



**PHARE Program HU-94.05 0201-L013-37**  
**TEMPUS Program SJEP 11126-96**  
**TEMPUS Program SJEP 12525-97**

# *Sejtbiológia*

*egyetemi jegyzet*

*DATE, 2000*

*Sejtbiológia jegyzet*

Szerkesztette: ifj. Szabó Gábor

Írták: a DOTE Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet munkatársai

Damjanovich Sándor  
Gáspár Rezső  
Krasznai Zoltán  
Matkó János  
Mátyus László  
Nagy Péter  
Panyi György  
ifj. Szabó Gábor  
Szöllősi János  
Vereb György

Nyomdai előkészítés: Vereb György

A jegyzetben található ábrák a Molecular Cell Biology (Lodish-Baltimore-Berk-Zipursky-Matsudaira-Darnell, Scientific American Books, 1995) ábrái alapján készültek.

Kézirat gyanánt

---

A jegyzet megjelenését az alábbi programok támogatták:

PHARE Program HU-94.05 0201-L013-37

TEMPUS (PHARE) SJEP 11126-96

TEMPUS (PHARE) SJEP 12525-97

## Előszó

A sejtbiológia tárgykörébe a sejt felépítése - a sejtszervek (organellumok) és azok felépítése -, a sejtekben folyó transzport folyamatok, sejtek mozgása, szaporodása, energia gazdálkodása, "szakosodása" (differenciálódása), a környezettel ill. más sejtekkel kimutatható kommunikációja tartoznak. A sejtek "funkcionális anatómiáját" - a működési elveket illusztrálendő - molekuláris mélységig tárgyalja, de a molekuláris részletek szisztematikus tárgyalását a biokémianak és molekuláris biológiának engedi át. A sejtbiológia - ha jól tölti be funkcióját - az orvosi egyetemi alapozó tárgyak ismeretanyagát szemléletesen és súlypontozva, de a hitelesség és a megértés élményét nyújtó részletgazdagsággal integrálja. Ezzel a sejt-szerveződés szöveti szintjén megmutatkozó élet-megnyílvánulások élettanát, a patológiás jelenségek sejtszintű hátterét és a sejt életébe való gyógyszeres beavatkozás értelmezését is bevezeti, azok háttérül szolgál, és kapcsolódik a bakteriológia és virológia számos fejezetéhez.

Az I. év második szemeszterében zajló sejtbiológia oktatás feltételezi az orvosi kémia tárgy keretében tanultak ismeretét, épít a biofizikai tanulmányok nyújtotta (részben metodikai) ismeretekre, és tanmenetében figyelembe veszi a molekuláris biológia kurrikulum haladását. Ismeretanyagát - optimális tantárgy-koordináció esetén - a genetika felhasználja, ill. a biológiai tulajdonságok fejlődésének evoluciós szempontú tárgyalásával, a fenotípus megjelenésének (a szervezetben is tetten érhető) dinamikáját értelmezve, mélyíti azt.

A sejtbiológiai problémák kutatása ma elsősorban molekuláris biológiai és biofizikai eszközökkel történik. A vizsgált tulajdonságokért felelős géneket előbb-utóbb klónozzák, működőképes konstrukció formájában bejuttatják olyan sejtekbe, melyekben azok korábban nem fejeződtek ki, a megjelenő tulajdonságokat kifinomult biofizikai eszközökkel tanulmányozzák, stb. A fixált sejtek felépítésének - annak elektronmikroszkópos megismerésében csúcsosodó - citomorfológiáját az élő állapot dinamikájának követésére alkalmas mikroszkópos eszközök nyújtotta, a molekuláris szerveződésről is tájékoztató funkcionális megközelítés váltotta fel. A sejtbiológia átfogó ismerete ugyanakkor nem nélkülözheti a hagyományos szövettani technikákkal nyert információk tételes áttekintését - utóbbira a sejtbiológia tantárgy keretében folyó hisztológiai kurzus révén kerül sor.

A sejtbiológia oktatása egyetemünkön korábban egy genetikai szemléletű, átfogó biológiai alapokat adó tárgy, az orvosi biológia keretében történt. Jelen oktatási struktura olyan modellt követ, melyben a biológia épülete több, könnyebben elsajátítható, kisebb volumenű kurzusból épül fel, a szintézis feladatát a hallgatókra bízza. A sejtbiológiát ma oktatók hálásan és elismerően gondolnak korábbi tanáraikra, akik az

egyetemen a tárgy molekuláris genetikai alapokon álló oktatását meghonosították. Tölük tanultuk, hogy a sejt nem azonos összetevőinek összegével, hogy tulajdonságai evoluciós eredetűek, hogy a jelenség mindig gazdagabb és igazabb, mint a magyarázat. Az általuk közvetített szakmai és emberi értékrend a tárgyat 1997-től oktató Sejtbiológia Tanszék oktatóit is odaadásra, elhivatottságra kötelezi. Saját oktatási programunkat sokéves sejtbiológiai kutatási tapasztalatainkra - egy változatos tematikájú, biofizikai és molekuláris biológiai szemléletet és eszközöket egyaránt hasznosító, főleg emlős sejtek életjelenségeivel kapcsolatos kísérletes élményanyagra és a tárgy szeretére építjük.

A sejtbiológia tanulása, tanítása és kutatása egyaránt - mint annyi más - akkor érdekes, izgalmas, ha a jelenségekből indul ki, azokra enged rácsodálkozni és értelmezésük segítségével megtanít azokban gyönyörködni. A laikus megközelítés vagy akár a deduktív gondolkodás számára úgy tünhet, hogy már minden "...varázstalanítva lett, hogy már minden banális óraszerkezet..." (Cseh Tamás után). A talán nem is olyan távoli, legfontosabb biológiai törvényszerűségei tekintetében - lényegében - feltárt világ felé vezető út azonban még valóban varázslatos.

Jegyzetünk évről-évre változni, fejlődni fog, a tudomány és tükrözői fejlődéstörténetének megfelelően. A hallgatók kérdéseiket, pontatlan vagy érthetetlen megfogalmazásokra, elírásokra, stb. vonatkozó észrevételeiket email formájában is közvetíthetik a tanszék felé (szabog@jaguar.dote.hu). A jegyzet a tantermi előadások háttérül szolgál, azokat kiegészíti, nem helyettesíti.

A tananyag szerkezete a helyi sajátságokat is tükrözi, amennyiben egyes, a sejtbiológia által is tárgyalható anyagrészeket csak vázlatosan vagy futólag említi, átengedve azok szisztematikus taglalását más, ezen területeken saját kutatási tapasztalatokkal rendelkező tanszékeknek (pl. a differenciálódás, a sejthalál, a tumor biológia, a neurobiológia vagy az immunbiológia számos sejtbiológiai aspektusa).

Jó tanulást, sikeres vizsgát kívánunk!

Dr. Szabó Gábor  
a Sejtbiológiai Tanszék  
vezetője

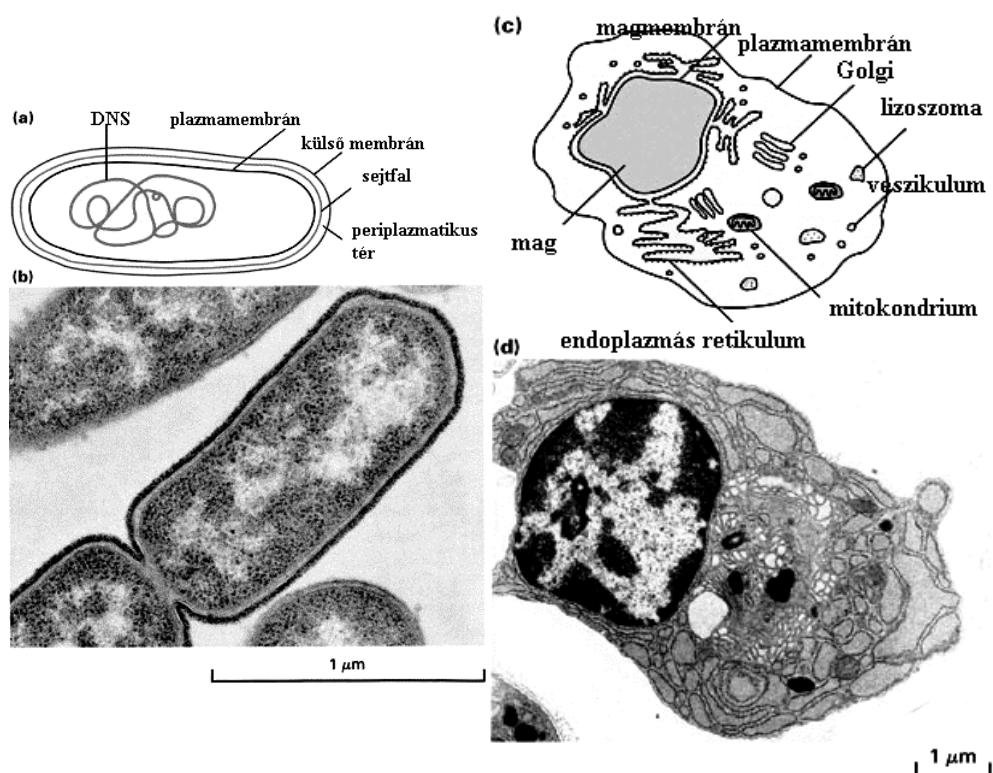
Debrecen, 1998

## *Tartalomjegyzék*

Előszó <i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	
1. Bevezetés: a sejtoranellumok áttekintése .....	1
<i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	
2. A sejtmembrán szerkezete .....	7
<i>(Damjanovich Sándor)</i>	
3. Membránfehérjék, membránpermeabilitás. Passzív és aktív anyagtranszport.....	13
<i>(Matkó János)</i>	
4. Hidrofób vegyületek transzportja. ABC-kazettás transzporterek .....	37
<i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	
5. Ioncsatornák és farmakológiai vonatkozásaiik .....	45
<i>(Gáspár Rezső)</i>	
6. Ionmilieu szabályozása.....	53
<i>(Panyi György)</i>	
7. Citoplazmatikus membránrendszerek.....	73
<i>(Nagy Péter)</i>	
8. A sejműködés energiaforrása: a mitokondrium .....	103
<i>(Szöllősi János)</i>	
9. A citoskeleton és a sejtmozgások.....	115
<i>(Mátyus László)</i>	
10. Multicelluláris szerveződés. Sejtek közötti kapcsolatok. ....	129
<i>(Szöllősi János)</i>	
11. A jelátvitel sejtbiológiája.....	143
<i>(Vereb György)</i>	
12. Sejtmag, kromatin.....	161
<i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	
13. Sejtciklus, mitózis.....	179
<i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	
14. A sejt lehetséges terminális állapotai .....	195
<i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	
15. Meiozis (redukciós osztódás) .....	209
<i>(Krasznai Zoltán)</i>	
16. Sejt-virus interakciók sejtbiológiai vonatkozásai. ....	213
<i>(ifj. Szabó Gábor)</i>	

## Bevezetés: a sejtoranellumok áttekintése

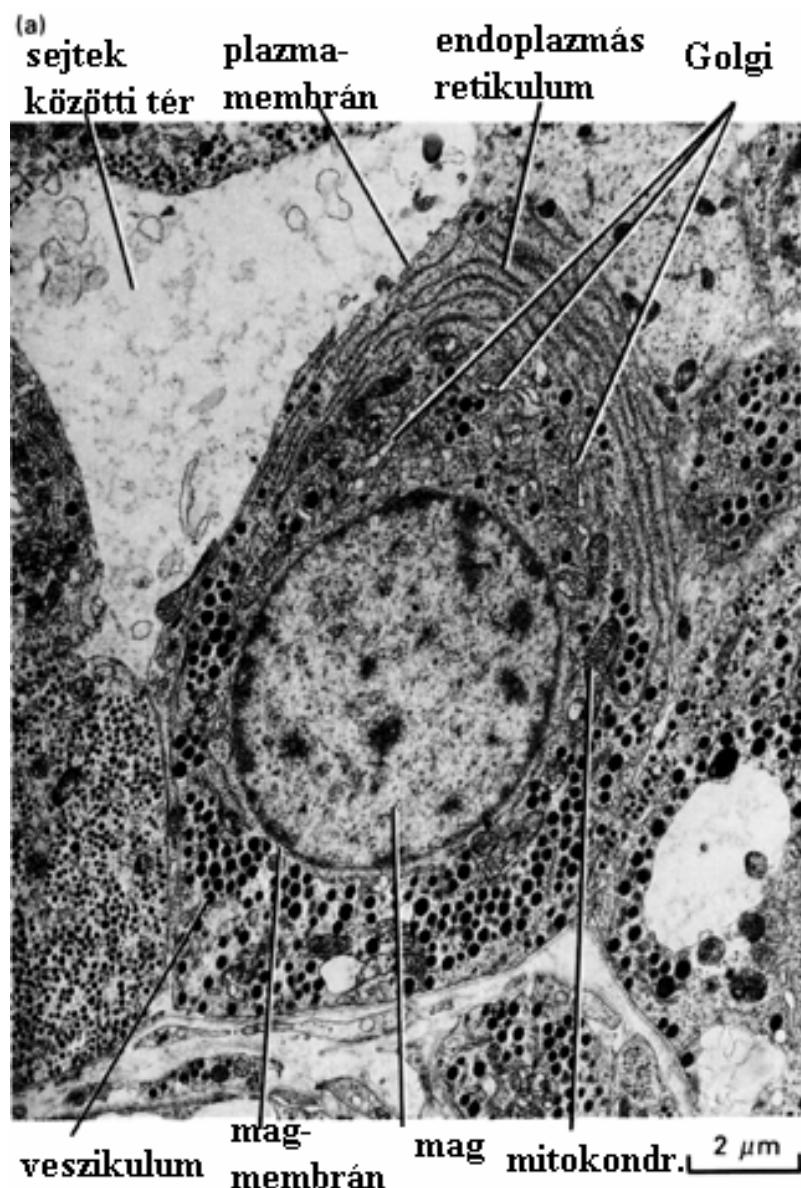
Két fő sejttípus létezik: (maghártyával határolt) maggal rendelkezők (ilyenek a magasabbrendűek, az eukarióták sejtjei) és sejtmag nélküliek („mag előttiek”, a prokarióták sejtjei – utóbbiak a baktériumok; minden egyéb organizmus eukarióta). A prokarióták kromoszóma-anyaga magszerű képződményt, un. nukleoidot alkot. Az ábrán egy baktérium és egy eukarióta sejt vázlatos felépítése hasonlítható össze. Ebben



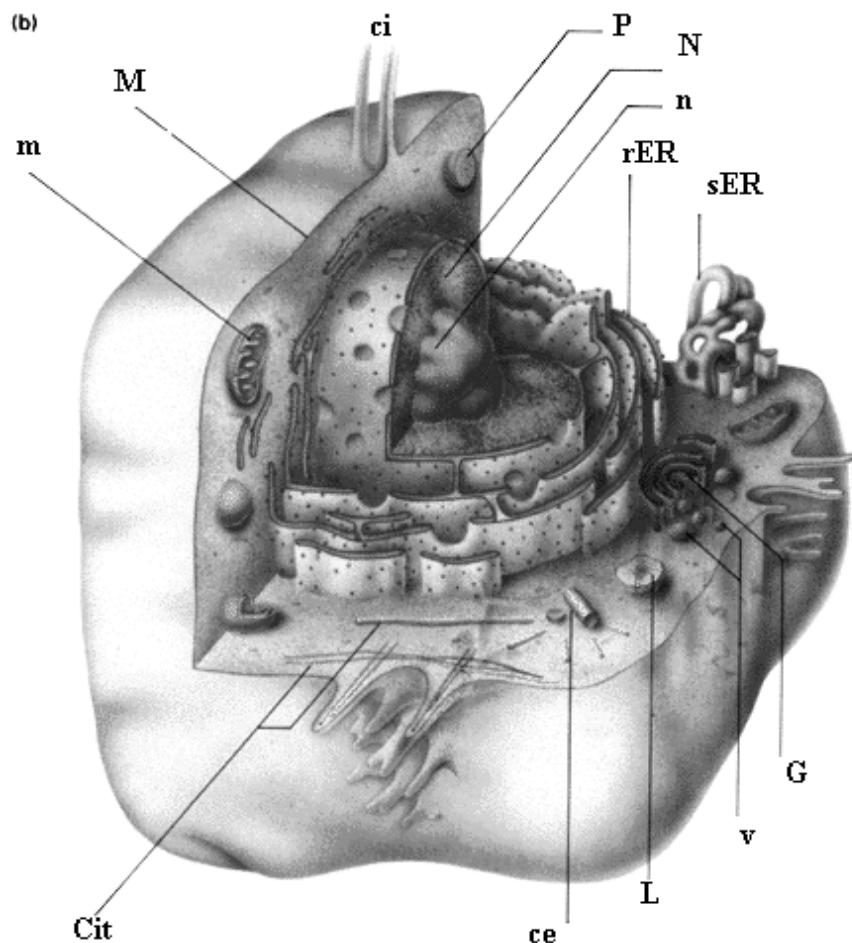
a jegyzetben kizárolag az eukarióta sejtek főbb jellemzőinek vázlatos leírására vállalkozunk. Utóbbi sejtek között is jelentős eltérések, különbségek vannak, alakjuk és szubcelluláris strukturáik dominanciája, mennyisége tekintetében.

Az alábbi ábrán pl. egy hormontermelő patkány sejtről készült elektronmikroszkópos kép látható, mely az emlős sejtek számos sajátságát is mutatja.

Egy “tipikus” állati sejt fénymikroszkópos feloldási szinten észlelhető organellumai (ld. alábbi rajz) a sejtmag (N), a magvacska (nukleólusz, n), a riboszómákkal fedett (durva

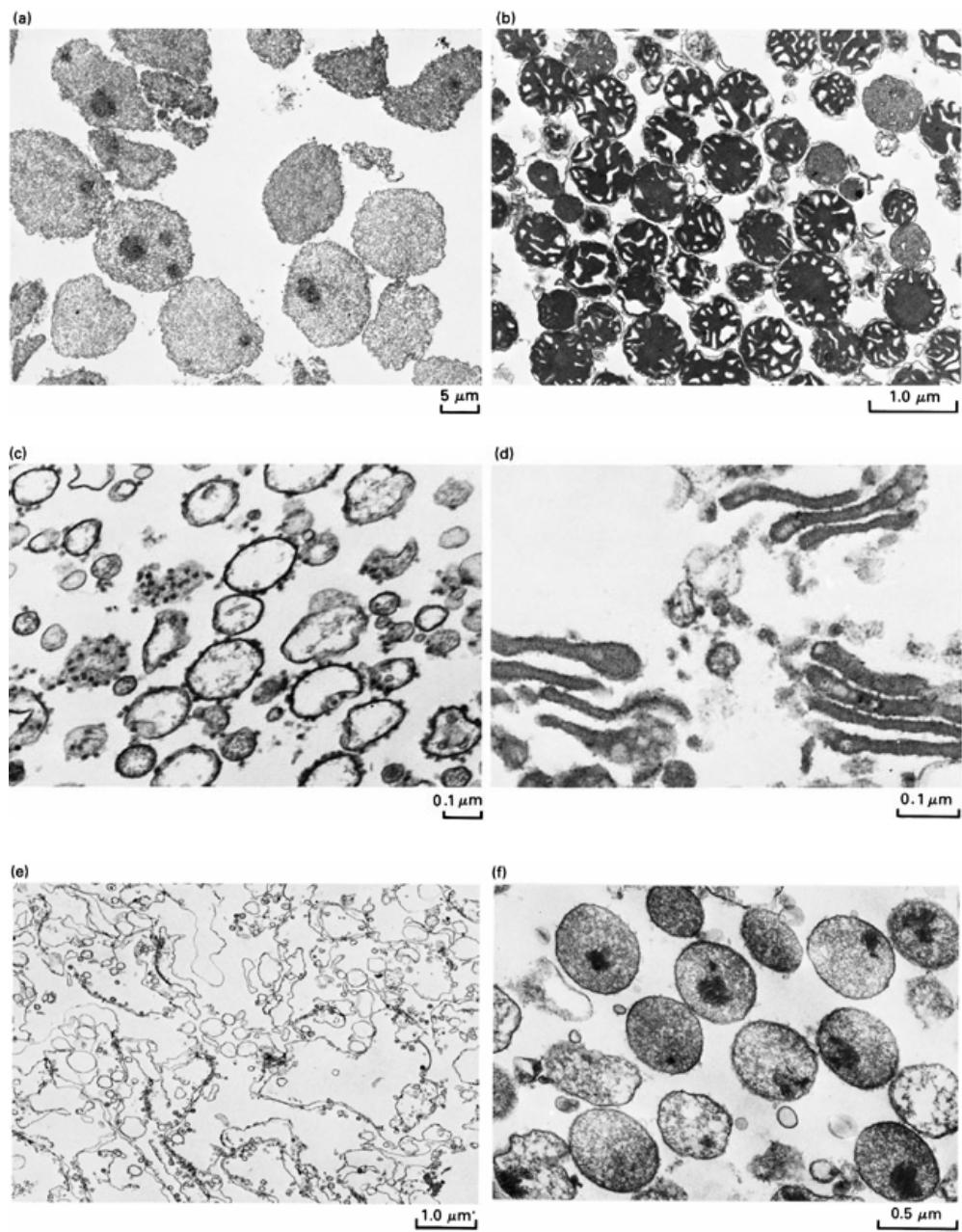


felszínű, granuláris; rER) és sima felszínű (agranuláris; sER) endoplazmás retikulum, a Golgi apparátus, a mitokondriumok (m), a plazmamembrán (M), a csillók (ciliumok;

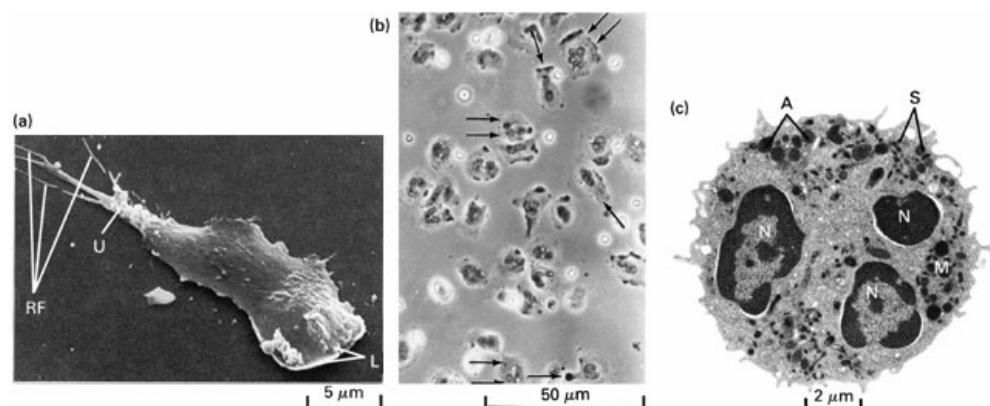


(ci)), a citoszkeleton tubulus és rostrendszer (Cit) ( a centriólumok (ce), a peroxiszómák (P) a lizoszómák (L) és egyéb, kisebb veszikulák (v).

A sejtorganellumok centrifugálásos eljárásokkal elkülöníthetők a többi sejtalkotótól. Az alábbi ábrán patkány májsejtek izolált magjai (a), mitokondriumai (b), kis veszikulákká törédezett endoplazmás retikuluma (c), Golgi veszikulái (d), plazmamembránja (e) és peroxiszomái (f) tisztított preparátumának elektronmikroszkópos képe látható.



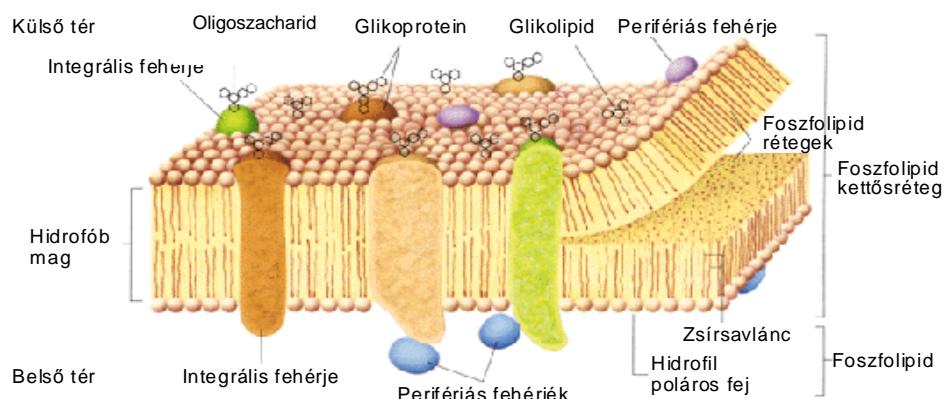
A sejtekből és organellumaiból annyi és úgy látható, amennyit és ahogyan az alkalmazott mikroszkópos technika azokból mutat. Az alábbi ábrán emberi fehérvérsejtek (polimorf magvú, vagyis szabálytalanul lebenyezett magvú leukociták) láthatók. A pásztázó elektronmikroszkópos felvétel (a) a sejtfelszín háromdimenziós képét mutatja. A sejt jól láthatóan mozgás közben van; erre utal széles, ellapult lamellopodiuma (L) az abból eredő keskeny, összehúzódni képes rostokban (RF) végződő "lábbal" (u; ultropod). Fénymikroszkópos (fáziskontraszt mikroszkópos) képen (b) áttekinthető a sejtek nagyobb csoportja: némelyik a tárgylemezzel szoros kontaktusban van, kiterül, (ezeket a sejteket kettős nyíl jelzi a képen), más sejtek mozgásban vannak (az ábrán nyíl jelzi ezeket). Transzmissziós elektronmikroszkópos képen (c) számos nagyobb (A) és kisebb (S) granulum tűnik elő, jól megkülönböztethető a sejtmag (N) és felismerhető néhány mitokondrium (M).



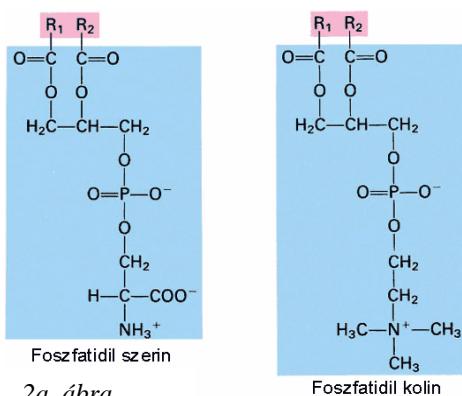


## A sejtmembrán szerkezete

A plazmamembrán a sejt belsejét elválasztja, de egyben össze is köti a külvilággal. A membránok fő szerkezeti és funkcionális részei a lipid kettősréteg és az abban elhelyezkedő, sejtenként nagy változatosságot mutató fehérjék. Mind a fehérjék, mind a lipidek megköthetnek oligoszacharid (cukor) molekulákat is. Az emberi plazmamembránok átlagosan 40-60% lipidet, 35-50% fehérjét és 1-2% oligoszacharid (viszonylag kisméretű) molekulát tartalmaznak.



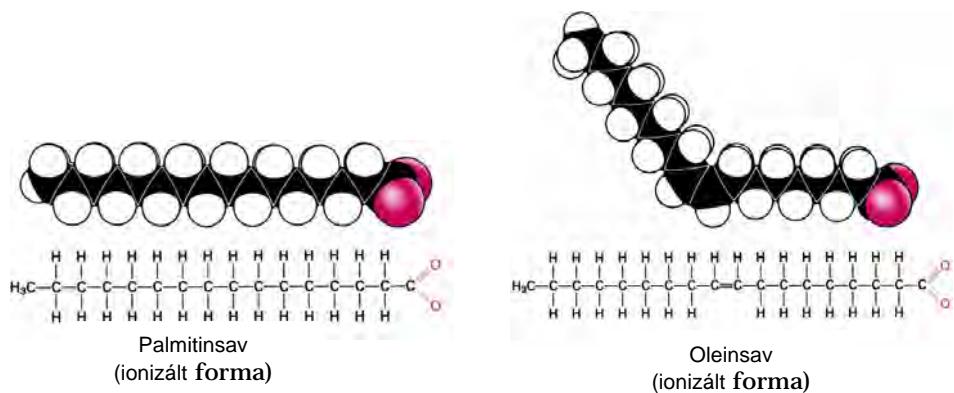
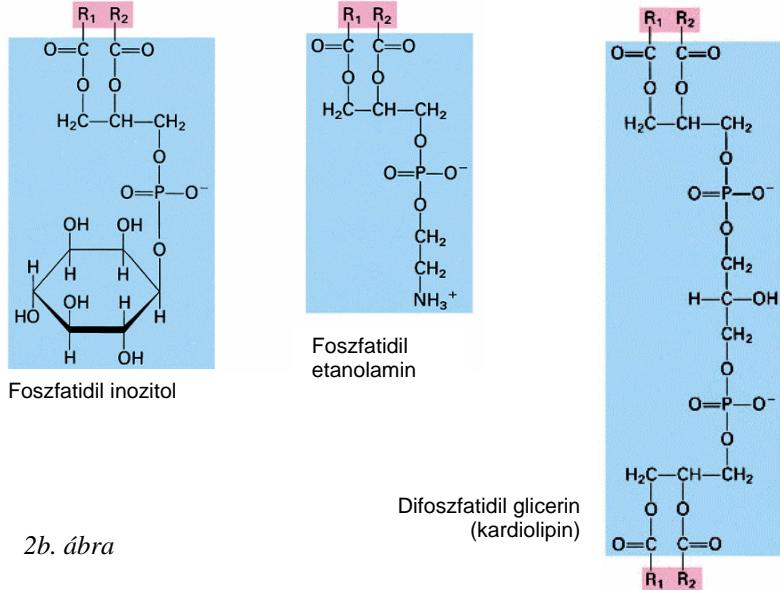
1. ábra



2a. ábra

A plazma membránok átlagos szerkezetét az 1. ábra mutatja. Jól látszik a lipid kettősréteg és a membránon áterő (integrális) fehérjék elhelyezkedése.

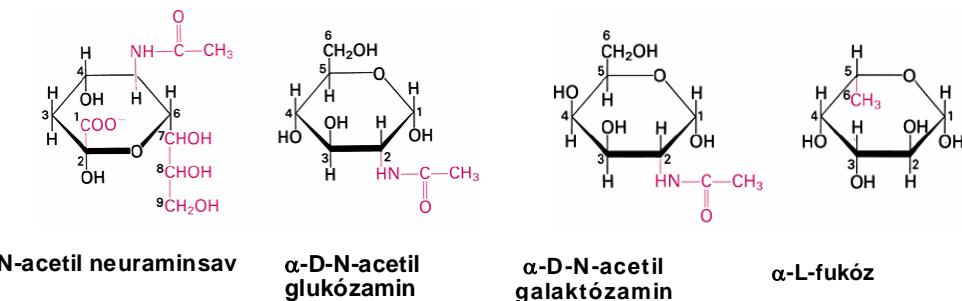
A lipid kettősréteget felépítő molekulák szerkezeti képlete elég egyszerű (2a, 2b. ábra). Az ábra az alifás szénláncokat csak jelzi (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>), amelyek a kettősréteg hidrofób belseje felé helyezkednek el.



*3. ábra*

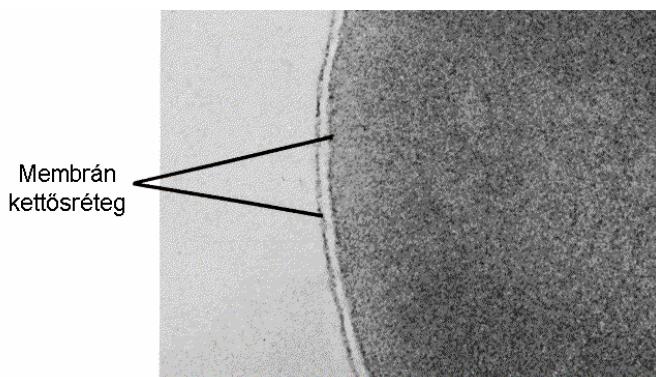
A hosszú szénláncok telített (pl. palmitinsav), vagy telítetlen (pl. oleinsav) zsírsavakból épülnek fel (*3. ábra*).

Cukrok és lipidek, ill. cukrok és proteinek kombinációjából keletkeznek a glikolipidek és a glikoproteinek, amelyek a membránoknak igen jellemző alkotórészei.



4. ábra

A membránoknak mind a citoszolikus, mind az extracelluláris oldalán találunk fehérjékhez, vagy lipidekhez kötődő specifikus cukor molekulákat (pl. N-acetylneuraminsavat, N-acetilglükózamint, stb., 4. ábra).



5. ábra

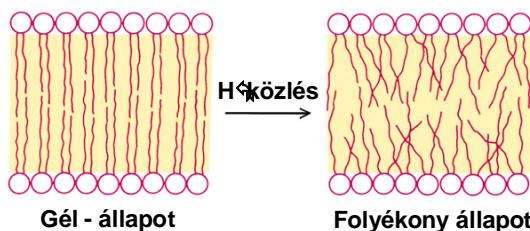
A vörösvértest membránjának elektronmikroszkópos képe (5. ábra). Az ozmium festéssel készült kép a lipid kettősréteg hidrofil részét mutatja sötétnek.

A membrán vastagsága kb. 10 nm, ami

főleg a lipid kettősréteg két egymással ellentétes oldalon lévő hidrofil részének az átlagos távolságát jelenti. Ez sejtfajtánként kissé módosulhat. A membránt a lipidekkel együtt felépítő fehérjéket nem számítva, a hidrofób réteg kb. 3 nm vastag.

A membrán szemipermeábilis, ami azt jelenti, hogy a külvilágóból a diffúzió által befelé és a sejt belséjéből kifelé haladó anyagokat csak korlátozottan engedi át, ezért nevezik féligáteresztő hártyának.

A foszfolipid réteg belsejében, a membrán síkjában, az ott oldódó anyagok képesek két- és három-dimenziós mozgás végzésére. A mozgás iránya lehet laterális (oldalirányú) vagy rotációs (forgó) mozgás. Ez a mozgékonyság függ a külső hőmérséklettől. Az emlősállatok plazma membránja 37°C-on a molekulák igen gyors mozgását engedi meg.

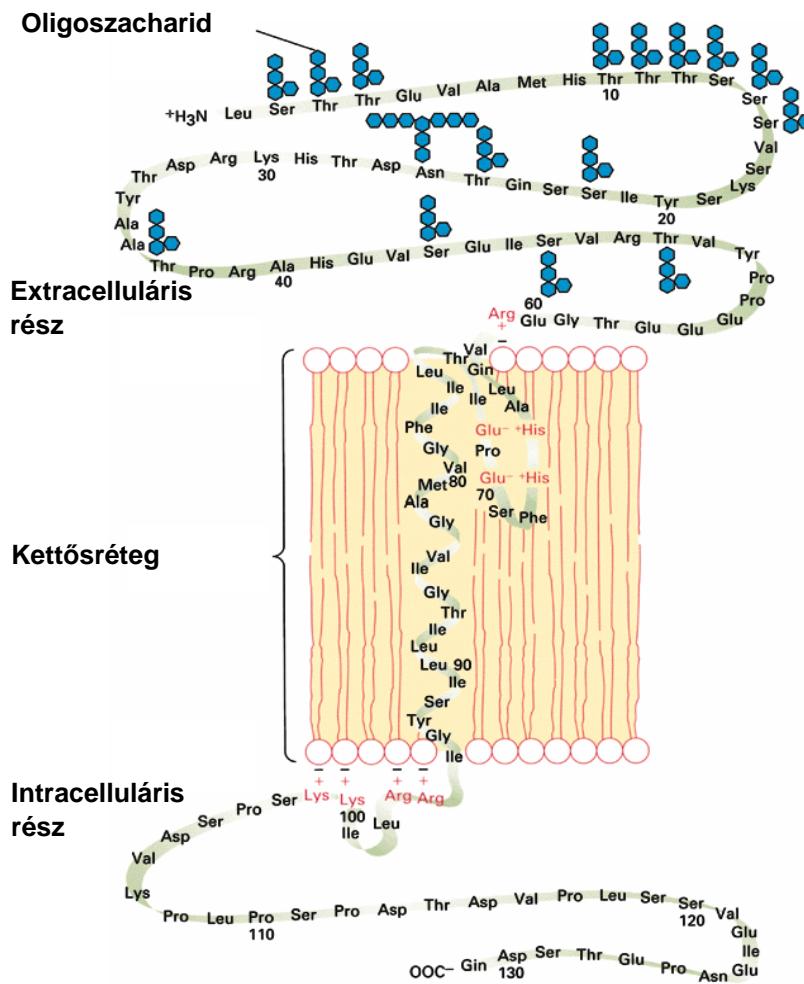


6. ábra

Alacsony hőmérsékleten ez a mozgékonyság igen nagy mértékben lecsökkenhet. Az emlősök plazma membránja 26 °C körül gél-szerű állapotba kerül, mintegy megfagy (6. ábra), amikor a mozgások igen lelassulnak. Hideg vízben élő állatok képesek membránjaik fluiditását a külső hőmérséklet változásának megfelelően növelni vagy csökkenteni. Ezzel teszik működőképessé membránjaikat különböző külső feltételek mellett.

A membrán folyékonysságának (fluiditásának) változtatása szerepet játszik a sejtek önálló mozgásában is. A fluiditás nagyrészt a membrán telített és telítetlen zsírsav molekuláinak arányától és minőségétől függ. A fluiditást pl. a koleszterin molekulák, vagy a telítetlen zsírsav molekulák oxidálása egyaránt csökkentheti. A citoszólban lévő membránok (mitokondriumok, lizoszómák, endoplazmatikus retikulum, stb. membránjai) különösen a membrán fehérjék minőségében különböznek a plazma membránuktól.

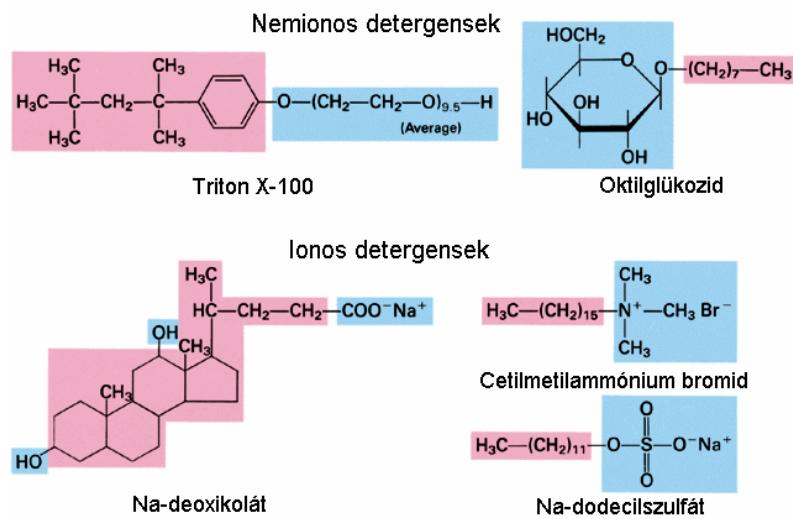
Az anyagszállítást a membránon keresztül sokszor bonyolult mechanizmusok végeznek, amelyeket összefoglalóan membrán transzportnak nevezünk. A membránon keresztül rendszerint csatornák segítik az egyes anyagok átjutását. A csatornákat fehérje molekulák építik fel amelyek átérnek a membrán egyik oldaláról a másikra. A csatornákat felépítő fehérjék képződhetnek egyetlen vagy több peptidláncból.



7. ábra

Ezek a peptidlánkok egyszer vagy többször haladhatnak át a membránon (7. ábra). A membránokon áthaladó peptid szakaszok leggyakrabban  $\alpha$ -hélix formát vesznek fel melynek felszínén főleg hidrofób aminosavak találhatók.

A membránok csatornái olyan alagutak, amelyek csak azon anyagok jelenlétében nyitnak ki, amelyek áthaladását megengedik.



8. ábra

A membrán struktúráját megváltoztatják a detergensek (ún. amfipatikus molekulák, amelyeknek egyaránt van hidrofil és hidrofób részük, 8. ábra), amelyek a lipid réteg folyamatosságát megszakítják és a membránt átjárhatóvá teszik. Ezen detergensek segítségével legetőség nyílik membránfehérjék izolálására.

## **Membránfehérjék, membránpermeabilitás, passzív és aktív anyagtranszport a membránon keresztül.**

### **A membránfehérjék általános jellemzése**

Valamennyi biológiai membrán két fő alkotó eleme, eredetétől függetlenül, a fehérje és a lipid komponens. Ezen kívül legtöbb membránban megtalálhatók még szénhidrát csoportok (oligoszacharidok) lipid vagy fehérje molekulákhoz kapcsolódva, melyek a lipid bioszintézist, ill. fehérjeszintézist követően, un. poszttranszlációs modifikációs folyamatokban (kovalens kötéssel) kerülnek ezen molekulákra. Ugyancsak fontos komponense a membránoknak a sterol vegyületek családja, melyek leggyakoribb képviselője a koleszterin. Az említett főbb komponensek (száraz súlyra számított) százalékos megoszlása (aránya) viszonylag nagy eltéréseket mutat különböző sejtípusok plazma membránjaiban, ill. a sejtekben található sejtszervecskék (organellumok) membránjaiban. Ezen eltérések többnyire a különböző membránok eltérő funkcionális szerepével hozhatók összefüggésbe.

### **1. Táblázat**

#### **Különböző biológiai membránok kémiai összetétele**

<b>Membrán</b>	<b>Fehérje (száraz súly %)</b>	<b>Lipid (száraz súly %)</b>	<b>Szénhidrát (száraz súly %)</b>
Myelin hüvely	18	79	3
Humán vörösvértest	49	43	8
Plazma membrán			
Egér májsejt			
Plazmamembrán	44	52	4
Növényi kloroplaszt	70	30	0
Membrán			
Mitokondrium			
Belső membrán	75	25	0

A funkció ellátásához nagy rugalmasságot és jó elektromos szigetelést igénylő membránokban (pl. myelin) viszonylag magas lipid/féhérje arány jellemző, a különböző eredetű plazmamembránokban ez az arány jó közelítéssel 1:1, míg az energia termelési funkciót ellátó egységek membránjaiban (pl. kloroplaszt vagy mitokondrium membránja) a fehérjék vannak túlsúlyban a lipidekhez képest (1.táblázat)

A membránfehérjék az adott membránok funkcióinak megfelelően igen nagy változatosságot mutatnak aminósav összetételüket és térszerkezetüket illetően, melynek részleteire az adott sejtípusok, ill. organellumok működésének tárgyalása során fogunk kitérni. A következőkben a membránfehérjék lipid kettősréteghez való kapcsolódásának, orientációjának ill. térszerkezetének általános vonásait és főbb kategóriáit fogjuk áttekinteni.

A membrán és az adott fehérje kölcsönhatásának típusát tekintve a membránfehérjék két szélesebb kategóriába sorolhatók. Az egyik az ún. *integrális* (vagy transzmembrán) membránfehérjék családja, melyek egy vagy több, lipid kettősrétegbe ágyazott szerkezeti egységet (szegmenst) valamint egy extracelluláris és egy intracelluláris részt (domént) is tartalmaznak. Ezen fehérjék "intramembrán" szegmensei az energetikai ill. entrópia feltételekből adódóan rendszerint külső felszínükön hidrofób csoportokat tartalmazó  $\alpha$ -helix struktúrák. Ezen fehérjék membránban való rögzítését és megfelelő orientációját az intramembrán szegmens(ek) és a lipid kettősréteg közötti fehérje-lipid kölcsönhatások (van der Waals kölcsönhatások) valamint a membránok felszínén, a töltéssel rendelkező csoportok között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatások együttesen biztosítják. (Id. előző fejezet: 7. ábra)

Ezen transzmembrán fehérjék tehát mintegy áthidalják az átlagosan 7-10 nm vastagságú lipid kettősréteget. Vannak olyan fehérjék, melyek csak egy intramembrán helikális szegmenssel rendelkeznek (pl. peptid hormon receptorok, egyes antigének vagy a glikoforin nevű vörösvértestekre jellemző membránfehérje (Id. előző fejezet 7. ábra), míg többségük, különösen a különböző transzport és ioncsatorna fehérjék, több (4,6 vagy 7) helikális szegmensből álló intramembrán régióval rendelkezik, melyek hurkokkal összekötve, többszörösen ívelik át a lipid kettősréteget.

A másik kategóriát az ún. *perifériális* membránfehérjék képviselik, melyek rendszerint egyszerűbb alegység szerkezzel (egy vagy kis számú polipeptid lánc) és kisebb mérettel rendelkeznek mint az előző kategóriába sorolható fehérjék. A perifériális membránfehérjék rendszerint a membrán külső vagy belső lipid rétegéhez vannak "rögzítve", különböző módon. Vagy integrális membránfehérjékhez kapcsolódnak (fehérje-fehérje kölcsönhatással) vagy a lipid réteghez közvetlenül, a fehérjén levő zsírsav csoport (leggyakrabban mirisztoil vagy farnezil csoportok) vagy esetenként glikozil-

foszfatidil-inozitol (GPI) nevű glikolipid közvetítésével. Periferális membránfehérjének tekinhetők pl. a sejtek belső vázrendszerének (a citoskeletonnak) főbb komponensei, a spektrin vagy az aktin fehérjék, valamint a protein kináz C nevű enzim (ld. később mint kulcs-enzim a jelátviteli folyamatok során) amely "kétarcú" fehérjeként ismert: inaktív formája a citoszólban, míg aktivált formája főként membránhoz kötve található meg. Egyéb periferális fehérjék, mint pl. az extracelluláris mátrix fehérjéi a plazma membrán külső (exofaciális) lipid rétegéhez kötve fejtik ki funkciójukat. A periferális fehérjék egyik jellegzetes csoportját képviselik az un. GTP-kötő fehérjék is, melyek általában a plazmamembrán belső, citoplazmatikus felszínéhez kötődnek, 3 alegységből ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) álló heterotrimereket képeznek és fontos szerepet játszanak a receptor fehérjéken keresztül lezajló jelátviteli folyamatokban, mint jel-átalakító/átvivő fehérjék.

Mindkét kategóriába eső membránfehérjék a lipid kettősréteghez képest nagyfokú szerkezeti asszimmetriát mutatnak, azaz megfelelő kötőhelyei specifikusan orientáltak vagy az extra- vagy az intracelluláris oldal felé. Ezt az orientációt már az aminósav szekvencia és a másodlagos szerkezet ismeretében meg lehet jósolni. Az asszimetria egy másik mutatója az, hogy a glikozilált membránfehérjék szénhidrát csoportjai mindenkor az extracelluláris oldal felé orientálódnak.

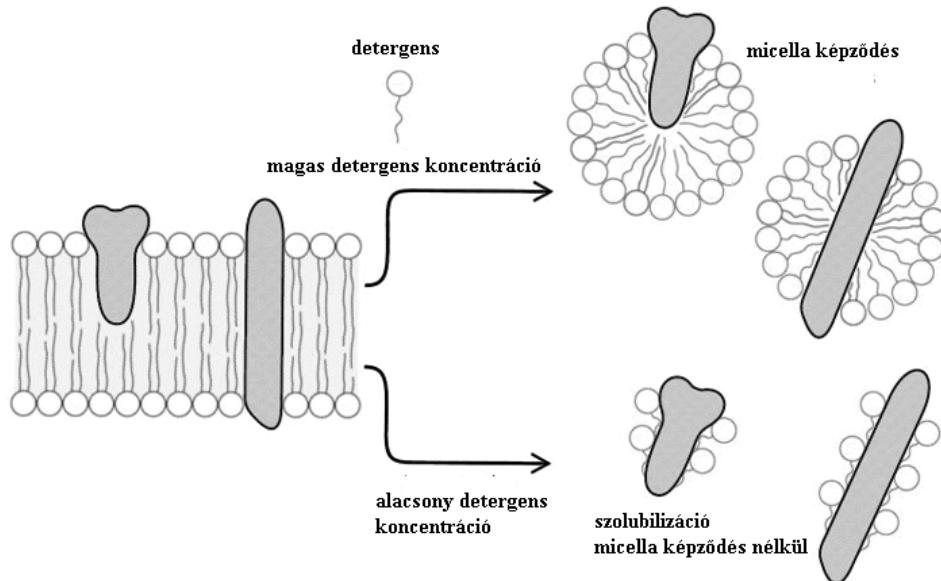
#### *A membránfehérjék azonosítása, a szerkezet és funkció vizsgálati lehetőségei.*

A különböző integrális és periferális membránfehérjék igen változatos funkciókat képesek ellátni, melyek leggyakrabban a sejt és környezete között lezajló szelektív anyag és információ csere folyamataiban valamint a sejteknek a környezetükben levő sejtekhez történő kapcsolódásában (sejtdhézió) és a közöttük fellépő kommunikációban játszanak fontos szerepet.

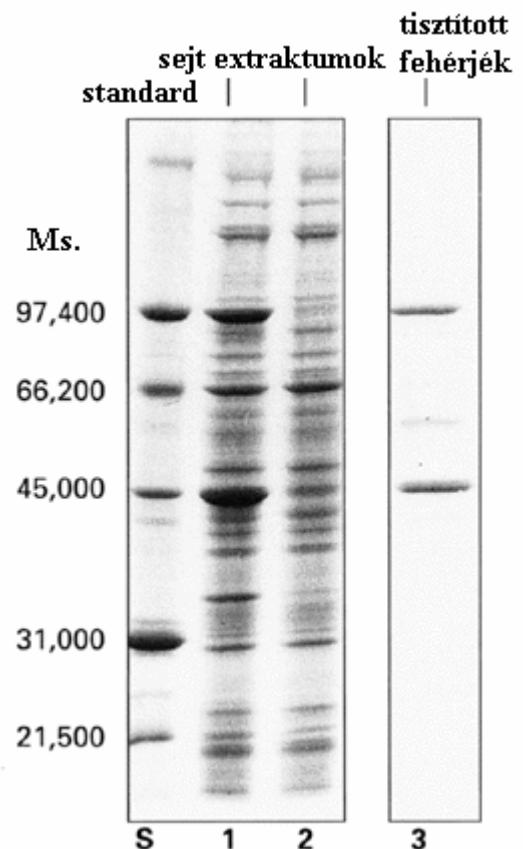
Így a membránfehérjék betölthetnek *transzportáló* funkciót (pl. glükóz transzporter, ioncsatornák, aktív ionpumpák, ld. később), *receptor* funkciót (az extracelluláris tér felől érkező "jeladó" molekulák, ún. *ligandok*: pl. hormonok, vírusfehérje-peptidek, neurotransmitter anyagok, stb. specifikus felismerésével és megkötésével), *antigén* funkciót (az immunválaszban résztvevő sejtek felszínén: pl. A,B és O vércsoport antigének vörösvértesteken) vagy *energia és töltésszállító* valamint *enzimatikus* funkciókat (pl. a sejtek energiatermelésében érintett mitokondrium vagy kloroplaszt membránokban).

A különböző membránfehérjék azonosítása élő, intakt sejtekben is elvégezhető. Vagy radioaktív, ill. fluoreszcensen jelzett specifikus ligandok vagy esetenként a fehérje molekulák ellen termeltetett monoklonális (specifikus) ellenanyag (antitest) segítségével az adott fehérje jelenléte, mennyisége, ill. orientációja kimutatható. A membránfehérjék

szerkezetének, méretének és egyéb funkcionális tulajdonságainak vizsgálatához azonban a fehérje membránból történő izolálása és tisztítása szükséges, csakúgy mint a sejtekben megtalálható vízoldható fehérjék esetén. Lényeges különbség azonban, hogy a membránfehérjék, különösen az integrális membránfehérjék, izolálása nem egyszerű feladat. Ennek oka az, hogy ezen fehérjék, ha közvetlen lipid környezetükben "kiszakítjuk" őket, egy hidrofób külső felszínnel rendelkeznek, minek következtében erős hajlamot mutatnak aggregációra, ill. vizes közegben kicsapódnak. Mindezen folyamatok során elveszítik eredeti natív térszerkezetüket, konformációjukat, így azok vizsgálata lehetetlenné válik a fehérjeszerkezet tanulmányozására alkalmas spektroszkópiás (abszorpció, fluoreszcencia, NMR, ESR, CD) ill. a röntgen-diffrakció alapuló krisztallográfiás módszerekkel. A membránfehérjék "oldhatóvá" tételeire (szolubilizására) alkalmasak azok az amfipatikus (részben hidrofil, részben hidrofób) molekulák, melyeket detergensnek nevezünk. Az ionos (pl.SDS) vagy nem-ionos detergensek (pl. oktil-glikozid, TRITON-X-100) segítségével, megfelő körülmények között az integrális membránfehérjék szerkezetük lényeges torzulása nélkül oldatba vihetők (ld. 1 ábra). Ebben a formában a vizsgált fehérjék alegységeinek mérete, molekulatömege és alakja meghatározható gélelektronforézis (2. ábra) vagy szedimentációs technikák segítségével. A szolubilizált, tisztított fehérjék funkcionális vizsgálatok céljára "beépíthetők" (rekonstituálhatók) mesterséges vagy természetes foszfolipidekből készített lipid vezikulákba (liposzómákba), melyek így csak a vizsgált fehérjét tartalmazzák.

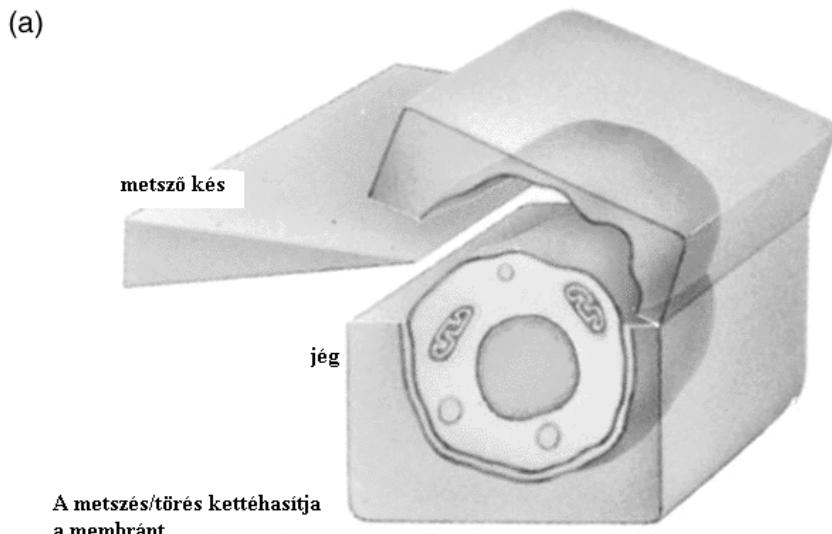


**1. ábra Membránfehérjék izolálása detergenssel**



**2. ábra** Membránfehérjék analízise SDS gélelektroforézissel

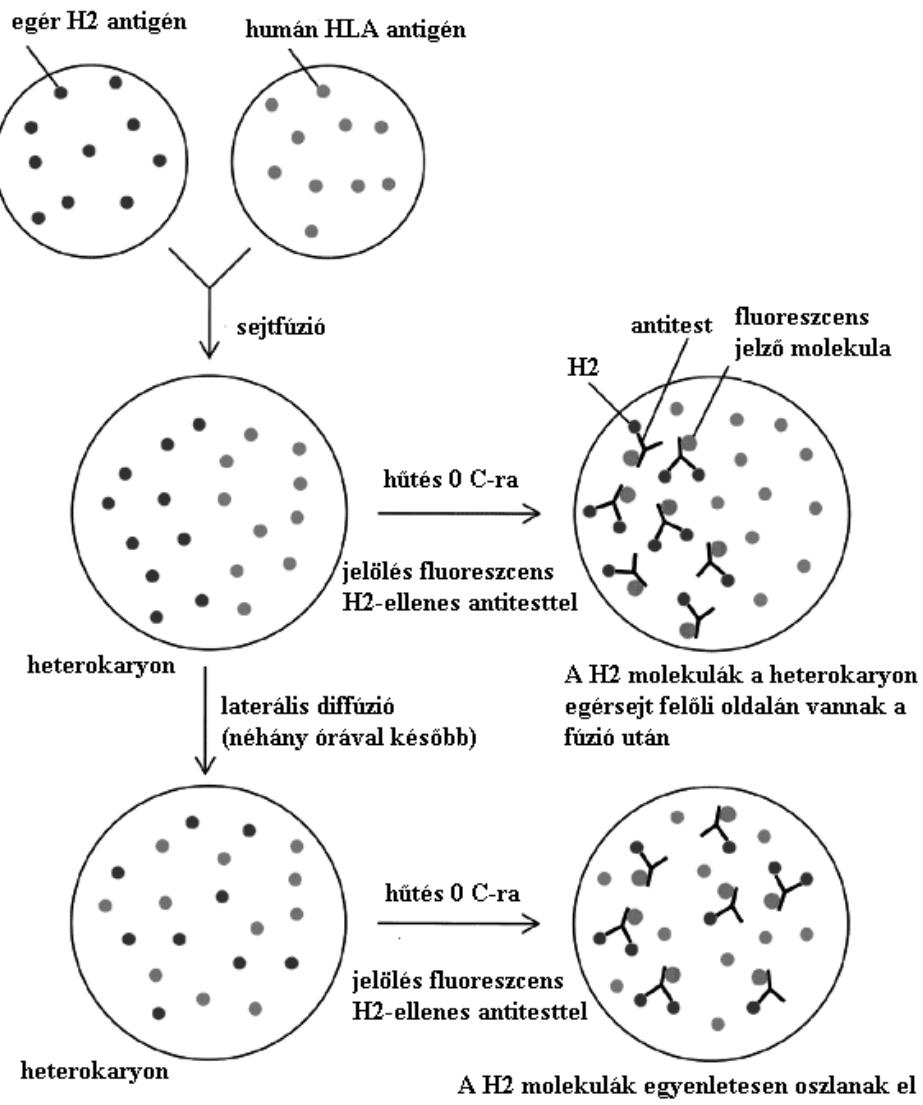
A membránfelszín morfológiája, a membránfehérjék membránban való eloszlása jól vizsgálható a nagyfelbontású elektronmikroszkópia segítségével is, az ún. "fagyaszta törés" technika alkalmazásával. Itt gyors mélyhűtést követően a membrán exofaciális (extracelluláris oldali) és citofaciális (citoplazma felőli) lipid rétege elválasztható egymástól egy speciális törési/metszési eljárással, melynek következtében a külső E (exoplazmatikus) felszín és a törési P (protoplazmatikus) felszín külön-külön tanulmányozható (ld. 3. ábra).



**3. ábra** A fagyaszta-törés technikája elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

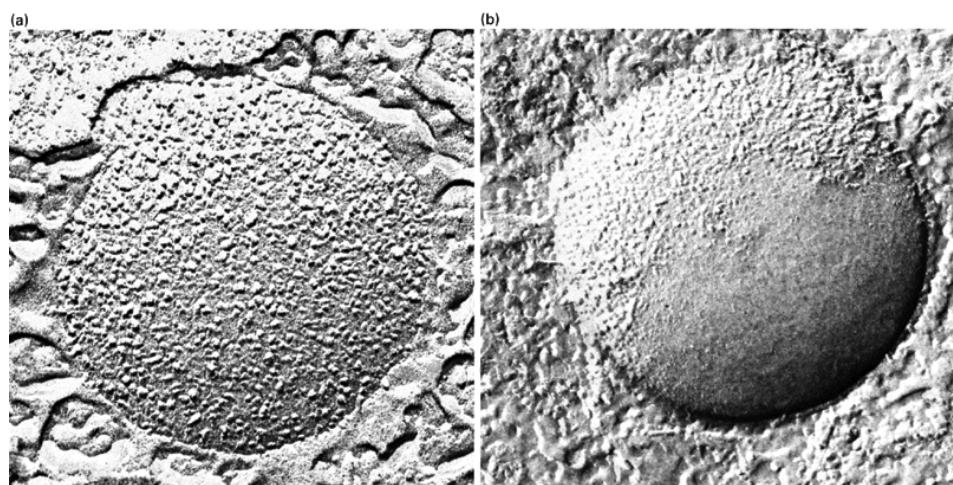
*A membránfehérjék laterális mobilitása, a "folyékony-mozaik" membrán-modell.*

Számos kísérletes megfigyelés utal arra, hogy a membránfehérjék, többek között az integrális membránfehérjék is, viszonylag szabadon diffundálnak a lipid kettős rétegen (laterális diffúzió). A legkorábbi bizonyíték 1970-ből, Frye és Edidin sejtfúziós kísérletéből származik, ahol egér és humán limfocita sejteket fuzionáltattak vírussal és az így létrejött heterokaryonban vizsgálták az egér és emberi hisztokompatibilitási antigén fehérjék (MHC) sejtfelszíni eloszlását, zölden illetve pirosan fluoreszkáló antitestekkel történő jelölés után, fluoreszcens mikroszkópia segítségével. A fúziót követően erősen polarizált egér és humán MHC-molekula eloszlást figyeltek meg a heterokaryon két oldalán, mely néhány óra elteltével diffúz eloszlásba ment át (4. ábra), bizonyítva ezzel az antigén fehérjék laterális diffúzióját.



4. ábra A Frye-Edidin féle sejtfúziós kísérlet

A “folyékony” membrán egy másik bizonyítéka egy elektronmikroszkópos megfigyelésből származik, mikor a gyors fagyasztva-törés technikáját alkalmazva, mitokondrium belső membránokban a fehérje részecskék eloszlását vizsgálták. Az 5a. ábrán egy viszonylag homogén fehérje-eloszlás figyelhető meg. A membrán vezikulákat egy erős elektromos tér hatásának kitéve, majd egy ultragyors fagyasztva-törést alkalmazva a fehérjék jelentős átrendeződését lehetett megfigyelni (5b.ábra), amely visszarendeződött az eredeti állapotba az elektromos tér megszüntetését követően. Ez is bizonyítja a fehérjék laterális diffúzióját, és maga a jelenség feltehetően fellép az ingerületátvitel folyamata során pl. idegejtek membránjában, mint ahogy hasonló elektronmikroszkópiás felvételek azóta ezt igazolták is.

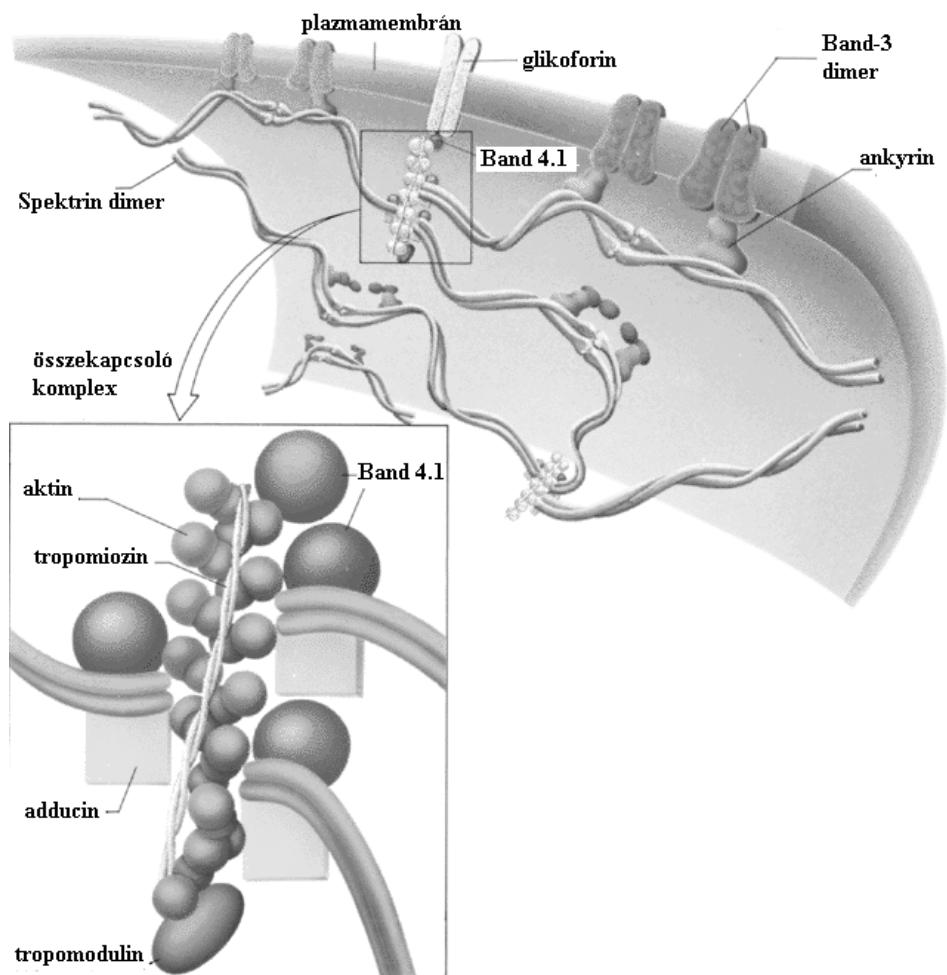


**5. ábra** A belső mitokondriális membrán fagyasztva-tört P felszínének elektronmikroszkópos képe. A.) fehérjeeloszlás a natív membránban, B.) fehérjeeloszlás elektromos erőtérnek kitett minta membránjában

A membránfehérjék és lipidek laterális mobilitását közvetlenül is nyomon követhetjük a FRAP (“fluoreszcencia visszatérés fotohalványítást követően”) technika, valamint az utóbbi években kifejesztett "SPT" (Single Particle Tracking = részecske nyomvonai követés) videomikroszkópiás módszer segítségével, ahol a sejtfelszínen a fluoreszcensen vagy kolloid aranygömbbel megjelölt fehérjék mozgásának nyomvonálat nagyfelbontású és gyors videokamera segítségével rögzíteni tudjuk. A mozgási nyomvonalak statisztikai analízisével megállapítható az is, hogy a kérdéses fehérje szabad

kétdimenziós laterális diffúziót végez vagy aktív metabolikus folyamatok segítségével "irányított mozgást" végez a sejtmembránban, vagy csak különböző mechanizmusok által gátolt, "korlátozott" diffúzióra képes a membránban. A membránfehérjék laterális mobilitását számos tényező gátolhatja. Ilyenek pl. a membránban lokálisan megemelkedett mikroviszkozitás, a kérdéses fehérje szoros asszociációja más fehérjékkel, vagy jelentős mértékű önasszociációja (aggregációja). Ugyancsak a laterális mobilitás korlátozásához vezethet a kérdéses membránfehérje szoros asszociációja a sejt citoszkeletális hálózatával (ld. pl. "Band 3" anion-transzport fehérje a vörös vértestek plazmamembránjában, 6. ábra), vagy a fehérje kapcsolódása az extracelluláris mátrix elemeihez. Megjegyzendő, hogy a vörösvértestek sajátságos ("farsangi fánk"-szerű) alakjának kialakulásában a plazmamembrán-citoszkeleton kölcsönhatásnak fontos szerepe van (a belső vázrendszer mintegy "behúzza" a membránfelszínt a sejt középpontja felé). Egyes genetikai betegségek hátterében, mint pl. a "spherocytózis", amely a vörösvértestek alakjának gömbszerű elváltozásában nyilvánul meg, pl. a citoszkeletális mátrix egyik fő komponensének, a spektrin fehérjének pontmutációja (egyetlen aminosav cseréje) áll, mely meggátolja a spektrin fehérjeháló kialakulásához szükséges spektrin-dimerek összekapcsolódását a monomer fehérjékből.

A biológiai membránok szerkezetéről kialakult és jelenleg elfogadott modell a Singer és Nicolson által 1971-ben leírt "folyékony-mozaik" membrán koncepción (előző fejezet, 1. ábra) alapul. Az utóbbi évek megfigyelései alapján ez annyi korrekcióra szorul, hogy a membránokban a fehérjék, noha jelentős mozgási szabadsággal rendelkeznek, nem teljesen véletlenszerűen helyezkednek el, illetve mozognak, hanem a membránban váltakozó folyékony lipid domének és az azokat összekötő gél állapotú lipid fázis határa valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatások révén mozgásuk korlátozott. Azaz a fehérjék és lipid molekulák a membrán felszínén szubmikronos méretű "funkcionális doménekbe" (mintázatokba) rendeződnek.

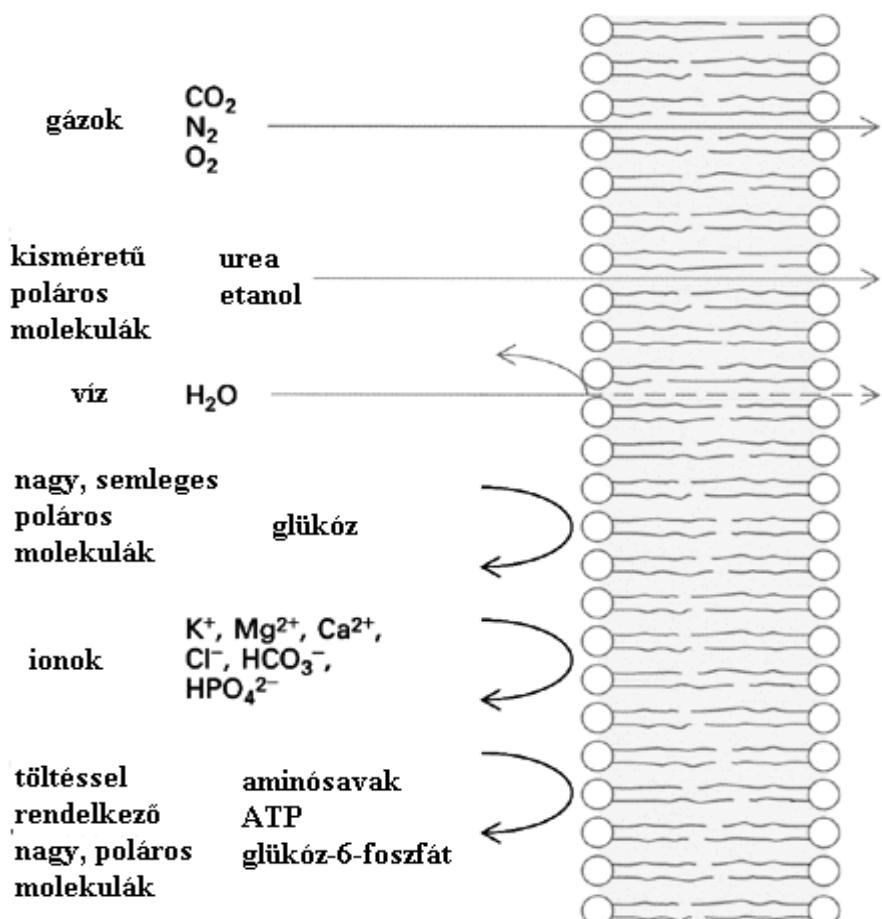


6. ábra A vörösvértest membránfehérjéinek (glikoforin, Band 3) "kihorgonyzása" a citoszkeletális fehérjeháló által. A spektrin-háló és a kapcsoló fehérje komplexek részletei ugyancsak láthatók.

## Anyagtranszport a sejtmembránon keresztül

### Molekuláris diffúzió a lipid kettősrétegen keresztül

Az élő sejtek számára a plazmamembrán lipid kettősrétege biztosítja a külvilággyal folytatott szelektív anyagcserét, izoláló szerepe révén, melyben a különböző membránfehérjék is aktívan közreműködnek specifikus transzport mechanizmusok útján. A lipid kettősréteg permeábilis (átjárható) kis méretű gáz, poláros és hidrofób molekulák számára, kis mértékben a vízmolekulák számára, míg gyakorlatilag nem permeábilis a nagyobb méretű poláros és töltéssel rendelkező molekulák, valamint ionok számára (7. ábra).



7. ábra A lipid kettősréteg permeabilitása különböző anyagokra nézve.

Az ún. passzív (szabad) diffúzió során a membrán két oldala között fennálló koncentráció gradiens hatására egy nettó anyagáram figyelhető meg, melynek sebessége a koncentráció gradiens nagyságától és a diffundáló molekula hidrofóbicitásától függ. A hidrofóbicitás jellemzésére az ún. megoszlási hányadost használhatjuk ( $K_p$ ) mely megadható a molekula lipid fázisban ill. vizes közegben mérhető egyensúlyi koncentrációinak hányadosaként.  $K_p = C^L / C^V$ . Az urea ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) esetén pl.  $K_p: 2 \times 10^{-4}$ , míg az erősebben hidrofób dietil-urea esetén  $K_p: 1 \times 10^{-2}$ , amely azt eredményezi, hogy a dietilurea kb.  $50 \times$  gyorsabban diffundál át a membránon. A passzív diffúzió kvantitatívabb jellemzésére szolgál Fick diffúziós elmélete, melynek értelmében a membránon keresztsüli diffúzió (anyagfluxus) sebességét a következő formában adhatjuk meg:

$$\frac{dn}{dt} = P A (C_{1v} - C_{2v})$$

ahol  $\frac{dn}{dt}$  az időegység alatt átáramló mólok száma,  $A$  a membrán felülete,  $C_{1v}$ , ill.  $C_{2v}$  az anyag koncentrációja a membrán két átellenes oldalán elhelyezkedő vizes fázisokban. A  $P$  permeabilitási állandó pedig függ a molekula hidrofóbicitásától ( $K_p$ ), diffúziós állandójától ( $D$ ), ill. a membrán vastagságától ( $x$ ):

$$P = K_p D / x$$

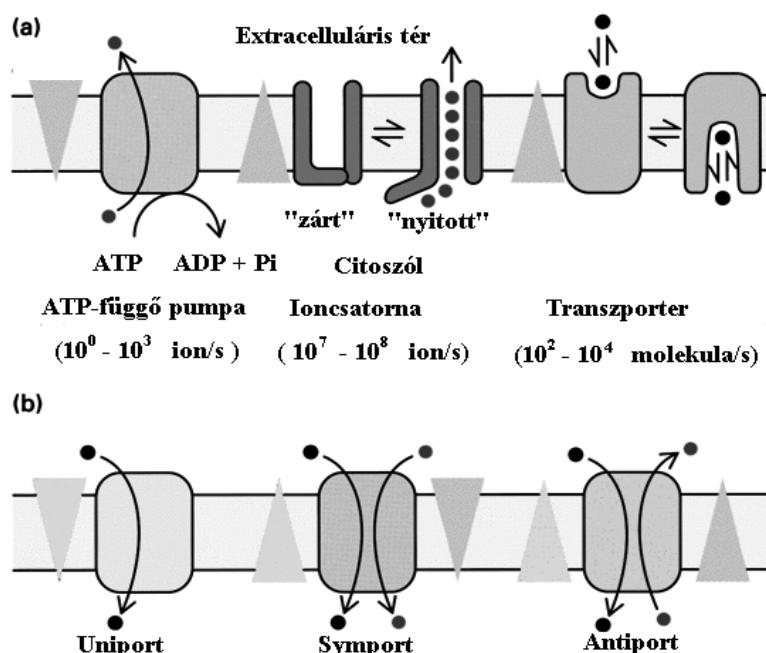
Az előzőekből jól látható, hogy - mivel a membrán vastagsága, ill. a közel azonos méretű molekulák diffúziós állandója is azonos - a különböző passzívan diffundáló molekulák transzportjának sebességét elsősorban hidrofóbicitásuk szabja meg. Számos gázmolekula, a víz, ill. a terápiában alkalmazott nagyobb hidrofóbicitású gyógyszerek transzportja is passzív diffúzióval valósul meg a target sejtek membránján keresztül. Természetesen ezen törvényszerűségek nem érvényesek töltéssel rendelkező molekulákra, hiszen ezek permeabilitását nemcsak a koncentráció gradiens, hanem a membrán két oldala között fennálló elektromos potenciál gradiens is megszabja.

### **A membrán-transzport fehérjék főbb típusai**

A membránon keresztsüli transzportban résztvevő fehérjéket működési mechanizmusuk alapján három főbb kategóriába sorolhatjuk: 1.) *Aktív pumpa fehérjék*, melyek ATP hidrolíziséből származó energia révén képesen molekulákat, ionokat koncentráció gradiensükkel ellenkező irányba is transzportálni, 2.) *Csatorna-fehérjék*, melyek sztérikusan megfelelő térszerkezetük (konformációjuk) révén képesek pl. a víz, vagy egyéb ionok membránon keresztsüli transzportját elősegíteni. Ezen csatornafehérjék túlnyomó része (egy-két kivétellel: ld. ioncsornák) a sejtek nyugalmi állapotában zárva

van, és a sejtet érő stimulus (inger) hatására nyílnak ki. 3.) *Transzporter fehérjék*, melyek egyidejűleg csak egy (vagy nagyon kevés) ion vagy molekula megkötésére alkalmasak, a kötődés hatására konformációjukat megváltoztatva kizárólagosan a megkötött anyagot juttatják át a membrán másik oldalára a koncentráció gradiens irányában. Tekintettel arra, hogy itt minden egyes molekula átjutása egy konformációváltozást is igényel, így ezen fehérjék transzport sebessége jóval alacsonyabb, mint pl. az ioncsatorna fehérjéké (8a. ábra).

Az anyagtranszport irányítottságát illetően ugyancsak három alapvető kategóriába sorolhatók a transzport fehérjék: 1.) *Uniport fehérjék*, melyek egy molekulát, egy irányba (a koncentráció gradiens irányába) transzportálnak 2.) *Sympart fehérjék*, melyek egyidejűleg két molekula vagy ionfélleség transzportját végezik azonos irányba.



8. ábra A membrán-transzport fehérjék típusai.

Ezen csatolt anyagtranszport esetén az egyik anyag koncentrációgradiensének irányába, míg a másik azzal ellentétes irányba transzportálódik. 3.) *Antipart fehérjék*, melyek két molekula vagy ion egyidejű transzportját végezik ellentétes irányban. Itt szintén az egyik molekula (ion) transzportja a gradiens irányában, míg a másiké azzal ellentétes irányban zajlik. Ezen tulajdonságok miatt szokás az utóbbi két kategóriát aktív transzportnak is említeni, azonban itt, a pumpa fehérjékkel szemben, a transzport nem kapcsolt ATP-

hidrolízishez. Ugyanakkor az utóbbi két transzport fehérje közös jellemzője, hogy "kotranszportot" végeznek (8b. ábra).

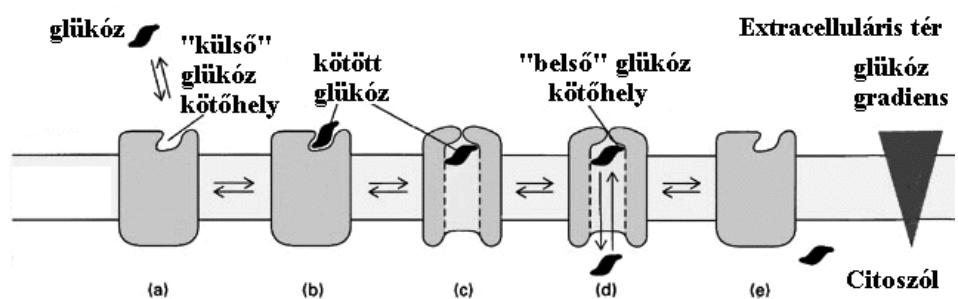
### Az uniport transzport mechanizmusa és főbb jellegzetességei

Az élő sejtek membránján keresztül nagyon kevés molekula jut át a transzport fehérjék segítsége nélkül. Az uniport transzport fehérjék mintegy katalizátorokként foghatók fel, melyek az egyébként termodynamikailag "megengedett" irányba zajló transzport folyamatot felgyorsítják. Ezt a folyamatot "facilitált" diffúzióknak is szokás nevezni. Az uniport mechanizmus főbb jellegzetességei a következők:

- 1.) A folyamat sebessége sokkal magasabb, mint amit a Fick féle, passzív diffúzióra vonatkozó törvények alapján várhatnánk.
- 2.) Az uniport transzport nagyon specifikus, azaz egy adott molekula-féleség (esetleg egy szűk, szerkezetileg rokon molekula csoport) transzportjára képes
- 3.) A foszfolipid kettősrétegen keresztlüli diffúzióhoz viszonyítva itt a transzport egy korlátozott számú fehérjén keresztlü valósul meg, így a transzport sebesség maximumot, "telítési értéket" mutat a koncentráció gradiens növelésekor.

Az uniport egyik jellegzetes példája az eritrociták (vörösvértestek) glükóz felvétele. A glükóz transzporter fehérje az egyik legrészletesebben tanulmányozott és ismert transzport fehérje. A fehérje két konformációs állapot között "billeg", az egyikben egy külső (extracelluláris) glükóz kötőhellyel rendelkezik, míg a másikban ez a kötőhely nem hozzáférhető, ugyanakkor egy belső (citoszól felé mutató) kötőhely alakul ki, mely lehetővé teszi a megköött glükóz molekula leadását a citoszólba (9. ábra). Meg kell jegyezni, hogy ez a transzport ellenkező irányban is működhet. A sebesség-meghatározó lépés a "befelé mutató" kötőhely átalakulása "külső kötőhellyé".

Az ábrán bemutatott glükóz transzporter fehérje nagy specificitást mutat D-glükózra (a többi szénhidrát molekulát, mint pl. mannóz, galaktóz, lényegesen kisebb affinitással köti). A fehérje szerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy a glükóz transzporter (Ms: 45.000), amely az erithrociták membránfehérjéinek mintegy 2 %-át képezi, 12 membránt áthidaló hélix együtteséből áll. A "külső" és "belő" glükóz kötőhelyek kialakításában elsősorban szerin, threonin, aszparagin és glutamin aminosavak csoportjai vesznek részt, melyek képesek a glükóz molekula hidroxil csoportjaival hidrogén-híd kötések kialakítására.



**9. ábra A glükóz-transzportáló uniport fehérje működése.**

Miután a glükóz bejutott az eritrociták belsejébe, a glükóz metabolizmus első lépéseként foszforilálódik és glükóz-6-foszfáttá alakul, így a glükóz felvételével követően gyakorlatilag nem növekszik az intracelluláris szabad glükóz koncentráció. Másrészt, így a membrán két oldala közötti glükóz koncentráció gradiens viszonylag állandó értéket mutat, csakúgy mint a glükóz felvétel sebessége, ami a sejtek glükóz-háztartásának egyensúlya szempontjából igen fontos.

#### Aktív iontranszport és ATP hidrolízis

Az ATP hidrolízise által "hajtott" ion pumpa mechanizmusok számos példáját sikerült megismerni az utóbbi évtizedek során. Így pl. a  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionok aktív (gradienssel ellentétes irányú) transzportját végző fehérjék fontos szerepet játszanak a sejtek membránpotenciáljának fenntartásában. Ugyanakkor a sejtmembránon keresztüli, és a sejtek működéséhez elengedhetetlen, igen nagy  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens fenntartásában is fontos szerepet játszanak az ATP-hidrolízishez kapcsolt ionpumpák. Az aktív ionpumpák létezésének első kísérletes bizonyítéka egy korábbi megfigyelésből származtak, miszerint a sejtek aerób körülmények közötti ATP-termelését bizonyos sejmérgekkel (pl. dinitrofenol) gátolni lehetett. Ennek az volt a következménye, hogy a sejtek belső és külső ionkoncentráció fokozatosan kiegyenlítődtek, mely a sejtek elhalásához vezetett. A sejthalál oka pedig az volt, hogy egyrészt lecsökkent a makromolekulák szintéziséhez nélkülözhetetlen magas intracelluláris  $\text{K}^+$  koncentráció, másrészről jelentősen lecsökkent a membránpon keresztüli  $\text{Na}^+$  koncentráció gradiens, melynek hiányában a sejtek képtelenek voltak felvenni az életműködésükhez szükséges tápanyagokat, mint pl. aminosavak. (Ez utóbbi molekulák felvétele a  $\text{Na}^+$ -al együtt kotranszport formájában valósul meg, ld. később.)

A sejtek belső energiatartalékának jelentős hárnya használódik el az előzőekben említett iongradiensek fenntartására, azaz az aktív ionpumpák működtetésére. Míg pl. ideg- vagy vese-sejtekben a megtermelt ATP mintegy 25%-a hasznosul az aktív iontranszportban, addig az erythrocytákban kb. 50%-a. Így a sejtanyagcsere kutatások egyik fontos kérdésévé vált, hogy hogyan hasznosítják ezen pumpafehéjék az ATP-hidrolízis energiáját az ion transzport folyamatok során.

Az aktív ionpumpák főbb képviselői a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{H}^+$ -pumpa fehéjék, melyek közös vonása, hogy valamennyien ATPáz típusú enzimmolekulák, míg a különbség ion-kötőhelyeikben, ill. a membránt többszörösen átvélő helikális szegmenseik számában és térbeli elrendezésében figyelhető meg.

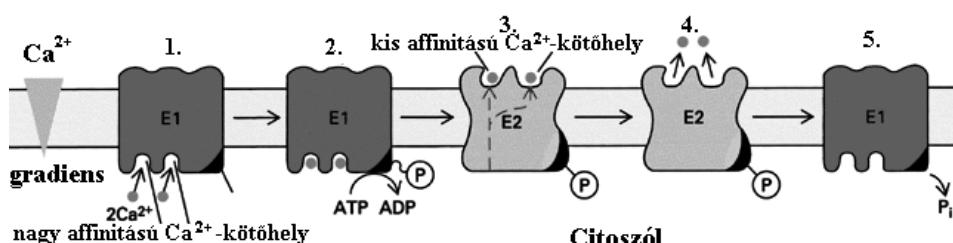
#### **A $\text{Ca}^{2+}$ -pumpa fehéjék működési mechanizmusa, a plazma membrán és izom (SR) kalcium pumpák funkcionális jellegzetességei**

Az aktív ionpumpák egyik jellegzetes típusát a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz enzimfehéjék képviselik, melyek fontos szerepet játszanak a citoszól rendkívül alacsony szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$ -jának (kb.  $1-2 \times 10^{-7}$  M) fenntartásában. A plazmamembrán kalcium-pumpa a sejt belsejéből pumpálja a kalcium ionokat a jelentős koncentráció gradiens (külső oldalon kb. 1-2 mM a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció) ellenében. Az izomsejtek egy másik fajta  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz fehéjét is tartalmaznak szarkoplazmatikus retikulumuk membránjában. Ez az ionpumpa kalcium ionokat pumpál a citoszól felől a szarkoplazmatikus retikulum (SR) belsejébe, amely az izomsejtek belső kalcium-raktáraként is tekinthető. Az izomsejtekben az SR membránon keresztsüli kalcium ion transzportnak nagy jelentősége van az izom-összehúzódás és elernyedés (relaxáció) folyamataiban. A  $\text{Ca}^{2+}$  ionok kiengedése az SR-ból a citoszólba mintegy megindítja az izom-összehúzódás (kontrakció) folyamatát, míg a pumpa, mely ezt követően aktiválódva visszapumpálja a  $\text{Ca}^{2+}$  ionokat az SR belsejébe, a relaxáció folyamatát segíti elő.

A plazmamembrán kalcium-pumpák elsődleges szerepe a sejtaktiváció, ingerlés következtében átmenetileg megemelkedett intracelluláris szabad kalcium ion szint visszaállítása az eredeti alacsony értékre. A plazmamembrán kalcium-pumpák rendszerint egy speciális fehérje molekulához, az un. *kalmodulinhoz* való kötődést igénylik hatékony működésükhez. A megemelkedett kalcium-szint miatt kalcium ionok kötődnek a kalmodulinhoz, mely így nagy affinitással képes a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz-hoz kötődni és azt aktiválni.

Az SR membrán  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz fehéjéi, szemben a plazma membrán kalcium pumpával, nem igényelnek kalmodulin-kötést működésükhez. Az SR kalcium pumpa egy ATP és egy alacsony valamint egy magas affinitású  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhellyel rendelkezik, és egy többlépéses, konformációt változás ( $E1 \Rightarrow E2$ ) által hajtott folyamatban juttatja át a kalcium

ionokat a citoszólból az SR belsejébe (10. ábra). Az ábrán bemutatott ATP kötés és az azt követő fehérjefoszforiláció valamennyi P típusú ATPáz (pl. emlős Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> vagy H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpák) közös jellemzője, így a bemutatott iontranszport mechanizmus jó közelítéssel valamennyi ilyen ionpumpára érvényes. Az egyes ionpumpák α fehérje alegységei hasonló molekulásúllyal és nagyon konzervatív (sok részletben azonos) aminosavszekvenciával rendelkeznek, ami arra enged következtetni, hogy ezen fehérjék evolúciója egy közös "ösből" (prekurzorból) történt, és az evolúció során fejlődtek ki a specifikus ionkötőhelyek.

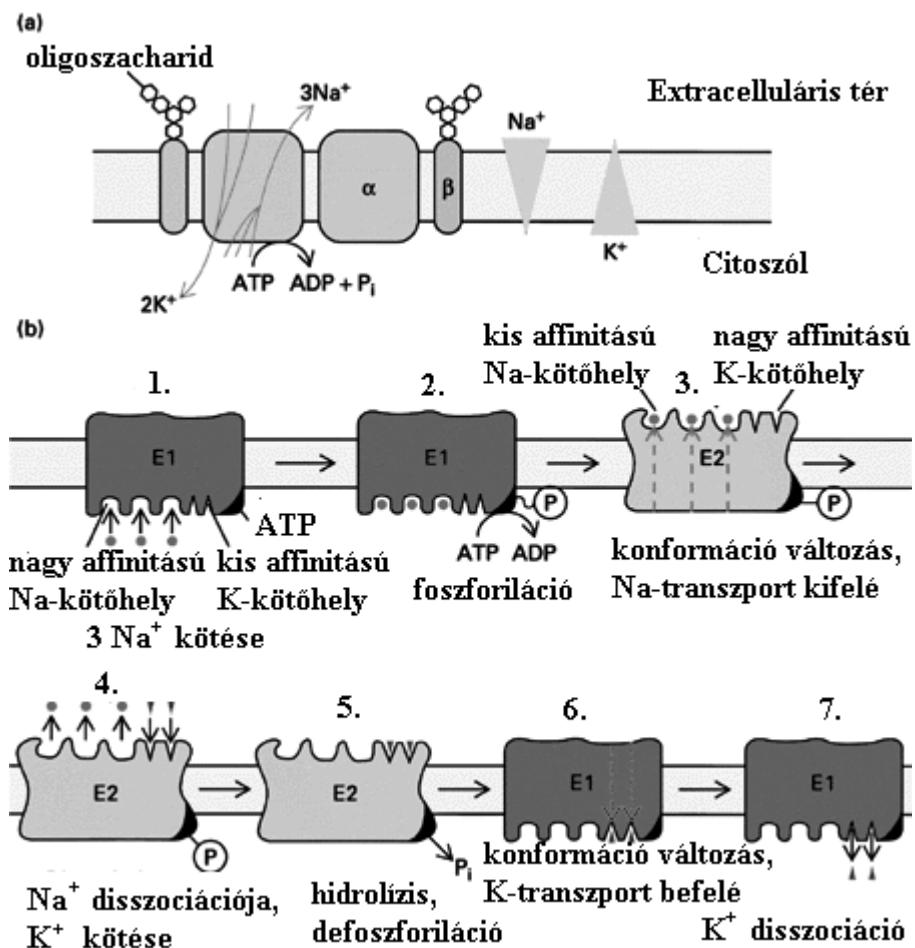


**10. ábra Az izomsejtből található kalcium-pumpa működésének modellje.**

#### A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáz pumpafehérjék működése és funkcionális jelentősége

A sejtek plazmamembrán potenciáljának (Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup>-gradienseinek) fenntartásában játszik kulcsszerepet a P típusú, ATP-hidrolízishez kötött ionpumpa fehérjék egy másik jellegzetes képviselője a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáz. Ez a pumpa egy tetramer fehérje, mely 2 α és 2 β alegységből épül fel (11a. ábra). Az α alegységeken keresztül zajlik az iontranszport, míg a β glikoprotein alegységek a fehérje megfelelő konformációjának és flexibilitásának kialakításában játszanak szerepet. Az ionpumpálás mechanizmusa nagyon sok hasonlóságot mutat a kalcium-pumpához (11b. ábra).

Az E1 konformációban levő fehérje citoplazmatikus doménje nagy affinitású Na<sup>+</sup>-kötő helyeket tartalmaz (3 db) melyek gyakorlatilag állandóan töltve vannak Na<sup>+</sup>-ionnal (a maximális transzport-sebesség felének eléréséhez szükséges Na<sup>+</sup>-koncentráció ( $K_m$ ): kb. 0.6 mM, mely jóval alacsonyabb mint az emlős sejtek többségében megfigyelhető intracelluláris [Na<sup>+</sup>]: kb. 10-12 mM). Az ATP megkötése után a fehérje egy intracelluláris szegmense foszforilálódik és kialakul egy nagy energiájú E1-P intermedier (2. lépés). Ezt egy jelentős konformáció változás (E1-P → E2P) követi (3. lépés), melynek során a Na<sup>+</sup> "áthelyeződik" (transzlokálódik) az extracelluláris oldal irányába és a Na<sup>+</sup>-



11. ábra A Na/K-ATPáz ionpumpa fehérje működésének modellje.

kötőhely affinitása jelentősen lecsökken, lehetővé téve az ionok leadását az extracelluláris térből. Ugyanezen konformáció változás során kialakulnak a "külső", nagy affinitású K<sup>+</sup>-kötőhelyek (2 db) melyek lehetővé teszik az extracelluláris K<sup>+</sup> ionok megkötését (4. lépés). Ezt követi az intracelluláris domén által kötött foszfátcsoport hidrolízise (5. lépés), mely egy az E1 állapotot visszaállító konformáció változást indukál, lehetővé téve a K<sup>+</sup> ionok intracelluláris oldalon történő leadását (6. lépés) (11b. ábra). A pumpa működését elsősorban az extracelluláris oldalon specifikusan kötődő drogok (mint pl. a ouabain nevű alkaloid) képesek gátolni.

Ezen pumpafehérjék kulcsszerepet játszanak több emlős sejtípus (pl. vese, idegsejtek) esetén a fenti két ion kapcsolt transzportjában és a sejtek membránpotenciáljának ingerlést (akciós potenciál) követően történő helyreállításában a nyugalmi értékre, mely újabb ingerlést tesz lehetővé.

### **A $H^+$ -ATPázok működése és jelentősége eukaryóta sejtekben**

Az ATP-hidrolízishez kapcsolt ionpumpák egy másik jellegzetes képviselője a V-típusú (vezikuláris eredetű)  $H^+$ -ATPáz, melynek főbb ismérvei a következők:

- 1.) Nagy méretű (Ms: kb. 600.000) fehérje, mely egy központi csatorna körül elhelyezkedő nagyszámú fehérje alegységből épül fel.
- 2.) Csak  $H^+$  ionok transzportját végzi
- 3.) Működésük ATP-függő, de a proton pumpálás során (a P típusú pumpákkal szemben) nem foszforilálódnak ill. defoszforilálódnak aminósav csoportjaikon.

A főleg lizoszómák, ill. endoszómák membránjában található V-típusú protonpumpák egy 5 különböző polipeptid láncból felépülő, nagyméretű, citoszól felé néző doménből (amely tartalmazza az ATP-kötés és hidrolízis helyét), és egy ugyancsak több szegmensből álló transzmembrán doménből állnak, mely egy specifikus térszerkezetet felvéve egy proton vezető csatornát képes formálni.

Ezen protonpumpák jelentős szerepet játszanak pl. a sejtek belséjében található "emésztő" organellumok (pl. lizoszómák, endoszómák) belséje (pH:4-5) és a citoszól (pH: kb.7.0) közötti jelentős pH-gradiens fenntartásában, azaz az organellumok belséjének "savasításában", mely természetesen a sejt ATP-termelésének függvénye. Egy másik példája ezen proton pumpák működésének a hámszövetek mitokondriumban gazdag sejtjeinek működése pl. a húgyhólyag esetén. Ezen hámsejtek apikális felszínén a membránban nagyszámú protonpumpa található, melyek funkciója a protonfelesleg kipumpálása, ami ezáltal a vizelet savasodásához vezet.

### **ABC-transzporterek**

Ezen fehérjék ugyancsak az ATP-kötő transzport fehérjék családjába tartoznak és szerkezetileg sok rokon vonást mutatnak a P-típusú ionpumpákkal. Fiziológiás funkciójukat ld. külön fejezetben. Az un. multidrog rezisztencia jelensége szintén ABC transzporterek működésével kapcsolatos és a rák kemoterápiában van nagy gyakorlati jelentősége – ld. Sejtbioológiai Gyakorlatok c. jegyzet.

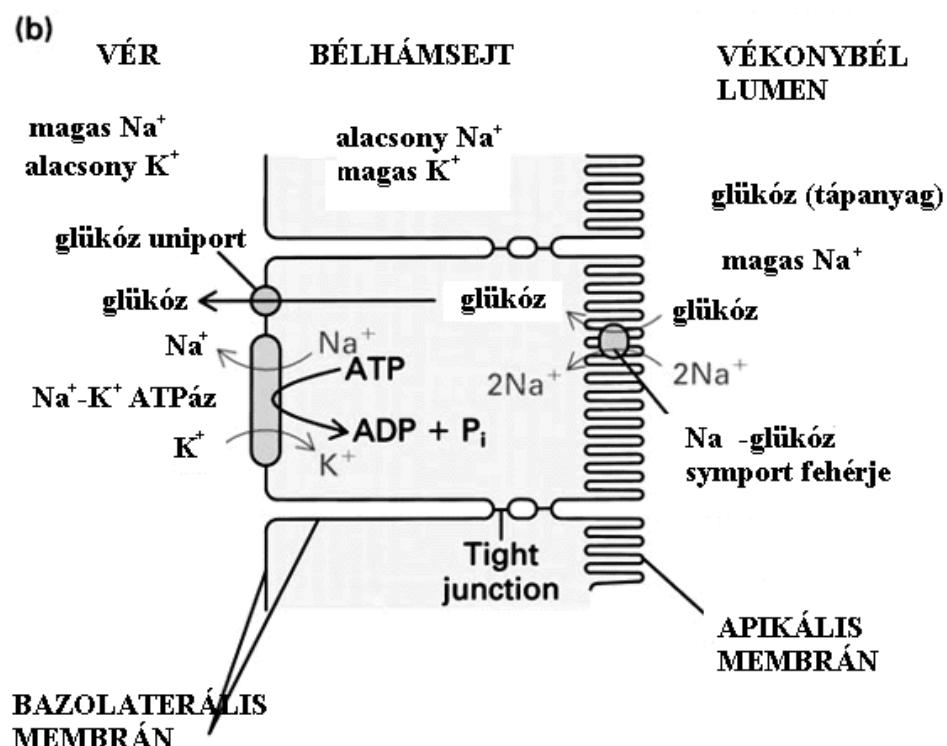
### **Sympot és antiport típusú ko-transzport rendszerek**

A ko-transzport rendszerek egyik talán leggyakoribb fajtája a  $Na^+$ -transzportozó kapcsolt aminosav és glükóz felvétel (sympot) az emlős sejtekben. Jellegzetes példája ennek a glükóz és aminosavak felvétele a vékonybél belséjéből a bélhámsejtek felszínén található mikrovillusok segítségével. Mindkét molekulaféleség koncentráció gradiensével szemben transzportálódik a hámsejtekbe, melyek aztán a vér felé továbbítják ezen anyagokat. Ehhez a transzportozó megfelelően polarizált hámsejtekre van szükség, melyeknek apikális ill. bazolaterális felszínén megtalálhatók az említett anyagok transzportját végző specifikus transzportfehérjék, mint pl. *nátrium-glükóz symporter*. A symporter 2  $Na^+$  és egy glükóz molekula egyidejű transzportját végzi, azonos irányba. A

$\text{Na}^+$  mozgásához kétféle hajtóerő van: 1.) a  $\text{Na}^+$  koncentráció gradiens (a nátrium ionok szintje alacsonyabb a hámsejtben, mint a bélben) 2.) a belül negatív membránpotenciál. A  $\text{Na}^+$  transzportját kísérő szabadenergia változást ( $\Delta G$ ) a következőképpen kaphatjuk meg:

$$\Delta G = RT \ln ([\text{glükóz}]_B [\text{Na}^+]_B^2 / [\text{glükóz}]_K [\text{Na}^+]_K^2) + 2FE$$

ahol T az abszolút hőmérséklet, a B és K indexek a sejten belüli ill. kívüli koncentrációkra utalnak, F: Faraday állandó, E: membránpotenciál. A fenti két tag összegeként számított teljes szabadenergia változás egy Na ionra kb. -3 kcal/mól. 2  $\text{Na}^+$  egyidejű transzportjához így kb. -6 kcal érték tartozik, mely szabadenergia kb.  $30.000 \times$  magasabb glükóz koncentrációt képes létrehozni a sejt belséjében külsejéhez képest. Így ez a transzport képes a glükóz "felhalmozására" a hámsejtekben belül. Hasonló symport folyamat játszódik le az aminosavak felvételénél is. A sejt ezt követően úgy tartja fenn "steady-state"



13. ábra A glükóz vékonybélből vérbe történő transzportjának mechanizmusa bélhámsejtek membrán-transzport fehérjéinek közvetítésével.

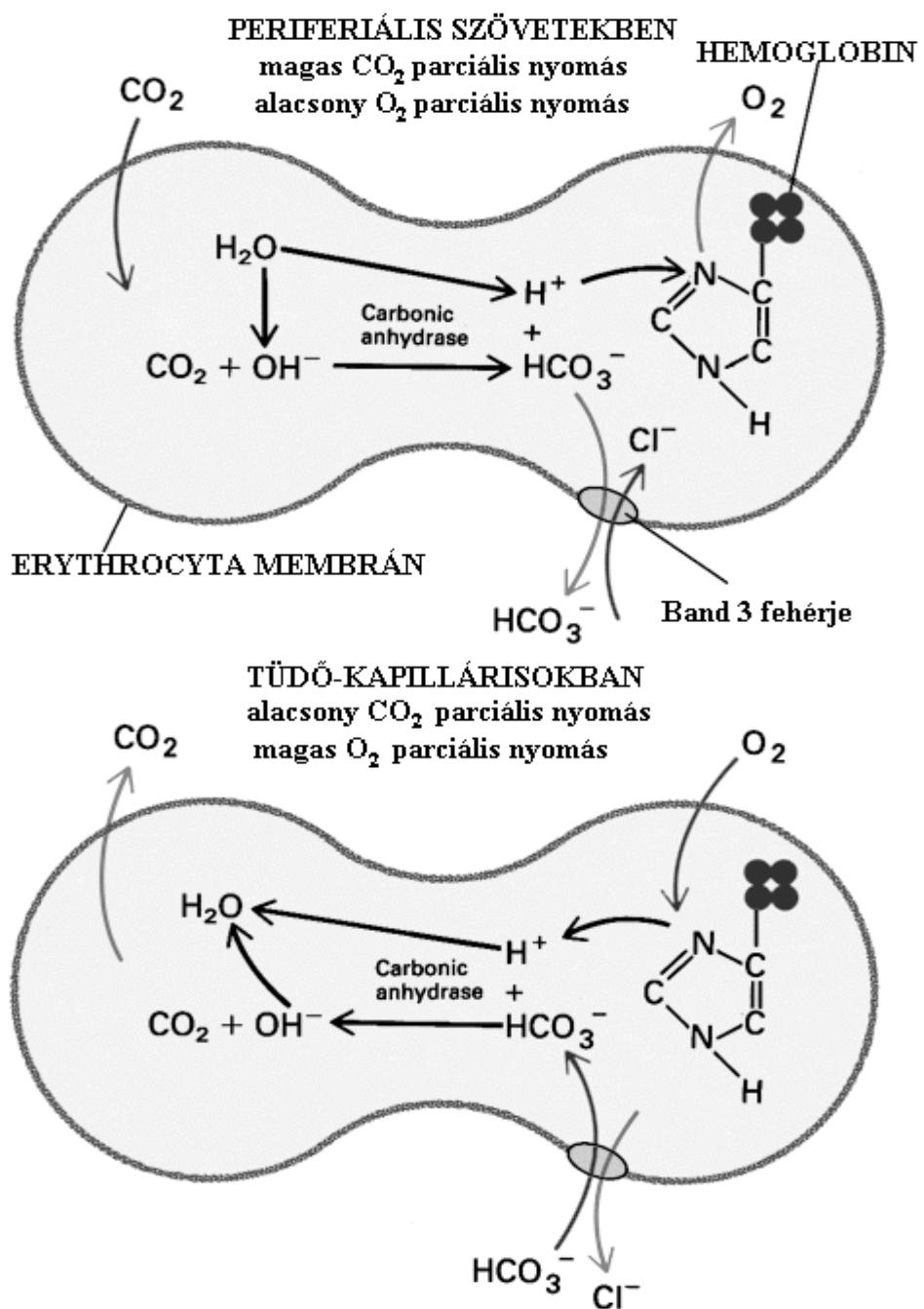
állapotát, hogy a másik, bazolaterális felszínén (membránján) keresztül, a csak ott megtalálható aktív ionpumpa ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz) segítségével kipumpálja  $\text{Na}^+$  ionokat, ill. egy uniport segítségével leadja a fölös glükózt a vérbe (13. ábra).

#### **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport**

Az antiport rendszerek hasonló módon működnek, mint az előzőekben bemutatott symport rendszer, azzal a különbséggel, hogy valamely ion koncentráció gradiense irányában történő transzportjához egy másik molekula (vagy ion) ellenkező irányú (saját gradiensével ellentétes) transzportja kapcsolódik. Ennek egyik jellegzetes példája a szívizomsejtek membránján kereszttüli  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens fenntartásában (a kalcium pumpa mellett) fontos szerepet játszó  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport, mely 3  $\text{Na}^+$  befelé irányuló transzportjával egyidejűleg 1  $\text{Ca}^{2+}$  iont transzportál kifelé a sejtből egy viszonylag magas (kb. 10.000-szeres) koncentráció grandienssel szemben. Ezen transzporter működése tehát csökkenti a citoszól  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját, lecsökkentvén ily módon a szívizom kontrakció erősségét. Természetesen a szívizom sejtek membránjában is megtalálhatók a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz pumpák, melyek fenntartják a  $\text{Ca}^{2+}$ - kivitelhez szükséges  $\text{Na}^+$ -koncentráció gradienst.

#### **$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiport eritrocita (vvt) membránban**

Az emberi eritrociták membránjában található az az anion-transzport fehérje (Band - 3), mely két negatív anion a  $\text{Cl}^-$  és  $\text{HCO}_3^-$  1:1 arányú "cseréjét" végzi a membránon keresztül, antiport formájában. Ez a transzport a légzési folyamat egyik fontos gáz komponensének a  $\text{CO}_2$ -nak a szervezeten belüli szállításában jelentős. Az erythrocyták a periferiás szövetekből (ahol magas a  $\text{CO}_2$  parciális nyomása) felveszik a  $\text{CO}_2$ -t és elszállítják a tüdőbe, ahol az alacsonyabb parciális nyomás miatt azt leadják, és a tüdő a kilélezés során eltávolítja a szervezetből. A vvt-ból eltávozott  $\text{CO}_2$  "pótlását" az anion transzporter fehérje valósítja meg a vizes oldatban jelen levő  $\text{HCO}_3^-$  anion felvételével, ill. a periferiás szövet-környezetben levő eritrocitáknál a  $\text{HCO}_3^-$  transzportja fordított irányban valósul meg. A transzport folyamat rendkívül gyors (50 ms/csere-ciklus, ezalatt mintegy  $5 \times 10^9 \text{ HCO}_3^-$  transzportálódik), mely különösen fontos abból a szempontból, hogy ne halmozódjon fel toxikus mennyiségi  $\text{CO}_2$  a sejtekben pl. intenzív fizikai igénybevételt követően. A vér  $\text{CO}_2$  tartalmának igen magas százaléka (kb.80%) transzportálódik az eritrocitákban képződött  $\text{HCO}_3^-$  anion formájában, azaz a fenti antiport mechanizmus (a  $\text{CO}_2$  viszonylag alacsony vízoldhatósága miatt) jelentősen megnöveli a szövetekből a tüdő felé szállítható  $\text{CO}_2$  mennyiségét (14. ábra), mivel lehetővé teszi, hogy a vérplazma is szállítsa a  $\text{HCO}_3^-$  anionok mintegy kétharmadát. Ezen antiport nélkül a vörösvértestek belsejében a  $\text{HCO}_3^-$ -nak a gázfelvételt követően növekvő koncentrációja a citoszól erőteljes lúgosodásához is vezetne. A Band-3 fehérjén kereszttüli transzport iránya tehát ellentétes a tüdőben ill. a periferiás szövetekben. A fehérje maga úgy működik, hogy a külső oldalon megkötött anion kötése után konformáció változást szenved, mely a megkötött aniont átviszi a membrán másik oldalára és az új konformációra jellemző



14. ábra Az eritrocita membránon keresztül lejátszódó gázcsere és anion transzport periferiás szövetekben és tüdő-kapillárisokban.

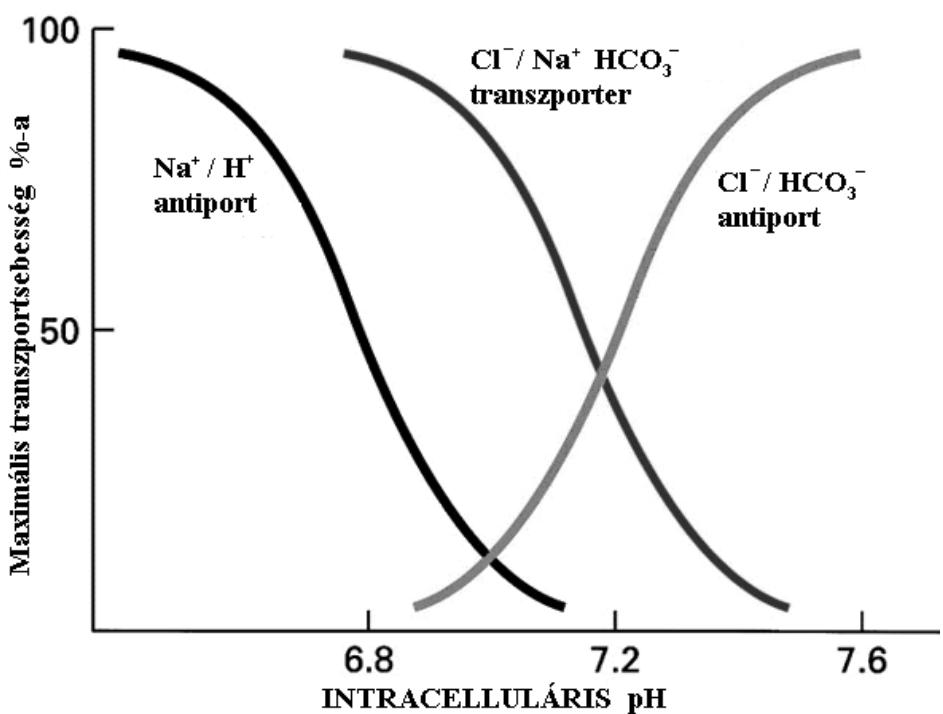
alacsony affinitás miatt le is adja. Ugyanakkor az új konformációban a fehérje egy nagy affinitású kötőhelyet képez a másik anion számára, s azt hasonló módon, újabb konformáció változással átjuttatja a membránon.

### A symport és antiport rendszerek együttműködése: a citoszól pH-jának szabályozása

A sejtek növekedéséhez, osztódásához a citoszól pH-ját egy szűk tartományban (pH:7.2-7.4) kell stabilizálni. Ezt megnehezíti az a tény, hogy az anaerob és aerob metabolizmusok tejsavat ill. CO<sub>2</sub>-t termelnek jelentős mennyiségben, mely utóbbit a sejt szénsavvá (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) alakít tovább. Ezen gyenge savak disszociációja miatt, szabályozó mechanizmusok hiányában a citoszól pH-ja fokozatosan és jelentősen csökkenne. A proton-felesleg eltávolításában kétféle típusú transzport fehérjét is használnak a sejtek.

Az egyik egy *Cl/Na<sup>+</sup>,HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transzporter*, mely egy Na<sup>+</sup> iont transzportál a gradiens irányában egy HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anionnal egyidejűleg és ugyanekkor egy Cl<sup>-</sup> iont transzportál kifelé a sejtből. A felvett HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a sejtből rekombinálódik az anyagcsere során képződött protonokkal, CO<sub>2</sub>-t képezve, mely aztán kidiffundál a sejtből. Ez a folyamat a pH növekedésének irányába hat.

Egy másik fontos transzport fehérje mely ugyancsak részt vesz a proton felesleg eltávolításában, a *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport*. Ez egy H<sup>+</sup>-t képes kijuttatni a sejtből egy Na<sup>+</sup> befele irányuló transzportjával egyidejűleg. A citoszól pH-jának kis mértékű változásai jelentős hatással lehetnek a sejtek anyagcsere folyamataira. Pl. sejtkultúrában, "letapadva" növekedő fibroblasztok növekedése során, ha azok elérik a maximális sűrűséget (konfluencia), a citoszól pH-jának csökkenése figyelhető meg (pH:7.4-ről pH:7.2-re) egyidejűleg a növekedés, DNS-szintézis leállásával, a fehérje-szintézis és glükóz katabolizmus sebességének jelentős csökkenésével. Az ilyen "nyugvó" sejtekhez növekedési faktort adva egy korai hatásként az intracelluláris pH növekedése figyelhető meg 7.4-re, mely részben az említett transzport fehérjék aktiválódásának következménye. A ténylegesen emlős sejtek többsége tartalmaz egy Band-3 fehérjéhez hasonló Cl/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> antiport fehérjét is, mely az intracelluláris pH 7.0 fölé emelkedésekor aktiválódik és a Cl<sup>-</sup> gradiens irányú (befelé irányuló) transzportjával egyidőben egy HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> aniont távolít el a sejtből, visszasavanyítással szabályozva a pH-t. Az említett 3 transzportfehérje működésének sebessége erősen pH-függő, és különböző pH-tartományban aktiválódnak (15. ábra). Így "együttműködésük" egy összehangolt és igen érzékeny intracelluláris pH-szabályozási mechanizmust eredményez.



15. ábra A sejtek intracelluláris pH-jának szabályozásában résztvevő kotranszport fehérjék aktivitásának pH-függése.

## **Hidrofób vegyületek transzportja.**

### **ABC-kazettás transzporterek.**

A membrán-transzport folyamatok *energetikai* jellegük alapján passzív, mintegy maguktól, vagyis a koncentráció- (ill. töltött molekulák esetén elektrokémiai) grádiens mentén végbemenő (“downhill”) és aktív, energia-igényes (“uphill”) folyamatok kategóriáira oszthatók. Egy másik lehetséges szempont, a transzportált szubsztrátok kémiai jellemzői alapján számos kategória definiálható. Ezek között sajátos helyet foglalnak el a *hidrofób* anyagok. Transzportjuk közös vonásai külön tárgyalást érdemelnek.

#### **I. Passzív transzport.**

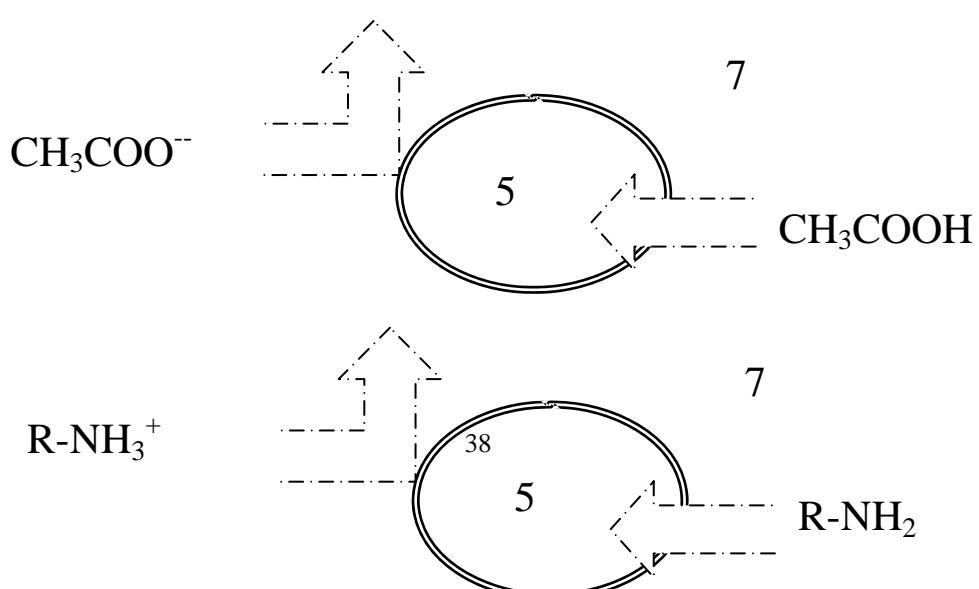
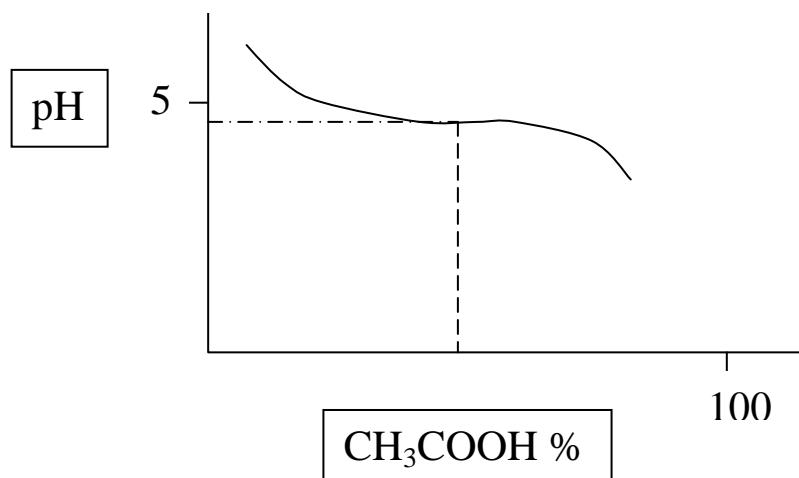
A hidrofób anyagok passzív transzportja (diffuziója a sejtmembránon át) két fő tényező függvénye.

1. Az illető molekula lipid / víz megoszlási hányszáma ( $R$ ) döntő módon meghatározza a membránon történő átoldódás sebességi állandóját. (Ebben a folyamatban inkább a fázishatárokon történő átmenet, mintsem a belső, zsírsavláncok alkotta hidrofób közegen át történő diffúzió a szűk keresztszínt.) Minél nagyobb az  $R$  értéke, annál nagyobb sebességgel hatolnak be a membránba (ill. át a membránon) a molekulák (vagyis időegység alatt több molekula jut át). Szoros korreláció áll fenn pl. az altatószerű zsíroldékonyisége ( $R$ -értéke) és (membránban elért koncentrációjukkal összefüggő) hatékonysegégek között. A zsíroldékony anyagok  $R$ -értéke mellett a membrán finomabb sajátságai is fontosak: azonos  $R$ -értékkel jellemzett anyagok számára nem minden membrán egyformán átjárható.

2. A citoplazmába került hidrofób molekulák sejten belüli passzív megoszlását a második jelentős tényező, a Henderson-Hasselbach egyensúly szabályszerűségei determinálják. Ennek az az oka, hogy a hidrofób molekulák egy részének oldhatósági jellemzői erősen pH-érzékenyek, így megoszlásukat az intracelluláris kompartmentek (citoplazmatikus viszonyuktól eltérő) pH-ja határozza meg (ld. ábra). Tekintsünk pl. egy olyan anyagot, melynek pK<sub>a</sub>-ja (vagyis az a pH, melynél a hidrofób vegyület töltött -NH<sub>2</sub> csoportja félleg protonált (töltött, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), félleg protonálatlan (azaz -NH<sub>2</sub>) állapotban van) a lúgos tartományban van (legyen ez pH=9). Ez az anyag a semleges extracelluláris térben nyílván elsősorban a semleges -NH<sub>2</sub> formájában van jelen. Ebben az állapotában nagy R érték jellemzi, ezért könnyen (gyorsan) átdiffundál a citoplazmába. Itt is közel semleges pH viszonyok uralkodnak, tehát az előbbi -NH<sub>2</sub>/-

$\text{NH}_3^+$  viszonyok reprodukálódnak. A lizoszómákba is könnyen bediffundálnak az  $-\text{NH}_2$  csoportot tartalmazó, töltetlen molekulák, ezeken belül azonban savas pH-t tartanak fenn az előbbi fejezetben tárgyalt pumpák, mely pH mellett a vegyület protonálódik. A töltötté vált molekulák bennrekednek a lizoszómákban, míg kívülről folyamatosan diffundálnak be az  $-\text{NH}_2$ -csoportot tartalmazó újabb molekulák. Mindez a lizoszóma-membrán telítődéséig ill. az anyag lizoszómán belüli kicsapódásásig tart és a molekula óriási mértékű lizoszómális feldúsulásához vezet. Nyílvánvaló, hogy ennek mértéke a lizoszómák pH-jának függvénye, mit ahogy az intracitoplazmatikus koncentráció is függ az extracelluláris és intracelluláris tér között fennálló pH-grádiens mértékétől. Utóbbi pl. a sejtciklussal összefüggésben változik, ill. különböző sejtípusokban eltérő  $\text{pH}_i$  lehet.

$$\log [(\text{CH}_3\text{COO}^-)/(\text{CH}_3\text{COOH})] = \text{pH} - \text{pK}$$



## **II. Aktív transzport: ABC-transzporterek.**

Hidrofób vegyületek aktív transzportja – részben - egy kiterjedt, ōsi fehérje-család tagjainak működéséhez kötődik. Ezen fehérjék által felismert ligandumok ill. transzportált molekulák feltünően gyakran (de nem feltétlenül) hidrofób karakterűek. Az ABC transzporter-család tagjai fontos szerepet játszanak prokariótákban és eukariótákban egyaránt. Közös szerkezeti jellemzőjük az ATP-kötő un. ABC-kazetta (amely a Walker A és Walker B motivumok valamint a kettő között elhelyezkedő, kizárálag a család tagjaira jellemző C (un. signature-) motivum együttese). Ezek az un. *ABC-transzporterek* ATP-függő módon - főleg, de nem kizárálag, hidrofób - szubsztrátokat *pumpálnak* a koncentráció gradienssel szemben (**a**), csatorna-működések kapuzását végzik (**b**), vagy egy velük asszociált fehérje működését *szabályozzák* (**c**). Ezen különbözönek tűnő feladatok egy molekuláris motor, az ABC-kazettát tartalmazó fehérje-domén különböző hasznosulásainak foghatók fel: egyik esetben a motor pumpát hajt, másik esetben csatornát kapuz, harmadik esetben valamilyen asszociált fehérje konformációját változtatja, a csatlakozó fehérje-doménektől függően. (Elképzelhető, hogy e háromféle működés egyes ABC-fehérjék esetében nem zárja ki egymást.) Az alábbiakban a legfontosabb ismert ABC-transzportereket tekintjük át, melyek a fenti **a,b, ill. c** típusú működéseket példázzák (ld. az összefoglalásban is).

**1. Prokarióták ABC transzporterei.** Baktériumok belső (citoplazma-) membránjában található egyes ABC-kazettás transzporterek un. *multidrog rezisztenciát* okoznak: működésük révén a baktérium egy sor toxikus vegyülettől képes megszabadulni, így azokkal szemben rezisztenssé válik. Ezen transzporterek gyakori jellemzője széles szubsztrát-spektrumuk, szemben a szigorúan illeszkedő, klasszikus enzim-szubsztrát kapcsolattal. Egy ilyen lazább, kevésbé diszkriminatív mechanizmusnak evoluciós előnyei nyilvánvalóak: a baktérium már rezisztens, mielőtt ökológiai ellenfele (pl. egy gombafaj) "kifejlesztene" ellene egy új antibiotikumot. Nyilván az evolúció során a pumpa csak úgy módosulhatott, hogy megőrizze széles szubsztrát-spektrumát miközben a pumpálásra *nem* szánt endogén lipidek, hidrofób vegyületek szintén széles köre számára nem vált befogadóvá a kötőhelye. Az ABC-fehérjék nagyfokú evoluciós konzerválódását mutatja az a tény, hogy egy bakteriális multidrog transzporter, az élelmiszeriparban és saját emésztőrendszerünkben is szerepet játszó *Lactococcus lactis* egyik ABC transzporterének (*LmrA*) génjét emlős sejtbe juttatva és ott kifejezve az emlős sejt is rezisztenssé tehető a pumpa szubsztrát-spektrumához tartozó vegyületekkel szemben. Bár ezen molekula mérete - mely daunorubicinnel, colchicinnel, ethidiummal és sok egyéb ágenssel szembeni rezisztenciát okoz - a hasonló funkciókat ellátó emberi ABC transzporter (*P-glikoprotein*, ld. később) méretének fele, génjét emberi sejtekbe transzfektálva azokban

pl. ethidium pumpálás mérhető. Ez azt is jelenti, hogy az LmrA ill. valószínűleg a Pgp is, más fehérjék közreműködése nélkül is képes xenobiotikumok (a biológiai környezetből származó szerves molekulák) kipumpálására. Ugyanezen baktérium egy másik ABC transzportere az un. oligopeptid permeáz, nagyméretű, akár 18 aminósav-hosszúságú *peptidet* is képes szállítani az extracelluláris tér felől, befelé. Utóbbi funkciója külső fehérje-források hasznosítása a baktérium számára. Egy másik peptid transzporter a baktériumok vasfelvételét segíti elő, mivel egy hem-kötő fehérjét szekretál. A hemolizin nevű oligopeptid toxin szintén ABC transzporter szállítja a két membránnal határolt, ezért un. Gram-festődést nem mutató (Gram-negatív) *E.coli* baktériumból. A peptidek a transzport során valószínűleg valamennyire letekerednek. Sok egyéb ABC-transzporter is van a baktériumokban: becslések szerint az *E. coli* genomnak kb. 5 %-a ABC-fehérjéket kódol.

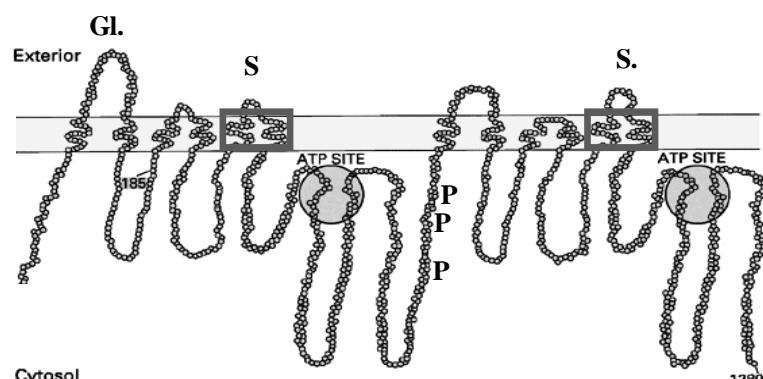
## 2. Emberi sejtek ABC transzporterei.

Sok emberi szövet is ABC-kazettás transzportereket használ egyes fiziológiai funkcióinak ellátására és a fehérje-család tagjai bizonyos kóros körülmények között, patológiás szerepkörben is tetten érhetők.

A foszfatidilkolin-flippáz (az MDR2 vagy, más némenklaturában: MDR3 gén fehérje-terméke) a májsejtek apikális felszínén található. A májsejtek által termelt foszfatidilkolint a külső membrán-lemezbe szállítja át. A belső lemezbe laterális diffuzió révén kerülhetnek a sejt belső membrán rendszereiből, ti. a tight-junction csak a külső leafletben gátolja a laterális diffúziót. A külső lemezben keletkezett kiboltosulások az epesavakkal való kölcsönhatás révén lefűződnek (veszikuláció). Így kerül a foszfatidilkolin az epébe. Szerepe itt valószínűleg az epesavak detergens-hatásának “pufferelése”, melynek hiányában az epeutakat bélélő hám károsodik. Ezért un. destruktív kolangitisz fejlődik ki a géntől megfosztott (un. knock-out) egerekben, ill. az ezzel analóg emberi genetikai betegségen. Mivel a koleszterin-transzport egyelőre nem teljesen tisztázott módon az epesó- és lipid transzporthoz kapcsolt, a foszfatidilkolin flippáz működés hiánya egyben a koleszterin kiválasztás defektusát is maga után vonja. Az MDR2 (3) gén nagyfokú homológiait mutat a következő részben tárgyalandó emberi multidrog transzporterre, így nem meglepő, ha a foszfatidilkolin mellett számos gyógyszert (pl. digoxint, vinblasztint, taxolt) is képes transzportálni. Az epe számos egyéb összetevőjét is (epesavak, bilirubin, gyógyszerek) különböző ABC transzporterek szállítják ki a májsejtekből az epébe, óriási koncentráció-grádienseket létrehozva.

Az MDR1 gén által kódolt P-glikoprotein kifejeződik többek között a májban, vesében, mellékvesében, a bélhámsejtekben, a hasnyámirigybén és a vér-agy gátban. Ennek ellenére, knock-out egerekben a patológiás eltérések igen szegényesek: csak a

vér-agy gát léziója okoz egyes központi idegrendszeri toxicitással rendelkező drogokkal szembeni fokozott érzékenységet (drogok bélből történő felszívódásában is észlelhetők kisebb változások). Az agyi kapillárisok endotél sejtjeinek tight-junction-jai a hidrofil molekulákkal szemben jelentenek gátat, míg az ugyanitt kifejeződő P-glikoprotein a hidrofób anyagokat pumpálja vissza a vérbe, ép vér-agy gát funkció esetén. A kock-out egerek tünet-szegénységének egy lehetséges magyarázata, hogy a P-glikoprotein elsődleges funkciója xenobiotikumok elleni védekezés. Olyan endogén molekulák, melyek transzportja P-glikoprotein-függő - azaz a pumpa hiánya ebből fakadó patológiai állapotot idézne elő - nem ismertek. Ugyanakkor a pumpa képes számos endogén lipid molekulát transzportálni – ezen működések élettani szerepét egyelőre homály fedi. A pumpa feltételezett molekuláris szerkezete, melyet 2x6 transzmembrán alfa-helix és két ABC-kazetta jellemz, a következő ábrán látható.



A P-glikoprotein aminosav-sorrendje alapján jóvolt szerkezeti modellje 2x6 membrán-átívelő transzmembrán régiót tartalmaz. (Ez a modell nem áll egyes adatokkal összhangban, így azt jelenleg csak egy lehetséges - nem bizonyos vagy kizárolagos - konformernek tekinthetjük.) A két homológ fél egy-egy ATP-kötő helyet tartalamaz (ABC), melyek összehangolt működését a foszforilációs helyeket (az ábrán "P") hordozó kapcsoló (un. linker) rész biztosítja. A szubsztrátfelismerésben feltehetően közvetlenül szerepet játszó transzmembrán régiók az ábrán bekeretezve láthatók. A molekula glikozilált (Gl.), mely ténynek talán a fehérje érési folyamatai során lehet szerepe. Az ATP-kötés és hidrolízis által indukált konformáció változás valamilyen módon valószínűleg átterjed a transzmembrán régiók által alkotott szubsztrátkötő hely környezetére, melynek eredményeként a megkötött drogok transzlokálódnak az extracelluláris térbe. A P-glikoprotein valószínűleg saját membrán- (lipid-)

környezetéből köti meg és pumpálja ki a hidrofób vegyületek igen széles spektrumát. A szubsztrátorok egymás transzportját éppen ezért befolyásolhatják. Utóbbi jelenség lehetőséget nyújt egy adott szubsztrát pumpálásának megakadályozására is (ld. még a Sejtbiológia laboratóriumi gyakorlatok jegyzetét). A P-glikoprotein gyakran rákos sejtek felszínén fokozott mennyiségen található, hiszen az ilyen sejtek szelekciós előnyt élveznek a kemoterápia során és így kiszelektálónak a fokozott P-glikoprotein expressziót mutató klónok. Ahogyan az MDR1 és a bakteriális multidrog rezisztencia jelenségéért felelős fehérjék egymás funkcióját képesek ellátni az idegen sejtbén, az élesztőbe transzfektált emberi MDR1 gén is komplementálni képes az élesztő szintén transzporter-defektussal kapcsolatos un. mating-faktor export-hiányát és ezáltal gyógyítani ebből adódó sterilitását.

A cisztkus fibrózis transzmembrán regulátor (CFTR) egy ATP-kapuzott  $\text{Cl}^-$  csatorna. Ezen a csatornán keresztül közlekedik  $\text{Cl}^-$  a tüdő bronchusok, bronchiolusok epítél-sejtjeinek és számos más szerv sejtjeinek membránján át. A kapuzás azáltal valósul meg, hogy a nyitási frekvencia ATP-függő. A gén hiányával vagy mutációjával kapcsolatos genetikai betegségben a hörgöket béllelő epítélsejtek által kiválasztott nedv sóösszetétele megváltozik. Ezáltal a hörgök átjárhatósága drámaian csökken és a viszkózus váladék krónikus fertőzések táptalajává válik. A csatorna - a sejtekkel reaktiv oxidáló metabolitjaiktól védő - organikus anionokat (pl. glutation) is átenged. A fenti betegség vezető tüneteiben mindenkor csatorna-funkció kiesésének (sőt indirekt effektusoknak is) szerepe lehet.

A hasnyálmirigy inzulin-termelő un. béta sejtjein az ATP-érzékeny  $\text{K}^+$  csatornák fontos szerepet játszanak a glükóz-indukálta inzulin-szekréció szabályozásában. Ez a  $\text{K}^+$ -csatorna hetero-oligomér, melynek egyik összetevője a szulfanilurea receptor (SUR1), amely egy ABC-féhérje. A másik komponens a csatornát képző fehérje. Szulfanilurea származékok valószínűleg a SUR1 két nukleotid-kötő doménjének kölcsönhatását modulálják, utóbbi pedig a  $\text{K}^+$ -csatorna működését. A SUR1 maga is ATP-szabályozott. Magas glükóz szint esetén nő az i.c. ATP szint és csökken az ADP szintje, ezért az ATP felkötődik az általa regulált  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -csatornára, amely így kinyílik. Ennek következményeként (annak figyelembe vételével, hogy ezen sejtek nyugalmi potenciálja, szemben sok más sejtével, nem  $\text{K}^+$ -potenciál) a  $\text{K}^+$  gradiens kiegyenlítődik a membrán két oldalán, ami depolarizációt okoz. Utóbbi feszültségekapuzott  $\text{Ca}^{++}$ -csatornákat aktivál (nyit ki), míg a megemelkedett i.c. Ca pedig inzulin-szekréciót idéz elő. Ezen reakciósor kimenetele SUR1-kötő gyógyszerekkel hatékonyan modulálható.

Az ABC1 gén fehérje-termékének egyik funkciója a makrofágok elhaló, un. apoptotikus sejtekkel eltakarító működésében van. Az apoptotikus sejtekben a korábban

elsősorban a belső membrán-lemezben lévő foszfatidilszerin ilyenkor a külső lemezbe kerül át, és mint “eat-me” szignál triggereli a makrofágok fagocitotikus működését. A fehérje másik, nemrég feltárt fontos funkciója a sejtekből történő koleszterin-exporttal kapcsolatos.

Az ABCR egy öröklétes szembetegségért, bizonyos kor-függő sárgafolt degenerációs elváltozásokért és a retinitis pigmentosa betegség tüneteiért is felelőssé tehető. A genetikai esetek, orvosi jelentőségük mellett, mint “emberi knock-out”-ok a génteknológiák komplexitásának megértésében is jelentős szerepet játszanak. A különböző ABCR-vonatkozású megbetegedések a gén többé vagy kevésbé ledált működésével kapcsolatosak. A normális allél fehérje-terméke a retinálnak a pálcikák külső szegmensében történő transzportját végzi.

A TAP1 és TAP2 (“transporter associated with antigen processing”) immunsejtek un. antigén-prezentációs működésében jelentősek. Két, egymással kapcsolódó, pórus-jellegű komplexet képező fehérje. Az idegen fehérjék lebontásának (FRAP adatok szerint citoplazmában úszkáló) peptid-termékei az ER-ben lokalizálódó TAP segítségével jutnak ki az ER lumenébe, ahol az MHC alegységeivel alkotnak komplexet. Utóbbi a Golgi-komplexen át kerül ki végül a sejt felszínére.

MRP (multidrog rezisztenciához társuló fehérje): a P-glikoproteinhez hasonlóan, xenobiotikumok eltávolításában játszik szerepet. Az MRP1 a xenobiotikumok vízoldékonnyá lett glutation-konjugátumait távolítja el a sejtek ből. Nem lezárt, hogy konjugátumok transzportálódnak, vagy konjugálatlan molekulák glutationnal kapcsolt kotranszportja valósul meg. Mivel a sejten belül az endoszómák, lizoszómák membránjában is kifejeződik, a xenobiotikumok szekvesztrációja, elkülönítése révén is csökkenti ezen vegyületek intracitoplazmatikus koncentrációját. A homozigóta (Mrp1-/-) knock-out egerekben a gyulladásos reakciók gátoltak, ti. egy fehérvérszervekre ható szabályozó anyag (az LTC4) transzportja az azt előállító hízósejtekben gátolt, ill. ezen egerek számos droggal szemben túlérzékenyek. Felmerült az Mrp1 működés és az intersticiális folyadék képződés lehetséges kapcsolata is. Az MRP1 fehérjének számos közeli rokona van, ezek egy része a májban epe-komponensek transzportját végzi. Az MRP1 a P-glikoprotein mellett a második leggyakoribb oka a daganatok multidrog rezisztenciájának.

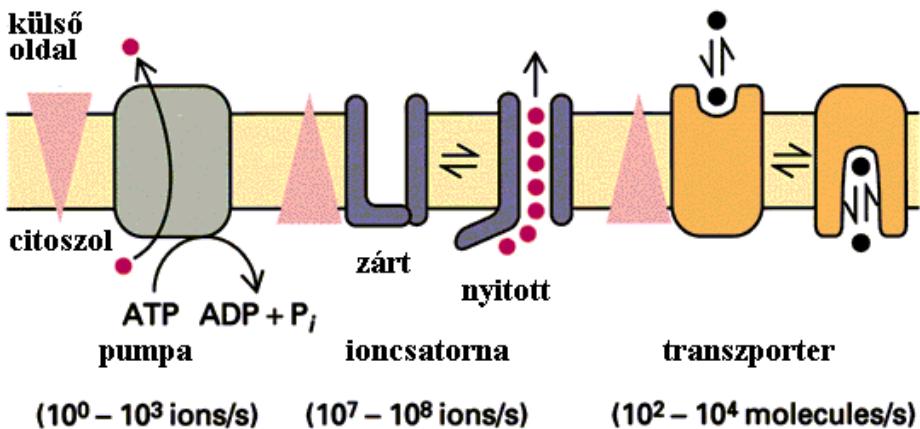
A fentiek egy jéghagy csúcsát képezik, hiszen az ezidáig ismert legnépesebb géncsalád tagjairól van szó. A pro- és eukarióták nehézfém-rezisztenciáját szintén ABC transzporterek biztosítják. Növények (pl. gomba eredetű) xenobiotikumokkal ill. herbicidekkel szembeni rezisztenciájának egyik fázisa ezen vegyületek metabolizálása (citokróm rendszer), konjugálása glutationnal (vagy glikozilálásuk) ill. eltávolításuk,

óriási vakuolákba történő aktív transzport által: utóbbi ABC-transzporterek végzik. A virágok színe is ilyen transzport folyamatok eredménye. A Plasmodium falciparum chloroquin rezisztenciája is hasonló, ABC-kazettás, multidrog transzporter működésével kapcsolatos. A pumpa működése miatt nem érhető el a körökozó elpusztításához elegendő gyógyszer-koncentráció a plasmodiumban. A plasmodium falciparum okozta malariának évente 300 millió új esetét regisztrálják és több, mint 3 millió beteg meghal évente ebben a trópusi betegségen.

### *Összefoglalás*

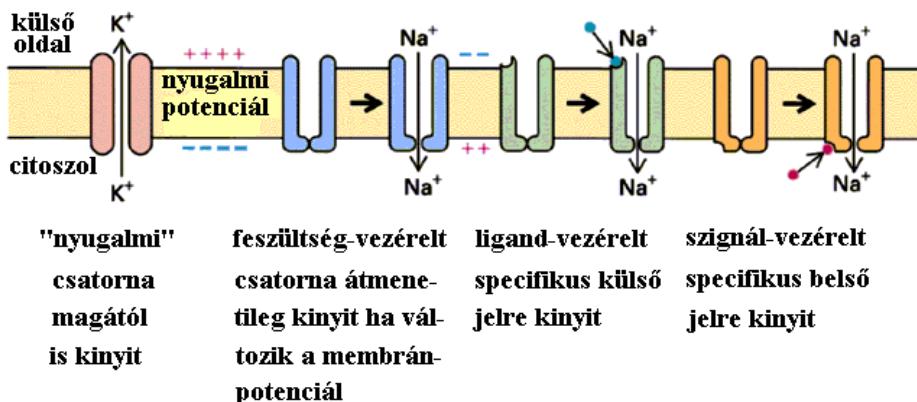
<b><u>Transzporter</u></b>	<b><u>Szubsztrát- spektrum</u></b>	<b><u>Mechanizmus</u></b>
<b>(a,b,c, Id. fenn)</b>		
-	hidrofób vegyületek	lipid/víz R
-	hidrofób vegyületek	Henderson-H.bach e.
<b>MDR2(3) (a)</b>	<b>foszfatidilkolin</b>	<b>Flippáz</b>
MDR1 (Pgp)	széles	membrán>>e.c. <u>(a)</u>
TAP1/2	oligopeptidek	<u>(a)</u>
ABC1	koleszterin	<u>(a)</u>
CFTR	Cl <sup>-</sup> , organikus anionok	<u>(b)</u>
SUR	-	<u>(c)</u>

## Ioncsatornák és farmakológiai vonatkozásai

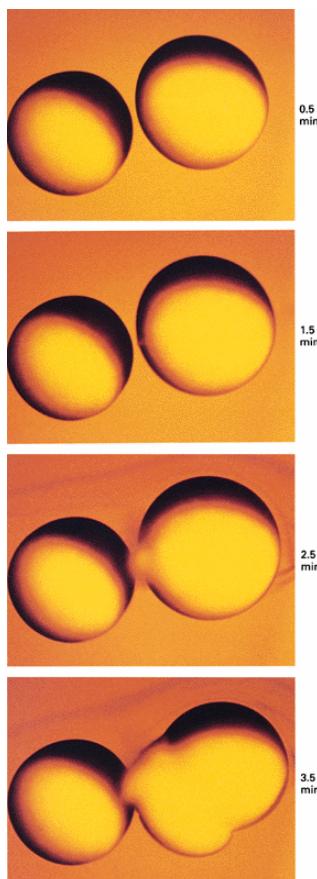


A csatorna fehérjék specifikusan vizet és különböző ionokat transzportálnak azok koncentráció (vagy elektromos) grádienseinek megfelelően. Fehérjével "kibélelt" csatornákat képeznek, amelyeken keresztül víz molekulák ill. ionok nagyszámú csoportokat alkotva haladnak át nagy sebességgel ( $10^7$ - $10^8$  db./másodperc).

### Az ioncsatornák



Az ioncsatornák egyik igen elterjedt típusa az összes állati sejt plazmamembránjában fellelhető kálium csatorna fehérje amely kizárolag a K<sup>+</sup> ion áthaladását engedi meg annak koncentráció grádiense mentén. Ezen csatorna típus még a nyugalomban lévő sejten is alkalmanként magától kinyit és így sok sejttípuson a nyugalmi potenciál értékét kialakító meghatározó tényező. A nyugalomban lévő sejten sok más csatorna fehérje zárt állapotban van és csak specifikus jelre nyit ki.



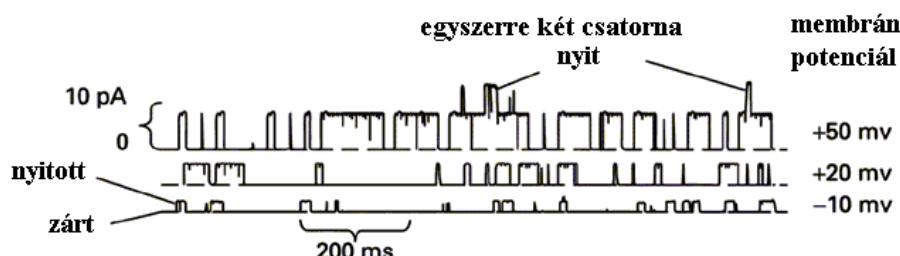
## A vízcsatornák

A tiszta foszfolipid kettősréteghez hasonlóan számos biológiai membrán a víz számára nehezen átjárható. A biológiai membránok vízre vonatkozó átjárhatóságát *vízcsatorna fehérjék* (CHIP) növelik. Ezen csatornák nélkül nem valósulna meg az ozmotikus nyomás következtében kialakuló víz átáramlás a membránokon keresztül. Egyes állati sejtek térfogati szabályozásában is fontos szerepet töltnek be a vízcsatornák.

A fenti ábra sorozaton a jobboldali béká oocitába a vízcsatorna fehérjét kódoló mRNSt juttatták be mikroinjekcióval és a sejteket hipotóniás só oldatba helyezve látható, hogy a vízcsatornát kifejező jobboldali sejt idővel megduzzadt az ozmotikus vízbeáramlás hatására.

## A kálium csatorna fehérjék sokfélesége

A kálium csatorna fehérjék sokfélesége felelős a különböző neuronok eltérő elektromos aktivitásáért. A *Drosophila* "shaker" génje elsődleges transzkripciójának eredményeként előálló mRNSt alternatív hasításával legalább öt különböző csatorna fehérje fejezhető ki oocitákban. Az oocitákban expresszált csatorna fehérjék különböző feszültség-függéssel és  $K^+$  vezetőképességgel rendelkeznek.



A "shaker" gént hibridizációs próbákkal használva több mint két tucat  $K^+$  csatorna fehérjét izoláltak grincsekből. Az eltérő szerkezetű csatorna fehérjék eltérő feszültség-függéssel, vezetőképességgel, nyitvatartási idővel stb. rendelkeztek. Legtöbbük nagy depolarizáló feszültségek hatására nyit ki, mint az a következő ábrán patch-clamp mérések során regisztrált egyedi csatorna aktivitást tükröző áram impulzusok amplitudójából és nyitási frekvenciából látható. Növekvő depolarizáció hatására az áram impulzusok amplitudója és a csatorna nyitott állapotban eltöltött ideje egyre nagyobb lesz.

A fenti hatás fiziológiai jelentősége az akciós potenciál terjedése során depolarizált idegsejt membrán repolarizációjában keresendő.

### A feszültség-vezérelt csatorna fehérjék közös eredete

A feszültség-függő  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák közötti alábbi hasonlóságok alapján feltételezhető, hogy minden csatorna fehérje egy közös ősből fejlődött ki.

#### Feszültség-vezérelt $\text{Na}^+$ csatorna

**Helix 4:** domain I   S A L R T F R V L R A L K T I S V I P G L K  
domain II   G L S V L R S F R L L R V F K L A K S W P  
domain III   G A I K S L R T L R A L R P L R A L S R F E  
domain IV   R V I R L A R I G R I L R L I K G A K G I R

#### Feszültség-vezérelt $\text{Ca}^{2+}$ csatorna

**Helix 4:** domain I   K A L R T F R V L R P L R V L S G V P S L Q  
domain II   L G I S V L R C I R L L R L F K I T K Y W T  
domain III   S V V K I L R V L R A L R P L R A I N R A K  
domain IV   I S S A F F R L F R V M R L I K L L S R A E

#### Feszültség-vezérelt $\text{K}^+$ csatorna

**Helix 4**                    R V I R L V R V F R I F K L S R H S K G L O

1.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák közös tulajdonsága, hogy akkor nyitnak ki amikor a membrán depolarizált állapotba kerül.

2. Mindhárom csatorna feszültség érzékelő S4 szegmensének minden harmadik vagy negyedik pozíciójában pozitív töltéssel rendelkező lizin (K) vagy arginin (R) aminosavrészett találunk.

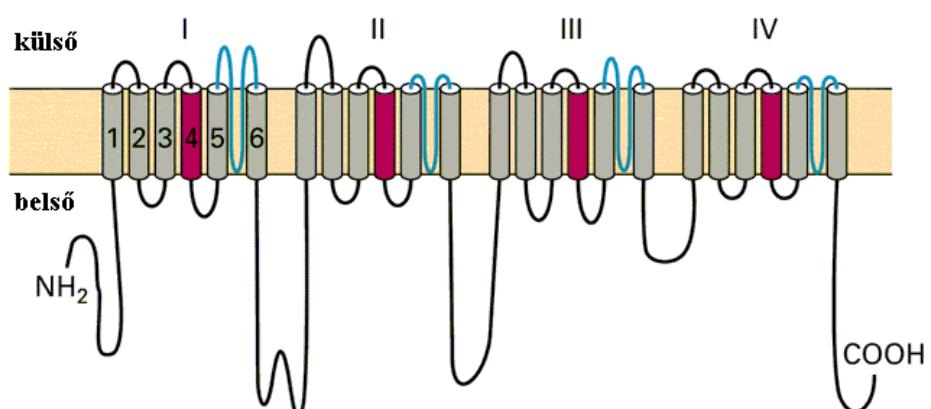
3. A feszültség-vezérelt  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák szerkezete nagyon hasonló alapokra vezethető vissza. A tipikus kálium csatorna négy azonos, egyenként 600 aminosavrészsből álló polipeptid láncot tartalmaz, amelyek mindegyike hat darab membránt átfélő alfa-hélikális struktúrával rendelkezik. A  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák ezzel szemben egy folyamatos kb. 2000 aminosavrészett tartalmazó polipeptid láncból állnak, amely mindegyike négy olyan homológ transzmembrán domaint tartalmaz, amelyek szerkezete viszont igen hasonlít a kálium csatorna fehérje szerkezetéhez.

4. A feszültség-vezérelt  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák egységesen tartalmaznak egy hasomló pozícióban lévő H5 pórus-bélelő szegmenst. Ezen szegmens aminosav oldalláncai határozzák meg ezen csatornák ionszelekтивitását, amint azt hely-specifikus csatorna mutánsokkal végzett kísérletekkel bizonyították.

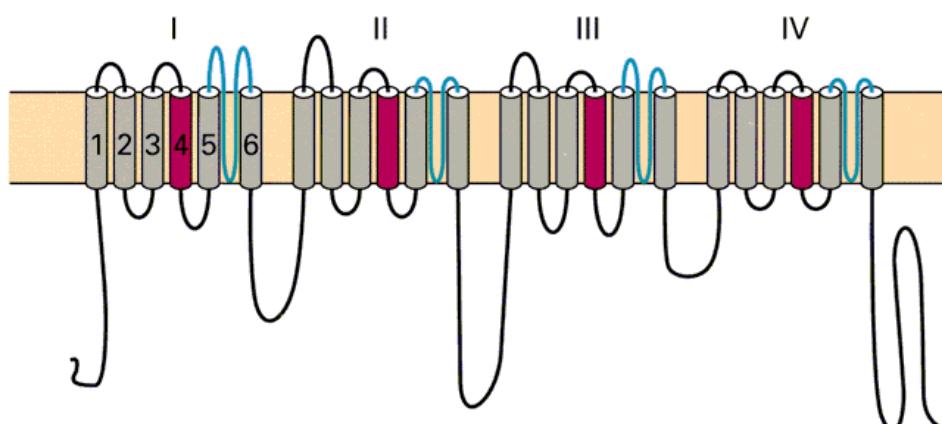
A feszültség-vezérelt kálium csatorna megtalálható minden élesztőben és állati egyejtűben. Ezzel szemben pl. a feszültség-vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$  csatornát csak a legfejlettebb

néhány állati egysejtű élőlény tartalmazza és csak a többsejtűeknek van feszültség-vezérelt  $\text{Na}^+$  csatornájuk. Ebből arra következtethetünk, hogy az evolúció során a kálium csatorna fehérje jelent meg először és a  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna fehérjék az ősi  $\text{K}^+$  csatorna gén ismételt duplikációjával jöttek létre.

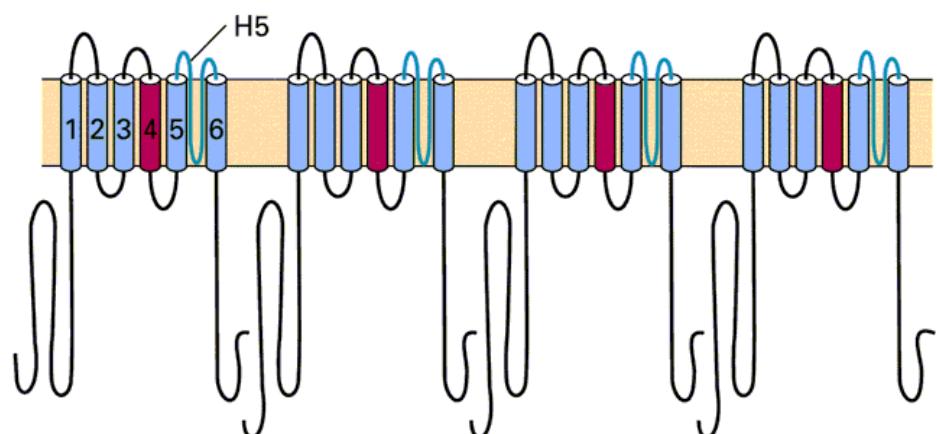
**(a) Feszültség-vezérelt  $\text{Na}^+$  csatorna**



**(b) Feszültség-vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna**

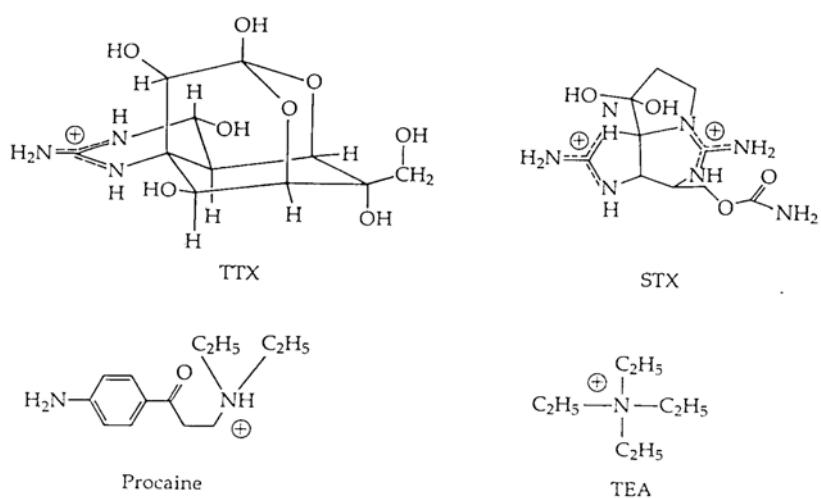


**(c) Feszültség-vezérelt  $K^+$  csatorna**



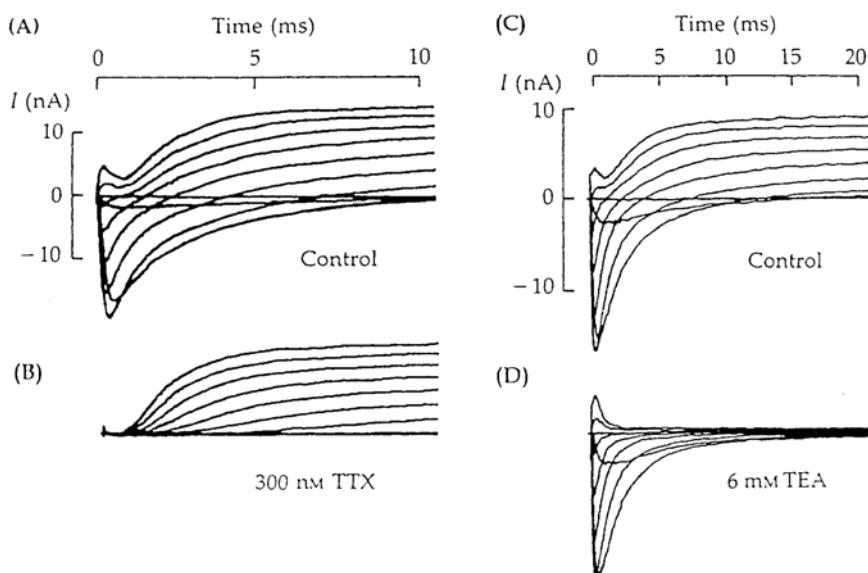
*Ioncsatornák farmakológiája*

**A nátrium és kálium csatorna aktivitás farmakológiai szeparálása csatorna blokkolókkal**



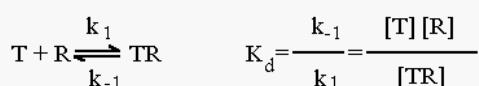
Tetrodotoxin (TTX) és saxitoxin (STX) paralizáló idegmérgek, amely vegyületek egyben igen specifikus nátrium csatorna blokkolók. A lokális aneszetikum gyanánt használt procain a klinikai gyakorlatban nátrium csatorna blokkolásra használják. A tetraethylammónium ion (TEA) egyszerű kvaterner ammónium vegyület, amelyet a kálium csatornák kísérleti blokkolására használnak széles körben. Az összes felsorolt vegyület hatása megfordítható.

A fenti ábrán a bal és jobboldali görbeseregek két független feszültség-zár kísérlet eredményét képviselik. A baloldali görbeseregeken látható, hogy a specifikus nátrium csatorna blokkoló TTX alkalmazását követően a tanulmányozott sejten csak a feszültség-függő kálium csatorna áramok mérhetők a kísérlet során a nátrium csatornák "zavaró" hatása nélkül. A jobboldali két ábrán a kálium blokkoló TEA alkalmazása hasonló módon lehetővé teszi a nátrium csatornáknak a kálium csatornáktól független észlelését.



### A gyógyszerek és toxinok receptorokon keresztül hatnak

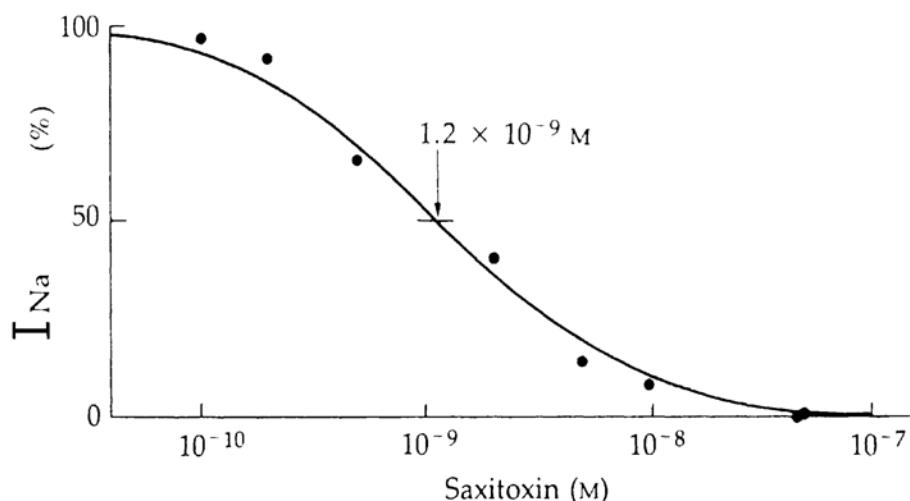
Az ioncsatornák és az azokat befolyásoló gyógyszerek, toxinok kölcsönhatása az alábbi egyszerű köcsönhatási sémával jellemezhető :



A százalékos receptor betöltöttség ( $y$ .) azaz a blokkolt csatorna hányad függése az alkalmazott drog koncentrációtól  $[T]$  az alábbi egyenlettel írható le, ahol  $k_d$  a drog disszociációs állandója és  $[R]$  a receptor koncentráció.

$$y = \frac{[TR]}{[TR]+[R]} = \frac{1}{1+k_d/[T]}$$

A következő ábrán egy tipikus dózis-hatásgörbét mutatunk be, amely a béka Ranvier csomóján mért nátrium csatorna aktivitásnak a saxitoxin hatására történő megváltozását tükrözi és megfelel a drog-receptor kölcsönhatás fenti egyszerű leírásának.



### Kulcsszavak, kulcskérdések

Ioncsatornák, vízcsatornák, nyugalmi csatornák, nyugalmi potenciál, feszültség-zár, egyedi ioncsatorna aktivitás, ionszelektivitás, csatorna gátló szerek, disszociációs állandó, dózis-hatásgörbe

Milyen csatorna típus határozza meg a sejtek nyugalmi potenciálját?

Milyen szabályozási feladatban vesznek részt a vízcsatornák?

Milyen tények bizonyítják a feszültség-függő ioncsatorna fehérjék közös eredetét?

Milyen egyszerű kölcsönhatási modellel írható le az ioncsatorna blokkolók hatása?

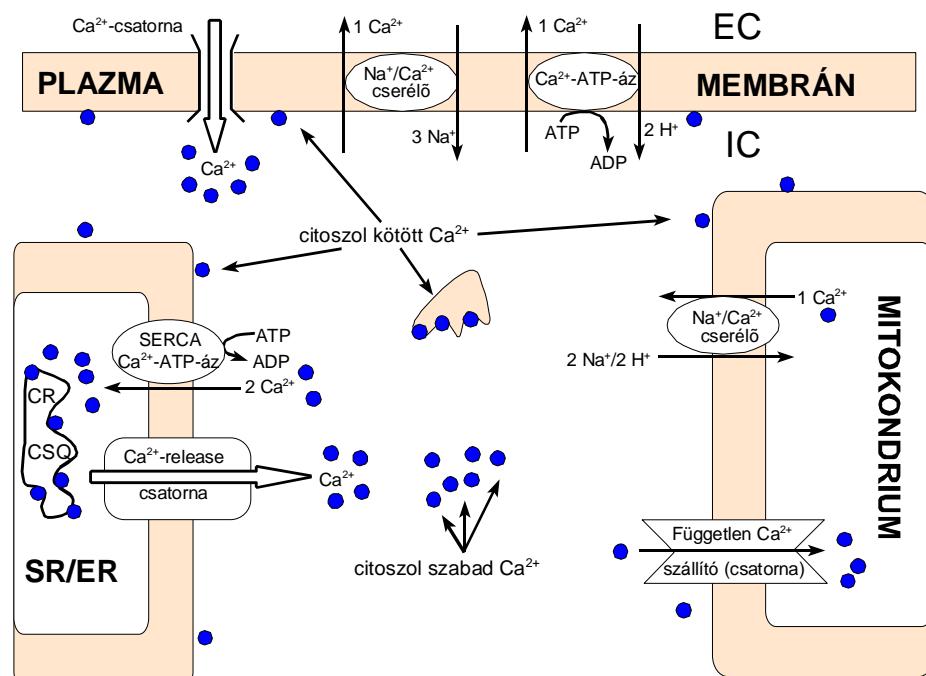


## Az ionmilieu szabályozása

### Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ homeosztázis

Gerinces élőlényekben a legnagyobb mennyiségen előforduló kation a kalcium (20-30 g/kg, emberben). A kalcium legnagyobb része a csontokban található hidroxiapatitként, ahonnan azonban hormonális hatásokra az oszteoklasztok segítségével nagy mennyiséggel kalcium mobilizálható, s így az extracelluláris tér szabad kalcium homeosztázisa fenntartható (szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció: ~1.2 mM).

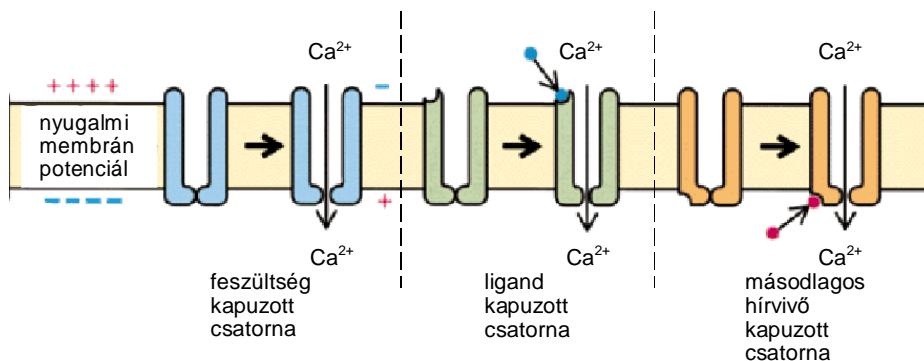
A citoszol szabad kalcium koncentrációja a sejtek nagy részében 100 és 200 nM között van. Ez a koncentráció több nagyságrenddel alacsonyabb mind az extracelluláris tér, mind pedig a sejten belüli sejtorganellumok  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációinál. Ebből következik, hogy a citoszol kalcium koncentrációjának szabályozásához nagyon hatékony rendszerek szükségesek. A szabályozásnak 3 komponense látható az 1. ábrán: a sejtmembrán, a szarko/endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium.



1. ábra Kalcium kompartmentek és transzport mechanizmusok. EC: extracelluláris tér, IC: intracelluláris tér, SR/ER: szarko- endoplazmatikus retikulum

## Sejtmembrán:

A sejtmembránban a citoszolból történő kalcium eltávolítására kétféle, ATP energiáját igénylő mechanizmus található. A **Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz**, amely szinte mindegyik emlős szövetben megtalálható, a P-típusú ion pumpák közé tartozik (lásd ott), elektroneutrálisan cserél 1 Ca<sup>2+</sup>-t 2 H<sup>+</sup>-ra ATP-ben tárolt energia felhasználásával. A transzport nagy affinitású és kis kapacitású, működési tartománya a normál citoszol Ca<sup>2+</sup> koncentráció tartományban van. Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció kismértékű emelkedése, és/vagy a Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin komplex (lásd később) allosztérikus úton aktiválja a pumpát, ami a citoszolikus szabad kalcium koncentráció csökkenéséhez vezet. A **Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiport** olyan (ideg és izom) sejtekben található, amelyekben a citoszol kalcium koncentrációjának gyakori és nagymértékű változásai következnek be a sejt működése során. A transzport elektrogén (3 Na<sup>+</sup> be /1 Ca<sup>2+</sup> ki), a működéséhez szükséges energiát a negatív membránpotenciál és a nátrium koncentráció gradiens biztosítja, azaz áttételesen a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-áz. A transzport alacsony affinitású és nagy kapacitású: szívizomsejtekben 3-5 μM citoszolikus szabad Ca<sup>2+</sup> koncentráció mellett (ami a normál érték >10-szerese!!) éri el a transzportsebesség a 3x10<sup>9</sup> ion/s-os maximum felét. A transzport tehát a sejtek ingerületi állapotát követő nagy mennyiséggű kalcium eltávolítására alkalmas. A membránon keresztül Ca<sup>2+</sup> az igen jelentős elektrokémiai gradiens kihasználva ioncsatornákon keresztül szabályozottan kerülhet be a sejtbe. A 2. ábrán a sejtmembránban elhelyezkedő Ca<sup>2+</sup> csatornák különböző kapuzási mechanizmusait mutatjuk be. Ideg és izomsejtekben leggyakoribb a feszültség kapuzott depolarizációra aktiválódó csatorna. A klasszikus értelemben



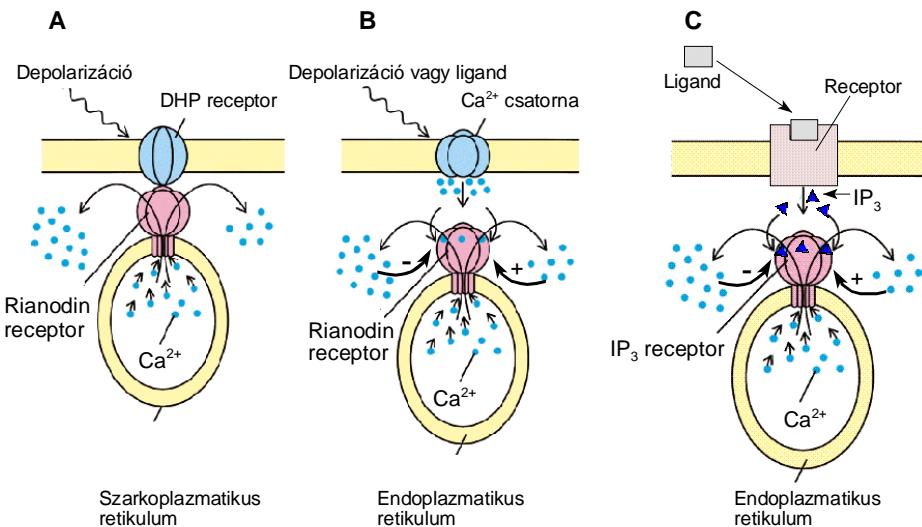
2. ábra Ca<sup>2+</sup> csatornák kapuzási mechanizmusai

"nem ingerelhető" (azaz akciós potenciált nem generáló) sejtekben külső ligand által és a másodlagos hírvivők által kapuzott csatornák a legjelentősebbek. Ez utóbbi csoportból fontos kiemelni azokat a csatornákat, melyek az IP<sub>3</sub> és IP<sub>4</sub> intracelluláris szintjének emelkedését követően aktiválódnak és így fontos pozitív visszacsatolást jelentenek a kalcium szignalizáció során (lásd később).

### Intracelluláris raktárak: gyorsan reagáló kalcium raktárak

Az emlős sejtekben a gyorsan reagáló kalcium raktárt az endoplazmatikus retikulum (ER) képzi (1. ábra). Ezen raktárak vesznek részt a citoszol Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának szabályozott, gyors változásaiban. Bár a kalcium forgalomhoz szükséges elemek megalálhatók az ER egészében (RER, SER - lásd a megfelelő fejezetben), mégis a jelenleg elfogadott nézetek szerint a kalcium forgalom jelentős része az ER specializálódott részeiben játszódik le. Ilyen speciális ER régiók izomsejtekben a szarkoplazmatikus retikulum (SR), nem izomsejtekben egy részében pedig a kalcioszóma. Ezen raktárak Ca<sup>2+</sup> felvételét a szarko-endoplazmás retikulum ATP-áz (SERCA) különböző szövetspecifikusan kifejeződő formái biztosítják. A SERCA a P-típusú ATP-ázok közé tartozik (ld. ott), 2 Ca<sup>2+</sup>-t transzportál egy ATP hidrolíziséből származó energiával a citoszolból a lumenbe. A SERCA nagy affinitású Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz ( $K_m \sim 400$  nM), érzékenyen reagál az citoszol Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának változására. A transzport kapacitás izomsejtek esetében igen nagy, a SR membrán fehérjéinek > 90%-a SERCA (!) Ca<sup>2+</sup> pumpa.

A gyorsan reagáló intracelluláris raktárakból a kalcium az un. Ca<sup>2+</sup>-release csatornákon keresztül szabadul fel. Ezek a release csatornák két különböző családba sorolhatók, elnevezésük pedig az öket aktiváló másodlagos hírvivő (IP<sub>3</sub>) ill. a hozzá-kötődő növényi alkaloida (rianodin) alapján rendre IP<sub>3</sub> receptor ill. rianodin receptor (RYR). Az IP<sub>3</sub> és rianodin receptorok szignifikáns C-terminális szekvencia homológia mellett igen hasonló általános szerkezzettel rendelkeznek: igen nagy méretű alegységekből felépülő tetramer molekulák, a membránba horgonyzott C-terminussal és a citoplazmába karfiol-szerűen türemkedő N-terminussal (3. ábra). A receptorok homológ, a membránba ágyazott része felelős a Ca<sup>2+</sup> csatorna funkcióért, a citoszolba betüremkedő rész pedig a csatorna kapuzásáért, az aktivációt biztosító szignál felvételéért felelős.



**3. ábra Intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  release csatornák** +: pozitív visszacsatolás, -: negatív visszacsatolás, háromszög:  $\text{IP}_3$ , kör:  $\text{Ca}^{2+}$

### Ryanodin receptor

A ryanodin receptorok a harántcsíkolt izom szarkoplazmatikus retikulumában ott találhatók, ahol a plazmamembrán egy speciális betüremkedése (T-tubulus, lásd ott) és az SR szoros kapcsolatban áll. A kapcsolat a RYR és a plazma membrán L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornái (dihidropiridin receptor, DHP) között van (3.A ábra). Az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák membrán depolarizációra aktiválódnak, a fehérjében ekkor létrehozott konformáció változás direkt fizikai csatolással tevődik át a ryanodin receptorra, okozva ezzel a RYR csatorna kinyitását és kalcium kiáramlását az SR lumenből. (3.A ábra). Szívizomban és idegsejtekben a plazmamembrán receptorok és a RYR között ilyen kapcsolat nincs. Ezen csatornák kapuzási mechanizmusa az un.  $\text{Ca}^{2+}$ -indukált- $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR). A plazmamembrán kalcium csatornáinak aktiválását követően (lásd 2. ábra) a citoszol szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja emelkedik, a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok a RYR receptorhoz kötődve aktiválják a csatornát, ami a raktáróból történő  $\text{Ca}^{2+}$  kiáramlást eredményezi (3.B ábra). A  $\text{Ca}^{2+}$  kiáramlás növeli a citoszol szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját ami újabb

RYR-t aktiválhat (pozitív visszacsatolás). A  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció további emelkedése negatív visszacsatolással gátolja a RYR-t.

### IP<sub>3</sub> receptor

A 3.C ábrán ideg és egyéb klasszikus értelemben "nem-ingerelhető" sejtek (hepatociták, limfociták) intracelluláris raktárából (ER/kalcioszóma) sejtmembrán receptor agonisták által kiváltott kalcium felszabadulás mechanizmusa látható. A plazmamembrán-receptor ligand általi aktivációját a citosol felé egy, a membránban található lipid (foszfatidil inozitol 4,5-difoszfát) bomlásterméke, az inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) közvetíti. (A receptorok és az inozitol lipidek közötti kapcsolatot részletesen a transzmembrán jelátvitellel foglalkozó fejezet tárgyalja). Az IP<sub>3</sub> kis, vízben jól oldódó, a citosolban könnyen diffundáló molekula, mely az ER/kalcioszóma IP<sub>3</sub>-receptorokhoz kötődik, indukálva ezzel az IP<sub>3</sub>-receptor- $\text{Ca}^{2+}$ -release csatornák kinyílását. Az IP<sub>3</sub>-receptor működésének legfontosabb szabályzója maga az általa szállított ion, a kalcium: az IP<sub>3</sub>  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló képessége függ az éppen aktuális citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációtól. A  $\text{Ca}^{2+}$  függés egy haranggörbével írható le, emelkedő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációk mellett az IP<sub>3</sub> hatása fokozódik, maximális  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló képesség ~ 300 nM  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció mellett figyelhető meg, ettől nagyobb  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció már gátolja az IP<sub>3</sub>-indukált Ca<sup>2+</sup> felszabadítást. A kezdeti kalcium release pozitív visszacsatolással fokozza a kalcium kiáramlást, a  $\text{Ca}^{2+}$  fokozatos citoszolikus akkumulációja pedig aktiválja a negatív visszacsatolást. A receptor feedback szabályozása tehát igen szoros hasonlóságot mutat a CICR mechanizmussal, ezért gyakran IP<sub>3</sub>-függő CICR mechanizmusnak is nevezik a receptor működését.

Az ER/SR lumenébe felvett kalcium ionok egy része szabad marad, túlnyomó többségük azonban kalciumot raktározó fehérjékhez kötődik (1. ábra). A két legjelentősebb kalcium-raktározó fehérje a calsequestrin (CSQ) és a calreticulin (CR) közös tulajdonsága, hogy nagyszámú, alacsony affinitású, nem specifikus kalciumkötő hellyle rendelkezik (20-50 kalciumkötés/molekula,  $K_d = 1-4 \text{ mM}$ ). A calreticulin korábbi megtévesztő neve (nagy affinitású kalciumkötő fehérje, HABP) abból származik, hogy van egy nagy affinitású kalcium kötőhelye is ( $K_d = 3-4 \text{ } \mu\text{M}$ ), a számos alacsony

affinitású kötőhely mellett. A CSQ különböző altípusai szinte kizárolag izomsejtekben fordulnak elő, míg a CR valamennyi eukarióta sejtben megtalálható. A CSQ és a CR elsődleges szerepe a gyorsan mobilizálható kalcium raktárak biztosítása valamint ezzel egyidejűleg az intraluminális kalcium koncentráció változások pufferolása. Az intraluminális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció ~0.01 M, a szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció néhány mM lehet, melyet konstans értéken tartanak a már említett  $\text{Ca}^{2+}$  kötő fehérjék. A stabil intraluminális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció igen fontos szerepet játszik az ER egyéb funkcióiban is, többek között számos intraluminális és integráns fehérje harmadlagos struktúrájának létrehozásában és fenntartásában (pl. BiP intraluminális chaperone fehérje).

### Intracelluláris raktárak: mitokondrium

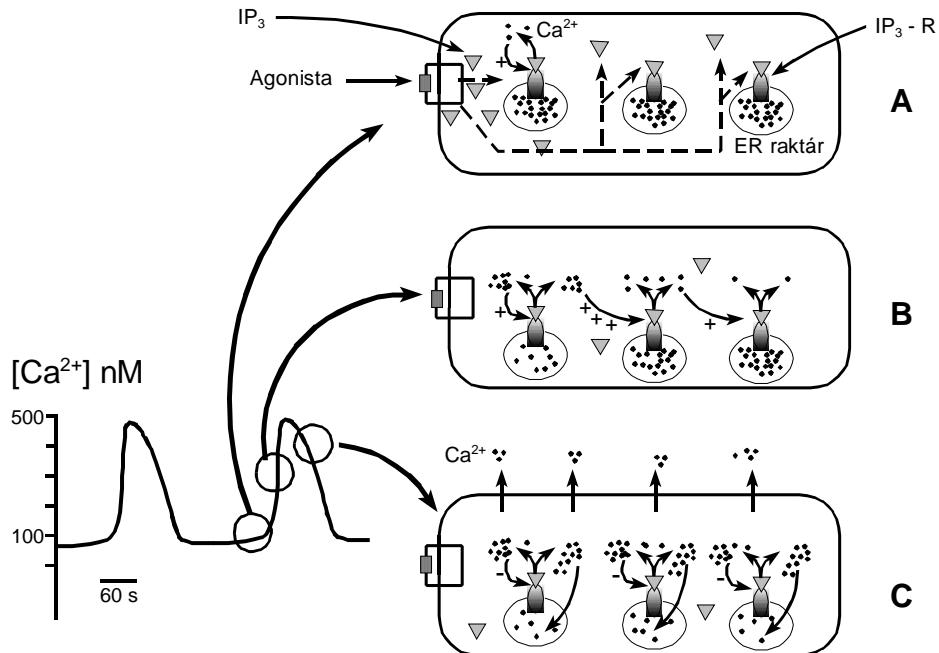
A mitokondriumok jelentős, relatíve nagy kapacitású, alacsony affinitású intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak (1. ábra). A raktárba a kalcium felvételét a mitokondrium belső membránjában található elektrogén "független szállító" végzi, mely újabb kutatási eredmények szerint inkább ioncsatorna mint karrier molekula. A kalcium transzportjához az energiát a kb -180 mV mitokondriális membránpotenciál biztosítja, ami az elektrogén  $\text{H}^+$  transzport eredménye (lásd kemiozmotikus elmélet). A transzportrendszer igen magas, >10  $\mu\text{M}$  citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció mellett aktiválódik. A mitokondriális mátrix  $\text{Ca}^{2+}$ -ot az elektroneutrális  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  és  **$2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport** segítségével képes leadni a citoszolba. A mitokondrium mátrixban a kalcium koncentráció 50 és 200  $\mu\text{M}$  közötti értéke az elektrogén  $\text{Ca}^{2+}$  influx és az elektroneutrális  $\text{Ca}^{2+}$  efflux közötti kinetikai egyensúly eredményeként alakul ki. Hosszú időn keresztül a mitokondriumokat lassan equilibrálódó  $\text{Ca}^{2+}$  raktárként tartották számon, a sejtek fiziológiai  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció tartományában a szabályozó szerepét vitatták. Újabb vizsgálatok bizonyították, hogy a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció és ezzel parallel a mátrixban található  $\text{Ca}^{2+}$  vezérelt dehidrogenázok működése érzékenyen és igen gyorsan követi a citoszol  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának változásait. A jelenséget úgy magyarázzák, hogy az  $\text{IP}_3$  receptor közelében a lokális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációk akár az 5-6  $\mu\text{M}$ -t is elérhetik, ami elegendő a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételének aktiválásához.

## Intracelluláris raktárak: lassan reagáló kalcium raktárak

Ezen raktárak közös tulajdonságai: *a*, neutrális vagy alkalikus intraluminális pH, *b*, ATP függő  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel (de nem SERCA), *c*,  $\text{IP}_3$  receptor és RYR hiánya. A legvalószínűbb ilyen raktárak a *trans*-Golgi hálózat és az ER kalcium forgalomra nem specializálódott részei lehetnek.

### A citoszol tulajdonságai:

A citoszolban található  $\text{Ca}^{2+}$  ionok 80-90 %-a intracelluláris proteinekhez és membrán felszínekhez kötött állapotban található, a maradék képzi a szabad kalciumot (1. ábra). A fentebb említett transzportfolyamatok eredményeként a citoszol nyugalmi szabad kalcium koncentrációja a sejtek nagy részében 100 és 200 nM között van. Az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció két szempontból kedvező a sejteknek. Egyrészt a magasabb rendű szervezetekre jellemző, foszfátvegyületeken alapuló anyagcsere egyik kritikus feltétele az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció, ellenkező esetben hidroxiapatit kristályok kiválása történne a citoszolban, a sejt "elmeszesedné". A másrészről, az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció energetikailag kedvezővé teszi az ion másodlagos hírvivőként való felhasználását: viszonylag kis mennyiségű ion energiaigényes mozgatása nagy  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációváltozásokat eredményez. A kalcium koncentráció emelkedése igen sokféle sejtből követíti az extracelluláris térből érkező igen eltérő ingereket a citoplazma felé (lásd 3. ábra). A kalcium ionok a diffúziója a citoszolban sokkal lassabban és sokkal behatároltabb mit akármelyik más másodlagos hírvivőé (pl.  $\text{IP}_3$ ) az igen nagyszámú, majdnem teljesen immobilis  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhely miatt. Ha  $\text{Ca}^{2+}$  csak az extracelluláris tér felől áramlana a sejtekbe, akkor nagyon lassan, vagy egyáltalán nem érné el a kalcium jel a sejt belső régióit - csak a kalcium felszabadulás helyétől radiálisan mért néhány  $\mu\text{m}$  távolságot, azaz csak lokális hírvivő lenne a legtöbb, viszonylag nagy sejtből. A kalcium szignál sejten belüli tovaterjedésének kulcsa az intracelluláris raktárak térben és időben megfelelő aktiválása akár az igen szolubilis  $\text{IP}_3$  gyors eloszlásával és/vagy önmagát erősítő, regeneratív  $\text{Ca}^{2+}$ -release-val (CICR).



**4. ábra Kalcium tüskék keletkezési mechanizmusa.** Az ábra bal oldalán a citoszol szabad  $Ca^{2+}$  koncentrációja az idő függvényében egy izolált májsejten. A  $Ca^{2+}$  tüskék körrökkel jelölt fázisainak megfelelő történések az ábra bal oldalán láthatók, A, B és C-vel jelölve. +: pozitív visszacsatolás, -: negatív visszacsatolás, háromszög:  $IP_3$ , sötét pontok:  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$ -R:  $IP_3$  receptor

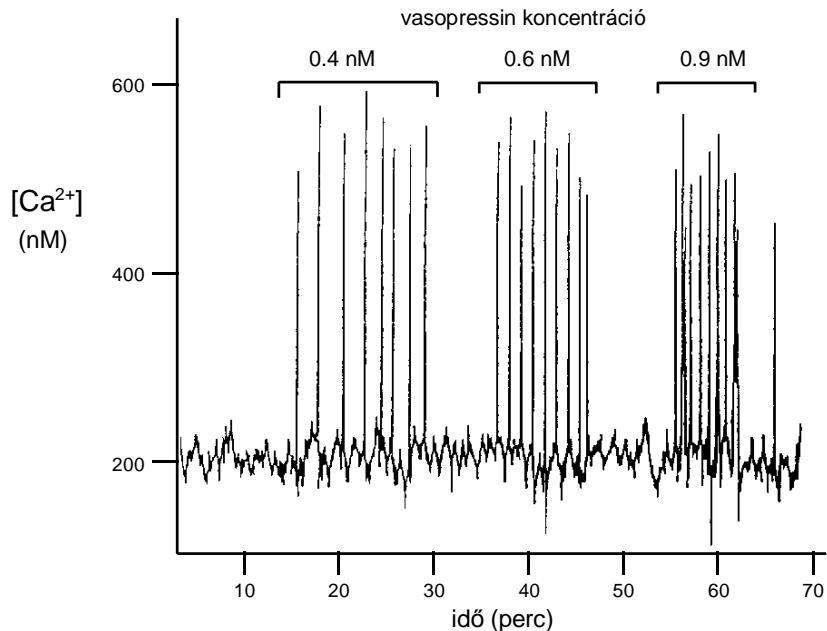
### $Ca^{2+}$ oszcilláció

Az intracelluláris raktárak térbeli és időbeli koordinált működése a legtöbb sejtben a citoszol  $Ca^{2+}$  koncentrációjának ritmikus oszcillációját eredményezi. A  $Ca^{2+}$  oszcillációk számos formája közül a "kalcium tüskéket" és azok keletkezését tárgyaljuk. A kalcium tüskék gyors felszálló szárral, és viszonylag lassú és igen variabilis leszálló szárral jellemzőek (4. ábra). A tüskék között a citoszol  $Ca^{2+}$  koncentrációja a nyugalmi értékre tér vissza. A jelenséget a receptor aktivációt követő kismértékű  $IP_3$  felszabadulás indítja el (4.A, 3.C. ábrák). Az  $IP_3$  az  $IP_3$  receptorhoz kötődve az intracelluláris raktárakból kismértékű  $Ca^{2+}$  felszabadulást indukál, ami a már

említett módon pozitív visszacsatolással fokozza a raktárak kiürülését és így a felszabadulás helyén a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt (4.A, 3.C. ábrák). A  $\text{Ca}^{2+}$  ionok lokális diffúziója érzékenyíti a közvetlen környezetben az  $\text{IP}_3$ -at kötött  $\text{IP}_3$  receptorokat ami újabb  $\text{Ca}^{2+}$  kiáramlást eredményez, elindítva ezzel egy térben tovaterjedő autokatalitikus folyamatot, mely a sejtben kalcium hullámként terjed tova (4.B ábra). Az  $\text{IP}_3$  receptor  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységének eloszlása egy olyan ingerelhető médiumot hoz tehát létre, melyben a  $\text{Ca}^{2+}$  hullám tovaterjedésének mechanizmusa  $\text{IP}_3$ -függő CICR. A  $\text{Ca}^{2+}$  hullám gyors terjedése (~50-100  $\mu\text{m/s}$ ) eredményezi az egész citoszol  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának változását mutató  $\text{Ca}^{2+}$  tüské gyors felszálló szárát. A tüské leszálló szárának magyarázata a felszabadított  $\text{Ca}^{2+}$  negatív feedback hatása az  $\text{IP}_3$ -indukált  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadításra (4.C, 3.C. ábrák), valamint a  $\text{Ca}^{2+}$  kipumpálása a citoszolból a raktárakba vagy az extracelluláris térré (4.C, 1. ábrák).

### A kalcium oszcillációk jelentősége

Ezek alapján érhetőek meg a kalcium tüskék további tulajdonságai: A membrán receptor agonisták és a következményes  $\text{IP}_3$  koncentráció növelésével a tüskék amplitúdója nem (ez jellemző tulajdonsága a pozitív feedback regulációnak-lásd az akciós potenciál keletkezését), csak a tüskék frekvenciája emelkedik !! (5. ábra). Így a sejtválaszok  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció függő szabályozása helyett (amplitúdó kódolás) sokkal finomabb szabályozást lehetővé tévő oszcilláció frekvencia kódolás használható. A frekvencia kódolás sokkal szélesebb inger tartományban biztosítja az extracelluláris tér felől érkező jelek kódolását, mint a tónusos, hosszú időn át fentálló, az inger erősségevel arányos citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változások (amplitúdó kódolás). Különösen igaz ez az "élettani" körülmények között mérhető igen alacsony hormon koncentrációk által kiváltott biológiai válaszokra: az extrém alacsony ingerre kialakuló tónusos  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedés szinte megkülönböztethetetlen lenne a nyugalmi  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció véletlenszerű ingadozásaitól. Ugyanekkor a stimulus erősségevel arányos frekvencia kódolással alacsony agonista koncentrációknál, ha ritkán is, de markáns  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változások tapasztalhatók. A kalcium oszcillációk frekvencia kódolt információját megfelelően nagy szabályzási tehetetlenséggel bíró kalcium függő enzimrendszerök könnyen integrálhatják biológiai válasszá. Egyik ilyen



**5. ábra Vasopressin indukált  $\text{Ca}^{2+}$  oszcilláció (kalcium tüskék) májsejtekben.** Az ábrán a citoszol szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja látható az idő függvényében különböző agonista koncentrációk mellett. A tüskék frekvenciája fokozódik a dózis növelésével, de az amplitúdó változatlan marad.

rendszer a máj sejtekben a mitokondriális redox rendszerek idő átlagában vett aktivitása, mely a kalcium oszcilláció frekvenciájától függ. Hasonló, az oszcilláció frekvenciájától függő aktivitást mutat a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin-CaM kináz rendszer, mely a kalcium koncentráció változásokban hordozott jelet közvetíti a sejt számára (lásd később).

Kiterjedten tanulmányozott kalcium oszcillációs választ adnak hepatociták vasopressin stimulációt ill. limfociták mitogén stimulációt követően. Ezen sejteken a kalcium tüskék 1s és 5 perc közötti időnként követik egymást, azaz relatíve lassú jelenségről van szó.

A kalcium tüské leszálló szárának egyik okozója a kalcium sejtből történő kipumpálása. E kalcium vesztés sorozatos ingerlést követően a kalcium raktárak

kiürüléséhez vezethet, meggátolva ezzel a további szignalizációt. Az intracelluláris raktárak ürülése azonban, eddig még nem tisztázott mechanizmussal elindítja a raktárak kalciummal való feltöltését az extracelluláris tér felől. A töltő áramot kalcium release aktivált áramnak ( $I_{CRAC}$ ) nevezik, hátterében igen kis vezetőképességű, plazmamembránban elhelyezkedő kalcium csatornák állnak.

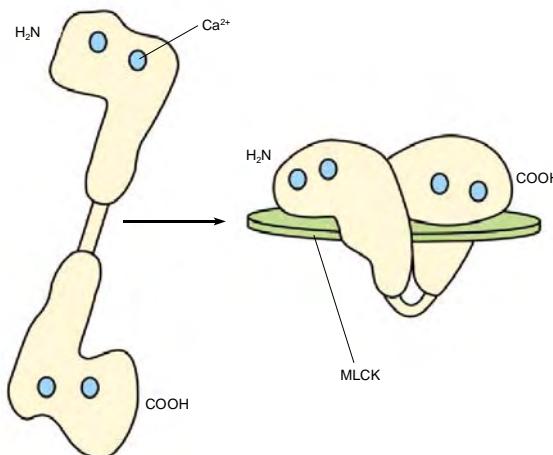
### A kalcium jel dekódolása: kalmodulin

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció extracelluláris jelek által kiváltott emelkedése számos sejtválaszt indít be. Ezen sejtválaszok közül az izomösszehúzódás kalcium ionok általi szabályozását az orvosi élettan tárgyalja részletesen. Az egyéb, bizonyítottan kalcium függő sejt válaszok találhatók az alábbi táblázatban:

#### 1. táblázat $\text{Ca}^{2+}$ függő sejt válaszok és a $\text{Ca}^{2+}$ emelkedés mechanizmusa

sejt	stimulus	$\text{Ca}^{2+}$ emelkedés mech.	sejt válasz	Comment:
idegvégződés	akciós pot.	fesz. kapuzott $\text{Ca}^{2+}$ csatorna	neurotransmitter szekréció	Comment:
limfocita	antigén*	$\text{IP}_3$ - kapuzott $\text{Ca}^{2+}$ csatorna	DNS szintézis, sejtosztódás	Comment:
pancreas $\beta$ sejt	acetilkolin*	$\text{IP}_3$ - $\text{IP}_3$ receptor-i.c. raktár	inzulin szekréció	
májsejt	vasopressin*	$\text{IP}_3$ - $\text{IP}_3$ receptor-i.c. raktár	glikogén lebontás	
fibroblast	PDGF*	$\text{IP}_3$ - $\text{IP}_3$ receptor-i.c. raktár	DNS szintézis, sejtosztódás	
limfocita	antigén*	$\text{IP}_3$ - $\text{IP}_3$ receptor-i.c. raktár	DNS szintézis, sejtosztódás	

PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor; \* a stimulus és az  $\text{IP}_3$  emelkedés kapcsolatát részletesen a transzmembrán jelátvitellel foglalkozó fejezet tárgyalja



**6. ábra Kalmodulin konformáció változás.**  $\text{Ca}^{2+}$  kötést követően (körök) a kalmodulin olyan konformációt vesz fel, amelyikben aktiválni tudja a miozin könnyű lánc kináz enzimet (MLCK).

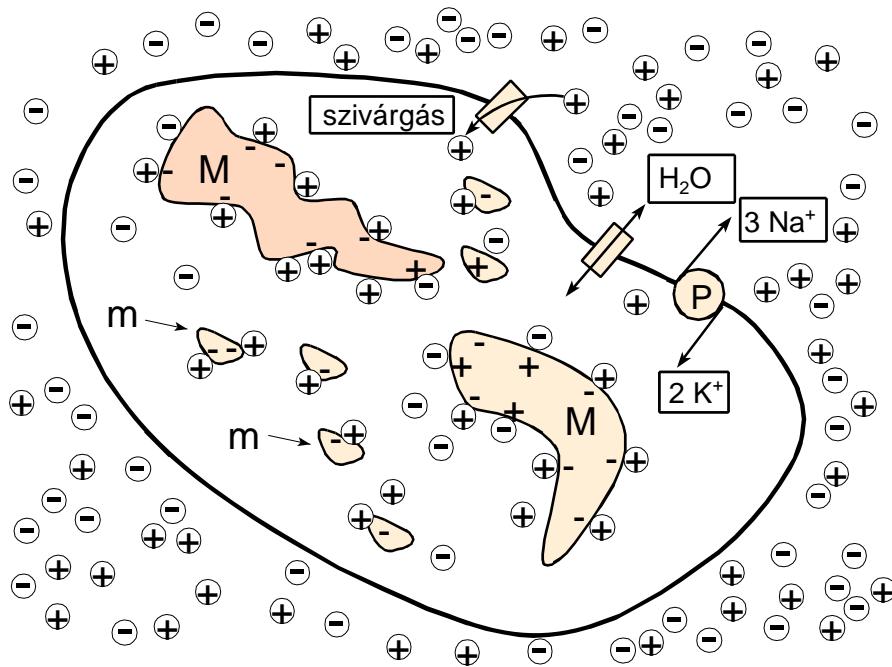
A megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt mint jelet a

kalciumot specifikusan kötő fehérjék továbbítják a kalcium függő sejtválaszok során. Az eukarióta sejtekben az egyik ilyen fehérje a kalmodulin. Egy kalmodulin molekula kooperatív módon köt négy  $\text{Ca}^{2+}$  iont (azaz az első  $\text{Ca}^{2+}$  kötődése elősegíti a következő  $\text{Ca}^{2+}$  bekötődését, és így tovább). A kalmodulin konformációját a  $\text{Ca}^{2+}$  kötés oly módon változtatja meg, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplex képessé válik számos intracelluláris enzimhez való kötődésre és azok aktiválására (6. ábra)

A  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplex számos eukarióta sejtbén aktiválja a plazma membrán  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ázt, ezzel fontos negatív visszacsatolást biztosít a citoszol  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának szabályozásában. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplex legjobban ismert szabályozó szerepe azonban a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin függő protein kinázokon (CaM-kináz) keresztül nyilvánul meg. A szűk szubsztrátspecifitású CaM-kinázok közül a glikogén lebontásban fontos szerepet játszó glikogén foszforiláz kináz (GPK) és a simaizom kontrakcióban szerepet játszó miozin könnyű lánc kináz (MLCK) a legismertebbek. A széles szubsztrátspecifitású CaM-kinázok közül az u.n. multifunkcionális CaM-kináz II működése a legjobban ismert. Idegvégződésekben ez az enzim szabályozza a katekolaminok szintézisét, azaz a megemelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció nemcsak a neurotranszmitterek szekrécióját, hanem azok újratermelését is beindítja (a fehérje foszforiláció általános szabályzó hatását lásd a transzmembrán jelátvitellel foglalkozó fejezetben).

## A sejtek ozmo- és volumen szabályozása

A sejtek citoplazmájában nagy mennyiségű oldott, ozmotikusan aktív komponens található. Ezeket mutatja be az 1. ábra. A citoplazma makromolekulái (1. ábra, M), bár méreteik igen jelentősek, önmaguk kis mértékben járulnak hozzá az intracelluláris ozmolaritáshoz alacsony intracelluláris moláris koncentrációik miatt. Többségük viszont többszörösen (negatívan) töltött, és töltéseiik számos ellentétes töltésű szervetlen iont (kationt) vonzanak magukhoz. Ezen un. ellenionok nagy számuk miatt jelentősen hozzájárulnak az intracelluláris ozmolaritáshoz, ezek az ionok adják az intracelluláris ozmolaritás döntő részét. A sejtek aktív transzport és metabolikus folyamatok révén nagy koncentrációban halmoznak fel kis méretű szerves molekulákat (1. ábra, m) mint pl. cukrokat, aminosavakat, nukleotidokat. Ezen metabolitok jó része



**1. ábra Intracelluláris ion és vízháztartás.** M: makromolekula, m: metabolit, M és m +/- töltései az intracelluláris fix töltések, körbe írt +/- töltések: ellenionok, ill. szabad ionok, P:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa

töltéssel rendelkezik és szintén szervetlen ellenionokat vonz magához. Így nemcsak maguk a kisméretű metabolitok hanem ellenionjaik is hozzájárulnak az intracelluláris ozmolaritáshoz, együttes ozmotikus aktivitásuk így jelentős.

Sem az intracelluláris makromolekulák sem pedig a kisméretű szerves metabolitok nem képesek átjutni a plazma membránon, ezek adják a sejten belüli kötött (fix) töltéseket. Ezzel szemben az ellenionok membránon átjuthatnak, így a sejtmembrán fél áteresztő membránként viselkedik (lásd Biofizika jegyzet).

Az extracelluláris folyadék ozmolaritásának túlnyomó részét az oldott szervetlen ionok adják, melyek képesek átszivárogni a sejtmembránon (1. ábra, szivárgás). Ha a sejt a beszivárgó ionokat nem pumpálná ki akkor egy klasszikus Donnan egyensúly alakulna ki a citoplazma és az extracelluláris tér között tekintve a nem permeáló töltött intracelluláris szerves molekulákat (lásd a Biofizika jegyzet megfelelő fejezeteit). Donnan egyensúlynál a permeáló szervetlen ionok intracelluláris koncentrációja (és így hozzájárulása az intracelluláris ozmolaritáshoz) nagyobb mint az extracelluláris térben. Mivel a plazma membránon át történő víztranszport az ozmotikus gradienstől függ, ezért membrán két oldala közötti ozmotikus gradiens a sejtek vízfelvételét vonná maga után (ozmózis jelenség), ami a sejtek duzzadásához, majd líziséhez vezetne. Könnyen belátható tehát, hogy a sejtek ozmo- és volumenregulációja szervesen összekapcsolódó jelenségek.

Baktériumok és állati eredetű sejtek a Donnan egyensúly és a kedvezőtlen ozmotikus gradiens kialakulása ellen az intracelluláris ionok plazmamembránon át történő kipumpálásával és így az intracelluláris ozmotikus nyomás csökkentésével védekeznek. A szervetlen ionok sejtekből történő eltávolítása kompenzál így a citoplazma organikus ion többletetéért.

Az intracelluláris ozmolaritás és következményesen a sejtvolumen szabályozásában legnagyobb szerepe a plazma membrán  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-áz pumpájának van (1. ábra, P). A pumpa egy ATP molekula energiáját felhasználva 3  $\text{Na}^+$ -t pumpál ki és 2  $\text{K}^+$ -t pumpál be a sejtbe az ionok koncentráció gradiensének ellenében. Egy munka ciklus alatt tehát nettó 1 ionnal csökkenti az intracelluláris kation tartalmat, fenntartva ezzel az alacsony intracelluláris anorganikus ion koncentrációt és elősegítve ezzel a citoplazma és az extracelluláris tér közötti ozmotikus gradiens megszüntetését. Mivel a pumpa

elektrogén, ciklusonként nettó 1 pozitív töltést juttat ki a sejtből, a pumpa működésével összefüggésben a sejt belsejében negatív membránpotenciál alakul ki, ami pedig gátolja a Cl<sup>-</sup> ionok sejtbe történő bejutását. Alapvetően tehát a sejtek Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> koncentrációja jelentősen alacsonyabb lesz az extracelluláris térben található értékeknél.

Az itt leírt pumpa-szivárgás mechanizmus szerepét számos sejt térfogat szabályozásában az bizonyítja, hogy a sejtek megduzzadnak, esetleg szét is eshetnek ha ouabainnal, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-áz pumpa specifikus gátlószerével kezeljük őket.

### Sejtek reakciói nem-izotóniás közegben

Az extracelluláris tér ionösszetételének és ozmolaritásának homeosztatikus szabályozása miatt a sejtek normál körülmények között ritkán kerülnek magasabb (hipertóniás) ill. alacsonyabb (hipotóniás) effektív ozmolaritású (tonicitású) közegbe. (A tonicitás az oldatok effektív ozmolaritása, mely függ az oldott anyagok koncentrációjáról és a szemipermeabilis membrán permeabilitási viszonyaitól). Kivételt képeznek többek között a vizelet elválasztó rendszer sejtei, ahol a megfelelő összetételű vizelet előállítása hatalmas ozmotikus gradienseket igényel, melyet a vesén áthaladva a vér alakos elemei (vörösvértestek, fehér vérsejtek) szintén érzékelnek (a vérplazma normál ozmolalitása 290 mosm/kg, a vese egyes részeiben a szövet közötti folyadék ozmolalitása eléri az 1200 mosm/kg értéket, lásd részletesen az orvosi élettant. ozmolalitás = 1000 g oldószerben oldott összes mólok száma, ozmolaritás = 1 dm<sup>3</sup> oldószerben oldott összes mólok száma).

Ha élő sejtek hipotóniás oldatba kerülnek, akkor megduzzadnak, míg hypertóniás közegben összeszegődnak. E folyamatban elsődleges szerepet játszik a sejtmembránon kereszttüli, az ozmotikus nyomás gradiens által kiváltott víztranszport. Mivel a mesterséges foszfolipid membránok víz permeabilitása igen alacsony ezért nem meglepő, hogy a sejtek plazma membránjának jelentős víz permeabilitásáért specifikus mechanizmusok, az aquaporin (CHIP) víz csatornák különböző, szövetspecifikusan kifejeződő formái a felelősek.

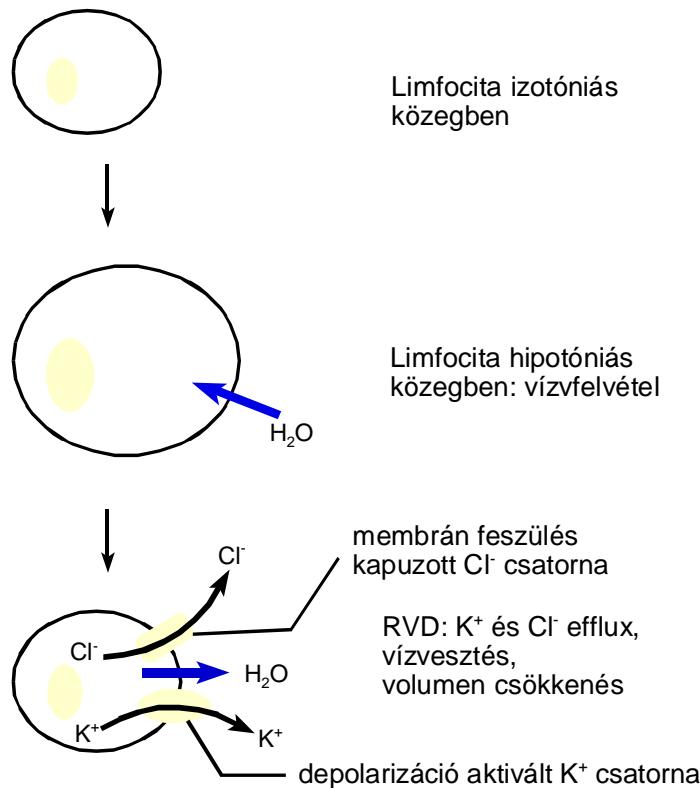
A térfogat változása károsan befolyásolja a sejtek működését: a sejtek duzzadását követően az intracelluláris ion- és metabolit koncentrációk csökkenése, a plazma

membrán feszülése és a mikrovillusok kisímulása, az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium lumenének kitágulása figyelhető meg. A sejtek zsugorodását követően az elsődleges zavart az intracelluláris ion koncentrációk emelkedése valamint a fehérjék hidratáltsági állapotának változása jelenti.

E kóros állapot megszüntetésére a sejtek komplex térfogat szabályozási mechanizmusokkal rendelkeznek: a hipotóniás közeg okozta duzzadást követően a sejtek térfogata csökken (szabályzó térfogat csökkenés, regulatory volume decrease, RVD), hipertóniás közeg okozta zsugorodást követően a sejtek térfogata nő (szabályzó térfogat növekedés, regulatory volume increase, RVI). Az RVD és RVI közös eleme az intracelluláris ozmotikusan aktív anyagok redisztribúciója és a következményes víz transzport ozmózis útján. Az ozmotikusan aktív anyagok redisztribúciójának első lépése a szervetlen ionok transzmembrán fluxusainak gyors megváltozása. Ehhez járul hozzá a szabad aminosavak és egyéb szerves metabolitok lassabb újraeloszlása a membrán két oldalán.

### Szabályzó térfogat csökkenés (RVD)

A 2. ábra mutatja be limfociták viselkedését hipotóniás közegben, feltüntetve az RVD-ben szerepet játszó elemeket. Az RVD elindítója a térfogat növekedést követő membrán feszülés, ami egy speciális  $\text{Cl}^-$  csatorna fajtát, a membrán-feszülés kapuzott kis vezetőképességű  $\text{Cl}^-$  csatornát aktiválja. A  $\text{Cl}^-$  ionok elektrokémiai gradiense olyan, hogy a nyitott csatornákon keresztül  $\text{Cl}^-$  ionok hagyják el a sejtet, a membrán fokozott  $\text{Cl}^-$  permeabilitása a membránt depolarizálja. A depolarizáció pedig a plazma membránban található feszültség kapuzott, depolarizáció aktiválta  $\text{K}^+$  csatornákat nyit ki, melyeken keresztül  $\text{K}^+$  ionok áramlanak ki a sejből. A sejt  $\text{K}^+$  és  $\text{Cl}^-$  vesztése csökkenti az intracelluláris ozmolaritást, ami a sejtek passzív vízvesztését és a normál sejt térfogat visszaállítását eredményezi. Ez egyúttal megszünteti az RVD-t elindító szignált, a membrán feszülését. A jelenség összegzése: a sejt  $\text{K}^+$  és  $\text{Cl}^-$  vesztéssel állítja be az intracelluláris tonicitást az extracelluláris oldat tonicitásához, ami következményes vízvesztést és a sejt térfogatának visszanyerését jelenti.



**2. ábra Az RVD mechanizmusa limfocitákban**

Más sejtekben az RVD-t a membrán feszülés aktivált  $Ca^{2+}$  csatornák indítják el, a citoszol szabad  $Ca^{2+}$  koncentrációja emelkedik, ami  $Ca^{2+}$  aktivált  $K^+$  és  $Cl^-$  csatornákat nyit ki a plazma membránban. A legtöbb állatfaj eritrocitáiban pedig az elektroneutrális  $K^+/Cl^-$  szimport aktiválódik hipotóniás közegben. A csatorna és transzporter mechanizmusok sokrétűsége biztosítja a különböző sejtek megfelelő adaptációs lehetőségeit.

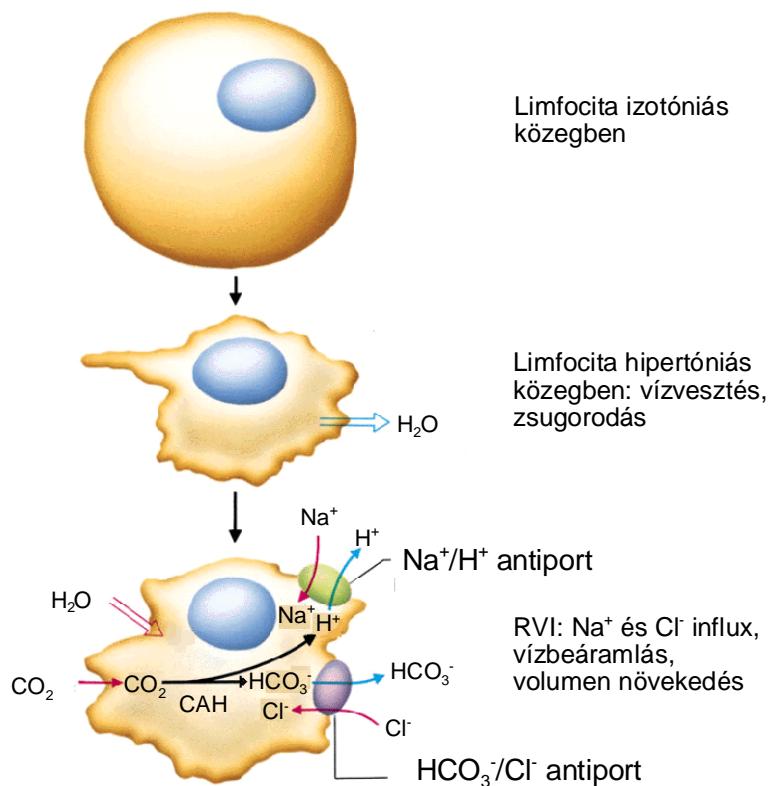
A sejtek azonnali (másodpercek-percek) válasza hipotóniás közeg hatására anorganikus ionok vesztése. A hosszabb távú (órák-napok) volumen szabályozás azonban a különböző aminosavak és bomlás termékeik, cukrok, polialkoholok és urea leadásával történik. Ezek közül legrészletesebben a sejtek taurin forgalma ismert. A

taurin (2-aminoetánszulfonsav) a kéntartalmú aminosavak anyagcseréjének végterméke és nagy koncentrációban (~50 mM) található meg a gerincesek legtöbb sejtjében, alkalmassá téve ezzel az intracelluláris ozmolaritás hatékony szabályozására. A sejtek duzzadását követően egy taurinra (és alaninra) specifikus csatorna aktiválódik pl. vörösvértestekben, biztosítva ezzel a taurin efflux útvonalat. Taurin és egyéb organikus molekulák (pl. szorbitol) sejtduzzadás indukálta effluxát biztosítja a nemrégiben glia sejtekben felfedezett VSOAC csatorna (Volume Sensitive organic Osmolyte/Anion Channel). A csatorna közepes vezetőképességű (~40 pS), nem szelektív, és működéséhez ATP-t igényel.

### Szabályzó térfogat növekedés (RVI)

A 3. ábra mutatja be limfociták viselkedését hipertóniás közegben, feltüntetve az RVI-ben szerepet játszó elemeket. Az RVI elindítója az elektroneutrális  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport aktiválódása. A sejt ozmotikusan aktív  $\text{Na}^+$ -t akkumulál miközben a  $\text{H}^+$  vesztés miatt a citoplazma pH-ja emelkedik. A citoszol lúgosodása aktiválja az RVI következő láncszemét, a  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  antiport mechanizmust (lásd a pH regulációt tárgyaló fejezetet). Az antiport elektroneutrálisan  $\text{HCO}_3^-$ -t távolít el a sejtből és  $\text{Cl}^-$ -t importál. A sejtből eltávolított  $\text{HCO}_3^-$  és a  $\text{H}^+$  pótlását a szénsav anhidráz végzi,  $\text{CO}_2$ -ból és vízből sénsav képződését katalizálja ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) ami azonnal bomlik  $\text{HCO}_3^-$  és a  $\text{H}^+$  ionokra. Az egész reakciósor eredményeként a sejten belül nettó  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  akkumuláció történik, az intracelluláris ozmolaritás emelkedik ami passzív vízfelvételt von maga után. A  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport aktiválódása és a sejt zsugorodása közötti kapcsolat részleteiben még nem tisztázott, feltehetően a transzporter citoskeletonnal való kapcsolata közvetíti az aktivációs szignált.

Más sejtekben a sejtek zsugorodása a  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  elektroneutrális kotranszportot (szimport) aktiválja, mely egy  $\text{Na}^+$ , egy  $\text{K}^+$ , és két  $\text{Cl}^-$  ion sejtbe történő bejutását katalizálja. A sók felvételét követi a sejtek vízfelvétele az emelkedő intracelluláris ozmolaritásnak köszönhetően. A  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  kotranszport aktivitása a protein foszforilációjával váltható ki, amit minden részletében még nem ismert mechanizmussal kontrollál a sejtek zsugorodása.



**3. ábra Az RVI mechanizmusa limfocitákban.** CAH: szénsav anhidráz

A hosszú ideig fentálló extracelluláris hypertonicitás mellett az ionok redisztribúciója mint szabályzó elem kimerül. A sejtek ezt szerves, ozmotikusan aktív anyagok felhalmozásával kompenzálják és tartják fönt az RVI-t. A szerves anyagok felhalmozása történhet a szintézisük felgyorsításával, a degradációjuk lelassításával, valamint az őket sejtbe transzportáló,  $\text{Na}^+$  koncentráció gradienst kihasználó szimport transzporterek aktiválásával. A leggyakrabban felhalmozott szerves, ozmotikusan aktív anyagok a taurin, szorbitol és inozitol.

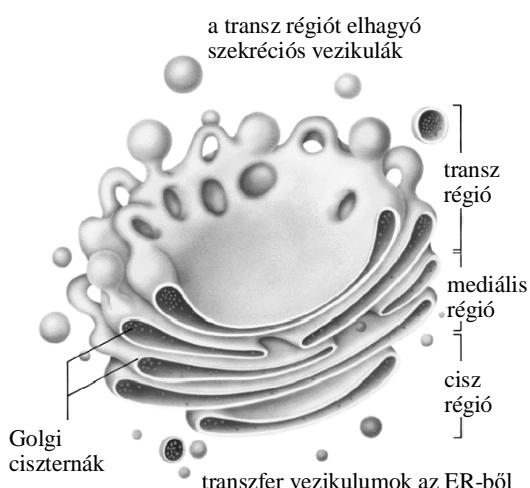


## Citoplazmatikus membránrendszerek

Az eukarióta sejtekben az intracelluláris tér nem tekinthető egybefüggő térnak, mert benne különböző membránrendszerek és membránokkal határolt sejtoragnellumok egymástól elválasztott kompartmenteket hoznak létre. A legkiterjedtebb membránrendszer az endoplazmatikus retikulum (ER), ami egy lipid kettősréteggel határolt összefüggő és elágazó rendszert képez. Két fajtája van:

1. *sima felszíni endoplazmatikus retikulum*: a zsírsavak, a koleszterol és a foszfolipid szintézis egyes lépéseinek helyszíne. Májsejtekben toxikus kémiail anyagok eltávolításában is részt vesz: az ER enzimei ezeket az általában hidrofób anyagokat hidrofil csoportokkal konjugálják, így azok vízoldékonnyá válnak, és végül kiválasztódnak az epébe. Szív- és vázizomsejtekben a sima felszíni endoplazmatikus retikulumot szarkoplazmatikus retikulumnak (SR) hívjuk. Az SR speciális funkciót tölt be: kiterjedt intracelluláris kalcium raktárként szolgál. Szerepet játszik ezen izmok kontrakciója során a kalcium felszabadulásban.
2. *durva felszíni endoplazmatikus retikulum*: felszínéhez riboszómák kötődnek. Ezen riboszómák felelősek a membránfehérjék, a szekretálódó fehérjék (emésztő enzimek, pl. tripszin; az extracelluláris tér strukturális elemei, pl. kollagén), peptid hormonok (pl. inzulin, glukagon) és a lizoszóma fehérjéinek szintéziséért. Az endoplazmatikus retikulumhoz nem kötött, ún. szabad riboszómák a citoplazmában, a magban, a mitokondriumokban és a peroxiszómákból található fehérjék szintézisét látják el.

Az endoplazmatikus retikulummal funkcionálisan szoros kapcsolatban van a Golgi készülék. Ez az organellum lipid membránnal határolt ciszternákból és vezikulumokból épül fel. A Golgi komplexum három fő funkcionális részből áll: cisz, mediális és transz Golgi ciszternák. Egyetlen Golgi készüléken belül több cisz, mediális és transz ciszterna is lehet, így összesen akár 6-10 ciszternát is tartalmazhat egyetlen Golgi komplexum. Ezen ciszternák a proteinek poszttranszlációs modifikációját végző enzimeket tartalmaznak: minden ciszterna csak a rá jellemzőket. Az endoplazmatikus retikulum felszínén szintetizálódó fehérjék vezikuláris transzporttal jutnak a Golgi készülékbe, ahol a cisz ciszternához kapcsolódó, vele összefüggő **cisz Golgi hálózatba** kerülnek, ami egymással összefüggő vezikulumokból áll. Ezt követően a fehérjék a



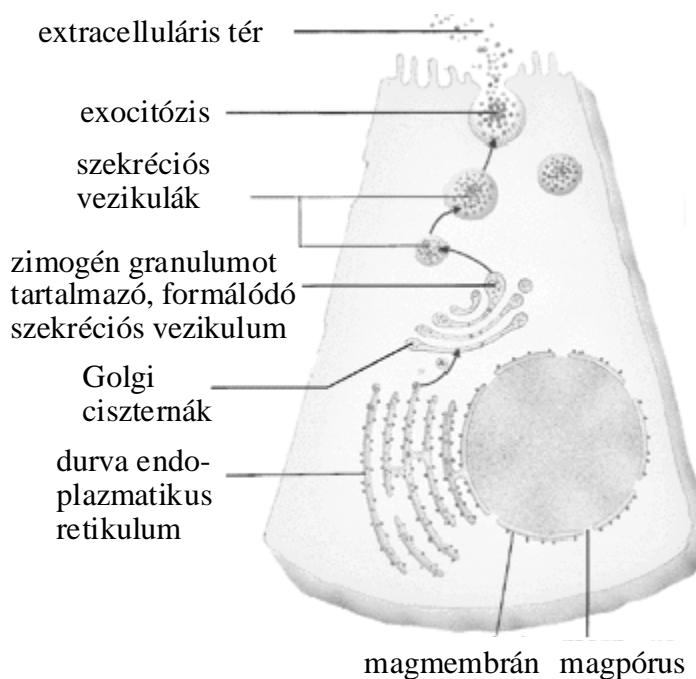
*1. ábra. A Golgi komplexum felépítése  
Az ábra a cisz és transz Golgi hálózatot nem tünteti fel, hanem a cisz és transz Golgi ciszternákkal együtt cisz, ill. transz régióknak nevezi.*

enzimek specificitása és a fehérje vándorlási iránya szabja meg, amely a Golgi készüléken belül egyirányú: a cisz oldal felől a transz oldal felé történik. A Golgi készülék ciszternái között a fehérjék vezikuláris transzporttal szállítódnak.

A sejtek alkotórészei folytonosan szintetizálódnak és lebomlanak. A lebontás egyik fontos helyszíne a lizoszóma, ami egy lipid kettősréteggel határolt membránvezikula. Az intravezikuláris pH savas (kb. pH 5). Ez kedvez a lizoszómában levő bontó enzimek működésének (nukleázok, proteázok, lipázok, glikozidázok, stb), mert ezek pH optimuma ezen érték körül van, és a lebontandó proteineket részben denaturálja, míg a bontó enzimek denaturáció nélkül elviselik a savas pH-t. A lizoszómákban kerülnek lebontásra egyes sejtorganellumok (pl. mitokondrium) és olyan proteinek, amelyeket a sejt az extracelluláris térből vett fel. Az ezekért a folyamatokért felelős bontó enzimek genetikus hiánya súlyos betegségeket eredményezhet (pl. Tay-Sachs betegség, amiben a hexózaminidáz nevű enzim hiánya miatt a glikoproteinek egy csoportjának lebontása károsodik, ezek felhalmozódnak egyes sejtekben, pl. az idegsejtekben, és azokat súlyosan károsítják).

Szintén egy lipid kettősréteggel körülvett sejtorganellum a peroxiszóma, ami

cisz, mediális és transz ciszternákba vándorolnak, és végül az „érett” fehérjék a transz ciszternával összefüggésben levő transz Golgi hálózatba kerülnek, ahonnan transzportvezikulák segítségével rendeltetési helyükre kerülnek. Eközben az egyes kompartmenteken belül az ott található enzimek módosítják a fehérjéket: szénhidrát egységeket adnak hozzájuk vagy hasítanak le róluk, másokat pedig módosítanak. Ezen folyamatok sorrendjét az



2. ábra. A szekréciós proteinek vezikuláris transzportja

bizonyos zsírsavak és aminosavak oxidációjában ( $R-H_2+O_2 \rightarrow R+H_2O_2$ , ahol  $R-H_2$  az oxidálódó anyag), és az ezen folyamat során keletkező hidrogén-peroxid lebontásában vesz részt. A peroxiszómákban nagy mennyiségben található a kataláz enzim, ami a hidrogén-peroxid lebontását végzi:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$ . minden peroxiszómális protein a citoplazmában szintetizálódik, és a kész protein transzportálódik a peroxiszómákba. A peroxiszómális oxidáció és a peroxiszómába irányuló protein transzport fontosságát hangsúlyozza az a tény, hogy a protein import genetikus hiánya halálos anyagsere betegségeket eredményez (pl. Zellweger szindróma, amiben a betegek a súlyos agy, vese és májkárosodás miatt születés után hamarosan meghalnak).

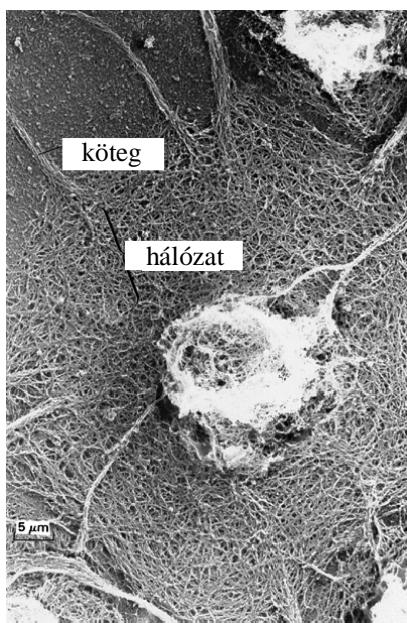
A citoplazmában találhatók a mitokondriumok is, amelyek a fentiek től eltérően kettős membránrendszerrel rendelkeznek. A mitokondriumok felelősek a sejtek energiatermelésének lebonyolításának nagyrészéért. Ezen folyamat legfontosabb része a belső membrán felszínén zajlik.

A sejtmagot a citoplazmától a magmembrán választja el. A magmembrán két lipid kettősrétegből áll, és összefügg az endoplazmatikus retikulummal: a magmembrán külső felszíne az ER folytatása. A magmembrán külső és belső felszíne a magpórusokban áthajlik egymásba. A magpórusokon keresztül zajlik a citoplazma és a sejtmag közötti transzport.

A citoplazmatikus membránok funkcionális és strukturális összefüggéseit a 2. ábra mutatja. Ezen egy szekréciós folyamatot végző sejt (hasnyálmirigy külső elválasztású mirigysejte) működését láthatjuk (a zimogén granulum kifejezés az emésztő enzimek inaktív formáját tartalmazó granulumokra utal).

Az eukarióta sejtekben levő membránrendszerek fontos szerepet töltnek be a sejtek anyagcseréjében. A membránnal határolt organellumok belsejében az egyes anyagok koncentrációja jelentősen különbözhet a citoplazmában található koncentrációtól. Ez egyrészt biztosítja azt, hogy a sejten belül egyszerre mehessenek végbe bontó és szintetizáló folyamatok: pl. a lizoszómák működésének alapvető feltétele az alacsony intravezikuláris pH; ha viszont az egész sejt pH-ja ilyen alacsony lenne, az a sejt halálát eredményezné. A citoplazmatikus proteázok hatásától viszont a lizoszómák, a Golgi komplexum, az ER és a szekréciós vezikulák proteinjei védettek ezen organellumok membránjai által. Másrészt a membránok két oldalán kialakuló gradiensek energiát tárolnak: biztosítják az ATP termeléshez szükséges közvetlen energiaforrást (l. mitokondriumok ATP termelése) és lehetővé teszik, hogy egyes anyagok koncentráció-gradiensükkel ellentétes irányba transzportálódjanak (pl. a glükózt a bélhámsejtek a koncentráció-gradienssel szemben veszik fel, az ehhez szükséges energiát a plazmamembrán két oldala között fennálló nátrium ion gradiens biztosítja). Továbbá a kalcium számára nehezen átjárható membránrendszerek teszik lehetővé, hogy az intracelluláris tér kalcium szintje alacsony legyen. Egyes organellumok (pl. mitokondrium és az endoplazmatikus retikulum speciális részei) a kalciumot ATP igényes aktív transzport segítségével felveszik. Bizonyos ingerek hatására (pl. hormonális inger) a kalcium ezen helyéről felszabadul, aminek a szignáltranszdukcióban van fontos szerepe.

## A citoplazma organizációja

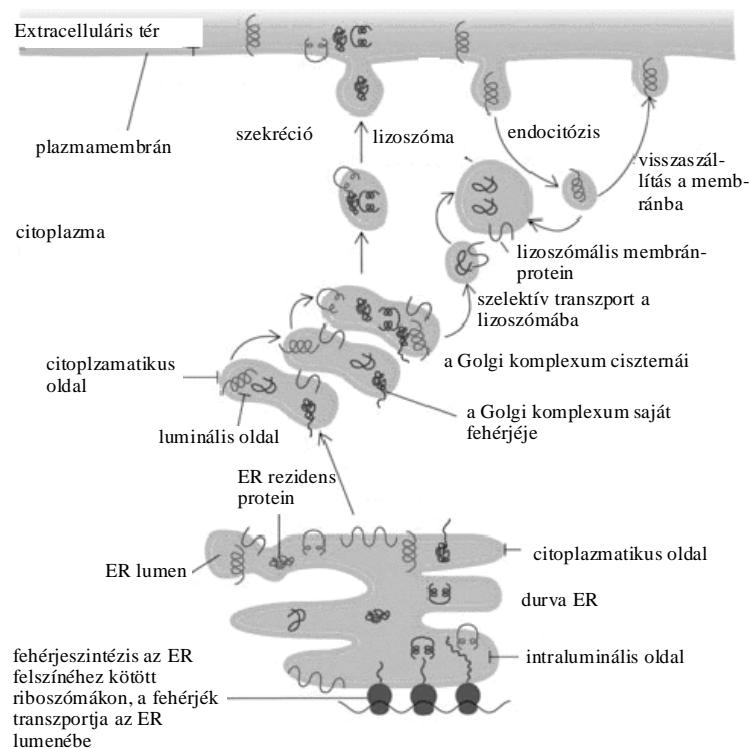


3. ábra. A citoskeleton behálózza citoplazmát. Az elektronmikroszkópos felvétel egy vérlemezről készült, amit a plazmamembrán eltávolítása céljából detergenssel kezeltek. A sejt középső részén a citoskeleton rendzetlen hálózatot alkot, míg a sejt nyúlványai mentén köteges szerkezet látható.

A citoplazma tagoltságának kialakításában nemcsak a fentebb ismertetett membránrendszer, hanem a citoskeleton is részt vesz. Ennek részletesebb ismertetésével külön fejezet foglalkozik. Az elektronmikroszkópos ábrán látható, hogy a citoplazmát rendkívül sűrűen behálózza a citoskeleton (3. ábra). Ennek felszínéhez nagyon sok, a citoplazmában „szabadon” levő enzim, vezikula és riboszoma kötődik. Ezen kölcsönhatások nagymértékben befolyásolják a citoplazmában lejátszódó diffúziós folyamatokat. Szabad diffúzió esetében a molekulák diffúziós állandója fokozatosan csökken a molekulatömeg emelésével. A citoplazmában lejátszódó diffúziós folyamatok esetében azonban a diffúzió sebessége csak egy bizonyos molekulatömegig csökken (kb. az inzulin molekulatömegéig, ami 12000 dalton), e fölött nagyjából állandó. Továbbá a citoplazmában történő diffúzió sebessége

általában lassabb, mint azt szabad diffúzió esetében várhatnánk. A diffúzió jellegének megváltoztatásáért a citoskeleton csak részben felelős, mert a citoskeleton felbontásával nem sikerült egyértelműen szabad diffúziót változtatni a citoplazmában lejátszódó folyamatokat. Ezért valószínű, hogy a diffúzió anomális jellegének kialakításában egyéb partikulumokhoz (pl. nagy protein komplexek és membránrendszer) való kötődés játsza a legfontosabb szerepet.

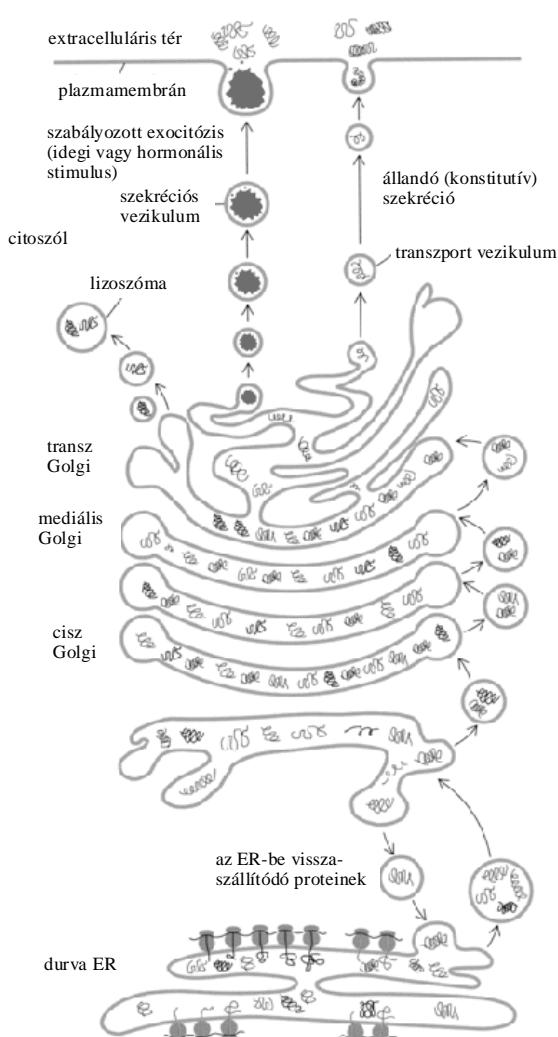
## Vezikuláris transzportfolyamatok általános áttekintése



4. ábra. A vezikuláris transzportfolyamatok áttekintése az ER-től a plazmamembránig

Az eukarióta sejtekben a makromolekulák transzportjában központi helyet foglal el a vezikulumok segítségével lejátszódó transzport. A vezikuláris transzport mindenkor egy vezikulum keletkezésével indul, ami lefűződéssel jön létre egy már létező membránból (pl. plazmamembrán, ER vagy Golgi komplexum membránja). Az így keletkezett vezikulum a citoplazmán keresztül eljut céljához, ahol fuzionál a célorganellum membránjával vagy a plazmamembránnal. A fent vázolt folyamat alapvetően minden vezikuláris transzportfolyamat (endocitózis, exocitózis, intracelluláris organellumok közötti transzport) esetében igaz, bár a molekuláris mechanizmusok specifikusak lehetnek az egyes esetekben. A vezikuláris transzportfolyamatok részletes tárgyalását a durva ER-en szintetizálódó proteinek útjának végigkövetésével kezdjük.

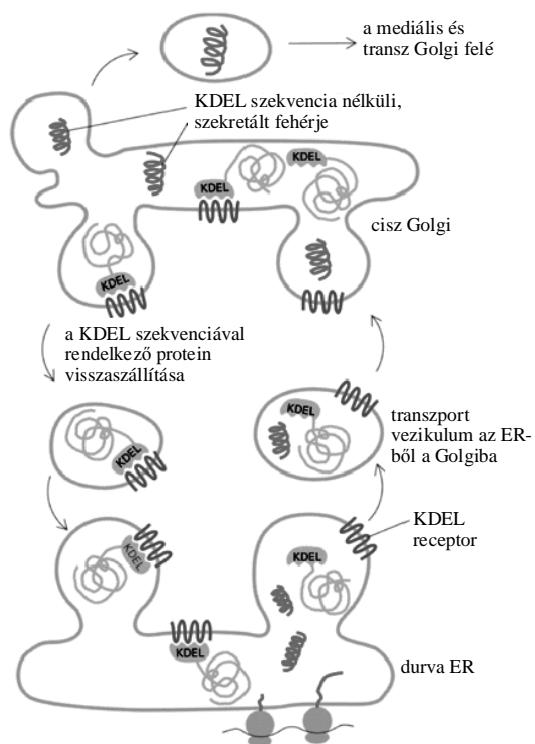
## Proteinek vezikuláris transzportja az ER-ból a Golgi komplexumba



5. ábra. Szekréciós folyamatok részletes bemutatása

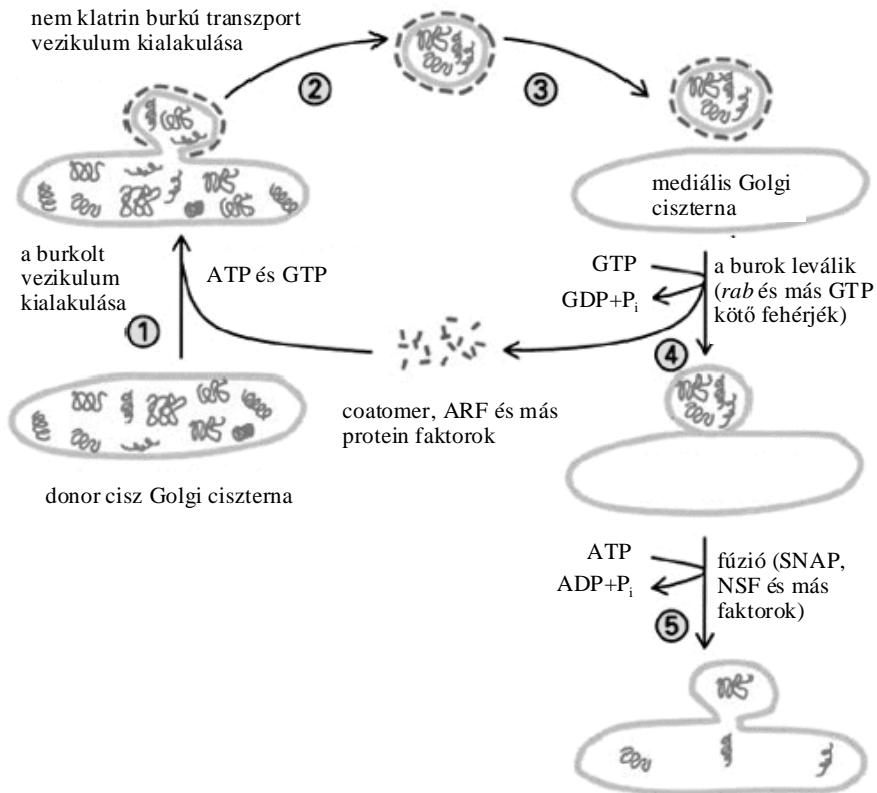
A szekrécióra kerülő, a lizoszómális és a membránproteinek az ER felszínén levő riboszómákon szintetizálódnak. Ezután a membránproteinek beépülnek az ER membránjába, a szekrécióra kerülő és a lizoszómális proteinek az ER lumenébe kerülnek. Ez ER-ben megkezdődik a fehérjék ún. poszttranszlációs modifikációja, ami a Golgi komplexumon belül is folytatódik. Az ER lumenében levő proteinek az ER-ről lefűződő vezikulák belsejében kerülnek transzportra a Golgi komplexum felé, míg a membránproteinek ezen vezikulumok membránjában szállítódnak. Az ER saját fehérjéi (ún. ER rezidens proteinek), amik az ER lumenében szabadon vannak, szintén bekerülnek ezen transzportvezikulumokba, de a Golgi komplexumból visszaszállítódnak. A folyamat alapja az, hogy ezen

proteinek egy speciális, négy aminosavból álló szekvenciával rendelkeznek: KDEL szekvencia (az aminosavak egybetűs rövidítése alapján: lizin-aszpartát-glutamát-leucin). Azon proteinek, amelyek rendelkeznek a KDEL szekvenciával, a Golgi komplexum lumenében kötődnek a KDEL receptorhoz. Ez a receptor, és minden hozzá kötődő fehérje visszatranszportálódik az ER-be (6. ábra). Ehhez elvében hasonló receptor-ligand kölcsönhatások képezik az alapját a proteinek szelektív transzportjának a vezikuláris transzport során: csak azon fehérjék kerülnek bele a vezikulumba, amelyek képesek a speciális receptorokkal kölcsönhatni.



6. ábra. ER rezidens proteinek transzportja a Golgiból az ER-be

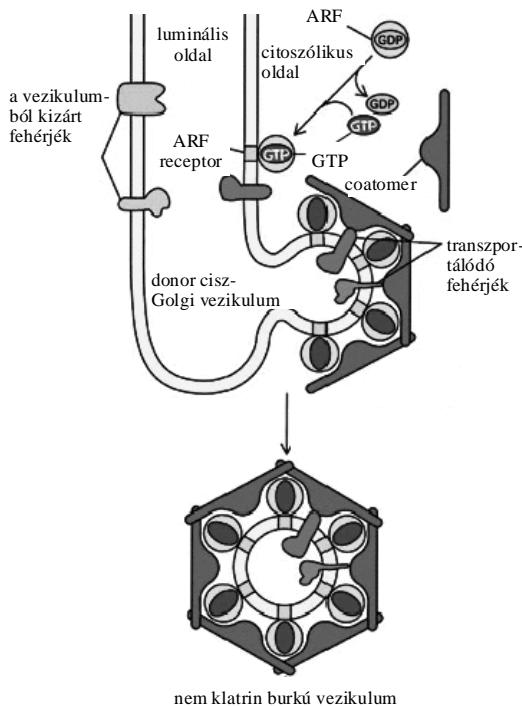
## A Golgi komplexumon belüli transzportfolyamatok részletei



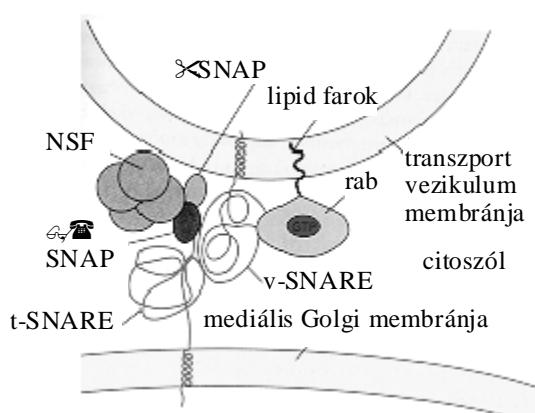
7. ábra. Vezikuláris transzport a Golgi ciszternák között

A Golgi komplexum cisz, mediális és transz ciszternái speciális funkcióval rendelkeznek. A Golgi komplexumba kerülő proteinek a cisz oldalra érkeznek meg az ER-ből, majd a mediális, végül a transz ciszternákba kerülnek. Az egyes ciszternák közötti transzportot ún. nem klatrin burkú vezikulumok bonyolítják le. (A klatrin a vezikulák egy csoportját borító protein, amelyet legkorábban fedeztek fel.) A nem klatrin burkú vezikulum kialakulását a cisz és a mediális Golgi ciszternák közötti transzport segítségevel szemléltetjük (7. ábra).

A transzportálódó proteinek a kialakulóban levő vezikulumban gyűlnek össze.



8. ábra. A coatomer burok kialakulása



9. ábra. A transzportvezikulum „dokkolását” irányító proteinek

Ezen folyamatban valószínűleg a KDEL receptorhoz hasonló funkciójú receptorok vesznek részt, amelyek specifikusan megkötik a transzportra kerülő proteineket. A transzportvezikulum kialakulása azzal kezdődik (8. ábra), hogy az ARF protein inaktív, GDP-t kötő alakja egy enzim hatására GDP-jét GTP-re cseréli, így aktiválódik. (ARF=ADP ribozilációs faktor, nevét onnan kapta, hogy a proteinekre ADP-ribáz csoportot illeszt; ezen aktivitásának a most tárgyalt folyamatban nincs jelentősége). Az aktív ARF-ben a proteinhez kötött zsírsavlánc exponálódik (a fehérje felszínére kerül), és rajta keresztül az ARF a membránhoz kötődik. A folyamatban szerepe lehet a formálódó vezikulumban elhelyezkedő ún. ARF receptornak is. A membránhoz kötött ARF a citoszólból ún. coatomer egységeket köt meg. A coatomer burok kialakulása ATP és GTP formájában

energiát igényel, továbbá szükséges hozzá egy citoplazmatikus, kis molekulatömegű G protein, aminek neve *rab*. A kis molekulatömegű G proteinek központi szerepet töltenek be a vezikuláris transzport szabályozásában (pl. *rab*) és a szignáltranszdukcióban (pl. *ras*). A kis molekulatömegű megjelölés szembeállítja ezeket a proteineket a 3 alegységes G proteinekkal, amelyek kizárolag a szignáltranszdukcióban vesznek részt.

A coatomer (és a később tárgyalandó klatrin) protein burokknak az a szerepe, hogy segíti a vezikulum lefűződését: mintegy kiboltosítja a membránt. Mindkét típusú burok további lehetséges szerepe, hogy hozzájárulnak a transzportra kerülő proteinek kiválasztásában. A burokproteinek egyéb fehérjéken keresztül (pl. AP a klatrin esetében, l. később) lépnek kölcsönhatásba a transzportálódó proteinekkel. Azok a fehérjék, amelyek nem képesek ilyen specifikus kölcsönhatások kialakítására, nem kerülnek bele a transzportvezikulumba.

A coatomer burok a vezikulum kialakulása után is a vezikulum felszínén marad, majd csak a célmembrán közelében, a fúzió előtt válik le. A depolimerizáció folyamata is energiaigényes: GTP-t és a kis molekulatömegű G proteineket igényel (pl. *rab*).

A transzportvezikulum és a célmembrán közötti felismerési folyamatban („dokkolás”) egy bonyolult molekulakomplexum vesz részt (9. ábra). A transzportvezikulum membránjában egy v-SNARE (vezikuláris SNAP receptor) protein

helyezkedik el. Ez kölcsönhatásba kerül az akceptor membránban levő t-SNARE proteinnel (target SNAP receptor). A két fehérje közötti kölcsönhatás stabilizálásában részt vesz az NSF (N-ethylmaleimid (NEM) szenzitív fúziós faktor, a NEM egy szulfhidril csoportokkal reagáló vegyület, ami azon proteineket, többek között az NSF-t is, inaktiválja, amelyek

rab1	ER és Golgi
rab2	ER és cisz Golgi
rab3a	szekréciós vezikulum
rab4	korai endoszóma
rab5	korai endoszóma, plazmamembrán
rab6	mediális és transz Golgi
rab7	késői endoszóma
rab9	késői endoszóma, transz Golgi
sec4	szekréciós vezikulum

1. táblázat. A *rab* proteinek szubcelluláris lokalizációja

működéséhez szulfidril csoport szükséges) és egy több alegységes protein, a SNAP (soluable NSF attachment protein). Ehhez a folyamathoz is szükséges egy *rab* protein, ami lipid farokkal kötödik a transzportvezikulum membránjához.

Felvetődik a kérdés, hogy mi biztosítja azt, hogy a transzportvezikulumok a megfelelő akceptor membránnal fuzionálnak. Ennek biztosításában a *rab* proteinek és a SNARE vesz részt, amelyeknek többféle formája létezik. Az egyes formák különböző vezikula-akceptor membrán kölcsönhatásokat tesznek lehetővé annak megfelelően, hogy milyen helyen találhatók (1. táblázat).

### A transz Golgi ciszternákból induló transzportfolyamatok

A szekrécióra kerülő, a membrán és a lizoszómális fehérjék útja a transz Golgi ciszternákból válik el egymástól. A lizoszómális proteinek mindegyikén mannóz-6-foszfát csoportot tartalmazó szénhidrát rész található. Egy enzim a lizoszómális proteineket egy speciális aminosav szekvenciarészlet alapján felismeri, és egy mannóz csoportot mannóz-6-foszfátra módosít. A mannóz-6-foszfát szénhidrát résszel rendelkező proteineket a transz Golgi hálózatban található mannóz-6-foszfát receptor felismeri és megköti. A receptor képes a lizoszómák felé transzportra kerülő vezikulumokba kerülni, és segítségével a lizoszómális proteinek is ezen transzport-vezikulumokba kerülnek.

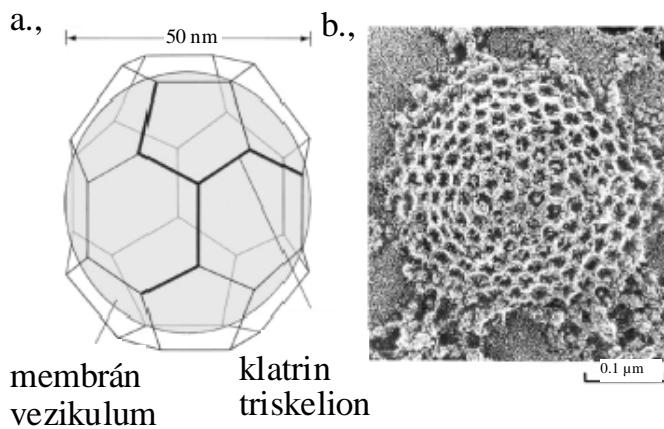
A szekrécióra kerülő proteinek transzportját a lizoszómákba irányuló transzporttól eltérő vezikulák bonyolítják le. Ezen csoporton belül további két út lehetséges (5. ábra): az állandóan (konstitutíven) szekretálódó proteinek útja elválik a reguláltan szekretálódó proteinektől. Konstitutíven szekretálódnak azok a proteinek, melyekre állandóan nagy mennyiségen van szüksége a szervezetnek (egyes szérumfehérjék, pl. albumin, az extracelluláris mátrix proteinjei), ill. a citoplazma membrán proteinjeit is a konstitutíven szekretálódó vezikulumok szállítják membránjukban (tehát nem a vezikulum lumenében) a plazmamembránhoz. A reguláltan szekretálódó proteinek szekréciójára csak külső (pl. hormonális) inger hatására következik be, ami a legtöbb esetben a citoplazmatikus kalcium koncentráció növekedése. Regulált szekrécióval kerülnek elválasztásra az emésztőenzimek és a hormonok. Nem pontosan ismert, hogy a transz Golgi ciszternában mi alapján kerülnek

ezen proteinek különböző vezikulumokba.

A plazmamembránhoz tartó transzportvezikulák útjuk végén összeolvadnak a plazmamembránnal, és tartalmukat kiürítik az extracelluláris térbe. Ezt a folyamatot exocitózisnak nevezzük.

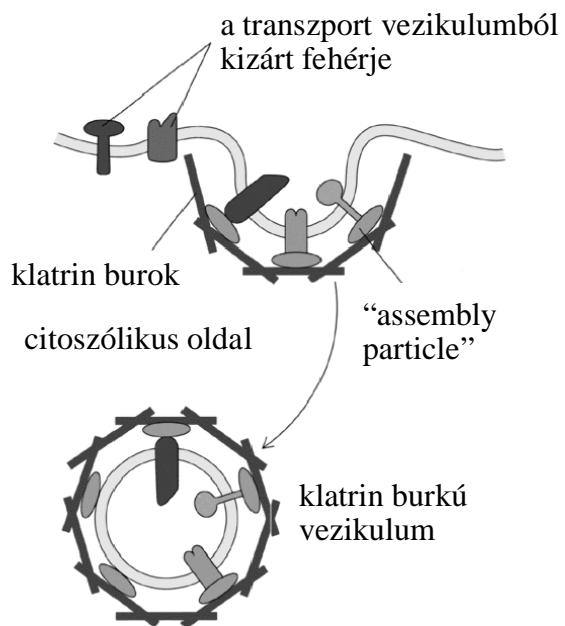
Bizonyos sejtek (pl. epiteliális sejtek) plazmamembránja polarizált: eltérő összetételű apikális (lumen fele néző) és bazolaterális membrándomennel rendelkezik. Ezen polarizáció vonatkozik a lipidekre és a proteinekre is. A már kialakult eltérő összetétel fenntartásában fontos szerepe van a két membránrész egymástól elválasztó, az egymás mellett elhelyezkedő sejteket rögzítő ún. tight junction-oknak, amik nem engedik a két membránrész közötti diffúziót. A polarizáció megteremtéséhez azonban az szükséges, hogy a két membránrészbe kerülő proteinek útja elváljon egymástól. Ez szintén a transz Golgi ciszternákban történik. A folyamat pontos mechanizmusa nem ismert. A legtöbb esetben az apikális és a bazolaterális membránba tartó proteinek eltérő vezikulumokba csomagolódnak. Valószínű, hogy az egyes membrándoménekbe kerülő proteinekben levő specifikus „szortírozó” szekvenciát egy receptor felismeri, és ez irányítja ezen proteineket a megfelelő membrándoménhez induló transzport-vezikulumokba.

A transz Golgi ciszternáról lefűződő vezikuláknak szintén van fehérje burkuk,



10. ábra. a., A klatrin burok felépülete klatrin egységekből (triskelion)

b., Egy klatrin burkú vezikulum elektronmikroszkópos képe.



11. ábra. A klatrin brok kialakulása

azonban a legtöbb esetben ez nem a már megismert coatomer egységekből, hanem klatrinból épül fel. A klatrin brok klatrin triskelion egységekből áll. Egy triskelion egység alakja a 10.a ábrán látható. Ezen egységekből egy öt- és hatszögekkel határolt, gömbölyű brok jön létre, melynek elektronmikroszkópos képe a 10. ábra b. részén látható. Míg a coatomer burkú vezikulák esetében a coatomer egységek membránhoz rögzítését az ARF látja el, hasonló feladatért a klatrin burkú vezikulák esetében az AP-1 és AP-2 (**assembly particle**) proteinek felelősek (11. ábra). Ezek a proteinek hozzákötődnek a transzportálódó proteinek citoplazma felőli oldalához, és a klatrin hozzájuk kötődve rögzül a vezikula felszínéhez. Azok a membránfehérjék, amelyek nem képesek az AP proteinek megkötésére, nem kerülnek bele a klatrin burkú vezikulába. A lizoszómális proteinek transzportja esetében a mannáz-6-foszfát receptor kerül kölcsönhatásba az AP proteinnel, és ez a kölcsönhatás teszi lehetővé, hogy a lizoszómális proteinek a transzport vezikulumokba kerüljenek.

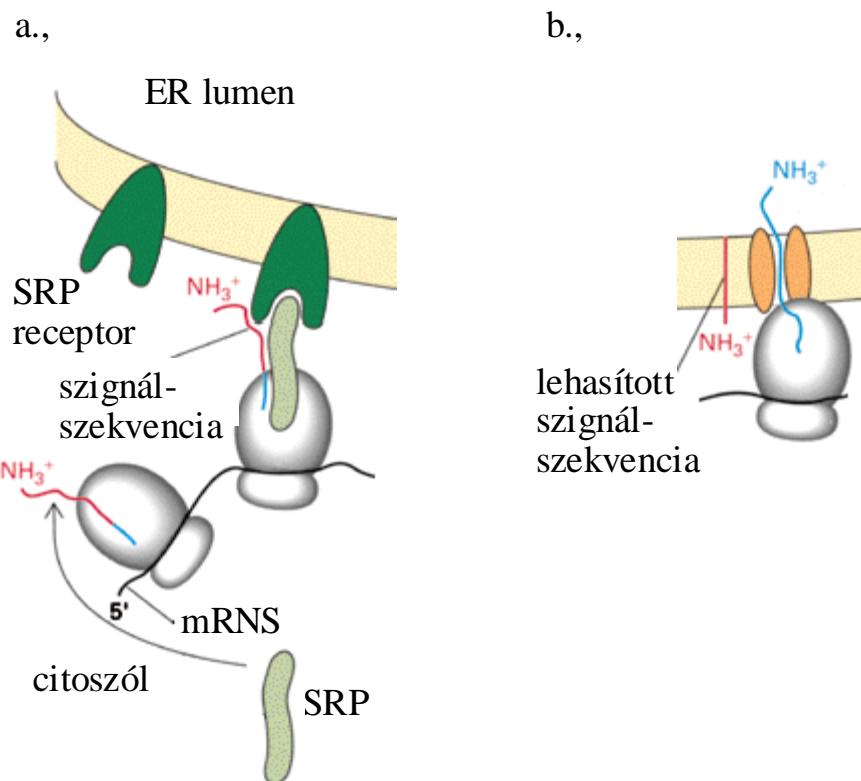
A klatrin egyes vélemények szerint képes spontán polimerizációra. Újabb

vizsgálatok azonban arra utalnak, hogy a coatomer egységek összeállásához hasonlóan a klatrin burok kialakulása is energiaigényes: a folyamatban egy GTP-t hidrolizáló protein, a dinamin szükséges. Dinamin deficiens sejtekben nem keletkeznek klatrin burkú vezikulák. A dinamin pontos funkciója nem ismert.

A klatrin burok a vezikulum lefűződése után szinte azonnal depolimerizálódik. Ez a folyamat energiaigényes, és a hsc70 nevű chaperone protein (hősök protein) vesz részt benne.

### **Proteinek szelektív célbaajuttatása**

Minden protein szintézise szabad riboszómákon kezdődik. A membránproteinek, a szekrécióra kerülő és lizoszámális proteinek és az ezeket a proteineket szintetizáló riboszómák egy ún. szignálszekvencia segítségével az ER felszínéhez kötődnek. Ez a szignálszekvencia a proteinek N-terminális részén található. A szignálszekvenciát az ún. szignál felismerő részecske (signal recognition particle, SRP) felismeri, majd az ER felszínén található SRP receptor megköti az SRP-t. Ezt követően a riboszóma az ER felszínéhez kötődik, és a protein a szintézise közben áthelyeződik az ER-be egy protein pórusról keresztül. A szekrécióra kerülő és a lizoszámális proteinek teljes egészében bekerülnek az ER lumenébe, míg a membránproteinek transzmembrán része az ER membránjában marad. A membránproteinek esetében a szignálszekvencia nem hasítódik le, míg más esetekben egy az ER lumenében levő enzim, a szignál peptidáz, lehasítja ezt a szekvenciát. A proteinek további sorsát egyéb specifikus szekvenciák irányítják. Így pl. a lizoszámális proteineknél egy enzim felismer egy szekvenciát, amely a lizoszámális proteinekre jellemző. Ez a szekvencia nem jellemző egyetlen szekvenciával, de vannak olyan közös vonásai (pl. egy lizin jelenléte), ami felismerhetővé teszi az enzim számára. A felismerés után az enzim egy mannóz-6-foszfát szénhidrát egységet alakít ki a fehérjén. Majd a mannóz-6-foszfát receptor irányítja a lizoszámális proteineket a lizoszómákba induló vezikulumokba. A lizoszámális proteinek szortírozásához elviekbén hasonló folyamat válogatja ki a regulált szekrécióra kerülő proteineket is. A specifikus szekvenciát felismerő receptor a klatrin burkú vezikulákba irányítja ezeket a fehérjéket.



12. ábra.

Egy szekrécióra kerülő protein kotranszlációs inzertálása az ER lumenébe

a., A szignálszekvenciát az SRP felismeri

b., A szignálszekvencia lehasítása után a protein az ER lumenébe kerül egy protein csatornán keresztül

Ebben az esetben azonban a pontos mechanizmus és a receptor protein nem ismertek. Létezik még egy ún. Golgi retenciós szekvencia is, ami a Golgi komplexum saját fehérjéinek Golgiban tartásáért felelős. A folyamat pontos mechanizmusa nem ismert. Ha egy fehérje nem rendelkezik sem lizoszómális, sem regulált szekréciós, sem Golgi retenciós szekvenciával, akkor coatomer burkú vezikulákba kerül, amelyek állandóan lefűződnek a transz Golgi ciszternákról. Ezen vezikulumok szállítják a konstitutíven szekretálódó proteineket és a membránproteineket.

Elviekben hasonló mechanizmus felelős a citoplazmatikus, szabad riboszómákon szintetizálódó proteinek célbajuttatásáért is. A sejtmag proteinjei a

szabad riboszómákon szintetizálódnak. Szignálszekvenciájuk (NLS=nuclear localization signal) a protein különböző részein helyezkedik el, melyet bizonyos fehérjék (karioferrin, másnéven importin) képesek felismerni. Ezt követően a magba szállítandó protein a karioferrin közvetítéssel specifikusan kötődik a magpórushoz. A póruron való átjutáshoz ATP-re van szükség. A nukleáris proteinekből a szignálszekvencia nem hasítódik ki.

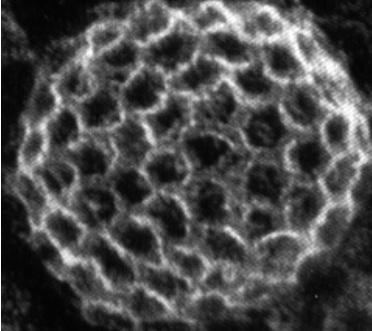
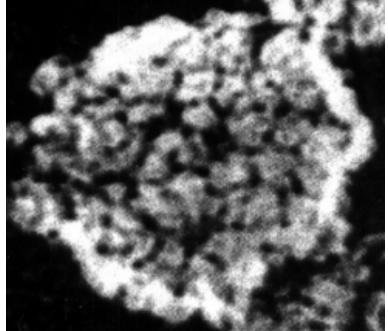
### A regulált és a konstitutív szekréció rövid összehasonlítása

- a regulált szekréció klatrin burkú vezikulumokkal, míg a konstitutív coatomer burkú vezikulumokkal történik,
- a regulált szekréció esetében a transzportálódó proteinek szelektálása a burkolt gödörben levő receptorokkal történik, míg a konstitutív szekréciós vezikulumokba más helyre irányító szekvencia hiányában kerülnek a proteinek (állandóan szekretálódó és membránproteinek),
- minden útvonal esetében a transzportvezikulák pH-ja savas. Az alacsony pH a vezikulumban jelen levő proteázokat aktiválja, amelyek a szekretálódó proteinek végső „érési” fázisában vesznek részt. A szekrécióra kerülő proteinek közvetlenül szintézisük után tartalmaznak olyan szekvencia részleteket, amelyek az érett proteinben nincsenek jelen. Ezeket az előalakokat proproteineknek vagy prohormonoknak nevezzük. (Esetenként még egy „pre” előtag is járulhat a szóhoz, l. később). A proteázok ezen szekvenciák kihasítását végzik el (pl. az inzulin preproinzulin formájában szintetizálódik. A „pre” szekvencia (azonos a szignálszekvenciával, ami az ER lumenébe irányítja a proteinet) az ER lumenében rögtön lehasítódik. Az így keletkező proinzulin kerül a transzportvezikulumba. A vezikulumban aktiválódó proteázok kihasítanak belőle egy peptidet (amit C peptidnek neveznek), és így alakul ki az érett inzulin molekula). A konstitutíven szekretálódó proteinek is átmennek érési folyamatot, de ezért más proteázok felelősek. A proteinok érési folyamatának többféle szerepe is lehet: 1. a proenzim formában termelődő emésztő enzimek esetében így biztosítja a szervezet, hogy az enzim nem aktiválódik pl. az ER-ben, ahol az aktív enzim fehérjebontó hatása káros lenne; 2. szerepe van a fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetének

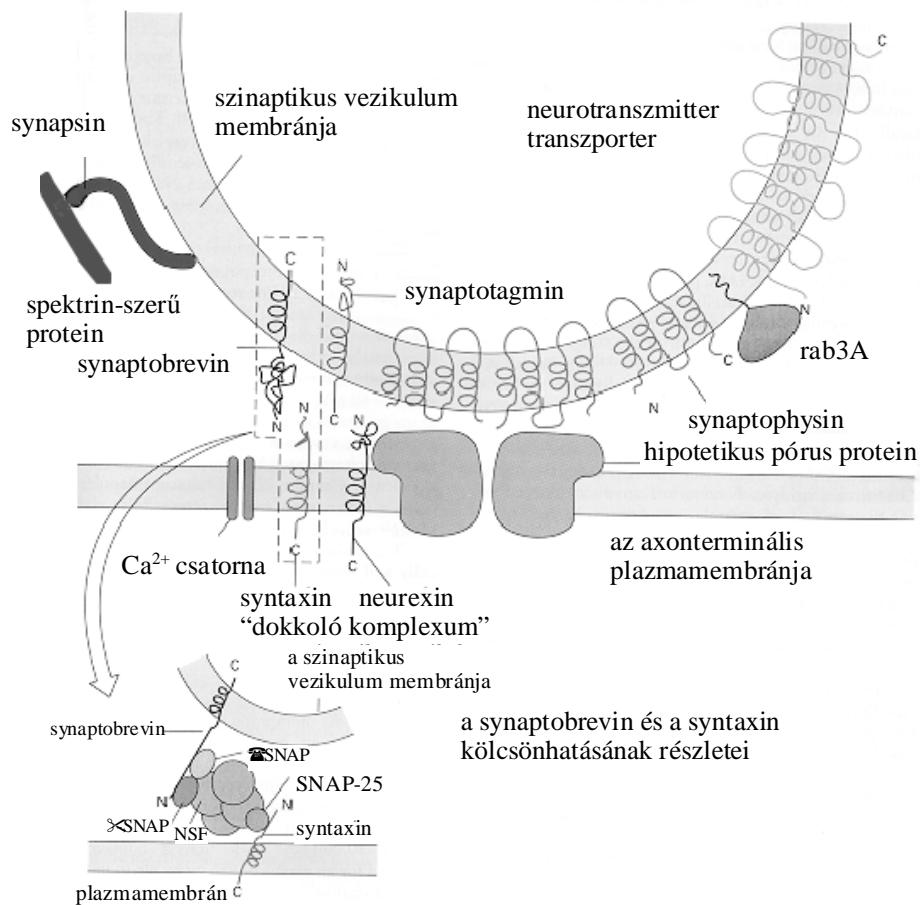
kialakításában; 3. egészen kis molekulatömegű proteinek esetében az érett protein szekvenciája olyan rövid, hogy abban nincs elég hely a különböző szignálszekvenciák számára.

- a regulált szekréció esetében a transzportvezikulum a citoskeletonhoz kötődik. A citoskeletonról való leváláshoz és a plazmamembránnal való fúzióhoz az intracelluláris kalcium koncentráció növekedése szükséges. A konstitutív szekréció esetében a vezikulum azonnal fuzionál a plazmamembránnal.

### Klatrin és coatomer burkú vezikulák összehasonlítása

Klatrin burok	Coatomer burok
	
spontán vagy dinamin mediált, GTP igényes kialakulás	ATP és GTP igényes polimerizáció <i>rab</i> proteinek részvételével
a klatrin az AP proteinek segítségével kötődik a membránhoz	a coatomer egységek az ARF segítségével kötődnek a membránhoz
a klatrin burok a vezikula kialakulása után leválik a vezikula felszínéről	a coatomer burok a vezikula kialakulása után leválik a vezikula felszínéről
ATP igényes depolimerizáció, amit a hsc70 katalizál	GTP igényes depolimerizáció, amiben a <i>rab</i> proteinek vesznek részt
szerep: vezikuláris transzport a plazmamembrán felől (receptor mediált endocitózis) és a transz Golgi ciszternától a lizoszómák és a plazmamembrán felé (ez utábbi esetben csak a regulált szekrécióra kerülő vezikuláknál).	szerep: vezikuláris transzport az ER-ból a Golgi komplexum felé, a Golgi ciszternák között és a konstitutíven szekretálódó proteinek esetében a Golgi és a plazmamembrán között.

## A regulált exocitózis mechanizmusa idegsejtekben



13. ábra A szinaptikus vezikulum exocitózisában résztvevő proteinek

Az ábra felső részén a szinaptikus vezikulum és az axonterminális látható. Az alsó részen a szinaptikus vezikulum exocitózisát szabályozó molekulakomplexum felépítésének részletei vannak feltüntetve.

Az idegsejtek működésének egyik legfontosabb lépése, amikor az egyik idegsejt ingerületbe hozza a másikat. Ennek az emberi idegrendszerben szinte kizártlagos módja kémiai ingerületátvivő anyagok (neurotranszmitterek) segítségével történik. A folyamat helyszíne a szinapszis, ahol az ingerületet átadó, ún. preszinaptikus sejt axonjának vége (axonterminális) kapcsolatba kerül az ingerületet

átvevő, posztszinaptikus neuronnal. Az ingerületátvitel során a már előre megszintetizált, szinaptikus vezikulumokban tárolt neurotranszmitter molekulák exocitózison mennek át, majd a posztszinaptikus sejt membránjában levő receptorokhoz kötődve ezen sejt ingerületi állapotát megváltoztatják. A szinaptikus vezikulum membránjában specifikus transzport proteinek helyezkednek el, amelyek felveszik a citoplazmában megszintetizálódó transzmitter molekulákat (13. ábra). Az exocitózis a preszinaptikus sejtből szabályozottan történik: az axonon végigterjedő akciós potenciál az axonterminálisban feszültségsfüggő kalcium csatornákat nyit meg, ami az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedéséhez vezet. A szinaptikus vezikulum exocitózisát az emelkedett intracelluláris kalcium szint váltja ki.

A szinaptikus vezikulumok a neuron nyugalmi állapotában a synapsin nevű protein segítségével a citoskeletonhoz (egy spektrin-szerű molekulához) kötődnek. Ebben a kötött formában exocitózis nem jöhet létre. Az intracelluláris kalcium szint növekedése kalcium-kalmodulin függő protein kinázokat aktivál. A kalmodulin egy kalciumkötő fehérje, ami kalciumot kötött, aktív konformációjában képes bizonyos protein kinázokhoz kötődni, és ezzel aktiválni őket. A kalcium-kalmodulin függő protein kináz foszforilálja a synapsint, ami ezáltal leválik a citoskeletonról. Az így szabaddá váló vezikulum képes lesz exocitózisra.

A szinaptikus vezikulum és a preszinaptikus sejt membránja közötti kölcsönhatás kialakításában sok protein vesz részt. A 13. ábra alsó részén látható a membránfúziót katalizáló protein komplexum. Az NSF és SNAP proteinekkel a Golgi komplexumban történő transzportfolyamatok esetében már találkoztunk. A synaptobrevin egy v-SNARE protein, a syntaxin pedig azonos a t-SNARE fehérjével.

A kalciumnak a synapsin foszforilációján kívül további szabályozó szerepe van. Alacsony, nyugalmi kalcium szint mellett a vezikula membránjában levő synaptotagmin kötődik a synaptobrevin és syntaxin molekulákhöz, és meggyőzzi, hogy ezek kölcsönhatásba lépjenek a SNAP-pal. Magas intracelluláris kalcium szint a synaptotagmin konformációját úgy változtatja meg, hogy az nem tud kölcsönhatni a synaptobrevin és syntaxin proteinekkel, így azok képesek lesznek a SNAP megkötésére.

A vezikulum és a plazmamembrán közötti kölcsönhatás kialakításában részt vesz még a rab3A protein és a neurexin is. Ez utóbbi valószínűleg a dokkoló komplexum része. A két membrán fúziójának elindításában a synaptophysin nevű

protein vesz részt.

A neurotranszmisszió folyamatában bekövetkező zavarok súlyos, akár halálos betegségekhez vezethetnek. Egy baktérium, a Clostridium botulinum által termelt toxin, a botulinus toxin, egy nagy specifikású proteáz, ami csak a synaptobrevint bontja. A toxin csak az akaratlagos mozgást szabályozó neuronokba tud bejutni, amelyek acetil-kolint használnak neurotransmitterként (kolinerg neuronok). A toxin ezen neuronokban meggátolja az ingerülettovábbítást, és ezáltal az akaratlagos mozgás (többek között a légzés) bénulását eredményezi.

### **Vezikuláris transzport a plazmamembrán felől a citoplazmába**

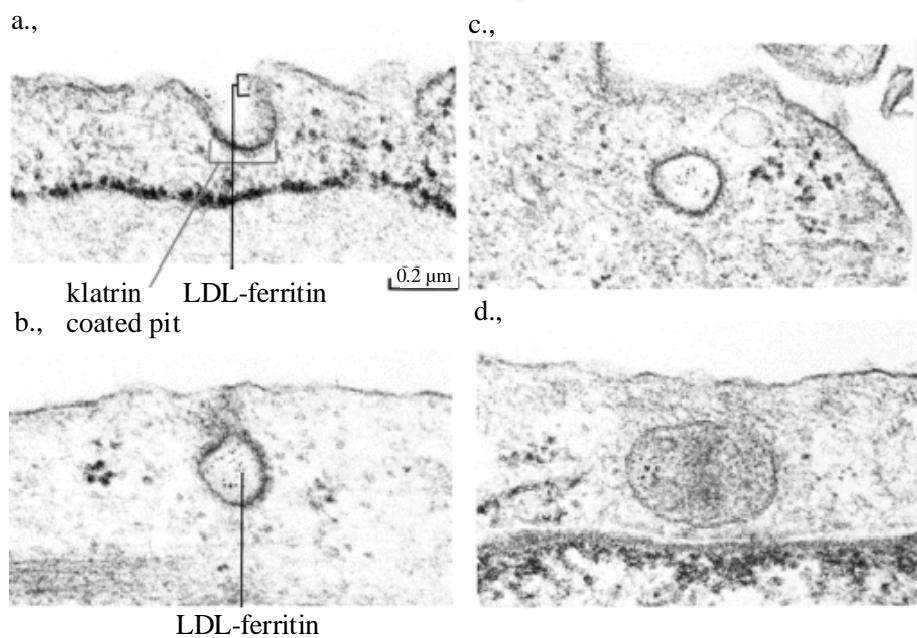
A vezikuláris transzport útjának ER-től a plazmamembránig való végigkövetése után most a citoplazmamembrántól induló transzportot tárgyaljuk. A folyamat a plazmamembrán egy darabjának lefűződésével kezdődik, ami általában 0.05-0.1  $\mu\text{m}$  átmérőjű, membránnal határolt vezikulum keletkezésével jár (kivéve fagocitózis, l. később). Ez a vezikulum magába zárja az extracelluláris tér egy darabját. Ezt a folyamatot endocitózisnak nevezzük. Az endocitózisnak több fajtáját lehet megkülönböztetni:

- pinocitózis: a vezikulákba az extracelluláris folyadék és a benne oldott anyagok aspecifikusan kerülnek bele,
- receptor mediált endocitózis: a plazmamembránban levő specifikus receptorok megkötik az extracelluláris térben levő ligandumot. A receptor-ligand komplexum specifikusan kerül bele az endocitótikus vezikulumba: a transzportálni nem kívánt membránproteinek nem kerülnek bele a vezikulumba, továbbá a vezikulum csak igen kevés extracelluláris folyadékot vesz fel aspecifikusan,
- fagocitózis: a sejt egy nagyobb partikulumot, legtöbbször baktériumot vagy egy másik sejtet vesz fel endocitózissal.

Pinocitózisra és receptor mediált endocitózisra az emberi szervezet legtöbb sejtje képes. A fagocitózis viszont specializált sejtek (makrofágok, neutrofil granulociták) funkciója. A fagocitózis során képződő vezikulát fagoszómának hívjuk, melynek mérete általában nagyobb mint 1  $\mu\text{m}$ . A fagoszóma fuzionál egy

lizoszómával. Az így keletkező fagolizoszóma belsejében a bekebelezett baktérium vagy sejt megemészti.

A fentiek közül sejtbiológiai szempontból a receptor mediált endocitózis a legfontosabb. A receptor mediált endocitózis ún. klatrin burkú gödrökből indul ki (clathrin-coated pit). Ezek elektronmikroszkóppal jól látható képződmények (14. ábra), melyeket a klatrin alkot a citoplazmamembrán alatt. Az endocitózisra kerülő receptorok ezen membránterületen gyűlnek össze. Bizonyos receptorok ligand nélkül is a klatrin coated pit-en belül helyezkednek el, mások csak a ligand kötés hatására vándorolnak ide. A receptorok megkötik az AP proteinet (assembly particle), és a klatrin ezekhez

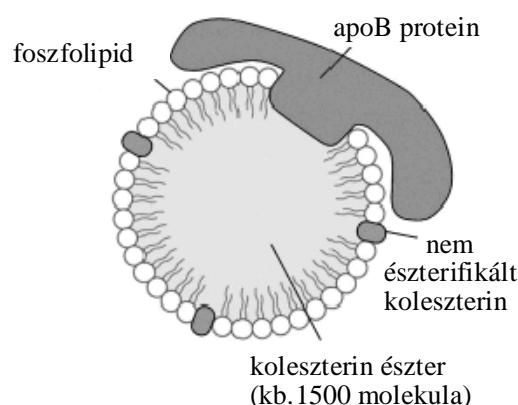


14. ábra a., Klatrin coated pit a plazmamembrán alatt. A receptor mediált endocitózisban ez esetben egy vasat tartalmazó fehérjével (ferritin) jelölt LDL partikulum vesz részt (l. később). A vas hatására a partikulum jól megfigyelhető elektronmikroszkóppal.  
 b., A vezikula már majdnem teljesen bezárult.  
 c., Teljesen kialakult, klatrin burokkal rendelkező vezikulum.  
 d., Az LDL partikulumok a korai endoszómában figyelhetők meg.

kötődik. A klatrin polimerizációja a membránt beboltosítja. A folyamat végül a vezikulum lefűződéséhez vezet.

A receptor mediált endocitózis részleteit három, részben eltérő mechanizmussal megvalósuló folyamat segítségével ismertetjük (LDL, transzferrin és EGF receptor endocitózisa).

### Az LDL receptor endocitózisa



15. ábra. Az LDL felépítése

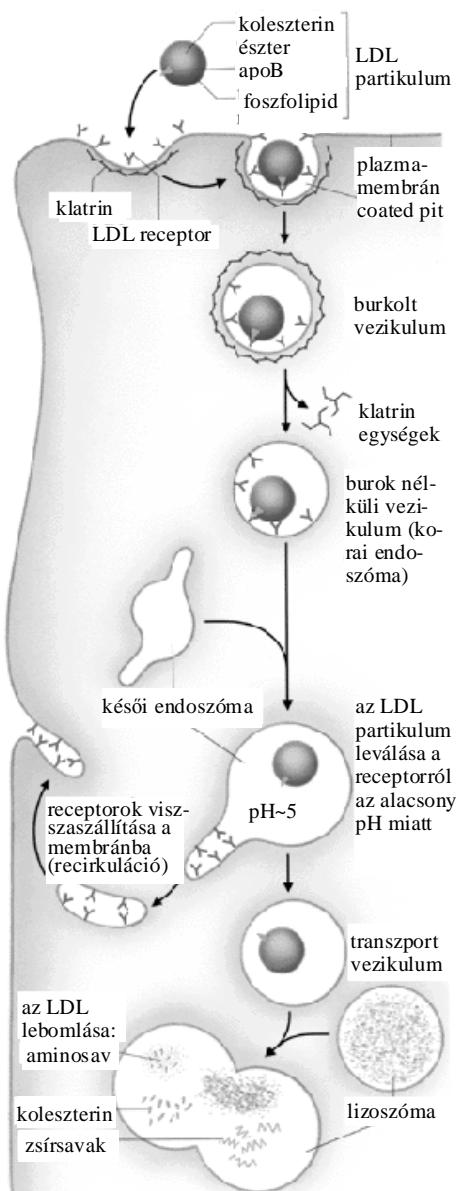
A lipidek az emberi szervezet számára fontos alkotórészek, amelyek azonban nem vízoldékonyak. Mivel szállításuk vizes közegben, a vérben történik, ehhez micellákat használ a szervezet. Ilyen micella például az LDL (low density lipoprotein, 15. ábra). A micella egyrétegű lipid burokkel rendelkező képződmény: falát foszfolipid alkotja, melynek hidrofil része a vizes közeg felé, hidrofób része a micella centruma felé néz. A micella hidrofób belsejében szállítódik a koleszterin. Az LDL tartalmaz egy apoB-nek nevezett proteint, ami az LDL receptorhoz való kötődésért felelős.

Az LDL receptor addig diffundál a plazmamembránban, amíg egy AP-2 protein segítségével nem asszociálódik a klatrinnal. Így az LDL receptorhoz kötött LDL partikulum is endocitózist szenved. A coated pit lefűződik a membránról, és bekövetkezik az endocitózis. A klatrin burok röviddel ezután leválik a vezikulum felszínéről. Az így kialakult vezikulumot korai endoszómának hívjuk. Ez fuzionál a

késői endoszómával, aminek hatására az intravezikuláris pH csökken. Az alacsony pH-n az LDL ledisszociál a receptorról. A receptorok visszaszállítódnak a plazmamembránba. Ezt a folyamatot receptor recirkulációnak nevezzük. Szerepe az, hogy a membránba visszatérő receptor újabb ligand megkötésére válik képessé.

Az LDL-t tartalmazó vezikulum fuzionál egy lizoszómával, és az így kialakult vezikulumban (amit szekunder lizoszómának neveznek) megtörténik az LDL lebontása a sejt számára később hasznosítható alkotókra (16. ábra).

A fenti folyamatban keletkező zavar súlyos betegségeket eredményez. Ha valami miatt nem történik meg az LDL endocitózisa, az felhalmozódik a vérben, és a vér koleszterin szintjének emelkedéséhez vezet. Ezt az állapotot familiáris hiperkoleszterinémiának nevezzük. Ebben a betegségben a magas koleszterin szint miatt megnő az érelmeszesedés és a szívinfarktus kockázata.



16. ábra. Az LDL endocitózisa

## A transzferrin receptor endocitózisa

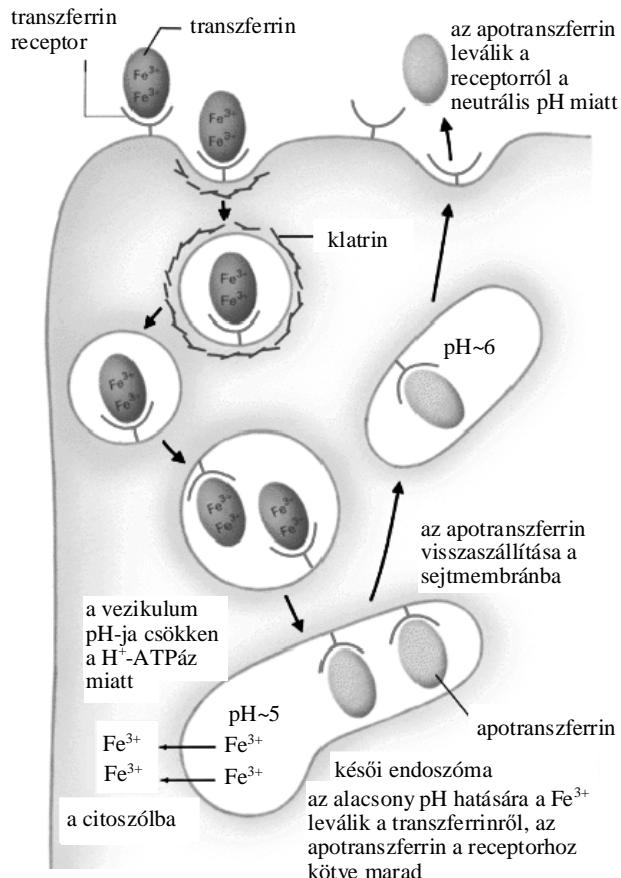
A sejtek, különösen az osztódó sejtek számára fontos, hogy elengedő mennyiségű vashoz jussanak. Mivel a szabad állapotban levő vas rendkívül toxikus (pl. szabad gyökök keletkezéséhez vezet, Fenton-reakció), a vas nem szabad állapotban, hanem egy transzport fehérjéhez, a transzferrinhez kötötten szállítódik. A transzferrin endocitózisa bizonyos

szempontból eltér a már ismertetett

LDL útvonaltól. A 17. ábra. A transzferrin endocitózisa

legfontosabb kü-

lönbég az LDL útvonalhoz képest, hogy a késői endoszómában az alacsony pH ellenére a transzferrin a receptorhoz kötve marad, csak a hozzá kötött két vas ion válik le, és ismeretlen mechanizmussal a citoszólba kerül. A vasat nem kötött transzferrint apotranszferrinnek nevezzük. A receptor-ligand komplex recirkulál a plazmamembránba, ahol ismét az extracelluláris tér neutrális pH-jának lesz kitéve. Az apotranszferrin neutrális pH-n nem képes a receptorhoz kötve maradni, így ledisszociál



róla. Így a receptor újabb vasat tartalmazó transzferrint tud megkötni, a szabaddá vált transzferrin pedig újból vasat vehet fel (17. ábra).

### Az EGF receptor endocitózisa

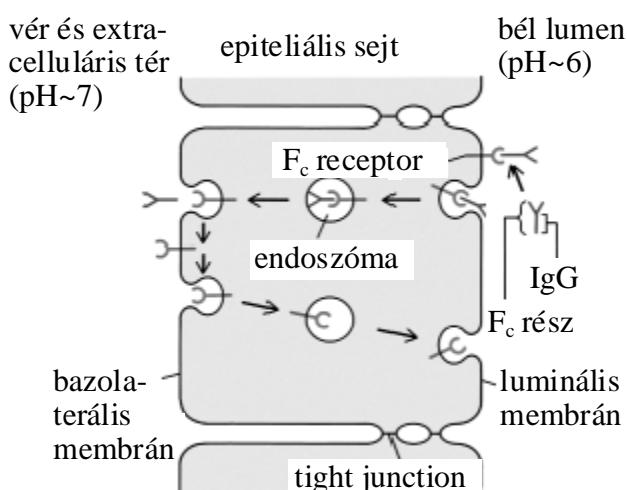
A sejtek ún. növekedési faktorokat igényelnek ahhoz, hogy osztódni tudjanak. Az egyik legfontosabb és legszéleskörűbben tanulmányozott növekedési faktor az epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor – EGF). Az EGF-nek specifikus sejtfészíni receptora van, az EGF receptor (EGFR), ami a ligandum megkötése után felelős a szignáltranszdukció beindításáért és a proliferációs válasz kiváltásáért.

Ha a sejteket folyamatosan EGF-et tartalmazó közegben inkubáljuk, a sejtfészíni EGFR szám csökken: a sejt így védekezik a túlzott stimuláció ellen. Ezen folyamat első lépése, hogy az EGF-et kötött receptor (a szabad EGFR nem) endocitózist szenved. Az LDL és transzferrin receptoruktól eltérően az EGF-EGFR komplexet tartalmazó vezikulum egy lizoszómával fuzionál, így mind a receptor, mind a ligand lebomlik, és nem kerül recirkulációra. Ezt a folyamatot, amely létre hozza a receptor szám fent leírt csökkenését, down-regulációnak nevezzük.

### A harmadik típusú burkolt vezikulum

Az utóbbi évek vizsgálatai szerint a klatrin és coatomer burkú vezikulák mellett létezik legalább még egyféle burkolt vezikulum. Ezek fehérjekomponensét caveolinnak neveztek el, a membrán betüremkedésekkel, amik megjelenésükben durván hasonlítanak a coated pitre, caveoláknak hívjuk. A caveolin és a caveolák szerepe még nem teljesen tisztázott, de bizonyos fehérjék endocitózisában vesznek részt.

## Transzepiteliális vezikuláris transzport



18. ábra. IgG transzepiteliális transzportja egér bélhámsejtjében

Bizonyos esetekben az endocitotikus vezikula és tartalma nem kerül feldolgozásra a sejtből, hanem keresztüljut rajta és a másik oldalon exocitózissal tartalmát kiüríti. Ilyen folyamat leginkább epitheliális sejtekben fordul elő, amikor a sejt anyagtranszportot folytat az általa el-

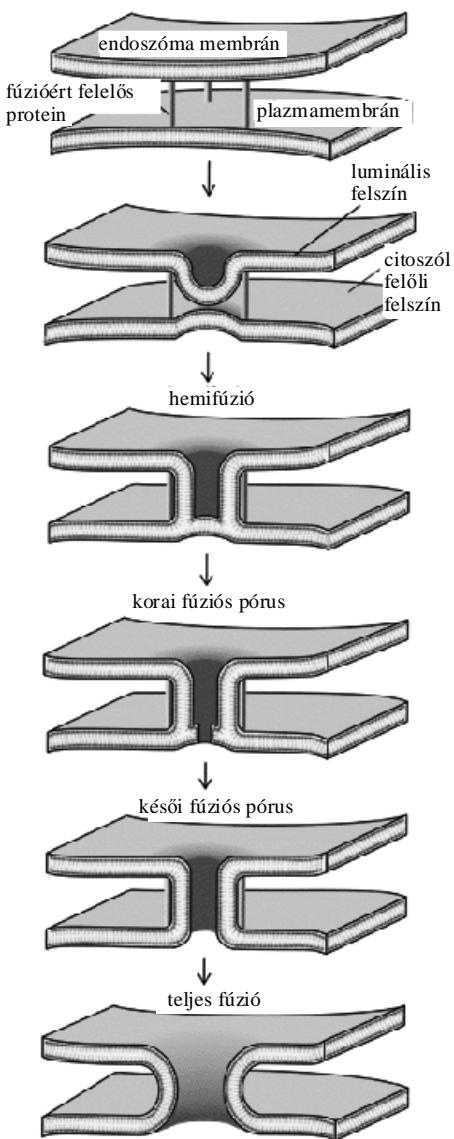
választott két térrész között. A 18. ábrán egy ilyen példa figyelhető meg. Bizonyos emlősök (pl. egér) esetében az anyatejben levő IgG típusú antitest az újszülött beléből receptor mediált endocitózissal kerül a bélhámsejtbe. A folyamatban résztvevő receptor az antitest Fc részét megkötő Fc receptor. (Az IgG típusú antitest egy Y alakú protein, amelynek két karja felelős az antigén megkötéséért (Fab – antigen binding fragment), az Y szárát képző konstans, Fc (constant fragment) rész pedig a sejtfelszínhez kötést és más, nem antigénspecifikus funkciókat lát el.) A sejten átjutó vezikulum a bazolaterális membránnal fuzionál. Míg az újszülött belének enyhén savas pH-ján az antitest kötődik az Fc receptorhoz, az újszülött extracelluláris terének semleges pH-ja lecsökkenti az Fc receptor IgG iránti affinitását, így az IgG ledisszociál az Fc receptorról és szabaddá válva bekerül az újszülött keringésébe. Az IgG az anyai vérből az emlő epitheliális sejtjein keresztül szintén transzcitózissal vándorol az anyatejbe. Az anyai IgG anyatejbe való kiválasztása, majd az újszülött beléből való felszívódása ember esetében nem játszik jelentős szerepet.

Az emberi magzat és újszülött védelmében fontos szerepet tölt be az anya által termelt IgG, amely szintén transzcitózissal jut át a méhlepényen és bekerül a magzat keringésébe.

## A membránfúzió molekuláris mechanizmusa

A transzportvezikulum és a célorganellum membránja közötti fúzió pontos lépései még ma sem ismerjük teljes részletességgel. A folyamat specificitását protein-protein kölcsönhatások biztosítják (v-SNARE, t-SNARE, *rab*), és a fúzió beindításában is valószínűleg proteineknek van szerepük. Ilyen pl. az ebben a fejezetben megismert synaptophysin, és a máshol részletesen ismertetésre kerülő influenza hemagglutinin.

A fehérje komponensek mellett a lipidnek nyilvánvalóan nélkülvállalatlan szerepe van a folyamatban, amely valószínűleg együtt jár a lipidek rendezettségének megváltozásával és fázisátalakulással. A 19-es ábrán követhetjük végig a fúzió egyes lépéseiit. A folyamat első lépésében az egymáshoz közelebb fekvő membrán lipidfelszínek olvadnak össze (hemifúzió). Ezt követi az egymástól távolabbi lipidfelszínek összeolvadása, ami a korai, majd késői fúziós pórus kialakulásához vezet. Végül a pórus kitágul és a két membrán teljesen összeolvad.



19. ábra. A membránfúzió folyamata

### **A vezikuláris transzport jelentősége**

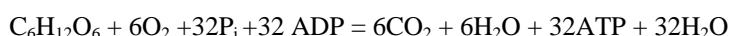
A membránokon kereszttüli transzport a kis molekula-, ill. atomtömegű anyagok (pl. ionok, aminosavak) esetében a membránt átérő proteincsatornák, pörusok, transzporterek segítségével zajlik. Felvetődik a kérdés, hogy a proteinek transzmembrán transzportja miért nem valósulhat meg hasonló folyamat eredményeképpen. A feltekeredett, ép proteinek nagy méretük folytán csak nagyon nagy pörusokon keresztül lennének képesek a membránon keresztljutni. Ilyen nagyméretű pörusok jelenléte a sejt számára kedvezőtlen lenne, mert rajta nagy mennyiséggű biológiaileg fontos anyagot vesztene a sejt (pl. ionok, ATP). Ezért a protein vagy még véleges szerkezetének kialakulása előtt, egy szerkezet nélküli aminosav lánc formájában jut át a membránon (pl. a szekréciós proteinek kotranszlációs inzertálása az ER lumenébe) vagy vezikuláris transzport segítségével transzportálódik. Ez utóbbi esetben a protein úgy képes egy membrán egyik oldaláról a másikra jutni, hogy közben a membrán folytonossága nem sérül meg.



# A sejtműködés energiaforrása: a mitokondrium

## 1. Az ATP előállítása aerob sejtekben

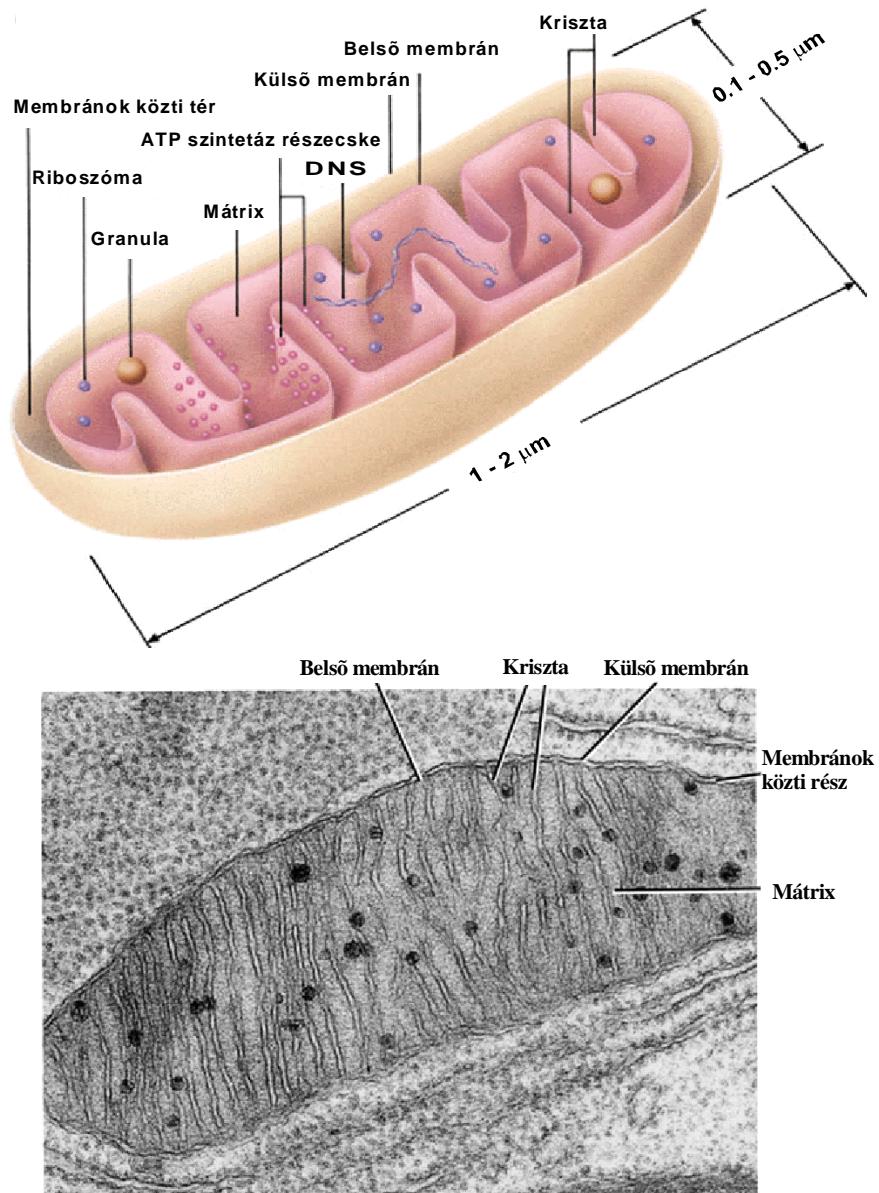
Az élő sejtek az anyagszeréjükhez és növekedésükhez szükséges kémiai energiát az ATP nagy energiájú kötéseinek elhasításával fedezik. A nem fotosintetizáló sejtekben az ATP előállításához szükséges energia a cukor ill. a zsírsavak elégetéséből származik. A cukor széndioxidá és vízzé történő aerob lebontása során kb. 32 ATP molekula is keletkezhet.



Eukarióta sejtekben a cukor lebontás első lépése, a glikolízis, a citoplazmában játszódik le, melynek során egy cukor molekulából, két ATP molekula mellett, két piruvát molekula is keletkezik. A piruvát molekula további oxidációja a mitokondriumban játszódik le ahol a folyamat során akár 30 ATP molekula is keletkezhet. A pontos számot azért nem lehet meghatározni, mert a mitokondriumban felhalmozott energiát nemcsak ATP szintézisre lehet felhasználni, de például hőfejlesztésre és molekulák transzportjához szükséges energia fedezésére is. Hasonlóképpen, a zsírsavak oxidációja során keletkező ATP szintén a mitokondriumban képződik. Ennek megfelelően a mitokondriumok a sejtek erőműveinek tekinthetők.

## 2. A mitokondrium szerkezete

A legtöbb eukarióta sejtből sok mitokondrium található, a mitokondriumok összesített térfogata kiterjed a citoplazma térfogatának 25 %-át is. A mitokondrium egyike a legnagyobb organellumoknak (csak a sejtmag, a vakuólumok ill. a növényi sejtekben a kloroplasztok nagyobbak náluk). Elég nagyok ahhoz, hogy fénymikroszkópon is megfigyelhetők, de részletes szerkezetük csak elektronmikroszkóppal tanulmányozható (1 ábra).



1. ábra A mitokondrium háromdimenziós metszete. A mátrixban mitokondriális DNS és riboszóma található. Az alsó ábrán a mitokondrium elektronmikroszkópos képe látható.

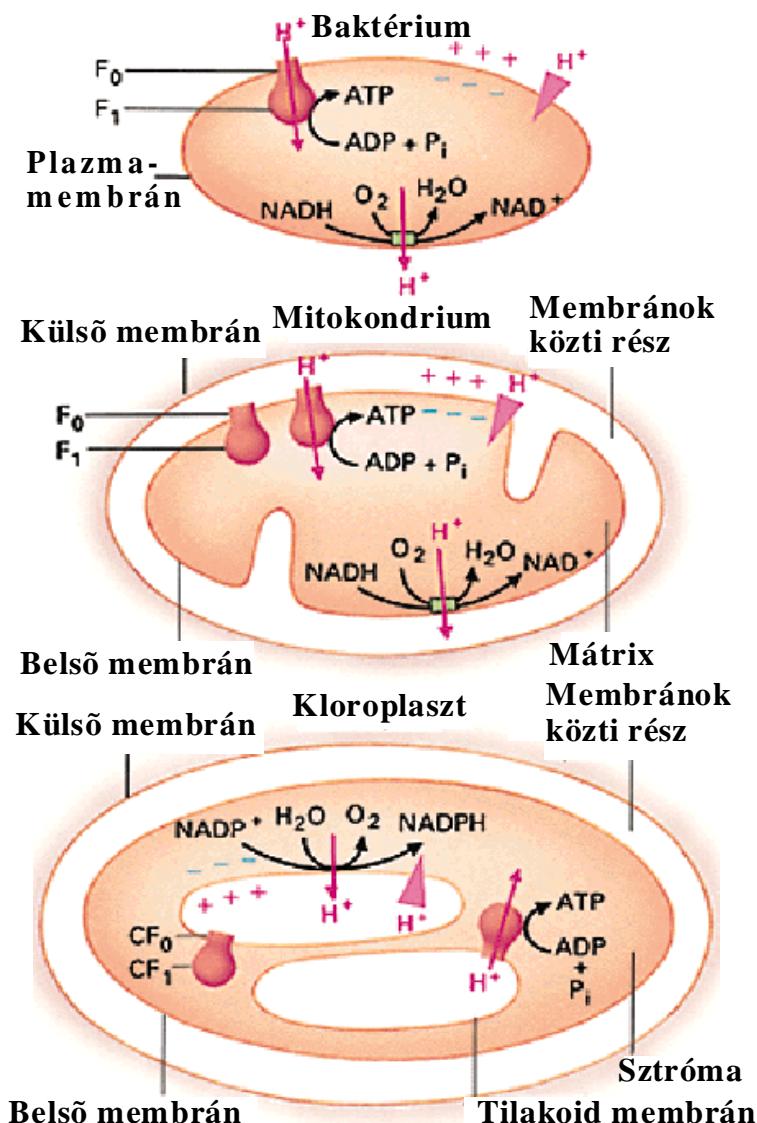
A mitokondrium két nagyon eltérő tulajdonságú membránnal rendelkezik. A külső membránnak kb. a fele lipid, a másik fele fehérje. A külső membránban lévő mitokondriális porin fehérje transzmembrán csatornákat képez, amelynek következtében a külső membrán kis molekulákra (egészen 6-10 kDa molekulasúlyig), a protont is beleértve, átjárható. A belső membrán sokkal kevésbé átjárható, 20 % lipid mellett 80 % fehérjét tartalmaz, a fehérje arány itt magasabb, mint a citoplazma membránban. A belső membrán felületét nagymértékben megnövelik a mátrixba benyúló betüremkedések, a kriszták. A felület megnövelése nagymértékben elősegíti az ATP szintézis hatékonyságát. Például egy májsejtben, a mitokondriumok belső membránjának összes felszíni területe 17-szerese a sejt citoplazma membrán felszínének. A mátrixban találhatók a cukrok és a zsírsavak terminális oxidációjában szerepet játszó enzimek. A belső membránban helyezkednek el az ATP előállításában résztvevő enzimkomplexelek. A mátrixban találhatók a mitokondrium saját DNS-e valamint a saját fehérjék előállításához szükséges riboszómák is.

### **3. Kemiozmózis**

A kemiozmózis elmélet magyarázza meg, hogyan kapcsolódik az oxidatív foszforiláció során felszabaduló energia az ATP szintéziséhez. Az elmélet kidolgozásáért Peter Mitchel 1978-ban Nobel díjat kapott. A kemiozmózis elmélete szerint az ATP szintéziséig a következő lépésekben keresztül jutunk el. A légzési lánc, ami könnyen oxidálható és redukálható hidrogén átvivő molekulákból és vas tartalmú citokróm fehérjékből áll, elektronát vesz át a citrát körben keletkező, nagy energiájú NADH molekulától. Miközben az elektron áthalad a légzési lánc egyes komponensein, a felszabaduló energia segítségével proton pumpálódik ki a mátrixból a membránok közötti részbe. A keletkező proton gradiens energiát (elektrokémiai potenciált) halmoz fel egyrészt koncentráció gradiens, másrészt potenciál különbség formájában. A belső membrán két oldalán létrejött proton gradiens mentén visszaáramlanak protonok egy membránhoz kötött ATP szintetáz molekulán keresztül, és közben a felszabaduló

energia segítségével ATP képződik ADP-ből és  $P_i$ -ból. Hasonló elven történik az ATP szintézise a baktériumokban és a kloroplasztokban is, csak míg a baktériumokban (a mitokondriumokhoz hasonlóan) a proton gradiens előállításához szükséges energiát az oxidatív foszforiláció fedezzi, addig a kloroplasztokban az elnyelt fotonok energiája. A 2. ábra összehasonlítja a baktériumok, mitokondriumok és kloroplasztok membrán szerkezetét, az ATP szintetáz molekulák orientációját.

A proton gradiens energiáját nemcsak ATP szintézisre lehet felhasználni, hanem egyéb folyamatok energia igényének fedezésére is. A baktériumok esetén a baktérium ostorát a membránon, a proton gradiens mentén, átfolyó protonok forgatják. Az *E. coli* ostorának egy teljes körbefogatásához például  $16 \times 16 = 256$  proton átáramlása szükséges. A mitokondriumban az ADP és foszfát molekulák aktív transzporttal jutnak át a citoszólóból a mátrixba a belső membránon keresztül, s ennek a folyamatnak az energia igényét szintén a proton elektrokémiai potenciál különbsége fedezzi. Az ADP/ATP antiport fehérje komplexen keresztül játszódik le a három negatív töltéssel rendelkező ADP kicserélődése a négy negatív töltéssel rendelkező ATP-re. Ennek a folyamatnak a hajtóereje a proton gradiens elektrokémiai potenciáljának két komponense (koncentráció vagy pH különbség ill. a membránpotenciál különbség) közül a membránpotenciál különbsége. Az ADP/ATP antiport komplex két 30 kDa molekulasúlyú alegység dimerjei, s a belső membrán fehérjéinek 10-15 %-át teszi ki. Az  $P_i$  bejuttatásáért a foszfát transzporter felelős, amely szintén antiport molekula, hiszen a  $P_i$ -t egy OH<sup>-</sup> anionra cseréli ki. Ennek a folyamatnak a hajtóereje elsősorban a membrán két oldalán fellépő pH különbség. A piruvát molekula szimport révén jut be a citoszólba. A barna zsírszövetekben a mitokondrium belső membránjában található egy termigenin nevű, 33 kDa molekulasúlyú fehérje, amely proton transzporterként működik. A fehérje segítségével a protonok átjutnak az elektrokémiai gradiens mentén a membrán másik oldalára, anélkül, hogy ATP-t szintetizálnának, s közben hő szabadul fel. Így gyakorlatilag rövidre zárják a proton gradienst. A barna zsírszövet hőtermelése különösen újszülöttök esetén jelentős, így védekezik az újszülött szervezete a lehűléssel szemben.



2. ábra. A membránok orientációja és a protonok áramlása a baktériumban, mitokondriumban és a kloroplasztban. A sötétített rész felé néző membrán oldal a az organellumok citoszóljából a világos rész felé néző membránrész pedig az exoplazmatikus oldal. Mind a baktériumban, mitokondriumban és a kloroplasztban az  $F_0F_1$  komplex a citoszólba nyúlik be. Az elektrontranszport során a protonok mindenkor a organellum citoszóljából pumpálódnak ki az exoplazma oldal felé, s így létrejön egy koncentráció gradiens (a citoszólban alacsonyabb a pH) és egy elektromos potenciál különbség (a citoszól oldal negatívabb). Az ATP előállítása során a protonok az elektrokémiai potenciál gradiens mentén áramlanak az  $F_0F_1$  komplexeken keresztül.

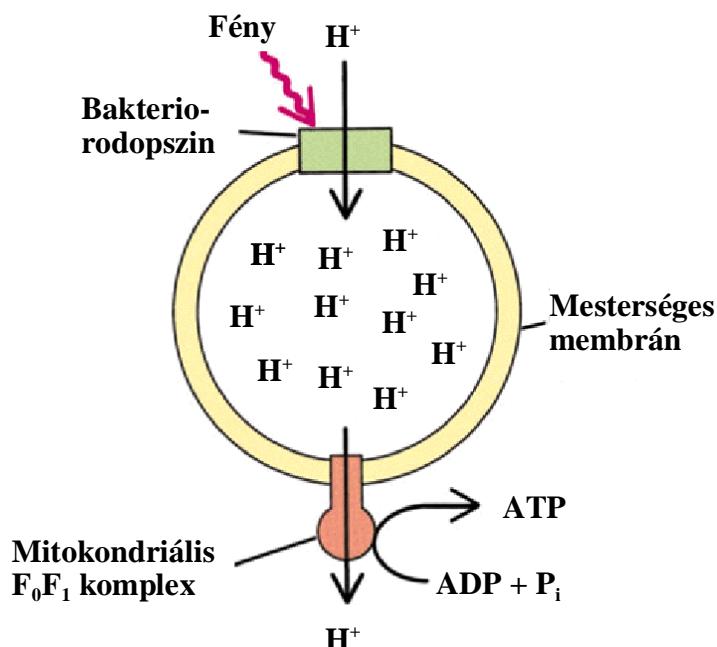
#### **4. ATP szintézise**

Az  $F_0F_1$  ATP szintetáz molekula komplex kapcsolja össze az elektrokémiai potenciál gradiens mentén történő proton áramlást az ATP ADP-ből és Pi-ból történő szintézisével. Az  $F_0$  rész egy integrális membránfehérje komplex, ami a membránon keresztül egy proton csatornát képez, az  $F_1$  komplex felelős az ATP szintéziséért. Mind a baktériumnak, mitokondriumnak és a kloroplasztnak hasonló szerkezetű ATP szintetáz molekula komplexe van ATP szintézise. Az ATP szintézise során az ATP szintetáz  $F_1$  komplex egyes alegységei felváltva vesznek fel különböző konformációs állapototokat, melyek különböznek az ATP-vel ill. az ADP-vel és  $P_i$ -vel szemben mutatott affinitásukban. Eközben a molekula bizonyos alegységei forognak, s ezt a forgást (a baktériumok ostorának mozgatásához hasonlóan) az  $F_0$  részen átfolyó protonok okozzák. A ciklikus folyamat eredményeképpen ATP szintetizálódik. A folyamat mechanizmusának felderítéséért Paul Boyer és John E. Walker 1997-ben Nobel díjat kapott.

A kemiozmózis univerzális voltát igazolja a következő szellemes kísérlet (3. ábra). Egy archeo-baktériumból bakteriorodopszin fehérjét, szarvasmarha mitokondriumából pedig az ATP szintetáz  $F_0F_1$  molekulakomplexet izoláltak. Ezt a két fehérjet asszimmetrikus módon beépítették foszfolidek felhasználásával előállított kettős lipidréteggel körbevett liposzómák membránjába. Megvilágítás hatására a bakteriorodopszin protont pumpál a liposzómák közti térből a liposzómák belsejébe, s így a liposzómamembrán két oldalán proton gradiens jön létre. A proton gradiens elektrokémiai potenciál különbségét használja fel a membránba beépített  $F_0F_1$  molekulakomplex ATP előállítására. Ha nem volt megvilágítás nem történt ATP szintézis. Ha nem építettek be a liposzóma membránba  $F_0F_1$  molekulakomplexet, a megvilágítás ellenére sem történt ATP szintézise. Ezek a megfigyelések egyértelműen igazolták, hogy az ATP-t előállító enzim az  $F_0F_1$  molekulakomplex, és az ATP szintézise függ a proton gradiens elektrokémiai potenciál különbségétől.

Mint minden enzimreakció, ez a folyamat is megfordítható. Ha nincs megvilágítás, és a liposzómák közötti térhez ATP-t adunk nagy koncentrációban,

molekulakomplex fordított irányban működik, proton fog a külső térből a liposzóma belsejébe pumpálni. Hasonló mechanizmus révén állítja elő és biztosítja szervezetünk a gyomor alacsony pH értékét is.



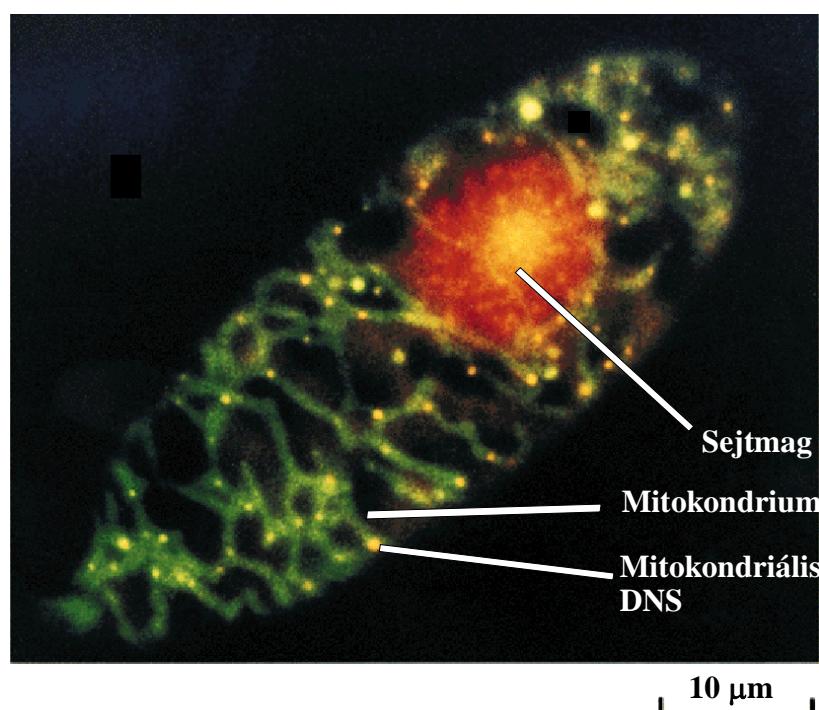
3. ábra. A kemiozmózis univerzális voltának kísérleti bizonyítéka. Foszfolipidből készült mesterséges vezikulákba, liposzómákba tisztított bakteriorodopszint és mitokondriális  $F_0F_1$  molekulakomplexet építettek be. Fény hatására a bakteriorodopszin proton pumpál a külső térből a liposzóma belsejébe és a létrejött proton gradiens hatására az  $F_0F_1$  molekulakomplex ATP-t szintetizál ADP-ből és  $P_i$ -ból.

### 5. A mitokondrium biogenézise

A mitokondriumok osztódása szorosan nem kapcsolódik a sejtmag osztódásához. Az interfázis során a mitokondriumok mérete nő a fehérjék beépülése során, a mitokondriális DNS folyamatosan replikálódik, és bizonyos méret elérése után a

mitokondrium kettéosztódik, hasonlóan a baktériumok növekedéséhez és osztódásához. Átlagosan, minden mitokondrium egyszer osztódik sejtgenerációként.

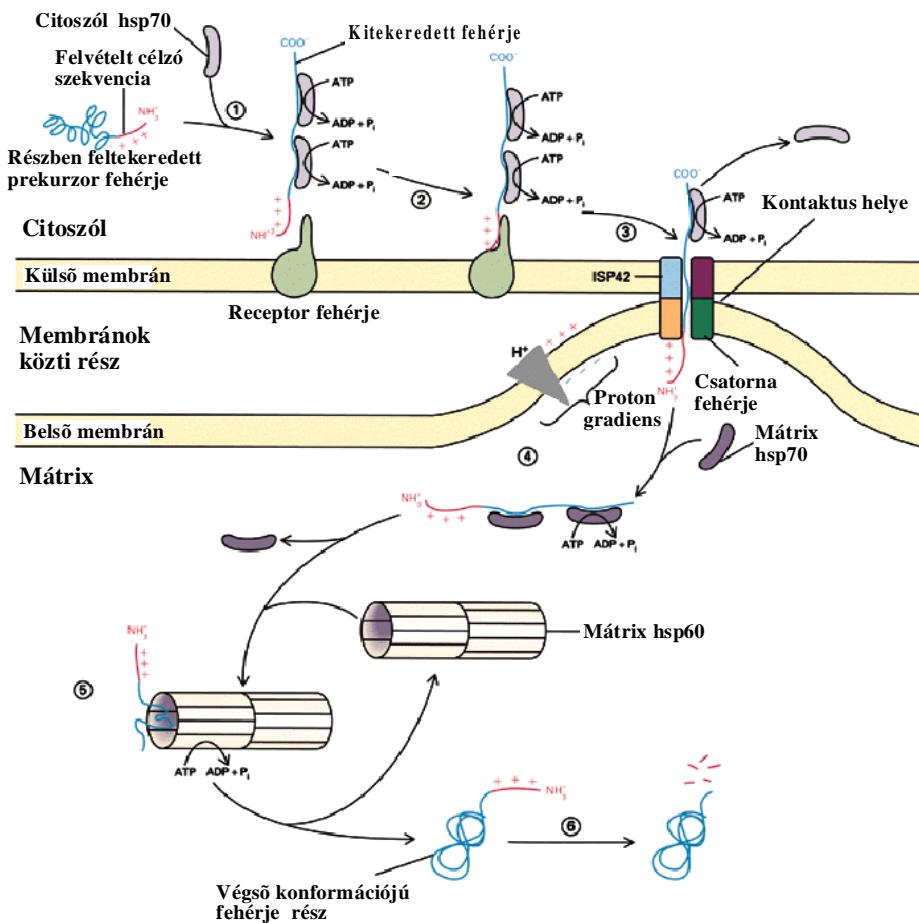
A mitokondriális DNS cirkuláris DNS, amelyből az állati sejtekben több azonos kópia, gombákban és növényekben pedig több, változó méretű kópia van jelen egy mitokondriumban (4. ábra). A DNS mérete fajonként változik, az ember mitokondriális DNS-e csak 16569 bázispárkból (bp) áll, az élesztőé 78 kbp-ból, a növényeké 200-2500 kbp-ból. A mitokondriális DNS a mitokondrium fehérjéinek csak egy részét kódolja. A mitokondrium saját riboszómáin lezajló fehérje szintézis olyan antibiotikumokkal gátolható, mint a baktérium fehérjék szintézise. A fehérjék nagyobb részét a kromoszómális DNS kódolja, szintéziséük a citoplazmatikus riboszómákon valósul meg, majd bekerülnek a mitokondriumba.



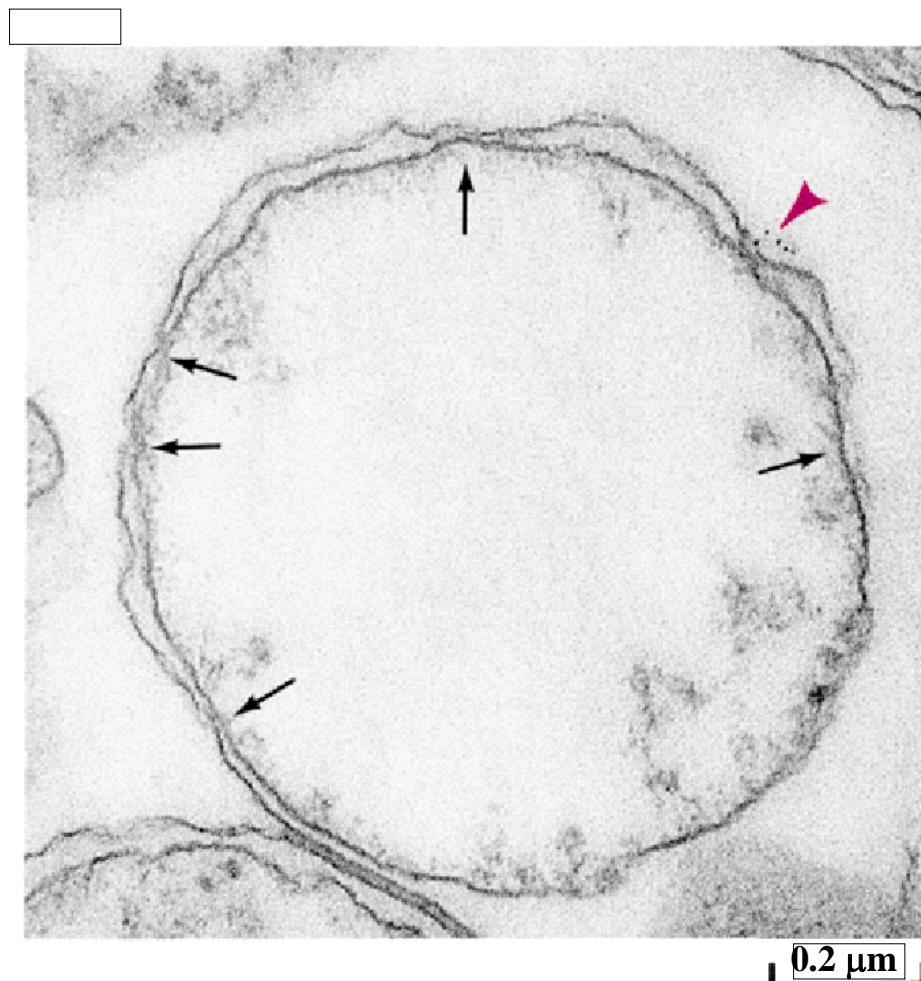
4. ábra. Az *Euglena gracilis* sejt mitokondriumának és DNS tartalmának kimutatása. Mind a DNS-t, mind a mitokondriumot fluoreszcencé festékkel jelölték. A sejtbén egy sejtmag és több mitokondrium, valamint a mitokondriumhoz tartozó mitokondriális DNS figyelhető meg.

A fentiek arra utalnak, hogy a mitokondriumok genetikai rendszere, fehérje szintézise a prokarióták működésére emlékeztet. Az endoszimbiota hipotézis szerint az ősi eukarióta sejtek stabil szimbiózisba léptek egy ősi baktériummal, s annak oxidatív foszforilációs rendszerét saját céljaikra hasznosították. Az evolúció során nagymértékű génátvitel játszódott le a mitokondrium és a sejtmag között, ez magyarázza, hogy a mitokondrium fehérjéinek nagy részét kódoló gének a sejtmagban vannak. Ezek a fehérjék a citoplazmában történő szintéziséük során prekurzor formában keletkeznek, az N-terminális végük egy célzó szekvenciát kap. Ez segíti elő ezen fehérjék bejutását a mitokondrium mátrixába. A mitokondriumok fehérje importjának mechanizmusát mutatja a 5. ábra. A fehérjék transzlolációja a mitokondrium membrán felszínén, csak azokon a helyeken játszódik le, ahol a külső és a belső membrán érintkezik egymással., s itt egy, több fehérjekomponensből álló, csatorna képződik. A csatornának része, a már azonosított, 42 kDa molekulasúlyú ISP42 transzmembrán fehérje. Elektron-mikroszkópos felvételek segítségével sikerült kimutatni, hogy a citoszólból szintetizált mitokondriális prekurzor fehérjék a külső és belső membrán érintkezési helyein halmozódtak fel (6. ábra). A prekurzor fehérjék denaturált formában jutnak át a fehérjékkel bélőt, minden a külső és a belső membránt átérő csatornán keresztül. Erre kísérleti bizonyítékot az szolgáltatott, hogy kémiai keresztkötő vegyületekkel a prekurzor molekulák keresztkötést képeztek minden a külső, minden a belső membrán integrális fehérjéivel.

Az utódsejtek mitokondriumjai eltérő mértékben származnak az egyes szülő sejtekből a különböző fajok esetén. Az élesztőben a haploid sejtek fúziója során minden szülő hozzájárul a diploid sejt mitokondriumaihoz. A növények egyharmadánál a mitokondriumok minden szülőtől származnak, kétharmaduknál pedig csak az anyai sejtből. Az emlősöknél a spermiumok alig (vagy egyáltalán nem) járulnak hozzá a zigóta mitokondriumaihoz, ennek következtében a mitokondriális DNS 99.99 %-a anyai eredetű.



5. ábra. A polipeptidek importja a mitokondriumok mátrixába. A prekurzor fehérje, melynek N terminális végén célzó szekvencia van, a citoszólban szintetizálódik. 1.) A hsp70 hősök fehérje (chaperon) ATP felhasználásával hozzáköötödik a perkurzor fehérjéhez. 2.) A hsp70 által stabilizált kitekeredett fehérje hozzáköötödik a receptor fehérjéhez. 3.) A fehérje transzlokálódik a membránban lévő csatornán keresztül a proton gradiens hajtóerejét felhasználva. A transzlokáció a külös és a belső membrán érintkezési pontjában játszódik le. A csatorna létrehozásában részt vesz egy 42 kDa molekulásúlyú, ISP42 nevű fehérje is. 4.) A mátrix hsp70 fehérje hozzáköötödik a bejutott prekurzor fehérjéhez, hogy azt megvédje az idő előtti, nem megfelelő feltekeredestől. 5.) A mátrix hsp60 molekula komplexe (chaperonin) katalizálja a prekurzor fehérje megfelelő konformációjának kialakítását. 6.) A feleslegessé vált célzó szekvenciát megfelelő enzimek lehasítják.



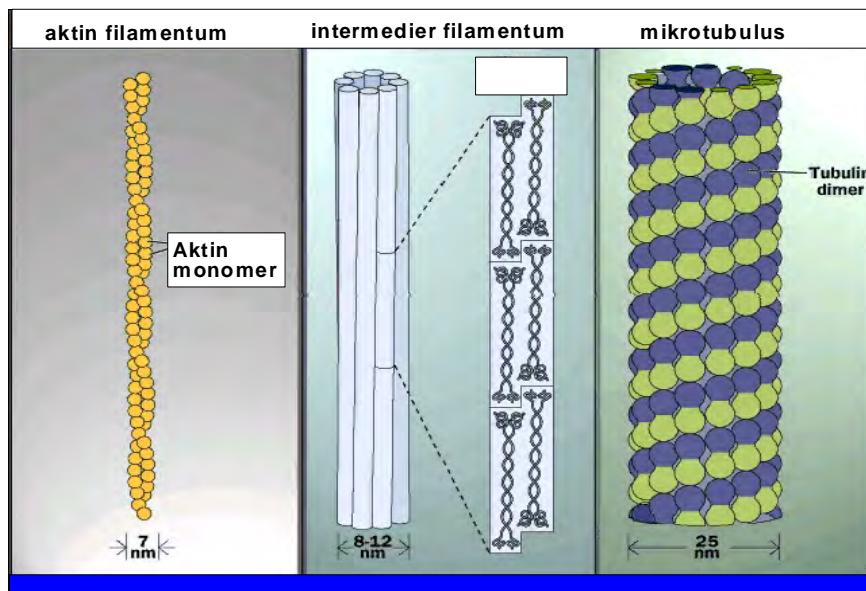
6. ábra. Mitokondrium prekurzor fehérjéinek felvételét igazoló elektronmikroszkópos felvétel. A nyilakkal jelölt helyeken jön létre kontaktus a mitokondrium külső és belső membránja között. A nagy nyílhagy mutatja a citoszólban szintetizált mitokondriális prekurzor fehérjék lokalizációját. Látható, hogy a prekurzor fehérje felvétele a kontaktus ponton formálódott csatornán keresztül valósul meg.



## A citoszkeleton és a sejtmozgások

A membránnal határolt sejtszervek az eukarióta sejtek szerveződésének egy szintjét jelentik. Egy további szerveződési szint a citoszkeleton, amely az eukarióta sejtek citoplazmájában jelenlevő fehérje hálózat. A citoszkeleton a sejt szerkezeti vázát képezi; jelentős szerepe van a sejt alakjának meghatározásában, és a citoplazma szerkezetének kialakításában. A strukturális szerep mellett, a sejt mozgásaiért is felelős a citoszkeleton. Ez nemcsak a sejt egészének mozgását jelenti, hanem az egyes organelumok intracelluláris transzportját is, és egyéb struktúrákat is mint pl. mitotikus orsót. Nagyon lényeges, hogy a citoszkeleton sokkal kevésbé rigid struktúra, mint ahogy azt a neve sugallja. Sokkal inkább egy dinamikusan szerveződött rendszer, amely állandóan változik ahogyan a sejtek alakjukat változtatják, mozognak vagy éppen osztódnak.

A citoszkeletális rendszer három fő komponensből áll: az aktin filamentumokból, az intermedier filamentumokból és a mikrotubulusokból, amelyeket egymáshoz és sejt organelumokhoz különböző kiegészítő fehérjék kapcsolnak.

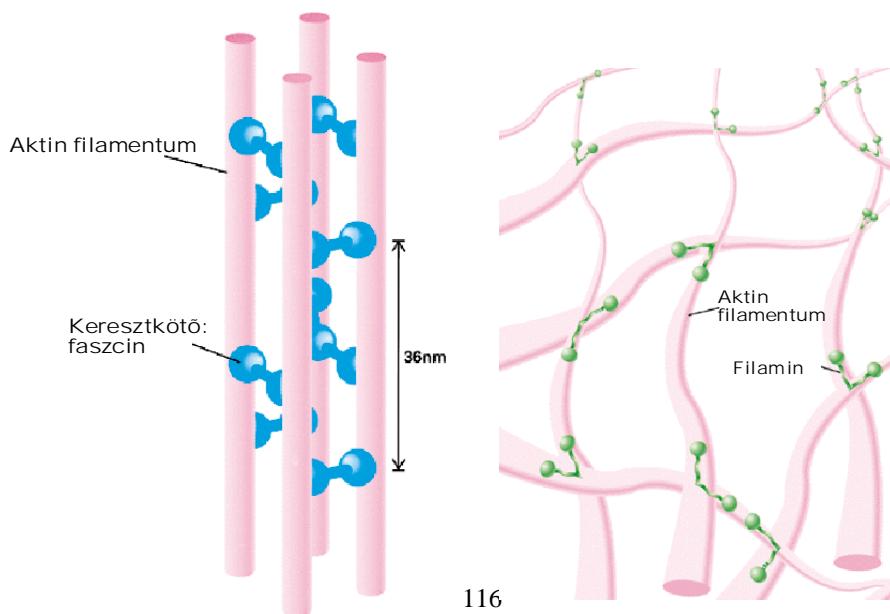
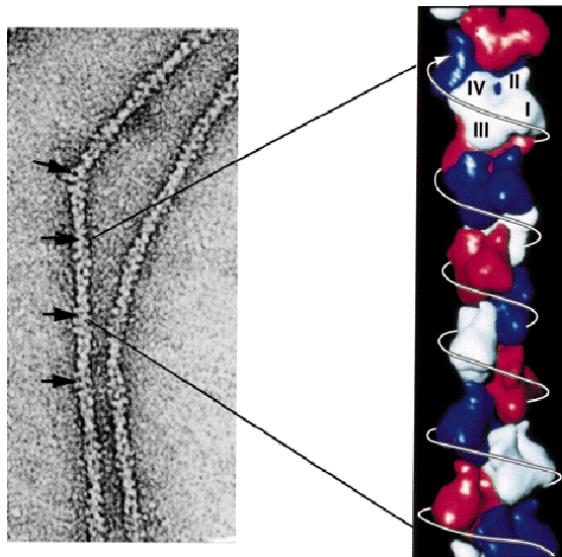


## Aktin filamentumok

A legfontosabb citoskeletális fehérje az aktin, amely 7 nm átmérőjű rugalmas filamentummá polimerizálódik. Ezt hívják aktin filamentumnak vagy mikrofilamentumnak is. Az aktin filamentumok kereszt-kötő fehérjék, mint pl. a **fimb-**

**rin**, a **faszcin**, vagy az összehúzódásra is képes rostok esetén az **V-aktinin** segítségével kötegekké szerveződhetnek.

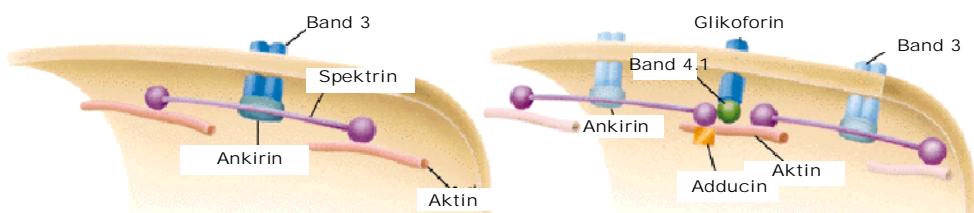
Más aktin kötő fehérjék, mint pl. a **filamin**, aktin hálózatok képzésében játszanak fontos szerepet. Az aktin kötő fehérjék között vannak olyanok is, amelyek aktin mono-merekhez kötödnek (**timozin** és **profilin**), ezáltal a monomerek polimerekké való alakulásának szabályozásában játszanak



szerepet. A **gelszolin** nevű fehérje pedig az aktin filamentumok végéhez képes kötődni, ezáltal megakadályozza a filamentum növekedését.

Az aktin filamentumok koncentrálódnak a plazma membrán közelében, ahol egy három dimenziós hálózatot képeznek. Ez döntően befolyásolja a sejt alakját, és fontos szerepet játszik a sejtek mozgásában is, azaz a citoskeleton és a plazma membrán összekapcsolódása strukturális és funkcionális szempontból is fontos. A különböző sejtfajták esetén ez a kapcsolat nagy variabilitást mutat. Itt az egyik legjobban tanulmányozott rendszert a vörösvértest citoskeletonet mutatjuk be.

A spektrinhez hasonló fehérje a **filamin** pl. a vérlemezekben játszik szerepet, míg a



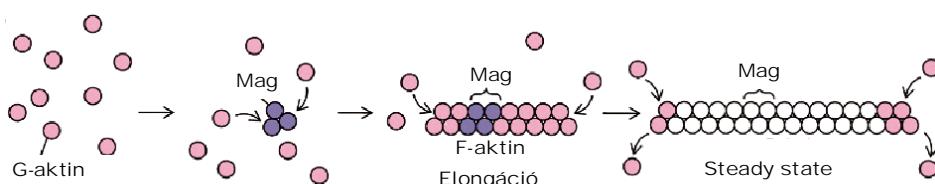
spektrinhez hasonló másik fehérje a **disztrófin** az izomsejtekben. Ez utóbbi különösen érdekes, mert mutációja izomdisztrófiához vezet (Duchenne és a kevésbé súlyos Becker disztrófiában). A betegség X kromoszómához kötötten öröklődik, és betegek ritkán élnek 20 évnél tovább. Molekuláris biológiai technikákkal sikerült kimutatni, hogy a betegekben a 427 kD molekulatömegű fehérje a disztrófin vagy hiányzik, vagy abnormális változatban van jelen.

### Az aktin filamentumok dinamikája

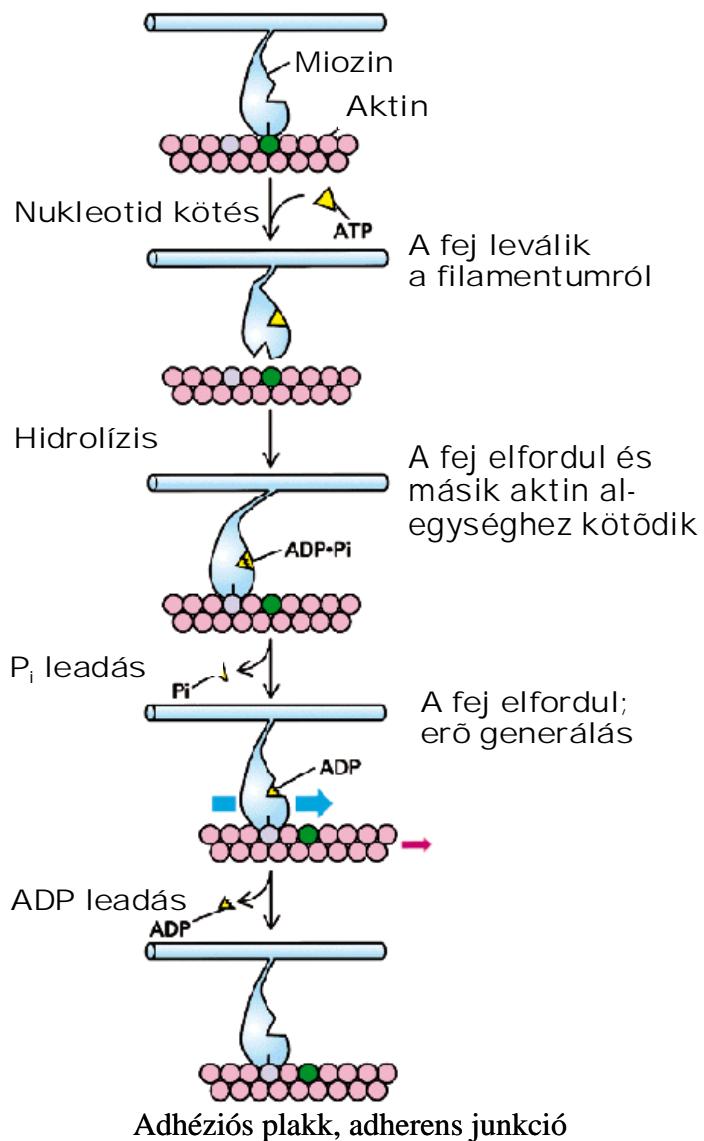
Az aktin monomer formája (G-aktin) 43 kD molekulatömegű. A monomerek polimerizációjában az első lépés az un. nukleáció (3 aktin monomer összekapcsolódása), melyet követően az aktin filamentum minden végén képes monomereket kötni. A két vég nem szimmetrikus: az un. + vég ötször gyorsabban növekszik, mint a - vég. Az aktin monomerek képesek ATP-t kötni, mely polimerizációt követően ADP-vé hidrolizál. Bár ATP nem feltétlenül szükséges a polimerizációhoz, de az ATP-t kötő forma hatékonyabban épül be mint az ADP-t kötő. Az aktin polimerizáció reverzibilis folyamat, amelyben a monomerek mind

asszociálódnak minden disszociálnak az aktin filamentum minden végén. Az alegység disszociáció sebességi állandója független a G-aktin koncentrációtól, míg az asszociáció függ a monomer koncentrációtól. Így egy dinamikus equilibrium állapot jöhet létre bizonyos monomer koncentrációjánál („treadmilling” jelenség).

### Miozin és sejtmozgások

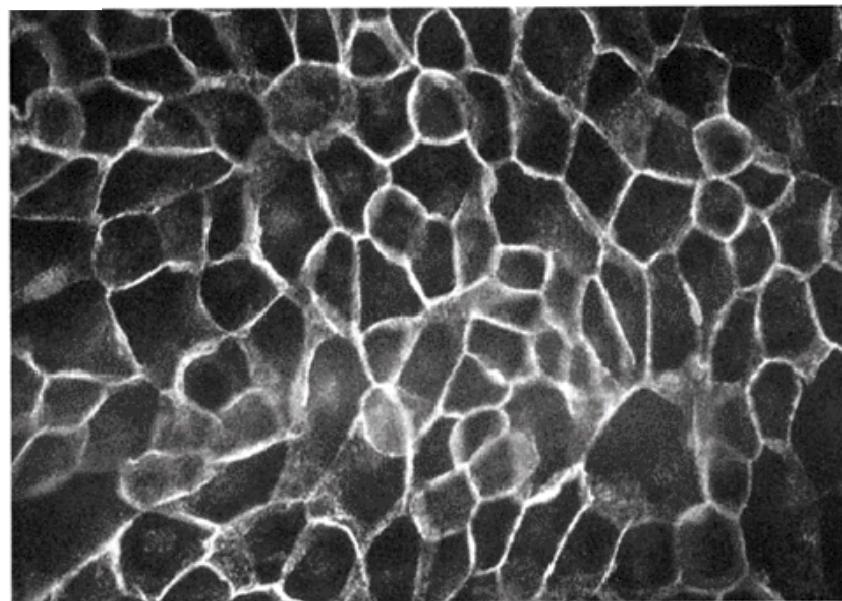
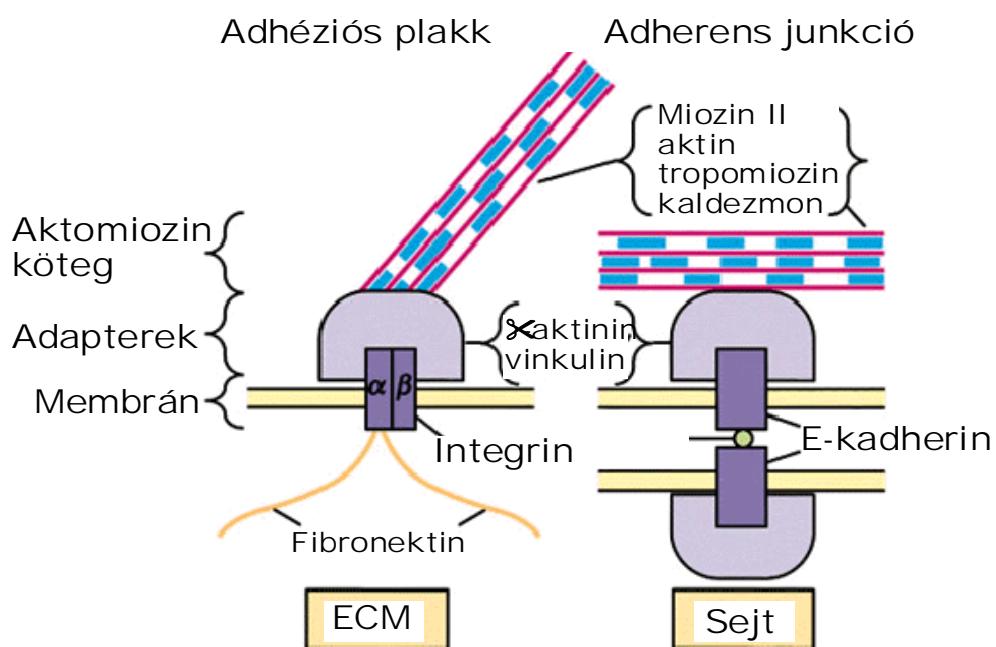


Az aktin filamentumok a **miozin** nevű fehérjével összekapcsolódván felelősek a legkülönbözőbb mozgásokért. Az izommozgást itt nem tárgyaljuk (az élettan tárgykörébe tartozik). A miozin egy különleges enzim molekula, amely képes az aktin filamentumok mentén mozogni, miközben ATP-t hidrolizál, azaz kémiai energiát alakít át mechanikai energiává. Az ilyen enzimeket mechano-kémiai vagy motor fehérjéknek nevezünk. Az ábra vázlatosan mutatja a folyamatot. Az első lépésben ATP molekula kötődik a miozin molekula ATP-kötő helyéhez, melynek hatására a miozin fej részén levő aktin-kötő zseb megnyílik. Ennek hatására a miozin ledisszociál az aktin filamentumról. Ezután az ATP elhidrolizál, miközben az ATP-kötő zseb bezáródik, és a miozin fej része begörbüli. Ebben az új konformációban a miozin fej képes az aktin filamentum egy másik alegységehez kötödni. A ciklus következő lépéseiben a miozin ismét az aktinhez kötődik. Az anorganikus foszfát és az ADP ledisszociálása **konformációs változással** jár és a miozin fej a mozgáshoz szükséges **erőt kifejt**. Kezdetben a miozin kötődése az aktinhez gyenge, de az anorganikus foszfát ledisszociálását követően ez a kapcsolat erősebbé válik. A ciklus végén az ADP ledisszociál és a miozin konformáció visszaáll a kiindulási állapotba. Ezen modell szerint a miozin végigsétál az aktin filamentumon. Természetesen a mozgás típusa attól függ, hogy az aktin és a miozin molekulák milyen egyéb molekulákhöz kapcsolódnak.



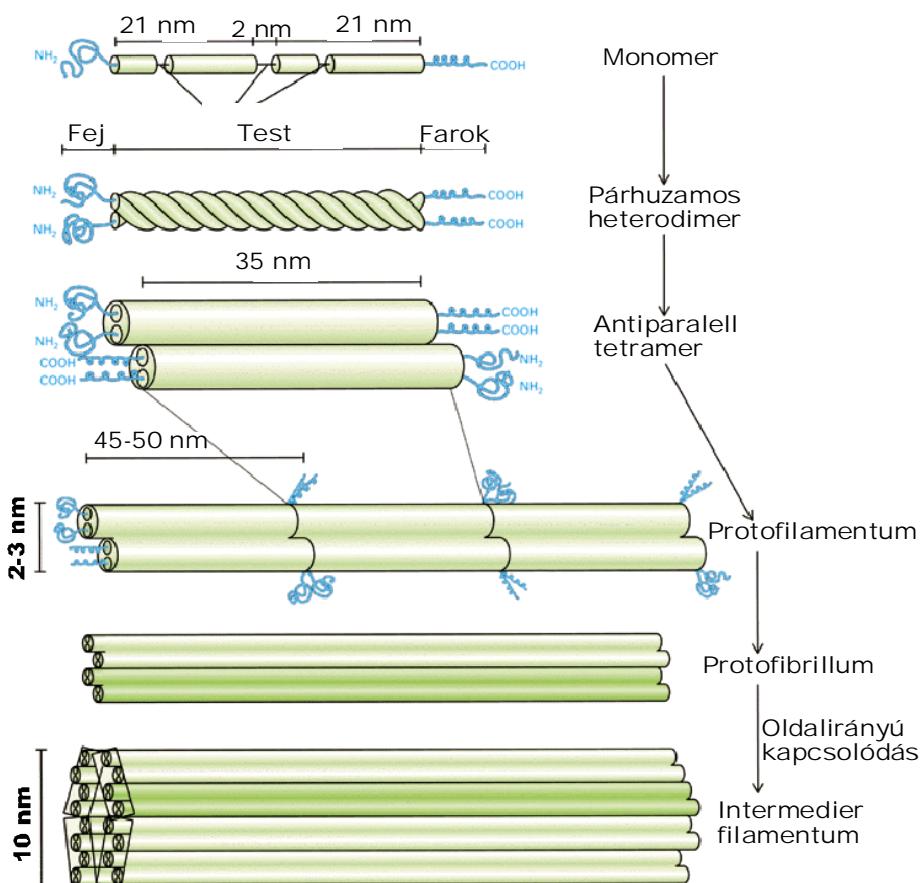
Sok sejtfajta plazma membránja speciális régiókkal rendelkezik, amelyek révén egymáshoz illetve a környezethez kapcsolódnak. Az aktin filamentumok ezeken helyeken belülről kapcsolódnak számos fehérje segítségével, mint pl. a vinkulin, talin stb. Az extracelluláris oldalon a sejtek pedig **integrinek** segítségével kötődnek az extracelluláris mátrixhoz. Az összehűzödésre képes aktin filamentumok, mint pl. a **stressz filamentumok** kapcsolódnak a sejt membránhoz is, és ezáltal részt vesznek a

sejt-sejt illetve a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok kialakításában is. Az ábra a két kapcsolódási lehetőség vázlatos képét mutatja, illetve fluoreszcenciásan jelölt anti E-kadherinnel festett sejtenyészeti mikroszkópos képét.



## Intermedier filamentumok

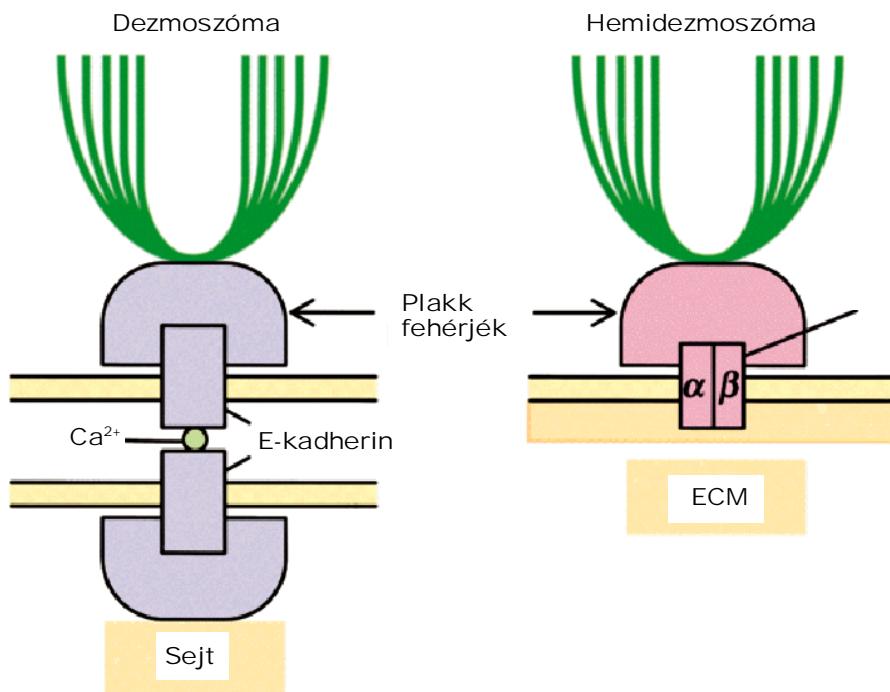
Az **intermedier filamentumok** átmérője mintegy 10 nm, amely az aktin filamentumok és a mikrotubulusok átmérője között van. Az aktin filamentumokkal és a mikrotubulusokkal ellentétben nem vesznek részt direktben a sejt mozgásában, ehelyett döntő módon a sejtek és szövetek mechanikai szilárdságát biztosítják. Míg az aktin filamentumok és a mikrotubulusok egy-egy fehérje (az aktin és a tubulin) polimerjei, addig a mikrofilamentumok több, a különböző típusú sejtekben kifejeződő fehérjékből állnak. Több mint 50 különböző ilyen fehérje ismeretes, melyeket aminosav szekvenciájuk hasonlatosságai alapján hat fő csoportba lehet sorolni. Az első két csoportba a **keratinok** tartoznak, amelyek döntő módon az epitheliális sejtekben



fejeződnek ki. A harmadik csoport legismertebb tagjai a **vimentin** amely egy sor sejtben megtalálható (pl. fibroblasztok fehérvérsejtek), valamint a **dezmin**, ami az izomsejtekben fordul elő. A negyedik csoportba a neurofilamentumok fehérjéi tartoznak (NF-L, NF-M és NF-H) valamint az  **$\alpha$ -internexin**, melyek az idegsejtekben fordulnak elő. Az ötödik csoport tagjai a magmembránt belülről körülvevő hálózat kialakításában vesznek részt és megtalálhatók a legtöbb eukarióta sejtben. A hatodik csoportba tartozó **nesztin** az idegsejtek korai fejlődési szakaszában fordul elő.

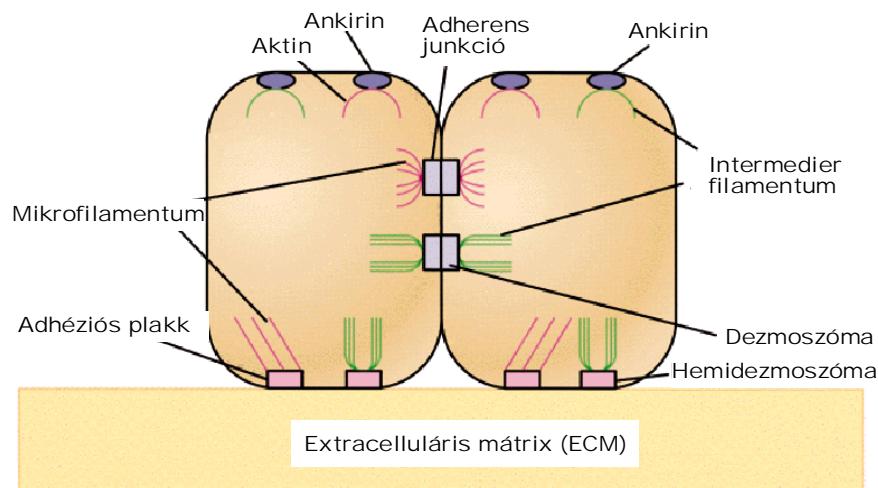
Annak ellenére, hogy nagyságukban és aminosav szekvenciájukban ezek a fehérjék jelentősen eltérnek egymástól, a különböző intermedier filamentumok szerveződése nagymértékben hasonlatos egymáshoz.

Az intermedier filamentumok a legtöbb sejtben egy magasan szervezett hálózatot képeznek, amely összekapcsolja a magot és a sejtmembránt. Mind keratin és vimentin filamentumok kapcsolódnak a maghoz, ezáltal mintegy rögzítik a magot a sejten belül.



## Dezmoszómák, hemidezmoszómák

Plakk fehérjékhez kapcsolódva az intermedier filamentumok a **dezmoszómákhoz** és **hemidezmoszómákhoz** is kapcsolódnak. Mindkettő szerkezete hasonlatos az aktin filamentumokhoz kapcsolódó adherens junkcióéhoz és az adhéziós plakkokéhoz. Ez a hasonlóság a közös fehérjékből következik. Pl. a dezmoszómákban található E-kadherin előfordul az adherens junkciókban is. Hasonlóképpen mind a hemidezmoszómákban, mind az adherens plakkokban integrinek találhatók. Bár az intermedier filamentumok és az aktin fibrillumok különböző polimerek, mindenki

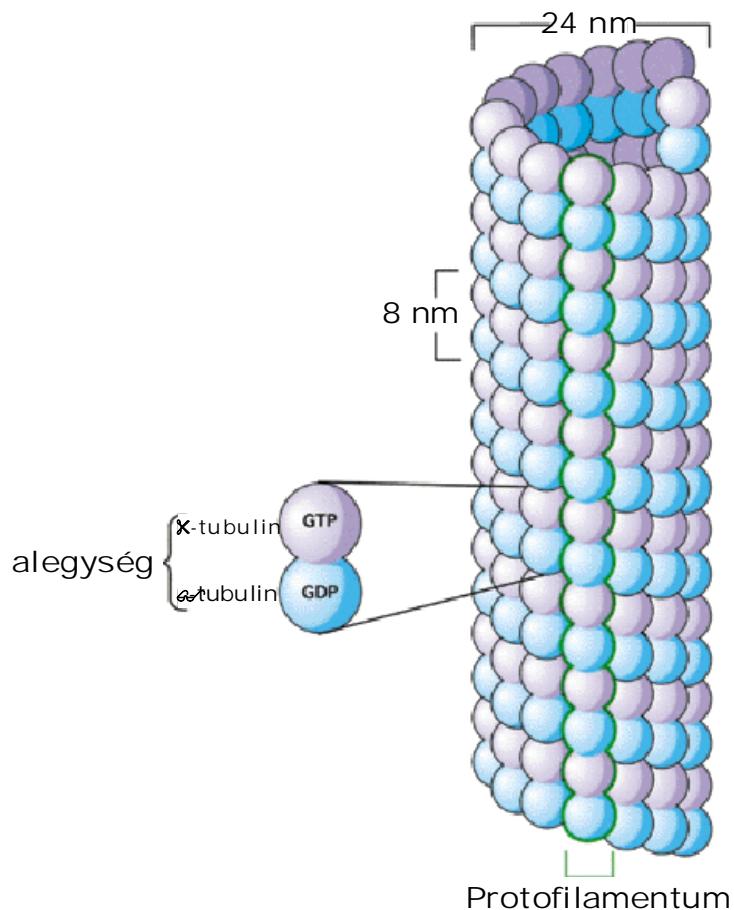


közös plakk fehérjék segítségével kapcsolódik a membránhoz.

## Mikrotubulusok

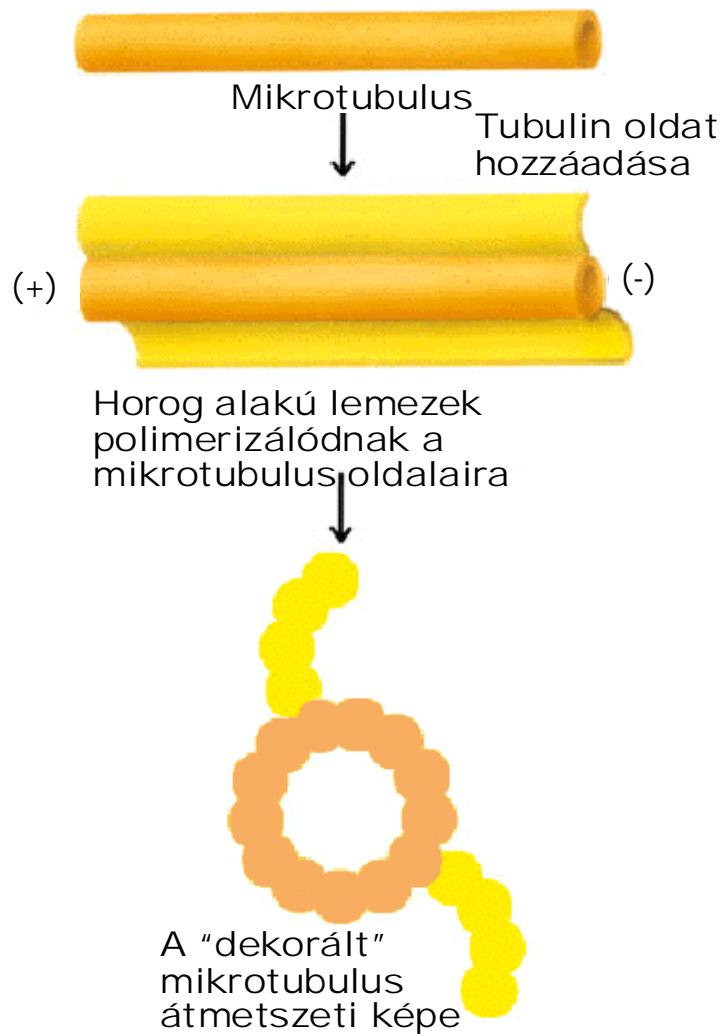
A mikrotubulusok a globuláris szerkezetű **tubulin** alegységek polimerjei, amelyek egy 24 nm átmérőjű hengeres csövet alkotnak, amely kétszer akkora, mint az intermedier filamentumok átmérője és háromszorosa a mikrofilamentumok átmérőjének. Hosszúságuk a néhány tized mikrométerről akár a néhány száz mikrométerig terjedhet. A mikrotubulusok sokkal rigidebbek, mint akár a mikrofilamentumok, akár az intermedier filamentumok, ami a csőalakú szerkezetükön következik.

A mikrotubulusban az oldalirányú és a hosszirányú kölcsönhatások a tubulin heterodimerek között felelősek a cső alakú forma kialakításáért. A mikrotubulus falában elhelyezkedő protofilamentum szerkezete ma is kérdéses. Egy lehetséges elrendezést mutat az ábra.



Az aktin filamentumokhoz hasonlóan a mikrotubulusok szerkezete is polaritást mutat. Ezt úgy is meg lehet mutatni, hogy a mikrotubulusokat nagy koncentrációjú tubulin oldatban inkubáljuk. Az alkalmazott magas só koncentráció miatt a tubulin, mint nem

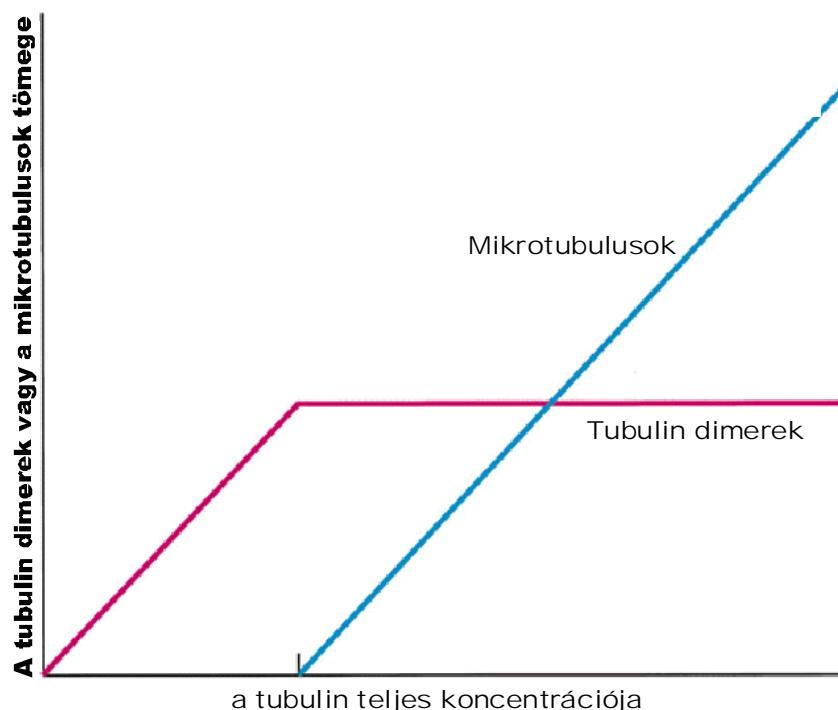
komplett mikrotubulus fal polimerizálódik a mikrotubulusra. Átmetszetben horog alakú lemezként látszik. Az óramutató járásának megfelelő görbület azt jelenti, hogy a mikrotubulust a (-) vége felől a (+) vég irányában nézzük, azaz a struktúra hossztengelyére nézve nem szimmetrikus.



Egy interfázisban levő sejtből a mikrotubulusok látszólag rendezetlenül helyezkednek el. Figyelmesebb vizsgálat azt mutatja, hogy a mikrotubulusok (-) vége a sejt

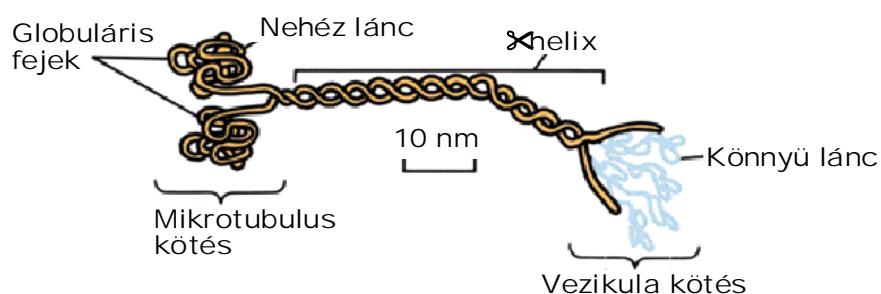
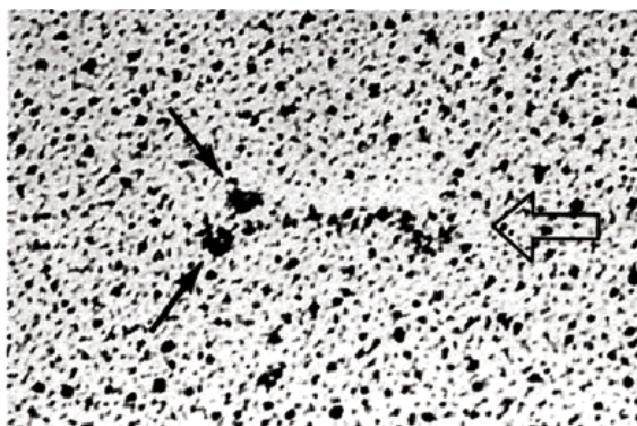
centroszómájához kapcsolódik, amely két egymásra merőleges centriolumból és a pericentrioláris anyagból áll.

A mikrotubulusok dinamikus instabilitást mutatnak. A tubulin koncentráció függvényében a mikrotubulusok össze- illetve szétszerelődnek. Az ábra azt mutatja, hogy egy **kritikus tubulin koncentráció** alatt csak tubulin dimerek figyelhetők meg, míg a kritikus koncentráció felett a tubulin mikrotubulussá polimerizálódik.



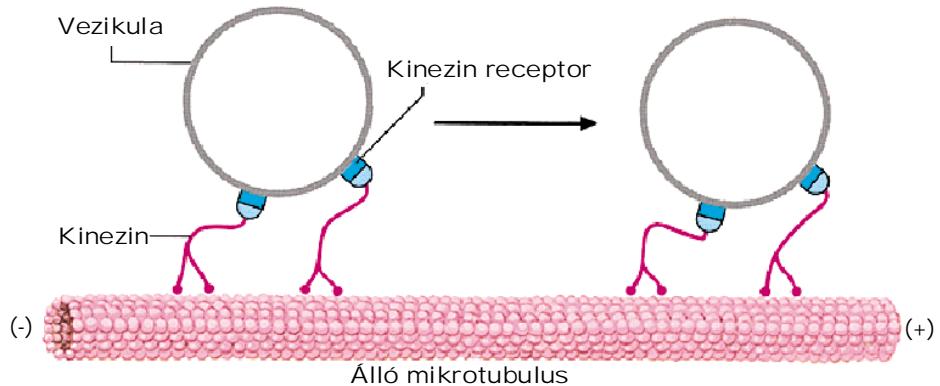
A sejten belül membránnal határolt vezikulák transzportja alkalmas technikával megfigyelhető. A vezikulák mikrotubulusok mentén transzportjában motor proteinként résztvevő **kinezin** szerkezete az ábrán látható. A 380 kD molekula tömegű fehérje két nehézláncból (melyek egyenként 124 kD tömegűek) és egy 64 kD tömegű könnyűláncból állnak. Az elektron mikroszkópos felvételen látszik, hogy a kinezin három doménből áll, melyek mindegyikének speciális funkciója van. A fej rész

Kinezin

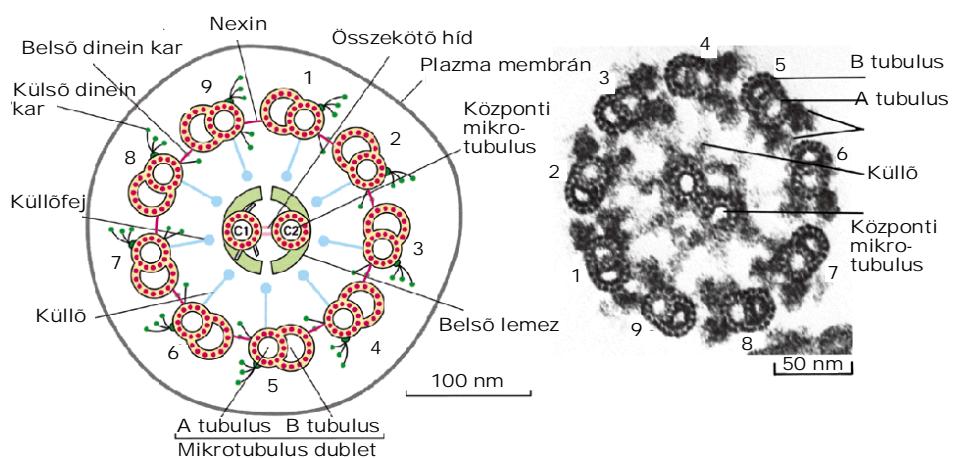


kötődik a mikrotubulusokhoz és köti az ATP-t, míg a könnyű lánchoz kapcsolódnak a szállítandó vezikulák.

Az ábra a kinezin katalizálta anterográd (előre irányú) transzport modelljét mutatja. A vezikulák transzportja a mikrotubulus (+) végének irányába történik. Ellentétes irányú transzportban a **dinein** nevű fehérje vesz részt.



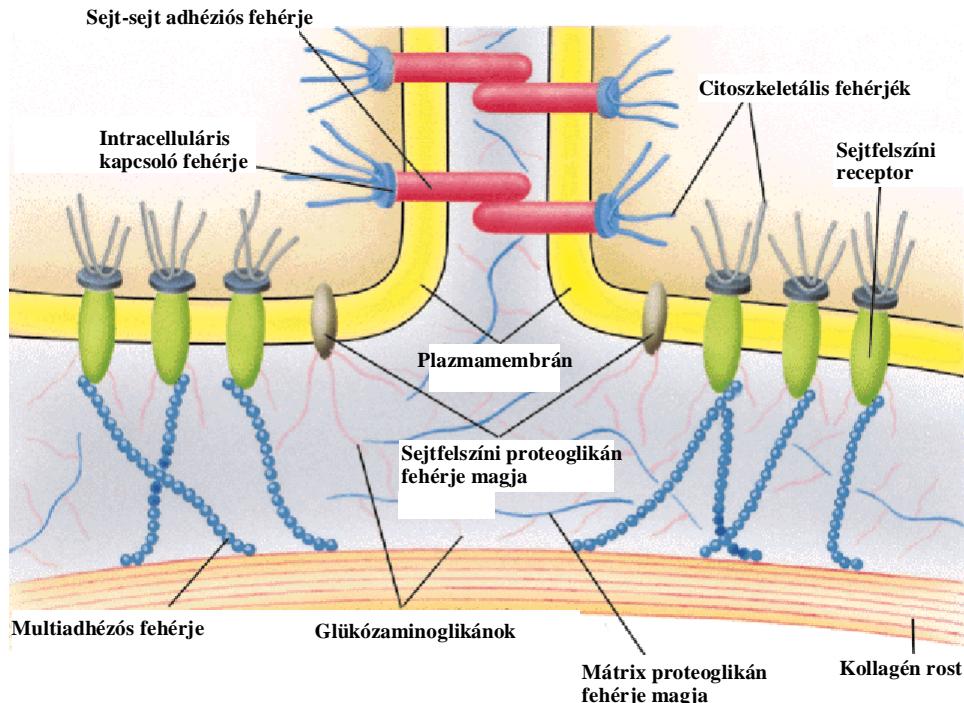
Az úszás jónéhány sejtfajta jellemző mozgási formája: egy ilyen sejtfajta pl. a spermium. A mozgás ezen formájának megvalósulása ostorok segítségével történik. Ezen struktúrák felépítésében a mikrotubulusok is részt vesznek. Az eukarióta sejtek ostorainak és csillóinak felépítése is bár változatosságot mutat, mégis nagyon sok tekintetben hasonlatos egymáshoz. Az ábra egy idealizált ostor keresztmetszeti képét mutatja a főbb alkotókkal.



## **Multicelluláris szerveződés. Sejtek közötti kapcsolatok**

### **1. Sejtek közötti kapcsolatok**

A multicelluláris szervezetek evolúciója során specializált sejtek és szövetek alakultak ki, a magasabb rendű növényekben több mint 15 sejtípust, a gerinces állatokban pedig több száz sejtípust különböztethetünk meg. A többsejtű szervezetek evolúciójában fontos szerepet játszott a sejtek azon képessége, hogy szoros kapcsolatokat és speciális kölcsönhatásokat tudnak létrehozni egymás között. A sejtfelszíni fehérjék lehetővé teszik, hogy az állati sejtek szorosan és specifikusan kapcsolódjanak ugyanazon vagy eltérő típusú sejtekhez. Ezek a kölcsönhatások biztosítják, hogy sejtek populációi egymástól megkülönböztethető szövetekbe szegregálódnak. Az aggregációt követően a sejtek között specializált kapcsolatok (junkciók) jönnek létre, amelyek stabilizálják a sejtek közötti kölcsönhatásokat és elősegítik a szomszédos sejtek közötti kommunikációt. Az állati sejtek ugyanakkor fehérjéket és szénhidrátokat, ill. szénhidrát származékokat választanak ki, amelyek egy komplex hálózatot, a sejtek közötti teret kitöltenek, extracelluláris mátrixot hoznak létre. Ez a mátrix segíti elő a sejtek szöveti szerveződését és tartalmaz olyan hormonokat, növekedési tényezőket, melyek szabályozzák a sejtek növekedését és differenciálódását. Ugyanakkor a mátrix egy hálózatot hoz létre, amelynek elemei mentén a sejtek irányítottan mozogni tudnak, különösen a differenciálódás korai fázisában. A sejtek lehetséges kapcsolódásait egymáshoz és az extracelluláris mátrixhoz mutatja az 1. ábra. Az ábrán jól látható, hogy a sejtek szövetekbe történő szerveződését az extracelluláris mátrix különböző komponensei (kollagén rostok, glükózaminoglikánok és mátrix proteoglikán fehérje magok, multiadhéziós fehérjék), specializált sejtfelszíni fehérjék (sejtfelszíni receptorok, sejtfelszíni proteoglikán fehérje magok, sejt-sejt adhéziós fehérjék), valamint sejten belüli fehérjék (intracelluláris kapcsoló fehérje, citoskeleton fehérjei) biztosítják.



1. ábra. A sejtek lehetséges kapcsolódásai. A sejtekkel egymáshoz olyan sejtadhéziós fehérjék kapcsolják össze, amelyek intracelluláris kapcsoló fehérjéken keresztül kihorgonyzódnak a citoplazma vázrendszeréhez. Egyéb membrán receptor fehérjék, amelyek szintén kihorgonyzódnak a citoskeletonhoz, kapcsolatba lépnek az extracelluláris mátrix elemeivel. A multiadhéziós fehérjék összekötik a sejtfelszíni receptorokat a mátrix különböző komponenseivel. A proteoglikánok, melyekben a fehérje maghoz glükózaminoglikán láncok kötődnek, szintén elősegítik a sejtek egymáshoz és az extracelluláris mátrix fehérje komponenseihez való kapcsolódását. Összességében ezek a kölcsönhatások teszik lehetővé a sejtek egymáshoz, valamint a szomszédos sejtek citoskeletális elemeihez történő kapcsolódását, ugyanakkor biztosítják a szövetek tartását és ellenállását külső behatásokkal szemben.

## 2. Multiadhéziós fehérjék és receptoraik.

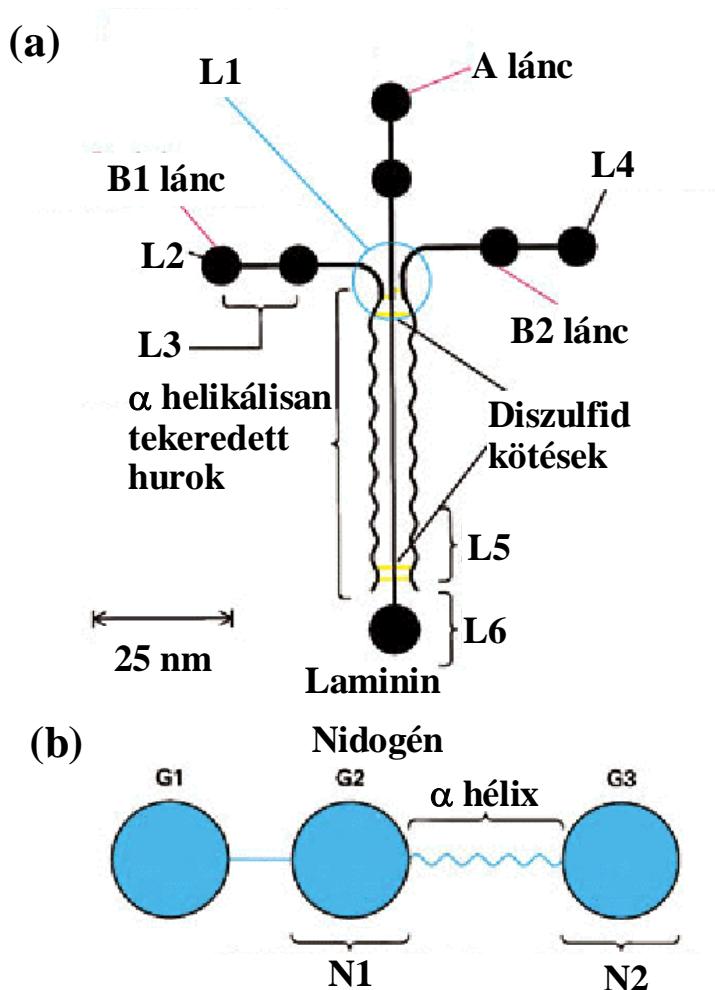
A multiadhéziós fehérjék elősegítik a mátrix egyéb komponenseinek szerveződését, valamint szabályozzák a sejtek kapcsolódását a mátrixhoz, a sejtek vándorlását és a sejtek alakját. A bazális lamina áltános összetétele: IV. típusú kollagén, heparansulfát proteoglikánok, nidogén és laminin. A kollagén komponense után gyakran hívják IV.

típusú mátrixnak is. Ilyen mátrix támasztja alá az epítél, a vérerek belső falát képező endotél, valamint a regenerálódó májsejteket. A mátrix valamennyi komponensét a rajta elhelyezkedő sejtek választják ki.

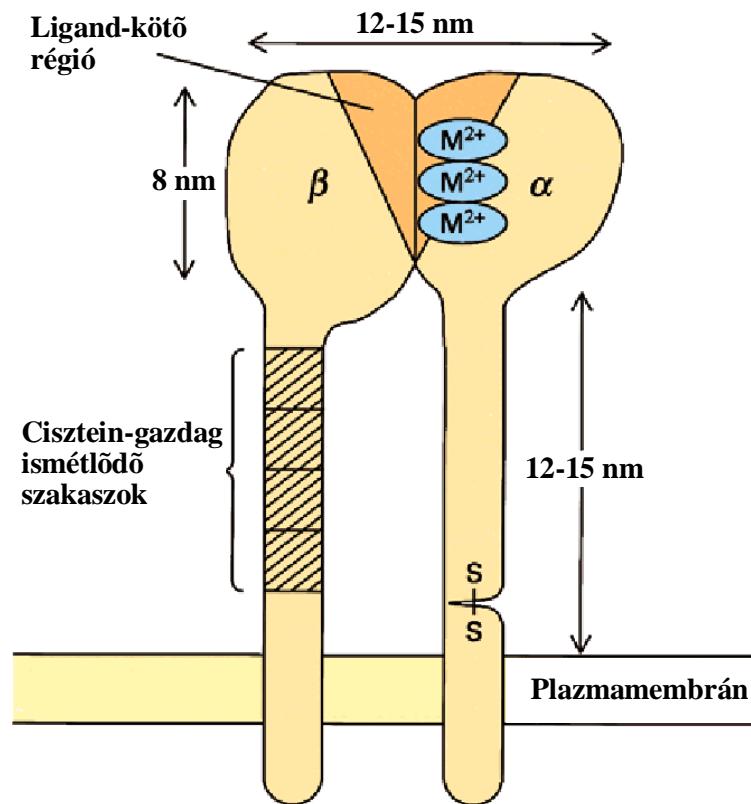
A **laminin** és a **nidogén** a bazális lamina fő strukturális fehérjéi. A laminin 70 nm hosszú kereszt alakú fehérje, molekulasúlya 820 kDa, és nagy affinitású kötőhelyekkel rendelkezik a bazális lamina egyéb komponensei számára. A nidogén molekulasúlya 158 kDa, bot alakja van három globuláris doménnal, és szorosan kötődik a lamininhez és a kollagénhez (2. ábra).

Az **integrinek** a sejtfelszíni receptorok egy nagy csoportját alkotják, amelyek a mátrix különböző komponenseihez kötődnek. Ezek a transzmembrán fehérjék sejt-sejt kölcsönhatást is közvetítnek. A különböző integrinek különböző sejteken fejeződnek ki, egy sejten több fajta integrin is található s így változatos módon tudnak a sejtek a mátrix egyes komponenseihez kapcsolódni. Az integrinek  $\alpha$  és  $\beta$  alegységből álló heterodimer molekulák. Általános szerkezetüket a 3. ábra mutatja. Az  $\alpha$  és a  $\beta$  alegységek molekulasúlya 100-140 kDa között van, az emlősökben 14  $\alpha$  és 8 fajta  $\beta$  alegységet különböztetünk meg. A  $\beta_1$  alegységet tartalmazó heterodimerek elsősorban az extracelluláris komponensekhez kötődik, a  $\beta_2$  alegységet tartalmazók pedig főleg a sejt-sejt kölcsönhatásokat közvetítik. Az  $\alpha_1\beta_1$  és az  $\alpha_2\beta_1$  integrinek a IV. típusú kollagénhez, ugyanezen integrinek a széles körben megtalálható  $\alpha_6\beta_1$  integrinekkel együtt a lamininhez kötődnek. A  $\beta_2$  alegységet tartalmazó integrinek csak a fehér vérsejtekben találhatók meg és csak sejt-sejt közötti kölcsönhatást közvetítnek. Bizonyos esetekben az integrin sejtfelszíni kifejeződése nem elegendő a kötések kialakításához, az integrineket aktiválni kell, hogy képesek legyenek az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódni. Ilyen jelenség játszódik le a véralvadás során, amikor a vérlemezke felszínén lévő integrinek aktiválódnak a folyamat során, a megfelelő kötések kialakításához. Az integrinek elég gyenge kötéssel kapcsolódnak az extracellulási mátrixhoz, de miután elég sok (több száz, vagy ezer) ilyen kötés jön létre, végeredményben erős kölcsönhatás lép fel a sejt és a mátrix komponensei között.

Ugyanakkor, az egyes kötéseket könnyű felszakítani, ezt használja ki a sejt migrációja során.



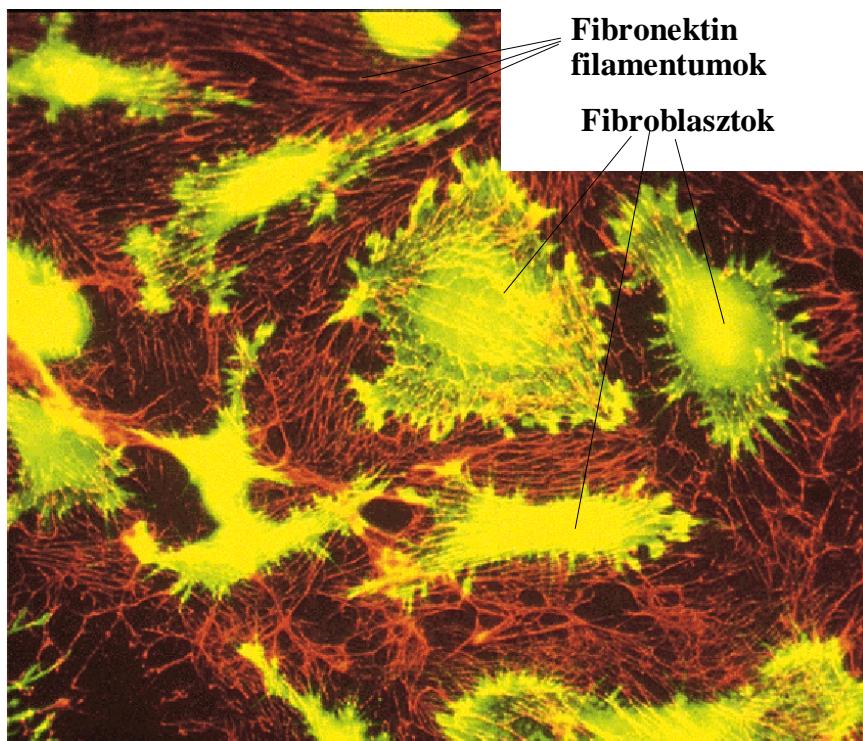
2. ábra. A laminin és a nidogén szerkezete. (a) A laminin A láncának molekulásúlya 400 kDa, a B1-é 215 kDa, a B2-é pedig 205 kDa. Az egyes kötőhelyek specifikációi: L1 - különböző sejtek sejfelszíni receptorainak és a nidogén kötőhelye, L2 - L6 helyek az extracelluláris mátrix különböző elemeinek kötőhelyei. (b) N1 - laminin kötőhely, N2 - IV. típusú kollagén és proteoglikánok kötőhelye.



3. ábra. Az integrinek általános szerkezete. Az  $\alpha\beta$  heterodimer  $\beta$  láncán négy cisztein gazdag ismétlődő régió található.

A **fibronektinek** szintén fontos multiadhéziós mátrix fehérjék. Elsősorban azokban a mátrixokban találhatók meg ahol a mátrix tartalmaz fibrilláris (I. II. III. és V. típusú) kollagént is. Érdekes módon csak nem transzformált sejtek felszínén találhatók meg, transzformált sejtek felszíne mentes a fibronektinektől. Elsődleges feladatauk a sejtek kihorgonyzása az extracelluláris mátrix elemeihez. A sejtekhez való kötődésükkel szabályozzák a sejtek alakját, a citoskeleton szerveződését és fontos szerepet töltenek be a sejtek migrációjában, differenciálódásában az embriogenézis során. A fibronektinek fontosak a sebek gyógyulása során, mert elősegítik a makrofágok és más immunsejtek migrációját a sérült területre. A fibronektineket két hasonló szerkezetű polipeptidlánc dimerje alkotja, amelyeket a C terminális részükön két diszulfidhíd kötés

tart össze. A láncok kb. 60-70 nm hosszúak és 2-3 nm vastagak. Körülbelül 20 különböző fajta fibronektint izoláltak már, ezek ugyanazon gén RNS átfrásának eltérő processzálásával keletkeztek. A vérben keringő fibronektin nagyon gyengén kötődik az integrin molekulákhoz, de ha a kollagén mátrixhoz kötődik, affinitása megnő az integrinekkel szemben, valószínűleg konformáció változás miatt. Az állati sejtekben nyolc különböző integrin kötődik a fibronektinekhez, és ez a sejtek adhézióját segíti elő. A fibroblasztok szövettenyészetében például a sejtek fibronektint választanak ki, ami hozzáköthető az edényhez, és egyéb mátrix komponensekkel szubsztrátumot hoz létre (4. ábra).



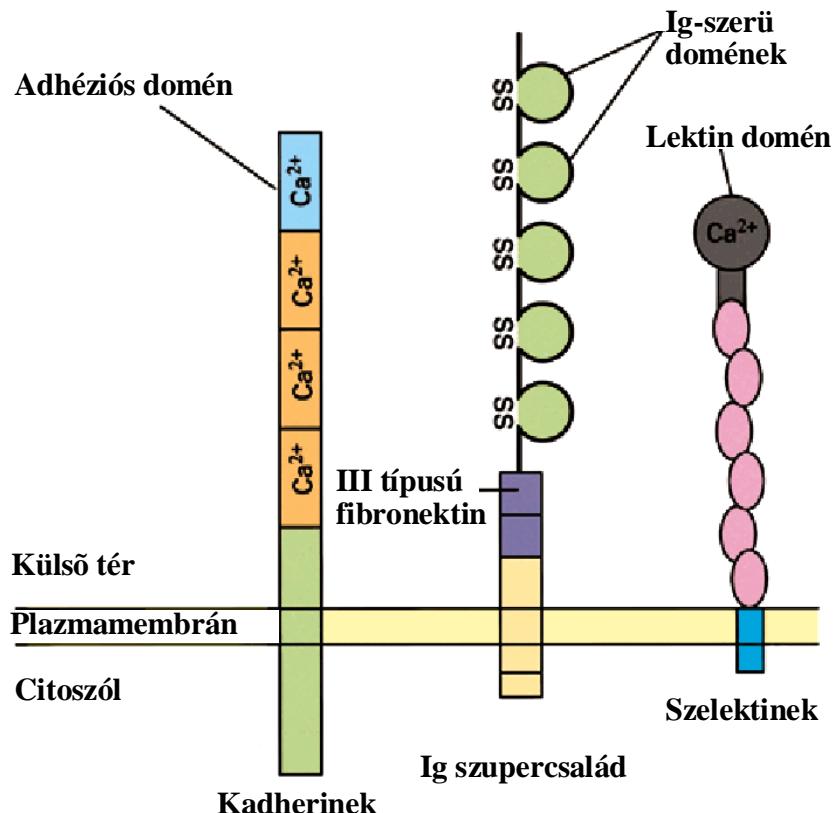
4. ábra. Sejtkulturában növő fibroblasztok által kiválasztott fibronectin szálak. A fibrillumok ott a legsűrűbbek, ahol a fibronectin a sejtekkel érintkezik.

A sejtek ehhez a szubsztrátumhoz kapcsolódnak integrin receptoraik segítségével a fibronektinen keresztül elősegítve kihorgonyzásukat. Nagyon sok rákos sejt nem tapad ki a tenyésztiő edényhez, mert csak nagyon kevés fibronektint választanak ki. A fibronektinek elősegítik a sejtek migrációját is, hiszen a mátrix fibrilláris elemeivel egy olyan "ösvényt" hoznak létre amelyek mentén a sejtek vándorolhatnak. Ez a sejtvándorlás elsősorban az embrionális szövetekben figyelhető meg, felnőtt szervezetben a sérülések gyógyulása során fordul elő sejmigráció. A véralvadás során keletkező fibrin szálak mentén a immunrendszer sejtjei (makrofágok, fibroblaszok és fehér vérsejtek) a sérülés helyére vándorolnak, hogy kifejték hatásukat.

### **3. Sejt-sejt adhézió. Adhéziós fehérjék.**

Nagyon sok szövet szerkezetét az azonos típusú sejtek kapcsolódása, adhéziója szabja meg. Ezen homofil adhéziót sejtfelszíni adhéziós fehérjék közvetítik. A sejtadhéziós fehérjék három fő csoportját különböztetjük meg: a **kadherineket**, a **szelektineket** és az **immunglobulin szupercsaládba (Ig)** tartozó fehérjéket (5. ábra). Míg a kadherinek és a szelektinek által közvetített sejt-sejt kölcsönhatások függnek a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok jelenlétéktől, addig az Ig családba tartozó fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$  távollétében is létrehoznak kötéseket. Mint már korábban is említettük, bizonyos integrin fehérjék szintén közvetítenek sejt-sejt kölcsönhatásokat.

A kadherinek homofil adhéziós molekulák, négy extracelluláris doménjük köt  $\text{Ca}^{2+}$ -ot. A negyedik - a membrántól legtávolabb elhelyezkedő - domén vesz részt a sejt-sejt adhézióban. Az E-kadherin tartja össze a gerincesekben az epitél sejteket (bélhám sejtek), de fontos szerepet játszik a morfogenézis s a differenciálódás során. A szelektinek a szomszédos sejtek szénhidrát csoportjaihoz kötődnek (ezért hívják őket *lektineknek*),  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében. A lektin-domén a molekula végén található. Az Ig szupercsalád fehérjéi homo- és heterofil kölcsönhatásokban vesznek részt, Ig doménekből és fibronektin doménekből állnak.

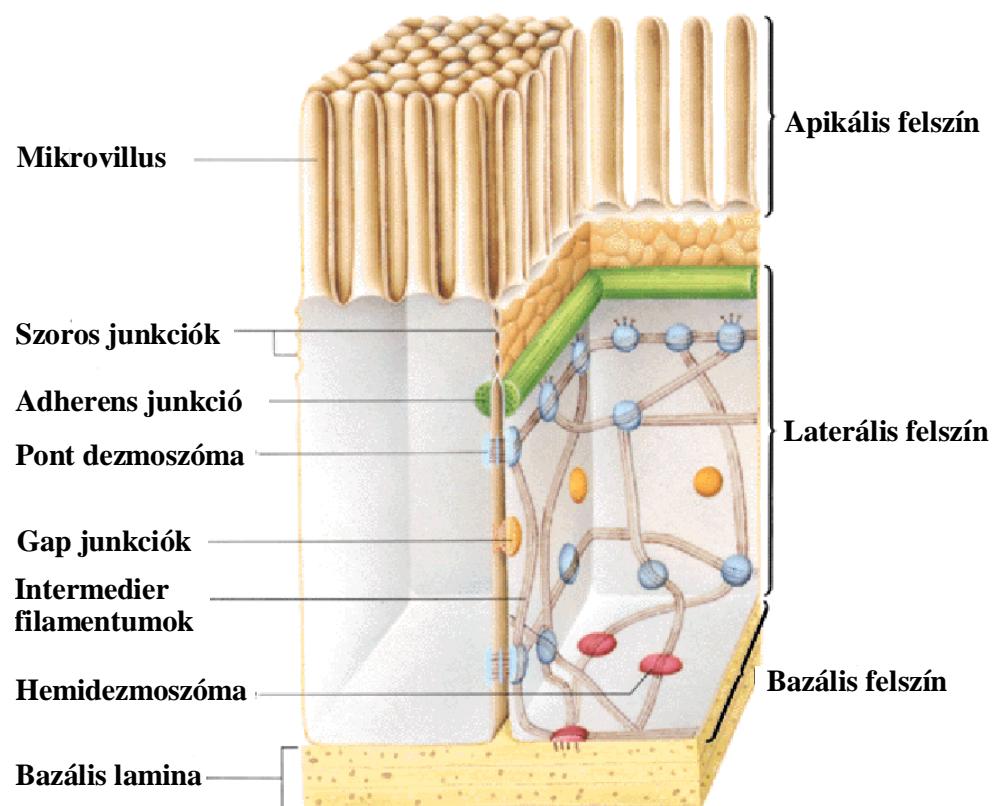


5. ábra. A sejtdadhéziós fehérjék fő családjai.

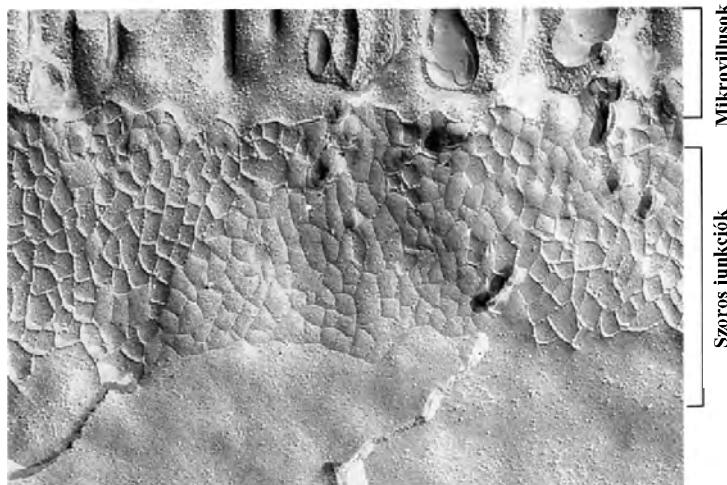
#### 4. Sejt-sejt adhézió. Sejtkapcsolatok (junkciók).

A sejtek egymáshoz történő adhézióját az előbb tárgyalt adhéziós fehérjék közül egy vagy több iniciálja. Ahhoz, hogy a sejtek a szövetekben integrális módon működni tudjanak, speciális sejtkapcsolatok, junkciók szükségesek. Ezen kapcsolatok három fő típusát különböztetjük meg: a **szoros junkciókat**, a **dezmoszómákat** és a **“gap” junkciókat**. A **szoros junkcióknak** az epiteliális sejtek kapcsolódásánál van fontos szigetelő szerepük (6. és 7. ábra). Ugyanakkor, gátolva a membrán fehérjék és a

lipidek diffúzióját, fenntartják az apikális és bazolaterális plazmamembránok eltérő összetételét.

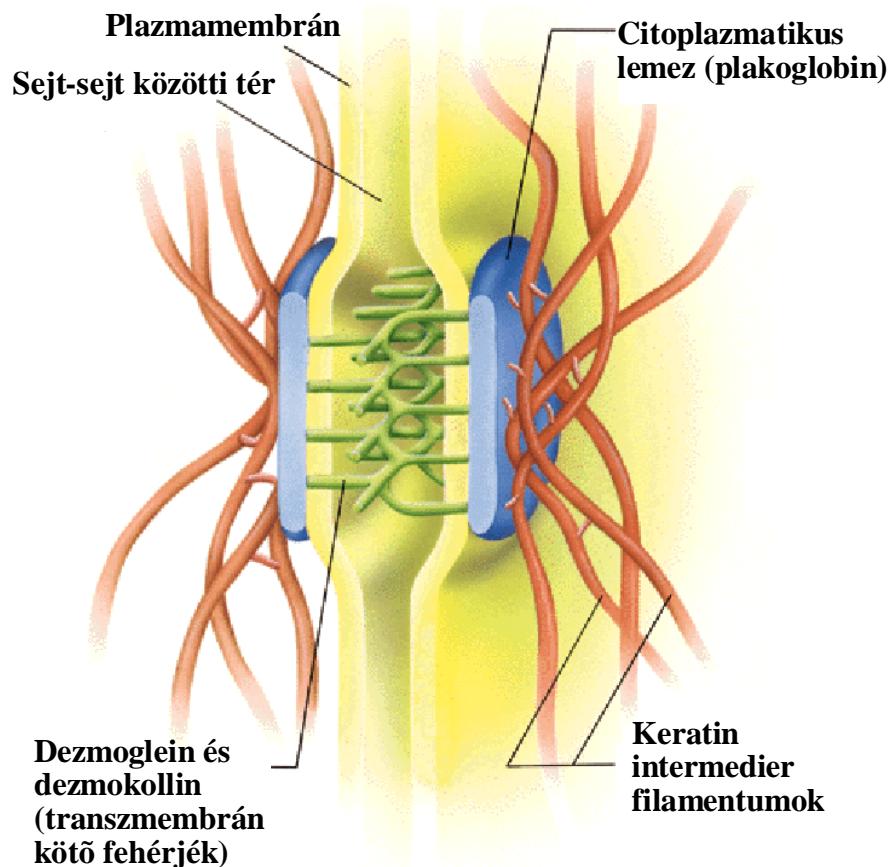


6. ábra. A bélhámsejtek sematikus diagramja.

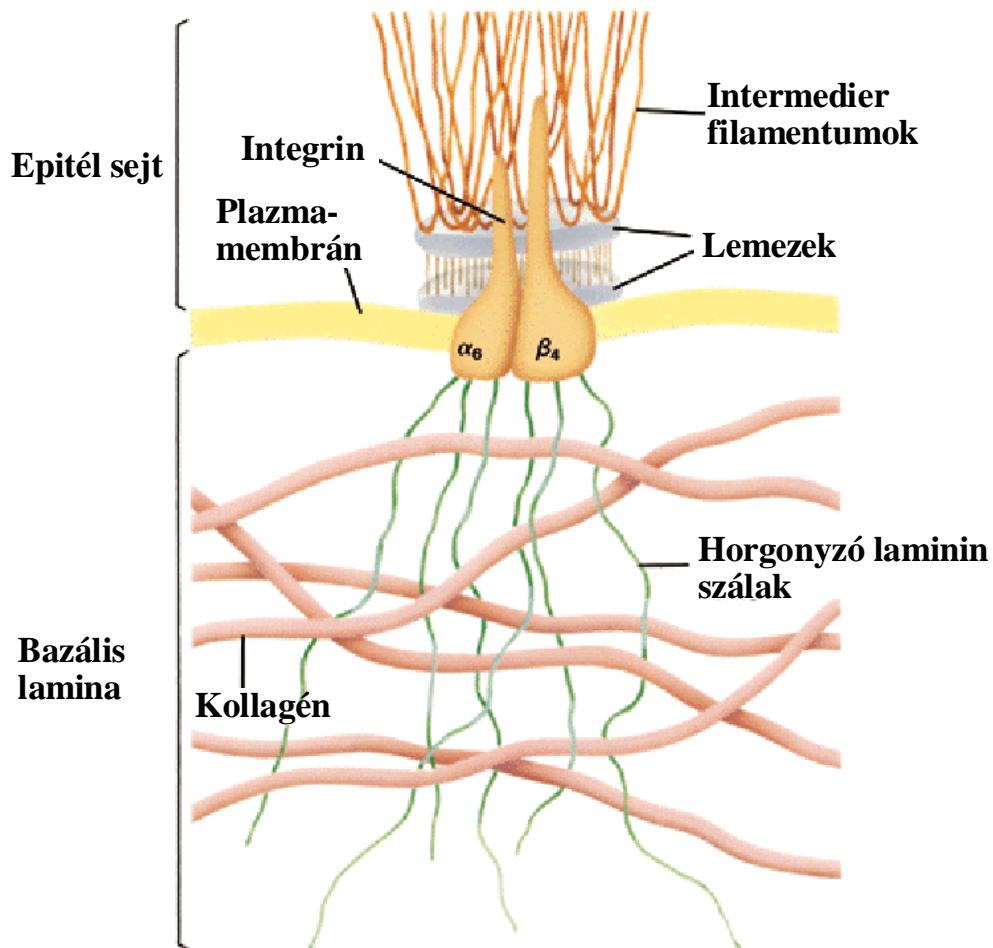


7. ábra. Két bélhámsejt szoros junkciójának elektronmikroszkópos felvétele.

A **dezmoszómáknak** három típusát különböztetjük meg, az **adherens junkciókat**, **pont dezmoszómákat** és a **hemidezmoszómákat**. Az **adherens junkciók**, vagy öv dezmoszómák elsősorban a hámsejtekben találhatók meg, ahol sejtsejt adhéziós övet formálnak éppen a szoros junkciók alatt (6. ábra). A **pont dezmoszóma** megtalálható hámsejtekben, de más szövetekben, például izomban is. Gombszerű kontaktust hoz létre két szomszédos sejt között, gyakorlatilag “hegesztési pontnak” is felfogható. A pont dezmoszóma fehérjéből álló, citoplazmatikus, 15-20 nm-es vastagságú adhéziós lemezket tartalmaz, amelyeket transzmembrán fehérjék kötnek össze (6. és 8. ábra). A lemezek fő alkotórésze a plakoglobin, az összekötő fibrilláris szálak dezmogleinból és dezmkollinból állnak. Míg az adherens junkcióban a citoskeleton aktinai kapcsolódnak a sejt-sejt kontaktus pontjaihoz, addig a pont dezmoszómához az intermedier filamentumok kapcsolódnak. A **hemidezmoszóma** a plazmamembránt horgonyozza ki az extracelluláris mátrixhoz. A hámsejtek például hemidezmoszómákon keresztül kötődnek a bazális laminához. A hemidezmoszóma fehérje összetétele eltér a pont dezmoszómától (6. és 9. ábra), a citoplazmatikus lemez nem tartalmaz plakoglobint és a plazmamembrán extracelluláris mátrixhoz való kötődésében fontos szerepet játszik az  $\alpha_6\beta_4$  integrin.



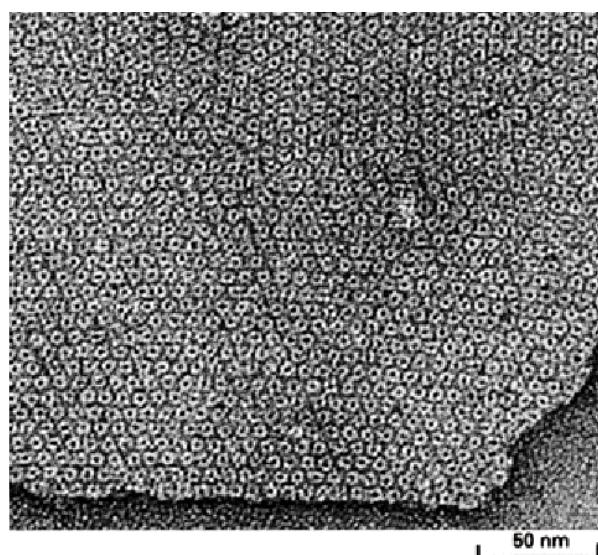
8. ábra. A pont dezmoszóma sematikus ábrázolása.



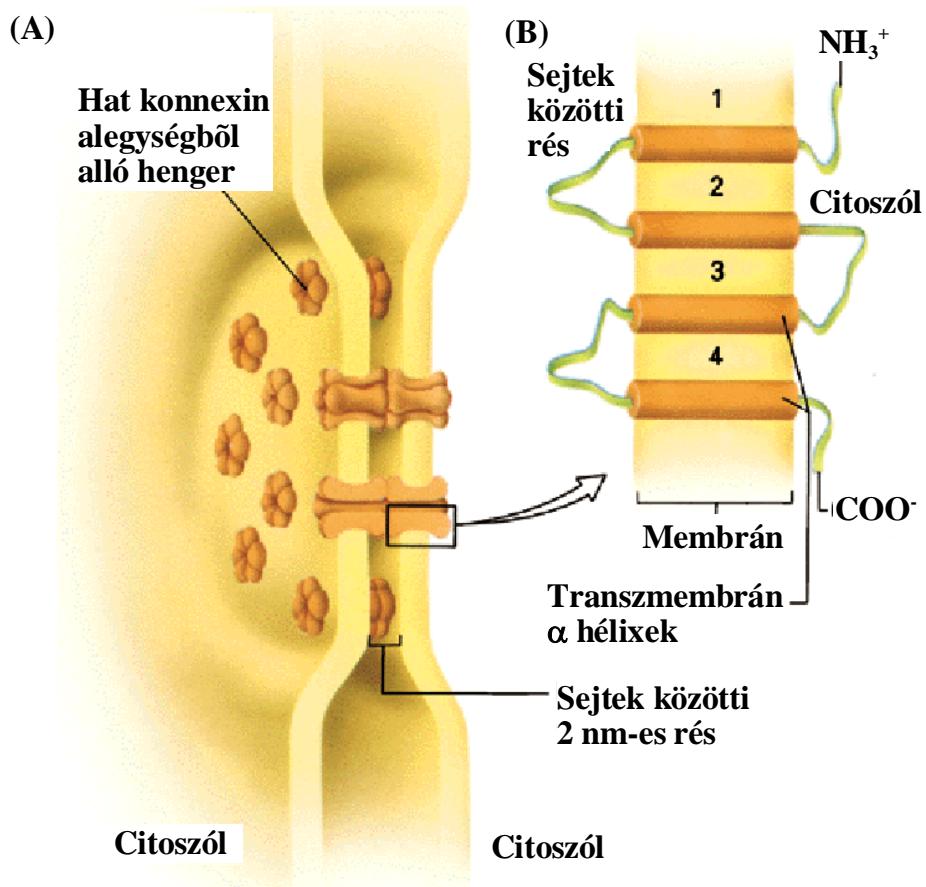
9. ábra. A hemidezmosszoma sematikus ábrázolása.

A “gap” junkciók a szomszédos sejtek laterális felszínén találhatók, rajtuk keresztül kisebb molekulák kicsérélődése is létrejöhét (10 és 11. ábrák). A “gap” junkciók helyén hat súlyzó alakú konnexin molekula formál egy henger alakú csatornát,

melynek átmérője 1.5-2 nm lehet, a teljes csatornát a két szomszédos sejt hasonló egységeinek szoros kapcsolódása hozza létre. A csatorna belső átmérőjének megfelelően az 1200 Da molekulásúlyú molekulák át tudnak jutni a póruson, a 2000 Da molekulák már nem, a két méret közötti molekulák csak korlátozottan, váltakozó sikkerrel jutnak át egyik sejtből a másikba. A "gap" junkcióknak a jelátvitelben van szerepük, a rajtuk átjutó ciklikus AMP vagy  $\text{Ca}^{2+}$  ionok koordinálják a szomszédos sejtek válaszát, például hormonok kiválasztása, vagy a sima izomsejtek koordinált összehúzódása során.



10. ábra. A "gap" junkció elektronmikroszkópos felvétele. Egy elektromos szinapsis képe, ahol igen sűrűn helyezkednek el a "gap" junkciók. A képen látható apró "fánkok" képeznek csatornát a szomszédos sejtek között.



11. ábra. (A) A “gap” junkció modellje. (B) A konnexin fehérje elhelyezkedése a membránban. A 3.  $\alpha$  hélix felénk eső oldala hidrofób, a másik oldal pedig hidrofil. A 3. hélix szekvenciája nagy mértékben konzervatív, a különböző sejtípusokban, a különböző fajokban nagyfokú hasonlóságot mutat. A 12 konnexin molekulából álló vízáteresztő csatornát ez a 3.  $\alpha$  hélix béléli ki.

## A jelátvitel sejtbiológiája

A soksejtű élőlények túlélésében alapvető szerepet játszik a sejtek közötti kapcsolatrendszer, mely az egyes sejtek szaporodását, differenciálódását és anyagcseréjét koordinálja. Ez a kapcsolatrendszer különféle kommunikációs csatornákon keresztül biztosítja, hogy a szövetek, szervek, szervrendszerök összehangoltan működjenek, az információ, a szabályozó jelek eljussanak egyik sejttől a másikig. A sejtek között áramló információ, mint az a hírközlő rendszerekre általában jellemző, kódolva van. Megjelenésének leggyakoribb formája a hírvivő molekula (messenger). Azonban, elsősorban az idegrendszer működése során, elektromos formában kódolt információval is találkozunk. Ebben a fejezetben a hírvivő molekulákon alapuló szignalizációt tekintjük át. A jelátvitel fogalma tágabb értelemben lefedi a hír kódolását és kibocsátását az egyik sejt, a jeladó által, valamint felfogását és dekódolását a célsejt által. Szükebb értelemben gyakran beszélünk szignalizációs folyamatról akkor is, amikor a jel felfogásának és értelmezésének molekuláris részleteit vizsgáljuk.

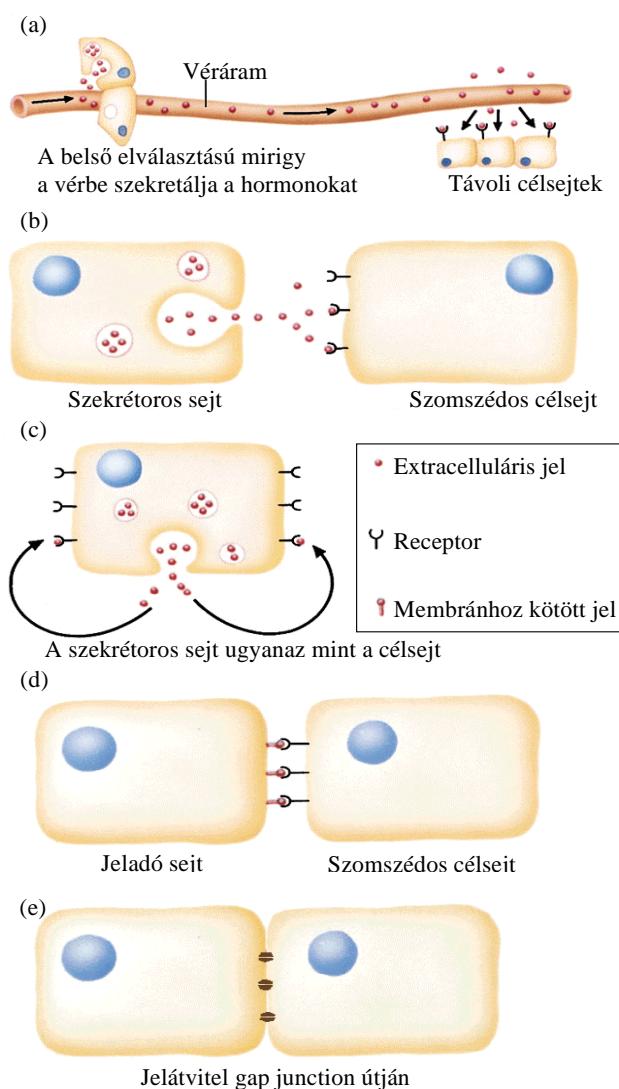
### A sejtek közötti jelátvitel szakaszai

A hírvivő molekulákon alapuló jelátvitel főbb lépései a következők: 1.) a jel-molekula szintézise a jeladó sejt által, 2.) a jel-molekula kifejezése a membránban, vagy kibocsátása az extracelluláris térbe, 3.) a hírvivő eljuttatása (transzportja) a célsejthez, 4.) a jel-molekula érzékelése a célsejt által specifikus receptor segítségével, 5.) a jel értelmezése a célsejt által és a rá adott megfelelő sejtválasz, mely a sejt metabolikus folyamatainak, vagy génkifejezésének megváltozásában nyilvánul meg, és végül, 6.) a szignál molekula inaktiválása (lebontása a vagy újrafelvétele), mely a válasz leállítását eredményezi.

Ezek a folyamatok nemcsak a magasabbrendű soksejtű élőlények sejtjei között valósulnak meg. Számos mikroorganizmus (élesztő, nyálkagombák, egysejtűek) használ szekretált molekulákat a szeparáltan élő sejtek összegyűjtésére szexuális szaporodás

vagy differenciálódás céljából. Ebben az esetben a szignál molekulát feromonnak nevezünk.

### A jel-molekulák útja változó hosszúságú lehet



1. ábra

A jelátviteli folyamatokat csoporatosíthatjuk aszerint, hogy az üzenetet küldő és a célsejt milyen távol helyezkedik el egymástól. Az endokrin szignalizáció (1a. ábra) során a belső elválasztású mirigybén elhelyezkedő jeladó sejtek által szekretált hírvivő molekulák a véráramba kerülnek, és abban távoli a célsejtekhez is eljutnak. A parakrin jelátvitel (1b. ábra) során a kiválasztott hírvivő molekula nem kerül a véráramba, a sejtközötti állomány közvetítésével néhány mikron távolságon belül a célsejthez

jut. A parakrin szignalizáció speciális esetének tekinthetjük az autokrin szabályozást (1c. ábra), ahol a szekrétoros sejt és a célsejt ugyanaz, a szignálmolekula és receptor a egyazon sejtből fejeződik ki. Ez a mechanizmus különösképpen a növekedési faktorok hatásmechanizmusára jellemző, és gyakran a tumoros sejtszaporulat kialakulásában is fontos tényező.

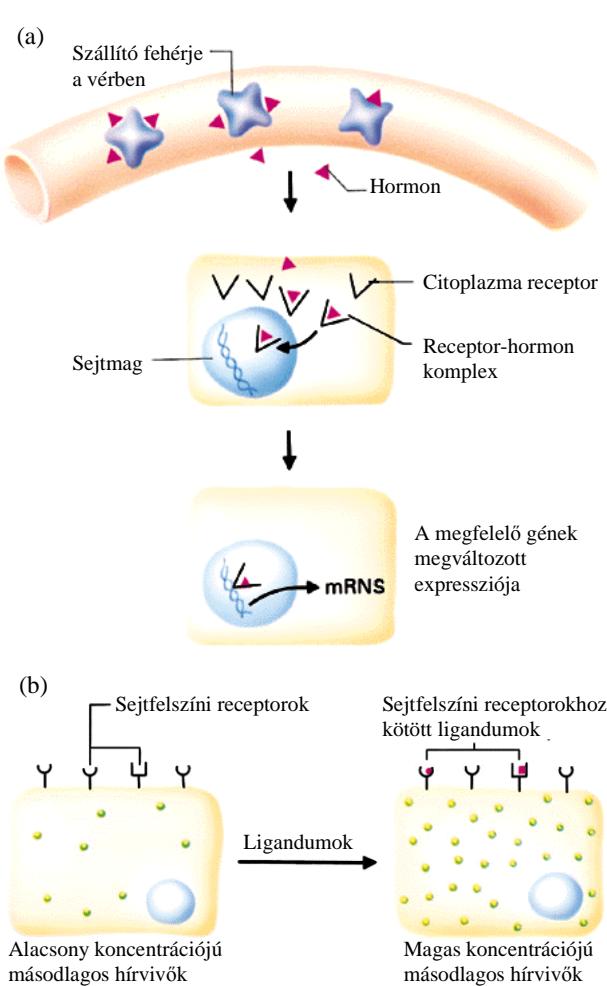
A parakrin jelátvitel másik speciális esete az ún. irányított szekréció. Ennek során a szekrétoros és a célsejt adhéziós molekulák és receptorok segítségével szoros kontaktusba kerülnek, s a jeladó sejt közvetlenül a célsejt membránja irányába választja ki a hírvivőt. Hasonló a helyzet a szinaptikus jelátvitel során, ahol a jeladó és a célsejtent minden össze a néhány nm-es szinaptikus rés választja el.

Míg az endokrin és parakrin folyamatok esetén a jel-molekulák a sejtből kiválasztásra kerülnek, vannak a jelátvitelnek olyan fajtái is, amikor a szignál molekula a jeladó sejt membránjához kötve fejeződik ki, és így csak a közvetlen szomszédságban levő sejt receptoraival képes kapcsolatba lépni (1d. ábra). Két egymással érintkező sejt úgy is cserélhet információt, hogy az öket összekötő gap junction szerkezeteken keresztül juttatja át a citoplazmájában jelen levő hírvivőt (1e. ábra).

### **A jelátvitel specificitásának alapja, a receptor – ligand kölcsönhatás**

Láttuk, hogy a jelátvitel során a jel-molekulák néhány nm és néhány m közötti távolságot tesznek meg, mielőtt hatásukat kifejthetnék. A jel specificitását, tehát hogy csak bizonyos sejtekben, és a kívánt hatást érje el, alapvetően a szekretált szignál molekula egyedisége, a szignál molekulát megkötő receptor molekula specificitása és affinitása, ill. a ligand-receptor komplex effektoros specificitása szabja meg. A ligand és receptor közötti kölcsönhatás a térszerkezetbeli komplementaritáson alapszik.

Általában a ligand kötődése a receptorához bármely sejtből azonos változást indukál a receptor szerkezetében. Ennek ellenére különböző sejtek gyakran másképpen reagálnak azonos ligandra, ami a kötőést követő másodlagos folyamatok, ill. az azokban résztvevő molekulák változatos volta utal. Így pl., míg az acetilkolin receptorához kötődve a vágizom összehúzódását idézi elő, ugyanezen ligand-receptor komplex kialakulása a szívizom összehúzódásainak lassulását és gyengülését okozza.



2. ábra

receptorok ligandjai szükségképpen lipofil hormonok, melyek át tudnak diffundálni a sejtmembránon. A vérben ezek a hormonok – hidrofobitásuk miatt – szállító fehérjéhez kötve találhatók. Ebbe a csoportba tartoznak a steroidok, a tiroxin és a reténsav. Hatásmechanizmusuk közös vonása, hogy a citoplazmában vagy a sejtmagban kötődnek receptorukhoz, majd a sejtmagban közvetlenül befolyásolják a génátírást és fehérjekifejezést.

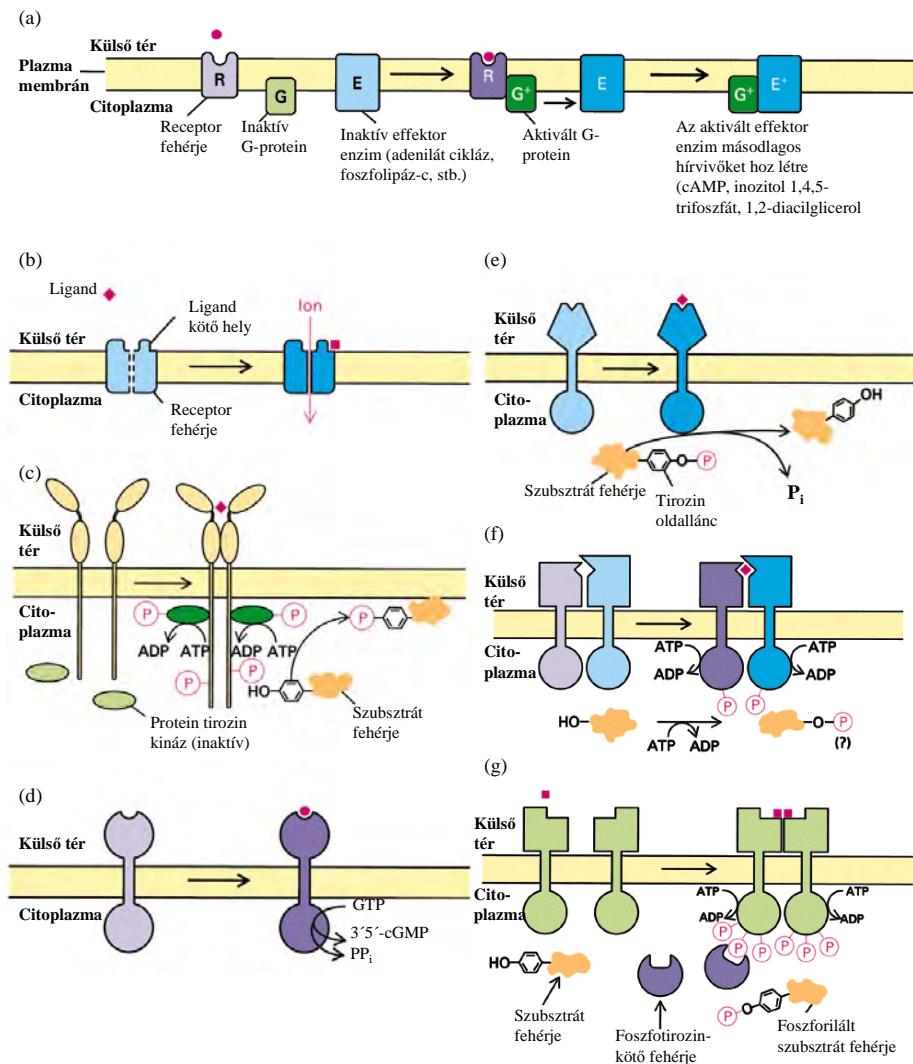
Ugyanakkor különböző ligand-receptor komplexek is képesek lehetnek azonos hatás kiváltására, pl. májsejt esetén akár a glukagon, akár az inzulin kötődik saját specifikus receptorához, a sejtválasz a glikogén lebontása glükózzá és a cukor vérbe juttatása lesz.

A ligand-receptor kölcsönhatást csoportosíthatjuk a ligand oldhatósága és a receptor elhelyezkedése szerint. A receptorok két fő csoportja az intracelluláris (2a. ábra) és a sejtfelszíni (2b. ábra) receptorok. Az intracelluláris

A sejtfelszíni receptorok ligandjai lehetnek hidrofil (adrenalin, peptid hormonok) vagy hidrofób (prostaglandinok) molekulák. Kötődésük hatására megváltozik az ún. másodlagos hírvivők (cAMP, Ca<sup>2+</sup>, stb.) koncentrációja, egyes enzimek aktivitása, vagy a membrán permeabilitása. Hatásukat tehát gyakran a már meglévő enzimekre, membrán csatornára, adapter fehérjékre fejtik ki, ami azonnali változásokban nyilvánul meg, és ezek a változások viszonylag hamar (órák, ritkán néhány nap alatt) lezajlanak. Számos esetben ezek a folyamatok is génátíráshoz és új fehérje szintéziséhez vezetnek, de nem olyan közvetlen módon, mint az intracelluláris receptorral rendelkező hírvivők esetén: a génátírás szabályozása itt bonyolult kaszkád mechanizmusok, és a közöttük létrejövő “áthallás” (közösen használt jelátviteli elemek – enzimek, szabályozó és adapter fehérjék) eredménye. Ezeket a mechanizmusokat az ōket elindító receptor természete szerint négy fő csoportra oszthatjuk.

### **A sejtfelszíni receptorok négy fő kategóriája**

1. G proteinhez kapcsolt receptorok (3a. ábra). A ligand kötődése aktivál egy G protéint, amely ezután másodlagos hírvivőket generáló enzim, vagy ioncsatorna működését befolyásolja (serkenti vagy gátolja). Pédául az adrenalin, szerotonin, glukagon, és bradikinin receptora működik ilyen mechanizmussal.
2. Ioncsatorna működésű receptorok (3b. ábra). A ligand kötődése megváltoztatja az ioncsatorna konformációját, amely a csatorna vezetőképességét módosítja. Az eredmény a membránon keresztül áramló ionfluxus és a membránpotenciál megváltozása. Klasszikus példa az idegizom kapcsolódás területén az acetilkolin receptor.
3. Tirozin kinázhoz kapcsolt receptorok (3c. ábra). A receptoroknak nincs saját enzimaktivitásuk, a ligand kötődés hatására dimerizálódnak, és a citoplazmában található protein tirozin kinázt kötnek meg, ill. aktiválnak. Az aktivált kinázok foszforilálják a receptort; az így kialakuló foszfotirozin csoportokhoz megfelelő kötőhellyel rendelkező szubsztrátok kötődnek, amelyeket a tirozin kinázok szintén foszforilálnak. Ezt a



3. ábra

csoportot általánosságban citokin receptor szupercsaládnak is nevezik. Ide tartozik az eritropoetin, az interferonok és az emberi növekedési faktorok receptorai.

4. Saját enzimaktivitással bíró receptorok (3d-g. ábrák). Ebbe a csoportba ciklázs, kináz és foszfatáz aktivitású receptorok tartoznak. Guanilát ciklázs

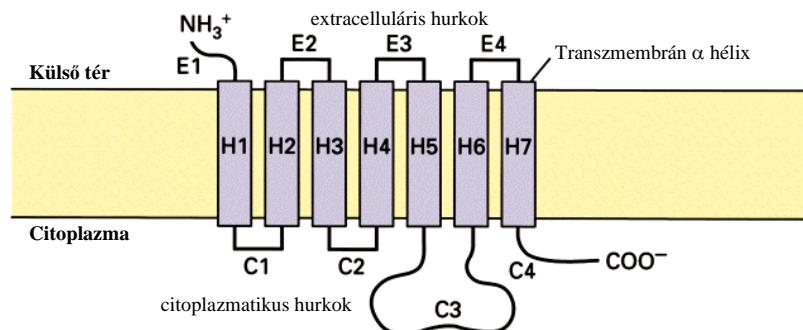
aktivitása van az atriális natriuretikus faktor receptorának (3d. ábra.). A tirozin foszfatáz receptorok egyik jellegzetes képviselője a leukocita CD45 foszfatáz (3e. ábra). Bár a szerin/treonin kinázok nagy többsége a jelátviteli kaszkád citoplazmaztikus részéhez tartozik, van köztük receptorral egybeépült is, pl. a TGF $\beta$  (transforming growth factor beta, transzformáló növekedési faktor) receptora (3f. ábra). A tirozin kináz aktivitású receptorok (3g. ábra) családjába több növekedési faktor receptor és onkogén termék tartozik, pl. az epidermális növekedési faktor (EGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) és az inzulin receptorai, valamint az erbB onkogének.

A fentiek közül az ioncsatorna aktivitással bíró receptorokat az ionháztartással foglalkozó fejezetben tárgyaljuk. A továbbiakban az 1. és 4. csoport működéséről szólunk részletesebben, egy-egy példával illusztrálva az alapvető vonásokat. (A 3. csoportba tartozó, tirozin kinázhoz asszociált receptorok jelátviteli alapkoncepciójában megegyezik a 4. pont alatti tirozin kinázokkal, azzal a különbséggel, hogy a kináz nem magán a receptor molekulán van.)

A G proteinhez kapcsolt és a tirozin kináz aktivitású receptorok bemutatása kapcsán lehetőségünk lesz három fontos másodlagos hírvivőről, a cAMP-ról, az inozitol foszfátokról és a kalciumról megemlékezni, valamint a két különböző receptorról induló jelátviteli folyamat közös pontjairól szót ejteni.

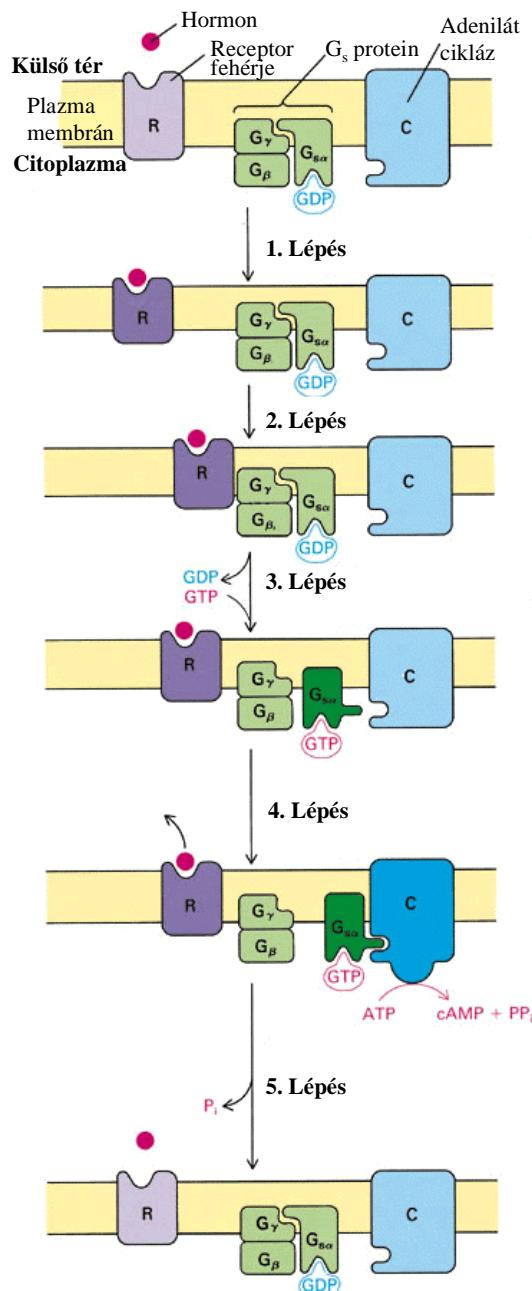
## G proteinhez kapcsolt receptorok 7 transzmembrán doménnel

Bár a G proteinekhez kapcsolt receptorok számos különböző hírvivő jelének dekódolására képesek, szerkezetük szerint egy nagy családba a “7 transzmembrán” (7 membrane spanning) receptorok családjába tartoznak. A név eredetéül az szolgál, hogy a receptor fehérje hét alfa-helikális transzmembrán doménnel rendelkezik, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnek össze (4. ábra).



4. ábra

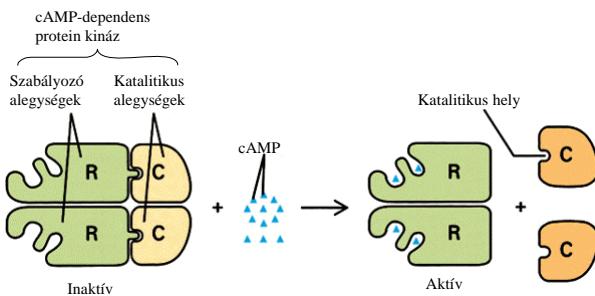
A receptor működési elvét az 5. ábra szemlélteti az adenilát ciklázt aktiváló G protein példáján keresztül. Ezt a G proteinet pl. az adrenalin, a glukagon és az ACTH (adrenokortikotróp hormon) receptora képes aktiválni. Az 1. lépésben a hormon kötödése a receptor konformáció változását okozza. A megváltozott térszerkezetű receptor kapcsolódik a trimer (3 alegységből álló) G proteinhez (2. lépés). Ez jelen példában egy serkentő G protein, ezért  $G_s$ -sel jelöljük. A 3. lépésben a receptorral asszociálódott G fehérje  $\alpha$  alegysége a hozzá kötődő GDP molekulát GTP-re cseréli, és elválik a másik két alegységtől. A szabaddá vált  $G_{s\alpha}$  aktiválja az adenilát ciklázt, amely ciklikus AMP-t (cAMP) termel (4. lépés); ugyanakkor a G proteinból eltávolodott receptorról könnyebben ledisszociálhat a hormon. A ciklázt aktiváló  $G_{s\alpha}$  elhidrolizálja a GTP-t GDP-vé, és disszociál a cikláztól, hogy újra egyesülhessen a trimer G protein (5. lépés). Ezzel a következő hírvivő megkötésének a feltételei regenerálódtak, a ciklus – amennyiben még van jel molekula a sejten kívül – újra kezdődhet.



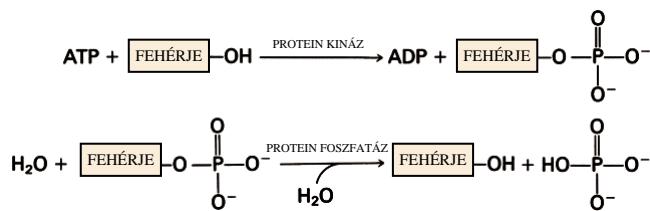
5. ábra

## A cAMP mint másodlagos hírvivő

A G protein által aktivált adenilát cikláz ATP-ból cAMP-t termel. A cAMP egy a számos másodlagos hírvivő közül, melyek a sejtben a jelátvitel további lépéseihez vesznek részt. A cAMP az A típusú protein kinázok (PKA) szabályozásában vesz részt (6. ábra). Ez a kináz 2 szabályozó és 2 katalitikus alegységből áll, s így, heterotetramer formában inakív. A cAMP hatására a szabályozó dimer leválik, és a két katalitikus alegység aktiválódik. Az aktív kináz más fehérjéket (pl. további kinázokat) foszforilál szerin vagy treonin oldalláncon. A foszforiláció egy általános szabályozási forma, amely a konformáció, töltés, polaritás megváltoztatásával módosítja a fehérjék működését. A foszforiláció megfordítható, az ellentétes folyamatot



6. ábra



7. ábra

(defoszforiláció) foszfatáz enzimek katalizálják (7. ábra).

A jelátviteli folyamat itt bemutatott kaszkádszerű szervezése az erősítés lehetőségét rejtő magában. A receptorához kötött egy hormon egy vagy néhány adenilát ciklázt aktiválhat. minden aktív cikláz nagyszámú cAMP molekulát generál ( $\sim 10^4$  szerves erősítés), amelyek azonos nagyságrendben tesznek szabaddá aktív A típusú protein kináz katalitikus alegységeket. minden aktív kináz számos enzimet foszforilálhat (további erősítés), melyek valamennyien aktívvá válnak a kívánt molekuláris termék előállításában, legyen az további aktivált enzim egy következő, a kaszkádhoz tartozó lépcsőben, vagy végtermék.

## Gátló és serkentő G proteinek, G proteinek serkentése és gátlása

Eddig az adenilát ciklázra serkentőleg ható  $G_s$  fehérje szerepét vizsgáltuk. Lényeges azonban tudni, hogy nem csak serkentő, hanem gátló G proteinek is vannak, melyek – más ligand hatása alatt – ellentétes szabályozó szerepet tudnak betölteni. Így pl. az adenilát cikláznak van gátló ( $G_i$  - inhibitor) hatású szabályozó faktora is, melyet

többek között az adenozin, a PGE<sub>1</sub> (E<sub>1</sub> prosztaglandin), az opioidok és az 5-HT (5-hidroxi-triptamin) receptora tud aktiválni.

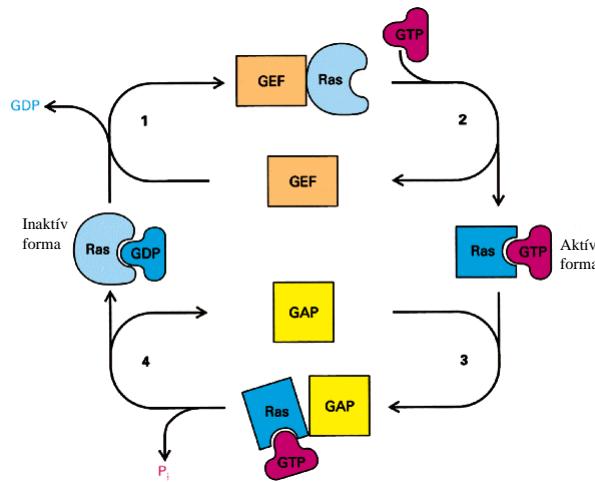
Az adenilát cikláz ugyanakkor nem az egyetlen G protein által aktivált fehérje. Speciális G proteinek aktiválhatják a foszfolipáz C (PL-C) enzimet (lásd részletesebben később, 12. ábra), a cGMP foszfodieszterázt, illetve csatolnak a már vázolt intermolekuláris interakciókkal különféle receptorokat (5-HT, GABA, adrenerg, dopamnerg, muszkarinerg) változatos ioncsatornákhöz, elsősorban Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> csatornához.

A különféle gátló és serkentő G proteinek a receptor aktiválás függvényében ciklikusan átalakulnak GDP-t kötő inaktív (de aktiválható) és GTP-t kötött aktív formáik között. A ciklust fiziológiaisan a ligand-receptor komplex jelentéte, valamint az  $\alpha$  alegység GTP-áz aktivitása, a GDP és GTP iránti relatív affinitás szabályozza. Egyes bakteriális fehérjék (kolera toxin, pertussis toxin) úgy módosítják az  $\alpha$  alegységet (ADP-ribáz kovalens hozzákötésével), hogy az a GTP-t, ill. GDP-t kötött állapotában rögzül, és visszafordíthatatlanul aktiválódik, vagy inaktiválódik.

### **A G<sub>sa</sub> és a Ras fehérje az intracelluláris kapcsoló fehérjék GTP-áz szupercsaládjába tartoznak**

A G<sub>sa</sub> ciklikus működéséről ismereteink jelentős része egy hasonló intracelluláris kapcsoló molekula, a Ras fehérje tanulmányozásából fakad. A Ras szintén GTP-áz aktivitással bír, és GTP-t kötött, “bekapcsolt” állapotában effektor fehérjéket köt és aktivál, melyek a sejtek növekedését és szaporodását kontrollálják (lásd a 10. ábrát is).

A Ras ciklikus átalakulását két fehérje segíti (8. ábra). A GDP ledisszociálását az inaktív Ras-ról a guanin nukleotid cserélő (exchange) faktor, a GEF segíti elő. A GTP, mivel túlsúlyban van, könnyen kötődik; ez a GEF és a Ras szétválását okozza, és létrejön az aktív Ras-GTP komplex. A Ras a G<sub>sa</sub>-hoz képest lassú GTP-áz, ezt a funkcióját a GTP-áz aktivátor protein (GAP) serkenti. Az így kialakuló szabályozási ciklus különös jelentőséget nyer egyes daganatképződési mechanizmusokban: a Ras, GEF és GAP egyes mutánsai, melyek stabil Ras-GTP komplex képződését



8. ábra

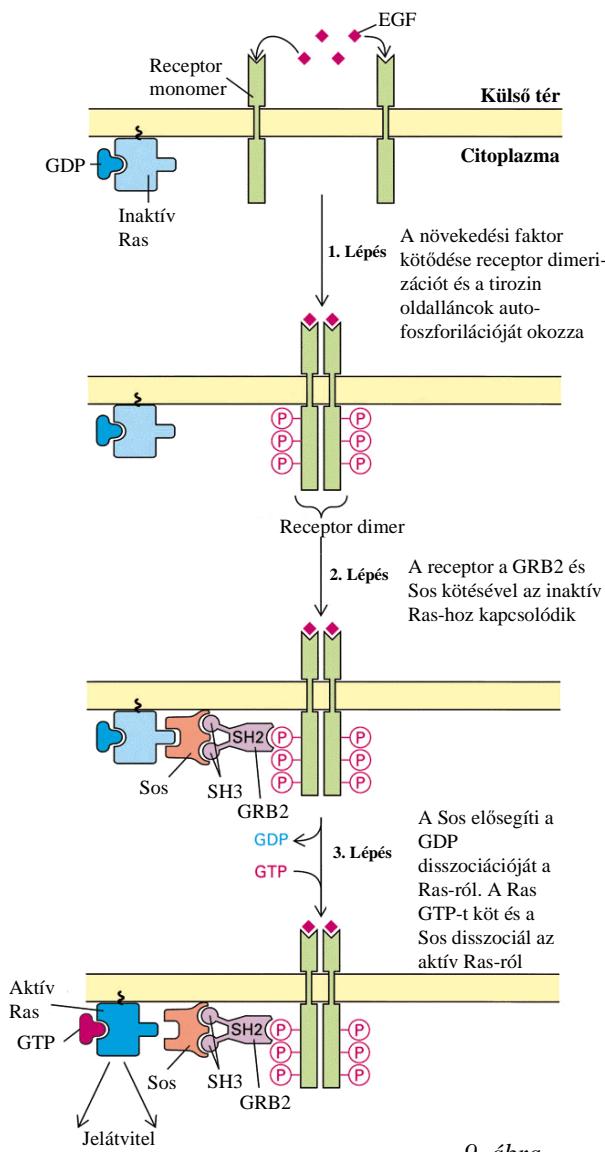
### Tirozin kináz aktivitással bíró receptorok

Az önálló enzimaktivitással rendelkező receptorokat a tirozin kináz receptorcsaládon keresztül mutatjuk be, mivel ezzel a mechanizmussal számos szignálmolekula jelátviteli folyamata zajlik, és a rendszer alkalmat ad néhány, a jelátvitelben fontos jelenség – receptor dimerizáció, felismerésre specializált fehérje domének, adapter proteinek – felvillantására, valamint az inozitol foszfát / kalcium másodlagos hírvivő rendszer bemutatására.

A receptor tirozin kinázok (RTK) bemutatására az epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor, EGF) receptorát (EGFR) használjuk fel (9. ábra). Az EGF kötésekor a receptor dimerizálódik, és az intracelluláris oldalon található tirozin kináz régió a szomszédos receptor tirozin oldalláncait foszforilálja (1. lépés). Azt is gondolhatnánk, hogy az EGF kötés hatására a receptor önmagát foszforilálja, de tudjuk, hogy a kináz régió nem érheti el az ugyanazon molekulában lévő foszforilációs helyeket. Mivel azonban a foszforiláció más kináz részvételle nélkül lezajlik, autofoszforilációt neveztek el.

eredményezik, a mutációt szenvedett sejtot az állandó aktiváció állapotában tartják, így képezve a korlátlan szaporodás alapját.

A 2. lépés a jel továbbvitelre a foszforilálódott receptorról. Az intracelluláris rész számos foszforilált tirozin oldalláncot tartalmaz, melyek más és más funkcióval bírnak. Molekuláris szintű felismeréstükre ún. SH2 domének specializálódtak (nevüket az src onkogén termékkel való hasonlóság miatt kapták: src homology domain). Bizonyos foszfatirozin oldalláncokhoz a foszfolipáz C (PLC) enzim kötődhet, és aktiválódhat (további hatását lásd a 12. ábránál). Más foszfatirozinokhoz különböző adapter fehérjék kötődnek. Az EGF receptorhoz SH2 doménjével a GRB2 nevű adapter



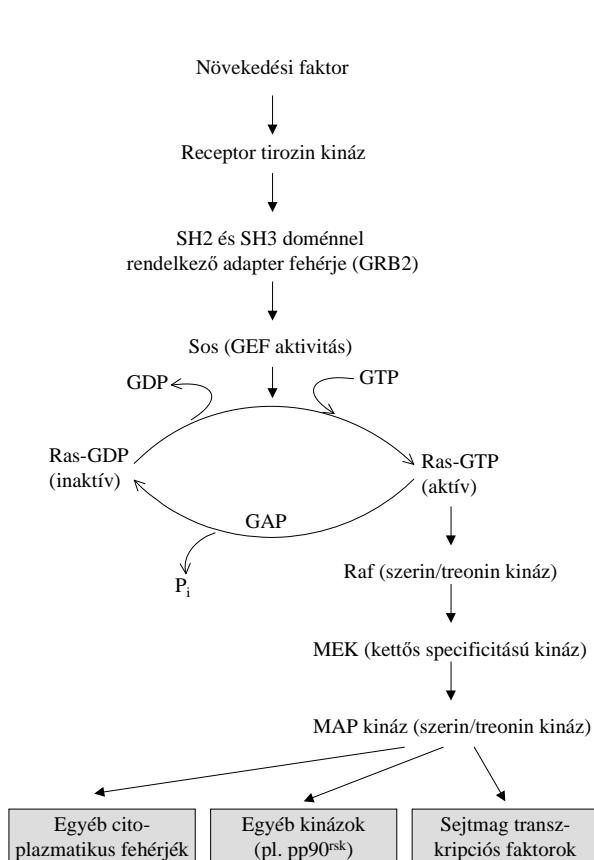
9. ábra

fehérje kapcsolódik. A GRB2 ún. SH2 doméneket is tartalmaz, és ezeken keresztül egy másik adapterhez, a SOS fehérjéhez is kötődik. Az aktivált EGFR-GRB2-SOS komplex

guanin nukleotid cserélő faktorként (GEF) viselkedik, és ilyen minőségében a Ras fehérjét aktiválja, elősegítve a GDP disszociációját és a GTP kötését (3. lépés).

Érdekességeként megemlíjtük, hogy a Ras aktiválása az inzulin receptoron keresztül is hasonló mechanizmussal zajlik, azonban itt még egy további elem található, egy citoplazmatikus fehérje, az IRS1 (inzulin receptor szubsztrát). Az aktiválódott inzulin receptor foszforilálja az IRS1-et, s az IRS1 foszfatirozinjai szolgálnak a GRB2 SH2 doménjének megkötésére.

### Az aktivált Ras jele egy kináz kaszkádon át a sejtmagba jut

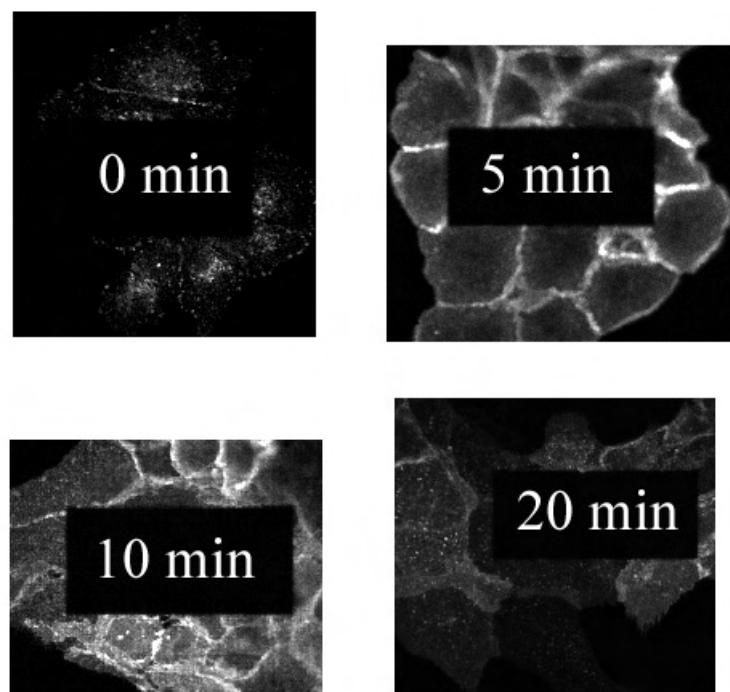


Hogyan jut tovább az RTK szignálja a sejtmag felé, hogy végül génátfiráshoz és fehérjeszintézishez vezessen (10. ábra)? Az aktivált Ras egy szerin/treonin kinázt köt meg: ez a Raf protein, mely így aktiválódik és a sejtmembrán közelségebe kerül. A Raf szubsztrátja a MEK, egy kettős specificitású – szerin / treonin és tirozin – kináz. A MEK a mitogén aktivált protein kinázt (MAPK) foszforilálja, amely további fehérjéket, kinázokat, és sejtmag transzkripcióst

10. ábra

faktorokat (CREB, TCF, SRF) aktivál szerin / treonin foszforilációval.

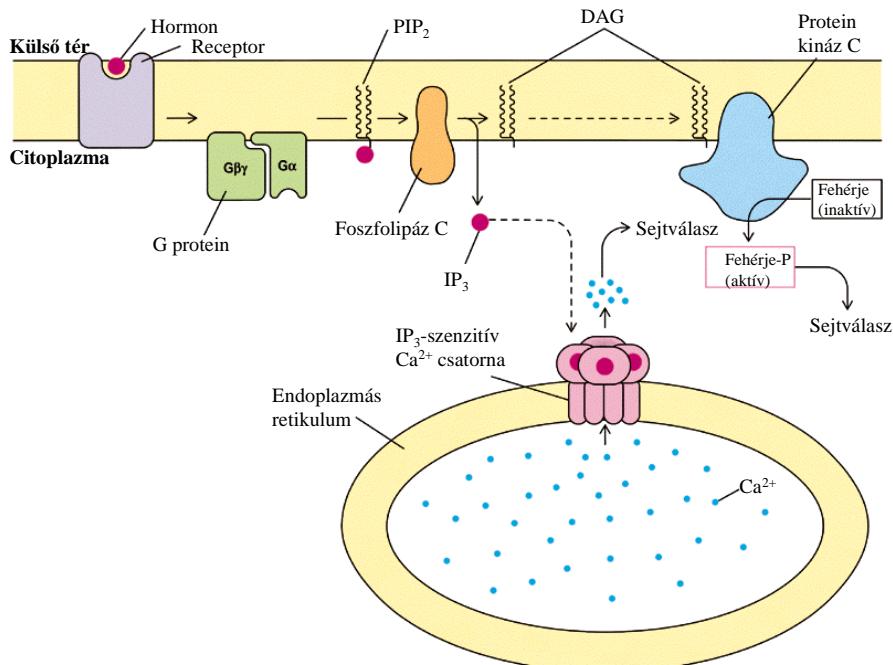
A leírt, és 10. ábrán szemléltetett kaszkád a szignál erősítés jellegzetes példája. Lefolyása élő sejtekben is nyomon követhető, pl. az egyes résztvevő elemek fluoreszcens jelölésével (lásd gyakorlati jegyzet). A jelzés alkalmas kvalitatív és kvantitatív következtetések levonására, pl. vizsgálhatjuk az egyes fehérjék expressziós szintjét, lokalizációját, és más fehérjékkel való kölcsönhatását. Pédaként egy A431 epidermoid karcinóma sejten mutatjuk a tirozin-foszforilált fehérjék megjelenését és mozgását EGF stimuláció hatására (11. ábra). A stimuláció előtt alig észlelhető foszfatirozin a sejtekben (0 min), 5 perc múlva a sejtmembránban intenzív jelet látunk, amely nagyrészt az EGF receptortól származik. A tizedik percben már a sejt citoplazmájában is van foszfatirozin, mely részben internalizált EGF receptoron, részben a foszforilált MAP kinázon található. A 20. percben lényegesen kisebb jeleket észlelünk, amely a válasz lezárására, az aktivált (foszforilált) molekulák eltünésére utal.



11. ábra

## A kalcium és a foszfatidil inozitol rendszer, mint másodlagos hírvivő

Az előbbieken végigkövettük a tirozinkináz receptortól a Ras fehérjén és a MAP kináz kaszkádon át a sejtmagba vezető utat. Azt is említettük azonban, hogy az autofoszforilált RTK számos más, SH2 doménnel rendelkező fehérje kapcsolódási (és aktivációs) helyéül szolgál. Ezek közül a foszfolipáz C (PL-C) kiemelkedő jelentőségű. A PL-C aktiválása minden RTK receptoron, minden G proteinhez kapcsolt receptoron keresztül történhet. A 12. ábra az utóbbi esetet vázolja.



12. ábra

Az aktivált PL-C funkciója az inozitol foszfat / kalcium másodlagos hírvivő rendszer aktiválása. A PL-C a sejtmembránhoz kötött enzim, a membránban található foszfatidilinozitol biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) hasítja diacilglicerollá (DAG) és inozitol triszfoszfáttá (IP<sub>3</sub>). A DAG a protein kináz C (PKC) enzim aktivátorá; az aktivált PKC számos transzkripció faktort, valmint sejttípustól függően enzimeket (pl. májban a glikogén szintetázt) foszforilál. Ugyanakkor az IP<sub>3</sub> az intracelluláris raktárakból

kalciumot szabadít fel (lásd az ionháztartásról szóló fejezetet). A kalcium koncentráció emelkedése szükséges többek között a (klasszikus) PKC sejtmembránhoz való transzlokációjához: a membránban képződött DAG csak így tudja aktiválni. Az emelkedett intracelluláris kalcium szint más enzimekre is hatással van, a hatás közvetítője gyakran a kalmodulin nevű fehérje, mely kalciumot kötött állapotában konformációváltozáson megy keresztül, és a kalcium/kalmodulin függő kinázokat (pl. glikogén foszforiláz kináz), foszfatázokat (pl. kalcineurin), vagy a cAMP foszfodieszteráz aktiválja.

## A membrán receptorok szabályozása

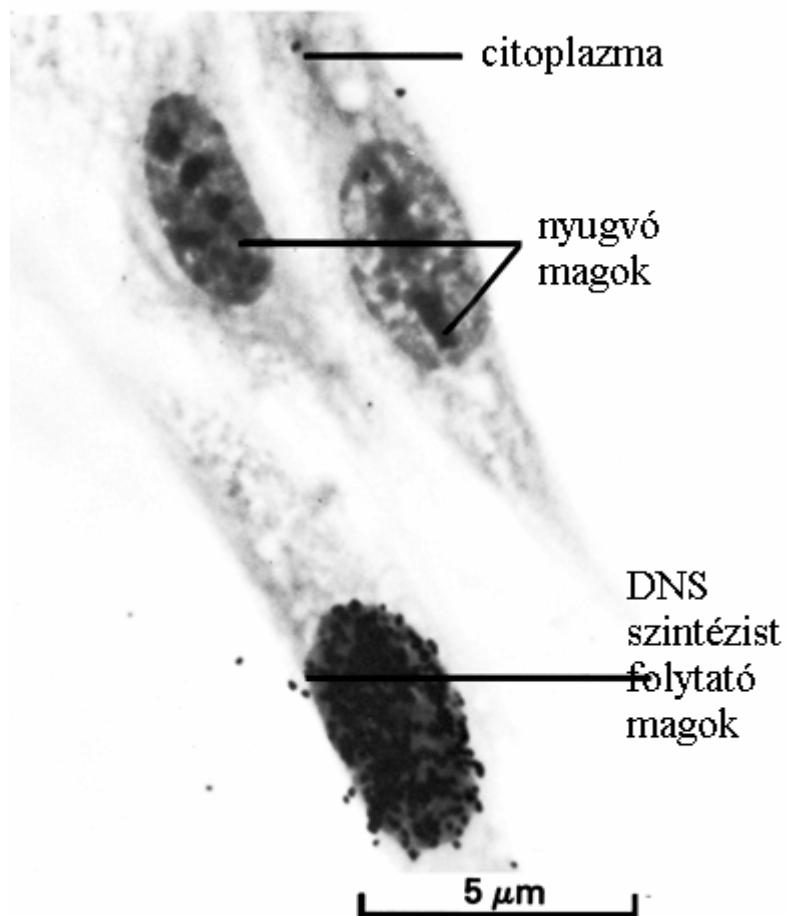
Miután áttekintettük a fő jelátviteli útvonalakat, szót kell ejtenünk a kiindulási pontjukul szolgáló receptorok szabályozásáról. A G protein ciklus kapcsán említettük, hogy a ciklus biztosítja a ligand disszociációját a receptorról, visszaállítva a stimulálható (készenléti) állapotot. A sejt környezetében maradt jel molekula túlzott hatásától részben annak megsemmisítése, visszavétele véd, részben a célsejt visszacsatolásos szabályozása. A  $\beta$ -adrenerg receptor pl. a cAMP függő protein kináz foszforilálja és inaktiválja; az inaktiváció mértéke arányos az A típusú protein kináz aktivitásával, ami az adrenerg receptor által termelt cAMP szintjével arányos. Emellett a  $\beta$ -adrenerg receptor kináz (BARK) is inaktiválhatja a receptort, de szelektíven csak a ligandot kötő receptorokat.

A tirozin kináz receptorok esetén is van hasonló szabályozás, pl. a PKC, amely az RTK  $\rightarrow$  PL-C  $\rightarrow$  DAG +  $\text{Ca}^{2+}$   $\rightarrow$  PKC útvonalon aktiválódik, foszforilálja az EGF receptor, ezzel csökkentve az EGF iránti affinitását. Az RTK-k másik igen fontos szabályozási formája az internalizáció. Átlag minden második ligand kötést és szignalizációt követően az EGF receptor internalizálódik, és endoszómákban vagy lizoszómákban lebontásra kerül.

A szabályozás említett azonnali formái mellett fennáll a hosszútávú kontroll lehetősége is. Ez különböző, a membránból a magba irányuló jelátviteli folyamatok, továbbá a sejtciklus szabályozása kapcsán a receptor gén átírásán, a receptor kifejezésén keresztül valósul meg.



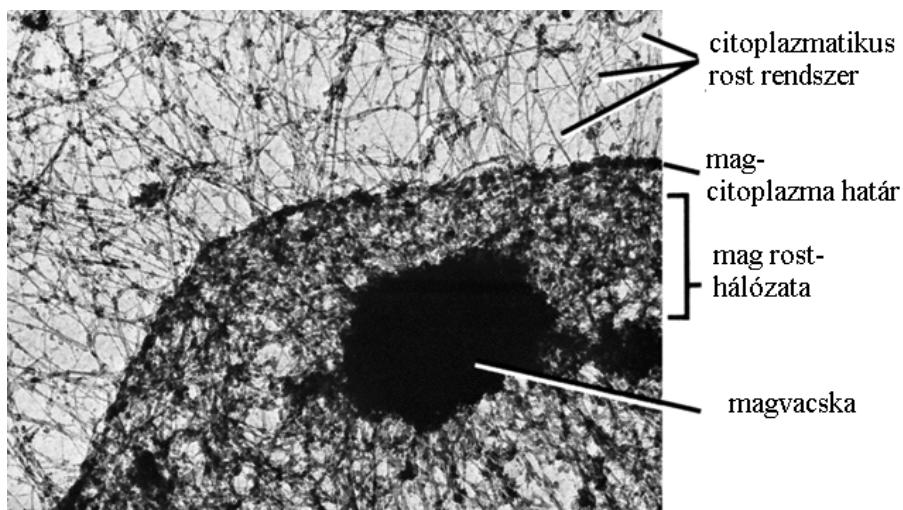
## Sejtmag, kromatin



### I. A sejtmag szerkezete: mag matrix

Sejtek nem-ionos detergenses kezelésével eltávolítva a sejt membrán-strukturáit és a DNS állományt nukleáz enzimmel megemészítve majd a hisztonokat és egyéb nukleáris fehérjéket ammónium szulfát kezeléssel kivonva előtűnik egy hálózatos rost rendszer a sejtmagon belül, az un. mag mátrix. Feltételezzük, hogy ez a struktúra nem a kezelések

eredménye (nem artefaktum), hanem tükröz vagy esetleg megszab egy ma még kevésé feltárt rendezettséget a sejtmagon belül. A struktura artefaktuális keletkezése ellen szól az a tény, hogy ezen mátrixhoz erősen kötve, de funkcionális állapotban találhatók, fenti kezelések után, a snRNP partikulák, az RNS érési folyamatának szereplői. A mátrixhoz a DNS az un. mátrix-asszociált régiói (MAR = SAR, szkaffold-asszociált régiói, AT-gazdag szekvenciái) által determinált pontokon kötődik. Megjegyzendő azonban, hogy az ilyen tulajdonságú szakaszok között igazi konszenzus DNS szekvenciát nem találtak, és nem találtak korrelációt a MAR régiók és a DNS egyéb, funkcionális jelentőségű helyeinek (a (DNáz I nukleáz számára hozzáférhető) DNáz I hiperszenzitív helyek, replikációs origó, promoter, enhancer, silencer, LCR (locus-controll régió)) lokalizációja között. Ugyan SAR-kötő tulajdonságai vannak a topoizomeráz II mellett a H1 hisztonnak, egyes HMG (high mobility group, vagyis nagy elektroforetikus mobilitású, nem-hiszton) fehérjéknek, ill. a lamin B1-nek, de meggyőzően MAR-specifikus fehérjéket eddig nem azonosítottak.

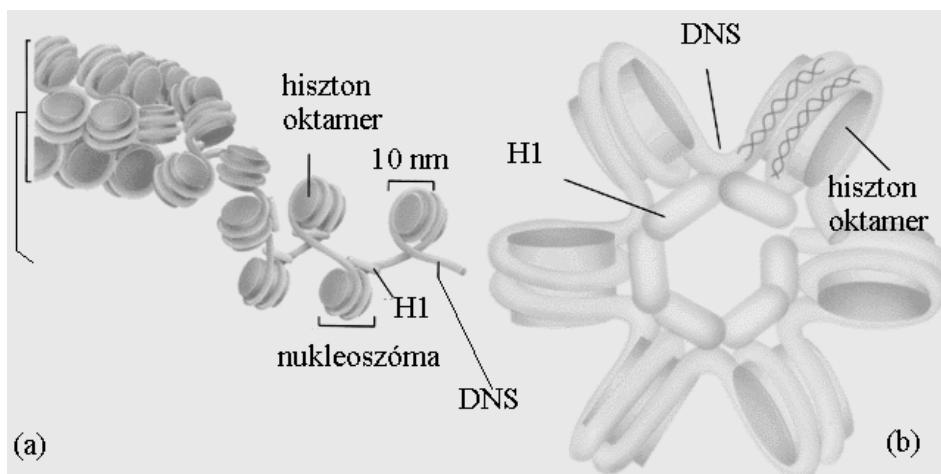


A metafázis kromoszómákból hasonló preparálási lépések nyomán visszamaradó vázról („scaffold”) feltételezik, hogy a mag mátrix-ból származik. A mátrix részeként fogható fel a kettős magmembrán belső (lipid-kettős-)rétegét bélélő, hálózatos, az intermedier filamentek rendszeréhez tartozó un. lamina, mely belülről a kromatinhoz (elsősorban a kompaktabb un. heterokromatikus elemekhez), kifelé néző felszínével a magmembrán belső lemezéhez kapcsolódik (a lamina fő alkotó elemei a lamin A, B és C nevű

fehérjék révén). A magmembrán külső lemeze az endoplazmás retikulummal folytonos, a két lemez közötti tér az un. perinukleáris tér. A két lemez un. pórus komplexek által kiképzett pórusokat alkotva hajlik át egymásba. (A pórusok szerkezetét és az általuk meghatározott transzport folyamatokat ld. később.)

## II A kromatin szerkezeti hierarchiája

Az (eukarióta) DNS dupla spirál minden 160-200 bázispárnyi szakaszából 146 bázispár 8 (4 pár) hiszton molekula által alkotott “magra” tekeredik fel. Ez a “gyöngysor-szerű” megjelenés jellemző a kromatin szerkezetre alacsony ionerősség mellett. Fiziológiás



sókoncentráció (0.15 M KCl) jelenlétében 30 nm-es átmérőjű kromatin fonvak figyelhetők meg az ábra (a) részén látható további feltekeredés következtében. A hiszton-oktamer/DNS alkotta nukleoszómákat a H1 hiszton kapcsolja össze (tekercseli fel) a vastagabb fonallá (ld. az ábra (b) részét). A nukleoszómák és a DNS kapcsolódása dinamikus egyensúlyként fogható fel, melynek egyik fontos szabályozó tényezője a hisztonok biokémiai módosításai (pl. acetilációja, ld. később). A 30 nm-es fonvak 50 (30-150) kilobázisos hurkokat alkotnak. Ezek szerveződését valószínűleg a kromatin fehérje váza, a mag mátrix irányítja az alacsonyabbrendű hierarchikus szintek

valamelyikének eddig lényegében fel nem ismert sajátosságai alapján. Az átlagos replikon mérettel ill. a távoli szabályzó régióival együtt tekintett gén mérettel nagyjából átfedő hurkok mind a génpreféjeződés, mind a DNS replikáció szabályozásának külön szintjét alkothatják. További feltekeredési szintek létéről tanúskodnak a kromatin nukleáz-enzimekkel szembeni hozzáférhetőségét (un. nukleáz szenzitivitását) tükröző adatok. A kromatinba foglalt DNS preferenciális hasíthatóságot mutat a szerkezeti hierarchia egyes emeletein: az internukleoszomális kapcsoló („linker”) régióban, a hurkok bázisának területén, valamint többszáz kilobázispár méretű diszkrét fragmenteket határoló régiókban. A sejtmagban a kromatin fény- és elektronmikroszkópos szerkezete alapján kétféle feltekeredési, kondenzációs forma különböztethető meg: a lazább szerkezetű, főleg aktív DNS régiókat tartalmazó un. eukromatin és a mind fény-, mind elektronmikroszkóppal felismerhető kondenzáltabb, a sejtciklus során későn replikálódó, kifejeződésre kevésbé kerülő heterokromatin. Utóbbinak konstitutív (állandósult, mint pl. a kromoszómák centromerikus régiója, vagy az inaktív X kromoszóma, az un. Barr test) és fakultatív (a sejt funkcionális állapotának megfelelően változó, reverzibilis) formáját szokás megkülönböztetni. Az aktív kromatin lazább, enzimek, DNS-kötő, szabályozó fehérjék számára könnyebb hozzáférhetősége ezen területek preferenciális nukleáz (pl. DNáz I) emészthetőségében is megnyilvánul. Észlelhető különbség van egy adott szövet sejtjeinek aktív és inaktív génjei között, ill. különböző szövetek azonos génjei között egy, a teljes gén-területre (a gén közeli és távoli szabályozó régióival együtt) vonatkozó relatív DNáz I szenzitivitásban és a szabályozó fehérjék kötődési pontjait definiáló un. DNáz I hiperszenzitivitási mintázatban egyaránt. A kromatin hozzáférhetőségének mindenkor megnyilvánulása örökítődik, propagálódik a mitózis során is. A feltekeredés okozta kromatin kondenzáció a kromoszómák formálódásával éri el maximumát, az interfázisos bepakolódás mértékének további kb. 10-es fokozódásával. Az egyes kromoszómákat alkotó egy-egy DNS molekula az interfázisos magban is önálló, és átlagos kondenzációjuknak megfelelően kisebb vagy nagyobb területet foglalnak el. Az átírt RNS molekulák ezen területek közötti centrifugális irányú útvonalon haladnak a pórus komplexek irányába, in situ hibridizációs kísérletek tanúsága szerint. Ezekben a kísérletekben egy adott mRNS-sel komplementer, fluoreszcens markerrel jelölt DNS-próbát hibridizáltatnak a fixált magok preparatumaihoz.

### **III. Kromatin szerkezet és funkció**

Az RNS polimeráz a mai ismereteink szerint állandóan nukleoszómakomplexben lévő DNS-t valószínüleg úgy írja át, hogy egymást követő kisebb szakaszokon a *hiszton*-DNS kötés időlegesen oldódik. A DNS ezeken a helyeken hozzáférhetővé válik kisebb-nagyobb molekulák (pl. a kísérletező által alkalmazott nukleázok, pl. DNáz I) számára, az ezek általi DNS-modifikációk (pl. hasítás) kímélettel és megmutatják, hogy a DNS mely szakaszainak megfelelően nyílt meg a kromatin szerkezet. A nyitott-zárt konfiguráció lókusz-specifikus létrejötte és ezzel együtt a differenciálódási állapotra jellemző kifejeződési minta fenntartása a sejtosztódások során multiprotein együttesek és génszabályozó szekvenciák kölcsönhatásán keresztül valósul meg.

A kromatin aktivitását befolyásolják a nukleoszómákból (rtg. krisztallográfiai adatok szerint) kinyúló hiszton-farkak *posztranszlációs modifikációi*. Ilyen pl. az acetiláció, mely a hisztonok lizin oldalláncainak pozitív töltését neutralizálva befolyásolja a kromatin kompaktságát, ill. az ezzel reciprok korrelációban lévő metiláció (ld. Biokémia és Molekuláris biológia). A posztranszlációs modifikációk lókusz-specifikus módon zajlanak, ti. a szabályozó fehérjék, transzkripció faktorok (pl. az Rb tumor szupresszor, sejtciklus szabályozó fehérje) "toborozzák" (angolul: recruit) ezen modifikáló enzimeket DNS-hez való kötődésük után. A kromatin metilációs-acetilációs állapota a sejtciklus során - még csak részben feltárt mechanizmusok révén - propagálódik, ezáltal a génkifejeződési mintázatot epigenetikusan örökítve. Léteznek nem-fehérje természetű szabályozó molekulák is: pl. az inaktív X kromoszóma "némaságáért" - részben - egy, ezen kromoszómán átírt RNS molekula felelős, mely "megfesti" az egész inaktív X-ét.

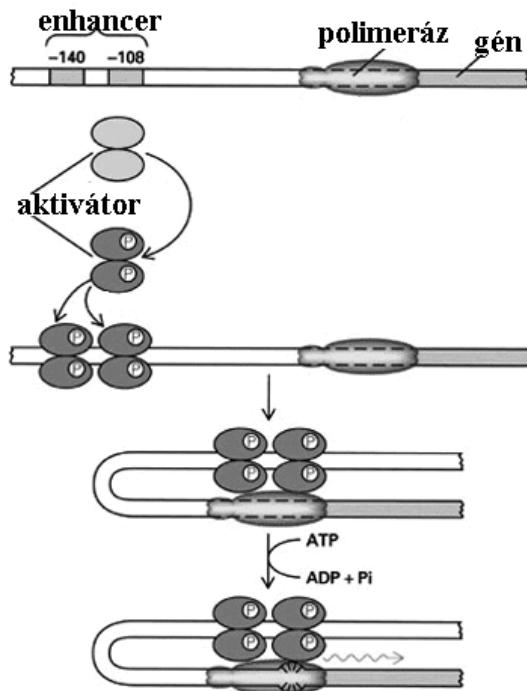
Szintén a kromatin aktivitást befolyásoló tényező a *H1 hiszton* jelen- ill. távolléte, nem-hiszton fehérjék kapcsolódása. Utóbbiak közül pl. a HMG ("high mobility group") egyes fajtái egy adott mag kromatinjának különböző pontjain mutathatók ki *in vivo*. A topoizomeráz és helikáz enzimek, a kondenzinek, kohezinek ill. multiprotein kromatin szerkezet módosító komplexelek ("remodelling machines") a DNS szuperhelicitását ill. bepakkolódását (az emberi DNS kinyújtva kb. 2 m hosszú

lenne!) szabályozhatják - ezek összefüggése az átírás ill. replikáció folyamataival nyílvánvaló, de részleteiben még kevéssé feltárt.

Az átírt pre-RNS processzálása (splicing) ko-transzkripcionálisan folyik: a szükséges fehérje faktorok a magon belüli, szubmikroszkópikus, immunfluoreszcenciás jelzéssel láthatóvá tehető doménjeiből (ilyenek pl. az un. csavarulatos testecskék a magvacska körül, ld. még később) az átírás területére vándorolnak.

A korábbi elképzélésekben a DNS jelentette a "hegyet", melyhez a kisebb fehérjék (polimeráz, stb.) mint "Mohamed" közeledtek. Ma már az RNS polimeráznak kb. 80 polipeptid komponense ismert, így reálisabbnak látszik úgy elképzelni ezen folyamatokat, hogy ezen enzimekből álló "gyárak" gépsorain halad át a DNS. Bár ezen "gyárakat" gyakran rögzítettnek fogják fel és feltételezik mátrix-asszociáltságukat valamint számos kromatin-hurok egyidejű processzálásának lehetőségét, a mátrixra vonatkozó jogos kételek tükrében inkább dinamikus, időben gyorsan változó strukturákról lehet szó.

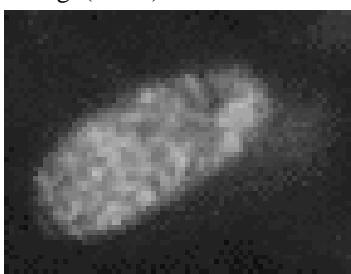
A DNS kettős spirál a nukleoszómákra feltekeredve további, un. *szuperhelikális* csavarulatot szenved, melyet energetikailag a nukleoszómákkal való kölcsönhatás tart fenn. Kimutatható, hogy a köralakú bakteriális kromoszómában a DNS szuperhelicitásának változásai a különböző bakteriális gének kifejeződésére jelentős (és különböző mértékű) hatással vannak. Így feltételezhető, hogy az eukarióta sejtek kromatinjában a DNS szuperhelicitás változásai is szerepet játszanak a génkifejeződés szabályozásában. A transzkripció kapcsán a szabaddá váló DNS szakasz szuperhelicitása változik. Ezen változások korrigálása a (DNS egy szálát elhasító majd a másik szál körüli körbeforgás után azt ismét egyesítő) vitális fontosságú topoizomeráz I enzim feladata lehet. A mátrixot, mint stabil strukturát feltételező elképzélések szerint az emlős kromatin transzkripció számára hozzáférhetővé váló, kitekeredő hurkai bázisuknál a mátrixhoz fixáltak, ezért idézheti elő a transzkripció aktiválódás és a transzkripció maga a szuperhelikális feltekeredés megváltozását. A mátrixot csak valamilyen funkcionális és dinamikus értelemben elfogadó elképzélések kontextusában ugyanez pl. az átíródó lókuszokat egymástól *elszigetelő DNS-elemek* elemek összefüggésének, kapcsolódásának feltételezésével értelmezhető. Ezen DNS szakaszok körül kialakult fehérje együttesek akadályozzák meg a lókuszon folyó transzkripciót befolyásoló hatások tovaterjedését a szomszédos lókuszokra.



*Kromatin-hurkok* feltehetően dinamikus jelenléte un. *cisz* (az adott DNS szakaszhoz közeli, vagy távoli, de azonos DNS molekulán lévő szabályozási régiókkal történő kölcsönhatásokon alapuló) szabályozást tesz lehetővé, ld. ábra.

A gének közeléi régiókhöz kötődő fehérjék a hurok különböző (akár igen távoli) pontjait (enhancer, silencer régióit, "lókusz kontroll régiói" (LCR-eit)) felismerő fehérjékkel kölcsönhatásban aktiválódhatnak vagy kerülhetnek gátlás alá. Valószínű, hogy a dinamikusan

formálódó-változó kromatin hurkok mintegy végig tapogatják közelebbi és távolabbi környezetüket, tranziens, vagy stabilabb kapcsolódásokat kialakítva. Az LCR feltehetően az adott kromatin hurokban a replikáció kiindulási helyét is befolyásolja. A replikáció az eukarióta sejtek magjában többszáz diszkrét fókuszban folyik, nukleozid analóg (BrdU) S-fázisban történő beépülésének immunfluoreszcenciás képe szerint



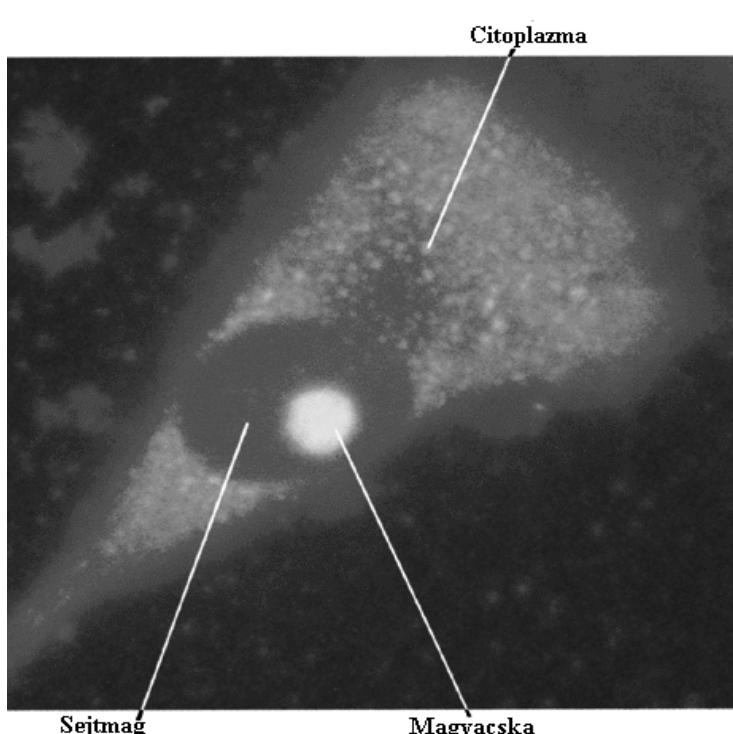
(fluoreszcens mikroszkópból, ld. ábra.) Példák vannak arra is, elsősorban Drosophila-vizsgálatokból, hogy a homológ kromoszómák azonos lókuszhoz tartozó távoli szabályozó régiói (enhancer-ei) *in trans* fejtik ki enhancer-hatásukat.

Mivel az ilyen kölcsönhatások akkor is kimutathatók, ha a megfelelő enhancer-t a homológ kromoszómán az eredeti lókusztól messzire transzlokálják, feltehető, hogy a kromoszómák DNS hurkai a kromoszóma teljes hosszában állandóan észlelik, "tapogatják" nemcsak a saját, hanem a homológ kromoszóma teljes hosszát. A sejt hatékony mechanizmusokkal rendelkezik mindenféle DNS szerkezet-módosulás kijavítására (*repair*). Folytonossághiányok, egy vagy

mindkét szálon bekövetkezők, perceken belül a reparációban részt vevő fehérjék helyszínre vándorlását, odakötődését váltják ki. Ezen fehérjék egy része in vitro is szabad vég-kötő tulajdonságú, mások pl. nukleáz aktivitással rendelkeznek, egyes fehérjék más résztvevőket foszforilálni képesek. A soklépéses folyamatot fehérje-féhérje kapcsolatok integrálják. A repair rendszer a check-point mechanizmus részeként kapcsolatban áll a ciklus-szabályozással.

#### IV. Nukleólusz

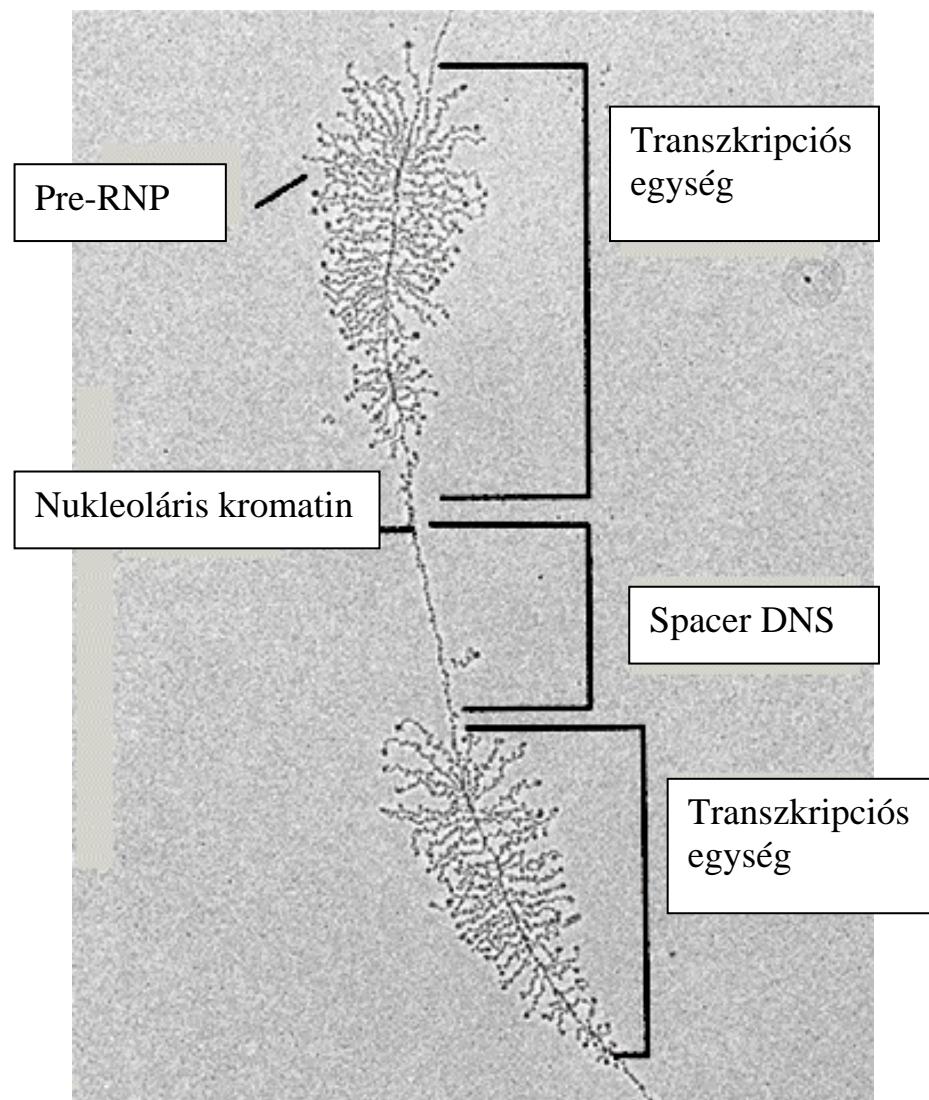
Az interfázisos (ld. sejtciklussal foglalkozó fejezet) magban a kromoszómák (ebben a letekeredett állapotukban) fény mikroszkóppal nem ismerhetők fel. A magon belül jól megkülönböztethető azonban annak egy szub-organelluma, a magvacska (nukleólusz,



ld. még a fejezet első ábráján). A legtöbb riboszómális RNS szintézise itt folyik, az un. nukleólusz organizátor területén (egy vagy több kromoszóma azon területe, melyek riboszómális RNS-eket kódoló tandem

ismétlődő géneket tartalmaznak). A riboszómák összeszerelődése már itt megindul, mint azt a riboszómális fehérjék immunfluoreszcenciás festésével készült felvétel demonstrálja.

Az alábbi elektronmikroszkópos felvételen a pre-rRNS transzkripcióss egységek két tandem kópiája látható. A sok polimeráz által szimultánan folyó szintézisük során egyre növekvő rRNS láncok toll-szerű képet alkotnak.

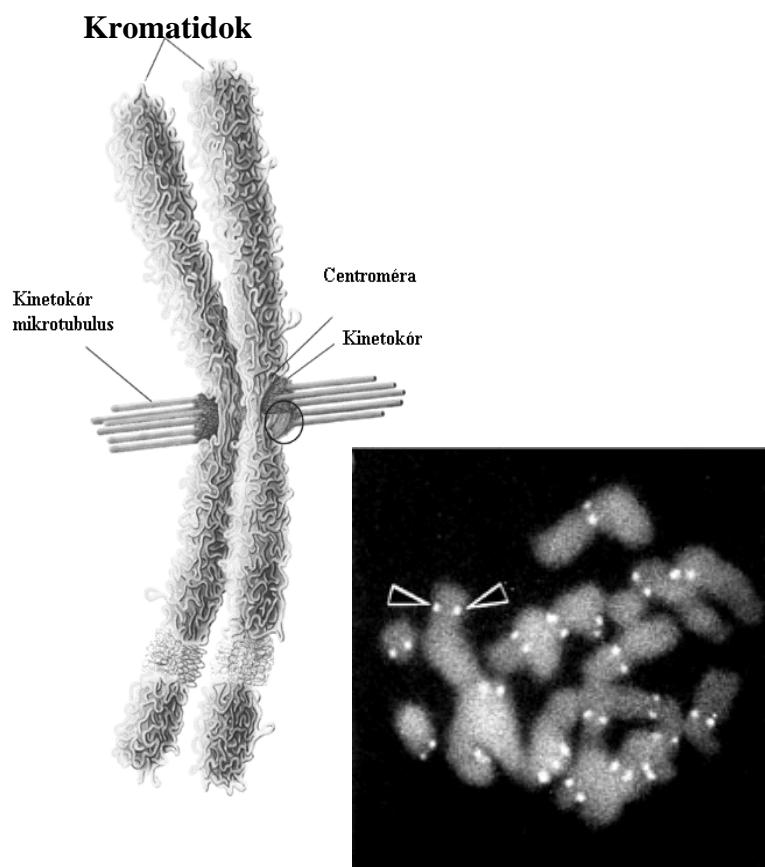


A fentiekben kívül a magvacska számos egyéb funkciójára fény derült: mRNS kifejeződésben játszott szerepére utal az alábbi kísérleti adat. Emberi (HeLa) sejtek és csirke eritrociták (virus-indukált) sejtfúziója során a keletkezett heterokarionokban az addig teljesen kondenzált kromatinú és nukleóluszt nem tartalmazó csirke mag dekondenzálódik és nukleóluszt formál. Addig nem észlelhető a csirke-specifikus fehérjék megjelenése, míg a nukleólusz nem jön létre, annak dacára, hogy a HeLa sejt végig jelenlévő nukleólusza riboszómákkal képes ellátni a teljes heterokariont.

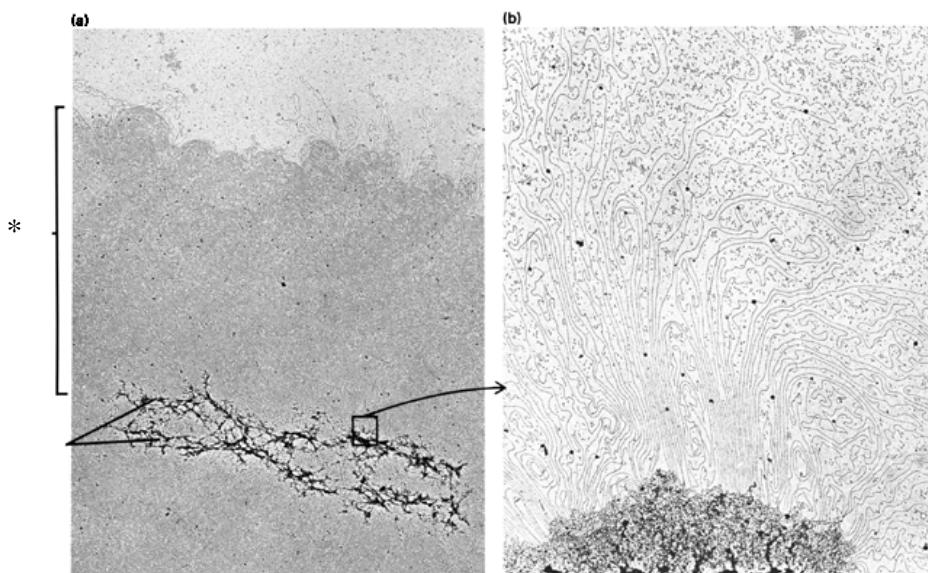
A magvacska körül helyezkednek el az ún. "coiled bodies", csavarulatos testecskék, melyek a splicing folyamatokkal állnak összefüggésben (snRNP-t tartalmaznak, ld. Molekuláris Biológia és Biokémia). Szerepet játszik a szekretoros és membrán fehérjék helyes lokalizációját meghatározó "signal recognition particle, SRP" RNS processzálásában és a SRP összeszerelődésében is. A kromoszóma végek replikáció során bekövetkező rövidülését kompenzálgó enzim (a telomeráz) RNS komponense is nukleoláris eredetű. Az öregedés és a nukleólusz funkciói közötti összefüggést sejtet, hogy az öregedő szervezetben, a telomer-rövidüléssel párhuzamosan, bizonyos telomereken található fehérjék magvacskába történő relokalizációja figyelhető meg.

## V. A kromoszóma szerkezete

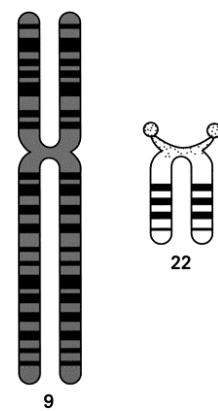
A diploid (emberi) sejt 6.2 pg-nyi DNS-ét a 46 kromoszóma átlagosan 4 cm hossúságú DNS molekulája alkotja. Az ábrán egy metafázis kromoszóma sémás szerkezete látható. Az (un. elsődleges) befűződést a specifikus (satellita) repetitív DNS-szakaszokból álló centromer képezi, melynek egyes (un. CEN konszenzus) szekvenciáihoz specifikusan kötődő proteinek alkotják a kinetokort, egy elektronmikroszkóppal felismerhető lemezes strukturát, melyhez a mitotikus orsó tubulusai kapcsolódnak. A kinetokór, protein komponenseire specifikus antitest segítségével immunfluoreszcens festési eljárással (ld. nyilak a betét ábrán) is láthatóvá tehető.



Az ábrán metafázisos kromoszóma elektronmikroszkópos szerkezete látható a hisztonok eltávolítása után. Kis nagyításnál (a) a nem-hiszton kromoszóma-váz (un. szkaffold)



mint sötét struktúra tűnik elő, melyből a kromatin hurkok (\*) türemkednek elő. Nagy (50000X) nagyításnál megfigyelhető a DNS hurkok kapcsolódása a fehérje vázhhoz. A kromoszóma váz egyik komponense a topoizomeráz II enzim, melyre specifikus antitest segítségével a váz kromoszómán belüli spirális lefutása láthatóvá lehető. Ez az enzim az interfázisos magban is DNS-asszociált marad és egyes adatok szerint a kromatin hurkok bázisán található. Ezzel kapcsolatos, hogy a daganatos beteségek kemoterápiás citosztatikum-kombinációinak gyakori komponensei, a topoII gátlószerek hatására a DNS-en hurok-méretű fragmentáció észlehető. A kromoszómák különböző festési eljárásokkal jellemző savozást mutatnak, melyek révén egymástól jól megkülönbözhetők. Ezen savok jelenthetik a kromatin szerkezeti hierarchiájának a csúcsát, átlagosan mintegy  $10^7$  bázispárnyi (több, mint 100 kromatin-huroknyi) DNS-t tartalmazva. Az ábrán példaként a 9-es és 22-es kromoszómák savozási mintázata látható. A preparátumok



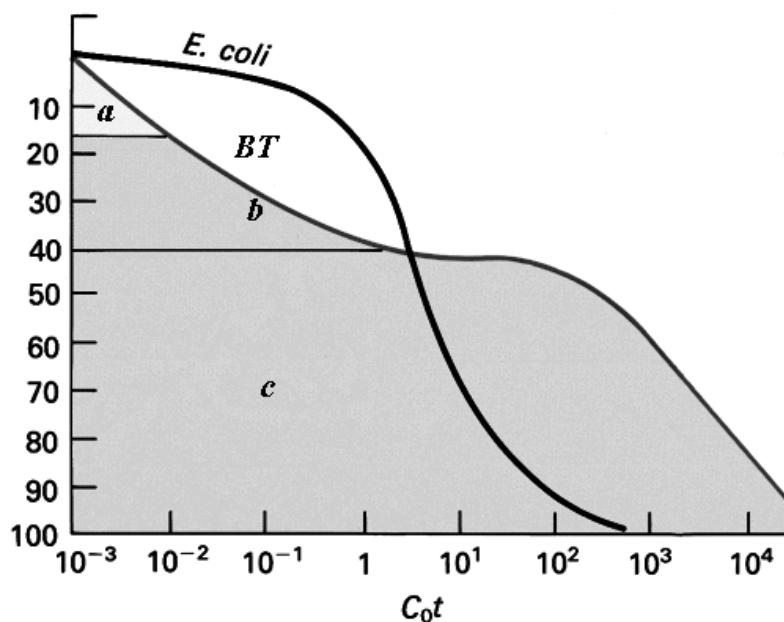
hő- ill. enzimes előkezelése ill. a festési eljárás alapján különböző sávozási technikák léteznek. A mintázat keletkezési mechanizmusa lényegében nem feltárt. (Ez a sávozódás nem tévesztendő össze a *Drosophila* interfázisos polytene (óriás) kromoszómáinak génexpressziót tükröző, kompaktabb ill. lazább szerkezetű kromatinnak megfelelő sávjaival.) Feltételezik, hogy a kromatin, majd a kromoszóma hossztengelyével párhuzamosan, centrálisan, a SAR régiók közvetítésével egy un. AT-lánc (AT-queue) alakul ki, melyre merőlegesen szerveződnének a hurkok. Az AT-lánc lefutása, saját további feltekeredése határozná meg a sávok festődési sajátságait.

## **VI. Az interfázisos kromatin és a metafázis kromoszóma szerkezete közötti összefüggés.**

A mitotikus kromoszómák un. R (korán replikálódó DNS-t tartalmazó) ill. a későn replikálódó DNS-t tartalmazó G (Q) sávozottsága megfelel az interfázisos kromatin magon belüli belső ill. periferiális (ld. heterochromatin elhelyezkedése) lokalizációjának. Egy adott DNS szakasz (perifériás vagy centrális) lokalizációja a magban a mitózist követően reprodukálódik az utódsejtekben. (A Q-sávokat a quinacrin, a G-ket az enyhe proteolitikus kezelés utáni Giemsa festés, az R-sávozódást a forró alkalikus kezelés nyomán kapott Giemsa festődési mintázat produkálja. Érdekes módon olyan kezelések nyomán, melyek DNS-fragmentációt okozva a sejtek programozott elhalását iniciálják, az ezen sejtekben kapott metafázis preparátumokon az R festődési mintázat megjelenését észlelték, az egyébként szükséges előkezelések nélkül is.)

## VII. A DNS heterogenitása

A kromoszóma méretű DNS (értelmes, egyik száláról) átfirásra kerülő, a diploid genomban két allélben előforduló egyedi géneket (a következő ábrán: c) és különböző mértékben (a, b) ismétlődő, a genomban tandem és szétszórtan, sok-sok másolatban jelenlévő szekvenciákat tartalmaz. A különböző szekvenciák száma a genom un. komplexitása, mely nagy mértékben különbözik a fajok között. A gének (és a repetitív elemek egyaránt) egyedi (nem ismétlődő), nem kódoló szakaszokkal (spacerekkel) határolódnak el egymástól, ill. intronjaik, valamint az un. pseudogének (RNS-ről „visszafelé”, DNS-be írt szekvenciák) szintén nem kódolnak fehérjét. A denaturált (egyszálú) DNS reassociációs kinetikája tükrözi ezt a heterogenitást, melynek kromoszómán belüli eloszlása feltehetően hozzájárul a kromatin szerkezeti hierarchiája magasabbrendű szintjeinek szervezéséhez. Mint az ábrán (előző oldal) látható, a bakteriális ill. eukarióta (borjú timusz, BT) DNS reassociációs viselkedése kevesebb ill. több (a teljes DNS álománynak jelentős részét alkotó) ismétlődő szekvencia arányára utal. A  $C_0 t$  érték a DNS (nukleotidáakra számolt) moláris koncentrációjának és az eltelt időnek a szorzata, melynek függvényében a reassociáció %-os mértékét ábrázoljuk. A



genom DNS szekvenciái bázisösszetételük (AT/GC arányuk) szerint is több különböző alosztályt alkotnak. Utóbbi arány szempontjából élesen elkülönülnek a gének és a transzkripció szempontjából inaktív területek. Ezek változása az eddig ismertté vált hosszabb DNS szekvenciák alapján nagyjából hurok-méretű periodicitást (is) mutat. Igen fontosnak gondoljuk, de még nagyrészen feltáratlan a szerepe és szabályozása mind a DNS szuper-helicitásának, a fehérje-kötődés által előidézett hajlított állapotának, mind a DNS alternatív konfigurációinak (pl. Z DNS, parallel és hármás szálú DNS). Az ábra egy izolált követően is még nagy mértékű szuperhelicitást (ld. nyilak) mutató *E. Coli* kromoszóma elektronmikroszkópos képe. (Középen a sötét terület egy membrán-darab, ti. a kromoszóma a bakteriális membránhoz kapcsolódik.)

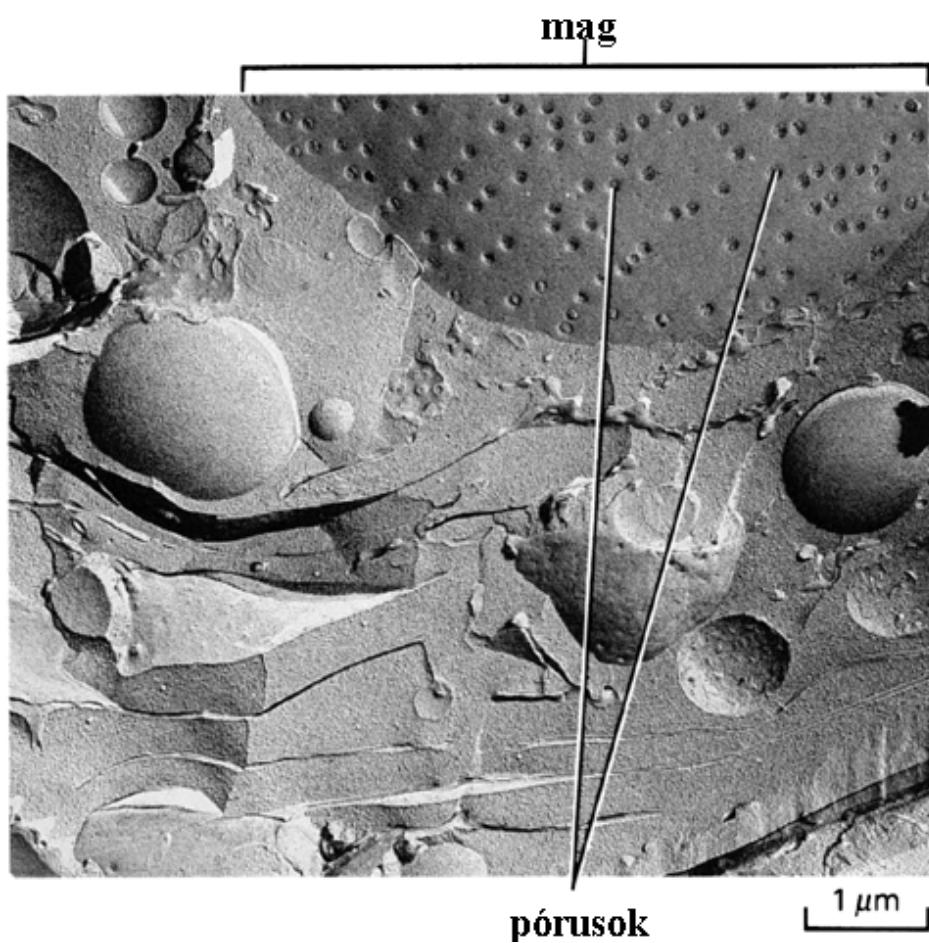


Az ismétlődés foka szerint háromféle szekvencia-kategóriát különböztetnek meg: erősen repetitív (egyszerű, tandem ismétlődő, rövid szekvenciákból álló nagyobb szakaszok, mint pl. a centromérikus régiók un. satellita DNS-e), a közepesen repetitív és a nem ismétlődő szakaszokból (pl. gének többsége) álló genom-hányad. A repetitív szekvenciák alkotják a genom több, mint felét, jelentőségükre nincs megyőző magyarázat (ez az un. C-value paradoxon – a C-érték a haploid genom DNS-tartalma; a lehetséges magyarázatok között vannak

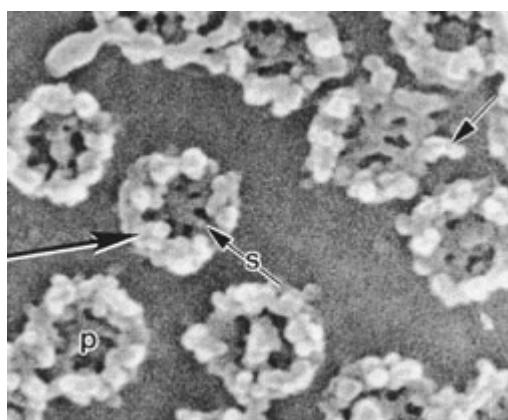
strukturális okok, ezen szakaszok környezetében kimutatható hatásai a DNS pakolódási, heterokromatizációs hajlamára, ill. a DNS saját „mobilitásának” ténye, olyan szekvenciák létezése, melyek révén hosszabb DNS szakaszok is önálló „útra kelhetnek” a magon (sejten, ill. populáció, ld. Genetika) belül és eredeti helyükhez képest más-hova inszertálódhatna

### VIII. Magmembrán. Szignál-transzdukció és sejtmag.

A magmembrán barrier-funkciója a sejt szabályozási működéseit lényegesen felgyorsítja, hiszen már jelenlévő molekulákat kell csupán átengedni vagy transzportálni



a másik kompartmentbe, nem szükséges szintetikus folyamatokra várni. Az időtényezőn kívül a magmembrán által biztosított kompartmentalizáció jelentőségével kapcsolatosan lényegesnek látszik az az elv, mely szerint a sejtciklust szabályozó egyes, mag-lokalizációs szignál-peptid nélküli fehérjék csak a magmembrán lebomlása után juthatnak el targetjeikhez.



A magmembrán két lipidkettős-reteget a pörusok (pörus-komplexek) mintegy fixálják. (Az unfagyasztva-töréses technikával készült magpreparátum elektronmikroszkópos felvételét ill. a pörus komplexek pásztázó elektronmikroszkópos felvétel által demonstrált szerkezetét lásd a mellékelt ábrákon. Jelölések az második ábrán: p, a pörus komplex

közepén lévő „dugó”; s, küllőszerű szerkezeti elem; jelöletlen nyíl, globuláris és pálcika alakú szerkezeti elemek.) Ellentmondásos a pörusok passzív átjárhatóságával kapcsolatos adatok: a kisebb fehérjékat is magában foglaló passzív permeabilitási tartományon belüli ionok közül a Ca-ra vonatkozóan magmembránon keresztsüli gradiensek létezése sem zárható ki. A pörusok nagy, középső "nyílása" egyébként sem tűnik üresnek (nagy feloldású EM felvételeken). Ezen kívül nyolc perifériális, kisebb csatorna látható a pörus komplexen belül. A pöruson keresztsüli anyag-transzportot értelmező egyik modell szerint az kétajtós "zsilip" módjára működik, melynek belső oldala export, külső oldala import szignállokra reagál. A pörus-komplex számos fehérjéje (az un. nukleoporinok) ismert. (Ezek egy része glikoprotein és köti a wheatgerm-agglutinin-t.) Az anyagtranszport során az importálódó (exportálódó) molekulákat (mRNS, snRNS, riboszomális és egyéb fehérjék, stb.) a pörus-komplex komponensei specifikus fehérje-komplexek formájában ismerik fel. Ezek a fehérjék (karioferrinek) "ingáznak" (un. shuttle-fehérjék) a citoplazma és a mag között, különböző molekuláris terheikkkel.

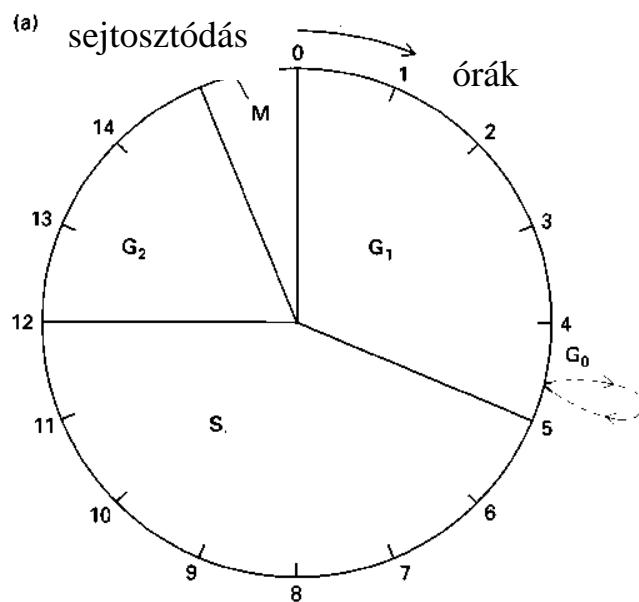
A magmembrán a jelátviteli folyamatokban gyaníthatóan megisméthi a sejtmembrán szintjén ma már részleteiben is ismert trükköket. A G proteinek

némelyikéről ( $G_i$ ) tudjuk, hogy transzlokálódik a magba. Egyes növekedési faktorok (melyek a sejtmembrán szintjén hatnak, pl. PDGF) mag-lokalizációs szignált hordoznak. A foszfatidil- inozitol jelátviteli relé-rendszer elemei jelen vannak a magmembránban. Izgalmas szabályozási mechanizmust példázhat az a tény, hogy az integrinek által közvetített sejt-adhéziós folyamatok során az adhéziós pontokon kimutatható egyes fehérjék nukleáris export szignált hordoznak.

A külső lipid-bilayer nyugvó sejten folytonosan közlekedik az ER üregrendszerével.  $Ca_i$  növekedése a közlekedés megszűnését (a járat-rendszer széttöredeződését?) vonhatja maga után. A mitózis során, korai profázisban a két lipid kettősrétegből álló magmembrán dezintegrálódik, és a keletkező veszikulák, FRAP kísérletekben, az ER-rel folytonosakká válnak. Telofázisban az egyes kromoszómák körül újraformálódik a kettős lipid-bilayer, majd ezek a burkok összeolvadnak, kialakul a magmembrán.

## Sejtciklus, mitózis

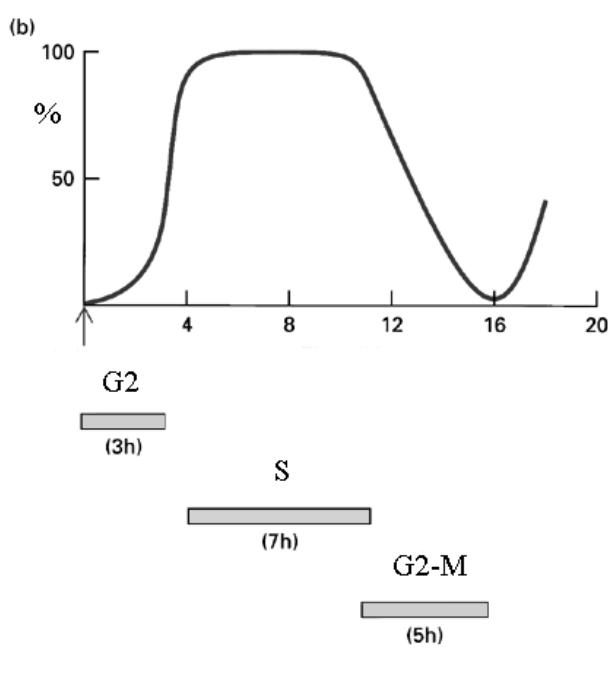
Az egyed túléléséhez a sejtosztódás szigorú szabályozására van szükség. Ennek a komplex szabályozásnak a zavara vezet a rákos daganatok kifejlődéséhez. A sejtek osztódása, proliferációja szabályozásában a sejtek környezete meghatározó szerepet játszik. In vitro, a tápfolyadék (médium) kimerülése, elhasználódása, pH-jának megváltozása a sejtosztódás leállásához vezet. A "környezetbe" a sejt maga is beletartozik, amennyiben a proliferáció sejtszám (sűrűség-) függő: egy adott denzitás fölé a kultúra nem nő, az adherens sejtek (hacsak nem rákosan transzformáltak) a konfluencia eléréséig (amikor a sejtek öszeérnek) szaporodnak, ill. in vivo, pl. a hámszövetben a sejtosztódás a sebszélek összeéréséig tart. In vitro, a sejtciklus során két, egymással és az anyasejttel azonos új sejt keletkezik; in vivo, a két leánysejt nem egyforma. Az egyik "különbözni kezd", differenciálódik valamilyen szöveti funkció irányában, a másik biztosítja további osztódásai révén az anya (ős-) sejt újratermelődését. Egyszerű számításokkal kimutatható, hogy ezen szereposztáson belüli



arányeltolódások korlátlan sejtszaporodáshoz vezetnek. Az ábrán (a) egy 16 órás generációs idej eml s sejt sejt-ciklusának fázisai látható. Az els kb. 5 óra G1 ("els gap") fázisa, az S fázis (a DNS "szintézisé" - a többi makromolekula szintézise nem korlátozódik az S fázisra) és a G2 (második

"gap") alkotják az interfázist. A fennmaradó kb. 1 óra az M (mitózis) fázis, melyben a sejt osztódása végbemegy. A G1 fázis a sejt növekedésének fázisa, G2 pedig a közvetlen előkészület a mitózisra. Az S, a G2 és M fázisok időtartama relative állandó (pl. az M fázisé általában 1-2 óra). Egy gyorsan növő emberi sejt-kultúrában a teljes sejtciklus

tartama kb. 20-24 óra. A sejtciklus teljes időtartamát a G<sub>1</sub> hossza határozza meg. Bizonyos, gyorsan osztódó sejtekben a G<sub>1</sub> szinte nem is létezik. Másokban pedig olyan hosszú, hogy a sejtek mintegy megrekednek ebben az állapotban – az ilyen nyugvó sejteket G<sub>0</sub> állapotú sejteknek nevezzük. Más megközelítésben a G<sub>0</sub> állapotot úgy fogják fel, hogy ekkor a sejt rövidebb-hosszabb időre elhagyja a ciklust, vagyis a sejthalmaz proliferációs kompartmentjét. A differenciálódás (egy adott célfeladatra, feladatkörre specializált állapot kialakulásának) folyamata ezen G<sub>1</sub>-G<sub>0</sub> átmenettel kapcsoltan zajlik. A sejt növekedése valamilyen kevssé ismert módon torkollik az S fázis megindulásába. Utóbbi a DNS szintézishez szükséges enzimek szintézisének nagymértékű fokozódásával indul. A sejt-

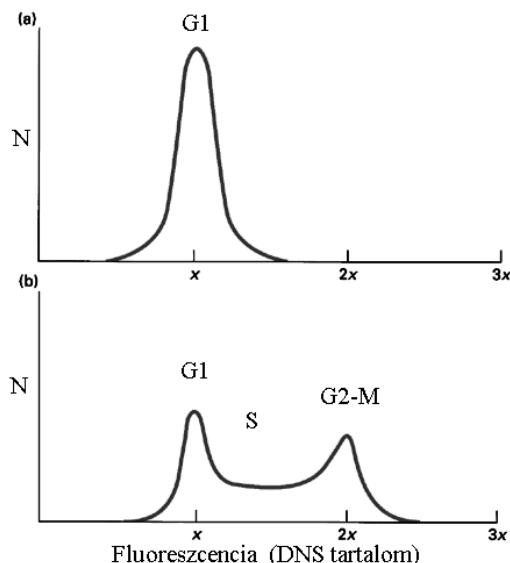


osztódás kulcsfolyamata, a DNS szintézise izotóppal jelzett, az él sejtek által is felvételre kerül prekurzornak (3H-timidin) az új DNS-szálba történ be-épüléssel követhet nyomon. Az ábrán (b) a nyíl a prekurzor (rövid ideig tartó “pulse” formájában történő)

hozzáadását jelzi, a beépülést a jelenlévő sejtek közül az izotóppal jelzett mitotikus alakok %-os arányában mérhetjük autoradiográfiával. (Fluoreszcens mikroszkópos vagy áramlási citometriás analízissel a 3H-timidin beépülés autoradiográfiás technikája kiváltható, amennyiben brómdeoxiuridin (BrdU) beépülését anti-BrdU antitest segítségével, immunfluoreszcenciás eljárással detektáljuk.)

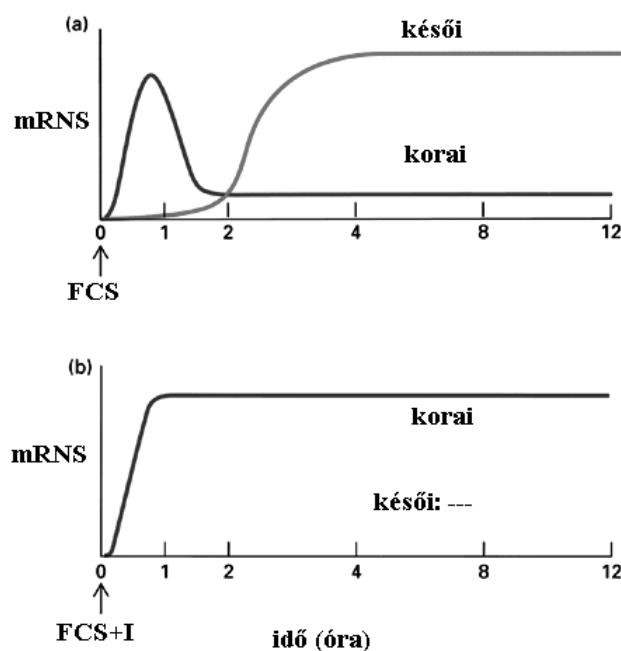
Tanulságos végigkövetni az előbbi ábra által mutatott változásokat. Mivel a timidint csak a DNS szintézisére tudja a sejt felhasználni, csak azok a sejtek fogják a radioaktiv timidint beépíteni, amelyekben DNS replikáció folyik éppen. Egy aszinkron kulturában, bármely pillanatban a sejtek a ciklus különböző fázisaiban találhatók. Ha a radioaktiv timidint csak néhány percig adjuk a kulturához, akkor (az autoradiográfiás eljárást követően) csak a pulzus ideje alatt éppen S fázisban lévő sejtek fölött lesznek ezüst szemcsék (grain-ek). A fénymikroszkóppal felismerhető mitotikus alakok fölött nem lesznek szemcsék, hiszen M fázisban a sejtek nem replikálnak DNS-t. Ha ezt a rövid idejű timidin inkubációt követően a radioaktív timidint kimossuk a mediumból, akkor további beépülés nem történik és a továbbiakban nyomon követhetjük a már beépült izotóp útját a sejtcikluson keresztül. (A már beépült izotópot tovább hordozza a sejt és közvetlen utódai, a replikáció szemikonzervatizmusa által determinált módon.) Egy órával a timidin-pulzus után végezve autoradiográfiát a kultura egy aliquotjával még mindig nem találunk jelölt mitotikus alakokat. Ez arra utal, hogy egy óra nem volt elég a sejteknek, hogy S-ből M-be jussanak. Ha a sejtkultura egy további aliquotját a timidin pulzus után két órával autoradiografáljuk, akkor még mindig ugyanilyen eredményt kapunk: tehát két óránál is hosszabb a G2 fázis időtartama. Egy négy óránál megvizsgált mintában már a mitotikus sejtek fele radioaktív. Ezek azon sejtek, melyek az S fázis második felében “jártak” a timidin inkubáció alatt. Ahogy a jelölt sejtek áthaladnak az M fázison, a jelölt mitotikus alakok aránya csökkeni fog, majd 0 %-ra csökken, hiszen sok olyan sejt van, amely a timidin-pulzus alatt még nem volt S-fázisban (akkor éppen G2-ben, M-ben, vagy G1-ben tartott.) A sejtmagról szóló fejezet első oldalán lévő ábra egy ilyen kísérletben készült autoradiográfiás felvétel. A laboratóriumi gyakorlatok egyike az eljárás BrdU-inkorporációt alapuló, fluorescens mikroszkópos változata. Megjegyezzük, hogy a timidin, vagy BrdU beépülés a (pozitiv) sejtek életképességének (viabilitásának) meggyőző indikátora.

A sejtek DNS tartalma alapján áramlási citometriás analízis segítségével is megkülönböztethetők a sejtiklus egyes fázisai. Az ábra egy diploid, egyöntet en G1 (vagy G<sub>o</sub>, tehát nyugvó, vagy differenciált) állapotban lévő sejtpopuláció (a) ill. egy proliferáló kultúra (b) DNS eloszlását mutatja. A DNS-hez sztöchiometrikusan kötődő



festék "x ill. 2x" átlagos sejtenkénti fluoreszcencia intenzitása arányos a sejtenkénti DNS mennyiséggel S fázis előtt és után - x emberi sejtek esetében 6.2 pg DNS-nek felel meg. A G<sub>o</sub> és G1 (ill. a G2 és az M) fázisban lévő sejtek DNS tartalom szempontjából nem különböztethetők meg. Vitális festésre is alkalmas a Hoechst festék egyike, mely az élő sejtek membránján áthatolva a DNS tandem AT bázispárjaihoz erősen kötődve intenzíven fluoreszkál (a szabad festék semleges pH-n aggregált állapotú és nem fluoreszkál). (Ezen festési eljárás és a BrdU beépülés kombinációjával nemcsak a sejtek jelen állapota, ciklus-eloszlása jellemző, hanem az is, hogy a jelenleg G1-fázisú sejtek korábban már építettek-e be BrdU-t, ti. a Hoechst festék fluoreszcenciáját a DNS-be épült BrdU csökkenti (kioltja), így az egymást követő osztódások során kihíguló BrdU-tartalom a G1 csúcs perturbálatlan pozíójához képest a kisebb intenzitások felé eső alcúcsokat fog okozni.) Más festési eljárásokkal RNS és fehérje tartalom, valamint a kromatin kompaktsága alapján szintén elkülöníthetők a ciklus egyes fázisai, sőt a ciklus fázisainak finomabb felbontása is elérhető. A görbék alatti területek az adott ciklus-fázisban eltöltött idővel, vagyis annak a valószínűségével arányosak, hogy véletlenszerűen kiválasztva egy sejtot a populációból az az illető csúcsnak megfelelő fázisban legyen. (Így nem tesz különbséget pl. a "befagyott" és egy gyorsan pörgő ciklus között, mely két szélsőség legegyszerűbben egymást követő időpontokban végzett sejtszámlálással különböztethető meg).

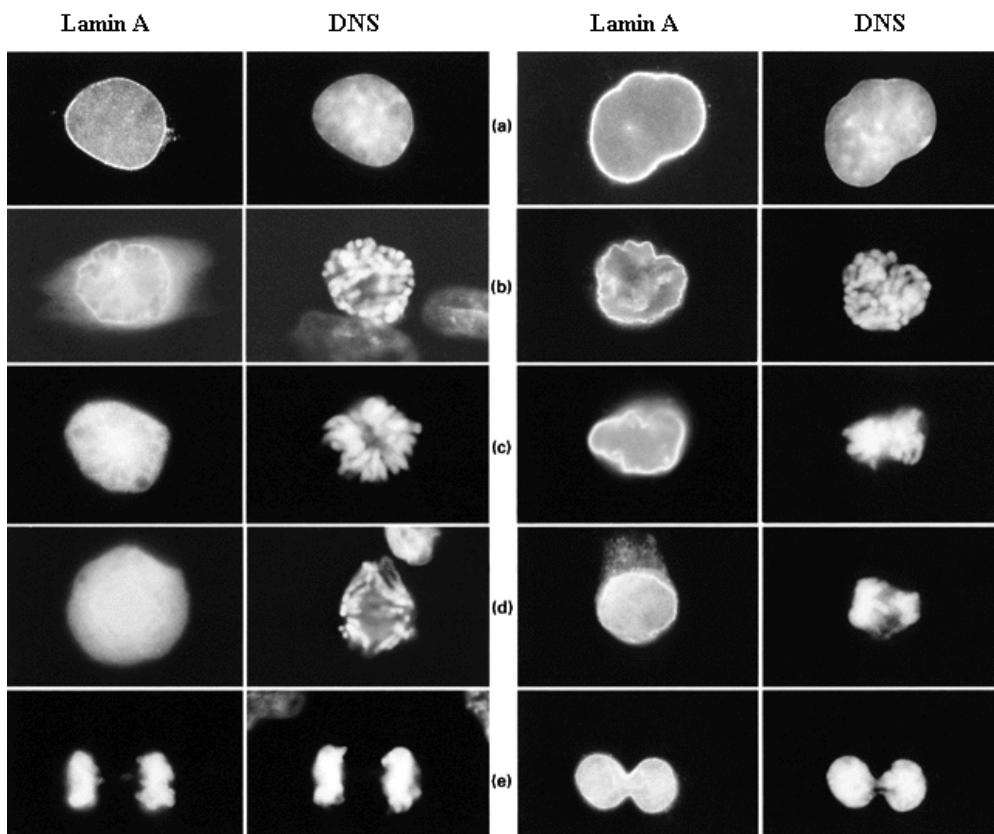
A fenti aszinkron kultura számos eljárással "szinkronizálható". Pl. egy letapadva növő sejtvonalban a mitotikus alakok spontán leválnak ill. könnyen lerázhatók az edény faláról. Szuszpenziós kulturák esetén az un. centrifugális elutriálás módszere nagy mennyiségi, az egyes fázisokban feldúsított élő sejtmintákat eredményez. Hasonló célra az áramlási citometria is alkalmas, vitális DNS festést akalmazva. Számos un. kémiai szinkronizálási eljárás is létezik, a DNS vagy a fehérje szintézis különböző fázisait reverzibilisen leállító sejtmérgek, vagy pl. magas timidin koncentráció (un. timidin-blokk) alkalmazásával.  $G_0$  fázisban feldúsult kultura nyerhető a sejtek éheztetésével, növekedési faktorokban szegény



médiumban való tartásával. Éheztetett sejtekhez (fetális borjú szérumot (FCS-t, vagyis növekedési faktorokat) adva, számos géntermék fokozott kifejeződése észlelhető. Azonnali aktiváció figyelhető meg egy sor transzkripció faktor esetében, melyek már jelen vannak  $G_0$  állapotú sejtekben is, pusztán poszt-transzlációs modifikációk (pl. foszforiláció) szüksége-

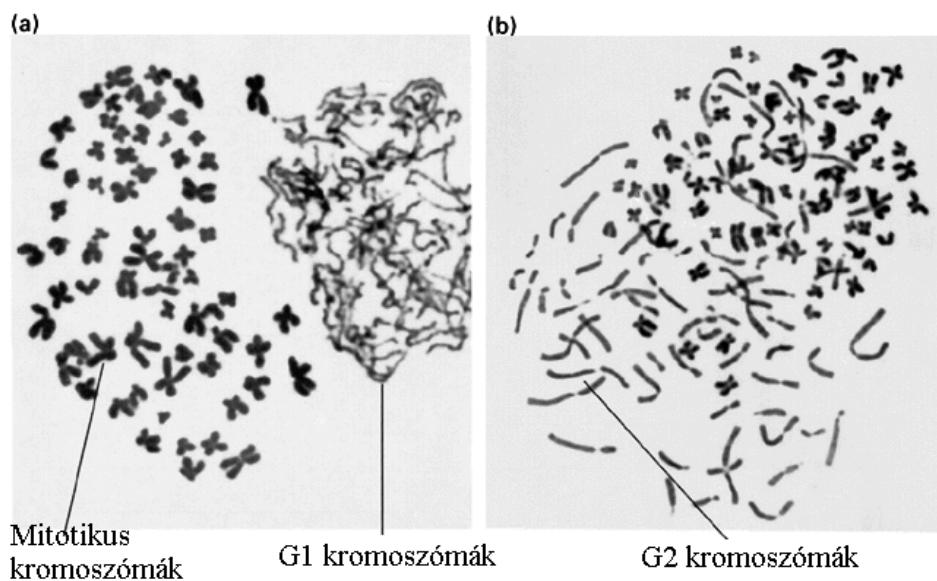
sek aktivációjukhoz. Ezen azonnali válasz ezért nem befolyásolható a fehérje szintézis kémiai blokkolásával (az ábrán "T"). A késői válasz génjeinek átírását a koraiak enzimjei végzik, ezért a késői gének által kódolt fehérjék termelődése fehérje-szintézis-függő. Ugyancsak új fehérjék szintézise szükséges a korai válasz mRNA-ai szintjének (a csúcsot követő) leszabályozásához. Ezeket a szabályszerűségeket demonstrálja az ábra. A G1 fázis egy pontján (un. restrikciós vagy START pont) a sejt mintegy "elkötelezi magát", belép az S fázisba és végighalad a cikluson, még akkor is, ha pl. a növekedési faktorokat elvonjuk a kultura mediumából..

A sejtciklus szabályozásában résztvevő bonyolult biokémiai mechanizmust jelentős mélységben már feltárták. Itt csak az illusztráció szintjén és a valóságot nagyban egyszerűsítve említjük ennek néhány elemét. Egy kulcsszereplő az M-fázis promoveáló faktor (MPF), melynek kináz (más fehérjéket foszforiláló) aktivitása (de nem a mennyisége) a ciklussal szimultán jellegzetes oszcillációt mutat. Ezen oszcilláció hátterében egy ciklin nevű fehérje-család tagjai állnak, melyek a ciklus nevezetes pontjain meghaladják MPF-aktiváló koncentrációjuk küszöbét. A folyamatok oszcilláló jellegének kialakításában foszfatázok és proteázok is fontos szerepet kapnak. Az MPF által foszforilált fehérjék közül a magmembrán belső oldalát behálózó laminát alkotó fehérje komponensek foszforilálásának következményei szépen értelmezhetők a sejtciklus

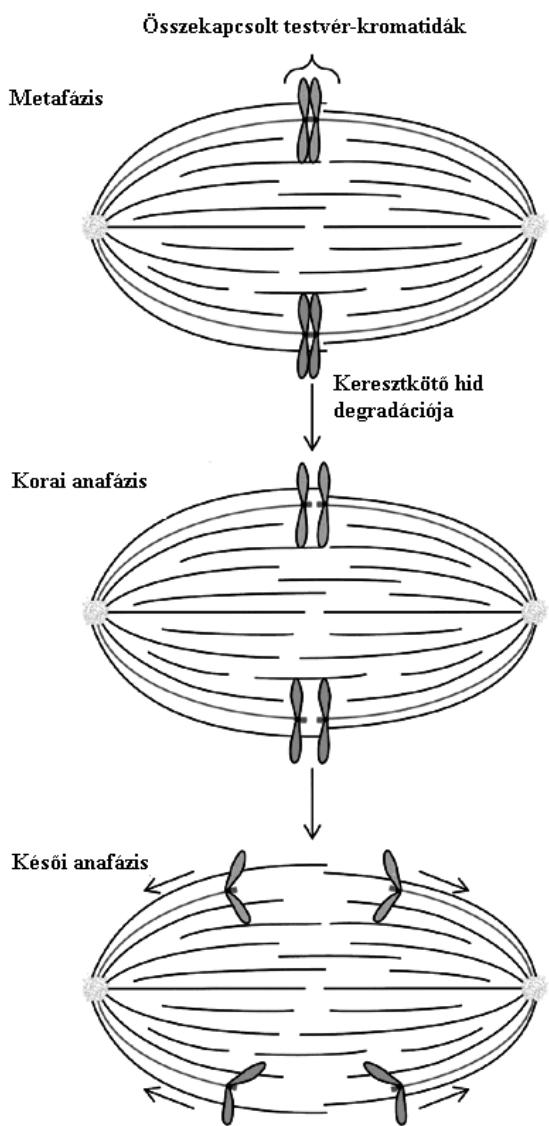


morfológiai történéseivel kapcsolatban. A lamin A, B, C molekulákból polimerizálódó (intermedier) filament-rendszer a B molekula hidrofób (izoprenil) oldallánca segítségével

horgonyzódik a magmembrán belső lemezéhez. A mitózis korai szakaszában az MPF-foszforilált lamin B és C ledisszociál, a lamina felbomlik, a magmembrán (az ER-rel vitatott viszonyban lévő) veszikulákká dezintegrálódik. Ezen folyamatban a lamin-foszforiláció szerepét demonstrálja az előbbi oldalon lévő ábra, mely normál (bal oldali képek) és mutáns (nem foszforilálható; jobb) lamin A-t kifejező sejtek mitózisát hasonlítja össze. Látható, hogy amíg a normál és mutáns sejtmag jellegzetes mitotikus kromoszóma kondenzálódási és vándorlási folyamatai (utóbbiak az anafázisig) megtörténnek (ld. DNS festés), addig a mutáns sejtek laminája, anti - lamin A antitesttel vizsgálva, mindenkor éles kontúrú immunfluoreszcenciát mutat. Az MPF további targetjei lehetnek a mikrotubulus-asszociált fehérjék, valamint a szintén veszikulákra széteső ER és Golgi komponensei, ill. a kromatin magasabbrendű szerkezetét, hierarchikus bepakolódását meghatározó fehérjék, köztük a H1 (linker) hiszton, a nukleáris matrix ill. a kromoszóma scaffold (váz) fehérjei. A mitotikus milieu kromoszóma kondenzációra kifejtett hatása szépen demonstrálható azokban a kísérletekben, melyek során G1 vagy G2 állapotban lévő sejteket mitotikus sejtekkel fúzionáltatnak. Mint az ábrán látható, az interfázisos sejtek kromoszóma-anyaga is nagymértékű kondenzációt mutat a fúzió után.

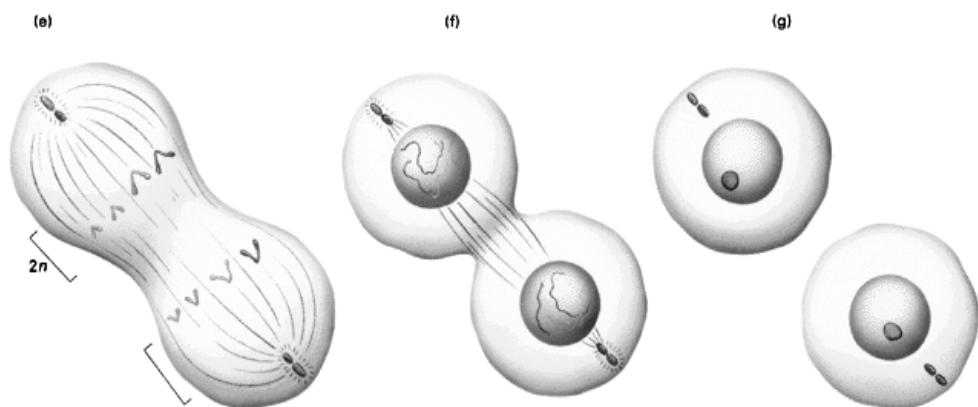


A mitózis késői szakaszában az MPF inaktivációjával együtt defoszforilációs és protein degradációs történések zajlanak. Utóbbiak pl. a következő ábrán demonstrált módon járulhatnak hozzá az anafázis történéseihez.



Az M fázisban zajló morfológiai történések: a mitózis (sejtmag osztódása) és citokinézis (a leánysejtek elkülönülésének) lépései az alábbi ábrán követhetők nyomon.

(a) Az interfázis G2 része elzi meg közvetlenül a sejtosztódás folyamatát. A kromoszómális DNS már megkettözött és megkötötte a kromatin fehérjekomponenseit, de a kromoszómák még nem ismerheték fel, a két ("sister-", nélkül-) kromatida még nem vált el egymástól. A magvacska az egyetlen fénymikroszkóppal



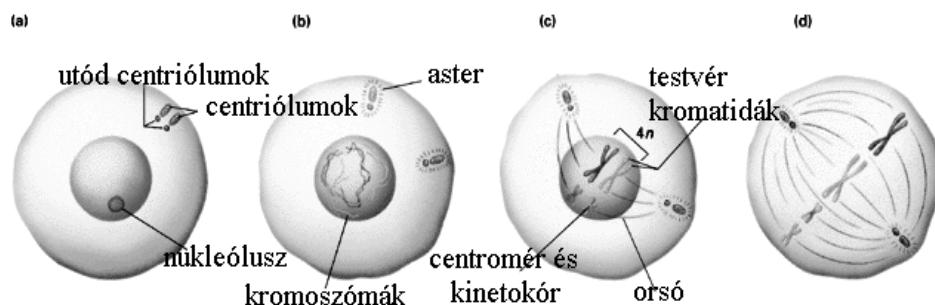
felismerhet különálló struktúra a magban.

(b) Korai profázisban a már osztódott centriolumok (centriolum párok) a sejt ellenkező pólusai felé kezdenek vándorolni. A kromoszómák mint hosszú fonalak törnek el. A magmembrán dezintegrálódik.

(c) Profázis középső és késői szakasza. A kromoszóma kondenzáció befejeződik, a centromérikus régiójuk által összekötött kromatidák megkülönböztethetőek. Mindkét kromatida egy-egy DNS fonala újonnan szintetizált DNS, a szemikonzervatív replikációs mechanizmusnak megfelelően. A pólusok felé vándorló centriolumok környezetében (az ún. pericentrioláris anyagból, mellyel együtt a centriolumok az ún. centroszómát, vagy mikrotubulus organizáló centrumot, MTOC) alkotják formálódni kezd az oszlási orsó mikrotubuláris rendszere. (A centriolumok, ezen

csövecskékből álló, egymással  $90^{\circ}$ -os szöget bezáró, elektronmikroszkóppal felismerhető szabályos szerkezetek szerepe nem világos, hiszen számos olyan sejtféleség van, melyek mitózisa nélkülik történik. A pericentriolaris anyagban béta-tubulint kötő gamma-tubulint és pericentrin nevű fehérjét azonosítottak; a béta és alfa tubulin alkotta heterodimerekből polimerizálódnak a mikrotubulusok.) Néhány orsó fonal pólustól-pólusig ér, legtöbbük a kromatidok kinetokórjaihoz csatlakozik (ld. kromoszóma szerkezetével kapcsolatos fejezet).

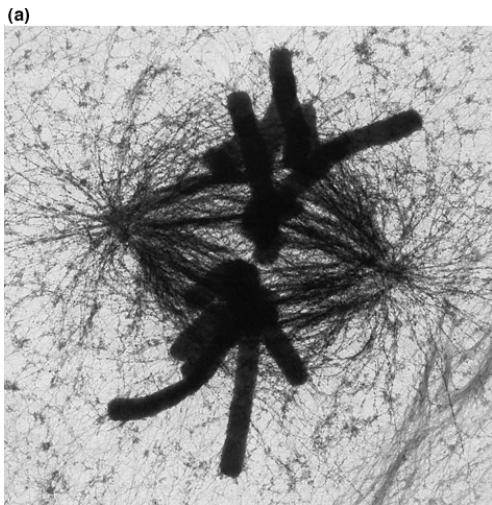
(d) Metafázis. A kromoszómák a sejt egyenlít je irányába mozognak, ahol elrendez dnek. A kromatidok még (centromérnek nevezett régiójuk által) összekapcsolt állapotban vannak. Ebben a fázisban szokás végezni a kromoszómák morfológiai analízisét.



(e) Anafázis. A kromatidok szétválva egymástól, az utódsejt kromoszómái elkülönülnek. Ezeket, centromérükhez kapcsolódva, az oszlási orsó az ellentétes pólus felé mozgatja. Eközben a sejt meghosszabbodik, az orsó pólusokat összeköt fonalaival egyetemben. A sejt közepén haránt barázda alakul ki, megkezd dik a citokinézis.

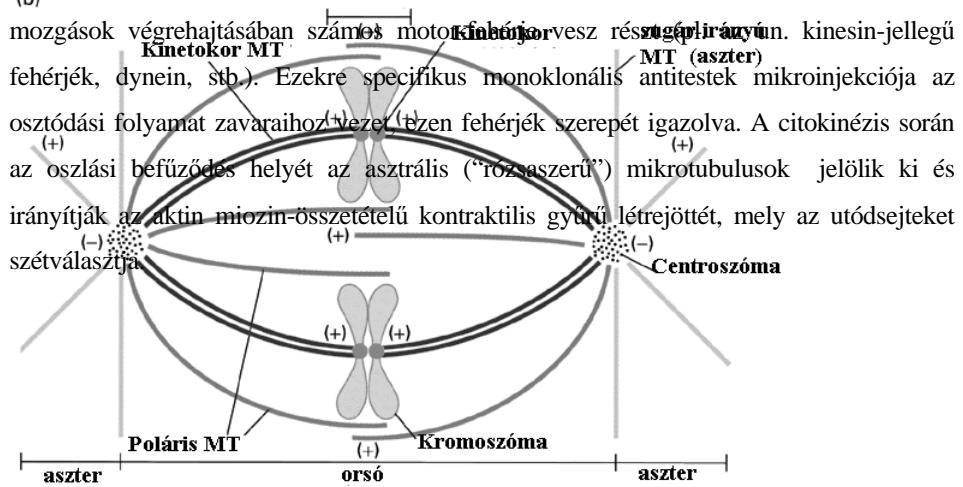
(f) Telofázis. Az újraalakuló magmembrán által körülhatároltan kialakulnak az utód magok, melyekben a kromoszómák dekondenzálódnak, elveszítik különálló jellegüket, a magvacska ismét láthatóvá válik. Az orsó a mikrotubulusok depolimerizálódásával elt nik, a citokinézis befejez dik.

(g) G1 interfázis. Hacsak a sejt G<sub>0</sub> fázisba nem lép, a G1-ben kapott ill. nem kapott utasításoknak megfelel en osztódásra elkötelezett sejt szintetikus folyamatai az S fázison keresztül ismét regenerálják a mitózis előtti G2 állapotot.

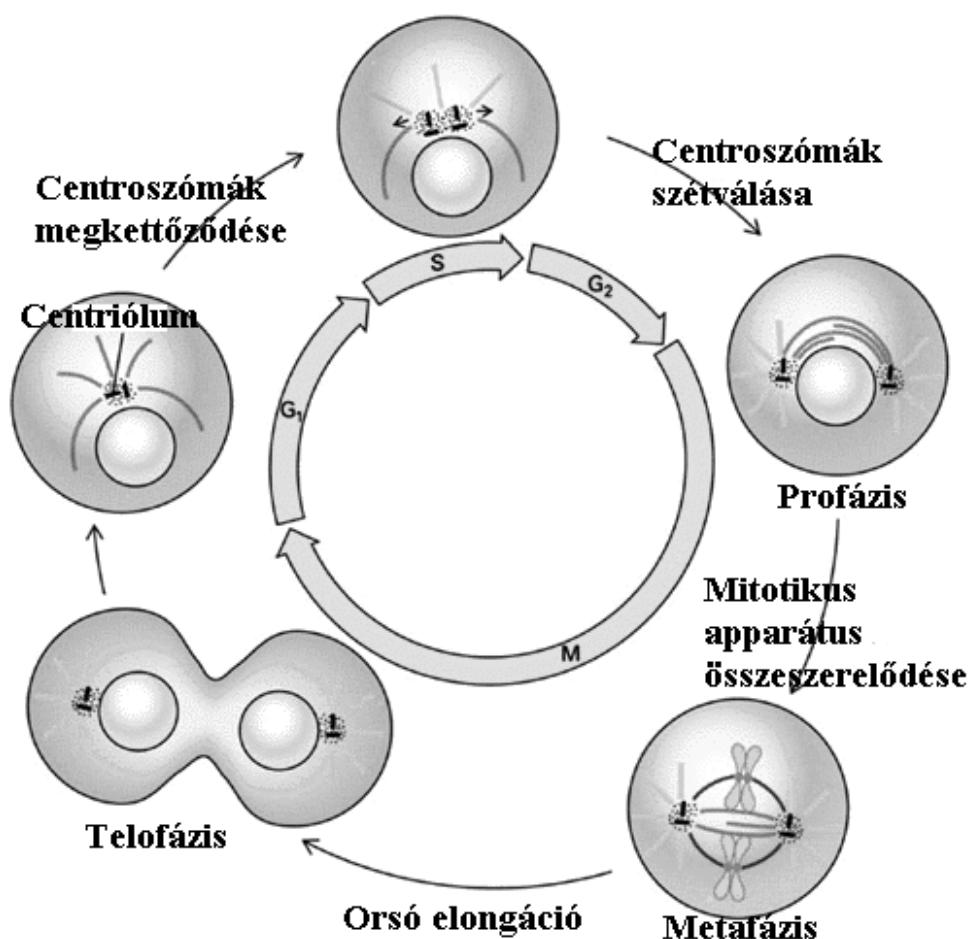


Az alábbi ábrákon az oszlási  
orsó elektronmikroszkópos képe és  
vázlatos szerkezete látható. A  
kromoszóma mozgások hátterében  
működő bonyolult mechanizmus számos  
részletét feltárták. A hosszú és  
folytonosan (de polarizált módon,  
"egyirányúan") polimerizálódó-  
depolimerizálódó hosszú interfázisos  
mikrotubulusok dezintegrálódása után

összeszerelődik a még sokkal gyorsabb dinamikájú oszlási orsó. Ennek mikrotubulusai mintegy "vakon" tapogatózva, növekedve-depolimerizálódva keresik meg a kinetokorokat, melyhez kapcsolódva ezek a mikrotubulus végek stabilizálódnak látszanak. Az itt leírt dinamikának szerepe van a későbbi lépésekben is, melyek során a kromoszómák a sejt egyenlítője mentén rendeződnek, majd szegregálódva a pólusok felé mozognak. A

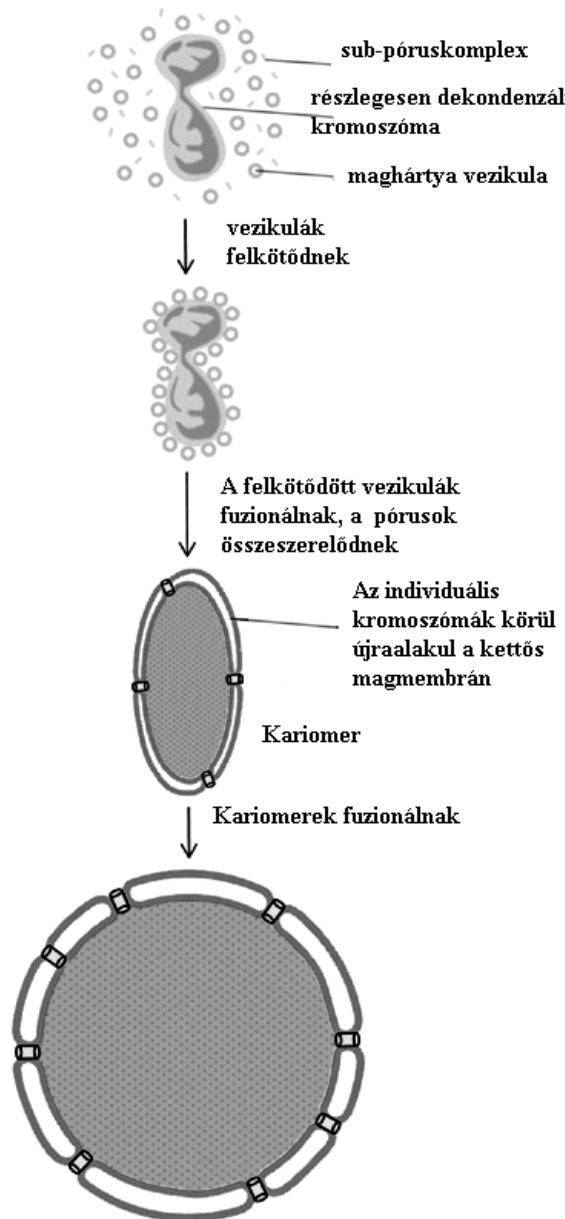


A mitotikus apparátus összesszerelődése a centriolum-ciklussal kapcsoltan zajlik. Mindegyik centriolum az S-G2 fázisok alatt fokozatosan növekvő utódot hoz létre – a saját DNS-sel rendelkező centriolumok osztódása valószínüleg szemikonzervatív mechanizmusú. A centroszómák megduplázódva a sejt ellentétes pólusaira vándorolnak.



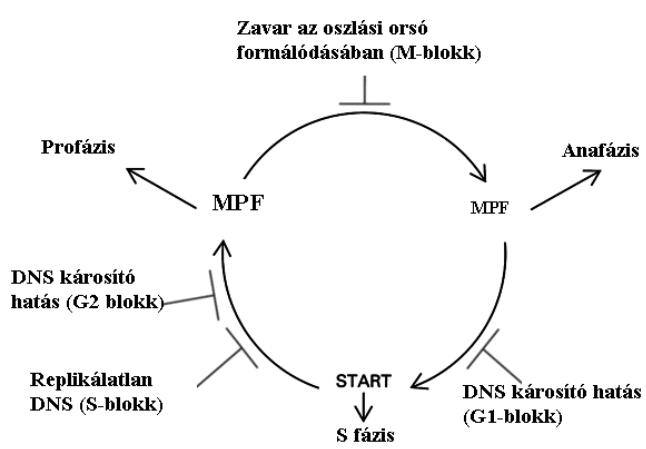
Maga a mitózis felfogható úgy, hogy a centroszómák osztódásuk után vándorolva "felcsípk" a kromoszómákat, kis szünetet tartanak metafázisban, majd folytatják utjukat a majdani leánysejtek irányában, együtt a kromoszómákkal. Majd ezeket elengedve, a citoplazmatikus mikrotubulus rendszer organizációját végzik.

A maghártya újraalakulásának fázisai az alábbi ábrán követhetők nyomon.

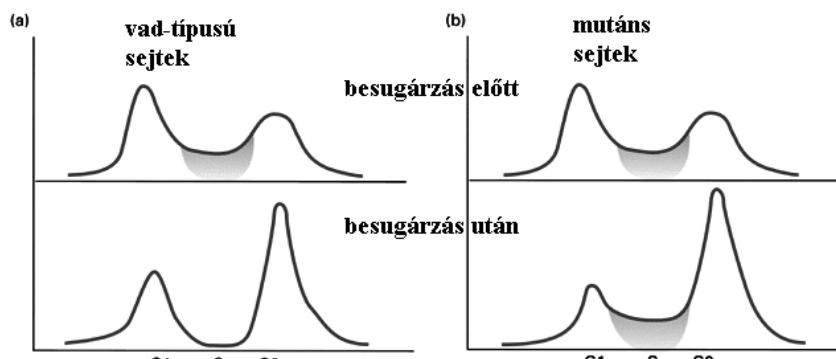


A sejtciklus szabályozásába több ellenőrzési pont (un. check-point kontroll) van beiktatva. Ezek funkciója a bonyolult DNSreplikációs és mitotikus folyamatok tökéletes

végbemenetelének ellenőrzése, és ezek hiányában a sejtosztódás leállítása, lehetővé téve a hibák kijavítását specifikus javító (repair) mechanizmusok által. Pl. a DNS ionizáló sugárzás hatására

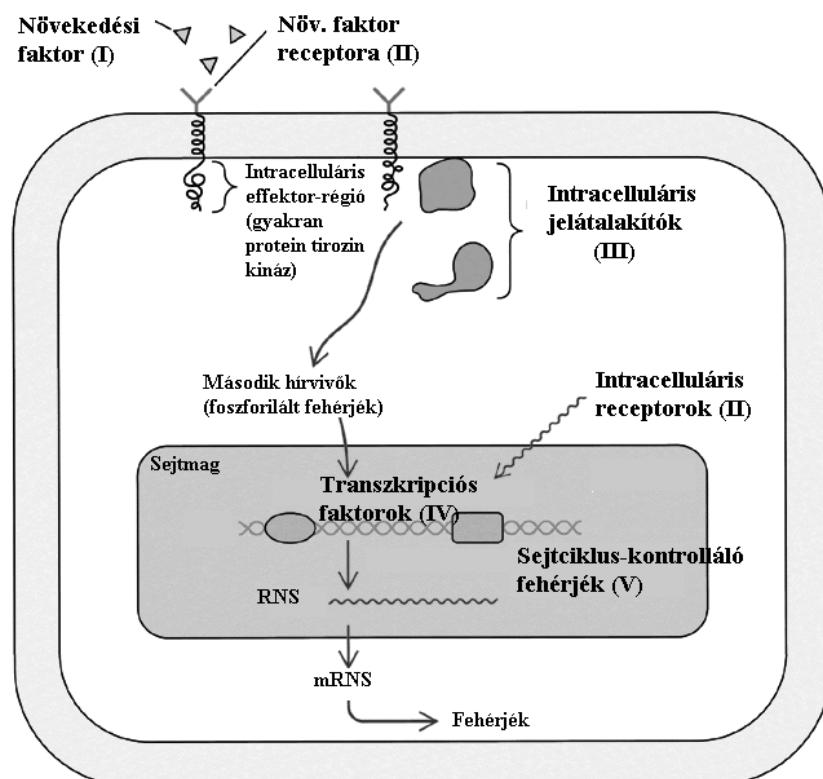


történő fragmentációja (szabad végek keletkezése) G1 blokkot vált ki. Az ábra vázlatosan ezen folyamatokat foglalja össze. A szabályozásban szerepet játszó egyes fehérjék már ismertek. Ezek egyike a p53 (az azonos nevű tumor szupresszor gén terméke), melynek

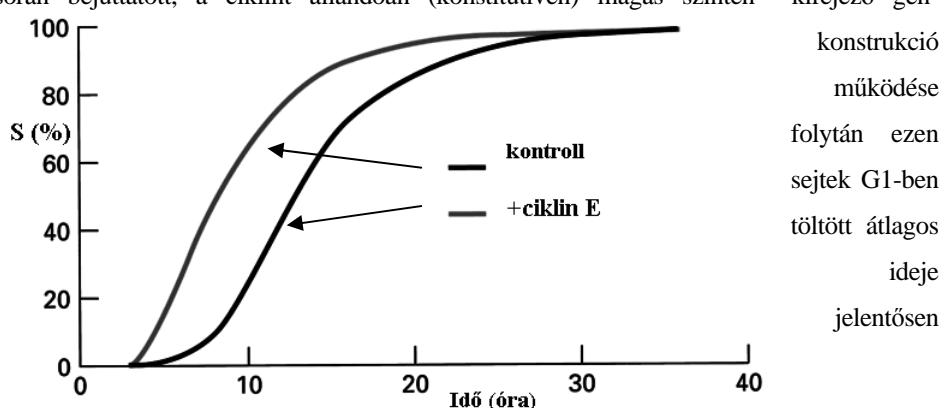


mutációja a G1 ellenőrzést hiusítja meg. Ennek következményeit demonstrálja az ábra. Bal oldalon 8 órával gamma-irradiációt követően felvett DNS eloszlási hisztogramm látható, normál p53-at kifejező (vad típusú) ill. jobb oldalon, mutáns p53-at kifejező sejtek esetében. Az S fázis kiürülése a normál sejtek esetében azt jelzi, hogy a besugárzáskor még G1-ben lévő sejteket az ellenőrzési mechanizmus nem engedte át S-be. A mutáns p53 esetében ez a kontroll láthatóan nem működött.

Az alábbi ábra a sejt növekedésének és sejtciklusba lépésének szabályozási szintjeit



demonstrálja. A római számmal jelzett szinteken bekövetkező tartós változások a szabályozás teljes felborulásához, a sejt rákos transzformációjához vezethetnek. Az alábbi ábra a ciklin E szerepét demonstrálja a sejtciklus szabályozásában: transzfektions kísérlet során bejuttatott, a ciklint állandóan (konstitutiven) magas szinten kifejező gén-



meghosszabbodik.



## A sejt lehetséges terminális állapotai

(Terminális differenciáció, állandósult proliferáció, sejt öregedés, sejthalál)

A sejtek (ill. osztódásuk esetén: utódaik) lehetséges sorsa: (1) osztódás, (2) osztódási folyamatok befejezése és specializálódás egy (összetett) funkcióra (differenciáció, ill. hangsúlyozandó ennek irreverzibilis voltát: "terminális" differenciáció) és (3) elhalás, mely gyakran a sejt közreműködésével zajlik (ld. programozott sejthalál ill. apoptózis különböző módozatai, Biokémia tanulmányok során).

*In vivo* a sejtek osztódása során azonos vagy nemiképpen különböző utódsejtek jöhettek létre. Az egyik utódsejt újból osztódhat, regenerálva az osztódásban lévő sejthalmazt (sejtkompartementet), a másik utódsejt új tulajdonságokat (fenotipust) mutathat, mely a következő osztódás során már mindenkor utódsejtben propagálódhat és az egész sejtklonra jellemző lesz. Az adott szövetre jellemző, teljesen differenciált sejtek már nem osztódnak, az osztódási ciklust elhagyva nyugvó, a sejtciklus fázisainak terminológiája szerint un.  $G_0$  állapotba (angolul: quiescence) mennek át. A fejlődési folyamatban az utódsejtek egyik lehetséges sorsa a (programozott, a sejt önmegsemmisítő mechanizmusait aktívan igénybe vevő) elhalás - különösen gyakori ez az ontogenetikai során. A lehetséges osztódások száma véges - a sejtek "számolják" osztódásaiat, osztódásról-osztódásra öregszenek. Utóbbi mechanizmusok sérülése kapcsán a sejt immortalizálódhat, melynek során a sejtciklus szabályozás egyéb kontrolljai még működnek (ezen lépés *in vivo* analógja jóindulatú daganatként ismerhető fel), ill. további genetikai (a DNS bázissorendjének megváltozását jelentő) és epigenetikai, a génkifejeződésben bekövetkező tartós változások nyomán a szabályozások alól teljesen kikerül (rosszindulatú daganat). Mint a sejtciklus szabályozása kapcsán írtuk, a protoonkogének konstitutív kifejeződése, vagy az antionkogének (szupresszor gének) szintjén mutatkozó defektus egyaránt a sejtciklus szabályozásának olyan felborulásához vezethet, mely kontrollál(hat)atlan sejtproliferációt okozhat. *In vitro* a sejtek lehetséges állapotai hasonló repertoárt mutatnak. A sejtek sorsának lehetséges különböző kimenetelei egy (már a megértés

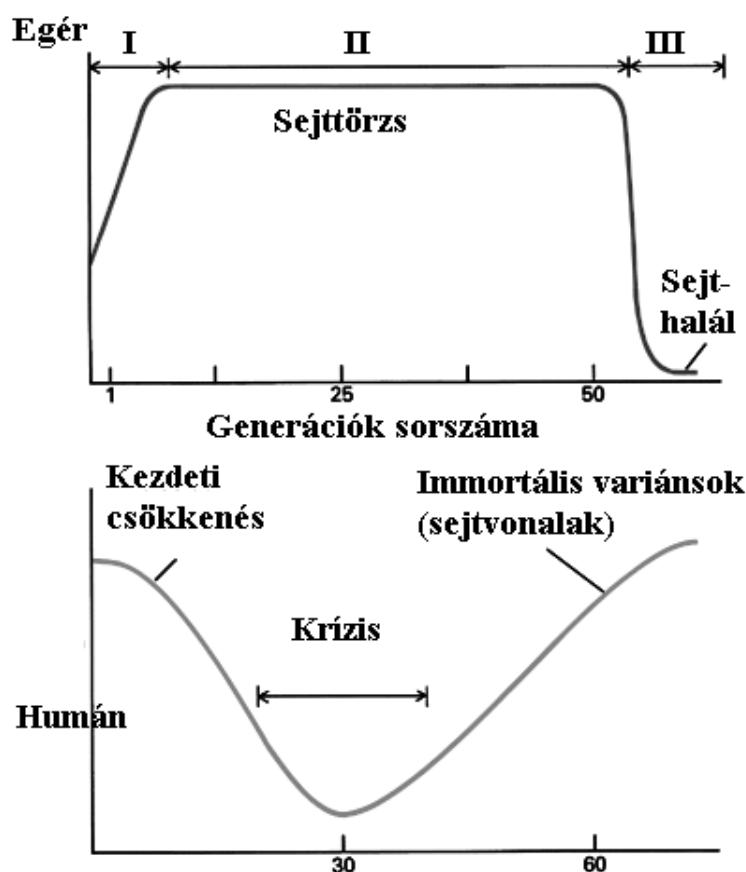
mai, részleges szintjén is) igen bonyolultnak tűnő szabályozási rendszer működésétől függnek.

Emlős sejtek in vitro: sejtörzsek, sejtvonalak. A sejtbiológia fejlődéstörténetének egyik meghatározó lépéseként a század első felében (30-40 év alatt) kialakult az in vitro szövettényészletek, majd (egyetlen sejtből kiinduló) sejttenyészletek létrehozásának, folyamatos fenntartásának metodikai kulturája. (A legfontosabb mozzanatok összefoglalását ld. a Sejtbiológia gyakorlati jegyzetben.) Sejtbiológiai ismereteink jelentős része ezen mesterséges körülmények között fenntartott kulturák megfigyeléséből, ezeken folytatott kísérletekből származik.

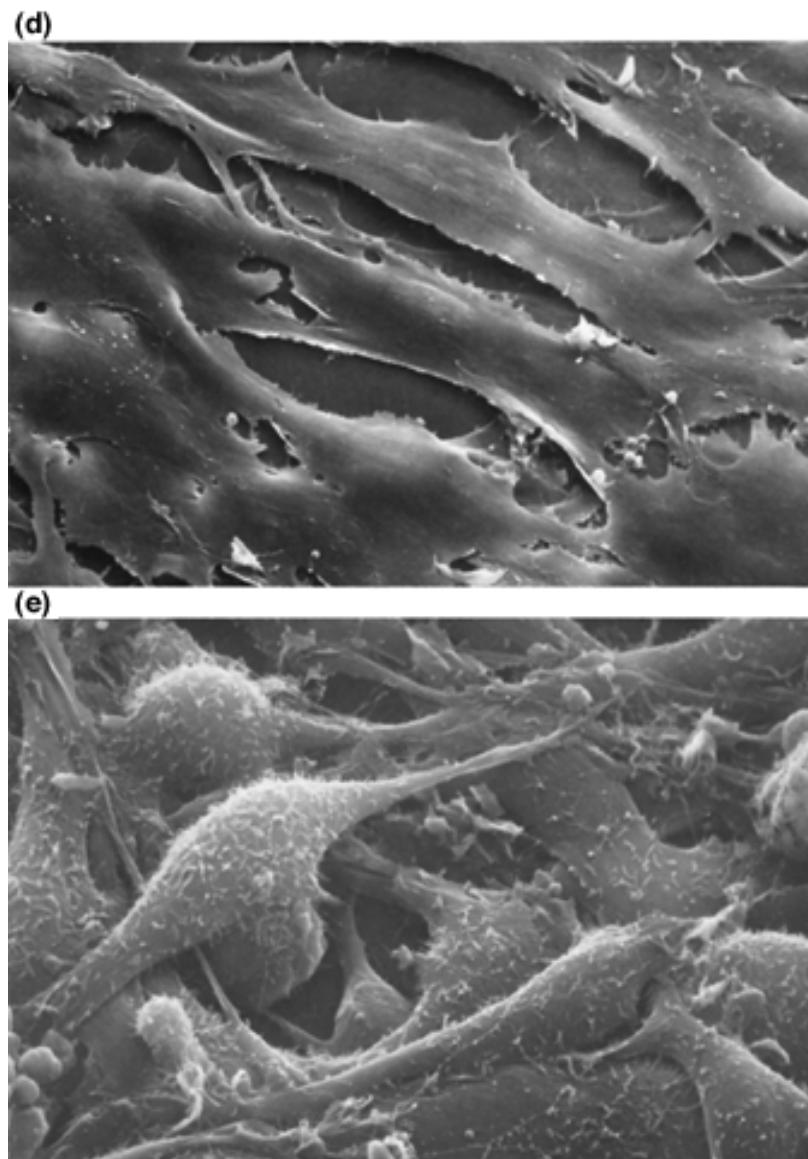
A folyamatosan passzálható, stabil sejtvonalak többsége rákos szövet eredetű (pl. a HeLa emberi cervikális karcinóma eredetű sejtvonal sejtjei a világ sok-sok laboratóriumban 1952 óta nőnek). A normál eredetűek mutációkat, kromoszóma abnormalitásokat akkumuláltak és ezáltal in vitro is propagálhatóvá váltak az (in vitro) tenyésztsi körülmények hatására.

Normál (nem rákos eredetű) *emberi* sejtek osztódási aktivitása, nem teljesen tisztázott okokból kb. 50 osztódási ciklust követően megszűnik, majd a kulturák (melyeket sejtörzseknek hívnak, a folyamatos kulturáktól való megkülönböztetésük okán) előbb-utóbb kipusztulnak. (Az osztódások megszünte a tenyésztsi körülményektől nem befolyásolható - a sejtek nem-osztódó állapotban való túlélési ideje igen, utóbbi akár egy-két év is lehet.) Ez az un. "Hayflick limit"-ként emlegetett jelenség, a normál emberi sejtek in vitro mutatott proliferációs aktivitásának határa, a teljes szervezet öregedésének egy *lehetséges* in vitro megfelelője. (A kulturák osztódási képességének megszűnésével járó "kiöregedése" (angolul: replicative senescence) az in vitro bekövetkező sejtosztódások számával és nem a kulturában eltöltött idő tartamával van összefüggésben. A sejttenyészeti kiöregedési időpontja korrelálni látszik a származási faj várható élettartamával és a származási egyed korával és a korai öregedéssel járó genetikai rendellenességek esetén rövidebb az átlagosnál. Az in vitro észlelt "limit" (határ) számszerűségében nem tekinthető az in vivo bekövetkező osztódás-szám hű tükrének, csak egy azzal összefüggő paraméternek.)

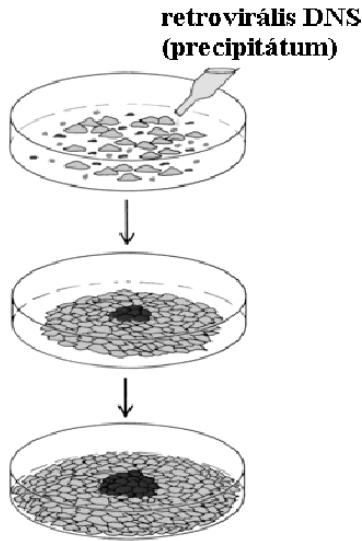
A rágcsálóból származó *normál* sejtek közül gyakran szelektálódnak ki olyan sejtek, melyek túlélik az in vitro "szokatás" (feltehetően mutációk megjelenésével, genetikai vagy epigenetikai diverzifikációval is járó) fázisát. (Normál emberi sejtek esetén az immortalizációt a tenyésztek mutagén kezelésével lehet elérni - de a rágcsálók spontán bekövetkező immortalizációjánál kisebb arányban). Az ábrán az emlős sejtek ezen kétféle (az emberi ill. a rágcsáló eredetű sejtek által reprezentált) in vitro viselkedése - a sejtek szaporodási üteme a tenyészet elindításától, a generációs szám függvényében - követhető nyomon. A rágcsáló sejtek esetén az immortalizált



vonalak megjelenése a sejtek nagy százalékának kipusztulását követi (ez az un. *krízis*). A rágcsáló és emberi eredetű sejtek viselkedése közötti szembeötlő különbség oka (okai) nem ismeretesek - azt gyanítják, hogy a telomer-hossz szabályozási különbségei vannak hátterében (ld. még az alábbiakban).



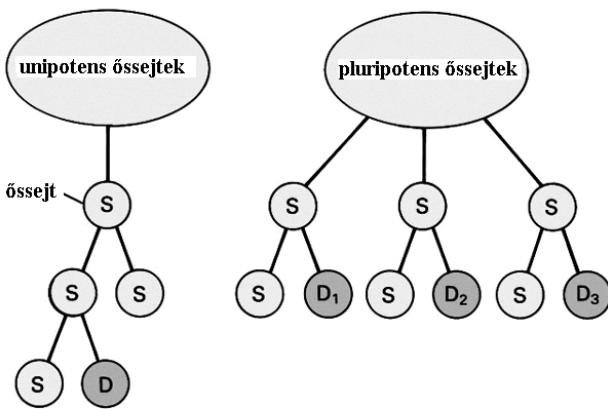
A folyamatosan növő sejtvonalak normál vagy rákos *eredete* némi képpen tükröződik in vitro viselkedéstük bizonyos vonásaiban: a normál eredetű sejtek motilitása és osztódási aktivitása (letapadós kulturák esetén) megszűnik, amint a sejtek a konfluens kultúrában egymáshoz érnek: ez az un. *kontakt gátlás* jelensége. Rákos eredetű sejtek osztódása, mozgása nem áll le kontaktus esetén, a sejtek egymásra nőnek, dezorganizált benyomást keltve (az ábrán normál (felső ábrarész) és egy retrovirussal transzformált (alsó) rágcsáló fibroblaszt kultura párosztázó elektronmikroszkópos képe



látható). Daganatkeltő virusok (vagy a belőlük származó, transzfektált DNS, ld. következő ábra) a normál eredetű tenyésztekben egymásra növő sejtek halmazait ("fókuszok", angolul: focus, tsz. foci) indukálják. A motilitás ill. az osztódás kontakt gátlásával kapcsolatos eltérés mellett a harmadik gyakori in vitro különbség a normál és rákos eretű sejtvonalak viselkedése között az "anchorage dependence", a tenyésztőedény felületére való *letapadástól való függés*: a rákos sejtek általában félfolyékony (gélszerű, un. semisolid) tenyésztfolyadékban, letapadás nélkül is szaporodnak, a normál eredetűek általában - pl. a megfelelő növekedési faktorok jelenlétében tenyésztek normál vérképző őssejtek kivételével - erre nem képesek. A kitapadásban szerepet játszanak membránon keresztsüli szignalizációt is közvetítő membrán fehérjék (integrinok) és extracelluláris matrix elemek (pl. a fibronectin).

#### **Terminális differenciáció.**

A sejt differenciáció - emberben a limloid sejtek esetét kivéve, amely sejtvonulatban (sejt-*"lineage"*) génátrendezősek is történnek a differenciálódás folyamán - a fenotípus szintjén zajlik és különböző tulajdonságok kombinációját, különböző fehérje repertoárak kifejeződését jelenti. (Analóg módon, azonos genetikai állomány áll alternatív sorsok háttérében a bakteriofágok litikus és lizogén életciklusa esetében, ld. virus-sejt interakciókkal foglalkozó anyagrész, ill. Genetika, Molekuláris biológia.) Ennek megfelelően, egy differenciált testi sejt magja tartalmazza az összes információt, amely egy teljes egyed létrehozásához szükséges (Gurdon klasszikus, többféle emlős esetén is nemrég reprodukált – ld. Dolly - sejtmag transzplantációs kísérletei szerint, ld. Genetika). Egy tipikus emlős sejtből a fenotípust az adott sejtféleségben kifejeződő kb.



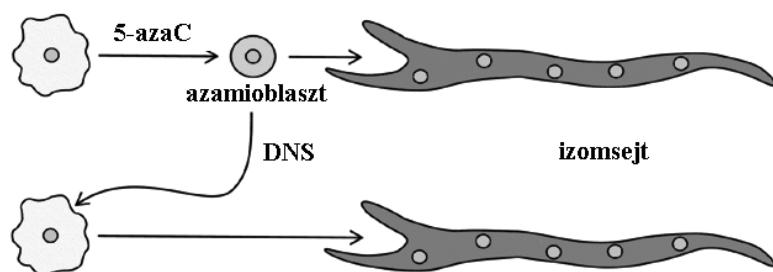
tízezer fehérje határozza meg. Differenciációt eredményezhet sejt-sejt szignalizáció, differenciális környezeti hatások ill. genetikai szabályozó anyagok egyenlőtlen eloszlása az utódsejtekben (aszimmetrikus sejtosztódás). A folyamatban egy

adott sejtvonulatot vagy többféle sejtvonulatot is produkáló (unipotens módon elkötelezett ill. pluripotens, ld. ábra) őssejt aszimmetrikus módon és korlátlanul (az egyed élettartamán belül) osztódik, egyrészt létrehozva egy önmagával azonos őssejtet, másrészről egy tőle különbözőt. Utóbbi további osztódások során megy keresztül. Az ezt követő osztódási lépések a klón expanziójával járnak, miközben a fehérjék kifejeződési mintázata sejtgenerációról-sejtgenerációra továbbadódnak. Utóbbi pl. megvalósulhat olyan módon, hogy egy adott szabályozó fehérje (mely egy sor más fehérje kifejeződését kontrollálja) saját kifejeződését is serkenti (pozitív feedback-et eredményező molekuláris mechanizmusok révén), s így az osztódás során utódsejtekbe jutó szabályozó fehérje ismét beindítja saját szintézisét. A fehérjék szintjét befolyásoló számos szabályozási szint (pl. mRNS degradáció, fehérje-degradáció, szortirozódás, stb.) közül elsődlegesnek az átfirás szabályozása tűnik. Nem szükséges azonban ugyanannyi szabályozó fehérje, ahány különböző gén van, ti. a szabályozó fehérjék együttesei, azok meghatározott kombinációi biztosítják a génkifejeződést – vagyis kisebb számú ilyen fehérje is sokféle kombinációban vehet részt. Az egyes szabályozó fehérjék csak megfelelő sejtekben hatásosak, hiszen az együttes akkor kezd működni, mikor az utolsó szükséges tagja is „megérkezik”. A „felkészült” állapot azáltal öröklődhet, hogy a sejtosztódás során új DNS-szálra került ill. a régin maradt vagy arra visszakerült komponensekhez kooperatív módon (a már felkötődöttek elősegítik a következők kapcsolódását) csatlakozó újakkal reprodukálódnak ezen fehérje együttesek. Végül terminálisan differenciált, további osztódásra nem képes, a

sejtvonulat utolsó tagjára, vagyis a differenciált sejtfajtára jellemző tulajdonságokat mutató sejtek jönnek létre. Pl. a bőr hámsejtjeinek bazális sejtjeiből kiindulva egy kb. 1 mm<sup>2</sup>-es területnek megfelelő szövethengerben az összes sejt egy őssejtből származik. Az osztódások során a sejtek oldal, majd vertikális irányban eltolódnak, miközben differenciált tulajdonságai megjelennek. Az első aszimmetrikus sejtosztódás helyett, ha fokozott őssejt-termelésre van szükség, megfelelő jelre az őssejtek szimmetrikusan osztódnak és pusztán saját számukat növelik osztódásaik által. (Meiosisra is az aszimmetrikus osztódás jellemző, a szükséges tápanyagmennyiség felhalmozása miatt, ld. ott.)

*In vitro* differenciációról akkor beszélünk, ha egy folyamatosan növekvő (osztódó sejteket tartalmazó) sejtkultura (sejtvonal) valamilyen kezelés eredményeként egy szövetfélésre jellemző differenciációs sajátságokat kezdi mutatni, miközben - a kezelés kezdetétől számított egy-két generációs időn belül - a sejtek G<sub>0</sub> fázisba kerülnek. Mivel ebből az állapotból a proliferatív állapotba általában (és a folyamat egy fázisán túl) nem tapasztalunk visszatérést, sőt a folyamat végül a sejtek (valószínűleg) un. apoptotikus elhalásába torkollik, ezt a folyamatot *terminális differenciáció*nak is szoktuk nevezni. Az alábbi példák nemelyike a leukémiák differenciáció-indukción alapuló terápiájának lehetőségét veti fel (az alábbi in vitro jelenségek egyben egy ilyen klinikai kutatási irányt is körvonalaznak):

**A. Izomsejt differenciáció.** Fibroblaszt tenyészleteknek a genom általános demetilációját és ezáltal kiterjedt géneexpresszió változást okozó 5-azadeoxycitidin kezelése nyomán megváltozott átmeneti kultura (az un.



"azamioblastok"-é) jön létre, melyből spontán, kis (de biológiaileg jelentős) százalékban izomsejtek differenciálódnak (ld. ábra). Utóbbi folyamat gyakorisága jelentősen növelhető pl. szérum megvonással, melynek a sejtek

G<sub>o</sub>/G1-ben történő akkumulációja a következménye. A folyamat során jelentős szerepet játszik a *MyoD* transzkripció faktor, mely egy, a genomban (pusztán statisztikailag is) elég gyakran előforduló konszenzus szekvenciát ismer fel. Ez a felismerés egy másik transzkripció faktorral való heterodimerizáció során válik izomsejt-specifikussá. Utóbbi lépést egy inhibitor, mely minden faktorral képes heterodimért képezni, kompetitív gátolja. A differenciáció indukciója során az inhibitor koncentrációja leesik, így aktív heterodimér formálódik a MyoD részvételével, izom-specifikus gének (pl. izom kreatin kináz) átírását elindítva. (Fenti séma kissé egyszerűsített, ti. további izomsejt-specifikus transzkripció faktorok érintettek a differenciálódási folyamatban, in vitro és in vivo egyaránt). A szabályozás redundanciáját ill. komplexitását jelzi, hogy ezen faktorok nemelyike egymás funkciót átveheti, így az egyes gének hiányának nem észlelhető következménye az un. gén knock-out kísérletekben (ld. Molekuláris biológia és Genetika). A differenciált izomsejt szérum visszaadásra újra nem lép be a sejtciklusba - ha csak transzfekció vagy virális fertőzés révén az Rb szupresszor fehérjét nem inaktiválja egy vele komplexáló fehérje (ld. az SV40 virus "T" antigéne)).

**B.** Myelomonocita sejtvonalakban indukálható differenciáció: ezen sejtvonalak állandóan proliferáló állapotukból különböző kezelésekkel kizökkenhetők. Differenciáció indukálható sokféle membránra ható szerves oldószerrel, azok szubtoxikus koncentrációját alkalmazva. A HL60 sejtvonal pl. 1-2 % DMSO jelenlétében (feltehetően a membrán perturbáció által kiváltott valamilyen jelátviteli folyamat eredményeként) granulocita irányban, a tumor promoter phorbol eszter (DAG analóg vegyület, ld. jelátvitellel foglalkozó fejezet) igen kis koncentrációjának jelenlétében monocita irányban differenciálódik. Morfológiai jegyek (pl. a mag - az un. polimorf magvú granulocitákra jellemző - lebenyezettsége), komplex funkciók, pl. fagocitózisra való készség jelennie meg a differenciáció során.

**C.** Egyes eritroleukémia sejtek egyszerű DMSO kezelés hatására benzidinpozitívvé válnak (hemoglobin szintézis!), eritroid irányú differenciációuk jeleként. (Az eritroid differenciáció *in vivo* több lépésben zajlik, a pluripotens

őssejtből kiindulva. Az első lépések során a pluripotens őssejt egy receptor tirozin kináza (a *kit* gén hasonnevű fehérje terméke) és az őssejet körülvevő un. stróma sejtjein kifejeződő ligand kölcsönhatása lényeges. Az utolsó lépésben résztvevő eritroid progenitor sejtekben az eritropoietin nevű, vesében szintetizált hormon membrán receptorához kötődve, azt dimerizálva indítja el azt a jelátviteli kaszkádot, mely a terminális differenciációt kiváltja. Ezen szabályozások - mai elképzeléseink szerint - nem determinisztikusan, hanem valószínűségi jelleggel befolyásolják a sejtek sorsát.)

**D.** Embrionális karcinoma sejtekből származó egyes sejtvonalak reténsav kezelés hatására neuronális irányban differenciálódnak.

Sejtdifferenciáció és szöveti regeneráció. A törzsfejlődés során a szöveti regenerációra való készség nyílvánvaló szellemi előnyöket hordoz. A probléma biológiai megoldásai a teljes elvesztett testrészek komplett regenerációjától (a törzsfejlődés alacsonyabb lépcsőfokain) a magasabbrendűek sokkal korlátozottabb, az eredeti szöveti viszonyokat kevésbé respektáló regenerációjáig terjed. Az előbbi organizmusok regenerációs folyamataikhoz részben embrionális fejlődésük mechanizmusait alkalmazzák. Ennek során a sebzés határán lévő sejtek *dedifferenciálódnak*, belépnek a sejtciklusba és létrehozzák a pozíciójukhoz képest disztalis szöveteket - származási helyüknek megfelelően (transzplantációs kísérletek szerint). Emlősök szöveti regenerációs készsége részben a szöveti sajátságoktól függ. A máj komplex szöveti szerkezete dacára pl. jelentős regenerációs hajlamot mutat (ld. Prometheus legenda). A regenerációban az összes májsejt féleség (hepatocita, Kupffer sejt, stb.) proliferációja kimutatható és az eredeti máj-méret eléréséig tart. A folyamatot szabályozó (elindító ill. megállító) számos növekedési faktort azonosítottak - összjátékuk pontos feltárása még nem történt meg.

## **Állandósult proliferáció.**

A sejtciklus szabályozás azon zavarai, melyek rákos transzformációhoz vezetnek, mindig ezen szabályozás valamilyen DNS-szintű megváltozására (mutáció, transzlokáció, virus-genom inszerció) vezethetők vissza. Egyes, már részleteiben feltárt esetekben (retinoblasztóma, ld. Genetika) a rákos folyamat kötelezően, invariabilis módon bekövetkezik *egyetlen* gén minden két alléljének megváltozásakor. Általában a karcinogenezis *multistep* (többlépéses) folyamat.

A sejtciklust szabályozó "pozitív", osztódási aktivitással korreltan működő gének a protoonkogének, melyek (mutáció, szerencsétlen génátrendeződés vagy virális szekvenciák inszerciója miatt keletkező) állandóan aktív, szabályozhatatlanná vált változatai az onkogének. A ciklus szabályozásban ellenőrző, az osztódási folyamatokat felfüggeszteni vagy teljesen leállítani képes (un. checkpoint-kontroll) mechanizmusok az un. (onko)szupresszor gének (vagy antionkogének) működéséhez kötött.

Ezek az ellentétes ("onko- ill. antionko-génikus") funkciók nem elsősorban egy-egy géntermék attributumai, hanem egy komplex szabályozás eredményei, melyekben az adott gén *is* szerepet játszik. Ez a gén, más konstellációban ellentétes folyamat résztvevőjeként *is* megmutatható: pl. a *myc* onkogén (proliferációs állapotnak kedvező) szerepe kimutatható a proliferációban, ugyanakkor a sejthalálhoz vezető celluláris folyamatoknak is szereplője. Hasonlóan, a *ras* protoonkogén, mely szignáltranszdukciós folyamatok egyik membrán-közeli résztervője, proliferáció gátlásban is részt vehet bizonyos sejtállapotokban. Ez az aspektus érthető, hiszen a sejtsorsok végső soron egymást kizáró alternatívák, így egyik folyamat beindítása feltételezi a másik gátlását, leállítását: vagyis némelyik komponens involválódhat több folyamatban is. Elnevezésük, onkogén vagy szupresszor kategóriába való sorolásuk a kifejezősíkhöz kapcsolódóan leggyakrabban észlelt funkciótól függ.

A különböző sejtsorsok szabályozásai sajátságosan összefonódhatnak. A *bcl-2* protoonkogén kifejeződése a sejthalálhoz vezető folyamatokban gátló tényező. Ugyanakkor, a sejthalál valószínűségének csökkenésével a *bcl-2* állandósult kifejeződése mellett konstitutív (szabályozhatatlan és magas) *myc* expresszió hamarabb vezet rákos sejtburjánzáshoz, mint önmagában.

A rákos transzformációban oki szerepet játszó fehérjék zöme a jelátviteli utak valamelyik lépését katalizáló ill. szabályozó géntermék. Néhány konkrét, rákos transzformációban érintett gén és az általa kódolt normális fehérje:

A. (Proto)onkogének:

sis - PDGF, ras - valamelyik G protein, erb - EGFR, jun - AP-1 transzkripció aktivátor fehérje.

B. Antionkogének (szupresszor gének):

Rb - retinoblasztoma protein, p53 gén - p53 fehérje

A protoonkogének konstitutív (állandósult, szabályozatlan) kifejeződéséhez gyakran az vezet, hogy egy protoonkogén szabálytalan génátrendeződés során (ld. Genetika) az adott szövetre jellemző, ott kifejeződő gént szabályozó régiók kontrollja alá kerül. (Pl. egyes limfómák esetében a myc protoonkogén az immunoglobulin régióba transzlokálódik.) Miért éppen a myc protoonkogén a gyakori alanya ennek az átrendeződésnek? Vajon a szövetre jellemző génkifejeződési minta választja ki sok-sok protoonkogén (vagyis sejtciklust, jelátvitelt szabályozó gén) közül éppen a myc-et, vagy a génátrendeződés egy korai (őssejt) stádiumban történik és a sejt a továbbiakban abba az irányba differenciálódik, amelyre a protoonkogén transzlokációs partnere predesztinálja? A kérdés vagylagos feltevése kissé félrevezető: minden két irányú kölcsönhatás valószínű. A sejtfajtára jellemző intracelluláris milieu befolyásolhatja, hogy milyen génátrendeződések valószínűek, mely átrendeződések géntermékei fejeződhettek ki ill. melyek élhetők tul. Az is valószínű, hogy az aberráns géntermék és az általa befolyásolt további szabályozó gének fehérje termékei a differenciálódási folyamatot befolyásolhatják.

Amikor a változások a checkpoint (kontroll-pont) ellenőrzési rendszer zavarait is magában foglalják, ezzel növelik az érintett sejtek genetikai variabilitását, lehetővé téve a klonális evolúciót a daganatban. (A szelekció tényezőihez pl. a kemoterápia is jelentősen hozzájárul, lásd a multidrog rezisztencia jelenségét a gyakorlati jegyzetben.)

A rákos, daganatos elfajulás sejtproliferációval való összefüggésének ténye nyílvánvalónak tűnik, ez az összefüggés mégsem egyszerű. Ezekben a sejtekben a ciklus nem "pörög" gyorsabban, mint számos normális, osztódó szövetünk sejtjeiben (a közhiedelemmel ellentétben). Inkább arról van szó, hogy a megváltozott sejtekben a

ciklust leállító mechanizmusok nem tartanak lépést a ciklust működtető, ellentétes folyamatokkal, így a sejtciklus nem áll le. A sejtelhalási folyamatok zavara és differenciáció-blokk is szerepet játszhatnak a daganatos elváltozások kialakulásában.

### **Sejtöregedés, sejthalál v. immortalitás**

A sejtöregedés állapotát elkerülő, vagy abból regenerálódó (?) sejtvonalak örök életűek - immortálisak - rágcsáló eredetű sejtek esetén feltehetően egy gén mutációja elég ehhez. Ez a mutáció érinthet egy onkogént, vagy egy szupresszor gént. Ugyanezt az immortalizáló hatást egyes virális fehérjék jelenléte (pl. SV40 "T" antigénje) is előidézheti. Az immortalizációhoz szükséges mutációk száma emberi eredetű sejtek esetén sokkal több lehet, mint rágcsálókból származó sejtek esetén (ld. még a fentebb leírtakat). Emberi sejtek esetén egy-egy (rágcsáló sejtekben domináns) immortalizáló gén bevitele (vagy pl. emberi antitest-termelő un. B sejtek in vitro Epstein-Barr virus fertőzése) csak a sejttörzs várható in vitro élettartamát növeli meg 20-30 extra osztódás erejéig. Ekkor következik be a *krízis*, a kultura kipusztulása - és az igen ritka ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  gyakoriságú) immortális sejtklonok megjelenése. (A kromoszóma végek minden DNS replikációval bekövetkező rövidülésnek – ld. alább - kritikus fázisa összefügg *het* az ilyen emberi kulturában észlelhető krízis állapotával, és az immortalizáció a kromoszóma aberrációkkal, melyeket a telomer-rövidülés előidéz.)

A sejtöregedés ill. immortalizáció hátterében álló mechanizmusok. Amikor un. heterokaryont hoznak létre oly módon, hogy az öregedő sejt magja és egy immortális tumor sejtvonal sejtmagja közös citoplazmában található, a halál diadalmaskodik az öröklét felett. (A hatást az öregedő sejt mRNS-ének mikroinjekciójával is létre lehet hozni.) A sejtek öregedési képessége valamilyen pozitív szelekciós nyomás hatására rögzülhetett. (Az evolúciót lehetővé tevő genetikai változékonyság csak véges élettartam esetében juthat szerephez, de felvetődött a sejtöregedés, mint evoluciós termék lehetséges szerepe a tumor szupresszor mechanizmusok sorában is.)

A jelenség hátterében álló egyik fontos molekuláris mechanizmus: a DNS replikáció biokémiai sajátságai (ld. ott) olyanok, hogy a kromoszómák végei (telomerek) minden osztódást követően rövidülnek, és egy kritikus határt elérve a

további osztódások gátlása következik be - ma még nem tudni, hogyan. Egy ezt a rövidülést enzimatikusan kompenzáló mechanizmus is ismeretes, mely egyes sejtféleségekben (pl. a vérképző őssejtekben vagy az ivarsejtek esetén, melyekre számos osztódás vár) biztosítja a kromoszóma végek regenerációját.

Komolyan remélhető, hogy a fenti jelenségekkel kapcsolatos biokémiai szabályozási utak további vizsgálata elvezet a sejtöregedés kérdéskörének igazi feltárásához. Intenzív kutatások folynak annak megválaszolására, hogy a telomer-hosszal kapcsolatos megfigyelések dacára miért életképesek a telomer-hossz csökkenés kompenzálságára nem képes knock-out egerek, hogy a telomer-hossz szabályozásának van-e köze a rákos transzformációhoz és a legfontosabb kérdés vonatkozásában: vajon mi köze a fenti jelenségeknek a szervezet öregedési folyamataihoz?

(Egy másik biológiai óra a sejtek egyes életmegnyílvánulásainak napi ritmusát - angolul: circadian rhythm - szabályozza. Hogy az egyes, nemrég megismert gének kifejeződésének napi ritmusú oszcillációja és a sejt egyéb funkciói milyen kapcsolatban vannak, ill. a sejtszintű megfigyeléseknek milyen közük van az egész szervezet - evolúció során konzervált - napi ritmusa között, az ma még nem ismert.)



## **Meiozis**

A meiózis az ivarosan szaporodó élőlényekben előforduló osztódási forma. A meiozis során a diploid kromoszómaszámú ősivarsejtekből haploid n kromoszómaszámmal rendelkező ivarsejtek jönnek létre és a sejtosztódás során az eredeti sejt kromoszómáiban lévő gének kölcsönösen kombinálódnak, azaz rekombináció történik. A meiozis alatt a DNS megduplázódását követően két teljes osztódás zajlik le, amelyenek mind a négy fázisa - a profázis, metafázis, anafázis és telofázis - megtalálható. Az első meiotikus osztódás profázisát az alábbi négy szakaszra osztjuk: leptoten, zygoten, pachiten és diploten szak. A meiozis első és második szakasza között nincsen vagy rendkívül rövid interfázis van.

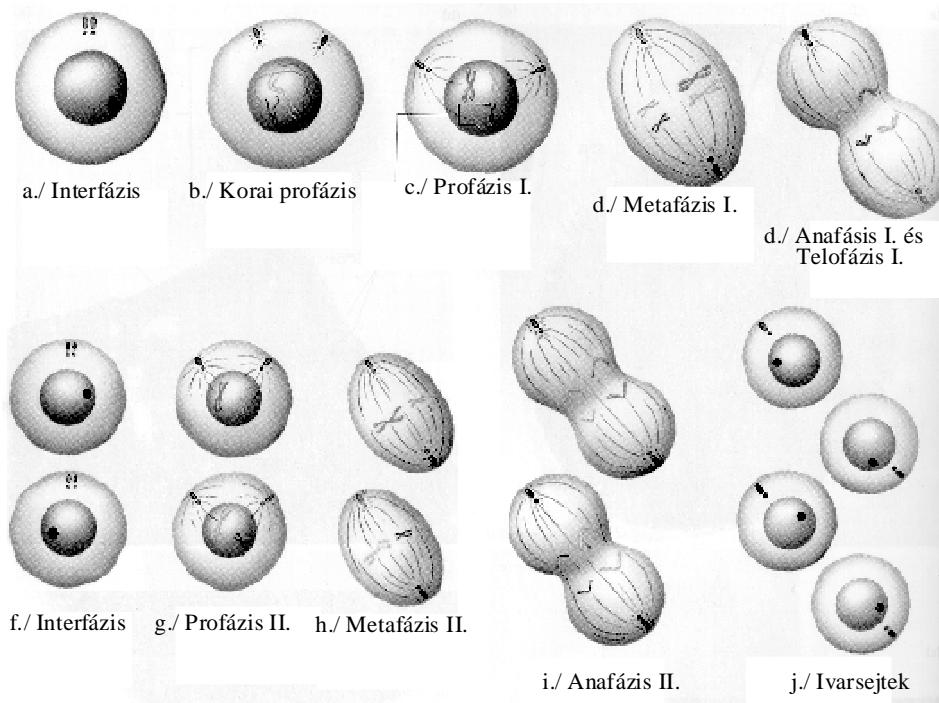
### **Meiózis I.**

#### **Leptotén szakasz**

A meiosisnak ebben a szakaszában a az S fázisban már megkettőződött kromoszómák kondenzáládnak, majd egyik végükönél fogva a maghártyához tapadnak. A kromoszómák másik vége szabadon mozog.

#### **Zigotén szakasz**

A zygotén szakaszban a maghártyához tapadt kromoszómák közeledni kezdenek egymáshoz és az anyai és apai eredetű homológ kromoszómák párokat képeznek. Ezt a jelenséget szinapszisnak is nevezik. A párosodás a maghártyához kapcsolódott végeknél kezdődik úgy hogy a megfelelő kromomerák a megfelelő kromomerákkal összesimulnak. Így a homológ gének azonos pozícióban helyezkednek el. A két kromoszóma egy vagy több ponton összekapcsolódik és a cipzár működéséhez hasonlóan párásodik. Eközben a kromoszómák megrövidülnek és megvastagodnak. Ez a folyamat teljesen a pachiten szakban fejeződik be.



### Pachitén szakasz

Ebben a szakaszban a párosodás teljes és befejeződik a kromoszómák rövidülése és így azok vastagabbak lesznek. Látszólag a sejt kromoszóma száma a felére csökken mert a homológ kromoszómák teljesen összeolvadnak, de megfelelő festési eljárásokkal kimutatható, hogy az összetapadt kromoszóma párok összesen négy kromatidából (kromoszómánként 2-2) állnak. Ezeket a széles szalagokat bivalenseknél vagy tetrádoknak nevezik. Az egyesült kromoszómáknak két centromérája van, mert az párosodó kromoszómák centromérái nem olvadnak össze, a testvérkromatidák centromérái pedig még nem osztódtak. Ebben a fázisban rekombinációs nodulusok jelennek meg a szinaptonémás komplexben. Ezek szerepe a homológ kromoszómák közötti átkereszteződés az un. Crossing-over segítése. Ez a szakasz a meiósis legfontosabb szakasza, mert az átkereszteződések révén a kromoszómák egyes darabjai kicserélődnek és így a gének új kombinációja jön létre. A crossing-over két, három, vagy négy homológ kromatida között jön létre.

### **Diplótén szakasz**

A párosodott kromoszómák kezdenek eltávolodni egymástól, de egyes pontokon még összetapadva maradnak mert az elválás nem tökéletes. Ezek a kötődési pontok az un. kiazmák az átkereszteződések valószínű helyei. Legalább egy kiazma képződik minden homológ minden homológ pár esetén, de lehetséges ennél sokkal több is. Később a kiazmáknál is szétválnak a kromoszómák, de szétválás közben eltörhetnek és a letört részek a klét kromoszóma között kicserélődhetnek.

A diplotén szakasz végét diakinézisnek nevezik, amikor a homológ kromoszóma párok teljesen szétválnak egymástól. Ekkor a nukleolusz eltünik, a maghártya feldarabolódik és a profázis befejeződik.

### **Metafázis I.**

Ebben a fázisban a kromoszómák az egyenlítői síkban rendeződnek és centromerjeikhez húzófonalak tapadnak.

### **Anafázis I.**

A homológ kromoszómák eltávolodnak egymástól és a sejtek ellentétes pólusaira vándorolnak. Így minden két pólusra a kétkromatidás kromoszómák haploid kromoszomaszerelvénye jut. Az anyai és apai kromoszómák eloszlása a két pólus között véletlenszerű.

### **Telofázis I.**

Egyes esetekben maghártya alakul ki, de a maghártya kialakulása nélkül is azonnal elindulhat a meiózis II. Szakasza. Nukleolusz nem képződik, nem történik despiralizáció, nincs új DNS szintézis.

## **Meiózis II.**

### **Profázis II.**

A sejtmagokat körülvevő hártya feloldódik.

### **Metafázis II.**

A kromoszómák száma ekkor a szomatikus kromoszómák fele, de minden kromoszóma két kromatida szálat tartalmaz. A meiózis I.ben bekövetkezett a génkombináció, de az előző interfázisban keletkezett két kromoszómaszál nem vált szét. Itt a második metafázisban minden kromatidának a centromérára osztódik, a kromoszómák hosszában hasadnak és eltávolodnak egymástól.

### **Anafázis II.**

A kétkromatidás kromoszómák testvérek kromatidái elkülönülnek egymástól.

### **Telofázis II.**

Ezen folyamat végére a két darab kétkromatidás sejtből négy darab egykromatidás haploid sejt keletkezik.

A meiózis egyszerre konzervatív és ugyanakkor rendkívüli variabilitást tesz lehetővé. Konzervativizmus alatt azt értjük, hogy a meiózis biztosítja a faj állandó  $2n$  kromoszómaszámát. Enélkül folyamatos kromoszómaszám duplázsodás jönne létre. (A poliploidia növenyeknél gyakori, alacsonyabb rendű állatokon gyakran előfordul, gerinceseken azonban (a halak kivételével) általában életképtelenséget eredményez. Ennek ellenére még gerincesek között is ismerünk természetes poliploid fajokat.)

A meiowitz genetikai következményeit a Genetika tantárgy részletesen tárgyalja.

Magasabbrendű élőlényekben a meiowitz különböző módon valósul meg hím és nőiivarú egyedekben. A hím ivarszervekben egyetlen ős spermasejtből (spermatocitából) négy egyenértékű spermium keletkezik. A női ivarszervben egy diploid oocitából csak egy teljes értékű petesejt keletkezik, három nagyon kicsi méretű un. poláris testté alakul az egyenlötlen aszimmetrikus osztódás miatt.

## **Virus-sejt interakciók egyes sejtbiológiai vonatkozásai**

A sejtek kommunikációja egymással, közvetlen és tágabb környezetükkel a korábbi fejezetek témaja volt. A sejtek az élővilág alacsonyabbrendű szerveződési formáival is tanulságos, a sejtek viselkedését, tulajdonságait tükröző kölcsönhatásokba kerülhet, a soksejtű organizmuson belül is.

A virusok fehérje-burokkal rendelkező, nukleinsavat (DNS-t vagy RNS-t) tartalmazó sejtparaziták. (Tárgyunk keretében csak egyes, szemléletformáló sejtbiológiai vonatkozásokat emlíünk, a virológia szisztematikus tárgyalása a Mikrobiológia feladata.) Sejtek nélkül nem képesek szaporodásra, vagyis hoszabb távon (evoluciós lépték szerint) fennmaradásra sem. A baktériumok virusai a bakteriofágok. A virusok elhagyhatják a fertőzött sejteket és továbbiakat fertőznek meg (szemben a baktériumok plazmidjaival, melyek a gazdasejt enzimatikus apparátusát és szubsztrátjait felhasználva replikálódnak, de nincs fehérje bürkük, sejtről-sejtre csak bizonyos körülmények között terjednek, ld. Genetika). Nem a virusok a legegyszerűbb fertőző ágensek, melyek a sejtekkel mintegy szimbiózisban élhetnek. A genom egyes részei, egyes DNS szakaszok helyet változtathatnak a genomon belül (ld. un. ugráló gének, Genetika és Biokémia tanulmányok során), sőt terjedhetnek egyedről-egyedre, fajról-fajra (evoluciós kihatásokkal), ill. vannak fehérjék (az un. prionok), melyek sejtről-sejtre terjedve (fertőzve) irreverzibilis módon befolyásolnak vitális sejfunkciókat (ld. Biokémia tanulmányok során). A virusok és sejtek kölcsönhatásai több szempontból is érdekesek és részben sejtbiológiai, részben orvosbiológiai jelentőségűek.

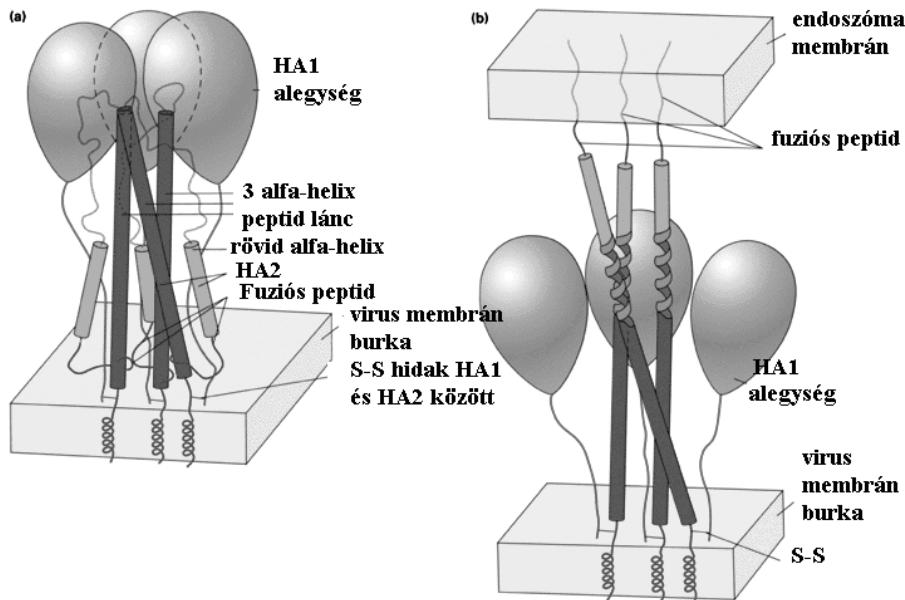
1. Egyrészt az általuk befolyásolt, módosított-károsított sejtműködések mintegy előtérbe kerülnek a virusfertőzés kapcsán és segítségükkel könnyen tanulmányozhatókká válnak. Pl. az SV40 DNS tumor (daganat) virus T-antigénje (fehérjéje) a sejtbén a p53 nevű, ma már szupresszor génként, a checkpoint rendszer egyik szereplőjeként ismert celluláris fehérjét specifikusan köti (a két fehérje egy komplexben található).
2. Másrészről számos virus patogén, betegséget okozó hatású, így ezen virusok sejtekkel való kölcsönhatásainak feltárása, ismerete közvetlen gyakorlati jelentőséggel bír. Pl. az AIDS betegségért felelős HIV virus sejtbe történő bejutása molekuláris részleteinek

megismerése minden a betegség körlefolyásának megértése, minden terápiája szempontjából kritikusnak bizonyult.

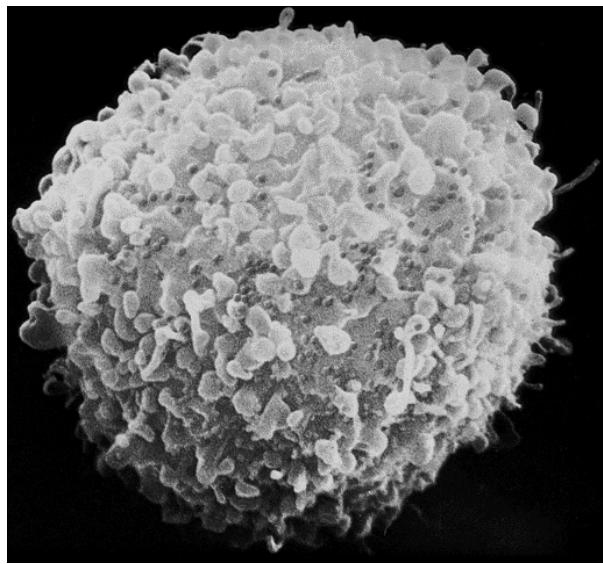
3. Továbbá, ma már olyan génterápiás eljárások vannak a klinikai kipróbálás stádiumában, melyek egyes (megfelelően átalakított, megszelidített) virusok fertőzőképességét használják fel a kívánt tulajdonságot hordozó gén bejuttatására. Az adenozin deamináz metabolikus funkció kiesésével járó veleszületett letális rendellenesség esetében pl. un. retrovírusos géntranszdukció módszerével reményteljes próbálkozások folytak emberen.

#### A vírusok bejutása a sejtbe

A vírusok egyéb - fisiológiai - funkciók céljait szolgáló (nem a vírusok céljaira szelekcióval dölt) sejtfelszíni struktúrák, mint receptorok, révén jutnak be a sejtek belsejébe. Pl. egyes nátha vírusok az ICAM-1 intercelluláris adhéziós receptoron keresztül jutnak be. Amennyiben a vírusok a sejt belsejébe receptor-mediált endocitózist követően jutnak be -



ilyen pl. az influenza vírus - a CURL savas közege által indukált konformáció változás keretében bizonyos hidrofób peptid láncok (ld. ábra) exponálódnak és ennek folytán a



virusburok fuzionál az endoszoma membránjával és jut be a citoszólba. Ezen kompartment pH-jának neutralizálásával (pl. a sejtek ammonia-tartalmú inkubátorban tartásával) az ottrekedt virusok a lizoszomalis enzimek martalékkává lesznek. Ez a pH-függő viselkedés viszont nem általános tulajdonsága a virusoknak. A HIV virus a T<sub>h</sub> immunsejtek immunológiai felismerésben

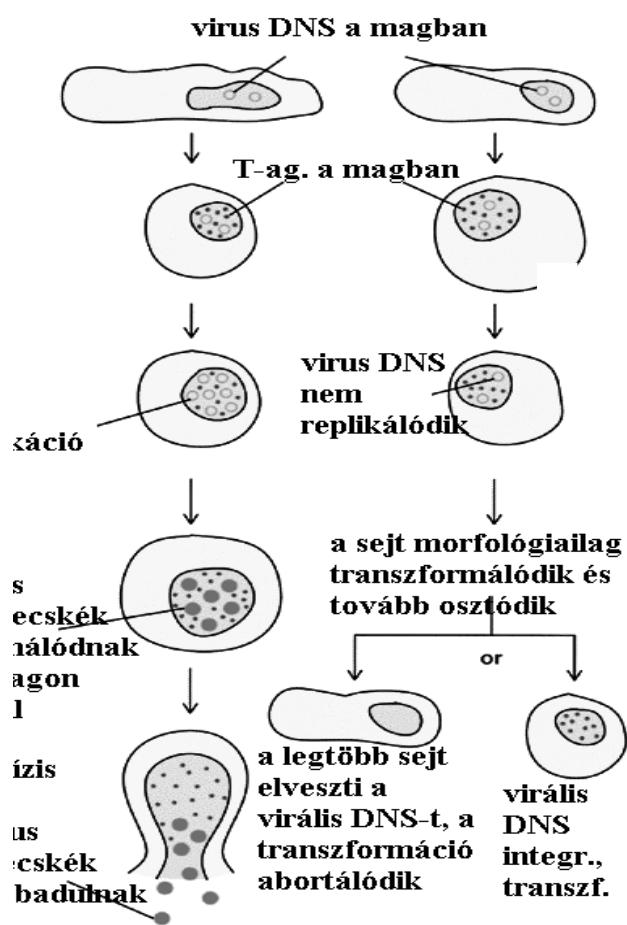
szerepet játszó un. CD4 receptorához (is) kötődve jut be a sejtbe (ld. a sejt és a felszínén lévő virusok - kis sötét pöttyök - párosztázó elektronmikroszkópos képét az ábrán).

Az SV40 virus és az adenovirusok egy része az immunológiai felismerésben központi szerepet játszó un. MHC I. alosztály fehérjéihez kötődve internalizálódnak. A herpesz virusok egyike több receptoron keresztül is bejuthat, többek között a komplement receptor és a tumor nekrózis faktor receptora segítségével. A bakteriofág genom a fág burok valamelyik fehérjéje és a baktérium specifikus receptora kapcsolódása után mintegy befecskendeződik a baktérium belsejébe.

#### A virus – sejt kölcsönhatás lehetséges kimenetelei

1. A fertőzés egyik lehetséges kimentele az, hogy a virusok korlátlan szaporodásnak indulnak és lizálják -a virus-replikációt "megengedő" (un. permisszív) állapotban lévő sejtet. Ilyenek pl. a baktériumok lizogén fágjai aktiválódásuk után (pl. UV hatására un. "tarfoltok" keletkeznek a Petri csésze baktérium-szönyegén), ill. az emlős sejt citopáthiás elváltozásai (mikroszkópból felismerhető elváltozások, majd teljes sejt lizis) influenza virus hatására.

2. A virus fertőzés egy másik kimenetele az illető virusra nézve un. "non-permisszív" sejtbén: a genomba integrálódott "provírusok" nyugvó, várakozó, látens állapotban vannak és együtt replikálódnak a gazda sejt DNS-ével. Ez, emlős sejtek esetén, pl. "rossz" helyen történő integráció esetén, kóros sejtburjánzáshoz vezethet, vagy az átírásra, kifejeződésre kerülő virális géntermékek okozta sejtkárosodással, pl. HIV esetén lassú sejtpusztulással járhat. Perzisztáló fertőzés jellemzi a hepatitis B virus - májsejt kölcsönhatást is. Az SV40 virus fertőzés lehetséges kimeneteleit demonstrálja az alábbi ábra.



### Virusok által receptor-szinten előidézett sejtbiológiai jelenségek

A virusburok és a sejtfelszíni receptorok interakciója receptor-specifikus funkcionális konzékenciákkal járhat. Pl. a CD4 molekulák HIV-általi keresztkötése a receptor immunológiai funkciót modulálja. Az eritroid érési vonal egyes korai alakjait fertőző, egér eritroleukémiát okozó Friend virus-komplex az eritropoietin receptoron keresztsüli (vörösvértest képződést fokozó) szignalizációt konstitutívvá téve okozza ezen sejtkompartment sejtjeinek malignus felszaporodását.

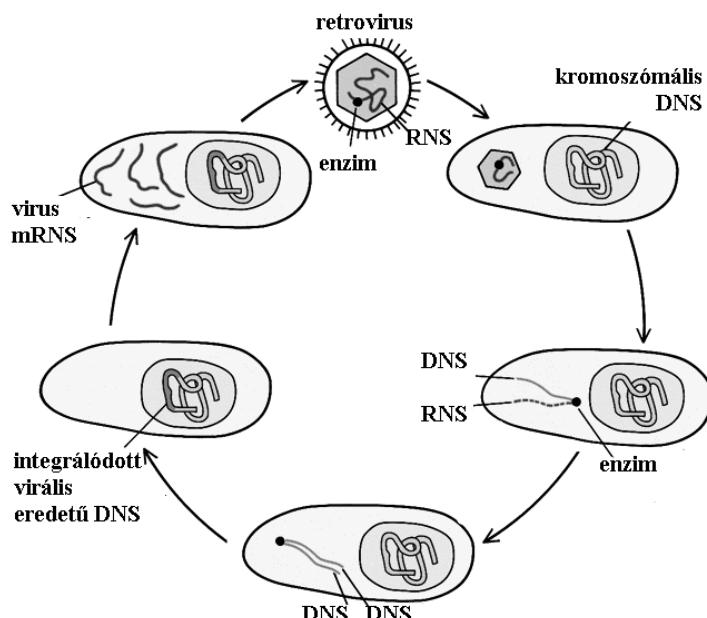
### Virusok kölcsönhatásai egyéb sejt alkotóelemekkel

A sejtfelszíni receptorokkal való kapcsolódáson kívül a virusok a sejtek egyéb organellumainak egyes komponenseivel is specifikus molekuláris kölcsönhatásokban vehetnek részt. Pl. a herpesz virusok egyike a magba a mikrotubulusok mentén, a dynein motor-fehérje segítségével transzportálódik. A fertőző májgyulladás vírusa kötődik a magmembrán pórus-komplexei valamely fehérje-komponensehez, majd a pórusokon keresztül a virus-genom beinjectálódik a magba. Mint említettük, az SV40 daganat vírus T antigéne a sejtmagban lévő p53 fehérjét köti - a fertőzött (egér) sejtek immortalizálódását okozva ill. ezt az állapotot fenntartva.

### Virusok mint a génterápia eszközei

Egyes virusokkal, mint a génterápia eszközeivel már kedvező klinikai tapasztalatokat is szereztek. (Megjegyzendő, hogy lipid-micellákba burkolt, sőt "pucér" DNS (feltehetően receptor-mediálta) sejthez való bejuttatásával kapcsolatosan is vannak terápiás szempontból is ígéretes megfigyelések, in vitro es in vivo egyaránt.) Az un. retrovirusok RNS-t DNS-be átiró enzimmel rendelkező, gyakran daganatkeltő RNS virusok, melyek életciklusát a következő ábra demonstrálja. A retrovirális géntranszfer során a kívánt gént tartalmazó, rákkeltő szekvenciáitól megfosztott és megfelelő transzkripcióssal szabályozó régiókkal ellátott

konstrukciót (10-100 microgrammnyi ilyen DNS molekulát) egy un. csomagoló sejtvonalba ("packaging line") transzfektálnak (visznek be a sejtek belsejébe). Itt a konstrukció integrálódik a gazda DNS-be és átfíródik. A teljes virális genom átfírása során keletkező RNS molekulák a csomagoló sejtvonal által termelt üres virális kapszidokba csomagolódva fűződnek le a sejtről. A keletkezett virus részecskék (az előbbi kultúra felülíuszójában) az emlős sejtek széles skáláját képesek megfertőzni, az általuk felismert sokféle sejten előforduló receptor révén. A megfertőzött sejtek génállományába a virális genom integrálódik és (un. konstitutív promoter esetén) állandóan kifejeződik.



Egy másik, sikeresnek ígérező génterápiás rendszer az un. adeno-asszociált virus (AAV), melynek természetes "lakóhelye" a tüdő epítélsejtjei. Az egyik (jelenleg még folyamatban lévő, tehát bizonytalan kimenetelű, de reményteljes) alkalmazás során ebbe a szövetbe a cisztikus fibrózisban nem működő  $\text{Cl}^-$  csatorna génjét próbálják bevenni.

A rákterápia szempontjából izgalmas az a próbálkozás, hogy olyan adenovirussal fertőznék a rákos szervezetet, melyek csak a p53 onkoszupresszor gén (rákos szövetekben igen gyakori) deléciója vagy mutációja esetén citotoxikus hatású. Így a funkcióképes p53-mal bíró normál sejtekre az ilyen tulajdonsággal felruházott virusok nem lennének hatással, míg a daganatos sejttípusok nagy hányadát megölné.

A virusok génterápiás célzatú felhasználásával kapcsolatos szempontok a következők – a teljesség igénye nélkül, csak az illusztráció kedvéért:

1. A fertőzhető sejtek (vagyis a virus-receptorok) specifitása milyen, vagyis mely szövetek célozhatók meg?
2. A megfertőzött sejtből kifejeződnek-e virális géntermékek is a bejuttatni kívánt génén kívül, melyeknek (pl. immunológiai) mellékhatásaival számolni kell?
3. Mennyire tartós a bevitt konstrukció fehérje-szintű kifejeződése - inegrálódik-e az a gazda-genomba?
4. Milyen - elegendő-e - a kifejeződés foka?
5. Mennyire megbízhatóan rekombináció-mentes a konstrukció (ezt a virális DNS génebészeti manipulációjával érik el)?
6. Az integrációt követően történnek-e további, epigenetikus változások (pl. metiláció), melyek a kifejeződés mértékét csökkentik?
7. A virus genom mekkora szakasza helyettesíthető a kívánt génnel a minimális virális funkciók károsodása nélkül?

Fentiek kitekintés gyanánt is szolgálnak, illusztrálandó a sejtbiológiai ismeretek orvosi gyakorlati kamatozódását, kapcsolódását más disziplinákhöz és a soha nem látott ütemben gyarapodó, molekuláris mélységű ismeretek gyakorlati relevanciáját.