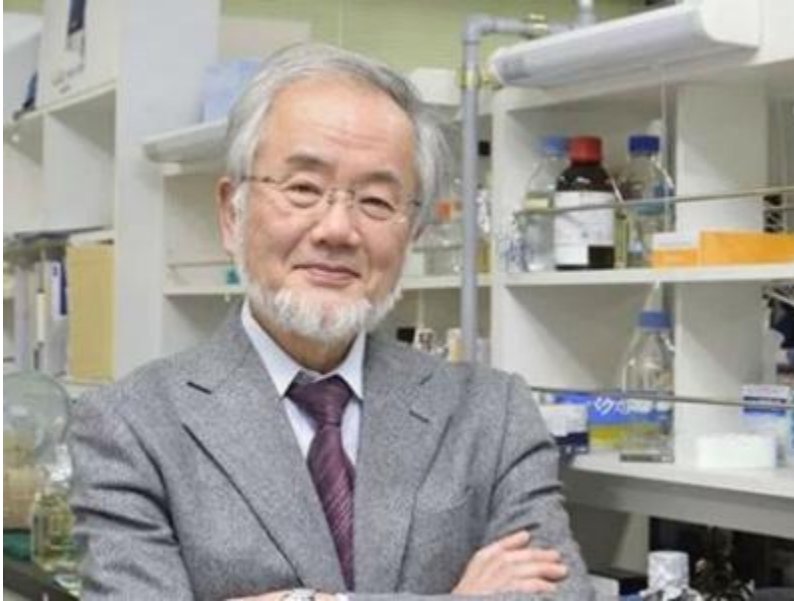
Autofágia

- A fagocitózis intracelluláris formája (önemésztés).
- Az autofágia minden sejtre jellemző → előregedett sejtalkotók, kóros proteinaggregátumok eltávolítása
- A fagocitózis intracelluláris formája
- Kettős membránnal határolt vakuólumok a sejtben
- Lizoszómákkal egyesülnek
- Autofág sejthalál esetén a sejtmag nem kondenzálódik, nem fragmentálódik
- Apoptózissal kevert formák



Autofágia

2016 Orvosi Nobel Díj



Yoshinori Ohsumi,
japán sejtbiológus

„for his discoveries of mechanisms for autophagy”

Kornifikáció

cornification

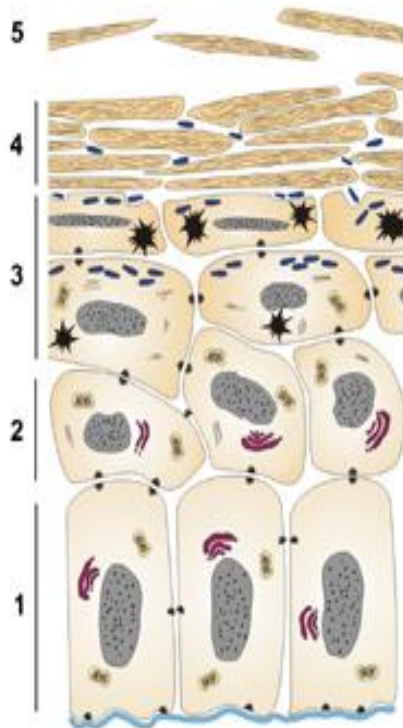
apoptosis

Desquamation

Protease activation
Organelle destruction
Degradation of the nucleus

Keratin expression
Cytoskeleton rearrangements
Proliferation arrest
Desmosome formation

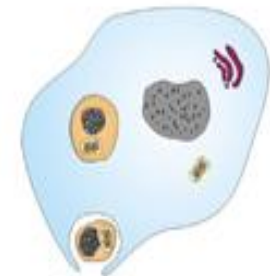
Viable,
proliferating cells



Detachment from substrate
Protease activation
Organelle damage
Blebbing of the cell

Phagocytosis
of dead cells

DNA degradation
Dismantling of cytoskeleton
Formation of apoptotic bodies



Lamellar body



Keratohyalin



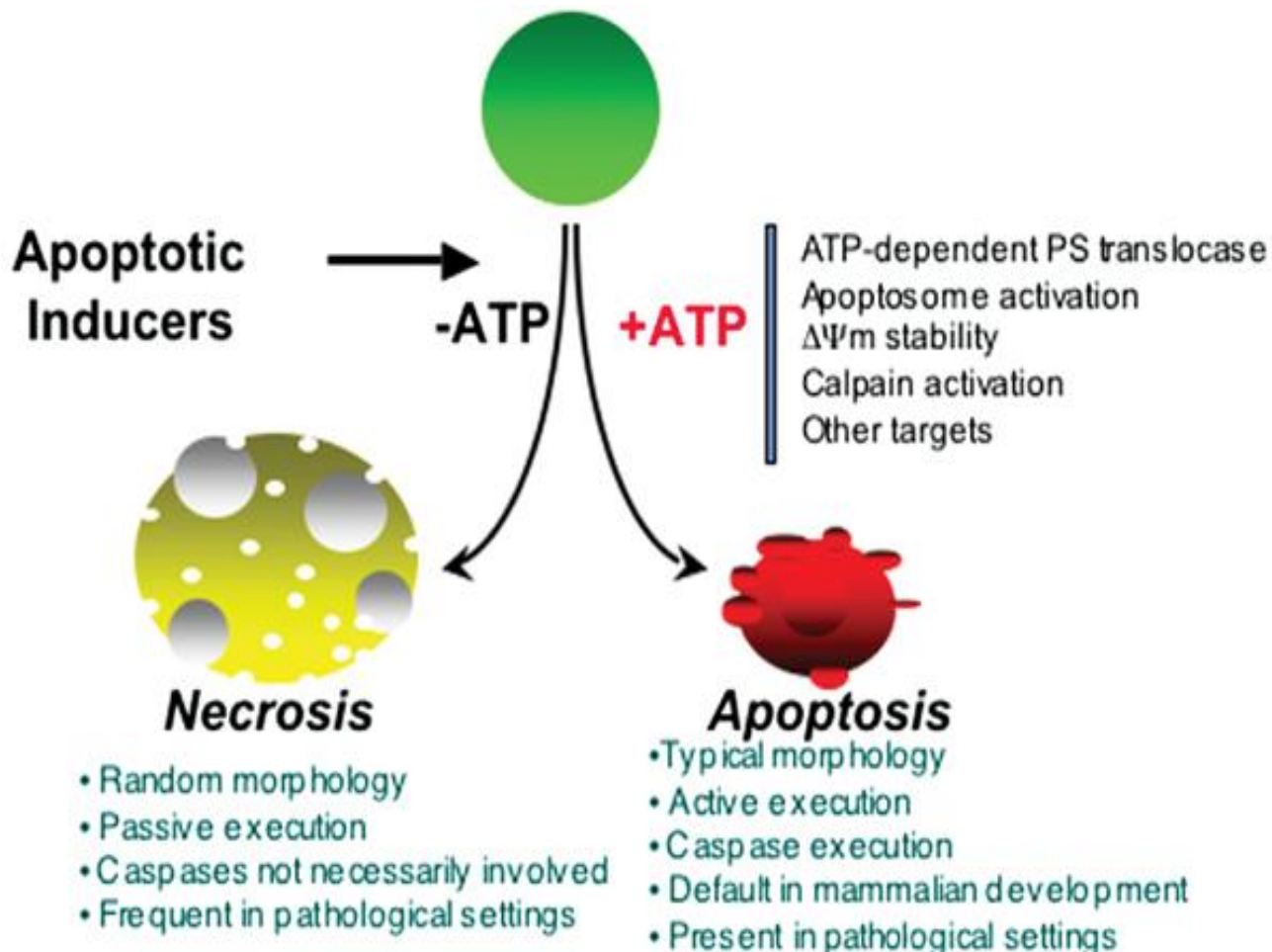
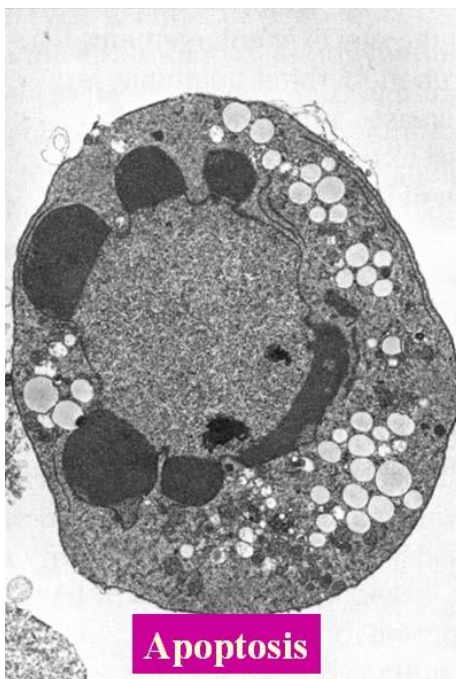
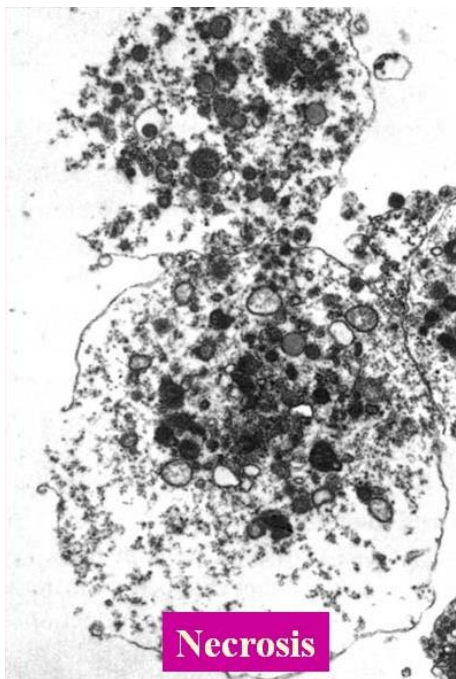
Keratin filaments



(Hemi-) Desmosome



Nekrózis vs. Apoptózis



A sejthalál formái

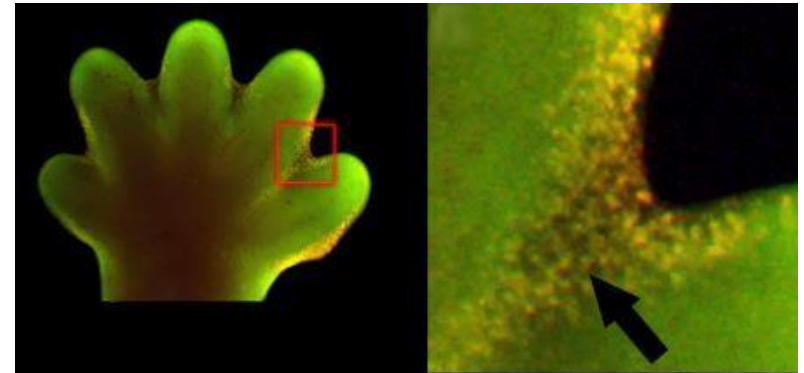
Nekrózis vs. Apoptózis

Nekrózis

- Patológiás
- Szövetkárosító hatásra
- Passzív

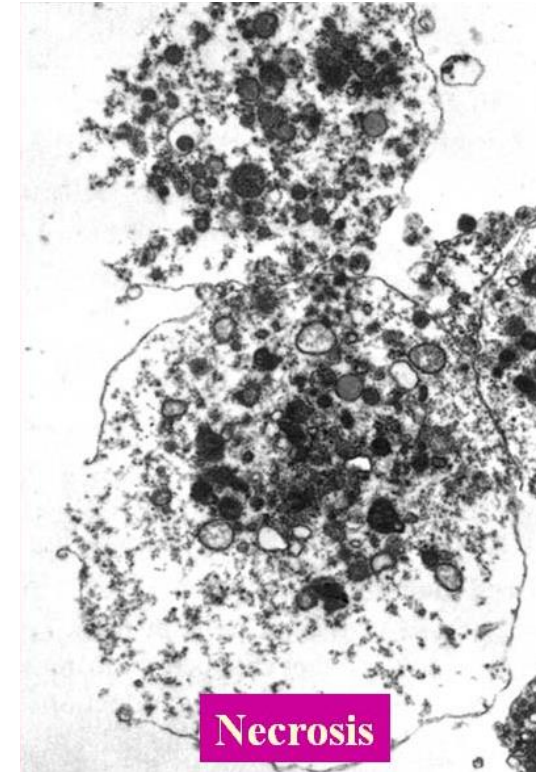
Programozott sejthalál (apoptózis)

- Fiziológiás / patológiás
- Szabályozott molekuláris történések
- Aktív



A nekrozis

- Sok sejtet érintő, masszív sejtelhalás.
- Mindig kóros hatásra, sosem fiziológias.
- Erőteljes káros hatásokra
 - hipertermia
 - mérgezés
 - ischemia
 - stb.
- Morfológiája véletlenszerű, függ a kiváltó stimulustól
- A mag és a sejtszervecskék duzzadnak → szétesnek
- Sejthártya integritása sérül → a sejt lízis
- Intracelluláris tartalmak és lizoszomális enzimek is kikerülnek
- → Gyulladás
 - Granulociták és makrofágok takarítják el
 - A környező sejtek is károsodnak



2002 Nobel Prize in Physiology or Medicine

Programmed Cell Death (PCD)



Sydney Brenner
(UK)



H. Robert Horvitz
(US)

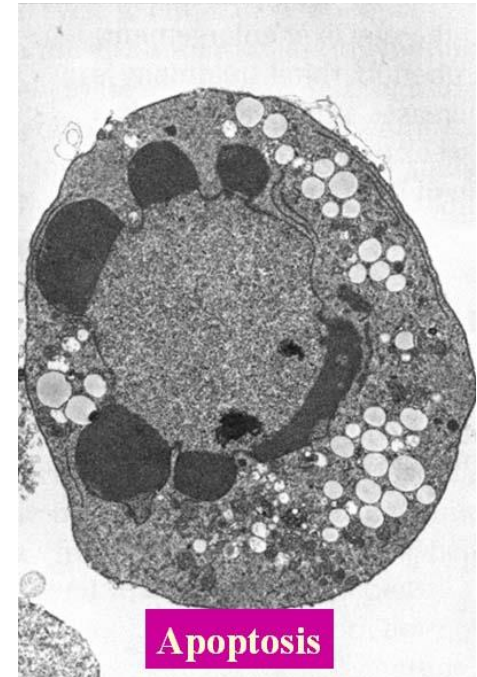


John E. Sulston
(UK)

"for their discoveries concerning genetic regulation of organ development and programmed cell death".

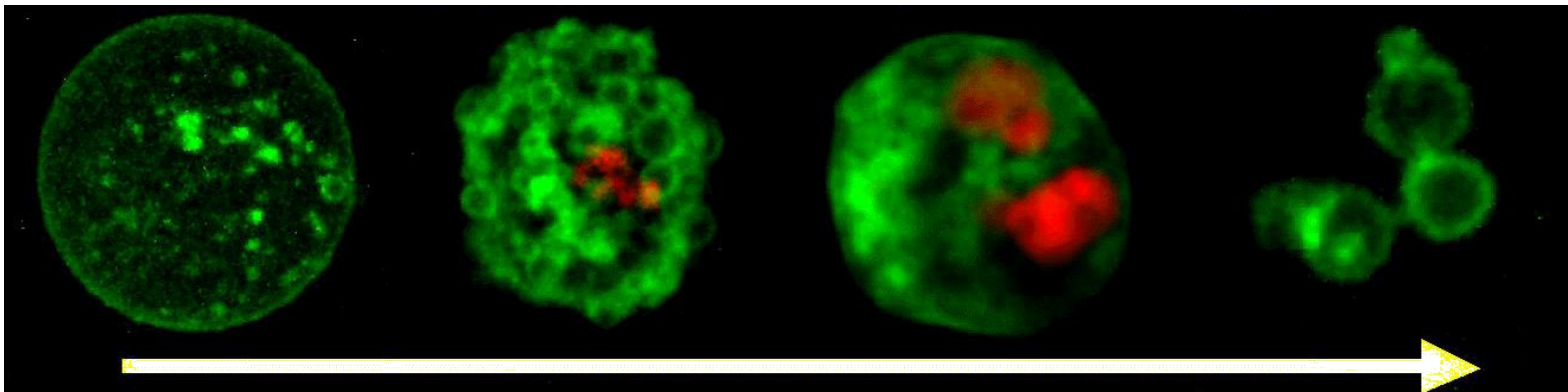
Az apoptózis (programozott sejthalál)

- Egy-egy sejtet érinthet.
- Néhány óra alatt.
- Fiziológias és patológias is lehet
- Különböző stimulusok hatására is hasonlóan zajló, szabályozott folyamat
- Aktív, ATP-t igényel
- A sejthártya integritása végig megmarad → nem kerülnek ki makromolekulák
- → Nem alakul ki gyulladás
- Az apoptotikus testeket makrofágok és a környező sejtek egyaránt fagocitálhatják
- A szöveti sejtkecsere során általában egyedi sejteket érint
- Az egyedfejlődés során eliminálódó szövetekben tömeges is lehet
- Szubnekrotikus sejtkárosító hatások is kiválthatják



Az apoptózis morfológiája

- Sejtterület csökken (*pyknosis*)
- Leválik a környező sejtekről és az extracelluláris mátrixról (*szeparáció*)
- A sejtmag zsugorodik (*karyopyknosis*)
- A kromatinállomány kondenzálódik és félhold alakban a maghártyához simul (*marginalizáció*)
- A sejtmag fragmentálódik (*karyorrhexis*)
- A legömbölyödő sejt felszínén hólyagok jelennek meg (*zeosis/blebbing*)
- A kiboltosuló hólyagok (*budding*) lefüződnek
- A sejt membránnal határolt apoptotikus testekre fragmentálódik
- A sejt hártya integritása végig megmarad



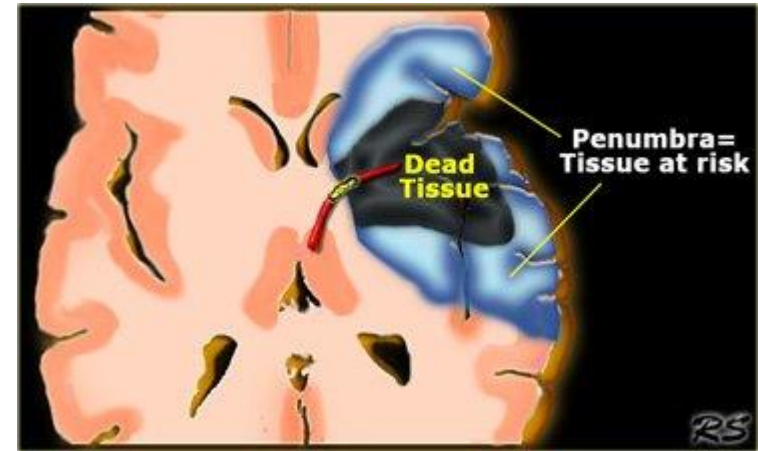
Apoptózis

Apoptotikus penumbra

- Agyi stroke-ot követően centrálisan, az ischemiás magban (umbra) percekben belül nekrotikus folyamatok játszódnak le.

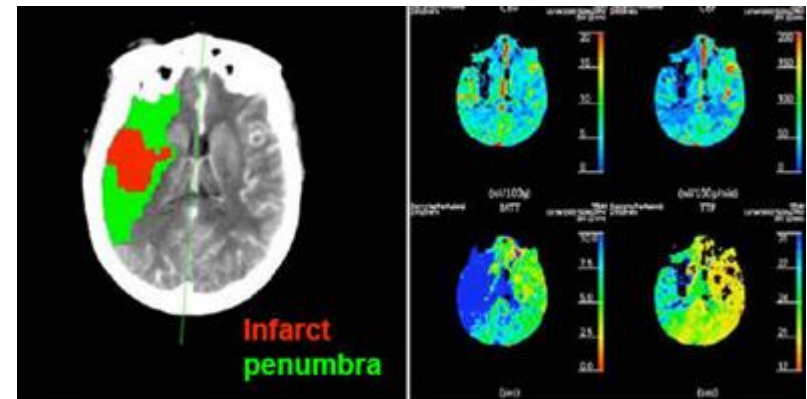
- Oka: nincs glükóz, oxigén, ATP

- *irreverzibilis!*



- A centrális (umbra) rész körüli periférián (a penumbrában) részlegesen csökkent a véráramlás, itt elsősorban apoptotikus folyamatok zajlanak.

- *reverzibilis!*



UMBRA – latin eredetű szó, jelentése „árnyék”

Alternatív sejthalálformák

Nekro(apo)ptózis vagy aponekrózis

APOPTÓZIS



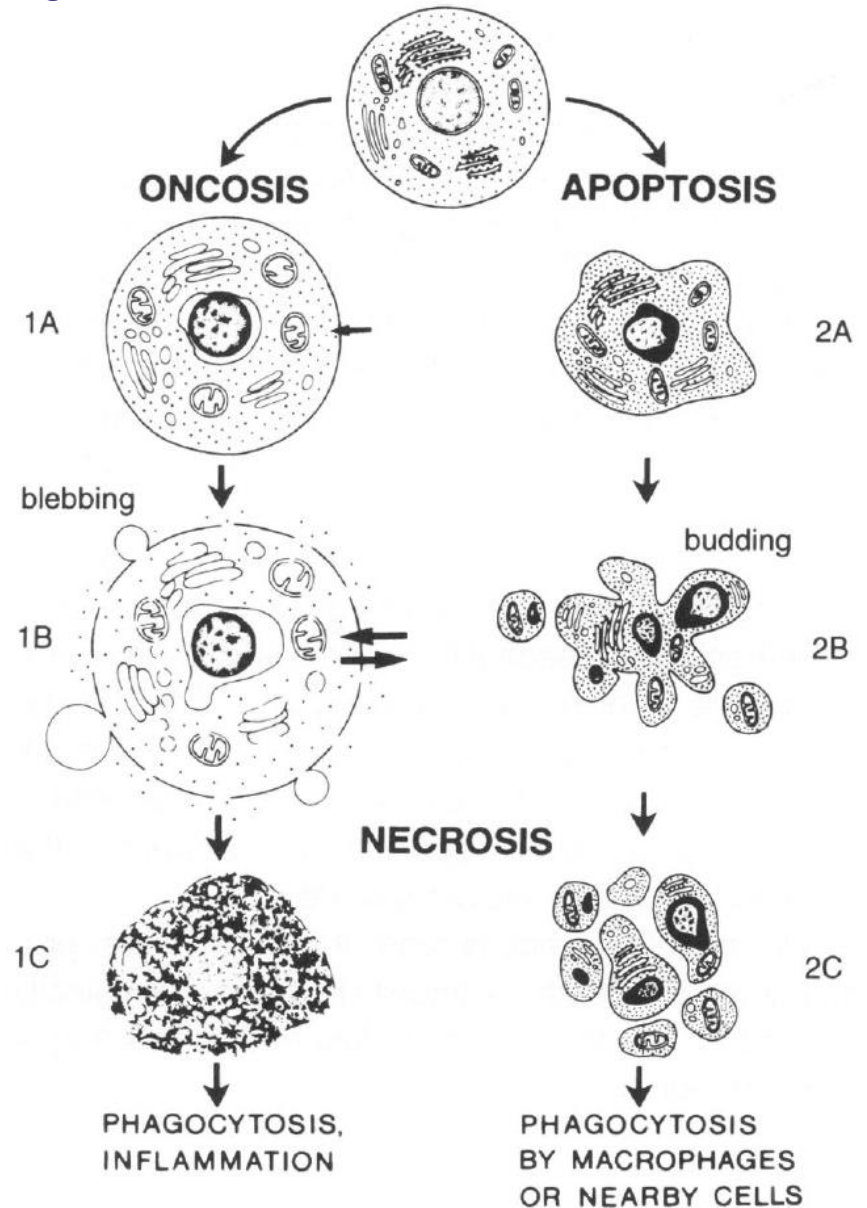
NEKRÓZIS

- Apoptotikusan indul, de a sejtmadványok nem kerülnek időben fagocitózisra → autolízis
- A sejtnak nincs elegendő energiája az apoptózis befejezéséhez → passzív elhalás (szekunder nekrosis)
- Alacsony ATP szint esetén az enyhe, apoptózist kiváltó hatások is nekrozist okoznak

Alternatív sejthalálformák

Onkózis

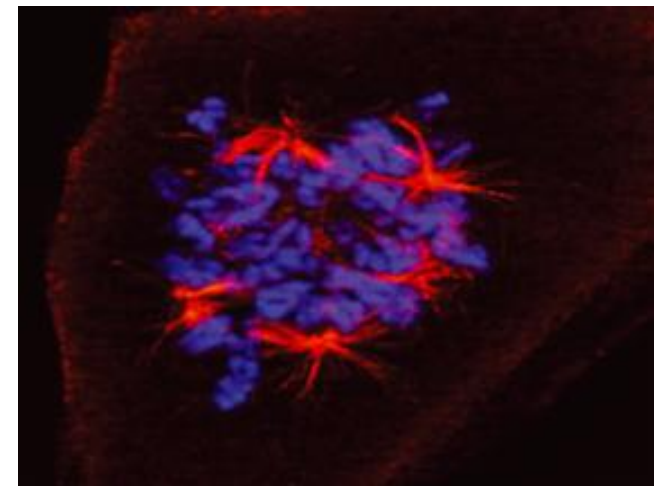
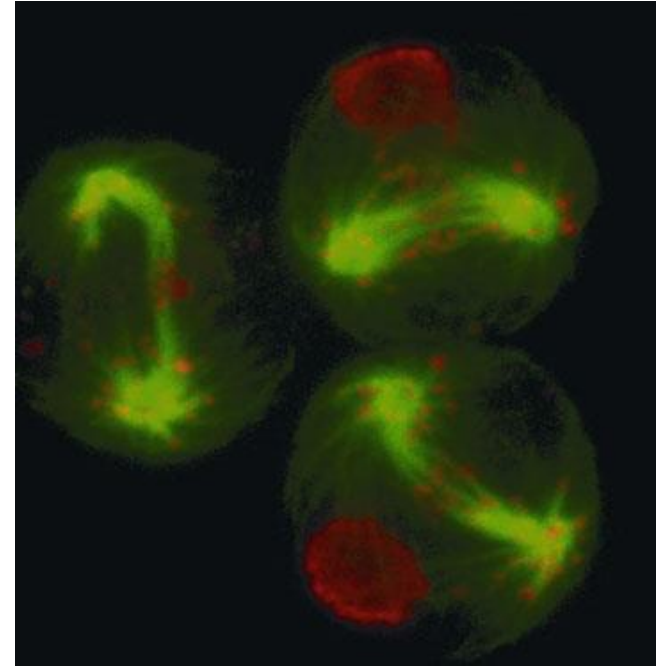
Energiahiány következtében kialakuló
ozmotikus duzzadás



Alternatív sejthalálformák

Mitotikus katasztrófa

- A sejtciklus ellenőrző pontjai meghibásodnak (pl. p53 fehérje kiesése) és a sejtek károsodott DNS-sel is túljuthatnak a sejtciklus G2-M ellenőrzőpontján
- Megkímélt metafázis ellenőrző pont esetén → mitotikus katasztrófa
- Kromoszómák szétválása nem történik meg → óriás sejtek
- (mikronukleáció:kromoszómák fragmentálódnak, multinukleáció: 2 vagy több különböző méretű sejtmag a hibás, citokinezis miatt)
- apoptotikus vagy nekrotikus morfológiával
- Kiváltható:
 - DNS károsító szerekkel
 - mikrotubulus mérgekkel



További sejthalálformák

Parapoptózis

- Insuline-like growth factor-I (IGFR-I) termelés
- ER és mitokondriumok megduzzadásából származó vakuólumok
- Hasonlít az onkózisra, de aktív, energiaigényes
- Kaszpáz inhibitorral vagy anti-apoptotikus Bcl-2-vel nem gátolható

Abortózis

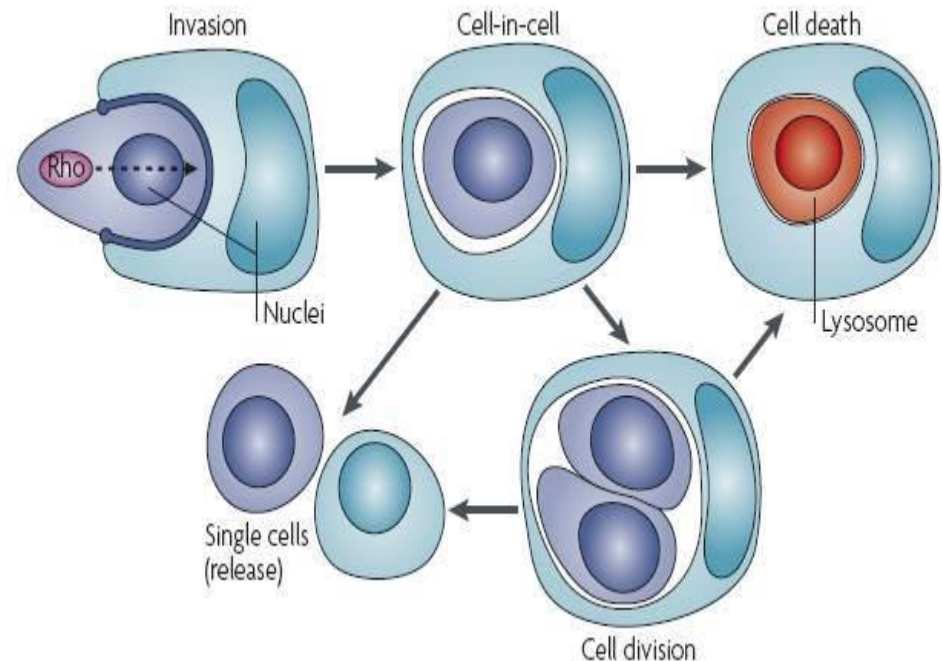
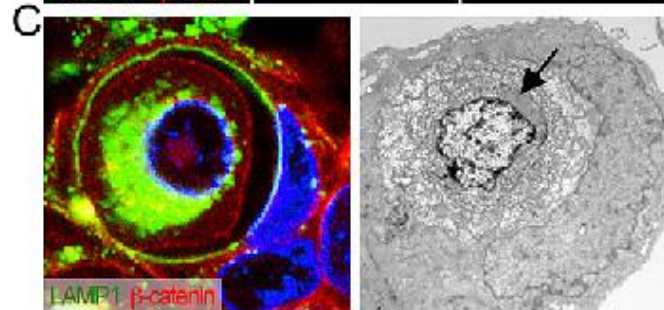
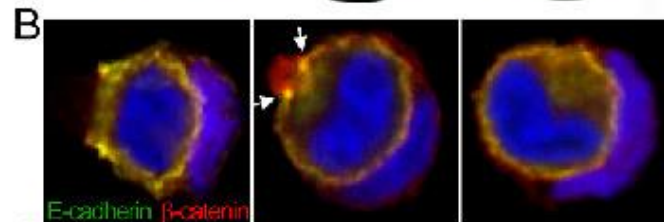
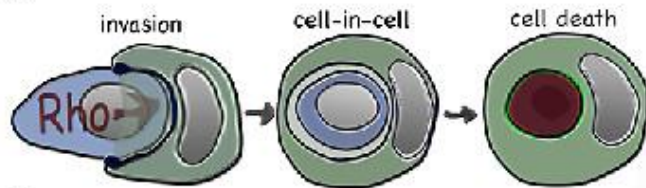
- (Slow cell death, lassú sejthalál)
- „védi” a sejteket a sejthaláltól
- amiloid plakkok – kaszpáz aktiválás – tau foszforilálás – apoptózis
- neurodegeneratív kórképekre jellemző (Alzheimer-, Huntington-, Parkinson-kór)
- lassú folyamat
- zsugorodott citoplazma, piknotikus sejtmag
- intracelluláris zárványtestek

További sejthalálformák

Entózis

- a limfoblasztok celluláris kannibalizmusa Huntington-betegségben
- egy sejt bekebelezi a szomszédos élő sejtet, ami a fagoszómában elpusztul (de időnként túl is élhet)
- pl. MCF-7 (emlő rák sejtek), nincs bennük kaszpáz-3 és beclin-1
- nem gátolható kaszpáz inhibitorral és anti-apoptotikus Bcl-2 vel

A Entosis model



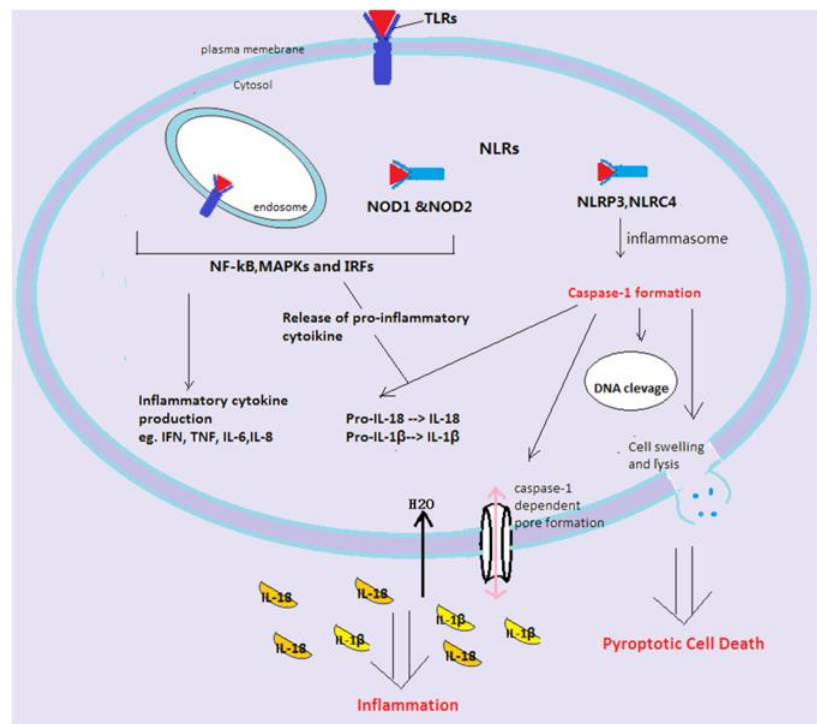
További sejthalálformák

Piroptózis

- Pro-inflammatorikus programozott sejthalál
- Salmonella typhimurium fertőzött makrofágok
- nem az apoptotikus kaszpázok szabályozzák hanem gyulladásoz kaszpázok (pl. kaspáz-1),
- Nod-like receptor komplexeket igényel (pl. Ipaf, Nlrp1): pyroptososome
- IL-1béta és IL-18 citokine termelődnek közben
- apoptótikus és nekrotikus jellemzők is
- fertőzések, hipoxia indukált sejthalálban

Pironekrózis

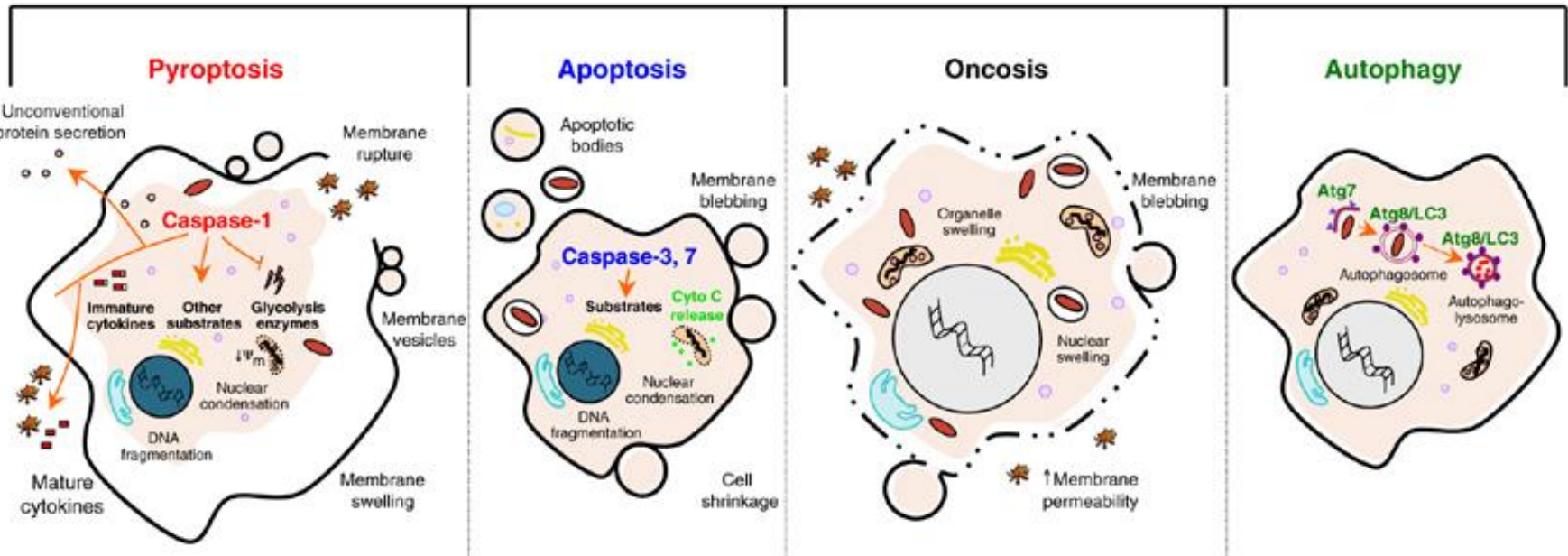
- Nlrp3 és ASC komplex
- S. Flexerni
- Magas baktérium és makrofág arány
- HMGB-1 és IL-1béta termelés



További sejthalálformák

Anoikisz

- hám és izomsejtek ECM-hoz és/vagy szomszédos sejtekhez való tapadásának megszűnése utáni apoptózis

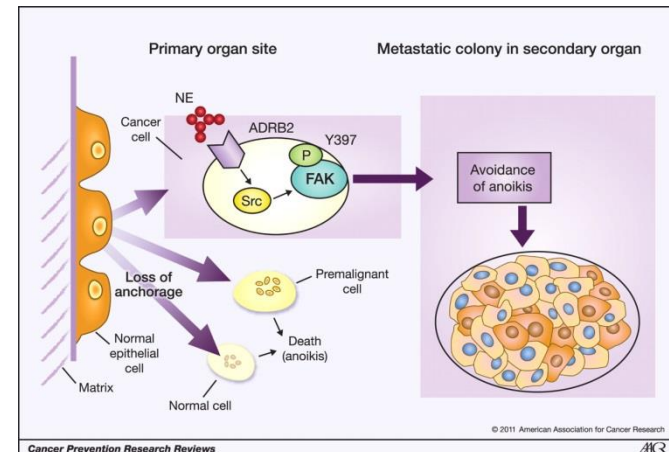
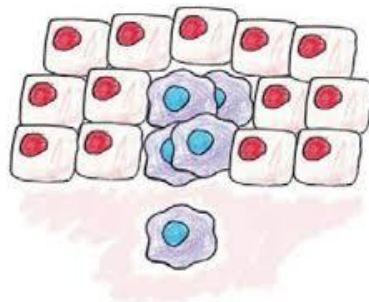
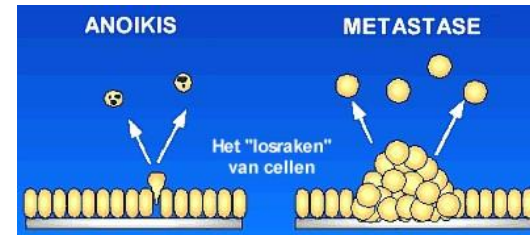
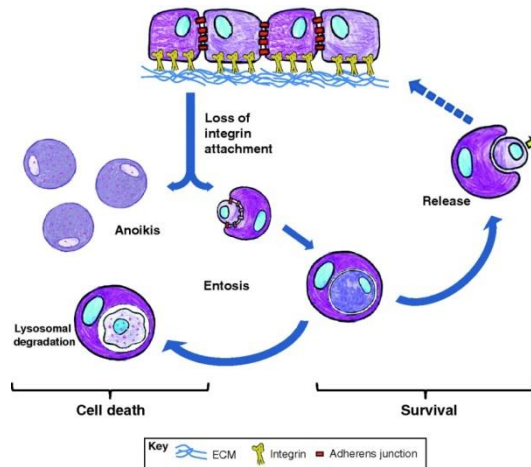


http://www.nature.com/cdd/journal/v15/n9/fig_tab/cdd200891f1.html#figure-title

További sejthalálformák

Anoikisz

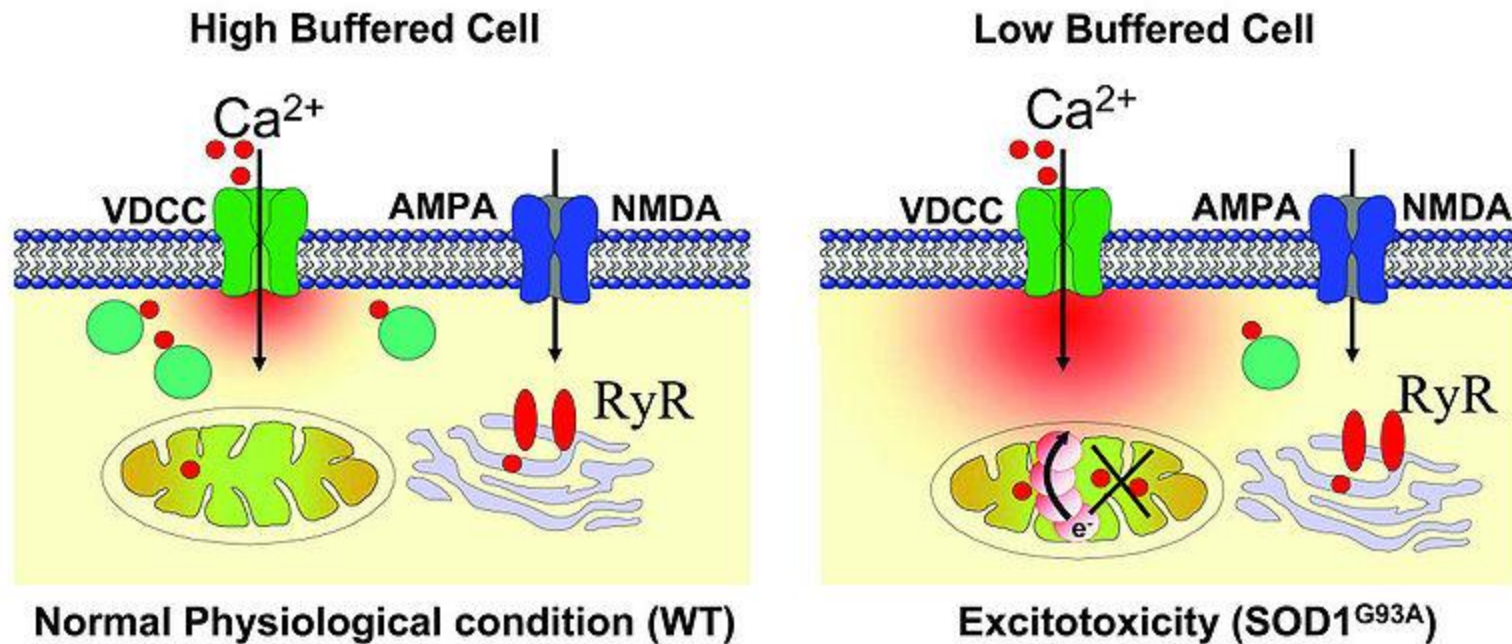
Hám és izomsejtek ECM-hoz és/vagy szomszédos sejtekhez való tapadásának megszűnése utáni apoptózis.



További sejthalálformák

Excitotoxicitás

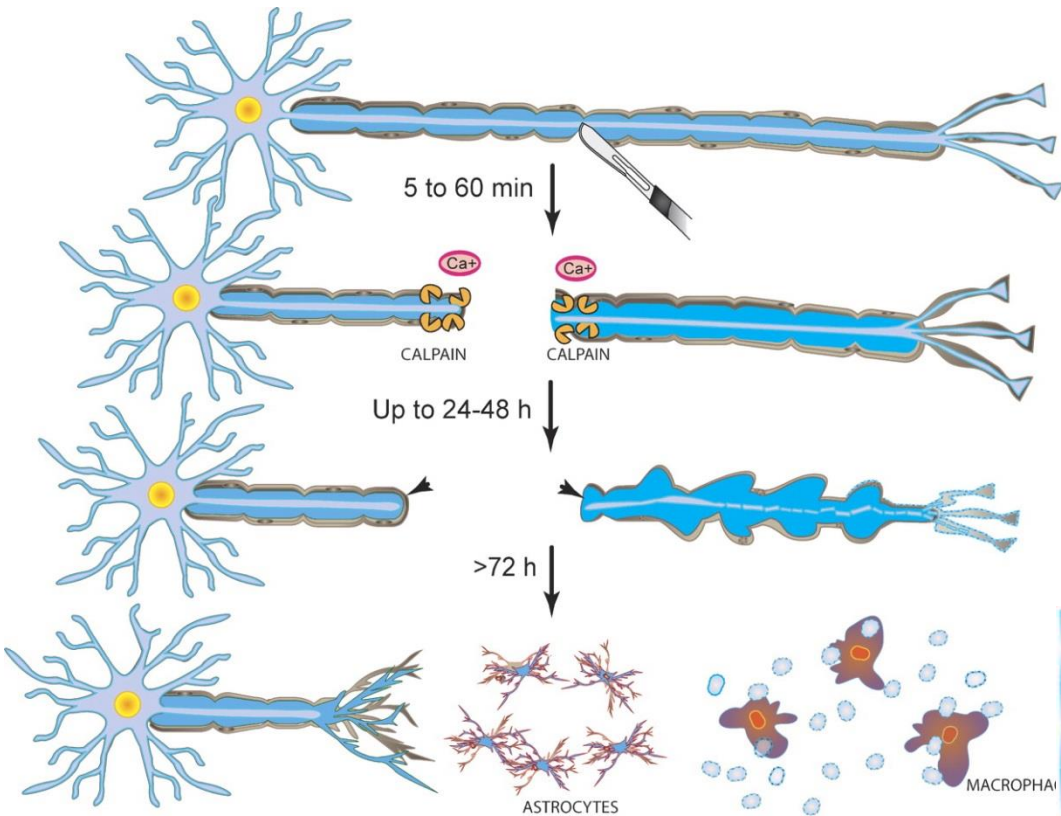
A neuronok sejthalál formája, túlzott excitatórikus aminosav típusú (pl. glutamát) neurotranszmitter érzékelés esetén, Ca-csatornák nyílnak, fokozott ic Ca, halál útvonalak aktiválódnak.



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

További sejthalálformák

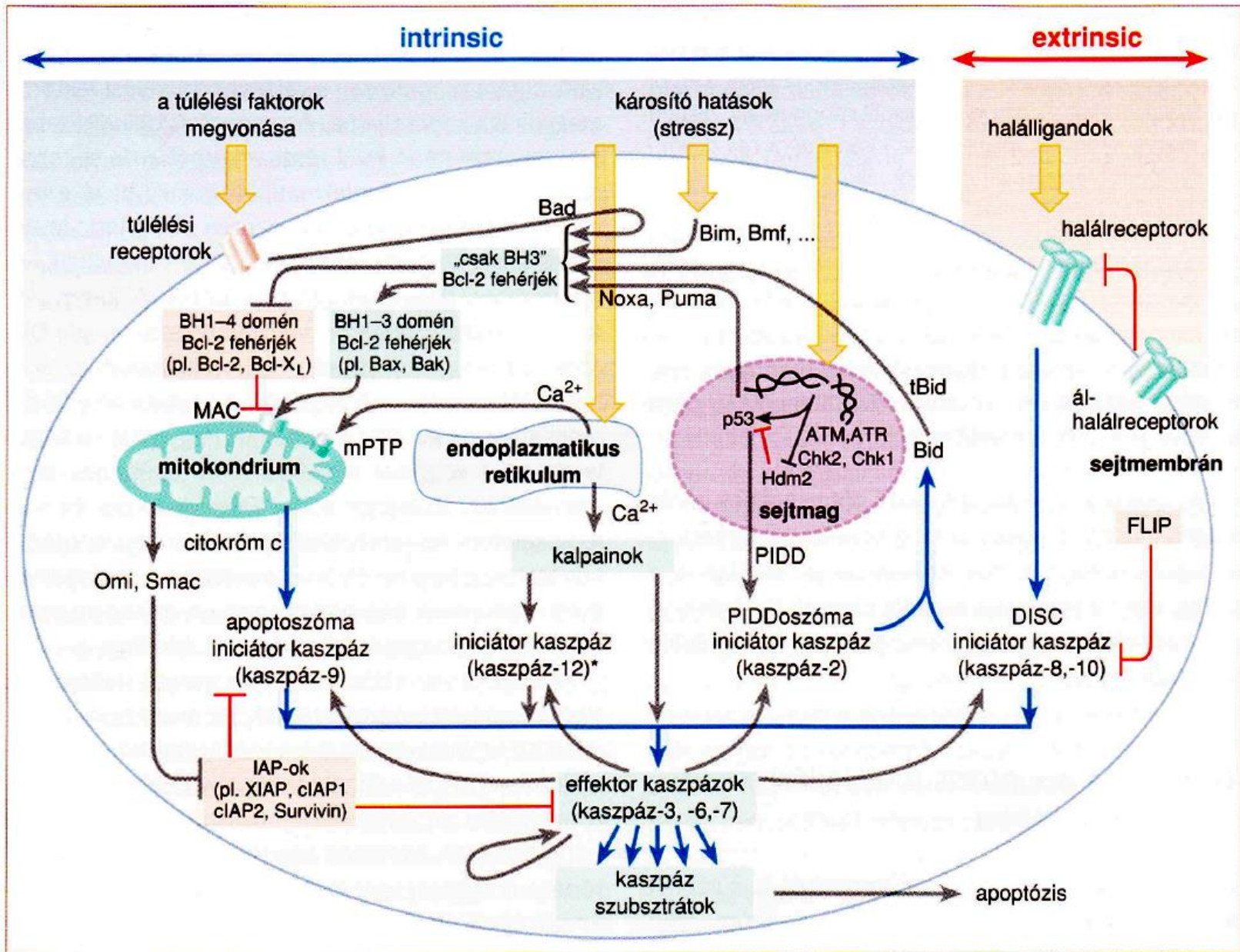
Wallerian degeneráció: a neuron egy része vagy az axon degenerációja anélkül, hogy a fő sejtestet befolyásolná.



Wallerian Degeneration

In less than 24 hours	Neurofilaments break up; axons break up into short lengths
Within 10 days	Myelin sheath breaks down into lipid droplets around the axon
Within a month	Myelin gets denatured chemically
Within three months	Macrophages from the endoneurium invade the degenerating myelin sheath and axis cylinder and phagocytose the debris

Az apoptózis eseményei



Az apoptózis végrehajtói: a kaszpázok

Cisztein proteázok, aszparagin-oldalláncok mentén hasítanak
(caspase: cysteinil asparatate-specific protease)

Prokaspáz formájában minden sejtben jelen vannak

Proteolitikus kaszkád

Csoportjaik:

- Gyulladásos kaszpázok

- Kaszpáz-1, -4, -5

- Apoptotikus kaszpázok

- **Iniciátor kaszpázok**

- Protein interakciós domént tartalmaznak
→ fehérjekomplexekhez kötődve konformációs változás során aktiválódnak (DISC, Apoptoszóma, PIDD-szóma)
- Effektor kaszpázokat aktiválnak
- Kaszpáz-2, -8, -9, -10

- **Effektor kaszpázok**

- citoszkeletális és szabályzó fehérjék (pl. PARP, laminok, stb.) hasítása → sejtalak változás, sejtmag zsugorodás → apoptózis

A kaszpáz-kaszkádot más proteázok is aktiválhatják:

- Granzim B – citotoxikus sejtek teremlik
- Kalpainok – Ca^{2+} aktiválja
- Katepszinek – lizoszómális proteázok

Az apoptózist kiváltó extrinsic útvonal: halálligandok és halálreceptorok

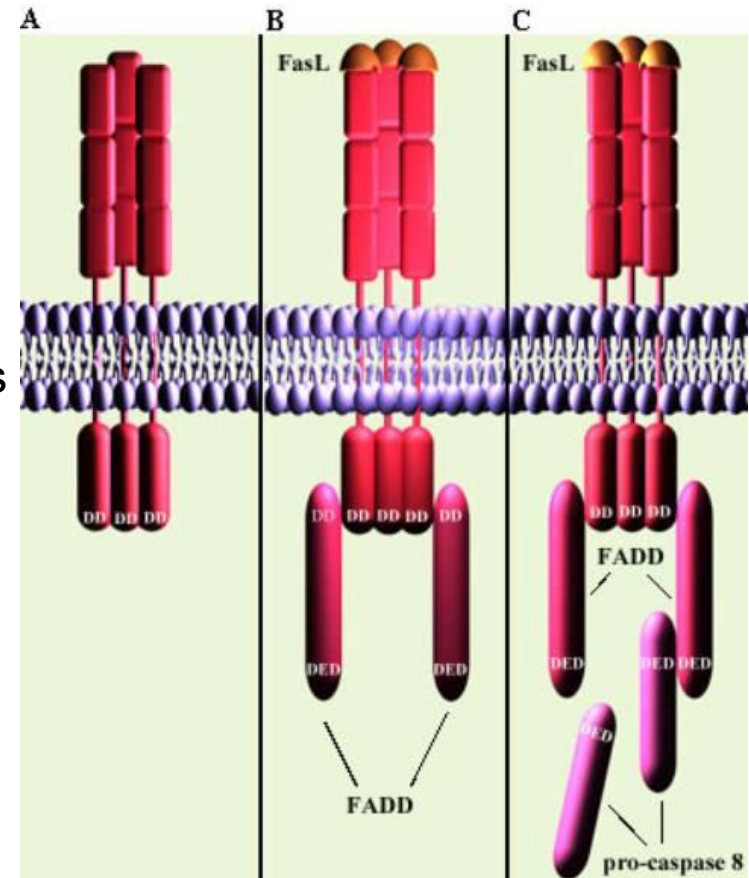
Halálligandok:

- TNF szupercsalád

Halálreceptorok:

- TNF-receptor szupercsalád
- Haláldomén: intracelluláris fehérje interakciós domén
- ligandkötést követően adaptermolekulák kapcsolódnak hozzá → DISC (death inducing signaling complex)

→ prokaspáz-8, -10 → kaspáz-8, -10



DD – death domain

DED – death effector domain

FADD – FAS associated death domain

A halálligandok iránti érzékenység szabályozása

A halálligandok elvonása:

Szolubilis receptorok

- EC domén proteolitikus lehasítása
- alternatív splicing

Ál-halálreceptorok

- Hiányzik az intracelluláris death domén

Halálreceptor-jelátvitel gátlása:

FLIP

- DISC-be épülve gátolja a prokaspázok aktiválódását

Halálreceptorokról közvetített túlélési szignálok:

Más adaptor fehérjék → NF- κ B

→ antiapoptotikus faktorok

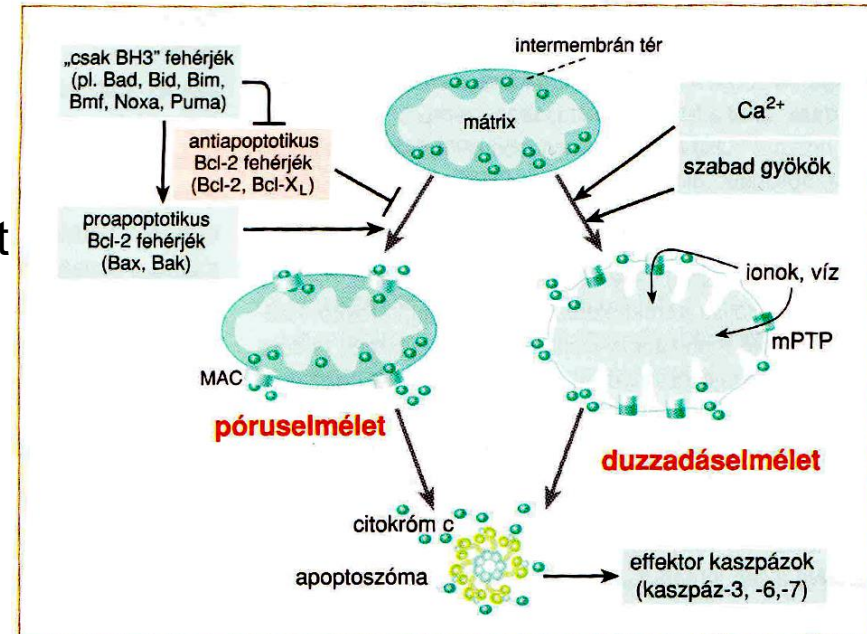
<i>Halálreceptorok</i>	<i>Halál- ligandok</i>	<i>Ál-halál- receptorok</i>
TNFR1 (DR1, CD120a)	TNF	–
Fas (DR2, CD95, Apo-1)	FasL (CD95L)	DcR3
DR3 (Apo-3)	TL1A (DR3L, VEGI)	
TRAILR1 (DR4, Apo-2)	TRAIL	DcR1 (TRAILR3)
		DcR2 (TRAILR4)
TRAILR2 (DR5)		osteoprotegrin (OPG)
DR6	?*	–

Az apoptózist kiváltó intrinsic útvonalak: a mitokondriumok szerepe

A külső mitokondriális membránok permeabilizálódása:

1. Duzzadás → a külső membrán ruptúrája
 - permeabilitási tranzíciós pórus (mPTP) a belső membránban
 - megacsatornák (<1,5 kDa)
 - a belső membrán duzzadása
 - a külső membrán ruptúrája
 - Ca^{2+} és szabadgyökök kiváltotta apoptózisban
2. Mitokondriális apoptózis indukált csatornák (MAC)
 - nagyobb átmérő → fehérjék is átjuthatnak
 - Bcl-2 fehérjecsalád
 - Antiapoptotikus: gátolja a megnyílést
 - pl. Bcl-2
 - Proapoptotikus: serkenti a megnyílést
 - pl. Bax

*PTP –
permeabilitási tranzíciós pórus*

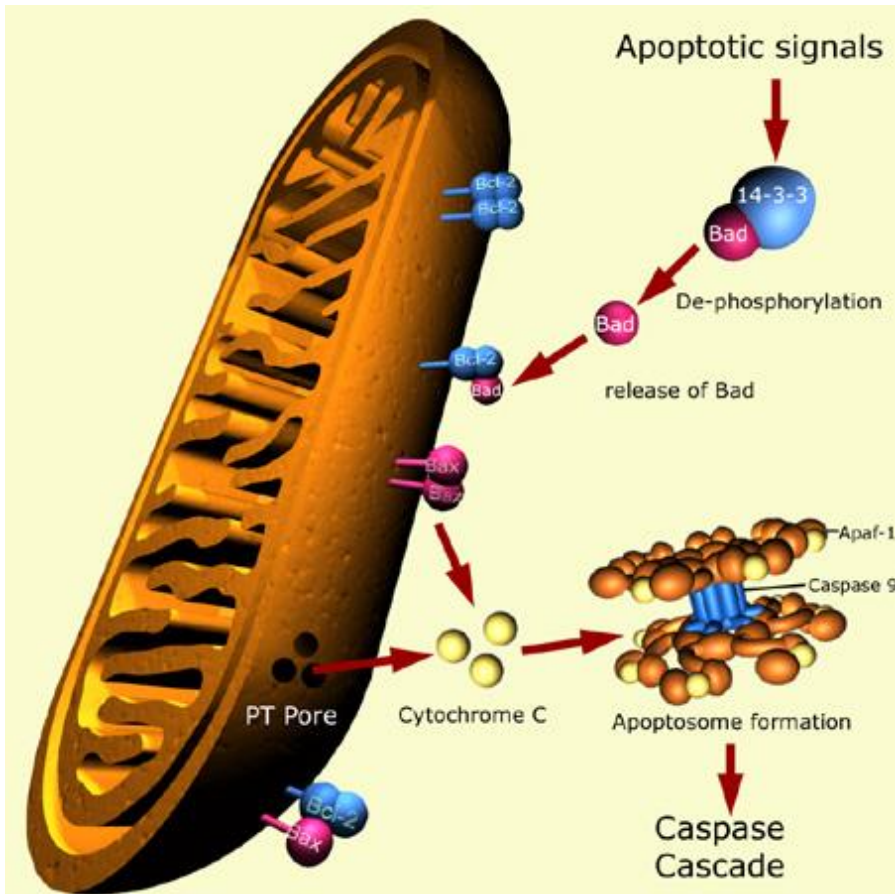


Az apoptózist kiváltó intrinsic útvonalak: a mitokondriumok szerepe

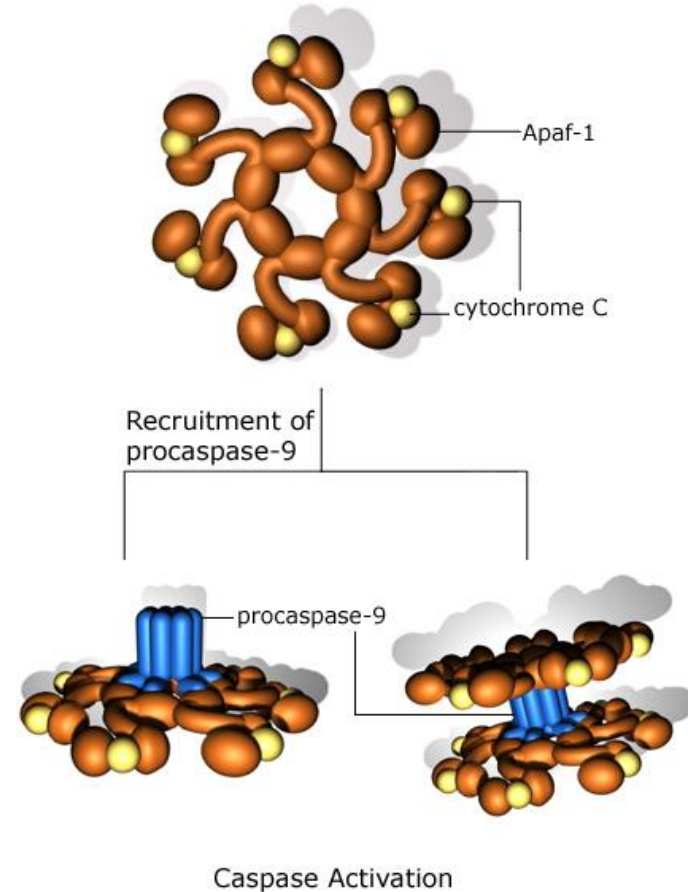
Mitokondriumokból felszabaduló molekulák → apoptózis

Citokróm-C (citoszolban) + Apaf adapterfehérje + ATP + prokaspáz-9

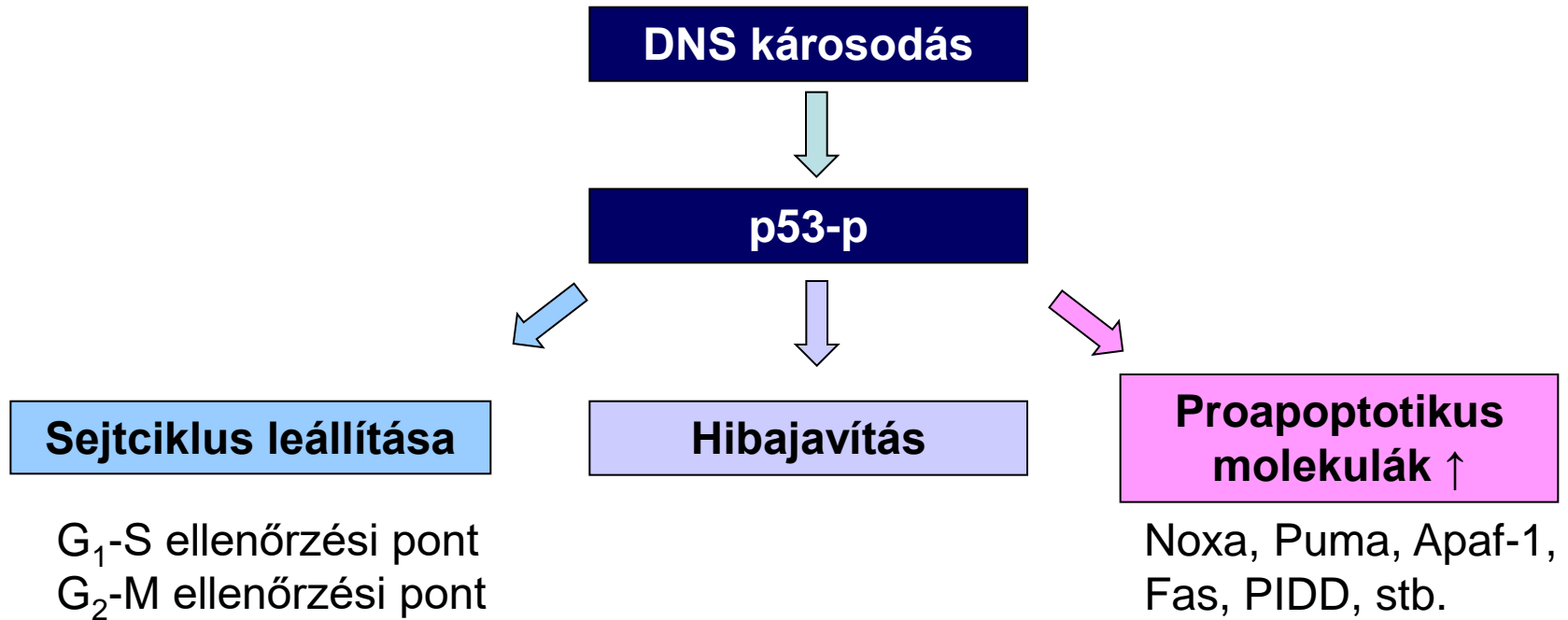
→ Apoptoszóma (7-7 egységből áll) → effektor kaszpázok
aktiválása



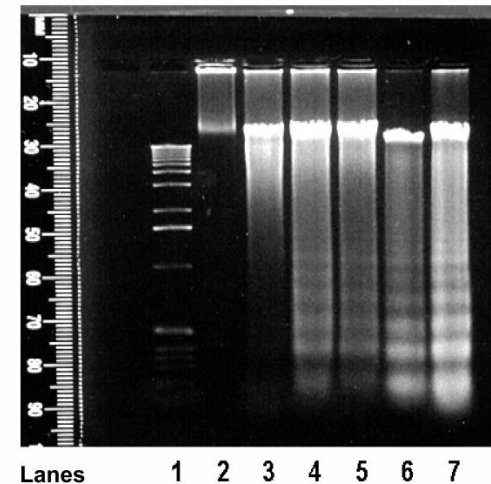
First stage of apoptosome formation



Sejtmag és apoptózis



Endonukleáz-G, **AIF** → DNS fragmentáció



Endoplazmatikus retikulum és apoptózis - mitokondrium *független* útvonalak -

ER → Ca^{2+} felszabadulás

→ Kalpainok (proteázok)

→ Kalcineurin → Bad defoszforiláció és aktiváció
(proapoptotikus)

→ **Szöveti transzglutamináz** → fehérje keresztkötések
→ nekrozis gátlása/apoptózis

Lizoszómák → katepszin felszabadulás

Az apoptózis gátlása

Apoptózis inhibitor fehérjék (IAP)

Az intrinsic útvonalat és az effektor kaszpázokat gátolják

- XIAP
- IAP
- Survivin
- Livin

A mitokondriumokból kiszabaduló IAP gátlók (Omi, SMAC) apoptózist váltanak ki

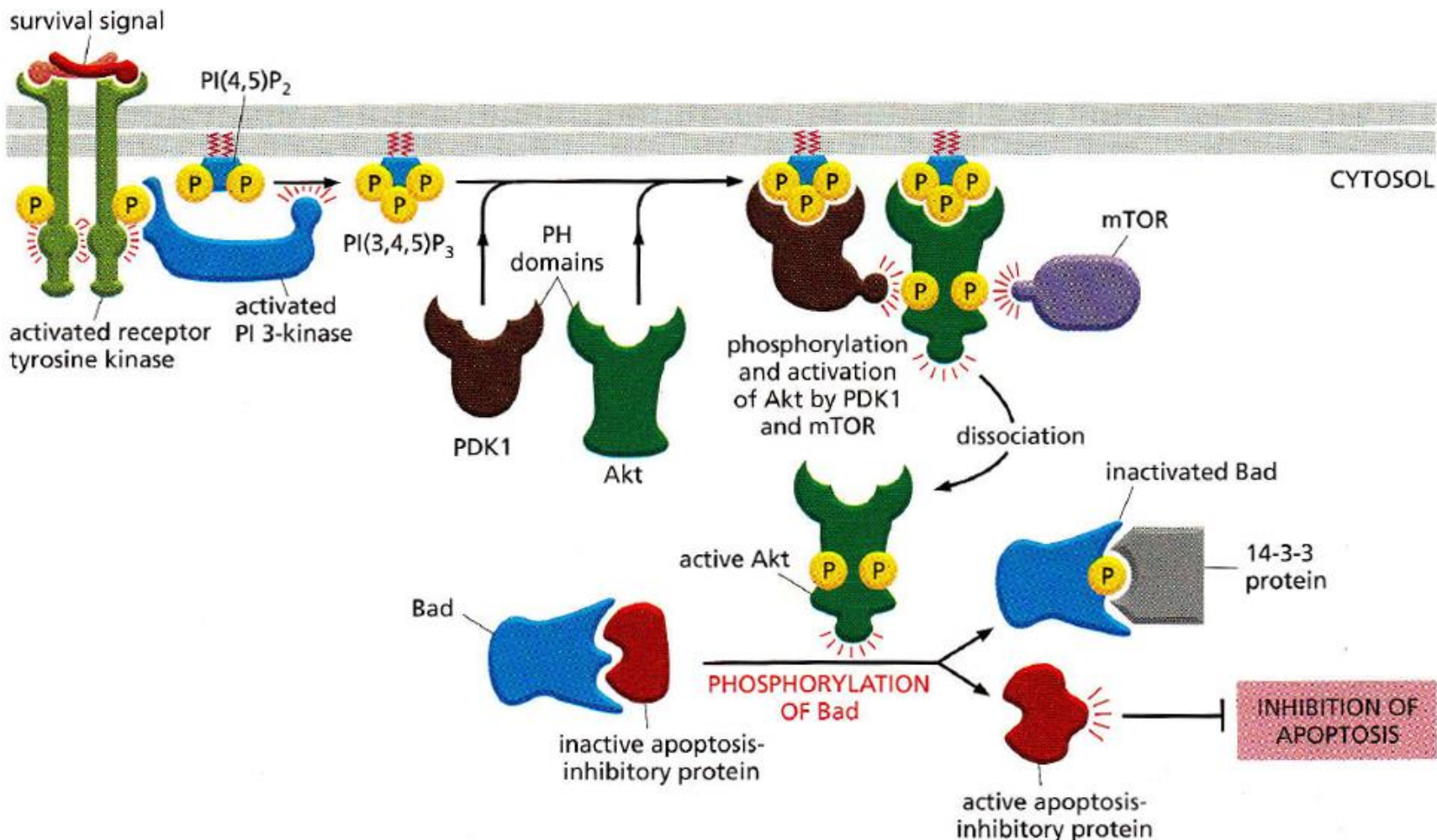
Hősokkfehérjék

Túlélési szignálok

Trófikus faktorok, sejt-sejt közötti állomány, sejt-sejt közötti kölcsönhatás

Neurotrofinok → Receptor tirozinkinázok → PI3K-Akt útvonal

Letapadás – Integrinek → citoskeletális rendszer → Fokális adhéziós kináz (FAK)



A sejthalál vizsgálati módszerei

Életképesség vizsgálatok

- sejtszámolás – Tripán-kék
- az MTT assay - az élő sejtszám meghatározása
 - MTT - tetrazólium gyűrű
 - mitokondriális hasítás - az élet jele
 - oldhatatlan formazán - kolorimetriás meghatározás

Necrosis vizsgálatok – Membránruptúra

- Nagyméretű DNS festékek (Propidium-jodid, SYTOX)
- A sejtekből necrosis hatására felszabaduló enzimek aktivitásának mérése
 - laktát-dehidrogenáz (LDH), glukóz-6-P dehidrogenáz (G6PD)

Apoptosis vizsgálati lehetőségek

1. Korai apoptosis

- membránperturbáció - annexin-V, FITC, áramlási citometria
- DNS fragmentáció - specifikus ELISA

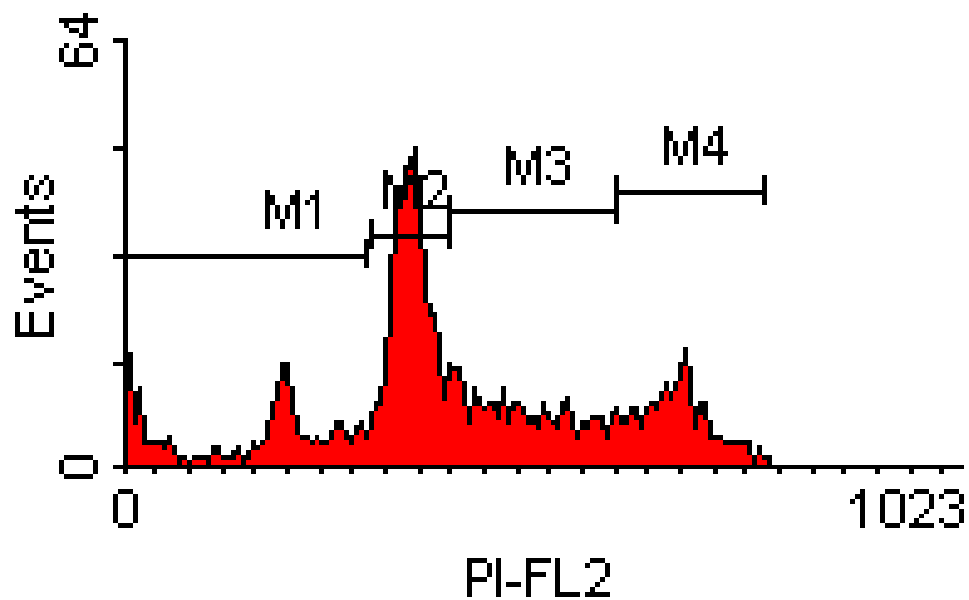
2. Késői apoptosis

- necroticus jelleg
- propidium-jodid - magfestés, flow cytometry

Sejtciklusanalízis

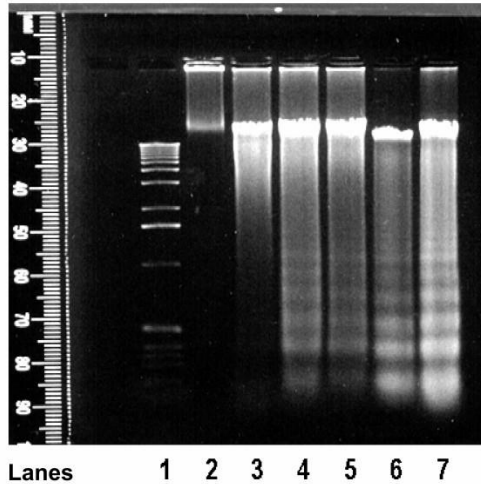
Propídium-jodid jelölés

Áramlásos citometria



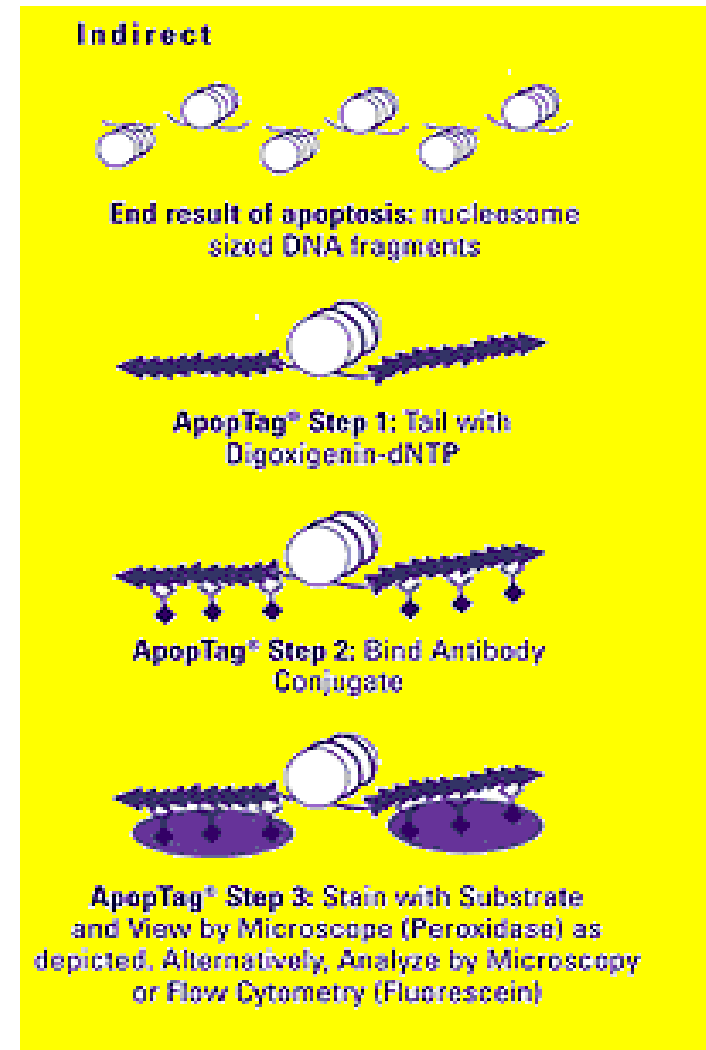
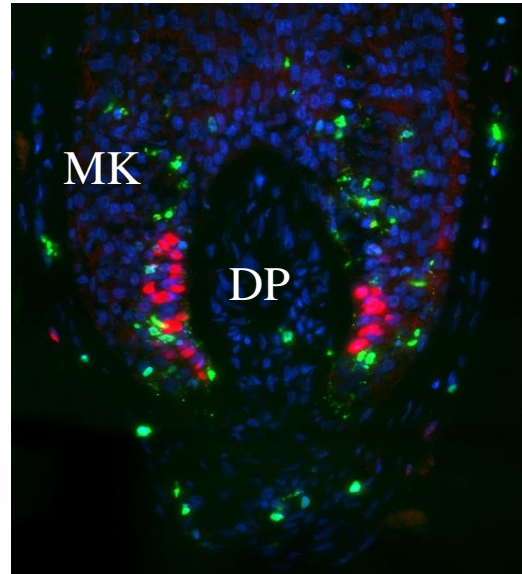
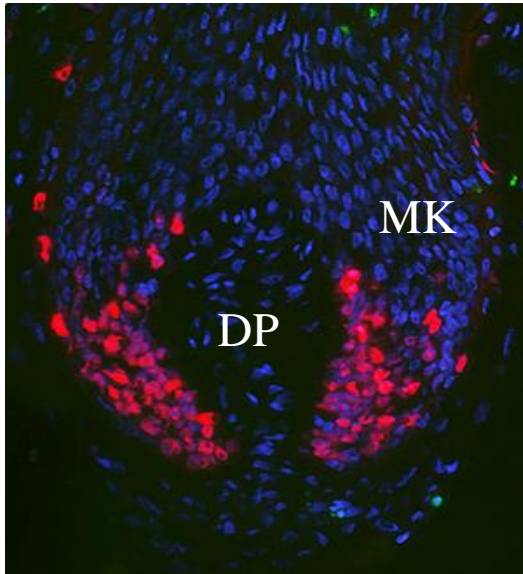
Az apoptózis vizsgálata

A DNS fragmentáció kimutatása



TUNEL assay:

Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling



Az apoptózis vizsgálata Annexin-V jelölés

Apoptózis:

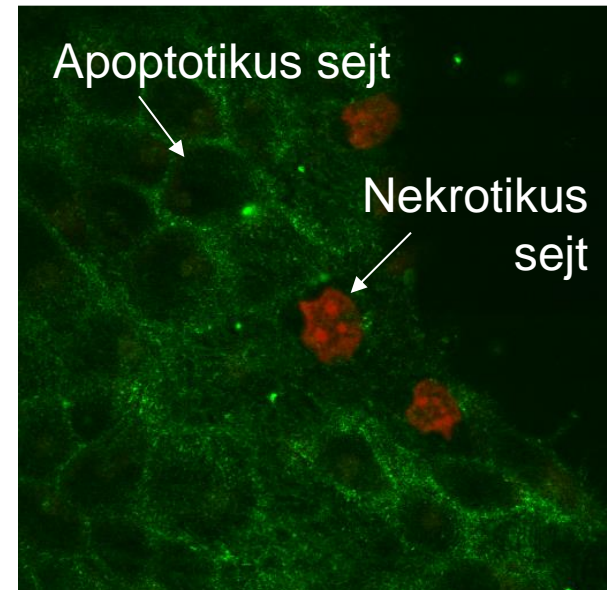
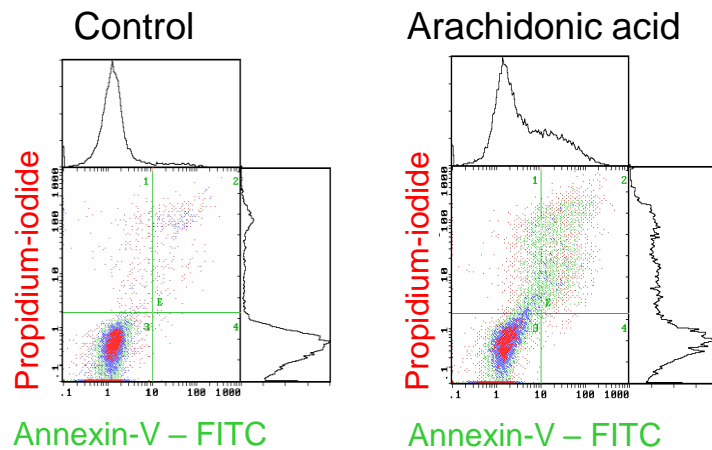
Foszfatidil-szerin externalizáció – Alexa Fluor488 konjugált annexin-V

Em/Ex: 488/520

Nekrózis:

Membránruptúra – Propidium-jodid

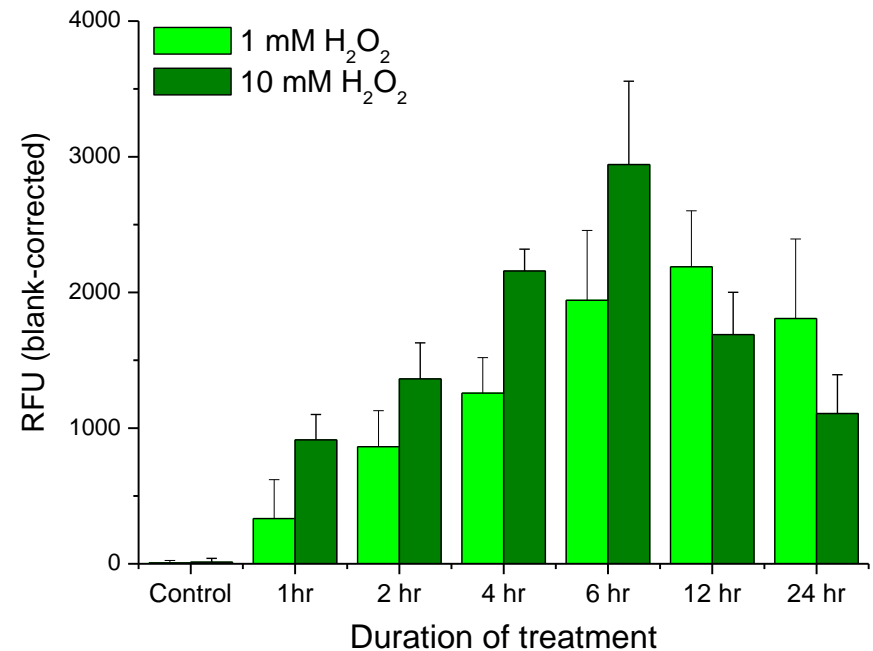
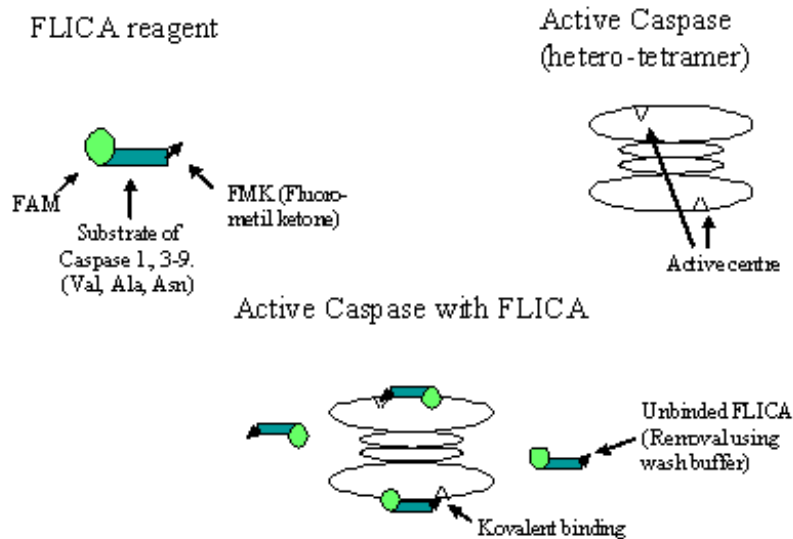
Em/Ex: 530/620



Az apoptózis vizsgálata

A kaspázaktivitás kimutatása

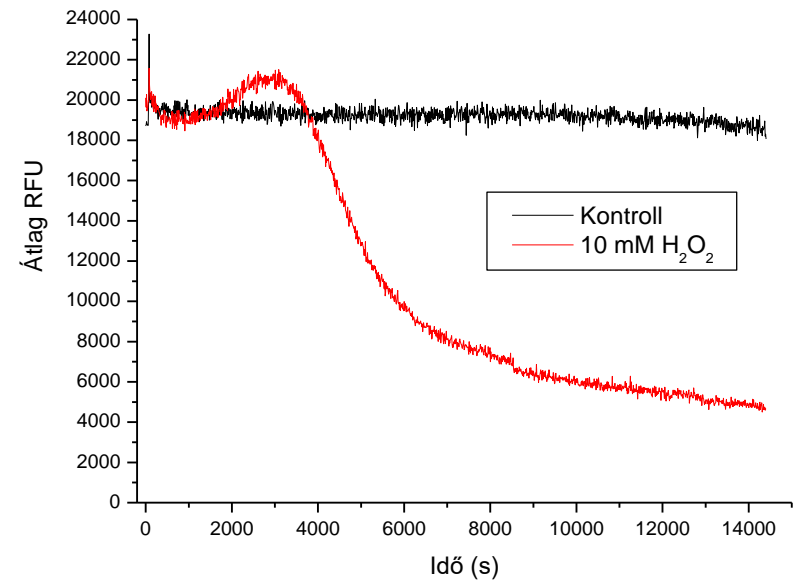
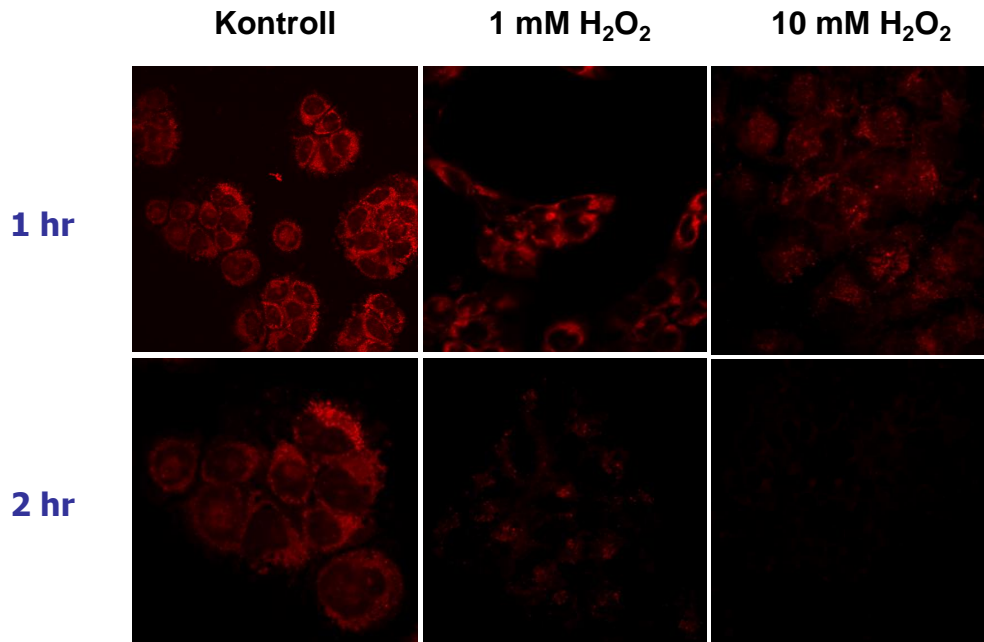
FAM jelölt FLICA reagens
(a kaspázok aktív centrumához kovalensen kötődő inhibitor)



Az apoptózis vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

Mitokondriális membránpotenciálhoz asszociáló festékek



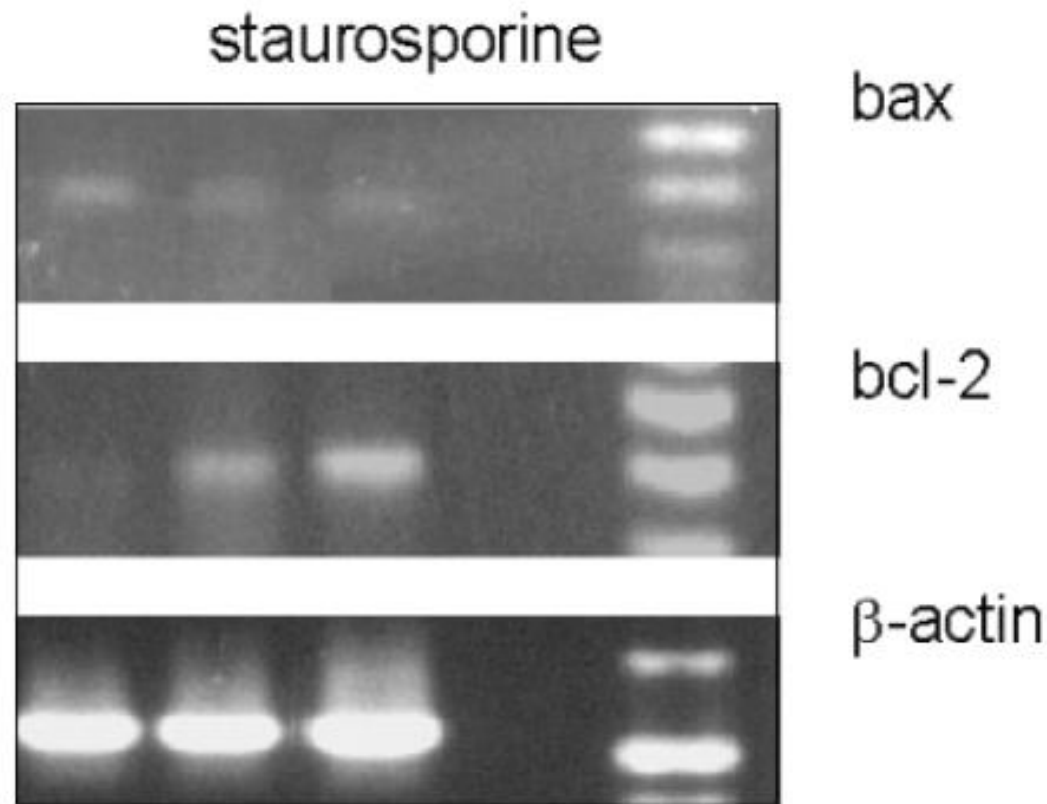
Az apoptózis vizsgálata

Az apoptózisban résztvevő molekulák kimutatása

Pl.: Bcl-2/Bax arányának vizsgálata

Bax – proapoptotikus

Bcl2 – antiapoptotikus



Köszönöm a figyelmet!