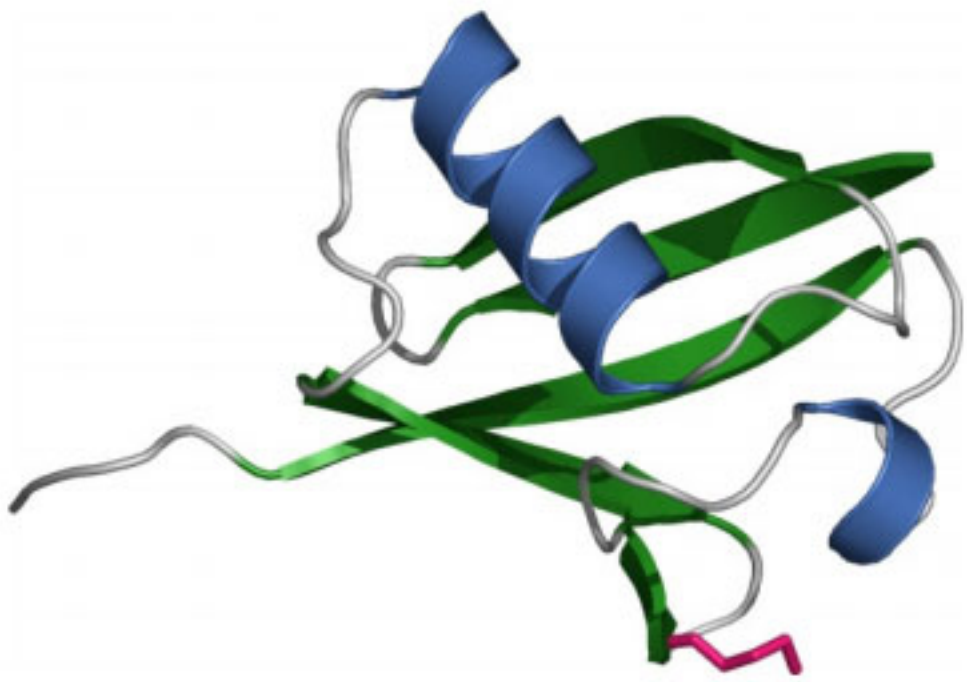
EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR



AZ ÖNEMÉSZTÉS, SEJTPUSZTULÁS ÉS MEGÚJULÁS MOLEKULÁRIS SEJTBIOLÓGIÁJA

dr. JUHÁSZ GÁBOR
dr. KOVÁCS ATTILA
dr. LÁSZLÓ LAJOS
dr. LŐW PÉTER

Az önemésztés, sejtpusztulás és megújulás molekuláris sejtbiológiája

dr. Juhász Gábor
dr. Kovács Attila
dr. László Lajos
dr. Lőw Péter

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az önemésztés, sejtpusztulás és megújulás molekuláris sejtbiológiája

írta dr. Juhász Gábor, dr. Kovács Attila, dr. László Lajos, és dr. Lőw Péter
Szerkesztette:
dr. Lőw Péter
Lektorálta:
dr. Bánhegyi Gábor, a Semmelweis Egyetem Orvosvegytani Intézetének igazgatója
Szerzői jog © 2013 Eötvös Loránd Tudományegyetem

E könyv kutatási és oktatási célokra szabadon használható. Bármilyen formában való sokszorosítása a jogtulajdonos írásos engedélyéhez kötött.

Készült a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú, „E-learning természettudományos tartalomfejlesztés az ELTE TTK-n” című projekt keretében. Konzorciumvezető: Eötvös Loránd Tudományegyetem, konzorciumi tagok: ELTE TTK Hallgatói Alapítvány, ITStudy Hungary Számítástechnikai Oktató- és Kutatóközpont Kft.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638

MAGYARORSZÁG MEGÚJUL

ÚJ SZÉCHENYI TERV

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Tartalom

I. Bevezetés – A celluláris önemésztés tanulmányozásának alapjai ... 1
A testalkotók lebontásának, a fehérje metabolizmus folyamatának és kutatásának jelentősége ... 1
A fehérje metabolizmus vizsgálatának kezdetei ... 1
Új szemlélet, a testfehérjék dinamikus állapotának felfedezése ... 2
Az intracelluláris fehérjelebontás létezésének közvetlen kísérleti bizonyítékai és további kérdések ... 3
Az intracelluláris lebontó folyamatok komplexitásának feltárása; teljes citoplazma részek és organellumok lebontása autofágia révén ... 5
A hosszú és rövid életidejű fehérjék lebontásának különbözőségei, a két fő lebontó mechanizmus létezésének felismerése ... 6
Az autofágia folyamatának felfedezése és elektronmikroszkópos vizsgálatának kezdetei ... 7
Az autofág vakuólák alapvető jellegzetességei és elektronmikroszkópos felismerésük kritériumai ... 9
Az autofág folyamatok altípusai ... 19
Az autofágia előfordulása és az elektronmikroszkópos eredmények alapján feltételezett legfontosabb funkciói ... 20
Hogyan viszonyul egymáshoz az autofágia és a biokémiai módszerekkel mérhető lizoszomális fehérje lebontás? ... 21
Az izoláló membrán keletkezésének néhány kérdése ... 27
Ellenőrző kérdések ... 35
Irodalom ... 35
II. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer ... 44
1. Bevezetés ... 44
2. Az ubiquitin szerkezete, feladatai, és az ubiquitiniláció enzimrendszere ... 44
Az ubiquitin a fehérjebontási útvonalak általános jelzőmolekulája ... 44
Az ubiquitin közvetítette fehérjebontás felfedezése ... 45
Az ubiquitin szerkezete ... 46
Ubiquitin gének ... 47
Az ubiquitin feladatai ... 48
Az ubiquitiniláció enzimrendszere ... 50
Az ubiquitin ligázok és a szubsztrát felismerés ... 53
A deubiquitiniláló enzimek ... 61
Az ubiquitin rokonai ... 62
Ellenőrző kérdések ... 66
Irodalom ... 66
3. A proteaszóma szerkezete és működése ... 68
A 26S proteaszóma ... 68
A 20S proteaszóma szerkezete ... 70
A szabályozó komplexum ... 76
Ellenőrző kérdések ... 81
Irodalom ... 81
4. Példák az ubiquitin-proteaszóma rendszer feladataira ... 82
dER minőségellenőrzés ... 82
Neurodegeneratív betegségek ... 83
Autofágia szabályozás ... 89
Ellenőrző kérdések ... 93
Irodalom ... 94
5. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer szerepe az apoptózis szabályozásában ... 95
Apoptózis ... 95
Ubiquitinilálódó célpontok az apoptózis útvonalán ... 98
Az ubiquitin-proteaszóma rendszer részvétele a jelátviteli folyamatokban ... 108
Ellenőrző kérdések ... 111
Irodalom ... 112
III. Autofágia ... 113
6. A lizoszómák ... 113
A lizoszómák feladatai ... 113
A lizoszómák felépítése ... 113

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A lizoszómák felfedezése, a lizoszóma-koncepció felállítása ... 115
A lizoszómák morfológiai azonosítása ... 115
A lizoszomális enzimek útja a lizoszómába ... 117
A lebontandó anyagok útja a lizoszómákba ... 119
A lebontandó anyagok útja a lizoszómákba - az endoszomális útvonal ... 119
Lizoszóma-szerű sejtorganellumok ... 122
Lizoszomális tárolási betegségek ... 122
Lizoszomotróp ágensek ... 132
Ellenőrző kérdések ... 133
Irodalom ... 133
7. Az autofág gének felfedezése és működése ... 134
Az autofágia fő útvonalai ... 134
Az autofág (Atg) gének azonosítása élesztőben ... 137
Az Atg fehérjék működése ... 141
Ellenőrző kérdések ... 142
Irodalom ... 142
8. Az autofágia mechanizmusa, jelentősége és TOR kináz-dependens szabályozása gerinctelen modellállatokban ... 143
Talajlakó fonalférgek (példa: *Caenorhabditis elegans*) ... 143
Rovarok (példa: *Drosophila melanogaster*) ... 145
Az autofág fehérjekomplexek működése állati sejtekben ... 152
Ellenőrző kérdések ... 153
Irodalom ... 153
9. Az autofágia kutatás során jelenleg leggyakrabban alkalmazott módszerek élesztő, gerinctelen és emlős rendszerekben ... 153
Az Atg fehérjék hierarchiája ... 153
Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia ... 154
Transzmissziós elektronmikroszkópia ... 156
Western blot ... 157
Genetikai analízis ... 159
Gátlószerek alkalmazása ... 159
Autofág fluxus vizsgálata ... 161
Ellenőrző kérdések ... 163
Irodalom ... 163
10. Az autofágia élettani és patológiás szerepe emlősökben ... 164
Az éhezés túlélése ... 164
A megfelelő egyensúly (homeosztázis/homeodinamika) fenntartása az eukarióta sejtekben és élőlényekben ... 165
Autofágia és öregedés ... 166
Az autofágia és a sejthalál ... 167
Adaptív immunválasz és gyulladás ... 168
Az autofágia szerepe az egyéb betegségekben ... 170
Ellenőrző kérdések ... 170
Irodalom ... 170
11. Szelektív autofág lebontás ... 171
Chaperone-mediált autofágia ... 171
Mikroautofágia ... 171
(Makro)autofágia ... 172
Ellenőrző kérdések ... 176
Irodalom ... 176
12. Az autofágia szerepe a sejtnövekedés és a rák kialakulása során ... 177
Az autofágia és a sejtnövekedés rendszerint fordított arányban állnak ... 177
Az Atg gének szerepe a tumor szuppresszióban ... 177
A p62/Keap1/Nrf2 útvonal ... 178
Metabolikus stressz ... 179
Warburg effektus ... 180
Onkogén és non-onkogén addikciós útvonalak ... 180
Az autofágia pro-tumor és tumor szuppresszor hatásai ... 181

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ellenőrző kérdések ... 182
Irodalom ... 182
13. Az autofágia szerepe az idegsejtek pusztulásával járó betegségekben ... 182
A neurodegeneratív betegségek meghatározása ... 182
A fehérje homeosztázis fenntartásának eszközei ... 186
A citoprotektív mechanizmusok egymásra épülése ... 188
Mitől is pusztulnak a neuronok? ... 198
Ellenőrző kérdések ... 199
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 200
IV. Apoptózis ... 202
14. Az apoptózis felfedezése és jellemzése *C. elegans*-ban ... 202
A sejtpusztulás vizsgálatának korai szakasza ... 202
A programozott sejthalál hipotézisének igazolása, genetikai és molekuláris folyamatainak alapvető jellemzése a *Caenorhabditis elegans* fejlődésének tanulmányozása alapján ... 205
Ellenőrző kérdések ... 210
Irodalom ... 211
15. A kaszpázok szerepe az apoptózisban ... 211
Az apoptózis jelensége ... 212
A kaszpáz molekulacsalád ... 213
A kaszpázok élettani funkciói ... 218
Az apoptózis és a kaszpáz aktivitás betegségekben betöltött szerepe ... 222
Ellenőrző kérdések ... 222
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 222
16. A sejthalál receptorok, apoptózis külső stimulusra (I. típus) ... 223
Indukció a halál receptorokon keresztül ... 223
A DISC komplex ... 224
Receptor-függő sejthalál útvonalak ... 229
Ellenőrző kérdések ... 233
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 234
17. A Bcl-2 fehérjecsalád és az apoptózis ... 234
A gerincesek Bcl-2 fehérjecsaládja ... 235
A külső mitokondriális membrán ellenőrzésének fontossága ... 236
A Bcl-2 fehérjék nem-apoptotikus funkciói ... 242
Ellenőrző kérdések ... 242
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 242
18. A mitokondriumok, apoptózis belső stimulusra (II. típus) ... 243
A mitokondriumok morfológiája és hálózata ... 243
A mitokondriális hálózat átszervezésének jelentősége ... 248
A mitokondrium és az apoptotikus szignálok ... 248
A mitokondriális sejthalál kaszpáz-függő és kaszpáz-független útvonala ... 253
A külső és a belső halálszignál útvonal összekapcsolása ... 254
Ellenőrző kérdések ... 254
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 255
19. Az apoptózis szabályozása: a IAP-ok, a hősokk fehérjék és a p53 ... 256
A IAP fehérjecsalád ... 256
Az apoptózis-szabályozó hatások ... 257
A hősokk fehérjék ... 260
A p53 szerepe az apoptózis szabályozásában ... 264
Ellenőrző kérdések ... 267
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 267
20. Az apoptózis és az immunrendszer működése ... 268
Az öröklött és a szerzett immunitás ... 269
A T limfociták, mint ölő sejtek ... 269
Az apoptotikus sejtmaradványok eltakarítása ... 271
A piroptózis ... 275
Ellenőrző kérdések ... 278
Felhasznált és ajánlott irodalom ... 278
V. Függelék ... 280

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

I. fejezet - Bevezetés – A celluláris önemésztés tanulmányozásának alapjai

A testalkotók lebontásának, a fehérje metabolizmus folyamatának és kutatásának jelentősége

Első látásra talán különös lehet, hogy az emésztés és a pusztulás fogalma egy címben szerepel a megújulással. Ez a látszólagos ellentmondás valójában az élet lényegét tükrözi. A normális működés fenntartásához és a megfelelő alkalmazkodáshoz, a hibák kijavításához ugyanis folyamatosan meg kell újulniuk az élőlényeknek. A megújulás feltétele a testet felépítő korábban létrejött alkotórészek lebontása, amelyek közül különös fontosságúak a fehérjék. A lebontó folyamatok makromolekulákat, organellumokat és sejteket egyaránt eltávolítanak. Tanulmányozásuk viszonylag új tudomány terület, kezdetei a múlt század közepére vezethetők vissza. A róluk való tudásunk még mindig erősen hézagos. Egyre világosabban látszik azonban az, hogy a fejlődéstől, a mindennapi normális működés fenntartásán át a betegségek leküzdéséig minden biológiai folyamatban nélkülözhetetlen szerepet játszanak. Ennek megfelelően fokozódik iránt az érdeklődés a biológiai és orvostudományi kutatómunkában.

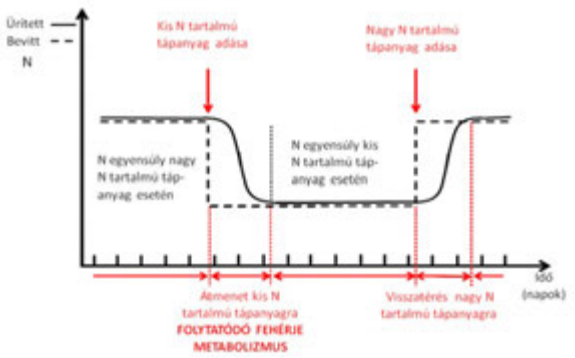
A fehérje metabolizmus vizsgálatának kezdetei

Az élőlények egyedeinek élete során ősidők óta ismert, jól megfigyelhető változás a növekedés. A soksejtűek fejlődésének és, - a mikroszkópos vizsgálatok bevezetése után - a sejtek életciklusának is a növekedés volt az egyik feltűnő, jól látható jellegzetessége. Látványos, ahogyan az utódok megszületnek, növekednek, majd elérik a szaporodó képességet és a kisebb méretű utód újra és újra végigjárja ezt a folyamatot. A növekedés kitűnően elképzelhető volt felépítő (anabolikus) folyamatok sorozataként, és a fejlődés morfológiai változásai is magyarázhatóak voltak új, más minőséget létrehozó un. differenciális növekedési folyamatok megjelenésével.

Nem meglepő tehát, hogy egészen a huszadik század 30-as éveiig az volt az uralkodó nézet, hogy az élőlényeket alkotó összetevők alapvetően stabilak, miután a környezetből felvett anyagok átalakítása révén a sejtek és a szervezet működő részeivé váltak. Leegyszerűsített hasonlattal élve ezen felfogás szerint az élőlény egy olyan gép, amelynek alkatrészei állandóak, a táplálék pedig főleg üzemanyagként szolgál, ill. kisebb részben az elhasználódott és elromlott alkatrészek pótlását végzi. Ez az un. „wear and tear” hipotézis, amelynek egyik első képviselője **Karl von Voit** (függelék 1. ábra) volt, akit a modern táplálkozástudomány megalapítójának tartanak. Hasonló nézeteket vallott **Otto Folin** (függelék 2-3. ábra) és Voit tanítványa **Max Rubner** (függelék 4. ábra).

A fenti nézetet látszólag jól alátámasztotta az a 20. század elején már széles körben ismert tény, hogy az egészséges felnőtt szervezet N-egyensúlyban van, függetlenül attól, hogy egy adott étrend nagy, vagy kis N-tartalmú. Ennek megállapítását **JohanKjeldahl** (függelék 5-8. ábra) módszere tette lehetővé, amelynek révén a szerves vegyületek N-tartalmát ammóniává alakítva meg lehetett mérni. A N-egyensúly azt jelenti, hogy a szervezetbe döntően fehérjék (az őket alkotó aminosavak) formájában bevitt és az onnan a lebontás után főként a vizelettel (elsősorban urea formájában) ürülő nitrogén mennyisége azonos (1.1. ábra).

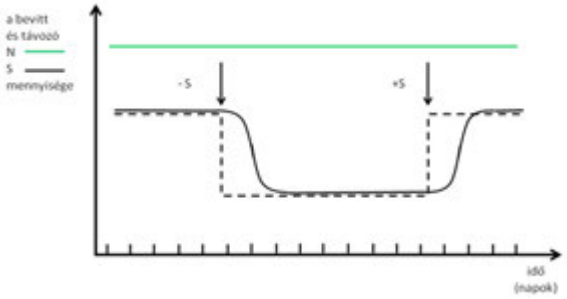
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.1. ábra A fehérjék lebomlásából származó nitrogén tartalmú végtermékek mennyiségének változásai éheztetés és újra táplálás hatására

Fejtörést okozott azonban egy jelenség, amit folytatódó fehérje metabolizmusnak neveztek el. Eszerint a nagy N-bevitelről a kicsire való átmenet során a vizeletben jelentős N-ürítés mérhető akkor is, ha a szervezet számára biztosítva van az energia nem N-tartalmú anyagokkal, tehát nincs ún. kalorikus éhezés, vagyis a szervezetnek nem kell lebontania az aminosavakat az energia termelés érdekében. (Természetesen a folytatódó protein metabolizmus észlelhető teljes éhezéskor is.) Ez csak azzal magyarázható, hogy ilyenkor valahol a szervezetben fehérjék bomlanak le. Mivel az éhezési körülmények között a táplálék révén nem jut a szervezetbe fehérje, ez a lebomlást jelző ürített N nem származhat közvetlenül a táplálkozással bevitt fehérjéből.

Úgy látszik tehát, hogy nemcsak a táplálék fehérjéi, hanem a szervezetbe már korábban beépült fehérjék is lebomolhatnak. Megerősítette ezt a tényt az, hogy a folytatódó protein metabolizmus olyan körülmények között is kimutatható, amikor biztosították a N-egyensúly megtartását és csak a kén tartalmú aminosavak bevitelét szüntették meg (Keighley és Borsook, 1935)(1.2. ábra).



1.2. ábra A folytatódó fehérje metabolizmus akkor is megjelenik, ha a nitrogén egyensúly fenntartása mellett csak a kén tartalmú aminosavakat vonják meg a táplálékban.

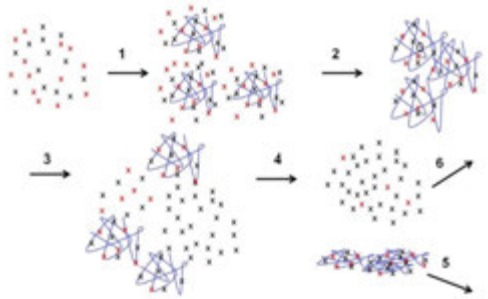
Új szemlélet, a testfehérjék dinamikus állapotának felfedezése

A folytatódó fehérje metabolizmus furcsa jelenségének magyarázatában a döntő lépést az izotópokkal végzett kísérletek jelentették. Ebben úttörő munkát végzett a magyar származású **Hevesy György** (függelék 9. ábra) akit eredményeiért Nobel-díjjal jutalmaztak. A Hevesy által kidolgozott módszer alapján **Rudolf Schoenheimer** (függelék 10-11. ábra) az 1930-as években stabil [^{15}N]-izotópot használt a fehérjék metabolizmusának vizsgálatára. Arra a következtetésre jutott, hogy a táplálékkal felvett és megemésztett fehérjékből lényegesen több [^{15}N]-el jelzett aminosav épül a szervezetbe, mint amit az ürítés mutat (Schoenheimer, 1942). Schoenheimer hasonló kísérleteket végzett lipidekkel kapcsolatban is, és azt az általános következtetést vonta le, hogy a szervezet és a sejtek alkotórészei állandóan lebomlanak, anyaguk pedig frissen készült alkotók szintézisében azonnal újrahasznosul. Dinamikus egyensúly van tehát a felépítés (anabolizmus) és a lebontás (katabolizmus) között, ami az alkotórészek folyamatos megújulását (turnover) biztosítja. A folyamatot jól lehet illusztrálni egy szupermarket működésével. A polcokról a vásárlók folyamatosan és fajtánként változó sebességgel viszik el az oda kitett árut, az árufeltöltők

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

pedig, ideális esetben a fogyás mértéke szerint, pótolják a termékeket. Eközben az egyes áruféleségek mennyisége a polcokon állandó marad. (Schoenheimer eredetileg a hadseregbe való besorozással és az onnan való leszereléssel szemléltette felfogását.) Az a gondolat, hogy a testalkotó fehérjék intracellulárisan lebomolhatnak, tehát létezik ún. endogén proteolízis, rendkívül szokatlan volt. A folyamat létezésére feltétlenül egzakt kísérleti bizonyítékokat kellett találni.

A továbbiak megértéséhez röviden ki kell térni a fehérjelebontás izotópok segítségével való mérésének módszerére. Az eljárás lényege, hogy megfelelő feltételek mellett egy jól megválasztott stabil, vagy radioaktív izotóppal jelzett aminosavat építünk a fehérjékbe, majd megmérjük annak a lebontás által felszabadított mennyiségét. Egy egyszerű *in vitro* végzett izotóp jelzéses kísérlet vázlatát mutatja az 1.3. ábra.



1.3. ábra A fehérjék izotópos jelzése és a lebontás mérése *in vitro*. Egy izotóppal (pl. b-sugárzó [^{14}C]- el jelzett, jól kiválasztott (nem metabolizálódó) aminosavat (pl. máj esetében ilyen a valin) adunk a sejteknek. A hozzáadott aminosavnak nem az összes molekulája jelzett, a jelzettség arányát az un. specifikus aktivitás mutatja meg (egysége radioaktivitás/mM aminosav). A fehérjeszintetizáló apparátus a jelzett (**x**) és a nem jelzett (**x**) valint egyaránt beépíti a fehérjékbe (kék vonal) (1). Ezután BSS-el (fiziológiás puffer) mossuk a sejtjeinket, hogy a jelzett szabad (fehérjébe be nem épült) aminosavat eltávolítsuk (2). A sejtekhez új médiumot adunk, amiben a jelző aminosav sokszoros koncentrációban van jelen („chase" médium). Ebben a médiumban tovább működnek a sejtek, új fehérjéket szintetizálnak is, és le is bontanak (3). A lebontott fehérjékből felszabadul az aminosav. Mivel a nem jelzett aminosav sokszoros koncentrációban van jelen, a felszabadult jelzett aminosav molekulák nem épülnek be jelentős mennyiségben az újonnan szintetizált fehérje molekulákba, így az oldatban felhalmozódnak (3). Erős sav segítségével kicsapjuk fehérjéket (4), majd centrifugálással ülepítjük őket (5). A felülúszóban (6) mérhető a lebontott fehérjékből felszabadult radioaktív aminosav. Ennek mennyiségéből következethetünk a lebontás mértékére.

A fehérjék jelölését *in vivo* is el lehet végezni. Mivel olyan aminosav nincs amelyik valamilyen szervben ne metabolizálódna (ennek legföljebb a mértéke változik), számíthatunk arra, hogy a jelölés „szétszóródik" és *in vivo* az újra beépülés sem akadályozható meg, mivel nem alkalmazhatunk „chase" médiumot. Emiatt jelentős háttérjelölődést kapunk. A lebontás mérését *in vivo* jelölés után is jobb a kivett szerveken, vagy sejteken *in vitro* végezni, többek között azért, mert így könnyebb meggátolni az újra beépülést. Az *in vivo* jelölésből származó háttér jelölést a kísérlet indulásakor vett kontroll mintákkal lehet figyelembe venni.

Az egyes fehérjék jelölődésének intenzitása a turnoverük sebességével egyenesen arányos lesz. Mivel az egyes fehérjéket nem különítettük el, az itt ismertetett egyszerű módszerrel egy átlagos lebomlási értéket mérünk. Ebben a jelölés időtartamától (azaz a radioaktív aminosavnak a fehérjeszintézis számára való rendelkezésre állásának időtartamától) függően reprezentálják magukat a fehérjék. A rövidebb jelölési idő a nagyobb, a hosszabb pedig a kisebb turnoverű fehérjéket preferálja. Ahhoz, hogy egy bizonyos fehérje turnoverére kapjunk adatokat izolálnunk kell az adott proteint.

Az intracelluláris fehérjelebontás létezésének közvetlen kísérleti bizonyítékai és további kérdések

Az intracelluláris fehérjelebontás egyik fontos sajátosságát feltáró első közvetlen és jelentős kísérleti bizonyítékot Melvin V. Simpson publikálta az1950-es évek elején. Eszerint a táplálék bélben való emésztésekor zajló

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fehérjelebontás és a májsejtekben folyó endogén proteolízis alapvetően különbözik egymástól. Az utóbbi ugyanis oxigén hiány hatására csökken, tehát energiát (ATP-t) igényel (Simpson, 1953).

Harry Eagle (függelék 12. ábra) és munkatársai 1959-ben döntő kísérletsorozatot publikáltak a szövettenyészeti sejtekben folyó fehérje megújulás (turnover) bizonyítására.

[^{14}C]-el jelzett tirozint vagy fenilalanint adtak a médiumhoz, de egy vagy több más esszenciális aminosavat kihagytak belőle. Ilyen körülmények között, a korábbi elképzelés szerint stabil fehérjéket feltételezve, nem lehetett fehérjeszintézis. A szövettenyészet ilyenkor valóban nem növekszik, az összes fehérjetartalma vagy stagnál, vagy kissé csökken. Ennek ellenére a radioaktív aminosav 0,7-1 %/h sebességgel beépül proteinbe, az izotóp hozzáadása után 24-48h között mérve (Eagle és mtsai., 1959). Nem mérhető tehát „netto protein szintézis”, vagyis nincs protein tartalom növekedés, és mégis van aminosav beépülés, mégis van protein szintézis. Egy újabb kísérletben megmérték azt is, hogy növekvő tenyészetekben a protein tartalom növekedése által indokoltnál jelentősen nagyobb mértékben épült be a radioaktivitás. A további részletek mellőzésével a legfontosabb megállapítást idézem. Eszerint a sejtek saját fehérjéiket intracellulárisan maguk bontják le, és a lebontás eredményeként keletkezett aminosavak ugyancsak saját fehérjéik szintézisében újrahasznosulnak (Eagle és mtsai., 1959).

Fontos megjegyezni még azt is, hogy további kísérletek szerint tévesnek bizonyult az a dogma, hogy a baktériumokban nincs fehérje turnover. Kimutatták, hogy ez a látszat azért keletkezett, mert optimális körülmények között élő, exponenciálisan növekvő tenyészeteket vizsgáltak, ahol valóban nincs endogén fehérjelebontás. Nem növekvő baktérium tenyészetekben az eukarióta sejtekéhez hasonló turnover mérhető (Mandelstam, 1958).

A hatvanas évek elejére eldőlt tehát a kérdés, minden kétséget kizáróan megállapították, hogy létezik intracelluláris fehérje lebontás. (Az angol nyelvű szakirodalomban erre több szakkifejezést használnak pl. „intracellular protein degradation”, „endogenous proteolysis”, „intracellular protein breakdown”). A sejtek saját citoplazmájukban, energia felhasználásával, aktívan és folyamatosan aminosavakra bontják saját fehérjéiket, és az így keletkezett aminosavakat azonnal felhasználják, főként új fehérje szintézisére.

A döntő bizonyítékok megszületése után nyomban új kérdések sora merült fel.

Miért energiaigényes az intracelluláris lebontás, amikor a bélben a fehérjelebontás nem az?

Miért kell egyáltalán lebontani a már megszintetizált fehérjéket?

A fehérjeszintézis idő és energiaigényes folyamat, a lebontása szintén az. A sejt és a szervezet tehát energiát és időt fordít arra, hogy lebontsa azt, amit idő és energia felhasználásával megszintetizált. Mi ennek az értelme?

Az endogén fehérjék intracelluláris lebontásához nyilvánvalóan endogén proteázok kellenek. Melyek és hol találhatók a sejtben a lebontást végző proteázok, milyen jellegzetességeik vannak?

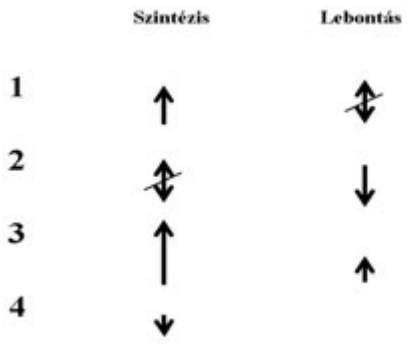
Hogyan működik az endogén fehérjék intracelluláris lebontó rendszere, hogyan válogat, és mi szabályozza? Vajon csak egy, vagy több lebontó rendszer van? Ha az utóbbi igaz, akkor milyen viszonyban vannak egymással, milyen közöttük a munkamegosztás?

A kérdésekre csak meglehetősen lassan születtek a válaszok, és természetesen újabb kérdések is felmerültek. Különösen az 1970-80-as években gyakran hangoztatták a témával foglalkozó kutatók, hogy az anabolikus folyamatokéhoz képest elmarad a katabolikus folyamatok tanulmányozása, és a róluk való tudásunk. Ez a kijelentés növekvő ismereteink ellenére, még ma sem vesztette érvényét.

Már magának a lebontásnak a puszta jelentősége is kevésbé kézenfekvő a szintézisénél, emiatt fogadták el olyan sokáig a „wear and tear” hipotézist. Miért van tehát egyáltalán szükség lebontásra? Ennek magyarázata éppen a gyors és hatékony fejlődés és alkalmazkodás kényszeréből adódik. A hatékonyság alapfeltétele, hogy megfelelő minőségben, mennyiségben, könnyen és gyorsan hozzáférhető legyen az, amire éppen szükség van. Könnyebb belátni a lebontás jelentőségét a test minőségi összetételével kapcsolatban. Nyilvánvaló, hogy fölösleges megtartani mindazt, ami csak a fejlődés egy-egy szakaszában működik; nem érdemes hosszan tárolni azt, ami csak ritkán szükséges; el kell távolítani mindazt ami „elkopott, elromlott”, tehát hibás. A minőségi szabályozás mellett azonban a lebontásnak nélkülözhetetlen szerepe van az összes folyamatosan, de változó intenzitással használt testalkotó fehérje mennyiségi szabályozásában is. Ha egy testalkotó proteinből több, majd kevesebb, majd ismét több kell, akkor a csökkentést lebontás nélkül lehetetlen elérni. Emellett, ha ismét több kell valamiből, akkor a mennyiséget azonos szintézis sebesség mellett is el lehet érni a lebontás csökkentésével. A lebontásnak a mennyiségi

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

szabályozásba való belépése új dimenziót nyit a regulációs lehetőségek dinamikájának, és ezáltal az alkalmazkodó képességnek a fejlődésében (1.4. ábra).



1.4. ábra A növekedés szabályozásának lehetőségei a lebontás részvételével.

Az intracelluláris lebontó folyamatok komplexitásának feltárása; teljes citoplazma részek és organellumok lebontása autofágia révén

Az 1950-es évek során a lebontó folyamatokkal kapcsolatos másik nagy jelentőségű új fejlemény a lizoszóma felfedezése volt. **Christian de Duve** (függelék 13. ábra) a szubcelluláris alkotók centrifugális ülepítésével olyan membránnal határolt részecskéket mutatott ki, amelyekben az összes sejtalkotó emésztésére alkalmas minden enzim jelen volt (de Duve, 1959; de Duve és mtsai., 1955). A felfedezés, és az azt követően kapott eredmények jelentőségét a de Duve-nek 1974-ben odaítélt orvosi Nobel-díj mutatja. A lizoszóma tehát elvileg képes lehetett arra, hogy elvégezze az intracelluláris fehérje lebontást. Az endogén fehérjelebontásról és a lizoszómákról szerzett kísérleti ismeretek azonban nagyon sok szempontból nem voltak egymással összeegyeztethetőek.

A sejtbiokémiai mérések alapján az 1960-as évek közepére világosan kiderült, hogy ha összehasonlítjuk az egyes testalkotó fehérjék turnoverét, az igen tág határok között mozog.

A turnovert leggyakrabban a fél-életidővel (half-life) jellemzik. A fél-életidő alatt azt az időt értjük, amely alatt egy a sejtben állandó koncentrációban jelen lévő fehérje molekuláinak fele lebomlik, és újra szintetizálódik. A mérések azt mutatták, hogy percekben, órákban, napokban, sőt hónapokban és években mérhető fél-életidejű fehérjék is léteznek (Goldberg és St John, 1976; Schimke, 1970). A heterogenitás nemcsak a citoszolikus fehérjékre értendő. Kiderült, hogy még az azonos organellumban és a membránokban lévő fehérjék turnovere is eltér egymástól (Siekevitz, 1972). Eközben normális esetben az egész kifejlett állatra, annak egyes szerveire, szöveteire és organellumaira nézve is lehet különböző az átlagos turnover és emellett a teljes protein tartalom hosszabb távon állandó marad. Mindez már a sejtek szintjén sem egyszerű, de amint azt az 1.5. ábra elvi sémája mutatja a teljes szervezet szintjén különösen bonyolult szabályozási folyamatok és kölcsönhatások meglétét vetítette előre (1.5. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.5. ábra A fehérje egyensúly szintjei soksejtű szervezetekben. A fehérje egyensúly megteremtése a soksejtű szervezetekben a különböző szerveződési szintek hierarchikus egymásra épülésének megfelelően történik. Minden szinten biztosítani kell a szintetikus és lebontó folyamatok megfelelő egyensúlyát. Ennek érdekében a szintetikus és a lebontó folyamatokat időben is össze kell hangolni. A pontosabb kép érdekében és a szabályozás bonyolultságának illusztrálására a fenti általános megállapítást ki kell egészíteni legalább két megjegyzéssel. 1. Az egyensúly általános tendenciaként érvényesül; állandó, dinamikus és bizonyos határok közötti fluktuáció mellett, ami a természetes fiziológiás alkalmazkodás része. Ilyen fluktuációt okozó hatások pl. a napszakos, a táplálkozási és a szexuális ciklus ritmusának változásai. 2. A lebontáshoz szorosan hozzátartozik az újrahasznosítás. Emellett azonban valódi fehérjeveszteség is történik (pl. szekréciós termékek, az elhalt bőr és bélhámsejtek, menstruációs vér, ejakulátum távozásával stb.), amit a szintézisnek szintén pótolnia kell.

Az egyes fehérjék lebontásának egyedi értékei specifikus szabályozás és lebontó rendszer létére utaltak. Ez elméletileg megvalósulhat pl. úgy, hogy minden fehérjének létezik egy lebontó enzime. Egy ilyen rendszer azonban végtelen sorozathoz vezet (Schimke, 1970), mivel a lebontót és a lebontó lebontóját is le kell bontani, stb. Ezért elvi meggondolások alapján is világos, hogy ha vannak is adott fehérjére specifikus lebontó enzimek, léteznie kell legalább egy nem specifikus degradációs rendszernek is, amelyik nem csak egy adott fehérjét ismer fel.

Az egyik fő kérdés tehát a lebontó rendszer szelektivitását érintette. Ennek magyarázatára felmerült, hogy az egyes fehérjéknek, mint szubsztrátoknak, különböző érzékenységük lehet egy feltételezett nem specifikus lebontó rendszerrel szemben. Emiatt az 1970-es években fellendülő kutatómunka jelentős mértékben a lebontást meghatározó molekuláris szerkezeti tulajdonságoknak, azaz a szelektivitás biokémiai alapjainak felderítésére irányult. Kiderült, hogy az aminosav analógok beépülésével létrehozott abnormális fehérjéket mind a baktériumok (Goldberg és Dice, 1974), mind az eukarióta sejtek fokozott sebességgel bontják (Knowles és mtsai., 1975; Rabinovitz és Fisher, 1964; Schimke és Bradley, 1975). Mivel az abnormális konformáció hajlamosít a lebontásra, felmerült az a lehetőség, hogy a normális proteinek egyedi élettartamát is valamilyen szerkezeti sajátosságuk határozza meg (Schimke és Bradley, 1975).

Kimutatták pl. azt, hogy a fehérjék denaturálhatósága savas pH és magas hőmérséklet hatására, korrelációba hozható a fél-életidejükkel (Goldberg és St John, 1976). A lebontást befolyásoló tényezőként számos egyéb paraméter (hidrofobicitás, az alegységek mérete, izoelektromos pont, enzimek esetében a szubsztrát jelenléte, abnormális térszerkezet stb.) is szóba került (Ballard, 1977; Goldberg és St John, 1976), de ezeknek a tényezőknek a szerepe további vizsgálatra szorult.

A hosszú és rövid életidejű fehérjék lebontásának különbözőségei, a két fő lebontó mechanizmus létezésének felismerése

Poole és Wibo már 1973-ban megfigyelte, hogy patkány fibroblaszt tenyészetekben a friss médium tartalmaz valamilyen faktort ami csak a hosszabb életidejű fehérjék lebontását gátolja (Poole és Wibo, 1973). Knowles és Ballard szövettenyészetben tartott Reuber H35 hepatoma sejteken végzett kísérletei kimutatták, hogy egy sor egymástól nagyon különböző szer (inzulin, cikloheximid, puromicin, leupeptin, antipain és magzati borjúszérum), hasonló jelölési feltételek mellett, ugyanolyan maximális mértékben (30 %) képes gátolni a normális fehérjék intracelluláris lebontását. Hasonló körülmények között a fenti anyagok nem befolyásolták az aminosav analóg fluorofenilalanin (Neff és mtsai., 1979) vagy kanavanin (Knowles és Ballard, 1976) beépítésével abnormálissá tett

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fehérjék, illetve egy rövid életidejű normális fehérje (foszfoenolpiruvát-karboxikináz) degradációját (Knowles és Ballard, 1976).

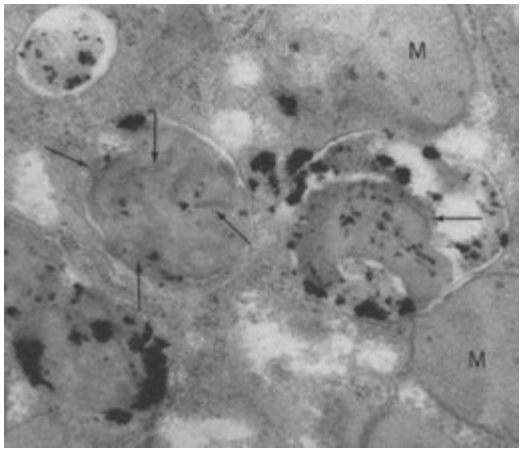
A szerzők ezen eredmények alapján azt az elképzelést alakították ki, hogy két alapvető lebontó mechanizmus működik az eukarióta sejtekben. Az egyik az abnormális és rövid életidejű fehérjék lebontására specializálódott, amelyre a fenti gátlószerek nem, vagy alig hatnak. Ezen utóbbi lebontó mechanizmusnak a további vizsgálata során kapott eredmények vezettek el később az ubiquitin-proteaszóma rendszer felfedezéséhez, amit kémiai Nobel-díjjal ismertek el 2004-ben. A három díjazott **Aaron Ciechanover, Avram Hershko** és **Irwin Rose** (függelék 14.,15., 16. ábra). Közülük Avram Hershko, azaz Herskó Ferenc Magyarországon született. Az ubiquitin-proteaszóma rendszerrel könyvünk a későbbiekben részletesen foglalkozik.

A jelzett fehérjék lebontásának sejtbiokémiai mérései alapján Knowles és Ballard egy másik lebontó rendszer létezésére is javaslatot tett (Knowles és Ballard, 1976). Ennek fő jellegzetességeit a következőkben látták. Az éhezés és a növekedési faktorok hiányában (angol kifejezéssel „stepdown”, tehát a katabolizmusnak kedvező, körülmények között) aktiválódik és az ellenkező, tehát anabolikus hatásokra (inzulin, aminosavak, szérum) gátlódik, emellett az átlagosan hosszabb életidejű fehérjék lebontását végzi.

Az autofágia folyamatának felfedezése és elektronmikroszkópos vizsgálatának kezdetei

A teljes kép felvázolásához ezen a ponton vissza kell térnünk az 1950-es évek sejtbiológiai vizsgálataihoz. Az 1950-es évek második felében következett be az a korszak, amikor a biológiai minták elektronmikroszkópos vizsgálatának módszerei elég fejlettek lettek ahhoz, hogy megkezdődjék a sejtek finomszerkezetének (ultrastruktúrájának) rendszeres vizsgálata. Az elektronmikroszkóp nagy felbontása révén a sejtek alkotórészeinek megfigyelése a nm-es tartományig tágult. Leírhatóvá váltak a sejteket felépítő legfontosabb organellumok és makromolekuláris komplexumok elektronmikroszkópos finomszerkezeti tulajdonságai. Megkezdődhetett ezeknek az alkotórészeknek a sejtbiokémiai módszerekkel kapott adatokkal való összevetése és funkciójuk felderítése. Ennek a kutatási trendnek Christian de Duve mellett két további képviselője (Albert Claude és George E. Palade) szintén megkapta a Nobel-díjat 1974-ben.

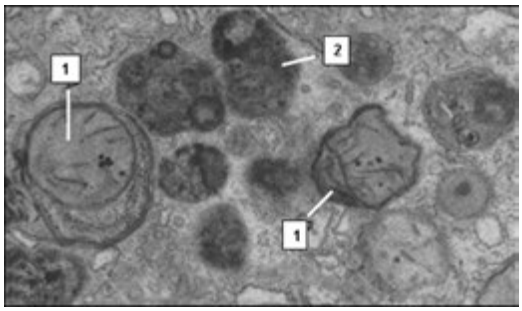
A sejtek elektronmikroszkópos szerkezetét tanulmányozó kutatók 1954-ben (Rhodin, 1954) majd 1957-ben (Clark, 1957) szokatlan jelenségre lettek figyelmesek vese tubulusok hámsejtjeiben. Megfigyelték, hogy a citoplazmában található membránnal határolt sötétebb beltartalmú un. „densz” testek (dense bodies, sötét testek) belsejében különös módon néha mitochondriumok fordulnak elő. Újabb éveknek kellett eltelniük ahhoz, hogy 1959-ben Alex Novikoff, a kor legkiválóbb citokémikusa újra felfigyeljen erre a jelenségre. Novikoff azt találta, hogy az ureter lekötése után nagy számban jelennek a vese hámsejtjeiben, vagy májsejtekben Triton-WR1339-el kezelt állatokban nemcsak mitochondriumot, hanem a sejt saját citoplazmájának egyéb részeit is tartalmazó membránnal határolt testek. Azt is kimutatta, hogy ezekben lizoszomális enzimek találhatók (Novikoff és Essner, 1962) (1.6. ábra).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.6. ábra A membránnal határolt, citoplazma alkotókat tartalmazó vakuólákban savas foszfatáz enzim jelenlétét mutatja a fekete csapadék. M: mitokondrium; a nyilak a vakuólákban lévő mitokondrium krisztáira mutatnak (patkány izolált májsejt)

Levonta tehát azt a helyes következtetést, hogy a megfigyelt képek a lizoszomális autolízis jeleit mutatják (Novikoff, 1959). Ezeknek az önemésztő testeknek a megnevezésére a „cytolysome" kifejezést használta (Novikoff, 1960). Ashford és Porter májsejtekben, glukagon kezelés nyomán találtak citoplazma komponenseket tartalmazó, membránnal határolt testeket, melyeket fokális autolízist végző lizoszómáknak tartottak (1.7. ábra) (Ashford és Porter, 1962).

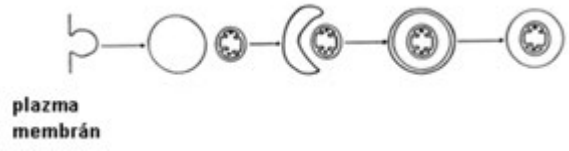


1.7. ábra Citoplazma részek membránnal határolt testekben glukagont tartalmazó médiummal perfundált patkány májban. 1: jól felismerhető mitokondrium a membránnal határolt testben; 2: degradálódó anyagot tartalmazó membránnal határolt test: fokális autolízis (patkány májsejt)

Mindezek azt bizonyították, hogy maguk a sejtek képesek saját citoplazmájuk kisebb-nagyobb részeit a lizoszomális rendszerük segítségével megemészteni.

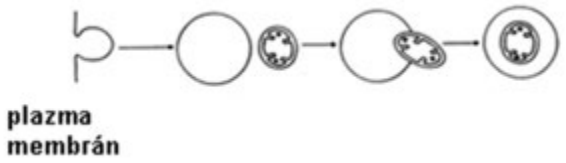
Mivel a funkcionális háttér eleinte még nem volt világosan tisztázott, **Jan L. E. Ericsson** és **Benjamin Trump** (függelék 17. ábra) kizárólag morfológiai kritériumok alapján bevezette a „cytosegresome" (szegregáló citoplazmatikus organellum) kifejezést (Ericsson és Trump, 1964). Az ilyen önemésztő citoplazmatikus organellumokra de Duve javasolta az „autofág vakuóla" elnevezést (de Duve, 1963; de Duve, 1964). Ez a kifejezés a membránnal határolt, morfológiailag azonosítható citoplazma alkotókat tartalmazó test megnevezésére szolgál, tekintet nélkül arra, hogy a benne zajló lebontás mennyire előrehaladott. Ugyancsak de Duve állította párhuzamba a sejt által kívülről felvett anyagok emésztését a saját citoplazma részek emésztésével, és javasolta a heterofágia és autofágia kifejezést az előbbi, illetve az utóbbi intracelluláris emésztő folyamat megnevezésére (de Duve és Wattiaux, 1966).

Az első megfigyeléseket az 1960-as évek közepén rendszeres elektronmikroszkópos vizsgálatok sorozata követte. Kezdetben az egyik leginkább izgalmas kérdés az volt, hogy hogyan kerül be egy membránnal határolt térbe a citoplazmán belül magának a citoplazmának egy része? Másképpen fogalmazva, hogyan történik a lebontandó citoplazma rész membránnal való elkülönítése a citoplazma többi részétől. (Erre a folyamatra ma is több kifejezést használnak úgymint izolálás, szegregálás, szekvesztráció; isolation, segregation, sequestration.) Ennek a kiderítése során meg kellett küzdeni a hagyományos, metszetekkel dolgozó elektronmikroszkópia azon alapvető problémájával, hogy kétdimenziós adatokból négydimenziós következetéseket kell levonni. Ennek ellenére az 1960-as évek második felének végére széles körben elfogadott leírása született az autofágia számos alapvető jellegzetességének. Ericsson 1969-ben közölt összefoglalójában többféle, spekulatív úton felvetett elvi lehetőséget mutat be az autofág vakuólák keletkezéséről (Ericsson, 1969a) (1.8-1.11. ábra).

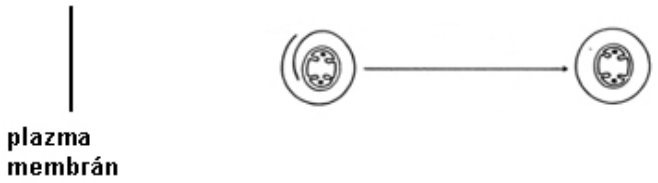


1.8. ábra Egy vagy több endocitózis vakuóla lapul el és veszi körbe a citoplazma egy részét

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.9. ábra A mitokondrium áthatol egy már meglévő endocitózis vakuóla membránján lévő résen



1.10. ábra A citoplazmában már meglévő, vagy újonnan (de novo) keletkezett ciszterna hajtja végre a szekvesztrációt

1.11. ábra Egymásra hajló membrán lemezek végzik a szekvesztrációt melyek végül összetapadnak

A kiigazodást erősen zavarta, hogy egyetlen membránnal határoltak mellett, viszonylag nagy számban fordulnak elő kettős membránnal burkolt autofág vakuólák is. Az ilyen kettős határoló membrán ciszternaszerű megjelenést mutat (1.8. és 1.11. ábra). Mivel az autofág vakuólák inkább a sejt belsejében jelentek meg mint a sejtmembrán mellett, valószínűbbnek látszott a határoló membránnak az endoplazmás retikulumból való származás (Ericsson, 1969a). Ez a vélekedés azonban továbbra is hipotetikus maradt, mert nem volt rá meggyőző bizonyíték.

A későbbiek során egyértelműen tisztázódott, hogy az 1.10. ábrán bemutatott lehetőség hasonlít legjobban a valósághoz. Ezzel azonban még nem igazolódott a határoló membránnak az ER-ből való származása, tehát nem oldódott meg a probléma amelynek, lényeges kérdései ma is válaszra várnak. Az erre vonatkozó vitával a továbbiakban is foglalkozunk.

Az autofág vakuólák alapvető jellegzetességei és elektronmikroszkópos felismerésük kritériumai

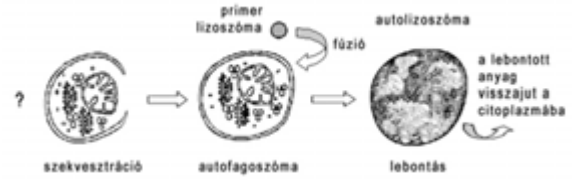
Az 1960-as évek során kialakultak a szempontok az autofág vakuólák felismerésére. Ezek némi kiegészítéssel ma is érvényesek és fontos lenne, hogy minden esetben precízen alkalmazzák őket új objektumoknak (sejttípusoknak) az autofágia kutatásába való bevonásakor. Az autofág elemek elektronmikroszkóppal történő azonosítása nélkülözhetetlen az újabban egyre többször használt fény- és elektronmikroszkópos markerek specificitásának igazolásához is. A bizonyítás alapja, mintegy az autofágia „conditio sine qua non”-ja (ami nélkül nem beszélhetünk autofágiáról), hogy a metszeteken membránnal teljesen körülhatárolt citoplazma területek forduljanak elő. A határoló (izoláló, szegregáló, szekvesztráló) membrán fontos és alapvető tulajdonsága, hogy felületén nincsenek riboszómák, tehát un. sima felszínű membrán (ld. az 1.10. ábrát).

Az 1960-as évek során sok minta gondos elemzésével megállapították, hogy a legkorábbi autofág vakuólák, amelyekben a citoplazma tartalom a morfológiai változás jeleit még egyáltalán nem mutatja, mind kettős membránnal burkoltak. Az így létrejött testet a de Duve és Wattiaux által eredetileg hipotetikusan javasolt kifejezéssel ma is autofagoszómának nevezzük (de Duve és Wattiaux, 1966).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A két membrán között rendszerint rés mutatkozott ami ciszternaszerű megjelenést adott a szekvesztráló membránnak (Ericsson, 1969b; Glinsmann és Ericsson, 1966). Elsősorban ennek alapján a kutatók többsége azt feltételezte, hogy a szegregáló membrán az ER ciszternából annak közvetlen transzformációja által keletkezik, bár szemben az előbbivel, az utóbbihoz riboszómák kapcsolódnak. Noha a legtöbb figyelmet és energiát is e lehetőség igazolásának szentelték, nem sikerült kellően meggyőző bizonyítékokat, pl. a kétféle membrán közötti direkt átmenetet találni az izoláló membrán eredetének egyértelmű eldöntéséhez.

Az 1960-as évek második felében véglegesen tisztázták, hogy az autofagoszóma lizoszómával való fúzió révén alakul át autolizoszómává, és beltartalma ezt követően morfológiailag szétesik (degradálódik), majd megemésztődik (Arstila és Trump, 1969; Ericsson, 1969b). A 1.12.-1.16. ábra a klasszikus, szekvesztrációval kezdődő autofág folyamat fő lépéseit mutatja.

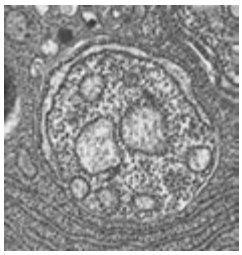


1.12. ábra A szekvesztrációval induló autofág folyamat fő lépései. A ma is vitatott eredetű és keletkezési mechanizmusú riboszóma mentes kétrétegű szekvesztrációs membrán „körbenövi” a citoplazma egy részét. A kettős membránnal határolt test az autofagoszóma, benne lebontás még nem folyik. Az autofagoszóma primer lizoszómával fuzionál, ennek révén lebontó enzimekhez jut, autolizoszómává alakul

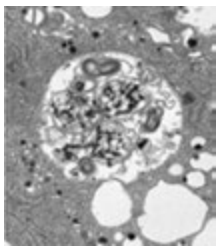
1.13. ábra A szekvesztrációval induló autofág folyamat első lépése elektronmikroszkópos képen. A ma is vitatott eredetű és keletkezési mechanizmusú riboszóma mentes kétrétegű szekvesztrációs membrán „körbenövi” a citoplazma egy részét. (egér ondóhólyag hámsejt)

1.14. ábra A szekvesztrációval induló autofág folyamat korai fázisa elektronmikroszkópos képen. A ma is vitatott eredetű és keletkezési mechanizmusú riboszóma mentes kétrétegű szekvesztrációs membrán „körbenövi” a citoplazma egy részét. (egér ondóhólyag hámsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

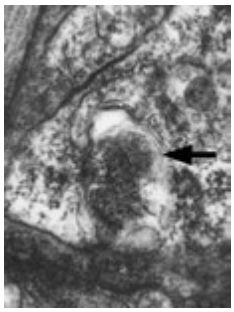


1.15. ábra Az autofágia elektronmikroszkópos képen. A kettős membránnal határolt test az autofagoszóma. Benne lebontás még nem folyik. (egér ondóhólyag hámsejt)

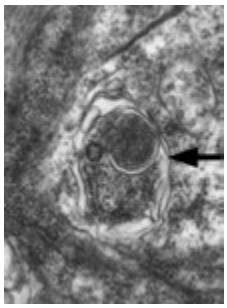


1.16. ábra Autofagoszóma primer lizoszómával fuzionál, ennek révén lebontó enzimekhez jut, autolizoszómává alakul. Az autolizoszómában zajlik a szekvesztrált citoplazmatikus anyag lebontása, ami által a szekvesztrált citoplazmatikus alkotórészek felismerhetetlenné válnak majd teljesen elemésztődnek (egér ondóhólyag hámsejt)

Fontos hangsúlyozni, hogy az autofágia elektronmikroszkópos kimutatásához önmagában nem elegendő, ha a metszetben (tehát síkban) kettős membránnal körülvett citoplazma részeket látunk. A teljes zártság bizonyítását minden igényt kielégítő módon sorozatmetszetek készítésével végezhetjük el (1.17-1.20. ábra). Ez azonban rutin vizsgálatok számára túlságosan fáradságos és hosszadalmas, ezért alkalmazására ritkán kerül sor.

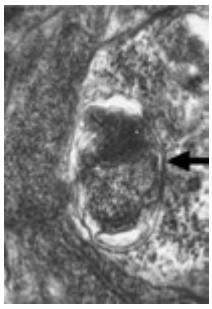


1.17. ábra Egy autofagoszóma sorozatmetszet első képe, a metszés síkja éppen eléri a vakuólát. Látszik, hogy az autofagoszómát határoló membrán a metszeten zárt; (*C. elegans* hámsejt)



1.18. ábra Egy autofagoszóma sorozatmetszetéből az autofagoszóma közepéhez közel készült metszet. Látszik, hogy az autofagoszómát határoló membrán a metszeten zárt; (*C. elegans* hámsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

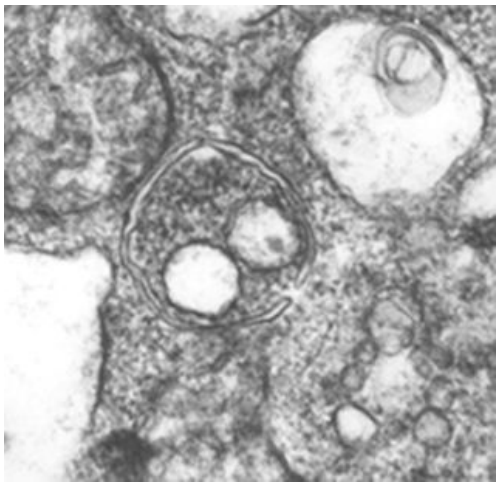


1.19. ábra Egy autofagoszóma sorozatmetszetéből az autofagoszóma közepéhez közel készült metszet. Látszik, hogy az autofagoszómát határoló membrán a metszeten zárt; (*C. elegans* hámsejt)

1.20. ábra Egy autofagoszóma sorozatmetszetéből készült kép, ahol a metszési sík még éppen érinti a vakuólát. Az előző képekkel egybevetve látszik tehát, hogy az autofagoszómát határoló membrán minden metszeten zárt; (*C. elegans* hámsejt)

Újabban bizonyos mértékig segíthet ebben az un. háromdimenziós elektronmikroszkópia (3D electron microscopy) ami, bár nem egyszerűen, de lehetővé teszi a szokásosnál 2-3-szor vastagabb (250-300 nm) metszetek vizsgálatát.

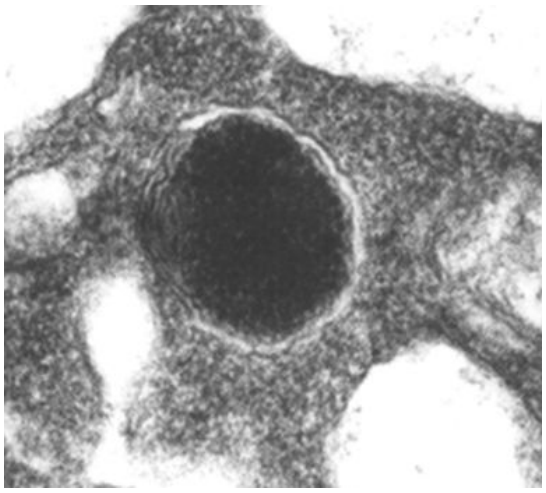
A sorozatmetszetek hiányát pótolhatja a degradációs sorozatok létének bemutatása is. Ezek az emésztés előrehaladását közvetetten bizonyító, a membránnal körülvett szegregált citoplazma komponensek morfológiailag kimutatható fokozatos dezintegrációját mutató képsorok (1.21-1.24. ábra). A módszer lényegében a folyamat időbeli nyomon kísérését jelenti. Logikai alapja az, hogy ha a dezintegrálódás fokális marad, (azaz a határoló membránon belülre korlátozódik), az közvetve a három dimenzióban való zártságot bizonyítja (Ashford és Porter, 1962). A fokális degradációs jelleg annyira jellemző, hogy több szerző egyenesen „fokális citoplazmatikus degradációnak” nevezte magát az autofág folyamatot (Hruban és mtsai., 1963).



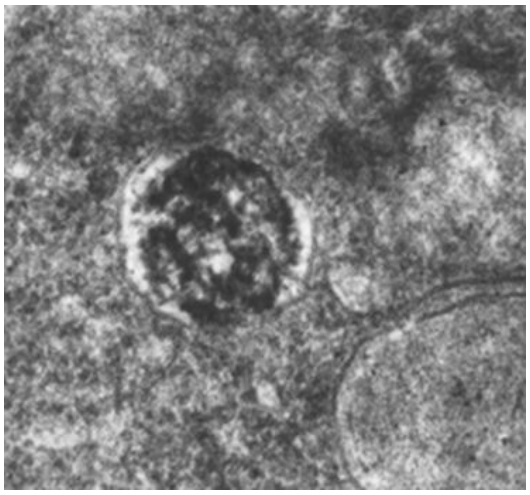
1.21. ábra Egy csaknem teljesen zárt izoláló membránnal körülvett citoplazma rész (*C. elegans* hámsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.22. ábra Kettős izoláló membránnal teljesen körülvett citoplazma rész amelynek beltartalma morfológiailag nem változott, a degradáció jeleit nem mutatja, tehát autofagoszómáról van szó; (*C. elegans* hámsejt)



1.23. ábra Bár a belső membrán még helyenként felismerhető, az izolált citoplazma rész denzitása erősen megnőtt, a beltartalom már nem felismerhető, a morfológiailag kimutatható destrukció már elkezdődött, de a szerkezet még kompakt, az emésztés nem előrehaladott, itt tehát már korai autolizoszómával van dolgunk (*C. elegans* hámsejt)

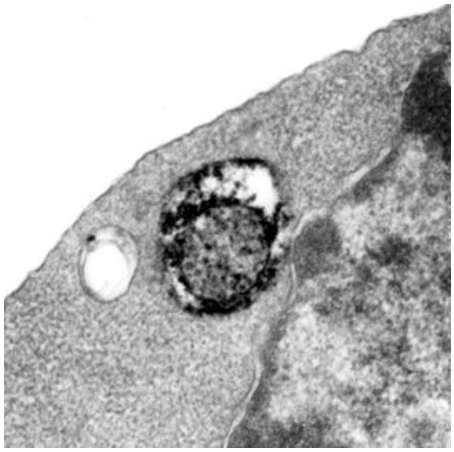


1.24. ábra A beltartalom lazább heterogén, a belső membrán már lebomlott, az emésztés tehát előrehaladott, ami aktívan degradáló autolizoszómára vall (*C. elegans* hámsejt)

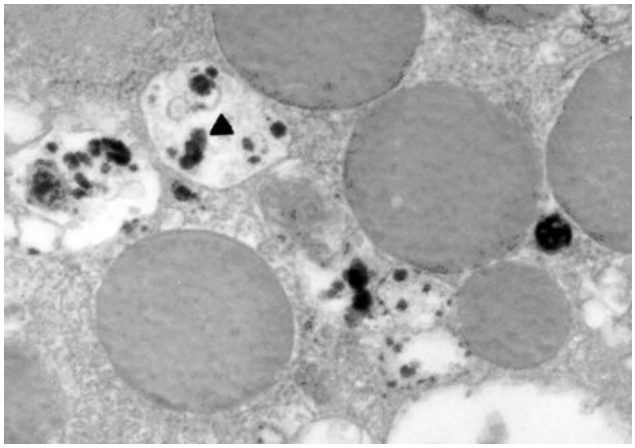
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Amint arról fentebb már esett szó, fontos bizonyíték, hogy a membránnal határolt degradációs sorozatok egyes tagjaiban meg kell jelenniük a lizoszomális enzimeknek (1.25-1.26. ábra). Az enzimkimutatások nehézkessége miatt természetesen irreális követelmény lenne, ha ezt minden mintában ki kellene mutatni. Minden olyan esetben demonstrálni kell azonban az enzimműködés jelenlétét megfelelően kiválasztott mintákban, amikor új, szokatlan sejttípusról, vagy az autofágiával újonnan kapcsolatba hozott folyamatról van szó.

Éppen az enzimműködés kritériumának vizsgálata során derült ki, hogy a morfológiailag kimutatható változást még nem szenvedett, de már szegregált citoplazma területek, tehát az autofagoszómák nem tartalmaznak savas hidrolázokat. Ennek alapján vált általánosan elfogadottá az a felismerés, hogy a folyamat prelizoszómális (szekvesztrációs és autofagoszómális) szakasszal indul (Glinsmann és Ericsson, 1966) (Arstila és mtsai., 1972; Arstila és Trump, 1968; Pfeifer, 1976).



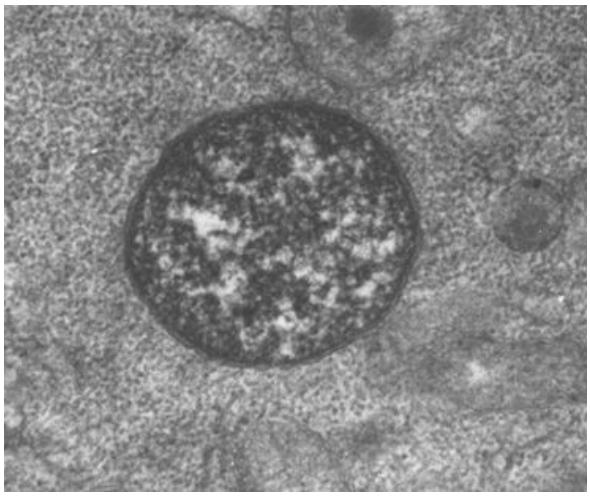
1.25. ábra Savas foszfatáz jelenlétét kimutató sötét csapadék autolizoszómákban (patkány eritroblaszt)



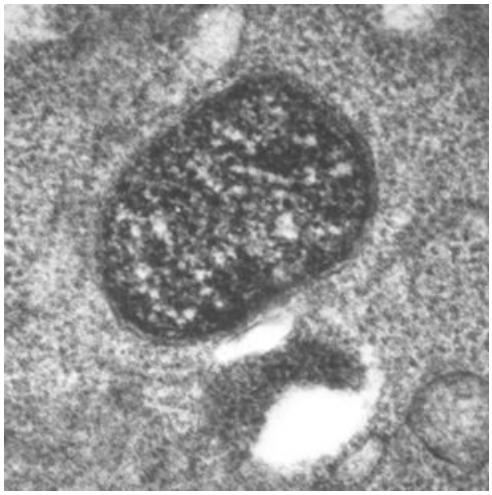
1.26. ábra Savas foszfatáz jelenlétét kimutató sötét csapadék autolizoszómákban (patkány hasnyálmirigy mirigy hámsejt)

Meg kell említenünk, hogy bizonyos sejttípusokban előfordulhatnak heterogén beltartalmú, a késői autolizoszómákhoz morfológiailag hasonlító vakuólák. Ezek lehetnek akár olyanok is amelyeknek a funkciójáról az irodalomban sem találunk adatokat. Ilyenkor ki kell derítenünk, hogy megtaláljuk-e a későinek látszó autofág vakuólának a feltételezett autofág folyamat korábbi szakaszában lévő képviselőit, azaz rekonstruálnunk kell az izolált beltartalom fokozatos degradációjának menetét. Ha ez nem lehetséges, akkor az összetéveszthető szerkezet nem autofág elem (pl. 1.27-1.28. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



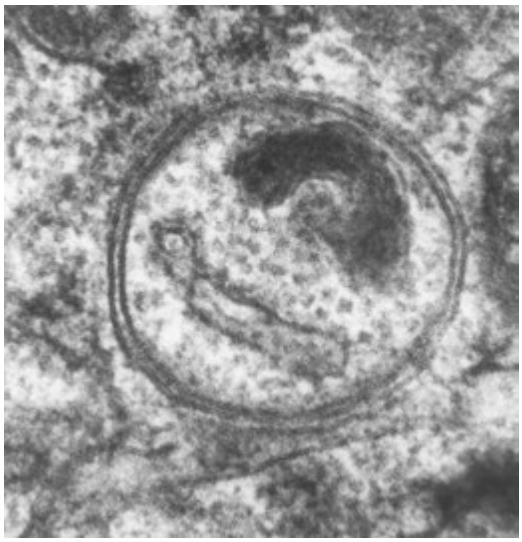
1.27. ábra Heterogén beltartalmú autolizoszómához hasonló testek, amelyek valószínűleg szekréciós elemek (*C. elegans* hámsejt)



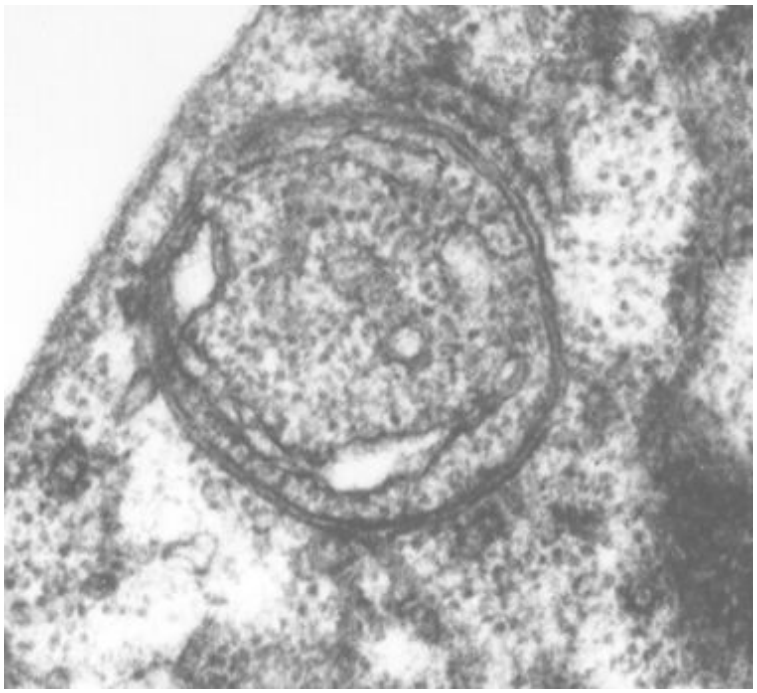
1.28. ábra Heterogén beltartalmú autolizoszómához hasonló testek, amelyek valószínűleg szekréciós elemek (*C. elegans* hámsejt)

Külön említést érdemelnek a soksejtűek bizonyos szöveteiben elterjedt interdigitációk, tehát a szomszédos sejtek plazma membránnal körülvett egymásba tűrődései. Ezek metszetben az autofagoszómákhoz hasonlóan dupla membránnal határolt területekként mutatkozhatnak (1.29-30. ábra), holott a térben vizsgálva ujjszerű képződmények. Sorozatmetszetekkel itt is egyértelműen tisztázható a helyzet, ez azonban még egyetlen esetben is jelentős munkabefektetést igényel, minden egyes struktúra esetében pedig gyakorlatilag kivihetetlen. Szerencsére egyéb támpontokat is találhatunk a megkülönböztetésre. Bár első látásra nem szembetűnő, de az interdigitációk határoló membránja kimutathatóan különbözik az autofagoszómákétól. Az első különbség, hogy a plazmamebrán un. vastag típusú membrán, amely elektronmikroszkópban mérve kissé vastagabb (9-10 nm) az autofagoszóma membránjánál (7-8 nm). Egy másik diagnosztikus sajátosság, ami a figyelmes olvasónak már föl is tűnhetett az, hogy az izoláló membrán két rétege a szokásos aldehid fixálás után túlnyomórészt szétválik és így benne egy üres rés keletkezik. Ez a helyenként igen feltűnő rés nem mutatkozik a két szorosan egymásra fekvő plazma membrán között. Az itt felsorolt jellegzetességeket mutatjuk be a 1.29-1.35. ábrákon.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

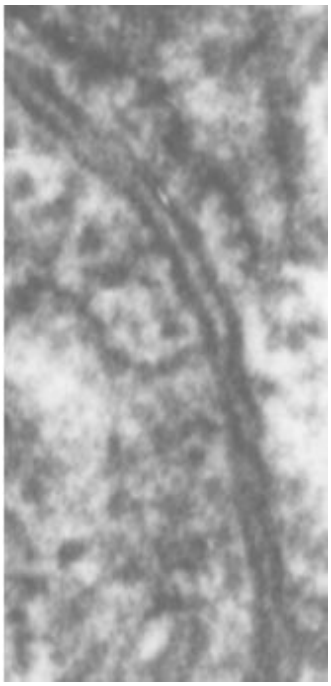


1.29. ábra Interdigitáció autofagoszómához hasonló megjelenésű metszete. Jól látható, hogy a határoló membránok között nincs rés, és vastagságuk a belül lévő RER membránjáénál nagyobb (*C. elegans* hámsejt)

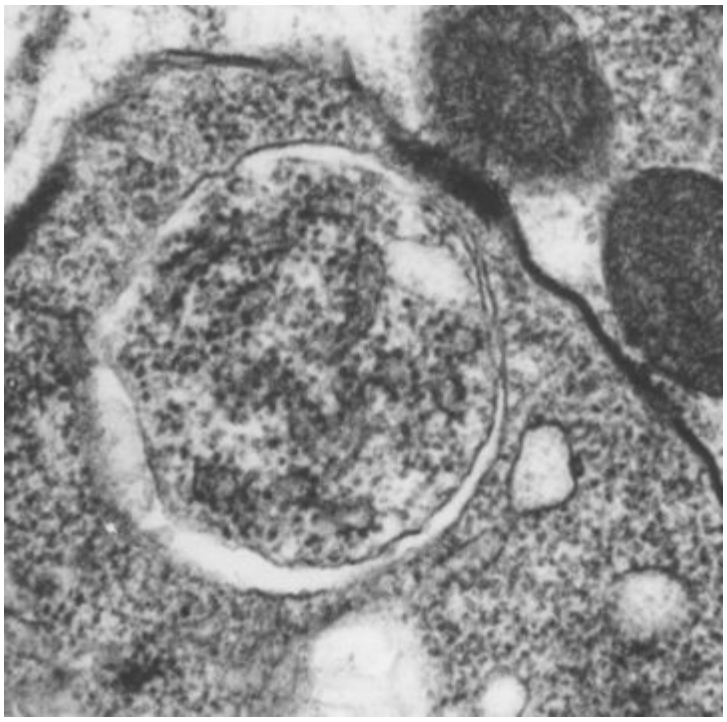


1.30. ábra Interdigitáció (*C. elegans* hámsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



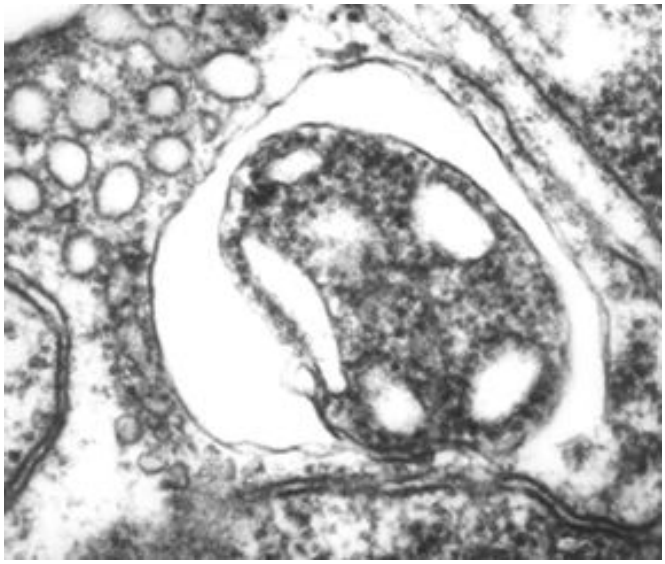
1.31. ábra Interdigitáció kinagyított része (*C. elegans* hámsejt)



1.32. ábra Az autofagoszóma dupla membránjának két lemeze között változó szélességű rés van (*C. elegans* hámsejt)

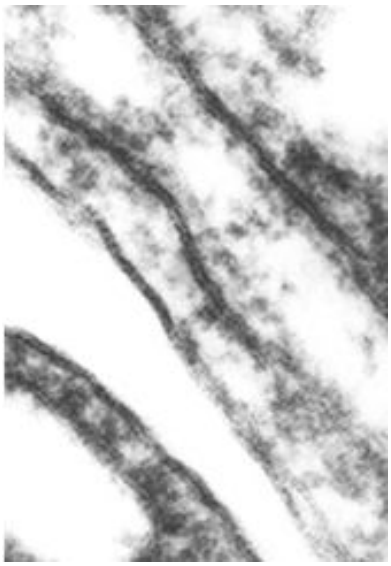
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.33. ábra Az előző kép kinagyított részén látható, hogy az izoláló membrán és az ER membrán azonos vastagságú, vékonyabb membrán (*C. elegans* hámsejt)



1.34. ábra Ebben az esetben az autofagoszóma dupla membránjának két lemeze között különösen nagy rés van (*C. elegans* hámsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.35. ábra A kinagyított részen jól látható a plazmamembrán és az izoláló membrán vastagságának különbözősége (*C. elegans* hámsejt)

További félreértéshez vezethet, hogy az autofagoszómához hasonló kettős membránnal határolt képlet jöhet létre pusztuló sejtek membránnal borított fragmentumainak (ún. apoptotikus testek) a fagocitózisa révén is (ld. később). Az így felvett idegen citoplazma részek a fagocitáló sejtben kettős membránnal határolt testek lesznek, azonban ezek is vastag plazma membránnal borítottak. Bonyolítja a helyzetet, hogy az interdigitációkkal ellentétben, ahol degradáció sohasem történik, a heterofágiával felvett apoptotikus testek szintén lebomlanak. A beltartalom tehát az autofágiához hasonlóan degradálódik. Az előrehaladott lebomlás fázisában már csak egy határoló membrán van, amely mindkét esetben vastag típusú. Ehhez hasonló gond vetődik fel a feladatuknál fogva erős fagocitotikus aktivitással bíró sejtekben zajló autofágia vizsgálatában. A problémákhoz ráadásul még hozzájárul az is, hogy az auto- és heterofág eredetű vakuólák a folyamat második szakaszában össze is olvad(hat)nak. Mindezek miatt fontos felismernünk azokat a kísérleti körülményeket amelyekben az autofágiával párhuzamosan fagocitózis is folyik és ilyenkor különös figyelemmel kell analizálnunk az eredményeket. A kérdésnek az izoláló membránt érintő néhány vonatkozására kitérünk még az 1.12 fejezetben.

Az autofág folyamatok altípusai

de Duve és Wattiaux eredeti meghatározása szerint az autofágia az a folyamat amelynek során az autofagoszóma és lizoszóma fúziója után a létrejött autolizoszómában megemésztődik a citoplazma egy elhatárolódott része. Ezt a folyamatot a kutatók a későbbiekben makroautofágiának (MaA) (Marzella és Glaumann, 1987) nevezték el. Az eddigiekben ezzel a folyamattal foglalkoztunk. Az elnevezés kiegészítése azért alakult ki, mert a citoplazmatikus önemésztésre felmerült további mechanizmusok létezése is. Közülük az egyik az amelynek során maga a lizoszóma membránja befelé tűrődve bekebelezhet kisebb citoplazma részeket. Ezt a mikroautofágia (MiA) szóval illették (de Duve és Wattiaux, 1966). Ehhez némileg hasonló az un. „lysosomal wrapping mechanism” (LWM) amit magyarul nevezhetnénk lizoszomális burkoló mechanizmusnak (Ogawa, 1981). Az elképzelés szerint ilyenkor a lizoszóma ellapulva és meghajolva rásimul egy-egy citoplazma régióra, majd teljesen körülveszi azt.

Ezek az utóbbi szekvesztrációs elképzelések (MiA, LWM) eredetileg morfológiai (elektronmikroszkópos) képek megfelelő értelmezéséből születtek, jelentőségük és mechanizmusuk a makroautofágiáénál sokkal kevésbé ismert. A folyamatok definíciója és az elnevezések sem általánosan elfogadottak, emiatt gyakran előfordul, hogy a különböző szerzők nem pontosan ugyanazt értik a fenti kifejezéseken. Az autofágia eddig tárgyalt típusai kiegészülnek a jól definiált ún. chaperon által mediált autofágiával (CMA). Ennek során egy fehérje komplexum pumpálja a lebontandó fehérjét a lizoszómába, annak membránján keresztül (Cuervo és Dice, 1998). A citoplazma egy részének lizoszomális emésztése az ún. krinofágia is (Marzella és mtsai., 1981). Ez lizoszóma és szekréciós vakuóla vagy vezikula fúziója révén valósul meg és legalább annyira autofág folyamat, mint a MiA vagy a CMA; elnevezésében azonban hagyományos szóhasználat miatt mégsem jelenik meg az autofág jelző.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az autofágia előfordulása és az elektronmikroszkópos eredmények alapján feltételezett legfontosabb funkciói

Az autofágia felfedezését követően az elektronmikroszkópos morfológusok a legkülönfélébb sejtekben, változatos élettani, fejlődéstani és patológiás körülmények között figyelték meg autofág vakuólák jelenlétét. Ennek bemutatására, a mélyebb érdeklődésű olvasók tájékozódásának elősegítésére és az irodalomban való tájékozódásra szolgál az alábbi összefoglalás.

Amint azt már részben érintettük, kezdetben az autofágiát főleg a vese (Clark, 1957; Ericsson, 1969b; Ericsson és mtsai., 1969; Ericsson és mtsai., 1965; Novikoff, 1959) és a máj (Arstila és Trump, 1968; Ashford és Porter, 1962; Becker és Lane, 1965; Ericsson, 1969b; Novikoff és Essner, 1962) hámsejtjeiben vizsgálták. Hamar kiderült azonban, hogy más sejttípusokban is előfordulnak autofág vakuólák. Már az 1960-as években és a 70-es évek elején megtalálták őket pl. a hasnyálmirigy exokrin (Hruban és mtsai., 1963; Swift és Hruban, 1964), a tüdő alveoláris (Balis és Conen, 1964), a vékonybél epitéliális sejtjeiben (Behnke, 1963; Moe és Behnke, 1962), osteoblastokban (Eisenstein és mtsai., 1966), az eritrociták érése során (Kent és mtsai., 1966; Tooze és Davies, 1965), neuronokban (Holtzman és mtsai., 1967), limfocitákban (Biberfeld és mtsai., 1968), HeLa sejtekben (Arstila és mtsai., 1971), a barna zsírszövet (Napolitano, 1963), az emlőmirigy (Helminen és Ericsson, 1968), az ondóhólyag (Kovacs, 1968) a prosztata hámsejtjeiben (Swift és Hruban, 1964), a here intersticiális sejtjeiben (Frank és Christensen, 1968), a szív pitvarának izomsejtjeiben (Jamieson és Palade, 1964), a Müller féle vezetékben (Scheib, 1965), rovarok zsírtest sejtjeiben (Locke és Collins, 1965), Euglena gracilisben (Brandes és mtsai., 1964; Malkoff és Buetow, 1964), Tetrahymena pyriformisban (Levy és Elliott, 1968), Phycomycesben (Thornton, 1968), Euphorbia characias merisztéma (Marty, 1971), Eranthis hiemalis endospermium sejtjeiben (Cresti és mtsai., 1972). Lényegében tehát az autofágia általánosan előforduló eukarióta jelenségnek mutatkozott amely az egysejtűektől a gombákon, növényeken át az állatok nagyon sokféle sejttípusában megtalálható.

Az autofágia előfordulásának körülményei és feltételei már a kezdeti megfigyelések szerint is igen változatos, szinte zavarba ejtően sokféle képet mutattak. Rendszerezésükre többféle megoldás lehetséges. Itt és most a hagyományoktól némileg eltérően két fő csoportba osztom a korai vizsgálatokban megfigyelt autofágiát.

1./ Funkcióváltással járó fiziológiás és fejlődési körülmények között, valamint hasonló változásokat okozó kísérleti beavatkozások után autofágiát találtak pl.:

emlősök szöveteiben közvetlenül születés után (Clark, 1957; Moe és Behnke, 1962), éhezést követően különböző emlős szövetekben (Brandes és mtsai., 1964; Levy és Elliott, 1968; Napolitano, 1963; Nevalainen és Janigan, 1974; Pfeifer, 1973; Swift és Hruban, 1964; Toro és Viragh, 1966), az éhezéshez hasonló állapotot előidéző exogén glukagon adagolás eredményeként (Arstila és Trump, 1968; Ashford és Porter, 1962; Deter, 1971; Deter, 1975; Deter és De Duve, 1967; Ericsson, 1969b; Ericsson, 1969c), epinefrin (Rosa, 1971) és paratireoid hormon hatására (Pfeifer és Guder, 1975), emlőmirigy posztlaktációs involúciója során (Brandes és mtsai., 1969; Helminen és mtsai., 1968), parciális hepatektómiát (Becker és Lane, 1965; Ericsson, 1969b), neuronális sérülést követően (Holtzman és mtsai., 1967), kasztrálás után prosztata hámsejtekben (Helminen és Ericsson, 1971b; Helminen és Ericsson, 1972), denerváció után fejlődő izomsejtekben (Schiaffino és Hanzlikova, 1972), fehér leghorn csirkék melanocitáiban (Jimbow és mtsai., 1974), teljes átalakulással fejlődő rovarok lárvális sejtjeiben a normális fejlődés során, vagy exogén ekdizon hatására (Locke és Collins, 1965; Sass és Kovacs, 1975; Sass és Kovacs, 1977), differenciálódó nyálkagombában (Charvat és mtsai., 1972), konjugáló csillós egysejtűben (Sapra és Kloetzel, 1975).

2./ Feltehetően károsodást, az intracelluláris működés zavarait okozó behatások eredményeként, xenobiotikumokkal való kezelés nyomán, kísérleti úton előidézett és természetes patológiás körülmények között megjelenő autofágia fordult elő pl.:

aminosav vagy nuklein bázis analógok (Ekholm és mtsai., 1962; Hruban és mtsai., 1965a; Hruban és mtsai., 1962; Swift és Hruban, 1964), a fehérjeszintézis gátló puromycin (Longnecker és mtsai., 1968), az RNS-polimerázt gátló aktinomicin D (Eisenstein és mtsai., 1966; Kovacs, 1972; Rodriguez, 1967), a karcinogén hatású dimetilnitrózamin (Hendy és Grasso, 1972), a lipoprotein és koleszterin szintézist megzavaró dietanolamin és triparanol (Hruban és mtsai., 1965b), az antibakteriális ciklikus polipeptid bacitracin (Ericsson, 1969b), a malária ellenes drog, klorokin

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

(Abraham és Hendy, 1970; Abraham és mtsai., 1968b; Fedorko, 1967; Fedorko, 1968; Fedorko és mtsai., 1968; Hendy és mtsai., 1969), a vitális festésre használt neutrálvörös (Alousi és mtsai., 1966; Alousi és mtsai., 1968; Kovacs és Rez, 1972; Rez és Kovacs, 1973; Réz és Kovács, 1975), toxikus kadmium ionok (Rez és Kovacs, 1972), a mikrotubulusok szétesését okozó kolhicin, vinblasztin és vinkrisztin (Arstila és mtsai., 1974; Hirsimaki és mtsai., 1976; Hirsimäki és mtsai., 1975; Kovács és mtsai., 1975; Terry és mtsai., 1970), a nem ionos detergens Triton WR 1339 (Novikoff és Essner, 1962; Plattner és mtsai., 1975), az UTP szintézist megzavaró D-galaktózamin (Rumpelt és mtsai., 1974; Scharnbeck és mtsai., 1972), az akut glikogenolízist kiváltó glukozid, florizin (Becker és Cornwall, 1971), ciklikus AMP (Pfeifer és Guder, 1975) hatására, hiperozmotikus glukóz (Pfeifer, 1972b) vagy szukróz (Rez és Kovacs, 1972) oldat intraperitoneális injektálása nyomán. Patológiás körülmények között pl. kísérleti nefrózisban (Ericsson és mtsai., 1969; Novikoff, 1959), sugárzás (Hendee és Alders, 1968; Lane és Novikoff, 1965; Masurovsky és mtsai., 1967; Sobel, 1964), a máj portális vénájának (Cole és mtsai., 1971; Pfeifer, 1970), az emlőmirígy vezetékének (Helminen és Ericsson, 1971a) a lekötése nyomán. A hiperoxia (Abraham és mtsai., 1968a) és a hipoxia (Confer és Stenger, 1964; Glinsmann és Ericsson, 1966) egyaránt autofág vakuólák megjelenéséhez vezetett. Ugyanakkor cianid hatására megszűnt az autofagoszómák képződése, de az oxigén ellátás hatására újra megindult (Trump és Bulger, 1968), ami a folyamat mérsékelt oxigén és energia igényére utal.

Az a tény, hogy az autofág vakuólákat, szemben pl. a mitochondriumokkal, nem ismerték fel mindjárt az elektronmikroszkópos vizsgálatok kezdetén, azzal magyarázható, hogy viszonylag kis mennyiségben fordulnak elő a sejtekben. Mennyiségük ritkán több mint a citoplazma térfogatának 1%-a. Emiatt a vizsgálatok kezdetben szinte kizárólag, és később is többnyire olyan jelenségekkel foglalkoztak ahol megnövekedett autofág vakuóla mennyiség mutatkozik a sejtekben. Felmerült természetesen az a kérdés, hogy vajon csak speciális feltételek mellett keletkeznek-e autofagoszómák? A különböző kísérletekben felhasznált kontroll állatok gondos vizsgálata arra az eredményre vezetett, hogy autofágia un. normális fiziológiás körülmények között, mindenféle kísérleti beavatkozás nélkül is előfordul pl. máj és vese hámsejtekben (Ericsson, 1965; Ericsson, 1969a; Novikoff és Essner, 1962), beleértve az emberi májat is (Ma és Biempica, 1971), de más sejttípusokban is (pajzsmirigy follikuláris sejtjei, laktáló emlőmirigy alveolusának epitéliális sejtjei, a pons ganglionjaiban lévő neuronok, Kupffer-sejtek, fibroblasztok (Ericsson, 1969a)). Patkány májban kimutatták, hogy az autofágiának napszakos ritmusa van, éjjel minimális, napközben maximális (Pfeifer, 1971a). Ez a ritmus az ellenkezőjére fordul, ha az etetés időpontját reggelre teszik, tehát a táplálék bevitellel mutat korrelációt (Pfeifer, 1972a). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az autofágia, vagyis nagyobb citoplazma részletek rendszeres emésztése mindennapi fiziológiás folyamatok velejárója lehet.

Ezek az 1960-70-es években elért eredmények, egyelőre, egzakt módon nem bizonyított, csupán valószínűsíthető, összefüggések alapján kirajzolták az autofágia akkoriban racionálisan feltételezhető funkcióit.

1. Normális fiziológiás körülmények között kifejlett szervezetekben az autofágia hozzájárulhat a citoplazmatikus komponensek nagyobb adagokban történő (teljes organellumokat egészükben érintő) megújulásához, azaz az organelláris turnoverhez.

2. Drámai átalakulással járó fiziológiai és fejlődési helyzetekben a fokozott autofágia fontos eszköz lehet a sejt saját szerkezetének és működésének átszervezéséhez.

3. Éhezés és esszenciális táplálék összetevők hiányában a sejtek az autofág önemésztéssel segíthetik a nehéz időszak átvészelését, a túlélést.

4. Szubletális sejtsérülés esetén a sejtek autofágiával távolíthatják el sérült citoplazma részeiket, ezzel elháríthatják a hibásan működő organellumok hatásának következményeit és a lebontás termékeit felhasználhatják új, normális sejtalkotók létrehozásához.

Hogyan viszonyul egymáshoz az autofágia és a biokémiai módszerekkel mérhető lizoszomális fehérje lebontás?

A fejezetcímben megfogalmazott kérdés a hatvanas-hetvenes évek során egyre markánsabban rajzolódott ki. Láthattuk, hogy már 1960-as évek során világossá vált az, hogy az autofágia a lizoszomális lebontó folyamatok része, és nyilvánvalóan részt vesz a fehérjék intracelluláris degradációjában is. Ennek ellenére a két folyamat kutatása kezdetben jellemző módon egymástól függetlenül, egymással párhuzamosan folyt. Nagy szerepe volt

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

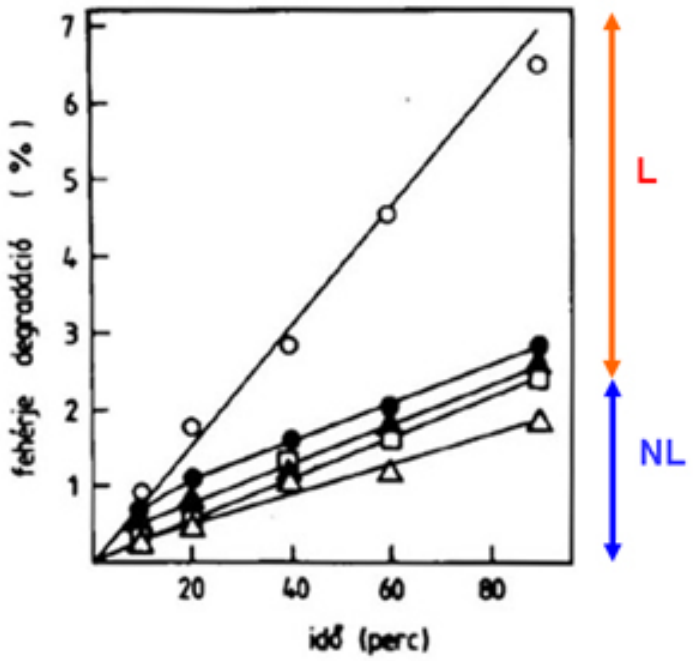
ebben a vizsgálati módszerek különbözőségének. Az autofágiát szinte kizárólag elektronmikroszkópos morfológia segítségével, míg a fehérjék katabolizmusát sejtbiokémiai módszerekkel vizsgálták. A fehérjelebontás kutatásában eleinte a prokarióták és a magasabbrendű eukarióták fehérjedegradációs mechanizmusainak összehasonlítása iránt volt nagyobb érdeklődés. A párhuzamosan végzett munkában felhalmozódó eredmények, tapasztalatok, módszertani újítások és a felszínre kerülő új kérdések együttes hatására a hetvenes években már lehetségessé vált a két folyamat közötti kapcsolatra vonatkozó adatok gyűjtése, és konkrét kísérleti eredmények alapján történő diszkussziója. Jellemző maradt ugyan az adott terület sajátos metodikai arzenáljának a szinte kizárólagos alkalmazása, született azonban példája a komplex megközelítésnek is. Az 1970-es évek közepétől jelentős haladás történt mind a degradáció mechanizmusainak, mind a lebontó folyamatok szabályozásának megismerésében beleértve az autofagocitózist is.

A legnehezebb kérdést az jelentette, hogy amint azt már említettük, a sejteket alkotó különböző proteineknek egyedi fél-életideje van, ami percektől órákon át napokig, hetekig vagy akár még tovább terjed, ez pedig nem összeegyeztethető az autofág-lizoszómális rendszer alapvetően nem szelektív működésével. A szelektív turnover megtalálható volt a baktériumokban is, amelyek nem rendelkeznek lizoszómákkal (Goldberg és Dice, 1974).

Az 1970-es évek során izolált-perfundált májban Glenn Mortimore és munkatársai kimutatták, hogy aminosavak és inzulin hozzáadása a fehérjelebontással párhuzamosan csökkentette, míg megvonásuk növelte az endogén proteolízist, a lizoszómák ozmotikus fragilitását (ami méretükkel és membránjuk természetének megváltozásával függ össze), valamint a lizoszomális kompartmentum morfometriailag meghatározott méretét (Mortimore és Schworer, 1977; Neely és mtsai., 1974; Woodside és Mortimore, 1972). Ezzel összehangzó eredmények (protein degradáció és fragilitás fokozódás) születtek a glukagon hatásával kapcsolatban is (Deter és De Duve, 1967; Schworer és Mortimore, 1979; Woodside és mtsai., 1974), amelyről már a 60-as évek elején ismertté vált, hogy autofág vakuólák megjelenését idézi elő (Ashford és Porter, 1962).

Az endogén proteolízis és a lizoszómális aktivitás összefüggését vizsgálták **Per Ottar Seglen** (függelék 18. ábra) norvég kutató és munkatársai az 1970-es és 80-as évek során. A kutatások kiindulópontja az az eredmény volt, hogy izolált májsejtekben a glutamin deaminálásából származó (Seglen, 1975) és a kívülről adott ammónia egyaránt gátolja az endogén proteolízist, ugyanakkor növeli a lizoszómák méretét (Seglen és Reith, 1976).

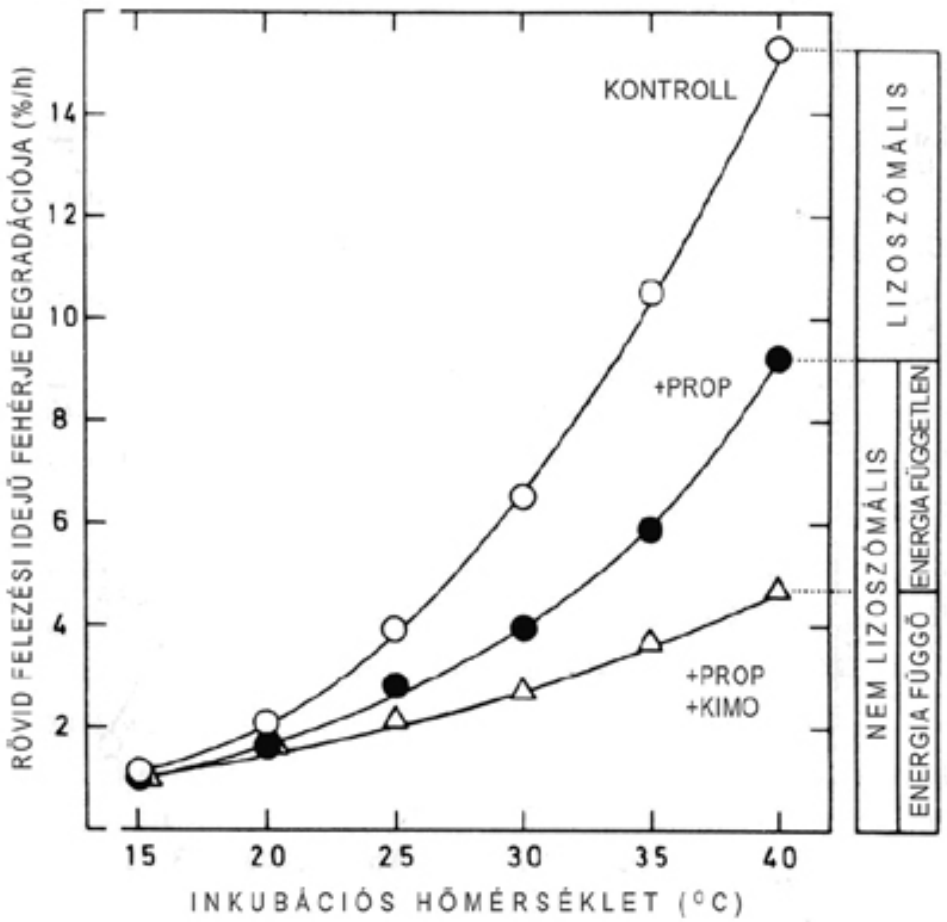
Ezt követően kiderült, hogy a fehérjék radioaktív jelölése nyomán (1.3. ábra) az izolált májsejtekben éheztetés körülményei között (tehát aminosav hiányos médiumban tartott sejteken) mérhető teljes fehérjelebontásnak egy része gátolható volt lizoszómális támadáspontú gátlószerekkel (aminokkal, mint pl. ammónia, metilamin, propilamin, leupeptinnel, vinblasztinnal ld. később) a másik része pedig nem. A kísérleti adatok szerint a gátlásnak van egy jól reprodukálható maximális értéke, tekintet nélkül az alkalmazott gátlószerre (1.36. ábra).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.36. ábra Többféle gátlószer (fehér kör: kezeletlen kontroll, fekete kör: aminosavak, fekete háromszög: leupeptin, fehér háromszög: propilamin, fehér négyszög: vinblasztin) hatása az intracelluláris fehérjelebontásra izolált májsejtekben; a maximális hatást biztosító koncentrációban adott gátlószerek 65-70 %-ban gátolják a lebontást, ami a lizoszomális lebontás (L) mértékének felel meg, szemben a nem lizoszomális lebontás (NL) 30-35 %-os értékével.

Ezen eredmények szerint tehát különbséget lehet tenni a lizoszomális és nem lizoszomális lebontás között. Ilyen típusú kísérletekkel (amelyek további részletezésétől eltekintünk), azt is ki lehetett mutatni, hogy a teljes degradációban még több részfolyamat szerepel, mivel a nem lizoszomális degradáción belül energiafüggő és energia független komponensek is szerepelnek (1.37. ábra) (Gordon és mtsai., 1987).



1.37. ábra A teljes intracelluláris fehérje lebontás összetevőire bontása a degradáció differenciális gátlásával izolált májsejtekben. Radioaktív aminosavval való rövid (néhány órás) jelölés után a teljes lebontás (kontroll) 35%-a lizoszomális (a lizoszomális támadáspontú propilaminnal (prop) gátolható), 65%-a pedig nem lizoszomális; a nem lizoszomális lebontáson belül további propilamin + kimosztatinnal (kimo) gátolható 30 % nem lizoszomális és energia függő, a maradék 35 % pedig nem lizoszomális energia független. (Az energiafüggőség megállapításához további itt nem részletezett számításokra van szükség.)

Az előzőekben már szó volt arról, hogy milyen sokféle vegyülettel és behatással befolyásolható, stimulálható és gátolható az autofág vakuólák elektronmikroszkóppal kimutatható megjelenése különböző sejttípusokban. Az eredmények diszkutálása során a kutatók, természetes logikával, az autofág vakuólák mennyiségének csökkenését az autofág aktivitás csökkenésével, szaporodásukat az autofágia intenzitásának a növekedésével magyarázták. Hasonlóan, vizsgálatok sorozatát végezték el sejt biokémikusok az endogén fehérje degradáció mérésével. Nem történt azonban meg a kétféle adatsor összehasonlító elemzése.

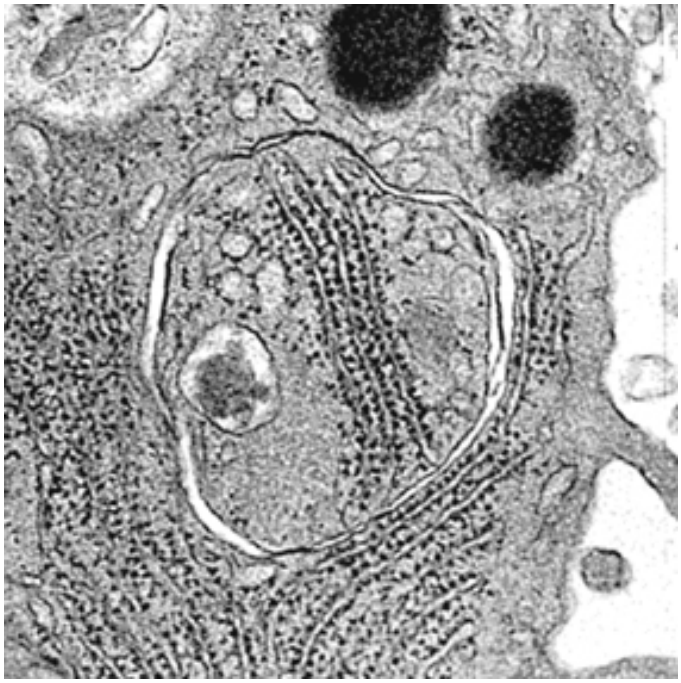
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Erre került sor ezen fejezet szerzőjének a Per Seglen laboratóriumában végzett munkája során, korrelatív biokémiai és elektronmikroszkópos morfometriai módszerek segítségével. A kísérletekben négy gátlószert alkalmaztunk, aminosavakat, vinblasztint, leupeptint és propilamint. Ezeknek a lizoszomális támadáspontú gátlószereknek a maximális hatása a teljes lebontásra nagyjából azonos volt. Ezek a szerek egy bizonyos, még toxikus koncentrációban egymással gyakorlatilag megegyező mértékben gátolták a lizoszomális degradációt. Ennek értéke adott jelölési feltételek mellett a lebontásnak közelítőleg 70 %-át teszi ki. Ezt az értéket tekintjük a lizoszomális degradáció mennyiségének.

A gátlószerek tehát egyformán hatottak a lebontásra, különbségek mutatkoztak azonban az autofág vakuólák mennyiségére gyakorolt hatásukban. Az aminosavak egyaránt csökkentették mind a fehérjelebontást, mind az autofagoszómák és autolizoszómák mennyiségét. Ez azzal magyarázható, hogy az aminosavak az autofág szekvesztráció gátlása révén csökkentik a fehérjelebontást.

A másik három szer, miközben az aminosavakkal lényegében azonos mértékben csökkentette a biokémiailag mérhető fehérjelebontást, egyúttal erősen megnövelte az autofág-lizoszómális rendszer citoplazmához viszonyított térfogatát. Ezek az eredmények világosan bizonyították, hogy az autofág vakuólák számának, az autofág-lizoszómális kompartmentum méretének növekedése paradox módon nemcsak a lebontás stimulálásával (Kovács és mtsai., 1981), de annak gátlásával is együtt járhat (Kovács és mtsai., 1982). Ennek magyarázata abban rejlik, hogy az utóbbi három szer az autofág-lizoszómális lebontást az autofagoszómák keletkezését követő lépésekben gátolják. Részletesebb morfológiai vizsgálatok hozzásegítenek ahhoz is, hogy megállapítsuk mely lépésekről lehet szó.

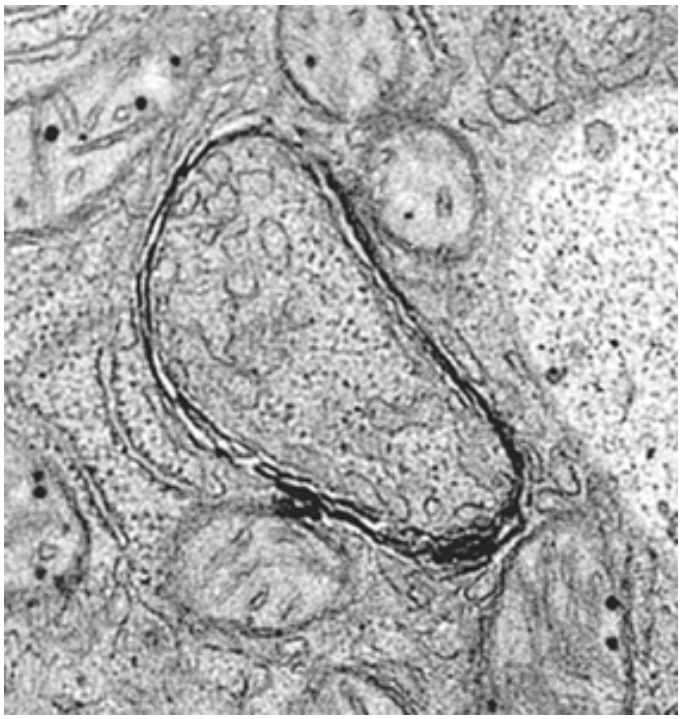
Morfológiai szempontból vizsgálva, az autofagoszómák minden kezelésben hasonló megjelenésűek voltak. Bennük nem, vagy alig változott a szekvesztrált organellumok, (pl. mitochondriumok, RER azaz a Riboszómás Endoplazmatikus Retikulum) struktúrája (1.38-1.40. ábra).



1.38. ábra Autofagoszóma vinblasztin kezelés után (patkány izolált májsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

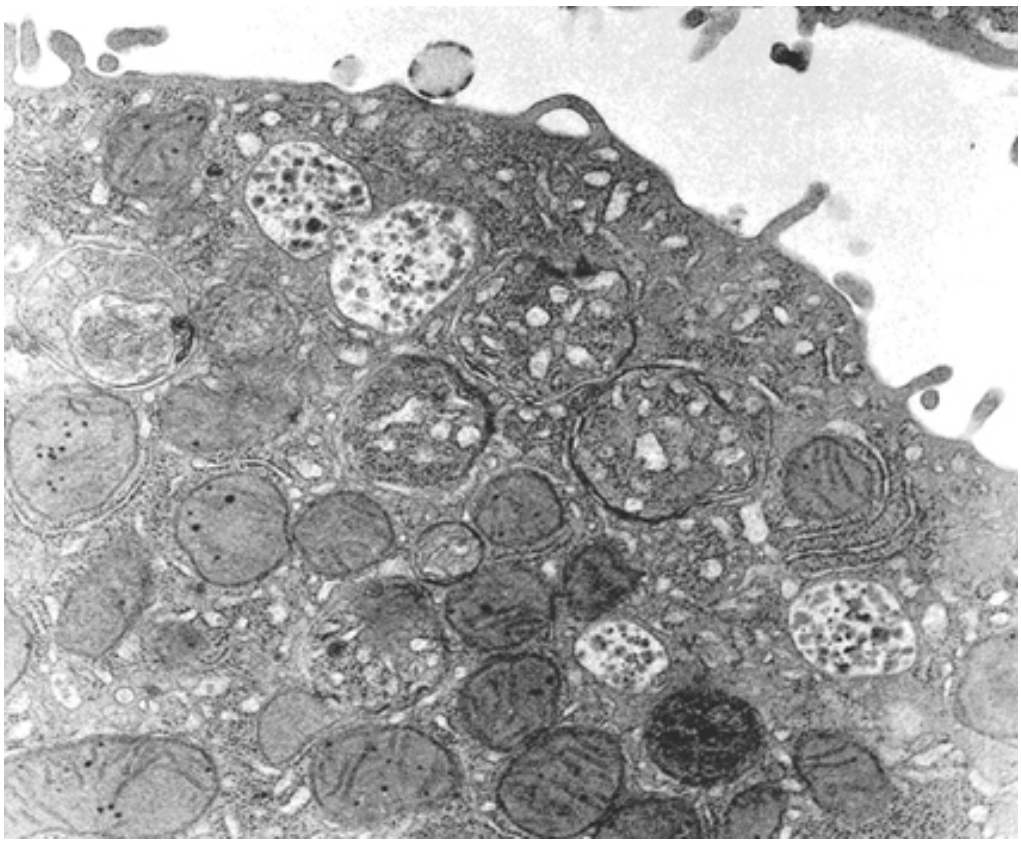
1.39. ábra Autofagoszóma leupeptin kezelés után (patkány izolált májsejt)



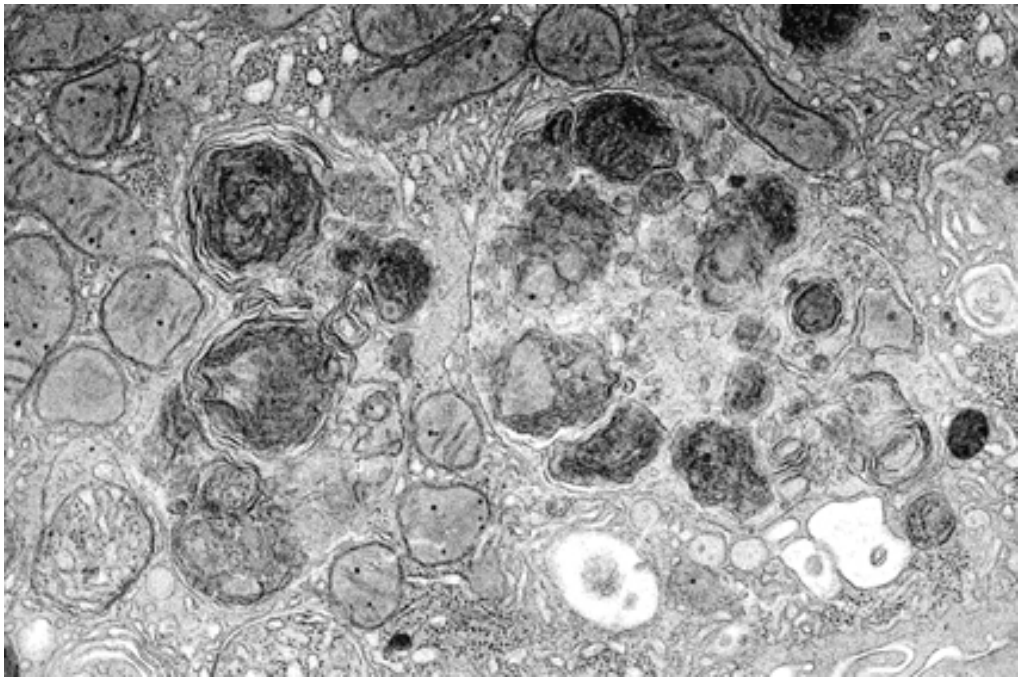
1.40. ábra Autofagoszóma propilamin kezelés után (patkány izolált májsejt)

A mikrotubulusok szétesését okozó vinblasztin kezelés után elsősorban az autofagoszómák mennyisége nőtt meg (1.41. ábra). A lizoszomális proteázgátló leupeptin hatására olyan autofág vakuólák halmozódtak fel a leginkább, amelyekben a szekvesztrált citoplazma részeket nehezen, vagy egyáltalán nem lehetett felismerni és beltartalmuk denzitása megnőtt (1.42. ábra). A propilamin hatására az autofág vakuólák erős duzzadást mutattak és bennük szétesett, de meg nem emésztett szekvesztrált fragmentumok halmozódtak fel (1.43. ábra) (Kovács és mtsai., 1982).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

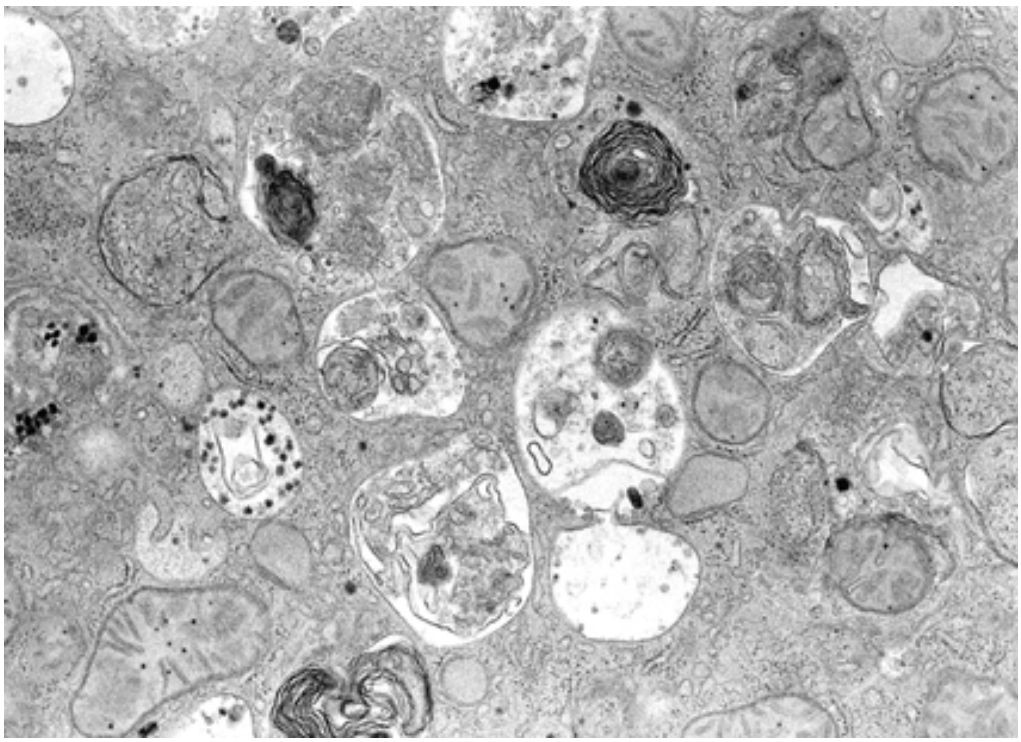


1.41. ábra Vinblasztin kezelés esetében túlnyomó többségben vannak az autofagoszómák (patkány izolált májsejt)



1.42. ábra Leupeptin kezelés esetében túlnyomó többségben vannak a komplex, fuzionált, jellemzően sötét részben degradált citoplazma részeket tartalmazó konstipált autolizoszómák (patkány izolált májsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.43. ábra Propilaminin kezelés esetében túlnyomó többségben vannak a nagyrészt világos, kissé duzzadt, nem fuzionált, szétesett citoplazma részeket tartalmazó autolizoszómák (patkány izolált májsejt)

Ezeket az eredményeket a következőképpen magyarázhatjuk. A vinblasztin a mikrotubulusok szétesését okozza, ennek következtében gátolja a citoplazmatikus mozgásokat. Emiatt lecsökken az autofagoszómák és a lizoszómák találkozásának gyakorisága, tehát a szekvesztrált anyag autofagoszómákban halmozódik fel. A leupeptin és a propilamin, különböző mechanizmussal, a lizoszomális enzimeket gátolják az autolizoszómákban. Leuptetin esetében ez közvetlen proteináz gátlás. A beltartalom destrukciójának, sötét amorf anyaggá alakulásának a valószínű magyarázata az, hogy alacsony a pH és a proteinázokon kívül az egyéb lebontó enzimek működnek. Az aminok azt okozzák, hogy a savas pH-jú autolizoszómába jutva protonálódnak, és csapdába esve nem tudnak kijutni a lizoszómából. Ezzel csökkentik annak pH-ját, és emellett megnövelik ozmotikus koncentrációját. A pH növekedése megszünteti a lizoszomális enzimek számára szükséges pH optimumot, az ozmotikus hatás pedig az autolizoszóma duzzadásához vezet.

A fenti eredményekkel összhangban az autofág lebontást befolyásoló, annak gátlását okozó hatások és szerek ma is érvényes legjobb csoportosítása a folyamat fő lépéseire gyakorolt hatásuk szerint történik. Ezek szerint vagy a szekvesztrációra, vagy a fúzióra vagy a lizoszomális lebontásra hatnak, esetleg ezek közül egyidejűleg többre is.

Az izoláló membrán keletkezésének néhány kérdése

A bevezetés nem lehet teljes anélkül, hogy visszatérnénk az izoláló, vagy szekvesztráló membrán keletkezésének problémájára. A kérdés mind a mai napig élénken vitatott, és nincs rá kísérletileg igazolt, mindenki által elfogadott, magyarázat. A probléma körüli polémia tanulságos példája a hipotézisek és a tények kezelésének a tudományos diszkussziókban.

A szekvesztráció folyamatát az 1990-es évek közepéig csak elektronmikroszkóppal lehetett vizsgálni. Amint azt már említettük, az 1960-as években tisztázták, hogy a folyamat elején a kettős membránnal határolt autofág vakuólák, az autofagoszómák állnak. A dupla membrán két lemeze között általában tágult, üresnek látszó tér mutatkozott, ami ciszternaszerű megjelenést okozott (1.44. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

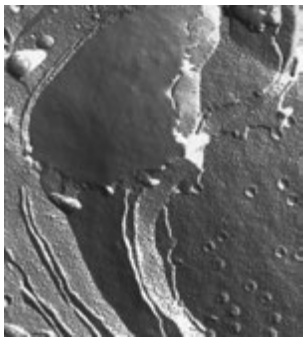
1.44. ábra Autofagoszómák (baloldalon és középen) és nyitott izoláló membránok (fagofórok, jobb oldalon). Mind az autofagoszómák, mind a fagofórok kettős membránja között üresnek látszó tér mutatkozik, ami fixálási műtermék ugyan, de olyan rendszeresen és jellegzetesen mutatkozik, hogy a rutinszerűen alkalmazott aldehiddel fixált mintákban felhasználható a korai autofág struktúrák (fagofórok, autofagoszómák) azonosítására (egér ondóhólyag hámsejt)

Emiatt a kézenfekvő és a leggyakrabban hangoztatott, fentebb már említett, elképzelés az volt, hogy az izoláló membrán a RER direkt transzformációjával keletkezik. A RER mellett az izoláló membrán (IM) forrásaként szóba került szinte az összes sejtben található membrán típus, így a pl. a Golgi-vezikulák (Locke és Collins, 1965), a sima endoplazmás retikulum (Arstila és Trump, 1968), vagy akár a plazma membrán is (Oledzka-Slotwinska és Desmet, 1969). Ez utóbbi nyilvánvaló tévedés, mivel a kettős IM vékony, a plazmamembrán pedig vastag típusú membrán. A RER-ből, illetve más preformált membránból transzformációval való keletkezés legerősebb támasza az a dogma volt, amely szerint a sejtekben membrán kizárólag membránból keletkezik.

A továbblépéshez fontos volt az autofagoszóma membrán sajátosságainak felderítése, és az autofagoszóma fázis előtti formák, tehát a még nem záródott IM-ok, azaz a fagofórok megfigyelése. Az autofág izoláló membrán specifikus sajátosságát mutatta az a megfigyelés, hogy megfelelő technikai feltételek mellett a membránja ozmiummal erősebben festődő volt (un. ozmium impregnáció), mint a többi membrán (Arstila és mtsai., 1972; Pfeifer, 1972c). Mivel az ozmium igen erősen festi a lipideket, ebből azt a következtetés vonták le a szerzők, hogy az IM-nak különösen nagy a lipid tartalma. További kísérleti bizonyítékot jelentett erre Réz Gábor és Jacopo Meldolesi freeze-fracture technikával kapott eredménye (Réz és Meldolesi, 1980). Eszerint az autofagoszóma membránja, szemben pl. az RER membránnal, alig tartalmaz intramembrán partikulákat (vagyis integráns membrán proteineket), tehát szinte tisztán foszfolipidekből áll (1.45-1.46. ábra).

1.45. ábra Sejtmag körüli nyitott izoláló membrán (fagofór) rutinfixálás után, benne az üresnek látszó rés (egér ondóhólyag hámsejt

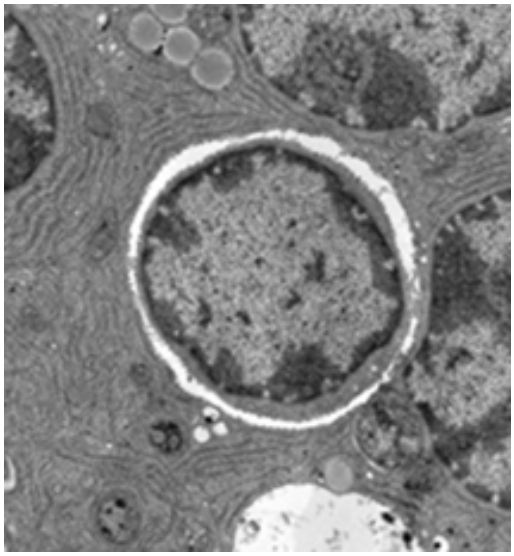
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.46. ábra A sejtmag körüli fagofór fagyasztva töréses képe. Jól látszik, hogy a fagofór lényegében partikulamentes, tehát nincsenek benne integrális membrán proteinek (egér ondóhólyag hámsejt)

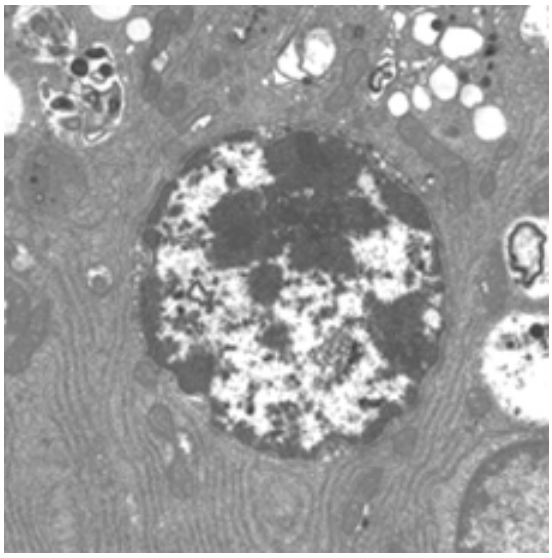
Ezen eredmények szerint tehát az izoláló membrán integráns fehérjéket nem tartalmazó különleges képződmény. Továbbra is nyitott kérdés marad azonban, hogy hogyan keletkezik? Ulrich Pfeifer elképzelése az volt, hogy citoszólikus lipidekből de novo, tehát újonnan áll össze. A de novo membrán keletkezés szembe ment a „membrán csak membránból jön létre” dogmájával. Az átmeneti preautofagoszómális formák megfigyelésének legnagyobb problémája az volt, hogy ilyenek rendkívül ritkán találhatók. Az első (Locke és Collins, 1965) és a második (Pfeifer, 1971b) még nem zárt izoláló membránról készült kép megjelenése között hat év telt el.

Seglen 1985-ben spekulatív módon arra a hipotetikus következtetésre jutott, hogy az IM egy önálló organellum amely reciklizál (Seglen, 1987). El is nevezte ezt a hipotetikus organellumot fagofórnak. Bár a reciklizációs hipotézis nem bizonyult helyesnek, a fagofór kifejezést ma is használjuk a még nem záródott IM szinonimájaként. A fagofór fázis részletes morfológiai analízisére csak évtizedekkel később kerülhetett sor, amikor ondóhólyag hámsejtekben *in vitro* olyan körülményeket találtunk amelyek mellett sok és igen nagy fagofór keletkezett (Kovács és mtsai., 2007; Kovács és mtsai., 2000) és emellett elsőként megfigyeltük a sejtmag szekvesztrációját (1.47-1.48. ábra), autofág megemésztését valamint a fagofór fázis reverzibilis voltát.



1.47. ábra Morfológiailag ép szekvesztrált sejtmag autofagoszómában (egér ondóhólyag hámsejt)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.48. ábra Részlegesen degradálódott sejtmag autolizoszómában (egér ondóhólyag hámsejt)

A vizsgálatokhoz a konvencionális elektronmikroszkópia mellett különböző impregnációs eljárásokat, valamint fagyasztva rögzítéses (kriofixációs) és freeze-fracture technikát is alkalmaztunk. Röviden összefoglalva a következő fő megfigyelések születtek.

1. A fagofór gyakran jelenik meg két RER ciszterna közötti tér közepén, ahol a standard távolságban lévő szomszédos ciszternák közötti teret pontosan felezi, és két oldalán csupán egy sor riboszóma marad közte és az RER membrán között (1.49-1.52. ábra).

2. Sehol nem látható folytonosság a fagofór és az RER membránja között.

3. Nem találhatók elektronmikroszkóppal kimutatható membránnal határolt prekurzor vezikulák a növekvő fagofór közvetlen szomszédságában.

4. A fagofór freeze-fracture technikával vizsgálva az autofagoszóma membránjához hasonlóan intramembrán partikulumoktól mentes (1.45. ábra).

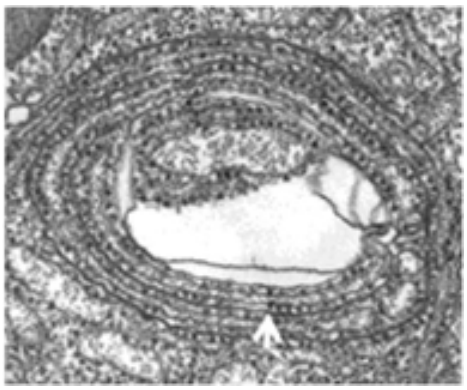
5. A fagofór általában ciszternaszerű megjelenést mutat egyszerű aldehid rögzítés után, mivel belsejében jól látható tágult üres rés van. Hasonló helyzet áll fenn az autofagoszóma IM-ja esetében (1.12-1.13, 1.43-1.44, 1.50 ábra). Ez annyira jellegzetes, hogy felhasználható az IM és az autofagoszóma azonosítására.

6. Imidazollal (1.48. ábra), csersavval (1.53. ábra) való impregnálás, vagy kriofixálás után (1.50. ábra) nem, vagy csak ritkán és helyenként jelenik meg az üres rés, ehelyett kompakt pentalamináris struktúrát mutat az IM (1.53-1.56. ábra), tehát a fagofór valójában nem ciszterna. Előfordulnak egymáshoz szorosan illeszkedő fagofórok ami azt bizonyítja, hogy membránjuk a planáris régióban nem képes a fúzióra (1.57. ábra).

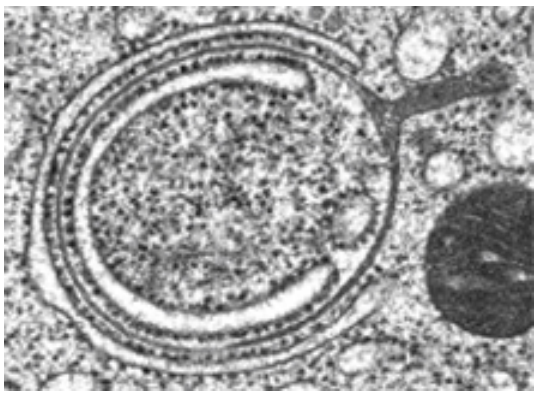
7. A növekvő fagofórok a környező RER ciszternák lefutását követik, esetenként hosszan kanyarognak az RER ciszternák között és szemmel láthatóan nem záródnak. Ezt a sejtmagok körüli fagogórok és a sejtmagok szekvesztrációja is alátámasztja (1.47-1.48. ábra). Az ilyen fagofórok 7 percen belül eltűnnek a sejtből, a fagofór növekedése tehát reverzibilis. A sejtmagok szekvesztrációját és autofág emésztését, valamint a fagofór növekedésének reverzibilis voltát elsőként mutattuk ki (Kovács és mtsai., 2007; Kovács és mtsai., 2000).

8. A részletes elemzés azt támasztja alá, hogy a fagofór az éles szögben visszahajló széleken nő, ahol a membrán térbeli okok miatt lazább szerkezetű.

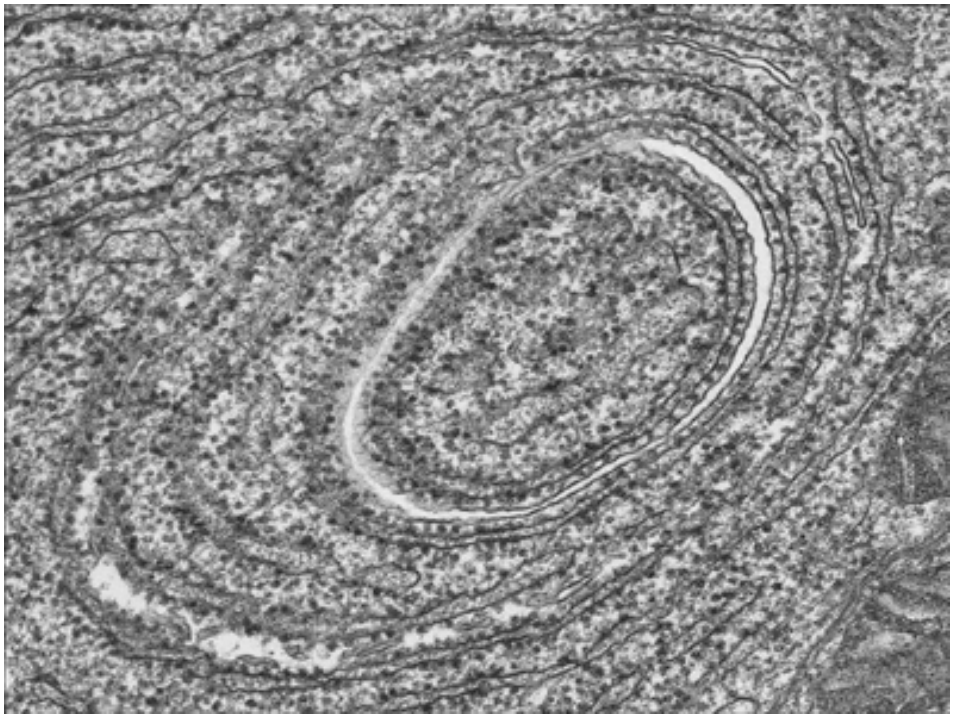
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.49. ábra Imidazollal való impregnálás után az izoláló membrán két lemeze szorosan tapad egymáshoz (nyíl) (egér ondóhólyag hámsejt).

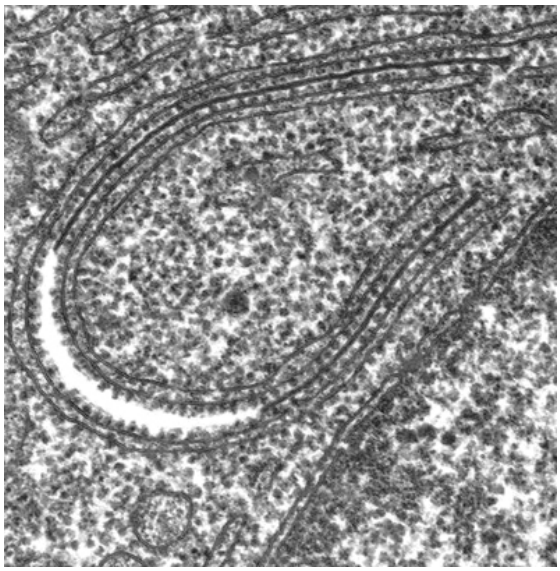


1.50. ábra Kriofixálás után az izoláló membrán két lemeze együtt marad. A képe jobb felső oldalán egy lizoszóma a fúzió után beltartalmát az autofagoszóma két membránja közé bocsátja (egér ondóhólyag hámsejt).

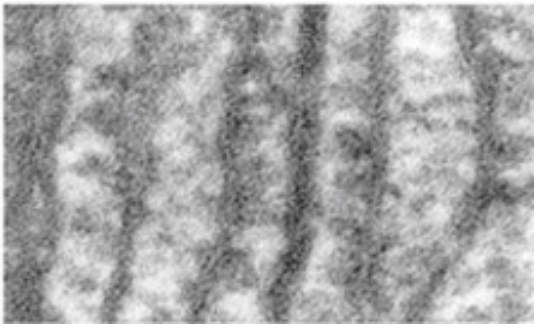


1.52. ábra Fagofór és izoláló membrán egér ondóhólyag hámsejt RER régiójában

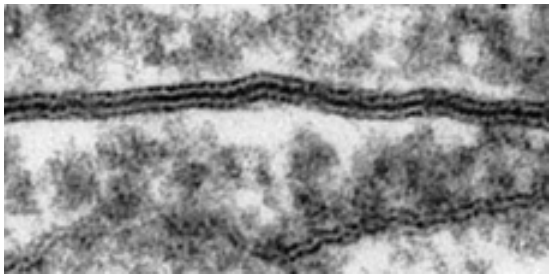
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



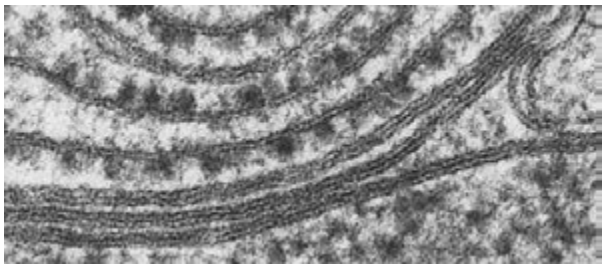
1.53. ábra Fagofór két RER ciszterna között csersavas rögzítővel fixált egér ondóhólyag hámsejtben. A fagofór egy részében látszik a fehéren feltűnő rés, nagyobbik részén azonban szorosan összetapadnak a kettős membrán lemezei.



1.54. ábra Imidazollal kiegészített rögzítő alkalmazása esetén a fagofór két membránja szorosan összetapad (egér ondóhólyag hámsejt)

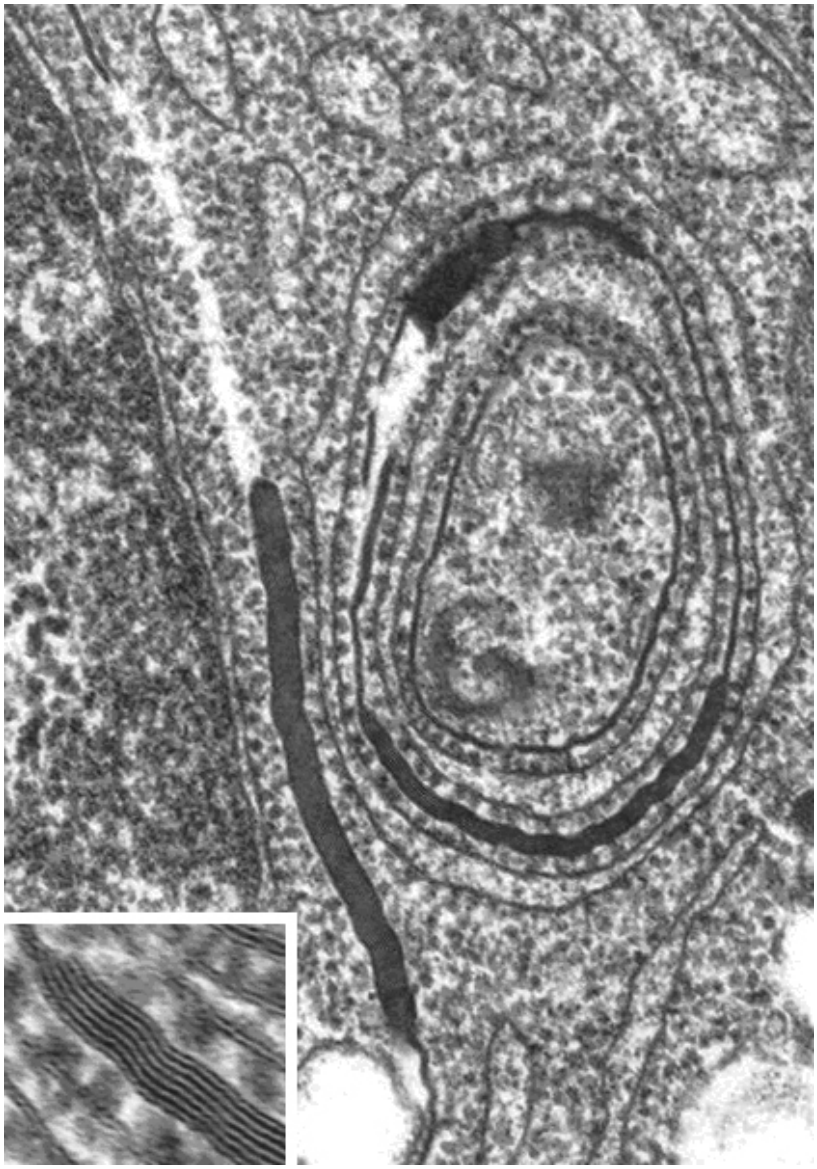


1.55. ábra Csersavval kiegészített rögzítő alkalmazása esetén szintén szorosan összetapad a fagofór két membránja (egér ondóhólyag hámsejt)



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.56. ábra Kriofixálással rögzített egér ondóhólyag hámsejtben a fagorórok két membránja szorosan összetapad és világosan megjelenő pentalamináris szerkezetet alkot, nyoma sincs a két membrán közötti résnek

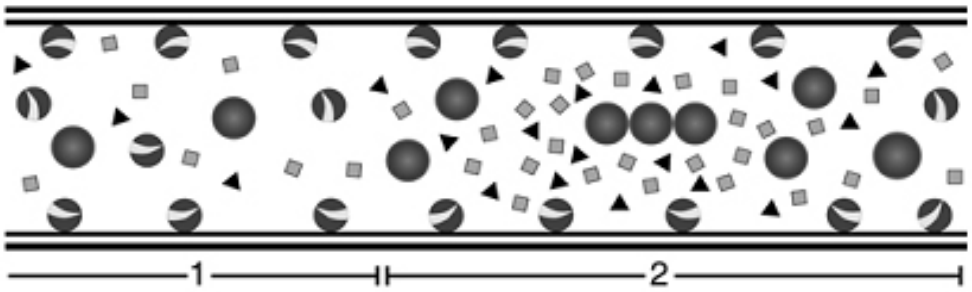


1.57. ábra Csersavval kiegészített rögzítő használata esetén az egér ondóhólyag hámsejtben a fagofórok két membránja között többnyire nincsen rés. A kinagyított képen látható, hogy több fagofór membrán is nőhet egymáshoz szorosan illeszkedve, anélkül, hogy összeolvadnának.

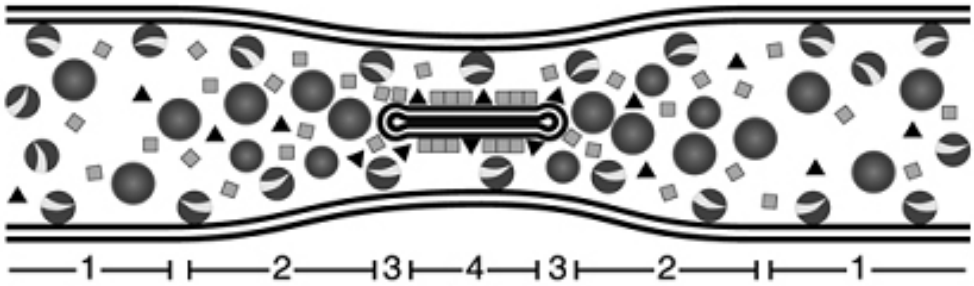
A fentiek alapján megfogalmazható volt egy hipotézis, amely prediktálja a fagofór keletkezésének bizonyos részleteit is. Eszerint a fagofór de novo keletkezik, a membrán prekurzora elektronmikroszkóppal nem mutatható ki. Feltételezhetjük tehát valamilyen labilis és nagy kapacitású új típusú lipidszállító vezikula-rendszer (esetleg micelláris rendszer) létét ami a növekedő fagofórt alkotó membrán lipideket szolgáltatja (Kovács és mtsai., 2007). A fagofór keletkezésének a fenti gondolatmenet alapján feltételezett folyamatát ábrázolják az 1.58-1.60. ábrák. Különösen élesztőben egyre több adat támasztja alá, hogy létezhet ilyen szállító mechanizmus amelynek része lehet az egyetlen transzmembrán ATG fehérje, az ATG9 (Yamamoto és mtsai., 2012). A fagofór növekedésének reverzibilis szakasza a gömbbé záródással ér véget.

Az 1.58-1.60. ábrák a fagofór két RER ciszterna keletkezésének egy lehetséges változatát mutatják az ondóhólyag hámsejtek elektronmikroszkópos képeinek elemzése alapján (a rajz elemeinek magyarázatát ld. az 1.60. ábrán).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.58. ábra Az első lépés a feltételezett, és a szokásos elektronmikroszkópos fixálók használata után ki nem mutatható foszfolipid szállító elemek csoportosulása.



1.59. ábra A második lépés a szokásos elektronmikroszkópos fixálókkal rögzíthető rövid fagofór membrán szakasz megjelenése, amely a szélén nő a beépülő membrán lipidek révén

1.60. ábra A harmadik lépésben a RER ciszterna a záródás előkészítésére meghajlik, miközben a növekvő fagofór követi a görbületet.

A különböző kísérleti rendszerekben kapott részben ellentmondásos adatok arra ösztönöznek sok kutatót, hogy többféle mechanizmust feltételezzenek a fagofór keletkezésére. Továbbra is előfordul, hogy az elektronmikroszkópos képeken ritkán található fagofór-ER membrán kontaktusokat az ER membránból való származás bizonyítékának

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

tekintik (Hayashi-Nishino és mtsai., 2009; Yla-Anttila és mtsai., 2009), ezek azonban nagy valószínűséggel műtermékek.

A vita sokszor abból adódik, hogy magát a problémát nem pontosan fogalmazzák meg. Mivel a szekvesztrációs membrán csaknem kizárólag lipidekből áll, a kérdés valójában az, hogy honnan származik a fagofór membránjának foszfolipidje és, hogy a membrán lipidek hogyan szerveződnek meg egy új típusú membránná. Biokémiai adatok bizonyítják, hogy a membránokat alkotó foszfolipidek csak az RER-ben, a mitochondriumokban és a Golgi készülékben szintetizálódnak (Blom és mtsai., 2011; Vance és Vance, 2004). Az RER-ből a kanonikus vezikuláris transzporttal (ER, Golgi, lizoszóma, szekréciós vakuóla, plazma membrán) jutnak a különböző membránnal határolt kompartmentumokba. A mitochondrium ebből a szempontból különálló kompartmentumnak látszik. Ha valóban létezik egy nagy kapacitású lipid szállító rendszer, akkor potenciálisan az összes intracelluláris membrán és a plazmamembrán egyaránt lehet a fagofór foszfolipidjeinek forrása.

Az autofágia az eukarióta sejtek legősibb fajaiban pl. az élesztő sejtekben is fontos szerepet játszik és szinte minden sejttípusban előfordul. Ez arra mutat, hogy lényegi kapcsolatban van az eukarióta létezéssel, az eukarióták evolúciójával. Lehetséges tehát, hogy a fagofór keletkezésének tanulmányozása hozzásegít a membránok keletkezése evolúciós folyamatainak tisztázásához is.

Az autofágia klasszikus módszereivel a kapott legfontosabb ismeretek leírása ezzel befejeződik. Az autofágia kutatásának módszerei az 1990-es évek elejétől alapvetően megváltoztak azt követően, hogy a folyamatot felfedezték *Saccharomyces cerevisiae*-ben. Ennek köszönhetően lehetővé vált az autofágia kutatása a legkorszerűbb molekuláris genetikai módszerekkel. Ez a folyamat iránti óriási érdeklődéshez, a benne résztvevők számának soha nem látott növekedéséhez vezetett. 2004-ben megszületett az első csak autofágiával foglakozó könyv (Klionsky, 2004) és megindult a kizárólag autofágiával foglalkozó konferenciák, szimpoziumok szervezése. Korábban az autofágia kutatás eredményei a fehérjelebontással foglalkozó könyvek és szimpoziumok részei voltak. 2005-ben **Daniel J. Klionsky** (függelék 19. ábra) kezdeményezésére megindult az Autophagy című folyóirat. Az autofágia iránti érdeklődés óriási fellendülését mutatja az is, hogy míg 1957-1992-ig csak 2 míg 1992-2007 között 30 olyan cikk jelent meg a Science vagy a Nature folyóiratban amely autofágiával foglalkozott.

Ellenőrző kérdések

1. Mi a „wear and tear” hipotézis?
2. Mi a N-egyensúly?
3. Mi a folytatódó protein metabolizmus?
4. Mit jelent a testalkotók dinamikus állapota?
5. Mi a turnover és milyen folyamatok vannak mögötte?
6. Mit jelent, hogy a turnover gyorsabb, vagy lassabb?
7. Hogyan kell a fehérjelebontást mérni in vitro?
8. Mit befolyásol a jelölés ideje?
9. Mi volt az intracelluláris fehérjelebontás első kísérleti úton feltárt fontos sajátossága?

Irodalom

Abraham, R., Dawson, W., Grasso, P., Golberg, L., 1968a. Lysosomal changes associated with hyperoxia in the isolated perfused rat liver. Exp Mol Pathol. 8**,** 370-87.

Abraham, R., Hendy, R., 1970. Effects of chronic chloroquine treatment on lysosomes of rat liver cells. Exp Mol Pathol. 12**,** 148-59.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Abraham, R., Hendy, R., Grasso, P., 1968b. Formation of myeloid bodies in rat liver lysosomes after chloroquine administration. Exp Mol Pathol. 9, 212-29.

Alousi, M. A., Morgan, W. S., Stenger, R. J., 1966. The effect of starvation and re-feeding upon the formation of neutral red granules in the pancreas. A light and electron microscopic study. Am J Pathol. 48, 21a-22a.

Alousi, M. A., Stenger, R. J., Morgan, W. S., 1968. The fine structure of pancreatic acinar and hepatic parenchymal cells after neutral red dye injection. Exp Mol Pathol. 9, 97-109.

Arstila, A. U., Jauregui, H. O., Chang, J., Trump, B. F., 1971. Studies on cellular autophagocytosis. Relationship between heterophagy and autophagy in HeLa cells. Lab Invest. 24, 162-74.

Arstila, A. U., Nuuja, I. J., Trump, B. F., 1974. Studies on cellular autophagocytosis. Vinblastine-induced autophagy in the rat liver. Exp Cell Res. 87, 249-52.

Arstila, A. U., Shelburne, J. D., Trump, B. F., 1972. Studies on cellular autophagocytosis. A histochemical study on sequential alterations of mitochondria in the glucagon-induced autophagic vacuoles of rat liver. Lab Invest. 27, 317-23.

Arstila, A. U., Trump, B. F., 1968. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. Am J Pathol. 53, 687-733.

Arstila, A. U., Trump, B. F., 1969. Autophagocytosis: origin of membrane and hydrolytic enzymes. Virchows Arch B Cell Pathol. 2, 85-90.

Ashford, T. P., Porter, K. R., 1962. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. J Cell Biol. 12, 198-202.

Balis, J. U., Conen, P. E., 1964. The Role Of Alveolar Inclusion Bodies In The Developing Lung. Lab Invest. 13, 1215-29.

Ballard, F. J., 1977. Intracellular protein degradation. Essays Biochem. 13, 1-37.

Becker, F. F., Cornwall, C. C., Jr., 1971. Phlorizin induced autophagocytosis during hepatocytic glycogenolysis. Exp Mol Pathol. 14, 103-9.

Becker, F. F., Lane, B. P., 1965. Regeneration of the mammalian liver. I. Auto-phagocytosis during dedifferentiation of the liver cell in preparation for cell division. Am J Pathol. 47, 783-801.

Behnke, O., 1963. Demonstration Of Acid Phosphatase-Containing Granules And Cytoplasmic Bodies In The Epithelium Of Foetal Rat Duodenum During Certain Stages Of Differentiation. J Cell Biol. 18, 251-65.

Biberfeld, P., Holm, G., Perlmann, P., 1968. Morphological observations on lymphocyte peripolesis and cytotoxic action in vitro. Exp Cell Res. 52, 672-7.

Blom, T., Somerharju, P., Ikonen, E., 2011. Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3, a004713.

Brandes, D., Anton, E., Barnard, S., 1969. Lysosomes and cellular regressive changes in rat mammary gland involution. Lab Invest. 20, 465-71.

Brandes, D., Buetow, D. E., Bertini, F., Malkoff, D. B., 1964. Role of lysosomes in cellular lytic processes. I. Effect of carbon starvation in *Euglena gracilis*. Exp Mol Pathol. 90, 583-609.

Charvat, I., Ross, I. K., Cronshaw, J., 1972. Autophagy during differentiation in the slime mold, Perichaena vernicularis. J Cell Biol. 55, 38a.

Clark, S. L., Jr., 1957. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. J Biophys Biochem Cytol. 3, 349-62.

Cole, S., Matter, A., Karnovsky, M. J., 1971. Autophagic vacuoles in experimental atrophy. Exp Mol Pathol. 14, 158-75.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Confer, D. B., Stenger, R. J., 1964. The Evolution Of Lysosomes In Hypoxic Liver Parenchyma As Seen With The Electron Microscope. Am J Pathol. 45, 533-46.

Cresti, M., Pacini, E., Sarfatti, G., 1972. Ultrastructural studies on the autophagic vacuoles in Eranthis hiemalis endosperm. J Submicr Cytol. 4, 33-44.

Cuervo, A. M., Dice, J. F., 1998. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. J Mol Med. 76, 6-12.

de Duve, C., Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In: T. Hayashi, (Ed.), Subcellular particles; a symposium held during the meeting of the Society of General Physiologists at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, June 9-11, 1958. New York, Ronald Press Co, 1959.

de Duve, C., 1963. The lysosome. Sci Am. 208, 64-72.

de Duve, C., 1964. From cytases to lysosomes. Fed Proc. 23, 1045-9.

de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem J. 60, 604-17.

de Duve, C., Wattiaux, R., 1966. Functions of lysosomes. Annu Rev Physiol. 28, 435-92.

Deter, R. L., 1971. Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuole, and acid phosphatase-bearing particle populations during the early phases of glucagon-induced autophagy in rat liver. J Cell Biol. 48, 473-89.

Deter, R. L., 1975. Analog modeling of glucagon-induced autophagy in rat liver. II. Evaluation of iron labeling as a means for identifying telolysosome, autophagosome and autolysosome populations. Exp Cell Res. 94, 127-39.

Deter, R. L., De Duve, C., 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. J Cell Biol. 33, 437-49.

Eagle, H., Piez, K. A., Fleischman, R., Oyama, V. I., 1959. Protein turnover in mammalian cell cultures. J Biol Chem. 234, 592-7.

Eisenstein, R., Battifora, H., Axelrod, E., 1966. Vitamin D-actinomycin D interactions in bone. An electron microscopic study of hypertrophy and hyperinvolution of osteoblasts. Lab Invest. 15, 1589-600.

Ekholm, R., Edlund, Y., Zelander, T., 1962. The ultrastructureof rat exocrine pancreas after brief ethionine exposure. J Ultrastruct Res. 7, 102-120.

Ericsson, J. L., 1965. Transport And Digestion Of Hemoglobin In The Proximal Tubule. II. Electron Microscopy. Lab Invest. 14, 16-39.

Ericsson, J. L., Mechanism of cellular autophagy. In: J. T. Dingle, H. B. Fell, Eds.), Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 2. North Holland, Amsterdam-London, 1969a, pp. 345-395.

Ericsson, J. L., 1969b. Studies on induced cellular autophagy. I. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. Exp Cell Res. 55, 95-106.

Ericsson, J. L., 1969c. Studies on induced cellular autophagy. II. Characterization of the membranes bordering autophagosomes in parenchymal liver cells. Exp Cell Res. 56, 393-405.

Ericsson, J. L., Holm, G., Biberfeld, P., 1969. Increased autophagocytosis in renal proximal tubules during experimental "autoimmune" nephrosis. Virchows Arch B Cell Pathol. 2, 74-84.

Ericsson, J. L., Trump, B. F., 1964. Electron Microscopic Studies Of The Epithelium Of The Proximal Tubule Of The Rat Kidney. I. The Intracellular Localization Of Acid Phosphatase. Lab Invest. 13, 1427-56.

Ericsson, J. L., Trump, B. F., Weibel, J., 1965. Electron Microscopic Studies Of The Proximal Tubule Of The Rat Kidney. II. Cytosegresomes And Cytosomes: Their Relationship To Each Other And To The Lysosome Concept. Lab Invest. 14, 1341-65.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Fedorko, M., 1967. Effect of chloroquine on morphology of cytoplasmic granules in maturing human leukocytes--an ultrastructural study. J Clin Invest. 46, 1932-42.

Fedorko, M. E., 1968. Effect of chloroquine on morphology of leukocytes and pancreatic exocrine cells from the rat. Lab Invest. 18, 27-37.

Fedorko, M. E., Hirsch, J. G., Cohn, Z. A., 1968. Autophagic vacuoles produced in vitro. I. Studies on cultured macrophages exposed to chloroquine. J Cell Biol. 38, 377-91.

Frank, A. L., Christensen, A. K., 1968. Localization of acid phosphatase in lipofuscin granules and possible autophagic vacuoles in interstitial cells of the guinea pig testis J Cell Biol. 36, 1-13.

Glinsmann, W. H., Ericsson, J. L., 1966. Observations on the subcellular organization of hepatic parenchymal cells. II. Evolution of reversible alterations induced by hypoxia. Lab Invest. 15, 762-77.

Goldberg, A. L., Dice, J. F., 1974. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Annu Rev Biochem. 43, 835-69.

Goldberg, A. L., St John, A. C., 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. Annu Rev Biochem. 45, 747-803.

Gordon, P. B., Kovacs, A. L., Seglen, P. O., 1987. Temperature dependence of protein degradation, autophagic sequestration and mitochondrial sugar uptake in rat hepatocytes. Biochim Biophys Acta. 929, 128-33.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., Yamamoto, A., 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. Nat Cell Biol. 11, 1433-7.

Helminen, H. J., Ericsson, J. L., 1968. Studies on mammary gland involution. II. Ultrastructural evidence for auto- and heterophagocytosis. J Ultrastruct Res. 25, 214-27.

Helminen, H. J., Ericsson, J. L., 1971a. Effects of enforced milk stasis on mammary gland epithelium, with special reference to changes in lysosomes and lysosomal enzymes. Exp Cell Res. 68, 411-27.

Helminen, H. J., Ericsson, J. L., 1971b. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Mechanism of autophagy in epithelial cells, with special reference to the rough-surfaced endoplasmic reticulum. J Ultrastruct Res. 36, 708-24.

Helminen, H. J., Ericsson, J. L., 1972. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Evidence for focal irreversible damage to epithelium, and heterophagic digestion in macrophages. J Ultrastruct Res. 39, 443-55.

Helminen, H. J., Ericsson, J. L., Orrenius, S., 1968. Studies on mammary gland involution. IV. Histochemical and biochemical observations on alterations in lysosomes and lysosomal enzymes. J Ultrastruct Res. 25, 240-52.

Hendee, W. R., Alders, M. A., 1968. Ultrastructural development of radiation injury in hepatic parenchymal cells of gamma-irradiated mice. Lab Invest. 18, 151-8.

Hendy, R., Grasso, P., 1972. Autophagy in acute liver damage produced in the rat by dimethylnitrosamine. Chem Biol Interact. 5, 401-13.

Hendy, R. J., Abraham, R., Grasso, P., 1969. The effect of chloroquine on rat heart lysosomes. J Ultrastruct Res. 29, 485-95.

Hirsimaki, P., Trump, B. F., Arstila, A. U., 1976. Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in the mouse liver.I. The relation of lysosomal changes to general injurious effects. Virchows Arch B Cell Pathol. 22, 89-109.

Hirsimäki, Y., Arstila, A. U., Trump, B. F., 1975. Autophagocytosis: in vitro induction by microtuble poisons. Exp Cell Res. 92, 11-4.

Holtzman, E., Novikoff, A. B., Villaverde, H., 1967. Lysosomes and GERL in normal and chromatolytic neurons of the rat ganglion nodosum. J Cell Biol. 33, 419-35.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Hruban, Z., Spargo, B., Swift, H., Wissler, R. W., Kleinfeld, R. G., 1963. Focal cytoplasmic degradation. Am J Pathol. 42, 657-83.

Hruban, Z., Swift, H., Slesers, A., 1965a. Effect Of Azaserine On The Fine Structure Of The Liver And Pancreatic Acinar Cells. Cancer Res. 25, 708-23.

Hruban, Z., Swift, H., Slesers, A., 1965b. Effect of triparanol and diethanolamine on the fine structure of hepatocytes and pancreatic acinar cells. Lab Invest. 14, 1652-72.

Hruban, Z., Swift, H., Wissler, R. W., 1962. Analog-induced inclusions in pancreatic acinar cells. J Ultrastruct Res. 7, 273-85.

Jamieson, J. D., Palade, G. E., 1964. Specific Granules In Atrial Muscle Cells. J Cell Biol. 23, 151-72.

Jimbow, K., Szabo, G., Fitzpatrick, T. B., 1974. Ultrastructural investigation of autophagocytosis of melanosomes and programmed death of melanocytes in White Leghorn feathers: a study of morphogenetic events leading to hypomelanosis. Dev Biol. 36, 8-23.

Keighley, G. L., Borsook, H., 1935. The continuing "metabolism" of nitrogen in animals. Proc Royal Soc London, Series B, Biol Sciences 118, 488-521.

Kent, G., Minick, O. T., Volini, F. I., Orfei, E., 1966. Autophagic vacuoles in human red cells. Am J Pathol. 48, 831-57.

Klionsky, D. J. (Ed.) 2004. Autophagy. Landes Bioscience, Georgetown, Eurekah. com, Austin, Texas, U.S.A.

Knowles, S. E., Ballard, F. J., 1976. Selective control of the degradation of normal and aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells. Biochem J. 156, 609-17.

Knowles, S. E., Gunn, J. M., Hanson, R. W., Ballard, F. J., 1975. Increased degradation rates of protein synthesized in hepatoma cells in the presence of amino acid analogues. Biochem J. 146, 595-600.

Kovács, A. L., Grinde, B., Seglen, P. O., 1981. Inhibition of autophagic vacuole formation and protein degradation by amino acids in isolated hepatocytes. Exp Cell Res. 133, 431-6.

Kovács, A. L., Pálfia, Z., Réz, G., Vellai, T., Kovács, J., 2007. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. Autophagy. 3, 655-62.

Kovács, A. L., Reith, A., Seglen, P. O., 1982. Accumulation of autophagosomes after inhibition of hepatocytic protein degradation by vinblastine, leupeptin or a lysosomotropic amine. Exp Cell Res. 137, 191-201.

Kovács, A. L., Réz, G., Pálfia, Z., Kovács, J., 2000. Autophagy in the epithelial cells of murine seminal vesicle in vitro. Formation of large sheets of nascent isolation membranes, sequestration of the nucleus and inhibition by wortmannin and 3-methyladenine. Cell Tissue Res. 302, 253-261.

Kovacs, J., 1968. Focal cytoplasmic degradation and lysosome formation in the epithelial cells of the seminal vesicle of the mouse. Acta Biol Acad Sci Hung. 19, 23-33.

Kovacs, J., 1972. Induced cellular autophagy in the epithelial cells of seminal vesicle of mice treated with actinomycin D. Acta Biol Acad Sci Hung. 23, 181-93.

Kovacs, J., Rez, G., 1972. Prevention of neutral red-induced krinom formation and autophagocytosis by cycloheximide in epithelial cells. Acta Biol Acad Sci Hung. 23, 407-8.

Kovács, J., Réz, G., Kiss, A., 1975. Vinblastine-induced autophagocytosis and its prevention by cycloheximide and emetine in mouse pancreatic acinar cells in vivo. Cytobiologie. 11, 309-313.

Lane, N. J., Novikoff, A. B., 1965. Effects of arginine deprivation, ultraviolet radiation, and x-radiation on cultured KB cells. A cytochemical and ultrastructural study. J Cell Biol. 27, 603-20.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Levy, M. R., Elliott, A. M., 1968. Biochemical and ultrastructural changes in Tetrahymena pyriformis during starvation. J Protozool. 15, 208-22.

Locke, M., Collins, J. V., 1965. The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. J Cell Biol. 26, 857-884.

Longnecker, D. S., Shinozuka, H., Farber, E., 1968. Molecular pathology of in-vivo inhibition of protein synthesis. Electron microscopy of rat pancreatic acinar cells in puromycin-induced necrosis. Am J Pathol. 52, 891-915.

Ma, M. H., Biempica, L., 1971. The normal human liver cell. Cytochemical and ultrastructural studies. Am J Pathol. 62, 353-90.

Malkoff, D. B., Buetow, D. E., 1964. Ultrastructural Changes During Carbon Starvation In Euglena Gracilis. Exp Cell Res. 35, 58-68.

Mandelstam, J., 1958. Turnover of protein in growing and non-growing populations of Escherichia coli. Biochem J. 69, 110-9.

Marty, F., 1971. Peroxysomes et compartiment lysosomal dans les cellules du meristeme radiculaire d'Euphorbia characias L. : une etude cytochemique. C R Acad Sci Paris. 273, 2504-7.

Marzella, L., Ahlberg, J., Glaumann, H., 1981. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 36, 219-34.

Marzella, L., Glaumann, H., Autophagy, Microautophagy and Crinophagy as mechanisms of protein degradation. In: H. Glaumann, F. J. Ballard, Eds.), Lysosomes: their role in protein breakdown. Academic Press, 1987, pp. 319-367.

Masurovsky, E. B., Bunge, M. B., Bunge, R. P., 1967. Cytological studies of organotypic cultures of rat dorsal root ganglia following X-irradiation in vitro. I. Changes in neurons and satellite cells. J Cell Biol. 32, 467-96.

Moe, H., Behnke, O., 1962. Cytoplasmic bodies containing mitochondria, ribosomes, and rough surfaced endoplasmic membranes in the epithelium of the small intestine of newborn rats. J Cell Biol. 13, 168-71.

Mortimore, G. E., Schworer, C. M., 1977. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. Nature. 270, 174-6.

Napolitano, L., 1963. Cytolysomes in metabolically active cells. J Cell Biol. 18, 478-81.

Neely, A. N., Nelson, P. B., Mortimore, G. E., 1974. Osmotic alterations of the lysosomal system during rat liver perfusion: reversible suppression by insulin and amino acids. Biochim Biophys Acta. 338, 458-72.

Nevalainen, T. J., Janigan, D. T., 1974. Degeneration of mouse pancreatic acinar cells during fasting. Virchows Arch B Cell Pathol. 15, 107-18.

Novikoff, A. B., 1959. The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. J Biophys Biochem Cytol. 6, 136-8.

Novikoff, A. B., Biochemical and staining reactions of cytoplasmic constituents. In: D. Rudnick, (Ed.), Developing cell systems and their control. Ronald Press Co., New York, 1960, pp. 167.

Novikoff, A. B., Essner, E., 1962. Cytolysomes and mitochondrial degeneration. J Cell Biol. 15, 140-6.

Ogawa, K., 1981. Lysosomal wrapping mechanism (LWM) during autophagy Acta Histochem Cytochem. 14, 362-65.

Oledzka-Slotwinska, H., Desmet, V., 1969. Participation of the cell membrane in the formation of "autophagic vacuoles". Virchows Arch B Cell Pathol. 2, 47-61.

Pfeifer, U., 1970. [Cellular autophagy: glycogen segregation in early stages of a partial liver atrophy]. Virchows Arch B Cell Pathol. 5, 242-53.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Pfeifer, U., 1971a. [Circadian rhythm of cellular autophagy]. Naturwissenschaften. 58, 152.

Pfeifer, U., 1971b. Probleme der zellulären Autofagie. Morphologische, enzymcytochemische und quantitative Untersuchungen an normalen und alterierten Leberepithelien der Ratte. Ergeb Anat Entwicklungsgesch. 44, 1-74.

Pfeifer, U., 1972a. Inverted diurnal rhythm of cellular autophagy in liver cells of rats fed a single daily meal. Virchows Arch B Cell Pathol. 10, 1-3.

Pfeifer, U., 1972b. [Lysosomal glycogen breakdown and hepatocellular glycogen metabolism. Cellular autophagy induced by intraperitoneal injection of hypertonic solution of glucose]. Virchows Arch B Cell Pathol. 10, 108-17.

Pfeifer, U., 1972c. Morphologische und funktionelle Aspekte der cellulären Autophagie. Acta Morphol Acad Sci Hung. 20, 247-67.

Pfeifer, U., 1973. Cellular autophagy and cell atrophy in the rat liver during long-term starvation. A quantitative morphological study with regard to diurnal variations. Virchows Arch B Cell Pathol. 12, 195-211.

Pfeifer, U., 1976. Lysosomen und Autophagie. Verh Dtsch Ges Pathol. 60, 28-64.

Pfeifer, U., Guder, W. G., 1975. Stimulation of cellular autophagy by parathyroid hormone and cyclic adenosine 3',5': monophosphate in isolated tubular fragments from the rat's kidney cortex. Virchows Arch B Cell Pathol. 19, 51-67.

Plattner, H., Henning, R., Brauser, B., 1975. Formation of triton WR 1339-filled rat liver lysosomes. II. Involvement of autophagy and of pre-existing lysosomes. Exp Cell Res. 94, 377-91.

Poole, B., Wibo, M., 1973. Protein degradation in cultured cells. The effect of fresh medium, fluoride, and iodoacetate on the digestion of cellular protein of rat fibroblasts. J Biol Chem. 248, 6221-6.

Rabinovitz, M., Fisher, J. M., 1964. Characteristics Of The Inhibition Of Hemoglobin Synthesis In Rabbit Reticulocytes By Threo-Alpha-Amino-Beta-Chlorobutyric Acid. Biochim Biophys Acta. 91, 313-22.

Rez, G., Kovacs, J., 1972. Electron microscopic examination of autophagy and cytoplasmic degradation induced by cadmium chloride and hyperosmotic sucrose in exocrine pancreatic cells of mice. Annales Univ Sci Budapest Sect Biol. 14, 219-36.

Rez, G., Kovacs, J., 1973. Prevention by cycloheximide of neutral red-induced formation of autophagic vacuoles and krinom granules in mouse pancreatic acinar cells. Virchows Arch B Cell Pathol. 12, 123-32.

Réz, G., Kovács, J., 1975. Neutral red-induced autophagocytosis in the exocrine pancreatic cells of the frog (Rana esculenta L.). Ann Univ Sci Budapest Sect Biol. 17, 147-54.

Réz, G., Meldolesi, J., 1980. Freeze-fracture of drug-induced autophagocytosis in the mouse exocrine pancreas. Lab Invest. 43, 269-77.

Rhodin, J., 1954. Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Tubule Cell of the Mouse Kidney. PhD thesis, Aktiebolaget Godvil, Stockholm. 1-76.

Rodriguez, T. G., 1967. Ultrastructural changes in the mouse exocrine pancreas induced by prolonged treatment with actinomycin D. J Ultrastruct Res. 19, 116-29.

Rosa, F., 1971. Ultrastructural changes produced by glucagon, cyclic 3'5'-AMP and epinephrine on perfused rat livers. J Ultrastruct Res. 34, 205-13.

Rumpelt, H. J., Albring, M., Thoenes, W., 1974. Prevention of D-galactosamine-induced hepatocellular autophagocytosis by cycloheximide. Virchows Arch B Cell Pathol. 16, 195-203.

Sapra, G. R., Kloetzel, J. A., 1975. Programmed autophagocytosis accompanying conjugation in the ciliate Stylonychia mytilus. Dev Biol. 42, 84-94.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Sass, M., Kovacs, J., 1975. Ecdysterone and an analogue of juvenile hormone on the autophagy in the cells of fat body of mamestra brassicae. Acta Biol Acad Sci Hung. 26, 189-96.

Sass, M., Kovacs, J., 1977. The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of Mamestra brassicae. Cell Tissue Res. 180, 403-9.

Scharnbeck, H., Schaffner, F., Keppler, D., Decker, K., 1972. Ultrastructural studies on the effect of choline orotate on galactosamine induced hepatic injury in rats. Exp Mol Pathol. 16, 33-46.

Scheib, D., 1965. [Fine Structure Of The Muellerian Duct In The Chick Embryo: Cytoplasmic Lesions Of The Male Duct In Regression.]. Compt Rend Acad Bulgare Sci. 260, 1252-4.

Schiaffino, S., Hanzlikova, V., 1972. Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. J Ultrastruct Res. 39, 1-14.

Schimke, R. T., Regulation of protein degradation in mammalian tissues. In: H. N. Munro, (Ed.), Mammalian protein metablism, Vol. 4. AP, New York, 1970, pp. 177-228.

Schimke, R. T., Bradley, M. O., Properties of protein turnover in animal cells and a possible role of turnover in "quality" control of proteins. In: E. Reich, D. B. Rifkin, E. Shaw, Eds.), Proteases and biological control. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1975, pp. 515-30.

Schoenheimer, R., 1942. The dynamic state of body constituents. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Schworer, C. M., Mortimore, G. E., 1979. Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 76, 3169-73.

Seglen, P. O., 1975. Protein degradation in isolated rat hepatocytes is inhibited by ammonia. Biochem Biophys Res Commun. 66, 44-52.

Seglen, P. O., Regulation of autophagic protein degradation in isolated liver cells. In: H. Glaumann, F. J. Ballard, Eds.), Lysosomes: their role in protein breakdown. Academic Press, 1987, pp. 371-414.

Seglen, P. O., Reith, A., 1976. Ammonia inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes. Quantitative ultrastructural alterations in the lysosomal system. Exp Cell Res. 100, 276-80.

Siekevitz, P., 1972. The turnover of proteins and the usage of information. J Theor Biol. 37, 321-34.

Simpson, M. V., 1953. The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. J Biol Chem. 201, 143-54.

Sobel, H. J., 1964. Electron Microscopy Of I-131-Irradiated Thyroid. Arch Pathol. 78, 53-60.

Swift, H., Hruban, Z., 1964. Focal Degradation As A Biological Process. Fed Proc. 23, 1026-37.

Terry, R. D., Wisniewski, H. M., Johnson, A. B., 1970. Study on the formation of autophagic vacuoles in neurons treated with spindle inhibitors (colchicin and vinblastine). J Neuropath Exp Neurol. 29, 142-3.

Thornton, R. M., 1968. The fine structure of Phycomyces. 1. Autophagic vesicles. J Ultrastruct Res. 21, 269-80.

Tooze, J., Davies, H. G., 1965. Cytolysomes In Amphibian Erythrocytes. J Cell Biol. 24, 146-50.

Toro, I., Viragh, S., 1966. The fine structure of the liver cells in the bat (Myotis myotis) during hibernation, arousal and forced feeding. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 69, 403-17.

Trump, B. F., Bulger, R. E., 1968. Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. IV. Electron microscopic observations of changes during the phase of altered homeostasis in tubules treated with cyanide. Lab Invest. 18, 731-9.

Vance, J. E., Vance, D. E., 2004. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. Biochem Cell Biol. 82, 113-28.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Woodside, K. H., Mortimore, G. E., 1972. Suppression of protein turnover by amino acids in the perfused rat liver. J Biol Chem. 247**,** 6474-81.

Woodside, K. H., Ward, W. F., Mortimore, G. E., 1974. Effects of Glucagon on General Protein Degradation and Synthesis in Perfused Rat Liver. J. Biol. Chem. 249**,** 5458-5463.

Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., Ohsumi, Y., 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. J Cell Biol. 198**,** 219-33.

Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., Eskelinen, E. L., 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. Autophagy. 5**,** 1180-5.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

II. fejezet - Az ubiquitin-proteaszóma rendszer

1. Bevezetés

Mint a könyv bevezetőjében már írtuk, a fehérjék sejten belüli mennyiségét nemcsak a felépítés (szintézis), hanem a lebontás (degradáció) üteme is meghatározza. A fehérjebontás több szempontból is fontos folyamat, hiszen a belső állandóságot fenn kell tartani, miközben a sejt szerkezetei folyamatosan átépülnek. Különösen így van ez az egyedfejlődés során illetve a külső hatásokra adott válasz esetén. A fehérjék fél-életideje a sejtben széles határok között változik, néhány perctől néhány napig, így a fehérjebontás eltérő üteme a sejten belüli szabályozás fontos részét képezi.

A sejtet felépítő, ún. struktúrfehérjék egy idő után „elöregszenek", szükségessé válik a lebontásuk, kicserélésük. A mutáció következtében, vagy hő, illetve oxidatív stressz hatására rosszul felgombolyodott, hibás térszerkezetű fehérjéket el kell tüntetni, mert könnyen összetapadhatnak, aggregálódhatnak. Ezek mellett a mindennapos „háztartási" feladatok mellett, a fehérje degradáció lehetőséget biztosít sok szabályozó fehérje (többek között ilyenek a ciklinek, a transzkripciós faktorok, és a jelátvivő folyamatok tagjai) hatásának a megadott időben történő megszüntetésére. Ezen túl az immunrendszer is az idegen antigének lebontásából származó immunokompetens peptidek jelenlétére támaszkodik.

Eukarióta sejtekben sejtszervecskékhez kötötten, a *lizoszómákban* folyik fehérjebontás. Emellett egy citoszólikus proteolitikus rendszer, az *ubiquitin-proteaszóma rendszer* is szükséges a normális működéshez. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer erősen konzervált a különböző fajokban, azaz egymástól rendszertanilag távol eső fajokban is majdnem azonos fehérjékből és enzimekből áll.

Az utóbbi néhány évben jelentős ismeretanyag halmozódott fel az *ubiquitin-proteaszóma rendszernek* az alapvető biológiai folyamatokban betöltött szerepéről. A sejtciklus szabályozó fehérjék, mint például a ciklinek, a ciklin-dependens kinázok inhibitorai (gátlói) és az anafázis inhibítor fehérjék, szelektív és programozott lebontása e rendszer által nélkülözhetetlen lépések a sejtciklus előrevitelében. Szintén a sejt növekedését és szaporodását szabályozza a tumor szupresszorok, proto-onkogének és a jelátviteli rendszerek tagjainak ubiquitin közvetített degradációja. Számtalan a gének átírását (transzkripciót) szabályozó molekula gyors lebontása része egy sereg jelátviteli folyamatnak és környezeti hatásokra adott válasznak. Az ubiquitin rendszer bizonyítottan részt vesz az endocitózisban, a receptorok és szállító molekulák számának csökkentésében, ugyanúgy, mint az endoplazmatikus retikulum állandó vagy rendellenes fehérjéinek lebontásában. Vannak már bizonyítékok az ubiquitin rendszernek az egyedfejlődésben (ontogenezisben) és a programozott sejthalálban (apoptózisban) betöltött szerepére is, bár az érintett célfehérjéket még nem azonosították ezekben az esetekben. Sok ubiquitin-közvetített folyamatban előforduló működési hiba betegséget okoz, akár még a rosszindulatú daganatos elváltozást (malignus transzformációt) is beleértve.

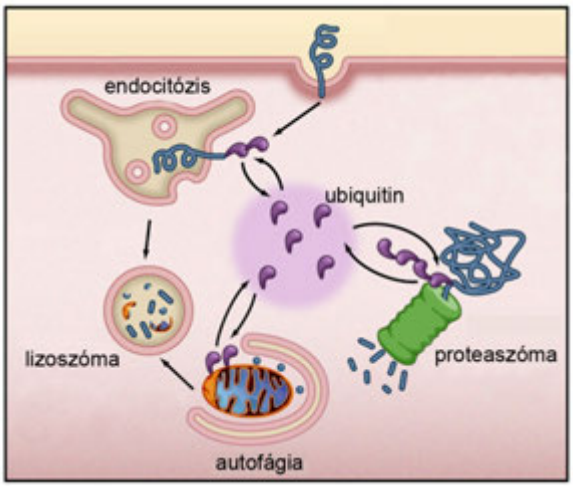
Tekintsük át először a lebontandó fehérjét megjelölő ubiquitinről és az ubiquitin kötődéséről szóló ismereteket (2. fejezet), majd pillantsunk be a proteaszóma szerkezetének és működésének rejtelmeibe (3. fejezet)!

2. Az ubiquitin szerkezete, feladatai, és az ubiquitiniláció enzimrendszere

Az ubiquitin a fehérjebontási útvonalak általános jelzőmolekulája

A szubsztrátok célba juttatásában emlős sejtekben az ubiquitin a közös nevező a proteaszóma, az endoszóma-lizoszóma, és az autofagoszóma által történő fehérjebontás, azaz a három fő protein degradációs útvonal esetén (2.1. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



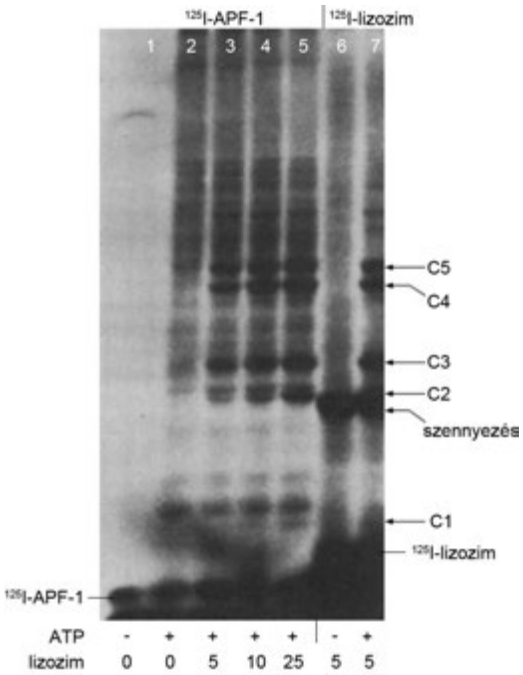
2.1. ábra Az ubiquitin a közös nevező a proteaszóma, az endoszóma-lizoszóma, és az autofagoszóma által történő fehérjebontás, azaz a három fő protein degradációs útvonal esetén

Mindegyik egyedi lebontó útvonalra irányító jel egy jellegzetes hosszúságú és kapcsolódású ubiquitin lánc, mely specifikusan kötődik az adott útvonal receptorához vagy különös érzékenységet mutat az útvonalhoz kapcsolódó deubiquitináz aktivitásra. Mindegyik útvonalnak megvan a maga specifikus receptora (Clague és Urbe, 2010). Ahhoz, hogy egy fehérje letekeredjen és bejusson a proteaszóma belső, fehérjebontó részébe a szabályozó rész Rpn10 és Rpn13 alegységeinek kell felismerniük a rajta lévő ubiquitin láncot (Finley, 2009). Az escort komplexek (ESCRT - endosomal sorting complexes required for transport) segítségével speciális ubiquitiniláció irányítja a kívülről felvett fehérjéket a lizoszomális lebontás felé (Clague és Urbe, 2006). Fontos szerepet játszik az ubiquitin a szelektív autofágiában is (Kirkin és mtsai., 2009). A lebontandó sejtszervecske vagy fehérje előbb ubiquitinilálódik majd a p62/sequestosome 1 vagy az NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1) adapter fehérje hozzáköti a formálódó pre-autofagoszomális membránhoz. Ezek az adapter fehérjék egyaránt rendelkeznek ubiquitin felismerő UBA doménnel (ubiquitin-interacting domain) és a membrán jellegzetes fehérjéjéhez kapcsolódó LIR motívummal (LC3-interacting region) (Pankiv és mtsai., 2007).

Az ubiquitin közvetítette fehérjebontás felfedezése

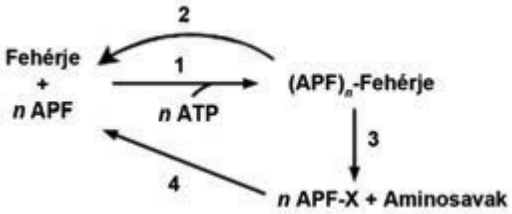
A bevezetőben leírtuk, hogy a múlt század közepére a kutatók rájöttek, hogy a sejtekben a fehérjék dinamikus egyensúlyban vannak, azaz az éppen működő készlet az állandó felépítő és lebontó folyamatok eredője. Azt is felfedezték, hogy a sejten belüli fehérjebontás energia igényes, annak ellenére, hogy a peptidkötés felnyílása exoterm folyamat (Simpson, 1953). Ennek a kérdésnek a tisztázására törekedett Etlinger és Goldberg az 1970-es években. Kidolgoztak egy erre a célra nagyon alkalmas, egyszerű kísérleti rendszert: nyúlból retikulocitákat izoláltak és ezekből ozmotikus sokkal sejtmentes rendszert állítottak elő. A retikulociták a fejlődő vörösvértestek előalakjai, melyekben még megtalálhatók a citoplazmatikus enzimek, de már hiányzik a sejtmagjuk és kevés sejtszervecske van bennük. Ezen a rendszeren azt tapasztalták, hogy az ATP serkenti a fehérjebontást (Etlinger és Goldberg, 1977). Hershko és Ciechanover néhány évvel később ugyanezt a rendszert használta kísérleteihez. A retikulocita-lizátumot DEAE cellulóz oszlopon két frakcióra választották szét: az egyikben egy hőstabil polipeptid, az általuk APF-1-nek (ATP-dependent proteolysis factor 1) nevezett fehérje volt, a másikban a specifikus fehérjebontáshoz szükséges enzimek (Ciechanover és mtsai., 1978). További munkájuk során azt találták, hogy az APF-1 ATP-t igénylő reakcióban kovalensen (izopeptid kötéssel) kötődik a fehérjékhez, egy vagy akár több példányban is (Ciechanover és mtsai., 1980). Radioaktívan jelölt (^{125}I) fehérjét (lizozimet) használva a gélelektroforetikus képen több sávot lehetett megfigyelni, melyek egy vagy emelkedő számú a fehérjéhez kötött APF-1 molekulát tartalmaztak (2.2. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.2. ábra Kovalens kötés képződése az APF-1 és a lizozim között ATP-függő reakcióban. Az 1-5 sávban az APF-1, a 6-7-es sávban a lizozim volt radiokatívan jelölve. C1-C5 - 1-5 APF-1-et hordozó lizozim fehérje csíkok. Az 1-es és a 6-os sávban hiányzott az ATP a reakcióelegyből, itt nem láthatók a csíkok, azaz nem kötődött az APF-1 a lizozimhoz.

A reakció megfordíthatónak bizonyult, vagyis az APF-1 visszanyerhető volt a konjugátumokból (Hershko és mtsai., 1980). A kutatók már a rendszert összekapcsoló reakciókat is megjósolták (2.3. ábra).



2.3. ábra Az ATP-függő fehérjebontás 1980-ban feltételezett lépései: 1, APF-1-protein amid szintetáz (lizin - NH_2 csoporton hat). 2, Amidáz, mely javítást tesz lehetővé, ha n 1 vagy 2. 3, Peptidázok, melyek az (APF-1)n származékokat bontják, ha n 1 vagy 2. 4, Amidáz az APF-1-X bontására; X lizin vagy kis peptid.

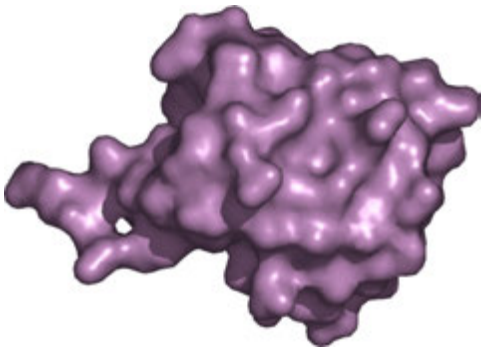
Később kiderült, hogy az APF-1 azonos a már korábban leírt ubiquitinnel (Wilkinson és mtsai., 1980). Az ubiquitin közvetítette fehérjebontás felfedezéséért Aaron Ciechanover, Avram Hershko és Irwin Rose 2004-ben megosztott kémiai Nobel-díjban részesült.

Az ubiquitin szerkezete

- 76 aminosav, 8,6 kDa
- Minden eukarióta sejtben előfordul
- Globuláris, kompakt, ellenálló szerkezet
- C-terminális: -Leu-Arg-Gly-Gly
- 7 Lys-ből 2 alkalmas izopeptid kötés létesítésére

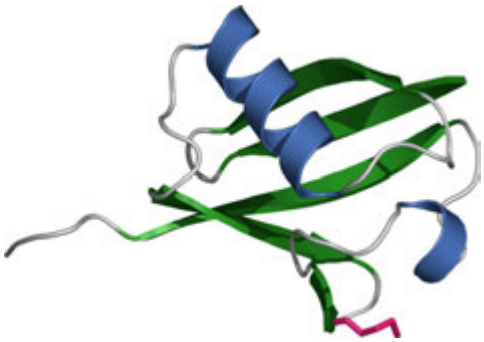
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az ubiquitin (ejtsd: ubikvitin) egy 76 aminosavból álló, pontosan 8565 Da molekulatömegű, kis fehérje, mely nagy mennyiségben van jelen az eukarióta sejtekben (ubique (lat.) = mindenütt). Az ubiquitin tömör, gombolyag alakú (globuláris) térszerkezetének (2.4. ábra) három, eltérő kémiai sajátságú oldala van: egy bázikus, egy savas és egy hidrofób.



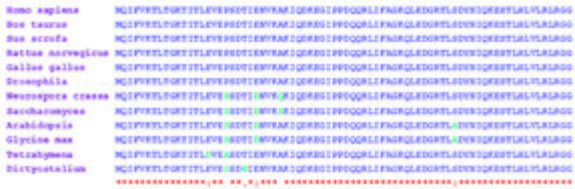
2.4. ábra Az ubiquitin fehérje térkitöltő modellje

A globuláris molekulán belüli kiterjedt hidrogén-híd rendszer (két α-hélix és öt β-réteg terület) merev szerkezetet ad, ami jól magyarázza az ubiquitin jelentős hőstabilitását és széles pH tűrését. A globuláris magból kilóg a molekula karboxi-terminális vége, ezen keresztül tud más fehérjékhez kapcsolódni (2.5. ábra).



2.5. ábra Az ubiquitin másodlagos szerkezetét mutató modell. A molekulában kialakuló α-hélixek kékek, a β-rétegek zöldek. A 48-as lizin oldallánc rózsaszín, ez a következő ubiquitin molekula normális kapcsolódási helye a poliubiquitin lánc képzéséhez.

Az ubiquitin rendkívül konzervatív fehérje, az evolúció során aminosav sorrendje alig változott: az élesztő és az ember ubiquitinje mindössze 3 helyen tér el egymástól. Mindez azt mutatja, hogy a rendszer már a korai evolúció során kialakult és majdnem változatlanul fennmaradt (2.6. ábra).



2.6. ábra Különböző fajok ubiquitin aminosav sorrendjének egybevetése (a türkizkék jelölésű aminosavak az eltérőek)

Ubiquitin gének

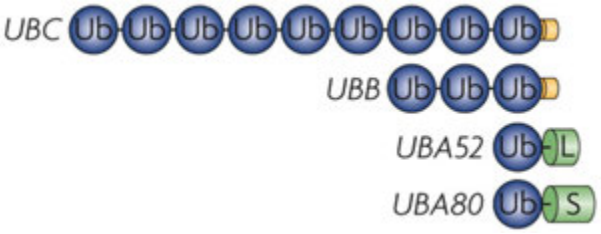
- I., II. osztály (normális körülmények között aktív): Ub-riboszómális fehérje
- III. osztály (stressz körülmények között aktív): polyubiquitin

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

- A keletkező fúziós fehérjéket izopeptidázok darabolják fel

Az ubiquitint kódoló géncsalád igen sokféle tagból áll és mindegyik gén ubiquitin elő-fehérjeként, prekurzor proteinként íródik át. (Géncsaládnak nevezzük az egyszeres génkészletben [monoploid genomban] kétszer vagy többször előforduló, azonos, vagy nagyon hasonló bázissorrendű, egyetlen ősi gén megkettőződésével létrejött géneket.) Az ubiquitin géneknek majdnem minden eukariótában három osztálya fordul elő. Az I. és II. osztályba tartozó gének riboszomális fehérjékkel fuzionált poli-proteineket kódolnak (élesztőben: az UBI1 és az UBI2 a nagy (60S), az UBI3 a kis alegységhez (40S) kapcsolódó gének). Normális körülmények között ezek működnek, azaz ilyenkor a fehérje szintézis és lebontás segédfehérjéi egyszerre keletkeznek. A III. osztályba a poliubiquitin gének tartoznak, melyekben több, azonos állású ubiquitint kódoló szakasz kapcsolódik lineárisan (élesztőben: UBI4, 5 Ub + 1 aa). Ez utóbbiak stressz körülmények között aktiválódnak, vagyis ilyenkor csak a hibás vagy felesleges fehérjék lebontását elősegítő ubiquitin szintetizálódik, méghozzá emelt mennyiségben.

Ubiquitint emberben négy gén kódolja (UBC, UBB, UBA52 and UBA80) és itt is vagy az többszörösen egymásután kapcsolt ubiquitin egységekből álló lineáris fúziós fehérjeként vagy egy-egy riboszomális fehérje (40S riboszomális fehérje L40 (L) vagy 60S riboszomális fehérje S27a (S)) N-terminálisához kapcsolva fordítódik át. A poliubiquitin gének egy vagy több aminosav hosszúságú toldalékot is kódolnak a C-terminálison (2.7. ábra).



2.7. ábra Az ubiquitin gének által kódolt fúziós fehérjék

Transzláció után a prekurzor molekulákból, a fúziós fehérjékből az ubiquitint a deubiquitiniláló enzimek (**DUB**) közé tartozó ubiquitin C-terminális hidrolázok (UCH) hasítják le. Ez a folyamat a célfehérjére kötődés előkészítő aktiváló lépéseként is értelmezhető.

Az ubiquitin feladatai

Minden faj ubiquitinjének C-terminális aminosava glicin (2.6. ábra). Ennek karboxil csoportja tud kovalens kötést létesíteni a módosítandó fehérje egyik alkalmas lizin oldalláncának ε-amino csoportjával. A folyamatot, mely megfordítható, *ubiquitiniláció*nak nevezzük a foszforiláció mintájára. Az ubiquitin többféleképpen is kapcsolódhat a megjelölendő fehérjére.

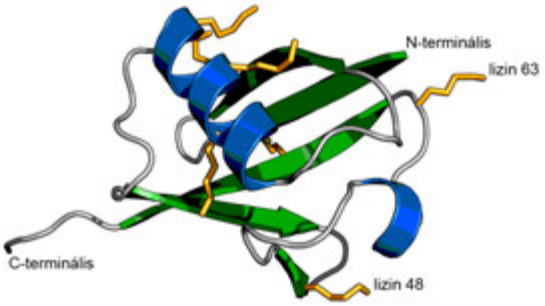
Monoubiquitiniláció

Monoubiquitiniláció esetén csak egy ubiquitin molekula kapcsolódik a célfehérjéhez (… ábra). Ez megváltoztathatja a fehérje aktivitását, sejten belüli helyét vagy kölcsönhatását más fehérjékkel. Számos példa bizonyítja, hogy stabil, monoubiquitinilált fehérjék vannak az élő sejtekben. A magasabbrendű eukarióták sejtmagjában a nukleoszómális hisztonok (H2A, H2B) nagy része monoubiquitinilált formában látja el feladatát (uH2A, uH2B), itt kötődik a sejten belüli ubiquitin 10%-a. A hiszton ubiquitiniláció kapcsolatban van a gén kifejeződés szabályozásával. Az ubiquitin riboszomális fehérjékhez kötődése (ld. ubiquitin gének I. és II. osztálya) elősegíti a riboszómák összeszerelődését, valószínűleg a szubsztrát fehérjék átmeneti stabilizálása által. Ubiquitin kötődik egyes sejtfelszíni receptorokhoz is (pl. limfocita homing receptor), ami azt mutatja, hogy az ubiquitin a receptor molekulák módosítása által részt vesz a sejtfelszíni folyamatokban (sejt-sejt kölcsönhatás, összetapadás). Az endocitózissal felvett integráns membránfehérjék citoplazmatikus vége mindig monoubiquitinilált. Ecetmuslicában ubiquitin kötődhet az aktinhoz. A repülőizomzat vékony filamentumaiban a monoubiquitiniláció periodikus, minden hetedik aktin molekulához kapcsolódik egy ubiquitin. Ezt a stabil, 55 kDa-os aktin-ubiquitin konjugátumot arthrinnak hívják (arthrin – arthropoda actin). A periodikusság az ubiquitin strukturális és/vagy izomműködést befolyásoló szerepére utal.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

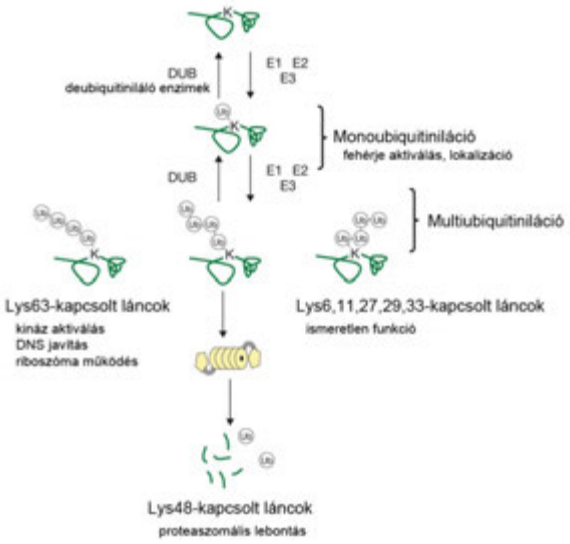
Multiubiquitiniláció

Az ubiquitin molekulában is van hét lizin (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63, 2.6. ábra), melyek közül kettő izopeptid kötés létesítéséhez megfelelő helyzetben van (Lys48, Lys63, 2.8. ábra).



2.8. ábra Az ubiquitin másodlagos szerkezetét mutató modellje. Az α-hélixek kék színűek, a β-rétegek zöldek. A molekulában levő 7 lizin oldalláncai narancssárga pálcikákként vannak feltüntetve. A multiubiquitin láncképzésben részt vevő két leginkább ismert kapcsolódási pont (48-as és 63-as lizinek) külön is meg vannak jelölve.

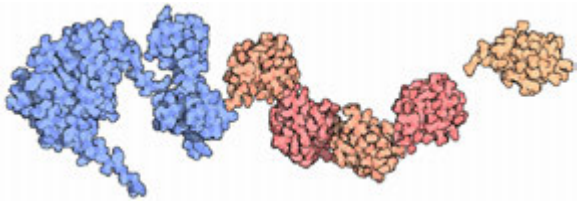
Így egy, már a célfehérjére kapcsolódott ubiquitin maga is ubiquitinilálódhat, ez a *multiubiquitiniláció* jelensége (Kirkpatrick és mtsai., 2005). Ilyenkor minden újabb ubiquitin egység C-terminálisa az előző ubiquitin egy specifikus lizin oldalláncához kapcsolódik. Az ubiquitin egyik fő feladata a hibás, sérült, rosszul hajtogatódott fehérjék lebontásra kijelölése. Emellett a szabályozó fehérjék gyors és specifikus lebontásában és a feleslegessé vált, nagy mennyiségű citoplazmatikus fehérjék megjelölésében is részt vesz. A 48-as helyzetű lizinen (Lys-48, K48) keresztül felépülő multiubiquitiniláció szolgál jelként a fehérje proteolitikus útra lépéséhez. Egy másik lizin (Lys-63, K63) is lehet receptora a multiubiquitinilációs folyamatnak, így más, szokatlan, elágazó, Y-alakú multiubiquitinilált fehérjeformák is keletkezhetnek. Ezek könnyen felismerhetők más molekulák számára és nem a lebontást szolgálják (2.9. ábra).



2.9. ábra Az ubiquitiniláció formái

Bár az ubiquitin egy kis fehérje (76 aminosav, 8,6 kDa), ha lebontási jelként akár 4-20 példányban is egy fehérjéhez kötődik, a jel már nagyobb lesz, mint maga a szubsztrát (2.10. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



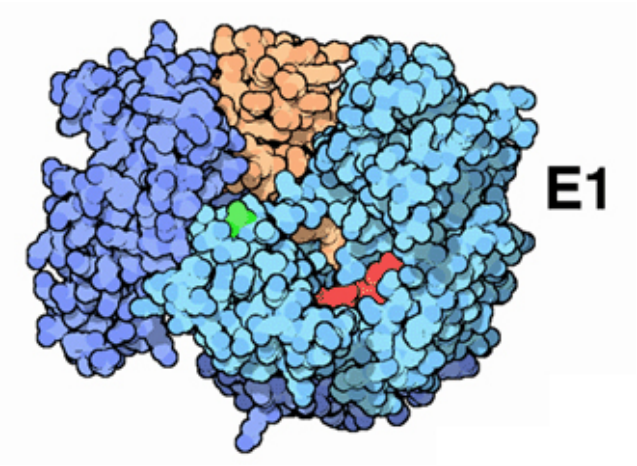
2.10. ábra Az SCR fehérjéhez (kék) kötött négytagú ubiquitin lánc (váltakozva halvány és élénk rózsaszín) és egy kapcsolódás előtt álló ötödik egység (halvány rózsaszín) (vö.: 2.4. ábra)

Az ubiquitiniláció enzimrendszere

Tekintsük át részleteiben az ubiquitin konjugáló enzimkaszkád három enzimjét:

E1 – ubiquitin aktiváló enzim

Az ubiquitin aktiváló enzimből (UBA – ubiquitin activating enzyme) fajonként csak egy típus található a sejtekben. Viszonylag nagy fehérje: hozzávetőlegesen 1.000 aminosavból áll és 115-125 kDa a molekulatömege. Jellegzetessége az ubiquitin kötő zsebben található aktív cisztein, melyhez az ubiquitin molekula C-terminális glicinje tud ideiglenesen kötődni (2.11. ábra).



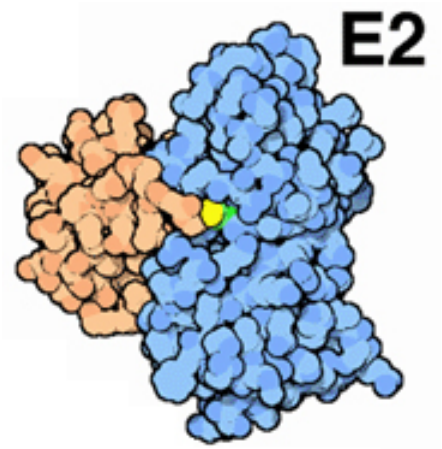
2.11. ábra Egy ubiquitin aktiváló enzim (E1) térkitöltő modellje. ATP (piros) energiáját felhasználva az ubiquitin (világos naranscsárga) C-terminálisán az enzim aktív ciszteinjére (zöld) kerül

A sejtmagban is megtalálható ez az enzim, tehát valójában sejtenként kétféle molekula fordul elő. Az egyiken van sejtmagi lokalizációs jel (NLS – nuclear localisation signal), a másikon nincs. Élesztőben UBA1-nek hívják az E1-es enzimet.

E2 – ubiquitin konjugáló enzim

Az ubiquitin konjugáló enzimet más néven ubiquitin szállító fehérjének (UBC - ubiquitin carrier protein) hívják, hiszen ez fogja a már aktivált ubiquitin molekulát a célfehérjéhez szállítani. Egyes esetekben az E2-ről közvetlenül kerülhet az ubiquitin a szubsztrátra. Az E2 enzimek jellemzője az UBC domén, mely egy 150 aminosavból álló, 16-18 kDa molekulatömegű egység, ebben található az aktív cisztein oldallánc (2.12. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



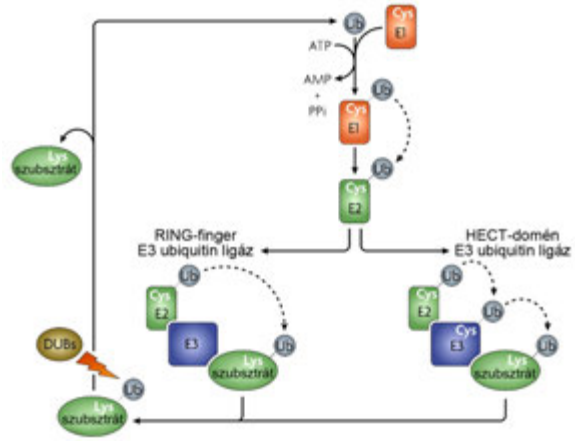
2.12. ábra Egy ubiquitin konjugáló enzim (E2) térkitöltő modellje. Az ubiquitin aktiváló enzimről az ubiquitin (világos narancssárga) C-terminális vége átmenetileg az ubiquitin konjugáló enzim aktív ciszteinjéhez (sárga) kapcsolódik.

Méretük és felépítésük alapján négy osztályba sorolhatók: Az I. osztályba a csak egy UBC domént tartalmazó enzimek tartoznak (ilyen az élesztő UBC4 és UBC5 E2-es enzime). A II. osztályba kerülőknél a C-terminálison, a III. osztályba soroltaknál az N-terminálison van a fehérje meghosszabbítva. Végül a IV. osztályba tartozóknál az UBC domén mindkét végén ki van egészítve a fehérje.

E3 – ubiquitin ligáz

Az ubiquitin ligázok általában nagyon nagy molekulák. Lehetnek egyetlen polipeptid láncból felépülők, de több alegységből álló összetett rendszerek is. Két altípusuk fordul elő:

1. a RING-finger (RING = really interesting new gene) típus – nem képez tioészter kötést az ubiquitinnel. Feladata, hogy ideiglenesen megköti a célfehérjét és az aktivált ubiquitin molekulát hordozó ubiquitin konjugáló enzimet (E2), alkalmas közelségbe hozza őket és elősegíti az ubiquitin átkerülését a célfehérjére (2.13. ábra, bal oldala).



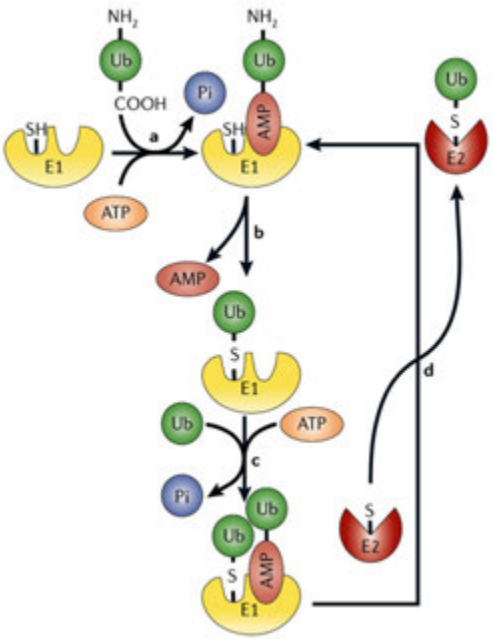
2.13. ábra Az ubiquitin ligáz (E3 enzim) két típusa

2. a HECT-domén (HECT = homologous to E6-AP C-terminus) típus – tioészter kötést alakít ki az ubiquitinnel. Ebben az esetben az ubiquitin először a megfelelő E2 enzimről az ubiquitin ligáz aktív cisztein oldalláncára kerül. Ez az E3-ubiquitin tioészter a donor a célfehérjével történő amid kötés kialakításánál (2.13. ábra, jobb oldal).

Az ubiquitin aktiválás és a multiubiquitiniláció lépései

Nézzük most meg részletesebben, hogyan is kötődik az ubiquitin a lebontásra kerülő fehérjére! Az ubiquitin konjugáció többlépcsős folyamat, melyhez fenti három enzim egymást követő működése szükséges (2.14. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

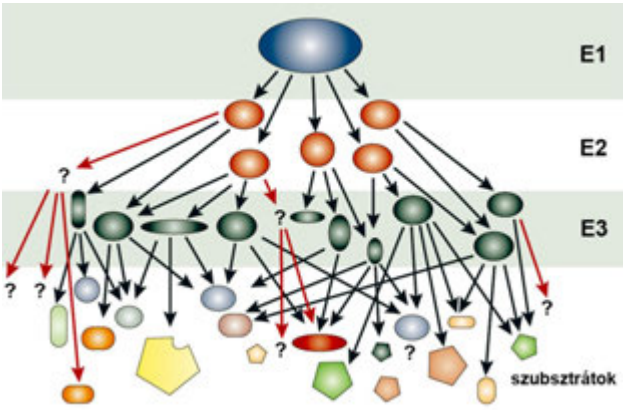


2.14. ábra Az ubiquitin aktiválásának lépései: a) adenilálás, b) AMP → Cys-E1, c) adenilálás, d) Cys-E1 → Cys-E2

A kezdő, aktiválási lépésben ATP felhasználásával tioészter kötés alakul ki az ubiquitin C-terminális glicinjének karboxil csoportja és az ubiquitin aktiváló enzim (E1) láncközi ciszteinjének szulfhidrilcsoportja között (2.14. ábra, a). Ebben a lépésben először ubiquitin-adenilát köztestermék alakul ki PP_i felszabadulásával, majd az ubiquitin az E1 cisztein oldalláncára kötődik és AMP szabadul fel. Az aktivált ubiquitin ezután egy ubiquitin-konjugáló enzim (E2, ubiquitin hordozó fehérje vagy ubiquitin carrier protein) specifikus ciszteinjére kerül át (2.14. ábra, d) (Nalepa és mtsai., 2006).

A végső, konjugáló lépésben az ubiquitin az E2-ről a célfehérjére kerül; az ubiquitin C-terminálisán át amid/izopeptid kötést formál a célfehérje egy lizin oldalláncának ε-amino csoportjával (2.13. ábra). A legtöbb esetben a szubsztrátok felismeréséhez egy harmadik faktorra is szükség van. Ezek az E3 fehérjék vagy ubiquitin ligázok az E2 enzimmel és a szubsztráttal egyaránt kapcsolatba lépnek, és így segítik az ubiquitin-protein konjugációt.

Míg az E1 enzimből minden sejtben fajonként csak egyféle molekula van (bár két változat: sejtmagi és citoplazmatikus), E2 enzimből többféle létezik (fajonként 10-30), E3-ból illetve E3 multiprotein komplexből pedig több enzimcsalád (fajonként több száz E3-as enzim). A megfelelő E3 enzimek ismerik fel a lebontandó több ezerféle célfehérjét, így ezek felelősek az ubiquitin-célfehérje kapcsolódás, és ennek következtében a fehérjebontás specifikusságáért (2.15. ábra).



2.15. ábra Az ubiquitin konjugáló enzimkaszkád piramis-szerű felépítése

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az ubiquitin ligázok és a szubsztrát felismerés

N-vég szabály

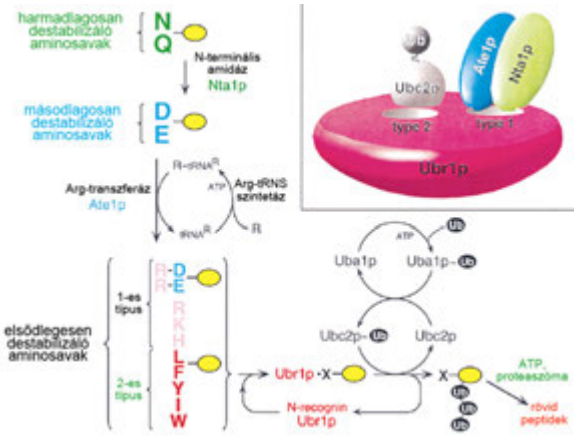
Lássuk most, hogy hogyan ismeri fel egy E3-as enzim a célfehérjét! Általában a célfehérjének illetve egy részletének térszerkezete alapján jön létre a kapcsolódás. Lehetséges, hogy éppen hibás térszerkezete (pl. a felszínen megjelenő hidrofób aminosav oldalláncok) miatt lepleződik le egy fehérje és kötődik egy E3-as enzimhez. Nem biztos, hogy a teljes fehérjét meg kell vizsgálni ahhoz, hogy kiderüljön megváltozott, módosult a szintézise óta. Minden eukarióta fehérje start kodonja metionint kódol, tehát egy frissen elkészült polipeptidlánc N-terminálisán mindig metionin aminosav van. Ha a fehérje módosul, sérül, enzimatikus hasítást szenved, akkor valószínűleg más aminosav lesz az amino-terminálisán. Az E3-as enzimek egy csoportja pontosan ezt ellenőrzi. Alexander Varshavsky fedezte fel, hogy egy citoszólikus fehérje fél-életidejét nagymértékben az amino-terminális csoportja határozza meg (Varshavsky, 1996).

A fehérjék azon tulajdonságait, melyek metabolikus instabilitásukat okozzák lebontási jeleknek vagy *degron*oknak nevezzük. Az egyik alapvető összetevője egy fehérje lebontási jelnek a destabilizáló N-terminális aminosav. Ezt a jelet *N-degron*nak hívjuk. Az N-degronok egy fajban kialakuló rendszere, mely különböző destabilizáló aminosavakból áll, az *N-vég szabály*. Ez a szabály, mely megmutatja egy fehérje fél-életideje és az N-terminális aminosava közti összefüggést, minden eddig vizsgált szervezetben megtalálható *E. coli* baktériumtól, az élesztőn (*S. cerevisiae*) át, az emlős sejtekig.

Ha metionin áll az amino-terminálison a fehérjének jellegzetesen hosszú, több mint 20 órás a fél-életideje, míg ha arginin, akkor csak kb. 2 perces. Az erősen destabilizáló amino-terminális csoportok, mint pl. az arginin és aszparaginsav gyors ubiquitinilációt okoznak, míg a stabilizáló csoportok, mint pl. a metionin és a szerin nem. Érdekes, hogy a stabilizáló, illetve destabilizáló amino-terminális csoportok hasonlóak az élesztőben és az emberben, azaz ez a fél-életidőt meghatározó jel változatlan maradt az evolúció sok millió éve alatt.

N-vég szabály az élesztőben

Az élesztőben végzett vizsgálatok szerint egy fehérje N-terminálisán *elsődlegesen destabilizáló*, azaz fél-életidő csökkentő hatásúak a *bázikus* oldalláncú aminosavak (arginin, lizin, hisztidin – 1-es típus, N-dp1) és a *hidrofób* oldalláncú aminosavak (leucin, fenilalanin, tirozin, izoleucin, triptofán – 2-es típus, N-dp2) (2.16. ábra).



2.16. ábra Az N-vég szabály az élesztőben. Sárga ellipszis jelöli a szubsztrát fehérjét. Rózsaszín és piros betűkkel az elsődlegesen, kékkel a másodlagosan, zölddel a harmadlagosan destabilizáló amnosavakat tüntettük fel.

A citoplazmában előforduló *Arg-tRNS-protein transzferáz* (R-transferase) enzim, melyet az ATE1 gén kódol az élesztőben, egy fehérje N-terminálisán lévő aszparaginsav illetve glutaminsav aminosavhoz képes egy arginint kötni. Az arginin, mint az előzőekben már láttuk, elsődlegesen destabilizáló aminosav, így a fehérje rövidesen lebomlik. Ezért az aszparaginsavat és glutaminsavat *másodlagosan destabilizáló aminosav*aknak (N-ds) hívjuk (2.16. ábra).

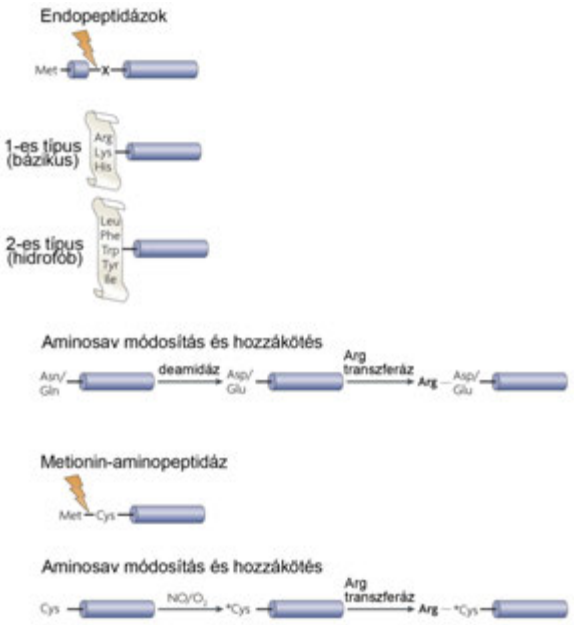
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az ugyancsak citoplazmatikus *N-terminális amidohidroláz* (Nt-amidase), melyet élesztőben az NTA1gén kódol, az N-terminálison lévő aszparagint illetve glutamint másodlagosan destabilizáló aszparaginsavvá illetve glutaminsavvá tudja átalakítani. Ezek természetesen a fent leírtak szerint tovább alakulnak és a fehérje végül lebomlik. Ezért az aszparagint és a glutamint *harmadlagosan destabilizáló aminosav*aknak (N-dt) nevezzük (2.16. ábra).

Élesztőben az ubiquitin aktiválását az *Uba1p* ubiquitin aktiváló (E1) enzim végzi. A 20 kDa tömegű *Ubc2p* ubiquitin konjugáló (E2) enzim katalizálja a Cys88-on tioészterkötéssel kötött, aktivált ubiquitin szubsztrát fehérjére kerülését. A folyamatot a 225 kDa tömegű *Ubr1p* ubiquitin ligáz (E3 vagy *N-recognin*) segíti azzal, hogy megköti az E2-es enzimet és az N-terminálisán szubsztrátot. Külön kötőhelye van az 1-es illetve 2-es típusú elsődlegesen destabilizáló aminosavaknak. Az 52kDa tömegű Nta1p (Nt-amidase) és az 58kDa tömegű Ate1p (R-transferase) az 1-es típus kötőhelye mellett ugyancsak az Ubr1p-hez kapcsolódik. Az Nta1p közvetlenül is kötődik az Ate1p enzimhez (2.16. ábra). Az enzimkomplex segítségével multiubiquitinilált fehérjét végül a 26S proteaszóma bontja le (Varshavsky, 1996).

A szubsztrátok aktiválása az N-vég szabály útvonalra

Az emlősökben az N-vég szabály lebontási útvonal 1-es típusú (bázikus) és 2-es típusú (hidrofób) destabilizáló aminosavait a 2.17. ábra mutatja.



2.17. ábra Az N-vég szabály útján lebomló peptidek keletkezésének lehetőségei emlősökben

Endopeptidázokkal történő hasítás (villám jel) eredményeképpen kerülhet destabilizáló aminosav (X) egy csonkolt fehérje N-terminálisára. Emlősökben működik a *metionin-aminopeptidáz*, mely metionin és cisztein között hasít. Az N-terminális cisztein későbbi oxidációja is destabilizációhoz vezethet, ha egy 1-es típusú, elsődlegesen destabilizáló arginin kapcsolódik hozzá (2.17. ábra). Emlősökben is működnek specifikus deamidázok, melyek az aszparagint aszparaginsavvá (illetve a glutamint glutaminsavvá) alakítják. Ez az átalakítás lehetőséget ad az arginintranszferáz enzimnek egy arginin az N-terminálishoz kapcsolására (2.17. ábra) (Ravid és Hochstrasser, 2008).

Az N-vég szabály útvonal kaszpázok által képzett szubsztrátjai

A kaszpázok endopeptidázok, melyek a fehérjéket adott sorrendű aminosav részlet után elhasítják. A kaszpáz hasítás helyét és a keletkező polipeptid N-terminális aminosavát néhány példa esetén a 2.18. ábra mutatja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

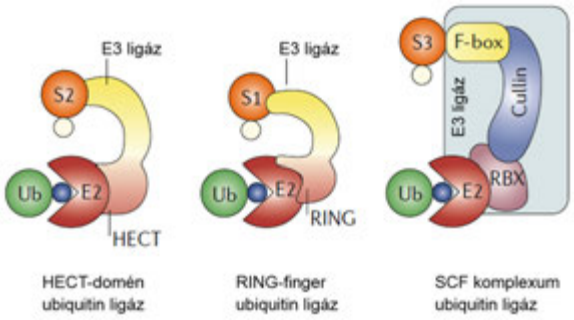
Dm-DIAP1	16 ...FDQVD▼NNTN...S 438
Hs-PKCδ	325 ...EDMQD▼NSGT...D 676
Hs-DNAPKcs	2709 ...GDEVD▼NKVK...M 4,128
Mm-Lamin A	226 ...LVEID▼NNGK...M 665
Hs-Caspase-1 (ICE)	115 ...QAVQD▼NPAM...H 404
Mm-CDC42	117 ...IDLRD▼DPST...F 191
Hs-MDM2	357 ...FDVPD▼CKKT...P 491
Hs-Cyclin E1	286 ...VLDVD▼CWQV...H 410
Hs-ETK / BMX	238 ...EDFPD▼WWQV...H 675
Hs-Vimentin	81 ...QDSVD▼FSLA...E 466
Hs-p21	108 ...EDHVD▼LSLS...P 164
Hs-Huntingtin	509 ...ADSVD▼LASC...C 3,144
Hs-Topoisomerase I	142 ...EDDAD▼YKPK...F 1,194
Hs-HEF1	626 ...MDDYD▼Y KTS...E 834
Hs-APAF1	15 ...ALEKD▼IKTS...E 1,194
Hs-HPK1	361 ...YDDVD▼IPTP...L 833

2.18. ábra Kaszpázok által képzett N-vég szabálynak megfelelő szubsztrátok. Dm - *Drosophila melanogaster*, Hs - *Homo sapiens* és Mm - *Mus musculus*. A zöld betűk a kaszpázok által felismert aminosav szekvenciát mutatják, a nyíl a hasítási helyet, a piros betű a keletkező fragmentum destabilizáló N-terminális aminosavát jelzik.

Egyelőre még csak a *Drosophila DIAP1* esetén bizonyították, hogy a kaszpáz hasítás eredményeként az N-terminálison megjelenő destabilizáló aminosav hatására a keletkező peptid valóban az N-vég szabály útvonalon bomlik le. Megfigyelhető azonban, hogy számos kaszpáz esetén elméletileg hasonlóan destabilizáló aminosav kerül a peptid termék N-terminálisára (2.18. ábra) (Varshavsky, 2003).

Az ubiquitin ligázok osztályai

Láttuk korábban, hogy az ubiquitin ligázoknak (E3) két típusa fordul elő. Nézzük most meg közelebbről, hogyan épülnek fel ezek az enzimek: A RING-finger domént tartalmazó ligázok állhatnak egyetlen polipeptid láncból vagy felépülhetnek több alegységből (pl. SCF komplexum). A HECT-doménnel rendelkező E3-as enzimek egy alegységgel rendelkeznek és az ubiquitiniláció során kovalens kötést létesítenek az ubiquitinnel (2.19. ábra) (Nalepa és mtsai., 2006).



2.19. ábra Az ubiquitin ligázok osztályai. Egy alegységes RING-finger E3-as enzim; HECT-domén E3-as ligáz; és *több alegységes* RING-finger E3-as ligáz (*SCF komplexum)*. (HECT, homologous to E6-AP C-terminus; RBX, RING-box protein; SCF, SKP1–Cullin–F-box)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

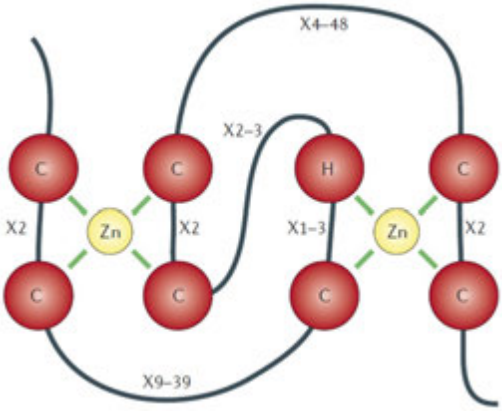
RING-finger domén típusú E3-as enzimek

A RING-finger domént tartalmazó ubiquitin ligázok családjának tagjai állhatnak egyetlen polipeptid láncból, működhetnek dimerként vagy felépülhetnek több alegységből. Nézzük meg közelebbről a névadó RING-finger domén szerkezetét.

RING-finger domén

- ~60 aminosav hosszú szerkezeti egység
- 2 vagy 3 cinkion stabilizálja

Az emlős genom több mint 600 lehetséges RING-finger E3-as enzimet kódol. A legtöbb RING-finger domén két cinkiont tartalmaz (sárga), melyeket 4 cisztein vagy 3 cisztein és 1 hisztidin oldallánc (piros) stabilizálnak. A domén általános konszenzus aminosav szekvenciája a következő: **C**-X_2-**C**-$X_{9–39}$-**C**-$X_{1–3}$-**H**-$X_{2–3}$-**C**-X_2-**C**-$X_{4–48}$-**C**-X_2-**C**, de más variáció is létezik (2.20. ábra).

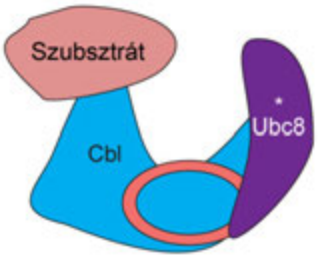


2.20. ábra A RING-finger domén alapszerkezete (C3HC4-típus)

A két cinkion és az őket tartó aminosavak egy átkaroló szerkezetet formáznak. A RING-finger doménnek két változata van, a C3HC4-típus és a C3H2C3-típus, melyek nagyon hasonlóak, csak a cisztein/hisztidin mintázatukban különböznek. Az utóbbi típust szokták RING-H2-fingernek is hívni. Az *U-box* elnvezésű domén hasonló szerkezet, de nincs benne cinkion (Nalepa és mtsai., 2006).

Egy alegységből felépülő RING-finger domént tartalmazó ligázok

A RING-finger család egyes tagjai egyetlen polipeptidből állnak. Ilyen molekula az Mdm2 illetve egyes IAP fehérjék. Ezek a fehérjék a RING-finger domén részükkel közvetlenül kötok a megfelelő E2-es enzimet és egy másik részükkel pedig a szubsztrát fehérjét (2.21. ábra).



2.21. ábra Egy alegységből felépülő RING-finger típusú ubiquitin ligáz (E3). A piros ellipszis a RING-finger domént jelöli.

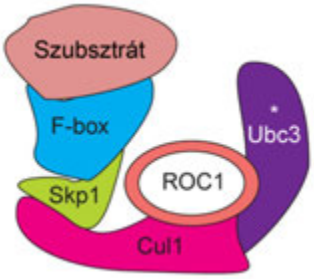
Gyakori azonban, hogy ezek a monomer ubiquitin ligázok kettesével, a RING-finger doménjükkel vagy az akörüli régióval összekapcsolódnak, homodimereket hoznak létre. Ilyen például a cIAP (cellular inhibitor of apoptosis, másnéven BIRC2), a SIAH (seven in absentia homologue 1), és a TRAF2 (TNF receptor associated factor 2).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Képződhetnek heterodimerek is, erre jó példa az Mdm2 (murine double minute 2, emberben Hdm2) és az MdmX (másnéven Mdm4, illetve emberben HdmX vagy Hdm4) összekapcsolódása, vagy a BRCA1 (breast cancer 1) és BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1) együttese. Heterodimerek esetén az egyik RING-domén fehérjének (MdmX, BARD1) gyakran hiányzik a ligáz aktivitása és csak stabilizálja az aktív E2-kötő RING-domént.

SCF komplexum

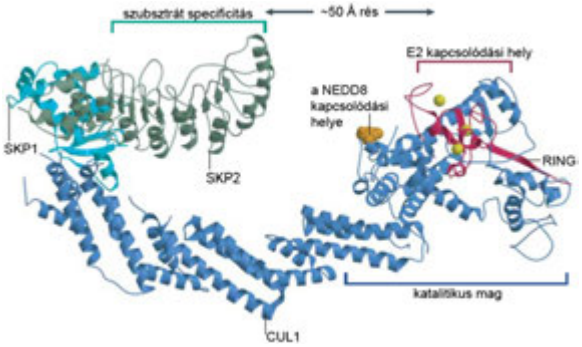
A legismertebb több alegységes RING-finger domén ubiquitin ligáz enzimek az SCF komplexum típusba tartoznak. Az SCF rövidítés a legfontosabb alegységek kezdőbetűiből áll össze: Skp1, cullin, F-box (2.22. ábra).



2.22. ábra Az SCF komplexum típusútöbb RING-finger domén ubiquitin ligáz enzim alegységei

Az SCF komplexum a cullint tartalmazó ubiquitin ligázok alaptípusa. A ligáz a szubsztrátfehérjét az egyik alegységének fehérje-kötő doménjével, a 45 aminosavból álló *F-box*-szal köti meg. Legalább három osztálya van az F-box fehérjéknek, aszerint hogy milyen a szubsztrátkötő részük: *Fbw* (WD40 - egy rövid kb. 40 aminosavból álló szakasz, gyakran a Trp-Asp (W-D) dipeptidre végződik), *Fbl* (LRR - leucine-rich repeat), *Fbx*. Az F-box protein az *Skp1* (S-phase kinase associated protein) fehérjéhez kapcsolódik, ami adapterként vagy zsanérként a *cullin*hoz köti. A cullin (cull (ang.): összeszed) állványfehérje a komplexum vázszerkezeteként szolgál és másik végén a RING-finger fehérjét (*Roc1/Rbx1)* tartja, az pedig egy specifikus E2 enzimhez kapcsolódik (2.22. ábra).

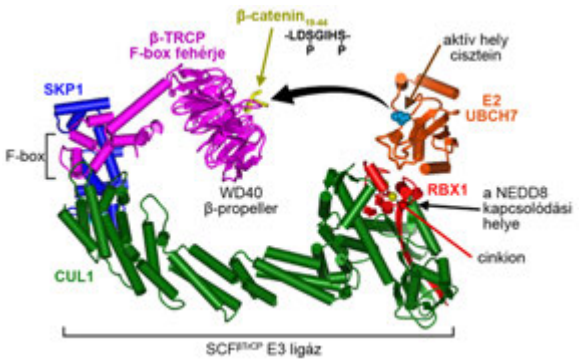
Láthatjuk, hogy egy SCF komplexum specificitását elsősorban a szubsztrát felismerő és megkötő F-box fehérje adja. Ezért egy adott enzim megnevezésekor az SCF rövidítés mellé felső indexként az F-box fehérje nevét írják. Például, ha az F-box az Fbl1 osztályba tartozó *Skp2*, akkor SCF^{Skp2} lesz az enzim jele (Petroski és Deshaies, 2005) (2.23. ábra).



2.23. ábra Az SCF^{SKP2} térszerkezete

Egy másik példában az F-box fehérje az Fbw1 osztályba tartozó, 7-szeres WD40 szakaszt tartalmazó *β-Trcp1* (β-Transducin repeat containing protein), a komplexum elnevezése: $SCF^{\beta TrCP}$ (2.24. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.24. ábra Az SCF$^{\beta TrCP}$ E3 enzim térszerkezete egy lebontandó peptiddel

A szubsztrát fehérje ubiquitinilálását gyakran a szubsztrát fehérje poszttranszlációs módosítása, így hiperfoszforiláció vagy hidroxiláció előzi meg. A különös foszforiláltsági mintázat az egyik jel az E3-as enzim számára a fehérje ubiquitinilálására. Ez játszódik le az SCF$^{\beta TrCP}$ E3 ligáz két természetes szubsztrátja, az IκB és a β-catenin esetén is.

RING E3 enzim közvetített katalízis mechanizmusa

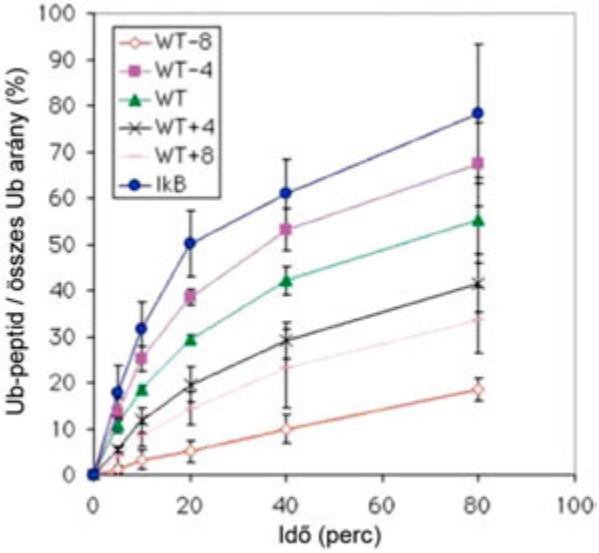
Az SCF$^{\beta TrCP}$ E3-as enzim ubiquitinilálási sebessége jelentősen függ az ubiquitinilálandó lizin és az enzim által a szubsztráton felismert ún. destrukciós motívum közötti távolságtól. Ennek vizsgálatára in vitro kísérletben vad típusú és módosított β-catenin és IκBα peptideket használtak (2.25. ábra).

2.25. ábra Az SCF$^{\beta TrCP}$ E3-as enzim aktivitásának méréséhez használt vad típusú és módosított β-catenin és IκBα peptidek. Az ábrán a destrukciós motívum sárgával jelölt, az ubiquitint fogadó lizinek rózsaszínnel a vad típusú peptidhez képest beillesztett aminosavak a wt+4 és wt+8 mutáns β-catenin peptidek esetén zöldek.

Mint az ábrán látható a két természetes szubsztrátban eltérő a távolság a lizin és a destrukciós motívum között, az IκBα-ban pontosan négy aminosavval rövidebb, mint a β-cateninben. A kísérletben létrehozott módosított β-catenin peptidekben a vadtípusnál 8 illetve 4 aminosavval rövidebb valamint 8 illetve 4 aminosavval hosszabb volt ez a távolság (Wu és mtsai., 2003).

Bár az SCF$^{\beta TrCP}$ E3-as enzim felismeri mindkét természetes szubsztrátját, a kísérlet kimutatta, hogy az IκBα-t nagyobb aktivitással ubiquitinilálja, mert itt éppen megfelelő az enzim számára a fogadó lizin és a felismert destrukciós motívum közötti távolság. Ha a β-cateninben mesterségesen lerövidítették ezt a távolságot, jobb ubiquitinilálási sebességet kaptak a vadtípushoz képest. Minden más változtatás csak gyengébb aktivitást eredményezett (2.26. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

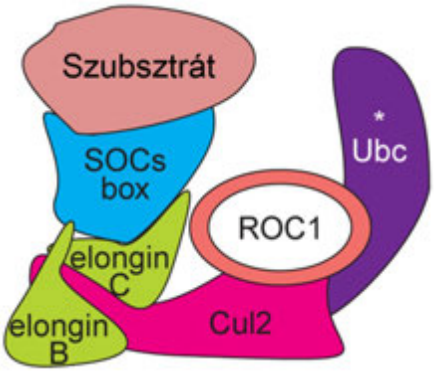


2.26. ábra Az SCF$^{\beta TrCP}$ ubiquitinilálási sebessége függ a szubsztrátpeptid lizinje és a destrukciós motívuma közötti távolságtól. A grafikon az ubiquitinilált peptid / összes ubiquitin arány időbeli változását mutatja. Négy párhuzamos kísérlet átlaga illetve standard deviációja szerepel az ábrán.

VBC komplexum (VHL-ElonginB-ElonginC)

- von Hippel-Lindau tumor szupresszor protein
- VHL disease – sporadikus vese karcinóma
- a Hif1α-t és Hif2α-t (hypoxia indukálható transzkripciós faktor) bontja, mely a VEGF-t (vascular endothelial growth factor) szabályozza

A VBC (VHL-elongin B-elongin C) komplexumot a VHL (von Hippel-Lindau) tumor-szuppresszor fehérjével együtt fedezték fel. Az E3-as enzim szubsztrátja, a Hif1α transzkripciós faktor a *SOCS box*-ot (suppressor of cytokine signalling) tartalmazó VHL fehérjéhez kötődik. A SOCS box az Skp1-hez hasonló elongin C-hez és az ubiquitin homológ elongin B-hez. A komplexum tagja még a Cul2 cullin és a Roc1/Rbx1 RING-finger protein (2.27. ábra).



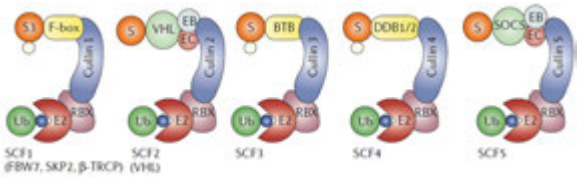
2.27. ábra A VBC komplexum vázlata

Az angiogenezis (érképződés) a tumor növekedés és előretörés alapja. Ennek kulcsszabályozója a hipoxia indukálható faktor (HIF) transzkripciós faktor család, melyek a bioenergetikában, sejt növekedésben és érképződésben érintett gének átíródását indukálják. Hipoxiás körülmények között a HIF fehérjék közül a Hif1α és Hif1β aktív és heterodimert képezve a hipoxia válasz génekhez (hypoxia response elements – HREs) kötődnek a célgének elé. Normális oxigénellátottságú körülmények között a Hif1β stabil, míg a Hif1α fehérjét az ubiquitin–proteaszóma rendszer lebontja, ezzel megakadályozva a transzkripciót. A Hif1α oxigén-függő szabályozásának a kulcsa a VHL komplexum. A HIF1α konzervatív helyzetű prolin aminosavain hidroxilálódik a HIF-prolil-hidroxiláz segítségével.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ez elősegíti, hogy VHL ubiquitin ligáz felismerje és ubiquitinilálja, ami gyors degradációját okozza a proteaszómában. Mindez csak normális oxigén ellátottság mellett zajlik így. Hipoxiás körülmények között a HIF-prolil-hidroxiláz gátlódik, mert az oxigént ko-szubsztrátként használja az aktivitása során.

A 2.28. ábra az SCF típusú sok alegységes RING-finger E3-as enzimeket hasonlítja össze.

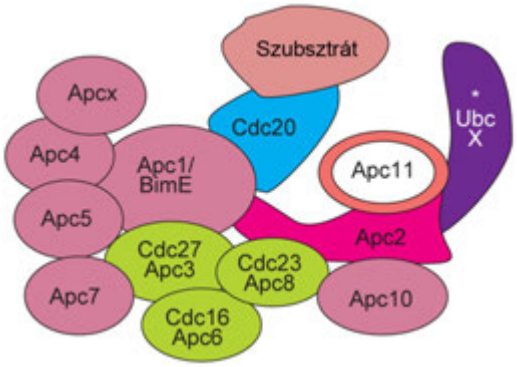


2.28. ábra Az SCF típusú sok alegységes RING-finger E3-as enzimek összehasonlító ábrája. A specificitást adó molekula részleteket (F-box, VHL, BTB, DDB1/2, SOCS-box) különböző cullinok kötik a RING-finger fehérjéhez (RBX). Az egyes cullinok egyedi, de szerkezetileg hasonló specificitást adó fehérjéket használnak. (Az ábrán használt rövidítések: β-TRCP, β-transducin repeat-containing protein; BTB, broad complex/tracktrack/bric-a-brac; DDB, DNA-damage binding protein; FBW, F-box and WD40 domain protein; HECT, homologous to E6-AP COOH-terminus; RBX, RING-box protein; SCF, SKP1–Cullin–F-box; SKP, S-phase kinase-associated protein; VHL, von Hippel-Lindau)

Anafázis promóciós komplexum

- mitotikus orsóban lokalizál
- metafázis-anafázis átmenet elősegítése
- ciklin B lebontás

Az APC (anaphase promoting complex, másnéven cyclosome) a legösszetettebb SCF típusú sok alegységes ubiquitin ligáz, mely a mitotikus orsóban található a sejtosztódás idején. Szubsztrátjait a Cdc20 és Cdh1 specifikus aktivátorokon keresztül köti meg. Az APC komplexum fehérjéi a legnagyobbtól indulva sorban a legkisebbig vannak beszámozva (Apc1-10, 2.29. ábra).



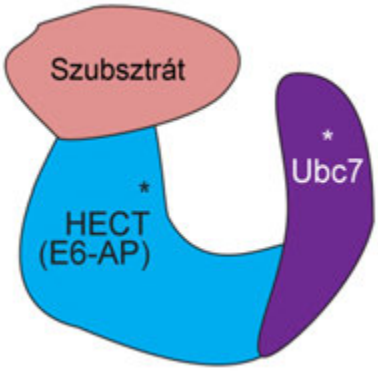
2.29. ábra Az anafázis promóciós komplexum (APC vagy cyclosome) nevű E3-as enzim alegységösszetételének egyszerűsített rajza

Az *Apc2* fehérje egy cullin homológ, az *Apc11* egy RING-finger fehérje. Az Apc3/Cdc27, Apc6/Cdc16 és Apc8/Cdc23 fehérjék külön komplexumot formálnak a *tetratricopeptide repeat* (TPR) doménjük segítségével és valószínűleg a komplexum megtámasztására szolgálnak. Az Apc1 az *Aspergillus* BimE proteinjének homológja. Az Apc4, Apc5, Apc7 és jópár más alegység szerepe egyelőre ismeretlen.

HECT-domén típusú E3-as enzimek

Emlősökben több mint 30 HECT-domén típusú E3-as enzim fordul elő. A fehérjéknek ez az egyre bővülő családja közvetlenül kapcsolódik a megfelelő ubiquitin konjugáló enzimhez (E2) és ugyancsak közvetlenül a szubsztráthoz (2.30. ábra).

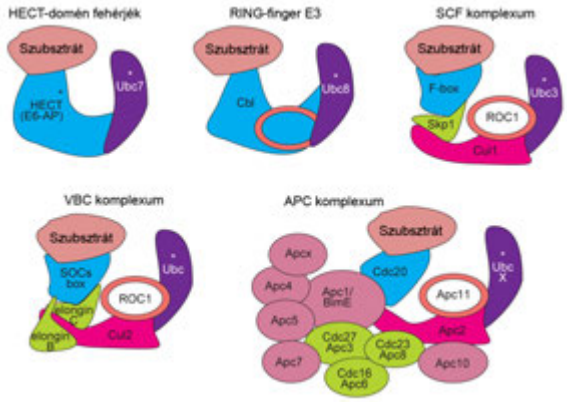
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.30. ábra Az E6-AP HECT-domén típusú E3-as enzim vázlata a hozzá közvetlenül kapcsolódó Ubc7 E2-es enzimmel

Többféle feladtuk mellett, a HECT E3-as enzimeknek kiemelkedő szerepe van a fehérje forgalomban, az immunválaszban, és sokféle, a sejtnövekedést és sejtosztódást szabályozó jelátviteli útvonalban (Rotin és Kumar, 2009). A HECT-domén (HECT - Homologous to E6-AP C-terminus) egy 350 aminosav hosszú, 40kDa tömegű fehérje illetve fehérje részlet, mely tartalmaz egy konzervált ciszteint, melyhez az ubiquitin átmenetileg kötődik. Maga a HECT-domén az enzim C-terminálisa felé helyezkedik el, míg az N-terminális sokféle lehet és a szubsztrát kötésért felelős (WW domén: -Trp-(20-22)-Trp-(40)-Pro- felépítésű hidrofób zseb). A HECT-domén maga is kétlebenyű, az N-terminális felé eső N-lebeny lép kapcsolatba az E2-es enzimmel és a C-terminális irányában elhelyezkedő C-lebeny tartalmazza az aktív ciszteint, mely átmeneti tioészterkötést alakít ki az ubiquitinnnel. A domén elnevezését adó fehérje, a humán papilloma vírus E6 fehérjéjéhez asszociált protein (E6-AP) maga is egy E3-as enzim. A neki megfelelő E2-es enzimről, az Ubc7-ről kerül rá az aktivált ubiquitin innen pedig természetes szubsztrátjára, a p53 fehérjére. A DNS megkettőződését leállító, apoptózis beindító fehérje ubiquitinilálása és lebontása kedvező a vírus számára, mert igyekszik megakadályozni a megfertőzött gazdasejt túl korai pusztulását (Jackson és mtsai., 2000).

A 2.31. ábrán vessünk egy pillantást az ubiquitin ligázokra (E3-as enzimekre).



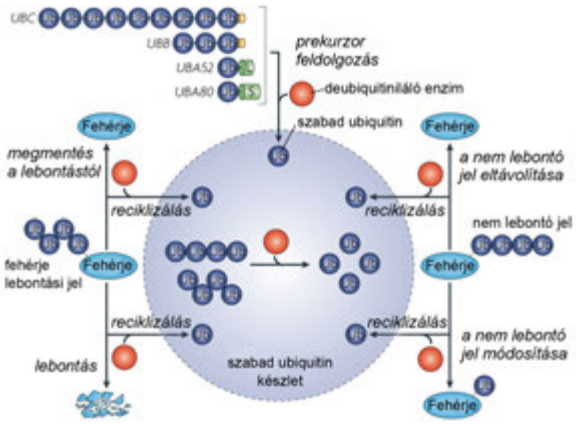
2.31. ábra Az ubiquitin ligázok összehasonlítása. Az ismert ubiquitin ligázok, ha egy polipeptidből épülnek fel, akkor vagy HECT domént, vagy RING finger domént tartalmaznak. A több alegységes ubiquitin ligázoknak mindig van egy cullin alegységük (Cul1–Cul5 vagy Apc2) és egy külön RING finger alegységük. A színkód magyarázta: a szubsztrát fehérje rózsaszín, a szubsztrátkötő fehérje kék, összekötő, zsanér zöld, cullin magenta, RING-finger fehérje vagy domén üres piros kör, E2-es enzim lila.

A deubiquitiniláló enzimek

Mióta a *deubiquitiniláló enzimek* (DUB), másnéven az *ubiquitin C-terminális hidrolázok* (UCH) családját felfedezték, nyilvánvalóvá vált, hogy az ubiquitin konjugáció részben megfordítható. A folyamat hasonló a kinázok és foszfatázok által katalizált megfordítható fehérje foszforilációhoz. A deubiquitiniláció megmenthet egyes multiubiquitinilált

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fehérjéket a proteaszómális lebontástól. Más esetekben, nem degradatív jeleket (pl. monoubiquitin vagy K63-as kapcsolódású multiubiquitin lánc) is eltávolíthat a fehérjékről (2.32. ábra).



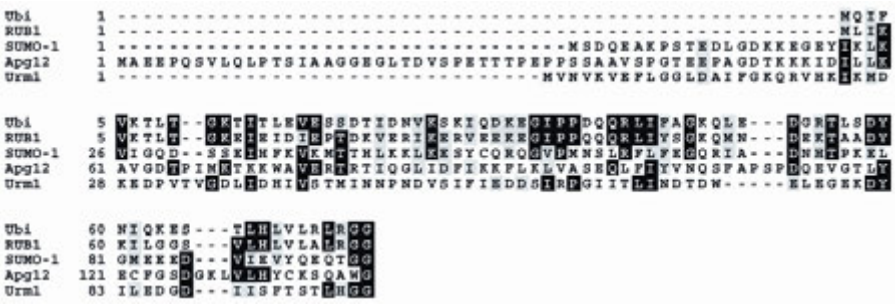
2.32. ábra A deubiquitiniláló enzimek (DUB) enzimek általános feladatai

A DUB enzimek felelnek az ubiquitin homeosztázisért a sejtben és megakadályozzák, hogy az ubiquitin a 26S proteaszóma vagy a lizoszomális útvonal szubsztrátjaival együtt megemésztődjön (ubiquitin reciklizálás). A szubsztrátokról egyben eltávolított multiubiquitin láncokat is a DUB enzimek szerelik szét, biztosítva ezzel, hogy a visszaforgatott ubiquitin megjelenjen a szabad ubiquitin raktárban. Egyes DUB enzimek újra szerkeszthetik a már a szubsztrát fehérjéken lévő ubiquitin láncokat, átalakítva az egyik típusú jelet egy másikká. Mint korábban láttuk az ubiquitint kódoló génekről először lineáris fúziós fehérjék készülnek. A deubiquitiniláló enzimek egyik kulcsfeladata, hogy ezekből a prekurzorokból szabad ubiquitint készítsenek (2.32. ábra) (Komander és mtsai., 2009).

Az ubiquitin rokonai

Az ubiquitin-szerű fehérjék

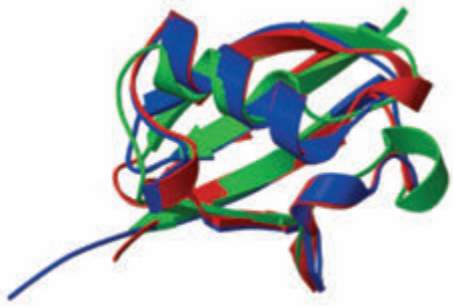
Az ubiquitin-szerű fehérjék (UBLs - ubiquitin-like proteins) aminosav szekvenciái közötti hasonlóság még a legközelebbieket (Rub1/NEDD8) tekintve is igen alacsony (2.33. ábra).



2.33. ábra Az ubiquitin-szerű fehérjék aminosav szekvenciái közötti hasonlóság. Az azonosság feketével, a hasonlóság szürkével jelölt.

Nemcsak az aminosav sorrendjük, az összhosszuk is jelentősen eltérő. A szekvenciák egyetlen közös vonása a C-terminális kettős glicin motívum. Miért tekintjük őket mégis az ubiquitin rokonainak? Az ubiquitin és rokonai elsősorban az ubiquitin superfold térszerkezetben hasonlítanak egymásra. Superfoldnak nevezzük azokat a fehérje hajtogatódási típusokat, melyek semmilyen szekvenciális vagy funkcionális rokonságot nem mutató fehérjék esetén mégis hasonló térszerkezetet kölcsönöznek a polipeptideknek (Welchman és mtsai., 2005). Az ubiquitin superfold β-rétegre épül (2.34. ábra).

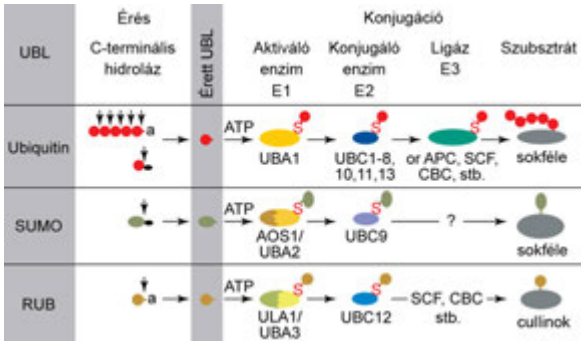
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.34. ábra Az ubiquiton – az ubiquitin (kék), a SUMO-1(zöld) és a Nedd8 (piros) egymásra vetített térszerkezete (Ubiquitin - Protein Data Bank (PDB) accession code P62988; SUMO-1 - PDB P63165; NEDD8 - PDB Q15843)

Tehát az ubiquitinnek csak a térszerkezete hasonlít az ubiquitin-szerű fehérjékre, ezeket együtt *ubiquiton*-oknak nevezzük. Az evolúció során az ubiquitonok hozták létre a szerteágazó funkcióval rendelkező kis fehérjék tárházát. Az ubiquitonok nemcsak kovalensen kötődhetnek, hanem genetikailag be is ágyazódhatnak más, sokkalnagyobb fehérjékbe, mint például a Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) kinázba.

Az ubiquitin-szerű fehérjék legtöbbje inaktív prekurzorokból proteolitikus hasítással válik éretté, aktívvá (2.35. ábra).



2.35. ábra Az ubiquitin és két ubiquitin-szerű fehérje (SUMO és Rub) szubsztrátra kerülésének sémája (a nyilhegyek a hasítási helyeket mutatják; a - aminosav)

Az ubiquitin vagy poliubiquitinként, vagy riboszómális fehérjékkel fuzionálva fejeződik ki. Az ubiquitin-szerű fehérjék szubsztrátra kötődéséhez *aktiváló* (E1) és *konjugáló* (E2) enzimekre van szükség, melyek tioésztert (S) formálnak a fehérjékkel (2.35. ábra). A cullinok Rub-bal történő módosításához az ubiquitinilálást is végző SCF/CBC-szerű E3-as enzimekre van szükség. Csak a SUMO képes többszörös láncot képezni az ubiquitinhez hasonlóan a szubsztráton, más ubiquitin-szerű fehérjékre ez nem jellemző (Jentsch és Pyrowolakis, 2000).

A SUMO

- SUMO: small ubiquitin-related modifier
- gerinctelenekben 1 gén kódolja: SMT3
- gerincesekben 4 génje van: SUMO-1, 2, 3, 4
- 101 aminosav, 18%-os hasonlóság az ubiquitinnel
- 50%-os hasonlóság egymással
- rövid meghosszabbítás az N-terminálison

A SUMO (small ubiquitin-related modifier) kovalensen módosít fehérjéket és ez szerteágazó biológiai következményekkel jár. Korábban is ismerték, de többféle néven: sentrin, PIC-1, GMP1, UBL1, DAP1.

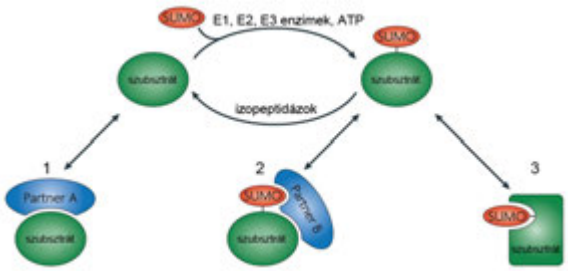
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Gerinctelenekben 1 gén kódolja: SMT3 (suppressor of mif two). Gerincesekben 4 génje van: SUMO-1, 2, 3, 4. A kész fehérje 101 aminosavból áll, és csak 18%-os hasonlóságot mutat az ubiquitinnel (2.36. ábra).

2.36. ábra Hasonlóság az ubiquitin és egyes SUMO fehérjék között. A humán SUMO-1, -2, és -3 aminosav sorrendjének összehasonlítása az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae)* SMT3-mal és a humán ubiquitinnel. Az azonosságok kékkel, a hasonlóságok sárgával vannak jelölve. A prekurzor hasítás helyét a kettős glicin motívum előtt, a C-terminális közelében, az olló jelzi.

Maguk a SUMO fehérjék is csak 50%-ban hasonlóak egymással. A konjugálás előtt szükség van a fehérje C-terminális végéből egy rövid peptid lehasítására, hogy a kettős glicin motívum előtűnjön. Ezzel kapcsolódik a szubsztrát fehérje egyik lizin oldalláncához. Az Smt3, SUMO-2 és SUMO-3 polipeptidekben konzervatív lizineket is találhatunk, ezek alkalmasak a jelölés láncszerű meghosszabbítására. A SUMO-4 molekula 90. prolin aminosava (Pro90) megakadályozza, hogy a Ulp/SENP enzim (lásd később) lehasítsa az általa megjelölt fehérjéről (Mukhopadhyay és Dasso, 2007; Müller és mtsai., 2001).

A sumoilálásnak a módosított fehérje számára háromféle molekuláris következménye lehet (2.37. ábra).



2.37. ábra A sumoilálás molekuláris következményei

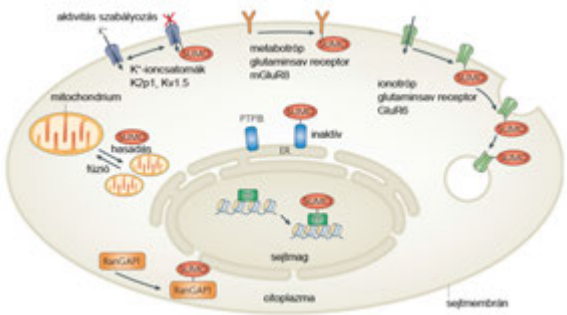
1. A sumoilálás akadályozhatja a szubsztrátfehérje és partnere kapcsolódását, így az interakció csak a SUMO hiányában tud létrejönni.

2. Más esetben éppen a sumoilálás szolgáltathat kötőhelyet a kapcsolódó partner számára, például az úgynevezett *nem kovalens SUMO interaktív motívum*on (SIM vagy SBM) keresztül. A SIM hidrofób magból áll, amit savas aminosavak vesznek körül, egyes esetekben szerin oldalláncok.

3. Végül a sumoilálás eredményezheti a módosított szubsztrátfehérje térszerkezetének megváltozását. Ha a módosított szubsztrát szintén tartalmaz egy SIM területet, akkor a SUMO és a SIM közötti intramolekuláris kölcsönhatás térszerkezeti válozáshoz vezethet (2.37. ábra). A sumoilálás okozta konformációváltozásra jó példa a timin DNS glikoziláz (Geiss-Friedlander és Melchior, 2007).

Lássuk most, milyen fehérjéket módosít a SUMO a sejtben! A legtöbb ismert SUMO célpont magi fehérje, pl. transzkripciós faktorok (TF), koregulátorok vagy a kromatin szerveződésében, megkkettőzésében és javításában résztvevő fehérjék. Ezek mellett találhatunk SUMO célfehérjéket a plazmamembránban, az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a citoplazmában (2.38. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.38. ábra Sumoilált fehérjék előfodulása a sejtben

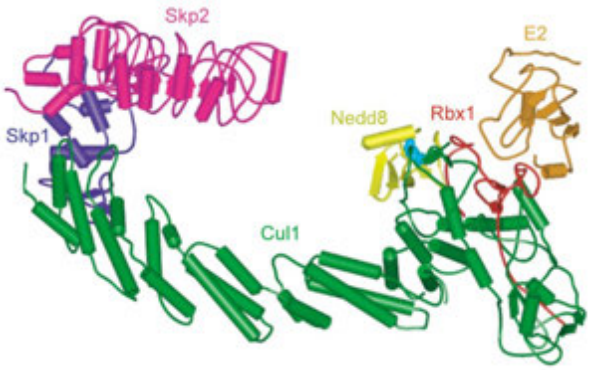
RanGAP1 sumoilálása megváltoztatja a sejten belüli lokalizációját: az eredeti fehérje a citoplazmában helyezkedik el oldott állapotban, de a SUMO-1 konjugáció után a magpórus komplexumba kerül. A plazmamembránba lokalizált K^+-ioncsatornák, a K2p1 és a Kv1.5 kevésbé aktívak a modifikációt követően. Az ionotróp glutaminsav receptor (GluR6) sumoilálása (ismeretlen mechanizmus szerint) elősegíti felvételét a sejtbe. A metabotróp glutaminsav receptor (mGluR8) is sumoilálódhat, de ennek nem ismerjük még a következményeit. Az ER-ben elhelyezkedő tirozin foszfatáz 1B-t (PTP1B) inaktiválja a SUMO kötődése. A SUMO a mitochondriumok dinamikájára is hat: a SUMO overexpressziója vagy a SUMO-specifikus izopeptidáz SENP5 aktivitásának csökkenése a mitochondriumok hasadásának növekedését eredményezi. Bár a dinamin-szerű DRP1 fehérje is sumoilálási célpont, egyelőre nem ismert, hogy ennek a módosítása is részt vesz-e a fenti folyamatban (Geiss-Friedlander és Melchior, 2007) (2.38. ábra).

Külön kiemeljük, hogy a p53 –Mdm2 rendszerben a SUMO-1 szabályozza az Mdm2 működését. A sumoiláció megakadályozza az Mdm2-t abban, hogy saját magát ubiquitinilálja, ezzel elősegíti a p53 ubiquitinilációját.

A Rub1/NEDD8

- Rub1: related to ubiquitin
- NEDD8: neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8 (egér)
- 50%-os hasonlóság az ubiquitinnel
- cullinhoz köt (SCF ubiquitin ligázban)

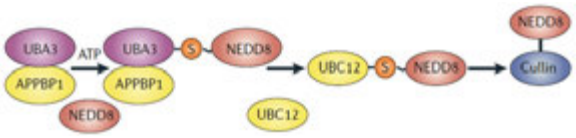
A Rub1/NEDD8 egy ubiquitin-szerű fehérje, melynek aminosav sorrendje 50%-ban hasonló az ubiquitinéhez. Egyetlen ismert funkciója, hogy az SCF^{Skp2} ubiquitin ligázt aktiválja azzal, hogy a ligáz cullin alegységéhez köt (2.39. ábra).



2.39. ábra A Rub1/NEDD8-cal aktivált SCF^{Skp2} ubiquitin ligáz térszerkezete az alegységek kristályszerkezeteiből összeállítva (Schwartz és Hochstrasser, 2003). A NEDD8 fehérjét kötő lizin oldallánc világoskék.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A NEDD8 aktiváló enzimnek (E1NEDD8) két alegysége van: az UBA3 és a APPBP1. ATP jelenlétében a NEDD8 tioészter kialakításán keresztül aktiválódik és az UBC12-re kerül. Az UBC12 a NEDD8-at a cullin fehérje egyik lizin oldalláncára juttatja, mellyel izopeptid kötést alakít ki (2.40. ábra).



2.40. ábra A Rub1/NEDD8 konjugálása az SCF ligáz cullin alegységére

Feltéve, hogy lehetséges egy E1 enzimhez specifikus inhibitort kifejleszteni, felmerül a kérdés, hogy mi lehet a sejtbiológiai következménye egy ilyen gátlásnak. Emlős sejtvonalakon végzett korábbi kutatások kimutatták, hogy az ubiquitin aktiváló enzim (E1Ub) hőérzékeny mutációi késői S fázisban és G2-ben megállítják a sejtciklust. Ez azt mutatja, hogy az E1Ub szükséges a sejtosztódáshoz. Ehhez hasonlóan az E1NEDD8 mutációi hatékonyan blokkolják a sejtosztódást *Caenorhabditis elegans*-ban, továbbá mind az UBC12, mind az UBC9 szükséges a fejlődéshez emlősökben. Ezért elviekben az ilyen E1 inhibitorok sejtciklus leállást idéznének elő és használhatók lennének hiperproliferációs rendellenességek, mint például a rák gyógyításában.

Mindemellett valószínű, hogy sokféle útvonalat érintene az E1 enzimek gátlása és ezek közül több elengedhetetlen a normális sejtműködéshez. Egy lehetséges előnye az E1NEDD8 gátlásának az E1Ub helyett, az hogy ennek csak a cullint tartalmazó ubiquitin ligázok aktiválása az egyetlen ismert funkciója. Így az E1NEDD8 gátlása remélhetőleg nem érint sok száz más ubiquitinilációs reakciót, melyek nem cullin függőek (Nalepa és mtsai., 2006).

Ellenőrző kérdések

1. Mik az ubiquitin fehérje legfontosabb jellemzői?
2. Hányféle gén és hogyan kódolja az ubiquitin fehérjét?
3. Mi a mono- és multiubiquitiniláció és mit jelent a sejtben?
4. Mik a multiubiquitiniláció egy ciklusának elemi lépései?
5. Mi az N-vég szabály?
6. Milyen E3-as enzimtípusokat ismer? Keressen példákat rájuk!
7. Milyen alegységei lehetnek egy RING-finger típusú E3-as enzimnek és mi a feladata ezeknek?
8. Milyen feladatai vannak a deubiquitiniláló enzimeknek?
9. Miben hasonlítanak az ubiquitinre az ubiquitin-szerű fehérjék és miben nem?
10. Mik a SUMO feladatai egy sejtben?
11. Hogyan aktiválódik és mi a feladata a Rub1/Nedd8 fehérjének?

Irodalom

Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. és Hershko, A. (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A***77**, 1365-8.

Ciechanover, A., Hod, Y. és Hershko, A. (1978) A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun***81**, 1100-5.

Clague, M. J. és Urbe, S. (2006) Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol***16**, 551-9.

Clague, M. J. és Urbe, S. (2010) Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* **143**, 682-5.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Etlinger, J. D. és Goldberg, A. L. (1977) A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A***74**, 54-8.

Finley, D. (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem***78**, 477-513.

Geiss-Friedlander, R. és Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol***8**, 947-56.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. és Rose, I. A. (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A***77**, 1783-6.

Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K. és Reimann, J. D. (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **10**, 429-39.

Jentsch, S. és Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.***10**, 335-342.

Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. és Dikic, I. (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell***34**, 259-69.

Kirkpatrick, D. S., Denison, C. és Gygi, S. P. (2005) Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol* **7**, 750-7.

Komander, D., Clague, M. J. és Urbe, S. (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol***10**, 550-63.

Mukhopadhyay, D. és Dasso, M. (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci***32**, 286-95.

Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. és Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol***2**, 202-10.

Nalepa, G., Rolfe, M. és Harper, J. W. (2006) Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov***5**, 596-613.

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. és Johansen, T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem***282**, 24131-45.

Petroski, M. D. és Deshaies, R. J. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol***6**, 9-20.

Ravid, T. és Hochstrasser, M. (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 679-90.

Rotin, D. és Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 398-409.

Schwartz, D. C. és Hochstrasser, M. (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28**, 321-8.

Simpson, M. V. (1953) The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J. Biol. Chem.* **201**, 143-154.

Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A***93**, 12142-9.

Varshavsky, A. (2003) The N-end rule and regulation of apoptosis. *Nat Cell Biol***5**, 373-6.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

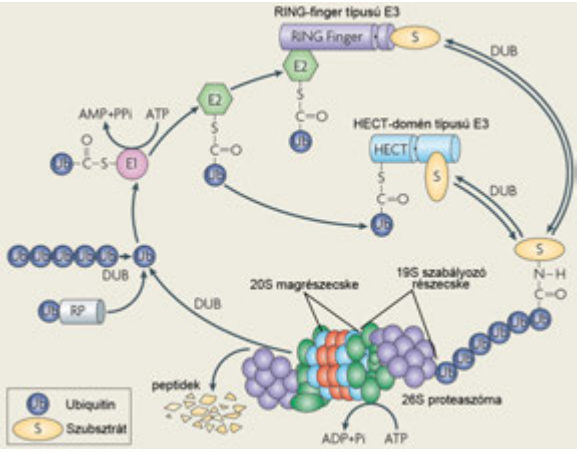
Welchman, R. L., Gordon, C. és Mayer, R. J. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol***6**, 599-609.

Wilkinson, K. D., Urban, M. K. és Haas, A. L. (1980) Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem***255**, 7529-32.

Wu, G., Xu, G., Schulman, B. A., Jeffrey, P. D., Harper, J. W. és Pavletich, N. P. (2003) Structure of a β-TrCP1-Skp1-β-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(β-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* **11**, 1445-56.

3. A proteaszóma szerkezete és működése

A proteaszóma az eddig ismert legösszetettebb fehérjebontó enzim komplexum. Labilis szerkezet, mely magrészecskére és szabályozó részecskékre válhat szét. A proteaszóma proteolitikusan aktív részei a magrészecskében vannak, jól elkülönítve e henger alakú szerkezet belsejében. A fehérjék a henger két végén lévő csatornákon léphetnek be a részecskébe. Szabad magrészecske azonban nem bont le ubiquitin-fehérje konjugátumokat, csak szabályozó részecskével kapcsolódva (3.1. ábra).



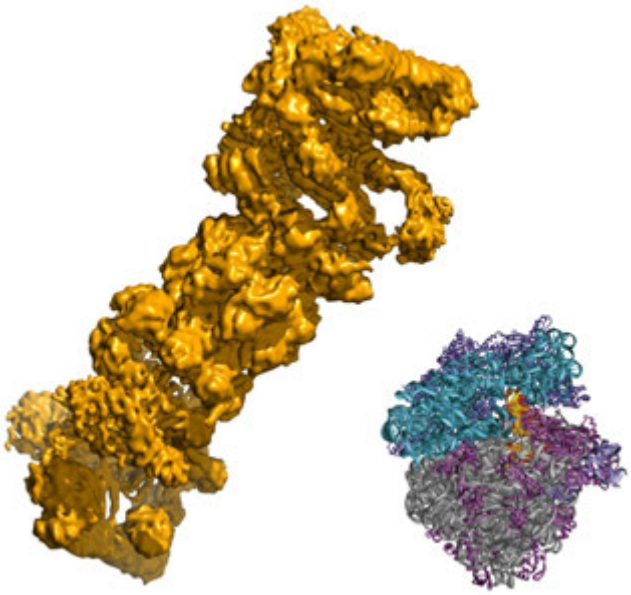
3.1. ábra Az ubiquitin-proteaszóma rendszer

A 26S proteaszóma

- 2,5 MDa komplexum
- 20S magrészecske
- két 19S szabályozó részecske
- multikatalitikus proteáz (MCP)

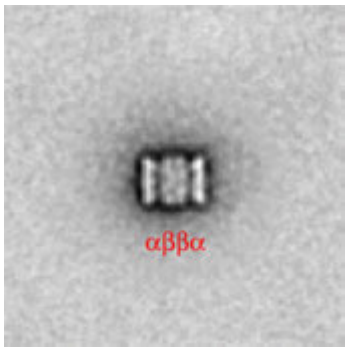
Az első leírás egy proteaszóma-szerű tulajdonságokkal rendelkező, cső alakú komplexumról még az 1960-as évek végéről származik. A későbbiekben rengeteg elnevezés született a proteaszómára vonatkozóan, ami jól mutatja, hogy mennyi problémával kellett megküzdeni biokémiai tulajdonságainak és sejten belüli szerepének meghatározása során az eltelt több, mint négy évtized alatt. Enzimológiai vizsgálatokkal egész sereg különböző proteolitikus aktivitást mutattak ki, ami a „multikatalitikus proteáz” (multicatalytic protease, MCP) egységes elnevezésre vezetett (Burger és Seth, 2004). Ezt a nevet érdekes módon hamarosan egy újabb váltotta fel, a *proteaszóma*, mely jobban hangsúlyozza a sejtszervecske méretű molekuláris „gépezet” jellegű tulajdonságait (3.2. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

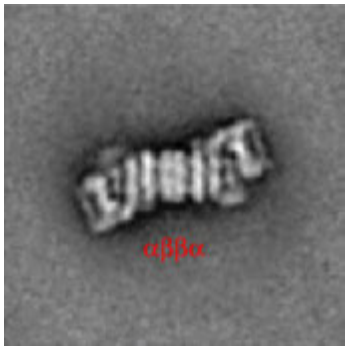


3.2. ábra A 26S proteaszóma térszerkezeti modellje (Baumeister és mtsai., 1998) mellette méretarányként egy riboszóma látható

Elektronmikroszkópos felvételeken a 26S proteaszóma elnyúlt szerkezetnek tűnik, amely kb. 45 nm hosszú. Ez egy központi 20S magrészecskéből áll (3.3. ábra), amelyet egyik vagy mindkét végéről a 19S részecske borít (3.4. ábra).



3.3. ábra Izolált 20S proteaszóma (magrészecske) negatív kontraszttal készült elektronmikroszkópos képe



3.4. ábra Izolált 26S proteaszóma (20S mag- és két 19S szabályozó részecske) negatív kontraszttal készült elektronmikroszkópos képe

Ezek a 19S „sapkák” vagy szabályozó részecskék, melyek emlősökben körülbelül 700 kDa molekulatömegűek (ezért PA700-nak [proteaszóma aktivátor 700 kDa molekulatömeggel] is hívják őket), szolgálják az ubiquitinilált

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fehérjék felismerését, és ezeket a fehérjéket a 20S magrészecske számára lebontható formába hozzák. A 20S magrészecskéhez kötődve a két 19S „sapka” ellentétes oldalra néz a 20S magrészecske középpontos szimmetriájára utalva. Érdekes, hogy egyszerre léteznek csak egyik vagy mindkét végükön „sapkát” viselő 20S magrészecskék. Igazából nem indokolja semmi a szimmetrikus komplexum szükségességét, sőt az aszimmetrikus felépítés jobban illik a működés folyamatához a szubsztrát felvételét és a termék leadását tekintve.

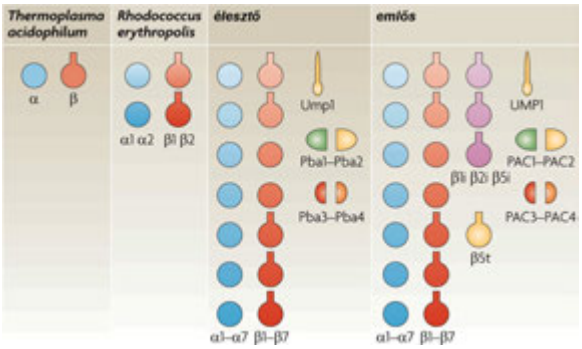
A 20S proteaszóma szerkezete

- 28 alegység
- prokarióta: 7-tagú homo-oligomer [$\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$]
- eukarióta: 7-tagú hetero-oligomer [(α1-α7)(β1-β7)(β1-β7)(α1-α7)]

A 20S proteaszóma evolúciója

Az 1970-es években felfedezték, hogy a proteaszómák nemcsak az eukarióta sejtekben fordulnak elő. Felépítésében egyszerűbb, de szerkezetében megdöbbentően hasonló fehérjebontó komplexumot találtak az archebaktériumokhoz tartozó *Termoplasma acidophilum*-ban, mely később kulcsszerepet kapott a proteaszóma szerkezetének és enzimatikus mechanizmusának megvilágításában. Normál életkörülmények között a proteaszómák vagy proteaszóma-szerű komplexumok nem létfontosságúak a baktériumokban. A *Mycobacterium smegmatis* sejtek, melyekben törölték a proteaszóma géneket, életképesek és külsőre megkülönböztethetetlenek a vad típusú sejtektől. Ez jól egybeesik azzal a megfigyeléssel, hogy néhány, a közelmúltban meghatározott baktérium genomban nem találtak proteaszóma szerű géneket. Az eukarióta élesztőben egészen más a helyzet, itt a 14 proteaszóma génből bármelyik sérülése az egyed pusztulásával jár (letális).

A legtöbb Archaea és Actinobacteria egyféle α- és egyféle β-típusú alegységgel rendelkezik, de az összetétel változatos lehet: egyféle α- és kétféle β-típus, kétféle α- és egyféle β-típus, valamint kétféle α- és kétféle β-típus. Azokban a fajokban, ahol kétféle β-típusú alegységet szintetizálnak, egyesekről feltételezik, hogy az egyik közülük inaktív (pl. *Sulfolobus*, *Pyrobaculum, Rhodococcus,* és *Aeropyrum sp*., 3.5. ábra).



3.5. ábra A 20S proteaszóma alegység-összetételének evolúciója

A prokariótákban tapasztalható sokféleséggel ellentétben, minden eukarióta 20S proteaszóma hét különböző α- és hét különböző β-típusú alegységből áll. A hétféle β-alegységből csak három, a β1, β2 és β5, melynek hidrolitikus aktivitása van. Az egyszerű eukariótáknak, mint az élesztőnek, csak egyfajta hét különböző α- és hét különböző β-típusú alegységből álló 20S proteaszómája van. Sok magasabbrendű eukariótának azonban paralóg génjei vannak. Például az *Arabidopsis thaliana*-ban az α7, β1, β6 és β7 alegységek kivételével mindegyiknek van párhuzamos párja, a *Drosophila melanogaster*-ben pedig a α3, α4, α6, β2, β4 és β5 paralóg gének csak hímekben fejeződnek ki. Ezeknek a megduplázott géneknek egyelőre ismeretlen a feladata (3.5. ábra).

A magasabbrendű gerinceseknél, így az emlősök esetén is a konstitutív katalitikus alegységek, β1, β2 és β5, γ-interferon (IFNγ) hatására β1i, β2i és β5i alegységekre cserélődnek, melyek *immunoproteaszómát* képeznek. Az immunoproteaszómának, melynek magasabb a tripszin-szerű és a kimotripszin-szerű aktivitása, mint a normális proteaszómának, fontos szerepe van a peptid antigének darabolásában, hogy alkalmasak legyenek az I-es fő hisztokompatibilitási komplexumon (MHC class I) való bemutatáshoz. A csecsemőmirigyben (thymus) egy másik

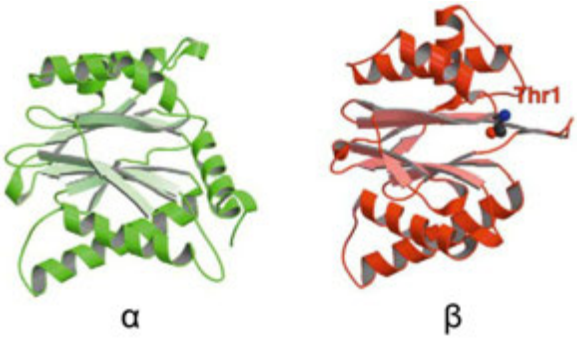
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

katalitikus alegység, a β5t, épül be a 20S proteaszómákba a β5 vagy β5i helyett, a β1i és β2i-vel együtt. Ezt a thymus-specifikus proteaszómát *thymoproteaszómának* nevezik és az MHC class I korlátozott T-sejtek pozitív szelekciójában van alapvető szerepe, ami megnöveli a hasznos T-sejt készletet (3.5. ábra).

Az eukariótáknak vannak a proteaszómák összeszerelését segítő speciális külső chaperon fehérjéik. Ezek az Ump1 vagy UMP1 (ubiquitin-mediated proteolysis 1) és a Pba1-4 (proteasome biogenesis-associated 1-4) vagy PAC1-4 (proteasome assembling chaperone 1-4). A chaperon fehérjék kialakulását az alegység összetétel bonyolultabbá válása indokolja (Murata és mtsai., 2009).

A 20S proteaszóma molekuláris szerkezete

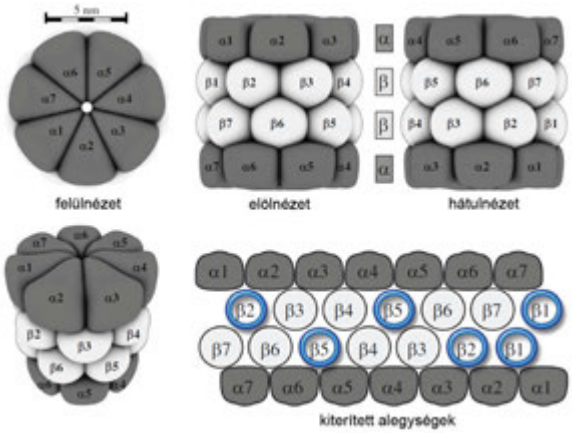
A 20S proteaszóma alapfelépítése megegyezik az archebaktériumoktól az eukariótákig, de eltérő alegység-összetételű. Az archebaktériumok proteaszómája két rokon, de mégis különböző alegység (α és β) 14-14 példányából áll (3.6. ábra).



3.6. ábra A *Thermoplasma acidophilum* 20S proteaszóma katalitikusan inaktív α (zöld) és aktív β (piros) alegységének térszerkezete. Jól látszik a két alegység nagyfokú homológiája. A β-alegység aktív proteolitikus centruma, az esszenciális nukleofil treonin, meg van jelölve (Thr1).

A fő különbség az α és β típusú alegységek között az, hogy az α típusú alegységeknek van egy erősen konzervált kiterjesztésük az aminoterminálisukon, melynek egy része (a 20-30. aminosavig) α-hélixet alkot a központi β-réteg tetején. Az N-terminális kiterjesztés szerepe nem ismert, de az α alegységekből álló gyűrűkön való elhelyezkedése közel az előkamrák bejáratához azt mutatja, hogy fontos lehet a szubsztrát továbbításában vagy a proteaszóma és a szabályozó alegységek közti kapcsolatban. Ehelyett az N-terminális kiterjesztés helyett a β típusú alegységeknek különböző hosszúságú előszekvenciái vannak, melyek a proteaszóma összeszerelődése során lehasadnak, szabadon elérhetővé téve a β-rétegek közötti hasadékot a központi üreg felől (Groll és Clausen, 2003).

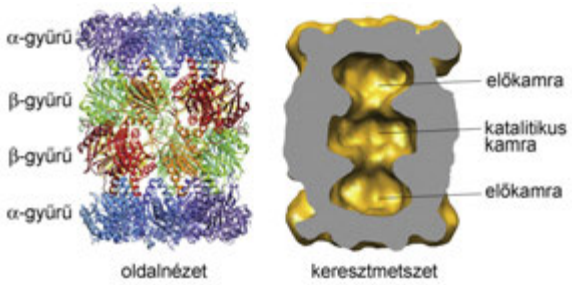
Az eukarióta proteaszóma bonyolultabb, ez 14 különböző alegység két-két másolatából szerelődik össze, melyek aminosav sorrendbeli hasonlóságuk alapján α és β típusú csoportba oszthatók (Jung és mtsai., 2009). Az alegységek négy héttagú gyűrűbe rendeződnek, úgy hogy az α típusú alegységek alkotják a két külső gyűrűt és a β típusúak a két belsőt (3.7. ábra).



3.7. ábra Az eukarióta 20S proteaszóma modellje. A kékkel bekarikázott β alegységek enzimatikusan aktívak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Együtt egy henger alakú komplexumot hoznak létre, mely 150 Å hosszú és 115 Å széles, és három belső üreget zár közre; ezek kb. 5 nm átmérőjűek és négy keskeny befűződés határolja őket. A központi katalitikus üreget a két egymás melletti β gyűrű, míg a két külső üreget (előkamrát) egy α és egy β gyűrű közösen alkotja (3.8. ábra) (Pickart és Cohen, 2004).



3.8. ábra A 20S magrészecske felépítése. Baloldalon az élesztő 20S proteaszómájának szalag modellje látható (PDB accession code: 1RYP) az α- és β-gyűrűk feltüntetésével. Jobb oldalt az élesztő 20S proteaszóma metszete látszik, az atomi koordinátákból számolva 20 Å-os szűréssel. A félbevágott térkitöltő modellen előtűnik a két előkamra és a központi katalitikus kamra.

A lebontandó polipeptideknek belső üregek és szűkületek rendszerén kell átküzdeniük magukat, míg elérik az aktív centrumokat a központi üregben, a bejárati nyílástól legalább 8-10 nm-re, a β gyűrű közepén. A szubsztrát továbbítás mechanizmusa nem ismert, mint ahogyan a két előkamra pontos szerepe sem. Könnyen elképzelhető, hogy ha a 20S proteaszóma a szabályozó komplexumával kapcsolódik, mely ATP függő módon legombolyítja a szubsztrát fehérjéket, a legombolyítás és a polipeptid továbbítás egymással kapcsolt folyamatok és a legombolyított peptidláncot az alegységek „benyomják" a 20S magrészecskébe. Ha in vitro csak legombolyított polipeptidet adunk a 20S proteaszómának, akkor az képes lebontani, tehát a transzlokáció nem szigorúan energiafüggő. A proteaszóma belsejének szerkezeti sajátságai minden bizonnyal befolyásolják a polipeptidlánc véletlenszerű mozgását az aktív centrum hasadékai felé. Az 59 nm^3 térfogatú előkamrákban az áthaladó polipeptid legombolyodott formában marad. Lehetséges, hogy a szűkületek, melyek elválasztják az áthaladó polipeptid elejét a végétől, az újra felgombolyodást hivatottak megelőzni.

A központi kamra, mely kevésbé hidrofób, mint az előkamrák, kb. 84 nm^3 térfogatú. Ez elméletben lehetővé teszi, hogy egy kb. 70 kDa tömegű felgombolyodott fehérje elférjen benne. A lazán csomagolódott, legombolyodott fehérjék sokkal több helyet igényelnek. Mivel a polipeptidek csak egymás után léphetnek be az üregbe, a központi kamrában rendszerint nem lehet egyszerre egynél több polipeptid. A szerkezeti alapot a proteaszóma lebontó működéséhez a szubsztrát bezárása jelenti ebbe a 6-14 aktív centrumot tartalmazó kamrába. Előbb egy polipeptid lebontását teljesen befejezi, mielőtt megkezdene egy másikat (Cheng, 2009).

Az auto-kompartmentalizáció

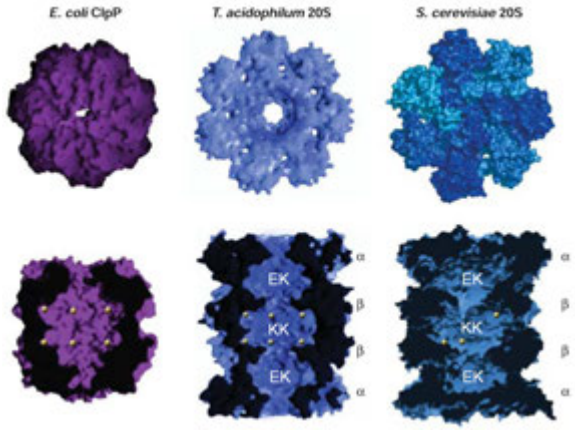
A bevezetőben leírt fontossága mellett a fehérje bontás veszélyt is jelent, ezért térben és időben szabályozottnak kell lennie, hogy a le nem bontandó fehérjék degradációja megelőzhető legyen. A fehérjebontás szabályozásának egyik alapvető stratégiája a *kompartmentalizáció*, azaz a fehérjebontó tevékenység olyan helyekre történő korlátozása, melyekre csak valamilyen lebontási jellel rendelkező fehérjék juthatnak be. Ilyen kompartment lehet egy membránnal határolt sejtszervecske, mint például a lizoszóma, mely a lebontandó fehérjéket specifikus útvonalakon importálja. A feladatot végrehajtó hidrolázok is más fehérjéktől elválasztva, transzport vezikulumok útján jutnak a lizoszómába.

A prokarióta sejtek, melyeknek sem membrán határolt sejtszervecskéik, sem vezikuláris transzportrendszerük nincs, a kompartmentalizáció eltérő formáját alakították ki, nevezetesen az ön- vagy *auto-kompartmentalizációt*. Ez az alapelv jól működik több, egymástól független proteáznál, amelyek mind hasonló felépítésűek, s melyekben a fehérjebontó alegységek maguktól henger alakú komplexummá állnak össze. Ez belső üregeket zár közre, melyek több nanométer átmérőjűek, és az aktív centrumot foglalják magukba. Ezekbe a belső kompartmentekbe szigorúan csak fel nem gombolyodott polipeptidek kerülhetnek be, melyek át tudnak jutni a bejáratot őrző keskeny lyukakon vagy csatornákon. A célfehérjéknek tehát kapcsolatba kell lépnie egy „gépezettel", mely képes azokat megkötni és letekert formában a proteolitikus magkomplexumba juttatni. Ez a kapcsolat lehet átmeneti vagy folytonos természetű. Mivel a fehérjék fel- és legombolyodási mechanizmusa igen közel áll egymáshoz, feltételezik, de nem bizonyított, hogy ezt a feladatot olyan ATPáz komplexumok végzik, melyek némileg hasonlítanak a chaperoninokra

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

(ejtsd: saperonin; a hősokk fehérjék egy családja, melyek tagjainak belsejében más fehérjék legombolyodása történik) és ezért „reverz chaperonoknak” vagy „unfoldase-oknak” hívják őket. Mivel a működésükhöz ATP hidrolízise szükséges, a fehérje degradáció energiaigényes folyamattá válik, noha a polipeptidlánc hidrolízise maga energia felszabadulással járó (exoterm) folyamat.

Az auto-kompartmentalizációs proteázok általánosan előfordulnak mind a három fő életformában: archebaktériumokban (Archea), prokariótákban (Bacteria) és eukariótákban (Eukarya) (Pickart és Cohen, 2004). Valójában a sejtszervecskékkel, mint pl. a lizoszóma, ellentétben az auto-kompartmentalizációs molekuláris szerkezetek sokkal nagyobb rugalmasságot tesznek lehetővé: a megfelelő lokalizációs jelekkel felszerelve a sejten belül különféle helyeken alkalmazhatók a citoplazmában vagy a sejtmagban, ahol működésükre éppen szükség van (3.9. ábra).



3.9. ábra Az auto-kompartmentalizációs proteázok galériája: az *E.coli* ATP-függő kimotripszin-szerű aktivitással rendelkező proteázának (ClpP - caseinolytic peptidase), *T. acidophilum* 20S proteaszómájának és az élesztő 20S proteaszómájának felülnézete és hosszmetszete. A sárga pöttyök az proteolitikusan aktív alegységeket jelölik. Az elmetszett felület fekete. EK, előkamra; KK, katalitikus kamra

Katalitikus alegységek

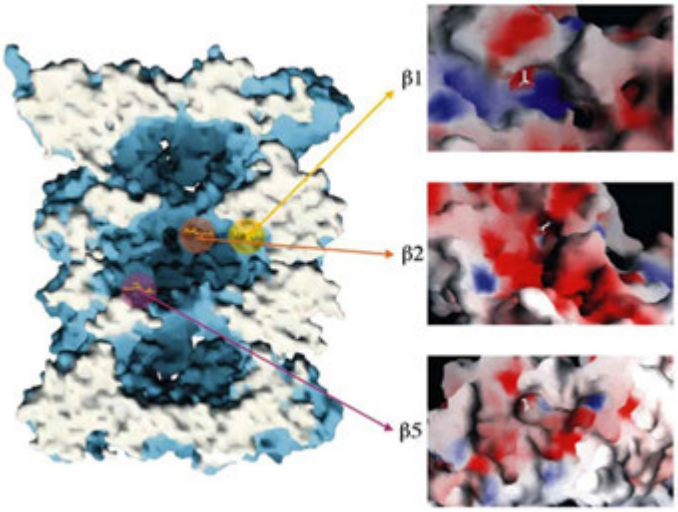
- β1 – post-glutamyl-peptidyl hydrolytic-like activity, kaszpáz-szerű aktivitás (Asp, Glu után)
- β2 – tripszin-szerű aktivitás (Arg, Lys után)
- β5 – kimotripszin-szerű aktivitás (Tyr, Phe után)
- katalitikus nukleofil N-terminális treonin
- a β7, β3 és β6 alegységek sorban az aktív zsebeket képzik
- a β4 szerepe ismeretlen

Bár térszerkezetét kezdetben egyedülállónak gondolták, a későbbiekben kiderült, hogy a proteaszóma egy új fehérjecsalád, az úgynevezett Ntn (N-terminális nukleofil) hidrolázok alaptípusa. Az Ntn-hidrolázok közös vonása az „egyetlen oldallánc” aktív centrum, mely a proszekvencia autokatalitikus lehasításával válik szabaddá. Nagy meglepetés volt, amikor a *Thermoplasma* proteaszóma β alegységének N-terminális treoninját katalitikus nukleofilként is és elsődleges proton akceptorként is sikerült azonosítani, mivel mindaddig a proteaszómát, mint szokatlan fajta szerin proteázt tartották számon.

Hogyan képes a proteaszóma szinte bármilyen fehérjét rövid peptidekre bontani? Mint korábbi elnevezése, a multikatalitikus proteáz is mutatja, ez a komplexum többféle enzimaktivitással is bír. Ezeket rövid ún. fluorogén peptid szubsztrátokkal határozták meg, melyek hasításakor ultraibolya fénnyel gerjeszthető termék keletkezik. A termék által visszasugárzott fény nagy érzékenységgel detektálható, így nagyon kis mennyiségű termék is már mérhető. Az eukarióta proteaszómáknak három fő peptidáz aktivitásuk van: kimotripszin-szerű aktivitás, mely hidrofób; tripszin-szerű aktivitás, mely bázikus; és peptidil-glutamil peptid hidrolizáló vagy kaszpáz-szerű aktivitás,

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

mely savas oldalláncú aminosavak után hasít (3.10. ábra). Emlős proteaszómákban két további specificitás jellemző: elágazó oldalláncú, illetve kis, semleges aminosavak utáni hasítás. A *Thermoplasma* és a *Rhodococcus* baktériumok proteaszómáinak csak kimotripszin-szerű aktivitása van, megegyezően azzal a ténnyel, hogy ezekben csak egy fajta aktív centrum található (Groll és Huber, 2004).



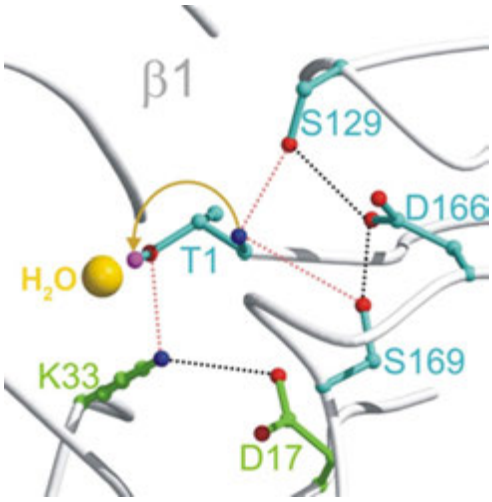
3.10. ábra A 20S proteaszóma hosszmetszete és katalitikus alegységeinek aktív centrumai. Az eredeti felszínek világoskékkel, a metszéslap fehérrel jelölt. A sárga pálcika modellek a kristályosítás során jelen levő calpain inhibitort, egyben a fél komplexum három aktív centrumát mutatják. A hasítási preferenciák: β1 alegység - kaszpáz-szerű aktivitás, β2 alegység - tripszin-szerű aktivitás, β5 alegység - kimotripszin-szerű aktivitás. A kinagyított részleteken pálcika modellként fel van tüntetve a nukleofil treonin oldallánc. A szubsztrát kötő zseb felszínének színezése: kék - bázikus, piros - savas, fehér - hidrofób oldalláncok.

Meglepő megfigyelés, hogy a szubsztrátok meglehetősen aspecifikus hasítása ellenére a keletkező termékek igen szűk mérettartományba esnek; átlagosan 7-9 aminosav hosszúak. Ez a tulajdonság, amely általánosan jellemző a prokarióta és eukarióta proteaszómákra, arra a feltételezésre vezetett, hogy egy belső „molekuláris mérce" határozza meg a termék hosszát. Az elképzelés szerint az egyszerre működő aktív centrumok közötti távolság adhat fizikai alapot egy ilyen mércéhez. A *Thermoplasma* proteaszóma kristályszerkezetében a szomszédos aktív centrumok között 2,8 nm-es távolság mutatkozik, ami kinyújtott konformációban hepta- vagy oktapeptidnek felel meg, vagyis úgy tekinthető, hogy bizonyítékot szolgáltat a molekuláris mérce elméletre. Másfelől viszont a termékek hosszának legutóbbi, még pontosabb analízise, bár az átlagos hosszban megegyezett, nagyobb méretbeli variációt mutatott, amit nehéz lenne pusztán geometriai alapon álló mércével magyarázni.

A fehérjebontó aktív centrum működése

A 3.11. ábrán az élesztő 20S proteaszóma β1-alegységének fehérjebontó aktív centrumának részletes szerkezete látszik (Groll és Clausen, 2003).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



3.11. ábra Az élesztő 20S proteaszóma β1-alegységének fehérjebontó aktív centruma

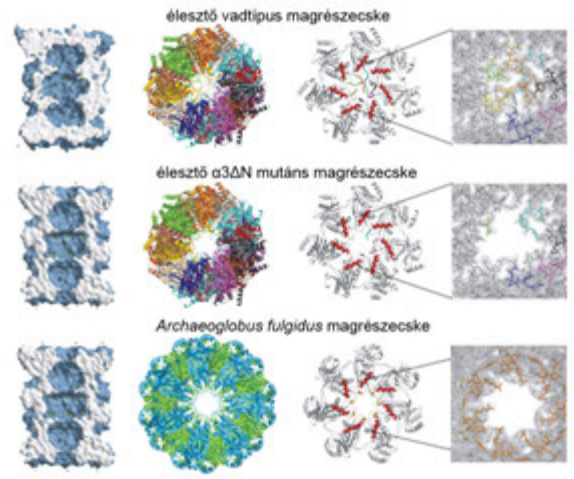
A polipeptidlánc gerince fehér hullámos vonalként van ábrázolva, ebből nyúlik ki az aktív centrum oldalláncainak (Thr1, Asp17, Lys33, Ser129, Asp166 és Ser169) pálcika modellje. Az Asp17-tel alkotott sókötés miatt a Lys33 pozitív töltésű, így elektrosztatikusan csökkenti a Thr1 hidroxil-csoportjának disszociációs állandóját (pKa). Az aktív centrumba nyúló további oldalláncok (Ser129, Asp166 és Ser169) a Thr1 térszerkezeti helyét határozzák meg. A sárga gömbbel jelölt vízmolekula pontosan úgy helyezkedik el, hogy a proteolízis idején protonokat tudjon közvetíteni a terminális amino-csoport és a Thr1 OH-csoportja között (sárga nyíl).

Az α-alegységek által működtetett kapumechanizmus

Hogyan kerülhetnek a lebontandó fehérjék a proteaszóma belsejébe? A *Thermoplasma* proteaszóma kristályszerkezetének megismerése feltárta egy csatorna létezését a henger közepén, a hétfogású szimmetriatengely mentén. Közvetlen bizonyítékot arra nézve, hogy ez a csatorna a tényleges bejárat a proteaszómába, az elektronmikroszkópos vizsgálatok adtak. Lefényképeztek egy továbbítás közben beszorult, arany kolloidszemcsével jelölt inzulin β-láncot. A viszonylag nagy (kb. 2 nm-es) aranyszemcse megakadályozta a molekulát, hogy a csatornán át az előkamrába csússzon. Az élesztő proteaszómában ezt a csatornát elzárják az α alegységek N-terminális oldalláncai, melyek a *Thermoplasma* proteaszómában rendezetlenek. Másrészről viszont az élesztő proteaszóma oldalán kis nyílások vannak az α és β gyűrűk közti határon. Elképzelhető az is, hogy ezek az oldalablakok valók a szubsztrát felvételére. Azonban nem túl valószínű, hogy ennyire konzervatív struktúrák gyökeresen eltérő utakat használjanak a transzlokációra. Az oldalablakok amúgyis meglehetősen rossz helyen lennének a szubsztrát felvételére, amikor a proteaszóma mag a szabályozó komplexummal kapcsolódik. Sokkal valószínűbb tehát, hogy az eukarióta proteaszómák is a központi csatornát használják, mely közben konformációs változásokon megy keresztül. Mivel az oldalablakok nem látszanak alkalmasnak a szubsztrát belépésére, lehetséges, hogy inkább a lebontási termékek kibocsátásában van szerepük.

Ha összevetjük a prokarióta és eukarióta 20S proteaszóma térszerkezeti ábráit (3.9. ábra, 3.12. ábra), láthatjuk, hogy míg az eukariótáknál az *α-gyűrű mindig zárt,* a prokariótáknál *mindig nyitott*. Az eukarióta proteaszóma α-alegységeinek N-terminális végei hidrogén-hidakkal kapcsolódnak a szomszédos végekhez. Ezzel egy blendeszerű zárórendszert alakítanak ki. Ez a kapu mindaddig zárva van, míg a 20S proteaszóma nem kapcsolódik egy szabályozó részecskéhez (19S vagy 11S). A prokariótáknál hiányzik ez a szabályozott kapumechanizmus. Az eukarióta kapumechnizmus vizsgálatára az α3 alegység N-terminálisáról 9 aminosavat (GSRRYDSRT) kivágtak (α3ΔN). Bár a többi alegység változatlan volt, a 20S proteaszóma α-gyűrűje nyitott maradt (3.12. ábra), mert az egymásra támaszkodó rendszer összeomlott. Az α-gyűrű alegységeinek N-terminális végeiből kialakuló zárórendszer fontosságát bizonyítja, hogy az α-alegységek N-terminális végi szekvenciái evolúciósan meglepően konzervatívak (Groll és mtsai., 2003).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



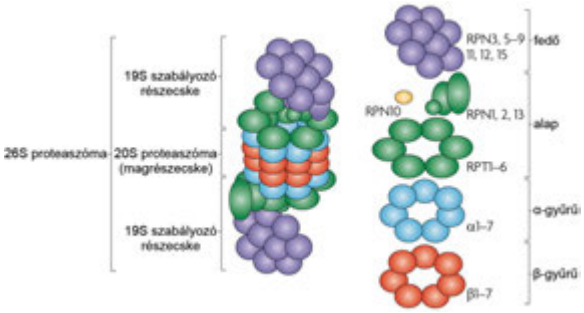
3.12. ábra Az eukarióta (élesztő) és a prokarióta (*A. fulgidus*) 20S proteaszómák α-gyűrűinek összehasonlítása

A szabályozó komplexum

A 19S komplexum

- 19S cap, PA700, 20 polipeptid
- alap + fedő (base + lid)

Mint ezt korábban láttuk, a 26S proteaszóma egy katalitikus magból, a 20S proteaszómából, és két 19S szabályozó részecskéből (RP – regulatory particle, PA700) áll. A 19S szabályozó részecske tovább osztható az alap és a fedő alkomplexumokra, melyek ATPáz aktivitást mutató (RPT - regulatory particle triple-A) és nem mutató (RPN - regulatory particle non-ATPase) alegységekből épülnek fel (3.13. ábra).



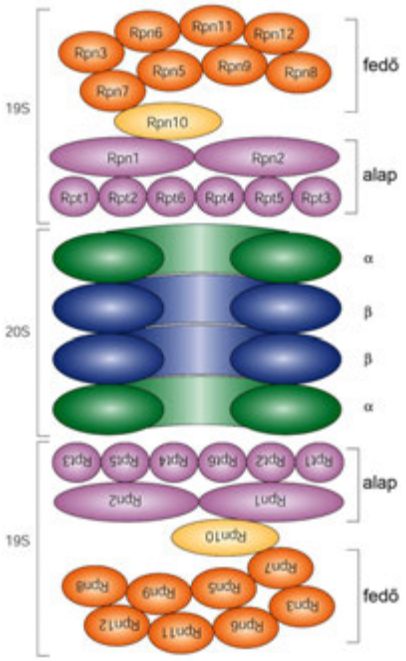
3.13. ábra A 26S proteaszóma felépítése. A 19S szabályozó részecskében vannak ATPáz aktivitású (RPT - regulatory particle triple-A) és nem ATPáz (RPN - regulatory particle non-ATPase) alegységek. Az RPN10 alegység sárga színű, mert az alap és a fedő határán kapcsoló szerepet tölt be.

Az utóbbi években sokat haladt előre a 19S komplexum összetevőinek meghatározása. Jelenleg, a homológokat nem számítva, 15 különböző alegységet írtak le DNS bázissorrendjük alapján, és legalább további hármat azonosítottak SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel. Hat alegység ATPáz aktivitást mutat és az AAA-ATPáz család tagja (AAA = ATPases associated with a variety of cellular activities, egy sereg sejten belüli tevékenységhez kapcsolódó ATPázok családja), melyben a proteaszóma ATPázok egy különálló ágat képeznek (RPT - regulatory particle triple-A). A 19S „sapka” ATPázok különleges ismertetőjegye, egy előre jelezhető kétszeresen feltekeredett szakasz az N-terminális közelében. Az ATPázok pontos szerepének meghatározása, amely minden valószínűség szerint a fehérje degradáció energiafüggő lépése lehet, még várat magára. Ebbe tartozhat a célfehérjék felismerése, megkötésük és legombolyításuk, továbbításuk a 20S magrészecske belső üregeibe, és/vagy a csatorna nyitása és zárása (Murata és mtsai., 2009).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A magkomplexum a szabályozó részecske megkötésével létrehozza a proteaszóma holoenzimet, és így aktiválódik a fehérjebontásra. A szabályozó részecske a magrészecske csatornájának a külső végéhez kötődik, ami arra utal, hogy a szabályozó részecske indítja meg a szubsztrát bekerülését a magba. A *Thermoplasma acidophilum*-ban a magba vezető csatorna csak 13 Å átmérőjű, így a továbbítódás a szubsztrát előzetes legombolyítását kívánja meg, melyet valószínűleg maga a szabályozó részecske végez. Ezek az adatok a szabad multiubiquitin láncok proteaszómához kötődésének vizsgálatával együtt az mutatják, hogy az ubiquitinilált fehérjék lebontásra való kiválasztását a szabályozó részecske végzi. Míg a szabad magrészecske képes kisebb peptidek hidrolízisére, specifikus aktivitása ezeken a szubsztrátokon kisebb, mint a holoenzimé. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az élesztő magrészecskéjének csatornája a szabad formában zárt állapotban van. Tehát a szabályozó részecske egy másik feladata lehet a mag szubsztrát csatornájának nyitása és zárása.

A szabályozó alegység szokatlanul összetett ATPáz komplexum, nemcsak az ATPázainak sokfélesége miatt, hanem mert benne az ATPázok egy nagyobb, legalább 12 nem-ATPázt tartalmazó részecskébe ágyazódnak be. Kiderült, hogy a szabályozó részecske két további komplexumra tagolódik. Az egyik a szabályozó rész alapja (base), mely mind a hat ATPázt tartalmazza három nem-ATPáz mellett. A többi szabályozó alegység egy különálló komplexumot formál, melyet fedélnek (lid) neveznek és az alaptól kifelé helyezkedik el. Az alap-komplexum egyedül is képes aktiválni a magrészecskét peptidek és nem-ubiquitilált fehérjék lebontására, ami arra utal, hogy képes a magrészecske központi csatornájának nyitására. Az alap és a fedél domének azonban együttesen szükségesek az ubiquitin-fehérje konjugátumok degradációjához (Pickart és Cohen, 2004) (3.14. ábra).



3.14. ábra Az élesztő 19S szabályozó részecskéjének alegység-összetétele. (Rpn - regulatory particle non-ATPase, Rpt - regulatory particle triple-A).

Míg a 20S proteaszóma, az enzimatikusan aktív magrészecske egy adott fajban mindig ugyanaz a komplexum, a 19S szabályozó részecskék alegység összetétele szövetenként más és más lehet. Sőt egyetlen sejten belül is lehetnek eltérő szabályozó alegység-összetételű proteaszómák. Átrendeződhet a szabályozó alegységek összetétele egy adott szövetben vagy sejtben a különböző fejlődési állapotokban is. Így tehát ugyanaz a 20S multikatalitikus proteáz mag a hozzákapcsolódó 19S szabályozó részecske alegységeinek térben és időben változó összetételétől függően más és más fehérjéket bonthat le.

19S „sapka” komplexumokat csak eukarióta sejtekben találtak, ami arra utal, hogy az ATPáz és nem-ATPáz alegységek a proteaszóma-komplexumhoz az evolúció során csak később adódtak hozzá. Sok közülük a proteaszómának az ubiquitin-rendszerhez való kapcsolásához szükséges (ubiquitin kötés vagy lehasítás), mely utóbbi az ubiquitin kapcsoló enzimkészletén keresztül specifikusságot kölcsönöz a proteaszómának. Ennek ellenére ez még nem azt jelenti, hogy a proteaszóma kizárólag az ubiquitin rendszerrel összefüggésben működne. A 19S komplexum legtöbb nem-ATPáz alegységének szerepe még mindig nem ismert. A génjeik elrontásával létrejött

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

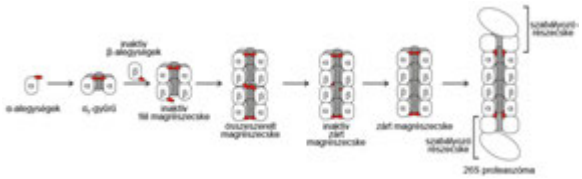
mutánsok nagy száma jól mutatja a proteaszóma részvételét egy sereg sejten belüli folyamatban, de kevés támpontot nyújt biokémiai szerepük feltárásához (Liu és Jacobson, 2013).

A 19S szabályozó részecske összeszerelődésének menete még nagyrészt ismeretlen, de valószínű, hogy az alap és a fedő egymástól függetlenül szerelődnek össze (Murata és mtsai., 2009). Élesztőben a Yin6 és a 90-es hősokk fehérje (heat-shock protein 90 - Hsp90) vesz részt a fedő összeállításában, mely két különböző alcsoportból alakul (3.15. ábra).

3.15. ábra A 19S szabályozó részecske összeszerelődésének modellje az élesztőben

Az Rpn10-es (regulatory particle non-ATPase 10) alegység stabilizálja a kapcsolatot az alap és a fedő között. Az élesztőben az Ecm29 (extracellular matrix 29) fehérje feladata, hogy kipányvázza a 20S magrészecskét az a szabályozó részecskéhez. Emlősökben az úgynevezett modulátor komplexum segíti a szabályozó részecske hozzákapcsolódását a 20S magrészecskéhez.

A 26S proteaszóma összeszerelése a 20S mag- és 19S szabályozó részecskékből csak a részecskék gátolt állapotában lehetséges. A β alegységek túlnyúló N-terminális propeptidei közvetlenül gátolják a fél 20S magrészecskében levő enzimatikus alegységek aktivitását. Az α alegységek túlnyúló N-terminálisainak gátló hatása akkor kerül előtérbe, mikor a magrészecske két fele egyesül és zárt kamrát hoz létre. Az inaktív magrészecske burkoltan aktív formába kerül, melyben a β alegységek már autolízissel aktiválódtak. Az utolsó lépés a holoenzim kialakítása, amellyel egyidőben a központi csatorna is megnyílik (Köhler és mtsai., 2001) (3.16. ábra).

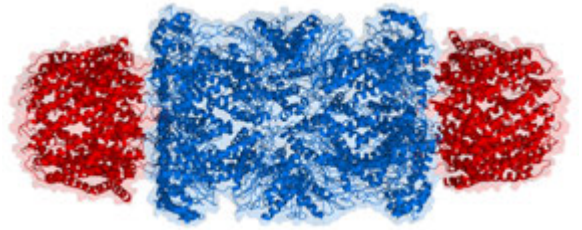


3.16. ábra A 26S proteaszóma összeszerelésének és aktiválódásának összekapcsolt folyamatai – az auto-kompartmentalizáció. Az aktivitást akadályozó túllógó alegységvégek pirossal kiemelve.

A 11S szabályozó részecske

- 11Sα és 11Sβ, 28 kDa alegységekből áll
- γ-interferon indukálja
- az immunoproteaszóma szabályozó részecskéje

A 20S proteaszómának van egy másik aktivátora is, melyet 11S vagy PA28 komplexumnak neveznek. Önmagában nincs enzimaktivitása, de ha 20S proteaszómával kerül össze meggyorsítja annak peptidáz aktivitását méghozzá *ATP független* módon (3.17. ábra).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

3.17. ábra Két 11S szabályozó részecskével (piros) kapcsolódó 20S proteaszóma (kék)

Érdekes, hogy nincs hatással fehérjék illetve ubiquitinilált fehérjék lebontására. Mivel a szabad peptidek rövid életidejűek, ennek következtében ritkán fordulnak elő a sejtben eleinte nem volt világos, hogy mi a 11S részecske feladata. További érdekesség, hogy a komplexum csak magasabbrendű eukariótákban található meg, ami inkább speciális szerepére utal, mintsem alapvető funkciót feltételez. A legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a proteaszóma antigén feldolgozó feladatában vehet részt. Az egyik érv, ami ez utóbbi mellett szól, hogy a γ-interferon nevű citokin hatására erősen megnő a 11S/PA28 szintézise. Mint ezt korábban láttuk, a γ-interferon hasonlóképpen serkenti a 20S proteaszóma három alternatív β-alegységének (β1i vagy LMP2, β2i vagy LMP7 és β5i vagy MECL-1) a termelődését is. Ezek helyettesítik a közönséges β-alegységeket az úgynevezett immunoproteaszómában. Ez a proteaszóma típus darabolja fel az idegen fehérjéket az MHC I komplexumon történő bemutatásra az immunrendszer antigén prezentáló sejtjeinek felszínén. Bár a 11S/PA28 szerepe így már megalapozottnak látszik, továbbra sem ismert a mechanizmus, mellyel a 20S proteaszóma aktivitását modulálja (Pickart és Cohen, 2004).

Ma már bizonyított, hogy a proteaszómának jelentős szerepe van a sejtfelszíni MHC I fehérjéken bemutatandó immunokompetens peptidek előállításában. Nyilvánvalóan a proteaszóma evolúciója megelőzte az immunrendszer evolúcióját és így a 7 és 9 tag közötti peptidek elérhetősége alapvető hatást gyakorolt az MHC I rendszer kialakulására. Cserébe a proteaszóma is válaszolt az immunrendszer specifikus peptid igényére azzal, hogy egyes β-típusú alegységeinek olyan variánsai alakultak ki, melyek γ-interferon indukció hatására helyettesíthetik a 20S magrészecskében állandóan jelenlevő megfelelőjüket, ezzel lehetővé téve a specificitás további módosítását.

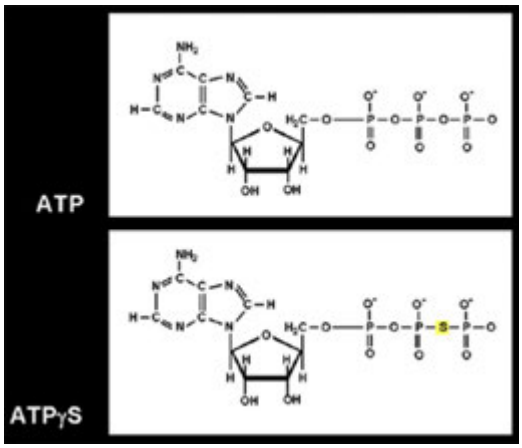
Az ATP sokrétű szerepe a proteaszóma fehérjebontásában

A szabályozó részecske alap részében elhelyezkedő hat ATPáz alegység alapján feltételezhető, hogy a proteaszóma működése ATP igényes. Valóban a proteaszóma összeszerelődésétől a szubsztrát hidrolízisig több lépéshez is kell ATP. Ezek a következők:

- a szabályozó részecske 20S magrészecskéhez kapcsolása
- a szubsztrát megkötése
- a 20S magrészecske kapu kinyitása
- a szubsztrát kitekerése
- a transzlokáció elősegítése

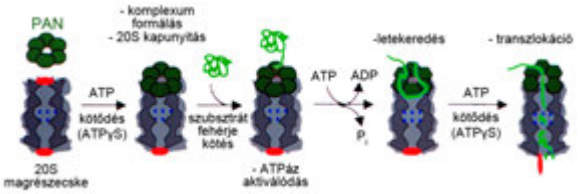
Annak eldöntésére, hogy ezek közül melyik lépéshez kell energia és melyekhez elég csak a nukleotid kötés egy egyszerűsített kísérleti rendszert állítottak fel. Az eukarióta 20S proteaszómát a *Methanococcus jannaschii*-ból származó PAN (proteasome-activating nucleotidase) komplexummal hozták össze, mely a 19S szabályozó részecske ősbakteriális homológja. Alegységeinek aminosav sorrendje 46%-ban hasonló a 19S ATPázaihoz. A PAN kötődése a 20S proteaszómához már lehetővé tette annak fehérjebontó működését, de nem igényelte a szubsztráton a multiubiquitinlánc jelenlétét. A csak nukleotid kötést igénylő lépések megtalálásához ATPγS-t, egy ATP analógot használtak. Térszerkezetében megegyezik az ATP-vel, de az ATPázok nem tudják hidrolizálni, azaz az energiát igénylő lépések nem mennek végbe, ha ATP helyett ez van jelen (3.18. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



3.18. ábra Az ATPγS hasznos eszköz az ATP igényes reakciólépések leleplezésére

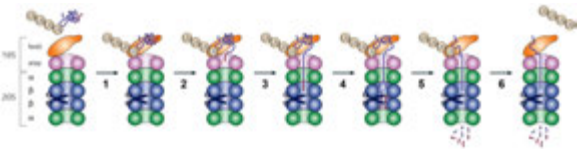
A kísérlet során megállapították, hogy az ATP kötődése a PAN-hoz elősegíti a 20S proteaszómához kapcsolódását és a 20S magrészecske kapu kinyitását (3.19. ábra). A szubsztrátot megköti a PAN ATP-t kötő formája, ez az ATP hidrolízisét stimulálja. A szubsztrát kihajtogatása az egyedüli lépés, ami valóban az ATP hidrolízisát igényli. A PAN ATP-t kötő formája elősegíti a kihajtogatott fehérje továbbjutását. A 20S proteaszóma felépítése és az aktív centrumok nukleofil támadása a szubsztráton valószínűleg lelassítja a kijutást, így a betöltés sebességének szabályozása eredményezi a rövid peptidekre történő lebontást (Smith és mtsai., 2005) (3.19. ábra).



3.19. ábra Az ATP-függő lépések a fehérje degradáció során. A 20S proteaszóma hosszmetszetének és a hozzákapcsolódó PAN komplexumnak az ábráján láthatók a szubsztrát bontás egyes lépései. Az α alegységek kapuzáró, túlnyúló N-terminálisai pirossal jelöltek.

Összefoglalva, az ATP kötődése önmagában képes aktiválni a proteaszóma működésének különböző kulcslépéseit, beleértve a komplexum kialakítást, a szubsztrát kötést, a kapunyitást és a kihajtogatott szubsztrát transzlokációját a 20S proteaszóma belsejébe. Az ATP tényleges hidrolízise csak a szubsztrát kihajtogatásához szükséges (Zhang és mtsai., 2009).

Megtalálták a 19S alegységek szerepét is a folyamatban, így a 26S proteaszóma szubsztrát proteolízisének lépései a következők (3.20. ábra):



3.20. ábra A 26S proteaszóma szubsztrát bontásának lépései

1. A szabályozó részecske alapjában lévő *Rpt5* (és valószínűleg más) ATPáz alegység felismeri a szubsztráthoz kapcsolt multiubiquitin láncot.

2. Az alap egy vagy több ATPáz alegysége „fogást keres” a szubsztrát fehérjén. Erre alkalmas lehet egy lazábban feltekert régió (piros), mely a szubsztrát továbbításának kiindulópontjául szolgálhat. A szubsztrát továbbítását az alapon lévő lyukon keresztül ATP hidrolízise hajtja és a szubsztrát letekeredésével, denaturálásával jár.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

3. A szubsztrát átjut a 20S magrészecske tengelyében levő nyíláson, melynek nyitását az *Rpt2*, az alap ATPáz alegysége szabályozza.

4. A katalitikus alegységek hidrolizálják a szubsztrátot, rövid peptidek keletkeznek.

5. A peptidek a tengelynyíláson át elhagyják a katalitikus kamrát. Az áteresztőképesség maximalizálására a pórust egy másik oldali szabályozó egység nyithatja.

6. Az *Rpn11,* a fedő nem ATPáz alegysége hidrolizálja a multiubiquitin láncot horgonyzó izopeptid kötést, a szabaddá váló láncot nem proteaszomális DUB enzimek bontják ubiquitin alegységekre (Pickart és Cohen, 2004).

Ellenőrző kérdések

1. Rajzoljon le egy 26S proteaszómát és jelölje meg a részeit!

2. Mi az auto-kompartmentalizáció?

3. Hogyan szerelődik össze egy 26S proteaszóma?

4. Milyen szabályozó részecskék kapcsolódhatnak egy 20S magrészecskéhez?

5. Milyen enzimaktivitásai vannak a proteaszómának, mint multikatalitikus proteáznak?

6. Milyen funkciói vannak a szabályozó részecske alegységeinek?

7. Mi az ATP szerepe a proteaszomális fehérjebontásban?

8. Milyen lépései vannak a proteaszomális fehérjebontásnak?

Irodalom

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. és Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell***92**, 367-80.

Burger, A. M. és Seth, A. K. (2004) The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur. J. Cancer* **40**, 2217-2229.

Cheng, Y. (2009) Toward an atomic model of the 26S proteasome. *Curr Opin Struct Biol***19**, 203-8.

Groll, M., Brandstetter, H., Bartunik, H., Bourenkow, G. és Huber, R. (2003) Investigations on the maturation and regulation of archaebacterial proteasomes. *J Mol Biol***327**, 75-83.

Groll, M. és Clausen, T. (2003) Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role. *Curr. Opin. Struct. Biol.***13**, 665-673.

Groll, M. és Huber, R. (2004) Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta***1695**, 33-44.

Jung, T., Catalgol, B. és Grune, T. (2009) The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine***30**, 191-296.

Köhler, A., Bajorek, M., Groll, M., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. és Finley, D. (2001) The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie***83**, 325-32.

Liu, C. W. és Jacobson, A. D. (2013) Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem Sci***38**, 103-10.

Murata, S., Yashiroda, H. és Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol***10**, 104-15.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Pickart, C. M. és Cohen, R. E. (2004) Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***5**, 177-187.

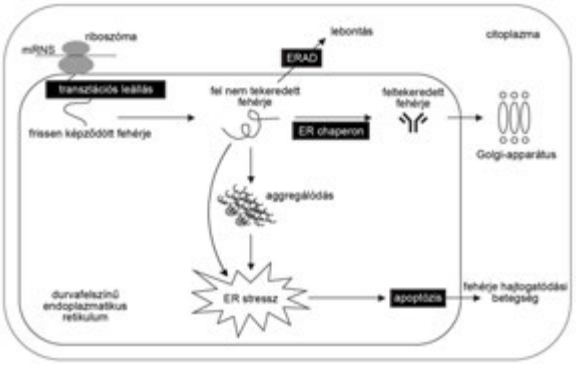
Smith, D. M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T. és Goldberg, A. L. (2005) ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell***20**, 687-98.

Zhang, F., Wu, Z., Zhang, P., Tian, G., Finley, D. és Shi, Y. (2009) Mechanism of substrate unfolding and translocation by the regulatory particle of the proteasome from Methanocaldococcus jannaschii. *Mol Cell* **34**, 485-96.

4. Példák az ubiquitin-proteaszóma rendszer feladataira

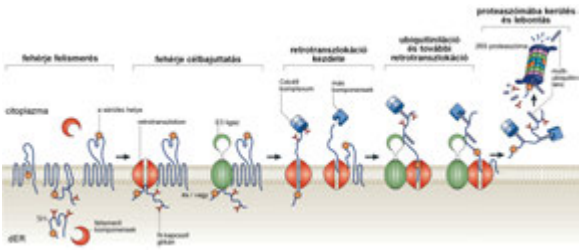
dER minőségellenőrzés

A fel nem tekeredett fehérjék az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenében ER stresszt váltanak ki, melyet a sejt azért indít, hogy uralja a helyzetet (Yoshida, 2007). Az emlős ER stresszválasz négy folyamatból tevődik össze: 1. a fehérjeszintézis megszakítása, 2. ER chaperonok expressziója, 3. felerősödő ER társult lebontás (ERAD - endoplasmic reticulum-associated degradation), 4. apoptózis (4.1. ábra).



4.1. ábra Az emlős ER stresszválasz négy folyamatból tevődik össze: 1. a transzláció megszakítása, 2. ER chaperonok expressziója, 3. felerősödő ERAD, 4. apoptózis.

A négy folyamat közül lássuk most az endoplazmatikus retikulummal társult lebontás (ERAD) lépéseit (4.2. ábra).



4.2. ábra Az ER-hez kötött lebontás (ERAD) lépései

1. *A fehérje felismerése.* A hibásan hajtogatott fehérjéket, melyek citoplazmatikus, intramembrán vagy ER lumenbeli sérüléseket hordoznak citoplazmatikus és intraluminális chaperonok és a hozzájuk kapcsolt faktorok, mint a 70 kDa-os hősokk fehérje (Hsp70) család tagjai, kalnexin és kalretikulin, valamint a fehérje diszulfid izomeráz család tagjai ismerik fel.

2. *A fehérje célba juttatása.* Az endoplazmatikus retikulummal társult lebontás (ERAD) szubsztrátjai a retrotranszlokációs gépezetbe kerülnek (retrotranszlokon) és/vagy E3-as ligázokhoz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

3. *A retrotranszlokáció kezdete.* A szubsztrát kikerülését a citoplazmába részben a Cdc48 (cell-division cycle-48) komplexum indíthatja el. Más résztvevők, mint molekuláris chaperonok vagy a proteaszóma szintén szükségesek lehetnek ehhez a lépéshez. A retrotranszlokációhoz nélkülözhetetlen még a diszulfid hidak redukciója, illetve a szénhidrátláncok eltávolítása a fehérjéről. A Cdc48, egy AAA+ típusú ATPáz, által az ATP hidrolízisével felszabadított energia ugyancsak szükséges a retrotranszlokációhoz.

4. *Ubiquitiniláció és további retrotranszlokáció.* Ahogy a fehérjék kijutnak a retrotranszlokonon keresztül az ER-ből E3-as ligázok multiubiquitinilálják őket. Ez kedvez a további transzlokációnak és citoplazmatikus ubiquitin-kötő komplexumok is segítik.

5. *Proteaszómába kerülés és lebontás.* Amit egy multiubiquitinilált szubsztrát kikerül a citoplazmába, a 26S proteaszóma 19S szabályozó részecskéinek receptorai felismerik. A DUB enzimek eltávolítják a multiubiquitin láncot. A szubsztrát ezek után befűződik a 20S magrészecske katalitikus kamrájába és peptid fragmentumokra bomlik. Az ubiquitin újrafelhasználhatóvá válik egy újabb multiubiquitinilációhoz (Vembar és Brodsky, 2008).

Neurodegeneratív betegségek

A proteaszóma és az idegrendszer

A proteaszómák minden sejtben, így az idegsejtekben is megtalálhatóak. A központi idegrendszerben a többi szervektől eltérő alegység összetételű proteaszómák vannak. Eloszlásuk sem egyenletes, sejttípusonként változó. Az agykérgi piramis sejtekben illetve a gerincvelő mellsőszarvi motoneuronjaiban a proteaszómák 10-15%-a magi és 85-90%-a citoplazmatikus lokalizációjú. A többi idegsejtben a proteaszómák főleg magi elhelyezkedésűek. A különbség okát egyelőre nem ismerjük.

A neurodegeneratív betegségek

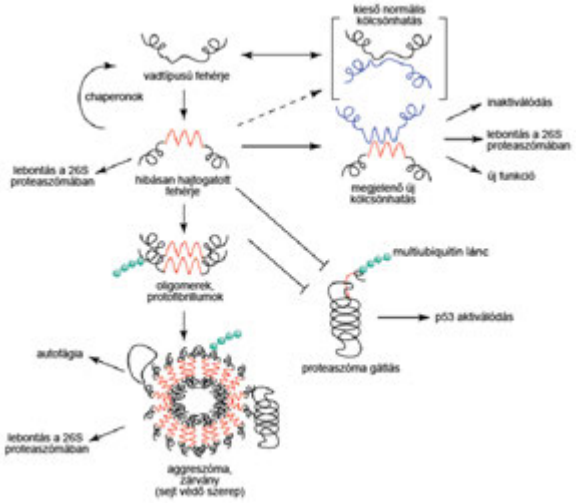
Az idegsejtek pusztulásával járó, úgynevezett neurodegeneratív betegségek oka és kórképe nagyon különböző lehet. Az egyik közös jellemzőjük: az idegsejtek citoplazmájában kisebb-nagyobb ubiquitinilált fehérje zárványok, aggregátumok jelenléte. Ezek megjelenésének oka, hogy a betegség folyamán abnormális vagy mérgező fehérjék keletkeznek, ezek aggregálódnak és így a fehérje bontó apparátus (a proteaszóma és az autolizoszómák) nem képesek lebontani őket. A sokféle neurodegeneratív betegség közül az ubiquitin-proteaszóma rendszer érintettségének bemutatására három példát választottunk ki:

- Alzheimer-kór (AD)
- Parkinson-kór (PD)
- Huntington-kór (HD)

A mérgező fehérje aggregátumok képződésének mechanizmusa neurodegeneratív betegségekben

A betegséggel összefüggő fehérje (pl. szinuklein vagy huntingtin) hibás térszerkezete, hajtogatódása köztes oligomereken keresztül egyre nagyobb aggregátumok kialakulásához vezet (4.3. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

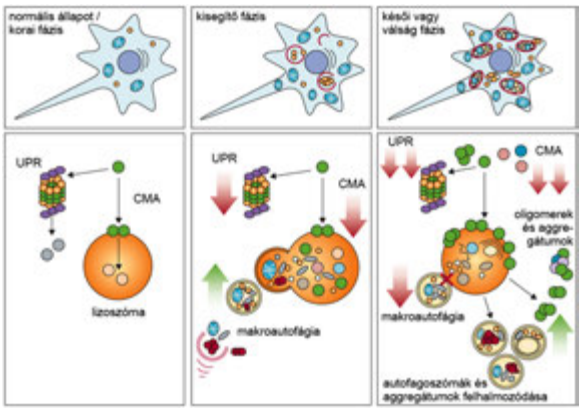


4.3. ábra A hibásan hajtogatott fehérjék sorsa és az ubiquitin-proteaszóma rendszerre gyakorolt hatásuk

A hibásan hajtogatott fehérjét az ubiquitin-proteaszóma rendszer el tudja takarítani mielőtt további rendellenes térszerkezeti változások történnének. Ha ez mégsem sikerül, az elősegíti a néhány fehérjéből összeálló köztes alakok (oligomerek) vagy esetleg a nagyobb fehérje aggregátumok kialakulását, amik már gátolják a proteaszómát és mérgezést okoznak. A fordított modellben az aggregátumok éppen a *túlélést* segíthetik a mérgező oligomerek elkülönítésével és az autofágia vagy esetleg a proteaszóma számára elérhetővé tételével. A proteaszómák bármilyen mechanizmus szerinti gátlása csak a mérgezés fokozódását idézi elő, mivel ilyenkor még az egyéb proteaszóma szubsztrátok is felhalmozódnak. Egy hibásan hajtogatott fehérje új kölcsönhatásokba léphet és ha nem képez összetapadt oligomereket vagy aggregátumokat, akkor funkció vesztéses (domináns negatív) vagy funkció nyeréses hatások is létrejöhetnek (Ross és Pickart, 2004).

A fehérjebontó rendszerek válsága a neurodegeneratív betegségekben

Előfordulhat, hogy egyes kulcsfontosságú idegrendszeri fehérjék térszerkezet megváltozik. A legtöbb oldható, hibás fehérje az ubiquitin-proteaszóma rendszerben (UPR) vagy a chaperon-mediált autofágiával (CMA) bomlik le az egészséges idegsejtben vagy a betegség *korai fázisában* (4.4. ábra).

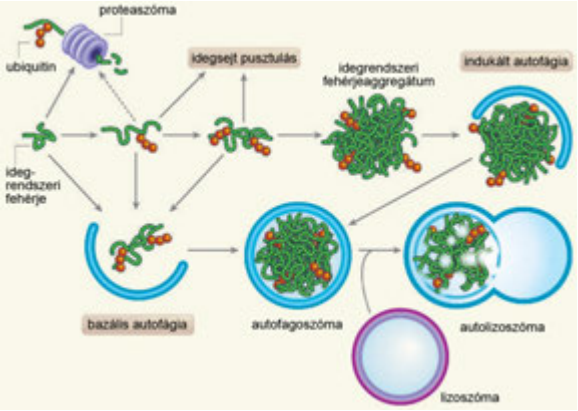


4.4. ábra A fehérjebontó rendszerek (az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az autofágia) fokozatos válsága a neurodegeneráció során (fent a pirossal bekarikázott autolizoszómákban elakadt a fehérje emésztés). Rövidítések: UPR, ubiquitin-proteaszóma rendszer; CMA, chaperon mediált autofágia.

Ezek a fehérjék azonban nem ideális szubsztrátjai a proteaszómáknak, ezért a citoplazmában halmozódnak fel. Néhány megváltozott térszerkezetű fehérje idővel mérgező hatást gyakorol erre a két lebontó rendszerre, ami gátolja a működésüket. Ezen túlmenően, ha a hibás fehérjék összetett struktúrákba rendeződnek (oligomerek vagy fibrillumok) akkor már nem tudnak lebomlani ezekben a rendszerekben. A bazális autofágia alacsonyan tudja

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

tartani ezeknek a hibásan hajtogatott fehérjéknek a szintjét. Ezt követően a *kisegítő fázisban* a makroautofágia indukálódik, így lehetővé válik a nagyobb fehérje aggregátumok lebontása (4.4. és 4.5. ábra).



4.5. ábra A hibás, rosszul hajtogatott idegrendszeri fehérjék lebontásának lehetőségei

A betegségtől függően a kisegítő fázis ideje változhat. A legtöbb esetben ezt a *késői vagy válság fázis* követi, amikor az idegsejt túlélése veszélybe kerül. Ebben a késői fázisban az UPR és CMA tovább blokkolódik, a makroautofágia aktivitása csökken, emiatt a mérgező fehérje képződmények felszaporodnak, és mindezek a sejt működésére negatív hatást gyakorolnak. A nagyméretű fehérje aggregátumok sokszor kevésbé mérgezőek, mert zárványokként elkülönülnek, és nem zavarják a sejt egyéb működéseit (4.4. ábra). Bár nem ismerjük a pontos okait a fehérjebontó rendszerek összeomlásának, a megnövekedett oxidatív stressz és az öregedés gyakran kiváltja ezt a kórképet (Klionsky, 2006; Martinez-Vicente és Cuervo, 2007).

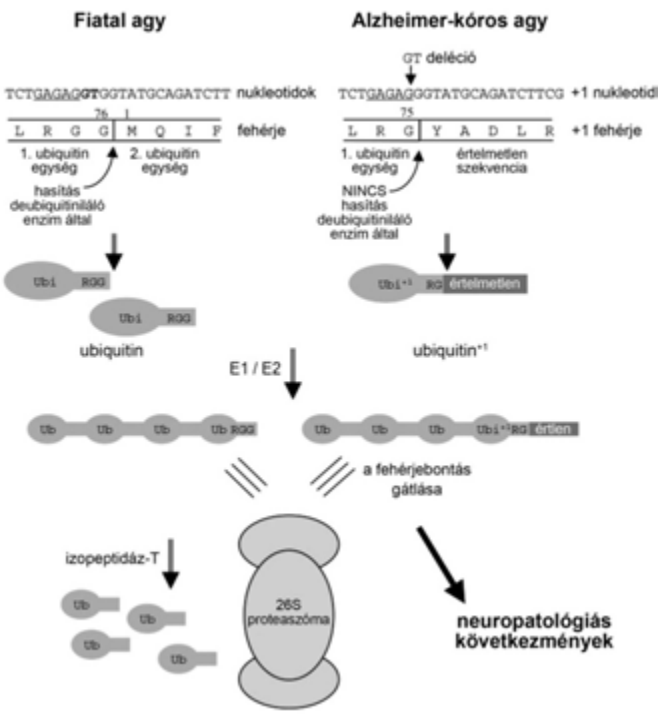
Példák egyes neurodegeneratív betegségek patomechanizmusára

Alzheimer-kór kialakulása hibás ubiquitin miatt

Az Alzheimer-kór (AD - Alzheimer's disease) progresszív, neurodegeneratív betegség. Az időskori elbutulás (demencia) leggyakoribb oka, ami a szellemi képességek súlyos romlásával jár együtt, olyan mértékig, ami a normális napi életvitelt, önellátást is lehetetlenné teszi. Velejárója a súlyos feledékenység, a gyakran látott, közel álló emberek nevének elfelejtése, illetve a mindennapi használati tárgyak megnevezésének képtelensége.

Az öregedő és Alzheimer-kóros agyban a poliubiquitin gén hibás leolvasása egy „+1 frameshift" fehérje kialakulásához vezet, mely 75 aminosavat tartalmaz az ubiquitin szekvenciából hozzákötve egy 20 aminosavas értelmetlen szekvenciához (ubiquitin^{+1}). A deubiquitiniláló enzimek nem tudják eltávolítani az értelmetlen szekvenciát a 75 aminosavas ubiquitinről, mivel az ubiquitin ehhez szükséges 76-os glicinje hiányzik (4.6. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



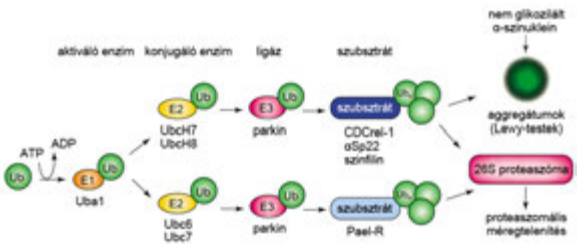
4.6. ábra Az ubiquitin^{+1} kialakulása és hatása Alzheimer-kórban

Az ubiquitin és ubiquitin^{+1} ubiquitinilálása horgony nélküli multiubiquitin láncokat eredményez, amelyek gátolják a proteaszomális fehérjebontást. A C-terminális (proximális) végükön ubiquitint tartalmazó láncokat az izopeptidáz-T deubiquitiniláló enzim gyorsan szétdarabolja. A végükön ubiquitin^{+1}-et tartalmazó láncok azonban rossz szubsztrátjai az izopeptidáz-T-nek és csak lassan szerelődnek szét. A proximális végükön ubiquitin^{+1}-gyel végződő multiubiquitin láncok gátolják az ubiquitin-függő fehérjebontást, ami neuropatológiás következményekhez vezet (Layfield és mtsai., 2001).

Genetikai mutációk és a Parkinson-kór patogenezise

A Parkinson-kór (PD – Parkinson's disease) a substantia nigra pars compacta (SNc) dopaminerg neuronjainak fokozódó pusztulásával, a striatum (STR) dopamin szintjének csökkenésével, és mozgási nehézségekkel (lelassult mozgás (bradykinesia), merevség, és remegés) jellemezhető betegség.

A parkin fehérje az ubiquitin-proteaszóma rendszerben, mint E3 ubiquitin ligáz működik (… ábra). A parkin együttműködik az Uba1 ubiquitin aktiváló (E1) enzimmel és az UbcH7 vagy UbcH8 ubiquitin konjugáló (E2) enzimekkel a CDCrel-1, az αSp22 vagy más néven α-synuclein interacting protein (az α-szinuklein egy szokatlan 22 kDa-os O-glikozilált formája), és a szinfilin-1 célfehérjék ubiquitinilálásában (4.7. ábra).



4.7. ábra A parkin E3-as enzimként működik az ubiquitin-proteaszóma rendszerben. Rövidítések: CDCrel-1, cell division control-related protein 1; Ub_n, multiubiquitin lánc; Pael-R, parkin-associated endothelin-receptor-like receptor.

A parkin elsőnek azonosított szubsztrátja, a *CDCrel-1* (cell division control-related protein 1), más néven septin 5 (Sept5) elsősorban az agyban kifejeződő fehérje, mely főleg a gátló neuronok preszinaptikus axon terminálisában

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

található. A szintaxin 1A fehérje SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) doménjéhez kötődik, ezért membránokhoz, szinaptikus vezikulumokhoz kapcsolódik. Gátolja az exocitózist, mert a vezikulum célba juttatás és fúzió folyamatait szabályozza. A parkin E3 ubiquitin ligáz közvetlen szubsztrátja, a Parkinson-kór autoszomális recesszív formájának egyik kiváltó molekulája.

A szinfilin-1 parkin általi ubiquitinilációja nem glikozilált α-szinuklein jelenlétében ubiquitinilált citoplazmatikus Lewy-test-szerű aggregátumok kialakulásához vezet. Az αSp22 is felszaporodik a Parkinson-kóros betegek agyában öröklött parkin mutációk következtében. Egyelőre nem ismert, hogy a αSp22 is Lewy-testekben rakódna le.

A parkin részt vesz az endoplazmatikus retikulumhoz kötött fehérjebontásban (ERAD) és az Ubc6 és Ubc7 ER kapcsolt E2-es enzimek segítségével mérgező, hibásan hajtogatott fehérjéket bont le, mint a G-protein kapcsolt receptor a Pael-R (parkin-associated endothelin-receptor-like receptor) (4.7. ábra). A Pael-R elsősorban oligodendrocitákban fejeződik ki, de egyes elkülönült neuron alpopulációkban is. A Pael-R hibásan hajtogatott és oldhatatlan formái a dopaminerg neuronok szelektív degradációját okozhatják. A parkin a Pael-R oldhatatlan formáját ubiquitinilálja, elősegítve a degradációját, ami visszaszorítja a hajtogatatlan fehérje indukálta sejthalál kialakulását. A CHIP, a HSP70 ko-chaperonja, fokozhatja a Pael-R parkin közvetítette ubiquitinilációját. A Pael-R felhalmozódik az agyban autoszomális recesszív mutáció okozta Parkinson-kór esetén (AR-PD) és a Pael-R overexpresszió indukálta sejtpusztulás kiküszöbölhető parkinnal (Chung és mtsai., 2001).

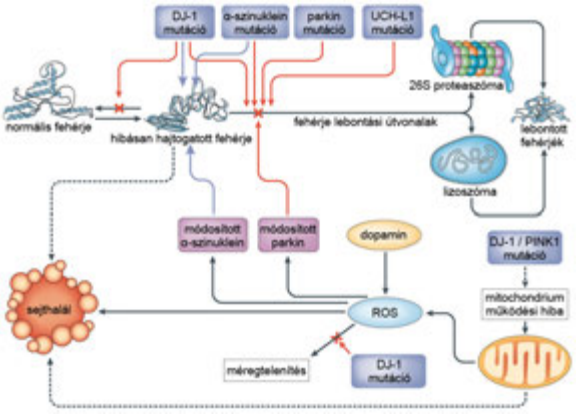
Sokféle genetikai lokusz áll kapcsolatban a Parkinson-kór örökletes, családi formáinak patogenezisével.

- PARK-1 - α-szinuklein, Ala 53 → Thr, Ala 30 → Pro, Glu 46 → Lys (domináns)
- PARK-2 - Parkin E3 (autoszomális recesszív)
  - Szubsztrátjai:
  - CDCrel-1 (cell division control-related protein 1), septin 5 GTPáz, szinaptikus vezikula dopamin felszabadulás
  - Pael-R (parkin-associated endothelin-receptor-like receptor), G-protein kapcsolt transzmembrán receptor, hajtogatási zavar
- PARK-5 - UCH-L1, ubiquitin C-terminális hidroláz, Ile 93 → Met (domináns)
- PARK-7– DJ-1, redox chaperon (autoszomális recesszív)

Az α-szinuklein gén két misszenz mutációja egy ritka, domináns forma kialakulásáért felel. Parkinson-kórhoz vezethet egy domináns mutáció az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCH-L1) génjében. Ezek mellett a parkin gén mutációinak egész sora felelős az autoszomális recesszív juvenilis parkinsonizmus (AR-JP) kialakulásáért. AR-JP-hez kapcsolódó parkin mutánsok nem tudják ubiquitinilálni és lebontani a parkin célfehérjéit, ami arra utal, hogy a fiatalkori Parkinson-kórt (AR-JP) lebontatlan fehérjék felhalmozódása okozza, melyek végül megmérgezik a dopaminerg neuronokat. Érdekes módon a parkin meg is tudja védeni a neuronokat a különböző támadásoktól, ami a parkin központi szerepét mutatja a dopaminerg neuronok belső rendjének fenntartásában. Legutóbb a DJ-1 gén és a Nurr-1 (nuclear receptor and transcription factor) kódoló NR4A2 gén mutációiról derült ki, hogy összefüggésben állnak a családi Parkinson-kórral. A DJ-1 vagy PARK7 a C56 peptidázok családjába tartozik és az androgén receptor-függő transzkripció pozitív szabályozója. Redox-chaperonként is működhet, az oxidatív stressz érzékelőjeként megvédi a neuronokat az oxidatív stressztől és a sejthaláltól.

A 4.8. ábrán nyomon követhető, hogy a fenti mutációk illetve a keletkező hibás térszerkezetű, funkció vesztett fehérjék hatására hogyan pusztulnak el a neuronok.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



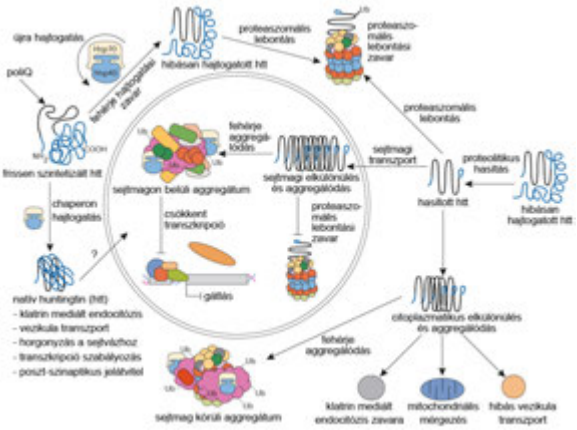
4.8. ábra A mutáns, hibásan hajtogatott fehérjék sejtpusztulást okoznak Parkinson-kórban

A mutáns α-szinuklein és DJ-1 hibásan tekeredik fel, ezért túlterheli az ubiquitin-proteaszóma rendszert és a lizoszomális lebontó rendszert (4.8. ábra, kék nyilak). Más mutáns fehérjék, mint a parkin és az UCH-L1, elvesztik normális funkciójukat, az E3 ligáz aktivitást. Mivel mindkét fehérje az ubiquitin-proteaszóma rendszerhez tartozik, a mutáció hatására sérül az a képességük, hogy felismerjenek és lebontsanak hibásan hajtogatott fehérjéket (4.8. ábra, piros nyilak). A DJ-1 mutációja elrontja feltételezett chaperon aktivitását, megakadályozza a hibásan hajtogatott fehérjék újra hajtogatását, és a sérült fehérjék degradációra irányítását (4.8. ábra, piros nyilak). A különböző fenti változások mind nem kívánt fehérjék felhalmozódásához vezetnek, melyek nem mindenben ismert mechanizmus szerint (4.8. ábra, szaggatott nyilak), neurodegenerációhoz vezethetnek. A hibás mitochondriumok és a dopamin metabolizmus miatt keletkező oxidatív stressz poszttranszlációs modifikációk útján ugyancsak elősegítheti a hibás fehérje hajtogatódást, különösen az α-szinuklein és a parkin esetén. Az oxidatív stressz a Parkinson-kórban származhat a DJ-1 csökkent reaktív oxigén gyökhatástalanító képességéből, míg a mitochondriális működészavar, legalábbis részben a DJ-1 és a PINK1 csökkent aktivitásából és hibás elhelyezkedéséből. A mitochondriális működészavar, oxidatív stressz és hibás fehérje kezelés ezért mind összefüggésben állnak egymással ebben a feltételezett patológiás modellben (Vila és Przedborski, 2004).

A Huntington-kór molekuláris patogenezisének modellje

A Huntington-kór (HD – Huntington' disease) egy gyors lefolyású, neurodegeneratív betegség. Jellemző tünetei, hogy a beteg akaratlan mozgásokat, agresszivitást, ingerlékenységet, érzelmi kitöréseket, a kognitív képességek romlását és szellemi leépülést tapasztal.

Tekintsük át, hogy ebben a betegségben milyen fehérjék hibája aggregációja okozza a proteaszóma rendszer válságát és végül az idegsejtek pusztulását. A Hsp70 és Hsp40 molekuláris chaperonok elősegítik az újonnan szintetizált huntingtin (htt) fehérjének a natív szerkezetre hajtogatódását (4.9. ábra).



4.9. ábra A Huntington-kór molekuláris patogenezisének modellje

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A vad típusú htt elsődlegesen a citoplazmában fordul elő és a klatrin-mediálta endocitózisban, a vezikuláris transzportban, a sejtvázhoz történő horgonyzásban, a neuronális transzportban vagy a posztszinaptikus jelátvitelben játszik szerepet. A htt bekerülhet a sejtmagba is és ott a transzkripciószabályozásban lehet feladata. A htt fehérje mutációja Huntington-kórban konformációs változásokat indukál és ez valószínűleg a fehérje rendellenes hajtogatódásához vezet, ami, ha nem javítják ki a chaperonok, a hibás térszerkezetű htt felhalmozódását okozza a citoplazmában. A htt-t különösen hajlamossá teszi az aggregációja az N-terminális poliglutamin szakasza. Ezzel párhuzamosan a mutáns htt proteolitikus bomlást szenvedhet, ami N-terminális fragmentumokat eredményez. Ezek a poliglutamin szekvenciájuk miatt β-rétegeket formálnak. Végül a mérgező hatást a teljes hosszúságú mutáns htt vagy a hasított N-terminális poliglutamin fragmentumok fejthetik ki. Ez utóbbiak oldható monomereket, oligomereket vagy nagy oldhatatlan aggregátumokat formálnak.

A citoplazmában a mutáns htt formák hatástalaníthatják az ubiquitin–proteaszóma rendszert (UPR), ami egyre több hibásan hajtogatott fehérje felhalmozódását eredményezi. Ezek a toxikus fehérjék a normális vezikulum transzportot és a klatrin-mediálta endocitózist is tönkretehetik. A mutáns htt jelenléte pro-apoptotikus fehérjéket is aktiválhat közvetlenül vagy közvetve mitochondriális károsodás útján, ami még nagyobb sejtes mérgezéshez és más lebontó folyamatokhoz vezet. Az önvédelmi erőfeszítései közepette, a sejt a mérgező fehérjedarabokat ubiquitinilált citoplazmatikus magkörüli aggregátumokba gyűjti. Ezen túl a mutáns htt bekerülhet a sejtmagba és ott magi inklúziókat hozhat létre, melyek a transzkripciót félbeszakíthatják és a magi UPR-t akadályozhatják (Landles és Bates, 2004).

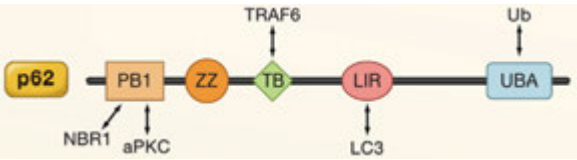
Autofágia szabályozás

Mint a neurodegeneratív betegségek példáján is láttuk a két fő sejten belüli fehérjebontó rendszer, az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az autofágia, egymást kiegészítő vagy akár egymást helyettesítő folyamatok. Ennek alapján szoros összeköttetésben kell lenniük, hogy a fehérjebontás zavartalanul működjön. Az egyik kapcsoló molekula a két folyamat között a p62 fehérje, más néven sequestosome-1, melyet eredetileg az atípusos protein kináz-C kölcsönható partnereként izoláltak. A p62 egy multidomén fehérje, mely részt vesz az NF-κB transzkripciós faktor aktiválásában. A p62 fehérje felismeri a mérgező szemetet a sejtben, amit aztán az autofágia eltakarít. Az autofágia hiánya a p62 felszaporodásához vezet, ami nem jó a sejteknek és stressz választ indít, ami betegséghez vezethet. A p62 részt vesz az autofágia szabályozásában, az apoptózis külső útvonalának működéséhez is köthető, sőt kulcsfaktor a tumor képződésben is. A p62 a sejthalál és túlélés fontos döntéshozatali pontjain helyezkedik el (Moscat és Diaz-Meco, 2009).

A p62 domén szerkezete

A p62 fehérjének öt funkcionális doménje van (4.10. ábra):

- Phox és Bem1p domén (PB1),
- ZZ-típusú cink ujj domén,
- TRAF6-kötő domén (TB - TRAF6-binding domain),
- LC3 kölcsönható régió (LIR - LC3-interacting region), és
- ubiquitin-kötő domén (UBA - ubiquitin-associated domain).



4.10. ábra A p62 fehérje szerkezeti doménjei és kölcsönható partnerei

A p62 *PB1 domén*je egy fehérje-fehérje interakciós modul, mely más jelátviteli molekulákban is megtalálható, mint az atípusos protein kináz-C (aPKC) és a Par-6 sejt polaritás fehérje. Az aPKC-k és a p62 a PB1 doménjeiken keresztül egymáshoz kapcsolódnak és ez a kötés az NF-κB transzkripciós faktor aktiválását eredményezi. Emellett

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

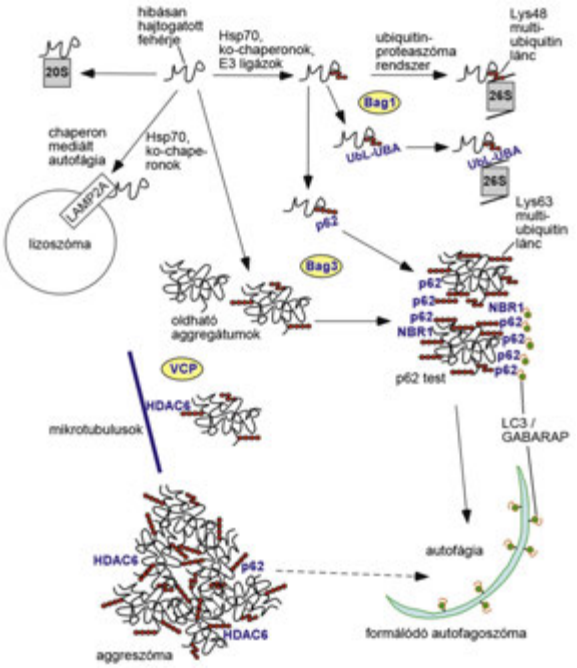
a p62 PB1 doménje lehetővé teszi az oligomerizációját is, ami nélkülözhetetlen a sejtbeli feladatainak ellátásához (Moscat és mtsai., 2007).

A p62 kis foltokban vagy nagyobb aggregátumokban található a citoplazmában, ezek a PB1 doménjükön keresztül összetapadt p62 oligomerekből és p62-aPKC komplexumokból, valamint multiubiquitinilált fehérjékből állhatnak. A citoplazmatikus foltok jelszerveződési pontok, ahol a p62 a *TB domén*jén keresztül kölcsönhatásba lép a TRAF6-tal és az *UBA domén*jével kaszpáz-8-cal (Jin és mtsai., 2009). A TRAF6 (tumour-necrosis factor (TNF)-receptor associated factor 6) egy 63-as lizin (K63) E3 ubiquitin ligáz. A p62 kapcsolódása a TRAF6-tal elősegíti az oligomerizációját, majd az aktiválódását, ami a TRAF6 K63 típusú multiubiquitinilálódásához és végül az NF-κB aktiválásához vezet.

Az autofágia és a p62 közötti kapcsolatot alátámasztja az a tény, hogy a p62 a *LIR* (LC3-interacting region) *domén*jén keresztül az Atg8/LC3 autofágia szabályozó molekulához köt valamint az a megfigyelés, hogy a p62 felszaporodik autofágia hiányos egerekben (Komatsu és mtsai., 2007). A p62 PB1 partnerével, az NBR1-gyel (neighbor of BRCA1 gene 1) együtt szabályozza a multiubiquitinilált, hibásan hajtogatott és aggregálódott fehérjék és működésképtelen sejtorganellumok csomagolását és célba juttatásukat az autofág struktúrákba emlős sejtekben és muslicában (Kirkin és mtsai., 2009; Nezis és mtsai., 2008).

A hibásan hajtogatott fehérjék lebontásának modellje

Az ubiquitin független fehérje lebontás a 20S proteaszómákban vagy a chaperon-mediált autofágia (CMA) útján zajlik (4.11. ábra). Az ubiquitin-függő protein degradáció az ubiquitin-proteaszóma rendszeren (UPR) keresztül vagy autofágiával történhet. Az UPR-be irányított ubiquitinilált fehérjéket közvetlenül a 26S proteaszóma 19S szabályozó részecskéje ismeri fel vagy az UbL–UBA család fehérjéi, mint például a Rad23 vagy az ubiquilin 1, viszik a proteaszómához őket (4.11. ábra).



4.11. ábra A hibásan hajtogatott fehérjék lebontásának modellje

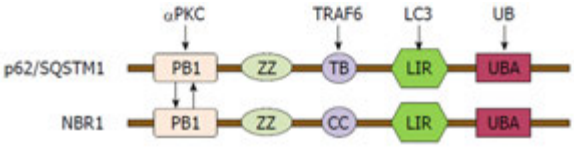
Emellett átmenetileg p62 testekben gyűlhetnek össze a hibásan hajtogatott fehérjék, ami az autofág lebontásukkal végződik. Az ubiquitin-kötő autofágia receptor fehérjék, a p62 és a NBR1 szükségesek mind az autofág struktúrák kialakulásához (az LC3/GABARAP család fehérjéivel közvetlenül kapcsolódnak az autofagoszómák formálásakor), mind a lebomlásukhoz. A BAG1 és BAG3 ko-chaperonok egymáshoz viszonyított arányától függ, hogy a hibásan hajtogatott fehérjék autofágiával bomlanak-e le. Magas BAG3 : BAG1 arány az autofágiát stimulálja és p62 testek kialakulását indukálja. A proteaszóma károsodása aggreszómák kialakulásához vezet. Az aggreszómák kialakulásához a fehérje aggregátumok mikrotubulusokon történő szállítására van szükség, melyet a HDAC6 ubiquitin-kötő tubulin

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

deacetiláz közvetít. A p97/VCP, egy chaperon és AAA+ ATPáz tulajdonságú fehérje kapcsolatba lép a HDAC6-tal és a szabályozó szerepet játszik a folyamatban (Lamark és Johansen, 2010).

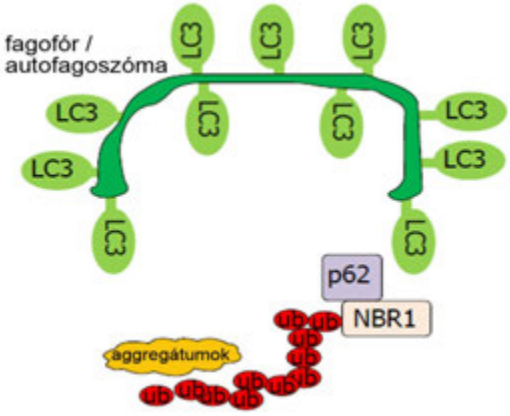
Ubiquitinilált fehérjék útja az autofagoszómákba

Lássuk most pontosan hogyan is kerülhetnek az ubiquitinilált fehérjék az autofagoszómákba. A p62 mellett az NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) fehérjét is azonosították, mint az Atg8 fehérje családdal kölcsönható, LC3- és ubiquitin-kötő fehérjét (4.12. ábra).



4.12. ábra A p62 és az NBR1 fehérjék domén szerkezetének vázlatos összehasonlítása. Az ábrán látható rövidítések: PB1: Phox és Bem1p domén; ZZ: cink ujj domén; TB: TRAF6-kötő domén; CC: coiled-coil domén; LIR: LC3-interaktív régió; UBA: ubiquitin-kötő domén.

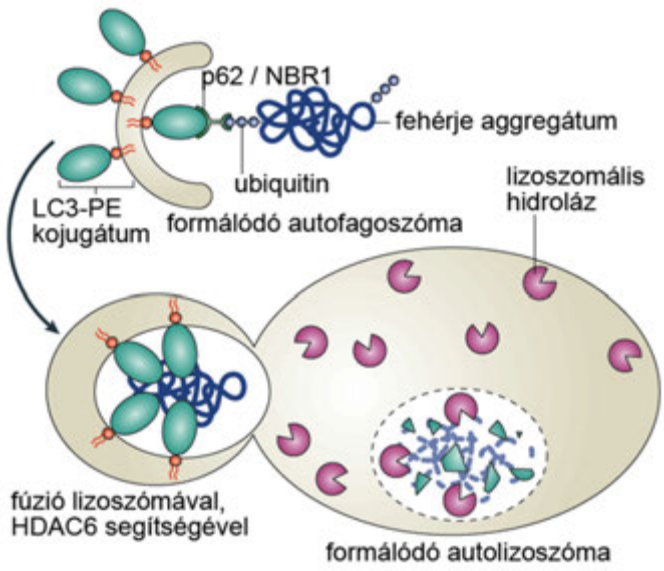
Az NBR1 a LIR régiójának köszönhetően autofág úton bomlik le, de ehhez nem feltétlenül szükséges a p62 (4.13. ábra). A p62-höz hasonlóan az NBR1 is felhalmozódik és aggregálódik, ha az autofágia gátolt és a patologikus zárványok részét képezi (Ding, 2010).



4.13. ábra A p62 és a NBR1 autofágia receptorok, melyek kapcsolatba lépnek egyrészt az *UBA domén*jükkel az ubiquitin-pozitív fehérje aggregátumokkal, másrészt a *LIR régió*juk segítségével a formálódó autofagoszómák membránján az LC3-mal és az ubiquitinilált célfehérjéket az autofagoszómákba irányítják, így elindítják autofág lebontását.

A fehérje aggregátumok ubiquitinilálásának jele kiváltja az *NBR1* vagy *p62* adapter fehérjék kötődését, melyek az LC3-hoz (light chain 3; az *Atg8* (autophagy protein 8) emlős homológja) is hozzákötnek. Ez utóbbi a formálódó autofagoszóma kettős membránjában lévő lipidekhez kapcsolódik (4.14. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

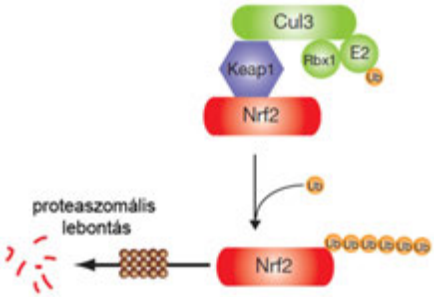


4.14. ábra Ubiquitinilált fehérjék útja az autolizoszómákba. Rövidítések: LC3, light chain 3, az Atg8 emlős homológja; PE, foszfatidil-etanolamin; HDAC6, hiszton deacetiláz 6.

Mindez lehetővé teszi, hogy az aggregátum bekerüljön a képződő autofagoszómába, ami aztán lizoszómával olvad össze, hogy a belső membrán határolta vezikulum a benne levő tartalommal hidrolitikus enzimek által lebontásra kerüljön (Tyedmers és mtsai., 2010).

Az Nrf2 aktivitásának szabályozása az autofágia receptor p62 által

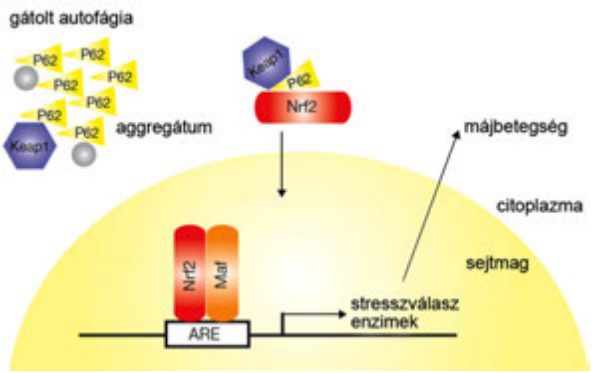
Normális körülmények között a bazális autofágia folyamatosan eltakarítja a citoplazmából a p62-t és a hozzákötődő szállítmányt, a mérgező aggregálódó fehérjéket. Az Nrf2 (nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2) fehérje, egy stressz válasz transzkripciós faktor, a Cul3–Rbx1 ubiquitin ligáz komplexum és a Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) adapter segítségével ubiquitinilálódik és a proteaszóma által bomlik le (4.15. ábra).



4.15. ábra Az Nrf2 (nuclear factor-like 2) transzkripciós faktor lebontása normális körülmények között

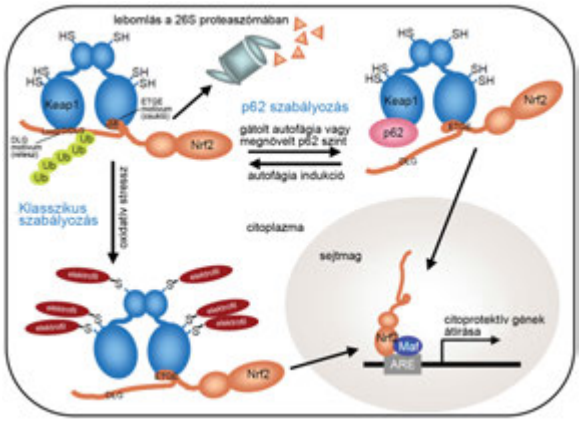
Autofágia hiányában, a p62 fehérje és a hozzákapcsolódó aggregátumok felhalmozódnak a citoplazmában (4.16. ábra). A felesleges p62 a Keap1-hez kötődik, megszakítva az Nrf2 ubiquitinilációját és ebből következően a lebontását. Ez a citoplazmatikus Nrf2 szint emelkedését okozza, lehetővé téve, hogy az Nrf2 belépjen a sejtmagba, ott a Maf transzkripciós faktorral heterodimerizáljon és aktiválják a génátírást az antioxidáns válaszelemet (ARE - antioxidant response element) tartalmazó promóterekről. A megnőtt Nrf2 aktivitás a fő okozója a májbetegségeknek, melyeket hiányos autofágia mellett figyeltek meg (Rusten és Stenmark, 2010).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.16. ábra Az Nrf2 fehérje aktivitásának szabályozása p62 által

Nézzük meg most az Nrf2 transzkripciós faktort aktiváló rendszert egy kicsit más oldalról megvilágítva. Hiányos autofágia következtében a p62 szelektív turnovere korlátozott, ami súlyos májkárosodást okoz, melyet p62 pozitív zárványok képződése és a méregtelenítő enzimek aktiválódása kísér. Ez a fenotípus nagyon hasonlít a humán májbetegségek, mint az alkoholos májbetegség (alkoholos szteatohepatózis, alcoholic hepatitis) és a hepatocelluláris karcinóma, patológiájára. A betegségek molekuláris mechanizmusai és a patofiziológiás folyamatai ennek ellenére még nem ismertek. Az Nrf2 transzkripciós faktort, melynek a célgénjei antioxidáns fehérjéket és méregtelenítő enzimeket kódolnak, a p62 szabályozza. A p62 a Keap1 (az Nrf2-t felismerő ubiquitin ligáz egyik alegysége) Nrf2 kötőhelyéhez kapcsolódik. Így tehát, a p62 túltermelése vagy az autofágia defektusa miatt felszaporodó p62 molekulák versenyre kelnek az Nrf2-vel a Keap1-hez való kapcsolódásért (4.17. ábra).



4.17. ábra Az Nrf2-Keap1 útvonal vázlatos ábrája. A klasszikus, oxidatív stressz által szabályozott útvonal az ábra baloldalán van feltüntetve. A p62 részvételével történő szabályozás a jobb oldalon látható. Az Nrf2 csukló és retesz mechanizmusa *in vivo* is működik.

Ez az Nrf2 stabilizálódását és az Nrf2 célgénjei transzkripciójának aktiválódását eredményezi. Mindez arra utal, hogy a p62 felhalmozódásával összefüggő patológiai folyamat az Nrf2 hiperaktivitását okozza és felvázolja a szelektív autofágia nem várt szerepét a védekező enzimek génjeinek transzkripció szabályozásában (Komatsu és mtsai., 2010).

Ellenőrző kérdések

1. Mik az endoplazmatikus retikulummal társult lebontás (ERAD) lépései?

2. Milyen mutációk és hogyan okozzák a Parkinson-kór kialakulását?

3. Hogyan vesz részt a parkin E3 enzim az ER-hoz kapcsolt fehérje degradációban?

4. Milyen szerkezeti doménjei és kölcsönható partnerei vannak a p62 fehérjének?

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

5. Hogyan szabályozza az ubiquitin-proteaszóma rendszer az Nrf2-Keap1 útvonalat?

Irodalom

Chung, K. K., Dawson, V. L. és Dawson, T. M. (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci***24**, S7-14.

Ding, W. X. (2010) Role of autophagy in liver physiology and pathophysiology. *World J Biol Chem***1**, 3-12.

Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V. C., Lill, J. R. és Ashkenazi, A. (2009) Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* **137**, 721-35.

Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjorkoy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P. és mtsai. (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**, 505-16.

Klionsky, D. J. (2006) Neurodegeneration: good riddance to bad rubbish. *Nature* **441**, 819-20.

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y. S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I. és mtsai. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* **12**, 213-23.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S. és mtsai. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149-63.

Lamark, T. és Johansen, T. (2010) Autophagy: links with the proteasome. *Curr Opin Cell Biol***22**, 192-8.

Landles, C. és Bates, G. P. (2004) Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep***5**, 958-63.

Layfield, R., Alban, A., Mayer, R. J. és Lowe, J. (2001) The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol***27**, 171-9.

Martinez-Vicente, M. és Cuervo, A. M. (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurology* **6**, 352-361.

Moscat, J. és Diaz-Meco, M. T. (2009) p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* **137**, 1001-4.

Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. és Wooten, M. W. (2007) Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci***32**, 95-100.

Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H. és Brech, A. (2008) Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol* **180**, 1065-71.

Ross, C. A. és Pickart, C. M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends In Cell Biology***14**, 703-711.

Rusten, T. E. és Stenmark, H. (2010) p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol***12**, 207-9.

Tyedmers, J., Mogk, A. és Bukau, B. (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol***11**, 777-88.

Vembar, S. S. és Brodsky, J. L. (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol***9**, 944-57.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

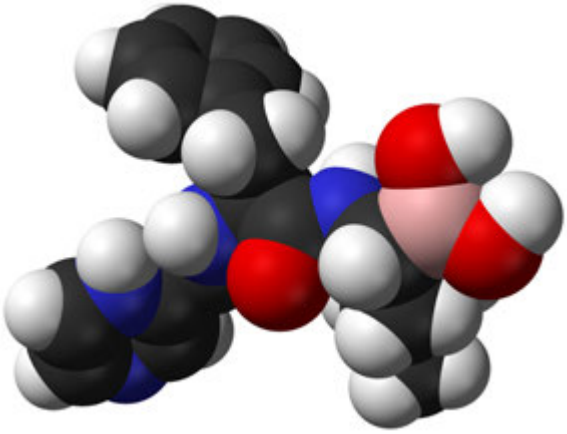
Vila, M. és Przedborski, S. (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med***10 Suppl**, S58-62.

Yoshida, H. (2007) ER stress and diseases. *FEBS J* **274**, 630-58.

5. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer szerepe az apoptózis szabályozásában

Az apoptózis a programozott sejthalál egy fajtája, melynek során azért pusztulnak el a sejtek, hogy megakadályozzák a túlzott sejtosztódást, vagy csökkentsék a DNS károsodás hatását. A természetes sejtpusztulás nagyon fontos szerepet játszik a normális életfolyamatokban is, mint a magzati fejlődés és a szöveti állandóság. Az apoptózis szabályozásában bekövetkező hibák sok betegség kialakulásához járulnak hozzá, mint a rák, autoimmun betegségek és neurodegeneráció. Másrészről viszont az apoptózist irányító fehérjék új gyógyszerkutatási célpontokat jelentenek és a rák kezelésének új lehetőségeihez vezethetnek.

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer a fő lizoszómán kívüli lebontó út, mely részt vesz a sejten belüli fehérjebontásban. A 26S proteaszóma egy multienzim komplex, mely a rosszul hajtogatott illetve felesleges fehérjéket bontja le. Megfordítva, a proteaszomális lebontó útvonal gátlása a nemkívánatos fehérjék felhalmozódásához és sejthalálhoz vezet. Mivel a ráksejtek sokkal gyorsabban osztódnak, mint a normál sejtek a fehérje átírási és lebontási sebességük is gyorsabb. Számos specifikus proteaszóma szubsztrát elengedhetetlenül szükséges a sejtciklus megállításához illetve az apoptózishoz. Ezen szubsztrátok lebontásának meghiúsítása proteaszomális gátlás révén új és egyedülálló megközelítése a daganatos betegségek kezelésének. Egy peptid bórsav vegyület, a bortezomib szelektív és reverzibilis proteaszóma gátlószer (5.1. ábra). Az amerikai FDA (Food and Drug Administration) és az Európai Gyógyszerértékelő Ügynökség (EMEA - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) is engedélyezte használatát a frissen diagnosztizált, más citosztatikumra nem reagáló csontvelőrák (mielóma muliplex) kezelésében (Velcade).



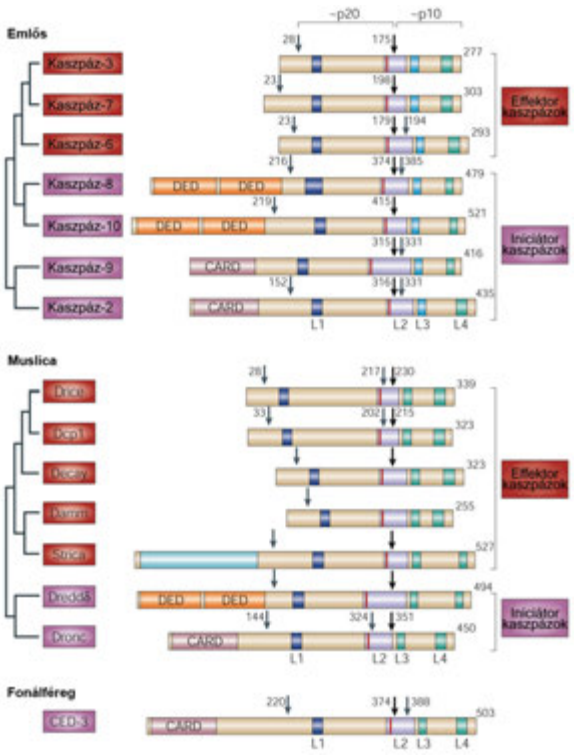
5.1. ábra A bortezomib (Velcade) térkitöltő modellje

A következőkben röviden tekintsük át az apoptózis azon folyamatait, melyek szabályozásában az ubiquitin-proteaszóma rendszer fontos szerepet játszik.

Apoptózis

Az apoptózis evolúciósan konzervált folyamat a sejt önmegsemmisítésére, mely sokféle sejten belüli és kívüli hatással beindítható. Amint a folyamat elindul, egy konzervált kaszkád rendszer viszi tovább és erősíti a jelet fehérje-fehérje kölcsönhatások útján. Végül cisztein proteázok egy különleges csoportja, melyeket *kaszpázok*nak hívunk (5.2. ábra), aktiválódik és sejten belüli célfehérjék széles spektrumát hasítja, úgymint DNS javító enzimeket, lamint és Mdm2-t (a p53 stabilitásának szabályozója), és ez végül a sejt pusztulásához vezet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.2. ábra Apoptotikus kaszpázok az emlősökben, muslicákban és fonálférgekben. Az iniciátor kaszpázokat lila, az effektor kaszpázokat vörös szín jelöli. A kaszpáz molekulát jelző sávok és a funkcionális részek csíkjai méretarányosan vannak feltüntetve. Rövidítések: DED, death-effector domain; CARD, caspase-recruitment domain.

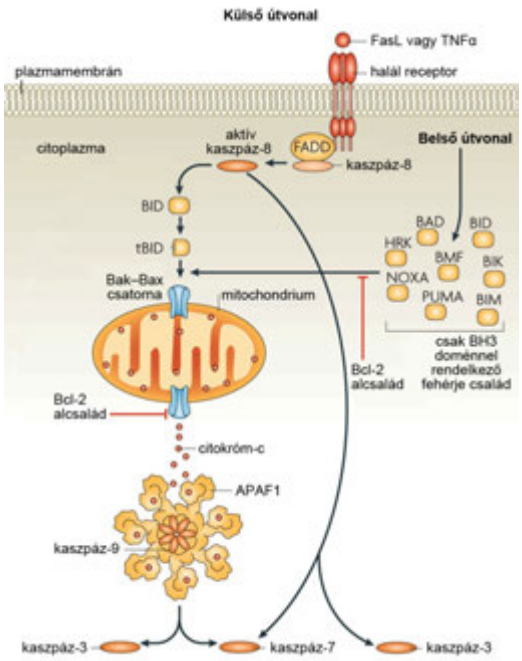
A CED-3 (cell-death abnormality-3) az egyetlen kaszpáz a fonálféregben (*Caenorhabditis elegans*), így mind az iniciátor, mind az effektor kaszpázok szerepét betölti (5.2. és 5.4. ábra). Az első, láncon belüli, aktiváló hasítás helyét az ábrán fekete nyilak jelölik (a nagy, p20, és a kis, p10, alegység között). A p20 és p10-es alegységek együtt egy kaszpáz monomert alkotnak. Az egyéb hasításokat szürke nyilak mutatják. Ez utóbbiak a kaszpáz aktivitást módosítják és a kaszpázok apoptózis gátló (inhibitor of apoptosis - IAP) fehérjék valamint más fehérjék általi szabályozását befolyásolják. Más proenzimektől eltérően egy kaszpáz N-terminális prodoménjének eltávolítása nem szükséges az aktivitásához. Az iniciátor kaszpázok prodoménjei kivétel nélkül azonos fajta kölcsönható domének, mint például a kaszpáz verbuváló domén (CARD - caspase-recruitment domain) és a sejthalál végrehajtó domén (DED - death-effector domain). Az ábrán ugyancsak meg van jelölve a katalitikus árkot alkotó négy, felszíni hurok (L1-L4). A katalitikus cisztein oldalláncot piros vonal jelzi az L2-es hurok elején (Riedl és Shi, 2004) (5.2. ábra).

Sejtek, melyeket külső vagy belső ingerek programozott öngyilkosságra serkentenek, apoptózissal pusztulnak el. A folyamatot számos összetett fehérje szabályozza, melyeket két fő útvonalon különféle hatások aktiválnak.

Sejthalál receptor útvonal (külső)

A külső útvonalat egy sejtfelszíni halál receptor indítja be (5.3. ábra). Ez a jelzés nagyon fontos szerepet tölt be a transzformált illetve vírusfertőzött sejtek immunrendszer általi leleplezésében és a saját fehérjék ellen reaktív limfociták eltávolításában. Ennek következtében a rendszer hibája sok esetben rosszindulatú daganatot vagy autoimmunbetegséget okoz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.3. ábra Kaszpáz aktiválási útvonalak az apoptózis folyamán. Az ábrán látható rövidítések: APAF1, apoptotic protease activating factor; BAD, BCL-2 antagonist of cell death; BAK, BCL-2-antagonist/killer-1; BAX, BCL-2-associated X protein; BID, BH3-interacting domain death agonist; BIK, BCL-2-interacting killer; BIM, BCL-2 interacting mediator of cell death; BMF, BCL-2 modifying factor; HRK, harakiri (más néven death protein-5); NOXA, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (a noxa latinul károsodást jelent); PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis.

A kaszpáz aktiválás a külső útvonalon sejten kívüli halál ligandumok (FasL vagy TNFα - tumour necrosis factor-α) kötődését igényli a transzmembrán halál receptorokhoz (5.3. ábra). Ha a halál receptorok kapcsolatba lépnek a nekik megfelelő ligandummal, megindul a kapcsoló fehérjék (például a FADD - Fas-associated death domain protein) verbuválása. Ezek számos kaszpáz-8 molekulát vonzanak és kötnek meg, elősegítve ezzel a kaszpáz-8 önaktiválását. Az aktív kaszpáz-8 aztán hasítja és aktiválja a kaszpáz-3-at és 7-et és a folyamat a szubsztrát fehérjék bontásához, végül sejthalálhoz vezet (Taylor és mtsai., 2008).

Mitochondriális útvonal (belső)

A belső útvonal akkor aktiválódik, ha a mitochondriumokból kiszabadul a citokróm-c fehérje (5.3. ábra). Mindkét út egy végső közös szakasz felé tart, melyben egymást aktiváló kaszpáz enzimek lebontanak minden eléjük kerülő szabályozó vagy szerkezeti fehérjét. Ez aztán a sejt pusztulásához vezet.

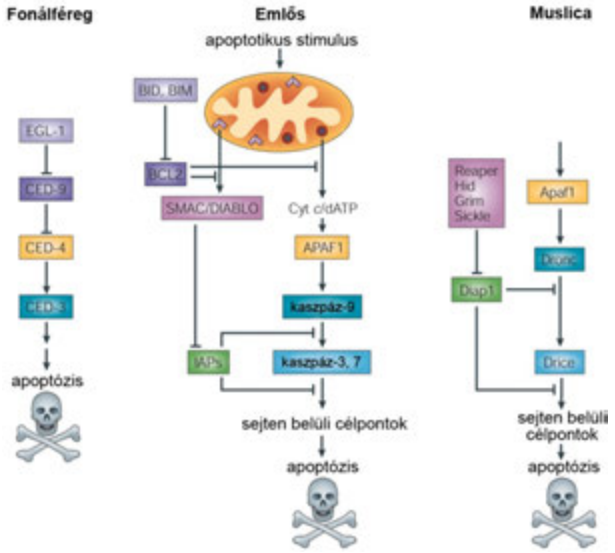
A belső útvonalon összetett hatások, melyek sejt stresszt vagy károsodást váltanak ki, jellemzően a csak BH3 doménnel rendelkező fehérje családot aktiválják (Taylor és mtsai., 2008). A csak BH3 doménnel rendelkező fehérje család tagjai útvonal specifikus érzékelőként reagálnak a különböző hatásokra és aztán eltérő módon szabályozódnak. Aktiválódásuk egy bizonyos határ felett túlnő az anti-apoptotikus Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) család tagjainak gátló hatásán és elősegíti a Bak–Bax oligomerek összeszerelődését a mitochondriumok külső membránjában. Ezek az oligomerek teszik lehetővé a membránok közötti térből a fehérjék, mint például a citokróm-c, kijutását a citoplazmába. A kijutott citokróm-c elindítja az apoptoszómák összeszerelődését. Az apoptoszóma az apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1 (APAF1) 7 molekuláját és ugyanannyi kaszpáz-9 homodimert tartalmaz. Ebben az aktív kaszpáz-9 elindítja a kaszpáz aktiválási kaszkádot (5.3. ábra).

Néhány esetben előfordul, hogy a külső sejthalál jelzések áthallatszanak a belső útvonalra a csak BH3 doménnel rendelkező fehérje családba tartozó BID (BH3-interacting domain death agonist) fehérje kaszpáz-8 általi hasítása miatt. A hasított BID (tBID - truncated BID) elősegíti a mitochondriális citokróm-c kijutását és az apoptoszóma összeszerelődését (5.3. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Konzervált apoptotikus útvonalak

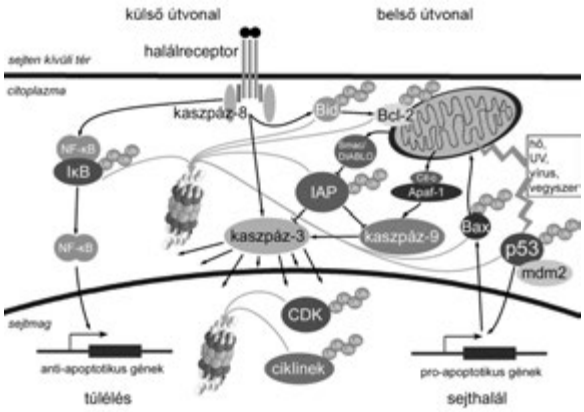
A kaszpáz-9 az emlősökben és a Dronc a muslicában (*Drosophila melanogaster*) iniciátor kaszpázok, míg a kaszpáz-3 és 7 az emlősökben és a Drice a muslicában az effektor kaszpázok osztályába tartozik (Riedl és Shi, 2004). A CED-3 a fonálféregben (*Caenorhabditis elegans*) iniciátor és effektor kaszpázként is működik. Az apoptózis gátló (IAP - inhibitor of apoptosis) fehérjék a kaszpázok negatív szabályozásával elnyomják az apoptózis folyamatát. Emellett az IAP antagonisták, a SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) az emlősökben és az RHG fehérjék (Reaper, Hid, Grim és Sickle) a muslicában az IAP fehérjék közvetítette kaszpáz gátlást függesztik fel (5.4. ábra).



5.4. ábra Konzervált apoptotikus útvonalak. A kaszpázok és a kaszpáz regulátorok funkcionális homológjai a különböző csoportokban azonos színnel vannak jelölve. Rövidítések: APAF1, apoptotic-protease-activating factor-1; Cyt c, citokróm-c.

Ubiquitinilálódó célpontok az apoptózis útvonalán

Az 5.5. ábra mutatja, hogy az apoptózis mindkét útvonalán előfordulnak olyan szabályozó fehérjék, melyeket az ubiquitin-proteaszóma rendszer bont le (Lee és Peter, 2003).



5.5. ábra Ubiquitinilálódó célpontok az apoptózis útvonalán

A p53 fehérje

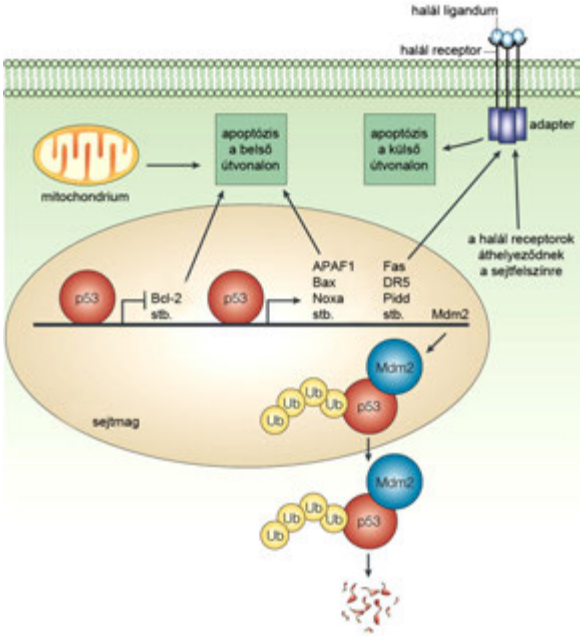
- rövid fél-életidejű fehérje, kis mennyiségben van jelen a sejtmagban

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

- sejtet érő stressz hatására stabilizálódik
  - DNS károsodás (vegyi vagy sugár)
  - hypoxia
  - onkogén aktiválódás
- sejtválasz
  - sejtciklus leállás
  - DNS javítás
  - differenciálódás, öregedés, apoptózis
- emberi tumorok 50%-ban a p53 mutáns

A p53 tumor szupresszor az egyik legismertebb pro-apoptotikus fehérje, ami a transzkripció szintjén hat. A p53 elfogadottan a genom őrzője, amely a sejtosztódás megállításával vagy apoptózis beindításával megakadályozza a mutáció továbbadását és ennek következtében a rák kialakulását (karcinogenezist). Álladóan alacsony koncentrációban van a sejtben, mert folyamatosan ubiquitinilálódik és a proteaszóma lebontja. Belső stressz hatásra, mint például vegyszer vagy sugárzás okozta DNS károsodás, oxigén hiány, onkogén aktiválódás, a p53 ubiquitinilálása gátlódik, ami a felszaporodásához vezet. Ez indukálja a sejtosztódás leállítását és az apoptózist. Az emberi tumoroknak körülbelül felében a p53 gén mutációkat hordoz vagy a rendszer hibás és a p53 lebontását segíti.

A p53 egyaránt indukálja a külső és a belső apoptotikus útvonalakon ható fehérjék kifejeződését és specifikusan blokkolja sejthalál gátló gének átíródását (5.6. ábra).



5.6. ábra A p53 és az apoptózis. Az ábrán látható rövidítések: Bcl-2, B-cell lymphoma 2; APAF1, Apoptotic protease-activating-factor 1; Bax, Bcl-2 associated X protein; NOXA, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; DR5, death receptor 5; Pidd, p53 protein induced, with death domain; Mdm2, Murine double minute 2.

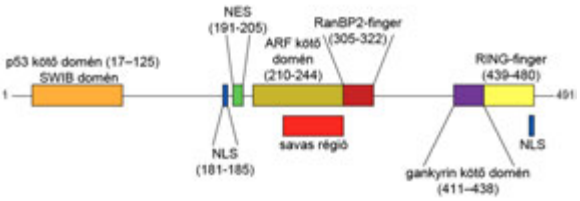
Leírták már a p53 a transzkripció szabályozásától eltérő, további feladatait is. Ilyen például a sejthalál receptorok, mint a Fas/CD95 (cluster of differentiation 95) Golgi-apparátusból a sejtfelszínre történő áthelyeződésének indukálása vagy a mitochondriumokkal való közvetlen asszociáció. A p53 legfontosabb regulátora az *Mdm2*

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

(Murine double minute 2), melynek átíródása viszont maga is a p53 szabályozása alatt áll. Az Mdm2 a p53-hoz köt, ubiquitinilálja és a magból kijuttatva proteaszomális lebontásra irányítja (Jesenberger és Jentsch, 2002).

Az Mdm2 fehérje

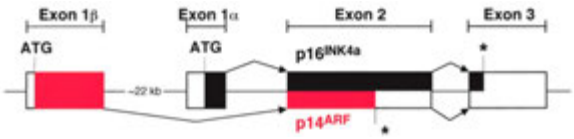
Az Mdm2 fehérje szerkezetében több jellegzetes domént is elkülöníthetünk (5.7. ábra). A *p53 kötő domén*jét (17–125 aminosav) átéri a SWIB domén (26–108 aminosav), mely a SWI/SNF fehérje család konzervált régiója. A *savas régió* egy aszparaginsavban és glutaminsavban gazdag szakasz. A *RanBP2-típusú* és *RING-finger domén*ek cink-ionokat fognak közre. A gankyrin a RING-finger domén mellett N-terminális irányban köt az Mdm2-höz (411–438 aminosav) (Dawson és mtsai., 2006).



5.7. ábra Az Mdm2 ubiquitin ligáz funkcionális doménjei. Rövidítések: NES, nuclear export signal; NLS, nuclear localization signal.

Az ARF fehérje

Az ARF fehérje felfedezése összekapcsolódik a $p16^{INK4a}$ felfedezésével, sőt innen ered. A $p16^{INK4a}$ egy 16 kDa tömegű humán fehérje, mely megköti és gátolja a CDK4-et (INK4 - *in*hibitor of CD*K4*). A p16 eredeti klónozása után különös jelenségre figyeltek fel: a p16 lokusz nagyon magas mutációs frekvenciát mutatott egyrészt tumorból származó immortalizált sejt vonalakban, másrészt különböző elsődleges tumorokban. Ma már világos, hogy a lokusz gyakori megváltozása a különös genetikai szerkezetéből fakad, mely egy másik, rejtett gént is kódol (5.8. ábra).

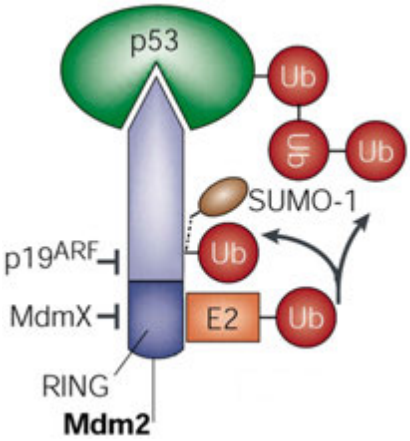


5.8. ábra A $p16^{INK4}$ (INK4 - inhibitor of CDK4, fekete) és az $p14^{ARF}$ (alternative reading frame, piros) fehérjéket kódoló lokusz exonjai. A csillag a stop kodon jele.

Ez a gén az ARF (alternative reading frame), melynek transzkripciója egy külön promoterről indul egy különálló első exonnal (exon 1β), ami a p16 exon 1α-hoz képest felfelé helyezkedik el. Bár az exon 2 és 3 területén átfed a p16 és az ARF kódoló szekvenciája az exon 1β által kódolt részletnek megvan a saját transzláció indító AUG kodonja. Ezáltal egy teljesen független fehérje keletkezik egy alternatív leolvasási keret szerint, emberben 14kDa molekulatömegű, 132 aminosavból álló ($p14^{ARF}$), egérben 19kDa molekulatömegű, 169 aminosavból álló ($p19^{ARF}$) fehérje (Zhang és Xiong, 2001).

Mint ahogy várható, egy olyan fehérje mellé, amelynek az a feladata, hogy a „genom védelmezőjét” elpusztítsa, sokféle biztonsági mechanizmus van beépítve, hogy ne tudjon elszabadulni (5.9. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.9. ábra Az Mdm2 működését szabályozó partnermolekulák

1. Az Mdm2 belső RING-finger-függő *ubiquitin ligáz* (E3) aktivitása van, így ubiquitinilálni tudja a p53-at, sőt saját magát is.

2. A p53 *foszforilációja* blokkolja az Mdm2-vel való interakciót.

3. Egy Mdm2-höz kötő fehérje, az *ARF* (5.8. ábra) a RING-finger doménje felett kapcsolódik hozzá és egy addig rejtett, a sejtmagvacskába irányító jelet fed fel az Mdm2 RING-finger doménjével egy vonalban (5.7. ábra). Ez elkülöníti az Mdm2-t a p53-tól, megakadályozva a p53 Mdm2 közvetített lebontását.

4. Ehhez hasonlóan az Mdm2 gátolható egy rokon RING-finger fehérjével, az *MdmX*-szel történő dimerizációval (Marine és Jochemsen, 2005).

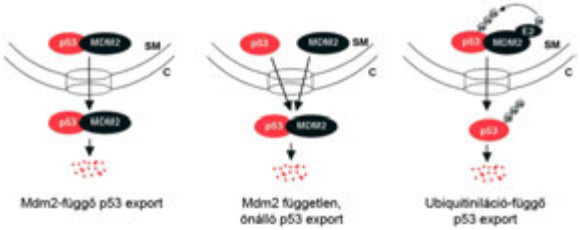
5. Mindazonáltal, arra is van bizonyíték, hogy a *SUMO-1* pozitívan szabályozza az Mdm2-t. A SUMO-1 ubiquitin-szerű fehérje ugyanahhoz a lizin oldallánchoz tud kapcsolódni az Mdm2-n, amihez az ubiquitin. Így kötődése megnöveli a p53 ubiquitinilációját, miközben lecsökkenti az Mdm2 ön-ubiquitinilálását.

Az Mdm2 a RING-finger típusú E3-as enzimek szubsztrát specificitását is jól mutatja. A p53 család egy másik tagja a p73 is kötődik az Mdm2-höz, de ez az interakció stabilizálja, és nem degradálódásra készteti. Ha kísérletileg az Mdm2 RING-finger doménjét egy eltérő RING-finger doménnel helyettesítjük, akkor ez visszaállítja a hibrid molekula ön-ubiquitinilálódását és a proteaszómába célzottságát, de nem ubiquitinilálja a p53-at és nem irányítja lebontásra (Weissman, 2001).

A p53 Mdm2 által történő szabályozásának modelljei

Mdm2-függő p53 export. Az első modell szerint az Mdm2 hozzákött a p53-hoz a sejtmagban és kiviszi a p53-at a citoplazmába (5.10. ábra). Ez a modell arra a megfigyelésre épül, hogy az Mdm2 egy belső magi export szignál (NES) segítségével kerül ki a magból a citoplazmába. Ennek mutációja megszünteti az Mdm2 nukleáris exportját és a p53 lebontó képességét is. Megerősíti ezt a modellt, hogy az Mdm2 magi lokalizációs jelének (NLS) mutációja kizárja a magba jutásból és ugyancsak megakadályozza a p53 degradálásában. Különböző sejtvonalak LMB-vel történő kezelése megnövelte a p53 fél-életidejét és egyensúlyi mennyiségét. Az LMB kovalens kötést alakít ki a CRM1 (exportin 1) egyik konzervatív cisztein oldalláncával, ami a fehérjék magi export jelének evolúciósan konzervált receptora és ezáltal megszünteti a CRM1-NES kötődést. Az LBM kezelés meggátolta az E6-E6AP közvetítette p53 lebontást a human papillomavírus fertőzött sejtvonalakban, megmutatva, hogy a p53 kikerülése a magból szükséges bármelyik ubiquitin ligáz útján történő lebontáshoz, de a folyamat nem teljesen Mdm2-függő (Zhang és Xiong, 2001).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.10. ábra A p53 Mdm2 közvetített lebontási modelljei normális sejtműködés esetén. SM, sejtmag; C, citoplazma.

Mdm2 független, önálló p53 export. A második modell szerint a p53 maga is tartalmaz egy működőképes magi export jelet (NES), ami lehetővé teszi számára a magból való kijutást (5.10. ábra). A magba injektálás után a fluoreszcensen jelölt p53 egy energiafüggő útvonalon perceken belül kikerült a magból, az NLS-sel jelölt humán szérum albumin azonban nem. A humán p53-ban azonosítottak egy leucin gazdag NES-t, mely a 339-352 aminosavak között húzódik. Ennek mutációja megakadályozta a p53 exportját a magból. A p53 NES szekvenciáját fuzionáltatták egy egyébként magban lokalizáló BSA fehérjéhez (p53 339–352-BSA), ami a fehérje citoplazmatikus felhalmozódását eredményezte LMB szenzitív módon. Az Mdm2 független p53 magi export modellt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy egy p53-GFP fúziós fehérje egyaránt előfordult a magban és a citoplazmában miután kifejeztették a p53 2/2-MDM2 2/2 kettősen hiányos MEF sejtekben, míg a p53 NES szignálban történt mutációk a p53-GFP kizárólag magi elhelyezkedését eredményezték. Mivel a NES szignál a p53 tetramerizációs doménjében található, feltételezték, hogy a p53 szabályozott tetramerizációja eltakarja a NES szignált és ezzel biztosítja a p53 visszatartását DNS kötő formájában a magban.

Ubiquitiniláció-függő p53 export. A harmadik modell szerint az Mdm2 ubiquitinilálja a p53-at a sejtmagban és a p53 multiubiquin lánca segíti a magi exportot és az ezt követő citoplazmatikus degradációt (5.10. ábra). Ez a modell olyan megfigyelések alapján készült, melyek szerint az Mdm2 és a p53-GFP fúziós fehérje együttes kifejeztetése a fúziós fehérje citoplazmatikus felhalmozódásával, sőt magi kizáródásával járt. A p53-GFP Mdm2 okozta kizáródása a magból megszűnt az Mdm2 RING-finger doménjének mutációjával, ami inaktiválta az ubiquitin ligáz aktivitását vagy az E1 ubiquitin aktiváló enzim mutációjának hatására. A modellt igazolja, hogy a magi export blokkolása LMB kezeléssel az ubiquitinilált p53 felhalmozódását eredményezte a magi frakcióban. Ezenkívül a p53 C-terminálisán levő NES-ben okozott mutációk meggátolták a p53 magi exportját, de az ubiquitinilációt nem. Mindez azt mutatja, hogy a p53 ubiquitinilációja a magban zajlik még a citoplazmába való export előtt (Zhang és Xiong, 2001).

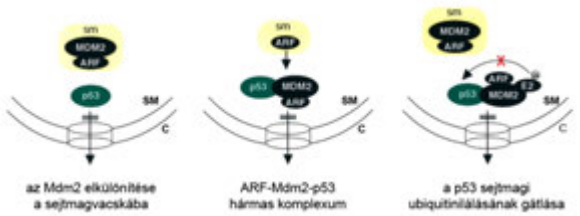
Az ARF p53 stabilizálásában betöltött szerepének három modellje. Függetlenül attól, hogy a magi p53 az Mdm2 segítségével, vagy magától, esetleg az Mdm2 közvetítette ubiquitiniláció útján kerül ki a sejtmagból a citoplazmába, a p53 magi exportjának blokkolása vagy az Mdm2-p53 komplexum szétszedése a p53 stabilizációját okozza. Az ARF fehérje gátolja a p53 Mdm2 közvetítette degradációját, legalábbis részben, a p53 és Mdm2 magi exportjának megakadályozásával. Jelenleg három modell próbálja a p53 Mdm2 közvetítette magi export ARF általi gátlásának molekuláris mechanizmusát megmagyarázni:

a. az Mdm2 elkülönítése a sejtmagvacskába;

b. ARF-Mdm2-p53 hármas komplexum kialakítása a nukleoplazmában;

c. az Mdm2 ubiquitin ligáz aktivitásának gátlása a sejtmagban.

Mindegyik modellnek van kísérletes alapja, de egyik sem tudja megnyugtatóan integrálni az összes megfigyelést. A modelleket az 5.11. ábrán vetjük össze.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

5.11. ábra Az ARF közvetített Mdm2 gátlás és p53 aktiváció három modellje onkogén hatás esetén. SM, sejtmag; C, citoplazma; sm, sejtmagvacska.

Az Mdm2 elkülönítése a sejtmagvacskába. Az első modell szerint az ARF az Mdm2-t a nukleoplazmából a magvacskába viszi, felszabadítva a p53-at az Mdm2 gátlása alól és ezzel lehetővé téve felszaporodását a sejtmagban (5.11. ábra). Ez a modell két megfigyelésen alapszik: az Mdm2 fehérje molekulák egy része, nem az összes, a nukleóluszokban található Mdm2-t és egér ARF-et kifejező plazmidokkal transzfektált HeLa sejtekben, egér ARF-et kódoló plazmiddal mikroinjektált egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtekben, és öregedő MEF sejtekben, melyekben mind az Mdm2, mind az ARF szint megemelkedik. A másik adatsor szerint az egér ARF mutáns (ARF D26-37) nem tud a magvacskába kerülni, ugyan megtartja az Mdm2 kötő aktivitását, mégsem tudja az Mdm2-t a magvacskába vinni, így a p53 stabilizáló képessége is csökken.

ARF-Mdm2-p53 hármas komplexum. A második modell az mutatja, hogy az ARF áthelyeződik az Mdm2 hatására a sejtmagvacskából a nukleoplazmába, és itt egy háromtagú komplexumot alakít ki az Mdm2-vel és a p53-mal, ezzel megakadályozva mind az Mdm2, mind a p53 magi exportját (5.11. ábra). Ha csak az ARF és a p53 fejeződik ki együtt, az Mdm2 hiányában sem az ARF sejtmagvacskába kerülése, sem a p53 eloszlása a nukleoplazma területén nem változik, egybevágóan azzal a megfigyeléssel, hogy az ARF az Mdm2 gátlásával lép kölcsönhatásba a p53-mal. Az Mdm2 kifejeztetése HeLa sejtekben, melyek nagy mennyiségben termelték az ARF-et a p53 működésének szünetelése miatt, az ARF átrendeződését eredményezte az egész nukleoplazmában. Ha mindhárom fehérjét egyszerre kifejeztették, az ARF, az Mdm2, és a p53 különálló magi testekbe került a nukleoplazmában. Az ARF exon 1β által kódolt Mdm2 kötő domén kivágódása vagy a magba vagy sejtmagvacskába irányító jelek mutációja a humán ARF exon 2 régiójában megszüntetik az ARF azon képességét, hogy magi testeket formáljon és csökkentik a p53 stabilizáló aktivitását. Ezek a tények összekapcsolják a hármas komplexum illetve magi testek formálását és az ARF közvetített p53 stabilizációt. Az E2F1, az ARF gén aktivátorának expressziója normális vagy Mdm2 gén amplifikált sejtekben az ARF felhalmozódását okozta a nukleoplazmában. A Saos-2 sejtekben azonban, melyek p53 hiányosak és rendkívül alacsony az Mdm2 szintjük, kizárólag a sejtmagvacskában lokalizált az ARF. Mindez élettani bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az Mdm2 képes megváltoztatni az ARF lokalizációját és képes magi testek kialakulását kiváltani ARF és p53 jelenlétében.

A p53 sejtmagi ubiquitinilálásának gátlása. A harmadik modell szerint az Mdm2 a p53-at a sejtmagban ubiquitinilálja és ez a jel elősegíti, sőt szükséges a p53 magi exportjához és az ezt követő citoplazmatikus lebontáshoz. Mivel az ARF-fel való kapcsolódás gátolja az Mdm2 ubiquitin ligáz aktivitását, az ARF megakadályozhatja a p53 magból történő kijutását a p53 Mdm2 közvetítette magi ubiquitinilálásának gátlásával (5.11. ábra). Ez a modell azokra a kísérletekre épül, melyek az Mdm2 és a p53-GFP együttes kifejeződését mutatják, nem pedig egyedül a p53-GFP-jét, és ez a p53-GFP citoplazmatikus felhalmozódását eredményezi vagy egyes sejtekben a magból való kizárását. Ezt a megfigyelést az Mdm2 közvetített p53 magi export bizonyítékának tekintették. A p53-GFP áthelyeződését megszüntette az Mdm2 RING-finger doménjének egy mutációja (HDM2 C464A), mely inaktiválta az ubiquitin ligáz aktivitását, illetve az ubiquitin aktiváló enzim (E1) egy hőmérséklet-szenzitív mutációja. Összhangban ezzel a modellel, a magi export gátlása LMB kezeléssel jelentős mennyiségű ubiquitinilált p53 felhalmozódásához vezetett a magfrakcióban a citoplazma frakcióhoz viszonyítva, ami arra utal, hogy az ubiquitiniláció a magban, a citoplazmába átkerülés előtt történhet (Zhang és Xiong, 2001).

A p53 a gyógyításban

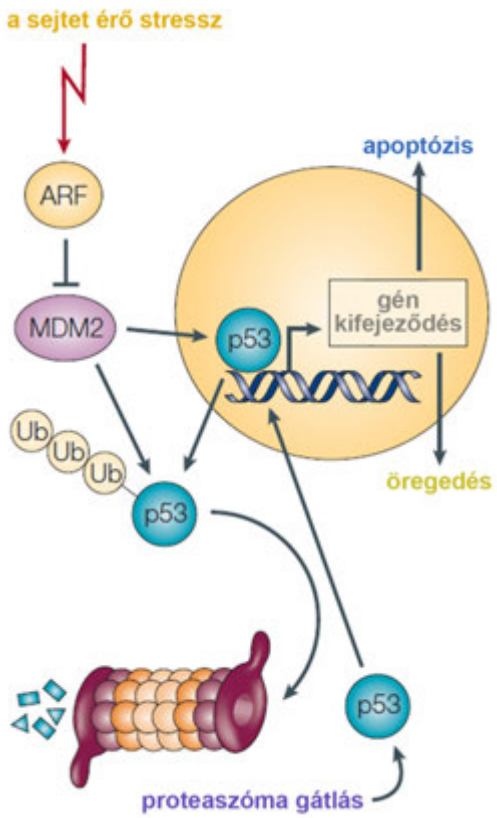
Az a megfigyelés, hogy a p53 a legtöbb rákbetegségben hibás, nem működik, igen alkalmas célponttá teszi új gyógymódok kidolgozásához. Mivel a p53 indukálhatja a tumorsejtek pusztulását, a legintenzívebben kutatott lehetőség, hogy olyan kis molekulát találjanak, mely egyes rák fajtákban újra aktiválja a p53-at. Olyan rákok esetén, ahol megmarad a vad típusú p53, de olyan változtatások történtek, melyek megakadályozzák a p53 aktiválódását, jó pár az Mdm2-t célba vevő vegyületet leírtak. Ezek közé tartozik a Nutlin-3, amelyik blokkolja a p53 és az Mdm2 kapcsolódását, és a HLI98 amelyik közvetlenül blokkolja az Mdm2 ubiquitin ligáz aktivitását. Ezek a vegyületek természetesen a normális és a tumor sejtekben egyaránt aktiválják a p53-at, de az a megfigyelés, hogy a rákos sejtek sokkal érzékenyebbek az apoptózis stimulálására, mint az egészséges sejtek, megcsillantja a reményt, hogy ezek a vegyületek elég szelektíven pusztítják a sejteket ahhoz, hogy használható rákellenes szerek váljanak belőlük.

Azok a rákbetegségek, melyekben mutáns a p53, más megközelítést igényelnek. Már leírtak olyan vegyületeket, melyek segítenek egyes ilyen mutáns fehérjéknek annyira újrahajtogatódni, hogy legalább a normális funkcióik egy részét visszanyerjék. A legtöbb esetben csak a tumorsejtek fejezik ki a mutáns fehérjét, így valószínű, hogy a gyógyszermolekulák erősen szelektívek lesznek, és alacsony toxicitást fejtenek ki a normális szövetekre. Erre az

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

esetre egy másik érdekes megközelítés, hogy azt próbálják szelektíven kihasználni , hogy tumorsejtekben nincs p53 és olyan vegyületeket találni, melyek p53 hiányában pusztítják el a sejtet (úgynevezett szintetikus letalitás). Bár a p53 aktiválása is jó ötlet, egyre nagyobb az érdeklődés a p53 gátlása iránt. A nyilvánvaló célja ennek a megközelítésnek, hogy megvédjék a normális sejteket a kemoterápia mellékhatásaitól. Általánosabban az inhibitorok a p53 más káros hatásait is kiküszöbölik.

A p53 útvonalon további gyógyszercélzási hely is adódik, a legalkalmasabb a p53 fő ubiquitin ligáza, az Mdm2 (5.12. ábra).



5.12. ábra A p53 aktiválása a proteaszóma gátlásával a rákgyógyításban

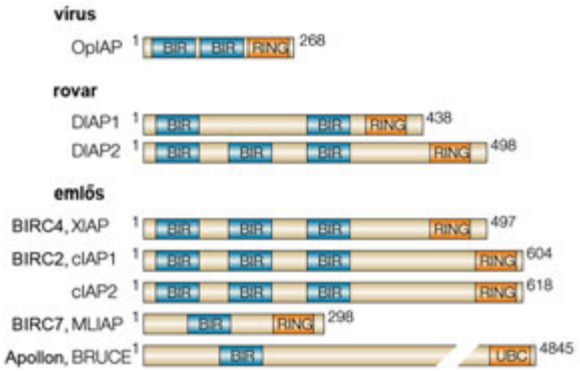
Az Mdm2 kifejeződését a p53 maga serkenti, ezzel egy negatív visszacsatolású szabályozó kört alakít ki. Ebből logikusan következik, hogy az Mdm2-p53 kölcsönhatás illetve a p53 ubiquitinilációjának gátlása a p53 tumor elnyomó aktivitásának erősödéséhez vezet. Az Mdm2 gátlása nemcsak a hibátlan, vad típusú p53-at hordozó tumorok esetén lehet kedvező hatású, hanem az Mdm2 más rákellenes fehérjéket bontó szerepét is megakadályozza. Ehhez hasonlóan alkalmazhatunk proteaszóma gátlószereket az olyan ráktípusok ellen is, melyek túl sok Mdm2-t fejeznek ki és ezáltal inaktiválják a p53-at (Adams, 2004).

Most még nehéz lenne megmondani a pontos okát annak, hogy egyes sejtek miért érzékenyek a proteaszóma gátlásra és mások miért nem. Egy lehetséges magyarázat szerint sok tumor gyors osztódási üteme függővé teszi ezeket a sejteket a proteaszómától, mely eltávolítja a megnövekedett számú sérült vagy rosszul hajtogatott fehérjét. Egy másik, még elegánsabb, mechanizmus az lehet, hogy a proteaszóma aktivitásának gátlása megfordíthatja vagy áthidalhatja a mutáns sejtciklus vagy apoptotikus ellenőrző pontokat, melyek a rákos fenotípus kialakulásában vagy fenntartásában szerepet játszanak. Ezért van tehát szükség a komplex ubiquitinilációs rendszer minél jobb megismerésére, mert új rákgyógyítási eljárásokhoz vezethet, melyek felcsillantják a reményt jobb és tökéletesebb gyógyítási eredmények elérésére a rosszindulatú és más daganatos betegségek kezelésére.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az IAP fehérjecsalád

Minthogy a kaszpázok által közvetített fehérjebontás irreverzibilis, pontosan szabályozni kell mennyiségüket és aktivitásukat. Az első ellenőrzőpont a kaszpáz útvonalon a proenzim aktiválás, a második ezzel egyenrangúan fontos, a kész, aktív kaszpáz közvetlen gátlása. Emlősökben és rovarokban ezeket a szabályozó folyamatokat az IAP (inhibitor of apoptosis protein) fehérjecsalád irányítja, mely a kaszpázok okozta veszély ellen az utolsó védelmi vonal. Az apoptózis gátló fehérjék, mint azt nevük is mutatja, védelmet nyújtanak a sejteknek az önpusztítás ellen (5.13. ábra).



5.13. ábra Az IAP fehérjecsalád tagjai különböző fajokban. Rövidítések: OpIAP, *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus IAP; BIR - baculovirus IAP repeat; DIAP, Drosophila melanogaster IAP; BIRC, BIR-domain-containing protein; XIAP, X-chromosome -linked IAP; cIAP, cellular IAP; MLIAP, melanoma IAP; BRUCE, BIR-repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme

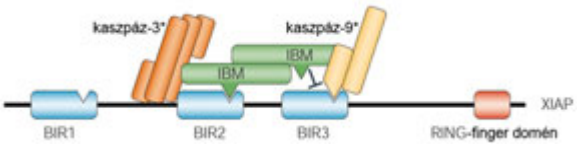
Az IAP fehérjéket eredetileg bakulovírusban azonosították, ugyanis képesek a fertőzött gazdasejt védekező apoptózisát elnyomni és ezzel a vírusnak több időt biztosítanak a replikációra. A bakulovírus IAP homológjait azóta megtalálták eukarióta szervezetekben is, pl. hasadó élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) sütő élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*), ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*), emlősökben, egérben és emberben, valamint utóbb már növényekben is. Az IAP család tagjai pro-apoptotikus fehérjék inaktiválásával és lebontásával gátolják az apoptózist. Az apoptózis szabályozó molekulák egyetlen olyan ismert csoportját alkotják, melynek van E3 ligáz aktivitása is. Tagsági követelmények ennél a családnál: egy vagy több jellegzetes *bakulovirális ismétlődő motívum* (BIR - baculovirus IAP repeat) megléte és az apoptózis leállításának képessége.

A Bcl-2 család fehérjéivel ellentétben, melyek csak a mitochondriális apoptózist gátolják, az IAP-k a külső és belső útvonalat is képesek blokkolni (5.3. ábra). A *BIR motívum*ra azért van szükség, mert ezáltal képesek olyan molekulákhoz kötődni (pl. Smac/DIABLO fehérjecsalád), melyek működésüket szabályozzák, illetve így tudnak kaszpázokhoz kapcsolódni és reverzibilisen gátolni őket. Mindezek mellett sok IAP molekulának van egy karboxiterminális motívuma, a *RING-finger domén*, ami ubiquitin ligázként (E3) működik vagy egy *ubiquitin konjugáló* (UBC) *motívum*, mely az ubiquitin átadásában vesz részt (5.13. ábra). A BIR közvetített szabályozás és inaktiválás és a RING közvetített fehérjebontás kombinációja központi szereppel bír az IAP család pro- és anti-apoptotikus döntéshozatalában (Jesenberger és Jentsch, 2002).

Az IAP-k C-terminális részlete funkcionálisan kapcsolódik az ubiquitin-proteaszóma rendszer közvetítette fehérjebontáshoz, mert itt egy RING-finger domént tartalmaznak. Apoptotikus stimulus hatására egyes IAP-k auto-ubiquitinilálódnak a RING-finger doménjük segítségével és a proteaszóma lebontja őket. Az XIAP az aktivált kaszpáz-3 ubiquitin ligázaként működhet, ubiquitinilálhatja és elősegítheti a proteaszomális lebontását. Ha szabályozó molekulák kapcsolódnak az IAP-k N-terminális végéhez, megakadályozzák a kaszpázokhoz történő kötődést és elősegítik az auto-ubiquitinilálásukat és lebomlásukat.

Egy egyszerű modellen nézzük meg most, hogy hogyan lép kölcsönhatásba az emlős XIAP (X-chromosome-linked IAP) az aktivált kaszpáz-3-mal és kaszpáz-9-cel. Az IAP fehérjék antagonista molekulái, melyek egy IAP kötőhelyet (IBM - IAP-binding motif) tartalmaznak, gátolják a kaszpázok és az IAP közötti kapcsolatot, azzal, hogy az IAP BIR doménjén levő résbe kötődnek (5.14. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

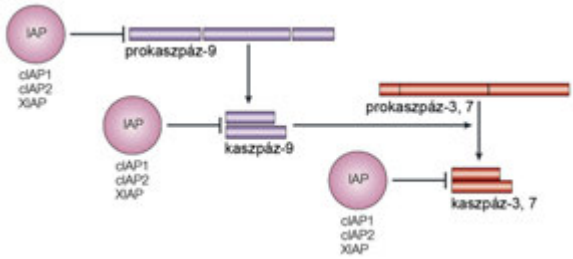


5.14. ábra A XIAP (X-chromosome-linked IAP) apoptózis gátló fehérje kaszpáz és antagonista kötése. A csillag az aktivált kaszpáz-3-at és kaszpáz-9-et jelzi. Rövidítések: IBM, IAP-binding motif; BIR, baculoviral IAP repeat.

Az IAP antagonisták közvetlenül is versengenek: a kaszpáz-9 IBM részéhez történő kapcsolódással megakadályozzák, hogy az IAP gátolja a kaszpáz-9-et. Egy közelmúltban történt megfigyelés szerint a BIR2 domén árkába kapcsolódó IAP antagonisták közvetlenül is versenghetnek az aktivált kaszpáz-3 és -7 kötéséért (Vaux és Silke, 2005).

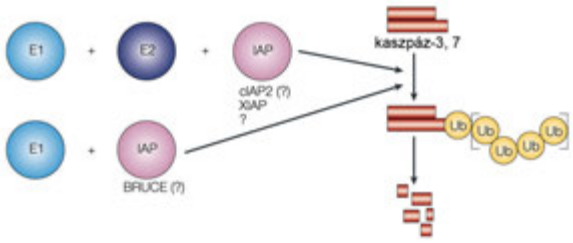
Az IAP fehérjék sokrétű szerepe

Emlősökben az X kromoszómához kötött apoptózis gátló fehérje (XIAP), a cIAP1, és a cIAP2 közvetlenül tudnak kötődni az aktív kaszpázokhoz és gátolják aktivitásukat (5.15. ábra). Ezen túl kölcsönhatásba léphetnek a prokaszpáz-9-cel és megakadályozhatják apoptotikus jelek hatására történő aktiválódását (Jesenberger és Jentsch, 2002).



5.15. ábra Az IAP fehérjék képesek gátolni akár az iniciátor, akár az effektor kaszpázok aktiválódását vagy aktivitását és ezzel a sejt túlélését segítik elő. (IAP, inhibitor of apoptosis protein; cIAP, cellular IAP; XIAP, X-chromosome -linked IAP)

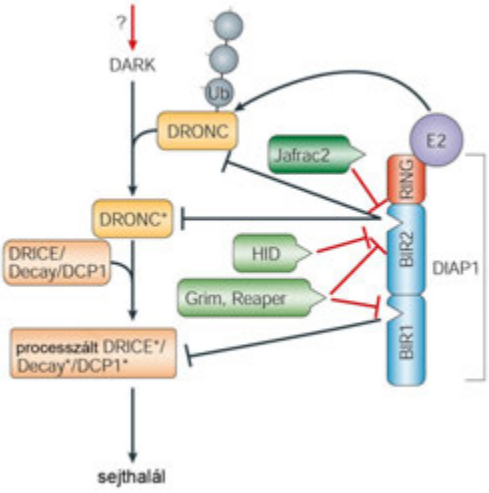
A XIAP és cIAP2 RING-finger fehérjékről kimutatták, hogy elősegítik az aktiválódott effektor kaszpázok ubiquitinilálását (5.16. ábra). A XIAP E3 aktivitása a kaszpáz-3-at és 7-et degradációra irányítja, ezzel is erősítve az apoptózis gátló hatását. A XIAP ubiquitin ligáz aktivitásához hasonlóan a BIR ismétlődő szekvenciát hordozó ubiquitin konjugáló enzim (BRUCE - BIR-repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) is képes ubiquitin láncot juttatni a kaszpázokra (Jesenberger és Jentsch, 2002).



5.16. ábra Ha az IAP fehérjék az ubiquitin ligáz (RING-finger) vagy ubiquitin konjugáló (E2) enzim aktivitásuk révén ubiquitinilálják a kaszpázokat, azokat a proteaszóma lebontja, és a sejt túlél. (IAP, inhibitor of apoptosis protein; cIAP, cellular IAP; XIAP, X-chromosome -linked IAP)

A fenti folyamatok gerinctelenekben is hasonlóan játszódnak le. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) IAP fehérjéje, a DIAP1 hozzá tud kötni a még nem aktivált DRONC-hoz illetve megköti és gátolja a DARK által már aktivált DRONC-ot (5.17. ábra).

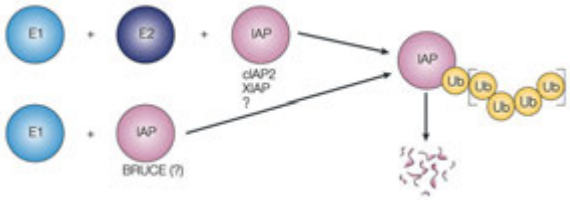
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.17. ábra A DIAP gátló hatásai az apoptózis folyamtára és az antagonisták Drosophilában. A csillag a kaszpáz aktivált formáját jelöli.

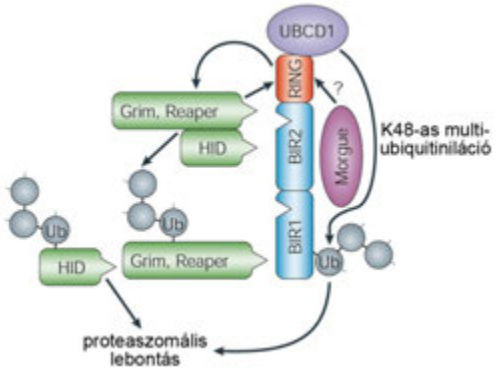
Az ecetmuslica IAP antagonistái (HID, Grim, Reaper és Jafrac2) különböző mértékben képesek az IAP fehérjék és a kaszpázok közti kapcsolódást megakadályozni. A Grim és a Reaper a DIAP1 mindkét bacolovírus IAP ismétlődő doménjéhez (BIR1 és BIR2) kötve a DRONC/DCP1/DRICE és a DIAP1 közti interakciót gátolja. A HID és a Jafrac2 a DIAP1 BIR2 doménjéhez kötve akadályozza a DIAP1-et a DRONC megkötésében és inaktiválásában. A DIAP1 RING-finger doménjéhez nagyon sokféle E2-es enzim hozzá tud kapcsolódni (Vaux és Silke, 2005).

Emlős T sejtekben apoptotikus stimulus hatására a XIAP és cIAP1 ubiquitin ligázok (E3) önmagukat ubiquitinilálják, majd a proteaszóma lebontja őket (5.18. ábra). Az IAP-k degradációja szükséges a T sejtek pusztulásához (Jesenberger és Jentsch, 2002).



5.18. ábra Apoptotikus stimulus hatására a XIAP és cIAP1 ubiquitin ligázok (E3) vagy a BRUCE (E2) önmagukat ubiquitinilálják, majd a proteaszóma lebontja őket, így a kaszpázokat nem gátolják, a sejthalál bekövetkezik (IAP, inhibitor of apoptosis protein; cIAP, cellular IAP; XIAP, X-chromosome -linked IAP)

Az emlős T sejtekhez hasonlóan, *Drosophilában* a Reaper és a HID (és valószínűleg a Grim is) képesek a DIAP1 degradációjának elősegítésére UBCD1-függő módon (5.19. ábra).



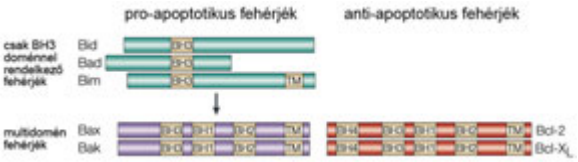
5.19. ábra A DIAP kölcsönható partnerei *Drosophilában*

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A Morgue, egy ubiquitin konjugáló enzim változat (UEV - ubiquitin E2 variant), szintén kölcsönhatásba lép a DIAP1-gyel, bár egyelőre a kapcsolódás funkciója nem ismert. Más esetben a HID, Grim vagy Reaper szintén ubiquitinilálódhatnak a DIAP1 által és proteaszomális lebontásra kerülhetnek. Az aktuális körülmények alapján dől el, hogy a két ellentétes hatású ubiquitiniláló folyamat közül melyik fog végbemenni (Vaux és Silke, 2005).

A Bcl-2 fehérjecsalád

A Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) családnak apoptózis elősegítő, *pro-apoptotikus* és gátló, *anti-apoptotikus* tagjai is vannak és a mitochondriumok épségének ellenőrzésén keresztül elsődleges a szerepük a programozott sejthalál szabályozásában (5.20. ábra).



5.20. ábra A Bcl-2 család fehérjéi. Az ábrán látható rövidítések: Bcl-2, B-cell lymphoma-2; Bid, BH3-interacting domain death agonist; Bad, Bcl-2 antagonist of cell death; Bim, Bcl-2 interacting mediator of cell death; TM, transzmembrán domén; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bak, Bcl-2-antagonist/killer-1; Bcl-X_L, B-cell lymphoma-extra large.

Itt a tagok a Bcl-2 homológia (BH) domén szekvencia és szerkezeti hasonlósága alapján kerültek a családba. A C-terminális transzmembrán régió horgonyozza ezeket a fehérjéket a mitochondriumok külső membránjába vagy az endoplazmatikus retikulumba. A pro-apoptotikus fehérjék a membránban pórusokká állnak össze, a kialakuló lyukakon keresztül citokróm-c és Ca^{2+} szabadul fel. Ezzel ellentétben az anti-apoptotikus tagok a membránban összekapcsolódnak a pro-apoptotikus fehérjékkel és így megvédik a mitochondriumok integritását az előbbi károsodások meggátlásával. A pro-apoptotikus családtagok (mint a Bid vagy a Bax) proteaszomális lebontása megmentheti a sejtet az öngyilkosságtól (Fennell és mtsai., 2008; Jesenberger és Jentsch, 2002; Youle és Strasser, 2008).

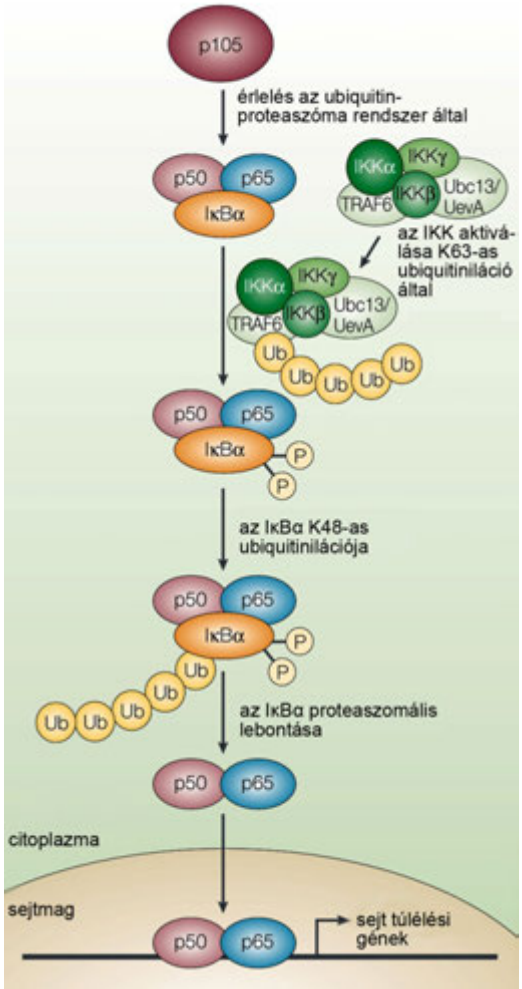
Az ubiquitin-proteaszóma rendszer részvétele a jelátviteli folyamatokban

Az NF-κB jelátviteli útvonal szabályozása

- Transzkripciós faktor (dimer)
  - NF-κB1 (p50) vagy NF-κB2 (p52), és c-Rel, RelA (p65), RelB
- I-κB - az NF-κB inhibitora
  - elfedi a magi lokalizációs jelet
  - ha foszforilálódik, ubiquitinilálódik - lebomlik
- Ub-proteaszóma rendszer részvétele
  - NF-κB processzálás (p100 – p50, p105 – p52)
  - IKK - I-κB kináz aktiválás
  - I-κB lebontás

Az NF-κB (nuclear factor κ enhancer binding protein) klasszikus formája egy p50 és p65 egységekből álló heterodimer (5.21. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

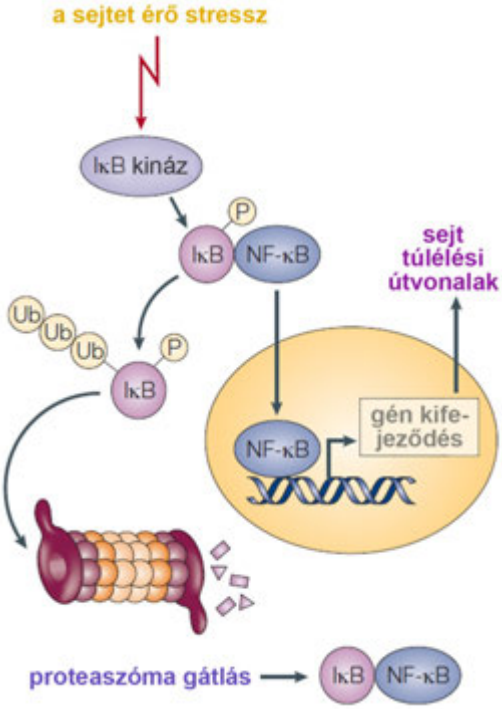


5.21. ábra Az NF-κB aktivitás szabályozása

A p50 prekurzor alakját, a p105 fehérjét az ubiquitin-proteaszóma rendszer alakítja az érett formába. A p50 a p65-tel együtt dimerként van jelen a citoplazmában és összekapcsolódik az NF-κB inhibitorával, az IκBα-val. Az NF-κB-hez kötve, az IκBα elfedi annak magi lokalizációs jelét és ezzel megakadályozza a bejutását a sejtmagba. A sejtet érő különféle jelek hatására, az IκBα gyorsan foszforilálódik az IκB kináz (IKK) komplexum által. Az IKK maga is nem proteolitikus multiubiquitiniláció hatására aktiválódik. Az aktiváláshoz Lys63-on át felépülő multiubiquitin láncokra van szükség. Ezt egy RING-finger fehérje, a TRAF6 (tumour-necrosis factor (TNF)-receptor associated factor 6) és egy vele együttműködő ubiquitin konjugáló enzimkomplexum, a heterodimer Ubc13/Uev1 (más néven TRIKA-1 - TRAF6-regulated IKK activator 1) szintetizálja. Ennek a szokatlan modifikációnak a célpontja maga a TRAF6. Az aktivált IKK általi foszforiláció után az IκBα foszforilált részei adják az RSIκB/β-TrCP ubiquitin ligáz számára felismerhető helyeket és az IκBα gyorsan ubiquitinilálódik majd a proteaszóma lebontja. Az IκBα degradációját követően az NF-κB bejut a magba, ahol az immunitással, gyulladással és más folyamatokkal kapcsolatos gének széles spektrumának átírását irányítja (Jesenberger és Jentsch, 2002).

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a rák kialakulásában a NF-κB rendszer fontos szerepet játszik. Ha felszabadul specifikus inhibitora, az IκB gátlása alól, bekerül a sejtmagba, a DNS-hez köt és a növekedéssel, differenciálódással kapcsolatos valamint apoptózist gátló gének (Bcl-2, IAP) átírását szabályozza (5.22. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.22. ábra Rákterápia proteaszóma gátlással az NF-κB útvonalon

Mindezeken túl elősegíti az onkogenezist és egyes rosszindulatú daganatsejtekben folyamatosan aktív. A folyamatos aktiválódás megtörténik kemoterápiás gyógyszerek, sugárzás, citokinek vagy oxidánsok hatására is. Ezzel összhangban, az NF-κB gátlása a kritikus szabályozási pont indukálható kemorezisztencia esetén és úgy tűnik, megnöveli a malignus sejtek érzékenységét a kemoterápiás szerek illetve a besugárzás iránt. Az NF-κB inaktiválása az IκB foszforilációjának gátlása útján nem tudja teljesen megakadályoznia a sejtosztódást, ami azt mutatja, hogy a proteaszóma inhibitorok nem csak az NF-κB blokkolásán keresztül hatnak, hanem más jelátviteli útvonalakat is célba vesznek. Mindezek mellett, a proteaszóma gátlás megakadályozza az ubiquitinilált IκB lebontását is (Adams, 2004).

A stresszre, mint a neoplasia vagy a kemoterápia, adott válasz során az IκB inhibitor foszforilálódik és lebomlik a proteaszóma által. Ezt követően az NF-κB bejut a magba és különféle túlélést elősegítő útvonalakat hoz működésbe. A proteaszóma gátlás megakadályozza az NF-κB aktiválódását és megnöveli a sejt érzékenységét a kemoterápia citotoxikus hatásaira (5.22 ábra).

Az NF-κB útvonal hibás szabályozása összekapcsolódik egyes rosszindulatú daganatokkal, ide tartozik az akut limfoblasztikus leukémia és a mielóma multiplex. Az NF-κB jelátviteli út állandó aktiválása a drogrezisztencia egyik formája, amit sok szolid tumor és hematológiai daganat használ. Például az NF-κB aktiválódásának gátlása az N-acetyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal proteaszóma inhibitorral jelentősen megnöveli az érzékenységet a különböző sejthalál indukáló ligandumok iránt (DILs - death-inducing ligands, például a TNF-α vagy a doxorubicin) érzékeny vagy DIL rezisztens limfoid sejtvonalakban.

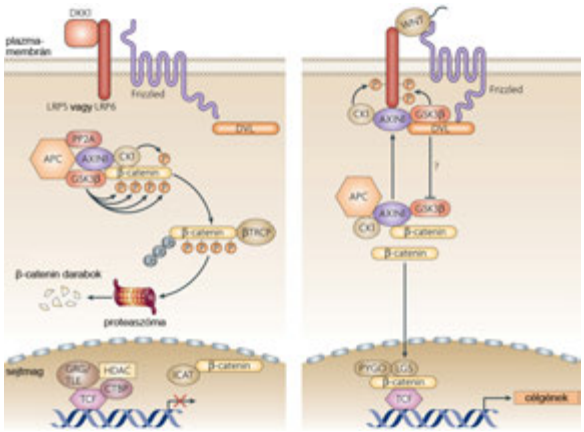
A Wnt–β-catenin–TCF/LEF jelátviteli útvonal

- a Wnt egy szekretált jelátvivő molekula
- a Frizzled receptor-család megköti
- ennek hatására a Dishevelled aktiválódik
- inaktiválja a glikogén szintáz kinázt (GSK-3β, zw3), az APC-axin-GSK-3β komplexum tagját
- a stabil β-catenin (Arm) belép a magba és leszorítja a groucho-t a TCF-ről

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

- beindul a génaktiválódás, génátírás
- a Wnt jelátviteli útvonalnak alapvető szerepe van a fejlődés és a differenciálódás szabályozásában
- a rendszer hibája illetve egyes célgének kifejeződés tumorképződéshez vezethet

A Wnt jel hiányában a β catenin szint a citoplazmában és a sejtmagban alacsony lesz, mert a CK1 (casein kinase 1) és a GSK3β (glycogen synthase kinase 3β) szerin/treonin kinázok folyamatosan foszforilálják. A hiperfoszforilált β catenint a βTRCP (β transducin-repeat-containing protein) megköti és ubiquitinilálja majd a proteaszóma lebontja (5.23. ábra, bal oldal). A β catenin lebontásra előkészítő komplexum a következő fehérjékből áll: CK1 és GSK3β, valamint az AXIN1 (axis inhibition protein 1) és az APC (adenomatous polyposis coli) horgonyfehérjék. A magban a TCF (T-cell factor) molekulákat ko-represszorok, mint a GRG/TLE (Groucho/transducin-like enhancer) kötik meg és ezzel megakadályozzák a Wnt célgének átíródását. A represszor komplexum további tagjai a CTbP (C-terminal binding protein) és a HDAC (histone deacetylase) fehérjék. A magban a β catenin TCF-hez kötődését az ICAT (cell autonomous inhibitor of β catenin and TCF) fehérje akadályozza meg. A sejtfelszíni Frizzled receptor komplexum, mely a Frizzled és az LRP5 (LDL receptor-related protein 5) vagy LRP6 fehérjékből épül fel, aktívan gátlódhat a receptor-kötött oldható inhibitorok által, mint amilyen a DKK1 (Dickkopf homologue 1) (Staal és mtsai., 2008).



5.23. ábra A Wnt jelátviteli útvonal inaktív (bal oldal) és Wnt kötött, aktív (jobb oldal) formája (DVL, mammalian homologue of *Drosophila* Dishevelled; PP2A, protein phosphatase 2A).

Ha a lipiddel módosított Wnt fehérje a receptor komplexumhoz köt bekapcsol a jelátviteli útvonal (5.23. ábra, jobb oldal). A CK1 és GSK3β kinázok foszforilálják a receptor LRP fehérjéjét és az AXIN1 a plazma membránhoz verbuválódik. A β catenin l lebontásra előkészítő komplexum kinázai inaktiválódnak és a β catenin tovább kerül a sejtmagba, hogy a TCF-fel aktív transzkripciós faktor komplexumot hozzon létre. Ez aztán célgének egész sorának átíródásához vezet. A magban a β catenin a TCF és LEF faktorokhoz kapcsolódik és kofaktorokat vonz oda, mint a LGS (legless, más néven bCL9) és a Pygopus (PYGO), CBP/p300, brahma és MED12, hogy elindítsa a génátírást (5.23. ábra).

Ellenőrző kérdések

1. Írjon példákat sokszorosan foszforilált, majd multiubiquitilált fehérjékre!
2. Milyen molekulák és milyen módon szabályozzák az Mdm2-t?
3. Hogyan bomlik le és hogyan stabilizálódik a p53?
4. Mik az apoptózis gátló fehérjecsalád (IAP) jellemzői?
5. Milyen mód(ok)on képesek az apoptózis gátló fehérjecsalád (IAP) tagjai az apoptózis megakadályozására?
6. Milyen mód(ok)on vesz részt a proteaszóma az NF-κB jelátviteli útvonal szabályozásában?
7. Mi a sorsa/funkciója a β cateninnek a Wnt szignál hiányában illetve jelenlétében?

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Irodalom

Adams, J. (2004) The proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer***4**, 349-360.

Dawson, S., Higashitsuji, H., Wilkinson, A. J., Fujita, J. és Mayer, R. J. (2006) Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53. *Trends Cell Biol* **16**, 229-33.

Fennell, D. A., Chacko, A. és Mutti, L. (2008) BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* **27**, 1189-97.

Jesenberger, V. és Jentsch, S. (2002) Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***3**, 112-121.

Lee, J. C. és Peter, M. E. (2003) Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.***193**, 39-47.

Marine, J. C. és Jochemsen, A. G. (2005) Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun***331**, 750-60.

Riedl, S. J. és Shi, Y. G. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***5**, 897-907.

Staal, F. J., Luis, T. C. és Tiemessen, M. M. (2008) WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* **8**, 581-93.

Taylor, R. C., Cullen, S. P. és Martin, S. J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol***9**, 231-41.

Vaux, D. L. és Silke, J. (2005) IAPs, RINGs, and ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***6**, 287-297.

Weissman, A. M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***2**, 169-178.

Youle, R. J. és Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47-59.

Zhang, Y. és Xiong, Y. (2001) Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ***12**, 175-86.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

III. fejezet - Autofágia

6. A lizoszómák

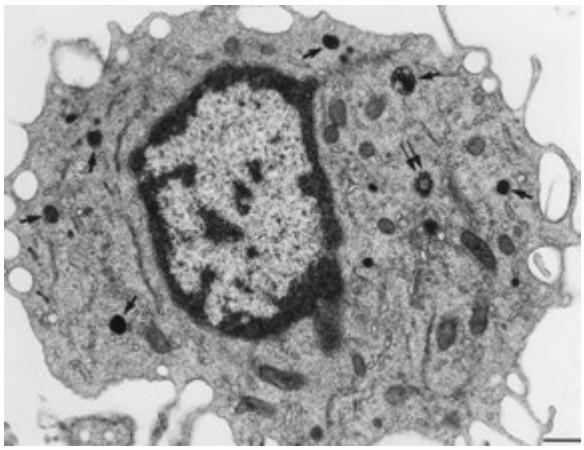
A lizoszómák feladatai

A lizoszómák sejtbiológiai szerepe az extracelluláris térből felvett anyagok, valamint az intracelluláris térben lévő, de a sejt számára már nem szükséges molekulák és sejtalkotók lebontása. Ezek a következő kategóriákba sorolhatók:

- heterofágiával felvett anyagok lebontása
  - a táplálékként szolgáló molekulák feldolgozása
  - más pusztuló sejtek maradványainak emésztése
  - idegen anyagok eltávolítása, védekezés kórokozók ellen
- autofágiával elkülönített anyagok lebontása
  - a sejt saját komponenseinek lebontása, állandó kicserélése, megújítása
  - a sejt átépítése (esetleg lebomlása) a növekedés, a fejlődés, a differenciáció során

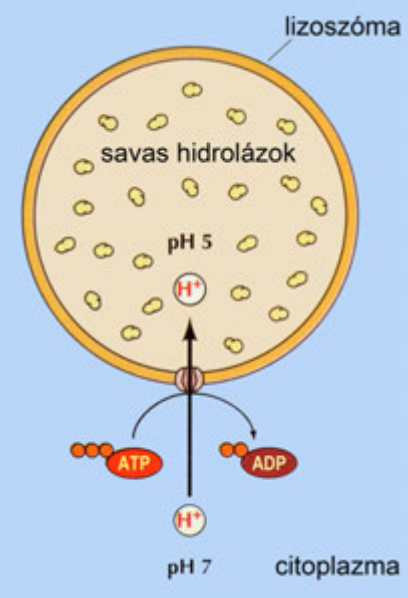
A lizoszómák felépítése

- a lizoszómák egyszeres membránnal körülölelt vezikulumok (6.1. ábra)
- a lizoszómák feladatait a bennük található, savas pH-n működő, hidrolitikus enzimek sokasága látja el
- a belsejükben uralkodó savas (pH 5) kémhatást egy ATP függő protonpumpa, a vakuoláris ATPáz (V-ATPáz) tartja fenn (6.2. ábra)
- a lizoszóma membránja védi a sejtet az önemésztéstől (az esetleg kikerülő lizoszomális enzimek aktivitása semleges pH-n töredéke a savas pH-n mutatott aktivitásnak)



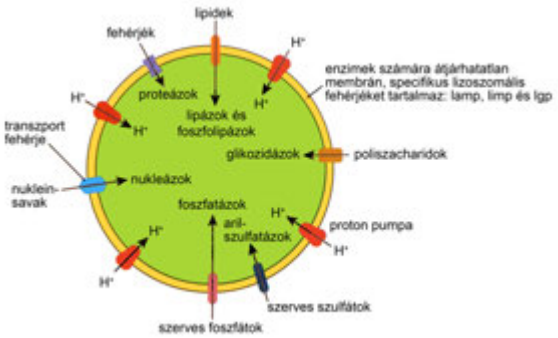
6.1. ábra Lizoszómák emlős limfocitában. A nyilak a lizoszómákra mutatnak. A kettős nyíl a sejtközpontot jelöli. Méretvonal: 1µm (László Lajos felvétele)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.2. ábra A lizoszóma ATP függő protonpumpája, a vakuoláris ATPáz (V-ATPáz)

A lizoszómák 0,05-1,5 µm átmérőjű, egyszeres lipidmembránnal körülvett vezikulumok. Morfológiai megjelenésük rendkívül változatos. A lizoszómákban több mint 40 nem specifikus, savas hidrolázt azonosítottak. Ezekről kiderült, hogy képesek valamennyi fontosabb szerves vegyületcsoportot (szénhidrátok, lipidek, fehérjék, nukleinsavak) lebontani. Működésük gyakran sorba kapcsolt, és legtöbbször a molekula teljes, monomerekig történő degradációjáig tart. A keletkező végtermékek átjutnak az autolizoszóma membránján és újra felhasználható építőkövekként jelennek meg a citoplazmában (6.3. ábra).



6.3. ábra A lizoszóma enzimei és az általuk lebontott anyagok

A savas hidrolázok közös jellemzője, hogy hidrolitikus reakciókat katalizálnak és csak savas (pH=5) környezetben működnek megfelelően. Ezt az alacsony intravezikuláris pH-t a lizoszómák membránjában levő vakuoláris ATPáz biztosítja, mely az elektrokémiai potenciálgrádienssel szemben protonokat juttat a lumenbe az ATP hidrolízisének energiáját felhasználva (Nishi és Forgac, 2002). A savas közeg azért is fontos, mert hozzájárul a bekerült fehérjék denaturációjához, így megkönnyíti a lebontásukat. A sejt citoplazmájában levő anyagok védettek az önemésztődéstől, egyrészt mert a lizoszóma membránja meggátolja az enzimek kijutását, másrészt a citoplazmába esetleg kikerülő enzimek a közel semleges pH-n (pH=7,2) gyakorlatilag nem aktívak. Maguk a lizoszomális fehérjék védettek a savas pH és az enzimek hatásaival szemben nagymértékű glikozilációjuknak köszönhetően, a lizoszomális membrán pedig speciális lipideket is tartalmaz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A lizoszómák felfedezése, a lizoszóma-koncepció felállítása

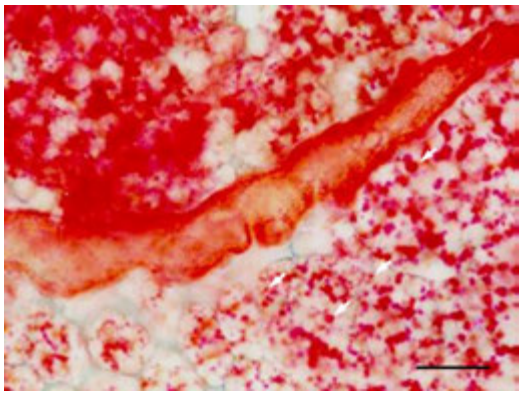
A májból készített vizes mitokondrium frakció nem specifikus foszfatáz aktivitásnak csak töredéke mérhető vissza a 0,25 M szukrózt tartalmazó frakcióban. Viszont hipotóniás sokkal, detergensekkel, fagyasztással-olvasztással, foszfolipid emésztéssel az enzimatikus aktivitás előhívható, azaz a frakcionálás során csak látens marad, de nem szűnik meg. Ebből az következik, hogy az enzimek a cukrot is tartalmazó frakcionálási eljárás során valamilyen, membránnal határolt részecskékben vannak. Ha ezeknek a membránjait elroncsolják, felszabadul az addig nem mérhető enzimaktivitás.

A frakcióban ezután számos enzimet azonosítottak (katepszin D, β-glükuronidáz, ribonukleáz, dezoxiribonukleáz). A mitokondrium frakciótól sejtfrakcionálási eljárásokkal megtisztítottak egy olyan viszonylag nagy tisztaságú frakciót, amely nagyrészt csak vezikulumokat és a látens aktivitású enzimeket tartalmazta. Az ezeket a savas hidrolázokat tartalmazó, membránnal határolt vezikulumokat nevezték el lizoszómának.

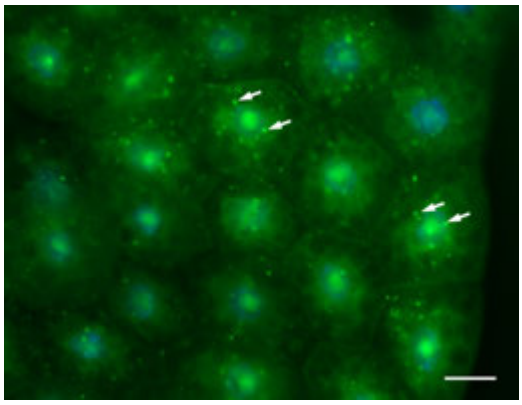
A lizoszómák 1955-ben történt felfedezéséért *Christian de Duve* belga biokémikus és sejtbiológus, Albert Claude-dal és George E. Palade-val megosztva, 1974-ben megkapta az orvosi Nobel-díjat. A közös indoklás szerint „a sejt szerkezeti és működési szerveződését érintő felfedezéseikért” kapták a legnagyobb tudományos elismerést.

A lizoszómák morfológiai azonosítása

A lizoszómák ultrastrukturális és enzimcitokémiai azonosítása *Alex Novikoff* és munkatársai nevéhez fűződik, akik 1952-56 között végezték ilyen irányú kísérleteiket. Fénymikroszkópban legkönnyebben a savas kémhatásukon alapuló vitális festéssel mutathatjuk ki a lizoszómák jelenlétét a sejtekben. Ilyen festékek a neutrálvörös (6.4. ábra), az akridinoranzs (6.5. ábra), vagy a Lysotracker-Red (6.6. ábra). Ez utóbbiak megfelelő hullámhosszú ultraibolya fénnyel gerjesztve fluoreszcens mikroszkópban vizsgálhatók.

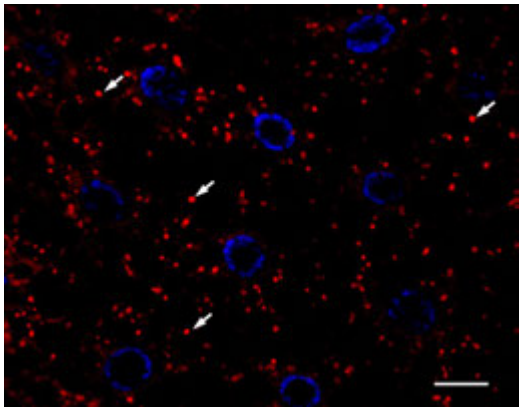


6.4. ábra Neutrálvörössel megfestett rovar zsírtest preparátum. A nyilak a lizoszómákra mutatnak. A kép közepén egy Malpighi-edény húzódik. Méretvonal: 20µm (Dr. Sass Miklós felvétele)



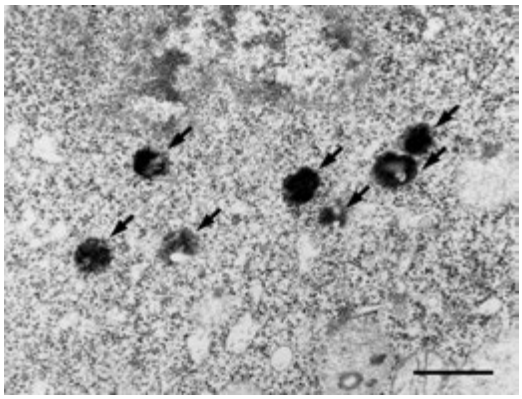
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.5. ábra Akridinoranzs festett rovar zsírtest preparátum fluoreszcens fénymikroszkópos képe. A nyilak a lizoszómákra mutatnak. A minden sejtben látható nagyobb zöld folt a sejtmagvacska, ami magas RNS tartalma miatt savas és ugyancsak megfestődik. Méretvonal: 20µm (Varga Ágnes felvétele)

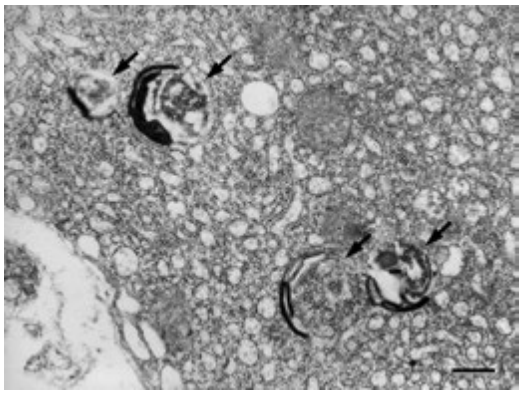


6.6. ábra LysoTracker Red-del festett rovar zsírtest preparátum fluoreszcens fénymikroszkópos képe. A sejtmagok kékszínben tűnnek elő a DAPI festés miatt. A nyilak a lizoszómákra mutatnak. Méretvonal: 20µm (Lőw Péter felvétele)

Jól használhatók az egyszerű festésnél kicsit összetettebb enzimhisztokémiai reakciók is, pl.: Gömöri-féle savas foszfatáz, nem specifikus észteráz, arilszulfatáz kimutatás. Ilyenkor a mesterséges szubsztrátról lehasított PO_4^- csoport a hozzáadott ólomsókkal csapadékot képez. Ez aztán fekete színben látszik a fénymikroszkópban, de a nehézfém elektrondenz volta miatt az elektronmikroszkópban is jól detektálható (6.7. és 6.8. ábra).



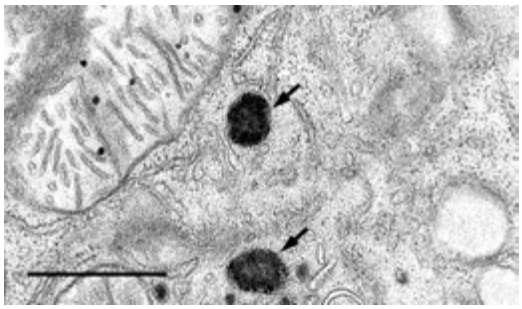
6.7. ábra Savas foszfatáz elektronmikroszkópos szintű enzimcitokémiai kimutatása emlős limfocitában. A nyilak a primer lizoszómákra mutatnak, melyekben a savas foszfatáz enzimaktivitás elektrondenz csapadékot hozott létre. Méretvonal: 1 µm (László Lajos felvétele)



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

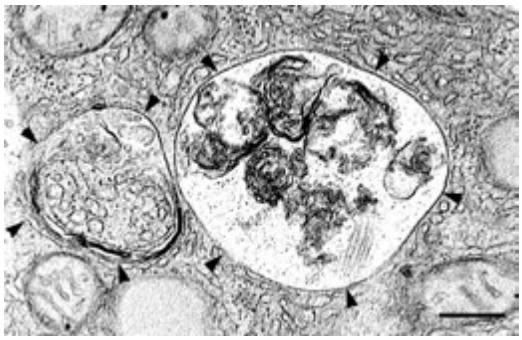
6.8. ábra Savas foszfatáz elektronmikroszkópos szintű enzimcitokémiai kimutatása emlős hasnyálmirigysejtben. A nyilak a szekunder lizoszómákra mutatnak. Méretvonal: 2 µm (László Lajos felvétele)

A *primer lizoszómák* azok, amelyek még nem vettek részt emésztési folyamatokban, nem tartalmaznak emésztendő anyagokat. Elektronmikroszkópos felvételen homogén belső szerkezetű, szabályos gömb alakú sejtszervecskék (6.9. ábra).



6.9. ábra Primer lizoszómák (nyilak) emlős májsejtben. Méretvonal: 1 µm (Kovács Attila Lajos felvétele)

A *szekunder lizoszómák* azok az organellumok, amelyek együtt tartalmazzák a savas hidrolázokat és a lebontandó anyagokat. Alakjuk rendkívül változatos, egységes morfológiájukat nem lehet megadni. belsejükben gyakran felismerhetők nagyobb sejtalkotók is. Ezeket az organellumokat nevezik az autofágia kutatásban autolizoszómának (6.10. ábra).



6.10. ábra Szekunder lizoszómák (nyílhegyek között) emlős májsejtben. Méretvonal: 1 µm (Kovács Attila Lajos felvétele)

A *tercier lizoszóma*, vagy *residualis test* az a sejtszervecske, amelyben minden emészthető anyag lebomlott már és csak emészthetetlen maradékot tartalmaz. Ezek felhalmozódhatnak a különféle sejtekben (ilyen például az öregségi pigmentnek is nevezett lipofuszcin), vagy exocitózissal kiürülhetnek belőle.

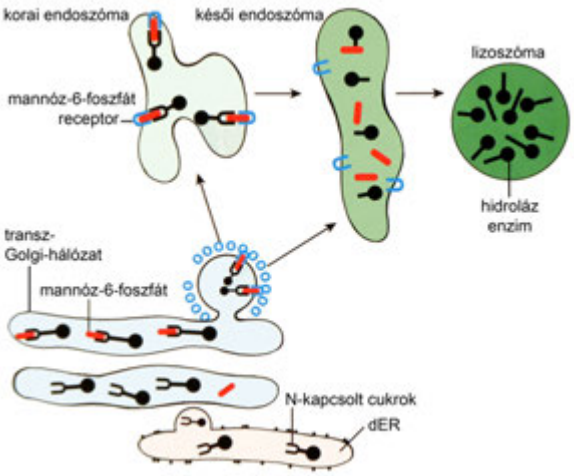
A lizoszomális enzimek útja a lizoszómába

Az állati sejt több sejtkompartmentuma is a membrán egységeik felhasználásával illetve megosztásával újul meg. Az endocitózis során például a sejtmembrán egy részlete fűződik le, hogy vezikulumot képezzen, ami majd a sejtben egy másik sejtszervecskével egyesül. Aktív újratermelés nélkül a plazmamembrán mérete folyamatosan csökkenne. A lizoszómák részt vesznek ebben a dinamikus membrán kicserélődési rendszerben, és fokozatos éréssel a megfelelő hidrolázokat szállító, Golgi eredetű vezikulumok késői endoszómákkal való fúziója során keletkeznek.

A lizoszomális fehérjék termelődése a lizoszómák fenntartásának egy módját valószínűsítik. A lizoszomális fehérjék génjei a sejtmagban íródnak át. Az mRNS átiratok kijutnak a magból a citoplazmába, ahol a durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (dER) felszínén lévő riboszómákon fordítódnak át fehérjére. A frissen szintetizált polipeptidek a dER lumenébe jutnak, ahol poszttranszlációs módosításokon esnek át. A dER-ből vezikuláris transzporttal a Golgi-komplexumba kerülnek. A cisz-Golgi-hálózatban lizoszóma specifikus jelet kapnak: egy kétlépéses enzimatikus reakció során a lizoszomális fehérjék mannóz oldalláncai foszforilálódnak, így mannóz-6-

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

foszfát keletkezik a peptideken (6.11. ábra). Ez a jel teszi lehetővé, hogy a transz-Golgi-hálózatban (TGN) hozzákötődjenek a mannóz-6-foszfát receptorokhoz, ami elengedhetetlen a lizoszomális rendszerbe jutó vezikulumokba csomagolódásukhoz. A Golgi-membrán-lizoszomális enzim-mannóz-6-foszfát-receptor komplexet egy klatrinburok veszi körül majd, mint egy vezikulum, lefűződik a TGN-ről. Ez a definíció szerinti *primer lizoszóma*.

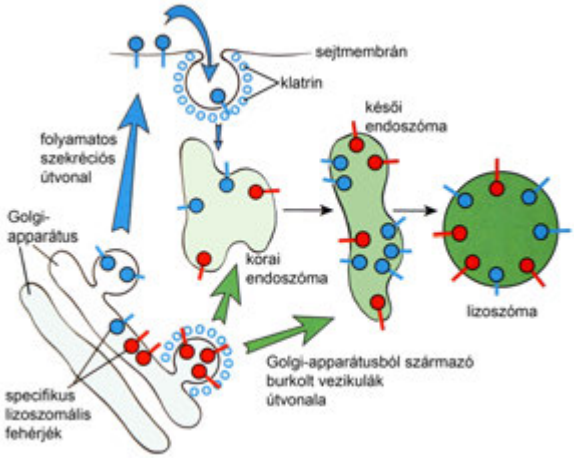


6.11. ábra A savas hidrolázok szelektív transzportja a lizoszómába. Az egyes kompartmentek pH csökkenésének mértékét az egyre mélyülő zöld szín jelzi.

A Golgi-apparátust elhagyva a lizoszomális enzimekkel töltött vezikulum késői endoszómákkal egyesül, ami viszonylag savas sejtszervecske hozzávetőlegesen 5,5 pH értékkel. Ez a savas közeg okozza a lizoszomális enzimek disszociációját a mannóz-6-foszfát receptorokról. Ezt követően a mannóz-6-foszfát defoszforilálódik és ezáltal az enzim aktívvá válik. A mannóz-6-foszfát receptor a membránhoz kötve marad és reciklizál a TGN-be (6.11. ábra).

Az enzimek további vezikulumokba csomagolódnak a végleges lizoszómákba szállítódásukhoz. A primer lizoszómából így vezikuláris transzport révén létrejön a szekunder, már emésztő lizoszóma. A folyamat során természetesen elveszíti a klatrin burkát. A késői endoszómák maguk is érett lizoszómává válnak, mint azt az endoszomális membránösszetevők lizoszómákból az endoszómákba történő visszaszállítása is bizonyítja (von Figura, 1991).

Érdemes megemlíteni, hogy bizonyos enzimek nem ezen az úton jutnak el a lizoszómába (mannóz-6-foszfát independens útvonalak) (Saftig és Klumperman, 2009). A folyamatos szekréciós úton keresztül bizonyos lizoszomális fehérjék a Golgi-apparátusból kilépve a sejtfelszínre kerülnek, majd innen endocitózissal újra felveszi őket a sejt. Korai és késői endoszómákon keresztül végül eljutnak a lizoszómákba (6.12. ábra).



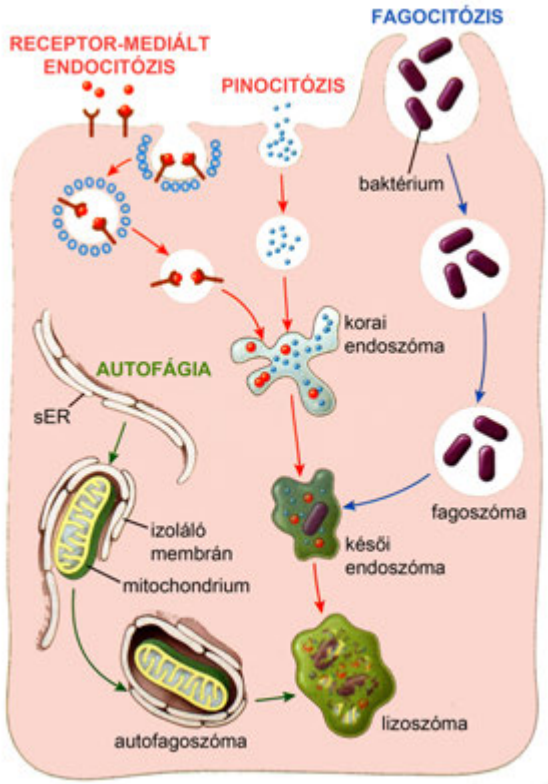
6.12. ábra A frissen szintetizált lizoszomális fehérjék kétféle úton juthatnak el a lizoszómába. A *kék nyilak* mutatják a folyamatos szekréciós utat, melyen keresztül bizonyos lizoszomális fehérjék a Golgi-apparátusból

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

kilépve a sejtfelszínre kerülnek és innen endocitózissal újra felveszi őket a sejt. Korai és késői endoszómákon keresztül végül eljutnak a lizoszómákba. A *zöld nyilak* a Golgi-apparátusból származó burkolt vezikulumok útján történő célbajuttatást mutatják. A Golgi-vezikulumok itt a korai vagy a késői endoszomális kompartmenttel fuzionálnak és így jutnak el a fehérjék a lizoszómákba. Az egyes kompartmentek pH csökkenésének mértékét az egyre mélyülő zöld szín jelzi.

A lebontandó anyagok útja a lizoszómákba

A lizoszómákba egyrészt az extracelluláris térből felvett anyagok juthatnak. Ebben az esetben a *fagocitózissal*, *pinocitózissal* vagy a *receptor mediált endocitózissal* létrejött vezikulum fuzionál egy primer vagy szekunder lizoszómával, majd tartalma megemésztődik a lizoszóma belsejében. A fagocitózis során keletkező endoszómát *fagoszómának*, az ennek a lizoszómával történő fúziójával létrejövő sejtszervecskét pedig *fagolizoszómának* nevezzük (6.13. ábra).



6.13. ábra A lebontandó anyagok útja a lizoszómákba

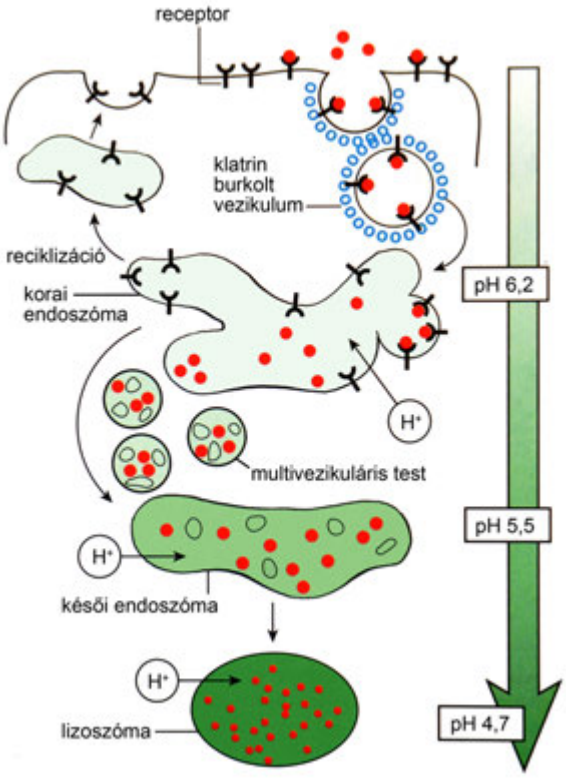
A lizoszómákban másrészt a sejt már elhasználódott alkotórészei bontódhatnak le. Ezt hívjuk makroautofágiának, ilyenkor a lebontandó citoplazma részletet egy kettős membrán veszi körül és az így formálódó *autofagoszóma* olvad össze primer lizoszómákkal. A keletkező *autolizoszómában* bomlanak le a megújításra szánt vagy felesleges anyagok (6.13. ábra). A citoplazmatikus anyagok mikroautofágia vagy a chaperon-mediált autofágia (CMA) révén is bejuthatnak a lizoszóma belsejébe. Ezekre a folyamatokra később térünk ki (lásd autofágia fejezetek).

A lebontandó anyagok útja a lizoszómákba - az endoszomális útvonal

Az endoszómák membrán „buborékok”, melyek akkor keletkeznek, mikor a sejt lefűz egy membrán vezikulumot, hogy valamit felvegyen a külső környezetéből (Mellman, 1996). Korai endoszómának nevezzük a vezikulumot közvetlenül a lefűződése után. A korai endoszómák csak enyhén savasak, így nincs bennük lebontás. Ahogy a korai endoszóma mélyebbre vándorol a sejtben, egyre savasabbá válik és késői endoszómává alakul, ami végül lizoszómát képez. Ez pedig teljesen lebontja azt, ami benne van (Cuervo és Dice, 1998).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az endoszómák válogatási környezetet biztosítanak a felvett anyagok számára, mielőtt a lebontó lizoszómákba kerülnek. Az LDL-t például a sejt a sejtfelszíni LDL receptorokon megkötve veszi fel. Ahogy a korai endoszómába jut, az LDL leválik a receptorról és a receptor visszakerül a sejtfelszínre. Az LDL az endoszómában marad és a lizoszómákhoz szállítódik további feldolgozásra. Az LDL a korai endoszómában uralkodó enyhén savas közeg miatt disszociál a receptorról, ezt a vakuoláris membrán proton pumpa V-ATPáz hozza létre (6.14. ábra).



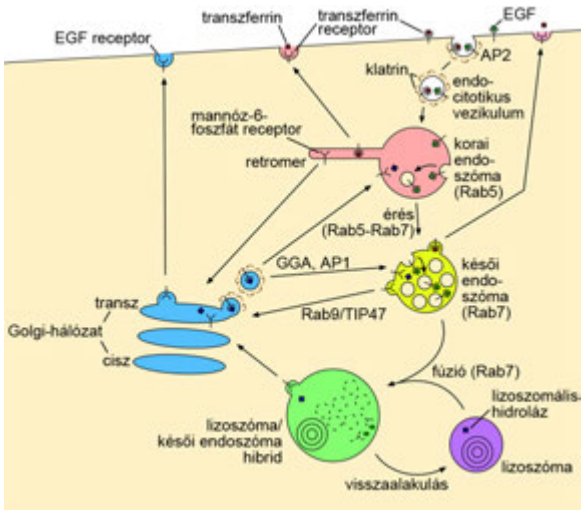
6.14. ábra A sejt endoszomális-lizoszomális kompartmentuma. Egy sejtfelszínről receptor mediált endocitózissal felvett fehérje (piros pötty, például az LDL) útja a lizoszómába. Az egyes kompartmentek pH csökkenésének mértékét az egyre mélyülő zöld szín jelzi.

Más esetben, az EGF és az EGF receptor pH rezisztens kapcsolatban van, ami fennmarad, amíg a lebontását végző lizoszómába nem kerül. A mannóz-6-foszfát receptor is hasonló módon szállít ligandumokat (melyek ez esetben lizoszomális enzimek) a Golgi-készülékből a lizoszómákba.

Az endoszómák három alkompartmentumra bonthatók: *korai endoszómák*, *késői endoszómák* és *reciklizáló endoszómák*. A megkülönböztetés egyrészt azon alapszik, hogy az endocitózissal bekerült anyag milyen hamar éri el az adott alkompartmentumot, másrészt marker fehérjék, mint például a RAB fehérjék, alapján történik (Stenmark, 2009). A morfológiájuk is különböző. Amint az endocitotikus vezikulumok levetik klatrin burkukat, részévé válnak a korai endoszómák rendszerének. A korai endoszómák késői endoszómákká érnek, mielőtt a lizoszómákkal egyesülnének (Henne és mtsai., 2011).

A *korai endoszómák* különböző módon érhetnek késői endoszómákká. A folyamat során egyre savasabbakká válnak a V-ATPáz működése következtében. A korai endoszómák dinamikus tubuláris hálózatot képeznek (vezikulumok 1 µm átmérőig, melyek összeköttetésben állhatnak kb. 50 nm átmérőjű csövecskék révén). Markereik többek között a RAB5 és RAB4, a transzferrin és receptora valamint az EEA1 (6.15. ábra). Sok visszaforgatott molekulát a korai endoszómák tubuláris részében uralkodó savas kémhatás távolít el. Ezek a tubulusok eltűnnek a reciklizáló útvonalak irányába, ennek következtében a késő endoszómáknak nincsenek tubuláris részei.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.15. ábra Az endocitózis útvonala állati sejtekben. Az endocitózissal felvett molekulák a sejt felszínről *korai endoszómák*ba kerülnek. Ezek *késői endoszómák*ká (multivezikuláris testekké) érnek: a pH-juk csökken, a reciklizáló molekulák kikerülnek belőlük, üregükben újabb vezikulumok formálódnak, a RAB5 helyettesítődik RAB7-tel. Mindezek alkalmassá teszik őket a *lizoszómák*kal történő összeolvadásra. A fúzió során keletkező hibrid kompartmentumból lizoszóma is újra alakulhat. Fehérjék szállítódnak a *Golgi-komplexum*ból az endoszómákba és visszafelé is. A transzferrin és receptora a plazma membrán és a korai endoszómák között reciklizál. A transzferrin az általa szállított Fe^{2+} iont az endoszóma savas közegében adja le. Az EGF (epidermal growth factor) receptorok az EGF kötődésétől aktiválódnak és inaktiválásuk a lizoszómában lebontással történik. Az EGF kötődése elősegíti az EGF receptor ubiquitinilálódását és ez a lizoszómákba irányítja őket. A mannóz-6-foszfát receptorok a Golgi-komplexum és az endoszómák között recirkulálnak, az általuk szállított fehérjéket ezek a receptorok is az alacsony pH miatt engedik el.

A *késői endoszómák* főként gömbszerűek, nincsenek tubulusaik, és sok szorosan elhelyezkedő vezikulum lehet az üregükben. Markereik a RAB7, RAB9, és a mannóz-6-foszfát receptor (6.15. ábra). Méretben is megnövekednek más korai endoszómákkal nagyobb vezikulumokká történő homotipikus fúzió következtében. A molekulák kisebb vezikulumokba is kerülhetnek, melyek a nagyobbak külső membránjáról fűződnek le az endoszóma üregébe luminális vezikulumokat képezve. Ez multivezikuláris megjelenést kölcsönöz a késői endoszómáknak, ezért ezeket multivezikuláris testeknek (MVB) is nevezik. A reciklizáló molekulák eltávolítása (pl. transzferrin receptor, mannóz-6-foszfát receptor) folytatódik ebben a szakaszban, valószínűleg az endoszómákból lefűződő vezikulumok által. Végül az endoszómák elvesztik a RAB5 és megkapják a RAB7 markerüket és így alkalmassá válnak a lizoszómákkal való fúzióra.

A *késői endoszómák* lizoszómákkal történő fúziójával hibrid kompartmentum keletkezik, a két kiindulási kompartmentum közti átmeneti tulajdonságokkal. A lizoszómák például sokkal denzebbek, mint a késői endoszómák, míg a hibridek denzitása köztes értéket mutat. A lizoszómák kialakulásuk közben a rájuk jellemző, magasabb denzitásúra kondenzálódnak. Mielőtt ez megtörténik további késői endoszómák kapcsolódhatnak a hibrid kompartmentumhoz.

Egyes anyagok közvetlenül a korai endoszómákból kerülnek vissza a plazma membránba, de a fő szállítási útvonal a *reciklizáló endoszómákon* keresztül vezet. A reciklizáló endoszómák főleg a mikrotubulus organizátor központ (MTOC) közelében csoportosulnak és főleg hálózatos tubulusokat tartalmaznak. Markerük a RAB 11. Specializált sejtekben, mint a polarizált sejtek és makrofágok, további altípusok is azonosíthatók (6.14. ábra).

Fagoszómák, pinocitotikus vezikulumok és autofagoszómák az endoszómákhoz hasonló módon érnek, és az érésük során összeolvadnak az endoszómákkal (Fader és Colombo, 2009). Némely sejten belüli kórokozó visszaveti ezt a folyamatot, például megakadályozza a RAB7 felvételét (Körner és mtsai., 2006). A késői endoszómákat (MVB-ket) egyes esetekben endocitotikus szállító vezikulumoknak is nevezik. Amikor egy endoszóma lefűződik, fontos membrán receptorokat is magával visz, amelyeket gyakran kár lenne lebontani. A bezárult receptor reciklizáló endoszómák útján visszatérhet a sejtfelszíni membránba ahová eredetileg tartozik, így elkerülve a késői endoszómában vagy lizoszómában történő lebontást (6.15. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Lizoszóma-szerű sejtorganellumok

Számos speciális, csak adott sejttípusra jellemző lizoszóma-szerű sejtorganellumot (LRO - lysosome related organelle) ismerünk, amelyek igen fontos élettani szerepet látnak el. Közös jellemzőjük, hogy a lizoszómákhoz hasonló útvonalon jönnek létre. Az ilyen organellumokra a legfontosabb példák a melanocitákban található melanoszómák, a citotoxikus T-sejtek és természetes ölősejtek lítikus granulumai, a spermiumokban található akroszómák, és a vérlemezkék denz granulumai. Ezek a speciális sejtszervecskék alapvető funkciókat látnak el életünkben, a fent említett példák alapján a bőr normális pigmentációjának biztosításában, a kórokozók elleni védekezésben, a megtermékenyítésben vagy a véralvadás során (Saftig és Klumperman, 2009). Említésre érdemes, hogy az ecetmuslica szem pigmentjei is a lizoszóma-szerű organellumok közé tartoznak, és a különféle muslica szemszínt megváltoztató mutációk tanulmányozása révén izoláltak olyan géneket, amelyek ezen organellumok biogeneziséhez szükségesek. Erre egy jól ismert példa az élesztő Vps18 gén Drosophila homológja, melyet a génmutáció okozta szem fenotípus alapján deep orange névre kereszteltek (Lloyd és mtsai., 1998).

Lizoszomális tárolási betegségek

Nagyon sok olyan betegség van, melyeknek valamilyen lizoszomális rendellenesség áll a hátterében. A tünetek azért alakulnak ki, mert a lizoszomális fehérjéket kódoló génekben mutációk történtek és a létrejött vagy öröklött genetikai hiba miatt nem alakul ki, vagy hibás egy, vagy több, vagy az összes lizoszomális enzim illetve membrán fehérje. Ennek következtében az enzimek által lebontandó anyagok felhalmozódnak a tercier lizoszómákban és zárványokat (inclusio) hoznak létre a sejtekben (pl. makrofágokban, neuronokban). Emiatt *lizoszomálistárolási betegségeknek* (lysosomal storage disease - LSD) nevezték el őket (Neufeld, 1991, Parkinson-Lawrence és mtsai., 2010). Ezek legtöbbször már fiatalkorban halálos kimenetelű, jelenleg gyógyíthatatlan betegségek (Parenti és mtsai., 2013). Recesszív módon öröklődnek, és rendszerint autoszomális öröklésmenet jellemző rájuk, így nőket, férfiakat egyaránt érintenek.

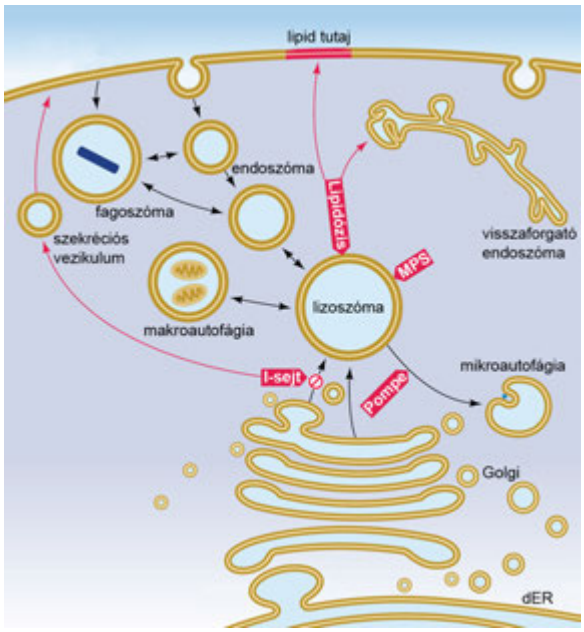
Bár egyes lipidózisok és mukopoliszacharidózisok (MPS) voltak az elsőként leírt lizoszomális tárolási betegségek, a lizoszómák létezésének és hibás működésüknek elképzelése a Pompe-kór vizsgálatából származik (6.1. táblázat). Ennek ellenére a lipidek biológiájával és a glükózaminoglükánok lebontásával foglalkozó kutatások elindulásának természetesen a lipidózisok és mukopoliszacharidózisok felfedezése volt a kiváltó oka. Az enzim működési hibákról és a lizoszomális tárolási betegségekben elérhető kereszt-javításokról egyre bővülő ismeretek alapvetően fontosak voltak az endocitotikus folyamatok megértéséhez és az ezt követő enzimhelyettesítési terápiák (ERT) kifejlesztéséhez (6.2. táblázat).

Év	Felfedezés	A felfedezés hatása
1881	Tay-Sachs kór	a lipidózisok felfedezése elindította a lipid biológiai kutatásokat
1882	Gaucher-kór	
1898	Anderson-Fabry angiokeratoma	
1914	Niemann-Pick kór	
1910	Hurler-szindróma	az első mukopoliszacharidózisok felfedezése a glükózaminoglükánok biológiájának elindulását jelentette
1917	Hunter-szindróma	
1932	Pompe-kór	ez a felfedezés elősegítette a lizoszómák felfedezését
1952	a mukopoliszacharidózis alapjelenségének leírása	a glükózaminoglükánok lebontásának vizsgálata elkezdődik
1955	a lizoszóma felfedezése	
1963	Pompe-kórt ismerik fel először, mint lizoszomális tárolási betegséget (LSD)	
1964	a mukopoliszacharidózisok kereszt-javítása	az enzimhelyettesítő kezelések kezdete (ERT)
1967	I-sejtes betegség	a lizoszomális célba juttatás is szerepet játszhat a betegségek kialakulásában

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.1. táblázat A tárolási betegségek felfedezésének időbeli sorrendje és a sejtbiológiára kifejtett hatásuk

A Pompe-kór esetében egy lizoszomális hidroláz hibája nem teszi lehetővé a vezikulumba autofagocitózissal felvett glikogén lebontását (6.16. ábra). A mukopoliszacharidózisoknál (MPS) különböző hibák fordulnak elő a glikozidáz vagy szulfatáz enzimekben, és ez gátolja a glükózaminoglükánok lebontását a lizoszómákban. A lipidózisok (szfingolipidózisok) különböző hidrolázok hibájából alakulnak ki, ezek gátolják meg a lipidek lizoszomális katabolizmusát. Az I-sejtes betegség a Golgi-apparátus egyik enzimét érinti, megakadályozva ezzel a lizoszomális hidrolázok lizoszómába juttatását, így ezek az enzimek szekretálódnak. Mivel az endoszóma-lizoszóma rendszerben nagyon sok a keresztkapcsolat, a fenti elsődleges hibák további lizoszomális funkciók másodlagos kiesését okozhatják.



6.16. ábra A lizoszomális tárolási betegségek által befolyásolt sejttani folyamatok egyszerűsített vázlata. MPS - mukopoliszacharidózis

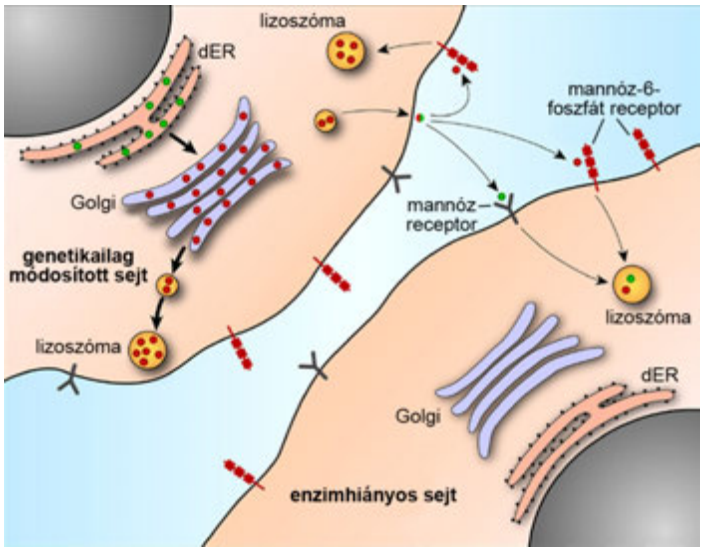
A tárolási betegségek gyakorisága változó, egyes elszigetelt populációkat jobban érint, átlagosan 1:7-8.000 születésre. A betegek várható életkora igen alacsony. Jelenleg 49 ilyen betegség ismert (Platt és mtsai., 2012). A kórképek biztos diagnózisa csak az enzimdefektusok kimutatása után állítható fel. A célzott terápiák tárháza sajnos ma még elég szűkös. A legtöbb tárolási betegség kezelése egyelőre csak tüneti terápiára szorítkozik, nincs lehetőség magának a kiváltó tényezőnek a kiiktatására, noha ígéretes kutatások vannak folyamatban. Vannak már olyan kórformák, ahol enzimpótlással szép eredményeket értek el (6.2. táblázat). A korán elvégzett csontvelő/őssejt átültetéssel is vannak már próbálkozások, de ezek megítélése nem egységes. Amíg nincs biztonságos és egyértelműen hatékony kezelés, addig csak az életminőség javítása lehet a cél, melyhez elengedhetetlen a fertőzések kivédése illetve kezelése, a csont deformitások lehetőség szerinti korrigálása, a merev ízületek lazítása fizioterápia segítségével.

Betegség	**Hibás enzim**	**ERT státus**
Anderson-Fabry angiokeratoma	α-galaktozidáz A	gyógyászati forgalomban (agalsidase)
Gaucher-kór, I típus	β-glükocerebrozidáz	gyógyászati forgalomban (alglucerase, imiglucerase, velaglucerase)
MPS I típus	α-L-iduronidáz	kísérleti kipróbálás alatt
MPS II típus	iduronsav-2-szulfatáz	gyógyászati forgalomban (idursulfase)
MPS VI típus	N-acetilgalaktózamin-4-szulfatáz	gyógyászati forgalomban (galsulfase)
Pompe-kór	α-glükozidáz	gyógyászati forgalomban (myozyme)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.2. táblázat Enzimhelyettesítési lehetőségek (ERT - enzyme replacement therapy) egyes lizoszomális tárolási betegségek esetében

Az egyik lehetséges lizoszomális enzimpótlás a „kereszt-javítás” technikája, melyet a következőkben röviden összefoglalunk. A frissen szintetizált lizoszomális enzimek az endoplazmatikus retikulumban glükozilálódnak (6.17. ábra, zöld körök) a normális és genetikailag módosított sejtekben egyaránt.



6.17. ábra Lizoszomális enzimszállítás és az enzimhiányos sejtek „kereszt-javítása” (vö. 6.12. ábra)

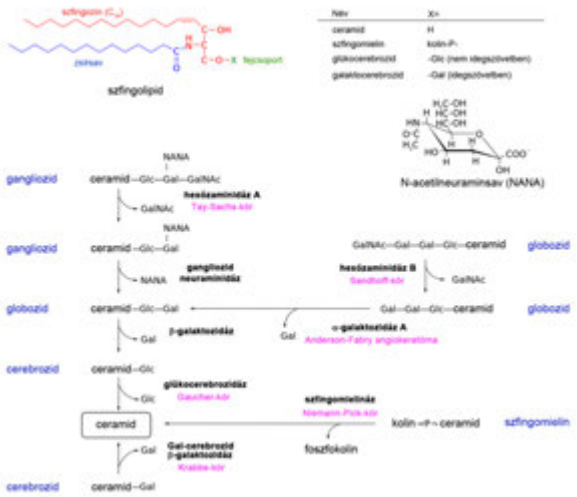
Ezt követően a Golgi apparátusban az enzimek átesnek a mannóz-6-foszfát modifikáción (6.17. ábra, piros körök) és itt a mannóz-6-foszfát receptorhoz (M6PR) kötnek. Többségük (6.17. ábra, vastag nyilak) ezután eljut a lizoszómákba. A lizoszomális enzimek kisebb részét (6.17. ábra, vékony nyilak) szekretálja a sejt. Az extracelluláris foszforilált enzim a plazmamembránhoz kötött M6PR-hoz, a nem foszforilált enzim pedig az ugyancsak membránkötött mannóz receptorhoz (ManR) kapcsolódik. Mindkét receptor közreműködik az endocitózisban és végül a kívülről jövő enzim lizoszómába juttatásában. Ez a folyamat genetikailag módosított vagy enzimhiányos sejtekben is végbemegy. Fontos megjegyezni, hogy az M6PR minden sejtben kifejeződik, míg a ManR csak a retikuloendotéliális rendszer sejtjeiben (rezidens szöveti makrofágok) (Sands és Davidson, 2006).

Az alábbiakban a lebontási zavarok természete szerint csoportosítva összefoglaljuk a legfontosabbakat.

Szfingolipid lebontási zavarok

A 6.18. ábrán tájékoztatásképpen bemutatjuk a szfingolipidek lebontási útvonalait. Az egyes lépéseket katalizáló enzimek mellett pirossal láthatók az enzim aktivitásának hiányában kialakuló szfingolipid lebontási zavarok elnevezései.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.18. ábra A szfingolipidek lebontási útvonalai. Az egyes enzimek mellett pirossal láthatók az enzim aktivitás hiányában kialakuló betegségek elnevezései.

Tay-Sachs kór (β-hexózaminidáz, α-alegység hiánya)

A 15-ös kromoszómán a HEXA gén mutációi okozzák (sok ilyen van). Az enzim aktivitásának kiesése következtében a gangliozidok nagymértékben felhalmozódnak a neuronokban és azok idő előtti pusztulását okozzák. A retina ganglionsejtjeinek kiterjedt pusztulása vakséghoz vezet és a retinán egy jellegzetes vörös folt jelenik meg, aminek fontos szerepe van a diagnózisban. A legrosszabb, infantilis típusú lefolyású változat esetén gyermekekben már a 6. hónaptól kezdve mutatkoznak az első tünetek (mentális és motoros alulfejlettség, vakság, majd süketség, izomatrófia, majd bénulások) és a betegek 4 éves koruk előtt meghalnak. A betegség később is kialakulhat (juvenilis és felnőttkorban is). Gyakorisága általában 1:300 születésre, de egyes elszigetelt populációkban jóval magasabb. A Kelet-Európából származó amerikai zsidó közösségekben minden 27-30. ember hordozója a betegségnek. A francia-kanadaiak között 1:50 az arány, nagyon hasonló ehhez a Cajun indiánok (Louisiana) között a hibás HEXA gének előfordulási gyakorisága.

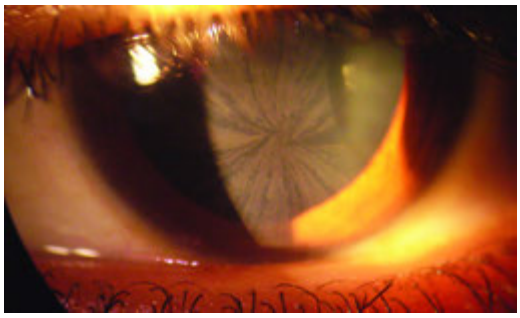
Sandhoff-kór (másnéven Sandhoff-Jatzkewitz betegség, a β-hexózaminidáz, β-alegység hiánya)

Az érintett betegekben nem keletkezik működő β-hexózaminidáz a HEXB génben történt mutáció miatt. A klinikai tünetek nem különböztethetők meg a Tay-Sachs-kórétól. A mutáció elszigetelt populációkban, az Argentína északi részén honos kreol népességben, a kanadai Saskatchewanban élő métis indiánok között és a ciprusi keresztény maroniták között gyakori.

Anderson-Fabry angiokeratoma

Az α-galaktozidáz A (α-GALA gén) mutációja okozza. Ez a gén az X kromoszómán található, így a betegség ritka kivételként nemhez kötötten öröklődik, azaz férfiakat érint, a nők csak heterozigótaként hordozzák a mutáns allélt. Az enzim aktivitás hiánya a glikolipidek felhalmozódását okozza, elsősorban a vererek falában. Tünetei: gyakori, erős fájdalomérzés, egyre súlyosbodó proteinuria, magas vérnyomás, cardiomyopathia (szívizomgyengeség), angiokeratoma (a bőrben levő kapillárisok sérülése, mely számos apró vörös foltot és fokozott szarusodást okoz), anhydrosis (a beteg nem képes izzadni), cornea verticillata (a szaruhártya kétoldali, örvényszerű, fehéres keskeny sávokban történő megvastagodása, 6.19. ábra), az agyvérzésre való hajlam megemelkedése. A beteg várható életkora 30-40 év. A betegség gyakorisága 1:40.000 – 120.000 születésre.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



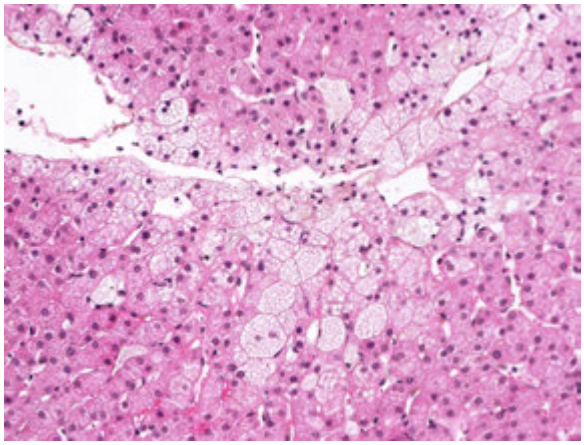
6.19. ábra Cornea verticillata, a szaruhártya kétoldali, örvényszerű, fehéres keskeny sávokban történő megvastagodása Anderson-Fabry angiokeratomában szenvedő betegnél

Gaucher-kór

A savas β-glükozidáz (EC 3.2.1.45, lizoszomális glükocerebrozidáz) mutációja okozza, mely az 1-es kromoszóma q21 régiójában található. A mutáció következtében a glükocerebrozid felhalmozódik a sejtekben, elsősorban a fehérvérsejtekben. Ezekben a sejtekben a felvett anyagok lipid komponensei nem tudnak lebomlani, granulumok, vagy fibrillumok formájában felhalmozódnak és a sejt Gaucher-sejt állapotba kerül. A sejt ilyenkor szinte olyan, mint egy összegyűrt papírlap. Tünetei: duzzadt has, megnagyobbodott máj, lép és nyirokcsomók, csontsérülések, összenövések az ízületekben, a bőr barnás elszíneződése, vérszegénység, alacsony trombocyta szám, sárga ínhártya (sclera). A hordozók arányában ez a *leggyakoribb* lizoszomális tárolási betegség, a hordozók aránya az USA-ban 1:100, de a betegek aránya 1:450 születésenként.

Niemann-Pick kór

A savas szfingomielináz (szfingomielin foszfodiészteráz 1, SMPD1) enzim hiánya miatt kialakuló örökletes, a tárolási kórképek csoportjába tartozó betegség. Lényege, hogy a szfingomielin illetve a koleszterin felszaporodnak a sejtek lizoszómáiban, nem képesek lebomlani a szfingomielináz enzim hiánya, vagy csökkent működése következtében. A szfingomielin főleg a makrofág-monocyta sejtvonal (pl. a lép hisztiocitáiban) lizoszómáiban szaporodik fel. Ezek a sejtek feldagadnak, akár 90 µm átmérőjűek lesznek, és citoplazmájuk „habos” megjelenésű lesz (6.20. ábra). Három altípusa ismeretes. Az A és B típus egyaránt a lizoszomális szfingomielináz enzim hiányára vezethető vissza. A hibás SMPD1 gén a 11-es kromoszómán található. Az A típus csecsemőkori kialakulású, erősen érinti az idegrendszert, nagyon rossz a prognózisa, a betegek 18 hónapos koruk előtt meghalnak. A B típus később alakul ki, a belső szervek megnagyobbodásával jár, de nem érinti a központi idegrendszert, és a betegek fiatal felnőtt korukig élnek. A C típus a leggyakoribb altípus a sejtek közötti koleszterin transzport hibája okozza, mely a 18-as kromoszómán található NPC-1 gén hibájához köthető. Gyakorisága 1:250.000 születésre.



6.20. ábra A 200-szoros nagyítású kép Niemann-Pick-kórban szenvedő beteg lépének hisztiocitáit mutatja, melyek citoplazmáját teljesen kitöltik a lebontatlan szfingomielinnel és más lipidekkel telt lizoszómák (hematoxilin-eozin festés).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Krabbe-kór (galaktozilceramid lipidózis)

Halálos kimenetelű, recesszíven öröklődő, autoszomális betegség, amelyben gátolt a központi idegrendszerben és a környékiben is az axonokat borító mielinhüvely kialakulása. A galaktocerebrozidáz enzimet kódoló GALC génben bekövetkező mutációk okozzák. Ennek következtében az idegsejtek axonjait burkoló mielinhüvely nem tud kialakulni, ami súlyos motoros zavarokat okoz első közelítésben. A galaktozilceramid felhalmozódás ún. psychosine akkumulációhoz vezet, ami az axonok degenerációjával jár. A beteg gyerekekben az első tünetek a 3-6. hónapban jelentkeznek. Láz, végtagi merevség, táplálkozási zavarok, hányás, lassú mozgási és mentális fejlődés, gyengülő látás, késleltetett ivari érés jellemzi őket. A legtöbb beteg 2 éves kora előtt meghal. Általában 1:100.000 születésre arányban fordul elő. Az izraeli arab közösségben 1:6.000 az előfordulása, Skandináviában pedig 1:50.000.

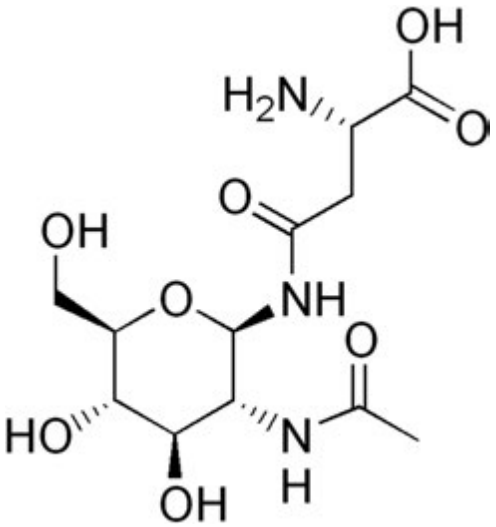
Betegség	Hiányzó fehérje	Felhalmozódó termék
Tay-Sachs-kór	β-hexózaminidáz, α-alegység	GM_2 gangliozid
Sandhoff-kór	β-hexózaminidáz, β-alegység	GM_2 gangliozid, oligoszacharidok
Anderson-Fabry angiokeratoma	α-galaktozidáz A	glikolipidek
Gaucher-kór	glükocerebrozidáz	glükocerebrozid
Niemann-Pick-kór	szfingomielináz	szfingomielin
Krabbe-kór	galaktozilceramidáz	Gal-ceramid, Gal-szfingozin

6.3. táblázat A szfingolipid lebontási zavarokkal összefüggő tárolási betegségek összefoglaló táblázata

Glükoprotein lebontási zavarok

Aszpartilglükózaminuria (AGU)

A betegséget az N-aszpartil-β-glükózaminidáz (EC 3.5.1.26) enzimaktivitásának hiánya okozza (6.21. ábra). Tünetei már 2-4 éves korban jelentkeznek: pszichomotoros retardáció, torz arcvonások, gyakori légzőszervi fertőzések, hasi sérvek és vázrendszeri rendellenességek. Gyakorisága Finnországban viszonylag magas, 1:17.000 születésre.



6.21. ábra Az N-aszpartil-β-glükózamin szerkezeti képlete

α-mannozidózis

Az α-D-mannozidáz (EC 3.2.1.24) enzimaktivitásának hiánya okozza. A diagnózist a fehérvérsejtek α-D-mannozidáz enzimaktivitás mérésével állítják fel. Tünetei: szellemi elmaradás, jellegzetes arcvonások, vázrendszeri rendellenességek, csontritkulás (osteopenia), mozgás koordinációs nehézségek (ataxia), izomgyengeség (myopathia), fokozott érzékenység a fertőzésekre, máj és lép megnagyobbodás (hepatosplenomegalia), halláskárosodás, szemlencse homályosodás (cataracta). Gyakorisága 1:500.000 - 1.000.000 születésre.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Betegség	Hiányzó fehérje	Felhalmozódó termék
Aszpartilglükózaminuria	aszpartilglükózaminidáz	N-kötött oligoszacharidok
α-Mannozidózis	α-mannozidáz	α-mannozidok

6.4. táblázat A glükoprotein lebontási zavarokkal összefüggő tárolási betegségek összefoglaló táblázata

Glükózaminoglikán (GAG) lebontási zavarok, mukopoliszacharidózisok

Az egyes kórképekben különböző lizoszomális enzimek működése hiányzik, de abban mind megegyeznek, hogy a mukopoliszacharidok lebontása károsodik, ami miatt kóros bomlástermékek halmozódnak fel a sejtekben, ez vezet a tünetekhez. Mivel a mukopoliszacharidok a kötőszövet alkotói, kötőszövet pedig gyakorlatilag test szerte, minden szervünkben megtalálható, ezért az egyes betegségekben is azt látjuk, hogy számos szervrendszer károsodik. A károsodás fokozatos, a beteg gyerekek állapota az évek során folyamatosan, és sajnos célzott kezelés hiányában megállíthatatlanul romlik. Van néhány olyan tünet, ami mindegyik kórképre igaz. A lép és a máj megnagyobbodása általában jelentkezik, de e mellett a szív és az erek érintettsége, valamint a csontelváltozások is megfigyelhetőek minden megjelenési formában, bár az érintettség mértéke különböző.

Hurler-szindróma (I-es típusú mukopoliszacharidózis, MPS I)

Az MPS egyes típusa a Hurler szindrómának nevezett betegség, melyet az α-L-iduronidáz enzim (EC 3.2.1.76) aktivitásának hiánya következtében kialakuló glükózaminoglikán (GAG) felhalmozódás okoz. Az enzimet az IDUA gén kódolja, mely a humán 4-es kromoszómán található és 52 mutációja ismert. A betegség tünetei: növekedés nagymértékben elmarad a normálistól (törpeség), nagy fej, rövid törzs, arc deformitás (a gyermek arca széles, az orrgyök lapos, az alsó állkapocs kicsi (micrognathia)), megnagyobbodott nyelv máj, lép és szív megnagyobbodás, szívbillentyű rendellenesség, ízületi merevség, beszűkült mozgás, gerinc deformitás, szellemi elmaradás (mentális retardáció), súlyos halláskárosodás, látászavar (homályos cornea, degenerálódó retina). Gyakorisága 1:100.000 születésre.

Hunter-szindróma (II-es típusú mukopoliszacharidózis, MPS II)

A Hunter szindróma, ami a mukopoliszacharidózis kettes típusa, nem csak tüneteiben, hanem az öröklődés módjában is különbözik a többi MPS-től. Az iduronsav-2-szulfatáz (I2S) enzim hiánya következtében alakul ki és glükózaminoglikán (GAG) felhalmozódással jár. Az enzim génje az X kromoszómán található, így a betegség ritka kivételként nemhez kötötten recesszíven öröklődik. Tünetei már az első év után jelentkeznek: A beteg gyerekek jellemzően kisnövésűek, 120-140 cm-es magasságnál ritkán nőnek tovább. Itt is jellemzők a durva arcvonások, nagy fej, előre ugró homlok, lapos orrnyereg, vastag szemöldök, nagyon dús haj és test szerte dús szőrzet. Ha a betegség enyhébb lefolyású, akkor a gyerek ép intellektusú, ha viszont a súlyosabb formával állunk szemben, akkor gyakran a beszéd megtanulása is lehetetlen.

Gyakori a légúti fertőzés, nátha és mandulagyulladás, és gyakran látunk légzési nehézséget is, aminek oka a mellkas kóros alakja, valamint a megnagyobbodott máj és lép, ami a rekeszizmot felfelé nyomja, így megakadályozva a tüdő normális mozgását. Gyakoriak a sérvek illetve előrehaladottabb betegségben a szívproblémák is (megvastagodott szívbillentyűk, gyengülő szív teljesítmény). Sok gyermek szenved gyakori középfülgyulladástól, de nem ritka az enyhe halláskárosodás sem. A szaruhártya homály viszont, ami a legtöbb MPS-ben jelen van, itt nem feltétlenül jelentkezik.

Az ízületi merevség valamint a gerincferdülés itt is gyakran megfigyelhető, és a kéz alakja is jellegzetes: az ujjak vaskosak és rövidek, a kézfej széles, a végső ujjpercek befelé görbülnek vagy karomszerűek. Ez a jellegzetes kézforma bizonyos mozdulatokat megnehezít, nehézkes pl. a ruha begombolása vagy kisebb tárgyak megfogása. A lábfejeken a kézhez hasonló deformitások láthatók. Ugyanakkor a kéz és a láb gyakran hideg, sőt a súlyosabb kórformákban a teljes test hőszabályozása zavart szenved.

Az életkilátások változóak és természetesen a betegség súlyosságától függenek. Egyes Hunter-szindrómás betegek elérik a felnőtt kort, iskolába járnak, megházasodnak, dolgozni is képesek. Súlyosabb kórforma esetén viszont a halál sajnos 15 éves kor körül bekövetkezik. Gyakorisága 1:130.000 születésre.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Maroteaux–Lamy-szindróma (VI-os típusú mukopoliszacharidózis, MPS VI)

A kórképet az N-acetilgalaktózamin-4-szulfatáz / arilszulfatáz B enzim (EC 3.1.6.12) hiánya következtében kialakuló glükózaminoglikán (GAG) felhalmozódás okozza. Az enzim a szulfát észter hasítását katalizálja a glükózaminoglikánok, kondroitin-4-szulfát és dermatán szulfát láncvégi N-acetilgalaktózamin-4-szulfát egységein.

A betegségben szenvedőkre az alacsony növés valamint a csont deformitások jellemzőek elsősorban. A mentális fejlődés jellemzően ép, vagy csak a betegség későbbi szakaszában válik érintetté. Látás és hallászavar, valamint a szív érintettsége megfigyelhető. A csonteltérések kifejezettek. A szindróma súlyosabb formájában a csont deformitások miatt gyakran kerül sor ortopéd sebészeti beavatkozásra.

A rosszabb prognózisú formában az arc deformitás is igen szembetűnő és a gyerekek gyakran nem érik meg a pubertás kort Jellemzően 10. életévük betöltése előtt meghalnak. A halál oka leggyakrabban a szív károsodásából fakadó szívelégtelenség. A Maroteaux-Lamy szindróma másik típusa kedvezőbb prognózisú. A beteg megjelenése a fentiekhez hasonló, de szembetűnőbb az alacsony termet valamint a homályos cornea.

A betegség oki kezelésében jó eredményeket értek el enzimhelyettesítő terápiával (ERT). A galsulfase a kórképet okozó humán enzim sejttenyészetben, rekombináns DNS technikával előállított formája, mely intravénás injekcióban vagy infúzióban adható a betegeknek és jelentősen csökkenti a tüneteket. A galsulfase egy 56 kDa molekulatömegű glükoprotein. A rekombináns fehérje 495 aminosavból áll és 6 aszparagin-kötésű glikozilálási helyet tartalmaz, melyből 4 bis-mannose-6-phosphate gyököt hordoz a sejtes felismerés érdekében (Hopwood és mtsai., 2006).

Betegség	Hiányzó fehérje	Felhalmozódó termék
Hurler-szindróma (MPS I)	α-L-iduronidáz	dermatán szulfát, heparán szulfát
Hunter-szindróma (MPS II)	L-iduronsav szulfatáz	dermatán szulfát, heparán szulfát
Maroteaux-Lamy-szindróma (MPS VI)	GalNAc 4-szulfatáz / arilszulfatáz B	dermatán szulfát

6.5. táblázat A glükózaminoglikán lebontási zavarokkal összefüggő tárolási betegségek összefoglaló táblázata

Egyéb egyetlen enzim hiányából származó zavarok

Pompe-kór, glycogen storage disease type II

A Pompe-kór esetén ismerték fel először, hogy a lizoszómák működési zavara áll a hátterében, azaz tárolási betegség (LSD). A betegség oka, hogy a lizoszomális savas α-glükozidáz (EC 3.2.1.20, savas maltáz) enzim hiánya miatt glikogén felhalmozódás történik a lizoszómákban. Az enzim génje a 17-es kromoszóma hosszabbik karján helyezkedik el és 197 mutációja ismert. Gyakorisága 1:140.000 születésre. A betegség tünetei korán, már a születés utáni 4-8. hónapban jelentkeznek és főként az izmokat érintik: izomgyengeség a láb-, törzs- és karizmokban (myopathia), szívizom vastagodás és működés zavar, légzőizom elégtelenség. Kezelése enzimhelyettesítő terápiával már lehetséges. A betegnek intravénásan a humán savas α-glükozidáz rekombináns formáját, a *myozyme* nevű enzimkészítményt adják.

Wolman-kór

A Wolman-kór, más néven családi xanthomatosis vagy Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) kialakulásáért a savas lipáz (lysosomal acid lipase, LAL) hiánya a felelős. Az enzim génje a 10-es kromoszómán található, de nem ismerik a pontos helyét. A betegség elnevezése a xanthos [ξανθος – görögül sárga] szóból ered, mert sárga, koleszterin gazdag anyag rakódása észlelhető az inakban illetve más területeken. Tünetei: magas koleszterin szint, magas triglicerid szint (lipidemia type II), magas transzamináz szint, nagyon alacsony HDL szint, megnövekedett nyirokcsomók és lép, májnagyobbodás (hepatomegalia), zsírmáj, mindezek gyakran vezetnek fibrosishoz, cirrhosishoz, végül a beteg halálát okozva. Gyakorisága 1:40.000 születésre.

Canavan-kór

A Canavan-kórt az aszpartoaciláz vagy aminoaciláz 2 enzim aktivitásának hiánya okozza. A hibás enzim a 17-es kromoszómán található ASPA génben történt mutáció miatt képződik. A betegség a leukodisztrófiák, az agyi

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fehérállományt érintő, betegségek közé tartozik. Jellemző rá az axonok mielinhüvelyének degenerációja, mely neuron pusztuláshoz vezet. A tünetek kora csecsemőkorban jelentkeznek és gyorsan súlyosbodnak: szellemi visszamaradottság, korábban megszerzett motoros képességek elvesztése, evési nehézségek, rendellenes izomtónus (túl laza vagy túl merev), bénulás, rossz fejtartás, megalocephalia, vakság.

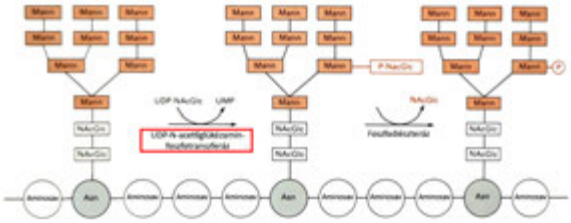
Betegség	**Hiányzó fehérje**	**Felhalmozódó termék**
Pompe-kór, Glycogen storage disease II	α-1,4-glukozidáz	glikogén
Wolman-kór, családi xanthomatosis	savas lipáz (LAL)	koleszterin észterek, trigliceridek
Canavan-kór	aszpartoaciláz aminoaciláz 2	N-acetilaszparaginsav

6.6. táblázat Az egy enzim hiányából adódó lebontási zavarokkal összefüggő tárolási betegségek összefoglaló táblázata

Lizoszóma biogenezis hibák

I-sejtes betegség, mukolipidózis II (ML II)

Ennél a kórképnél a Golgi-készülék hibás foszfotranszferáza minden oldható lizoszomális hidrolitikus enzim hibás szortingját eredményezi (6.22. ábra).



6.22. ábra A mannóz foszforiláció

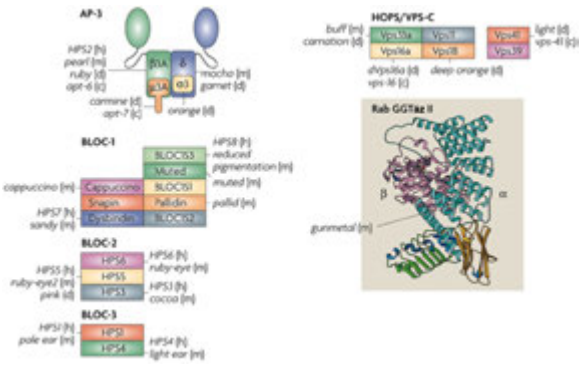
Az enzimek így szekréciós útvonalra jutnak és kikerülnek a sejtből. Ennek következtében a lizoszomális hidrolázok hiányoznak a lizoszómákból és a lizoszómákban a lebontandó anyagok zárványként felszaporodnak. A zárványokat tartalmazó sejtet *inclusion cell*-nek hívják, innen ered az I-sejtes betegség elnevezés. Egyelőre ez is gyógyíthatatlan betegség.

Hermansky–Pudlak szindróma

Hermansky–Pudlak szindróma (HPS) egy ritka autoszomális recesszív betegség, melynek tünetei okulokután albinizmus (csökkent melanin pigmentáció a bőrben, a szőrzetben és a szemben egyszerre), vérzékenység (vérlemezke hiány miatt), és ceroid-lipofuszcin (sárga, autofluoreszcens, amorf lipoprotein) felhalmozódás a sejtekben (különösen a tüdőben és a vesében). Az albinizmus másodlagosan látási zavarokat is okozhat, mint például fényérzékenység (photophobia), kancsalság (strabismus), vagy akaratlan szemmozgások (nystagmus). Ritka esetekben enyhe lefolyású, általában azonban rossz prognózisú betegség. A betegség lefolyása a tüdő, bélrendszer, vese vagy a szív súlyos működési zavaraihoz vezethet. A fő komplikáció a leggyakrabban a tüdő fibrózis, mely jellemzően 40-50 éves korban alakul ki.

A HPS okozója emberben legalább 9 gén mutációja lehet: HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DTNBP1 (dysbindin, HPS7), BLOC1S3 (Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 3, HPS8), és BLOC1S6 (pallidin, PLDN). Ezek és még hét másik gén ortológjaiban történt mutációk hasonló rendellenességeket okoznak egérben. A rokon gének mutációi *Drosophila melanogaster*-ben a szem pigment granulumok és *Caenorhabditis elegans*-ban a bélcső granulumok hibás kialakulását okozzák (6.23. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.23. ábra A Hermansky–Pudlak szindróma (HPS) hátterében álló fehérjekomplexumok ismert alegységei. Az alegységek neve mellett fel vannak tüntetve az emberi HPS izoformák (h) illetve azok az egér (m), muslica (d) vagy *C. elegans* (c) törzsek, melyekben ezek az alegységek mutáció következtében hibásak vagy hiányoznak.

A fentiek közül majdnem mindegyik gén általánosan kifejeződő fehérjekomplexumok alegységeit kódolják, melyek a lizoszóma-szerű sejtorganellumok (LRO), mint a vérlemezkék denz granulumai (γ-granulum) és a melanoszómák, képződésében vesznek részt. Egyes komplexumok ismert fehérje válogató lépésekben vesz részt. Például a *Rab geranilgeranil transzferáz II* (RabGGTáz II) a Rab-GTPázok prenilációját katalizálja, ez a módosítás a Rab-fehérjék membránhoz kötődéséhez szükséges. Hasonlóan, az *AP-3* a lizoszomális fehérjeválogatás és a homotipikus fehérjeválogatás (HOPS - homotypic protein sorting) komplexumaiban vesz részt, szabályozza a SNARE-ekkel (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) történő kölcsönhatást, mely szükséges a homotipikus vakuólum fúzióhoz élesztőben és az endoszóma dinamikához emlősökben. A *BLOC-1* (biogenesis of lysosome-related organelle complex-1), *BLOC-2* és *BLOC-3* komplexumok alegységeinek, az előzőekkel ellentétben, nem ismerjük a jellemző szerkezeti motívumait vagy hozzájuk hasonló ismert funkciójú fehérjéket. Az AP-3 komplexummal együtt a BLOC-1 is szükséges a membránfehérje szállítmányok a perikarionban összeszerelődő vezikulumokba történő célbajuttatásához, ezek aztán az axonba illetve az idegvégződésekbe szállítódnak tovább. A BLOC-1 komplexum a SNARE fehérjékkel együtt az axon növekedésben is részt vesz.

A Hermansky–Pudlak szindróma gyakorisága világviszonylatban of 1:500.000 és 1:1.000.000 születésre közötti. A HPS-1 gyakorisága észak-nyugat Puerto Rico -ban igen magas, 1:1.800 születésre, ezért a klinikai kutatások nagy részét itt végzik. A HPS-1 gyakori előfordulását írták még le egy kis elkülönült svájci faluban.

Betegség	Hiányzó fehérje	Felhalmozódó termék
I-sejtes betegség, mukolipidózis II	GlcNAc-1-foszfotranszferáz (GlcNAcPTase)	lebontandó anyagok a lizoszómákban
Hermansky–Pudlak szindróma	a lizoszóma-szerű sejtorganellumok biogenezisének komplexuma-1 (dysbindin, pallidin)	lipofuszcin, nem képződik LRO

6.7. táblázat A lizoszóma biogenezis hibákból adódó lebontási zavarokkal összefüggő tárolási betegségek összefoglaló táblázata

Lizoszomális membrán hibák

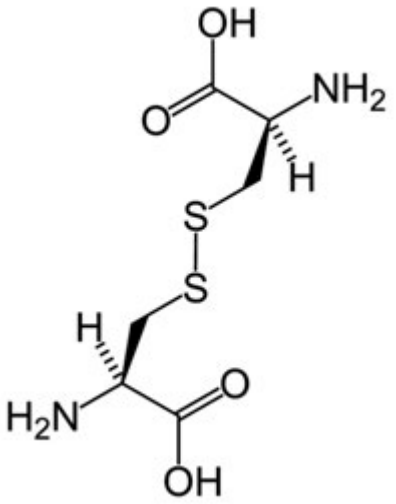
Danon-kór, Glycogen storage disease type IIb (GSD IIb)

A betegség okozója a LAMP2 fehérje génjében történt mutáció, aminek következtében a beteg szervezete nem termel LAMP2-t. Szinte ugyanazokkal a tünetekkel jár, mint a Pompe-kór. Meglepő, hogy fiúkban sokkal súlyosabb tüneteket okoz, mint lányokban. Tünetei a következők: izomgyengeség, a gyerek nem tud járni, szívizom rendellenességek (cardiomyopathia), főleg izompusztulás, tanulási és egyéb mentális zavarok, látási zavarok a pigmenthártya hibái miatt.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Cisztinózis

A cystinosin (CTNS) gén hibája okozza, mely hét transzmembrán doménnel rendelkező lizoszomális cisztein transzport fehérjét kódol. Ennek hiánya a sejteken belüli cisztin kristályok felhalmozódásához vezet (6.24. ábra). Tünetei megegyeznek a Fanconi-szindrómával: magas aminosav és szénhidrát tartalmú vizelet, nagy mennyiségű vizeletképzés, a vér alacsony K^+ és PO_4^- tartalma.



6.24. ábra A cisztin szerkezeti képlete

A cisztinózist általában a cysteamine nevű gyógyszerrel kezelik, mely lecsökkenti a sejten belüli cisztin szintet. A cysteamine a lizoszómákban halmozódik fel, reagál a cisztinnel és cisztein és cisztein-cysteamine komplex keletkezik, melyek már el tudják hagyni a lizoszómát. Gyakorisága 1:100.000 – 200.000 születésre.

Betegség	Hiányzó fehérje	Felhalmozódó termék
Danon-kór, Glycogen storage disease IIb (GSD II)	LAMP2	autofagoszómák
Cystinosis	cystinosin (cisztein transzporter)	cisztin

6.8. táblázat A lizoszomális membrán hibákból adódó lebontási zavarokkal összefüggő tárolási betegségek összefoglaló táblázata

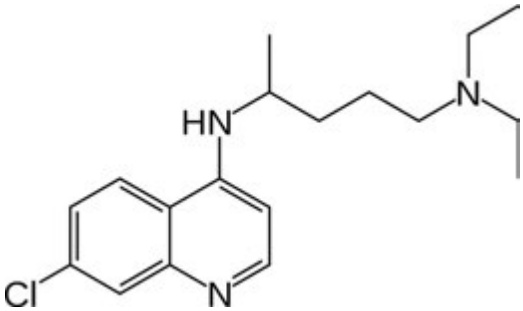
Lizoszomotróp ágensek

A lizoszomotróp ágens kifejezést DeDuve és munkatársai vezették be 1974-ben olyan anyagok megjelölésére, melyeket szelektíven a lizoszómák vesznek fel. Ez a meghatározás nem szól a lizoszomotróp anyag kémiai természetéről és a felvétel mechanizmusáról. A lizoszomotróp ágensek bázikus csoporttal is rendelkező lipofil illetve amfifil vegyületek. Majdnem mindegyik lizoszomotróp ágens a gyenge bázisok közé tartozik és inkább a sejthártya permeabilitása miatt, nem pedig endocitózissal jutnak a sejtbe. Tehát a lizoszomotróp anyagok specifikus felvétele a lizoszómákba a kompartmentum savas pH-jának köszönhető. Ha bekerülnek a lizoszóma savas közegébe, a vegyület protonálódik és csapdába esik. Ilyen ioncsapda mechanizmussal kerül a lizoszómákba a klorokvin, a primakvin, a kinin, a DAMP (N-(3-[(2,4-dinitrophenyl)-amino]-propyl)-N-(3-aminopropyl-methylamine)dihydrochloride), és az NH_4Cl. A vegyületek a lizoszómákba jutva blokkolják azok működését, mert felemelik az intralizoszomális pH-t.

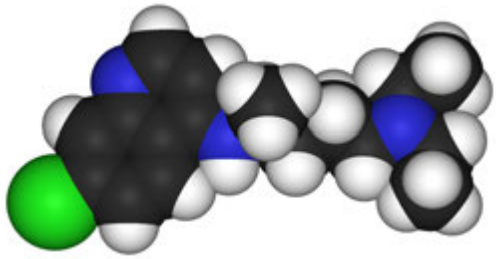
A klorokvin (chloroquine, 6.25 és 6.26. ábra) kinolin nitrogénjének pKa-ja 8,5, ami azt jelenti, hogy fiziológiás pH-n 10%-a deprotonált állapotban van. Ez hozzávetőlegesen 0,2%-ra csökken a lizoszomális pH=4,6 környezetben. Mivel a deprotonált forma jobban átjut a sejtmembránon, mint a protonált, a molekula csapdába kerül a lizoszómákban. A klorokvin malária ellenes hatása is lizoszomotróp jellege miatt van. A vegyület felszaporodik a parazita savas emésztővakuólumában és meggátolja az emésztést. Sajnos a malária fertőzött afrikai területeken

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

olyan nagy mennyiségben használták a múlt században, hogy mára már széles körben elterjedtek a malária klorokvin rezisztens törzsei, így a gyógyszer hatástalan. A klorokvin lizoszomotróp sajátsága teszi lehetővé, hogy *in vitro* kísérletekben autofágia gátlására használják.



6.25. ábra A klorokvin szerkezeti képlete



6.26. ábra A klorokvin térkitöltő modellje

Ellenőrző kérdések

1. Mi a lizoszómák feladata?
2. Milyen körülmények szükségesek a lizoszomális enzimek működéséhez és mi állítja ezt elő?
3. Hogyan jutnak el a lizoszomális hidrolázok a lizoszómákba?
4. Hogyan kerülnek a lebontandó anyagok a lizoszómákba?
5. Milyen lizoszomális tárolási betegség típusokat ismer?
6. Milyen szfingolipid lebontási zavarokat ismer?
7. Melyik a leggyakoribb lizoszomális tárolási betegség és mi okozza a tüneteit?
8. Mondjon példákat nem autosomális mutáció miatt kialakuló LSD-kre?

Irodalom

Cuervo, A. M. és Dice, J. F. (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med (Berlin)***76**, 6-12.

Fader, C. M. és Colombo, M. I. (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ***16**, 70-8.

Hopwood, J. J., Bate, G. és Kirkpatrick, P. (2006) Galsulfase. *Nat Rev Drug Discov***5**, 101-2.

Körner, U., Fuss, V., Steigerwald, J. és Moll, H. (2006) Biogenesis of *Leishmania* major-harboring vacuoles in murine dendritic cells. *Infect Immun***74**, 1305-12.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Lloyd, V., Ramaswami, M. és Krämer, H. (1998) Not just pretty eyes: Drosophila eye-colour mutations and lysosomal delivery. *Trends Cell Biol***8**, 257-9.

Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.

Neufeld, E. F. (1991) Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem***60**, 257-80.

Nishi, T. és Forgac, M. (2002) The vacuolar (H+)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol***3**, 94-103.

Parenti, G., Pignata, C., Vajro, P. és Salerno, M. (2013) New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases. *Int J Mol Med***31**, 11-20.

Parkinson-Lawrence, E. J., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, G. N. és Brooks, D. A. (2010) Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda)***25**, 102-15.

Platt, F. M., Boland, B. és van der Spoel, A. C. (2012) The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol***199**, 723-34.

Saftig, P. és Klumperman, J. (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 623-35.

Sands, M. S. és Davidson, B. L. (2006) Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther***13**, 839-49.

Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol***10**, 513-25.

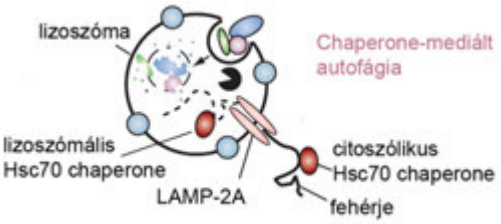
von Figura, K. (1991) Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr Opin Cell Biol***3**, 642-6.

7. Az autofág gének felfedezése és működése

Az autofágia fő útvonalai

A manapság legelterjedtebb definíció alapján autofágiának azt a folyamatot nevezzük, amely során a sejt saját anyagai, azaz a sejtben megtalálható fehérjék és organellumok a lizoszómába kerülnek, majd ott degradálódnak. Három fő típusát szokás elkülöníteni annak alapján, hogy a lebontandó anyagok hogyan jutnak a lizoszómába.

Az első útvonalon bizonyos fehérjék egy molekuláris transzportrendszer révén a citoszólból közvetlenül a lizoszóma membránon átjutva annak belsejébe kerülnek. A KFERQ aminosavszekvenciát hordozó, nem megfelelő térszerkezetű fehérjék szelektív felismerését a Hsc70 citoszólikus chaperone (dajkafehérje) biztosítja. Ezt követően a fehérjék a lizoszóma membránban elhelyezkedő LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein 2A) molekulák által képzett csatornán keresztül jutnak be a lítikus organellum belsejébe, ahol a lizoszómális Hsc70 „fogadja” ezeket, majd pedig lebontódnak a savas hidrolázok közreműködésével. Ennek az útvonalnak a neve **chaperone-mediálta autofágia** (CMA, 7.1. ábra).

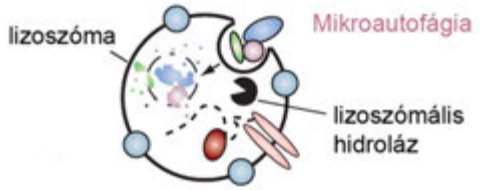


7.1. ábra A chaperone-mediálta autofágia folyamata. A KFERQ szekvencát hordozó fehérjéket felismeri a citoszólikus Hsc70 chaperone. A lizoszóma membránban elhelyezkedő LAMP-2A molekulák által alkotott csatornán bejut a letekert fehérje az organellum belsejébe, ahol a lizoszómális Hsc70 chaperone fogadja, majd a lizoszómális hidrolázok lebontják.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

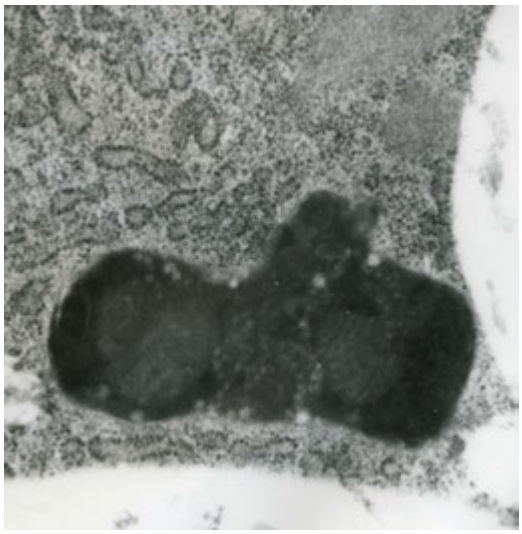
A folyamat szelektivitását feltehetően egyéb, még nem teljesen ismert tényezők is befolyásolják, mivel a citoszólikus fehérjék harmada hordoz KFERQ szekvenciát. Ez az útvonal csak egyedi fehérjéket képes a lizoszómába szállítani, méghozzá meglehetősen limitált mennyiségben.

A második útvonal, a **mikroautofágia** során a lizoszóma membránja befelé tűrődve felveszi a citoplazma egy részét, majd a bekerült vezikula membránja a szállítmánnyal együtt a lizoszómában lebomlik (7.2. ábra).



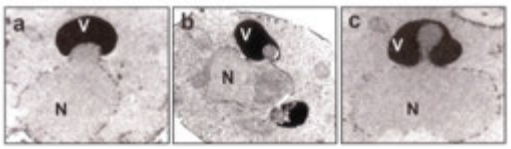
7.2. ábra A mikroautofágia folyamata. A citoplazma részletek a membrán betűrődésével jutnak be a lizoszómába, ahol a lizoszómális hidrolázok lebontják.

A folyamat ránézésre hasonlónak tűnhet az endocitózishoz, ezért fontos kiemelni hogy a topológiája fordított, azaz ilyenkor nem a citoplazmába, hanem a külvilágnak tekinthető lizoszóma lumenébe kerül az anyag, és jelenlegi tudásunk szerint az endocitózisban szereplő fehérjék ehhez nem szükségesek (7.3. ábra).



7.3. ábra A mikroautofágia morfológiája. A képen egy sötét, elektrondenz, heterogén beltartalmú autolizoszóma látszik, amelyben még felismerhető néhány lebomlófélben levő mitokondrium. Vegyük észre a rengeteg apró, világosabb vezikulát a lizoszóma belsejében, melyek a határoló membrán betűrődésével (mikroautofágia) kerülnek be a lumenbe. Juhász Gábor felvétele.

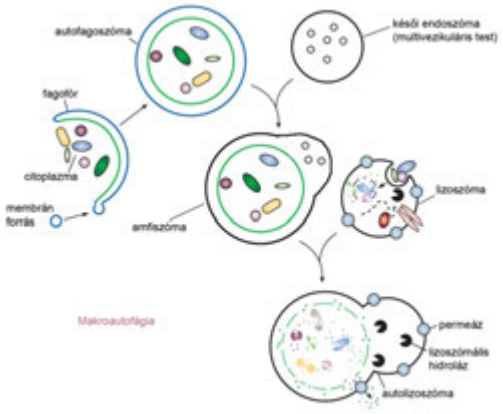
A mikroautofágia molekuláris mechanizmusa még kevéssé ismert, annyit tudunk jelenleg hogy részben átfed a legfőbb útvonaléval (lásd később). A szállított anyag mennyisége már jóval nagyobb mint a CMA-nál, ezen az úton akár teljes organellumok, például peroxiszómák is bejuthatnak lizoszómába. Élesztő sejtekben még a sejtmag egyes részei is a vakuoláris lebontásra kerülhetnek mikroautofágia révén (7.4. ábra).



7.4. ábra A sejtmag egyes részeinek mikroautofág lebontása. Az a-c ábrákon a sejtmag (N) egyes részeit az itt sötéten jelölődő vakuólum (V) mikroautofágia révén felveszi. Forrás: Mol. Biol. Cell 2003: 14 (1), 129-141.

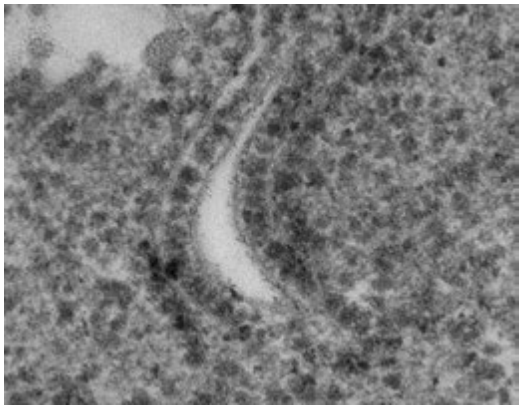
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A legjelentősebb és legjobban ismert a harmadik útvonal, a **makroautofágia** (7.5. ábra).



7.5. ábra A makroautofágia folyamata. A citoplazma egy részletét egy növekvő kettős membrán, a fagofór veszi körül. Záródásával létrejön az autofagoszóma. A külső membránja késői endoszómával fúzionál, így kialakul az amfiszóma. Végül lizoszómával olvad össze, az így kialakuló autolizoszómában a savas hidrolázok lebontják a belső membránt a szekvesztrált anyagokkal együtt.

Ennek során egy máig sem teljesen tisztázott eredetű fagofór (más néven izoláló membrán) ciszterna jön létre a citoplazmában, amely egyre növekedve és meghajolva körbeveszi annak egy részét (7.6. ábra).



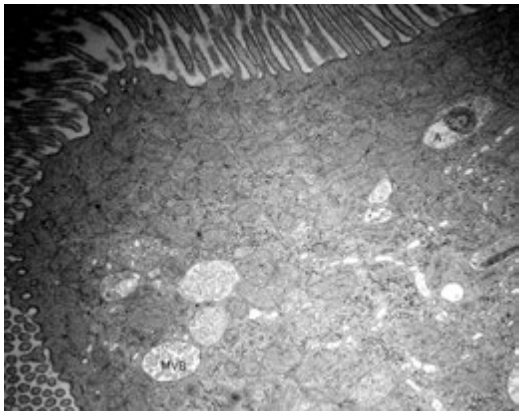
7.6. ábra A fagofór morfológiája. A fagofór (más néven izoláló membrán) jellegzetes, ultravékony metszetben gyakran félhold alakú (a valóságban persze térbeli, például csésze alakú) membránciszterna. Gyakran a két membrán között jellegzetes, üres tér figyelhető meg a rutinszerűen alkalmazott mintaelőkészítés következtében. Vegyük észre, hogy közvetlenül a fagofór mellett jobbra és balra is egy-egy durva felszínű, riboszómákat hordozó endoplazmás retikulum ciszterna látható. Ez az elhelyezkedés sok sejttípusban igen gyakori. Kovács Attila felvétele.

A fagofór záródásakor jön létre a kettős membránnal határolt autofagoszóma, melynek tartalma gyakorlatilag megegyezik a környező citoplazmával, de már szeparálásra került attól (7.7. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

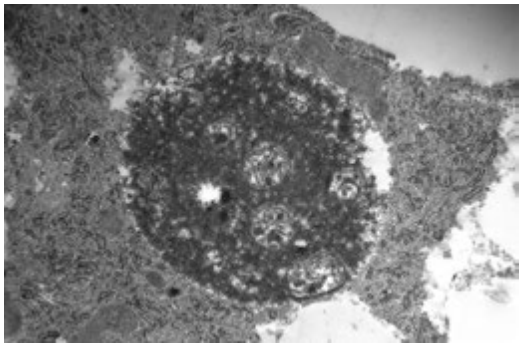
7.7. ábra Az autofagoszóma morfológiája. Az autofagoszóma (AP, autophagosoma) jellegzetes, kettős membránnal határolt vezikula. A fagofórhoz hasonlóan ezen a képen is megfigyelhető a külsö és belső membrán közötti, üresnek tűnő rés. Az autofagoszóma belsejében található, elkerített citoplazmarészlet morfológiája teljes mértékben megegyezik a környező citoplazmával, mivel lebontás ebben a sejtorganellumban még nem történik. Juhász Gábor felvétele.

A következő lépésben az autofagoszóma külső membránja késői endoszómával fúzionál, az így keletkező hibrid organellumot nevezzük amfiszómának (7.8. ábra).



7.8. ábra Az amfiszóma morfológiája. Ebben a felszínén mikrovillusok tömkelegét hordozó muslica bélhámsejtben megfigyelhetünk tipikus multivezikuláris testeket (MVB, multivesicular body), amik késői endoszómának felelnek meg. A kép jobb felső sarkában látható egy potenciális amfiszóma (A), mivel belsejében MVB-re jellemző kis vezikulákat és egy autofagoszóma belső membánnal határolt beltartalmát is felfedezhetjük. Juhász Gábor felvétele.

A folyamat végén az autofagoszóma tartalma a lizoszómába kerül szintén vezikulafúzió révén, majd ott lebomlik (7.9. ábra).



7.9. ábra Az autolizoszóma morfológiája. A képen látható sötét, elektrondenz autolizoszóma (AL) belsejében még felismerhető több, a degradációs folyamat kezdetén tartó mitokondrium, és egyéb membránnal határolt organellumok maradványai. Juhász Gábor felvétele.

Fontos kiemelni, hogy a degradáció végtermékei újrahasznosítódnak: például a keletkező aminosavakat a lizoszóma membránban található, specifikus transzporterek juttatják vissza a citoplazmába. A makroautofágia által szállított anyag mennyisége messze meghaladja az első két útvonalét, így érthető hogy a témával kapcsolatos kutatások általában ezzel foglalkoznak. Bevett gyakorlat, hogy az egyszerűség kedvéért autofágia alatt a makroautofágiát értik a szakirodalomban, így ebben a könyvben is ezt a nevezéktant alkalmazzuk.

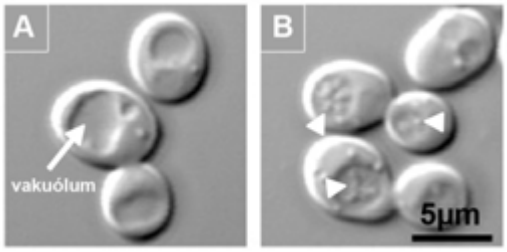
Az autofág (Atg) gének azonosítása élesztőben

Az autofágia molekuláris mechanizmusa, az abban szereplő gének és géntermékek mibenléte egészen az 1990-es évek közepéig-végéig ismeretlen maradt. Ebből is adódott hogy eddig az időszakig szinte csak leíró jellegű kutatások folytak, azaz megfigyelték hogy milyen körülmények vagy hormonális ingerek váltanak ki autofág választ különféle

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

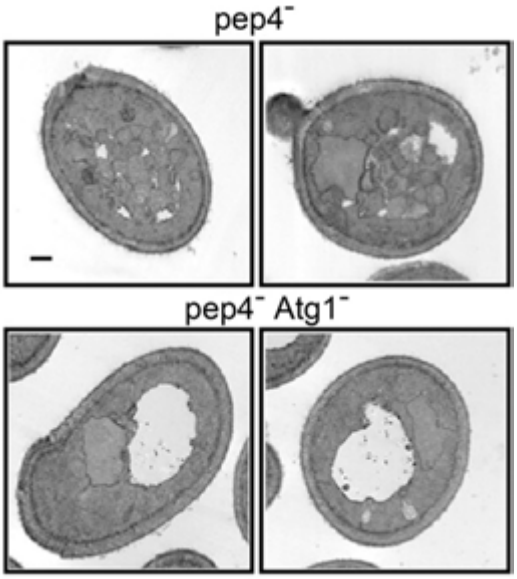
élőlények sejtjeiben, de a folyamat fiziológiás vagy patológiás jelentőségét csak korlátozottan lehetett vizsgálni. Ekkorra már leírtak ugyan olyan hatóanyagokat, amelyekkel az autofág lebontást serkenteni (pl. rapamicin) vagy gátolni (pl. 3-metiladenin vagy klorokvin) lehetett, azonban ezen drogok egyéb intracelluláris folyamatokat is befolyásolnak, így szelektivitásuk kérdéses.

Az igazi áttörést, sok más kutatási területhez hasonlóan, az élesztő genetikai vizsgálatok érték el. Az autofágiát *Saccharomyces cerevisiae*-ben 1992-ben írták le (Takeshige és mtsai, 1992). Vakuóláris proteináz A és B vagy karboxipeptidáz Y (CPY) hiányos mutáns élesztő sejteket tanulmányoztak, melyek nem képesek a normális lebontásra. Azt tapasztalták, hogy ha a vegetatív körülmények között tartott, minden igényt kielégítően táplált mutáns sejteket nitrogénhiányos, táplálékszegény médiumba teszik át (tehát éhezésre kényszerítik), akkor a fénymikroszkóppal üresnek látszó vakuólumban (ami valójában egy óriási lizoszóma) apró szemcsék jelennek meg (7.10. ábra).



7.10. ábra Élesztősejtek DIC optikával készült fénymikroszkópos képe. A (b) panelen látható, vakuoláris proteázokat gátló PMSF jelenlétében éheztetett élesztő sejt vakuólumában rengeteg apró rögöcske, autofág test figyelhető meg. Az (a) panel autofág gén mutáns élesztő sejtjeiben autofagoszómák, így autofág testek sem jönnek létre éhezés hatására. Forrás: Mol. Biol. Cell 2005: 16 (5), 2544-2553

Elektromikroszkóppal vizsgálva ezeket a sejteket kiderült, hogy a vakuólum belsejében lévő szemcsék citoplazma részeket tartalmazó szimpla membránnal határolt vezikulák, melyeket autofág testeknek nevezték el (7.11. ábra).

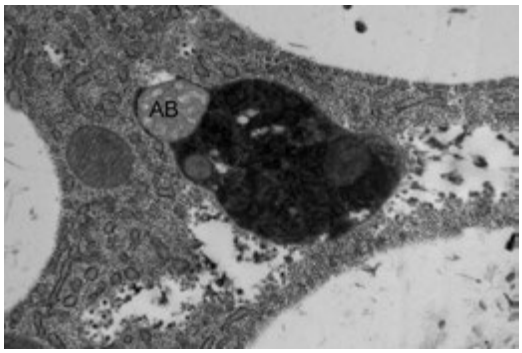


7.11. ábra Éheztetett élesztősejtek elektronmikroszkópos képe. A felső sorban látható, éheztett pep4 (vakuoláris hidroláz) mutáns élesztő sejtekben a nagyméretű vakuólum belsejében membránnal határolt citoplazma részletek, autofág testek találhatóak. Ha az Atg1 gén is hiányzik, akkor az autofagoszómák és autofág testek képződése gátolt, üresnek látszik a vakuólum az alsó sorban található képeken. Forrás: Mol. Biol. Cell 2008: 19(2), 668-681

Ezek a citoplazmában keletkeznek mint kettős membránnal burkolt autofagoszómák, majd a külső membránjuk a vakuólum membránnal fúzionál, és a belső membránnal határolt apró, fél-egy mikrométer átmérőjű vezikulák a náluk egy nagyságrenddel nagyobb vakuólum belsejébe jutva megfelelő, differenciális interferencia kontraszt (DIC) képalkotásra képes fénymikroszkópban láthatók. Ennek persze feltétele hogy az autofág testek ne bomoljanak

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

le szinte azonnal, amit megfelelő vakuoláris proteáz gátlószer kezeléssel (ilyen például a proteináz B-t gátló PMSF, fenil-metil-szulfonil fluorid) vagy a fent említett lebontó enzimek mutánsait vizsgálva lehet elérni. Megjegyzendő hogy ilyen autofág testek az állati sejtekben is keletkeznek, azonban mivel az élesztő és növényi sejtekre jellemző egy nagy vakuólum helyett rengeteg kisebb méretű lizoszómát hordoznak, így azokat gyakorlatilag csak elektronmikroszkóppal lehet kimutatni (7.12. ábra).



7.12. ábra Autofág test morfológiája állati sejtekben. A képen látható sötét autolizoszóma bal oldali részében kitűnően felismerhető egy autofág test (AB, autophagic body). A közvetlenül a kémiai rögzítést megelőzően megtörtént autofagoszóma-lizoszóma fúzió során az autofagoszóma belső membránnal körbevett beltartalma még degradáció jeleit nem mutatja, morfológiája hasonló a környező citoplazmáéhoz. Juhász Gábor felvétele.

Ekkor vált lehetővé, hogy mutagenezis révén autofágiához szükséges géneket izoláljanak. Az autofágiát élesztőben leíró Yoshinori Ohsumi japán kutatócsoportja 1993-ban publikálták az első nagyléptékű genetikai szűrés (screen) eredményeit (Tsukada és Ohsumi, 1993). Proteináz A deficiens (pep4) genetikai háttérben olyan törzseket kerestek amelyek éheztetés hatására nem halmoztak fel autofág testeket. Ezzel a módszerrel azonban csak egy mutánst (APG1) sikerült találni. Ennek vizsgálata során kiderült, hogy ebben a mutánsban nitrogén-éheztetés körülményei között nem fokozódott az endogén fehérjelebontás, és túlélőképessége a vad típusúénál lényegesen rosszabb volt: néhány napi éhezés hatására a vad típusú sejtekkel ellentétben az APG1 mutáns sejtek többsége elpusztult. Ezt az életképesség csökkentést felhasználva egy újabb kísérlet során 100 000 kémiai mutagenezissel létrehozott törzsből izoláltak 75 APG mutánst. Ezekről kiderítették, hogy 15 komplementációs csoporthoz tartoznak, azaz 15 gént reprezentálnak. A 15 mutáns törzs (APG1-15) mindegyike a következő közös fenotipikus tulajdonságokat mutatta.

1. Nitrogén, szén és aminosav éheztetés körülményei között nem halmozott fel autofág testeket, és életképességét viszonylag gyorsan elvesztette.

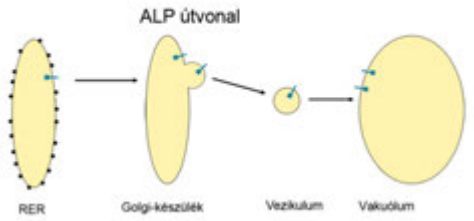
2. Nem történt meg benne az endogén proteolízis éheztetés általi erőteljes fokozódása.

3. Egyik homozigóta APG mutáns sem volt képes normális spóraképzésre.

Egy másik, német kutatócsoport által alkalmazott szelekciós rendszerben első markerként egy, a vad típusú élesztősejtekben éheztetés körülményei között lebomló citoszolikus enzimnek (zsírsav szintetáznak) a vakuólában való felhalmozódását detektálták immunológiai módszerrel. Azokat a törzseket amelyekben az autofágiát stimuláló (éhezési) körülmények közt nem tapasztaltak nagy mértékű zsírsav szintetáz szintcsökkenést, tehát feltehetően hiányzott az autofág lebontó aktivitás, PMSF gátlás mellett megvizsgálták arra nézve, hogy képesek-e autofág testeket felhalmozni. Ezen módszerek felhasználásával izolálták az AUT1-9 mutánsokat (Thumm és mtsai, 1994).

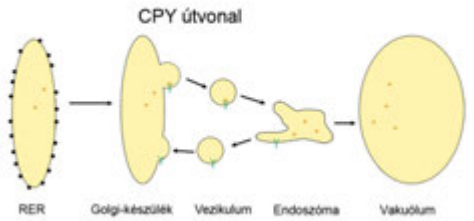
Az élesztőben folyó vizsgálatok harmadik vonulata egy szokatlan és teljesen új folyamat felfedezéséhez vezetett. Daniel J. Klionsky amerikai munkacsoportjának vizsgálatai kiderítették, hogy egy rezidens vakuóláris enzim, az aminopeptidáz I (API), amely a szintézisének befejezésekor a citoszólba jut, egy új és sajátos úton kerül a végleges műlködési helyét jelentő vakuólumba (Harding és mtsai, 1995). Ez lényegesen különbözik a hagyományos úgynevezett ALP (**al**kaline **p**hosphatase) útvonaltól (7.13. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



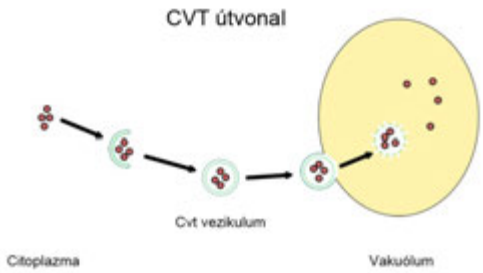
7.13. ábra Az ALP (alkaline phosphatase) útvonal. A durva felszínű endoplazmatikus retikulumból (RER) a Golgi-készüléken és Golgi vezikulum úton kerül az enzim a vakuólumba. Kárpáti Manuéla ábrája.

Ennek során az ALP enzim a klasszikus RER – Golgi - Golgi-vezikula utat járja be, végül fúzió révén a vakuólumba kerül. Egy másik jól jellemzett transzport rendszer az RER - Golgi- Golgi-vezikula – endoszóma - vakuólum utat használja. Ezt egy tipikus képviselőjéről (**c**arboxy**p**etidase **Y**) CPY útvonalnak hívják (7.14. ábra).



7.14. ábra A CPY (carboxypetidase Y) útvonal. A durva endoplazmatikus retikulumból (RER) a Golgi-készüléken keresztül létrejövő vezikulum szállítja az enzimeket, amely előbb endoszómával, majd ezt követően a vakuólummal fúzionál. Kárpáti Manuéla ábrája.

Az API-t szállító mechanizmus újdonságát az adta, hogy ez az enzim kikerüli a fenti útvonalakat és a citoplazmából közvetlenül a vakuólumba kerül. Éppen amiatt ezt a vadonatúj mechanizmust Cvt (**c**ytoplasm to **v**acuole **t**argeting) útvonalnak nevezték el. Miután genetikai screen-ekben CVT mutánsokat izoláltak, váratlan módon kiderült, hogy a Cvt út genetikailag, mechanizmusát és elektronmikroszkópos megjelenését tekintve is hasonlóságokat mutat az autofágiával (7.15. ábra).

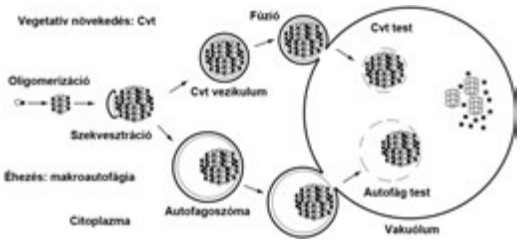


7.15. ábra A Cvt (cytoplasm to vacuole targeting) útvonal. Az enzim a citoplazmából egyenesen a vakuólumba kerül egy kettős membrán borítású Cvt vezikulumban. Kárpáti Manuéla ábrája.

Például a Cvt mechanizmus elektronmikroszkópban vizsgálva is hasonlít az autofágiához. Mindkettő esetében kettős membrán által végrehajtott szekvesztráció révén, a citoplazma egy része (autofágia) vagy a vakuólumba szállítandó enzimek (Cvt út) elhatárolódnak a citoplazma többi részétől. Az így létrejött Cvt vezikula kisebb méretű (átmérője kb. 150 nm), és ami különösen érdekes, szelekív módon csak a szállítandó enzimeket valamint a csomagolásukhoz szükséges fehérjéket veszi fel. Az autofagoszóma nagyobb méretű, élesztőben átmérője kb. 300-900 nm. Benne a feltételezések szerint többé-kevésbé válogatás nélkül szekvesztrált citoplazma részletek vannak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A Cvt vezikula vagy az autofagoszóma külső membránja azután a vakuólum membránjával való fúzió révén juttatja a belső membránnal eleinte még továbbra is beburkolt tartalmát, a Cvt vagy autofág testet a vakuólum belsejébe. Érdekes módon normális tápanyagellátottság esetén a bioszintetikus Cvt útvonal aktív, míg éhezés hatására az élesztősejtek képesek átkapcsolni az autofág útvonalra (7.16. ábra).



7.16. ábra A Cvt (cytoplasm to vacuole targeting) és autofág útvonalak. Az API (aminopeptidáz 1) enzim jól táplált élesztősejtekben a citoplazmából egy kettős membrán borítású Cvt vezikulum közvetítésével kerül a vakuólumba. Éhezés esetén viszont a Cvt útvonal gátlódik, helyette autofág úton jut a vakuólumba ez a hidroláz. Forrás: Mol. Biol. Cell 2000: 11 (3), 969-982.

Fontos, hogy a Cvt úton szállított enzimek ilyenkor autofágia révén jutnak el a vakuólumba, azaz egy Cvt-specifikus mutáció okozta API transzport hiba „megmenekíthető" éheztetéssel. Megjegyzendő, hogy a Cvt-hez hasonló útvonalat még semmilyen egyéb élesztőfajban vagy magasabb rendű sejtben nem találtak.

Az élesztő autofág mutánsainak felfedezése kétfelé is utat nyitott. Az egyik úton felderíthető az autofágia molekuláris mechanizmusa és szabályozása élesztőben és magasabb rendűekben. A másik úton reverz genetikai módszerekre alapozva meg lehetett célozni az autofágia más modellszervezetekben, köztük állatokban és tenyésztett egér vagy emberi sejteken történő vizsgálatát.

A gyorsabb előrehaladás az autofágia molekuláris hátterének megértésében természetesen az élesztő sejteken valósult meg. Az APG, AUT és CVT mutánsok száma tovább bővült, valamint egyéb mutagenezis screenekből (mint pl. az igen sokféle vezikulatranszport útvonalben szereplő vakuoláris protein sorting, VPS mutánsok) is számos autofágiához szükséges gént izoláltak. Kiderült, hogy a különféle élesztő screenekben azonosított APG/AUT/CVT stb. mutánsok részben allélikusak egymással, tehát ugyanazt a gént érintik. A párhuzamos elnevezések egyre nehézkesebbé tették a folyamatok áttekintését. A helyzet az új évezred elejére megérett a tisztázásra, aminek az eredményeképpen az élesztőben azonosított autofág gének új nevezéktanát vezették be (Klionsky és mtsai, 2003). Az új név az "**au**tophag**y**-related" kifejezésből az ATG génekre, illetve az Atg fehérjékre vonatkozik élesztőben, de gyakran magasabb rendűekben is hasonló elnevezéssel találkozunk.

Az Atg fehérjék működése

Az eddigi kutatási eredmények alapján elmondható, hogy az Atg fehérjéket funkciójuk szerint több evolúciósan konzervált csoportba oszthatjuk (Mizushima és mtsai, 2011). Ezek többsége legalábbis átmenetileg megtalálható a leendő és képződő fagofór területén, melyet PAS-nak neveznek (pre-autophagosomal structure vagy phagophore assembly site). Mivel szerepük hasonló a különféle élőlényekben, így csak az élesztő komplexeket ismertetjük részletesebben, és utalunk az emlős homológok elnevezésére ahol azok eltérnek az élesztő nómenklatúrától. Egy fontos különbség például az, hogy a magasabb rendűek sejtjeiben egyszerre több fagofór is ki tud alakulni, viszont élesztőben csak egy, a vakuólum közelében elhelyezkedő PAS mutatható ki. Az Atg fehérjék működését az autofágia során a gerinctelenekről szóló fejezet 18. ábrája illusztrálja.

Az autofág indukció során először az Atg1 kináz komplex aktiválódik, melyet az Atg1 szerin-treonin kináz (emlősök homológjai az ULK1 és 2) mellett az Atg13 és az Atg17 alkot, egyéb fehérjék mellett. Az Atg17 élesztőben autofágia-specifikus, a Cvt útvonalban az Atg11 funkcionál ezen komplex alegységeként. Említésre érdemes hogy ámbár az élesztő Atg17 homológjait nem találjuk meg állati sejtekben, egy hasonló szerepű fehérje, a FIP200 viszont megtalálható az Atg1/ULK komplexben. Az Atg1 kinázra jellemző hogy autofoszforilációra képes, továbbá állati sejtekben az Atg13-at foszforilálja. Egyéb szubsztrátjai még kevéssé ismertek.

A fagofór kialakulásához szintén kulcsfontosságú az Atg9. Ez az egyetlen integráns membránfehérje (6 transzmembrán domént tartalmaz) az Atg géntermékek között, így csak vezikulák formájában szállítódhat. Az

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Atg9 az eddigi eredmények alapján a Golgi készülék és az endoszómák területén lelhető fel, ami arra utal, hogy a fagofór membránkomponenseinek egy része ezen sejtalkotókból származhat.

Az autofág fehérjék harmadik csoportját egy autofágia-specifikus lipid kináz komplex alkotja. Ennek katalitikus alegysége a Vps34, amely egy foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K, és a III. osztályba tartozik, lásd később). Működése során ezt a membránalkotó lipidet képes az inozitol cukorgyűrű 3. szénatomjához kapcsolódó hidroxilcsoportján foszforilálni, ezáltal foszfatidil-inozitol 3-foszfáttá (PI3P) alakítani. A komplex további alegységei közé tartozik a szerin-treonin kináz Vps15, az Atg6 (emlős homológja a Beclin-1), valamint az Atg14. Ez utóbbi szerepe az, hogy autofágia-specifikussá tegye a komplex működését. A PI3P ugyanis nem csak a fagofórok és autofagoszómák, hanem az endoszómák membánjában is jelen van, döntően a Vps34 aktivitásának köszönhetően. Az endocitotikus útvonalban szereplő lipid kináz komplexben azonban az Atg14 alegység helyett a Vps38 (emlősökben UVRAG) található meg.

A negyedik csoportot az Atg18 (emlősökben WIPI1-4) és Atg2 fehérjék komplexe alkotja. Az Atg18 PI3P kötő motívummal rendelkezik, így a lipid kináz komplex effektora. Mindkét fehérje köt az Atg9-hez is, így feltételezhetően annak aktivitását, elhelyezkedését befolyásolja. Említésre érdemes hogy emlősökben leírtak egy másik PI3P effektort is, melyet DFCP1-nek neveznek, mivel két specifikus lipidkötő domént hordoz (double FYVE domain containing protein 1). A DFCP1 nem minden élőlényben fordul elő, és ahol megtalálható azokban a sejtekben a hiánya nem gátolja az autofágiát. Vizsgálata azonban kiderítette, hogy bizonyos tenyésztett sejtvonalakban a DFCP1 az endoplazmás retikulum egy speciális szubdoménjében helyezkedik el, ott ahol az autofagoszómák keletkeznek. Ez a terület az autofagoszóma keletkezésének bizonyos fázisában omega alakú görbületet mutat, ennek alapján omegaszómának nevezték el. Ezen kísérletek felvetették annak a lehetőségét, hogy a fagofór képződéséhez az ER membrán is hozzájárulhat. Az hogy a kapcsolat mennyire direkt, azaz hogy van-e közvetlen membránösszeköttetés vagy vezikuláris transzport zajlik-e az ER és a fagofór között, még nincs megnyugtatóan bizonyítva.

Végezetül két ubiquitin-szerű protein konjugációs rendszer is szükséges az autofagoszómák létrjöttéhez. Az Atg8 és az Atg12 térszerkezete nagyon hasonló az ubiquitinéhez, bár az aminosavsorrend szintjén ez nem nyilvánvaló. Mindkét fehérje aktiválását az Atg7, egy E1-szerű enzim végzi. Ezután az Atg8-at az Atg3, az Atg12-t pedig az Atg10 szállítja (E2). Az Atg12 kovalensen kapcsolódik az Atg5 fehérjéhez, majd az Atg16-tal együtt egy nagy fehérjekomplexet alkotnak. Ez az Atg5-12-16 komplex a képződő fagofór membránokat kötve interakcióba lép az Atg3-Atg8 komplex-szel, így segíti elő az Atg8 konjugációját egy membránlipidhez, a foszfatidil-etanolaminhoz (Romanov és mtsai, 2012). A folyamat végeredményeképpen egy membránkötött Atg8 molekula jön létre, amely mind a fagofór, mind pedig az autofagoszóma felszínén megtalálható. Fontos, hogy az Atg8 és homológjai (ezek egyike emlősökben az LC3, microtubule accociated protein light chain 3) még az E1 enzimhez való kapcsolódás előtt limitált proteolízisen esnek át: az Atg4 cisztein proteáz lehasítja a C-terminushoz közeli glicint követő aminosavakat, ami a konjugációs lépésekhez szükséges. Hőérzékeny Atg4 mutáns élesztősejtek vizsgálata derítette ki hogy az Atg4 az autofágia egy későbbi lépésében is szerepel: az autofagoszóma külső membránjához kapcsolt Atg8-at szabadítja fel. Ez élesztőben szükséges ahhoz, hogy az autofagoszóma a vakuólummal fúzionálni tudjon. Az autofagoszóma belső membránján található Atg8 a vakuólumba/lizoszómákba jut, és ott lebomlik. Ezáltal az Atg8 és homológjai az autofágia során szelektíven lebomlanak, és állandó utánpótlásra van szükség (transzkripció és transzláció révén) a maximális degradációs kapacitás eléréséhez.

A fenti, stabilnak tekinthető komplexeken és rendszereken kívül még rengeteg, az Atg fehérjekomplexek közötti kölcsönhatás játszhat döntő szerepet az autofág indukció során, melyek felderítése jelenleg is folyamatban van.

Ellenőrző kérdések

1. Milyen útvonalakon juthatnak a lebontandó anyagok a citoplazmából a lizoszómába?

2. Hogyan fedezték fel az autofágiához szükséges géneket?

3. Az Atg fehérjék milyen fő funkcionális csoportokba sorolhatók?

Irodalom

Harding, T. M., Morano, K. A., Scott, S. V. és Klionsky, D. J. (1995). Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of cell biology***131**, 591-602.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. és mtsai (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell***5**, 539-545.

Mizushima, N., Yoshimori, T. és Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.***27**, 107-132.

Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C. és Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.***31**, 4304-4317.

Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. és Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants és conditions for its induction. *The Journal of cell biology***119**, 301-311.

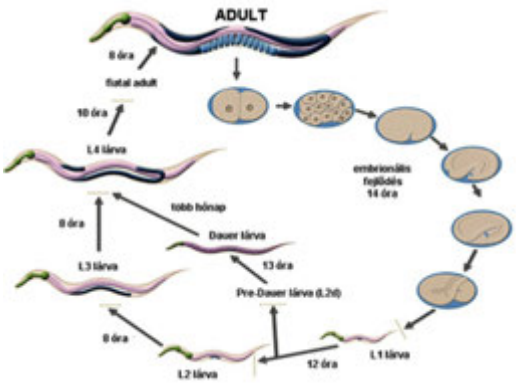
Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. és Wolf, D. H. (1994). Isolation of autophagocytosis mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **349**, 275-280.

Tsukada, M. és Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.***333**, 169-174.

8. Az autofágia mechanizmusa, jelentősége és TOR kináz-dependens szabályozása gerinctelen modellállatokban

Talajlakó fonalférgek (példa: *Caenorhabditis elegans*)

A *Caenorhabditis elegans* egy viszonylag egyszerű felépítésű, kb. 1 mm hosszú, talajlakó faj. Az 1960-as években alkalmazták először az egyedfejlődés és az idegrendszer genetikájának vizsgálatára. Előnyei hogy az áttetsző testében elhelyezkedő egyedi sejteket megfelelő fénymikroszkópos technikákkal látható fényben is tanulmányozni lehet, és laboratóriumi körülmények között a közönséges *Eschericia coli* baktériumtelepeket hordozó Petri csészékben egyszerűen tenyészthető. A peték kikelése után 4 lárvastádium (L1-L4) közbeiktatásával fejlődnek ki a szaporodóképes adultok, mintegy két nap leforgása alatt. Egy speciális, a normális körülmények között nem jellemző lárvaállapot (dauer stádium) révén az állatok a tartós tápanyaghiány vagy egyéb hátrányos körülmények közepette is hosszú ideig túlélnek (8.1. ábra).



8.1. ábra A *Caenorhabditis elegans* életciklusa.

A Caenorhabditis elegans életciklusa egy folyamatábra, melyben az egyes fejlődési stádiumok egy kör mentén helyezkednek el. Legfelül, 12 óránál, az adult állatból indul ki a embrionális fejlődés lépéseit ábrázoló 6 ovális kör. Utána kezdődnek az egyes lárvastádiumok, egy külön elágazásban ábrázolva a Dauer lárvastádiumot.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A *C. elegans* embrionális fejlődése 14 óra alatt zajlik le. A peték kikelése után 4 lárvastádium (L1-L4) közbeiktatásával fejlődnek ki a szaporodóképes adultok, mintegy két nap leforgása alatt. A tartós tápanyaghiány vagy egyéb hátrányos körülmények közepette egy speciális, a normális körülmények között nem jellemző lárvaállapot (dauer stádium) révén hosszú ideig túlélhetnek, majd megfelelő tápanyagellátottság esetében adultokká is fejlődhetnek. Forrás: **www.wormatlas.org**

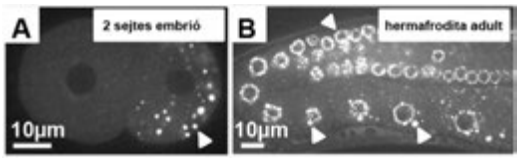
Autofágia az élethossz szabályozásában

A fonalférget előszeretettel használják az ecetmuslicával együtt élethossz vizsgálatokra, azaz hogy a különféle genetikai hátterek vagy környezeti hatások hogyan befolyásolják azt, hogy ezek az állatok meddig élnek. Ezekből az eredményekből természetesen nem jósolható meg az emberek várható élettartama, hiszen azt rengeteg olyan környezeti, lélektani és szociális hatás befolyásolja amit nem lehet ilyen egyszerű gerinctelen modellek esetén figyelembe venni. Valószínűleg leszűrhetőek azonban olyan általános fiziológiai tényezők és sejtbiológiai folyamatok, melyek szerepet játszhatnak a humán élethossz meghatározásában.

Férgek esetén ismert hogy az inzulin receptorát kódoló gén (DAF-2, dauer formation abnormal 2) funkcióvesztése nagymértékben megnöveli a mutáns állatok élethosszát. A feltételezések szerint ez annak köszönhető, hogy lecsökken a sejtnövekedés és anyagcsere intenzitása. Beth Levine munkacsoportja mutatta ki azt elsőként, hogy az inzulin jelátvitel csökkenése az élethosszt autofágiában szereplő génektől függő módon növeli meg, majd arra is fény derült, hogy az autofágia gének funkcióvesztése a vad típusú férgek élethosszát is lerövidíti (Melendez és mtsai, 2003). A későbbi vizsgálatok alapján az autofág gének a lecsökkent táplákozási ráta, TOR aktivitás (lásd később) vagy mitokondriális működés által kiváltott élethosszt megnövelő hatáshoz is nélkülözhetetlennek bizonyultak férgekben. Úgy tűnik tehát, hogy akár minden, az élethosszt megnövelő behatás részben az autofágia révén fejtheti ki hatását (Tóth és mtsai, 2008).

Az autofágia szerepe a csíravonal specifikáció során

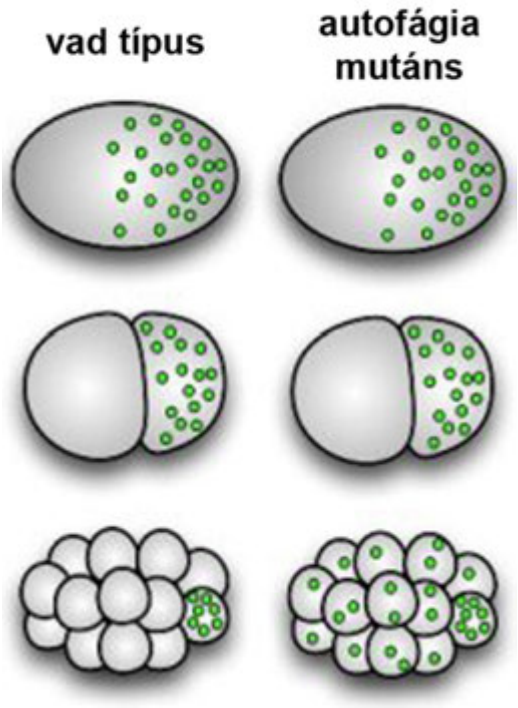
A fonalférgek korai embrionális fejlődése szigorúan szabályozott, az osztódások során keletkező sejtek pozíciója és későbbi sorsuk is determinált. A leendő ivarsejteket létrehozó csíravonal sejtjeire jellemző az RNS-ben gazdag P granulumok citoplazmás jelenléte, melyek feltételezhetően a csírasejtekre jellemző génexpressziós mintázat kialakításában vesznek részt (8.2. ábra).



8.2. ábra P-granulumok jelenléte kétsejtes embrióban és a csírasejtekben (A) 2 sejtes fonalféreg embrió posterior sejtjében P-granulumok jelenléte látható. (B) Hermafrodita adultokban a csírasejtekben vannak jelen a P-granulunok. A nyílfejek a P-granulumokat jelölik mindkét ábrán. Forrás: Development 2008, 135(5): 983-993.

Hong Zhang kutatócsoportja egy nagyléptékű genetikai screen során olyan géneket keresett, amelyek a P granulumoknak az utódsejtekben való egyenlőtlen eloszlását szabályozzák fejlődő féreg embriókban. Normális esetben ilyen granulumok csak a csírasejtek őseiben találhatók (Tian és mtsai, 2010). Zhang irányításával az autofág gének számos mutánsát izolálták, amelyekben a csírasejtek mellett a leendő testi sejtek is P granulumokat tartalmaztak (8.3. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.3. ábra P-granulumok elhelyezkedése C. elegans egyedfejlődése során A vad típusú fonalférgekben a P-granulumok csak a csírasejtekben és az azokat létrehozó embrionális sejtekben vannak jelen. Az autofág mutánsokban a testi sejtekben is kimutatható a P-granulumok jelenléte. Forrás: F1000 Biol Rep. 2009: 29, 1:49.

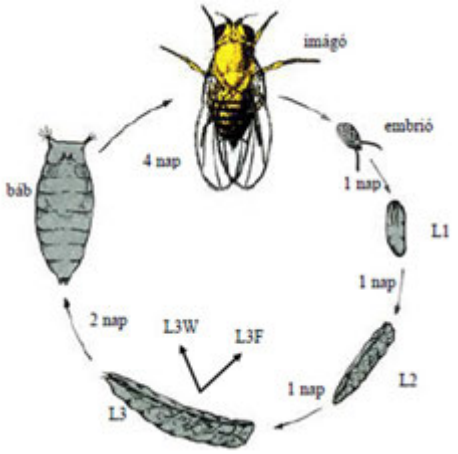
Ebből azt a következtetést lehetett levonni, hogy a P granulumok eloszlását az autofágia is szabályozza a testi sejtekben található struktúrák szelektív lebontása révén. Ez az ektopikus P granulum (EPG) screen a már élesztő vizsgálatok alapján ismert autofág gének homológjai mellett több, állati sejtekre specifikus, autofágiához szükséges gént is azonosított. Ilyen például az emlős VMP1 (más néven TMEM49). Ez a döntően az endoplazmás retikulumban elhelyezkedő fehérje még nem ismert módon szükséges a megfelelő méretű fagofór kialakulásához és záródásához.

Rovarok (példa: *Drosophila melanogaster*)

A gerincteleneken folyó kísérletek másik kedvelt alanya a *Drosophila melanogaster*, amely laboratóriumi körülmények között üvegfiolákban könnyen tenyészthető. Bár egyedfejlődése lassabb mint a fonalféregé (az imágók kikelése mintegy 10 nappal a peterakást követően várható), testfelépítésének bonyolultságát, szerveit és élettanát tekintve jóval közelebb áll az emlősökhöz, mint a férgek. Nagy előnye az igen szofisztikált genetikai eszközkészlet, amellyel például genetikai mozaik állatok hozhatók létre. Ennek során különböző genotípusú sejtek egyazon állatban vagy szövetben vizsgálhatók, tehát bizonyos mutációt homozigóta formában hordozó vagy éppen egy adott fehérjét túltermelő sejteket kontroll sejtek vesznek körül. A mozaik analízis nem csak az egyébként a szervezet szintjén letalitást okozó mutációk vizsgálatát teszi lehetővé, hanem az egyazon szöveten belül elhelyezkedő, egymással szomszédos kontroll és genetikailag manipulált sejtek összehasonlítása a biológiai rendszerekre egyébként igen jellemző variabilitást is nagyrészt kiküszöböli.

A muslica teljes átalakulással fejlődő rovar, amely a metamorfózis során lárvából kifejlett adulttá alakul (8.4. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

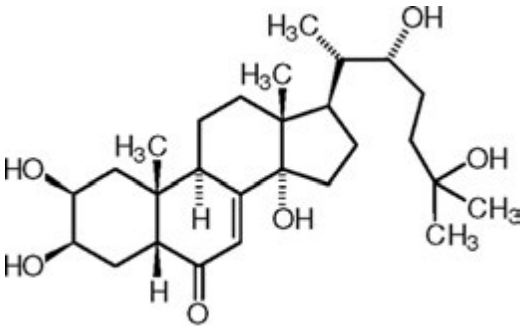


8.4. ábra A Drosophila melanogaster életciklusa Az ecetmuslica teljes átalakulással fejlődő rovar, amely a metamorfózis során lárvából kifejlett adulttá alakul. A megtermékenyülést követően a pete burkán belül zajlik le körülbelül egy nap alatt az embriogenezis. A kikelést követően 3 lárvastádiumot különíthetünk el (L1, L2, L3). Az harmadik lárvastádiumot két részre oszthatjuk: táplálkozó (F, feeding) és vándorló (W, wandering) szakaszra. A L3W lárvák száraz helyet keresve vándorolnak, majd ezt követi a puparium (előbáb) kialakulása. A metamorfózis folyamata során a lárvából 4 nap alatt kifejlett imágó alakul ki.

A petékből kikelő lárvák szélsőségesen alkalmazkodtak a rothadó gyümölcsben vagy hasonló táplálékban történő minél gyorsabb növekedéshez. A lárvát alkotó szövetek nagy része poliploidizálódik, így a citokinéziseket megspórolva hatalmasra nő. Például a májunkhoz és zsírszövetünkhöz hasonló zsírtest a lárvális fejlődés 4 napja alatt (L1-L3 stádiumok) tömegét mintegy 200-szorosára növeli. Ezek a szervek a rengeteg raktározott biomassza révén megfelelő raktárt biztosítanak a diploid sejtek részére éhezés vagy metamorfózis során. Ilyen körülmények közepette a zsírtesthez hasonló poliploid szövetekben döbbenetes mértékű autofág indukció figyelhető meg, amely a hemolimfába jutva biztosítja az imágót kialakító diploid szövetek táplálását külső tápanyag hiányában is. A nagymérvű éheztetési vagy fejlődési autofág válasz és a mozaik analízis kombinációja együttesen a muslicát kiváló modellállattá teszik az autofágia sejtszintű vizsgálatára. Emellett a féreg modellhez hasonlóan az autofágia fiziológiás jelentősége is tanulmányozható.

Az autofágia hormonális szabályozása

A muslica és a hasonló rovarok vedlésének és metamorfózisának szabályozása sokoldalúan és részletesen tanulmányozott folyamat (Riddiford, 1993). A vedlési hormon (ekdizon) egy szteránvázas molekula (8.5. ábra), szintje az egyes lárvastádiumok végén megemelkedik.



8.5. ábra A vedlési hormon aktív formájának (20-hidroxi-ekdizon) szerkezete. Forrás: Wikipedia.

Amennyiben a juvenilis hormon szintje magas, akkor ez az ekdizon csúcs a következő lárvastádiumba vezető vedlést fogja kiváltani. Az utolsó (muslicáknál a harmadik) lárvastádium során azonban a juvenilis hormon szintje lecsökken, és ilyenkor a magas ekdizon szint a metamorfózis megkezdését okozza. Első lépésben egy enyhe ekdizonszint emelkedés váltja ki az addig táplálkozó állatok viselkedésének megváltozását: vándorolni kezdenek. A vándorlás célja hogy megfelelően száraz helyet találjon magának az állat a bábozódáshoz, és így megkönnyítse

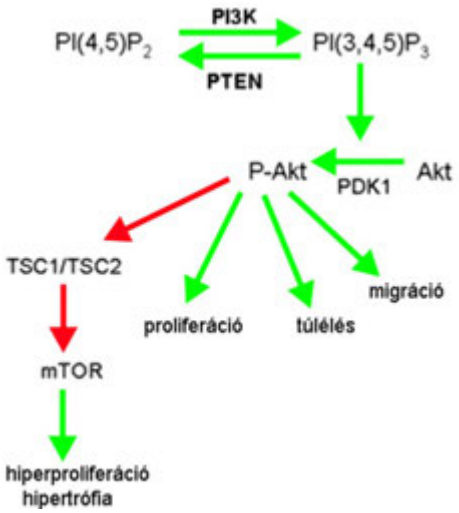
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

a kifejlett imágó kikelését. A vándorló viselkedést kiváltó ekdizon csúcs indukálja a lárvális zsírtest és bél autofágiáját már a bebábozódás előtt lepkefélék lárváiban (Sass és Kovacs, 1975). Drosophilaesetén ez nagyjából 108 órával a peterakást követően, a 3. lárvastádium vége felé történik meg (Rusten és mtsai, 2004). Egy következő, nagyságrenddel magasabb ekdizonszint emelkedés hatására 120 óránál következik be a pupárium formálódás, mely az előbáb (prepupa) stádium kezdete. 12 óra múlva egy újabb ekdizon csúcs váltja ki a tulajdonképpeni vedlésnek tekinthető változást, és innentől beszélünk a tulajdonképpeni bábállapotról (pupa).

A vándorlás kezdetén a poliploid szövetekben megfigyelhető autofág indukció már korábban is kiváltható éhezéssel. Ezt a laborban a kb. 80-90 órás lárvák 20%-os cukoroldatba helyezésével a legkönnyebb kísérletesen vizsgálni, ugyanis ebben a tömény oldatban a lárvák nem süllyednek el, így sem a megfulladás, sem pedig a szétmászás nem okoz problémát. Megjegyzendő, hogy az állati szervezetek igen jelentős pufferkapacitással bírnak a tápanyagokra nézve, így a vérben vagy hemolimfában keringő aminosavak mennyisége ilyen körülmények közepette sem csökken drasztikusan. Az élesztősejtekkel ellentétben az autofág indukció döntően hormonális változások révén zajlik. Mind az éhezés, mind pedig a vándorlást kiváltó ekdizon csúcs eredménye az lesz, hogy a zsírtest sejtekben inaktiválódik az inzulin receptor (InR) szabályozta sejtnövekedési útvonal, mivel az agy pars intercerebralis részében található neuroszekréciós sejtek kevesebb inzulin-szerű növekedési faktort (IGF, insulin-like growth factor) szekretálnak. Kövessük végig hogy hogyan működik ez a jelátviteli út!

Az inzulin/PI3K/AKT és TOR jelátviteli utak szerepe

Az InR a receptor tirozin kinázok családjába sorolható, amikor aktív akkor foszforilálja az inzulin receptor szubsztrát (IRS) fehérjét. Az IRS ennek hatására köti és aktiválja az I. osztályba tartozó PI3K lipid kinázt. Fontos megjegyezni hogy ez különbözik a III. osztályba tartozó Vps34-től, amely a legősibbnek tekinthető, már élesztőben is jelen van. Az aktiválódott I. osztályú PI3K szubsztrátja is más, ez ugyanis a plazmamembránban található foszfatidil-inozitol 4,5-bisz-foszfátot alakítja foszfatidil-inozitol 3,4,5-trisz-foszfáttá (PIP3). A PIP3 foszfolipidhez specifikusan kötő doménnel rendelkező fehérjék (ilyen az ún. PH domén) lesznek ennek a másodlagos hírvivő anyagnak az effektorai. Elsősorban a PDK1 (foszfolipid-dependens kináz), amely az AKT szerin-treonin kinázt fogja aktiválni. Az AKT PDK1 általi foszforiláció mellett szintén hordoz PH domént, tehát ugyanazt a foszfolipidet fogja kötni a plazmambránban. Az aktív AKT serkenti a sejtnövekedést és gátolja az apoptózist, továbbá a TOR jelátvitel aktivitását is növelni tudja (8.6. ábra).

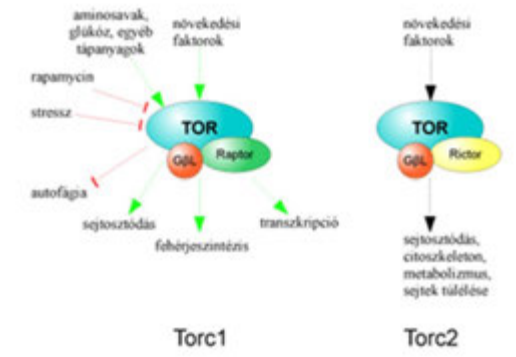


8.6. ábra Az Akt kináz szabályozása és hatásai. A foszfatidil inozitol 3 kináz (PI3K) a plazmamembránban található foszfatidil-inozitol 4,5-bisz-foszfátot (PIP2) alakítja foszfatidil-inozitol 3,4,5-trisz-foszfáttá (PIP3). A folyamat reverzibilis, a PTEN (phosphatase és tensin homolog) a PIP3 PIP2-vé való visszaalakulását katalizálja. A PDK1 (foszfolipid-dependens kináz) foszforilálja és így serkenti az Akt-ot, aktiválásához viszont PIP3 kötés is szükséges. Az aktív Akt serkenti a proliferációt, túlélést és migrációt (zöld nyilak), és gátolja a TSC1/2 komplexet (piros nyíl). Ennek hatására az mTOR aktivitása is nő, ami szintén serkenti a sejtnövekedést és a hipertrófiát. Pircs Karolina ábrája.

A TOR elnevezése a target of rapamycin rövidítése. A rapamycin (más néven sirolimus) egy makrolid típusú hatóanyag, melyet gombaellenes és immunszuppresszáns (például szervátültetésnél a kilökődést megakadályozó)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

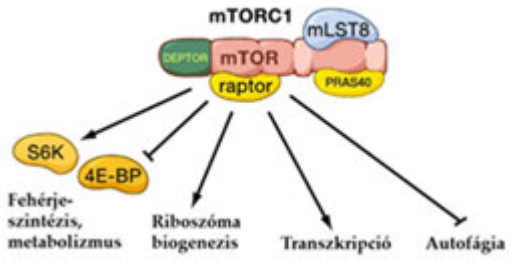
kezelésekre, újabban pedig rákellenes szerként használnak. Eredetileg egy Húsvét-szigetekről (Rapa Nui, innen ered a rapamycin név) származó talajmintában fedezték fel, a *Streptomyces hygroscopius* baktériumfaj termeli a vele kompetícióban álló gombák térnyerésének megakadályozására. A sejtekbe jutva a rapamicin az FKBP12 (FK506-binding protein of 12 kDa) alkot komplexet, és együtt a TOR kinázhoz kötődve inaktiválják azt. A TOR szerin-treonin kináz az egyik legjelentősebb jelátviteli csomópont az eukarióta sejtekben, ugyanis a sejt energiaszintjét, az aminosavak mennyiségét és többsejtűekben a különféle növekedési faktorok jeleit integrálja (8.7. ábra).



8.7. ábra A TORC1 és TORC2 komplexek felépítése, szabályozódása és hatásaik A növekedési faktorok, glükóz, aminosavak és egyéb tápanyagok serkentik a TORC1 komplex működését. A rapamycin és különböző stresszhatások viszont gátolják a TORC1-et. Az aktív TORC1 gátolja az autofágiát, serkenti a sejtosztódást, a fehérjeszintézist és bizonyos gének transzkripcióját. A TORC2 működését főleg növekedési faktorok befolyásolják, és legfőképpen a citoszkeletonra hat. A TORC1 és a TORC2 komplexek közötti különbséget a Raptor vagy Rictor alegység jelenléte határozza meg. Nagy Péter ábrája.

Élesztőben két homológ gén (TOR1 és TOR2) létezik, de a TOR2 funkciója eltér, citoszkeletális változásokat szabályoz. Magasabbrendűekben ugyan csak egy TOR gén található, viszont itt is két fehérjekomplexet képez: mTORC1 (mammalian or mechanistic TOR complex 1) és mTORC2, az élesztőhöz hasonló funkciókkal. Megjegyzendő hogy rapamicinre csak az mTORC1 érzékeny. A fő különbség az komplexek összetételében az, hogy az mTORC1 egyik alegysége, a raptor (rapamycin-sensitive companion of TOR) helyett az mTORC2 esetén a rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR) fehérjét találjuk. A TOR-t több kis GTPáz fehérje is aktiválja, ezek egyike a Rheb. A fent említett AKT a TOR aktivitását úgy képes serkenti, hogy a TSC1-TSC2 (tuberous sclerosis 1, 2) komplexet foszforilálva gátolja annak Rheb-re kifejtett GTPáz aktivátor működését, tehát a Rheb így több ideig lesz aktív, mielőtt GTP-t hidrolizálna.

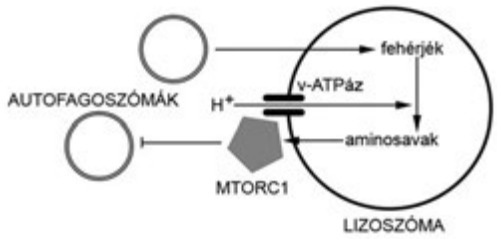
A TOR fő kimenetei közé tartozik a transzláció serkentése és az autofágia gátlása. A TOR szubsztrátja például az S6K (S6 kináz), amely így aktiválódva a riboszóma kis alegységének 6. számú fehérjéjét foszforilálja, ezáltal serkenti a transzlációt. Egy másik TOR szubsztrát a 4EBP (eIF-4E binding protein), ami a 4E jelű transzlációs iníciációs faktort kötve gátolja a fehérjeszintézist. A 4EBP TOR által történő foszforilációja megakadályozza az eIF-4E-hez történő kötését, azaz kikapcsolja az iníciáció gátlást. A TOR itt nevesített harmadik szubszrátja pedig az Atg1 kináz, amelyet inaktivál. Az éhezés, vagy magasabb rendűeknél a növekedési faktorok megvonása a fentiekkel ellentétes folymatokhoz vezet, tehát transzláció gátlást és autofág indukciót okoz (8.8. ábra).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

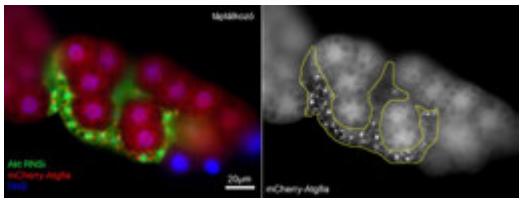
8.8. ábra Az aktív emlős mTORC1 által szabályozott legfontosabb folyamatok. Az mTORC1 5 alegységből épül fel: az mTOR-ból, a Raptorból, a Deptorból, a PRAS40-ből és az mLST8-ból. Az mTORC1 serkenti a riboszómák biogenezisét és bizonyos gének transzkripcióját. Az S6 kinázt aktiválva és és a 4E-BP-t gátolva serkenti a fehérjeszintézist és metabolizmust. Az mTORC1 többek között az Atg1 foszforilációja révén gátolja az autofágiát. Csikós György ábrája.

Említésre érdemes, hogy a legújabb eredmények alapján az mTORC1 a lizoszómákhoz kötődve aktív, amihez egy másik, Rag típusú GTPáz általi aktiváció is szükséges. Éhezés során a TOR inaktiválásra kerül és így indukálódik az autofágia. Ennek eredményeképpen az autolizoszómális lebontás révén rengeteg hasznos alapanyag fog újrahasznosulni. Ezek viszont képesek a TOR-t reaktiválni, vagyis így egy negatív visszacsatolással szabályozódhat le az autofág indukció. Feltételezik, hogy a TOR aktivitását valamiképpen a lizoszómákban található, illetve onnan kijutó aminosavak mennyisége befolyásolja (8.9. ábra).

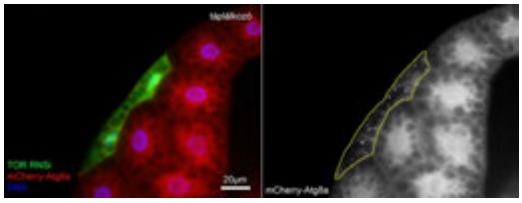


8.9. ábra Feltételezések szerint a lizoszómákban található aminosavak mennyisége szabályozza a mTORC1 aktivitását. Az mTORC1 gátlása révén autofágia indukálódik, melynek során az autofagoszómák szállítják a citoplazmás fehérjéket és organellumokat a lizoszómákba. A vakuoláris (v-) ATPáz komplex biztosítja a fehérjék aminosavakra történő bontásához szükséges savas pH-t a lizoszómális proteázok számára. A lebontás során keletkező aminosavak aktiválják az v-ATPázhoz kötődő mTORC1-et, amely negatív visszacsatolási hurok révén a további autofagoszómák keletkezését gátolja. Forrás: Autophagy 2012; 8(12): 1875-6.

Az inzulin/PI3K/AKT és TOR jelátviteli rendszerek autofágiában játszott szerepét Thomas Neufeld kutatócsoportja elsők között igazolta *Drosophila* mozaik analízis révén (ezt illusztrálják a 8.10-8.11-8.12-8.13. ábrák).

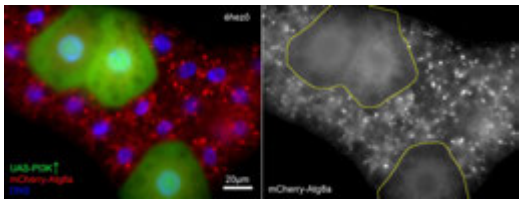


8.10. ábra Az Akt csendesítésének hatása az autofágiára. Jól táplált Drosophila lárvák zsírtestsejtjeiben a zöld (GFP pozitív) Akt géncsendesített klónsejtekben megnövekszik az mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák mennyisége a szomszédos kontroll sejtekhez képest, ami megnövekedett autofág aktivitásra utal. Jól látható, hogy a szomszédos kontroll sejtekhez képest jelentős mértékben lecsökkent az Akt géncsendesített klónsejtek mérete is. Piros: mCherry-Atg8a, zöld: GFP, kék: sejtmag. Nagy Péter ábrája.

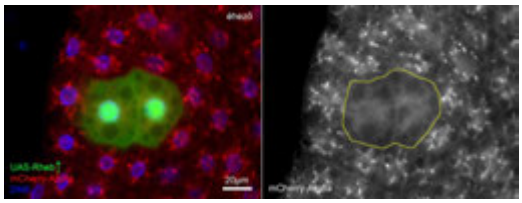


8.11. ábra A TOR géncsendesítés hatása az autofágiára. Jól táplált Drosophila lárvák zsírtestsejtjeiben a zöld (GFP pozitív) TOR géncsendesített klónsejtekben megnövekszik az mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák mennyisége a szomszédos kontroll sejtekhez képest, ami autofág indukcióra utal. Vegyük észre hogy a kontroll sejtekhez képest jelentős mértékben lecsökken a TOR géncsendesített klónsejtek mérete is. Piros: mCherry-Atg8a, zöld: GFP, kék: sejtmag. Nagy Péter ábrája.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.12. ábra A PI3K túltermeltetésének hatása az autofágiára. Éheztetett Drosophila lárvák zsírtestsejtjeiben a zöld (GFP pozitív), PI3K-t túltermelő klónsejtekben szinte teljes mértékben gátolt az mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúrák mennyisége a szomszédos kontroll sejtekhez képest, ami az autofág válasz hiányára utal. Jól látható, hogy a környező kontroll sejtekhez képest megnő a PI3K-t overexpresszáló klónsejtek mérete is. Piros: mCherry-Atg8a, zöld: GFP, kék: sejtmag. Nagy Péter ábrája.

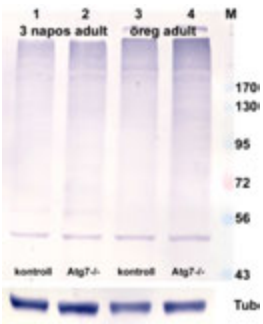


8.13. ábra A Rheb túltermeltetésének hatása az autofágiára. Éheztetett Drosophila lárvák zsírtestsejtjeiben a zöld (GFP pozitív), Rheb-et túltermelő klónsejtekben nem láthatóak mCherry-Atg8a pozitív struktúrák a szomszédos kontroll sejtekkel szemben, ami gátolt autofág válaszra utal. A kontroll sejtekhez képest ebben az esetben is megnő a Rheb-et overexpresszáló klónsejtek mérete. Piros: mCherry-Atg8a, zöld: GFP, kék: sejtmag. Nagy Péter ábrája.

Ezek a folyamatok az állati sejtekben evolúciósan konzervált útvonalak (Scott és mtsai, 2004), emiatt kerültek ebben a fejezetben részletes leírásra.

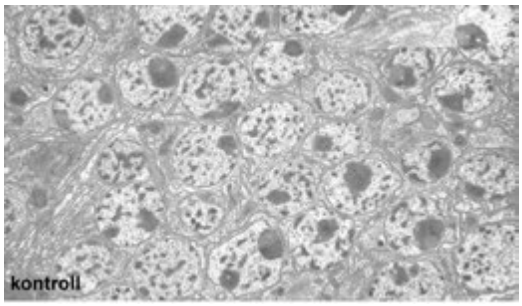
Az autofagoszóma kialakulása és érésének élettani jelentősége

Az autofágia normális élethosszt és különféle sejtkárosító anyagok (mint például az oxidációs stressz) elleni hatékony védekezést befolyásoló szerepét *Drosophila* kísérletek is alátámasztják. Az Atg7 mutáns imágók fele például 30 napos korukra elpusztul, míg a kontroll állatoknál ez 42 napnak adódik (Juhasz és mtsai, 2007). Az oxidatív ágensekkel (parakvat vagy hidrogén-peroxid) történő kezelésre is érzékenyebbek ezek a mutánsok, feltételezhetően azért mert az ezen szerek által nagy mértékben károsodott fehérjék hatékony lebontásához az autofágia is hozzájárul. Különösen szembeötlő hogy az Atg7 mutáns muslicák nem képesek normálisan mozogni: repülési vagy mászási képességük koruk előrehaladtával drámaian lecsökken. Agyukban 30 napos korukra igen kiterjedt sejtpusztulás figyelhető meg, és mind biokémiai, mind ultrastruktúrális vizsgálatokkal kimutatható az ubiquitinilált fehérjeaggregátumok felhalmozódása (8.14-8.15-8.16. ábra).

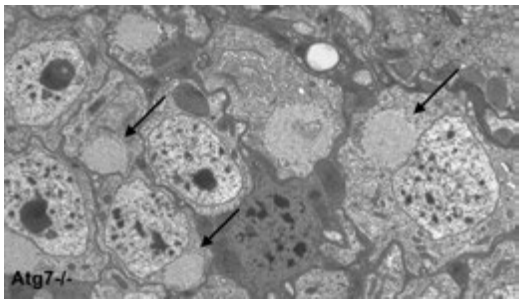


8.14. ábra Az ubiquitinilált fehérjék felhalmozódnak az Atg7 mutánsok agyában A western blot az ubiquitinilált nagy molekulasúlyú fehérjék felhalmozódását mutatja. Már a 3 napos imágók esetében is látható a kontrollhoz viszonyítva az ubiquitinilált fehérjék szintjének megnövekedése az Atg7 mutánsokban (1. és 2. oszlop) és ez az eltérés még szembetűnőbb a 30 napos, öreg adultok esetében (3. és 4. oszlop). Az M (marker) alatti oszlopban szereplő számok jelzik a molekulasúlyokat kiloDaltonban kifejezve. A mintákhoz használt futtatási kontroll a tubulin volt. Juhász Gábor ábrája.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.15. ábra Vad típusú muslicák idegrendszerének ultrastruktúrája. A képen neuronok láthatók, melyek jellegzetesen nagy sejtmagvai körül található perikaryon régió mutatja be a normális, 30 napos imágók agyára jellemző morfológiát. Juhász Gábor felvétele.

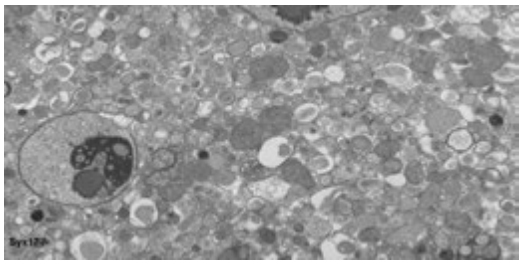


8.16. ábra 30 napos Atg7 mutáns muslicák idegrendszerének ultrastruktúrája. A képen látható neuronok citoplazmájában számos fehérjeaggregátum látható (egy részük nyilakkal van jelölve). Ilyenk kóros inkluziós testeket kontroll állatok agyában nem találunk. Juhász Gábor felvétele.

Mivel hasonló fenotípusokat találtak idegsejtspecifikus Atg7 vagy Atg5 deléciót hordozó génkiütött egereknél is, ezen vizsgálatok alapján elmondható, hogy az ubiquitin-proteaszóma rendszer mellett az autofágia is szükséges ezen lebontásra szánt fehérjék hatékony eliminálásához. Az utóbbi évek kutatásai során kiderült hogy ebben a folyamatban specifikus, ubiquitint és Atg8 homológokat egyaránt kötni képes autofág receptor fehérjék szerepelnek (lásd később a szelektív autofágiáról szóló résznél).

A legújabb áttörést az autofagoszómák érése kapcsán *Drosophila* és humán sejttenyészeti adatok szolgáltatták (Itakura és mtsai, 2012; Takats és mtsai, 2013). Mivel a vezikulafúziók többségét SNARE (SNAP [Soluble NSF Attachment Protein] Receptor) fehérjék alkotta komplexek mediálják, ezért feltételezhető volt hogy az autofagoszómák és lizoszómák fúziójában is ilyen típusú fehérjék szerepelnek. A fúzió során három Q SNARE (Qa, b, c) és egy R SNARE alkot komplexet (a Q és R a már összeállt komplexben meghatározott helyet elfoglaló glutamin és arginin aminosavoldallácokra utal). Az élesztő sejtek esetén leírt, az autofagoszóma és a vakuólum fúziójában szereplő SNARE mechanizmus nem konzervált, valamint több adat is arra utal, hogy állati sejtekben az autofagoszómák elsősorban először késői endoszómákkal és nem feltétlenül közvetlenül lizoszómákkal egyesülnek. Kiderült hogy mind humán, mind pedig muslica sejtek esetén a Qa SNARE Syntaxin 17 kerül a már kialakult autofagoszóma külső membránjába, egyelőre még nem ismert módon. A Syntaxin 17 köti a SNAP29 (*Drosophila*-ban ubisnap) fehérjét, ami két SNARE domént (Qbc) hordoz, viszont a legtöbb SNARE-rel ellentétben nincs transzmembrán doménje. Ezek együttesen fogják a késői endoszómák és lizoszómák membránjában elhelyezkedő VAMP fehérjékkel (VAMP7 *Drosophila* és VAMP8 humán sejtek esetén, R SNARE) kialakítani a fúziót mediáló SNARE komplexet. A Syntaxin 17 mutáns imágók a kikelést követően néhány napon belül elpusztulnak, és többek között idegsejtjeikben is autofagoszómák nagymérvű felhalmozódását és az autolizoszómák hiányát tapasztalták (8.17. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

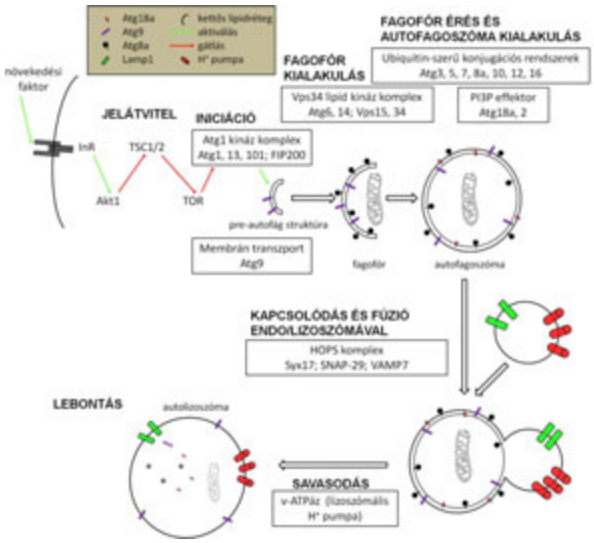


8.17. ábra Autofagoszómák felhalmozódása Syntaxin 17 mutáns, 2 napos imágók idegrendszerében. A képen látható neuronok citoplazmájának nagy részét kettős membránnal határolt autofagoszómák töltik meg, mivel késői endoszómákkal és lizoszómákkal fúzionálni nem képesek a Syntaxin 17 hiányában. Juhász Gábor felvétele.

Mivel mászási és repülési képességeik is jelentősen elmaradtak a kontroll állatokétól, ezek az adatok összeségében arra utalnak, hogy nem csak az autofágia korai lépései, hanem a már szekvesztrált citoplazmarészlet autofág lebontása is esszenciális.

Az autofág fehérjekomplexek működése állati sejtekben

A gerinctelen és emlős sejtekre is jellemző, az autofágia molekuláris mechanizmusát összefoglaló 8.18. ábra a *Drosophila* Atg fehérjék példáján mutatja be működésüket az autofágia egyes morfológiai lépései során.



8.18. ábra Az autofágia mechanizmusa Növekedési faktorok jelenlétében, például az inzulin-receptor közvetített módon aktiválódik az Akt1, amely gátolja a TSC1/2 komplexet. Ebben az esetben a TOR kináz aktitása megnő, és gátolja az autofágia iníciációjában központi szerepet játszó Atg1 kináz komplexet. Éhezés esetén a TOR gátlódik, ezáltal aktiválódik az autofágia folyamata. Az Atg1-kináz komplex (Atg1, Atg13, Atg101, FIP200) aktiválódása mellett az Atg9 membrán transzport fehérje szállít vezikulákat a létrejövő pre-autofág struktúrákhoz. A fagofór (izoláló membrán) kialakulásához szükséges a Vps34 lipid kináz komplex (Atg6, Atg14, Vps15, Vps34) működése. A fagofór érése és növekedése során körbeveszi a citoplazma egyes elemeit. Széleinek hóziója révén bezárul, és így létrehoz egy kettős membránnal határolt vezikulát. Ezt autofagoszómának nevezzük, melynek membránjában az Atg8a mellett esetleg még jelen van az Atg18a és az Atg9 is. Az éréshez és az autofagoszóma kialakulásához szükséges a PI3P effektor Atg18a, Atg2 és az ubiquitin-szerű konjugációs rendszerek (Atg3, Atg5, Atg7, Atg8a, Atg10, Atg12, Atg16) működése. Az autofagoszóma késői endoszómákkal és lizoszómákkal történő fúziójához szükséges a HOPS komplex jelenléte és megfelelő SNARE fehérjék (Syx17, SNAP29, VAMP7) működése. A lizoszóma membránjában található, erősen glikozilált LAMP fehérjék a membránt védik a savas hidrolázoktól. A lizoszómális protonpumpa (v-ATPáz), melyet a Vha fehérjék építenek fel, alakítja ki a lumenre jellemző savas pH-t. Az autolizoszómában működő lebontó enzimek (savas hidrolázok) hatására a bekebelezett anyag építőköveire bomlik. Nagy Péter ábrája.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ellenőrző kérdések

1. Milyen hatása van az élethosszra az autofág gének funkcióvesztésének férgekben és muslicákban?
2. Mik azok a P granulumok, és miért csak a fejlődő *C. elegans* embriók csírasejtjeiben vannak jelen?
3. Milyen hormonok és hogyan szabályozzák az autofágiát a teljes átalakulással fejlődő rovarok metamorfózisa során?
4. Milyen úton és hogyan hatnak az inzulin-szerű növekedési faktorok (IGF) az autofágiára és a sejtnövekedésre?
5. Milyen molekuláris mechanizmus biztosítja az autofagoszómák autolizoszómává alakulását?

Irodalom

Itakura, E., Kishi-Itakura, C. és Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**, 1256-1269.

Juhasz, G., Erdi, B., Sass, M. és Neufeld, T. P. (2007). Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in Drosophila. *Genes Dev.* **21**, 3061-3066.

Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H. és Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans. *Science* **301**, 1387-1391.

Riddiford, L. M. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* **3**, 203-209.

Rusten, T. E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P. O., Brech, A. és Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell***7**, 179-192.

Sass, M. és Kovacs, J. (1975). Ecdysterone and an analogue of juvenile hormone on the autophagy in the cells of fat body of mamestra brassicae. *Acta Biol Acad Sci Hung***26**, 189-196.

Scott, R. C., Schuldiner, O. és Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev. Cell* **7**, 167-178.

Takats, S., Nagy, P., Varga, A., Pircs, K., Karpati, M., Varga, K., Kovacs, A. L., Hegedus, K. és Juhasz, G. (2013). Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila. *J. Cell Biol.***201**, 531-539.

Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., Huang, X., Yang, P., Li, X. és mtsai (2010). C. elegans screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell* **141**, 1042-1055.

Tóth, M. L., Sigmond, T., Borsos, E., Barna, J., Erdelyi, P., Takacs-Vellai, K., Orosz, L., Kovacs, A. L., Csikos, G., Sass, M. és mtsai (2008). Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in Caenorhabditis elegans. *Autophagy* **4**, 330-338.

9. Az autofágia kutatás során jelenleg leggyakrabban alkalmazott módszerek élesztő, gerinctelen és emlős rendszerekben

Az Atg fehérjék hierarchiája

Az Atg géntermékek működését taglaló fejezetben leírtak alapján elmondható, hogy ezek a fehérjék funkcionális csoportokba rendezhetők, és egymásutániságuk nagyjából meghatározható. Persze nem fejthetőek lineáris sorba,

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

hiszen egy egymással bonyolult kapcsolatokkal rendelkező hálózatként működnek, nem pedig úgy mint például a glikolízis során az egymást követő enzimek. Az eddig idézett publikációkban az Atg gének hierarchiáját döntően lokalizációs vizsgálatokkal próbálták meghatározni (Suzuki és mtsai, 2007; Itakura és Mizushima, 2010). Az Atg fehérjék többsége legalábbis átmenetileg megtalálható a képződő fagofór területén, így a fluoreszcens riporter fehérjék (ilyen például az adott fehérjéhez géntechnológiai módszerekkel fúzionált GFP [green fluorescent protein] vagy mCherry), vagy immunofluoreszcens festések alapján az endogén fehérje specifikus, a fluoreszcens mikroszkópban pöttyöket alkotó elhelyezkedése vizsgálható, és az egyéb megfelelő PAS markerekkel történő kolokalizációja meghatározható. Ilyen marker élesztőben a pro-API aggregátum. Magasabb rendőekben a p62 és más szelektív autofág szállítmányok (angolul cargo) használhatók az Atg fehérjéket is hordozó PAS azonosítására. Amennyiben az általunk vizsgált gén hiányában ez a specifikus lokalizáció eltűnik, akkor feltehető, hogy a (riporter) fehérje megfelelő célbajutásához az adott gén működése szükséges. Fontos kiemelni, hogy ez a módszer is egyfajta episztázis analízisnek tekinthető, bár sok szempontból különbözik a klasszikus, kettős mutánsokra építő genetikai vizsgálatoktól.

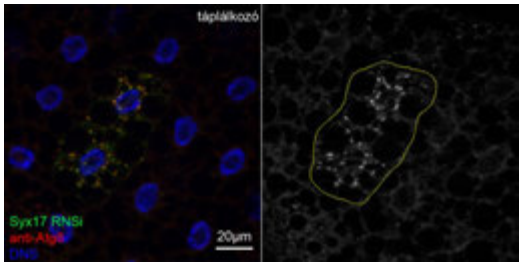
Az eddigi élesztő és emlős sejttenyészeti vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az Atg1 kináz komplex aktiválódik először (legalábbis éhezés esetén), és ezt követik a lipid kináz komplex és effektorai. Emlős sejttenyészeti sejtekben ezek a fehérjék előszeretettel lokalizálnak a korábban már tárgyalt omegaszómákhoz. Az Atg8-nak a képződő fagofóron való megjelenése viszonylag késői esemény, amihez az Atg2 és VMP1 gének kivételével minden eddig ismert központi autofág gén működése szükséges. Központi autofág gén alatt az egyszerűség kedvéért azokat a géneket értjük, melyek hiányában a megfelelő stimulus által indukált autofagoszóma képződés gátolt, és az adott géntermék a fagofór keletkezésében közvetlen szerepet játszik (tehát kiesése nem egy felsőbb szabályozási útvonal, mondjuk a növekedési jelátvitel aktiválása révén fejti ki autofágia-gátló hatását).

A következő fejezetekben áttekintjük az autofágia kutatásában jelenleg leggyakrabban használt módszereket, melyek alkalmazhatóak az élesztőtől az emberi sejtekig.

Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia

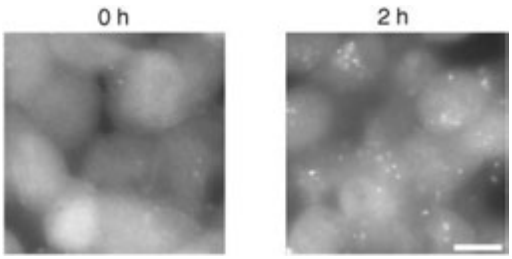
Az előző bekezdésben említett lokalizációs vizsgálatokhoz szükséges a megfelelő endogén fehérjét felismerő ellenanyag (melyet fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyag segítségével teszünk láthatóvá), vagy specifikus riporter fehérje kifejeztetése az adott sejtben vagy élőlényben. Az első megközelítés előnye hogy jobban reprezentálhatja a valós viszonyokat, bár a immunjelöléshez szükséges fixálás okozhat műterméket. Az utóbbi megközelítés hátránya, hogy rendszerint overepresszált fúziós fehérjéken alapul, ami gyakran nem reprezentálja megfelelően az endogén fehérje kifejeződési szintjét és lokalizációját. Nagy előnye viszont, hogy lehetővé teszi mikroszkópos videók készítését, ami betekintést enged a folyamat dinamikájába.

Az autofágia vizsgálatok során messze a leggyakrabban használt marker fehérje az Atg8 és homológjai. Emlősökben több géncsalád is ide tartozik, közülük az LC3 nevezetű fehérjét érdemes kiemelni. Ezeket a riportereket vagy immunjelöléseket az esetek döntő többségében arra használják, hogy a mikroszkópban látható, adott területre eső vagy sejtenkénti átlagos pöttyszámot meghatározzák (9.1. és-9.2. ábra).



9.1. ábra Endogén Atg8 immunofluoreszcens jelölése. Jól táplált L3 stádiumú lárvák zsírtestsejtjeiben a Syntaxin 17 géncsendesítés (mely csak a pöttyszerű eloszlást mutató GFP-t expresszáló sejtekben történik meg) az endogén Atg8-pozítív autofagoszómák felhalmozódásához vezet. Ez a jobb oldali panelen még szembetűnőbb, ez ugyanis csak az Atg8 immunfestés képét mutatja. A környező kontroll sejtekben ilyen Atg8 jelölést nem látunk. Piros: anti-Atg8, zöld: GFP, kék: sejtmag. Takáts Szabolcs felvétele.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

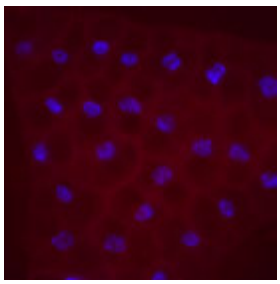


9.2. ábra GFP-fúziós LC3 riporter vizsgálata. A GFP-LC3-at kifejező tenyésztett emlős sejtekben 2 órás éhezés hatására drasztikusan megnő a GFP-pozitív autofagoszómák száma a kontroll, jól táplált sejtekhez (0 óra) viszonyítva. Forrás: Mol. Biol. Cell 2004; 15 (3), 1101-1111.

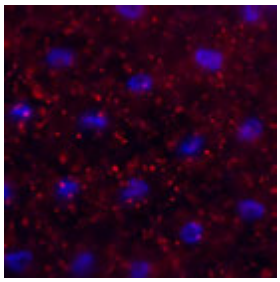
Mivel az Atg8/LC3 fehérje döntően az autofagoszómákat jelöli, ezzel a módszerrel az autofagoszóma számot lehet megbecsülni(Kabeya és mtsai, 2000). Talán az egyik legfontosabb ezzel kapcsolatos kutatás során Noboru Mizushima vezetésével létrehoztak egy GFP-LC3 riportert kifejező transzgénikus egértörzset (Mizushima és mtsai, 2004). Ennek vizsgálatával leírták, hogy alapszinten a csecsemőmirigy és a szemlencse sejtjeire viszonylag sok GFP-LC3 pötty jellemző, és ezek száma 24 órás éhezés hatására nem változik. Ezzel ellentétben a máj, szívizom vagy musculus gastrocnemius éhezés során igen erőteljes GFP-LC3 pöttyszám növekedést, tehát autofág indukciót mutat.

Az Atg8/LC3 mellett egyéb Atg fehérje vagy szelektív szállítmány lokalizációját is lehet tanulmányozni a fenti jelölési módszerrel. Leggyakrabban az egyes komplexekből az Atg1/ULK fehérjét, Atg14-et, Atg9-et, Atg18-at, és az Atg16 vagy Atg5 fehérjéket vizsgálják (ez utóbbi kettőt fagofór markernek is tekintik, mivel az autofagoszóma létrejöttekor disszociálnak). Fontos azonban megemlíteni, hogy ezen Atg fehérjék lokalizációját leginkább az autofágia központi mechanizmusát célzó kutatásoknál vizsgálják.

A módszerek következő csoportja olyan vegyületek alkalmazásán alapul, amelyek a membránokon átdiffundálva a lizoszómák belsejébe kerülnek, ahol a savas kémhatás következtében protonálódnak (un. lizoszomotrop ágensek). Az így fellépő pozitív töltés megakadályozza kijutásukat, tehát a lizoszómák belsejében felhalmozódnak. Ezekre a vitális, élő sejteken alkalmazott festésekre egy példa a Lysotracker Red, amely egy pirosan fluoreszkáló vegyület. A *Drosophila* zsírtest vizsgálata során előszeretettel alkalmazzák (Scott és mtsai, 2004), mivel valamilyen okból kifolyólag a jól táplált állatok sejtjeiben levő lizoszómákat nem jelöli, csak az éhezés hatására képződő autolizoszómákat festi (9.3. és 9.4. ábra). Ennek oka lehet például az, hogy a lizoszómák ilyenkor aktiválódnak, és pH-juk éhezés hatására lecsökken.



9.3. ábra Jól táplált Drosophila lárva zsírteste, Lysotracker Red festéssel. A jól táplált állatok sejtjeiben levő lizoszómákat nem jelöli a pirosan fluoreszkáló festék, csak homogén hátteret látunk. Kárpáti Manuéla felvétele.

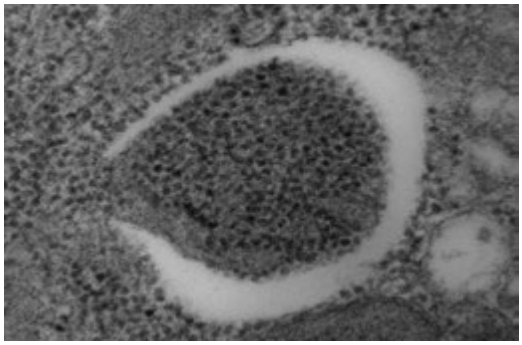


XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

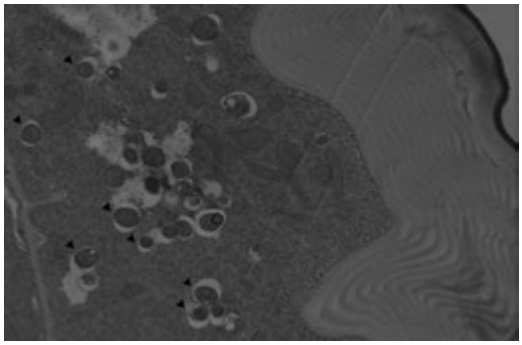
9.4. ábra Éheztetett Drosophila lárva zsírteste, Lysotracker Red festéssel. Az éheztetés hatására megjelenő autolizoszómákat jelöli a pirosan fluoreszkáló festék. Kárpáti Manuéla felvétele.

Transzmissziós elektronmikroszkópia

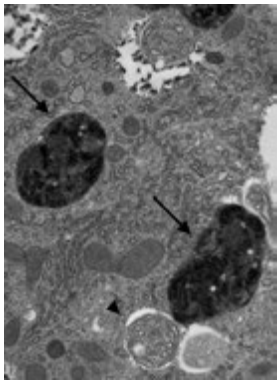
Minden kétséget kizáróan ez a legrégebben, már az autofágia kutatás kezdeteitől alkalmazott metódus, de még ma is igen nagy jelentőségű. Felbontása révén ezzel a technikával közvetlenül vizsgálható a fagofór, az autofagoszóma és az autolizoszóma ultrastruktúrája, a határoló membránok felépítése stb (9.5-9.7. ábra).



9.5. ábra A fagofór elektronmikroszkópos morfológiája. A képen látható, résszerű ürege alapján könnyen felismerhető fagofór már majdnem teljesen körbezárult. Kovács Attila felvétele.



9.6. ábra Autofagoszómák elektronmikroszkópos morfológiája. Syntaxin 17 mutáns muslica lárvák epidermisz sejtjeiben igen nagy számú, kettős membránnal határolt autofagoszóma (egy részüket nyílhegy jelöli) halmozódik fel. A kép jobb oldali részén a kutikula igen jellegzetes szerkezete látszik. Juhász Gábor felvétele.

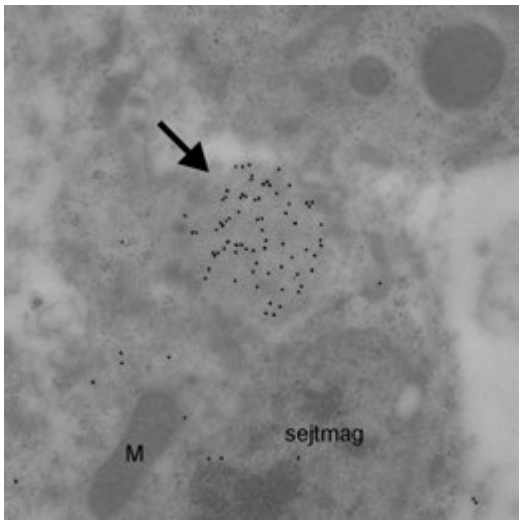


9.7. ábra Autolizoszómák elektronmikroszkópos morfológiája. A vad típusú muslicalárvák zsírtest sejtjeiben éhezés hatására rengeteg heterogén beltartalmú autolizoszóma (nyilak) képződik. Az erős elektron denzitás a degradáció következménye. A nyílhegyek autofagoszómákra mutatnak. Forrás: Autophagy 2012: 8(7), 1124-35.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Fontos azonban hogy nem csak a bonyolult mintaelőkészítés és a mikroszkóp kezelése, hanem a látott struktúrák felismerése, megfelelő interpretálása is igen nagy gyakorlatot igényel. Az általánosan alkalmazott kémiai, glutáraldehiddel történő rögzítést követő víztelenítés és beágyazás egy igen jellegzetes műterméket okoz: a fagofór membránok, valamint az autofagoszóma külső és belső membránjai gyakran elválnak egymástól a biológiai minta eltérő mértékű zsugorodása miatt (Eskelinen és mtsai, 2011). A jelenség egyik oka az lehet, hogy ezek a membránok gyakorlatilag nem tartalmaznak transzmembrán fehérjéket, és a glutáraldehid elsősorban a fehérjék között létesít kovalens keresztkötéseket a rögzítés során, így a lipidekben gazdag sejtalkotók kevésbé jól őrződnek meg. Ez az üresnek tűnő tér viszont igen megkönnyíti az ilyen korai autofág struktúrák felismerését (Kovacs és mtsai, 2000).

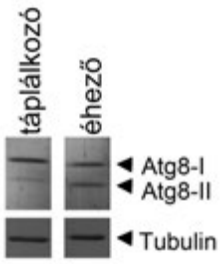
Természetesen lehetséges ultrastrukturális szinten is immunjelölést alkalmazni. Ennek során a másodlagos ellenanyag nem fluoreszcensen jelölt, hanem apró (5-20 nanométer átmérőjű) aranyszemcséhez van kapcsolva. Az elektronmikroszkópos felvételeken ilyenkor az aranyszemcsék az ellenanyag által felismert fehérje (például az LC3 vagy a p62) helyét reprezentálják (9.8. ábra).



9.8. ábra Elektronmikroszkópos immunjelölés. A képen az Atg7 mutáns muslica imágók agyában felhalmozódó fehérje aggregátum (nyíllal jelölve) látható, amit az endogén p62-re specifikus ellenanyagot jelölő aranyszemcsék is világosan azonosítanak. M, mitokondrium. Juhász Gábor felvétele.

Western blot

Ezzel a biokémiai módszerrel vizsgálható poliakrilamid gélelektroforézist követően a fehérjemintákban (általában sejtekből készült lizátumokban) az adott ellenanyag által jelölt fehérje jelenléte és expressziós szintje. Az esetek döntő többségében megint az Atg8/LC3 fehérjét alkalmazzák, köszönhetően annak, hogy autofág indukció során rendszerint megnő a lipidált, aktív, feltehetően autofagoszóma-asszociált Atg8/LC3 szintje (9.9. ábra).

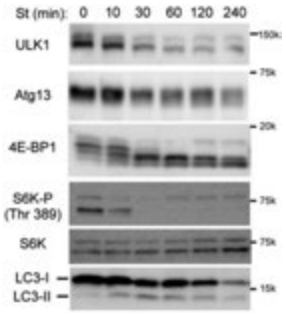


9.9. ábra Anti-Atg8 Western blot Drosophila lárvákból készült fehérjemintán. Az Atg8 lipidációjának hatására megnő a fehérje elektroforetikus mobilitása, és jól látszik, hogyaz éheztetéssel indukált autofágia során megemelkedik a lipidált Atg8-II tubulinhoz viszonyított szintje. Varga Ágnes felvétele.

Mivel a lipidáció megnöveli a fehérje elektroforetikus mobilitását, így ez a metódus alkalmas ezen változás kimutatására.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

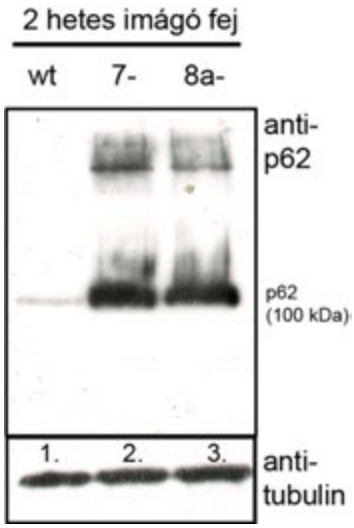
A módszer szintén alkalmas egyéb poszttranszlációs módosítások kimutatására is. Például az Atg fehérjék foszforilációs állapota változik az autofág indukció során, és ez az adott fehérje elektroforetikus mobilitását csökkenti (9.10. ábra).



9.10. ábra Foszforiláció hatása a fehérjék elektroforetikus mobilitására. Éhezés (St, azaz starvation) hatására csökken a TOR szubsztrátjainak, azaz az ULK1, 4E-BP1 és S6K fehérjék foszforilációs szintje. Vegyük észre, hogy az ULK1 és 4E-BP1 fehérjék elektroforetikus mobilitása csökken, míg az S6K esetén csak a foszforilált formára specifikus (S6K-P) ellenanyag alapján szembetűnő a változás. Jól látszik, hogy az autofág indukció során a lipidált LC3-II mennyisége megnő. Forrás: Mol. Biol. Cell 2009: 20 (7) 1981-1991.

Ez persze nem egy igazán specifikus változás, hiszen egy fehérje igen sok, akár több tucat aminosav oldalláncán is képes foszforilálódni és defoszforilálódni, és ezen események eredője határozza meg a gélben történő migráció sebességét. Ideális esetben használhatóak olyan specifikus ellenanyagok, amelyek az adott fehérje megfelelő szakaszát csak megfelelő foszforilációs állapot esetén ismerik fel. Mivel azonban az Atg fehérjék szabályozásának ilyen szintű biokémiai jellemzése még gyerekcipőben jár, ezért jelenleg ilyen vizsgálatokra még nem nagyon van lehetőség.

Az Atg8/LC3 mellett a másik leggyakrabban alkamazott teszt azon alapul, hogy bizonyos specifikus autofág szubsztrátok, vagy másik kifejezéssel élve szállítmányok mennyisége az autofág lebontással fordítottan arányos. Erre a legjobb példa a szelektív autofágiáról szóló fejezetben részletesen tárgyalásra kerülő p62. Tehát a p62 mennyisége autofágia indukciójakor elvileg csökken, míg az autofágia gátlása drasztikusan megemeli a mennyiségét (9.11. ábra). Megjegyzendő, hogy ezek a fehérjék többféle funkciót is ellátnak, és expressziójuk gyakran transzkripciósan is szabályozódik, így nem feltétlenül csak az autofág lebontástól függ az adott fehérje mennyisége.



9.11. ábra Anti-p62 western blot Drosophila fejekből készült fehérje mintákon. A p62 felhalmozódik az Atg7 (7-) és Atg8a (8a-) mutáns imágók fejében a kontrollhoz (wt, azaz wild type) viszonyítva. Forrás: PLoS One. 2012;7(8):e44214.

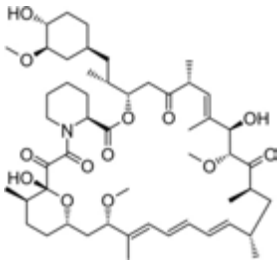
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Genetikai analízis

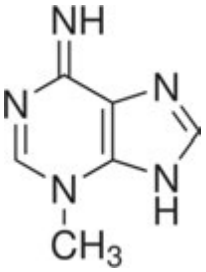
Az 1990-es évek közepétől induló módszer mára már klasszikus megközelítési módnak számít. A genetikai analízisre korábban már említett példákban az Atg gének hiányát vizsgálták. Ha például ilyenkor lecsökkent a vizsgált férgek vagy muslicák élethossza, akkor ebből nagy valószínűséggel (de nem teljes biztonsággal) arra lehet következtetni, hogy a változás az autofágia gátlása miatt következett be. Tulajdonképpen ebben rejlik az élesztőben felfedezett autofág gének egyik fő jelentősége, hiszen így nem csak leíró jellegű, az autofágia szintjét dokumentáló kutatásokat lehetett végezni, hanem lehetővé vált ok-okozati viszonyok felderítését célzó, azaz mechanisztikus kísérletek kivitelezése is. Fontos kiemelni azonban azt, hogy ez a módszer egyrészt indirekt, másrészt pedig feltételezi hogy az adott Atg gén valóban csak az autofágiában szerepel. Ez sajnos nem mindig mondható el, vagy előfordulhat az is, hogy egy adott gén szerepét egyéb folyamatokban azért nem írták le, mert egyszerűen még senki sem vizsgálta.

Gátlószerek alkalmazása

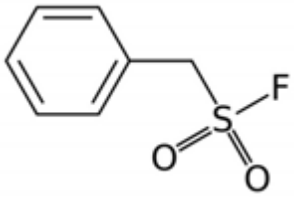
Már az 1960-as évektől alkalmaznak olyan kismolekulájú, a plazmamembránon átdiffundálni képes szereket, amelyek az autofág struktúrák megjelenését és a lebontás mértékét jellemzően befolyásolják. Mára már klasszikus autofágia indukáló szer a korábban említett rapamicin (9.12. ábra), amely a TOR gátlása révén fejti ki hatását. Hátránya viszont hogy nem specifikus az autofágiára, hiszen egyéb hatások mellett általános transzláció gátlást is okoz. A leggyakrabban alkalmazott autofágiát gátló szerek közé tartozik a 3-metiladenin (9.13. ábra), amely a foszfolipid kinázok specifikus inhibitora, így feltételezhetően a Vps34 gátlása révén hat az autofágiára. Emellett több olyan szer is ismert, amely a lizoszómára fejti ki hatását. Az élesztő esetén alkalmazott PMSF (9.14. ábra), vagy emlős sejtekben a leupeptin (9.15. ábra) gátolja bizonyos kritikus hidrolázok aktivitását, ami az autofág fehérjebontás csökkenéséhez vezet. A klorokvin (9.16. ábra) a Lysotracker Red-hez hasonlóan felhalmozódik a lizoszómákban, és egész egyszerűen neutralizálja, azaz a savas pH-t semleges felé tolja el. A vakuoláris H^+ ATPázok gátlószerei (ilyen például a bafilomycin A_1, 9.17. ábra) a savas pH-t létrehozó és fenntartó proton pumpa gátlásával éri el ugyanezt a hatást. A pH emelkedése ilyenkor a lizoszómában található savas hidrolázok aktivitását jelentősen lecsökkenti.



9.12. ábra A rapamicin térszerkezete.

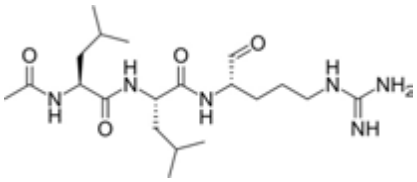


9.13. ábra A 3-metiladenin térszerkezete.

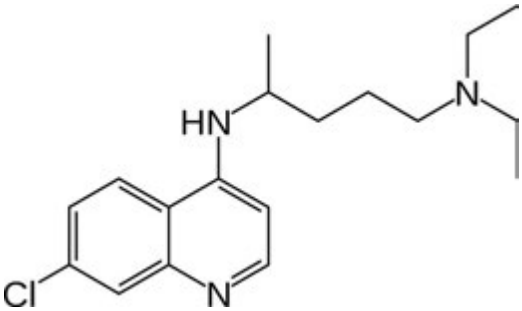


XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

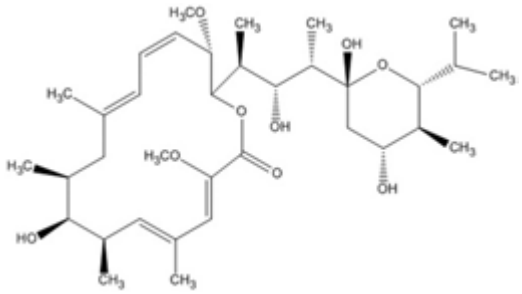
9.14. ábra A PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) térszerkezete.



9.15. ábra A leupeptin térszerkezete.

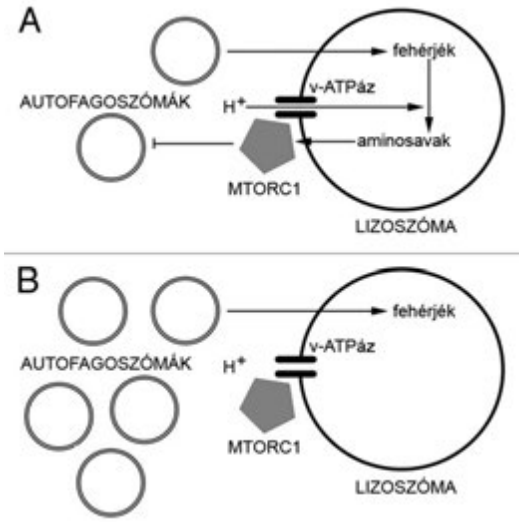


9.16. ábra A klorokvin térszerkezete.



9.17. ábra A bafilomycin A_1térszerkezete.

Ezen drogkezelések hátránya lehet az, hogy hatásuk nem specifikus az autofágiára nézve. Például a lizoszómális emésztés gátlása csökkenti a TOR kináz aktivitását a korábban már tárgyalt Rag GTPázokon keresztül, azaz nem csak az autofág lebontást gátolja hanem ezzel egyidejűleg az autofagoszóma keletkezés mértékét is megnövelheti (9.18. ábra).



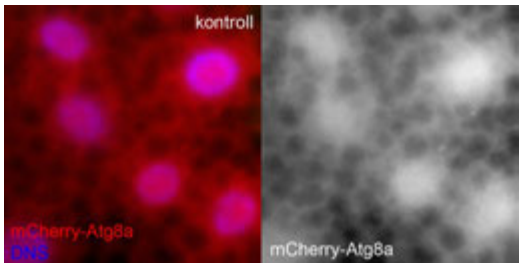
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

9.18. ábra A lizoszómális lebontás gátlása a TOR komplexen keresztül befolyásolhatja az autofág indukciót. Alapesetben (A panel) az autofágia révén a lizszómában keletkező aminosavak reaktiválják a TOR komplexet, ami az autofágiát gátolja, így a folyamat idővel lecseng. A lizoszómális emésztés gátlása (B panel) a TOR inaktiválása révén kihathat az autofagoszómák keletkezésére, és a reaktivációt megakadályozza. Forrás: Autophagy 2012; 8(12): 1875-6.

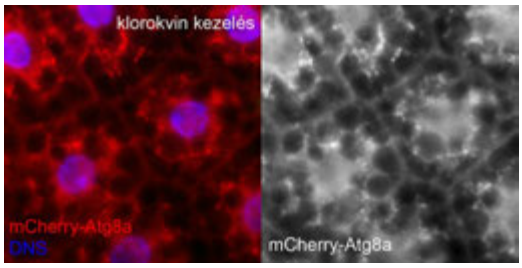
Autofág fluxus vizsgálata

Az egyik legfontosabb kérdés az autofágia vizsgálata során az, hogy egy adott kezelés vagy genetikai manipuláció milyen hatással van az autofág lebontásra. A fent felsorolt módszerek többsége csak egy pillanatfelvételt szolgáltat a vizsgált folyamatról, és ezek alapján nem mindig egyértelmű a következtetés. Ha például egy adott kísérletben minden jel arra mutat hogy megnőtt az autofagoszómák száma, akkor ezt okozhatja korai indukció (több autofagoszóma keletkezés) vagy későbbi gátlás (ugyanannyi autofagoszóma keletkezik mint a kontroll sejtekben, de azok például nem fúzionálnak lizoszómákkal, ezért felhalmozódnak). Ezért mindig elegedhetetlen az autofág fluxus (azaz hogy mennyi anyag „folyik keresztül" az autofág útvonalon) vizsgálata. A folyamatot tehát lehetőség szerint teljes egészében kell vizsgálnunk, tehát a bemenet (autofagoszóma keletkezés) és a kimenet (autolizoszómális lebontás) mértékét és arányát is meg kell határoznunk.

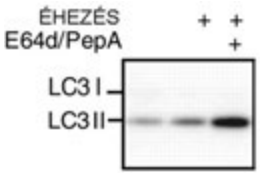
Az egyik leggyakrabban alkalmazott technika a mikroszkópban látható Atg8/LC3 pöttyök számának, vagy western blot alapján a lipidált forma mennyiségének meghatározása lizoszómális lebontást gátló szer (mint a fent említett bafilomicin vagy klorokvin, vagy az E64 és pepsztatin kombinációja) nélkül és annak jelenlétében. Ezek a gátlószerek az autofág lebontást megakadályozzák, így megnövelik mind az Atg8/LC3 pöttyök számát, mind pedig a lipidált fehérjemennyiséget (9.19-9.21. ábrák).



9.19. ábra mCherry-Atg8a riportert expresszáló muslica lárvák zsírteste. Jól táplált állatokban az autofagoszómákat és autolizoszómákat jelölő mCherry-Atg8a riporter nagyon kevés pöttyöt mutat. Pircs Karolina felvétele.



9.20. ábra mCherry-Atg8a riportert expresszáló, klorokvin kezelt muslica lárvák zsírteste. Jól táplált állatok több napig tartó klorokvin kezelése rengeteg mCherry-Atg8a pozitív autofág struktúra felhalmozódásához vezet. Pircs Karolina felvétele.

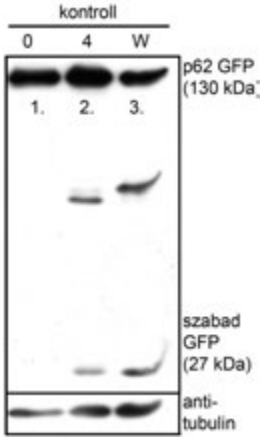


XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

9.21. ábra Lizoszómális gátlószer kezelés hatása a lipidált LC3 szintjére. Humán sejttenyészeti kísérletekben az éhezés megnöveli a lipidált LC3 II mennyiségét. Mivel az LC3 az autofágia során lebomlik, a lizoszómális enzimeket gátló E64d/pepsztatin A kezelés hatására felhalmozódik. Forrás: Mol. Biol. Cell 2012; 23 (5): 896-909

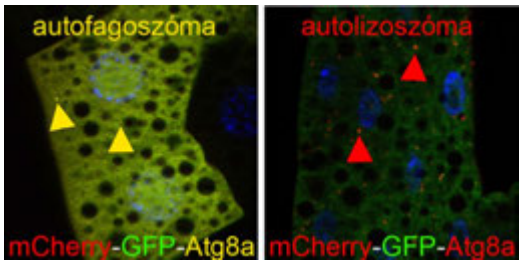
Amennyiben a vizsgált sejtben már eleve gátolt volt a lizoszómális lebontás, akkor viszont ezeknek a kezeléseknek elvileg nincs hatásuk. Sajnos azt egyelőre kevesen veszik figyelembe, hogy a TOR aktivitását csökkentheti a lizoszómális lebontás gátlása, emiatt maga a fluxus meghatározását célzó drogkezelés nem csak a lebontást, hanem az autofagoszóma keletkezést is befolyásolhatja (Juhasz, 2012).

Egy másik megközelítés azon alapul, hogy a lizoszóma az autofágia során szelektíven bekerülő fehérjéket lebontja. Ilyen protein például az Atg8/LC3, és az ehhez erősen kötő specifikus szállítmány, a p62 is. Ez a GFP-vel vagy mCherry-vel fúzionált riporterekre is igaz, viszont ezek a fluoreszcens fehérjerészek a lizoszómában kompakt térszerkezetük miatt jóval lassabban bomlanak le. Tehát western blot segítségével követhető, hogy mennyi GFP-LC3 vagy GFP-p62 bomlik le, mivel ez a lizoszómális proteolízis következtében keletkező, a lebomlott LC3 vagy p62 nélküli szabad GFP mennyiségével arányos (9.22. ábra).



9.22. ábra A GFP-fúziós p62 riporteren alapuló konverziós esszé. Autofágia indukciójakor a p62-GFP molekula p62 része gyorsan lebomlik, míg a lizoszómális degradációnak jobban ellenálló szabad GFP megjelenik a western blot kísérletekben. Ezen a képen az éheztetett (4) és vándorló (W) állatokban látható szabad GFP a táplálkozó (0) állatokban nem mutatható ki. Forrás: PLoS One. 2012; 7(8): e44214.

Ezt a technikát konverziós esszének nevezik, mivel a fúziós fehérje a lizoszómális emésztés következtében szabad GFP-vé vagy mCherry-vé alakul. Az Atg8/LC3 és a p62 fúziós riporterei mikroszkópos szinten is felhasználhatóak fluxus vizsgálatokra. Ehhez dupla, GFP és mCherry cimkét egyaránt hordozó riportereket használnak. Ezek a fúziós fehérjék a lizoszómába jutnak, ahol azonban a GFP fluoreszcenciája a savas pH hatására kialszik, az mCherry-vel ellentétben. Tehát például az mCherry-GFP-Atg8 riportert használva az autofagoszómák sárgák (egyszerre zöldek és pirosak), míg az autolizoszómák inkább pirosak (csak mCherry-pozitívak) lesznek (9.23. ábra).



9.23. ábra Az mCherry-GFP-Atg8a riporter felhasználása autofág fluxus vizsgálatára. Az mCherry-GFP-Atg8a riportert expresszáló muslica lárvák zsírtestében rövid idejű éhezés során főként apró, sárga (mCherry és GFP pozitív) autofagoszómák láthatók (bal oldali panel). Hosszú ideig tartó éhezés esetén viszont a piros, csak mCherry fluoreszcenciát mutató autolizoszómák jelenléte jellemző (jobb oldali panel). Nagy Péter felvételei.

Összegzésül elmondható, hogy vizsgálataink során célszerű minél többféle kísérleti megközelítéssel vizsgálódni, hogy a különféle kísérletekben nyert adatok alapján minél megbízhatóbb következtetéseket tudjunk levonni az

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

autofágiára nézve. Ezért is készült el nemrégiben egy, az autofágiával foglalkozó kutatók nagy részének részvételével megfogalmazott új ajánlás, amely a fenti módszerek tárgyalása mellett egyéb metodikákat is részletesen leír (Klionsky és mtsai, 2012).

Ellenőrző kérdések

1. Az Atg fehérjkomplexek közül melyek szerepelnek a fagofór kialakulás kezdeti, és melyek akésőbbi lépéseiben?
2. Fluoreszcens mikroszkóppal hogyan vizsgálható az autofágia?
3. Milyen jellegzetes morfológiát mutatnak a különféle autofág struktúrák az elektronmikroszkópos felvételeken?
4. Milyen biokémiai módszerrel és hogyan vizsgálható az autofágia?
5. Mi az egyik legerősebb (bár indirekt) bizonyíték arra, hogy az autofágia egy adott folyamatban szerepel?
6. Miért szükséges, és hogyan vizsgálható az autofág fluxus?

Irodalom

Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovacs, A. L. és Seglen, P. O. (2011). Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* **7**, 935-956.

Itakura, E. és Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**, 764-776.

Juhasz, G. (2012). Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations. *Autophagy* **8**, 1875-1876.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. és Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.***19**, 5720-5728.

Klionsky, D. J. Abdalla, F. C. Abeliovich, H. Abraham, R. T. Acevedo-Arozena, A. Adeli, K. Agholme, L. Agnello, M. Agostinis, P. Aguirre-Ghiso, J. A. és mtsai (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544.

Kovacs, A. L., Rez, G., Palfia, Z. és Kovacs, J. (2000). Autophagy in the epithelial cells of murine seminal vesicle in vitro. Formation of large sheets of nascent isolation membranes, sequestration of the nucleus and inhibition by wortmannin és 3-methyladenine. *Cell Tissue Res.***302**, 253-261.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. és Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell***15**, 1101-1111.

Scott, R. C., Schuldiner, O. és Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev. Cell* **7**, 167-178.

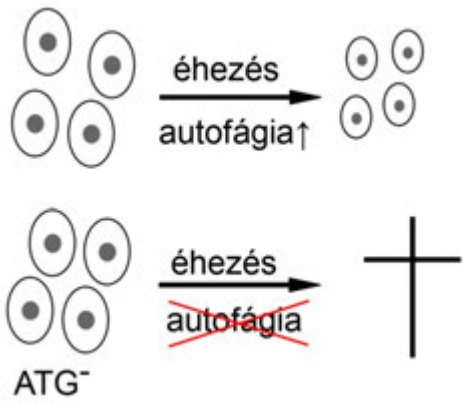
Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T. és Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**, 209-218.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

10. Az autofágia élettani és patológiás szerepe emlősökben

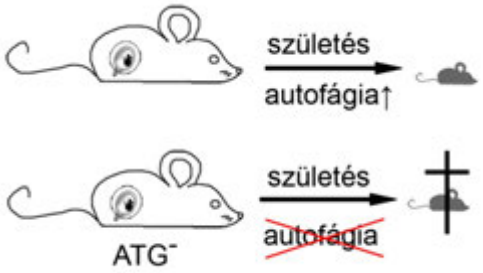
Az éhezés túlélése

Már a legelső ismert élesztő autofág mutáns vizsgálata kapcsán kiderült, hogy a tápanyaghiányos időszak túlélésének biztosítása az autofágia valószínűleg legősibb funkciója(10.1. ábra).



10.1. ábra Éhező élesztő sejtek. Éhezés hatására az élesztő sejtekben indukálódik az autofágia, ami segíti a túlélésüket. ATG mutáns sejtek gyakorlatilag nem képesek autofág lebontást végezni, így éhezés hatására elpusztulnak. Varga Ágnes ábrája.

Ez természetesen nem csak az egysejtűekre, hanem a növényekre és az állatokra is igaz. Érdemes tudni, hogy a normális egyedfejlődés során vannak olyan időszakok amikor az állat nem táplálkozik. Erre kitűnő példa a fonalférgek dauer lárvája, vagy az ecetmuslica metamorfózisa. Még az emlősök esetén is megfigyelhetőek ilyen, fejlődéstanilag beprogramozott „éhezési" időszakok. A születés során megszűnik az addig az anyai szervezetből a köldökzsinóron keresztül tápanyagokat szállító összeköttetés, és még ha a születést követően rögtön el is kezd szopni az újszülött, akkor is több óra telik el mire a bélrendszer és a máj feldolgozza az elfogyasztott anyatejet. Az egerek embrionális fejlődése Atg5 hiányában is végbemegy, azonban a (császármetszéssel) türténő születést követően 12 órán belül elpusztulnak(10.2. ábra).

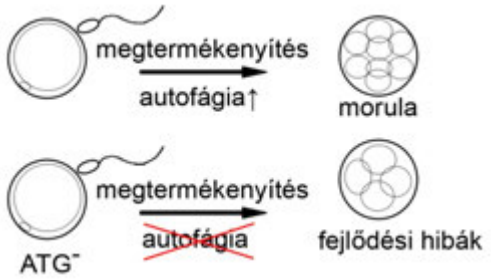


10.2. ábra A születés utáni első éhezési időszak. Minden emlős újszülött, így az egerek is a születés utáni időszakban tápanyaghiányos állapotnak vannak kitéve. A placentális táplálás és az anyatej feldolgozása közötti időszakban a túlélést az autofágia segíti. ATG mutáns egerek a születés után nem sokkal elpusztulnak. Varga Ágnes ábrája.

Mesterséges táplálás esetén túlélik ezt a kritikus korai időszakot, de két nappal később egyelőre ismeretlen okból elpusztulnak (Kuma és mtsai, 2004). Nem ez a legkorábbi éhezési stressz viszont az emlősök életében. A petesejt megtermékenyítését követően a létrejövő zigóta ugyanis a saját tápanyagraktáraira van utalva egészen a beágyazódásig, sőt bizonyos mértékig azt követően is, hiszen a méhlepény csak ezután alakul ki és biztosít

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

utánpótlást. Ezzel összhangban a korai embriogenezisre jellemző igen gyors osztódások során az embrió mérete nem növekszik, hanem a zigótáéval megegyező marad, tehát egyre több de egyre kisebb sejt építi fel. A zigótában nagymérvű autofág indukció figyelhető meg, ami már a megtermékenyítés hatására kezdetét veszi (Tsukamoto és mtsai, 2008) (10.3. ábra).



10.3. ábra Autofágia a megtermékenyítés során. A megtermékenyítéstől a beágyazódásig az emlősök zigótája saját anyagait használja fel, részben autofágia révén. Az autofág géntermékek hiánya a korai embrionális fejlődés során osztódási rendellenességekhez vezet. Varga Ágnes ábrája.

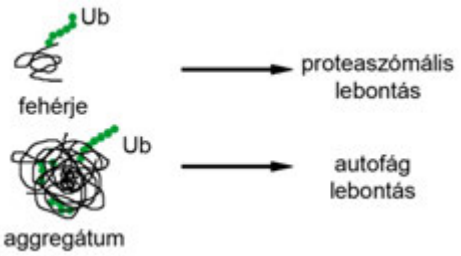
Ebben az időszakban nehézkes funkcióvesztéses vizsgálatokat végezni az anyai géntermékek (mRNS és fehérje) jelenléte miatt. Maternális és zigotikus Atg5 null mutáns egér embriók vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy az autofágia hiánya a szedercsíra állapot során osztódási rendellenességeket és késést okoz. A Noboru Mizushima laborjában végzett fenti kísérletek bizonyították az autofágia szerepét a korai embriogenezisre jellemző és a perinatális éhezési periódusban.

A megfelelő egyensúly (homeosztázis/homeodinamika) fenntartása az eukarióta sejtekben és élőlényekben

Minden élő rendszer képes fenntartani belső folyamatainak egyensúlyát, melyre gyakran a görög eredetű homeosztázis kifejezést használják. Sajnos ez, bár széles körben elterjedt, de mégsem teljesen jó elnevezés, hiszen a sejt vagy élőlény nem statikus rendszer: a sejteket alkotó makromolekulák nagy része, a sejtorganellumok, sőt az élőlényt alkotó legtöbb sejttípus is folyamatosan cserélődik. Ezért talán helyesebb homeodinamikáról beszélni, mert ez a kifejezés jobban megragadja az élet során fejlődő, érő, a külső behatásokra megfelelően reagáló, majd megöregedő sejtek és szervezetek működését.

A sejtek és a szervezet szintjén is érvényes az a megállapítás, hogy normális körülmények között az anabolikus (felépítő) és katabolikus (lebontó) folyamatok nagyjából egyensúlyban vannak egymással. Az elöregedő, funkcióképtelen vagy feleslegessé váló sejtorganellumok lebontása mellett az autofágia a fehérjék turnover-ében, állandó cserélődésében is kulcsszerepet játszik. Hosszú idő óta tartja magát az a hipotézis, hogy az ubiquitin-proteaszóma rendszer elsősorban a rövid féléletidejű, míg az autofág-lizoszómális útvonal a hosszú féléletidejű fehérjék lebontásában játszik szerepet. Az autofágia ilyetén szerepéről kialakult korábbi nézeteket alátámasztották az Atg génekre szövetspecifikus knock-out (génkiütött) egerek vizsgálatával született eredmények. Az Atg5 vagy Atg7 neuronspecifikus deléciója ubiquitinilált fehérjeaggregátumok felhalmozódásához vezet (Hara és mtsai, 2006; Komatsu és mtsai, 2006). Ennek hatására progresszív neurodegeneráció, az idegsejtek apoptotikus pusztulása, és az egerek mozgási rendellenességei jelennek meg. Ezek, és az ecetmuslicákban tett, korábban említett hasonló megfigyelések bizonyították minden kétséget kizáróan azt, hogy az autofágia alapszintű működése során (amelyre gyakran a bazális autofágia kifejezést használják) kulcsszerepet játszik a megfelelő protein turnover fenntartásában (10.4. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.4. ábra Protein turnover. Az ubiquitinilált fehérjék lebontásáért az ubiquitin-proteaszóma rendszer felelős, míg a nagyobb méretű ubiqitinilált fehérjeaggregátumok autofágia útján degradálódnak. Varga Ágnes ábrája.

Ennek hiányában különösen az idegsejtekhez hasonlóan hosszú életidejű, terminálisan differenciálódott sejtek károsodást szenvednek.

Autofágia és öregedés

A gerincteleneken végzett genetikai vizsgálatokhoz hasonlóan emlősök esetén is feltételezik, hogy az autofágia megfelelő szintje késlelteti az öregedés folyamatát. Ez igen nagy jelentőségű lehet, hiszen a sok embert érintő problémák (rák vagy neurodegenerációs betegségek) is jellemzően idős korban alakulnak ki (Vellai és mtsai, 2009). Patkány kísérletek alapján ismert hogy az autofágia szintje, a lebontó kapacitás egyre csökken az élet során. Az autofágiát indukáló kalorikus restrikció, azaz csökkent mértékű táplálkozás (a korlátozás nélküli evéssel járó kalóriabevitel 60%-a) megnöveli az élethosszt mind gerinctelen, mind pedig rágcsáló modellekben. Fontos, hogy ezekben a kísérletekben az állatok jóval tovább egészségesek is maradtak. Ezt humán epidemiológiai adatok is alátámasztják: a nem éhező, de szerényen táplálkozó és sok egészségesnek tartott növényi táplálékot fogyasztó embercsoportok (mint például az Okinawa szigetén élő japánok) különösen hosszú várható élettartammal rendelkeznek (10.5. ábra).

10.5. ábra A hosszú élet egyik titka? A szerény, egészségesnek tartott növényi táplálékban gazdag diéta lehet a hosszú és egészséges élet egyik kulcsa, mint azt a képen látható 102 éves, aktív életet élő Okinawa szigetén élő hölgy példája mutatja.

Beth Levine kutatócsoportjának egyik legújabb, a napilapok hasábjaira is felkerült eredményei alapján a testmozgás (a vizsgált egerek esetében a mókuskerékben futás) autofágiát indukál (He és mtsai, 2012). Azt tapasztalták, hogy

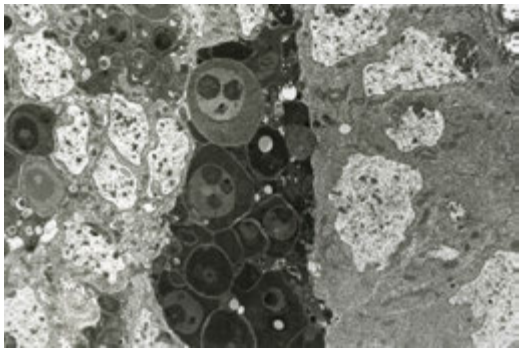
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

a testedzés hatására a Bcl-2 fehérje 3 aminosav oldalláncán foszforilálódik, és ez a kölcsönhatás destabilizálja a Bcl-2 Beclin-1-gyel (az Atg6 emlős homológjával) alkotott komplexét. Így a Beclin-1 felszabadul a Bcl-2 gátlás alól, ami hozzájárul a testedzés során megnövekvő autofágiához. Létrehoztak egy mutáns egértörzset ennek a vizsgálatára olyan genetikai módosítással (knock-in), hogy az endogén Bcl2 fehérje normálisan az edzés hatására foszforilációdó 3 aminosavát alaninra cserélték. Így az egerek minden vizsgált tekintetben (például éhezéssel indukált autofágia) vad típusra jellemző fenotípust mutattak, de testedzés során kevesebb autofagoszóma keletkezett a váz- és szívizomszövetben. Ezek az egerek cukorbetegségre és elhízásra hajlamosak, és a rendszeres testedzés nem javítja állapotukat. Természetesen túlzás lenne minden életmódbeli változás öregedésre vagy egészségre gyakorolt jótékony hatását az autofágiára visszavezetni, de az talán már bizton állítható hogy a folyamat jelentős szerepet játszik az életünkben (10.6. ábra).

10.6. ábra A hosszú élet másik titka? A rendszeres futás (vagy más hasznos testmozgás) igen jótékony hatású a különféle betegségek kialakulása ellen, mint például az elhízás, cukorbetegség vagy magas vérnyomás. Ezt a képen látható hosszútávfutó testalkata kiválóan illusztrálja.

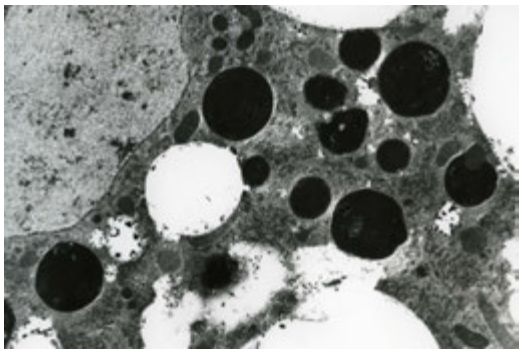
Az autofágia és a sejthalál

Pusztuló sejtekben gyakran megfigyelték a különféle autofág vezikulák felhalmozódását, ennek hatására alkották meg a II. típusú, autofág sejthalál kifejezést, így különböztetve meg ezeket a klasszikus apoptotikus morfológiát mutató sejtpusztulástól (10.7., 10.8. ábra).



10.7. ábra Apoptotikus sejthalál. A képen egy muslica lárva agyaának elektron mikroszkópos felvétele látható. A proapoptotikus Hid gén túltermelése a neuronok jó részében sejthalált indukál. A kép közepén található pusztuló sejtek sötét citoplazmájuk és zsugorodott morfológiájuk alapján egyértelműen felismerhetőek. Juhász Gábor felvétele.

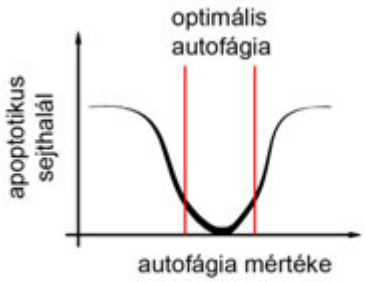
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.8. ábra Autofágiával kísért sejthalál. A lárvális muslica zsírtestben a metamorfózist megelőzően rendkívül sok, erősen elektrondenz, a képen sötétnek tűnő autolizoszóma megjelenése látható. A sejtek csak több nap múlva pusztulnak el azonban, és nem feltétlenül az autofágia ilyen magas szintje a sejthalál kiváltó oka. Juhász Gábor felvétele.

Általában igaz az a megállapítás, hogy az egyedileg pusztuló sejtekre inkább jellemző az apoptotikus morfológia, míg a teljes szövetek visszafejlődése (regressziója) során igen nagymérvű autofágia indukció történik. A kezdeti megfigyelések természetesen leíró jellegűek voltak, hiszen csak az autofágia központi mechanizmusában szereplő gének felfedezését követően vált lehetővé annak tesztelése, hogy az autofágia milyen szerepet játszik a folyamat során. Sokak meglepetésére az esetek döntő többségében azt találták, hogy az autofágia genetikai (esetleg farmakológiai) gátlása nem akadályozza meg, sőt gyakran éppen hogy serkenti a sejtek pusztulását (10.9. ábra). Általában ugyanis az autofágia a sejtek túlélését szolgálja, és elképzelhető hogy ez a halál előtti indukció is egy túlélési kísérlet a sejt részéről. Vannak persze kivételek, ilyen lehet például a muslica lárvális szövetek (bél, nyálmirigy) metamorfózis során történő hisztolízise (Ryoo és Baehrecke, 2010). Ennek egyik magyarázata lehet talán az hogy ezek a szövetek egyszerűen túl tömegesek, és nincs elég fagocita kapacitás pusztulásuk esetén a keletkező sejttörmelék eltakarítására, így „előemésztik” magukat. Felvetették annak a lehetőségét is, hogy a pusztuló sejtekben indukálódó autofágia a sejtfragmentek eltakarítását segítheti elő. A kísérletek során azt találták, hogy az apoptózis autofágia hiányos sejtekben is lezajlott, azonban a megfelelő, makrofágok odacsalogatását kiváltó jeleket a sejtek nem képesek produkálni (Qu és mtsai, 2007). Ezekre gyakran „eat me” és „come get me” szignálként utalnak a szakirodalomban. Hipotézisük szerint ezen pusztuló sejtekben az autofágia energiatermelő szerepe miatt sérülnek a sejtpusztulás ezen végső lépései.

Muslicákban az Atg1 kináz túltermeltetése nem csak autofágiát, hanem idővel a kaszpázok aktiválódása által kísért sejthalált is indukál (Scott és mtsai, 2007). Összeségében elmondható, hogy az autofág aktivitásnak van egy ideális körüli szintje, hiszen a kísérleti adatok többsége alapján a túl sok és a túl kevés autofágia is megnöveli a sejtpusztulás valószínűségét (10.9. ábra).



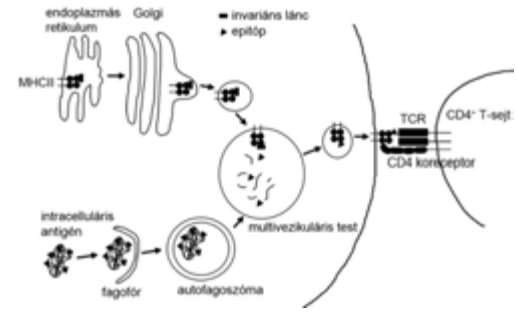
10.9. ábra Az autofágia és az apoptózis. Az autofágia optimális szintje szükséges a túléléshez. Túl kevés és túl sok autofágia egyaránt apoptotikus sejthalálhoz vezethet. Varga Ágnes ábrája.

Adaptív immunválasz és gyulladás

Jól ismert, hogy az MHC I. molekulákon történő antigén prezentáció során az immunproteaszóma hozza létre a megfelelő, általában 8-11 aminosavas peptideket. Ezzel szemben a professzionális antigén prezentáló sejteken

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

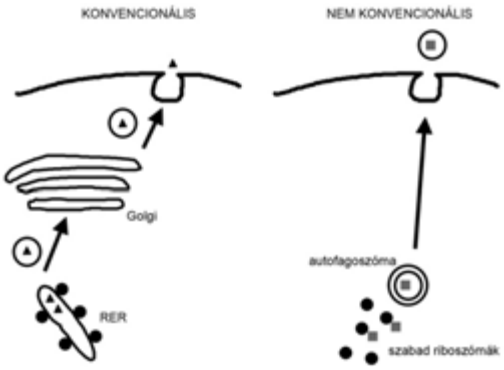
(ilyenek például a makrofágok és dendritikus sejtek) található MHC II. molekulákon prezentált 18-22 aminosavas peptidek nem csak a késői endoszómákban történő limitált proteolízis révén, hanem autofág úton (feltehetően amfiszómákban) is keletkezhetnek (10.10. ábra).



10.10. ábra Az antigén prezentáció MHCII útvonala. A sejt által bekebelezett vagy saját fehérjék késői endoszómákban (multivezikuláris testekben) kapcsolódnak a szekréciós útvonalon érkező MHCII molekulákhoz, limitált proteolízist követően. Ezek az antigénként szolgáló oligopeptidek nem csak a sejt által felvett potenciális patogének fehérjéinek endoszómális úton történő degradációja révén, hanem a sejtben található fehérjék autofág lebontása során is keletkezhetnek. Nagy Péter ábrája.

Ennek a folyamatnak igen fontos szerepet tulajdonítanak a sejteket megfertőző patogének elleni adaptív immunválasz során.

A fertőzéseket és szolid tumorokat gyakran kísérő gyulladási reakciók fontos szerepet töltenek be a szervezet védekezésében, bár a túlzott gyulladási reakció igen káros következményekkel járhat. A folyamatban szereplő hormonok, azaz gyulladásos citokinek egy része (például az interleukin-1 béta) nem-konvenciális szekréciós úton jut ki a sejtekből (10.11. ábra).



10.11. ábra Konvencionális és nem konvencionális szekréciós útvonalak. A szekrécióra szánt fehérjék többsége a klasszikus, durva felszínű endoplazmás retikulum – Golgi készülék útvonalon jutnak ki a sejtből. A nem konvenciális úton szekretálódó fehérjék szabad riboszómákon szintetizálódnak, így a kijutás problémáját máshogyan oldják meg. Ezen nem konvenciális utak egyike az autofagoszómák szekréciója. Nagy Péter ábrája.

Ez azt jelenti, hogy nem az endoplazmás retikulumban szintetizálódik, hanem szabad riboszómákon, így természetesen nem tud a Golgi-készüléken keresztül távozni. Néhány éve fedezték fel, hogy az autofág gének szükségesek élesztő sejtekben az ACBP (acyl-coenzyme A binding protein) szekréciójához. Ez egy citoszólikus fehérje, és nem ismert hogy miért kerül szekrécióra éhezés során, viszont kimutatható volt hogy szelektíven bekerül olyan, speciális autofagoszómák belsejébe, amelyek lizoszómális lebontás helyett kijuttatják a sejtből. Emlős sejttenyészeti vizsgálatok később rámutattak, hogy az autofág géntermékek szintén szükségesek az interleukin-1 béta szekréciójához, tehát a gyulladásos folyamatok szabályozásában részt vesznek az Atg gének. Ugyan nem ez az egyetlen nem-konvenciális szekréciós útvonal, de mivel sok olyan fehérje ismert ami az ER-Golgi rendszertől függetlenül jut ki sejtekből, valószínűleg az elkövetkezendő években az autofág szekréció révén kikerülő fehérjék száma is nőni fog.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az autofágia szerepe az egyéb betegségekben

Rengeteg további patológiás állapot során vizsgálták és jelenleg is vizsgálják az autofágia szerepét. Néhány példát kiragadva az izomgyengeséggel és akár teljes bénulással járó vakuoláris miopátiákra jellemző, hogy a különféle autofág vezikulák nagy mértékben felhalmozódnak az izomsejtekben, ami nyilvánvalóan a nem megfelelő lebontás miatt állhat elő. A Pompe és Danon betegségekre, továbbá az öregedés során is jellemző szívizom gyengeség egyik okaként tartják számon a csökkent mértékű autofág lebontást. Ugyanakkor a szív kórosan oxigénhiányos állapotát követő (ischemia-reperfúzió) hatalmas autofág indukció már káros is lehet. Vannak adatok az autofágia szerepéről többek között az elhízás, a cukorbetegség kialakulása, a Crohn típusú gyulladásos bélbetegség, a T-sejtek érése és vérképzés során is, de ezek további részletes tárgyalása túlmutatna a jelen tankönyv céljain. Az autofágia szerepét a rák, néhány neurodegenerációs betegség és a patogének sejten belüli lebontása során a későbbi fejezetekben elemezzük.

Ellenőrző kérdések

1. Mi az autofágia feltételezett legősibb feladata?
2. Mire utalnak a homeosztázis/homeodinamika kifejezések, és hogyan kapcsolódik ehhez az autofágia?
3. Elemezze a csökkent kalóriabevitel, testedzés és autofágia jelentőségét az öregedés során!
4. Létezik-e autofág sejthalál?
5. Milyen szerepet játszhat az autofágia az immunrendszer működése során?

Irodalom

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. és mtsai (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889.

He, C., Bassik, M. C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q. és mtsai (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* **481**, 511-515.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. és mtsai (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. és Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036.

Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R. N., Gilpin, C. és Levine, B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**, 931-946.

Ryoo, H. D. és Baehrecke, E. H. (2010). Distinct death mechanisms in Drosophila development. *Curr. Opin. Cell Biol.***22**, 889-895.

Scott, R. C., Juhasz, G. és Neufeld, T. P. (2007). Direct induction of autophagy by atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.***17**, 1-11.

Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A. és Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**, 117-120.

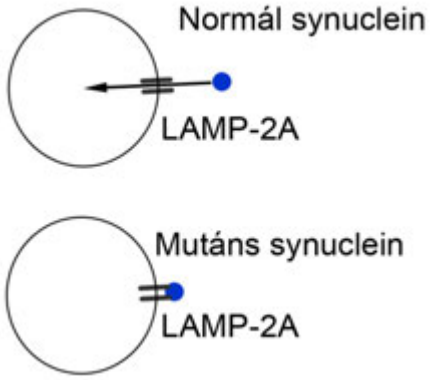
Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Sass, M. és Klionsky, D. J. (2009). The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol* **19**, 487-494.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

11. Szelektív autofág lebontás

Chaperone-mediált autofágia

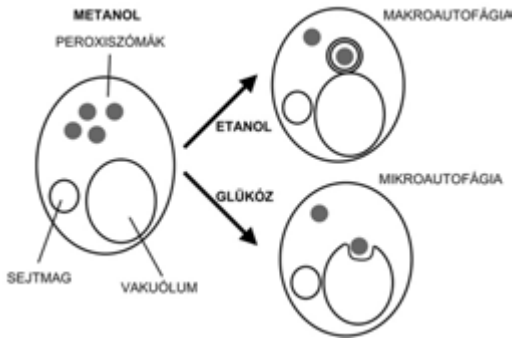
A korábban már tárgyalt CMA útvonalon a KFERQ aminosavszakaszt hordozó fehérjék kerülhetnek a lizoszómába. Ez a motívum a citoszólikus fehérjék harmadában megtalálható, így feltételezhetően egyéb, még nem ismert tulajdonságok is befolyásolják az útvonal szelektivitását. A folyamat jelentőségére még igen kevés adat van, nagyon sok ezzel kapcsolatos biokémiai vizsgálatot sejtlizátumokon végeztek (Wong és Cuervo, 2010). A feltételezések szerint több, humán betegségekben szereplő fehérje is képes ezen az útvonalon lebomlani, mint például a synuclein fehérjék. Egy új tanulmány azt sugallta, hogy a Parkinson betegségben szerepet játszó mutáns synuclein a lizoszómális receptorként működő LAMP-2A csatornákhoz kötődik ugyan, de a lumenbe nem tud transzlokálódni (11.1. ábra). A csatornák eldugítása miatt pedig egyéb fehérjék CMA útvonalon történő bejutása is gátlódhat.



11.1. ábra A mutáns synuclein gátolhatja a CMA útvonalat. In vitro vizsgálatok azt suggalják, hogy míg a normális synuclein fehérje képes a chaperone-mediálta autofágia útján lebomlani, addig a Parkinson-kór esetén előforduló mutáns változat a LAMP-2A receptorhoz kötve gátolhatja a CMA-függő lebontási útvonal működését.

Mikroautofágia

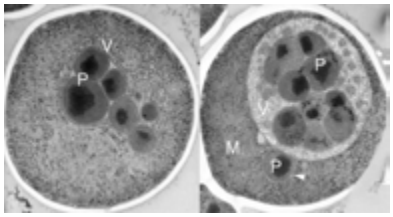
A mikroautofágia vizsgálatát előszeretettel, végzik az egysejtű *Pichia pastoris*-ban, amely egy metilotróf élesztőfaj. Ezzel összhangban metanol tartalmú táptalajon tenyésztve rengeteg peroxiszóma keletkezik a sejtekben. Ha a táptalajt etanol-tartalmúra cserélik, akkor a feleslegessé váló peroxiszómák egy kivételével szelektív makroautofágia (makropexofágia) révén lebomlanak. Ebben döntően a kanonikus makroautofágiához is szükséges gének szerepelnek. Viszont glukóz-tartalmú táptalaj hatására a peroxiszómák szelektív mikroautofágiával (mikropexofágiával) jutnak a vakuólumba (11.2. ábra).



11.2. ábra A pexofágia útvonalai. A metanol-tartalmú táptalajon tartott Pichia élesztő sejtek rengeteg peroxiszómát tartalmaznak. Etanol hatására az immáron feleslegessé váló peroxiszómák makroautofágia (makropexofágia), míg cukros táptalajon mikroautofágia (mikropexofágia) révén bomlanak le. Varga Ágnes ábrája.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A különbség oka még nem ismert, de ez lehetőséget ad az indukálható szelektív peroxiszóma autofágia vizsgálatára (11.3. ábra).



11.3. ábra Pexofágia elektronmikroszkóppal vizsgálva. A metanol tartalmú táptalajon felszaporodó peroxiszómák (bal oldali kép) a táptalaj lecserélése következtében feleslegessé válnak, így (mikro- vagy makro-) autofágia révén bekerülnek a vakuólumba (V, jobb oldali kép). Pichia pastoris esetén a jellegzetes, az elektron mikroszkópos képen szinte fekete fehérjekristály jelenléte teszi könnyen felismerhetővé a peroxiszómákat (P). Forrás: Mol. Biol. Cell 2005; 16 (2), 446-457.

A mikropexofágiában eredetileg leírt PAZ és GSA gének egy része a későbbiekben allélikusnak bizonyult a központi Atg génekkel, de a folyamat molekuláris eseményeinek megértésétől még messze állunk (Sakai és mtsai, 1998).

(Makro)autofágia

Ubiquitinilált fehérjék lebontása

Mint azt már korábban említettük, az autofágia fő útvonala igen fontos szerepet játszik az ubiquitinilált fehérjék lebontásában. Ezt megfelelő szelektív autofág receptor fehérjék biztosítják. A plazmamembránban elhelyezkedő receptoroktól eltérően itt a receptor kifejezés csak arra vonatkozik, hogy ezek a molekulák képesek kétféle fehérjét összekapcsolni. Közülük az egyik maga az ubiquitin, természetesen itt a (poli-) ubiquitinilált fehérjékre kell gondolni. A másik pedig az Atg8/LC3 családba tartozó, ubiquitin-szerű fehérjék. Ezen fehérjék interakcióinak az eredménye az lesz, hogy az ubiquitinilált fehérjék (a szállítmány) a képződő, Atg8-cal borított fagofórhoz kötődnek a receptoron keresztül, majd együttesen a létrejött autofagoszóma belsejébe kerülnek (Lamark és Johansen, 2010). A legtöbbet vizsgált Atg8-cal szelektíven kölcsönhatásba lépő fehérje a p62 (más néven SQSTM-1, sequestosome-1). A p62 az ubiquitinilált fehérjéket UBA (ubiquitin-associated) doménje révén képes kötni, az Atg8/LC3-hoz pedig egy rövid peptidszakasz, az AIM/LIR motívum (Atg8 interacting motif/LC3 interacting region) révén köt (11.4. ábra).

humán p62 LIR 335 D D D W T H L S 342
Drosophila p62 LIR 451 D P E W Q L I D 458

11.4. ábra A LIR motívum. A képen a humán és muslica p62 fehérjék LC3-mal, illetve Atg8-cal interakcióba lépő régióját (LIR) alkotó aminosavak sorrendje van feltüntetve. Forrás: Int J Cell Biol. 2012; 146767.

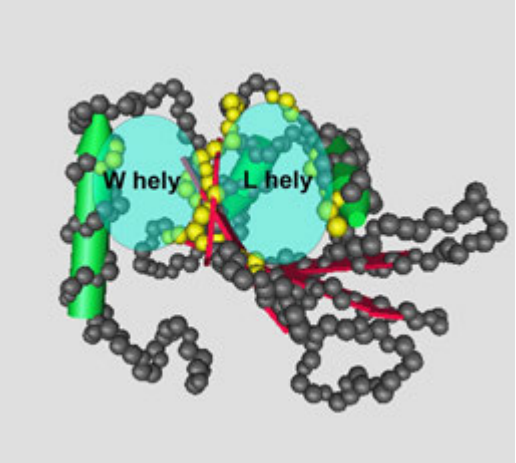
Ez egy körülbelül 8 aminosavas, általában rendezetlen fehérjerégióban elhelyezkedő szakasz. Az első három aminosav között gyakran vannak savas oldalláncúak, a negyedik (0. pozíciónak tekintett) mindig egy aromás (triptofán, tirozin vagy fenilalanin), utána két savas vagy apoláros, végül pedig a 3. pozícióban egy apoláros oldalláncú (leucin, izoleucin vagy valin) aminosav helyezkedik el (11.5. ábra).

[DE] [DE] [DEST] [WFY] [DELIV] [X] [ILV]

11.5. ábra A LIR régió konszenzus szekvenciája. A bizonyítottan Atg8/LC3 molekulákat interakcióba lépő fehérjék kötőszekvenciáit összehasonlítva lehetséges konszenzus szekvenciát meghatározni, ami az ábrán van feltüntetve. Fontos, hogy a 0. pozícióban levő aromás aminosav (W, F, vagy Y) és a 3. pozícióban elhelyezkedő apoláros oldalláncú aminosav (I, L vagy V) játszik döntő szerepet a kölcsönhatás során, így a többi aminosav a konszenzustól természetesen eltérhet, mint az a 4. ábrán bemutatott p62 példák esetén is látható.

A legkritikusabb a 0. és 3. pozíció, mert ezek az aminosavak az Atg8/LC3 fehérje felszínén található mélyedésekbe kötnek (W és L hely, mert ide dokkolnak a triptofán- és a leucin-szerű oldalláncok) (11.6. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.6. ábra Az Atg8/LC3 családba tartozó fehérjék térszerkezete. Az ábra a jellegzetes, ubiquitin-foldnak nevezett térszerkezetű Atg8/LC3 fehérjék felszínén található W és L helyeket mutatja be. Ezekhez kötnek a partnerfehérjék LIR régiójának 0. pozíciójában levő aromás és a 3. pozícióban található apoláros aminosav oldalláncok. Nagy Péter ábrája.

Az UBA és AIM/LIR mellett a p62-ben szintén megtalálható PB1 domén is elengedhetetlen a megfelelő funkcióhoz, ugyanis ez biztosítja azt hogy a p62 másik p62 fehérjével, vagy egyéb PB1 domént hordozó molekulákkal aggregálódni tudjon. Így jön létre az a szelektív receptorokat és ubiquitinilált fehérjéket egyaránt tartalmazó aggregátum, ami köré tud nőni a képződő fagofór (11.7. ábra).

11.7. ábra A p62 fehérje doménszerkezete. A diagram a p62 autofágia szempontjából lényeges doménjeinek elhelyezkedését mutatja be: a PB1 aggregációt, a LIR motívum LC3 kötést, az UBA domén pedig az ubiqutinilált fehérjék kötését biztosítja.

Mint azt már korábban láttuk, autofágia hiányában ezen aggregátumok száma és mérete is drasztikusan megnő a sejtekben. A p62 nem az egyetlen ilyen típusú receptorfehérje. Közvetlen kötőpartnere az NBR1 (neighbor of BRCA1), ami szintén rendelkezik PB1, LIR és UBA doménekkel, bár ez a PB1 doménjára jellemző sajátosságok miatt önmagával nem tud aggregátumot képezni (11.8. ábra).

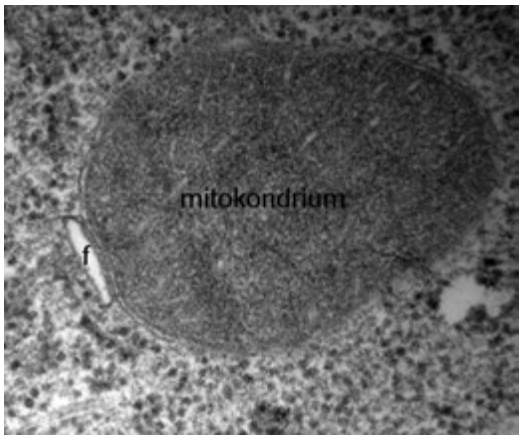
11.8. ábra Az NBR1 fehérje doménszerkezete. A diagram az NBR1 autofágia szempontjából lényeges doménjeinek elhelyezkedését mutatja be: a PB1 aggregációt, a LIR motívum LC3 kötést, az UBA domén pedig az ubiqutinilált fehérjék kötését biztosítja.

Létezhetnek egyéb, még kellőképpen nem ismert jelek is, amelyek a kóros fehérjeaggregátumok szelektív autofág lebontását teszik lehetővé. A neurodegenerációs betegségek egy csoportjára jellemző, hogy mutáns, például poliglutamin expanziót hordozó fehérjék aggregátumai halmozódnak fel a sejtekben, mint az a Huntington-kór esetén is megfigyelhető. Mutáns huntingtin fehérjét kifejező tenyésztett sejtek vagy egér modellek esetén leírták, hogy az autofágia megfelelő hatóanyagokkal (például rapamicin) történő fokozása csökkenti a kóros aggregátumok szintjét és a patológiás folyamatok ellen hat (Ravikumar és mtsai, 2004).

Mitofágia

Mitofágia során a képződő fagofór szelektíven, egy adott mitokondriumot körbenőve hozza létre az autofagoszómát (11.9. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



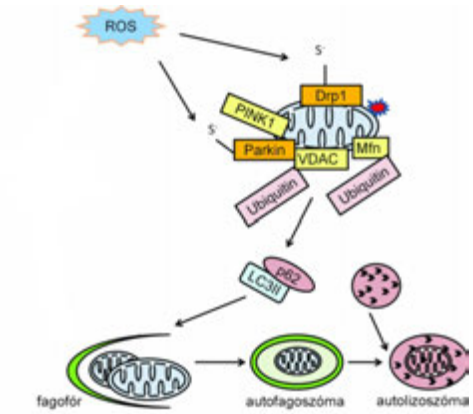
11.9. ábra Mitofágia. A mitokondrium szelektív lebontása (mitofágia) során a képződő fagofór (f) a mitokondrium felszínéhez asszociálva jön létre és növi körbe a degradációra szánt organellumot, így a környező citoplazma gyakorlatilag nem kerül bele az autofagoszómába. Kovács Attila felvétele.

A mitofágia jelensége igen jellemző a korai a retikulocita érés során, hiszen ilyenkor az összes mitokondrium eliminálódik, az érett vörövértestben már nincsenek jelen. Ebben a folyamatban szintén egy LIR motívummal rendelkező fehérje, a Nix játszik fontos szerepet (Novak és mtsai, 2010). Érdekes módon a Nix génkiütött egerek retikulocitáiban a mitokondriumok körbeveszik az autofagoszómákat ahelyett hogy bekerülnének.

Már évtizedekkel ezelőtt leírták, hogy a megtermékenyítést követően a spermiumokból származó mitokondriumok ubiquitinilálódnak. Jól ismert hogy a mitokondriumok maternálisan öröklődnek. Sokáig nem volt világos, hogy az apai mitokondriumok hogyan eliminálódnak a zigótából. A legújabb eredmények alapján a spermiumokból származó, ubiquitinilált mitokondriumok részben szelektív autofágia révén bomlanak le (Sato és Sato, 2013). Még nem ismert hogy milyen mechanizmus biztosítja azt, hogy csak az apai mitokondrium ubiquitinilálódjon. Elképzelhető, hogy a spermiumokra jellemző, igen intenzív mozgáshoz szükséges rengeteg energia igen rövid idő alatt történő előállítása olyan mértékben károsítja ezeket az organellumokat, hogy ez a károsodás lesz a jel a szelektív lebomlásra.

A mitofágia jelentőségét és molekuláris mechanizmusát legjobban a Parkinson-kórral kapcsolatos vizsgálatok alapján ismerjük (Youle és van der Bliek, 2012). A mitokondriumok egy nagyon dinamikus hálózatot alkotnak, amelyre folyamatos fúziók és fissziók jellemzőek. Az örökletes Parkinson-kórt kiváltó recesszív mutációk vizsgálata derített fényt arra, hogy a PINK1 szerin-treonin kináz és a Parkin ubiquitin ligáz kiesése a substantia nigra pars compacta részében található dopaminerg idegsejtjeinek pusztulásához vezethet. A későbbi molekuláris adatok alapján körvonalazódik ezen fehérjék mitofágiában betöltött szerepe. Leírták, hogy a mitokondriumok károsodása (például az elektron transzport lánc szétkapcsolása, melyet megfelelő drogkezeléssel mesterségesen is elő lehet idézni) miatt valamilyen úton-módon a normálisan igen gyorsan lebomló, folyamatosan cserélődő PINK1 fehérje stabilizálódik az adott organellum felszínén. Ezt követi a Parkin citoszólból a mitokondrium felszínére történő transzlokálódása, melynek eredményeképpen több mitokondriális külső membrán fehérje is ubiquitinilálódni fog. Ezek közé tartoznak a mitofuzin fehérjék, amelyek hiányában a károsodott mitokondrium már nem képes fúzióra, izolálódik, majd feltehetően az ubiquitin cimkéknek köszönhetően szelektíven lebomlik (11.10. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

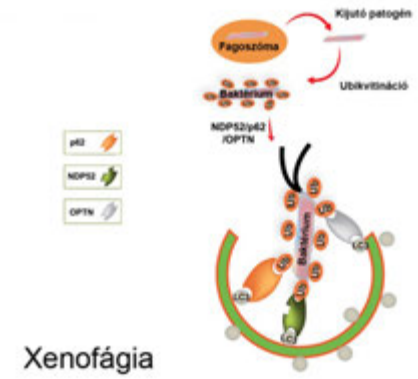


11.10. ábra A mitofágia molekuláris mechanizmusa. A sérült mitokondriumokon még teljes egészében nem ismert mechanizmus révén stabilizálódik a PINK1 kináz. Ennek hatására a Parkin a citoszólból a mitokondrium felszínéhez transzlokálódik, és a mitokondrium külső membránján elhelyezkedő fehérjéket ubiquitinilálja. Ezután, feltehetően a p62 és hasonló szelektív autofág receptorok közvetítésével, az adott mitokondrium lebontásra kerül. Forrás: Biochem. J. 2012, 441: 523–540.

A folyamat elromlása (PINK1 vagy Parkin funkcióvesztés esetén) a károsodott mitokondriumok felhalmozódásához vezet, ami hozzájárulhat a Parkinson kórra jellemző neurodegenerációs tünetek kialakulásához.

Xenofágia

A görög xeno, azaz idegen szóból származó kifejezés arra utal, hogy az állati sejtek képesek a bejutó patogéneket (baktériumok, vírusok) szelektív autofágia révén lebontani. (11.11. ábra)



11.11. ábra A xenofágia folyamata. A citoplazmába kerülő patogén baktériumok felszínén elhelyezkedő fehérjék többféle, itt nem részletezett mechanizmus révén ubiquitinilálódnak, valamint további, specifikus autofág degradációt kiváltó jelek is megjelölhetik ezeket. Ezen molekuláris lépések hatására a specifikus autofág receptorok (mint például az NDP52, p62 és az optineurin) a baktérium és az LC3 kötése révén mediálják a patogén autofág lebontását. Forrás: Front. Immunol. 2013; 4:97.

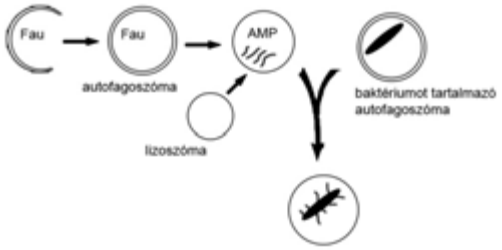
Szigorú értelemben véve persze ezek nem saját fehérjék vagy organellumok, de mivel bekerültek a citoszólba így értelmezhetjük ezt az útvonalat az autofágia egyik változataként. A legújabb kutatások rámutattak, hogy az endocitotikus vezikulumokból a citoplazmába kijutó patogén baktériumok (például a Salmonella) felszíne ubiquitinilálódik. Ezt a p62 mellett egyéb szelektív receptorok is felismerik, ilyenek az optineurin és az NDP52, melyek szintén rendelkeznek LIR motívummal és ubiqutin is köthetnek, azonban PB1 doménjük nincs (11.12. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

11.12. ábra Az NDP52 és OPTN fehérjék szerkezete. A diagramok az NDP52 és Optineurin szelektív xenofágia receptorok autofágia szempontjából lényeges, LC3-at kötő (LIR) és ubiquitinnel kölcsönható (UBAN) régióinak elhelyezkedését mutatja be.

Ezen molekuláris lépések eredményeképpen a baktérium a lizoszómába jutva lebomlik (Randow és mtsai, 2013). Vegyük észre, hogy ez a mechanizmus sok hasonlóságot mutat a mitofágiával. Ez valószínűleg nem véletlen, hiszen a mitokondriumok egy ősi szimbionta baktérium leszármazottainak tekinthetők.

Egy igen érdekes megfigyelés az, hogy a lizoszómák különösen hatékonyan képesek elpusztítani és lebontani ezeket a mikroorganizmusokat. Proteomikai vizsgálatok során számos olyan rövid peptidet izoláltak lizoszómákból, amelyeknek igen erőteljes antimikrobiális hatása van. Kiderült hogy ezek a peptidek az autofágia révén a lizoszómába jutó citoszólikus fehérjékből származnak. Mivel a lizoszómában jönnek létre részleges emésztés révén, ezeket neo-antimikrobiális peptideknek is nevezik. Ilyen például a Fau vagy más néven rpS30, amely a riboszóma kis alegységének 30. számú fehérjéje (11.13. ábra).



11.13. ábra A neoantimikrobiális peptidek keletkezése. A citoszólikus fehérjék egy része, mint például a Fau (rpS30), autofágia révén a lizoszómába kerülve antimikrobiális peptidekre (AMP) bomlik le. Az ilyen peptideket tartalmazó lizoszómák rendkívül hatékonyan képesek a bekerülő baktériumokat elpusztítani. Varga Ágnes ábrája.

Ellenőrző kérdések

1. Hogyan indukálható kísérletesen a peroxiszómák lebomlása?
2. Milyen autofág receptorokat ismer, és milyen kritikus fehérjemotívumok jellemzőek ezekre?
3. Milyen élettani és patológiás szerepe lehet a mitofágiának?
4. Hogyan tudnak autofágia révén védekezni a sejtek a bejutó patogének ellen?

Irodalom

Lamark, T., és T. Johansen. 2010. Autophagy: links with the proteasome. *Current opinion in cell biology*. 22:192-198.

Novak, I., V. Kirkin, D.G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F. Lohr, D. Popovic, A. Occhipinti, A.S. Reichert, J. Terzic, V. Dotsch, P.A. Ney, és I. Dikic. 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep*. 11:45-51.

Randow, F., J.D. MacMicking, és L.C. James. 2013. Cellular self-defense: how cell-autonomous immunity protects against pathogens. *Science*. 340:701-706.

Ravikumar, B., C. Vacher, Z. Berger, J.E. Davies, S. Luo, L.G. Oroz, F. Scaravilli, D.F. Easton, R. Duden, C.J. O'Kane, és D.C. Rubinsztein. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36:585-595.

Sakai, Y., A. Koller, L.K. Rangell, G.A. Keller, és S. Subramani. 1998. Peroxisome degradation by microautophagy in Pichia pastoris: identification of specific steps and morphological intermediates. *J Cell Biol*. 141:625-636.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Sato, M., és K. Sato. 2013. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1833:1979-1984.

Wong, E., és A.M. Cuervo. 2010. Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a006734.

Youle, R.J., és A.M. van der Bliek. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 337:1062-1065.

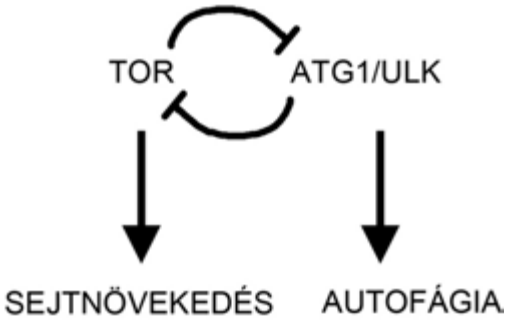
12. Az autofágia szerepe a sejtnövekedés és a rák kialakulása során

Az autofágia és a sejtnövekedés rendszerint fordított arányban állnak

Mint az már korábban részletes kifejtésre került, a növekedési jelátviteli utak (mint például az AKT/PI3K és TOR rendszerek) a sejtnövekedést és ebből kifolyólag a sejtosztódást is serkentik, és az autofágiát gátolják. Ez biztosítja, hogy a sejt igényeinek megfelelően koordinálódjék az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlya (12.1. ábra).

12.1. ábra A lebontó és felépítő folyamatok egyensúlya. A növekedési jelátviteli utak serkentik a sejtnövekedést és gátolják az autofágiát. A két folyamat egyensúlyban van egymással.

Egy intenzíven növekvő és osztódó sejtnek rendszerint nincs akkora szüksége az autofág lebontó útvonalra, mint egy nyugvó, akár terminálisan differenciálódott sejtnek. A sejtnövekedés egyik fő regulátora, a TOR kináz az Atg1-et (ULK1/2-t) közvetlenül foszforilálja és gátolja. Az Atg1/ULK kinázok aktiválódása viszont képes a TOR-t foszforilálva gátolni, tehát így felerősíteni az autofág indukció és sejtnövekedés gátlásának mértékét (12.2. ábra).



12.2. ábra A lebontó és felépítő folyamatokat szabályozó jelátviteli események. A TOR kináz serkenti a sejtnövekedést és az ATG1/ULK foszforilálásán keresztül gátolja az autofágiát. Az aktív ATG1/ULK kináz viszont képes a TOR-t foszforilálva gátolni azt, így felerősíti az autofág indukciót és a sejtnövekedés gátlást .

Természetesen emellett rengeteg egyéb, pozitív és negatív visszacsatolási lépés vesz részt ezen folyamatok finomszabályozásában (Alers és mtsai, 2012).

Az Atg gének szerepe a tumor szuppresszióban

Az élesztő Atg6 homológjáról, a Beclin-1 génről kiderült, hogy haploinszufficiens tumor szuppresszor. Ez azt jelenti, hogy a gén egyik alléljének elveszése megnöveli a rák kialakulásának valószínűségét. Ez nem feltétlenül

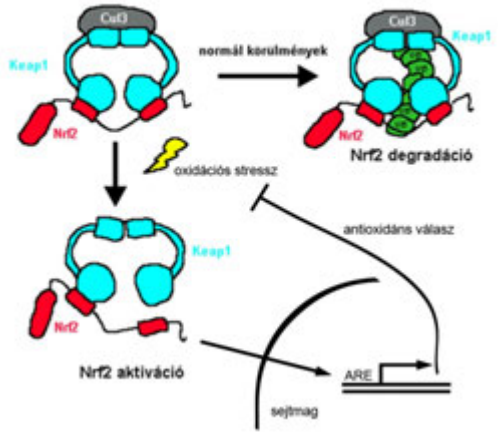
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

az autofág aktivitás csökkenése miatt van, hiszen ne feledjük hogy ez a fehérje többek között az endocitózisban is szerepel. A későbbi vizsgálatok viszont kiderítették, hogy az Atg7 gén májspecifikus deléciója jóindulatú tumorok kialakulását eredményezi (Takamura és mtsai, 2011). Érdemes kiemelni, hogy a központi autofág gének elveszése nem feltétlenül jár együtt az autofág lebontás teljes hiányával. Mind élesztő, mind *Drosophila*, mind pedig humán adatok arra utalnak, hogy az Atg mutáns élőlényekben az autofág aktivitás drasztikusan lecsökken a vad típus 10-25 százalékára, de ez a szám nem nulla! Ezzel együtt az Atg7 hiánya természetesen együtt jár a szelektív autofág receptor p62 (ami egyben szubsztrát, azaz szállítmány is) felhalmozódásával. Az Atg7 p62 kettős mutáns hepatociták azonban nem voltak képesek tumorokat képezni, vagyis a p62 valamiképpen szükséges az autofágia hiányában meginduló tumorigenezishez. A p62 fehérjéről érdemes tudni, hogy rengeteg folyamatban szerepel a szelektív autofágia mellett. Ilyenek a csontképződés, a zsírszövet megfelelő kialakulása, valamint az antioxidáns válasz. Ez utóbbit tárgyaljuk részletesebben!

A p62/Keap1/Nrf2 útvonal

A p62 fehérjében az LC3 kötőhely (LIR) mellett található egy másik peptidszakasz, amelyet KIR-nek neveznek (Keap1 interacting region). Ebből már kitalálható, hogy a p62 ennek révén képes kötni a Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) fehérjét. No de mi az a Keap1, és mi a szerepe?

A Keap1 gyakorlatilag egy intracelluláris oxidációs stressz szenzor. Két Keap1 molekula közvetítésével képes a Cullin 3 fehérje (ami egy ubiquitin ligáz) az Nrf2-höz (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2) kötni. A Keap1 a citoplazmában tartja és a Cullin 3 segítségével ubiqutinilálja az Nrf2-t, így annak féléletideje normál körülmények közepette igen rövid (kb. 20 perc) a folyamatos proteaszómális degradációnak köszönhetően. Oxidációs vagy elektrofil stressz hatására, azaz amikor például a reaktív oxigéngyökök koncentrációja megnő, a Keap1 megfelelő cisztein oldalláncai révén ezt érzékeli, és a folyamat eredményeképpen disszociál az Nrf2-től. Az Nrf2 ennek hatására egyrészt stabilizálódik, szintje megnő, másrészt szabadon képes bejutni a sejtmagba, ahol a megfelelő célgének transzkripcióját aktiválja. Az Nrf2 célgénjeire jellemző, hogy úgynevezett ARE (antioxidant response element) szekvenciákat hordoznak a promóterükben. Ezek a gének jellemzően antioxidáns funkciókat ellátó enzimeket (mint például a glutation S-transzferáz) kódolnak, és így csökkentik a Keap1 által érzékelt stressz hatását (12.3. ábra).



12.3. ábra A Keap1/Nrf2 rendszer. Alapesetben a Keap1 köti az Nrf2 transzkripciós faktort, ennek eredményeképpen a Cullin 3 ubiquitin ligáz közreműködésével az Nrf2 proteaszómális úton lebomlik. Elektrofil vagy oxidációs stressz hatására a Keap1 disszociál az Nrf2-től, ami így stabilizálódik és a sejtmagba jutva célgénjeinek átíródását serkenti. Az így szintetizálódó antioxidáns enzimek szerepe az oxidációs stressz csökkentése.

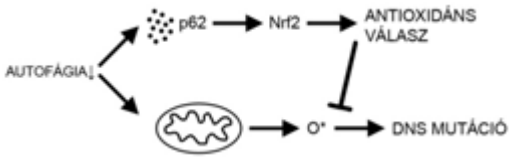
A sejttenyészeti és egér vizsgálatok kiderítették, hogy az autofágia gátlásakor felhalmozódó p62 képes a Keap1-et kötni, így megszüntetve a Keap1-Nrf2 kölcsönhatást (Inami és mtsai, 2011). Ezt a p62-ben megtalálható KIR motívum (Keap1 interacting region) teszi lehetővé, ami megszünteti a Keap1-Nrf2 interakciót (12.4. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

humán p62 KIR 344 KEVDPSTGELQSL 356
Drosophila p62 KIR 484 VRDFGQLGELLRQ 496

12.4. ábra A p62 KIR motívuma. A képen a humán és muslica p62 Keap1-kötő régiójának aminosavsorrendje látható. Pirossal a kritikus, központi szekvenciarészlet van kiemelve. Forrás: Int J Cell Biol. 2012; 146767.

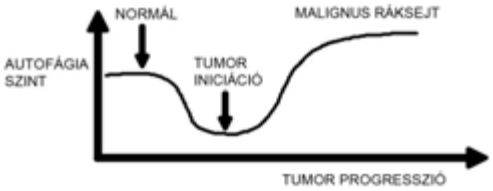
A kötés eredménye pedig a megnövekedő antioxidáns sejtválasz, ami még nem ismert módon serkenti a tumorigenezist. Vannak arra vonatkozó adatok, hogy autofágia hiányában nem csak kóros fehérjeaggregátumok, hanem károsodott sejtorganellumok is felhalmozódnak. Amennyiben ez a jelenség a mitokondriumokra is érvényes, akkor gondolhatunk arra, hogy a hibás mitokondrium reaktív oxigén gyököket hoz létre és ezzel „szennyezi" az intracelluláris teret. Ez különösen igaz lehet a szétkapcsolt elektron transzport lánccal rendelkező mitokondriumokra. Ne feledjük, hogy ezek a vegyületek képesek károsítani nem csak a fehérjéket, hanem a sejtmagba diffundálva a DNS-t is. Emiatt megnő a mutációs ráta, ami közismerten melegágya a rák kialakulásának (12.5. ábra).



12.5. ábra Az autofágia és a mutációs ráta lehetséges kapcsolata. Autofágia gátlásakor megnő a hibás, nem megfelelően működő organellumok, így a mitkondriumok száma is. A feltételezések szerint ezek a mitokondriumok sok reaktív oxigén gyököt termelnek, ami mutagén hatású. Ezt a hatást csökkentheti az autofágia hibája miatt felhalmozódó p62, ami az Nrf2 jelátvitelt serkentve antioxidáns válaszhoz vezet.

Metabolikus stressz

Az elégtelen mennyiségű táplálék alapvetően befolyásolja a sejtek működését, és mint láttuk, autofágiát indukál. Az autofágia révén a sejtek képesek átvészelni ezt a kedvezőtlen időszakot, mivel a nélkülözhető anyagok lebontása és újrahasznosítása révén előállított alapanyagok mind a fehérjeszintézis, mind pedig a mitokondriális energiatermelő folyamatok igényeit képesek ellátni. Kedvezőtlen körülmények a már kialakultszolid tumorokban is megfigyelhetők, hiszen gyakran jellemző rájuk az elégtelen keringés miatt létrejövő oxigén- és tápanyaghiányos állapot, különösen a tumor belső részein. A hosszas éhezés apoptózishoz vezet, ami az autofágia hiányában sokkal hamarabb megtörténik. Sejttenyészeti kísérletek azonban azt mutatják, hogy nem minden sejt pusztul el ilyen metabolikus stressz hatására. Bizonyos sejtek különböző okokból csökkent mértékű autofág választ produkálnak ugyan, de mégis túlélnek. A feltételezések szerint ezekben a sejtekben megnő a károsodott sejtorganellumok száma és az oxidációs stressz mértéke, felhalmozódik a p62, antioxidáns válasz indukálódik, és megnő a mutációs ráta. Bizonyos rák kialakulást modellező kísérletek (például egerek alacsony dózisú karcinogénnel való kezelése) alapján elmondható, hogy a tumorigenezis kezdetén is megfigyelhető az autofágia szintjének csökkenése (de nem teljes hiánya!). A fenti folyamatok hatására létrejövő ráksejtek azonban, talán meglepő módon, de az eredeti szövethez képest megnövekedett autofág aktivitást mutatnak (12.6. ábra).



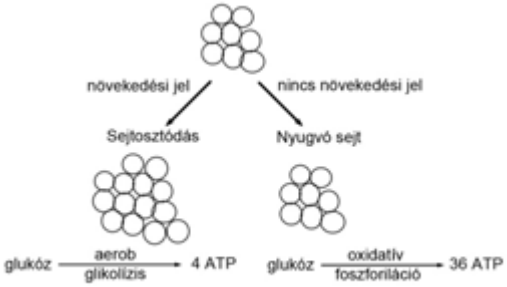
12.6. ábra Az autofág aktivitás változása a tumor progresszió során. A feltételezések szerint az autofág aktivitás csökkenése a rák kialakulásának kezdeti lépéseihez hozzájárulhat, azonban a tumor progresszió későbbi szakaszában szintje az eredeti szövetnél magasabb, így segítheti a ráksejtek növekedését, túlélését és malignáns fenotípusának fenntartását.

Ez az agresszív, intenzíven növekvő ráksejtek megváltozott anyagcseréjével állhat összefüggésben (White, 2012).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Warburg effektus

Otto Warburg német biokémikus már egy évszázaddal ezelőtt felfigyelt arra, hogy az intenzíven növekvő ráksejtek a normálisnál jóval több cukrot (és mint később kiderült glutamint) fogyasztanak, amelyet meglepően alacsony oxigénigény kísér. Az ő kutatásai alapján nevezték el ezt a jelenséget Warburg hatásnak, ami gyakorlatilag egy aerob aerob körülmények között is intenzíven folyó glikolízisnek felel meg. Eredményei nyomán Nobel-díjat is kapott. Az elmúlt évtized kutatásai alapján elmondható, hogy ez a fajta anyagcsere nem csak a ráksejtekre, hanem általában az intenzíven növekvő szövetekre, vagy akár egysejtűekre is jellemző. A klasszikus, biokémia kurzusokan tanított anyagcsere leginkább nyugvó sejtekre jellemző. Ennek során egy glukózmolekulából oxigén felhasználásával a glikolízis és oxidatív foszforiláció során 36 ATP molekula jöhet létre, és az „elégetett" cukor széndioxid formájában távozik. Oxigén hiányában csak anaerob glikolízisre van lehetőség, ami 2 ATP molekulát képes produkálni, és például tejsav lesz a végtermék. Ezzel szemben az aerob glikolízis (Warburg effektus) során nagyjából 4 ATP keletkezik, valamennyi széndioxid és viszonylag sok tejsav mellett (12.7. ábra).



12.7. ábra A Warburg effektus. Intenzíven osztódó sejtek glukózmolekulánként csak kb. 4 ATP-t szintetizálnak aerob glikolízis révén (ezt a jelenséget hívjuk Warburg hatásnak), szemben a nyugvó sejtekre jellemző oxidatív foszforiláció során keletkező 36 ATP molekulával.

Első ránézésre ez talán ellentmondás lehet, hiszen úgy tűnik hogy az intenzíven osztódó és növekvő sejtek pazarolnak. Azonban érdemes tudni azt, hogy az egysejtűekre ez akkor jellemző, ha a környezetben jelen levő tápanyagok mennyisége nem limitáló tényező. Állatok esetén rendszerint a tápanyagok szintje viszonylag állandó a vérben. Itt a növekedési faktorok jelenléte dönti el, hogy milyen útvonalat fog követni az adott sejt. Ugyan energiát ez a fajta proliferatív anyagcsere kevesebbet termel, viszont jóval több biomasszát állít elő. Ez részben van mert a citromsav ciklusba bejutni nem képes köztes termék, a piruvát felhalmozódása miatt a glikolitikus intermedierek szintje is megnő. Ezek így elterelődnek olyan bioszintetikus útvonalak felé, mint például a nukleotid bioszintézis. A pontos metabolikus utak tárgyalása nem tartozik a kurzus anyagába, de érdemes megemlíteni, hogy a ráksejtek gyakran hordoznak olyan mutációkat, amelyek közrejátszanak az anyagcsere átprogramozásában, és a metabolitok bioszintetikus utak felé terelésében. Van olyan elmélet, amely szerint az autofágia az intenzíven növekvő ráksejtek megfelelő energiaszintjének fenntartásához szükséges.

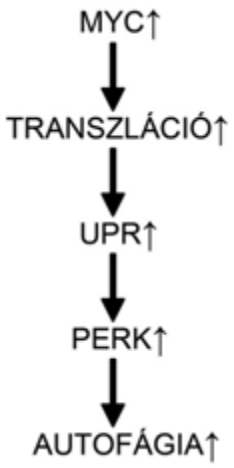
Onkogén és non-onkogén addikciós útvonalak

Rengeteg akadémiai és gyógyszeripari kutatás arra irányul hogy a ráksejtekben hiperaktív jelátviteli utak gátlásával hatékony gyógyszert állítsanak elő. Ez azon a megfigyelésen alapul, hogy az aktiválódott onkogén gátlása a tumor regressziójához vezet, mert a sejt csak az aktív onkogén jelenlétében mutatja a rákra jellemző tulajdonságokat, mint hiperproliferáció vagy apoptózis rezisztencia. Ez az onkogén addikció jelensége. Ilyen gátlószereket jellemzően meghatározott aktív centrummal rendelkező enzimek ellen lehet viszonylag könnyen létrehozni. Az eddigi próbálkozások alapján a más fehérjéket kötő jelátvivők (mint például a kis GTP-áz Ras) vagy transzkripciós faktorok (ilyen a Myc, a ráksejtekben leggyakrabban deregulációra kerülő celluláris onkogén) ellen jóval nehezebb potenciális hatóanyagot fejleszteni. Egy viszonylag új megközelítés szerint az onkogének hatására jellemzően megváltozó anyagcsere is egyfajta függőséghez vezethet. Ez azt jelenti, hogy egy adott folyamat elengedhetetlenné válik az ilyen ráksejtek számára, holott normál szövetben nélkülözhető. Tehát ha ezt a folyamatot specifikus hatóanyaggal gátolni tudjuk, akkor a ráksejtek az aktív onkogén jelenlétében sem tudnak osztódni vagy túlélni.

Egér és muslica kísérletek alapján is azt tapasztalták hogy a Myc overexpressziója a drasztikusan megnövekvő transzlációs aktivitás következtében nem megfelelő térszerkezetű fehérjék felhalmozódásához vezet (unfolded

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

protein response). Ez aktiválja a PERK nevezetű kinázt, aminek eredményeképpen megnő az autofágia szintje. Autofágia hiányában a Myc overexpresszió hatására bekövetkező intenzív sejtnövekedés és tumor progresszió gátolt (Hart és mtsai, 2012; Nagy és mtsai, 2013) (12.8. ábra).

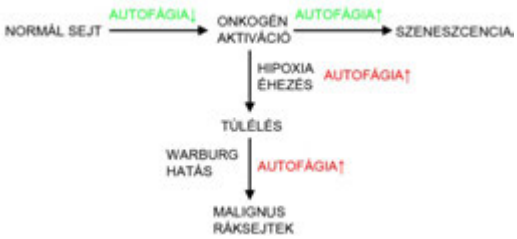


12.8. ábra Az autofágia szerepe onkogén Myc-indukálta tumorigenezisben. A transzkripciós faktor Myc overexpressziója olyan mértékben megnöveli a transzláció mértékét, hogy nem megfelelő térszerkezetű fehérjék felhalmozódnak (UPR, unfolded protein response). Ennek következtében aktiválódik a PERK kináz, ami autofágiát indukálva feltehetően hozzájárul a Myc okozta stressz kivédéséhez. PERK vagy autofágia hiányában a Myc overexpresszió nem képes sejtnövekedést és proliferációt indukálni egér és muslica modellekben. Nagy Péter ábrája.

Következésképpen, az autofágia egy potenciális non-onkogén addikciós útvonal lehet. Ezzel összhangban vannak azok a megfigyelések, hogy a klorokvin kezelés képes bizonyos tumorok regresszióját kiváltani egér modellekben. Amint azt már említettük, a klorokvin egy lizoszómális pH-t neutralizáló szer, eredetileg a malária kezelésére engedélyezte használatát az FDA (Federal Drug Agency, az amerikai gyógyszerfelügyeleti hatóság). A malária parazita ugyanis egy speciális, savas vakuólum segítségével szabadul meg a felesleges anyagcseretermékektől, és a klorokvin képes volt a fertőzést gyógyítani. Sajnos a nyakló nélküli klorokvin használat rezisztens malária változatok elterjedéséhez vezetett. Így erre a betegségre ma már nem használható,. Jelenleg viszont újabban klinikai kísérletekben alkalmazzák rákbetegeknél egyéb kezelések kiegészítésére. Természetesen a klorokvin nem szelektív az autofágiára nézve, és számos mellékhatása lehet. A gőzerővel zajló specifikus autofágia gátlószerek (mint például Atg7-et gátló drog) kifejlesztése a jelenlegieknél sokkal hatékonyabb szerek alkalmazását is remélhetőleg lehetővé teszi majd (Cheong és mtsai, 2012).

Az autofágia pro-tumor és tumor szuppresszor hatásai

A fentiek tükrében jól látszik, hogy az autofágia szerepét a rák során nem lehet egyértelműen meghatározni. Az autofág aktivitás csökkenése elősegítheti a primer tumor kialakulását, tehát tumor szuppresszor folyamatnak tekinthető. Arra is vannak adatok, hogy az onkogén aktiváció által kiváltott szeneszcencia, azaz sejtes öregedés során is fontos szerepet játszik. Ugyanakkor az autofágia szükséges lehet a ráksejtek túléléséhez, és a megváltozott metabolizmus, vagy elégtelen keringés miatt fellépő tápanyaghiányos állapotban (12.9. ábra).



12.9. ábra Az autofágia kettős szerepe a tumorigenezis során. Az autofágia a primer tumor kialakulása ellen hat (az ábrán zöld felirattal kiemelve) feltehetően a mutációs ráta csökkentése révén, valamint onkogén aktivációt

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

követően a sejtes öregedés serkentésével. Azonban már kialakult tumorsejtek túlélését facilitálja a szolid tumorra jellemző hipoxiás és tápanyaghiányos állapotok során. Elképzelhető, hogy a ráksejtek megváltozott anyagcseréje (Warburg effektus) is igényli az autofág úton keletkező, újra felhasználható bomlástermékeket.

Ez támadáspontot nyújthat megfelelő terápiás eljárások kifejlesztéséhez. Nehéz tehát egyértelműen állást foglalni az autofágia káros vagy hasznos voltát firtató kérdésben. Az egészséges ember esetén talán jobb ha normális vagy kicsit emelkedett az autofág aktivitás, míg egy már rákos beteg kezelésében hatékonynak gyógymódnak bizonyulhat az autofágia gátlása.

Ellenőrző kérdések

1. Milyen viszonyban áll egymással rendszerint az autofágia és a sejtnövekedés?
2. Milyen kapcsolat van az autofágia gátlás és az antioxidáns válasz között?
3. Hogyan segítheti elő az autofágia a ráksejtek túlélését?
4. Mi az a Warburg hatás?
5. Miben külnbözik az onkogén addikció a non-onkogén addikciótól?
6. Milyen tumor szuppresszor és tumor promoter hatásai vannak az autofágiának?

Irodalom

Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S. és Stork, B. (2012). The incredible ULKs. *Cell Commun Signal***10**, 7.

Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T. és Thompson, C. B. (2012). Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat. Biotechnol.* **30**, 671-678.

Hart, L. S., Cunningham, J. T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S. L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M. és mtsai (2012). ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of clinical investigation* **122**, 4621-4634.

Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M. és mtsai (2011). Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **193**, 275-284.

Nagy, P., Varga, A., Pircs, K., Hegedus, K. és Juhasz, G. (2013). Myc-driven overgrowth requires unfolded protein response-mediated induction of autophagy and antioxidant responses in Drosophila. *PLOS Genetics* **in press**.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K. és Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.***25**, 795-800.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature Rev Cancer***12**, 401-410.

13. Az autofágia szerepe az idegsejtek pusztulásával járó betegségekben

A neurodegeneratív betegségek meghatározása

A központi idegrendszert sújtó, az idegsejteknek a fiziológiás mértéket jóval meghaladó intenzív, regionális és többnyire szelektív pusztulásával járó kórképeket a neurodegeneratív betegségek gyűjtőnévvel illetjük. Klinikai

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

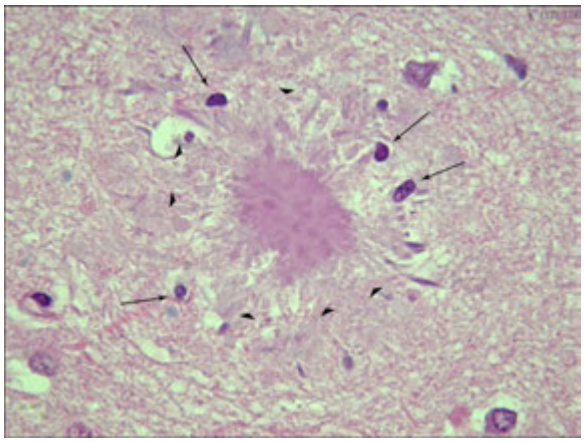
és neuropatológiai szempontból igen heterogén, sőt, sok esetben kevert tüneteket mutató betegség-csoportról van szó.

A neurodegeneratív rendellenességek legismertebb és leggyakrabban előforduló típusai az Alzheimer-, a Parkinson- és a Huntington-kór, az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) és a prion betegségek.

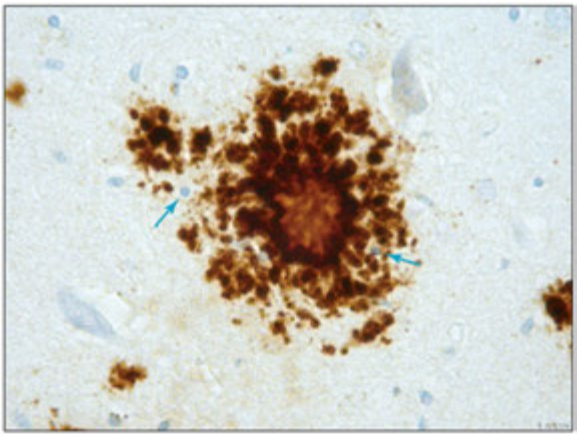
A közös jellemző: patogén konformációjú fehérje formák megjelenése

Molekuláris sejtpatológiai szinten valamennyi kórkép hátterében az áll, hogy a sejtek egy vagy több, egyébként fiziológiás funkciójú fehérjéjének megváltozik a natív konformációja, és e változás következményeként intra- vagy extracelluláris aggregációra fokozottan hajlamos, részlegesen vagy teljesen proteáz rezisztens, patológiás hatású peptidek halmozódnak fel (**konformációs betegségek**). A definitív diagnózis legbiztosabb eszköze még ma is a páciensek agyából származó (poszt-mortem) metszeteken az aggregátumok legfőbb fehérje komponenseinek, illetve azok szöveti és sejtes eloszlási mintázatának immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása.

Az Alzheimer-kórban (AK) az amiloid prekurzor fehérje (amyloid precursor protein, APP) egyik, kóros hasítási terméke, az **amiloid-beta** ($A\beta_{\square\square 42}$) igen nagy és jellegzetes filamentáris szerkezetű aggregátumokat (plakkokat) formál az extracelluláris térben[1] (13.1. és 13.2. ábra).



13.1. ábra Filamentáris szerkezetű amiloid plakk Alzheimer-kóros páciens agyszövetében (hematoxilin-eozin festés). A felvétel közepén jól látható a sugaras elrendeződésű filamentumokból álló extracelluláris amiloid lerakódás, melynek központi része tömör, perifériája lazább szerkezetű (nyílhegyek). A plakkot sötétlila sejtmagvú mikroglia sejtek veszik körük (nyilak).

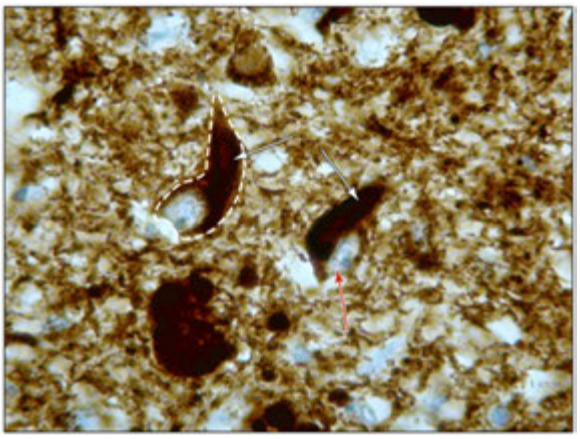


[1] Az APP egy másik hasítási terméke az $A\beta_{1\text{-}40}$ is képez extracelluláris aggregátumokat. Ezek az úgynevezett szenilis plakkok, amelyeknek a száma az öregedéssel párhuzamosan általában gyarapszik, de jelenlétük nem párosul patológiás tünetekkel.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

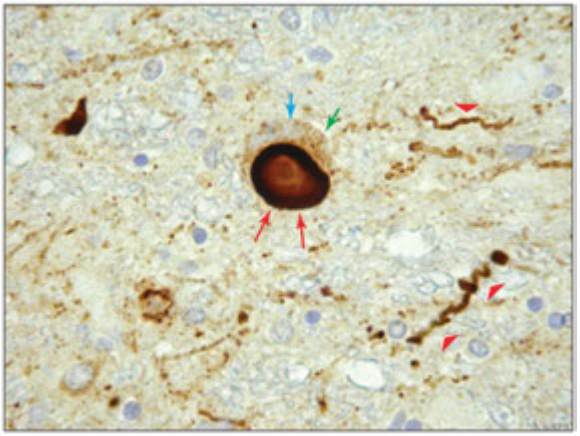
13.2. ábra Amiloid-beta immunhisztokémiai kimutatása Alzheimer-kóros beteg agyszövet mintájában. Az immunhisztokémiai jelölés egyértelműen bizonyítja, hogy az amiloid-plakk legfőbb fehérje-komponense az Aβ□ Az extracelluláris plakk sugaras felépítésű, a perifériáján lazább szerkezetű, a beta-amiloid kötegek közé beékelődve néhány apró glia sejtmag is azonosítható (világoskék nyilak). (DAB előhívás, hemalaun magfestés.)

Az AK másik, a betegség súlyosságával rendkívül jól korreláló szövetpatológiai bélyege a mikrotubulus asszociált fehérjék (MAP) csoportjába tartozó **tau** fehérjéből álló intracelluláris neurofibrilláris kötegek (neurofibrillary tangle, NFT) megjelenése és regionális expanziója (13.3. ábra).



13.3. ábra Tau fehérje immunhisztokémiai kimutatása Alzheimer-kóros beteg agymintájában. Az immunpozitivitást barna csapadék jelzi, ami kiemeli a felvétel közepén látható két idegsejtet (fehér nyilak). A bal oldali sejtet szaggatott fehér vonallal körülrajzoltuk, citoplazmájában a tau tartalmú neurofibrilláris köteg gyertyaláng alakú. A jobb oldali neuron sejtmagjára piros nyíl mutat. (DAB előhívás, hemalaun magfestés.)

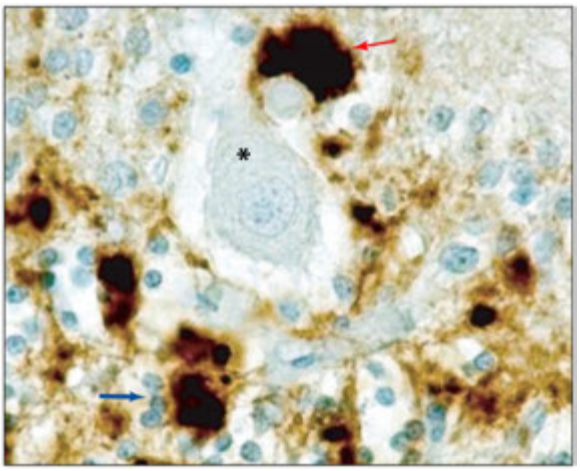
A Parkinson-kór (PK) legjellegzetesebb neuropatológiai bélyegei az úgynevezett Lewy-testek és a Lewy-neuritek. Immunhisztokémiai jelölés alapján egyértelmű, hogy mindkét intraneuronális aggregátum fő komponense az **α-szinuklein** (13.4. ábra).



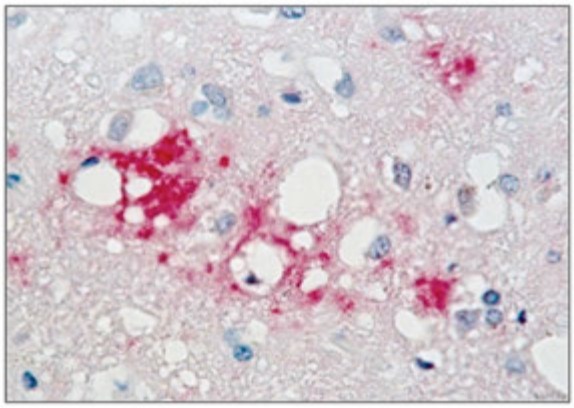
13.4. ábra Lewy-test és Lewy-neurit Parkinson-kóros beteg középagyának *substantia nigra* magjában. A felvétel közepén jellegzetes (világosbarna központú és sötétbarna szélű) αszinuklein pozitív intracelluláris aggregátum (Lewy-test) látható (piros nyilak), mellette jobbra két megvastagodott, szintén immunpozitív Lewy-neurit (piros nyílhegyek). A Lewy-testet tartalmazó sejt magjára világoskék, a citoplazmában felhalmozódó melanin pigment szemcsékre zöld nyíl mutat. (α-szinuklein immunhisztokémiai kimutatás, DAB előhívás, hematoxilin magfestés.)

A prion betegségeknél a kóros **prion protein** (PrP^{P}: patogén prion protein, PrP^{Sc}: scrapie prion protein) extra- és intracelluláris felhalmozódást is mutat. Az extracelluláris lokalizáció típusa is kétféle: lehet úgynevezett plakk-szerű (13.5. ábra) vagy perivakuoláris (13.6. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.5. ábra Kóros prionfehérje immunhisztokémiai kimutatása Creutzfeldt-Jakob beteg (CJB[2]) kisagykérgében. Nagyméretű, plakk-szerű, extracelluláris fehérje lerakódások (piros nyíl) egy Purkinje sejt (csillag) közelében és a szemcsesejtek (kék nyíl) között. (DAB előhívás, hemalaun magfestés.)

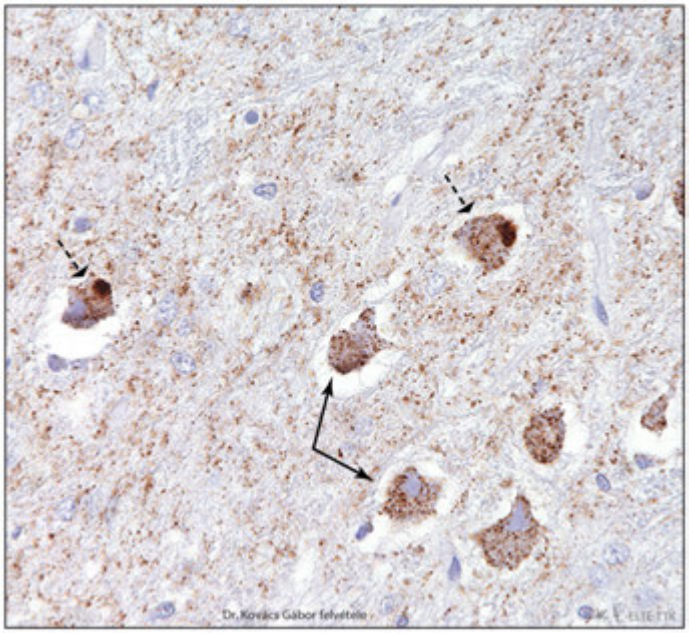


13.6. ábra Kóros prion fehérje perivakuoláris felhalmozódása Creutzfeldt-Jakob beteg agyának parietális kérgében. A fénymikroszkópos felvételen jól láthatók a prion betegség jellegzetes neuropatológiai bélyegei, az úgynevezett szivacsos léziók és a körülöttük, közöttük felhalmozódó prion fehérje lerakódások (piros csapadék). (PrP immunhisztokémiai kimutatás, FAST-red előhívás, hemalaun magfestés.)

A PrP^{Sc} intracelluláris felhalmozódása szemcsés jellegű (13.7. ábra), ami arra utal, hogy a kóros prion fehérje a citoplazmában membránnal határolt struktúrákban akkumulálódik.

[2] CJB = Creutzfeldt-Jakob betegség, a leggyakoribb humán prion betegség, amelynek családi halmozódású, örökletes formája (az összes CJB eset 10-15 %-a) és ún. sporadikus formája (az összes CJB eset 85-90 %-a) is ismert. A genetikai eredetű CJB hátterében a prion fehérje génjének, a PRNP-nek a mutációja áll.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

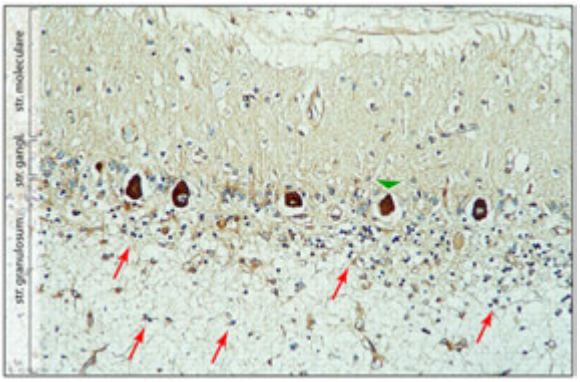


13.7. ábra A prion fehérje patológiás konformációjú izomerjének intraneuronális felhalmozódása. Genetikai (E200K mutáns) CJB páciens idegsejtjeiben kisebb, szemcsés (nyíl) és nagyobb, granuláris (szaggatott nyíl) jellegű prion fehérje felhalmozódások figyelhetők meg az immunhisztokémiai kimutatást követően. (PrP immunhisztokémiai kimutatása, DAB előhívás, hemalaun magfestés.)

A fehérje homeosztázis fenntartásának eszközei

Az eukarióta sejtekben a kiegyensúlyozott fehérje háztartás (protein homeosztázis vagy proteosztázis) biztosítása alapvető a sejt normális, fiziológiás működése szempontjából. Miután a (fehérje) konformációs neurodegeneratív betegségekben valamilyen külső (pl. prion-fertőzés) vagy belső (pl. mutáns fehérje expresszió) ok miatt éppen ez az egyensúly borul fel, s az aggregációra hajlamos (úgynevezett amiloidogén) fehérjék termelődése kerül túlsúlyba, nem meglepő, hogy aktiválódnak a fehérje háztartást karbantartó intracelluláris stresszválasz mechanizmusok.

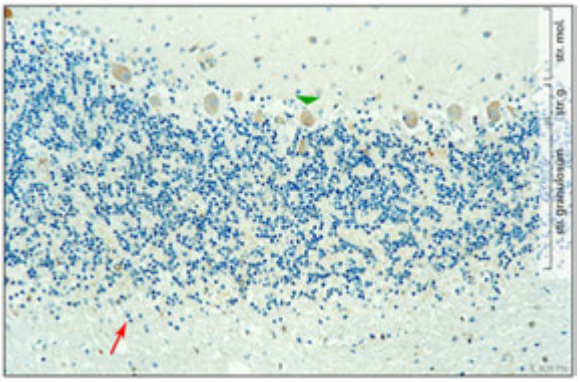
Amint erről már korábban is volt szó, a fehérjék térszerkezetét megváltoztató stresszel szemben az első védvonalat a **dajkafehérjék** (molekuláris chaperonok) hálózata képezi (19. fejezet). A dajkafehérjék – a transzlációhoz kapcsolódva – alapvető szerepet játszanak a frissen szintetizált fehérjék natív szerkezetének kialakításában. A fehérjék konformációjának megváltozását előidéző stresszhatások az **indukálható** dajkafehérjék (pl. Hsp72) expressziójának nagymértékű fokozódását váltják ki. Azok a sejttípusok, amelyek képesek arra, hogy a krónikus stresszre folyamatosan magas szinten expresszálják a dajkafehérjéket és a citoplazmájukban fel is halmozzák azokat (pl. a kisagyi Purkinje-sejtek), kiemelten védettek a sejtkárosító hatásokkal szemben, míg az erre képtelen sejtek (pl. kisagyi szemcsesejtek) tömegesen pusztulnak (13.8. és 13.9. ábra).



13.8. ábra Hsp72 immunhisztokémiai lokalizációja CJB páciens kisagykérgében. A *str. ganglionare* (str. gangl.) rétegében szembetűnőek a hatalmas méretű, még a végstádiumban is jelentős mennyiségű Hsp72-t expresszáló

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

(barna) Purkinje-sejtjek (az egyikre zöld nyílhegy mutat). Alattuk, a *str. granulosum*ban alig maradtak szemcsesejtek (a piros nyilak szemcsesejt magokat mutatnak). (DAB előhívás, hemalaun magfestés.)



13.9. ábra Hsp72 immunhisztokémiai lokalizációja a fenti Creutzfeld-Jakob beteggel közelítőleg azonos életkorú, nem demens személy kisagykérgében. A *str. ganglionare* (str. g.) Purkinje-sejtjei halványbarnák (az egyikre zöld nyílhegy mutat). A *str. granulosum*ban rengeteg szemcsesejt azonosítható (apró, kék sejtmagok, kettőre piros nyíl mutat).

A dajkafehérjék általában **chaperon-komplexek** formájában végzik a fehérjék (kliensek) térszerkezetének alakítgatását (folding-refolding). Ezen komplexek működésében a dajkafehérjéken kívül többnyire „társult", segítő molekulák, úgynevezett co-chaperonok is részt vesznek.

A fehérje homeosztázis fenntartásában és a proteinek intracelluláris lebontásában két nagy rendszernek kiemelkedő szerepe van. Ezek az **ubiquitin-proteaszóma** és az **endoszóma-lizoszóma rendszer** (UPR és ELR).

Az UPR és az ELR, valamint az autofágia strukturális és molekuláris komponenseit a tankönyv több fejezete is részletesen tárgyalja. Ennek a fejezetnek az a célja, hogy a neurodegeneratív betegségek molekuláris sejtpatológia folyamatainak bemutatása kapcsán felhívja a figyelmet arra, hogy milyen **finoman hangolt kapcsolat és munkamegosztás van a kóros fehérje stresszre adott citoprotektív válasz mechanizmusok között, a dajkafehérjéktől – az UPR-en és az autofágián át – egészen az aktív sejthalálig.**

A két sejten belüli degradációs rendszerről (UPR, ELR) és az autofágiáról tudjuk, hogy megfelelő működésük meghatározza a fehérjék életidejét és a szintézissel együtt biztosítja azok körforgalmát (turnover). Az **UPR** alapvetően a citoszólikus, általában rövid féléletidejű, valamint a stresszhatások (pl. oxidatív stressz) által károsított, de oldható fehérjék lebontását végzi. Az **ELR** ennek kiegészítéseként a hosszú életidejű (általában szerkezeti) fehérjék, valamint a sejtorganellumok lebontását végzi. Korábban úgy gondolták, hogy ezek a struktúrák a nem szelektív makroautofágia révén kerülnek lizoszómális lebontásra. Ma már tudjuk, hogy az autofágia folyamata szelektív is lehet (l. 11. fejezet).

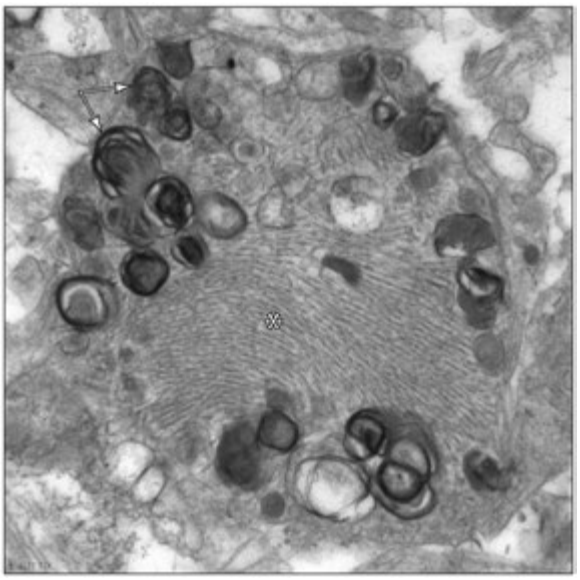
Az ELR-be kétféle úton kerülhetnek be a sejt saját fehérjéi vagy fehérje tartalmú komponensei: 1) ubiquitin mediált receptor endocitózis és 2) az autofágia különböző formái, úgymint a) mikroautofágia, b) chaperon-mediált autofágia és c) makroautofágia révén (l. 10 fejezet).

A krónikus neurodegeneratív betegségek során folyamatosan termelődő, kóros konformációjú, aggregációra hajlamos és többé-kevésbé proteáz rezisztens fehérjék alaposan próbára teszik, sőt, az idő (életkor) előre haladásával, illetve a betegség progressziójával ki is merítik a fenti degradációs rendszerek kapacitását. (Ne feledjük, hogy a neuronok hosszú élettartamú sejtek, egész életünk során végigkísérnek minket.) Ugyanilyen probléma lehet, ha valamilyen oknál fogva (pl. valamelyik molekuláris komponens mutációja következtében) ezek a rendszerek eleve csökkentett „üzemmódban" működnek. A parkin gén mutációja pl. familiáris (öröklődő) PK kialakulásához vezet azért, mert a **hibás parkin** fehérje nem tudja megfelelően ellátni az ubiquitin-ligáz funkcióját (l. Parkinson-kór patogenezise).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

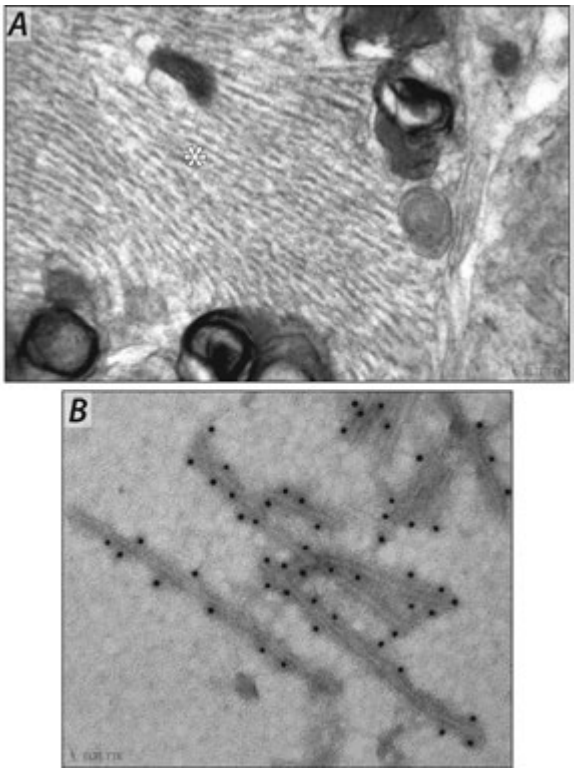
A citoprotektív mechanizmusok egymásra épülése

Az intracelluláris citoprotektív stresszválasz mechanizmusok egymásra épülésének szép példáját figyelhetjük meg az **Alzheimer-kór** esetében. A mikrotubuláris rendszer dinamikus stabilitását és átrendeződését biztosító egyik mikrotubulus asszociált fehérje a **tau**. Feladatának betöltése közben dinamikus foszforilációja és defoszforilációja meghatározza azt, hogy mikor kapcsolódjon a sejtvázhoz, s mikor váljon le arról. A fiziológiásnál nagyobb mértékű, úgynevezett hiperfoszforilációja azonban olyan konformáció változáshoz vezet, aminek következtében megindul a fehérje aggregációja. A kezdetben még oldható oligomerek egyre rendezettebb filamentáris (páros helikális filament, PHF) majd fibrilláris struktúrákká (neurofibrilláris kötegek, NFT) szerveződnek (13.10. és 13.11. ábra), miközben proteáz rezisztenciájuk fokozatosan nő.



13.10. ábra Neurofibrilláris köteg Alzheimer-kóros beteg agyszöveti metszetében. A felvétel degenerálódó axon keresztmetszetét mutatja, benne számtalan autofág vakuólummal (nyilak) és neurofibrilláris köteggé (NFT) szerveződött páros helikális filamentumokkal (csillag).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



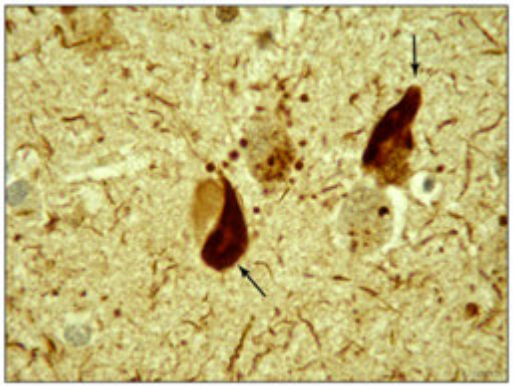
13.11. ábra Neurofibrilláris köteg (NFT) szöveti környezetben és páros helikális filamentumok izolálás után. A kötegekbe rendeződő páros helikális filamentumok (PHF) fotóján sejthető az egyedi filamentumok csavart, helikális szerkezete (A). Az NFT-ből izolált filamentumok nagyobb nagyítással, tau immun-arany jelölés után (B).

A **Hsp70/Hsp90** dajkafehérjékből és a CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein) co-chaperonból álló komplexek próbálják helyreállítani a hiperfoszforilált tau konformációját és elősegíteni a defoszforilációját. (A defoszforilált tau fehérje ismét hozzá tud kapcsolódni a mikrotubulushoz és stabilizálja annak hálózatát.) A permanensen termelődő, még oldható hiperfoszforilált tau fehérjéknek azonban csak egy kis részét sikerül a dajkafehérjéknek megfelelő konformációs állapotba hozni, így előtérbe kerül a **CHIP** ubiquitin-ligáz funkciója, melynek révén a hiperfoszforilált taut poli-ubiquitinilálja, azaz proteaszómális degradációra jelöli ki. Sajnos a hiperfoszforilált tau az ubiquitiniláció ellenére sem tökéletes szubsztrátja a proteaszómának, miután a „merev" konformációjával előbb-utóbb „eltömi" azt, s így nem csak a saját lebontását gátolja, hanem elzárja az utat a többi citoszólikus proteaszómális szubsztrát lebontása elől is. Ez tovább fokozza az intracelluláris fehérje stresszt.

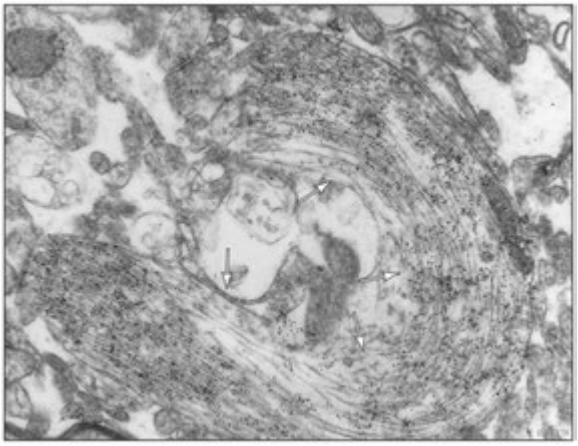
Mai ismereteink szerint a patológiás konformációjú, aggregációra hajlamos fehérjék **szolubilis oligomerek** formájában fejtik ki a legkárosabb hatásukat (nem kívánatos reakciókba lépnek más fehérjékkel, lipidekkel), így a sejt védelmi rendszerének mindenképpen törekednie kell ezen formák szegregációjára, s lehetőség szerint az eliminációjára is.

A patogén fehérjék szolubilis, citotoxikus oligomereinek nagyon rendezett és oldhatatlan **citoplazmatikus zárványok**ba történő szegregációja (izolációja) a következő olyan védekezési lehetőség, amelyben az ubiquitinilációnak és a dajkafehérjéknek is szerepe van. Az ubiquitinilált fehérje zárványok immunhisztokémiai kimutatásának szintén differenciál diagnosztikai jelentősége van. Az Alzheimer-kóros páciensekből származó agymintákban jól látható, hogy a neurofibrilláris kötegekbe szerveződő úgynevezett PHF-tau intenzíven ubiquitinilált (13.12. ábra és 13.13. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

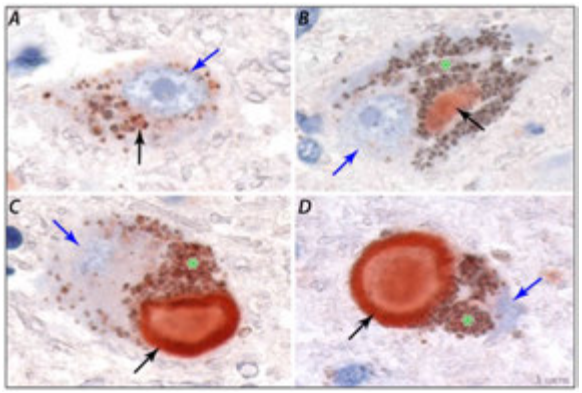


13.12. ábra Ubiquitin jelenlétének kimutatása Alzheimer-kóros beteg NFT-tau tartalmú idegsejtjeiben. Az immunpozitívitást jelző barna (DAB) csapadék kirajzolja az intraneuronális, gyertyaláng alakú neurofibrilláris kötegeket mindkét sejtben, ami azt bizonyítja, hogy az NFT-tau ubiquitinilált. (Ubiquitin immunhisztokémia, DAB előhívás.)



13.13. ábra PHF-tau-ból rendeződött neurofibrilláris köteg (NFT) ubiquitin immun-arany lokalizációja után. Az ubiquitin(ált fehérjék) jelenlétét jelző fekete aranyszemcsék kirajzolják a sarló alakban rendeződött tau filamentumokat (fehér nyilak).

A Parkinson-kór esetében is hasonló folyamat zajlik a középagy *substantia nigra* régiójában a nagy, melanopigment tartalmú, dopaminerg sejtek citoplazmájában. Az α-szinuklein, mint citoszólikus fehérje, természetes szubsztrátja lehet az UPR-nek (l. 2-5. fejezet) és a chaperon-mediálta autofágiának (13.15. és 13.16. ábra) is. A patológiás konformáció kialakulása azonban korlátozza az α-szinuklein ezen degradációs mechanizmusok révén történő lebontását, következményként az aggregációra hajlamos fehérjék hatalmas, aggreszóma-szerű, ubiquitin-pozitív zárványokba (Lewy-testek) tömörülnek (13.14. ábra).



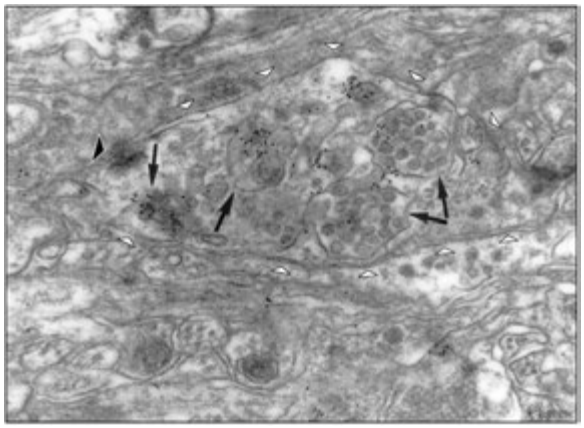
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

13.14. ábra Formálódó Lewy-test ubiquitin pozitivitásának kimutatása immunhisztokémiai módszerrel Parkinson-kóros beteg *substantia nigra* idegsejtjeiben. A Lewy-test immunpozitivitását piros szín jelzi (fekete nyíl). Mellette a citoplazmában melanopigment szemcsék (zöld csillag) és a sejtmag (kék nyíl) látható. Az A– B) képeken formálódó, a C–D képeken már kialakult Lewy-test látható. (Fast Red előhívás, hemalaun magfestés.)

Ubiquitin-pozitív fehérje-zárványok megfigyelhetők a Huntington-kóros páciensek idegsejtjeinek citoplazmájában, sőt, sejtmagvában is. Citoplazmatikus felhalmozódás az ALS esetében is detektálható.

Az endoszóma-lizoszóma rendszer és az autofágia

Az endoszóma-lizoszóma rendszernek és az autofágiának kettős szerepe van a neurodegeneratív betegségek patogenezisében. A kísérleti eredmények alapján több mint 20 éve vetődött fel az az elképzelés, miszerint a prion betegségek és az AK esetében a kóros konformációjú fehérje (PrP^{Sc}), illetve oligopeptid ($A\beta_{1-42}$) kialakulásában az ELR központi szerepet játszik. Ezt a későbbi kutatások a prion betegségek esetében teljes mértékben igazolták, az Alzheimer-kór kapcsán pedig egyre inkább megerősítik. Immun-arany elektronmikroszkópos módszerrel a prion fertőzött kísérleti állatok agyából készült szövettani mintákban jelentős mennyiségű kóros prion fehérjét lehet azonosítani az ELR-ben, különösen a multivezikuláris testekben (13.15. ábra). Azt is kimutatták, hogy az enyhén **savas pH** különösen kedvez a β-redőben gazdag, proteáz rezisztens PrP konformáció kialakulásának és az amiloid prekurzor fehérje (APP) amiloidogenikus hasításának, azaz az $A\beta_{1-42}$ képződésének is.



13.15. ábra Kóros prion fehérje ultrastrukturális lokalizációja prion-fertőzött egér agyszövetében. Az elektronmikroszkópos felvétel egy idegsejt nyúlványának keresztmetszetét mutatja (fehér nyilhegyek) számos multivezikuláris testtel (MVB, fekete nyilak), amelyekben a kóros prion fehérjét reprezentáló aranyszemcsék specifikus felhalmozódása látható (ICC).

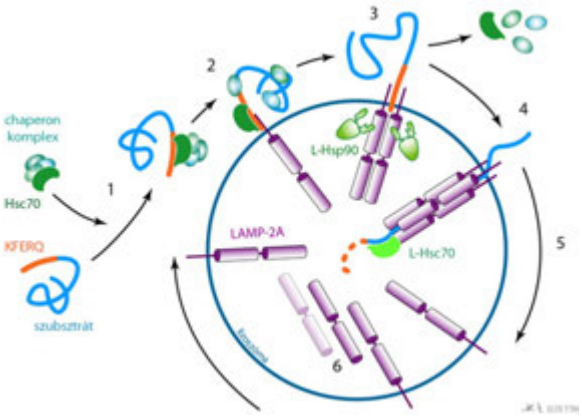
Jogos tehát az a felvetés, hogy ezeknél a betegségeknél az ELR finoman szabályozott szelektív gátlása szóba jöhet, mint terápiás lehetőség. Nem hagyható figyelmen kívül azonban az a tény, hogy az autofágiának és az ELR normális működésének **alapvetően citoprotektív szerepe** van, és az intracelluláris stresszválasz markáns résztvevői a neurodegeneratív betegségek esetében is.

Az autofágia szerepe

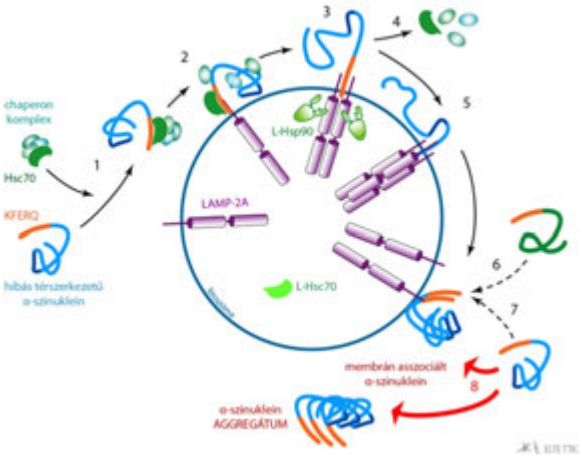
Az autofágia különböző formáiról, és azok molekuláris mechanizmusáról az előző fejezetekben már volt szó.

A **chaperon-mediált autofágia** (CMA), illetve annak rendellenes működése a szinukleinopátiák, így a Parkinson-kór sejtpatológiájának kialakulásában játszhat jelentős szerepet. Az α-szinuklein, mint egy olyan citoszólikus fehérje, amelyen hozzáférhető az a KFERQ aminosav motívum, amelyet a Hsp70 felismer, a CMA természetes szubsztrátja. Így a CMA minden bizonnyal részt vesz a natív (fiziológiás) konformációjú szinuklein lebontásában (13.16. ábra). Az aggregációra hajlamosító konformáció változás nem érinti a KFERQ motívumot, így a dajkafehérje komplex a kóros térszerkezetű fehérjét is odaszállítja a lizoszóma membránjához. Az α-szinuklein patológiás konformációja azonban gátolja a LAMP-2A membrán-transzlokációs funkcióját (13.17. ábra), s így az α-szinuklein a saját lebontása mellett más citoszólikus fehérjék lizoszómális degradációját is hátráltatja, tovább fokozva ezzel a fehérje felhalmozódásból adódó stresszt.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.16. ábra A chaperon-mediált autofágia folyamatának fő eseményei. A KFERQ szekvenciát hordozó citoplazmatikus fehérjéket Hsc70 tartalmú chaperon komplex ismeri fel (1), ami a proteint a lizoszóma membránjának LAMP-2A transzlokációt végző fehérjéjéhez irányítja (2). A LAMP-2A és a lizoszómális Hsp90 (L-Hsp90) közreműködésével a fehérje transzlokációja megkezdődik, miközben a citoplazmatikus chaperon komplex elemei leválnak róla (3). A transzlokáció során a fehérje megfelelő konformációjának fenntartását a lizoszómális Hsc70 (L-Hsc70) biztosítja (4). A bejutott proteint, valamint az életidejét betöltött LAMP-2A fehérjét a lizoszómális enzimek lebontják (5, 6).



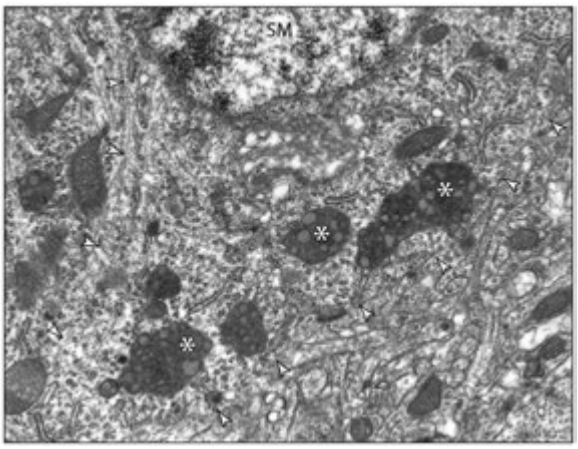
13.17. ábra A kóros konformációjú a-szinuklein gátolja a chaperon-mediált autofágiát. A hibás térszerkezetű α-szinuklein KFERQ szekvenciája révén felismerésre kerül (1) és hozzákapcsolódik (2) ugyan a lizoszóma felszíneihez (3), de „hajtogatási nehézségek" miatt nem képes átjutni a LAMP-2A fehérjék által formált transzlokációs póruson (5). Ezzel saját maga (7) és más fehérjék lebontását is akadályozza (6), illetve képződő oligomerjei kölcsönhatásba lépnek a lizoszómális membránnal is, ami annak károsodásához vezethet. Mivel a hibás térszerkezetű α-szinuklein lebontás híján a citoszólban egyre halmozódik, oligomerjei aggregátumokat képeznek (8).

KFERQ motívuma az APP-nek, a tau-nak és a Huntington-kórban szerepet játszó huntingtin fehérjének is van. Eddig azonban csak a tau esetében születtek olyan kísérleti eredmények, amelyek azt bizonyítják, hogy a fiziológiás tau természetes szubsztrátja lehet a chaperon-mediált autofágiának, és a hiperfoszforilációval járó konformáció változás – az α-szinukleinhez hasonlóan – akadályozza a CMA működését.

A **makroautofágia** jelenlétét és fiziológiás szerepét a bazális protein körforgalomban a neuronok esetében sokáig vitatták. Két japán kutatócsoport azonban egyértelműen kimutatta, hogy az autofágia szelektív gátlása az idegsejtek esetében ubiquitinilált fehérje gócok felhalmozódását idézi elő a citoplazmában. A kísérletben használt transzgénikus állatok neurodegeneratív rendellenességekre utaló tüneteket mutattak.

Az (auto)lizoszómális rendszer működésének fontosságára hívja fel a figyelmet az a tény is, hogy az öregedő szervezet központi idegrendszerének idegsejtjeiben egyre nagyobb tömegben halmozódnak fel az úgynevezett lipofuszcin granulumok, vagy más néven kopási pigmentek, amelyek tulajdonképpen az autolizoszómális degradáció lassulása és egyre kevésbé hatékony módja miatt fennmaradó reziduális testek (13.18. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



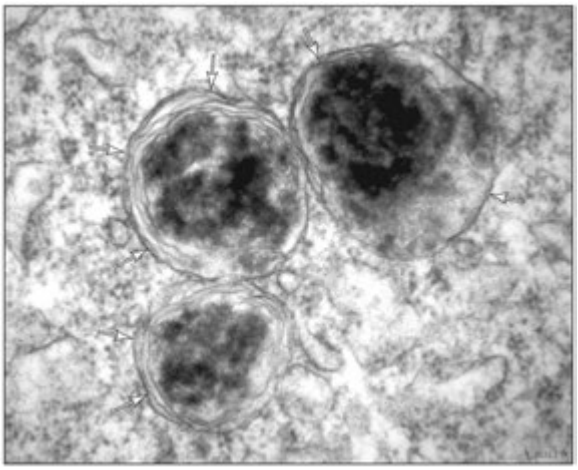
13.18. ábra Lipofuszcin granulumokkal teli neuron. A sejtmagot (SM) a kép tetején találjuk, a lipofuszcin granulumokat fehér csillag, a plazmamembránt fehér nyílfejek jelzik.

A szelektív makroautofágia

A krónikus neurodegeneratív betegségekben a hibás konformációjú fehérjék termelődése és felhalmozódása folyamatos. Amint azt a korábbi példáinkban bemutattuk, az érintett neuronok minden rendelkezésükre álló védelmi rendszert (dajkafehérjék, UPR, CMA) mozgósítanak az őket ért fokozódó fehérje stressz negatív hatásainak kiküszöbölése és a kóros fehérjék eliminálása vagy legalább szegregálása érdekében. Ezek a mechanizmusok azonban egyrészt jellegükből adódóan nem alkalmasak nagyobb tömegű hibásan feltekeredett és aggregálódó fehérje szubsztrát feldolgozására, másrészt a hozzájuk kötődő kóros fehérjék által „telítődnek" és funkcionálisan is károsodnak (13.17. ábra). Újabb véderő mozgósítására és bevetésére van tehát szükség és ez a citoplazma nagyobb részleteit szegregálni és degradálni képes makroautofágia. Az utóbbi évek vizsgálatai derítettek fényt arra, hogy ennek a lizoszómális lebontási rendszernek a korábbi „hiedelmekkel" ellentétben bizonyos körülmények között és egyes sejttípusokban van szubsztrát specifikus, azaz szelektív formája is (l. 11. fejezet).

Proteinofágia vagy aggrefágia

A konformációs neurodegeneratív betegségek esetében különös jelentősége van a hibás szerkezetű, aggregálódó fehérjék specifikus felismerésének, megjelölésének, szelektív szegregációjának és lebontásának (13.19. ábra).



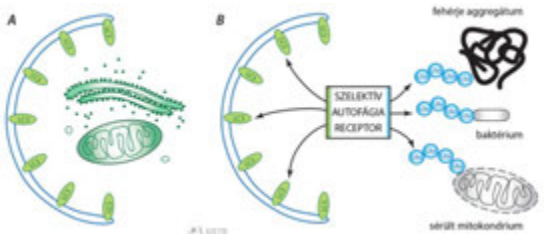
13.19. ábra Autofág vakuólumokba szegregált fehérje aggregátumok α-szinukleint túltermelő SH-SY5Y idegsejtekben. A tömör aggregátumokat membránok határolják (fehér nyilak).

A lebontandó fehérjék felismerése és megjelölése ebben az esetben is ubiquitinilációval történik. Az ubiquitinilált, kisebb-nagyobb fehérje aggregátumok autofág szegregációjához olyan közvetítő molekulákra van szükség, amelyek egyrészt poli-ubiquitin láncon keresztül kapcsolatba tudnak lépni a szekvesztrálandó fehérjékkel, másrészt a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

formálódó autofág izoláló membránnal is. Ilyen citoszólikus adapter fehérjék vagy más néven „autofág-receptorok” például a p62 (sequestosome-1) és az NBR1 (neighbour of BRCA1), amelyeknek funkcionális doménjei: az ubiquitin lánc kötéséért felelős UBA (ubiquitin assiciated), az autofág izoláló membrán LC3 komponensét felismerő LIR (LC3 interacting region) és végül a p62 molekulák egymáshoz kapcsolódásáért is felelős PB1 (N-terminal Phox and Bem1p) regió (13.20. és 13.21. ábra).

13.20. ábra A szelektív (makro)autofágia receptor (adapter) fehérjéi és azok funkcionális doménjei (Rövidítések: PB1: N-terminal Phox and Bem1p; ZNF: zinc-finger domain; LIR: LC3: interacting region; HDAC: histon deacetylase; UBA: ubiquitin associated domain; BUZ: ubiquitin-binding zinc finger; CC: coiled coil domain; RING: C-terminal RING[3] zink finger; BEACH, BEACH domain; BH3: Bcl-2 homology 3 domain; Dysf: Dysferlin domain; FYVE: Fab1,YOTB/ZK632.12, Vac1, and EEA1 domain; PH: Pleckstrin homology domain; TM: transmembrane domain; WD40: WD40 repeats; WW: WW domain.)



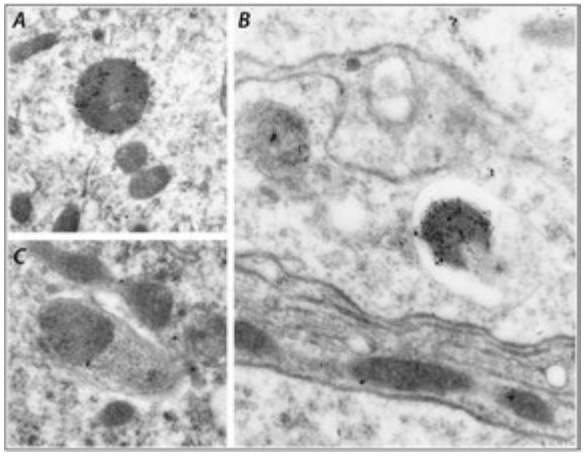
13.21. ábra A nem szelektív és a szelektív autofágia összehasonlítása. A) A nem szelektív autofágia során a citoplazma egyes komponensei előzetes megjelölés nélkül, véletlenszerűen határolódnak el a környező citoplazmától és kerülnek be egy-egy dupla izoláló membrán által körbezárt térbe. B) A szelektív autofágia során viszont ubiquitin lánccal megjelölt fehérjék, mikrobiális kórokozók és sérült mitokondriumok célzott bekebelezése történik, amely során az ubivitinált célpontok és az izoláló membrán LC3 komponensei között adapter fehérjék, „autofág-receptorok” teremtenek kapcsolatot.

Elvileg tehát az aggregációra hajlamos és (poli-)ubiquitinilált fehérjék szelektív autofágiájának (proteinofágia) és lizoszómális degradációjának a lehetősége adott a citoszólban hozzáférhető fehérjék esetében (13.22. ábra). Ugyanakkor a nagyméretű aggreszómákat[4] (pl. Lewy-test) sem szegregálni, sem lebontani nem lehet autofágia révén. Ennek bizonyítéka, hogy az intenzíven ubiquitinilált Lewy-testek a dopaminerg neuronok pusztulása után „érintetlen formában” láthatók a sejtközötti térben (13.23. ábra).

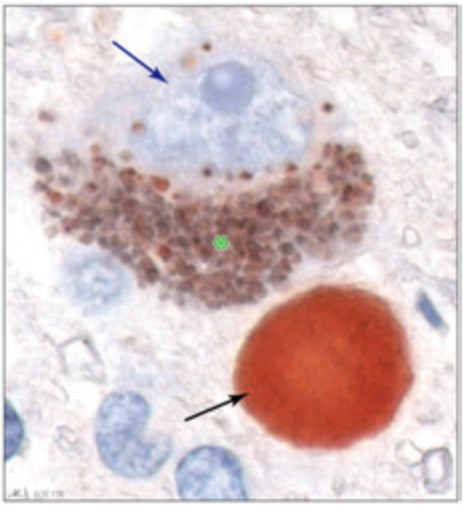
[3] RING: really interesting new gene

[4] Az aggreszóma egy olyan, nagy citoplazmatikus fehérje aggregátum, amely hibás konformációjú, többnyire poli-ubiquitinilált, már oldhatatlan fehérjéket tartalmaz. Jellegzetes helye a sejtközpont környezete, mivel e fehérjék összegyűjtését a mikrotubulus rendszer végzi. Képzésében az intermedier filamentum hálózat is részt vesz (l. vimentin).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.22. ábra Ubiquitinilált fehérjék immuncitokémiai kimutatása proteinofágiában. Ubiquitin immun-arany jelöléssel (kisebb aranyszemcsék) pozitív fehérje aggregátum a citoplazmában (A) és attól izolálva, membránnal körülvett térben (B, C).



13.23. ábra Extracelluláris Lewy-test. A neuron által lebontani nem tudott fehérje aggregátum (fekete nyíl) a sejt halála után a sejtközötti térben marad. Szomszédságában egy nagyméretű dopaminerg neuron látható ép sejtmaggal (kék nyíl) és nagymennyiségű melanopigmenttel (zöld csillag).

A szelektív proteinofágia jelentősége inkább abban áll, hogy a citotoxikus, kisebb méretű, de az UPR és a CMA számára már feldolgozhatatlan pre-aggregátumokat szegregálja és a lizoszómális enzimek révén megpróbálja lebontani. Erre látunk példát az a-szinukleint fokozottan expresszáló humán eredetű SH-SY5Y (dopaminerg) neuronokban, ahol az ubiquitinilált szinuklein aggregátumokat autofág izoláló membrán határolja.

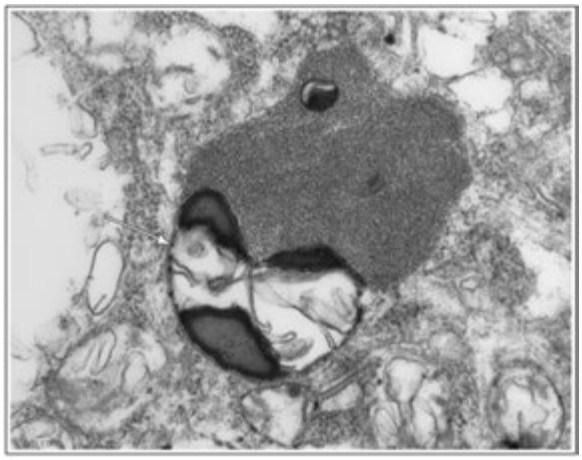
Mitofágia

A makroautofágiának a számtalan, korábban már ismertetett élettani funkciója mellett (l. 10. fejezet), alapvető szerepe van a sejteket ért károsító (stressz) hatások kivédésében (mérséklésében), a túlélés biztosításában, azaz a citoprotekcióban. Különösen „életbevágó” az autofágia megfelelő szintű és folyamatos működése az olyan végdifferenciált sejttípusokban, mint az idegsejtek, amelyek többségének élethossza megegyezik az egyed élethosszával. Selye János óta tudjuk, hogy az élet együtt jár a folyamatos stresszel, s ez az idegsejtek szintjén is igaz. Az „életfogytig” tartó stressz kifinomult, specifikus és lehetőleg szelektív intracelluláris stresszválaszokat igényel. Amint azt a 18. fejezetben bemutatjuk, az eukarióta sejtek számára az egyik legnagyobb veszélyforrást a saját **sérült mitokondrium**aik jelentik, miután azok citoplazmába áramló egyes molekulái a programozott sejthalál belső (intrinsic) útvonalának központi szereplői.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

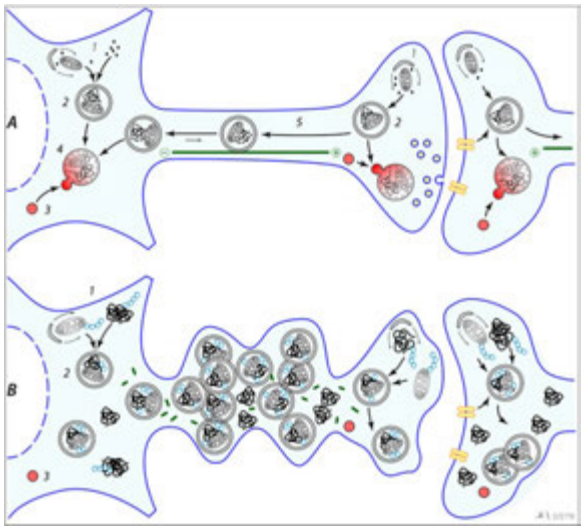
A hosszú nyúlványokkal rendelkező, rendkívül polarizált idegsejtekben a mitokondriumok egy igen hatékony elektron- és energia transzportot biztosító dinamikus **hálózat**ba szerveződnek (18. fejezet), amely egyben védettséget is jelent számukra. A különböző külső és belső (itt nem részletezendő) membránkárosító hatásokra elsősorban e hálózatról lefűződő, kicsi (a legnagyobb felszín/térfogat aránnyal rendelkező) egyedi mitokondriumok a legérzékenyebbek (l. 18. fejezet). A sérült mitokondriumok szelektív izolálása és lebontása tehát a sejt további fiziológiás működése szempontjából nélkülözhetetlen.

Sejtorganellumok szegregálása és lizoszómális lebontása csak makroautofágia útján történhet. Az elmúlt évek kutatási eredményei hívták fel a figyelmet arra, hogy ez a folyamat a sérült mitokondriumok esetében valóban szelektív lehet (l. 11. fejezet). Az idegsejtekben a mitokondrium hálózatról lefűződött, elöregedett, megváltozott membránpotenciálú mitokondriumok szelektív mitofágiája a sejt egyedi élete során minden bizonnyal folyamatosan zajlik. Erre utal az a megfigyelés is, hogy az öregedő idegsejtekben az egyre lassuló lebontás miatt felszaporodó, autolizoszómális eredetű lipofuszcin granulumok (kopási pigmentek) beltartalma valószínűleg degradálódó mitokondriumokból származik (13.24. ábra).



13.24. ábra Degenerálódó, de még felismerhető mitokondrium (fehér nyíl) egy membránnal határolt lipofuszcin granulumban.

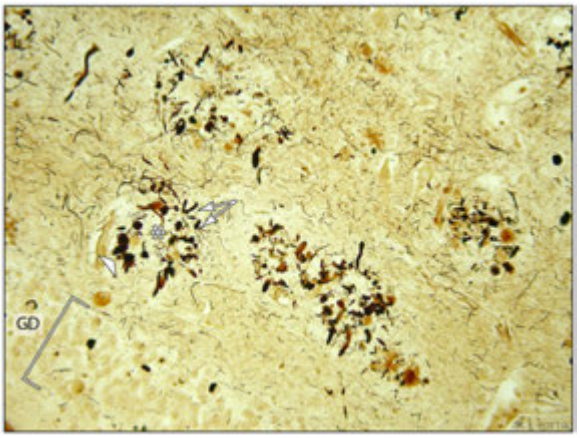
A neurodegeneratív betegségek általános jellemzője („köszönhetően” elsősorban a fokozódó oxidatív stressznek és a Ca^{2+} toxicitásnak), hogy tömegessé válik a mitokondriumok sérülése. A károsodás elsőként az idegsejtek perifériáján, a nyúlványokba behúzódó mitokondrium hálózatról lefűződő mitokondriumokat érinti. Ezen mitokondriumok lokális koncentrálódása vezet(het) a neuropatológusok számára jól ismert, gyöngysor-szerűen megduzzadt, úgynevezett **disztrófiás neuritek** kialakulásához (13.25. ábra).



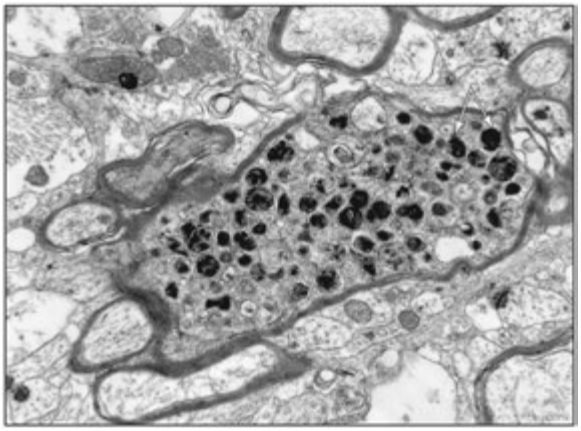
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

13.25. ábra A disztrófiás neuritek kialakulása. A) Ép idegsejtben az axon végeken és a perikarionban is képződnek (1) autofagoszómák (2), amelyek tartalma a lizoszómával (3) történő fúzió után lebomlik (4). A perikarionális autofágiához a mikrotubulus hálózat (zöld vonal az axonban) közreműködésével zajló retrográd transzporttal érkező autofág vakuólumok is hozzájárulnak (5). Az egész folyamat olyan gyors, hogy a sejtekben egyik komponens felhalmozódása sem tapasztalható. B) Neurodegeneratív betegség esetében az ubiquitin lánccal jelölt (kék körök) rossz térszerkezetű fehérjék és a károsodott mitokondriumok szekvesztrációja megtörténik (1). Az autofagoszómák (2), ha fuzionálnak is a lizoszómákkal (3), beltartalmuk – éppen a kóros fehérjék aggregációja miatt – nagyrészt lebontatlan marad. A mikrotubulus hálózat szétesésével (kis zöld vonalak) a retrográd transzport is károsodik, ami az egyre szaporodó autofág vakuolumok axon mentén történő, csoportos felhalmozódásához vezet. A hibás konformációjú fehérjék a sejttestben és az axonban is olyan aggregátumokat képeznek, amelyek nem csak a citoszólikus fehérjéket károsítják, hanem a membránokat is.

Ralph Nixon ultrastrukturális vizsgálatai hívták fel a figyelmet arra, hogy az Alzheimer-kóros agyszövetben az amiloid plakkok körül tömegesen előforduló disztrófiás neuriteket (13.26. ábra) a degradáció különböző fokán álló autofág vakuólumok töltik meg (13.27. ábra).



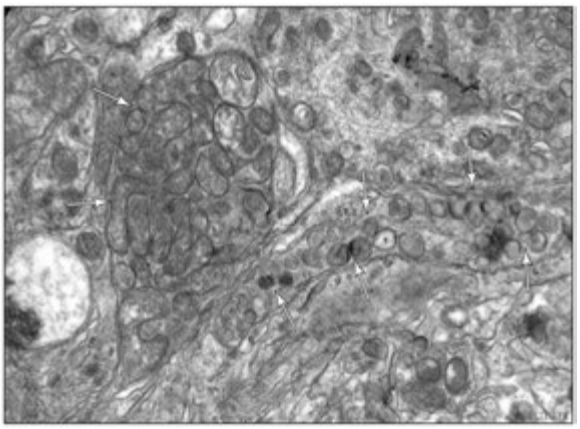
13.26. ábra Disztrófiás neuritek beta-amiloid plakkok körül Alzheimer-kóros beteg hippocampus metszetén (Bielschowsky-féle ezüst impregnáció). A *gyrus dentatus* (GD) szemcsesejtjeinek rétege fölött számos neuritikus plakk látható (az egyik középpontját csillag jelzi), amiket vastag, disztrófiás neuritek vesznek körül. A neurit metszetek között vannak hosszmetszetek (nyilak) és nagy átmérőjű keresztmetszetek (nyílhegy) is.



13.27. ábra Disztrófiás neurit Alzheimer-kóros beteg agyából származó elektronmikroszkópos metszeten. Látható, hogy a mielinizált axont terét teljesen kitöltik a különböző denzitású autofág vakuólumok (fehér nyilak).

További, finomabb ultrastruktúrális és immuncitokémiai vizsgálatokat igényel azonban annak az alapos feltételezésnek a bizonyítása, hogy ezen vakuólumok többségének beltartalma szelektíven szegregált mitokondrium-e. Meg kell jegyezzük, hogy az autofág vakuólumok és a lebontandó mitokondriumok tömeges felhalmozódásával létrejött disztrófiás neuritek nem csak az AK-ra jellemzőek, hanem más neurodegeneratív betegségekben, így pl. a prion betegségek esetén (13.28. ábra), sőt, az öregedés során is megfigyelhetők.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.28. ábra Disztrófiás neuritek prion beteg agyszövetben. Jól kivehető, hogy a neuritekben mitokondriumok koncentrálódnak (fehér nyilak).

Bár a folyamat fokozatos axon degenerációval jár (13.25. ábra), a neuron egésze szempontjából mégis egy szelektív stresszválasznak tekinthető, hiszen a sejt igyekszik szegregálni és a perikarionális régiótól távol tartani az apoptózist indukáló sérült sejtorganellumokat.

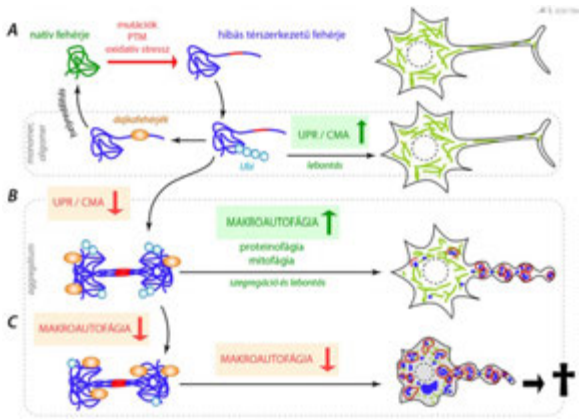
A szelektív mitofágia létezését a **Parkinson-kór** esetében sikerült egyértelműen bizonyítani. A folyamat részletes leírását és molekuláris komponenseinek bemutatását a Parkinson-kór patogenezise fejezet tartalmazza. Mindenképpen megjegyzendő azonban, hogy a mitokondrium hálózat fragmentálódásának és a lefűződött mitokondriumok membránpotenciálja csökkenésének iniciáló szerepe van a folyamatban, és nem meglepő módon a szegregációs/degradációs jelet itt is az ubiquitiniláció jelenti. Ma már azt is tudjuk, hogy a mitokondrium külső membránjában a **parkin** által ubiquitinilált fehérjék éppen azok a molekulák (mitofuzin1/2), amelyek az izolált mitokondrium hálózatba történő visszaépülését segítenék. Az a tény, hogy az ubiquitin-ligáz funkciót ellátó parkin fehérje génjének mutációja, azaz a parkin rendellenes működése és ennek következtében a szelektív mitofágia zavara **juvenilis Parkinson-kór** kialakulásához vezet, alátámasztja azt a feltételezést, hogy az ubiquitin-mediált szelektív mitofágia az idegsejtek esetében a mitokondriális homeosztázis biztosításának élethosszig tartó, alapvetően neuroprotektív eszköze.

Mitől is pusztulnak a neuronok?

Láthatjuk, hogy a hibás térszerkezetű fehérjék jelenlétéből adódó stressz kivédésére a neuronok minden rendelkezésükre álló citoprotektív rendszert mozgósítanak (13.29. ábra). A citoszólikus fehérjéket dajkafehérjék segítségével megpróbálják helyreállítani (indukálható hősokk fehérjék expressziója nő). Ha ez nem eredményes, akkor a stresszt kiváltó proteineket ubiquitin lánccal megjelölik, és az UPR vagy a chaperon-mediált autofágia révén megpróbálják lebontani. Miután ezek a rendszerek telítődnek, a folyamatosan újra termelődő és/vagy képződő hibás térszerkezetű fehérjéket a dajkafehérjék közreműködésével aggregátumokba (aggreszóma) „terelik” annak érdekében, hogy az **oligomerek** citoszóllal érintkező, nem kívánt reakciókat indukáló felszínét minimalizálják. Az aggregációra hajlamos proteinek ugyan önmaguktól is hajlamosak aggregátumokat létrehozni, egyértelműen kimutatható azonban, hogy az idegsejtekben ezt egyes dajkafehérjék még segítik is. Ma már elfogadott állítás az, hogy az aggregátumok képzése citoprotektív folyamat, s hogy a patológiás tünetek megjelenése és súlyossága az oligomerek mennyiségével áll kapcsolatban. Az idegsejtek az aggregátumokat, valamint az oligomerek által károsított organellumokat (pl. mitokondriumokat) makroautofágiával (proteinofágia vagy aggrefágia és mitofágia) igyekeznek eliminálni. Miután a feladat „menet közben” egyre szaporodik, s a lebontó rendszerek kimerülnek, az oligomerek mellett az autofág vakuólumok is felhalmozódnak. Ráadásul a lizoszómális kompartmentumba bejutó és a részleges vagy teljes proteáz rezisztenciájuk miatt folyamatosan halmozódó patológiás konformációjú fehérjék egyre nagyobb mértékben gátolják a lizoszómális enzimek működését is. Az **autofág fluxus** kimeneti oldalának gátlása tovább fokozza az autolizoszómák felhalmozódását.

A neuronok az életben maradásért elmennek a legvégsőkig, ám amikor a működőképes citoplazma és sejtorganellumok aránya egy kritikus érték alá csökken, a szöveti integritás megőrzése érdekében nem marad számukra más lehetőség, mint a programozott sejtpusztulás, az apoptózis.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.29. ábra Az aggregációra hajlamos fehérjék eliminációját célzó citoprotektív mechanizmusok összefoglalása. A) A hibás térszerkezetű fehérjét a neuronok dajkafehérjék segítségével igyekeznek helyreállítani, vagy ha ez nem megy, akkor ubiquitinnel való megjelölés után lebontani. Ez az ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPR) és/vagy a chaperon-mediált autofágia (CMA) intenzitásának emelését igényli (zöld felfelé mutató nyíl). A jobb oldalon látható sejtben a zöld vonalakkal jelölt mitokondriális hálózat és a sejt ultrastruktúrája ép. B) A folyamatosan termelődő rossz térszerkezetű fehérje előbb-utóbb kimeríti az UPR/CMA rendszert (piros lefelé mutató nyíl), de az oligomerekből keletkező aggregátumok és a károsodott sejtorganellumok (pl mitokondriumok) eltávolítása ekkor még makroautofágia (proteinofágia és mitofágia) révén lehetséges. Ez a makroautofágia rendszerének felpörgését eredményezi (felfelé mutató zöld nyíl), így a jobb oldalon látható sejtben megjelennek az autofág vakuólumok. Kezdetben ezek a perikariontól távol, a neuritben halmozódnak fel (disztrófiás neurit). Beltartalmuk lebontása azonban egyre lassul. C) Amikor a makroautofágia rendszerének kapacitása is kimerül, a sejtnek nem marad további eszköze a permanens stressz károsító hatásainak kivédésére, a zsugorodott, kapcsolatait vesztett sejt apoptózis révén elpusztul.

Ellenőrző kérdések

1. Mit értünk konformációs neurodegeneratív betegségen? Soroljon fel olyan fehérjéket, amelyek e betegségekben központi szerepet játszanak!

2. Mik a dajkafehérjék és milyen szerepük van a sejt lebontó rendszereinek működtetésében?

3. Mutassa be, hogy milyen citoprotektív mechanizmusokat aktivál egy Alzheimer-kóros beteg neuronja annak érdekében, hogy a tau fehérje patogén konformációjú változatának káros hatásit kivédje?

4. Az endoszóma-lizoszóma rendszernek milyen szerepe van a konformációs neurodegeneratív betegségekben?

5. Az autofágiának milyen szerepe van a konformációs neurodegeneratív betegségekben? Miért nem tudja az idegsejt lebontani a hibás térszerkezetű α-szinukleint?

6. Mit nevezünk makroautofágiának? Mit jelent a proteinofágia vagy aggrefágia kifejezés? Milyen molekuláris komponensek vesznek részt a folyamatban?

7. Mit jelent a mitofágia kifejezés? Mi a fiziológiás szerepe?

8. Mit nevezünk disztrófiás neuritnek? Milyen folyamat során és hogyan keletkezik?

9. A parkin génjének mutációja melyik betegség kialakulásához vezet?

10. Egy folyamatábrán foglalja össze azt, hogy a neuron milyen citoprotektív mechanizmusokat aktivál egy aggregációra hajlamos fehérje által kiváltott neurodegeneratív betegség lefolyása során!

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Felhasznált és ajánlott irodalom

Funderburk, S. F., Marcellino, B. K., Yue, Z. (2010) Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* **77(1)**, 59-68. doi: 10.1002/msj.20161.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441(7095)**, 885-9.

Heiseke, A., Aguib, Y., Schatzl, H. M. (2010) Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol.***12(2)**, 87-97.

Jin, S. M., Youle, R. J. (2012) PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci.***125(Pt 4)**, 795-9. doi: 10.1242/jcs.093849.

Johansen, T., Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy***7(3)**, 279-96.

Kaushik, S., Cuervo, A. M. (2012) Chaperones in autophagy. *Pharmacol Res.* **66(6)**, 484-93. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.002.

Koga, H., Cuervo, A. M. (2011) Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis.***43(1)**, 29-37. doi: 10.1016/j.nbd.2010.07.006.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature***441(7095)**, 880-4.

Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.***40(2)**, 280-93. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.

Lamark, T., Johansen, T. (2010) Autophagy: links with the proteasome. *Curr Opin Cell Biol.***22(2)**, 192-8. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.002.

Laszlo, L., Lowe, J., Self, T., Kenward, N., Landon, M., McBride, T., Farquhar, C., McConnell, I., Brown, J., Hope, J., Mayer, R. J. (1992) Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *Journal of Pathology***166(4)**, 333-341. doi: 10.1002/path.1711660404

Mayer, R. J., Landon, M., Laszlo, L., Lennox, G., Lowe, J. (1992) Protein processing in lysosomes - the new therapeutic target in neurodegenerative disease. *Lancet***340(8812)**, 156-159. doi: 10.1016/0140-6736(92)93224-b

Mizushima, N. (2005) A(beta) generation in autophagic vacuoles. *J Cell Biol.* **171(1)**, 15-7. doi: 10.1083/jcb.200508097

Nixon, R. A. (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.* 120(Pt 23, 4081-91. doi: 10.1242/jcs.019265

Nixon, R. A., Yang, D. S., Lee, J. H. (2008) Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* **4(5)**, 590-9.

Park, C., Cuervo, A. M. (2013) Selective Autophagy: Talking with the UPS. *Cell Biochem Biophys.* doi: 10.1007/s12013-013-9623-7

Sahn, R., Kaushik, S., Clement, C., C. Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., Santambrogio, L. (2011) Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell***20(1)**, 131-139. doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.003.

Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H., Dikic, I. (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.***20(1)**, 21-30. doi: 10.1038/cdd.2012.72.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Son, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H., Ha, J. Y., Han, J. Y. (2012) Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med.***44(2)**, 89-98. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.031.

Tanaka, A. (2010) Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Lett.***584(7)**, 1386-92. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.060.

Xu, Y., Tian, C., Wang, S. B., Xie, W. L., Guo, Y., Zhang, J., Shi, Q., Chen, C., Dong, X. P. (2012) Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy***8(11)**, 1604-20. doi: 10.4161/auto.21482.

Yamamoto, A., Simonsen, A. (2011) The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* **43(1)**, 17-28. doi: 10.1016/j.nbd.2010.08.015.

Youle, R., R., Narendra, D. P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature Rev. Mol. Cell.***Biol.12**, 9-14.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

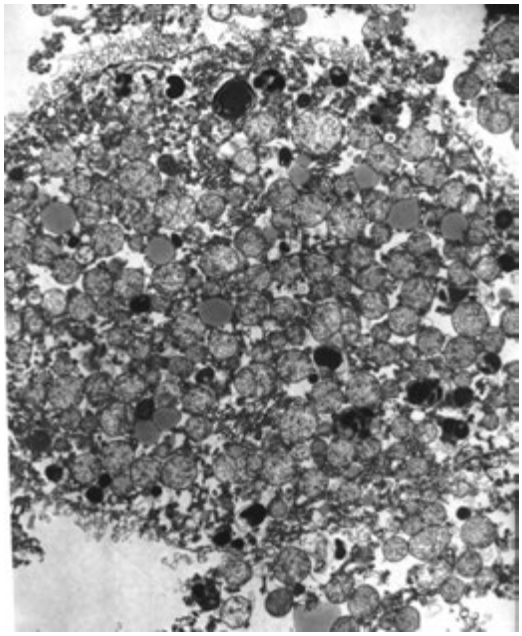
IV. fejezet - Apoptózis

14. Az apoptózis felfedezése és jellemzése *C. elegans*-ban

A sejtpusztulás vizsgálatának korai szakasza

A sejtpusztulás iránti érdeklődés fellendülésében, a folyamat részletes morfológiai jellemzésében fontos szerepet játszott az elektronmikroszkópia. **Benjamin F. Trump** (függelék 17. ábra) és munkatársai 1965-ben egy sorozat cikket közöltek a májsejtek pusztulásáról (Trump és mtsai., 1965a; Trump és mtsai., 1965b; Trump és mtsai., 1965c; Trump és mtsai., 1965d). Ezekben elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján leírták és elemezték a sejtek káros hatások okozta letális sérülés általi pusztulásának, a nekrózisnak az ultrastruktúrális jellegzetességeit. A nekrózis elnevezés a halott jelentésű görög „necros” szóból származik.

Az 1960-as és 70-es években további vizsgálatok alapján megfogalmazták a nekrózis fő jellegzetességeit, amelyek a következőek. A szövetek nagyobb területein lévő, egymással szomszédos sejtek és a bennük lévő mitochondriumok megduzzadnak. A sejtmag és az intracelluláris komparmentumok szétesnek, a sejtmembrán felhasad és a nekrotikus sejtek beltartalma kijut az extracelluláris térbe (14.1. ábra), ahol emiatt gyulladás keletkezik. A nekrózis alapvetően passzív folyamat, amely nem igényel energiát.



14.1. ábra Szétesett, nekrotikus májsejt

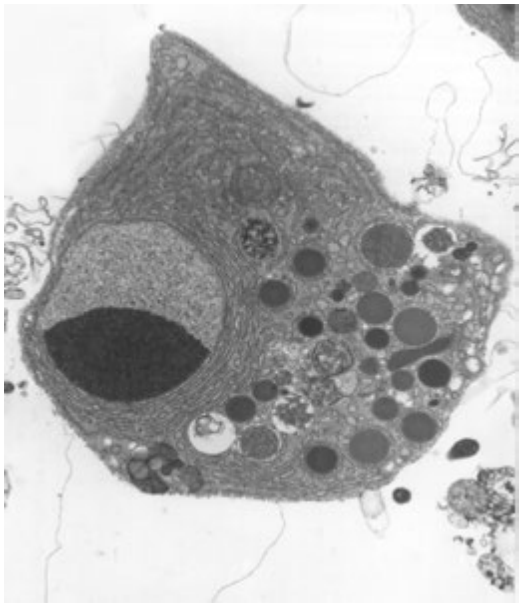
A következő jelentős lépést **John F. R. Kerr** (függelék 20. ábra) és munkatársai tették, akik szintén májon végzett vizsgálataik során a sejtek nagyobb csoportjait érintő nekrózis mellett elszórt egyedi sejtek pusztulását figyelték meg, amit a fő morfológiai jellegzetességük alapján zsugorodásos sejtpusztulásnak (shrinkage necrosis) neveztek el. Ebben az esetben az elpusztult sejtek egyenként, szétszórtan helyezkednek el és nem következik be gyulladás (Kerr, 1971).

A sejtpusztulással kapcsolatos irodalmi ismeretek és saját kutatásaik áttekintése alapján J.F.R. Kerr, A. H. Wyllie és A. R. Currie 1972-ben publikált mérföldkőnek számító cikket publikált (Kerr és mtsai., 1972). Ebben arra a következtetésre jutottak, hogy a sejthalálnak ez a zsugorodásos típusa előfordul ugyan káros hatások nyomán is (pl. rákos szövetekben kemoterápia hatására) a jellemző azonban az, hogy normális fiziológiás körülmények között rendszeresen és spontán módon jelentkezik egy sor szövetben, és feltehetően azok megújulását szolgálja. Különösen gyakori az egyedfejlődés során egy sor szerkezetváltozással járó átrendeződési folyamatban, pl. az újjak

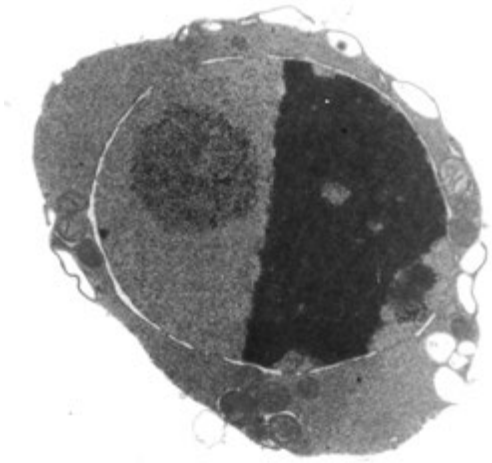
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

képződésekor, vagy a hím és női ivarszervek kialakulásakor emlősökben, a farok regressziójakor békákban, hogy csak néhány gerinces példát említsünk.

Kerr és munkatársai részletesen leírták a szétszórt egyedi sejteket érintő sejtpusztulási folyamat morfológiailag megfigyelhető szakaszait. Első lépésként a halálra ítélt sejtek leválnak szomszédjaiktól. A rögzített és festett preparátumokon a sejtek a normálisnál sötétebbnek mutatkoznak, zsugorodnak. Különösen elektronmikroszkópos képeken jellemző és szembetűnő, hogy sejtmagjukban holdsarló szerűen kondenzálódik a kromatin (14.2-14.3. ábra).



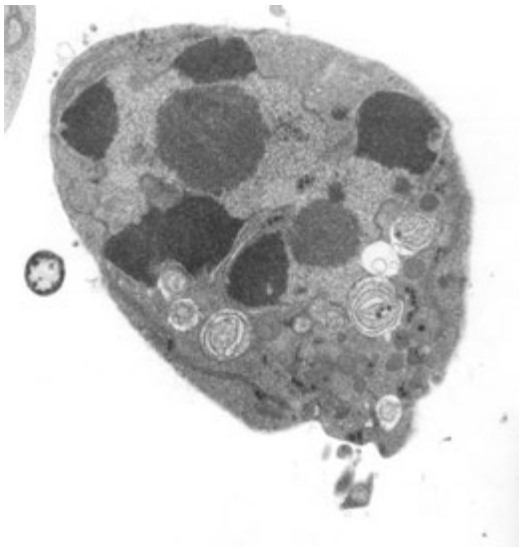
14.2. ábra A sejtmag kromatin állományának az apoptózisra jellemző holdsarló alakú éles határral történő elkülönülése sötét és világos területre izolált hasnyálmirigy acinus sejtben



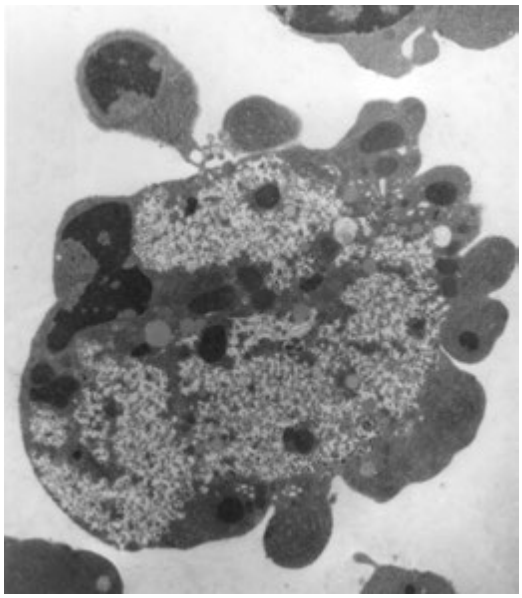
14.3. ábra A sejtmag kromatin állományának az apoptózisra jellemző holdsarló alakú éles határral történő elkülönülése sötét és világos területre eritroblasztban

Ezt követően a sejtmag (14.4. ábra) és a sejt is fragmentálódik, ami azt jelenti, hogy a sejtről plazma membránnal borított kisebb citoplazma részek tűrődnek ki, majd válnak le (14.5-14.6. ábra). Ezek közül sok a sejtmag fragmentumait is tartalmazza. A leváló részek megjelenése az élénk fantáziájú szerzőket a lombhullásra emlékeztették. Ennek alapján a folyamat megnevezésére a görög apoptózis szót választották, ami a virágszirmok, vagy levelek lehullását jelenti (Kerr és mtsai., 1972).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

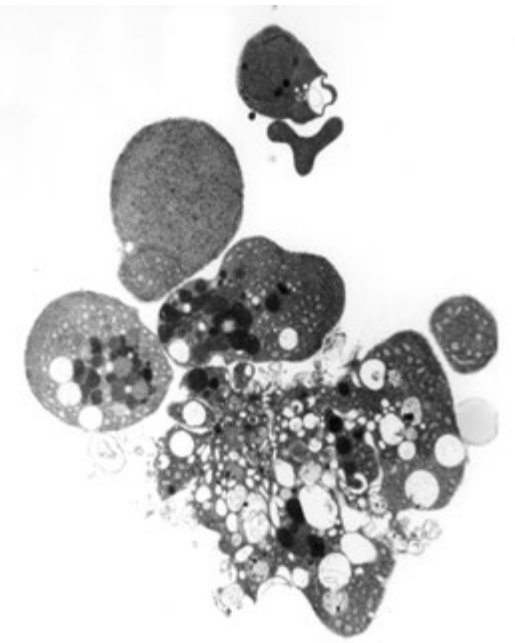


14.4. ábra A sejtmag szétesése az apoptózis folyamatának középső szakaszában. A hasnyálmirigy acinus sejtben autofág vakuólák is láthatóak



14.5. ábra A fragmentálódás kezdetén lévő apoptotikus izolált májsejt

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.6. ábra Egy teljesen fragmentált apoptotikus izolált hasnyálmirigy sejt

A leváló sejtrészletek az un. apoptotikus testek (apoptotic bodies), amelyeket a szomszédos tovább élő sejtek, vagy fagocita sejtek kebeleznek be és emésztenek meg. A folyamat alapvető jellegzetessége, hogy az elpusztult sejtek fragmentálódott részei mindvégig plazma membránnal borítottak, citoplazma tehát nem jut ki az extracelluláris térbe, ezért gyulladás sem keletkezik. Az emésztés intracellulárisan zajlik a bekebelező sejtek lizoszomális rendszerének segítségével.

Az apoptózis kifejezés bevezetésénél lényegesen fontosabb, hogy Kerr és munkatársai feltételezték, hogy az apoptózis a sejtben aktiválódó program szerint megy végbe. Ezzel az emlősökre is kiterjesztették a programozott sejthalál koncepcióját, amit korábban rovarok fejlődési folyamatainak tanulmányozásakor fogalmazott meg Richard A. Lockshin és Carroll M. Williams (Lockshin és Williams, 1964).

Ezt követően a sejthalállal kapcsolatos kérdések egyre nagyobb érdeklődést keltettek. Új módszereket és kísérleti rendszereket fejlesztettek ki, amelyek révén néhány évtizeden belül sejt- és orvos biológiai szempontból is kiemelkedő eredmények születtek. Az apoptózis és a programozott sejthalál kifejezéseket mind a mai napig egyéni ízlés szerint szinonimákként, egymással párhuzamosan használják, de rendszerint ugyanazt a folyamatot értik alatta.

A programozott sejthalállal foglalkozó fejezetek általános bevezetésének lezárásaként meg kell még említenünk, hogy a sejtek pusztulásának a nekrózis és az apoptózis mellett számos más típusa és átmeneti formája is ismert. Könyvünk ezekkel csak utalásszerűen foglalkozik mivel jellemzésük nem kellően kidolgozott és csoportosításuk ma is élénk vita tárgya.

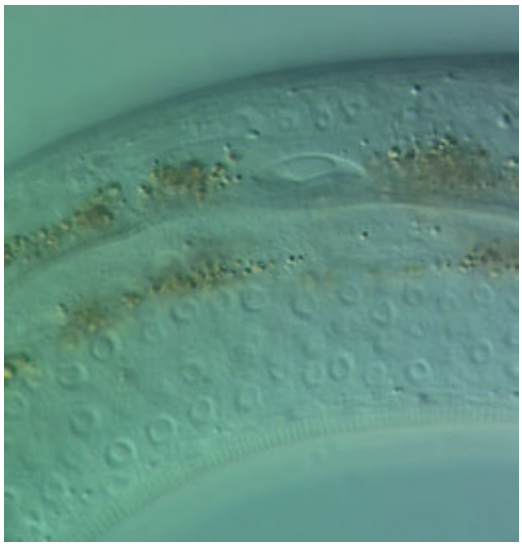
A programozott sejthalál hipotézisének igazolása, genetikai és molekuláris folyamatainak alapvető jellemzése a *Caenorhabditis elegans* fejlődésének tanulmányozása alapján

A tudomány fejlődése során gyakran előfordul, hogy egy probléma megoldásához a tovább lépést, a felvetődésétől távol álló terület eredményei teszik lehetővé. Ez történt az apoptózis esetében is. Az 1960-as években kezdődött az a munka, amelynek során a gének soksejtűekben való működésének felderítését tűzte ki **Sydney Brenner** (függelék 21. ábra). Ehhez egy új modell szervezetet vezetett be, az apró (a felnőtt állat kb. 1mm hosszú) és viszonylag egyszerű fonálférget, a *Caenorhabditis elegans*t. Ennek az állatnak a testfala mikroszkópban, vizes

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

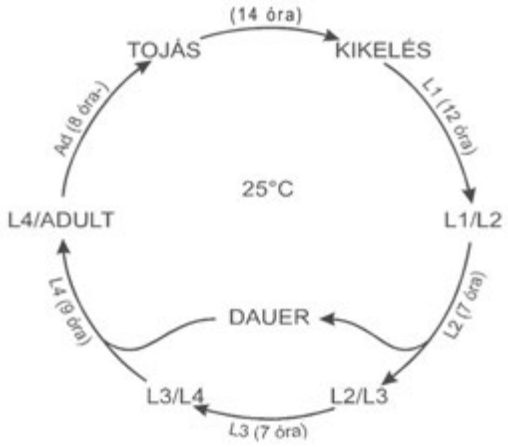
közegben, megfelelő megvilágítás mellett átlátszó (14.7. ábra), és Nomarski optikával minden egyes sejtje azonosítható, elsősorban a sejtmagja segítségével (14.8. ábra).

14.7. ábra Felnőtt hermafrodita *C. elegans.* Az átlátszó testfalon keresztül jól látszik a bélcső



14.8. ábra A *C. elegans* átlátszó testfalán át a test sejtjei egyenként azonosíthatóak Nomarski féle differenciál-interferencia kontraszt (DIC) rendszerű fénymikroszkópban

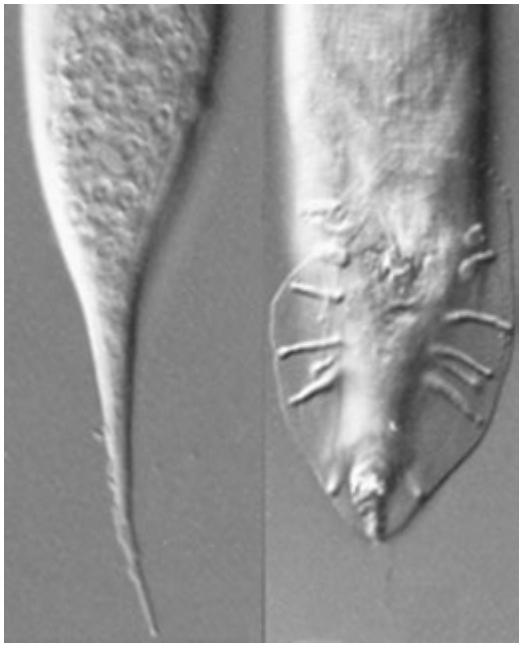
Életciklusa rövid, a jól táplált állatok négy lárvastádiumon (L1-L4) át válnak felnőtté. Kedvezőtlen körülmények között képesek nem táplálkozó tartós (un. dauer) lárva stádiumba lépni, ha pedig a helyzet jóra fordul onnan kilépni és továbbfejlődni (14.9. ábra).



14.9. ábra A *C. elegans* fejlődésének fázisai

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

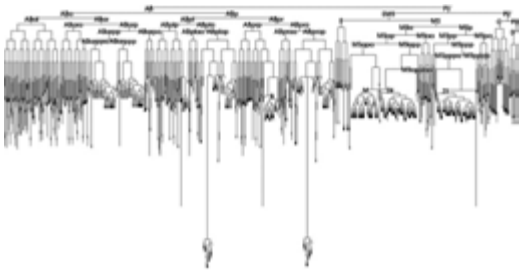
Az egyedek túlnyomó többsége hermafrodita, amelyek önmegtermékenyítéssel szaporodnak, míg nagyjából minden ötszázadik hím (14.10. ábra), és így keresztezésre is mód van.



14.10. ábra A hermafrodita állat farki vége meredeken elkeskenyedő fonálban végződik, míg a hímé legyezőhöz hasonlóan kiszélesedik

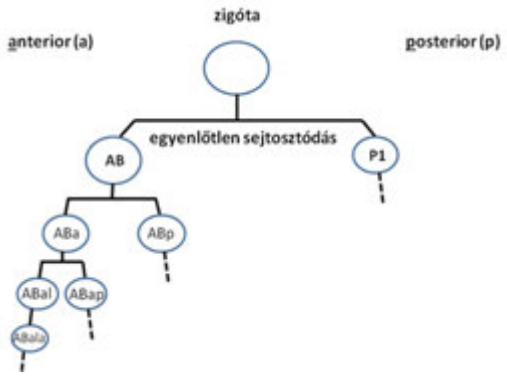
Brenner annak a gondolatnak a szellemében választotta ezt a modell állatot amelynek figyelembe vétele a mai kísérleti biológusok számára is fontos: „.. choosing the right organism for one's research is as important as finding the right problems to work on." Nézetének helyességét a később a *C. elegans*-szal dogozó kutatók számának exponenciális növekedése és a kutatások sikeréért 2002-ben kapott orvosi Nobel díj is igazolja.

A Brenner által irányított korai munka egyik fő iránya a *C. elegans* fejlődésmenetének minél részletesebb feltárása volt. Ennek során azt az elképesztően ambiciózus célt tűzték ki, hogy sejtről-sejtre feltérképezzék a fonálféreg egyedfejlődését. Ehhez Nomarski féle optikával fénymikroszkópban in vivo egyenként kellett felismerni az osztódások révén létrejött utód sejtmagokat és segítségükkel követni az utódsejtek mozgását. A munka nehézségét **Robert Horvitz** (függelék 22. ábra)aki az apoptózis *C. elegans-ban* való kutatásáért 2002-ben szintén orvosi Nobel díjat kapott, a következőkkel illusztrálta: „A simple analogy is to imagine that you are watching a bowl with hundreds of grapes, trying to keep your eye on each grape as it and many others move." Mivel az egymást követő sejtosztódások menete minden egyes *C. elegans* egyedben tökéletesen azonos, ez a rendkívüli munka végül elvezetett a fejlődés során keletkező összes sejt leszármazási vonalának (cell lineage) pontos és teljes feltérképezéséhez (Sulston és Horvitz, 1977; Sulston és mtsai., 1983) (14.11-14.12. ábra).



14.11. ábra A *C. elegans* embrionális fejlődése során kialakuló sejtek leszármazásának diagramja

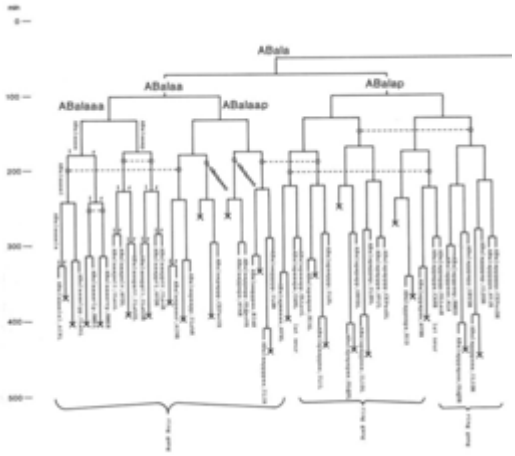
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.12. ábra Az osztódások sora a zigótától az ABala sejtig. A 14.11. ábra bal oldala kezdeti osztódásainak kinagyított képe. A sejtek elnevezésében látható „a”, „p”, „l” és „r” sorrendben az anterior, posterior, left, right, az utódsejteknek az osztódást követő pozícióját jelenti. „a” az osztódást követően elöl (anterior pozícióban), a „p” hátul (posterior pozícióban)

A sejtek leszármazásával foglalkozó kutatás vezetőjét és motorját, **John E Sulstont** (függelék 23. ábra) 2002-ben szintén orvosi Nobel díjjal jutalmazták. (Sulston további érdemeket szerzett a *C. elegans* genomjának szekvenálásában is.)

A sejtleszármazás feltérképezésének egyik legfontosabb eredményeként kiderült, hogy a hermafrodita egyedek fejlődése során keletkezett 1090 sejt közül ugyanaz a 131 (melyek közül 105 idegsejt) szigorú idő és térbeli rend szerint elpusztul (14.13.. ábra).



14.13. ábra A teljes leszármazási diagram bal oldali részének kinagyítása az ABala sejttől a végső utódokig. Az x-el jelölt sejtek apoptózissal elpusztulnak.

A pusztuló sejtek nagyjából fél óra alatt lekerekednek, majd gyors zsugorodás után eltűnnek (14.14. ábra) (Horvitz, 2002; Sulston, 2002).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

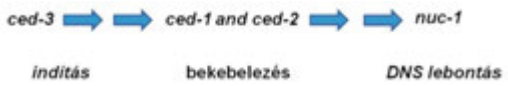
14.14. ábra *C. elegans* embrióban a pusztuló sejtek Nomarski optikával lekerekedett, kiemelkedőnek mutatkozó képleteknek látszanak (nyilak)

A folyamat reprodukálhatósága azt sugallta, hogy a pusztulás sorsára jutó sejtek kiválasztása és a pusztulás mechanizmusa egyaránt genetikai szabályozás alatt áll. A továbblépéshez tehát a sejthalált befolyásoló géneket kellett találni. Sulston megfigyelte, hogy egyes állatokban ott ahol normális esetben sejtpusztulás történik, Feulgen festéssel jól kimutatható sejtmagok maradnak. Ez azt jelenti, hogy nem történik meg a DNS-nek a sejthalállal normálisan együtt járó lebomlása. Az így felismert mutáns amelyben az endonukleáz abnormálisan működött, a *nuc-1* (nuclease abnormal) elnevezést kapta (Conradt és D., 2005).

Ezt követően két újabb mutánst találtak *(ced-1, ced-2*; cell death abnormal), amelyekben a legömbölyödött halott sejtek (ezeket az angol kifejezés nyomán sejthulláknak (cell corpse) nevezhetjük) megmaradtak, tehát a sejthulláknak nem történt meg a bekebelezésük. Horvitz laboratóriumában további mutánsok felismeréséhez vezettek azok a kutatások, amelyekben *ced-1* állatokat mutagenizáltak. A mutagenizálás után olyan egyedeket kerestek amelyekben a normális pusztulási folyamathoz képest eltérés látszott (Horvitz, 2002).

Ilyen módon sikerült egy olyan mutánst azonosítani, amelyben nem mutatkoztak sejthullák. Ebben a *ced-3*-nak elnevezett mutánsban mind a 131 sejt megmaradt, amelyeknek el kellett volna pusztulniuk. A *ced-3* tehát nélkülözhetetlen a sejthalál megindulásához, azaz un. pro-apototikus gén.

A ced-3 felfedezése nyomán fel lehetett állítani az addig leírt sejthalál gének működési sorrendjének első, legegyszerűbb genetikai sémáját. Eszerint a *ced-3* a pusztulás megindításában szerepel, ezt a bekebelezést szabályozó a ced-1 és a ced-2 követi; a folyamat sémáját a 14.15. ábra mutatja.



14.15. ábra A programozott sejthalál génsorrendjének első, legegyszerűbb sémája

A Horvitz labor egy másik projektjében a tojásrakásban hibás (**egg**-**l**aying defective) mutánsokat kerestek. A megtalált 145 mutáció közül az egyikben hiányoztak az un. HSN motoros neuronok, amelyek a tojásrakásban szereplő vulvális izmokat idegzik be. Ennek magyarázatára az egyik elvi lehetőség az volt, hogy a HSN neuronok létre sem jönnek, a másik pedig az, hogy létrejönnek ugyan, de ezt követően programozott módon elpusztulnak. Az utóbbi lehetőséget az egl-1/ced-3 kettős mutáns vizsgálatával igazolták. Ebben megmaradtak a HSN neuronok, a ced-3 tehát szupresszálta az egl-1 hatását. Ez az eredmény gyorsította a munkát azzal, hogy a további ced-3-hoz hasonló mutánsokat lehetett keresni az egl-1 szupresszálása révén. Így fedezték fel a *ced-4*-et (Ellis és Horvitz, 1986).

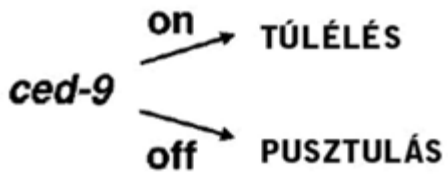
Ezután mozaik analízissel tisztázták, hogy a ced-3 és a ced-4 a sejteken belül hat, ami azt igazolta, hogy a programozott sejthalálnak ez a formája celluláris öngyilkosság (Yuan és Horvitz, 1990).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Elvégezték a ced-4 klónozását és szekvencia analízisét, ami szerint teljesen új proteinről volt szó. Csaknem két évet kellett arra várni, hogy 1992-ben a szekvencia adatbázisban a ced-4-hez hasonló, emberből izolált fehérje szekvenciája megjelenjen. Ez az ICE (interleukin- 1-beta converting enzyme) volt, az első tagja azoknak a cisztein proteázoknak, amelyeket mai néven kaszpázoknak nevezünk.

Ennek alapján az a következtetés adódott, hogy ha a CED-3 cisztein proteinázként nélkülözhetetlen szerepet játszik a *C. elegans* apoptózisában, akkor az ICE hasonló szerepet játszhat emlős sejtekben (Miura és mtsai., 1993).

A *C. elegans*ban folyó apoptózis további génjeinek azonosítására az állat garatjában lévő egy bizonyos, normális esetben apoptózissal elpusztuló, neurális sejt túlélését okozó mutánst kerestek. Hat mutációt találtak, ezek közül ötben defektív volt a ced-3 vagy a ced-4, a hatodik azonban új génnek bizonyult, amit elneveztek ced-9-nek. Erről további vizsgálatok alapján kiderült, hogy nem funkcióvesztéses (loss of function), hanem funkciónyeréses (gain of function) mutáció. Ez azt jelenti, hogy a ced-9 funkciónyeréses mutációja esetén megmaradnak azok a sejtek amelyeknek programozott sejthalállal meg kellene halniuk, addig a ced-9 funkcióvesztéses mutációja következtében elpusztulnak azok a sejtek amelyeknek élniük kellene. Eszerint a ced-9 az a gén amely eldönti, hogy egy sejt életben marad-e, vagy programozottan elpusztul (14.16. ábra).



14.16. ábra A ced-9 bekapcsolt (on) állapotban túléléshez, kikapcsolt (off) állapotban pedig pusztuláshoz vezet

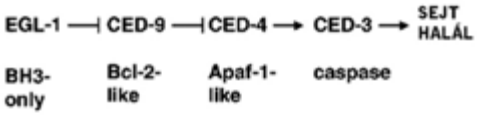
A ced-9 klónozása után kiderült, hogy hozzá hasonló gén az emberben is megtalálható, és mutációja follikuláris limfómát okoz. Emiatt a Bcl-2 (Bcell lymphoma) nevet kapta.

A ced-9 és a szekvenciájában hasonló Bcl-2 tehát megvédi a sejteket az apoptotikus pusztulástól. Ezzel a felfedezéssel sikerült kapcsolatot találni a *C.elegans*ban zajló programozott sejthalál és az emberben történő apoptózis között.

További vizsgálatok révén az emlősökben egy sor ced-9-hez hasonló fehérjét fedeztek fel, amelyek így együtt a CED-9/Bcl2 fehérje családot alkotják.

A programozott sejthalált a *C. elegans*ban szabályozó gének és az emlősökben folyó apoptózisban szereplő gének hasonlósága ráirányította a kutatók figyelmét arra, hogy a *C. elegans*ban működő programozott sejtpusztulás génjeinek sorrendjéhez hasonló lehet a humán apoptózisban szereplőké. Fontos megerősítést kapott a hasonlóság azzal, hogy a humán Bcl-2-vel sikerült helyettesíteni a ced-9-et transzgén *C. elegans*-ban.

Ennek a lehetőségnek a kiaknázásához pontosan meg kellett állapítani a gének működésének sorrendjét *C. elegans*-ban. A téma iránt ugrásszerűen megnőtt az érdeklődés és az újonnan bekapcsolódó laboratóriumok eredményeinek hozzájárulásával kialakult a *C. elegans* programozott sejtpusztulásának központi szakaszában résztvevő gének működési sorrendjének sémája (14.17. ábra).



14.17. ábra A programozott sejtpusztulás központi szakaszában résztvevő gének működési sorrendje *C. elegans*-ban

Ellenőrző kérdések

1. Hogyan változik az apoptotikus sejtek elektronmikroszkópos morfológiája?

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

2. Milyen tulajdonságai teszik az apoptózis tanulmányozására alkalmas modellállattá a *C. elegans*-t?

3. Milyen apoptotikus géneket fedeztek fel a *C. elegans*-ban és mik ezeknek a feladatai?

Irodalom

Conradt, B., D., X., 2005. Programmed cell death. The C. elegans Research Community, WormBook,. http://www.wormbook.org.

Ellis, H. M., Horvitz, H. R., 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. Cell. 44**,** 817-29.

Horvitz, R., 2002. Worms, life and death. Nobel Lecture. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/horvitz-lecture.pdf.

Kerr, J. F., 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J Pathol. 105**,** 13-20.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 26**,** 239-57.

Lockshin, R. A., Williams, C. M., 1964. Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths

Journal of Insect Physiology 10**,,** 643-649.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E. A., Yuan, J., 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. Cell. 75**,** 653-60.

Sulston, J. E., 2002. C. elegans: the cell lineage and beyond. Nobel Lecture. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/sulston-lecture.pdf.

Sulston, J. E., Horvitz, H. R., 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. Dev Biol. 56**,** 110-56.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., Thomson, J. N., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev Biol. 100**,** 64-119.

Trump, B. F., Goldblatt, P. J., Stowell, R. E., 1965a. Studies of mouse liver necrosis in vitro. Ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei. Lab Invest. 14**,** 1969-99.

Trump, B. F., Goldblatt, P. J., Stowell, R. E., 1965b. Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and lipid droplets. Lab Invest. 14**,** 2000-28.

Trump, B. F., Goldblatt, P. J., Stowell, R. E., 1965c. Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural and cytochemical alterations of cytosomes, cytosegresomes, multivesicular bodies, and microbodies and their relation to the lysosome concept. Lab Invest. 14**,** 1946-68.

Trump, B. F., Goldblatt, P. J., Stowell, R. E., 1965d. Studies on Necrosis of Mouse Liver in Vitro. Ultrastructural Alterations in the Mitochondria of Hepatic Parenchymal Cells. Lab Invest. 14**,** 343-71.

Yuan, J. Y., Horvitz, H. R., 1990. The Caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. Dev Biol 138**,** 33- 41.

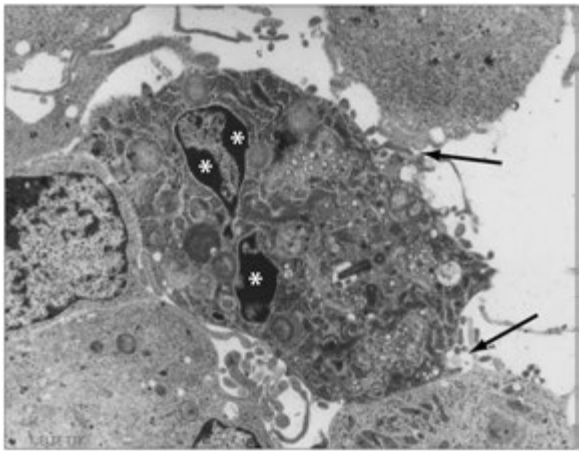
15. A kaszpázok szerepe az apoptózisban

Az aktív sejthalál apoptotikus formájának molekuláris mechanizmusa kivétel nélkül minden esetben bizonyos proteolitikus enzimek működésének beindulásával és/vagy aktivitásának fokozódásával kezdődik. A folyamat teljes kivitelezésében, sőt, a „sejthullák” végső eltakarításában is dominálnak a sejten belüli fehérjebontó enzimek.

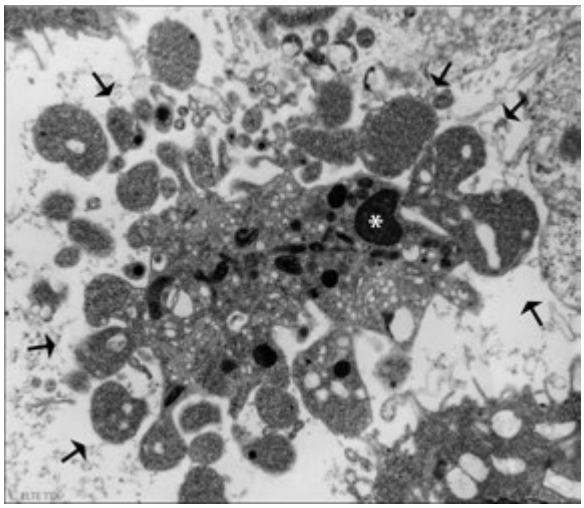
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az apoptózis jelensége

A **tipikus apoptózis** folyamán megjelenő morfológiai jellemzőket a 15.1.–15.3. ábrán látható három elektronmikroszkópos felvétel szemlélteti. A folyamat elején a sejtek zsugorodása indul meg. A szöveti környezetben lévő sejtnél ennek legelső jele bizonyos **sejt-sejt kapcsolatok gyengülése**, felszakadása (l. 15.9. ábra és „A kaszpázok szubsztrátjai" c. fejezet), amit az adott sejt zsugorodása követ. Ultrastrukturális, sejtmagi szinten már a korai stádiumban lehet látni a maghártya mellett egy nagyon határozott **kromatin kondenzáció**t, ami általában perifériku s, félhold alakú. Emellett megkezdődik az úgynevezett **apoptotikus testek vagy blebek** képződése és lefűződése; e folyamat neve: **zeiozis**. A sejtmembrán teljesen intakt, a környezettől elhatároló, de azzal szabályozott anyag- és energiakicserélő kapcsolatot biztosító szerepét be tudja tölteni. A sejtorganellumok épek, működőképesek; a citoplazma elektrondenzitása azonban a transzglutaminázok aktivitásának fokozódása, a fehérjék keresztkötése miatt változik. A lefűződött sejtrészek is ép membránnal határoltak, a bennük lévő struktúrákkal együtt (többnyire) működőképesek. A folyamatot a sejtmag feldarabolódása, fragmentációja kíséri, így a citoplazma lefűződésekbe sejtmag részletek is bekerülnek. Az apoptózis **„hulló levelet vagy virágszirmot" jelent**, ami a zeiozis folyamatára utal.

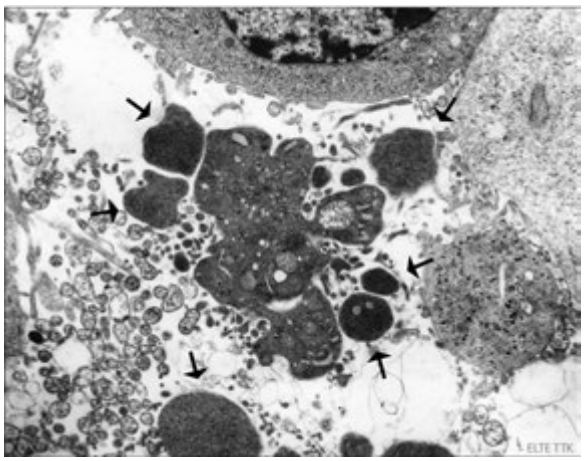


15.1. ábra Az apoptózis korai szakaszának morfológiai jellemzőit mutató transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel. A sejtkapcsolatok felszámolódnak, a sejt elválik a szomszédaitól (fekete nyilak). Már megfigyelhető a sejtmag kromatin állományának perifériális kondenzációja (fehér csillagok), a citoplazma denzitásának fokozódása és a sejtfelszín „hólyagosodása".



15.2. ábra Előrehaladott apoptózis ultrastrukturális szintű morfológiai sajátosságai. A sejtmag fragmentálódott (egyik részletét fehér csillag jelöli), a sejtfelszínen virágszirmok elrendeződésére emlékeztető apoptotikus testek képződnek és fűződnek le (fekete nyilak).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

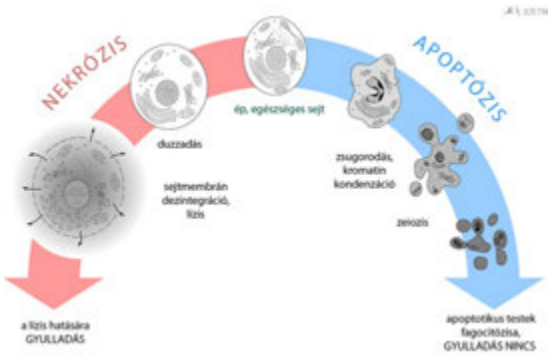


15.3. ábra Az apoptózis késői szakaszának morfológiai jellemzői. Az erőteljesen zsugorodott és szinte teljesen fragmentálódott sejt felszínéről még ekkor is fűződnek le apoptotikus testek. A citoplazma fokozott denzitása miatt a sejtalkotók alig felismerhetők.

Az apoptózis **szöveti protektív szerepű**, mivel a sejt végig intakt membránnal határolt részekre esik szét, majd ezeket az apoptotikus testeket a környező szövet ép sejtjei, vagy erre specializált sejtek kebelezik be és bontják le. **Sejten belüli Ca^{2+}-ion koncentráció** kimutatás alapján megállapítható, hogy az intracelluláris kalcium-koncentráció az apoptotikusan pusztuló sejt esetében lassan növekszik és „csak” szubnekrotikus szintet ér el.

Arról, hogy az integritás megőrzésének és a sejthalál folyamatát kísérő energiaigényes folyamatok energetikai „finanszírozásának” hátterében mi áll, a „Kaszpázok szubsztrátjai” c. fejezetben adunk bővebb tájékoztatást.

A fent bemutatott morfológiai jellemzői alapján az apoptotikus és a nekrotikus sejthalál között éles különbségek mutatkoznak. A nekrózis esetében a sejt intenzíven duzzad, a sejtmembrán elveszti épségét (intaktságát), ezzel együtt barrier szerepét is. A beltartalom a környezetbe áramlik, miközben a sejtorganellumok (így a sejtmag) is sérülnek. A lízis következtében a környezetbe antigének kerülnek, amelyek gyulladásos folyamatot indukálnak (15.4. ábra).



15.4. ábra A nekrózis és az apoptózis morfológiai vonásainak összehasonlítása.

A kaszpáz molekulacsalád

A kaszpázok szerkezeti jellemzői

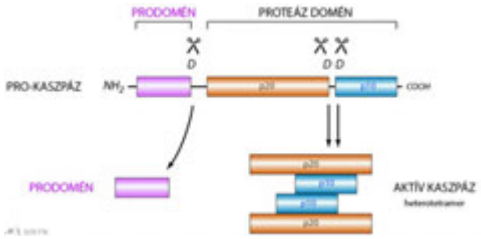
A kaszpázok olyan **cisztein proteázok**, amelyek egy 4 aminosavból álló úgynevezett **konszenzus szekvencia** mellett hasítják el a peptidkötést. Ennek az aminosav-motívumnak az utolsó tagja minden esetben egy **aszparaginsav** (15.5. ábra). A kaszpázok ezen tulajdonsága eredményezi azt, hogy szubsztrátumaikat rendkívül pontosan, csak meghatározott helyeken és csak részlegesen bontják (**limitált proteolízis**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A fenti tulajdonságokkal rendelkező, elsőként leírt enzimet a korábbi szakirodalomban még ICE (Interleukin Converting Enzyme) néven találjuk meg. Az elmúlt 20 év kutatásai során azonban több mint 10 tagra bővült a hasonló szerkezetű és aktivitású, bár különböző névvel illetett enzimek száma. Ezért logikus és szükséges lépés volt a közös tulajdonságon alapuló, egységes nevezéktan bevezetése és az enzimek egy közös családba való besorolása (caspases: cisteinyl aspartate-specific proteases). Itt az egyes „családtagokat" számozással különböztetjük meg egymástól. Az emlős kaszpázok családja jelenleg 13 tagból áll (15.6. ábra).

Valamennyi kaszpáz közös tulajdonsága, hogy szintézise során inaktív, **proenzim (prokaszpáz)** formában jelenik meg (zimogén forma). Az aktiváláshoz az **N-terminálison lévő** úgynevezett **prodomén** lehasítása szükséges. Az ezután megmaradó, az enzimatikus működéshez szükséges fehérje minden kaszpáz esetében két részből áll. Ezek közül a nagyobb (large, l) egy úgynevezett **p20**, a rövidebb (small, s) egy **p10** domént képez (15.5. ábra).

Az N-terminális prodoménje mögött a már ismert konszenzus szekvencia található csakúgy, mint a p20 és p10 domének között (15.5. ábra). A kaszpázok aktiválásához szükséges szerkezeti átalakítások érdekében tehát olyan hasításokra van szükség, amelyeket egy másik, ugyanolyan vagy más számmal jelzett kaszpáz képes végrehajtani.



15.5. ábra A zimogén prokaszpázok kaszpáz-specifikus hasítási helyei (D: aszparagin sav).

A kaszpázok csoportosítása

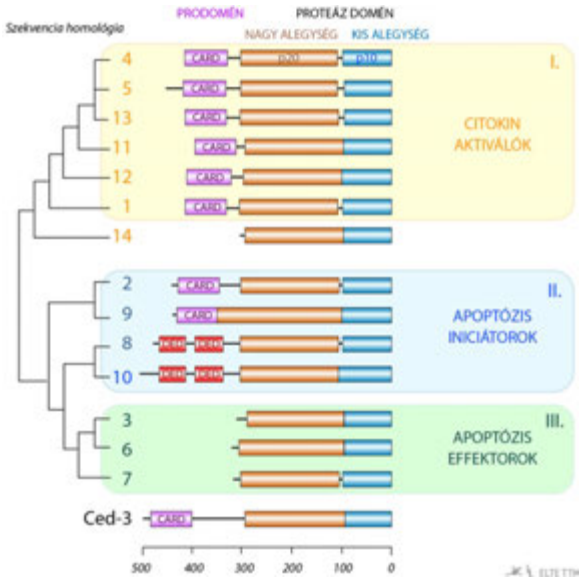
Az egy családba tartozó kaszpázokat funkciójuk és szerkezetük alapján is alcsaládokba sorolhatjuk. Az egyes családtagokat számozással különítjük el egymástól. 13 féle humán kaszpázt különböztetünk meg, amelyek nevei kaszpáz-1–kaszpáz-14. Arról a molekuláról, amelyet korábban kaszpáz-13-ként tartottak számon kiderült, hogy nem létezik (kísérlet következtében keletkezett műtermék).

Csoportosítás prodomén szerkezet alapján

A prodomén lehet rövid vagy hosszú. A **rövid prodoménű** enzimek a kaszpáz-3, -6, -7 és 14 (15.6. ábra). Az utóbbi (kaszpáz-14) kivételével valamennyien az apoptózis „végjátékában" szerepelnek, mint **végrehajtó, effektor, vagy exekutor**[1] **kaszpázok** (III. típus). Prodoménjük 30-nál kevesebb aminosavból áll, s azon kívül, hogy biztosítja inaktív állapotukat, semmilyen más funkcióval nem rendelkezik.

[1] execution: kivégzés

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



15.6. ábra Az emlős kaszpázok szerkezeti felépítése és az ennek alapján megállapítható csoportjai. Alul a Ced-3, a C. elegans kaszpáz homológjának a szerkezete látható. (CARD: caspase activating recruiting domain; DED: death effector domain, Ced-3: cell death abnormality-3).

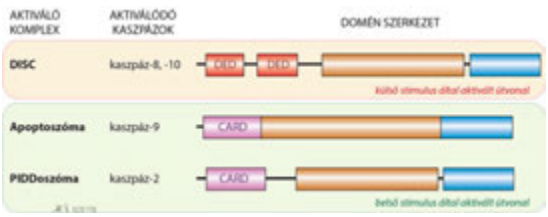
A **hosszú prodoménű kaszpázok** esetében a pro-régió összetettebb és a sejt további élete szempontjából sorsdöntő funkcióval is bír(hat).

Ide tartoznak az aktív sejthalál apoptotikus formájának beindításában kulcsszerepű, úgynevezett **iniciátor kaszpázok** (kaszpáz-2, -8, -9, -10), amelyeknek olyan prodoménjei vannak, amelyekben fehérje-interakciós **mikrodomének** találhatók. Utóbbiak a halál domén (death domain) fehérje szupercsaládba tartoznak.

A halál domén szupercsalád

A halál domén szupercsalád az egyik legintenzívebben kutatott domén család. Tagjai a **halál domén**[2] (death domain, **DD**), a **halál effektor domén** (death effector domain, **DED**), a **kaszpáz aktiváló és toborzó** (caspase activating recruiting domain, **CARD**), valamint a **pirin domén (**pyrine domain, **PYD**) **alcsalád**. Szerkezetükben közös, hogy olyan globuláris molekularészek, amelyek egymás mellett felhajtogatott 6 hélixet tartalmaznak. Fő funkciójuk közös: az apoptotikus, illetve a gyulladásos szignalizációs útvonalban homotipikus kölcsönhatások kialakítása révén több alegységes (oligomer) jeladó komplex kialakítása.

Halál domén tartalmuk alapján a kaszpázok körében két alcsoportot különítünk el. A kaszpáz-8 és -10 szerkezetében két-két egymást követő (tandem) **DED** régió, míg a kaszpáz-9 és -2 molekulában egy-egy aktiváló és toborzó, úgynevezett **CARD** régió található (15.6 és 15.7. ábra). A DED és CARD mikrodomének révén az ezekkel rendelkező kaszpázok hasonló doménekkel rendelkező molekulákhoz tudnak kapcsolódni, ami alapvetően meghatározza azt, hogy a sejtben milyen molekuláris komplexum részeként és hogyan aktiválódnak (l. 15.7. ábra és „A kaszpázok aktivációja” c. fejezetet).



15.7. ábra Az iniciátor kaszpázok mikrodoménjei. A mikrodomének típusa meghatározza azt, hogy a proenzim melyik aktivációs útvonalon és melyik komplexben aktiválódik.

[2] Sajnos a szupercsalád és az egyik alcsalád neve ugyanaz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Csoportosítás funkció alapján

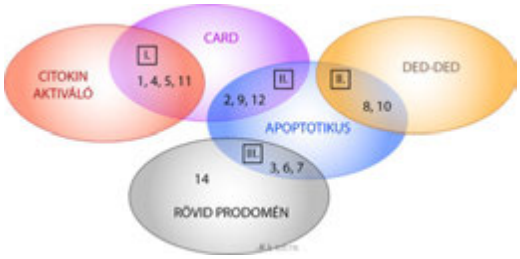
A kaszpázok három csoportba sorolhatók aszerint, hogy milyen folyamatok aktiválásában vesznek részt (15.6. és 15.8. ábra). Az **I. csoport**ba azok tartoznak, amelyek citokineket aktiválnak, így gyulladásos folyamatok előidézésében vesznek részt. **CARD** halál doménnel rendelkeznek.

A **II. csoport**ba az apoptózis beindításában szerepet játszó, **iniciátor kaszpázok** tartoznak. Mind hosszú prodoménnel rendelkeznek, amelyben tandem **DED** vagy egy **CARD** mikrodomén található (15.6. ábra).

A **III. csoport**ot az apoptózis végrehajtásában szerepet kapó **effektor kaszpázok** képezik. Kivétel nélkül **rövid prodoménű kaszpázok** (15.6. ábra).

Mai ismereteink szerint egyetlen kaszpáz nem sorolható be a fenti csoportokba. Ez a **kaszpáz-14**, amely rövid prodoménű. Korábban citokin-aktiválónak tartották, de ma már bizonyos, hogy egy harmadik aktív sejthalál típusban, a keratinizációban játszik szerepet (l. 15.13. ábra). Csak az epidermiszben expresszálódik, s egy eddig még azonosítatlan proteáz aktiválja.

A fenti alapokon képzett csoportokat az 15.8. ábra mutatja be.



15.8. ábra A kaszpázok besorolása a szerkezeti és funkcionális alapon képzett csoportokba: a funkcionális csoportokat római számok jelzik

A **kaszpázok szerepe** az eukarióta sejtek működésében sokkal kiterjedtebb, mint azt korábban gondolták. Az irreverzibilis apoptózis mellett számos sejtszintű átrendeződési folyamatban (remodeling) nélkülözhetetlenek (bővebben l. „A kaszpázok élettani funkciói” c. fejezetet.). Nem meglepő tehát, hogy mai ismereteink szerint az emberi fehérjekészlet (proteom) mintegy 1000 féle fehérjéről tudjuk már azt, hogy limitált hasításukat kaszpázok végzik (l. „A kaszpázok szubsztrátjai” c. fejezetet).

A kaszpázok aktivációja

Amint azt már korábban említettük, a prokaszpázok aktiválása limitált proteolízissel, azaz a prodomének lehasításával és a nagy (p20) és kis (p10) alegységek közötti, kaszpáz specifikus konszenzus szekvencia melletti peptidkötések elbontásával történik (15.5. ábra). Mivel a hasító-helyet kijelölő (konszenzus) szekvencia egyben kaszpáz-specifikus is, ennek alapján a kaszpázokra jellemző az **autokatalízis** (amikor ugyanazon típus molekulái kölcsönösen hasítják egymást). Többféle kaszpázról lévén szó, ez egyben azt is lehetővé teszi, hogy a kaszpázok több tagból álló reakció sorokba rendeződjenek (úgynevezett **kaszpáz-kaszkádok**). Nyilvánvaló, hogy a sor elején olyan molekulák állnak, amelyek autokatalízissel aktiválódnak – ezek lesznek az iniciátor kaszpázok, míg a kaszkád sort a végrehajtó kaszpázok zárják (15.6. ábra).

A 15.5. ábrán egyértelműen látható, hogy az aktív enzimet két-két p20 és p10 domén alkotja, ami csak két prokaszpáz molekulából származhat. Az aktivációnak tehát van még egy feltétele, s ez a proenzimek összegyűjtése, toborzása (recruiting), hiszen az aktív enzim kialakításához a hasítás és a dimerizáció egyaránt fontos lépés.

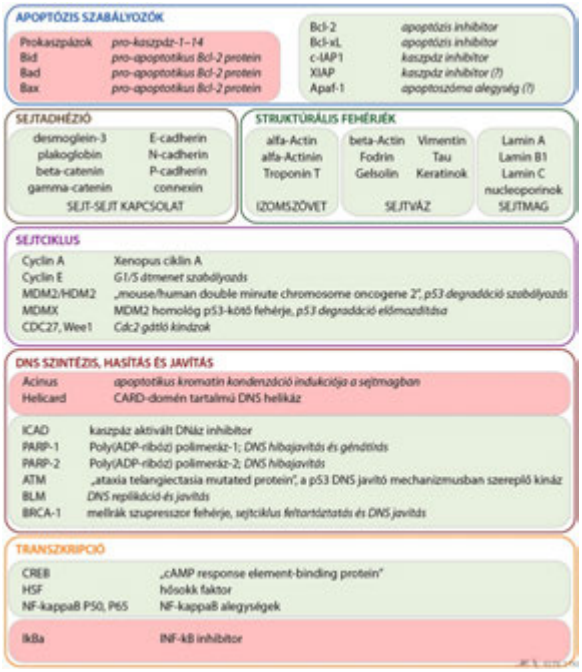
Az **iniciátor kaszpázok esetében** az aktiváció nagy, többkomponensű molekuláris komplexumokban történik (DISC vagy apoptoszóma, illetve PIDDoszóma, l. később), míg az **effektor kaszpázokat** vagy aktív iniciátor kaszpázok, vagy a citotoxikus T-sejtek által a célsejtbe juttatott granzim-B (granzyme-B) enzimek, vagy Ca^{2+}-aktivált proteolitikus enzimek, az úgynevezett kalpainok aktiválják.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A kaszpázok szubsztrátjai

A kaszpázok szubsztrátjai között szerepelnek a sejthalál folyamatában meghatározott szereppel rendelkező, **strukturális vagy szabályozó szerepet betöltő fehérjék**, amelyek a **sejt szinte minden kompertimentumában és működésének minden szintjén** megtalálhatók. Hasításuk következtében a sejt vázrendszere összeesik és a fehérje szintézis minden szinten ellehetetlenedik. Felszámolódnak a fokális kapcsolatok, amelyek a sejtet a szomszédokhoz, illetve az extracelluláris mátrixhoz kötik: ez lehetővé teszi a sejt zsugorodását és környezetből való kiválását.

A kaszpáz szubsztrátok között megtaláljuk magukat a pro-kaszpázokat, valamint a pro- és antiapoptotikus fehérjéket (l. később). Ezen kívül vannak citoplazma (β-aktin, fodrin, gelsolin, vimentin, citokeratinok) és magváz (laminok, nukleoporinok), valamint ER→Golgi transzportot, Golgi szerkezetet biztosító fehérjék, vezikuláris transzportban (clathrin-burok összeállítása), sejtadhézióban (desmosoma és nexus /gap junction/ felépítésében) résztvevő proteinek, az ECM kapcsolatot biztosító fehérjék (integrinek), jelátviteli útvonalakban (β-catenin, integrin útvonal) szereplők és egyben transzkripciót szabályozók (CREB, HSF, NF-κB), transzlációt (eukarióta transzlációs iniciátor faktor fehérjék), fehérje körforgalmat, RNS szintézist és illesztést, valamint sejtciklust (ciklin A, ciklin E, Cdk aktivitás) regulálók, végül pedig a DNS replikációban és hibáinak kijavításában (ICAD, acinus, helicard, PARP) résztvevő proteinek. A proteolízis hatására egyesek inaktiválódnak, mások pedig aktiválódnak: az anti-apoptotikus fehérjék (pl. Bcl-2)– az elvárásnak megfelelően – az első csoportba, míg a pro-apoptotikus faktorok (l. Bcl-2 fehérjecsalád) és a kaszpáz inhibítorok a másodikba tartoznak (15.9. ábra).



15.9. ábra Néhány fontos kaszpáz szubsztrát az eddig azonosított több száz közül. A fehérjéket funkcionálisan csoportosítottuk. A piros keretbe foglaltak aktiválódnak, a zöld keretben szereplők inaktiválódnak. A XIAP és Apaf-1 neve mögött zárójelben szereplő kérdőjel arra utal, hogy az inaktiváció csak feltételes.

A kaszpázok szubsztrátjainak azonosítására többféle molekuláris biológiai megközelítést alkalmaztak; ezek közül az apoptotikus sejtek szisztematikus proteomikai analízisével ma már közel 1000 szubsztrátot azonosítottak. Ezek listája sejtenként részben változó, aminek hátterében az áll, hogy egy adott kaszpáz sejttípus-függő mértékben aktiválódhat (egyes fehérjék csak masszív kaszpáz aktiváció alkalmával hasítódnak), illetve az, hogy egyes szubsztrátok szekvenciája organizmusonként kissé eltérő lehet, s a kaszpáz hasítási hely nem feltétlen őrződik meg (a ciklin A afrikai karmosbéka oocita apoptózisa során hasítódik, míg emlős sejtben nem). Az apoptózis jelenségének konzervatív voltából kiindulva azonban feltételezhetjük, hogy létezik **a szubsztrátoknak egy jól körülhatárolható**, a sejthalál folyamatának levezényléséhez, a környezeti reakciók beindításához és szabályozott lebonyolításához döntően szükséges **köre**. Ez a többszintű rendszer magába foglalja a 1) sejtciklus befagyasztását, 2) a DNS hibajavító (repair) mechanizmusok ellehetetlenítését, ezzel párhuzamosan a kromatin állomány kondenzációját, 3) a molekuláris

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

szintű mechanizmusok szétszerelését, 4) a sejt környezetből való kiválását, elkülönülését, valamint 5) citokin prekurzorok előállítását.

A fenti, 15.9. ábra által közölt táblázatból csak néhány fehérjét emelünk ki részletesebb bemutatásra. Az apoptózis morfológiai jellegzetessége a **kromatin állomány kondenzációja** (l. 15.1. és 15.2. ábra) és a DNS feldarabolódása. A kondenzációban vesz részt az **acinus** (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus) és a CARD mikrodoményt hordozó DNS helikáz, a **helicard** (CARD-containing DNA helicase). Az apoptotikus sejt DNS állományának **internukleoszómális** (oligonukleoszómális) **fragmentálásá**ban kiemelkedő szerepet játszik a kaszpáz aktivált DN-áz, a **CAD** (caspase activated DNA-se). Az ép sejtben ezt egy inhibítor, az **ICAD** (inhibitor of CAD) kötött, inaktív állapotban tartja. A kaszpáz kaszkád aktiválódásakor a végrehajtó kaszpáz-3 elhasítja az ICAD fehérjét, amely ezt követően leválik a CAD molekuláról, így az utóbbi aktiválódik, bejut a magba és ott elhasítja a nukleoszómák közötti DNS szálat (16.10. ábra).

A **PARP-1** ADP-ribóz polimereket köt bizonyos magfehérjékhez, ezzel a sérült DNS hibáit kijavító mechanizmus beindítója. Korábban úgy gondolták, hogy a kaszpáz-3 általi inaktiválása letális DNS elváltozásokhoz vezetve járul hozzá a sejt halálához. Azt figyelembe véve azonban, hogy a PARP tevékenysége, így a DNS hibáinak kijavítása igen nagy energiát emészt fel, ennek a folyamatnak kaszpáz-3 általi kikapcsolása a sejt ATP szintjének megőrzésében játszik szerepet. Míg az apoptózis energiaigényes folyamat, addig az energia hiány a sejt nekrózissal történő gyors halálához vezet. (Kaszpáz rezisztens PARP jelenléte, illetve ATP elvonás az apoptózist kiváltó stimulusok mellett is nekrotikus sejthalált eredményez.) A PARP tehát inkább az apoptotikus és a nekrotikus sejthalál típus közötti egyensúly felbillentésére szolgáló molekuláris kapcsolóként fogható fel, inaktivációja az energiaszint megőrzésén keresztül **biztosítja az apoptózis energetikai hátterét**.

A hagyományos felfogás szerint az apoptózis és a **gyulladás** folyamata egymástól elhatárolt események, az apoptózist nem kíséri gyulladás. Mai ismereteink szerint azonban a két folyamat több szinten is kapcsolatban van egymással. Tudjuk, hogy a kaszpáz 1 olyan citokin prekurzorok érésében is főszerepet játszik, amelyek gyulladáskeltők (l. piroptózis).

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy ahhoz, hogy egy szubsztrátként azonosított molekula hasítása az adott körülmények között az élő sejtben megtörténjen, az szükséges, hogy az aktivált enzim és a szubsztrát ugyanazon kompartmentumban legyen. Erre a proteomikai eredmények nem adnak információt, így a reakció végbemenetelének bizonyítására az ultrastrukturális szintű morfológiai vizsgálat elengedhetetlen.

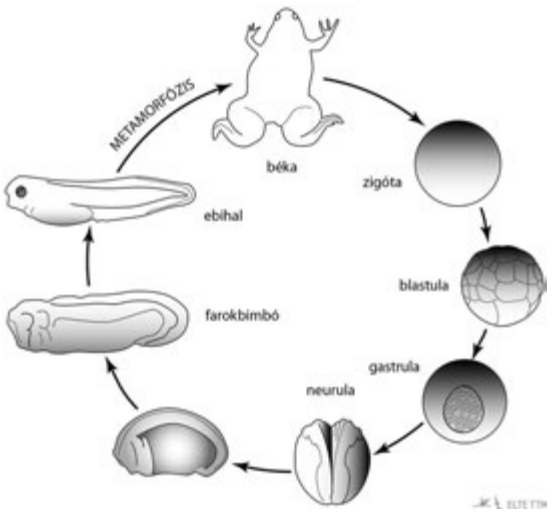
A kaszpázok élettani funkciói

A kaszpázok fiziológiai funkcióinak áttekintésekor két alapvetően eltérő helyzetet érdemes elkülönítenünk. Az egyikben a kaszpázok sora aktiválódik, azaz apoptotikus sejthalál következik be, ami az adott sejt célzott eliminációját szolgálja. A másik esetben egy-egy kaszpáz olyan folyamatban vesz részt, amelynek nem a sejt elpusztítása, hanem valamilyen végdifferenciációs folyamat lebonyolítása a célja.

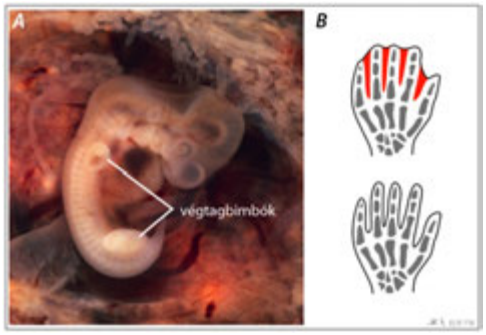
Az apoptózis és a szöveti átszerveződés

Az apoptózisnak az alaki fejlődésben (**morfogenezis**ben) betöltött szerepe mindenki előtt ismert. Gondoljunk csak a lárvális szövetek eliminációjára a metamorfózis (15.10. ábra), vagy a nagyszámú felesleges idegsejt eltávolítására az idegrendszer fejlődése során. A sejthalál e típusa újraformálhatja a test alakját szöveti reorganizáció nélkül (l. az interdigitális szövetrészek eltávolítása a végtagfejlődés során), vagy a környezetben indukált szöveti (extracelluláris mátrix) átszerveződéssel is. Az önálló ujjak kialakításának folyamata egy kőszobrász munkájához hasonló, ahol a művész a felesleges részek eltávolításával, a környezet meghagyásával formálja meg a végleges alakot (15.11. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



15.10. ábra Az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) metamorfózisa. Az átalakulás során az egyik legfeltűnőbb változás az ebihal farkának regressziója: a „felesleges” szövetrészek apotózissal pusztulnak el.



15.11. ábra Az apoptózis szerepe szövetrészek eltávolításában. A) Emberi magzat végtagbimbói. B) Az ujjak közti területek (piros) felszámolása a környezet érintetlenül hagyásával történik.

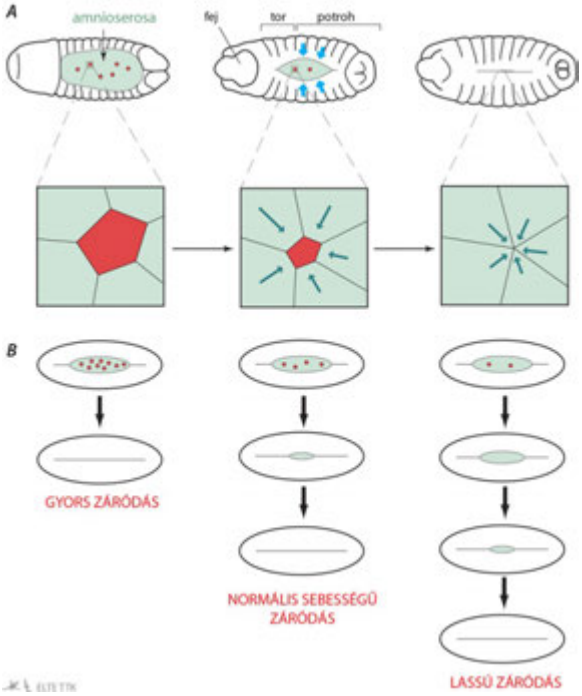
Amikor az apoptózisnak aktív szerepe van a **környezet átalakításá**ban, az inkább egy fém megmunkálásához hasonlít, ahol lényeges méretű szövetrészek kiemelése nélkül, inkább a felszín átalakításával formálódik meg az új alakzat. Régóta ismert, hogy az apoptotikus sejtek képesek üzeneteket küldeni nagyobb távolságokra. Ilyen üzenetek a makrofágokat csalogató „találj meg” („find me”) és a bekebelezést serkentő „egyél meg” („eat me”) szignálok (l. később). Csak az utóbbi időben figyeltek fel arra, hogy a pusztuló sejtek a közvetlen környezetükkel is kommunikálnak. Az például, hogy az apoptotikus hámsejtek kilökődnek a hámrétegből, annak is köszönhető, hogy hatással vannak a szomszédos sejtek vázára, s abban a sejtek alakját megváltoztató folyamatokat indukálnak. Ez a folyamat működhet biológiai „ollóként” is, melynek eredményeképpen szomszédos szövetrészek elszigetelődnek egymástól (a jelenség megfigyelhető az ecetmuslica embrionális fejlődésében szelvényhatárok kijelölése és megtartása során).

A sérülés által kiváltott apoptózis esetében több modell szervezetben (hidra, planária, ecetmuslica, gőte, afrikai karmos béka, egér) megfigyelték, hogy a pusztuló sejtek **mitogén szignálok**at bocsátanak a környezetükbe. Ha a sejt életben marad (pl. kaszpáz inhibítorok hatására), akkor ez a szövet túlburjánzásához (hiperplázia), a szerv normálisnál nagyobb méretűvé válásához vezet. Ha elpusztul, akkor helyét a sejtosztódással létrejött új sejtek foglalják el. A mitogén szignálok kibocsátásának a zavartalan egyedfejlődés során is szerepe lehet, erre utal az, hogy a jelenséget a Drosophila ivarsejtképző sejtvonalának sejtszám szabályozása során is megfigyelték. (A „zavartalan” jelző itt „szokásost” jelent, hiszen a sejtek számára az egyedfejlődés számtalan stresszhelyzetet teremt, ami lényegében nem különbözik a sebzés okozta „megrázkódtatástól”.)

Néhány éve ismert, hogy az apoptózissal elpusztuló sejtek egy sejtrétegben olyan húzóerőt generálhatnak, ami befolyásolja a **morfogenetikus sejtvándorlások** sebességét. A Drosophila embrió egyedfejlődésének késői lépése az, amely során a háti oldalt borító átmeneti amnioserosa szövete felszívódik, s helyét epidemisz foglalja el. A folyamat során az amnioserosa területe zsugorodik, a lateralis felhám rétege pedig dorsalis irányba terjeszkedik

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

mindaddig, amíg a háti középsíkban a jobb és bal oldali szélei összeérnek (dorsal closure). A folyamat valószínűleg az amnioserosa sejtjeinek mintegy 10%-ától indul: ezek a sejtek apoptózissal pusztulnak el, s közben a sejtváz átszerveződését, így alakváltozást indukálnak a szomszédaikban. Az apoptotikus sejtek száma aktívan hat a környezetre: a sejtpusztulás intenztitásának növelése (ektopikus expresszió) a folyamat gyorsulását, míg a pusztuló sejtek számának csökkentése (apoptózis gátlás) a dorzális záródás késleltetését eredményezi (15.12. ábra).



15.12. ábra Az apoptózis morofgenetikus szerepe az ecetmuslica epidermiszének záródásában. A) A felső ábrasor a Drosophila lárva dorsalis felszínét ábrázolja az amnioserosa területével. Ebben a piros pöttyök az apoptotikus sejtek jelenlétére utalnak. A középső rajzon a kék nyilak azt a húzóerőt jelzik, amit a pusztuló sejtek a környezetükben keltenek, s amelynek hatására az epidermisz réteg szélei a dorsalis középsík felé húzódnak. A jobb oldali ábrán a záródás már csaknem teljes. Az alsó képsor az amnioserosa kinagyított területén egy apoptotikus sejtet és ennek szomszédait mutatja nagy nagyítással. A szomszédokban kialakított, fokozatosan növekvő megnyúlás lehet a forrása annak a húzóerőnek, amit a pusztuló sejtek a környezetükben keltenek. (A szomszédos sejtek helyzete a határoló négyzethez képest az ábrasor mentén változatlan!) B) Az apoptotikus mintázat változásának hatása a dorsalis záródás sebességére: az apoptotikus sejtek számának emelése a záródás sebességét növeli, míg a sejthalál gátlása a záródást lassítja.

A kaszpázok nem-apoptoptikus funkciói

Az előző példákkal ellentétben egyes morfogenetikus lépésekben nem a teljes kaszpáz hálózat aktiválódik, azaz az aktiválódás nem vezet apoptotikus sejthalálhoz. Ezekben a folyamatokban az enzimek nem–apoptotikus funkciói kerülnek előtérbe. Ahhoz, hogy ez a folyamat ne vezessen sejthalálhoz, az aktivációnak térben és időben nagyon szabályozottnak, átmenetinek és limitáltnak kell lennie. Arról kevés ismeretünk van, hogy milyen tényezők biztosítják azt, hogy a folyamat során csak bizonyos szubsztrátok hasítása történjen, mások pedig érintetlenek maradjanak. A háttérben állhat a kaszpázok kompartmentumokhoz kötése, anti-apoptotikus faktorok koordinált expressziója, illetve a kaszpáz aktivitás inhibítorok segítségével történő féken tartása.

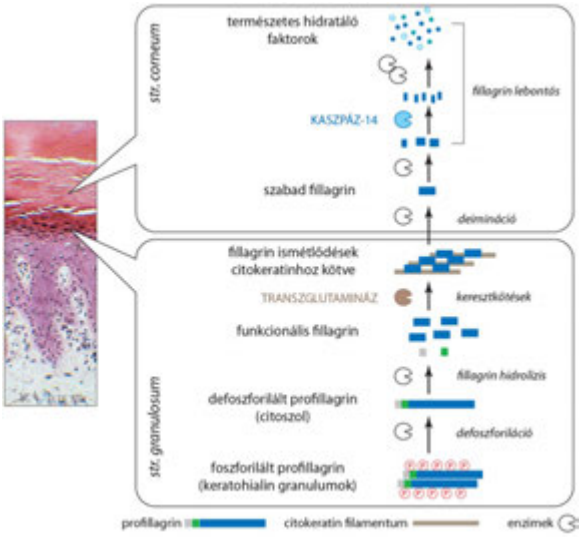
Az in vitro és in vivo (kaszpáz hiányos transzgenikus egértörzseken végzett) kísérletek eredményeit a 15.I. táblázat foglalja össze. Ebből csak néhány példát emelünk ki. Az iniciátor kaszpázok közül egérben a kaszpáz-8 hiánya rendellenes érfejlődéssel jár, ami más szervek morfogenezisére is végzetes hatással van: az embriók az intrauterin élet felének tájékán meghalnak. A kaszpáz-9 génjének kiütése nem jár 100%-os letalitással, s a túlélőkben késleltetett velőcső záródást, tágult agykamrákat, hibás axon növekedést és gyenge szinaptikus jelátvitelt eredményez. A végrehajtó kaszpázok közül a kaszpáz-3 esetében jegyezték fel, hogy – hasonlóan a kaszpáz-9-hez – hiánya az idegrendszer rendellenes fejlődéséhez vezet. Az enzimhiányos egerek nagy része a születés tájékán meghal.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

15.I. táblázat. A kaszpázok nem-apoptotikus funkcióinak összefoglalása.

NÉV	FENOTÍPUS	FELTÉTELEZETT FUNKCIÓ
kaszpáz-1	normális fejlődés, egyes sejttípusokban csökkent apoptózis intenzitás	vírusfertőzések és tumor-képződés elleni védelem
kaszpáz-2	normális fejlődés, sterilitás, rendellenes apoptózis csak egyes sejtvonalakban	különböző pro-apoptotikus útvonalak tagja
kaszpáz-3	születés körüli, változó okokra visszavezethető letalitás; a túlélők agyi hiperplasiat mutatnak	nélkülözhetetlen a neuronális sejthalálban, s egyes sejttípusok differenciálódásában
kaszpáz-8	embrionális letalitás	halál receptor útvonal tagja, érrendszer fejlődése, immunsejtek differenciációja, epidermalis sebgyógyulás
kaszpáz-9	születéskori, nem 100%-os letalitás, a túlélők agyi hiperplasiat mutatnak	fontos a neuronális sejthalálban és a citotoxikus drogok és besugárzás elleni védelemben
kaszpáz-11	normális fejlődés, sterilitás	bakteriális fertőzések elleni védelem
kaszpáz-14	normális fejlődés, sterilitás	keratinizáció

A szervezet bizonyos sejtjei differenciálódásuk során „elveszítik” a sejtmagjukat. Ez a sejtmag degradáció vagy kilökődés olyan esetekben figyelhető meg, ahol az érett sejtek funkciója egy bizonyos fehérje nagymennyiségben való felhalmozásával kapcsolatos (pl. keratin, krisztallin, hemoglobin). A keratinizáció speciális, sejthalállal végződő differenciációs folyamat, melynek során a kaszpáz-14 a fillagrin aminosavakká történő lebontásában vesz részt: a keletkező aminosavaknak a felhám hidratálásában van szerepük (15.13. ábra). Kaszpáz aktiváció kimutatható a lencserostok magjának lebomlásakor is, az erythropoesis, a megakariociták fejlődésére, a vérlemezkék képződése, a makrofágok és a vázizomzat fejlődése, a spermatidák individualizálódása (a közöttük lévő citoplazma hidak felszakadása) során is. Természetesen nem feledkezhetünk meg a citokinek érésében, az örökletes (nem specifikus) immunrendszerben (innate immune system), valamint egyes betegségek kialakulásában betöltött szerepükről sem (l. következő fejezet).



15.13. ábra A kaszpáz-14 szerepe a fillagrin lebontásában. Az oldhattalan, foszforilált fillagrin a szemcsesejtek rétegében (str. granulosum) a keratohialin granulumokban halmozódik fel. Defoszforiláció után a citoszolba kerül, ahol hidrolízissel funkcionális fillagrin képződik belőle. Ezt a transzglutamináz citokeratin fibrillumokhoz köti, ami erősíti a sejtvázrendszert és a sejtek ellapulását okozza. A fillagrin deiminációja érzékennyé teszi azt proteázokkal szemben. A természetes hidratáló anyagokat eredményező, lépcsőzetes lebontásban – több enzim mellett – a kaszpáz-14 is fontos szerepet játszik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az apoptózis és a kaszpáz aktivitás betegségekben betöltött szerepe

Mint láttuk, az apoptózis rendkívül összetett folyamat. Részfolyamatainak tér és időbeli rendezettsége hierarchikus és egymáshoz kapcsolódásuk szigorúan szervezett. Az összehangolásban fellépő bármilyen zavar, ami akár lassítja, akár „felpörgeti" az egyes részfolyamatok intenzitását, betegségek megjelenéséhez vezet. A jelenség kimutatható daganatok kialakulása és fennmaradása, tartós virális fertőzések, autoimmun folyamatok, neurodegeneratív betegségek esetében.

Megkérdőjelezhetetlen bizonyos kaszpázok és kaszpáz szubsztrátok szerepe az **autoimmun betegségek** kialakulásában. Az intenzív apoptózis során keletkező, kellő gyorsasággal el nem „takarított" sejttörmelék nagy mennyiségben tartalmaz ugyanis intracelluláris, proteolitikus hasításon átesett fehérjéket. Ezekben a hasítás következtében autoantitestek képződését kiváltó, a natív térszerkezetben (még) rejtett részletek kerülnek felszínre. Ilyen, autoimmun betegségekben azonosított kaszpáz szubsztrátok a laminok, a fodrin és a PARP is.

A neurodegeneratív betegségek közül a **Huntington- és az Alzheimer-kór** kialakulásában van szerepe kaszpáz hasításnak. A huntingtin gén 5' végén egy CAG triplet megsokszorozódása eredményezi azt, hogy a fehérje N-terminálisán egy poli-glutamin szekvencia jelenik meg. A huntingtint a kaszpáz-3 hasítja, mégpedig a poli-glutamin szakasz hosszával korreláló intenzitással. A proteolízis eredményeként a fehérjének egy olyan N-terminálist tartalmazó része keletkezik, ami amiloidogén, azaz oligomerizációra, s ezen keresztül aggregátumok képződésére hajlamos.

Az Alzheimer-kórban extracellulárisan felhalmozódó amiloid-beta$_{40\text{-}42}$ (A$\beta_{40\text{-}42}$) képződésében szintén felvetődött a kaszpáz-3 szerepe. Egyrészt az amiloid prekurzor fehérje (APP) olyan hasítási termékét állíthatja elő, amiből nagyobb valószínűséggel keletkezik patogén Aβ, másrészt képes az Aβ keletkezésében kulcsszerepet játszó γ-szekretáz egyik alegységének, a preszenilin 1-nek a hasítására is – ezzel a familiáris Alzheimer-kórban jellemző tüneteket okozza. A fokozott Aβ oligomer produkció apoptotikus neuron pusztuláshoz vezet, amely során a kaszpáz-3, mint effektor kaszpáz aktivitása nő. Transzgénikus egérben megfigyelték, hogy kaszpáz aktivitás előzi meg az AD kialakulásában szintén kulcsszerepet játszó tau páros helikális kötegek képződését is.

Az irodalomban arról is találunk adatot, hogy kaszpázoknak szerepe van a motoneuronok betegségeként számon tartott ALS (amyotrophic lateral sclerosis) és a fokozott asztrocita aktivációt jelentő asztrogliózis kialakulásában is.

Ellenőrző kérdések

1. Sorolja fel az apoptotózis morfológiai jellemzőit!
2. Mutassa be a kaszpázok közös tulajdonságait!
3. Csoportosítsa a kaszpázokat azok prodomén szerkezete alapján!
4. Csoportosítsa a kaszpázokat azok funkciói alapján!
5. Milyen elemekből épül fel a kaszpáz-kaszkád?
6. Milyen kaszpáz szubsztrátokat ismer? Csoportosítsa ezeket helyzetük és funkciójuk szerint! Legyen köztük struktúr és adhéziós fehérje, sejtciklus és transzkripció szabályozó, valamint a DNS állomány épségét fenntartó!
7. Mi a kaszpázok élettani jelentősége? Milyen folyamatokban vesznek részt a fejlődés során? Említsen olyan eseményt, ami apoptózissal jár, s olyat, amiben nem következik be sejthalál!

Felhasznált és ajánlott irodalom

Crawford, E. D., Seaman, J. E., Barber, A. E., David, D. C., Babbitt, P. C., Burlingame, A. L., Wells, J. A. (2012) Conservation of caspase substrates across metazoans suggests hierarchical importance of signaling pathways

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

over specific targets and cleavage site motifs in apoptosis. *Cell Death Differ.***19(12)**, 2040-2048. doi: 10.1038/cdd.2012.99

Crawford, E. D., Wells, J. A. (2011) Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **80,** 1055-1087. doi:10.1146/annurev-biochem-061809-121639

Eimer, W. A., Vassar, R. (2013) Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener.***8**, 2-12. doi: 10.1186/1750-1326-8-2.

Fischer, U., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. **10(1)**, 76-100. doi: 10.1038/sj.cdd.4401160

Hart, M. P., Gitler, A. D. (2012) ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *J Neurosci*. **32(27)**, 9133-42. doi: 10.1523/jneurosci.0996-12.2012

Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., Gilbert, B., Lippens, S., De Groote, P., Roelandt, R., Van Damme, P., Gevaert, K., Presland, R. B., Takahara, H., Puppels, G., Caspers, P., Vandenabeele, P., Declercq, W. (2011) Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *J Invest Dermatol.***131(11)**, 2233-41. doi: 10.1038/jid.2011.153.

McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.***5(4)**, a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.

Metcalfe, M. J., Huang, Q., Figueiredo-Pereira, M. E. (2012) Coordination between proteasome impairment and caspase activation leading to TAU pathology: neuroprotection by cAMP. *Cell Death Dis.***3**, e326, doi: 10.1038/cddis.2012.70

Miura, M. (2012) Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.***4(10)**, pii: a008664. doi: 10.1101/cshperspect.a008664.

Park, H. H. (2012) Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci.***13(4)**, 4807-18. doi: 10.3390/ijms13044807.

Perry, J. A., Kornbluth, S. (2007) Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div.***2:** 12. doi: 10.1186/1747-1028-2-12

Ryoo, H. D., Bergmann, A. (2012) The Role of Apoptosis-Induced Proliferation for Regeneration and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.***4(8)**, a008797. doi: 10.1101/cshperspect.a008797

Suzanne, M., Steller, H. (2013) Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.***20(5)**, 669-75. doi: 10.1038/cdd.2013.11.

Young, M. M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A. K., Amin, S., Hu, C. D., Zhang, J., Kester, M., Wang, H. G. (2012) Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem.***287(15)**, 12455-68. doi: 10.1074/jbc.M111.309104.

16. A sejthalál receptorok, apoptózis külső stimulusra (I. típus)

Indukció a halál receptorokon keresztül

A külső útvonalon keresztül aktivált apoptózis egészséges, de nem kívánatos, esetleg veszélyes sejtek eltávolítására szolgál. Ebben az esetben az iniciátor kaszpázok tandem **DED domén**nel rendelkező proenzimei (prokaszpáz -8

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

és -10) közvetlenül a célsejt membránjához kötődő **sejthalál indukáló molekuláris komplexum** (death inducing signaling complex, **DISC**) révén aktiválódnak (16.1. ábra).

A DISC fő komponensei a **halál receptorok** (death receptors, **DR**), amelyek valamennyien a tumor nekrózis faktor receptor (TNF-R) szupercsalád tagjai. Közös szerkezeti jellemzőjük, hogy a sejtközötti tér felé néző ligandum-kötő régiójuk mellett van egy hidrofób transzmembrán doménjük, valamint a C-terminálison egy fehérje-interakciós, úgynevezett **halál domén**jük (**DD**). Ilyen receptorok többek között a **TNF-α receptor** (tumor necrosis factor-α receptor, TNF-R1) a **Fas** (TNF receptor superfamily member 6, más neveken: CD95, Apo1, TNFRSF6) és a **TRAIL-receptorok** (TNF-alpha-related-apoptosis-inducing ligand receptor) is. Ma már a sejthalál receptorok esetében is törekszenek a nevezéktan egységesítésére, és számozással történő megkülönböztetésükre. Valamennyi sejthalál receptorra a DR rövidítést használják (DR1: TNF-R1, DR2: Fas/Apo1/CD95, DR3: Apo2, DR4: TRAIL-R1, DR5: TRAIL-R2).

A DISC komplex

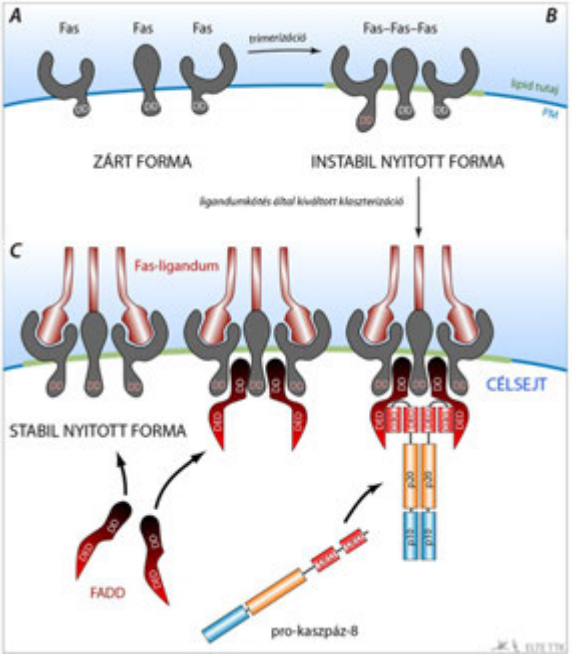
A DISC összeszerelődése

A halál receptor citoplazmatikus vége köré szerveződő **sejthalál indukáló molekuláris komplexum,** röviden **DISC** összetétele a legegyszerűbb a Fas esetében. Ez a receptor (Fas), a FADD (Fas associated death domain) és a pro-kaszpáz-8 molekulákból szerelődik össze. A jelfelfogó receptor és a jelátvitelt megvalósító kaszpáz között a FADD hídként szolgál, mivel a pro-kaszpázok nem képesek közvetlenül a Fas molekulához kötődni. Körülményektől függően a pro-kaszpáz-8 helyett a komplex része lehet a pro-kaszpáz-10 vagy a kaszpáz-8 homológ FLIP is.

A DISC **összeszerelődése** (kölcsönhatások kialakulása a receptorok és a FADD molekulák között) ligandum jelenléte nélkül nem következik be. Mivel a komplex összeállása szó szerint végzetes következményekkel jár, a folyamatnak rendkívül szigorúan szabályozottnak kell lennie. Ugyanakkor az önszerveződés gyorsasága szükséges akkor, amikor a külvilágból érkező jelzés (ligandum) valóban jelen van.

A DISC összeállásának alapfeltétele a receptor trimerizációja. Ez általában egy speciális membrán környezetben (lipid tutaj, raft) történik, s akár véletlenszerű esemény is lehet. A **Fas trimerizációjá**val annak intracelluláris végén lévő halál doménje (Fas-DD) olyan konformáció változáson megy át (2 hélixének átrendeződésével), amelynek következtében felszínén kialakul a más molekulák DD doménjével kötést kialakítani képes felszín. Ez a receptor (DD domén) úgynevezett nyitott formája, ami azonban csak **ligandum kötése**, a **receptor csoportosulása** (klaszterizációja) nyomán stabilizálódik megfelelő mértékben ahhoz, hogy **FADD adapter fehérjék** DD doménjeit kösse, azaz FADD molekulákat toborozzon. A ligandum jelenléte már nem véletlenszerű, így a FADD-nak a DISC komplexbe vonása már szintén nem történhet meg véletlenszerűen. A megkötött FADD fehérjék ezután a másik fehérje-interakciós doménjükkel, a halál effektor doménnel (**DED**) kaszpáz-8 **proenzimek** DED régiójával képesek kölcsönhatásba lépni: a pro-kaszpázok komplexbe épülése ekkor már elkerülhetetlen. Ezt a folyamatot vázlatosan, a valós sztöchiometriai és szimmetriaviszonyokat nem tükrözve az 16.1. ábra mutatja be.

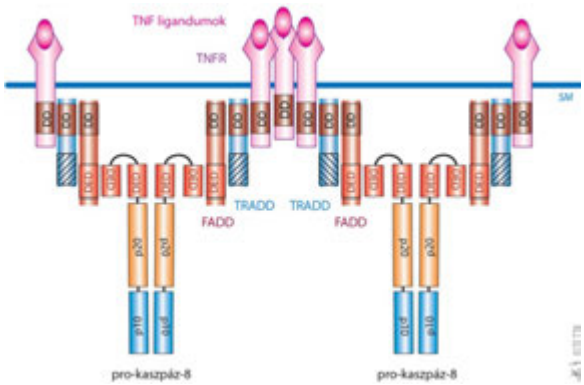
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.1. ábra A Fas DISC összeszerelődésének lépései. A Fas lipid tutajban (zöld plazmamembrán szakasz) történő oligomerizációja során a monomer Fas DD doménje globuláris, zárt konformációjú állapotból (A) instabil, nyitott formájúvá alakul (B). A nyitott formát a Fas-ligandum (be)kötése által indukált receptor csoportosulás (klaszterizáció) stabilizálja. A stabil Fas-DD doménhez a FADD adapter fehérje DD doménje képes kötődni, s ezzel lehetővé válik a pro-kaszpáz-8 DED doménen keresztüli toborzása is.

A Fas DD doménjének nyitott formában történő stabilizálása feltehetően nemcsak a FADD kötőhelyet alakítja ki, hanem abban is szerepe van, hogy két-két, nem ugyanabba a trimerbe tartozó Fas molekula között híd képződjön. Ennek következtében a kialakuló DISC nem más, mint egy több egységből álló **molekuláris hálózat**, amelyben egymást segítő (stabilizáló) hálószemek vannak. Ebben a rendszerben megállapíthatók ugyan „alapegységek" (sztöchiometriai arány az egyes komponensek között), arról azonban, hogy ezekben a ligandumok, a halál receptorok és a FADD molekulák milyen arányban vesznek részt, nincs egységes vélemény az irodalomban.

A TNF-α receptorhoz a FADD adapter fehérje nem képes közvetlenül hozzákapcsolódni, ezért a DISC-be egy másik közvetítő fehérje is beépül. Ez a **TRADD** (TNF receptor-associated via death domain), aminek DD doménje van, de DED doménnel nem rendelkezik (16.2. ábra).



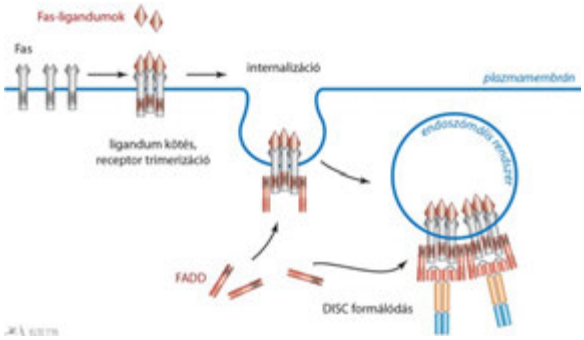
16.2. ábra A TNF-R1 köré szerveződő apoptózist indukáló DISC. Ebben a receptorhoz két adapter fehérje kapcsolódik: az első a receptor DD doménjéhez kapcsolódó TRADD, a második az ehhez kötődő FADD. A FADD DED doménje révén pro-kaszpázokat toboroz a DISC-be.

A sztöchiometriai arány és a komponensek geometriai elrendeződésének fontosságára utal az, hogy az említett halál receptoron keresztül apoptózis és nem-apoptotikus válasz egyaránt kiváltható. A Fas esetében az elsőt membránkötött, a másodikat pedig szolubilis ligandum kötése indítja be. Membránkötött ligandum esetében a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

ligandumok térbeli eloszlását, mintázatát a sejthalált indukáló sejt (pl. T-sejt) plazmamembránjának doménszerkezete határozza meg.

Megjegyezzük, hogy a sejthalál beindításához szükséges, megfelelő mennyiségű pro-kaszpáz aktiválását elvégezni képes méretű és kiterjedésű DISC összeszerelődése nem feltétlen (csak) a sejtfelszínen történik, mivel a sejthalál receptorok internalizálódnak, így az endoszómális rendszerben gyűlnek fel. Kísérleti adatok szerint a FADD molekulák jelentős része is az endoszóma membrán külső (citoplazmatikus) felszínéhez toborzódik, s itt jön létre az úgynevezett **receptoszóma** (16.3. ábra).



16.3. ábra A receptoszóma felépítése. A receptoszóma úgy alakul ki, hogy az internalizálódott, endoszómális halál receptorok köré kiterjedt DISC szerveződik.

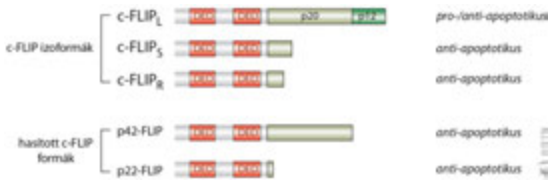
A DISC működésének szabályozása: választás élet és halál között

Ahogy azt az előző fejezetben említettük, a **Fas** (DR2) esetében az összeszerelődő DISC (Fas DISC) FADD adapter fehérjéinek DED doménjeihez kétféle DED domént hordozó protein kötődhet: az egyik a pro-kaszpáz-8/10, a másik a **c-FLIP** (cellular FLICE-inhibitory proteins).

A DISC-ben az aktív kaszpáz létrehozásához a pro-kaszpáz molekulák megfelelő közelsége (oligomerizációja) kell, valószínűleg azért, mert a két molekula egymást hasítja. A kaszpáz-8 létrehozása két egymást követő proteolítikus lépést igényel. A zimogén és az aktív, iniciátor szerepet betöltő enzim szubsztrát specifitása eltérő: míg a pro-kaszpáz-8 specifitása nagyon szűk határok között mozog, addig a kaszpáz-8 jóval több szubsztrátot képes elhasítani. A DISC-ben mindkét aktivitás mérhető, tehát a pro-kaszpáz és a kaszpáz is aktív.

Említettük, hogy a Fas receptorhoz **apoptotikus és nem-apoptotikus jelátviteli útvonal** is kapcsolódik. Az aktív kaszpáz-8 enzimet eredményező második hasítási hely tönkretétele meggátolja az apoptózist, ugyanakkor a nem-apoptotikus jelátvitelt nem érinti. A két jelátviteli útvonal tehát „**szétkapcsolható**”. Tudjuk azt is, hogy pro-kaszpáz-8 katalitikus alegységének **foszforilációj**a szintén megszünteti a pro-apoptotikus funkciót, ugyanakkor a pro-enzim DISC-en belüli **ubiquitinilációj**a pro-apoptotikus hatású.

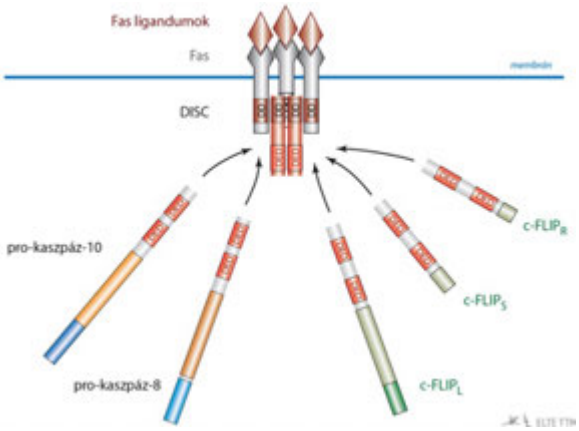
A **Fas DISC-en** belül a pro-kaszpáz-8 inhibítora a **c-FLIP** fehérje, melynek három izoformája ismert. Ezek a hosszú c-$FLIP_L$ (long), és a két rövid c-$FLIP_S$ (short) és c-$FLIP_R$ (raji) forma. Mindegyiknek két **DED** doménje van, így képesek kötődni a FADD adapter molekulákhoz. A két rövid változat anti-apoptotikus, míg a hosszú a körülményektől (receptor stimuláció erőssége, más c-FLIP formák koncentrációja) függően lehet pro- és anti-apoptotikus hatású is. A c-FLIP proteolízisét, azaz további két hasított, rövid forma létrehozását a DISC-ben a pro-kaszpáz-8 végzi. A két c-FLIP hasítási terméke is anti-apoptotikus hatású (16.4. ábra).



16.4. ábra A kaszpáz-8 inhibítor c-FLIP fehérjék. A három teljes hosszúságú izoforma, valamint a hasított, rövid c-FLIP fehérjék is rendelkeznek tandem DED doménnel. Mindegyik protein anti-apoptotikus hatású, a c-$FLIP_L$ azonban lehet pro-apoptotikus is.

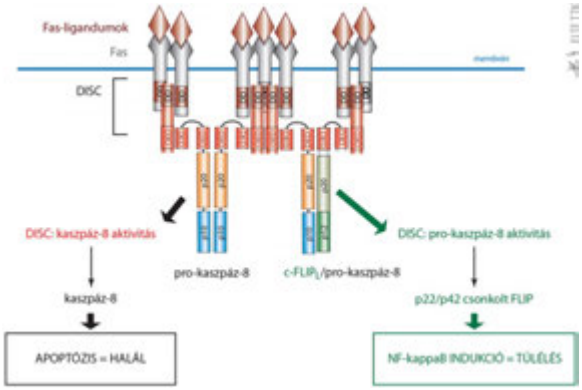
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A cFLIP fehérjék tandem DED doménjük révén versenyeznek a pro-kaszpáz molekulákkal a DISC-beli FADD kötőhelyekért (16.5. ábra), s a verseny eredményeként kaszpáz-kaszpáz homo- és kaszpáz-c-FLIP heterodimerek is keletkezhetnek. A receptorból kiinduló szignalizáció jellegét ennek alapján a bekötődő komponensek aránya fogja meghatározni. Régóta ismert, hogy a Fas jelátvitel nem csak apoptózist eredményezhet, hanem segítheti a sejt túlélését is. Ez utóbbi esetben a szignalizáció az **NF-κB** (nuclear factor-kappa B) aktivitásának emelkedését eredményezi. Ehhez mind a pro-kaszpáz-8, mind pedig a c-FLIP aktivitása szükséges, hiszen ebben a szignalizációs útvonalban a c-FLIP hasított formái vesznek részt. Az útvonal beindításához az kell, hogy a pro-kaszpáz-8 aktív legyen, de ugyanakkor ne keletkezzen belőle az apoptózist beindító, aktív kaszpáz8.



16.5. ábra Tandem DED doménnel rendelkező fehérjék versengenek a DISC-beli kötőhelyekért. A receptorból kiinduló jelátviteli útvonalat a bekötődő komponensek aránya határozza meg.

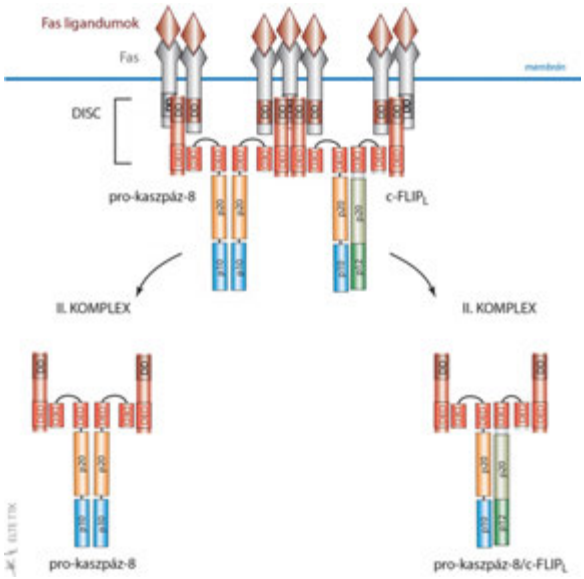
A Fas receptor köré szerveződő DISC tehát két szignalizációs útvonal kiindulópontja: az egyik a sejthalált, a másik a túlélést jelenti (16.6. ábra). Azt, hogy a receptor stimulációját követően melyik útvonal aktiválódik, a pro-kaszpáz-8 és a c-FLIP$_L$ citoplazmatikus, következésképpen DISC-beli arányától függ. A DISC-beli FADD protein DED kötőhelyeiért **két citoplazmatikus DED domént hordozó fehérje verseng**: a c-FLIP$_L$ és a pro-kaszpáz-8. Ha alacsony a c-FLIP mennyisége, akkor a DISC komplexben pro-kaszpáz túlsúly alakul ki, aktív kaszpázok keletkeznek, ami apoptózishoz vezet. Növekvő c-FLIP$_L$ szint viszont az NF-κB útvonalat aktiváló hasított c-FLIP termékek mennyiségének emelkedését eredményezi. Magas c-FLIP$_L$ koncentrációnál a pro-kaszpáz-8 teljesen kiszorul a DISC-ből, így nem képződik sem aktív kaszpáz, sem pedig hasított c-FLIP molekula, tehát egyik jelátviteli útvonal sem aktiválódik.



16.6. ábra A Fas DISC-be bekötődő DED proteinek versengése élet-halál kérdése fölött dönt. Koncentrációfüggő módon a Fas receptor trimer köré szerveződő DISC alkotója lehet a c-FLIP molekula is, amely gátolja a kaszpáz-8 aktivitás megjelenését a DISC-en belül. Alacsony cFLIP mennyiségnél a DISC-be csak pro-kaszpáz-8 épül be, ami aktív kaszpáz-8 enzimek keletkezéséhez, majd sejthalálhoz vezet. Magasabb c-FLIP koncentrációnál a c-FLIP verseng a FADD DED kötőhelyeiért, s részben elfoglalja azokat a pro-kaszpáz-8 molekula elől. Mivel a c-FLIP a pro-kaszpáz aktivitást nem gátolja, a bekötődött c-FLIP fehérjét a szomszédos pro-enzim elhasítja. Ezzel két anti-apoptotikus, NF-κB útvonalat serkentő, rövid c-FLIP termék keletkezik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Úgy tűnik, hogy általánosítható az a megfigyelés, hogy a TNF receptorok jelátviteli útvonalában a DISC (másnéven **I. komplex**) mellett egy másik, a DISC-ből származó, úgynevezett **II. komplex** (complex II.) is részt vesz. Ezt a DR1 (TNF-α receptor-1) esetében írták le először. Összetevői a halál receptor nélküli DISC komponensek, esetleg jelátviteli útvonalanként (receptor típusonként) további molekulákkal kiegészítve. A Fas (DR2) halál receptor esetében a DISC kompnensei a Fas, a FADD molekulák, valamint a pro-kaszpáz8/10 és/vagy a c-FLIP fehérjék. A citoplazmában található II. komlex részei a Fas kivételével ugyanezek (16.7. ábra).



16.7. ábra A Fas jelátviteli útvonalon kialakuló DISC és a II. komplex komponensei. Az itt bemutatott esetben a DISC kialakításában a pro-kaszpáz-8 mellett c-FLIP molekulák is részt vesznek. A citoplazmában aktív II. komplex a receptor kivételével a DISC minden komponensét tartalmazza.

A FADD lokalizációjának szabályozó szerepe

A Fas DISC adapter fehérjéje a FADD, amelyről leírták, hogy foszforilációja **sejtmagi transzport**ot tesz lehetővé. A sejtmagi felhalmozódásnak az adapter fehérje nem-apoptotikus (pl. a sejtciklus szabályozásában, proliferációban betöltött) funkciója során van szerepe. Újabban egyre több adat gyűlik össze arra vonatkozóan, hogy a FADD fehérjéknek a programozott nekrózis, azaz a nekroptózis beindításában, az apoptózis és a nekroptózis sejthalál típus közötti választásban milyen szabályozó szerepe lehet.

Annak, hogy a sejt „nyugalmi" állapotában a FADD nem a citoszolban található, biztonsági funkciója is lehet, hiszen megakadályozza azt, hogy véletlenszerűen összeálljon a DISC más komponenseivel, s így „akaratlanul" a sejt pusztulását okozza. Nukleáris lokalizációt korábban a tumor nekrózis faktor receptor-1 (DR1) adapter fehérje (TRADD) esetében is megfigyeltek.

A DISC összeszerelődéséhez a sejtmagban tartózkodó FADD vagy TRADD molekulákat a citoplazmába kell átirányítani. Arról, hogy ez kapcsolatban van-e a halál receptor ligandum kötésével, s ha igen, milyen mértékben függ magától a receptortól, s hogy a jelátvitelben milyen faktorok vesznek részt, igen keveset tudunk. Ismét utalunk azonban arra, hogy a sejthalál kiváltásához szükséges méretű DISC összeszerelődése egyes adatok szerint az endoszómális membrán mentén (is) történhet, így az adapter fehérjéket is ide kell toborozni.

A poszt-transzlációs módosítások szabályozó szerepe

Az apoptózis indukciójában fehérjék vesznek részt, így várható, hogy számos olyan **poszt-transzlációs módosítás** (PTM) érheti őket, ami befolyásolja a sejthalál kiváltásában betöltött funkciójukat. A részletek ismertetése nélkül ezek között van foszforiláció, glikoziláció, ubiquitiniláció és palmitoiláció is. Az átalakítások érintik a halál receptorokat, a DISC komponenseket, valamint a későbbiekben tárgyalt apoptózist szabályozó fehérjéket (Bcl2 család, IAP) is. A PTM szerepének tisztázását egyes esetekben nehezíti az, hogy az adott proteinnek nem csak apoptotikus szerepe van, így elképzelhető, hogy a szerkezeti módosítás éppen más irányú funkcióját befolyásolja

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

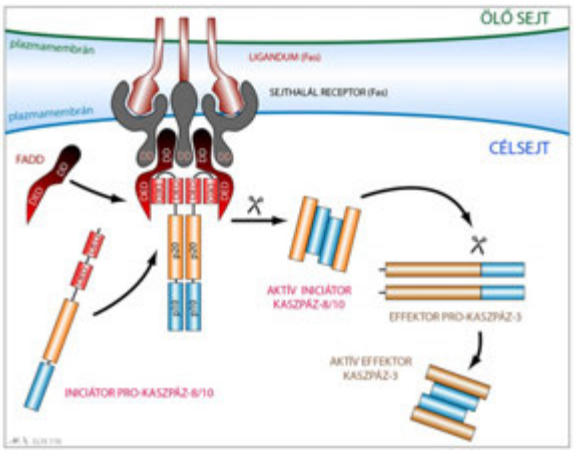
(l. pl. a FADD foszforilációja nem befolyásolja a DISC-beli működését, de hatással van a sejtciklus szabályozásban betöltött szerepére).

Receptor-függő sejthalál útvonalak

Az apoptotikus útvonal

A halál receptoroktól kiinduló apoptotikus szignalizációs útvonalat, azaz a kaszpázokból álló kaszkád sor aktivációját és szerveződését a **Fas DISC–iniciátor prokaszpáz-8** példájával mutatjuk be.

Ahogy erről korábban szó volt, a sejthalált indukáló molekuláris komplexumban az adapter fehérjék több pro-kaszpáz-8 molekulát gyűjtenek és rendeznek maguk mellé, amelyek így megfelelő közelségbe kerülnek egymáshoz ahhoz, hogy egymást aktiválják. Két iniciátor prokaszpáz-8 molekulából egymást követő hasításokkal lesz egy aktív, heterodimer (tetramer) szerkezetű enzim. A DISC-ben megtörténik a két pro-enzim molekula belső, konformációs átrendeződése és autokatalitikus aktiválódása. A DISC-ből kiváló aktív kaszpáz-8 a továbbiakban effektor pro-kaszpáz (pl. pro-kaszpáz-3) proteolitikus aktivációjára képes (16.8. ábra).



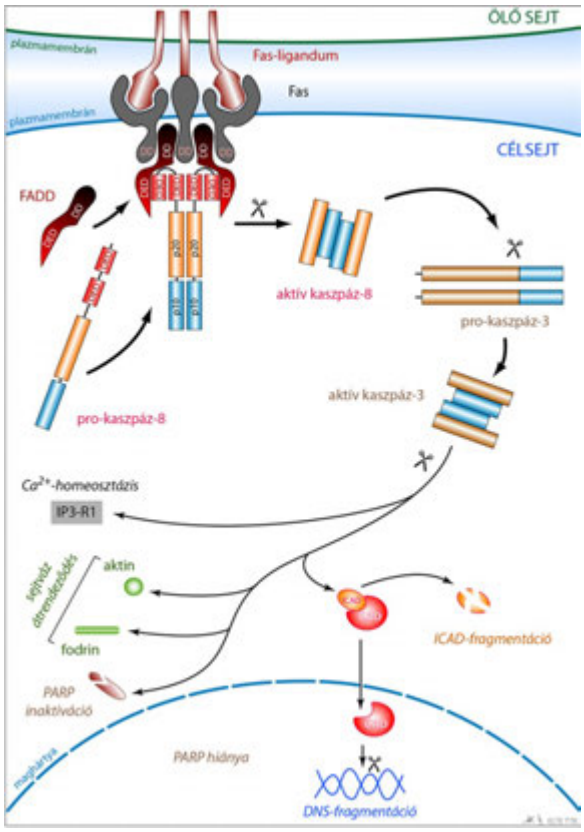
16.8. ábra A pro-kaszpáz-8/10 Fas DISC általi aktiválása. A trimerizálódott Fas magához gyűjti a FADD adapter fehérjéket, azok pedig a pro-kaszpáz-8 molekulákat. Az így összeállt DISC-ből aktív kaszpáz-8 molekulák szabadulnak fel, amelyek effektor kaszpázt aktiválnak (a DISC szerkezetét itt leegyszerűsítve ábrázoltuk).

A halál receptorok által beindított jelátvitel kétféle utat járhat be. Az úgynevezett **I. típusú sejtek**ben a kaszpáz-8 közvetlenül aktiválja a végrehajtó kaszpázokat. A **II. típusú sejtek**ben nem termelődik elegendő aktív kaszpáz-8 az apoptózis hatékony beindításához. Ennek oka az, hogy az ilyen sejtek citoplazmája nagy mennyiségben tartalmazza a végrehajtó kaszpázokat gátló **IAP** (inhibitors of apoptotic proteins) fehérjéket, amik hatékonyan blokkolják a kaszpáz-8 által elindított folyamatot. A II. típusú sejtekben ezért a DISC-ben aktiválódó kaszpáz-8 a **Bid** hasításával a belső sejthalál útvonalat aktiválja (l. 18. fejezet). Mivel a IAP-ok gátló hatása ezen az útvonalon nem érvényesül, a sejthalál folyamata e kerülő út használatával inndítható be.

A külső sejthalál stimulusok által beindított kaszpáz-kaszkád felpörgése, valamint az aktív effektor kaszpázok koncentrációjának ugrásszerű megemelkedése a sejt normális működéséhez nélkülözhetetlen szerkezeti és szabályozó fehérjék (l. 15.9. ábra) tömeges lebontásához vezet (16.9. ábra). Ennek következményeként a citoplazmatikus és a sejtmagi vázrendszer dezorganizálódik, az intracelluláris transzport folyamatok súlyosan károsodnak, alapvető sejtélettani folyamatok leállnak.

Az enzimek egy részének proteolitikus aktiválása mellett, az aktív effektor kaszpázok (pl. a kaszpáz-3) bizonyos enzimek inhibítorainak hasításával enzimeket „szabadítanak fel” a gátlás alól. Ez történik a már említett ICAD esetében, amelyből az inhibítor lehasítása után szabaddá válik az aktív CAD, s a sejtmagba bejutva megkezdi a DNS internukleoszómális feldarabolását (16.9. és 16.10. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

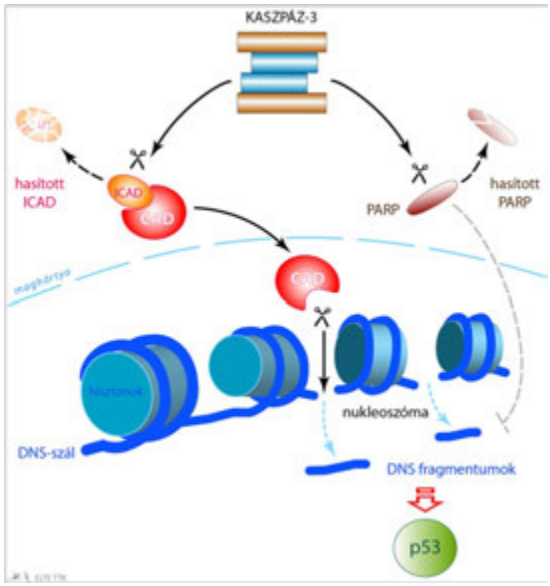


16.9. ábra A kaszpáz-8 által aktivált útvonal hatásai: a DISC-ből felszabaduló iniciátor kaszpáz-8 effektor pro-kaszpáz-3 molekulákat aktivál. Ezek számos olyan fehérje részleges proteolízisét végzik, amelyek funkciójának kiesése a sejtváz és a kromatin állomány feldarabolódásához, széteséséhez vezet. (A DISC szerkezetét leegyszerűsítve ábrázoltuk.)

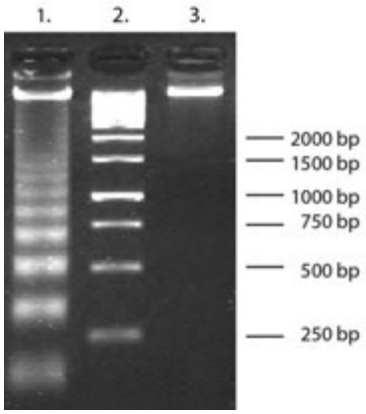
A CAD a DNS szálból kivágja az internukleoszomális szakaszokat, ami előbb-utóbb a kromatin állomány **nukleoszomális méretű feldarabolódásá**hoz vezet (16.10. ábra). Az ily módon történő fragmentáció során csak meghatározott méretű (kb. 180 nukleotid és annak többszörösei) DNS darabok keletkeznek, amelyek agaróz gélen diszkrét, elkülönülő csíkokból álló sorozatot, úgynevezett apoptotikus létrát alkotnak (16.11. ábra). A DNS fragmentáció metszeteken az ún. tunel (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) reakcióval mutatható ki (16.12. ábra).

A kaszpáz aktiváció következtében a DNS sérülések helyreállításában (DNS repaire) nélkülözhetetlen folyamatok is károsodnak (l. PARP inaktiválása kaszpáz-3 által, 16.9. ábra), s ez tovább fokozza a CAD DNS károsító hatását. A keletkező kis DNS szakaszok a p53 aktivitásának fokozásához vezetnek (16.10. és 19.22. ábra).

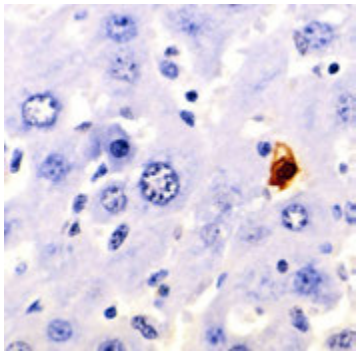
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.10. ábra A kaszpáz-3 és a CAD szerepe a DNS fragmentációban. Az ICAD hasításával felszabaduló CAD a magban oligonukleoszómális darabokra szabdalja szét a kromatin állományt, miközben a DNS-szál helyreállítását végző PARP kaszpáz-3 általi inaktivációja miatt nem tudja annak szerkezetét helyreállítani. A DNS fragmentációja – a funkcióvesztés mellett – a p53 fehérje aktvitásának fokozódásához vezet (l. 19.22. ábra).



16.11. ábra Az apoptotikus létra agaróz gélen. Az 1. minta olyan sejtekből származik, amiket előzőleg apoptózist indukáló szerrel kezeltek, a 3. minta kezeletlen kontroll. A kezelt sejt esetében a DNS állomány diszkrét, jól láthatóan elkülönőlő méretű darabokra esik szét, míg a kezeletlen sejtekben megmarad nagyméretű, a gél tetején látható molekula (etidium-bromid festés).



16.12. ábra Az apoptózis során feldarabolódó DNS kimutatása tunel reakcióval. A pusztuló sejt magja azért azonosítható, mert az eljárás során a fragmentált DNS helyén barna színű (DAB) csapadék képződik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Szintén apoptózishoz vezető, külső stimulusra aktiválódó jelátviteli folyamat a granzimeB útvonal, amelynek ismertetésére az immunrendszerrel kapcsolatban a 20. fejezetben térünk ki.

Útvonal a nekroptózis felé

Nekrotikus sejthalált kiválthat virális fertőzés (dupla szálú RNS), mitokondrium sérülés (mitokondriális DNS és reaktív oxigén szabadgyökök), DNS károsodás, valamint bakteriális LPS extracelluláris megjelenése és megfelelő receptorhoz (TLR4) kötése. Eleinte a nekrózis minden formáját szabályozatlan sejthalál típusnak tekintették, függetlenül attól, hogy milyen stresszhatás váltja ki. Mintegy két évtizede azonban változni kezdett a kép, mivel ezen sejthalál típus egyre több részfolyamatáról derült ki az, hogy szigorúan szabályozott keretek között zajlik. Arra, hogy a kiindulási pontjai részben ugyanazok a receptorok, amelyek az apoptózis indukciójában is részt vesznek, akkor derült fény, amikor számos sejttípuson kaszpáz gátlás mellett serkentették a halál receptorokat, s ez nekrotikus fenotípust mutató sejthalálhoz vezetett (16.13. ábra).

Nekroptózis kiváltható a TNF-R1 (DR1), a Fas (DR2), és a TRAIL-R1/2 (DR4/5) receptorokon keresztül, s az indukciójában nélkülözhetetlenek a Ser-Thr-kináz aktivitású **RIP** (receptor interacting protein) enzimek[3]. A receptor-ligandum kötésnek három féle kimenete lehet, amit a TNFα receptor esetén mutatunk be.

1. A receptorok ligandum kötését követően az aktivált receptor az **I. komplex** komponenseit toborozza össze. A komlex alkotásában olyan adapter fehérjék vesznek részt, mint a TRADD, a TRAF2/5 és RIP1. A TRAF2/5 (TNF receptor associated factor) a TRADD úgynevezett TRAF doménjéhez kötődik. Mivel a TRADD egy RING doménnel is rendelkezik, ennek alapján apoptózist gátló IAP (cIAP) kötésére is képes. Ennek hatására az NF-κB útvonal aktiválódik, ami anti-apoptotikus fehérjék (c-FLIP, cIAP) expresszióját eredményezi (16.13. és 16.14. ábra).

Megjegyezzük, hogy a TNFα receptor esetében feltehetően a sejtfelszíni receptorhoz kapcsolódó DISC (TRADD, TRAF2/5, RIP1) anti-apoptotikus, míg az internalizációval az endoszómális rendszerbe kerülő receptor köré szerveződő DISC pro-apoptotikus (TRADD, FADD, kaszpáz) jelátviteli útvonalat aktivál.

16.13. ábra A TNF receptor DISC-je kétféle jelátvitali útvonal kiindulópontja. Az egyik esetben a DISC-be TRADD, TRAF2/5, RIP1 és cIAP fehérjék épülnek be. Ez a komplex az NF-κB indukcióját célzó útvonal aktivációját eredményezi. A másik lehetőség az, hogy a DISC-be a TRADD, FADD és pro-kaszpáz-8 molekulák épülnek be. Ez apoptotikus sejthalált indít be.

2. A receptor internalizációjának hatására a DISC komponensei poszt-transzlációs módosításokat szenvednek. Ennek hatására a RIP1 bekerül a citoplazmába, s ott a **II. komplex** kialakítását kezdeményezi. Ebben a RIP1 mellett a RIP3 és (esetlegesen) a DISC-ből származó FADD-kaszpáz-8 vesz (vehet) részt. Az apoptotikus jelátviteli

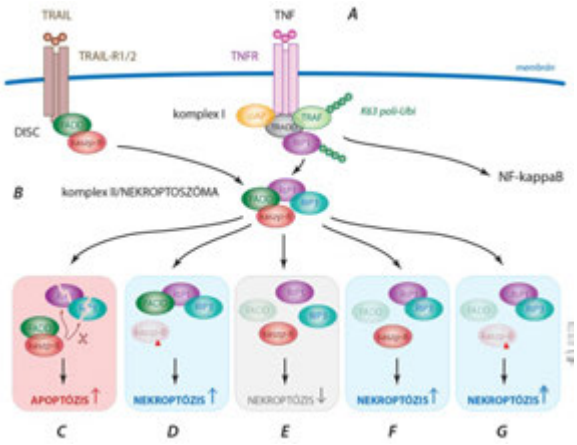
[3] RIP fehérjék az ún. ripoptoszóma alkotásában is részt vesznek, ami a DNS károsodások hatására a halál receptorok működésétől függetlenül összeálló citoszolikus komplex. Komponensei a RIP1, RIP3, FADD, kaszpáz-8, FLIP és IAP-ok.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

útvonallal ellentétben itt a FADD már nem közvetlen adapter, nem kapcsolja össze a TNF receptort és a végrehajtó RIP és kaszpáz8 fehérjéket (16.14. ábra).

3. Az aktív **nekro(pto)szóma** kialakulásához a RIP1 és a RIP3 foszforilációja szükséges (mindkettő képes autofoszforilációra). Az aktiválódott komplex közvetlenül hozzájárul a reaktív oxigén-gyökök (reactive oxygen species, ROS) szintjének emeléséhez, ezen keresztül membránok (pl. mitokondrium, lizoszóma) sérüléséhez, valamint az ATP-szint gyors lecsökkentéséhez (a sérült mitokondriális membránok miatt leáll az oxidatív foszforiláció, de az apoptózissal ellentétben itt még a nagy „energiafogyasztó” PARP is aktiválódik).

Sejttenyészeteken végzett *in vitro* kísérletsorozatok eredményei alapján lehet összegezni azt, hogy a II. komplex összetétele hogyan határozza meg a sejthalál típusát, azaz hogy az egyes faktorok hogyan befolyásolják az apoptózis és a nekroptózis közötti választást (16.14. ábra).



16.14. ábra In vitro kísérletek eredményeinek összegzése. A nekroptoszóma összetétele dönti el azt, hogy a sejt az apoptózis vagy a nekroptózis útján pusztul-e el. A) A TNF receptor köré szerveződő I. komplex az NF-κB útvonalat aktiválja, ami a sejt túlélését jelenti. B) A RIP1 deubiquitinilálódás után kiválik az I. komplexből és a citoszolban magához toborozza a II. komplex tagjait (RIP3, valamint szintén TNF (TRAIL) receptor köré szerveződő DISC-ből származó FADD-kaszpáz-8). Az aktiválódó nekroptoszóma a komponenseinek arányától függően apoptózist vagy nekroptózist indukál. C) A FADD asszociált kaszpáz-8 elhasítja a RIP fehérjéket és végrehajtó kaszpázok proteolízisével apoptózist indukál. D) Kaszpáz-8 hiányában vagy kaszpáz inhibítor (piros kis háromszög) jelenlétében a FADD-RIP1-RIP3 által formált nekroptoszóma nekroptózist indukál. FADD hiányában a nekroptoszóma vagy nem áll össze, ezzel gátlódik a nekroptózis (E) vagy csökkent kaszpáz-8 aktivitás mérhető, ami kedvez a nekroptózis indukciójának (F). G) Kaszpáz inhibítor (kis piros háromszög) jelenléte és a FADD hiánya eredményezi a leghatékonyabb nekroptoszóma formálódást.

Ellenőrző kérdések

1. Mik az úgynevezett sejthalál receptorok közös jellemzői? Nevezzen meg ilyen receptorokat!

2. Mi a DISC, s milyen alapon szerveződik? Mutassa be a Fas és a TNF receptor köré szerveződő DISC komponenseit!

3. Hogyan szerelődik össze a Fas DISC? Hol történik ez a folyamat? Mi a receptoszóma?

4. Mik a c-FLIP fehérjék és milyen szerpük van a receptor szignaliozációban?

5. Mi az I. és a II. komplex, hol találhatók? A FADD lokalizációja hogyan kapcsolódik a funkcióihoz?

6. Egy folyamatábra segítségével mutassa be a Fas halál receptoron keresztüli jelátvitelt az iniciátor kaszpáz aktiválásáig!

7. A Fas által közvetített útvonalon melyik effektor kaszpáz aktiválódik? Milyen következményei vannak ennek az aktivációnak a citoplazmában és a sejtmagban?

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

8. Minek a hatására kondenzálódik az apoptotikus sejtek kromatin állománya, s mi darabolja fel a DNS szálakat? Milyen méretű fragmentumok keletkeznek, s ez hogyan mutatható ki?

9. Mik a RIP fehérjék, s melyik halál receptor DISC-jéhet kapcsolódhatnak? Milyen útvonal aktiválásában vesznek részt? Mi a nekroszóma?

Felhasznált és ajánlott irodalom

Foger, N., Bulfone-Paus, S., Chan, A. C., Lee, K. H. (2009) Subcellular compartmentalization of FADD as a new level of regulation in death receptor signaling. *FEBS J.***276(15)**, 4256-65. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07134.x.

Lavrik, I. N., Krammer, P. H. (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.***19(1)**, 36-41. doi: 10.1038/cdd.2011.155.

Lee, E. W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S., Song, J. (2012) The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep.***45(9),** 496-508. http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.9.186

Park, H. H. (2012) Structural Features of Caspase-Activating Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 4807-4818; doi:10.3390/ijms13044807

Peter, M. E., Krammer, P. H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.***10(1)**, 26-35.

Pobezinskaya, Y. L., Liu, Z. (2012) The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle.* 11(5):871-6. doi: 10.4161/cc.11.5.19300.

Salvesen, G. S., Riedl, S. J. (2009) Structure of the Fas/FADD complex: a conditional death domain complex mediating signaling by receptor clustering. *Cell Cycle.* **8(17)**, 2723-7.

Schleich, K., Krammer, P. H., Lavrik, I. N. (2013) The chains of death: a new view on caspase-8 activation at the DISC. *Cell Cycle.***12(2)**, 193-4. doi: 10.4161/cc.23464.

Scott, F. L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G. S., Schwarzenbacher, R., Riedl, S. J. (2009) The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature***457(7232)**,1019-22. doi: 10.1038/nature07606.

Tchikov, V., Bertsch, U., Fritsch, J., Edelmann, B., Schütze, S. (2011) Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *European Journal of Cell Biology***90 (6-7)**, 467-475, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.002

Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2012) Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. Cell Death Differ. **19(1)**, 75-86. doi: 10.1038/cdd.2011.164.

Wang, L., Yang, J. K., Kabaleeswaran, V., Rice, A. J., Cruz, A. C., Park, A. Y., Yin, Q., Damko, E., Jang, S. B., Raunser, S., Robinson, C. V., Siegel, R. M., Walz, T., Wu, H. (2010) The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat Struct Mol Biol.***17(11)**, 1324-9. doi: 10.1038/nsmb.1920.

Werner, M. H., Wu, C., Walsh, C. M. (2006) Emerging roles for the death adaptor FADD in death receptor avidity and cell cycle regulation. Cell Cycle. **5(20)**, 2332-8.

17. A Bcl-2 fehérjecsalád és az apoptózis

A gerincesekben a Bcl-2 család a mitokondriumok külső membránjának integritása fölött őrködik, ezzel kapcsolatban elsősorban az **apoptózis mitokondriumokból kiinduló, úgynevezett „belső" (intrinsic) útvonal**ának szabályozásában játszik szerepet. Ez az útvonal akkor aktiválódik, amikor a mitokondriumok külső membránja sérül, s ennek következtében a két membrán közötti intermembrán térből apoptogén (apoptózist indukáló) faktorok kerülnek ki a citoszolba. Ez a halál receptoroktól függetlenül egy citoplazmatikus helyzetű pro-kaszpáz toborzó platform (apoptoszóma) kialakulását kezdeményezi, ami pro-kaszpázok aktiválásán keresztül apoptózishoz vezet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Annak ellenére, hogy a Bcl-2 család evolúciós szinten konzervativizmust mutat, a gerinces és a gerinctelen modellállatokban betöltött feladatai csak részben azonosak. A mitokondriális külső membrán integritásának felügyelete úgy tűnik, hogy az említettek közül csak a gerincesekre jellemző. Alábbi leírásunk a gerincesek Bcl-2 fehérje családjára vonatkozik.

A gerincesek Bcl-2 fehérjecsaládja

Az **erős evolúciós konzervativizmus**t mutató molekula család első tagját, a Bcl-2 fehérjét non-Hodgkin (B-sejtes) *lymphomá*ból izolálták, mint protoonkogént. A fehérje (és az egész család) elnevezése erre utal: Bcl-2 = B-cell CLL/lymphoma 2. A Bcl-2 gén itt az immunglobulin nehéz lánc lókuszba épült be, ami a fehérje folyamatosan magas szintű expresszióját (konstitutív hiperexpresszió) eredményezte. Az átírt nagy mennyiségű fehérje nem proliferációt serkentett, hanem védetté tette a limfocitákat a szelekció folyamán fellépő pro-apoptotikus hatásokkal szemben.

A Bcl-2 molekulában összesen 4 különböző, jellegzetes, alpha-helix dominanciájú, konzervatív szekvencia található. A Bcl-2 fehérjecsaládba olyan molekulák tartoznak, amelyek rendelkeznek legalább egy ilyen, úgynevezett **Bcl-2 homológia (BH-) domén**nel. A szerkezeti homológia és az apoptózisban betöltött funkció alapján ma már több mint 20 fehérjét sorolunk ebbe a családba. A molekula család szerkezeti és funkcionális csoportosítása jól korrelál egymással (17.1. ábra).

Az **anti-apoptotikus hatású** molekulák mutatják a legnagyobb szekvencia homológiát a Bcl-2 molekulával, mivel rendelkeznek valamennyi Bcl-2 homológia doménnel (**BH1, BH2, BH3, BH4**), így az úgynevezett **BH-multidomén alcsalád** tagjai. Közös jellemzőjük továbbá, hogy a C-terminálisukon található egy hidrofób transzmembrán (**TM**) régió, amely nagymértékben meghatározza a sejten belüli lokalizációjukat. Elsősorban a mitokondrium külső membránjában, az endoplazmatikus retikulum és sejtmag membránban találhatók. A Bcl-2 mellett ebbe a csoportba tartoznak a Bcl-X_L (BCL-2-related gene, long isoform), a Bclw (másnéven: Bcl2-L-2, Bcl-2-like protein 2) az MCL1 (myeloid cell leukemia 1), a Bcl-2A1 (BCL-2-related gene A1), valamint a Bcl-B (másnéven: Bcl2L10, bcl-2-like protein 10, Diva/Boo).

A **pro-apoptotikus családtagok** a Bcl-2 homológia doménjük száma alapján két csoportba oszthatók. Vannak közöttük BH1–3 régióval rendelkező BH-multidoménű fehérjék és vannak csak BH3 domént tartalmazó, úgynevezett „BH3 only” proteinek. A multidoménnel rendelkezők mindegyikének van **TM régió**ja, míg a „csak BH3” fehérjék közül csupán csak egyeseknek.

A **BH-multidoménű pro-apoptotikus fehérjék** közé tartoznak a Bax (BCL-2-associated X protein), a Bak (BCL-2 antagonist/killer) és a Bok (BCL-2-related ovarian killer). A Bax és a Bak **végrehajtó**, effektor funkciójú, mindketten a mitokondrium membránban kialakuló pórusok képzésében vesznek részt. (Ilyen funkciót a Bok esetében nem igazoltak.) Míg a TM régiója alapján a Bak „rezidens” mitokondriális membrán fehérje, addig a Bax transzmembrán régiója csak konformáció változás után kerül a felszínre, s a citoszolból ez irányítja a mitokondriális membránba.

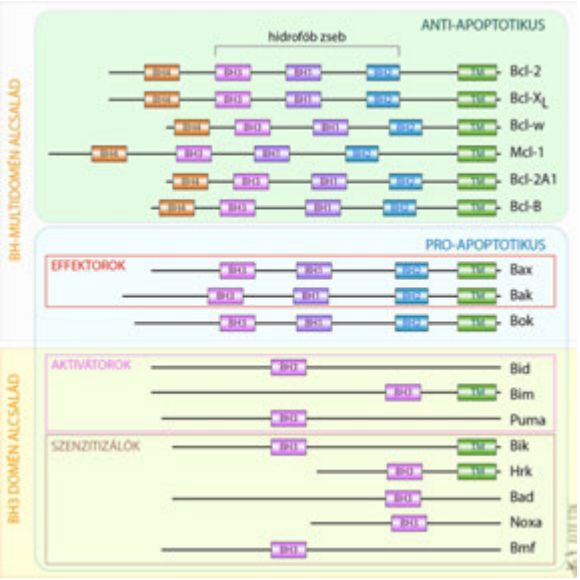
A **„BH3 only”** csoport tagjai celluláris stressz szenzorok. Tartalmaznak ugyan BH3 domént, de evolúciós szempontból távolabb állnak a multidomén családtagoktól. Egy képviselőjüket, az Egl-1-et már a C. elegans apoptózis génjeinek felfedezése során leírták, de a csoport tagjainak számszerű és funkcionális gyarapodása valószínűleg a gerincesek törzsfejlődése során történt meg. Ide tartoznak a Bad (BCL-2 antagonist of cell death), a Bik (BCL-2-interacting killer), a Bmf (Bcl-2-modifying factor), a Hrk (harakiri), a Noxa (Bcl-2 homology 3, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), a Puma (p53upregulated modulator of apoptosis), a Bid (Bcl-2-interacting domain death agonist) és a Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) fehérjék. Az, hogy az emlős sejtekben ennyire sokféle BH3 fehérje alakult ki, valószínűleg az apoptózis fokozott szelektivitását teszi lehetővé, ami által lehet a sejthalál indukcióját csak egyes (szignalizációs útvonalakkal rendelkező) sejttípusokra korlátozni.

Az anti- és a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék között kialakuló kölcsönhatásokat csak tájékoztatásul foglaljuk össze a 17.I. táblázat segítségével.

A Bcl-2 fehérjék alakjuk alapján globuláris és belsőleg rendezetlen szerkezetű csoportokra oszthatók. A globuláris szerkezetet mutatók közé a multi-doménnel rendelkező családtagok tartoznak. A Bid kivételével a csak BH3

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

domént tartalmazó fehérjék rendezetlen konformációjúak, s rendezett szerkezetet csak másik családtaghoz való kötéssel alakítanak ki.



17.1. ábra A Bcl-2 fehérjecsalád tagjainak szerkezeti és funkcionális felosztása. A szerkezeti rajzokon a barna, lila és kék BH feliratú négyzetek a Bcl-2 homológ domént, a zöld TM feliratú négyzetek pedig a transzmembrán domént jelölik. A funkcionális felosztás alapján megállapíthatjuk, hogy az anti-apoptotikus családtagok mindannyian a BH multidomén alcsaládba, míg a pro-apototikusak részben ide, részben a BH3 domén alcsaládba tartoznak. A pro-apoptotikus fehérjék között vannak effektorok, direkt aktiválók és szenzitizálók is. (A részleteket és az elnevezések /betűszavak/ magyarázatát l. a szövegben.)

17.I. táblázat. Az anti- és a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék között kialakuló kölcsönhatások

	PRO-APOPTOTIKUSAK		
	MULTIDOMÉN F.	CSAK BH3 FEHÉRJÉK	
ANTI-APOPTOTIKUSAK	Bax/Bak/Bid	AKTIVÁTOROK	SZENZITIZÁLÓK
Bcl-2	Bax, Bid	Bim, Puma	Bmf, Bad
Bcl-X$_L$	Bax, Bak, Bid	Bim, Puma	Bmf, Bad, Bik, Hrk
Bcl-w	Bax, Bak, Bid	Bim, Puma	Bmf, Bad, Bik, Hrk
Mcl-1	Bak, Bid	Bim, Puma	Noxa, Hrk
Bcl2-A1	Bak, Bid	Bim, Puma	Noxa, Bik, Hrk

A külső mitokondriális membrán ellenőrzésének fontossága

A **mitokondriális külső membrán** mindenkori állapotáért, intaktságáért, áteresztőképességének változásáért többek között a **Bcl-2 molekula család** transzmembrán régióval is rendelkező **anti- és pro-apoptotikus** tagjai a felelősek. Az egészséges sejtben a mitokondriumok hálózatot alkotnak (l. 18. fejezet), s nem lehet véletlen az, hogy e hálózat növekedésében (mitokondrium fúzió) és fragmentálódásában („osztódás", lefűződéses szétválás), azaz a mitokondriális hálózat stabilitásának meghatározásában – a mitokondrium-fúziót és „osztódást" lebonyolító fehérjéken kívül (l. 18. fejezet) – e fehérje család tagjait is megtaláljuk. A mitokondriális hálózat viszonylag gyors és irreverzibilis szétesése azonban „csak" szükséges, de nem elégséges feltétele a mitokondriális sejthalál útvonalak felpörgésének.

A mitokondriumok számos olyan fehérjét „őriznek" intramembrán terükben, amelyek az egészséges sejtben hasznos funkciót töltenek be, a citoplazmába kijutva azonban **apoptogén** hatásúak. A sejt élete szempontjából tehát alapvető

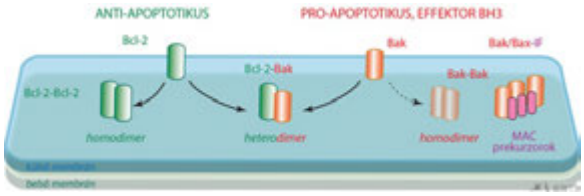
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fontosságú az, hogy ezek a molekulák ne kerülhessenek ki a citoplazmába. Közülük csak a legfontosabbakat említve ide tartozik a citokróm-c, az AIF, az endonukleáz G, a Smac és az Omi, amelyek a rendeltetési helyükként szolgáló mitokondrium „fogságából” kijutva – a sejthalál előidézése érdekében – átfogó hadműveletekbe kezdenek (hatásukról a 18. és a 19. fejezetben lesz szó). Az apoptózis mitokondriális útvonalának kezdő lépése, azaz a mitokondriális hálózat gyors és irreverzibilis szétesése után az igazi, lényegi kérdés tehát az, hogy ezek az apoptogén molekulák hogyan jutnak ki a citoplazmába.

A Bak és a Bax pórusképzése

A mitokondrium terének citoplazmától való elszigeteltségét a külső membrán épsége biztosítja. Erre a Bcl-2 fehérje család **anti-apoptotikus** tagjai „vigyáznak”. A névadó Bcl-2 és a Bcl-X_L **homodimer** formában vannak itt jelen, azonban arra is képesek, hogy az effektor, pórusképző pro-apoptotikus multidomén fehérjékkel **heterodimer**eket alkossanak. Apoptotikus szignál nélküli állapotban ez csak a Bak fehérje heterodimerbe való bevonását jelenti, ami elvonja azt a BakBak homodimerek képződésétől (17.2. ábra).

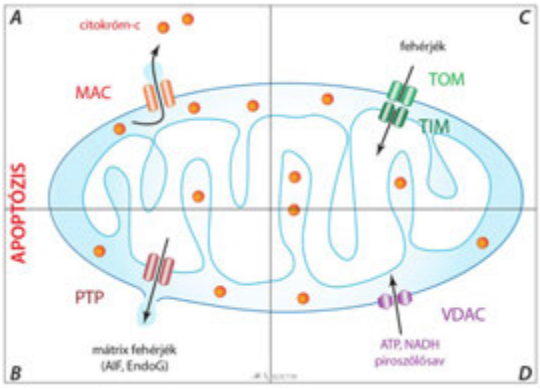
A **Bak** állandóan a mitokondrium külső membránjában található, pro-apoptotikus Bcl-2 családtag. Homodimert képez, de nagy affinitással kötődik a Bcl-2 és Mcl-1 antiapoptotikus fehérjékhez is. A **Bax** a citoszolban található pro-apoptotikus faktor, ami az anti-apoptotikus családtagok közül a Bcl-2-t és a Bcl-X_L-t köti. Apoptotikus szignál hatására bekövetkező konformáció változás után kerül át a mitokondrium külső membránjára, ahol homodimert majd oligomert formál. Ahhoz, hogy a multidomén effektor fehérjék homotipikus oligomereket képezhessenek az szükséges, hogy túlsúlyba kerüljenek a velük heterodimereket formáló anti-apoptotikus családtagokkal szemben. Az aktiválódó és fölénybe kerülő effektor fehérjék úgynevezett **apoptózis indukált csatornák**at (mitochondrial apoptosis-induced channel, **MAC**) formálnak, amelyeken keresztül a fent említett apoptogén faktorok közül a citokróm-c a citoszolba jutva sejthalált indukál. A MAC előképzett formában már a nyugalomban lévő mitokondriumban is megtalálható: komponensei a Bax/Bak és egy még azonosítatlan fehérje (17.2. ábra).



17.2. ábra Az anti-apoptotikus Bcl2 és Bcl-X_L fehérjék homo- és heterodimerjei a mitokondrium külső membránjában. A multidomén szerkezetű, egymással homodimereket alkotó anti-apoptotikus fehérjék képesek a pro-apoptotikus Bak megkötésére is, meggátolva ezzel annak di- és oligomerizációját (szaggatott nyíl). A MAC prekurzor formában jelen van a membránban, benne az effektor Bcl-2 fehérjék monomerjei és egy még ismeretlen (a rajzon lila színnel jelzett) fehérje található.

A MAC a külső membránban kialakuló, patch clamp technikával kimutatható, nem feszültségfüggő csatorna, amely apoptótikus szignál hatására áll össze, s pórus átmérője 3–7,5 nm közötti. Szerkezetileg és működésében is elkülöníthető más mitokondriális pórusoktól, így a belső membránban nyíló permeabilitási tranzíciós pórusoktól (permeability transition pore, PTP) is (17.3. ábra). Bizonyos hatásokra csak a MAC vagy a PTP, más stimulusokra pedig mindkettő megnyílik. Valószínűsíthető, hogy a PTP apoptózisban betöltött szerepe közvetett: nyílásával a mátrix tartalom áramlik ki az intermembrán térbe, s ez a külső membrán felhasadásához, végső soron apoptogén faktorok citoplazmába jutásához vezet (17.3.C ábra). A MAC ezzel ellentétben csak az intermembrán tér tartalmát engedi ki a citoszolba (17.3.A ábra). A Baxbizonyítottan komponense a MAC-nak, s Bax hiányában a Bak képes helyettesíteni effektor társát. A pórus formálás előfeltétele az oligomerizáció.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.3. ábra A mitokondrium külső és belső membránjának csatornái. A MAC az intermembrán teret nyitja össze a citoszollal, így nyitása citokróm-c kiáramlást okoz, ami apoptózist indukál (A). A PTP a belső membránban található, a mátrix tartalmát engedi ki az intermembrán térbe. A kiáramló faktorok között vannak apoptózist indukálók is (AIF, EndoG: endonukeáz G), s ez a beltartalom a külső membrán felhasadásával kerül ki a citoszolba (B). A TOM és a TIM komplexek a sejtmagban kódolt fehérjék mitokondriumba jutását biztosítják (C), míg aVDAC (voltage dependent anion-selective channel) számos faktor mellett a nukleotidokat és a piroszőlősavat transzportálja.

Azzal kapcsolatban, hogy a mitokondrium membránjában a Bcl-2 fehérje család egymás mellett található anti- és pro-apoptotikus tagjai milyen kölcsönhatásokra képesek, hogy ezek alapján hogyan marad meg, illetve billen át a közöttük lévő egyensúly adott esetben az apoptózis irányába, többféle elmélet látott napvilágot.

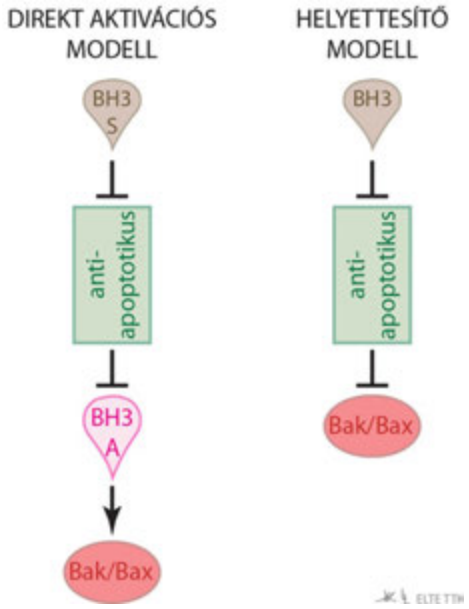
A direkt aktivációs elmélet

Az úgynevezett direkt aktivációs modell (17.4. ábra) szerint a BH3 fehérjéknek direkt kapcsolódniuk kell a pórusképző Bak és Bax proteinekhez. Ez a modell a BH-3 fehérjéket direkt aktivátorokra és „érzékenyítőkre” osztja. Az **aktivátorBH3 fehérjék** ugyan kapcsolatba lépnek mind az anti-, mind pedig a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjékkel is, de nagy affinitással a pro-apoptotikus Bak és Bax proteinekhez kötődnek. Az aktivátorok közé tartozik a hasított Bid, a Bim és a Puma. Ahhoz, hogy ez ne vezessen sejthalál indukcióhoz, az kell, hogy az **anti-apoptotikus** családtagok megkössék, „fogva tartsák” az aktivátorokat. A **szenzitizáló BH3 fehérjék** (Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk)az anti-apoptotikus családtagokkal alakítanak ki kölcsönhatásokat; elvonva ezzel azokat a pro-apoptotikus családtagok kötésétől, „fogva tartásától”. Ebben a modellben az anti-apoptotikus családtagok ezekután nem képesek az effektor Bak és Bax kötésére.

A helyettesítő modell

Az elmélet azt állítja, hogy a pórusképző **Bak és Bax fehérjék állandóan aktívak** (oligomerizálódva MAC-ot formálnának), így ahhoz, hogy a sejt életben maradjon, biztosítania kell azt, hogy az anti-apoptotikus családtagok egy komplexben inaktiválják a fenti proteineket. A BH3 fehérjék a multidoménű, pro-apoptotikus Bak és a Bax fehérjéket oly módon szabadítják fel a gátlás alól, hogy helyettesítik azokat az anti-apoptotikus fehérjékkel alkotott komplexben (17.4. ábra). E modell szerint a Bak és a Bax aktiválásához tehát nem szükséges azoknak BH-3 fehérjékkel való direkt molekuláris kölcsönhatása, és az elmélet nem különböztet meg aktivátor és szenzitizáló BH-3 csoportokat sem. Azt, hogy mely fehérjék képesek az anti-apoptotikus partnereket elvonni a pórusképző családtagoktól, csupán az azokkal szembeni kötésük affinitása határozza meg.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.4. ábra A direkt és a helyettesítő modell vázlata. A direkt aktivációs modellben (bal oldal) az anti-apoptotikus fehérjék nem az effektor Bak és Bax proteinekhez kötődnek, apoptózisgátló hatásukat az aktivátor BH3 családtagok (BH3 A) megkötésével fejtik ki. Amikor azonban a szenzitizáló BH3 fehérjék komplexbe vonják az anti-apoptotikus Bcl-2 proteineket, akkor az aktiválók „felszabadulnak". A helyettesítő modell (jobb oldal) nem különböztett meg aktivátorokat: itt a Bak és a Bax állandóan aktív. Inaktivitásukat az anti-apoptotikus fehérjék biztosítják, ám ezeket a BH3 proteinek elvonhatják.

Az „együtt a membránba ágyazódva" modell

Ez a modell figyelembe veszi azt, hogy a MAC pórusképző forma membránba ágyazott környezetben alakul(hat) csak ki, s egyesíti az előző modellek fő vonásait. Azon alapszik, hogy pórusok addig nem jelennek meg a mitokondriális membránban, amíg a Bak és a Bax el nem éri a megfelelő aktív formáját, s hogy az egyes szereplőknek a **membránnal kialakított kölcsönhatása** következtében beálló konformáció változás szabja meg a kialakítható komplexek relatív arányát.

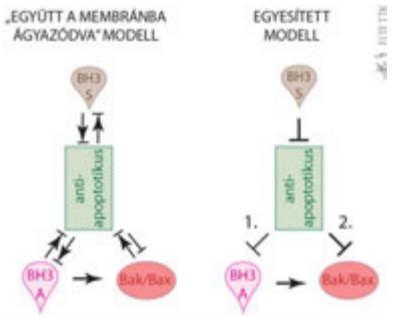
Ebben a modellben az **aktivátor BH-3** fehérjék közvetlenül képesek kötődni a Bak és Bax proteinekhez, de képesek kötni az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjéket is: mindkettőt „helyettesíteni" tudják a komplexben (17.5. ábra). A modellben szerepelnek az **érzékenyítő BH-3** fehérjék is, amelyek csak az anti-apoptotikus családtagokat kötik. Az **anti-apoptotikus fehérjék** apoptózis gátló hatásukat egyrészt a pro-apoptotikus proteinek megkötésével, másrészt azok membránhoz való kötődésének megakadályozásával ér(het)ik el. A fenti folyamatokban lényeges szempont a membránhoz való kötődés képességének kialakítása, valamint az egyensúly fenntartásában az, hogy az egyes komplex alkotók membránba integrálódni képes formái milyen arányban állnak rendelkezésre.

Az egyesített modell

Ismert, hogy a Bak és a Bax fehérjék a **mitokondrium hálózat dinamikájá**nak szabályozásában is részt vesznek (l. 18. fejezet). Az ebben és az apoptózis indukciójában betöltött szerepüket legsikeresebben ez a modell integrálja. Ez az elképzelés az „együtt a membránba ágyazódva" modellre építve az **anti-apoptotikus fehérjék**nek kétféle kölcsönhatási módját tételezi fel (17.5. ábra). Az első az **aktivátor BH3** fehérjék „lefoglalását" jelenti, a második az effektor Bak és Bax proteinek komplexbe vonását. Az apoptózis gátlása az első módon kevésbé bizonyul hatékonynak, mint a második útvonal használatával, s viszonylag könnyen legyőzhető az **érzékenyítő családtagok** közreműködésével. Mindkét útvonal lehet domináns, s ez az adott stresszhatástól, illetve a vizsgált sejttípustól függ. A Bak és a Bax mitokondriális hálózatot érintő hatását (fúzió gátlás) csak a kettes útvonal befolyásolja. Az anti-apoptotikus fehérjék ugyanis ebben az esetben közvetlenül gátolják a pórusképző fehérjéket (17.5. ábra)

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a Bcl-2 család tagjai között lezajló kölcsönhatások mindig a megfelelő állapotban lévő és hozzáférhető partnerek mennyiségétől (expresszió mértéke, poszt-transzlációs módosítások) függnek, amit az adott sejt fiziológiai állapota határoz meg.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.5. ábra Az „együtt a membránba ágyazódva” és az egyesített modell vázlata. Az „együtt a membránba ágyazódva” modellben (bal oldal) az anti-apoptotikus fehérjék mind a BH3 aktivátor (BH3 A), mind pedig a BH3 szenzitizáló (BH3 S) fehérjékkel képesek összekapcsolódni, s mindegyik kötés felbontható, azaz reverzibilis. A komplexek arányát az egyes, membránba integrálódni képes szereplők lokális mennyisége határozza meg. Az anti-apoptotikus fehérjék sejthalál gátló hatásukat egyrészt az aktivátor, másrészt a Bak/Bax proteinek komplexben tartásával, valamint mindezek membránba való integrációjának gátlásával érik el. Az egyesített modell az előzőre épít, azonban az anti-apoptotikus fehérjéknek csak kétféle kölcsönhatását tételezi fel. Az 1. típus az aktivátor BH3 fehérjék komplexbe vonását, a 2. pedig a Bak és Bax fehérjék inaktivációját jelenti. Az első módozat könnyebben „felülírható” a szenzitizáló BH3 (BH3 S) proteinekkel, amelyek elvonják a komplexből az anti-apoptotikus szereplőket. A Bak/Bax mitokondriális hálózattal kapcsolatos funkcióit csak a 2. típusú kölcsönhatás befolyásolja.

A pórusképzés lehetőségei

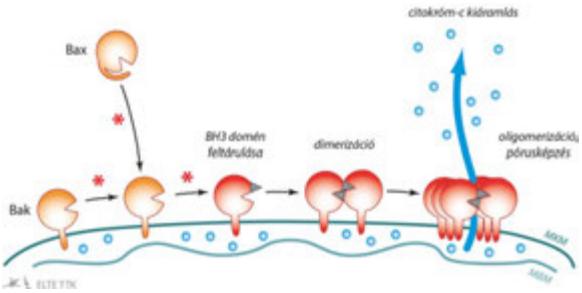
Az apoptogén faktorok kijutását lehetővé tevő pórusok Bax és Bak fehérjék közreműködésével történő kialakulásának és/vagy fenntartásának magyarázatára alapvetően kétféle elképzelés született.

Az **egyik lehetőség** az, hogy ezek a **pórusok előképzett formában** már rendelkezésre állnak, de nem aktívak. A kísérletek alapján ennek a pórusnak része egy feszültségfüggő anion-csatorna, ami a külső membránban található. Az aktivált effektorok ehhez kapcsolódnak, ezzel stabilizálják annak nyitott állapotát.

Másik lehetőségként felmerül az, hogy maguk a Bak és Bax proteinek **formálják** a pórusokat (17.6. ábra). Mindkét fehérje tartalmaz olyan α-hélixeket, amelyek képessé teszik a molekulákat erre.

A citoszolikus Bax esetében leírták, hogy a membránnal való kezdeti kölcsönhatás következtében bekövetkező többlépéses konformáció változását egy BH3 fehérjével (l. Bim) való interakció stabilizálja: ennek következtében a Bax N-terminálisának egy szakasza a membránba süllyed. A mitokondriális külső membránban található Bak esete más: proapoptotikus BH3 általi aktiválása után valószínűleg több doménje is képes a fehérjét a membránba horgonyozni.

A BH3 fehérje általi aktiváció mind a Bak, mind pedig a Bax esetében nélkülözhetetlen a **homodeimerek** kialakulásához. A dimerizáció után a MAC kialakulásához **oligomerizáció** szükséges, ami további Bak és Bax fehérjék bevonását feltételezi. Az oligomerizációban a fehérjék egyik hélixe és a BH3 domén vesz részt (17.6. ábra). Az, hogy ezeket a csatornákat hány alegység és milyen elrendeződésben alkotja, pontosan még ma sem tisztázott.



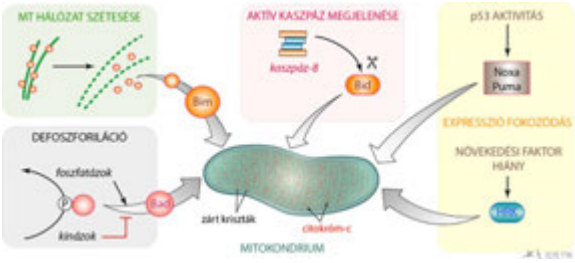
17.6. ábra A pórusképző multidoménű pro-apoptotikus fehérjék aktiválása. Apoptotikus szignál (piros csillag) hatására a Bax fehérje a „kiegyenesedő” transzmembrán régiójával a mitokondrium külső membránjába (MKM)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

horgonyzódik. A Bak és a Bax fehérjék az aktiváció hatására feltáruló BH3 doménjükkel egymáshoz kapcsolódva dimerizálódnak, majd pórusformáló oligomereket képeznek. A póruson keresztül apoptogén faktorok (pl. citokrómc) áramlik ki a citoszolba. Az ábrán nem jeleztük, hogy az apoptotikus szignálokat (piros csillag) a legtöbb esetben a mobilizált „BH3-only" fehérjék közvetítik, illetve nem tüntettük fel a preformált MAC ma még nem azonosított fehérje komponensét sem, amely a monomer Bax/Bak fehérjéhez kötődhet.

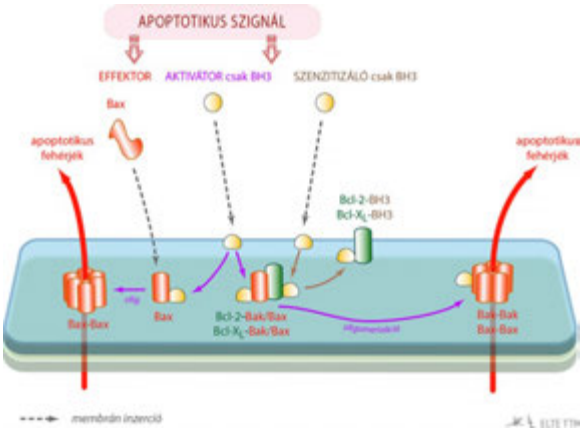
A pórusképzés indukciója

A mitokondriális eredetű apoptogén faktorok megjelenésének, azaz az apoptotikus sejthalál belső útvonala aktiválásának kulcslépése a **BH3 fehérjék és a Bax külső mitokondriális membránhoz irányítása**. A „BH3-only" fehérjék mobilizálása a citoplazmában különböző apoptotikus szignálokra történik. Ilyen lehet a mikrotubuláris hálózat szétesése (Bim), a Bid parciális hasítása, ami aktív csonkolt Bid-et (truncated, tBid) eredményez, defoszforiláció (Bad), növekedési faktor hiánya (Hrk) és expresszió fokozódás (Puma, Noxa) (17.7. ábra).



17.7. ábra A csak BH-3 fehérjék mobilizálása és aktiválása. A „BH3-only" fehérjék apoptotikus szignálokra történő mobilizálása szükséges a mitokondrium külső membránjában helyet foglaló pro- és anti-apoptotikus multidoménű Bcl-2 családtagok egyensúlyának az apoptózis irányába történő eltolásához.

A membránhoz való kötődést intenzív szerkezeti átrendeződés követi, majd a szenzitizáló BH3 családtagok az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjéket, míg az aktiváló BH3 fehérjék (Bim, Bid, Puma) az effektor Bcl-2 proteineket (Bak, Bax) kötik meg. A BH3 kötött anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék „elengedik" az effektorokat, amelyek ezután dimerizálódnak, majd oligomereket képezve olyan transzmembrán pórusokat formálnak (vagy hozzájárulnak ezek nyitva tartásához), amelyeken keresztül apoptotikus fehérjék áramlanak ki a citoszolba (17.8. ábra).



17.8. ábra A BH3 fehérjék szerepe a mitokondriális transzmembrán pórusok létrehozásában. Az apoptotikus szignálok aktiválják a citoszolikus BH3 fehérjéket, melyek a mitokondrium külső membránjába épülnek. A szenzitizáló BH3 proteinek a Bcl-2 fehérjékhez kötődnek, s elvonják azokat az effektor BH3 fehérjékkel alkotott heterodimerekből. Az aktiváló BH3 családtagok stabilizálják a citoszolból érkező Bax fehérjéket, valamint hozzásegítik az effektorokat az oligomerizációhoz. A Bak és Bax oligomerek által képzett transzmembrán pórusokon keresztül apoptotikus faktorok jutnak ki a mitokondriumból a citoszolba. (A membránba integrálódott szenzitizáló BH3 fehérjék útját barna, az aktivátor BH3 proteinek útját pedig lila színű nyilak jelzik.)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A Bcl-2 fehérjék nem-apoptotikus funkciói

Az apoptózis szabályozásán kívül a Bcl-2 család tagjainak szerepe van az ER kálcium tartalmának megőrzésében (Bcl-2), a mitokondrium-hálózat dinamikájának (mitokondrium fúzió, Bak, Bax, l. 18. fejezet), és a sejtciklus, valamint a gyulladásos válaszreakció szabályozásában (Bid) és a genom integritásának megőrzésében is.

Több BH3 fehérjékről is kimutatták, hogy szerepet játszik az autofágia szabályozásában. Közülük központi szerepet játszik a **Beclin-1**, ami a „csak BH3" Bcl-2 családtagok közé tartozik. A Beclin-t mint Bcl-2 fehérjével kölcsönható proteint írták le (alternatív neve: coiled-coil myosin-like Bcl2-interacting protein), s ez szolgáltatta az alapját annak a feltételezésnek, hogy az autofágia és az apoptózis folyamatai molekuláris szinten kapcsoltak.

A Bcl-2 család néh ány tagjának nem-apoptotikus funkciójáról a 17.II. táblázat segítségével adunk betekintést.

17.II. táblázat. Néhány Bcl-2 fehérje nem-apoptotikus funkciója.

FEHÉRJE	FUNKCIÓ EGÉSZSÉGES SETJBEN
Bax, Bak	mitokondrium fúzió segítése
Bid	genom integritás megőrzése, sejtciklus és gyulladásos válaszreakció szabályozása
Bcl-2	IP3 receptor kötése, a kálcium mediált apoptózis gátlása
Bim	mikrotubulus asszociált fehérje
Bad	glükóz anyagcsere szabályozása
Bmf	a mizozin V motorkomplex szabályozása
Beclin-1	autofágia szabályozás

Ellenőrző kérdések

1. Jellemezze a Bcl-2 molekula családot! Ismertesse a szerkezeti jellemzőiket! Funkcionálisan milyen csoportokra oszthatók?

2. Mik a Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjainak közös tulajdonságai?

3. Milyen alcsoportokra oszthatók a pro-apoptotikus Bcl2 családtagok, s mi ennek az alapja? Nevezzen meg „csak BH3" és multidoménű családtagokat!

4. Miért létfontosságú a mitokondriális membrán épségben tartása? Egy vázlatrajz segítségével mutassa be, hogy milyen összetételű homo- és heterodimerek találhatók a a mitokondrium külső membránjában egy egészséges sejtben?

5. Hogyan formálnak pórusokat a mitokondrium külső membránjában a Bax és a Bak fehérjék?

6. Milyen elméleteket ismer arra vonatkozóan, hogy hogyan borul fel az anti- és a proapoptotikus fehérjék egyensúlya apoptotikus szignál hatására?

7. A Bcl-2 fehérje család mely tagjai és milyen folyamatok során vesznek részt a pórusképzés indukciójában?

Felhasznált és ajánlott irodalom

Dejean, L. M., Ryu, S. Y., Martinez-Caballero, S., Teijido, O., Peixoto, P. M., Kinnally, K. W. (2010) MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. *Biochim Biophys Acta.***1797(6-7)**, 1231-8. doi: 10.1016/j.bbabio.2010.01.007

Dewson, G. (2010) Interplay of Bcl-2 Proteins Decides the Life or Death Fate. *The Open Cell Signaling Journal* **3**, 3-8

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Dewson, G., Kluck, R. M. (2010) Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton***2**, 9–22

Funderburk, S. F., Wang, Q. J., Yue, Z. (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* **20(6)**, 355-62. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.002.

Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., Tang, D. (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.***18(4)**, 571-80. doi: 10.1038/cdd.2010.191.

Peixoto, P. M., Dejean, L. M., Kinnally, K. W. (2012)The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia-reperfusion injury, and neurodegeneration. *Mitochondrion***12(1)**, 14-23. doi: 10.1016/j.mito.2011.03.003

Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., Andrews, D. V. (2013) Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008714

Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., Green, D. G. (2010) The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell***37**, 299-310. DOI 10.1016/j.molcel.2010.01.025

Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.***7(12)**, 1174-81.

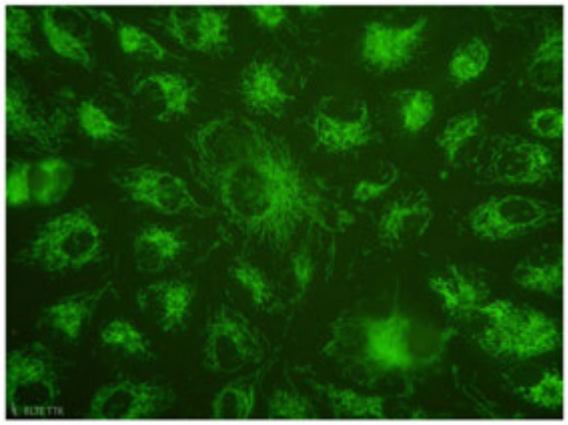
Yip, K. W., Reed, J. C. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27(50)**, 6398-406. doi: 10.1038/onc.2008.307.

18. A mitokondriumok, apoptózis belső stimulusra (II. típus)

A mitokondriumok morfológiája és hálózata

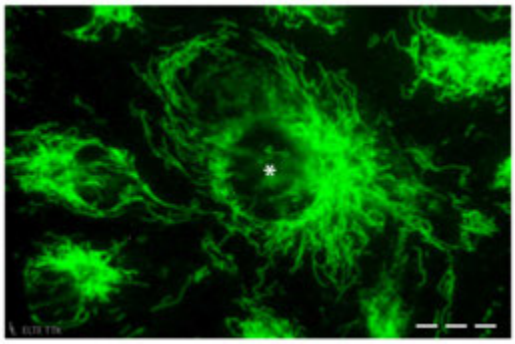
A mitokondriumok alakjáról és szerkezetéről korábban – elsősorban fixált szöveti- és sejtmintákon végzett morfológiai megfigyelések alapján – alkotott képünket jelentősen módosították az elmúlt évek korszerű elektronmikroszkópos, immuncitokémiai, membrán fiziológiai és biokémiai vizsgálatai, valamint az *in vivo* megfigyelések céljára kifejlesztett mitokondriális marker, vitális fluoreszcens festékek (mitotracker) és a fluoreszcens fúziós fehérje konstrukciók alkalmazása.

Már évekkel ezelőtt is használtuk a sejt „mitokondrium rendszere” (mitochondrial system) szókapcsolatot, de az új ismeretek birtokában egyre gyakrabban találkozunk a szakirodalomban a **mitokondriális hálózat** (mitochondrial network) kifejezéssel. Való igaz – különösen a nagy metabolikus aktivitású, vagy erősen differenciált és polarizált sejtekre, mint például az izom- és idegsejtek –, hogy aktív működésük során a mitokondriumaik egy kiterjedt, elektromos és energetikai „kábelrendszerből” álló hálózatot alkotnak, amely nagyon szépen kirajzolódik a sejtekben a vitális mitotracker festés után (18.1.–18.3. ábra).

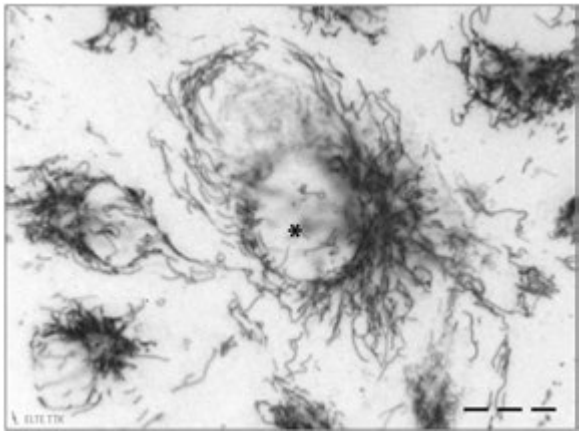


XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.1. ábra Mitokondrium hálózat endotélium sejtekben mitotracker festéssel. A sejtmagok fekete foltok, amiket a mitokondrium hálózat „körülfon”.

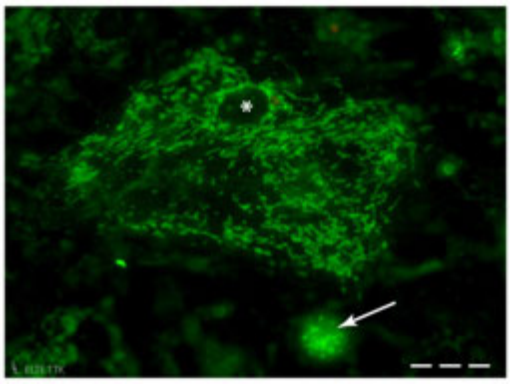


18.2. ábra Kiterjedt mitokondrium hálózat. A mitokondriumokat mitotrackerrel jelöltük, ami egy vitális, mitokondrium-specifikus fluoreszcens festék. A csillag a sejtmagot jelzi.



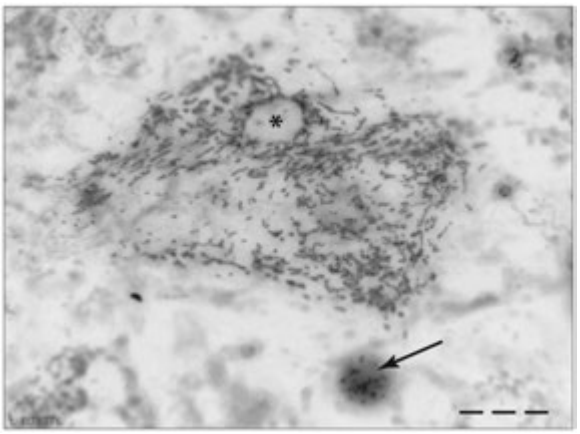
18.3. ábra Az előző felvétel fekete-fehér változata. Itt élesebben körülrajzolódik a kiterjedtebb mitokondrium hálózat. A mitokondriumokat mitotrackerrel jelöltük, ami egy vitális, mitokondrium-specifikus fluoreszcens festék. A csillag a sejtmagot jelzi.

Bizonyos körülmények között a **hálózat fragmentálódik**, s a tankönyvekből jól ismert bab alakú szemcsékre esik szét (18.4. és 18.5. ábra). A mitokondriumok görög eredetű tudományos neve arra utal, hogy erre a morfológiai lehetőségre már a sejtszervecske leírói is felfigyeltek, hiszen a név a mitosz=fonál és a kondrosz=szemcse szavak összevonásából ered.



18.4. ábra Szétesett hálózat egyedi mitokondriumokkal apoptotikus sejtben. A mitokondriumokat mitotrackerrel jelöltük, a csillag a zsugorodott sejtmagot jelzi, a nyíl egy rendkívül zsugorodott sejtre, vagy apoptotikus testre mutat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



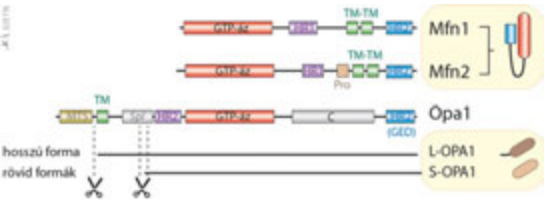
18.5. ábra Az előző felvétel fekete-fehér változata. Szétesett hálózat egyedi mitokondriumokkal apoptotikus sejtben. A mitokondriumokat mitotrackerrel jelöltük, a csillag a zsugorodott sejtmagot jelzi, a nyíl egy rendkívül zsugorodott sejtre, vagy apoptotikus testre mutat.

A mitokondriumok fúziója

A hálózatos és a „szemcsés” formák fiziológiás körülmények között dinamikus egyensúlyban vannak egymással. A molekuláris sejtbiológiai kutatási módszerek fejlődésével fény derült a mitokondriumok fúziójáért és a fonalak fragmentálódásáért (lefűződéses szétválás, „osztódás”) felelős molekuláris szereplőkre is.

A fúzióban kulcsszerepet játszó fehérjék a **mitofuzinok** (mitofusin, Mfn1/2, 18.6. ábra). Transzmembrán (**TM**) régióik segítségével a mitokondrium külső membránjában rögzülnek, s alkothatnak homo- és heterodimereket egyaránt. A fúzió alkalmával a két egymáshoz megfelelő közelségbe került mitokondrium felszínén „egymással szemben állva” úgynevezett **HR** (heptad repeat) régióik révén kapcsolódnak össze (18.6 és 18.7. ábra). A HR domének helikális szerkezetűek, s egymás mellé rendeződve képesek arra, hogy a mitofuzin **GTP-áz domén**jének közreműködésével (GTP hidrolízis) felszabaduló energiát a membránok közelítésére fordítsák.

Bizonyosnak látszik, hogy léteznek olyan fehérjék, amelyek a két membrán közötti kapcsolat kialakításában vesznek részt. Ilyen a dynamin homológ **Opa** (optic atrophy), amelynek proteolítikus hasításával egy hosszabb, a belső membránhoz kötött, és egy rövidebb, az intermembrán térben mozgó, de membrán felszínnel kölcsönhatásba lépni képes formáját azonosították (18.6. ábra).



18.6. ábra Mitokondrium fúzió folyamatában résztvevő molekulák szerkezete. Mindegyik fehérje rendelkezik zöld színnel jelzett transz-membrán (TM), lilával jelölt HR, valamint piros színnel kiemelt GTP-áz aktivitású doménnel. Az Opa1 hasításával két rövidebb fehérje keletkezik, ezek egyike membránhoz kötött (L-Opa1), a másik szolubilis (S-Opa1). (Pro: prolin gazdag domén, MTS: mitokondriális transzport szekvencia, Spl: alternatív mRNS-illesztésű domén, GED: GTP-áz effektor domén)

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a kettős membránnal határolt mitokondriumok fúziója szükségképpen kétlépéses folyamat, hiszen a külső membránok után a belsőknek is egyesülniük kell. Nullmutáns embrionális fibroblasztokon végzett kísérletek szerint a külső membránok fúziójához a mitofuzinok, a belsőéhez pedig az Opa1 fehérje elengedhetetlenül szükséges (18.7. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.7. ábra A mitokondrium fúzió szakaszai. Az első lépésben a külső membránok egyesülnek: ehhez nélkülözhetetlenek a mitofuzin (Mfn1/2) fehérjék. A második szakaszban a belső membránok fúzionálnak, amihez az Opa1 fehérje szükséges.

A mitokondrium fúzió bonyolult folyamatának ma még csak egyes mozzanatait ismerjük. A fúzióhoz szükséges lépések megindítására a **mitofuzinok homo- és heterodimerjei** (Mfn1-Mfn1, Mfn2-Mfn2, Mfn1-Mfn2) egyaránt alkalmasak. Az egymás mellé rendeződő, antiparalell helyzetű C-terminálisok HR régiói játszanak szerepet abban, hogy a mitofuzin molekulák oligomerizálódnak, s megfelelő közelségbe hozzák, illetve tartják a két szomszédos külső membránt. Az oligomerizációt követően még egy konformációváltozás is szükséges, amit valószínűleg GTP hasításból származó energia fedez (18.8. ábra).

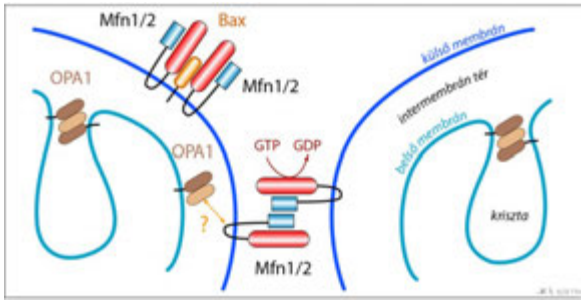
Stresszmentes körülmények között a belső membránok egyesülésében az Opa1 fehérjének mind a hosszú, mind pedig a rövid formája részt vesz.

Az bizonyosnak tűnik, hogy a két membrán egyesülését biztosító lépések **mechanikai összekapcsolásá**t a mitofuzinok és az Opa fehérjék közötti fizikai kapcsolat létrejötte biztosítja. Hogy ez mikor és milyen módon történik, az ma még nem kellőképpen tisztázott.

A mitokondriumok szerkezetének és működésének minél alaposabb felderítését célzó finom ultrastrukturális és membránpotenciál vizsgálatok egy másik érdekes (mint kiderült, funkcionálisan is fontos) morfológiai tényre hívták fel a figyelmet.

A mitokondrium külső membránja és a belső membrán közötti **intermembrán tér**, valamint a belső membrán által határolt mátrix téren kívül, a krisztáknak az intermembrán tértől való reverzibilis lehatárolódásával kialakulhat egy harmadik, úgynevezett **interkrisztális tér** is. A kriszták lemezeinek a külső membrán felöli szélét **kriszta-kapcsoló struktúrák** (crista junction) kötik össze egymással, amelyeknek a pontos szerkezete még nem ismert. Az egyik molekuláris komponensét azonban egyértelműen azonosították, s ez érdekes módon a mitokondrium hálózat dinamikus átrendeződésének egyik ismert szereplője, az **Opa1** (18.8. ábra).

Számos olyan fehérjét azonosítottak, amelyik képes kötődni a mitofuzinokhoz. Ilyen a mitofuzin kötő fehérje (mitofusin-binding protein, MIB), valamint a pro-apoptotikus Bcl-2 családtag **Bak és Bax** (l. 18.8. ábra). Az utóbbiak szerepéről a későbbiekben lesz szó.

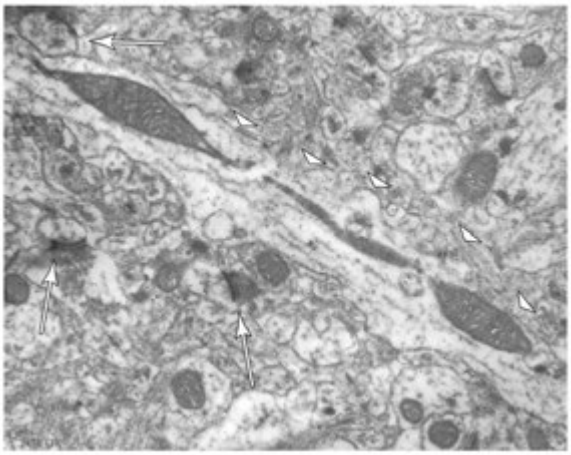


18.8. ábra A mitokondriális külső membránok fúziójának kezdeti lépése. Az ábrán jeleztük, hogy a belső membrán krisztáinak terét kriszta-kapcsoló struktúrák zárják le, amelyeknek egyik tagja az Opa1 fehérje hosszú és rövid formája által alkotott komplex (Mfn, OPA, HR, TM jelentését l. a szövegben, Pro: prolin gazdag domén, MTS: mitokondriális transzport szekvencia, Spl: alternatív mRNS-illesztésű domén, GED: GTP-áz effektor domén).

A mitokondriumok „osztódása”

Az egyedi mitokondriumok olyan fonalas hálózatot hoznak létre, amelyben „individualitásuk” megszűnik. A hálózathoz folyamatosan csatlakoznak új tagok, s arról szintén folyamatosan le is válnak ismét egyedivé váló mitokondriumok. A fúzió mellett a dinamikus átépülést a rendszer fragmentálódása, régebbi felfogásban a mitokondriumok osztódása biztosítja, amely lényegében **lefűződés, feldarabolódás** (18.9. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.9. ábra Fragmentálódó mitokondriális hálózat neuron axonjában, transzmissziós elektronmikroszkópos felvételen. (A nyilak szinapszisokra, a nyílhegyek a neurit membránjára mutatnak.)

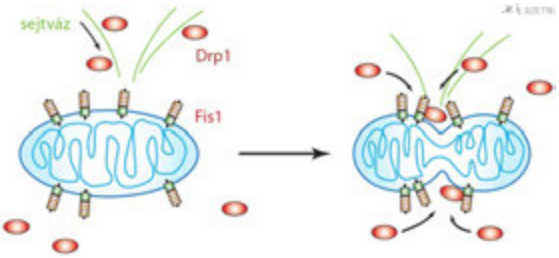
Mitokondriumok hálózatról való lefűződése megfigyelhető sejtosztódáskor, amikor az ATP-forrást az energiafelhasználás helyére kell irányítani és koncentrálni (a lefűződött mitokondrium szállítható). Tény azonban, hogy egy egyedi mitokondrium sebezhetőbb, mint a hálózat, s az önálló sejtszervecske autofágia áldozatává is válhat. A hálózat fragmentálódása az apoptotikus sejthalál egyik bevezető jelensége.

A lefűződésben központi szerepet játszó molekula a **Drp1** (dynamin related protein 1) fehérje. A Drp olyan citoszolikus, TM régióval nem rendelkező, nagyméretű **GTP-áz**, amely a **dynaminhoz hasonló** szerkezettel és funkcióval rendelkezik (18.10. ábra). (A dynamin endoszómális vezikulák sejtmembránról történő lefűzésében játszik szerepet.)

Az „osztódás” bevezető lépéseként a citoszolikus Drp1 a mitokondriális membránhoz kötődik. A membrán-asszociált Drp1 frakció arányát egyes poszt-transzlációs módosítások (PTM) növelik, míg mások csökkentik. Az első esetben az „osztódás” intenzitása nő, a második esetben az gátlódik. A PTM típusa lehet foszforiláció, sumoiláció, ubiquitiniláció, nitroziláció: a többségük az „osztódást” serkenti. A PTM-eken keresztül a Drp1 aktivitása kapcsolatban van a sejtosztódási ciklussal és a tápanyag ellátottsággal is.

A mitokondrium felszínén több olyan molekulát is azonosítottak, ami biztosíthatja a Drp1 membránhoz kötését. A **Fis1** (fission 1) transzmembrán (**TM**) doménje révén a mitokondrium felszínén rögzül. N-terminálisán két **TPR** (tetratricopeptide repeate) régiót hordoz (18.10. ábra), ezzel köti magához a Drp1-t. A Drp mitokondriumhoz szállításában a sejtváz játszik szerepet (18.11. ábra). A Fish1-hez hasonló fukciójú adapter fehérjék az Mff (mitochondrial fission factor) és a MiD49/51 (mitochondrial dynamics proteins 49 and 51).

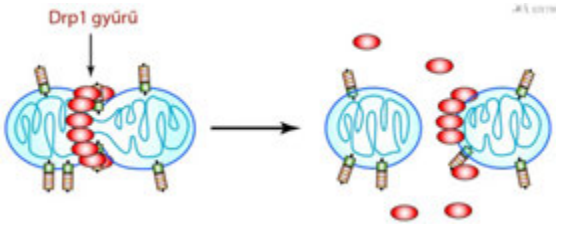
18.10. ábra A mitokondriumok hálózatról való lefűződésében („osztódásában”) főszerepet játszó fehérjék. A Drp1 N-terminálisán egy GTP-áz domén van, ezt egy centrális (C), egy variábilis (V) és egy GTP-áz effektor (GED) domén követi. A mitokondrium külső membránjában található Fis1 N-terminálisa TPR ismétlődéseket tartalmaz: ez teszi lehetővé a Drp1 megkötését. A membránlokalizációt transz-membrán régió biztosítja.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.11. ábra Mitokondrium lefűződésének (osztódásának) kezdeti lépései. A Drp1 a sejtváz közvetítésével a mitokondrium felszínéhez jut (A), majd megjelenik a kezdeti befűződés és a Drp1 molekulák hozzákötődnek a Fis1-hez (B). (A rajzon az egyszerűség kedvéért a folyamatot egy mitokondrium kettéosztódásaként ábrázoltuk.)

A **Fis1-Drp1 komplexek** a mitokondriumon megjelenő kezdeti befűződés mentén sorakoznak fel úgy, hogy egy, a mitokondriumot átölelő gyűrűt képeznek, amely egyre szorosabbra húzódik, míg végül lefűz egy mitokondriumot a hálózatról (18.12. ábra). Ebben a dynamin homológ Drp1 szerepét hasonlónak képzelhetjük, mint amilyet a dynamin az endoszómális vezikulák plazmamembránról való leválasztásában betölt (a dynamin a formálódó vezikula „nyaka" körül képez gyűrűt, s azt egyre szorosabbra vonva választja azt le a sejtmembránról). Annak mechanizmusa, hogy a belső membrán hogyan követi a külső membránban zajló eseményeket, s hogy az emlős sejtekben mi biztosítja a lefűződését, kevés ismeretünk van. A folyamat egyik lehetséges résztvevője a fent említett **Opa1**, amely mint írtuk, szintén dynamin homológ.



18.12. ábra A mitokondrium „osztódásának" befejező lépései. A Fis1 segítségével a membránhoz kötött Drp1molekulákból szerveződő lánc kettéfűzi a mitokondriumot. Végezetül a Drp1–Fis1 komplexek szétesnek, a Drp1 visszakerül a citoszolba. (A rajzon azt nem jeleztük, hogy itt nem egy mitokondrium kettéfűződéséről, hanem egy mitokondrium hálózatról történő lefűződéséről van szó.)

A mitokondriális hálózat átszervezésének jelentősége

A mitokondriális hálózat átszerveződésének a sejtre jellemző morfológia fenntartásán kívül fiziológiai jelentősége is van. Lehetőséget ad arra, hogy a mitokondriumok membránjainak és tereinek tartalma keveredjen, ezzel fenntartja azok genetikai és biokémiai egyformaságát. Segít megőrizni a mitokondriális DNS stabilitást és számos recesszív mutáció fenotípusos megjelenését kiküszöböli. Számos kísérleti eredmény utal arra, hogy a hálózatról való lefűződésben központi szerepet játszó Drp1 szerepet játszik az apoptózisban, mivel serkentheti a Bax oligomerizációját, ezzel elősegítve azon transzmembrán pórusok (MAC) képződését, amelyeken keresztül apoptogén faktorok jutnak ki a mitokondriumból a citoszolba.

A mitokondrium és az apoptotikus szignálok

Az apoptózis morfológiájával alaposabban foglalkozó kutatók érdekes megfigyelése volt az, hogy azokban a sejtekben, amelyekről kiderült, hogy később apoptózissal pusztulnak el, a tipikus apoptotikus morfológiai bélyegek megjelenése előtt jelentősen **megnő a mitokondriumok száma**. Ezt a jelenséget azzal próbálták magyarázni, hogy a sejt a fokozódó stresszre erőteljes és valódi mitokondrium osztódással reagál, megnövelve ezzel a védekezéshez szükséges energiatermelő kapacitását. Ma már tudjuk, hogy a számbeli növekedés valójában inkább a **mitokondriális hálózat**ot alkotó fonalas mitokondriumok kicsi „szemcsékké" történő **fragmentálódásának** a következménye.

Az apoptotikus pusztulás sorsára jutott sejt mitokondriális állományának relatív citoplazmatikus térfogataránya azonban nem növekszik; sőt, a folyamat előre haladtával – a mitokondriumok zsugorodása és a sérült, „védtelen", kisméretű mitokondriumok szelektív autofágiája (**mitofágia**) miatt – jelentősen csökken. (Többek között ez a magyarázata az apoptózis során fellépő és növekvő energiahiánynak.)

Ma már azt is tudjuk, hogy egy kedvező fiziológiás körülmények között működő sejt esetében az ép mitokondriumokban a **kriszta-kapcsoló struktúrák** zártak és a belső membrán külső felszínéhez kötődő **citokróm-c** molekulák nagy része az interkrisztális térben található. A kriszta-kapcsoló struktúrák zárt és nyitott állapota is dinamikusan változhat, és ez szoros összefüggésben áll a mitokondriális hálózat fragmentációjával.

Már a fenti, elsősorban morfológiai vizsgálatokból származó megfigyelések alapján egyre izgalmasabbá vált az a tudományos felvetés, hogy a mitokondriumok nem csak a földi élet oxidatív környezetéhez alkalmazkodott eukarióta

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

sejtek életjelenségeihez szükséges energia előállításáért felelősek, hanem kulcsszerepet játszanak „befogadó gazdájuk” kivégzésében is.

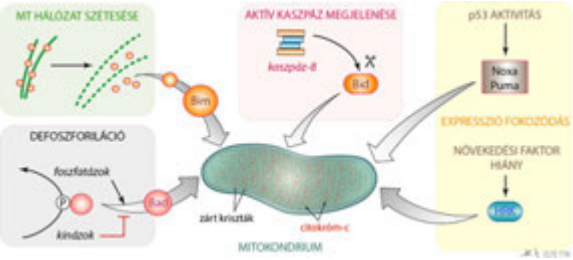
A legújabb kísérletes kutatások egyre meggyőzőbb molekuláris sejtbiológiai bizonyítékokat szolgáltatnak arra, hogy az aktív sejthalál apoptotikus típusában, annak kaszpáz-függő és kaszpáz-független útvonalaiban egyaránt, a mitokondriumok szerepe szó szerint (sejt)sorsdöntő!

Az **intracelluláris (intrinsic) sejthalál stimulusok** nagy része a kiterjedt mitokondriális hálózat membránján gyűlik össze. A hosszú, fonalas és a kicsi, lefűződött mitokondriumok dinamikus egyensúlya megbomlik és eltolódik a fragmentáció irányába (18.4. ábra). Ezzel egyrészt megnő a károsító hatásnak kitett membrán felület, másrészt a kicsi, egyedi mitokondriumok sokkal kiszolgáltatottabbak és védtelenebbek a károsító stimulusokkal szemben, mint maga a hálózat (l. előző fejezet).

Ahogy azt korábban írtuk, a **mitokondriális külső membrán** mindenkori állapotáért, intaktságáért, áteresztőképességének változásáért a már korábban megismert **Bcl-2 molekula család** transzmembrán régióval is rendelkező anti- és pro-apoptotikus tagjai a felelősek (6. fejezet). Nem lehet véletlen tehát az, hogy a mitokondrium fúzióban és lefűződéses szétválásban kulcsszerepet játszó molekulákon (Mfn1/2, Opa1, Fis1, Drp1) kívül a hálózat stabilitásában, illetve annak felbomlásában e fehérjecsalád tagjait is megtaláljuk.

A „BH-3 only” fehérjék aktiváló szerepe

A mitokondriális hálózat viszonylag gyors és irreverzibilis szétesése azonban „csak” szükséges, de nem elégséges feltétele a mitokondriális sejthalál útvonalak felpörgésének. Apoptotikus szignálok hatására a Bcl-2 fehérjecsalád **„BH3-only”** tagjai (17.1. ábra) aktiválódnak, s a mitokondrium felszínére kerülve (18.13. ábra) hozzákötődnek az ott lévő anti- és pro-apoptotikus családtagokhoz.

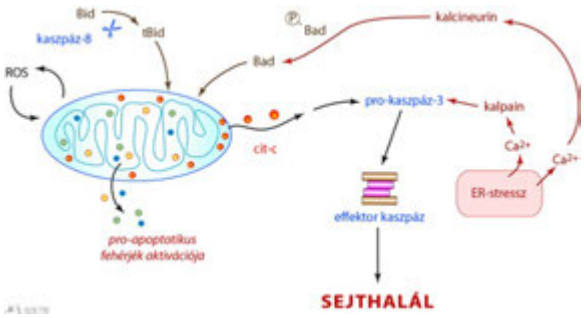


18.13. ábra Az apoptózis mitokondriális útvonalát beindító „csak BH3” fehérjék aktiválásának módjai a transzlokáció, a foszforiláció, a limitált proteolízis és az expresszió fokozása

A **Bid** egy olyan „csak BH3” doménnel rendelkező Bcl családtag, aminek **csonkolt formája** (tBid) egyrészt képes a Bcl-2 megkötésére (ezzel elvonja azt a Bcl-2–Bak heterodimerből, l. 17.8. ábra), másrészt pedig a Bax konformációjának oly módon történő átrendezésére, hogy az képes legyen a mitokondrium membránba inzertálódni (17.6. ábra). Hasonlóan kettős hatású a **Bim** és a **Puma**. A Bid hasítására a halál receptorok DISC-jében létrejövő kaszpáz-8 (l. I. típusú sejt) és a későbbiekben bemutatott granzim-B útvonalban központi szerepet játszó enzim, a granzim-B is képes.

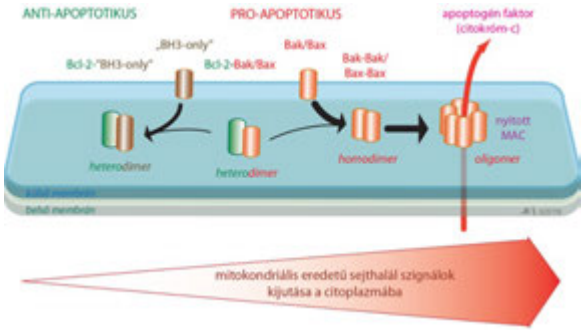
A citoplazmatikus **Ca^{2+} koncentráció** pro-apoptotikus szintre emelkedése olyan Ca^{2+}-függő molekulákat aktiválhat, amelyeknek fontos szerepe lehet az apoptózisban. Az intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedés elsősorban az endoplazmatikus retikulumot (ER) ért stressz következménye. Ezek a folyamatok ugyan az apoptotikus sejthalál II. típusának (úgynevezett belső útvonal) indukciójában szerepelnek, nem tekinthetők azonban egyértelműen kaszpáz függetlennek. A **szerin proteáz Ca^{2+}-függő kalpainok** ugyanis közvetlenül aktiválhatnak effektor kaszpázokat, míg a **kalcineurin** foszfatázként a pro-apoptotikus **Bad** fehérjét (Bcl család, „csak BH3) defoszforilálja és aktiválja. Ez utóbbi viszont mitokondriális közvetítéssel zajló kaszpáz aktivációhoz vezet (18.14. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.14. ábra A Bid és a Bad „BH3-only” fehérjéket aktiváló tényezők. A Bid csonkolását, ezzel aktiválását a halál receptorok DISC-jéből származó kaszpáz-8 végzi, a Bad fehérje foszforilációját pedig az endoplazmatikus retikulumból (ER) stressz hatására felszabaduló Ca^{2+} közvetítéssel aktiválódó kalretikulin. A mitokondrium sérülése következtében felszabaduló reaktív oxidatív gyökök (ROS) a mitokondriális membrán további károsodáshoz vezetnek. A membránkárosodás következtében a citoszolba pro-apototikus faktorok, többek között citokróm-c (cit-c) áramlik ki, utóbbi közvetett módon (két nyíl) hozzájárul további pro-kaszpázok aktiválásához.

Az aktivált „BH3-only” fehérjék a membránban homo- és heterodimereket alkotó anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék működését gátolják, miközben a pro-apoptotikus dimer-alkotókat aktiválják (17.6. és 17.8. ábra), s ezzel utat nyitnak a pro-apoptotikus folyamatoknak, azaz az effektor multidomén szerkezetű Bcl-2**Bak és Bax** fehérjék homodimer, majd oligomer képződésének. A proapototikus homodimerek nagyszámú megjelenése a mitokondrium membránjának permeabilitását drasztikusan megváltoztatja: a membránon **apoptózis indukált csatornák** (MAC) nyílnak, amelyeken keresztül mitokondriális eredetű, sejthalál szignált közvetítő faktorok jutnak ki a citoplazmába (17.8. és 18.15. ábra).



18.15. ábra Az anti- és a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék egyensúlyának felborulása apoptózis indukált csatornák (MAC) nyílását eredményezi. Az aktiválódó Bak és Bax hatására az anti- és pro-apototkius multidoménű fehérjék közötti egyensúly eltolódik a heterodimerek, illetve a pro-apoptotikus homodimerek irányába. Ez az utóbbiak oligomerizációjához, végső soron pórusok (MAC) nyílásához vezet. Az oligomerizációval párhuzamosan egyre több mitokondriális eredetű sejthalál szignál (citokróm-c) jut ki a citoplazmába.

A mitokondriális eredetű apoptogén faktorok hatása

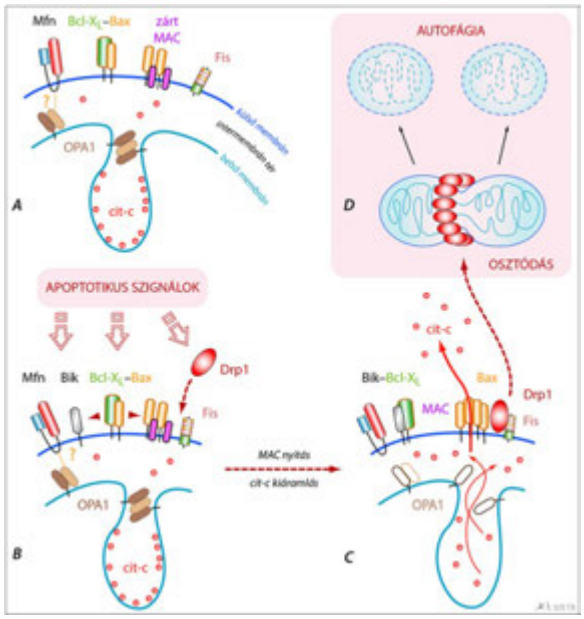
Ahogy említettük, a mitokondriumok számos olyan fehérjét „őriznek” intramembrán terükben, amelyek az egészséges sejtben hasznos funkciót töltenek be, a citoplazmába kijutva azonban **apoptogén** (apoptózist indukáló) hatásúak. Ilyen az intermembrán térben felhalmozódó **citokróm-c**, valamint a mátrixban található **AIF**(apoptotosis inducing factor), **endonukleáz G**, **Smac** (second mitochondria-derived activator of caspases) és **Omi/HtrA2** (high temperature-requirement protein A2), amelyek – a fiziológiás rendeltetési helyükként szolgáló mitokondrium „fogságából” kijutva – képesek az apoptotikus sejthalál kaszpáz-függő vagy kaszpáz-független belső útvonalának beindítására. A mátrix eredetű faktorok citoszolba jutásához a belső membránban helyet foglaló **permeabilitási tranzíciós pórus**ok (permeability transition pore, **PTP**) nyílására van szükség. A citokróm-c kiáramlásához elegendő a MAC kialakulása (17.3. ábra).

A mitokondriális fragmentáció és a külső membránban zajló események hatással vannak a belső membrán stabilitására is. A **kriszta-kapcsoló struktúrák felbomlanak**, ezért az interkrisztális térből nagy mennyiségű citokróm-c áramlik az intermembrán térbe, ami onnan a megnyílt pórusokon keresztül kijut a citoplazmába (18.16.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

ábra). A megnyíló PTP-ken keresztül történhet az AIF, az endonukleáz G, a IAP-gátló Smac (l. „A IAP fehérjecsalád” c. fejezet) és HtrA2 kijutása is.

Apoptotikus szignál hatására a **Drp1** a mitokondrium felszínére toborzódik, ahol az aktivált **Bax** kölcsönhatásba lép vele. A Drp1 kimutatható hatással van a mitokondriumokból felszabaduló citokróm-c mennyiségére, valószínűleg növeli a Bax proteinnek a membránhoz való affinitását, így segítheti annak pórusképzését. (Megjegyezzük, hogy a citokróm-c kijutásában játszott szerepe nem feltétlen érinti más apoptotikus faktorok kiáramlását.) A Bax és a Bak a **mitofuzinok**kal (Mfn) egészséges sejtben is kapcsolatba lép, apoptotikus sejtben pedig úgy tűnik, hogy gátolja a fúziót, segíti az „osztódást” (18.16. ábra). Hogy a Bcl-2 család e tagjai milyen szerepet töltenek be az egészséges sejt mitokondrium hálózatának dinamikájában, s hogy a sejtpusztulás alatt milyen mechanizmuson keresztül fejtik ki a hálózat feldarabolódását eredményező hatásukat, az ma még nem ismert.

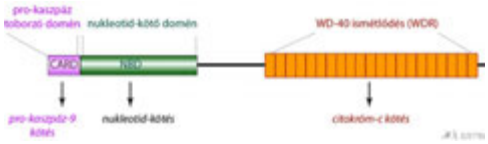


18.16. ábra A Bax mitokondriális hálózat dinamikát befolyásoló hatásai. Nyugalmi állapotban a Bax anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjékkel (pl. Bcl-X_L) heterodimereket képez. (A). Apoptotikus szignálok hatására a Drp1 a külső membránhoz toborzódik, s kölcsönhatásba lép a heterodimerből kilépő Bax fehérjével (B). A Bax közreműködésével kialakuló mitokondriális apoptózis indukált csatornák (MAC) nyílásával párhuzamosan a kriszta-kapcsoló struktúrák felbomlanak és a citokróm-c (cit-c) kiáramlik a citoszolba. (A rövidítéseket l. korábbi fejezetekben.)

Az apoptoszóma

Az apoptotikus kaszpáz-kaszkád belső útvonalán a legfontosabb **iniciátor kaszpáz a kaszpáz-9**. Ennek aktiválása egy nagy, több komponensű molekuláris komplexum, az úgynevezett **apoptoszóma** révén zajlik. Ez a komplexum a citoplazmában szerelődik össze, mégpedig egyrészt az apoptotikus stimulusok (oxidatív stressz, megnövekedett szubnekrotikus Ca^{2+} szint) hatására a mitokondriumokból felszabaduló **citokróm-c**, és a citoplazmában prekurzor formában jelenlévő **Apaf-1** (apoptotic-enzyme activating factor), valamint pro-kaszpáz-9 molekulákból. A komplexum kialakulásához ATP hidrolízisre és nukleotid cserére (ADP/ATP) is szükség van.

Az Apaf-1 molekula több fontos funkcionális régióval is rendelkezik. Az N-terminálisán található egy **CARD** interakciós domén, ahová (megfelelő körülmények között) a hasonló régióval rendelkező iniciátor pro-kaszpáz (pro-kaszpáz-9) tud kötődni. A középső régióban egy oligomerizációt is lehetővé tevő nukleotid-kötő domén (NBD: nucleotide binding domain) helyezkedik el, ami ADP/ATP kötésre alkalmas, míg a C-terminális régiót egy hosszú, WD-40 repetitív szekvencia (WDR) alkotja (18.17. ábra)

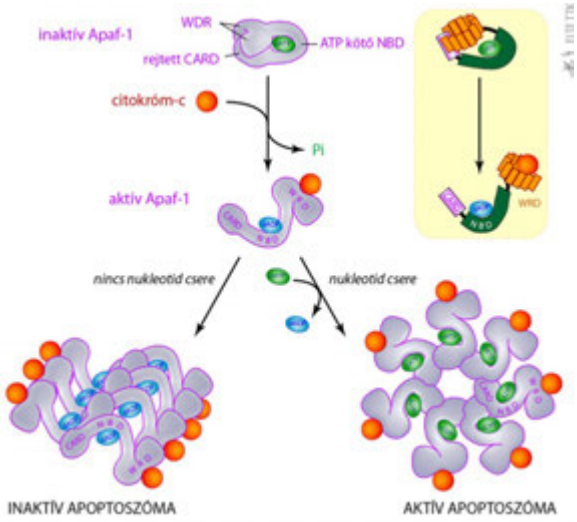


XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.17. ábra Az Apaf-1 doménjei. A molekula N terminálisán egy kaszpáz toborzó CARD domén található, amit egy nukleotid-, majd egy citokróm-c kötő régió követ.

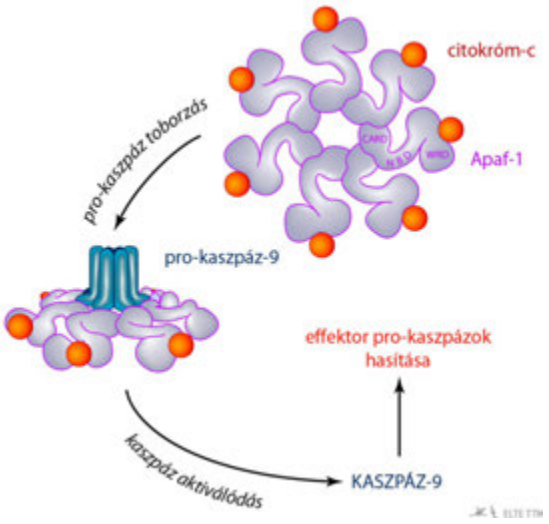
Az **inaktív Apaf-1** igen zárt térszerkezete legjobban egy saját farkába harapó kígyóhoz hasonlít, amiben a C-terminális WD-40 repetitív régió által alkotott „állkapocs” fogva tartja az N-terminális CARD régióját, lehetetlenné téve ezzel a pro-kaszpáz-9 bekötését (**autoinhibíció**, 18.18. ábra).

Ebből az inaktív állapotból csak **apoptotikus stimulus** hatására léphet ki az Apaf-1, mégpedig akkor, amikor az NBD régióhoz kötődő **ATP-t elhidrolizálja**. Ennek hatására az „állkapocs” szorítása lazul, s a mitokondriumokból kiszabaduló **citokróm-c** (ez egyben az apoptotikus jel) „felpeckeli” az „állkapcsot”. A folyamat során az Apaf-1 zárt konformációja teljesen átalakul, és egy **ADP/ATP nukleotid-cserét** követően 7 darab Apaf-1–citokróm-c–ATP egységből álló, sugaras szimmetriájú komplex alakul ki. Amennyiben nukleotid csere nem történik, a sugaras szimmetria nem alakul ki – ez esetben pro-kaszpáz molekulák bekötődésére sincsen lehetőség (18.18. ábra).



18.18. ábra Az Apaf-1 aktiválódása és apoptoszómává szerveződése. Nyugalmi állapotban az Apaf-1 egy saját farkába harapó kígyóra emlékeztet: a kaszpáz toborzó CARD régióját a WDR ismétléseket hordozó C terminális inaktiválja (zárt forma). A konformáció megváltozásához ATP hidrolízis és citokróm-c kötésre van szükség. Az így „kiegyenesedő” molekula egy nukleotid csere után már képes pro-kaszpázokat toborozni. A sárgával keretezett részen látható molekulamodellek a 7.13. ábrának megfelelően mutatják a tőlük balra látható konformációt.

Az aktív apoptoszómában a kaszpáz-toborzó CARD régió hozzáférhető, így lehetőség van a **prokaszpáz-9** molekulák bekötésére és aktiválódására. Ezzel kialakul a **proteolitikusan aktív** apoptoszóma (18.19. ábra). Az aktivált kaszpáz-9 molekulák (hasonlóan a kaszpáz-8-hoz) limitált hasítással effektor pro-kaszpázokat aktiválnak.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.19. ábra A prokaszpáz-9 apoptoszómába épülése és a proteolitikusan aktív komplex kialakulása. Az aktiválódott és sugaras komplexet kialakító Apaf-1 molekulák pro-kaszpáz-9 fehérjéket toboroznak, aminek az eredménye végül aktív effektor kaszpázok citoplazmatikus megjelenése lesz.

A mitokondriális sejthalál kaszpáz-függő és kaszpáz-független útvonala

A mitokondriális sejthalál **kaszpáz függő mechanizmusa** a mitokondriumokból nagymennyiségben kiszabaduló **citokróm-c** közvetítésével aktiválódik. A citokróm-c a citoplazmában inaktív formában lévő Apaf-1 fehérjéhez kötődve iniciálja az **apoptoszóma** összeszerelődését (l. 18.18. és 18.19. ábra), ezen keresztül a pro-kaszpáz-9 iniciátor kaszpáz és effektor kaszpázok aktiválódását.

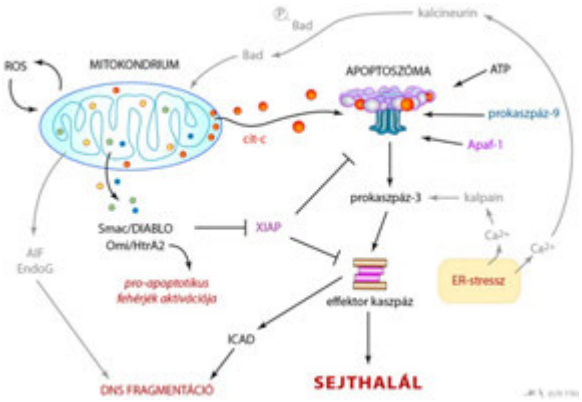
Az apoptózist kiváltó stimulusok a főcsapást jelentő kaszpáz-kaszkádokon kívül más molekuláris komponensek révén is hozzájárulhatnak azonban a sejt aktív elhalásához.

A **mitokondriális membrán permeabilizálódása** következményeként a mitokondriumokból nem csak a kaszpáz aktivációban szerepet játszó citokróm-c jut ki a citoplazmába, hanem a belső membrán PTP csatornáinak megnyílásával más fehérjék is, mint például az AIF és az endonukleáz G (18.20. ábra). Az **AIF** (apoptosis-inducing factor) egy oxido-reduktáz funkciójú flavoprotein, amely normális körülmények között a mitokondriális intermembrán térben található. Miután azonban a mitokondriális lokalizációs szignálon (MLS) kívül magi (nukleáris) lokalizációs szekvenciája (NLS) is van, nem meglepő, hogy a citoplazmába kerülve onnan a sejtmagba transzlokákódik.

Az AIF a sejtmagban a ciklofilin-A-val molekuláris komplexeket, úgynevezett **degradoszómák**at képezve részt vesz a DNS fragmentálásában. Az **endonukleáz G** a sejtmagba jutva hasonló szerepet játszik (18.20. ábra).

A mitokondriumokból kijutó **Omi/HtrA2** (high temperature-requirement protein A2) nem csak a IAP-ok gátlását végzi, hanem szerin proteáz aktivitása révén maga is képes pro-apoptotikus fehérjék limitált proteolízissel történő aktiválására. A **Smac** (second mitochondria-derived activator of caspases) az apoptózisgátló XIAP inhibítora (18.20. ábra).

Mitokondrium hálózattól független esemény az endoplazmatikus retikulumot érő stressz. Ez utóbbi sejtfelszíni (nem halál) receptorokon keresztül is kiváltható (pl. túlzott aktiválással), s lehet kapcsolatos a fehérje szintézist befolyásoló hatásokkal. Az utóbbi esetben jelentős mértékűvé akkor válik, amikor a sejt egy olyan fehérjét termel, ami mutáció következtében hibás konformációjú (l. 13. fejezet). A rossz térszerkezetű fehérje helyreállítására aktiválódnak az ER hibajavító mechanizmusai (pl. az ER chaperonok), de ha a natív konformáció nem állítható helyre, akkor gondoskodnak a fehérje eltávolításáról, azaz annak citoplazmába juttatásáról (l. ERAD mechanizmus). Az endoplazmatikus retikulumot ért folyamatos megterhelés, vagy a receptorok felől érkező szignalizáció hatására az ER ciszternákból Ca^{2+}ionok áramlanak ki, s a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció pro-apoptotikus szintre emelkedik. Ez egyrészt a Bad „BH3-only”, másrészt a végrehajtó kaszpázok aktiválását eredményezi (18.14. ábra). A mitokondriumból, valamint az ER-ből kiinduló útvonalakat a 18.20. ábra foglalja össze.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

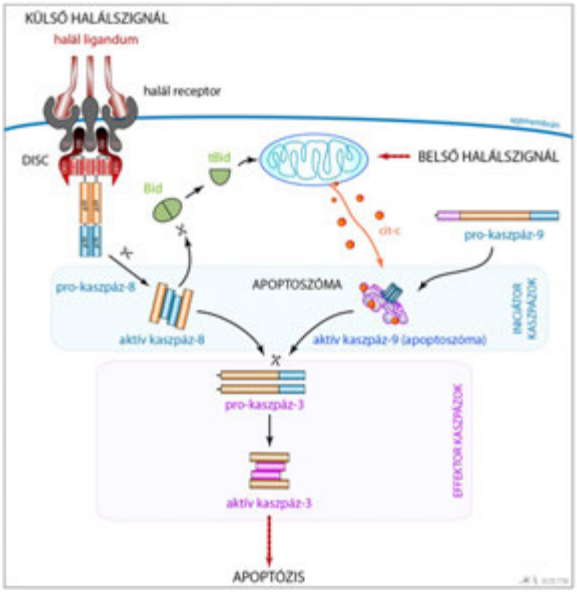
18.20. ábra A mitokondriális sejthalál kaszpáz-függő és kaszpáz-független útvonalainak összefonódása: az előbbit fekete, az utóbbit szürke nyilak és feliratok jelzik (a magyarázatot l. a szövegben) (cit-c: citokróm-c, ER: endoplazmatikus retikulum, ROS: reaktív oxidatív szabadgyök , a többi rövidítést a szöveg tartalmazza).

A külső és a belső halálszignál útvonal összekapcsolása

Amint látjuk, a sejt többnyire a külső és belső kényszerítő körülményeknek – a továbbiakban már elviselhetetlen és a környező sejteket is veszélyeztető – hatására szánja rá magát az önpusztító lépésre. A „visszavonhatatlan döntés" meghozatala után az egész folyamat óramű pontossággal, a fogaskerekek tökéletes illeszkedésével zajlik. A rendszerbe a „véletlen menekvés" esélyének minimalizálása érdekében **számos kapcsoló és jelerősítő (amplifikáló) útvonal** van beépítve. Ennek egyik szép példája a külső (extrinsic), halál receptorról induló apoptotikus útvonal és a belső (intrinsic), mitokondriális útvonal összekapcsolása az exekuciót végző effektor kaszpázok megfelelő mértékű aktiválása érdekében.

A folyamatban a **jelkapcsoló molekula** szerepét egy „csak BH3" fehérje, a **Bid** tölti be, aminek a citoplazmában található inaktív formáját proteolítikus hasítással lehet aktiválni. A Bid csonkolására több olyan enzim is képes, amelyek fontos szerepet töltenek be az apoptózis mechanizmusában, így a Ca^{2+}-függő kalpain (l. 18.20. ábra), a granzim-B és két iniciátor kaszpáz, a kaszpáz-2 és -8 (18.21. ábra).

Amennyiben a pro-kaszpáz-8 DISC-hez kötött aktiválása során nem keletkezik elegendő mennyiségű aktív kaszpáz-8 molekula az effektor kaszpázok közvetlen aktiválásához, a kaszpáz-8 a Bid-et is hasítja (l. II. sejttípus). A csonkolt Bid (tBid), mint aktív „BH3 only" protein az anti-apoptotikus Bcl-2-t és a Bcl-X_L-t gátolva (17.I. táblázat), illetve a pro-apoptotikus Bax és Bak molekulák homodimerizációját ösztönözve (18.15. ábra), serkenti a citokróm-c molekulák mitokondriumból citoplazmába irányuló kiáramlását. Itt ennek hatására a már korábban leírt pro-kaszpáz-9 és Apaf-1 molekulákból aktív apoptoszómák szerveződnek (18.18. és 18.19. ábra), amelyek felsokszorozzák az aktív iniciátor és effektor kaszpázok mennyiségét, és a folyamat így tovább gördülhet egészen a sejt teljes megsemmisüléséig (18.21. ábra).



18.21. ábra A Bid szerepe a külső és belső halálszignálok által aktivált útvonalak összekapcsolásában, a „jelerősítésben". A halál receptorhoz adapter fehérjével kötődő pro-kaszpáz-8 aktiválódás után nem csak effektor pro-kaszpázt képes aktiválni, hanem elhasítja a Bid-et is. A csonkolt Bid (tBid) a mitokondrium membránjához kötődve hozzájárul a citokróm-c (cit-c) citoplazmába történő kiáramlásához, ezzel az apoptoszóma aktiválásához, végső soron a DISC-ből induló kaszpáz rendszer működésének felerősítéséhez.

Ellenőrző kérdések

1. Mit tud a mitokondrium hálózatról? Milyen körülmények között alakul ki, s mikor fragmentálódik? Ennek a dinamizmusnak mi az élettani jelentősége?

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

2. Mutassa be röviden a mitokondriumok fúziójának mechanizmusát a molekuláris szereplőkkel együtt!
3. Mit jelent a mitokondriumok osztódása? Milyen molekuláris mechanizmus áll a hátterében?
4. Milyen izolált terek alakulnak ki egy ép mitokondriumban? Mi az a kriszta-kapcsoló struktúra és miért fontos a megléte?
5. Mi a szerepe a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentrációnak az apoptózis mechanizmusában?
6. Mik azok a mitokondriális apoptogén faktorok?
7. Mi az apoptoszóma? Milyen komponensei vannak, s hogyan szerelődik össze?
8. Milyen folyamatot takar a mitokondriális sejthalál útvonal kaszpáz független útvonala? Milyen sejtalkotókat érint, és milyen következményekkel jár?
9. Egy vázlatrajz segítségével mutassa be, hogy hogyan és hol kapcsolódik össze az apoptózis kaszpáz és kaszpáz független útvonala!
10. Milyen lehetőség van a külső és belső sejthalál szignálok által beindított útvonalak összekapcsolására? Az ebben szerepet játszó fehérje milyen molekula családba tartozik?

Felhasznált és ajánlott irodalom

Benard, G., Rossignol, R. (2008) Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal.* **10(8),** 1313-42. doi: 10.1089/ars.2007.2000.

Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M. J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., Lipton, S. A. (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol.***15(6)**, 706-16. DOI 10.1016/j.ceb.2003.10.015

Chan, D. C. (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.***46**, 265-87. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132529.

Frohman, M. A. (2010) Mitochondria as integrators of signal transduction and energy production in cardiac physiology and disease. *J Mol Med (Berl)*. **88(10)**, 967-70. doi: 10.1007/s00109-010-0662-x.

Landes, T., Martinou, J. C. (2011) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta.***1813(4)**, 540-5. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.021.

Suen, D. F., Norris, K. L., Youle, R. J. (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.***22(12)**, 1577-90. doi: 10.1101/gad.1658508.

Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M.T., Palmer, C. S. (2013) Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta* **1833**, 150–161.

Suen, D. F., Norris, K. L., Youle, R. J. (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* **22(12),** 1577-90. doi: 10.1101/gad.1658508.

Riedl, S. J. Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(5), 405-13.

Yuan, S., Akey, C. W. (2013) Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. Structure **21**(4), 501–515. http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024

Zorzano, A., Liesa, M., Sebastian, D., Segales, J., Palacin, M. (2010) Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol.***21(6)**, 566-74. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.01.002.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

19. Az apoptózis szabályozása: a IAP-ok, a hősokk fehérjék és a p53

A IAP fehérjecsalád

Szerkezeti jellemzők

A IAP (inhibitors of apoptotic proteins) fehérje család első tagját (OpIAP, *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhydrosis virus) bakulovírusból izolálták, mint olyan fehérjét, amelynek az a szerepe, hogy meggátolja a gazdasejt önpusztító védelmi reakcióját, s minél hosszabb ideig biztosítsa a vírus teljes replikációját. A későbbiekben a gerinctelenektől (élesztő, *C. elegans*, ecetmuslica) a halakon át az emlősökig számos olyan molekulát fedeztek fel, amelyek funkció és szerkezeti hasonlóság alapján is egy csoportba sorolhatók az OpIAP molekulával.

Valamennyiük szerkezetében közös, hogy rendelkeznek legalább egy, úgynevezett **BIR** (baculovirus IAP-repeat) régióval, és a többségük egy **RING** (really interesting new gene)-finger doménnel vagy egy UBC (ubiquitin conjugating) régióval (19.1. és 19.2. ábra).

19.1. ábra A bakulovírus és a Drosophila IAP fehérjéi. A család tagjainak szerkezetére a BIR, a RING és az esetleges UBC domének jellemzőek. (A rövidítések jelentését l. a szövegben.)

19.2. ábra Az emlősök IAP fehérjéi. A család különc tagja a NAIP (neuronal apoptosis-inhibitory protein/BIRC1), aminek a BIRC doméneken kívül nukleotid-kötő oligomerizáló (NOD, nucleotid-binding oligomerization domain) és leucin-gazdag ismétlődést tartalmazó (LRR, leucine rich repeate) doménjei vannak. A NAIP kaszpáz-9 enzimet köt.

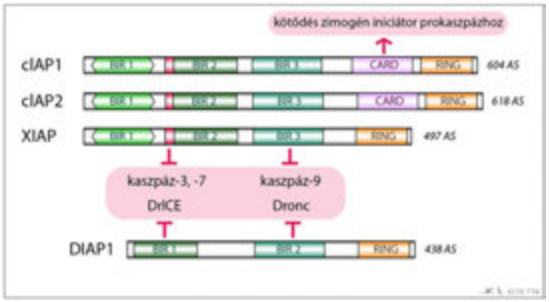
A **BIR domének** fehérje-fehérje interakciós domének, amik ismétlődése növeli a kötőpartner iránti affinitást, valamint a lehetséges kötőpartnerek számát. Az emlősöknél a BIR2 és a BIR3 vesz részt az apoptotikus fehérjék működésének szabályozásában, míg a BIR1 szignalizációs útvonalak szereplőivel teremt kapcsolatot. A BIR2 és a BIR3 domén képes kapcsolódni egy evolúciósan konzervatív, úgynevezett IAP-kötő, **IBM** (IAP binding motif) szekvenciához, amit számos fehérje visel. Az IBM szekvenciát megtalálták többek között a **kaszpáz-9, a kaszpáz-3 és a kaszpáz-7** enzimeken, a mitokondriumból kiinduló belső sejthalál útvonalon aktiválódó **Smac** és az **Omi** proteineken (19.3. ábra). Ennek a szekvenciának a jellegzetessége az, hogy a natív fehérjékben rejtett, csak azok proteolítikus hasításával tárul fel. A Smac és az Omi esetében ez a mitokondriumba irányító szignálszekvencia lehasításakor történik meg, ami azt jelenti, hogy e fehérjék IAP-kötő motívuma a citoplazmában nem jelenik meg, csak akkor, amikor a Smac és az Omi a mitokondrium membrán sérülése során kijutnak a citoszolba (18.15. ábra). A BIR-IBM interakció természetesen megszünteti mindkét kötőpartner más irányú aktivitását, így ennek alapján a Smac és az Omi IAP-inaktiváló, azaz proapoptotikus hatású (18.20. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

EMLŐS								
Smac/DIABLO	A	V	P	I	A	Q	K	S
hCasp-9	A	T	P	F	Q	E	G	L
mCasp-9	A	V	P	Y	Q	E	G	P
xCasp-9	A	T	P	V	F	S	G	E
hHtrA2/Omi	A	V	P	S	P	P	P	A
mHtrA2/Omi	A	V	P	A	P	P	P	T
DROSOPHILA								
Reaper	A	V	A	F	Y	I	P	D
Grim	A	I	A	Y	F	L	P	D
Hid	A	V	P	F	Y	L	P	E
Sickle	A	I	P	F	F	E	E	E

19.3. ábra Különböző, főként apoptózist stimuláló fehérjék IBM (IAP-kötő) régiójának evolúciós konzervativizmusa: a nyolc tagból álló tetrapeptid motívumban (A-(V/T/I)-(P/A)-(F/Y/I/V)) zöld és sárga színnel a konzervatív aminosavakat jelöltük. Az ecetmuslicában egy további kötőhely is van, amely kékkel jelzett.

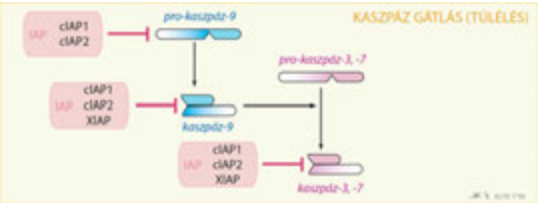
A BIR-IBM kötődés alapján egyes IAP-ok közvetlenül képesek kaszpázok aktivitását gátolni. Ezt az is lehetővé teszi, hogy a **cIAP1/2** emlős IAP-okon zimogén kaszpáz rekrutáló (CARD) régió is található, amely révén a hasonló prodoménű iniciátor pro-kaszpázokhoz (kaszpáz-2, -9) kötve képesek meggátolni azok aktivációját (19.4. ábra).



19.4. ábra A IAP család reprezentatív tagjai és azok funkcionális régiói. A BIR domének enzimgátlók, a CARD régiók iniciátor prokaszpáz toborzók (az ábra alján szereplő DIAP Drosophila IAP)

Az apoptózis-szabályozó hatások

A fenti két mechanizmus alapján a cIAP1, a cIAP2, valamint az XIAP a kaszpázok szintjén képesek apoptózist gátló hatást kifejteni. Kaszpázokhoz való kötődést mindhárom IAP esetében leírtak, azonban csak az XIAP képes az iniciátor kaszpáz-9 és az effektor kaszpáz–3/7 hatékony gátlására (19.5. ábra).



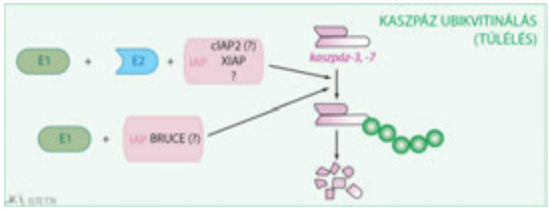
19.5. ábra A IAP-ok anti-apoptotikus funkciói. Egyes IAP fehérjék képesek a pro-kaszpáz-9 aktiválását megakadályozni, illetve a már aktív kaszpázokat gátolni.

A fehérje családban ugyancsak jellemző domén a **RING-**finger (C-terminal RING[4] zink finger)régió, melynek révén a IAP-ok **ubiquitin-ligázként** (E3, az ubiquitin konjugáló enzimsor utolsó tagja) működnek. A RING domén teszi lehetővé az ubiquitin szubsztrátra való átvitelét, mivel biztosítja az E2 enzimmel való kapcsolatot. A RING domént hordozó IAP-ok tehát képesek poli-ubiquitin lánccal specifikusan megjelölni az általuk felismert fehérjéket, pl. a fent említett kaszpázokat (19.6. ábra), a Smac, Omi és TRAF fehérjéket, és így azokat proteaszómális lebontásra ítélik. A BRUCE (BIRC6) esetében egy **UBC** (ubiquitin conjugating) domént is találunk a molekulában, ami

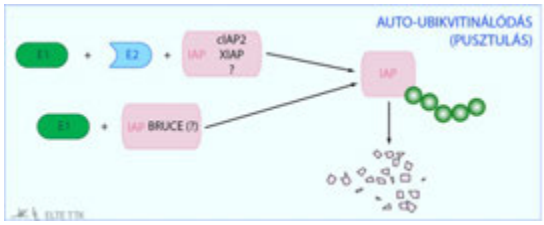
[4] RING: really interesting new gene

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

alapján ez a IAP E2 ubiquitin konjugáló enzimként működik. Megjegyezzük, hogy míg az előbb említett BIR-IBM interakción alapuló kötődés reverzibilis, addig a poli-ubiquitiniláció visszafordíthatatlan. A IAP-ok ubiquitin-ligáz aktivitása alapján az is lehetséges, hogy egymást és magukat poli-ubiquitinilálják (az utóbbi auto-ubiquitiniláció), és így az ubiquitin-proteaszóma rendszer révén szabályozzák saját koncentrációjukat, szabad utat adva ezzel az apoptózis folyamatának (19.7. ábra).



19.6. ábra A IAP-ok poli-ubiquitiniláció révén kifejtett anti-apoptotikus hatása. A RING domént hordozó IAP-ok ubiquitin ligázként képesek kölcsönhatásba lépni az ubiquitin-konjugáló enzimmel (E2, kék), illetve egy UBC domén segítségével az ubiquitin aktiváló enzimmel (E1, zöld). A poliubukvitin láncot effektor kaszpázokra „építik", ami azokat proteolítikus degradációra ítéli.



19.7. ábra A IAP-ok apoptózisnak utat nyitó ubiquitiniláló működése. A IAP-ok mennyiségét poli-ubiquitinilációval maguk a IAP fehérjék (is) szabályozzák. (E1: ubiquitin aktiváló enzim, E2: ubiquitin konjugáló enzim).

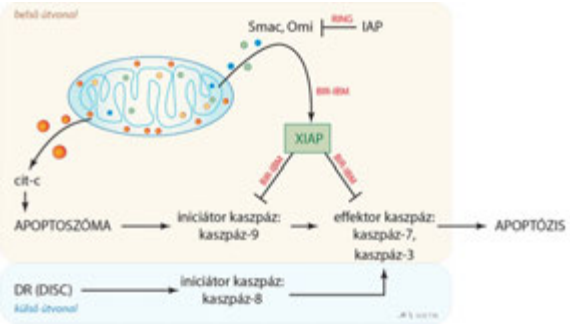
Az XIAP aktivitásai és a IAP-ok kooperációja

Egy sejt nyugalmi, „építkező" állapotára – többek között – az jellemző, hogy a citoplazmában a IAP család tagjai „féken tartják" a kaszpázokat. Amíg a sejtet csak szub-apoptotikus stressz-hatások érik, ez az egyensúly fenn is marad. Amint azonban olyan mértékű stressz éri a sejtet, ami aktiválni képes a **mitokondriális sejthalál útvonal**at (l. 18. fejezet), a sérült mitokondriumokból kiáramló **Smacés Omi** az evolúciósan konzervatív **IBM régió**ik révén (19.3. ábra) gátolni tudják a IAP-ok működését. Ez a kaszpázok „gátlástalan" tobzódásához vezet, s a sejt, mint egy fékevesztett jármű a lejtőn, egyre gyorsuló sebességgel rohan a végzete felé.

A IAP fehérjék egy többszintű, egymást támogató hálózat kialakításával valamennyi (külső, belső) kaszpáz-függő sejthalál útvonalat képesek gátolni. E téren a **XIAP** (X-linked IAP) rendelkezik a legszélesebb repertoárral. Kétféle mechanizmus útján is gátolja az iniciátor kaszpáz-9, valamint az effektor kaszpáz-3/7 működését: egyrészt BIR-IBM interakción alapuló kötéssel, másrészt a kaszpázok szubsztrátkötő zsebének „lefedésével". Ezen felül megakadályozza a pro-kaszpáz-9 dimerizációját (allosztérikus gátlás), ezzel aktiválódását. Más IAP-ok ubiquitiniláció révén proteaszómális degradációra ítélhetnek pro-apototikus fehérjéket. A Smac például gátolja az XIAP-ot (IBM-BIRC kölcsönhatás révén), ám ez a gátlás feloldható a Smac ubiquitinilálásával, amit a RING doménnel rendelkező cIAP-ok képesek elvégezni (19.8. ábra). Vannak adatok arra is, hogy a IAP-ok heterodimerek képzésével képesek egymás aktív állapotát stabilizálni.

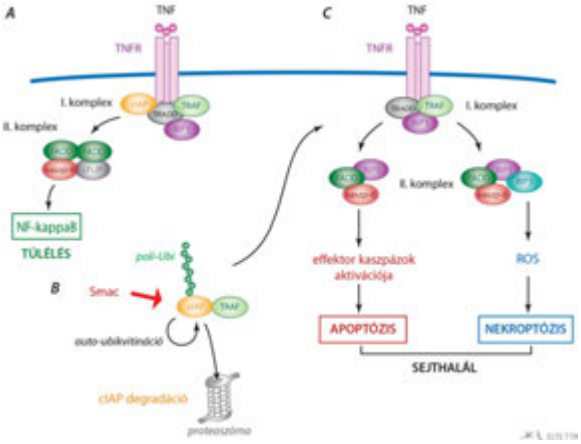
A fentiek alapján a IAP fehérjék a mitokondriális útvonal aktiválását képesek gátolni. Az ebben az útvonalban (is) effektor kaszpázként szereplő enzimeket (kaszpáz-3, -7) azonban a külső, sejthalál receptorok DISC-jéből kiinduló útvonal is eléri (19.8. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.8. ábra Az XIAP aktivitását meghatározó kölcsönhatások. A BIR-IBM interakció alapján az XIAP képes gátolni a kaszpáz-9/3/7 aktivitását, de ugyanez a kölcsönhatás azt is lehetővé teszi, hogy a Smac és az Omi felfüggessze ezt az inhibíciót. Más, RING doménnel rendelkező IAP fehérjék a Smac és az Omi ubiquitinilálásával támogathatják az XIAP anti-apoptotikus tevékenységét. A IAP-ok a belső (mitokondrium-mediált) útvonalon mind az indukciót, mind pedig a végrehajtást képesek gátolni, de a külső jellel induló útvonalon csak az effektor kaszpázokra vannak hatással.

A mitokondriális eredetű Smac igen kiterjedt hatásokkal rendelkezik. Korábban szó volt arról, hogy a TNF receptorból kiinduló, **NF-κB** aktiváló jelátviteli útvonalban **cIAP**-ok is szerepelnek (16.13. és 16.14. ábra). Annak, hogy a Smac (az XIAP mellett) képes hozzákötődni a cIAP fehérjékhez is, végzetes szerepe vant abban, hogy a sejt sorsa a sejthalál felé terelődik. A sejthalál típusa, a TNF receptor DISC-jének és az abból származó II. komplexnek az összetételétől függően, lehet apoptózis vagy nekroptózis. A Smac-cIAP kötődés hatására a cIAP auto-ubiquitinilálódik (19.7. ábra), ezzel proteaszómális lebontásra irányítódik. Hiányában a DISC-ből származó II. komplex vagy effektor kaszpázokat aktivál, vagy RIP3 jelenlétében oxidatív szabad gyököket képez (l. „Útvonal a nekroptózis felé” c. fejezet). Az előbbi apoptózishoz, az utóbbi nekroptózishoz vezet (16.14. és 19.9. ábra).

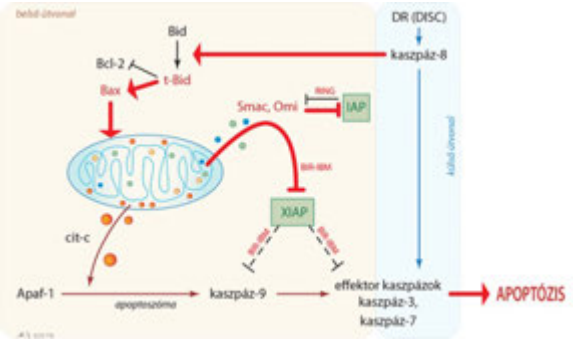


19.9. ábra A cIAP Smac általi megkötésének hatása a TNF receptoron keresztüli sejthalál kiváltásában. A cIAP fehérje a sejt túlélését segíti oly módon, hogy a TNF receptor DISC-jébe épül be, s olyan II. komplex kialakulását segíti, ami az NF-κB útvonalat aktiválja (A). A mitokondriális eredetű Smac a cIAP auto-ubiquitinilációját, ezzel proteaszómális lebomlását okozza (B), cIAP hiányában pedig a II. komplex összetétele vagy az apoptózis, vagy a nekroptózis felé tereli a sejtet (C).

Az XIAP hátba támadása: a tBid szerepe

Korábban szót ejtettünk azokról a sejtekről, amelyek az apoptózis indukciója szempontjából az úgynevezett **II. típus**ba sorolhatók. Ezekben a sejtekben a sejthalál receptorok DISC-je által aktivált iniciátor kaszpáz-8 enzimek a Bid „BH3-only” fehérjét is hasítják. A **csonkolt Bid** (t-Bid) aktiválja a pro-apototikus Bax fehérjét, ami ekkor a mitokondrium külső membránjába integrálódva (a Bak fehérjékkel együttműködésben) transzmembrán pórusok (MAC) képzésével beindítja a belső, mitokondriális sejthalál indukciós útvonalat (18.15. és 19.10. ábra). Ez a mozzanat a IAP-ok szempontjából egy hátba támadással ér fel, hiszen a citoplazmába nagy mennyiségben kiáramló Smac és Omi (pro-apoptotikus faktorok aktiválása mellett) gátolják az XIAP-ot, így szabad utat nyitnak a külső útvonalon is megindított effektor kaszpáz aktivációnak (19.10. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.10. ábra A tBid a Bax fehérje aktiválásán keresztül gondoskodik az XIAP gátlásáról, így aktiválva és védve a belső útvonalat, hatékonyabbá teszi a halál-receptorról induló jelátvitelt is (a rövidítések jelentését l. a szövegben).

A IAP-ok nem apoptotikus funkciói

A IAP fehérjék elsősorban az apoptózis gátlásában betöltött szerepükről ismertek, e mellett azonban nem apoptotikus funkciókkal is rendelkeznek. Ezek közül néhányat a 19.I. táblázatban foglalunk össze. Közülük csak egyet emelünk ki: a cIAP1/2 és az XIAP – valószínűleg több szinten is – részt vesz a TNF receptorokból kiinduló NF-κB aktiváló jelátvitelben (16.13. és 16.14. ábra).

19.I. táblázat. A IAP fehérjék néhány azonosított funkciója.

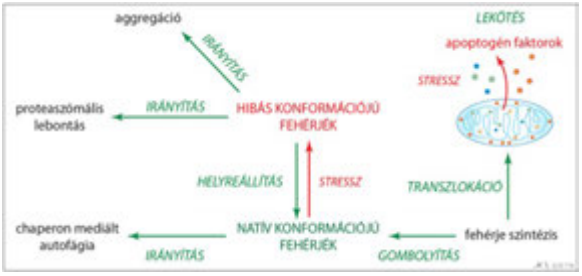
IAP	**Funkció**
BIRC1	kaszpáz-1 aktiváció, neurit növekedés
BIRC2/cIAP1	NF-κB aktiváció, proliferáció, differenciáció
BIRC3/cIAP2	NF-κB aktiváció
BIRC4/XIAP	NF-κB aktiváció, Bmp szignalizáció, proliferáció, neuronok túlélésének elősegítése
BIRC5/Survivin	kromoszóma szegregáció sejtosztódásban, citokinezis
BIRC6/Apllon	placenta fejlődés, proliferáció
DIAP1	pro- és antiapoptotikus hatás az embrionális fejlődésben

A hősokk fehérjék

Rövid bemutatás

Az eukarióta sejtek legősibb, evolúciósan rendkívül konzervatív, intracelluláris védelmi rendszerét a hősokk fehérjék (heat shock protein, **Hsp**) alkotják. Ezek a fehérjék, mint molekuláris chaperonok (dajkafehérjék) fejtik ki hatásukat. **Alapvető funkcióik**: 1) elősegítik a frissen szintetizálódott fehérjék feltekeredését (felgombolyítását), a fiziológiás (natív) konformációjuk kialakulását; részt vesznek 2) a hibás konformációjú fehérjék szerkezetének helyreállításában; 3) az irreverzibilisen károsodott fehérjék lebontásának szabályozásában; 4) bizonyos fehérjéknek különböző, membránhatárolt sejtorganellumokba (sejtmag, mitokondrium) történő transzlokációjában és 5) a mitokondrium-mediált apoptotikus útvonalon a citoszolba kiáramlott apoptogén faktorok lekötésében, inaktiválásában (19.11. ábra). Ezeket a funkciókat a dajkafehérjék csak úgy tudják ellátni, hogy közvetlen molekuláris kontaktusba lépnek a kezelendő fehérjékkel, a „kliensekkel”.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



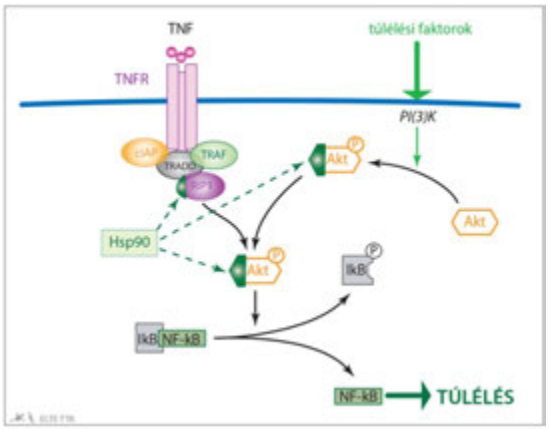
19.11. ábra A dajkafehérjék legfontosabb funkcióinak összefoglalása (egyszerűsített vázlat). Hsp-k részt vesznek a szintetizálódó fehérjék helyes konformációjának kialakításában, a hibás konformáció helyreállításában, vagy a rossz térszerkezetű fehérjék eltávolításában, illetve fehérjék sejtorganellumokba irányuló transzportjának lebonyolításában és szabályozásában, valamint apoptózist indukáló stresszhatásra a citoszolba jutó apoptogén faktorok lekötésében (inaktiválásában).

A dajkafehérjék feladatairól, működéséről, a sejt életében betöltött szerepéről hatalmas irodalom áll rendelkezésre. A könyv tematikájához kapcsolódva itt csak néhány példát hozunk fel annak bemutatására, hogy a dajkafehérjék nagy családján belül a három legfontosabb és legtöbbet tanulmányozott alcsalád (Hsp90, Hsp70, kis molekulatömegű chaperonok) tagjai milyen szerepet töltenek be az apoptózis különböző folyamatainak szabályozásában. Az alcsaládok itt említett elnevezése a dajkafehérjék legáltalánosabban elfogadott csoportosítását tükrözi, ami a családtagokat a molekulatömegük alapján sorolja alcsoportokba.

A dajkafehérjéknek az apoptózis szabályozásában betöltött funkciói

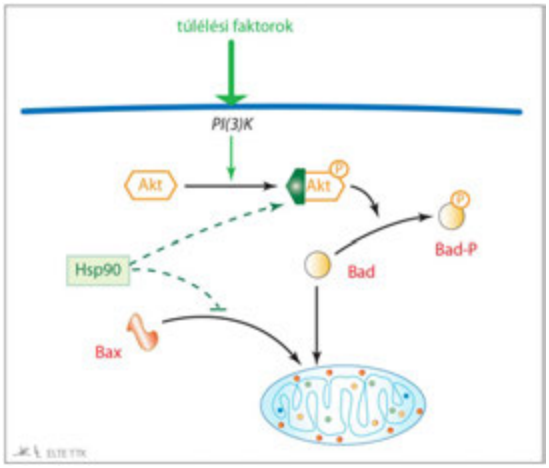
A Hsp90

A **Hsp90** kétféle útvonalon szabályozza az apoptotikus sejthalált. Az egyikben a RIP és a túlélési faktorok (pl. IGF) jelenlétében aktiválódó Akt (másnéven: protein kináz B) protein kinázokkal lép köcsönhatásba (stabilizálja azokat). Az inhibítor IκB foszforilációjával elősegíti az NF-κB disszociációját az inhibítorról és ezzel az NF-κB túlélési útvonalat támogatja (19.12. ábra). Emellett a Hsp90 által stabilizált Akt, mint Ser/Thr-kináz képes a „BH3-only" Bad fehérje foszforilációja révén annak pro-apoptotikus hatását kivédeni/csökkenteni. A másik útvonalban a Bax transzlokáció gátlása révén akadályozza a mitokondriumok külső membránjában a transz-membrán pórusok (MAC) kialakulását és így apoptogén faktorok kiáramlását a mitokondriumokból (19.13. ábra).



19. 12. ábra A Hsp90 NF-κB aktiválást támogató hatása. A Hsp90 stabilizálja a RIP fehérjét a TNF receptor DISC-jében, ami feltétele az NF-κB aktiválását eredményező jelátviteli útvonal beindításának. A hősokk fehérje hozzákötődik a túlélési faktorok hatására foszforilálódó Akt kinázhoz, védi annak foszforilált formáját. A foszforilált Akt foszfát csoportot kapcsol az IκB fehérjére, ami így elengedi az NF-κB-t.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

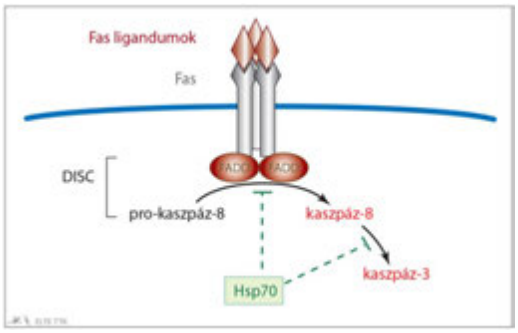


19.13. ábra A Hsp90 pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjékre irányuló citoprotektív hatása. A Hsp90 kétféle módon is gátolja a mitokondrium külső membránjában történő pórusképzést: egyrészt az Akt kináz stabilizálásával hozzájárul a Bad fehérje foszforilálásához, másrészt gátolja a Bax fehérje mitokondrium felszínére történő transzlokációját.

A Hsp70

A **Hsp70** család tagjai rendkívül szerteágazó és sokoldalú feladatot látnak el az eukarióta sejtek működésének, ezzel együtt az apoptózis folyamatának szabályozásában. Sejthalált kiváltó hatásokra a Hsp70 család stressz-indukálható tagjainak fokozott expressziója figyelhető meg az érintett sejtekben. Az aktiválódott Hsp70 molekulák az apoptózis sejthalál receptorból kiinduló (külső) és a mitokondrium-mediált (belső) útvonalait több ponton is képesek gátolni (19.14. és 19.15. ábra).

Elsőként említjük, hogy a Hsp70 az iniciátor kaszpáz-8 aktív, tetramer formájának kialakulását gátolja, illetve az effektor kaszpáz-3 aktivitását is jelentős mértékben képes csökkenteni (19.14. ábra).

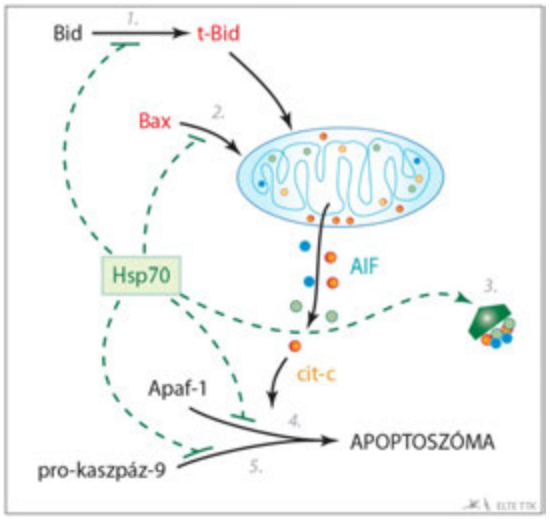


19.14. ábra A Hsp70 aktív kaszpázok megjelenését akadályozza a Fas jelátviteli útvonalban. A hősokk fehérje gátolja az aktív kaszpáz-8 tetramerizációját és az effektor kaszpáz-3 aktivitását is csökkenti.

Fontos szerepe továbbá, hogy a mitokondrium-mediált útvonalon egyrészt „lekötőként" (scavenger) akadályozza a Bcl-2 család pro-apoptotikus tagjainak stressz hatásokra történő aktiválását, másrészt közvetlenül gátolja az aktivált Bax citoplazmából mitokondrium külső membránjához történő áthelyeződését. Amennyiben mégis bekövetkezik a membránpórusok (MAC) kialakulása, a Hsp70 a citoplazmába kiáramló apoptogén faktorok (AIF, citokróm-c) megkötésével és az aktív apoptoszóma összeszerelődésének megakadályozásával (Apaf-1 kötése, pro-kaszpáz-9 apoptoszómába épülésének gátlása) gátolja az effektor kaszpázok megjelenését (19.15. ábra).

Kiemelendő, hogy a Hsp70 képes megakadályozni a különböző apoptotikus útvonalak összekapcsolásában kulcsszerepet játszó „BH3-only" Bid fehérjének a hasítását, így elejét veszi a csonkolt Bid (t-Bid) pro-apoptotikus hatásainak. Egyes kísérleti eredmények szerint a Hsp90-hez hasonlóan a Hsp70 is képes az NF-κB útvonal serkentésére (19.15. ábra). A Hsp72 védi a lizoszóma membrán integritását is, ezáltal gátolja a katepszinek citoszolba történő kiáramlását és megelőzi az általuk okozott sejtkárosító folyamatokat.

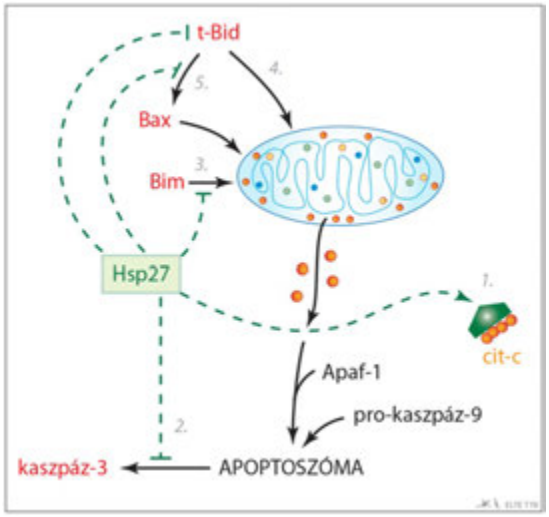
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.15. ábra A Hsp70 mitokondriális sejthalál útvonalat gátló hatásai. A hősokk fehérje több ponton is gátolja a belső útvonal aktiválását és felerősödését: gátolja a Bid hasítását (1), a Bax fehérje mitokondriumhoz történő szállítását (2), megköti a mitokondriumból kiszabaduló apoptogén faktorokat (3), megakadályozza az Apaf-1 oligomerizációját (4) és a pro-kaszpáz-9 apoptoszómába kötését (5).

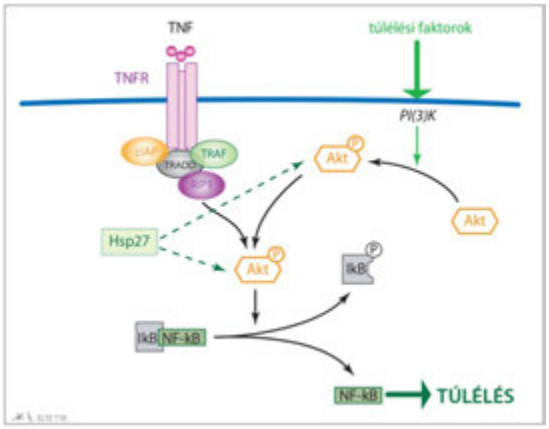
A Hsp27

A kis molekulatömegű chaperonokhoz tartozó **Hsp27** mindkét sejthalál útvonalon hat. A külső útvonal beindítását a pro-kaszpáz-8 aktiválásának megakadályozásával éri el. A belső útvonal iniciálását a mitokondriumból kiáramló citokróm-c megkötésével és a pro-kaszpáz-3 aktiválásának gátlásával akadályozza. Őrködik a mikrotubuláris hálózat felett, így megelőzi azt, hogy annak szétszerelődésével a pro-apoptotikus „BH3-only" Bim fehérjék felszabaduljanak (17.7. ábra) és a mitokondrium felszínéhez kötődjenek. Ugyanígy megakadályozza, hogy a külső és a belső sejthalál útvonal összekapcsolásában szerepet játszó t-Bid a mitokondrium külső membránjához, illetve a Bax pórusképző fehérjéhez kapcsolódjon (19.16. ábra). Apoptózist gátló hatásai mellett a Hsp27 a Hsp90-hez hasonlóan a sejt túlélését is segíti azzal, hogy stabilizálja az Akt kinázt, így segíti az IκB lebontását, amivel lehetővé teszi az NFκB sejtmagba jutását (19.17. ábra).



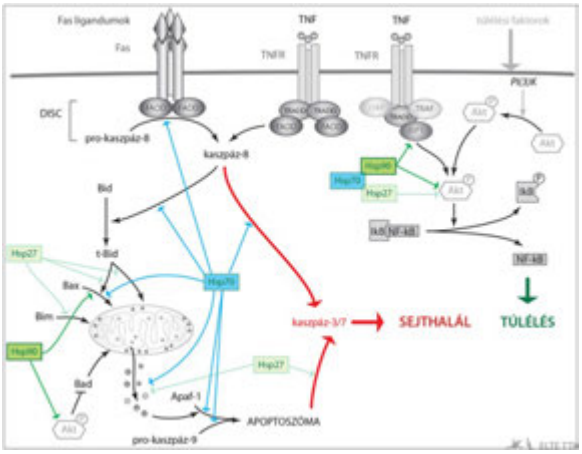
19.16. ábra A Hsp27-nek a belső sejthalál útvonalat blokkoló anti-apoptotikus hatásai. A kis molekulatömegű hősokk fehérje a mitokondriumból kijutott citokróm-c-t megköti (1), illetve akadályozza a kaszpáz-3 aktiválását (2). Gátolja a pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék (Bim, Bax, Bid) mitokondrium felszínéhez kötődését (3–5), így transz-membrán pórusok kialakulását.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.17. ábra A Hsp27 NF-κB útvonalat támogató hatása. A hősokk fehérje stabilizálja az Akt kinázt, ami foszforilálja az IkB-t, így szabaddá teszi az NF-κB-t.

A hősokk fehérjék fent felsorolt funkcióit a 19.18. ábra összegzi.



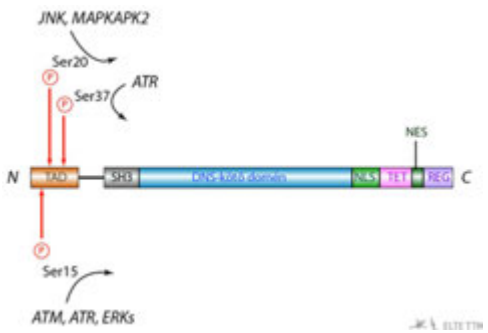
19.18. ábra A hősokk fehérjéknek az apoptózis jelátviteli folyamatait szabályozó legfontosabb beavatkozási pontjai. A Hsp-k az ábra bal oldalán szereplő folyamatokat az Akt kináz Bad fehérjérere gyakorolt hatásának kivételével gátolják, a jobb oldalon láthatókat segítik. (A halál receptorok DISC-jéből származtatott II. komplexeket, valamint a receptor internalizáció hatását nem tüntettük fel. A magyarázatot l. a szövegben.)

A p53 szerepe az apoptózis szabályozásában

A sejt genetikai állományát alkotó DNS molekulák a transzkripciós és a transzlációs útvonal révén központi szerepet töltenek be a sejt élettani folyamatainak irányításában, valamint az információk utódsejtekbe történő átadásában. A DNS károsodás tehát súlyos zavart okozhat a sejt egyedi működésében, ami végső esetben a sejt pusztulásához vezet. Ugyanakkor a sejt szabályozatlan és korlátlan osztódásához vezető úgynevezett malignus (rosszindulatú) transzformáció az egész szervezetet veszélyezteti.

Ezért nélkülözhetetlen a sejt DNS állományának szigorú védelme, szükség esetén károsodásainak helyreállítása (reparációja), végszükségben (a DNS visszafordíthatatlan károsodásakor) pedig a sejt „öngyilkossága”, azaz a halálba menekülés, az apoptózis. Érdekes módon a DNS károsodás olyan jelátviteli módokat aktivál, amelyeknek fő komponensei **kinázok**. A biztonsági őr szerepét betöltő **p53 fehérje** az a transzkripciós faktor, amelynek aktivációja ezen kinázok által közvetített **foszforiláció** révén zajlik (19.19. ábra, 19.II. táblázat). Az aktivált p53 számtalan, az **apoptózisban kulcsszerepet játszó fehérje génjének átíródásá**t szabályozza. Azon aminosavak (Ser), amelyeknek foszforilációja az aktív önmegsemmisítés stimulálását eredményezi, jellemzően a p53 molekula N-terminálisán helyezkednek el.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.19. ábra A p53 molekula szerkezete. Az apoptózisban szerepet játszó foszforilációs helyek jellemzően az N-terminálison elhelyezkedő szerinek (ATM: ataxia talengiectasia mutated, ATR: ataxia talengiectasia and Rad3 related protein, JNK: c-JUN N-terminális kináz, MAPKAPK2: mitogén aktivált protein kináz-aktivált protein kináz 2, TAD: transactivation domain, SH3: Src homology 3-like domain, NLS: magi lokalizációs szignál, NES: magi export szignál, TET: tetramerizációs domén, REG: C-terminális regulátor domén)

19.II. táblázat. A p53 apoptotikus kimenettel járó foszforilációi (az enzimnevek rövidítéseinek jelentését l. a fenti, 8.16. ábra aláírásában)

Foszforilációs hely	Kinázok	Aktiváló tényezők
Ser15	ATM	DNS sérülés
Ser15, Ser37	ATR	γ-sugárzás, UV
Ser15	ERKs	UV
Ser20	JNK	UV
Ser20	MAPKAPK2	UV
Ser15	p38 kináz	UV

A p53 elsősorban az **apoptózis mitokondrium-függő útvonalának serkentésé**n keresztül fejti ki hatását. Egyrészt a Bcl-2 molekula család anti-apoptotikus tagjainak (Bcl-2, Bcl-X_L) az expresszióját gátolja, ezáltal a mitokondriumokat kiszolgáltatottá teszi az apoptotikus hatásoknak. Másrészt az aktív (programozott) sejthalál kivitelezésében (Apaf1, Fas, Bax) vagy annak ösztönzésében (Bid, Noxa, Puma) résztvevő molekulák expresszióját stimulálja (19.22. ábra).

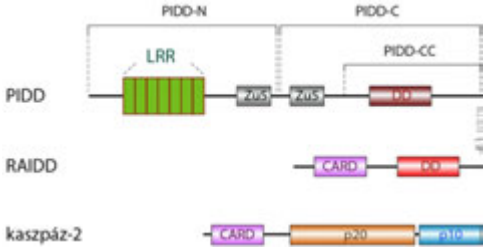
A PIDDoszóma

Az aktív p53 képes beindítani - egy, az apoptoszómához hasonló alapon szerveződő citoplazmatikus komplex, az úgynevezett **PIDDoszóma** összeszerelődésén keresztül - egy kaszpáz aktivációs sejthalál útvonalat is. Ennek a komplexnek a centrális molekulája a **PIDD** (p53-induced protein with death domain), amelynek expresszióját a p53 fokozza. A PIDD (a halál receptorokhoz hasonlóan, l. Fas) C-terminálisán (PIDD-CC) egy **DD** (death domén) szekvenciát hordoz, amely fehérje-fehérje kölcsönhatást alakíthat ki más, DD részletet tartalmazó molekulával (19.21. ábra).

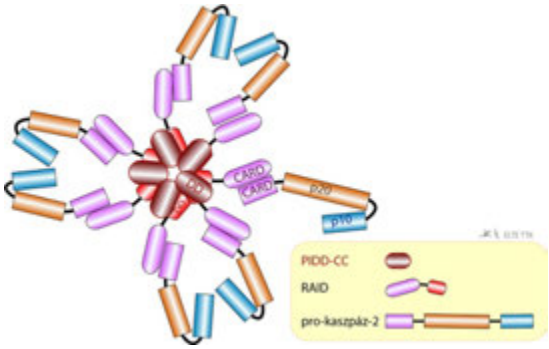
Az aktivált PIDD a citoplazmában lévő **RAIDD** (RIP-associated ICH-1/CAD-3 homologous protein with a death domain) **adapter fehérjé**t köti, mégpedig annak halál doménjén (DD) keresztül (19.20. ábra). Mivel a RAID N-terminálisa egy **CARD** domént hordoz, az adapter fehérje pro-kaszpáz molekulákat képes toborozni a komplexbe.

A PIDDoszómába beépülő zimogén kaszpáz a pro-kaszpáz-9-hez hasonló szerkezetű **pro-kaszpáz-2**, amely szintén iniciátor kaszpáz (19.21. ábra).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.20. ábra A PIDDoszóma kialakításában résztvevő fehérjék szerkezete. A PIDD proteolitikus hasítással egy N- és egy C-terminálist tartalmazó részre (PIDD-N és PIDD-C) bontható. A PIDD-CC az utóbbi további emésztésével kapható végdarabja, amely a halál domént tartalmazza (LRR: hét tandem leucin gazdag ismétlődés, Zu5: fehérje interakciós domén, CARD: caspase recruitment domain, p20: az aktív kaszpáz nagy alegysége, p10: az aktív kaszpáz kis alegysége, PIDD, RAIDD: l. szövegben)

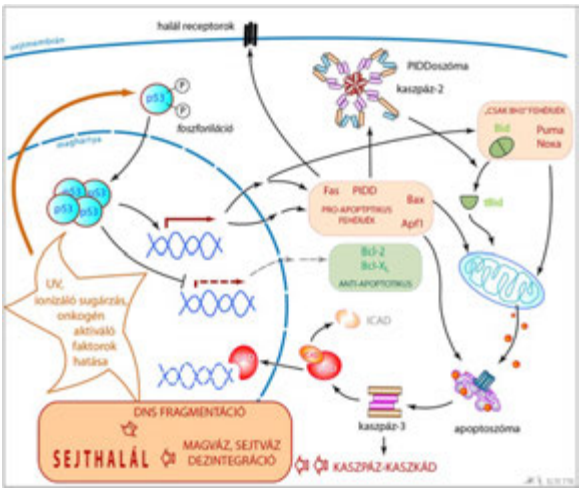


19.21. ábra A PIDDoszóma szerkezete: a komplex hét kaszpáz-2 molekulát tartalmaz (a rövidítések jelentését l. a szövegben)

Az aktív kaszpáz-2 közvetlenül részt vesz effektor pro-kaszpázok (prokaszpáz-3, -6, -7) proteolitikus aktiválásában és/vagy – a kaszpáz-8-hoz hasonlóan – **csonkolja a Bid-et**, és **„felerősíti" a mitokondriális (belső) sejthalál útvonalat** (19.22. ábra).

Öszefoglalva: a p53 aktivációja esetében nagyon igaz az a mondás, miszerint „minden út Rómába" – azaz a sejt aktív önpusztításához – „vezet" (19.22. ábra).

A leírtak alapján nem véletlen, hogy az immortalizált sejtek létrehozásának egy közkedvelt eszköze a p53 gén kiütése (p53 knockout).



19.22. ábra A p53 fehérje központi szerepe az apoptózisban (az ábra csak a legfontosabb útvonalakat mutatja; a részleteket l. a szövegben)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ahogyan azt a 15. fejezetben írtuk, az apoptózis során a haldokló sejtről lefűződő apoptotikus testeket és az egyre zsugorodó sejtet is membrán határolja, ami megakadályozza, hogy gyulladást kiváltó faktorok kerüljenek ki a citoplazmából az extracelluláris térbe. Annak biztosításáról azonban, hogy ez a teljes elhalás után se következzen be, s ne maradjanak „temetetlen holtak a csatamezőn”, makrofág sejtek és a környező szövet fagocitózisra képes sejtjei gondoskodnak. Ennek a folyamatnak a részleteiről a következő fejezetben lesz szó.

Ellenőrző kérdések

1. Mit jelent a IAP elnevezés? Jellemezze a IAP fehérjecsaládot! Milyen fehérje interakciós kölcsönhatásokra képesek?

2. Hogyan szabályozzák a IAP fehérjék az apoptózis? Az ubiquitiniláció ebben milyen szerepet tölt be?

3. Mutassa be egy vázlatrajzon azt, hogy hogyan játszik központi szerepet az XIAP az apotózis féken tartásában! Hogyan lehet az XIAP-ot megkerülni, illetve semlegesíteni?

4. Mutassa be röviden a hősokk fehérjéket és a sejtben betöltött funkcióikat!

5. Hogyan vesz részt a Hsp90 az apoptózis szabályozásában?

6. Hogyan vesz részt a Hsp70 az apoptózis szabályozásában?

7. Hogyan vesz részt a kis molekulasúlyú Hsp27 az apoptózis szabályozásában?

8. Egy vázlatrajzon mutassa be azt, hogy a Hsp90, a Hsp70 és a Hsp27 mely pontokon avatkozik be az apoptózis folyamataiba!

9. Mutassa be a p53 molekula szerkezetét, s apoptotikus kimenettel járó foszforilációit!

10. Mit értünk az alatt, hogy a p53 elsősorban az apoptózis mitokondrium-függő útvonalának serkentésén keresztül fejti ki hatását? Milyen molekulák expresszióját serkenti?

11. Mi az a PIDDoszóma, s melyik prokaszpázt aktiválja?

12. Egy vázlatrajz segítségével mutassa be a p53 apoptózisban betöltött központi szerepét!

Felhasznált és ajánlott irodalom

Arya, R., Mallik, M., Lakhotia, S. C. (2007) Heat shock genes – integrating cell survival and death. *J. Biosci*. **(32)** 595–610.

Beug, S. T., Cheung, H. H., LaCasse, E. C., Korneluk, R. G. (2012) Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends Immunol.* **33(11)**, 535-45. doi: 10.1016/j.it.2012.06.004.

Bouchier-Hayes, L., Green, D. R. (2012) Caspase-2: the orphan caspase. Cell Death and Differentiation **(19)**, 51–57; doi:10.1038/cdd.2011.157

Darding, M., Meier, P. (2012) IAPs: Guardians of RIPK1. *Cell Death and Differentiation***(19)**, 58–66; doi:10.1038/cdd.2011.163

Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A., Cartier, J. (2008) IAPs. *Cell Cycle***7(8)**, 1036-1046.

Kaufmann, T. Strasser, A. Jost, P.J. (2012) Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation***(19)**, 42–50; doi:10.1038/cdd.2011.121

Labbe, K., McIntire, C. R., Doiron, K., Leblanc, P. M., Saleh, M. (2011) Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity***35(6)**, 897-907. doi: 10.1016/j.immuni.2011.10.016.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Sreedhar, A. S., Csermely, P. (2004) Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* (**101**), 227–257.

Srinivasula, S. M., Ashwell, J. D. (2008) IAPs: What's in a name? *Mol Cell*. **30(2)**, 123–135. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.008.

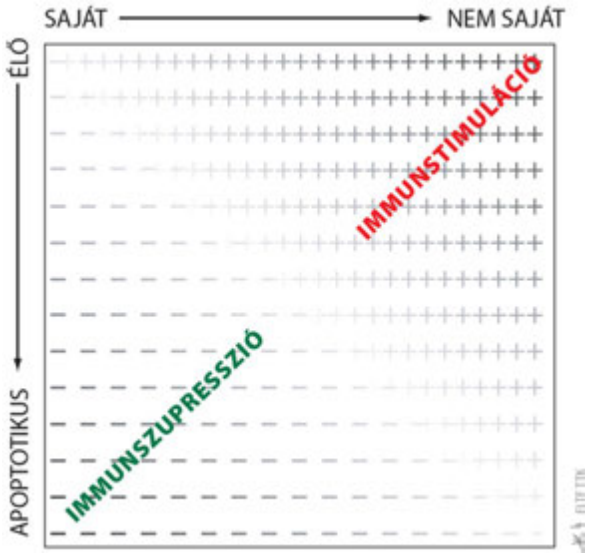
Stetler, R. A., Gan, Y., Zhang, W.,, Liou, A. K., Gao, Y., Cao, G., Chen, J. (2010) Heat Shock Proteins: Cellular and molecular mechanisms in the CNS. *Prog Neurobiol*. **92(2)**, 184–211. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.05.002.

20. Az apoptózis és az immunrendszer működése

Az immunrendszerben (központi és a centrális nyirokszervekben és szövetekben) naponta 10^9 nagyságrendű sejt pusztul el programozott módon a nyiroksejtek érése, válogatása és életciklusa során (a limfociták pozitív és negatív szelekciója, az immunrendszer sejt-homeosztázisának fenttartása). Ezeknek a folyamatoknak a részletes taglalása messze meghaladná ennek a tankönyvnek a kereteit és alapvetően az immunológia tantárgy kereteibe tartozik. Ebben a fejezetben csak arra szorítkozunk, hogy (az eddigieken túlmenően) néhány példán keresztül felhívjuk a figyelmet arra, milyen szoros a kapcsolat a programozott sejthalál különböző típusainak (intracelluláris „önpusztító" védelmi rendszer) és az immunrendszernek (szervezet szintű védelmi rendszer) a működése között.

A soksejtű szervezetek szöveteinek természetes életciklusa során, illetve nem kívánatos, káros hatásokra (pl. baktérium és vírusfertőzés) nagyon nagyszámú elhaló sejt veszélyeztetheti a környező, ép sejteket. Alapvető érdek tehát, hogy az apoptózissal elpusztuló sejtek által kiváltott hatások annak környezetére lokalizálódjanak, s maradványainak felszámolása minél gyorsabban, lehetőleg gyulladási folyamatok beindulása nélkül történjen. Az apoptotikus sejtek felszínének molekuláris mintázata megváltozik, így a sejtmaradványok az immunsejtek számára felismerhetők lesznek, s mivel az immunrendszer fagocitáló sejtekkel is rendelkezik, a „temetés" feladatát is elvégzi.

Az immunrendszer megfelelő válaszreakcióinak kiváltására való képesség minden sejt apoptózis során kialakuló sajátja (gain of function), ami független a sejttípustól. Hasonlóan minden sejttípus tulajdonsága az, hogy felismeri és bekebelezi az apoptotikus szomszédokat, ez tehát nem csak a professzionális fagocita (makrofág, dendritikus sejt, neutrofil granulocita) sejtek képessége, hanem egy öröklött adottság. A pusztuló és a bekebelező sejt közötti kölcsönhatások nagyon ősiek lehetnek, evolúciós konzervativizmust mutatnak és nem fajspecifikusak. Az immunrendszer működésének – a közismert „saját–nem saját" felismerés mellett – létezik egy másik dimenziója is, ez pedig az **„élő–apoptotikus sejt" elkülönítés**ének és felismerésének képessége (20.1. ábra).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

20.1. ábra Az immunrendszer működésének két dimenziója. A „saját” sejtek, akár élők, akár apoptózissal pusztulók, toleranciát váltanak ki (immunszupresszió), míg a „nem saját” betolakodók immunválaszt indukálnak (immunstimuláció).

Az öröklött és a szerzett immunitás

A szervezetbe bejutó antigének, patogének, vagy a megváltozott saját struktúrák immunválaszt indukálnak, az immunrendszer felismeri és semlegesíti őket, míg a saját struktúrák toleranciát váltanak ki. E működésekben az **öröklött vagyveleszületett** és a **szerzett vagy adaptívimmunrendszer** egymást támogató, kiegészítő funkciókkal rendelkezik. Az öröklöttimmunrendszer (másnéven természetes) azonnal, de nem specifikusan reagál az antigénekre, memóriája nem alakul ki. Ezzel szemben az adaptív immunitás kialakulása csak néhány nap elteltével következik be, s hogy az antigénnel való legközelebbi találkozáskor a reakció minél gyorsabb lehessen, „emléknyom”, memória hozható létre benne. Az immunrendszer két része nem egymástól függetlenül dolgozik, hiszen számos funkció összekapcsolja őket. Ilyen az antigén felvétel és annak prezentációja, valamint a válaszreakciók kiváltása. Az adaptív és természetes immunrendszer tehát egymást kiegészítve tartják fenn a szervezet immunhomeosztázisát (20.2. ábra).

20.2. ábra Az immunremdszer egymást támogató és kiegészítő részei az öröklött és a szerzett immunitás.

Az öröklött immunrendszer sejtjei a makrofágok, a dendritikus sejtek, a granulociták, a természetes ölősejtek; nem sejtes elemei pedig receptorok, oldott fehérjék (komplement rendszer), enzimek és peptidek. Elemei filogenetikai örökségünknek tekinthetők, a törzsfejlődés során kipróbált rendszerek és módszerek, amelyek összessége a szervezet integritását hivatott biztosítani külső betolakodók, fizikai behatások és kóros belső elváltozások ellen. Bár e rendszer – szemben a kifinomultabb szerzett vagy adaptív immunitás klonális receptoraival – nem képes molekuláris szinten alkalmazkodni az aktiváló ingerhez, mégis úgy tűnik, hogy döntő szerepet játszhat a kialakuló immunválasz minőségének meghatározásában.

Az adaptív immunrendszer elemei a T- és B-limfociták. Az antigén specifikus immunválaszt a T-sejtek indítják be, míg a B-sejteket az úgynevezett intakt antigén (bakteriális és nem bakteriális patogének felszínén levő antigéndeterminánsok) vagy a Thelper sejtek aktiválják.

A T limfociták, mint ölő sejtek

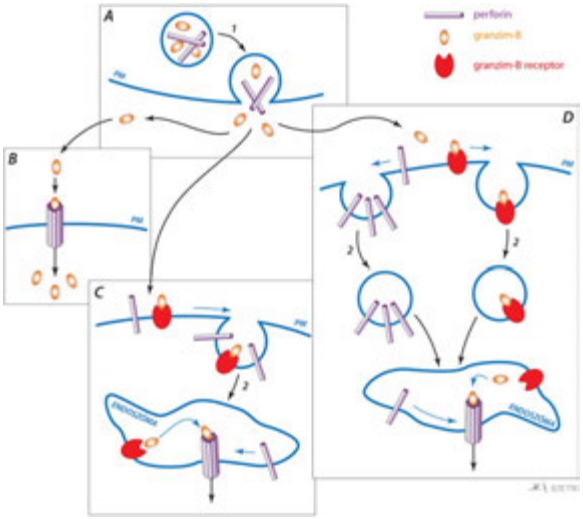
A T limfociták egyes csoportjai, a citotoxikus T limfociták (CTL) és a természetes ölő (NK) sejtek képesek apoptózist indukálni a szervezet saját, de patogénnel fertőzött, elpusztítandó sejtjében. Erre kétféle mechanizmus szolgál. Az egyik a **Fas**halál receptoron keresztüli jelátvitel (erről részletesen szóltunk az 16. fejezetben), a másik az úgynevezett **granzim-B útvonal** (20.4. ábra).

A **granzim enzimek** kaszpáz jellegű aktivitással rendelkező szerin proteinázok. A T-sejt ezt az enzimet a célsejt membránjához való kötődése után juttatja be annak citoplazmájába. A bejuttatás mechanizmusa még ma sem tisztázott. A fenti limfociták kicsi, membránnal határolt granulumokat, úgynevezett **szekréciós lizoszómák**at szállítanak a sejtfelszínre és beltartalmukat az extracelluláris térbe ürítik. A vezikulák granzim-B (GrB) enzimeket és perforin (pore forming protein) molekulákat tartalmaznak. Önállóan egyik fehérje sem elegendő az apoptózis beindításához.

A **perforin** – eddig még nem teljesen tisztázott módon – alapvetően a GrB-nek a célsejt citoplazmájába juttatását segíti elő. Ez a folyamat Ca^{2+}-ion függő, és háromféle módon történhet. Az első lehetőség az, hogy miután a granulumok exocitózissal az extracelluláris térbe kerültek (20.3.A ábra), a perforin integrálódik a célsejt membránjába, ott pórust képez és átereszti a granzim molekulákat az elpusztítandó sejt citoplazmájába (20.3.B ábra). Egy lehetséges alternatíva szerint a GrB-t egy receptor köti meg a célsejt membránján, majd a receptor-ligandum komplex a perforinnal együtt internalizálódik. Bejutva a korai endoszómába, a perforin képessé válik a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

pórusképzésre, a receptor pedig elengedi a ligandumát, így a szabaddá váló GrB kijuthat a citoszolba (20.3.C ábra). Felmerül az a lehetőség is, hogy a perforin és a GrB külön-külön internalizálódnak, s csak az endoszómában kerülnek egy térbe (20.3.D ábra). Bármelyik útvonal is igazolódik, a végeredmény az, hogy a kaszpáz-szerű aktivitással rendelkező GrB bekerül a célsejt citoplazmájába. Azt pedig, hogy az exocitózissal az extracelluláris térbe került perforin és GrB az elpusztítandó sejt felszínére nagy koncentrációban érkezzen, az biztosítja, hogy a T sejt felsimeri és szorosan köti a célsejtet (20.4. ábra).

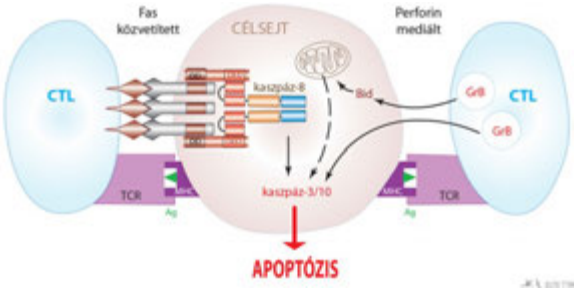


20.3. ábra A perforin lehetséges szerepe a granzim-B célsejtbe jutattatásában. A perforin és a GrB exocitózis során (1) együtt kerülnek ki a citotoxikus T-sejtből a sejtközötti térbe (A). A perforin beépül a célsejt membránjába és ott pórust képez, átvezeti a GrB-t a célsejt citoplazmájába (B). Lehetséges, hogy a GrB receptorhoz kötődve internalizálódik (2), s az endoszómális rendszerbe jutva válik szabaddá. Azt, hogy az internalizációja a perforinnal együtt (C) vagy attól elkülönülten (D) történik, még nem tudjuk.

A programozott sejthalál granzim-B útvonala

A granzim-B hatására beinduló molekuláris és morfológiai változások sok tekintetben nagyon hasonlatosak az apoptózis esetében megfigyeltekhez. Itt is jellemző a plazmamembrán hólyagosodása (blebbing), a kromatin kondenzáció, a DNS fragmentáció, a mitokondrium membrán-potenciál változása, illetve a citokróm-c kiáramlása.

A GrB legalapvetőbb molekuláris hatása mégis az, hogy pro-kaszpázokat képes hasítani és így aktiválni. *In vivo* kimutatták, hogy ezek között szerepelnek iniciátor (pro-kaszpáz-8/10) és effektor (pro-kaszpáz-3/7) enzimek is. Így a GrB a célsejt elpusztítását alapvetően a kaszpáz-függő útvonalak aktiválásán keresztül éri el, s a végrehajtó kaszpázok közreműködésével a sejtváz és a magszerkezet szétesését, valamint a kromatin állomány fragmentációját okozza (20.4. és 20.5. ábra).

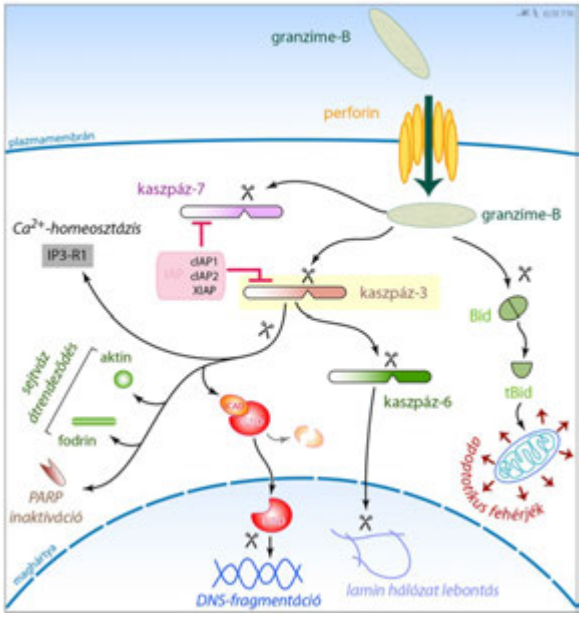


20.4. ábra A citotoxikus T sejtek (CTL) apoptózist kiváltó mechanizmusai. A bal oldalon a halál receptor (Fas), a jobb oldalon a perforin közvetített indukció vázlata látható. Az ölő sejt a célsejtet az annak felszínén hordozott antigén (Ag)-MHC komplex alapján ismeri fel, majd aktiválja annak Fas DISC-jét, ami iniciátor és effektor kaszpázokon keresztül apoptózishoz vezet (bal oldal). A T sejt granzim-B (GrB) tartalmú vezikulákat hordoz, amelyek tartalmát a célsejtbe juttatja. A GrB közvetlenül képes effektor kaszpázokat aktiválni, illetve hasítja a Bid pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjét, ami a mitokondriális útvonal aktivációjához vezet (jobb oldal).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Meg kell jegyezzük azonban, hogy a GrB-perforin aktiválta sejthalál során a célsejt membránja perforálódik és előbb-utóbb fellép a sejt lízise.

Egyes kísérleti adatok szerint a granzim-B citoplazmatikus szubsztrátumai közé tartozhat a Bcl-2 fehérjecsalád egyik pro-apoptotikus tagja, a Bid is (20.4. és 20.5. ábra). A csonkolt Bid (tBid) a **mitokondriális sejthalál útvonal aktiválásá**ban vesz részt. Ahogy azt korábban láttuk, ez megadja a kegyelemdöfést a célsejtnek, mivel a mitokondriumokból számos pro-apototikus fehérje kerül ki a citoplazmába, s ez rendkívüli módon felerősíti és visszafordíthatatlanná teszi a sejtpusztuláshoz vezető folyamatokat (erről l. „A külső és a belső halálszignál útvonal összekapcsolása” c. fejezetet).



20.5. ábra A sejtbe került granzim-B enzim iniciátor kaszpázként működik, aktiválja az effektor pro-kaszpáz-7 és pro-kaszpáz-3 enzimeket. A kaszpáz-3 olyan folyamatokat indít be, amelyek a sejtváz és a magszerkezet szétesésához és a kromatin állomány fragmentációjához vezetnek. Feltehetően szerepe van a Bid hasításában, így a mitokondriális sejthalál útvonal aktiválásában is. Az utóbbi eredményeként a mitokondriumból apoptotikus fehérjék szabadulnak ki a citoplazmába (az ábra közepén rózsaszín négyzetben látható IAP fehérje család tagjairól l. a 19. fejezetet)

Az apoptotikus sejtmaradványok eltakarítása

A szervezetben jutott kórokozók felismerésének kulcsa a rajtuk lévő molekuláris mintázatok felismerése. Az azonosítást olyan receptorok végzik, amelyek felismerik ezeket a mintázatokat és jelzik azok jelenlétét a szervezet számára. A mintázatokat **patogénekhez kapcsolt molekuláris mintázatok**nak (pathogen associated molecular patterns, PAMP) nevezzük, a receptorokat pedig **mintázatfelismerő receptorok**nak (pattern recognition receptors, **PRR**). A PRR-családba tartoznak az igen változatos felismerési képességekkel rendelkező **Toll-szerű receptorok** (Toll-like receptor, TLR), amelyek ligandumai lehetnek fehérjék, lipoproteinek, glikolipidek, lipopoliszacharidok, oligoszacharidok és ribonukleinsavak.

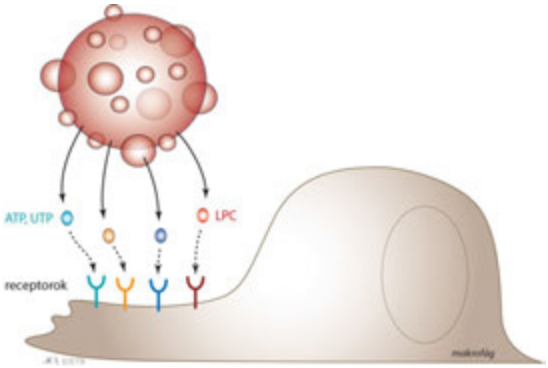
Az apoptózissal elpusztult sejtek maradványait professzionális makrofágok vagy a környező sejtek kebelezik be. Igen korai megfigyelés volt, hogy ez nem jár gyulladási folyamatok beindításával. A jelenség gyökere ott keresendő, hogy a makrofágok felismerik a fiziológiás sejthalállal pusztuló sejteket.

A „találj meg” szignál

Az apoptotikus sejthalál esetében a „sejthullák” eltakarítása csakúgy, mint a sejtelhalás egésze, szabályozott folyamat. Előkészítését maga a pusztuló sejt kezdeményezi.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az apoptotikus sejt kemotaktikus **„találj meg”** („find me”) szignálokat bocsát ki, amelyek fagocitotikus aktivitással rendelkező sejteket (pl. szöveti makrofágok, monociták) vonzanak a közelébe (20.6. ábra). Számos szignál molekulát azonosítottak már, s úgy tűnik, hogy önmagában egyik sem elégséges a fagocita sejtek helyszínre csalogatásáért. Az első leírt faktor a **lizofoszfatidil kolin** (LPC) volt. Ennek megjelenése a foszfolipáz A2 kaszpáz-3 függő aktiválásának következménye – ez utóbbi felelős a foszfatidil kolin LPC-vé alakításáért. Újabban fedezték fel, hogy az apoptotikus sejtekből kis mennyiségű **nukleotid** (ATP és UTP) szabadul fel szabályozott módon a sejthalál korai fázisában. Ez szintén kaszpáz tevékenység következménye (pannexin csatornák nyílnak a plazmammebránban). Mivel az extracelluláris nukleotidokat szöveti nukleotidázok nagyon gyorsan lebontják, ez a jel nagyon rövid életű, s így csak a környezetben tartózkodó szöveti makrofágokra képes hatást gyakorolni. Az, hogy ezek a jelzések additív vagy szinergista módon hatnak-e a fagociáló sejtek csalogatásában, ma még nem tisztázott.



20.6. ábra A „találj meg” szignalizáció. Ahalódó sejtből olyan szignálok szabadulnak fel (pl. LPC és nukleotidok), amelyek a makrofágokat odavonzzák.

A találj meg szignalizációnak van még egy hatása: képessé teszi a fagocitáló sejteket az úgynevezett „egyél meg” szignálok fogadására, s növelheti azok fagocitotikus aktivitását („étvágyát”).

Megjegyezzük, hogy a „találj meg” jelzések kis mértékben ugyan, de a gyulladásos folyamatok beindításában központi szerepet játszó neutrofil granulocitákat is mozgósíthatják. A gyulladás elkerülése alapvető cél, így feltételezhető, hogy a makrofágoknak szóló „koktélban” vannak olyan faktorok is, amik a granulociták reakcióit gátolják („stay away” szignál).

Az „egyél meg” szignál

Az apoptózis egyik korai velejárója, hogy a sejtmembrán külső felszínének molekuláris mintázata (összetétele, töltésmintázata) megváltozik. Ez nem a korábban említett patogénekhez kapcsolt mintázatok kialakulását eredményezi, felismerése nem a TLR receptorok feladata, s nem aktiválja az öröklött immunrendszer kórokozókkal szembeni fegyvertárát. Ennek az **apoptotikus membrán-mintázat**nak a kialakításában szerepe van egyes fehérjék glikozilációs mintázatváltozásának, eredetileg a membrán belső rétegében elhelyezkedő membrán komponensek külső rétegben, azaz a sejtfelszínen való megjelenésének.

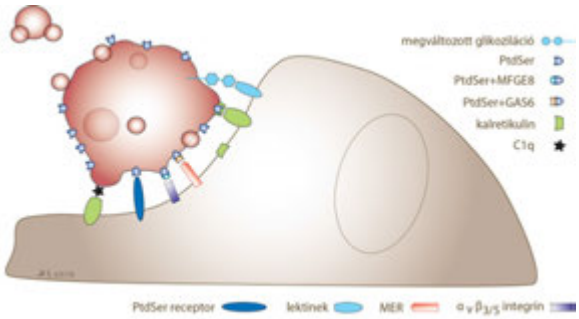
Az „egyél meg” („eat me”) szignál legalaposabban tanulmányozott komponense a foszfatidil-szerin[5] (PtdSer). Kaszpáz aktivitás következtében sejtfelszíni mennyisége órák alatt jelentősen (280 szorosára) megemelkedik. A PtdSer mellett kalretikulin is kimutatható. A PtdrSer szükséges, de lehet, hogy önmagában nem elégséges, így mellette más jelzések is működhetnek a fagocita sejt aktivitásának fokozásához. Más membránlipidek a kaszpáz aktivitás nyomán bekövetkező oxidáció hatására módosulnak, így a komplementrendszer (C1q) kötőhelyévé válnak.

Az apoptotikus sejt plazmamembránjának egyes elemeihez szolubilis, úgynevezett **pozícionáló faktorok** (tethering factors) kötődnek, amik híd funkciót töltenek be. Egyik molekula részükkel a sejtfelszíni komponenshez, másik doménjükkel pedig a fagocitózisra készülő sejt valamelyik receptorához kapcsolódnak (20.7. ábra). Ilyenek a professzionális makrofágok által szekretált PtdSer-t felismerő MFG-E8 (milk fat globule epidermal growth factor 8) és a GAS-6 (growth-arrest-specific 6).

[5] Az öreg vörösvértestek felszínén is megjelenik, s jelként szolgál a keringésből való kivonásukra.

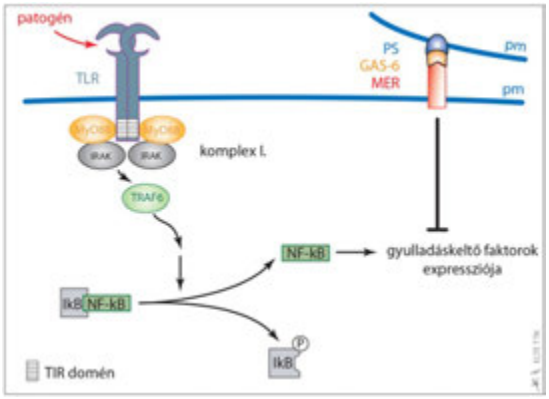
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A fagocitáló sejt felszínén számtalan olyan receptort azonosítottak, amiknek szerepe van a felismerésben és kötésben. A pozícionáló faktorokat az úgynevezett **pozícionáló receptorok** kötik, mint amilyen a $\alpha_v\beta_{3/5}$-integrin és a MER (20.7. ábra). (Az eredetileg PtdSer receptorként azonosított fehérjéről időközben kiderült, hogy sejtmagi protein, s nincs közvetlen szerepe a fenti folyamatokban.) Az apoptotikus sejtekkel szemben az élő sejtek úgynevezett „ne egyél meg” szignálokat hordoznak a felszínükön.



20.7. ábra Az „egyél meg” szignalizáció. Az apoptotikus sejt felszínén megjelennek az „egyél meg” szignál komponensei, aminek része a foszfatidil-szerin (PtdSer), valamint a plazmamembrán fehérjéinek megváltozott oligoszacharid oldalláncai. A PtdSer-t több szolubilis pozícionáló faktor (MFGE8, GAS6) is felismeri, utóbbiakat pedig a makrofág felszínének megfelelő receptorai ($\alpha_v\beta$3-integrin, MER) kötik meg.

Az „egyél meg” szignálok megkötését végző receptorok olyan szignalizációs útvonalakat aktiválnak, amelyek hatása rögtön megjelenik. A korai válaszok közé tartozik annak az NFκB útvonalnak a gátlása, ami gyulladáskeltő citokinek és kemokinek átírását serkenti (20.8. ábra). Ezzel párhuzamosan e faktorok (pl. interleukin /IL/-6, IL-8, tumor necrosis factor-α /TNFα□, macrophage inflammatory protein-1a) kibocsátása is gátlás alá kerül.



20.8. ábra Az apoptózissal pusztuló sejt felismerésének korai lépése a gyulladáskeltő faktorok átírásának gátlása. A TLR-ek közös szerkezeti eleme az intracelluláris TIR-domén. Ehhez kapcsolódik a myeloid differenciálódási 88 faktor (Myd88) nevű adapter fehérje, amelynek egy haláldoménje (DD) is van. Ligandum kötés hatására a Myd88 a haláldoménje révén kapcsolódik egy szintén haláldomént hordozó szerin/treonin-kinázzal, az IL-1R-asszociált kinázzal (IRAK). Az IRAK1 és IRAK4 foszforiláció hatására aktiválódik, és a TRAF6-hoz (TNF-receptor-asszociált 6. faktor) kapcsolódik. További lépések során az NFκB bejut a sejtmagba ésgyulladáskeltő faktorok átírását serkenti. Az apoptotikus sejtfelszín felismerése (PS–GAS-6–MER) után az NF-κB tevékenysége gátlódik (p,: plazmamembrán).

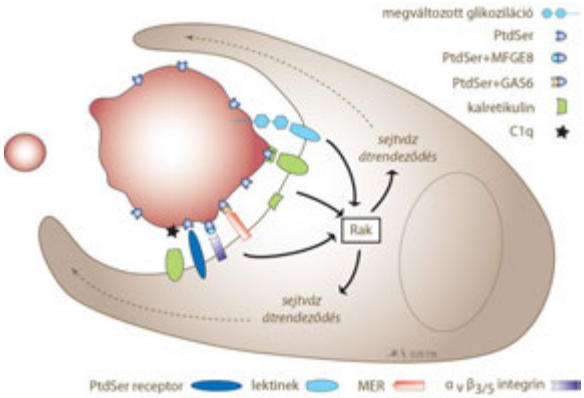
A fagocitáló makrofágban kiváltott válaszreakció **későbbi lépés**e gyulladás ellenes (anti-inflammatory) faktorok (ilyen az IL-10, transforming growth factor-β, prostaglandin E2, platelet activating factor) expressziójának beindítását és kibocsátását biztosítja. A szekréció autokrin és egyben parakrin, célja a gyulladás csökkentő hatásnak a környezetben való szétterjesztése.

Az „egyél meg” viselkedés és az ezzel együtt járó gyulladásos folyamatok visszaszorításának kiváltására való képesség hiánya (hiba a jelfelismerésben vagy a jelátviteli útvonalban) „temetetlen holtak” megjelenéséhez és autoimmun betegségek kialakulásához vezet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

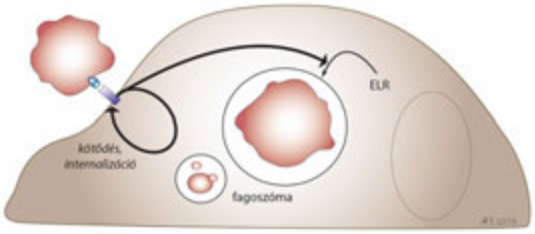
A sejtmaradványok bekebelezése

A megfelelő receptor-ligandum kötések kialakulása a fagocitáló sejt sejtváz rendszerének átrendeződésével megteremti a lehetőségét a sejtmaradvány és az apoptotikus testek teljes bekebelezésére. A makrofágban több jelátviteli útvonal is aktiválódik, amelyik az **aktin váz átrendezését** végző Rac1 aktivitását eredményezi. Ennek hatására a sejt képessé válik arra, hogy körülölelje, majd bekebelezze az apoptotikus testeket és az elpusztult sejt maradványát (20.9. ábra)



20.9. ábra A sejtmaradványok bekebelezése. A már zsugorodott sejttel való kapcsolat a makrofágban olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, amelyek célpontja az aktin váz átrendezését lehetővé tevő Rac1. Ennek hatására a sejt képessé válik arra, hogy körülölelje, majd bekebelezze az apoptotikus sejtet (A). Az egész folyamat során a makrofág gyulladásgátló jelzéseket (IL10, TGFβ□□transforming growth factor-β, PGE2: prostaglandin E2) is küld a környezetébe (B).

Az apoptotikus sejtmaradványok „eltakarítása” nem ér véget azok bekebelezésével. Az internalizáció „növeli az étvágyat”, s további apoptotikus törmelék felvételére készteti a makrofágot, így az egyidőben több fagoszómát „kezel”. A bekebelezett apoptotikus testek lebontásához aktiválni kell az endoszóma-lizoszóma rendszert, s időt kell arra biztosítani, hogy a bekebelezett anyag lebontódhasson (20.10. ábra).



20.10. ábra A makrofág fagocitotikus aktivitásának fokozása. Az apoptotikus maradványok bekebelezése serkenti a fagoszómának az endoszóma-lizoszóma rendszer (ELR) komponenseivel való fúzióját és újabb apoptotikus testek felvételét.

A környező sejtek és az egész szervezet számára rendkívül fontos, hogy sem az apoptotikus sejthalál, sem pedig az ennek végeredményeként megjelenő sejtmaradványok eltakarítása **nem vált ki gyulladásos immunreakciót**, hiszen a pusztuló sejt citoplazmatikus komponensei mindvégig ép membránnal körülvett térben vannak, s ahogy láttuk, a „temetést végző” fagocitáló sejt gyulladásgátló szignálokat is kibocsát a környezetébe. A bekebelezést végző makrofágok aktivitásának fokozására azért van szükség, mert az el nem távolított apoptotikus testek mebránja egy idő után felhasad (**másodlagos nekrózis**): a lízis olyan molekulák felszabadulását eredményezi, amelyek szöveti roncsolódáskor szoktak megjelenni (damage-associated molecular-pattern molecules, DAMP; pl. hősokk fehérjék, nukleinsavak), és aktiválják a TLR jelátvitali útvonalakat s ezeken keresztül gyulladást indukálnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A piroptózis

A piroptózis kifejezést eredetileg a makrofág sejtek baktérium-infekció által indukált sejthalál formájának leírására használták. Az elnevezése arra utal, hogy egy olyan aktív sejthalál formáról van szó, amelynek a kivitelezéséhez **pro-kaszpáz aktivációra** (kaszpáz-1) van szükség, ugyanakkor a sejtek gyulladást indukáló interleukineket is kibocsátanak. A piroptózis tehát molekuláris szempontból programozottnak tekinthető ugyanúgy, mint az apoptózis vagy a nekroptózis.

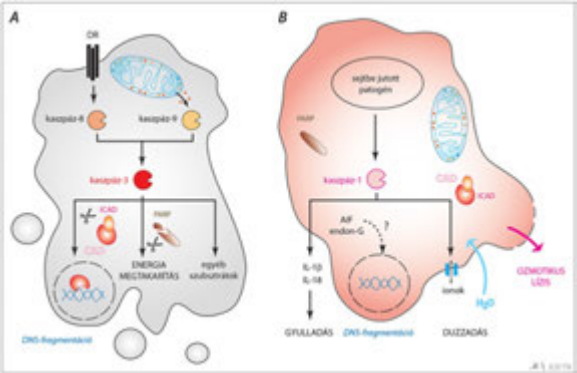
A piroptózis morfológiai és biokémiai jellemzői

Ezt a sejthalál típust kaszpáz-1 közvetített sejthalálnak is nevezzük, miután a kivitelezésében a kaszpáz enzim család elsőként felfedezett taggjának, a kaszpáz-1 enzimnek központi szerepe van. A **kaszpáz-1** eredeti neve ICE (interleukin-converting enzyme), és a piroptózis során az úgynevezett inflammaszóma komplexben történő aktiválódása **gyulladást előidéző citokinek** (IL-1β, IL-18) kibocsátásához vezet a piroptózis útjára lépett sejtből, még mielőtt a sejthalál bármiféle morfológiai bélyege megjelenne.

Az apoptózissal szemben, ahol a sejtmembrán a sejthalál teljes folyamata során ép marad, a piroptózis során 1–2 nm átmérőjű **pórusok** formálódnak a sejtmembránban, amit az aktin hálózat átrendeződése, a citoplazma duzzadása és a sejt egyes részeinek ozmotikus lízise követ. A pórusok az inflammatórikus molekulák extracelluláris térbe való kijutását biztosítják. Ilyen tekintetben a piroptózis fenotípusa nagyon hasonló a többi immunogén sejthalál (nekrózis, nekroptózis) morfológiájához.

Ugyanakkor a sejtmagban az apoptózishoz hasonlóan a kromatin kondenzációja (**piknózis**) és a **DNS fragmentációja** figyelhető meg, amely azonban nem a kaszpáz aktivált DN-áz (CAD) révén zajlik. Az még tisztázásra vár, hogy a kaszpáz független nukleázok (AIF, endonukleáz G) részt vesznek-e ebben a folyamatban.

Összességében elmondható, hogy a piroptózis mind az apoptózis, mind pedig a necroptózis bizonyos morfológiai bélyegeit mutatja (20.11. ábra).



20.11. ábra Az apoptózis és a piroptózis fő jellegzetességeinek összehasonlítása. (A magyarázatot és a részleteket l. a szövegben.)

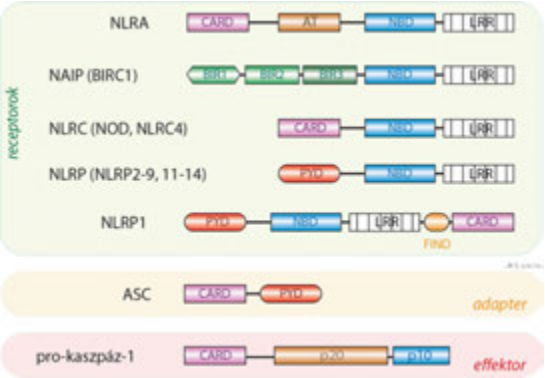
Molekuláris sejtbiológiai szinten elmondható, hogy már a piroptózist kiváltó jel (pyroptotic trigger) is más, mint a korábban leírt sejthalál formáké (20.I. táblázat). A PAMP-szerű bakteriális peptidoglikánt vagy flaggelint az **NLR** (nucleotid-binding oligomerization domain-like receptors) ismerik fel. Ezek jellemző szerkezeti egysége egy leucin gazdag ismétlődésekből álló (LRR) és egy nukleotid kötő és oligomerizációért felelős (NBD) domén. Az N terminálison különböző fehérje-fehérje interakciót lehetővé tevő molekula részlet található, ami lehet kaszpáz toborzó (CARD) régió, azzal szerkezeti rokonságot mutató pirin (PYD), vagy bakulovírus IAP ismétlődéseket (BIR) tartalmazó domén (20.12. ábra).

Miután ezen molekulák némelyike nem rendelkezik kaszpáz toborzó (CARD) régióval, ezért itt is adapter molekulára van szükség ahhoz, hogy a pro-kaszpáz tartalmú aktivációs komplex összeszerelődjön. Jelen esetben ez az **ASC** (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD), aminek egy CARD és egy pirin (PYD) doménje van (20.12. ábra). A komplexbe a CARD régiója alapján beépült pro-kaszpáz-1 a többi kaszpázhoz hasonlóan parciális proteolítikus folyamatok során válik „érett”, aktív enzimé.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

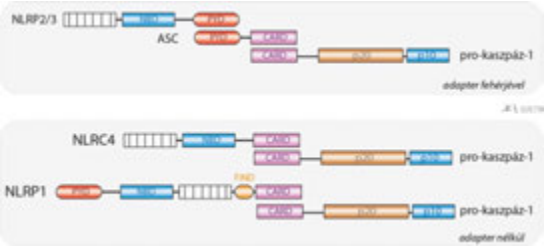
20.I. táblázat. A programozott sejthalál típusok összehasonlítása.

TÍPUS	STIMULUS	FENOTÍPUS	KÖVETKEZMÉNY
Apoptózis	halál receptor aktiváció DNS kérosodás reaktiv oxigén gyökök	Piknózis, DNS fragmentáció, „blebbing”	Apoptotikus testek keletkezése, fagocitózis
Nekroptózis	TNFR1 receptor aktiváció és XIAP gátlás (Smac) TNFR1 receptor aktiváció és kaszpáz gátlás TRAILR1 + kaszpáz gátlás	Citoplazma duzzadása, sejtorganellumok duzzadása, sejtmembrán dezintegráció	A sejt beltartalmának kiáramlása gyulladás
Piroptózis	Bakteriális fertőzés Virális fertőzés Infarktus	Citoplazma duzzadás, DNS fragmentáció, pórus képződés	Citokin szekréció gyulladás



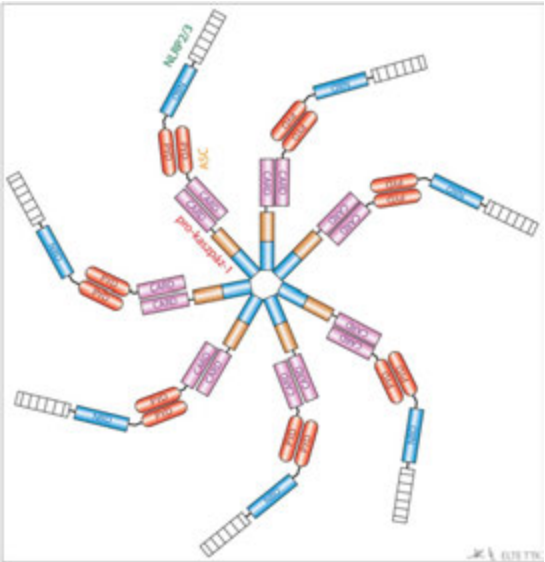
20.12. ábra Az NLR receptorok, az ASC adapter fehérje és a pro-kaszpáz-1 szerkezete. Az NLR receptorokra jellemző a leggyakrabban a C terminálison található leucin gazdag ismétlődéseket tartalmazó LRR domén és egy nukleotid-kötő és oligomerizáló (NBD) domén. Egyes receptorok rendelkeznek pro-kaszpáz toborzó CARD régióval, míg mások pirin (PYR) domént hordoznak. A NAIP (BIRC1) a IAP fehérje családba tartozó, bakulovírus IAP ismétlődéseket (BIR) tartalmazó molekula.

Az NLR fehérjék közvetlen vagy közvetett kaszpáz toborzó képességük alapján funkcionális hasonlóságot mutatnak az Apaf1 proteinnel, ami oligomerizációjával a prokaszpáz-9 iniciátor kaszpázt aktiváló apoptoszómát állítja össze. A pro-kaszpáz-1 aktiválásra képes aktivációs komplexek az inflammaszóma és a piroptoszóma. Az **inflammaszóma** az NLR receptortól függően kétféle szerkezetet mutat: az egyikben a pro-kaszpáz a CARD doménjén keresztül közvetlenül tud kapcsolódni a receptorhoz, míg a másikban ehhez egy adapter fehérjére van szükség (ASC, l. 20.13. ábra). Az utóbbi esetben az összeszerelődő inflammaszómában 7-7 receptor, adapter és pro-kaszpáz fehérje áll össze úgy, hogy a pro-kaszpáz molekulák kerülnek a középpontba (20.14. ábra).



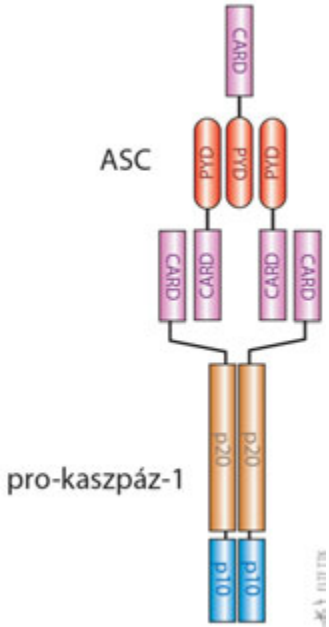
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

20.13. ábra Az inflammaszóma komponenseinek kapcsolódási lehetőségei. Azon receptorokhoz (pl. NLRP1 és NLRP3), amiknek nincsen kaszpáz rekrutáló CARD doménje, a prokaszpáz-1 az adapter ASC fehérjén keresztül kapcsolódik. Az ASC protein hídként épül be a receptor és a kaszpáz közé, a pro-kaszpáz molekulákat ő toborozza (felül). Vannak olyan NLRP receptorok (NLRC4, NLRP1), amik rendelkeznek CARD régióval, így önállóan képesek pro-kaszpázt kötni (alul).



20.14. ábra Az inflammaszóma felépítése. Ebben az esetben az NLR receptorhoz ASC adapter fehérje közvetítésével kapcsolódik pro-kaszpáz-1 fehérje. A rajz leegyszerűsített, nem jelzi azt, hogy az NLR molekulák a nukleotid-kötő és oligomerizáló doménjeik (NBD) segítségével állnak össze úgy, hogy a komplex alapját képezzék.

A **piroptoszóma** a citoplazmában aktív, receptortól független, minimum két ASC adapter fehérje köré szerveződő pro-kaszpáz tartalmú komplex (20.15. ábra).



20.15. ábra A piroptoszóma felépítése. A komplexet ASC és pro-kaszpáz-1 molekulák alkotják (a rajzon 3 adapter fehérje csak az egyszerűség kedvéért szerepel, a komplex több ASC-t is tartalmazhat.)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A piroptózis élettani jelentősége

A piroptózis szerepével kapcsolatban feltétlenül meg kell említenünk, hogy aktiválódását elsősorban mikrobiális kórokozók válthatják ki, és nem csak makrofágokban. Ugyanakkor ma már azt is tudjuk, hogy a baktérium és vírus fertőzésen túl infarktus is előidézheti, sőt, kemoterápiás kezelés során is felléphet. A rák esetében új gyógyítási lehetőséget kínál a kemoterápia és a kaszpáz-1 kontrollált aktiválásának együttes alkalmazása, amellyel serkenteni lehet a szelektív anti-tumor immunválaszt, azaz a transzformált sejtek célzott pusztulását.

Ellenőrző kérdések

1. Milyen válaszreakciót váltanak ki az immenrendszerből az apoptotikus sejtek?
2. A T limfociták milyen módon válthatják ki egy célsejt apoptotikus halált? Ehhez milyen receptorokat és jalátviteli útvonalakt aktiválhatnak? Mit tud a granzim enzimekről?
3. Mutassa be az apoptózis granzim-B útvonalát!
4. Mik az apoptotikus sejthalállal elpusztult vagy elpusztított sejtek eliminációjának fő lépései? Mit tud a „találj meg” szignálról?
5. Mi az „egyél meg” szignál, s aktiválódásának mi a korai és későbbi következménye?
6. Hogyan történik az apoptotikus testek és sejtmaradványok bekebelezése, s mi ennek a molekuláris sejtbiológiai háttere?
7. Mit a piroptózis, s mik a morfológiai jellemzői?
8. Milyen biokémiai folyamatok állnak a piroptózis hátterében? Mutassa be az NLR receptorokat!
9. Mi a piroptoszóma és az inflammaszóma? Milyen alapon szerveződnek és mi a különbség köztük? Mi a piroptózis élettani jelentősége?

Felhasznált és ajánlott irodalom

Beug, S. T., Cheung, H. H., LaCasse, E. C., Korneluk, R. G. (2012) Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends Immunol.* **33(11)**, 535-45. doi: 10.1016/j.it.2012.06.004.

Birge, R. B., Ucker, D. S. (2008) Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death and Differentiation***(15)**, 1096–1102. doi:10.1038/cdd.2008.58

Dagenais, M., Skeldon, A. Saleh, M. (2012) The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death and Differentiation***19**, 5–12; doi:10.1038/cdd.2011.159

Devitt, A., Marshall, L. J. (2011) The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J. Leukoc. Biol.***90**, 447–457. DOI: 10.1189/jlb.0211095

Ewen, C. L., Kane, K. P. Bleackley, R. C. (2012) A quarter century of granzymes. *Cell Death and Differentiation***19**, 28–35; doi:10.1038/cdd.2011.153

Fink, S. L., Cookson, B. T. (2007) Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cellular Microbiology* **9(11)**, 2562–2570. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01036.x

Hochreiter-Hufford, A., Ravichandran, K. S. (2013) Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008748 doi: 10.1101/cshperspect.a008748

Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L. Kroemer, G. (2010) Pyroptosis – a cell death modality of its kind? *Eur. J. Immunol.* 2010. 40: 595–653. DOI 10.1002/eji.200940160

Krammer, P. H. (2000)CD95’s deadly mission in the immune system. *Nature***407**, 789-795.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Labbe, K.,´ Saleh, M. (2011) Pyroptosis: A Caspase-1-Dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection. I. Couillin et al. (eds.), The Inflammasomes, Progress in Inflammation Research, DOI 10.1007/978-3-0348-0148-5_2.

Miao, E. A., Rajan, J. V., Aderem, A. (2011) Caspase-1 induced pyroptotic cell death.*Immunol Rev.* **243(1)**, 206–214. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x.

Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2008) Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology*, **20**, 504–511. DOI 10.1016/j.coi.2008.05.007

Trapani, J. A. (2012) Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death and Differentiation***19**, 21–27; doi:10.1038/cdd.2011.156

Trapani, J. A., Smyth, M. J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Rewiev Immunology* **2**, 735-747. doi:10.1038/nri911

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

V. fejezet - Függelék

1. ábra Carl von Voit (1831, Amberg – 1908, München). Német vegyész és fiziológus a modern táplálkozástudomány atyja. Kimutatta, hogy az ureaként a szervezetből ürülő nitrogén proteinből származik. A proteinek tehát lebomlanak és belőlük részben urea lesz. Csak jóval később mutatták ki, hogy az urea a máj segítségével jön létre.

2. ábra Otto Knut Olof Folin (1967, Åseda, Småland, Svédország – 1934). Svéd-amerikai biokémikus, az USA-ban a chicagoi Minnesota egyetemen tanult. A Harvard Egyetemen, a Nyugat Virginia Egyetemen, a bostoni McLean Kórházban végzett kutatói munkája során mikromódszereket dolgozott ki a vér szűrlet komponenseinek, köztük a glukóznak a meghatározására; felfedezte, hogy az izmokban kreatin szulfát található, kifejlesztette a polifenolok kimutatására alkalmas módszert (Folin–Ciocalteu reagens (FCR).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

3. ábra Folin biokémiai laboratóriumában 1905-ben

4. ábra Max Rubner (1854, München – 1932, Berlin). Német fiziológus. A müncheni egyetemen végzett. Kutató munkája főként a metabolikus folyamatok, az energia hasznosítás élettana és a táplálkozásnak a hőtermeléssel való összefüggésére irányult. Többek között megfogalmazta azt az elképzelést, hogy a metabolizmus intenzitása élő állatok fordítottan arányos az állatok élettartamával

5. ábra Johan Kjeldahl (Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl 1849, Koppenhága, Dánia – 1900, Tisvildeleje, Dánia). Dán vegyész, kidolgozta azt a módszert amellyel a szerves vegyületek N-tartalmát ammóniává alakítva meg lehet határozni. A Kémiai osztályát vezette az alapításától, 1876-1900-ig. Ez a Carlsberg sörgyár laboratóriuma volt és még ma is működik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

6. ábra Kjeldahl a Carlsberg Laboratóriumban

7. ábra A Carlsberg Laboratórium épülete

8. ábra A ma is kedvelt termék

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

9. ábra Hevesy György (1885, Budapest, – 1966, Freiburg, Németország). Fizikai-kémikus, fontos szerepet játszott a radioaktív nyomjelzők kifejlesztésében. Ezeket először a növényekben zajló biokémiai folyamatok vizsgálatában hasznosították, és csak ezt követően alkalmazták állatokban. Munkájáért 1943-ban kémiai Nobel-díjat kapott.

10. ábra Rudolf Schoenheimer (1898, Berlin – 1941, New York). Német-amerikai orvos, biokémikus. Az izotópos nyomjelzést Hevesy nyomán alkalmazta. Nem radioaktív, hanem stabil izotópokat használt. 1933-ban kivándorolt az USA-ba és a Columbia Egyetemen dolgozott. 1935-től deutériumot használt a zsírok és koleszterin, majd 1937 után N15-öt az aminosavak jelölésére. Megállapította, hogy a szervezetben lévő vegyületek (alkotórészek) folyamatosan megújulnak, kicserélődnek.

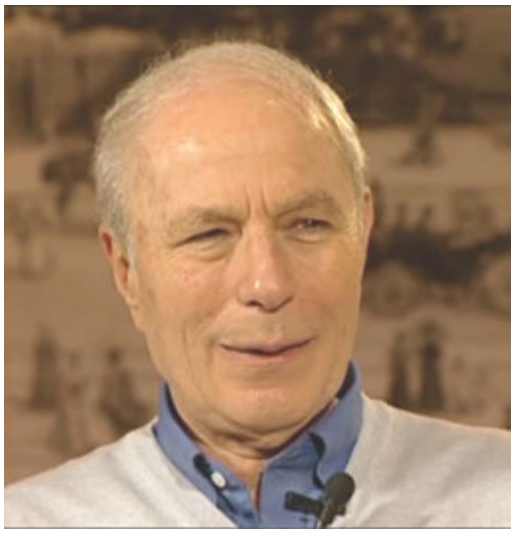
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

11. ábra Munka közben

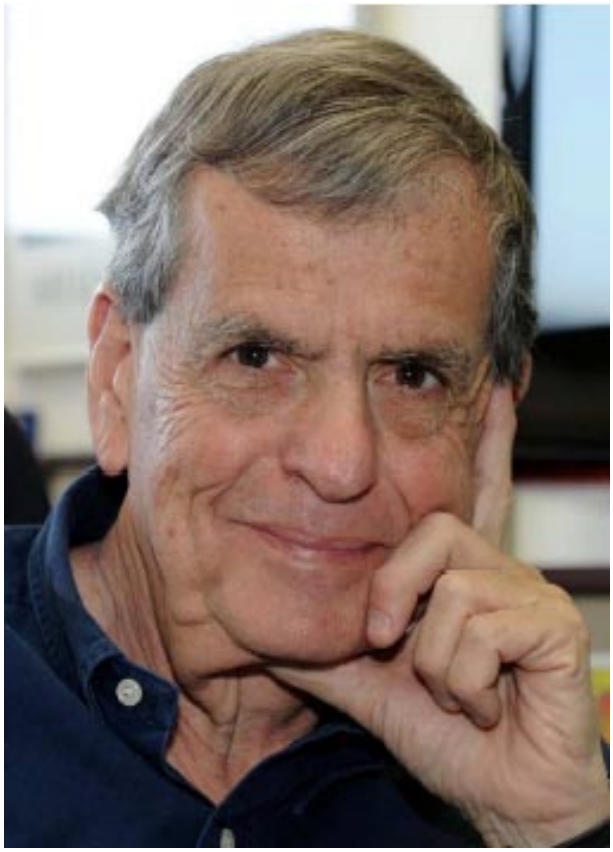
12. ábra Harry Eagle (1905, New York Port – 1992, Chester, N.Y.). Patológus, kísérleti biológus, a John Hopkins Egyetemen, a National Institute of Health-ben az Albert Einstein College of Medicine-ben végzett kutatómunkát. Tevékenységének máig nélkülözhetetlen eredményei elsősorban a szövettenyésztés területén születtek. Ő dolgozta ki a minimális esszenciális medimot, amely a szövettenyészetei ma is leggyakrabban használt tápközege.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

13. ábra Christian de Duve (1917, Thames-Ditton, Nagy Britannia – 2013, Belgium). Sejtbiológus, főként Belgiumban és az USA-ban dolgozott az eukarióta sejtek szerkezetének felderítésén. Sejtfrakcionálás és centrifugálás segítségével felfedezte a lizoszómákat. Keveset, de foglalkozott autofágiával is. 1974-ben élettani és orvosi Nobel díjat kapott

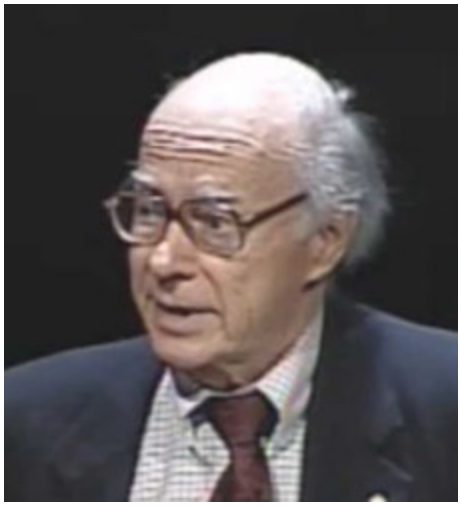


14. ábra Herskó Ferenc (Avram Hershko) (1937, Karcag, Magyarország). Orvos-biokémikus, 1950-ben Izraelbe emigrált családjával. A fehérjelebontás mechanizmusát tanulmányozta és döntő szerepet játszott az ubiquitin-proteaszóma rendszer felfedezésében és leírásában. A munka eredményeként kiderült, hogy az intracelluláris proteolízisben egyedi enzimek helyett komplex, sokkomponensű rendszer működik. Ezért a felfedezésért 2004-ben a kémiai Nobel díjat.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

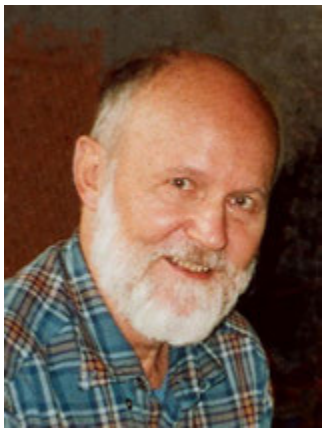
15. ábra Aaron Ciechanover (a fénykép Aaron Ciechanover ajándéka és Zvi Roger készítette) (1947, Haifa, Izrael). Biokémikus, együtt dolgozott Herskó Ferenccel az ubiquitin-proteaszóma rendszer felfedezésében amiért 2004-ben őt is kémiai Nobel díjjal jutalmazták.



16. ábra Irwin A. Rose (1926, Brooklyn, New York, USA). Enzimológus. Együtt dolgozott Herskó Ferenccel és Aaron Ciechanoverrel az ubiquitin-proteaszóma rendszer felfedezésében amiért 2004-ben őt is kémiai Nobel díjjal jutalmazták

17. ábra Benjamin Franklin Trump (1932, Kansas City Missouri – 2008, Denver Colorado). Állatorvosi patológus, BA University of Missouri, Kansas City Missouri 1953, MD University of Kansas School of Medicine, Kansas, 1970 University of Maryland, School of Medicine, a Department of Pathology professzora és elnöke. A sejtek különböző sérüléseket (ischemia, anoxia, toxikus hatások) követő károsodásának és folyamatát tanulmányozta. Eredményei alapvetően járultak hozzá a sejtek pusztulásának időbeli változásairól és mechanizmusáról való tudásunkhoz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

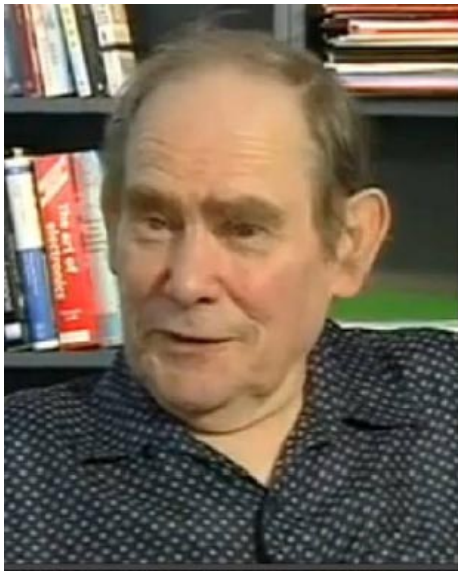


18. ábra Per O. Seglen (a fénykép Per Seglen ajándéka) (1943, Norvégia). Sejtbiológus, az endogén proteolízis, a lizoszomális lebontás és az autofágia kutatója. 1972 óta a Norvég Rákkutató Intézet Szövettenyésztési Osztályán dolgozik. Új májsejt izolálási módszert dolgozott ki, amely világszerte a leginkább elterjedt. Kimutatta, hogy az autofagoszómák a lizoszómákat megelőzően endoszómákkal fuzionálnak. Ezeket a vakuólákat amfiszómáknak nevezte el. Bevezette a fagofór kifejezést.

19. ábra Daniel J. Klionsky (fénykép: 2006, 4th International Symposium on Autophagy, Mishima, Japán). Egyetemi tanulmányok: University of California-ban (Los Angeles); PhD fokozat: Stanford University; postdoc: California Institute of Technology 2000-től: Department of Biological Chemistry, University of Michigan Medical School. Az élesztőben zajló autofágia kutatásának egyik úttörője. A Saccharomyces-ben folyó egyik szelektív autofág folyamat, a citoplazma-vakuóla szállító mechanizmus felfedezője. Az első kizárólag autofágiával foglalkozó könyv szerkesztője (2004), az Autophagy folyóirat alapító főszerkesztője (2005-)

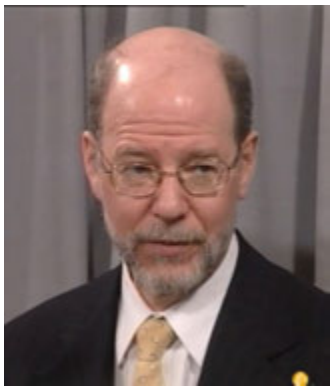
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

20. ábra John Foxton Ross Kerr (1934, Sydney, Ausztrália). Patológus, a sejtpusztulás nekrotikus és programozott típusai szövettani és ultrastruktúrális tanulmányozásának vezető kutatója, az apoptózis mint programozott sejthalál koncepciójának és az apoptózis a fiziológiás szöveti megújulásban játszott szerepének megfogalmazója.



21. ábra Sydney Brenner (1927, Germiston, Dél-Afrika). Molekuláris biológus, sejtbiológus, genetikus; PhD. Exeter College, Oxford. A cambridge-i Medical Research Council Unit-ban dolgozva jelentősen hozzájárult a genetikai kód megfejtéséhez. Az 1960-as évektől kezdve kialakította az egy modell szervezetre koncentráló komplex kutatások rendszerét. A kiválasztott modell organizmus a fonálféreg *Ceanorhabditis elegans* volt. A későbbiek során tanítványai és követői alapvető jelentőségű felfedezéseket tettek elsősorban a fejlődésbiológia, fejlődésgenetika, sejtpusztulás és DNS szekvenálás területén. 2002-ben Élettani és Orvosbiológiai Nobel-díjat kapott.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



22. ábra Howard Robert Horvitz (1947, Chicago, Illinois, USA). Biológus, PhD Harvard University, 1974; Massachusetts Institute of Technology (MIT). A PhD fokozat megszerzése után együtt dolgozott Sydney Brennerrel a Medical Research Council Cambridge-i laboratóriumában. 1986-ban professzori címet és státuszt kapott az MIT-ben. Döntő szerepe volt az apoptózis gének felfedezésében és a folyamat molekuláris genetikai leírásában. 2002-ben Élettani és Orvosbiológiai Nobel-díjat kapott.

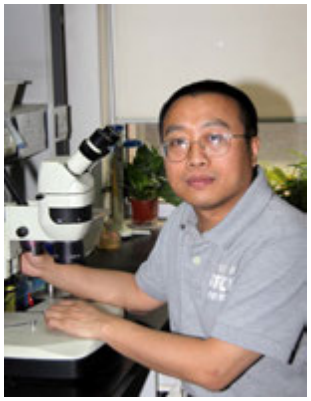
23. ábra Sir John Edward Sulston (1942, Nagy-Britannia). Brit tudós, eredetileg vegyész, aki PhD fokozatát nukleotid kémiai kutatásokból szerezte 1967-ben. Később csatlakozott Sydney Brennerhez akivel együtt dolgozott a Medical Research Council Cambridge-i laboratóriumában. Vezető szerepet játszott a sejtek származási vonalának feltérképezésében a *Caenorhabditis elegans* egyedfejlődése során. Központi alakja volt a Caenorhabditis elegans, majd az ember genomjának megszekvenálásában. Egy ideig igazgatója volt a humán genom szekvenálás egyik fellegvárát képező The Sanger Centre-nak (jelenleg Wellcome Trust Sanger Institute). 2002-ben Élettani és Orvosbiológiai Nobel-díjat kapott.

24. ábra Yoshinori Ohsumi (a fénykép Yoshinori Ohsumi ajándéka) (1945, Fukuoka, Japán). Biokémikus, sejtbiológus, PhD 1974, Tokyo University; 1974-77 posztdoktor Rockefeller University, New York City; 1977-ben visszatért Tokyo-ba. Az 1980-as évek végén kezdte tanulmányozni az élesztő vakuólumban zajló folyamatokat. Vakuóláris proteináz deficiens mutánsokat tanulmányozva azt találta, hogy ezekben a tenyészet éheztetése után

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

fénymikroszkóppal észlelhető apró szemcsék jelentek meg. Elektron mikroszkóppal vizsgálva kiderült, hogy ezek olyan vezikulák, amelyek autofágia révén keletkeznek. A megfigyelés nyomán kifejlődő munka vezetett az autofágia molekuláris mechanizmusának tanulmányozásához, aminek Ohsumi ma is egyik vezető alakja.

25. ábra Noboru Mizushima (a fénykép Yoshinori Ohsumi ajándéka) (1966, Tokyo, Japán). Orvos, biológus, PhD 1996, molekuláris immunológia témában, ezt követően csatlakozott Yoshinori Ohsumi laboratóriumához, ahol bekapcsolódott az élesztőben zajló autofágia molekuláris mechanizmusának kutatásába. Fontos szerepe volt az ubiquitin-szerű Atg12 konjugációs rendszer felfedezésében. Ezt követően 2001-ben Atg5-/-mutáns, és GFP-vel konjugált Atg5-öt expresszáló embrionális őssejteket hozott létre. Később Atg5-/- mutáns egeret és GFP-LC3 transzgén egeret is sikerült létrehoznia. Ezekkel és további molekuláris genetikai eszközökkel dolgozva úttörő munkát végez az emlős sejtekben folyó autofágia szerepének tisztázására.



26. ábra Hong Zhang (a fénykép Hong Zhang ajándéka). Biokémikus, molekuláris genetikus; 1991 Anhui, Kína; 2001 PhD molekuláris genetika, Albert Einstein College of Medicine USA; 2001-2004Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Research Fellow; 2004-2012 Kínai Nemzeti Biológiai Kutató intézet; 2012-Kínai Tudományos Akadémia Biofizikai Intézet kutatási csoportvezető. A *Caenorhabditis elegans*-ban folyó molekuláris genetikai kutatás vezető egyénisége. Kimutatta, hogy a *C. elegans* korai embriogenezisében az autofágia fontos szerepet játszik az ivarsejt specifikus P-granulum fehérjék (PGL-1, PGL-3) eltávolításában. A P-granulum degradáció defektusa alapján végzett genetikai screen segítségével új eukarióta specifikus géneket talált.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

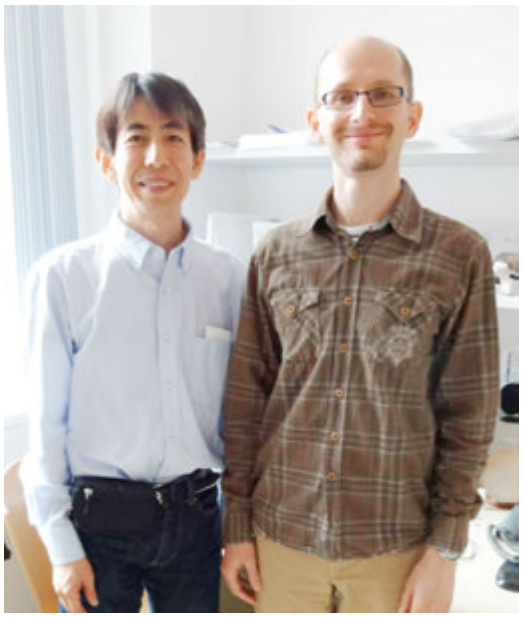
27. ábra Tom Neufeld (a fénykép Tom Neufeld ajándéka) (1966, Minneapolis, USA). Genetikus, sejtbiológus. PhD 1994-ben, Drosophila fejlődésbiológia témában. Doktori munkáját Gerry Rubin laborjában végezte, majd posztdoktorként Bruce Edgar témavezetésével a sejtnövekedés és sejtosztódás genetikai szabályozását vizsgálta. 1998-ban tért vissza Minneapolisba, saját kutatócsoportot alapítva. Kezdetben a sejtnövekedést szabályozó jelátviteli hálózatokat (inzulin és TOR útvonalak) vizsgálta, e kutatások kapcsán kezdett az autofágia tanulmányozásába. Úttörő szerepet játszott a Drosophila, mint autofágia kutatásra alkalmas genetikai modell kidolgozásában.

28. ábra Beth Levine (a fénykép Beth Levine ajándéka) Orvos, biológus, 1986 Cornell University Medical College, USA; posztdoktorként neurobiológiával, fertőző betegségekkel és virológiával foglalkozott; 1994-2004 a Columbia Egyetemen a virológiai kutatás vezetője volt. 1998-ban az általa irányított csoport talált egy új gént amely a Bcl-2 fehérjéhez kapcsolódó fehérjét kódol amelyet beclin-1-nek nevezték el. Erről a génről később kimutatták, hogy szerepel az autofágiában. Ez lett tehát az első emlősökben felfedezett autofág gén. Hipotézise szerint a beclin-1 szerepet játszhat különböző szervekben előforduló rákos folyamatokban (pl. mell-, tüdő-, petefészek-, rákban, B sejtes limfómában).

Az e-book szerzői:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

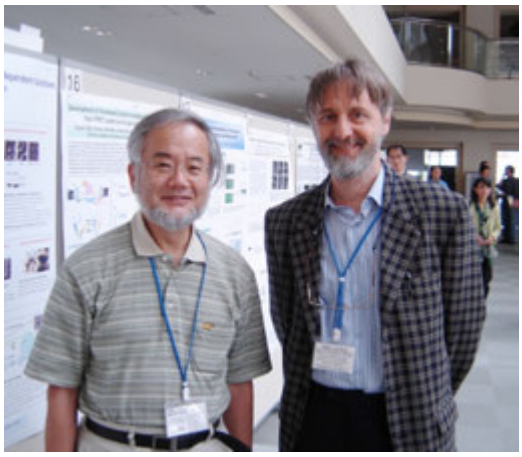
29. ábra Lőw Péter (1964, Budapest, Magyarország). Biológus, 1988 ELTE TTK; PhD 1995, molekuláris sejtbiológia; habilitált doktor 2009; tanszékvezető egyetemi docens 2010-. Kutatási területe az autofágia szabályozásában közreműködő gének, az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az autofágia valamint az apoptózis és az autofágia kölcsönhatásai



30. ábra Noboru Mizushima és Juhász Gábor (Budapest, 2013) Juhász Gábor (1976, Esztergom, Magyarország). Genetikus, sejtbiológus, PhD 2004-ben az ELTE (akkor még) Állatszervezettani Tanszékén. Már szakdolgozatát és doktori disszertációját is az autofágia témájából írta a Sass Miklós laborjában akkortájt vizsgálni kezdett Drosophila modellen. Ezt követően 2004-től a minnesota-i Egyetemen posztdoktorként folytatta ez irányú kutatásait Tom Neufeld vezetésével. 2006-ban tért vissza az ELTE Anatómiai Tanszékére, ahol 2009-ben alapított saját kutatócsoportot. Karrierje kezdetétől az autofágia szabályozását és szerepét vizsgálja, jelenleg Drosophila és sejttenyészeti kísérletek révén.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

31. ábra Keji Tanaka és László Lajos (Salzburg, 2011) László Lajos (1954, Gödöllő, Magyarország). Sejtbiológus, egyetemi docens ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék. Biológiai tudomány kandidátusa 1994. 1989-93, vendégkutató az University of Nottingham Medical School Biokémiai Tanszékén. 1993-94, a későbbi Nobel-díjas (1997) Stanley B. Prusiner meghívására vezető kutató az University of California San Francisco Neurológiai Tanszékén. Fő kutatási területe a neurodegeneratív betegségek sejtpatogenezise. Kvantitatív immun-elektronmikroszkópos vizsgálatai révén, már húsz évvel ezelőtt elsőként hívta fel a figyelmet az ubiquitinilált fehérjéknek az endoszóma-lizoszóma rendszerben (ELR) történő specifikus felhalmozódására. Úttörő szerepet játszott a patogén prion fehérjék ultrastrukturális lokalizációs mintázatának a felderítésében és annak bizonyításában, hogy az ELR központi szerepet játszik a prion konverzióban és a patogenezisben.



32. ábra Kovács Attila Lajos Yoshinori Ohsumival (Mishima, Japán, 2006) Kovács Attila (1947, Kispest, Magyarország). Sejtbiológus, 1970 ELTE biológia-kémia szak; 1974 egyetemi doktor; 1983 a biológiai tudományok kandidátusa (CSc, PhD); 2011 az MTA doktora (DSc); 2012 habilitált doktor; 1979-80, 1997-98 ösztöndíjas, majd meghívott kutató a Norvég Rákkutató Intézet Szövettenyésztési Osztályán, Per Seglen laboratóriumában; az Autophagy folyóirat 2005-ben történt indulása óta a szerkesztő bizottság tagja. 1972-ben kapcsolódott be az autofágia kutatásába. In vivo és in vitro rendszerekben elektronmikroszkópos és sejtbiokémiai módszerekkel többféle emlős sejttípusban, *C. elegans*-ban pedig elsőként tanulmányozta az autofág folyamatokat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/