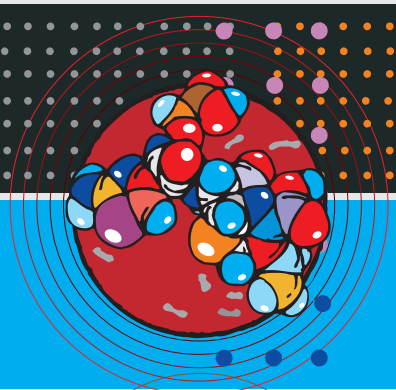
Bánhegyi Gábor
Sipeki Szabolcs

BIOKÉMIA, MOLEKULÁRIS ÉS SEJTBIOLÓGIA

EGYETEMI JEGYZET



Semmelweis Kiadó

Biokémia, molekuláris és sejtbiológia

EGYETEMI JEGYZET

Szerkesztette:
BÁNHEGYI GÁBOR és SIPEKI SZABOLCS

Második, bővített kiadás

Semmelweis Kiadó
www.semmelweiskiado.hu
Budapest, 2018

A könyv szerzői
Dr. Bánhegyi Gábor
Dr. Buday László
Dr. Csala Miklós
Dr. Csermely Péter
Dr. Hrabák András
Dr. Kapuy Orsolya
Dr. Kardon Tamás
Dr. Kereszturi Éva
Dr. Keszler Gergely
Dr. Kukor Zoltán
Dr. Lizák Beáta
Dr. Mandl József
Dr. Mészáros Tamás
Dr. Müllner Nándor
Dr. Nemoda Zsófia
Dr. Rónai Zsolt
Dr. Sasvári Mária
Dr. Sipeki Szabolcs
Dr. Sőti Csaba
Dr. Vér Ágota

A könyvet lektorálta:
Dr. Bánhegyi Gábor, Dr. Csala Miklós, Dr. Müllner Nándor, Dr. Sipeki Szabolcs

© *Dr.Bánhegyi Gábor, Dr. Sipeki Szabolcs, 2015, 2018*

ISBN 978-963-331-425-8

A könyv és adathordozó (legyen az e-könyv, CD vagy egyéb digitális megjelenés) szerzői jogi oltalom és kizárólagos kiadói felhasználási jog alatt áll. Bármely részének vagy egészének mindennemű többszörözése kizárólag a szerkesztők, a szerzők és a kiadó előzetes írásbeli engedélye alapján jogszerű.



Felelős kiadó: *dr. Táncos László*
Tördelőszerkesztő: *dr. Vincze Judit*
© *Ábrák: Ángyán Gergő*
© *Borító: dr. Táncos László*
SKD: 573

Tartalom

I. FEJEZET: MAKROMOLEKULÁK SZERKEZETE ÉS MŰKÖDÉSE

I/1. Fehérjék szerkezete és fehérjeszerkezet kialakulását segítő sejtes mechanizmusok 2
Csermely Péter, Sőti Csaba
I/1.1. Aminosavak és peptidek 2
I/1.2. A fehérjék szerkezete 4
I/1.3. A fehérjék szerkezetét kialakító és stabilizáló erők 10
I/1.4. A fehérjék szerkezetének denaturációja 11
I/1.5. A fehérjék szerkezetének kialakulása in vitro 12
I/1.6. A fehérjeszerkezet kialakulásának termodinamikai viszonyai 14
I/1.7. Különbségek az in vitro és in vivo fehérjeszerkezet kialakulás között 15
I/1.8. A fehérjék szerkezetének kialakulása és megőrzése a sejtben, a chaperonok . . . 16

I/2. Enzimológia 19
Kukor Zoltán
I/2.1. Enzimek elnevezése 19
I/2.2. Enzimkatalízis 19
I/2.3. Enzimaktivitás mértékegységei 21
I/2.4. Enzimek specificitása 21
I/2.5. Enzimkinetika 22
Michaelis–Menten-kinetika 22
Több szubsztrátos enzimek 23
Kinetikailag perfekt enzimek 24
Az enzimreakciók gátlása 24
Enzimaktivitás szabályozása 26
I/2.6. Medicinális enzimkinetika 27
Enzimek mennyiségi meghatározása 28
Enzimatikus koncentrációmérés (metabolitmeghatározás) 28

I/3. Hemoglobin: az oxigénszállítás biokémiája 29
Mandl József
I/3.1. A hemoglobin szerkezete 29
I/3.2. A hemoglobin oxigénkötése, -leadása 31
I/3.3. A hemoglobin CO_2- és NO-kötése 32
I/3.4. Haemoglobinopathiák 32

I/4. Proteázok 34
Kereszturi Éva
I/4.1. Szerin-proteázok 34
Limitált proteolízis 34
Szubsztrátspecificitás 36
Katalízis 37
Sav-bázis katalízis 37
Kovalens katalízis 37
Egyéb szerin-proteázok 38

Szerin-proteáz-inhibitorok . . . 39
I/4.2. Metalloproteázok . . . 40
Katalízis . . . 40
I/4.3. Savanyú proteázok . . . 40
Aktiválódás . . . 40
Katalízis . . . 41
I/4.4. Cisztein-proteázok . . . 42
I/4.5. Egyéb proteázok . . . 42

I/5. A hemosztázis biokémiája . . . 43
Keszler Gergely
I/5.1. Áttekintés . . . 43
I/5.2. A véralvadás szerin-proteáz rendszere és annak szabályozása . . . 44
I/5.3. A trombinaktivitás kontrollja . . . 49
Plazma-proteázinhibitorok . . . 49
A protein C/protein S rendszer . . . 51
I/5.4. A véralvadék feloldása . . . 53

I/6. Transzporterek . . . 57
Lizák Beáta
I/6.1. Diffúzió biológiai membránonkon keresztül . . . 57
I/6.2. Fehérjemediált transzport . . . 58
I/6.3. Transzportfolyamatok energetikája . . . 60
I/6.4. Carrier típusú transzporterek . . . 61
Passzív transzport . . . 61
Glukóztranszporterek (GLUT) . . . 61
Klorid-bikarbonát antiporter . . . 62
Aktív transzport . . . 62
P-típusú pumpák . . . 62
F-típusú pumpák . . . 66
V-típusú pumpák . . . 66
ABC-transzporterek . . . 67
I/6.5. Csatornák . . . 68
Aquaporinok . . . 69
I/6.6. A sejtek Ca^{2+}-homeosztázisa . . . 69
A citoszól Ca^{2+}-koncentrációját emelő transzportfolyamatok . . . 70
Ca^{2+}-csatornák a plazmamembránban . . . 70
Ca^{2+}-felszabadulás intracelluláris raktárakból . . . 71
Az intracelluláris Ca^{2+}-szintet csökkentő transzportfolyamatok . . . 71

I/7. A nukleinsavak felépítése, szerepe . . . 73
Rónai Zsolt
I/7.1. Replikáció . . . 77
A genetikai információ . . . 77
Prokarióta replikáció . . . 78
Eukarióta replikáció . . . 82
I/7.2. DNS-károsodás, hibajavítás, mutációk és polimorfizmusok . . . 84
DNS-károsodások és azok javítása . . . 84
Mutációk és polimorfizmusok . . . 87

I/8. Transzkripció: a DNS-ben tárolt információ átírása RNS-re 89
Sasvári Mária
I/8.1. A transzkripció fő jellemzői 89
A DNS-függő RNS-polimerázok által katalizált reakció 91
A prokarióta transzkripció jellegzetességei 91
Transzkripció eukariótákban és az elsődleges transzkriptum érése 93
Az eukarióta DNS-függő RNS-polimerázok 94
Az eukarióta mRNS érési folyamata 94
Alternatív intronkivágás (alternative splicing) 96
Az eukarióta riboszomális RNS-ek és a tRNS-ek érése 96
Az RNS-ek nukleáris exportja 97
I/8.2. A transzkripció szabályozása prokariótákban 97
Az *E. coli* lac operonjának működése 98

I/9. A génkifejeződés szabályozása eukariótákban, epigenetikai módosulások 101
Nemoda Zsófia
I/9.1. A transzkripció kromatinszintű szabályozása 101
Hisztonmódosítások 101
DNS-metiláció 103
Géninaktiváló folyamatok 104
I/9.2. Az eukarióta transzkripció iniciáció jellegzetességei 104
I/9.3. Az eukarióta transzkripciós faktorok szerkezeti motívumai 107
I/9.4. Az eukarióta mRNS képzési és érési folyamatainak szabályozása a sejtmagban 108
Alternatív promoter használata 108
Alternatív splicing 109
RNS szerkesztés 110
I/9.5. Az eukarióta mRNS stabilitásának szabályozása 111
A mRNS lebomlásának tényezői 111
A mikroRNS szabályozási mechanizmusa 111

I/10. A genetikai kód és a fehérjeszintézis 114
Mészáros Tamás
A genetikai kód 114
A fehérjeszintézis adaptorai, tRNS-ek 115
A genetikai kód értelmezése, aminoacil-tRNS-szintetázok 116
A fehérjeszintézis helyszíne, riboszóma 117
Transzláció, a peptidlánc kialakulása 119

I/11. A transzláció szabályozása 125
Mészáros Tamás

I/12. A fehérjék poszttranszlációs módosítása 131
Mészáros Tamás

I/13. Proteaszomális fehérjedegradáció 139
Mészáros Tamás

I/14. Vírusok molekuláris biológiája 143
(Csala Miklós)
I/14.1. Bevezetés 143
I/14.2. A vírusgenom sajátosságai 144
I/14.3. A bakteriofágok reprodukciós stratégiái 145
I/14.3.1. Litikus ciklus 145
I/14.3.2. Lizogén ciklus. 146
I/14.3.2.1. A λ fág integrációja 147
I/14.3.2.2. A λ fág represszió ja 148
I/14.3.2.3. A λ fág indukciója 148
I/14.4. Az emberben élősködő vírusok reprodukciós stratégiái 150
I/14.5. A vírusgenom replikációjának sajátosságai. 152
I/14.5.1. DNS-vírusok (dsDNS és ssDNS) replikációja 152
I/14.5.1.1. Bidirekcionális DNS-replikáció 153
I/14.5.1.2. Szálkiszorításos („strand displacement") DNS-replikáció . . 153
I/14.5.1.3. Forgó karika („rolling circle") DNS-replikáció 154
I/14.5.2. Reverz transzkripciós DNS-vírusok (dsDNS-RT) replikációja . . . 156
I/14.5.3. Tisztán RNS-vírusok (dsRNS, (+) ssRNS és (-) ssRNS) replikációja. 157
I/14.5.3.1. A dsRNS-vírusok replikációja 158
I/14.5.3.2. A (+) ssRNS-vírusok replikációja. 158
I/14.5.3.3. A (-) ssRNS-vírusok replikációja 159
I/14.5.4. Reverz transzkripciós RNS-vírusok (retrovírusok) replikációja . . . 161
I/14.6. A vírusgének transzkripciójának sajátosságai 163
I/14.6.1. DNS-vírusok génjeinek transzkripciója 163
I/14.6.2. Tisztán RNS-vírusok génjeinek transzkripciója 164
I/14.6.2.1. Polimerázmegcsúszás („polymerase slippage") 164
I/14.6.2.2. Ambiszensz vírusok génjeinek transzkripciója. 164
I/14.6.3. Retrovírusok génjeinek transzkripciója 166
I/14.7. Az eukarióta vírus-mRNS-ek érése és szerkesztése. 166
I/14.7.1. Az 5′ vég érése 166
I/14.7.2. Splicing 168
I/14.7.3. A 3′ vég érése. 169
I/14.7.4. RNS-szerkesztés („RNA editing") 169
I/14.8. A vírusfehérjék transzlációjának sajátosságai 171
I/14.8.1. Sapkafüggetlen iniciáció – riboszómabeléptető hely 172
I/14.8.2. eIF2-független iniciáció – iniciátor tRNS-t elhelyező hurok vagy csomó 173
I/14.8.3. Iniciáció alternatív start kodonokkal 173
I/14.8.3.1. Figyelmetlen pásztázás („leaky scanning"). 174
I/14.8.3.2. Riboszómaelterelés („ribosome shunting"). 174
I/14.8.4. Termináció–reiniciáció 175
I/14.8.5. Riboszómaugrás 176
I/14.8.6. Transzlációs kereteltolódás 177
I.14.8.7. Terminálásgátlás („suppression of termination"). 177
I.14.9. Vírusellenes taktikák a gazdasejtben és ezek kivédése 177
I.14.9.1. Restrikciós metilázok és endonukleázok a baktériumokban 180
I.14.9.2. A kettősszálú RNS által kiváltott stressz eukarióta (humán) sejtekben 182

I/15. Géntechnika, biotechnika 185
Rónai Zsolt
I/15.1. Polimeráz láncreakció 185
A PCR-termék detektálása: DNS elektroforetikus analízise 187
A valós idejű PCR 187
I/15.2. Mutációk és polimorfizmusok vizsgálata 188
Ismétlődési variációk 188
SNP-k és pontmutációk 190
Restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus 190
DNS-szekvenálás 191
SNP-k és pontmutációk vizsgálata valós idejű PCR-rel 192
I/15.3. Rekombináns DNS előállítása és alkalmazása 193
A DNS-konstrukció előállítása 194
I/15.4. A génkifejeződés vizsgálata 197
RT-PCR 197
DNS-chip 198
Fehérjék kimutatásának lehetőségei 199

I/16. Rendszerbiológia (systems biology), bioinformatika, hálózatok 203
Csermely Péter, Kapuy Orsolya
I/16.1. Rendszerbiológia (systems biology) 203
Szabályozási motívumok 204
Alkalmazott módszerek 205
A sejtciklus szabályozási hálózatának feltérképezése 206
A jelátviteli hálózatok tanulmányozása 208
Virtuális sejt 209
I/16.2. Bioinformatika 209
A bioinformatika alapjai 210
Adatbázisok 211
Szekvenciavizsgálat 212
Szerkezeti bioinformatika 212
I/16.3. A hálózatok 214
A biológiai hálózatok legfontosabb tulajdonságai 214
A biokémiai és molekuláris biológiai rendszerek legfontosabb hálózatai . . 218

II. FEJEZET: BIOENERGETIKA ÉS ANYAGCSERE

II/1. Bioenergetika, oxigénmetabolizmus 222
Mandl József
II/1.1. Az energiatranszformáció – metabolizmus 222
II/1.2. Csoportátvitel – kapcsolt reakciók 223
Foszforil-transzfer szerepe 223
Elektronátvitel szerepe 226
Az elektrontranszfer és a foszforiltranszfer szabályozó szerepe a metabolizmusban 229
II/1.3. Oxigén szerepe a hatékony energiatranszformációban 230
Oxidoreduktázok a metabolizmusban 230
Oxidázok 230
Dehidrogenázok 230
Hidroperoxidázok 231

Oxigenázok . . . 231
Az oxigén tökéletlen redukciója . . . 231
A biológiailag jelentős ROS-molekulák és keletkezésük . . . 232
A ROS károsító hatásai . . . 234
A ROS eliminálása, az antioxidáns védelem mechanizmusai . . . 234

II/2. Glikolízis . . . 238
Csala Miklós
II/2.1. A glikolízis fázisai . . . 238
Az első fázis lépései . . . 239
Hexokináz–glukokináz (HK–GK) . . . 239
Foszfohexóz-izomeráz . . . 239
Foszfofruktokináz-1 (PFK1) . . . 240
Aldoláz(ok) . . . 241
Foszfotrióz-izomeráz . . . 241
A második fázis lépései . . . 241
Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz . . . 241
Foszfoglicerát-kináz . . . 241
Foszfoglicerát-mutáz . . . 241
Enoláz . . . 242
Piruvát-kináz (PK) . . . 242
II/2.2. A glikolízis folytatása . . . 242
II/2.3. Glikolízis a vörösvértestben – a 2,3BPG útvonal . . . 243
Biszfoszfoglicerát-mutáz . . . 243
2,3-Biszfoszfoglicerát-foszfatáz . . . 244
II/2.4. A glikolízis energiamérlege . . . 245
Szubsztrát szintű foszforiláció . . . 245
Oxidatív foszforiláció . . . 245

II/3. Piruvát-dehidrogenáz komplex . . . 247
Csala Miklós
A piruvát oxidatív dekarboxilációja . . . 247
A piruvát-dehidrogenáz komplex építőelemei . . . 248
A piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált folyamat . . . 248
Piruvát-dehidrogenáz . . . 248
Dihidrolipoil-transzacetiláz . . . 250
Dihidrolipoil-dehidrogenáz . . . 250
A piruvát-dehidrogenáz komplex kitüntetett metabolikus szerepe . . . 250
A piruvát-dehidrogenáz komplex szabályozása . . . 251
Allosztérikus szabályozás . . . 252
Foszforiláció/defoszforiláció . . . 252

II/4. Citrátkör . . . 254
Csala Miklós
II/4.1. A citrátkör lépései . . . 254
Citrát-szintáz . . . 254
Akonitáz . . . 255
Izocitrát-dehidrogenáz . . . 256

a-Ketoglutarát-dehidrogenáz (komplex) . . . 256
Szukcinil-KoA-szintetáz . . . 256
Szukcinát-dehidrogenáz . . . 256
Fumaráz . . . 257
Malát-dehidrogenáz . . . 257
II/4.2. A citrátkör összetett funkciója . . . 257
A citrátköri intermedierekből kiinduló útvonalak . . . 258
Zsírsav- és koleszterinszintézis . . . 258
Aminosavak szintézise . . . 259
Glukózszintézis . . . 259
Porfirinszintézis . . . 259
A citrátköri intermedierekben végződő útvonalak – anaplerózis . . . 259
Piruvát-karboxiláz . . . 260
Aminosavak lebontása . . . 260
Páratlan szénatomszámú zsírsavak lebontása . . . 261
II/4.3. A citrátkör szabályozása . . . 261
II/4.4. A citrátkör energiamérlege . . . 262
Szubsztrát szintű foszforiláció . . . 262
Oxidatív foszforiláció . . . 263

II/5. Oxidatív foszforiláció . . . 264
Csala Miklós
II/5.1. A légzési lánc . . . 264
Begyűjtő szakasz . . . 264
NADH:KoQ-reduktáz (I. komplex) . . . 265
Szukcinát:KoQ-reduktáz (II. komplex) . . . 265
Mitokondriális glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz . . . 266
ETF-dehidrogenáz . . . 266
Közös szakasz . . . 266
$KoQH_2$:citokróm-c-reduktáz (III. komplex) . . . 267
Citokróm c . . . 267
Citokróm-c-oxidáz (IV. komplex) . . . 267
II/5.2. Az elektrontranszferhez kapcsolt ATP-termelés . . . 268
ATP-szintáz, azaz FoF1 ATP-áz . . . 268
Az elektrokémiai gradiens kapcsoló szerepe – a kemiozmotikus elmélet . . . 269
Elektromos és kémiai gradiens . . . 269
II/5.3. Az oxidatív foszforiláció szabályozása . . . 270
II/5.4. Az oxidatív foszforiláció energiamérlege – a P/O hányados . . . 270
Az ATP-termeléshez kapcsolódó transzportok . . . 270
ATP/ADP antiport . . . 270
Pi/OH– antiport . . . 271
Egy oxigénatomra jutó ATP-keletkezés . . . 271
II/5.5. A citoplazmában termelt NADH felhasználása . . . 272
Malát-aszpartát útvonal . . . 272
II/5.6. Az oxidatív foszforiláció a metabolizmus mozgató rugója . . . 274
II/6. Glukoneogenezis . . . 275
Kardon Tamás

II/7. A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása 280
Kardon Tamás
II/7.1. A glikolízis szabályozása 280
II/7.2. A glukoneogenezis szabályozása 283

II/8. A fruktóz és a galaktóz metabolizmusa 286
Kardon Tamás
II/8.1. A fruktóz anyagcseréje 286
II/8.2. **Galaktóz anyagcseréje 288**

II/9. A glikogén anyagcseréje 291
Kardon Tamás
II/9.1. Glikogénszintézis 291
II/9.2. Glikogenolízis 293
II/9.3. A glikogénszintézis szabályozása. 295
II/9.4. A glikogenolízis szabályozása 296
II/9.5. A glikogénszintézis és -lebontás koordinált szabályozása. 298
Szabályozás fokozott glukózigény esetén – vércukorszint esése étkezések között/éhezésben 298
Szabályozás fokozott glukózkínálat esetén – vércukorszint emelkedése táplálkozás során/után 298

II/10.
A pentóz-foszfát ciklus. 300
Kardon Tamás
II/10.1. A pentóz-foszfát-ciklus szabályozása 303

II/11. Lipidek anyagcseréje 304
Hrabák András
II/11.1. A lipidek általános tulajdonságai 304
II/11.2. A lipidek raktározása és szállítása 304
II/11.3. A zsírok emésztése és felszívódása 306
II/11.4. A zsírok mobilizálása a zsírszövetből 308
II/11.5. A zsírsavak oxidációja 309
Zsírsavoxidáció éhezésben – a ketontestek szintézise 313
II/11.6. Zsírsav-bioszintézis 314
II/11.7. A trigliceridek szintézise 320
II/11.8. Egyéb glicerolipidek anyagcseréje. 323
II/11.9. A szteránvázas vegyületek anyagcseréje 327
A koleszterinszintézis szabályozott enzime a HMG-KoA-reduktáz 329
Az epesavak anyagcseréje és annak szabályozása 331
A koleszterin szállítása 333
Hormonhatású szteránvázas vegyületek szintézise 335
A szteroid hormonok szintézise 337
II/11.10. Az eikozanoidok anyagcseréje. 337
II/12. Aminosavak anyagcseréje, ornitinciklus 339
Vér Ágota
II/12.1. Az aminosavak fő reakciótípusai 340

Transzaminálás . . . 341
A glutamát-dehidrogenáz központi szerepe . . . 342
Aminosav-oxidázok . . . 343
Az aminosavak dekarboxilezése . . . 344
Egy szénatomos töredékek keletkezése az aminosav-anyagcserében . . . 344
A nitrogén sorsa . . . 346
Ammónia megkötése és transzportja . . . 347
Az ureaszintézis szabályozása . . . 350
Ureaszintézis enzimei az extrahepatikus szövetekben . . . 350
Az ureaszintézis zavarai . . . 351
II/12.2. Aminosavak lebontása . . . 351
Aszparagin, aszparaginsav . . . 351
Glutamin, glutaminsav . . . 351
Prolin . . . 353
Arginin . . . 353
Hisztidin . . . 353
Alanin . . . 356
Szerin . . . 356
Glicin . . . 356
Cisztin, cisztein . . . 357
Hidroxiprolin . . . 359
Fenilalanin, tirozin . . . 359
Triptofán . . . 360
Lizin . . . 360
Treonin . . . 361
Metionin . . . 363
Valin, izoleucin, leucin . . . 363
II/12.3. Aminosavak szintézise . . . 364
Glutamát és glutaminszintézis . . . 365
Alanin és aszpartát, aszparaginszintézis . . . 365
Prolin, argininszintézis . . . 366
Szerinszintézis . . . 366
Glicinszintézis . . . 366
Ciszteinszintézis . . . 366
Hidroxi-aminosavak kialakulása . . . 367
Szelenociszteinszintézis . . . 367

II.13. Porfirin- és vasanyagcsere . . . 368
Vér Ágota
II/13.1. A porfirinváz felépítése . . . 368
II/13.2. A porfirinek bioszintézise . . . 368
II/13.3. A hemszintézis szabályozása . . . 370
A hemszintézis zavarai, porfíriák . . . 373
II/13.4. Vasanyagcsere . . . 374
A hem lebontása . . . 375
Hemlebontás zavarai . . . 378
II/14. A nukleotidok anyagcseréje . . . 380
Keszler Gergely
II/14.1. A nukleotidok felépítése . . . 380

II/14.2. A nukleotidok bioszintézise 381
A purin nukleotidok *de novo* bioszintézise 382
A pirimidin nukleotidok *de novo* bioszintézise 384
A dezoxiribonukleotidok szintézise 386
A timin nukleotidok keletkezése 388
Mentő (salvage) reakciók 389
II/14.3. A nukleotidok egymásba történő átalakulása 390
II/14.4. A nukleotidok lebontása 391
A purin nukleotidok lebontása 392
A pirimidin nukleotidok lebontása 393

II/15. A szervezet anyagcseréjének összehangolt szabályozása 395
Müllner Nándor
Jóllakott állapot. 397
Éhezés 401
Éhező sejtek 403
Elágazási pontok az anyagcserében 403
Glukóz-6-foszfát 404
UDP-glukóz 404
Piruvát 404
Oxálacetát 405
Acetil-KoA 406
Patológiás állapotok 406
Éhezés 406
Kövérség, obezitás 407

II/16.
Biotranszformáció – gyógyszer-metabolizmus – méregtelenítés 409
Mandl József
II/16.1. A biotranszformáció folyamata, fázisai 409
A biotranszformáció első, előkészítő fázisa. 410
A biotranszformáció második, konjugációs fázisa 413
Glukuronidáció. 414
Szulfatálás 414
Glutationkonjugáció 414
Metilezés 415
A biotranszformáció harmadik fázisa. 415
A biotranszformáció jelentősége 416

II/17. Alkoholmetabolizmus 418
Csala Miklós
II/17.1. Az alkohol mint tápanyag 418
II/17.2. Az alkohol mint xenobiotikum 419
Egyéni különbségek az alkohol metabolizmusában. 420

III. FEJEZET: JELÁTVITEL, CELLULÁRIS ÉS SZUBCELLULÁRIS BIOKÉMIA

III/1. Jelátvitel 424

Buday László, Sipeki Szabolcs
III/1.1. A receptorok . . . 424
III/1.2. Protein-kinázok és foszfoprotein-foszfatázok . . . 426
A protein-kinázok . . . 426
Foszfoprotein-foszfatázok . . . 428
III/1.3. Protein domének a jelátvitelben . . . 429
III/1.4. A GTP-kötő fehérjék . . . 430
A heterotrimer G-fehérjék . . . 431
A kis G-fehérjék . . . 433
III/1.5. Inozitol-foszfolipidekkel működő jelpályák . . . 434
A inozitol-foszfolipidek hidrolízise mint jeltovábbító lépés . . . 435
A Ca^{2+} intracelluláris mediátor szerepe . . . 435
A diacil-glicerin a protein-kináz-C aktivátora . . . 436
A foszfatidil-inozitol 3-kináz segítségével működő jelpálya . . . 437
III/1.6. Jeltovábbítás ciklikus purin nukleotidokkal . . . 438
A cAMP-jelpálya . . . 439
Jelátvitel cGMP-vel . . . 441
III/1.7. A tirozin-kinázokkal működő jelpályák . . . 444
A növekedési faktorok jelátvitele . . . 444
Az inzulin jeltovábbító rendszere . . . 447
Nem-receptor tirozin-kináz segítségével aktiválódó jelpályák: a JAK-Stat jelpálya . . . 449
III/1.8. Jelátvitel receptor szerin/treonin-kinázokkal: a TGFβ jelpálya . . . 450
III/1.9. Jelátvitel foszforilációval szabályozott fehérjebontás segítségével: az NFκB jeLpálya . . . 451
III/1.10. A magi receptorok . . . 453

III/2.
Intracelluláris jelek érzékelése és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli pályák . . . 457
Bánhegyi Gábor
III/2.1. mTORC1, az intracelluláris jelek fő integrátora . . . 457
Aminosavérzékelés . . . 458
Növekedési faktorok hatása . . . 459
Energiatöltöttség érzékelése . . . 459
Stressz . . . 459
mTORC1 szubsztrátok . . . 459
Az autofágia szabályozása . . . 459
Mitokondrium biogenezis és más transzkripciós szintű mTORC1-hatások . 460
III/2.2. Az energiatöltöttség érzékelése – az AMP-kináz . . . 460
Az AMPK anyagcserehatásai . . . 461
III/2.3. Oxigénérzékelés . . . 462

III/3. Kronobiokémia (a cirkadián óra biokémiája) . . . 464
Bánhegyi Gábor
III/3.1. A központi oszcillátor . . . 464
III/3.2. Bemenő jelpályák – „Zeitgeber”-ek . . . 466
A cirkadián óra metabolikus szabályozása . . . 467
Redox szabályozás: NAD+/NADH . . . 467
Energiatöltöttség: AMP/ATP . . . 468
Oxigénérzékelés: hem . . . 468

III/3.3 Kimenő jelpályák – a génexpresszió szabályozása óramechanizmusokkal . . . 468
III/3.4. A cikadián óra szerepe a humán patológiában . . . 468

III/4. Az eukarióta sejtciklus szabályozása . . . 470
Csala Miklós
III/4.1. A sejtciklus fázisai . . . 470
Ellenőrzési pontok a ciklus során . . . 471
Restrikciós pont és G_1/S ellenőrzési pont . . . 471
G_2/M ellenőrzési pont . . . 472
M (metafázis vagy mitotikus orsó) ellenőrzési pont . . . 473
III/4.2. Ciklinek, ciklinfüggő kinázok és inhibitoraik . . . 473
Ciklin kötődése . . . **474**
Foszforiláció/defoszforiláció . . . 474
Gátló fehérje kötődése . . . 475
A G_1 fázis és átmenet az S fázisba . . . 475
A G_2 /M átmenet szabályozása . . . 477
III/4.3. DNS-hibák ellenőrzése a ciklus során . . . 480
ATR-CHK1 . . . 481
ATM-CHK2 . . . 481
III/4.4. A p53 fehérje szerepe a sejtciklus szabályozásában . . . 482
A p53 mennyiségének és aktivitásának szabályozása . . . 482
A p53 fehérjefoszforiláció általi aktiválódása . . . 482
A p53 aktiválódása az Mdm2 szekvesztrációjával . . . 483
A p53-aktiválódás sejtciklusgátló hatása . . . 484
III/4.5. A „transforming growth factor-β" (TGFβ) mint sejtciklusgátló hormon . . . 484

III/5. Apoptózis . . . 486
Csala Miklós
III/5.1. Az apoptózis kiváltó okai . . . 487
III/5.2. Az apoptózis morfológiai jellemzői . . . 488
III/5.3. Az apoptózis szabályozása – a kaszpázok . . . 490
Kaszpázok . . . 491
Kaszpázgátló fehérjék . . . 493
III/5.4. Az apoptózist beindító komplexek . . . 493
Apoptoszóma . . . 494
DISC („death-inducing signal complex") . . . 494
PIDD-oszóma . . . 495
III/5.5. A Bcl-2 fehérjék szerepe az apoptózis szabályozásában . . . 496
Proapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék . . . 497
Antiapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék . . . 497
Csak BH3 domént tartalmazó Bcl-2 fehérjék . . . 497
III/5.6. Az apoptózis fő útvonalai . . . 499
A mitokondriális apoptózis . . . 499
A halálreceptorról kiinduló apoptózis . . . 501
A p53-eredetű apoptózis . . . 502
Egyéb apoptózisútvonalak . . . 502
ER-stressz eredetű apoptózis . . . 502
Granzim-B hatására bekövetkező apoptózis . . . 503

III/5.7. Az apoptotikus testek eltakarítása 503

III/6. Az öregedés molekuláris biológiai alapjai 506
Sőti Csaba
III/6.1. Az öregedés jellemzői 506
III/6.2. Az öregedés oka és mechanizmusai 507
III/6.3. Celluláris szeneszcencia 508
Telomer régió és replikatív szeneszcencia 509
Szeneszcencia-asszociált szekréciós fenotípus (SASP). 510
III/6.4. A tápanyag ellátottság hatása az öregedésre 510
Kalóriacsökkentés. 510
A tápanyag-érzékelő jelpályák 511

III/7. Az extracelluláris mátrix 514
Csermely Péter
III/7.1. A kollagén, az extracelluláris mátrix fő alkotóeleme 514
III/7.2. Az extracelluláris mátrixot a kollagén mellett felépítő más makromolekulák . . 519
III/7.3. A csontképződés néhány molekuláris jellemzője: mineralizációs alapfogalmak 522
III/7.4. A sejtkapcsoló struktúrák és az extracelluláris mátrixhoz kötődő jelátviteli jelenségek 523
Réskapcsolat (gap junction) 525
A kadherin/katenin-függő jelátviteli út 525
Az integrin és a hozzá kötődő fokális adhéziós kináz 525
Az integrinhez kötődő extracelluláris molekulák 526
Integrin által közvetített, kívülről befelé irányuló jelátvitel, a fokális adhéziós kináz 526
Példák az integrin által közvetített, belülről kifelé irányuló jelátvitelre . . . 528
III/7.5. Az extracelluláris mátrix szerepe a tumor metasztázisban 528
Malignus sejtek kiszabadulása 528
Malignus sejtek vándorlása 530
Malignus sejtek letapadása 530

III/8. Szubcelluláris biokémia 531
Bánhegyi Gábor
III/8.1. Az eukarióta sejt kompartimentumai. 531
III/8.2. Az eukarióta sejt felépítése 532
Plazmamembrán 532
Citoszol 532
Sejtmag. 533
Mitokondrium 534
Az endomembrán rendszer. 535
A szekréciós pálya organellumai 535
Az endoplazmás retikulum 535
Endoplazmás retikulum – Golgi intermedier kompartimentum (ERGIC) . 536
Golgi-apparátus. 536
Szekréciós vezikulák 536
Az endomembrán rendszer oldalágai. 537
Zsírcseppecske 537

Autofagoszóma (autofág vakuóla) . . . 538
Endoszóma . . . 539
Lizoszóma . . . 539
Peroxiszóma . . . 540
Extracelluláris kompartimentumok . . . 541
III/8.3. Citoszkeleton és vezikuláris transzport . . . 541
A vezikuláris transzport . . . 541
A citoszkeleton . . . 545
Mikrofilamentumok / aktin filamentumok . . . 545
Intermedier filamentumok . . . 546
Mikrotubulusok . . . 548
Motorfehérjék . . . 549
Az izomszövet . . . 552
A citoszkeleton és a membránok kapcsolódása . . . 553
III/8.4. Organellum-biogenezis . . . 554
A mitokondrium biogenezise . . . 554
ER és magmembrán . . . 555
III/8.5. Fehérjeimport: az organellum proteóma kialakulása . . . 556
Fehérjeimport pórusokon keresztül: a sejtmag . . . 558
Kotranszlációs fehérjeimport: az endoplazmás retikulum . . . 558
Molekuláris mechanizmusok az endoplazmás retikulumhoz kötött fehérjeszintézisben . . . 559
Oxidatív fehérjefolding . . . 559
Minőségellenőrzés az endoplazmás retikulumban . . . 560
BiP (GRP78) . . . 560
N-glikoziláció és a glikoproteinek minőségellenőrzése . . . 560
Endoplazmás retikulumhoz kapcsolt fehérjelebontás (ERAD) . . . 562
Jelfolt és vezikuláris fehérjeimport: a lizoszóma . . . 562
Poszttranszlációs, transzmembrán fehérjeimport: a mitokondrium . . . 564
Érett fehérjék importja: a peroxiszóma . . . 566
III/8.6. Metabolizmus és transzport: a metabolóma kialakulása . . . 567
Az organellumok metabolikus profilja . . . 567
Az organellumok pH- és redox-homeosztázisa . . . 568
III/8.7. Organellum stressz és stressz jelpályák . . . 569
Az endoplazmás retikulum stressz . . . 569
Jelátvitel az ER és a sejtmag között . . . 570
Peroxiszomális stressz . . . 572
Mitokondriális stressz . . . 573
A mitokondriális stresszválasz jelpályái . . . 573
Mitokondriális UPR . . . 575
III/8.8. Organellum stressz és sejthalál . . . 575
Endoplazmás retikulum stressz és autofágia . . . 576
Mitokondriális eredetű nekrózis . . . 576
Lizoszomális eredetű nekrózis . . . 577

I.
FEJEZET

MAKROMOLEKULÁK SZERKEZETE ÉS MŰKÖDÉSE

I/1. Fehérjék szerkezete és fehérjeszerkezet kialakulását segítő sejtes mechanizmusok
(Csermely Péter, Sőti Csaba)

I/2. Enzimológia
(Kukor Zoltán)

I/3. Hemoglobin: az oxigénszállítás biokémiája
(Mandl József)

I/4. Proteázok
(Kereszturi Éva)

I/5. A hemosztázis biokémiája
(Keszler Gergely)

I/6. Transzporterek
(Lizák Beáta)

I/7. A nukleinsavak felépítése, szerepe
(Rónai Zsolt)

I/8. Transzkripció: a DNS-ben tárolt információ átírása RNS-re
(Sasvári Mária)

I/9. A génkifejeződés szabályozása eukariótákban, epigenetikai módosulások
(Nemoda Zsófia)

I/10. A genetikai kód és a fehérjeszintézis
(Mészáros Tamás)

I/11. A transzláció szabályozása
(Mészáros Tamás)

I/12. A fehérjék poszttranszlációs módosítása
(Mészáros Tamás)

I/13. Proteaszomális fehérjedegradáció
(Mészáros Tamás)

I/14. Vírusok molekuláris biológiája
(Csala Miklós)

I/15. Géntechnika, biotechnika
(Rónai Zsolt)

I/16. Rendszerbiológia (systems biology), bioinformatika, hálózatok
(Csermely Péter, Kapuy Orsolya)

I/1.
Fehérjék szerkezete és fehérjeszerkezet kialakulását segítő sejtes mechanizmusok

Csermely Péter, Sőti Csaba

I/1.1. AMINOSAVAK ÉS PEPTIDEK

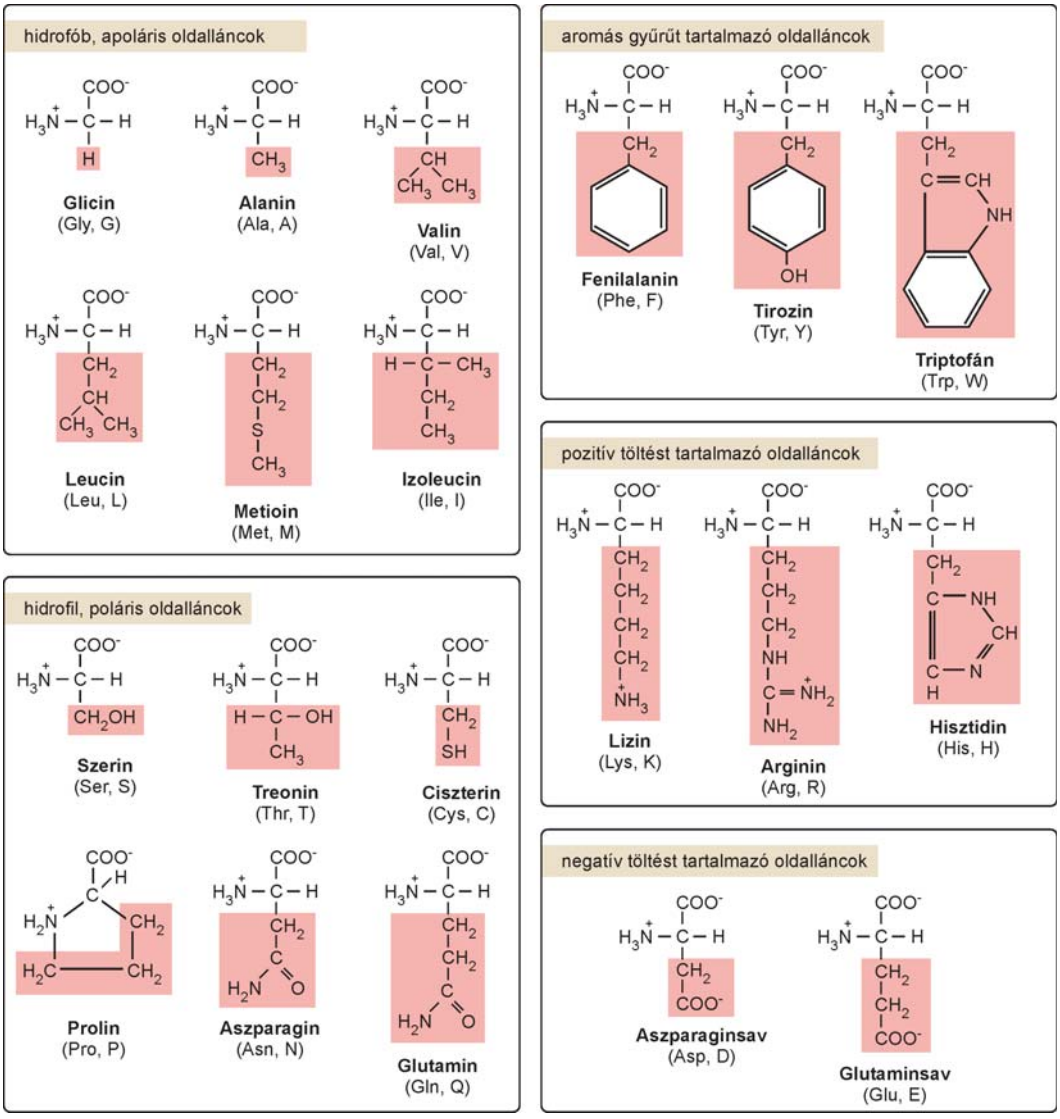
Aminosavak, mint fehérjealkotó molekulák. A fehérjéket α-aminosavak alkotják. Az emberi szervezet fehérjéibe közvetlenül beépülő 20 aminosavat az *I/1-1. ábrán* mutatjuk be.

Az aminosavak közös szerkezeti elemei, az α-amino és α-karboxil-csoportok a későbbiekben ismertetett módon egymással peptidkötést képeznek. A peptidkötések a fehérjék szerkezetének alapvázát teremtik meg. A fehérjék egyediségét azonban az adott fehérjét felépítő aminosavak oldalláncai határozzák meg. Oldalláncaik szerint az aminosavak polárosak (pl. a neutrális pH-n az oldalláncában is töltéssel bíró glutaminsav, vagy lizin, illetve az oldalláncában töltéssel nem rendelkező, de poláros szerin, vagy glutamin), vagy apolárosak (pl. valin, izoleucin) lehetnek. A poláros aminosavak vizes közegben általában a fehérjék felszínén, az apoláros oldalláncúak pedig a fehérjék belsejében helyezkednek el.

A cisztein S–H csoportjainak oxidációjával diszulfidhidakat tud képezni, és ezzel stabilizálhatja a sejten kívüli, oxidatív térben elhelyezkedő fehérjék szerkezetét. Hasonlóan a fehérjeszerkezetet merevítő hatása van a prolinnak, amely gyűrűs szerkezete miatt a polipeptidlánc forgási képességét erőteljesen csökkenteni képes. Ezzel ellentétben a legegyszerűbb aminosav, a glicin igen kis oldallánca miatt hajlékonnyá teszi az őt tartalmazó fehérjerészletet. Az aminosavak közül egyedül a hisztidin rendelkezik olyan funkciós csoporttal, amelynek pK-ja a fiziológiás pH- hoz közeli értéket mutat, így protondonorként és -akceptorként egyaránt képes működni. Emiatt a hisztidint igen gyakran találjuk olyan enzimek (pl. Ser- proteázok) katalitikus helyén, amelyek protonátmenettel járó reakciókat (pl. hidrolízis) katalizálnak. A különböző fehérjék működését a sejtben különféle poszttranszlációs módosítások szabályozzák. A szerin, treonin és tirozin oldalláncok foszforilációja vagy a lizin acetilációja ilyen szabályozófolyamatok alapját képezi.

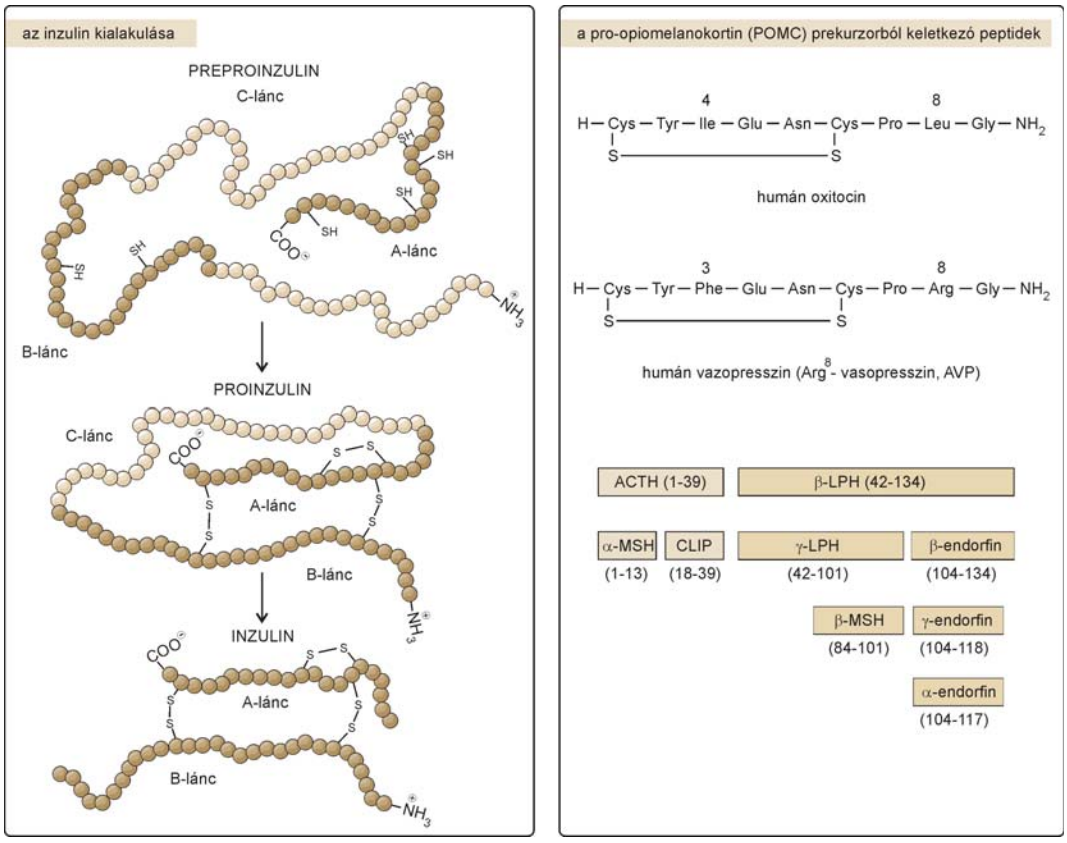
A fehérjealkotó aminosavak (a glicin kivételével, amely optikailag nem aktív) L konfigurációjúak. A fehérjék optikai aktivitása azonban nem annyira az aminosavaikból, hanem a szimmetriasíkkal nem rendelkező szerkezeti elemeikből (így pl. a későbbiekben tárgyalt α-hélixből) ered.

Nem fehérjealkotó aminosavak. A fehérjealkotó 20 aminosav mellett számos olyan, biológiailag fontos aminosavat ismerünk, amelyek nem fordulnak elő fehérjékben. Ilyen pl. a koenzim A részét képező β-alanin (NH_2-CH_2-CH_2-COOH), az ingerületátvitelben fontos szerepet betöltő gamma-amino-vajsav (GABA), vagy az urea ciklusban szerepet játszó ornitin és citrullin. A szabad aminosavak dekarboxilezésével biológiailag igen hatékony *biogén amin*ok jönnek létre, mint pl. a hisztidinből keletkező hisztamin. A tirozinból több szintetikus lépéssel számos katekolamin így a dopamin, a noradrenalin és az adrenalin szintetizálódik, triptofánból pedig szerotonin keletkezik.



I/1-1. ábra
A fehérjealkotó aminosavak

A *biológiailag fontos peptidek* közül az inzulin, az oxitocin, a vazopresszin, és a pro-opiomelanokortin peptidcsalád vázlatos szerkezetét mutatjuk be a *I/1-2. ábrán*. A bemutatott képletek alapján néhány általánosítást is tehetünk. A biológiailag hatékony peptidek, peptidhormonok szintézise igen gyakran egy prekurzor számos egymást követő proteolitikus hasításával megy végbe. A peptid-hormonokban igen gyakran találunk diszulfid-hidakat. Ennek az az oka, hogy a kisméretű peptidek önmagukban csak ritkán képesek stabil szerkezetet kialakítani, és az, hogy e peptidek hatásmódjukat a sejten kívüli térben fejtik ki, amely a sejt belsejével szemben oxidáló, így kedvez a diszulfid hidak kialakulásának és fennmaradásának. Így a szerkezet stabilizálását az inzulin, az oxitocin és a vazopresszin esetében a diszulfidhidak biztosítják.

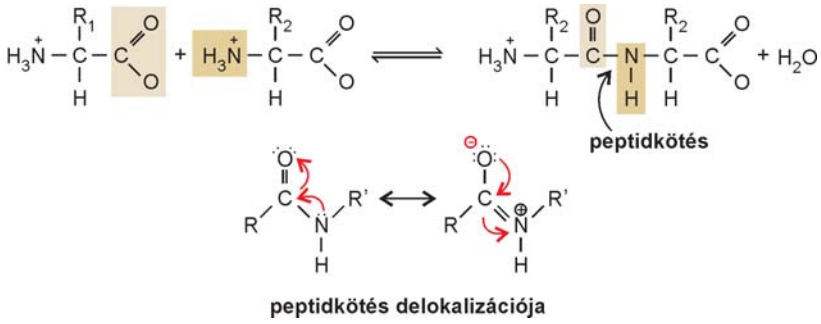


I/1-2. ábra
Az inzulin, az oxitocin, a vazopresszin és a pro-opiomelanokortin peptidcsalád vázlatos szerkezete

I/1.2. A FEHÉRJÉK SZERKEZETE

A fehérjék általános tulajdonságai. A fehérjék egy vagy több polipeptidláncból épülnek fel. Az egyes polipeptidláncokat egymással peptidkötéssel összekapcsolódó aminosavak alkotják. A fehérjék molekulatömegét kilodalton (kDa) egységekben adjuk meg. A fehérjék változatos működését az aminosavsorrend által meghatározott egyedi, ún. natív térszerkezet teszi lehetővé.

Fehérjék szerkezeti szintjei. A fehérjék szerkezetének négy szintjét különítjük el. Az elsődleges szerkezet az aminosavak peptidkötésekkel meghatározott sorrendjét jelöli. A másodlagos szerkezet az aminosavsorrendben egymás melletti, vagy egymáshoz közel lévő aminosavak által kialakított, gyakran előforduló fehérjeszerkezeti elemeket különbözteti meg. A fehérjék harmadlagos szerkezete egy polipeptidlánc teljes háromdimenziós szerkezetét jelöli. A negyedleges szerkezetről akkor beszélünk, ha több polipeptidlánc kapcsolódik össze, avagy a polipeptidlánchoz más, nem fehérje természetű molekula is kapcsolódik, pl. hem, lipidek, szacharidok, RNS.

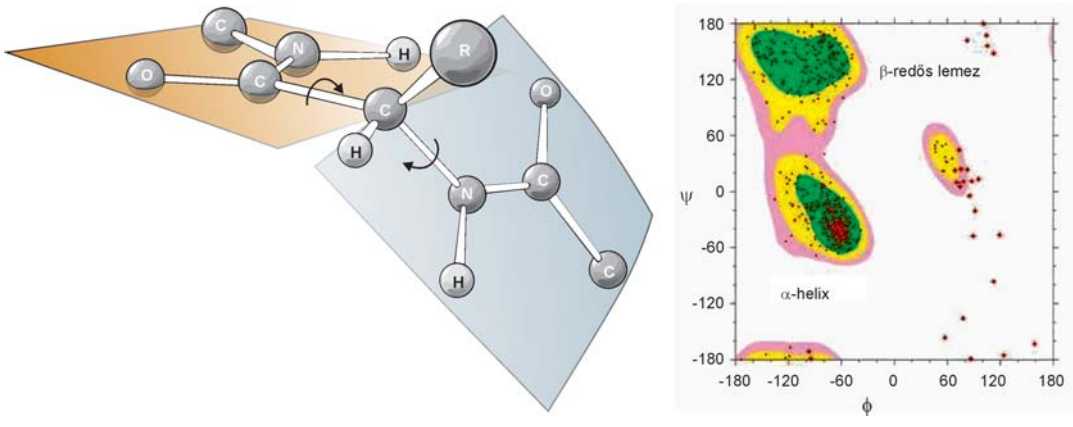


I/1-3. ábra
A peptidkötés

A peptidkötés. A peptidkötés *(I/1-3. ábra)* az aminosavak α-karboxilcsoportjából és α-aminocsoportjából vízkilépéssel keletkező szekunder savamid kötés. A peptidkötés a karbonilcsoport π-elektronjainak és a nitrogén nemkötő elektronpárjának a delokalizálódása miatt planáris, merev szerkezetű, a kötésszögek 120°-osak. A peptidkötés körül a delokalizált elektronpárok miatt nincsen forgás. A kötés transz konformációjú. Ez alól kivétel a prolin melletti peptidkötés, amely cisz állapotban is lehet. (A prolin melletti peptidkötés izomerizációját segítő sejtes mechanizmusokra a fejezet végén térünk ki.)

A peptidek biológiai szintézise során az elsőnek beépülő aminosav α-aminocsoportja (N-terminális) és az utolsónak beépülő aminosav α-karboxilcsoportja (C-terminális) marad csak szabadon. A peptidek szerkezetét ennek megfelelően balról jobbra az N-terminális felől a C-terminális irányába írjuk fel, azaz egy GDEY képletű tetrapeptid glicint tartalmaz az N-terminálisán és tirozint a C-terminálisán. Ezen tetrapeptid neve: glicil-aszpartil-glutamil-tirozin. A háromnál több aminosavból felépülő peptideket oligopeptidnek, az 50-nél több aminosavból állókat pedig fehérjéknek nevezzük.

A fehérjék másodlagos szerkezete. A peptidkötés delokalizált szerkezete miatt a fehérjék peptidláncában forgás csak az α szénatom melletti két σ- (szigma-) kötés mentén lehetséges *(I/1-4. ábra)*. A két σ-kötés helyzetét jellemző szögpár azonban a peptidkötést alkotó csoportok és az aminosav oldalláncok térigénye miatt nem vehet fel tetszőleges értékeket. Ha a fehérjékben ténylegesen előforduló szögpárok értékeit ábrázoljuk, az ún. *Ramachandran-diagram*hoz jutunk *(I/1-4. ábra)*. A

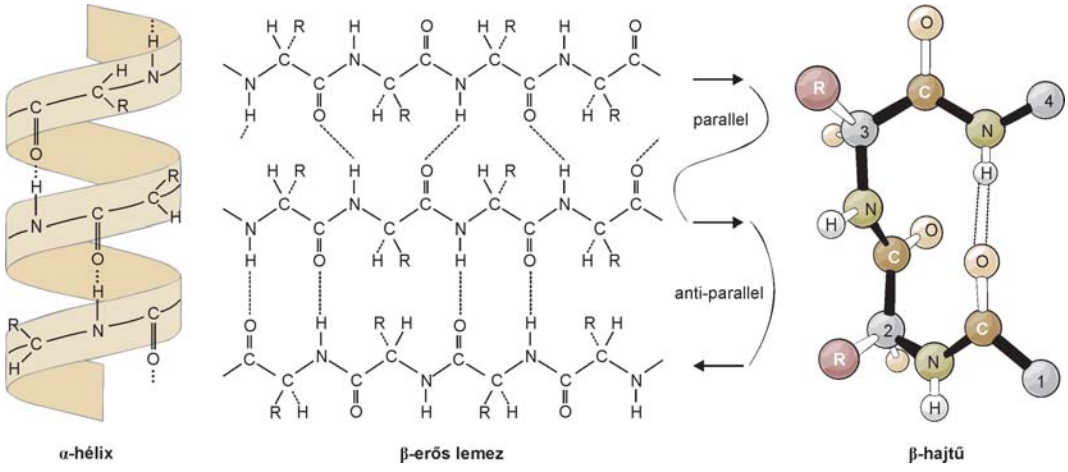


I/1-4. ábra
A peptidkötés forgási szögei és a Ramachandran-diagram

Ramachandran- diagramot megfigyelve azt tapasztaljuk, hogy a lehetséges szögpárok zöme viszonylag kis szigetekre koncentrálódik. Egy-egy ilyen sziget egy meghatározott másodlagos fehérjeszerkezeti elemnek (α-hélix, β-redőzött lemez, β-hajtű, illetve más típusú hélixek) felel meg. Az egyedi szögpárok általában rendezetlen (random coil) struktúrákat jelölnek.

Az α-hélix. Az α-hélixet alkotó, a primer struktúrában egymás melletti aminosavak jobbmenetes (az óramutató járásával megegyező) hélixben csavarodnak fel *(I/1-5. ábra)*. A jobbmenetesség a fehérjealkotó aminosavak L konfigurációjából következik, ugyanis a balmenetes α-helikális struktúrában az L-aminosavak oldalláncai a közelükben lévő peptidkötések karbonilcsoportjaival összekoccannának. Az α-hélix tipikus hossza 15-25 aminosav. Az α-hélixek egy menetében 3,6 aminosav található, így az α-hélixben minden 7. aminosav van kb. egymás fölött. Az α-hélixeket a hélix tengelyével párhuzamos, a peptidkötések karbonilcsoportjai és N–H csoportjai között kialakuló H-híd kötések stabilizálják. Az α-hélixek belsejében nincsen hely. Emiatt az aminosav oldalláncok mindegyike az α-hélix külsején, körkörösen kifelé helyezkedik el, így a hidrofób peptid-gerincet elrejti. Az α-hélixek az őket felépítő aminosavak hidrofobicitása következtében egyaránt megtalálhatók a fehérjék felszínén, belsejében vagy a transzmembrán régiókban. Az α-hélixeket sokszor hengerként is ábrázolják. Bizonyos aminosavak (így például az α-szénatom melletti σ-kötések forgási szögeit az α-hélix szerkezetével nem összeférhető pozícióban rögzítő gyűrűs szerkezet miatt a prolin) „hélixtörők", azaz α-hélixekben nem fordulnak elő.

A β-redős lemez. A β-redős lemez szerkezetet cikk-cakkos struktúrára emlékeztető, nyújtott egyedi peptidláncok, β-redők alkotják *(I/1-5. ábra)*. A egyedi β-redőket rájuk merőleges, a peptidkötések karbonilcsoportjai és N–H csoportjai között kialakuló H-híd-kötések stabilizálják. Több, H-híd kötéssel összekötött β-redő β-redős lemez szerkezetet alkot. Az egyedi β-redőket sokszor az N-terminális aminosavuktól a C-terminális aminosavuk felé mutató vastag nyíllal szokták ábrázolni. A β-redők a β-redős lemezben N- és C-terminális aminosavaik elhelyezkedése szerint vagy egymással párhuzamos (parallel), vagy egymással ellentétes (antiparallel) állásban



I/1-5. ábra
Az α-hélix, a β-redős lemez és a β-hajtű

vannak. A parallel β-redős lemez egymást követő β-redőit hosszú aminosav szakaszok kötik össze. Ezek az összekötő szakaszok sokszor a β-redős lemez síkja felett (vagy alatt) elhelyezkedő α hélixeket alkotnak. Az antiparallel β-redős lemez egymást követő β-redőit rövid szakaszok kötik össze. Ezek a szakaszok sokszor β-hajtű struktúrát képeznek. A β-redős lemez aminosav oldalláncai vagy a lemez felett, vagy a lemez alatt, a lemez síkjából kiállva helyezkednek el. A β-redős lemez struktúra lapszerű képződményt alkot. A lap a fehérjeszerkezetekben hajlott állapotban, sőt, akár hengerpalástot képezve is előfordulhat. Mivel a β-redőben a hidrofób peptid gerinc fedetlen, ezért ez általában a fehérjék belsejében helyezkedik el. A fehérjék felszínén, több β-redős lemez egymáshoz illeszkedésével alakul ki a β-amiloid struktúra, amely a neurodegeneratív betegségekben (így az Alzheimer- és Parkinson-kórban) előforduló fehérjezárványok szerkezetét alkotja.

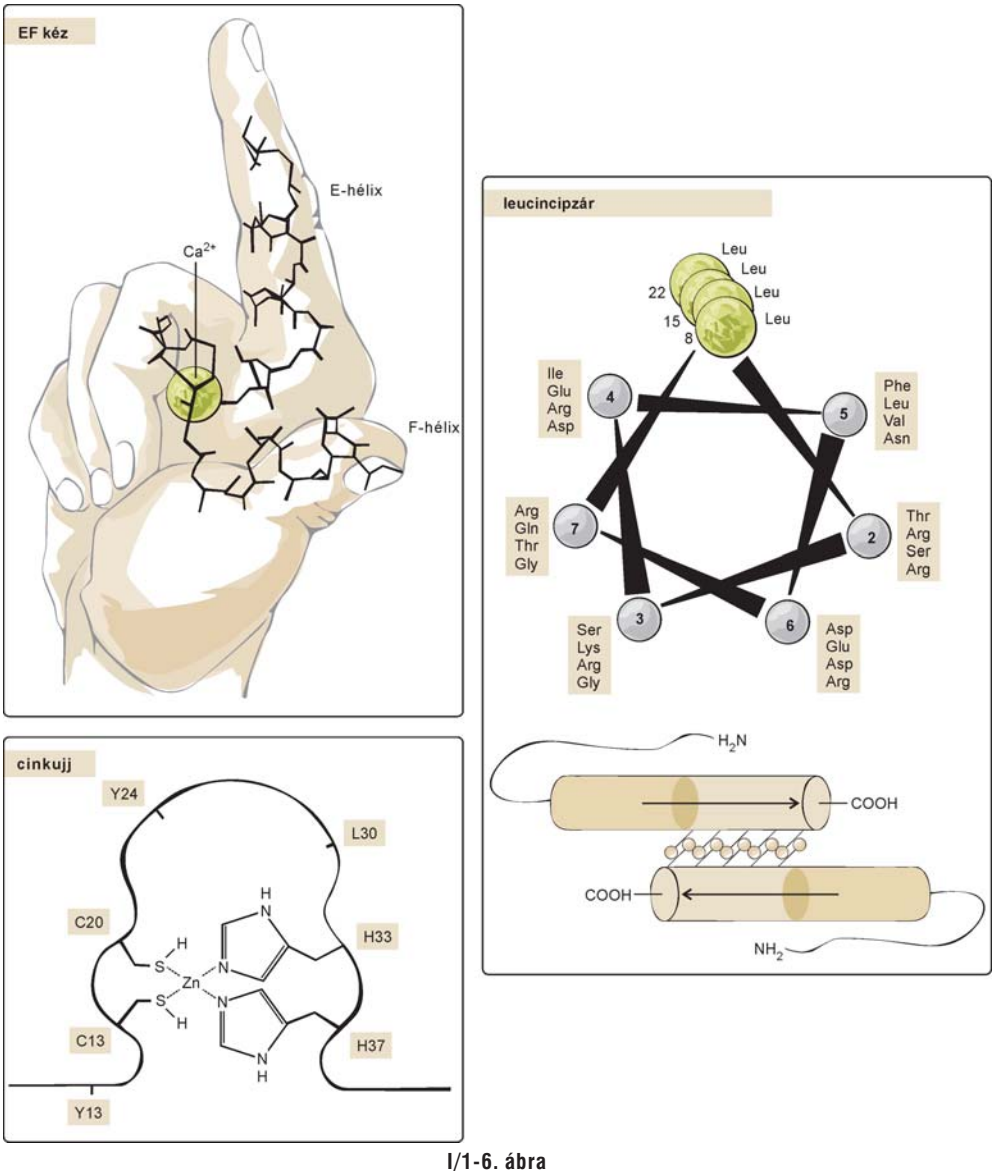
A β-hajtű (vagy β-görbület, β-kanyar, β-turn). Négy aminosav β-hajtű struktúrát képezhet, amelyet az aminosavak közötti hidrogén-híd kötés tart össze *(I/1-5. ábra)*. A β-hajtűben a polipeptidlánc megfordul, emiatt ilyen szerkezeti elemek igen gyakran a fehérjemolekula külső részén fordulnak elő. A fehérjefelszínen megjelenő β-hajtű részletek részt vehetnek a fehérjemolekulák egymáshoz kötésében. Sejtjeinkben igen sok jelátviteli folyamat fehérjekomplexek kialakulásával és elbomlásával megy végbe. E molekuláris történésekben számos esetben a felszíni β-hajtűk kitüntetett szerepet játszanak.

Rendezetlen szerkezetű fehérjeszakaszok. A fehérjékben másodlagos szerkezettel nem rendelkező, rendezetlen szerkezetű (random coil, disordered, unstructured) szakaszok is előfordulhatnak. Ezek a szakaszok vagy rövid, a másodlagos szerkezetű szakaszokat összekötő peptidlánc-részletek, vagy a fehérje nagyobb részére (néha egészére) kiterjedő struktúrák. A rendezetlen fehérjeszakasz flexibilitása az őket hordozó fehérjét alkalmassá teszi arra, hogy sokfajta más molekulához (pl. fehérjéhez) tudjon kötődni. Így ugyanaz a fehérje többféle sejtes funkciót is elláthat. A rendezetlen szakaszok enzimatikus módosításával (így pl. szerin, treonin vagy tirozin aminosavakon történő foszforilálásával) a kötődés, és így az adott fehérje funkciói jól szabályozhatók. A nagyobb rendezetlen szakaszokkal bíró fehérjék elsősorban az emberi szervezet sejtjeire jellemzőek, ahol a sejtes (pl. jelátviteli) folyamatok komplexitását növelik.

Fehérjedomének. A fehérjedomének olyan, a másodlagos fehérjeszerkezeti elemeknél nagyobb (azokat sokszor tartalmazó), de a teljes polipeptidlánc által alkotott szerkezetnél általában kisebb fehérje szerkezeti egységek, amelyek meghatározott funkciókat hordoznak, és szerkezetük viszonylag jól konzerválódott az evolúció során. Így például beszélhetünk nukleotidkötő, kináz-, illetve foszfatázdoménekről. Egy fehérjemolekulában több domén is előfordulhat. A különböző domének igen gyakran csak egy vékony, strukturálatlan fehérjeszakasszal kötődnek egymáshoz, amely biztosítja egymástól többé-kevésbé független konformációváltásukat és azt is eredményezi, hogy az egyes fehérjedomének limitált proteolízissel egymástól elkülöníthetők. (A proteáz jobban hozzáfér a szabadon hagyott összekötő fehérjeszakaszokhoz, mint a domének belsejében lévő globuláris struktúrákhoz.)

A fehérjedomének egyik példája a két α-hélixből alkotott kalciumkötő „EF-kéz” *(I/1-6. ábra)*, ahol a kalciumionnal a két hélix találkozásánál elhelyezkedő glutaminsav és aszparaginsav oldalláncok karboxilcsoportjai képeznek komplexet. (A kialakuló komplex hasonló az általános kémiai komplexometriás titrálások EDTA-komplexéhez.) EF-kéz szerkezet például a kalciumfüggő jelátvitelben részt vevő kalmodulin fehérjében fordul elő.

A fehérjedomének másik példája a négy cisztein és/vagy hisztidin oldallánccal komplexet képző cink ionnal stabilizált „cinkujj”, amely a fehérjék DNS-hez, illetve (ún. LIM-doménként) foszfotirozinokhoz való kötésében vesz részt *(I/1-6. ábra).* A cinkujj ujjszerű részét alkotó két aminosav lánc akár 20–30 aminosavat is tartalmazhat, amelyek α-hélixeket formálhatnak. Cinkujj-szerkezetek találhatóak pl. a szteroidhormon-receptorokban, amelyek cinkujj-részletekkel kötődnek a DNS- hez.



I/1-6. ábra

EF-kéz, cink-ujj és leucin-zipzár (Az EF-kéz E és F α-hélixei közötti zseb aszparaginsav és glutaminsav-oldalláncai komplexet képeznek a kalciumionnal; a cinkujj ciszteinjeinek SH-csoportjai és hisztidin imidazoljainak nitrogénjei szolgálnak a cinkionok ligandumaiként; a leucin-cipzár „ragadós”, egy egyenes mentén elhelyezkedő hidrofób leucinjait az ábrán szürke körök jelölik.)

A „leucincipzárt" két hidrofób felszínnel rendelkező α-hélix alkotja *(I/1-6. ábra)*. A hélixekben minden hetedik aminosav leucin, így a hélixek egy hidrofób „szalagot" tartalmaznak az oldalukon. Vizes közegben a hidrofób részek nem stabilak, és csak egymással összetapadva képesek stabilizálódni. Emiatt, ha két leucincipzár kezdő leucinjai közel kerülnek egymáshoz, akkor a többi leucin cipzárszerűen sorozatosan egymáshoz képes kapcsolódni. A dimer struktúra a cinkujjhoz hasonlóan szintén DNS-kötő fehérjeelem. Leucincipzárt tartalmaznak pl. a Fos és Jun transzkripciós faktorok, amelyek ezekkel a struktúrákkal DNS-kötődésre képes homo- és heterodimereket képezhetnek.

A domének viszonylagos konzervativitása és egymástól való elég nagy függetlensége a *moduláris evolúció* elméletével magyarázható. Ezen elmélet azon megfigyeléseket foglalja össze, amelyek kimutatták, hogy egymástól nagymértékben különböző funkciójú fehérjékben igen gyakran hasonló (és hasonló részfunkciókat betöltő) domének fordulnak elő. A sejt „nem pazarol". Ha már egyszer „rájött" arra, hogy milyen fehérjedomén a legalkalmasabb arra, hogy pl. a fehérjét az aktinszálakhoz hozzákösse, akkor ugyanezt a domént alkalmazza akkor, ha egy a sejtmetabolizmusban és akkor is, ha egy a jelátvitelben használatos enzimet kell az aktinhoz hozzákötnie. A fehérjedoméneket kódoló génszakaszok gyakran együtt cserélődnek, vándorolnak a különböző gének között az evolúció során. A fehérjedomének megőrzését az is indokolja, hogy viszonylag kevés olyan fehérjetekeredési alapstruktúra ismeretes, amely nem változik meg (nem megy tönkre), ha az őt alkotó aminosavakból jó néhány random mutációval kicserélődik. A fehérjék harmadlagos szerkezetének igen erős szerkezeti kötöttségei miatt a természet a konformációs térnek csak megdöbbentően kis százalékát tudja kihasználni. Emiatt a stabil fehérjedomén szerkezetek a földi élet megőrzésre érdemes nagy kincseivé léptek elő.

A fehérjék harmadlagos szerkezete. A fehérjék harmadlagos szerkezetének egyik legfontosabb tulajdonságát az a vizes közeg határozza meg, amelyben a fehérjék döntő többsége (pl. a membránokban elhelyezkedő fehérjék kivételével) létezik. A víz igen stabil, hidrogén-hidas szerkezete kiszorítja magából a hidrofób aminosav oldalláncokat, így azok a fehérje belsejében helyezkednek el, a fehérje pedig az olajcsepphez hasonlóan gömb alakú (globuláris) szerkezetet vesz fel. A fehérje felszínén a hidrofil, illetve töltött aminosav oldalláncok találhatóak. Amennyiben két fehérje felszínére hidrofób oldallánc kerül (például a fehérje szerkezetének sérülése, vagy a fehérje későbbiekben tárgyalt denaturációja során), ezek egymással való kölcsönhatással tudják csökkenteni a víz hidrogénhidas szerkezetét sértő, destabilizáló hatást. A hidrofób fehérjefelszínek összetapadását a fehérjék aggregációjának nevezzük. A sejten belül a denaturáció, a hidrofób felszínek megjelenése és nemspecifikus kölcsönhatásai funkciózavarhoz vezetnek, emiatt a sejtben számos, a későbbiekben tárgyalt mechanizmus alakult ki a fehérjék natív konformációjának védelmére, és helyreállítására.

A fehérjék harmadlagos szerkezetének másik legfontosabb tulajdonsága az, hogy a fehérjék belsejében nincsen üres hely. A szoros illeszkedést csak nagyon egyedi szerkezetek képesek megvalósítani, hiszen ha pl. két egymás mellett lévő α-hélix egyikében glicin oldallánc van, a másikában pedig triptofán, akkor nem lehet a glicint nagyméretű, a triptofánt meg kisméretű oldalláncra cserélni, hiszen így „lyuk" jönne létre a fehérje belsejében. A „lyukba" vízmolekulák kerülnének, azok pedig a hidrofób belső közeget destabilizálnák. Emiatt a fehérjék belsejében a mutációs szabadság kicsi, azaz a fehérjék belsejében elhelyezkedő aminosavak kevésbé változnak meg az evolúció során, mint a fehérjék külsején levők.

I/1.3. A FEHÉRJÉK SZERKEZETÉT KIALAKÍTÓ ÉS STABILIZÁLÓ ERŐK

A fehérjék létrejöttének elengedhetetlen feltétele a peptidkötések kialakulása. Ha a fehérjéket azonban csak a peptidkötések tartanák össze, akkor egy fehérjének számtalan konformációja egyaránt stabilis volna. A fehérjék natív konformációját számos más kötés, erő stabilizálja. Ezek közül a legnagyobb energiával a *diszulfidhíd*kötés bír, amely két cisztein aminosav oldallánc SH-csoportja enyhe oxidációjával létrejövő kovalens kötés. A diszulfid-hidak a sejt reduktív belső közegében nem stabilak. Emiatt diszulfidhidak csak a sejten kívüli térben, illetve a sejten kívüli térbe való kilépésre a fehérjéket „felkészítő" endoplazmás retikulum és Golgi-rendszer oxidatív belső terében, illetve a mitokondrium membránközti terében találhatóak.

Az egyedi kötések közül a *hidrogén-híd kötés* erőssége átmenetet képez a kovalens és a másodlagos kötések kötéserőssége között. Az α-hélixeket és a β-redős lemezeket stabilizáló, peptidkötésekből származó hidrogén-híd kötések mellett az aminosav oldalláncok (pl. szerin, threonin –OH csoportok, aszparaginsav, glutaminsav karboxilcsoportjai, hisztidin imidazolgyűrű nitrogénjei, lizin aminocsoportja stb.) is képesek hidrogénhídkötések kialakítására, amelyek mind fontos szerepet töltenek be a fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetének kialakításában.

A sejtjeinkben, szervezetünkben előforduló semleges pH-n a savas aminosav-oldalláncok (pl. aszparaginsav, glutaminsav) negatív, a bázisosak (pl. arginin, lizin) pozitív töltéssel rendelkeznek. A pozitív és negatív töltések „párosodásából", az ún. sóhidak, *sókötések* képződéséből jelentős energianyereség származik. Ha nem egy teljes töltés alakul ki a fehérjemolekulán belül, hanem a különböző elektronegativitású atomok miatt elektron eltolódás megy végbe, és ennek következtében résztöltések keletkeznek, ezen ellentétes résztöltések párosodása is energianyereséggel jár. A résztöltések kialakulása révén keletkező dipólusok közti Coulomb vonzóerőket másodlagos kötőerőknek, vagy *van der Waals-erők*nek hívjuk. A van der Waals-erők közül a két dipólus vagy egy dipólus és az általa indukált másik dipólus között létrejövő erők erősebbek. A fehérje hidrofób belsejében csak a molekulák belső rezgéséből átmenetileg kialakuló tranziens dipólusok közötti, ún. London-erők hatnak, amelyek a kialakult dipólusok vagy indukált dipólusok között ható van der Waals-erőknél kisebbek.

A fehérjék szerkezetének kialakításában fontos szerepet játszanak a *hidrofób kölcsönhatások*. Ahogyan korábban említettük a globuláris fehérjék vizes oldatában a hidrofób aminosav oldalláncok a fehérje belsejében találhatóak, a hidrofil oldalláncok pedig a fehérje felszínén helyezkednek el. Ötven évvel ezelőtt úgy gondolták, hogy ezt az általánosan jellemző elrendeződést a hidrofób oldalláncok van der Waals féle vonzása stabilizálja. A hetvenes évek elején jöttek rá arra, hogy a hidrofób kölcsönhatások mértéke jóval meghaladja azt a szintet, ami pusztán a van der Waals-kötőerők hatásával magyarázható lenne. Kiderült, hogy a globuláris fehérjék harmadlagos szerkezetének stabilitását egy, a fehérjéktől független tényező, a víz szerkezete biztosítja. Hidrofób anyagok képtelenek a vízmolekulákkal hidrogénhídkötéseket létesíteni, így a víz/hidrofób határfelületen a víz hidrogénhidas szerkezete megtörik. Így már könnyen érthető, hogy nem a fehérjemolekula hidrofób magjának önvonzása, hanem a fehérjét körülvevő víz hidrogénhidas szerkezetének lehető legteljesebb megőrzése az a hajtóerő, amely a fehérjék „bent hidrofób, kint hidrofil" harmadlagos szerkezetét stabilizálja. A fentiekből egyszersmind az is következik, hogy a fehérjék alakjára az őket körülvevő közeg viszonylag kis változásai is igen nagy hatással lehetnek. Így a külső közeg változásai a fehérjék denaturációjának igen fontos okai lehetnek.

A fehérjék szerkezetének kialakításában és megőrzésében a legnagyobb szerepet az utoljára említett hidrofób és van der Waals-erők játsszák. A fehérjemolekulákon belüli hidrogén-híd kötések hatása számottevő, míg az egyenként nagy energiát képviselő sókötések és diszulfidhidak összességükben (csekély számuk miatt) csak kevéssé járulnak hozzá a fehérjeszerkezet kialakulásához.

I/1.4. A FEHÉRJÉK SZERKEZETÉNEK DENATURÁCIÓJA

A legtöbb fehérje csak egyetlen kitüntetett szerkezeti állapotban, a natív szerkezetben stabil. Különböző környezeti behatásokra a natív szerkezet felbomolhat, amelyet a fehérje denaturációjának nevezünk. A fehérjék denaturációja lehet reverzíbilis és irreverzíbilis. A denaturáció visszafordíthatósága függ a fehérje fajtájától és a környezeti változás mértékétől. Így a denaturációfajták „reverzíbilis" és „irreverzíbilis" osztályokra való felosztása csak általános útmutatásként szolgál az adott denaturációfajta hatására.

Fehérjék reverzíbilis denaturációja. Reverzíbilis denaturáció például *kisózás*sal jöhet létre. A kisózás során a fehérje oldat sókoncentrációját a fiziológiás sókoncentráció sokszorosára (pl. több mólosra) növeljük. Azonos fehérjék ugyanabban az oldatban ugyanolyan töltéssel rendelkeznek, azaz taszítják egymást. A nagy sótartalom a Coulomb erőket lecsökkenti, így a fehérjék szerkezetét stabilizáló só-hidak megszűnnek, ami megbontja a fehérjék szerkezetét. A fehérjék közötti taszítóerők is lecsökkennek, ami tovább kedvez a fehérjék felszínre kerülő hidrofób részei összetapadásának, aggregációjának. Az *oldószercsere* során az eredetileg vizes közeget szerves oldószerre (például alkoholra) cseréljük le. A fehérjét körülvevő közeg így egyre inkább a fehérje belsejében lévő hidrofób részeket kezdi kedvelni, azaz a fehérje mintegy „kifordul", és az addig belül lévő aminosav oldalláncai kifelé, a kívül lévők pedig befelé törekednek. Az *SH-reagensek* szulfhidrilcsoportot tartalmazó molekulák. Jelenlétük a fehérjékben található diszulfid hidakat redukálja, és ezzel szerkezetstabilizáló hatásukat megszünteti.

Fehérjék irreverzíbilis denaturációja. Az irreverzíbilis denaturáció leggyakoribb formája a hődenaturáció. A hődenaturációt alkalmazzuk a főzés során, hogy az ételekben lévő fehérjék natív szerkezetét megbontsuk. Erre azért van szükség, mert a peptidkötéseket elbontó proteáz emésztő enzimek a natív szerkezetben nem férnek hozzá a peptidkötésekhez, hiszen a peptidikötések mind az α-hélix, mind pedig a α-redős lemez szerkezetek belsejében, az aminosav oldalláncok által takarva, védetten helyezkednek el. A hődenaturáció a peptidkötéseket a fehérje felszínére juttatja, és ezáltal a proteázok számára hidrolizálhatóvá teszi. Extrém pH változtatás is irreverzíbilis denaturációt okozhat, hiszen egyneművé teszi a fehérjék töltéssel rendelkező aminosav oldalláncainak töltéseit. Az erősen savas közegben csak pozitív, az erősen lúgos közegben pedig csak negatív töltések a fehérje különböző részeit eltaszítják egymástól, így a fehérjék szerkezetét megbontják. Az erősen savas közeg denaturáló hatását a gyomorban, az erősen lúgos közeg által okozott denaturációt pedig a mosás során hasznosítjuk. A hidrogénhidas szerkezetet megbontó anyagok, így a peptidkötések egymással képzett H-hídjainál erősebb H-hidakat képző *urea*, illetve *guanidin*, valamint a *kaotrop ionok* (a jodid – I^- –, a rodanid vagy tiocianát – SCN^- – és azid – N_3^- –ionok) szintén a fehérjék denaturációját okozzák. (Kaotrop ágenseknek nevezzük azon anyagokat, melyek megbontják a makromolekulák szerkezetét, s ezáltal denaturálják azokat.) A *detergensek* hosszú, hidrofób láncot és hidrofil vagy ionos, töltéssel rendelkező kisebb molekularészletet tartalmazó

amfipatikus vegyületek. Detergens-jellegű anyagok vannak minden mosószerben, de ilyenek a szappanokban található hosszú szénláncú zsírsav molekulák is. A detergensek hidrofób részei befúródnak a fehérje hidrofób magjába és felszínre hozzák, míg a hidrofil/töltéssel rendelkező részei a fehérje-víz határfelületen segítik elő az oldódást, igy a fehérje natív szerkezete felbomlik. Az ionos detergens molekulák töltései azonosak, ezek taszítják egymást, így megbontják a velük érintkező fehérje részletek szerkezetét.

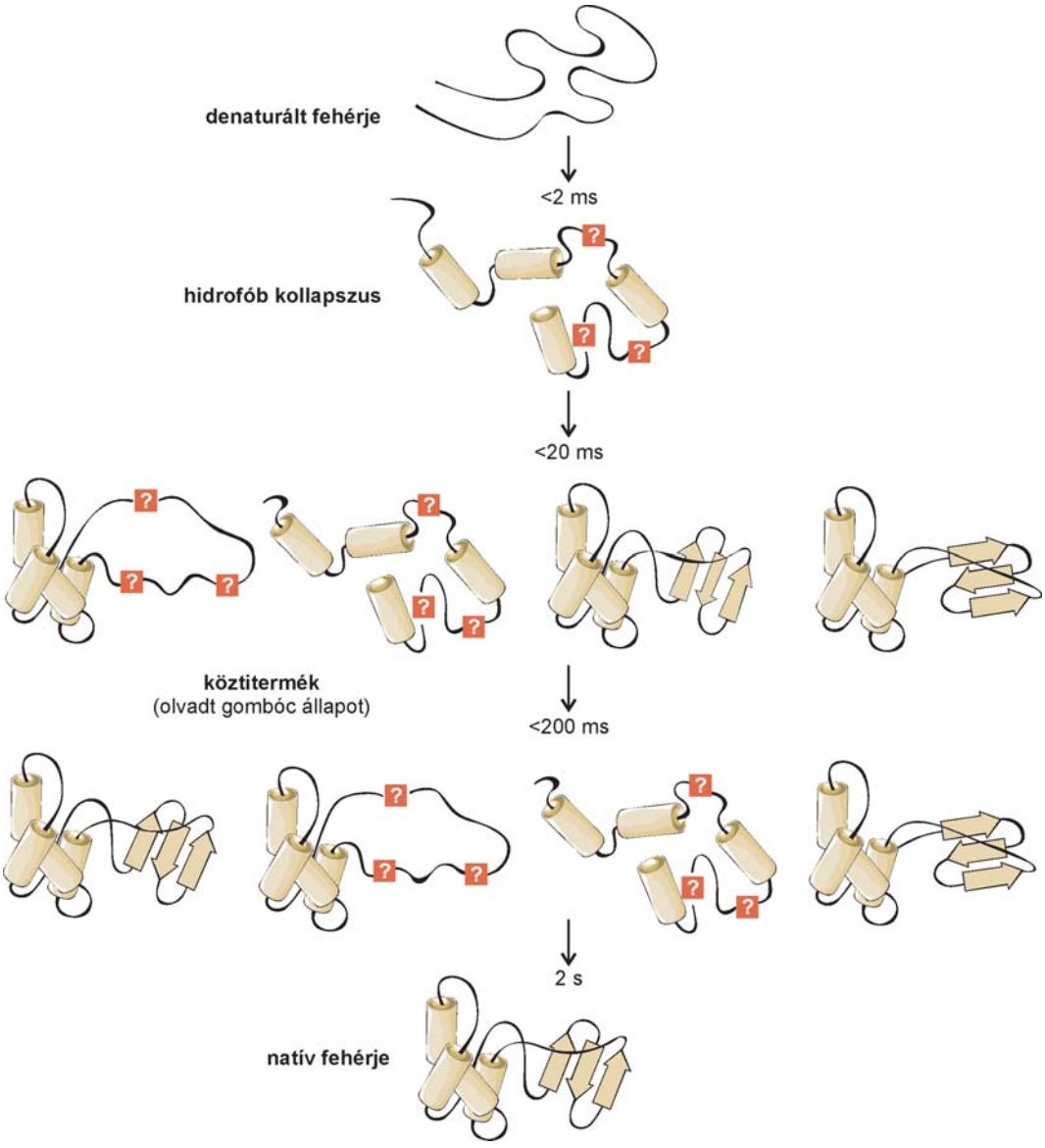
I/1.5. A FEHÉRJÉK SZERKEZETÉNEK KIALAKULÁSA IN VITRO

In vitro körülmények között a fehérjék szerkezetének kialakulása viszonylag egyszerűen vizsgálható. A fehérjét először valamilyen reverzíbilis behatással denaturáljuk, majd a denaturálószert eltávolítva különböző szerkezetvizsgálati eljárásokkal a fehérje szerkezetének kialakulását folyamatosan nyomon követjük. A folyamat kiindulási állapota a rendezetlen fehérjemolekulák sokasága (ezeket a *I/1-7. ábrán* csak egyetlen szerkezettel jelöltük). A folyamat végpontja a funkcióval rendelkező fehérje egyetlen, natív állapota. A fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakulása nem egymásra épülő lépések egyenes láncolataként írható le, hanem egy olyan folyamat, amelyben számtalan zsákutca van és a natív, alacsony energiájú szerkezetét kereső fehérjemolekulának sok, különböző konformációjú változata egyidejűleg megtalálható *(I/1-7. ábra)*. A szerkezet kialakulása gyors lépésekkel indul, a folyamat lassú, sebesség meghatározó lépései a natívhoz közeli állapot kifejlődésére jellemzőek.

A fehérjeszerkezet kialakulásának első, gyors lépései. A szerkezet kialakulásának első lépései során azok az egymás melletti aminosav oldalláncok rendeződnek össze, amelyek α-helikális (kisebb mértékben β-hajtűs) szerkezetek kialakítására képesek. Ennek az az oka, hogy **(a)** az egymás melletti aminosav oldalláncok könnyen megtalálják egymást (az aminosav oldalláncok lokális koncentrációja 10^8 és 10^{11} mol/liter közé esik!), **(b)** a közel fekvő aminosavak közötti hidrogénhídkötések kialakulásának valószínűsége magas, és **(c)** a stabilizálódó fehérjeszerkezet csak viszonylag kis fehérjerészletre terjed ki, így a kialakulásával együtt járó entrópiacsökkenés viszonylag kicsi (a termodinamikai vonatkozások részleteit lásd később). A β-redős lemezek kialakulása azért követi az α-hélix megjelenését, mert bennük egymástól távollévő aminosavak között létesülnek hidrogénhíd- kötések, ami mindhárom fenti szempont alapján sokkal nehezebben következik be.

Az α-hélixek kialakulásával párhuzamosan az előzőekben részletezett hidrofób effektus miatt a fehérje hidrofób magja „összeugrik", egy vagy több hidrofób csomó képződik. Ezen hidrofób kollapszus (összeugrás) során a fehérjének egy olyan magja alakul ki, amely a további rendeződési folyamatokat nagymértékben meggyorsítja. A fehérjeszerkezet kialakulásának ezen autokatalitikus (öngyorsító) sajátossága nélkül a világegyetem egész eddigi életkora sem lenne elegendő egyetlen darab fehérjemolekula teljes szerkezetének kialakulásához (*Levinthal-paradoxon*).

A harmadlagos szerkezet kialakulásának ezen kezdeti lépései rendkívül gyorsan, a másodperc tört része alatt lezajlanak. A kezdeti lépések után egy stabil, köztes intermedier, az ún. „*olvadt gombóc"* (molten globule) keletkezik. Az olvadt gombóc másodlagos szerkezeti elemei (így bizonyos β-redős lemezek is) többé-kevésbé kialakultak, a harmadlagos szerkezete azonban erőteljesen fluktuál. Az olvadt gombóc formában lévő fehérjemolekula a hidrofób kollapszus miatt elég kompakt, a denaturált fehérje összes térfogatának mintegy 10–20%-át teszi ki, és térfogata csak 10–20%-kal nagyobb a natív fehérje térfogatánál. A harmadlagos szerkezet kialaku-



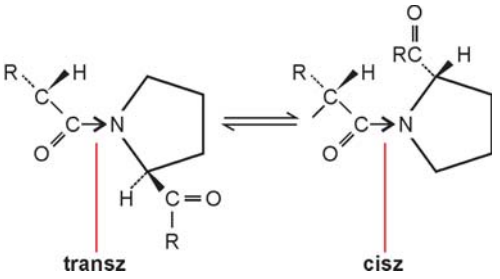
I/1-7. ábra
A fehérjeszerkezet kialakulásának lépései *in vitro* (Az ábrán a lizozim szerkezetének kialakulását mutatjuk be. Más, a lizozimnál nagyobb fehérjék kialakulása a bemutatottnál bonyolultabb utakat követ, és az ábrán jelölt 2 másodperccel szemben akár percekig-órákig is eltarthat.)

latlansága miatt az olvadt gombóc még tartalmaz felszíni hidrofób részleteket, ezért aggregációra hajlamos. Az olvadt gombóc szerkezetben még előfordulnak a fehérje belsejében lévő vízmolekulák, amelyek a natív szerkezet kialakulása során „kipréselődnek" a hidrofób környezetből.

A fehérjeszerkezet kialakulásának záró-, sebességmeghatározó lépései. A záró-lépések azért sebességmeghatározók, azért lassúak, mert a tekeredő fehérje belső,

hidrofób magjának úgy kell átrendeződnie a natív, rendezett szerkezetbe, hogy közben a hidrofób kollapszus után a fehérjét a víz igen szorosan összepréseli, és emiatt a belsejében nem marad elég tér arra, hogy a rosszul összetekeredett (pl. a felszínre még kilógó) hidrofób polipeptidlánc a natív szerkezetet felvehesse.

A folyamat záró lépései során kerül sor az egyedi, nagyenergiájú kötések, így a diszulfid-hidak és a só-kötések kialakulására. Ebben a fázisban kerül sor a prolin melletti peptidkötések (az egyetlen olyan peptidkötés, amely az általánosan jellemző transz helyzet mellett cisz állapotban is előfordulhat – lásd *I/1-8. ábra*) cisz/transz izomerizációjára is. E zárólépések azért maradnak a folyamat végére, mert legtöbbször a fehérjeláncban egymástól távoli csoportok kölcsönhatását feltételezik. Az ilyen kölcsönhatások létrejöttük esetén is túl nagy entrópia veszteséget jelentenének abban az esetben, ha a fehérjeszerkezet többi eleme az adott –SH csoportokat, illetve ionokat nem hozná amúgy is egymáshoz közel.



I/1-8. ábra
A prolin melletti cisz/transz peptidkötés

I/1.6. A FEHÉRJESZERKEZET KIALAKULÁSÁNAK TERMODINAMIKAI VISZONYAI

Ahogy a fehérje szerkezete kialakul, a fehérje egyre rendezettebb állapotba kerül, azaz az entrópiája csökken. A folyamat entalpiaváltozása szintén negatív, hiszen a rendeződés során különböző kötések kialakulása zajlik, amely energianyereséggel jár (a folyamat exoterm). A

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$$

egyenlet értelmében az entrópiacsökkenés az entalpiacsökkenés ellen dolgozik, és ez a hatás különösen magas hőmérsékletek esetén érvényesül. *Ez a fehérjék hődenaturációjának termodinamikai oka*, hiszen biztos hogy létezik egy olyan hőmérséklet, ami felett az entrópiatag a ΔG értékét pozitívvá teszi, ami a betekeredési folyamatot megfordítva a fehérjék denaturációjához vezet. Az entrópia és az entalpia hatása meglehetősen kiegyenlített, így a folyamat szabadentalpiaváltozása elég mérsékelt, –20 és –70 kJ/mol közé esik. Ha a fehérjeszerkezet kialakulását nagyobb szabadentalpiacsökkenés kísérné (a fehérje a natív konformáció kialakulásával mélyebb energiagödörbe zuhanna bele) a kialakult szerkezet igen stabil lenne. Ez erőteljesen csökkentené annak a valószínűségét, hogy a natív fehérje konformációváltozásokon menjen keresztül, ami gátat szabna a legtöbb enzimfunkciónak és jelátviteli folyamatnak. A natív fehérjekonformáció kialakulásával együtt járó szabadentalpia-csökkenés háromszor-ötször nagyobb értéke esetén a földi élet nem jött volna létre (vagy nem a fehérjéket használná az egyik legfontosabb molekulájaként).

A fehérjék natív szerkezetében a szerkezeti részletek döntő többségének energiaminimuma lokálisan nagyenergiájú részleteket, ún. aktív helyeket hoz létre. Ezeken az aktív helyeken olyan konformációs feszültség lép fel, amely a fehérjemolekula további átalakulása révén már nem tud stabilizálódni. A fehérje ilyen aktív helyei csak akkor képesek arra, hogy tovább stabilizálódjanak, ha valamilyen más molekulát megkötnek. Termodinamikai szempontból a fehérjék aktív helyeinek léte adja meg az enzimműködés magyarázatát, hiszen ha a fehérjemolekula minden részlete

az elérhető legstabilabb konformációban lenne, nem tudna olyan konformációs átmeneteket létrehozni, amelyek átsegítik a szubsztrátot a katalizálandó reakció energiagátján.

I/1.7. KÜLÖNBSÉGEK AZ *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* FEHÉRJESZERKEZET KIALAKULÁS KÖZÖTT

A ribonukleáz enzim reverzíbilis denaturációja (*Anfinsen-kísérlet*, *I/1-9. ábra*) során a négy diszulfidhíddal rendelkező ribonukleázt *Christian Anfinsen* és csoportja több mint 90%-ban az eredeti szerkezetébe visszaalakítani (renaturálni) volt képes. A kísérlet azért volt a fehérjebiokémiai kutatások Nobel-díjjal jutalmazott jelentős mérföldköve, mert azt bizonyította, hogy a fehérjére jellemző összes információ a fehérje primer szerkezetével (az aminosav szekvenciával) meghatározott. Az *Anfinsen-kísérlet* azt is megmutatta, hogy a ribonukleáz szerkezetének kialakulása spontán végbemegy. A fehérjék jelentős része – a ribonukleáz A-val ellentétben – segítséget igényel ahhoz, hogy a szerkezetét ki tudja alakítani. E segítség formáit a fejezet további részeiben ismertetjük.

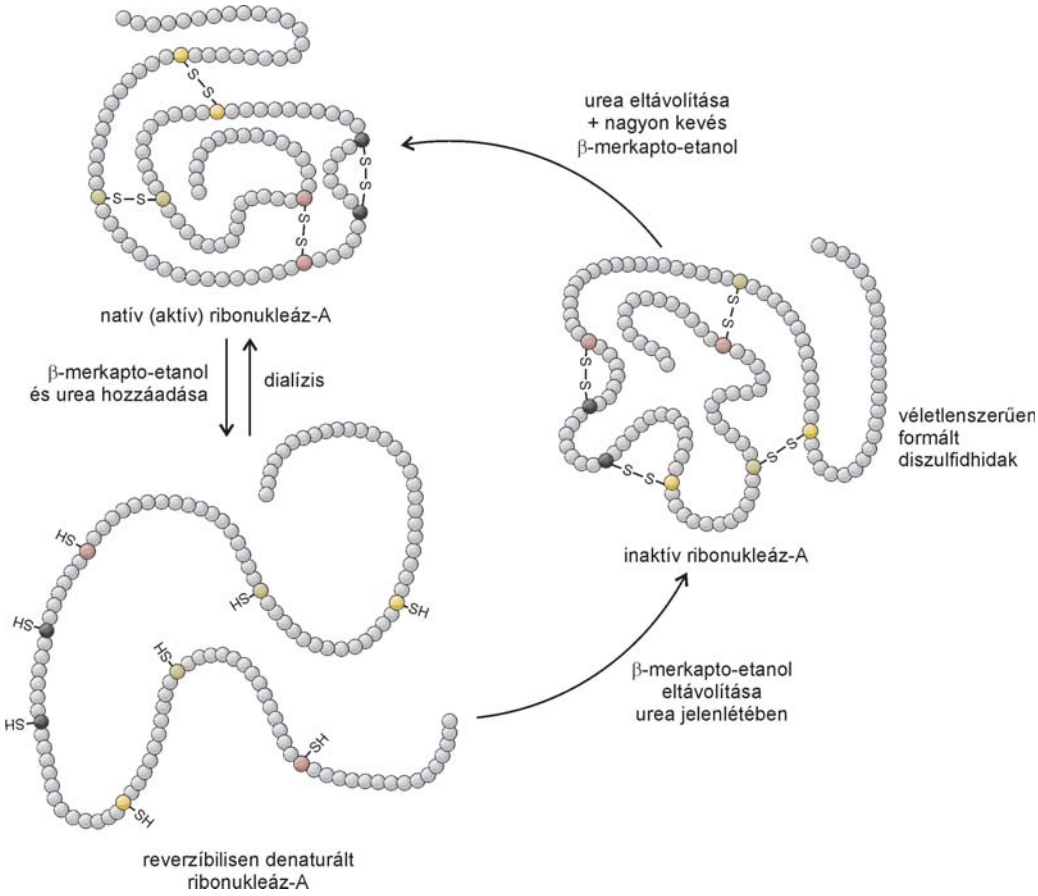
Az Anfinsen-kísérlethez hasonló *in vitro* fehérje-renaturáció azonban számos vonatkozásában eltér a fehérjék *in vivo* körülmények közötti „betekeredésétől" (folding- jától). Az *in vitro* folyamat sok esetben órák alatt megy végbe, míg az *in vivo* betekeredés legfeljebb perceket vesz igénybe. *In vitro* a fehérjekoncentrációt nem lehet 0,1–1 mg/ml fölé emelni, mert ellenkező esetben a kezdeti, kitekeredetthez közeli állapotok és az olvadt gombóc intermedier hidrofób felszínei miatt a tekeredő fehérjék intenzív aggregációja következik be. *In vivo* a fehérjekoncentráció ennél legalább százszor magasabb, aggregáció mégsem tapasztalható. *In vitro* az egész fehérje egyszerre tekeredik, *in vivo* a riboszómából „kibújó" naszcens fehérjének először az N-terminálisa nyerheti el végleges állapotát, amit csak később követhet a fehérje szintézisének végén megszülető C-terminális betekeredése.

Megállapítható tehát, hogy *in vivo* körülmények között kell, hogy legyenek olyan mechanizmusok, amelyek védik a naszcens fehérjét az aggregáció és a „túl korai" (csak az N-terminálisra kiterjedő) betekeredés ellen, visszafordítják a tekeredő fehérjéket a tekeredés zsákutcáiból és meggyorsítják a fehérjeszerkezet kialakulásának záró, sebesség-meghatározó lépéseit: a hidrofób mag lassú rendeződését, a prolin melletti peptidkötések izomerizációját és a diszulfidhidak kialakulását. (A sóhidak kialakulását nem kell segíteni, mert az ellentétes töltések mindenképpen vonzzák egymást, ha elég közel kerülnek egymáshoz.) E segítő feladatokat a sejten belül az ún. chaperonok (dajkafehérjék) látják el.

I/1.8. A FEHÉRJÉK SZERKEZETÉNEK KIALAKULÁSA ÉS MEGŐRZÉSE A SEJTBEN, A CHAPERONOK

Egy közhasznú definíció szerint a chaperonok olyan fehérjék, amelyek más fehérjék instabil állapotaihoz kötve, azokat stabilizálva, megszabják az adott fehérje sorsát a sejten belül. A chaperonok elnevezésére használatos szó francia eredetű, gardedámot jelent, hiszen ezek a fehérjék úgy kísérik, irányítják a többi fehérjét, mint ahogy a gardedámok irányították, óvták a süldő leánykákat a hajdan volt bálokon.

A chaperonok közül számos fehérje szintézise változatos környezeti stresszek (pl. hősokk, glukózmegvonás) hatására számottevően megemelkedik. Ezek a



I/1-9. ábra

Az Anfinsen-kísérlet (A ribonukleáz *A* eredeti enzim aktivitásának akár 90%-át is visszanyerő dialízis során az enzim, a β-merkapto-etanol és az urea keverékét olyan félig-áteresztő hártyába zárták, amely a külső térbe csak a kis molekulákat, így a β-merkapto-etanolt és az ureát engedte át.)

hősokk fehérjék (Hsp-k) és glukózregulált fehérjék (Grp-k) a stressz hatására károsodott fehérjék „helyretekerésében" közreműködve egy ősi, sejten belüli védekezési mechanizmus elemeit alkotják. Nem minden chaperon hő-sokk fehérje és fordítva: nem minden hősokk fehérje chaperon.

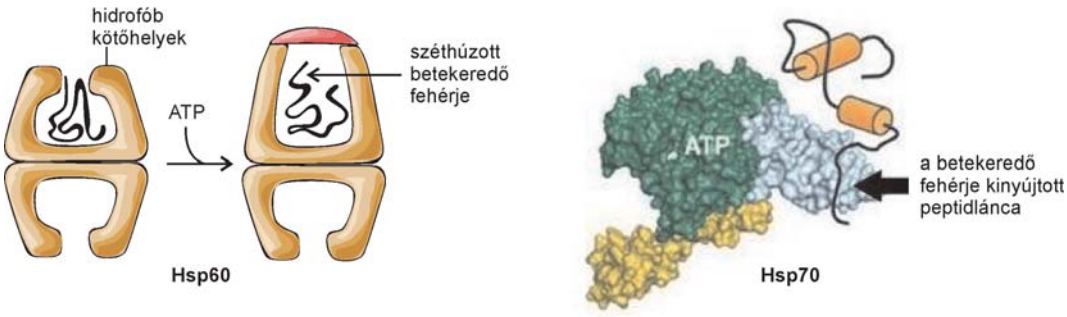
A fentiek értelmében a naszcens fehérjék aggregáció elleni védelmét és N-terminális részletük „idő előtti" betekeredésének megakadályozását a riboszómával asszociált molekuláris chaperonok, leginkább a 70 kDa-os hő sokk fehérjék (Hsp70) látják el. A riboszóma mellett „várakozó" Hsp70 molekulák mintegy „ráülnek" a naszcens fehérje először szintetizálódó N-terminális részletének hidrofób szakaszaira, és megvédik, további tekeredésre képes állapotban tartják e fehérjeelemeket. A különböző chaperonok a natív konformációjukat még el nem nyert, illetve a stresszhatásra részlegesen denaturált fehérjéket leginkább hidrofób felszíneik alapján ismerik fel. Bizonyos chaperonok esetén a felismerést segítik a részleges denaturáció során a fehérjék felszínére került peptidkötések is.

A fehérjék konformációja kialakulásának záró lépései közül a diszulfidhidak keletkezését a *protein-diszulfid-izomeráz* enzim segíti. Az enzim (amelyet Anfinsen csoportjával párhuzamosan két magyar tudós, *Venetianer Pál* és *Straub F. Brúnó* fedezett fel, akik a protein-diszulfid-izomerázt tekeráznak nevezték el) a cisztein oldalláncok –SH-csoportjainak reverzíbilis oxido/redukcióját katalizálja, és közben segíti a diszulfid hidakkal stabilizálódó fehérje korrekt konformációjának kialakulását is. A protein-diszulfid-izomeráz leginkább az endoplazmás retikulum lumenében fordul elő, amely sokkal oxidáltabb, mint a citoplazma, ezáltal kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. Az endoplazmás retikulum oxidációs állapota átmenetet képez a citoplazma és az extracelluláris környezet redoxpotenciálja között és így a protein-diszulfid-izomerázzal együtt fokozatosan felkészíti a szekrécióra, illetve a plazmamembrán külső oldalára kerülő fehérjéket a sejten kívüli tér sokkal oxidatívabb környezetére. A prolin melletti peptidkötések cisz/transz izomerizációját (*I/1-8. ábra*) a *peptidil-prolil-cisz/transz-izomeráz* (PPI, rotamáz) segíti. A peptidil-prolil-cisz/transz-izomeráz elnevezés egy népes családot jelöl, amelynek tagjai igen sok fehérjekomplex, így pl. a szteroid receptor komplexeinek is részét képezik. Az immunszuppresszióban használatos jónéhány szer peptidil-prolil-cisz/transz-izomerázokhoz kötődve fejti ki a limfociták aktivációját gátló hatását.

A chaperonok az előzőekben ismertetett funkcióikat számos enzimaktivitás segítségével tudják betölteni. Ezek közül a legjelentősebb a chaperonok egy nagy csoportjára (az ún. ATP-függő chaperonokra) jellemző adenozin trifoszfát-kötése és hidrolízise (ATPáz aktivitás). ATP kötésére a chaperonok konformáció változáson mennek keresztül, majd az ATP hidrolízisével az eredeti állapotukba visszaalakulnak (ATP-ciklus). Az ATP-függő chaperonoknak két nagy családja ismeretes. Az egyik a *Hsp60 fehérjék* családja, amelyek üreges szerkezetűek. A betekerendő (visszatekerendő) fehérje ebbe az üregbe kerül, ahol a Hsp60 az ATP-ciklus során először "széjjelhúzza", majd elereszti *(I/1-10. ábra)*. Figyeljük meg, hogy a széthúzással a Hsp60 ellensúlyozza a víz hidrofób kollapszust okozó összenyomó hatását, és nagyobb helyet biztosít a félretekeredett fehérje belső hidrofób magjának az elereszés során megvalósuló újrarendeződésre. A másik nagy család a *Hsp70 fehérjék* családja. Ezek a fehérjék a betekerendő fehérjének egy kisebb szakaszát kötik meg, ahol a peptidláncot az ATP-ciklus során először kinyújtják, majd elereszti. Egy betekerendő fehérjére egyidejűleg akár több Hsp70 is „rácsimpaszkodhat" *(I/1-10. ábra).* Gondoljuk meg, hogy a polipeptidlánc több helyen is bekövetkező kinyújtása, majd elereszése milyen nagy rángásokat okozhat a betekerendő fehérje szerkezetében. Az élesztő *Hsp104* ATP-áz chaperonja két aminosavanként araszoló lépésekkel húzza ki az egyik aggregált fehérjét a többi közül. A legombolyított fehérje a szerkezetét más chaperonok segítségével nyeri vissza. Az ATP-függő chaperonok a fenti ciklusokat ugyanazzal a fehérjével többször is megismételhetik. Azonban 5-8 ciklus után a folyamat kinetikája fokozatosan megváltozik, ami a visszatekeredésre képtelen fehérjét a komplexhez hozzákötő proteolitikus enzimeknek adja át lebontásra.

Az ATP-függő chaperonok mellett ATP-független chaperonok is ismeretesek. E fehérjék, pl. az ún. *kisméretű chaperonok* családja általában 10–30 kDa-os fehérjéket jelöl. Az ATP-független chaperonok leginkább a károsodott fehérjék átmeneti megkötésében, és aggregáció elleni védelmében vesznek részt addig, ameddig e fehérjéket át nem tudja adni az ATP-függő chaperonok valamelyikének. A kis chaperonok közé tartozó αB-krisztallin a szemlencse áttetszőségét biztosítja.

A fehérjék helyes konformációjának kialakításán túl a chaperonok a *fehérje konformációs homeosztázis* fő fenntartói: segítenek a fehérjekomplexek kialakulásában, a sejten belüli membránokon keresztül megvalósuló fehérjetranszportban, illetve bi-



I/1-10. ábra

A chaperonok két alapvető hatásmechanizmusa (Az ábra bal oldalán látható Hsp60 a felső részén lévő hidrofób kötőhelyekkel ismeri fel a betekerendő fehérje felszínére került hidrofób részeket. A Hsp60 üregének tetejére az ATP kötésével párhuzamosan a Hsp10 fehérje „sapkája" kerül, amelyet az ábrán pirossal jelöltünk. Így a Hsp60 a betekerendő fehérjét zárt, védett üregében, az ún. Anfinsen-ketrecben húzza szét, majd ereszti el. Az ábra jobb oldalán látható Hsp70 molekulából egyszerre több is kötődhet ugyanahhoz a betekerendő fehérjéhez.)

zonyos fehérjék (pl. protein kinázok, transzkripciós faktorok, receptorok) inaktív/aktív formájának egymásba való átalakításában is. Chaperonok (hősokk fehérjék) indukciója (pl. lázas állapotban) elősegíti a betegségek által megtámadott szövetek, szervek gyorsabb regenerációját és további betegségek ellen védelmet biztosít. A chaperonok ilyenkor a károsodott szövet, illetve szerv sejtjeiben felhalmozódó elromlott szerkezetű fehérjék denaturáció elleni védelmét, visszatekerését, illetve lebontását koordinálják. A chaperonok fehérje homeosztázist védő működése bizonyos betegségekben és az öregedés során csökken.

I/2. Enzimológia

Kukor Zoltán

A szervezetben zajló több ezer biokémiai folyamat – néhány kivételtől eltekintve – katalizátorok közreműködésével játszódik le. A szervezetben fehérje és ribonukleinsav alapú katalizátorok találhatóak. A folyamatok döntő része fehérjealapú katalizátorok, az enzimek segítségével játszódik le. Az enzimek a reakciósebességet 10^5–10^{17}-szeresére növelik! Ribozimnak a ribonukleinsav katalizátorokat nevezik. A ribozimok csak néhány reakciót katalizálnak, ezek elsősorban nukleinsavak átalakítására szolgálnak.

I/2.1. ENZIMEK ELNEVEZÉSE

Az enzimeket kezdetben triviális néven nevezték el, így született pl. a hexokináz, tripszin, kimotripszin név. Néhány elnevezés elterjedtsége, rövidsége miatt történelmileg rögzült (tripszin, pepszin, trombin). Az enzimek számának bővülése miatt vált szükségessé a szisztematikus elnevezés. Ennek megfelelően az enzimek nevét jelenleg általában szubsztrátjuk nevéből *-áz* végződéssel képzik. A hexokináz enzim a hexózokat foszforilálja:

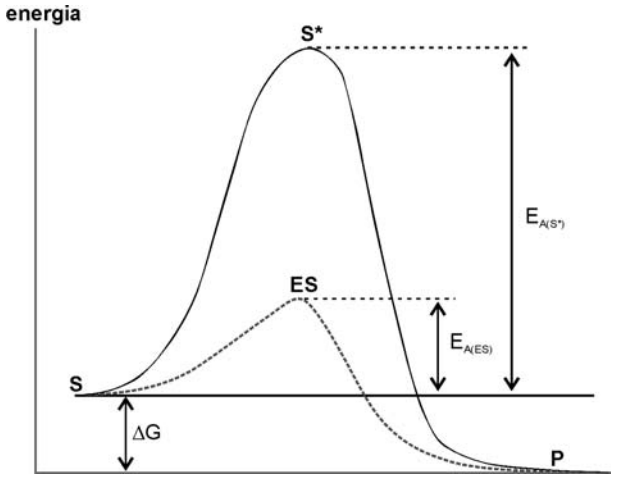
$$\text{glukóz} + \text{ATP} \rightarrow \text{glukóz-6-foszfát} + \text{ADP}$$

Az enzimek szabályos jelölése az Enzyme Commission (Enzim Bizottság) ajánlása szerint történik. Az enzim azonosítására négy, egymástól ponttal elválasztott szám szolgál, ezek közül az első az *enzim osztályát* jelöli *(oxidoreduktáz, transzferáz, hidroláz, liáz, izomeráz, ligáz)*, a többi a szubsztrátokat és a reakció mechanizmusát pontosítja.

Az enzimek elnevezésének szabályai nem teszik lehetővé a különböző fajok és az izoenzimek megkülönböztetését. Ha szükséges, akkor ezt jelölni kell.

I/2.2. ENZIMKATALÍZIS

A termodinamika II. főtétele szerint csak azok a reakciók mennek végbe önként, amelyek szabadentalpia- (ΔG) vagy szabadenergia változása (ΔF) negatív. Termodinamikailag két reakciótípus különböztethető meg, az önként végbemenő (exergonikus) és az önként végbe nem menő (endergonikus) reakció. Az exergonikus reakció termodinamikai értelemben megy önként végbe, ha magas az aktiválási energiája, reakció nem történik. Az enzimek, a katilizátorokra jellemzően, új reakcióút megnyitásával az aktiválási energiát csökkentik, így teszik lehetővé a reakció lezajlását *(I/2-1. ábra)*.



I/2-1. ábra

A nem katalizált- és az enzimkatalizálta S → P reakció energiaszintjei. Az S* ($E_{A(S^*)}$)a nem katalizált, az ES ($E_{A(ES)}$)az enzimkatalizálta reakció aktivált állapotának energiaszintjét jelöli. A kisebb aktiválási energia gyorsabb reakciósebességet eredményez. A reakció szabadentalpia-változását (ΔG) a katalízis nem befolyásolja

Az egyensúlyra vezető kémiai reakciók szabadentalpia változása közel 0, és a reakció akkor éri el az egyensúlyi állapotot, ha a $\Delta G=0$. A $\Delta G=\Delta G^0+RT\ln Q$ (Q = reakcióhányados). Az egyenletből következik, hogy a sejtben a szubsztrátok aktuális koncentrációi szabják meg a reakció irányát. Az endergonikus reakcióknál az aktiválási energia csökkentése még nem teszi lehetővé a reakció lezajlását. Az élőlényekben zajló biokémiai folyamatok egy része viszont endergonikus reakciók eredménye. Ezek a reakciók úgy mehetnek végbe, hogy egy exergonikus reakcióval kapcsolja az enzim. Ilyenkor a teljes reakció exergonikussá válik. Az endergonikus reakciók energiaigényét többnyire ATP hidrolízise biztosítja.

Az enzimek szubsztrátjaikat az **aktív hely**en alakítják át. Az aktív hely azon részeit, amelyek a szubsztrát átalakítását végzik, *katalitikus csoport*oknak nevezik. A katalitikus funkció betöltésének elengedhetetlen feltétele a szubsztrát kötődése az enzimhez. Az enzimnek azt a részét, ami kötődik a szubsztráthoz, *szubsztrátkötő hely*nek nevezik. A szubsztrát kötődése az enzimhez biztosítja az enzimek specificitását, valamint lehetővé teszi, hogy a szubsztrátok térbeli pozíciója az átalakulásukat lehetővé tévő optimális elrendeződésben legyen.

A katalitikus csoportok felépítésében részt vesznek aminosav oldalláncok és részt vehetnek kis molekulatömegű, nem polipeptid természetű anyagok (prosztetikus csoport), valamint fémionok is.

A szubsztrátkötő hely az enzimnek olyan része, ami a szubsztrát szerkezetének térbeli megfelelője. Ennek a speciális kapcsolatnak a kialakulása két elmélettel jól magyarázható. A *kulcs-zár modell* szerint az enzim és szubsztrát eleve olyan szerkezettel rendelkeznek, amik kiegészítik egymást. Az *indukált illesztés modell* szerint az enzim szerkezete folyamatosan változik, a szubsztrát kötése módosítja a kötőhelyet úgy, hogy a kötőhely már pontosan illeszkedik a szubsztráthoz. A kölcsönhatás során változó szerkezet nem csak az enzim szerkezetében idézhet elő torzulást, hanem a szubsztrátban is, így segítve elő a reakció végbemeneteléhez szükséges átmeneti (tranzíciós) állapot kialakulását. Az aktív hely rendelkezhet a tranzíciós állapotot stabilizáló szerkezettel, így az átmeneti állapot kialakulása kisebb energiaigénnyel alakulhat ki, ami magyarázza az enzimkatalizálta folyamat gyors reakciósebességét.

Az aktív hely kialakításában az enzim szerkezetének csak egy kis része vesz részt. A többi rész ennek kialakításáért felel, illetve az enzim szabályozhatóságát, tulajdonságait, sejtbeli elhelyezkedését befolyásolja. Azok az enzimek, amelyek egy reakciósor több lépését katalizálják, össze is kapcsolódhatnak. Így a reakció hatékonyabbá válhat, mert az egyik enzim produktuma – ami a másik enzimnek szubsztrátja – közvetlenül a másik enzim aktív centrumára kerülhet. Ezeket a több polipeptidláncból álló rendszereket multienzim rendszernek vagy komplexnek nevezik. Olyan multifunkciós enzimre is van példa, amely egyetlen polipeptidláncból

áll, és több aktív centruma segítségével katalizál egymással szoros kapcsolatban álló reakciókat (pl. a zsírsav-szintetáz).

Adott reakció katalizálását a szervezetben végrehajthatja egy minden sejtben azonos enzim, de számos példa van arra is, hogy ugyanazt a reakciót különböző aminosav sorrendű, különböző fehérjék katalizálják. Ezeket az enzimeket *izoenzimek*nek nevezik. Az izoenzimek lehetnek különböző géneknek a termékei, máskor alternatív splicing eredményeképpen jönnek létre. Az izoenzimek katalitikus csoportja megegyezik, de szabályozhatóságuk, kinetikai tulajdonságuk, sejt- vagy szöveti eloszlásuk különbözhet, és ez eltérő funkciók betöltését teszi lehetővé.

I/2.3. ENZIMAKTIVITÁS MÉRTÉKEGYSÉGEI

Az enzimreakciók sebessége az enzim mennyiségével egyenesen arányos, emiatt a reakciósebesség az enzim mennyiségének mértéke lehet. Az enzimkatalizálta reakció sebességét *enzimaktivitás*nak nevezik. Az enzimaktivitás az időegység alatt átalakított szubsztrát vagy a képződött termék anyagmennyisége:

$$A = \frac{-\Delta S}{\Delta t}; \quad A = \frac{\Delta P}{\Delta t}.$$

A leggyakrabban használatos enzimaktivitások a következők:

Az SI mértékegység a *katal*, ez mol átalakított szubsztrát/ másodperc mértékegységet jelent. Közvetlen használata nem terjedt el, de segítségével számítják az enzimek átviteli számát.

Az *egység*, más néven unit (U), nemzetközi egység, international unit (IU) definíciószerűen μmol átalakított szubsztrát/ perc. A unit általánosan használt egység.

A *specifikus aktivitás* egységnyi tömegre számított aktivitás, mértékegysége U/mg fehérje. A specifikus aktivitás megmutatja, hogy egy enzimkészítménynek mekkora a hatásos (aktív) enzimtartalma. Egy enzim tisztításnál a specifikus aktivitással a tisztítás mértékét lehet kifejezni. Ha a fehérjekeverék enzimtartalma a tisztítás során nő, a specifikus aktivitás szintén növekszik.

Az *átviteli szám* (moláris enzimaktivitás) egy másodperc alatt 1 mol enzim által átalakított szubsztrát anyagmennyiségét jelenti: mol szubsztrát / másodperc / mol enzim.

I/2.4. ENZIMEK SPECIFICITÁSA

Az enzimek meghatározott reakciót katalizálnak, szubsztrátspecificitásuk eltérő lehet. Egyes enzimek kizárólag egyetlen szubsztrátmolekula átalakítására képesek, mások egy funkciós csoportot alakítanak át, így számos olyan vegyület lehet a szubsztrátjuk, amelyek a funkciós csoportot hordozzák.

A peptidázok például peptidkötést hidrolizálnak:

$$\mathbf{R_1–CO–NH–R_2 + H_2O \rightarrow R_1–COOH + H_2N\text{-}R_2}$$

A peptidkötésen kívül hasíthatják az amid- és észterkötéseket is. A mosóporokban használatos – bakteriális eredetű – szubtilizin széles szubsztrátspecificitású enzim, a peptidláncon belül bármilyen aminosav mellett képes hasítani a peptidkötést, többek között ezért alkalmas arra, hogy a fehérje jellegű szennyeződéseket eltávolítsa a ruhákból. Az emésztőrendszer peptidázai specifikusabbak.

Az enzimek szubsztrátspecifitását a K_M értékkel jellemezhetik. Minél kisebb a K_M értéke, az enzim annál hatékonyabban alakítja át a szubsztrátot, mert nagy az enzim affinitása az adott szubsztráthoz. A laktát-dehidrogenáz a

$$\text{laktát} + NAD^+ \leftrightarrow \text{piruvát} + NADH + H^+$$

reakciót katalizálja. Az enzim széles specificitású, de a piruvátnál és laktátnál jóval kisebb sebességgel alakít egymásba más α-ketosavakat és α-hidroxisavakat. A glicerátot is oxidálja, de százszor lassabban, mint a laktátot. A $NADP^+$/NADPH is lehet koenzime, de ekkor a reakciósebesség századrésze a NAD^+/NADH koenzimmel mértnek.

I/2.5. ENZIMKINETIKA

Az enzimkinetika az enzimreakciók sebességének törvényeivel foglalkozik. A törvények helyes értelmezéséhez szükséges az enzimműködés mechanizmusának ismerete is.

Michaelis–Menten-kinetika

Az enzimaktivitást leíró egyik első egyenlet a Michaelis–Menten-egyenlet:

$$v = V_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

amelyben a v a reakciósebesség, a V_{max} a maximális reakciósebesség, a [*S*] a szubsztrátkoncentráció, a K_M a Michaelis–Menten-állandó.

Az egyenlet állandói (V_{max} és K_M) jól hasznosíthatóak a gyakorlatban, ezért jelenleg is alkalmazzák. Az egyenlet a legegyszerűbb enzimkatalizálta folyamat modellezésére született. A reakció egy szubsztrát (S) átalakulása termékké (P) egy enzim–szubsztrát komplex (ES) intermedieren keresztül. Az ES kialakulása reverzíbilis folyamat, így disszociálhat enzimre és szubsztrátra, vagy átalakulhat irreverzíbilisen termékké és enzimre. A folyamat a

$$S + E \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

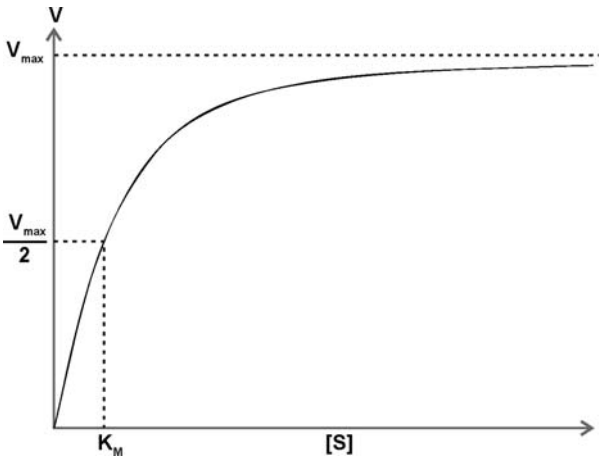
egyenlettel írható le, amelyben a k_1, k_2 és k_3 a sebességi állandók. A Michaelis– Menten-egyenlet a következő feltételek mellett érvényes:

- az enzimreakció egyszubsztrátos,
- a reakció során egy termék képződik,
- az enzim koncentrációja nagyságrendekkel kisebb, mint a szubsztráté ($[E] << [S]$),
- az enzim–szubsztrát komplex koncentrációja [ES] állandó. Ez azt jelenti, hogy az ES komplexnek nagyon gyorsan kell kialakulnia, valamint a mérés ideje alatt a szubsztrát- és enzimkoncentráció számottevően nem változhat ($k_1/k_2 >> k_3$),
- az enzimnek monomernek kell lennie vagy ha dimer, oligomer szerkezetű, a monomerek nem befolyásolhatják egymás működését,
- a reakció egyirányú,
- a hőmérséklet, a pH, az ionerősség állandó (az enzimek fehérjék, ezért a felsoroltak változásaitól függnek az enzimek katalitikus tulajdonságai is).

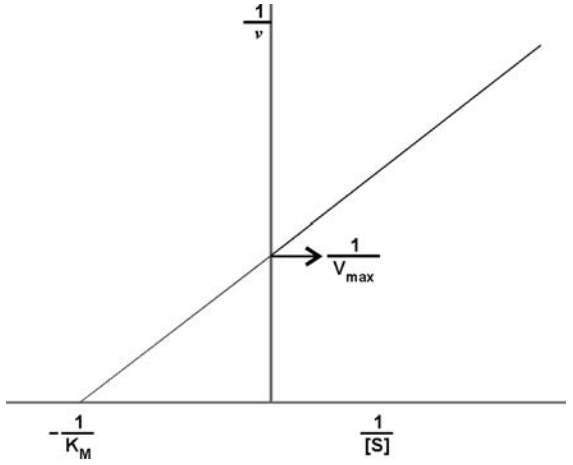
A Michaelis–Menten-egyenlettel számítható reakciósebességet egy derékszögű hiperbola egyenlete írja le a különböző szubsztrátkoncentrációknál *(I/2-2. ábra)*.

A K_M a reakcióegyenlet sebességi állandóival ($K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$) is kifejezhető, de definiálható úgy is, hogy a K_M az a *szubsztrátkoncentráció*, amely mellett a reakciósebesség a *maximális reakciósebesség fele*. A K_M értékkel az enzimek *szubsztrát iránti affinitás*a jellemezhető. Minél kisebb a K_M értéke, annál nagyobb az enzim szubsztrát iránti affinitása, mert kisebb szubsztrátkoncentrációnál is hatékony. A fiziológiás szubsztrátkoncentrációk általában a K_M értékhez (10^{-2}–10^{-7} M) közelítő értéknek felelnek meg.

A maximális reakciósebesség az enzim mennyiségétől és katalitikus képességétől függ. A Michaelis–Menten-egyenletből következik, hogy a V_{max} végtelen nagy szubsztrátkoncentrációnál érhető el, és ennek segítségével állapítható meg a K_M. A kinetikai állandók meghatározása nemlineáris regresszióval, görbeillesztéssel történhet. Grafikusan az egyenlet linearizálásával lehetséges a meghatározás. Ennek legegyszerűbb módja a Lineweaver–Burk-féle kettős reciprok ábrázolás. Hátránya, hogy viszonylag kis hibák is jelentős eltérést okoznak az állandók meghatározásánál, de előnye, hogy az ábra könnyen értelmezhető, ezért magyarázó célú alkalmazásra a mai napig alkalmas *(I/2-3. ábra)*.



I/2-2. ábra
Szaturációs görbe



I/2-3. ábra
A szaturációs görbe kettős reciprok ábrázolása. Az egyenes K_M/V_{max} meredekségű. Az egyenes az ordinátát $1/V_{max}$, az abcisszát a $-1/K_M$ értéknél metszi

Több szubsztrátos enzimek

Az enzimek fiziológiás körülmények között ritkán működnek Michaelis–Menten-kinetika szerint. A katalizált reakciók kevés kivételtől eltekintve több szubsztrátosak, sokszor reverzíbilisek, a produktum is jelen van, az enzim dimer, oligomer szerkezettel rendelkezik.

Több szubsztrátos reakciónál a reakciómechanizmus bonyolultabb, mint a Michaelis–Menten-kinetika szerint működő enzimek esetén. Ez nemcsak annak köszönhető, hogy a reakció során több szubsztrátot köt meg és alakít át az enzim (a reakciósebességet leíró egyenletet több sebességi állandó befolyásolja), hanem annak is, hogy a reakció menete is több úton lehetséges. *Szekvenciális mechanizmus*

esetén a több szubsztrát átalakítása meghatározott sorrendben történik. Az enzim a szubsztrátjait mindig ugyanabban a sorrendben köti meg. *Random sorrend* esetén a szubsztrátok véletlen sorrendben kötődnek az enzimhez és az átalakításuk is ennek megfelelően történik. A *ping-pong mechanizmus* során az enzimhez bekötődik egy szubsztrát, amelyet az enzim átalakít és az első produktum leválik, de az enzim nem az eredeti, hanem módosított formába kerül. A módosított enzim megköti és átalakítja a következő szubsztrátot, majd a második termék disszociációjával az enzim az eredeti állapotába kerül és válik alkalmassá ismét az első szubsztrát megkötésére. A több szubsztrátos enzimek maximális reakciósebességét az enzim koncentrációjának és egy összetett katalitikus állandónak (k_{cat}) a szorzata határozza meg.

Kísérleti célokra a körülmények megfelelő megválasztásával általában az enzimek többségénél elérhető, hogy a Michaelis–Menten-kinetika szerint működjenek.

Kinetikailag perfekt enzimek

A V_{max} és K_M állandók mellett gyakran jellemzik az enzimet a specifitási állandóval is (k_{cat}/K_M). Ez az érték az enzim hatékonyságát jellemzi. Magas értéke azt jelenti, hogy az enzim kis koncentrációjú szubsztrátot is nagy sebességgel alakít át. Azt az enzimet, melyre igaz, hogy $k_{cat}/K_M \sim 10^8$–10^9, kinetikailag perfekt enzimnek nevezzük. Ez az érték az elméletileg elérhető maximum. Ez azt jelenti, hogy az enzimhez kapcsolódó szubsztrátot az enzim azonnal átalakítja termékké. A kinetikailag perfekt enzimek reakciósebességét a diffúzió sebessége szabja meg. A reakciósebesség csak úgy növelhető, ha a szubsztrát gyorsabban mozog, mint ahogy a diffúzió engedi. Ez speciális körülmények között lehetséges. Nő a sebesség, ha enzimkomplexben van az adott enzim, és a szubsztrátot a reakcióláncban őt megelőző enzim adja át neki. A diffúziónál nagyobb sebességet biztosít az, ha az enzim elektrosztatikusan vonzza a szubsztrátot (Kirké-effektus).

Az enzimek többsége kinetikailag nem tökéletes. Csak néhány kinetikailag perfekt enzimet ismerünk (trióz-foszfát-izomeráz, acetil-kolin-észteráz, fumaráz, szénsav-anhidratáz, kataláz). A kataláz másodpercenként akár 40 000 000 hidrogénperoxid- molekulát is képes elbontani:

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 0{,}5\ O_2$$

Ehhez a kimagaslóan nagy átviteli számhoz 1 M K_M párosul, ami 10^8 körüli K_{cat}/K_M-t eredményez.

Az enzimreakciók gátlása

Az enzimek aktivitását gátlószerekkel (inhibitorokkal) specifikusan lehet csökkenteni. Az inhibitoroknak fontos szerepük van a fiziológiás enzimszabályozásban, de az enzimek biokémiai tulajdonságainak vizsgálatában is. Orvosi szempontból kiemelendő, hogy a legtöbb gyógyszer és méreg hatása enzimgátláson alapul.

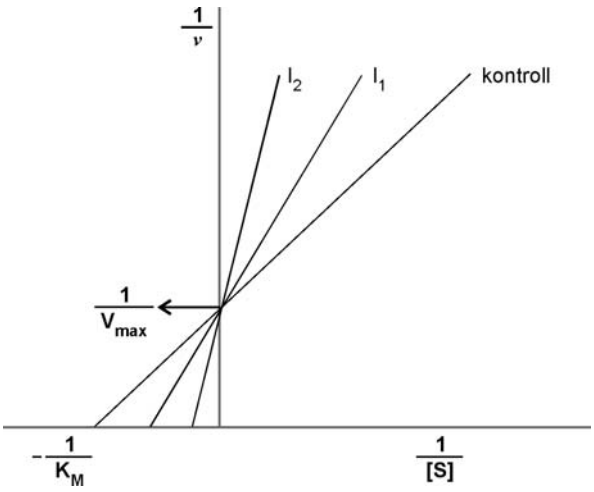
Az enzimgátlások az alábbi alapvető csoportokra bonthatók:

- reverzíbilis gátlás:
  - kompetitív,
  - nonkompetitív,
  - unkompetitív,
  - kevert típusú;
- irreverzíbilis (kovalens) gátlás:
  - aktív hely oldalláncok módosítása,
  - mechanizmus alapú (öngyilkos) gátlószerek.

A reverzíbilis gátlás az inhibitor eltávolításával megszűntethető, míg az irreverzíbilis gátlás az inhibitor eltávolítása után is megmarad.

Reverzíbilis gátláskor az inhibitor gyenge kölcsönhatások révén kötődik az enzimhez és könnyen disszociálhat is róla.

A *kompetitív gátlás*ra jellemző, hogy az inhibitor szerkezete hasonló a szubsztrátéhoz vagy az átmeneti állapot szerkezetéhez, ami azt eredményezi, hogy az inhibitor képes az enzim szubsztrátkötő helyébe illeszkedni és ezzel megakadályozza, hogy a szubsztrát bekötődjön. A szubsztrát és az inhibitor verseng a kötőhelyért. A gátlás mértéke a szubsztrát és inhibitor affinitásától, valamint koncentrációjuktól függ. A szubsztrát koncentrációjának emelésével az inhibitor leszorítható az enzimről, a gátlás a szubsztrátkoncentráció emelésével felfüggeszthető. Így a V_{max} értéke nem változik, a K_M viszont látszólag nő *(I/2-4. ábra)*. A valódi kompetitív inhibitorok az enzim szubsztrátkötő helyébe illeszkednek. A látszólagos, csak kinetikailag kompetitív inhibitorok nem az enzim szubsztrátkötő helyébe illeszkednek, de az enzim affinitását csökkentik a szubsztráthoz, a K_M-et növelik, a V_{max}-ot viszont nem változtatják meg. A valódi kompetitív inhibitorokhoz tartozik számos gyógyszer, ezeket *antimetabolitok*nak nevezik.

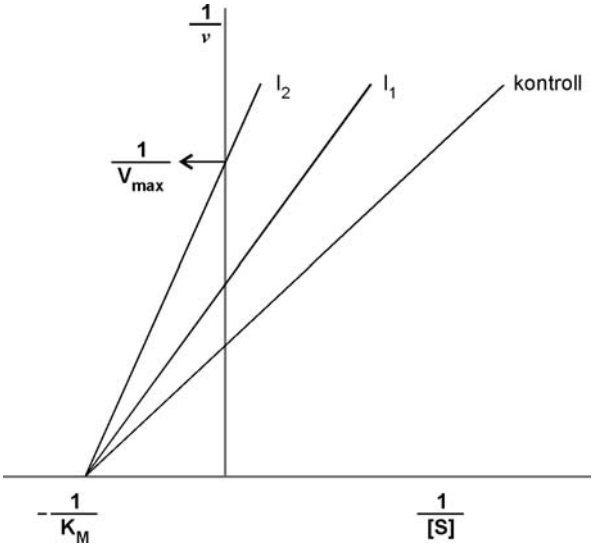


I/2-4. ábra
Kompetitív gátlás

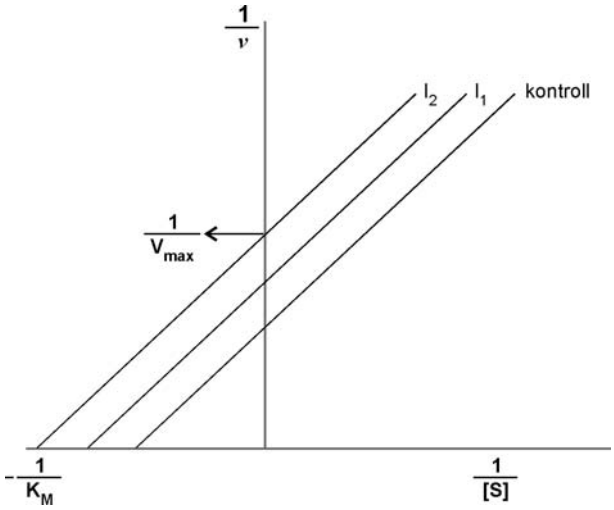
A *nonkompetitív* (nem kompetitív) *gátlás*nál a gátlószer az enzimhez és az enzim–szubsztrát komplexhez is kötődik. Nonkompetitív gátlást okozhat például egy kelátképző anyag abban az esetben, ha megköti a fémiont tartalmazó enzim fémionját. Az enzim-inhibitor komplex nem képes átalakítani termékké a szubsztrátot, tehát működésképtelen. Az inhibitort nem kötő enzim viszont maradéktalanul működik. Kinetikailag ez azt eredményezi, hogy a V_{max} csökken, de a K_M nem változik *(I/2-5. ábra)*.

Unkompetitív gátlás abban az esetben alakul ki, ha az inhibitort az enzim–szubsztrát komplex köti meg. Az inhibitor mind a szubsztrát termékké alakulását, mind az enzim-szubsztrát disszociációját gátolja. Ennek eredményeként a V_{max} és a K_M is csökken *(I/2-6. ábra)*.

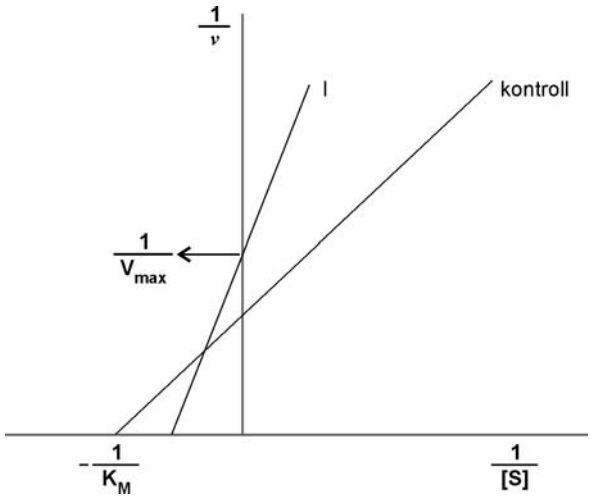
Kevert típusú gátlás esetén az inhibitor az enzimhez és az enzim-szubsztrát komplexhez kötődik. Kinetikailag a K_M értékének növekedése és a V_{max} csökkenése figyelhető meg *(I/2-7. ábra)*. Elméletileg egy kompetitív és egy nonkompetitív komponensből összetett gátlásnak fogható fel.



I/2-5. ábra
Non-kompetitív gátlás



I/2-6. ábra
Unkompetitív gátlás



I/2-7. ábra
Kevert típusú gátlás

Irreverzíbilis gátlás esetén az inhibitor erősen, általában kovalensen kötődik hozzá az enzimhez, végérvényesen megváltoztatja. Aktivitása csökken, vagy teljesen elvész.

Az *aktív hely oldallánc módosítás*a esetén valamelyik reaktív aminosav oldalláncc reagál az inhibitor. Szerinspecifikus inhibitorokkal (például organofoszfátokkal) irreverzíbilisen gátolható az acetil-kolin-észteráz, a szerin-proteázok.

A *mechanizmus alapú gátlószerek* (gyógyszerek) alkalmazásánál az inhibitorral a katalitikus folyamat elindul, de egy intermedier lépésnél megáll és az enzim működésképtelenné válik.

Enzimaktivitás szabályozása

Az enzimreakciók a szervezetben szigorú szabályozás alatt állnak, összehangolásuk a sejt megfelelő anyagcseréjét, működését biztosítja. Az anyagcsere folyamatok speciális szabályozása az egyes enzimek aktuivitásának szabályozásán keresztül valósul meg. Általános szabályként azt tarthatjuk szem előtt, hogy egy reakciósor első vagy elágazás utáni első irreverzíbilis lépését katalizáló enzim működése határozhatja meg a folyamat sebességét, tehát ennek szabályozása kulcsfontosságú.

Az enzimek szabályozásának főbb lehetőségei az alábbiak.

A reakció *szubsztrát és koenzim ellátottság*a alapvetően meghatározza az enzimaktivitást. A fiziológiás szubsztrát- és koenzimkoncentrációk ritkán érik el a telítési koncentrációt, így általában a szaturációs görbe elsőrendű szakaszához tartozik *(I/2-8. ábra)*. A szubsztrátellátottság változása emiatt jelentősen befolyásolhatja az enzimaktivitást.

Az *allosztérikus enzimek* az aktív centrumtól eltérő helyen rendelkeznek még más ligand számára is kötőhellyel (allosztérikus kötőhely). Az allosztérikus ligand kötése a szubsztrátéhoz hasonlóan gyenge kölcsönhatásokon alapul. Hatása reverzíbilis, kialakulása pillanatszerűen alakul ki és a ligand koncentrációjától függ. Az allosztérikus ligand bekötése az enzim harmadlagos vagy negyedleges szerkezetének megváltoztatásával befolyásolja az enzimaktivitást. Ez lehet gátlás vagy aktiválás is. Abban az esetben, ha az allosztérikus ligand az enzim maximális reakciósebességét módosítja, *V típusú* allosztérikus ligandról van szó. A *K típusú* ligand az en-

zim K_M értékét befolyásolja. Ha a K_M értékét növeli, az allosztérikus ligand kinetikailag kompetitív inhibitorként viselkedik. A K_M értékének csökkentésével az enzim affinitása nő a szubsztráthoz, ami a reakciósebesség emelkedését eredményezi. E hatások akkor jelentkeznek, ha a szubsztrát koncentrációja a K_M értékhez közelít.

Az allosztérikus szabályozásnak kiemelkedő jelentősége van a sejten belüli anyagcserefolyamatok összehangolásában. Az ellentétes utakat gyakran ugyanaz a ligand szabályozza. Az egyik folyamat aktiválásával, a másik gátlásával érhető el az, hogy az ellentétes folyamatok közül csak az egyik menjen végbe. Az allosztérikus szabályozásnak speciális esetei a végtermék gátlás (feedback gátlás) és az allosztérikus szubsztrát aktiválás. Ezekben az esetekben a végterméknek és a szubsztrátnak az aktív centrumon kívüli kötőhelye is van az enzimen, és ehhez való kötődésével gátolja vagy aktiválja az enzimet.

Az enzim *kovalens módosítás*a is befolyásolja a működését. Ennek néhány jellegzetes példája az alábbiakban olvasható.

*Limitált proteolízis*sel történő aktiválás történik, ha inaktív formában szintetizálódik az enzim és a peptidlánc meghatározott inhibitor tulajdonsággal rendelkező részének lehasadásával aktiválódik.

Az enzimek mintegy harmada *foszforilációval-defoszforilációval* szabályozható. A fehérjék foszforilációját protein-kinázoknak nevezett enzimek végzik. Ezek szerin/treonin vagy tirozin oldalláncokat képesek foszfátcsoporttal ellátni. A foszforiláció reverzíbilis, a foszfátcsoport eltávolítását protein-foszfatázok végzik el. A foszforiláció/defoszforiláció hatása lehet aktiválás és gátlás is, attól függően, hogy melyik enzim foszforilálódik.

Irreverzíbilis módosítást eredményez az enzimeknek az *ubikvitinálás*a. Ennek során a fehérjékhez kovalensen ubikvitin proteinegységek kapcsolódnak, és az így jelölt fehérjék degradálódnak.

Az enzim mennyisége szabályozható *transzkripciós szint*en is. Az enzim mennyisége induktorral növelhető. Az induktor olyan anyag, ami az enzim mRNS-ének átírását, végső soron a fehérjének a mennyiségét fokozza. A represszor az induktorral ellentétes hatású, az adott fehérje transzkripcióját gátolja, így az enzimaktivitást az enzim mennyiségének csökkentésével mérsékli.

I/2.6. MEDICINÁLIS ENZIMKINETIKA

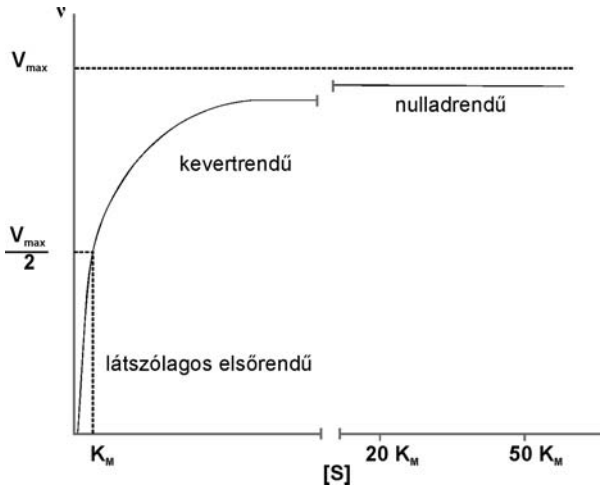
A medicinális enzimológiát a diagnosztikában, a terápiában, a terápia nyomonkövetésében egyaránt felhasználják.

Ezen vizsgálatok során vagy *enzimaktivitás*t (mennyiséget) határoznak meg, vagy enzimreakciót használnak fel egyes diagnosztikai értékkel bíró anyagok mennyiségi meghatározására. Utóbbit *metabolitmeghatározás*nak nevezzük.

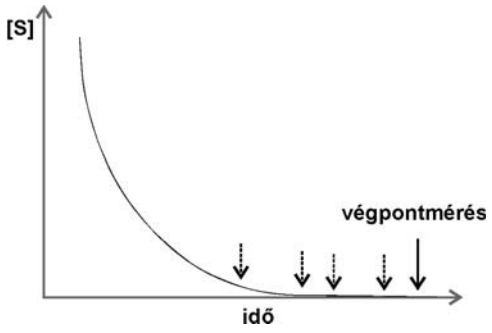
Enzimek mennyiségi meghatározása

Az *enzimek mennyiségét biológiai mintákban* (vér, vizelet), enzimkészítményekben ritka kivételektől eltekintve a *reakciósebességgel jellemzik*. A reakciósebességet különböző egységekben adhatják meg. A folyadékok aktivitását U/ml vagy U/l egységben határozzák meg, a szilárd anyagoknak pedig a specifikus aktivitását. A *reakciósebesség számítás*ánál azt az alapelvet kell követni, hogy az eredeti minta reakciósebességét kell megadni. Az előkészítésnél, az aktivitásmérésnél az eredeti minta hígul, ezt figyelembe kell venni a számításnál.

Enzimreakció sebességének függése a szubsztrátkoncentrációtól. A Michaelis–Menten-kinetika szerint működő enzimek nullad-, első- és kevertrendű kinetika szerint működhetnek a szubsztrátra nézve *(I/2-8. ábra)*. Ha a szubsztrátra nézve a reak-



I/2-8. ábra
A reakció rendűségének szubsztrátkoncentrációtól való függése



I/2-9. ábra
A végpontmérés. A szaggatott nyíllal jelölt időpontokban végzett mérések annak eldöntésére alkalmasak, hogy lejátszódott-e teljesen a reakció. A számolást a végpont méréssel jelzett időhöz tartozó adatokból kell elvégezni

ció nulladrendű a mérés ideje alatt, a szubsztrátkoncentráció változása nem befolyásolja a reakciósebességet. Ebben az esetben a legkényelmesebb a reakciósebességet mérni, ami megegyezik a V_{max} értékével ($k_3 \cdot [E]$). Elvileg ehhez végtelen szubsztrátkoncentráció szükséges, a gyakorlatban viszont ha a mérés ideje alatt a szubsztrátkoncentráció nem csökken 20 K_M alá ($v = V_{max} \cdot [S] / (K_M + [S]) = 0{,}95\, V_{max}$), a reakciósebesség változása a méréshatáron belül (5%) marad.

Enzimatikus koncentrációmérés (metabolitmeghatározás)

Az enzimekkel történő koncentrációmérésnek az az előnye, hogy az enzimek specifikusan képesek a szubsztrát átalakítására, a mérés során más jelen lévő anyagok nem befolyásolják a végeredményt. A mérésnél felhasznált enzim ideális esetben kinetikailag perfekt enzim, mert gyorsan (magas a k_{cat} értéke) és maradék nélkül (kicsi a K_M értéke) alakítja át a szubsztrátot. A mérés során a reakciósebességet nem kell meghatározni, mert az átalakított szubsztrát mennyisége fontos. A mérés során a maximálisan nyerhető produktum koncentrációját mérik, vagyis a végpontot (endpoint). Ennél a mérési módszernél fontos, hogy a reakció teljes legyen, a mérés idejét ennek megfelelően kell meghatározni *(I/2-9. ábra)*. A méréshez használt produktum nem alakulhat át a mérés időtartama alatt.

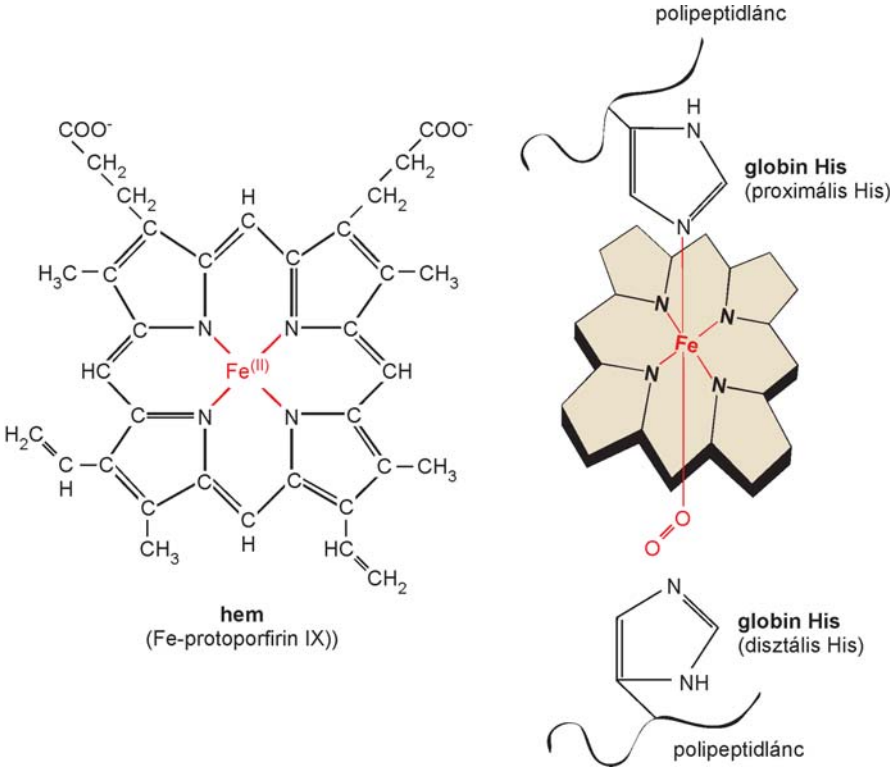
I/3.
Hemoglobin: az oxigénszállítás biokémiája

Mandl József

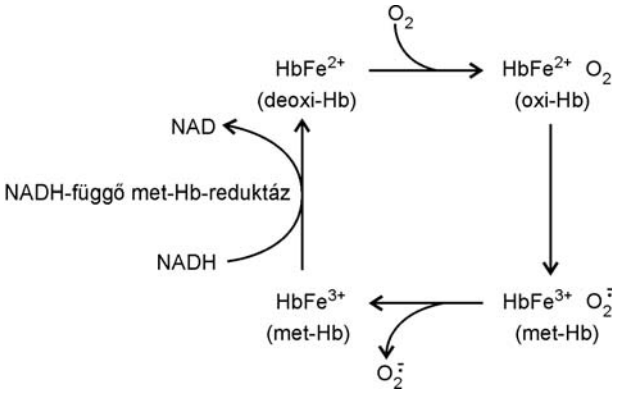
Az oxigénszállítás alapproblémája az, hogy az oxigén vízoldékonysága gyenge. A hemoglobin (Hb) jelenléte 50-szeresre fokozza az oxigén koncentrációját a vérben: 5 ml normál állapotú O_2/l versus 250 ml O_2/l. A hemoglobin azonban nemcsak az oxigénszállítás fehérjéje. Alkalmas más gázok kötésére, szállítására is, mint a CO_2, NO, CO, hogy a fiziológiai és toxikológiai szempontból legfontosabbak kerüljenek említésre. A Hb konzervatív fehérje, a növényi Hb-oknak is fontos energetikai és gázkötő funkcióik vannak.

I/3.1. A HEMOGLOBIN SZERKEZETE

A Hb a hemoproteinek közé tartozik. A Hb prosztetikus csoportja, a hem protoporfirin IX-et és Fe^{2+} oxidáltsági állapotú vasat tartalmaz *(I/3-1. ábra).* A Hb reverzíbi-



I/3-1. ábra
A hem szerkezete a hemoglobinban, az oxigén kötődése a hemhez, a hem kötődése a globin lánchoz



I/3-2. ábra

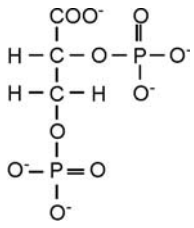
Methemoglobin képződése. A hemoglobin (Hb) O_2 kötésével oxi-Hb-ná alakul. Az így kötődött O_2 a Hb Fe^{2+} terhére redukálódik szuperoxid-anionná ($O_2^{-\bullet}$) miközben a Hb Fe^{2+} oxidálódik Hb-Fe^{3+}- ionná, methemoglobinné (met-Hb)

lisen képes oxigént kötni. A hem Fe^{2+} oxidáltsági állapot a Hb O_2-kötésének feltétele. Mivel a Hb hem-Fe^{3+} állapotban már nem köt O_2-t, methemoglobin jön létre, amely csak úgy tud ismét oxigént kötni, ha redukálódik a NADH-függő met-Hb-reduktáz segítségével $HbFe^{2+}$ ionná *(I/3-2. ábra)*. A redukáló enzim hiánya kongenitális methaemoglobinaemiát okoz.

A tetrapirrol gyűrűrendszer közepén elhelyezkedő vas mind a négy pirrol N-hez kötődik; további, két, koordinatív kötéséből az egyikkel kötődik a globinlánchoz, míg a megmaradt kötés az oxigénmolekula kötőhelye *(I/3-1. ábra)*. A hemoglobinmolekula oxigénkötő helyének kialakításában hisztidinek játszanak kitüntetett szerepet. Részint a hemvas hisztidinen keresztül kapcsolódik a globinlánchoz (proximális His), részint a globinlánc egy másik hisztidinje (disztális His) bár nem kötődik a vasatomhoz, mégis fontos a kötőhely kialakításában. A Hb-hoz ugyanazon a kötőhelyen, de az O_2-nél jóval erősebben kötődő CO affinitását például a disztális His jelentősen mérsékli. Az *in vivo* az oxigénnél 200-szor erősebb kötődés az oka annak, hogy a CO-mérgezés életveszélyes.

A HbA (adult) vagy „felnőtt” Hb 4 alegységből áll. Minden alegység egy globinláncot, illetve hemet tartalmaz. A HbA két (141 aminosavból álló) alfa- és két (146 aminosavból álló) béta-globin láncból áll. Több más Hb-t is ismerünk. A HbF (fetalis), a magzati Hb, amelynek összetevői két alfa- és 2 gamma-globin-lánc. A HbF oxigénaffinitása nagyobb mint a HbA oxigénaffinitása, ami szerepet játszik a magzat oxigénellátásában. Az anyai keringésből elősegíti az oxigén bejutását a magzati keringésbe. A placentáris keringésben a magzati deoxi-HbF az anyai oxi-HbA-tól kapja az oxigént. Ezen túlmenően számos más különböző összetételű Hb-t ismerünk. Az izomsejtekben expresszálódó, a Hb alegységeihez hasonló szerkezetű mioglobin (Mb) egy alegységből álló hemoprotein, amelynek funkciója az oxigéntárolás. A hem prosztetikus csoport egy hidrofób mélyedésben helyezkedik el. Az alegység szerkezet tehát nem az oxigén kötéséhez szükséges feltétel.

A Hb polipeptidláncok a fehérjeszerkezet megismerésének és tanulmányozásának talán leghíresebb objektumai. Ez volt az első megfejtett 3D szerkezet a fehérjék között. A globinláncoknak 8 alfa-hélix szakasza van, míg redőzött lemez szerkezetű részt nem tartalmaznak. A Hb-molekulában tömör tetraéderes szerkezetet alkotva helyezkednek el, amelynek átmérője kb. 5,5 nm. A láncokat apoláros és ionos kötések kapcsolják össze. A négy globinlánc együtt képezi a 2,3-bisz-foszfoglicerát (BPG) *(I/3-3. ábra)* kötőhelyét, ami a polipeptidláncokat összetartó 8 sókötést stabilizálja. A BPG Hb-hoz történő kötődése allosztérikusan befolyásolja a Hb-molekula O_2-kötését. Mivel a Hb oxigénszállító molekula, az O_2 kötése mellett az O_2 elengedése is kulcsfontosságú a molekula működésében. Az oxigént a Hb a tüdő alveolusaiban köti meg és a szövetekhez szállítja, ahol leadja azt. A HbA $\alpha_2\beta_2$ szerkezete optimális az O_2 kötésre, és alkalmassá teszi a molekulát az oxigén leadására is. Ha mesterségesen α_4- vagy β_4-Hb-t hoztak létre, az szintén alkalmas az O_2-kötésre, de

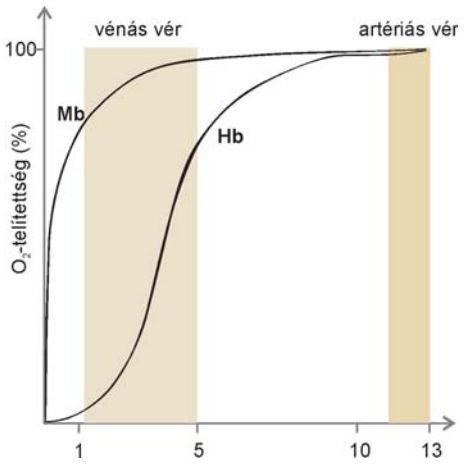


I/3-3. ábra
A 2,3-biszfoszfo-glicerát

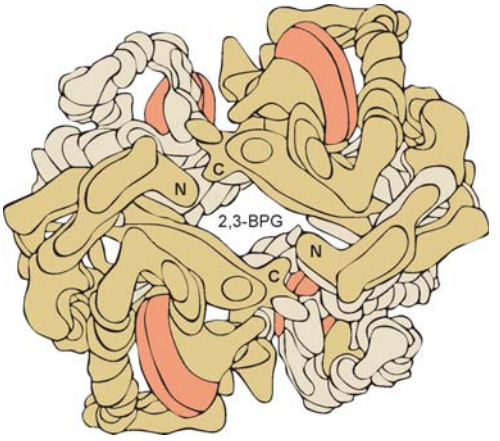
a működő szövetekben történő leadásra már kevésbé. Röntgen-krisztallográfiával mutatták ki, hogy oxigénkötés hatására csak az $\alpha_2\beta_2$ szerkezete változik meg; a Mb szerkezete, vagy az α_4-, illetve β_4-Hb azonos marad. Az O_2-kötés behúzza a proximális His irányába enyhén kiemelkedő vasatomot a porfiringyűrű síkjába, és ez jelentős elmozdulásokat eredményez a láncok egymás közti helyzetében. Oxigénkötés hatására kialakul az R (relaxed) oxi-Hb módosulat, szemben az oxigén nélküli T (tense), deoxi-Hb módosulattal. A T→R átmenet a HbA-t stabilizáló sókötések felszakadása miatt jön létre. Az R konformáció az oxi-Hb, az aktív szubsztrát kötött konformáció. Ezt a nómenklatúrát az enzimológia a Hb mintájára átvette, T formának allosztérikus fehérjék esetében azt a konformációt nevezik, amelynek kisebb a szubsztrátaffinitása.

I/3.2. A HEMOGLOBIN OXIGÉNKÖTÉSE, -LEADÁSA

A típusos Hb oxigéntelítési görbe csak az $\alpha_2\beta_2$ szerkezetű Hb esetén alakul ki. Ez szigmoid telítési görbe, szemben a Mb vagy a mesterséges α_4- vagy β_4-Hb hiperbola telítési görbéjével *(I/3-4. ábra).* A szigmoid telítési görbe az alegységek közötti kooperativitást jelzi, valamint azt is, hogy a Hb allosztérikus fehérje. A görbe kialakulásának feltétele az allosztérikus effektor BPG jelenléte. BPG nélkül az $\alpha_2\beta_2$-Hb oxigéntelítési görbéje is hiperbolikus. A jellegzetes görbe kialakulásának oka ugyanis az, hogy a deoxi-Hb szerkezetét, a sókötéseket a BPG stabilizálja. A Mb nem lenne alkalmas oxigénszállításra, mivel az oxigént a szövetekben uralkodó oxigén parciális nyomás viszonyok között nem tudná leadni. Paradox módon a vörösvérsejtek anyagcseretermékе, a BPG valójában rontja a Hb oxigénkötését, ezzel azonban biztosítja annak leadását. A BPG a glikolízis melléktermékе. Koncentrációja 4,5 mM körül van. A BPG koncentrációjának szabályozási mechanizmusát nem ismerjük. Mennyisége jelentősen emelkedhet a magaslati alkalmazkodás során: 2 nap alatt 4500 méter magasságban akár 7 mM-ra. A Hb-telítési görbét így az emelkedett BPG koncentráció jobbra tolja. A változás reverzíbilis, a tengerszintre történő visszatérés a BPG-szintet normalizálja. A BPG- szint-emelkedés patológiás állapotokban, így a légzőfelület jelentős csökkenését okozó tüdőtágulás, krónikus emfizéma esetén is megtörténhet. Ez a szövetek jóval jobb oxigenálását teszi lehetővé. A ritka glikolízis enzim zavaroknál leírták, hogy hexokinázhiányban a BPG mennyisége csökken, míg piruvát-kinázhiányban nő.



I/3-4. ábra
A hemoglobin és a mioglobin oxigén telítési görbéjének összehasonlítása

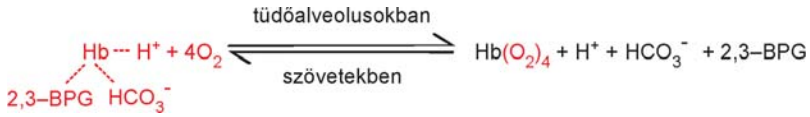


I/3-5. ábra
A hemoglobin 2,3- biszfoszfo-glicerát kötése

Egy molekula HbA-hoz egy molekula BPG kötődik *(I/3-5.ábra)*. Kötőhelye T állapotban válik szabaddá. Oxi-Hb, R konformáció esetén a BPG kötőhelyét jelentő „zseb" eltűnik. Az öt negatív töltéssel bíró BPG-anion kötőhelyét T állapotban pozitív töltésű aminosav-oldalláncok, négy His és 2 Lys alkotja. Egyszerre O_2 és BGP nem tud a Hb-hoz kötődni. Tárolt vér esetén a BPG-koncentráció csökken, a Hb oxigénaffinitása nő, az oxigéntelítési görbe balra tolódik, ami transzfúzió esetén veszélyes. Ezért a vérkészítmények tárolásánál, erre gondolva inozint adnak a tárolt vérhez, ami bejut a vörösvérsejtekbe és belőle BPG képződik.

I/3.3. A HEMOGLOBIN CO_2- ÉS NO-KÖTÉSE

Ismert, hogy csökkent pH esetén a Hb oxigénaffinitása csökken. Míg pH=7,6 esetén a Hb az oxigén 80%-át, pH=6,8 esetén 45%-át tartja vissza. A sejtanyagcserében az O_2 kb. 80%-a alakul CO_2-vé, ami a metabolizmus állapotától függően módosulhat. Az így keletkezett CO_2 15%-át a Hb szállítja. A vér-pH csökkenése – például fokozott izommunkában laktát-acidózis – miatt jobbra tolódó Hb oxigéntelítési görbe jelenségét *Bohr-effektus*nak nevezik. A béta-lánc N-terminális NH_2-csoportjával a CO_2 és a protonok karbamátot (-OOC-NH-R) képeznek, további sókötések jönnek létre, ami csökkenti a Hb oxigénaffinitását. A tüdőalveolusokban aztán megtörténik a gázcsere *(I/3-6. ábra)*.



I/3-6. ábra
Hemoglobin oxigén- és CO_2-szállítása, „gázcsere" a szövetekben és a tüdő alveolusokban

A Hb S-nitrozilált Hb vagy vas-nitrozil hem formájában szállít NO-t. Mivel az NO értágító hatású, ezért az NO-t szállító/leadó Hb-nek – vörösvérsejtnek – értágító hatása van, ami hipoxiás területen megnő. A Hb a fentieken kívül más gázokat is köthet (H_2S), amely kötésnek fontos anyagcsere-funkciója lehet. A Hb NO- és H_2S-kötése és annak élettani szerepe jelenleg is intenzív kutatások tárgya.

Érdekességként megemlítjük, hogy vannak olyan hemoglobinok a növényvilágban, ahol a hemvas enzimatikus prosztetikus csoportként működhet az NO $\rightarrow$ NO_3 átalakulásban NO, illetve O_2 kötéssel. Hasonló szerkezettel tehát különböző biológiai funkciók valósíthatók meg.

I/3.4. HAEMOGLOBINOPATHIÁK

A Hb szerkezeti zavarainak hatalmas irodalma van. A haemoglobinopathiák száma meghaladja a háromszázat. Legtöbb esetben mindössze egyetlen aminosav eltérés történik, ez azonban súlyos elváltozásokat is okozhat. Hemoglobin a vörösvérsejtek fehérjetartalmának döntő többsége, ezért a kóros hemoglobinok részint vörösvérsejt-károsodásokat, anaemiát, részint az oxigénszállítás zavarait okozhatják.

A legismertebb közülük, a molekuláris betegség fogalmát is megalapozó *sarlósejtes anaemia* (sickle cell anaemia), amelyben HbS képződik. A HbA és HbS között egyetlen aminosav a különbség: a béta-lánc 6. aminosava Glu helyett Val. A deoxi-HbS oldékonysága csökken, permanens T állapot alakul ki. Emiatt a HbS aggregálódik, ami rostképződés révén nemcsak a vörösvérsejt alakját, hanem ozmotikus rezisztenciáját is jelentősen megváltoztatja. 1000 afroázsiai amerikaiból 4 HbS génhordozó.

Tradicionálisan azokkal a városnevekkel jelölik a különböző Hb mutánsokat, ahol azokat először leírták. Van $Hb_{Kiskunhalas}$, Hb_{Buda} és Hb_{Pest} is. A Hb-szerkezet / funkció kapcsolatok felfedezéseihez a haemoglobinopathiák felismerései jelentősen hozzájárultak. Ha például a proximális His helyén Tyr van, akkor a jobban kiemelkedő Fe^{2+} könnyebben oxidálódik, így methaemoglobinaemia (HbM) alakul ki.

A polipeptidláncok szintézisének zavarai a *thalassaemiák* betegségcsoport kialakulását eredményezik. Autoszomális recesszíven öröklődő kórképek, az alfa-, illetve a béta-lánc szintézise csökken (alfa-, illetve béta-thalassaemia). Kompenzatórikusan emelkedik a többi lánc szintézise, és nemfiziológiás összetételű tetramerek képződnek, vagy az oligomerizáció is zavart szenved. Ezek egy része fatális betegség lehet, magzati halálhoz vagy gyerekkori súlyos anaemiához vezethet.

I/4. Proteázok

Kereszturi Éva

A proteázok peptidkötést hidrolizáló, fehérjebontó enzimek. A proteázok szerepe szervezetünkben nagyon szerteágazó. A legkézenfekvőbb emésztési folyamatoktól kezdve a véralvadáson és immunválaszon át egészen a jelátviteli útvonalakig számos ponton kulcsszerepet töltenek be. A proteázok inaktív, *proenzim* vagy *zimogén* formában szintetizálódnak, aktiválódásukhoz más enzimek által katalizált (melyek így szintén proteázok), precízen kivitelezett részleges hasítására, úgynevezett *limitált proteolízisre* van szükség. A proteázok két csoportba oszthatók aszerint, hogy a polipeptid lánc közepén – *endopeptidázok* – vagy a lánc végén – *exopeptidázok* – hasítanak-e el egy peptidkötést. Az exopeptidázok között is megkülönböztetünk karboxi- és aminopeptidázokat, melyek a szubsztrátok C-, illetve N-terminálisáról hasítanak le egy-egy aminosavat. További csoportosításuk és egyben elnevezésük is az aktív centrumban található, a katalízisben fontos szerepet játszó aminosavak szerint történik. Ennek megfelelően szerin-, aszpartát-, metallo-, cisztein-, glutamát-, aszparagin-, treonin- és kevert proteázokat különböztethetünk meg.

I/4.1. SZERIN-PROTEÁZOK

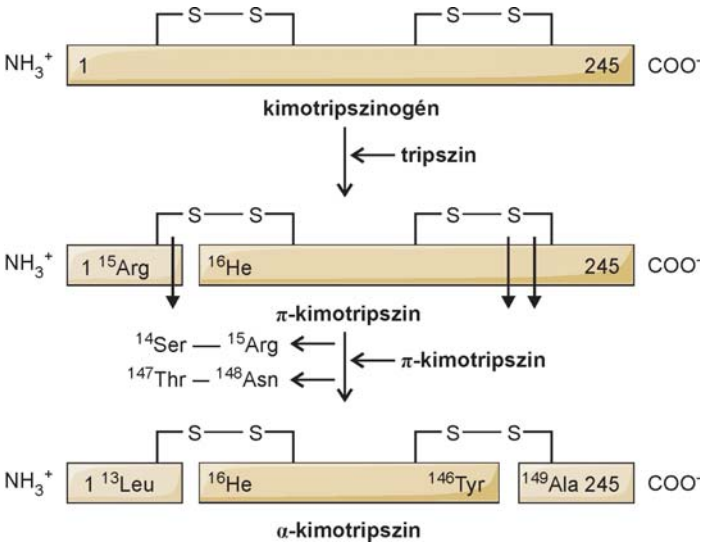
A szerin-proteázok katalitikus centrumában három, a katalízis szempontjából fontos aminosav található, egy *szerin*, egy *hisztidin* és egy *aszpartát*. Ezek együttesét hívjuk *katalitikus triád*nak. A szerin-proteázok egy specifikus gátlószere a diizopropil-fluorofoszfát (DFP), mely az enzimben található számos szerin közül kizárólag a katalitikusan aktívhoz köt irreverzíbilis formában. A szerin-proteázok között találunk emésztőrendszeri enzimeket, véralvadás faktorokat, de az immunvédekezésből ismert komplementrendszerben is találkozhatunk velük.

Limitált proteolízis

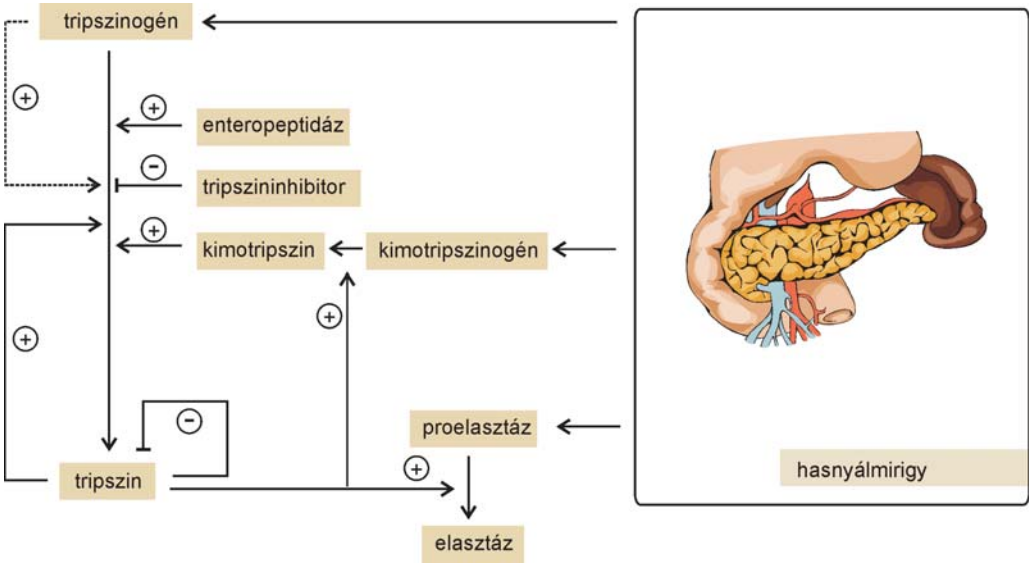
A *limitált proteolízis*sel, vagyis a fehérje részleges elhasadásával történő aktiválódás minden proteáz esetén bekövetkezik, a hasítás helye és száma az adott enzimre jellemző. A folyamat jelentősége abban rejlik, hogy ezen enzimek aktivitására nem állandó jelleggel van szükség a szervezetben, hanem nagyon jól szabályozott körülmények, faktorok gondoskodnak ezek bekapcsolásáról. Ezen kívül sok esetben az adott enzimre nem is a termelést végző sejten belül van szükség (pl. emésztő enzimek, véralvadási faktorok), hanem azok szekréció útján kerülnek a megfelelő közegbe, ahol aktiválódhatnak. Könnyen belátható, hogy ilyen esetekben az intracelluláris aktiválódás kifejezetten káros, akár önemésztési folyamatokhoz is vezethet. A limitált proteolízis klasszikus példája a hasnyálmirigy által termelt egyik emésztő enzim, a kimotripszinogén aktiválódása a bél lumenében *(I/4-1. ábra)*.

A kimotripszinogén 245 aminosav hosszúságú, két diszulfidhidat tartalmazó polipeptid formájában szintetizálódik a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben inaktív, zimogén formában. Az enzim csak a vékonybélbe jutva aktiválódik, első lépésként egy másik aktív szerin-proteáz, a tripszin hasítja egyetlen helyen, a 15-ös Arg és a 16-os Ile között. Az így képződő két peptidrészt az egyik diszulfidhíd továbbra is összetartja. A tripszin proteolitikus hasítása következtében kialakuló enzimet π-kimotripszinnek nevezzük, mely némi enzimaktivitással bír, önmagát képes további három helyen hasítani. Ennek következtében két dipeptid kihasad a fehérjéből, de az immár három polipeptidláncból álló enzimet a két diszulfidkötés továbbra is összetartja. Az így kialakult aktív enzim az α-kimotripszin.

A limitált proteolízisek sorozata azonban aktiválódási kaszkád formájában egymásra is épülhet, így biztosítva a gyors és sokrétű enzimaktivitás megjelenését. Ennek klaszszikus példája a hasnyálmirigy által termelt fő emésztő enzimek, a tripszinogén, a kimotripszinogén és a proelasztáz aktiválódásának folyamata, mely így biztosítja a táplálékkal felvett fehérjék gyors és legoptimálisabb lebontását *(I/4-2. ábra)*.



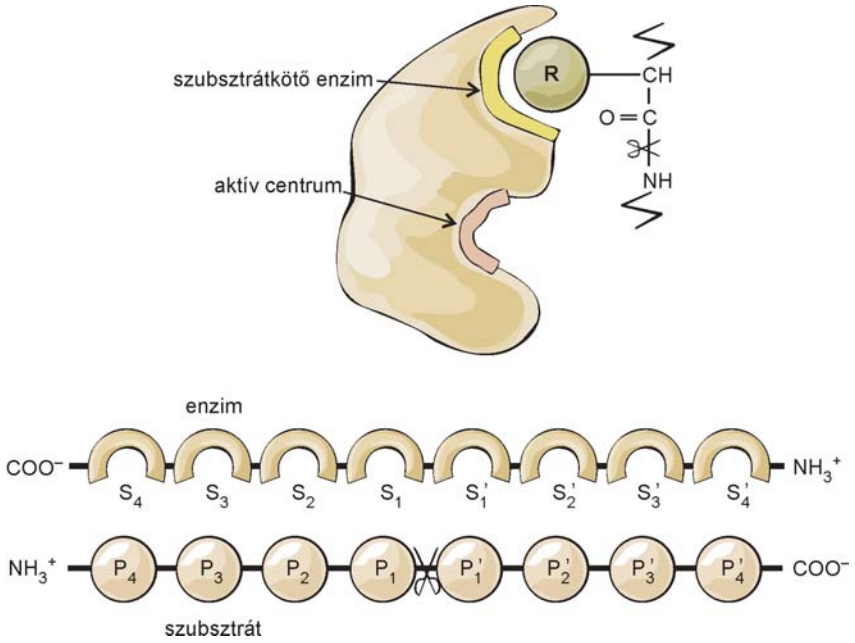
I/4-1. ábra
A kimotripszinogén aktiválódása limitált proteolízissel



I/4-2. ábra
A fehérjék emésztésében szerepet játszó szerin-proteázok aktivációs kaszkádja

Szubsztrátspecificitás

A szerin-proteázok szubsztrát specificitását a szubsztrátkötő zseb mérete és polaritása határozza meg. *A szubsztrátkötő zseb* az aktív centrum közelében helyezkedik el, kialakítása az enzimre jellemző típusú aminosav oldalláncok megkötésére képes *(I/4-3. ábra)*. Ennek megfelelően a szerin-proteázokat három csoportra oszthatjuk. A *kimotripszinszerű proteázok* csoportjába tartozó enzimek szubsztrátkötő zsebe nagy és apoláros felszínű, így elsősorban az aromás aminosavak (Phe, Tyr, Trp) oldalláncának megkötésére képesek. A *tripszinszerű enzimek* kötőhelye negatív felszínt hordoz, így a pozitív töltésű oldalláncokat (Arg, Lys) ismerik fel. Az *elasztázszerű proteázok* kis méretű szubsztrátkötő zsebébe rövid oldallánccal rendelkező aminosavak (Gly, Ala, Ser) bekötődése lehetséges. A szubsztrátkötő zsebbe bekötődő aminosav pontosan az enzim aktív centrumhoz pozícionálja a karboxi-terminális felé eső oldalán található peptidkötését, mely a katalízis során elhasad.



I/4-3. ábra

A szerin-proteázok szubsztrátspecificitását befolyásoló tényezők. A szubsztrátkötő zseb és az aktív centrum egymáshoz viszonyított helyzetét az ábra felső része ábrázolja. Az ábra alsó része a szubsztrátspecifikus bekötődésében szerepet játszó további aminosavakat mutatja be

Egy enzim szubsztrátspecificitását a szubsztrátkötő zseb minőségén kívül a környező aminosavak milyensége is befolyásolja. Erre jó példa a véralvadási kaszkád egyik fontos tripszinszerű szerin-proteáza, az aktivált X. faktor. A Xa faktor egyik szubsztrátja a protrombin, melyet limitált proteolízissel trombinná aktivál. A szubsztrát fehérjében található számos arginin dacára az aktiváció során a protrombinban mindössze két Arg mellett történik hasítás. Az enzim-szubsztrát kapcsolat kialakításában szerepet játszó aminosavakat az enzimen S_1-S_4 és S'_1-S'_4 a szubsztráton P_1-P_4 és P'_1-P'_4 jelöléssel láthatjuk el *(I/4-3. ábra)*.

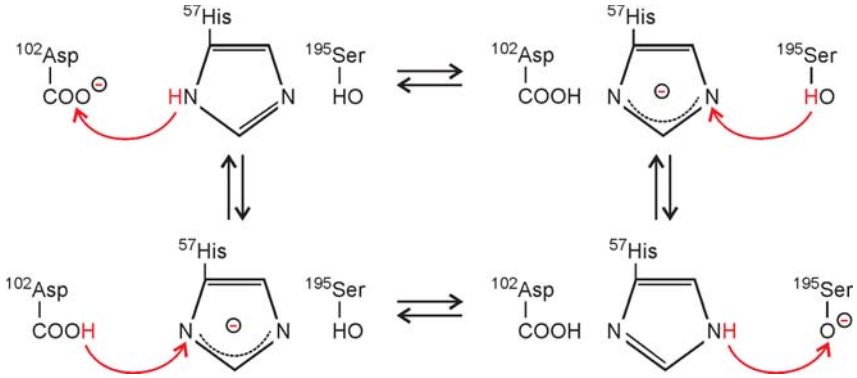
A szubsztráton az enzim általi hasítás a P_1 és P'_1 helyek között történik, az enzim szubsztrátkötő zsebébe a P_1 helyen található aminosavnak kell beleillenie. A többi aminosav másodlagos kötések kialakítására képes az enzim és a szubsztrát megfelelő felszínei között, ami lehetővé teszi az azonos, elvben a kötő zsebbe beleillő aminosavak közötti különbségtételt, ezzel növelve az enzim specificitását.

Katalízis

A szerin-proteázok működése alatt *sav-bázis és kovalens katalízis* egyaránt lejátszódik. A sav-bázis katalízis során az enzim aktív centrumában egy folyamatos, reverzíbilis protontranszfer játszódik le, aminek a töltéssel rendelkező közti termékek stabilizálásában van szerepe. A kovalens katalízis alatt azt értjük, hogy a reakció során átmenetileg kovalens kötés jön létre az enzim és szubsztrátja között.

Sav-bázis katalízis

A sav-bázis katalízisben az enzim aktív centrumában található katalitikus triád (Asp, Ser, His) tagjai vesznek részt *(I/4-4. ábra)*.

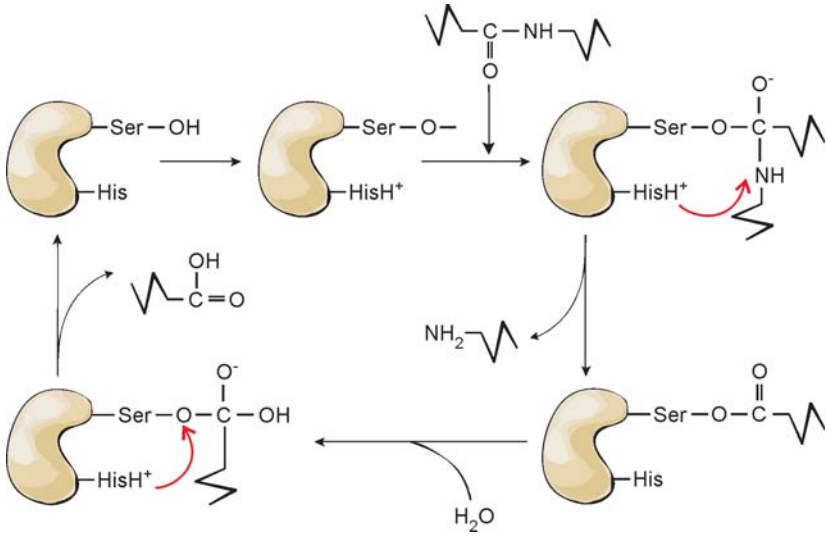


I/4-4. ábra
A proton-negatív töltés ingajárat

Az aszparaginsav karboxilcsoportja deprotonált állapotba kerülve negatív töltést hordoz, mely képes a hisztidin imidazolgyűrűjén található nitrogéntől protont elvonni. Ennek következtében az imidazolgyűrű delokalizált negatív töltésűvé válik, mely viszont a szerin oldalláncának hidroxilcsoportjától vonja el a hidrogéniont. Az így negatív töltésűvé vált Ser oldallánc pedig képes a folyamatot teljes egészében megfordítani, a protont a His-től visszavenni, mely pedig az Asp karboxilcsoportját deprotonálja. Ezt a folyamatot nevezzük *proton-negatív töltés ingajárat*nak. A proton-negatív töltés ingajárat miatt különleges az enzim aktív centrumában található szerin (például ezért csak ehhez köt a DFP), hiszen a katalitikus triád többi tagja nélkül a szerin hidroxilcsoportja nem deprotonálódhatna.

Kovalens katalízis

A peptidkötés enzimatikus hidrolízisére akkor kerülhet sor, ha a szubsztrátkötő zseb kapcsolatba kerül a megfelelő oldalláncal, illetve, ha a proton-negatív töltés ingajárat során a katalitikus szerin reaktív állapotba kerül, azaz deprotonálódik



I/4-5. ábra
A szerin-proteázok kovalens katalízisének mechanizmusa

(I/4-5. ábra). A szerin deprotonálódott hidroxilcsoportja képes kovalens kötést kialakítani a szubsztrát fehérje adott peptidkötésének pozitívan polározott szénatomjával, így az oxo csoport kettős kötése telítődik, az oxigén negatív töltést hordoz. A peptidkötésben található szénatom három helyett négy különböző ligandot köt, tetraéderes, királis vegyületté alakul. Ezt az átmeneti állapotot hívjuk *első tetraéderes tranzíciós állapot*nak.

Ezt követően a hisztidin protonálja a peptidkötésben található nitrogént, így szabad NH_2-vég alakul ki, mely disszociál az enzimről. Így az első peptidtermék felszabadult, a hasított fehérje másik fele viszont kovalensen, észterkötéssel kapcsolódik az enzimhez kialakítva az *acil-enzim kovalens intermedier*t. A viszonylag instabil acil-enzim kovalens intermedier hidrolitikus hasítása a reakció leglassabban végbemenő része. A reakció során egy vízmolekulából származó proton a katalitikus hisztidint protonálja, a hidroxidion pedig az eredeti petidkötés α-karboxil-csoportjának szénatomjához kapcsolódik hidroxilcsoport formájában. Ezzel a szénatom ismét tetraéderes térszerkezetűvé válik, ez a *második tetraéderes tranzíciós állapot*. Végül a hisztidin visszaprotonálja a katalitikus szerin oxigénjét, így a második, COOH-terminálissal rendelkező termék is leválik az enzimről, az enzim katalitikus triádja visszakerül eredeti, kiindulási állapotába.

Egyéb szerin-proteázok

Az emésztőrendszeri enzimek (tripszin, kimotripszin, elasztáz) mellett a szerin-proteázok számos más biokémiai, élettani folyamat kulcsenzimei. Jelentős szerepet játszanak többek között a *hemosztázis*ban. A véralvadási kaszkád aktiválódása tulajdonképpen szerin-proteáz enzimek sorozatos limitált proteolízisének következménye. A véralvadási szerin-proteázok közé tartozik számos véralvadási faktor (VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa), a kallikrein, az aktivált protein-C, a plazmin és az urokináz is. Alul- vagy túlműködésük egyaránt súlyos kórképeket eredményezhet, haemophylia, illet-

ve trombózis, valamint ezek következményei alakulhatnak ki. A véralvadási folyamatokon kívül számos szerin-proteázzal találkozhatunk a komplement rendszer tagjai között is. A komplement aktiválódási folyamat az emésztőrendszeri enzimek és a véralvadási faktorok aktiválódásához nagyon hasonlóan, a szerin-proteázok limitált proteolízisre való képességét kihasználva, kaszkád-szerűen történik. A komplementrendszer klasszikus (C1r, C1s, C2), lektin (MASP1, MASP2) és alternatív (B-faktor, D-faktor) aktiválódási útjaiban egyaránt találkozhatunk szerin-proteázokkal.

Bármilyen folyamatban is vegyenek részt, az eukarióta szerin-proteázok mindegyike egy közös ősgénből alakult ki, majd az evolúció során differenciálódott és specializálódott különböző feladatok ellátására. Ez nem jelenti azonban azt, hogy a prokarióta szervezetek ne ismernék és alkalmaznák a szerin-proteáz típusú enzimatikus hidrolízis mechanizmusát. A baktériumok egy tipikus szerin-proteáza a *szubtilizin*. A szubtilizin prokarióta eredete miatt szerkezetileg egyáltalán nem mutat hasonlóságot az eukarióta enzimekkel, a katalitikus centruma, triádja és mechanizmusa mégis megegyezik az eukariota szerin-proteázokéval. Számos mesterséges mutánsa ismert, melyek többek között az enzim stabilitásában és specificitásában térnek el eredeti fehérjétől. A mindennapok során mindannyian találkozunk ezekkel a szubtilizin változatokkal például a mosóporokban, különböző tisztítószerekben, kozmetikumokban.

Szerin-proteáz-inhibitorok

A szerin-proteázok nagyon gyakran, az előző fejezetekben már említett, ún. aktivációs kaszkádok részét képezik. Ezek a kaszkádok sokféle proteáz egyidejű, rendkívül gyors aktiválódását, így a feladat minél hatékonyabb elvégzését teszik lehetővé. A szabályozatlanul zajló fehérje emésztő enzimek aktiválódása, valamint a funkció betöltése után visszamaradó, immár feleslegessé vált enzimek jelenléte azonban komoly károsodást (pl. nem szubsztrát fehérjék emésztését) okozhatnak, mind sejten belül, mind az extracelluláris terekben. A szerin-proteázok aktivitásának szabályozásában ezért fontos szerepet játszanak a *szer*in-*p*roteáz *in*hibitorok vagy *szerpin*ek. A szerpinek családjának néhány fontosabb tagját, azok funkcióját mutatja be az *I/4-1. táblázat*.

I/4-1. táblázat
Szerin-proteáz-inhibitorok. Néhány szerin-proteáz-inhibitor funkciója és hiányában kialakuló betegségek

Név	Funkció (mit gátol?)	Betegség
SPINK1	tripszin	hasnyálmirigy-gyulladás
α1-antitripszin	neutrofil elasztáz	emphysema
antitrombin	trombin, Xa, IXa	trombózis
plazminogén aktivátor inhibitor-1	trombin, uPA, tPA	szív- és érrendszeri betegségek, tumorprogresszió
α2-antiplazmin	plazmin	véralvadási zavaraok
neuroszerpin	plazmin, iPA, tPA	demencia

I/4.2. METALLOPROTEÁZOK

A metalloproteázok katalíziséhez, nevükhöz híven, egy fémionra van szükség. Ez a legtöbb metalloproteáz esetében Zn^{2+}, esetleg Co^{2+}, ritkán Mg^{2+}, Ca^{2+} vagy Fe^{2+}. A fémiont leggyakrabban egy *hisztidin-*, *glutaminsav-* vagy *aszparaginsav-oldallánc, valamint egy vízmolekula* tartja kötésben. A metalloproteázok lehetnek exo- vagy endopeptidázok, funkció szempontjából rendkívül heterogén csoportot képeznek. Az enzimcsalád tagjai részt vesznek a vérnyomás szabályozásában, immunológiai és gyulladásos folyamatokban, kötőszöveti fehérjék bontásában, a táplálékkal felvett fehérjék emésztésben, sőt bizonyos gének transzkripciójának szabályozásában is.

Katalízis

A metalloproteázok működési mechanizmusa a karboxipeptidáz-A enzimen keresztül jól szemléltethető. A karboxipeptidáz-A a táplálékkal bevitt fehérjék emésztésében játszik szerepet, a hasnyálmirigyben termelődik proenzim formában. A vékonybél lumenébe jutva a tripszin limitált proteolízissel aktiválja. Az enzim egy cink-proteáz, aktív centrumában a Zn^{2+}-ionon kívül egy glutaminsav található. A karboxipeptidáz-A egy exopeptidáz, mely a fehérjék karboxi-terminálisáról hasítja le az aminosavakat. A katalízis során az enzimben található fémion először a hasítandó peptidkötés oxocsoportját, valamint egy vízmolekulát tart kötésben. A vízmolekulából származó hidrogénion az aktív centrumban található, fiziológiás körülmények között deprotonált oldalláncú glutaminsav karboxilcsoportját protonálja. A szintén a vízből származó hidroxidion pedig a peptidkötés pozitívan polározott szénatomjához kapcsolódik, így egy tetraéderes, de az enzimmel kovalensen nem kapcsolódó struktúra jön létre. Ezt követően a glutaminsavból származó proton segítségével a peptidkötés felhasad, így egy szabad N-terminális és C-terminális vég jön létre, és a láncvégi aminosav lehasad.

I/4.3. SAVANYÚ PROTEÁZOK

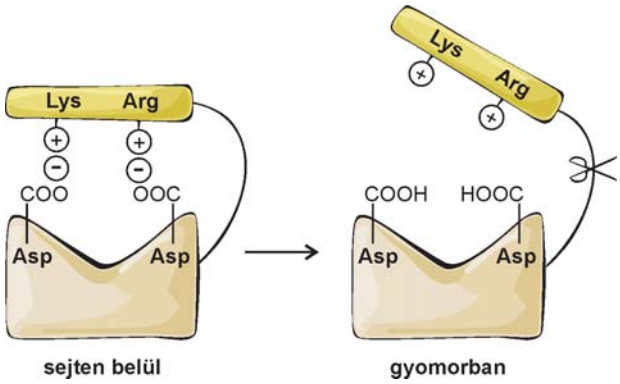
A savanyú, avagy aszpartát-proteázok nevüket az aktív centrumukban található *aszparaginsav*ról kapták. A savanyú proteázok általában endopeptidázok, melyek főleg *hidrofób oldalláncú aminosavak* melletti peptidkötést hasítanak. A többi proteázhoz hasonlóan proenzim formában képződnek. A katalitikus folyamat során kovalens intermedier nem alakul ki az enzim és a szubsztrátja között, így kizárólag *sav-bázis katalízis*ről beszélhetünk. A savanyú proteázok családjába tartozik pl. a renin, a katepszinek néhány formája, valamint a pepszin, melynek aktiválódási és katalitikus mechanizmusa részletesen bemutatásra kerül.

Aktiválódás

A pepszin pepszinogén formában a gyomor fősejtjeiben termelődik. Intracellulárisan, vagyis semlegeshez közeli pH-n az enzim aktív centrumában található aszparaginsav oldalláncok deprotonált állapotúak, negatív töltést hordoznak. A sejten belüli pepszinaktivitás megakadályozása miatt az aszpartátokat, így az aktív centrumot a fehérje egy másik részén található, pozitívan töltött lizin és arginin aminosav oldallánc tartja kötésben. Az aktív centrum tehát intracelluláris körülmények

között, a semleges pH-nak köszönhetően lefedett állapotba kerül, a sejt így tudja elkerülni az önemésztődési folyamatokat *(I/4-6. ábra)*.

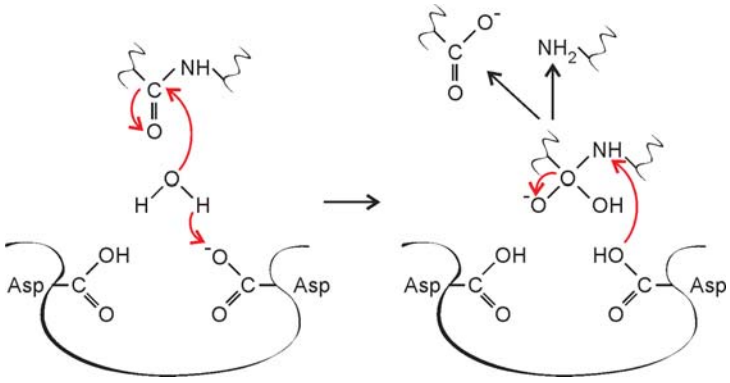
A szekréció során a pepszinogén a gyomor lumenébe, igen savas körülmények közé kerül. Savas közegben az aktív centrum aszparaginsavai protonálódnak, elveszítik negatív töltésüket, így többé nem tudnak kötődni az inaktivitásukat biztosító pozitív töltésű oldalláncokhoz, mely egyúttal az enzim aktiválódását is jelenti. Ezt követően egy másik proteáz a pozitív töltésű aminosav-oldalláncokat hordozó peptidszakaszt lehasítja az enzimről, mely végül így pepszinogénből pepszinné alakul. A pepszin esetében tehát nem maga a limitált proteolízis, hanem a *pH-változás* az, amely végső soron az enzim aktiválódását eredményezi.



I/4-6. ábra
A pepszinogén aktiválódásának mechanizmusa

Katalízis

A pepszin katalitikus mechanizmusában az aktív centrumában található aszparaginsav-oldalláncok játszanak szerepet. Bár a gyomor savas közegében az aszpartátok karboxilcsoportjai nagyrészt protonáltak, időleges és részleges deprotonálódás mégis előfordul. Ez a sav-bázis katalízis alapja. A deprotonált aszpartát a vízmolekulától hidrogéniont von el, a hidroxidion a hasítandó peptidkötés pozitívan polározott szénatomjához kapcsolódik. Az így keletkezett termék a *tetraéderes oxianion intermedier*. Ezután az aszparaginsavról származó proton a peptidkötés N-jéhez kapcsolódik, a kötés elhasad és egy-egy szabad amino- és karboxiterminális jön létre *(I/4-7. ábra)*.



I/4-7. ábra
A pepszin katalízisének mechanizmusa

I/4.4. CISZTEIN-PROTEÁZOK

A cisztein- vagy tiol-proteázok katalitikus mechanizmusa gyakorlatilag teljesen megegyezik a szerin-proteázok esetében bemutatottakkal *(I/4-5. ábra)*. A *sav-bázis katalízis* mellett ugyanúgy *kovalens katalízis* is zajlik, a szerin helyett a cisztein tiol-csoportja viselkedik savként a reakcióban.

A cisztein-proteázok három fő csoportját a *kaszpázok*, a *katepszinek* és a *kalpainok* alkotják, melyek elsősorban intracelluláris folyamatokban játszanak szerepet. A kaszpázok, avagy cisztein-aszpartát-proteázok nevüket az aktív centrumban található ciszteinről és a szubsztrátkötő zsebbe illő aspraginsavról kapták. Elsősorban az apoptotikus folyamatokban betöltött szerepük jelentős (lásd apoptózis / programozott sejthalál fejezet). A cisztein-proteázok második csoportja a katepszineké. A katepszinek a sejtek lizoszómájában, savas (pH = 5) pH-n aktiválódnak. A kalpainok kalciumfüggő, nem lizoszomális, de intracelluláris cisztein-proteázok. Neutrális pH-n aktiválódnak, nem sepcifikusak egyetlen aminosavra sem, a szubsztrát felismerésben elsősorban a hasítandó fehérje harmadlagos szerkezete játszik szerepet. Számos kalpain ismert, melyek az emberi szervezetben a sejtciklus és az apoptózis szabályozásáért, valamint a memória kialakulásáért felelősek.

I/4.5. EGYÉB PROTEÁZOK

A négy fő proteáz családon kívül néhány egyéb típusú proteázt is ismerünk. Ezek közé tartoznak a *treonin-proteázok*, melyek más proteázokkal együttműködve a proteaszomális fehérjelebontásért felelős endopeptidázok. *Glutaminsav-proteázok* és *aszparagin-proteázok* szintén léteznek, pontos mechanizmusuk és funkciójuk azonban még alig ismert.

I/5.
A hemosztázis biokémiája

Keszler Gergely

I/5.1. ÁTTEKINTÉS

A hemosztázis fogalma mindazon sejtes és szolubilis faktorok összességének dinamikus egyensúlyát jelenti, amely fenntartja az érpályában a vér folyékony halmazállapotát, ám az érfal sérülése nyomán másodperceken belül beindítja a vérzéscsillapodáshoz vezető folyamatokat. A sérüléskor fellépő vérzés megállításának céljából keletkező alvadék (trombus) megakadályozza a további vérvesztést, ugyanakkor az is alapvetően fontos, hogy az ép területeken a folyamatos vérellátás fennmaradjon. Az alvadék feloldására (trombolízis, fibrinolízis) fiziológiásan az érpálya újra átjárhatóságának biztosítása miatt kerül sor a sebgyógyuláskor. A keringésben az alvadási és az alvadást gátló mechanizmusok egyensúlyának eltolódása fokozott alvadékonyságot, artériás és vénás trombózist, más esetekben vérzékenységet eredményezhet. Az alvadási folyamat megfelelő keretek között tartásához az alvadást segítő (protrombotikus) és gátló (antitrombotikus) folyamatok dinamikusan szabályozott összjátéka szükséges, melyek középpontjában egy sejt, a vérlemezke, illetve egy fehérje, a fibrinogén áll.

Az érfal folytonosságának megszakadását követő vérzéscsillapodás első fázisában helyi érösszehúzódás, vazokonstrikció lép fel, amelyet a fájdalomreflex, illetve a lokálisan felszabaduló mediátorok váltanak ki. Az érösszehúzódás csak néhány percig tart, de ezalatt lehetőség van a végérvényes vérzéscsillapodást biztosító alvadék (trombus) képződésének megindulására. A celluláris fázisban a trombociták kitapadnak az érfalhoz és aktiválódnak, így alakul ki a trombocitadugó, a fehér trombus. Ezzel egy időben beindul a plazmatikus fázis, azaz a koaguláció is a vérplazma alvadási rendszerének aktiválódásával. Ennek során a vérplazmában oldott állapotban található fibrinogén részleges proteolízissel fibrinné alakul, a fibrin polimerizálódik, majd a polimer stabilizálódik. Az épülő fibrinháló a vér sejtes elemeit is magába zárja, így jön létre a vér nyomásának ellenálló, stabil vörös trombus. A véralvadék későbbi feloldásáért részben a fagociták, részben a plazmin és egyéb proteázok fibrinolitikus aktivitása felelős. A hemosztázis celluláris fázisát az élettan tárgyalja; a jelen fejezet a véralvadás plazmatikus fázisával, illetve a fibrinolízissel foglalkozik.

A véralvadásban szerepet játszó funkcionális elemeket alvadási faktoroknak nevezzük, ezek egy részét saját névvel, a többit római számmal jelöljük. Az alvadási faktorok a kalcium-ion kivételével fehérjék. Ezen fehérjék jó része limitált proteolízissel aktiválódik. Az aktivált formát „a”-val jelöljük, például Xa faktor. Az aktív alvadási faktorok között találunk enzimeket is, ezek proteázok, kivéve a transzglutamináz aktivitású XIIIa faktort.

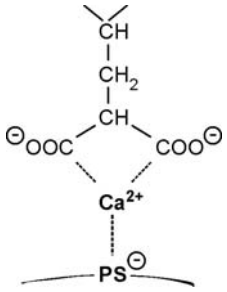
Az alvadási folyamat legfontosabb lépései a következők. A sérülés helyén először a X-es faktort aktiváló komplex jön létre a megfelelő alvadási faktorokból. Ezt tenáznak nevezzük, mert a X-es faktort (angolul „ten”) aktiváló limitált protolízisért („-áz”) felelős. A Xa faktor maga is proteáz. A Xa további faktorokkal kiegészülve kialakítja a protrombináz komplexet, amely a protrombinból limitált proteolízissel

trombint hoz létre. A trombin megint csak aktív proteáz, ez alakítja ki limitált proteolízissel a fibrinogénből a fibrint. A fibrin ragadós fehérje, spontán polimerizálódik. A laza fibrin polimert a XIIIa faktor stabilizálja, mert transzglutamináz aktivitásával kovalensen egymáshoz köti a fibrinmolekulákat. A XIII-as faktort szintén a trombin aktiválja limitált proteolízissel.

A továbbiakban a véralvadás és a fibrinolízis működésének és szabályozásának részletei kerülnek ismertetésre.

I/5.2. A VÉRALVADÁS SZERIN-PROTEÁZ RENDSZERE ÉS ANNAK SZABÁLYOZÁSA

Az alvadási faktorok túlnyomó részét a máj termeli és inaktív proenzim (zimogén) formában a plazmába szekretálja. Szöveti sérülés hatására beindul a véralvadási proteolitikus kaszkád, az egyes faktorok egymást hasítva hozzák létre a katalitikusan aktív proteázokat. Ennek nyomán végül sor kerül a protrombin aktiválására, amely a vízben jól oldódó fibrinogénből oldhatatlan fibrint képez. A fibrin monomerek spontán polimerizációjával, majd kovalens keresztkötésével kialakul a stabil fibrinháló, a vörös trombus alapja. Az aktív proteázok általában egy diszulfidhíddal összekötött két polipeptidláncból állnak. Katalitikus centrumuk a C-terminális közelében található.

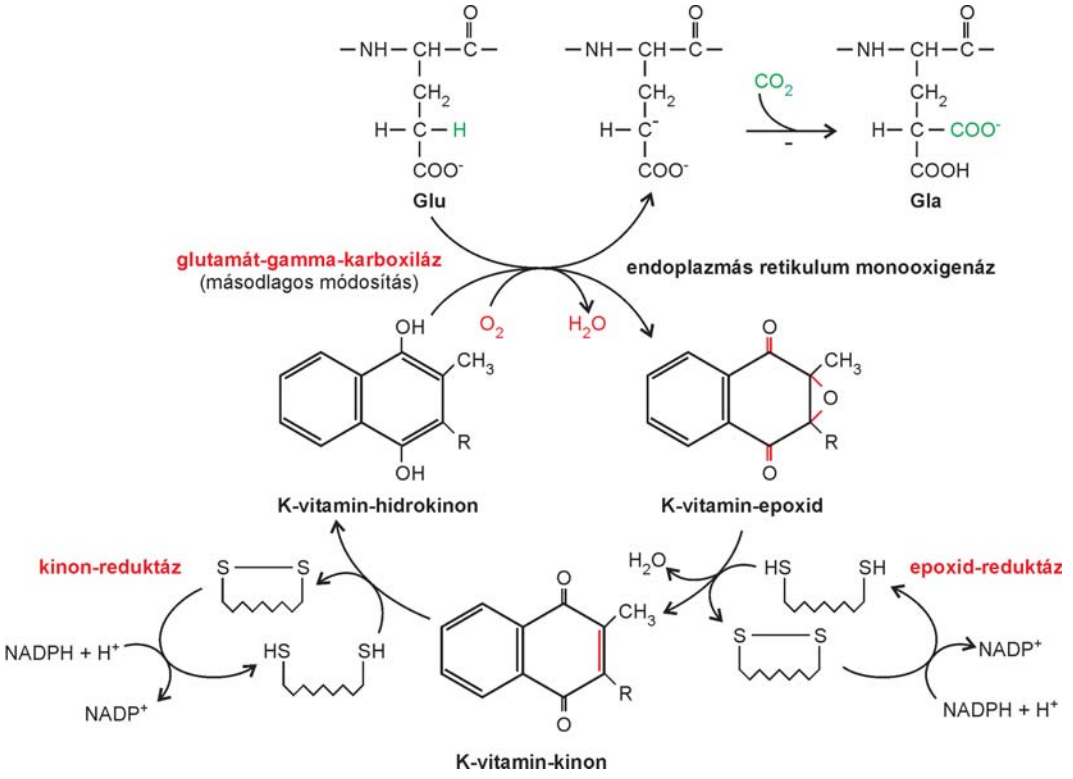


I/5-1. ábra
A Gla-fehérjék kitapadása a membránhoz

Az alvadási folyamat jellegzetessége a felületi katalízis, vagyis több alvadási faktor egyidejűleg kötődik az aktivált trombocita felszínéhez, így egy olyan multienzim komplex alakul ki, ahol a lokálisan magas faktorkoncentráció miatt a proteolitikus hasítás kiemelkedően nagy hatékonysággal mehet végbe. A trombocitamembránhoz történő kitapadás a fehérjék gamma-karboxi-glutamátban (Gla) gazdag doménjén keresztül történik; a negatív töltésű Gla-oldallánc kelátkomplexet képez a véralvadáshoz épp emiatt elengedhetetlenül szükséges kalciumionokkal, amelyek egyidejűleg a membrán külső rétegébe kihelyezett negatív töltésű foszfatidil-szerin-molekulákkal létesítenek elektrosztatikus kapcsolatot *(I/5-1. ábra)*. Az alvadási kaszkád és a trombocitaaktiváció között tehát szoros és kölcsönös egymásrautaltság van – a vérlemezkék aktív felszínt nyújtanak, a trombin pedig hatékonyan aktiválja őket –, ami hozzájárul a vérzéscsillapítás gyors és a sérülés helyére korlátozódó lezajlásához.

A plazma kalciumionjai éppoly elengedhetetlen tényezői a véralvadásnak, mint a Gla-oldalláncok jelenléte. Kalcium-kelátorokkal (citrát, oxalát, EDTA) a véralvadás gátolható, azonban ennek csak *in vitro* van jelentősége: a diagnosztikai célból levett vér alvadása megakadályozható. Ahhoz, hogy *in vivo* gátoljuk az alvadást, annyira alacsony szintre kellene levinni a plazma kalciumszintjét, ami az élettel összeegyeztethetetlen. A megfelelő glutamát-oldalláncok gamma-karboxilációja a májsejtek endoplazmás retikulumának lumenében, K-vitamin-függő poszttranszlációs módosítással történik (K-vitamin-ciklus, *I/5-2. ábra)*. A ciklus kulcsenzime egy citokróm-tartalmú monooxigenáz, amely bizonyos glutamát-oldalláncok gamma-szénatomján szén-dioxid beépítésével egy további karboxilcsoportot hoz létre. Az enzim hidrogéndonorként működő kofaktora a K-vitamin, amely a reakció során epoxikinonszármazékká oxidálódik. A K-vitamin hidrokinonná történő visszaredukálását a NADPH-függő, tiolcsoportokat tartalmazó epoxid-reduktáz és kinon-reduktáz enzimek végzik két lépésben. A ciklus epoxid-reduktáz enzime K-vitamin-antagonistákkal (kumarinszármazékok, warfarin) gátolható, amelyek óriási gyógyászati jelentőséggel bírnak a tromboembóliás kórképek kezelése, illetve megelőzésére

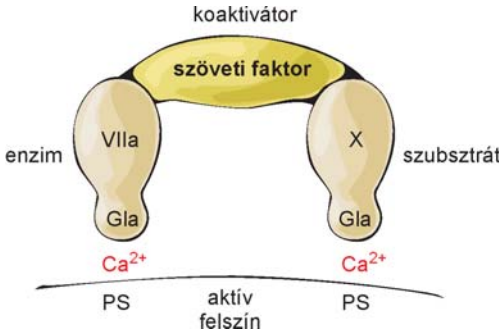
szempontjából. Előnyük, hogy szájon át szedhetők, hatásuk viszont csak a terápia megkezdését követő néhány nap múlva lesz számottevő, amikorra a kezelés megindítása előtt képződött gamma-karboxilált fehérjék lassan eltűnnek a keringésből.



I/5-2. ábra
A máj K-vitamin-ciklusa

A véralvadásban érintett fehérjék közül a protrombin, illetve a VII-es, IX-es és X-es faktor, valamint a protein C, S és Z tartalmaz Gla-gazdag peptidszakaszt. A Gla két karboxilcsoportja egy kalciumiont tud megkötni kelátkomplexben, amely közvetítésével az aktivált trombocitamembrán felszíni foszfatidil-szerinjeihez tud kötődni. Az alvadási folyamat ezáltal a sérülés területére korlátozódik, vagyis oda, ahol aktivált vérlemezkék vannak jelen (heterogén katalízis).

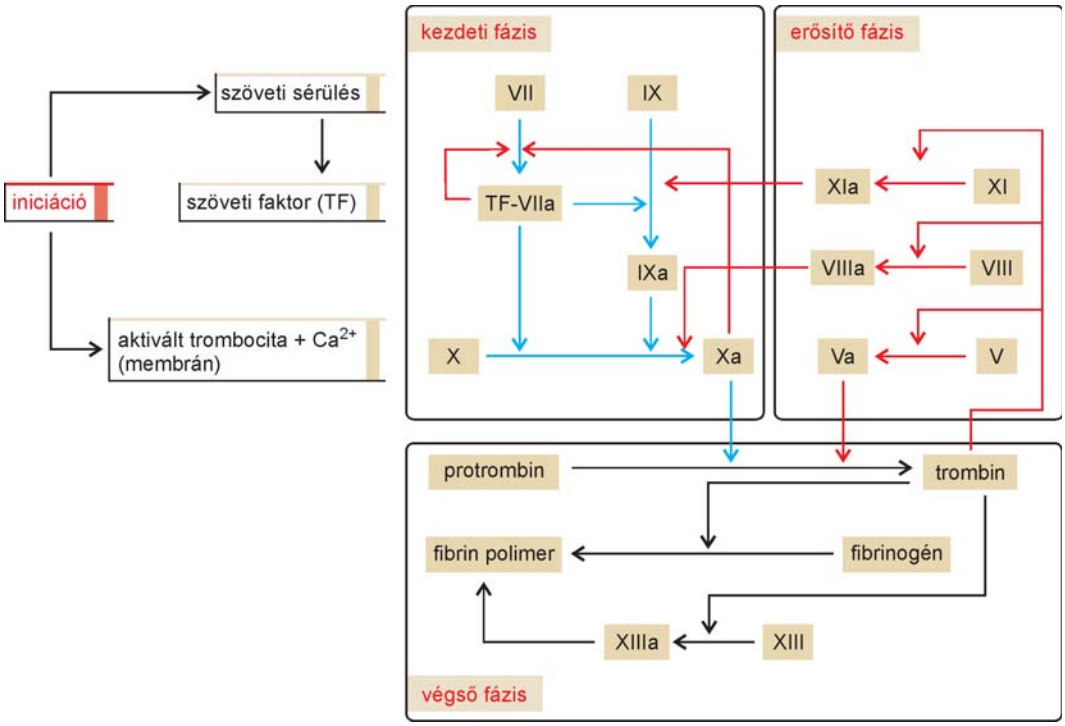
Hasonlóan a trombociták aktiválódásához, az alvadási kaszkádnak is az érfal folytonosságának megszakadása a közvetlen kiváltója. Az érpályából kilépő vérplazma kapcsolatba kerül a *szöveti faktor*ral (tissue factor, TF), egy olyan sejtfelszíni glikoproteinnel, amely a vérplazmával közvetlenül nem érintkező valamennyi magvas sejt felszínén megtalálható. Ennek következtében kialakul egy kalcium- és Gla-függő multiprotein komplex az aktivált membrán, a hozzá kötődő aktív VII-es faktor (VIIa) és az inaktív X-es faktor, valamint a TF részvételével (régebben extrinsic tenáz komplexnek nevezték; *I/5-3. ábra*). Ebben a mikrokompartimentumban a VIIa katalitikus aktivitását a TF jelenléte hét nagyságrenddel (!) fokozza, így a X-es faktor aktiválása másodpercek alatt végbemegy. A VIIa és a TF egyidejűleg, hasonló me-



I/5-3. ábra
Az „extrinsic tenáz" komplex felépítése
(PS = foszfatidil-szerin)

chanizmussal a IX-es faktort is aktiválhatja, utóbbi aktivált VIII-as faktor jelenlétében, szintén egy kelátkomplexen keresztül aktiválhatja a X-es faktort („intrinsic tenáz"), vagyis a VIIa a X-es faktort közvetlenül és közvetve is aktiválhatja. A Xa viszont a VII-es faktort aktiválja, illetve a TF/VIIa komplex is képes a VII-es faktort aktiválni (pozitív visszacsatolás; *I/5-4. ábra)*. Megjegyzendő, hogy a kanonikus alvadási faktorokon kívül a X-es faktort a Russel-vipera mérge és egy daganatos sejtekben termelődő ciszteinproteáz, az ún. cancer procoagulans is aktiválni képes, ami részben magyarázhatja a rosszindulatú betegségben szenvedő betegeken észlelt fokozott trombózishajlamot.

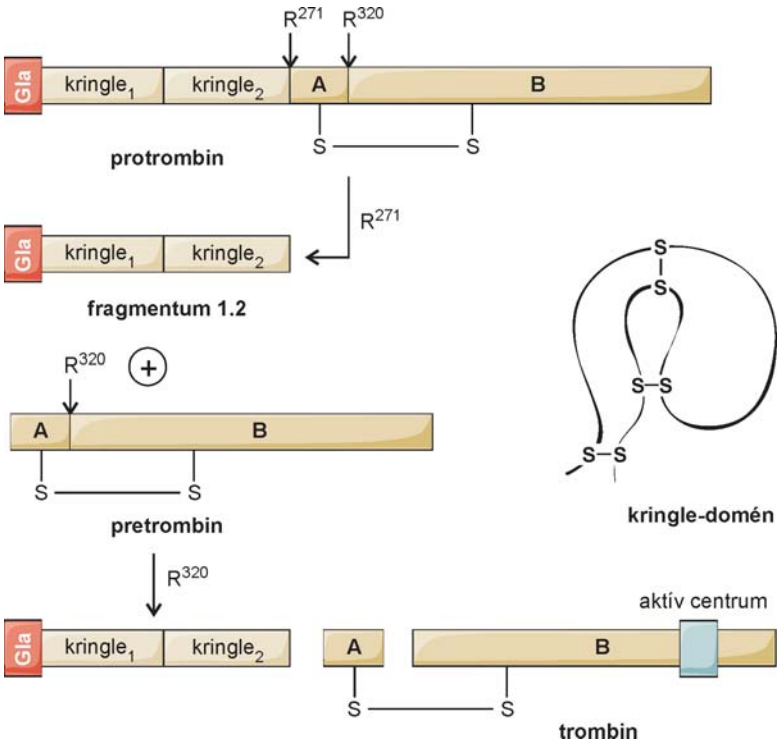
Az aktivált X-es faktor legfontosabb feladata a



I/5-4. ábra
A véralvadási kaszkád fázisai és felépítése

protrombinnak az ún. protrombináz komplex keretén belül történő proteolitikus aktiválása. Ebben a membrán-, kalciumion- és Gla-függő reakcióban az aktivált X-es faktor enzimként, a protrombin inaktív zimogénje szubsztrátként, míg a két fehérjéhez szorosan kötődő aktivált V-ös faktor egy hatékony katalizátorként vesz részt, amely a hasítási reakció sebességét öt nagyságrenddel fokozza. A protrombin akti-

vált X-es faktor általi hasítása két lépcsőben, két kitüntetett arginin-aminosav mellett történik *(I/5-5. ábra)*. Az első proteolitikus hasítás leválasztja a protrombin N-terminális, Gla-ban gazdag és két kringle-domént tartalmazó polipeptidjét, az úgynevezett fragmentum 1.2-t; a megmaradt C-terminális polipeptidet *pretrombin* névvel szokták illetni. A kringle-motívum egy három diszulfidhíd által stabilizált hurokszerű szuperszekunder szerkezeti elem, amely egy skandináv perecre való hasonlatossága miatt kapta a nevét, és fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tud stabilizálni. A második hasítás a pretrombinban található, egymással diszulfidhidat alkotó két cisztein között történik, így a keletkező két peptid a diszulfidhíd révén szoros kovalens kapcsolatban marad. Ezáltal kapjuk a két láncból (A és B) álló aktív trombinmolekulát, amelynek aktív centruma a B-láncon, a C-terminális közelében található.



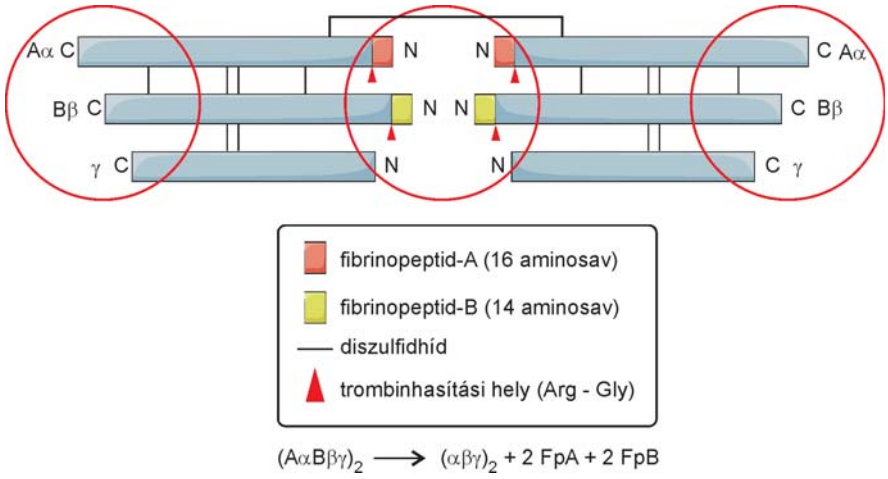
I/5-5. ábra
A protrombin szerkezete és aktivitásának mechanizmusa

Az aktív trombin nemcsak az alvadási fázis végső lépését, a fibrin képződését katalizálja (lásd később), hanem pozitív visszacsatolások segítségével fokozza saját aktiválódásának sebességét. Többek között hasítással aktiválja az V-ös és a VIII-as alvadási faktorokat, amelyek ugyan nem proteázok, viszont fehérje-fehérje kölcsönhatások révén meggyorsítják az alvadási folyamatot, amint az a fentiekből már kiderült. Ezen túlmenően a trombin a XI-es faktort is aktiválja. Bár a XI-es faktor nem tud az aktivált vérlemezke-membránhoz kötődni, a trombin mégis „megtalálja", mert az aktív trombinban már nincs meg a Gla-gazdag szekvencia, vagyis az aktív trombin egy szolubilis, a plazmában szabadon diffundáló proteáz. Az aktivált XI-es faktor ezt követően a IX-es faktort aktiválja, amely a TF/VIIa rendszer révén is aktiválódhat

(I/5-4. ábra). A trombin egy további célpontja a trombocita felszínén található PAR-1 trombinreceptor, amelynek aktiválódása egyrészt a trombocitaaggregáció párhuzamos felerősítésében fontos, másrészt növeli az alvadási kaszkád szempontjából óriási jelentőségű aktivált membrán felszínét. Az elmondottakat összefoglalva, az alvadási kaszkád szöveti sérülés hatására kezdetben nagyon alacsony intenzitással, kis mennyiségű trombin keletkezésével indul (kezdeti fázis), majd a trombin az V-ös, VIII-as, XI-es faktorok és a PAR-1 hasítása révén saját képződésének sebességét drámai mértékben fokozza (önerősítő fázis).

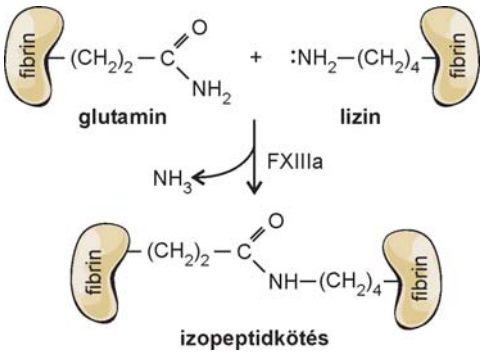
A XII-es faktor a régi tankönyvekben még az érfalon belüli (intrinsic) alvadási útvonal iniciátoraként szerepelt, azonban az újabb kutatások nyomán kiderült, hogy *in vivo* gyakorlatilag nem játszik szerepet a véralvadásban, hiszen aktiválódása lassú, hosszú perceket igénylő folyamat, illetve az alvadási rendszer aktiválásán kívül a fibrinolízist is elindíthatja. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, hogy az egyszerre prokoaguláns és profibrinolitikus faktor veleszületett hiánya klinikai tüneteket nem okoz. A XII-es faktor további biológiai jelentőségét jelenleg immunológiai folyamatok és az értónus szabályzásában látjuk. A XII-es faktor a sérült érfal szubendoteliális kötőszöveti rostjaihoz a *nagy molekulatömegű kininogén* (high molecular weight kininogen, HMWK) segítségével kötődik, amely egyidejűleg a prekallikrein zimogént is magához köti a plazmából. Ebben a fehérjekomplexben a XII-es faktor és a prekallikrein egymást aktiválják, majd a XIIa kemotaktikus hatású fragmentumokat hoz létre komplemetfehérjék hasításával. Ezen túlmenően a kininogénből értágító hatású bradikinint tesz szabaddá, illetve szerepet játszik a plazminogén aktiválásában. Az aktivált XII-es faktor emellett aktiválhatja a XI-es és a VII-es alvadási faktorokat is; utóbbiak a XII-es faktort pozitív visszacsatolás révén aktiválni képesek.

Az aktív trombin elsődleges feladata a fibrinogén vízben oldhatatlan fibrinné történő hasítása. A fibrinogén a plazma legnagyobb koncentrációban jelen lévő alvadási faktora, egy hat polipeptidláncból álló glikoprotein. A két-két alfa-, béta- és gamma- láncot számtalan diszulfidhíd köti össze olyanképpen, hogy három-három lánc N- és C-terminális végei egy-egy globuláris szerkezetet képeznek *(I/5-6. ábra).* A C-terminális telopeptidek egy-egy laterális helyzetű D-régiót alkotnak, míg a centrális helyzetű hat amino-terminális szekvencia az E-régiót hozza létre. Az alfa- és bé-



I/5-6. ábra
A fibrinogén szerkezete és aktivációjának mechanizmusa; Fp=fibrinopeptid

ta-láncok N-terminálisának 16, illetve 14 aminosavból álló részét fibrinopeptid A-nak, illetve B-nek nevezzük. Ezeket képes a trombin lehasítani, majd az így létrejövő konformációváltozás nyomán kialakul a plazmában oldhatatlan fibrin monomer. A fibrin monomerek a D- és E-régiók alfa- és gamma-láncai között kialakuló hidrogénkötések révén „oldal az oldalhoz" spontán összekapcsolódva dimereket hoznak létre, amelyek „vég a véghez" polimerizálódva hosszú láncokat alkotnak. Végül egy térhálós szerkezet, az ún. nem-kovalens fibrin polimer jön létre, amelynek mechanikai stabilitása még kicsi, a vér nyomásának nem áll ellen, ezért tovább szilárdítani szükséges. Ezt a feladatot a fibrinstabilizáló vagy XIII-as faktor (Laki–Lóránd-faktor) látja el, amely transzglutamináz-aktivitása révén két D-régió alfa-, illetve gamma-láncai között kovalens keresztkötéseket létesít. A XIII-as faktor aktív centrumában redukált tiolcsoportok vannak, ezért szulfhidril-ligáznak is nevezik *(I/5-7. ábra)*. Az izopeptid típusú keresztkötések egy lizin-, illetve glutamin-oldallánc között ammónia kilépésével jönnek létre. Így alakul ki a nagy mechanikai szilárdságú, mégis rugalmas kovalens fibrin polimer, amely trombocitákat és vörösvértesteket magába zárva a vérzés csillapításának definitív megoldását adja (vörös trombus). A két katalitikus alfa-láncból és két gátló béta-láncból álló inaktív XIII-as faktort a trombin aktiválja oly módon, hogy az alfa-láncból egy peptidet hasít ki, ami a béta-láncok disszociációjához vezet. Érdekesség, hogy a XIII-as faktor egy izoformája a vérlemezkék aktivációjában játszik szerepet.



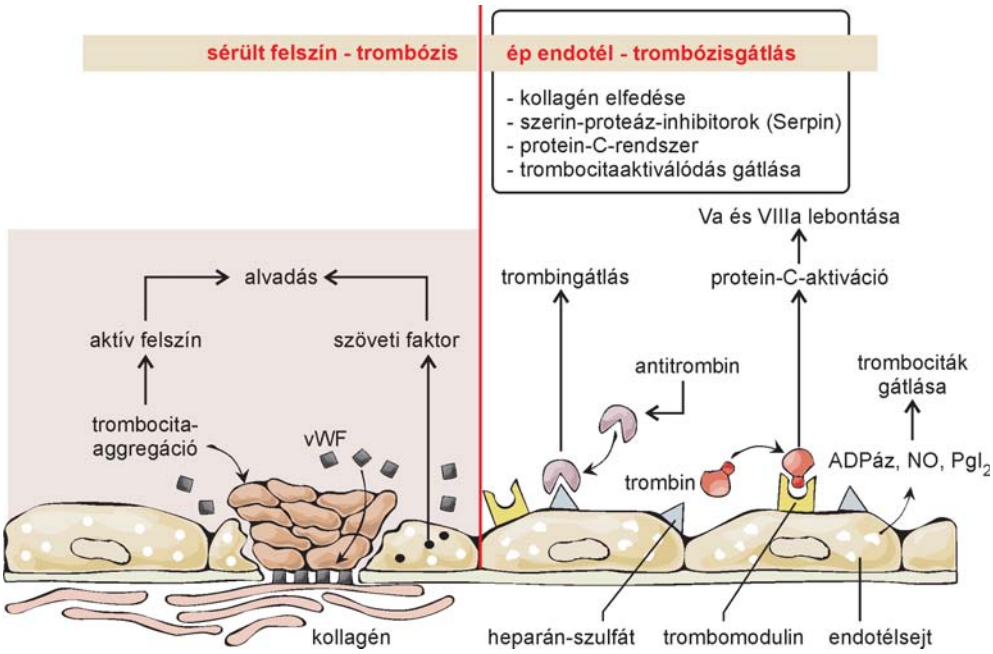
I/5-7. ábra
A XIII-as faktor által katalizált ligázreakció

I/5.3. A TROMBINAKTIVITÁS KONTROLLJA

A trombin az alvadási kaszkád legfontosabb szerin-proteáza. Mivel Gla-domént már nem tartalmaz, az aktivált trombocitáktól távolabb is hasíthat fibrinogént, illetve aktiválhatja azokat a faktorokat, amelyek saját képződésének felgyorsításáért felelősek (V, VIII, XI). A trombin és általában az alvadási kaszkád szerin-proteázai aktivitásának viszont határt kell szabni, hiszen az alvadás folyamatának a sérülés helyére kell korlátozódnia; életveszélyes helyzetet teremtene, ha az ép endotéllel borított érszakaszokon is vérrögök keletkeznének. Ezt a feladatot a vérplazma szerin-proteáz-inhibitorai (szerpin), illetve a protein C/protein S rendszer látja el *(I/5-8. ábra)*.

Plazma-proteázinhibitorok

A plazma proteázinhibitorait az alvadási faktorokhoz hasonlóan döntően a májsejtek termelik. Funkcionálisan két csoportjuk különíthető el; a pszeudoszubsztrát típusú és a sztérikus gátlófehérjék; utóbbiak közül az α_2-makroglobulin a legfontosabb. Ez a több alegységből álló fehérje kosárszerűen körülveszi és természetes szubsztrátfehérjéitől elszigeteli a szerin-proteázokat. A molekuláris csapda akkor zárul a proteáz körül, amikor az egy tioészterkötést hidrolizált az inhibitor fehérjében. Az α_2-makroglobulin egy nem specifikus gátlófehérje, amely a véralvadás szerin-proteázain kívül a fibrinolízis enzimeit is hatékonyan gátolni képes.

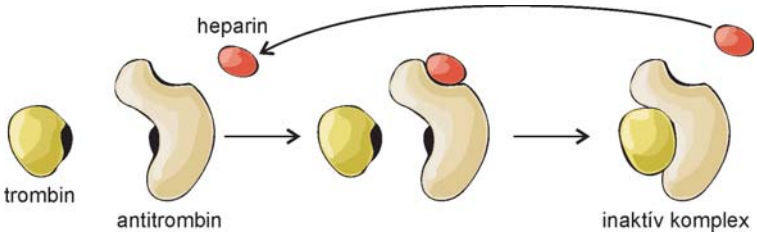


I/5-8. ábra
Az ép és a sérült területekre jellemző folyamatok

A pszeudoszubsztrát típusú gátlófehérjékben található ún. reaktív hurok egy olyan arginin-peptidkötést tartalmaz, amelyet a szerin-proteáz felismer és megköt, de hidrolizálni már nem képes. Az így keletkező inaktív enzim–inhibitor komplexet a máj Kupffer-sejtjei veszik fel a keringésből, majd lebontják. A család tagjai közül az antitrombin (antitrombin-III) a legismertebb. Ez az inhibitor *in vitro* az alvadási proteázok széles skáláját gátolhatja (trombin, Xa, IXa stb.), *in vivo* azonban gyakorlatilag csak a trombint gátolja, mivel a Gla-doménnel rendelkező proteázok kompakt membránkomplexei gyakorlatilag hozzáférhetetlenné teszik őket az antitrombin számára.

Az antitrombin affinitása nagyon alacsony a trombin iránt, azonban heparin katalizátor jelenlétében nagyságrendekkel megnő. A heparin egy erősen negatív töltésű heteroglikán, amely glukuronsav, iduronsav és különböző szénatomokon szulfatált glukózamin-egységekből áll. A heparint a hízósejtek termelik és juttatják a szövetközti térbe, azonban heparán-szulfátként az endotélsejtek felszínén is megtalálható. A heparin a trombin és az antitrombin pozitív parciális töltésű felszíni doménjeihez kötődik, megkönnyítve a trombin-antitrombin komplex kialakulását, amelynek kiemelkedő stabilitása a heparin jelenlétét már nem igényli, így a heparin ledisszociál és újabb gátló komplexek képződését katalizálhatja *(I/5-9. ábra)*. A komplex képződése szempontjából a legfontosabb tényező, hogy az antitrombinhoz kötődő heparin olyan konformációváltozást vált ki a reaktív hurok területén, ami képessé teszi azt a trombin aktív helyéhez történő bekötődésre. A heparin az alvadásgátló kezelés egyik legfontosabb pillére; a K-vitamin-antagonistákkal szemben hatását azonnal képes kifejteni. A heparin az antitrombin mellett egy további serpin, a hepa-

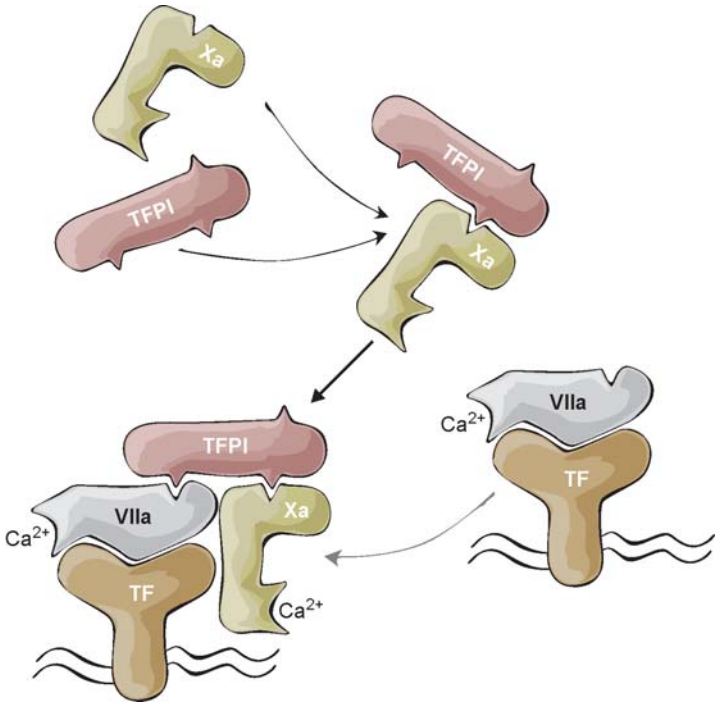
rin-kofaktor-II működéséhez is nélkülözhetetlen. A túladagolt heparin hatását egy erősen pozitív parciális töltésű fehérjével, a protamin-szulfáttal lehet azonnal felfüggeszteni.



I/5-9. ábra
A heparin katalizálta trombin-antitrombin reakció

A heparinkezelés hatástalansága esetén veleszületett antitrombin-hiányra (familiáris thrombophylia) kell gondolni (a heparin csak az antitrombin trombinkötő affinitásának fokozása révén képes hatását kifejteni). Ilyenkor az ún. közvetlen trombin-inhibitorok nyújthatnak segítséget. Természetes alapvegyületük a hirudin, az orvosi pióca *(Hirudo medicinalis)* nyálmirigyében termelődő rövid fehérje, amelynek térszerkezete a fibrinogénre hasonlít, így egyszerre kötődhet a a trombin felszíni fibrinogénkötő helyéhez, illetve aktív centrumához, azonban pszeudoszubsztrát lévén nem hasítható.

A további szerin-proteáz-inhibitorok sorában kiemelendő még a szöveti faktor indukálta alvadási útvonalat „csírájában elfojtó", tehát hatását még jóval a protrombin aktiválódása előtt kifejtő TFPI (tissue factor pathway inhibitor). E fehérje olyan, szerkezetében perecre emlékeztető kringle-doméneket tartalmaz, amelyek a véralvadási-fibrinolitikus rendszer számos szerin-proteázában is megtalálhatók. A TFPI egyik kringle-doménjén keresztül a Xa fehérjéhez tapad, majd az így létrejött térszerkezet-változás hatására egy másik kringle-hurok segítségével az aktivált VII-es faktort is köti és inaktiválja *(I/5-10. ábra)*. Ugyancsak a Xa faktort inaktiválhatja a PZI (protein Z kofaktor függő inhibitor), amely működéséhez a Gla-domént tartalmazó protein Z jelenlétét igényli.

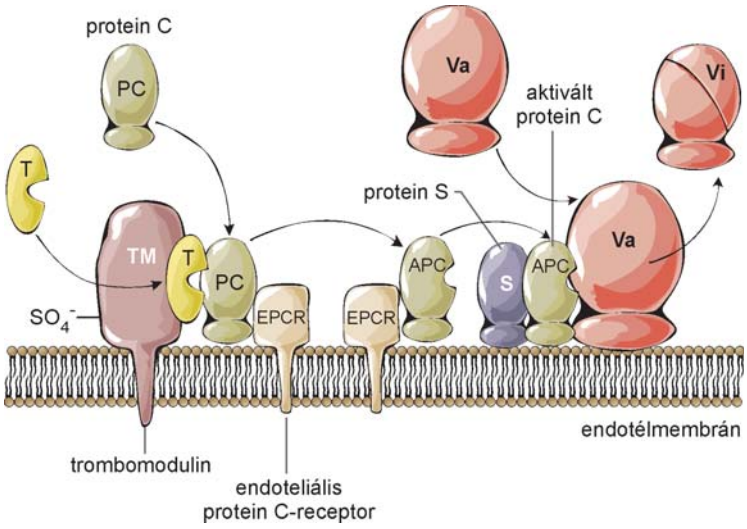


I/5-10. ábra
A TFPI hatásmechanizmusa

A protein C/protein S rendszer

Az ép endotél luminális membránja a trombomodulin nevű transzmembrán fehérjét tartalmazza, amelynek extra-

celluláris szakasza nagy affinitással köti a véráram révén az ép endotéllel borított területekre sodródott trombint. A trombomodulinhoz kötött trombin szubsztrátspecificitása drámai változáson megy keresztül. Míg a szabad trombin a fibrinogént hasítani és az V-ös, VIII-as, XI-es és XIII-as faktorokat, illetve a trombocita PAR-receptorait aktiválni képes, addig a kötött trombin ezt a hat protrombotikus funkcióját nem tudja betölteni, ellenben hasítani és aktiválni képes az endotélfelszín endoteliális protein C receptorához (EPCR) kötődő protein C-t. Az aktivált protein-C (aPC) és segédfehérjéje, a proteolitikus aktiválást nem igénylő protein S gamma-karboxilált faktorok, így kifejezetten stabil membránkötött komplexet alkothatnak az aktivált V-ös vagy VIII-as faktorral, amelyeket az aPC peptidkötések hasítása révén inaktivál (Vi és VIIIi; *I/5-11. ábra*). Az Va faktorban három darab aPC hasítási hely található. A középső és legfontosabb hasítási helyet az 506-os helyzetű arginin karboxilcsoportja által képzett peptidkötés alkotja. A két laterális hasítási helyen történő proteolízis előfeltétele, hogy az aPC az 506-os arginin melletti peptidkötést elhasítsa. Ha a Leiden-mutációnak is nevezett G → A misszensz pontmutáció nyomán ezt a kritikus arginin aminosavat egy glutamin helyettesíti, az Va faktor inaktiválódása nem történik meg, ami a véralvadás egyensúlyának a trombózis irányába történő eltolódását eredményezi. Ez az állapot más rizikófaktorok egyidejű fennállása esetén (pl. dohányzás, orális fogamzásgátlók szedése) súlyos trombotikus szövődményekhez vezethet. Ez az aktivált protein C-rezisztenciának nevezett állapot a leggyakoribb öröklött trombofília, amely az európai népesség mintegy 5–6%-át érinti. A trombomodulin, az EPCR és a protein S jóval ritkábban fellépő mutációi hasonló klinikai képet hozhatnak létre.

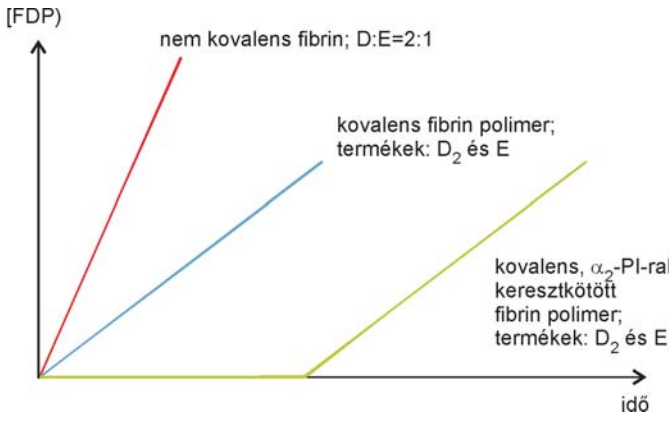


I/5-11. ábra
Az aktvált protein C/protein S rendszer szerepe a trombin kontrolljában

I/5.4. A VÉRALVADÉK FELOLDÁSA

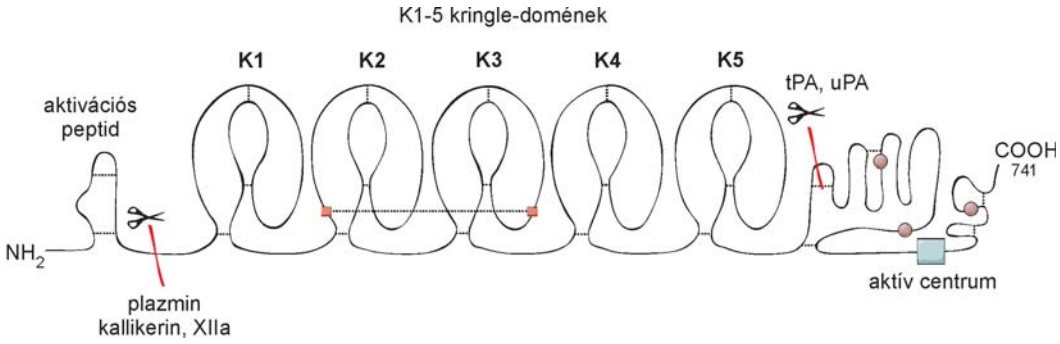
Amint a trombus betöltötte biológiai szerepét, a sebgyógyulással párhuzamosan szükség van a helyreállított érszakasz újra átjárhatóságának biztosítására, vagyis az alvadék feloldására, amit trombolízisnek nevezünk, de a biokémiai szakirodalom a fibrinháló enzimatikus feloldására utalva a fibrinolízis kifejezést részesíti előnyben. Ebben a folyamatban sejtes elemek (fagociták) és proteázok (elasztáz, metalloproteázok, plazmin) egyaránt részt vesznek, de a plazmin minden tekintetben kitüntetett szerepet játszik.

A plazmin a fibrinmolekulákat a D és E domének között található régióban hasítja (monomerenként tehát összesen két helyen), ott, ahol az alfa-, béta- és gamma-polipeptidláncok egy hármas szuperhélixet (coiled coil) képeznek. Amennyiben a frissen képződött fibrinháló viszonylag korán lebomlik, vagyis kovalens keresztkötéseket még nem tartalmazott, akkor 2:1 arányban keletkeznek a D- és E-fibrin monomer lebomlási termékek (FDP, fibrin degradation products). Ha idősebb, a XIII-as faktor révén keresztkötött fibrint bont a plazmin, akkor a folyamat a merevebb, zártabb szerkezetű szubsztrát miatt egyrészt lassabban megy végbe, másrészt a keresztkötések számától függően egyre magasabb arányban kapunk izopeptid-kötéssel összekötött ún. D_2-dimereket. Végül, ha a Laki– Lóránd-faktornak annyi idő állt rendelkezésre, hogy a fibrinháló védelmében a plazmin specifikus inhibitorát, az α_2-plazmin- inhibitort is a fibrinrostok közé szőtte, akkor a fibrin lebontása csak akkor indulhat meg, amikor a trombust támadó plazmin-molekulák valamennyi plazmin-inhibitorral ekvimoláris komplexet hoztak létre, vagyis önmagukat feláldozva inaktiválták a gátló molekulákat. Az elmondottakat az *I/5-12. ábra* szemlélteti. A D_2/D arány meghatározásának szív- és egyéb infarktusok esetében klinikai jelentősége van; minél magasabb ez az érték, annál lassabban megy végbe a trombus feloldása, vagyis a beteg kilátásai annál rosszabbak.



I/5-12. ábra
A fibrinolízis kinetikája három fiziológiás plazmin-szubsztrát esetében

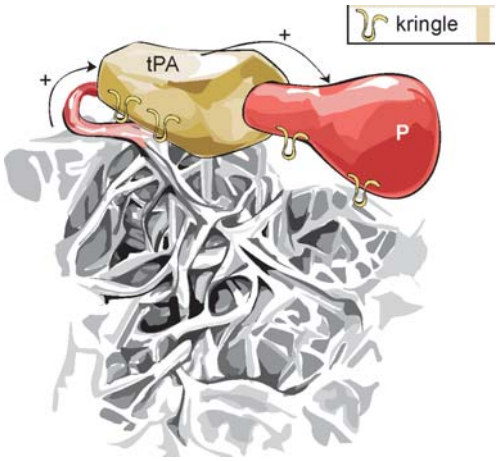
A szerin-proteázok csoportjába tartozó plazmin inaktív zimogénje a plazminogén, amelynek szerkezetét az *I/5-13. ábra* illusztrálja. A natív plazminogén-molekula térszerkezetének érdekessége, hogy az N-terminális aktivációs peptid a C-terminális közelében található aktív hellyel lép kölcsönhatásba és gátolja azt. A plazminogén aktiválásának érdekében ezt a gátló kapcsolatot meg kell szüntetni, amire két lehetőség nyílik. Egyrészt az aktivációs hurok proteolízissel leválasztható; ezt a reakciót az aktivált XII-es faktor vagy a kallikrein, de leggyakrabban maga a plazmin végzi (pozitív visszacsatolás). A másik lehetőség egy olyan konformációváltozás, amelynek eredményeképpen az aktivációs peptid térben messzebb kerül az aktív helytől, így annak enzimaktivitását nem gátolja. Az aktivációs peptid helyzetének megváltozását általában a szubsztrát, vagyis a fibrin plazminogénhez való kötődése váltja ki. A plazminogén–fibrin kapcsolatot a plazminogén 1-es és 5-ös hely-



I/5-13. ábra
A plazminogén szerkezete és hasítási helyei

zetű kringle-doménje, illetve a fibrin C-terminális lizin aminosav-oldalláncai közötti elektrosztatikus kölcsönhatások biztosítják, amely hatására a fibrinogén egy nyitottabb konformációt vesz fel (ún. módosított plazminogén). Az aktivációs peptid lehasítása vagy konformációváltozással kiváltott „elforgatása" létrehozza azt a már minimális enzimaktivitást mutató térszerkezetet, amikor az enzimaktivitás kibontakoztatásához elengedhetetlen peptidkötés hasítása megtörténik. Ezt a kritikus hasítási lépést a szöveti típusú (tPA), illetve urokináz típusú (uPA) plazminogénaktivátorok katalizálják *(I/5-13. ábra)*. Ez a hasítás egy diszulfidhíd két ciszteinpillére között történik, vagyis az aktív plazmin a kringle-doméneket tartalmazó nehéz láncból és az aktív helyet hordozó könnyű polipeptidláncból álló kétláncú molekula (szerkezetileg erős hasonlóságot mutat a trombinnal!).

Az endotél, illetve részben urotélsejtek által termelt plazminogénaktivátorok a keringésben egyláncú előalakjaik formájában keringenek addig, amíg – amint azt a hemosztázis szerin-proteázai kapcsán szinte már megszokhattuk – egy diszulfidhídon belül célzott proteolízissel kétláncú aktív formává nem alakulnak. Az aktiváló hasítást a kallikrein vagy maga az aktív plazmin végezheti – a plazmin tehát saját képződését többszörös visszacsatolási körökön keresztül segíti elő. A kétláncú uPA aktivitása maximális, azonban a tPA csak kofaktorok jelenlétében tudja a módosított plazminogént hatékonyan aktiválni. A tPA legfontosabb segédfehérjéje maga a fibrin, amelyhez kringle-doménjei segítségével tud kötődni. Egy lenyűgözően hatékony és logikus aktivációs mechanizmusnak lehetünk tanúi: a fibrinháló felszínéhez tPA és plazminogén tapad ki, utóbbi konformációja a fibrinkötés hatására módosul, így a proenzim részleges aktivitást nyer. A módosult és minimálisan aktív plazminogén alacsony sebességgel tPA-t aktivál, amely kofaktora, a fibrin jelenlétében teljesen aktív lesz és a plazminogén hasításával plazmint hoz létre *(I/5-14. ábra)*. A plazmin további tPA- és plazminogénmolekulákat aktivál, valamint lebontja a fibrint.

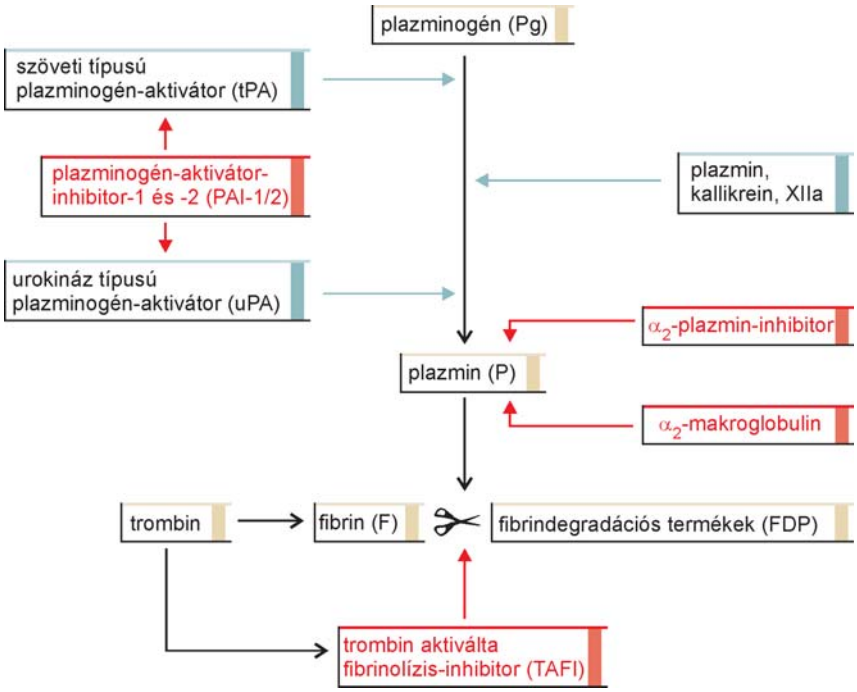


I/5-14. ábra
A tPA és plazmin fibrinnel képzett komplexe

A rekombináns technológiával előállított plazminogénaktivátorokat az orvosi gyakorlatban vérrögök feloldására használják. Nyilvánvalóan a tPA

használata mellett szól, hogy a fibrin felszínén aktiválja a plazminogént, vagyis azon a helyen, ahol a fibrinolízisnek történnie kell; uPA használatával ezt kevésbé célzottan tudjuk biztosítani *(I/5-14. ábra)*. A két endogén, vagyis a szervezet által is termelt enzim mellett korábban a streptokináz nevű exogén plazminogénaktivátort is gyakran használták trombusok feloldására. Ezt a fehérjét bizonyos *Streptococcus* baktériumtörzsek termelik, de funkciójára nézve nem kináz, sőt még enzimaktivitása sincsen, így a plazminogén hasítására sem képes. A sztreptokináz ekvimoláris komplexet képez a plazminogénnel, ennek hatására utóbbi konformációja kinyílik és részleges aktivitást nyer, vagyis további plazminogénmolekulákat tud hasítani. A sztreptokináz fokozatosan kiszorul az orvosi gyakorlatból, mert a plazminogént nem célzottan, a feloldandó vérrög felszínén aktiválja, hanem az egész keringésben, ami vérzéses komplikációkhoz vezethet, illetve testidegen fehérje lévén nem kívánt immunválaszt válthat ki.

Ahogy az alvadási, úgy a fibrinolitikus kaszkád is szigorú szabályzás alatt áll, amelynek három hierarchikus szintjét lehet megkülönböztetni *(I/5-15. ábra)*: (i) az uPA és a tPA gátlása plazminogén-aktivátor-inhibitor-1 és -2 (PAI-1/2) segítségével; (ii) az aktív plazmin gátlása α_2-plazmin inhibitorral (α_2-antiplazminnal) vagy α_2-makroglobulinnal; (iii) a fibrinláncok módosítása oly módon, hogy azok ne köthessék meg a plazminogént.



I/5-15. ábra
A fibrinolitikus kaszkád feépítése és inhibitorrendszere

A PAI-1/2 érdekessége, hogy célfehérjéikhez, az uPA-hoz és tPA-hoz hasonlóan az endotélsejtek termelik. A két antagonista fehérje szekréciójának aránya természetesen a mindenkori körülményektől függ; az ép endotél profibrinolitikus tulajdonságú, vagyis inkább plazminogénaktivátorokat

szekretál, ezzel szemben a mechanikailag sérült vagy diszfunkcionális endotél elsősorban PAI-t tesz szabaddá.

A fejezet elején már szó volt a fibrinhálóhoz kötött α_2-plazmin-inhibitor (α_2-antiplazmin) jelentőségéről. Az inhibitor egyrészt a plazmin aktív centrumát blokkolja, másrészt annak a fibrinkötés szempontjából kritikus jelentőségű kringle-doménjeit is lefedi. A már fibrinhez kötődött plazminogént, illetve plazmint viszont az α_2-antiplazmin már csupán rossz hatásfokkal tudja inaktiválni, mert a kringle-domének már megkötötték a fibrint. A szubsztrátjához (és egyben aktivátorához) kötött plazmin tehát többé-kevésbé védett az inhibitorával szemben.

A plazminaktivitás gátlásának legérdekesebb és meglehetősen egyedülálló módja a szubsztrát kémiai módosítása. A plazma karboxipeptidáz-B enzime képes arra, hogy a fibrinláncok C-terminális lizinjeit lehasogassa, így a fibrin nem tudja a plazminogént és annak aktivátorait megkötni, tehát védetté válik a proteolízissel szemben. Az enzim inaktív előalakját, a prokarboxipeptidáz-B-t a trombomodulinhoz kötött trombin aktiválja, ezért a szakirodalom TAFI néven is gyakran emlegeti (*t*rombinnal *a*ktiválható *f*ibrinolízis-*i*nhibitor).

Mint az elmondottakból kiderült, a hemosztázis dinamikája a sejtes elemek (trombociták és májsejtek ↔ endotélsejtek), illetve plazmafehérjék (alvadási faktorok ↔ fibrinolitikus enzimek, proteázok ↔ antiproteázok) finom egyensúlyán nyugszik. A folyamatok ugyanakkor még nem minden részletükben tisztázottak, s az egyes szereplők néha merőben ellentétes funkciói is zavarba ejtők lehetnek, mint azt az endotélsejtek anti- és prokoaguláns aktivitása is demonstrálja (PAI-1, illetve uPA és tPA egyidejű szekréciója). A hemosztázis itt leírt mechanizmusainak szabályzása jelenleg is intenzív kutatás tárgya, s az új eredmények minden bizonnyal segítenek majd tisztázni a ma még nyitva maradt kérdéseket.

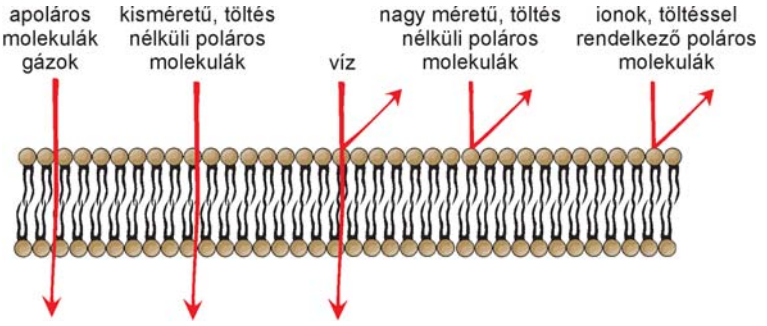
I/6. Transzporterek

Lizák Beáta

Az élő sejtek belső környezete alapvetően különbözik az extracelluláristól, egyes anyagokat nagyobb, másokat sokkal kisebb koncentrációban tartalmaz. Az anyagok eloszlása a sejten belül sem egyenletes az egyes kompartimentumokban. Az anyagcsere során a sejtnek tápanyagmolekulákat kell felvennie, míg lebontási vagy végtermékeket le kell adnia. A sejtek közti kommunikációban jelentős szerepe van bizonyos ionkoncentrációk gyors változásának. Kis molekulák, ionok ilyen szabályozott eloszlása csak szelektív barrierek segítségével valósulhat meg. Ilyen a sejtmembrán kettős lipidrétege, amely bizonyos molekulák számára teljesen átjárhatatlan, míg meghatározott anyagok könnyen, szabályozott módon jutnak át rajta. Ezért felelősek a transzporterek, melyek tulajdonságai, eloszlásuk fontos szabályozási lehetőség, vagy szöveti jellegzetesség lehet.

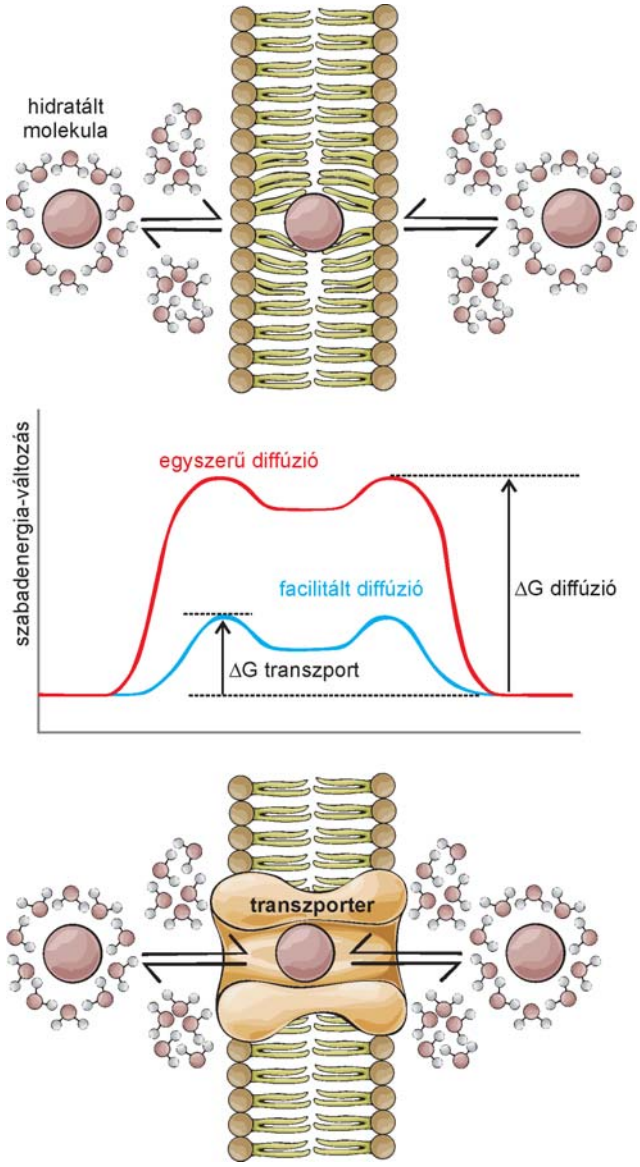
I/6.1. DIFFÚZIÓ BIOLÓGIAI MEMBRÁNONKON KERESZTÜL

A biológiai membránok foszfolipid kettős rétegének belseje hidrofób, ebből adódik a membránok szelektív átjárhatósága *(I/6-1. ábra)*. Egyszerű diffúzióval átjuthatnak a membránokon gázmolekulák pl. O_2, CO_2, NO, és bizonyos lipidoldékony anyagok. A hidrofil anyagok membránpermeabilitása töltésük és méretük függvénye, kisméretű, töltéssel nem rendelkező anyagok korlátozottan átjutnak, viszont a nagyobb, töltéssel bíró molekulák vagy ionok számára a membrán teljesen impermeábilis.



I/6-1. ábra
Biológiai membránok átjárhatósága

Egy biológiai membránon keresztül egy hidrofil részecske átjutása jelentős energiabefektetést igényel. Ahhoz, hogy beléphessen a lipidrétegbe, először meg kell szabadulnia a hidrátburoktól, át kell jutnia a vizes fázisból a hidrofób fázisba, amelyben sokkal rosszabbul oldódik, és át kell diffundálni egy nagyjából 3 nm széles hidrofób közegen. A mindezekhez a lépésekhez szükséges energiát visszanyeri a membrán másik oldalán, mikor újra a vizes fázisba oldódik és összeáll a hidrátburka. A kezdeti lépések magas energiaszükséglete vi-



I/6-2. ábra
Hidrofil részecske membránon keresztüli diffúzióját kísérő szabadenergia-változás

szont lehetetlenné teszi, hogy hidrofil molekulák spontán átjussanak a membránon. Ez a kezdeti energiagát hasonlít a kémiai reakciónál megfigyelt aktiválási energiához. Ahogy az enzimek csökkentik a kémiai reakciók aktiválási energiáját, úgy speciális membránfehérjék, a transzporterek segítik a hidrofil részecskék számára legyőzni a membránon való átjutás energiagátját, tehát a transzporterek a diffúzió katalizátorai. A transzporter fehérjék alternatív útvonalat biztosítanak a membrán átjárásához, mégpedig úgy, hogy a hidrofil molekulának ne kelljen a hidrofób lipidréteggel érintkeznie. A grádiens irányába történő, transzporterek által segített, energiabefektetést nem igénylő folyamatot ***facilitált diffúzió*nak** nevezzük, megkülönböztetve a nem fehérjemediált egyszerű diffúziótól *(I/6-2. ábra)*.

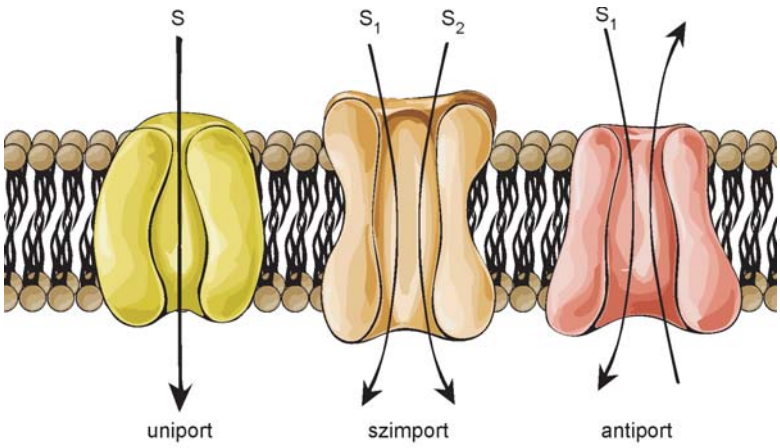
I/6.2. FEHÉRJEMEDIÁLT TRANSZPORT

A transzporter fehérjék membrán proteinek, több transzmembrán doménnel is rendelkeznek, amelyek egy hidrofil oldalláncokkal bélelt átjárót képeznek a transzportálandó molekula számára. A membrántranszportban résztvevő fehérjéket működési mechanizmusuk alapján két csoportra oszthatjuk: carrierek és csatornák.

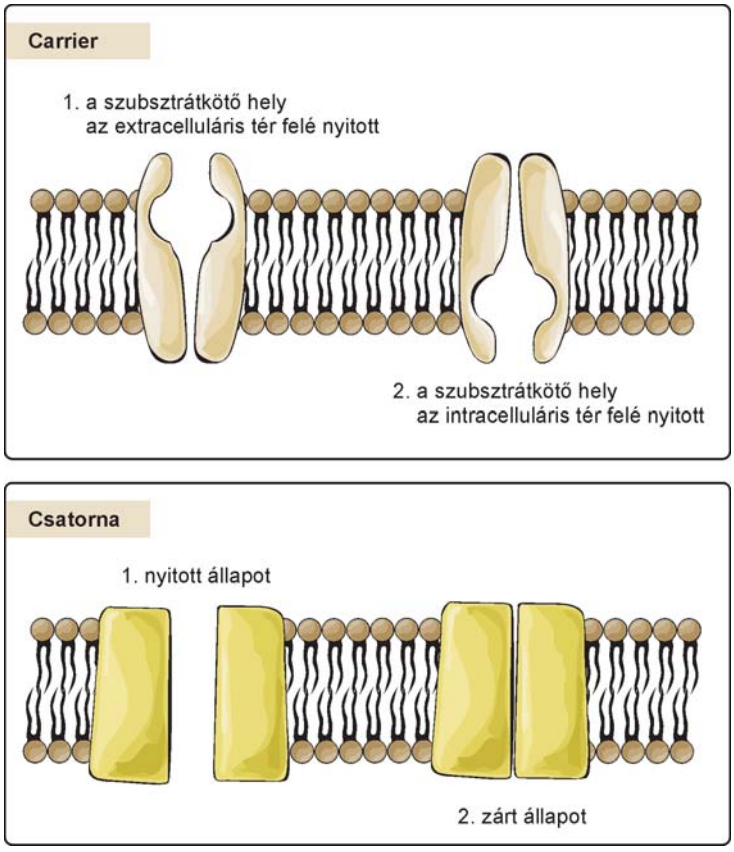
A *carrierek* specifikusan kötik a szubsztrátmolekulát, konformációváltozással érik el, hogy az adott anyag a membrán egyik oldaláról a másikra jusson. Általában két kitüntetett konformációs állapotban léteznek, az egyik helyzetben a szubsztrátkötő domén a membrán egyik oldala felől elérhető, a másikban a másik oldal felől. A két szerkezet közti átmenetet minden carrier fehérje esetében más hatás váltja ki. Ha a transzport kezdeti sebességét ábrázoljuk az extracelluláris koncentráció függvényében, a Michaelis–Menten-kinetika szerinti görbét kapunk. A transzport telíthető, vagyis egy bizonyos szubsztrátkoncentráció elérése után már nem növekszik a transzport sebessége.

A carrier típusú transzportereket tovább osztályozhatjuk az alapján, hogy hányféle molekulát, és milyen irányban transzportálnak. Ha a transzporter egyetlen anyagot mozgat, a folyamatot *uniport*nak nevezzük. Ha egyidejűleg többféle anyag transzportálódik, akkor *kotranszport*ról beszélünk. Ha egy irányba mozog mindkét molekula, akkor *szimport* történik, ha ellentétes irányba, akkor antiportnak hívjuk *(I/6-3. ábra)*.

A *csatornák*, a carrierekkel szemben, a membrán teljes vastagságát átérő, hidrofil pórust alkotnak, amely nyitott vagy zárt állapotban lehet. A két állapot közötti váltás speciális hatásra következik be. Szubsztrátjaik, amelyek ionok vagy vízmolekula lehetnek, folyamatosan áramolnak a csatornafehérje által létrehozott nyíláson keresztül, megközelítve a szabad diffúzió sebességét. Tehát a csatornák még a carriereknél is nagyságrendekkel nagyobb sebességű transzportra képesek. Telítési kinetika nem jellemzi őket, gyakorlatilag nyitott állapotban a transzport sebessége közel maximális. A csatornák működését jobban leírja a nyitási valószínűség, vagyis hogy egy adott időtartam hányad részében van a csatorna átjárható állapotban.



I/6-3. ábra
Carrier típusú transzporterek osztályozása



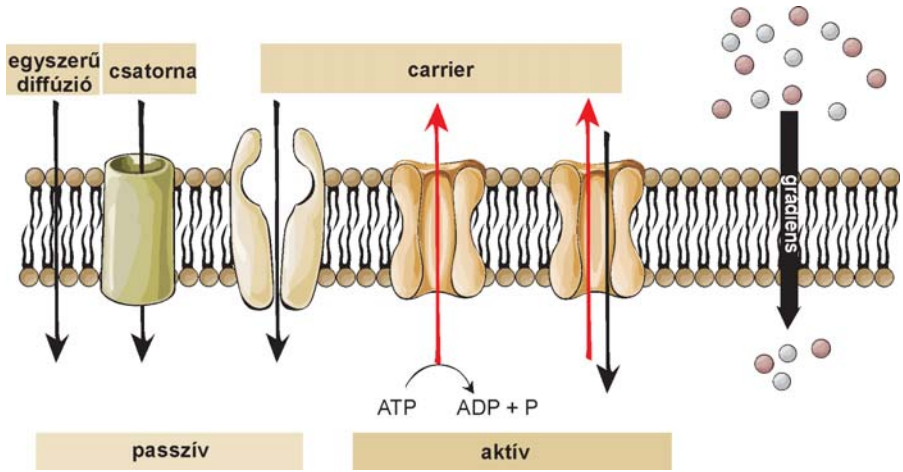
I/6-4. ábra
Carrier és csatorna típusú transzporterek modellje

A csatornákat nagyfokú szelektivitás jellemzi, specifikusan gátolhatók. Általában egyféle molekulát vagy iont egy irányba transzportálnak, tehát uniporterek. Csatornák között sosem találunk kotranszportereket *(I/6-4. ábra)*.

I/6.3. TRANSZPORTFOLYAMATOK ENERGETIKÁJA

Egy adott részecske membránon történő áthaladását szabadenergia-változás kíséri, amelynek mértéke az adott anyagnak a membrán két oldalán lévő koncentrációjának arányától, vagyis a *koncentrációgradiens*től függ. A gradiens iránya mindig a töményebb felől a hígabb oldat felé mutat. Az ionok transzportját kísérő energiaváltozást a töltéskülönbségből eredő membránpotenciál és az ion töltése is befolyásolja. A koncentrációkülönbség és az elektromos potenciálkülönbség együttesét *elektrokémiai gradiens*nek nevezzük. A transzportfolyamatokat ez alapján két csoportba osztjuk. Az exergonikus, vagyis a koncentráció- vagy elektrokémiai gradiens irányában történő transzportot *passzív transzport*nak nevezzük. Az ilyen folyamatok spontán végbemehetnek. A koncentráció, illetve az elektrokémiai gradiens ellenében történő anyagmozgatás viszont energia befektetést igényel, ilyenkor beszélünk aktív transzportról. A kapcsolt reakciókhoz hasonlóan, az aktív transzport energiaigényét egy másik exergonikus reakció során felszabaduló energia fogja fedezni. Ez lehet ATP hidrolízise, ezt nevezzük elsődleges aktív transzportnak; vagy egy másik anyag koncentráció gradiens irányában történő transzportja, ez a másodlagos aktív transzport. A passzív transzport a membrán két oldalán lévő koncentrációk kiegyenlítését eredményezi, míg az aktív transzport során koncentráció különbség alakulhat ki.

Carrier típusú fehérjék közvetíthetnek passzív és aktív transzportot egyaránt, csatornák viszont kizárólag a koncentráció gradiens irányában, csak passzívan transzportálnak *(I/6-5. ábra)*.



I/6-5. ábra
Transzportfolyamatok típusai

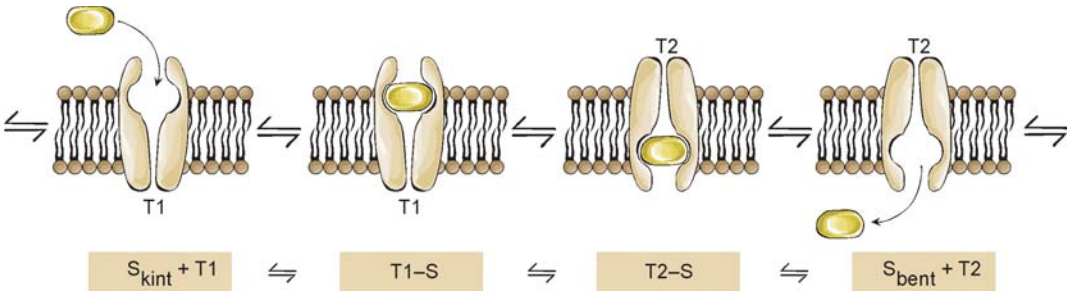
I/6.4. CARRIER TÍPUSÚ TRANSZPORTEREK

Passzív transzport

Az intermedier anyagcsere során számos molekula lépi át a plazmamembránt vagy az intracelluláris membránokat a koncentrációgradiens irányában, amely folyamatokról részletesen az adott fejezetben olvashatnak. Itt két jellegzetes képviselőt, egy uniportert és egy antiportert írunk le részletesen. Energetikailag passzív transzport történik a csatornákon keresztül is, ezekről részletesen később lesz szó.

Glukóztranszporterek (GLUT)

A glukóztranszporterek (GLUT) uniporterek, a facilitált diffúzió jellegzetes képviselői. A transzporter fehérje két konformációs helyzetben létezik, a T1 forma szubsztrátkötő helye az extracelluláris tér felé nyitott, T2 helyzetben pedig az intracelluláris oldal felől érhető el. A két konformációs állapot közti átmenetet a glukóz bekötődése indukálja. A transzportfolyamat egy ciklussal írható le, melyben minden lépés reverzíbilis *(I/6-6. ábra)*.



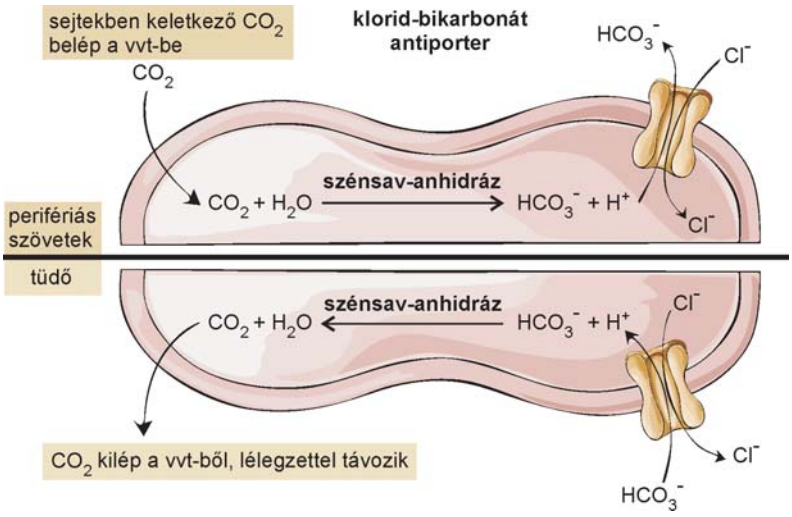
I/6-6. ábra
Glukóztranszporterek katalitikus ciklusa

A transzporter mindkét irányba képes glukózt transzportálni a koncentrációviszonyok függvényében. A glukóz bizonyos sejtekben mégis általában befelé áramlik, ami annak köszönhető, hogy a sejten belül rögtön metabolizálódik, tehát az intracelluláris szabad glukóz koncentráció mindig alacsonyabb a külső koncentrációnál. Májsejtekben azonban keletkezhet szabad glukóz, így itt a vérplazma felé irányuló transzport is megvalósulhat, tehát a máj képes a vércukorszint emelésére. A GLUT-ok sztereospecifikus transzporterek, pl. a vörösvértestekben található GLUT1 K_M-je D-glukózra 1,5 mM, míg L-glukózra több mint 3 M. A glukóz diasztereomerjeit is képes megkötni, de sokkal kisebb affinitással, D-galaktózra a K_M 30 mM, D-mannózra 20 mM.

A humán genomban eddig 14 féle GLUT transzportert írtak le, amelyek eltérő kinetikai paraméterekkel és szöveti eloszlással rendelkeznek. A pontos funkciója csak néhánynak ismert: a GLUT1 a vörösvértestekben található, alacsony K_M-értékkel rendelkezik a központi idegrendszerben expresszálódó GLUT3-hoz hasonlóan. Ezzel szemben a májban és a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben az alacsony affinitású, magas K_M-ű GLUT2 izoformát találjuk, amely elengedhetetlen a vércukorszint szabályozásában. A GLUT4 az izomra és a zsírszövetre jellemző, inzulin szignálra helyeződik ki a plazmamembránba. A GLUT5 jellegzetessége, hogy fruktózra specifikus.

Klorid-bikarbonát antiporter

A vörösvértestek membránjában elhelyezkedő klorid-bikarbonát antiporter az anion cseretranszporterek fontos képviselője. A transzport során egy kloridion egy bikarbonát ionra cserélődik, tehát töltésmozgás nincs, a folyamat kizárólag az ionok koncentrációgradiensétől függ. A transzporter elengedhetetlen a vér CO_2 szállításában. A periférián keletkező CO_2 szabad diffúzióval belép a vörösvértestbe, ott a szénsav-anhidráz szénsavvá alakítja, amely azonnal disszociál HCO_3^--ra és H^+-ra. A HCO_3^- a klorid-bikarbonát antiporteren keresztül kilép az vörösvértestből, és így szállítódik a tüdő felé. Mivel a bikarbonát jobban oldódik a vérplazmában, mint a CO_2 ez a folyamat rendkívül megnöveli a vér CO_2-szállító kapacitását. A transzporter azt is biztosítja, hogy a vörösvértestben ne halmozódhasson fel a HCO_3^- toxikus mértékben, például intenzív izommunka során. A tüdőben a CO_2 a légzéssel távozik, a koncentrációviszonyok megfordulnak, a fenti reakciók az ellentétes irányba zajlanak le *(I/6-7. ábra)*.



I/6-7. ábra

Aktív transzport

Aktív transzport során a szállítandó molekula az elektrokémiai gradiens ellenében mozog, vagyis kisebb koncentrációjú kompartmentből a nagyobb koncentrációjú felé. Ez a folyamat csak akkor mehet végbe, ha egy exergonikus reakcióhoz kapcsoljuk. Elsődleges aktív transzportnál ez az ATP hidrolízise. Az ilyen transzportereket pumpáknak vagy transzport ATPázoknak is hívjuk. Aktív transzporterek képesek iongradiens létrehozására, ami másodlagos transzportfolyamatok energiaigényét fedezheti. Ugyanis másodlagos transzportfolyamatoknál az exergonikus kapcsolt reakció egy ionnak a gradiens irányában történő transzportja. A mitokondrium belső membránjában olyan protongradienst létrehozó pumpák találhatóak, melyek egy redox reakció energiáját használják ki, erről részletesen az adott fejezetben szólunk.

Az elsődleges aktív transzportereket szerkezetük és működésük alapján négy csoportra osztjuk: P-, F- és V-típusú pumpák és ABC-transzporterek.

P-típusú pumpák

A P-típusú pumpák arról kapták nevüket, hogy a transzportfolyamat alatt időlegesen foszforilálódnak egy konzervált aszpartát oldalláncon. Ez a foszforiláció vezet

a transzportot megvalósító konformációváltozáshoz, melyben a szubsztrátkötő hely affinitása és megközelíthetősége is változik. A transzport ciklust két kitüntetett konformációs helyzet jellemzi: a defoszforilált E1, és a foszforilált E2. Az E1 állapotban a membrán egyik oldala felé nyitott és nagy affinitású a szubsztrákötő domén, amely a kis koncentráció ellenére is megköti a transzportálandó molekulát. Az E2 állapotban a transzporter a membrán másik oldala felé nyitott, viszont a szubsztráthoz kicsi az affinitása, így az a nagy koncentráció mellett is disszociál róla. A P-típusú pumpák képviselőit és legfontosabb jellemzőit az *I/6-1. táblázat* mutatja.

I/6-1. táblázat
P-típusú pumpák fajtái

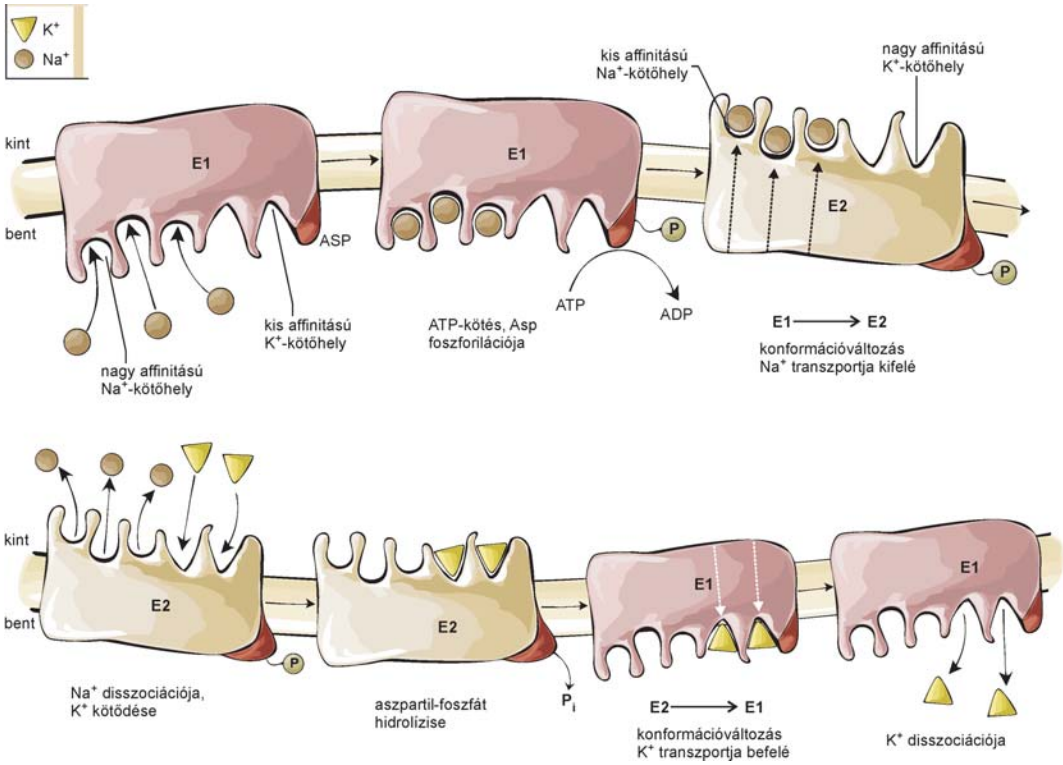
Név	Transzport sztöchiometriája	Lokalizáció	Funkció
PMCA	$2Ca^{2+}$/ATP	plazmamembrán	alacsonyan tartja az intracelluláris $[Ca^{2+}]$-t
SERCA	$2Ca^{2+}$/ATP	szarko/endoplazmás retikulum membránja	alacsonyan tartja az intracelluláris $[Ca^{2+}]$-t
Na^+-K^+ pumpa	$3Na^+/2K^+$/ATP	plazmamembrán	nyugalmi membránpotenciál létrehozása
H^+-K^+ pumpa	H^+/K^+/ATP	plazmamembrán	gyomorsav-szekréció

SERCA, PMCA

A plazmamembránban (PMCA) és az endo/szarkoplazmás retikulum membránjában (SERCA) található kalcium pumpák a P-típusú ATPázok legjobban ismert képviselői. Mindkét membránban található pumpa alapvető funkciója a citoplazma kalciumkoncentrációjának alacsonyan tartása, amely jelentőségét később részletesen tárgyaljuk.

Na^+-K^+ pumpa

A Na^+-K^+ pumpa hozza létre az élő sejtekre jellegzetes ionkoncentráció eltérést a citoplazma és az extracelluláris tér között. A sejten belül a Na^+ koncentrációja 10 mM, a K^+-é 140 mM, míg a sejten kívül a Na^+ 145 mM-os a K^+ pedig 4 mM-os koncentrációban található. A pumpa antiporter, 3 Na^+-iont pumpál kifelé és 2 K^+-iont befelé. Töltéskülönbséget is létrehoz, tehát elektrogén. Az így létrejött ioneloszlás fontos meghatározója a nyugalmi membránpotenciálnak, melyhez még egyéb ionok eloszlása is hozzáadódik, és általában -50 – -70 mV között mozog. A sejt belseje tehát negatív az extracelluláris térhez képest, ami a koncentrációkülönbséggel együttesen nagy befelé hajtó erőt jelent a Na^+ számára. A K^+-eloszlás ezzel ellentétben közel egyensúlyban van. A pumpa az ATP-hidrolízis energiáját iongradienssé alakítja, melynek jelentőségét az is mutatja, hogy a szervezet energiaháztartásának mintegy 25%-a ennek a pumpának a működtetésére használódik. Ez az iongradiens nagyon fontos az ingerelhető sejtekben az akciós potenciál létrehozásában, és minden sejtben másodlagosan aktív transzportfolyamatok energiaigényének fedezésében. A pumpa katalitikus ciklusát az *I/6-8. ábra* mutatja be.



I/6-8. ábra
Na^+-K^+ pumpa katalitikus ciklusa

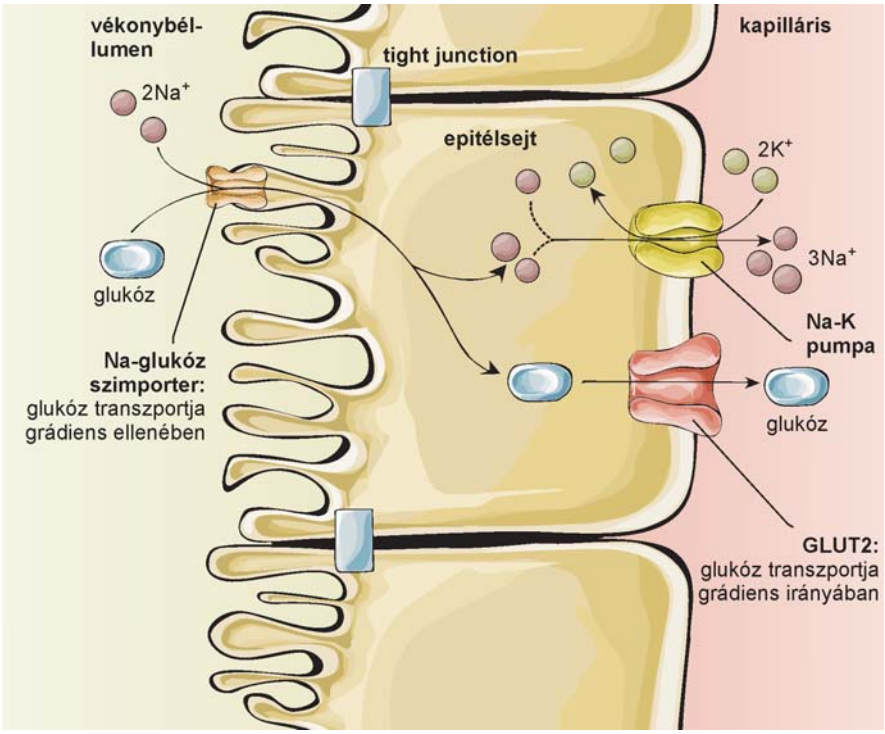
Másodlagos transzportfolyamatok a Na^+-gradiens terhére

A Na^+-ion citoplazmába történő transzportja exergonikus folyamat az iont befelé hajtó koncentrációgradiens és töltéskülönbség miatt. Ennek a terhére történik számos molekula koncentráció gradiens ellenében történő transzportja, vagyis másodlagos aktív transzport. Az ilyen transzporterek kotranszporterek, egyidejűleg mozgatják a Na^+-t és a másik transzportálandó anyagot. Katalizálhatnak szim- és antiportot is.

Na^+-gradiens hajtotta antiportra példa a *Na^+-H^+ transzporter*, amely a sejt pH-jának szabályozásában tölt be fontos szerepet.

Ehhez hasonló a *Na^+-Ca^{2+} cseretranszporter*, amely szívizomban különösen jelentős (lásd a fejezet végén).

Számos molekula felszívódása a Na^+-gradiens terhére történik a bélcsatornában. A glukóz és bizonyos aminosavak felszívódása a bélumenből, a bélhámsejteken keresztül a vérplazmába, a *transzcelluláris transzport* jellegzetes példája. A bélhámsejtek polarizáltságának köszönhetően az apikális (bélumen felőli) és a bazális (vérplazma felőli) membránban más-más transzportereket találunk. A membrán különböző fehérjeösszetételének fenntartásában fontos szerepük van az ún. tight junction (szoros kapcsolat) sejtkapcsoló struktúráknak, amelyek megakadályozzák a membránfehérjék laterális diffúzióját és a sejtek közötti tereket is átjárhatatlanul lezárják. A glukóz felszívódása két lépésben történik *(I/6-9. ábra).* Az apikális memb-

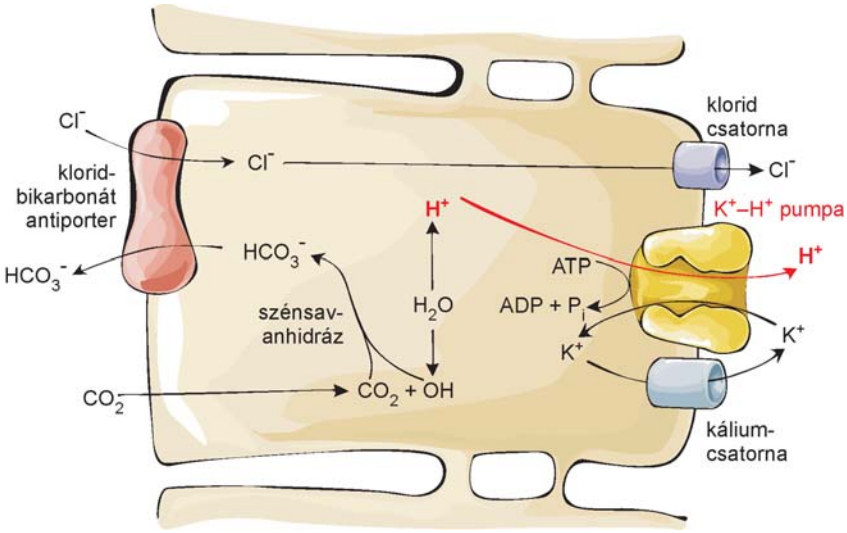


I/6-9. ábra
Glukóz felszívódása bélhámsejteken keresztül

ránban található Na^+-glukóz szimporter 2 Na^+ befelé történő transzportja terhére 1 glukóz molekulát szállít a bélhámsejtbe, ahol ezzel a másodlagos aktív transzporttal magas glukózkoncentráció érhető el. Ezt kihasználva a bazális felszínem a GLUT2 transzporter facilitált difffúzióval transzportálja a glukózt a vérbe. Ezen a felszínen található a Na^+-K^+ pumpa is, amely fenntartja az aktív transzporthoz szükséges iongrádienst. A Na^+-glukóz kotranszporter fontos tulajdonsága, hogy kizárólag mindkét szubsztrát együttes jelenlétében transzportál. Az így felszívódó ozmotikusan aktív anyagok víz felszívódását is maguk után vonják, amit ún. orális rehidrációs terápia is kihasznál. Súlyos só- és vízvesztéssel járó hasmenések, pl. kolera terápiájára használt oldat ezért tartalmaz glukózt is különböző sók mellett. Az aminosavak felszívódása hasonló mechanizmussal, az apikális felszínen működő Na^+-aminosav kotranszporterrel zajlik.

H^+-K^+ ATPáz

A gyomor parietális sejtjeinek gyomorsavtermeléséért is egy P-típusú aktív transzporter felelős. A H^+-K^+ pumpa hatására termelődik a 0,1 M-os sósavat tartalmazó gyomornedv, ami elengedhetetlen a gyomorban működő savas proteázok aktivitásához. A pumpa hatalmas koncentrációgradiens ellen dolgozik, hiszen a parietális sejtek intracelluláris pH-ja 7 a gyomornedv 1-es pH-jával szemben. A pumpa 1 ATP hidrolízisével 1 K^+-iont befelé és 1 H^+-t kifelé transzportál. Proton transzport hidroxid-ionok felhalmozódását idézné elő a sejtben, de egyéb transzporterek



I/6-9. ábra
Gyomorsav-szekréció

biztosítják, hogy a savszekréció ellenére a sejt intracelluláris pH-ja mégis neutrális maradjon. A keletkező hidroxidion a szénsav-anhidráz hatására CO_2-vel HCO_3^--ionná alakul, és bikarbonát formájában szállítódik el. A transzportját a már megismert klorid-bikarbonát antiporter végzi. Az így sejtbe jutott klorid-ionok egy Cl^--csatornán távoznak a gyomornedvbe, a bepumpált K^+-ionok pedig egy K^+-csatornán keresztül jutnak vissza. Végeredményben a 0,1 M-os sósavat létrehozó szekréció sem az intracelluláris pH-t sem a membránpotenciált nem változtatja meg.

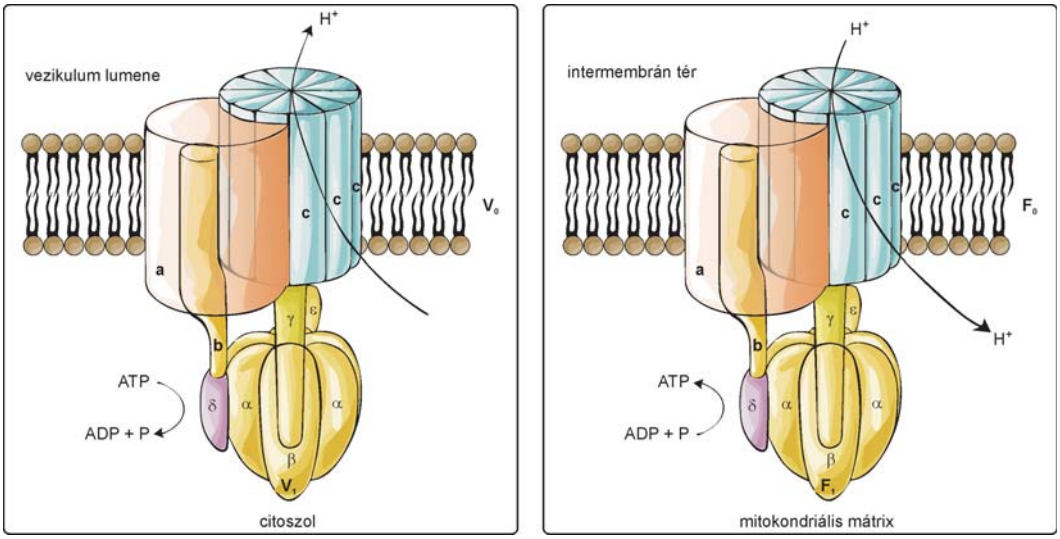
F-típusú pumpák

F-típusú pumpákat a mitokondriumok belső membránjában találunk, ahol protont transzportálnak a gradiens irányában és ezzel párhuzamosan ATP-t szintetizálnak, tehát fordítva működő proton-pumpák. A protongradiens hiányában ATP felhasználásával valódi protonpumpaként működnek *(I/6-11. ábra)*.

Az F-típusú pumpák szerkezetét egy F_o protontranszporter alegység és egy F_1 ATP-kötő alegység alkotja. A protonáramlás során a transzmembrán domén folyamatosan elfordul, ezáltal megforgatja az F_o- és F_1-alegységeket összekötő γ-alegységet. Így a protonok F_o-alegységen keresztüli áramlásának kinetikai energiája áttevődik az ATP-kötő doménra, amelyen olyan konformáció változás jön létre, ami lehetővé teszi az ATP szintézisét. Az ATP-szintézis részleteit a megfelelő fejezetben tárgyaljuk.

V-típusú pumpák

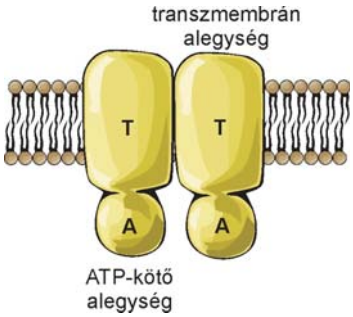
A V-típusú pumpák szerkezete hasonló az F-típusúakéhoz, működésük során nem foszforilálódnak *(I/6-11. ábra).* Protont transzportálnak különböző intracelluláris organellumok lumenébe, innen ered elnevezésük is (vakuola). Ilyen típusú pumpák felelősek a lizoszómák, endoszómák, Golgi-kompartment, szekréciós vezikulumok belsejének savasításáért, 4,5–5 körüli pH létrehozásáért. A V-típusú



I/6-11. ábra
F és V típusú pumpák szerkezete

protonpumpák által létrehozott protongradiens másodlagos transzportfolyamatokat is táplálhat, pl. a neurotranszmitterek vagy hormonok felvétele a szekréciós vezikulumokba ennek terhére történik. Ezen pumpák pontos működési mechanizmusa még nem tisztázott.

ABC-transzporterek



I/6-12. ábra
Az ABC-transzporterek szerkezete

Az ABC-transzporterek a transzport ATPázok legnagyobb és legváltozatosabb családját alkotják. Nevüket az ***A**TP **B**inding **C**assette* szerkezetű nukleotidkötő alegységről kapták, amely a család minden tagjában megtalálható, két példányban. Ezen kívül rendelkeznek még két transzmembrán, transzportért felelős alegységgel is *(I/6.12. ábra)*.

Sokféle, eltérő szerkezetű, főleg hidrofób molekulát képesek pumpálni a koncentráció gradiens ellenében. Jelentőségüket mutatja, hogy a humán genom 48 különböző ABC-transzporter fehérjét kódol. A plazmamembránban helyezkednek el, általánosságban a funkciójuk a szervezet számára felesleges vagy toxikus molekulák aktív transzporttal történő eltávolítása. Így számos ABC-transzportert találunk a májban, ahol az epébe választanak ki pl. koleszterint, epesavakat, konjugált bilirubint vagy a biotranszformáció egyéb végtermékeit. A család számos tagját találjuk a vesében és a bélhámsejtekben is hasonló funkcióval.

Az első megismert képviselőjük az MDR (multidrog rezisztencia) fehérje volt, amely tumorsejtekből pumpálja ki a különböző citosztatikumokat így gyógyszer-rezisztenssé téve a rosszindulatú szövetet.

Az ABC-transzporterek különleges képviselői a flippáz és floppáz enzimek, melyek foszfolipidek cseréjét katalizálják a membrán két rétege között.

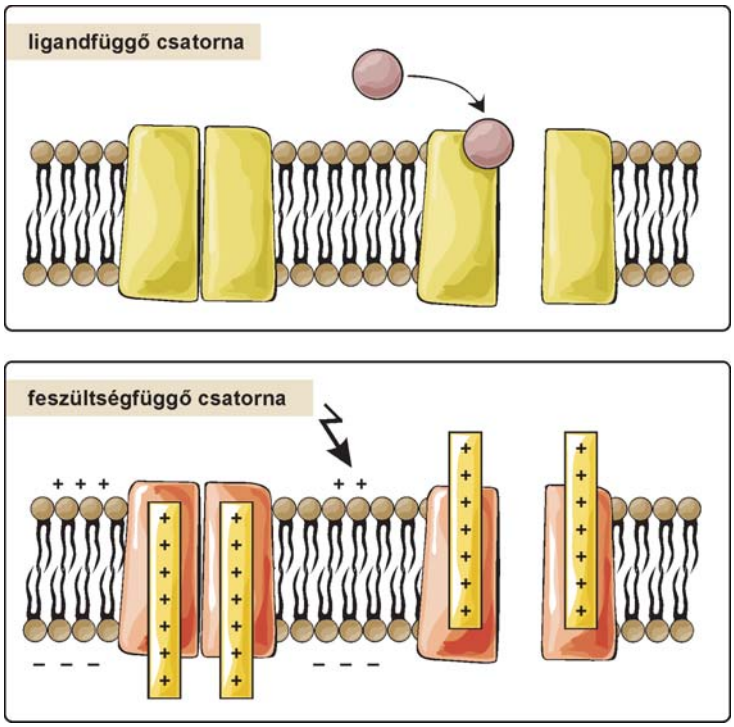
I/6-2. táblázat
ABC transzporterek és szubsztrátjaik

Név	Szubsztrát
CFTR	Kloridion
MDR/ P-glikoprotein	Gyógyszermolekulák
ABCG5/8	Koleszterin
ABCA1	Koleszterin
BSEP	Epesavak
TAP1/2	Antigén peptidek

Ebbe a családba tartoznak a TAP1/2 (transporter associated with antigen processing) fehérjék, amelyek az endoplazmás retikulum lumenébe transzportálnak antigén peptideket, hogy feltöltsék az MHC antigén prezentáló fehérjéket *(I/6-2. táblázat)*.

A család egyetlen ioncsatorna tagja a CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) fehérje, melynek mutációja okozza a leggyakoribb genetikai betegséget, a cisztikus fibrózist. A CFTR a szokásos nukleotid-kötő és transzmembrán doméneken kívül egy regulációs alegységet is tartalmaz. A kloridionokra specifikus csatorna nyílásához az ATP kötésen kívül a regulációs alegység foszforilációja is szükséges. Exokrin mirigyekben található, mirigyváladékok szekréciójában játszik fontos szerepet. Hiányában, cisztikus fibrózisban a külső elválasztású mirigyek funkciója károsodik, a váladék túl sűrű lesz, könnyen eltömíti a mirigyek kivezetőcsöveit. Ez különösen a tüdőben és a hasnyálmirigyben okoz problémát, a betegek nagy része légúti fertőzésekben hal meg.

I/6.5. CSATORNÁK



I/6-13. ábra
A feszültség- és a ligandfüggő csatornák működési sémája

A csatorna típusú transzportfehérjék működési mechanizmusa lényegesen különbözik a carrier típusú transzporterekétől. A csatornák egy nyílást hoznak létre a membránban, amelyen keresztül folyamatos, rendkívül gyors áramlás jön létre. Működésüket nyitott vagy zárt állapot jellemzi, két csoportba soroljuk őket. A *feszültségfüggő csatornák* a mebránpotenciál változásra reagálnak, a *ligandfüggő csatornák* egy bizonyos molekula bekötődésére nyílnak ki. A csatornák jellemzően ionok áramlását teszik lehetővé, de a víztranszportért is ilyen típusú fehérjék felelősek *(I/6-13. ábra)*.

Minden csatornára jellemző néhány általános szerkezeti alapelv. Általában több, 4 vagy 5 azonos alegységből állnak, amelyek a membránt áttörve létrehoznak egy csőszerű szerkeze-

tet. Az alegységek egy meghatározott része alkotja a „kapu" domént, amely a csatorna zárásáért felelős, megakadályozza az ionáramlást. A csatorna ürege egy bizonyos részen beszűkül, ami a szelektivitási filter elnevezésű szerkezeti elemet alkotja. Itt speciális aminosav oldalláncok határozzák meg, hogy a csatorna milyen ionra lesz szelektív. Pl. pozitív ionokra specifikus csatornák negatív töltésű oldalláncokkal béleltek, míg anion-csatornákban pozitív oldalláncú aminosavakat találunk a filter belső oldalán. A másik válogatási szempont az ionok mérete, ebben meghatározó a szűkület mértéke. Az ionok általában egy sorban, a csatorna aminosav oldalláncaival másodlagos kötéseket képezve áramlanak át a membrán túloldalára.

A feszültségfüggő csatornák nélkülözhetetlenek az ingerület átvitelben, tehát az ideg- és izomműködés kivitelezésében, amellyel részletesen az élettan foglalkozik. A membránpotenciál változás, tehát a töltéseloszlás változása váltja ki ezen csatornák kinyílását. Mégpedig egy argininben gazdag, vagyis pozitív töltésekkel sűrűn ellátott kapualegység segítségével, ami a potenciálváltozása konformációt vált, így nyitja a csatornát.

A ligandfüggő csatornákat szokás receptor ioncsatornáknak is nevezni, mert pl. egy neurotranszmitter bekötődésére nyílhatnak ki. A neurotranszmisszión kívül fontos szerepük van a jelátviteli folyamatokban is, melyről az adott fejezetben lesz részletesen szó. Ezek a csatornák reagálhatnak extracelluláris, vagy intracelluláris ligand bekötődésére, és a hatás lehet nyitás vagy zárás a csatorna típusától függően.

Aquaporinok

A biológiai membránok vízre korlátozottan átjárhatók. Állati sejtekben a víz az ozmotikus koncentrációk kiegyenlítése felé mozog, tehát a hígabb oldatból a töményebb felé. Bizonyos szövetekben találunk specifikusan vízre átjárható csatornákat is, melyek nagyban megnövelik a membrán víz permeabilitását. A vizet transzportáló pórusok, az *aquaporinok* a csatornákhoz hasonló szerkezetű transzporterek. Rendkívül specifikusak a vízmolekulára, megakadályozzák az oxóniumionok átjutását, ami nagyon fontos a sejt pH egyensúlya szempontjából. Kapu funkciójú alegységet nem írtak le az aquaporinokkal kapcsolatban, viszont a membránba helyeződésük szabályozott. Legfontosabb képviselőiket és funkcióikat a *I/6-3. táblázatban* foglaltuk össze.

I/6-3. táblázat
Aquaporinok típusai

Név	Szubsztrát	Lokalizáció
AQP-0	H_2O	szemlencse
AQP-1	H_2O	vvt, vese
AQP-2	H_2O	vese, ADH érzékeny
AQP-3	H_2O, glicerin, urea	vese, bőr, tüdő
AQP-4	H_2O	agy, gerincvelő
AQP-5	H_2O	nyálmirigy, könnymirigy
AQP-6	H_2O	vese

I/6.6. A SEJTEK Ca^{2+}-HOMEOSZTÁZISA

A kalciumionok különleges szerepet töltenek be a sejtek életében, számos alapvető folyamat fontos szabályozói, mint pl. anyagcsere, izomkontrakció, szekréció és a programozott sejthalál. Nyugalmi helyzetben a citoszol Ca^{2+}-koncentrációja 100 nM körül van, míg az extracelluláris koncentráció négy nagyságrenddel nagyobb, mM-os érték. A sejtek jelentős felszabadítható kalciumraktárral rendelkeznek, melyet az endoplazmás retikulum vagy izomsejtekben a szarkoplazmás retikulum képvisel. Ez a membránnal elválasztott kalcium raktár is az extracelluláris térhez hason-

lóan mM-os Ca^{2+}-koncentrációval rendelkezik. A jelentős koncentrációkülönbség és a sejtek negatív nyugalmi potenciálja nagy citoplazmába hajtóerőt jelent a kalciumionok számára. A sejtet érő stimulusok kalciumra átjárható csatornákat nyithatnak meg a plazmamembránban, vagy az intracelluláris kalciumraktárat képező endo/szarkoplazmás retikulum membránjában, melyeken keresztül a gradiens irányában áramló ionok gyorsan megnövelik a citoszol Ca^{2+}-szintjét. A kalcium az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő, vagyis a sejtet érő külső hatások intracelluláris közvetítője. A kalciumszintet befolyásoló jelátviteli útvonalak és az ion hatásának részleteit a megfelelő fejezetek tárgyalják, itt a citoszol kalciumkoncentrációját befolyásoló transzportmechanizmusokat foglaljuk össze.

A citoszol Ca^{2+}-koncentrációját emelő transzportfolyamatok

Ca^{2+}-csatornák a plazmamembránban

Az extracelluláris tér felől a Ca^{2+} kétféle hatásra léphet be a sejtbe, depolarizáció megnyithatja a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat, vagy bizonyos kívülről vagy belülről érkező ligandok ligandfüggő csatornákat aktiválhatnak.

A feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák az excitábilis sejtek plazmamembránjában találhatóak, fontos szerepet töltenek be az izomkontrakció beindításában, neurotranszmitterek vagy hormonok felszabadításában. A csatornának négyféle típusa ismert, melyek az aktiválódáshoz szükséges depolarizáció mértékében és szöveti eloszlásukban különböznek, valamint farmakológiai gátlószereik is eltérnek. A legjobban ismert képviselőjük az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatorna, amelyet dihidropiridin-receptornak is szoktak nevezni legismertebb gátlószere alapján. A csatorna négy közel azonos alegységből épül föl, a depolarizációt a jellegzetes pozitív töltésű oldalláncokban gazdag szerkezeti elem érzékeli. Ezen a csatornán áramlik be a szív-, sima- és harántcsíkolt izom összehúzódását elindító Ca^{2+}. A harántcsíkolt izomban az L-típusú Ca^{2+}-csatorna egy speciális struktúra része, ugyanis ebben szövetben a plazmamembrán mélyen betüremkedik a sejt belsejébe az ún. transzverzális tubulusokat (T-tubulus) alkotva. Ez a membránrész nagyon közel kerül az intracelluláris kalcium raktárat alkotó szarkoplazmás retikulum (SR) membránjához. Itt szoros kapcsolatba kerül egymással a feszültségfüggő kalcium csatorna és az SR membrán rianodin receptora, amelyen keresztül depolarizáió hatására kalcium áramlik a citoplazmába. A két csatorna egymásra hatásának pontos mechanizmusa még nem tisztázott. Szívizomban nincsenek ilyen T-tubulusok, ott az L-típusú Ca^{2+}-csatornán depolarizációra beáramló kalcium ionok nyitják a SR rianodin receptor csatornáit, ezt nevezzük Ca^{2+} indukálta Ca^{2+}-felszabadulásnak.

Számos neurotranszmitter receptora önmaga is kalcium csatorna, vagy olyan jelátvivő molekulákat aktivál, amelyek a citoplazmatikus oldalról nyithatnak kalcium csatornát.

A plazmamembrán kalcium csatornáinak különleges típusát képviselik a TRP (tranziens receptor potenciál) csatornák, amelyek különböző fizikai vagy kémiai stimulusra nyílnak. Ebbe a családba tartozó csatornák reagálnak mechanikai hatásra, hőre, nyomásra, reaktív oxigén származékokra vagy pl. kapszaicinre. Biológiai szerepük ebből következően nagyon sokrétű.

A plazmamembrán kalciumcsatornák közé tartozik az ORAI1 vagy teljes nevén kalciumfelszabadulás által aktivált kalciumcsatorna. Az ORAI1-et az endoplazmás retikulum kalciumszenzor STIM1 fehérjéje aktiválja, fehérje-fehérje kölcsönhatás révén. Ennek megfelelően, a csatorna a kalcium raktárak kiürülése esetén nyílik meg, elősegítve azok visszatöltését.

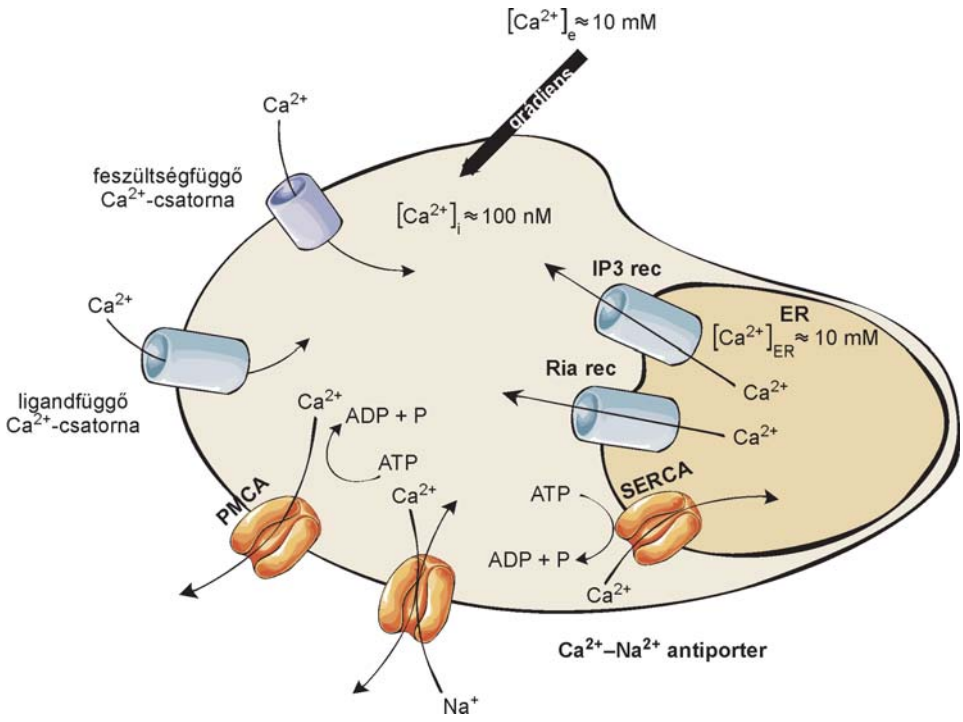
Ca^{2+}-felszabadulás intracelluláris raktárakból

A sejtek intracelluláris kalcium raktárát az endo/szarkoplazmás retikulum képezi, amelyből az ion megfelelő hatásra felszabadítható és ahova a citoplazmából vissza is transzportálható. Sokféle jelátviteli mechanizmus irányul az ER-ből történő Ca^{2+}-mobilizálásra, melyek nagy része az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP_3) másodlagos hírvivőn keresztül történik. Az IP_3 a plazmamembrán foszfolipidjéből, a foszfatidil-inozitolból keletkezik a foszfolipáz C hatására, amelyet bizonyos jelátviteli események aktiválnak. Az IP_3 egy ligand-függő Ca^{2+} csatornát nyit az ER membránjában, így jön létre a kalciumionok kiáramlása.

Az endo/szarkoplazmás retikulum membránjának másik kalciumcsatornája a rianodinreceptor, amelyet a feszültségfüggő kalciumcsatornáknál már említettünk, nevét a gátlószereként ismert növényi alkaloidáról kapta.

Az intracelluláris Ca^{2+}-szintet csökkentő transzportfolyamatok

A citoplazma Ca^{2+}-koncentrációjának emelkedése átmeneti jelenség, hatékony transzportfolyamatok állítják vissza a kiindulási állapotot, hogy a sejt újra készen állhasson a következő jel fogadására. Az intracelluláris kalciumszint csökkentéséért így az iongradiens fenntartásáért aktív transzporterek felelősek, Ca^{2+}-pumpák a plazmamembránban és az E/SR membránjában, valamint egy a Na^+-gradienst ki-



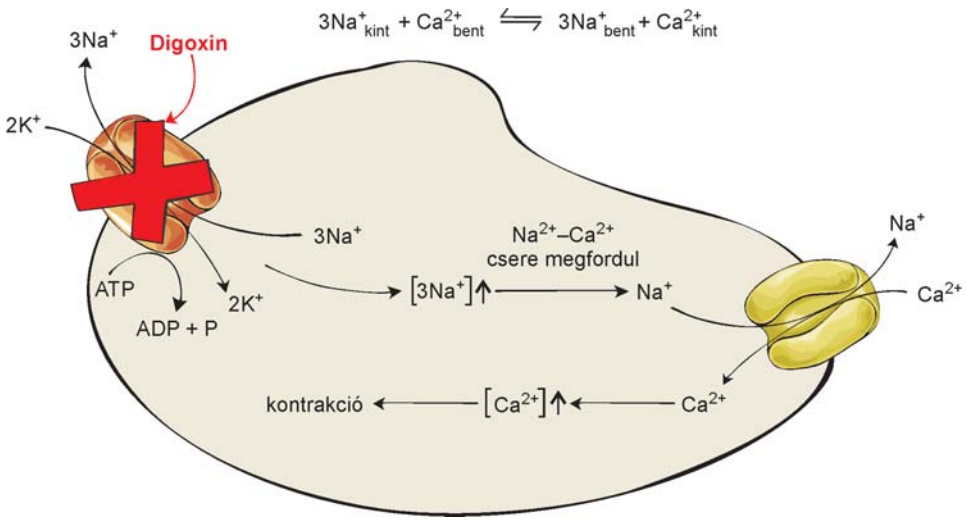
I/6-14. ábra
Intracelluláris kalciumszintet befolyásoló transzportfolyamatok

használó másodlagos aktív transzportfolyamat. Az intracelluláris kalciumszintet befolyásoló transzportfolyamatokat az *I/6-14. ábrán* foglaltuk össze.

A plazmamembránban található Ca^{2+}-pumpa (**PMCA**) a P-típusú ATPáz-ok tipikus képviselője. Fontos tulajdonsága, hogy kalmodulinnal aktiválható. A kalmodulin egy minden sejtben megtalálható általános kalcium-kötő fehérje, sok jelátviteli folyamat közvetítője. Az intracelluláris Ca^{2+}-tartalom emelkedés hatására serkenti az iont kipumpáló transzportert, ezáltal biztosítva a Ca^{2+} hatékony eltávolítását.

Az endo/szarkoplazmás retikulum kalcium pumpája *(SERCA)* is a P-típusú pumpák közé tartozik. Nemcsak a nyugalmi kalciumszint fenntartásában fontos, hanem feltölti az intracelluláris Ca^{2+}-raktárt is.

A Na^+-Ca^{2+} cseretranszporter a szívizomban különösen jelentős másodlagos transzportfolyamat. Ez a transzporter alapesetben 1 Ca^{2+}-iont kifelé pumpál és és 3 Na^+-iont befelé enged egyidejűleg. Működése azonban reverzíbilis, a koncentrációviszonyok függvényében mindekét irányba működhet. A szívelégtelenségben használt szívglikozidok (pl.digoxin) a Na^+-K^+ pumpa specifikus gátlószerei, melyek közvetve a Na^+-Ca^{2+} kotranszporteren keresztül hatnak. Ugyanis a Na^+-K^+ pumpa gátlásával a Na^+-gradiens csökken, a Na^+-Ca^{2+} cseretranszport kisebb hatékonysággal működik, vagy akár meg is fordulhat. Így nő a citoplazma Ca^{2+}-koncentrációja, ami a szívizom kontrakciós erejét fokozza *(I/6-15. ábra)*.

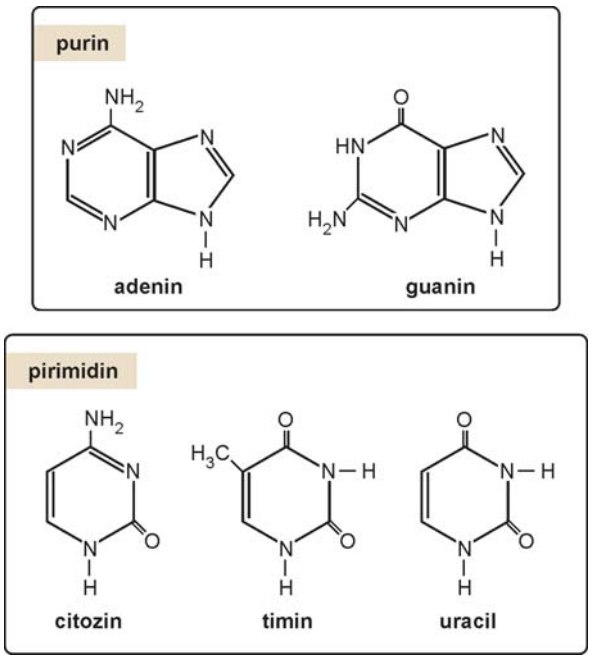


I/6-15. ábra
A szívglikozidok hatásmechanizmusa

I/7.
A nukleinsavak felépítése, szerepe

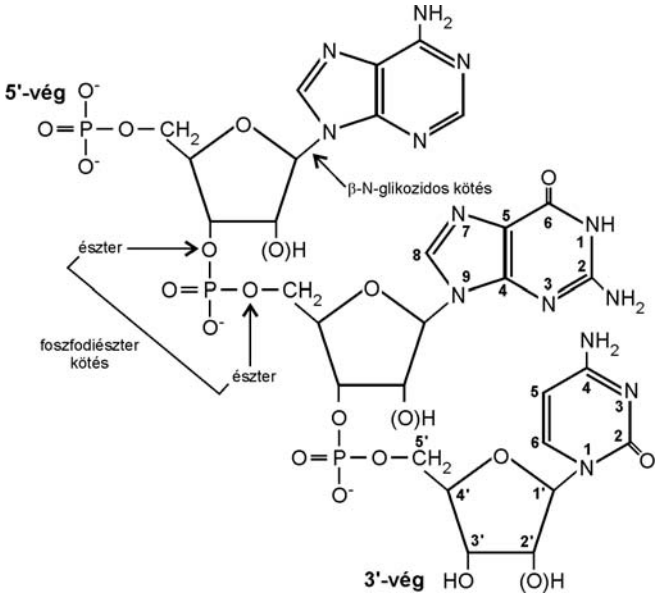
Rónai Zsolt

Az öröklődő információkat szervezetünkben a nukleinsavak hordozzák: a *dezoxiribonukleinsavak (DNS)* felelősek ezen genetikai információ tárolásáért, míg a *ribonukleinsavak (RNS)* segítségével történik meg a genetikai információ kifejeződése, működése. Mindkét vegyület makromolekula, melyek építőelemei a *nukleotid*ok. A nukleotidok maguk is több részből állnak. Fontos alkotójuk a nitrogéntartalmú szerves *bázisok*, ezek a genetikai információ kódolásáért felelnek. Ezeket szerkezetük szerint két fő csoportba sorolhatjuk. Purinvázzal rendelkezik az *adenin,* illetve a *guanin*, míg a pirimidin bázisok közé a csak RNS-ben előforduló *uracil*, a főképp a DNS-re jellemző *timin* és a mindkét nukleinsavban megtalálható *citozin* tartozik *(I/7-1. ábra)*.



I/7-1. ábra
A nukleinsavakban előforduló N-tartalmú bázisok szerkezete. Az adenin és a guanin purin bázisok, mindkét nukleinsav típusban megtalálhatók. A pirimidin bázisok közül az uracil csak az RNS-ben, a timin csaknem kizárólag a DNS-ben, míg a citozin mind az RNS-ben, mind a DNS-ben előfordul

A purin, illetve pirimidin bázisok (9-es, illetve 1-es N-atomjukkal) pentóz (öt szénatomos) monoszacharid egységhez kapcsolódnak β-N-glikozidos kötéssel. Ez a pentózrész *D-ribóz* (RNS), illetve *2'-dezoxi-D-ribóz* (DNS) lehet – ezen fő szerkezeti különbségen alapul a nukleinsavak elnevezése. A bázisból és monoszacharidból álló egységet *nukleozid*nak nevezzük. A pentóz 5'-OH-csoportjához a nukleinsavakban észter kötéssel egy *foszfát* csoport kapcsolódik, ez a három molekula építi föl a nukleinsavak alapelemeit, a *nukleotid*okat. Ezek a nukleinsavláncban úgy kapcsolódnak egymáshoz, hogy a foszfátcsoportok a szomszédos nukleotid pentóz egységének 3'–OH csoportjával alakítanak ki észterkötést, így a nukleinsav gerincét ezen pentóz-foszfát-lánc alkotja. Ebből következik a nukleinsavak irányítottsága, polaritása is, vagyis az a biológiailag fontos tulajdonság, hogy a DNS- és RNS-szál 5'- és 3'-vége szerkezeti és funkcionális szempontból is eltér egymástól *(I/7-2. ábra)*. A bázisok, nukleozidok és nukleotidok elnevezését az *I/7-1. táblázat* foglalja össze.



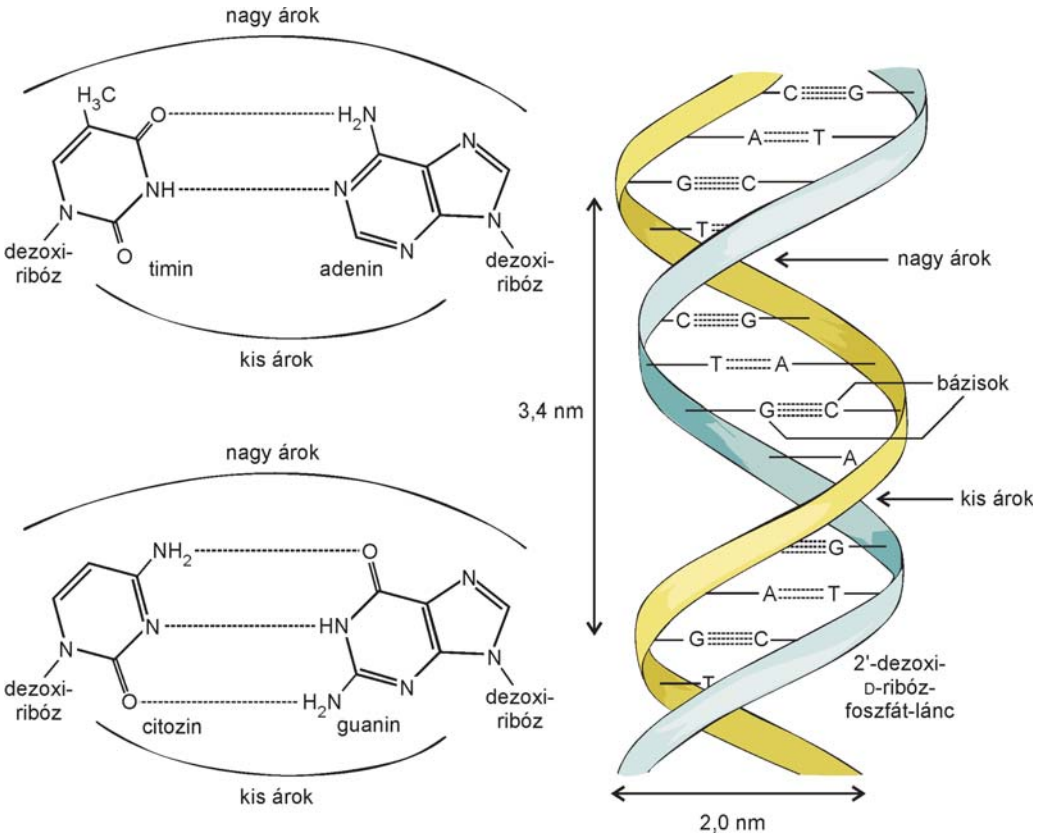
I/7-2. ábra
Egy nukleinsav lánc szerkezete. Az ismétlődő jellegzetes kötéstípusok valamint a gyűrűk számozása csak egy-egy egységben van feltüntetve

I/7-1. táblázat
Bázisok, nukleozidok és nukleotidok elnevezése

Bázis	Nukelozid (RNS)	Nukleozid (DNS)	Nukleotid
adenin	adenozin	dezoxi-adenozin	(dezoxi)adenozinmono-, di- vagy trifoszfát – (d)AMP, (d)ADP, (d)ATP
guanin	guanozin	dezoxi-guanozin	(dezoxi)guanozinmono-, di- vagy trifoszfát – (d)GMP, (d)GDP, (d)GTP
citozin	citidin	dezoxicitidin	(dezoxi)citidinmono-, di- vagy trifoszfát – (d)CMP, (d)CDP, (d)CTP
timin	ribotimidin	timidin (vagy dezoxitimidin)	(dezoxi)timidinmono-, di- vagy trifoszfát – (d)TMP, (d)TDP, (d)TTP
uracil	uridin	–	uridinmono-, di- vagy trifoszfát – UMP, UDP, UTP

Míg a nukleinsavláncokban a pentózegységek között egyetlen foszfátcsoport teremt kapcsolatot, szabad állapotban fontosak a nukleozid-*difoszfátok* és -*trifoszfát*ok is. A három, egymáshoz kapcsolódó foszfátcsoportot a pentóz 5'–OH csoportjával észterkötést kialakítón kezdve α-, β- és γ-foszfátnak nevezzük, közöttük két *savanhidrid kötés* található. Ezen kötés magas energiájú, azaz a β- és γ-foszfát lehasítása jelentős energia felszabadulással jár, ami nemcsak a nukleinsavak építése során, hanem az anyagcserében általában (ATP-függő reakciók) alapvető jelentőségű.

Bár a DNS-t és RNS-t felépítő nukleotid egységek szerkezete, kapcsolódási módja sok hasonlóságot mutat, mégis a felépülő nukleinsavláncok alapvetően különböznek egymástól. A *DNS* rendkívül *stabil* molekula, ezzel szemben az *RNS* könnyen *bomlik*, aminek oka a ribóz 2' C-atomján lévő hidroxil csoport. Ez az OH-csoport ugyanis nukleofil ágensként kapcsolatba lép a 3' C-hez kötődő foszfátcsoporttal, így az RNS-lánc felhasad, és a foszfátcsoport a ribóz 2'- és 3'-C-atomjával képez foszfodiészter-kötést. További lényeges különbség, hogy az *RNS* rendszerint *egyszálú*, míg a *DNS kettős szálú* molekula. A DNS kettős hélix szerkezete alapvető jelentőségű a sejtosztódás során a genetikai információ változatlan továbbvitelében. A két lánc *antiparallel és komplementer* szerkezetű: az egyik polinukleotid lánc 5'–3', a másik pedig 3'–5' irányú, a szabályos párhuzamos elhelyezkedés pedig csak úgy jöhet létre, ha mindig egy nagyobb purin egy kisebb pirimidin bázissal alkot bázispárt. Ennek megfelelően az



I/7-3. ábra
A DNS-ben található bázispárok, a „B"-DNS szerkezetének vázlata. Adenin a timinnel két, guanin a citozinnal három H-kötést (pontozott vonalak) alkot

egyik DNS-lánc bázissorrendje (primer szerkezete) vagyis a benne tárolt genetikai információ egyértelműen meghatározza a másik lánc bázissorrendjét: *adenin*hez ugyanis mindig *timin* kötődik két H-kötéssel, míg *guanin*nal szemben minden esetben *citozin* helyezkedik el, és közöttük három H-híd található *(I/7-3. ábra)*.

A nukleotidok térszerkezete alapvetően meghatározza a nukleinsav láncok három dimenziós struktúráját. A N-tartalmú bázisok heteroaromás gyűrűrendszerét alkotó atomok mindig egy síkban helyezkednek el, bekövetkezhet viszont oxo–enol, illetve amin–imin tautomer átalakulás. Bár az oxo-, illetve amin-formák valószínűsége több, mint 99%, ezen spontán átalakulás lehetősége elsősorban a replikáció során jelentős. Különböző, az egész nukleinsav molekula felépítését befolyásoló konformációk jöhetnek létre viszont a pentóz gyűrű eltérő térbeli formái valamint a β-N-glikozidos kötés körüli szabad forgás következtében.

Az emberi szervezetben a DNS-molekulák legnagyobb része „*B*" formában fordul elő *(I/7-3. ábra)*. Ebben a kettős hélix másodlagos szerkezetben a középen elhelyezkedő bázispárok a hélix tengelyére merőlegesek. A hélix jobb menetes. Egy fordulatban 10 bázispár helyezkedik el, ezek távolsága 0,34 nm. A molekula felszínén a

párhuzamos láncok között egy kisebb, 0,6 nm-es és egy nagyobb, 1,2 nm nagyságú bemélyedés, a *kis* és *nagy árok* található. Ezen felszínek (elsősorban a nagyárok) fehérjék kötőhelyéül szolgálnak, és így lehetővé teszik a DNS működésének szabályozását.

Laboratóriumi körülmények között vízelvonással a „B"-DNS „*A*" térszerkezetűvé alakítható át. Ebben a konformációban a bázispárok a hélix tengelyére nem merőlegesek, hanem azzal kb. 70°-os szöget zárnak be. A kettős hélix ennek következtében szélesebb (2,3 nm) és zömökebb, 11 bázispár helyezkedik el egy fordulatban, ezek 0,24 nm távolságra vannak egymástól. A hélix jobb menetes, a kis árok csaknem eltűnik. Bár *in vivo* a DNS „A" konformációban nem fordul elő, a DNS–RNS kettős hélixek viszont rendszerint ezt a térszerkezetet veszik föl.

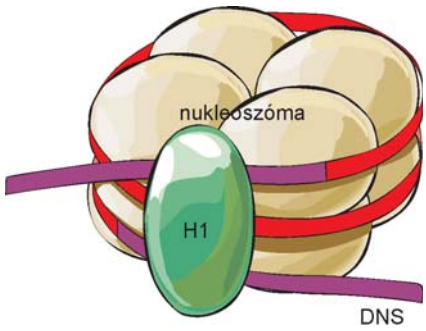
Ismert még egy, az „A"- és „B"-DNS-től nagyobb mértékben eltérő kettős hélix konformáció is, ezt „*Z*"-DNS-nek nevezzük. Ez a térszerkezet a teljes DNS csupán igen kis részére jellemző, elsősorban azokra a szakaszokra, melyeken dezoxiguanozin– dezoxicitidin dinukleotidok ismétlődnek – $(dGdC)_n$ –, a szerkezetet stabilitása tovább nő, ha a bázisok metilált formában vannak jelen. Mindez arra utal, hogy ez a forma a génkifejeződés szabályozásában játszhat szerepet, pontos biológiai funkciója azonban mindmáig nem ismert. A „Z"-DNS balmenetes hélixet képez, a DNS-láncok kissé szabálytalan, cikkcakk alakúak (innen származik az elnevezés: angolul *z*ig-zag). Egy teljes fordulat lényegesen hosszabb: 4,56 nm, amelyben 12 bázispár helyezkedik el.

A DNS kettős hélix termokémiai szempontból stabil („*relaxált*") konformációt jelent, a DNS működésének azonban minden esetben az az alapfeltétele, hogy a *két lánc* – egy rövid szakaszon – *szétváljon egymástól*. Ez a folyamat az élő sejtben a DNS térszerkezetének további megváltozásával jár többek között azért, mert a DNS-láncok nem rendelkeznek szabad végekkel, így a láncok egymás körüli mozgása korlátozott. A prokarióták DNS-molekulája gyűrű alakú, tehát egyáltalán nincs szabad 5'-, illetve 3'-vége, az eukarióták esetében ugyan a DNS lineáris, de a lánc végek kromoszóma struktúrában rögzített helyzetűek. A DNS kettős hélixének szétkert vagy éppen ellenkezőleg: túltekert formáját *szupertekercs*nek nevezzük, ez a DNS *harmadlagos szerkezet*e. A széttekert DNS-t negatív szupertekercsnek hívjuk, ebben az esetben 10-nél több bázispár helyezkedik el egy csavarulatban. Ezzel szemben pozitív szupertekercsnek nevezzük a szorosabb, túltekert hélixet, amely fordulatonként tíznél kevesebb bázispárt tartalmaz. *Topológiai izomer*eknek nevezzük azokat a DNS-molekulákat, melyeknek csupán a harmadlagos szerkezete különböző, ezek egymásba történő átalakításában a *topoizomeráz* enzimek döntő szerepet játszanak. Az *I-es típusú* topoizomerázok a dupla hélix *egyik láncát* elhasítják, az elhasított szabad láncvég a másik szál körül spontán letekeredik, így a szupertekercs szerkezet megszűnik. A folyamat végén az elhasított lánc egyesítése egy foszfát-észter-kötés létrehozását jelenti, amelyhez az I-es típusú topoizomerázok nem igényelnek külön energiát. A II-es típusú topoizomerázok a DNS mindkét szálát elhasítják, és energiaigényes (ATP-függő) folyamat során a dupla szálú DNS-láncok egymás körüli tekeredését, majd a szabad láncvégek újraegyesítését katalizálják.

Mind prokarióta, mind eukarióta sejtek esetében a DNS további jelentős mértékű feltekeredése szükséges ahhoz, hogy a molekula a sejtben elférjen. Eukarióták esetében egy kromoszóma felel meg egy nyílt láncú DNS-molekulának, ennek megfelelően az emberi sejt teljes örökítő anyaga 23 DNS-ből (23 kromoszóma) áll, melyek mindegyikéből két példány található meg a diploid testi sejtekben. Az eukarióta sejtek esetében a prokariótákhoz képest a DNS lényegesen hatékonyabb feltekeredése szükséges, ami annak hosszát öt nagyságrenddel csökkenti. Ezt az igen kompakt kromoszóma szerkezetet *kromatin*nak nevezzük, melynek kialakulásában a *hiszton* fehérjék játszanak alapvető szerepet. A hisztonok és a DNS közötti erős köl-

csönhatás kémiai alapja az, hogy ezen fehérjék rendkívül gazdagok bázisos, azaz fiziológiás pH-n pozitív töltésű aminosavakban: lizinben és argininban, amelyek erősen kötődnek a DNS negatív töltésű dezoxiribóz-foszfát vázához. Ezek segítségével alakul ki a kromoszóma szerkezet alapja, ami egy fonalra felfűzött gyöngysorhoz hasonlítható. A gyöngyök a *nukleoszóma*k, amelyeket összesen 8 hiszton fehérje: egy $(H3)_2$–$(H4)_2$ tetramer és két H2A–H2B dimer épít föl. Minden hisztonban megtalálható egy középső apoláros domén, amely a globuláris szerkezet kialakításáért és a hiszonok egymással történő összekapcsolódásáért felelős, a pozitív töltésű aminosavak az N-terminális szakaszon helyezkednek el. A nyolc hisztonból álló nukleoszóma egy 11 nm átmérőjű, 6 nm magas korongot képez, melyre kb. 150 bázispár hosszúságú DNS-szál tekeredik fel megközelítőleg 1,5 fordulatot képezve. A hisztonok a DNS kis árkához kapcsolódnak, így a nagy árok más – a DNS működésének szabályozásában szerepet játszó – fehérjék számára szabadon hozzáférhető. Két nukleoszómát 20–90 bázispárnyi DNS-lánc köt össze, a DNS ezen szakaszához a H1 hiszton kötődik, amely a nukleoszómákkal is kölcsönhatásba lép, így kezdődik meg a DNS további feltekeredése *(I/7-4. ábra).*

A nukleoszóma szerkezet kialakítását maga a DNS szekvenciája is befolyásolja, de ennél is fontosabb, hogy felépülése bizonyos hatásokra időben is változhat. A nukleoszómák a DNS-lánc mentén elmozdulhatnak, így egyes szakaszok feltekeredése szorosabbá válhat, míg a szerkezet máshol lazul, azaz a DNS jobban hozzáférhetővé válik. A teljes DNS-láncra kiterjedő rendkívül kompakt szerkezet alakul ki a mitózis metafázisa során (ilyenkor a kromoszómák fénymikroszkóppal láthatók). Ezzel szemben a DNS működését, azaz a gének transzkripcióját éppen a lazább kromatinszerkezet teszi lehetővé.



I/7-4. ábra
A nukleoszóma komplex vázlata. Kék szín jelöli a nukleoszómát alkotó nyolc hisztonmolekulát, amire a DNS (piros) kb. 150 bázispárnyi szakasza 1,5-szer tekeredik föl. Zöld a nukleoszómákat összekötő DNS-lánchoz (lila) kapcsolódó H1 hiszton

I/7.1. REPLIKÁCIÓ

A genetikai információ

Egy élőlény teljes genetikai információját *genom*nak nevezzük. A genom *szerkezet*i egységeinek a *kromoszóma*k tekinthetők. Prokarióta sejtekben a teljes genom mindig *egyetlen* (gyűrűs) *DNS*-molekulát jelent, amely ugyan nem hasonlít az eukarióta kromoszómára, mégis funkcionális szempontból szokás ezt a DNS-t bakteriális kromoszómának nevezni. Ez a DNS-állomány képezi a sejtek örökítő anyagát, ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy prokarióták esetében a *plazmid*ok további speciális genetikai anyagot képviselnek, míg eukariótákban a *mitokondrium*ok rendelkeznek saját DNS-sel. Az eukarióta genom annyi (nyílt láncú) DNS-ből áll, ahány kromoszóma az adott fajra jellemző: emberi sejtekben a genetikai anyag *23 kromoszóma*ra tagolódik, a *diploid* testi sejtekben mindegyikből két példány (egy anyai és egy apai), azaz összesen 46 kromoszóma található. Ezek alkotják a kétszer *3 millárd bázispár* nagyságú humán genomot, azaz a $2 \cdot 3 \cdot 10^9$ „A”, „C”, „G” és „T” „betűből” álló genetikai információt (a DNS 4 N-tartalmú bázisának megfelelően).

A teljes emberi genom szekvenciája ma már ismert és mindenki számára ingyenesen hozzáférhető.

A genom *funkcionális egység*ei a *gén*ek. A gének legtöbb esetben fehérjéket kódolnak, kiolvasható belőlük a fehérjék primer szerkezete. A gének fontos elemei a szabályozó szekvenciák is, amelyek a gén átíródás aktuális igényeknek megfelelő aktiválására vagy gátlására szolgálnak. Az eukarióták esetében egy gén egy fehérje kifejeződéséért felelős, prokariótákban ezzel szemben policisztronos, több fehérje kifejeződését egyszerre lehetővé tevő funkcionális egységek is ismertek. Fontos, hogy a gének egy része olyan RNS-molekulákat kódol, melyek nem fordítódnak le fehérjére, de a fehérje szintézis folyamatában nélkülözhetetlenek (pl. rRNS-ek, tRNS-ek, mikroRNS-ek).

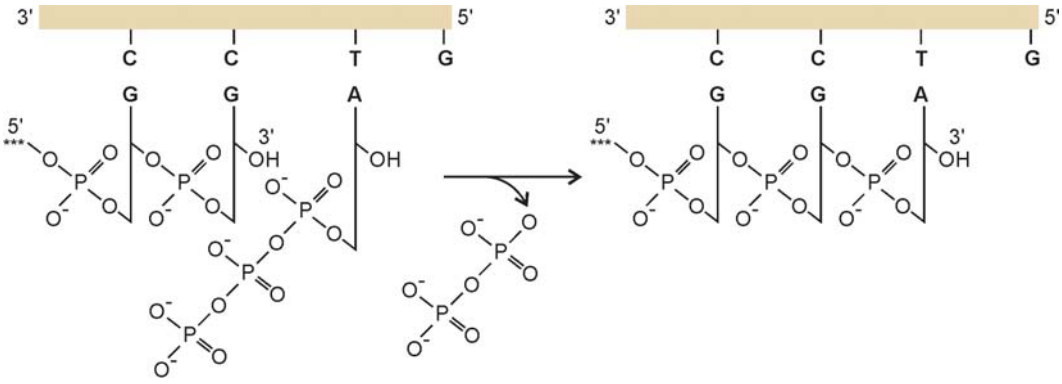
Érdekes, hogy bár a humán genom szekvenciája már régóta teljes egészében ismert, ennek pontos jelentése minden részletre kiterjedően mindmáig nem tisztázott. Meglepő, hogy bár a genom alapvető feladatának a *fehérjék aminosav sorrendjének kódolás*át tartjuk, mégis ezt a szerepet a *genomnak csupán kb. 1%-a* látja el. Egy eukarióta gén *exon*okból és *intron*okból épül föl. A génekről átíródó, a fehérjeszintézis mintájaként funkcionáló mRNS érése során az intronok kivágódnak, az érett mRNS-t tehát az exonoknak megfelelő szekvencia alkotja. Ez azonban nem kódol teljes egészében fehérjét: a transzláció (fehérjeszintézis) kezdő-, illetve végpontja nem azonos az mRNS végeivel, hanem az mRNS mindkét vége felé egy-egy szabályozó funkciót betöltő szakasz, az 5'-, illetve a 3'-UTR (*u*ntranslated *r*egion) helyezkedik el. A fehérjét kódoló szakasz – azaz a transzláció kezdő (start kodon) és végpontja (stop kodon) közötti „CDS" (*c*oding *s*equence) vagy „ORF" (*o*pen *r*eading *f*rame) – az exonoknak csupán kb. felét teszi ki, azaz a két UTR szekvencia mérete és fehérjét kódoló exon szakaszok hossza nagyjából hasonló. Mindezek figyelembe vételével a *teljes humán genom kb. egy negyed részére terjednek ki a fehérjét kódoló gének*, melyeknek kb. 4%-a (tehát a genom egy század része) kódol aminosav sorrendet.

Eukarióta élőlények *minden* testi *sejt*je a *genomot teljes egészében* azonos formában tartalmazza, természetesen ennek más-más része működik ténylegesen az egyes szövetekben. Mind egy élőlény kifejlődése, mind pedig egy faj fenntartása során mindazonáltal alapvető jelentőségű, hogy a sejtek osztódása során a genomi DNS (csaknem) hibátlan másolata mindkét utódsejtben jelen legyen. Ez a folyamat a *DNS replikáció*ja, ami alapelveit tekintve minden élő sejtben (pro- és eukariótákban egyaránt) hasonló módon valósul meg.

Prokarióta replikáció

A DNS azon alapvető szerkezeti jellegzetessége, hogy adenin mindig timinnel, guanin pedig mindig citozinnal képez bázispárt, azt eredményezi, hogy a kettős hélix egyik szálának szekvenciája egyértelműen meghatározza a másik lánc bázissorrendjét, azaz lényegében mindkét szál tartalmazza ugyanazt a genetikai információt. Éppen ez a *szemikonzervatív* megkettőződés alapja, melynek lényege, hogy a két lánc elválik egymástól, majd mindkettő alapján egy-egy új szál szintetizálódik. Ez azt jelenti, hogy minden DNS-molekula egy eredeti szülői és egy újonnan felépített láncból áll. Ez az alapelv egyszerű, a replikáció rendkívüli pontossága ugyanakkor döntő fontosságú, átlagosan csupán egyetlen hiba történik egy milliárd nukelotid beépítése során.

A folyamatban alapvető szerepet játszó enzimek a *DNS-függő DNS-polimeráz*ok. Ezek az enzimek több különböző aktivitással rendelkezhetnek. Nélkülözhetetlen a *szintetikus* aktivitás, amely az új DNS-lánc felépítését jelenti *(I/7-5. ábra)*. A folyamathoz feltétlenül szükséges egy nukleinsavlánc szabad *3'–OH-vég*e, az enzimek eb-



I/7-5. ábra

Az új DNS-lánc szintézisének vázlata. Egy DNS-szál szabad 3' végével a mintául szolgáló láncnak megfelelő nukleozid-trifoszfát reagál. A folyamatot a DNS-függő DNS-polimeráz szintetikus aktivitása katalizálja

ben az irányban tudják a láncot *meghosszabbít*ani, ugyanakkor a DNS-polimerázok egy új láncot sem elkezdeni, sem pedig egy 5'-véget meghosszabbítani nem tudnak. Szükséges továbbá egy mintául szolgáló DNS-szál is, mivel ez fogja meghatározni az új lánc bázissorrendjét, azaz azt, hogy milyen bázist tartalmazó *nukleozid-trifoszfát*ok képezik a *szubsztrát*ot az egyes lépések során. Maga a DNS lánc felépítése energiaigényes folyamat. Az első lépésben a *minta-DNS* soron következő nukleotidjával egy dezoxinukleozid-trifoszfát bázispárt képez, majd ennek β- és γ-foszfátcsoportja pirofoszfátként lehasad, és létrejön az észterkötés a hosszabbodó lánc szabad 3'–OH-vége és az újonnan beépült nukleotid α-foszfátja között. A pirofoszfát-csoportot a pirofoszfatáz enzim két foszfátra hasítja, a savanhidrid-kötések elhasadása során felszabaduló energia biztosítja a DNS-lánc felépítéséhez szükséges energiát. Mindez azt jelenti, hogy DNS-*szintézis* mindig *5'–3' irány*ban, míg a – DNS-hélix antiparallel szerkezetéből adódóan – a mintául szolgáló DNS-lánc *leolvasása 3'–5' irány*ban történik.

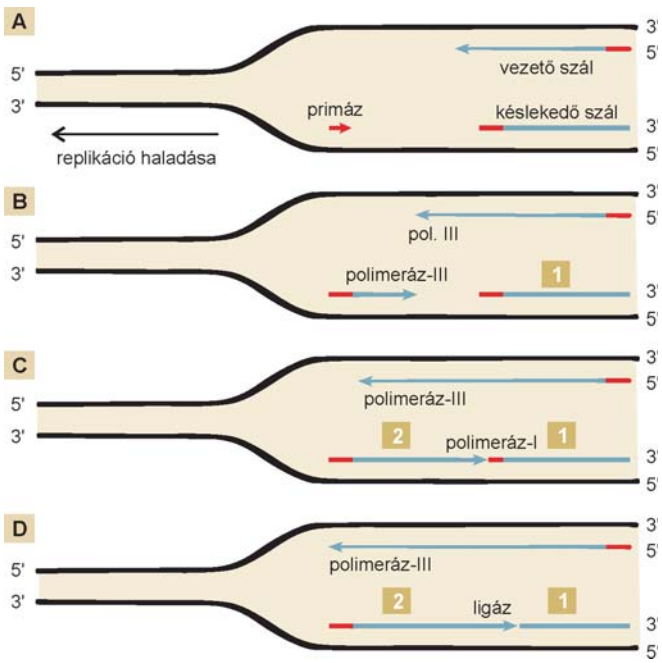
A DNS-függő DNS-polimerázok ezen alapfunkció mellett *5'*- és *3'-exonukleáz* aktivitással is rendelkezhetnek *(I/7-2. táblázat).* Ezen reakció során az enzimek egy DNS-lánc 5'- vagy 3'-végi nukleotidját tudják lehasítani, ami a replikáció egyes lépései során szükséges, valamint alapvető szerepet játszik a DNS-megkettőződés nagyfokú pontosságának biztosításában.

A DNS-szintézis pontosságát két – egymással összefüggő – folyamat biztosítja. Legtöbb esetben a DNS-polimeráz csak olyan nukleotiddal tudja meghosszabbítani az épülő DNS-szálat, amely megfelelő *bázispár*t alkotott a mintalánccal. Ez az enzim és a szubsztrát térszerkezetével magyarázható: egy nukelotid, amelynek bázisa

I/7-2. táblázat
Prokarióta DNS-polimerázok

Típus	Szintetikus aktivitás	3'-exonukleáz-aktivitás	5'-exonukleáz-aktivitás	Funkció
I.	van	van	van	hibajavítás, Okazaki-fragmentumok vége
II.	van (lassú)	van	nincs	hibajavítás, szintézis hibás minta-DNS-ről
III.	van	van	nincs	replikáció, új láncok döntő részének szintézise

nem tud hidrogén kötéseket kialakítani, nem illeszkedik megfelelően a DNS-polimeráz aktív centrumába. Ez a folyamat 10^{-4}–10^{-6} hibagyakoriságot eredményez (1 hiba 10 000– 1 000 000 bázis beépítése során), ami bár meglehetősen nagy megbízhatóságot jelent, önmagában mégsem elegendő a genom sejtről sejtre történő pontos átörökítéséhez. A pontosság további növelése a DNS-polimerázok *hibajavító 3'-exonukleáz* aktivitásával valósul meg. Ha – az előző mechanizmus ellenére – az épülő láncba hibás nukleotid épült be, nem alakulnak ki hidrogénhíd-kötések ezen utolsó építőelem és a mintalánc között. Ezt a hibás bázispárral végződő láncot a DNS-polimeráz tovább építeni nem tudja, megfelelő szubsztrát viszont az enzim 3'-exonukleáz aktivitása számára, vagyis az enzim a lánc végéről a hibás nukleotidot lehasítja. Ez a folyamat annál megbízhatóbb, minél hosszabb az aktuálisan felépülő szál: a rövid lánc(ok) által alkotott kettős hélix stabilitása még alacsony. Ez lehet az evolúciós magyarázata annak, hogy a DNS-polimerázok új DNS-lánc szintézisét elkezdeni nem tudják: a kezdeti szakaszon a szükséges precizitás még nem lenne biztosítható. A DNS-replikáció során ritkán beépülő hibás nukleotid kijavítására korlátozott ideig még a szintézis után is lehetőség van (*lásd* mismatch hibajavítás), de a genom minimális megváltozása hozzájárulhat a környezethez történő alkalmazkodáshoz az evolúció során.



I/7-6. ábra

A replikációs villa vázlata. Miközben a DNS-polimeráz-III a vezető szálat folyamatosan a replikáció haladásával megegyező irányban építi fel, a késlekedő szál egyes szakaszai (Okazaki-fragmentumok) külön-külön, a replikáció haladásával ellentétes irányban szintetizálódnak. A késlekedő szálon a primáz létrehozza a második Okazaki-fragmentum RNS indítóját (A), majd (B) a DNS-polimeráz-III felépíti a DNS-láncot. Elérve az 1. Okazaki-fragmentum RNS-indítóját a DNS-polimeráz-III a szintézist nem tudja folytatni, mert nem rendelkezik 5'-exonukleáz-aktivitással, így a DNS-polimeráz-I „írja át" ezt az RNS-szakaszt DNS-re (C), majd a két Okazaki-frgamentumot a DNS-ligáz összeköti (D)

Prokariótákban (*Escherichia coli* baktérium tanulmányozása során szerzett ismeretek alapján) a replikáció a cirkuláris DNS egyetlen pontján (*oriC*) indul meg mindkét irányban. Ezt a DNS-szakaszt a *dnaA* fehérje ismeri föl, és ehhez a *dnaC* segítségével a *dnaB* fehérje kötődik. A *dnaB* egy helikáz enzim, amely a DNS két szálát egymástól széttekeri, ez a replikáció alapfeltétele. A folyamat energiaigényes, ATP terhére történik, és a két szál a helikáz aktivitású dnaB–dnaC komplex mögött egyből újra kettős hélixet alkotna, ezt az *SSB* (*s*ingle *s*trand *b*inding) fehérjék akadályozzák meg: a DNS-t egyszálú formában tartják. Így jön létre a két egymással szemben elhelyezkedő *replikációs villa*, melyek együtt az iniciációs buborékot alkotják. A DNS egy ponton történő széttekerése azonban a széttekert szakasz előtti kettős hélix túltekeredését eredményezi. A replikáció során éppen ezért fontos szerepet játszik a II. típusú topoizomerázok csoportjába tartozó *DNS-giráz*, ami – ATP felhasználása mellett – képes negatív szupertekercset létrehozni, illetve pozitív szuperte-

kercset megszüntetni. A DNS-*giráz* replikációban betöltött szerepét az is bizonyítja, hogy specifikus *gátlószerei anti- biotikum*ként alkalmazhatók (coumermycin-A1, novobiocin). A DNS-lánc szintézisének kezdete egy speciális enzimet igényel, mivel a DNS-polimerázok egy új szál felépítését elkezdeni nem tudják. Minden DNS szintézise ezért egy rövid (kb. 10–15 nukleotidból álló) *RNS* keletkezésével kezdődik, ezt az *indító*, primer láncot a dnaB-hez kapcsolódó *primáz* – más néven *dnaG* – hozza létre.

A DNS kettős hélix antiparallel szerkezetéből, illetve a DNS-polimerázok működéséből – miszerint a szintézis mindig 5'–3' irányban történik – egyértelműen adódik, hogy a két mintául szolgáló lánc mentén a replikáció eltérő módon történik. Azon mintaszál esetében, mely az oriC-től kiindulva 3'–5' irányú, a szintézis megszakítás nélkül mehet végbe, mivel a primáz által létrehozott indítót a *DNS-polimeráz-III* a *replikációs villa haladásával* megegyező irányban folyamatosan meg tudja hosszabbítani. Ezen a szálon az *DNS-szintézis* 5'–3' iránya és a *replikációs villa* előrehaladásának *iránya megegyezik*: ezt a szálat *vezető lánc*nak nevezzük. A másik, a *késlekedő* szál építése során a helyzet viszont éppen fordított: a replikáció egészének haladása és a DNS-szintézis ellentétes irányú. Ez csak úgy valósulhat meg, ha az új DNS ezen az oldalon rövidebb darabokként épül fel: ezen kb. 1000–2000 nukleotidból álló szakaszokat *Okazaki-fragmentum*oknak nevezzük *(I/7-6. ábra)*. A primáz a replikációs villától távolodva hozza tehát létre az első RNS indítót, majd ezt folytatva a *DNS-polimeráz-III* felépíti az első Okazaki-fragmetumot. Eközben a replikációs villa és a vezető lánc szintézise az ellenkező irányban tovább haladt, így hasonló módon megtörténhet a második Okazaki-fragmentum felépítése. Ennek végén a DNS-polimeráz-III eléri az első Okazaki-fragmentum RNS-indítójának 5' végét, és mivel ez az enzim nem rendelkezik 5' exonukleáz aktivitással, a szintézist nem tudja folytatni. A késlekedő szál felépítéséhez így két további enzimre is szükség van. Elsőként az utóbb felépített Okazaki-fragmentum szabad 3' –OH-végét a *DNS-polimeráz-I* hosszabbítja meg. Ez az enzim rendelkezik 5' exonukleáz aktivitással is, éppen ez teszi a DNS-szintézist lehetővé, ezzel párhuzamosan ugyanis az enzim önmaga előtt az előző Okazaki-fragmentum RNS-indítóját lebontja. A DNS-polimeráz-I ily módon az RNS primernek megfelelő szakaszt DNS-re cseréli. Az enzim nem veszi észre, ha már elérte a DNS-ből álló szekvenciát, ennek további bontására és újraszintetizálására ugyanúgy képes, ami természetesen már szükségtelen. Ezen pazarló folyamat azonban legfeljebb rövid szakaszra terjed ki, mert a DNS-polimeráz-I viszonylag kis számú nukleotid hozzáadása után időről-időre leválik az épülő nukleinsavláncról, a szintézist azonban mindaddig újrakezdi, amíg a teljes RNS-primer el nem tűnik. A két Okazaki-fragmentum azonban még mindig két külön molekula: a lánc nem folytonos, mivel közöttük hiányzik a foszfát-észter-kötés. Egy lánc folytonosságának ilyen megszakítását *nick*nek nevezzük. A nicket a *DNS-ligáz* enzim szünteti meg, azaz egy DNS-lánc 5'-végét egy másik szál 3'-végéhez kapcsolja (ennek feltétele, hogy az 5'- és a 3'-vég a párhuzamos folytonos lánccal tökéletes bázispárokat alkosson, ami ebben az esetben teljesül). A folyamathoz szükséges energiát az enzim NAD^+ hidrolízisével fedezi. Ez az enzim azonban RNS-t DNS-hez nem tud kapcsolni, ez biztosítja azt, hogy a két lánc csak akkor köthető össze egymással, ha a DNS-polimeráz a teljes RNS-indítót lebontotta és dezoxiribo-nukleotidokkal helyettesítette.

Bár logikailag a vezető és a késlekedő szálon a DNS felépítése ellentétes irányban történik, ténylegesen mégsem figyelhető meg két ellenkező irányú szintézis. Ez úgy valósul meg, hogy a késlekedő szál mintájául szolgáló DNS-láncon egy hurok képződik, így egyetlen enzimkomplex, a *repliszóma* szintetizálja egyidejűleg mind a vezető, mind a késlekedő szálat. Erről a komplexről a késlekedő szál az Okazaki-fragmentum felépítésének végén leválik, a DNS-polimeráz-I és a DNS-ligáz a szinté-

zist befejezi, majd egy új hurok képződésével ismét a repliszómához kapcsolódik, hogy a következő Okazaki-fragmentum létrejöhessen. A repliszóma fő komponense a több alegységből álló DNS-polimeráz-III enzimkomplex.

A baktériumsejtek gyakran tartalmaznak a genom mellett további lényegesen kisebb, szintén gyűrűs szerkezetű DNS-molekulákat, ezeket *plazmid*oknak nevezzük. A plazmidok a genomtól függetlenül replikálódhatnak, így egy sejten belül több másolat jelen lehet. Ennek különös jelentősége az, hogy a plazmidokat a baktérium sejtek egymásnak át is tudják adni, így a genetikai információ nem csak generációról generációra adható át, hanem rendkívül gyorsan horizontálisan is kicserélhető. Ebben a folyamatban játszik alapvető szerepet az „*F*" plazmid, mely olyan fehérjéket kódol, melyek segítségével két baktérium sejt – plazmid átadása céljából – össze tud kapcsolódni. Más plazmidok („*R*") antibiotikummal szembeni rezisztenciát okozó fehérjéket kódolnak, ennek orvosi jelentősége alapvető. Plazmidok kódolhatnak olyan enzimeket is, melyek bizonyos anyagok metabolizmusához szükségesek, a sejt fokozott virulenciáját okozzák vagy éppen mérgezőek más baktérium sejtek számára.

A plazmidok megkettőződése történhet a bakteriális kromoszóma replikációjához hasonló módon, azzal egyidőben és függetlenül is, ezért egy baktériumsejt akár több száz kópiát is tartalmazhat egy plazmidból. A másik, az „F" plazmidra jellemző lehetőség, hogy a replikáció és a plazmid másik sejtbe történő átvitele egyidejűleg történik meg. Ebben az esetben a kettős szálú plazmid-DNS csupán egyik lánca szolgál mintául, a másik lánc az új szál felépítésével párhuzamosan letekeredik, és a két baktériumot összekötő „piluson" keresztül átjut a másik sejtbe. A plazmid az eredeti sejtben is megmarad, az átadott szál pedig egy antiparallel lánccal kiegészül a másik baktériumban, így mindkét sejt rendelkezik ugyanazzal a genetikai információval.

Eukarióta replikáció

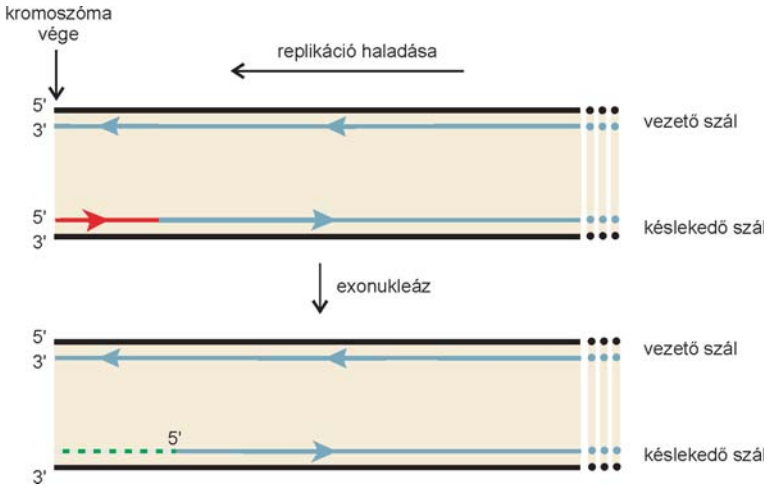
Az eukarióta replikáció a folyamat elvét és menetét tekintve a prokarióta DNS-megkettőződéssel lényegében azonos *(I/7-6. ábra)*, a folyamatban azonban természetesen más fehérjék és enzimek vesznek részt.

Az eukarióta replikáció egyik legfőbb jellegzetessége, hogy a DNS megkettőződése még egy kromoszóman belül is számos ponton egyszerre kezdődik meg. Erre nem csak azért van szükség, mert az eukarióta genom lényegesen nagyobb, hanem azért is, mert az eukarióta DNS-polimerázok kb. egy nagyságrenddel lassabban építik fel az új DNS-láncokat. A replikáció kiinduló pontjait az ORC (origin recognition complex) ismeri fel, majd ehhez egy másik, helikáz aktivitású komplex, az MCM (minichromosome maintenance proteins) kötődik. A folyamatot ciklin-dependens protein-kinázok szabályozzák (*lásd* sejtciklus). Az eukariotákban a DNS-szintézis folyamatában résztvevő enzimeket a görög ábécé betűivel jelöljük. A szintézis zömét a *DNS-polimeráz* δ végzi, ez az enzim felel a *vezető* szál és a *késlekedő lánc* döntő részének felépítéséért, azaz funkciója hasonlít a prokarióta DNS-polimeráz-III működéséhez. A *DNS szintézisének kezdete* eukariótákban valamelyest bonyolultabban történik, ehhez a *primáz* mellett a *DNS-polimeráz*-α is hozzájárul. A két enzim komplexet képez, a primáz létrehozza a kb. 10 nukleotid egységből álló RNS-indítót, majd a DNS-polimeráz-α ezt további 15–30 dezoxiribonukleotiddal meghosszabbítja. Ez az RNS–DNS-lánc jelenti a DNS-polimeráz-δ által katalizált folyamat kiindulópontját. A *DNS-polimeráz*-γ a *mitkondriális DNS* megkettőződéséért felelős, a *hibajavítás* legfontosabb enzimei a *DNS-polimeráz*-β és -ε. Az eukarióta DNS-polimerázok egy része nem rendelkezik saját 3'-exonukleáz-aktivitással, a hibajavító funkciót estenként a polimerázzal komplexet képző külön exonukleáz enzimek biztosítják. Emberi sej-

tekben az *Okazaki-fragmentum*ok lényegesen *rövidebb*ek: kb. 130–200 bázispárból állnak.

A vezető szál szintézise azzal kezdődik, hogy a lánc első rövid szakaszát a primáz, majd a DNS-polimeráz-α létrehozza. A DNS-polimeráz-δ megbízható működéséhez eukarióták esetében is szükség van egy *csúszó kapocs*ra, ezt *PCNA*-nak nevezzük. A fehérje a DNS-polimeráz-δ enzimet a DNS-lánchoz rögzíti, a komplex kialakulását a replikációs faktor C katalizálja. A késlekedő szál szintézisének mechanizmusa hasonló mindaddig, amíg a DNS-polimeráz-δ el nem éri az előző Okazaki-fragmentum RNS-indítóját. Az enzim saját 5' exonukleáz aktivitással nem rendelkezik, az RNS-szakasz lebontását két másik enzim végzi. Az első enzim lebontja az RNS-indítót úgy, hogy csupán egyetlen ribonukleotid egység marad a láncban. Ezt követően a második enzim nemcsak a még jelenlévő egyetlen ribonukleotidot távolítja el, hanem az azt követő rövid DNS-szakaszt is abban az esetben, ha ott hibás bázispárok találhatók. Ezen ellenőrző mechanizmus azért szükséges, mert ezt a láncrészt a 3'-exonukleáz-aktivitással nem rendelkező DNS-polimeráz-α hozta létre. Az RNS-, illetve hibás DNS-rész eltávolítása után az Okazaki-fragmentum szintézisét a *DNS-polimeráz-δ folytatja,* illetve fejezi be, a két fragmentumot ATP-függő reakcióban a *DNS-ligáz* kapcsolja össze. A DNS megkettőződésével párhuzamosan a replikáció során a nukleoszómaszerkezet kialakulásához szükséges hiszton fehérjék is megszintetizálódnak. A régi hisztonok a vezető szálat tartalmazó DNS-re kerülnek, míg az újonnan szintetizálódott fehérjék a késlekedő szál kromoszóma szerkezetének kialakításához járulnak hozzá.

A bemutatott eltéréseken kívül a prokarióta és eukarióta replikáció között még egy lényeges különbség mutatkozik, ami abból adódik, hogy az eukarióta genom lineáris DNS-molekulákból áll. A kromoszóma vége a *telomer*, ezen DNS-szakasz teljes egészének *replikációja a késlekedő szálon nem lehetséges* (I/7-*7. ábra*). Ez a jelenség a késlekedő szál szintézisének mechanizmusával magyarázható. A primáz az utolsó Okazaki-fragmentum RNS-indítóját a késlekedő lánc mintájának 3'-vége felől kezdi el felépíteni, ez az RNS-szakasz azonban a replikáció végén lebomlik. A keletkező hiány *semmilyen módon nem pótolható*, mivel nincs következő Okazaki-fragmentum: nincs szabad 3'–OH-vég, amely minden DNS-polimeráz működéséhez nélkülözhetetlen. Emiatt a kromoszómák végein az újonnan szintetizálódó DNS-láncok 5'-végei minden replikációval rövidülnek. A *telomeráz* enzim működésének köszönhetően azonban a kromoszómák ezen *elkerülhetetlen rövidülése* mégsem jelenti a genetikai információ fokozatos elvesztését. Az enzim a még nem differenciálódott sejtekben ak-



I/7-7. ábra

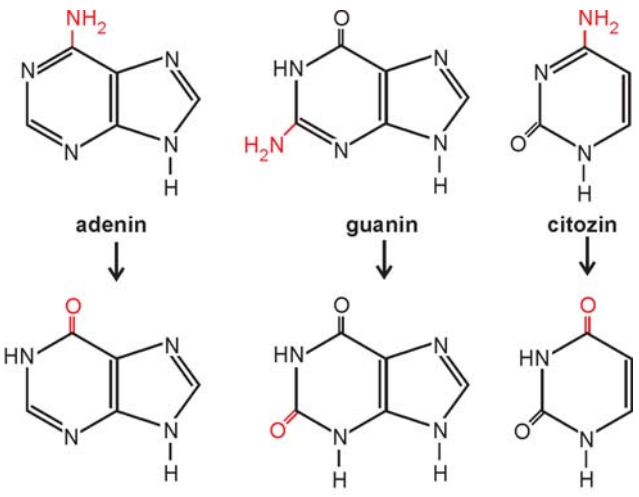
A telomer. A kromoszóma végén a legutolsó Okazaki-fragmentum (RNS-ből álló) 5'-vége lehasad, de ez (a zöld-szürke sávozott résznek megfelelő szakasz) DNS-sel nem pótolható, így a DNS minden replikáció során kissé rövidül

tív, a kromoszómák 3'-végét meghosszabbítja: a humán DNS-ek végére a TTAGGG szekvencia kerül több ezer példányban. A telomeráz egy *RNS-függő DNS-polimeráz* (azaz egyfajta reverz transzkriptáz), s a mintául szolgáló RNS pedig az enzim saját prosztetikus csoportja. Differenciált sejtekben a telomeráz enzim már nem expresszálódik, így a sejt lehetséges osztódásainak száma korlátozott. A genetikai információ megőrzése céljából ugyanis ha a $(TTAGGG)_n$ telomer szekvencia hossza egy adott érték alá csökken, akkor apoptózis indukálódik, a sejt elpusztul. Daganatsejtekben ugyanakkor a telomeráz enzim ismét kifejeződik.

A daganatos megbetegedések kezelése során alkalmazott *kemoterápiás gyógyszerek* egy fontos csoportja *a DNS-szintézist gátolja*. Ennek alapja az, hogy a DNS-szintézis megakadályozása főképp a legaktívabban osztódó sejteket, azaz éppen a tumorsejteket károsítja.

I/7.2. DNS-KÁROSODÁS, HIBAJAVÍTÁS, MUTÁCIÓK ÉS POLIMORFIZMUSOK

Bár több mechanizmus biztosítja a DNS-replikáció nagyfokú pontosságát, a folyamat mégsem 100%-os. Ennél is fontosabb, hogy a sejtet és annak genetikai állományát számos hatás éri: nemcsak a külső, károsító tényezőkre (pl. sugárzásokra) kell gondolni, hanem bizonyos anyagcsere folyamatok, pl. oxigén tartalmú szabad gyökök keletkezése is alapvető jelentőségű. Mindezen faktorok mellett teljesen spontán folyamatok is előidézhetik a *DNS károsodás*át. A DNS-károsodásokat *hibajavító mechanizmusok* folyamatosan *javítják* azon egyszerű elv alapján, hogy a párhuzamos ép DNS-lánc alapján a károsodott szakasz eredeti szerkezete visszaállítható. Ha azonban egy DNS-károsodás javítása mégsem történik meg a replikációig, a *hiba* az új DNS-be bemásolódik, rögzül, és többé már nem korrigálható. *A még javítható DNS-károsodások így a DNS-megkettőződése során már nem javítható mutációvá alakulnak.*



I/7-8. ábra
A bázisok dezaminálódása. A folyamat során a bázisok amino- ($-NH_2$) csoportja oxocsoporttá (=O) alakul át

DNS-károsodások és azok javítása

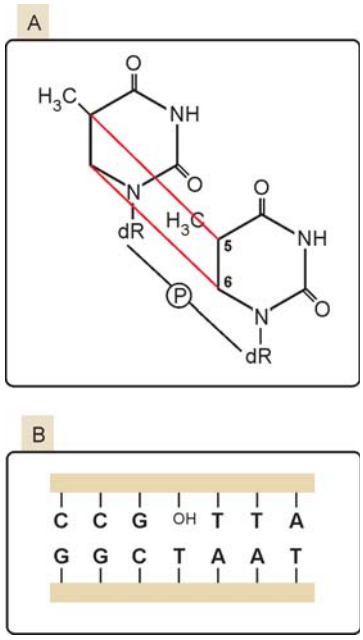
Az adenin, a guanin és a citozin spontán dezaminálódhat, a folyamat során hipoxantin, xantin, illetve uracil keletkezik *(I/7-8. ábra)*. Ezek a DNS-ben idegen bázisok. Mivel az aminocsoport a H-hidak létrehozása során H-donor, az oxo-csoport pedig H-akceptor, ezen átalakulás kijavítása döntő fontosságú. Ha ez a replikációig nem történik meg, a DNS-szintézis során az adeninből létrejövő hipoxantinnal szembe timin helyett citozin épül be, és hasonlóan: a citozinból keletkező uracil guanin helyett adeninnel képez bázispárt. (A guanin–xantin átalakulás a bázispárosodást nem változtatja meg.) Feltételezhető hogy éppen ezen viszonylag

gyakori – minden sejtben naponta több ezerszer lejátszódó –, spontán folyamattal magyarázható, hogy a DNS-ben uracil helyett fiziológiásan timin fordul elő, azaz az uracil a DNS-ben idegen bázis, hibának számít. Ha ugyanis ez nem így lenne, akkor a javító mechanizmusok a citozin dezaminálódása révén keletkező uracilt a többi uraciltól nehezen tudnák elkülöníteni.

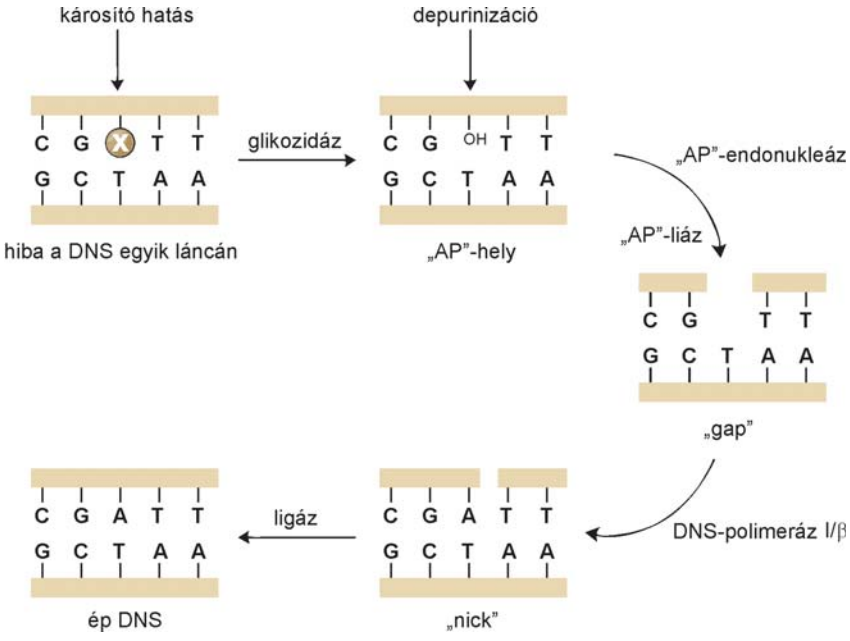
Ultraibolya fény hatására következik be leggyakrabban a pirimidinek dimerizálódása. Ez leggyakrabban két szomszédos timin között történik meg: a gyűrűk 5-ös, illetve 6-os C-atomjai között alakul ki egy-egy kovalens kötés, de két egymás mellett elhelyezkedő citozin, vagy egy citozin és egy timin is képezhet dimert hasonló módon *(I/7-9. ábra)*.

Rendkívül gyakori, spontán folyamat a depurinizáció, azaz a dezoxiribóz és a purin bázis közötti β-N-glikozidos kötés elhasadása, ami átlagosan 5000-szer történik meg naponta minden emlős sejtben *(I/7-10. ábra)*. A folyamat ritkábban a pirimidin tartalmú nukleotidokat is érintheti.

A DNS-ben lévő *hibák javítása* (repair) legtöbb esetben azonos módon, az érintett szakaszon *a károsodott bázis,* illetve *nukleotid kivágásával* történik pro- és eukariótákban egyaránt *(I/7-10. ábra)*. A hibás bázisokat specifikus *glikozidáz* enzimek távolítják el a DNS-ből a β-N-glikozidos kötés elhasításával. Így a depurinizáció eredményéhez hasonló hely keletkezik. Ezt az *AP-endonukleáz* ismeri fel, és a bázis nélküli dezoxiribózt a lánc-



I/7-9. ábra
A: Timindimer, B: depurinizáció.
dR: dezoxiribóz

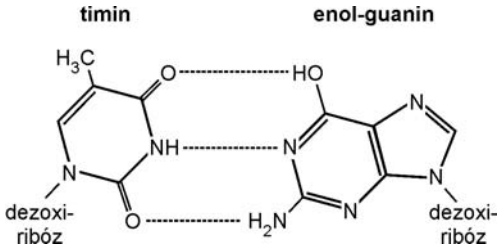


I/7-9. ábra
A hibás bázis, illetve nukleotid kihasításán alapuló hibajavítás. A károsító hatás valamint a hibás rész eltávolítása után hiányzó DNS-szakaszt (gap) a DNS-polimeráz-I, illetve -β szintetizálja újra, majd a DNS-ligáz összeköti a két láncot. : hibás bázis

ból kihasítja egy másik enzimmel együttműködve. Az ilyen lánchiányt *gap*-nek nevezzük. A hiányzó nukleotidot a prokariótákban a DNS-polimeráz I, az eukariótákban a DNS-polimeráz-β építi fel. Ilyenkor a lánc még nem folytonos: hiányzik a foszfodiészter-kötés, ez a *nick*. A két láncot a DNS-ligáz enzim köti össze.

A pirimidin dimerek javításának speciális módját egy fényre aktiválódó *fotoliáz* enzim végzi, amely a két pirimidin közötti kovalens kötéseket elhasítja, azaz a hibát közvetlenül kijavítja. Ez a folyamat számos élőlény esetében fontos szerepet játszik, ugyanakkor jelentősége emlősökben csekély. A pirimidin dimerek javítása mégis alapvető fontosságú emberben is, ezt bizonyítja, hogy a folyamat zavara a xeroderma pigmentosum nevű betegséget okozza. A betegség autoszómális recesszív módon öröklődik, jellemző tünet az extrém fényérzékenység, a bőrdaganatok kialakulásának valószínűsége igen nagy.

Hibajavítás nemcsak a replikáció hűsége miatt szükséges: előfordul, hogy egy DNS-károsodás az érintett gén kifejeződését is lehetetlenné teszi. Ennek javítása esetenként kritikus fontosságú, mivel a sejt ellenkező esetben bizonyos létfontosságú fehérjét vagy enzimet nem tud előállítani. A *transzkripcióhoz kapcsolt hibajavítás*t (transcription-coupled repair) a hibás szakasznál elakadt DNS-dependens RNS-polimeráz komplex aktiválja, ami így megáll, a gén átírását nem tudja folytatni. Nagy kiterjedése miatt ugyanakkor a hibajavító enzimek sem férnek hozzá az érintett szakaszhoz. A hiba kijavítását így egy olyan fehérjekomplex kezdi meg, ami az elakadt RNS-polimeráz komplexet eltávolítja, megtörténik a hibás bázis, illetve nukleotid kihasítása és az eredeti lánc helyreállítása az általános mechanizmus szerint, majd ezt követően az RNS-polimeráz enzim folytatja a transzkripciót.



I/7-11. ábra
Timin–enol-guanin bázispár. A hibás bázispár kialakulásának egyik oka az oxo–enol tautoméria

Hibás bázis előfordulásának az is lehet az oka, hogy a replikáció során a DNS-polimeráz nem a megfelelő nukleotidot építi be az új DNS-láncba. Ez nem csak az enzim tévedése miatt történhet meg, hanem amiatt is, hogy a bázisok spontán *oxo–enol tautomer* átalakulásra képesek, ami megváltoztatja a H-akceptor és -donor csoportok elrendeződését. Például a guanin enol formája timinnel alkot 3 H-kötést *(I/7-11. ábra)*, így ha a replikáció pillanatában az adott guanin éppen ebben a formában van jelen, a DNS-polimeráz a H-kötések kialakulása miatt timin tartalmú nukleotidot épít be az új láncba. A hibás bázispárok javítása két szempontból is lényegesen eltér a fent bemutatott általános módszertől. Egyfelől a replikáció már folyamatban van, így lényegesen kevesebb idő áll rendelkezésre a hiba korrigálására. Másfelől pedig a DNS egyik lánca sem tartalmaz idegen bázist, csupán a párosítás rossz (*mismatch*), a hibajavítás során így mindenekelőtt azt kell eldönteni, hogy melyik szálat kell javítani.

*Escherichia coli*ban a hibás, azaz az új szál azonosítása azon alapul, hogy a GATC palindrom (másik szálon 5'–3' irányban szintén GATC) szekvenciák adeninje mindkét szálon metilálódik. A DNS-szintézis során azonban az adenin tartalmú nukleotidok még módosítatlan formában épülnek be, s a replikációt követően a félig metilált helyeket a fenntartó metiláz metilálja. Ehhez azonban valamennyi időre szükség van, ezalatt a mismatch hibajavító rendszer a hibás bázispárokat felismeri, és a még nem metilált szálból ennek meglehetősen hosszú környezetét kihasítja. A hiányzó láncrész a DNS-polimeráz-I és a DNS-ligáz segítségével pótlódik. A folyamat emberben is alapvető jelentőségű, pontos mechanizmusa azonban még minden részletre kiterjedően nem tisztázott. Az újonnan szintetizált, de hibás lánc kihasítását követően a hiányzó szakasz felépítésében a DNS-polimeráz-δ (vagy -ε) játszik szerepet.

Mutációk és polimorfizmusok

Ha a DNS-ben létrejött károsodás javítására nem kerül sor a replikációig vagy éppen a DNS-megkettőződés folyamata során keletkezik hiba, akkor a DNS mindkét szálának bázissorrendje megváltozik. Ez a későbbiekben már nem korrigálható, a DNS-szekvencia ilyen végleges és öröklődő megváltozását *mutáció*nak nevezzük. Leggyakrabban ezek egyetlen bázispár megváltozását jelentik, ezeket *pontmutáció*nak hívjuk. A pontmutáció az esetek túlnyomó többségében *szubsztitúció*, azaz egy bázispár egy másikra cserélődik, de egy nukleotid kiesése (*deléció*) vagy egy extra nukleotid beépülése (*inzerció*) is a pontmutációk csoportjába tartozik. *Tranzíció*nak nevezzük azokat a báziscseréket, melynek során pirimidin pirimidinre vagy purin purinra cserélődik (C↔T vagy A↔G mutációk). Ezek létrejöhetnek ki nem javított dezaminálódás révén, vagy úgy, ha a mismatch hibajavító rendszer az oxo–enol tautoméria következtében kialakult hibás bázispárt nem korrigálta. Ha pirimidin helyére purin vagy purin helyére pirimidin kerül (A↔T vagy C↔G mutációk), *transzverzió*ról beszélünk, ez minden esetben a DNS-polimeráz enzim tévedésére vezethető vissza. *Deléció* hátterében depurinizáció állhat: a DNS-polimeráz a bázis nélküli dezoxiribózt átugorja, vele szembe nem épít be semmilyen nukleotid egységet. *Inzerció*hoz vezethetnek olyan vegyületek (főként policiklusos aromás szénhidrogének) melyek a DNS bázispárjai közé ékelődnek. Ezeket a molekulákat a polimeráz tévesen bázisként értelmezi, és így számfeletti nukleotidot épít be az új láncba.

Mutációk hosszabb DNS-szakaszokat is érinthetnek, ilyenek a nagyobb génszakaszokat érintő *inzerció*k, *deléció*k és *direkt ismétlődő régió*k. Ezek kialakulásában *rekombináció*s folyamatok is részt vehetnek, melyek során az azonos vagy közel azonos (pl. apai és anyai) kromoszómaszakaszok kicserélődése nem tökéletesen megy végbe. Rövidebb, ismétlődő régiók esetében az ismétlődési szám megváltozhat úgy is, hogy a DNS két lánca elcsúszva alkot kettős hélixet, és mindkét oldalon egy-egy egyszálú hurok jön létre *(I/7-12. ábra)*.



I/7-12. ábra
Elcsúszott kettős hélix ismétlődő szakaszon. A kékkel jelölt régiók azonos szekvenciájú ismétlődő régiók, ezért egy ismétlődő egységgel elcsúszva a világos és sötét kékkel jelölt szakaszok egymással össze tudnak kapcsolódni

Egy mutáció *biológiai hatás*át számos tényező befolyásolja. Mindenekelőtt döntő, hogy az adott genetikai variáció milyen genomi szakaszon helyezkedik el. Elképzelhető, hogy egy mutáció nem érint működő gént, ilyenkor jelentős biológiai hatás nem várható. Ugyanakkor még a fehérjét kódoló szakaszon elhelyezkedő mutációk hatása is rendkívül széles tartományban változhat. Egy *szubsztitúció* eredményezheti azt, hogy egy aminosavat kódoló triplet stop kodonná alakul, ez a *nonsense mutáció*. Ilyenkor a transzláció ezen a ponton befejeződik, csonkolt fehérje jön létre, amely rendszerint nem működőképes. A mutáció megváltoztathatja az exon–intron határokat is, ebben az esetben egy exon kiesik vagy egy intron exonként működik, ami szintén teljesen más polipeptidláncot, működésképtelen fehérjét eredményez-

het. Más esetben a DNS-szekvencia megváltozása miatt az adott bázishármas másik aminosavat kódol, ez a *missense* mutáció. Változó, hogy egy aminosav cseréje a fehérje működésében milyen következménnyel jár. Ha az adott aminosav egy enzim aktív centrumában van, vagy a térszerkezet kialakításában alapvető szerepet játszik (pl. egy diszulfid-híd kialakításában fontos cisztein cserélődik ki), a fehérje funkciója jelentősen romlik. Más esetben az aminosav csere a fehérje szerkezetét és működését alapvetően nem befolyásolja, különösen valószínű ez, ha azonos karakterű (pl. apoláros) aminosavak váltják fel egymást. Előfordulhat az is, hogy a megváltozott DNS-szekvencia ellenére a kódolt fehérje szerkezete nem módosul, mivel egyes aminosavakat több triplet kódol. Az ilyen variációk a *szinonim* (samesense) mutációk. Ismert mégis, hogy ezek sem minden esetben teljesen hatástalanok biológiai szempontból: az mRNS stabilitásának megváltozása révén a képződő fehérje mennyiségét befolyásolhatják. Ugyanez mondható el a gének *szabályozó régió*iban elhelyezkedő mutációkról is: a transzkripció vagy a transzláció aktivitását módosíthatják azáltal, hogy az adott szekvenciához transzkripciós faktorok, mikroRNS-ek stb. megváltozott affinitással kötődnek, így módosulhat a génkifejeződés aktivitása. A hosszabb szakaszra kiterjedő inzerciók, deléciók, ismétlődési variációk hatása szintén elsősorban a genomi lokalizációtól függ. Kódoló szakaszban, ha hárommal nem osztható számú szekvencia esik ki vagy ékelődik be, *kereteltolódás* jön létre, azaz a transzláció során nem ugyanaz a 3 nukleotid tartozik össze, így a mutáció utáni szakasz jelentése teljesen megváltozik. Ilyenkor a fehérje teljesen működésképtelen lesz. Hárommal osztható hosszúságú ismétlődés a fehérjében is egy megváltozott hosszúságú peptidszakaszt eredményez. Ez azonban nem jár egyértelműen enyhébb következményekkel. A trinukleotid ismétlődések megemelkedett számával magyarázhatók például a Huntington-betegség, a fragilis X-szindróma és a Friedrich-féle ataxia – érdekes módon az utóbbi két betegség esetében a mutáció nem kódoló szakaszon helyezkedik el.

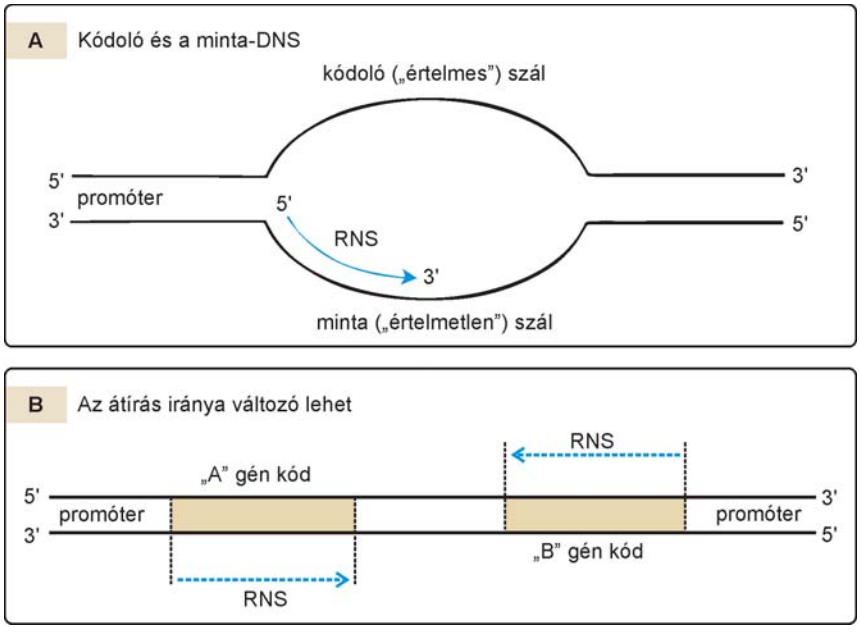
Pontmutáció – akár „csupán” egyetlen aminosav megváltozása – áll számos öröklődő betegség hátterében, a sarlósejtes anaemia esetében például egyetlen glutaminsav–valin csere következtében változik meg a hemoglobin szerkezete oly módon, hogy ez a vörösvérsejtek struktúrájára is jelentős hatással van. Ilyen esetben egyetlen génhiba felel a tünetek kifejlődéséért – *monogénes* betegségről beszélünk. A mutációk jelentős része azonban nem okoz drámai hatást, így az evolúció során idővel elterjed a populációban. Ha a ritka („mutáns”) *allél*variáns gyakorisága 1% alatti, mutációról beszélünk, ennél magasabb érték esetén *genetikai polimorfizmusról* szólunk, az ebbe a kategóriába tartozó szubsztitúciókat (báziscseréket) *egypontos nukleotid polimorfizmus*nak (*SNP* – single nucleotide polymorphism) nevezzük. Ezekből valamint a polimorfizmus gyakorisági kategóriába sorolható ismétlődési variációkból mára több milliót azonosítottak: ez azt jelenti, hogy a genom számos pontján az emberi populációban különböző bázis(szakasz)ok fordulhatnak elő anélkül, hogy ez kóros következményekkel járna. Természetes is ez, hiszen ha két személy genomja 100%-ban egyezik, akkor ők teljesen egyformák (ilyenek az egypetéjű ikrek); két nem rokon személy genomja között a különbség kb. 0,1–0,5%. Ezek a különbségek tehát abból adódnak, hogy a genom ezen polimorf helyein eltérő allélváltozatok vannak jelen. Ezek a különbségek felelnek minden öröklött tulajdonságunkért (szemszín, hajszín stb.), de ezek a különbségek orvosi szempontból is jelentősek: bár a pontos részletek a legtöbb esetben még nem tisztázottak, de a *számos polimorfizmus a környezeti tényezőkkel* együtt felelhet *komplex kórkép*ek kialakulásáért, mint amilyen a cukorbetegség vagy számos pszichiátriai kórkép.

I/8.
Transzkripció: a DNS-ben tárolt információ átírása RNS-re

Sasvári Mária

I/8.1. A TRANSZKRIPCIÓ FŐ JELLEMZŐI

A transzkripció folyamatát úgy definiálhatjuk, hogy DNS-minta (templát) alapján RNS-szintézis történik a *DNS-függő RNS-polimerázok* segítségével, ribonukleozid-trifoszfát-szubsztrátok (ATP, GTP, CTP és UTP) felhasználásával. A *transzkripció* folyamata sejttípustól, fejlődési stádiumtól és egyéb tényezőktől függően csak bizonyos RNS-t és fehérjét kódoló gének területét érinti, mely esetenként igen kis hányada a teljes genomnak. A transzkripció során különböző RNS-ek képződhetnek, mint például a fehérjék szintézist irányító hírvivő vagy messenger RNS (*mRNS*), az aminosavak szállítását végző transzfer RNS (*tRNS*), a riboszómákat alkotó riboszomális RNS (*rRNS*), valamint további, kisebb méretű RNS-ek, mint például a sejtmagban maradó kis magi RNS-ek (*snRNS*-ek), vagy a citoplazmába jutó mikro-RNS (*miRNS*). Bár a különböző RNS-eknek változatos funkciója van, valamennyi RNS szintézise az ún. *elsődleges transzkiptum* elkészítésével kezdődik, mely az RNS vagy fehérje gének területeinek hű másolata. Ugyanakkor az elsődleges transzkriptum lehet sokkal hosszabb is, mint a végleges vagy érett RNS, sőt az is előfordulhat, hogy szintézise



I/8-1. ábra
A transzkripció lehetséges irányai

után nem sokkal lebomlik. Az eukarióták sejtmagjában található nagyméretű magi RNS (*hnRNS*) ezen elsődleges transzkriptumoknak összessége.

A transzkripció iránya megegyezik a DNS-szintézis irányával *(I/8-1. ábra)*, azaz a szintézis 5'-3', a templát másolása 3'-5' irányban folyik.

A transzkripció szabályozási módjaival a későbbiekben még részletesen foglalkozunk, itt csak röviden megemlítjük, hogy a különböző gének átírásához a DNS-függő RNS-polimerázoknak egy kettős szálú DNS-szakaszhoz, a *promóter régió*hoz kell kapcsolódniuk ahhoz, hogy a promóter mögött található kettős szálú DNS szétnyíljon, és az egyik DNS-szál leolvasása megkezdődjön.

A transzkripció szempontjából megkülönböztetünk egy *kódoló DNS-szálat (pozitív, értelmes, sense szál),* melynek szekvenciája azonos a szintetizálódó RNS-sel, illetve egy *minta DNS-szálat (negatív, templát, antisense szál)*, mely leolvasásra kerül (lásd I/8-1. ábra, A). Mivel a DNS mintaszál komplementer a másik (a kódoló) DNS-szállal, és a transzkripció során az RNS a DNS-minta komplementereként készül, a keletkezett RNS szekvenciája meg fog egyezni a kódoló DNS-szál szekvenciájával (kivéve, hogy a DNS-ben lévő timint az RNS-ben uracil helyettesíti). Fontos megjegyezni, hogy az átírás iránya génenként változó lehet, azaz egy adott DNS-szál valójában az egyik génre nézve lehet kódoló (pozitív, értelmes), a másik szempontjából pedig minta (negatív, antisense) szál, annak megfelelően, hogy a gén milyen orientációban helyezkedik el a DNS-szálon (lásd I/8-1. ábra, B). Azonos módon történik az átírás akkor is, ha RNS a végtermék (pl. rRNS, tRNS, snRNS, miRNS), de ilyenkor természetesen nem képződik fehérje.

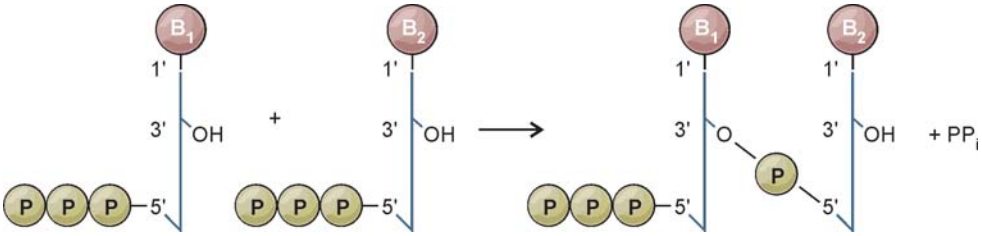
A DNS-replikáció és a transzkripció legfontosabb jellemzőit az *I/8-1. táblázat* foglalja össze. Az egyik legfontosabb eltérés az a tény, hogy a transzkripció során a genomnak csupán meghatározott szakaszai, az aktív gének íródnak át, míg a replikáció a teljes genomot érinti. A transzkripció terméke egy egyszálú RNS, melynek elkészítéséhez nem szükséges indító. Fontos eltérés még, hogy az RNS-szintézis során kisebb jelentőségű a hibajavítás, mivel egyetlen RNS-molekula hibája nem jár súlyos következményekkel a sejt életére nézve, és az esetleges hibák semmiképp sem öröklődnek. Kissé eltérőek a szubsztrátok is: az RNS szintézise ribonukleotidokból történik, és uracil bázist fogunk találni az RNS-ben timin helyett.

I/8-1. táblázat
A replikáció és a transzkripció összehasonlítása

	Replikáció	**Transzkripció**
Enzim	DNS-függő DNS-polimeráz	DNS-függő RNS-polimeráz
Másolás kiterjedése	teljes genom mindkét DNS-szál	az adott gének csak az egyik szál
Szintézis iránya	5' → 3'	5' → 3'
Másolás iránya	3' → 5'	3' → 5'
Indító (primer)	kell	nem kell
Templát	DNS mindkét szála	DNS mintaszál adott szakasza
Szubsztrát	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	ATP, GTP, CTP, UTP
Létrehozott kötés	foszfodiészter	foszfodiészter

A DNS-függő RNS-polimerázok által katalizált reakció

A *I/8-2. ábra* mutatja be vázlatosan az RNS-polimerázok által katalizált reakciót. Az ábra egyszerűsített részében a függőleges vonal a ribóz gyűrűt jelöli: 1'-helyzetben található a bázis (B_1: 1. bázis, B_2: 2. bázis), 3' helyzetben a szabad hidroxilcsoport, 5'-végen a három foszfátcsoport. Az ábra az első és a második nukleotid összekapcsolódását jelzi, a bázisok természetesen komplementerek a templáttal, ami az ábrán nincs feltüntetve. Az viszont világosan látszik, hogy az RNS-polimeráz össze tudja kapcsolni a legelső nukleotidot a másodikkal, azaz nincs szüksége indítóra (primerre), és hogy a legelső nukleotid trifoszfát formában marad. A reakció lényege, hogy a második, illetve az összes többi, soron következő nukleotid 5'-végéről lehasad egy pirofoszfát, és a nukleotid a megmaradt (alfa helyzetű) foszfátcsoportjával hozzákapcsolódik a szabad 3'–OH-véghez. Ezáltal az előző nukleotid 3'–OH csoportja és a beépülő nukleotid 5'-foszfát-csoportja (mely maga is foszfát-észter-kötésben van) közt létrejön egy újabb foszfát-észter-kötés létrehozva a foszfodiészter-kötést. Ez a reakció gyakorlatilag azonos a DNS-polimerázok által katalizált reakcióval, csupán ribonukleotidok kerülnek beépítésre dezoxiribonukleotidok helyett. Érdemes megjegyezni azonban, hogy itt nincs vezér szál és késlekedő szál, mivel a promóter specifikusan kijelöli a transzkripció irányát, így egyetlen, folyamatosan képződő RNS-molekula íródik át.



I/8-2. ábra
A nukleotidok összekapcsolása az RNS-szintézis során

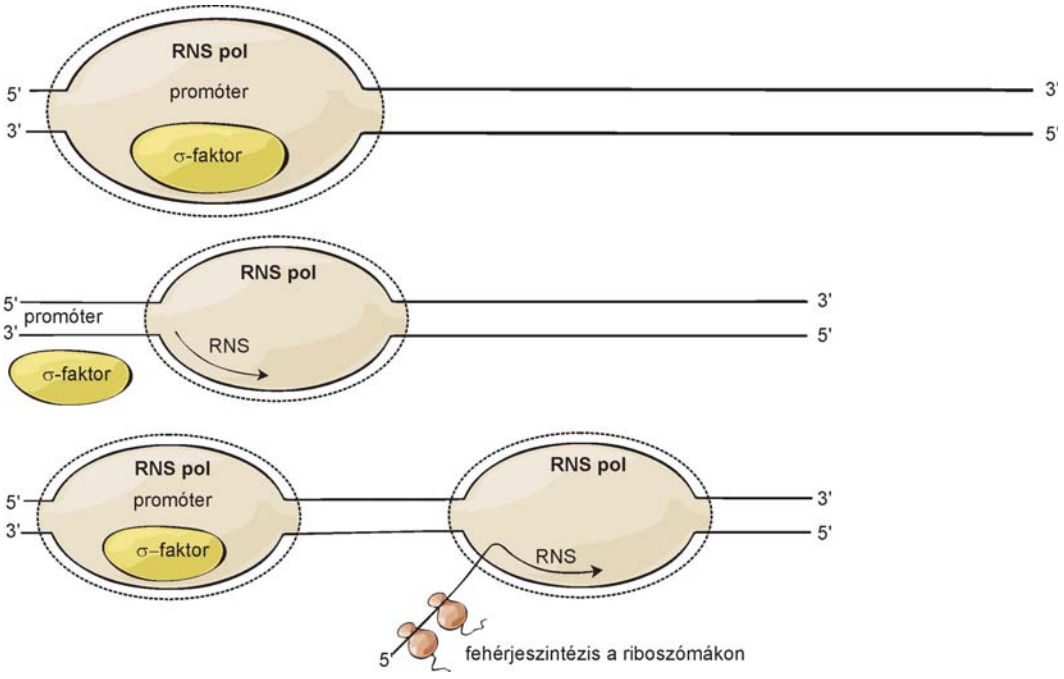
A prokarióta transzkripció jellegzetességei

A legismertebb prokarióta RNS-polimeráz az *Escherichia coli* (*E. coli*) transzkripcióért felelős enzime. Ez a DNS-függő RNS polimeráz teljes formájában *(holoenzim)* 5 alegységet tartalmaz (2 alfa, béta, béta' és szigma), a szigma-alegység leválása után „*core" enzimről* beszélünk. A prokarióta RNS-polimeráz fontos gátlószere a *rifampicin,* mely a béta alegységhez kötődik. Bár a rifampicin antibiotikum, azaz elsősorban a prokarióták RNS szintézisét gátolja, meg kell jegyezni, hogy a mitokondriális RNS szintézisre is hatással van. A mitokondriumnak ugyanis van saját DNS-e, amelyről a mitokondriális mRNS-ek, tRNS-ek és rRNS-ek transzkripciója folyik a mitokondriális RNS-polimerázzal. Ez a polimeráz hasonlít a prokarióta RNS-polimerázhoz és gátolható rifampicinnel. A klinikumban a rifampicint elsősorban a tuberkulózis kezelésére használják.

A transzkripció folyamata három szakaszra bontható: iniciáció, elongáció és termináció. Az *iniciáció* első lépéseként a szigma alegység csatlakozik az RNS-polimeráz core enzimhez és így létrejön a holoenzim, mely a DNS-hez kapcsolódva

a promóter meghatározott szekvenciáihoz kötődik, létrehozva a *zárt promóter komplexet*. A nagy mértékben konzervált promóter szakaszok a transzkripciós start helytől -35 és -10 bázispárnyira (a pozitív, kódoló szálon 5'-irányban) található TTGACA és TATAAT szekvenciák, amelyek együttesen kijelölik az RNS szintézis helyét és irányát is. Ezt az információt a szigma alegység ismeri fel és közvetíti az RNS-polimeráz holoenzimben. Ezután az enzim egy rövid szakaszon (kb. 25 bázispár) felnyitja a kettős szálú DNS-t, és elkezdi a gén másolását *(nyitott promóter komplex),* azaz elkezdődik a bázisok komplementaritása alapján történő átírás. Amikor az átírás során létrejön egy kb. 9 bázispár hosszúságú RNS-DNS hibrid, akkor *a szigma faktor leválik, és újabb iniciáláshoz használódik fel*. Amint az RNS-polimeráz elhagyja a promóter régiót, egy újabb RNS-polimeráz tud kötődni és transzkripció iniciációt kezdeni, így a prokariótákban egy génen egyszerre több polimeráz végezhet átírást.

A transzkripció *elongációs* szakaszában a transzkripciós buborék folyamatosan halad a pozitív, kódoló szálat tekintve a 3' irányba, az RNS 3' végére újabb nukleotidok épülnek be, miközben az 5' vége folyamatosan letekeredik az RNS-DNS hibridről és elhagyja a transzkripciós buborékot, ezzel lehetőséget adva arra, hogy riboszómák kapcsolódjanak az 5'-véghez, és megkezdődjön a fehére szintézise *(I/8-3. ábra)*. Prokariótákban gyakran előfordul, hogy az összetartozó funkciójú fehérjék génjei közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a DNS-en, és ezek a gének egyszerre íródnak át egyetlen mRNS-be. Az ilyen mRNS több polipetidlánc információját hordozza, azaz policisztronos. Természetesen a policisztronos mRNS-ről képződő fehérjék a transzláció során már önálló polipeptid láncként fognak megszintetizálódni, mivel az egyes polipeptidláncok elejét és végét jelzik a start és a stop kodonok (lásd Fehérjeszintézis fejezet).



I/8-3. ábra
A prokarióta transzkripció iniciációjának főbb lépései

Amikor a transzkriptum az átírandó DNS szakasz vége felé közeledik, a *termináció* szakaszába lépünk. A prokarióta *termináció lehet rho faktor függő vagy rho faktor nélküli*. Ha a transzkriptumban megjelenő *terminációs szekvencia* hatására az RNS-polimerázhoz egy újabb alegység, a rho kapcsolódik, ami megállítja a további átírást. akkor rho-függő terminációról beszélünk. A prokarióta transzkripció megállításához azonban nem feltétlen szükséges fehérje faktor, esetenként a transzkriptum végén található terminációs szekvencia önmaga is le tudja állítani az átírást. A termináció általában egy palindrom, G-C gazdag szekvencia segítségével történik, mely lehetővé teszi egy hurok kialakulását, ez viszont akadályozza a transzkripciós buborék továbbhaladását.

Prokariótákban a transzkripció során szintetizálódott elsődleges transzkriptum fehérjét kódoló gén esetén nem megy keresztül további változásokon, azaz megegyezik a mRNS-sel. Valójában még kész sincs egy adott mRNS, már rákapcsolódnak a riboszómák, és elkezdődik a fehérjék gyártása. Ez azért is lehetséges, mert nincs sejtmag, és a transzkripció és transzláció folyamata nem különül el sem térben sem időben.

Az RNS gének átírása esetében azonban az elsődleges transzkriptum több RNS-molekula információját tartalmazza, és ezeket utólag kell szétvagdosni. *E. coli*ban például a háromféle rRNS egyetlen elsődleges transzkriptum formájában képződik, sőt, ugyanebben a transzkriptumban van még egy tRNS is. Az egyes RNS géneket meghatározott szekvenciák (spacer) választják el egymástól. A megfelelő feldarabolásban egy kisméretű RNS vesz részt, amely egyes esetekben endonukleáz fehérje nélkül is képes katalizálni a hasítást. Az olyan RNS-t, mely enzim-szerűen katalizál egy adott reakciót, *ribozim*nek nevezik. A ribozimek léte alátámasztja azt az elképzelést, hogy az evolúció során az RNS ősibb struktúra lehetett a fehérjéhez képest.

Az RNS gének elsődleges transzkriptuma a hasításon kívül további módosulásokon is átmehet. Ilyen a tRNS és az rRNS ritka bázisainak (mint például pszeudouridin) kialakulása, melyek mindig utólag képződnek, hiszen a leolvasás folyamatában kizárólag a négy alapbázis szerepel. Ezen kívül a tRNS-ek utólag kapják meg a CCA végüket, mellyel majd az aminosavakat kötik.

Transzkripció eukariótákban és az elsődleges transzkriptum érése

A prokarióta és az eukarióta transzkripciót összehasonlítva jelentős eltéréseket találunk az iniciáció és a termináció fázisaiban, valamint az elsődleges transzkriptum további módosításaiban. Az iniciáció folyamata a prokariótákban röviden úgy jellemezhető, hogy először kialakul a csupasz (core) enzim és a szigma-faktor fehérje komplexe, majd ez a fehérje komplex rákapcsolódik a DNS-re a promóter régiónál. Az eukarióta génkifejeződés első lépése, hogy a szuperhelikális struktúrából kitekeredjen a kromatin és létrejöjjön az aktív kromatin szerkezet, amelyben továbbra is kettős spirál állapotban van a DNS. Ezután kötődnek a transzkripció iniciációjához szükséges obligát és specifikus transzkripciós faktorok a DNS promóter és egyéb szabályozó régióihoz, és az így kialakult DNS-fehérje komplexhez fog hozzákötődni az RNS-polimeráz, ez a folyamat az ún. *toborzás (recruitment*). A toborzás folyamatáról részletesen az *eukarióta génkifejeződés szabályozása c. fejezetben* lesz szó.

Az eukarióta transzkripció terminálása összefügg az *elsődleges transzkriptum érési folyamataival (RNA processing)*, melyeket az alábbiakban tárgyalunk részletesen. Bár a prokariótáknál is találkoztunk azzal a jelenséggel, hogy a rRNS-ről elkészült elsődleges transzkriptum változásokon megy keresztül, a prokarióta mRNS utólagos módosítása nem lehetséges, hiszen a fehérje szintézis már akkor elkezdő-

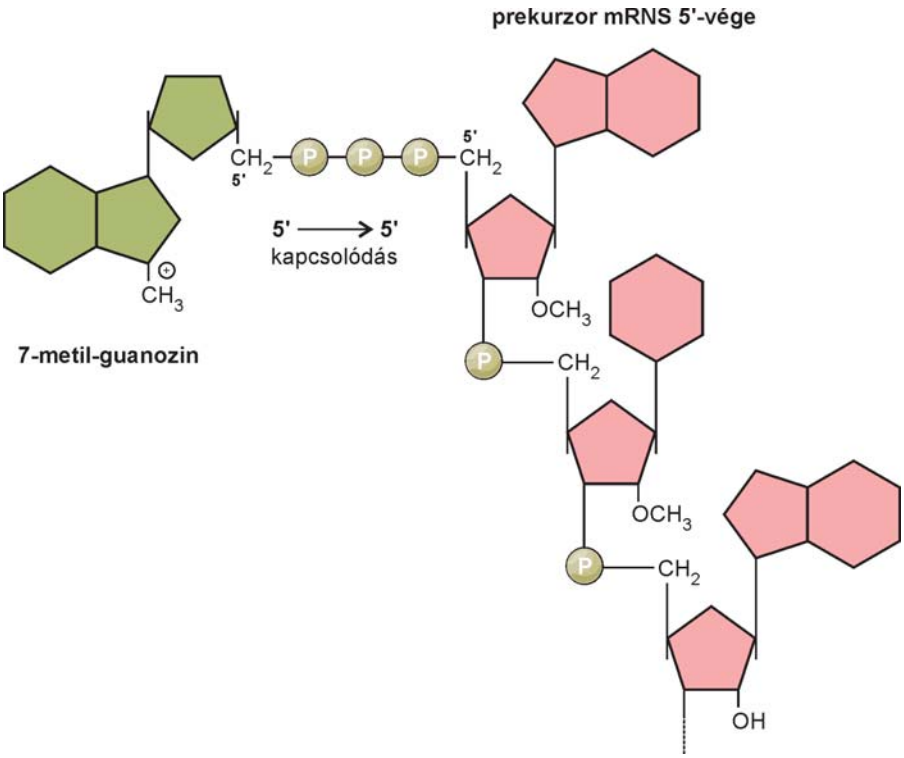
dik, mielőtt a mRNS szintézise befejeződött volna. Eukarióták esetében azonban a transzkripció a sejtmagban történik, és valamennyi transzkriptum számos változáson megy át, mielőtt kikerül a citoplazmába. A sejtmagot csupán az érett (módosított) RNS-ek hagyják el, és így jutnak el a fehérje szintézis helyére a citoplazmában. Az eukariótákban tehát a *transzkripció és a transzláció térben és időben elkülönül.*

Az eukarióta DNS-függő RNS-polimerázok

Eukariótákban a DNS-függő RNS-polimerázoknak három fő típusát ismerjük. Ebből kettő, az I. és a III. típus olyan RNS-eket szintetizál, melyekről nem traszlálódik fehérje: az I. típus a rRNS-ek szintéziséért felelős, míg a III. típus kisméretű RNS-eket készít, mint pl. tRNS-t és a legkisebb riboszomális RNS-t (5S rRNS). A DNS-függő RNS-polimeráz-II feladata a fehérjét kódoló gének átírása, azaz a mRNS szintézise. A II. típusú RNS-polimeráz igen erős gátlószere az alfa-amanitin, a gyilkos galócában található méreg. A mitokondriumokban található DNS átírása egy specifikus polimerázzal történik, mely különbözik a fenti típusoktól és rifampicinnel gátolható. Valamennyi transzkripciós folyamat gátolható a DNS kettős szála közé beékelődő molekulákkal, melyeket *interkalálódó ágenseknek* hívunk, ilyen pl. az aktinomicin D.

Az eukarióta mRNS érési folyamata

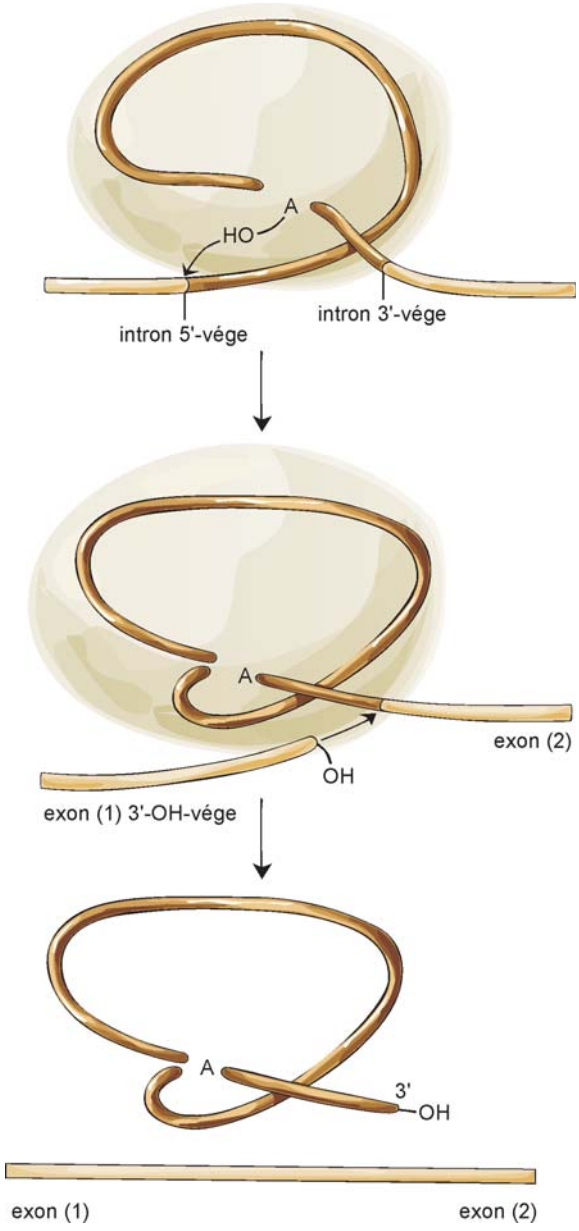
Az eukarióta DNS-függő RNS-polimeráz-II nagyobbik alegységén található, ún. C-terminális domén (CTD) kapcsolja össze a transzkripció és az érés folyamatát. Az



I/8-4. ábra
A mRNS 5'-végén képződő sapka

iniciáció állapotában a CTD nincs foszforilálva, azonban kb. 25 nukleotid beépítése után többszörösen foszforilálódik, és a foszforilált CTD elkezdi összegyűjteni az RNS éréshez szükséges fehérjéket. A mRNS érése három fő folyamatot foglal magába: (1) az 5'-sapka (cap) képzése, (2) az intronok kivágása (splicing) és (3) a 3'-végen képződő poliA farok.

Az *5'-sapka (cap)* egy specifikus (capping) enzim segítségével képződik. Ez az enzim GTP-ből egy guanozint kapcsol a szintetizálódó mRNS 5' trifoszfát végéhez, létrehozva egy igen speciális, 5'-5' irányú kötést. Ezt követően specifikus metilázok S-adenozil-metionin felhasználásával metilálják az 5' végre rakott guanin bázist és az első két ribózt *(I/8-4. ábra)*. Az 5'-sapka még a transzkripció befejezése előtt, tehát ko-transzkripcionálisan képződik. Feladata az mRNS stabilitásának növelése, továbbá a fehérjeszintézis iniciációjában is szerepe lesz.



I/8-5. ábra
Hurokképzés az intronok kivágása során

A pre-mRNS érésének egyik legfontosabb lépése a fehérje információt hordozó exon-szekvenciákat elválasztó *intronok kivágása, a splicing*. A szintetizálódó pre-mRNS kibújik a transzkripciós buborékból, és a kis nukleáris RNS-ek (*snRNS, más néven U-RNS*) fehérjével alkotott komplexeihez (*snRNPs, snurps)* kapcsolódva egy *intron kivágó komplex (splicesosome)* jön létre. Rendkívül izgalmas, és részleteiben még nem teljesen megoldott kérdés az, hogy hogyan ismeri fel az intron kivágó komplex a vágási és az újraragasztási helyeket. Hiszen pl. egyetlen nukleotiddal való eltolódás az információt teljesen megváltoztatná. A pontos vágási hely felismerésében szerepe van az intronok kezdő és végső szekvenciáinak, ugyanis minden intron GU- val kezdődik és AG-vel végződik. Ugyan a két-két bázis szükséges, de nem elégséges feltétele a kivágandó szekvencia pontos felismerésének, mivel sok olyan GU dimer van, ami mellett nem történik hasítás. A splicing folyamatában részt vevő harmadik fontos szerkezeti elem az intronban található *elágazódási hely* nevű szekvencia (UACUAAC; a szekvencián belül adölt betűvel írt *A* vesz részt a hasítás folyamatában). Akkor történhet splicing, ha mindhárom említett szerkezeti elem jelen van a pre-mRNS-ben annyiszor, ahány intront tartalmaz. A kivágandó intron helyének pontosabb meghatározásában fontos szerepe van az

snRNS-eknek, más néven U-RNS-eknek. Az intron kivágása a következőképp történik. Első lépésként az elágazódási hely adenozin nukleotidjának 2'–OH csoportja megtámadja az előtte található exon 3' és a kivágandó intron 5'-vége közti foszfátcsoportot, így *foszfotriészter* kötés alakul ki. Ez a kötés gyorsan visszaalakul foszfodiészterré, olyan módon, hogy az első exon 3'–OH csoportja felszabadul, az adenozin pedig az intron 5' végi guanozinjával formál 2'-5' foszfodiészter kötést. Az első exon szabaddá vált 3'–OH csoportja ekkor megtámadja az intron másik, 3'-vége és a következő exon 5'-vége közötti foszfodiészter kötést, így most itt alakul ki egy foszfotriészter kötés. Ez a foszfotriészter kötés is rövid életű, az első exon 3'- és a második exon 5'-vége között marad meg egy foszfodiészter kötés, az intron 3'–OH csoportja pedig felszabadul. A kivágott intron egy érdekes, 2'-5' foszfodiészter kötéssel kialakult hurkot tartalmazó, lasszószerű struktúra *(I/8-5. ábra).* Ismertek olyan, az intronokat érintő mutációk, amelyek hibás splicingot eredményeznek. A hemoglobin béta-lánc génjének első intronjában található GU AU-ra való cserélődése például hibás intron-kivágáshoz, aberráns mRNS-hez, a polipeptid-lánc szintézisének korai befejeződéséhez vezet, amely béta-talasszémia nevű vérszegénységet okoz.

A leendő mRNS 3' vége általában jóval hosszabb, mint ami a fehérjelánc kódolásához szükséges. A fehérje információ végét jelző stop kodon után található mRNS szekvenciát *3'-nem kódoló régiónak (3' untranslated region, 3' UTR)* nevezzük. Ez az RNS szakasz hordozza például a transzlációt szabályozó miRNS kötőhelyeket (lásd az eukarióta génkifejeződés szabályozásáról szóló fejezetben), és itt található a transzkripciót termináló szignál ami egyben a poliadenilációs szignál is. A 3' UTR vége felé található konszenzus AAUAAA szekvenciához egy specifikus vágó komplex kapcsolódik, és kb. 20 bázissal lejebb (3' irányban) elvágja a transzkriptumot. A transzkriptum így keletkező szabad 3' OH végéhez egy poliA-polimeráz 50-150 AMP-ből álló poliA farkat szintetizál. A poliA-polimeráz templát nélkül működik, szubsztrátja az ATP, és a szokásos foszfodiészter kötést hozza létre a nukleotid egységek között. Vagyis az érett mRNS 3' végén mindig megtalálható egy olyan poliA szekvencia, ami a genomban nincs jelen.

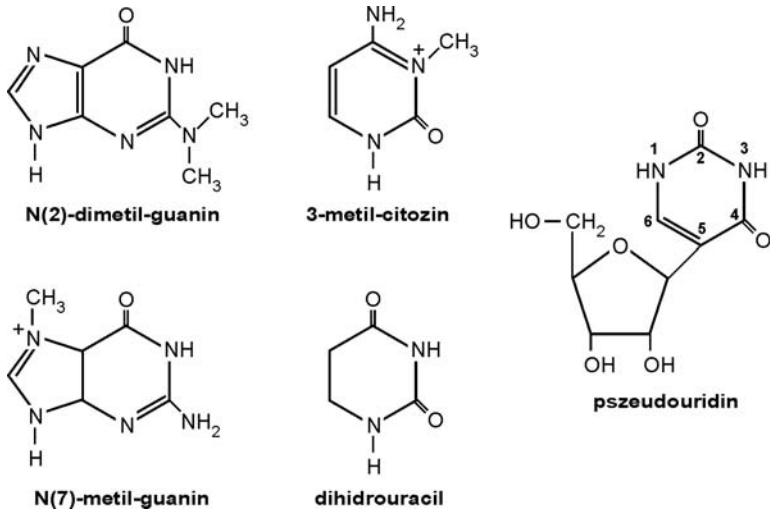
Alternatív intronkivágás (alternative splicing)

A gének exon-intron szerkezete lehetővé teszi azt, hogy egy adott génnek többféle fehérje produktuma legyen. Egyes *fehérje izoformák* génje azonos, de a mRNS érése során eltérő exon szám alakul ki, azaz egyes szövetekben az intron kivágó rendszer bizonyos pre-mRNS szakaszokat szövet-specifikusan kezelhet exonként vagy intronként. Például az alfa-TM gén által kódolt tropomiozin fehérjék exon száma igen változó a különböző szövetekben. A 2. exon csak a simaizom tropomiozinjában lesz benne. A legtöbb exont (a 2-es kivételével az összes exont) a harántcsíkolt izomban található tropomiozin tartalmazza, míg a hepatociták tropomiozinje a legrövidebb (6 exont tartalmaz). Az intron kivágó komplex (splicesosome) szövet-specifitásának molekuláris alapjai még nem teljesen ismertek.

Az eukarióta riboszomális RNS-ek és a tRNS-ek érése

Mind az rRNS, mind pedig a tRNS érése poszt-transzkripcionálisan történik, azaz az elsődleges transzkriptum elkészítése után. A riboszomális gének transzkripciója a sejtmagvacskában, a nukleoluszban történik. Az eukarióta rRNS-ek átírása némiképp emlékeztet a prokariótáknál leírtakhoz, mivel itt is egy közös, hosszú, elsődleges transzkriptum készül, mely tartalmazza mindhárom rRNS szekvenciáit. A vég-

leges rRNS-ek kivágása meghatározott sorrendben történik egy nagy, fehérjéket és RNS-eket tartalmazó komplex hatására. Az érés során specifikus helyeken bázis-metiláció is történik, sőt, pszeudouridin is képződhet. Ezt a reakciót egy kis magi, RNS-eket és fehérjéket tartalmazó partikulum végzi, melyet *snoRNP*-nek nevezünk. Az snoRNP-k tartalmaznak egy segéd RNS-t, mely komplementer azokkal az rRNS szekvenciákkal, ahol módosítás fog történni. Így a metiláció és a pszeudouridin képzés szekvenciaspecifikus.



I/8-6. ábra
Példák az rRNS és a tRNS érése során kialakuló „ritka" bázisokra és nukleozidokra

Végül az érett rRNS-ek a megfelelő fehérjékkel együtt riboszómává rendeződnek a nukleoluszban.

A különböző tRNS-ek egyenként íródnák át, azaz az elsődleges transzkriptum csak egyetlen tRNS információját tartalmazza. Az elsődleges transzkriptum mindkét végén hosszabb, és tartalmazhat intront is. Az 5' véget a *ribonukleáz P* vágja le, amely endonukleáz aktivitású *ribozim*. A 3' végen exonukleáz fogja lehasítani a felesleges nukleotidokat. A prokariótákhoz hasonlóan, az eukarióták tRNS-ének 3' végére is utólag, templáttól független reakcióban kerül rá a jellemző CCA szekvencia. Ha van intron az elsődleges transzkriptumban, akkor az is kivágásra kerül. A tRNS érési folyamatára rendkívül jellemző a nukleozidok utólagos módosítása.

Az RNS-ek nukleáris exportja

A sejtmag és a citoplazma alkotóelemei a magi pórusokon át tudnak közlekedni. Ezek a pórusok ugyan nagyok, de egy centrális „dugó" található bennük, ezért gyakorlatilag csak ionok és kismolekulák közlekedhetnek szabadon a magi pórusokon át. A különböző RNS-ek transzportja a dugón keresztül egy aktív, azaz energiát igénylő folyamat révén valósul meg. Így teljes riboszómák, az aktiváló enzimükhöz kötött RNS-ek, és fehérjékkel borított mRNS-ek juthatnak át. Az mRNS-t borító fehérjék közt találjuk például az 5'-sapkához specifikusan kötődő fehérjét, vagy a magi exportra jellemző szignál szekvenciákat hordozó fehérjéket.

I/8.2. A TRANSZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁSA PROKARIÓTÁKBAN

Az egyik legjobban ismert baktérium, az *E. coli* genomja kb. 4300 fehérje kódoló gént tartalmaz, ezek közül azonban csak azok a gének expresszálódnak egy adott időben, amelyre a baktériumnak feltétlenül szüksége van. A transzkripció elindításá-

nak feltétele az RNS polimeráz holoenzim promóterhez való kötődése. Mivel ugyanaz az enzim kötődik minden promóterhez, minden promóternek vannak olyan szekvenciái (boxok), melyek az RNS polimeráz fő kötőhelyei. A transzkripciós start helytől a pozitív, kódoló szálon 5' irányban található TTGACA és TATAAT szekvenciák ilyen kötőhelyek, ezek határozzák meg a polimerizáció irányát is. Az *erős promóterekben* szinte pontosan az említett szekvenciák találhatók, ezért az RNS polimeráz kötődése igen hatékony. A *gyenge promóterek* esetében azonban ezen boxok szekvenciája kissé más, ezekről ritkábban indul el transzkripció. A *konstitutív*, folymatosan átíródó gének kifejeződésének szintjét csak a promóter erőssége befolyásolja. Más gyenge promóterek esetében az RNS-polimeráz megfelelő kötődéséhez további szabályozó fehérjék közreműködése is szükséges. Ha a szabályozó fehérje promóterhez kapcsolódása a transzkripció elindításához szükséges (lásd CAP fehérje alább), *pozitív szabályozásról* beszélünk.

A baktérium sokféle tápanyagot tud lebontani, ezért génjeinek egy jelentős része a különböző tápanyagokat bontó enzimeket kódolja. Adott időben azonban csak azon gének transzkripciója fog elindulni, amelyek az éppen rendelkezésre álló tápanyag lebontásához szükségesek. Honnan tudja a baktérium szabályozási rendszere, hogy melyik tápanyag áll rendelkezésre? A leggyakoribb szabályozási modell az ún. *negatív szabályozás*, amikor a *szabályozó fehérje* (*represszor*) DNS-hez való kapcsolódása gátolja a génexpressziót. Ez a gátlás akkor szűnik meg, ha a tápanyag fő komponense, általában egy *kis molekula* (pl. a laktóz), az ún. *induktor* hozzákapcsolódik a represszor fehérjéhez, és ennek hatására a represszor leválik a DNS-ről. A negatív szabályozás lényege tehát, hogy a szabályozó fehérje feladata a transzkripció gátlása.

Negatív szabályozásról beszélünk akkor is, ha a transzkripció gátlása csak egy kis molekulájú korepresszorral együtt jön létre. Ez történik pl. a triptofán szintéziséhez szükséges enzimek génexpressziójának szabályozásánál, ahol a korepresszor a triptofán. Így, ha van elég triptofán, akkor a triptofán szintéziséhez szükséges enzimek génjei nem kerülnek átírásra, mivel a represszor–korepresszor komplex bekötődik az operonba és gátolja a transzkripciót.

A bakteriális szabályozó rendszer másik fontos sajátsága, hogy az egyes metabolikus utakhoz tartozó enzimek génjei általában egymás mellett helyezkednek el a genomban, létrehozva a prokaritóta transzkripciós egységet, az *operon*t. Például a laktóz transzportjához és bontásához szükséges fehérjék génjei az ún. lac operonban tömörülnek, a triptofán aminosav szintéziséhez szükséges enzimek génjei pedig a trp operonban találhatók. Az egyes anyagcsere utakért felelős enzimek gyakran egyetlen, policisztronos mRNS-be íródnak át, mint pl. a lac operon által kódolt 3 fehérje. Az operon modell azonban csak a prokariótákra jellemző, az eukariótáknál a gének általában nem csoportosulnak, és policisztronos mRNS sem képződik.

Az *E. coli* lac operonjának működése

Az *I/8-7. ábrán* a lac operon negatív szabályozása látható. A béta-galaktozidáz a laktóz bontásához szükséges enzim, génje a lacZ, mely egy *strukturális gén.* A lacZ két másik strukturális génnel együtt íródik át egy policisztronos mRNS-be, a lacY-nal, mely egy transzacetilázt, és a lacA-val, mely egy permeázt kódol. A transzacetiláz funkciója nem ismert, a permeáz valószínűleg a laktóz transzportjában vesz részt. Ennek a három strukturális génnek a képződését a gének előtt található lacO operátorhoz és a lacP promóterhez kapcsolódó fehérjék szabályozzák. A lacI egy szabályozó fehérjét kódoló gén, melyről a lac represszor fehérje képződik.

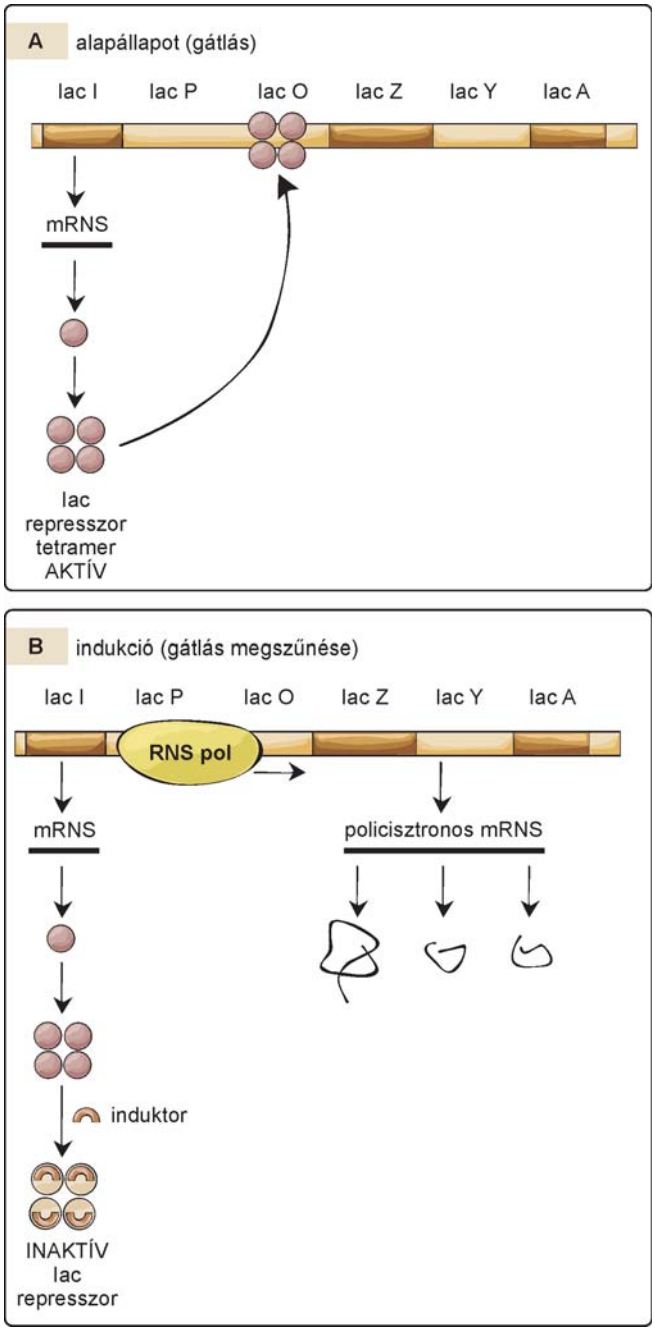
A lac represszor fehérje kis sebességgel, de állandóan képződik, így a sejtben állandóan található néhány molekula lac represszor, mely a DNS-hez igen erősen

kötődik az operátor (lacO) régiójában. Ha a lacO-hoz represszor fehérje kötődik, az RNS-polimeráz nem tud hozzákapcsolódni a promóter régióhoz, és az átírás nem kezdődhet el.

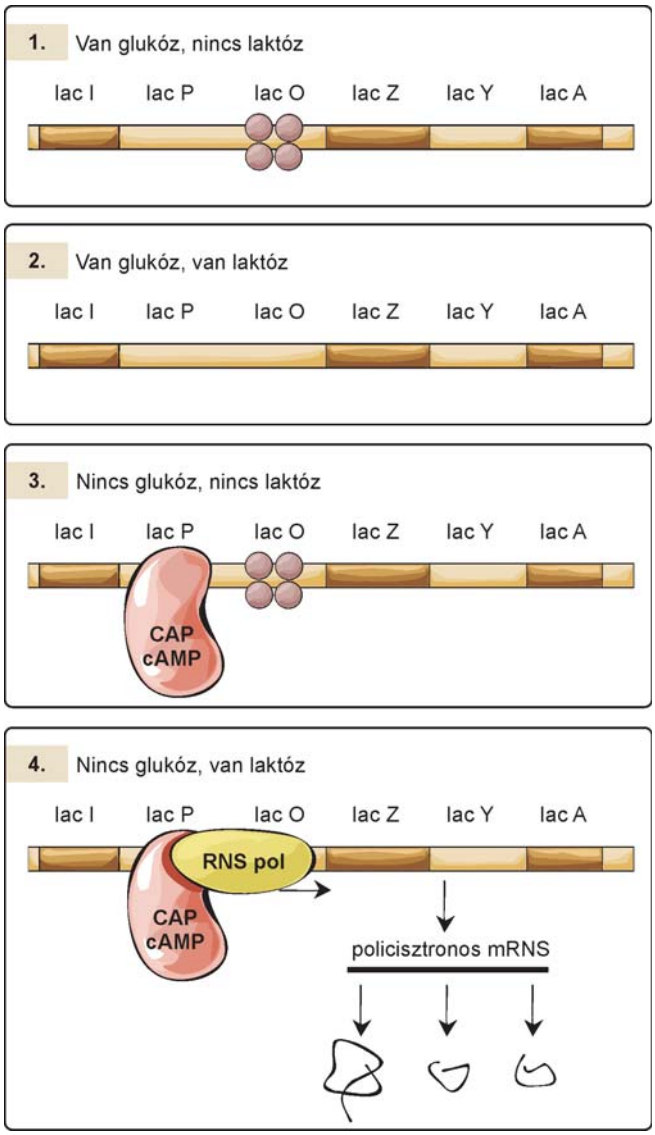
Ha a baktérium laktóztartalmú közeggel érintkezik, néhány laktózmolekula bejut a sejtbe, és a lac represszor fehérjét inaktiválja, azaz a lac represszor nem tud bekötődni a lac operátor génhez. Így az RNS-polimeráznak lehetősége adódik arra, hogy a promóterhez kapcsolódva elkezdje a policisztronos mRNS szintézisét, és a lac strukturális gének kifejeződjenek. A mRNS életideje azonban igen rövid (féléletidő kb. 3 perc), azaz gyorsan lebomlik. Így a lac operon strukturális génjeinek hatékony kifejeződéséhez az induktor állandó jelenléte szükséges. Ha a laktóz elfogyott, a szintézis igen rövid idő alatt leáll.

Mivel a lacO és a lacP régiók részlegesen átfednek, az operátorhoz kötődött represszor fehérje fizikailag akadályozza az RNS-polimeráz promóterhez való kötődését. Az operátor régió az ún. *cisz-regulációs elem*, mivel a promóterhez közel helyezkedik el. A represszor fehérjét kódoló lacI gén ún. *transz-regulációs elem*, mert a lac operontól távolabbi DNS-szakaszon található.

A lac operon azonban *pozitív szabályozással* is rendelkezik, ebben az esetben a regulátor fehérje elősegíti az RNS-polimeráz promóterhez való kötődését és a transzkripció elindulását. Ilyen regulátor fehérje a *CAP* (*katabolit aktivátor protein*), mely minden olyan operont szabályoz, mely katabolikus (bontó) enzimeket kódol, a glukóz anyagcsere enzimei-



I/8-7. ábra
A lac operon negatív szabályozása



I/8-8. ábra
A lac operon lehetséges állapotai

nek kivételével. A CAP cAMP-al együtt tud bekötődni a promóterekhez, és így cAMP jelenlétében segíti elő a katabolikus enzimek szintézisét. A cAMP egy ősi éhségszignál, azt jelzi, hogy a sejt bármilyen anyagot szívesen lebontana, mert nincs elég glukóz. Ha glukózt adunk a tápoldatba, akkor a baktérium cAMP-szintje csökken, és a CAP fehérje leválik a DNS-ről. Vagyis a glukóz egy preferenciális katabolit, és ha elegendő van belőle, a sejt nem bont le más anyagokat.

Az *I/8-8. ábra* összefoglalja a bakteriális lac operon lehetséges állapotait.

I/9.
A génkifejeződés szabályozása eukariótákban, epigenetikai módosulások

Nemoda Zsófia

Eukariótákban, csakúgy mint prokariótákban, a gének kifejeződése az aktuális biológiai szükségleteknek megfelelően történik. Azonban a táplálék ellátottság és a környezeti hatásokhoz való alkalmazkodás mellett a többsejtű szervezetekben a sejt- és szövetdifferenciálódás során is be-, illetve kikapcsolásra kerülnek egyes gének. A génexpresszió szabályozásának négy, egymásra épülő és egymást időben követő szintjét lehet megkülönböztetni. Az első és legfontosabb szint a gén transzkripciója, hiszen itt dől el, hogy a genetikai információ kifejeződik-e avagy sem. A további három szint (poszttranszkripciós, transzlációs és poszttranszlációs szabályozás) a génkifejeződés finomhangolását szolgálja. Ebben a fejezetben azok a folyamatok kerülnek bemutatásra, amelyek meghatározzák a gén átíródás térbeli, időbeli és mennyiségi mértékét (transzkripciós szabályozás), vagy hatással vannak a keletkezett mRNS életidejére illetve szekvenciájára (poszttranszkripciós szabályozás).

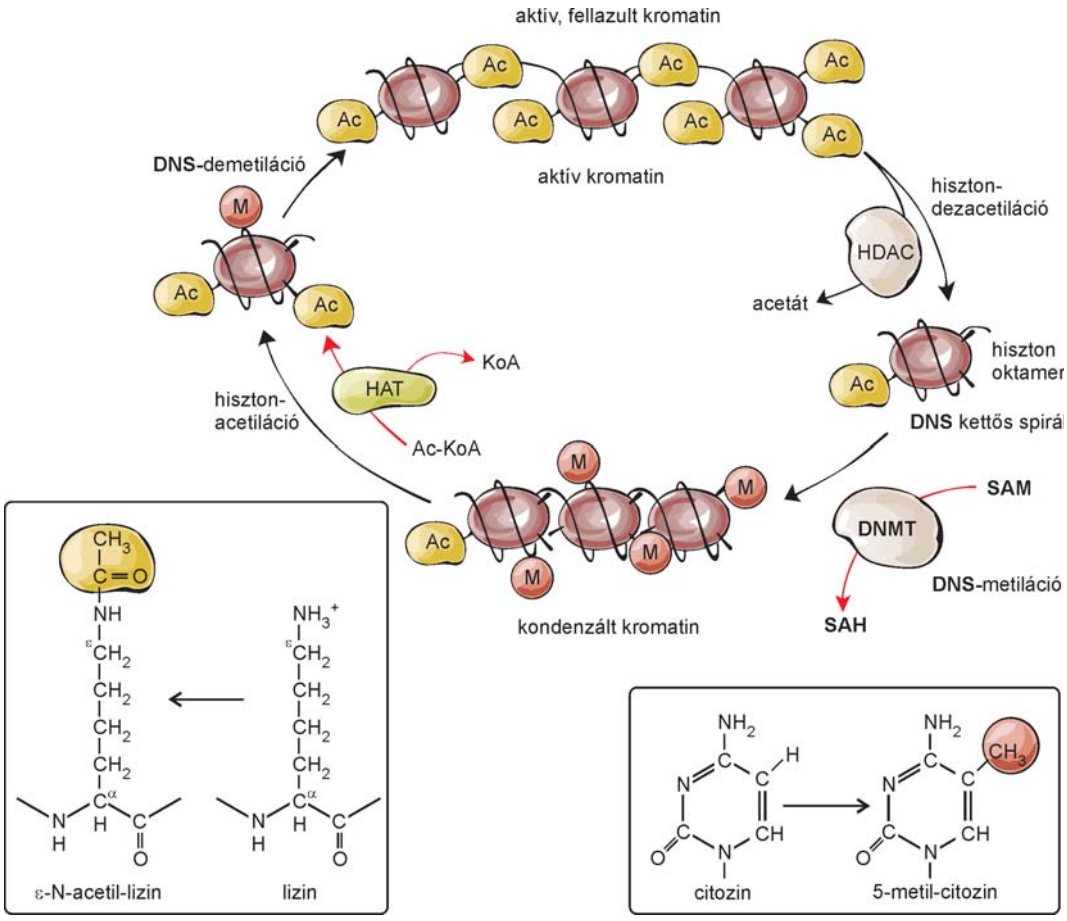
A transzkripció szabályozásáért alapvetően genetikai és epigenetikai faktorok felelősek. A gén szabályozó régiójának specifikus szekvenciái, illetve a hozzájuk kötődő transzkripciós faktorok tartoznak a genetikai faktorok körébe. Az epigenetikai szabályozási formák a genetikai kód (DNS-szekvencia) megváltozása nélkül, a kromatin szerkezetére vannak hatással (az epi- előtag jelentése: valami feletti, azaz epigenetika = genetika feletti). Az epigenetikai szabályozás körébe a hiszton fehérjék módosításait, a DNS metilációját és a kromatin átstrukturálását soroljuk. Az epigenetikai jelek a mitotikus osztódás során továbbadódhatnak sejtről sejtre. Ezek a szabályozási folyamatok alapvető fontosságúak az egyedfejlődésben, a sejtek differenciálódásában és a környezeti hatásokra bekövetkező válaszreakciókban. Mivel a többsejtű szervezetek különböző sejttípusai ugyanazzal a DNS szekvenciával rendelkeznek, léteznie kell egy olyan hatékony szabályozó mechanizmusnak, amely kijelöli a szükséges fehérjéket kódoló információkat. Ez az információ tovább is adódik az utódsejteknek (az ún. „szöveti tudat" kialakítása, hiszen az osztódó májsejtnek máj utódsejtjei lesznek). Tehát a sejtek adott differenciáltsági fokán kialakul egy olyan, DNS-szekvencia feletti információ, az ún. epigenetikai információ vagy epigenotípus, mely az adott szövetre jellemzően kapcsolja be illetve ki a géneket. Ez azért is fontos, hogy a transzkripciós mechanizmus hatékonyan tudjon működni azokon a kromoszóma részeken, amiknek átíródását az adott sejt igényli, miközben az aktuálisan nem használt részeket kis helyen tudja tömöríteni.

I/9.1. A TRANSZKRIPCIÓ KROMATINSZINTŰ SZABÁLYOZÁSA

Hisztonmódosítások

Az eukarióta sejtekben a kettős szálú DNS hiszton fehérjékre feltekeredve, kromatinszerkezetben található (lásd DNS-szerkezet). Az aktív, fellazult és az inak-

tív, kondenzált kromatinszerkezetben meghatározó, hogy milyen kovalens módosításokat tartalmaz a nukleoszómát alkotó globuláris hisztonok flexibilis N-terminális vége (az ún. hisztonfarok). A *transzkripció elsődleges feltétele az aktív*, ún. *eukromatin* szerkezet, ahol a hisztonfarok (főleg a H3 és H4 hisztonok) egyes lizin aminosavjai acetilezve vannak. A *hisztonok acetilációja* amidkötés kialakításával megszünteti a lizin oldalláncok pozitív töltését *(I/9.1. ábra),* ez csökkenti a negatív töltésű DNS és a bázikus hiszton fehérjék közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat, amely lazább kromatin szerkezetet eredményez. Az acetilcsoport acetil-KoA-ról történő átvitelét *hiszton-acetiltranszferáz* (HAT) enzimek katalizálják. Tehát a gén átíródásához szükséges fellazult, aktív kromatinszerkezetet a hisztonok magas fokú acetiláltsága jellemzi. Amikor az adott kromoszómaszakasz inaktiválásra kerül, az acetilcsoportok hidrolitikus eltávolítását a *hiszton-dezacetiláz* (HDAC) enzimek végzik. Az acetiláció mellett a hisztonok N-terminális, farki részén egyéb módosulások is bekövetkezhetnek, mint például egyes lizin- és arginin-oldalláncok metilációja, illetve bizonyos szerin és treonin aminosavak foszforilációja. Ezen kívül a H2A és H2B hisztonok C-terminális részén létrejöhet lizin ubikvitináció is. Ezek a hisztonmódo-



I/9-1. ábra
A kromatinszerkezetet meghatározó hiszton- és DNS-módosítások
SAM-SAH: S-adenozil-metionin átalakulása S-adenozil-homocisztеinné

sulások együttesen képezik az ún. *hisztonkód*ot, amely szerepet játszik a kromatin lokális transzkripciós aktivitásának kialakításában és az aktivitási szint továbböröklítésében.

A különböző hisztonmódosulatokhoz olyan szabályozó fehérjék kapcsolódhatnak, amelyek az adott kémiai jelre specifikus résszel (doménnel) rendelkeznek. Ilyen például az acetilált lizin oldalláncokat felismerő és kötő bromodomén, vagy a metilált lizin oldalláncokat kötő kromodomén. A *bromodomén*t tartalmazó fehérjék szerepet játszanak abban, hogy az acetilált hisztonokhoz a kromatin fellazítását végző, ún. kromatin-ATPáz-ok csatlakozhassanak. Ez az enzim család energia felhasználásával csúsztatja el, helyezi át a hiszton oktamereket, és teszi szabaddá a gén promoter területét a transzkripciós faktorok bekötődésére. A *kromodomén* jellemzően a kromatint tovább kondenzáló, géncsendesítő fehérjék fontos struktúr motívuma.

DNS-metiláció

A kromatin inaktív állapotához a DNS metilációja is nagymértékben hozzájárul. A DNS metilációja eukariótákban leggyakrabban a *citozin 5'-szénatomján* történik CG dinukleotid szekvenciában (amit a dezoxiribonukleotidok közötti foszfodiészter kötés jelölésével CpG-nek is rövidítenek). A *DNS-metiltranszferáz* (DNMT) enzimek metilcsoport donorként S-adenozil-metionint használnak (*I/9-1. ábrán:* SAM-SAH). A DNS-metiltranszferázok két csoportba sorolhatók attól függően, hogy új metilációs mintázatot alakítanak-e ki (ún. *de novo* metiltranszferázok), vagy a replikáció után az újonnan képződött DNS-szálat metilálják az eredeti metilációs mintázat szerint (ún. fenntartó metilázok). A keletkezett *5-metil-citozin*t sokan a DNS ötödik bázisaként említik. A humán genomban a citozin bázisok kb. 3–4%-a metilált (a genom összes bázisára nézve ez 0,6–0,8% körüli érték, ugyanis a genom citozintartalma 20,5%); az 5-metil-citozin százalékos aránya természetesen erőteljesen szövet- és sejttípus függő.

A humán genomban található *CG dinukleotid-szekvenciák* közel 70%-a metilált, ezek nagyrészt ismétlődő (repetitív) szekvenciák, például a transzpozonok (lásd DNS-szerkezet) GC-gazdag régióiban találhatók. Az ismétlődő régiók magas fokú metiláltsága valószínűleg védekező mechanizmus, hogy ezek a DNS-szakaszok ne kerüljenek átíródásra. A fehérjét kódoló génekben a módosított citozin bázisok általában az 5'UTR-szakaszok, esetleg az intronok szabályozó régióiban találhatók, de exonokban is elhelyezkedhetnek. A promoter régió metilálása a gén inaktiválásához vezet, míg az exonokban található metiláció feltehetően alternatív transzkripciós start helyek csendesítésében fontos. Fontos megjegyezni, hogy a DNS-metiláció szintje tipikusan igen alacsony az ún. CpG-szigetek területén, amely az aktívan átíródó háztartási (housekeeping) gének promoterét jellemzi (lásd később).

A DNS demetilációjáról több teória látott napvilágot. Eredetileg csak a passzív demetilációt tartották lehetségesnek, amikor is a DNS metilációs szignál az egymást követő sejtosztódások során eltűnik a DNS-ről. Ez akkor következik be, ha a fenntartó metil-transzferáz (DNMT1) nem készít 5-metil-citozint az újonnan képződött DNS-szálra, azaz a hemimetilált kettős szálú DNS-re. Az utóbbi évtizedekben azonban megjelentek aktív demetiláció hipotézisek is, ezek nagy része több lépéses folyamatban képzeli el a metilcsoport eltávolítását. A jelenleg legelterjedtebb modellben az 5-metil-citozin először 5-hidroxi-metil-citozinná alalkul a TET1 (ten eleven translocation) 5-metil-citozin-dioxigenáz által. Ez a reakció Fe^{2+}-iont, α-ketoglutarátot és aszkorbátot igényel. Az 5-hidroxi-metil-citozin tovább tud oxidálódni a TET enzimcsalád által 5-formil-, majd 5-karboxil-citozinná. Az így keletkezett módosult bázist ismeri fel, vágja ki és cseréli citozinra a DNS hibajavító mechanizmus. Szintén

mismatch javító enzimek vesznek részt a dezaminációval módosult bázisok eltávolításában, ugyanis a citidin-deamináz 5-metil-citozinból timint, 5-hidroxi-metil-citozinból pedig 5-hidroxi-metil-uracilt tud készíteni. Ezek a módosult bázisok a DNS másik szálán levő guaninnal nem komplementerek, így a hibajavító enzimek végül citozinra cserélik le őket.

A fent említett reakcióhoz hasonló módon, Fe^{2+}-ion és α-ketoglutarát kofaktorral működik a hiszton metiláció eltávolítását végző enzimek egyik fajtája, a jumonji domént tartalmazó lizin demetiláz. A másik típusú lizin-demetiláz FAD-tartalmú oxidáz, mely specifikus regulációs komplexben képes a hisztonokról a mono- és dimetilcsoportok eltávolítására.

A kromatin szerkezetét befolyásoló DNS metiláció és hiszton dezacetiláció egymást segítő, kiegészítő folyamatok. Ezt a két folyamatot a *metil-CpG-kötő fehérjék* koordinálják oly módon, hogy a metilált DNS-hez kötődve HDAC enzimet tartalmazó, transzkripciót gátló komplexet toboroznak. Emellett a citozinra helyezett metilcsoport jelenléte önmagában megakadályozhatja egyes transzkripciós faktorok bekötődését, így befolyásolhatja a gén expresszióját.

Géninaktiváló folyamatok

Bizonyos kromoszómaszakaszok nem képesek dinamikus eukromatin – heterokromatin változásra. Az egyedfejlődés korai szakaszában egyes kromoszómák, illetve kromoszóma szakaszok inaktív heterokromatin szerkezetbe kerülnek és ez az epigenetikus információ sejtről-sejtre továbbadódik. Jellegzetes példa erre a női embriók egyik *X kromoszómá*jának *inaktivációja* a célból, hogy a kétszeres kópiában lévő X kromoszóma állomány dóziskompenzációja létrejöjjön. Ezáltal az X kromoszómán található gének expresszió monoallélos lesz. Úgy tűnik, hogy az embrionális sejtek random módon gátolják az apától vagy az anyától örökölt X kromoszómát. Azonban a klonális természetű öröklődés miatt az adott X kromoszóma inaktív állapotát minden utódsejt továbbörökíti, így adott szöveti részekben ugyanaz az X kromoszóma inaktív. Érdemes megjegyezni, hogy az X kromoszóma nem teljes hosszában gátlódik, egyes régiói „megmenekülnek" az inaktiválásból, tehát biallélos lesz az expressziójuk.

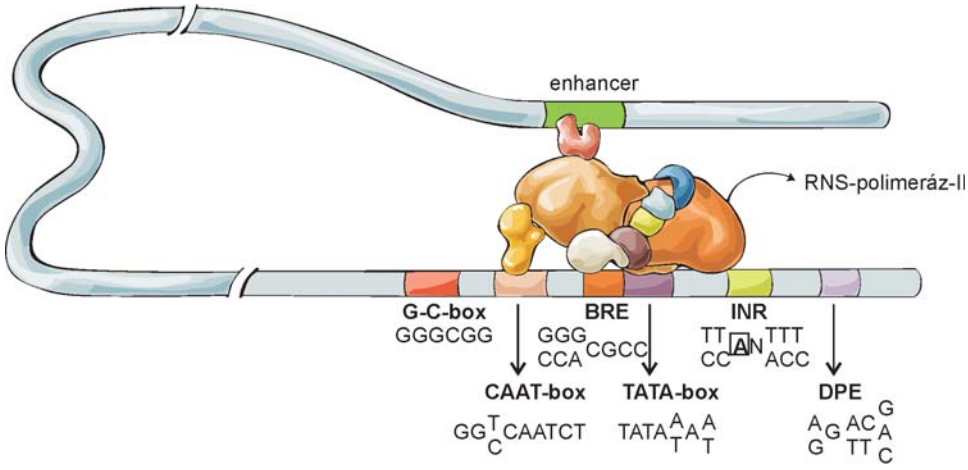
A *genomikus beíródás (imprinting)* jelensége szintén monoallélos expressziót eredményez, azaz csak az egyik (anyai vagy apai) allélről történik gén átíródás. Azonban ebben a gén inaktiválási folyamatban fontos, hogy az apától vagy az anyától örökölt kromoszóma szakaszok gátlódnak. Lényeges különbség még, hogy a beíródás lehet szövetspecifikus, azaz csak egyes szöveteket, sejttípusokat érint és nem minden szomatikus sejtben gátlódik az adott allél expressziója. A humán genomban közel száz körüli gént érint ez a jelenség. Jellegzetes példa az IGF2 (inzulinszerű növekedési faktor-2) génje, amely csak az apai kromoszómáról íródik át, mivel „anyai beíródás" jött létre, ezért az anyától származó allél inaktív. Az ugyanezen kromoszóma szakaszon található H19 gén ezzel szemben „apai beíródás" áldozata és csak az anyától örökölt allél íródik át.

I/9.2. AZ EUKARIÓTA TRANSZKRIPCIÓ INICIÁCIÓ JELLEGZETESSÉGEI

Ahogy az előzőekben már tárgyaltuk, a génátíródást eukariótákban a promoter régióhoz, illetve ettől messzebb eső, de még ugyanazon a DNS-szálon levő, ún. cisz-regulátor elemekhez bekötődő transzkripciós faktorok indítják el. Ezek a fehér-

jék a kettős szálú DNS-hez való kötődés után toborozzák az RNS polimerázt (recruitment folyamata). Azokat a *cisz-elemek*et, amelyek a gén kifejeződését pozitívan szabályozzák *erősítő (enhancer)*, míg a negatívan ható szekvenciákat *csendesítő (silencer)* elemnek nevezzük. A gén átíródást befolyásoló *transz-elemek* közé tartoznak a *transzkripciós faktorok* (aktivátorok és represszorok), illetve *kofaktorok* (koaktivátorok és korepresszorok). Ezek olyan fehérjék, amelyek a szabályozandó géntől független gének termékei, így térben elkülönülnek (innen a transz elnevezés). Egy transzkripciós faktor több gén átíródását szabályozhatja, ezek a gének azonban sokszor egy funkcionális csoportba tartoznak, például egy anyagcsereút elemei. Az aktivátor fehérjék az erősítő (enhancer) szekvenciákhoz, a represszorok a csendesítő (silencer) szekvenciákhoz kötődnek. Ezek a szekvenciák nagymértékben konzerváltak, és adatbázisokban, katalógusszerűen megtalálhatók az adott transzkripciós faktorhoz tartozó, ún. konszenzus DNS-szekvenciák (kb. 8-20 bp hosszú szekvenciák).

A fehérjéket kódoló eukarióta gének promoter régiója többféle konszenzus szekvenciát tartalmazhat az ún. *obligát, általános transzkripciós faktorok* bekötődésére, amelyek szükségesek az RNS-polimeráz-II toborzásához. Ebből adódik a nevük: TFII(A-H), azaz az RNS-polimeráz-II preiniciációs komplexhez szükséges transzkripciós faktorok. Preiniciációs komplex alatt a promoterhez kötődött általános transzkripciós faktorokat és az általuk megkötött RNS-polimeráz-II egységét értjük. A *transzkripciós start hely*, amely az első átírt (+1-es pozíciójú) nukleotidnak felel meg, eukariótákban majdnem mindig két pirimidin bázis után lévő adenin, lásd a *kiemelt A az I/9-2. ábrán.* A start helytől proximális és disztális irányban elhelyezkedő 100–200 bázispárnyi szakaszt minimális (avagy core) promoternek nevezzük. Itt található a start helynél elhelyezkedő *iniciátor (INR)* elem, illetve a 3' irányban, 28-32 bázispárnyira található *disztális promoter elem* (*DPE*: downstream promoter element), szekvenciáját lásd az *I/9-2. ábrán*. Ezeken kívül, a humán gének 15–20%-ánál a transzkripciós start helytől 5' irányban 25-30 bázispárnyira található az ún. *TATA-box*. Ennek szekvenciája TATA(A/T)A(A/T), ahol a zárójelben lévő pozíciókban akár A, akár T bázis lehetséges. A TATA-box jellemzően szövetspecifikus gének (például a béta-globin gén) proximális promoter régiójában található. A konstitutívan



I/9-2. ábra
Eukarióta transzkripció iniciáció elemei
(INR: iniciátor elem, DPE: disztális promoter elem, BRE: TFIIB felismerő elem)

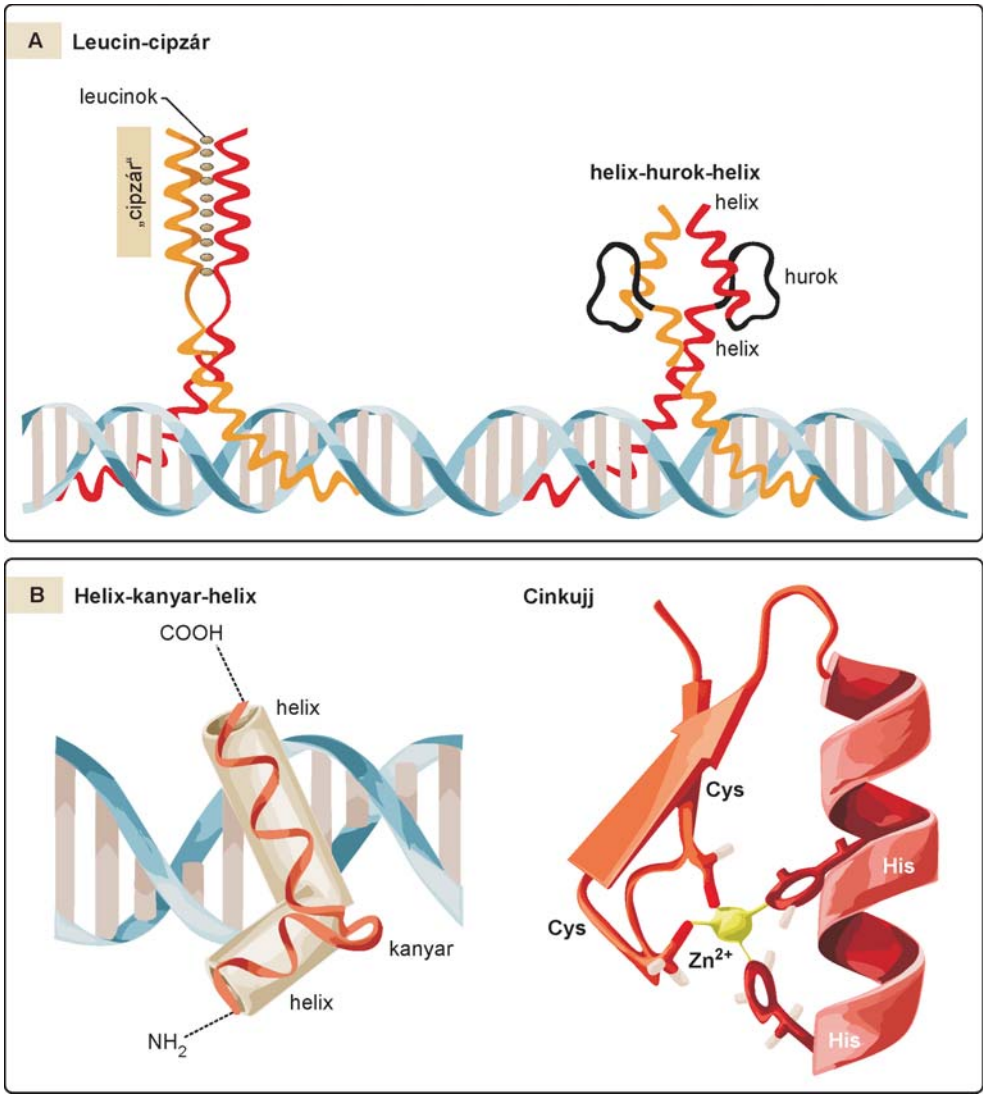
átíródó, háztartási (housekeeping) gének promotere jellemzően nem tartalmaz TATA-boxot. Ezeknél a „TATA-nélküli" géneknél a *GC-box*ot (GGGCGG szekvenciát) találjuk a promoter GC-gazdag régiójában, a CpG-szigetben. Ide kötődik az SP1 transzkripciós faktor, amely minden sejtben megtalálható. Gyakori még a proximális promoter régióban a *CAAT-box*, melynek szekvenciája GG(T/C)CAATCT. Ez általában erős promoterre jellemző szekvencia és többféle transzkripciós faktort tud kötni. Fontos megjegyezni, hogy ezen szekvenciák egyike sem szükséges illetve elégséges feltétele az aktív transzkripciónak. Sok aktívan átíródó gén promoterében nem találhatók ilyen cisz-elemek, ezért (is) fontosak az egyéb, génspecifikus szabályozó szekvenciák.

Az általános transzkripciós faktorok mellett *specifikus transzkripciós faktorok* bekötődése erősíti vagy gyengíti az adott gén transzkripciós aktivitását. Az enhancer és silencer elemek a promotertől távolabb (sokszor több száz vagy akár több ezer bázispárnyira) helyezkednek el, akár 5', akár 3' irányban, így lehetnek például a gén intronjaiban is. Ezek a cisz-elemek a kromatinhurok tekeredése révén kerülnek közel a preiniciációs komplexhez, ahogy azt az *I/9-2. ábra* is mutatja. Ezek átlagosan 100-200 bp hosszú szakaszok, amelyek többszörösen tartalmazzák a 8-20 bázispárnyi konszenzus szekvenciákat. Jellemző rájuk, hogy funkciójuk nem függ az orientációjuktól. A transzkripciós faktorok közvetlenül vagy kofaktorokon keresztül tudnak kapcsolatot létesíteni a preiniciációs komplexszel, elősegítve (koaktivátorral) vagy gátolva (korepresszorral) annak funkcióját. A koaktivátoroknak általában hiszton-acetil-transzferáz, míg a korepresszoroknak hiszton-dezacetiláz aktivitása is van, így egyszerre több szinten is módosíthatják az adott gén átírását. A promotertől való távolság nem döntő az aktivitásukban, hiszen DNS-hurok képződésével egymástól távol lévő kromoszóma szakaszok kerülhetnek térben egymás mellé. Fontosabb inkább az, hogy az enhancer és a promoter között megtalálható-e transzkripciós szigetelő (inzulátor) CCCTC szekvencia, és ahhoz kötődik-e a CTCF (CCCTC-binding factor) cinkujjas fehérje. Ugyanis az enhancer és a promoter között lévő CTCF megakadályozza a transzkripció erősítését.

Azokat a DNS-szekvenciákat, amelyek egy hírvivő molekula által szabályozott faktort kötnek, *reszponzív elem*eknek nevezzük. Ilyenkor a hírvivő molekula (például szteroid hormon) a megfelelő transzkripciós faktor ligandjaként működik. A hormon-receptor komplex pedig a szteroid reszponzív elemhez tud kötődni a gének promoter régiójában (részletesen lásd az intracelluláris receptoroknál). A CREB (cAMP responsive element binding protein) transzkripciós faktor pedig a cAMP-függő protein-kináz (PKA) katalizálta foszforiláció hatására tud homodimerként a cAMP-reszponzív elem (CRE) szekvenciához kötődni.

A *preiniciációs komplex összerendeződés*ének első lépésében a minimális promoterhez kötődik a *TFIID komplex*, amely egy TATA-kötő fehérjéből (TBP: TATA binding protein) és 12 TBP-asszociált faktor (TAF) alegységből áll. A TATA-nélküli promoter konszenzus szekvenciáihoz TBP vagy TLF (TBP-like factor) kötődik és a TFIID többi alegysége, a TAF fehérjék segítik a *start hely felismerésé*t. A további transzkripciós faktorok közül a TFIIA stabilizálja a faktorok kötődését, míg a TFIIF irányítja az RNS- polimeráz-II-t az egyre növekvő preiniciációs komplexhez és stabilizálja annak kötődését. Kiemelendő még a TFIIH, amely helikáz és kináz alegységekkel rendelkezik. A *TFIIH* ATP-t igénylő folyamatban *felnyitja a kettős szálú DNS-t*, így hozzáférhetővé teszi a DNS-szálat az RNS-polimeráz számára (nyitott promoter komplex). Az RNS-polimeráz-II el is kezdi az átírást (nincsen primerre szüksége), azonban csak akkor tud továbbhaladni a DNS-szálon, ha a *C-terminális doménje (CTD) foszforilálódik*. A TFIIH kináz aktivitású alegysége végzi az itt található szerin oldalláncok foszforilációját, amely szükséges a polimeráz konformáció változásához és végeredményben az elongáció szakaszába való lépéshez. A stabilizáló TFIIF

rajtamarad a polimerázon, míg a többi általános transzkripciós faktor disszociál a preiniciációs komplexből. A TFIID komplex azonban kötve marad a DNS-hez, hogy újabb preiniciációs komplex toborozását kezdhesse el (reiniciáció). Ez különösen fontos meghatározója a keletkező mRNS mennyiségének, hiszen az RNS átírásának sebessége állandó, így a termék koncentrációja attól függ, hogy időegység alatt hányszor indult el a gén átírása.



I/9-3. ábra

Eukarióta transzkripciós faktorok szerkezeti motívumai. A: Dimert képző transzkripciós faktorok (az egyik tag sárga, a másik vörös színű). Az alfa-helikális részek fontosak mind a DNS-fehérje, mind a fehérje-fehérje kölcsönhatásban. B: DNS-t kötő domének szerkezete. A C2H2 cinkujj motívumnál a kettős szálú DNS nincs jelezve; itt is az alfa-helix-rész kötődik a DNS nagy árkához

I/9.3. AZ EUKARIÓTA TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK SZERKEZETI MOTÍVUMAI

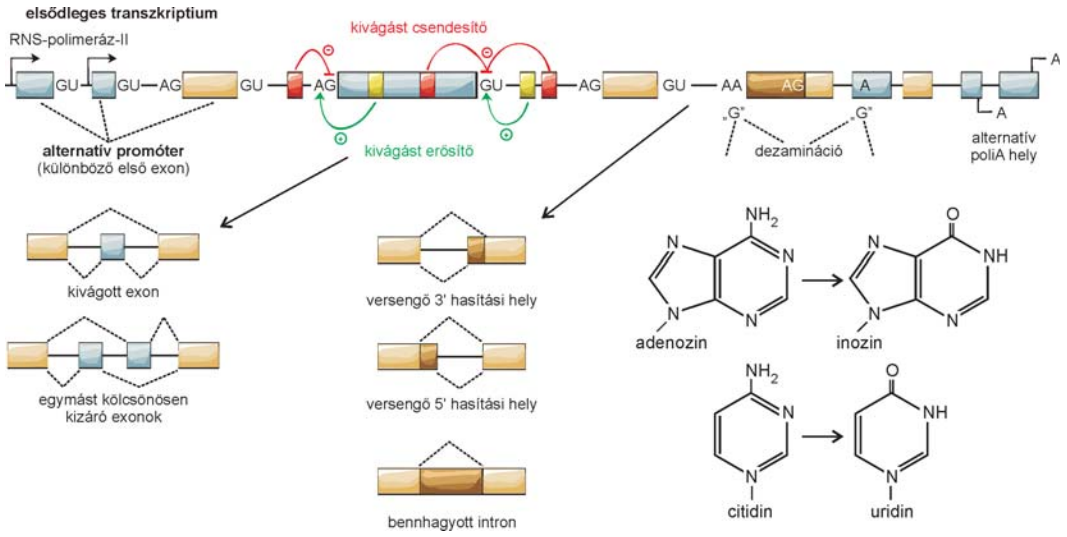
Az eukarióta transzkripciós faktorok nagy részében (80%-ában) jellegzetes fehérje motívumok találhatók, amik specifikus funkciókat, úgy mint a kettős szálú DNS-hez, RNS-polimerázhoz, illetve más transzkripciós faktorokhoz való kötődést szolgálnak. Nagyon gyakori, hogy a transzkripciós faktorok egymással, homo- vagy heterodimér formában fejtik ki hatásukat, illetve más fehérjéket, például hiszton modifikáló enzimeket kötnek. Ezeket a *fehérje-fehérje interakció*kat létrehozhatja például a *leucin-cipzár* motívum, ami úgy jön létre, hogy a fehérje alfa-helix szakaszán hat aminosav távolságában leucinok ismétlődnek, így a leucinok mindig a helix azonos oldalára kerülnek. Két, leucincipzár motívumot tartalmazó fehérje (például a fos és a jun protoonkogének) hidrofób kölcsönhatásokkal kapcsolódnak egymáshoz *(I/9-3. ábra, A).* A két fehérje további alfa-helikális része bázikus aminosavakat tartalmaz, amely a DNS-hez való kötődéshez kell. Egy másik fehérje-fehérje kötődést létrehozó motívum a *helix-hurok-helix (HLH: helix-loop-helix)*, ahol a fehérjében lévő két alfa-helix szakaszt egy rugalmas hurok rész köt össze. Ez a rugalmasság teszi lehetővé, hogy a két közel kerülő fehérje egymáshoz tudjon kapcsolódni, például a hipoxia indukálta faktor-1 alfa- és béta-alegysége esetében. A második, hosszabb alfa-helix szakasz bázikus aminosavakat tartalmaz és a DNS nagy árkába illeszkedik be (a dimért alkotó két fehérje bázikus alfa-helix része a DNS két szomszédos nagy árkába fekszik, *I/9-3. ábra, A*).

A *kettős szálú DNS-hez való kötődés*ben szintén alfa-helikális szerkezetek vesznek döntően részt. Gyakori motívum a *helix-kanyar-helix (HTH: helix-turn-helix)*, ahol a két alfa-helix szakaszt egy rövid „kanyar" köt össze, amely különböző síkba rendezi a két alfa-helixet. A hosszabb, C-terminális részen lévő alfa-helix illeszkedik a DNS nagy árkába *(I/9-3. ábra, B)*. Másik gyakori DNS-kötő motívum a *cinkujj*, ahol a fehérje hurokban levő négy aminosav oldallánc egy Zn^{2+}-ionnal létesít koordinált kötést. Itt is a hurok alfa-helikális része illeszkedik a DNS nagy árkába. Attól függően, hogy a kötésben résztvevő aminosavak mindegyike cisztein vagy 2 cisztein és 2 hisztidin vesz részt a kötésben, C4, illetve C2H2 típusú *(I/9-3. ábra, B)* cinkujj motívumról beszélünk. Általában két cinkujj motívum található a transzkripciós faktorok (mint például a szteroidhormon-receptorok) DNS-kötő doménjében.

I/9.4. AZ EUKARIÓTA mRNS KÉPZÉSI ÉS ÉRÉSI FOLYAMATAINAK SZABÁLYOZÁSA A SEJTMAGBAN

Alternatív promoter használata

A többsejtű szervezetek különböző sejttípusaiban eltérő lehet ugyanazon génről keletkező elsődleges transzkriptum szekvenciája, illetve annak érési folyamata. A transzkriptum 5' kezdeti szakasza szövetspecifikus módon különbözhet az ún. alternatív promoterhez kötődő transzkripciós faktorok által felismert *alternatív transzkripciós start hely* használatával. Ilyenkor az első exon szekvenciája más lesz, sokszor egy-két exonnal rövidül/hosszabbodik a mRNS. Jelenlegi becslések szerint a humán gének felénél található kettő vagy annál több alternatív promoter a gén 5'-régiójában (egy extrém példát említve, az UDP-glukuronozil-transzferázt kódoló UGT1A1 génnek 13 alternatív promotere van). Az alternatív promotert követő exon 3'-vége után mindig megtalálható a splice donor GU szekvencia (az intronban ez az



I/9-4. ábra

RNS-módosulatok alternatív kivágás és RNS-szerkesztés révén. A világos téglalapok minden transzkriptumban megjelenő exonokat jeleznek, a kék téglalapok alternatív vagy megváltozott szekvenciájú exonokat jelölnek. A barna téglalapok a transzkriptumban bennmaradt intronrészeket jelképezik. A kis piros téglalapok kivágást csendesítő, a sárgák pedig kivágást erősítő cisz-elemeket jelölnek. Az intronok 5'-részén található splice donor GU és 3'-végén levő splice akceptor AG szekvenciák láthatók a fontosabb részeken

5' splice hely), azonban az exon előtti részen nem található meg a kivágást irányító AG szekvencia (az intron 3' splice helye). Így az intron kivágó mechanizmus akárhány alternatív exont ki tud vágni, és csak a következő exon előtti splice akceptor AG szekvenciánál ragasztja össze az exonokat az érett mRNS-ben *(I/9-4. ábra)*. Az alternatív promoter *szövetspecifikus regulációs elemek*et tartalmazhat, például a PKLR génről átíródó piruvát-kináz májban (L = liver) és vörösvértestben (R = reticulocyte) található izoformájánál. Az alternatívan átíródó exon pedig olyan specifikus fehérje részt kódolhat, ami különböző szubcelluláris elhelyezkedést tesz lehetővé, mint például a katekol-O-metiltranszferáz (COMT) enzim membrán-kötött és szolubilis izoformái.

Alternatív splicing

Az elsődleges transzkriptum módosítása a sejtmagban sokszor a gén átíródással egy időben zajlik. Az intron kivágó komplex (spliceosome, lásd eukarióta mRNS érése) az éretlen (heteronukleáris) mRNS-en kezd el dolgozni. Az alternatív intron kivágás (alternative splicing) emberben az intront tartalmazó gének 90–95%- ánál megfigyelhető. Szervezetünk legbonyolultabb szabályozását igénylő szervében, az agy szövetében ez nagyon elterjedt jelenség. Leggyakoribb formája az exon kihagyás (skipping), amikor a kivágó komplex nem érzékeli az exon előtti és mögötti hasítási helyeket, így az exont a környező intronokkal együtt kivágja. Hasonló mechanizmussal néha egy-egy intron marad az érett mRNS-ben, ha nem erős a hasítási szignál az intron elején és végén. A kivágó komplex szekvencia-felismerésénél versengés is létrejöhet, ha az exon előtti vagy mögötti régióban több hasítási szignál (splice akceptor AG illetve splice donor GU szekvencia) található. Ilyenkor versengő 3', illetve 5' hasítási helyről beszélünk *(I/9-4. ábra)*. A *kivágást szabályozó cisz-ele-*

mek a környező intronokban vagy az exonban található szekvenciák (kivágást erősítő = splicing enhancer, kivágást csendesítő = splicing silencer). Ezekhez a szekvenciákhoz kötődnek *transz-regulációs elemek*, úgy mint a szerin-arginin (SR) fehérjék, amik erősítik a kivágó komplex kötődését, illetve a heterogén nukleáris ribonukleoproteinek (hnRNP), amelyek gyengítik ezt a kötődést.

Az *alternatív exonok* kódolhatnak olyan *szövetspecifikus fehérjerészek*et, amik különböző hormonális vagy allosztérikus szabályozáshoz szükségesek, illetve eltérő szubcelluláris elhelyezkedést tesznek lehetővé (membrán-kötött és szolubilis izoformák). Ha a transzkriptum 3' UTR része változik meg, az a mikroRNS-ek általi szabályozást (lásd alább) tudja szövetspecifikusan befolyásolni. A bennmaradó intronok vagy intron-szakaszok (amik a versengő hasítási helyeknél való vágás során jönnek létre, lásd *I/9-4. ábra*) kereteltolódás (frameshift) miatt gyakran korai stop kodont eredményeznek. Ezáltal *értelmetlen (nonszensz) mRNS* keletkezik, ami nem íródik át fehérjére, hanem lebomlik az ún. nonszensz-közvetített bomlás (NMD: nonsense-mediated decay) mechanizmusa által a citoplazmába való kikerülése után. Az NMD-hez való irányításban a mRNS stop kodon utáni részén rajtamaradt fehérjék felelősek, amiket nem távolít el a riboszóma az első transzlációs körben. Ezek a fehérjék az exonok összeillesztését jelzik (EJC: exon junction complex), még a sejtmagban, az intron kivágás során kerülnek a mRNS-re, és a mRNS transzportjában fontos szerepet töltenek be. Az értelmes mRNS transzlációja során, amikor a riboszóma a mRNS teljes hosszán végighalad, eltávolítódnak az EJC fehérjék a mRNS-ről, és a lecsupaszított mRNS-hez újabb riboszóma tud kötődni. Azonban az EJC fehérjékkel borított mRNS-t a sejt eltávolítja, hogy ne képződjön csonka, nem funkcionáló fehérje. Ilyen módon az alternatív kivágással létrejött nonszensz mRNS-ek végső soron az értelmes mRNS-ek mennyiségét, és a fehérje képződés hatékonyságát csökkentik.

RNS szerkesztés

Másik fontos poszt-transzkripciós módosítás az RNS szerkesztés (editálás), mely szintén még a sejtmagban, az éretlen mRNS-en következhet be. Emberben a leggyakoribb formája a *dezaminálás (I/9.4. ábra)*, amelynek során *adenozin-inozin* (A-I) vagy *citidin-uridin* (C-U) módosulás következik be. Ha a módosult bázis a kodon első vagy második pozíciójában van, akkor az aminosav-cserét eredményezhet, megváltoztatva ezzel a fehérje minőségét. Az *A-I szerkesztés*t a kettős szálú RNS-en ható *adenozin- dezamináz* (ADAR: adenosine deaminase acting on RNA) enzimek végzik. Ilyenkor a keletkező inozint a kodont leolvasó mechanizmus guanozinként érzékeli, így a fehérjében gyakran glutamin-arginin csere jön létre (CAG kodon CIG=CGG kodonra való változása miatt). Ez a szabályozási folyamat az agy neuronjaiban tölt be fontos moduláló szerepet. Például az ioncsatorna típusú AMPA glutamátreceptor egyik alegységének transzmembrán régiójában egy glutamin-arginin csere megszünteti a csatorna átjárhatóságát kalciumionokra nézve. A *C-U szerkesztés*t a *citidin-dezamináz*ok végzik. Jellegzetes példa erre a bélben az apolipoproteint kódoló APOB génről keletkező mRNS szerkesztése, amely CAA (Gln) helyett UAA stop kodont eredményez, így egy rövidebb (2152 aminosavat tartalmazó) apoB-48 fehérje keletkezik (ennek hossza a teljes hosszúságú fehérje hosszának közel 48%-a, innen származik az elnevezés). Májban az apoB-mRNS teljes hosszában átíródik és a 4536 aminosav hosszúságú apoB-100 fehérje keletkezik. Érdekes együttese a két RNS módosításnak amikor RNS szerkesztés során megváltozik az intron kivágását meghatározó szignál és létrejön például egy splice akceptor hely (AA dinukeotidból AI=AG keletkezik, lásd versengő 3' hasítási hely keletkezése az *I/9-4. ábrán*).

I/9.5. AZ EUKARIÓTA mRNS STABILITÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSA

A mRNS lebomlásának tényezői

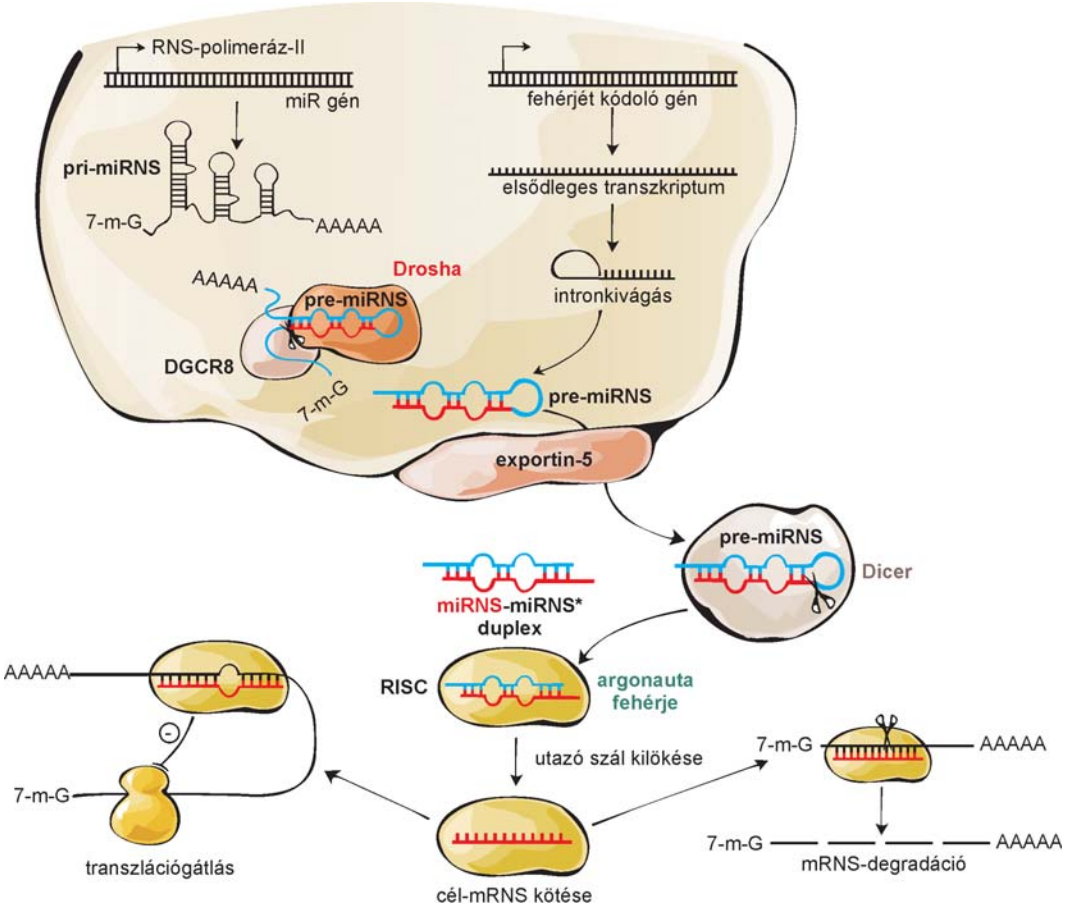
Eukariótákban a transzlációs mechanizmus elkülönülése a transzkripciós helytől lehetővé teszi a mRNS-ek életidejének többlépéses szabályozását. Az átírt mRNS-ek először is átesnek egyfajta minőség ellenőrzésen a sejtmagból való kijutásuk előtt. A nem megfelelően átírt illetve processzált mRNS-t az 5'-sapka eltávolítása után az exoribonukleáz aktivitású *exoszóma komplex* bontja le. Az érett mRNS-ek aktív transzporttal jutnak ki a citoplazmába (lásd RNS-ek nukleáris exportja). Ebben a transzportban kritikus fontosságúak a mRNS-hez kötődött fehérjék, amelyek az 5' sapkát, a poliA farkat, illetve az exon-exon kapcsolódásokat borítják. Az exon-exon kapcsolódást borító EJC fehérjék eltávolításának szerepéről már említést tettünk (lásd előző fejezet). Az 5'-sapkához és a poliA-farokhoz kötődő fehérjék a mRNS stabilitásának megőrzésében fontosak. Ezek a fehérjék védik a mRNS-t a sapka-eltávolító (decapping), illetve a citoszolban található exoszóma komplexekkel szemben, amelyek végül a mRNS lebontását végzik. Az eukarióta mRNS-ek féléletideje – funkciójuktól függően – eléggé változó, percek-órák nagyságrendben mozog, ritka esetben lehet csak egy-két nap hosszúságú.

Specifikus esetekben külső faktorok szabályozhatják a mRNS stabilitását a transzkripciós faktorokhoz hasonló mechanizmussal. Ilyenkor a mRNS 5' vagy 3' nem-kódoló régiójában létrejövő kettős szálú RNS struktúrák köthetnek szabályozó fehérjéket. Például alacsony intracelluláris vasion-koncentráció esetén a transzferrin-receptor mRNS-ének 3'UTR-része egy stabilizáló fehérjét köt, így transzkripció fokozás nélkül növekszik a receptor képződése. A ferritin vasraktározó fehérje mRNS-ének 5'UTR-régiójához kötődő ugyanezen fehérje viszont csökkent ferritin-szintet eredményez azáltal, hogy gátolja a riboszóma működését. A vashiányra tehát logikus válaszreakciót kapunk: a sejt próbál több vasat felvenni a receptor mennyiségének fokozásával, a tároló fehérjére viszont átmenetileg nincs szükség, így annak a szintézise leáll.

A mikroRNS szabályozási mechanizmusa

Az elmúlt évek kutatásai során tárult fel a kis nem-kódoló RNS-ek, azon belül is főleg a mikroRNS-ek (miRNS-ek) szabályozó mechanizmusa. A miRNS-ek olyan 20–24 nukleotidból álló egyszálú RNS-ek, amelyek döntően a transzláció szintjén szabályozzák a génexpressziót az argonauta (más néven eukarióta transzláció iniciációs faktor 2C = eIF2C) fehérjék segítségével. Mivel a miRNS-ek gátló hatása leggyakrabban *a fehérjeszintézis csökkenés*ével jár, ezt a folyamatot *átíródás utáni géncsendesítés*nek (post-transcriptional silencing) nevezzük. Ez a szabályozási típus elég elterjedt a növény- és állatvilágban. Emberben eddig több mint ezer miRNS-szekvenciát írtak le, amelyek a fehérjét kódoló gének 30–40%-át tudják szabályozni.

A miRNS-eket kódoló DNS-szakaszok lehetnek önálló miRNS gének, amelyek legtöbbször csoportosan fordulnak elő a genomban. Sokszor egy promoter régió mögött több miRNS szekvenciája is megtalálható. Érdekes azonban, hogy a miRNS-ek közel felének (kb. 40%-ának) a DNS szekvenciája fehérjét kódoló gének intronikus régiójában helyezkedik el, amely az intronok kivágása során nyer önálló életet *(I/9-5. ábra)*. Fontos azonban megjegyezni, hogy a cél (target) fehérje, aminek transzlációját az adott a miRNS gátolja, és az a fehérje, melynek génjében a miRNS



I/9-5. ábra

miRNS képződése és hatásmechanizmusa. Az elsődleges transzkriptum érésekor keletkező 5'-sapkát a 7-m-G (7-metil-guanozin) jelzi, a poliA farkot pedig az AAAAA szekvencia jelképezi

kódolva van (a vendéglátó = host gén), nem azonos. Az önálló miRNS gének elsődleges transzkriptumát legtöbbször az RNS-polimeráz-II készíti el – a fehérje kódoló gének átírásához hasonlóan – sőt, az 5'-sapka és a poliA-farok is elkészül. Erre az ún. *primer miRNS (pri-miRNS)* közti termékre jellemzőek a hajtű-szerkezetek, melyek megfelelnek a kettős szálú RNS kritériumának. Így a *Drosha* nevű, kettős szálú RNS-re specifikus endoribonukleáz hozzákapcsolódik, és levágja a kettős szálú RNS-régión túllógó szekvenciákat, beleértve az 5'-sapkát és 3'-poliA-farkat is. Ha az elsődleges transzkriptum több hajtű-szerkezetet tartalmaz, akkor többféle *pre-miRNS* fog képződni (ez a miRNS képződésének második közti terméke, kb. 70 nukleotid hosszúságú RNS molekula).

A pre-miRNS-ek az exportin-5 segítségével jutnak ki a citoszolba, melyhez Ran GTP-áz szolgáltatja az energiát. Itt a további hasítást a *Dicer* nevű enzim végzi, amely a Drosha-hoz hasonlóan szintén egy endoribonukleáz, de van egy RNS helikáz aktivitású doménje is. Az érési folyamat végén a kivágott kettős szálú RNS *argonauta (eIF2C) fehérjék*hez kötődik, létrehozva a Dicer-rel és más specifikus RNS

kötő fehérjékkel az ún. *RISC komplex*et (RNA-induced silencing complex). A komplex RNS helikáz aktivitású tagja szétválasztja a miRNS-miRNS* duplexet és kétféle miRNS-tag keletkezik, amelyből az antiszensz szálat *-gal jelölik. Általában csak az egyik miRNS szál fog az argonauta fehérjéhez kötve maradni, a másik, kevésbé stabil, ún. utazó miRNS szál kilökődik és lebomlik. A RISC komplex részévé vált miRNS 20-25 nukleotid hosszúságú, és hozzákapcsolódik a cél (target) mRNS-hez, legtöbbször annak a 3'UTR részéhez.

A miRNS és a mRNS kapcsolódása a komplementaritás elve alapján történik. Ehhez általában elég egy rövid (6-8 nukleotid hosszúságú) szakasz komplementaritása, mely lehetővé teszi azt, hogy egyfajta miRNS többféle mRNS-t tudjon szabályozni. A miRNS 5' végén található a mRNS szekvenciájával szigorúan komplementer, ún. mag (seed) régió. A leginkább hatékonynak tűnő miRNS-mRNS kapcsolódás a mRNS 3'UTR-ben van, a stop kodontól legalább 15 nukleotid távolságban. Feltehetően a RISC komplex kapcsolódását itt már nem zavarják a mRNS-en dolgozó riboszómák. Mivel a mRNS 3' UTR-je több száz nukleotid hosszú lehet, többféle miRNS tud kötődni a mRNS 3' szabályozó régiójához. A mRNS-hez való két vagy többféle miRNS kapcsolódása sokszor szinergista hatású, azaz a transzláció gátlás erősségét növeli.

A miRNS kutatások egyik érdekes kérdése, hogy milyen szabályozás alatt áll a miRNS képződés? Hasonlóan a fehérjét kódoló gének átíródásához, specifikus transzkripciós faktorok tudják az önálló miRNS gének transzkripcióját befolyásolni. Az intronból kivágódó miRNS-ek szabályozása pedig a vendéglátó (host) gén transzkripciós szabályozása alatt áll. Ezen kívül a miRNS-ek, illetve a prekurzor pri- és pre-miRNS-ek stabilitását többféle poszttranszkripciós folyamat befolyásolhatja. Például a pri-miRNS-ek egy része (kb. 10%-a) RNS-szerkesztés során megváltozhat még a sejtmagban. Az ADAR által katalizált A-I szekvencia módosítás (lásd előző fejezet) megváltoztathatja a mag (seed) régiót, így a csendesítendő mRNS populációt (minőségi változás). Gyakoribb jelenség azonban az, hogy az átalakított pri-miRNS rosszabb szubsztrátja lesz a Droshanak, így a miRNS képződés hatékonysága csökken le (mennyiségi változás).

I/10.
A genetikai kód és a fehérjeszintézis

Mészáros Tamás

A genetikai kód

A fehérjék elsődleges szerkezetére, azaz aminosav szekvenciájára vonatkozó információ bizonyos vírusoktól eltekintve DNS-ben tárolódik. A fehérjék alapvetően huszonegyféle aminosavból épülnek fel, a DNS-t alkotó négy nukleotidnak azonban csak húsz aminosavat kell leírnia, mivel a huszonegyedikként számon tartott szelenociszteinnek nincs saját genetikai kódja. Ahhoz, hogy a négyféle nukleotiddal húsz aminosav leírható legyen, a genetikai kódnak minimálisan három betűsnek kell lennie. A három betűs kód $4^3 = 64$ variációt tesz lehetővé, és mivel minden kombinációnak van jelentése, a genetikai kód degenerált (redundáns), egy adott aminosavat, illetve a transzláció végét jelző stop jelet többféle nukleotid triplet, ún. kodon is leírhat *(I/10-1. táblázat)*. A genetikai kód ugyanakkor generalizált (univerzális) is, néhány ritka kivételtől eltekintve az egész élővilágra érvényes. Az egy meghatározott aminosavat jelentő kodonok száma változó, míg a fehérjékben legritkábban előforduló metioninnak és triptofánnak mindössze egy kodonja van, addig több olyan aminosavat is találhatunk, amelyek hat kodonnal rendelkeznek.

1. táblázat
Aminosav kodon táblázat

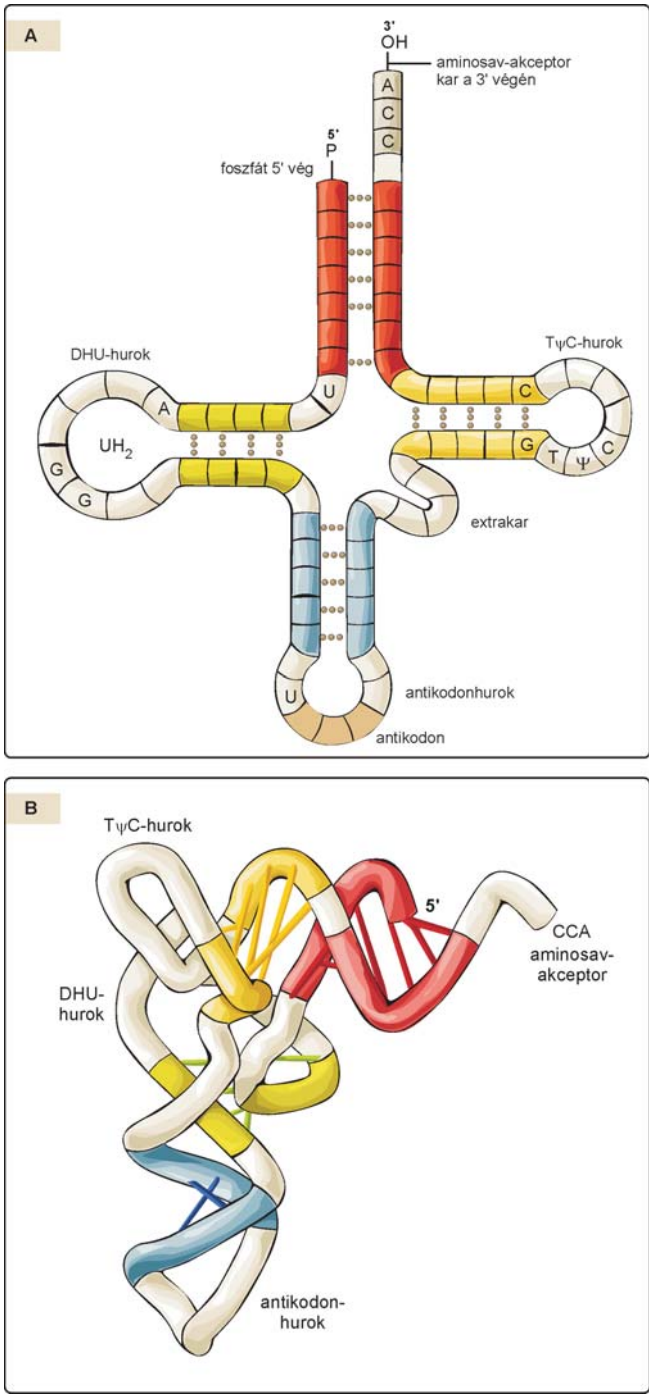
Első nukleotid	Második nukleotid: U – kodon	U – aminosav	C – kodon	C – aminosav	A – kodon	A – aminosav	G – kodon	G – aminosav	Harmadik nukleotid
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP	A
	UUG		UCG		UAG	STOP	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	CGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		CGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	CGA		A
	GUG		GCG		GAC		CGG		G

A kodonok ismeretében és annak tudatában, hogy az mRNS olvasása 5'-3' irányú, a fehérjék polipeptidláncainak aminosav-sorrendje a nukleinsav szekvenciából a nyílt olvasási kerettel (open reading frame, ORF) megadható. ORF alatt egy, a transzláció start jeleként szolgáló, metionint kódoló ATG és egy stop kodon között terjedő, nukleotid tripletekből álló szekvencia régió értendő az mRNS-ben. Az olvasási keretben az egyes kodonok közvetlenül követik egymást és nem fednek át. A korábban ismertetésre került mRNS szintézis sajátosságainak megfelelően a prokarióták esetében az ORF közvetlenül a genomi DNS-ből, míg eukariótáknál csak az érett, intronokat nem tartalmazó mRNS-nek megfelelő szekvenciájából határozható meg.

A fehérjeszintézis adaptorai, tRNS-ek

A transzkripció során keletkező mRNS-ben lévő kodonokat nem ismerik fel az aminosavak, azaz a genetikai kód nem fordítható közvetlenül fehérjére. A probléma áthidalásának közreműködői a transzfer RNS (tRNS) molekulák, melyek egyrészt az mRNS kodonjához kapcsolódnak antikodonjukon keresztül, másrészt kovalensen kötve hordozzák a kodonnak megfelelő aminosavat.

A tRNS-ek transzkripciójukat követően nyerik el végleges formájukat, melynek során bizonyos részeik kihasadnak, számos nukleotidjuk módosul, a 3' végükre pedig egy-



I/10-1. ábra

A tRNS másodlagos (A), illetve harmadlagos szerkezete (B). Az egyes hurkok a bennük elhelyezkedő módosított nukleotidok alapján kerültek elnevezésre, úgymint dihidroxi-uridin (DHU) és pszeudouridin (ψ)

ségesen a CCA triplet kerül. Az érett tRNS mintegy 80 bázis hosszúságú, sajátos térbeli szerkezettel rendelkező molekula. A sematikus szerkezeti ábrázoláson látható, hogy a tRNS bázispárosodásokon keresztül 3 nagy és egy kis hurkot hoz létre, így egy lóherére emlékeztető alakzat jön létre. A molekula térbeli szerkezete azonban ettől eltérően egy olyan L betű, amelynek egyik végén az antikodon hurok, másik végén pedig a CCA triplethez kapcsolva az aminosav helyezkedik el *(I/10-1. ábra)*. Ez a szerkezet lehetővé teszi, hogy a tRNS parányi rugóként működve megfelelően pozícionálja az aminosavakat a fehérjeszintézis során.

A mRNS-RNS kodon-antikodon bázispárosodása alapján várható lenne, hogy minden kodonhoz tartozik egy azzal komplementer tRNS. Az élőlényekben azonban a 64 kodonhoz csak jóval kevesebb, például emberben mindössze 48 különböző tRNS társul. Az ellentmondás magyarázata az ún. lötyögő bázispárosodás jelenség, azaz bizonyos tRNS molekulák abban az esetben is kapcsolódni tudnak az mRNS-hez, ha csak a kodon első két nukleotidja komplementer az antikodon bázisaival.

A genetikai kód értelmezése, aminoacil-tRNS-szintetázok

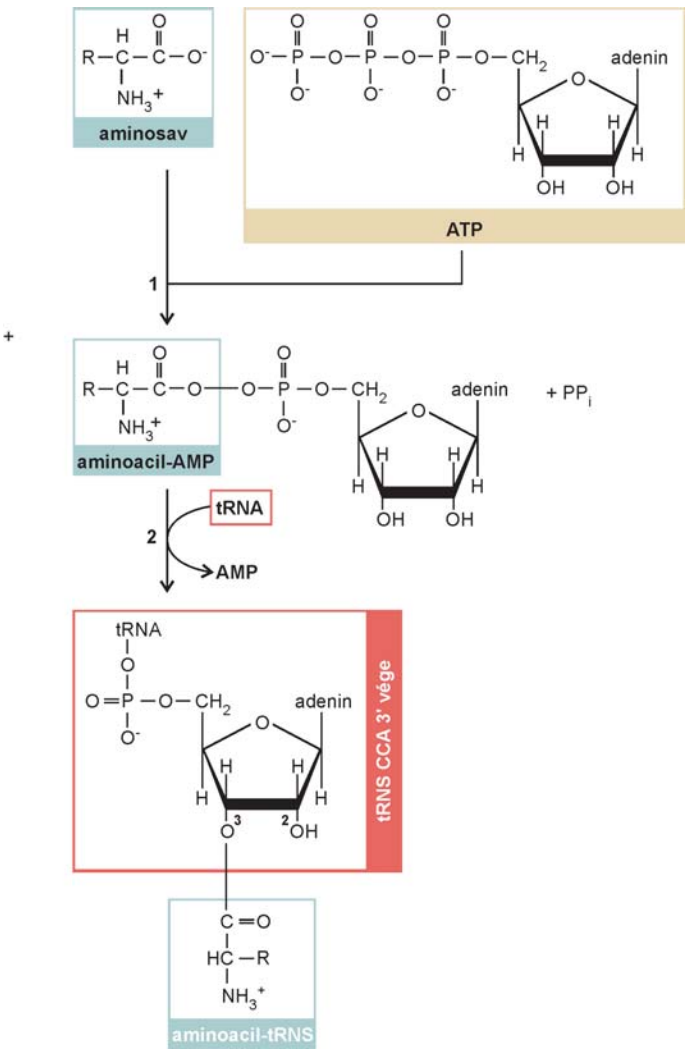
A fehérjeszintézis több lépésből álló, sok komponens részvételével lezajló folyamat, a szó szoros értelmében vett transzláció, azaz a nukleinsav kód aminosavra történő fordítása még a tulajdonképpeni fehérjeszintézist megelőzően, az aminosavak aktiválása során megtörténik.

A genetikai kód értelmezéséért a kettős funkcióval rendelkező aminoacil-tRNS-szintetáz (ARS) enzimek felelősek. Az enzimcsalád tagjai ATP terhére a tRNS 3' végén található ribóz kettes vagy hármas szénatomjának hidroxil csoportja és a megfelelő aminosav karboxilcsoportja között egy észterkötést hoznak létre. A reakció két lépésben, aminoacil-AMP intermedieren keresztül valósul meg *(I/10-2. ábra)*. Az aminoacil–tRNS komplex kialakulása tulajdonképpen az aminosav aktivációjának tekinthető, mivel a létrejött észterkötés fedezni tudja a fehérjeszintézishez elengedhetetlen peptidkötések kialakulásának energiaigényét.

Az aminoacil-tRNS komplex az aminosav komponensétől függetlenül, a Watson– Crick-bázispárosodás szabályainak engedelmeskedve, az mRNS kodonjának megfelelő antikodonnal rendelkező tRNS-t szállítja a fehérjeszintézis helyszínére. Mindezek következtében az, hogy milyen aminosav épül be, a tRNS-aminosav komplex kialakulása során dől el, így az aminoacil-tRNS szintetázok azon túl, hogy aktiválják az aminosavakat, a nukleinsav kód értelmezéséért is felelősek. A 20 aminosavnak megfelelően a legtöbb organizmusban 20 féle aminoacil-tRNS szintetáz fordul elő. Ezek az élővilág legspecifikusabb enzimei közé tartoznak.Kézenfekvőnek tűnhet az a feltételezés, hogy az ARS-ek az antikodonjuk alapján ismerik fel az egyes tRNS-eket, majd hozzák létre a megfelelő aminoacil-tRNS-eket. A valóság azonban ennél összetettebb, habár az enzim család tagjainak többsége az antikodonnal is kapcsolatba lép a tRNS-ek felismerése során, számos képviselőjüknél az antikodonnak nincs szerepe a folyamatban, a tRNS egyéb szekvencia elemei szükségesek az azonosításukhoz.

Az aminoacil-tRNS szintetázok számára a megfelelő tRNS kiválasztása egyszerű, hiszen a hosszú tRNS molekulák nukleotid-sorrendje eltérő. Nehezebb feladat a kicsiny aminosav molekulák közül a megfelelő felismerése (például a valin és az izoleucin megkülönböztetése). Az aminoacil-tRNS szintetázok többsége az aktivációs domén mellett vágó doménnel is rendelkezik, így a képződött aminoacil-tRNS-ek döntő része minőségellenőrzésen is átesik. Ez a folyamat biztosítja a megfelelő komplexek képződését, a helytelen aminosav–tRNS párok között keletkezett

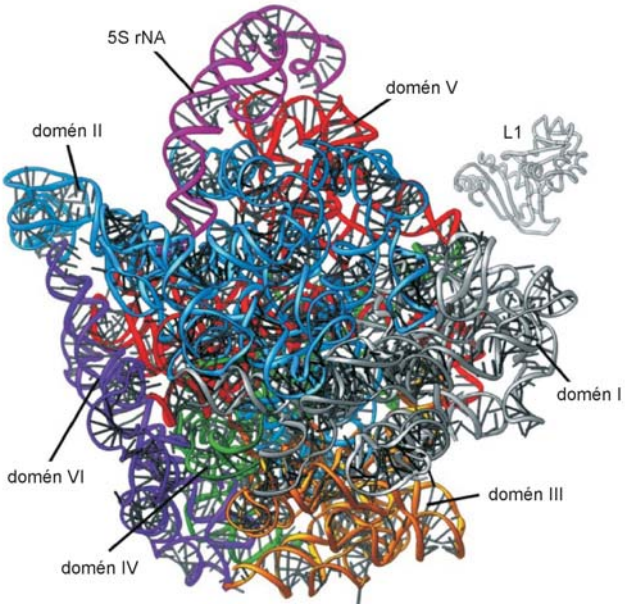
észterkötések hidrolízisét. Az ellenőrzés analóg a DNS polimeráznál látottakkal, a nem megfelelő aminosavval töltött tRNS az aminoacil-tRNS szintetáz vágó doménjébe kerül, ahol az aminoacil-tRNS kötés elhasad. A tRNS a kötés hidrolízise közben és azt követően is az aminoacil-tRNS szintetázhoz kötve marad, így az aminosavcsere gyorsan, viszonylag kis energia befektetéssel mehet végbe. Mindezen mechanizmusok ellenére az aminoacil-tRNS szintetázok a DNS-polimerázzal összevetve nagyobb hibaaránnyal dolgoznak, kb. minden 40000-ik tRNS-hez nem megfelelő aminosav kapcsolódik. Könnyen belátható, hogy egy-egy helytelen fehérje keletkezése nem jár olyan drámai következményekkel, mint az örökítő anyag megváltozása, a hibás fehérjéket a sejtek degradálhatják. Mivel a szigorúbb ellenőrzés nagymértékben fékezné a fehérjeszintézis folyamatát, ez a mértékű pontatlanság tekinthető a hatékonyság érdekében született kompromisszumnak.



I/10-2. ábra
Az aminoacil-tRNS szintetáz által katalizált reakció

A fehérjeszintézis helyszíne, riboszóma

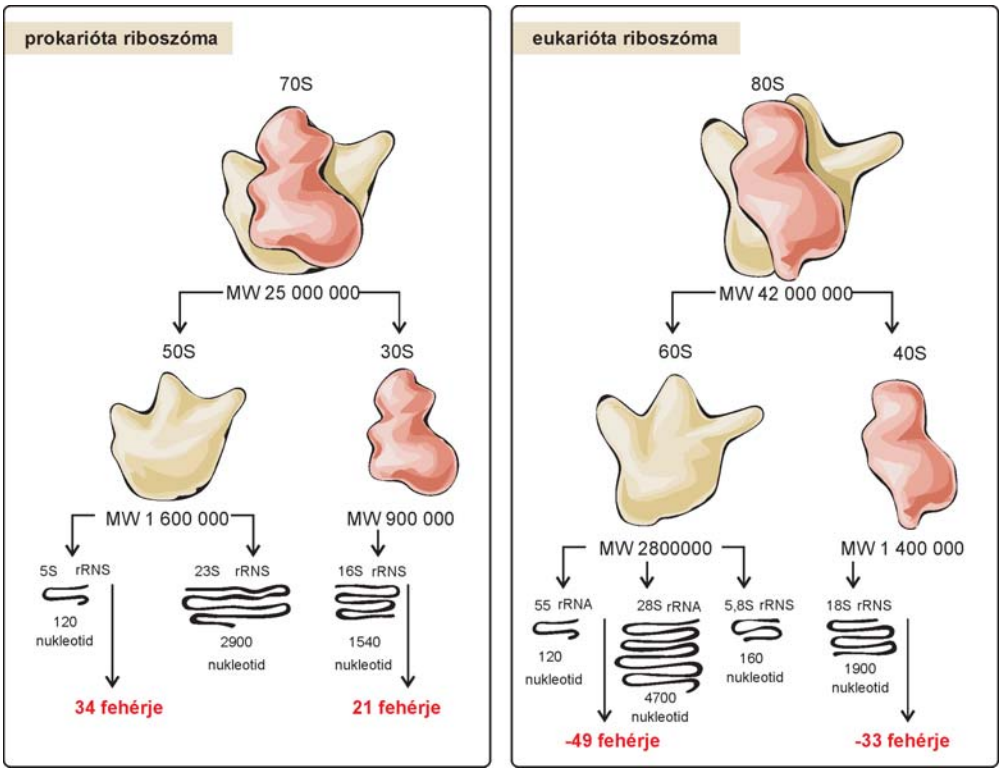
Az aminoacil-tRNS-ekből kiinduló fehérjeszintézist hatalmas, elektronmikroszkóppal már jól látható ribonukleoprotein komplexek, az ún. riboszómák koordinálják. Egy adott sejtben több millió riboszóma is lehet, így akár a sejt tömegének negyedét is adhatják ezek az organellumok. A riboszómák a sejtmagvacskában több, mint 50 fehérjéből és számos rRNS-ből állnak össze, és azt követően a sejtmagpórusokon keresztül kijutnak a citoplazmába. Érdekes megfigyelés, hogy a riboszómák rendkívüli összetettségük ellenére alkotórészeik jelenlétében önmaguktól, in vitro körülmények között is kialakítják megfelelő szerkezetüket. A riboszómákat, illetve az azokat alkotó rRNS-eket az ultracentrifugálás során mért szedimentációs fak-



I/10-3. ábra
A bakteriális riboszóma nagy alegységének RNS szerkezete

toruk, így áttételesen a tömegük alapján osztályozzuk. A szedimentációs koefficiens mértékegysége a Svedberg (S).

A prokarióta és eukarióta riboszómák felépítésükben és működési mechanizmusukban is rendkívül sok hasonlóságot mutatnak. Az alapvázat mindkét esetben a riboszóma tömegének mintegy 2/3-át adó rRNS-ekből kialakuló különlegesen komplex szerkezet adja, és ehhez a vázhoz kapcsolódnak a fehérje komponensek *(I/10-3. ábra)*. A riboszómák minden élőlényben két alegységből, az ún. kis és nagy alegységből állnak, és működési mechanizmusuk is megegyezik, de alkotóelemeik és méretük prokariótákban és eukariótákban eltérő *(I/10-4. ábra)*.



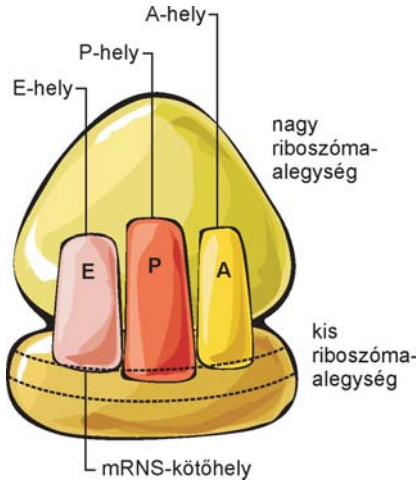
I/10-4. ábra
A prokarióta és eukarióta riboszóma alkotóelemei

A prokarióták kis és nagy alegységei 30S, illetve 50S nagyságúak, míg ezek az értékek eukariótákban 40, illetve 60S. Az inaktív alegységek elkülönülten találhatóak a citoplazmában, a funkcionális, két alegységből álló prokarióta 70S, illetve eukarióta 80S méretű riboszómák szigorúan a fehérjeszintézis időtartamára alakulnak ki. A jelentéktelennek tűnő eltéréseknek orvosi szempontból óriási jelentősége van, mivel számos antibiotikum szelektíven gátolja a prokarióták riboszómáit. A fehérjeszintézist gátló antibiotikumok hatásukat változatos mechanizmusokkal fejtik ki, így például a tetraciklin az aminoacil-tRNS kötődését akadályozza, a sztreptomicin gátolja az elongáció kezdetét, a klóramfenikol a peptidkötés kialakulását blokkolja, míg az eritromicin a riboszóma tRNS kilépő helyéhez kapcsolódik. A prokariótákra szelektív antibiotikumok mellett olyanok is ismertek, amelyek minden élőlényben gátolják a transzlációt (puromicin), illetve amelyek csak az eukarióta riboszómán fejtik ki hatásukat (cikloheximid). Ezen utóbbi antibiotikumok a kutatás fontos eszközei.

Transzláció, a peptidlánc kialakulása

A korábbiakban jeleztük, hogy a szó szerinti értelemben vett transzlációért az ARS enzimek felelősek, ennek ellenére a tudományos nyelvezet az aminoacil-tRNS-ekből történő polipeptid szintézist ismeri transzláció néven. A folyamatot három fázisra oszthatjuk, úm. iniciáció, elongáció és termináció. Az utóbbi kettő nagy hasonlóságot mutat prokariótákban és eukariótákban, így azok együtt kerülnek bemutatásra, míg az iniciáció jellegzetességeit külön-külön tárgyaljuk.

A transzláció mechanizmusának megértéséhez először a riboszóma funkcionális felépítését kell bemutatnunk. A riboszóma kis alegységéhez kapcsolódik az mRNS, míg a nagy alegységben alakulnak ki a peptidkötések. Ennek fényében jól értelmezhető a tRNS L alakú szerkezetének jelentősége. Ez a sajátságos forma teszi lehetővé, hogy a tRNS az antikodon hurokkal kapcsolódjon a riboszóma kis alegységében lokalizált mRNS-sel, a nagy alegységben kialakuló peptidkötésekhez pedig biztosítsa a CCA triplethez kapcsolt aminosavat. A tRNS a kodon-antikodon bázispárosodás mellett a riboszóma meghatározott helyeivel is kapcsolatba lép. Ebből a szempontból három, mindkét alegységén átívelő helyet különböztetünk meg a riboszómán: A (aminoacil-tRNS), P (peptidil-tRNS) és E (exit) hely *(I/10-5. ábra)*. A transzláció során a három hely közül mindig csak kettő töltött tRNS-sel. Mai ismereteink alapján a riboszóma közvetlenül nem vesz részt a peptidkötés létrejöttének katalízisében, csak a kötés kialakításában résztvevő csoportok megfelelő orientációját biztosítja.

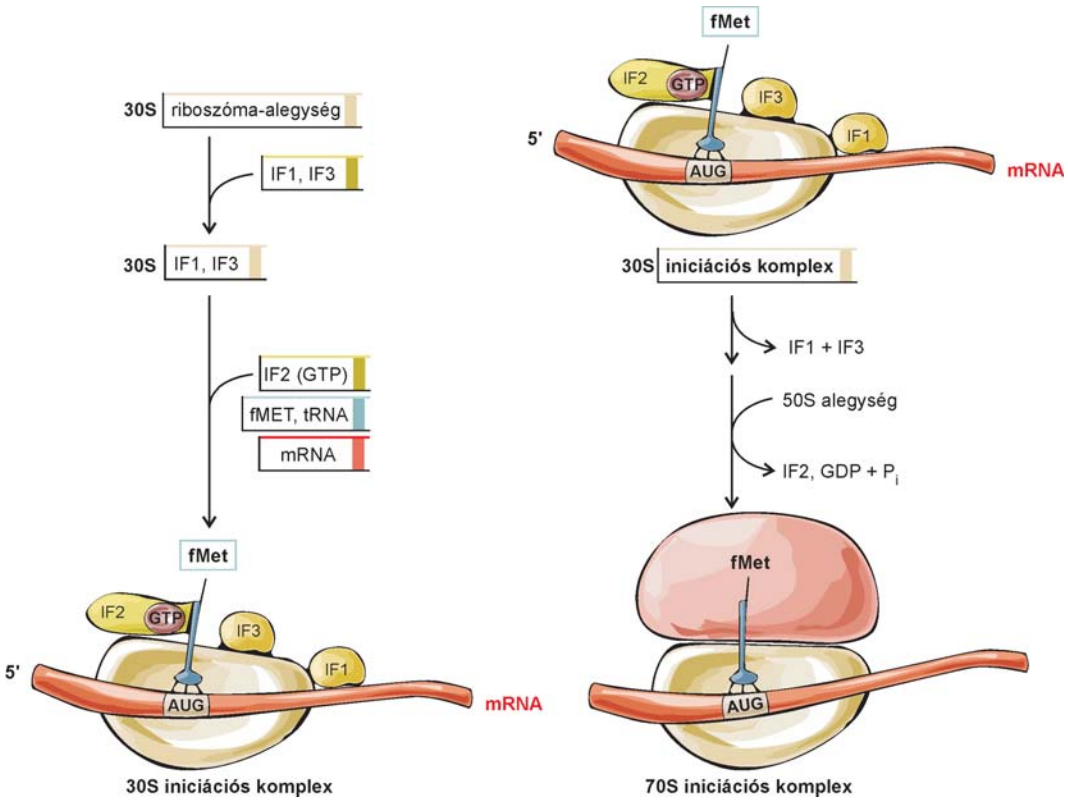


I/10-5. ábra
A riboszóma funkcionális szerkezete

Amint a korábbi fejezetben már láthattuk, a prokarióta és eukarióta mRNS-ek számos tekintetben eltérnek egymástól, és ezek a különbségek a transzláció mechanizmusában is megnyilvánulnak. A prokarióta mRNS az esetek döntő részében policisztronos, több transzlációs start és stop kodont tartalmaz, így egy adott mRNS több fehérje transzlációjában is közreműködik. A prokarióta mRNS csak rövid, néhány tíz bázishosszúságú nem transzlálódó (untranslated region, UTR) 3' és 5' vé-

gekkel rendelkezik, és a transzkripciót követően nem módosul. Mindezek következtében a prokarióták sajátos iniciációs mechanizmussal rendelkeznek, és a transzkriptum közvetlenül kapcsolódhat a riboszómához, így egy adott gén átírása és a fehérje szintézise szimultán történhet.

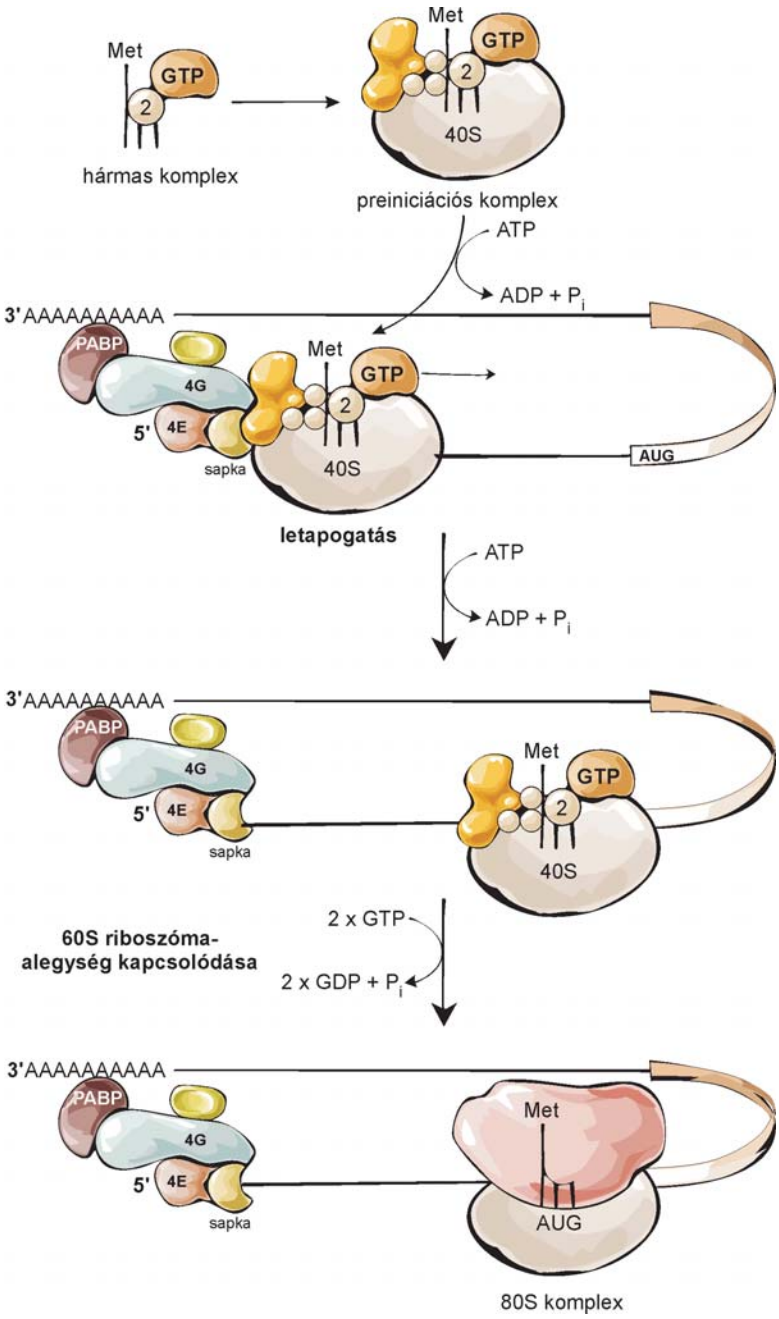
A transzláció során beépülő első aminosav minden élőlény esetében a metionin, prokariótákban azonban ennek egy módosult formája, a formil-metionin (f-Met) indítja a fehérjék szintézisét. A prokarióta transzláció iniciációja nem csak ebben a tekintetben tér el az eukariótáknál megfigyelhető mechanizmustól. A bakteriális mRNS-ben a start kodon előtt néhány bázissal egy purin gazdag szakasz, az ún. Shine-Dalgarno motívum helyezkedik el. Ez a nukleotid szekvencia rész komplementer a riboszóma kis alegységében található 16S rRNS 3' végével, így ezen keresztül az mRNS a megfelelő pozícióban kötődik a riboszóma kis alegységéhez. A policisztronos mRNS-ekben minden start kodont megelőz egy Shine-Dalgarno motívum, így a riboszóma az mRNS belső szakaszain is megkezdheti a fehérjék szintézisét. A transzlációhoz a riboszómán és az aminoacil-tRNS-en kívül számos egyéb fehérje faktorra is szükség van. Ezek közül az iniciációban három játszik szerepet. Az IF1 és IF3 (iniciációs faktor) fehérjék a riboszóma kis alegységéhez kötődnek. Az előbbi megakadályozza a két alegység idő előtti kapcsolódását, az utóbbi a f-Met-tRNS-t a kis alegység P-helyére irányítja. A f-Met-tRNS a GTPáz aktivitással rendelkező IF2 segítségével kapcsolódik a Shine–Dalgarno- motívum közelében lé-



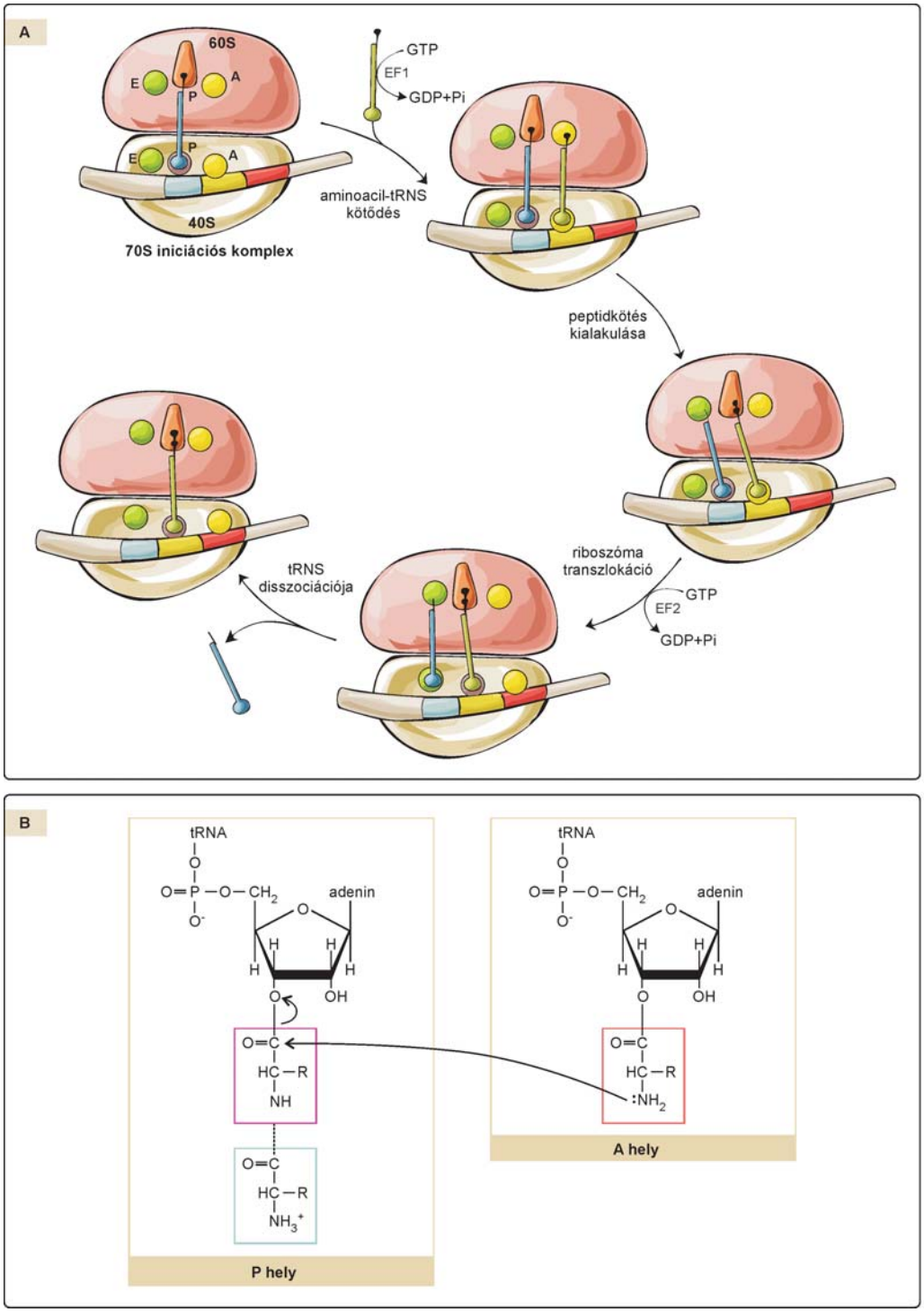
I/10-6. ábra
A prokarióta iniciáció mechanizmusa

vő AUG triplethez. Az iniciációban résztvevő tRNS különbözik a peptidlánc belsejében található metioninok tRNS-étől. Az IF2 csak az előbbivel képes komplexet alkotni, így biztosított, hogy a formil-metionin a megfelelő pozícióba épüljön be. A f-Met-tRNS start kodonhoz kötődését követően mindhárom iniciációs faktor leválik a riboszóma kis alegységéről, és az IF2 hidrolizálja a vele komplexben lévő GTP makroerg kötését, így az GDP-vé alakul. Ezeket a lépéseket követően a két riboszóma alegység kapcsolódását már nem gátolja az IF1, kialakulhat a funkcionális, két alegységből álló 70S riboszóma, és a transzláció az elongáció fázisába léphet *(I/10-6. ábra)*.

Az eukarióta transzláció iniciációja számos ponton eltér és jóval összetettebb a prokariótáknál látottaktól. A folyamatban legkevesebb 11 eIF (eukarióta iniciációs faktor) vesz részt lehetővé téve a transzláció kifinomult szabályozását. Az iniciáció részletes ismertetésétől eltekintünk, csak a főbb jellegzetességei kerülnek bemutatásra. Az eukarióta mRNS sajátosságai, úm. a Shine–Dalgarno-motívum hiánya, az 5'-metil-guanozin-sapka, a 3'-poliA-farok és a hosszú, akár több száz bázisnyi nem transzlálódó régiók (UTR) a transzlációval összefüggésben vizs-



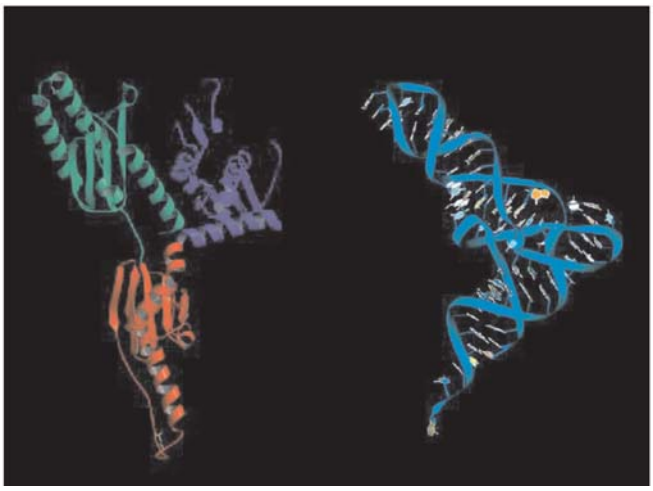
I/10-7. ábra
Az eukarióta transzláció iniciációjának vázlatos mechanizmusa



I/10-8. ábra
A transzláció elongációs fázisának sematikus ábrája (A). A peptidkötés keletkezése (B)

gálva nyernek igazi értelmet. A transzláció első fázisában a riboszóma kis alegysége köti a Met-tRNS-sel komplexet alkotó eIF2 és számos más eIF-t, így létrehozva a 43S preiniciációs komplexet. A preiniciációs komplex az eIF4E és eIF4G fehérjékből összeálló sapka komplexen keresztül kötődik a 7-metil-guanozinhoz, és ezen keresztül az mRNS-hez. Az eIF4G a poliA-kötő fehérjén keresztül a mRNS poliA-farkához is kapcsolódik, így az mRNS tulajdonképpen cirkularizálódik. Ez a mechanizmus lehetővé teszi, hogy csak a mindkét végükön intakt mRNS-ek vehessenek részt a transzlációban. A 7-metil-guanozinhoz való kötődést követően a preiniciációs komplex leválik a sapkakomplexről, és egy RNS helikázként funkcionáló eIF segítségével csúszik az mRNS 3'-vége felé. A preiniciációs komplex az mRNS letapogatása során a start kodonig halad, ott leválnak róla az eIF fehérjék, a GTP hidrolizálódik, és a riboszóma nagy alegységének kapcsolódásával létrejön a 80S funkcionális riboszóma, így a transzlációs apparátus készen áll az elongációra *(I/10-7. ábra)*.

A funkcionális, két alegységből összeállt riboszómák fehérjeszintézise lényegileg megegyezik minden organizmusban, az elongációban részt vevő fehérje faktorok megnevezése azonban eltérő. A továbbiakban az eukariótákban alkalmazott nevezéktannak megfelelően mutatjuk be a folyamatot. Az iniciáció befejeztével a riboszóma mindkét alegységének P helyét f-Met-RNS, ill Met-RNS foglalja el. Az mRNS második kodonjához az aminoacil-tRNS-t a funkcionálisan az eIF2-nek megfelelő EF1 (elongációs faktor-1) szállítja a riboszóma A-helyére. A folyamat az EF1 esetében is egy GTP hidrolízisével jár együtt. Az aminoacil-tRNS A-helyre történő kötődését követően a tRNS szára az aminosavval egyetemben áthajlik, a nagy alegység P-helyére, ahol az észterkötéssel tRNS- hez kapcsolt metionin található. Ez a pozicionálás lehetővé teszi, hogy az A-helyről áthajolt aminosav aminocsoportja megtámadja az észterkötést, és ennek nyomán kialakuljon az első peptidkötés, a másodikként érkezett tRNS-hez kapcsoltan egy dipeptid jöjjön létre. A reakció következtében egyúttal az iniciátor tRNS is megszabadul aminosavától, és a 3'-vége a riboszóma nagy alegységének E-helyére kerül. A riboszómához kötött két tRNS ezen a ponton egy jellegzetes hibrid állapotban van, fele részben a P-, illetve A-, fele részben pedig az E-, illetve P- helyen lokalizálódik. A következő lépésben a riboszóma az EF2 fehérje segítségével, egy újabb GTP makroerg kötését felhasználva egy kodonnyit továbbcsúszik az mRNS-en, és helyreáll az elongáció kezdetén látott állapot. Természetesen ilyenkor a P helyre kötődött tRNS, az ún. peptidil-tRNS már a két aminosavból összeállt dipeptidet hordozza magán, így az újabb A helyre érkező aminoacil-tRNS már egy három aminosavas peptidet fog létrehozni. A ciklus addig ismétlődik, amíg a riboszóma A helye egy stop kodonhoz nem érkezik *(I/10-8. ábra)*.



I/10-9. ábra
Az RF fehérje (balra) és tRNS (jobbra) háromdimenziós szerkezete
(Copyright Garland Science, 2008)

A transzláció végső szakasza, a termináció akkor veszi kezdetét, amikor a riboszóma a 3 stop kodon valamelyikébe ütközik. A folyamat során egy érdekes molekuláris mi-

mikrit figyelhetünk meg. A stop kodonoknak nincs megfelelő tRNS párja, ehelyett egy a tRNS-hez háromdimenziós szerkezetében nagyon hasonló fehérje, az ún. RF (release factor) fehérje kapcsolódik a stop kodonhoz *(I/10-9. ábra)*. Az RF katalizálja a peptidil-tRNS észterkötésének hidrolízisét, így a már teljes aminosav szekvenciát hordozó fehérje kiszabadul, a riboszóma pedig szétesik két alegységére.

A keletkező polipeptidláncok szintézisük során a riboszóma belsejében elhelyezkedő csatornán keresztül hagyják el a riboszómát. A csatorna fala hidrofób és hidrofil foltokkal borított, így a megszülető fehérjék nem lépnek kölcsönhatásba a riboszómával, másodlagos, harmadlagos szerkezetük kialakítása nélkül lépnek ki a riboszómából. Ezen szerkezeti változások a dajkafehérjék közreműködésével következnek be.

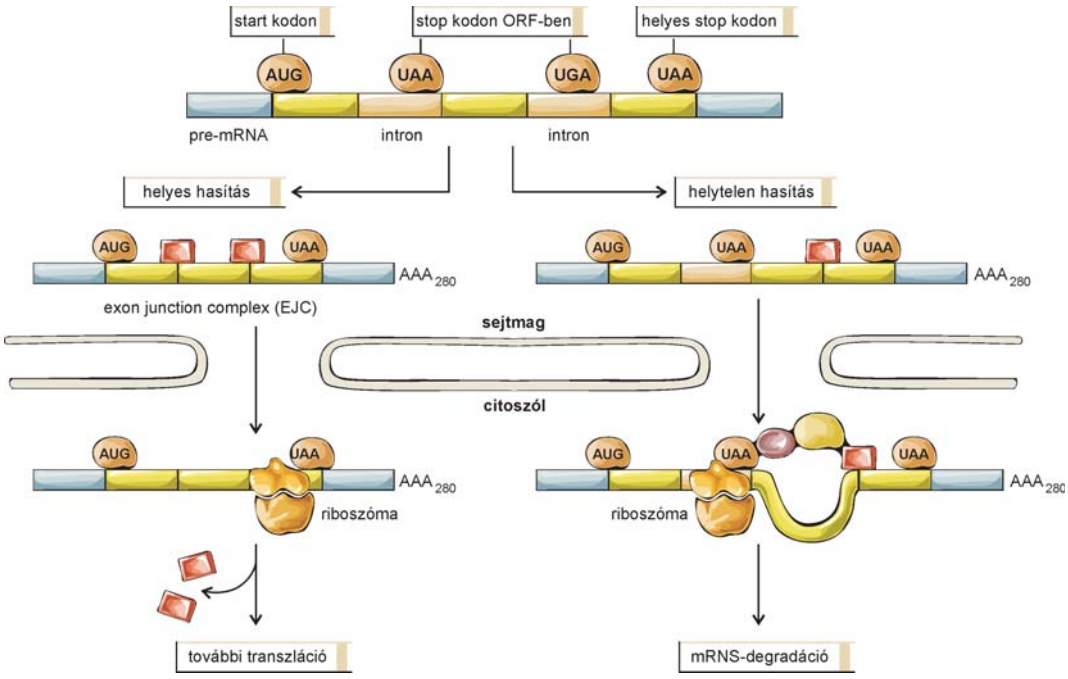
A fehérjeszintézis nagy sebességgel és hatékonysággal végbemenő folyamat, egy prokarióta riboszóma másodpercenként akár 20 aminosav beépítésére is képes. Ráadásul egy-egy mRNS-en egyszerre több riboszóma is folytatja a transzlációt, ún. poliriboszómák jönnek létre, így az mRNS-ről perceken belül nagy mennyiségű fehérje jöhet létre.

I/11.
A transzláció szabályozása

Mészáros Tamás

Az élőlények genomjában kódolt több tízezer fehérje soha nincs együtt jelen egy meghatározott sejtben. A sejtekben egy adott pillanatban található fehérjék összessége, az ún. proteom két okból is dinamikusan változik. Egyrészt a sejtek igazodnak a változó körülményekhez, exogén és endogén szignálokhoz, és azoknak megfelelően termelik az alkalmazkodáshoz szükséges fehérjéket. Másrészt a folyamatosan károsodó és degradáló fehérjék állandó pótlásra szorulnak, így az egyes fehérjék populációja is folyton cserélődik. A fehérjék mennyiségi kontrolljára a sejteknek három lehetőségük van: az mRNS mennyiségének meghatározása, valamint a transzláció és a fehérjék lebontásának szabályozása. Az mRNS-re vonatkozó ismereteket a transzkripció fejezetben már ismertettük, a fehérjék sejten belüli degradációját pedig később mutatjuk be, így itt a három lehetőség közül csak a transzláció szabályozását tárgyaljuk.

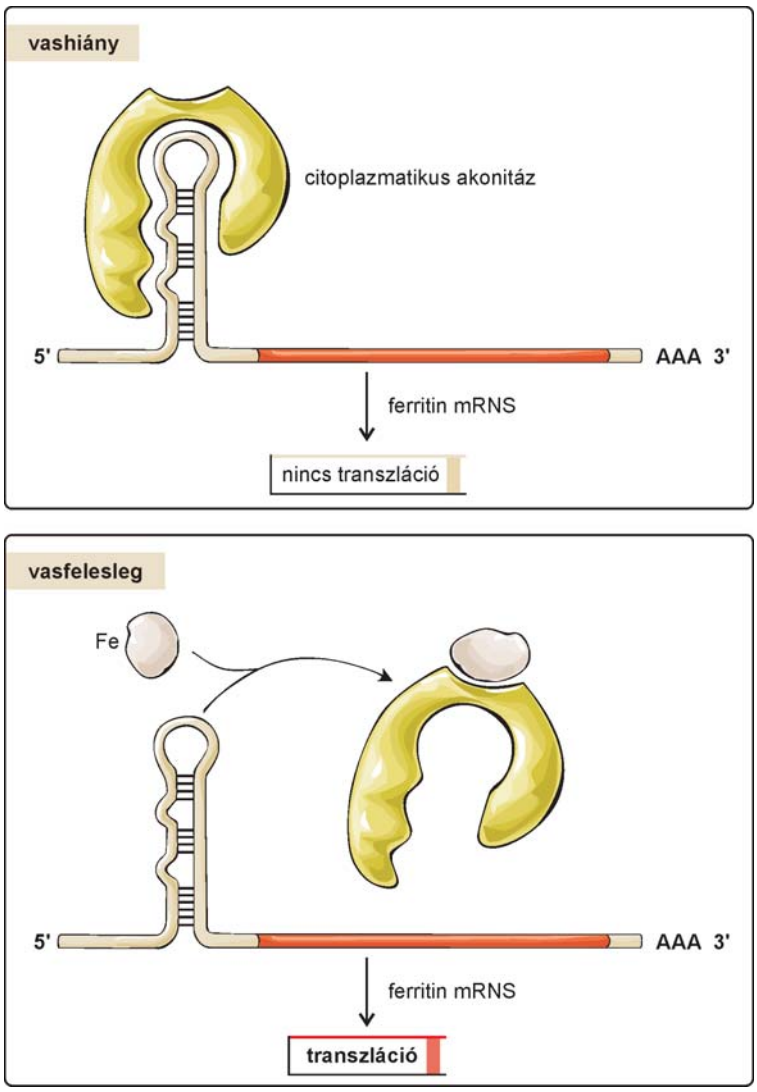
A prokarióták esetében a fehérjék mennyiségének szabályozása elsősorban a transzkripció szintjén valósul meg, de ismeretesek transzlációs kontroll mechaniz-



I/11-1. ábra
Az mRNS hasítás minőségellenőrzési mechanizmusa

musok is. Ezek általában a riboszóma-mRNS kapcsolat kialakulását befolyásolják. A prokarióták Shine-Dalgarno szekvenciájához kötődhet fehérje, antiszensz RNS, illetve maga az mRNS is létrehozhat olyan másodlagos szerkezeteket, amelyek magukba foglalják a riboszóma kötő helyet is. Az eukarióta organizmusokban ennél sokkal változatosabb és kifinomultabb a transzláció szabályozása, a továbbiakban ennek tárgyalására szorítkozunk.

A korábbiakban már láthattuk, hogy az eukarióta mRNS metil-guanozin sapkája és poliA farka egyfajta minőségi kontrollt is lehetővé tesz. Ezeken túl a sejtmagból kikerülő mRNS első transzlációja során egy olyan típusú ellenőrzésen is átesik, amely biztosítja, hogy csakis a megfelelően hasított mRNS szolgálhasson a fehérjeszintézis templátjaként. Az mRNS érése során az intronok eltávolításra kerülnek, és a két exon határára bekötődik a több fehérjéből felépülő exon kapcsolódási komplex (exon junction complex, EJC). A sejtmagból kijutott mRNS olvasása közben a riboszóma eltávolítja az útjába kerülő EJC-eket, majd a stop kodonnál szétesik két alegységére. Az átvizsgált és EJC mentesített mRNS további riboszómáknak szolgálhat transzlációs templátként. Egészen más lesz az mRNS sorsa, ha a riboszóma úgy ütközik stop kodonba, hogy attól 3' irányba még található EJC. Az ilyen szituáció egyértelműen jelzi, hogy az érési folyamat során az mRNS nem a megfelelő módon vágódott, így hibás fehérje létrejöttét eredményezné a transzlációja. Ezekben az esetekben az mRNS további fehérjék közreműködésével degradálódik *(I/11-1. ábra)*. Az mRNS több lépcsős, szigorú minőségi kontrolljának jelentősége könnyen belátható annak tudatában, hogy a fehérjeszintézis a legenergiaigényesebb biokémiai folyamat.



I/11-2. ábra
A ferritin transzlációjának szabályozása

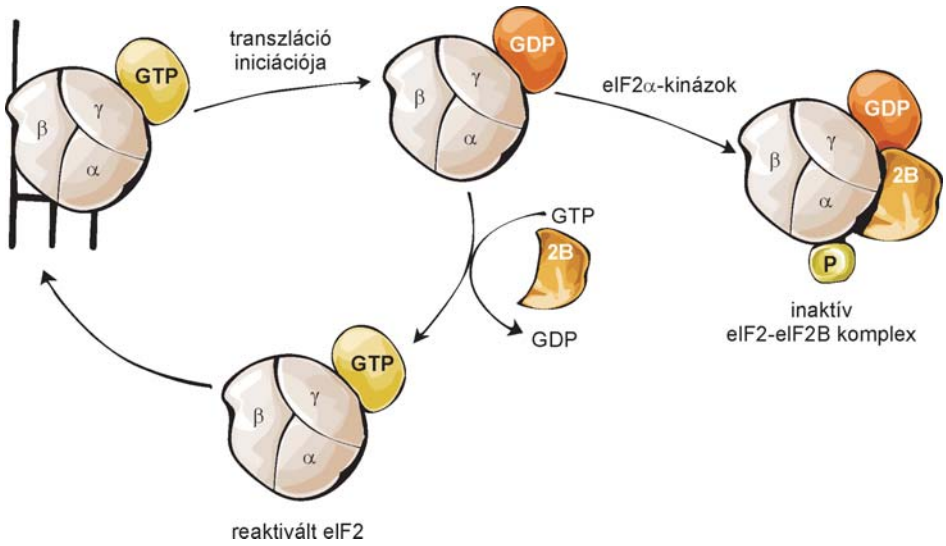
A minőségi követelményeknek megfelelő mRNS

sok esetben várakozik a citoplazmában, nem kerül azonnali transzlációra, a fehérjére történő fordítása csak bizonyos feltételek teljesülése esetén következik be. A transzláció szabályozásának legközvetlenebb módja a prokariótáknál látottakhoz hasonlatos, amennyiben az mRNS-hez kötődő regulátor fehérje közvetlenül befolyásolja a fehérjeszintézis sebességét. Jó példa erre a szabályozási módozatra a ferritin szintézisének kontrollja. A szabad vas reaktív gyökök keletkezését katalizálja, így azt a sejtek ferritinhez, vasat tároló fehérjéhez kötve raktározzák. A ferritin mRNS-nek 5'-UTR szekvenciája hajtű struktúrát hoz létre, amelyhez vashiány esetén a citoplazmatikus akonitáz vas-kén fehérje kötődik, így gátolva a ferritin transzlációját. Emelkedett vas koncentrációnál az akonitáz a vassal komplexet képez, konformáció változáson megy át, leválik a hajtűről, ily módon szabad utat adva a transzlációnak *(I/11-2. ábra)*.

A transzláció szabályozása legtöbb esetben a fentieknél jóval összetettebb, és több fehérje közreműködésével valósul meg. Ezek közül a preiniciációs komplex összeállásának, illetve annak a sapka komplexekhez történő kapcsolódásának a szabályozása részletesen feltárt és általánosan elterjedt mechanizmus.

A preiniciációs komplexhez a három alegységből álló eIF2 GTPáz szállítja a Met-tRNS-t. Az iniciáció során GTP GDP-vé alakul, az eIF2 ezáltal inaktiválódik. Az újraaktiválásban, azaz GDP-GTP cserében az eIF2B fehérje működik közre, ez a reaktiválás azonban fehérje kinázok segítségével gátolható. Amennyiben az eIF2 α-alegysége foszforilálódik, a csere nem következik be, a hármas komplex GDP kötött formában csapdába esik, és így a továbbiakban nem tud részt venni a transzláció beindításában. Az inhibitor foszforilációt számos, különböző stresszek hatására indukálódó fehérje kináz kivitelezheti. Ezek közül a legismertebbek a virális fertőzés nyomán megjelenő, duplaszálú RNS által aktivált PKR kináz, az aminosavhiány esetén indukálódó GCN2 kináz, a hem hiányában aktiválódó HRI1 és az ER stressz következtében aktívvá váló PER kináz *(I/11-3. ábra)*.

A korábbiakban már láthattuk, hogy a metil-guanozin sapka az eIF4E és eIF4G fehérjéken keresztül lép kapcsolatba a preiniciációs komplexszel. Az iniciációnak ez



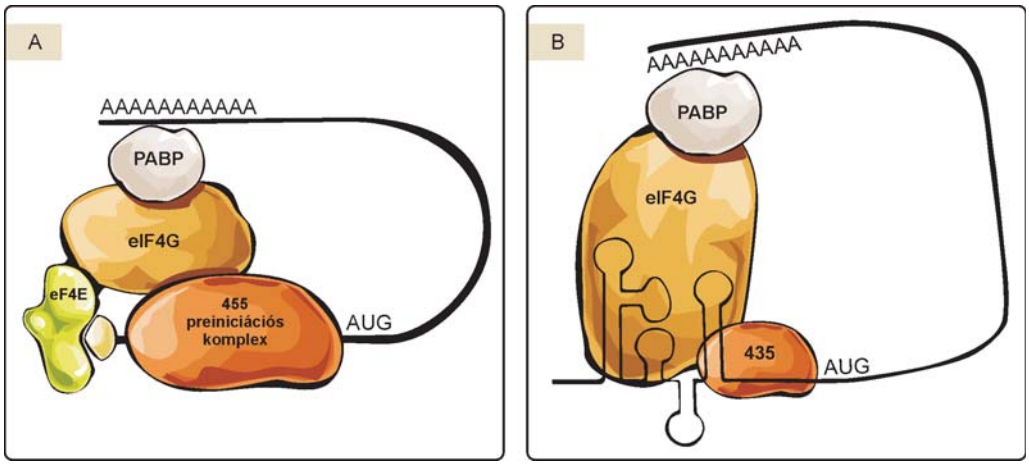
I/11-3. ábra
Transzláció gátlása az eIF2 foszforilációján keresztül

a lépése is szabályozható foszforiláción keresztül, habár a foszfátcsoport kapcsolásának ebben az esetben transzlációt fokozó hatása van. Az eIF4G kompetícióban van az eIF4E-BP transzlációs represszor fehérjével, mivel mindkettő képes az eIF4E-vel kapcsolatba lépni. Az eIF4E-BP foszforilációt követően azonban elveszti eIF4E kötő képességét, így lehetővé teszi az eIF4E-eIF4G komplex kialakulását, ezen keresztül pedig a preiniciációs komplex sapkához történő kötődését. Az eIF4E-BP foszforilációjáért az mTOR kináz felelős.

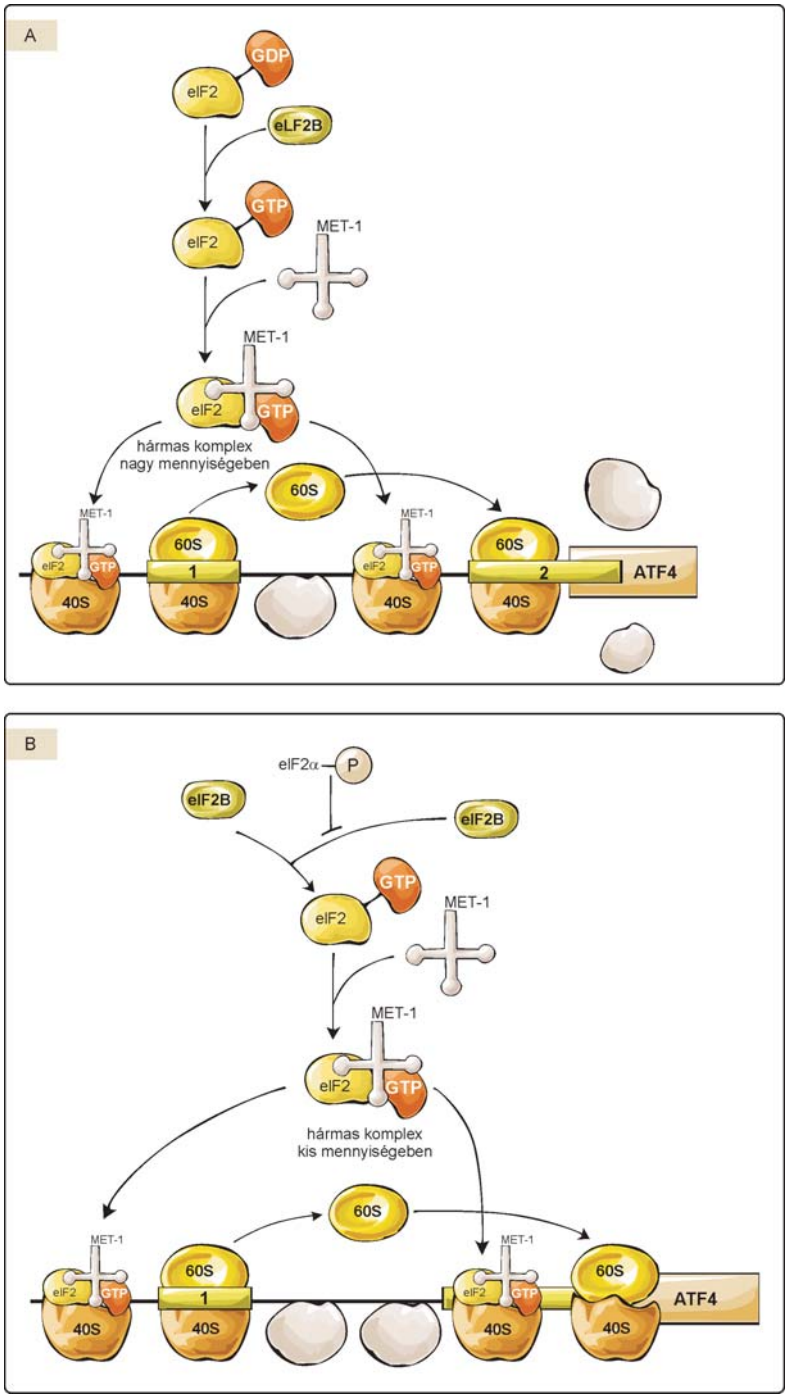
A fenti két foszforilációs-defoszforilációs mechanizmus a transzláció általános szabályozásáért felelős, melyek hatására a fehérjék túlnyomó részének szintézise leállhat. A sejtek ezzel egyszerűen csökkentik a transzlációval járó terhelést, reagálnak a növekedési jelek hiányára, illetve ily módon próbálják a vírusfehérjék szintézisét megakadályozni. A transzláció gátlását kiváltó stresszekhez a sejtek a passzív védekezés mellett a legtöbb esetben aktívan is alkalmazkodnak. Az adaptáció folyamata speciális, a megváltozott körülményekhez szükséges fehérjék transzlációja nélkül azonban kivitelezhetetlen. Az ilyen fehérjék transzlációjának szabályozása eltérő az eddig ismertetett általános mechanizmusoktól, így éppen akkor aktív a szintézisük, amikor a fehérjék nagy része nem keletkezik.

A vírusoknál általánosan elterjedt, hogy sapkafüggetlen transzlációval kényszerítik a megtámadott eukarióta sejteket saját fehérjéik szintézisére. A vírus mRNS 5'-végén nem található metil-guanozin sapka, így az általános transzlációs iniciáció nem jöhet szóba. A vírusfehérje mRNS-en a sapkát a start kodon előtt elhelyezkedő több száz bázisból álló IRES (internal ribosome entry site, belső riboszóma belépő hely) motívum helyettesíti. Az IRES bázispárosodásokon keresztül olyan bonyolult másodlagos szerkezetet hoz létre, amelyhez az eIF4G közvetlenül kapcsolódik, így a preiniciációs komplex a metil-guanozin-sapka közreműködése nélkül, a start kodon közelében kötődik az mRNS-hez *(I/11-4. ábra)*. Bizonyos vírusok még tovább fokozzák saját fehérjéiknek transzlációját azáltal, hogy olyan proteázokat kódolnak, amelyek degradálják az eIF4G eIF4E kötő doménjét, így a megtámadott sejt többé nem képes sapkafüggő transzlációra, teljesen átáll a vírusfehérjék szintézisére.

IRES szekvenciák nem csak a vírusok mRNS-ében azonosíthatók, az eukarióták saját fehérjéik transzlációját is indíthatják IRES-en keresztül. Az eukarióta IRES szekvenciák a várakozásoknak megfelelően a különböző stressz válaszokban és az



I/11-4. ábra
Transzláció iniciációja metil-guanozin sapkán (A) és IRES-en keresztül (B)



I/11-5. ábra

A transzláció szabályozása uORF-n keresztül. Normális körülmények között a hármas komplex mennyisége nem limitálja a transzlációt, az uORF szekvenciával rendelkező ATF4 mRNS nem transzlálódik (A). A stressz nyomán az elérhető hármas komplex mennyisége kisebb, az ATF4 fehérje kifejeződik (B)

apoptózis során aktív gének mRNS-ében találhatóak, de a sejtek normális működéséhez is elengedhetetlen ez a fajta transzlációs iniciáció, mivel a sejtciklus G2/M fázisában kifejeződő fehérjék is IRES reguláltak.

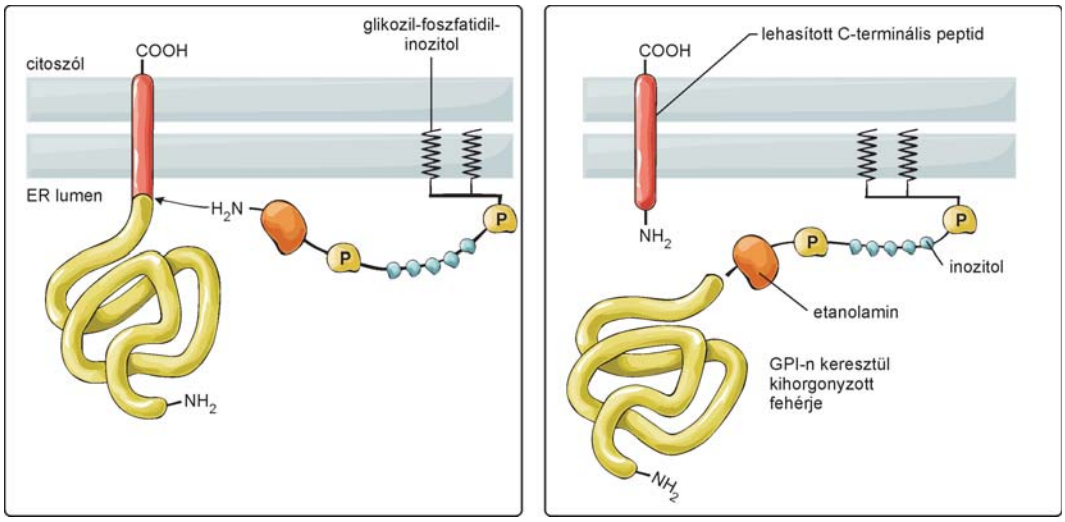
Amint korábban láthattuk, az eIF2 α-alegységét számos, stressz aktiválta kináz foszforilálja, minek következtében a transzláció általánosságban csökken. A stressz válaszban szerepet játszó fehérjék szintézisének mértéke azonban éppen ellentétes tendenciát mutat, az eIF2 foszforilációjának hatására nagyobb mennyiségben keletkeznek. Ezen gének közé tartozik az ER stressz hatására keletkező ATF4 transzkripciós faktor is, aminek példáján keresztül bemutatjuk ezt a sajátságos szabályozási mechanizmust. Az ATF4 mRNS 5' végén a fehérje start kodonját megelőzően két rövid peptidet kódoló ORF helyezkedik el, az ún. uORF (upstream ORF). A preiniciációs komplex összeáll a metil-guanozin sapkánál, majd elkezd csúszni az mRNS 3' vége felé, és eléri az első uORF, amiről egy néhány aminosavból álló peptidet szintetizál. A peptid stop kodonja után a riboszóma két alegysége szétválik, de a kis alegység az mRNS-en tovább csúszik. Ahhoz, hogy a kisalegység ismét aktív 43S preiniciációs komplexszé váljon, újra kell tölteni az eIF2-GTP-met-tRNA hármas komplexszel. Amennyiben a reaktiválás még a második uORF elérése előtt bekövetkezik, akkor megszintetizálódik a második rövid peptid is, és a riboszóma itt már leválik az mRNS-ről. A második uORF átfed az ATF4-t kódoló szekvenciával, így annak start kodonján a riboszóma anélkül halad át, hogy az ATF4 transzlációját elkezdené, így ebben az esetben nem keletkezik ATF4 fehérje. A stressz hatására foszforilált eIF2-n nem következik be a GDP-GTP csere, ezért az elérhető hármas komplex szintje alacsony lesz, így kisebb eséllyel alakul ki a 43S preiniciációs komplex. Mindezek következtében az első uORF-en áthaladó kis riboszóma alegység nagyobb valószínűséggel jut túl inaktív formában a második uORF start kodonján, míg az ATF4 start kodonjáig már esélye van az újra töltődéshez, így az ATF4 transzlációja megkezdődhet *(I/11-5. ábra)*. A bemutatott mechanizmus részletei változóak, lehetnek eltérések az uORF-ek számában és a peptidek méretében, de minden eukarióta sejtben központi jelentőségű a stressz aktivált fehérjék transzlációja során.

I/12.
A fehérjék poszttranszlációs módosítása

Mészáros Tamás

Az eukarióta sejtekben jelen lévő fehérjék döntő része a transzlációt követően módosulásokon esik át, melyeknek következtében tulajdonságaik megváltoznak, így tovább fokozódik a proteom komplexitása. A transzláció utáni, ún. poszttranszlációs módosítások a fehérje valamelyik aminosavának kovalens módosítását jelentik. A jelenség mind változatosságában, mind az érintett fehérjék számában igen kiterjedt az eukarióták között. Napjainkban már több mint 200 különféle poszttranszlációs módosítás ismert, és szinte minden fehérje érintett valamilyen módosításban. A jegyzet keretei a téma kiemelt orvosi jelentősége ellenére sem teszik lehetővé, hogy részletekbe menően tárgyaljuk ezt a területet, inkább csak betekintés jellegűen mutatjuk be az idevonatkozó ismereteket.

A poszttranszlációs módosítás az elágazó szénlácú aminosavak és a fenilalanin kivételével bármilyen aminosavon bekövetkezhet. A polipeptidlánc végét érintő módosítások közül kiemelt jelentőségűek azok, amelyek lipidek kapcsolásával biztosítják a hidrofil fehérjék membránhoz horgonyzását. A lipidált fehérje kötődhet a sejtmembrán külső, illetve belső felszínéhez. Az extracelluláris fehérjék glikozil-foszfatidil-inozitollal (GPI), míg az intracellulárisak zsírsavval vagy izoprén származékkal módosulnak. A membrán külső felszínén lokalizált fehérje csakúgy, mint minden más extracelluláris fehérje a transzláció során az ER lumenébe kerül, és a GPI-vel való módosítás is ebben az organellumban következik be. Az ilyen típusú fehérjék C-terminálisukon 15-20 hidrofób aminosavat hordoznak, így a transzlációt követően

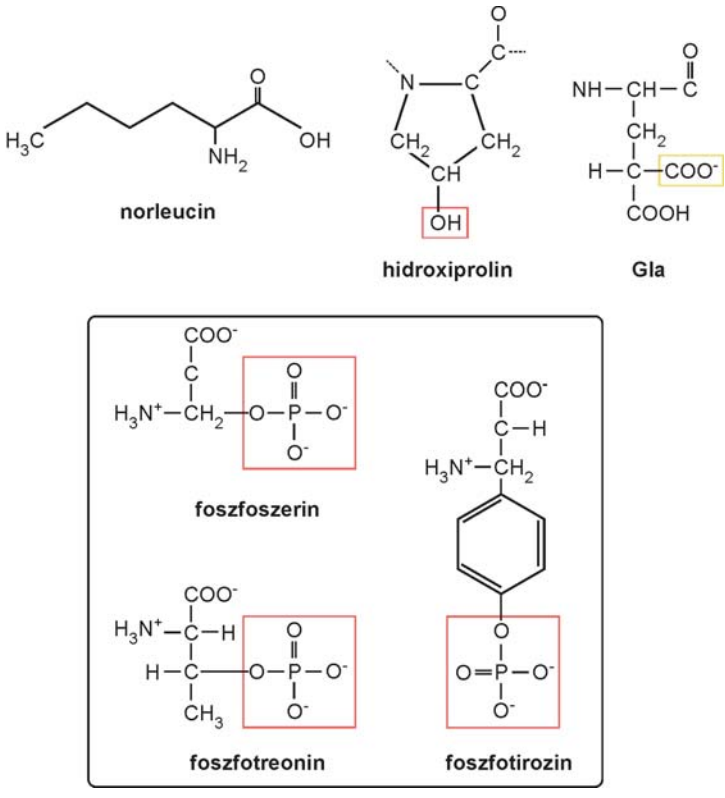


I/12-1. ábra
A GPI módosítás mechanizmusa

az ER membránjához kötve maradnak. A következő lépésben a hidrofób régió lehasításra kerül, és az újonnan létrejött C-terminálison keresztül a fehérje a már eleve membránba merülő GPI-hez kapcsolódik. A sejtből kifelé irányuló vezikuláris transzport során az ER membránjának topológiája megváltozik, az ER ürege felé néző membránfelszín a sejtmembrán külső oldalán jelenik meg, aminek következtében a GPI-kapcsolt fehérjék extracellulárissá válnak *(I/12-1. ábra)*.

Számos, a jelátvitelben központi szerepet játszó fehérje kapcsolódik a sejtmembrán citoplazmai oldalához zsírsavakon, illetve izoprén származékokon keresztül. A mirisztilsav az N-terminális glicinnel hoz létre peptidkötést (a fehérjék nagy részéről a transzlációt követően lehasad az N-terminális metionin), a palmitinsav a fehérje lánc belsejében lévő ciszteinnel alkot tioészter kötést, míg az izoprénvázas farnezil és geranil-geraniol a C-terminális közelében elhelyezkedő ciszteinhez tioéter kötéssel kapcsolódik. Ezek a módosítások viszonylag gyengén kapcsolják a fehérjéket a membránhoz, a kötés erőssége azonban sok esetben fokozódik azáltal, hogy egy-egy fehérjén egyszerre több lipidációs módosítás is bekövetkezik. Fontos megemlíteni, hogy az intracelluláris fehérjék lipidációja reverzíbilis folyamat, így a fehérje sejten belüli elhelyezkedése dinamikusan változhat a különböző stimulusok hatására. A későbbi fejezetekben láthatunk példákat arra, hogy a fehérje lokalizáció szabályozása alapvető jelátviteli mechanizmusként működik.

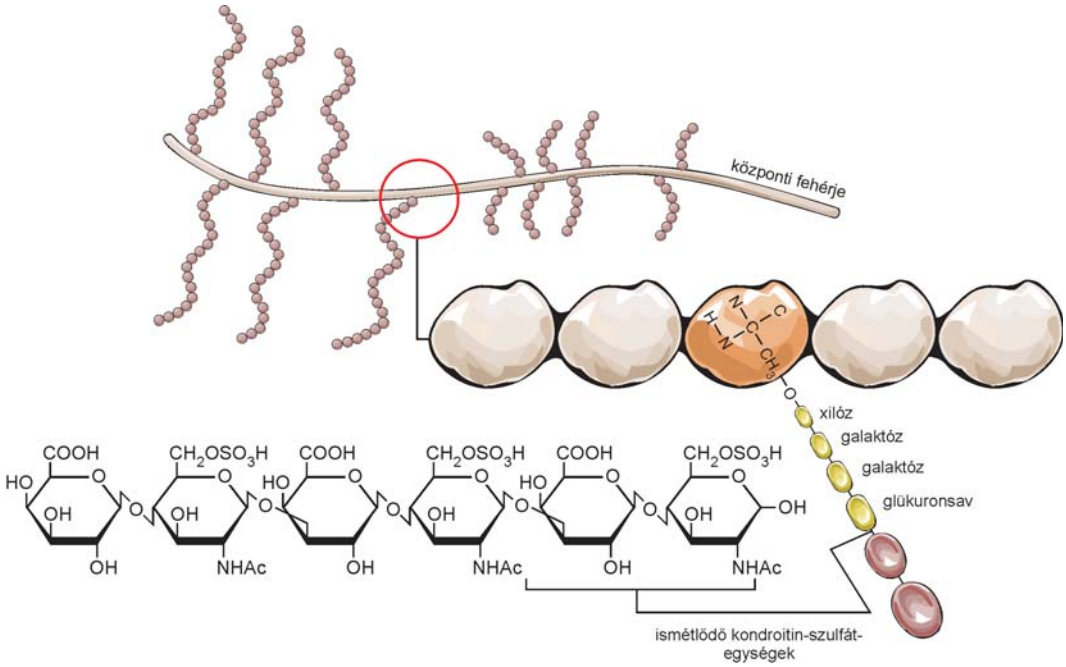
A több száz ismert poszttranszlációs módosulás döntő része a polipeptidlánc belső aminosavain következik be. A folyamat jelentőségét nem lehet túlhangsúlyozni, ugyanis a fehérjékhez kovalensen kapcsolódó csoportok alapvetően megváltoztathatják a fehérje szerkezetét, aktivitását, egyéb fehérjékkel való kölcsönhatását, lokalizációját és féléletidejét. Ezeknek a módosításoknak a következményeivel a jegyzet több más fejezetében is találkozhatunk. Például az extracelluláris mátrix mennyiségileg legjelentősebb fehérjéje, a kollagén nem alakíthatja ki a mátrix alapját adó térhálós szerkezetet a prolin hidroxilálásával és a lizin dezaminálásával kialakuló hidroxi-prolin és norleucin nélkül *(I/12-2. ábra)*. A normális hemosztázis elképzelhetetlen a glutaminsav karboxilálása nyomán megjelenő γ-karboxi-glutaminsav (Gla) nélkül *(I/12-2. ábra)*. A jelátviteli fejezetben pedig láthatjuk, hogy a szignál transzdukció legáltalánosabb mechanizmusa a fehér-



I/12-2. ábra
Fehérjék poszttranszlációsan módosult aminosavainak kémiai szerkezete

jék szerinjének, treoninjának, illetve tirozinjának foszforilációja (I/12-2. ábra). Ezt az egyszerű poszttranszlációs módosítást, melynek nyomán az ATP γ-foszfátja az aminosav hidroxilcsoportjával alakít ki egy foszfoészter-kötést több mint 500 féle humán protein-kináz katalizálja, jól illusztrálva a foszforiláció központi szerepét. A fehérje kinázok gyorsan és szelektíven foszforilálják szubsztrátjaikat, így ez a poszttranszlációs módosítás tökéletesen megfelel a hatékony jelátvitellel szemben támasztott követelményeknek. Ráadásul a reakció reverzíbilis, de enzimet igénylő, nem spontán folyamat. Az ellenirányú reakcióról, a defoszforilációról mintegy 150 foszfoprotein-foszfatáz gondoskodik. Ez az enzimcsalád, hasonlóan a protein-kinázokhoz, nagy szelektivitással és sebességgel katalizálja a reakciót, így a fehérjék foszforilációs-defoszforilációs ciklusa gyorsan és szigorúan kontrolláltan mehet végbe.

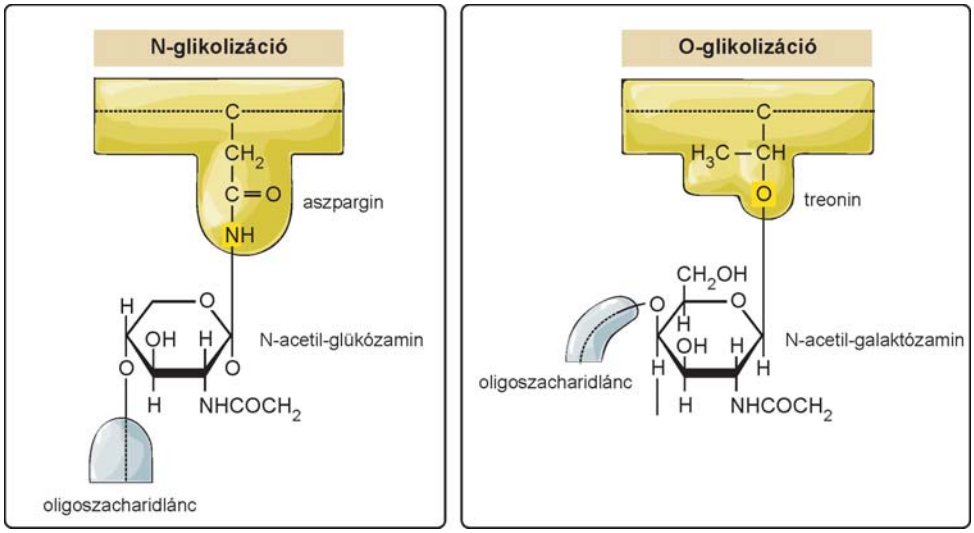
A foszforiláció mellett a glikoziláció az eukarióta fehérjék egyik legáltalánosabb, transzlációt követő módosulása. Az összes fehérje mintegy fele és szinte minden extracelluláris fehérje glikozilálódik. A fehérje-szénhidrát arányt alapul véve két kategóriára oszthatjuk a glikozilált fehérjéket, az egyik csoportot a proteoglikánok képezik, melyek tömegének több mint 60, de akár 95%-át is szénhidrátok adják. Ezeknek a makromolekuláknak szénhidrátláncait a negatív töltéssel rendelkező glikozaminoglikánok (GAG) alkotják, és az extracelluláris mátrixban mint szerkezeti fehérjék funkcionálnak. A GAG oldallánc a Golgiban, a fehérje szerinjéhez kapcsolva épül fel. Első lépésben egy négy szénhidrátos egység kapcsolódik a fehérjéhez, majd ezt követően a glikozil-transzferázok közreműködésével, egyesével kötődnek a további széhidrátok. A szintézis végeredményeként általában ismétlődő diszacharid egységekből, hosszú, kb. 80 szénhidrátból álló, elágazódás nélküli láncok alakulnak ki. A GAG szulfát- és karboxilcsoportjai ozmotikusan aktív kationokat, elsősorban nátriumot vonzanak, így végső soron egy hidratált gélt alkotnak, ami biztosítja a kötőszövetek rugalmasságát *(I/12-3. ábra)*.



I/12-3. ábra
A proteoglikánok tipikus felépítése

A glikozilált fehérjék másik csoportja, a glikoproteinek szénhidráttartalma 1–60% közé esik, és rövidebb, elágazó szénhidrátláncokkal rendelkeznek. A glikoproteineket tovább osztályozhatjuk aszerint, hogy a szénhidrátlánc a szerin vagy treonin hidroxil-, illetve az aszparagin aminocsoportjához kapcsolódik. Ezek alapján O-, illetve N-glikozidos fehérjéket különböztethetünk meg *(I/12-4. ábra)*. Az O-glikozidos glikoproteinek a proteoglikánokhoz hasonlóan a Golgiban alalkulnak ki. A reakciót ebben az esetben is glikozil-transzferáz enzimek katalizálják, de a létrejött lánc többféle szénhidrátból épül fel, nem savas karakterű, és amint már jeleztük, viszonylag rövid és elágazó.

A fehérjék glikozilációjának döntő része aszparaginon történik, és ennek mechanizmusa számos ponton eltér az előbb látottaktól. Az O-glikozilációban érintett szeri-

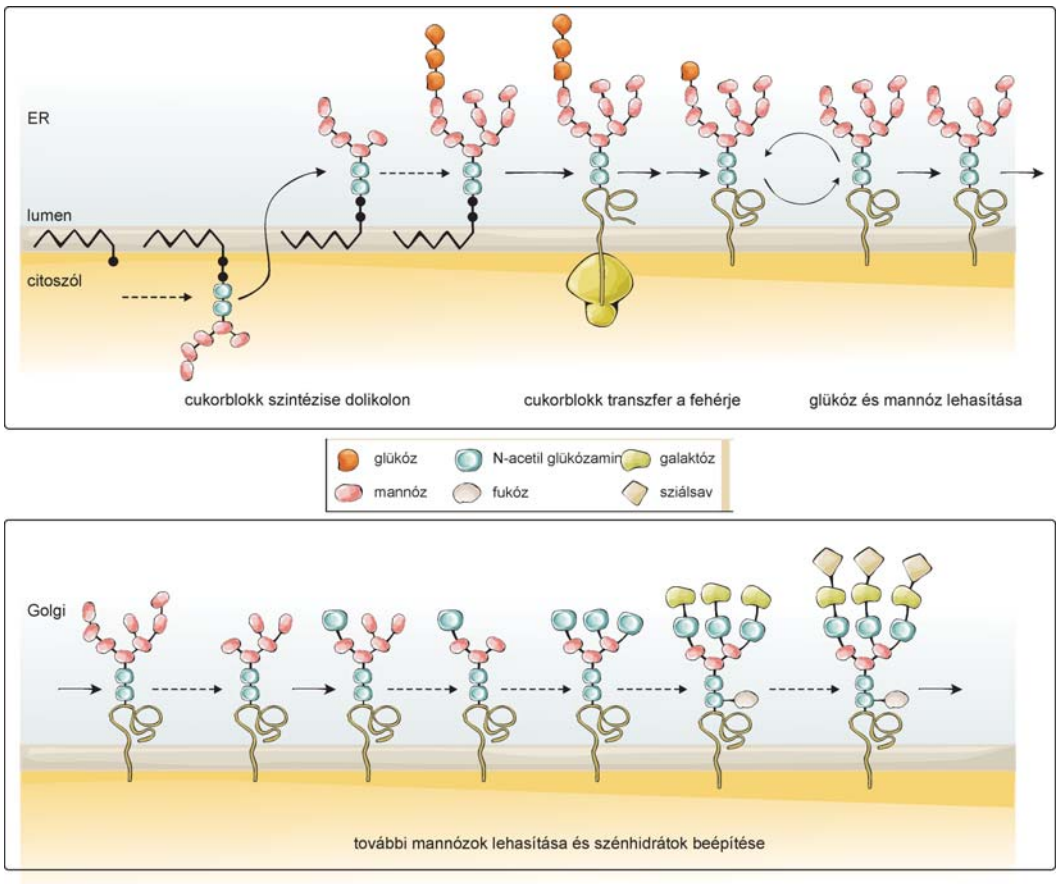


I/12-4. ábra
Az N- és O-glikozilált fehérjék szénhidrát kapcsolata

nek és treoninok a fehérjeszekvencia alapján nem azonosíthatóak, nincs ismert szekvenciális követelmény, ami meghatározza a szénhidrát kötés helyét. Ezzel szemben N-glikoziláció csakis az Asn-X-Ser vagy Asn-X-Thr (X bármilyen aminosavat jelölhet) fehérjeszekvenciák aszparaginján lehetséges, így a cukor kapcsolódási helye jósolható. Az N-glikozilációs módosítás az ER-ben veszi kezdetét, melynek során egy 14 tagú, N-acetil-glükózamin, mannóz- és glükóztartalmú cukorblokk egyben kerül az aszparaginra. A reakciót katalizáló oligoszacharid-transzferáz enzim az ER fehérje transzlokátorával asszociálva található, így a megfelelő szekvencia motívummal rendelkező fehérjék az ER-be belépve azonnal átesnek ezen a módosításon. A fehérjére kapcsolandó 14 tagú cukorblokk maga több lépésben, eleinte a citoszolban, majd az ER lumenében dolikol-pirofoszfáthoz kapcsoltan épül fel. A dolikol egy olyan rendkívül hosszú, 90-100 szénatomból álló izoprén származék, amely többszörösen áthurkolja az ER membránját, így lokalizálhatja a cukorblokkot az ER membrán luminális oldalán. Érdekes módon az érett N-glikozilálódott fehérjék többségén az eredeti 14 szénhidrátos blokkból csak egy 5 cukorból álló töredék

azonosítható. Az oligoszacharid csonkolása az ER-ben induló, majd a Golgiban folytatódó komplex reakciósorozat következménye. A blokkból a 3 glükóz és egy mannóz már az ER-ben lehasad, majd a Golgiban újabb mannózok kerülnek eltávolításra *(I/12-5. ábra)*. A Golgi szerepe nem korlátozódik a mannózok lehasítására, a humán genom több száz olyan glikozil-transzferázt kódol, amelyek a Golgi lumenében lokalizálódnak. Ezen transzferázok aktivitásának következtében bonyolult, több elágazást tartalmazó szénhidrát motívumok jönnek létre. A glikozil-transzferázoknak az expressziója sejttípustól és fejlődési stádiumtól függ, így ugyanazon fehérje eltérő szénhidrát mintázattal rendelkezhet a különböző szövetekben.

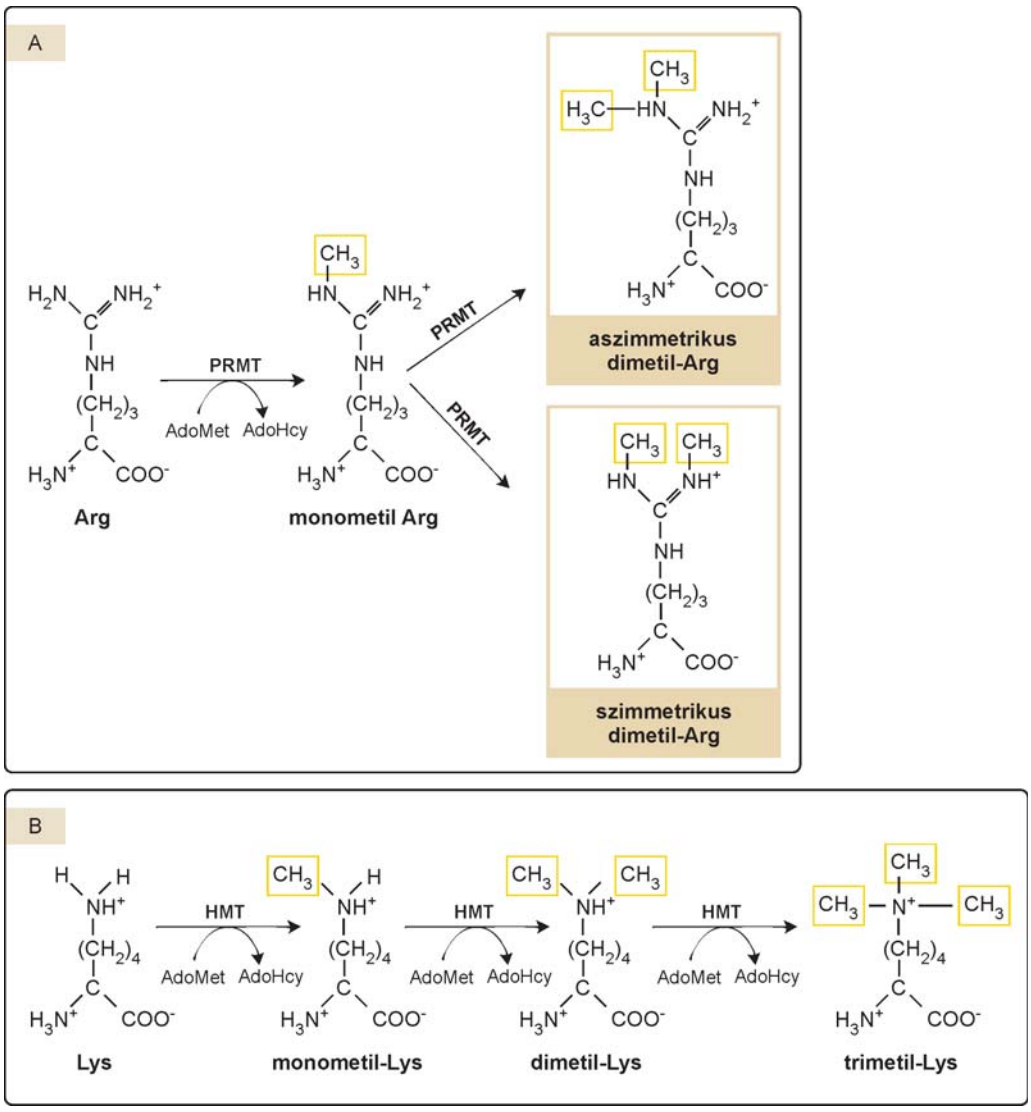
A glikoziláció szerepe rendkívül szerteágazó, egyike a legintenzívebben kutatott, de még távolról sem felderített tudományterületeknek. A sok kérdőjel ellenére a glikoziláció számos funkciója azonban már egyértelműen igazolt. Így például ismert, hogy a glikoziláció elengedhetetlen az ER-ban processzálódó fehérjék megfelelő hajtogatódásához. A sejtfelszíni és extracelluláris fehérjék esetében a glikozilációjának protektív szerepe is van, mivel megakadályozza a makromolekulák, mint például a proteázok sejtek, illetve fehérjék közelébe férkőzését. Végül a



I/12-5. ábra
Az N-glikoziláció folyamatábrája

glikoziláció legösszetettebb funkciója a sejtek közötti kommunikációban érhető tetten. Ebből a szempontból jelentős, hogy a szénhidrátok különböző szénatomjaikon keresztül kötődhetnek egymáshoz és elágazó láncokat alkothatnak, így már néhány cukor egymáshoz kapcsolódása változatos szerkezeteket hozhat létre. Az oligoszacharid szintézisnek ez a kombinatorikus jellege kiváló lehetőséget nyújt a sejtek egyedi jelölésére.

A gének transzkripciós aktivitása közvetlenül befolyásolható a kromatin szerkezetének változtatásán keresztül. Ez egy olyan újabb alapvető folyamat, melynek az



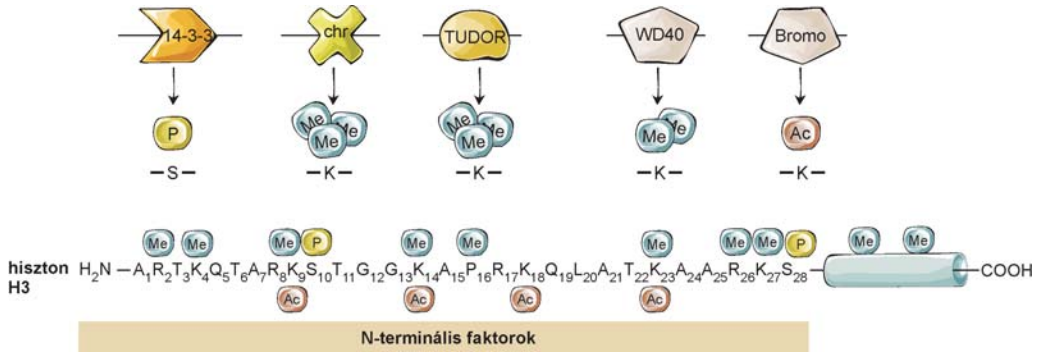
I/12-6. ábra
Az arginin és lizin metilációja. Protein arginin-metiltranszferáz (PRMT), adenozin-metionin (AdoMet), adenozin-homocisztein (AdoHcy) és hiszton-metiltranszferáz (HMT)

alapját a poszttranszlációs módosítások adják. A korábban már említett foszforiláció és a sejten belüli fehérje degradáció fejezetben ismertetésre kerülő ubikvitináció mellett a lizin és az arginin metilációja, illetve a lizin acetilációja is kiemelt jelentőségű a kromatin szerkezetének meghatározásában. A módosítások elsődleges célpontjai a H3 és H4 hisztonok nukleoszómából kinyúló N-terminális végei. Mind a metiláció, mind az acetiláció reverzíbilis, enzim katalizált folyamat. A metilációért a protein arginin-metiltranszferázok és hiszton-metiltranszferáz enzimek felelősek, míg az ellenirányú reakciót a demetilázok katalizálják. A metiltranszferázok az S-adenozil-metionin metilcsoportját használják a reakció során, és a módosítás eredményeként a lizin és az arginin egyaránt többszörösen metilálttá válhat *(I/12-6. ábra)*.

A hisztonok acetilációja során hiszton-acetiltranszferázok viszik át az acetil-CoA acetilcsoportját a lizin ε-amino-csoportjára. A reakció eredményeként a lizin oldalláncában a pozitív töltésű aminocsoportból semleges savamid alalkul ki, így a negatív töltésű DNS kevésbé asszociálódik a hisztonokkal, ami végső soron a lazább szerkezetű eukromatin kialakulását eredményezi. Ez a reakció is reverzíbilis, a hiszton-deacetiláz gyorsan eltávolíthatja az acetilcsoportot, így a kromatin szerkezete dinamikusan változhat.

Az eddig ismertetett példák jól illusztrálják, hogy az aminosavak kovalens módosításai új kémiai tulajdonságokkal ruházzák fel a fehérjéket, ily módon közvetlenül befolyásolhatják azok aktivitását, és lokalizációját. Mindezek a változások lehetővé teszik, hogy a sejtek gyorsan alkalmazkodhassanak a változó körülményekhez. A poszttranszlációs módosulások azonban nem csak közvetlen hatást fejtenek ki a fehérjékre, legalább ilyen jelentőségű a közvetett, a fehérjék kölcsönhatását szabályozó szerepük. Az eukarióta sejtekben a poszttranszlációs módosítások kiegészülnek az egyes módosítások felismerésére képes fehérjedoménekkel.

A poszttranszlációs változások sejtszintű értelmezésének a modularitás mellett a kooperativitás is fontos jellemzője. Ugyanazon fehérjéken sok esetben nemcsak egyetlen poszttranszlációs módosulás következhet be, egyszerre lehet több, különböző aminosaván foszforilálva, acetilálva, metilálva stb., így egy időben több, az adott módosítást felismerő fehérjével léphet kapcsolatba. Az így létrejött komplex fehérje tagjai egymás hatását kiolthatják, felerősíthetik vagy megváltoztathatják. Ez a fajta kooperativitás részletesen ismert a hiszton fehérjék esetében, ahol a poszttranszlációs módosulások csakis együttesen eredményezhetnek adekvát vá-



I/12-7. ábra
A H3 hiszton N-terminális végének lehetséges poszttranszlációs módosulásai és az azokat felismerő fehérjedomének

laszt. A módosítások külön-külön nem értelmezhetőek, csak összességüknek, az ún. hiszton kódnak van sejtfiziológiás jelentése *(I/12-7. ábra)*.

A fentiekben láthattuk, hogy maguk a poszttranszlációs változások bináris jeleknek tekinthetők, vagy bekövetkeznek, vagy nem. Ezeknek az egyszerű jeleknek az értelmezése azonban már kombinatorikus jellegű, ezért lehetséges, hogy a poszttranszlációs módosítások adják a metazoákban megfigyelhető kifinomult, dinamikusan alkalmazkodó jelátviteli mechanizmusok alapját.

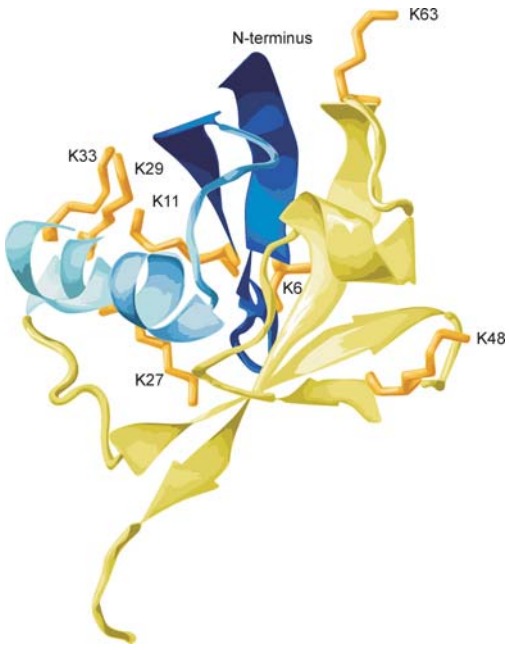
I/13.
Proteaszomális fehérjedegradáció

Mészáros Tamás

A fehérjék intracelluláris degradációja két szempontból is központi jelentőségű folyamat. Egyrészt az egyes fehérjék szelektív és időzített eltávolítása számtalan sejtfiziológiai folyamat nélkülözhetetlen szabályozási mechanizmusa. Elengedhetetlen a sejtciklus szabályozásában, a gyulladásos reakciókban és az immunválaszban is, hogy csak néhány jól ismert példát említsünk. Másrészt a károsodott, illetve nem megfelelően hajtogatódott fehérjék képtelenek funkciójuk betöltésére, ráadásul sok esetben a sejtek számára veszélyes módon aggregálódnak, ezért eliminálásuk elengedhetetlen. Az intracelluláris fehérjedegradációnak többféle változata ismert, ezek közül proteaszomális és a lizoszomális rendszerek a legfontosabbak. A lizoszóma működése a Szubcelluláris biokémia c. tankönyvben kerül bemutatásra, itt csak a proteaszóma-rendszert tárgyaljuk.

A proteaszomális fehérjedegradáció, más néven ubikvitin/proteaszóma rendszer két nagyobb részre osztható. Az első szakasz biztosítja a rendszer szelektivitását, ekkor következik be a fehérjék proteolízisre történő kijelölése. A második fázisban a lebontásra ítélt fehérjék bejutnak a proteaszómába, és ott egységesen 7-9 aminosav hosszúságú peptidekre darabolódnak.

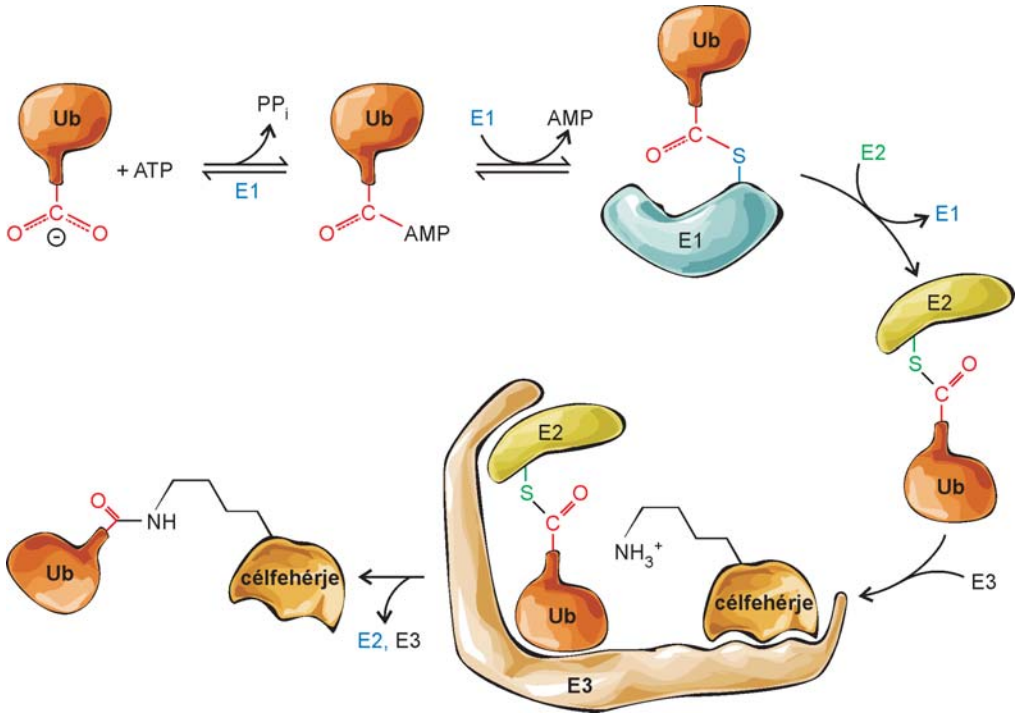
A degradációra való kijelölés a célfehérje adott lizinjének poliubikvitinációját jelenti. A kisméretű, 76 aminosavból álló ubikvitin fehérje nevét annak köszönheti, hogy az egyik legkonzerváltabb, az eukariótákban általánosan előforduló fehérje *(I/13-1. ábra).* Mielőtt a poliubikvitinációt ismertetnénk, fontos kiemelni, hogy a monoubikvitináció, azaz egy-egy ubikvitin fehérjéhez történő kapcsolódása ugyan fontos poszttranszlációs módosítás, de nem jelöli ki a fehérjét lebontásra. Az utóbbi kutatási eredmények alapján már az is igazolt, hogy a poliubikvitinációnak is vannak olyan formái, melyek nem fehérjedegradációs jelként funkcionálnak. Degradációs szignálról csak akkor beszélünk, ha a célfehérjéhez egy olyan poliubikvitin lánc kötődik kovalensen, amely minimálisan négy ubikvitin egységből áll, és ezek az ubikvitinek 11-es vagy 48-as pozícióban található lizinjeiken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A poliubikvitin lánc a célfehérje lizinjén épül fel az ubikvitinek szekvenciális kapcsolódásával. Az elsőként beépülő ubikvitin a C-terminális karboxilcsoportjával egy izopeptid kötést alakít ki a fehérje lizinjének aminocsoportjával. Ezt követően a fehérjéhez most már kovalensen kötött ubikvitin megfelelő lizinjéhez kapcsolódik a következő ubikvitin egy újabb



I/13-1. ábra
Az ubikvitin szerkezete lizinjeinek feltüntetésével

izopeptid kötéssel. Ez a ciklus ismétlődik mindaddig, amíg a lánc eléri a fehérje proteaszómába való irányításhoz szükséges hosszt.

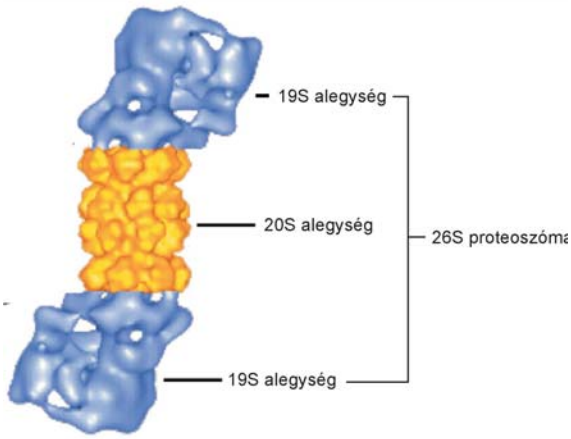
A fehérjék poliubkivitinációja egy három szakaszra bontható folyamat, melynek során az ubikvitin először aktiválódik, majd két lépésen keresztül a célfehérjéhez kapcsolódik. Az aktivációért felelős enzim ubikvitin-aktivátor vagy E1 néven ismert. Az E1 által katalizált reakció során az enzim ATP energiáját felhasználva saját ciszteinjéhez kapcsolja az ubikvitint, melynek eredményeként egy makroerg tioészter kötés keletkezik a cisztein tiol- és az ubikvitin C-terminális karboxilcsoportja között. A folyamat következő lépéseként az aktivált ubikvitin transzferálódik az E2, vagy más néven ubikvitin-konjugátor enzim ciszteinjére, így a nagy energiájú tioészter kötés nem vész el, csak átkerül egy másik fehérjére. Az ubikvitin végső célpontjára, a lebontandó fehérjére történő kötésében az ubikvitin-ligáz (E3) enzim működik közre *(I/13-2. ábra)*. A poliubikvitinációs kaszkád egyes lépéseiben közreműködő fehérjéket kódoló gének száma nagyon eltérő. Az ubikvitin-aktivátorok családját kevesebb, mint 10 fehérje képviseli, és az E2 fehérjék száma is 50 alatt van. Ezekkel szemben az ubikvitin-ligáz aktivitással rendelkező fehérjék a humán genom egyik legnagyobb géncsaládját alkotják a maguk több mint 600 képviselőjével. Az E3 fehérjéket szerkezetük alapján tovább osztályozhatjuk HECT és RING alcsaládokra. Az alcsaládok képviselői nem csak felépítésükben, hanem működési mechanizmusukban is eltérnek. A HECT fehérjék közvetlenül az E2-ről transzferálják az ubikvitint a célfehérjére, míg a RING alcsalád tagjai először saját ciszteinjükön kötik az ubikvitint, majd ezt követően továbbítják a lebontásra ítélt fehérjére.



I/13-2. ábra
Az ubikvitináció lépései

Az ubikvitin-ligázok egyszerre képesek felismerni a megfelelő E2 partnerüket és az ubikvitálandó fehérjét, így a létrejövő fehérje komplex biztosíthatja a degradációra történő kijelölés nagyfokú szelektivitását. Ráadásul a RING E3 enzimek gyakran nagy, 10-20 egyéb fehérjéből összeálló komplexekben találhatóak, ami még tovább fokozza szelektivitásukat, és lehetővé teszi a poliubikvitináció kifinomult szabályozását. A fehérjék túlnyomó része előbb vagy utóbb, de intracellulárisan degradálódik, ennek a lebontási folyamatnak azonban térben és időben is kontrolláltan kell megtörténnie. Egy adott fehérje idő előtti és túl késői lebontása egyaránt végzetes következményekkel járhat a sejtekre és ezen keresztül a teljes organizmusra, így érthető, hogy miért van szükség egy ilyen komplex, sok komponensű és jól szabályozható poliubikvitinációs rendszerre.

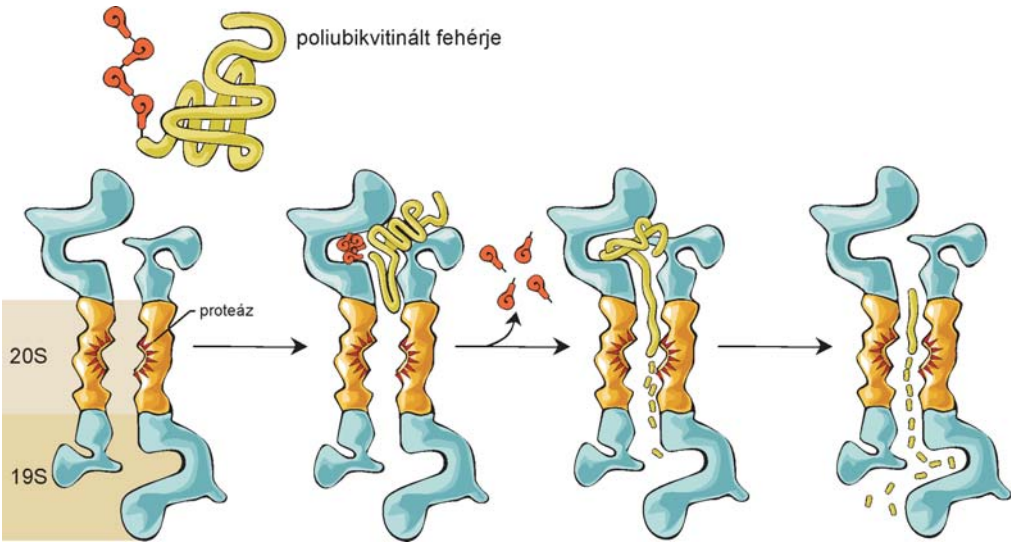
A degradációra kijelölt fehérjék a citoplazmában és sejtmagban egyaránt nagy mennyiségben előforduló ATP-függő proteázrendszerbe, a 26S proteaszómába kerülnek. A proteaszóma szerkezete egy olyan hordóhoz hasonlítható, melynek mindkét fedele szabályozottan nyitható *(I/13-3. ábra)*. A hordó képezi a proteaszóma 20S katalitikus alegységet, amelyet 4, egyenként 7 fehérjéből álló gyűrű épít fel. A hordót alkotó proteázok katalitikus doménje a proteaszóma belseje felé tekint. Ez a szerkezet megakadályozza, hogy a proteaszóma kontrollálatlanul eméssze a citoplazmában, illetve sejtmagban lokalizált fehérjéket. Ugyanakkor a poliubikvitinált, proteaszóma üregébe bejutó fehérjék proteolízise rendkívül hatékony, mivel a 20S alegység egy processzív enzim komplex, szubsztrátját addig kötve tartja, amíg az teljes egészében néhány aminosavból álló peptidekre hasad.



I/13-3. ábra
A proteaszóma elektronmikroszkópos felvételek alapján rajzolt szerkezete

A fehérjék proteaszómába kerülését a hordó fedele, a 17 fehérjéből összeálló 19S alegység szabályozza. Funkcionálisan két részét különböztethetjük meg ennek az alegységnek. Egyik része felelős a poliubikvitin szignál felismeréséért, míg a másik a fehérje kitekerésével a proteaszómába jutást biztosítja. A 19S alegységnek ez a kettős funkciója lehetővé teszi, hogy a degradációs jellel rendelkező fehérjék azonosításukat követően denaturálódva másodlagos, harmadlagos fehérjeszerkezet nélkül jussanak be a proteaszóma üregébe *(I/13-4. ábra)*. A fehérjék denaturációjáért az AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) enzim család egyik tagja felelős. A család tagjai rendkívül változatos folyamatokban vesznek részt, közös jellemzőjük, hogy a kémiai energiát fizikaivá konvertálják, ugyanis az ATP makroerg kötését a fehérjék konformációjának megváltoztatására használják fel. Az ubikvitin egységeket a 19S alegységben található deubikvitináz enzim lehasítja, így azok nem esnek át proteolízisen és újbóli felhasználásra kerülhetnek.

A szabályozott fehérjelebontás központi szerepének megfelelően az ubikvitin/proteaszóma rendszer károsodásai számos betegség hátterében tetten érhetők. A károsodások már mikroszkóposan látható következménye a rosszul hajtogatódott fehérjék felhalmozódása, az ezekből létrejövő fehérje aggregátumok, az aggreszómák megjelenése. Az aggreszómák kialakulása egyfajta kísérlet a károsodott fe-



I/13-4. ábra
A proteaszóma működésének vázlata

hérjék sejten belüli izolálására, azonban ez a védekezési mechanizmus egy bizonyos szint után kimerül, ami végül a sejt halálához vezet. Az így kialakuló sejtpusztulásnak a regenerációra kevésbé képes idegrendszerben vannak a legdrámaibb következményei, ennek megfelelően a legtöbb ubikvitin/proteaszóma rendszer sérülés következtében kialakuló patológiás elváltozást a neurodegeneratív betegségek között találjuk. A jelenleg elfogadott álláspont szerint az öregedés során a sejteknek egyszerre csökken a fehérje hajtogató kapacitása és az ubikvitin/proteaszóma rendszer aktivitása, ennek eredményeként alakulhatnak ki az olyan jellegzetesen időskori betegségek, mint az Alzheimer- és Parkinson-kór.

Az UPS szerepe nem korlátozódik a károsodott fehérjék eliminációjára, elengedhetetlen a sejtciklus szabályozásában, a gyulladásos reakciókban és az immunválaszban is, hogy csak néhány jól ismert példát említsünk. A korábbiakban láthattuk, hogy a poliubikvitináció szelektív mechanizmus, egy adott ubikvitin-ligáz komplex szigorúan a neki megfelelő fehérjét jelöli ki lebontásra. Az UPS sokrétű funkciója és nagyfokú szelektivitása elméleti lehetőséget teremt arra, hogy számos betegséget ezen rendszer befolyásolásán keresztül kezeljünk. A klinikai gyakorlatba eddig csak egy, bizonyos tumorok kezelésére alkalmas általános proteaszóma gátlószer (Bortezomib) került be, de intenzív kutatások folynak poliubikvitinációs rendszer egyes tagjait megcélzó vegyületek azonosítására is.

I/14.
Vírusok molekuláris biológiája

Csala Miklós

I/14.1. BEVEZETÉS

A vírusok különleges helyet foglalnak el a biomasszában, ugyanis e szerves vegyülettársulások az élő és élettelen határán ingadoznak. Örökítőanyagként szolgáló nukleinsavat és fehérjét tartalmaznak, ami néha membránlipidekkel is kiegészül, de önállóan (virion) semmilyen életjelenséget nem mutatnak, nem táplálkoznak, nem mozognak, nem növekednek, nem szaporodnak, nem szekretálnak és nem reagálnak a környezet ingereire. Megfelelő sejtbe jutva azonban a gazda erőforrásait felhasználva reprodukcióra képesek, ezért **obligát endoparaziták**. Bár az áldozatul esett sejt nem feltétlenül pusztul bele az „együttélésbe", az őt tartalmazó többsejtű szervezet rendszerint megsínyli a fertőzést, ezért az állati, emberi és növényi vírusok leginkább az általuk okozott betegségekről ismertek. A XIX. század végén fedezték fel, hogy egyes kórok testváladékok vagy szövethomogenátumok sejtmentes szűrletével átvihetők egyik egyedből a másikba. Maga a vírus elnevezés is a latin „virus" (méreg, mérgező váladék) magyar változata – és nem a latin „vir" (férfi, férj) szóból származik.

A vírus nukleinsavát körülvevő fehérjestruktúrát, amely kevés – néha csupán egyetlen – típusú fehérje több példányából áll, **kapszidnak** nevezik. Ha ezt lipid kettősréteg („envelop", **boríték**) is burkolja, az a gazdasejt plazmamembránjából származik, és szintén vírusfehérjéket tartalmaz. Felfedeztek már olyan kórokozókat is, amelyek kizárólag nukleinsavat (RNS-t) tartalmaznak, és ezt még kapszid sem fedi, de ezek nem valódi vírusok, hanem viroidok, és replikációjukat itt nem tárgyaljuk.

Ahhoz, hogy a vírusok sikeresen tudják kihasználni a megtámadott sejtek metabolikus és molekuláris biológiai adottságait, nagymértékű specializáltságra van szükség, amit a sejtek és a hozzájuk tartozó vírusok közös evolúciója alakít ki. Éppen ezért egy adott vírus jellemzően csak egy vagy néhány nagyon közel álló faj egyedeit tudja megfertőzni, és az egyedeken belül csak bizonyos típusú sejtekben szaporodik. A fajok közti átfertőzés viszont azzal a kockázattal jár, hogy kifejlődhet a vírus olyan változata, amely már az új faj egyedei között terjed, és ez súlyos járványhoz vezethet. A prokarióta sejtekben, pl. baktériumokban élősködő vírusokat fágoknak vagy **bakteriofágoknak** hívják. Az elnevezés az „enni" jelentésű ógörög φαγω [phágő] szóból származik, és valószínűleg arra utal, hogy szilárd táptalajon képzett, homogén baktériumtenyészetben a fágfertőzés úgy néz ki, mintha a sejtmasszából kiharaptak volna egy darabot.

A vírusokat a (mikro)biológia a gazdasejt fajtája, az örökítőanyag típusa, a replikációs mechanizmus és morfológiai jegyek alapján osztályozza; a klinikai orvostudomány az okozott betegség tüneteire, szövődményeire, prognózisára, terjedésére, valamint kezelési és megelőzési módjaira koncentrál. E fejezet pedig kizárólag azokkal a molekuláris jelenségekkel és folyamatokkal foglalkozik, amelyek csak vírust tartalmazó sejtekben fordulnak elő, és ezért a könyv normális sejtműködéssel foglalkozó fejezeteiben nem kerülnek szóba.

I/14.2. A VÍRUSGENOM SAJÁTOSSÁGAI

Míg a sejtek örökítőanyaga minden esetben cirkuláris és/vagy lineáris kettősszálú DNS, a vírusok e vonatkozásban sokkal nagyobb változatosságot mutatnak. A virionban található nukleinsav lehet egyszálú vagy kettősszálú DNS (ssDNS vagy dsDNS), illetve egyszálú RNS (ssRNS), amely kódoló, úgynevezett pozitív „sense" (+) RNS vagy azzal komplementer, úgynevezett negatív „sense" (-) RNS, és lehet kettősszálú RNS (dsRNS), ami persze komplementer, antiparallel kettős hélix, (±) RNS. A DNS örökítőanyaggal rendelkező vírusok között van olyan, amelyik egyszálú RNS-en keresztül replikálódik, és az egyszálú pozitív RNS-t hordozó vírusok egyik csoportja is (a retrovírusoké) kitűnik azzal, hogy genomját DNS-en keresztül replikálja. A retrovírusok tehát élesen elkülönülnek a többi RNS-vírustól, amelyek DNS megjelenése nélkül sokszorosítják genomjukat, vagyis **„tisztán RNS-vírusok"** (lásd a vírusgenom replikációjáról szóló részben). A kapszid sokszor csak egyetlen példányban tartalmazza a vírus genomját, de van olyan virion is, amely dupla nukleinsavat hordoz (pl. a retrovírusoké). A (-) ssRNS-vírusok között akadnak olyanok, amelyek genomja **szegmentált**, vagyis több, lineáris (-) RNS molekulára osztott, ez azonban a replikáció és transzkripció mechanizmusának lényegét nem befolyásolja, így a szegmentált (-) ssRNS-vírusok csupán alcsoportot alkotnak. Ezen alcsoporton belül léteznek olyan vírusok, amelyeknek legalább egy RNS-szegmentje ambivalens polaritású **(„ambisense")**, vagyis részben kódoló (az mRNS-ével azonos), részben minta (az mRNS-ével komplementer antiparallel). Ezek az „ambisense" vírusok mégsem alkotnak önálló csoportot, és nem tekinthetők átmenetnek a (+) és (-) ssRNS-vírusok között, ugyanis szinte mindenben az utóbbiak jellegzetességeit hordozzák.

A vírusok széles körben elterjedt Baltimore osztályozása:

I. Csoport: kettősszálú DNS-vírusok (dsDNS-vírusok)
II. Csoport: egyszálú DNS-vírusok (ssDNS-vírusok)
III. Csoport: kettősszálú RNS-vírusok (dsRNS-vírusok)
IV. Csoport: pozitív egyszálú RNS-vírusok ((+) ssRNS-vírusok)
V. Csoport: negatív egyszálú RNS-vírusok ((-) ssRNS-vírusok)
VI. Csoport: DNS intermedier közbeiktatásával replikálódó (+) ssRNS-vírusok (Retrovírusok)
VII. Csoport: ssRNS intermedier közbeiktatásával replikálódó dsDNS-vírusok (dsRNS-RT-vírusok)

Változó, hogy a virion **cirkuláris** vagy **lineáris** nukleinsavat tartalmaz-e. Mivel a DNS replikációja primert igényel, a lineáris DNS replikációja mindig felveti a telomerek eróziójának veszélyét. Ha tehát a vírus genomja lineáris DNS, vagy a replikáció során lineáris DNS-ként fordul elő, a vírusnak gondoskodnia kell arról, hogy replikáció során ne veszítse el genomjának egy részét. Megoldást jelent, ha a gazdasejtbe került lineáris vírusgenom a replikáció előtt cirkularizálódik (pl. a λ fág esetén), vagy integrálódik a gazdasejt DNS-ébe (pl. a lizogén λ fág vagy a retrovírusok DNS-e). Elkerülhető a DNS-vesztés, ha a primer, amelyről a replikáció elindul, nem RNS, hanem fehérje, amely lehetővé teszi, hogy mindjárt az első nukleotidtól DNS polimerizálódjon (ez figyelhető meg pl. az adenovírusoknál). Egyes vírusok nukleinsavának két végén repetitív hurkok biztosítják a teljes replikációt, és előfordul, hogy a telomer erózióját úgy védi ki a vírus (pl. T4 fág), hogy a replikációt rekombinációval ötvözi. Az itt felsorolt mechanizmusokról bővebben a fejezet megfelelő részeiben lesz szó.

A vírusok kevés génnel operálnak, és ezeket is a lehető legkisebb genomba sűrítik, hiszen stratégiájuk fontos részét képezi a kis méret és az egyszerű struktúra. Szemben tehát a fejlettebb eukarióta sejtek genomjával, amelyeknek csupán néhány százaléka kódol fehérjét, a vírusgenom kihasználtsága igen magasfokú. Gyakran fordul elő, hogy a vírus génjei részben vagy egészben átfednek egymással, és ilyenkor nem feltétlenül azonos leolvasási keret érvényesül. Arra is akad példa, hogy a kettősszálú DNS két szálának egymással komplementer szakaszai egyaránt vírusfehérjét kódolnak, vagyis itt, a mindkét irányban átíródó szakaszon, mindkét DNS-szál minta és kódoló szál is egyben.

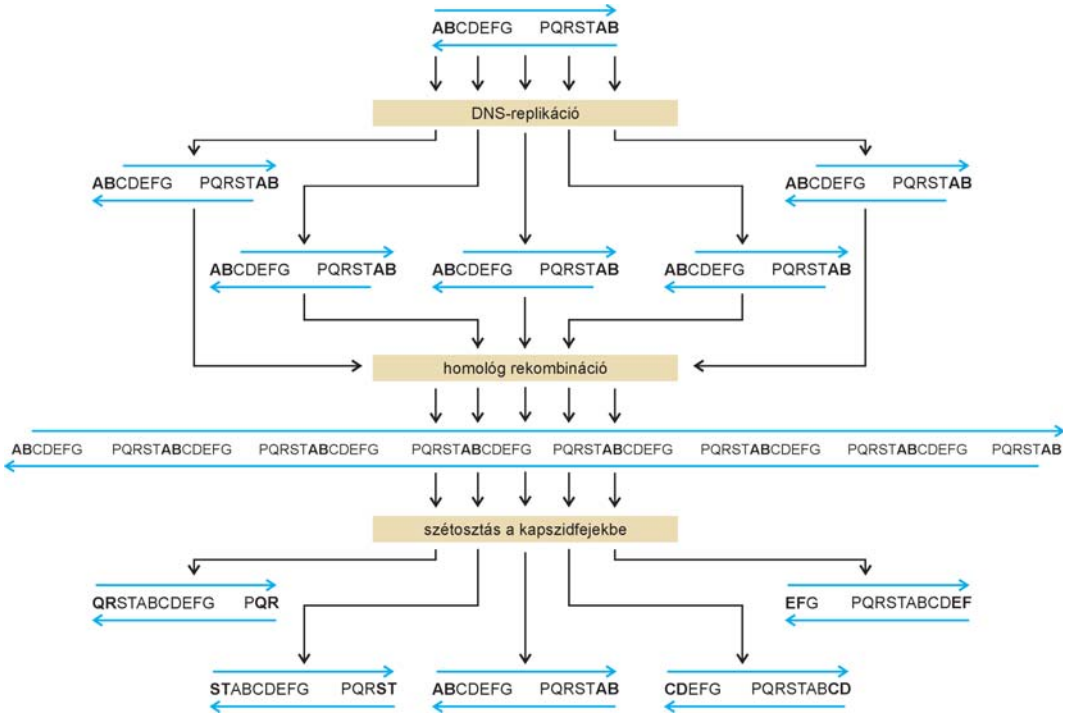
Gyakori jelenség, hogy a vírus replikációja során a sejtben **konkatemer** képződik. Ez olyan lineáris nukleinsav, amely egy viszonylag hosszú szekvenciát (jelen esetben a vírusgenomot) többször egymás után ismétlődve, folyamatos láncként foglalja magában (lásd a vírusgenom replikációjánál több helyen). Bakteriofágoknál nem ritka, hogy a konkatemer genomnyinál kicsivel hosszabb darabokra szabdalva kerül a kapszidba, így a virionok különböző, cirkulárisan permutált és terminálisan redundáns nukleinsavakat tartalmaznak. A **cirkuláris permutáció** azt jelenti, hogy a teljes szekvencia változó kezdőponttal jelenik meg az egyes virionokban. Ha a teljes genomot önmagába záródó körként képzeljük el, az egyes gének (A, B, C, D, E, F, G) meghatározott sorrendben követik egymást, és az utolsó után ismét az első következik (ABCDEFGABCDEFGABC…). Cirkuláris permutációt azzal érünk el, ha változó génnel kezdve vágunk ki egységnyi szakaszokat (pl. ABCDEFG; BCDEFGA; CDEFGAB stb.). A t**erminális redundancia** azt jelenti, hogy a virionba kerülő szekvencia eleje és vége azonos, vagyis egy szakasz megismétlődik. A fenti példában említett génkészlet esetén ez azt jelentené, hogy a kapszidok pl. ABCDEFGA szekvenciát zárnak magukba. Mivel azonban a terminális redundancia a cirkuláris permutációval együtt jár, a kapszidok változó szekvenciákat (pl. ABCDEFGA, BCDEFGAB, CDEFGABC, DEFGABCD, EFGABCDE stb.) rejtenek.

I/14.3. A BAKTERIOFÁGOK REPRODUKCIÓS STRATÉGIÁI

A vírusok önreprodukciós stratégiáit – a molekuláris biológia területén megszokott módon – célszerű elsőként a prokarióták vonatkozásában áttekinteni, mielőtt a vizsgálódást az eukariótákra is kiterjesztenénk. A fágok alapvetően kétféle módszerrel sokasítják saját genetikai állományukat. Az egyik fertőzőképes virionokat hoz létre, és a gazdasejt pusztulásával jár; a másik az életben maradó baktériummal örökíti a fágot generációkon át. Ez utóbbi sem jelenti persze, hogy a baktérium és a fág eggyé válva új fajt eredményez, a vírus ugyanis a gazdát elpusztítva képes visszanyerni integritását.

I/14.3.1. Litikus ciklus

A T4 fág *E. coli* baktériumban zajló reprodukciója a sejt gyors kihasználásával, majd „széthasításával" járó, úgynevezett litikus ciklus legalaposabban tanulmányozott, tipikus esete. A virion megtapad a baktérium felszínén, amit a virion farokrostjai és a külső sejtmembrán pórusképző fehérjéi közti specifikus kölcsönhatás tesz lehetővé. A baktérium érintett fehérjéit ezért – némi szarkazmussal – fágreceptornak is nevezik. A virion farkát alkotó fehérjehüvely hosszában összehúzódik, és a vírusgenomot (dsDNS) a citoplazmába fecskendezi. A gazdasejt egyetlen, cirkuláris kromoszómája perceken belül fragmentálódik, majd teljesen megemésztődik, a li-



I/14-1. ábra
A T4 fág cirkulárisan permutált, terminálisan redundáns, kettősszálú, lineáris DNS-ének replikációja

neáris vírus-DNS pedig több kezdőponton (oriA-G) replikációba kezd, amely hamarosan rekombinációval ötvöződik, és meglehetősen komplikált módon lineáris vírusgenom-konkatemer keletkezéséhez vezet *(I/14-1. ábra).* Az egy-egy vírusra jutó DNS-szakaszt egy vírusfehérje erről a konkatemerről szabja le és tölti az időközben összeállt virionfejekbe. A T4 fág is azon vírusok közé tartozik, melyek DNS-e cirkulárisan permutált és terminálisan redundáns (lásd a vírusgenom sajátosságainál). Végül a vírus kihasítja a sejt membránját és falát, így kiszabadulhat az addigra elkészült **néhány száz új virion.** Az egész ciklus átlagosan 22 percet vesz igénybe.

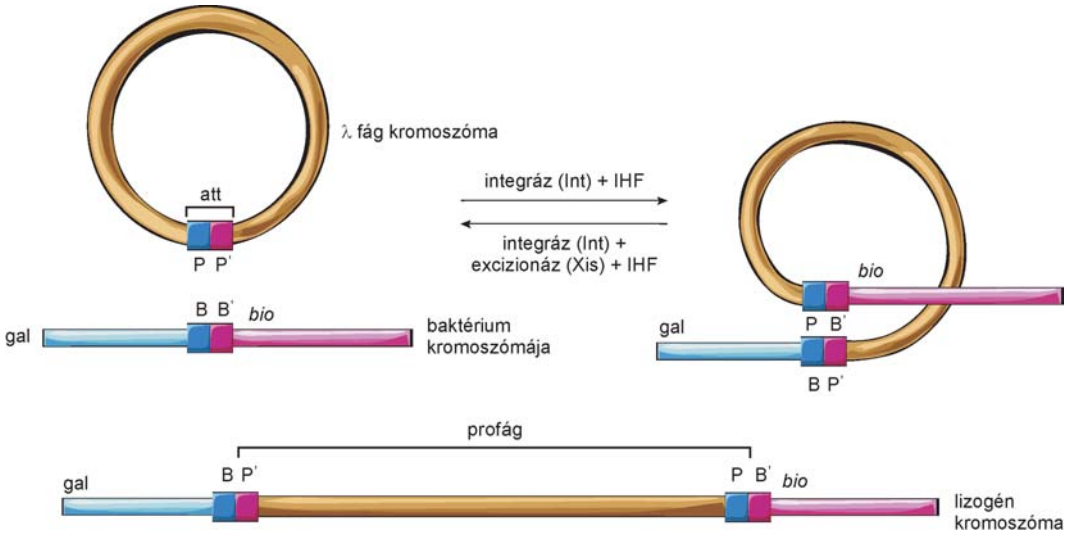
I/14.3.2. Lizogén ciklus

Mivel megfelelő körülmények között maguk a baktériumok is meglehetős hatékonysággal képesek sokszorosítani saját genetikai állományukat, bizonyos fágok úgy is megvalósíthatják biológiai programjukat, hogy beleolvadnak a gazda genomjába és azzal együtt szaporodnak. Ez persze csak akkor vírusreplikáció, ha a fág bármikor képes visszanyerni önállóságát, tehát időzített bombaként tartózkodik a gyanútlan baktériumban. Azokat a fágokat, amelyek képesek így meghúzódni a háttérben, **visszafogott fágoknak** nevezzük (a szerző szerint ez találóbb megfelelője az angol „temperate phage" kifejezésnek, mint a gyakran használt, szó szerinti „mérsékelt fág" kifejezés). Az inaktív, látens – lényegében csak genetikai információként létező – fág a **profág**, a sejt pedig, melynek a lízis – némi képzavarral – Damoklész kardjaként függ a feje fölött, a **lizogén**. A profág tartós represszió jának megszűnése, vagyis a fág reaktiválódása a **fágindukció**.

A legismertebb visszafogott fág az E. coliban élősködő λ (lambda) fág a T4-hez hasonlóan juttatja be lineáris dsDNS-ét a baktériumba. A genom két végén egy-egy 12 nukleotid hosszúságú, egymással antiparallel-komplementer, egyszálú DNS-szakasz található, amelyek tapadó végként („cohesive ends") a DNS gyűrűvé záródását segítik. A restrikciós endonukleázoknál említendő, ragadós végek („sticky ends") lényegesen rövidebbek és palindromok, ezért ezeket célszerű elkülöníteni. Az itt tárgyalt tapadó végeket a fág termináz enzime hozza létre a vírus-DNS replikációjakor a (nem palindrom) cos-szekvencia kétszeres (nem szimmetrikus) hasításával. Az azonnali gének kifejeződésekor el is dől, hogy a fág mennyire lesz visszafogott, azaz hogy a litikus vagy a lizogén utat választja. Ez alapvetően két transzkripciós szabályozó fehérje arányán múlik: ha a cro/cII arány magas, a sejt fággyárrá válik és elpusztul; ellenkező esetben integráz termelődik, és a segítségével a bakteriális kromoszómába integrálódott profág csak λ-represszor (cI) fehérjét termel. Szemben a litikus ciklussal, amely kb. 20 percenként százával ontja a virionokat, a lizogén ciklus a bakteriális hasadás tempójában szaporítja a (pro)fágot, ami optimális körülmények között kb. félóránkénti duplázódást jelent.

I/14.3.2.1. A λ fág integrációja

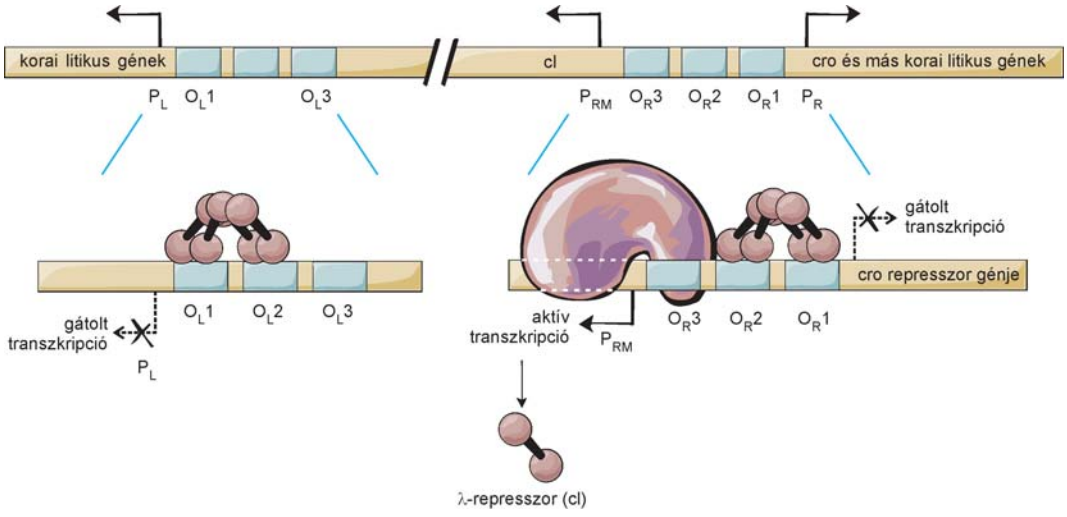
A fág és a baktérium cirkuláris DNS molekulái előre kijelölt pontjaikon („attachment sites" – attP és attB) érintkeznek egymással, és a vírus integráz (Int) enzime a baktérium egyik fehérjéje („integration host factor", IHF) segítségével végrehajtja a két genom rekombinációját *(I/14-2. ábra)*. Mivel a profág beékelődése nem véletlenszerű helyen történik, és ez két operon közé esik, a baktérium részéről nem kell funkcióvesztéssel számolni, és a vírusgének expresszió is függetlenül szabályozható.



I/14-2. ábra
A λ fág integrációja és kihasítása a gazdasejt gal és bio operonjai között

I/14.3.2.2. A λ fág represszója

A fágrepresszió lényege, hogy a lizogénben jelen lévő egyetlen fágfehérje szabályozza saját termelődését, és egyúttal megakadályozza bármilyen más fággén kifejeződését. A represszió tehát mindaddig fennáll, amíg ez a bizonyos fehérje (a cI λ-represszor) el nem tűnik. A profág litikus ciklusának korai génjei két operonba rendeződnek, melyeket a géntérképen való elhelyezkedésük alapján bal- (L) és jobb oldali (R) operonokként különböztetnek meg. A bal oldali operon transzkripciója a promóterétől (P_L) indulva balra halad, a jobb oldali operon átírása a promóterétől (P_R) indulva jobbra halad. A λ-represszor cI génje egyik operonhoz sem tartozik, és a kettő között, centrálisan helyezkedik el. A cI promótere (P_{RM}) a P_R közelébe esik, és a gén balra haladva íródik át. Mindkét oldalon három-három operátor régió köti a génexpresszió szabályozófehérjéit. A bal oldali operátorok (O_L1, O_L2 és O_L3) a bal oldali operon átírásának regulációjában vesznek részt, a jobb oldali operátorok (O_R1, O_R2 és O_R3) pedig a jobb oldali operon és a cI transzkripcióját szimultán kontrollálják. A λ-represszor mindkét oldalon nagyobb affinitással kötődik az 1-es és 2-es, mint a 3-as operátorhoz. Ha tehát a λ-represszor fehérje koncentrációja alacsony, az csak az O_L1, O_L2, illetve O_R1, O_R2 régiókat fedi le. Ez egyrészt megakadályozza mindkét korai litikus operon kifejeződését, másrészt növeli az RNS-polimeráz PRM iránti affinitását, ezzel fokozza magának a cI génnek az átírását *(I/14-3. ábra)*. Ha azonban a λ-represszor fehérje koncentrációja megemelkedik, az O_L3 és O_R3 kötőhelyek is telítődnek, és ez már megakadályozza az RNS-polimeráz PRM-hez való kapcsolódását, így felfüggeszti magának a cI génnek az átírását. Ez a rendszer a λrepresszor szintjét korlátok között tartja, de a profág egyetlen más génjének kifejeződését sem teszi lehetővé.



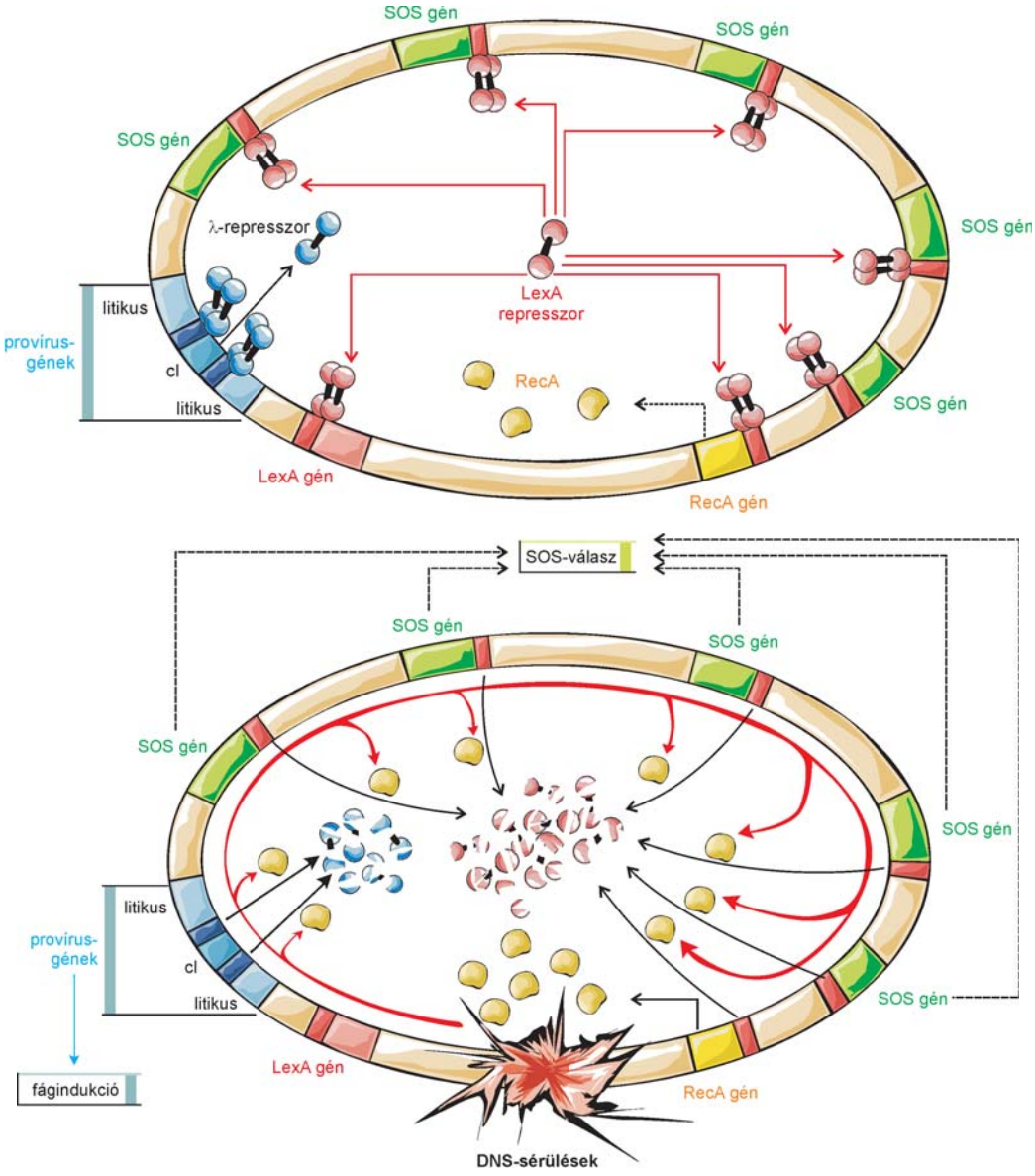
I/14-3. ábra
A λ-represszor (cI) expressziójának önszabályozása és a provírus represszió a lizogénben

I/14.3.2.3. A λ fág indukciója

Bár a profág reaktiválódása látszólag spontán módon is bekövetkezhet, ezt jellemzően a gazdasejt súlyos DNS-károsodása indítja be, így mesterségesen is kivált-

ható például UV-besugárzással. Mivel a korai operonok negatív szabályozás alatt állnak, az indukció a represszor kiiktatását igényli, a fág evolúciója pedig gondoskodott róla, hogy a λ-represszor fehérje lebomoljon, amikor a baktérium nagy bajban van.

A nagy bajt az úgynevezett **SOS-válasz** beindulása jelzi. Ennek lényege, hogy a replikációs villa elakadását eredményező DNS-sérüléseket érzékelve a baktérium RecA fehérjéje aktív konformációt vesz fel, és hozzákapcsolódik a baktérium LexA represszorához, amely ennek hatására autoproteolízist követ el, vagyis elhasítja sa-



I/14-4. ábra
A λ-represszor (cI) működésének felfüggesztése a lizogén SOS-válasza során

ját peptidláncát. A LexA által kontrollált gének, amelyek ilyenkor felszabadulnak a gátlás alól, a DNS-léziók kijavításáról, a replikáció továbbhaladásáról és a baktérium túléléséről gondoskodnak.

A λ-represszor fehérje szabályozásában a LexA represszort utánozza, vagyis szintén köti az „aktiválódott" RecA-t, és szintén autoproteolízissel gondoskodik a profág korai litikus operonjainak indukciójáról *(I/14-4. ábra)*. Az egyik korai géntermék a cro represszor, amely nagy affinitással kötődik az OR3-hoz, ezáltal megakadályozza az RNS-polimeráz PRM-hez való kapcsolódását, vagyis a cI gén átírásának blokkolásával irreverzibilissé teszi a fágindukciót. Egy másik korai géntermék, az excizionáz (Xis) az integrázhoz kapcsolódva, annak eredeti funkcióját visszájára fordítva, a profág precíz kihasítását idézi elő, amihez az IHF jelenléte is szükséges *(I/14-2. ábra)*. Innentől kezdve a fág úgy viselkedik, mintha most jutott volna a sejtbe, és belefog a litikus ciklus végrehajtásába. Világos, hogy a baktérium részéről az SOS-válasz kétségbeesett kísérlet az életben maradásra, és érthető, hogy a genomjában megbújó profág ezt észlelve litikussá válik, és virionként menekül, hiszen a süllyedő hajót a patkányok hagyják el először.

I/14.4. AZ EMBERBEN ÉLŐSKÖDŐ VÍRUSOK REPRODUKCIÓS STRATÉGIÁI

Az eukarióta sejteket, szervezeteket támadó vírusok reprodukciós stratégiái lényegesen nagyobb változatosságot mutatnak, mint a fágokéi. Mivel ez a könyv orvos- és fogorvostanhallgatók számára készül, a téma tárgyalását leszűkítjük a humán patogén vírusok területére.

A tisztán RNS-vírusok az influenzavírusok kivételével a citoplazmában reprodukálódnak, míg a retrovírusok reverz transzkripciója a citoplazmában zajlik, de a replikációt utána mindig a sejtmagban folytatják. A kisebb DNS-vírusok szintén beköltöznek a sejtmagba, de a nagyobbak inkább saját enzimkészletet kódolnak, és a önállóan a citoplazmában reprodukálják magukat.

A humán vírusfertőzések legjellemzőbb alapesete tulajdonképpen a fágok litikus ciklusának megfelelő **heveny fertőzés (akut infekció),** amikor a vírus sikeresen replikálódik és elpusztítja a gazdasejteket. Így zajlik például az influenza, a vírusos nátha, gyomor-, bélhurut, a heveny májgyulladás, valamint ilyenek voltak a típusos gyermekkori vírusbetegségek (mumpsz, kanyaró, rózsahimlő, bárányhimlő, járványos gyermekbénulás), amelyeket – hála a védőoltásoknak – ma már ritkán látni, és ilyen volt a (fekete) himlő, amelyet védőoltásokkal sikerült teljesen felszámolni. Akut infekció folytatásaként vagy önállóan is megtörténhet, hogy a vírust valamilyen formában tartalmazó sejtek életben maradnak. Ha e sejtek folyamatosan termelik a fertőzőképes virionokat, de ők maguk nem pusztulnak el, így az utánpótlás fennmarad, **tartós (perzisztáló) vírusfertőzésről** beszélünk. Klinikai értelemben akkor szokás **idült fertőzésnek (krónikus infekciónak)** nevezni, ha vírus jelenléte tünetekkel is jár, de előfordul, hogy a fertőző vírusgazda vagy **-hordozó** aszimptomatikus marad, esetleg ez a két állapot váltogatja egymást. Erre példa a krónikus májgyulladás, amelyet a nem A típusú hepatitis vírusok szoktak okozni. Amikor a vírust tartalmazó sejtek egyáltalán nem termelnek virionokat, mert a kórokozó alvó („dormant") marad, **lappangó fertőzés (látens infekció)**, ami természetesen tünetekkel sem jár, sőt kimutatni is nehéz. Bár a látens infekció a perzisztáló infekció extrém esetének – vagy inkább fázisának – is tekinthető, a kettőt általában megkülönböztetik egymástól a tartós viriontermelődés hiánya, illetve megléte alapján. A látenciát azonban bármikor felválthatja a rejtőző provírus aktiválódása, amit a gazdasejtben kialakuló

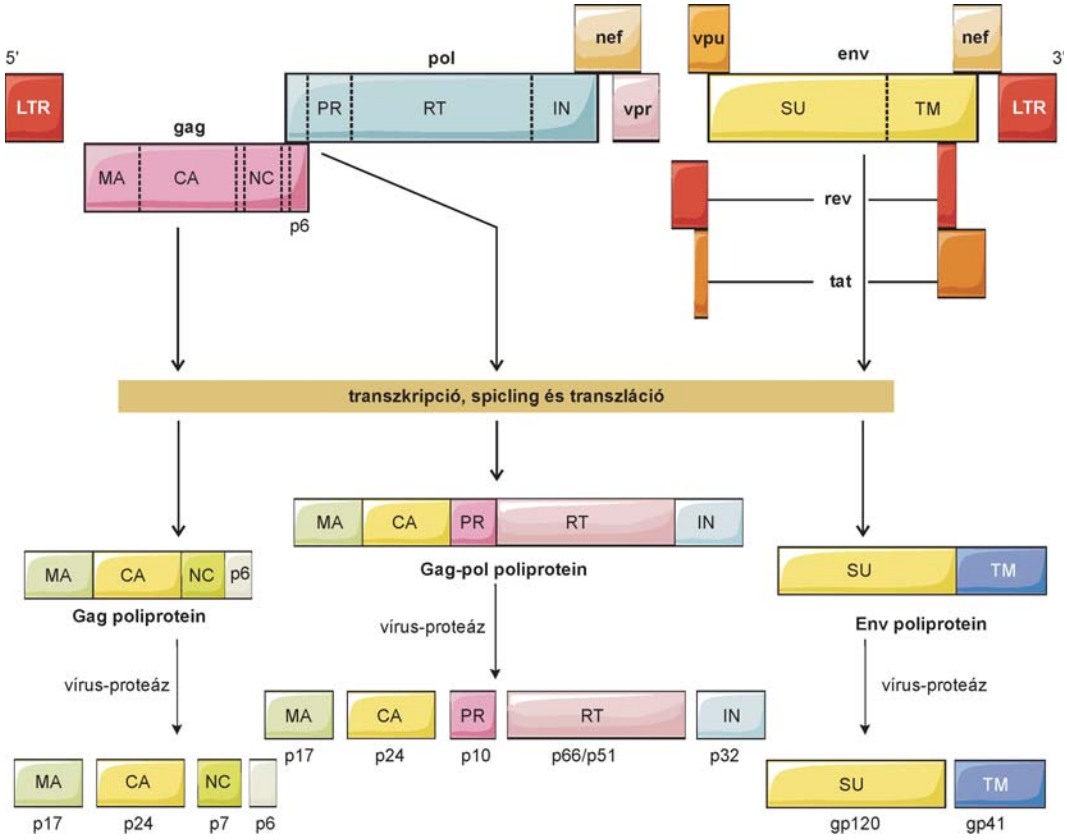
stressz, illetve a szervezet immunrendszerének és/vagy tápanyagellátottságának zavara indít be. Közismert példa erre Herpes simplex 1 vírus által okozott ajakherpesz és a bárányhimlő után akár évekkel kialakuló övsömör, amelyeket a sokáig látens Varicella zoster vírus vált ki.

Hogy a vírus litikus replikációt hajt végre, vagy alig reprodukálja magát, esetleg teljesen alvó állapotba kerül, a vírus és a gazdasejt tulajdonságaitól és a szervezet állapotától is függ. Egy adott vírus reprodukcióját lehetővé tevő sejteket **permisszívnek** nevezzük. Ha a vírus **nem permisszív** (vírusszaporodást gátló) sejtbe jut, ott provírusként látszólag vagy valóban inaktívvá válik. A provírus két formában rejtőzködhet a sejtben: maradhat önálló, cirkuláris, kettősszálú episzóma jellemzően több példányban, vagy integrálódhat a gazda genomjába. Mindkét változat veszélyt jelenthet a nem permisszív sejt, illetve azon keresztül az egész szervezet számára, ugyanis megzavarhatják a sejtproliferáció és a sejthalál összetett szabályozását. Ennek egyik módja, hogy az alvónak tűnő állapotban is termelődő vírusfehérjék a sejt úgynevezett tumorszuppresszor fehérjéihez (pl. p53, pRB) kötődnek, és azokat gátolják. Az előre kiszámíthatatlan helyre való provírusintegráció pedig kiiktathat vagy éppen túlaktiválhat olyan géneket, amelyek a sejt osztódását, differenciálódását és túlélését hivatottak kontrollálni. Perzisztáló fertőzés esetén mindezekhez hozzáadódik még a folyamatos gyulladás és stressz, valamint a pusztuló sejtek állandó utánpótlása miatt szükséges mitogén és túlélési stimulus. Éppen ezért talán nem meglepő, hogy egyes vírusfertőzések fokozzák a rosszindulatú daganatok kialakulásának kockázatát, ezért az ilyen kórokozókat **tumorkeltő vírusoknak** nevezik. E fejezet szempontjából fontos kiemelni, hogy a gazdasejt transzformálása burjánzó daganatsejtté nem más, mint alternatív replikációs stratégia a litikus reprodukció lehetőségétől megfosztott vírus számára.

Az eukarióta sejtekben élősködő vírusok között különleges csoportot alkotnak a **retrovírusok**. Sok sajátosságukat e fejezet későbbi részei tárgyalják részletesebben, de egyedi reprodukciós stratégiájuk miatt itt is külön szakaszt érdemelnek. Virionjuk lipidmembrán borítékkal rendelkezik, és ezen belül helyezkedik el a nukleokapszid, vagyis a kettős fehérjeburokba foglalt két pozitív RNS molekula. A boríték membránjában ülő vírusfehérjék specifikusan kötődnek a célsejt plazmamembránjának fehérjéihez, majd a nukleokapszid a két membrán fúziójával jut a citoplazmába. Itt végbemegy a vírus-RNS-ek reverz transzkripciója, a keletkező vírus-DNS a magba vándorol, és kötelezően integrálódik a sejt DNS-ébe. Az inszerció mindig génexpresszió szempontjából aktív eukromatinban történik, de pontos helye előre nem meghatározott. Litikus vírusreplikáció hiányában az akut infekció jelei nem észlelhetők, helyette általában hosszú, tünetmentes perzisztáló fertőzés zajlik, és a betegség néha csak hónapok, évek elteltével válik nyilvánvalóvá. A vírus-DNS saját promóterrel (LTR-szekvencia, lásd később) rendelkezik, és innen kiindulva a sejt transzkripciós apparátusa különböző vírus-mRNS-eket polimerizál, melyekről a citoplazmában többnyire **poliproteinek** szintetizálódnak. A plazmamembránnál gyülekező vírus-poliproteinek membránkiboltosulást okoznak, amely a vírus genomiális RNS-ének két példányát és a gazdasejt hozzájuk kapcsolódó egy-egy tRNS-ét is magába zárja, majd végül lefűződik a sejtről. A retrovírus proteáza, amely már poliproteinbe foglalva is működőképes, a poliproteineket a megfelelő helyen hasítja, így létrejönnek az önálló vírusfehérjék, és a kétrétegű fehérjekapszid elnyeri végső formáját.

A retrovírusok poliproteint kódoló génjei a *gag*, a *pol* és az *env*, melyekről gag, gag-pol és env poliproteinek szintetizálódhatnak. Ezek mellet tartalmaz még a retrovírusgenom néhány gént, amelyek önálló fehérjéket kódolnak. Mivel a retrovírus csak egy promóterrel (LTR) bír, a különböző gének kifejeződése alternatív mRNS-splicing függvénye (lásd később). A vírusprotetáz a gag-ból kapszid-

fehérjéket, a pol-ból a reverz transzkriptázt, az integrázt és magát a proteázt, az env-ből pedig a boríték két fehérjéjét szabadítja ki *(I/14-5. ábra)*. Az állati retrovírusok egy része tartalmaz még egy ráadás gént a genom végén, amely a gazdasejt egyik természetes fehérjekódoló szekvenciájának sokszorosan mutált változata. Ezt a vírusonként eltérő gént általános néven virális onkogénnek (v-onc) nevezik, mivel nagyon hatékonyan transzformálja a gazdasejtet daganatsejtté. Az ilyet hordozó vírusokat pedig megkülönböztetésül **akutan transzformáló retrovírusként** emlegetik.



I/14-5. ábra
A HIV retrovírus genomja és poliproteinjei

I/14.5. A VÍRUSGENOM REPLIKÁCIÓJÁNAK SAJÁTOSSÁGAI

I/14.5.1. DNS-vírusok (dsDNS és ssDNS) replikációja

A reverz transzkripciós DNS-vírusok (dsDNS-RT) kivételével a DNS-vírusok replikációjának alapelve azonos a sejteknél megismertével, és magától értetődően ebben is DNS-függő DNS-polimeráz, más néven DNS-polimeráz, játssza a főszerepet, amely lehet a vírus által kódolt fehérje vagy a gazdasejt enzime. Azok a vírusok,

amelyek teljes életciklusukat a citoplazmában töltik, nem férnek hozzá a sejt polimerázaihoz, így replikációjukhoz és transzkripciójukhoz saját fehérjéket kell biztosítaniuk. Ezzel szemben néhány kis DNS-vírus a sejtmagban reprodukálódik, és saját polimerázok híján kizárólag a gazda enzimkészletére hagyatkozik. A sejt DNS-polimerázainál megszokott **piszkozatjavító** 3'-exonukleáz aktivitás néhány vírus-DNS-polimerázban is megtalálható, de általában hiányzik, ami a vírusgenom **magasabb mutációs rátáját**, egyúttal a vírus gyorsabb evolúciós adaptációját biztosítja. Egyetlen **DNS-polimeráz** sem tud szabadon új láncot indítani, vagyis a dezoxi-ribonukleotidokat **csak meglévő hidroxil-csoporthoz** tudja hozzákapcsolni. Ez a hidroxil-csoport lehet egy primáz által előkészített RNS primer 3' OH-ja; ssDNS esetén lehet a lánc saját, önmagával komplementer, és ezért visszafordúló 3' vége; dsDNS esetén lehet a komplementer DNS-szál egyik 3' OH-ja, ha azt egy endonukleáz „nick" képzéssel szabaddá teszi; és lehet egy vírusfehérje tirozin vagy szerin oldalláncának funkciós csoportja. Utóbbi esetben persze a nukleinsav a fehérjéhez kovalensen kötve marad.

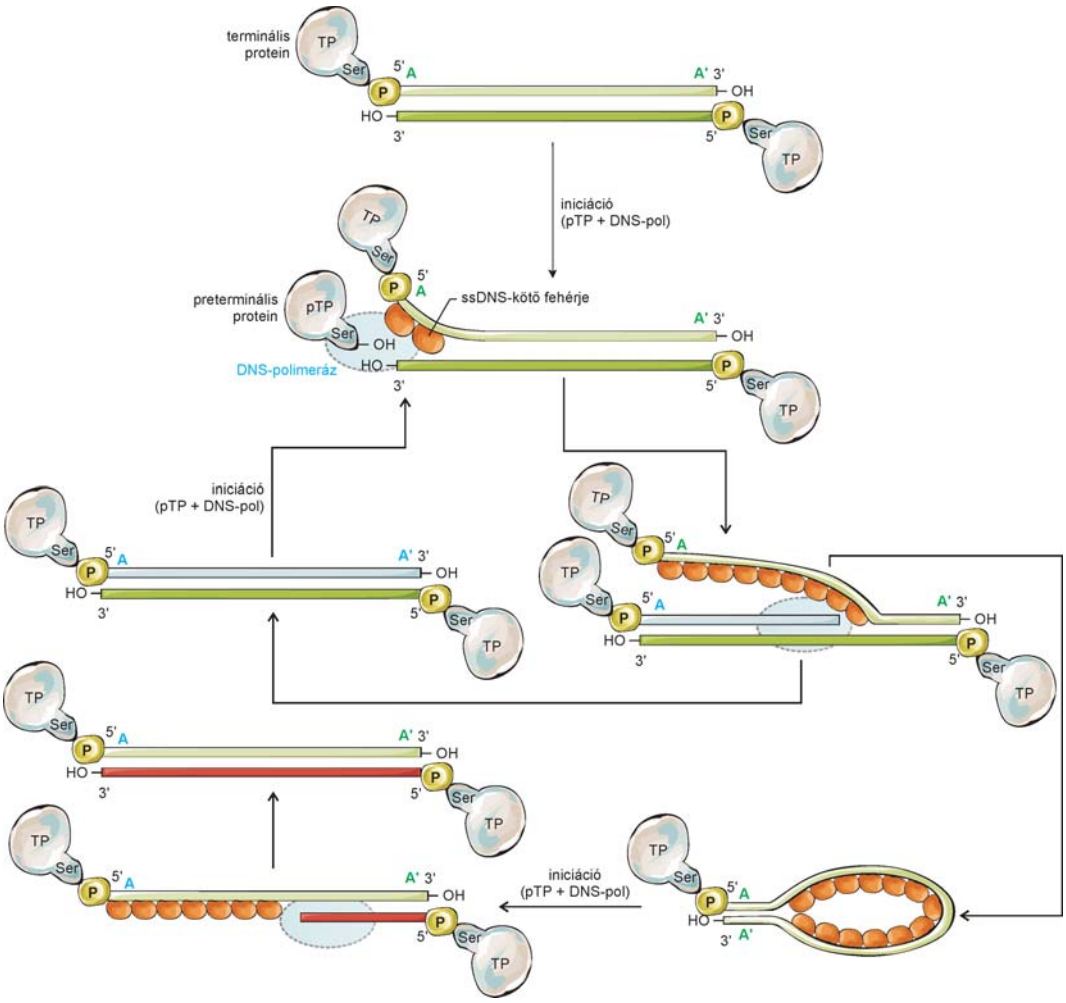
I/14.5.1.1. Bidirekcionális DNS-replikáció

Számos bakteriofág és a sejtmagban szaporodó dsDNS-vírusok többsége alapvetően azt a kétirányú DNS-szintézist követi, amelyet a prokarióta genom replikációjánál megismertünk. Az eleve cirkuláris vagy a sejtbe jutva gyűrűvé alakuló kettősszálú DNS tartalmaz egy kezdőpontot („origin"), ahol a hélix széttekeredik, majd a replikációs villák egymástól távolodva théta (θ)-struktúrát formálnak. Vezető és késlekedő szálak alakulnak ki, az utóbbin Okazaki-fragmentumokkal. RNS primerek kezdik a DNS-szakaszokat, amelyeket utólag DNS vált fel, és a „nick"-eket egy ligáz beheggeszti. Vírusonként változó, hogy mely részfeladatokat látnak el a gazdasejt fehérjéi és melyeket a vírus saját géntermékei.

I/14.5.1.2. Szálkiszorításos („strand displacement") DNS-replikáció

E DNS-szintézis sajátossága, hogy a lineáris, kettősszálú DNS egyik szála mintául szolgál egy új komplementer szál polimerizációjához, amely képződésével fokozatosan leszorítja az eredeti kettős hélix már meglévő másik szálát, és azt egyszálú DNS-t kötő fehérjék borítják. Ezután ehhez az egyszálú DNS-hez második lépésként szintetizálódik egy komplemeter szál, és ezzel (szemikonzervatív módon) kialakul az eredetivel azonos, lineáris dsDNS.

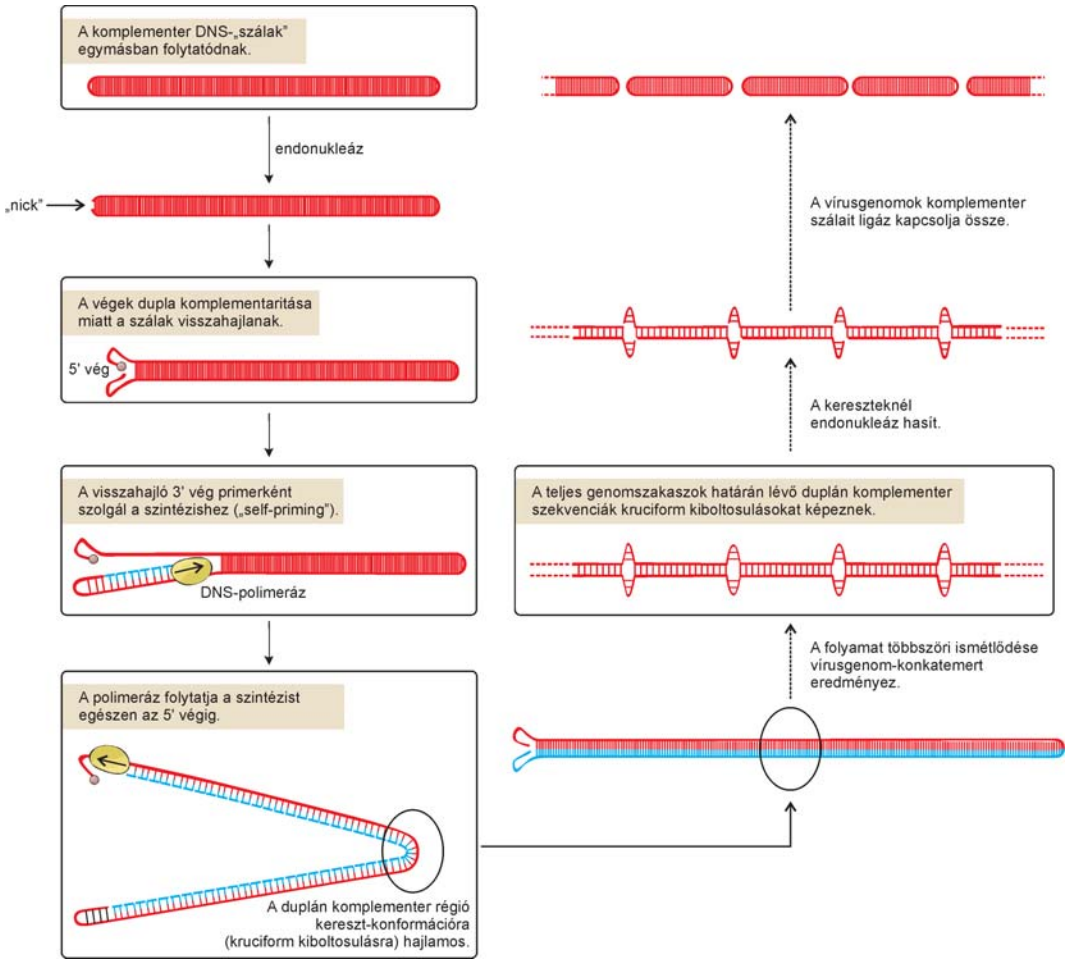
Az adenovírusok esetén a DNS-szintézis elindításához egy **pre-terminális fehérje** („pre-terminal protein, pTP) szolgáltat „primert". Az új szál szintézise nukleotidkihagyás nélkül indulhat a komplementer szál végén, ugyanis a legelső nukleotid (egy dCMP) a pTP egyik szerin oldalláncának hidroxil-csoportjához kapcsolódik. A replikáció során a pTP fehérje terminális fehérjévé (TP) érik, így a vírusgenom minden DNS-szála kovalensen kötött TP-t tartalmaz az 5' végén *(I/14-6. ábra)*. Más vírusoknál (pl. poxvírusok) a lineáris genom végei úgy záródnak, hogy a komplementer szálak egymással folytonosak, a DNS tehát voltaképpen egyszálú és cirkuláris. Endonukleáz általi hasításkor terminális, duplán komplementer szekvenciák hurkot képeznek, és ez szolgál primerként **(„self-priming")**. Ilyenkor a szálkiszorításos replikáció többszöri lefolyása olyan, hosszú terméket eredményez, amely az eredeti vírusgenomot folyamatosan több példányban is tartalmazza (konkatemer). Az teljes genomszakaszok közti duplán komplementer szekvenciák kereszt-konformációt (kruciform kiboltosulásokat) alakítanak ki. A folyamat azzal fejeződik be, hogy e kereszteknél a konkatemert egy endonukleáz felhasítja, és a komplementer szálak végei között kialakul a folytonosságot biztosító foszfodiészter *(I/14-7. ábra)*.



I/14-6. ábra
Az adenovírusok szálkiszorításos replikációja fehérje-primerrel

I/14.5.1.3. Forgó karika („rolling circle") DNS-replikáció

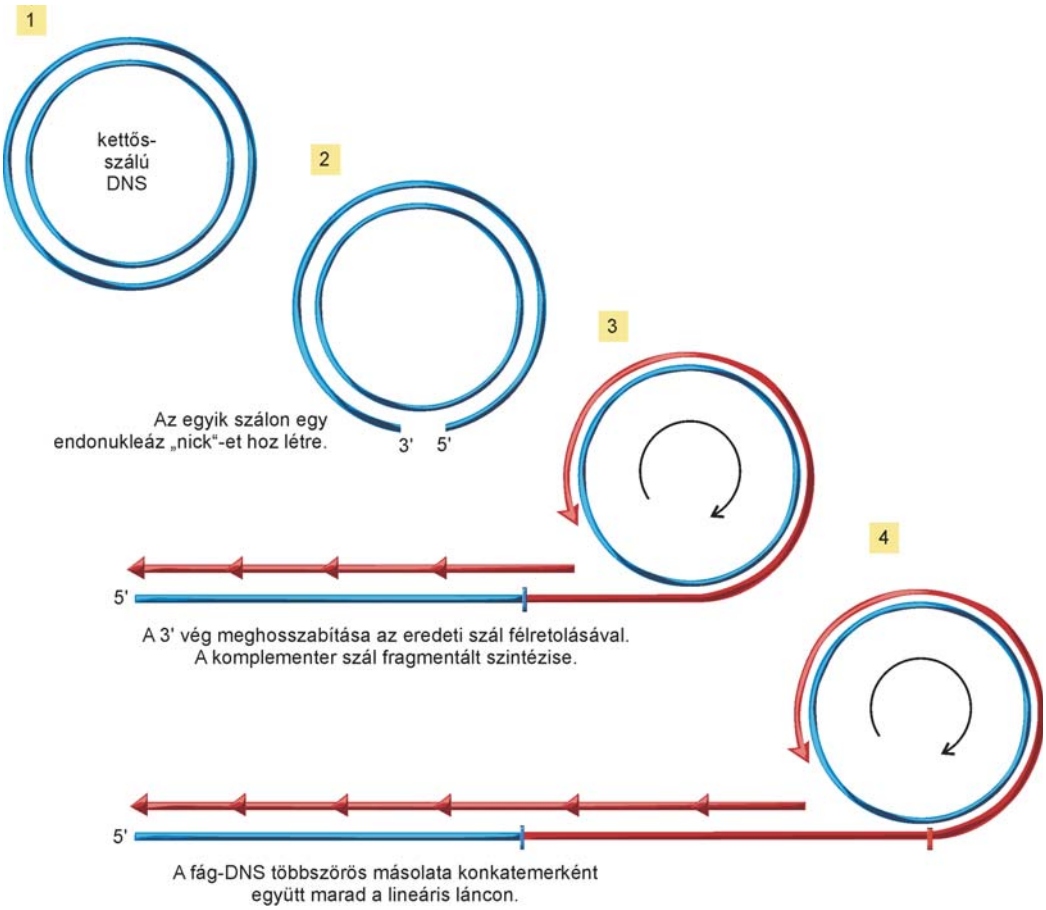
Ez a mechanizmus az előbbi kettő hibridje, mert a cirkuláris DNS szálkiszorításos replikációjával és az így keletkező egyszálú DNS-en a másik új szál késlekedő (Okazaki fragmenseket képző) szintézisével először lineáris konkatemer jön létre. A folyamat azzal kezdődik, hogy a cirkuláris kettősszálú DNS egyik szálán egy endonukleáz elhasít egy észterkötést, vagyis „nick"-et hoz létre, amelynek szabad 3' OH-csoportja szolgál a vezető szál szintézisének kiindulópontjául. Csakhogy a polimerizáció letolja maga előtt az eredeti szálat, amely egy teljes fordulat után már nem eredeti, hanem újonnan szintetizált, és a forgó karika nyomtatóhengerként állítja elő a vírusgenom újabb példányait egy láncra fűzve (konkatemer). Ezen a folyton letekeredő vezető szálon az ellenkező irányban Okazaki-fragmentumok formájában



I/14-7. ábra
A poxvírusok szálkiszorításos replikációja „self-priming" indítással

szintetizálódik a komplementer késlekedő szál. Az RNS primerek utólag DNS-re cserélődnek, és a fragmentumok folytonos szállá kapcsolódnak össze a sejtekben zajló replikációnál megismert módon *(I/14-8. ábra)*. A kettősszálú konkatemer utólag vírusgenomnyi darabokra vagdosva kerül az újonnan képződő kapszidokba. Itt is érdemes megemlíteni, hogy ha a darabolás egysége nagyobb a teljes genetikai információ egységénél – és ez fágoknál gyakori –, akkor terminális redundancia, illetve cirkuláris permutáció észlelhető (lásd a vírusgenom sajátosságainál).

Az ssDNS-vírusok általában szintén forgó karika replikációval sokasodnak. A gazdasejt enzimei először „kétszálúsítják" a vírusgenomot, vagyis előállítják a komplementer szálat, így kialakul az úgynevezett replikációs forma. Ezen „nick" keletkezik, és beindul a vezető szál szintézise, csakhogy annak minden vírusgenomnyi szakasza lehasad, és nem egészül ki komplementer szállal, hanem vagy kapszidba csomagolódik, vagy újabb replikációs formát képez, ezzel újabb vírusgyárat alapítva (amplifikáció). Ily módon rengeteg + és – szál keletkezik, amelyek egyaránt bekerül-



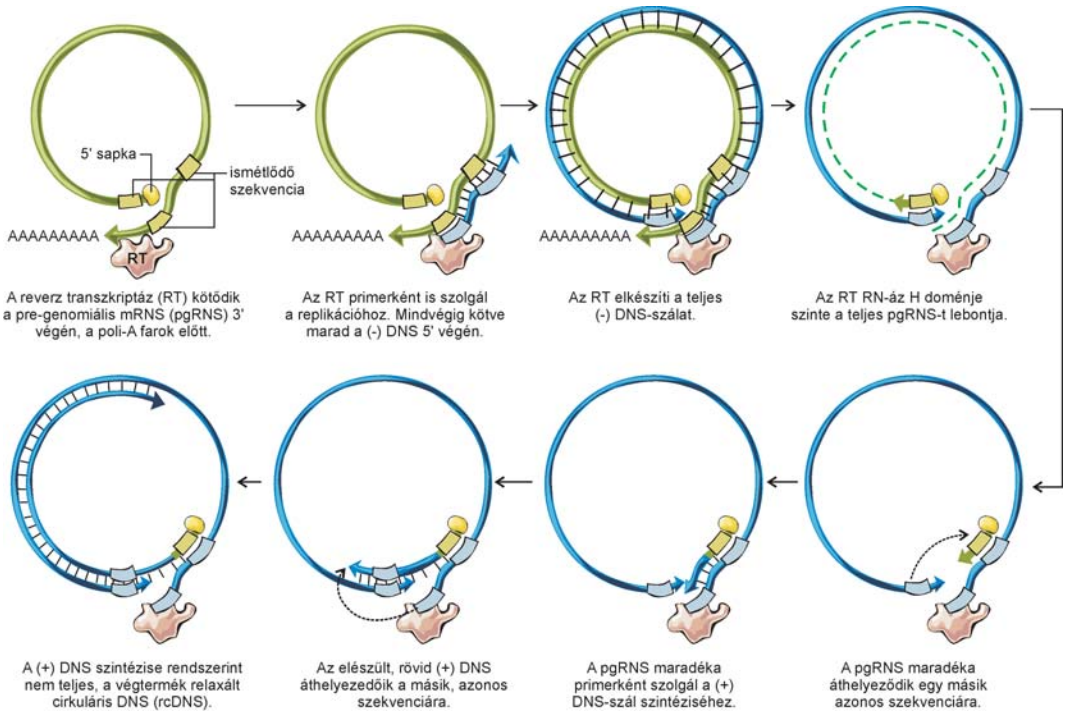
I/14-8. ábra
A forgó karika („rolling circle") DNS-replikáció

hetnek az újonnan képződő kapszidokba. Az ssDNS-vírusokat éppen ezért nem lehet aszerint osztályozni, hogy pozitív vagy negatív „sense" szálúak.

I/14.5.2. Reverz transzkripciós DNS-vírusok (dsDNS-RT) replikációja

A DNS-vírusok különleges csoportját alkotják a Caulimoviridae és a Hepadnaviridae családok (ez utóbbiba tartozik a hepatitisz B vírus, HBV), **amelyek tökéletlenül kettősszálú DNS örökítőanyaga (relaxált cirkuláris DNS, rcDNS) egy vírus-RNS-ről (pre-genomiális RNS, pgRNS) mint mintáról reverz transzkripcióval készül.**

A megfertőzött sejtbe került rcDNS gyűrű alakú, de egyik szála sincs kovalensen gyűrűvé zárva. A teljes hosszúságú (-) szálának 5' vége kovalensen kötődik a reverz transzkriptáz (RT) fehérje TP doménjében található egyik Tyr-OH csoporthoz. A komplementer (+) szál rendszerint nem teljes hosszúságú, és 5' végén RNS primer található. Ezt a struktúrát a sejtmagban a hibajavító enzimek valódi és teljes



I/14-9. ábra
A reverz transzkripciós DNS-vírusok (dsDNS-RT) replikációja

gyűrűs, kettősszálú DNS-sé (kovalensen zárt cirkuláris DNS, cccDNS) alakítják, amely a vírus mRNS-einek mintáját szolgáltatja, és így a vírusgének (a kapszid és a boríték fehérjéit, illetve az RT-t kódoló gének stb.) kifejeződését teszi lehetővé. A cccDNS azonban közvetlenül nem replikálódik újabb vírus-DNS-ekké. E helyett az újonnan összeállított kapszidokba egy-egy pre-genomiális vírus-mRNS (pgRNS) és hozzájuk társult RT fehérje csomagolódik, majd itt zajlik az új vírus-DNS-ek szintézise. Az RT az mRNS 3' végén, közvetlenül a poli-A farok előtt, megkezdi a (-) DNS-szál szintézisét, méghozzá egyedülálló módon **primerként is saját magát** (TP domén, Tyr-OH) használva. A teljes hosszúságú szál elkészültekor az RT (annak RN-áz H doménje) az eddig templátként használt mRNS-t szinte maradéktalanul lebontja. A meghagyott, rövid RNS fragmentum a DNS-en áthelyeződve primerként szolgál a komplementer (+) DNS-szál RT általi szintéziséhez, de ez legtöbbször félbemarad, aminek legvalószínűbb oka, hogy elfogynak a dNTP-k a kapszidban *(I/14-9. ábra)*.

I/14.5.3. Tisztán RNS-vírusok (dsRNS, (+) ssRNS és (-) ssRNS) replikációja

Azokat a vírusokat nevezik tisztán RNS-vírusnak, amelyek **reprodukciója nem foglalja magában a genom DNS-ként való megjelenését**, tehát a genetikai információ tárolása, átörökítése és fehérjéken keresztüli kifejeződése kizárólag RNS mo-

lekulákat igényel. Ez azonban csak úgy valósulhat meg, hogy replikáció (átörökítés) és transzkripció (kifejeződés) során egyaránt – a sejtekben szokatlan módon – RNS mintáról kell RNS-t szintetizálni. Az ezekhez szükséges **RNS-függő RNS-polimeráz** enzimet mindenképpen a vírusnak kell kódolni és biztosítani, hiszen a gazdasejt ilyet nem tartalmaz.

Az RNS-függő RNS-polimerázok **nem rendelkeznek piszkozatjavító nukleáz aktivitással**. A hibás nukleotidok gyakori beépülése itt a genom replikációját is érinti, és magas mutációs rátát eredményez (kb. százezer nukleotidonként egy nem oda illő kerül a láncba). Gyakorlatilag minden újonnan létrejött RNS-vírus genomja egy nukleotidban eltér az elődjéétől.

Az RNS-függő RNS-polimeráz a vírus egyéb fehérjéivel, valamint a gazdasejt bizonyos fehérjéivel alkot komplexeket, melyek a kettősszálú RNS-vírusok és a pozitív egyszálú RNS-vírusok esetén kétféle üzemmódban működhetnek. Az egyik egy egyszálú RNS templátról teljes hosszában kettősszálú RNS-t hoz létre; ezt replikációs komplexnek vagy **replikáznak** nevezik. A másik a kettősszálú RNS negatív szálát írja át (nem feltétlenül az egészet), és terméke egyszálú (+) RNS; ezt transzkripciós komplexnek vagy **transzkriptáznak** hívják. Negatív egyszálú RNS-vírusok polimeráza a (-) szálat és a (+) szálat egyaránt teljes hosszában átírja, de utóbbihoz jóval nagyobb az affinitása, és terméke mindig egyszálú RNS.

Az RNS-függő RNS-polimerázok többsége tud primer nélkül láncot indítani, de lejjebb részletezendő okokból, illetve célokkal gyakran mégis primert (oligonukleotidot vagy fehérjét) használnak, amely így a keletkezett RNS termék 5' végéhez kovalensen kötve marad. Érdekes, hogy bizonyos RNS-vírusok polimeráza váltogatni tudja, hogy primerrel vagy anélkül kezdi a szintézist. A döntés ilyenkor azon alapul, hogy transzkripció vagy replikáció zajlik-e éppen.

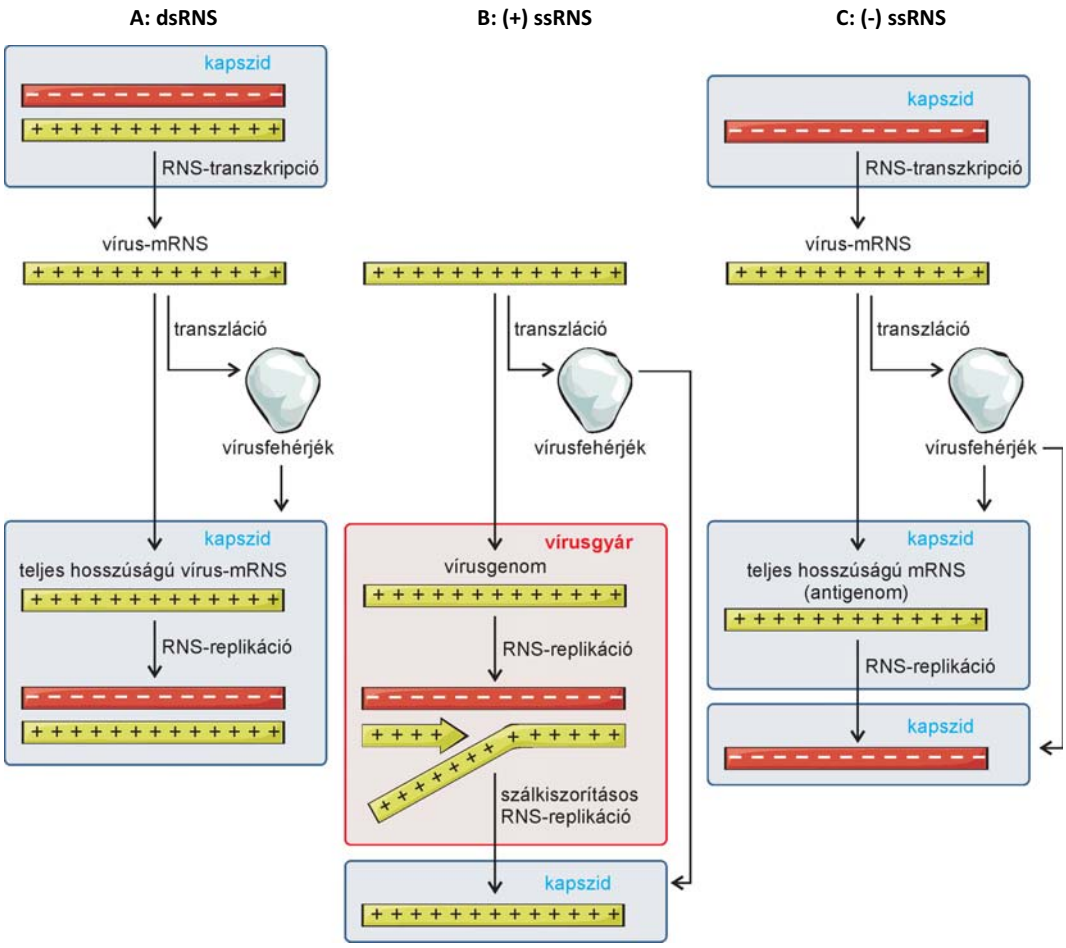
Az óhatatlanul – átmenetileg ssRNS-vírus esetén is – megjelenő dsRNS a sejtekben idegen struktúra, amely leleplezi a meglapulni igyekvő parazitát. Ezért az RNS-függő RNS-polimeráz általában nem a citoplazmában, hanem attól elzárt kompartmentben működik. Az RNS-vírusok gyakran sejtorganellumok membránjának betüremkedését, esetleg az endoplazmás retikulum membránjából képzett, kettős membránnal határolt vezikulumokat használják vírusgyárként (lásd a vírusellenes taktikákról szóló részben). Ráadásul a dsRNS-vírusokra és a (-) ssRNS-vírusokra jellemző, hogy az eredeti vagy újonnan képzett kapszidokban szintetizálnak RNS-t.

I/14.5.3.1. A dsRNS-vírusok replikációja

A sejtbe jutott vírusrészecskéből általában nem szabadul ki a vírusgenom, hanem csak a kapszid védelmében működő transzkriptáz (+) ssRNS termékei, vagyis a vírus mRNS-ek lépnek ki a citoplazmába. Megindulhat tehát a vírusfehérjék transzlációja, és amikor a feltételek már adottak, az újonnan összeállított kapszidokban (gyakran a vírusgyárakban) a replikáz létrehozhatja az utódvirionok genomját, amihez teljes hosszúságú vírus-mRNS-eket használ mintaként *(I/14-10. A ábra)*.

I/14.5.3.2. A (+) ssRNS-vírusok replikációja

A vírusgenom a citoplazmában maga is mRNS-ként funkcionál, így nincs akadálya a vírusfehérjék transzlációjának. A citoplazmától általában az endoplazmás retikulum membránjának betüremkedésében (vírusgyárban) elkülönítve a replikáz először dsRNS-t hoz létre (replikatív forma), majd a transzkriptáz erről (+) ssRNS-eket gyárt, amelyek mRNS-nek és új vírusgenomnak egyaránt alkalmasak *(I/14-10. B ábra)*. Egyes (+) ssRNS-vírusok (Picornaviridae és Caliciviridae) polimeráza fe-

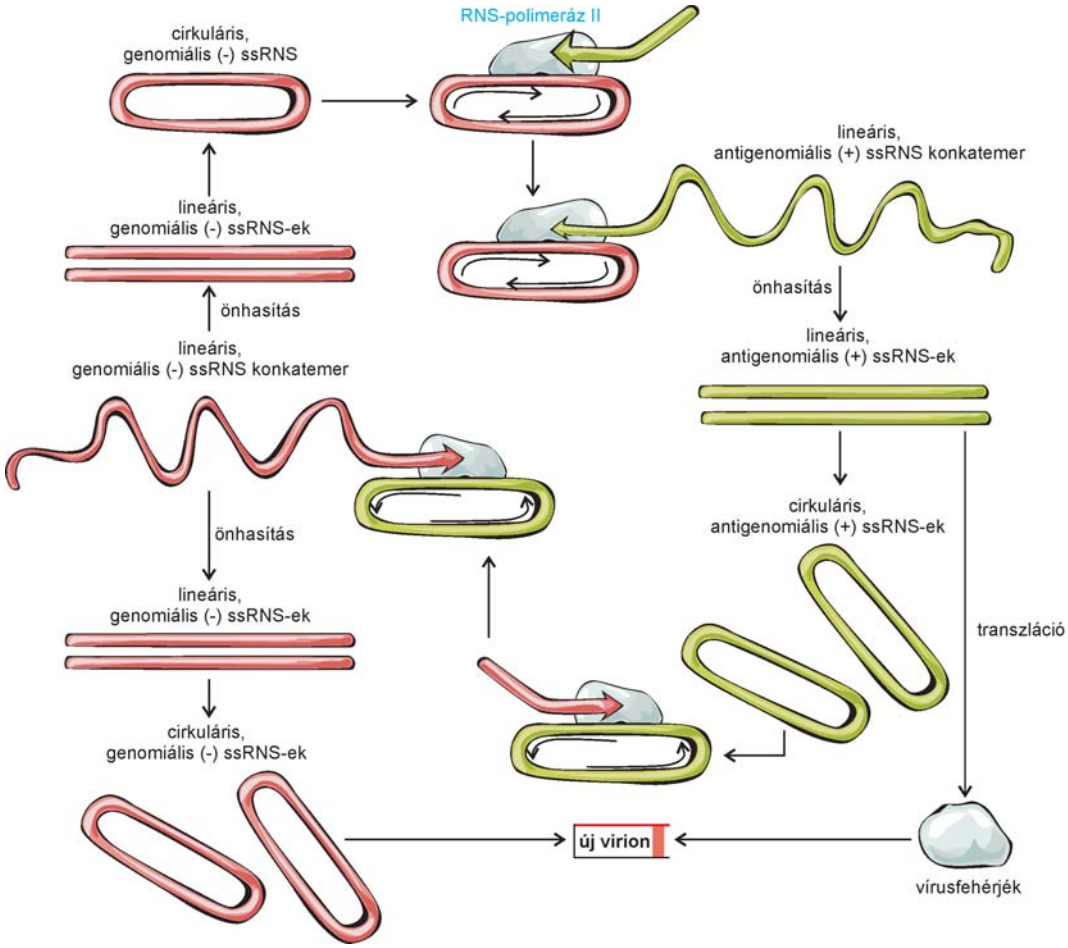


I/14-10. ábra
A tisztán RNS-vírusok replikációjának sémája

hérje szerkezetű primert használ, ezért a polipeptid a genomiális RNS 5' végéhez kötve is mindig megtalálható, innen az elnevezése: genomhoz kapcsolt vírusfehérje („viral protein genome-linked" VPg). E fehérjéről az mRNS-ek érésénél és a transzlációnál még szó esik. Az első nukleotid – egy uridilát, amelyet további uridilátok követnek (lásd „A 3' vég érése" c. alfejezet) – a VPg fehérje egyik tirozin-oldalláncának fenolos hidroxilcsoportjához kapcsolódik egy szabályos foszfodiészter kialakulásával (5' VPg-pU-pU-RNS).

I/14.5.3.3. A (-) ssRNS-vírusok replikációja

A lineáris negatív szálú RNS-t tartalmazó vírusok rendszerint a citoplazmában replikálódnak, és örökítőanyagukat eközben is, végig kapszidfehérjék borítják; de kivételt képeznek az influenzavírusok, amelyek bejutnak a sejtmagba. A transzkripciós üzemmódban működő RNS-függő RNS-polimeráz a vírusgenomról mint templátról sapkával és poli-A farokkal ellátott mRNS-t, esetleg különböző mRNS-



I/14-11. ábra
A cirkuláris (-) ssRNS-vírus, HDV szimmetrikus forgó karika replikációja

eket állít elő, amelyek a vírusfehérjék transzlációjához visznek információt. A kapszidfehérjék mennyiségének növekedése a polimeráz replikációs üzemmódjának kedvez. Ilyenkor teljes hosszúságú (+) ssRNS (antigenom) keletkezik, amelyről ismét teljes hosszúságú (-) ssRNS genom másolatok készülnek és csomagolódnak a kapszidokba *(I/14.10. C ábra)*. A replikáznak nagyjából egy nagyságrenddel nagyobb affinitása van az antigenomhoz, mint a genomhoz, ami biztosítja, hogy utóbbiból jóval több példány jön létre.

A (-) ssRNS-vírusok különleges képviselője a hepatitisz D vírus (HDV), amelynek genomja cirkuláris, önmagával komplementer RNS. Ez a vírus **szimmetrikus forgó karika** mechanizmussal reprodukálja örökítőanyagát, ami annyiban tér el a fenti sémától, hogy az antigenomiális (+) és a genomiális (-) RNS-ek egyaránt forgó karikában, hosszú, lineáris konkatemerekként keletkeznek. Először antigenomiális (+) ssRNS konkatemer képződik, amely antigenomnyi egységekre (egyben vírus mRNS-ekre) hasítja önmagát, és ezek cirkuláris antigenomokká záródnak („ligálódnak"). Szimmetrikus második fázisként a cirkuláris antigenomról genomiális (-) ssRNS konkatemer képződik, amely ugyancsak önhasítással és ligálódással nyeri el az eredeti genommal azonos szerkezetet *(I/14-11. ábra)*.

Érdekesség, hogy a HDV az RNS-vírusoktól szintén szokatlan módon (bár az influenzavírusokhoz hasonlóan) bejut a sejtmagba, ráadásul saját RNS-függő RNS-polimeráz helyett a gazdasejt (eredetileg DNS-függő) RNS-polimerázait programozza át, és azok – elsősorban az RNS-pol II – segítségével végzi a leírt szimmetrikus forgó karika replikációt. A csupán egyetlen gént tartalmazó és annak két termékét kódoló (lásd később) HDV valójában nem is önálló vírus, hanem a HBV szatellita vírusa (szubvirális szatellita), ugyanis csak a HBV-vel fertőzött sejtekben képes reprodukcióra.

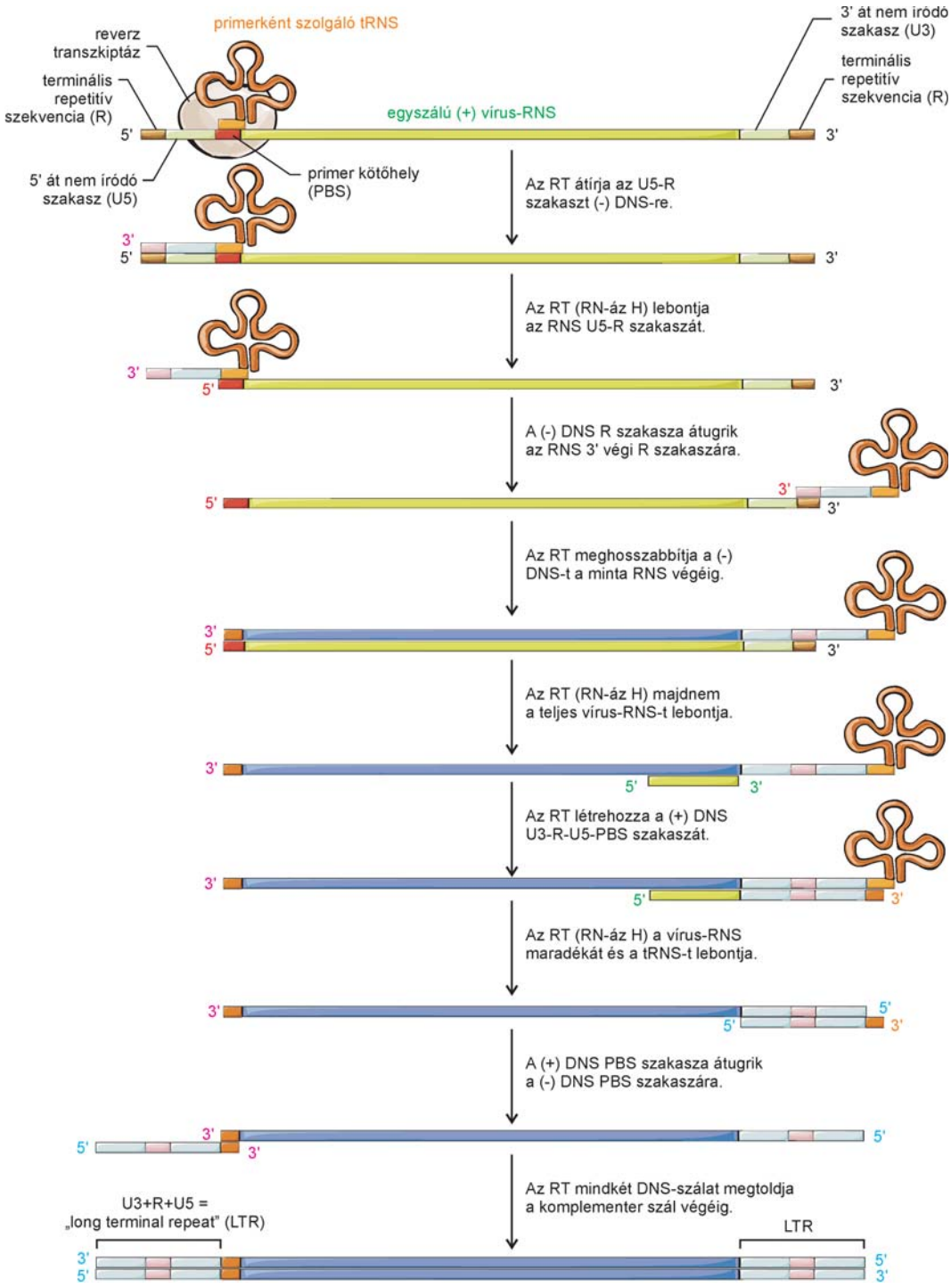
I/14.5.4. Reverz transzkripciós RNS-vírusok (retrovírusok) replikációja

Az RNS örökítőanyagot tartalmazó vírusok között vannak a korábban már kiemelt, minden szempontból különleges retrovírusok, melyek emberi betegséget okozó képviselői a humán T-sejtes leukémia vírus (HTLV) és a humán immundeficiencia vírus (HIV). A fejlett szervezetek genomja tartalmaz még számos endogén retrovírust, amelyek nem terjednek sejtről-sejtre, nem köthetők emberi kórképekhez, és rokonságban állnak a transzpozonokkal. A valódi, exogén retrovírusok virionja egyszálú pozitív RNS-t tartalmaz rendszerint két példányban, és ezekhez kapcsolódik egy-egy reverz transzkriptáz (RT) enzim és egy-egy tRNS az előző gazdasejtből, amely a primer szerepét tölti majd be. A kapszidot lipid-kettősréteg, boríték burkolja, és ebben a virion gazdasejthez kötődését biztosító vírusfehérjék találhatók.

A kapszid a boríték és a sejtmembrán fúziójával bejut a citoplazmába, ahol a vírus-RNS-ek kiszabadulnak, és működésbe lépnek az RT enzimek. A teljes vírusgenom replikációja meglehetősen bonyolult, többlépéses folyamat. Először a primerként szolgáló tRNS kötőhelyétől, „primer binding site” (PBS) a vírus-RNS 5’ végéig készül komplementer, „copy” DNS (cDNS), és az átírt RNS-szakasz eközben le is bomlik. Mivel az eredeti vírus-RNS két végén azonos, ismétlődő, „repeated” (R) szekvenciák találhatók, a létrehozott (-) cDNS-szakasz át tud helyeződni az RNS 3’ végéhez, és szintézise itt folytatódhat egészen a megmaradt RNS 5’ végéig (a PBS 5’ végéig). A szintézist megint a minta-RNS lebontása kíséri, de annak egy rövid, puringazdag szakasza, a „polypurine” (PP) traktus, továbbra is megmarad, ami lehetővé teszi felhasználását a másik DNS-szál primereként. Innen tehát kezdődik a leírt folyamat elölről: a (-) DNS és a tRNS PBS szakaszának átírása (+) DNS-re, az újonnan szintetizált (+) DNS szál áthelyezése a minta 3’ végéhez, amit a PBS mindkét helyen való jelenléte tesz lehetővé, az RNS-maradványok (tRNS és PP) eltávolítása, végül mindkét DNS-szál kiegészítése a komplementer 5’ végéig *(I/14-12. ábra).*

Fontos megjegyezni, hogy az RT által megalkotott kettősszálú vírus-DNS szekvenciája nem azonos a virionba csomagolt, eredeti vírus-RNS-évél, ugyanis rövid R szakaszok helyett hosszú, úgynevezett **„long terminal repeat” (LTR)** szakaszok alakultak ki a DNS mindkét végén, amelyek az U3+R+U5 szakaszoknak felelnek meg. Ennek az az oka, hogy a leírt mechanizmus miatt a primerkötő helyek (PBS, illetve PP) és az R szakaszok közti RNS-részletek (U5 és U3) duplán iródnak át DNS-re. Az LTR nem szükségtelen melléktermék, ugyanis fontos szerepet játszik a vírus-DNS integrációjában, majd hatékony erősítő („enhancer”) hatású promóterként szolgál a vírusgének transzkripciója során. A vírus mRNS-e, amely egyben az utódvirion örökítőanyaga is, már ismét csak R-től R-ig tart és csak egy példányban tartalmazza az U5 és U3 régiókat.

A retrovírusok és a dsDNS-RT vírusok **reverz transzkriptáz** enzimei egyaránt **háromféle aktivitást** fejtenek ki, amikor egyszálú RNS-ből kettősszálú (illetve részlegesen kettősszálú) DNS-t állítanak elő. A (-) DNS-szál (+) RNS minta alapján való



I/14-12. ábra
A retrovírus-RNS reverz transzkripciója és az LTR keletkezése

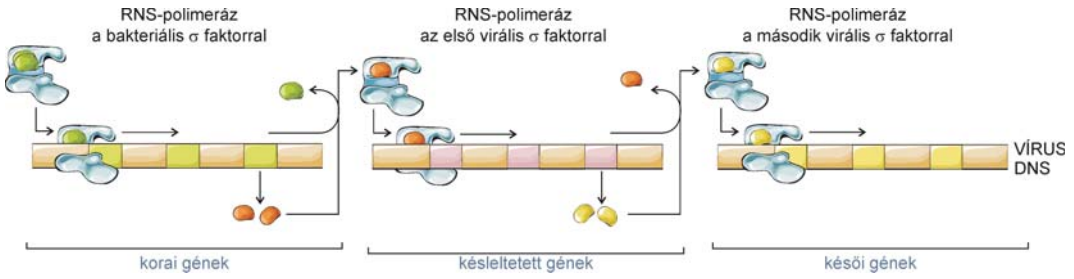
szintézisekor **RNS-függő DNS-polimerázként** működnek; a (-) DNS komplementer (+) DNS-szállal való kiegészítése **DNS-függő DNS-polimeráz** funkciójukat igényli; de mindeközben le is bontják az eredeti (+) RNS-t, ami **ribonukleáz** aktivitást jelent. Ez utóbbi feladatot jellegzetes RN-áz H doménjük látja el. A dsDNS-RT vírusok reverz transzkriptáza – szemben a retrovírusokéval – még **TP domént** is tartalmaz, amely a DNS-szintézis primerét szolgáltatja azáltal, hogy az első dezoxi-ribonukleotidot az egyik saját tirozin-oldallánca hidroxil-csoportjához kapcsolja (lásd a dsDNS-RT vírusok replikációjáról szóló részt).

I/14.6. A VÍRUSGÉNEK TRANSZKRIPCIÓJÁNAK SAJÁTOSSÁGAI

I/14.6.1. DNS-vírusok génjeinek transzkripciója

A DNS-vírusok mRNS-ei a gazdasejt génjeinek kifejeződésekor szokásos módon készülnek. A bakteriofágok egy része (pl. a T4 és a λ fág) nem rendelkezik saját RNS-polimerázzal, hanem a baktérium tetramer (2α, β, β') enzimét használja. Az azonnal kifejeződő fággének promótere általában a megtámadott baktérium génjeinek erős promóteréhez hasonló, így a jelen lévő σ (szigma) faktor (*E. coli*ban a σ70) ezekhez is oda tudja irányítani a polimerázt. Ezt persze tovább segíti, ha a fág a DNS-ével együtt egy azonnali génekre specifikus aktivátort is beinjektál a baktériumba. A saját RNS-polimerázzal nem rendelkező fág génjeinek egymás utáni (azonnali, késleltetett, késői) fázisokban történő átírását az biztosítja, hogy minden fázis géntermékei közt vannak olyan fehérjék, amelyek az adott fázis génjeinek promótertől a következő fázis génjeinek eltérő promóteréhez irányítja át a bakteriális polimerázt. Lehetnek ezek új aktivátorok, **új σ faktorok**, amelyek az éppen működő σ faktor helyébe lépnek *(I/14.13. ábra),* és lehetnek **anti-σ faktorok**, amelyek az éppen működő σ faktor promóterkötését felfüggesztik, de gyakran ezek kombinációja biztosítja az átmenetet. Vannak azonban olyan bakteriofágok (pl. T7 fág), amelyek **saját RNS-polimerázt** kódolnak, és ez a bakteriális RNS-polimeráz segítségével mindjárt az azonnali fázisban kifejeződik, ráadásul egy olyan fehérjével együtt, amelyik a bakteriális polimerázt inaktiválja. A késleltetett fázis génjei már fág-, pl. T7-promóterrel rendelkeznek, és ezeket a fág-, adott esetben T7-RNS-polimeráz igen nagy specificitással felismeri.

Az eukarióta sejtek kisebb DNS-vírusai, melyek teljes életciklusukat a sejtmagban töltik, saját DNS- és RNS-polimerázt nem kódolnak, hanem a gazdasejt poli-



I/14-13. ábra
A fág génexpressziós programjának futtatása a σ faktor cserélgetésével

merázait veszik igénybe, és mRNS-eik a magban érnek, gyakran még alternatív splicing-on is keresztülmennek. Ezzel szemben a részben vagy teljesen a citoplazmában reprodukálódó, nagyobb DNS-vírusok (pl. Poxviridae), amelyek nem vagy nem mindig férnek hozzá a sejtmagi enzimekhez, saját DNS-és RNS-polimerázt kénytelenek használni. Mivel ezekre a sejtbe jutáskor azonnal szükségük van, egy-egy példányukat már a kapszidba csomagolva a genomjukkal hoznak.

A bakteriofágok egyszerű, monomer (egy polipeptid) szerkezetű RNS-polimerázai nem a bakteriális vagy eukarióta RNS-polimerázok rokonai, sokkal közelebb állnak a prokarióta DNS-polimeráz I-hez, illetve a vírusok DNS-függő DNS-polimerázaihoz, RNS-függő RNS-polimerázaihoz és reverz transzkriptázaihoz. Az eukarióta sejtekben élősködő vírusok összetettebb, multimer szerkezetű (több alegységből álló) RNS-polimerázai viszont már a prokarióta és eukarióta polimerázokra hasonlítanak.

I/14.6.2. Tisztán RNS-vírusok génjeinek transzkripciója

A **pozitív szálú RNS (mRNS) keletkezése elválaszthatatlan a tisztán RNS-vírusok replikációjától**, bármelyik típusról legyen is szó. A dsRNS-vírusok a kapszidjukból eleve mRNS-eket bocsátanak ki, amelyek transzlációhoz és replikációhoz egyaránt felhasználhatók *(I/14-10. A ábra)*. A (+) ssRNS-vírusok eredeti és a vírusgyárból kikerülő, újonnan szintetizált genomja nem más, mint vírus-mRNS *(I/14-10. B ábra)*. A (-) RNS-vírusok kénytelenek kapszidjukban magukkal hozni RNS-függő RNS-polimerázukat, hiszen örökítőanyaguk közvetlenül nem kódol fehérjét (a kód antiparallel komplementerét tartalmazza). A lineáris (-) ssRNS-vírusok genomjáról először csak mRNS-ek készülnek, melyek nem feltétlenül teljes genomhosszúságúak, és az RNS-függő RNS-polimeráz csak akkor vált replikációs üzemmódba, ha a kapszidfehérjék már kellő mennyiségben rendelkezésre állnak *(I/14-10. C ábra)*. A cirkuláris (-) ssRNS-vírusok szimmetrikus forgó karika replikációja során az antigenomiális konkatemerből kivágott antigenomiális vírus-RNS-ek voltaképpen vírus mRNS-ek *(I/14-11. ábra)*.

I/14.6.2.1. Polimerázmegcsúszás („polymerase slippage")

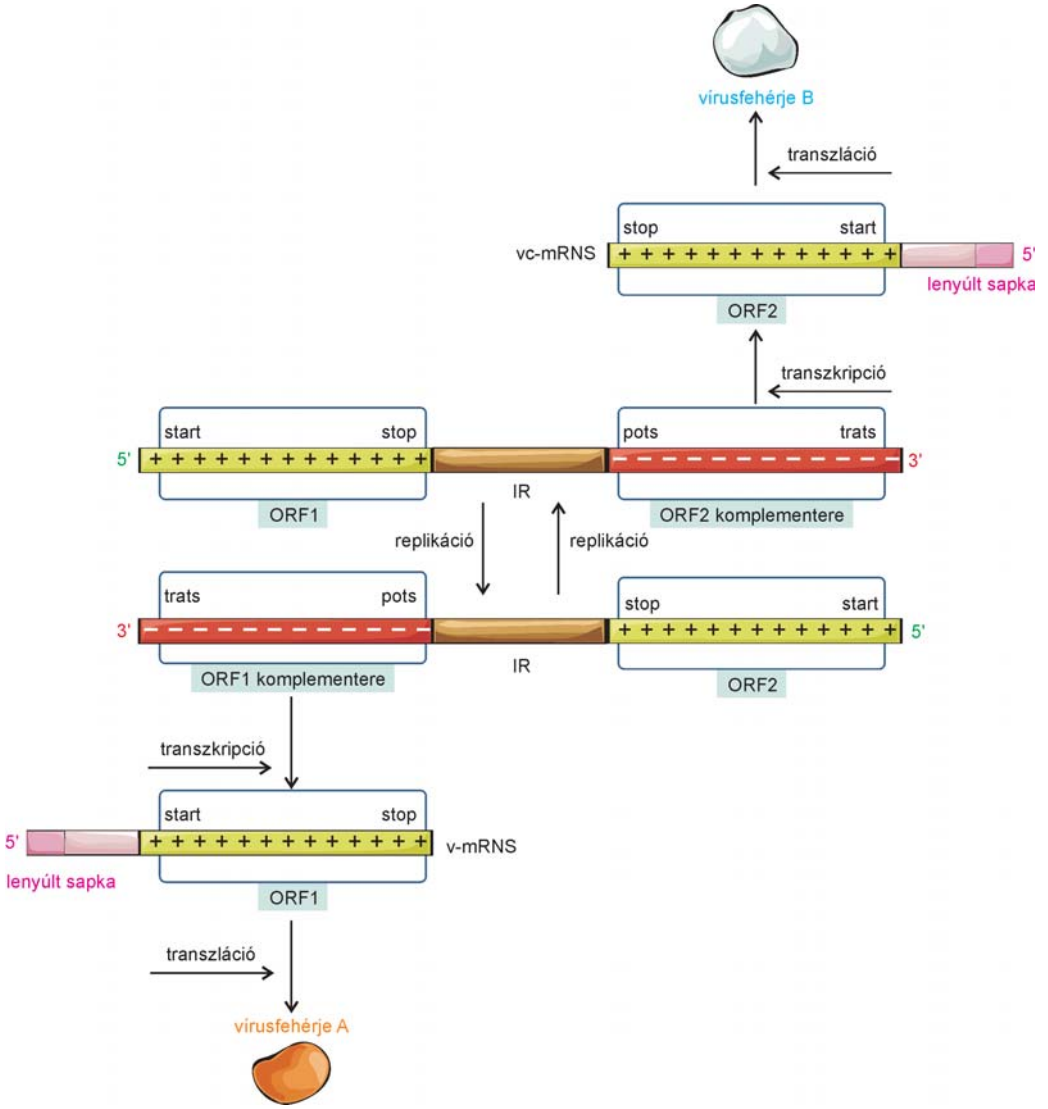
Több (-) ssRNS-vírusnál (köztük pl. a mumpsz, a kanyaró és az ebola vírusainál), valamint egy növényi (+) ssRNS-vírusnál leírták, hogy azonos génszakaszukról kereteltolással különböző, akár háromféle, fehérjét képesek előállítani. Ezt pedig úgy érik el, hogy az **RNS-függő RNS-polimeráz** bizonyos helyeken **visszacsúszik transzkripció közben**, és így az éppen átírt nukleotidból (szinte mindig guanilátból) egy helyett kettőt, hármat vagy akár többet illeszt be a szintetizálódó mRNS-be. A számfeletti nukleotid(ok) a megadott ponttól kereteltolódást okozhatnak, vagyis az eredetileg kódolttól teljesen eltérő aminosavak beépülését eredményezhetik. Természetesen ilyenkor a stop kodon is máshova kerül, így a kereteltolódással szintetizált fehérjék mérete is különböző lehet.

I/14.6.2.2. Ambiszensz vírusok génjeinek transzkripciója

Amint arról korábban szó volt, az ambiszensz („ambisense") vírusok a szegmentált (-) ssRNS-vírusok alcsoportjába tartoznak. Replikációjuk a csoport többi tagjáétól nem tér el, de – amint a nevük is utal rá – génexpressziós szempontból különlegesek. Mivel az ide sorolható arenavírusok és phlebovírusok egyes képviselői emberi

betegségeket (agyhártya-, agyvelőgyulladás vagy vérzéses láz) is okoznak, röviden áttekintjük az ambiszensz RNS-szegmentumok transzkripcióját.

Az ambiszensz RNS 5' része pozitív, 3' része negatív. Mindkettő egy-egy (ellentétes polaritású) ORF-et tartalmaz, melyek nem fednek át, elválasztja őket egy úgynevezett gének közti („intergenic") régió (IR). Érdekes, hogy általában az eredeti ambiszensz RNS és annak átírt komplementere egyaránt megtalálható a virion kapszidjában, holott egyszálú RNS-vírusról van szó. Mivel ez esetben az eredeti és a komplementer szál egyaránt ambiszensz, értelmét veszti a (+) és (-) előjel használata, és helyette a virionban nagyobb mennyiségben jelenlévő szálat vírus-RNS-ként (v-RNS), az alulreprezentált szálat pedig **víruskomplemeter RNS-ként** (vc-RNS) szokás megkülönböztetni.



I/14-14. ábra
Az ambiszensz vírusok génjeinek transzkripciója

A v-RNS és a vc-RNS 5'-végi, pozitív polaritású ORF-je elméletileg akár közvetlenül transzlálható lenne, de ez nem vallana (-) ssRNS-vírusra. Minden jel arra utal, hogy ez nem is történik meg, hanem mindkét genomiális RNS-ről transzkripció révén keletkezik a lenyúlt sapkával ellátott (lásd az 5' vég érésénél), de poli-A farok nélküli, valódi mRNS. Mivel az IR mindkét irányban transzkripciós terminációs szekvenciát tartalmaz, a két keletkező mRNS szubgenomiális, vagyis a genomiális RNS-eknél rövidebb, és csak egy ORF-re terjed ki. Így persze mindkét genomiális RNS-ről a 3'-végi, negatív polaritású ORF által kódolt fehérje fejeződik ki *(I/14-14. ábra)*. A két gén kifejeződése eltérő módon szabályozódhat, így az RNS ambiszensz jellege fontos szerepet játszhat a vírus replikációs ciklusának végrehajtásában.

I/14.6.3. Retrovírusok génjeinek transzkripciója

Bár a retrovírusok kapszidjából kiszabadult genomiális RNS pozitív, és minden módosítás nélkül elindulhatna róla bizonyos vírusfehérjék transzlációja, ez mégsem történik meg, aminek az lehet a magyarázata, hogy azonnal megkezdődik a reverz transzkripció, és ez a folyamat az RNS lebomlását is magában foglalja. A gazdasejt nukleáris DNS-ébe integrálódott vírus-DNS voltaképpen hatékony promóterrel (a kódoló szál 5' végén keletkezett **LTR**) rendelkező, fehérjét kódoló génként viselkedik, amely ráadásul eleve aktívan átíródó, laza kromatinállományú régióban helyezkedik el. A DNS-vírusok nagy részéhez hasonlóan a retrovírusgének transzkripcióját is a gazdasejt RNS-polimeráza (RNS-pol II) végzi. **Egyetlen elsődleges transzkriptum** keletkezik, amely megegyezik az eredeti genomiális RNS-sel (R-től R-ig tart). Hogy ez egy új virion örökítőanyaga lesz vagy a transzláció hírvivője, az jelentős részben a splicing-on múlik (lásd később).

I/14.7. AZ EUKARIÓTA VÍRUS-MRNS-EK ÉRÉSE ÉS SZERKESZTÉSE

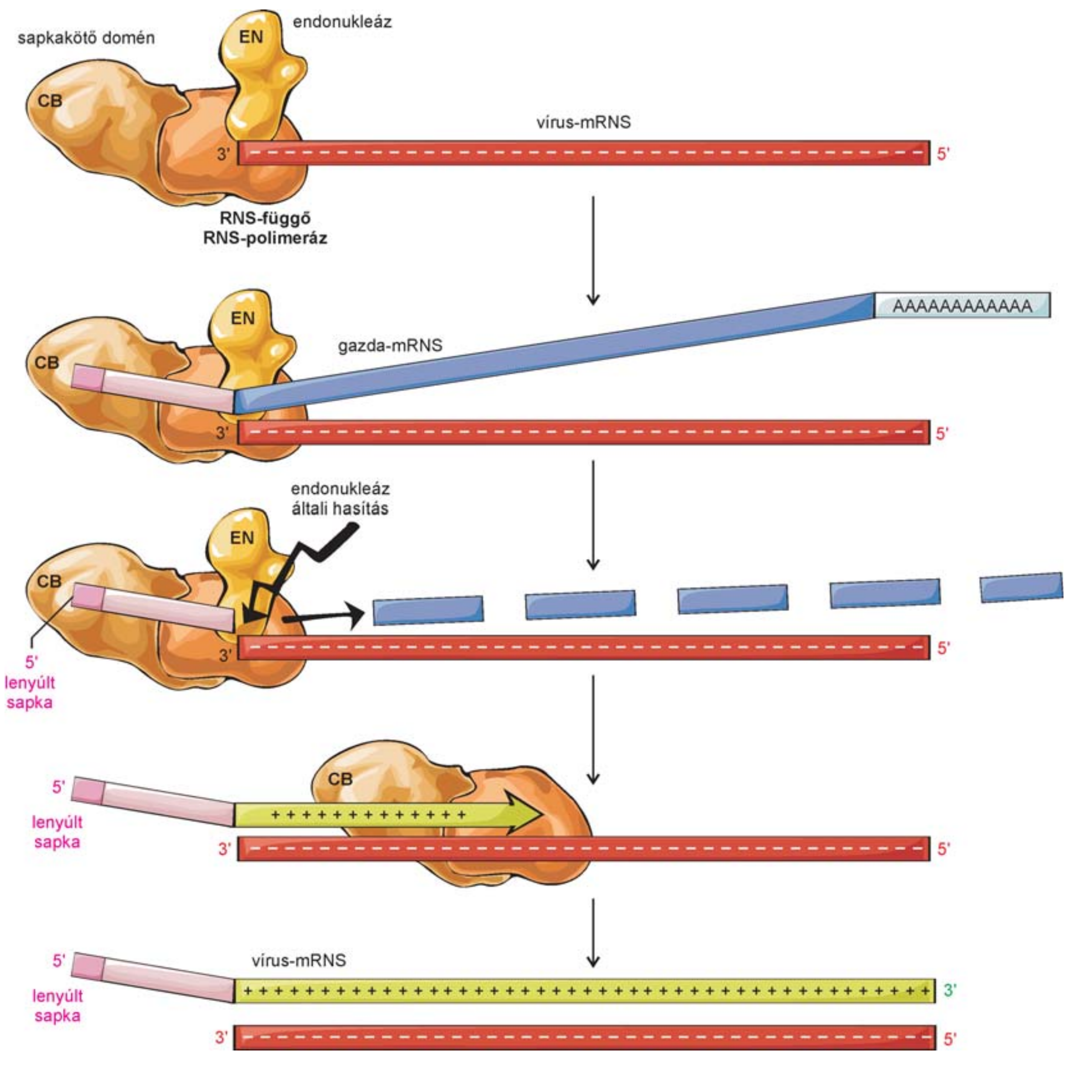
I/14.7.1. Az 5' vég érése

Az eukarióta mRNS 5' végén még transzkripció közben a sejtmagban sajátos szerkezet alakul ki, amelyet sapkának neveznek. Egy 7-metil-guanidin az 5'-hidroxil-csoportjához kötött három foszfáton keresztül kapcsolódik az eredetileg első nukleozid 5'-hidroxil-csoportjához, és az eredeti lánc első vagy első két ribóz egységének a 2' hidroxil-csoportja szintén metilált. A citoplazmában ehhez a sapkához az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E (eIF4E) kötődik, ami további iniciációs faktorokat is ide vonz. A sapka az mRNS érettségének egyik jele, és egyúttal azt is jelzi a sejt számára, hogy az mRNS az ő génjének átírásából származik (nem idegen eredetű). Védi az mRNS 5' végét az exonukleázok általi hasítástól, és kijelöli a szokványos transzlációs iniciáció helyét. Mindebből következik, hogy a vírusok csak úgy tudják hatékonyan előállítani saját fehérjéiket, ha mRNS-eiket sapkával látják el, vagy gondoskodnak valamilyen ezt helyettesítő, illetve kiváltó megoldásról.

Sapka nélküli mRNS-ekkel bizonyos (+) ssRNS-vírusok operálnak, és ezeket két csoportba lehet osztani. Az egyik csoport (Picornaviridae és Caliciviridae) már a transzkripciónál – lényegében primerként – használ egy **„viral protein genome-linked" (VPg)** nevű fehérjét, amely így az mRNS 5' végéhez kovalensen kötődik. Mint a neve is mutatja, ez a fehérje a kapszidba csomagolt genomiális RNS elején is megtalálható. Azon túl, hogy védi az 5' véget, a VPg közvetlenül részt is vehet a

transzláció iniciációjában (pl. a kalicivírus esetén), vagyis helyettesítheti a sapkát. A másik csoport (ide tartozik pl. a hepatitisz C vírus, HCV) mRNS-einek 5' vége **szabad, módosulatlan trifoszfát**, ahogy a polimeráz az első nukleozid-trifoszfátot (NTP-t) az iniciációkor beépítette. Mivel ez rendkívül támadhatóvá teszi az RNS-t, és riasztja a sejt belső védelmi rendszerét, a HCV-nek ki kellett fejlesztenie a víruselle-nes mechanizmusok kivédésének és elkerülésének sajátos módjait. Mindkét csoport fehérjéi értelemszerűen sapkafüggetlen transzlációval termelődnek, de ennek részleteivel egy külön alfejezet foglalkozik. E két csoport kivételével minden vírus biztosítja a sapka jelenlétét, de ennek három különböző módja ismert.

A sejtmagba jutó DNS-vírusok és a retrovírusok mRNS-ét a **gazdasejt enzimei** látják el sapkával, ami nem meglepő, hiszen a transzkripciójukat is a gazdasejt



I/14-15. ábra
Sapkalenyúlás a (-) ssRNS-vírusoknál

polimeráza végzi. A citoplazmában tartózkodó dsDNS-vírusok, a dsRNS-vírusok és néhány (+) ssRNS-, illetve (-) ssRNS-vírus **saját enzimeket** kódol a sapka citoplazmában való kialakításához, ami történhet akár a sejtben szokásos, akár attól eltérő reakció-útvonalon. Végül sok (-) ssRNS-vírus (pl. az influenzavírusok, a Lassavírus és a Hantavírus) alkalmazza a sapkalenyúlás („cap snatching") eljárást. Amint a névből is kikövetkeztethető, a csel lényege, hogy a vírus óvatlan, érett celluláris mRNS-ek sapkáját lopja el és használja saját mRNS-eihez – az influenzavírusok a sejtmagban a többiek a citoplazmában. E vírusok RNS-függő RNS-polimerázához alegységként csatlakozik egy endonukleáz. Amikor a polimeráz transzkripciós üzemmódban működik, az endonukleáz sapkakötő doménje megragadja az áldozat sapkáját, majd nukleáz doménje lehasítja a sapkát tartalmazó 8-14 nukleotid hosszúságú darabot. A polimeráz csak ezután fog hozzá az mRNS szintéziséhez, mégpedig oly módon, hogy az elcsent sapkát hordozó oligonukleotidot primerként használja, vagyis annak frissen keletkezett 3' végét hosszabbítja meg a vírusgenomban kódolt szekvenciával *(I/14-15. ábra)*.

I/14.7.2. Splicing

A kisebb DNS-vírusok, amelyek bejutnak a sejtmagba, reprodukciójukhoz nem csak az ott lévő celluláris polimerázokat, hanem az mRNS-érés teljes enzimarzenálját, így a spliceoszómákat is igénybe veszik. Az ilyen vírusok mRNS-einek alternatív splicing-ja növelheti a termelődő vírusfehérjék változatosságát. A kizárólag a citoplazmában tartózkodó, nagyobb DNS-vírusoknak ez a lehetőség nem áll rendelkezésére.

A retrovírusok integrálódott DNS-éről (a provírusról) az RNS-pol II által szintetizált pre-mRNS-e először megkapja a szokásos 5' sapkát és 3' poli-A farkat, majd sorsát és funkcióját alternatív splicing dönti el. Amennyiben az RNS intronkihasítás nélkül, változatlan formában kerül ki a citoplazmába, kettős szerepe lehet: becsomagolódik az új kapszidba mint genomiális RNS, vagy mRNS-ként a gag-pol poliprotein transzlációjához szolgáltat információt. A gag-pol poliproteint később a HIV-proteáz (PR) öt fehérjére (két kapszidfehérje, RT, integráz és maga a PR) hasítja *(I/14-5. ábra)*. Mivel az eukarióta sejtek transzlációs iniciációs komplexe rendszerint a sapkához legközelebbi AUG tripletet azonosítja start kodonként, ahhoz, hogy a vírus többi fehérjéje is termelődni tudjon, azok start kodonja előtti szakaszokat még a sejtmagban intronként ki kell hasítani. A keletkező poliprotein összetételét szintén változó intronkihasítás tudja befolyásolni, ami sokszor a leolvasási keret váltását is jelenti. A HIV esetén például egy vagy két változó méretű szakasz eltávolítása a teljes hosszúságún kívül még hat különböző mRNS létrejöttét eredményezi, amelyek végül tizenhét vírusfehérje szintézisét teszik lehetővé.

Az RNS-vírusok rendszerint a citoplazmában tartózkodnak, és azon belül igyekeznek külön kompartmentet képezni a vírusgyár számára, hogy szokatlan szerkezetű intermedierekkel lehetőleg minél kevésbé keltsék fel a gazdasejt gyanakvását. A szegmentált genommal rendelkező (-) ssRNS influenzavírusok egyedi módon bejutnak a sejtmagba, ahol replikációjuk és transzkripciójuk persze saját RNS-függő RNS-polimerázuk működéséhez kötött. Ez a polimeráz ráadásul sapkáról és poli-A farokról egyaránt gondoskodik az általa szintetizált mRNS-ek számára. Az influenzavírus-mRNS-ek egy része ezután – kihasználva a hely adta lehetőséget – alternatív splicing-on megy keresztül, és a citoplazmába kijutva eltérő fehérjékhez szolgáltat információt.

I/14.7.3. A 3' vég érése

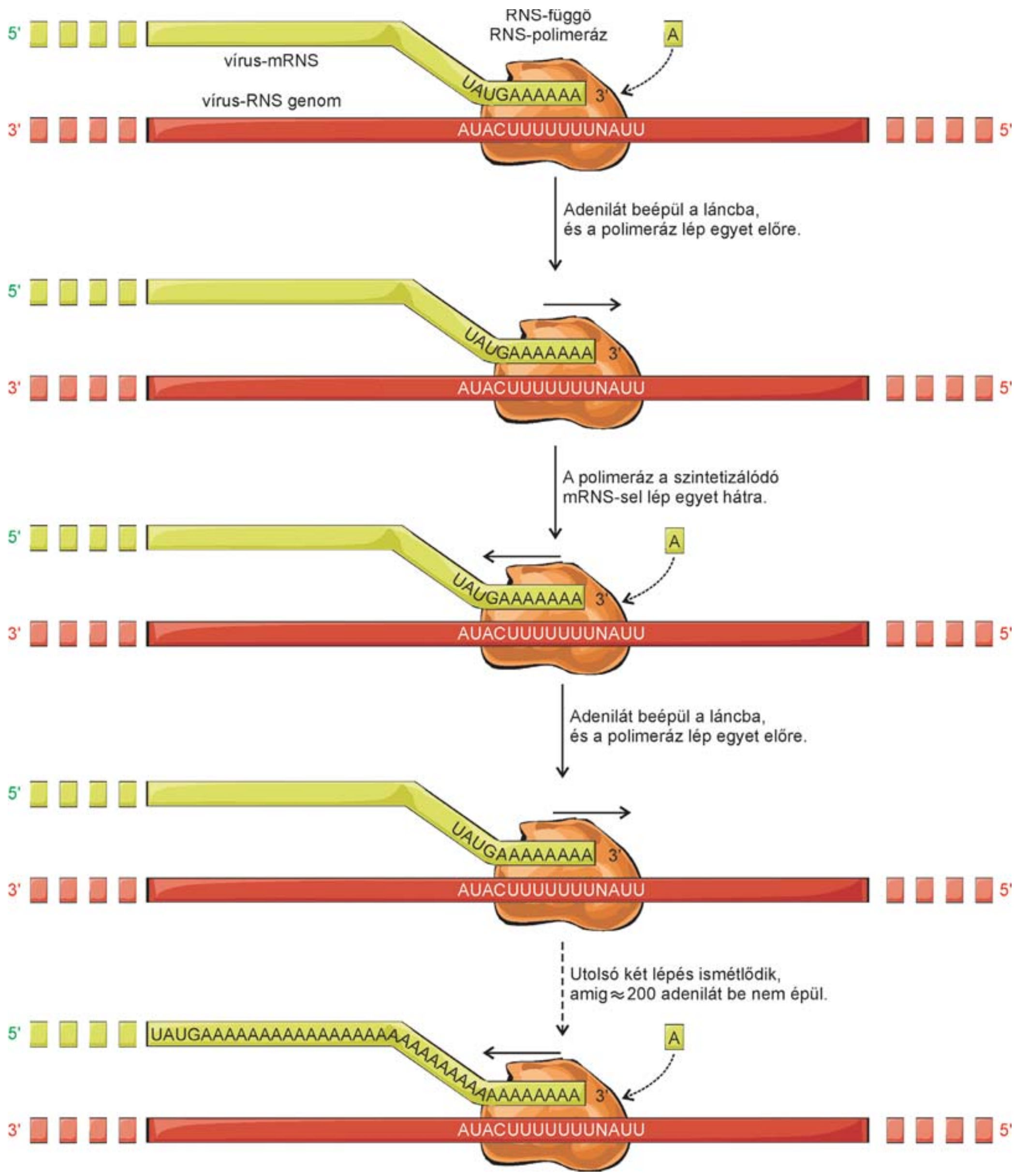
A celluláris mRNS-ek citoplazmai lebomlásának – és ezáltal élettartamának – szabályozása elválaszthatatlan a 3' véghez még a magban hozzátoldott poli-A farok sorsától. A poli-A farok fokozatos rövidülése lényegében időzíti az mRNS teljes degradációját, ami bekövetkezik, ha a poli-A farok hossza kritikus érték alá csökken. Egy csapásra megsemmisíthető egy mRNS, ha egy endonukleáz a 3' UTR szakaszon hasítva eltávolítja a teljes poli-A farkat.

Sok vírus ugyanezt a sémát követi, és mRNS-ei szintén adenilátpolimerrel végződnek. Ez a megoldás kézenfekvő és automatikus a sejtmagba jutó DNS-vírusoknál, és ehhez csupán a megfelelő poliadenilációs (és egyben terminációs) szignált kell megjeleníteniük a transzkripciós egységek végén. Nem ilyen egyszerű a citoplazmában található vírusok helyzete. Néhányan közülük nem is látják el poli-A farokkal az mRNS-eiket, hanem változatos (néha a tRNS-ekéhez hasonló) szekvenciákkal igyekeznek védeni őket a degradációtól. Sok (+) ssRNS-vírus (pl. Picornaviridae és Caliciviridae) genomiális RNS-e, vagyis a kapszidba csomagolt örökítőanyaga 3' poli-A farokkal rendelkezik, és a VPg-vel mint primerrel inicializált replikáció során erről 5' poli-U szakasszal kezdődő negatív szálú RNS készül. A vírus-mRNS-ek tehát már az e mintáról folyó transzkripciójuk során a génben „kódolt" poli-A farokra tesznek szert. A poli-A farok a (-) ssRNS-eknél is már az elsődleges transzkriptumban megjelenik, de – a (+) ssRNS-eknél megfigyelttől eltérő, és első hallásra meglepő módon – anélkül, hogy a mintául szolgáló genomiális (-) RNS tartalmazná az ennek megfelelő poli-U szakaszt. Amikor e vírusok RNS-függő RNS-polimeráza transzkripciós üzemmódban működik (és lopott 3' sapkával kezdi a szintézist), egy terminációs szignálként funkcionáló oligo-U szekvenciához érkezve dadogni kezd, vagyis a minta egy-egy uridilátjának komplementer adenilátját többször ismételve, újra és újra beilleszti az mRNS-be közben persze mindig visszalépve egy nukleotidnyit. A rövid oligo-U ily módon hosszú poli-A farokká konvertálódik *(I/14-16. ábra*). A jelenséget találóan **polimerázdadogásnak** („polymerase stuttering") nevezik, és érdekes módon még a sejtmagban elhelyezkedő (-) ssRNS-vírus influenzavírusok is alkalmazzák.

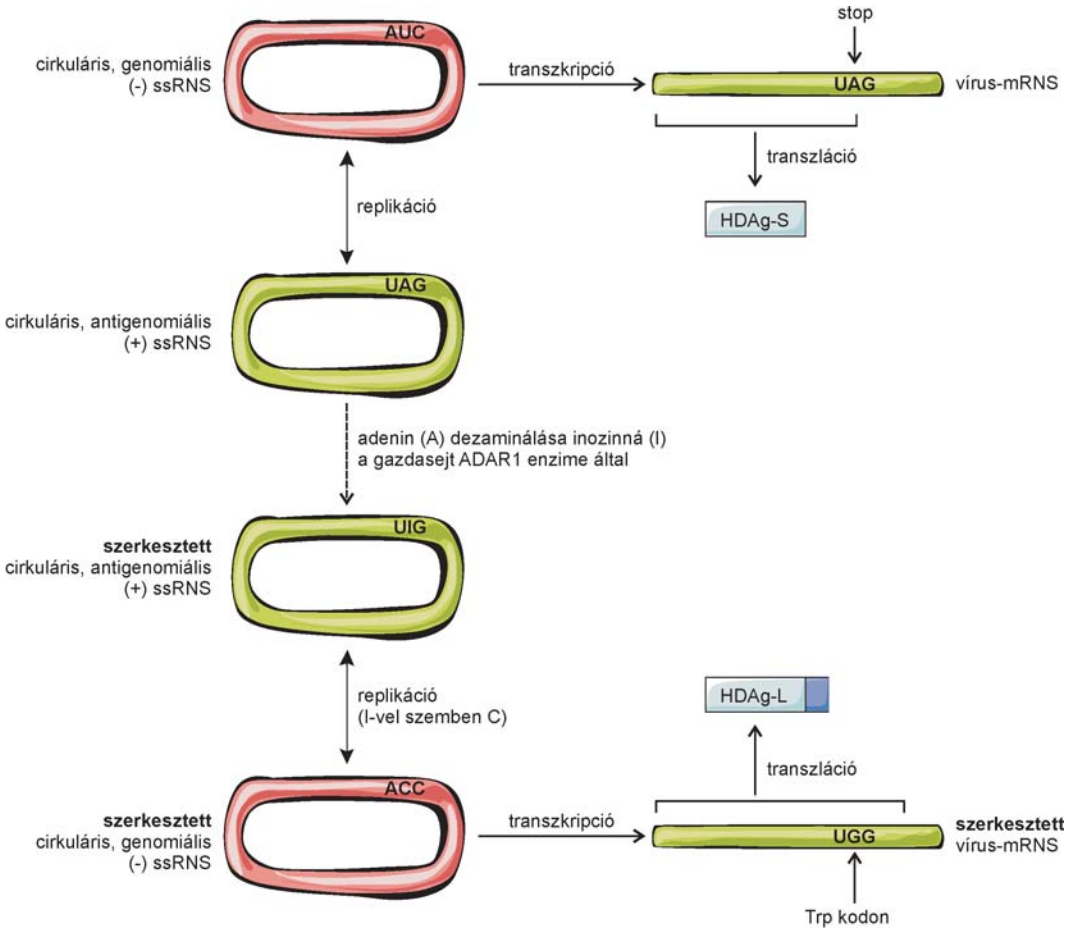
I/14.7.4. RNS-szerkesztés („RNA editing")

A korábban már említett, és sok szempontból kivételt képező HDV egyetlen génje kétféle fehérjét kódol. A HDV-antigén kisebb és C-terminális 19 aminosavval megtoldott hosszabb változata (S-HDAg és L-HDAg) a vírusreplikáció különböző szakaszaiban eltérő funkciókat látnak el. A fertőződéskor először az S-HDAg termelődik, amely a vírusgenom sejtmagba jutását és replikációját segíti, majd megjelenik az L-HDAg is, amely gátolja a replikációt, és szükséges a virion összeállításához. A váltás oka, hogy a replikáció intermedioereként keletkező antigenom (cirkuláris pozitív egyszálú RNS) egy része a sejtmagban kémiai módosuláson esik át. A gazdasejt egyik RNS-adenozin-deamináz enzime (ADAR1), az antigenom egy meghatározott adeninjét hipoxantinná alakítja (vagy adenozinjét inozinná, illetve adenilátját inozináttá, ahogy tetszik). Az antigenom soron következő átírásakor az inoziláttal szemben citidilát épül be a genomiális (-) RNS-be, ez pedig már olyan genomiális (+) RNS mintájául szolgál, amelyben az eredetileg „UAG" stop kodon helyett egy triptofánt jelentő „UGG" triplet található *(I/14-17. ábra)*. A transzláció így termináció helyett e ponttól a következő stop kodonig még 19 aminosavat hozzáad a polipeptidlánchoz (a rövidebb HDAg-S fehérje helyett a hosszabb HDAg-L keletkezik).

A virionba mindig az eredeti, szerkesztetlen genomiális RNS kerül, különben a fertőzőképesség elveszne.



I/14-16. ábra
Polimerázdadogás a (-) ssRNS-vírusoknál



I/14-17. ábra
RNS-szerkesztés a HDV-ben

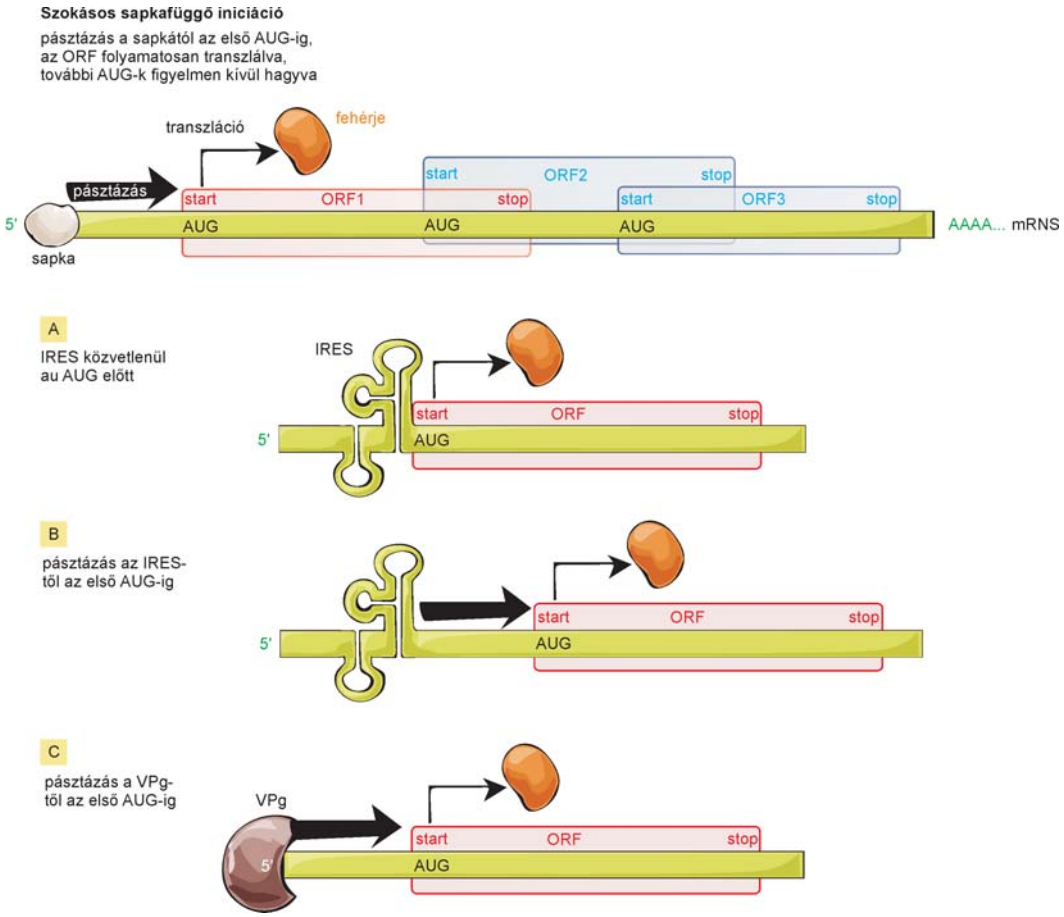
I/14.8. A VÍRUSFEHÉRJÉK TRANSZLÁCIÓJÁNAK SAJÁTOSSÁGAI

Az eukarióta sejtekben a transzláció beindulásának alapesete a sapka- és eIF2α-függő iniciáció, amely rendszerint az 5' véghez legközelebbi start kodont, vagyis AUG tripletet tekinti kezdőpontnak. A sapkát az eIF4E fehérje köti, az AUG kodont pedig az eIF2 által vezetett metionil-iniciátor-tRNS (met-tRNSini) leli meg. A szintézis a start kodon által kijelölt keretben halad, amíg a három stop kodon valamelyikéhez nem érkezik, és az itt szétesző komplex nem fog hozzá újabb polimerizációhoz. Bizonyos stresszhelyzetek – és ilyen a vírusfertőzés is – az eIF2α foszforilációja által háttérbe szorítják a tipikus iniciációt és alternatív mechanizmusoknak kedveznek, így elősegítve olyan fehérjék termelődését, amelyek segítenek a stressz leküzdésében vagy éppen a sejt elpusztításában.

A vírusok, köztük is elsősorban az RNS-vírusok gyakran használják ki az alternatív iniciáció lehetőségeit, illetve módosítják a transzláció menetét különböző módokon, ami leginkább három szempontból előnyös számukra. Egyrészt olyan vírus-mRNS-ek is lefordítódnak, amelyek 5' szerkezete nem azonos a gazdasejtben megszokottal, másrészt egy adott vírus-mRNS-ről többféle fehérje is transzlálódik, ami a korlátozott méretű genom miatt kedvező, harmadrészt éppen akkor fokozódik a vírus-mRNS-ek transzlációja, amikor a sejt a fertőzés okozta stressz leküzdésére törekszik. Nemegyszer éppen a vírus akadályozza a klasszikus, sapka- és eIF2α-függő iniciációt, amivel saját mRNS-ei transzlációjának (is) kedvez.

I/14.8.1. Sapkafüggetlen iniciáció – riboszómabeléptető hely

Sapkával ellátott mRNS-ek 3' UTR szakaszán is előfordulhat belső riboszómabeléptető hely **(„internal ribosome entry site", IRES)**, amelyet a sejt erre specializálódott fehérjéi („IRES-transacting factors", ITAFs) ismernek fel, és segítenek itt



I/14-18. ábra
Sapkafüggetlen iniciáció

összeállítani az iniciációs komplexet. Ha az IRES az AUG közvetlen közelében van, indulhat is a transzláció, ellenkező esetben az IRES-től kezdődik az első AUG keresése *(I/14-18. A és B ábra)*. Bár az itt említett példák az eIF2α közreműködését igénylik, a sapkafüggő mechanizmussal szemben mégis kedvez nekik az eIF2α foszforilációja.

Magától értetődik, hogy azok a (+) ssRNS-vírusok, amelyek nem gondoskodnak 5' sapkáról mindenképpen sapkafüggetlen iniciációval indítják a fehérjeszintézist. Ezek között különlegesnek számít a HCV, amelynek mRNS-ei nem csak abban tűnnek ki, hogy csupasz trifoszfáttal indulnak, hanem abban is, hogy sajátos IRES szekvenciájuk közvetlenül (ITAF, eIF3 és eIF4 nélkül) – igaz GTP-eIF2α segítségével – kihorgonyozza a kis (40S) riboszómaalegységet és a met-tRNSini-t.

A sapka helyett **VPg-t** viselő mRNS-t előállító vírusok között vannak olyanok (pl. a poliovírus), amelyeknél a VPg nem vesz részt az IRES működésében, csak az 5' véget védi. Másoknál (pl. a kalicivírusnál) maga a VPg vonzza magához az eIF4E (alapvetően sapkakötő) faktort, majd az iniciációs komplex többi tagját, így ez valójában IRES nélküli sapkafüggetlen iniciáció *(I/14-18. C ábra)*.

I/14.8.2. eIF2-független iniciáció – iniciátor tRNS-t elhelyező hurok vagy csomó

Néhány vírus olyan technikát alkalmaz, amely különleges módon alakítja ki a kezdő kodon (nem feltétlenül AUG) és az első aminoacil-tRNS (nem feltétlenül met-tRNSini) kapcsolódását, így fehérjéinek szintézisét még akkor is lehetővé teszi, ha a stressz és maga a vírus az eIF2 működését teljesen felfüggeszti.

A Togaviridae családba tartozó egyes alfavírusok az mRNS kódoló szakaszának sajátos hurokszerkezete („downstream hairpin loop", DLP) segítségével helyezik az iniciátor tRNS-t a start kodonra. Az iniciációs komplex az 5' sapkához tapadva alakul ki, de a start kodont nem azáltal találja meg, hogy a GTP-eIF2-höz kapcsolt met-tRNS$_{ini}$ pásztázza az 5' UTR-t, hanem annak helyét **az AUG után kb. 25 nukleotid távolságra elhelyezkedő és a met-tRNSini-t közvetlenül kötő stabil hurok** struktúra jelöli ki. Feltételezhető, hogy a rubeolát okozó rubivírusban is hasonló mechanizmus működik.

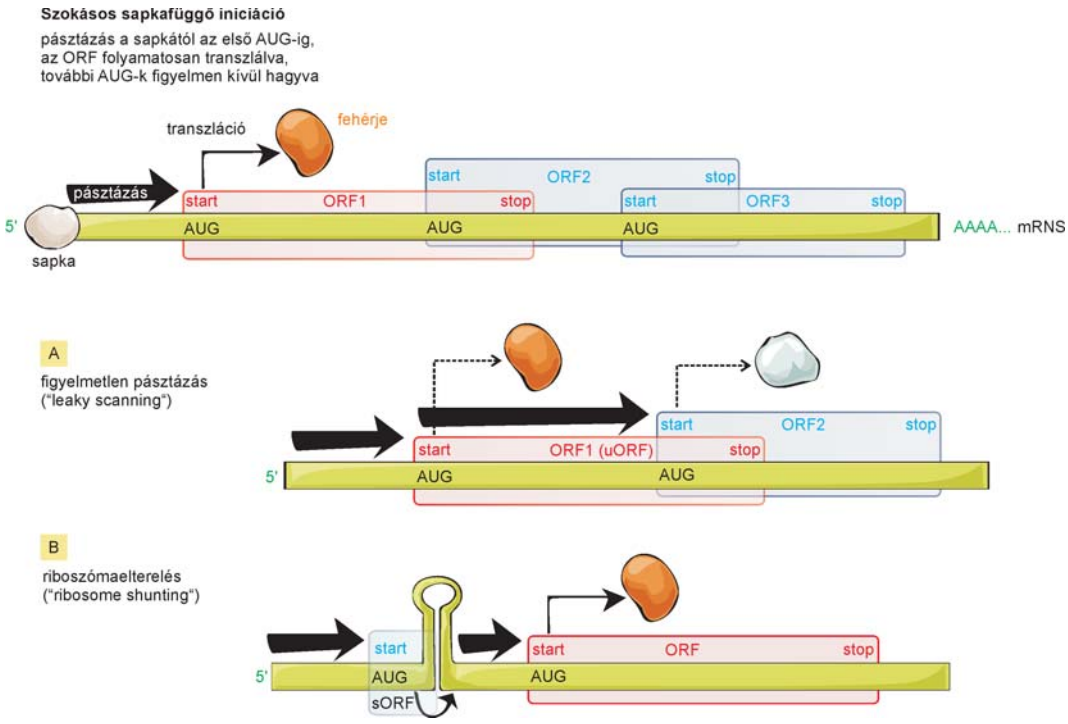
Számos ízeltlábú (+) ssRNS-vírus alkalmaz olyan IRES szekvenciát („cricket paralysis virus-like IRES, CPV-IRES), amelyben **az első kodonra egy közvetlenül előtte kialakuló álcsomó („pseudoknot") szerkezet pozícionálja a 40S riboszómaalegységet és az első aminocil-tRNS-t**. Ebben a transzlációindításban nem vesznek részt az alapvető iniciációs faktorok. Ráadásul az első kodon nem AUG (hanem GCU vagy CAA), az első aminoacil-tRNS pedig nem met-tRNSini (hanem alanint, illetve glutamint hordozó tRNS), továbbá iniciáció során a riboszóma „P" helye üresen marad, és a kezdő aminoacil-tRNS az „A" helyre ül.

I/14.8.3. Iniciáció alternatív start kodonokkal

A vírus mRNS-ek transzlációja sokszor nem a legelső (sapkához, illetve 5' véghez legközelebbi), hanem második vagy akár többedik AUG kodonnál indul, aminek vagy az az oka, hogy az iniciációs komplex folyamatos pásztázás során figyelmen kívül hagyja az első start kodont, vagy az, hogy a pásztázás nem folyamatos.

I/14.8.3.1. Figyelmetlen pásztázás („leaky scanning”)

Az első AUG figyelmen kívül hagyása nem vírusspecifikus jelenség. Sok eukarióta mRNS is tartalmaz olyan első **AUG tripletet, amely nem feltétlenül szolgál start helyként**, mert a környező nukleotidszekvencia nem kedvez az iniciációnak. Az általa kijelölt kódoló szekvenciát „upstream open reading frame” (uORF) néven emlegetik. Az uORF start kodonja felett elsikló iniciációs komplex a második AUG-t ismeri fel, amely egy másik ORF-et jelöl ki *(I/14-19. A ábra)*. Ha a két leolvasási keret egybeesik, akkor egy hosszabb, és egy N-terminális kezdőszakaszt nélkülöző, rövidebb polipeptid keletkezhet. Ha nem esnek egybe, az mRNS két teljesen eltérő fehérjét kódol. Fontos tudni, hogy az eIF2α stressz hatására bekövetkező foszforilációja a pásztázás figyelmetlen voltának, vagyis a második leolvasási keret használatának kedvez.



I/14-19. ábra
Iniciáció alternatív start kodonokkal

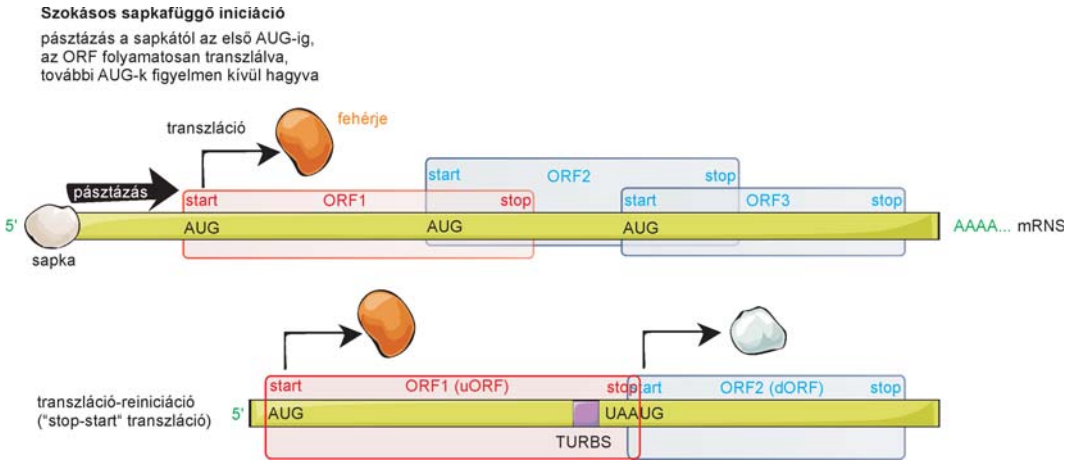
I/14.8.3.2. Riboszómaelterelés („ribosome shunting”)

Az elöl lévő („upstream”) AUG kodon(ok) ignorálásának másik mechanizmusa, amikor a riboszóma közvetlenül – az mRNS egy részének kihagyásával – átköltözik az első start kodontól egy későbbihez. Az mRNS eleje tartalmaz néhány start kodont, amelyek igen rövid kódoló szakaszokat („short open reading frames”, sORFs) jelöl ki. Közülük az elsőről (sORF A) néha keletkezik is egy néhány amino-

savból álló, funkció nélküli peptidlánc, de az utána következők már egy mRNS-hajtűkanyarba esnek, amelyet a riboszóma rendszerint „levág", és a pásztázást ezek mögött folytatva talál rá a valódi start kodonra és az általa kijelölt ORF-re, amely már tényleges fehérjét kódol *(I/14.19. B ábra)*. Ez a mechanizmus már inkább vírusspecifikus, amennyiben sokféle vírusban (pl. adenovírusokban) megfigyelték, de az eukarióta génekben igen ritka. A riboszómaelterelés tulajdonképpen a lejjebb részletezett **termináció-reiniciáció sajátos változatának is tekinthető**, de az sORF transzlációja esetleges, oligopeptid terméke pedig felesleges. Mivel a pásztázásból kihagyott RNS-nyél és -hurok nem tartalmaz működőképes fehérjét kódoló szakaszt, úgy tűnik, itt a „leaky scanning"-től eltérően csak egy start kodon használatának van értelme, vagyis a riboszómaelterelés szerepe még tisztázásra szorul.

I/14.8.4. Termináció–reiniciáció

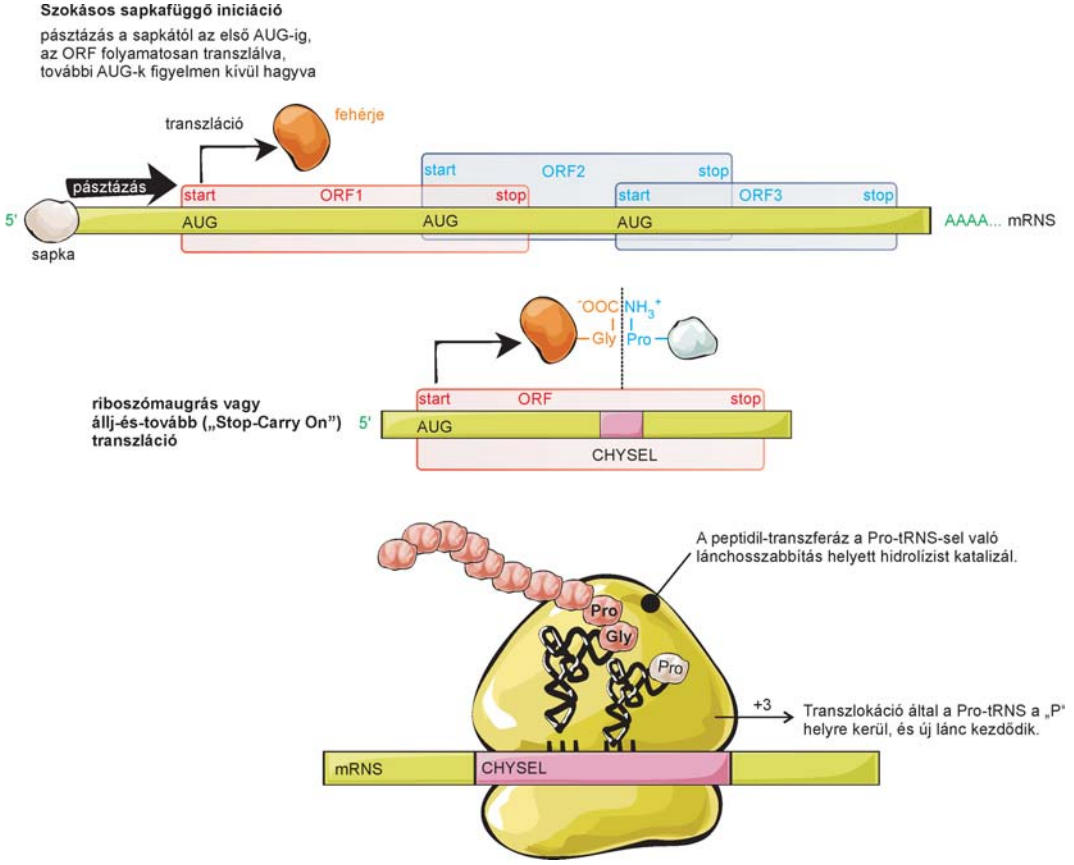
Az RNS-vírusok bicisztronos, azaz két kódoló szakaszt (ORF-et) tartalmazó, mRNS-ein a két fehérje összehangolt transzlációját gyakran (pl. az influenza B vírus és a „respiratory syncytial virus" esetén) termináció-reiniciáció mechanizmus (más néven „stop-start" transzláció) biztosítja. Az első ORF stop kodonja és a második ORF start kodonja általában összeolvad (pl. **UAA**UG, illetve A**UGA** – ahol a stop kodon vastag betűvel, a stop pedig aláhúzással van jelölve) vagy tetszőleges sorrendben egymáshoz nagyon közel helyezkednek el. A két leolvasási keret nem esik egybe, így nem okoz gondot, ha az első („upstream") ORF stop kodonja a második („downstream") ORF start kodonja után helyezkedik el, és nem fordul elő, hogy a két kódoló szakaszról egybefüggő poliproteint szintetizálódik. A mechanizmus lényege, hogy a „downstream" ORF start kodonjánál nincs IRES, így az itt végbemenő iniciáció nem önálló folyamat, hanem az „upstream" ORF stop kodonjánál való termináció függvénye, és attól elválaszthatatlan. Az első stop kodon (és egyúttal a hozzá nagyon közel lévő második start kodon) előtt helyezkedik el az a szekvencia, amely a terminációt megelőző riboszómakötőhely „termination upstream ribosome binding site" (TURBS) nevet viseli, és visszatartja a stop kodonnál szétesőő komplex 40S alegységét, amíg az ismét metionil-tRNSini-t köt, és azzal illeszkedik az új start kodonra *(I/14-20. ábra)*.



I/14-20. ábra
Termináció-reiniciáció

I/14.8.5. Riboszómaugrás

Sok RNS-vírus fehérjéinek szintézise zajlik úgy, hogy egy folyamatos kódoló szekvencia nem egy, hanem két polipeptiddé transzlálódik, mintha a peptidlánc a riboszómán belül, szintézis közben elhasadna. A riboszómaugrásnak („ribosome skipping”-nek) vagy állj-és-tovább („Stop-Carry On”) transzlációnak nevezett jelenség lényege, hogy az mRNS jellegzetes szekvenciájának egy jól meghatározott pontján a „P” helyen lévő peptid C-terminális glicinje és az „A” helyre került prolin között nem jön létre peptidkötés. A peptidil-transzferáz itt – a terminációkor megszokott módon – hidrolázként működik, és leválasztja a glicinre végződő peptidet, ám a transzláció folytatódik tovább (vagy újrakezdődik) egy prolinnal induló lánc szintézisével. A riboszómát így ugrató RNS-szakaszt 2A-szerű vagy CHYSEL szekvenciának nevezik. Előbbi a vírusra utal, amelyben elsőként felfedezték, utóbbi a „cis-acting hydrolase element” betűszava *(I/14-21. ábra)*.



I/14-21. ábra
Riboszómaugrás („ribosome skipping”)

I/14.8.6. Transzlációs kereteltolódás

Néhány vírus (köztük az influenzavírus és a HIV) esetén megfigyelték, hogy egyes fehérjéik szintézise közben – programozottan, előre meghatározott ponton – a riboszóma egy, vagy ritkábban két nukleotidnyit előre (+1, +2) vagy hátra (-1, -2) csúszik, és az így megváltozott leolvasási keretben folytatja a transzlációt. A váltás nem 100%-os, így hol a folyamatos, hol az eltolt keret érvényesül, vagyis egy mRNS kétféle polipeptidet kódol egyszerre. A csúszás helye általában hét nukleotid hosszúságú szakaszra terjed ki, és a csúszás irányát ezen belüli, illetve ezt követő szekvenciák határozzák meg. Bármilyen irányba csúszik is a riboszóma, ettől a benne ülő peptidil-tRNS antikodonja és a „P" helyen lévő kodon teljes komplemetaritása megszűnik, és csak egy vagy két nukleotidra korlátozódik.

Ha a csúszós heptanukleotidot optimális távolságban (5-9 nukleotid kihagyásával) egy markáns másodlagos szerkezet, rendszerint álcsomó, hajtű vagy RNS-triplex követi, akkor a riboszóma visszafelé csúszhat *(I/14-22. A ábra)*. Ez történik például a HIV gag és pol génjeinek átmeneténél. Ha a keret nem tolódik el, hamarosan stop kodon következik, és a transzláció gag poliproteint eredményez. Amikor a keret eltolódik -1 nukleotiddal, a feltáruló keretben a pol gén is érvényesül, így a riboszóma legyártja a gag-pol poliproteint.

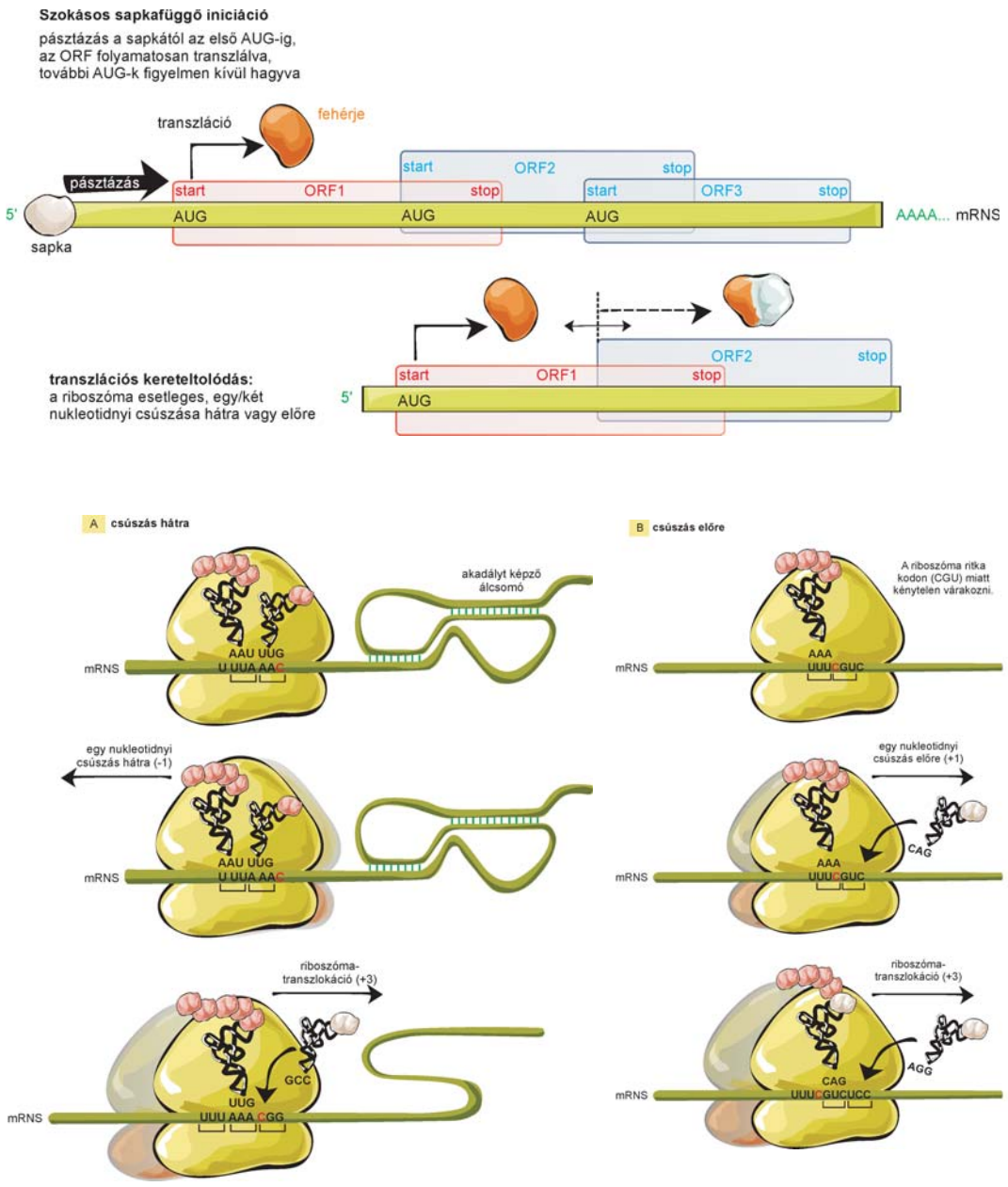
Amennyiben a csúszós heptanukleotidot nem követi akadály, viszont magában foglal egy ritka kodont, a riboszóma – a nehezen előkeríthető aminoacil-tRNS-re való várakozást elunva – előre mozdulhat egy nukleotidnyit (+1). Így ugyanis egy gyakoribb triplet kerül az „A" helyre, amelyet a megfelelő aminoacil-tRNS hamar fel is ismer, és a transzláció végre folytatódhat *(1/14-22. B ábra)*. Így keletkezik például kétféle RNS-függő RNS-polimeráz az influenza A vírus egyetlen génjéről.

I.14.8.7. Terminálásgátlás („suppression of termination")

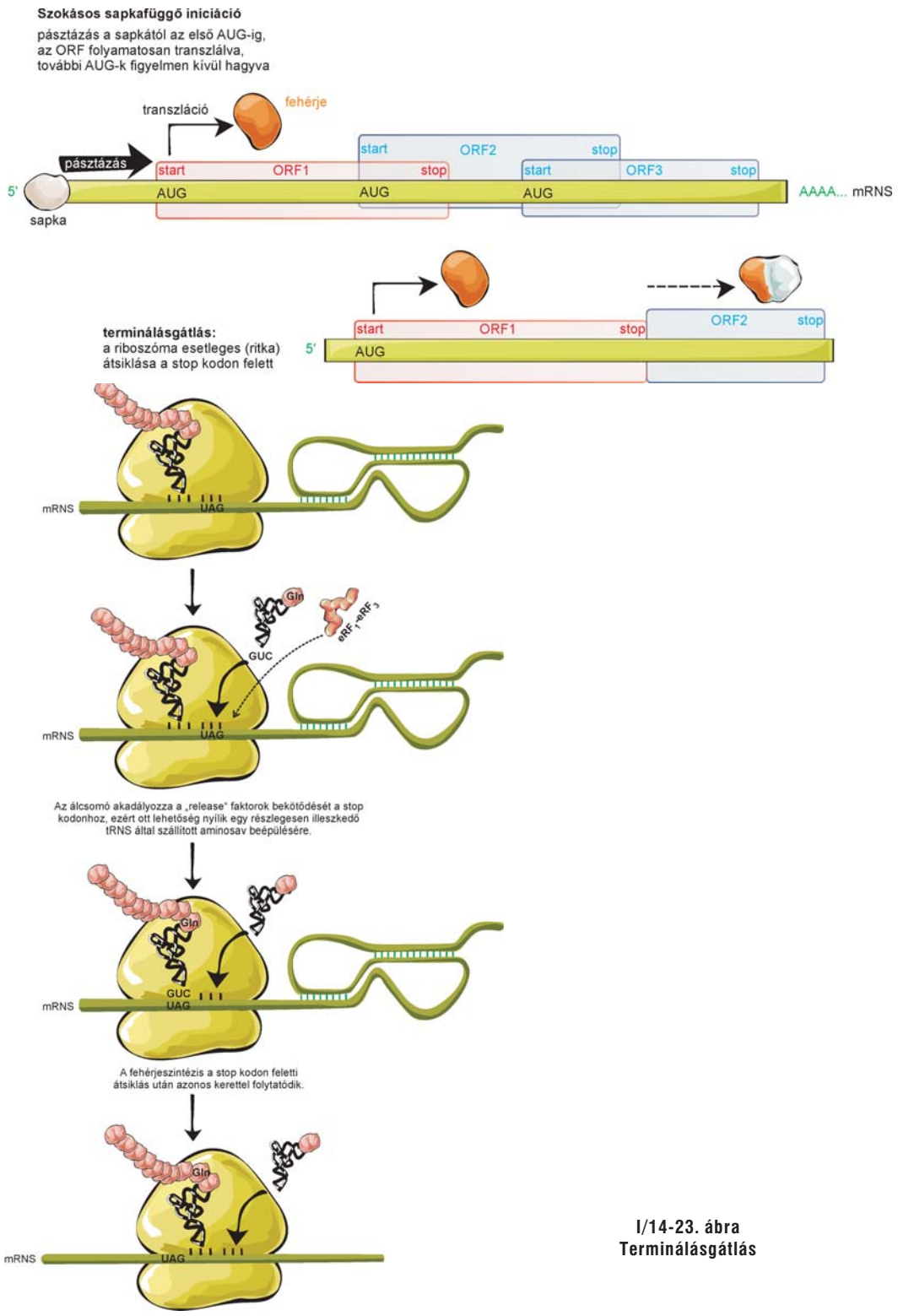
Szintén RNS-vírusoknál fordul elő, hogy egyes polipeptidláncuk C-terminális meghosszabbítását a stop kodon figyelmen kívül hagyásával és a transzláció tovább folytatásával érik el. Ezt a mechanizmust ezért stop kodon feletti átsiklásnak („stop codon read-through") is nevezik. Az szóban forgó stop kodont olyan szakasz (gyakran RNS-álcsomó) követi, amely akadályozza a „release" faktorok (eRF1 és eRF3) bekötődését az UAG vagy UGA tripletekhez, így esélyt adva közel komplementer antikodonnal rendelkező, bár nem tökéletesen illeszkedő aminoacil-tRNS-eknek, hogy valamelyikük beillesszen egy (nem kódolt) aminosavat és ezzel továbblökje a riboszómát *(I/14-23. ábra)*. Néhány állati retrovírus (pl. a Moloney egér leukémia vírus) terminálásgátlással biztosítja, hogy ne csak gag, hanem gag-pol poliprotein is termelődjön a vírusreplikáció megfelelő szakaszában.

I.14.9. VÍRUSELLENES TAKTIKÁK A GAZDASEJTBEN ÉS EZEK KIVÉDÉSE

A differenciált, többsejtű szervezetekben, mint az emberé is, a vírusok elleni védekezésben kiemelkedő szerepet játszik az immunrendszer, ami főként a vírussal fertőzött sejtek elpusztításával, kisebb részben a virionok bekebelezésével szab gátat az infekciónak. Az antivirális immunitás összetett kérdésével e fejezet nem foglalkozik. Itt csupán abba pillantunk bele, hogyan veheti fel a harcot maga a fertőzött sejt a benne megjelenő vírusgenom ellen, és hogyan játszhatja ki a vírus a sejt éberségét.



I/14-22. ábra
Transzlációs kereteltolódás

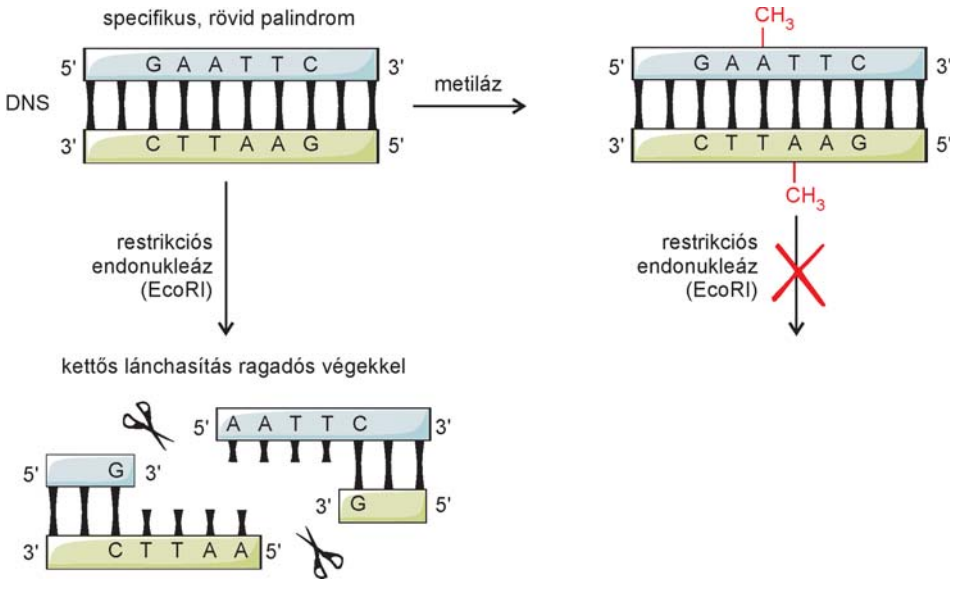


I/14-23. ábra
Terminálásgátlás

I.14.9.1. Restrikciós metilázok és endonukleázok a baktériumokban

A láncbeli nukleotidok, különösen a dezoxi-adenilátok és dezoxi-citidilátok bázisainak metilálása a DNS jelölésének leggyakoribb módja a baktériumokban. Ennek a replikáció késleltetésében, vagy a „mismatch" hibajavításban betöltött szerepével más fejezetek foglalkoznak. A baktériumok azonban meghatározott szekvenciák metilálását használják DNS-ük SAJÁT voltának jelzésére is, ami már közvetlenül kapcsolódik a fágellenes védekezéshez.

A baktériumok olyan endonukleázokat tartalmaznak, amelyek egy rájuk jellemző nukleotidszekvenciát felismerve, annak kovalens módosulásai alapján állapítják meg, hogy a DNS-t hasítaniuk kell-e, majd pozitív esetben foszfodiészterek hidrolízisével mindkét szál folytonosságát megszakítják, vagyis a DNS-t fragmentálják. Ezeket az úgynevezett **restrikciós endonukleázokat** kezdetben a hasítási helynek a felismert szekvenciától mért távolsága alapján osztották három csoportra: az **I. típusúak** nagyjából ezer bázispárnyira, véletlenszerű helyen; a **II. típusúak** a felismert szekvencián belül, vagy annak közvetlen közelében; míg a **III. típusúak** körülbelül 25 bázispárnyi távolságban vágják ketté a DNS-t. Mindhárom csoportra érvényes, hogy az egyes endonukleázoknak metiláz (metil-transzferáz) párja van, amely ugyanazt a szekvenciát ismeri fel, és annak bizonyos bázisait képes metilálni, amivel megjelöli a saját DNS-t. Az I. és III. típusoknál a restrikciós endonukleáz és metiláz egy fehérjén belül található, a II. típus esetén ellenben a két feladatot két önálló fehérje végzi. A felismerendő szekvencia metilált állapota akadályozza restrikciós hasítást. Az enzimek hármas felosztása később kiegészült egy **IV. típussal**, és ebbe sorolták azokat a különleges restrikciós endonukleázokat, amelyeket éppen a felismert szekvencia kovalensen módosított bázisai (hidroximetil-C, metil-C vagy metil-A) sarkallnak hasításra. Ezeknek persze nincsenek metiláz párjaik, hiszen éppen a fágra jellemző módosításokra (lásd lejjebb) vadásznak.

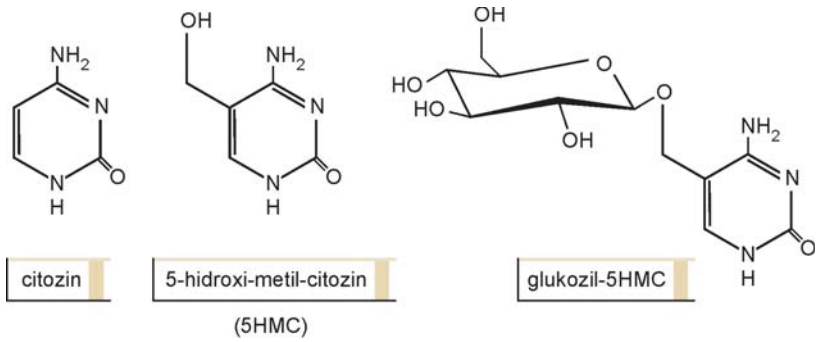


I/14-24. ábra
A II. típusú restrikciós endonukleáz (pl. EcoRI) és metiláz működése

A leírtakból nyilvánvaló, hogy a rekombináns DNS-technológia leginkább a II. típusú enzimek megismeréséből profitált, így ezeket is ismerjük a legalaposabban. Klasszikus képviselőik kisméretű, egymással szemben álló alegységek homodimereként kötődnek a DNS-hez, ennek megfelelően rövid (4-9 bázispár) **palindrom szekvenciákat** ismernek fel, és ezen belül szimmetrikusan hasítanak. A hasítás ritkán a szakasz közepére esik, ilyenkor tompa végű töredékek keletkeznek. Általában azonban 5' vagy 3' túlnyúló, úgynevezett **ragadós végek** maradnak a fragmentumokon, ami kiválóan alkalmassá teszi őket (mesterséges) rekombinációra *(I/14-24. ábra)*.

Ha idegen (fág-) DNS kerül a baktérium citoplazmájába, a restrikciós endonukleázok jó eséllyel megtalálják benne a rájuk jellemző, rövid szakaszokat, és a betolakodót felaprítják. A fágok persze megpróbálják kijátszani ezt a védelmet, és van is példa arra, hogy bizonyos metilációkat átvesznek a gazdasejttől, de nem alkalmazhatnak a baktériuméval teljesen azonos jelölőrendszert, hiszen a litikus ciklus során ők is fel akarják darabolni a baktérium kromoszómáját anélkül, hogy a sajátjuk is áldozatul esne.

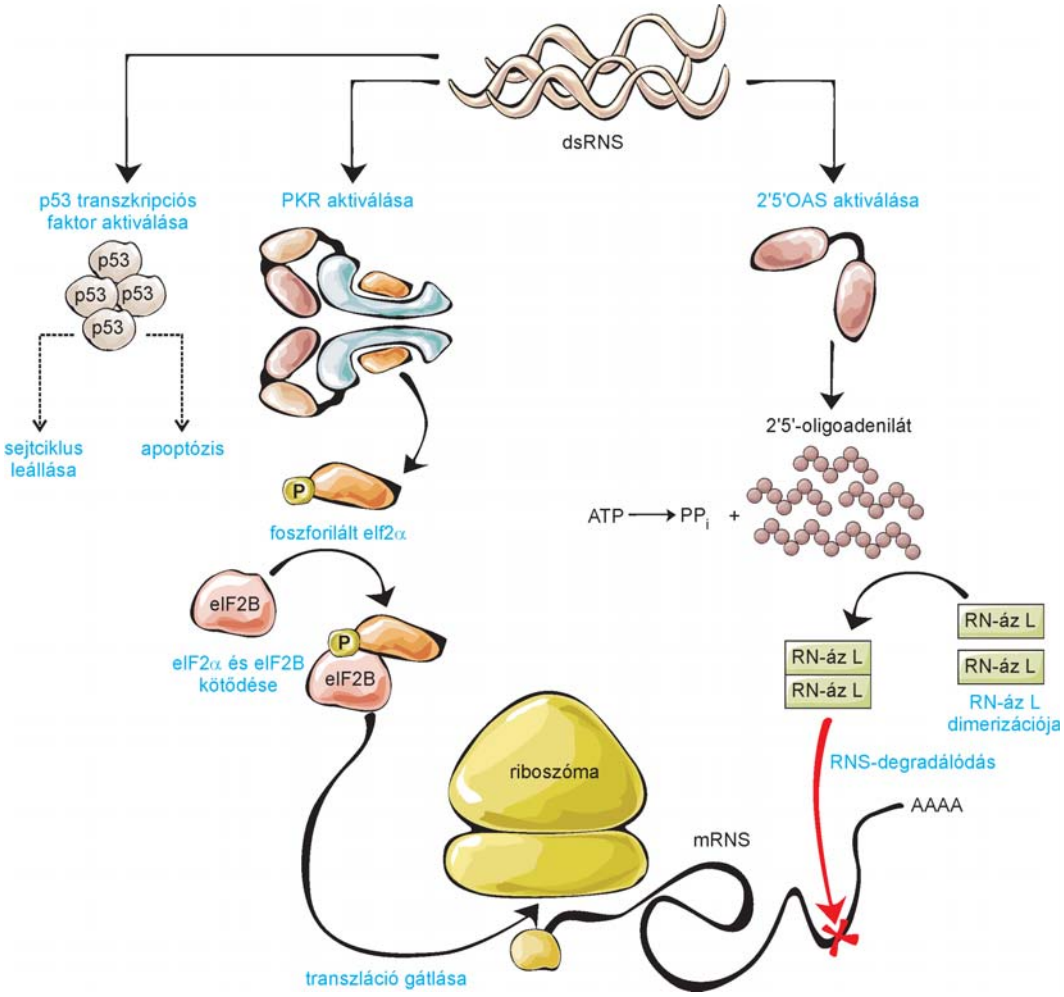
A legtöbbet tanulmányozott **T4 fág** például azzal igyekszik kivédeni az I-III. típusú restrikciós endonukleázok támadását, hogy DNS-e nem tartalmaz citozint *(I/14.25. ábra)*. Mielőtt ugyanis a fág genomja replikálódna, a fág endonukleáza felaprítja a citozintartalmú gazda-DNS-t, majd a fág enzimei a sejt összes citozinmolekuláját átalakítják **5-hidroximetil-citozinná (5HMC)**. E módosított bázis ugyanúgy párosodik guaninnal a kettős hélixben, mint az eredeti, így dezoxi-citidilát helyett mindenütt dezoxi-hidroximetil-citidilát épül be az újonnan polimerizálódó fág-DNS-be, ami tehát **100%-ban citozinmentes** lesz. A különleges szerkezetű fág-DNS nem csak a legtöbb restrikciós endonukleázzal, de a fág saját endonukleázával szemben is védettséget élvez. Nem meglepő, hogy a közös evolúció során a baktériumokban kialakultak újabb fajta (IV. típusú) **restrikciós enzimek** (McrA és McrBC) amelyek éppen az 5HMC-k jelenlététől aktiválódnak. A leleményes fág erre egy olyan enzimmel állt elő, amely a replikáció során a DNS-ébe beépült összes 5HMC-t glukozilálja is (UDP-glukózt felhasználva glukózmolekulát konjugál hozzájuk), így a fág-DNS-ben már felismerhető 5HMC sincs, és a glukozilált bázist tartalmazó nukleotid nem fér el az Mcr enzimek aktív centrumában. Csalódnunk kellene az evolúcióban, ha egyes *E. coli* törzsek nem álltak volna elő egy olyan restrikciós enzimmel (GmrSD), amely a **glukozil-5HMC-t tartalmazó DNS-t hasítja**. A citozinok további módosítása helyett a T4 fág erre azzal reagált, hogy kapszidjából már megérkezésekor a DNS-ével együtt injektálja be a sejtbe az újonnan kifejlesztett „internal protein I*" (IPI*) nevű GmrSD-gátló fehérjét. A történet ezzel még nyilván nem ért véget.



I/14-25. ábra
A citozin és annak a T4 fág DNS-ében található módosulatai

I.14.9.2. A kettősszálú RNS által kiváltott stressz eukarióta (humán) sejtekben

Igaz, hogy kettősszálú RNS az egészséges eukarióta sejtekben is megjelenik, hiszen a génexpresszió mikroRNS-ek általi szabályozása az mRNS-ek komplementer szekvenciájához való kötődést igényli, sőt a pre-miRNS-ek önmagukban is komplementerek. Az ilyenkor létrejövő RNS kettős hélixek terjedelme azonban csak két-három fordulatnyi, és azok már eleve a miRNS-érést katalizáló enzimek, illetve a transzlációt és RNS-degradációt reguláló fehérjekomplexek ölelésében alakulnak ki, így nem hívják fel magukra a vírusdetektorok figyelmét. Ezzel szemben a tisztán RNS-vírusok örökítőanyaga, még ha eleve nem is volna kettősszálú, az RNS-függő RNS-polimeráz által végrehajtott replikáció és transzkripció során rövidebb-hosszabb szakaszon mindenképpen azzá válik. Kialakult tehát az eukarióta sejtekben a dsRNS-válasz, ami a legismertebb intracelluláris vírusellenes mechanizmus.



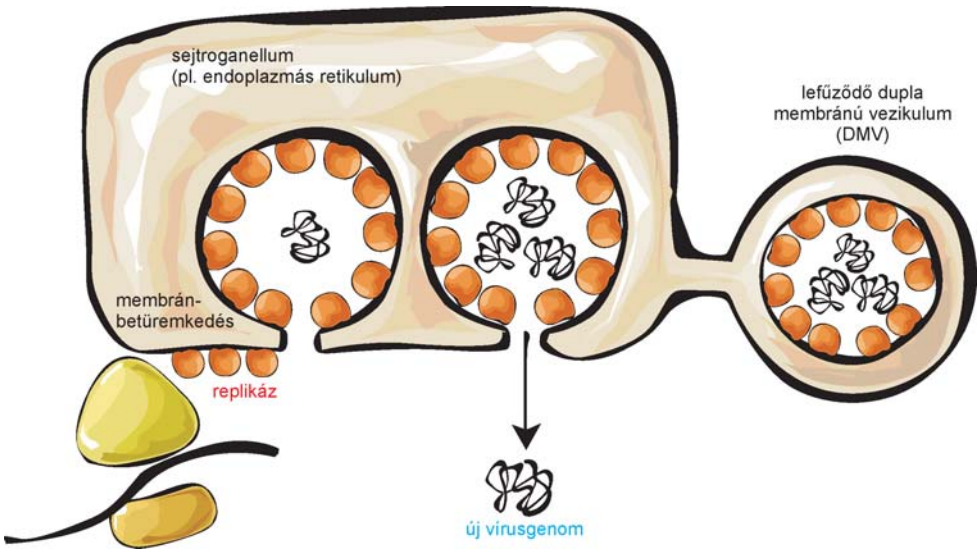
I/14-26. ábra
A kettősszálú RNS-ek által kiváltott dsRNS-válasz eukarióta sejtekben

A szervezet részeként, közösségben élő humán sejtek virusfertőzésre adott válaszreakciója sokkal heroikusabb a tömegben is magányos baktériumokénál. Míg utóbbi megpróbálja kiirtani a bele került parazitát, és körme szakadtáik küzd az életben maradásért, addig előbbiek saját fennmaradásukat is veszélyeztetve próbálják megakadályozni, hogy bennük a vírus sikeresen megsokszorozódjon, és ha másként nem tudják a szervezet többi sejtjét megvédeni, készen állnak az idegen lénnyel együtt önmagukat is feláldozni. A **dsRNS-válasz** ennek megfelelően **a transzláció leállítását**, a citoplazma **RNS-einek lebontását**, a **sejtciklus feltartóztatását** és a **programozott sejthalál esetleges beindítását** foglalja magában. A legtöbb sejtben a dsRNS-ek két fő szenzora a **dsRNS által aktivált protein-kináz (PKR)** és a **2'-5'-oligoadenilát-szintetáz (OAS)**. Mindkettő a tisztán RNS-vírusokra jellemző, hosszabb dsRNS-ek kötődésekor aktiválódik, és mindkettő indukálódik interferonok hatására (lásd később). Előbbi gátolja a transzláció szokásos, sapka- és eIF2-függő iniciációját, méghozzá az **eIF-2α foszforilációja révén**. Utóbbi 2-30 alegységből álló adenilát-oligomereket szintetizál, amelyek egy **oligoadenilátok által aktivált ribonukleázt (RN-áz L)** hoznak működésbe, és az válogatás nélkül felaprítja a keze ügyébe kerülő RNS-eket *(I/14-26. ábra)*.

A PKR az eIF-2α mellett a **p53 transzkripciós faktort** is foszforilálja, ez pedig olyan génexpressziós változásokat indít el, amelyek a sejt osztódási ciklusának leállításához vezetnek, és az apoptózis végrehajtásának kedveznek.

Ha a szervezetben vírusok szedik áldozataikat, beindul a riadólánc, azaz a virionokkal már érintkezésbe került leukociták és fibroblasztok **interferonokat** (IFNα és β) szekretálnak, így előre figyelmeztetve a többi sejtet, hogy készüljenek az invázióra. Ezek az úgynevezett I-es típusú interferonok sejtfelszíni receptorokhoz kötődve több mint 300 gént (interferon által stimulált gének, ISG-k) indukálnak, melyek között szerepel a PKR és az OAS génje is. Az IFN-ek által felkészített sejtekben tehát a vírus-RNS sokkal intenzívebb és hatékonyabb dsRNS-választ tud kiváltani.

Ezt a védelmi rendszert a vírusok alapvetően azzal próbálják kivédeni, hogy kettősszálú RNS-üket elrejtik a szenzorok elől. Korábban szó volt róla, hogy az RNS-vírusok a kapszidon belül és/vagy a citoplazmában kialakított rekeszben szin-



I/14-27. ábra
Vírusgyár

tetizálják az új genomiális RNS-eket és az mRNS-eket. Ezeket a vírusok által kialakított rekeszeket **vírusgyáraknak** („virus factory") nevezik. Előnyük nem csak a sejt védekezőmechanizmusainak elkerülése, hanem a vírusgenom, a replikáz és a vírusreplikáció gazdasejt eredetű komponenseinek egy helyre koncentrálása is. Az RNS-vírusok vírusgyárai legtöbbször intracelluláris **organellumok** (endoplazmás retikulum, Golgi, mitokondrium, endoszóma, lizoszóma vagy peroxiszóma) **membránjának betüremkedésével** jönnek létre. Az endoplazmás retikulum esetében a betüremkedés gyakran le is fűződik vezikulumot képezve a lumenben, majd ez az organellum membránját kifelé domborítva ismét lefűződhet, így a citoplazmában dupla membránú vezikulum (DMV) alakul ki *(I/14-27. ábra)*. Bizonyos megfigyelések arra utalnak, hogy ilyen vírusgyár DMV-k autofagocitózis révén is keletkeznek. A vírusgyár létrehozása nem korlátozódik az RNS-vírusokra. A kisméretű DNS-vírusok a magban, a nagyobbak pedig a citoplazmában alakítanak ki rekeszeket **(viroplazma),** de ezeket nem membrán, hanem főként citoszkeletonkomponensek és chaperonok konglomerátuma határolja. A sejtmagban replikálódó Herpes simplex RNS-vírus szintén fehérjékkel körülvett replikációs kompartmenteket alakít ki a nukleuszon belül.

I/15.
Géntechnika, biotechnika

Rónai Zsolt

Napjainkban csaknem végtelen azoknak a laboratóriumi módszereknek a száma, amelyek a genom, a transzkriptom (adott szövetben, adott időpontban működő gének összessége) és a proteom (a jelen lévő fehérjék) akár teljes egészét, akár egy-egy elemét vizsgálják. Bár a *Humán Genom Program* sikeres befejezésével 2003 óta az emberi genomot alkotó 3 milliárd bázis(pár)ból álló szekvencia teljes egészében ismert, mégis ennek pontos jelentése, a genom polimorf helyeinek (mutációinak és polimorfizmusainak) biológiai hatása mindmáig minden részletre kiterjedően nem tisztázott. Talán még komplexebb feladat annak megértése, hogy milyen szabályozó mechanizmusok határozzák meg, hogy adott szövetben, bizonyos körülmények között mely gének működjenek.

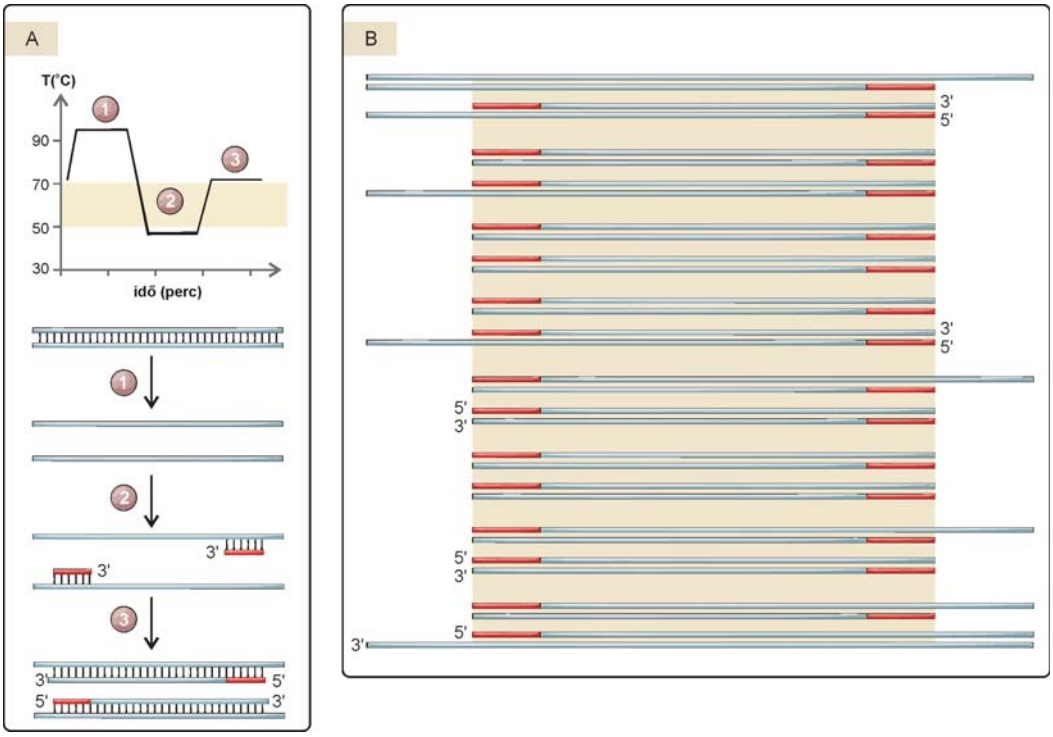
A laboratóriumi géntechnikai eljárások egy részét a mindennapi klinikai gyakorlatban is alkalmazzák (pl. mutációk vizsgálata monogénes kórképek diagnosztizálása céljából; kórokozók genetikai anyagának kimutatása), más eljárások a klinikai munka nélkülözhetetlen segítői (pl. peptid hormonok – inzulin – előállítása rekombináns technikákkal), míg a módszerek további csoportja elsősorban a kutató laboratóriumok eszköztárába tartozik.

I/15.1. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

A *polimeráz láncreakció* (*PCR* – polymerase chain reaction) nemcsak a legtöbb genomot vizsgáló technika alapja, de több más eljárásnak – pl. egy rekombináns DNS-molekula előállításának – is fontos eszköze. A módszer lényege, hogy egy mintául szolgáló DNS egy kiválasztott szakaszáról több millió vagy akár milliárd azonos másolat készül: a keletkező DNS-termék így láthatóvá tehető, analizálható vagy más további eljárásokban felhasználható.

A módszer alapelve a sejtosztódáskor végbemenő szemikonzervatív DNS-megkettőződés, vagyis az, hogy a DNS két szála egymástól szétválasztható, és mindkét szál lemásolható, így egy molekulából két azonos DNS keletkezik *(I/15-1. ábra, A)*. Ha ezt a folyamatot további ciklusokban láncreakció formájában megismétlik, akkor *n* ciklus alatt (optimális körülmények között) 1 molekuláról 2^n számú másolat készül. A PCR során így kb. 100–20 000 bázispár hosszúságú szakaszok sokszorozhatók fel.

A minta bármilyen DNS lehet: mutációk vizsgálata során a sejtből izolált teljes genomból indulnak ki. Fontos szempont itt, hogy bármilyen genetikai variációt is vizsgálnak, a minta származhat vérből vagy akár szájnyálkahártya sejtekből is, mivel a szervezetünkben a genom minden sejtben azonos. Más esetben a minta-DNS lényegesen rövidebb is lehet: kiindulásul szolgálhat egy baktérium plazmidja vagy akár egy előző PCR terméke is. A lemásolni kívánt szakasz kijelölése azon alapul, hogy a DNS-függő DNS-polimerázok a lánc szintézisét elkezdeni nem tudják, csak egy nukleinsav lánc szabad 3’ végét képesek meghosszabbítani. A PCR alapvető



I/15-1. ábra

Polimeráz láncreakció (PCR). A: A PCR termociklusa és lépései: 1. denaturálás (kb. 95 °C), 2. anneálás (40–70 °C), 3. extenzió (72 °C) B: a folyamat terméke a 4. ciklus után

komponense ezért két előre szintetizált rövid (18–60 nukleotid egységből álló) egyszálú DNS, a *primer*. Ezek a primerek jelölik ki a megsokszorozandó szakaszt oly módon, hogy az egyik primer az egyik lánchoz, a másik pedig a komplementer szálhoz kötődik úgy, hogy 3' végük néz egymás felé. Így a DNS-szintézis során mindkét szálon a két primer által közrefogott régió íródik át, illetve a folyamat elején ennél valamivel hosszabb szakasz másolódik le. A következő *ciklus*okban azonban már az előző lépések során képződött termékek is mintául szolgálnak, ezek kezdetét viszont éppen egy primer jelölte ki, így a róla készült másolat már pontosan a két primer által határolt DNS-szakasz lesz. Az *I/15-1. ábra B* része egyetlen molekuláról 4 ciklus alatt keletkező termékeket ábrázolja, megfigyelhető, hogy már ekkorra viszonylag alacsony a túlnyúló láncok relatív száma.

Az adott DNS-szakasz megsokszorozása egy 3 lépésből *(I/15-1. ábra, A)* álló folyamat ciklusos (20–45-szörös) ismétlését jelenti. Az első lépés, a *denaturálás* magas hőmérsékleten (kb. 95 °C) történik – a DNS 2 lánca ennek során elválik egymástól. A következő lépésben a hőmérséklet alacsonyabb (40–70 °C), ekkor a primerek a minta- DNS megfelelő, komplementer régiójához kötődnek, ezt *anneálás*nak hívjuk. Ezt követi az *elongáció* vagy *extenzió*: a DNS-függő DNS-polimeráz rendszerint 72 °C-on a primereket meghosszabbítva felépíti az új DNS-láncokat: az adott régió megkettőződött.

A PCR során ezen 3 lépés ismétlődik rendszerint 20–45 ciklusban, a hőmérséklet előre programozott változásáról (a termociklusról) a PCR-berendezés gondoskodik. A reakcióelegy tartalmazza a minta-DNS-t, a primereket, valamit a DNS-függő

DNS-polimerázt. Az enzim alapvető tulajdonsága, hogy hőstabil: a hasonló funkciójú humán enzimek ilyen magas hőmérsékleten denaturálódnának és inaktiválódnának. A PCR-hez alkalmazott egyik első DNS-polimerázt a *Thermus aquaticus*-ból izolálták, innen ered a Taq-polimeráz elnevezés. Az enzim számára optimális körülményeket (pH, ionkoncentráció) pufferoldat biztosítja. A reakcióelegy nélkülözhetetlen összetevői továbbá a dezoxiribonukleozid-trifoszfátok (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ezekből építi fel az enzim az új DNS-szálakat.

A PCR-termék detektálása: DNS elektroforetikus analízise

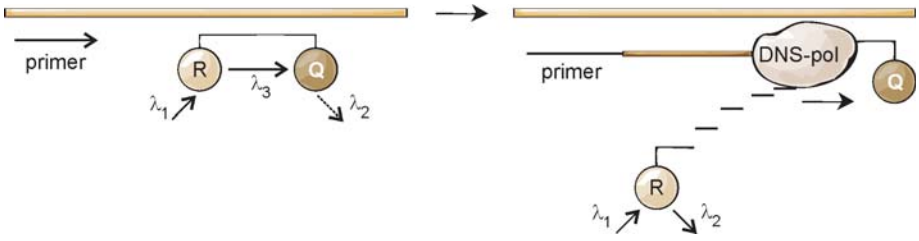
Polimeráz láncreakciót követő gyakori lépés a keletkezett DNS-molekulák láthatóvá tétele, ez gyakran gél-elektroforézissel történik. Az elektroforézis lényege, hogy töltéssel rendelkező molekulák elektromos mezőben vándorolnak, sebességüket (elektroforetikus mobilitásukat) töltésük és molekulatömegük határozza meg. Ennek megfelelően az elektroforézis DNS mellett RNS és fehérje molekulák vizsgálatának is gyakori eszköze. DNS (és RNS) vizsgálata során technikai könnyebbséget jelent, hogy a nukleinsavak (a foszfát csoportok miatt) mindig negatív töltésűek, sőt töltésük arányos a lánc hosszával, azaz lényegében a molekulatömeggel. Ez azt eredményezi, hogy a nukleinsavak a gélelektroforézis során mindig a pozitív pólus felé mozognak, a molekulák vándorlásának sebessége pedig a molekulatömegtől függ: a kis molekulák gyorsabban, a nagyok pedig lassabban haladnak. A DNS így tehát nem csupán láthatóvá tehető, hanem mérete is megbecsülhető, ami számos eljárás (pl. mutáció vagy polimorfizmus vizsgálata, bakteriális vagy virális genom kimutatása stb.) alapját képezi (*I/15-3. ábra*).

A DNS-molekulák elválasztására szolgáló gél leggyakrabban agaróz vagy poliakrilamid lehet, a nukleinsavak láthatóvá tételéhez valamilyen fluoreszcens festék alkalmazható. Ez akár kovalens kötéssel rögzíthető a primerhez, de gyakran használnak a DNS bázispárjai közé beékelődő interkalátor festékeket (pl. etídium-bromid) az elektroforézis alatt vagy után.

A valós idejű PCR

A valós idejű vagy *real-time PCR* abban különbözik a hagyományos módszertől, hogy a rendszer a PCR-*termék*et minden ciklusban detektálja, így annak megsokszorozódása a folyamat során *végig nyomon követhető*. Ez elsősorban nem csupán azért előnyös, mert a PCR-t követően további lépésre nincs szükség, hanem főképp azért, mert a pontos mennyiségi mérés lehetőségét kínálja.

A real-time PCR során a keletkező *DNS detektálása* alapvetően kétféle módon történhet. Egyik lehetőség a DNS-interkalátor festékek alkalmazása, melyek jellemzője, hogy csak akkor bocsátanak ki fluoreszcens jelet, ha duplaszálú DNS-sel komplexet képeznek. Ennek megfelelően ahogy nő a PCR-termék mennyisége, ezzel arányosan emelkedik a kibocsátott szignál intenzitása. A másik megközelítés valamivel pontosabb: olyan oligonukleotid alkalmazásán alapul, amely a termék egy szakaszához hibridizál, s két végére fluoreszcens molekulákat kötöttek. Ez a molekula a *próba*, 5'-végén az úgynevezett „riporter" festék, 3'-végén pedig a „csillapító" csoport („quencher") található, így azok távolsága rögzített. Alapállapotban a gerjesztett riporter festék által kibocsátott jelet a csillapító elnyeli. A PCR-termék szintézise során a DNS-polimeráz a próbát 5'-exonukleáz aktivitásával nukelotidokra bontja le. Ennek eredményeként a fluoreszcens festék és a csillapító térbeli közelsége megszűnik, a kibocsátott jel felszabadul a gátlás alól: detektálhatóvá válik *(I/15-2. ábra).* Ahány DNS-másolat képződik, annyi próba bomlik le, így a mérhető jel a keletkező PCR-termék mennyiségével egyenesen arányos.



I/15-2. ábra

A keletkező termék detektálása fluoreszcens próbával. Alapállapotban a riporter („R") által kibocsátott jelet a csillapító („Q") elnyeli. A DNS-polimeráz 5' exonukleáz aktivitásával a próbát nukleotidokra bontja le, így a riporter a csillapítótól eltávolodik, s a jel detektálhatóvá válik

A polimeráz láncreakció működésének lényege, hogy a képződő termék mennyisége minden ciklusban megkétszereződik, így elvben a folyamatos detektálás nem feltétlen szükséges a kiindulási *DNS-mennyiség meghatározásá*hoz. A mérés pontosságát a valós idejű PCR mégis nagymértékben növeli. Ennek oka az, hogy a folyamat előrehaladása során a hatékonyság csökkenni kezd, az összes molekula megkettőződése már nem tud végbemenni, a folytonos detektálással megállapítható, hogy ez mikor következik be. Ez pedig lehetővé teszi, hogy a mennyiségi mérést a PCR még hatékony ugyanakkor már jól detektálható szakaszában végezzük el. Ebben a tartományban jelöljük ki az ún. küszöb-fluoreszcencia értéket, és azt határozzuk meg, hogy egy adott mintában az egyre emelkedő jel hányadik ciklusban éri el ezt a határértéket, ez a C_T. Mivel a PCR termék mennyisége – eddig a pontig még tökéletes hatékonysággal – minden ciklusban kétszeresére nő, kettőször, négyszer, nyolcszor magasabb kiindulási mennyiséghez eggyel, kettővel, hárommal alacsonyabb C_T tartozik, azaz a kiindulási mennyiség a 2^{-C_T} értékkel egyenesen arányos. Ez a matematikai alapelv mind abszolút, mind relatív kvantifikálásra alkalmas. Abszolút kvantifikálás során – más eljárásokhoz teljesen hasonlóan – ismert minta alkalmazásával hígítási sort és kalibrációs egyenest készítünk, s ennek segítségével határozzuk meg az ismeretlen minták koncentrációját. A relatív mérés összehasonlítására alkalmas: két minta koncentrációjának hányadosa határozható meg.

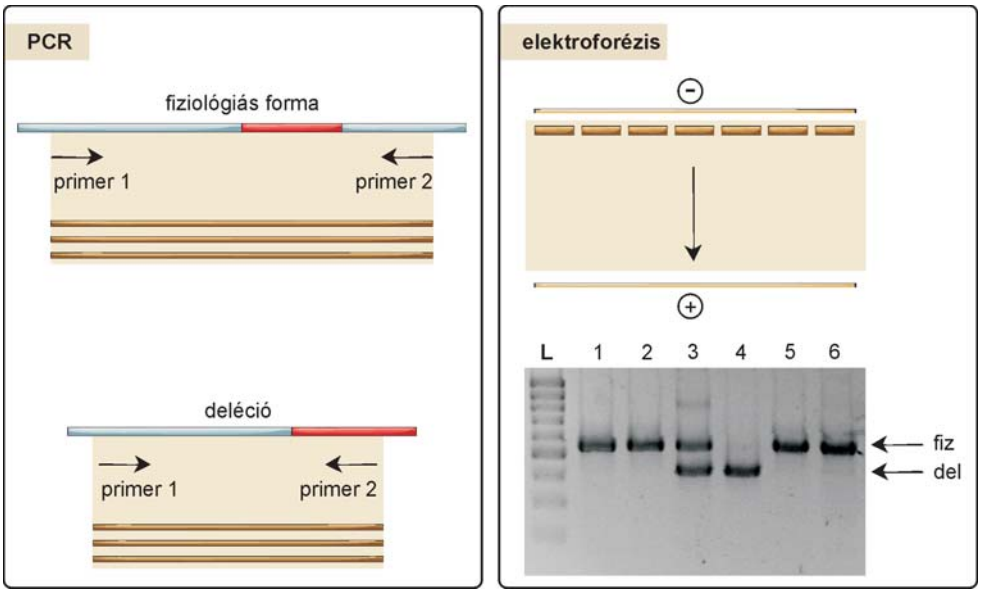
I/15.2. MUTÁCIÓK ÉS POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA

A mutációk és polimorfizmusok vizsgálata nemcsak a laboratóriumi kutatómunka gyakori feladata. Ezeket a módszereket a klinikai diagnosztikában is rendszeresen alkalmazzák monogénes betegségeket okozó mutációk kimutatására.

Ismétlődési variációk

A polimeráz láncreakció és azt követően a keletkezett termékek elektroforetikus analízise alkalmas egy adott génszakasz hosszának megállapítására. A két eljárás így deléciók, inzerciók vizsgálatára valamint repetitív szakaszok ismétlődési számának meghatározására közvetlenül alkalmas, mivel ebben az eseten a mutáció vagy polimorfizmus éppen az érintett régió hosszának megváltozását okozza.

Az eljárás alapja az, hogy a PCR során alkalmazott kér primer az érintett régiót szegélyező génszakaszhoz kötődik, mivel ezek a szekvenciák a deléció jelenlététől



I/15-3. ábra

Deléció kimutatása. Az érintett régió két oldalára tervezett primerpárral a vizsgált szakaszt megsokszorozzák, majd a keletkező termékeket gélelektroforézissel azonosítják. A PCR-termék hossza attól függ, hogy jelen van-e a deléció az adott mintában. A DNS-molekulák vándorlásának irányát a jobb fölső ábrarész szemlélteti. A jobb alsó kép 6 személy vizsgálatának eredményét ábrázolja. L: Molekulatömeg marker. A 3. személy heterozigóta hordozó, a 4. homozigóta a delécióra nézve. „Fiz": a normál hosszúságú génszakaszról képződő hosszabb termék, „del": deléciót tartalmazó régióról keletkező rövidebb fragmentum

függetlenül mindig azonosak, így minden esetben keletkezik termék. Ugyanakkor ha a két primer által határolt szekvenciából egy rész kiesik (deléció), a két primer közelebb kerül egymáshoz, azaz a lemásolt régió rövidebb lesz. Ez gélelektroforézissel láthatóvá tehető. Az *I/15-3. ábra* jobb alsó része 6 személy vizsgálatának eredményét mutatja be. A gél bal sávjában egy molekulatömeg marker látható. Ez ismert méretű DNS-molekulák keveréke, amit azért alkalmaznak, hogy a mintákban lévő fragmentumok méretét ehhez viszonyítva megbecsülhessék. Az 1., 2., 5. és 6. személy esetében a PCR során csak egy hosszabb termék keletkezett, ők mindkét kromoszómán *homozigóta* formában a fiziológiás allélváltozattal rendelkeznek. A 4. minta elemzése során egy gyorsabb, azaz kisebb molekulatömegű fragmentum képződött, aminek oka a deléció jelenléte a homológ kromoszómapár mindkét tagján (homozigóta „del"/„del" genotípus). A 3. személy esetében jól megfigyelhető, hogy mind a rövidebb, mind a hoszszabb termék szintetizálódott a polimeráz láncreakció során. Ez a jellegzetes kép tapasztalható *heterozigóta hordozó*k esetében: az anyai és apai kromoszóma eltérő szerkezetű, egyiken a fiziológiás, másikon a deléciót hordozó génváltozat helyezkedik el.

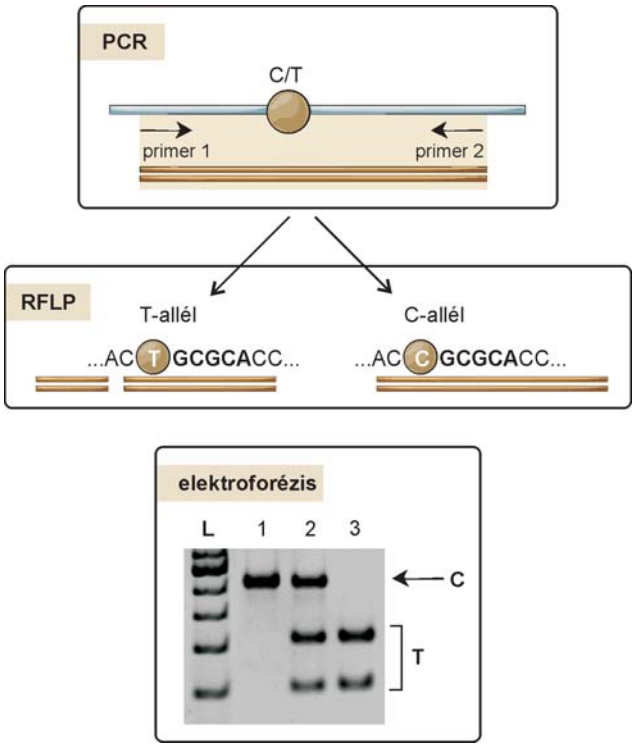
Ezzel a módszerrel több monogénes betegség (pl. Huntington-kór, cisztikus fibrózis) hátterében álló deléció kimutatható, számos esetben azonban a két allélváltozat közötti hosszúságkülönbség olyan kicsi, hogy a hagyományos eljárás helyett speciális elektroforetikus technika alkalmazása szükséges. Ilyen a kapilláris gélelektroforézis, melynek során a molekulák analízise egy kb. 50 μm belső átmérőjű kapilláriscsőben történik. Érzékeny, lézeres detektálással akár 1 bázispárnyi különbség is megbízhatóan kimutatható.

SNP-k és pontmutációk

A genom variációinak zöme egyetlen bázispár cseréje, amit *szubsztitúció*nak nevezünk. Ide tartoznak a *pontmutációk*, és az *egypontos nukleotid polimorfizmus*ok (*SNP*). Az előbbiek esetében a ritkább allél-változat gyakorisága alacsonyabb, mint 1%. Ezek a mutációk rendszerint monogénes betegségek okozói, éppen emiatt nem terjedtek el nagyobb gyakorisággal a genomban. Az SNP-k esetében a ritkább variáns gyakorisága is eléri az 1%-ot, s ezek általában nem okozzák egy fehérje jelentős funkcióromlását vagy hiányát.

Az SNP-k és pontmutációk kimutatásának elve azonos. Alapvető szempont, hogy a PCR és elektroforézis kombinációja önmagában nem elegendő, mivel a báziscsere az érintett régió hosszát nem változtatja meg. Számos eljárást dolgoztak ki ezen genetikai variációk vizsgálatára. Az alaplogika több módszernél közös: a szekvencia megváltozását hosszúságkülönbséggé kell alakítani, hogy az egyes variánsok gélelektroforézissel azonosíthatók legyenek.

Restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus



I/15-4. ábra

Egy C/T SNP vizsgálata RFLP-vel. A génszakasz PCR-rel történő megsokszorozását követően a terméket egy restrikciós endonukleázzal *(Fsp I)* hasítják. Az enzim felismerő helye: TGCGCA, amit a C allél elront. A gélelektroforetikus képen 3 személy vizsgálata látható. T allél jelenléte esetén két rövidebb, C esetén egy hosszabb termék képződik. L: molekulatömeg marker

A restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus (*RFLP* – restriction fragment length polymorphism) eljárás a II-es típusú *restrikciós endonukleáz*ok alkalmazásán alapul. Ezek az enzimek a DNS-en egy rendszerint palindrom (a két szálon 5'–3' irányban azonos, pl. TGCGCA) szekvenciájú, 4–8 bázispár hosszúságú szakaszt felismernek, és a DNS mindkét szálát elhasítják. A restrikciós endonukleázok a természetben is előfordulnak: prokariótákban védekező mechanizmust jelentenek vírusok ellen, ugyanis azok DNS-ét lebontják. A bakteriális genomban előforduló felismerő helyeket egy metiláz enzim módosítja, így a baktérium saját DNS-e nem károsodik.

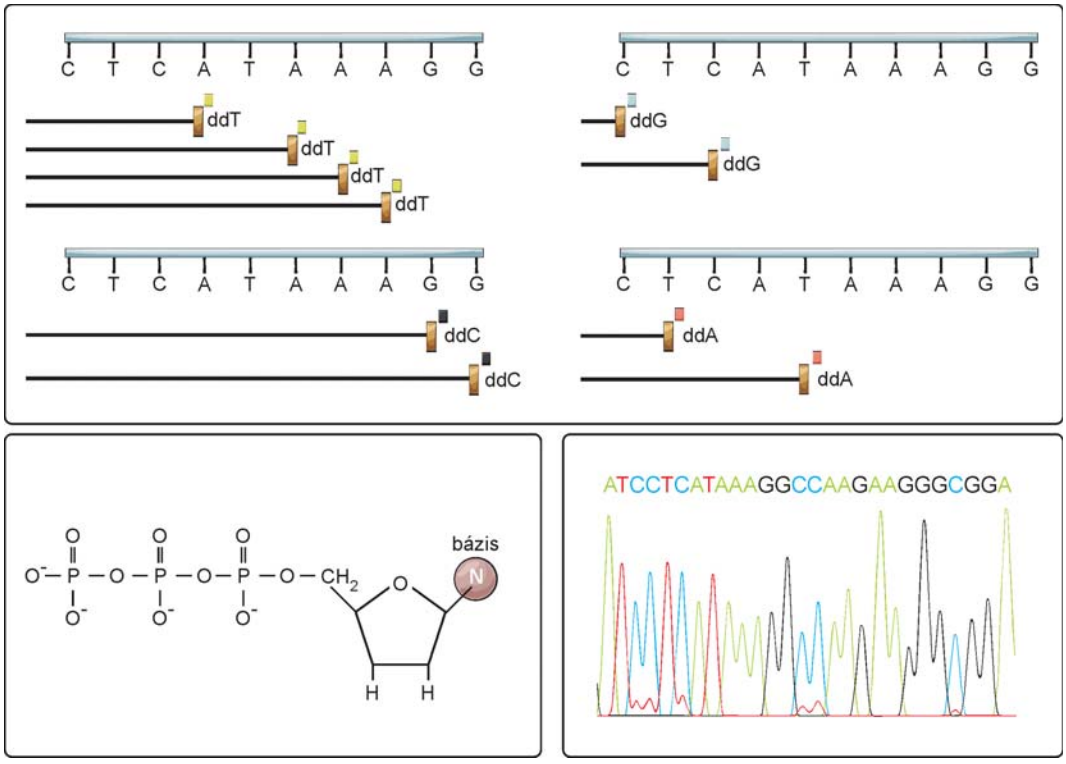
Az enzimek rendkívül specifikusak: ha a felismerő hely egyetlen nukleotidja kicserélődik, a hasítás teljesen elmarad. Éppen ez az alapja ennek az eljárásnak: ha az SNP egyik allélváltozata létrehozza, másik pedig eltünteti egy restrikciós endonukleáz felismerő helyét, akkor a báziscserétől függően a hasítási mintázat megváltozik: két rövidebb, hasított vagy egy hosszabb, hasítatlan terméket kapunk. A szekvencia eltérése így hosszúságkülönbséggé alakítható, ami gélelektroforézissel detektálható.

Az *I/15-4. ábra* példaként egy citozin–timin báziscsere vizsgálatának elvét és eredményét mutatja be. Az alkalmazott restrikciós endonukleáz felismerő helye T változat esetén van jelen a szekvenciában, a C allél ezt megszünteti. Ennek megfelelően értelmezhető az elektroforetikus kép. Az 1. személy genotípusa homozigóta CC, mivel csak a hosszú, hasítatlan termék látható. A 3. személy homozigóta TT, erre utal a két rövidebb fragmentum jelenléte és a hosszú termék hiánya. A 2. személy heterozigóta, a homológ kromoszóma pár egyike tagja citozint, a másik pedig timint tartalmaz ezen a ponton.

DNS-szekvenálás

A DNS-szekvenálás egy DNS-molekula bázissorrendjének meghatározását jelenti. A módszer alkalmas ismeretlen régiók azonosítására – így határozták meg a humán genomot alkotó 3 milliárd bázispárnyi DNS szekvenciáját. A humán genom ismerete azonban távolról sem jelenti azt, hogy szekvenálásra nincs már szükség. Éppen ellenkezőleg: mutációk és genetikai polimorfizmusok azonosítása, a rekombináns DNS-molekulák előállítása újabb és hatékonyabb eljárások kifejlesztésére ösztönöz.

Igen széles körben alkalmazzák a ma már *hagyományos*nak nevezhető *Sanger-féle szekvenálás*i technikát. Ezzel a módszerrel határozták meg az emberi genomot a Humán Genom Program során, az eljárás a 2'-3'-didezoxiribonukleotidok haszná-



I/15-5. ábra

Sanger-féle (didezoxi) DNS-szekvenálás. Fölül: a reakció elve, bal oldalon alul: 2'-3'-didezoxiribonukleozid-trifoszfát szerkezete, jobb oldalon alul: egy DNS-szekvenálás eredménye

latán alapul *(I/15-5. ábra)*. Ezeket a molekulákat a DNS-polimeráz a szintézis során be tudja építeni a képződő láncba, a 3'-hidroxil-csoport hiánya miatt azonban a lánc nem folytatható. A didezoxi-szekvenálás során egyetlen primert, DNS-függő DNS-polimerázt és a dezoxiribonukleotidok (dNTP) valamint 2'-3'-didezoxiribonukleotidok (ddNTP) megfelelő arányát alkalmazzák. Ha a DNS szintézisekor ddNTP épül be az új szálba, a lánchosszabbodás befejeződik. A reakcióelegy viszont dNTP-t is tartalmaz, ezen alapul, hogy a reakció akár 800 bázispár hosszúságú régió „leolvasására" is alkalmas. Hagyományosan négy különböző reakcióelegy tartalmazott egy-egy 2'-3'-didezoxiribonukleotidot, és a kapott termékek hossza külön-külön mutatta meg, hogy mely pozíciókban található adenin, guanin, citozin illetve timin. Az *I/15-5. ábra* szemlélteti, hogy pl. didezoxi-citidin-trifoszfátot használva – a bemutatott példában – 9 vagy 10 egységből álló lánc képződik, ami azt jelenti, hogy a 9. és a 10. pozíciókban guanintartalmú nukleotid található.

A módszer hatékonyságát nagyságrendekkel növelte az a technikai fejlesztés, hogy a 4 különböző 2'-3'-didezoxiribonukleotidot 4 eltérő színű fluoreszcens festékkel megjelölték, így azokat egyetlen reakcióelegyben lehet használni. Ez azt jelenti, hogy a képződő termékek hossza között egyetlen nukleotidnyi különbség van, és a fragmentumok színe alapján állapítható meg, hogy milyen bázis áll az adott pozícióban. Az egyetlen nukleotidnyi különbség illetve a négyféle színű fluoreszcens jel detektálása megfelelő kapilláris gélelektroforézis technikával megvalósítható *(I/15-5. ábra)*.

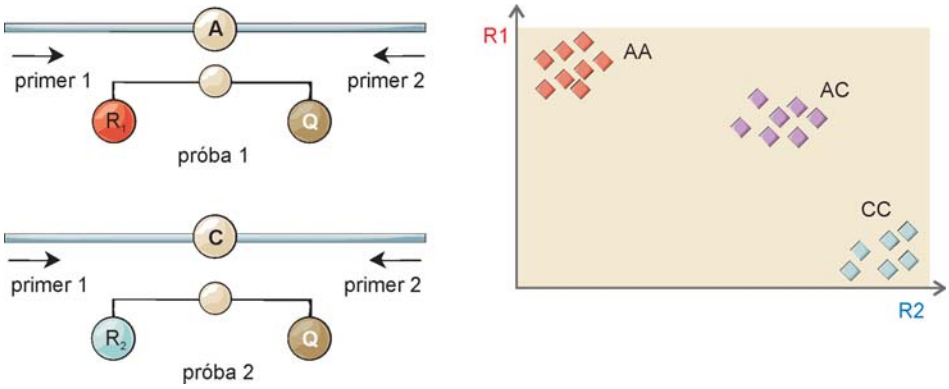
Napjainkban egyre nagyobb teret hódítanak az *új generációs szekvenálás*i eljárások. Ezek közös logikája az, hogy viszonylag rövid, de rendkívül nagy számú átfedő szakaszok bázissorrendjét határozzák meg, amiket bioinformatikai eszközökkel az átfedő részek alapján egyesítenek. Ezen új eljárások a Sanger-módszernél lényegesen olcsóbbak, és a többszörös lefedettség miatt polimorfizmusok, mutációk elemzésére is igen alkalmasak.

A Sanger-féle szekvenálás rokona a *miniszekvenálás*nak vagy *primer extenzió*nak nevezett eljárás, amely pontmutációk és SNP-k kimutatására használható. A reakcióelegy ennél a technikánál nem tartalmaz dNTP-t, csak a négy (eltérő „színű") 2'-3'-didezoxiribonukleotidot. A primer éppen vizsgált pozíció előtt végződik, és a DNS-polimeráz ezt csupán egyetlen nukleotiddal hosszabbítja meg. A szubsztitúciós helyen jelen lévő nukleotid határozza meg, hogy ddATP, ddCTP, ddGTP vagy ddTTP fog-e beépülni, ami a képződő termék színe alapján azonosítható – elektroforetikus méret meghatározás ebben az esetben nem szükséges.

SNP-k és pontmutációk vizsgálata valós idejű PCR-rel

Valós idejű PCR-rel történő SNP-vizsgálat során két eltérő lehetőség kínálkozik. Az egyik módszer allél-specifikus fluoreszcens próbák alkalmazásán alapul, ez az eljárás az SNP-k és pontmutációk rendkívül hatékony vizsgáló módszere, mivel PCR-t követően semmilyen további lépés nem szükséges, az eredmény azonnal látható.

A technika lényege az, hogy a két allél-változathoz bekötődni képes próbát eltérő színű fluoreszcens festékkel jelölik meg *(I/15-6. ábra)*. A PCR során a polimeráz 5' exonukleáz aktvitása révén azt a próbát hasítja el, amelyik a minta-DNS-hez kötődni tud. Ez pedig éppen a személy genotípusától függ, ez határozza meg tehát, hogy melyik jel intenzitása emelkedik. A *I/15-6. ábra* egy A/C SNP vizsgálatát mutatja be. Erős piros szignál alacsony intenzitású kék jellel kombinálva azt jelenti, hogy a reakció során csak az A-specifikus próba kötődött be, a genotípus tehát homozigóta AA. Hasonlóan a kék jel magas aránya CC genotípusra utal, míg közel azonos piros és kék szignál arra utal, hogy mindkét próba működött: a genotípus heterozigóta AC.



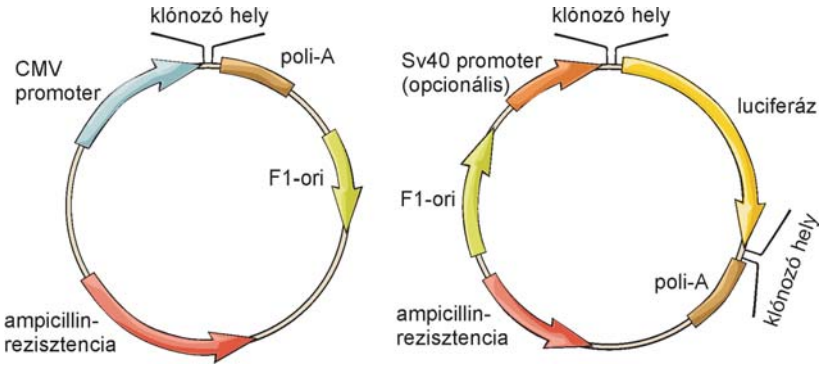
I/15-6. ábra

SNP-genotipizálás szekvencia-specifikus fluoreszcens próbák alkalmazásával. A reakcióelegy a két allélváltozatra specifikus próbát eltérő színnel megjelölve tartalmazza (bal oldal). A három különböző genotípusra a mérhető fluoreszcens jelek eltérő aránya jellemző (jobb oldal)

Valós idejű PCR-rel meghatározható egy DNS *olvadáspont*ja (T_m), ami összefüggésben áll az adott molekula bázissorrendjével. A DNS olvadáspontja azt a hőmérsékletet jelenti, melynél a molekulák 50%-ában a két lánc elvált egymástól. Ez a hőmérséklet a DNS-interkalátor festékek alkalmazásával nagy pontossággal meghatározható, mivel ezek csak akkor bocsátanak ki fluoreszcens jelet, ha duplaszálú DNS láncai közé ékelődnek. Az olvadáspont meghatározása úgy történik, hogy a kettős láncú DNS-t (PCR-fragmentumot) és DNS-interkalátort tartalmazó oldatot lassan felmelegítjük: az olvadáspontnak megfelelő hőmérsékleten a jelerősség lecsökken, mivel a duplaszálú molekulák egyszálúvá alakulnak. Ez az eljárás megfelelő körülmények között akár egyetlen bázis cseréjének kimutatására is alkalmas. Említésre méltó, hogy – szemben számos más módszerrel – a szubsztitúció pontos helyének ismerete ebben az esetben nem szükséges, így a technika ismeretlen mutációk feltárására is használható.

I/15.3. REKOMBINÁNS DNS ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ALKALMAZÁSA

A *rekombináns DNS* vagy *DNS-konstrukció* olyan molekulát jelent, melyet laboratóriumi körülmények között hoznak létre úgy, hogy *két eltérő* forrásból származó *DNS-t kapcsolnak össze*. A két alkotórészt *vektor*nak és *inzert*nek nevezzük. A vektor a természetben is előforduló DNS, amely replikációra képes, ez a rekombináns DNS működésének alapfeltétele. Erre a célra gyakran vírust vagy baktériumból származó plazmidot alkalmaznak. Ebbe építik be az *inzert*et, amit a vektor „sajátjának” tekint, s ez az idegen szekvencia a beépítés lokalizációjától függően működni fog. A rekombináns DNS-ek egyik gyakori alkalmazási területe expressziós rendszerek előállítása. Az *inzulin* volt az első hormon, melyet géntechnikai eljárásokkal állítottak elő gyógyászati felhasználásra, ma már több fehérje természetű gyógyszert készítenek így.

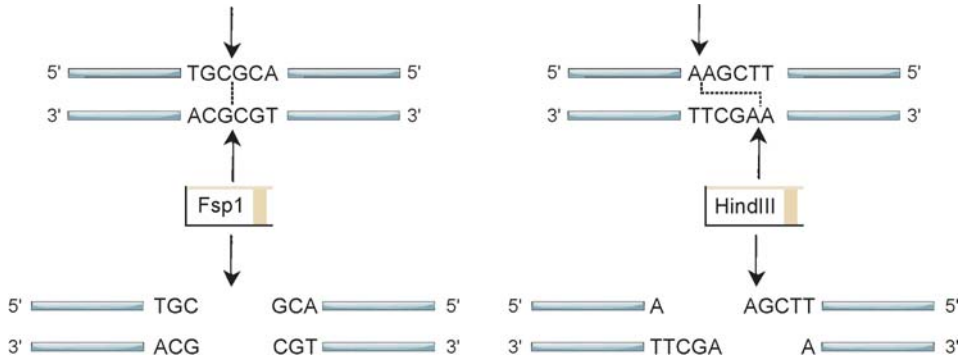


I/15-7. ábra
Expressziós és riporter vektor felépítése. Expressziós vektor segítségével fehérjék szintetizáltathatók. A riporter vektor szabályozó génszakaszok hatásának vizsgálatára alkalmazható

A DNS-konstrukció előállítása

Egy fehérje előállításához szükséges rekombináns DNS létrehozásának lényege, hogy a fehérje aminosavsorrendjét kódoló DNS-szakaszt egy expressziós vektorba klónozzuk.

Az expressziós vektor *(I/15-7. ábra)* több funkcionális szempontból jelentős szakaszt tartalmaz. Az inzertet a *klónozó hely*re lehet beépíteni. Ez a rövid szakasz számos II-es típusú restrikciós endonukleáz hasító helyét tartalmazza, ezekkel a vektort el lehet hasítani, ki lehet nyitni, ez nyújt lehetőséget az inzert beillesztésére. A II-es típusú restrikciós endonukleázok olyan enzimek, amik a DNS egy rendszerint palindrom, 4–8 bázispár hosszúságú szakaszát felismerik, s nukleinsav mindkét szálát a felismerő helyen belül elhasítják. A hasítás történhet a felismerő hely közepén, így keletkeznek az ún. *tompa vég*ek *(I/15-8. ábra)*. Az *Fsp* I enzim például a TGCGCA szekvenciát – mindkét szálon – a 3. helyen álló citozin és a 4. pozícióban lévő guanin nukleotid között vágja el: túlnyúló végek nem jönnek létre. Más esetben a hasítás



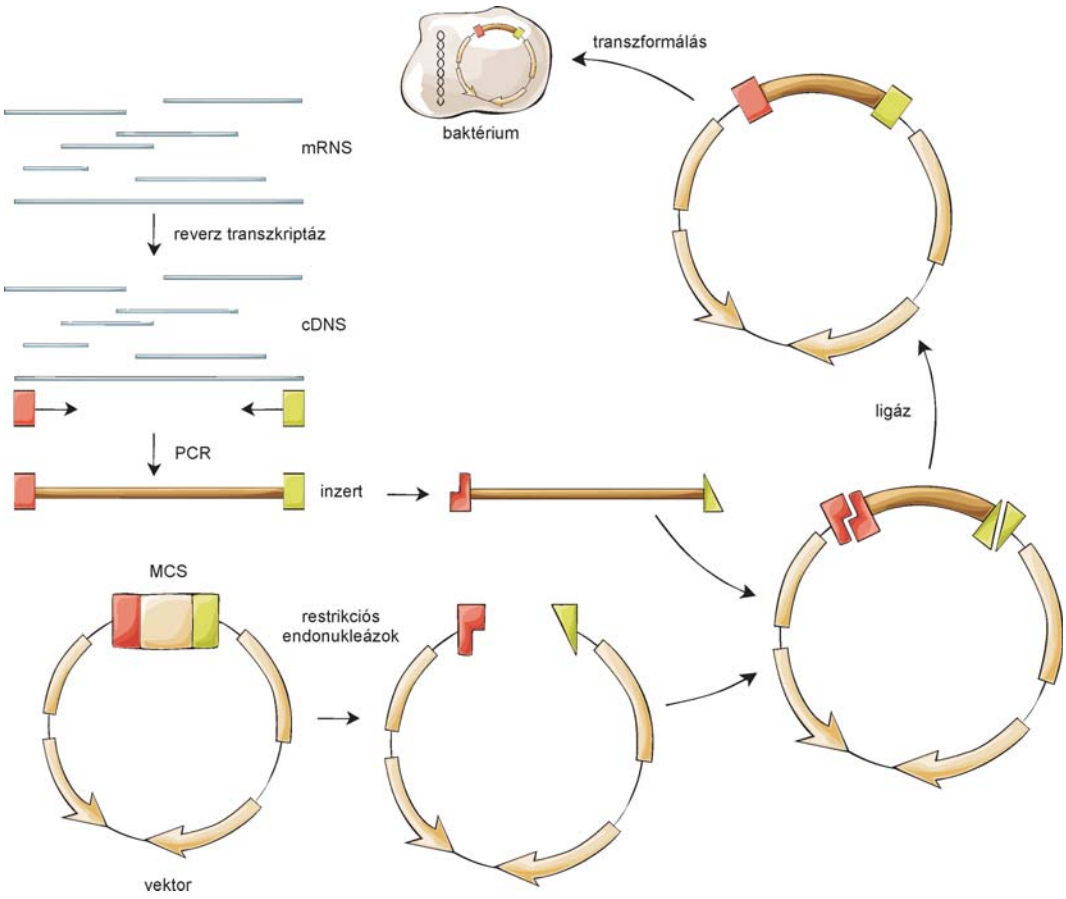
I/15-8. ábra
A restrikciós endonukleázok által katalizált reakció. Ha az enzim a felismerő hely közepén hasítja el a DNS-t (bal oldal), tompa végek jönnek létre. Aszimmetrikus hasítás (jobb oldal) ragadós végeket eredményez

aszimmetrikusan történik. A hasítás ilyenkor is mindkét szálon ugyanazon két nukleotid – *Hin*d III enzim esetében az AAGCTT szakasz két A-ja – között történik, ez a hely azonban a két láncon nem egymással szemben van. Ennek következtében a láncvégeken rövid, egyszálú túlnyúló szakaszok keletkeznek, ezek a *ragadós vég*ek. Mivel a DNS kettős hélix energetikailag igen kedvező, stabil szerkezet, így az egymással komplementer, összeillő ragadós végek megfelelő körülmények között spontán összeilleszkednek. Ezen a mechanizmuson alapul az inzert és a vektor összekapcsolása.

A klónozó hely több restrikciós endonukleáz felismerő helyét tartalmazza. A plazmid, illetve a keletkező DNS-konstrukció működése szempontjából közömbös, hogy melyeket alkalmazzuk. A vektor és az inzert kompatibilis végeit viszont úgy hozzuk létre, hogy az inzertet is emésztjük ugyanazokkal a restrikciós endonukleázokkal. Itt azonban alapvető kritérium, hogy az alkalmazott enzimnek az inzerten belül ne legyen hasítóhelye. A klónozó helyen lévő számos felismerő hely lehetővé teszi, hogy ebből a szempontból megfelelő endonukleázokat választhassunk. Másik fontos szempont, hogy a klónozás során a vektort két enzimmel „nyitjuk ki", és az inzert két oldalán is ennek megfelelően két eltérő (rendszerint) ragadós véget hozunk létre. Ennek két oka van. Az egyik, hogy ha a vektort csak egy enzimmel nyitnánk ki, annak két vége egymáshoz illeszkedne, és így a vektor nagy valószínűséggel inzert beépülése nélkül bezáródna. A másik, hogy ha az inzert két vége azonos lenne, akkor véletlenszerű orientációban épülhetne be a vektorba. Az mRNS szintézise viszont természetesen mindig a promoter felől történik, így a konstrukciók fele a fehérjét kódoló szekvenciát (az inzertet) fordítva tartalmazná, és róla teljesen más polipeptidlánc képződne.

A klónozó hely előtt található erős promoter aktív mRNS- és fehérjeszintézist biztosít. Vannak olyan plazmidok, amik szabályozható promotert (pl. *lac*) tartalmaznak, így a fehérjeszintézis egy megfelelő vegyület hozzáadásával be- illetve kikapcsolható. Az F1-ori szekvencia a plazmid replikációjához szükséges. A plazmid fontos része továbbá az antibiotikum rezisztenciát kódoló szakasz. Ennek segítségével a rekombináns DNS megsokszorozása során kiszelektálhatók azok a baktérium sejtek, amelyek felvették a DNS-konstrukciót.

Az *inzert* létrehozása rendszerint PCR-rel történik. Itt két szempontot kell figyelembe venni. Az egyik, hogy – amennyiben a DNS-konstrució egy fehérje előállítása céljából készül – az inzert az exonoknak megfelelő szekvenciát kell jelentse intronok nélkül. Egyrészt azért, mert az intronok általában nagyon hosszúak: a teljes gén (exonok és intronok) egy PCR-ben nem állítható elő, illetve az így készített inzert a vektorba nem épülne be. Másrészt prokarióta expressziós rendszer az intronokat nem is tudná kivágni, mivel baktériumokban az ehhez szükséges apparátus nem áll rendelkezésre. Így az inzert készítésekor nem lehet genomi DNS-ből kiindulni, hanem egy köztes lépés szükséges. Egy olyan sejtből, ami az adott gént expresszálja, RNS-t tisztítanak, majd erről *reverz transzkriptáz* (RNS-függő DNS-polimeráz) enzim segítségével cDNS-t készítenek. A cDNS így egy sejtben jelen lévő érett mRNS-ek „DNS-másolata", amiben a fehérjét kódoló szakaszok intronok nélkül vannak jelen. Ebből a cDNS-ből polimeráz láncreakcióval a használni kívánt kódoló szakasz felsokszorozható. Az inzert beépíthetőségének emellett alapfeltétele, hogy a végein restrikciós endonukleázokkal létre kell hozni azokat a végeket, amelyek a kinyitott vektorral összeilleszthetők. Egy kódoló szakasz végein legritkább esetben találhatók ilyen szekvenciák, ezért ezeket mesterségesen kell bevinni a PCR-termékbe. Ez könnyen megvalósítható, mivel egy primer hatékony működéséhez elegendő, ha annak 3' végi 18–20 nukleotidnyi szakasza komplementer a minta-DNS-sel, az 5' végén viszont tetszőleges szekvencia lehet jelen. Mivel a polimeráz a PCR során a pri-



I/15-9. ábra
Expressziós konstrukció előállításának vázlata. MCS: klónozó hely. A piros és zöld jelek a restrikciós endonukleázok hasító helyeit ábrázolják

mert hosszabbítja meg, ezen mesterséges szakaszok a termék részei lesznek, így az endonukleáz hasító helyek az inzertbe bevihetők *(I/15-9. ábra)*.

Ezt követi a vektor és az inzert hasítása a megfelelő *restrikciós endonukleáz*okkal: létrejönnek az egymással kompatibilis (rendszerint ragadós) DNS-végek. Megfelelő körülmények között az inzert spontán beilleszkedik a vektorba, a két DNS-t azonban ekkor még csak H-hidak tartják össze, de közöttük egy-egy nick (a foszfodiészter kötés hiánya) található. A láncok folytonosságát a DNS-*ligáz* enzim segítségével lehet létrehozni, ezzel elkészült a rekombináns DNS.

Ezután a DNS-konstrukciót baktériumsejtekbe juttatják, ez lehetővé teszi a konstrukció felszaporítását és – egyes esetekben – működtetését. Ezt a lépést *transzformálás*nak nevezzük, ami különböző módszerekkel oldható meg. Leggyakoribb a kémiai út: a baktériumsejteket alacsony hőmérsékleten (jégen) összekeverik a DNS-konstrukcióval Ca^{2+}-ionokat tartalmazó oldatban. Ez a sejtmembránt valamelyest átjárhatóvá teszi, majd a rekombináns DNS rövid ideig tartó hősokk (rend-

szerint 42 °C – 45 másodperc) alatt bejut a sejtekbe. A baktériumokat ezután olyan táptalajon növesztik, ami azt az antibiotikumot tartalmazza, amely ellen a vektor rezisztencia fehérjét kódol, így csak azok a baktériumok osztódnak, amelyek a transzformálás során valóban felvették a rekombináns DNS-t. A keletkező baktérium kolóniákból ezután a konstrukció nagyobb mennyiségben izolálható, s újfent pro- vagy eukarióta sejtekbe juttatható: megtörténik a kívánt fehérje szintézise.

Megvalósítható az is, hogy az inzert két fehérje kódoló szakaszát tartalmazza. Ilyenkor a két polipeptid egybe szintetizálódik: *fúziós fehérje* jön létre. A második peptid lehet egészen rövid: címkeként segítheti a detektálást további lépések (pl. Western-blot) során. Egy fehérjéhez ily módon hozzáköthető a zöld fluoreszcens fehérje (*GFP*), mellyel *in vivo* sejten belüli lokalizáció vizsgálható. Más esetben a hozzáadott polipeptid szakasz a fehérje hatékony tisztítását teszi lehetővé.

Hasonló lépések segítségével *riporter konstrukció*k *(I/15-7. ábra)* is előállíthatók – ezeket elsősorban kutatólaboratóriumokban alkalmazzák. Riporter konstrukcióval egy szabályozó szakasz (pl. promoter vagy 3' UTR) génkifejeződésre kifejtett szabályozó hatása tanulmányozható. A riporter vektor „üresen" tartalmaz egy kódoló szakaszt, erről egy olyan fehérje íródik át, amelynek mennyisége viszonylag egyszerűen és pontosan mérhető. Gyakran alkalmazzák a *luciferáz* enzimet: az általa katalizált ATP-függő reakcióban fény keletkezik, ennek intenzitása pontosan mérhető és arányos a jelen lévő enzim mennyiségével.

A vizsgálandó szabályozó szakaszt eredeti elhelyezkedésének megfelelően a luciferáz elé (promoter) vagy mögé (3' UTR) klónozzák. Ezzel az eljárással többek között mikroRNS-ek működése, egy szabályozó régióban lévő mutáció vagy polimorfizmus hatása elemezhető.

I/15.4. A GÉNKIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATA

Míg a genom minden sejtben az egyed élete során mindvégig azonos és változatlan, különböző szövetekben számos hatás megváltoztathatja egyes gének működését. Gyakori feladat ezért annak vizsgálata, hogy egyes kóros állapotokban illetve bizonyos külső hatásokra hogyan változik meg adott gének működése.

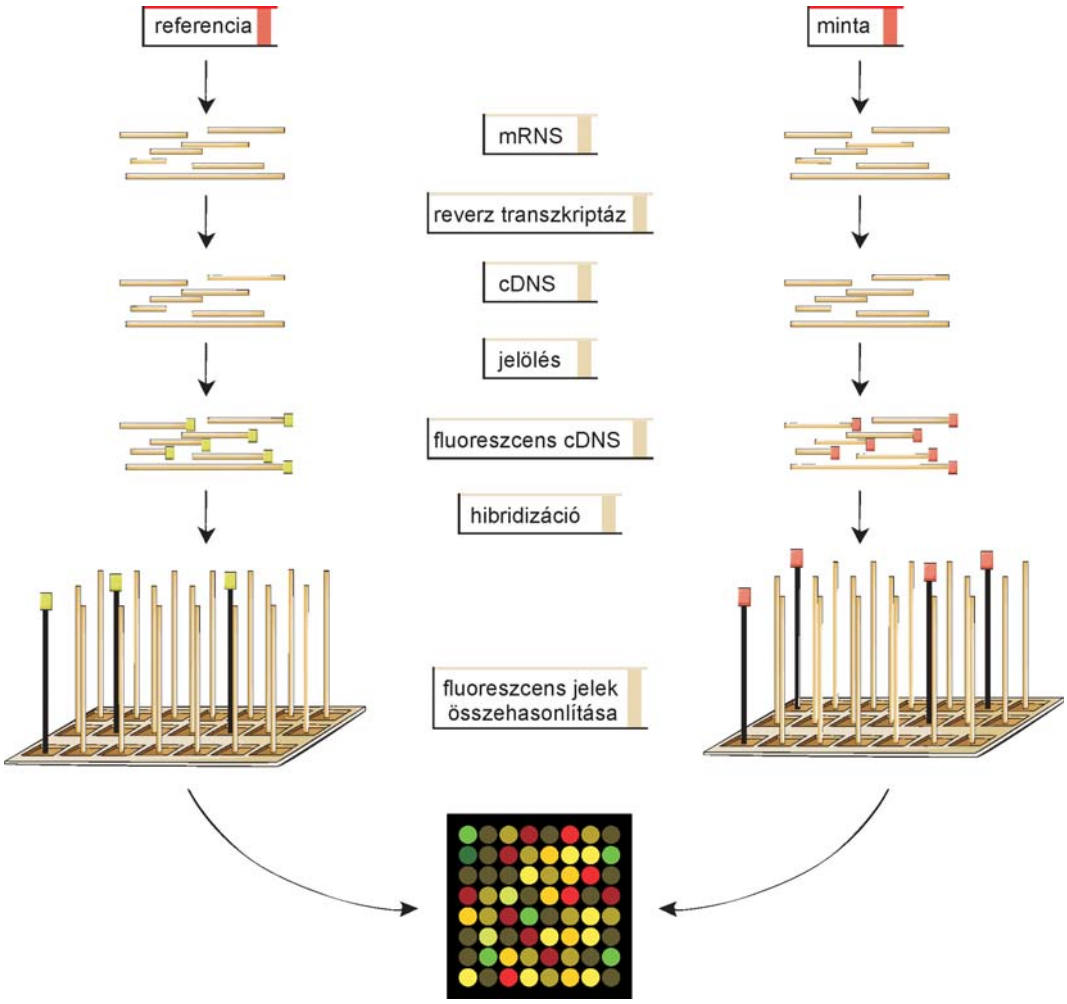
RT-PCR

Célzott (egy vagy néhány adott gént elemző) vizsgálatok az eddig bemutatott eljárásokkal eredményesen elvégezhetők. Fontos hangsúlyozni, hogy – szemben a genom vizsgálatával – ebben az esetben a minta csak a megfelelő szövetből származhat: nincs garancia arra, hogy különböző sejttípusok adott körülményekre teljesen azonosan válaszolnak. A vizsgálat első lépése az mRNS-ek átírása cDNS-re. Bár a folyamatot RT-PCR-nek (RT: *r*everz *t*ranszkriptáz) nevezzük, itt nincs szó valódi láncreakcióról, hanem minden mRNS-ről egyetlen *egyszálú DNS másolat* képződik, ez a *cDNS*. Megsokszorozásra itt nem kerül sor, ami azért is szükséges, mivel a további mérések megbízhatóságának éppen az az alapfeltétele, hogy a mennyiségi viszonyok a cDNS-írás során ne változzanak. Az mRNS-ek DNS-re történő másolása random hexamer oligonukleotid vagy poli-T primer segítségével történik.

Az így létrehozott cDNS tehát a sejt mRNS készletének felel meg. A további mennyiségi mérések gyakori eszköze a valós idejű PCR, melynek során rendszerint relatív kvantifikálást végzünk: két mintában (kezelt–kezeletlen, egészséges–beteg stb.) adott gének expresszióját hasonlítjuk össze.

DNS-chip

Léteznek olyan nagy hatékonyságú eljárások, amelyek egy mérés keretében több, akár a genom összes génjét vizsgálják *(I/15-10. ábra)*.



I/15-10. ábra
A DNS-chip technika vázlata. Az alsó, eredményt bemutató ábrarész illusztráció

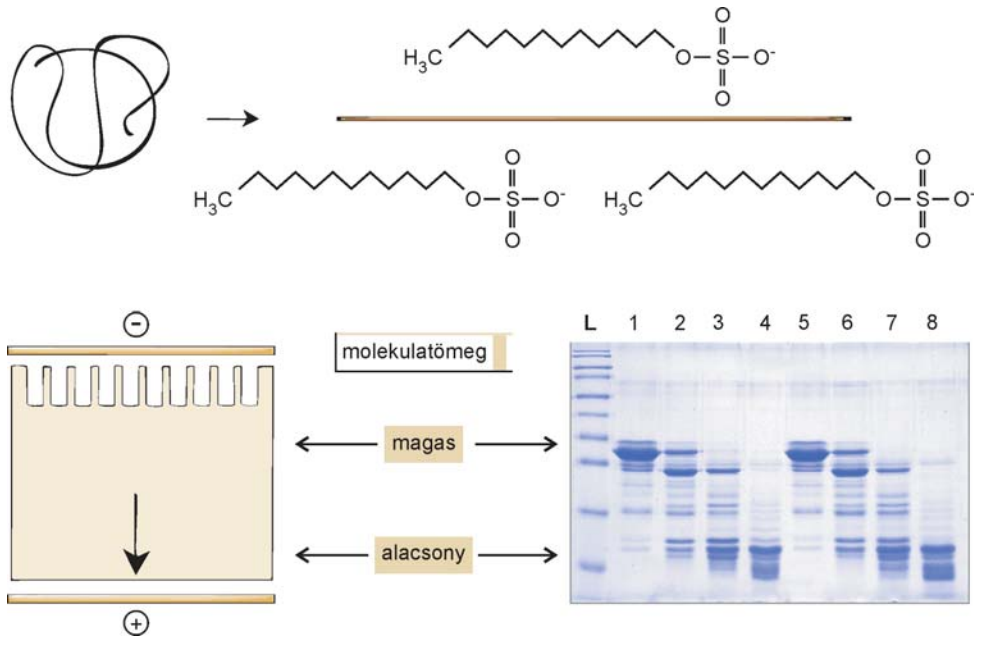
Egyik gyakran alkalmazott eljárás a DNS-chip technika. A DNS-chip egy mikroszkópos tárgylemezhez hasonló üveglap, melynek felszínén egy „oligonukleotid erdőt” hoznak létre. A felszín több tíz-, illetve százezer mezőre van felosztva, és minden mezőbe különböző szekvenciájú, általában 60–100 nukleotidból álló egyszálú DNS-molekulákat rögzítenek, ezeket *próba*knak nevezzük. Az eljárás legelőnyösebben két minta összehasonlítására alkalmas. Mindkettőből RNS-t izolálnak, majd azt cDNS-sé átírják, és a két mintából származó cDNS-t különböző színű (rendszerint zöld és piros) fluoreszcens festékkel megjelölik. Ezt követi a hibridizálás: az egyszálú cDNS-eket a chip felszínére viszik, a cDNS-ek „megtalálják” a velük komplemen-

ter próbákat, és azokkal duplaszálú hélixet alkotnak. Így azokban mezőkben, melyeknek megfelelő gének az adott mintában fokozott expressziót mutatnak, magas zöld illetve piros fluoreszcens jel detektálható. A mintázatokat egymásra vetítve szembetűnővé válnak a két minta közötti különbségek: zöld szín egy gén alulműködését (referenciamintában magasabb expressziót), piros szín pedig egy gén túlműködését jelzi a vizsgált mintában a referenciához viszonyítva. A mezők jelentős része sárga vagy egészen sötét (barna) színű. A sárga szín azt jelzi, hogy az adott gének a két mintában hasonló mértékben fejeződnek ki, a sötét mezők génjei igen alacsony expressziót mutatnak.

Fehérjék kimutatásának lehetőségei

A génexpresszió változásait, egy mutáció vagy polimorfizmus biológiai hatását gyakran fehérje szinten vizsgáljuk. Ez nem csupán a fehérjék jelenlétének vagy mennyiségének detektálását jelenti, hanem sok esetben azok működésének vizsgálatát is: meghatározható az enzimek aktivitása, vizsgálható egyes fehérjék sejten belüli lokalizációja vagy más vegyületekkel való kapcsolata.

A *gélelektroforézis* a fehérjék vizsgálatának is gyakran alkalmazott eszköze. A fehérjék elektroforetikus elemzése azonban – a nukleinsavakkal szemben – valamelyest bonyolultabb amiatt, hogy a fehérjék töltése változó. Ez az adott molekula aminosav összetételétől illetve a pH-tól függ, alapállapotban semlegeshez közeli pH-értéken mindenesetre egy komplex minta fehérjéinek egy része pozitív, más része negatív töltésű, így a gélben ellenkező irányba vándorolnak, egyszerre nem vizsgálhatók. További tényező a fehérjék rendkívül változatos térszerkezete, ami az



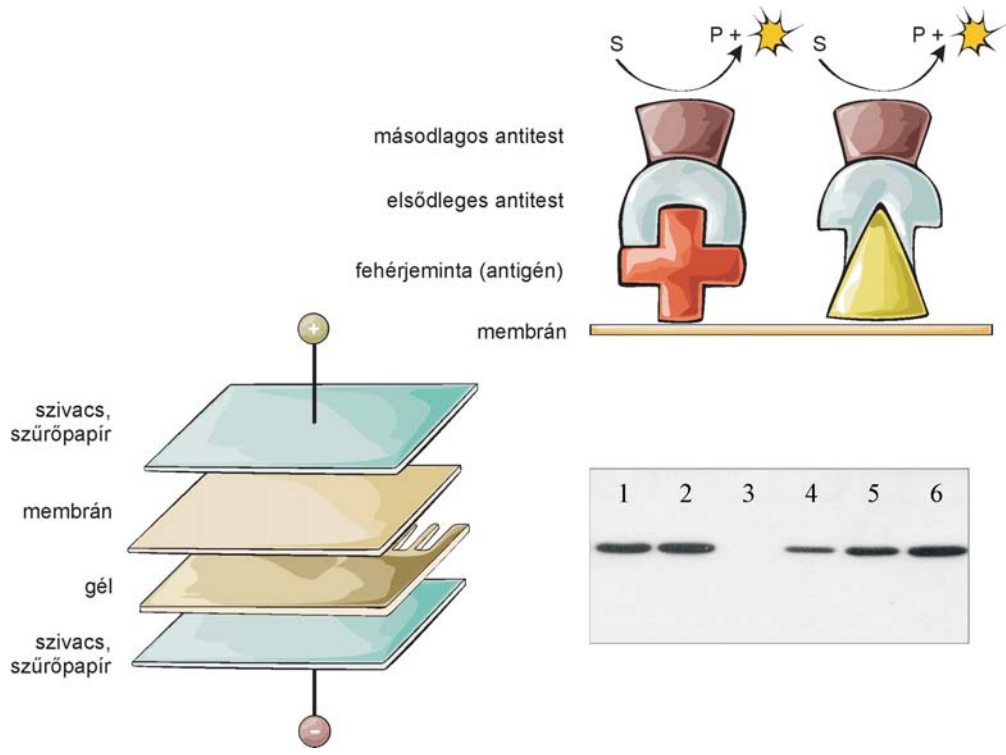
I/15-11. ábra

SDS-PAGE. A fehérjéket denaturált állapotban vizsgáljuk, az SDS minden molekulának méretével arányos nagyságú negatív töltést kölcsönöz. Így minden molekula a pozitív pólus felé vándorol. A jobb alsó ábra egy elektroforézis eredményét mutatja. L: molekulatömeg marker

elektroforetikus mobilitást szintén befolyásolja. Ezzel együtt a fiziológiás szerkezetű fehérjék elektroforetikus elemzése megvalósítható, az eljárást *natív elektroforézis*-nek nevezzük. Ez a technika nem ad pontos információt az adott fehérje molekulatömegéről: a vándorlás sebességét a molekula mérete és töltése határozza meg. Célzott kísérleti elrendezésben ugyanakkor megbízható eredményt ad: jól nyomon követhetők pl. a fehérje olyan módosulásai (pl. foszforilálás, szulfatálás), melyek a molekula töltésének megváltozását eredményezik.

Az *SDS-PAGE (nátrium-lauril-szulftát poliakrilamid gélelektroforézis – s*odium *d*odecyl *s*ulphate *p*oly*a*crylamide *g*el electrophoresis) eljárást gyakran alkalmazzák fehérjék kimutatására: ez a módszer lehetővé teszi a fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását a töltéstől függetlenül.

A minták előkészítése során a fehérjéket hővel és redukálószerekkel *denaturál*ják, és nátrium-lauril-szulfátot (SDS) adnak hozzájuk. A fehérjék így kitekerednek, az SDS kötődik a polipeptid láncokhoz, és annak negatív töltést kölcsönöz. A kapcsolódó SDS molekulák száma, azaz a negatív töltés nagysága a fehérje hosszától függ: ennek eredményeként minden fehérje negatív töltésű, és a tömeg / töltés arány közel állandó *(I/15-11. ábra).* A minták elválasztása két üveglap közötti vékony, *poliakrilamid* gélben történik vertikális elrendezésben. Az egyes fehérjék vándorlásának sebessége a molekulatömegtől függ: kis molekulák gyorsabban, nagyobbak lassabban vándorolnak. Az ekektroforetikus elválasztást követően a gélt Coomassie-kékkel megfestik: a fehérjék láthatóvá válnak. SDS-PAGE analízis során



I/15-12. ábra

Western-blot. Elektromos áram hatására a fehérjék a gélből a nitrocellulóz vagy PVDF membránba kerülnek át változatlan elrendezésben. A fehérjék specifikus detektálása az elsődleges, a láthatóvá tétel a másodlagos antitest segítségével történik. S: szubsztrát, P: termék. Jobb oldalon alul egy Western-blot eredménye látható

is alkalmaznak molekulatömeg-markert (*I/15-11. ábra:* gélkép „L" sáv) ugyanabból a célból, mint DNS vizsgálatakor. A marker („létra") ismert molekulatömegű fehérjék keveréke, ennek alapján a vele párhuzamosan futtatott minták molekulatömege megbecsülhető.

A Coomassie-kék a mintában jelen lévő összes fehérjét megfesti. Bizonyos kísérleti rendszerekben ennél specifikusabb detektálási eljárást alkalmaznak, ilyen technika a *Western blot* (immunblot). A fehérjék célzott, specifikus kimutatása előnyös lehet amiatt, hogy egy adott fehérje azonosítása így megbízhatóbb, mivel természetesen több különböző fehérjének lehet azonos vagy hasonló a molekulatömege. Fontos szempont az is, hogy sok esetben komplex biológiai mintát (pl. egy sejtkivonatot) analizálnak, aspecifikus festési eljárással egy ilyen mintában a fehérjéket reprezentáló csíkok alig különülnének el egymástól, a vizsgálni kívánt adott fehérje azonosítása csaknem lehetetlen lenne. A Western-blot nem utolsó sorban rendkívül érzékeny eljárás a gélfestéssel történő detektáláshoz képest.

A Westen-blot lényege, hogy a gélelektroforézist követően a fehérjéket egy *nitrocellulóz* vagy *PVDF* (poli-vinildénfluorid) *membrán*ra visszük át. Erre a lépésre azért van szükség, mert a további detektálási folyamatok a gélen technikailag nem lennének kivitelezhetők, a membrán jóval könnyebben kezelhető, a rajta rögzített fehérjék akár hosszú ideig tárolhatók is. Ez a folyamat a *transzfer*, ami elektromos áram segítségével történik *(I/15-12. ábra).* A gélre egyszerűen ráfektetik a membránt, az elektromos kontaktust szűrőpapírok biztosítják. A síkra merőleges irányú elektromos mezőben a fehérjék a gélből a membránra vándorolnak, a molekulák elrendezése nem változik.

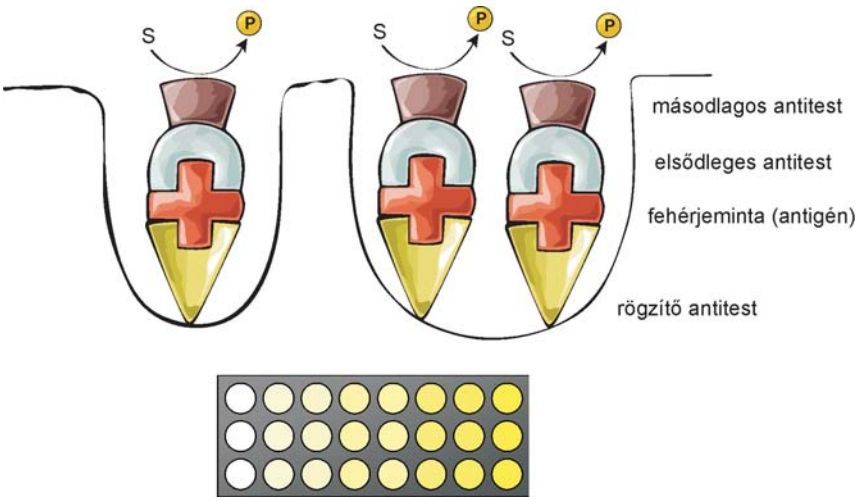
A fehérjék specifikus detektálása az immunrendszer működéséhez hasonlóan történik (innen származik az immunblot elnevezés). Az SDS-PAGE során elválasztott és a transzferrel a membránhoz rögzített fehérjék felelnek meg az *antigén*nek, melyeket az *antitest*ek specifikusan felismernek. A folyamat a *blokkolás*sal kezdődik. Ez azért szükséges, mert az antitestek maguk is fehérjék, a membrán pedig olyan anyagból készül, ami bármilyen fehérjét nagy affinitással köt. Ezért a blokkolással a membrán teljes felszínét valamilyen a vizsgálat szempontjából közömbös fehérjével „be kell fedni", ellenkező esetben a detektáláshoz használt antitest mindenhova kötődne. A fehérjék kimutatása az elsődleges és másodlagos antitest egymást követő alkalmazásával történik. Az eljárást szendvics technikának nevezik. Az elsődleges antitest ismeri föl specifikusan a vizsgált fehérjéket, ez azonban nem jelölt, így a molekulák ettől még nem válnak láthatóvá. Az elsődleges antitestek – rendkívül leegyszerűsítve – úgy állíthatók elő, hogy valamilyen laboratóriumi állatba (pl. patkányba) az adott fehérjét bejuttatják, így annak immunrendszere az idegen molekula ellen antitesteket termel. A másodlagos antitest az elsődlegeshez kötődik, annak fajra specifikus régióját ismeri fel, s valamilyen módon jelölve van. Ez azt jelenti, hogy egyetlen másodlagos (pl. ún. „anti-patkány") antitesttel számtalan olyan fehéje–elsődleges antitest komplex kimutatható, amelyben az elsődleges antitestet ugyanabban az adott állatban (patkányban) állították elő. Ez az első hallásra komplikált eljárás praktikus okokból előnyös. Egy antitest jelölése bonyolult és drága, ezért minden egyes elsődleges antitest esetében ez nehezen lenne megvalósítható. A szendvics technika viszont lehetővé teszi, hogy egyetlen jelölt, másodlagos antitesttel számtalan fehérjét lehessen detektálni a Western-blot során.

A másodlagos antitest jelölése több módon történhet. Egyik lehetőség a fluoreszcens festékek alkalmazása. Gyakran alkalmaznak *torma-peroxidáz* (*HRP*) enzimmel konjugált másodlagos antitestet. Az enzim egyes szubsztrátokból színes termékeket állít elő, ún. kemilumineszcens anyag hozzáadása esetén pedig a katalizált reakcióban fény keletkezik *(I/15-12. ábra)*. Ha a membránra egy filmet helyeznek, és azt megfelelő exponálás után előhívják, a filmen láthatóvá válnak azok a pozíciók,

ahol a membránon az adott fehérje jelen volt, és így az elsődleges illetve másodlagos antitest bekötődött. Az *I/15-12. ábra* jobb alsó része egy kísérlet eredményét mutatja. Hat különböző mintában vizsgálták egy fehérje jelenlétét. Látható, hogy a Western-blot „szemikvantitatív" eredményt ad: az ábráról nem csak az olvasható le, hogy az adott fehérje a 3. mintában nem volt kimutatható, hanem látható az is, hogy a 4., 5. és 6. mintában mennyisége rendre egyre emelkedik (a jel intenzitása nő). (Megbízható mennyiségi mérés megfelelő kontrollok alkalmazását teszi szükségessé.)

A módszer a nevét onnan kapta, hogy hasonló – transzfert követő specifikus detektáláson alapuló – eljárást *Edwin Southern* brit biológus végzett el először. Ő munkája során DNS-t vizsgált, így a *DNS*-elektroforézis, transzfer és specifikus detektálás kombinációja a *Southern-blot* nevet kapta. Később a hasonló elvű *RNS*- és *fehérje*kimutató technikákat *Northern*- és *Western-blot*nak nevezték el.

A specifikus detektálás SDS-PAGE nélkül is megvalósítható egy fehérje kimutatására. Ez az eljárás az *ELISA* (enzyme-linked immuno sorbent assay), ami a Western-blotnál technikailag lényegesen egyszerűbb, ezért nem csak a kutatómunkában, hanem a mindennapi klinikai gyakorlatban is igen elterjedten alkalmazzák. A módszer lényege az, hogy a vizsgált fehérjét valamilyen módon (pl. ún. rögzítő antitest segítségével) a felszínhez kötik, majd ennek detektálása a Western-blothoz hasonlóan elsődleges és másodlagos antitest kombinált hozzáadásával történik. A másodlagos antitesthez konjugált enzim rendszerint valamilyen színes termék kép-



I/15-13. ábra

ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). Fehérjék specifikus kimutatása a Western-blothoz hasonló detektálási elven, de elektroforetikus eljárás nélkül közvetlenül kémcsőben. Az alsó ábrarész egyre növekvő mennyiségű fehérje detektálását mutatja három párhuzamos reakcióban (illusztráció)

ződését katalizálja *(I/15-13. ábra)*. A képződő termék mennyisége a szín intenzitása alapján meghatározható, így az eljárás a pontos mennyiségi mérés lehetőségét is kínálja. A módszer olyannyira elterjedt, hogy nem is csak a klinikai gyakorlatban, de még a mindennapi életben is alkalmazzuk: az ELISA módszer elvén működnek pl. az otthon is használatos terhességi tesztcsíkok.

I/16. Rendszerbiológia (systems biology), bioinformatika, hálózatok

Csermely Péter, Kapuy Orsolya

Az élő szervezetek alapvető tulajdonsága, hogy megfelelő biztonsággal reagáljanak az őket körülvevő, különböző környezeti hatásokra, és összehangolt módon válaszoljanak a külső és belső jelekre (szignálokra). Többsejtes szervezetek minden egyes sejtjének megbízhatóan kell érzékelnie a külső és belső környezetüket érintő stimulusokat, és viselkedésüket ezekhez kell igazítaniuk. A sejtekben lejátszódó folyamatok összehangolt működése egy összetett, legtöbbször fehérje-fehérje kölcsönhatásokból álló komplex szabályozási hálózaton keresztül valósul meg. Más szóval a szervezeti egységek legfontosabb tulajdonságai és viselkedése – azok fiziológiája (élettana) – ezen hálózatok működésének a következménye. Az élő szervezeteket irányító bonyolult hálózatok megértéséhez, a lehető legpontosabb részletességgel kell feltárni azokat. A kísérletes módszerek mellett egyre elfogadottabb a matematikai megközelítések használata és azok számítógéppel történő analízise.

Ebben a fejezetben ízelítőt adunk a biokémiai és molekuláris biológiai adatok sokaságának megszerzésére (rendszerbiológia, angol nevén: systems biology) és megértésére kialakult módszerekről (bioinformatika, illetve ennek részeként: hálózatos szemléletmód). Ezek a kísérletes és adatelemzési módszerek a XX. század legutolsó éveitől elkezdve rohamos fejlődésnek indultak. Emiatt a fejezet csak néhány kiragadott példán keresztül tárgyalja őket, és semmiképpen nem kívánja az önálló tantárgyakként is tanítható rendszerbiológia, illetve bioinformatika teljes leírását adni.

I/16.1. RENDSZERBIOLÓGIA (SYSTEMS BIOLOGY)

A rendszerbiológia a biológiai rendszerek, így a sejt egészének adatrendszerét meghatározó, leíró és elemző tudomány. A rendszerbiológia az ezredforduló, az emberi genom megfejtése után vált egyre szélesebb körben művelt tudományterületté. A rendszerbiológiai vizsgálatok pl. a sejt génkészletét (genomika), ennek epigenetikus szabályozását (epigenomika), a sejt fehérjekészletét (proteomika), ennek jelátviteli szabályozását (transzkriptomika, szignalomika), a sejt membránjainak összetételét (lipidomika), illetve a sejtben előforduló metabolitok mennyiségét (metabolomika) tárgyalják.

A rendszerbiológiában használatos vizsgálatok a legtöbbször nem egyedi biokémiai kísérletekkel, hanem robotok által elvégzett, automatizált, igen sok mintát megvizsgáló (high-throughput) kísérletekkel történnek. A rendszerbiológia ugyanakkor szoros kapcsolatban áll a különböző molekuláris biológiai módszerekkel, hiszen az ezekkel a módszerekkel kapott adatok, különösen a dinamikai adatok matematikai modellezése is a tárgykörét képezi. Ez a megközelítés valósítja meg, hogy a molekuláris ismereteink összhangban legyenek az egész sejtet leíró fiziológiai kísérletek eredményeivel, és azoknak dinamikai viselkedését is megérthessük.

Szabályozási motívumok

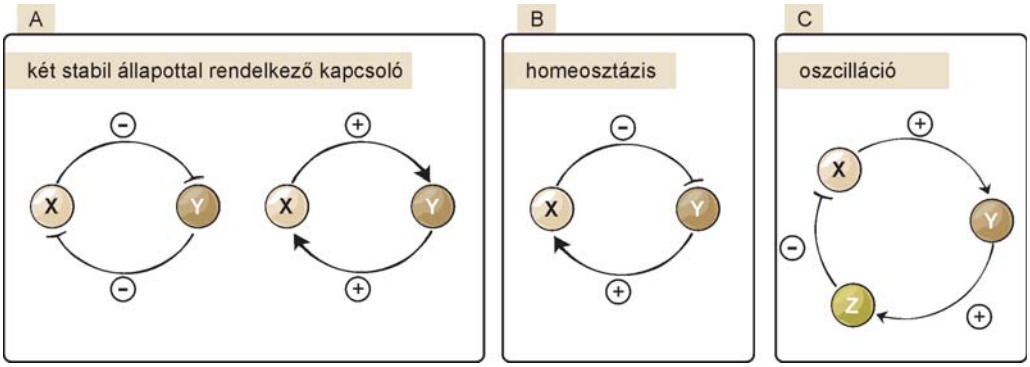
A rendszerbiológia egyik fontos vizsgálati eljárása az élő szervezetek működésében kulcsszerepet játszó, legtöbbször fehérjékből álló, komplex szabályozási hálózatokat felépítő hálózati motívumok és a köztük lévő dinamikus kapcsolatok feltárása. (A hálózatok leírásával a 3. alfejezetben fogunk részletesen foglalkozni.) Hálózati motívumnak hívunk minden olyan szabályozási egységet, amely nagyobb valószínűséggel fordul elő a hálózatban, minthogy az egy random rendszerben megtalálható lenne. A különböző szabályozási motívumok lehetővé teszik, hogy a sejtek a különböző hatásokra eltérő válaszokat adhassanak. Minél összetettebb a szabályozási rendszer hálózata, annál összetettebb és átfogóbb szabályozást tesz lehetővé. Egy precíz ellenőrzési hálózat sokszor a különböző hálózati motívumok kombinációjának az eredménye.

A szabályozásban részt vevő elemek közti kapcsolatok lehetnek szimplán szekvenciálisak (X hat Y-ra, Y hat Z-re… stb.), az ilyen hálózatokban azonban gyakran úgynevezett visszacsatolási hurkok is előfordulnak. A visszacsatolási hurok egy olyan szabályozási modult hoz létre, amelyben a keletkező molekula képes arra, hogy visszahasson a saját aktivitására, közvetlenül vagy közvetetten egy másik molekula szabályozása által. Két fajtája van:

1. pozitív visszacsatolás: a szabályozó elem pozitívan hat a saját aktivitására;
2. negatív visszacsatolás: a szabályozó elem negatívan hat a saját aktivitására.

E visszacsatolási hurkok kulcsfontosságúak az élő szervezetekben található szabályozási rendszerek viselkedésének a meghatározásában. A különböző előjelű visszacsatolási hurkok kapcsolatainak döntő szerepük van a rendszer minőségi leírásában azáltal, hogy különböző dinamikai viselkedést eredményeznek a szabályozási hálózatban. A három leggyakrabban előforduló szabályozási motívum *(I/16-1. ábra):*

1. két stabil állandósult állapottal rendelkező „kapcsoló” (angolul toggle switch): olyan visszacsatolási hurok esetén jöhet létre, amikor az elemek (lásd *I/16-1. A ábrán* X és Y) azonos előjelekkel hatnak egymásra. Amennyiben X és Y pozitívan hatnak egymásra, akkor pozitív, amennyiben X és Y negatívan hatnak egymásra (antagonisták), akkor dupla negatív visszacsatolási hurokról beszélünk. Az ilyen típusú szabályozási motívumokban a rendszernek két, egymástól jól elkülönített stabil állapota lehetséges. Az, hogy éppen melyikben tartózkodik, csak a kezdeti feltételek függvénye. Dupla negatív visszacsatolás esetén egy időben csak az



I/16-1. ábra
A legelterjedtebb szabályozási motívumok

egyikük lehet aktív (vagy X, vagy Y), míg pozitív előjelű visszacsatolási hurokban X és Y egyszerre lesznek aktívak. Ez a típusú motívum gyakran alkalmazott a szabályozási hálózatokban különböző irreverzíbilis átmeneteknél, pl. az apoptotikus folyamatok bekapcsolásánál.

2. homeosztázis *(I/16-1 ábra, B):* legkönnyebben egy közvetlen negatív visszacsatolási hurokkal valósítható meg. A kapcsolatban résztvevő elemek állandóságát biztosítja, hiszen egy ilyen szabályozási hurokban sem az X, sem az Y korlátlan mértékű aktiválódása nem figyelhető meg.
3. oszcilláció *(I/16-1. ábra, C):* legkönnyebben egy késleltetett negatív visszacsatolási hurokkal valósítható meg, így egy időben ciklikusan ismétlődő változást hoz létre valamely stabil állapot(ok) körül. Erre jó példa a sejtciklus során az öröklődéshez szükséges DNS pontosan lemásolásának és a leánykormatidák szétválasztásának a generációkon keresztül történő alternációja.

Alkalmazott módszerek

A rendszerbiológia egyik vizsgálati eljárása a biokémiai reakciókinetika szabályainak olyan alkalmazása, amely során a biológiai rendszer viselkedését matematikai összefüggésekkel jellemzi. Ennek lényege és alkalmazásának főbb lépései a következők:

1. a kísérletes eredmények alapján egy lehetséges hatásmechanizmus felvázolása;
2. a rendszer komponenseinek a jellemzése úgynevezett sebességi egyenletekkel, amely egy adott X fehérjére a következőképpen néz ki:

$$\frac{dX}{dt} = \text{szintézis} + \text{aktiválás} - \text{lebontás} - \text{inaktiválás}$$

a jobb oldalon pozitív taggal szerepelnek azok a folyamatok, amelyek az *X* komponens értékét növelik (szintézis és/vagy aktiválás), míg negatív előjellel jelennek meg a fogyasztó lépések: lebomlás és/vagy inaktiválás. Az így kapott úgynevezett differenciál egyenletek mint egyfajta sebességi egyenletek megadják, hogy az egyes komponensek koncentrációja/aktivitása milyen gyorsan változik a szintézis és lebomlás, illetve az aktiválás és inaktiválás következtében. Más szóval a szabályozási rendszer állapota az egyes komponensek koncentrációjának vagy aktivitásának értékével definiálható. Amennyiben minden komponensre felírunk egy egyenletet, ún. sok-paraméteres differenciálegyenlet-rendszert kapunk;

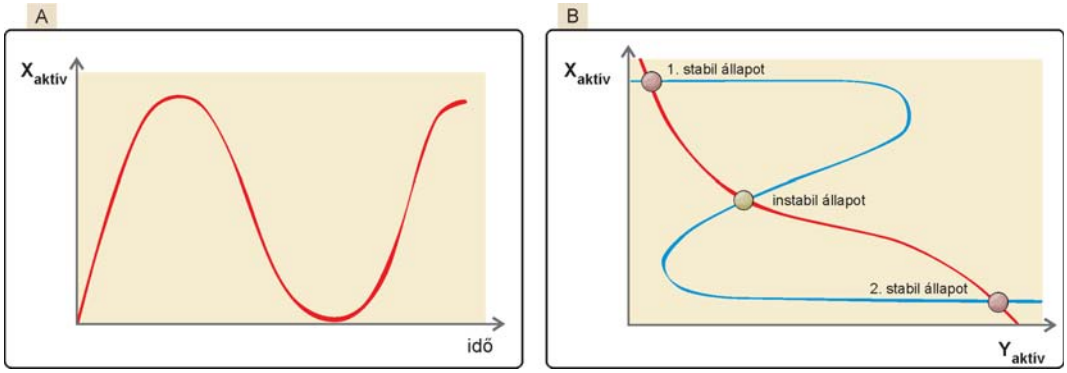
3. a differenciálegyenletekből álló egyenletrendszer paramétereinek (reakciósebességi állandók, Michaelis állandók… stb.) illetve kezdeti feltételeinek meghatározása, majd az egyenletrendszer megoldása számítógép segítségével történik, amely így kiszámolja a feltételezett mechanizmus várható viselkedését;
4. a kapott eredmények összevetése a kísérletes adatokkal.

A paraméterek változtatásával olyan számítógépes szimulációk végezhetők, amelyek a hálózatot alkotó komponensek koncentráció változásának időbeli vizsgálatára alkalmasak. Különböző mutánsok megfigyelése tehát a paraméterek változtatásával történhet:

1. hiánymutáns esetén az adott komponens szintézisét vagy a teljes mennyiségét meghatározó paraméterek egyikét lehet közel nullára változtatni.
2. egy adott fehérjét túltermelő mutáns esetén (over-expresszálódás) a szintézist leíró paraméter növelhető a sokszorosára.

A sok-paraméteres differenciálegyenlet-rendszer megoldására döntően két módszert alkalmaznak:

1. a differenciálegyenlet-rendszert egy számítógépes program segítségével numerikusan oldják meg, és a komponensek koncentráció vagy aktivitás változásainak időbeni lefutását grafikusan vizsgálják *(I/16-2. ábra, A).*
2. két kulcsfontosságú differenciálegyenlet kiválasztásával úgynevezett kétdimenziós fázissík analízist végeznek. Ebben az esetben csak két dinamikus változó van (a többi komponensről azt feltételezzük, hogy egyensúlyban vannak), és azokat egymás függvényében ábrázolják. Ilyen ábrázolás során mindig a rendszer működését leginkább meghatározó két egyenletet választják ki, majd a két görbe lefutásából és azok metszéspontjaiból következtetni lehet a rendszer dinamikai viselkedésére (*I/16-2. ábra B,* ahol a kétdimenziós fázissík egy kétállású kapcsolót ábrázol).



I/16-2. ábra
Matematikai modellek kiértékelésére szolgáló módszerek

A fenti rendszerbiológiai megközelítés alapjait a két legfontosabb alkalmazási területén, a sejtciklus kutatásokon és a jelátviteli hálózatok vizsgálatán keresztül mutatjuk be.

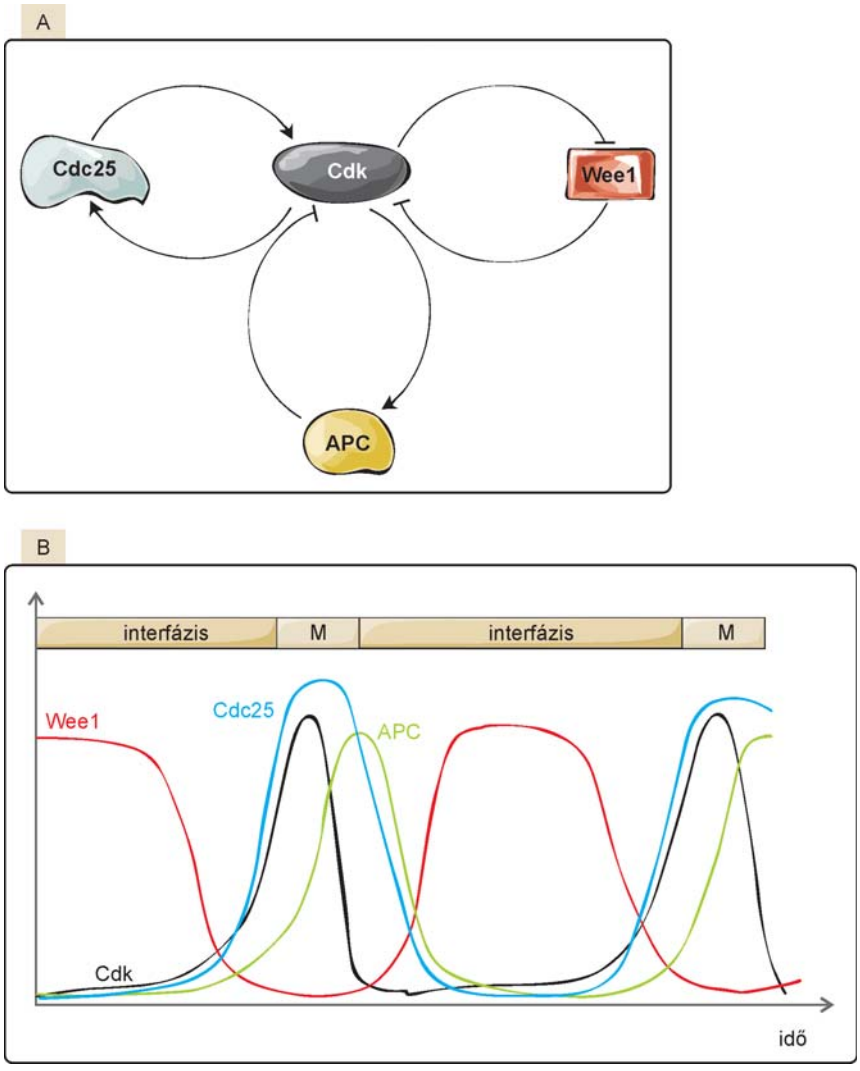
A sejtciklus szabályozási hálózatának feltérképezése

A sejtciklust működtető komplex molekulahálózat biztosítja, hogy a sejtek az egymást követő sejtciklus események láncolata során megduplázzák a genetikai információs anyagukat (DNS replikáció – S fázis), majd a magosztódás folyamán (mitózis – M fázis) szétválaszthassák a leánykromatidákat. A sejtciklus-motor fő szabályozó fehérjéje egy protein kináz, amelynek ciklin függő protein-kináz a neve – Cdk (lásd Sejtciklus fejezet!). Ezek a fehérjék két alegységből állnak. A katalitikus alegység a protein-kináz, ami akkor és csak akkor aktív, ha hozzákapcsolódik egy szabályozó ciklin fehérje. A mitózisos Cdk aktivitása jellegzetesen változik a sejtciklus folyamán: a sejtmagosztódás során magas a koncentrációja, míg a mitózis befejezésénél hirtelen nullára csökken. Ez az aktivitás csökkenés a mitózis végén aktiválódó APC-nek (anafázist segítő komplex – anaphase promoting complex) köszönhető. Amikor a Cdk aktivitás lecsökken, a kromoszómák dekondenzálnak, és a sejt kilép az M fázisból.

A megfelelő működésnek további nélkülözhetetlen elemei a rendszert behálózó visszacsatolási hurkok. Nevezetesen, hogy nemcsak a Cdk aktivitása szabályozott, hanem pozitívan vagy negatívan ő is visszahat a regulátoraira. Kísérletes eredmé-

nyek igazolták, hogy a Cdk aktiválja az őt gátló APC-t. Mivel ez a negatív visszacsatolás egy homeosztázishoz vezetne és nem oszcillációhoz, a dinamikai vizsgálatok igazolták, hogy még a legegyszerűbb sejt S és M fázisainak ciklizáló mechanizmusa is igényel egyéb szabályozási hurkokat.

Az egyik legegyszerűbb osztódási ciklus a béka (*Xenopus laevis*) sokáig éretten várakozó oocitájában található, amely a megtermékenyítést követően a sejtosztódások egy nagyon gyors sorozatát indítja el. Ennek során S és M fázisok különböző G fázisok és ellenőrzési pontok alkalmazása nélkül váltogatják egymást, aminek eredményeként az óriási pete növekedés nélkül vágódik egyre kisebb sejtekre. E szabályozási hálózatokban a CDK-APC negatív visszacsatolási hurok két pozitív visszacsatolással egészül ki, méghozzá a Cdk-Wee1 dupla negatív és Cdk-Cdc25 pozitív visszacsatolási hurokkal *(I/16-3. ábra, A)*. A visszacsatolási hurkoknak kulcsfontos-



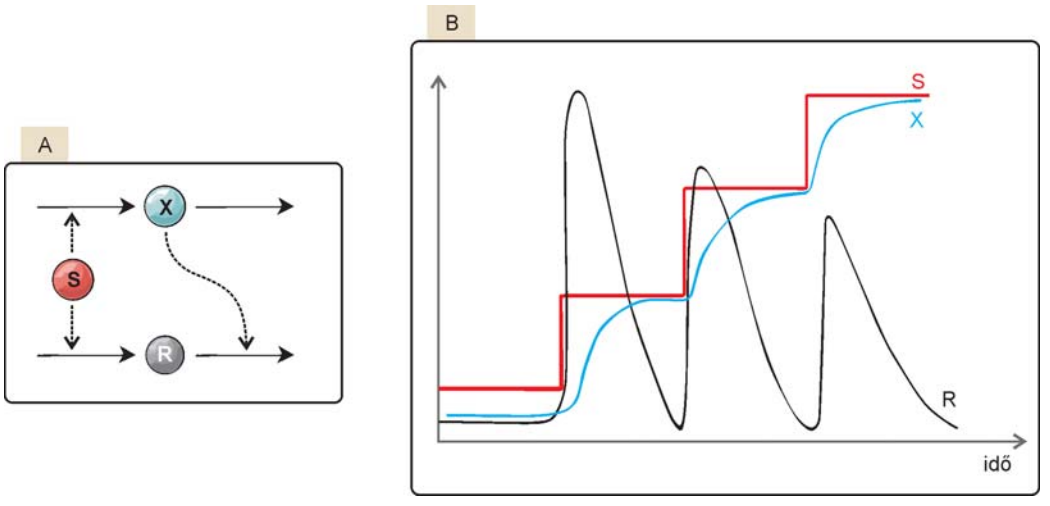
I/16-3. ábra
A béka oocita korai embrionális osztódási ciklusát leíró szabályozási hálózat

ságú szerepük van abban, hogy a Cdk csak akkor és akkor tudja elindítani a mitózisos folyamatokat, amikor az aktív Cdk szintje elér egy bizonyos küszöbértéket. Ez a küszöbérték biztosítja, hogy a Cdk mintegy ugrásszerűen tudjon aktiválódni, és így a sejtek M-be lépjenek. A mitózisba lépést tehát a Cdc25 pozitív hatása, és a Cdk Wee1 „ellenfelének" az inaktiválása teszi lehetővé. Az M fázisban lévő aktív Cdk kis késéssel az APC aktiválódását vonja maga után, amely a Cdk ciklin alegységének a lebomlását és így Wee1 vissza-aktiválódását és a Cdc25 kikapcsolását eredményezi. A sejtek kilépnek M-ből, majd egy ciklusos kinetikai viselkedést mutatva az egész folyamat kezdődik elölről *(I/16-3. ábra, B)*.

Ez az egyszerű dinamikai modell megbízhatóan írja le az embrionális sejtciklus működését, de a különböző eukarióta sejtek sejtciklusai egyéb szabályozási elemeket is tartalmaznak. Az evolúció során kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatások egyéb visszacsatolási hurkokat hoztak létre, amelyek a sejtciklus G0, G1 és G2 fázisait, az ellenőrzési pontok működését, a növekedési kontrollt, és nem utolsó sorban a szabályozási rendszer állandóságát (robosztusságát) biztosítják a külső környezeti hatásokkal szemben.

A jelátviteli hálózatok tanulmányozása

Egy másik jelentős terület, ahol elméleti és biológiai megközelítést is alkalmaznak, a jelátviteli hálózatok vizsgálata. (A hálózatok leírásával a 3. alfejezetben fogunk részletesen foglalkozni.) A jel általában valamilyen receptor segítségével, mint egyfajta információ jut el a sejthez. A sejt egy összetett fehérje-fehérje hálózat segítségével fogalmazza meg a pontos választ, és továbbítja az üzenetet a végrehajtó elemekhez. A jelátviteli hálózatok modelljét a baktériumok kemotaxisának szabályozásán mutatjuk be. A kemotaxis kémiai anyag által irányította mozgás: a baktériumokat „vonzó" anyagokat attraktoroknak nevezzük (pl. tápanyagok), míg amelyek „taszítják" őket, repellenseknek (pl. toxikus anyagok) hívjuk. Amennyiben a baktériumok sejtfelszíni receptorai attraktor/repellens koncentrációnövekedést érzékelnek a környezetükben, akkor képesek arra, hogy az intracelluláris szignál átvivő útvonalon keresztül a mozgáshoz szükséges csilló motorjának adjanak megfelelő utasítást.



I/16-4. ábra
Adaptációs mechanizmust leíró szabályozási hálózat

Kísérletek igazolták, hogy hiába ér el az attraktor vagy repellens koncentrációja tartósan magas értéket, az általuk kiváltott mozgási jellegzetességek idővel visszaállnak az eredeti értékre. Ennek a viselkedésnek a neve az úgynevezett tökéletes adaptáció, aminek alapvető jelentősége van abban, hogy a baktériumok újra és újra reagálni tudjanak az attraktor/repellens koncentrációjának a változására. Az adaptációs mechanizmus szerepe tehát, hogy állandó környezetben semlegesítse a jelet. A tökéletes adaptáció során a szignál hálózat ugyan ad átmeneti választ, amennyiben a szignál értéke hirtelen megváltozik, de a szignál nincs hatással a vizsgált komponens állandósult állapotbeli (angolul steady state) koncentrációjára. Ezt a viselkedést a legkönnyebben az *I/16-4. ábra A részén* feltüntetett szabályozási hálózattal valósíthatjuk meg. A szignál (S) pozitívan hat mind az X-re, mind az R-re (válasz molekula). Az R gyorsan aktiválódik (választ fogalmaz meg), de a szignál hatására aktiválódó X fokozatosan legátolja őt. Amennyiben numerikus szimuláción ábrázoljuk az R válasz aktivációját különböző S értékeknél, azt láthatjuk, hogy ugrásszerűen követi az S növekedését, majd az X késleltetett növekedésével az R (válasz) lecseng *(I/16-4. ábra, B).*

Hasonló adaptációs viselkedés jellemzi a sejtek oxigénhiányos (hypoxia) környezethez való alkalmazkodását valamint az emberi szaglószervet is.

Virtuális sejt

A rendszerbiológiai kutatások egyik célja, hogy az élő sejt másolatát *in silico* módon meg lehessen alkotni. Ez önmagában nagyon összetett feladat, mert nem elég az adott folyamatokban résztvevő komponensek azonosítása, de a pontos mennyiségüket, aktivitásukat és dinamikai viselkedésüket is meg kell tudni határozni. (Nem olyan régen a tudományos kutatóknak sikerült létrehozniuk egy közel kétszáz fehérjéből álló, fenntartható metabolikus hálózatot, amely egy fontos lépés az úgynevezett virtuális sejtek létrehozásához.)

Ennek gyakorlati jelentősége, hogy jelentősen csökkentheti mind pénzben, mind időben:

1. az új gyógyszerek kifejlesztését;
2. az új gyógyszerek mellékhatásainak feltérképezését.

A virtuális sejt megalkotása emellett segítheti:

1. betegségek gyors diagnosztizálását azáltal, hogy a virtuális sejttel a páciensek tüneteit lemodellezik;
2. célzott gyógyítást olyan több faktorból álló betegségekben is, mint például a rák.

Az interneten keresztül tudományos célokra elérhető az University of Connecticut Health Center-ben készült „Virtual Cell” (http://vcell.org/).

I/16.2. BIOINFORMATIKA

A bioinformatika a biológiai adatok tárolásának, visszakeresésének, rendszerezésének és elemzésének módszereit kidolgozó multi-diszciplináris tudományterület. A bioinformatika a biológiai adatok (sokszor már rendszerbiológiai szintű) sokszorozódásával és a számítógépek fejlődésével a XX. század utolsó évtizedeitől indult nagy fejlődésnek. A terület kutatói igen sok, mindenki által hozzáférhető biológiai adatbázist, és ezek pl. adatbányászati, illetve hálózatos elemzését, ábrázolásait dolgozták ki. A bioinformatikai terület szerves része a folyamatok modellezése, a mesterséges intelligencia megteremtése, a képszerű tudományos eredmények ér-

telmezése és elemzése. A bioinformatika célja, hogy a biológiai adatok sokaságát értelmes rendszerbe foglalja össze, különböző módon analizálja azokat (pl. a térszerkezet, illetve a funkciók és az evolúciós összefüggések vizsgálata szintjén), ezáltal is segítve azok megértését. A bioinformatika a nagyléptékű DNS-, RNS- és fehérjekutatási programok által produkált adathalmazok kezelését és értékelését teszi lehetővé. A bioinformatika elterjedésében kulcsszerepet játszottak azon molekuláris biológiai módszerek, amelyek a nagyszámú biológiai adat létrehozását (többek között genom szekvenálás, PCR, DNS mikrochipek) tették lehetővé.

A bioinformatika alapjai

A bioinformatikai tudás igen gazdag, amelynek két alapvető művelete:

1. a komplex rendszerek leírása és elemzése: pl. a szekvencia analízis, a genom funkcionális annotációja, az összehasonlító genomika által;
2. jóslások tétele: pl. a tudományos irodalom adatbányászata, a rendszerbiológia tárgykörében felsorolt sejtes folyamatok és adatok elemzése, a fehérjeszerkezetek elemzése által, valamint a később részletesebben tárgyalandó hálózatkutatás terén.

A bioinformatikai módszerek leggyakoribb felhasználási területei:

1. klasszikus bioinformatika: pl. különböző számítógépes algoritmusok megalkotása adatbázisok létrehozására, vagy akár egyes humán betegségek, járványok terjedésének a vizsgálatára;
2. szekvencia vizsgálat: pl. nukleinsav vagy fehérje szekvenciák illesztése, ezek annotációja, hasonlóság keresés, statisztikai elemzés;
3. szerkezeti bioinformatika: fehérjeszerkezetek háromdimenziós vizsgálata, szerkezet modellezés pl. gyógyszertervezéshez.

A bioinformatikai vizsgálat legfontosabb elemei:

1. adatbázisok létrehozása és azok karbantartása: a rendelkezésünkre álló nagyszámú adat olyan formába rendezése, hogy a kutatók a munkájukhoz könnyen felhasználhassák ezeket az információkat. Ennek érdekében az adatbázisok többsége ingyenes.
2. eszközök, módszerek és algoritmusok kifejlesztése az adatok elemzésére, továbbá az adatok elemzéséhez szükséges informatikai háttér biztosítása.
3. az eszközök és módszerek alkalmazása az adatok elemzésére, és az eredmények értelmezése a biológia szempontjából.

A bioinformatika gyors elterjedésében fontos szerepet játszott a Humán Genom Projekt (HGP). E nagyszabású projekt a XX. század utolsó éveiben indult, és közel 20 éven keresztül tartott. A teljes emberi genom feltárását tűzte ki célul, egészen a bázispárok szintjéig. A teljes genom körülbelül 30 000 gént tartalmaz, továbbá azonosították a genomot felépítő összes gént is. A HGP maga után vonta a proteomika, genomika, metabolomika és farmakogenomika kialakulását/kifejlődését. A genomkutatás felbecsülhetetlen orvosi jelentőséget hordoz, legfontosabb alkamazási területei:

1. új vakcinák előállítása, amely során a különböző kórokozók genomikai adatai biztosítják az alapot; pl. az agyhártyagyulladásért felelős *Neisseria meningitis* két B-szerotípusának vakcinációjában fontos fehérjéjének megtalálása történt genom szekvenciából;
2. új antibiotikumok fejlesztése, amelynél az új hatóanyagok felkutatása során a leküzdeni kívánt baktériumok eddig kihasználatlan sejtes célpontjait támadják meg; pl. genomelemzés során a baktérium külső burkát alkotó elemekre fókuszálnak.

Adatbázisok

A bioinformatikai feladatok középpontjában legtöbbször az adott témában releváns információk összegyűjtése áll, ezért úgynevezett könyvtárakat, vagy adatbázisokat hoznak létre. A biológiai adatok nagyszámú és széles kiterjedésű halmazait a bioinformatikusok különböző adatbázisokba igyekszenek besorolni, amelyek jelentős része minden kutató számára ingyenesen elérhető az interneten keresztül. Az adatbázisok olyan koncepcióval készülnek, hogy a bennük összegyűjtött adatok könnyen kezelhetőek legyenek, akár további számítógépes algoritmusok által. Az adatbázisok mérete és kapacitása igen széles körben változnak.

Átfogó és felhasználóbarát adatbázisok kidolgozása nagy kihívás. Ennek okai:

1. az adatbázishoz szükséges biológiai információk (úgymint biokémiai, klinikai, epidemiológiai adatok) nagyon széles formában fordulnak elő;
2. a készítőnek tisztában kell lennie avval, hogy a felhasználók milyen formában szeretnének keresni az adatbázisban és milyen analíziseket fognak végezni, és az ehhez szükséges algoritmust kell megterveznie.

Néhány gyakran használt, ingyenesen elérhető adatbázis elérhetőségét az *I/16-1. táblázat*ban foglaljuk össze:

I/16-1. táblázat
Gyakran használt, ingyenesen elérhető adatbázisok

Adatbázis neve	Adatbázis alkalmazási területe	Adatbázis elérhetősége
GenBank	nukleotidszekvencia adatbázis	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
UniProt	fehérjeszerkezet és -funkció adatbázis	http://www.uniprot.org
ProteinDataBank	3D térszerkezeti adatbázis	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
String	fehérjeinterakciós adatbázis	http://string.embl.de
HapMap (Haplotype Map Project)	SNP és humán betegségek kapcsolatának vizsgálata	http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements Project)	humán genom funkciós elemeinek azonosítása	http://www.genome.gov/10005107/
EntrezGene	egyedi humán gén adatbázis	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene
dbGAP (Database of Genotype and Phenotype)	genotípus és fenotípus közti kapcsolat adatbázis	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	humán gén és génmutáció adatbázis	http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim
HGMD (HumanGeneMutationDatabase)	humán génmutáció adatbázis	http://hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
Cancer Genome Atlas	génanalízis rák vizsgálatához	http://www.cancergenome.nih.gov/
GeneCards	információgyűjtés adatbázisokból egy adott génről	http://www.genecards.org/

Szekvenciavizsgálat

A bioinformatikai vizsgálat egyik fontos feladata a genom azonosítása, vagy más néven genom annotáció, amelynek célja, hogy a szekvencia adatbázisokban tárolt információ értelmet nyerjen. A kérdéses szekvencia (query sequence) vizsgálatára kétféle analízis létezik:

1. általános homológiakeresés;
2. szekvencia belső sajátságainak elemzése.

A homológiakeresés során a vizsgálni kívánt szekvenciát hasonlítjuk össze az összes addig már ismert szekvenciákkal, majd a talált hasonló szekvenciák (gének, fehérjék) funkciójának ismeretében feltételezést teszünk a vizsgált gén vagy fehérje funkcióját illetően. Ehhez az elemzéshez az adatbázisokban való keresésre van szükség, amelyhez különböző algoritmusokat is kidolgoztak. Az egyik legelterjedtebb a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), amely egy adott szekvencia adatbázisban keres a vizsgálandóval hasonló szekvenciákat. A BLAST használata során a vizsgálandó szekvenciát kell beírni a szekvencia mezőben, majd a használni kívánt adatbázis kiválasztása után elvégezhető a keresés *(I/16-5. ábra)*.

A BLAST módszer lépései:

1. homológ keresése a kereső felület aktiválásával;
2. a kapott szekvenciák illesztése;
3. homológ szakaszokon azonos szerkezet feltételezése;
4. hiányos szakaszok kitöltése, modellezése;
5. szerkezet finomítása, jóslások tétele.

Szekvenciavizsgálat során egy fontos kérdés lehet, hogy melyek azok a pozíciók, melyek valamilyen szempontból fontosak. Ezáltal az evolúciósan konzervált szakaszok is meghatározhatóak.

Szerkezeti bioinformatika

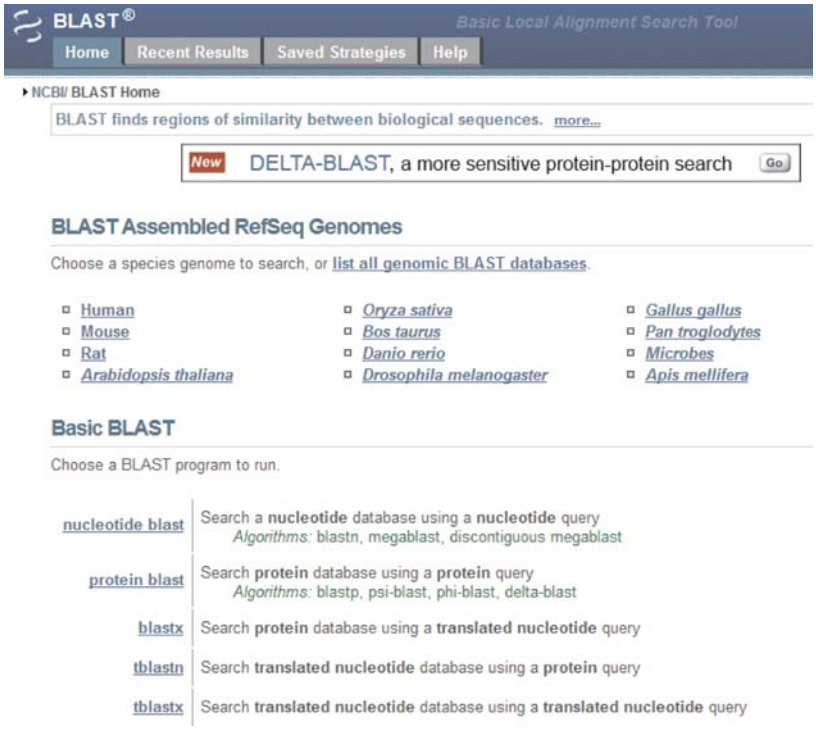
Ismeretlen fehérjék azonosítása történhet térszerkezet-vizsgáló módszerekkel. Ilyen módszer az aminosav szekvencia ismeretében képes arra, hogy térszerkezetet vizualizáljon; hasonló szerkezeteket illesszen és osztályozzon, ezáltal a funkciójára következtessen illetve a fehérje másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetére tegyen jóslásokat.

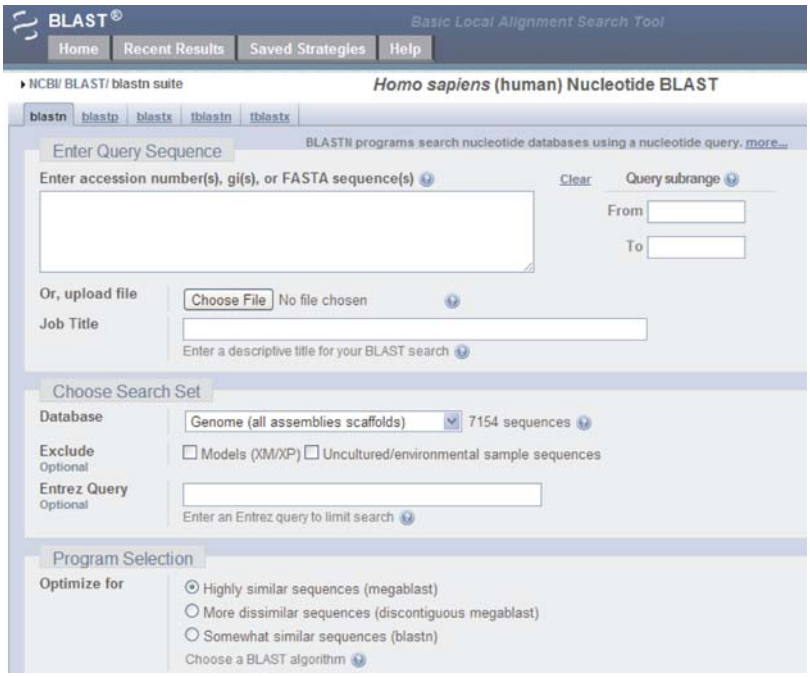
A fehérjeszerkezetek jóslásának funkciója:

1. fontos élettani szerepet betöltő fehérjék (pl. onkogének, apoptotikus faktorok) megismerése, amely gyakran kísérletesen nem megoldható;
2. molekuladinamikai szimulációk végzése;
3. kismolekula dokkolásának vizsgálata számítógépes módszerekkel.

A dokkolásos vizsgálat lényege, hogy két molekula között megkeresik, és energetikailag jellemzik a legoptimálisabb elrendezést. Ezt az algoritmust alkalmazza a CADD (Computer-Aided Drug Design). Ennek a módszernek ugyanis felbecsülhetetlen a szerepe a gyógyszertervezés korai fázisában a gyógyszerfejlesztés költségeinek a csökkentésében:

1. egy ismert térszerkezetű célfehérje blokkolása esetén meggátolható valamilyen káros folyamat;
2. számítógép segítségével nagyszámú lehetséges gyógyszerjelölt kismolekula generálható;





I/16-5. ábra
Az NCBI BLAST keresőfelülete

3. dokkolással eldönthető, hogy mely molekulák kötődnek a legnagyobb affinitással;
4. az *in vitro* kísérleteket már csak a jelöltekkel kell elvégezni.

I/16.3. A HÁLÓZATOK

Matematikai értelemben a hálózatok gráfoknak tekinthetők. A gráfok pontokból és az őket összekötő élekből épülnek fel. A hálózatokban ezeket elemeknek (nódusoknak) és kapcsolatoknak is nevezhetjük. Ez azt jelenti, hogy bármi vizsgálható hálózatosan, aminek képesek vagyunk definiálni az elemeit, ha rendszerezett tudásunk van az elemek közötti kapcsolatokról. Azaz a hálózatkutatás egy szemléletmódot, illetve vizsgálati módszertárt ad. Egy hálózattal jellemzett komplex rendszer mindig több, mint az elemeinek és kapcsolatainak összessége. A komplex rendszernek csoportjellemző (emergens) tulajdonságai vannak, amelyek nem egyértelműen következnek az elemeinek a tulajdonságaiból (így például egyetlen vízmolekula nem tud megfagyni). A hálózatos elemzésmód e csoportjellemző tulajdonságok jóslására is szolgál.

A biológiai hálózatok legfontosabb tulajdonságai

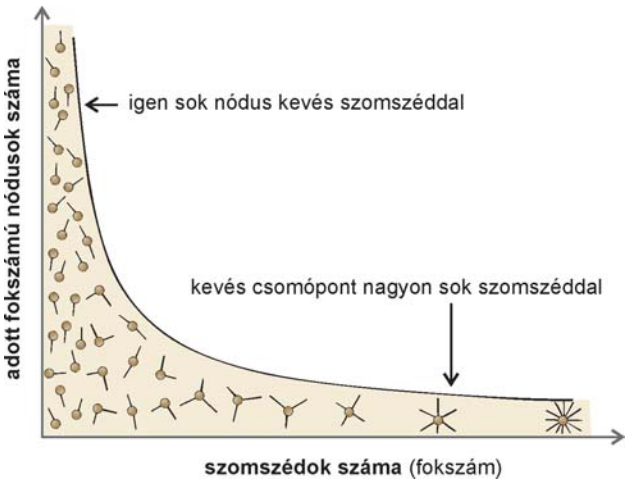
A hálózatos elemzésmód azért is hasznos, mert a természetben előforduló hálózatoknak sok általános tulajdonsága van. Ezek közül a legfontosabbak az egymásba épültség, a kisvilágság, a skálafüggetlenség, a modularitás, a hierarchia és az önhasonlóság.

Egymásbaépültség. Az egymásbaépültség (angolul nestedness) a biológiai hálózatok felépülésének igen jellemző tulajdonsága. Biológiai rendszerek esetén általánosan jellemző az, hogy az adott hálózat egyik nódusa önmagában is egy teljes hálózatot jelent. Így például a fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat egyetlen nódusa (egyetlen fehérje) felfogható építőelemeinek, az aminosavaknak, vagy akár egyedi atomoknak a hálózataként. Az egymásbaépültség (természetesen) fordított irányban is igaz: így az atomok hálózatai (makro)molekulákat, a makromolekulák hálózatai sejteket, a sejtek hálózatai (többsejtű) élőlényeket, az élőlények hálózatai pedig ökoszisztémákat (illetve emberek esetén szociális hálózatokat) építenek fel.

Kisvilágság. A természetben előforduló, illetve az ember által alkotott hálózatok döntő hányada kisvilág. Ez azt jelenti, hogy a hálózat átmérője (azaz annak a mértéke, hogy a hálózat bármely két elemét összekötő legrövidebb utak közül a leghosszabb hány élt tartalmaz) a hálózat elemeinek számával a lineárisnál lassabban, csak logaritmikusan nő. Egyszerűbben fogalmazva a hálózatok elemei egymástól a hálózat élein haladva meglepően kevés lépéssel elérhetők. Így a Földön élő emberek egymástól átlagosan 6 ismerősnyi távolságra vannak. (A Facebook-ot használó több mint egymilliárd ember egymástól vett átlagos távolsága alig több mint 4 lépés.) A kisvilágság jelenségét először Karinthy Frigyes jósolta meg 1929-ben, majd szociális hálózatokra negyven évvel később Stanley Milgram igazolta. A kisvilágság jelenségének általánosságára Duncan Watts és Steven Strogatz 1998-ban mutatott rá. Ez az év jelentette a biológiában is széles körben alkalmazott hálózatos kutatások kezdetét. A kisvilágság azért általános jelenség, mert minden információtovábbító lépés torzítja az információt, és a torzítás a lépések számával hatványozódik Emiatt azok a hálózatok, amelyek nem voltak kisvilágok, az evolúció során kihaltak

(illetve az ember által alkotott technikai hálózatok esetén kidobásra kerültek a mérnöki tervezőasztalról). Minden információ válogatás nélküli terjesztése azonban a hálózatok túlterhelődését idézi elő. Fontos tehát, hogy a hálózatok olyan szűrő mechanizmusokkal rendelkezzenek, amelyek megkülönböztetik egymástól a hálózatos szerveződés túlélése szempontjából fontos jeleket, a túlélés szempontjából nem fontos változásoktól, a zajoktól. A hatásokat szűrő mechanizmusok között igen fontos a csomópontok jelenléte (hiszen egy csomóponthoz egyidejűleg sok információ érkezhet, de csupán kevés halad onnan tovább).

Skálafüggetlenség. A hálózatok skálafüggetlensége az elemeik fokszámainak eloszlását jellemzi. Az elemek fokszáma a szomszédjaik számával azonos. A skálafüggetlenség hatványfüggvényt követő eloszlást jelent, ami azt jelenti, hogy a természetben előforduló hálózatokban tízszer több szomszédja kb. tizedannyi nódusnak van. (Azért hívjuk ezt skálafüggetlennek, mert ez a szabályszerűség attól függetlenül érvényes, hogy a nódusok fokszámának milyen értékénél, milyen skálájánál vizsgáljuk.) Ez az eloszlásfajta a fokszámot feltüntető vízszintes és az előfordulás valószínűségét feltüntető függőleges tengelyen egyaránt logaritmikusan ábrázolva egyenest ad. A fokszámok skálafüggetlen eloszlása (és nem a véletlenszerű hálózatokra jellemző Poisson-eloszlása) azt jelenti, hogy nullánál lényegesen nagyobb a valószínűsége annak, hogy a hálózatban megjelenjenek csomópontok, azaz olyan elemek, amelyeknek az átlagnál sokkal több szomszédja van *(I/16-6. ábra)*. A skálafüggetlen fokszám eloszlás általánosságára Barabási Albert-László és Albert Réka mutatott rá 1999-ben.



I/16-6. ábra
A skálafüggetlen fokszám eloszlás

Számos biológiai hálózatban a csomópontok egy bizonyos szomszédsági szám felett már csak hosszabb időtartam alatt figyelhetőek meg. Ennek az az oka, hogy a kapcsolódás térigénye miatt egy nódus egyidejűleg csak néhány kapcsolatot képes fenntartani. Azokat a csomópontokat, amelyek nagyméretű fehérjék, és egyszerre sok fehérjével képesek kapcsolódni, partizó csomópontoknak nevezzük. Ellentéteik a randevúzó csomópontok, amelyek a partnereiket váltogatva, csak hosszabb időtartam alatt képeznek több fehérjével kapcsolatot.

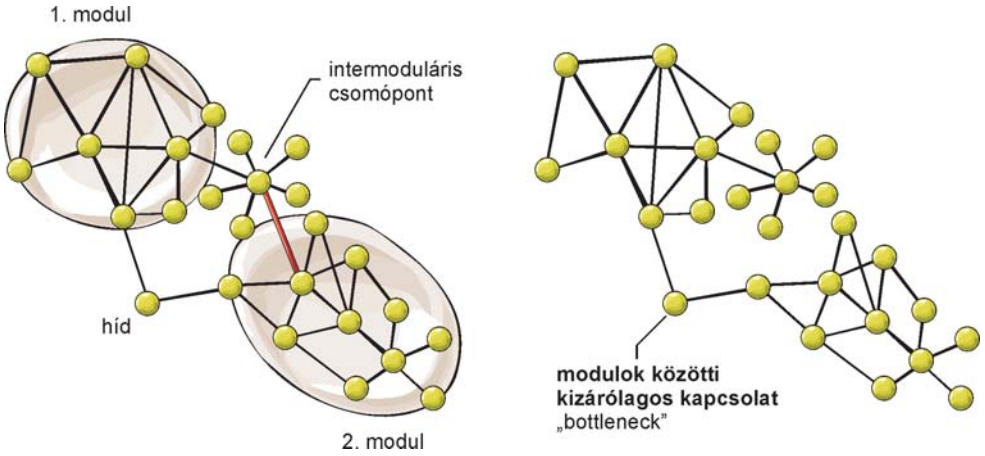
A csomópontok sok hálózatban, így például a fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatban, szeretnek egymással összekapcsolódni, amelyet gazdag-klubnak (rich-club) nevezünk. A gazdag-klub igen hatékonnyá teszi az információ továbbítását. A gazdag-klub ugyanakkor veszélyt is jelenthet a hálózat életére annyiban, hogy a hálózatot károsító hatásokat is nagy hatékonysággal terjeszteni képes. (A fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat ezt úgy védi ki, hogy a károsodott fehérjék kevésbé tudnak szelektíven egymáshoz kötődni. A károsodott fehérjék aggregációjától a molekuláris chaperonok védik meg a sejtjeinket.) A biológiai hálózatok igen gyakran fejlesztenek ki egy központi, sűrűn összekötött magot, amelyet a „periféria” vesz körül. A gazdag-klub az ilyen hálózatos „mag”-ok egyik példája.

Egymással összeköttetésben álló nódusok sokszor *hálózatos motívumokat* képeznek. A motívumok kevés számú nódus gyakran ismétlődő kapcsolódási formái, amelyek különösen az irányított hálózatokban (így pl. a jelátviteli hálózatokban) játszanak fontos szerepet. Az erősítést, vagy a negatív visszacsatolást meghatározó motívumok a hálózatos szabályozás fontos eszközei.

Modularitás. A csomópontok mellett a hálózatban terjedő hatásokat a modulok (a hálózat csoportjai) is szűrik. A modulok a hálózatos elemek olyan csoportjait jelölik, amelyek belső kapcsolatrendszere sűrűbb, mint a modulokat a szomszédos modulokhoz kötő kapcsolatok sűrűsége. Belátható, hogy ha egy információ egy modulba bejut, akkor annak az esélye általában kisebb, hogy egy következő modulba átjusson, mint annak, hogy a modulon belül keringjen (és ott egy idő után lecsengjen, elhaljon). A hálózatos modulok nagyon sokszor funkcióra szerveződnek. Így például a fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat moduljai pl. a fehérjék szintézisét, illetve lebontását biztosító fehérjekomplexek (ahol a két konkrét példának a riboszóma és a proteaszóma felel meg).

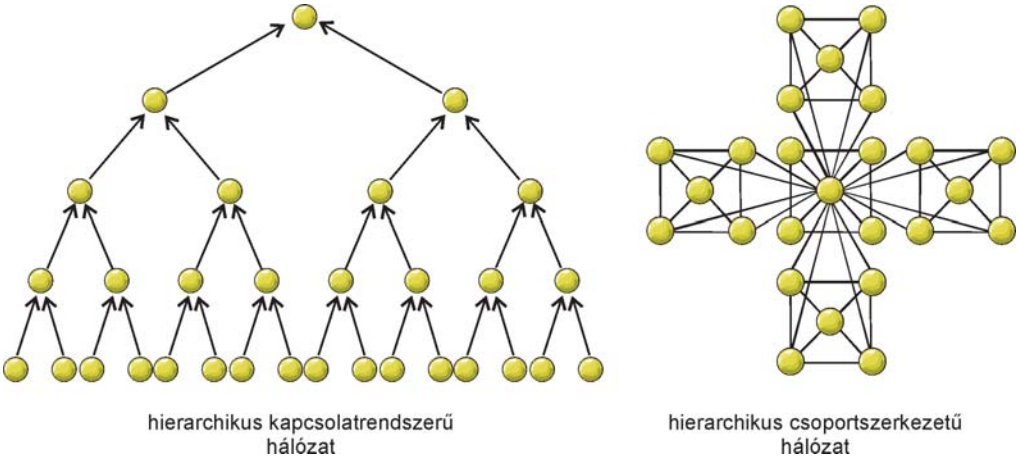
A hálózatos modulok nagyon sokszor átfedőek, azaz a hálózatnak sok olyan nódusa van, amelyek egyszerre több modulnak is a részét képezik. Két modult összekötő nódusokat hidaknak is szoktuk nevezni. A hidak nagyon fontos szerepet töltenek be a modulok közötti információcsere szabályozásában. Különösen fontossá válik ez a szerep akkor, ha a két modult csak egyetlen híd köti össze (az ilyen pozíciót az angolszász irodalomban bottleneck-nek nevezik; *I/16-7. ábra*). Vannak olyan híd pozícióban lévő nódusok is, amelyek kettőnél több modult egyszerre kötnek össze. Ezek szabályozó szerepe kiemelten magas. A hálózatos modulok és hidak azonosítására nagyon sokfajta módszer ismeretes.

Hierarchia. A hálózatok nagyon sokszor hierarchikus felépítésűek, azaz vannak olyan nódusaik, amelyek a hálózatban központi helyzetet foglalnak el, és ebből is következően a hálózat többi nódusát irányíthatják. A hierarchikus elrendeződés modulokra is igaz lehet, azaz létezhetnek központi helyzetet elfoglaló modulok is. A hierarchikus elrendezés akkor válik igazán irányítóvá, ha a hálózat kapcsolatai maguk is irányítottak, és a hálózat középponti pozícióiban elhelyezkedő nódusok nem kapcsolatokat befogadó „nyelők” (angolul sink-ek), hanem kapcsolatokat indító „források” (source-ok). A legtöbb hálózat 4-5 hierarchikus szintre bontható, ahol a felsőbb



I/16-7. ábra
Híd pozíciójú nódusok

szint tagjai irányítják az alattuk lévőket *(I/16-8. ábra)*. A hierarchikus hálózat középső szintjein elhelyezkedő nódusok horizontális kapcsolatai is fontos szabályozó szerepet tölthetnek be.



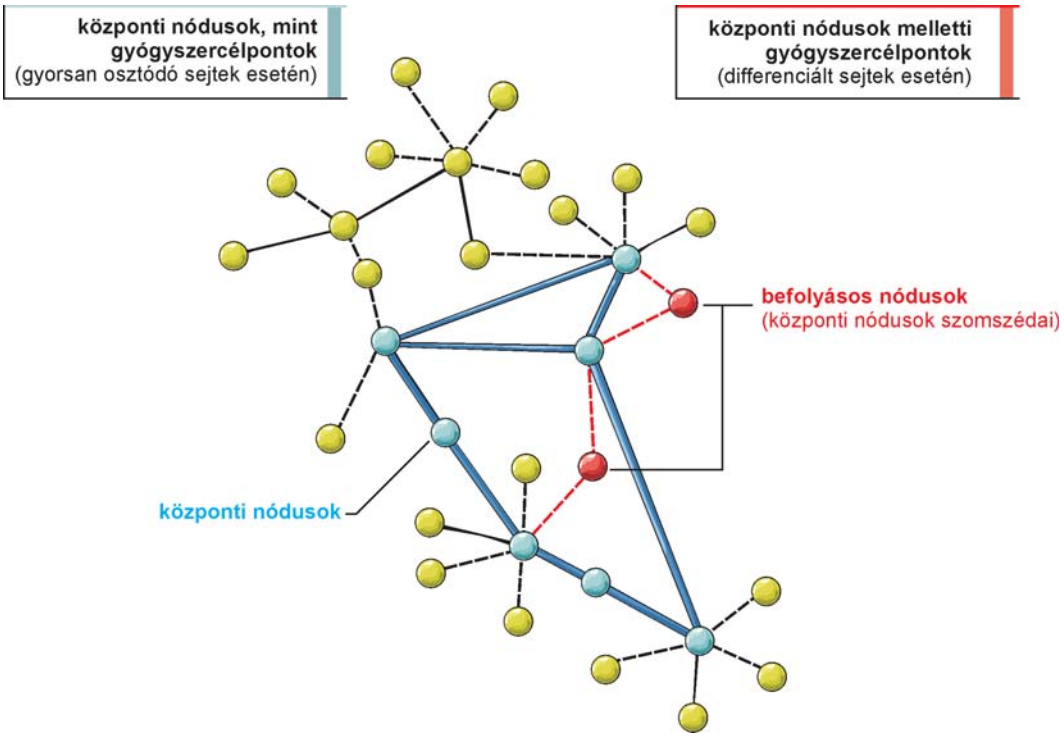
I/16-8. ábra
Hierarchikus hálózatok

A hálózatok centrális régiójában elhelyezkedő nódusok, illetve kapcsolatok (élek) azonosítására nagyon sok definíció és ezeket alkalmazó eljárás ismeretes. A csomópontok lokálisan centrális nódusoknak tekinthetők. A Google kezdeti keresési algoritmusát jelentő PageRank algoritmus az első szomszédoknál jóval szélesebb hálózatos környezetben értelmezte a központi nódusokat (honlap-címeket). A sejten belüli hálózatok központi nódusai a rákos sejtekre, és a fertőző organizmusokra ható gyógyszerek gyakori támadáspontjai *(I/16-9. ábra)*. Más betegségek leghatékonyabb gyógyszerei a legtöbbször a központi nódusok melletti nódusokra hatnak, mivel a központi nódusok erős gátlása (vagy aktiválása) számos mellékhatást, illetve toxicitást okozhat. (Figyeljük meg, hogy rákos sejtek, illetve fertőző organizmusok esetén a központi nódusok „támadása" éppen az őket tartalmazó sejt elpusztítása miatt válik fontossá.)

A hálózatok központi nódusai (élei) a legtöbb biológiai hálózatban egymással össze vannak kötve. Az összekötött központi nódusok a hálózat vázát (angolul: skeleton) képezik. A hálózat váza olyan, mint az úthálózaton belül az autópályák rendszere, azaz a hálózat váza nagy intenzitású információcsere hatékony lebonyolítására képes. A fő metabolikus útvonalak a metabolikus hálózat vázát képezik. A jelátviteli hálózat vázát a legfontosabb jelátviteli utak alkotják.

Önhasonlóság. A biológiai hálózatok általában megközelítőleg önhasonlók, azaz egy kisebb részük szerkezete lényegében hasonlít egy nagyobb és sokkal nagyobb részük szerkezetéhez. A matematikai precizitással önhasonló objektumok a fraktálok. Szinte az összes természetes struktúra fraktálszerű képződmény: a fáktól a felhőkön át az idegrendszerünkig.

A hálózatok szerkezetének még nem ismert kapcsolatait, vagy nódusait számos eljárás jósolni képes. Amennyiben az eredeti hálózat gyógyszerek és fehérje-targetjeik hálózata volt, ilyen eljárásokkal a gyógyszerek lehetséges mellékhatásai, illetve új terápiás alkalmazásai megjósolhatóak.



I/16-9. ábra
Hálózatos gyógyszertarget típusok

Számos eljárás ismeretes hálózatok, illetve részeik egymással való összehasonlítására, és hasonlóságuk mértékének a meghatározására. Ezek az eljárások különösen az időben megváltozó hálózatos szerkezetek összehasonlító vizsgálata esetén válnak fontossá. Hálózatok viselkedésének az előre jelzése a hálózatkutatás egyik leggyorsabban fejlődő ága. Ennek segítségével ma már jósolhatóak a hálózatos rendszerek váratlan átalakulásai (pl. tőzsdekrach, vagy malignus transzformáció) és sok esetben megtervezhetővé válik ezen átalakulások lassítása, késleltetése, avagy elkerülése is.

A biokémiai és molekuláris biológiai rendszerek legfontosabb hálózatai

A fehérjeszerkezet hálózatok. A fehérje szerkezet hálózatokban két aminosavat akkor kötünk össze, ha a fehérje háromdimenziós szerkezetében egy adott távolságnál közelebb vannak egymáshoz. Az aminosavak hálózatai is kisvilágok, de sok szomszéddal rendelkező csomópontok nem annyira alakulnak ki bennük, hiszen a fehérjén belül egy aminosav nem tudja cserélgetni a szomszédjait, és körülötte a térgátlás miatt néhány aminosavnál több nem fér el.

A fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok. A fehérjék fizikai összekapcsolódásával keletkező hálózatokat fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatoknak, avagy interaktómoknak nevezzük. Ez az egyik leggyakrabban vizsgált hálózattípus. Az emberi sejtben megtalálható néhány tízezer fehérje kb. 1 millió kapcsolatot létesít egymás-

sal. Ezeknek a kapcsolatoknak 2017-ben mintegy harmada volt ismert. Az interaktómok moduljai (csoportjai) a fehérjék komplexeinek felelnek meg. A legtöbb modulnak igen jól definiált funkciója van a sejtben.

A metabolikus hálózatok. A metabolikus hálózatok elemeit a sejtben előforduló szerves molekulák, a metabolitok alkotják. Ilyen például a glukóz-6-foszfát vagy az uracil. A metabolitokat összekötő kapcsolatok azok az enzimek, amelyek a két összekötött metabolit egymásba alakulását katalizálják. Így például az előbb említett glukóz-6-foszfát egyik metabolikus hálózatbeli szomszédja a glukóz, és a kettőjük közötti él a hexokináz, illetve a glukokináz enzim. A metabolikus hálózatok vizsgálatával meghatározhatóak a sejt növekedésének pontos kémiai jellemzői.

A jelátviteli és génexpressziós hálózatok. A jelátviteli hálózat a fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatoknak azon részhálózata, amely a jelátvitelben részt vevő fehérjéket tartalmazza. Ebbe a hálózatba tartozik az összes jelátviteli útvonal, az őket összekötő kapcsolatok (keresztbeszélgetések, angolul „cross-talk”-ok), az állványfehérjék, és a jelátvitelt szabályozó molekulák, pl. a mikro-RNS-ek. A génexpressziós hálózatokat az adott sejt génjei és az ezekre a génekre ható transzkripciós faktorok alkotják. A génexpressziós hálózat hierarchikus: a legfelül álló transzkripciós faktorok más transzkripciós faktorok átíródását szabályozzák, és így tovább. A hierarchikus szerkezet általában 4-5 réteget tartalmaz. A jelátviteli és génexpressziós hálózatokat az epigenetikus szabályozás metilációs, illetve hiszton modifikációs adatsorai (ahol az utóbbit hiszton-kódnak is szokás nevezni) egészítik ki. A jelátviteli és géntranszkripciós hálózatok irányítottak és igen sokszor feltételes kapcsolatokat is tartalmaznak, azaz bizonyos kapcsolataik csak akkor válnak aktívvá, ha az adott fehérjéhez egy másik fehérje is kapcsolódik (illetve kapcsolódott korábban).

A sejtszervecskék hálózatai. A sejtmag, a mitokondriumok, a plazmamembrán, az endoplazmás retikulum, a Golgi-rendszer és a többi membránnal határolt sejtszervecske nem különálló egységek, hanem kapcsolatban állnak egymással. Összességüket a sejtszervecskék hálózatának nevezzük. A sejtszervecske-hálózat egyes részhálózatai, így például a mitokondriumok hálózata önállóan is vizsgálható. A mitokondriumok hálózata a sejtet ért erős stressz alkalmával igen jellemző szétkapcsolódást mutat. Ez segíti a sejtet abban, hogy a károsodott mitokondriumokban megjelenő fokozott mennyiségű szabadgyök ne rombolja szét a többi, még működő mitokondriumot.

A XXI. század első éveiben a hálózatkutatás a biokémiai és a molekuláris biológiai adatok áttekintését, megértését, valamint a hálózatokkal leírt biológiai rendszerek viselkedésének megjóslását, illetve befolyásolásuk megtervezését jól segítő tudománnyá vált. A hálózatos elemzésmódot egyre több gyógyszerkutatási eljárásban alkalmazzák hatékony gyógyszertargetek valószínűsítésére, illetve az emberi sejt viselkedésének (pl. molekulák emberre mutatott toxicitásának) becslésére. Hálózatos módszerek egyre nagyobb segítséget adnak az orvosi kezeléseknek az adott beteg egyedi tulajdonságaira (így genetikus, epigenetikus hátterére, vagy később akár egyedi stressz-történetére) való személyre szabott alkalmazásában is.

BIOENERGETIKA ÉS ANYAGCSERE

II/1. Bioenergetika, oxigénmetabolizmus
(Mandl József)

II/2. Glikolízis
(Csala Miklós)

II/3. Piruvát-dehidrogenáz komplex
(Csala Miklós)

II/4. Citrátkör
(Csala Miklós)

II/5. Oxidatív foszforiláció
(Csala Miklós)

II/6. Glukoneogenezis
(Kardon Tamás)

II/7. A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása
(Kardon Tamás)

II/8. A fruktóz és a galaktóz metabolizmusa
(Kardon Tamás)

II/9. A glikogén anyagcseréje
(Kardon Tamás)

II/10. A pentóz-foszfát ciklus
(Kardon Tamás)

II/11. Lipidek anyagcseréje
(Hrabák András)

II/12. Aminosavak anyagcseréje, ornitinciklus
(Vér Ágota)

II/13. Porfirin- és vasanyagcsere
(Vér Ágota)

II/14. A nukleotidok anyagcseréje
(Keszler Gergely)

II/15. A szervezet anyagcseréjének összehangolt szabályozása
(Müllner Nándor)

II/16. Biotranszformáció – gyógyszer-metabolizmus – méregtelenítés
(Mandl József)

II/17. Alkoholmetabolizmus
(Csala Miklós)

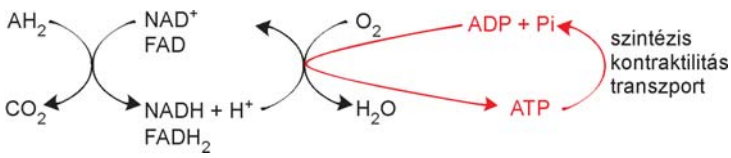
II/1.
Bioenergetika, oxigénmetabolizmus

Mandl József

A bioenergetika kifejezés a legendárium szerint *Szent-Györgyi Albert*től származik. Munkásságának szakmai méltatásában, mint kulcsszó – a C-vitamin mellett – rendszerint a biológiai oxidáció szerepel. Oxidáció a meghatározó reakció a környezetből felvett kémiai energia hasznosításában. A bioenergetika tárgya: hogyan történik az energia transzformáció az élő szervezetben, hogyan nyerünk energiát a környezetünkből energiaigényes folyamatokra. A sejtek endergonikus folyamatok segítségével többek között felépítik saját anyagaikat; biztosítják maguk, illetve a sejten belüli kompartmentek környezetüktől való elkülönültségét; a kontraktilis elemek működtetését; valamint a transzport folyamatok egy jelentős részét. A különböző endergonikus folyamatok aránya a „megtermelt"/transzformált energia „elköltésében" sejttípusonként más és más; például egy inzulin termelő és szekretáló pancreas béta sejt esetében az energiát fogyasztó folyamatok között a fehérje szintézis dominál, simaizomsejtnél a kontraktilis elemek, egy neuron esetében inkább a transzport folyamatok.

II/1.1. AZ ENERGIATRANSZFORMÁCIÓ – METABOLIZMUS

Élő rendszer endergonikus folyamatok nélkül nem működik. Metazoákban a heterotróf sejtek kémiai energiával fedezik energiaszükségletüket; lévén izoterm, izobar rendszerek minimális térfogat ingadozással. A kémiai energia forrása a tápanyag felvétel környezetünkből. A *metabolizmus* fogalma alatt azokat a folyamatokat értjük, amelyeknek révén a bekerülő anyagokat átalakítjuk két szempontból: (i) belőlük saját anyagokat nyerünk, építünk át és fel különböző reakciók révén, (ii) a teljes, vagy részleges lebontásuk során nyert energiát transzformáljuk olyan formába, ami alkalmas az endergonikus folyamatok energiaigényének fedezésére. Ez több kérdést is felvet: milyen – lebontó - folyamatok révén nyerünk energiát a környezetből, milyen módon tudunk energiaigényt kielégíteni. A metabolizmus két részre osztható: a lebontó folyamatokat *katabolizmus*nak, az építő folyamatokat *anabolizmus*nak



II/1-1. ábra

Az energiatranszformáció összefoglalása. A szervezetbe kerülő tápanyag (AH_2) CO_2-vé oxidálódik. Hidrogénjei átvivő molekulákra (NAD^+, FAD) kerülnek, amelyek átmenetileg redukálódnak, majd az átvett hidrogénnel az oxigént redukálják vízzé. Az így felszabaduló energia terhére ADP foszforilálódik. A képződött ATP hidrolízise szolgál energiaforrásként különböző energiaigényes folyamatok számára.

szokás nevezni. Ez az elkülönítés azonban nem mindig egyszerű és egyértelmű. Első megközelítésben a katabolikus folyamatok között az oxidáció, az anabolikus reakcióknál a redukció dominál. Ezért a metabolizmusban alapvető jelentőségűek az elektrontranszferrel járó oxidoredukciók. Az energiaigény kielégítésében egyes (foszfát)vegyületek foszforilációja és a foszfát csoport hidrolíziséből származó energia hasznosítása a meghatározó. Így a metabolizmust alkotó reakciók között az elektron- és foszforil-csoport átvitelével járók különösen jelentősek *(II/1-1. ábra)*.

Intermedier anyagcsere alatt a kismolekulasúlyú anyagok (metabolitok) átalakulásait, metabolizmusát szokták érteni. A humán metabolom körülbelül ezres nagyságrendben képződő metabolitot takar, kifejezetten nem számolva a környezetből bekerülő kismolekulasúlyú, nem tápanyag, idegen eredetű (xenobiotikum, xenometabolit) anyagokat. A környezetből felvett tápanyagok száma viszonylag alacsony, ezért közvetlenül bioenergetikai jelentősége kevés molekulának van. Katabolikus szempontból a metabolizmus konvergens: sokféle anyagból igen kisszámú képződik, míg az anabolizmus divergens: a rendkívül sokféle metabolit igen kisszámú bioszintetikus előanyagból (prekurzor) lesz. A lebontó folyamatok végtermékei egyben a szintetikus folyamatok kiinduló pontjai.

II/1.2. CSOPORTÁTVITEL – KAPCSOLT REAKCIÓK

A teljes metabolizmus nem energiaigényes. Ez nemcsak a reakciók összességére, hanem egyetlen reakcióra is igaz. Ha endergonikus a reakció, akkor mellé egy olyan exergonikus reakció kell társuljon, hogy a nettó szabadenergia változás negatív legyen – ez a kapcsolt reakciók elve. A biokémiai folyamatok döntő többsége enzim által katalizált reakció. A kapcsolt reakciók csak enzimatikus reakciókban valósulnak meg gyakran oly módon, hogy egyetlen enzim egyszerre több – egy katabolikus és egy anabolikus – reakciót katalizál.

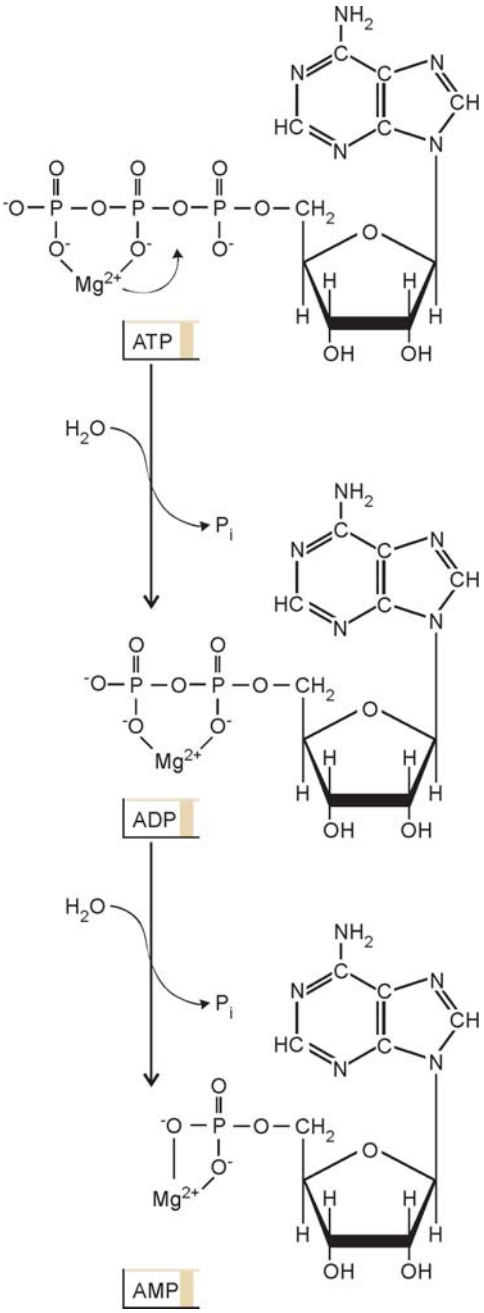
Nagyon sok reakció alkotja a metabolizmust, egy jelentős részük azonban elektron, proton vagy atomcsoport átvitelével jár, így ebből a szempontból rendszerezhető. A csoportátvitel tendenciáját jellemző *csoportátviteli potenciál*t a kérdéses reakció standard szabadentalpia változása határozza meg. A csoportátvitelre jellemző, hogy van egy, esetleg több (csoport)átvivő molekula, amelyhez az átviendő részecske vagy atomcsoport átmenetileg kapcsolódik. Enzimatikus folyamatokról lévén szó az átvivő része az enzimreakciónak, koenzim vagy prosztetikus csoport. Külön érdekesség, hogy táplálkozásélettani szempontból az átvivő gyakran vitamin, vagy annak származéka *(II/1-1. táblázat)*.

II/1-1. táblázat
Csoportátvitelben szerepet játszó vitaminszármazék *koenzimek*

Átvitelre kerülő csoport	**Vitamin**	**Koenzim**
aldehid-	B_1	tiamin-pirofoszfát
elektron-	B_2 niacin	FAD NAD
acil-	pantoténsav	koenzim-A
C1 töredék	folsav	tetrahidrofolsav
CO_2	biotin	biotin
amino-	B_6	piridoxál-foszfát

Foszforil-transzfer szerepe

Az exergonikus és endergonikus folyamatok közötti energiaátvitelben az *ATP* (adenozin-trifoszfát) a kulcsszereplő *(II/1-2. ábra)*. A *II/1-2. táblázat*ban szereplő foszfátok között az ATP és az ADP terminális foszforilcsoportja hidrolízisének sza-



II/1-2. ábra

ATP, ADP, AMP. Az ATP (adenozin-trifoszfát) adeninból, ribózból és három – ADP (adenozin-difoszfát) esetében kettő, AMP (adenozin-monofoszfát) esetében egy – foszfátcsoportból áll. A sejtben Mg^{2+} komplex formájában találhatók.

II/1-2. táblázat

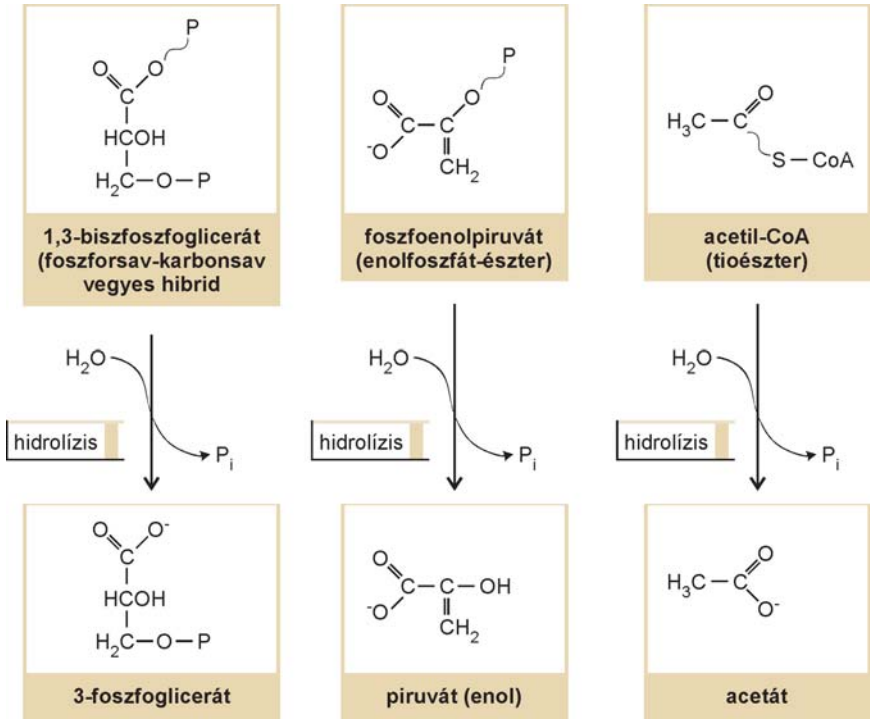
Egyes metabolit foszfátok foszforilcsoportjainak hidrolízis $\Delta G^{0'}$ értékei

Foszfátvegyület	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)
foszfoenol-piruvát	-61,9
karbamil-foszfát	-51,4
1,3*-biszfoszfoglicerát	-49,3 -13,4*
kreatin-foszfát	-43,7
3'5'-cAMP	-49,7
ATP (ADP)	-30,5
ADP (AMP)	-27,6
pirofoszfát	-27,6
AMP	-14,2
glükóz-1-foszfát	-20,9
glükóz-6-foszfát	-13,8
fruktóz-1-foszfát	-15,9
* A C3-foszfát-csoport hidrolízisének $\Delta G^{0'}$	

bad entalpia értékénél – foszforilációs potenciáljánál, amivel a csoportátvitel jellemezhető – egyaránt vannak magasabb és alacsonyabb értékek. Ez teszi alkalmassá az AMP-t a foszforil csoport átvitelben való központi szerepre: képes a foszforil csoporto(ka)t felvenni és a felvett csoportot átadni. A magasabb foszforilációs potenciállal rendelkező foszfátokat makroerg foszfátoknak is nevezik és „~" jellel jelölik *(II/1-3. ábra).* Hidrolízisük során a felszabaduló energia kapcsolt reakcióban hasznosul. Az adenilát nukleotid készlet (pool) viszonylag állandó, foszforiláltsági állapota jellemzésére az energiatöltést szokták használni.

$$\text{Energiatöltés} = \frac{1}{2}\frac{2[ATP]+[ADP]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]}$$

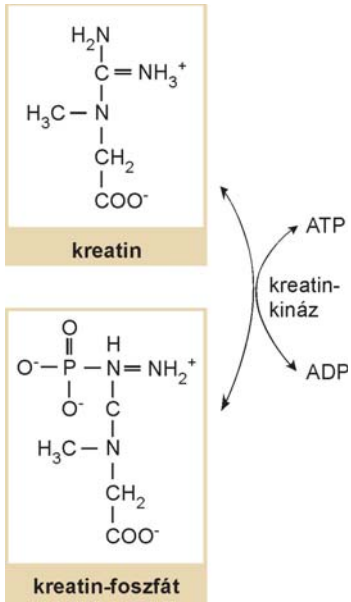
Az ATP 2, az ADP 1 magas csoportátvitelű kötést tartalmaz, míg az AMP egyet sem. Így teljes energiatöltés, minden adenilát ATP esetén az energiatöltés 1, ellenkező esetben – minden adenilát AMP esetén 0.



II/1-3. ábra
Néhány magas csoportátviteli potenciálú vegyület hidrolízisének folyamata

Az ATP intracelluláris koncentrációja 1–10 mM. Különböző kalkulációk szerint ez kb. 30 s tartósságú „élethez" lenne elegendő, nem számítva például egy éppen 100 méteres síkfutást végző, vagy egy kapásra váró horgász igen különböző élethelyzetét és ebből adódó energiafogyasztási különbségeit. Az ATP nem raktározódik, hanem az ADP foszforilációjával folyamatosan termelődik. Ennek két módja van: az oxidatív foszforiláció és a szubsztrát szintű foszforiláció. Egyfajta makroerg foszfát raktári funkciót izomszövetben és agyban a kreatin-foszfát *(II/1-2. táblázat)* tölt be. A kreatin-foszfát azonnal mobilizálható „energiaforrás" *(II/1-4. ábra)*.

Különböző folyamatokat a sejtben különböző, nukleozid-trifoszfátok mediálta energiatranszfer jellemez. Általában a szénhidrát szintézisben UTP az energiadonor, a lipid szintézisben CTP, a fehérjeszintézisben GTP. Az energiatranszfer során képződő nukleozid-difoszfátok azonban ezekben az esetekben is ATP → ADP átalakulás terhére refoszforilálódnak. Tehát az ADP/ATP ciklus a központ a foszforil transzferben, valamint az endergonikus reakciók energiaszükségletének biztosításában. A különböző adenilát nukleotidok funkciója számos reakcióban nemcsak energetikai; aktivátorok, vagy inhibitorok több reakciósorozat szabályozásában.



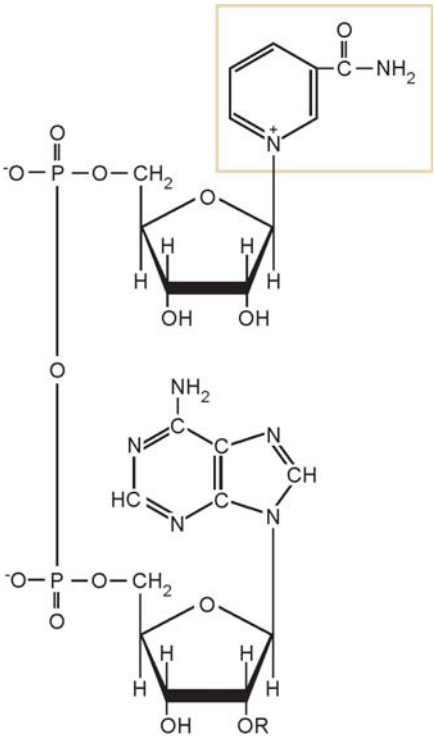
II/1-4. ábra
A kreatin foszforilációja ATP terhére

Elektronátvitel szerepe

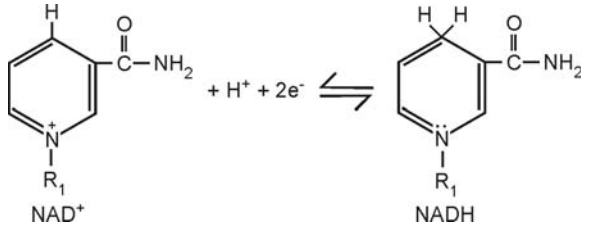
Szent–Györgyi egyik találó és szellemesen tömör fogalmazása nyomán az élet lényege, hogy elektronok nyugalmas helyet keresnek. Az elektronátvitel alapvető jelentőségű az energiatranszformációban *(II/1-1. ábra).* Az intermedier anyagcserében az elektronátvitelekben átvivő funkciójú molekula a piridin nukleotid NAD^+, $NADP^+$, illetve a flavin nukleotid FMN, FAD. Így az ATP/ADP foszforilációs ciklusa mellett redox ciklusaik az anyagcsere központi folyamatai.

A *NAD^+* (nikotinsavamid-adenin-dinukleotid) a katabolikus folyamatok oxidoredukcióiban tölt be meghatározó szerepet *(II/1-5. ábra).* A NAD^+ redox ciklusának sajátossága a két elektron egy proton átvitel *(II/1-6. ábra).* A katabolizmus során számos dehidrogenálás két hidrogénatom leadásával jár *(II/1-7. ábra);* a NAD^+ nikotinsavamid gyűrűje két elektront és egy protont (hidridion H^-) vesz fel, a maradék H^+ oldatba kerül. A NADH is egyszerre két elektront, illetve egy protont ad le oxidációja során.

Az anabolikus folyamatok egy része redukció, amihez elektrondonorra van szükség. Ez gyakran a *NADP*H+H^+ *(II/1-5. ábra).* Reduktív bioszintézisek esetében így a NADPH+H^+ a „redukáló erő”. A NAD^+ oxidált és redukált formában kb. 0,1–1 mM koncentrációban található a szövetekben, általában az oxidált forma irányába eltolva. A $NADP^+$ oxidált és redukált formájának összmennyisége kevesebb, kb. 0,01–0,1 mM, és a redukált forma koncentrációja a magasabb. Ez az elkülönültség lehetővé teszi a NADPH-függő, reduktív, bioszintetikus folyamatokat azokban az esetekben is, amikor ugyanebben az időben éppen fokozott NADH oxidációra van szükség energiahiányban az ATP-szintézis igénye miatt.



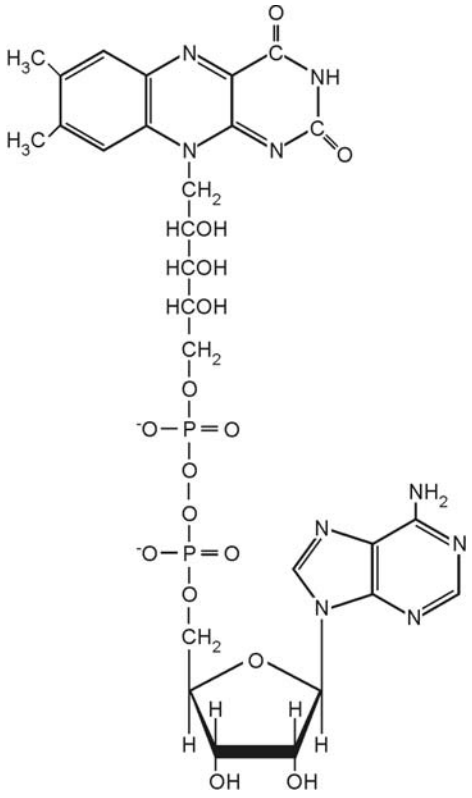
II/1-5. ábra
A NAD^+ szerkezeti képlete. A NADP esetében R: foszforilcsoport, NAD esetében R: H



II/1-6. ábra
A NAD^+ redox ciklusa



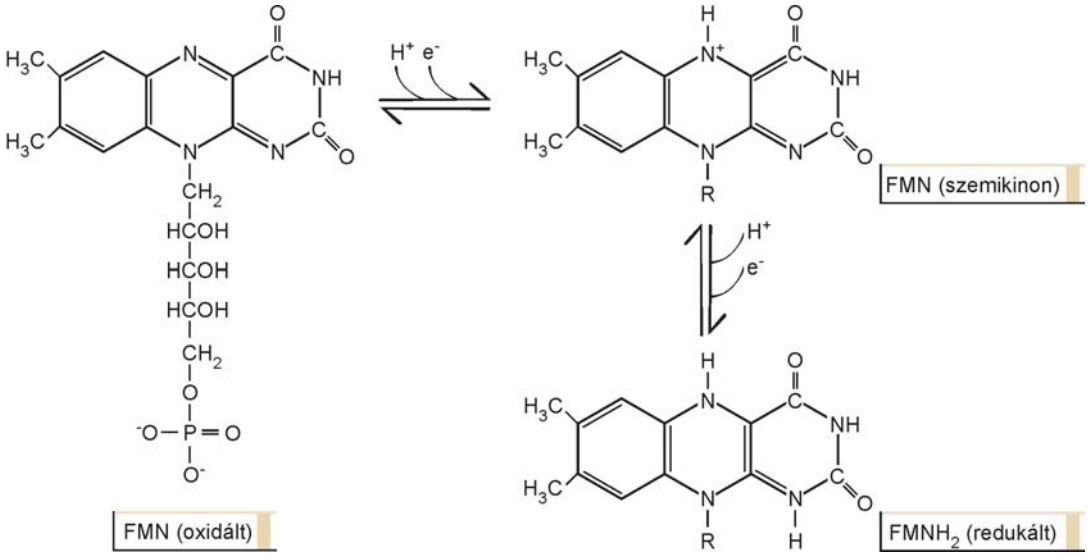
II/1-7. ábra
A NAD^+ függő dehidrogenázok általános reakciósémája



II/1-8. ábra
A FAD szerkezeti képlete

A *FAD* (flavin-adenin-dinukleotid) izoalloxazint, ribitolt, foszfátot és AMP-t, az *FMN* (flavin-mononukleotid) izoalloxazint, ribitolt, foszfátot tartalmaz *(II/1-8. ábra)*. Szemben a NAD oxidoredukciójában szereplő nikotinsavamid gyűrűvel a FAD redox ciklusában szerepet játszó izoalloxazin gyűrű egy és két hidrogént is képes felvenni, illetve leadni *(II/1-9. ábra)*. Ez lehetővé teszi a két lépésben történő elektrontranszfert, aminek az elektrontranszfer-láncokban (pl. mitokondriális légzési lánc, mikroszomális légzési lánc) igen nagy jelentősége van, mivel megteremti az átmenet lehetőségét az egy, illetve két elektront átvivő molekulák/molekulakomplexek között.

A redox reakciók enzimatikus és nem enzimatikus reakciók lehetnek a szervezetben. A piridin és flavin nukleotidok enzimatikus folyamatok kofaktorai. Ezekben az enzimatikus reakciókban a piridin nukleotidok zömmel koenzim, míg



II/1-9. ábra
Az FMN redox ciklusa

a flavin nukleotidok zömmel prosztetikus csoport szerepet töltenek be *(II/1-10. ábra).*



II/1-10. ábra
A FAD prosztetikus csoporttal működő dehidrogenázok általános reakciósémája

A sejtben, mint vizes oldatban végbemenő oxidoredukciók reakciópartnerei elektrondonor–elektronakceptor konjugált redox párokat képeznek. A csoportátviteli potenciál funkciónak ezekben az esetekben a standard redoxpotenciál felel meg *(II/1-3. táblázat).*

$$\Delta G^{0'} = -nF\,\Delta E_0$$

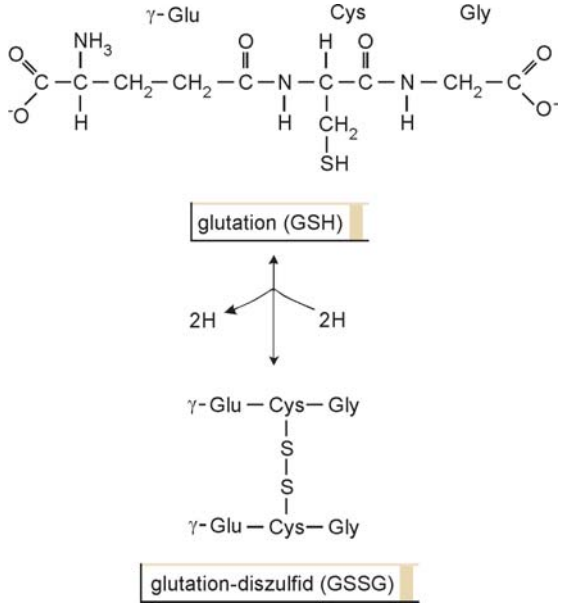
ahol *n* az átvitt elektronok száma, *F* a Faraday-állandó.

Ezzel jellemezhető az elektronátadás tendenciája az egyik redoxrendszerből a másikba. Az aktuális redoxpotenciál viszont az oxidoredukcióban részt vevő anyagok koncentrációitól függ a Nernst-egyenlet szerint.

További, kismolekulasúlyú elektronátvivők enzimatikus és nem enzimatikus folyamatokban játszhatnak szerepet, valamint nemcsak az elektron átvitelben, hanem más folyamatokban is részt vesznek. Ilyen a tripeptid *glutation* (GSH); glicint, ciszteint és glutaminsavat tartalmaz *(II/1-11. ábra).* A glutation hidrogéndonor; két glutationmolekula, két hidrogént átadva egy hidrogénakceptor molekulának, diszulfidkötéssel kapcso-

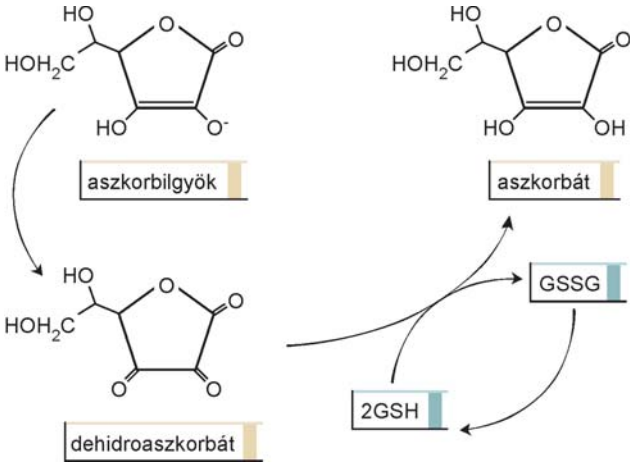
II/1-3. táblázat
Egyes metabolit konjugált elektrondonor-elektronakceptor párok által alkotott redoxelektródok standard redoxpotenciálja

	E_0' (kJ/mol)
szukcinát/α-ketoglutarát	-0,67
α-ketoglutarát/izocitrát	-0,38
$NAD^+/NADH+H^+$	-0,32
lipoát/dihidro-lipoát	-0,29
glutation-diszulfid/glutation	-0,23
$FAD/FADH_2$	-0,21
piruvát/laktát	-0,19
oxálacetát/szukcinát	-0,17
oxálacetát/malát	+0,03
citokróm$_b$ Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,08
citokróm$_{c1}$ Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,22
citokróm$_a$ Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,29
O_2/H_2O_2	+0,3
$1/2\ O_2/H_2O$	+0,82



II/1-11. ábra
A glutation redox ciklusa

lódik egymással, és így glutation-diszulfiddá alakul. A glutation/glutation diszulfid redox pár redox puffer funkciót is ellát például az endoplazmás retikulum intraluminális oxidatív környezetének biztosításában, vagy a GSH biotranszformációs folyamatok kofaktora is lehet. A glutation redox ciklusa kapcsolódhat az *aszkorbinsav* (C-vitamin) redox ciklusához *(II/1-12. ábra)*. Az aszkorbinsav biológiai szerepe komplex, és ma sem teljesen ismert. Külön érdekessége, hogy az aszkorbinsav egy elektron- és két elektrontranszferre egyaránt képes. Egy elektrontranszfer esetén aszkorbilgyök keletkezik. A biológia egyik rejtélye, hogy miért lett az aszkorbinsav emberben vitamin. Több enzimatikus és nem enzimatikus folyamat redox kofaktora.



II/1-12. ábra
A C-vitamin redox ciklusa

Elektronátvitelben a fentieken kívül enzimek, vagy enzimkomplexek prosztetikus csoportjaként, vagy annak részeként számos esetben a *hem, Fe- és Cu-ionok* is szerepet játszanak.

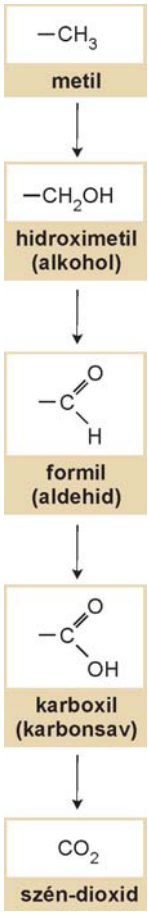
Az elektronátvivők így lehetővé teszik az elektrontranszfert:

1. direkt módon, amikor egyik molekuláról a másikra közvetlenül kerülnek át elektronok (pl. mitokondriális légzési lánc komponensei között),
2. hidrogénátvitellel, amihez hidrogéndonor és -akceptor szükséges (pl. szukcinát-dehidrogenáz által katalizált reakció),
3. hidridion formájában (pl. NAD^+-függő dehidrogenázok által katalizált reakciók).

Az elektrontranszfer és a foszforiltranszfer szabályozó szerepe a metabolizmusban

Az elektrontranszfer és a foszforiltranszfer állapota sejtszinten a metabolizmus érzékeny jellemzője. A metabolikus állapotot az átvivők – elsősorban az adenilátok foszforiláltsági és a NAD^+ redukáltsági – állapota; az ATP/ADP és a $NAD^+/NADH+H^+$ arányok jelzik. Közvetlen szabályozó szerepük számos enzimreakcióban jól ismert, gyakran allosztérikus regulátorok. Ezeket a szerepeket az intermedier anyagcsere megfelelő fejezeteinél tárgyaljuk.

A fenti hányadosok közvetett szabályozó szerepeit pontosan még ma sem ismerjük. Jelenleg az epigenetikai kutatásokban a kromatin állomány szerkezeti változásainak gén expressziót szabályozó szerepének tanulmányozása során merül fel a NAD^+/NADH-, illetve ATP/AMP-függő szabályozások lehetősége a metabolizmus–epigenetika relációban. Ismertek olyan enzimek, így az AMP-kináz vagy a NAD^+-dependens sirtuinok, amelyek kromatin fehérjék poszttranszlációs módosításaiban és ezzel közvetve a gén expresszió szabályozásában lehetnek jelentősek. Ez egy teljesen új kutatási terület az intermedier anyagcsere szabályozás szempontjából is. Demonstrálja, hogy az elektron- és foszforiltranszfer nemcsak a metabolizmus legfontosabb története, hanem szabályozója is egyben.

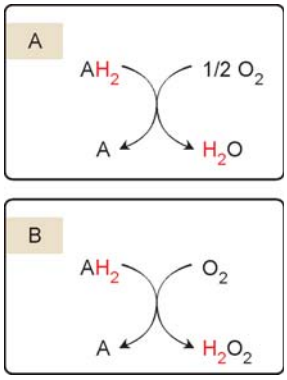


II/1-13. ábra
A szénatom oxidációja a metabolizmusban

II/1.3. OXIGÉN SZEREPE A HATÉKONY ENERGIATRANSZFORMÁCIÓBAN

Mivel az oxidáció elektronvesztés, így azonnal felvetődik annak kérdése, hogy a hatékony energiatranszformációban mi az elektronakceptor. Az energiatranszformációban a végső elektronakceptor a molekuláris oxigén.

2,5 milliárd évvel ezelőttre teszik, hogy az evolúció során megjelentek azok a szervezetek, amelyek a napenergiát szénkötések kémiai energiájává voltak képesek átalakítani. A fotoszintézis folyamatában CO_2 és H_2O glukózzá alakul a napenergia terhére – melléktermékként pedig oxigén képződik. Az atmoszférában megjelenő, majd emelkedő oxigénkoncentráció megváltoztatta a bioszférát. 1,5 milliárd éve jelentek meg a mitokondriumokkal rendelkező eukarioták, amelyek teljessé tették az energia ciklust: a legteljesebb, így leghatékonyabb energia transzformáció akkor valósul meg, amikor egy vegyület katabolizmusában CO_2 és H_2O keletkezik az oxidoredukciók sorozata végén. A biológiai oxidáció során a C-atom így több lépésben teljesen oxidálódik, míg az oxigén redukálódik vízzé *(II/1-13. ábra).* Mivel ennek feltétele az oxigén jelenléte, így az oxigén-homeosztázis fenntartása létfontosságú.



II/1-14. ábra
Oxidázok által katalizált reakciók általános sémája

Oxidoreduktázok a metabolizmusban

Az oxidoredukciók döntő többsége enzimek – oxidoreduktázok – által katalizált folyamat. Az oxidoreduktázokat négy csoportba soroljuk: oxidázok, dehidrogenázok, hidroperoxidázok, oxigenázok. Az elektron transzfert redox aktív prosztetikus csoportjaik, így *hem, FMN, FAD, fémionok* biztosítják.

Oxidázok

Oxidázok által katalizált reakció esetén az elektron akceptor az oxigén. Két alcsoportjuk van:

Egyik alcsoportjuk legismertebb képviselője a terminális oxidáció utolsó lépését katalizáló citokróm-oxidáz, amely több alegységből álló *hemoprotein*. Az oxigén teljes redukcióját biztosító négy elektron transzferében nemcsak a két hem Fe^{2+}/Fe^{3+} átalakulás, hanem két hemhez asszociált egy-egy $Cu^{+}/^{2+}$ ion is részt vesz. A reakció végterméke víz *(II/1-14/A ábra).*

Az oxidázok egy másik csoportját *flavoproteine*k alkotják, két elektront visznek át az oxigénre. Számos esetben az elektrontranszferben fém is részt vesz. Ilyen az L-aminosav-oxidáz, a nukleotid-anyagcsere fontos enzime, a molibdéntartalmú xantin- oxidáz, vagy a szintén molibdént és nem-hem vasat tartalmazó aldehid-dehidrogenáz. A reakció végterméke hidrogén-peroxid *(II/1-14/B ábra).*



II/1-15. ábra
Dehidrogenázok által katalizált reakciók általános sémája

Dehidrogenázok

A dehidrogenázok által katalizált reakcióban nem vesz részt oxigén *(II/1-15. ábra*). A redox

transzfert NAD^+, $NADP^+$, FAD, citokrómok bonyolítják. Az intermedier anyagcsere dehidrogenázai nemcsak a szubsztrátjaikra, hanem a koenzimeikre is gyakran specifikusak: pl. *NAD^+*-dal működő izocitrát-dehidrogenáz a mitokondriumban, a *$NADP^+$*-vel működő izoforma a citoszolban található. A NAD^+ dehidrogenázok a katabolizmus enzimei (pl. citrátkör), a $NADP^+$-vel működők általában a reduktív bioszintézisben játszanak szerepet (pl. zsírsavszintézis).

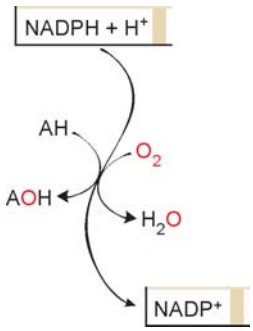
A NAD(P) $^+$-vel működő dehidrogenázok elsősorban szén és oxigén, a FAD-dal működő dehidrogenázok két szénatom között hoznak létre kettős kötést.

Hidroperoxidázok

Az emberi sejtekben expresszálódó hidroperoxidázok olyan reakciókat katalizálnak, amelyekben az elektronakceptorok peroxidok. A *peroxidázok* és a *kataláz* tartozik az oxidoreduktázoknak ebbe a kategóriájába. Az antioxidáns védelemben játszott szerepükről van a legtöbb ismeretanyag.

Oxigenázok

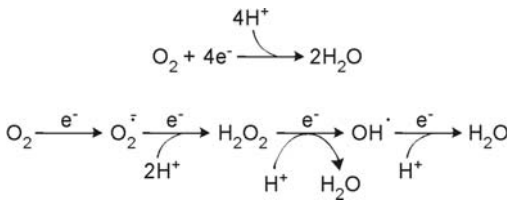
Az oxigenázok az oxigén beépülésével járó oxidoredukciókat katalizálják. Amennyiben mindkét oxigénatom egy szubsztrát molekulába épül be *dioxigenázok*, amennyiben a két oxigén atom különböző szubsztrátokat oxigenál, *monooxigenázok* által katalizált a folyamat. Dioxigenázok például az aminosav-anyagcserében – triptofán-dioxigenáz vagy az eikozanoid-anyagcserében – lipoxigenáz vesznek részt. Monooxigenázok olyan reakciókat katalizálnak *(II/1-16. ábra),* amelyekben az egyik oxigén atom beépül az oxidálandó szubsztrátba, a másik pedig vízzé redukálódik. A monooxigenázokat ezért kevert funkciójú oxigenázoknak is nevezik. Több részből álló membránkötött elektron transzfer rendszer részei, mint például a mitokondriális szteroid szintézisben szereplő monooxigenázok, vagy a drog metabolizmus citokróm P450 rendszere az endoplazmás retikulum membránban (mikroszomális légzési lánc). Prosztetikus csoportjuk a hem. Az oxigén kötését a hem-Fe oxidáltsági állapota megszabja; Hem-Fe^{2+} esetében kötődik az oxigénmolekula, azonban hem-Fe^{3+} esetén nem. A működésükhöz szükséges elektrondonor a NAD(P)H.



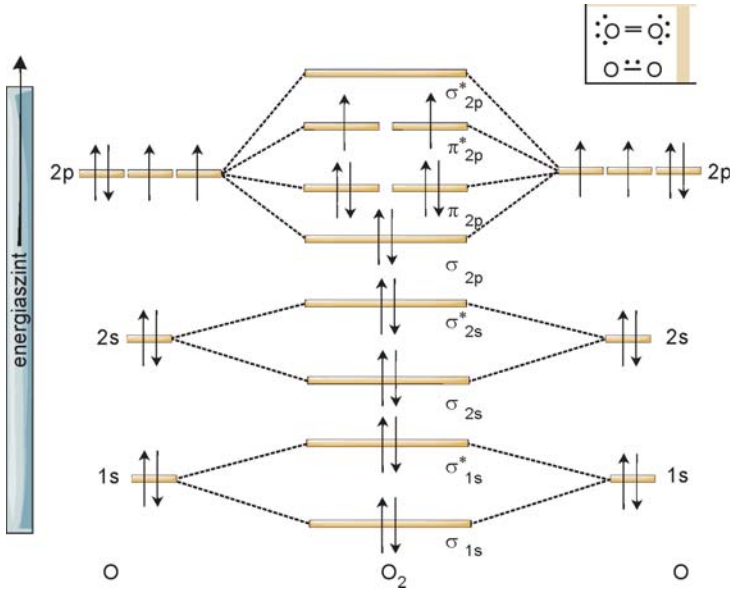
II/1-16. ábra
$NADP^+$ függő monooxigenázok által katalizált reakciók általános sémája

Az oxigén tökéletlen redukciója

Az oxigénmolekula redukciója vízzé 4 elektrontranszferrel járó reakció (lásd citokróm-oxidáz a terminális oxidációban). Ez azonban nem történik mindig egyetlen reakcióban *(II/1-17. ábra*). Az oxigén molekula elektron szerkezete *(II/1-18. ábra)* vonzza az elektronokat, így az részlegesen is könnyen redukálódhat. Másrészt, az elektrontranszferrel járó enzimatikus folyamatrendszerek – mitokondriális, mikroszomális légzési láncok – során az elektronok egy része kikerülhet, és spontán, nem enzimatikus reakcióba léphet oxigénnel. A tökéletlenül redukált oxigénszármazékok (*ROS: reaktív oxigén species*) – részben molekula orbitálon párosítatlan spinű elektronokkal rendelkező szabad gyökök – vonzzák magukhoz a további elekt-



II/1-17. ábra
Az oxigén redukciója



II/1-18. ábra
Alapállapotú (triplet) oxigénmolekula

ronokat, így erélyes oxidálószerek. A vonzandó elektronok forrásai a környezetük sejtmembrán-, plazmalipoprotein lipidjei, nukleinsavai, fehérjéi. Így ROS hatására ezek a molekulák oxidálód(hat)nak, ennek következtében biológiai funkcióik változhatnak, károsodhatnak.

A biológiailag jelentős ROS-molekulák és keletkezésük

Az enzimatikus és spontán folyamatokban képződő *szuperoxid anion* ($O_2^{\bullet -}$), a természetes és mesterséges (például gamma-) sugárzásokban, víz hasításával képződő *reaktív hidroxil gyök* ($OH^{\bullet}$), az enzimatikus folyamatokban képződő egyik legjelentősebb szabályozó molekula $NO^{\bullet}$, valamint a nem szabad gyök H_2O_2, amely mind enzimatikusan, mind spontán képződhet tekinthetők a legfontosabb biológiai szereppel rendelkező ROS-nak. Emellett azonban számos, más fiziológiai és patológiai szereppel bíró ROS képződik. Alapvető konfliktus biológiai funkcióik megítélésekor és interpretációjában az, hogy spontán és enzimatikus úton is létrejöhetnek.

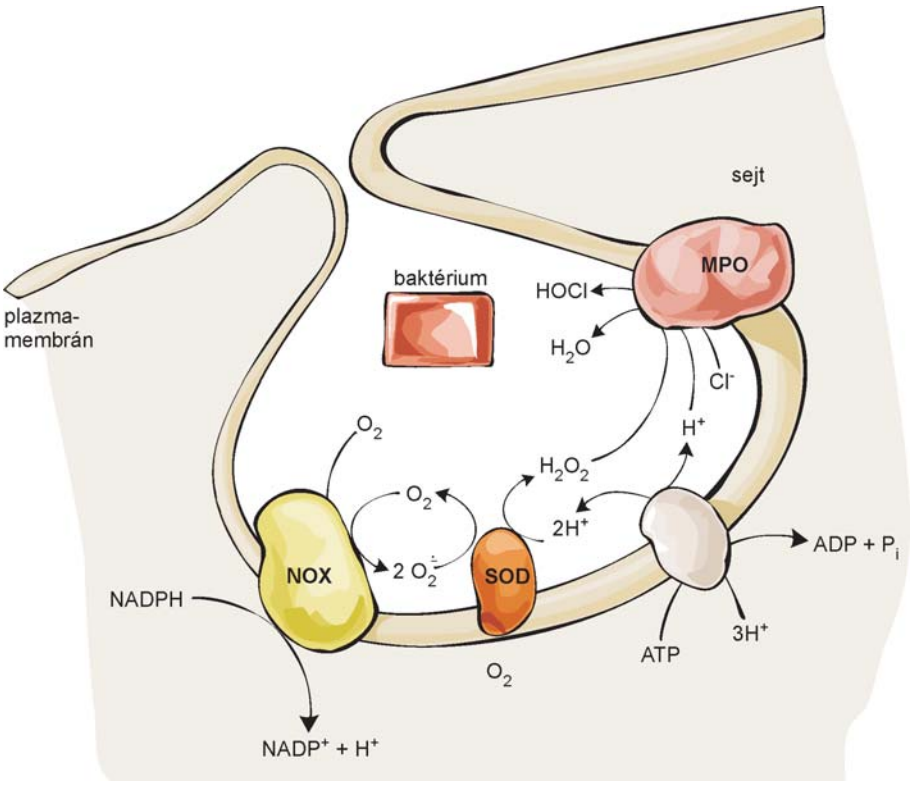
Reaktív molekulák (RS: reaktív species fogalma nemcsak a ROS-ra korlátozódik. Emellett például RNS: reaktív nitrogén speciesek – NO -, RCS: reaktív klór speciesek – hipoklórossav HClO – és mások is ismertek.) spontán keletkezése rendkívül veszélyes egy pontosan szabályozott rendszerben. Nem véletlen, hogy biológiai rendszerekben a ROS fogalma kezdetben a toxikológiával, a ROS okozta károsodásokkal társult. Logikus következtetés volt ebből, hogy emiatt a károsító hatás miatt kellett kialakulniuk a ROS-t eliminiáló, hatásait ellensúlyozó antioxidáns mechanizmusoknak. Korábban szinte egyeduralkodó volt a „kémiai baleset" elmélet. A *nem enzimatikus úton történő ROS képződés*ben az Fe atom igen fontos. Ismert a különböző Fe-komplexek – elsősorban a nukleotid-Fe komplexek (pl ADP-Fe^{2+}) – szerepe a ROS képződésben. Gyakorlatilag minden oxigént „fogyasztó" folyamatban – hemoglobin oxigén szállítása, légzési lánc stb. – $O_2^{\bullet -}$ is keletkezik. Mai ismereteink sze-

rint normális állapotban a belélegzett levegő 1–5%-a $O_2^{\bullet-}$ lesz. Ez évente kb. 2 kg-nak felel meg. A ROS képződés azonban jelentősen megnőhet számos patológiai folyamatban. Többek között a kémiai karcinogenezisben, atherosclerosisban, coronariabetegségekben, gyulladásokban tulajdonítanak patológiai jelentőséget a ROS képződésnek. A legfontosabb, nem enzimatikus ROS-képző folyamatok az alábbiak:

$$Fe^{2+} + O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \text{ (Fenton-reakció)}$$
$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet} \text{ (Haber–Weiss-reakció)}$$

Az *enzimatikus ROS képződés*ben a ROS mintegy „fegyverként”, más organizmusoknak kárt okozó molekulaként szintetizálódhat. A fagocitózisban, plazma-membrán kötött rendszerben a *NADPH-oxidáz* (NOX) $O_2^{\bullet-}$-t képez. A NOX flavoprotein, elektron transzfer lánc része és a károsító, ROS képző folyamatok a mieloperoxidáz révén RCS hipoklórossav képződésben folytatódnak *(II/1-19. ábra)*. A NOX hiánya vagy működési zavara az általában rossz prognózisú krónikus granulomatózus betegség (CGD) kialakulásához vezethet, amelyet visszatérő, makacs fertőzések jellemeznek.

$O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 termelődhet – melléktermékként – számos enzimatikus reakcióban, így a már említett xantin oxidáz, vagy flavin oxidáz, aminosav oxidázok által katalizált folyamatokban. Ezekben az enzimatikus reakciókban is flavoprotein, illetve fémionok (Mb, Co) szerepelnek a ROS-képződésben.



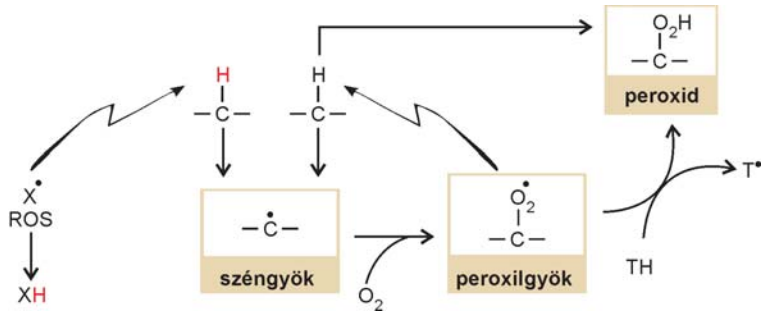
II/1-19. ábra
A NADPH oxidáz rendszer működése fagoszómában
(NOX: NADPH-oxidáz, SOD: szuperoxid-dizmutáz, MPO: mieloperoxidáz)

Az enzimatikus, ROS képző folyamatok egy másik – jelenleg talán a legintenzívebben kutatott – részében a képződő ROS-nak valamilyen biológiai szabályozó funkciója van. Az NO-szintáz tulajdonképpen egyetlen fehérje komplex-molekulába „tömörített" elektron transzfer rendszer, amelynek a termékeként, az egyszerre oxigén és nitrogén származék, NO képződik. Az NO funkcióit más fejezet tárgyalja. Tökéletlenül redukált oxigén származékok tehát nemcsak a károsodásokkal asszociálhatók. Élettani jelentőségű ROS-képződés is történik, melynek jelátviteli és más funkciója is lehet.

A ROS károsító hatásai

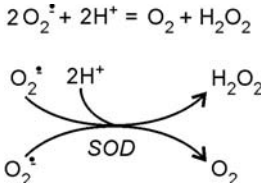
A ROS keletkezése után többféle reakcióba léphet. A másik ROS-sal való kapcsolat lehetőségére példa az $O^{2\cdot-}$ és NO által képzett *peroxinitrit*- ($ONOO^-$) képződés, amely számos kóros folyamat résztvevője. Nemcsak fehérje károsító hatású, hanem spontán további ROS képző (pl. aktív hidroxil-, nitrónium-ion) is. Ugyanakkor két ROS egymással történő reakciója eliminációs mechanizmus is lehet, így például a szuperoxid-anion szuperoxid-dizmutáz, illetve a hidrogén-peroxid kataláz általi lebontása.

A ROS talán legismertebb károsító hatása a *lipid-peroxidáció*. Lényege a hidrogén elvonás láncreakcióban egy többszörösen telítetlen (membrán vagy lipoprotein LDL) zsírsav oldalláncban *(II/1-20. ábra).* Ennek során folyamatosan szén gyök képződik, oxigén épül be a zsírsav láncba és a peroxidok képződése membránfehérje károsodásokat, fluiditás és permeabilitás zavarokat okoz. Többek között ez történik stroke-ban, atherosclerosisban; patogenetikai szerepe részletesen tanulmányozott.



II/1-20. ábra
A lipidperoxidáció folyamata. Az E-vitamin leállítja a lipid-peroxidációt. (TH: tokoferol, T• : tokoferilgyök)

Nukleinsav bázisok változásai, DNS-ben például timin-glikol vagy 8-hidroxiguanin képződés és ezek károsító – például mutagén – hatásai jól ismertek aktív hidroxil gyök „támadásban". Egészséges embereken 100 nmol/nap mennyiségben mutathatók ki ROS következtében oxidált bázis származékok



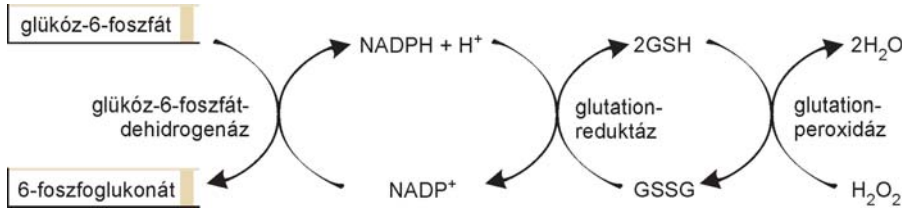
II/1-21. ábra
A szuperoxid-dizmutáz által katalizált reakció

A ROS eliminálása, az antioxidáns védelem mechanizmusai

Az antioxidáns védelem a redox egyensúly meghatározója. A ROS-eliminálás mechanizmusai között az *antioxidáns enzimek* alapvetőek.

A *szuperoxid-dizmutáz* (SOD) által katalizált reakcióban szuperoxid eliminálódik *(I/1-21. ábra)*. Különböző SOD izoenzimek expresszálódnak különböző kompartmentekben: Cu,Zn-SOD a citoszolban és a mitokondrium membrán közti térben, Mn-SOD a mitokondrium mátrixban.

Hidrogéndonor szükséges a *peroxidázok* működéséhez. Ide tartozik a szelén tartalmú *glutation peroxidáz,* az antioxidáns védelem igen jelentős enzime. Kofaktora a redukált GSH *(II/1-11. ábra).* Szelén-hiányban ismert a peroxid szint növekedése. A glutation redox ciklusának zavarát, a glutation reduktáz elégtelen hidrogén ellátását okozó glukóz-6-foszfát dehidrogenáz hiányban (lásd fejezet, pentóz-foszfát út) vörösvérsejt membrán károsodás, hemolízis (pl drog indukált hemolitikus anémia) lép fel a ROS felhalmozódás miatt *(II/1-22. ábra).* A *peroxiredoxinok* peroxidokat redukálnak. Fehérjét alkotó Cys-SH oxidálódik Cys-OSH-vá, majd az oxidálódott aminosav részint tovább oxidálódhat, illetve diszulfid hidat képez. A peroxiredoxinok akár jelátviteli mediátorként is szereplő H_2O_2 szenzorok, illetve azt redukáló enzimek.



II/1-22. ábra
A glutation-peroxidáz által katalizált reakció és a pentóz-foszfáz út közti kapcsolat

Az ubikviter *kataláz* hemoprotein; elsősorban a peroxiszómák tartalmazzák. Az alábbi reakciót katalizálja:

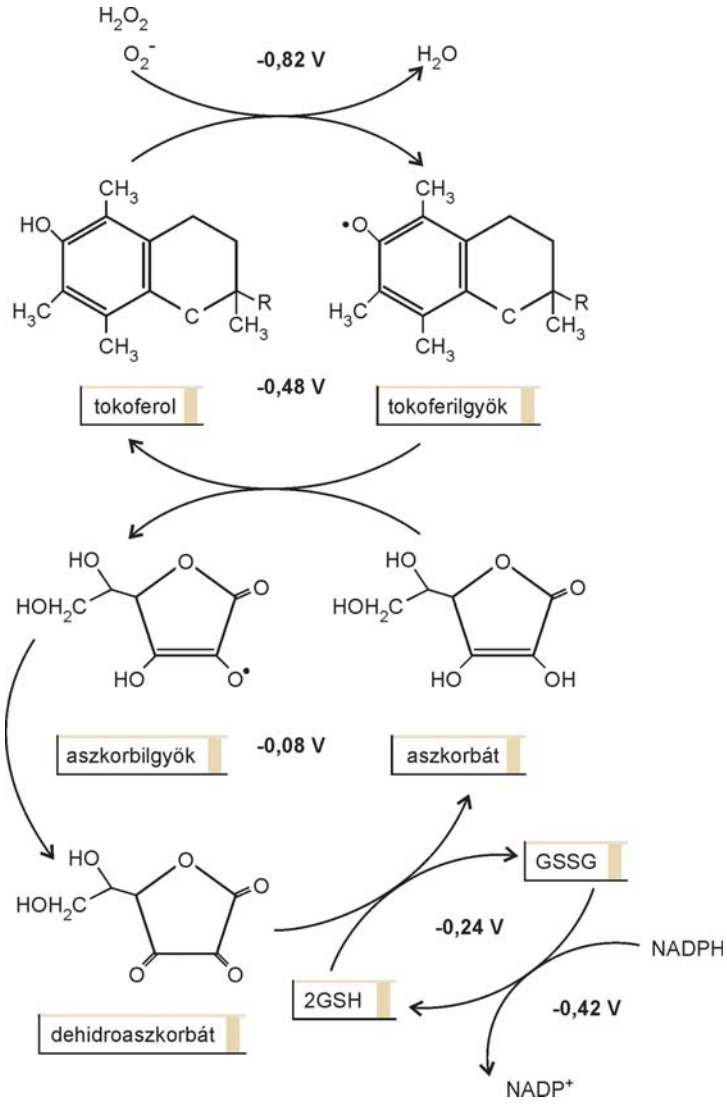
$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Az *endogén antioxidáns hatású molekulák* részben hidrogén donorként hathatnak. Közöttük kiemelkedő jelentőségű zsíroldékonysága miatt az *E-vitamin*, tokoferol. Membránokban, lipoproteinekben hidrogén donorként képes a lipidperoxidáció láncreakciójának leállítására – ezért peroxil gyök „scavenger" *(II/1-20. ábra).* A vízoldékony antioxidáns védelem részei a hidrogén átvivő *C-vitamin* és a *glutation*. Az ubikinon is antioxidáns. A különböző antioxidáns redox párok standard redoxpotenciál különbségei alapján összeálló Halliwell-Asada ciklus a legfontosabb endogén antioxidánsok enzimatikus és nem enzimatikus kapcsolatrendszerét demonstrálja *(II/1-23. ábra).*

Az intermedier anyagcsere egyes végtermékeinek – bilirubin, urát – is antioxidáns funkciót tulajdonítanak, és képződésük ilyen aspektusaira számos evolúciós teória is létezik.

A *plazmakomponensek* között a ROS képződésében is részt vevő fémionokkal (Fe, Cu, Zn) való komplexkötő képessége miatt a transzferrin, cöruloplazmin, albumin, haptoglobin, metallotionein számít jelentős antioxidáns hatásúak.

Egyes növényi hatóanyagok antioxidáns hatása jól dokumentált. Többek között a béta karotin, paradicsomban a napfény hatására termelődő likopin, a vörösbor- és keserű csokoládé-flavonoidok antioxidáns hatása közismert.



II/1-23. ábra
Redox ciklusok kapcsolata az antioxidáns védelemben, a Halliwell–Asada-ciklus

A ROS-képződés és az antioxidáns védelem közti egyensúly megbomlásakor *oxidatív stressz* alakulhat ki. Az elégtelen antioxidáns védelem miatt bekövetkező oxidáns hatások patogenetikai szerepét a legkülönbözőbb kórképekben bizonyították, feltételezik. Az oxigén ellátottság zavara oxigénhiányos, hipoxiás állapotokban, majd a helyreálló oxigén ellátás okozta változások szinte valamennyi sebészeti beavatkozás (ischaemia – reperfúzió szindróma), átmeneti keringési akadály (infarctus, stroke) után kialakul. Más részről az oxigén részvételével a különböző sejt organellumokban zajló folyamatok (pl. mitokondrium – terminális oxidáció, endoplazmás retikulum – diszulfidhidak létrejötte) változó intenzitása és ennek következtében változó oxigén fogyasztása is eltérő mennyiségű ROS-képződést eredményez, amihez az antioxidáns védelemnek alkalmazkodnia kell(ene). ROS-képződés fokozódást anyagcsere betegségektől (pl. diabetes mellitus), neurodegeneratív megbetegedésekig (pl. Parkinson-kór, amyotrophiás lateralsclerosis) számos kórképben észleltek és ennek patogenetikai jelentőséget tulajdonítanak. Ezen alapul a különböző antioxidánsok és gyökfogók terápiás alkalmazása, illetve az ilyen típusú étrend kiegészítők propagálása. Az öregedésnek, mint ismétlődő oxidatív stresszek következményének elmélete ismert, jelentős irodalma van a fizikai terhelés és a ROS termelődés összefüggéseinek. Az antioxidáns ubikinon mennyiségét a rendszeres testedzés például növeli, míg az életkor előrehaladtával viszont csökkenő ubikinon szinteket mértek. Többen úgy tartják, hogy az antioxidáns védelem a hosszú élet titka és az E-vitamint egyesek öregedés ellenes vitaminnak is nevezik.

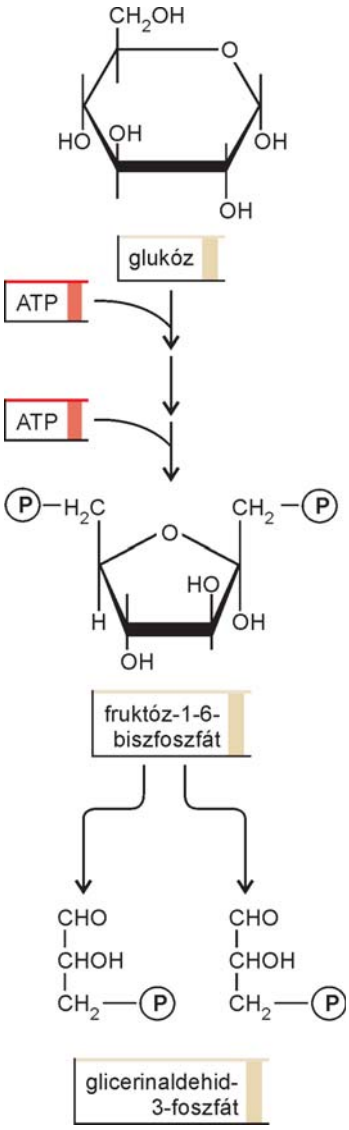
Az oxigénellátottság és a ROS-képződés az egész metabolizmus szempontjából döntő jelentőségű. A korábbi főként toxikológiai kérdéseket a regulációs szemlélet váltotta fel: mindkettő szabályozási szempontból is az érdeklődés középpontjába került az elmúlt évtizedekben.

Az oxigénellátottság a meghatározó az egyik legkiterjedtebb gén expressziós transzkripciós szintű szabályozási rendszerben. Az oxigén szenzorként működő, az oxigént szubsztrátként használó oxigenázok (pl. prolin-hidroxilázok) által katalizált poszttranszlációs módosítások a HIF (hypoxia inducible factor) transzkripciós faktoron közvetítik – a tudomány jelen állása szerint – a legtöbb génre kiterjedő – a glikolízistől kezdve a vörösvérsejt képzésen keresztül az érrendszerig – eukarióta szabályozási rendszert.

A ROS-képződés fiziológiai szerepe akár a jelátvitelben, akár a fizikai igénybevételekhez történő alkalmazkodásban, vagy más területeken szemléletileg is alapvető fontosságú. Ezen belül, az NO-t nem számítva, elsősorban a H_2O_2 szerepeit kutatják igen intenzíven mind fiziológiai, mind toxikológiai szempontból. Az új ismeretek az egész redox egyensúlynak, egyes antioxidáns enzimek – pl. peroxiredoxinok – funkcióinak is új értelmezést adnak. A peroxidok sokrétű, köztük alternatív oxigén donor, funkcióit régóta ismerik, így a peroxid szenzor fehérjék szerepének megismerése – benne az átmeneti ROS-képződéssel – új jelátviteli és fehérje-fehérje kölcsönhatási mechanizmusok felfedezéséhez vezethet el.

II/2.
Glikolízis

Csala Miklós



II/2-1. ábra
A glikolízis befizető fázisa

A glikolízis az egyik legősibb anyagcsere-folyamat, amely az összes emberi (és a legtöbb nem emberi) sejtben megtalálható. Neve a görög glykys (édes) és lysis (hasítás) szavakból ered, és legpontosabban úgy definiálhatjuk, hogy a glukózmolekula intracelluláris lebontása háromszénatomos α-ketosavakra (piruvát) vagy α-hidroxisavakra (laktát). A folyamat teljes egészében a citoplazmában zajlik, az összes résztvevő enzim szolúbilis citoszolikus fehérje. E fejezetben a glikolízist mint a glukóz teljes, energiahasznosító lebontásának első stádiumát tárgyaljuk, melynek folytatása a piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált reakció, a citrátkör és ezekkel kapcsolatban az oxidatív foszforiláció. A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása szorosan összefügg, és nem választható el a szénhidrát-anyagcsere egészétől, ezért a reguláció leírására ott kerül sor.

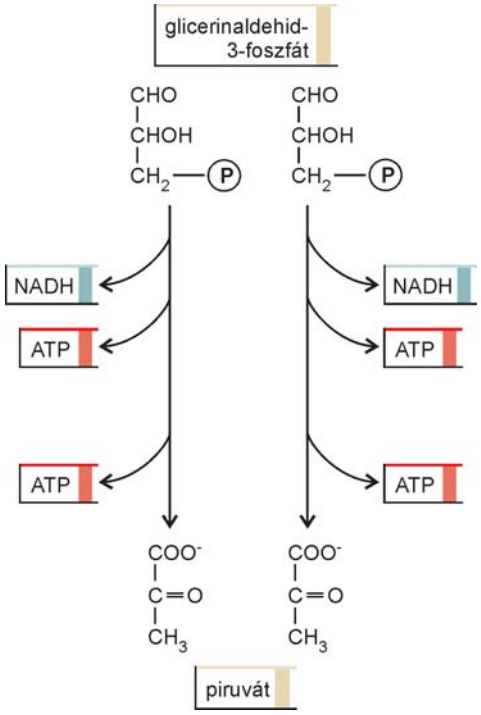
II/2.1. A GLIKOLÍZIS FÁZISAI

A teljes folyamatot két, jól elkülönülő fázisra bontva érdemes és szokás tárgyalni. A két szakasz az intermedierek oxidáltsága, az energiahasznosítás, valamint a szénatomok száma vonatkozásában egyaránt markánsan különbözik.

Az első fázis a hatszénatomos glukóz két háromszénatomos trióz-foszfátra való kettéhasítását jelenti *(II/2-1. ábra)*. A termékek, a ketotrióz dihidroxi-aceton és az aldotrióz glicerinaldehid foszfát-észterei, egymásba reverzíbilisen átalakulhatnak, és köztük egyensúly alakul ki, vagyis teljesen egyenértékűek. A glikolízisnek ebben a részében nincs oxidáció, vagyis a szénatomok oxidációs száma összességében változatlan, és egyetlen elektronszállítóra sem kerülnek elektronok. Ráadásul ATP-termelés sem történik, sőt, glukózonként két ATP befektetésére van szükség a foszforilált triózok létrehozásához. Ez a fázis tehát a – későbbi nyereség reményében történő – invesztíció szakasza, és ezért *„befizető” fázis*nak is szokás nevezni.

A második fázis a glicerinaldehid-3-foszfát – csupa háromszénatomos intermedieren keresztüli – átalakítása piruváttá *(II/2-2. ábra)*. Annak érdekében, hogy a glikolízis egyenlegét meg lehessen vonni, e szakasz be- és kimenőit mindig duplán vesszük figyelembe, hiszen egy glukóz molekulából két triózfoszfát jött létre. Már az első lépésben oxidáció történik, amely elektronokat juttat NAD^+-ra. A keletkező NADH magában hordozza az ATP-termelés

lehetőségét, amennyiben redukáló erejét az oxidatív foszforiláció fogja felhasználni. Ezenfelül a második fázisban közvetlenül is hasznosul a szabadenergia, vagyis szubsztrát szinten is keletkezik ATP. Látható, hogy az első szakasz befektetése kamatostul megtérül a folytatásban, amit ezért *„kifizető" fázis*ként is emlegetnek.



II/2-2. ábra
A glikolízis kifizető fázisa

Az első fázis lépései
(II/2-3. ábra)

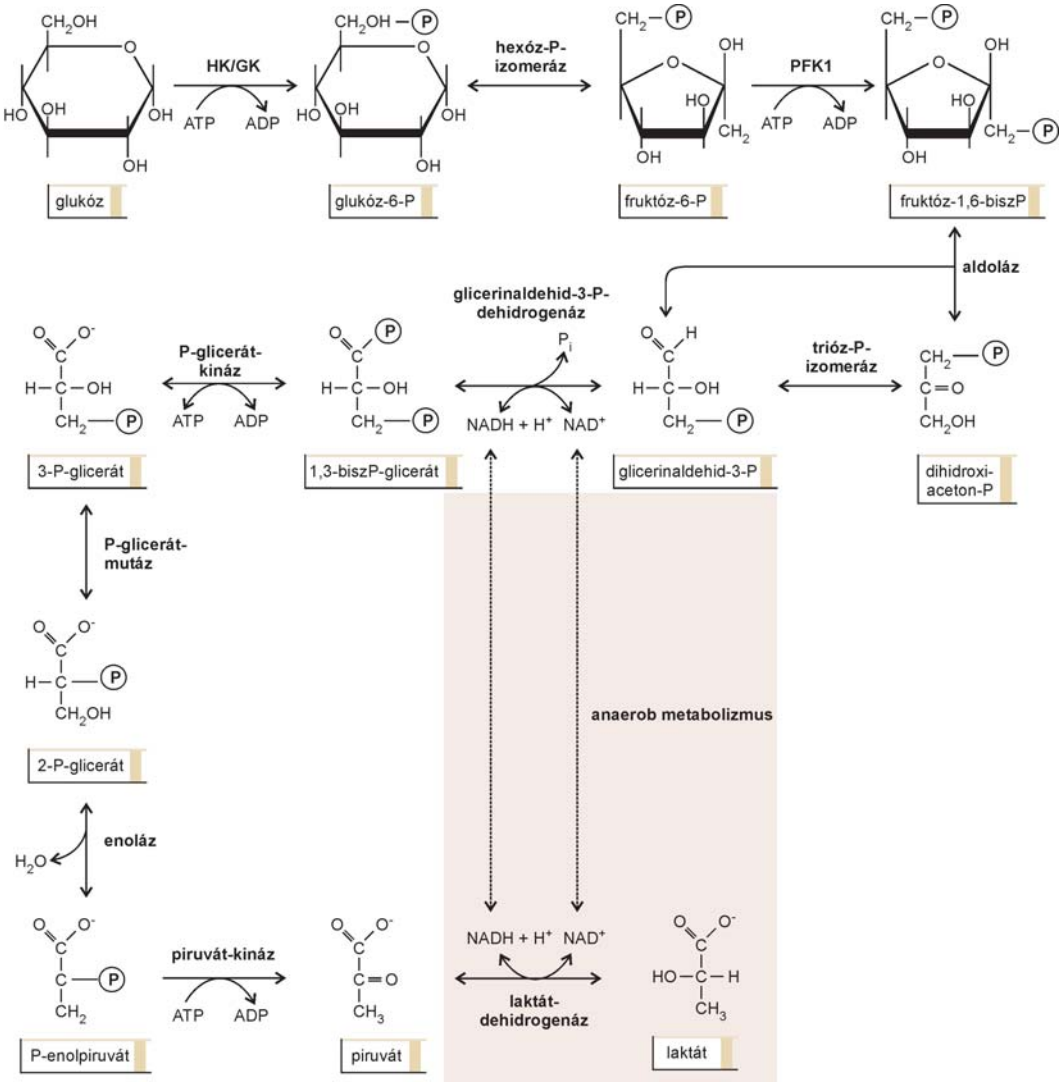
Hexokináz–glukokináz (HK–GK)

A sejtbe kerülő glukóz molekulák gyakorlatilag egyetlen lehetséges metabolikus átalakulása a 6-os szénatomon történő foszforiláció, melyet *ATP felhasználásával* a hexokináz vagy a glukokináz enzim katalizál. A másik lehetőség, hogy a (felesleges) glukóz szorbitollá redukálódik, majd fruktózzá oxidálódik (poliol útvonal), valójában csak hiperglikémia esetén válik jelentőssé. A glukózfoszforiláció egy makroerg foszforil-csoport áthelyezését jelenti alacsony csoportátviteli potenciállal rendelkező észter-kötésbe, ezért jelentős negatív szabadenergia-változással járó, *irreverzíbilis* reakció. A glukokináz – nevének megfelelően – glukózra specifikus, magas K_M értékkel (kis affinitással) jellemezhető enzim. Ugyanazokban a sejtekben (pl. hepatocita, inzulintermelő β-sejt, hypothalamus jóllakottságközpontjának neuronjai, bélhámsejtek) található, amelyekben a GLUT2 transzporter, és együtt a sejt glukózérzékelő képességét biztosítják. A többi sejt hexokinázt tartalmaz, amely fruktózt és mannózt is foszforilál. Glukóz iránt nagy affinitása van, és saját terméke, a glukóz-6-foszfát (G6P) allosztérikusan gátolja.

A bélből való fel-, illetve a vesetubulusokból történő visszaszívástól eltekintve, a sejtek facilitált (passzív) diffúzióval, GLUT transzporteren keresztül veszik fel a glukózt (és más monoszaharidokat) az extracelluláris térből. Mivel a transzport iránya csak az aktuális gradiens függvénye, amennyiben a sejtnek (akármilyen célból) szüksége van glukózra, azt foszforilációval csapdába kell ejtenie. A keletkező G6P, a sejt által megkaparintott glukóz, még több metabolikus útvonal (a glikolízis mellett pl. glikogénszintézis, pentóz-foszfát útvonal, aminocukrok szintézise, glukuronidáció stb.) kiindulópontja. A HK/GK által katalizált reakció tehát nem a glikolízis, hanem a glukózfelhasználás elkötelező lépése.

Foszfohexóz-izomeráz

Az azonos szénatomszámú aldózok és ketózok szerkezeti izomerjei egymásnak, ezért az 1-es és 2-es szénatomokhoz kapcsolódó atomok átrendezésével egymásba alakíthatók, és az ezt katalizáló enzimet izomeráznak nevezzük. Mivel nincs jelentős különbség a G6P és a fruktóz-6-foszfát (F6P) szabadenergia-szintje között, az izomerizáció egyensúlyra vezető, reverzíbilis reakció.



II/2-3. ábra
A glikolízis reakciólépései

Foszfofruktokináz-1 (PFK1)

Az első szénatomon, az előző lépésben kialakult primer alkoholos hidroxilcsoport foszforilációja frutóz-1,6-biszfoszfát (F1,6BP) keletkezését eredményezi. Az *ATP-ről áthelyezett* foszforilcsoport átviteli potenciálja jelentősen csökken, ezért a reakció *irreverzíbilis*. Innen már nincsenek jelentősebb elágazások, a F1,6BP sorsa nagyjából megpecsételődött. Ráadásul a glikolízis innentől kezdve, egészen az utolsó lépésig csupa reverzíbilis reakcióból áll: a F1,6BP egyensúlyban van a foszfoenol-piruváttal. A PFK1 tehát a glikolízis sebességmeghatározó és valóban elkötelező lépését katalizálja, így a folyamat szabályozására nyilvánvalóan a legalkalmasabb (lásd szénhidrát-anyagcsere fejezet).

Aldoláz(ok)

A mindkét végén foszforilált F1,6BP kettéhasítása eredményeként az első három szénatomból dihidroxi-aceton-foszfát, a második háromból pedig glicerinaldehid-3-foszfát jön létre. Az enzim neve arra utal, hogy a szekunder alkoholos hidroxilcsoportok aldol kötésként is felfoghatók, és egy ilyen aldol lízise történik, amikor a négyes szénatomon aldehid-csoport szabadul fel. A reverzíbilis reakciót katalizáló A-, B- és C-aldolázok különböző szövet-, illetve sejttípusokban találhatók, aminek a glikolízis szempontjából nincs igazán jelentősége. Kiemelendő azonban, hogy a fruktóz-anyagcsere intermedierjeként keletkező fruktóz-1-foszfátot csak a májban működő aldoláz B képes hatékonyan hasítani (lásd szénhidrát-anyagcsere fejezet).

Foszfotrióz-izomeráz

Ugyanazt a fajta reakciót katalizálja, mint a foszfohexóz-izomeráz. A dihidroxi-aceton-foszfát és a glicerinaldehid-3-foszfát reverzíbilis egymásba alakulása egyensúlyt alakít ki az első fázis termékei között. Mivel a második fázis az utóbbi intermedier átalakulását jelenti, az egyensúly ilyenkor ebbe az irányba tolódik, és tulajdonképpen az első fázis két glicerinaldehid-3-foszfát keletkezésével jár.

A második fázis lépései
(II/2-3. ábra)

Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

Kapcsolt reakcióval indul a második fázis, ugyanis a szubsztrát aldehid-csoportjának (exergonikus) oxidációja fedezi az újonnan keletkező karboxil-csoport anorganikus foszfáttal való (endergonikus) kondenzációjának energiaigényét. Mivel a domináns történés az oxidáció, és ez egy elektronszállító (NAD^+) redukcióját eredményezi, az enzimet dehidrogenáznak hívjuk. A termék 1,3-biszfoszfoglicerát (1,3BPG) 1-es szénatomján most kialakult kondenzált kötés vegyes savanhidrid, melynek csoportátviteli potenciálja az ATP γ-foszfátjáéhoz hasonló. Létrejöttéhez nagyjából annyi energiára van szükség, amennyit a redox reakció felszabadít, így a nettó szabadenergia-változás már közel van a nullához, és a folyamat reverzíbilis. Kezdetét vette tehát a befektetések hozamának behajtása: a NADH az oxidatív foszforilációban, a most kialakult makroerg foszfát pedig a szubsztrát szintű foszforilációban hasznosítható ATP-termelésre.

Foszfoglicerát-kináz

Az első *szubsztrát szintű foszforiláció* a glikolízisben, amikor az 1,3-biszfoszfoglicerát 1-es szénatomjáról áthelyeződik a foszforil-csoport egy ADP β-foszfátjára, vagyis ATP keletkezik. Mivel a kötéstípus (savanhidrid) és így a csoportátviteli potenciál sem változik lényegesen, a reakció reverzíbilis. A 3-foszfoglicerát megmaradt foszfátja már nem makroerg (észter-) kötésben van.

Foszfoglicerát-mutáz

A foszforilcsoport molekulán belüli áthelyeződése (mutálása) nem jár a szabadenergia jelentős változásával, hiszen a 2-foszfoglicerát is egyszerű észter kötést tartalmaz, ezért a reakció reverzíbilis. Az enzim katalitikus mennyiségű (μM-os kon-

centrációjú) 2,3-biszfoszfoglicerát (2,3BPG) jelenlétét igényli, melyet 1,3BPG-ből hoz létre a sejt, de ez az oldalág csak a vörösvértestekben befolyásolja számottevően a glikolízis energiamérlegét (lásd később).

Enoláz

Az enzim a hidratázok családjába tartozik, és ennek megfelelően egy vízmolekula reverzíbilis ki-belépését katalizálja, amely a 2-foszfoglicerát – foszfoenol-piruvát (PEP) átalakulást eredményezi. A foszforil-csoport kötéstípusa megváltozik, ugyanis a PEP-ben nem (szekunder) alkoholhoz, hanem enolhoz (telítetlen szénatomon elhelyezkedő hidroxilhoz) kapcsolódik. Az enol-észter – az egyszerű észterrel szemben – makroerg kötés. A jelenség remekül példázza, hogy a makroerg kötés, amelyet (helytelenül) magas energiájú kötésnek is szokás nevezni, nem rendelkezik a többinél magasabb kötési energiával, hiszen akkor az enoláz által katalizált reakció nem lehetne reverzíbilis. A makroerg kötés hidrolízisekor vagy a csoport áthelyezésekor bekövetkező nagyobb szabadenergia-felszabadulás a kapcsolódó spontán lépéseknek (pl. tautomer átrendeződés, savi disszociáció, elektron-delokalizáció) köszönhető.

Piruvát-kináz (PK)

A második *szubsztrát szintű foszforiláció* – az elsővel ellentétben – irreverzíbilis, ugyanis a PEP csoportátviteli potenciálja nagyjából kétszerese az ATP γ-foszfátjáénak. Más szavakkal, a PEP foszforil-csoportjának eltávolítása (lényegében az enol-észter hidrolízise) kétszer akkora szabadenergia felszabadulásával jár, mint amennyit a csoport ADP β-foszfátjára való helyezése (a foszfátok kondenzációja savanhidriddé) igényel, így e kapcsolt reakció nettó $\triangle G$ értéke jócskán a negatív tartományba esik. A foszfáttól megfosztott enol-piruvát azonnal átrendeződik a stabilabb tautomer (oxo-)piruváttá, amit a glikolízis végtermékének tekinthetünk (kivéve, ha anaerob glikolízisről beszélünk, lásd később). Az aktív piruvát-kináz hatékonyan „elszívja” a glikolízis egyensúlyban lévő intermedierjeit (a két trióz-foszfáttól egészen a PEP-ig). Ezért minden olyan esetben, amikor – akár glukoneogenezishez (májsejt), akár 2,3-biszfoszfoglicerát szintéziséhez (vörösvértest) – szükség van ezen intermedierekre, a piruvát-kinázt gátolni kell. Ez magyarázza, hogy a piruvát-kináz májsejtekben, illetve vörösvértestekben található két izoenzime (PK-L és PK-R) szabályozható (részleteket lásd a szénhidrát-anyagcsere fejezetben), míg a vázizomban működő izoforma (PK-M) esetében erre nincs szükség.

II/2.2. A GLIKOLÍZIS FOLYTATÁSA

Bár a piruvátot a glikolízis végtermékének tekinthetjük, a monoszaharidok lebontása semmiképpen nem áll meg ezen a ponton. A glukózból kinyerhető szabadenergia túlnyomó része még benne foglaltatik a két piruvát molekulában. Érthető tehát, hogy – amennyiben a körülmények ezt lehetővé teszik – a katabolizmus a piruvát további, ATP-termeléshez kapcsolt (oxidatív) bomlásával folytatódik. Erre akkor van lehetőség, ha a sejt *aerob anyagcserét* folytat. Ennek két feltétele, hogy tartalmaz mitokondriumokat, és oxigén is kellő mennyiségben áll rendelkezésére; amit egybefoglalva úgy is megfogalmazhatunk, hogy működik az oxidatív foszforiláció. Ilyenkor a glukóznak akár mind a hat szénatomja szén-dioxiddá oxidálódhat, mintha elégettük volna, és maximális az energiabetakarítás.

Az aerob glikolízis nettó egyenlete:

$$\text{glukóz} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ \text{piruvát} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{NADH} + 2\ H^+ + 2\ H_2O$$

Az aerob anyagcsere nem csak a piruvát, hanem a glikolízisben termelt NADH ATP-termelés céljából való felhasználásához is elengedhetetlen, hiszen éppen a NADH-oxidáció az oxidatív foszforiláció egyik fő profilja. *Anaerob metabolizmus*ú sejtekben (amelyek nem tartalmaznak működőképes mitokondriumot és/vagy nem jutnak elegendő oxigénhez) tehát a glikolízis három terméke közül csak az ATP felhasználható, sőt szükséges, a piruvát és a NADH hasznavehetetlen. A továbbalakíthatatlan produktumok előállítása nem csupán felesleges, de – megoldás hiányában – pillanatok alatt lehetetlenné tenné az ATP-termelést is. A kisebbik probléma, hogy a piruvát felhalmozódása progresszív ozmotikus duzzadást okozna, ezért mindenképpen meg kell szabadulni tőle. A fő gond, hogy a sejt korlátozott mennyiségű, folyamatosan egymásba alakuló NAD^+-NADH-készlettel rendelkezik, ezért a NADH (vissza)oxidációja mindenképpen szükséges a glikolízis folytatásához: a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz NAD^+-szükségletének biztosításához. Mivel a piruvát és a NADH ekvimoláris mennyiségben termelődik, kézenfekvő megoldás a NADH piruváttal való oxidálása. Ezt a reakciót katalizálja a minden humán sejt citoplazmájában jelen lévő *laktát-dehidrogenáz* (LDH) enzim. Működése a legtöbb prokarióta és eukarióta sejt glukózfermentációját teszi lehetővé, és a glikolízist teljesen önálló, anaerob ATP-termelő folyamattá teszi *(II/2-3. ábra)*.

Az anaerob glikolízis nettó egyenlete:

$$\text{glukóz} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i \rightarrow 2\ \text{laktát} + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

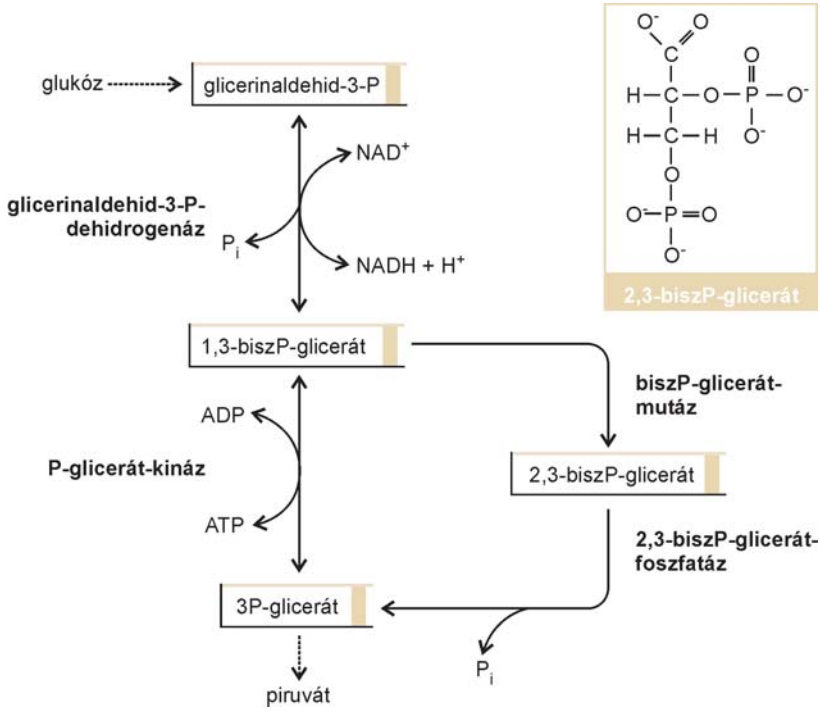
A NADH oxigéntől független oxidációja a glikolízis kofaktorellátásának problémáját megoldja, de az ozmotikus sokk elkerülése érdekében a termelődő laktáttól meg kell szabadulnia a sejtnek. A szekréciót lehetővé tevő transzporter(ek) megtalálhatók minden sejt plazmamembránjában, így az anaerob sejtek az extracelluláris térbe, illetve vérbe ürítik a tejsavat (vagyis laktátot és protonokat). A laktát kiváló tápanyag az aerob sejtek számára, melyek ugyanezen transzporterek segítségével veszik azt fel. Mivel a laktát lebontása mindenképpen oxidatív folyamat, az anaerob sejtek csak elodázzák az oxigénfelhasználást, vagyis később törlesztendő kölcsönt vesznek fel energiaigényük fedezésére, ezért a jelenséget oxigénadósságnak nevezik.

II/2.3. GLIKOLÍZIS A VÖRÖSVÉRTESTBEN – A 2,3BPG ÚTVONAL

A glikolízis második fázisának az 1,3BPG és a 3-foszfoglicerát közötti szakasza alternatív útvonalon is folyhat, amely lehetővé teszi a 2,3BPG termelését és lebontását, ugyanakkor kihagy egy szubsztrát szintű foszforilációs lépést *(II/2-4. ábra)*.

Biszfoszfoglicerát-mutáz

Az 1,3BPG 1-es szénatomján (makroerg savanhidrid kötésben) lévő foszforilcsoport molekulán belüli áthelyeződése a 2-es szénatomra a szabadenergia jelentős csökkenésével jár, hiszen az új helyen egyszerű észter kötés jön létre, ezért a reakció *irreverzíbilis*. A 2,3BPG tehát nem rendelkezik magas csoportátviteli potenciállal, ezért egyik foszfátját sem tudja ADP-nek átadni. Termelésének ára tehát molekulánként egy ATP-vel egyenértékű szabadenergia.



II/2-4. ábra
A 2,3BPG útvonal

2,3-Biszfoszfoglicerát-foszfatáz

ATP-szintézishez ugyan nem elegendő a 2,3BPG 2-es szénatomján lévő foszfát csoportátviteli potenciálja, ahhoz azonban igen, hogy az észter kötés, foszfatáz által katalizált hidrolízise *irreverzíbilis* legyen. A keletkező 3-foszfoglicerát már az általános útvonal intermediere, tehát a két, egymást követő, egyirányú lépés csupán a foszfoglicerát-kinázt kerüli meg.

Ez a mellékág minden sejtben kimutatható, hiszen a foszfoglicerát-mutáz enzimmolekulák beindítása („priming") egy-egy 2,3BPG molekulát igényel, de intenzitása elhanyagolható a fent bemutatott fő útvonalához képest. A vörösvértestekben azonban van a 2,3BPG-nek egy másik, ettől teljesen független szerepe, ugyanis stabilizálja a deoxi-hemoglobin T konformációját, ami a szigmoid O_2-telítési görbe feltétele. Ez a funkció nagyságrendekkel magasabb (a körülményektől függően változó, néhány mM-os) 2,3BPG-koncentrációt igényel, és ennek megfelelően a mellékág intenzitása is több százszorosa-ezerszerese a más sejtekre jellemzőnek, ami már az energiamérleget is jelentősen befolyásolja. Speciális funkciója miatt, a 2,3BPG termelése és lebontása a vörösvértestekben a glikolízistől független szabályozás alatt áll. Magaslaton való tartózkodás (alacsonyabb parciális O_2 nyomás), krónikus légzési elégtelenség, anémia stb. esetén a 2,3BPG koncentrációja emelkedik, és így a hemoglobin több oxigént tud leadni a szöveteknek.

II/2.4. A GLIKOLÍZIS ENERGIAMÉRLEGE

A glikolízis alapvetően energiahasznosító, lebontó folyamat, ezért érdemes megvizsgálni, mennyit hoz a glukóz lebontása. Ez jelentősen függ attól, hogy anaerob vagy aerob anyagcseréjű sejtben történik. Előbbi esetben csak a szubsztrát szintű foszforilációval, míg utóbbi esetben az oxidatív foszforilációval is számolhatunk.

Szubsztrát szintű foszforiláció

A glukóz lebontása molekulánként két ATP befektetésével indul (HK/GK és PFK1), ami duplán megtérül a kétszer két ATP szubsztrát szintű termelődésekor (foszfoglicerát-kináz és PK, mindkettő kétszer). Ha csak a szubsztrát szintű foszforilációt számoljuk, a tiszta nyereség glukózonként 2 ATP, és ez aerob-anaerob metabolizmustól független. Jellegzetes kivételként említhető a vörösvértestekben zajló (anaerob) glikolízis, amely a számottevő intenzitású, 2,3BPG útvonal következtében kettőnél is kevesebb ATP-t termel glukózonként. A glikolízis szubsztrát szintű foszforilációjának matematikájából következik, hogy a glukóz 2,3BPG-n keresztüli lebontása egyáltalán nem termel ATP-t („pénz az ablakban"). Ha pl. a 2,3BPG termelése annyira felgyorsul, hogy e mellékág sebessége eléri a fő útvonalét, akkor az ATP-termelés glukózonként 1 ATP.

Oxidatív foszforiláció

A glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz által létrehozott két NADH-val azonban már csak aerob metabolizmusú sejtekben számolhatunk, mert azokat anaerob sejtek kényszerűségből laktáttermelésre fordítják. Attól függően, hogy a NADH elektronjai a lehetséges útvonalak melyikén jutnak a légzési láncba, egyenként 1,5 vagy 2,5 (összesen 3 vagy 5) ATP szintézisét teszik lehetővé (lásd az oxidatív foszforilációról szóló fejezetben).

Az anaerob glikolízis energiamérlege tehát 2 ATP/glukóz, az aerobé pedig 5 vagy 7 ATP/glukóz. Fontos azonban megjegyezni, hogy az aerob anyagcseréjű sejtek teljesen lebonthatják a piruvátot is, és ez teszi lehetővé a glukózban lévő energia legnagyobb részének hasznosítását. Ahogy az a megfelelő fejezetekből kiderül, a piruvát-dehidrogenáz 2 NADH-t, a citrátkör pedig 6 NADH-t, 2 ubiquinolt és 2 GTP-t termel glukózonként. A 8 NADH egyenként 2,5, összesen 20 ATP; a 2 ubiquinol egyenként 1,5, összesen 3 ATP, a 2 GTP pedig 2 ATP keletkezését teszi lehetővé. A glikolízis aerob folytatása tehát további 25 ATP keletkezésével jár, így az összesített energiamérleg 30 vagy 32 ATP/glukóz.

Érdemes összevetni a glukóz teljes oxidációjának (égésének) szabadenergia-változását (-2880 kJ/mol) a 30-32 ATP csoportátviteli potenciáljával, ami (1 mol ATP-re 30,5 kJ-lal számolva) összesen 915–976 kJ/mol. Könnyen kiszámítható, hogy az aerob glukózkatabolizmus energiahasznosításának hatásfoka 32-34%-os, és a felszabaduló energia 66–68%-a vész el hő formájában. Az anaerob glikolízisnek ugyanakkor semmi köze az elégetéshez, hiszen a glukóz nem is oxidálódik. A 2 ATP termeléséhez csupán a molekula kettéesése szolgáltat szabadenergiát. A két laktátmolekula – aerob sejtben történő – lebontása mindenképpen az LDH által katalizált oxidációval kezdődik, ami két piruvátot és két NADH-t eredményez. Ezek a fent leírtaknak megfelelően 25 ATP (két piruvát) + 3 vagy 5 ATP (két citoplazmai NADH), összesen 28-30 ATP termelését teszik lehetővé. Látható tehát, hogy ilyenkor az aerob glukózlebontás ATP-hozadéka (30-32 ATP/glukóz) oszlik meg – kissé arány-

talanul – a résztvevő anaerob és aerob sejt között. Az anaerob sejtre jutó 2 ATP a kinyerhető összes mennyiségnek (30-32 ATP) csupán 6–7%-a, ami kevésnek tűnik, de megbecsülendő, hiszen az anaerob humán sejtek semmilyen egyéb forrásból nem tudnak ATP-t előállítani.

Az anaerob és aerob glikolízis ATP-termelő képessége közti jelentős különbség jól magyarázza az úgynevezett Pasteur-effektust. A *Louis Pasteur* által leírt jelenség lényege, hogy oxigén jelenlétében az élesztőgombák lassabban fogyasztják a glukózt (holott gyorsabban nőnek), mint oxigénmentes környezetben. Az anaerob anyagcserére kényszerített élesztőnek nagy sebességgel kell a glukózt etanollá és szén-dioxiddá fermentálnia (ami csak egy dekarboxilációval tér el a tejsavtermelő, humán fermentációtól), hiszen molekulánként csupán 2 ATP-t tud kinyerni. Ha az oxidatív folyamatait is működésbe léptetheti, akkor lassíthatja a glukózfogyasztást, mert azonos mennyiségből mintegy tizenötször több hasznos energiához jut.

II/3.
Piruvát-dehidrogenáz komplex

Csala Miklós

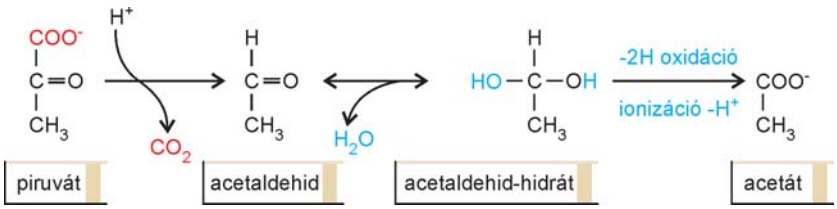
A glikolízis végtermékének tekinthető piruvát nemcsak glukózból keletkezik, mert az összes monoszaharid lebontása a glikolízisbe torkollik. Ugyancsak piruvát termelődésével jár egyes aminosavak (Ala, Gly, Ser, Cys, Thr, Trp) katabolizmusa, illetve a laktát oxidációja is. A citoplazmában képződött piruvát csak úgy hasznosulhat az ATP-termelésben és a lipid- (zsírsav-, koleszterin-) szintézisben, ha bekerül a mitokondriális mátrixba, és ott oxidatív dekarboxilezéssel acetil-KoA-vá alakul. Ez az átalakulás az intermedier anyagcsere egyik központi és kulcsfontosságú folyamata, melyet a piruvát-dehidrogenáz komplex (PDC) katalizál. Ehhez persze aerob metabolizmusra (működőképes mitokondrium és oxigén jelenléte) van szükség.

A mitokondrium szerkezetét, kompartmentjeit és membránjainak tulajdonságait más fejezetek tárgyalják. Itt csupán annyit említünk, hogy a külső membrán piruvát számára szabadon átjárható; a membránközti térből pedig specifikus piruvát – hidroxidion antiporter (ami piruvát – proton szimporternek is tekinthető) segítségével tud bejutni a mátrixba. Itt kétféle átalakulásával kell számolni: karboxilálódik (lásd piruvát-karboxiláz a citrátkörről szóló fejezetben) vagy oxidálódva dekarboxilálódik.

A piruvát oxidatív dekarboxilációja

Az α-ketosavak karboxilcsoportjának eltávolítása (dekarboxiláció) akár hő hatására is spontán végbemegy. Ilyenkor az alfa-szénatom, mely eredetileg szekunder volt, primerré válik (nem is alfa többé), és ennek megfelelően ketocsoportja aldehidcsoporttá alakul. A piruvát közönséges dekarboxilációja tehát acetaldehidet (és szén-dioxidot) eredményez. Az acetaldehid – mint az aldehidek általában – meglehetősen reakcióképes, és oxidációval könnyen acetáttá alakul. Összegezve: a piruvát oxidatív dekarboxilációja acetáttá egy veszélyes intermedieren (acetaldehid) keresztül végbemenő, és jelentős mértékű szabadenergia-felszabadulással járó, kétlépéses reakció *(II/3-1. ábra)*.

Biológiai rendszerekben ezt a folyamatot célszerű olyan útvonalra terelni, amely kivédi az acetaldehid toxicitását, és ugyanakkor lehetővé teszi a szabadenergia egy



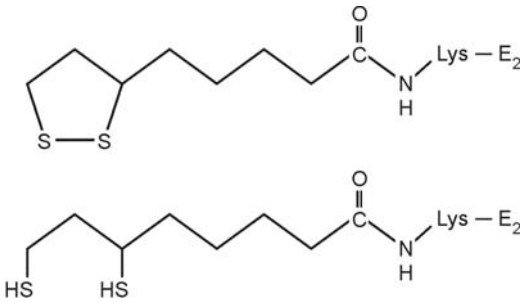
II/3-1. ábra
A piruvát oxidatív dekarboxilációja

részének hasznosulását is. Ezt a feladatot látja el a PDC. Az általa katalizált oxidatív dekarboxiláció során az acetaldehid biztonságos formában, az enzimhez kovalensen kötve keletkezik, és így is alakul acetáttá. Ráadásul az acetát sem szabadul fel, hanem végül KoA-hoz kapcsolódik, és az acetil-KoA-ban kialakult tioészter az ATP savanhidridjével egyenértékű makroerg kötés (melynek létrehozása rendszerint 2 ATP felhasználását igényli). Ez már önmagában jelentős energiahasznosítást jelent, de ehhez hozzáadódik még, hogy a komplex NAD^+-ot alkalmaz oxidálószerként, melynek redukciójával 2,5 ATP termeléséhez felhasználható NADH keletkezik.

A piruvát-dehidrogenáz komplex építőelemei

A piruvát oxidatív dekarboxilációja több lépésben zajló folyamat, melyet három, sajátosan együttműködő enzim katalizál. Mindhárom enzim tartalmaz egy-egy prosztetikus csoportot, melyek közül kettő (a tiamin-pirofoszfát, TPP és a flavin-adenin-dinukleotid, FAD) B-vitamin-származék. A komplex metabolikus enzimei és részüket képező prosztetikus csoportjai a következők:

E1: piruvát-dehidrogenáz, TPP
E2: dihidrolipoil-transzacetiláz, liponsav
E3: dihidrolipoil-dehidrogenáz, FAD



II/3-2. ábra
Az E2-höz kötött liponsav(amid), és annak redukált változata, a dihidrolipoamid

A három metabolikus enzim mindegyike több példányban van jelen a komplexben. Eukarióta sejtekben jellemzően 60 db ikozaéderes elrendeződésű E2 fehérje képezi a struktúra központját, amelyhez nagyszámú E1 és E3 fehérje kapcsolódik. Ez a felépítés lehetővé teszi, hogy az E2 komponensek hosszú liponsavamidcsoportjai *(II/3-2. ábra)* lengőkarként hol az egyik, hol a másik enzim aktív centrumába nyúljanak be (lásd katalizált folyamat). A komplex részét képezi még két szabályozó enzim is: a piruvát-dehidrogenáz-kináz (vagy PDC-kináz) és a piruvát-dehidrogenáz-foszfatáz (vagy PDC-foszfatáz), melyek az E1 fehérje kovalens módosítása révén befolyásolják a piruvát–acetil-KoA átalakulás sebességét (lásd szabályozás).

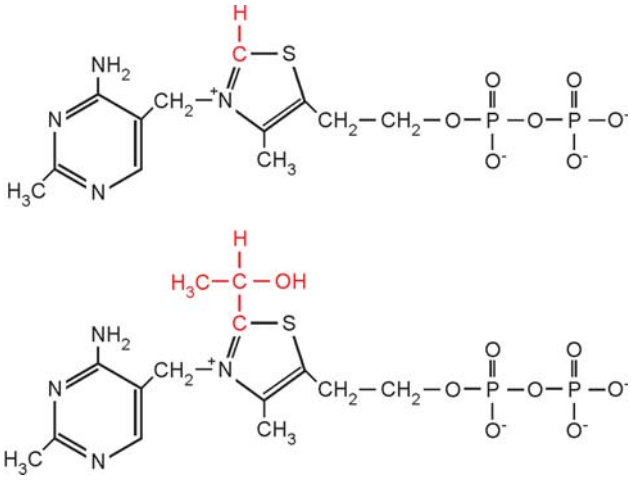
A PDC bemutatott architektúrája és lejjebb bemutatandó működési mechanizmusa néhány másik – szintén oxidatív dekarboxilációt katalizáló – dehidrogenázban is fellelhető. Ilyen az α-ketoglutarát-dehidrogenáz (citrátkör) és az elágazó α-ketosav-dehidrogenáz (Val, Ile, Leu matabolizmusa). A hasonlóságon túlmenően, az ilyen enzimkomplexek E3 alkotórésze ugyanaz (azonos gén terméke), és csupán a szubsztrátra specifikus E1 és E2 fehérjék különbözők.

A piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált folyamat

Piruvát-dehidrogenáz

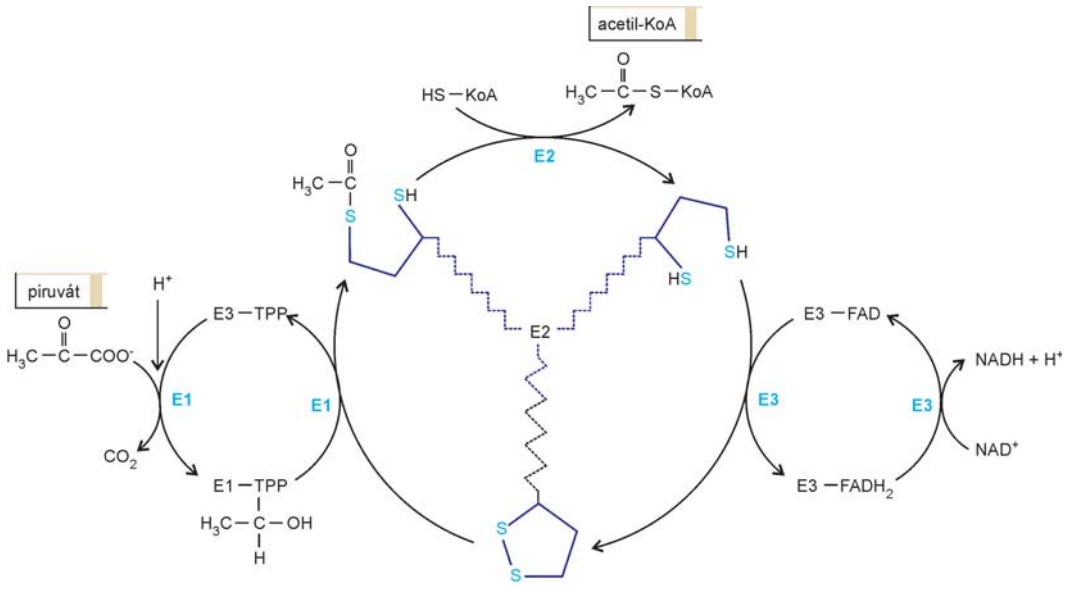
Az E1 aktív centrumában található TPP egyik szénatomja olyan különleges környezetben van, amely elősegíti, hogy a hozzá kapcsolódó hidrogénatom protonja

disszociáljon, vagyis e savas metenil karboanionná alakuljon. Amikor a negatív töltésű szénatom nukleofil addícióba lép a piruvát alfa-szénatomjával, a keletkező intermedier azonnal dekarboxilálódik, és a TPP-hez kötve hidroxietilcsoport jön létre *(II/3-3. ábra)*. A hidroxietilcsoport egy kovalensen kötött acetaldehidnek felel meg, hiszen ugyanilyen szerkezet jönne létre, ha a TPP közvetlenül acetaldehiddel addicionálódna. Hátra van még a hidroxietilcsoport (acetaldehid) oxidációja acetilcsoporttá (acetáttá).



II/3-3. ábra
A TPP és a hozzá kapcsolódó acetaldehid (hidroxietilcsoport) szerkezete

Az E2 liponsavamid karja ilyenkor benyúlik az E1 aktív centrumába, és diszulfidjának egyik kénatomjára átveszi a hidroxietil-csoportot *(II/3-4. ábra)*. Ez persze csak akkor történhet meg, ha a diszulfid két tiolcsoporttá (dihidrolipoamid) redukálódik, amihez az elektronokat éppen a hidroxietil-csoport biztosítja. Ez tehát azt jelenti, hogy a csoportátvitel és az elektrontranszfer szimultán történik. Valódi kapcsolt reakcióról van szó, mert a spontán végbemenő redox reakció fedezi az acetilcsoporttá oxidált intermedier és a tiolcsoporttá redukált enzimrész közötti makroerg (tioészter) kötés kialakulásának energiaigényét.



II/3-4. ábra
A piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált folyamat

Dihidrolipoil-transzacetiláz

Az oxidatív dekarboxiláció már az E1 enzim aktív centrumában teljes egészében végbement – most még az E2 enzimet kell visszaalakítani eredeti állapotába, vagyis 1) el kell távolítani róla a terméket, 2) a dihidrolipoamidot újra diszulfiddá kell oxidálni. A termék eltávolítása egyszerű csoportátvitel, vagyis acetiltranszfer, melyet már az E2 katalizál. Karja most átlendül saját aktív centrumába, ahol az acetilcsoport KoA tiolcsoportjára helyeződik át, ami nem változtatja meg a kötés típusát, az továbbra is makroerg tioészter marad *(II/3-4. ábra).*

Dihidrolipoil-dehidrogenáz

Az E3 funkciója, hogy az E2 dihidrolipoamidját visszaoxidálja, és a két elektront NAD^+ koenzimnek adja át. Ez a redox reakció két lépésben, az enzim FAD-jának közvetítésével megy végbe *(II/3-4. ábra).* Érdemes megemlíteni, hogy az E-FAD/E-$FADH_2$ redox pár a NAD(P)$^+$/NAD(P)H pároknál rendszerint magasabb redoxpotenciállal jellemezhető, így a biokémiai elektrontranszferek (pl. citokróm-reduktázok, glicerin-3-foszfát-dehidrogenázok, glutation-reduktáz, tioredoxin-reduktáz, nitrogén-monoxid-szintáz stb.) tipikusan a NAD(P)H felől az E-FAD felé irányulnak. Ez az oka annak is, hogy a légzési láncba flavoproteinek közvetítésével juttatott elektronok kénytelenek kihagyni az I. komplexet (lásd oxidatív foszforiláció). Mivel azonban a FAD prosztetikus csoportként elválaszthatatlan része az enzim aktív centrumának, redoxpotenciálja jelentős mértékben függ az adott fehérje által kialakított környezettől. Ezzel magyarázható, hogy a dihidrolipoil-dehidrogenáz működésekor az E3-$FADH_2$ – szokatlan módon – NAD^+-ot tud redukálni.

A PDC által katalizált reakció nettó egyenlete:

$$\text{piruvát} + \text{KoA} + NAD^+ \rightarrow \text{acetil-KoA} + CO_2 + \text{NADH} + H^+$$

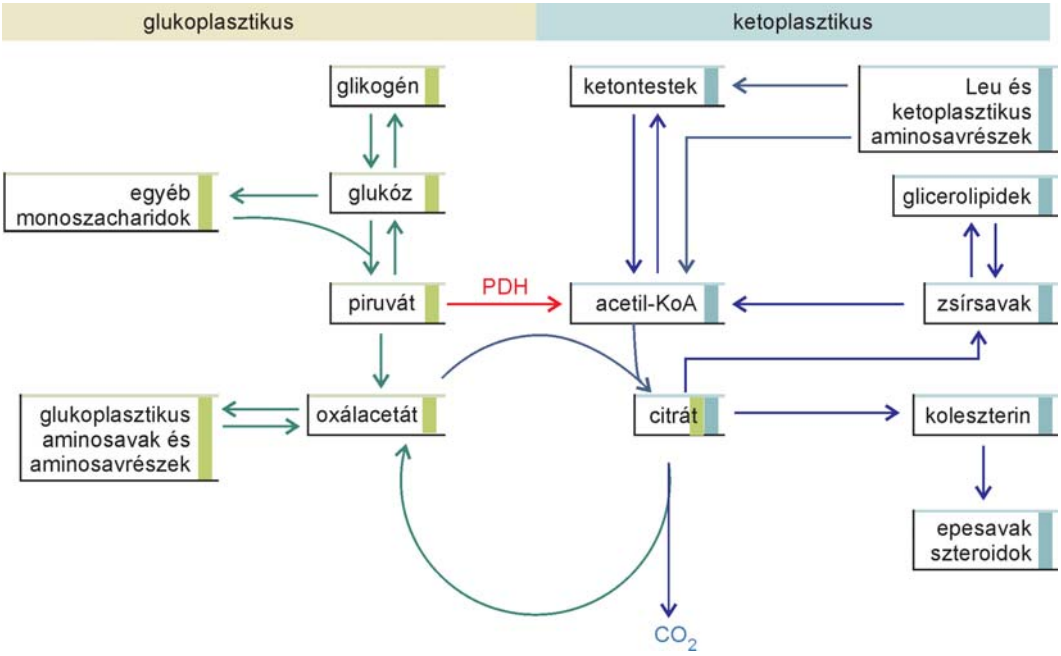
A kezdő lépések nagy szabadenergia-felszabadulása miatt a teljes reakció *irreverzíbilis*. A keletkező szén-dioxid (amely természetesen hidratálódik és szénsavként bikarbonátra disszociál) a szén biológiai rendszerekben elérhető legoxidáltabb formája, és megfelel egy elégetett szénatomnak. Emberi (általában heterotróf) sejtekben a katabolizmus fő végterméke, amely a tüdőn keresztül távozik a szervezetből.

A piruvát-dehidrogenáz komplex kitüntetett metabolikus szerepe

A humán (orvosi) biokémia egyik hangsúlyos témaköre a vércukorszint fenntartása, vagyis a felesleges szénhidrátok felhasználása jóllakott állapotban, illetve a rászoruló sejtek glukóz-utánpótlásának biztosítása éhezésben. A szénhidrát-raktározás meglehetősen korlátozott lehetőséget nyújt mindehhez, ugyanis csak glukózt tárolunk (glikogénként), és csak a májban tárolt glikogént használjuk vércukor előállítására. Ebből következik, hogy a máj raktárkapacitását is felülmúló szénhidrátokat részben ATP-termelésre kell felhasználni, nagyobb részben pedig zsírsavakká kell átalakítani, melyek trigliceridként a zsírszövetben tárolhatók. (Tudjuk jól, hogy a test zsírraktározó képessége szinte korlátlan.)

Hasonló helyzet adódik az aminosavak esetében is. Az emberi szervezet egyáltalán nem tárol aminosavakat (nincs olyan fehérje, amelynek egyetlen ismert funkciója az aminosavtárolás lenne). Ezért a feleslegben fogyasztott fehérjék aminosavait jóllakott állapotban lebontjuk, illetve főként raktározható zsírsavakká alakítjuk át a májban.

Mindez azért olyan fontos, mert a szervezetünkben szénhidrátokból és aminosavakból előállított zsírsavak már nem alakíthatók vissza szénhidrátokká. A humán anyagcsere intermedierjei két csoportra oszthatók aszerint, hogy éhezésben (ATP-termelésen kívül) mire használhatók fel. A *glukoplasztikus* vegyületekből a májban létrehozható glukóz (vércukor), ezért különösen értékesek. A *ketoplasztikus* molekulákból glukóz nem lehet, ezek a májban ketontestekké alakíthatók, így hozzájárulhatnak bizonyos aerob szövetek táplálásához, és a glukózigény csökkentéséhez *(II/3-5. ábra)*.



II/3-5. ábra
A piruvát-dehidrogenáz komplex a gluko- és ketoplasztikus vegyületek határán

Glukoplasztikus az összes szénhidrát, a glikolízis és a citrátkör összes intermediere, a legtöbb aminosav (némelyik gluko- és ketoplasztikus), valamint a glicerin. Ketoplasztikus minden páros szénatomszámú, el nem ágazó láncú zsírsav és rövidebb monokarbonsav, beleértve az acetátot, ezek KoA-származékai és a Leu. (Logikailag idesorolhatók a koleszterin és az epesavak, de ezekből még ketontestek sem keletkezhetnek.) Az egyetlen és egyirányú átkelő, amely összeköti a glukoplasztikus vegyületek világát a ketoplasztikusokéval, a piruvát-dehidrogenáz komplex. A feleslegben fogyasztott szénhidrátok és (glukoplasztikus) aminosavak piruváton keresztül, a PDC segítségével alakulhatnak át acetil-KoA-vá, ami lebontható a citrátkörben vagy felhasználható a zsírsav- és koleszterinszintézisben. A PDC által katalizált reakció tehát nem csupán irreverzíbilis (megfordíthatatlan), hanem végleges („visszacsinálhatatlan") is egyben.

A piruvát-dehidrogenáz komplex szabályozása

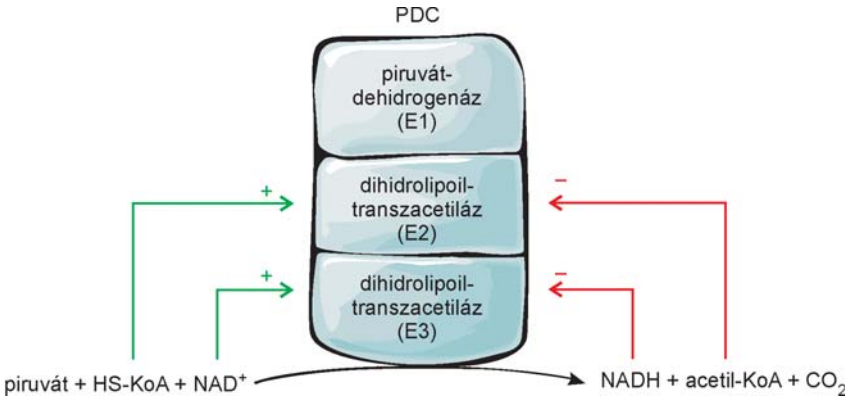
A PDC (a citrátkörhöz és a zsírsavak β-oxidációjához hasonlóan) a légzési lánchoz kapcsolt lebontó reakciót katalizál, vagyis aktivitása alapvetően az oxidatív

foszforiláció intenzitásához igazodik. A mátrix NAD^+-NADH készlete ugyanis csak közvetett kapcsolatot tart fenn a citoplazmáéval (lásd az oxidatív foszforilációról szóló fejezetben), azonban közvetlen kapcsolatban áll a légzési lánccal. Az e kompartmentben elhelyezkedő dehidrogenázok tehát csak aerob körülmények között aktívak, és legfeljebb akkora sebességgel működhetnek, amekkorával az általuk előállított NADH a légzési láncban NAD^+-dá oxidálódik.

Kitüntetett metabolikus szerepének megfelelően azonban a PDC önálló, gondos szabályozás alatt áll, így aktivitását a légzés intenzitása csak korlátozza, de nem határozza meg automatikusan. Az önálló szabályozás lényege, hogy az értékes piruvát csak akkor alakuljon acetil-KoA-vá, ha kellő mennyiségben rendelkezésre áll, és a sejt energiaigénye ezt szükségessé teszi. A kontroll kisebb részben közvetlen, allosztérikus hatások által, de főként az E1 fehérje kovalens módosítása (foszforiláció/defoszforiláció) révén valósul meg.

Allosztérikus szabályozás

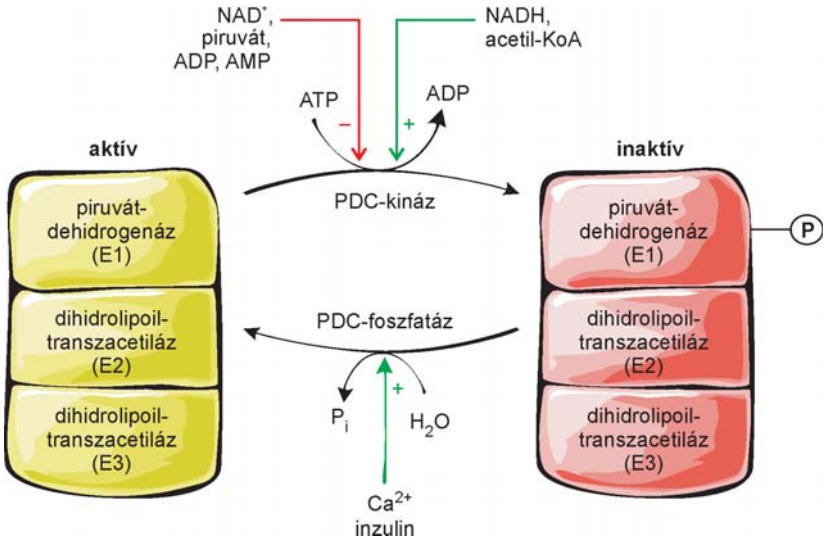
A PDC allosztérikus aktivátorai (NAD^+ és KoA), valamint allosztérikus gátlószerei (NADH és acetil-KoA) kivétel nélkül a komplex saját szubszrátjai, illetve termékei, ezek tehát közvetlen szubsztrátaktivációt és termékgátlást valósítanak meg *(II/3-6. ábra)*.



II/3-6. ábra
A PDC allosztérikus szabályozása

Foszforiláció/defoszforiláció

A PDC domináns szabályozása azon alapul, hogy az E1 fehérje szerin-foszforilációja (PDC-kináz által, ATP-terhére) inaktív konformációt eredményez, míg a foszforiláció megszüntetése (PDC-foszfatáz által, hidrolízissel) az enzimet bekapcsolja *(II/3-7. ábra)*. E mechanizmus hatása részben átfed az allosztérikus szabályozással, ugyanis a PDC-kináz (allosztérikus) aktivátorai, a NADH és az acetil-KoA így közvetve is gátolják a komplexet. Ugyanakkor ki is egészíti az effektorok körét, mert a PDC-kinázoknak – a NAD^+ mellett – (allosztérikus) gátlószere a piruvát, az AMP és az ADP is, melyek így szintén fokozzák a komplex működését. Ráadásul a PDC hormonális szabályozása is e kovalens módosítás révén valósul meg, ugyanis az inzulin és a Ca^{2+}-szignált kialakító hormonok-neurotranszmitterek (pl. α_1-adrenerg agonisták, vazopresszin, acetil-kolin stb.) a PDC-foszfatáz aktiválásán keresztül stimulálják a piruvát – acetil-KoA átalakulást.



II/3-7. ábra
A PDC szabályozása kovalens módosítás révén

Összegezve tehát a PDC aktivitását az alacsony *[NADH]:[NAD$^+$], [ATP]:[ADP] és [acetil-KoA]:[KoA] arányok*, illetve az *inzulin*hatás és a mitokondriális *Ca^{2+}*-ion-koncentráció emelkedése fokozzák. Ez pedig azt jelenti, hogy akkor gyorsul a piruvát oxidatív dekarboxilációja, amikor a sejt aktivitása fokozódik, és nagy szüksége van energiára, illetve a légzést tápláló elektronokra, vagy jóllakott állapotban, amikor a zsírsavszintézist nyugodtan táplálhatjuk a piruvátból keletkező acetil-KoA-val.

II/4.
Citrátkör

Csala Miklós

Az acetil-KoA olyan intermedier az emberi anyagcserében, amely gyakorlatilag kötelezően kialakul a mitokondrium mátrixban bármilyen természetű tápanyag-molekula (szénhidrát, zsírsav, aminosav) teljes, oxidatív lebontása során; ugyanakkor belőle már csak lipid jellegű vegyületek (és a ketontesteket is idesoroljuk) keletkezhetnek. Ráadásul – ahogy ezt a piruvát-dehidrogenáz komplexről szóló fejezetben részletesebben olvasható – a glukoplasztikus intermedierek acetil-KoA-ként léphetnek át (visszavonhatatlanul) a ketoplasztikus intermedierek csoportjába. Ha a sejt az acetil-KoA lebontása mellett dönt, ezt a teljes citrátkör végrehajtása tudja biztosítani. Ha az acetil-KoA-t lipid- (zsírsav- vagy koleszterin-) szintézisre kívánja felhasználni, akkor először ki kell juttatnia a mátrixból a citoplazmába, amihez a citrátkör első lépését kell csak igénybe vennie (lásd a lipidanyagcserénél). Az acetil-KoA egyetlen lehetséges, citrátkörtől független felhasználása, a ketontesttermelés – ez viszont éppen akkor (és azért) következik be, amikor (és mert) a citrátkör nem képes a felhalmozódó acetil-KoA befogadására (lásd a lipidanyagcserénél).

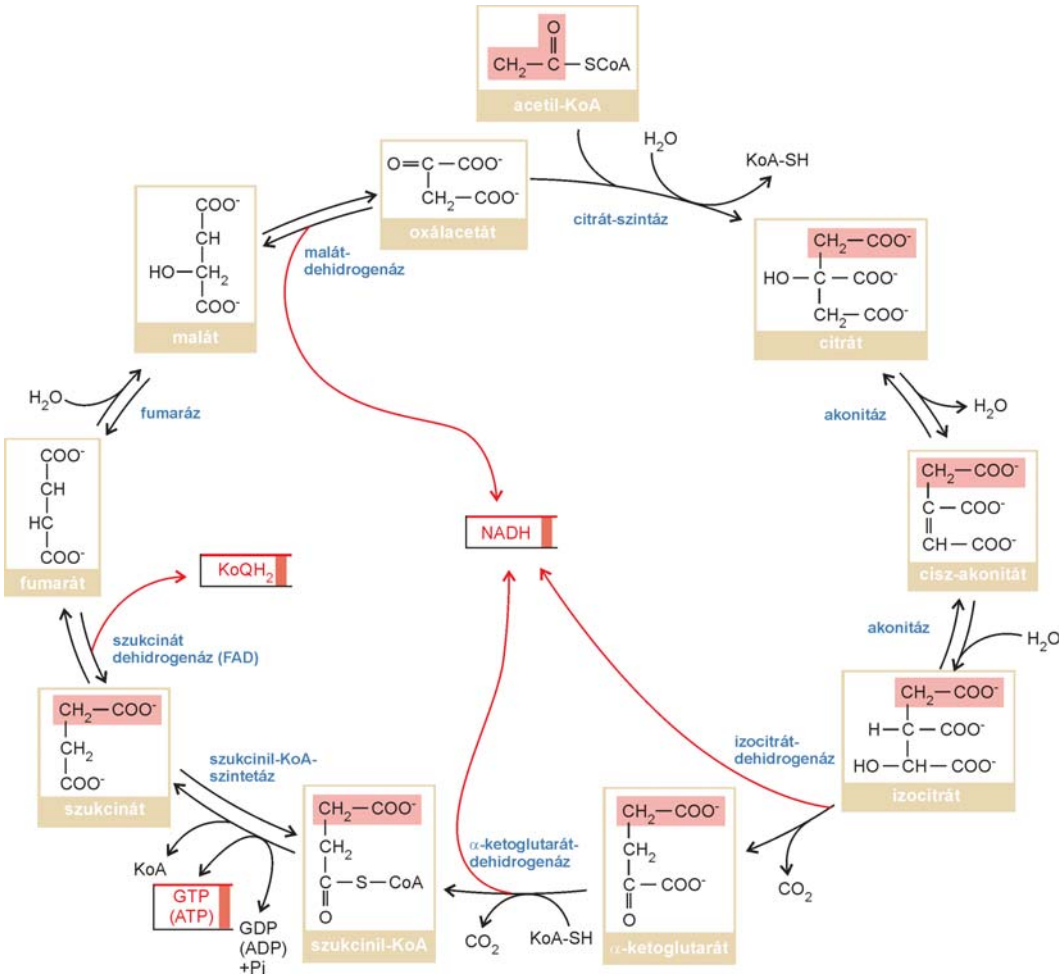
A citrátkör tehát igen fontos (később még alaposabban részletezendő), központi szerepet tölt be az intermedier anyagcserében. Teljes egészében a mitokondriális mátrixban zajlik, és ezen a tényen az sem változtat, hogy egyik enzime (a szukcinát-dehidrogenáz) a mitokondrium belső membránjának belső felszínéhez kapcsolódik.

II/4.1. A CITRÁTKÖR LÉPÉSEI

A citrátkör – nevének megfelelően – körfolyamat, így nem határozható meg, melyik az első lépése. Mivel azonban a ciklus legfőbb feladatának hagyományosan az acetil-KoA acetilcsoportjának lebontását tekintjük, azzal a lépéssel szokás kezdeni, amelyikben az acetil-KoA is szerepel. A ciklus tehát azzal kezdődik, hogy a kétszénatomos acetát és a négyszénatomos oxálacetát egyesülve hatszénatomos citráttá alakul. A soron következő lépések a két extra szénatom szén-dioxid formájában való eltávolítását, és az ehhez szükséges oxidáció(ka)t biztosítják, így regenerálva az oxálacetátot, és bezárva a kört. Közben még egy (ATP-vel egyenértékű) GTP termelésére, vagyis szubsztrát szintű foszforilációra is adódik alkalom *(II/4-1. ábra).*

Citrát-szintáz

Az acetil-KoA metil-szénatomja nukleofil addícióba lép az oxálacetát keto-szénatomjával. A képződő citril-KoA intermedier ezután (még az enzim aktív centrumában) hidrolízissel citrátra és KoA-ra hasad. A második lépés egy makroerg tioészter felbontása, ami jelentős szabadenergia-felszabadulással jár, így a teljes reakciót *irreverzibilis*sé teszi. Akármennyire is ezt tekintjük a ciklus első – ráadásul megfordíthatatlan – lépésének, mégsem ez az acetát lebontásának elkötelező lépése. Fontos elágazást jelent ugyanis az a lehetőség, hogy a citrát kiléphet a ciklusból,



II/4-1. ábra
A citrátkör reakciólépései

sőt a mitokondriumból, és kiviheti az acetilcsoportot a citoplazmába, hogy elérhetővé tegye azt a lipidszintézis számára. Ez pedig fontos szempont a ciklus szabályozása szempontjából (lásd később).

Akonitáz

A citrát központi, 3-as szénatomján lévő hidroxilcsoport két lépésben – egy dehidratálást követő (re)hidratálással – helyeződik át a 2-es szénatomra, és így izocitrát keletkezik. Először a 2-es szénatomon lévő egyik H-atom és a 3-ason lévő hidroxilcsoport együtt, H_2O-t képezve, kilép a vegyületből (vízelimináció). Majd az így hátrahagyott kettőskötés egy H_2O fordított orientációjú belépésével telítődik (vízaddíció). A telítetlen intermedier, a cisz-akonitát, melyről az enzim a nevét kapta, szinte el sem hagyja az aktív centrumot. Egyik lépés sem jár jelentős szabadenergia-változással, így a teljes citrát – izocitrát átalakulás reverzíbilis. Érdekes, hogy e –

vas-kén centrumot tartalmazó – enzim citoplazmai izoformája „iron response element binding protein" (IREBP) néven a vasanyagcsere poszt-transzkripciós szintű szabályozásában is szerepet játszik (lásd a génexpresszió szabályozásáról szóló fejezetekben).

Izocitrát-dehidrogenáz

Az izocitrát 2-es szénatomján lévő hidroxilcsoport oxidációja és 3-as szénatomján lévő karboxilcsoport lehasadása egymás után – de egymástól elválaszthatatlanul – történik az enzim aktív centrumában, és α-ketoglutarát keletkezik. Az oxidáló ágens – dehidrogenázról lévén szó – egy elektronszállító; jelen esetben NAD^+ (a citoplazmai izocitrát-dehidrogenáz $NADP^+$-vel működik). Amint ezt a piruvát-dehidrogenáz komplexnél említettük, az oxidatív dekarboxiláció mindkét lépése spontán megy végbe. Ráadásul itt nem keletkezik makroerg kötés, ami csökkentené a nettó szabadenergia-felszabadulást, ezért a reakció törvényszerűen *irreverzíbilis*. A ciklus e lépése az acetát lebontása iránti elköteleződést jelent, sőt kezdetét is veszi a két szénatom eloxidálása. Az első valóban annyira oxidált állapotban szabadul itt fel, amennyire csak lehetséges (CO_2-ként).

α-Ketoglutarát-dehidrogenáz (komplex)

Ez az oxidatív dekarboxiláció minden tekintetben a piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált folyamathoz hasonlóan megy végbe. Az oxidálószer itt is NAD^+, és a termék itt is KoA-hoz kötve termelődik. Valójában csupán annyi a különbség, hogy a szubsztrát – és nyilván az intermedierek és a termék is – egy karboximetil-csoporttal ($-CH_2-COO^-$) hosszabb, vagyis itt acetil-KoA helyett szukcinil-KoA keletkezik. E négyszénatomos intermedier megjelenése jelzi, hogy a ciklusban felszabadult a második, és egyben utolsó, végletekig oxidált szénatom (mint CO_2), azaz lebomlott az acetát, de néhány elektronját még itt hagyta (a szukcinát jóval redukáltabb a kiinduló oxálacetátnál), amelyektől a továbbiakban meg kell szabadulni. Bár jelentős mennyiségű szabadenergia hasznosul a makroerg tioészter létrejöttekor, a reakció mégis *irreverzíbilis*. Az enzim felépítése (E1-TPP, E2-lipoamid, E3-FAD) is hasonlít a PDC-éhez; csak a szubsztrátspecifikus E1 (α-ketoglutarát-dekarboxiláz) és E2 (dihidrolipoil-transz-szukciniláz) enzim tér el, ellenben az E3 azonos.

Szukcinil-KoA-szintetáz

A szukcinil-KoA acil-csoportátviteli potenciálja nagyjából megegyezik az ATP γ-foszforil-csoportátviteli potenciáljával. A szukcinil-KoA-szintetáz azt a prototípusos kapcsolt reakciót katalizálja, amelyben egy szukcinil-KoA tioészterének hidrolízise szolgáltat energiát egy GDP és egy P_i közti savanhidrid kondenzációjához, vagy éppen fordítva: a GTP hasítása hajtja a szukcinát és a KoA összekapcsolódását (ez utóbbira utal az enzim neve). A hasonló szabadenergia-változások nagyjából kioltják egymást, ezért a kapcsolt reakció reverzíbilis. Az irreverzíbilis lépések hajtják a ciklust, és benne ezt a reakciót a GTP-termelés irányába. Más szavakkal, az acetát oxidatív lebontása e ponton lehetővé teszi egy ATP-ekvivalens közvetlen keletkezését, azaz *szubsztrát szintű foszforilációt*.

Szukcinát-dehidrogenáz

Az enzim elválaszthatatlan részét képezi a légzési lánc II. komplexének (szukcinát:KoQ oxidoreduktáz). Ez egyrészről azt jelenti, hogy a mitokondrium belső

membránjának mátrix felőli felszínéhez tapadva (mégis a mátrixban) katalizálja a szubsztrát két metiléncsoportjának (-CH_2-) metenilcsoporttá (=CH-), vagyis a szukcinát fumaráttá való oxidációját. Másrészről azt, hogy aktív centrumának FAD prosztetikus csoportja – a II komplex vas-kén fehérjéinek közvetítésével, de NAD^+ részvétele nélkül – továbbadja az így szerzett két elektront a membránban oldódó KoQ (ubikinon) elektronszállítónak. A reakció tehát – az elterjedt vélekedéssel szemben – nem E-$FADH_2$ (hiszen ez maga az enzim!) hanem $KoQH_2$ (ubikinol) keletkezésével jár. Összességében nem kíséri jelentős szabadenergia-változás, ezért e lépés is reverzíbilis.

Fumaráz

A (transz-konfigurációjú) fumarát hidratációja (vízaddíciója) ezen enzim segítségével sztereospecifikus módon megy végbe, ezért mindig L-malát termelődik. Ez a lépés, a hasonló reakcióknál (pl. enoláz és akonitáz) megszokotthoz hasonlóan, reverzíbilis.

Malát-dehidrogenáz

A ciklus (össze)zárásaként a NAD^+ elektronakceptor két elektront vesz át. Ezzel a malát szekunder alkoholos hidroxilcsoportja ketocsoporttá oxidálódik, s így visszakapjuk a kiinduló oxálacetátot. A reakció sajátossága, hogy rendkívül nagy pozitív (!) standard szabadenergia-változása ($\Delta G^{\circ\prime} = +29{,}7$ kJ/mol) miatt standard körülmények között az ellenkező irányban irreverzíbilis. Más szavakkal, egyforma szubsztrát- és termékkoncentrációk esetén (25 °C-on) a malátot NAD^+-dal nem lehet oxálacetáttá oxidálni. Nyilvánvaló tehát, hogy a ciklusban csak akkor regenerálódhat az oxálacetát, ha a [NADH]:[NAD^+] arány nagyon alacsony (ami érvényesül, ha a légzés aktív), de még így is nagyon magas lesz az egyensúlyi [malát]:[oxálacetát] arány. A valós (nem standard) szabadenergia-változás ilyen körülmények között gyakorlatilag nulla, vagyis az utolsó lépést tekinthetjük reverzíbilisnek.

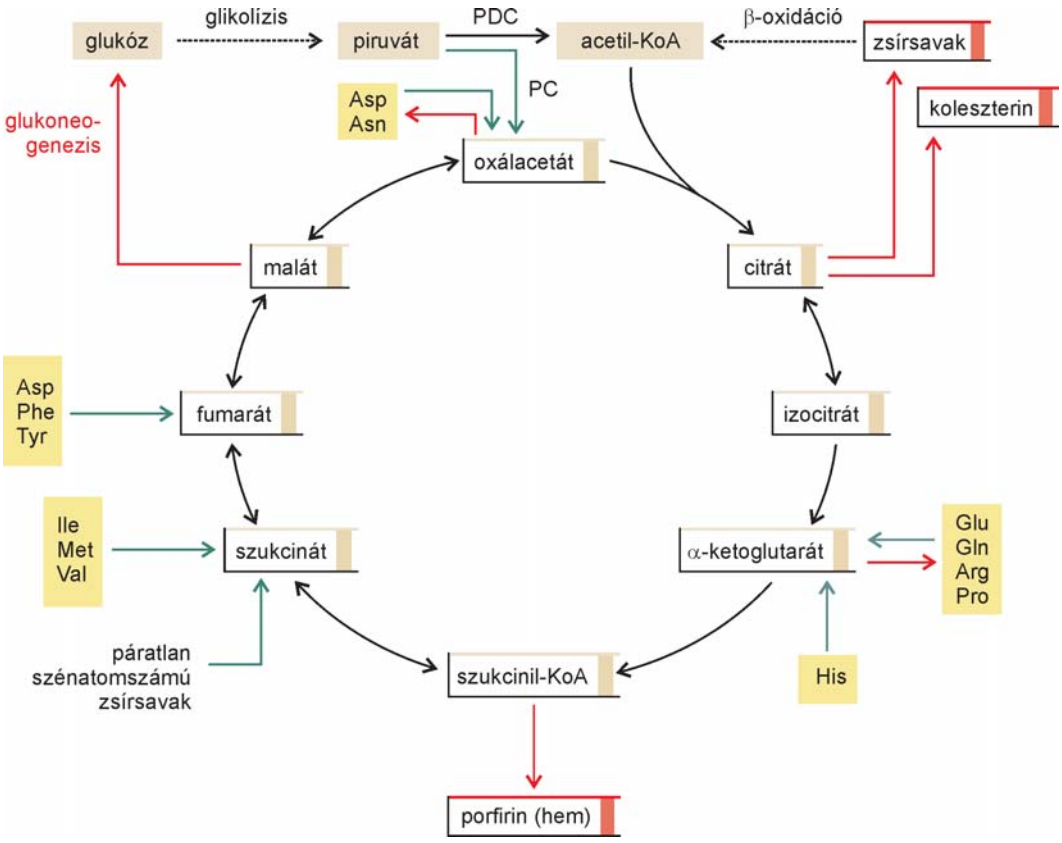
A teljes ciklus egyszeri körbejárásának nettó egyenlete:

$$\text{acetil-KoA} + 3NAD^+ + KoQ + GDP + P_i \rightarrow$$
$$2CO_2 + KoA + 3NADH + 2H^+ + KoQH_2 + GTP$$

A ciklus „elején” halmozódnak az irreverzíbilis lépések, így csak a szukcinil-KoA és az oxálacetát közötti szakasz reverzíbilis, a körfolyamat egésze *irreverzíbilis*nek tekintendő. A keletkező szén-dioxid molekulák (vizes oldatban bikarbonátionok) a tápanyagmolekulák elégetett szénatomjai, és végtermékként kilégzéssel távoznak a szervezetből.

II/4.2. A CITRÁTKÖR ÖSSZETETT FUNKCIÓJA

A fenti összesített reakcióegyenlet jól mutatja, hogy a teljes ciklus az acetát két szénatomjának tökéletes oxidációját jelenti, melynek során az elektronokat NAD^+ és ubikinon veszi át. Az exergonikus katabolizmus egyrészt a redukált elektronszállítók által (oxidatív foszforiláció), másrészt közvetlenül (szubsztrát szintű foszforiláció) táplálja az endergonikus ATP-termelést. Joggal kijelenthető, hogy ez a citrátkör alapvető metabolikus szerepe, de korántsem az egyetlen funkciója. A ciklus intermedierjei ugyanis néhány másik anyagcsere-folyamatnak is résztvevői. (A citrátkör kitüntetett helye miatt szoktuk úgy tekinteni, hogy intermedierei más útvo-



II/4-2. ábra
A citrátkör elosztó szerepe (piros: a ciklust fogyasztja; zöld: a ciklust feltölti; sárga: aminosavak)

nalak kiinduló molekulái vagy végtermékei, vagyis az útvonalak innen erednek, illetve ide futnak be, holott valójában leginkább közös köztitermékekről van szó, azaz a ciklus egyes részei átfednek más folyamatokkal.) A citrátkör tehát elosztó központként is működik a szénhidrát-, lipid- és aminosav-anyagcsere magjában. Mivel egyaránt tölt be katabolikus és anabolikus szerepet, összefoglalóan „*amfibolikus*” folyamatnak nevezhetjük. Sokrétű kapcsolatait e fejezetben csak vázlatosan tekintjük át (hiszen mindegyiket részletesen bemutatja a megfelelő fejezet), és közülük csak néhányat emelünk ki.

A citrátköri intermedierekből kiinduló útvonalak

Zsírsav- és koleszterinszintézis

Acetil-KoA a mátrixban termelődik, ugyanakkor szintetikus folyamatokhoz (a ketontest-termelés kivételével) a citoplazmában használódik fel. Mivel KoA-hoz kötött szerves savak nem jutnak át a mitokondriális belső membránon, és a karnitinfüggő

mechanizmus csak hosszabb szénláncú (zsír)savak átjuttatásához nyújt megoldást, az acetát citoplazmai KoA-ra való áthelyezése citrát közvetítésével történik. Jóllakott állapotban, amikor a PDC gyorsabban termeli az acetil-KoA-t, mint amilyen sebességgel az el tud oxidálódni a ciklusban, az izocitrát-dehidrogenáz előtti intermedierek (citrát és izocitrát) felhalmozódnak a mitokondriumban. Citrát kijutása, majd malát vagy piruvát visszajutása (lásd lipidanyagcsere) végsősoron az acetát transzportját eredményezi a tápanyag-raktározás céljainak megfelelően.

Aminosavak szintézise

Nem-esszenciális aminosavaink zöme citrátköri intermedierekből (α-ketoglutarát, oxálacetát) szintetizálódik. (A többi a glikolízis egyik intermedierjéből vagy esszenciális aminosavakból). Mivel a fehérjetermelés (transzláció) esszenciális aminosavak nélkül lehetetlen, a nem-esszenciálisak előállítása nem a proteinogén aminosavak éhezésben történő utánpótlásául szolgál. Az Arg (Orn) termelése (α-ketoglutarátból), valamint az Asp keletkezése (oxálacetátból) az ureaciklus fenntartása és az ammónia detoxifikálása miatt fontos. A Glu szintézise (α-ketoglutarátból) neurotranszmitterek (Glu, GABA) termeléséhez szükséges, és rajta keresztül a Gln előállítása az ammónia biztonságos transzportját biztosítja a vérben.

Glukózszintézis

Szabad glukózmolekula előállítása és szekréciója egyáltalán nem tartozik az ősi anyagcsere-folyamatok közé. Ilyesmire csak többsejtű, heterotróf szervezetekben lehet szükség (éhezésben) a glukózfüggő sejtek életben tartása céljából. Emberben e feladat a májsejtekre (és a vesekéreg sejtjeire) hárul, és ezzel a képességgel is ők rendelkeznek csupán. A szénhidrát-anyagcserénél glukoneogenezis néven bemutatott útvonal (a glikolízissel való párhuzamba állíthatóság érdekében) piruvátból indul, és glukózzal végződik. Valójában a piruvát átalakulása oxálacetáttá még nem elkötelező lépése a glukózszintézisnek, ami ténylegesen azzal kezdődik, hogy az oxálacetát a citoplazmában átalakul foszfoenol-piruváttá. (Ehhez persze előbb malátnak kell kijutnia a mátrixból, és ott oxálacetáttá oxidálódnia, de az ebben közreműködő transzport és dehidrogenálás reverzíbilis, így nem tekinthető elkötelező lépésnek.) Akárhogy is definiáljuk a glukoneogenezis kezdőpontját, tény, hogy a citrátkör összes intermedierje felhasználható (maláton/oxálacetáton keresztül) a glukóz szintéziséhez.

Porfirinszintézis

A hem vázát képező protoporfirin endogén vegyület, melynek szintézise a mitokondriumban kezdődik, és – kis kitérő után – itt is fejeződik be. Mivel a hem változatos oxigénkötő és/vagy redox fehérjék prosztetikus csoportja, szintézise minden aerob sejtben jelen van, és fogyasztja a szukcinil-KoA-t. Nem elhanyagolható szempont, hogy szervezetünk képtelen a porfirint újra lebontani (visszaalakítani citrátköri intermedierré), helyette biotranszformációval (konjugált) bilirubinná alakítva üríti az epébe.

A citrátköri intermedierekben végződő útvonalak – anaplerózis

A citrátkör körfolyamat jellegéből adódik néhány fontos törvényszerűség. Egyik ilyen, hogy ami képződhet a citrátkör egy adott intermedierjéből, az képződhet bármelyikből, hiszen az intermedierek mind egymásba alakíthatók. (Porfirin például

nemcsak szukcinil-KoA-ból, hanem oxálacetátból is szintetizálható.) Visszafelé is igaz ez az okoskodás: ha valamiből létre lehet hozni a citrátkör egyik intermedierjét, akkor abból bármelyiket létre lehet hozni. A másik – ezzel összefüggő – törvényszerűség, hogy a citrátkör összes intermediere metabolikus szempontból egyenértékűnek (ekvivalensnek) tekintendő, ezért tulajdonképpen mindegy, hogy éppen melyik intermediert használjuk fel (vonjuk ki a ciklusból), mert az összes együtt fogy. Ha tehát a fenti – citrátköri intermedierekből kiinduló útvonalak – fogyasztják a citrátkört, akkor annak működése csak azonos mennyiségű visszafizetés (görögül: *anaplerózis*) esetén tartható fenn. Az azonban – a fentiekkel összhangban – közömbös, hogy melyik intermedier más forrásból történő előállításával töltjük fel a ciklust. Ahogy az alábbiakból látható lesz, az anaplerózis forrásai szénhidrátok vagy aminosavak, illetve ezek metabolitjai lehetnek – ezeket összefoglaló névvel *glukoplasztikus* vegyületeknek nevezzük (lásd még a piruvát-dehidrogenáz komplexnél írottakat). Nagyon fontos annak megértése, hogy azon reaktánsok, amelyek az egyik intermedier másikká való átalakulásában közreműködnek (vagyis reagálnak egy intermedierrel, és képződik egy másik), nem változtatják meg a citrátköri intermedierek összmennyiségét. Az acetil-KoA, éppúgy, mint a H_2O, illetve más lépéseknél a KoA vagy a GTP nem fogyasztja, de nem is termeli a citrátkört, csak hajtja azt körbe. E vegyületek átalakulása szempontjából a citrátkör intermedierestül, enzimestül egységes katalizátornak tekinthető. Ez a magyarázata annak, hogy zsírsavak és metabolitjaik, köztük az acetil-KoA nem alakíthatók glukózzá, csak ketontestekké, vagyis ketoplasztikusak. A következő folyamatok a citrátkör szempontjából anaplerózist, a vércukorszint fenntartása szempontjából pedig a glukoplasztikus vegyületek glukózszintézis felé terelését jelentik.

Piruvát-karboxiláz

A mitokondriumba jutott piruvát lebontása vagy lipidszintézisben való felhasználása a PDC reakcióval kezdődik. Alternatív lehetőségként a 3-as szénatomján karboxilálódhat, vagyis átalakulhat oxálacetáttá. A szén-dioxid-fixálás szervetlen szénvegyület beépülését jelenti a biomasszába, az ilyen fúzió endergonikus, ezért csak exergonikus reakcióhoz kapcsolva megy végbe. Növények képesek az elnyelt fényenergiát erre a célra fordítani, vagyis fotoszintetizálnak; állati/emberi sejtek azonban rendszerint ATP hidrolíziséből nyerik a szükséges szabadenergiát. A mitokondriális mátrixban elhelyezkedő piruvát-karboxiláz is először ATP γ-foszfátjával „aktiválja” a szén-dioxidot makroerg savanhidridet tartalmazó karboxi-foszfáttá, majd erről helyezi a karboxilcsoportot saját biotin prosztetikus csoportjára, és végül onnan a szubsztrátra. A reakció összességében irreverzibilis. Anaplerotikus szerepét jól mutatja, hogy az enzim csak acetil-KoA (allosztérikus aktivátor) jelenlétében aktív, hiszen ennek hiányában nincs értelme feltölteni a ciklust.

Aminosavak lebontása

A húsz proteinogén aminosav közül tizennyolc teljesen vagy részben glukoplasztikus. A glukoplasztikus amonosavak, illetve aminosav-részek pedig kivétel nélkül a citrátkörön keresztül konvertálódnak glukózzá (éhezéskor a májban). Néhányan közülük (Ala, Gly, Ser, Cys, Thr, Trp) először piruváttá, majd oxálacetáttá alakulnak, de a többi közvetlenül α-ketoglutarátra (Glu, Gln, Arg, His, Pro), szukcinil-KoA-ra (Met, Ile, Val, Thr), fumarátra (Asp, Asn, Phe, Tyr) vagy oxálacetátra (Asp, Asn) bomlik. Az éhezés korai fázisában éppen a fehérjeszintézis és -lebontás utóbbi javára való eltolódása szolgáltat bőséges forrást a vércukorszint – és egyben a citrátkör működésének – fenntartásához.

Páratlan szénatomszámú zsírsavak lebontása

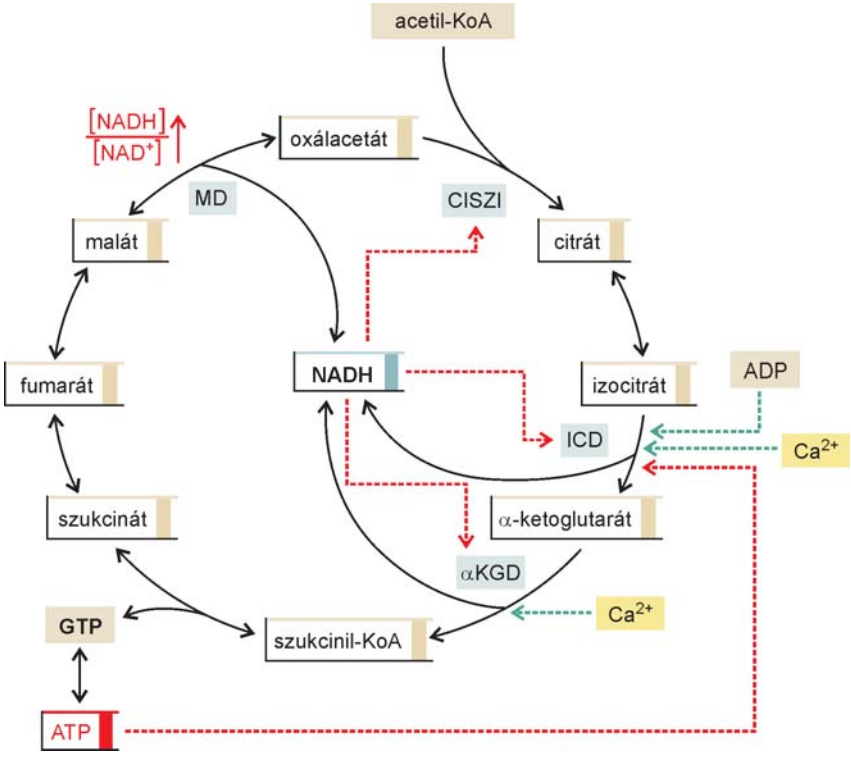
A páratlan számú szénatomot tartalmazó monokarbonsavak β-oxidációja nem tudja a láncot acetil-KoA-ig rövidíteni, mert az utolsó ciklus végén egy háromszénatomos propionil-KoA keletkezik. Ez – a piruváthoz hasonlóan – ATP terhére karboxilálódik, majd egy B_{12}-vitaminból származó kofaktor közreműködésével átrendeződik, és szukcinil-KoA lesz belőle (lásd lipidanyagcsere). A jelenség meghazudtolni látszik azt a kijelentést, hogy zsírsavakból nem lehet glukózt termelni. A valóságban ezen metabolikus opció megléte nem változtat a tétel igazságán, ugyanis páratlan szénatomszámú zsírsavak nem tárolódnak számottevő mennyiségben a humán zsírszövetben. Ha a táplálékkal fogyasztunk ilyeneket, akkor nem alakulnak glukózzá, mert jóllakott állapotban nem termelünk glukózt. Ha pedig éhezünk, és a májsejtjeink glukózt próbálnak előállítani, akkor ilyen forrás nem áll rendelkezésre. A propionil-KoA – szukcinil-KoA átalakulás enzimei és kofaktorai azonban – a ritka zsírsavak lebontásától függetlenül is fontos szerepet töltenek be az anyagcserében, ugyanis a szukcinil-KoA-ra bomló glukoplasztikus aminosavak katabolizmusa ebbe az útvonalba csatlakozik.

II/4.3. A CITRÁTKÖR SZABÁLYOZÁSA

Amint a PDC esetében, itt is leszögezendő, hogy a citrátkör (a zsírsavak β-oxidációjához hasonlóan) a légzési lánchoz kapcsolt lebontó reakciót katalizál, vagyis aktivitása alapvetően az oxidatív foszforiláció intenzitásához igazodik. A mátrixban elhelyezkedő dehidrogenázok csak aerob körülmények között aktívak, és legfeljebb akkora sebességgel működhetnek, amekkorával az általuk előállított NADH a légzési láncban NAD^+-dá oxidálódik. A [NADH]:[NAD^+] arány tömeghatása leghatározottabban és legszembetűnőbben a malát-dehidrogenáz működése kapcsán érhető tetten (lásd ott), de a ciklus többi dehidrogenáza esetén is érvényesül *(II/4-3. ábra)*.

A citrátkör allosztérikus mechanizmuson alapuló szabályozása is minden tekintetben sok hasonlóságot mutat a PDC-ével, és a két folyamat részben összehangoltan működik. Fő vezérlő elv az aktuális energia- (ATP- és NADH-) igényhez való alkalmazkodás. Ha a citrát-szintáz nem tudna lépést tartani a PDC-vel, akkor a felszaporodó acetil-KoA csak ketontestekké alakulhatna, ami azonban (a PDC, a citrát-szintáz és nem utolsó sorban a piruvát-karboxiláz koordinált szabályozása folytán) soha nem fordul elő. Ketontestek mindig a zsírsavakból származó acetil-KoA-ból keletkeznek a májban, ha a citrátkör feltöltése elégtelen. Fontos azonban kiemelni, hogy a PDC aktivitása felülmúlhatja a ciklus későbbi – izocitrát-dehidrogenázzal kezdődő – szakaszának sebességét, amikor is a citrát a zsírsav- és koleszterinszintézishez szállítja az acetátot.

Allosztérikus szabályozás: A NADH allosztérikusan gátolja a citrát-szintázt, az izocitrát-dehidrogenázt és az α-ketoglutarát-dehidrogenázt. Az izocitrát-dehidrogenázt – amelyről említettük, hogy az acetátlebontás elkötelező lépése – ezen felül gátolja még az ATP, és aktiválja az ADP és a Ca^{2+}. A mitokondriális Ca^{2+}-koncentráció emelkedése az α-ketoglutarát-dehidrogenáz működését is fokozza. Az oxidációban kulcsszerepet játszó két enzim kalcium általi aktiválása – a PDC-nél említettek szerint – hormon- és neurotranszmitter-hatásokat közvetít, és szerepe van az oxidatív, ATP-termelő katabolizmus izomkontrakció, illetve stressz esetén bekövetkező serkentésében *(II/4-3. ábra)*.



II/4-3. ábra
A citrátkör szabályozása (piros: gátlás; zöld: aktiválás; szaggatott nyíl: allosztérikus hatás)

A citrátkör aktivitását tehát az alacsony *[NADH]:[NAD$^+$] és [ATP]:[ADP] arányok*, illetve a mitokondriális ***Ca***$^{2+}$-koncentráció emelkedése fokozzák. Akkor gyorsul tehát az acetilcsoport oxidációja, amikor a sejt aktivitása fokozódik, és nagy szüksége van energiára, illetve a légzést tápláló elektronokra.

II/4.4. A CITRÁTKÖR ENERGIAMÉRLEGE

A citrátkör alapvető funkciója az acetát oxidatív lebontása, ezért fontos áttekinteni, hány ATP-t termel ehhez kapcsoltan. A ciklus kizárólag aerob anyagcseréjű sejtben működik, amikor az elektronokat átveszi a légzési lánc. Az energiahasznosítás zöme az oxidatív foszforiláció eredménye, de figyelembe kell venni a már bemutatott szubsztrát szintű foszforilációt is.

Szubsztrát szintű foszforiláció

A citrátkörben – a glikolízissel ellentétben – nincs ATP-befektetés, így a szukcinil-KoA-szintetáz által termelt GTP tiszta nyereségnek tekinthető. A GTP (és a többi nukleozid-trifoszfát), enzimkatalizált reverzíbilis reakcióban átadhatja foszfátját ADP-nek, vagyis egyenértékű az ATP-vel, ezért a citrátkör közvetlen hozama

acetil-KoA molekulánként 1 ATP. Ez a szubsztrát szintű foszforiláció azonban – a glikolízisével ellentétben – nem tud önállósodni, mert a ciklust nem lehet a légzéstől szétkapcsolni.

Oxidatív foszforiláció

A ciklus három dehidrogenáza (izocitrát-, α-ketoglutarát-, valamint malát-dehidrogenáz) állít elő NADH-t; és egy dehidrogenáz (szukcinát-dehidrogenáz) helyezi az elektronokat ubikinonra. A 3 NADH egyenként 2,5, összesen 7,5 ATP; az ubikinol pedig 1,5 ATP, vagyis összesen 9 ATP keletkezését teszi lehetővé az oxidatív foszforilációban (magyarázatot lásd ott).

Ha tehát a citrátkör acetil-KoA-t bont, molekulánként 10 ATP termelésével számolhatunk. A glukózlebontás energiamérlegének kiszámításakor ezt duplázni kell, mert glukózonként két acetil-KoA keletkezik.

II/5.
Oxidatív foszforiláció

Csala Miklós

Az emberi sejtek energiaháztartása arra az általános sémára épül, hogy a tápanyagmolekulák exergonikus (spontán) oxidációja és bomlása hozzá van kapcsolva az ATP (ADP-ből és szervetlen foszfátból történő) endergonikus termelődéséhez. A kapcsolás két szinten valósul meg. Valahányszor alkalom adódik a katabolizmus során egy-egy makroerg kötés kialakítására, ennek felhasítása közvetlenül lehetővé teszi egy ATP keletkezését. Ezt hívjuk szubsztrát szintű foszforilációnak, és példái a glikolízisben, valamint a citrátkörben találhatók. Mennyiségileg sokkal jelentősebb azonban az energiakonverziónak az a mechanizmusa, amelyben az oxidálódó intermedierekből származó elektronok célba juttatása szolgáltat szabadenergiát az ATP előállításához. A lebomló szerves vegyületek többé-kevésbé redukált szénatomjai – ha csak lehet – fokozatosan szén-dioxiddá oxidálódnak, ami a légkörből származó, molekuláris oxigén erős oxidáló hatásának köszönhető. Az elektronok azonban nem közvetlenül jutnak a szénvegyületekről az oxigénre, ez ugyanis túlságosan nagy energiafelszabadulással járna, ami nem csupán hasznosíthatatlanná és kezelhetetlenné, hanem fékezhetetlenné is tenné a folyamatot, és öngyulladáshoz vezetne. Ehelyett inkább kézről-kézre (elektronszállítóról-elektronszállítóra) továbbítódnak, és csak e hosszú lánc legvégső lépéseként veszi át őket az O_2 mint végső akceptor, amely így vízzé redukálódik. A széttördelt redox reakció egyes lépései alkalmasak arra, hogy szabadenergia-változásuk hasznosuljon, és táplálja az ATP-szintézist. Az itt felvázolt, és a sejtek oxigénfogyasztásának jelentős részéért felelős elektrontranszfer-láncot légzési láncnak, a hozzá kapcsolt ATP-termeléssel együtt pedig oxidatív foszforilációnak nevezzük. Az összetett folyamat a mitokondriumban, annak belső membránjához kötött fehérjék közreműködésével zajlik, és megléte vagy hiánya alapján definiáljuk az aerob, illetve anaerob anyagcserét.

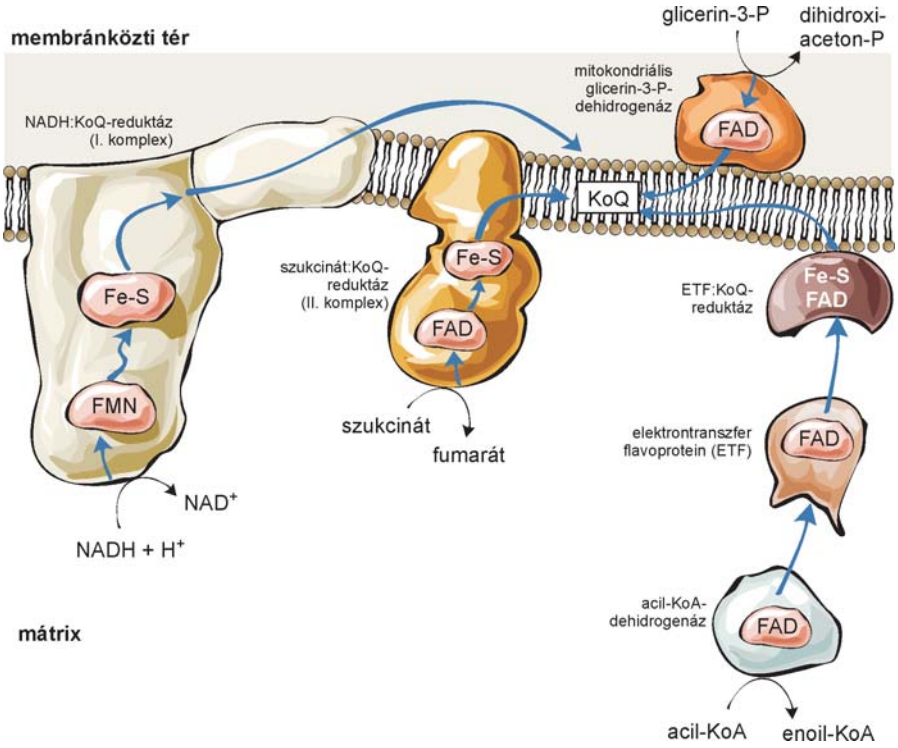
II/5.1. A LÉGZÉSI LÁNC

Az anyagcsere lebontó folyamataiban az oxidálódó intermedierekről származó elektronok redox reakciók láncolata útján jutnak az oxigénmolekulára, amely vízzé redukálódik. A közreműködő szállítómolekulák és oxidoreduktázok zöme (a NADH és a citokróm c kivételével mind) a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el. A teljes lánc két szakaszra osztható: az elsőben négy lehetséges forrásból gyűlnek az elektronok, és mind az ubikinonra kerülnek; a másodikban az ubikinol elektronjai már egységesen haladnak tovább az oxigénig.

Begyűjtő szakasz

A légzési lánc központi elektronszállítója, az ubikinon (koenzim-Q, KoQ), apoláros szerkezete miatt lipofil vegyület, és a belső membrántól elválaszthatatlan,

mozgása a laterális diffúzióra terjed ki. Ez persze egyáltalán nem korlátozza funkciójának ellátásában, mert mind az öt dehidrogenáz, amellyel kapcsolatba kell lépnie, a belső membrán integráns fehérjéje. Az öt enzim közül négy (NADH:KoQ-reduktáz, szukcinát: KoQ-reduktáz, mitokondriális glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz és ETF-dehidrogenáz) az ubikinonra helyez elektronokat, egy pedig az ubikinolról helyezi a következő szállítómolekulára (lásd közös szakasz). A KoQ-t redukáló négy dehidrogenáz a légzési lánc négy elérhető elektronforrása, illetve – más aspektusból – négy lehetséges belépési pontja *(II/5-1. ábra).*



II/5-1. ábra
A légzési lánc begyűjtő szakasza

NADH:KoQ-reduktáz (I. komplex)

A légzési lánc legnagyobb (43-46 alegységből álló) fehérjekomplexe. A mátrix felőli oldalon köti a NADH-t, és FMN prosztetikus csoportjára veszi át az elektronokat, melyek 8-9 vas-kén fehérjén keresztül jutnak a membránban lévő KoQ-ra. Az I. komplex, a redox reakcióhoz kapcsoltan, protonpumpa funkciót is ellát (lásd később). Az enzim specifikus gátlószere a rotenon és az amitál.

Szukcinát:KoQ-reduktáz (II. komplex)

A lánc legkisebb (4 alegységből álló) fehérjekomplexe. A mátrix felőli oldalon köti a szukcinátot, és FAD prosztetikus csoportjára veszi át az elektronokat, melyek 3 vas-kén fehérje (és egy hem prosztetikus csoport) közvetítésével jutnak a membrán-

ban lévő KoQ-ra. A II. komplex azonos a citrátkör *szukcinát-dehidrogenáz* enzimével. Átszeli ugyan a belső membránt, de nincs protonpumpa aktivitása. Kompetitív gátlószere a – szukcináttól csak egy metiléncsoportban különböző – malonát.

Mitokondriális glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz

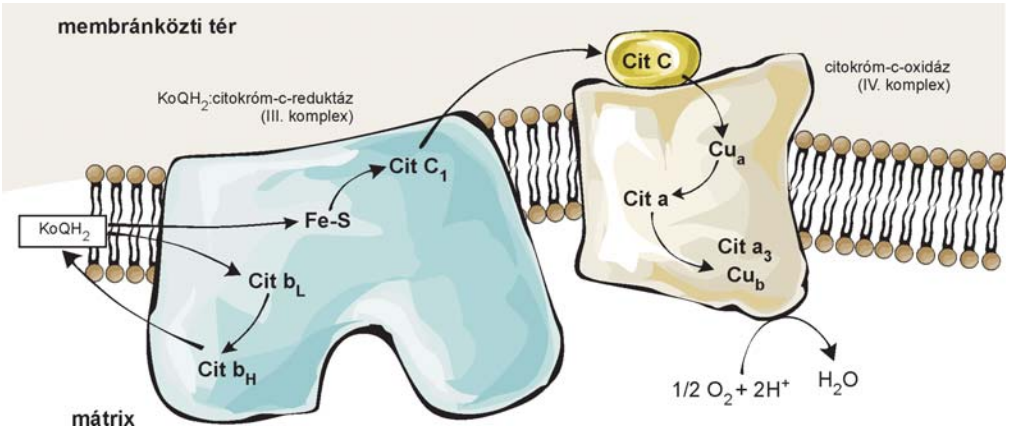
FAD prosztetikus csoportot tartalmazó homodimer vagy homotetramer szerkezetű integráns membránfehérje, amely nem szeli át a membránt, csak a külső (intermembrán tér és citoplazma felőli) rétegébe mélyed bele. Ez a sajátos orientáció teszi különlegessé az enzimet, ugyanis a membránnak ezen az oldalán az egyetlen belépési pontot nyújtja az elektronok számára. Nem tartozik a lánc számozott fehérjekomplexei közé, és nincs protonpumpa aktivitása.

ETF-dehidrogenáz

Az előbbi enzimhez hasonlóan csak a membrán egyik rétegébe mélyedő enzim, orientációja azonban éppen ellentétes. Ez a FAD-ot és vas-kén centrumot egyaránt tartalmazó enzim a mátrix felőli oldalon található elektrontranszfer-flavoprotein (ETF) nevű fehérjéről helyezi át ubikinonra az elektronokat. Az ETF csupán közvetítő szerepet játszik e belépési pontnál, ugyanis a leadandó elektronokat a zsírsavak β-oxidációjának első lépését katalizáló acil-KoA-dehidrogenáztól veszi át. Mivel mindhárom fehérje flavoprotein, sajátos módon, három FAD prosztetikus csoport adogatja az elektronokat a KoQ felé. Ez a trió sem tartozik a lánc számozott fehérjekomplexei közé, és nincs protonpumpa aktivitása.

Közös szakasz

Az ubikinol elektronjai már eredetüktől függetlenül, egységes módon és úton haladnak tovább végső céljuk felé. Két (számozott) enzimkomplex (ubikinol:citokróm-c-reduktáz, valamint citokróm-c-oxidáz) és egy elektronszállító fehérje (citokróm c) közvetítésével jutnak a molekuláris oxigénre *(II/5-2. ábra)*. Érdekes, hogy – bár az összes lehetséges belépési pont kettesével kapja az elektronokat, és a KoQ is



II/5-2. ábra
A légzési lánc közös szakasza

két elektront tud átvenni/átadni – e második szakaszban már kizárólag olyan szállító molekulák és aktív centrumok szerepelnek, amelyek egyszerre egy elektron szállítására képesek. Ehhez persze szükség van az ubikinon különleges képességére, hogy a két elektront egyenként is át tudja adni. Az O_2-molekula teljes (vízzé) redukálásához négy elektron szükséges, melyek tehát egyesével érkeznek a lánc utolsó komponenséhez.

$KoQH_2$:citokróm-c-reduktáz (III. komplex)

Háromféle hem prosztetikus csoportot és egy vas-kén centrumot tartalmazó komplex, amely 11 különböző alegység funkcionális dimerjeként szeli át a mitokondriális belső membránt. Citokróm b alegységei segítségével veszi át az elektronokat a membránban elhelyezkedő ubikinolról, majd a vas-kén fehérjén keresztül először saját citokróm c_1 alegységére továbbítja, végül onnan a citokróm c-re helyezi őket. A III. komplex az I. és IV. komplexhez hasonlóan, protonpumpaként (is) működik (lásd később). A III. komplex ismert gátlószere az antimicin-A nevű antibiotikum.

Citokróm c

Bár e hem prosztetikus csoporttal rendelkező fehérje minden tekintetben dehidrogenáznak tekinthető, mégis a lánc mobil elektronszállítói közé soroljuk. (Ennek oka, hogy enzimként a III. és IV. komplexek lennének a szubsztrátjai.) A kisméretű (12 kDa-os) fehérje szabadon mozoghat a mitokondrium membránközti terében, és ingázik a két említett komplex között. Egyetlen elektront vesz át a III. komplex citokróm c_1 alegységétől, és leszállítja azt a IV. komplex réziont tartalmazó Cu_a központjának. Normális körülmények között a fehérje nem tudja elhagyni az intermembrán kompartmentet, mert nem fér át a külső membrán porin-pórusain. A mitokondriális apoptózis útvonal kulcslépése, amikor Bax-Bak pórusok keletkeznek, melyeken át a citokróm c kiléphet a citoplazmába, és előmozdíthatja az apoptoszóma kialakulását (lásd Apoptózis fejezet). Ez a funkciója természetesen független a respirációban betöltött szerepétől.

Citokróm-c-oxidáz (IV. komplex)

Ez a lánc egyetlen oxidáz komponense (a többi mind dehidrogenáz), ugyanis – a folyamat lezárásaként – oxigénnek adja át a citokróm c-k elektronjait. A membránt teljesen átszelő komplex 13 alegységéből kettő rendelkezik aktív centrummal. Az egyik egy két rézionból álló centrum (Cu_a), mely egyesével fogadja az elektronokat, és továbbadja őket a másiknak, ahol először a hem a-ra (citokróm a-ra) kerülnek, majd onnan a különlegesen kiképzett O_2-kötő helyre. Ez a hem a_3 (citokróm a_3) és egy rézion (Cu_b) kombinációja. Az oxigénmolekula egyszerre kötődik kovalensen a vas(II) és a réz(I)ionokhoz, ami csökkenti a ROS-elszabadulással járó kémiai balesetek esélyét. A IV. komplex is pumpál protonokat a membránon keresztül (lásd később). A citokróm a_3 vas ionja csak öt datív kötéssel rendelkezik, és törekszik az ideális, hatos koordinációs szám (oxigénkötés általi) elérésére. Ki van tehát téve az O_2-nél erősebb ligandok hatékony támadásának, ezért a citokróm-c-oxidáz rendkívül hatékonyan gátolható olyan egyszerű szerkezetű, közismerten halálos mérgekkel, mint pl. a cianid (CN^-), azid (N_3^-) vagy szén-monoxid (CO).

Bár a citokróm-c-oxidáz működése csak négy db, egyenként érkező elektron oxigénre helyezéseként értelmezhető, és sehol nem bontható – ésszerűen – két részre, a légzési lánc egészének aktivitását hagyományosan mégis két elektronra

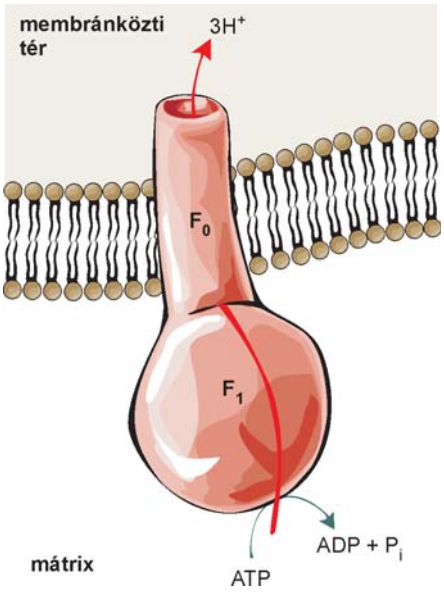
(fél oxigénmolekulára) vonatkoztatva összegezzük. Az elektrontranszfer-lánc nettó egyenlete tehát (a belépési ponttól függően):

$NADH + H^+ + 1/2O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$, vagy
szukcinát $+ 1/2O_2 \rightarrow$ fumarát $+ H_2O$, vagy
glicerin-3-P $+ 1/2O_2 \rightarrow$ dihidroxi-aceton-P $+ H_2O$, vagy
acil-KoA $+ 1/2O_2 \rightarrow$ 2-enoil-KoA $+ H_2O$

Hála az oxigén-víz páros nagy redoxpotenciáljának, a légzési lánc által mediált négyféle redox reakció mindegyike jelentős mértékű, negatív előjelű szabadenergia-változással jár. A bevezetőből is nyilvánvaló, hogy ennek egy részét hasznos(ítható) kémiai energia formájában menti meg a sejt, vagyis az elektrontranszferhez ATP-ter- melés kapcsolódik.

II/5.2. AZ ELEKTRONTRANSZFERHEZ KAPCSOLT ATP-TERMELÉS

A respirációs redox folyamat és az ATP-szintézis együttműködése a kémiailag független reakciók energetikai összekapcsolásának gyönyörű példája. Az ATP-t ADP-ből és anorganikus foszfátból létrehozó enzim (ATP-szintáz vagy más néven F_oF_1 ATP-áz) fizikailag nincs kontaktusban a légzési lánc szereplőivel. Miután kiderült róla, hogy valójában F-típusú H^+-pumpa, nyilvánvalóvá vált, hogy a két részfolyamat között a protongradiens teremti meg a kapcsolatot.



II/5-3. ábra
Az F_oF_1 ATP-áz (zöld nyíl: exergonikus; piros nyíl: endergonikus)

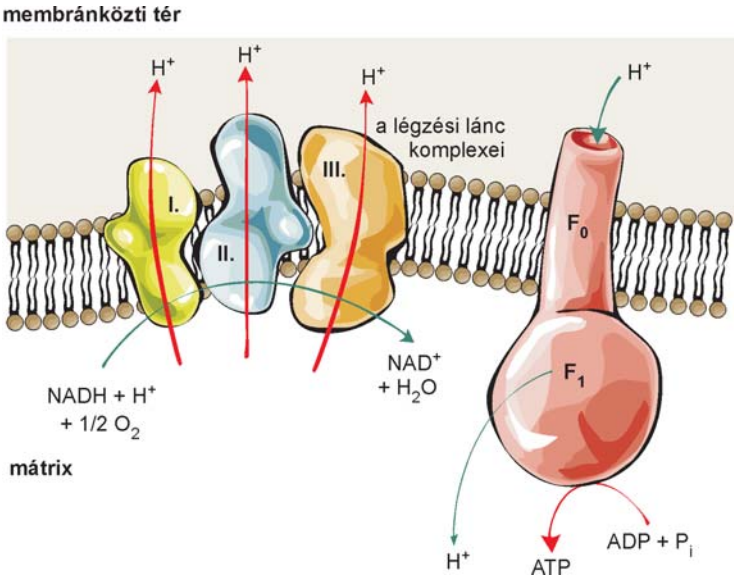
ATP-szintáz, azaz F_oF_1 ATP-áz

Az oxidatív foszforiláció mechanizmusának és molekuláris alapjainak kutatásakor sikerült azonosítani egy fehérjekomplexet, amely a mitokondriális belső membrán belső felszínéhez tapadva bizonyíthatóan részt vesz az ATP-szintézisben, ezért elnevezték a folyamat 1-es faktorának (F_1). Ez a 3α-, 3β-, γ-, δ- és ε-alegységekből álló komplex három egyforma (az α- és β-alegységek által kialakított) nukleotidkötő aktív centrummal bír, és önmagában, vagy roncsolt szerkezetű mitokondriumban ATP-áz aktivitást mutat. Ahhoz, hogy ATP-szintázként is működhessen, intakt mitokondriumra van szükség, és hozzá kell kapcsolódnia partneréhez, egy membránt áthidaló fehérjekomplexhez. Ez utóbbi az oligomicin nevű antibiotikummal specifikusan gátolható, ezért elnevezték oligomicin-érzékeny faktornak (F_o).

Az F_o és F_1 együttes komplexe önmagában – a légzéstől függetlenítve (lásd később) – H^+-ATP-ázként működik. A mátrix felőli oldalon (az F_1 három aktív centrumában) hidrolizálja az ATP-t ADP-re és P_i-re; és egy-egy ATP felhasználásának terhére három protont pumpál ki a mátrixból a membránközti térbe *(II/5-3. ábra)*.

Az elektrokémiai gradiens kapcsoló szerepe – a kemiozmotikus elmélet

Az F_oF_1 H^+-ÁTP-áz önállóan az [ATP]:[ADP] arány által limitált szabadenergia-különbség ellenében tudja kipumpálni a protonokat, vagyis korlátozott mértékű, befelé irányuló H^+-gradiens létrehozására képes. Ha azonban más, azonos orientációjú protonpumpák ezt jelentősen felülmúló gradienst hoznak létre, akkor az F_oF_1 komplex működése visszájára fordul. Ilyenkor a protonok exergonikus befelé áramlása (az F_o alegységein keresztül) hajtja az ADP és P_i endergonikus kondenzációját ATP-vé (az F_1 három aktív centrumában); és három proton bejutása fedezi egy-egy ATP keletkezését. A légzési lánc három protonpumpájának (I., III. és IV. komplex) sajátos tulajdonsága, hogy nem ATP-hidrolízis, hanem redox reakciók szolgáltatják az ionok aktív transzportjához szükséges szabadenergiát. Sokkal nagyobb gradiens létrehozására képesek, mint az F_oF_1 H^+-ATP-áz, amely ezért inverz működésre (ATP-termelésre) kényszerül, amennyiben a légzés aktív *(II/5-4. ábra).*



II/5-4. ábra
Az F_oF_1 ATP-áz inverz működése: az ATP-szintáz (zöld nyíl: exergonikus; piros nyíl: endergonikus)

Elektromos és kémiai gradiens

Az elektrontranszfer és az ATP-szintézis közötti energetikai kapcsolást tehát a protonok koncentrációkülönbsége biztosítja (ezt nevezik kemiozmotikus hipotézisnek, amely már régen több mint hipotézis). Érdemes azonban azt is elemezni, hogy a protongradiens önmagában két – külön-külön is befolyásolható – elemből áll. Egyrészt fennáll a *részecskekoncentráció különbözősége* (kémiai gradiens), amely töltéssel nem rendelkező partikulumok esetében is alkalmas lenne a szabadenergia tárolására. Ugyanakkor az adott részecske (proton) töltéséből adódóan a koncentrációkülönbséget *elektromos potenciálkülönbség* (elektromos gradiens) is kíséri. Ha egy proton halad át a membránon, a gradiens mindkét komponense változik; ha más ion halad át, az csak az elektromos gradienst érinti; ha egy proton egy másik egyértékű kationra cserélődik, akkor csak a kémiai gradiens módosul – és ugyanez történik, ha hidroxidion (OH^-) cserélődik egyértékű anionnal, hiszen a hidroxidionból és protonból keletkező víz szabadon átjut a membrán akvaporin csatornáin (lásd Transzporterek fejezet).

A fentiek fontos következménye, hogy a légzési láncból és ATP-szintézisből (valamint az elektrokémiai gradiensből) álló teljes rendszer, az oxidatív foszforiláció

működésének alapfeltétele, hogy a belső mitokondriális membrán ionok általi átjárhatósága (permeabilitása) korlátozott. Más szavakkal, a membrán (tetszőleges) ionok általi szabad átjárhatósága szétkapcsolja a légzést és az ATP-szintáz működését. Az úgynevezett *szétkapcsoló szerek* (pl. dinitro-fenol, ionomicin stb.) ezért azt eredményezik, hogy az önállósult légzés felgyorsul, és sebességét csupán az oxigén hozzáférhetősége korlátozza, a rohamos oxidáció (már-már égés) energiája – jobb híján – hővé alakul, miközben az F_oF_1 H^+-ÁTP-áz valóban ATP-ázként működik, amíg talál ATP-t. Ha ez valamely méreg hatására generalizáltan történik, életveszélyes állapotot eredményez. A jelenséget azonban, a sebesség korlátozásával, megfelelő kontroll alatt, a termogenin nevű szétkapcsoló fehérje segítségével, hőtermelésre használja a barna zsírszövet.

II/5.3. AZ OXIDATÍV FOSZFORILÁCIÓ SZABÁLYOZÁSA

Az aerob sejtek legfőbb ATP-termelő gépezete egyben a legegyszerűbben szabályozott anyagcsere-folyamatok egyike. Valójában nem is áll szabályozás alatt (sem allosztérikus hatások, sem kovalens módosítások nem befolyásolják), hanem csupán energetikai kapcsoltsága révén alkalmazkodik a sejt ATP-igényéhez.

Ha a sejt kevés ATP-t fogyaszt, az [ATP]:[ADP] arány magas, vagyis alacsony az ADP-koncentráció. Ilyenkor, szubsztrát híján, nyilván csökken az ATP-szintáz működése, ezért lassul a protonok beáramlása. Fokozódik a protongradens, ami megnöveli a H^+-kipumpálás szabadenergia-igényét, ezért az I., III. és IV komplex által katalizált reakciók nettó szabadenergia-változása egyre közelít a nullához, amikor beáll az egyensúly, vagyis virtuálisan leáll az oxigénfogyasztás. Az ATP-fogyasztás gyorsulása az ADP mint energia- és foszfátakceptor rendelkezésre állása révén serkenti az oxidatív foszforilációt. Éppen ezért a vázolt mechanizmust *akceptor kontroll* néven is szokás emlegetni.

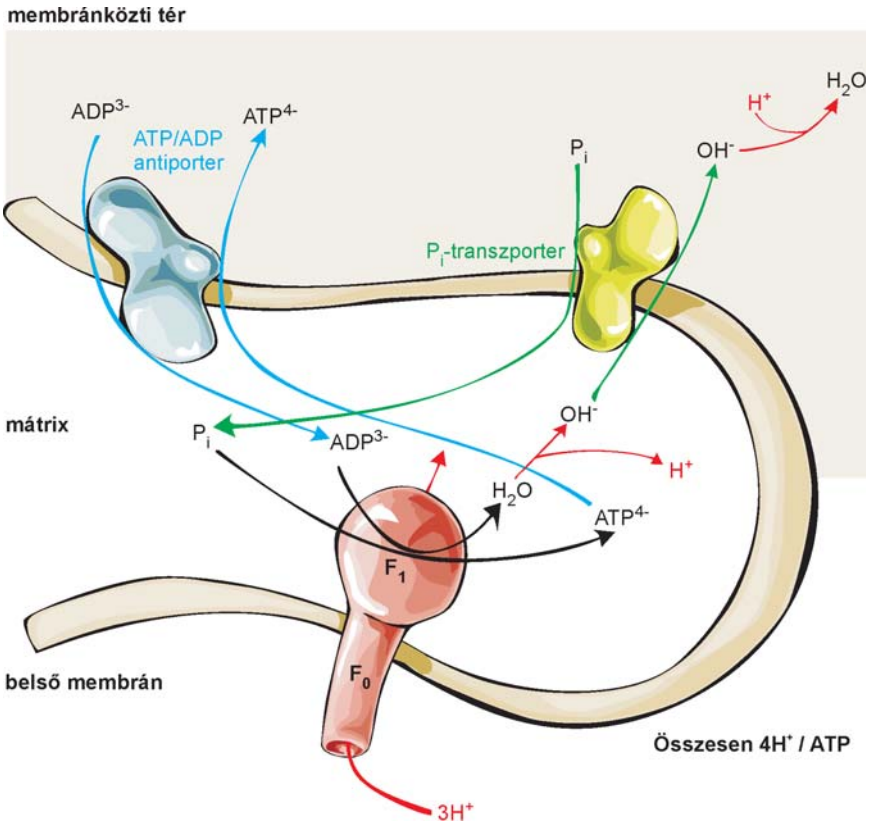
II/5.4. AZ OXIDATÍV FOSZFORILÁCIÓ ENERGIAMÉRLEGE – A P/O HÁNYADOS

Az oxidatív foszforiláció energiamérlegének kiszámításakor figyelembe kell venni a folyamathoz szükségszerűen társuló transzportok esetleges hatását is. Az ATP-szintáz aktív centruma(i) ugyanis a mátrix felőli oldalon van(nak), az ATP-fogyasztás azonban elsősorban a citoplazmában zajlik. Az ATP kijuttatása, valamint az ADP és a P_i bejuttatása együttesen annyival csökkenti az elektrokémiai gradiens energiáját, mint egy H^+ beeresztése *(II/5-5. ábra)*.

Az ATP-termeléshez kapcsolódó transzportok

ATP/ADP antiport

A két nukleotid kicserélése elektrogén folyamat, ugyanis az ATP az ADP-nél eggyel több negatív töltéssel rendelkezik. A fiziológiás irányokat alapul véve, ez ATP-molekulánként nettó egy negatív töltés kiáramlását jelenti, ami tehát fogyasztja az elektromos gradiens energiáját.



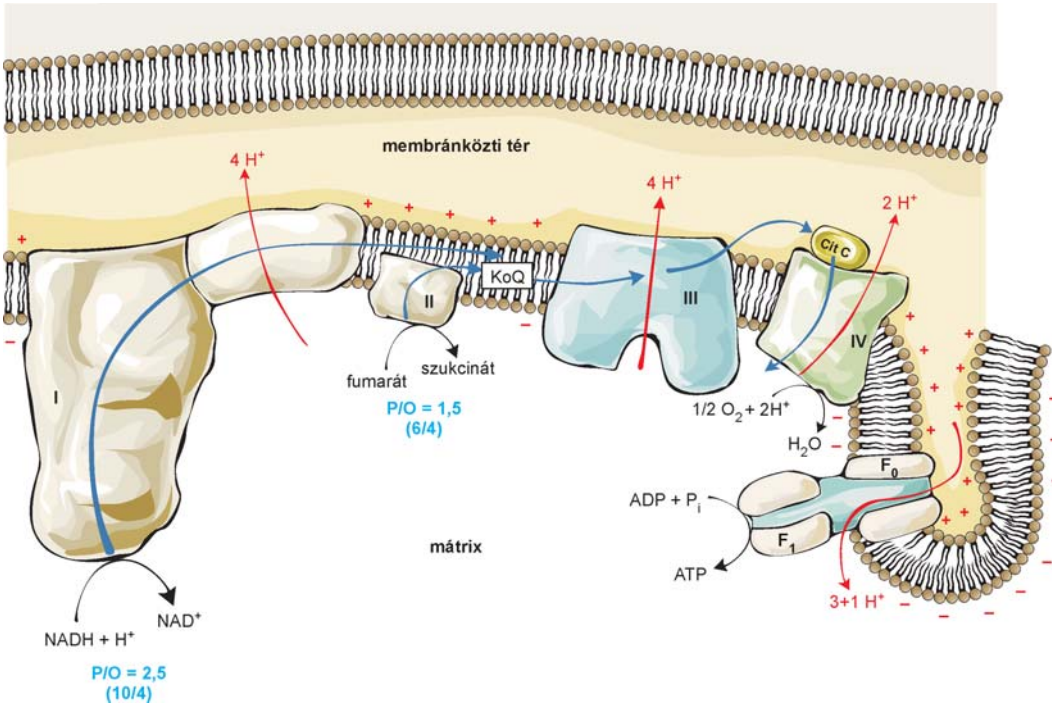
II/5-5. ábra
Az ATP-termeléshez kapcsolódó transzportok és hatásuk az elektrokémiai gradiensre

P_i/OH^- antiport

A befelé jövő anorganikus foszfát távozó hidroxidionra való kicserélése (egyenértékű egy foszfát és egy proton együttes belépésével) összességében minimális töltésmozgással jár, de fogyasztja a kémiai gradiens energiáját.

Egy oxigénatomra jutó ATP-keletkezés

A légzési lánc I. és III. komplexe két-két elektron áthaladásakor négy-négy protont, IV. komplexe pedig négy elektron oxigénre helyezése kapcsán négy protont juttat a mátrixból a membránközti térbe. A légzési lánc (fent bemutatott) egyenletei jelzik, hogy két elektronnal, vagyis fél oxigénmolekulával számolunk. Ha NADH szolgáltatja az elektronokat, akkor összesen 10 H^+ kipumpálásával számolhatunk. Ha bármely más forrásból származnak az elektronok, akkor az I. komplex nem vesz részt a folyamatban, így csak 6 H^+ helyeződik át a membránközti térbe. Egy ATP szintézise – a járulékos transzporttal együtt – 4 H^+ beáramlásának energiáját igényli. Ebből könnyedén kiszámítható, hogy az egy oxigénatomra jutó ATP-keletkezés (P/O hányados) az előbbi esetben (10/4) 2,5, az utóbbiban pedig (6/4) 1,5 *(II/5-6. ábra)*.



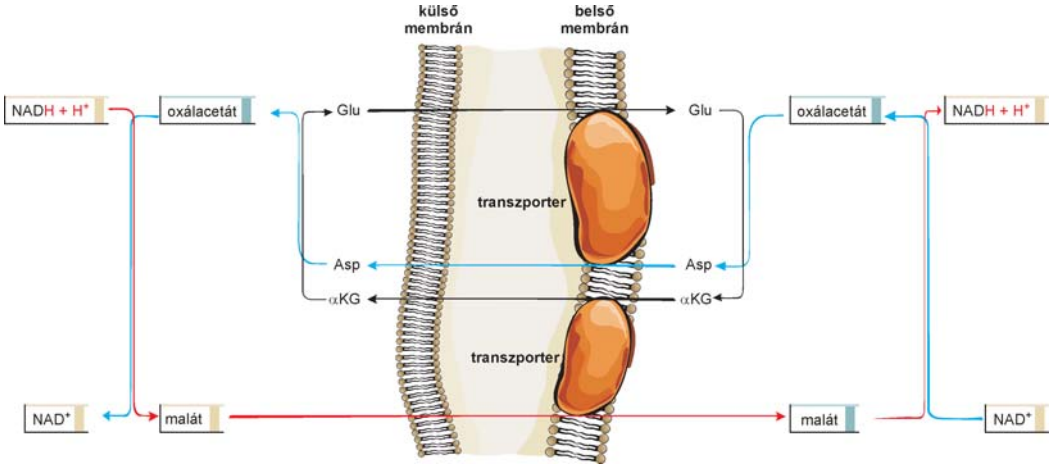
II/5-6. ábra
A P/O hányados függ az elektronok belépési pontjától

II/5.5. A CITOPLAZMÁBAN TERMELT NADH FELHASZNÁLÁSA

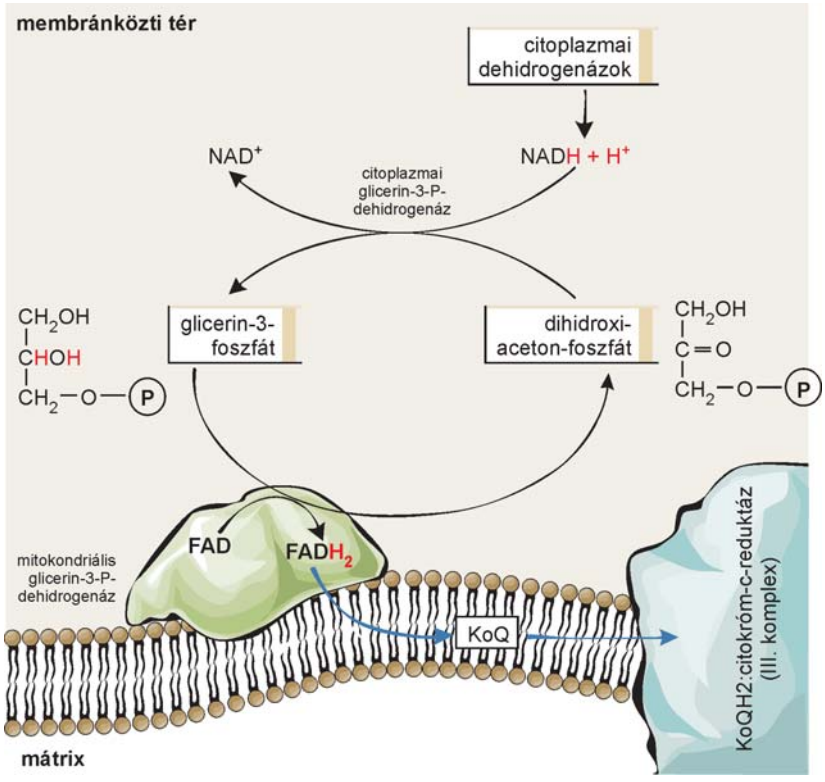
A citoszolikus NADH – a mitokondrium külső membránjának pórusain keresztül – akadálytalanul eljuthat a belső mitokondriális membrán külső felszínéig. Ott azonban egyetlen enzim sem mutat iránta érdeklődést: a NADH-t oxidálni képes I. komplex aktív centruma a mátrix felé tekint, a membránközti tér felől pedig a KoQ csak a glicerin-3-foszfát elektronjait fogadja. Egyszerű megoldást jelentene a NADH beléptetése a mátrixba, de megfelelő transzporter híján erre nincs lehetőség. Ez nem jelenti azt, hogy a glikolízis (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz), illetve más, citoplazmai dehidrogenázok (pl. laktát-dehidrogenáz, alkohol-dehidrogenáz, UDP-glukóz-dehidrogenáz stb.) által termelt NADH nem használódhat fel az oxidatív foszforilációban. Csupán azt jelenti, hogy a citoplazmai NADH elektronjait más vegyületek közvetítésével kell becsempészni a légzési láncba. Ennek két leggyakoribb módja a malát-aszpartát útvonal és a glicerin-3-foszfát útvonal.

Malát-aszpartát útvonal

A citoplazmai elektronok légzési láncba juttatásának összetettebb, mégis általánosabb (a szívizom, máj, vörös izom, vese sejtjeire jellemző) módja, amely a citoszol és a mátrix két-két enzimaktivitását, valamint két transzporter működését igényli *(II/5-7. ábra)*. A NADH elektronjait – *malát-dehidrogenáz* segítségével – oxálacetát



II/5-7. ábra
A malát-aszpartát útvonal



II/5-8. ábra
A glicerin-3-foszfát útvonal

veszi át, és az így keletkező malát α-ketoglutarát ellenében (antiport) jut be a mátrixba. Ott a reakció az ellentétes irányba halad, tehát a citrátkör malát-dehidrogenáz enzime máris elérhetővé teszi az elektronokat a légzési lánc számára. Csakhogy a citoplazmában egy oxálacetátot, a mátrixban pedig egy α-ketoglutarátot vissza kell pótolni, hogy az útvonal tovább működhessen. Ha nem csak *malát:α-ketoglutarát antiporter* lenne a membránban, hanem oxálacetát:α-ketoglutarát kicserélődés is, akkor a probléma egycsapásra megoldódna. Mivel azonban ilyen nincs (sőt, semmilyen oxálacetát-transzport nem működik a belső membránban) a két α-ketosav aminosav-származéka cserélődik ki az *Asp:Glu-antiporter* segítségével, és mindkét kompartmentben az *Asp-aminotranszferáz (ASAT)* segítségével a megfelelő ketosavvá transzaminálódnak. Így a kör(ök) bezárul(nak), és a nettó egyenlet egy NADH oxidációja a citoszolban, valamint egy NAD^+ redukciója a mátrixban. Megéri tehát a sok munka, mert *energiavesztés nélkül* sikerül az elektronokat a légzési láncba juttatni: az *I. komplexen* belépő két elektron 2,5 ATP termelését táplálja.

A glicerin-3-foszfát útvonal: Lényegesen egyszerűbb, közvetlen út az ubikinonhoz, amely csak egy citoplazmai enzimaktivitást igényel, és nem jár NAD^+ redukciójával a mátrixban *(II/5-8. ábra)*. A glikolízis első fázisának végén keletkező dihidroxi-aceton-foszfátot a *citoplazmai glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz* NADH felhasználásával glicerin-3-foszfáttá redukálja. A visszaoxidálódást már a légzési lánc egyik belépési pontjaként említett *mitokondriális glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz* katalizálja a belső membrán külső felszínén. Az I. komplex kihagyása azt jelenti, hogy a NADH potenciáljából egy ATP-nyi energia elvész, és a két elektron csak 1,5 ATP termelését táplálja. Úgy is felfoghatjuk, hogy ATP terhére pumpáljuk az elektronokat a légzési láncba, ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy ezt az útvonalat leginkább a gyors energiafelhasználású sejtekben (agysejtek és rovarok szárnyizmai) figyelték meg.

II/5.6. AZ OXIDATÍV FOSZFORILÁCIÓ A METABOLIZMUS MOZGATÓ RUGÓJA

A földi élet energetikailag a szervetlen (szén-dioxid) és szerves szénvegyületek, illetve az oxigén és a víz egymásba kapcsolódó redox ciklusán alapul. Az oxigén-víz redox pár magas redox potenciálja miatt a víz szénvegyületekkel csak úgy oxidálható oxigénné, ha a folyamatba jelentős mennyiségű energiát táplálunk. Az energiát a napfény fotonjai biztosítják, és a redukálódó szén-dioxid pedig változatos szerves vegyületekké (szénhidrátok, aminosavak, lipidek) alakulva a biomassza mennyiségét növeli (fotoszintézis). Az oxigén azonban energiaráfordítás nélkül redukálható szénvegyületekkel vízzé. A magas oxigéntartalmú légkörben a szerves vegyületek csupán a redox reakciók magas aktiválási energiája miatt nem égnek el azonnal. A biomolekulák oxidációjakor a (foto)szintézisükkor befektetett energia egy részét hasznosítani lehet, miközben az oxidáláshoz használt oxigén vízzé redukálódik (oxidatív foszforiláció).

A humán sejtek látszólag rendelkeznek az oxidatív foszforiláció mellett alternatív energiahasznosítási lehetőségekkel (szubsztrát szintű foszforiláció). Ez azonban illúzió csupán, még akkor is, ha valóban léteznek sejtek, amelyek tisztán szubsztrátszintű foszforilációval (anaerob glikolízis) fedezik energiaigényüket. Az ilyen sejtek anyagcseréje ugyanis csak akkor tartható fenn, ha a keletkező laktátot más sejtek eloxidálják, vagyis – végső soron – az anaerob ATP-termelést is az oxidatív foszforiláció (igaz, egy másik sejté) hajtja.

II/6.
Glukoneogenezis

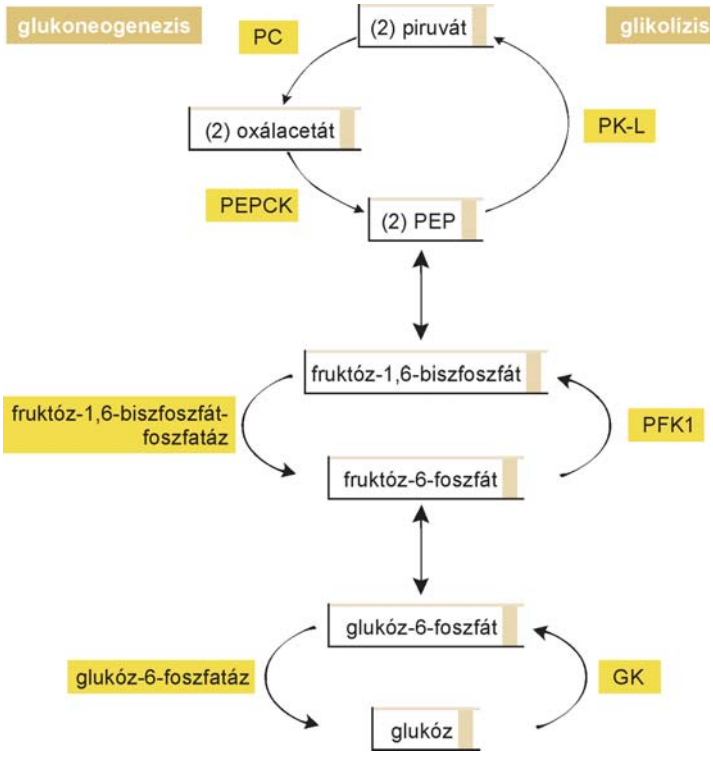
Kardon Tamás

Az emberi szervezetben vannak olyan szövetek, sejtek pl. agy, hereszövet, vesevelő, vörösvérsejt, fehér izomrostok, bőr fibroblasztjai, melyek glukózra vannak utalva, hogy a működésükhöz szükséges energiát fedezni tudják. A táplálékfelvételek közötti éhezéses (hipoglikémiás) periódusok esetén ezek a szövetek és sejtek nem tudnának megfelelően működni, így például az agy sem, ami a szervezet teljes glukóz metabolizmusának mintegy 25%-át használja fel.

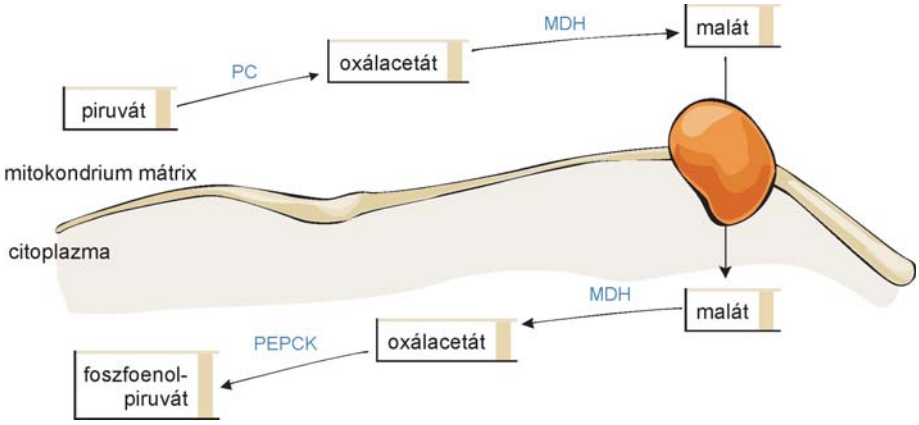
A glukoneogenezis az a folyamat, amely – szűk határok között levő – állandó glukózszintet biztosít a vérben. Glukóz ún. glukogén prekurzorokból szintetizálódhat, melyek lehetnek módosult szénhidrátok (pl. glikogén, lásd később), illetve nem szénhidrát jellegű molekulák. Ez utóbbiakból kiinduló szintézist nevezzük szűkebb értelemben glukoneogenezisnek. Emberben és más emlősökben glukoneogenezisre képes szövet a máj és kisebb mértékben a vese.

Glukogén prekurzoroknak tekinthetők a laktát, a piruvát, a glukogén aminosavak – melyek leginkább izomfehérjék lebontása során keletkeznek –, valamint a lipidlebontás során keletkező glicerin. A glukoneogenezis reakciólépései azonosak a glikolízis lépéseivel fordított sorrendben, kivéve a három irreverzíbilis reakciót *(II/6-1. ábra)*. A három enzim – glukokináz, foszfofruktokináz-1, piruvát-kináz – által katalizált reakciónak olyan mértékben negatív a $\Delta G^{\circ\prime}$-a, hogy a termékek fiziológiás koncentrációja sosem olyan magas, hogy lehetővé tegye a reakció fordított lejátszódását. Ezek a reakciólépések más úton mennek végbe.

A glukoneogenezis során először piruvát képződik (pl. laktátból vagy alaninból), ami



II/6-1. ábra
A glukoneogenezis lépései fordított sorrendben azonosak a glikolízis lépéseivel

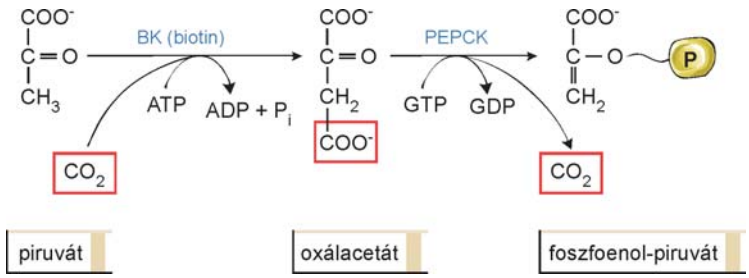


II/6-2. ábra
A glukoneogenezis kezdeti lépései

azután foszfoenol-piruvát képződéshez vezet. A glukoneogenezis ezen legalaposabban kidolgozott része három fő lépésen keresztül valósul meg *(II/6-2. ábra)*:

A mitokondriumban a piruvát oxálacetáttá karboxilálódik.
Az oxálacetát a mitokondriuból a citoplazmába transzportálódik.
A citoplazmában az oxálacetát dekarboxilálódik és foszfoenolpiruváttá foszforilálódik.

Az első lépésben *(II/6-3. ábra)* a mitokondriumban a piruvát CO_2-t köt meg és oxálacetáttá karboxilálódik. A reakciót a biotinfüggő karboxilázok családjába tartozó piruvát-karboxiláz (PC) katalizálja. A reakcióhoz az enzimhez (lizinhez) kötött biotinon kívül szükség van ATP hidrolízisre. Az ATP hidrolízise során a lehasadó foszfát csoport a HCO_3^- -tal átmenetileg karboxifoszfátot képez. A vegyületből felszabaduló CO_2 a biotin nitrogénjéhez kötődik. A folyamat végén a biotin segítségével az enzim a CO_2-t a piruvát metil csoportjához köti és létrejön az oxálacetát. Ez a reakció egyben a citromsavciklus legfontosabb anaplerotikus lépése is (lásd citrátkör fejezet). A reakcióban az ATP hidrolízisekor felszabaduló energia a biotin karboxibiotinná átalakuláshoz kell.



II/6-3. ábra
Foszfoenol-piruvát keletkezése

Az oxálacetát a második lépésben a citoplazmában a foszfoenolpiruvát karboxikináz (PEPCK) segítségével foszfoenolpiruváttá foszforilálódik. Az oxálacetát viszont nem tudja a mitokondriumot elhagyni, mert a mitokondrium membránjában nincs oxálacetát transzporter. Az oxálacetátból három különböző membrán transzportra alkalmas vegyület keletkezhet. Az oxálacetát ezeken keresztül juthat a mitokondriumból a citoplazmába:

1. A mitokondriális malát dehidrogenáz az oxálacetátot NADH-val maláttá redukálja. A malát transzporter kijuttatja a malátot a citoplazmába, ahol a citoplazmatikus malát dehidrogenáz segítségével viszzaoxidálódik (malát-sönt – lásd oxidatív foszforiláció) *(II/6-2. ábra)*.
2. A mitokondriális ASAT segítségével az oxálacetát aszpartáttá transzaminálódik. Az aszpartát antiporteren keresztül jut ki a citoplazmába, ahol a citoplazmatikus ASAT visszaalakítja oxálacetáttá (malát-sönt – lásd oxidatív foszforiláció).
3. Acetil-KoA-val az oxálacetát citráttá kondenzálódik. A citrátot trikarboxilát transzporter juttatja ki a citoplazmába, ahol a citrát liáz segítségével oxálacetáttá és acetil-KoA-vá bomlik. Az acetil-KoA lesz a kinduló vegyülete a zsírsavszintézisnek (lásd zsírsavszintézis).

Az oxálacetát citoplazmába kerülésének legvalószínűbb útja a maláttá való redukálódás. A glukoneogenezis során a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz által katalizált reakció megfordításakor ugyanis szükség lesz az iménti reakció során keletkező redukált NADH-ra (lásd glicerinaldehid-3-foszfát-szintézis).

A második esetben nincs nettó NADH redukció, ezért csak magas citoplazmatikus NADH szintek esetén lesz jelentősége. Ilyen eset pl., amikor magas az intracelluláris laktát szint. A laktát laktát-dehidrogenázzal piruváttá oxidálódik, miközben NADH redukálódik.

A harmadik reakció csak akkor tud lejátszódni, ha megfelelően magas az intramitokondriális citromsav koncentráció, illetve, ha a citoplazmatikus acetil-KoA tovább tud alakulni zsírsavakká.

Ez utóbbi két folyamat nem jellemző éhezésben, ezért szerepük elhanyagolható az oxálacetát transzportjában.

A foszfoenol-piruvát keletkezését oxálacetátból a PEPCK enzim katalizálja. Az előző reakció során létrejött karboxilcsoport CO_2 formájában lehasad és beépül egy foszfát csoport. A foszfát csoportot GTP adja, a reakció végterméke 1 CO_2 valamint 1 GDP. A reakció reverzíbilis, de fiziológiásan a foszfoenol-piruvát keletkezése az előnyben részesített folyamat *(II/6-3. ábra)*.

Az ezt követő lépések foszfoenolpiruvátból a fruktóz-1,6-biszfoszfát keletkezéséig megegyeznek a glikolízis lépéseinek megfordításával. A fruktóz-1,6-biszfoszfát első szénatomjáról a fruktóz-1,6-biszfoszfát foszfatáz enzim hidrolitikusan lehasít egy anorganikus foszfátot. A lépéssel a foszfofruktokináz 1 által katalizált reakciót sikerül megkerülni. A következő irreverzíbilis enzimig a fruktóz-6-foszfát reverzíbilisen izomerizálódik glukóz-6-foszfáttá.

A glukóz-6-foszfát → glukóz átalakulást egy összetettebb rendszer, a glukóz-6-foszfatáz enzimrendszer végzi. Ez az endoplazmás retikulumban található. Ez a több fehérjének az együttműködése révén működő rendszer csak a májban és a vese proximális tubulusaiban található meg. A glukóz-6-foszfatáz katalitikus alegysége az endoplazmás retikulum lumene felé néz, ezért szükség van egy transzporterre, amely a glukóz-6-foszfátot az endoplazmás retikulum lumenébe transzportálja. A foszfát csoport hidrolízise után a keletkezett glukózt és anorganikus foszfátot egy-egy transzporter szállítja az endoplazmás retikulumból a citoplazmába.

A citoplazmatikus glukózt a GLUT2 szállítja a szisztémás keringésbe a májsejtekből *(II/6-4. ábra)*.

A glukoneogenezis energiaigénye kiszámolható, ha sorra vesszük azokat a lépéseket, amelyek ATP hidrolízissel járnak (a GTP-t egyenértékűnek tekintjük az ATP-vel).

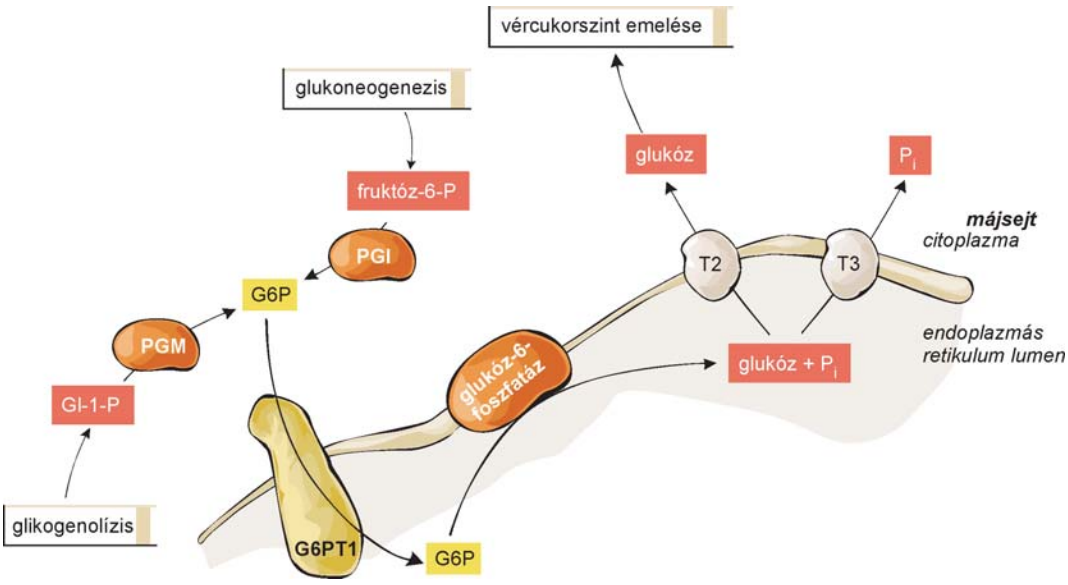
Piruvát → oxálacetát	1 ATP → ADP + P_i
Oxálacetát → foszfoenol-piruvát	1 ATP (GTP) → ADP + P_i
3-foszfoglicerát → 1,3-biszfoszfoglicerát	1 ATP → ADP + P_i

A glukózmolekula két piruvátból keletkezik, azaz összesen 6 ATP hidrolízise szolgáltatja az energiát 1 glukóz szintéziséhez.

Piruváton kívül laktát, glicerin és glukogenikus aminosavak a glukoneogenezis legfőbb forrásai.

Laktát keletkezik egyrészt a vázizomban anaerob glikolízis során. Másrészt a glikolízis végterméke vörösvérsejtekben fiziológiásan mindig a laktát, hiszen a sejteknek mitokondrium hiányában csak anaerob glikolízisre van módjuk. A laktát a májba szállítódik, ahol visszaoxidálódik piruváttá. A piruvát a májsejt energiaállapotától függően vagy továbboxidálódik acetil-KoA-vá, vagy a glukoneogenezis révén glukóz lesz belőle. Ez utóbbi a májsejtből a véráramba kerülve visszajut a vörösvérsejtekhez, illetve az izomba, ahol a glikolízis során ismét piruvát majd laktát keletkezik. A periférián laktátot termelő, majd ebből a májban glukózt szintetizáló és a perifériára visszajuttató folyamatot nevezik keírója után Cori-körnek. Éhezésben nem emelkedik meg a laktát szint, ezért a laktát csak kismértékben vesz részt a glukoneogenezisben.

Triglicridek lebontása során három zsírsav és egy glicerin képződik. A glicerinből májsejtben két enzim segítségével dihidroxi-aceton foszfát keletkezik. A glicerin



II/6-4. ábra

→ gicerofoszfát átalakulást a hepatocitákban található glicerokináz katalizálja – az enzim ezen kívül még bélhámsejtekben található meg –, amit majd a glicerin-foszfát-dehidrogenáz oxidál dihidroxi-aceton foszfáttá. A dihidroxi-aceton-foszfát glicerin-aldehid-3-foszfáttá izomerizálódik, és a két molekula az aldoláz által katalizált reakcióban fruktóz-6-foszfáttá alakul.

Glicerin + ATP → glicerin-3-foszfát + ADP
– glicerokináz

Glicerin-3-foszfát + NAD^+ ↔ dihidroxi-aceton-foszfát + NADH + H^+
– glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz

Dihidroxi-aceton foszfát ↔ glicerinaldehid-3-foszfát
– trióz-foszfát-izomeráz

Glicerinből kiinduló glukoneogenezis kevésbé előnyös a szervezetnek, mivel a glukóz szintézise nem oxálacetáton keresztül történik és megkerüli a citrátkört.

Glukogén aminosavak többnyire a vázizomból származnak. Ezek vagy transzaminálódással piruváttá alakulnak, vagy a katabolikus utak végtermékeként a citromsav-ciklus lépéseiben metabolizálódnak oxálacetáttá. A páratlan számú zsírsavak lebontásakor keletkező propionil-KoA-ból karboxileződés és átrendeződés során szukcinil-KoA keletkezik, ami a citromsav-cikluson keresztül szintén beléphet a glukoneogenezisbe. Ez a folyamat elhanyagolható, mivel a szervezetben csak kis mennyiségben található páratlan szénatomszámú zsírsav.

II/7.
A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása

Kardon Tamás

II/7.1. A GLIKOLÍZIS SZABÁLYOZÁSA

A különböző szövetek, szervek glukóz lebontása nagyon eltérő. A glukóz felhasználását funkcionális eltérések és napszaki ingadozások egyaránt jellemzik. Glukózból csak korlátozott mennyiségű tartaléka van a szervezetnek (lásd glikogén-anyagcsere), ezért a glikolízis szigorú szabályozás alatt áll és a mindenkori igényekhez igazodik.

A glikolízis reakciólépéseiben három olyan enzimet találunk, amelyek fiziológiásan irreverzíbilis reakciót katalizálnak, ezeket nevezzük a glikolízis kulcsenzimeinek. A három enzim a hexokináz/glukokináz, a foszfofruktokináz-1, illetve a piruvát kináz. A három enzim többszintű szabályozás alatt áll: allosztérikus, kovalens és transzkripcionális.

Minden sejt vesz fel glukózt, ami az első lépésben rögtön glukóz-6-foszfáttá alakul. Az első szabályozott enzim, a hexokináz a reakciósor elején található. Több szempontból is fontos a szabályozása:

a keletkezett glukóz-6-foszfátból indul ki a glikogén szintézise,
glukóz-6-foszfáttal indul a pentóz-foszfát út, és
a katalizált reakciót igen magas negatív ΔG jellemzi.

A hexokináz K_M-je kb. 0,1 mM. A vér fiziológiás glukóz koncentrációja 3,3–5,5 mM között változik, azaz nagyságrendnyivel magasabb, mint a hexokináz K_M-je. A glukóz GLUT transzporterek révén passzív diffúzióval, koncentráció-gradiensének megfelelően jut be a sejtekbe. Ez azt jelenti, hogy a hexokináz nagyjából maximális reakciósebességgel dolgozik a sejtekben. Hogy ne termelődjön feleslegesen sok glukóz-6-foszfát, a hexokináz termékgátlás alatt áll, azaz a glukóz-6-foszfát allosztérikus gátlószere az enzimnek. Ez azt jelenti, hogy csak addig tud maximális sebességgel működni, amíg a glukóz-6-foszfát el nem ér egy kritikus koncentrációt, a fölött az enzim gátlódik. Ennek a szabályozásnak a révén pl. harántcsíkolt izomsejtekben az átlagos glukóz-6-foszfát koncentráció nem megy 4 mM fölé.

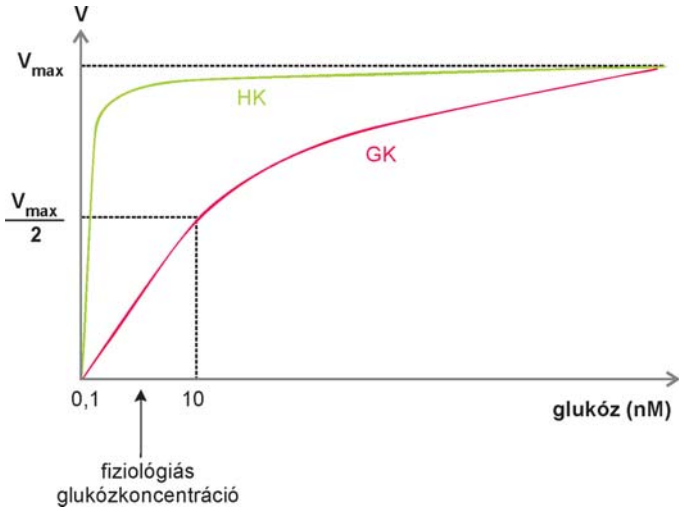
A májsejtekben az első glikolitikus enzim, a glukokináz szabályozása eltér a hexokináz szabályozásától. Reszorpciós fázisban a májsejtek a portális keringésből igen magas glukóz terhelésnek vannak kitéve. A máj igen jelentős szerepet játszik a vércukor szint bizonyos határok között tartásában és ez az első glikolitikus enzim karakterisztikájában és szabályozásában is megmutatkozik. A glukokináz K_M-je jóval magasabb, mint a hexokinázé, ami a reakciókinetikában azt jelenti, hogy pl. 10 mM-os intracelluláris glukózkoncentrációnál az enzim még csak a maximális reakciósebességnek a felével dolgozik, azaz van kapacitása, hogy az emelkedő glukózkoncentrációt követően egyre több glukóz-6-foszfátot termeljen *(II/7-1. ábra)*.

Az inaktív glukokináz érdekessége, hogy a sejtmagban található, ahol egy ún. regulátoros fehérjével alkot nagy affinitással heterodimert. Amikor megnő az intracelluláris glukóz koncentrációja, akkor a glukóz hozzákötődik a heterodimerhez és csökkenti a regulátoros fehérje affinitását a glukokinázhoz, így az szabaddá válik és

a citoplazmába transzlokálódik, ahol a glukóz → glukóz-6-foszfát átalakítást katalizálja. Allosztérikusan a regulátoros fehérje-glukokináz kötés K_M-jét a fruktóz-1-foszfát emeli, a fruktóz-6-foszfát csökkenti, azaz az előbbi a glikolízist serkenti, míg az utóbbi gátolja. A keletkezett glukóz-6-foszfát elsősorban a posztreszorpciós fázisban lebontott glikogén szintézisére fordítódik és csak kevés glukóz bomlik le a glikolízisben.

A glukokináz inzulin hatására indukálódik.

A következő irreverzíbilis reakciót a foszfofruktokináz-1 katalizálja, ami nem csupán egy kulcsenzim, hanem a valódi sebesség-meghatározó enzim a glikolízisben.



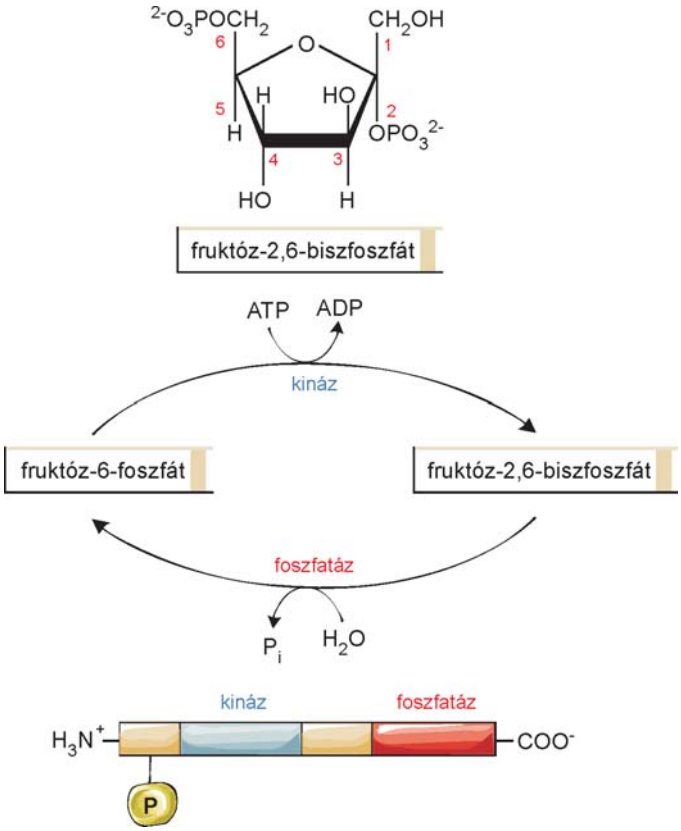
II/7-1. ábra
Kinetikai különbségek a HK és GK között

A foszfofruktokináz-1 az első igazán glikolízisre specifikus reakciót katalizálja, szabályozása meghatározza az egész glikolízis sebességét, irányát. Ha gátolva van, akkor a glukóz-6-foszfát más utakra kényszerül, ha viszont aktív, akkor a glukóz-6-foszfát maradéktalanul lebomlik piruvátra. A foszfofruktokináz-1-et allosztérikusan aktiválja AMP és fruktóz-2,6-biszfoszfát, míg az allosztérikus gátlószerei az ATP, a citrát, az acil-Koa és a csökkenő pH. A glikolízis egyik legfontosabb feladata, hogy ATP-t szintetizáljon. Amennyiben elegendő ATP van a citoplazmában, akkor nem fokozni, hanem ellenkezőleg, lassítani érdemes a glukóz lebontását, amit az ATP a foszfofruktokináz-1 allosztérikus gátlásával valósít meg. Míg magas [ATP] a glikolízist fokozza, emelkedett [AMP] az enzimet gátolja. A folyamat akkor érthető meg, ha figyelembe vesszük a koncentráció különbségeket. ADP koncentrációja az ATP-hez képes igen alacsony, ezért kismértékű csökkenés az ATP-ben nagymértékű emelkedést okoz az ADP-ben. Emelkedett AMP még nagyobb ATP igényt jelent. Ez akkor következik be, amikor két ADP egy ATP-re és egy AMP-re diszproporcionál az adenilát-kináz által katalizált reakcióban:

$$ADP + ADP \rightarrow ATP + AMP$$

Citrát fiziológiás körülmények között a mitokondriumban keletkezik a citromsav ciklus első lépésében. Amennyiben a ciklus működik, úgy a citrát oxálacetáttá alakul át. Ha magas a mitokondrium és ezzel együtt a sejt ATP koncentrációja, akkor a ciklus gátlódik, és a keletkezett citrát kijut a citoplazmába, ahol gátolja a foszfofruktokináz-1-et. Ez szintén annak a jele, hogy elegendő ATP van jelen, azaz a sejt energetikailag jól el van látva, nincs szükség a glikolízis fokozására.

A fruktóz-2,6-biszfoszfát a foszfofruktokináz-1 legerősebb allosztérikus aktivátora. A fruktóz-2,6-biszfoszfát nem intermediere a glikolízisnek, viszont egy glikolitikus intermedierből, a fruktóz-6-foszfátból szintetizálódik a foszfofruktokináz-2 közreműködésével *(II/7-2. ábra)*. Az enzim bifunkcionális, ún. tandem enzim, mert két különböző aktivitással rendelkezik. Aktivitásának irányát a foszforilációs állapota határozza meg. Az enzim négy alegységből álló homotetramer, öt izoformája ismert és



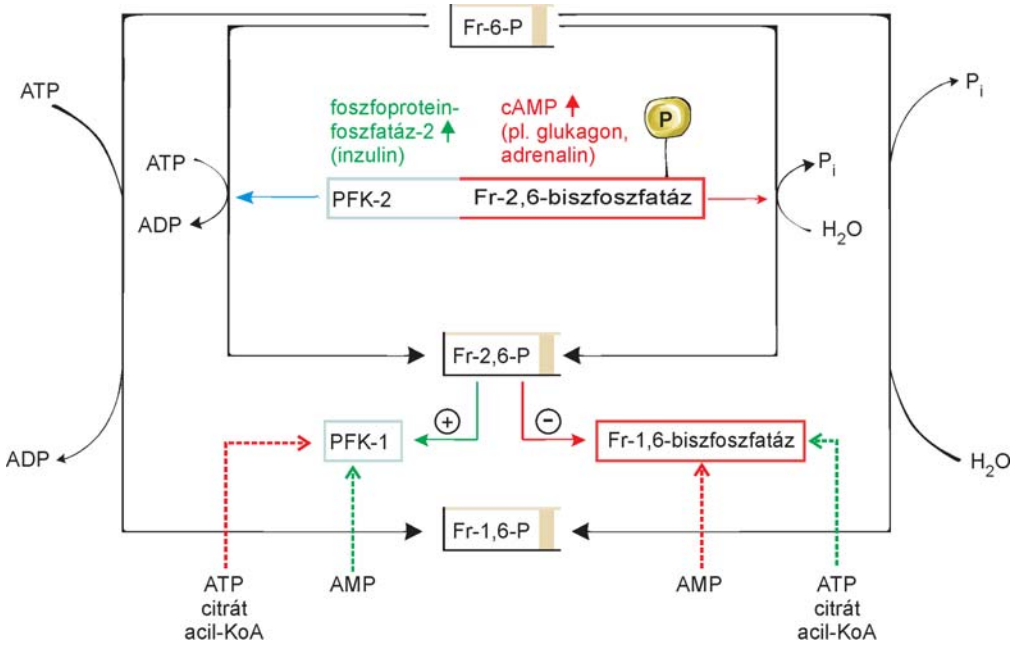
II/7-2. ábra

három doménből áll. A májban előforduló izoforma egy rövid amino-terminális regulációs doménből, valamint egy kináz- és egy foszfatázaktivitással rendelkező doménből áll. A katalizált reakció alapján foszfofruktokináz 2-nek, illetve fruktóz-2,6-biszfoszfatáznak nevezik attól függően, hogy fruktóz-2,6-biszfoszfátot szintetizál, vagy hidrolizál. A foszforilálható szerint tartalmazó regulációs domén egy molekuláris kapcsoló, amelynek a foszforilációja dönti el, hogy az enzim kináz vagy foszfatáz. Foszforilált állapotban foszfatázként működik és a kináz aktivitása gátolt, defoszforilálva pedig ATP-t felhasználva kináz aktivitása van és a foszfatáz domén gátolt.

Az enzim foszforiláltsága hormonális szabályozás alatt áll. A foszfofruktokináz-2 szubsztrátja a protein kináz A-nak, ezért minden olyan szignál, amely fokozza a cAMP szintet és aktiválja a protein kináz A-t, a foszfatáz aktivitását erősíti. Amennyiben lebontja a fruktóz-2,6-biszfoszfátot, úgy az nem tudja allosztérikusan aktiválni a foszfofruktokináz-1-et, ezért a glikolízis sebessége lelassul. A foszforilált fehérjét foszfoproteinfoszfatáz-2 (PPP2) defoszforilálja. A PPP2 inzulin hatására aktiválódik. Az inzulin emellett csökkenti az intracelluláris cAMP-szintet is egy foszfodiészteráz aktiválásán keresztül *(II/7-3. ábra)*.

Az extrahepatikus szövetek a glikolízisből nyert ATP-t a saját szükségleteikre hasznosítják, és nem vesznek részt a vércukor szabályozásában. Ezekben a szövetekben, sejtekben a foszfofruktokináz-2 öt izoformájából olyanok találhatóak, amelyek cAMP emelkedésre egy másik szerinen foszforilálódnak, mint a májban lévő izoforma. Ez a foszforiláció viszont fokozza a kinázaktivitást a májban leírtakkal szemben, aminek a glikolízis aktiválódása a következménye. Ilyen például, amikor adrenalin hatására az izomsejtek felkészülnek a várható fokozott stresszhelyzetre, izommunkára, ami érthetően fokozott ATP mennyiséget igényel.

A piruvát-kináz a harmadik irreverzíbilis lépést katalizáló enzim a glikolízisben. Szabályozása az utolsó lehetőség a glikolízis szabályozásában. Ennek az enzimnek is több izoformája ismert, ezek közül a májban található piruvát-kináz-L szabályozását mutatjuk be. A piruvát-kináz-L-et allosztérikusan a fruktóz-1,6-biszfoszfát aktiválja, ATP és alanin gátolja. Az enzimen található foszforilációs hely is, a szabályozásban ez a kovalens módosítás is szerepet játszik. A piruvát-kináz-L szubsztrátja a PK-A-nak és foszforilálva inaktív, defoszforilálva aktív. Ez azt jelenti, hogy minden



II/7-3. ábra
PFK-1 szabályozása

olyan szignál, ami a citoplazmatikus cAMP-t emeli, a piruvát-kináz-L-et gátolni fogja, azaz csökkenti a glikolízis sebességét. Az enzim alloszterikus aktiválása fruktóz-1,6-biszfoszfáttal klasszikus példája az ún. előreható aktiválásnak. A fruktóz-1,6-biszfoszfát a glikolízis sebességmeghatározó, és egyben legjobban szabályozott lépésében keletkezik. Amennyiben emelkedik a fruktóz-1,6-biszfoszfát mennyisége, úgy ez fokozott szubsztrátáramlást jelent a nem szabályozott reverzíbilis lépésekhez a glikolízis során. Ez egészen a piruvát-kinázig fokozódhat, itt viszont lelassulna a reakció, az intermedierek torlódnának. Mivel a fruktóz-1,6-biszfoszfát alloszterikusan aktiválja a piruvát-kinázt, nem engedi, hogy a glikolízis emiatt lelassuljon.

II/7.2. A GLUKONEOGENEZIS SZABÁLYOZÁSA

A glukoneogenezis szabályozása, akárcsak a glikolízisé, többszintű: alloszterikus szabályozással és kovalens módosítással gyorsan, míg transzkripciós szintű szabályozással lassabb, de hosszabban elhúzódó szabályozás érhető el. A szabályozott enzimek a glikolízis irreverzíbil**is lépéseit kikerülő enzime**k (lásd II/6-1. ábra).

A piruvát-karboxiláz aktivitását alloszterikusan az acetil-KoA aktiválja, egyben fokozza az oxálacetát szintézisét. A szabályozásnak a citromsav ciklus feltöltő reakcióinál van kitüntetett szerepe (lásd citrátkör, anaplerotikus folyamatok). Az ADP és az aszpartát allosztérikus gátlószerek. ADP-szint emelkedése a sejt fokozott energiaigényére utal, ilyen esetben tehát nem érdemes fokozni az amúgy is energiaigényes glukoneogenezist.

A foszfoenol-piruvát karboxikinázt az ADP allosztérikusan gátolja.

II/7-1. táblázat
A glukoneogenezis szabályozása

	Alloszterikus	**Kovalens**	**Transzkripciós**
Glukokináz	glukóz ↑, fruktóz-6-P ↑, fruktóz-1-P ↓, palmitoil-KoA ↓		inzulin: I, glukagon: R
Hexokináz	glukóz-6-foszfát ↓		
Foszfofruktokináz-1	AMP ↑, Fr-2,6-P ↑, ATP ↓, citrát ↓, acil-KoA ↓, alacsony pH ↓	inzulin ↑, glukagon ↓ (indirekt módon Fr-2,6-P-on keresztül)	inzulin: I, glukagon: R
Piruvát-kináz-L	Fr-1,6-P ↑, ATP ↓, Ala ↓	inzulin ↑, glukagon ↓	inzulin: I
Piruvát-karboxiláz	acetil-KoA ↑, ADP ↓, Asp ↓		glukokortikoidok: I, inzulin: R
Foszfoenol-piruvát-karboxikináz	ADP ↓		glukokortikoidok: I, cAMP: I, inzulin: R
Fruktóz-1,6-bisz-foszfát-foszfatáz	ATP ↑, citrát ↑, acil-KoA ↑, AMP↓, F-2,6-P↓	inzulin ↓, glukagon ↑ (indirekt módon Fr-2,6-P-on keresztül)	glukokortikoidok: I, inzulin: R
Glukóz-6-foszfatáz			glukokortikoidok: I, inzulin: R

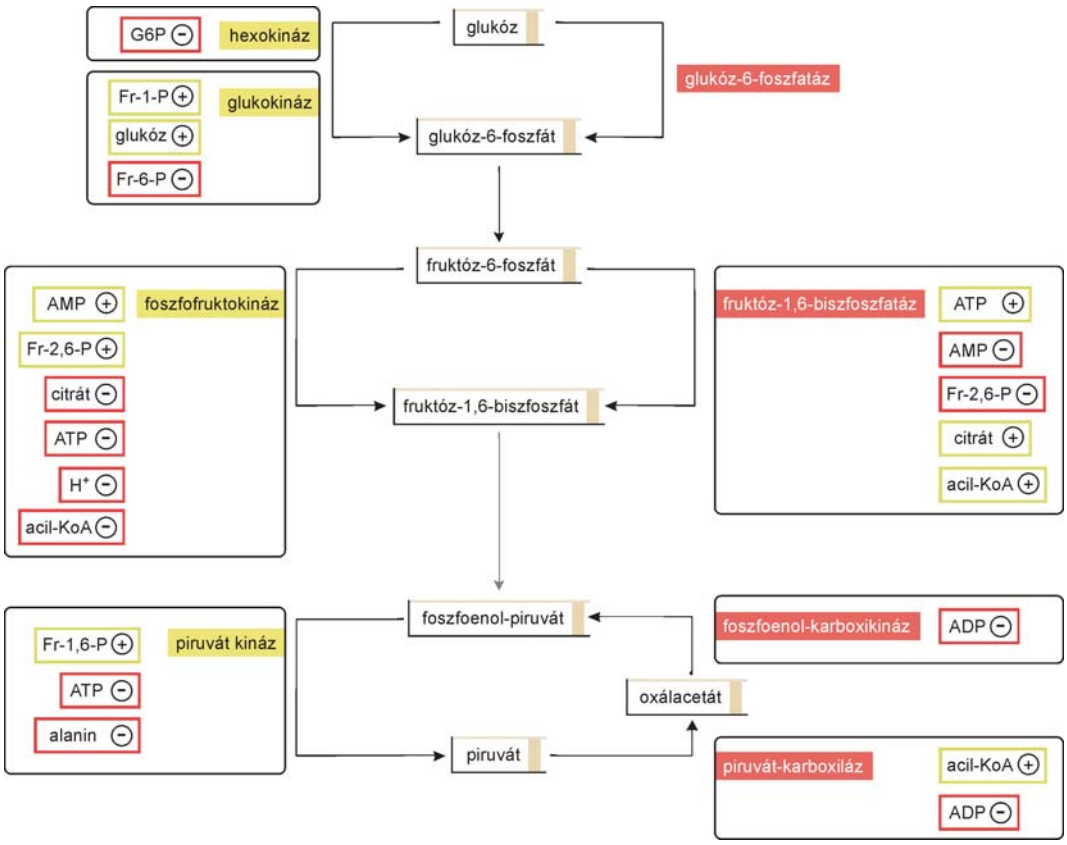
(↑: aktivál, ↓: gátol, I: indukció, R: represszió)

Az előbb említett két enzimre jellemző, hogy éhezésben főként glukagon és glukokortikoidok hatására) fokozódik a szintézisük, ami jelentősen növeli a glukoneogenezis kapacitását.

A fruktóz-1,6-biszfoszfát foszfatáz aktivitása a sejt energiaállapotától függ, azaz az ATP, a citrát és az acil-KoA allosztérikusan aktiválja az enzimet, míg az emelkedett AMP és fruktóz-2,6-biszfoszfát az enzim inhibitorai. A fruktóz-2,6-biszfoszfát az enzim legerősebb allosztérikus inhibitora, mennyisége a glikolízisnél szabályozásánál leírtak szerint hormonális szinten szabályozódik.

A glukóz-6-foszfatáznak nincs ismert allosztérikus szabályozása, aktivitását a glukóz-6-foszfát luminális irányú transzportja határozza meg.

Összevetve a glikolízis és a glukoneogenezis szabályozását, megfigyelhető, hogy az allosztérikus szabályozó molekulák – pár kivétellel – közül azok, amelyek a glikolízist serkentik, egyben gátolják a glukoneogenezist és fordítva *(II/7-4. ábra).* Ezt a típusú szabályozást nevezzük *koordinált szabályozás*nak. A glikolízis és a glukoneogenezis nem játszódhat egyszerre le, ez hiábavaló energiaciklushoz vezetne, ráadásul a máj nem tudná a vércukorszintet szabályozni.



II/7-4. ábra
A glikolízis és a glukoneogenezis koordinált szabályozása

II/8.
A fruktóz és a galaktóz metabolizmusa

Kardon Tamás

II/8.1. A FRUKTÓZ ANYAGCSERÉJE

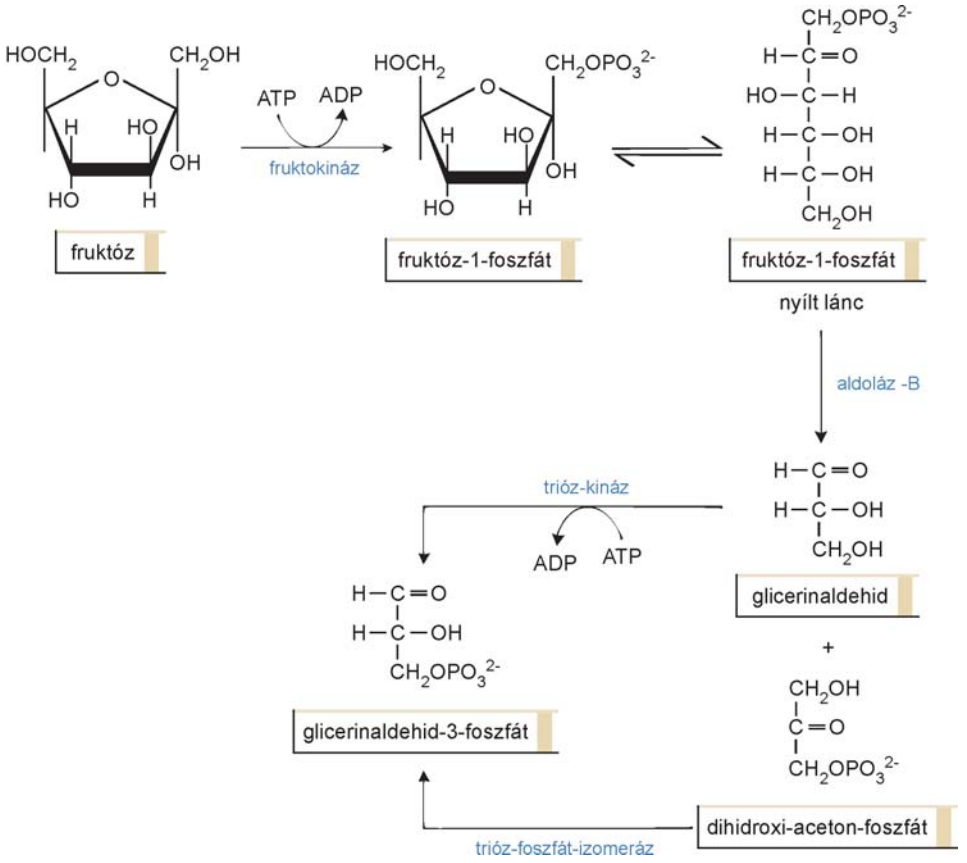
A táplálékban fruktóz főleg szacharózként és szabad fruktózként (gyümölcscukor) van jelen. A szacharóz diszacharid, glukózt és fruktózt tartalmaz α1-β2 kötésben (α-D-glukopiranozil-1-2-β-D fruktofuranóz). Szacharózból diszacharidázok hidrolízise után jut a vékonybélbe, majd GLUT5-ös transzporteren keresztül bejut az epitelsejtekbe, ahonnan szintén GLUT5 transzportálja a portális keringésbe és végül a májba jut. A monoszacharidok metabolizmusára jellemző, hogy katabolizmusuk nagy része a májsejtekben történik és intermedierjeik révén csatlakoznak a glikolízishez. A fruktóz majdnem teljes mennyisége a májban metabolizálódik, az extrahepatikus szövetekhez csak elhanyagolhatóan kis hányada jut. A fruktóz a lebontás során dihidroxi-aceton-foszfát formájában kapcsolódik a glikolízisbe.

A lépések a következők:

1. fruktóz + ATP $\rightarrow$ fruktóz-1-foszfát + ADP
   – fruktokináz
2. fruktóz-1-foszfát $\rightarrow$ glicerinaldehid + dihidroxi-aceton foszfát
   – aldoláz B
3. dihidroxiaceton-foszfát $\leftrightarrow$ glicerinaldehid-3-foszfát
   – trióz-foszfát-izomeráz
4. glicerinaldehid + ATP $\rightarrow$ glicerinaldehid-3-foszfát + ADP
   – trióz-kináz

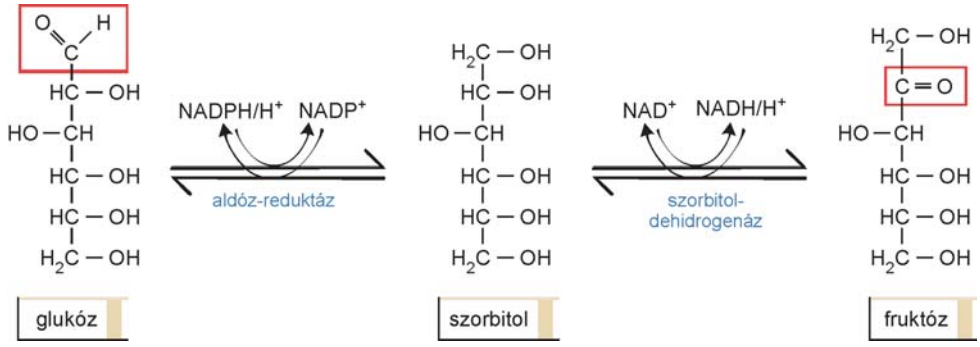
Az első lépésben a fruktózt fruktokináz foszforilálja ATP segítségével fruktóz-1-foszfáttá. A lépés irreverzibilis és nem áll szabályozás alatt. A követező lépésben a fruktóz-1-foszfátot az aldoláz-B bontja két triózra: glicerinre és dihidroxi-aceton foszfátra. Az aldoláz-B annyiban különbözik a glikolízisben megismert aldoláztól, hogy igen nagy az affinitása a fruktóz-1-foszfát iránt, viszont kicsi a fruktóz-1,6-foszfát irányában. A keletkezett dihidroxi-aceton-foszfátot a glikolízisben megismert trióz-foszfát-izomeráz alakítja glicerinaldehid-3-foszfáttá.

A glicerinaldehid trióz kináz segítségével ATP terhére foszforilálódik glicerinaldehid-3-foszfáttá *(II/8-1. ábra)*. A fruktóz metabolizmusa jóval gyorsabb, mint a glukóz lebontása. Ennek valószínűleg az az oka, hogy glicerinaldehid-3-foszfátként kapcsolódva a glikolízisbe kikerüli a szabályozott lépést, és csak a szubsztrát mennyiségétől függően lesz belőle piruvát. Ennek megfelelően a fruktóz lipogenikus hatása is erősebb, mint a glukózé. Meg kell jegyezni, hogy a minden sejtben jelen lévő hexokináz szintén képes foszforilálni a fruktózt, a reakció végterméke a fruktóz-6-foszfát. Ez a reakcióút viszont nem jelentős, mert a máj képes majdnem az összes táplálékkal felszívódott fruktózt lebontani. A fruktokináz K_M-je nagyon alacsony a fruktózra nézve, míg a hexokináz K_M-je 1 mM felett van, jóval magasabb a fiziológiásan mérhető fruktóz koncentrációnál.



II/8-1. ábra
A fruktóz lebontása

Fruktózra a spermiumoknak a gyors energiatermelés miatt nagy szüksége van. A fruktóz alternatív úton glukózból képződik ezekben a sejtekben. Ezt a szintézist poliol útnak is nevezik. A glukóz NADPH terhére aldóz reduktáz (poliol-dehidro-



II/8-2. ábra
A fruktóz szintézise – „poliol" út

genáz) enzim segítségével cukoralkohollá, szorbitollá redukálódik. A fruktózzá való visszaoxidációt NAD^+-dal működő ketóz-reduktáz (szorbitol-dehidrogenáz) fogja ezután katalizálni *(II/8-2. ábra)*.

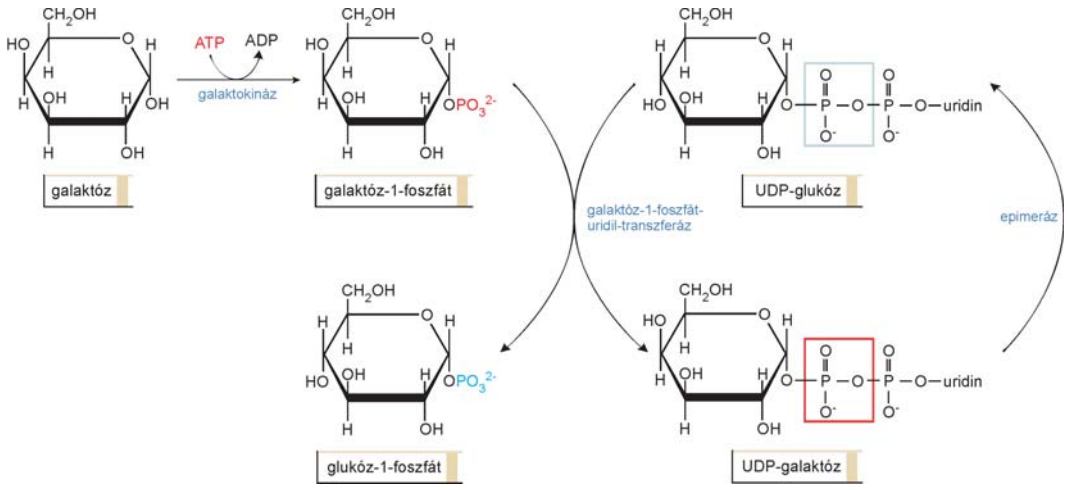
II/8.2. GALAKTÓZ ANYAGCSERÉJE

A laktóz a tejben található diszacharid, ami galaktózból és glukózból áll β1-α4 kötésben (β-D-galaktopiranozil-1-4-α-D-glukopiranóz). A bélbolyhok felszínén laktáz hidrolizálja glukózra és galaktózra. A glukózzal párhuzamosan a galaktóz is másodlagosan aktív transzporttal jut be az epitelsejt lumenébe, ahonnan a GLUT2 segítségével a portális keringésbe jut. A májban glukóz-6-foszfáttá alakul és belép a glikolízisbe.

A lépések a következők:

1. galaktóz + ATP → galaktóz-1-foszfát + ADP
   – galaktokináz
2. galaktóz-1-foszfát + UDP-glukóz → UDP-galaktóz + glukóz-1-foszfát
   – UDP-glukóz-galaktóz-1-foszfát uridil transzferáz
3. UDP-galaktóz → UDP-glukóz
   – epimeráz
4. glukóz-1-foszfát → glukóz-6-foszfát
   – foszfoglukomutáz

A májba kerülve a galaktózt a galaktokináz ATP terhére galaktóz-1-foszfáttá foszforilálja. A következő lépéshez szükség van egy aktivált glukózra, ami az uridil csoportot a galaktóz 1. szénatomjához köti. A keletkezett UDP-galaktóz epimeráz segítségével regenerálódik UDP-glukózzá. A reakció másik termékét a glukóz-1-foszfátot a foszfoglukomutáz glukóz-6-foszfáttá izomerizálja. A galaktóz ezen az úton végül glukóz-6-foszfáttá alakul és glukóz ekvivalensként be tud lépni a glikolízisbe *(II/8-3. ábra)*.

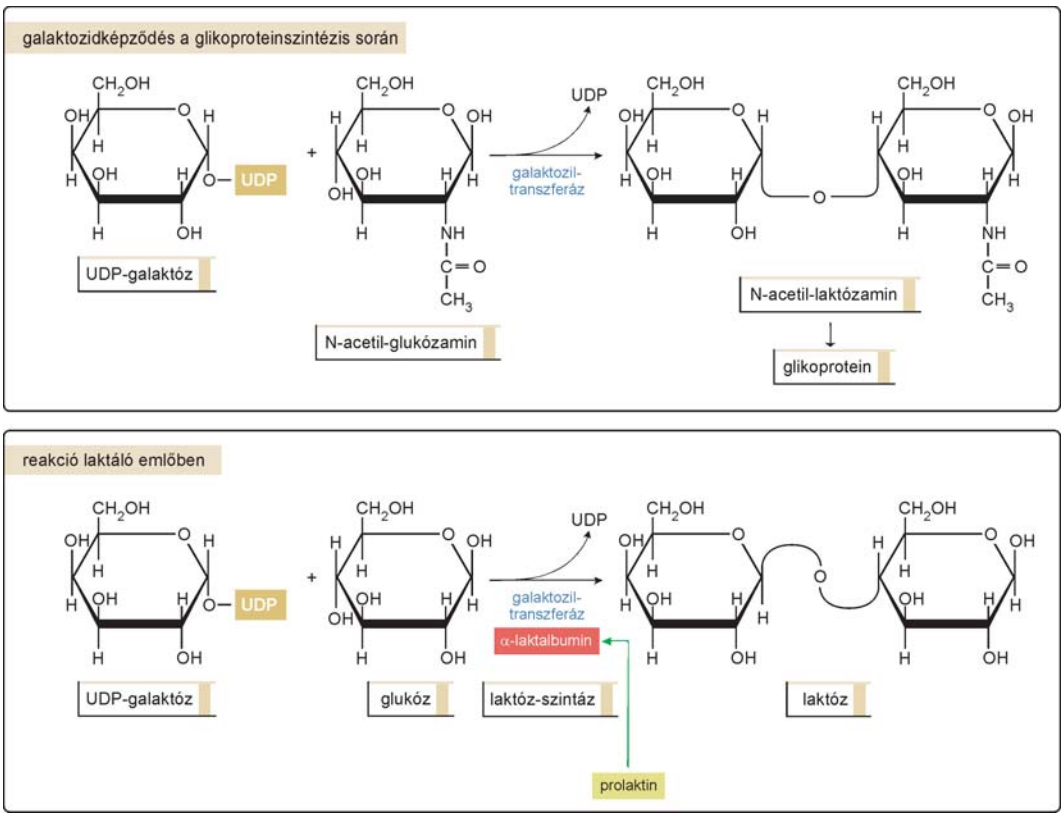


II/8-3. ábra
Galaktóz átalakulása glukóz-1-foszfáttá

A humán szervezet képes laktózt szintetizálni, hiszen szülés után a megfelelő anyatejes táplálkozáshoz szükség van az anyatej magas laktóz tartalmára. Ez a következő lépésekben zajlik:

1. glukóz-6-foszfát ↔ glukóz-1-foszfát
   – foszfoglukomutáz
2. glukóz-1-foszfát + UTP → UDP-glukóz + PP_i
   – UTP-glukóz-1-foszfát transzferáz
3. UDP-glukóz ↔ UDP-galaktóz
   – epimeráz
4. UDP-galaktóz + glukóz ↔ laktóz
   – laktóz-szintáz

Érdemes megfigyelni, hogy laktóz két glukózból szintetizálódik. Az első két lépés megegyezik a glikogén szintézis első lépéseivel. Az UDP-glukóz UDP-galaktóz átalakulást katalizáló epimeráz reverzibilis reakciót katalizál és fordítottja a galaktóz lebontásánál látott reakciónak. Az utolsó lépéshez laktóz szintázra van szükség. Ennek az enzimnek a specificitását az α-laktalbumin határozza meg. Ez a fehérje csak az emlőmirigyekben expresszálódik, fiziológiásan szülés után. Más sejtekben az UDP-galaktóztat az enzim az N-acetil-glukózaminhoz kapcsolja. A keletkező termék a



II/8-4. ábra
A laktóz szintézise

glikoprotein szintézisben használódik fel. Terhesség során fokozódik a prolaktin szintézise, ami a laktóz szintézishez elengedhetetlen. Az emlőmirigyek mégsem tudnak laktózt szintetizálni, mert a szintén magas koncentrációban jelen levő progeszteron gátolja a prolaktin hatását. Szülést követően a progeszteron mennyisége hirtelen lecsökken, ezért a prolaktin képes az emlőmirigyekben indukálni az α-laktalbumin fehérje szintézisét. Az α-laktalbumin hozzákötődik a galatozil-transzferázhoz és csökkenti annak affinitását az N-acetil-glukózaminra, viszont megnöveli a glukózra. A képződött termék emlőmirigyben tehát nem N-acetil-laktózamin lesz, hanem laktóz *(II/8-4. ábra)*.

II/9.
A glikogén anyagcseréje

Kardon Tamás

A glikogén, a glukóz egyetlen raktározási formája, a szervezet legismertebb és legfontosabb poliszacharidja. A glikogén molekula elágazó láncai faágszerűen helyezkednek el a sejt citoplazmájában, melyek elektronmikroszkóppal jól látható hexagonális szemcsékké állnak össze. A glikogénben a glukóz molekulák alapvetően α1-4 kötéssel kötődnek egymáshoz, a faágszerű térszerkezet pedig úgy jön létre, hogy nagyjából 9-10 monomerenként egy α1-6-os elágazást találunk a láncban. Mindegyik szemcse közepén glikogenin fehérjemolekula található.

Szénhidrát-raktározás glikogén formában azért előnyös a szervezetnek, mert a glikogénben tárolt glukóz gyorsan mobilizálható glukóz-foszfátként. Szerkezetéből adódóan nem növeli az intracelluláris ozmotikus nyomást. Mivel a táplálékkal felvett glukóz csak rövid ideig biztosítja a vér fiziológiás vércukorszintjét, ezért a glikogénlebontásból származó glukóz az elsődleges forrás a vércukorszint szabályozásában.

Glikogént két szervben találunk: a májban kb. 150 g, a vázizmokban pedig kb. 300 g glikogén raktározódik. Ez azt jelenti, hogy a máj tömegének körülbelül 10%-át teszi ki, míg az izmok össztömegének kb. 2%-át. A máj glikogénraktárai éhezéses periódusokban használódnak fel. A glikogén lebontása végső soron glukóz-6-foszfátot eredményez, amelyből az endoplazmás retikulumban a foszfát hidrolízisével glukóz keletkezik. A glukóz a vérbe transzportálódik, és emeli a vércukorszintet. A vázizmok glikogénraktárai csak az izomműködéshez szükséges energiaforrásként szolgálnak, a vér glukóz koncentrációját nem emelik. Glikogénből a szervezet kb. 24 óráig képes a fiziológiás vércukorszintet fenntartani. Táplálékfelvétel alkalmával a glikogénraktárak gyorsan újból feltöltődnek.

II/9.1. GLIKOGÉNSZINTÉZIS

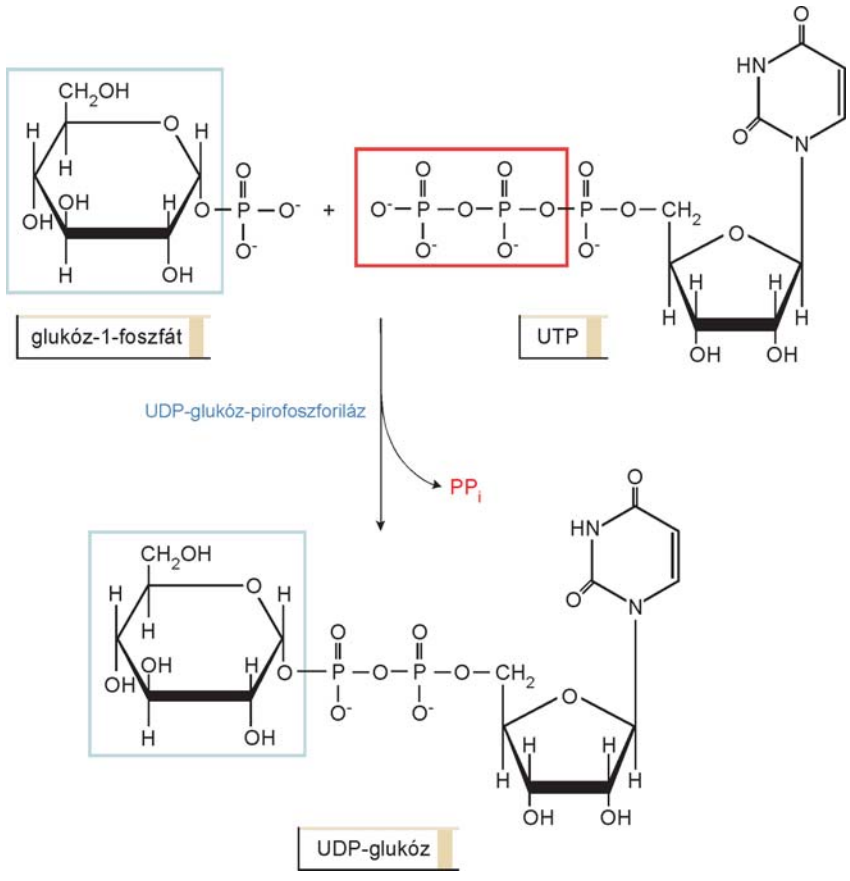
Glikogén szintézise csak pozitív intracelluláris energiamérleg esetén következik be, azaz tápanyagbevitel esetén (étkezések alatt és után). A glikogén szintézise általában nem új glikogénmolekula szintézisét jelenti, hanem egy már meglévő glikogén lánc meghosszabbítását. Mindegyik glikogénszemcse (molekula) közepén egy glikoprotein: a glikogenin található.

A glikogén szintézise energiaigényes folyamat. A glukóz molekulát aktiválni kell, hogy magas csoportátviteli potenciállal rendelkező vegyületet kapjunk. Az ennek hasításakor felszabaduló energia fedezi a glikogénlánc meghosszabbításához szükséges energiát. A glukóz aktiválása három lépésben megy végbe, amit a glikogénlánc hosszabbítása követ.

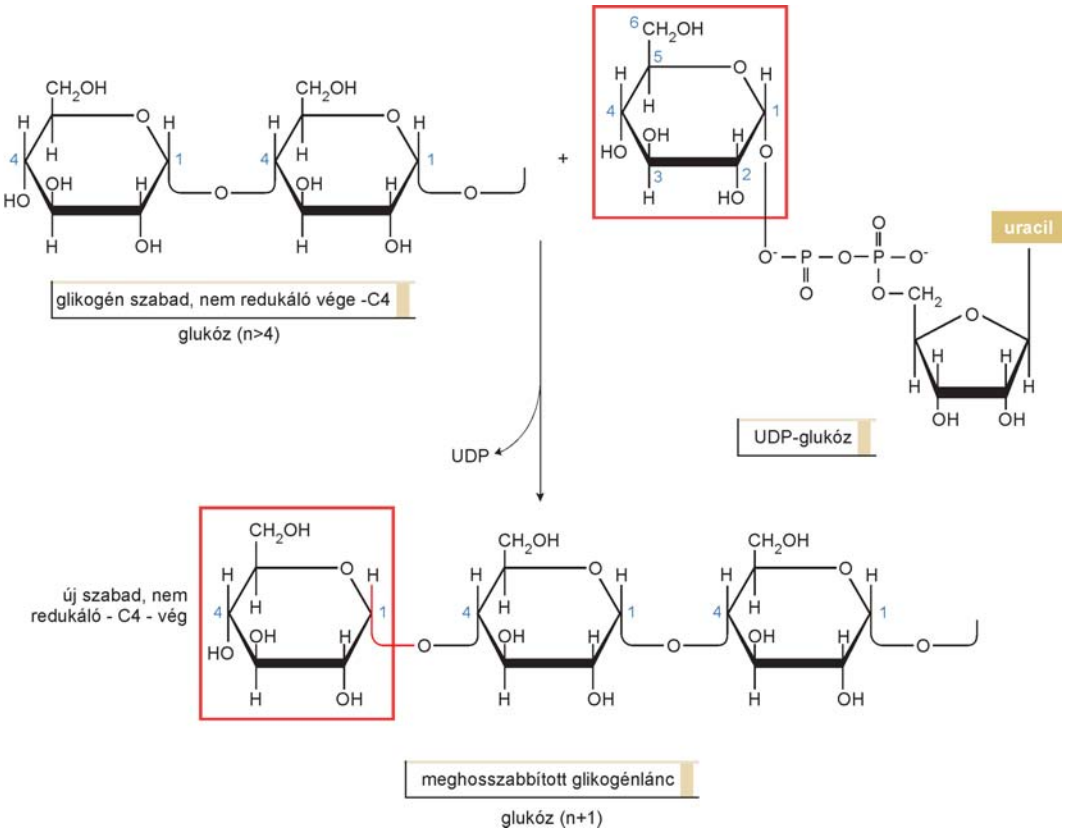
1. glukóz + ATP $\rightarrow$ glukóz-6-foszfát + ADP – glukokináz
2. glukóz-6-foszfát $\leftrightarrow$ glukóz-1-foszfát – foszfoglukomutáz
3. glukóz-1-foszfát + UTP $\rightarrow$ UDP-glukóz + PP_i – UTP-glukóz-1-foszfát-transzferáz
4. UDP-glukóz + $\text{glikogén}_{(n \text{ db glukóz})} \rightarrow$ UDP + $\text{glikogén}_{(n+1 \text{ db glukóz})}$ – glikogén-szintáz

Az első reakció megegyezik a glikolízis első lépésével. A második izomerizációs lépés során kialakul a glukóz-1-foszfát, amely az uridin-trifoszfáttal való konjugációhoz szükséges foszfátot az első szénatomon köti. A reakció reverzibilis. A harmadik reakció az uridin-difoszfáttal aktivált glukóz képződése. Az uridin-trifoszfát és glukóz-1-foszfát konjugációjával kialakul a nagyenergiájú kötést tartalmazó UDP-glukóz *(II/9-1. és II/9-2. ábra)*. A reakció $\Delta G'$ értéke negatív, azaz a reakció az UDP-glukóz képződés irányába tolódik el. A sejtekben jelen lévő anorganikus pirofoszfatázok a PP_i-t nagyon gyorsan két anorganikus foszfátra hidrolizálják, ami által a 3. reakció jobb oldalán található PP_i mennyisége nulla lesz. Az UDP-glukóz savanhidrid kötésének hasítása fedezi az utolsó lépéshez szükséges energiát: a glikogén egy glukóz molekulával – α1-4 kötéssel – meghosszabodik.

A glikogén elágazó molekula, a glikogén-szintáz viszont csak az α1-4-kötések kialakítását tudja katalizálni, az elágazásokét nem. Az elágazásokat egy ún. elágaztató enzim – amilo-1,4-1,6-transzglukoziláz katalizálja. Az enzim akkor tud hozzákapcsolódni a glikogénhez, ha a szintetáz már legalább 11 glukózmonomer hosszúságú polimert szintetizált. Kapcsolódás után lehasít egy 7 egységből álló oligoszacharidot és áthelyezi a szintetizálódó glikogén egyik glukóz egységének a 6. szénatomjához α1-6 kötéssel. Az újabb utolsó szabad glukóz nem redukáló negye-



II/9-1. ábra
Az aktivált glukóz szintézise



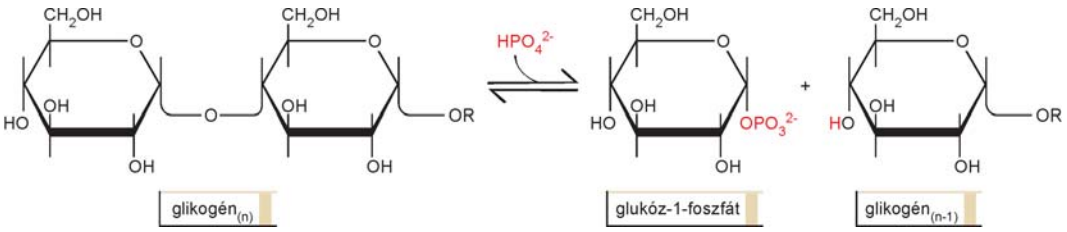
II/9-2. ábra
A glikogén szintézise

dik szénatomjához a glikogén szintáz addig köt újabb glukózokat, míg legalább újabb 11 monomer összekapcsolódik, innentől kezdve ismétlődik a folyamat. A szabad, nem redukáló végek száma folyamatosan növekedik.

A glikogenin egy 37 kDa-os fehérje, amely glikozil-transzferáz aktivitással rendelkezik. A glikogén de novo szintézise két glikogenin dimerizációjával kezdődik. A két fehérje egymást glikozilálja a 194-es tirozinjaik hidroxilcsoportján, majd a következő 7 glukóz α1-4-es konjugációját is elvégzi. A reakcióhoz itt is UDP-glukózra van szükség. A már nyolc glukózt tartalmazó lánc egymástól eltávolodik, ezért hozzá tud kapcsolódni a glikogén szintáz. A szintézis lépései ettől kezdve nem különböznek az előzőekben leírtaktól.

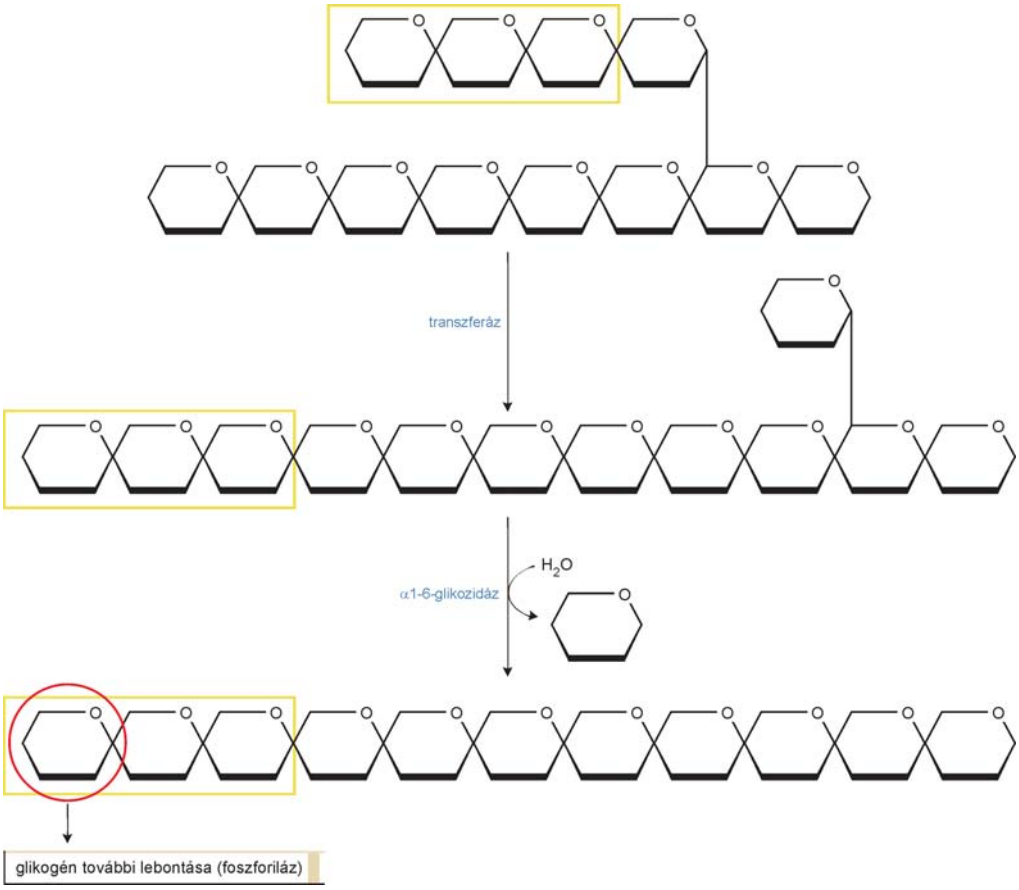
II/9.2. GLIKOGENOLÍZIS

A glikogén láncvégi glukóz egységei a glikogén-foszforiláz enzim segítségével hasadnak le. Az enzimnek piridoxál-foszfát a prosztetikus csoportja. A reakciót foszforolízisnek nevezzük a hidrolízis elnevezés analógiájára, hiszen nem víz, hanem anorganikus foszfát segítségével jön létre a molekula hasítása. A reakció vég-



II/9-3. ábra
Glikogén-foszforiláz

terméke glukóz-1-foszfát, mely a foszfoglukomutáz segítségével glukóz-6-foszfáttá alakul. A glikogén-foszforiláz csak a láncvégi α1-4 glikozidos kötéseket tudja hasítani *(II/9-3. ábra)*. Mivel a glikogén számos elágazódást tartalmaz, szükség van olyan enzimre, melyek az α1-6 kötéseket is képesek hasítani.

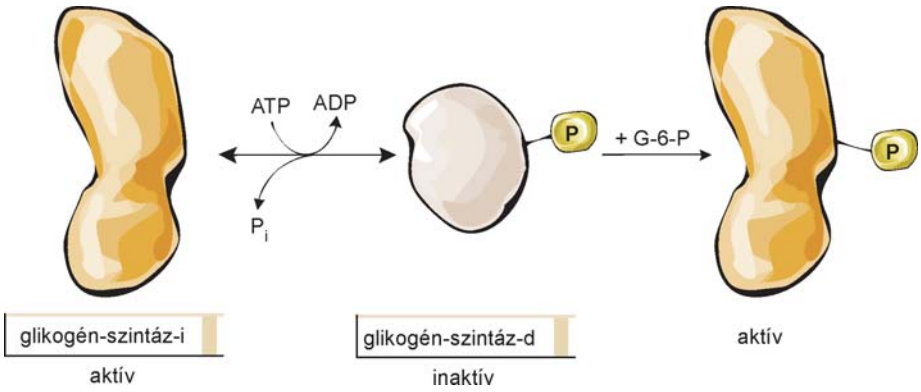


II/9-4. ábra
Glikogén elágazásainak bontása

Az elágazásoknál hasító enzimet elágazódást bontó enzimnek nevezik. Ez egy tandem enzim, amely két különböző enzimaktivitással rendelkezik. Először négy egységgel az elágazás előtt az utolsó triszacharid egységet hidrolízissel lehasítja, és áthelyezi egy hosszabb glikogénlánc nem redukáló C4 végéhez α1-4 kötéssel (transzferáz aktivitás). Ezután a megmaradt elágazásnál lévő glukóz molekula egy α1-6 hidrolízissel glukóz formájában lehasad (α1-6-glikozidáz-aktivitás) *(II/9-4. ábra*). A glikogenolízis során keletkezett glukóz-6-foszfát a májban az endoplazmás retikulumban glukózzá hidrolizál, innen a citoplazmába kerül, végül a GLUT2 segítségével a vérbe transzportálódik. Izomsejtek szarkoplazmás retikulumából hiányzik a glukóz-6-foszfatáz, ezért e sejtekben a glikogénből származó gukóz-6-foszfát a glikolízisbe lép és piruvát lesz belőle.

II/9.3. A GLIKOGÉNSZINTÉZIS SZABÁLYOZÁSA

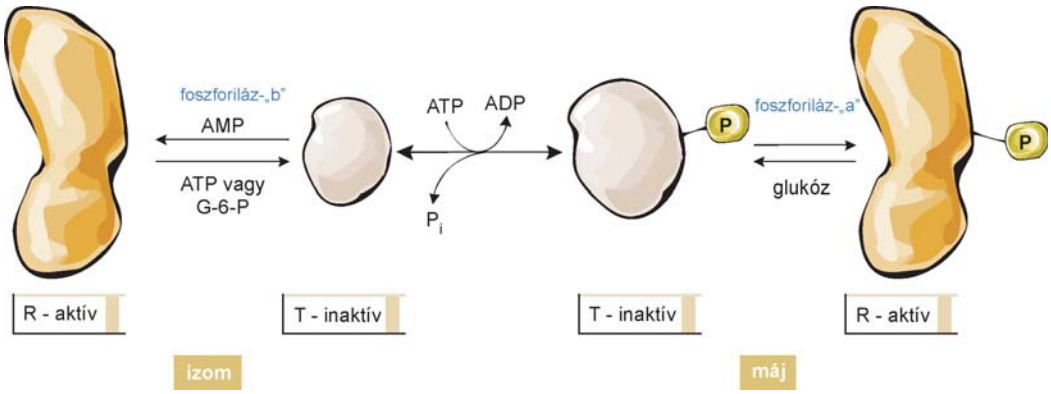
A glikogénszintézist a glikogén-szintáz sebessége határozza meg. A glikogén-szintáz számos protein-kináznak szubsztrátja, mint pl. protein-kináz-A (PKA), glikogén-szintáz-3 (GSK3), protein-kináz-G (PKG), kazein-kináz-1. A szintáz kovalens módosítására később a koordinált szabályozásban térünk ki. A glikogén-szintáz a foszforilázhoz hasonlóan, két konformációban található, egy aktív R és egy inaktív T formában. A foszforiláció a T, inaktív forma kialakulásának kedvez. Az enzim három állapotot vehet fel, attól függően, hogy a sejtben jelen van-e glukóz-6-foszfát vagy sem. A foszforilációval létrejött inaktív enzimet glikogén-szintáz-„D”-nek, a defoszforilált aktív formát glikogén-szintáz-„I”-nek nevezik, attól függően, hogy függ-e a glukóz-6-foszfáttól. Intracelluláris glukóz-6-foszfát szintjének emelkedése a glikolízis sebességének csökkenését jelenti, azaz a glikogén lebontása tovább nem szükséges, a „fölös” glukóz-6-foszfát elindulhat a glikogénszintézis irányába. A foszforilált, inaktív glikogén-szintáz-D alloszterikusan megköti a gukóz-6-foszfátot, és átmegy foszforilált R formába, azaz aktiválódik és a glikogénszintézis megindul *(II/9-5. ábra)*.



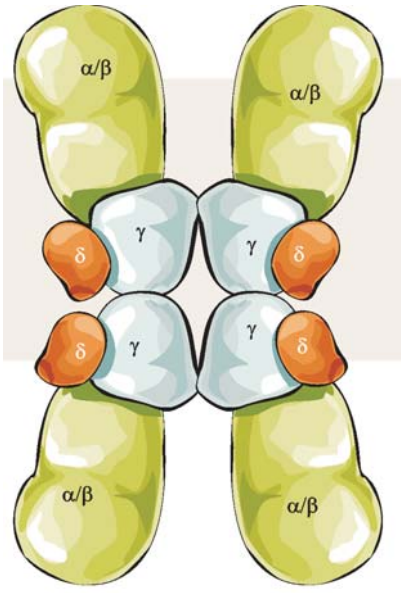
II/9-5. ábra
A glikogén-szintáz szabályozása

II/9.4. A GLIKOGENOLÍZIS SZABÁLYOZÁSA

A glikogenolízis sebesség-meghatározó lépése a glikogén foszforiláz által katalizált reakció. A glikogén foszforiláz „a" formája a foszforilált, „b" a defoszforilált formát jelenti. Általánosságban kijelenthetjük, hogy a glikogén foszforiláz foszforilált formában aktív. A kovalens módosítást hormonális hatásra a glikogén foszforiláz kináz végzi. A glikogén foszforiláz b alakja két konformációban található, egy aktív R (relaxed) és egy inaktív T (tense) formában. ATP és gukóz-6-foszfát stabilizálja a defoszforilált állapotú enzim T állapotát, azaz gátlólag hat, míg AMP kötése az R for-



II/9-6. ábra

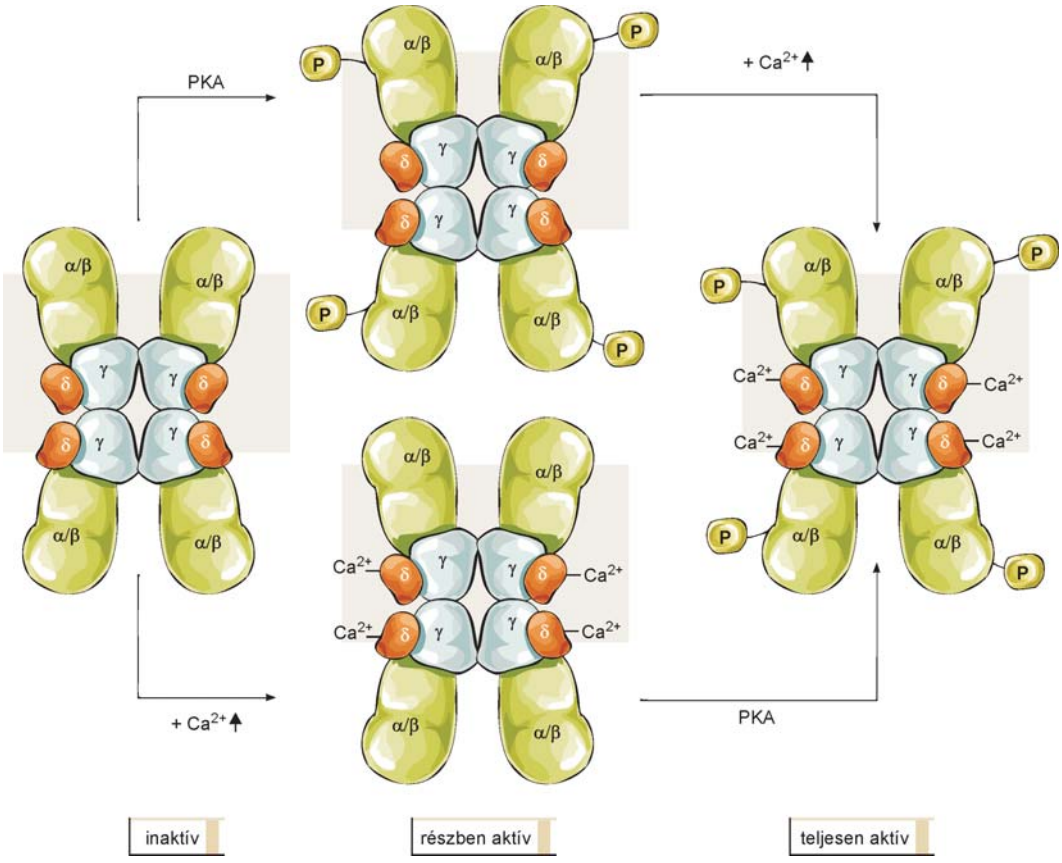


II/9-7. ábra
A glikogén-foszforiláz-kináz szerkezete

ma kialakulásának kedvez, azaz aktiválja az enzimet még akkor is, amikor az nincs foszforilálva (ez főleg az izomra jellemző). A foszforiláz-a viszont allosztérikus kötőhellyel rendelkezik glukóz számára, és az a foszforilált aktív R formát inaktív, de foszforilált T formában stabilizálja, azaz végeredményben gátol (ez inkább májra jellemző) *(II/9-6. ábra)*. Ez utóbbi hatást nevezzük a májsejt glukóz szenzorának, hiszen a felvett glukóz mennyiségének növekedése már azelőtt megakadályozza az igen értékes glikogén lebontását, mielőtt hormonális hatások révén a glikogén-foszforiláz defoszforilálódna.

A glikogén-foszforiláz-kinázt négy különböző alegység építi fel (α, β, γ, δ) *(II/9-7. ábra)*. Az α és β regulációs alegységek, ezek tartalmazzák azokat a szerin oldalláncokat, amelyeket a PKA foszforilál. A γ-alegység az enzim katalitikus alegysége, amely tartalmazza az aktív centrumot. A δ-alegység pedig a kalmodulin, amelyik a Ca^{2+}-t köti. A glikogén foszforiláz kináz hormonális és allosztérikus szabályozás alatt áll. Éhezéskor a glukagon hatása csak a májsejteken érvényesül, míg stressz esetén az adrenalin a májsejtekre és az izomsejtekre egyaránt hat. G fehérjékhez kötött receptorokon keresztül megemelkedik a sejtek cAMP szintje, ami

PKA aktivációhoz vezet. A PKA szerinen foszforilálja a glikogén-foszforiláz-kináz α- és β-alegységeit, és aktiválja az enzimet. Az enzim akkor is aktiválódik, ha a δ-alegységek Ca^{2+}-t kötnek. Ez utóbbi regulációs folyamat főleg izomműködés során fontos, amikor gyorsan megemelkedik a citoplazma Ca^{2+} koncentrációja és hirtelen nagy mennyiségű ATP-re is szükség van. Az ATP-t a sejtek leggyorsabban a glikogénbontásból származó glukóz-6-foszfát lebontásából tudják fedezni. A foszforiláz-kináz teljes aktiválódásához foszforilációra és a Ca^{2+}-ionok kötésére egyaránt szükség van *(II/9-8. ábra)*. A foszforiláz kovalens módosítására később a koordinált szabályozásban is visszatérünk.

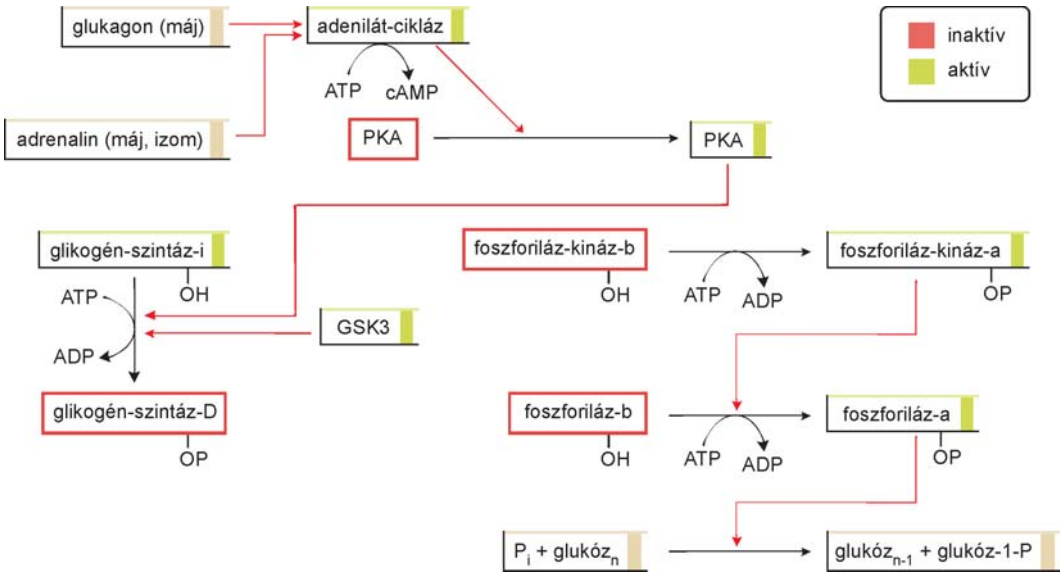


II/9-8. ábra
A foszforiláz-kináz teljes aktiválódása

II/9.5. A GLIKOGÉNSZINTÉZIS ÉS -LEBONTÁS KOORDINÁLT SZABÁLYOZÁSA

Szabályozás fokozott glukózigény esetén – vércukorszint esése étkezések között/éhezésben

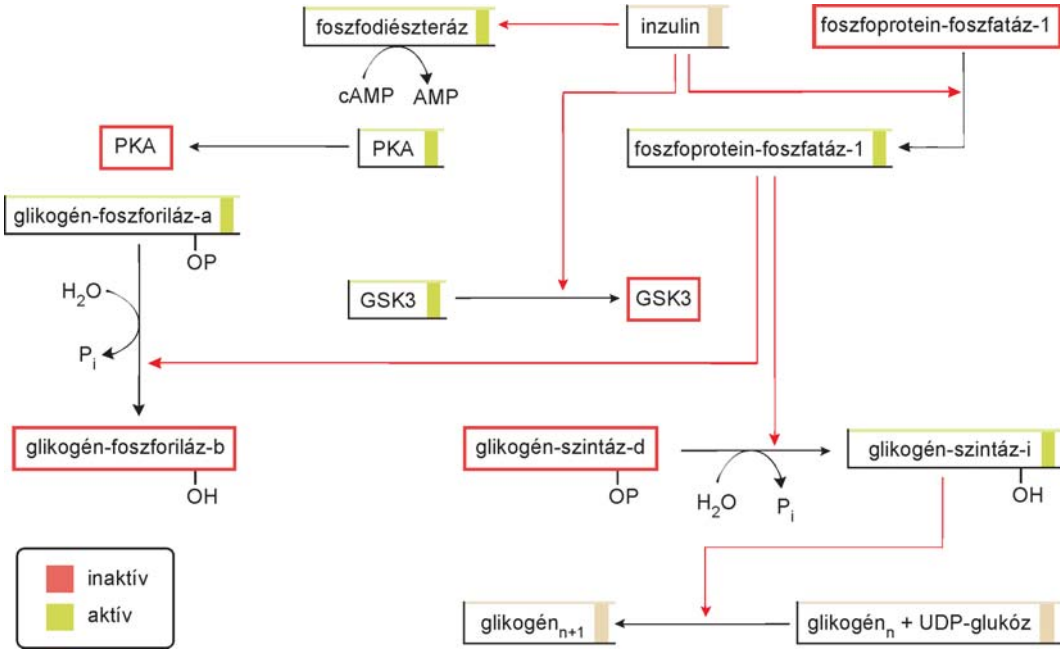
Vércukorszint csökkenés a vérben glukagon és adrenalin szintézishez valamint szekrécióhoz vezet. A hormonok a célsejtek receptorához kötődnek, majd G-fehérje és adenilát cikláz aktiválásán keresztül fokozzák a cAMP intracelluláris szintjét. A cAMP aktiválja a cAMP dependens protein kinázt, a PKA-t. A glikogén szintáz szubsztrátja a PKA-nak és több szerinen is foszforilálódik, ezáltal inaktiválódik, a glikogén szintézis leáll. A PKA a foszforiláz kinázt is foszforilálja, amely ezután a glikogén foszforilázt foszforilálással aktiválja és elkezdődik a glikogén lebontása. A glikogén szintázt nem csak a PKA, hanem a glikogén szintáz kináz 3 (GSK3) is foszforilálja. A két kináz összesen 7 szerin oldalláncot foszforilál és ezen keresztül teljesen gátolja az enzim működését *(II/9-9. ábra)*.



II/9-9. ábra
Glikogénanyagcsere szabályozása

Szabályozás fokozott glukózkínálat esetén – vércukorszint emelkedése táplálkozás során/után

A vércukor emelkedése fokozott inzulintermeléshez és -szekrécióhoz vezet. Az inzulin transzmembrán receptorán keresztül foszfodiészterázt aktivál, ami a cAMP-ből AMP-t hidrolizál. Csökkent cAMP PKA inaktiváláshoz vezet, a glikogén-szintáz és foszforiláz-kináz nem foszforilálódik tovább. Inzulin aktiválja a protein-kináz-B-t



II/9-10. ábra
Inzulin hatása a glikogén-anyagcserére

(PKB), amely a GSK3-at foszforiláció útján inaktiválja. Inzulin hatására aktiválódik a foszfoprotein-foszfatáz-1 (PP1), amely a glikogén-foszforilázt defoszforilálja, és így az aktiválását megszünteti. A szabályozás eredménye, hogy a glikogén lebontása megáll, és elkezdődik a glikogén szintézise *(II/9-10. ábra)*.

II/10.
A pentóz-foszfát ciklus

Kardon Tamás

A pentóz-foszfát ciklus a glukóz alternatív lebontási útja a citoplazmában. Más néven a glukóz direkt oxidációja. A ciklus glukóz-6-foszfátból indul ki (ciklusról lévén szó a kiindulási pont kijelölése önkényes). A ciklusnak két döntő fontosságú funkciója van:

1. NADPH termelése a bioszintetikus, biotranszformációs és antioxidáns reakciók számára,
2. Ribóz-foszfátok szintézise a nukleotidszintézishez.

A glikolízishez képest a glukóz oxidációja a pentóz-foszfát ciklusban nem az energiatermelést szolgálja, hanem az anabolikus utakhoz elengedhetetlen redukáló ekvivalensek szintéziséhez járul hozzá. Az oxidáció során az elektronok nem NAD-ot redukálnak, hanem NADP-re kerülnek és redukáló bioszintetikus utakhoz használódnak fel. NADPH-ra a következő szövetekben az alábbi bioszintetikus utakhoz van szükség (a teljesség igénye nélkül):

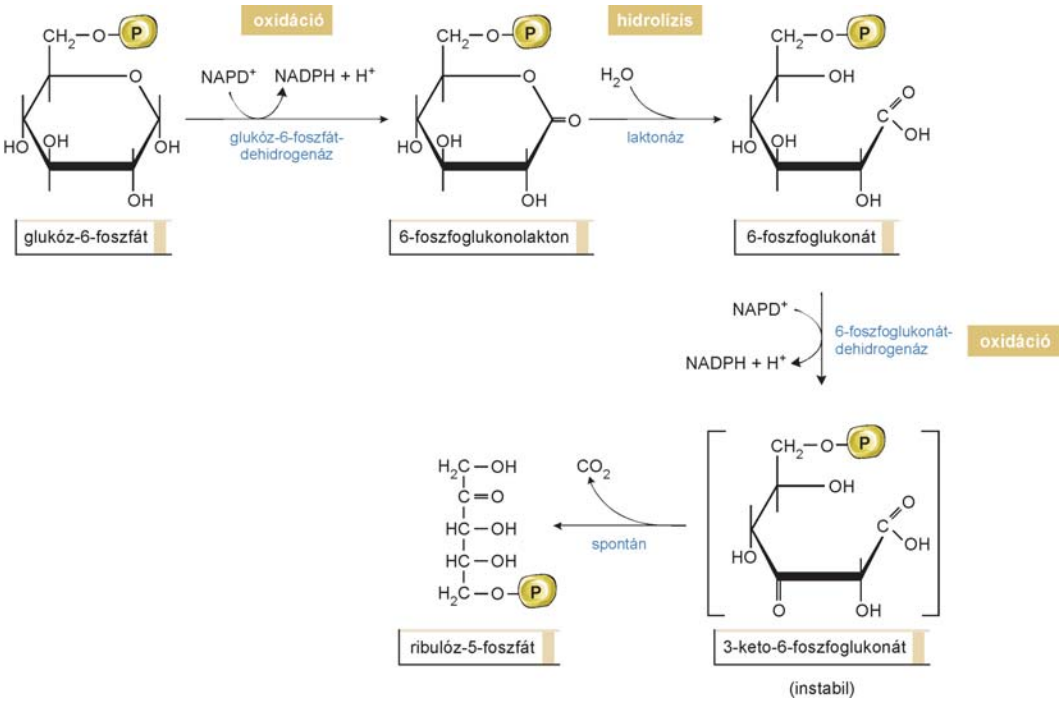
zsírsav szintézishez zsírsavakat intenzíven szintetizáló szövetekben (máj, zsírszövet, laktáló emlő),
koleszterin szintézis (máj),
szteroid hormonok szintézise (mellékvesekéreg, gonádok),
biotranszformációs lépések (máj),
antioxidáns védelem (minden sejt).

Vörösvérsejteknél különösen fontos megemlíteni, hogy – mitokondrium és citrátköri intermedierek hiányában – a pentóz-foszfát ciklus a NADPH egyetlen forrása. Mivel ez szolgáltatja a redukáló ekvivalenseket a glutation-peroxidáz-reakcióban oxidálódott glutation visszaredukálásához, a csökkent mennyiségű NADPH az eritrocitákban hemolitikus anémiához vezethet (lásd drog indukálta hemolitikus anémia).

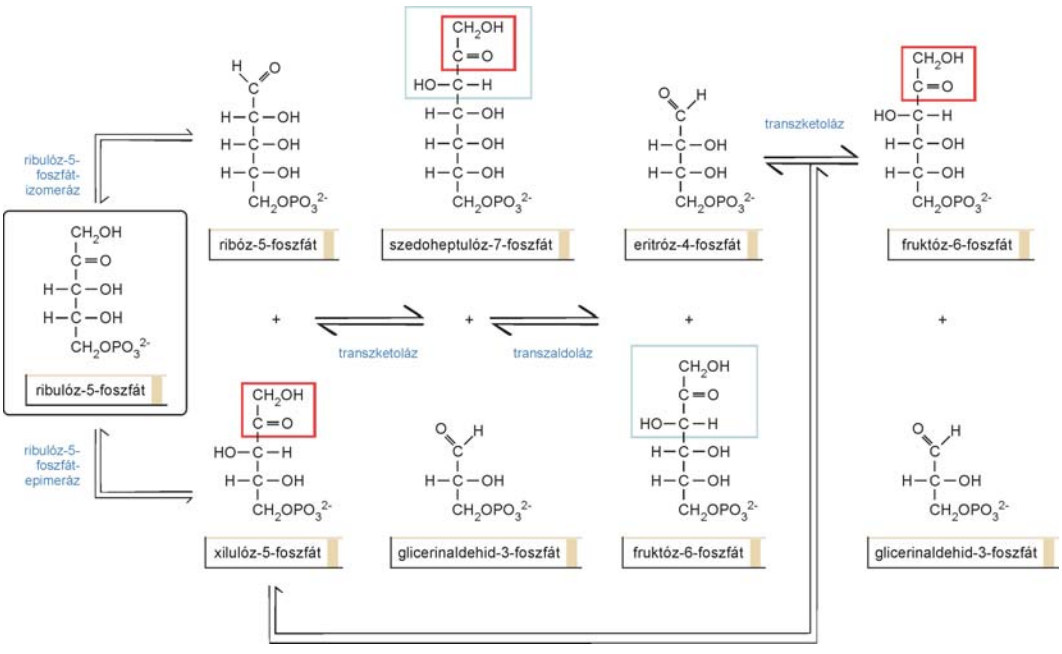
A pentóz-foszfát ciklus két fő részre osztható. Az első, oxidatív szakasz három lépéséből kettőben 2 db NADP redukálódik. Ezek a lépések, melynek során a glukóz-6-foszfát ribulóz-5-foszfáttá bomlik, irreverziíbilisek, a lehasadó szénatom pedig CO_2 formájában szabadul fel (oxidatív dekarboxiláció). A keletkező ribulóz-5-foszfátból izomerizációval ribóz-5-foszfát keletkezik, amely a nukleotidok alkotórésze, ezáltal a nukleinsavak szintéziséhez is felhasználódhat. A második, nem oxidatív szakasz reakciói reverzibilisek. Amennyiben nincs szükség a keletkezett öt szénatomos szénhidrát-származékokra, akkor azok be tudnak kapcsolódni a glikolízisbe. A ribulóz-5-foszfátból több lépésben glicerinaldehid-3-foszfát és fruktóz-6-foszfát lesz. Ebben a formában csatlakoznak a glikolízis folyamatához.

A folyamat reakciólépései és a katalizáló enzimek *(II/10-1. és II/10-2. ábra)*:
Oxidatív szakasz:

1. glukóz-6-foszfát + $NADP^+ \rightarrow$ 6-foszfoglukonolakton + NADPH + H^+ –
   glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz



II/10-1. ábra
Pentóz-foszfát út oxidatív szakasza



II/10-2. ábra
Pentóz-foszfát út nem oxidatív szakasza

2. 6-foszfoglukonolakton + H_2O → 6-foszfoglukonát – laktonáz
3. 6-foszfoglukonát + $NADP^+$ → ribulóz-5-foszfát + CO_2 + NADPH + H^+ – *6-foszfoglukonát dehidrogenáz*

Nem oxidatív szakasz

4. 2 ribulóz-5-foszfát → ribóz-5-foszfát + xilulóz-5 foszfát – *izomeráz, ill. epimeráz*
5. ribóz-5-foszfát + xilulóz-5 foszfát → glicerinaldehid-3-foszfát + szedoheptulóz-7-foszfát – *transzketoláz*
6. glicerinaldehid-3-foszfát + szedoheptulóz-7-foszfát → eritróz-4-foszfát + fruktóz-6-foszfát – *transzaldoláz*
7. xilulóz-5 foszfát + eritróz-4-foszfát → glicerinaldehid-3-foszfát + fruktóz-6-foszfát – *transzketoláz*

Az első lépésben a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz oxidálja a glukóz-6-foszfátot és foszfoglukonolakton keletkezik. A lépés során egy NADP, mint oxidáló szer, NADPH-vá redukálódik. A keletkezett foszfoglukonolakton intramolekuláris észter, mely úgy jön létre, hogy a NADP hidridiont vesz fel a glukóz-6-foszfát 1-es szénatomjától, a visszamaradt proton pedig ledisszociál. Ebben a két lépésben végső soron egy aldóz karbonsavvá oxidálódott.

A második lépésben egy laktonáz a gyűrűt hidrolizálja, és kialakul a lineáris 6-foszfoglukonát.

Az első fázis harmadik lépésében a 6-foszfoglukonát harmadik szénatomján történik oxidáció, 3-keto-6-foszfoglukonát intermedier képződésével. A keletkezett karbonilcsoport instabil és spontán dekarboxileződik, létrejön a ribulóz-5-foszfát. Ezt a reakciót is NADP-vel működő dehidrogenáz végzi – a 6-foszfoglukonát dehidrogenáz –, a végtermék a cukor-foszfáton kívül redukálódott NADPH. Mind a két dehidrogenáz által katalizált lépésben egy hidroxilcsoport keto csoporttá oxidálódott. Az oxidatív szakasz itt végetér, és a nem oxidatív szakasz ezt követő lépéseiben létrejönnek a glikolízis intermedierjei.

Először izomeráz és epimeráz katalizálta reakciókban a ribulóz-5-foszfát ribóz-5-foszfáttá és xilulóz-5-foszfáttá rendeződik át. A két keletkezett pentóz-5-foszfát transzketoláz által katalizált reakcióban szedoheptulóz-7-foszfátot szintetizál úgy, hogy a xilulóz-5-foszfátról egy két szénatomos ketocsoport helyeződik át a ribóz-5-foszfátra. A xilulóz-5-foszfátból glicerinaldehid-3-foszfát lesz. A transzketoláz, ami tiamin-pirofoszfát koemzimmel működik, csak a xilulóz-5-foszfát ketocsoportját ismeri fel, a ribulóz-5-foszfátét nem. A 6. lépésben a szedoheptulóz-7-foszfátbólból és glicerinaldehid-3-foszfát transzaldoláz segítségével négy szénatomos eritróz-4-foszfát és fruktóz-6-foszfát keletkezik. A fruktóz-6-foszfát már glikolitikus intermedier. Ebben a lépésben az enzim három szénatomos ketocsoportot helyez egy aldózra. A reakciósor utolsó lépéséhez szükség van egy újabb xilulóz-5-foszfátra. A következő, szintén transzketoláz katalizálta reakció végén az eritróz-4-foszfátból fruktóz-6-foszfát keletkezik, míg a xilulóz-5-foszfát glicerinaldehid-3-foszfáttá alakul, mindkettő glikolitikus/glukoneogenetikus intermedier. Ha összegezzük a nem oxidatív szakasz reakcióit, akkor a következő egyenletet állíthatjuk fel:

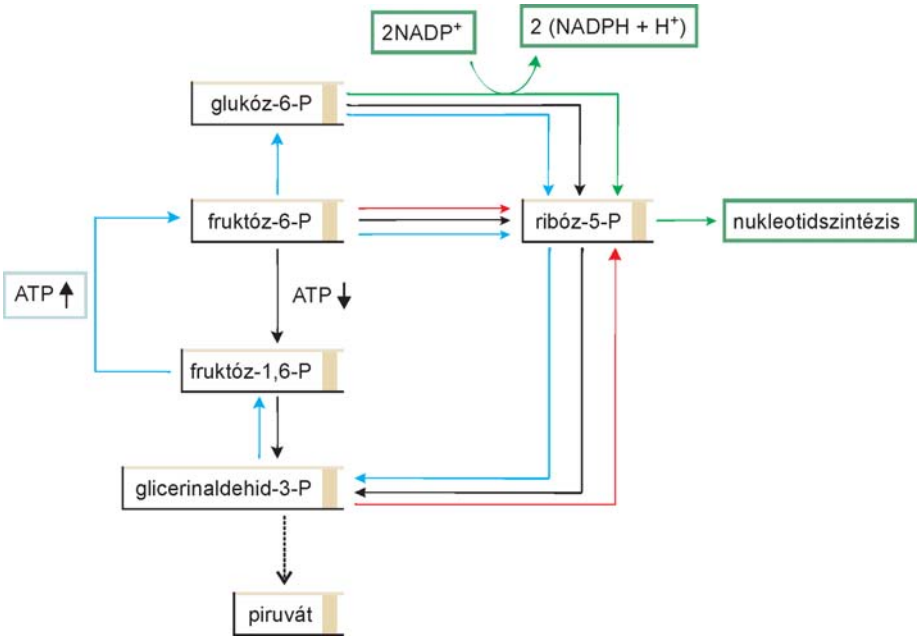
ribóz-5-foszfát + 2 xilulóz-5-foszfát → 2 fruktóz-6-foszfát + glicerinaldehid-3-foszfát

Azaz három pentózból két hexóz és egy trióz keletkezett (3*C5=2*C6+C3).

A keletkezett termékek glikolitikus intermedierek, azaz a glikolízis lépéseiben részt tudnak venni. Az, hogy glukóz-6-foszfát lesz-e belőlük, vagy piruvát, azt a sejt energiaállapota határozza meg. Felvetődik a kérdés, hogy mitől ciklus a fent leírt folyamat? Ahogy azt korábban említettük, a sejtek energiaállapota és a szükséglete

határozza meg, hogy a pentóz-foszfát út melyik folyamata zajlik le. Több különböző állapotot tudunk megkülönböztetni, melyek közül csak az egyik ciklus. Amennyiben a sejtnek fokozott NADPH igénye van, de nincs nukleotid szintézis, akkor az első oxidatív fázis zajlik le és a pentóz-foszfátok glikolitikus intermedierekké alakulnak. Amennyiben ebben a sejtben a glikolízis gátolt, a glikolízis/glukoneyogenezis egyensúlya a glukoneogenezis irányába tolódik, azaz a glikolitikus intermedierekből megint glukóz-6-foszfát lesz, ami ismét belép a pentóz-foszfát-ciklusba és NADPH-t generál. Ekkor valóban ciklusról van szó *(II/10-3. ábra,* kék). Amennyiben a sejtnek energiatermelésre van szüksége, úgy az intermedierek piruváttá bomlanak le (*(II/10-3. ábra,* fekete).

Ritka esetben csak a nem oxidatív szakasz zajlik le. Ezek a reakciók reverzíbilisek, azaz fruktóz-6-foszfátból és glicerinaldehid-3-foszfátból ribóz-5-foszfát szintetizálódik. Ilyen előfordulhat izomsejtekben, ahol igen intenzív ATP szintézisre van szükség és a NADPH igény alacsony (*(II/10-3. ábra,* piros). Amennyiben NADPH-ra és pentóz-foszfátokra is szüksége van a sejtnek, akkor csak az oxidatív szakasz játszódik le, a ribóz-5-foszfát nukleotidok szintézisére használódik fel (*(II/10-3. ábra,* zöld).



II/10-3. ábra

II/10.1. A PENTÓZ-FOSZFÁT-CIKLUS SZABÁLYOZÁSA

A pentóz-foszfát ciklus sebesség-meghatározó lépése a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz által katalizált reakció. Az enzimet a NADPH/ $NADP^+$ arány szabályozza. Mivel az citoszolikus NADPH/$NADP^+$ arány kb. 800, ezért a $NADP^+$ emelkedése igen érzékeny mutató. $NADP^+$ emelkedése aktiválja a glukóz-6-foszfát-dehidrogenázt, míg a NADPH gátolja. A pentóz-foszfát ciklus enzimeit ezen kívül az inzulin indukálja.

II/11.
Lipidek anyagcseréje

Hrabák András

II/11.1. A LIPIDEK ÁLTALÁNOS TULAJDONSÁGAI

A lipidek csoportjába kémiailag egymástól jelentősen különböző vegyületek tartoznak, maga a lipid-fogalom inkább egy közös fizikokémiai sajátosságot, a részleges, vagy teljes hidrofobicitást fedi, ami természetesen nem jelenti azt, hogy minden hidrofób vegyület lipid, és azt sem, hogy a lipidek egy része ne tartalmazna hidrofil szerkezeti elemeket. A lipideket többféle szempont szerint csoportosíthatjuk. Szerkezeti alapon a klasszikus felosztás elszappanosítható (lúgos hidrolízissel bontható, észter-, éter- vagy amidkötést tartalmazó), valamint el nem szappanosítható (a fent említett kötéseket nem tartalmazó) lipideket különböztet meg. Funkcionális szempontok szerint a lipideket energiaraktározó, strukturális és speciális élettani funkciókat hordozó csoportokba oszthatjuk. Szempont lehet még az adott lipid relatív mennyisége a szervezetben: vannak nagy mennyiségben előforduló „major" lipidek (pl. neutrális zsírok), valamint igen kis mennyiségben (pikomol, femtomol !) is hatékony „minor" lipidek (pl. eikozanoidok, karotinoidok, szteroid hormonok). A lipidek szerkezeti tulajdonságaival, kémiai reakcióival, biológiai funkcióinak ismertetésével ebben a fejezetben csak a szükséges mértékben foglalkozunk, mivel ezek részletesen megtalálhatók részben a „Biokémia" c. egyetemi jegyzetben, részben e tankönyv membránszerkezetet, illetve jelátviteli folyamatokat tárgyaló fejezeteiben.

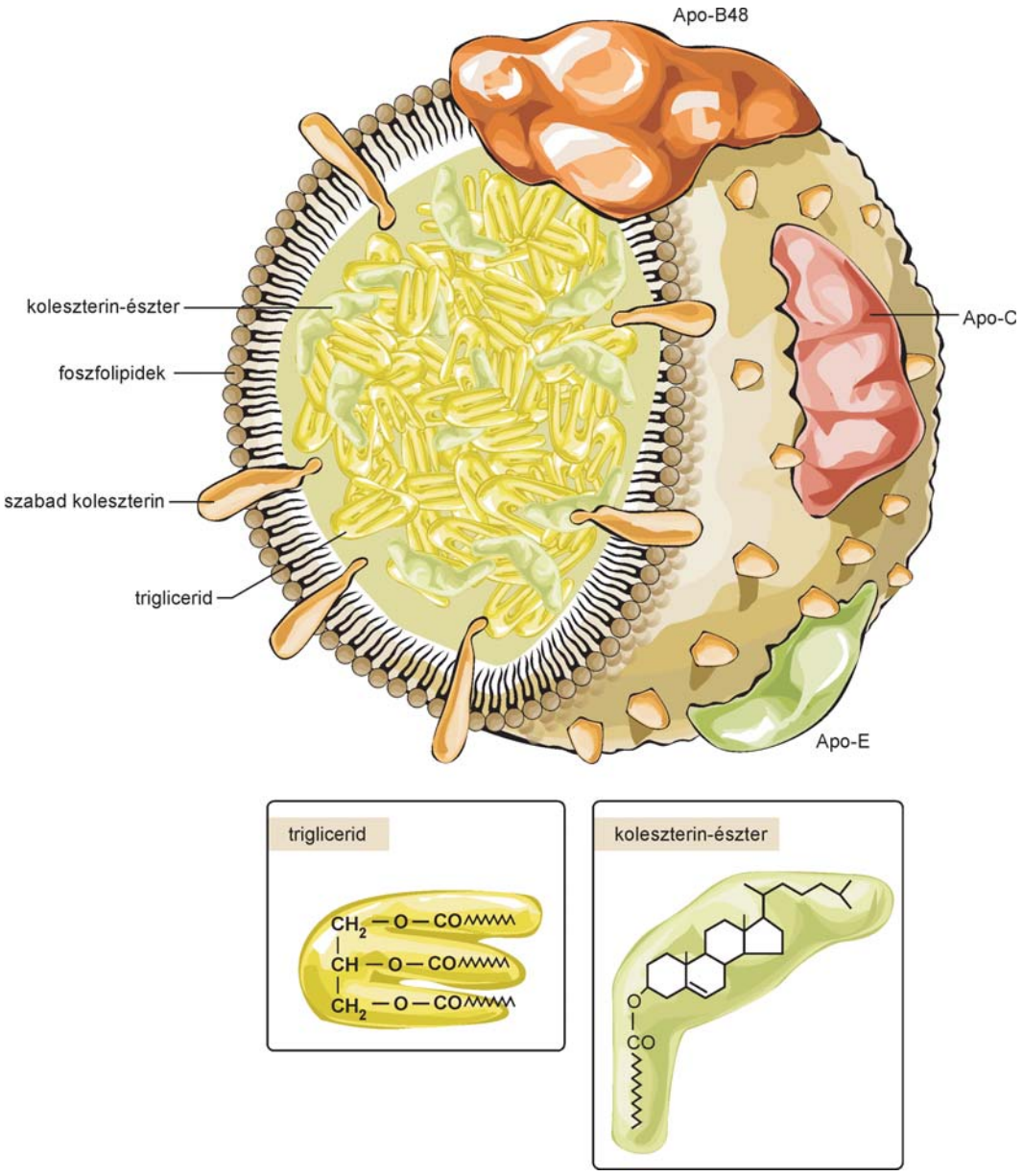
A fejezetben a következő fontosabb vegyületek anyagcseréjével (katabolizmusával és anabolizmusával) foglalkozunk: zsírsavak, trigliceridek, foszfolipidek, szfingolipidek, koleszterin és más szteránvázas vegyületek, karotinoidok, eikozanoidok. Ezen kívül részletesen tárgyaljuk a lipidek szállításában szereplő lipoproteinek szerepét, anyagcseréjét.

II/11.2. A LIPIDEK RAKTÁROZÁSA ÉS SZÁLLÍTÁSA

A lipidek közül az emberi és emlős szervezet jelentős mennyiséget trigliceridekből (triacilglicerolokból) raktároz a zsírszövet adipocitáiban. Ez a szövet a szervezet legnagyobb energiaraktára, mivel a benne tárolt zsírokból egységnyi tömegre számítva a szénhidrátokhoz képest több mint kétszer annyi energia szabadítható fel (35–40 kJ/g), ami a zsíroknak a szénhidrátokhoz képest magasabb hidrogén-tartalmával magyarázható. Ehhez a zsírokból az oxidálható zsírsavakat mobilizálni kell, melynek részét képezi azok vérben történő transzportja is. A lipidtranszport lipoproteinek formájában történik. Mivel a lipidek közös sajátossága a rossz vízoldhatóság, ezért van szükség ezekre a komplex struktúrákra. A lipidek szállítása a lipidanyagcsere főbb centrumai között történik. Ezek közé tartozik a vékonybél, ahol a táplálékkal felvett lipidek felszívódnak, a máj, ahol lipidbontás és szintézis folyik, valamint a zsírszövet, ahol a raktározás történik. A lipoproteineket egy hidrofil burok és

egy hidrofób mag alkotja. A hidrofil burok poláros apoproteinekből és amfipatikus sajátságú foszfolipidekből és koleszterinből áll, a belső magban pedig trigliceridek és koleszterin-észterek találhatók. A lipoproteinek általános felépítését az *II/11-1. ábra* mutatja, főbb sajátságaikat pedig az *II/11-1. táblázat* összegzi.

A trigliceridek szállításában elsősorban a kilomikron és a nagyon kis sűrűségű lipoprotein (angol nevének rövidítése VLDL), kisebb mértékben a közepes sűrűségű



II/11-1. ábra
Egy lipoprotein általános szerkezete

II/11-1. táblázat
A lipoproteinek főbb tulajdonságainak összefoglalása

Lipoprotein	Fehérjetartalom (%)	Lipidtartalom (%)	Legfontosabb lipidek	Legfontosabb apoprotein
kilomikron	1–2	98–99	triglicerid	B48, C-II, C-III, E
very low density lipoprotein (VLDL)	7–10	90–93	triglicerid	B-100, C-I, C-II, C-III, E
intermediate density lipoprotein (IDL)	15–20	80–85	triglicerid, koleszterin-észzter	B-100, E
low density lipoprotein (LDL)	20–25	75–80	koleszterin-észter	B-100
high density lipoprotein (HDL)	40–55	50–55	foszfolipid koleszterin-észter	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E

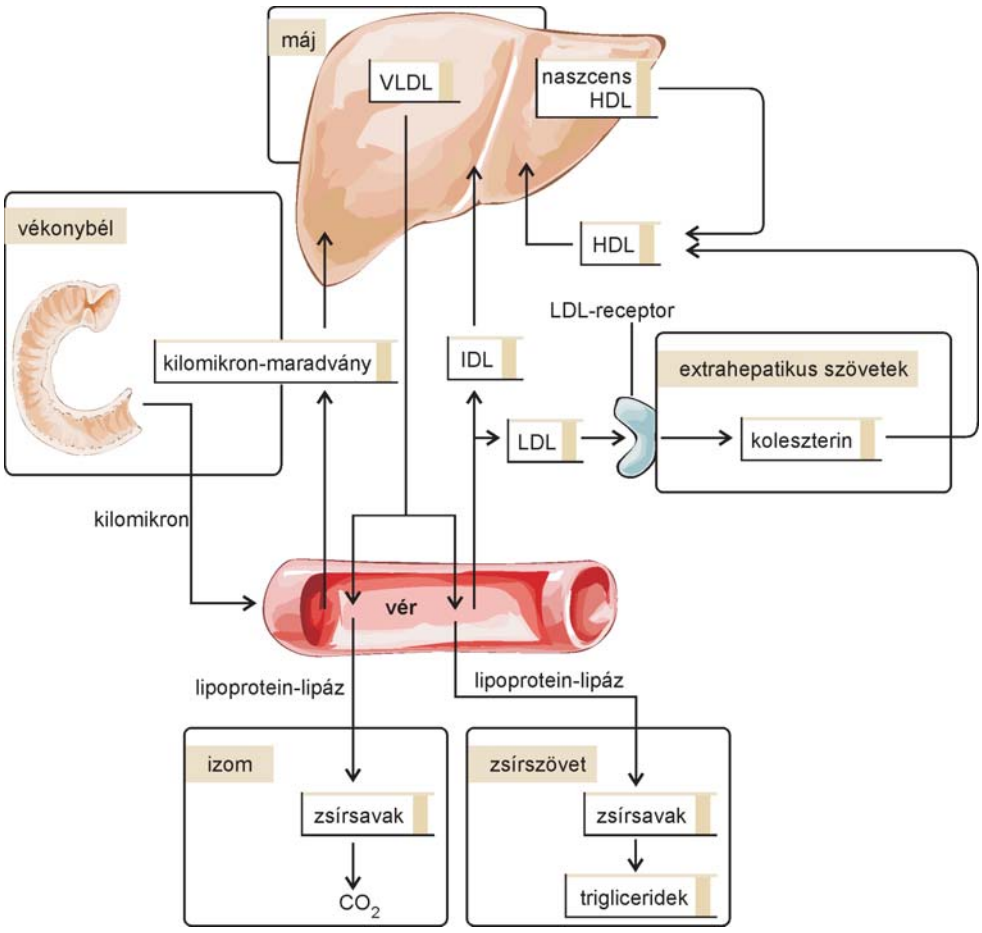
lipoprotein (IDL) vesz részt. Ezek szerepét a zsírok emésztésével és felszívódásával kapcsolatosan tárgyaljuk. A másik két lipoprotein, az alacsony denzitású (low density lipoprotein, LDL) és magas denzitású (high density lipoprotein, HDL) a koleszterin szállításában játszik kitüntetett szerepet, ezért ezekkel a koleszterin anyagcseréjével kapcsolatosan foglalkozunk részletesen.

II/11.3. A ZSÍROK EMÉSZTÉSE ÉS FELSZÍVÓDÁSA

A zsírok jelentős részben a táplálkozással kerülnek a szervezetbe, és ott a vékonybélben bomlanak le alkotórészeikre. A bomlást az ugyancsak a lipidek közé tartozó epesavak emulgeáló hatása, valamint a bélperisztaltika segíti elő, az észterkötéseket pedig a hasnyálmirigy-lipáz bontja el, amely 2-monogliceridet és zsírsavakat képez. Más enzimek a koleszterin-észtereket illetve a foszfolipideket bontják le, így a jejunumban 2-monogliceridek, koleszterin és zsírsavak keletkeznek, amelyek epesavakkal micellákat képeznek és ezek lipidtartalma a mucosasejtek membránján áthaladva bejut a sejtekbe. Ott aciltranszferáz enzimek segítségével a trigliceridek, foszfolipidek és koleszterin-észterek reszintetizálódnak, az adott fajra jellemző zsírsavösszetétellel. Ezek a lipidek a B-48 apoproteinnel kapcsolódva hozzák létre a naszcens kilomikront, amely a sejtekből a nyirokutakba kerül és azokon keresztül a májat megkerülve a többi szervbe jut. A rövidebb szénláncú (<12) zsírsavak közvetlenül is képesek a vérpályába felszívódni.

A naszcens kilomikron a továbbiakban a ductus thoracicuson át a véráramba kerül és további apoproteinekkel (C-II, C-III, E) kiegészülve érett kilomikron formájában jut el a szövetekhez. A szövetek egy részének (harántcsíkolt izom, szív, zsírszövet, laktáló emlő) kapillárisaiban található lipoprotein-lipáz segítségével a kilomikron triglicerid-tartalma lebomlik, a glicerin a májba, a zsírsavak a szövetekbe kerülnek, ahol vagy energiát szolgáltatva eloxidálódnak (izom), vagy újra trigliceridekbe épülnek be (zsírszövet). A C-II apoprotein fokozza a lipoprotein-lipáz aktivitását. Az ún. maradék („remnant") kilomikront apoprotein E-tartalma révén a máj receptorai felismerik és endocitózissal a májba kerül, ahol lebomlik. A májban keletkező VLDL főleg trigliceridet tartalmaz, de viszonylag magas a koleszterin-észter-tartalma is, amely koleszterindús táplálék esetén akár a triglicerideddel azonos arányt is elérhet.

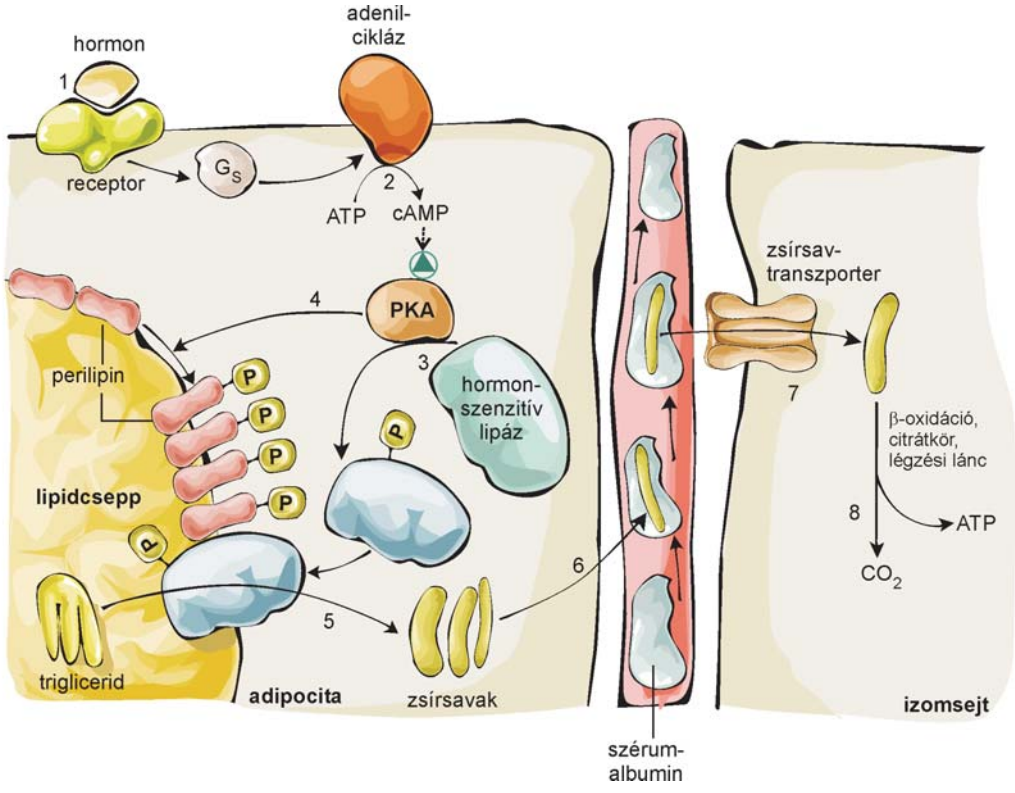
A VLDL-ben levő triglicerid- és koleszterin a maradék kilomikron mellett a máj által de novo termelt zsírsavakból képződött triglicerideket és koleszterint is tartalmaz. A VLDL fő apoproteinje a B-100, amely a belőle kialakuló LDL egyetlen apoproteinje lesz. A zsírszövetben a VLDL lipidjeinek zsírsav-tartalma raktározandó triglicerideкbe épülhet, a lipoprotein pedig IDL-é alakul át. Ebben a koleszterin-tartalom aránya lényegesen nagyobb a kevés maradék trigliceridhez képest. Az IDL jelentős részét is a máj veszi fel az apo-E receptorokon keresztül, a keringésben maradó IDL-ből pedig LDL lesz, amelynek szerepével a koleszterin-anyagcsere kapcsán foglalkozunk. A triglicerideк szállítását és a lipoproteinek egymásba alakulását a *II/11-2. ábra* mutatja.



II/11-2. ábra
A fontosabb lipidek transzportja a szervek között és a lipoproteinek egymásba alakulása

II/11.4. A ZSÍROK MOBILIZÁLÁSA A ZSÍRSZÖVETBŐL

A zsírsavakat tartalmazó trigliceridek felhasználás előtt mobilizálódniuk kell a raktárakból. A mobilizálás a trigliceridek hidrolízisével kezdődik, amelyet a hormonszenzitív lipáz indít el, amely egy zsírsavat hasít le a glicerin valamelyik szélső szénatomjáról. Ezt az enzimet a cAMP-dependens proteinkináz A (PKA) ATP terhére történő foszforilációval aktiválja, a cAMP-szint emelését pedig glukagon, adrenalin, noradrenalin vagy ACTH hatása idézi elő. Ha a vérben a glukóz és az inzulin szintje emelkedik (jóllakottsági állapot), az enzimet foszfatázok defoszforilálják és inaktiválják. A hormonszenzitív lipáz mellett azonban a PKA hiperfoszforilál egy, a zsírcseppek védőburkát alkotó fehérjét, a perilipint is, amelynek konformációja ennek hatására megváltozik, és a trigliceridek hozzáférhetővé válnak az aktivált lipáz számára *(II/11-3. ábra).* A diglicerid többi szénatomjáról más lipázok hasítják le a másik két zsírsavat. A felszabaduló zsírsavak a keringésbe jutnak és albuminhoz kapcsolódva, mint szabad zsírsavak (free fatty acids – FFA) szállítódnak. A glicerin, amelyet a zsírszövet nem tud metabolizálni, kidiffundál a zsírsejtekből és a keringéssel a májba jut, ahol glicerin-3-foszfáttá alakul, és egy NAD^+-függő dehidrogenázzal dihidroxiaceton-foszfáttá oxidálódva a szénhidrát-anyagcsere folyamataiba kapcsolódik be.



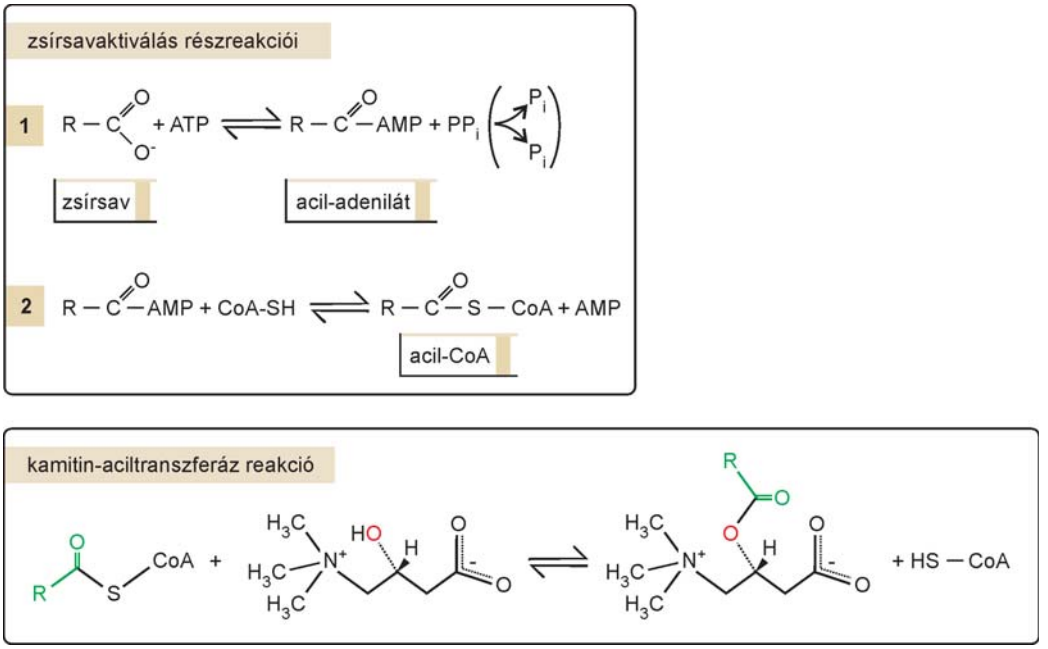
II/11-3. ábra

A perilipin szerepe a zsírok mobilizálásában. 1: A hormon kötődése; 2. Az adenilcikláz aktiválása; 3. A lipáz foszforilációja; 4. A perilipin foszforilációja; 5. A zsírok bomlása; 6. Zsírsavak kijutása a keringésbe és albuminhoz kötődésük; 7. és 8. A zsírsavak bejutása az izomsejtekbe és aerob oxidációjuk

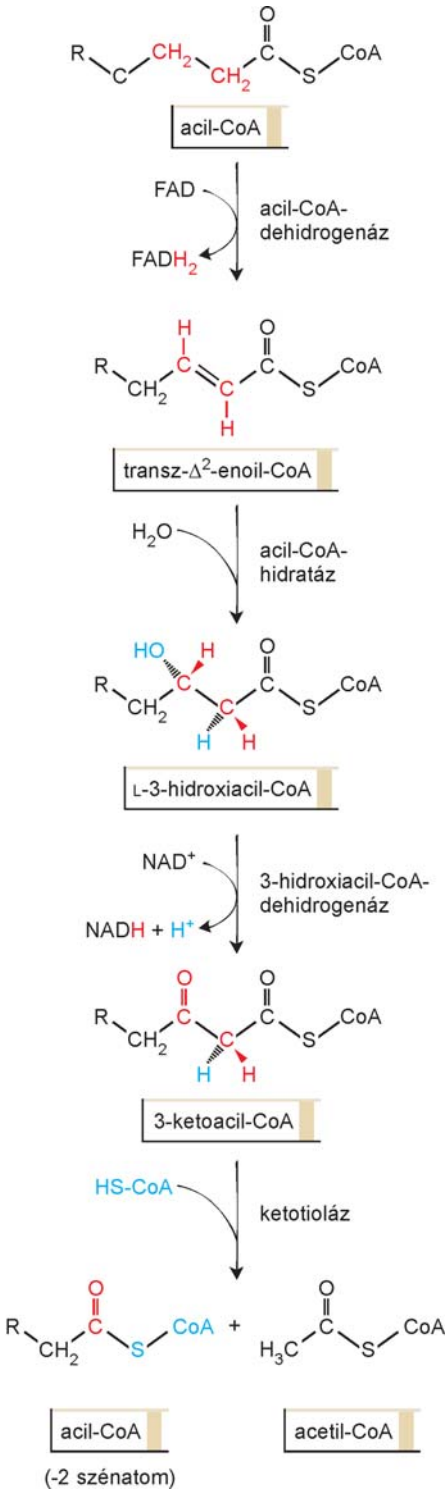
II/11.5. A ZSÍRSAVAK OXIDÁCIÓJA

A keringésből a zsírsavak a szöveti sejtekbe kerülnek, ahol megfelelő körülmények között oxidációjuk révén energiát szolgáltatnak. Ennek elsősorban a szívizomban és a harántcsíkolt izomban van jelentősége, ugyanakkor vannak sejtek (pl. vörösvértest), amelyek egyáltalán nem képesek oxidálni a zsírsavakat. Jóllakott állapotban a sejtek elsősorban a könnyebben oxidálható szénhidrátokat használják fel, éhezésben (amely biokémiai vonatkozásban a glukóz hozzáférhetőségének hiányát jelenti) – a ketontestek mellett (lásd később) – megnő a zsírsavak szerepe az energiatermelésben.

A sejtekbe került zsírsavaknak először aktiválódniuk kell. Ezt a folyamatot a mitokondriumok külső membránjában vagy az endoplazmás retikulumban levő tiokináz enzim katalizálja, amely egy ATP AMP-vé bontásának (vagyis két magas csoportátviteli potenciálú foszfátnak) a terhére egy koenzim-A molekulát kapcsol tioészterkötéssel a zsírsavhoz, acil-adenilát intermedier képződésével *(II/11-4. ábra).* A reakciót a pirofoszfát elbomlása irreverzíbilissé teszi. Az acil-koenzim A-ra a mitokondrium membránja nem permeábilis, ezért annak átjutásához egy karnitin-molekulára van szükség. A karnitin a zsírsavat észterkötéssel megköti *(II/11-4. ábra),* ehhez a karnitin-aciltranszferáz-I enzim szükséges, a koenzim-A felszabadul, a zsírsav-karnitin észter átjut a membránon, majd belül a karnitin-aciltranszferáz II enzim segítségével és a mitokondriális koenzim A-val visszaalakul az acil-koenzim A, és megkezdődhet a zsírsav oxidációja. A karnitin (N,N,N-trimetil-2-hidroxi-3-aminovajsav) részben a táplálékkal kerül a szervezetbe, de a máj és vese sejtjei is képesek szintetizálni két esszenciális aminosavból, lizinből és metioninból kiindulva.



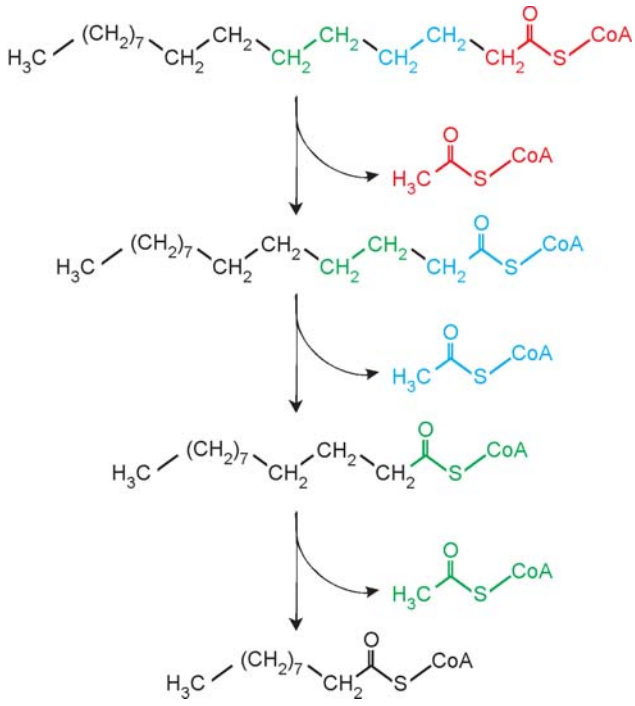
II/11-4. ábra
A zsírsavak aktiválása és a karnitin-aciltranszferáz reakció



II/11-5. ábra
A zsírsavak β-oxidációjának részlépései

Az alábbiakban a telített páros szénatomszámú zsírsavak oxidációjának részleteit ismertetjük és utána térünk ki az egyéb zsírsavaknál tapasztalható különbségekre. (A páros szénatomszámú zsírsavak teszik ki az oxidált zsírsavak nagy részét, mivel a zsírsavak bioszintézise során az acetil-KoA-ból főleg ilyenek jönnek létre.)

A zsírsavoxidáció (amelyet a béta-helyzetű szénatomon végbemenő oxidációs lépések miatt béta-oxidációnak is neveznek), több, gyakorlatilag azonos lépésből álló ciklusban vezet az acetil-KoA végtermékhez. A lebomlást az *II/11-5. ábra* a palmitinsavon szemlélteti. Első lépésben egy, a citrátciklus szukcinát-dehidrogenáz reakciójával analóg folyamatban egy acil-KoA-dehidrogenáz enzim két szomszédos szénatomról két hidrogént visz át FAD-ra és ezzel egy enoil-KoA molekulát képez, amelynek a kettős kötése transz-konfigurációjú. A következő lépésben az enoil-KoA-hidratáz (a fumaráz analógiájára) víz bevitelével L-hidroxiacil-KoA képződését eredményezi. A következő lépésben (amely a malát-dehidrogenázzal analóg), a sztereospecifikus L-β–hidroxiacil-dehidrogenáz NAD^+-ra visz át a β-szénatomról két hidrogént, és ezzel β-ketoacil-KoA jön létre. A különböző lánchosszúságú zsírsavakhoz különböző specificitású enzimek tartozhatnak. A ciklus utolsó lépése a β-ketotioláz (vagy acetil-KoA-aciltranszferáz) enzim által katalizált reakció: ekkor egy KoA belépésével acetil-KoA és egy két szénatommal rövidebb acil-KoA képződik, amely azután a következő ciklus kiindulópontja lesz *(II/11-6. ábra)*.



II/11-6. ábra
A zsírsavlánc rövidülésének sémája a β-oxidáció során

A palmitinsav (C16) teljes oxidációja ennek megfelelően 8 acetil-KoA-t eredményez, közben 7-7 FAD és NAD^+-molekula redukálódik. A teljes energiamérleghez figyelembe kell vennünk, hogy 1 acetil-KoA teljes eloxidálódása a citrátkörben 10 ATP-t eredményez (3 NADH, 1 $FADH_2$, 1 GTP), ami 80 ATP-t jelent. A 7-7 redukált koenzim összesen 28 ATP-t jelent, ebből a 108 ATP-ből azonban 2 ATP-t le kell vonni, mert a zsírsav-aktiválási lépésben két makroerg kötés hasad fel. Ezért 1 molekula palmitinsavból 106 molekula ATP képződik. Mivel a sztearinsav két szénatommal hosszabb, ott további 10 + 4 = 14 ATP-vel kell számolni, vagyis a sztearinsav oxidációjának energiamérlege 120 ATP/molekula.

A zsírsavoxidáció szabályozásában a malonil-KoA játszik jelentős szerepet, mert gátolja a karnitin-aciltranszferáz I enzimet. Mivel ez a vegyület a zsírsavszintézis egyik intermedierje (lásd később), magas koncentrációja megakadályozza, hogy a szintetizálódott zsírsavak a citoplazmából a mitokondriumba jussanak és rögtön eloxidálódjanak.

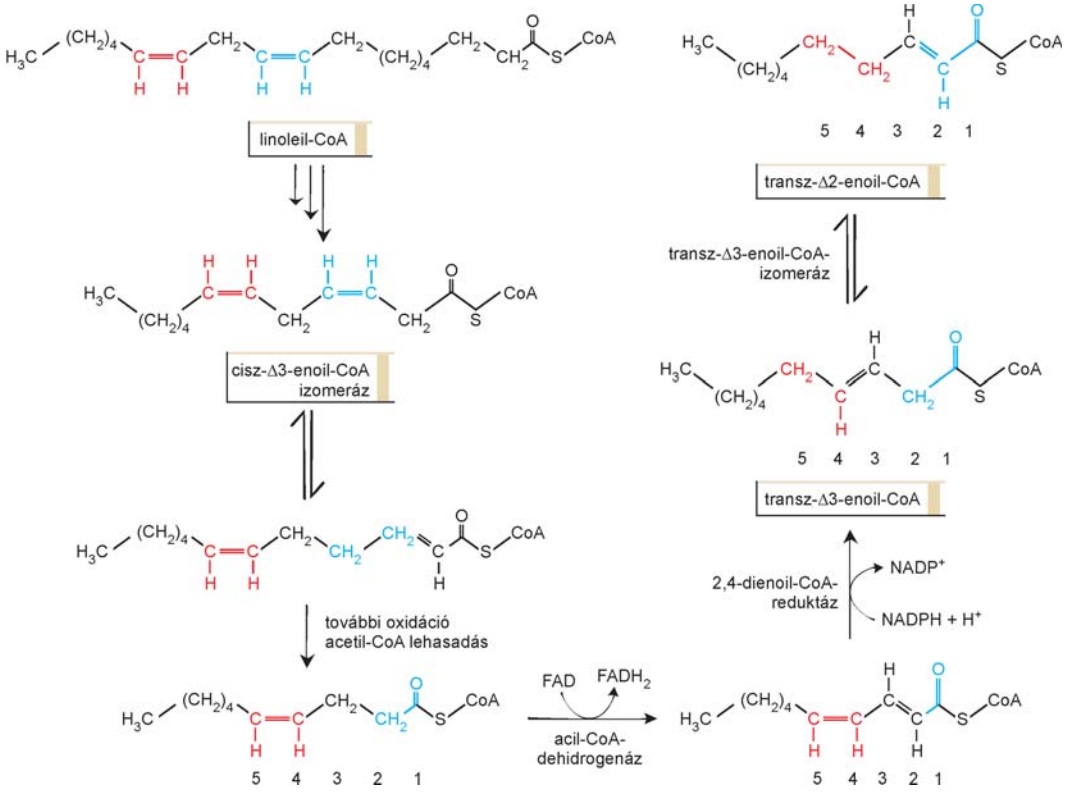
A fenti sémával azonos módon, néhány eltérő lépéssel zajlik le a telítetlen és a páratlan szénatomszámú zsírsavak oxidációja. Telítetlen zsírsav jelentős mennyiségben kerülhet lebomlásra a trigliceridekből, a táplálékokban csak nyomokban előforduló páratlan szénatomszámú zsírsavak oxidációja azonban inkább az aminosav-anyagcseréhez kapcsolódik, ahol egyes elágazó szénláncú aminosavak katabolizmusa vezet propionil-KoA-hoz (lásd az aminosav-anyagcsere fejezetben).

A telítetlen zsírsavak oxidációjában két mechanizmus játszhat szerepet, attól függően, hogy a kettős kötés milyen helyzetben található; ezeket a linolsav példáján mutatjuk be *(II/11-7. ábra)*. Ha a kettős kötés az acetil-KoA-egységek lehasadása után Δ3 cisz pozícióban van, vagyis sem a helyzete, sem a konfigurációja nem egyezik azzal, ami a béta-oxidációban képződő enoil-KoA-ban található, akkor egy izomeráz enzim egyszerre változtatja meg a kettős kötés helyzetét és konfigurációját, és egy Δ2-transz-enoil-KoA-t hoz létre, amely már szubsztrátja a hidratáznak, így az oxidáció folytatódhat, mely Δ2-cisz-Δ4-dienoil-KoA képződéséhez vezet. Ekkor egy specifikus reduktáz, amely NADPH-val működik, transz-Δ3-enoil-KoA-t hoz létre, amelyet egy izomeráz transz-Δ2-enoil-KoA-vá alakít át, ez szubsztrátja a hidratáznak és így a béta-oxidáció folytatódhat *(II/11-7. ábra)*.

A páratlan szénatomszámú zsírsavak oxidációja propionil-KoA-ig a szokásos módon folyik. A propionil-KoA továbbalakulását a propionil-KoA karboxiláz enzim katalizálja, amely hidrogénkarbonát felhasználásával ATP terhére egy újabb karboxilcsoportot épít be a molekulába és D-metilmalonil-KoA keletkezik. Ez a vegyület egy specifikus mutáz enzim segítségével L-metilmalonil-KoA-n keresztül szukcinil-KoA-vá alakul, amely a citrátkör egyik intermedierje. Az enzim, amely egy epimerizációs és egy mutáz reakciót katalizál *(II/11-8. ábra)* B_{12}-vitamint igényel kofaktorként, ennek hiányában metilmalonsav ürül a vizeletben. Hasonló eredménnyel jár az enzim örökletes hiánya is. A B_{12}-vitamin hiányának az anaemia perniciosában játszott szerepe azonban nem ezzel a reakcióval, hanem az ún. folát csapdával magyarázható, amelyről az aminosav- és nukleotid metabolizmus károsodásaival kapcsolatban lesz szó.

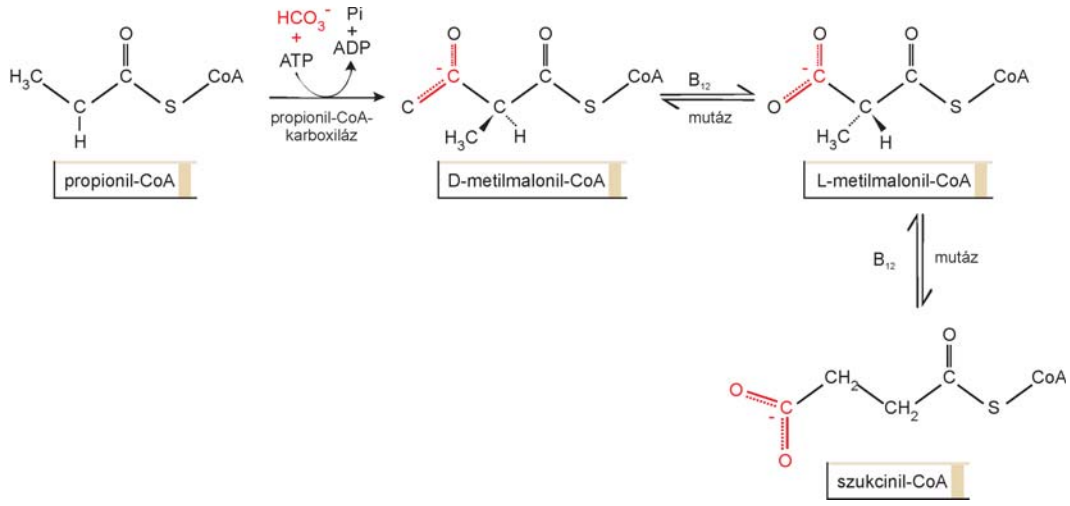
Egyes elágazó láncú zsírsavak (pl. a 20 szénatomos fitánsav) lebontásában az α-oxidáció is szerepet játszhat. Ekkor az α-szénatomon hidroxiláció történik, majd egy dekarboxilációs lépés után kezdődik el a β-oxidáció folyamata. Egyes közepes szénatomszámú zsírsavak oxidációja pedig az ω-szénatomon is elkezdődhet, ekkor több oxidációs lépést követően dikarbonsav alakul ki, amely azután β-oxidációval alakul tovább. Ezek a folyamatok főleg a peroxiszómákban mennek végbe.

A zsírsavoxidáció folyamatában résztvevő enzimek defektusai különböző patobiokémiai folyamatok kiindulópontjai lehetnek. Ezeknek ismertetésére itt nincs helyünk, részletes leírásuk az Orvosi patobiokémia c. tankönyvben megtalálható.



II/11-7. ábra

A linolsav oxidációja: először egy nem megfelelő helyzetű cisz-kötést kell megfelelő helyzetű transz-kötéssé alakítani, majd egy megfelelő helyzetű transz-izomer redukcióját követően kell egy nem megfelelő helyzetű transz-kötést kell megfelelő helyzetbe átalakítani



II/11-8. ábra

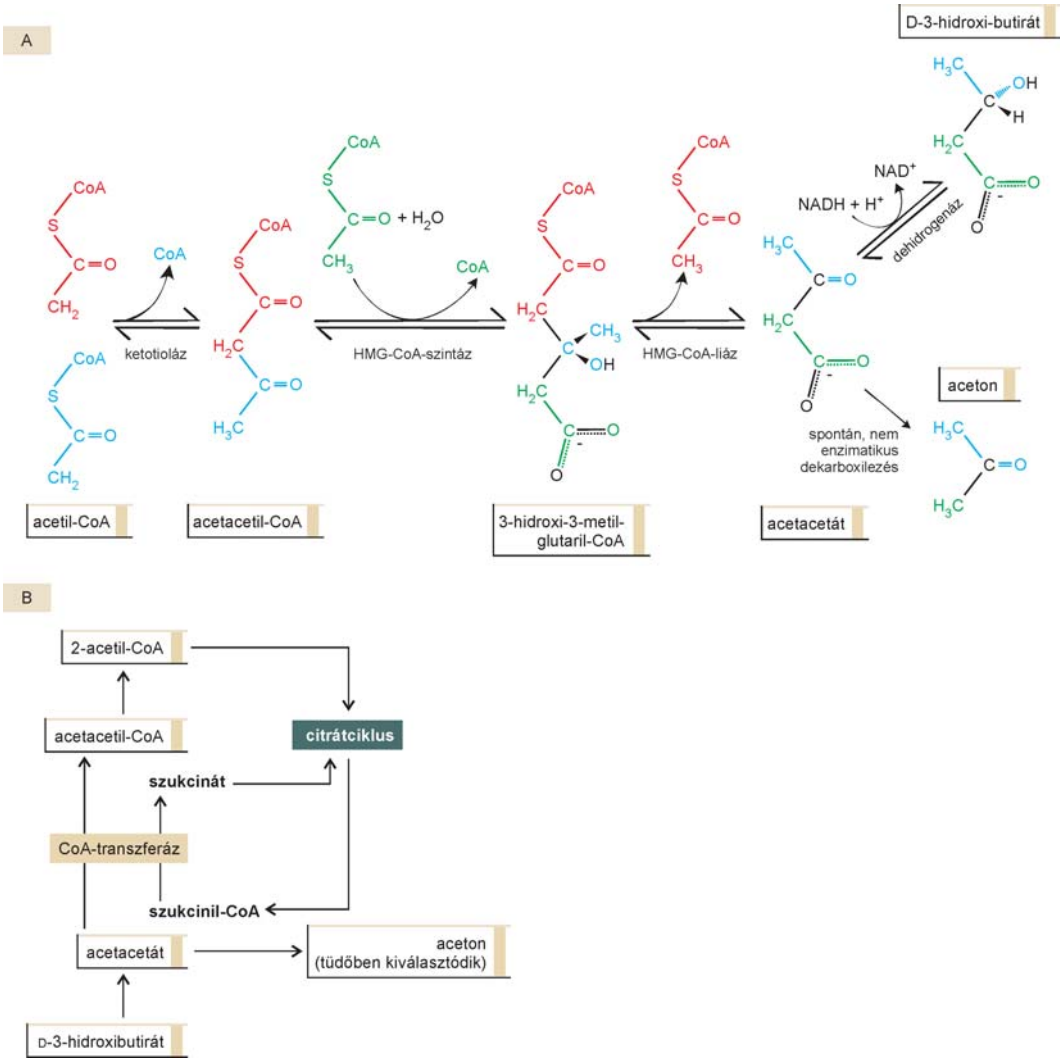
A páratlan szénatomszámú zsírsavak lebontásának eltérő utolsó lépései. A metilmalonil-KoA-mutáz B_{12}-vitamin kofaktort igényel

Zsírsavoxidáció éhezésben – a ketontestek szintézise

A zsírsavak oxidációjában keletkezett acetil-KoA csak akkor képes teljesen eloxidálódni, ha a citrátkör megfelelően fel van töltve intermedierekkel. Mivel ezek az intermedierek a piruvát-karboxiláz által katalizált fő anaplerotikus reakcióban képződő oxálecetsavból jönnek létre, a piruvát pedig a glukóz-metabolizmus terméke, glukózhiány, vagyis éhezés esetén az acetil-KoA nem képes a citrátkörben eloxidálódni. Ekkor fokozott zsírsavbontás indul meg, amely még több acetil-KoA-t termel. Mivel nincs energiabőség, az acetil-KoA a zsírsavszintézisbe nem tud belépni és a más kompartmentben (citoplazma) történő, ugyancsak energiaigényes koleszterin-szintézisben sem tud felhasználódni. A máj, és kisebb mértékben a vese azonban rendelkezik olyan enzimekkel, amelyek képesek az acetil-KoA átalakítására, és az így képződött ketontestek a perifériás szövetekben alternatív energiaforrásként szolgálnak glukóz hiányában is. Az éhezés mellett ketontestek keletkezéséhez vezethet a kezeletlen diabetes is, ahol a glukóz hiánya a sejtek károsodott glukózfelvételének tulajdonítható, az inzulin hiánya a glukóz csökkent katabolizmusát idézi elő, ami szintén megakadályozza a citrátkör feltöltését.

A ketontestek szintézisének első lépése a mitokondriumokban a tioláz-reakció megfordulása a magas acetil-KoA-szint következtében: így acetoacetil-KoA képződik. Egy újabb acetil-KoA-val ebből 3-hidroxi-3-metilglutaril-KoA (HMG-KoA) jön létre, ezt a reakciót, a ketontest-szintézis sebesség-meghatározó lépését a HMG-KoA szintáz katalizálja. Ez az enzim számos sejtben előfordul, de mitokondriális lokalizációja csak a májra jellemző, a citoplazmatikus izoenzim a koleszterin-bioszintézisben vesz részt. A következő lépésben a HMG-KoA liáz hatására acetil-KoA és acetecetsav keletkezik, ez az enzim a citoplazmában nincs jelen. Az acetecetsav maga is ketontest, de belőle egy reduktáz segítségével magas NADH szint mellett 3-hidroxibutirát (β-hidroxivajsav), enzim nélküli dekarboxilációval pedig aceton keletkezik, ez utóbbi a tüdő léghólyagocskáin át a kilégzéskor távozik. A ketontestek középerős savak (pK_a = 3,5), ezért ha a metabolizmus éhezés vagy diabetes esetén a ketontest-képzés felé tolódik, akkor ketonemia és ketonuria alakul ki, kezeletlen diabetes esetén ez ketoacidózishoz vezet, ami életveszélyes állapot. Ilyenkor a ketontestek koncentrációja a vérben 3–5 mM-ra emelkedik, de súlyos esetben a 20 mM-t is elérheti, míg normális metabolizmus esetén ennek századrésze (0,2 mM) alatt van.

Éhezésben a ketontest-képzés kompenzációs válasznak tekinthető a glukózhiányra. Mivel ezek a vegyületek hidrofilek, a keringéssel eljutnak a szövetekig, amelyek glukóz helyett képesek azokat energia-termelésre felhasználni. A perifériás szövetekben egy transzferáz enzim szukcinil-KoA-ról átviszi a koenzim A-t az acetecetsavra, amely a tioláz enzim segítségével metabolizálódik acetil-KoA-vá. Ez a transzferáz a májban hiányzik, tehát a máj nem tudja azonnal felhasználni az általa termelt ketontesteket. A perifériás szövetek közül különösen az egyébként glukóz-függő agy képes a felhasználásukra, amely akár az energia 75%-át is képes ketontestekből fedezni. A ketontestek képződésének és felhasználásának reakcióit a *II/11-9. ábra* mutatja be.



II/11-9. ábra

A ketontestek keletkezése acetil-KoA-ból (A) és felhasználásuk a periférián (B). Perifériás felhasználó szövetek: agy, vese, szívizom, harántcsíkolt izom

II/11.6. ZSÍRSAV-BIOSZINTÉZIS

A zsírsavak bioszintézise felületesen szemlélve a béta-oxidáció megfordításának tűnhet, azonban számos fontos különbség van a két folyamat között. Ezeket a *II/11-2. táblázat* tünteti fel. A két folyamat azonossága jószerével a két szénatomonkénti lebomlásra és felépülésre korlátozódik. Ennek következtében a szervezetben döntően páros szénatomszámú telített zsírsavak képződnek, amelyekből utólag keletkeznek a telítetlen zsírsavak. Néhány többszörösen telítetlen zsírsav az emberi

II/11-2. táblázat
A zsírsavoxidáció és -szintézis különbségei

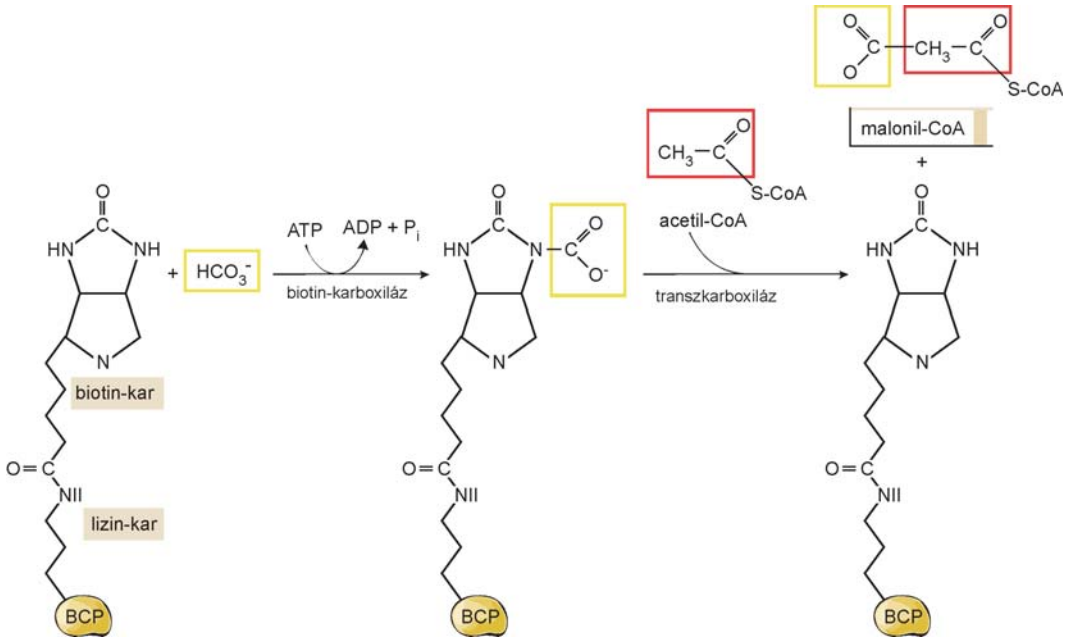
	β-oxidáció	**Zsírsavszintézis**
kompartment	mitokondrium	citoplazma*
enzimek	függetlenek	multifunkcionális komplex
intermedierek	acetil-KoA	acetil-KoA és malonil-KoA
aktiváló csoport	Koenzim A	ACP
koenzim(ek)	NAD^+, FAD	NADPH
3-hidroxiacil vegyület	L-hidroxiacil-KoA	D-hidroxiacil-ACP
*a kész zsírsavlánc (C16) meghosszabbítása az endoplazmatikus retikulumban történik		

sejtekben nem tud kialakulni. Ezeket – linolsav, linolénsav – a táplálékkal kell felvenni, ezért esszenciális zsírsavaknak nevezzük őket.

A zsírsavak de novo szintézise elsősorban a májban, zsírszövetben és emlőmirigyekben, kisebb mértékben a vesében történik. Prekurzora az acetil-KoA, amely a lebontó folyamatok terméke. A zsírsavszintézisben felhasználódó acetil-KoA jelentős részben a piruvát-dehidrogenáz komplex működése során a mitokondriumban keletkezik, a bioszintézis enzimrendszere viszont a citoplazmában található. Mivel az acetil-KoA nem tud a membránon átjutni, ezért speciális transzportra van szüksége. Ez úgy történik, hogy oxálacetáttal citráttá alakul, amely egy transzporterrel ki tud jutni a citoplazmába. Erre akkor kerül sor, ha az izocitrát-dehidrogenáz gátolt állapotban van (magas ATP-szint), és az acetil-KoA nem tud a citrátkörben eloxidálódni. Az energiabőség tehát jel az energia zsír formájában történő raktározására. A citrát a citoplazmában az ATP-citrát-liáz enzim segítségével ATP terhére KoA felhasználásával visszaalakul acetil-KoA-vá és oxálacetáttá, ez utóbbi a malát-aszpartát transzportrendszeren keresztül visszakerül a mitokondriumba.

Az acetil-KoA-ból kiinduló zsírsavszintézis elkötelező lépése az első lépés: ekkor az acetil-KoA egy hidrogénkarbonát formájában „aktivált” CO_2 felvételével, ATP hidrolízisének terhére malonil-KoA-vá alakul *(II/11-10. ábra).* A lépést az acetil-KoA karboxiláz enzimkomplex katalizálja, amely egy biotinkötő fehérjéből (BCP), biotin-karboxilázból és transzkarboxilázból áll. Az enzimet a citrát allosztérikusan aktiválja, a malonil-KoA (termék), valamint a palmitoil-KoA (szintézis végtermék) pedig gátolja. A citrátnak tehát kettős szerepe van: egyrészt átviszi a prekurzort a citoplazmába, másrészt elősegíti annak átalakulását, citrát pedig akkor van bőven, ha a sejteknek nincs szükségük aktuálisan több ATP megtermelésére, hanem konzerválják az energiát zsírsavak formájában. Az enzim aktivitása ezen kívül kovalens módosítással is szabályozódik: az AMP-aktivált proteinkináz foszforilálja, és ezzel gátolja a karboxilázt, a protein foszfatáz 2A pedig aktiválja. A foszforiláció glukagon hatására következik be (a glukagon katabolikus reakciókat indít be, az anabolikus folyamatokat gátolja), míg az inzulin ellentétes hatású. Ez a kovalens szabályozás tehát hormonális kontroll alatt áll. Az enzim aktivitásának befolyásolása gyors szabályozást tesz lehetővé; ezen kívül létezik az enzimfehérje szintézisén keresztül ható lassúbb, tartós szabályozás is, a szénhidrátokban gazdag vagy zsírban szegény étrend fokozza az enzimfehérje de novo szintézisét, míg a zsírban gazdag étrendnek csökkentő hatása van.

A malonil-KoA-ból a palmitinsav szintéziséhez vezető út egy, az oxidációhoz hasonlóan ciklusokból álló reakciósorozat, amelyet a zsírsav-szintáz enzimkomplex

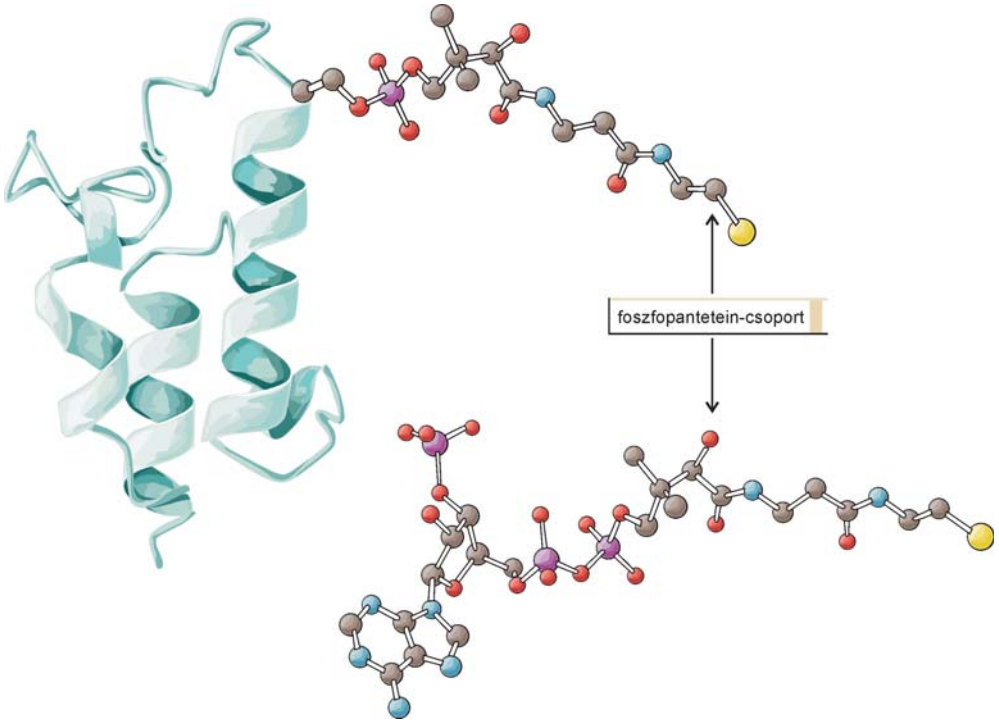


II/11-10. ábra
Az acetil-KoA karboxiláz reakció lépései. BCP: biotin-carrier protein

katalizál. A komplex két azonos alegységből, alegységenként hét enzimfehérjéből álló enzim, amelynek mindkét alegységén két kitüntetett tiolcsoport található, amelyek az acetil-, illetve acilcsoportok megkötésére szolgálnak. Az egyik csoport a pantoténsavból képződő 4-foszfopantetein, ez az acil-carrier protein (ACP) alkotórésze, ami a koenzim-A-ban is megtalálható *(II/11-11. ábra).* A másik tiolcsoportot a 3-ketoacil-ACP-szintáz (vagy kondenzáló enzim) cisztein oldallánca képezi. Az acetilcsoportot az acetil-transzferáz viszi át a kondenzáló enzimre, a malonilcsoportot pedig a malonil-transzferáz az ACP-re. A reakciókban így mindkét csoport elveszti KoA-részét, és acetil-S-kondenzáló enzim, valamint malonil-S-ACP keletkezik belőlük. A következő lépésben a 3-ketoacil-ACP-szintáz elvégzi az acetil- és malonilcsoport összekapcsolódását CO_2 lehasadása közben:

$$\text{malonil-S-ACP} + \text{acetil-S-kond. enzim} \rightarrow \text{acetoacetil-S-ACP} + CO_2$$

Ezt redukciós lépések követik, melyek során a 3–ketoacil-ACP-reduktáz NADPH felhasználásával D-3-hidroxibutiril-ACP-t képez, ebből egy dehidratáz eltávolít egy vizet és krotonil-S-ACP-t alakít ki, amelyet az enoil-ACP reduktáz egy újabb NADPH felhasználásával butiril-S-ACP-vé transzformál. Ezzel az első redukciós ciklus lezárult *(II/11-11. ábra).* A butiril-S-ACP ezután a kondenzáló enzim (3-ketoacil-ACP-szintáz) SH-csoportjára kerül át, az ACP egy újabb malonilcsoportot köt, majd létrejön a következő kondenzáció, ekkor már egy hat szénatomos 3-keto-kaproil-S-ACP képződik. Ennek redukciós ciklusa végén kaproil-S-ACP képződik, amely újabb kondenzációs és redukciós ciklusok során 16 szénatomos palmitoil-S-ACP-ig növekszik. Ezt az teszi lehetővé, hogy a két azonos alegységből álló zsírsav-szintáz komplex különböző doménjei térben egymáshoz közel kerülve egymásnak adják to-

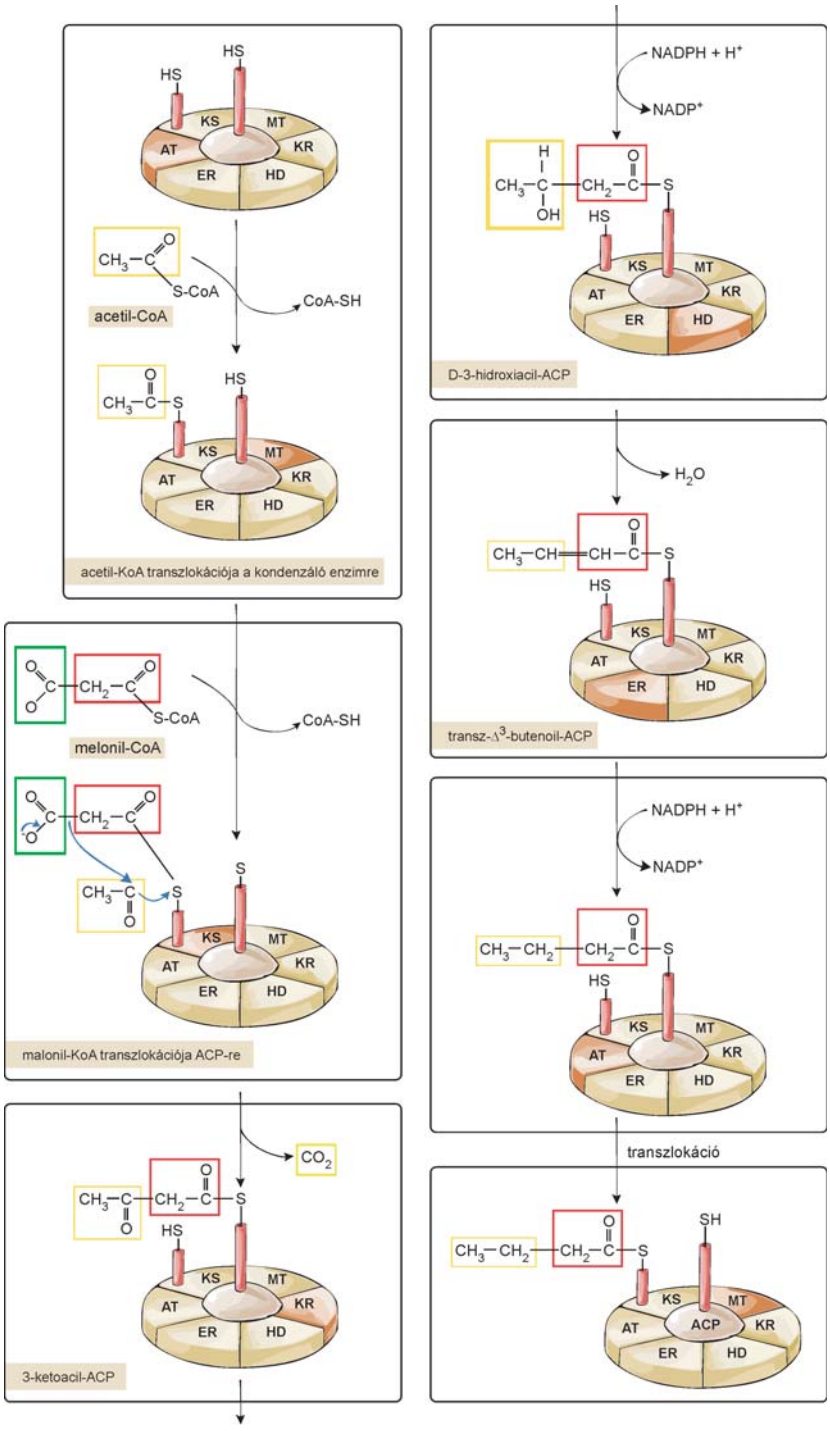


II/11-11. ábra
A koenzim-A és az acil carrier protein (kék szalag modell) közös alkotórésze a foszfopantetein-csoport (az –SH csoport sárga színnel jelölve)

vább a következőnek szubsztrátként szolgáló molekulát. Így egyszerre két zsírsav szintetizálódhat egy aktív szintáz-komplex felületén. Amikor a szénlánc elérte a 16 szénatom hosszúságot, egy tioészteráz lehasítja a palmitinsavat *(II/11-12. ábra)*. Így egy palmitinsav molekula szintéziséhez 8 acetil-KoA, 14 NADPH + 14 H^+ (7 ciklus 2-2 NADPH-val) és 7 ATP (a 7 malonil-KoA kialakításához) szükséges, ha az acetil-KoA molekulák citoplazmába juttatásához szükséges ATP-molekulákkal (ATP-citrát-liáz) nem számolunk (a szén-dioxid-molekulák visszaalakulnak a reakció során). A zsírsavszintézis tehát erősen energiaigényes folyamat.

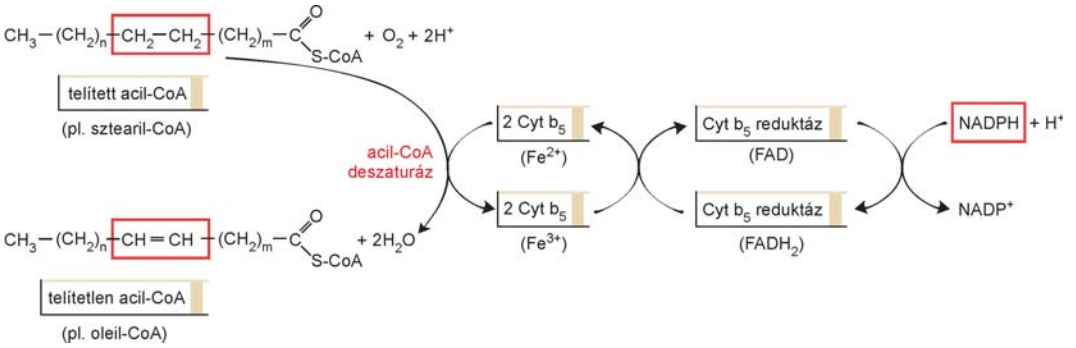
Természetesen a palmitinsav mellett más, hosszabb szénláncú zsírsavak is szükségesek a lipidek felépítéséhez. Szintézisük fő színhelye az endoplazmás retikulum, ahol az elongációs folyamat során a citoplazmához hasonlóan kondenzációs és redukciós lépések zajlanak le malonil-KoA és NADPH részvételével, de ehhez különálló (nem komplexben levő) enzimek szükségesek, amelyek KoA-val aktivált (és nem ACP-hez kötött) zsírsavakat hosszabbítanak meg. A fő termék a 18 szénatomos sztearil-KoA. Elongáció kisebb mértékben a mitokondriumokban is folyik, ahol ez a béta-oxidációs reakciók megfordításával történik, de a $FADH_2$ helyett NADPH vesz részt a redukcióban.

A trigliceridek gyakran tartalmaznak telítetlen zsírsavakat is. A deszaturáció ugyancsak az endoplazmás retikulumban történik. A reakciót ún. kevert funkciójú oxigenázok katalizálják, amelyek egy flavoproteinből, citokróm b_5-ből és egy nem-hem vasat tartalmazó deszaturázból állnak. A deszaturáz enzim különböző zsírsavakra lehet specifikus. Az enzim egy molekuláris oxigént és NADPH-t használ

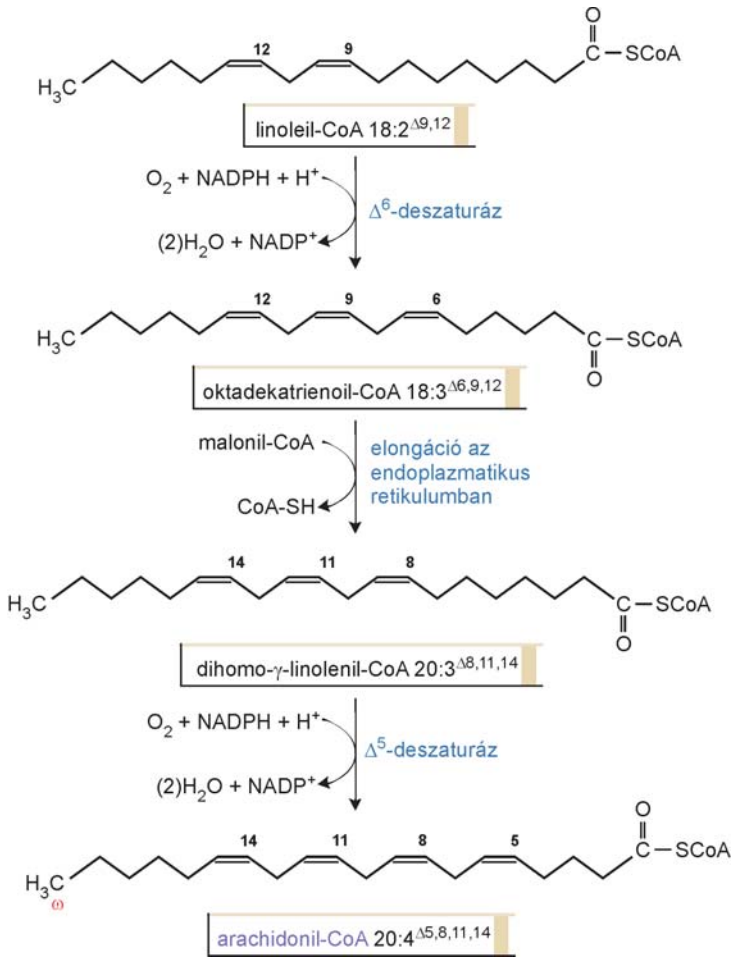


II/11-12. ábra

A zsírsav-szintáz reakció első ciklusa. Az egyes enzimek rövidítése: AT: acetil-KoA–ACP-transzacetiláz; KS: keto-acil-ACP-szintáz; MT: malonil-KoA-ACP-transzferáz; KR: 3-ketoacil-ACP-reduktáz; HD: 3-hidroxiacil-ACP-dehid-ratáz; ER: enoil-ACP-reduktáz



II/11-13. ábra
A telítetlen zsírsavak kialakulása



II/11-14. ábra
Az arachidonsav szintézise linolsavból

szubsztrátként, az egyik oxigén a zsírsav két szomszédos szénatomjáról eltávolított hidrogénekkel, a másik a NADPH hidrogénjeivel képez vizet (ezért nevezik kevert funkciójú oxigenáznak, *II/11-13. ábra*). A sztearil-KoA-ra specifikus Δ9-deszaturáz olajsavat képez, más deszaturázok a már Δ9 helyzetben telítetlen savba vihetnek be újabb kettős kötéseket Δ4,5,6-helyzetbe, de csak a már meglevő kötés és a tioészter kötés közé. Mivel a deszaturázok olajsavba nem tudnak újabb kettős kötést bevinni, a Δ9,12 helyzetű két kettős kötést tartalmazó linolsav és a Δ9,12,15 helyzetben három kettős kötést tartalmazó linolénsav esszenciális zsírsavnak minősül. E két zsírsavnak prekurzor szerepe van az arachidonsav (Δ5,8,11,14) szintézisében. Linoleil-KoA-ból először egy Δ6-deszaturáz és NADPH, valamint molekuláris oxigén segítségével 6,9,12-oktadekatrienoil-KoA képződik, amely azután egy elongációs reakcióban malonil-KoA-val meghosszabbodik, ezzel a három kettős kötés Δ8,11,14 pozícióba kerül, majd egy Δ5-deszaturáz NADPH-val és oxigénnel már képes bevinni a negyedik kettős kötést, így létrejön a cisz-Δ5,8,11,14-eikozatetraénsav (arachidonsav, *II/11-14. ábra*). Az arachidonsav továbbalakulásával az eikozanoidokról szóló alfejezetben foglalkozunk.

A deszaturáció szabályozásában a diétának van nagy szerepe. Mivel a telítetlen zsírsavaknak a membránokat alkotó foszfolipidek felépítésében, és ezzel a membrán fluiditásának kialakításában van szerepe, a megfelelő arány elérését követően a sztearil-KoA deszaturáz aktivitása csökken.

A zsírsav-szintáz tipikusan a palmitinsav szintézisét katalizálja, azonban segítségével létrejöhetnek rövidebb szénláncú és elágazó szénláncú zsírsavak is. Rövidebb szénláncú zsírsavak főleg az emlőben képződnek, mert fő előfordulási helyük az emlősök teje. Ebben az esetben egy hormonális szabályozás alatt álló tioészteráz még az előtt lehasítja a zsírsavat az ACP-ről, hogy az elérte volna a 16 szénatomos méretet. Elágazó szénláncú zsírsavak pedig a verejtékmirigyekben termelődő viaszokban találhatók, ezeknek a szintézise metilmalonil-KoA felhasználásával történik: ilyenkor ez a vegyület helyettesíti a malonil-KoA-t. A reakciót a zsírsav-szintáz komplex katalizálja, a két vegyület felhasználásának mértéke előfordulásuk arányától függ. Elágazó szénláncok előfordulnak aminosavakban is (valin, leucin, izoleucin), ezek azonban az emlősök, így az ember számára is esszenciálisak.

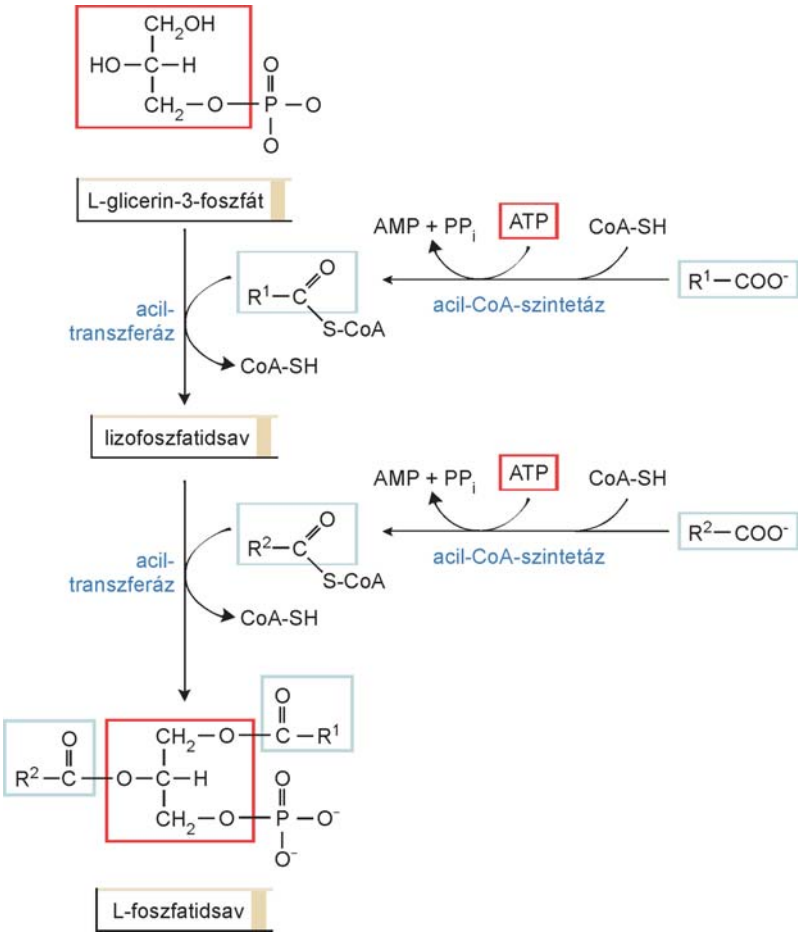
A zsírsavszintézissel kapcsolatban említést kell tennünk a NADPH forrásairól, mert az ezeket a folyamatokat katalizáló enzimek nagyrészt NADPH-ra specifikusak. Szemben a számos oxidációs folyamatban keletkező NADH-val, a $NADP^+$ redukciója csak néhány folyamatban következik be, ezek azonban javarészt citoplazmatikus folyamatok, tehát a zsírsavszintézis kompartmentjében zajlanak le. A legjelentősebb ilyen folyamat a glukóz direkt oxidációjának két korai lépése (lásd a szénhidrát-fejezetet), valószínűleg ebből származik a legtöbb NADPH. Egy másik citoplazmatikus reakciót az „almasav-enzim" katalizál, ennek során malátból egy dekarboxilációs reakcióban piruvát keletkezik. Kisebb mértékben képződhet NADPH a citoplazmatikus izocitrát-dehidrogenáz reakcióban, valamint a glutamát-dehidrogenáz reakcióban is, bár utóbbi főleg NAD^+-ot használ kofaktorként.

II/11.7. A TRIGLICERIDEK SZINTÉZISE

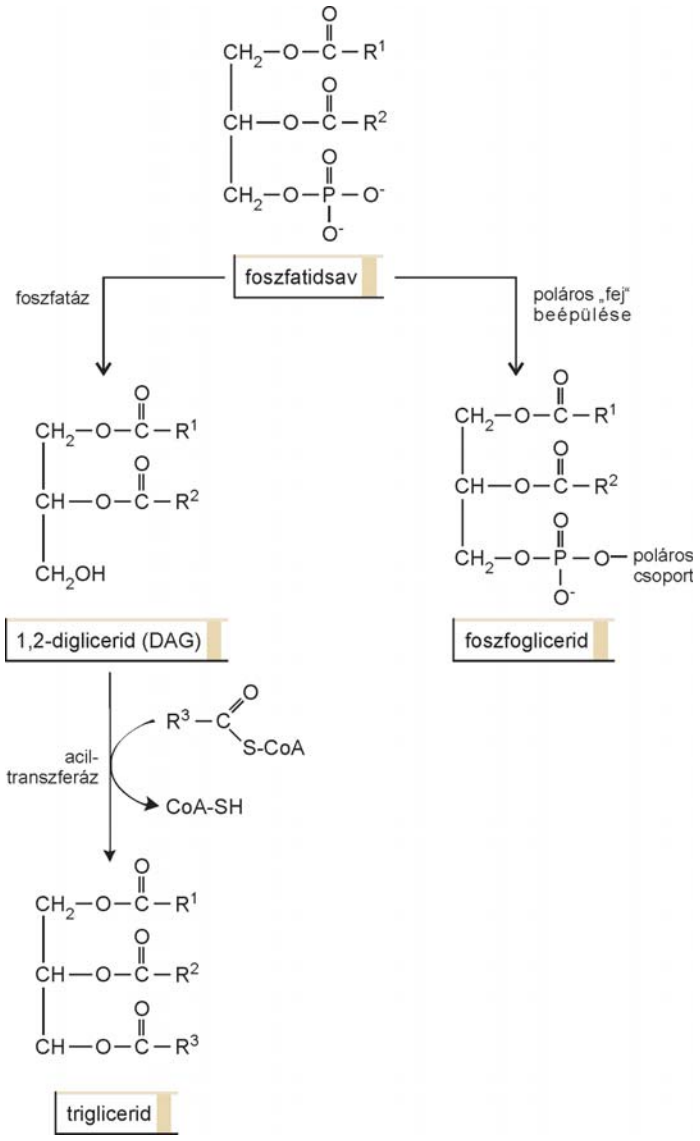
A zsírsavakból raktározás céljából trigliceridek keletkeznek. A trigliceridek a májban és a zsírszövetben képződnek. Ez a zsírsavak aktiválásával kezdődik, amely a zsírsavoxidációnál leírt mechanizmussal acil-koenzim-A képződésével jár. Az acil-KoA egy aciltranszferázzal glicerin-3-foszfáthoz, vagy dihidroxi-aceton-foszfáthoz kapcsolódik, amely NADPH-val redukálódik. A termék mindkét esetben

lizofoszfatidsav, amely a glicerin 1. szénatomján van észteresítve. Ezután a glicerin középső szénatomjára egy újabb transzferáz-reakcióval egy másik zsírsav kerül, és foszfatidsav jön létre. A foszfatidsav (akárcsak a glicerin-3-foszfát) királis, és a belőle keletkező termékek L-konfigurációjúak *(II/11-15. ábra)*. A foszfatidsav a glicerofoszfatidok (lásd később) és trigliceridek közös prekurzora. Erről egy foszfatáz lehasítja a foszfátot, a helyére pedig egy harmadik acil-KoA-ról újabb zsírsav kerül *(II/11-16. ábra)*. A bélhámsejtekben, ahol a táplálékból felszívódott, és a pankreász lipáz által hasított zsírból 2-monoglicerid képződik, nem keletkezik foszfatidsav, hanem acil-KoA-ból acil-transzferázokkal erre épül rá két zsírsav.

A három zsírsav helyzete bizonyos törvényszerűségeket mutat. Az 1. szénatomon általában telített, míg a 2. szénatomon telítetlen zsírsav helyezkedik el. A helyzetet elsősorban az acil-transzferázok specifitása határozza meg, amelyet a rendelkezésre álló zsírsavkészlet korlátoz.

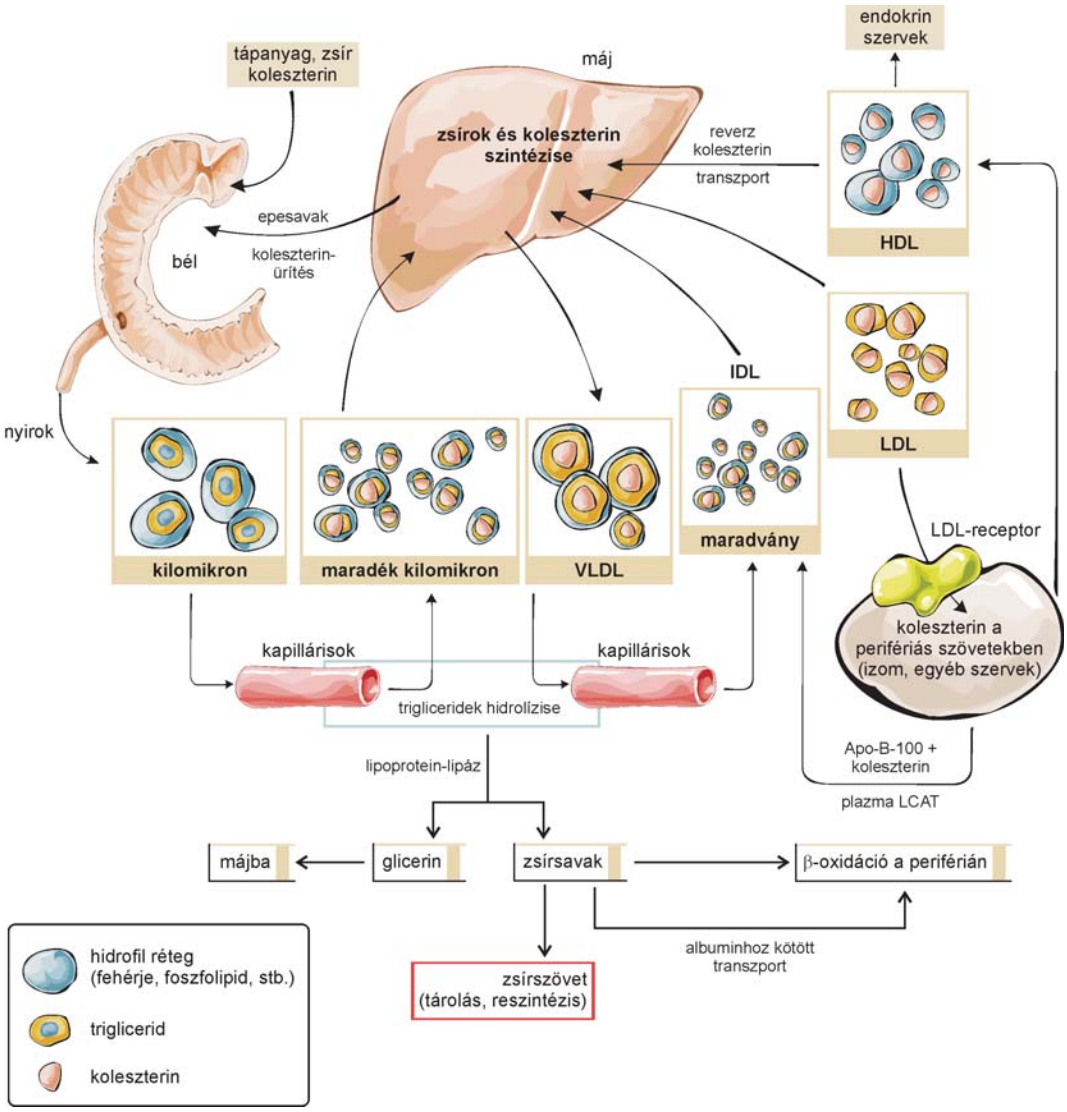


II/11-15. ábra
A foszfatidsav keletkezése glicerin-3-foszfátból



II/11-16. ábra
Trigliceridek szintézise foszfatidsavból
(mely a foszfogliceridek prekurzora is)

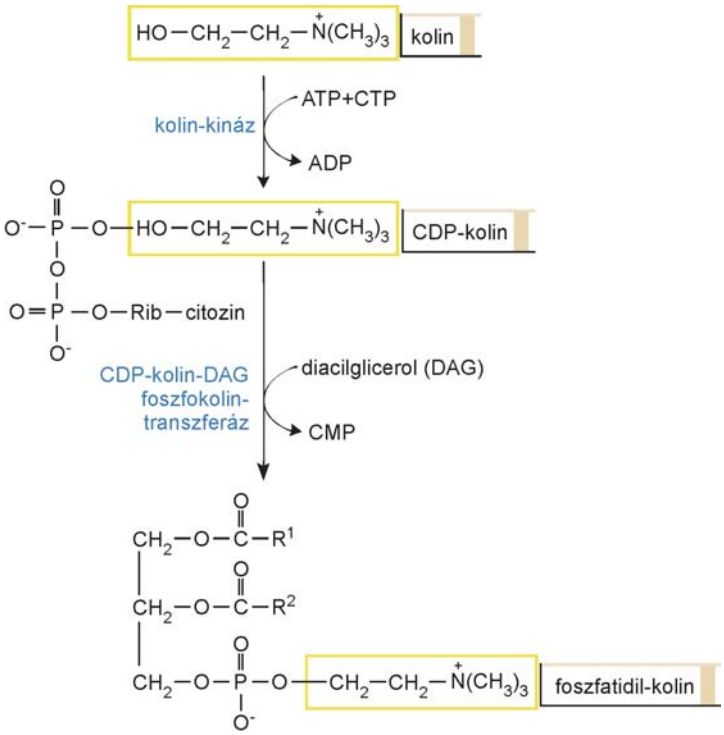
A keletkezett trigliceridek a májban VLDL-hez kapcsolódnak és elszállítódnak, míg a fehér zsírszövetben raktározódnak és szükség esetén onnan mobilizálódnak. A zsírszövetben zajló folyamatokat a szénhidrát-anyagcsere befolyásolja. Bőséges szénhidrát-ellátottság esetén inzulin hatására glukóz lép be a zsírsejtekbe, amelyből glicerin-3-foszfát keletkezik. Az inzulin aktiválja a lipoproteinlipázt, amely az odaszállított lipoproteinekből (VLDL, kilomikron) zsírsavakat hasít le, ezzel elősegíti a trigliceridek szintézisét is. Ilyenkor tehát a szervezet energiát raktároz, mert a fő energiaraktár a zsírszövet (fehérjedepó nincs, a glikogénraktárak – máj, izom – pedig korlátozottak). A zsírszövet mint raktár nem statikus; a trigliceridek félideje néhány nap, tehát állandó fel- és leépülés jellemzi őket. Ha ez a regulációs valamilyen okból felborul, és a zsírok felszaporodása túlzott mértékűvé válik, kialakul az elhízás (obezitás), amely az adipociták számának és méretének növekedésével jár és számos patofiziológiai folyamat kiindulópontja lehet. A trigliceridek szervek közötti forgalmát a lipoproteinek egymásba alakulását mutató *II/11-17. ábrán* láthatjuk.



II/11-17. ábra
A lipoproteinek egymásba alakulási folyamatainak összefoglalása

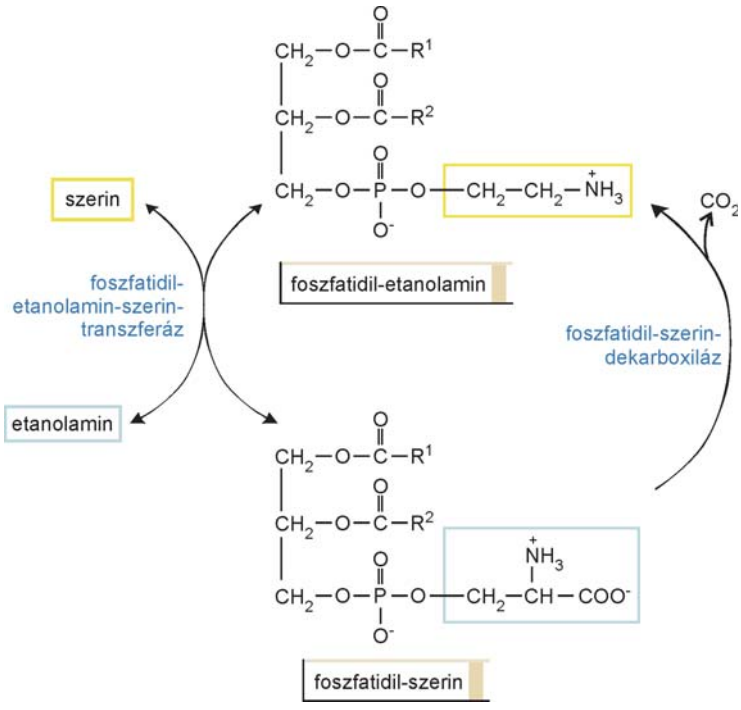
II/11.8. EGYÉB GLICEROLIPIDEK ANYAGCSERÉJE

A glicerin a trigliceridek kívül még a foszfolipidek nagyrészében is előfordul, ezeket glicerinfoszfatidoknak hívjuk. Többségükben a membránok alkotórészei, de pl. az inozitol-foszfatidoknak a jelátviteli folyamatokban is komoly szerepe van. A szfingolipidek nem glicerint tartalmaznak, de számos szerkezeti hasonlóságot mutatnak a glicerolipidekkel.



II/11-18. ábra
A foszfatidil-kolin szintézisének fő útja

A legnagyobb mennyiségben előforduló glicerinfoszfatid a foszfatidil-kolin, vagy triviális nevén lecitin. Szintéziséhez kolinra (trimetil-etanolamin) van szükség, amely elsősorban a táplálékkal kerül a szervezetbe, a sejtekbe pedig speciális transzporterekkel kerül be. A sejtek citoplazmájában a kolint a kolin-kináz foszforilálja és így kolin-foszfát képződik. Ennek aktiválódnia kell, amelyhez CTP-re van szükség. Ebből a két vegyületből a CTP:foszfokolin-citidil-transzferáz enzim hatására CDP-kolin keletkezik és pirofoszfát szabadul fel, ez az enzim aktív formában az endoplazmás retikulumban lokalizálódik. Itt található a CDP-kolin:1,2-diglicerid-foszfokolin-transzferáz is, amely az aktivált foszfokolint a diglicerid 3. szénatomjára kapcsolja és CMP kilépésével kialakul a foszfatidil-kolin *(II/11-18. ábra)*.



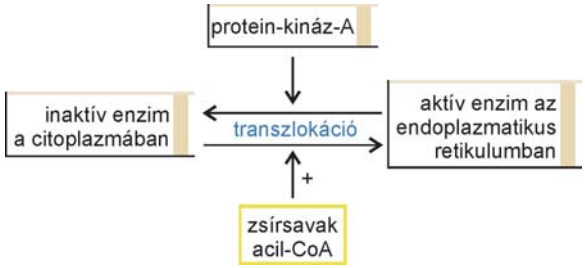
II/11-19. ábra
A foszfatidil-etanolamin és foszfatidil-szerin egymásba alakulása

A májban létezik egy alternatív út is, ahhoz előzetesen szintetizálódott foszfatidil-etanolamin szükséges. Ebből 3 egymást követő metilációs lépésben S-adenozil-metionin metildonorral egy metiltranszferáz enzim segítségével kialakul a foszfatidil-kolin.

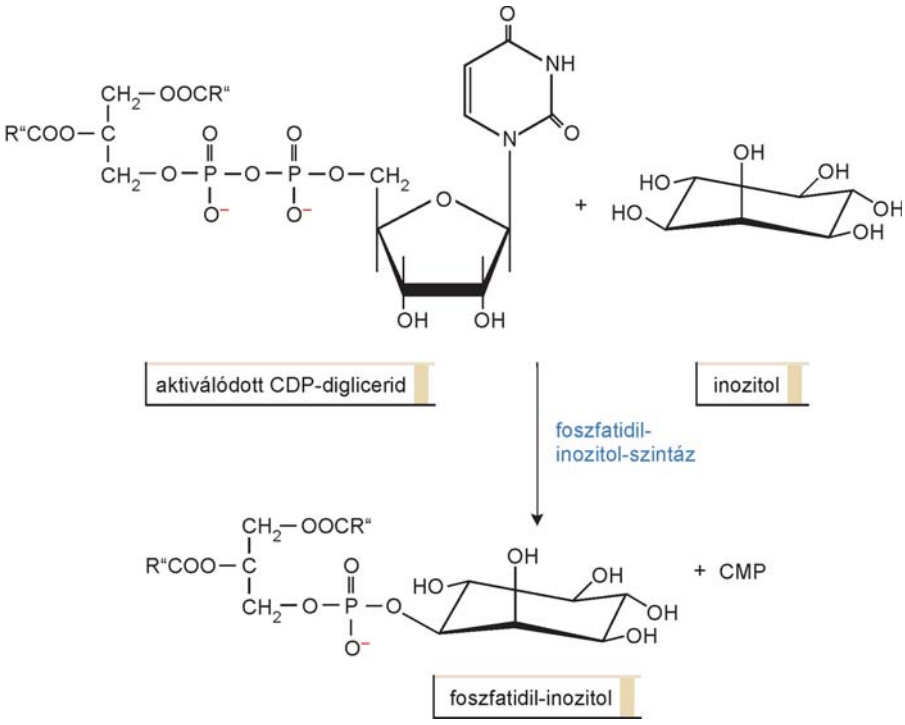
A foszfatidil-kolin szintézisének sebesség-meghatározó lépése a citidilil-transzferáz, amely a citoplazmából kerül az endoplazmás retikulumba és ezzel aktiválódik is. E transzlokáció tehát meghatározza a folyamat sebességét is. A foszfatidilkolin-szintézis igényei a triglicerid-képződéssel szemben elsőbbséget élveznek. A transzferáz aktivitását a cAMP-függő proteinkináz-A is befolyásolja, foszforiláció hatására az enzim leválik az endoplazmás retikulumról és inaktiválódik.

A foszfatidil-kolin a lipoproteinek felépítéséhez is szükséges. Ezért kolinhiány esetén a májban trigliceridek alakulnak ki és nem szállítódnak el, ami zsírmáj kialakulásához vezet. A digliceridek közös intermedierei a triglicerid- és foszfolipid-szintézisnek, ezért a foszfatidsav-foszfatáz enzim regulációja fontos szerepet játszik mindkét lipidféleség szintézisében. Az enzimet stressz, glukokortikoidok és alkohol aktiválja.

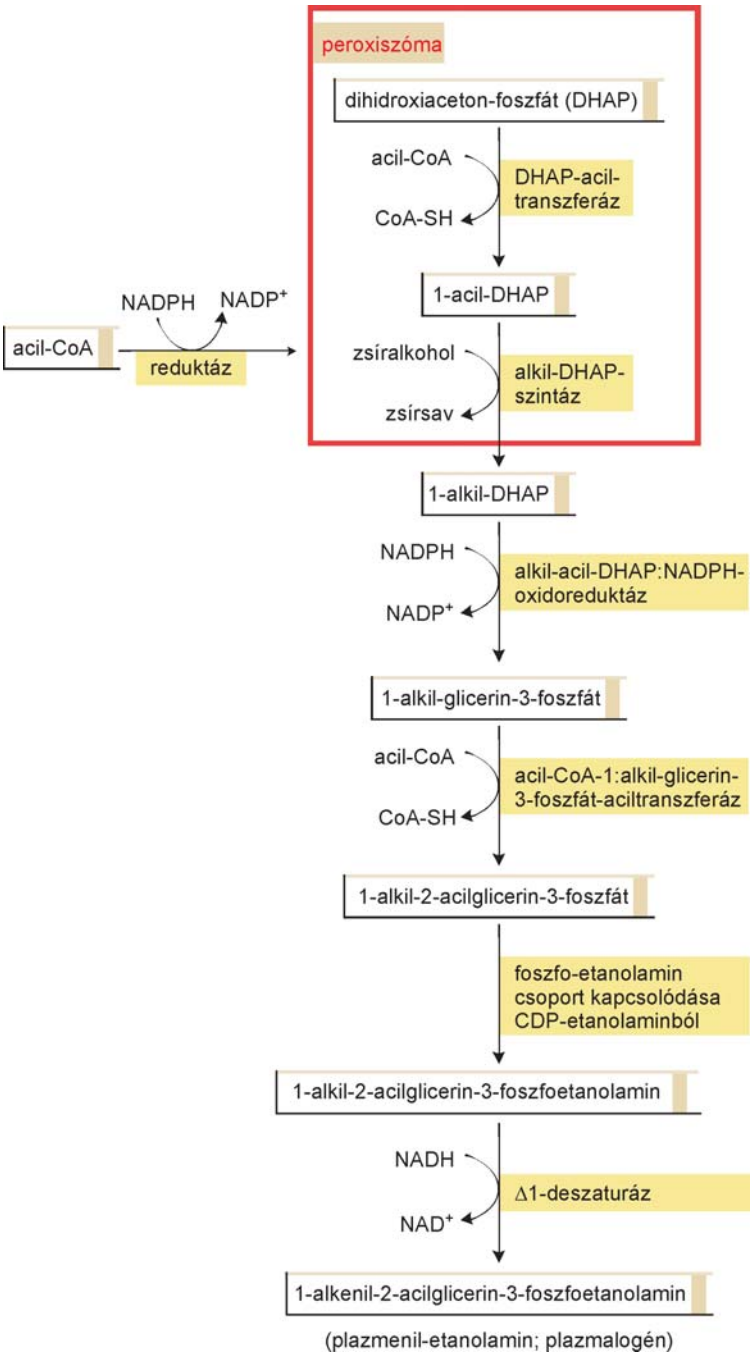
A foszfatidil-etanolamin és foszfatidil-szerin anyagcseréje szorosan összefügg.



II/11-20. ábra
A citidilil-transzferáz enzim aktivitásának szabályozása



II/11-21. ábra
A foszfatidil-inozitol szintézisekor foszfatidsav aktiválódik CDP-digliceriddé



II/11-22. ábra

A plazmenil-etanolamin szintézisének lépései. A piros keretben látható reakciók a peroxiszómában, a többi reakció az endoplazmatikus retikulumban játszódik le

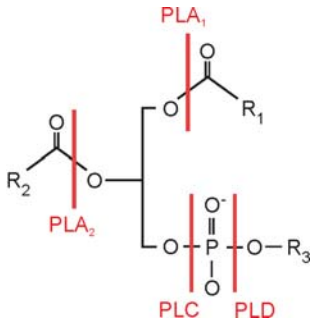
A foszfatidil-etanolamin a foszfatidil-kolinhoz hasonló lépésekben szintetizálódik: a táplálékkal felvett etanolamint egy kináz foszforilálja, utána CTP-vel CDP-etanolaminná aktiválódik, amelyet azután a citidilil-transzferáz CMP lehasadásának kíséretében diglicéridre visz át, és így kialakul a foszfatidil-etanolamin. Prokariotákban létezik egy másik út is, amely foszfatidil-szerinből dekarboxilációval alakítja ki a foszfatidil-etanolamint. Emlősökben azonban inkább a foszfatidil-etanolamin a foszfatidil-szerin prekurzora: ebben a reakcióban etanolamin-szerin csere történik, amely reverzíbilis *(II/11-19. ábra)*. A citidilil-transzferáz szabályozását a *II/11-20. ábrán* láthatjuk.

A foszfatidil-inozitol esetében érdekes módon a diglicerid aktiválódik CTP-vel: ez a citidilil-transzferáz foszfatidsavra specifikus és CDP-diglicéridet hoz létre egy pirofoszfát kiválása mellett. A CDP-diglicerid és az inozitol összekapcsolódását a foszfatidil-inozitol-szintáz katalizálja *(II/11-21. ábra)*. A foszfatidil-inozitolnak azonban további foszforilált formái is megtalálhatók a plazma membránban, ezeket kinázok alakítják ki ATP terminális foszfátjának terhére és végül foszfatidil-inozitol- 4,5-biszfoszfát jön létre. Ez a vegyület fontos szerepet tölt be hormonok és neurotranszmitterek hatásmechanizmusában, melynek részleteivel a megfelelő fejezetek foglalkoznak.

A foszfatidsav a prekurzora két másik foszfolipidnek, a foszfatidil-glicerinnek és a kardiolipinnek is. Előbbi szintézise CDP-diacilglicerinből és glicerin-3-foszfátból indul ki, a keletkező foszfatidil-glicerin-3-foszfátról egy foszfatáz lehasítja a foszfátot és létrejön a foszfatidil-glicerin. Ez a vegyület pedig egy CDP-digliceriddel létrehozza a kardiolipint a kardiolipin-szintáz enzim segítségével.

Az éter foszfolipidek közé tartozó plazmalogének a glicerin 1. szénatomján éterkötéssel kötött alkoholt tartalmaznak. Szintézisük ezért a többi foszfolipidtől jelentősen eltér. A kiinduló vegyülete dihidroxiaceton-foszfát, amelynek 1. szénatomjára egy acil-KoA-ról átkerül az acilcsoport. Az ezt követő lépésben egy transzferáz enzimmel hosszú láncú alkohol cseréli le a zsírsavláncot, így kialakul az éterkötés. Az ezt követő, NADPH-t igénylő redukciós lépés a középső szénatomon alkoholos OH-csoportot alakít ki, amelyet egy második acil-KoA észteresít. Az így kialakult intermedier foszfát-csoportjára egy CDP-etanolaminról kerül át a bázis, majd a befejező lépésben egy NADH-val működő deszaturáz (citokróm b_5-öt tartalmazó kevert funkciójú oxigenáz) az 1. szénatomon levő alkohol első két szénatomja között kettős kötést alakít ki, így jön létre a plazmenil-etanolamin *(II/11-22. ábra).*

A foszfolipidek katabolizmusában specifikus foszfolipázok vesznek részt. Osztályozásuk annak alapján történik, hogy a glicerofoszfatid melyik észterkötését bontják. Az sn-1 acil-láncot lehasító enzimeket foszfolipáz A1-nek, az sn-2 acilkötést hasítókat foszfolipáz A2-nek, a glicerin és a foszfát közötti kötést hasítókat foszfolipáz C-nek, végül a foszfát és a hozzá kapcsolódó másik alkohol közötti kötést hasítókat foszfolipáz D-nek nevezzük *(II/11-23. ábra).* A foszfolipáz B elnevezés olyan enzimekre vonatkozik, amelyek akár az sn-1, akár az sn-2 szénatomon levő acilcsoportot le tudják hasítani, ha a másik már lehasadt a molekuláról. A jelátvitelben a foszfolipáz C-nek van a legnagyobb jelentősége, mert ez hasítja a jelátviteli folyamatokban szerepet játszó foszfatidil-inozitolokat digliceridre és inozitol-foszfátokra (lásd ott).

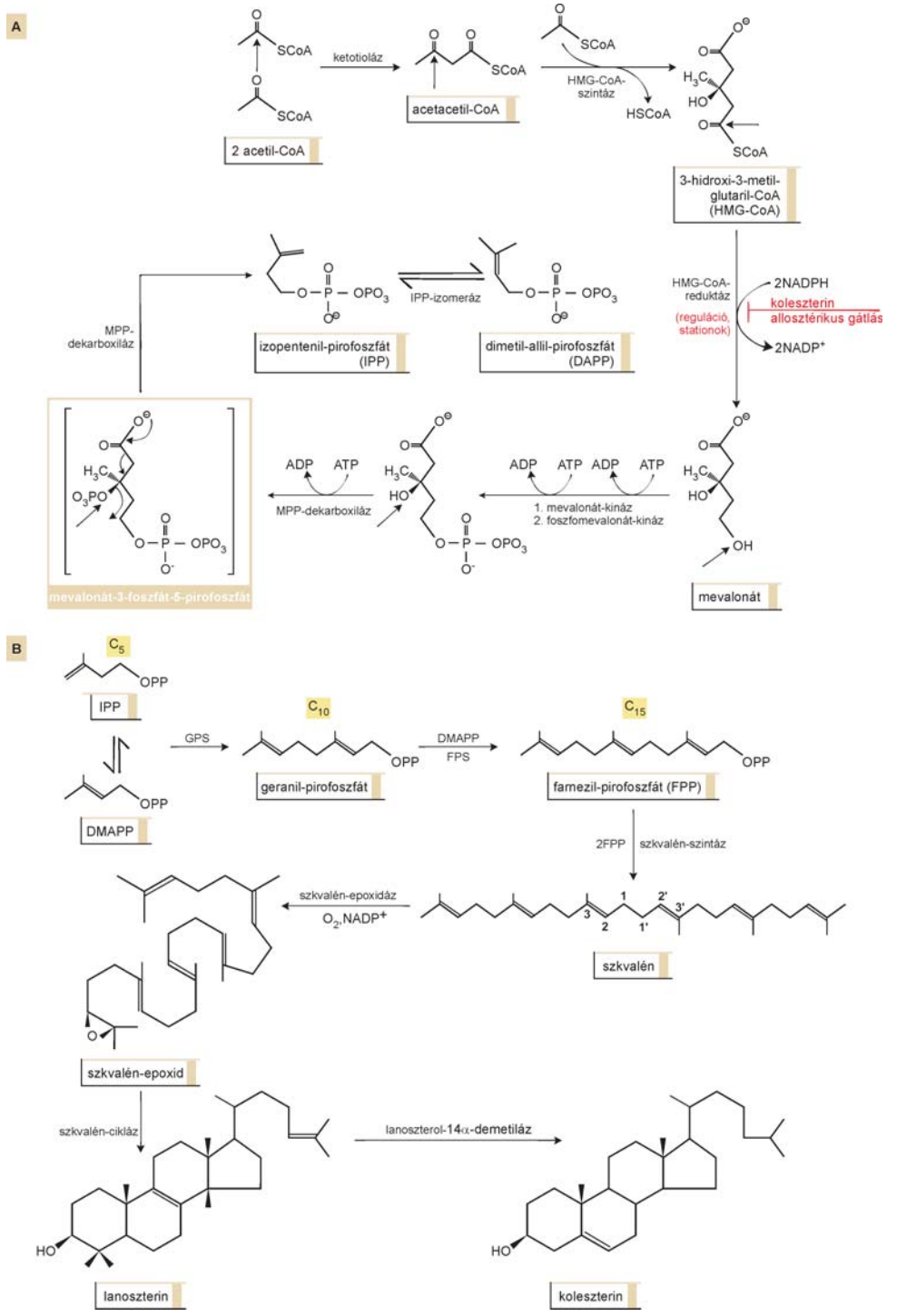


II/11-23. ábra
A foszfolipázok hasítási helyei. A kétféle PLA-aktivitással rendelkező enzimet foszfolipáz B-nek hívják

II/11.9. A SZTERÁNVÁZAS VEGYÜLETEK ANYAGCSERÉJE

A szteránvázas vegyületek valamennyien a szervezet fő szteroidjából, a koleszterinből keletkeznek. Ezért először a koleszterin szintézisével foglalkozunk.

A koleszterin szintézise acetil-KoA-ból indul a citoplazmában. A szintézis első lépései egészen a 3-hidroxi-3-metilglutaril-KoA-ig (HMG-KoA) megegyeznek a ketontest-szintézis megfelelő lépéseivel, azok azonban a mitokondriumban, ettől elkülönített térben mennek végbe. Ez lehetővé teszi a koleszterin szintézisének elkülönült szabályozását is. Az endoplazmás retikulum membránjának citoplazmatikus oldalán működő HMG-KoA reduktázt ugyanis a koleszterin végtermék gátolja, ezzel megakadályozza a jelentős energiabefektetést igénylő folyamat felesleges folytatását, ha a koleszterin koncentráció magas. A HMG-KoA-ból a reduktáz segítségével, NADPH felhasználásával mevalonát képződik (a név a *me*til-*val*ero-lakt*on* intermedier nevéből összevonással származtatható). A mevalonát két további lépésben egy kinázzal ATP terhére foszforilálódik, így 5-pirofoszfo-mevalonát képződik, amelyből egy újabb ATP hidrolízisével párhuzamosan 5 szénatomos izoprenoid vegyületek (dimetilallil-pirofoszfát és izopentenil-pirofoszfát) keletkeznek. A két izoprenoid egymásba átalakulni is képes. Két ilyen izoprenoid egység összekapcsolódásával egy



II/11-24. ábra

A koleszterin-bioszintézis lépései az aktivált terpének kialakulásáig (A). A koleszterin-bioszintézis második szakasza (B). IPP: izopentenil-pirofoszfát; DMAPP: dimetil-allil-pirofoszfát; GPS: geranil-pirofoszfát szintetáz; FPS: farnezil-pirofoszfát szintetáz

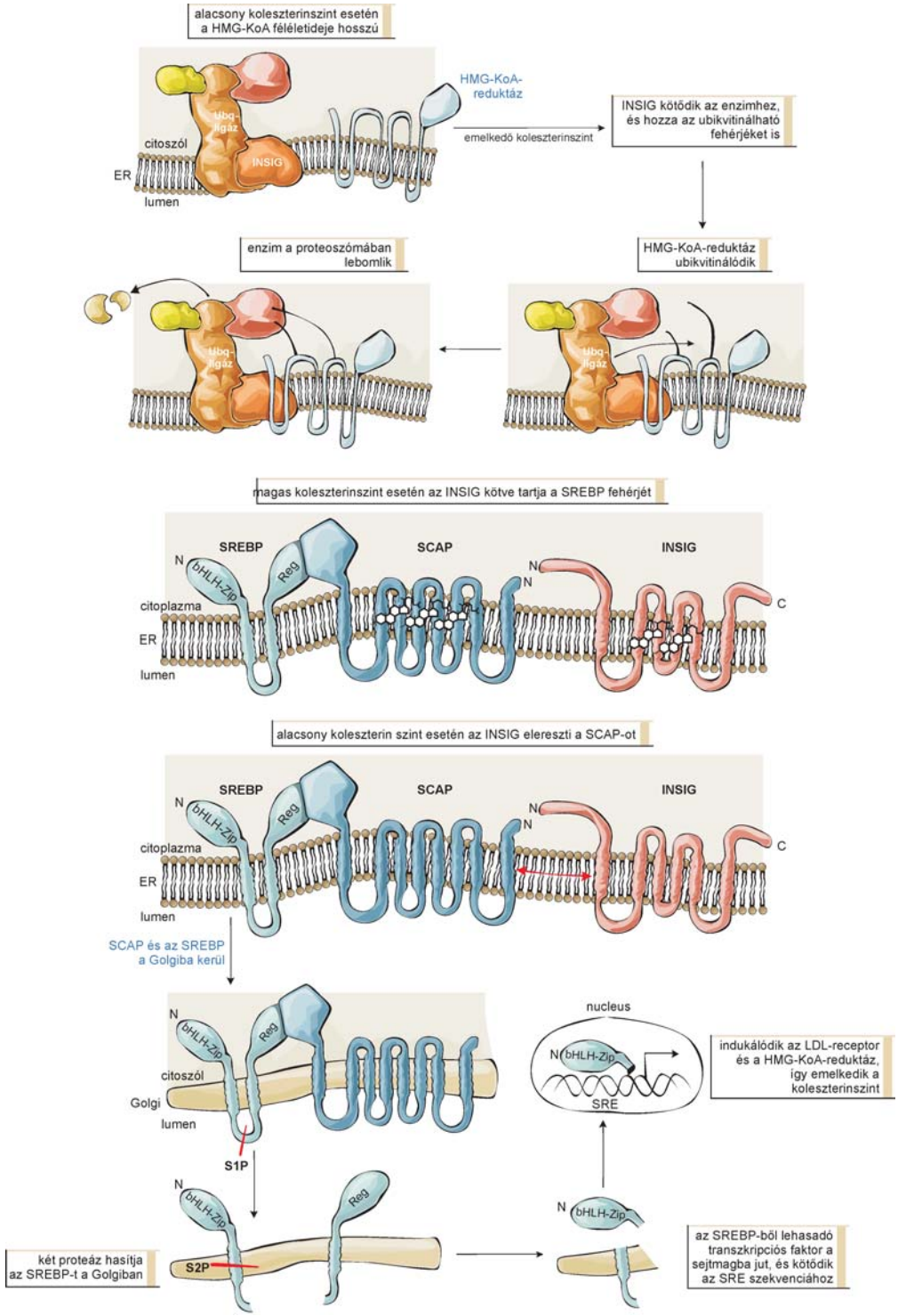
10 szénatomos terpén képződik (geranil-pirofoszfát), majd abból egy újabb izoprenoid hozzákapcsolódásával 15 szénatomos szeszkviterpén (farnezil-pirofoszfát) keletkezik. Két farnezil-pirofoszfát összekapcsolódása a két pirofoszfát felszabadulása kíséretében a szkvalén-szintetáz segítségével egy triterpént hoz létre, amelyet szkvalénnek nevezünk. A szkvalén már tartalmazza a szteránváz összes atomját, de még nyílt szénláncú vegyület. Koleszterinné alakulásához ciklizáló enzimekre van szükség, amelyek egyúttal 3 szénatommal meg is rövidítik a láncot, valamint a majdani szteránváz 3. szénatomjára egy hidroxilcsoportot is beépítenek. Ennek során először a szkvalén-epoxidáz NADPH felhasználásával (kevert funkciójú oxigenáz reakció) szkvalén-2,3-epoxidot eredményez, amelyből egy cikláz enzim létrehozza a lanoszterint, melynek során a gyűrűzáródásokon kívül metilcsoportok is áthelyeződnek más pozíciókba és két kettős kötés is kialakul, továbbá kialakul a 3-OH csoport. A lanoszterinből újabb NADPH-t, NADH-t és oxigént igénylő reakciókban alakul ki a koleszterin, melynek során három metilcsoport szakad le szén-dioxid formájában, a kettős kötés pedig Δ5-helyzetbe kerül *(II/11-24. ábra).*

A koleszterin-szintézis energiamérlege jelentős energia-felhasználást mutat. Egyetlen molekula szintéziséhez 18 acetil-KoA, 16 molekula NADPH és 36 molekula ATP szükséges, utóbbiak fele a mitokondriális acetil-KoA citoplazmába történő transzportja során használódik fel. Ez megmagyarázza azt a tényt, hogy a sejtek igyekeznek megőrizni a koleszterint. Mivel a szervezet koleszterin-megőrző rendszere rövid idő alatt nem volt képes alkalmazkodni a jelenlegi lipidben dús táplálkozáshoz, ez hozzájárul a fejlettebb országok populációjának kórosan magas koleszterin-szintjéhez.

A koleszterinszintézis szabályozott enzime a HMG-KoA-reduktáz

Mivel a vérplazma koleszterin-szintje viszonylag szűk tartományban mozoghat (3,6–5,2 mM), és koleszterin a táplálékkal is kerül a szervezetbe, a de novo szintézis szabályozása alapvető fontosságú. A szabályozás fő célpontja a már említett HMG-KoA-reduktáz, amelyet a koleszterin allosztérikusan gátol *(II/11-23. ábra).* Az enzim kovalens módosításokkal is regulálódik, amely hormonális hatásokra bekövetkező foszforilációs-defoszforilációs szabályozást jelent. A glukagon hatására a cAMP-szint emelkedik, a HMG-KoA-reduktáz foszforilálódik, ezzel aktivitása csökken, ezt egy foszfatáz helyreállíthatja. A sejtek alacsony energia-ellátottsága, amely az AMP koncentrációjának emelkedése formájában jelentkezik, ugyancsak az enzim foszforilációjához vezet, az AMP-aktivált kináz révén.

A HMG-KoA-reduktáz szabályozásának másik szintje az enzim mennyiségnek a szabályozásával valósul meg. Ez a hosszú távú szabályozás az enzim lebontásának a sebességét befolyásolja. Az endoplazmás retikulum membránjában az INSIG (insulin induced gene) fehérjetermékei magas koleszterin-koncentráció esetén a HMG-KoA-reduktázt hozzákapcsolják az ubikvitinációs fehérjekomplexhez, ezáltal az enzim ubikvitinálódik és a proteaszómában lebomlik. Magas koleszterinszint esetén az INSIG egy kapcsoló fehérjén át a fő reguláló fehérjéhez, a SREBP-hez (steroid response element binding protein) kötődik és megakadályozza a SREBP transzlokációját a sejtmagba. Alacsony koleszterinszint esetén ez a kötés felbomlik és a SREBP először a Golgi-készülékbe kerül, ahol proteázok elhasítják, az egyik hasítási termék pedig egy olyan transzkripciós faktor, amely bejut a sejtmagba és ott az SRE szekvenciához kötődik. Ennek hatására indukálódik a HMG-KoA reduktáz, valamint az LDL-receptor szintézise, melynek következtében a koleszterin-szint emelkedik *(II/11-25. ábra)*.



II/11-25. ábra
A koleszterin-szint szabályozása a HMG-KoA mennyiségének változtatásával

A HMG-KoA reduktáz gátlásán alapul a gyógyszeres koleszterin-csökkentők többségének hatása is. Ezek az ún. statinok a HMG-KoA reduktáz mesterséges inhibitorai, és aktivitásának csökkentésével rendszeres szedés esetén a magas koleszterinszint normalizálható.

A koleszterinszintet az epesavakká történő átalakulás regulációjával is lehet szabályozni. Ennek az átalakulásnak a lépéseit és szabályozását az epesavak anyagcseréjének ismertetésekor fogjuk tárgyalni.

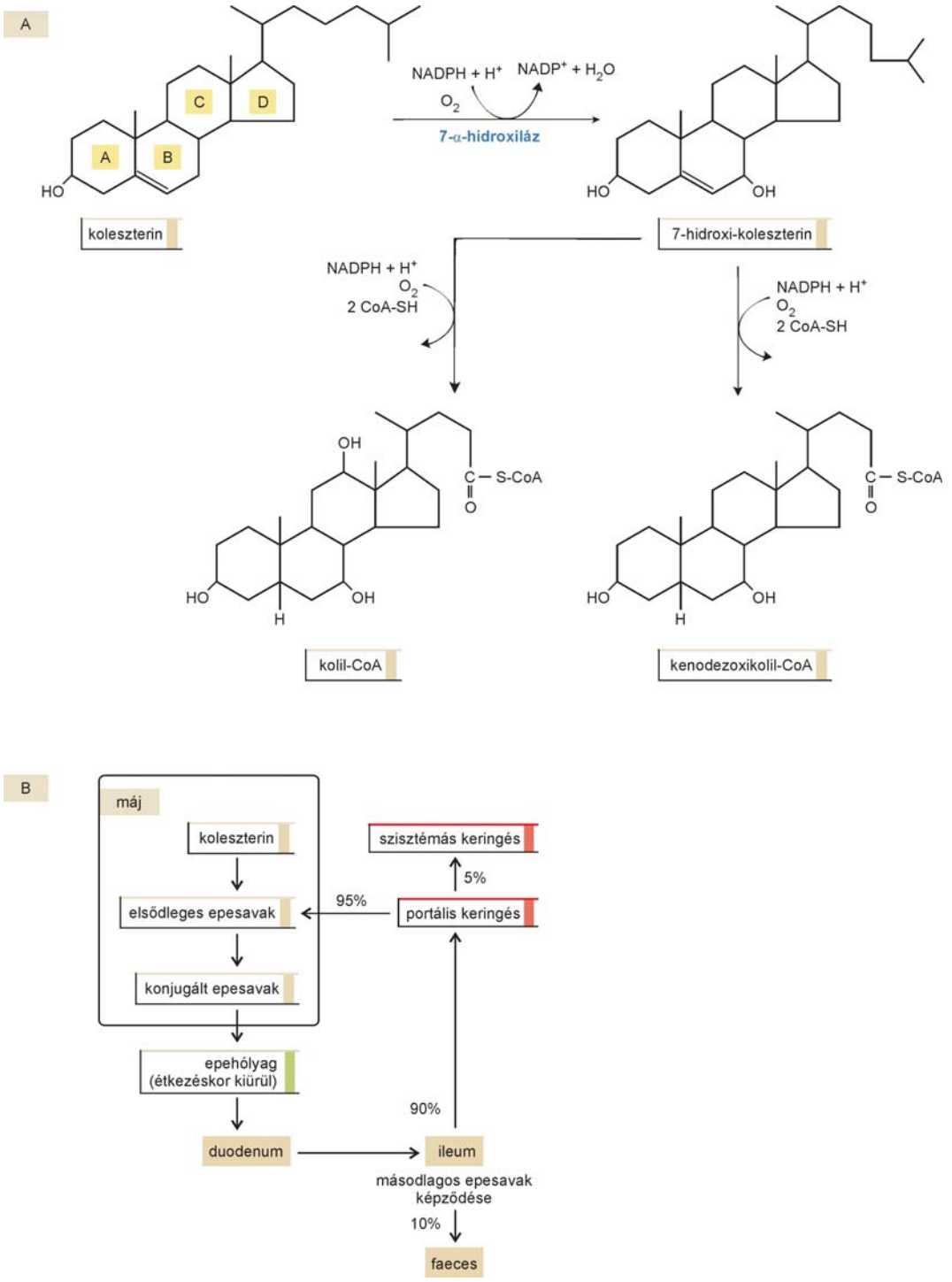
Az epesavak anyagcseréje és annak szabályozása

A koleszterin epesavakká alakulása a koleszterin metabolizmusának mennyiségileg legjelentősebb útja. Az epesavak szerepet játszanak a zsírok emésztésében (emulgeáló hatásuk révén), oldatban tartják az erősen hidrofób koleszterint, valamint biztosítják annak kiürülését a székleten keresztül. Az epesavak szintézise a májban történik, ezek az úgynevezett elsődleges epesavak. Ezekből a bélben másodlagos epesavak keletkeznek.

A szintézis első, sebesség-meghatározó lépésében a 7-α-hidroxiláz hatására a koleszterin 7-es szánatomjára egy hidroxilcsoport épül be, a 3-OH csoport pedig β-konfigurációból α-helyzetbe izomerizálódik. Innen a két elsődleges epesav útja részben kettéválik, a kolánsav szintézise során a 12-es C-atomon is hidroxiláció következik be. Ettől kezdve a lépések azonosak: a Δ5-kettős kötés telítődik, a 26-os és 24-es C-atomokon hidroxiláció és oxidáció történik, majd egy koenzim-A segítségével az oldallánc elhasad, egy propionsav leválik, a 24-es szénatom pedig a KoA révén aktiválódik. Így jön létre a kolil-KoA és a kenodezoxikolil-KoA, a két aktivált elsődleges epesav. Ezek glicinnel és taurinnal konjugálódhatnak, a KoA leválik az epesavról, ekkor a 24-es karboxilcsoport savamidkötéssel kapcsolódik a két konjugáló vegyülethez és az erősebben poláros glikokólsav és taurokólsav (valamint a megfelelő kenodezoxikólsavak) képződnek. Az epébe kerülve bekövetkezik ezek dekonjugációja, ezzel kialakulnak az elsődleges epesavak, a kólsav (3,7,12-trihidroxi-kolánsav), valamint a kenodezoxikólsav (3,7-dihidroxi-kolánsav). Mivel a kettős kötés redukálásakor az AB gyűrűk cisz-helyzetbe kerülnek egymáshoz képest, az α-helyzetű poláros hidroxilcsoportok még közelebb kerülnek egymáshoz a molekula azonos oldalán, és ezzel az epesavak ténylegesen amfipatikus molekulákká válnak: egyik oldaluk hidrofil, a másik hidrofób, ami lehetővé teszi emulgeáló hatásukat, valamint a koleszterin oldatban tartását *(II/11-26. ábra, A)*.

A bélbe jutó epében az epesavak részben elvesztik a 7-es szénatomon levő hidroxilcsoportjukat és másodlagos epesavakká alakulnak. Így jön létre a kólsavból a dezoxikólsav (3,12-dihidroxi-kolánsav), a kenodezoxikólsavból pedig a litokólsav (3-hidroxi-kolánsav). A bélből mind a megmaradt elsődleges, mind a másodlagos epesavak jelentős része visszaszívódik a mucosán keresztül és a portális keringéssel albuminhoz kötve visszaszállítódik a májba, ahol újra konjugálódik és ismét kiválasztódik. Ezt a folyamatot enterohepatikus körforgásnak nevezzük. Naponta mintegy 300 mg epesav a széklettel kiürül a szervezetből, ez a koleszterin eltávolításának egyik útja. Ezt gyógyszeresen úgy lehet felgyorsítani, hogy per os epesavakat kötő gyantákat adnak a páciensnek, az így megkötött epesavak kiürülnek és pótlásuk a koleszterin fokozott felhasználásával jár. Az epesavaknak egyébként a koleszterin oldatban tartásában is nagy szerepük van: a foszfolipidekkel együtt hozzájárulnak az erősen apoláros koleszterin oldatban tartásához. Ha az epesavak aránya az epében lecsökken, akkor a koleszterin epekövek formájában kiválik *(II/11-26. ábra, B)*.

A májban a koleszterinszint szabályozásához olyan molekulák is hozzájárulnak, amelyek az epesavak metabolizmusán keresztül hatnak. Ebben két receptornak van



II/11-26. ábra

Az epesavak anyagcseréje. Elsődleges epesavak szintézise (A) és az epesavak enterohepatikus körforgása (B)

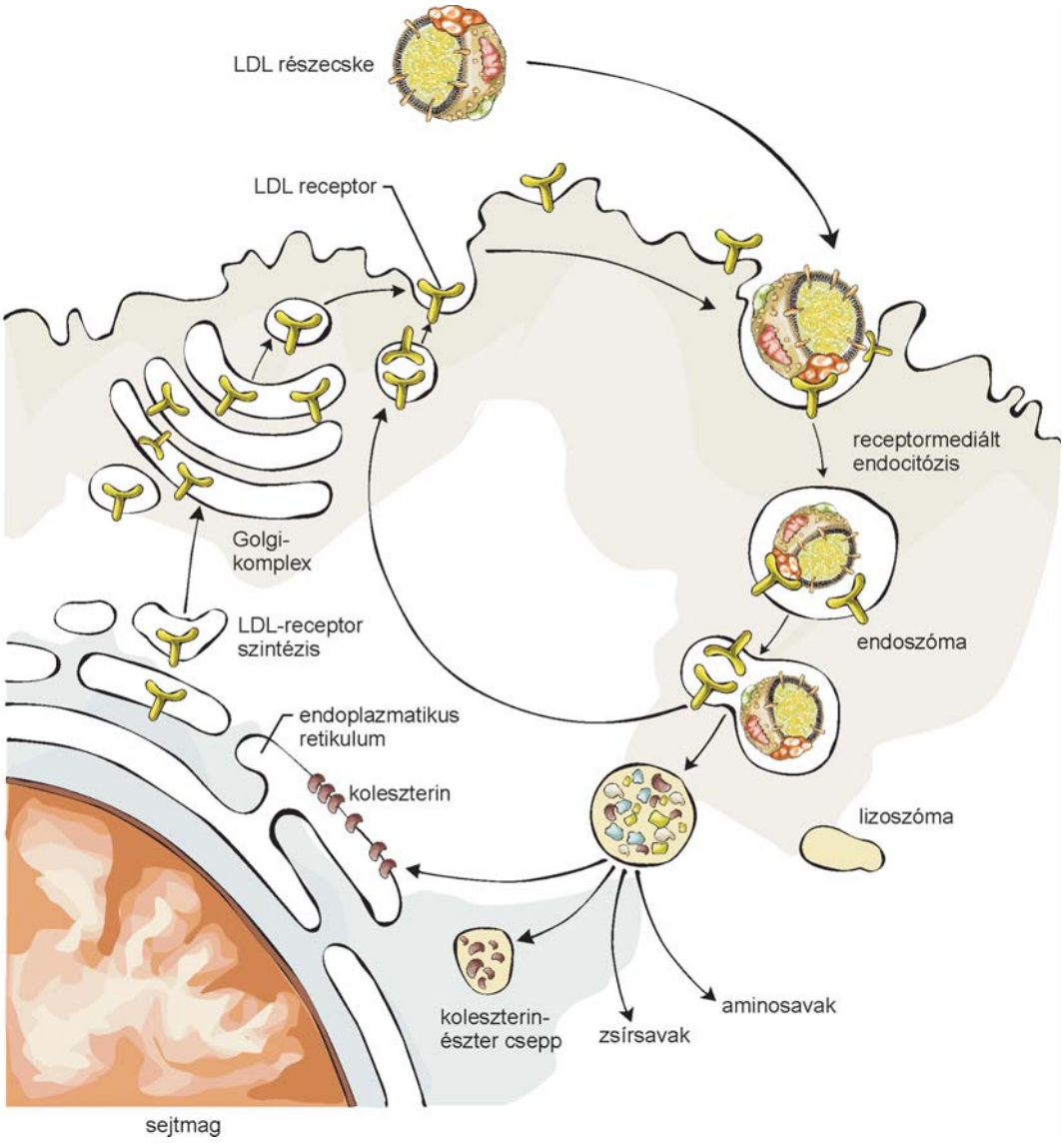
szerepe. Az LXR (liver-X-receptor) magas koleszterin-szint esetén az oxidált koleszterint megköti és az így kialakult komplex a sejtmagban a retinoid-X-receptorhoz (RXR) kötődik. Ez az LXR-RXR heterodimer indukálja a 7α-hidroxilázt, ezzel az epesavak szintézisét, ugyancsak indukálja a koleszterin-pumpákat, valamint egy olyan fehérjét, amely fokozza a koleszterin kicserélődését a VLDL, illetve az LDL és HDL között. A keletkezett epesavak egy másik receptorhoz (farnezoid-X-receptor, FXR) kötődnek, amely a sejtmagba jutva szintén heterodimert alkot az RXR-rel. Ez a heterodimer indukálja az epesavak kipumpálását és ürítését, egy másik fehérje (small heterodimer partner, SHP) indukálásával pedig LXR-SHP heterodimerek képződését segíti elő, ezzel elvonja az LXR-t és csökkenti az epesavak szintézisét. Így egy nagyon érzékeny rendszer alakul ki, amely egyrészt fokozza a koleszterin epesavakká alakulását, másrészt az epesavak eltávolításával megakadályozza azok felhalmozódását is.

A koleszterin szállítása

Amint azt a trigliceridek tárgyaláskor említettük, a koleszterint is lipoproteinek szállítják, melyek közül az LDL és a HDL tartalmazza a legtöbb koleszterint. Az LDL fokozatosan alakul ki a VLDL-ből, amely elveszíti triglicerid-tartalmát, apoproteinjeit pedig javarészt a HDL-nek adja át. Az LDL egyetlen apoproteinje a B-100, meghatározó lipidje pedig a koleszterin-észter.

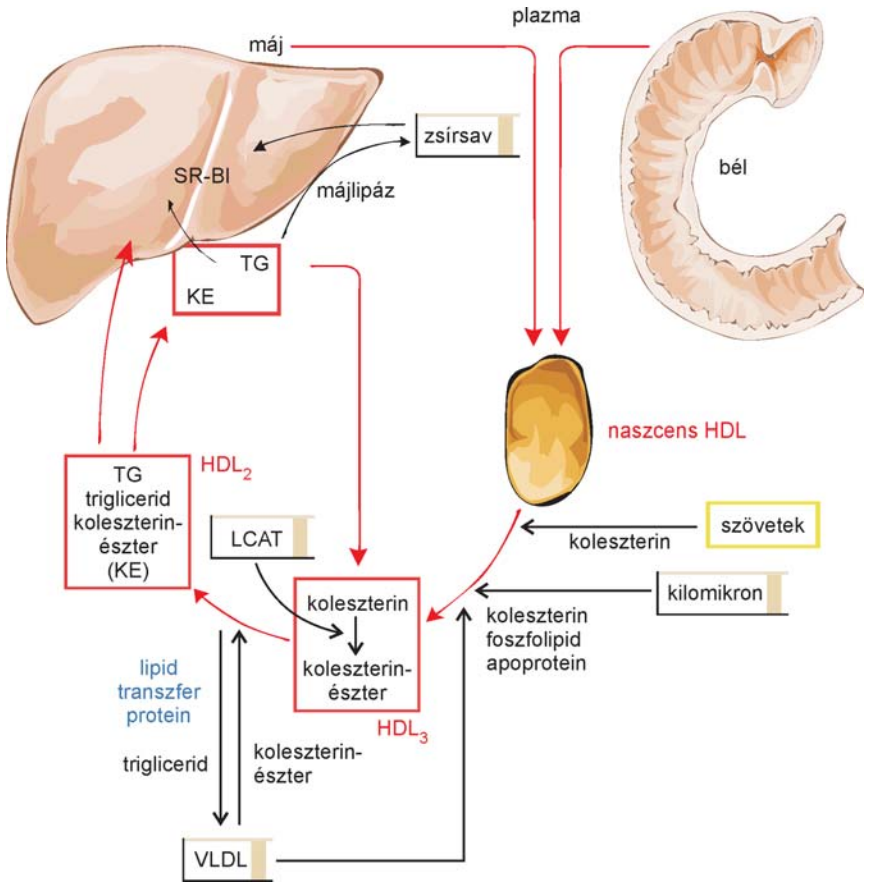
A keringésben található koleszterin többsége koleszterin-észter. A sejtekben a koleszterin-észterek keletkezését az acil-KoA:koleszterin-aciltranszferáz (ACAT) katalizálja, és az aktuálisan fel nem használt koleszterint hosszú szénláncú zsírsavakkal észteresíti. A plazmában, ahol a koleszterint a lipoproteinek szállítják, az észteresítést a lecitin:koleszterin-aciltranszferáz (LCAT) katalizálja, amely lecitinből viszi át a 2-es szénatomon levő zsírsavat. Ez a reakció elsősorban a HDL-t tölti fel koleszterin-észterekkel, amelyek még a koleszterinnél is apolárosabbak, a HDL a májba szállítja őket. A koleszterin-észterekből szükség esetén észterázok szabadítják fel a koleszterint, ilyen enzimek főleg a lizoszómákban, illetve az endoplazmás retikulumban találhatók.

Az LDL B-100 apoproteinjének alapvető jelentősége van a koleszterin sejtekbe történő felvételében. A B-100 receptora sokféle sejten megtalálható, azonban legnagyobb mennyiségben a máj képes az LDL-koleszterin felvételére. Az LDL-receptoron történő megkötődés után a komplex endocitotikus vezikulumokba kerül, ahol a sejten belül az LDL ledisszociál róla, a receptor pedig visszavándorol a membránba. Az LDL-koleszterin lizoszómákba kerül, ahol a fehérje lebomlik, a koleszterin-észtereket pedig az észteráz bontja le. A felszabadult koleszterin szabályozza a koleszterin-metabolizmust *(II/11-27. ábra)*. Egyrészt gátolja az LDL-receptorok szintézisét és ezzel a felesleges koleszterin-felvételt, másrészt gátolja a HMG-KoA-reduktázt és ezzel a koleszterin de novo szintézisét, valamint a HMG-KoA-reduktáz transzkripcióját is. A fel nem használt koleszterint az ACAT észteresíti, az észterek a sejtek citoplazmájában raktározódnak. Az LDL-receptorok csökkent száma, vagy elégtelen funkciója okozza a familiáris hiperkoleszterinémia kórképet. Ebben az örökletes betegségben a homozigótákban egyáltalán nincs LDL-receptor szintézis, heterozigótákban pedig csökken az LDL és ezzel a koleszterin eliminációja a keringésből, amelynek súlyos cardiovasculáris rendellenességek a következményei. A heterozigóták esetén a korábban említett statinok, valamint epesavkötő gyanták jönnek szóba a terápiában. A koleszterin-anyagcsere, valamint a lipidanyagcsere további betegségeiről részletes leírást az Orvosi Patobiokémia tankönyvben találunk.



II/11-27. ábra
Az LDL-koleszterin felvétele és eliminációja

A másik fontos koleszterin-szállító lipoprotein a HDL. A HDL ún. reverz koleszterintranszporter, vagyis a koleszterint az extrahepatikus szövetekből és az artériák falából a májba szállítja. Ott a koleszterin metabolizálódik (epesavak), a felesleges mennyiség kiválasztódik vagy VLDL-be épül. Ezért a HDL által szállított koleszterint „jó" koleszterinként szokták említeni, szemben az LDL-ben kötött „rossz" koleszterinnel. A naszcens HDL a májban és a bélben képződik, fő apoproteinje az apo-E, sok foszfolipidet és koleszterint tartalmaz. Érése során az LCAT észteresíti a koleszterint, az apo-E pedig apo A-I-re cserélődik, a lipoprotein gömb alakúvá válik. A to-

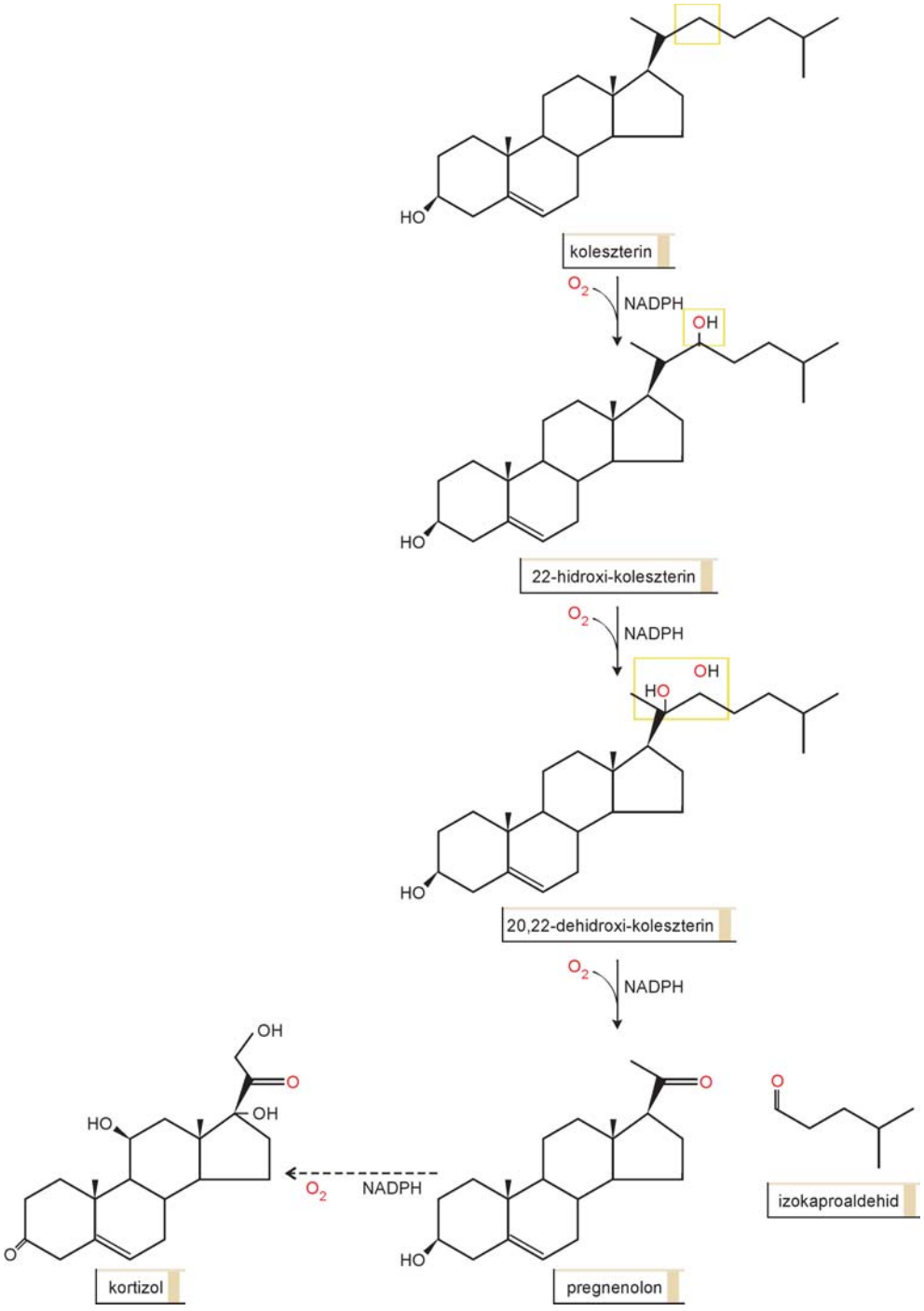


II/11-28. ábra
Az HDL-koleszterin különböző formáinak egymásba alakulása és felvétele

vábbi érés során az apo A-I apo A-II-re cserélődik, apo-C proteinek is beépülnek és a lipidtartalom – beleértve a koleszterint is – állandó dinamikus változásban van. Két jelentős szubpopulációja van: a HDL_2 triglicerid-tartalma magasabb és mérete is nagyobb, mint a HDL_3-é. A HDL és a VLDL között triglicerid-koleszterin-észter csere figyelhető meg, főleg étkezés után nő meg a HDL trigliceridtartalma. A máj-lipáz lehasítja a triglicerideket, ezzel a HDL_2 HDL_3-má alakul át *(II/11-28. ábra).* A vizsgálatok egyértelműen fordított összefüggést mutattak a plazma HDL-koleszterin szintje és az arterioszklerózis kialakulása között, amelyhez az említett reverz koleszterin-transzport mellett a HDL más, ma még nem ismert hatásai is hozzájárulhatnak. Alapvetően a HDL/LDL arány a fontos: ha ez magas (0,4 felett van), akkor alacsony az ateroszklerózis kialakulásának valószínűsége.

Hormonhatású szteránvázas vegyületek szintézise

Az epesavak mellett a koleszterin számos hormonhatású szteroidnak is prekurzora. Ezek közé tartozik a D_3-vitamin (amely valójában hormon, csak ultraibolya su-



II/11-29. ábra
A szteroid hormonok bioszintézisének bevezető lépései

gárzás hiányában válik vitaminná), a szénhidrát-anyagcserére ható glukokortikoidok, a só-vízháztartásra ható mineralokortikoidok és a nemi hormonok (androgének, ösztrogének, progesztagének). Szteroid hormonok a mellékvese-kéregben és a gonádokban keletkeznek, a D_3-vitamin a bőrben, míg az aktív hormon a májban alakul ki.

A szteroid hormonok szintézise

A mellékvese-kéregben és a gonádokban számos szteroid hormon (gluko- és mineralokortikoid, valamint nemi hormon) képződik.

Első lépésben koleszterinből a citokróm P-450 redoxrendszer segítségével pregnenolon keletkezik *(II/11-29. ábra),* amely az összes kortikoszteroid prekurzora. Ez a lépés a mitokondriumokban zajlik le. Ennek során a koleszterinnek a 20-as szénatomról kiinduló oldallánca oxidációval leválik és a 17-es szénatomon egy acetilcsoport jelenik meg. A két út itt ágazik el: a pregnenolont a 17-α-hidroxiláz 17-hidroxi-pregnenolonná alakítja, és a továbbiakban mindkét vegyületből azonos enzimek katalizálják a különböző szteroidok képződését.

II/11.10. AZ EIKOZANOIDOK ANYAGCSERÉJE

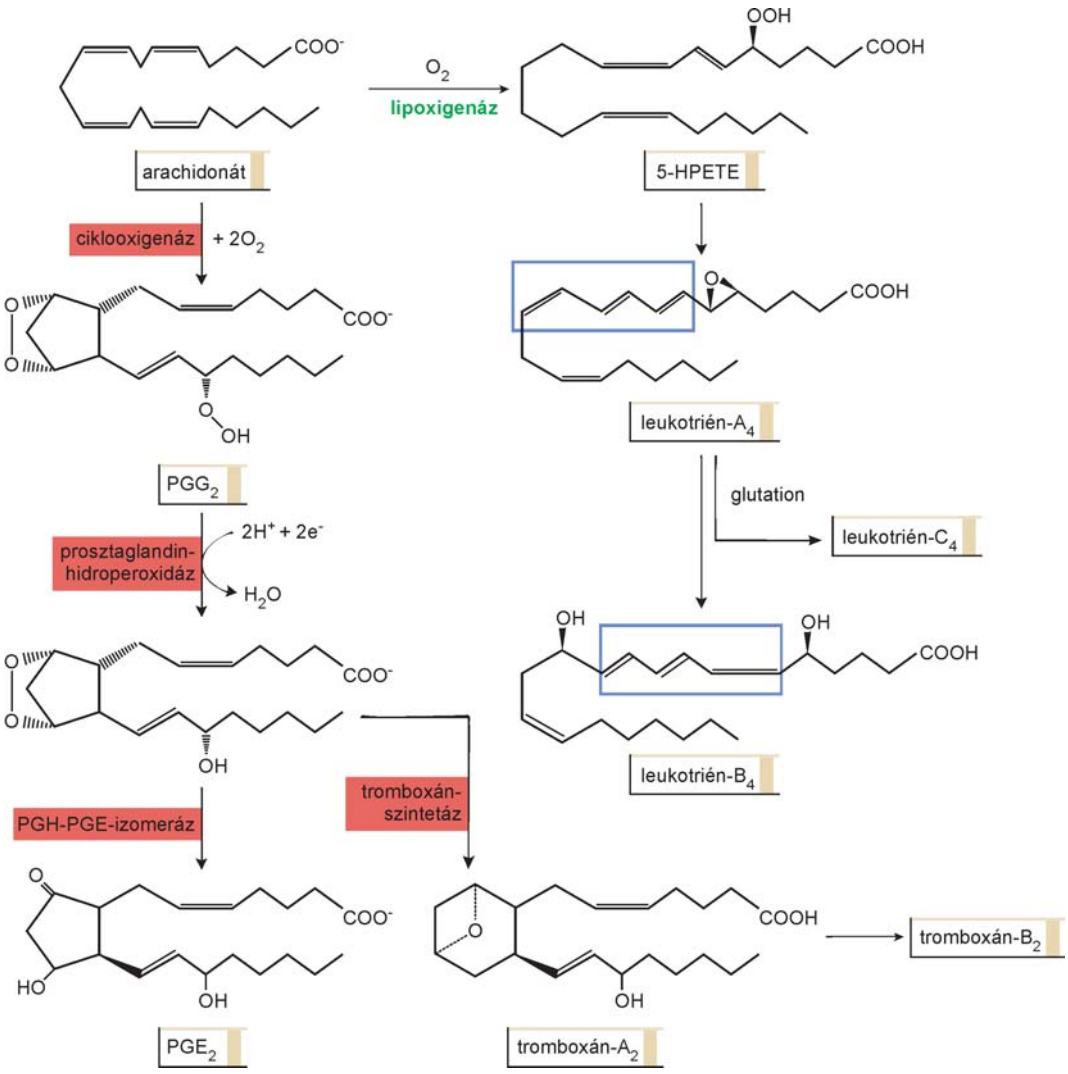
Az eikozanoidok egymástól eltérő szerkezetű és biológiai hatású vegyületek, melyeknek közös tulajdonsága, hogy szintézisük a 20 szénatomos arachidonsavból (eikozatetraénsav) indul ki (eikoza = húsz). Biológiai tulajdonságaik alapján hormonoknak tekinthetők, igen kis koncentrációban is hatékonyak.

Az arachidonsavat (amely esszenciális zsírsavakból szintetizálódik) foszfolipáz A_2 izoenzimek szabadítják fel a foszfolipidek 2. szénatomján levő észterkötésből. Trombocitákban jelentős egy másik út, ebben a foszfolipáz C, valamint a működése nyomán keletkező diglicerideket (DAG) bontó DAG-lipáz játszik szerepet. A felszabadult arachidonsav kikerülhet a sejtekből, visszaépülhet foszfolipidekbe, valamint enzimatikus oxidatív utakon különböző eikozanoidokká alakulhat át. (Nem enzimatikus úton autooxidációval hidroperoxidokká alakulhat.)

A ciklooxigenáz út két fontos eikozanoid-csoport szintézisének irányába vezet. A ciklooxigenáz dioxigenáz, reakcióterméke a prosztaglandin G_2, amelyben már csak két kettős kötés található, valamint egy ciklopentán gyűrűt, endoperoxid-, illetve hidroperoxid-csoportot tartalmaz. A következő reakciót a prosztaglandin-hidroperoxidáz katalizálja, amely hidroxilcsoporttá alakítja a hidroperoxidot és PGH_2 alakul ki. Ebből különböző izomerázok és reduktázok alakítják ki a természetes prosztaglandinokat (PGD_2, PGE_2, PGF_{α}). A reakciók során az endoperoxid kötés felhasad és a ciklopentán gyűrűn hidroxil- vagy ketocsoport jelenik meg *(II/11-30. ábra).*

A ciklooxigenázokat nemszteroid gyulladáscsökkentők – aszpirin, indometacin – gátolják, farmakológiai hatásuk ezen a gátláson alapul. Mivel a ciklooxigenáz a tromboxánhoz vezető reakciósor enzime is, az aszpirin preventív antikoaguláns hatása is ezzel magyarázható.

A másik fontos oxidációs út a lipoxigenáz enzim aktiválását igényli. Ezek szintén dioxigenázok, amelyek hidroperoxil-csoportot hoznak létre az 5. (esetleg a 12. vagy 15.) szénatomon, ennek következtében 5-hidroperoxi-6,8,11,14-eikozatetraénsav (5-HPETE) jön létre. A hidroperoxid OH-csoporttá történő redukciója 5-HETE keletkezését eredményezi, a fontosabb reakcióút azonban a hidroperoxi-csoport epoxiddá alakulásával létrejövő instabil leukotrién A_4 (LTA_4, 5-oxido-7,9,11,14-eikozatetraénsav) létrejöttéhez vezet. Ebből hidrolízissel és oxidációval leukotrién B_4, gluta-



II/11-30. ábra

Az eikozanoidok metabolizmusa. A ciklooxigenáz (piros) és a lipoxigenáz (zöld) út. PG: prosztaglandin. A leukotriének három konjugált kettős kötése kék téglalapban látható

tionnal való konjugáció útján pedig leukotrién C_4 képződik, amely további leukotriének prekurzora *(II/11-30. ábra)*. A leukotriének neve abból ered, hogy a négy kettős kötés közül három konjugáltan helyezkedik el, ami biológiai aktivitásuknak is feltétele.

A leukotriének katabolizmusa gyors, a májból az epén át, valamint a vesén át is ürülhetnek, részben módosulás nélkül, részben N-acetilációval történő inaktiválás után. A leukotriének biológiai hatása a gyulladások létrejöttében, illetve az immunválasz befolyásolásában, allergiás reakciókban fontos, amit az is mutat, hogy elsősorban a fehérvérsejtekben – monociták, makrofágok, granulociták –, valamint hízósejtekben szintetizálódnak.

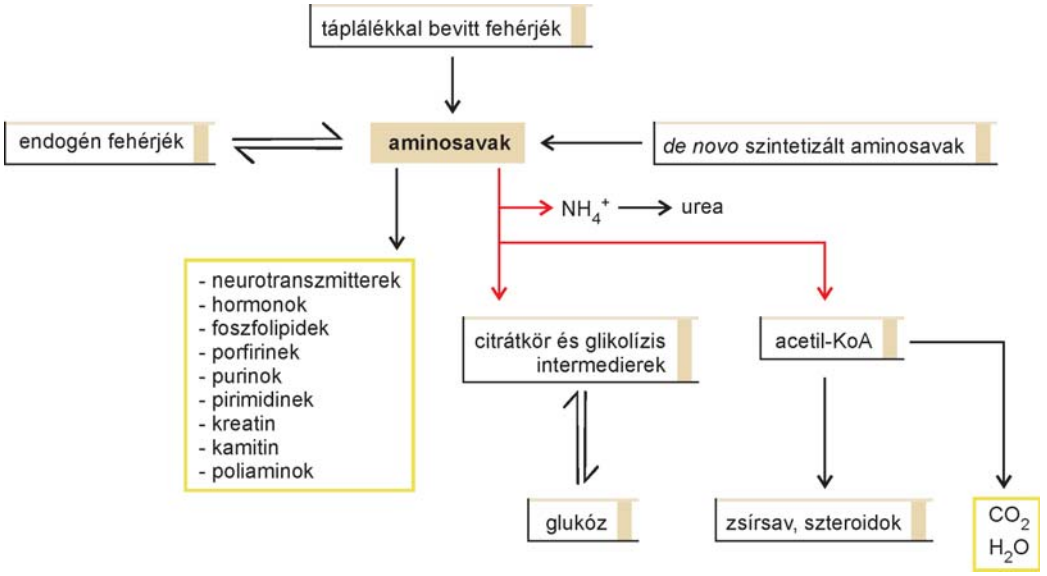
II/12.
Aminosavak anyagcseréje, ornitinciklus

Vér Ágota

Az aminosavak fontos szerepet játszanak a szervezetben: fehérjék építőelemei, N-tartalmú molekulák (nukleotidok, hormonok) szintézisének kiinduló anyagai, szénláncaik bekapcsolódhatnak a szénhidrát vagy a lipid anyagcserébe, illetve a szervezet energiatermelésébe. Fehérje bevitelére feltétlenül szüksége van az emberi szervezetnek, hogy az endogén fehérjék és az aminosavakat igénylő, nitrogéntartalmú, nem fehérje természetű anyagok szintézisére megfelelő mennyiségű és minőségű aminosav- készlettel rendelkezzen. Az emberi szervezet nem tudja a molekuláris nitrogént hasznosítani. Egyes organizmusok (pl. talajbaktérium) azonban rendelkeznek egy speciális enzimrendszerrel (nitrogenáz-komplex), amely képes a molekuláris nitrogénből ammóniát előállítani, az ammónia pedig beépülhet az organikus vegyületekbe. Az emberi szervezet nitrogénigényét a táplálkozás (fehérje és más nitrogéntartalmú anyagok bevitele) biztosítja. A plazma aminosav-koncentrációja a táplálkozástól, az endogén fehérjék lebontásától, azok reszintézisétől, valamint a különböző szövetek aminosav-felhasználásától függ. Az emberi szervezet bizonyos aminosavakat metabolikus prekurzorokból (citrátköri, illetve glikolízis intermedierekből) elő tud állítani, ezek a táplálkozás szempontjából nélkülözhető, más néven nem esszenciális aminosavak *(II/12-1. táblázat)*. Az aminosavak közel felét az emberi szervezet nem képes szintetizálni, ezeket a táplálkozás szempontjából nélkülözhetetlen, esszenciális aminosavaknak nevezzük *(II/12-1. táblázat)*. Ebbe a csoportba tartoznak az elágazó szénláncú aminosavak (izoleucin, leucin, valin), az apoláros, gyűrűs aminosavak többsége (triptofán, fenilalanin), a bázikus aminosavak közül a lizin és a hisztidin (az arginin szemiesszenciális), a kéntartalmú metionin (a cisztein szintézis metionint igényel) és a treonin. Szemiesszenciálisnak nevezzük azokat az aminosavakat, amelyeket az emberi szervezet képes szintetizálni, de a szintézis sebessége alacsony, így mennyiségük nem elégséges a fejlődő szervezetek számára. Ez a fejezet az aminosavak metabolizmusával foglalkozik, nagy hangsúlyt fektetve a nitrogén metabolizmusára és az aminosavak szénláncának a sorsára. Ellentétben a szénhidrátok és a zsírsavak lebontásával, az aminosavak szénláncának metabolizmusa nagyon változatos útvonalakon történik, a lebontási folyamat végterméke alapján glukogén és ketogén aminosavakról beszélünk *(II/12-1. ábra)*. A táplálkozással bevitt fehérjék emésztését követően a felszívódott aminosavak első állomása a máj, amely központi szerepet játszik az aminosav anyagcserében is. A portális keringéssel bekerült aminosavak jelentős része metabolizálódik a májban, kivéve az elágazó szénláncú aminosavakat, amelyek főleg az izomszövetbe kerülnek felvételre. Az ami-

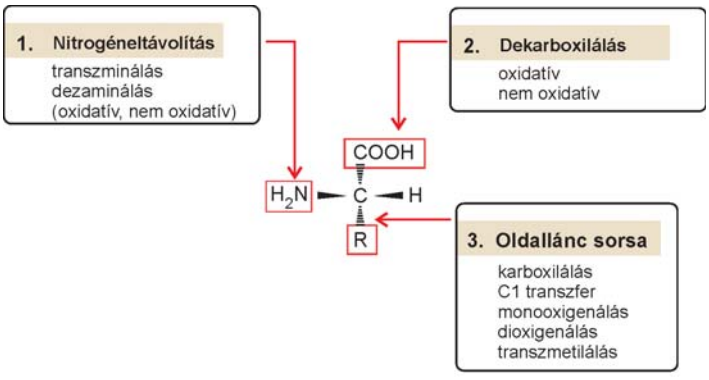
II/12-1. táblázat
Aminosavak csoportosítása

Esszenciális aminosavak	
	Izoleucin
	Leucin
	Valin
	Triptofán
	Fenilalanin
	Lizin
	Hisztidin
	Metionin
	Treonin
Szemiesszenciális aminosav	
	Arginin
Nem esszenciális aminosavak	
	Glutamát
	Glutamin
	Aszpartát
	Aszparagin
	Glicin
	Alanin
	Prolin
	Tirozin (fenilalanin-függő)
	Szerin
	Cisztein(metionin-függő)



II/12-1. ábra
Az aminosavak szerepe

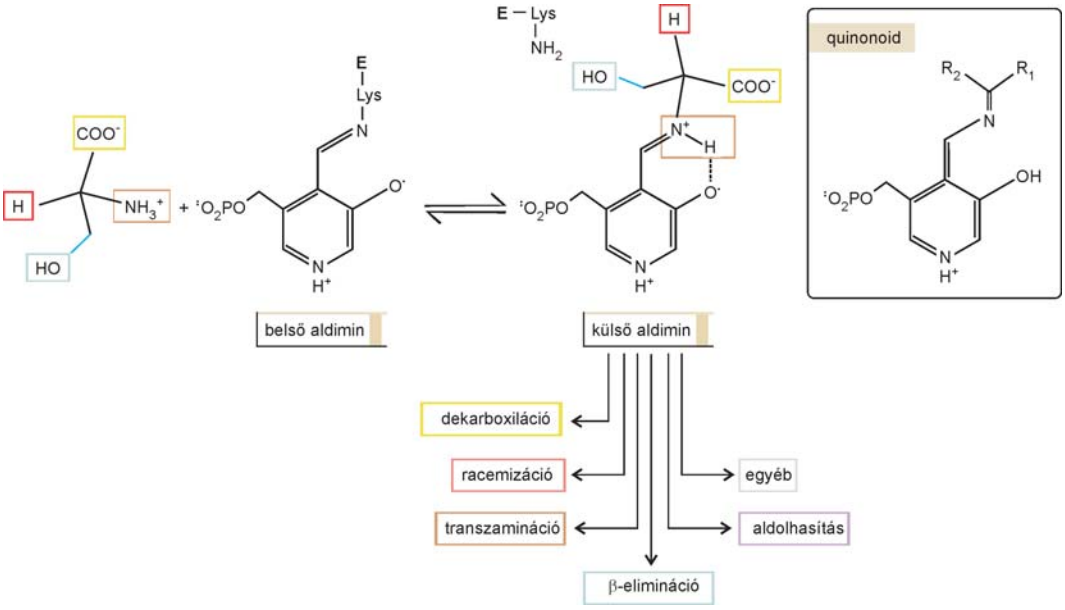
nosav-anyagcserében a máj mellett az izomszövet játszik kiemelkedően fontos szerepet, a szervezet aminosav- készletének több mint 50%-a az izomszövetben található. A posztabszorpciós fázisban fehérje dús étkezést követően a szplanknikus szövetek aminosavakat bocsátanak ki, míg a perifériás szövetek aminosavakat vesznek fel. Korai éhezés periódusában az izomszövetből alanin és glutamin kerül a keringésbe. Az alanint elsősorban a máj, a glutamint elsősorban a vékonybél és a vese veszi fel. A vese alanint és szerint bocsát a máj rendelkezésére. Az izomszövetből származó elágazó szénláncú aminosavak elsősorban az agyban kerülnek felhasználásra.



II/12-2. ábra
Az aminosavak főbb reakciótípusai

II/12.1. AZ AMINOSAVAK FŐ REAKCIÓTÍPUSAI

Az aminosavak anyagcsere-folyamatai három fő csoportba sorolhatók: az aminocsoport-reakciók, a karboxilcsoport-reakciók és az oldallánc-reakciók *(II/12-2. ábra).* A reakciókat katalizáló enzimek nagy részében a B_6-vitaminból származó, aldehidcsoporttal rendelkező piridoxál-foszfát (PLP) mint prosztetikus csoport szerepel

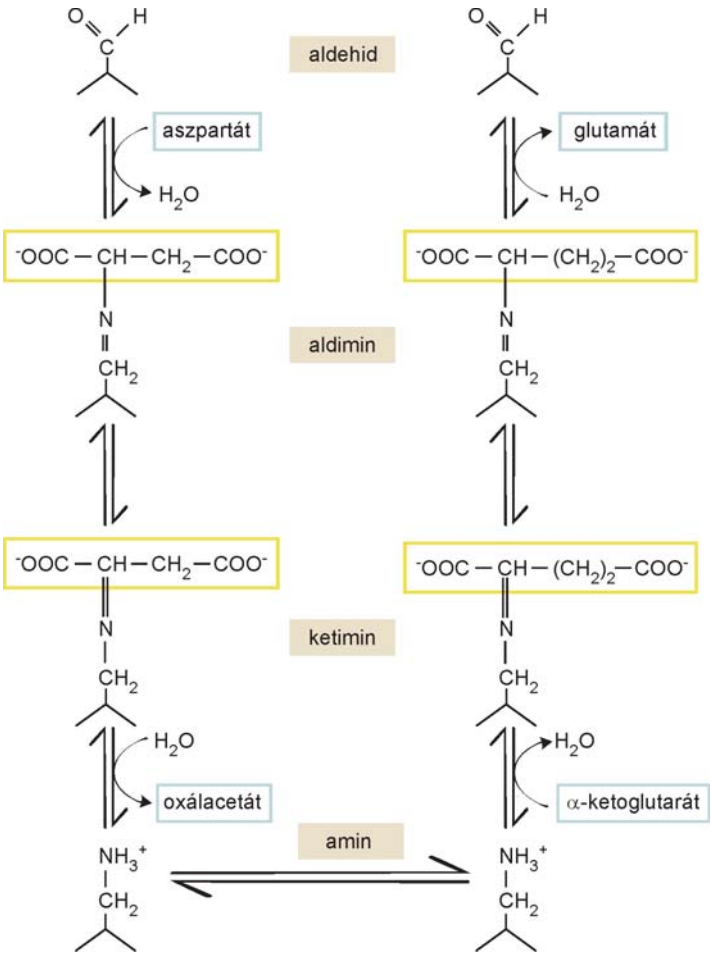


II/12-3. ábra
A piridoxál-foszfát szerepe az aminosav-anyagcserében

(II/12-3. ábra). A PLP ionos és hidrofób kölcsönhatásokkal, valamint H-hidakkal kötődik az enzimekhez. Aminosav hiányában az PLP aldehidcsoportja belső aldimint (Schiff-bázist) képez az enzimek lizil-oldalláncának ε-amino-csoportjával. Aminosav jelenlétében a kapcsolat megszűnik, és a PLP a metabolizálandó aminosavat köti meg, és ún. külső aldimint képez.

Transzaminálás

A transzaminálás a legáltalánosabb reakció az aminosav anyagcserében, a treonin és a lizin kivételével minden aminosavra van specifikus enzim. A transzaminálás folyamata során a nitrogén nem távolítódik el az aminosavkészletből, hanem egy adott aminosav$_1$ (alanin) aminocsoportja egy ketosavra$_2$ (α-ketoglutársav) kerül át, s így az aminosav$_1$-ből származó ketosav$_1$ (piruvát) és a ketosav$_2$-ből egy aminosav$_2$ (glutamát) keletkezik. A példaként leírt folyamatot az alanin-aminotranszferáz enzim katalizálja. A *II/12-4. ábrán* pedig az aszpartát-aminotranszferáz által katalizált reakció látható. A transzaminálás reverzíbilis folyamat, de figyelembe kell venni, hogy ha a szervezet nem képes egy adott ketosav equivalens mennyiségű szintézisre, a folyamat egyirányúvá a válhat. Több mint 60 aminotranszferáz enzim ismert. Az izoenzimek csoportosítása történhet lokalizáció szerint (citoplazmatikus és mitokondriális), szubsztrát partnerek szerint, aminocsoport helyzete szerint (α, β stb.). Az aminosav$_1$ szubsztrát aminocsoportjával alkotott külső aldiminből (aminosav$_1$-PLP) tautomerizáció következtében egy rezonancia stabilizált kinonoid intermedier alakul ki. Az α-ketosav$_1$-piridoxamin-foszfát (PMP) Schiff-bázis hidrolízisével PMP és α-ketosav$_1$ képződik. A koenzim regenerációja fordított úton történik, α-ketosav$_2$ lép be a folyamatba mint aminocsoport akceptor, amelyből a megfelelő aminosav$_2$ képződik (II/12-4. ábra). A reakció végén a piridoxál-foszfát

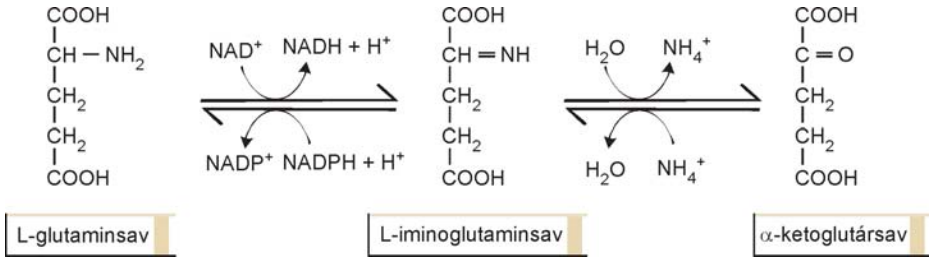


II/12-4. ábra
A transzaminálás mechanizmusa

ismét az enzim lizil-oldalláncával képez belső aldimint. A legismertebb két aminotranszferáz: az aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) régi nevén glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) és az alanin-aminotranszferáz (ALAT), régi nevén glutamát-piruvát-transzamináz (GPT). A legtöbb transzaminálási reakcióban az α-ketoglutársav vesz részt mint ketosav szubsztrát, és glutaminsav keletkezik, mint ahogyan látható az ASAT és az ALAT reakciókban is. A folyamat jelentősége kettős: a glutaminsavban összegyűlt aminocsoportok bármikor felhasználhatók más transzaminálási reakcióban, vagyis a megfelelő ketosavból aminosavat tudunk előállítani. A másik fontos szempont az, hogy a glutamát egy lépésben dezaminálódhat a glutamát dehidrogenáz által. Különösen élénk transzaminálás folyik a májban, a szívizomban, az agyszövetben, a vesében és a harántcsíkolt izomszövetben. A szövetek károsodásakor (gyulladás, ischaemia stb.) az elhalt sejtekből transzaminázok válnak szabaddá és megemelkedik az enzimaktivitás a szérumban, amely diagnosztikus értékű lehet.

A glutamát-dehidrogenáz központi szerepe

A glutamát központi szerepet játszik az aminosavak anyagcseréjében. Egyedül a glutaminsavnak van saját dezaminász enzime, az L-glutaminsav-dehidrogenáz (GLUD). A glutamát-dehidrogenáz reverzíbilis folyamatot katalizáló enzim *(II/12-5. ábra)*. A dezaminációhoz NAD^+, glutamát szintéziséhez $NADPH+H^+$ kofaktor szükséges, vagyis energiahiányos állapotban az enzim dezaminálja a glutamátot, ezáltal egyrészt $NADH+H^+$, másrészt egy citrátköri intermedier α-ketoglutársav keletkezik, a termékek energiát szolgáltatnak. Az emberi szervezetben a GLUD két izoformája van jelen, mindkettő mitokondriális. A GLUD1 izoenzim általános (háztartási gén terméke), minden szövetben kifejeződik, a GLUD2 izoforma főleg a retinában, az agyban (asztrocitákban) és a here Sertolli-sejtjeiben mutatható ki. Az enzim szabályozása elsősorban a szubsztrát koncentrációkon keresztül valósul meg, de allosztérikus

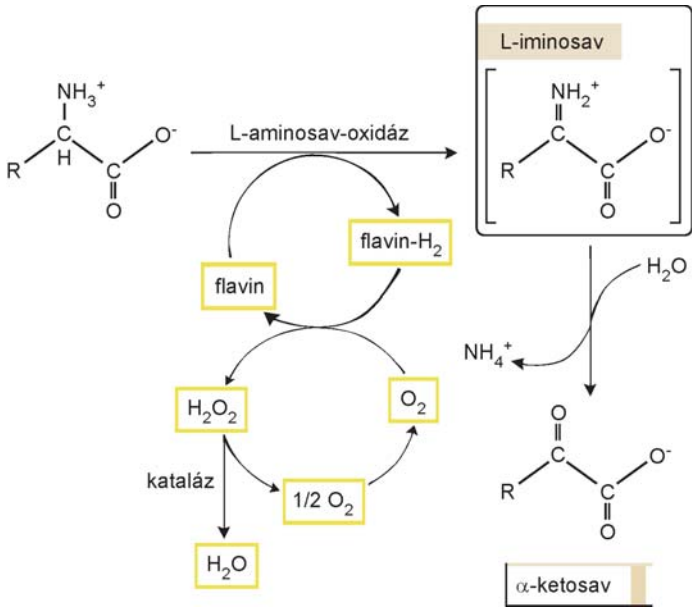


II/12-5. ábra
A glutamát-dehidrogenáz reakciója

modifikátorok is befolyásolják a működését. A GLUD1 izoenzim esetében a glutamát lebontását az ADP és az L-leucin allosztérikusan aktiválja, míg GTP, ATP, palmitoil-KoA, ösztrogének és NADH (valamint a zöld teából származó epigallokatechin-gallát is) allosztérikusan gátolja. A GLUD2 izoenzim működését a GTP nem befolyásolja. Az energia hiányos állapot a glutamát lebontásnak, energia töltött állapot a glutamát szintézisnek kedvez. A glutamáton keresztül összekapcsolódik a transzaminálás és a dezaminálás folyamata. Az α-ketoglutársav mint aminocsoport akceptor átveszi más aminosavak amino- csoportját és a glutamát dehidrogenáz enzim által dezaminálódik, így a „N" kikerül az aminosavkészletből, vagyis az aminosavak a glutamáton keresztül transzdezaminálódnak.

Aminosav-oxidázok

A GLUD által katalizált oxidatív dezaminációval mellett más aminosavak közvetlen oxidatív dezaminálása is lehetséges, amit az L-aminosav-oxidázok katalizálnak. L-aminosav oxidázok FMN prosztetikus csoporttal rendelkeznek, aktivitásuk alacsony. A lizin lebontásában van szerepük *(II/12-6. ábra)*. A D-aminosav-oxidázok FAD prosztetikus csoporttal rendelkeznek, szerepük nem teljesen tisztázott. Feltehetően a baktériumok vagy a növények sejtfalából felszabaduló D-aminosavakat bontják le.



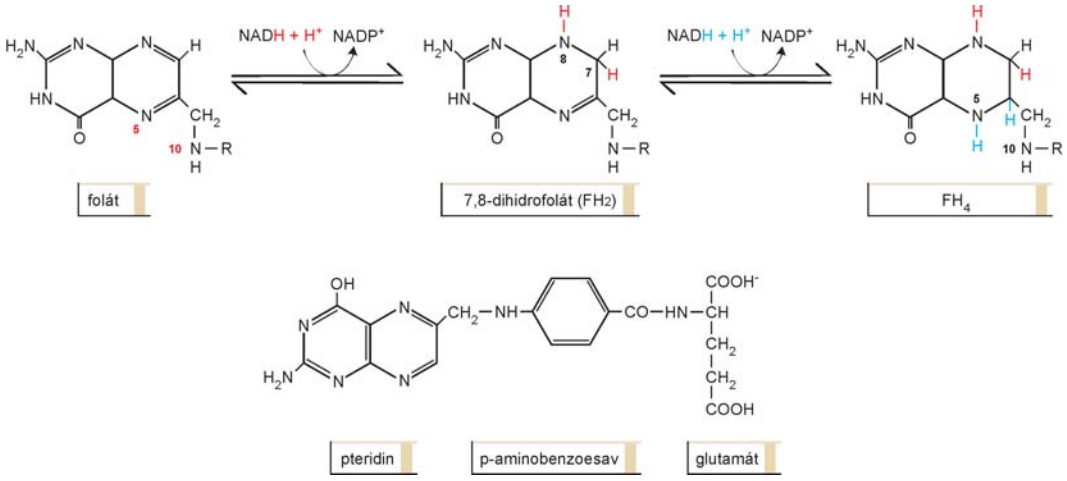
II/12-6. ábra
Az L-aminosav-oxidáz reakciója során L-iminosavon keresztül α-ketosav, NH_4 és H_2O_2 keletkezik, melyet a kataláz hasít

Az aminosavak dekarboxilezése

A dekarboxilezés leginkább a májban, az agyban és a vesében megy végbe. A dekarboxiláz enzimek által katalizált folyamat során az aminosavakból szén-dioxid kilépése mellett primer amin keletkezik. A folyamat nem elsősorban az aminosavak lebontása szempontjából jelentős, hanem bizonyos élettanilag fontos vegyületek keletkezésének módja. Így keletkezik a hisztamin, a szerotonin, dopamin (szöveti hormonok) vagy a neurotranszmitter γ-aminovajsav, valamint a vastagbélben a toxikus hatású kadaverin és a putreszcin.

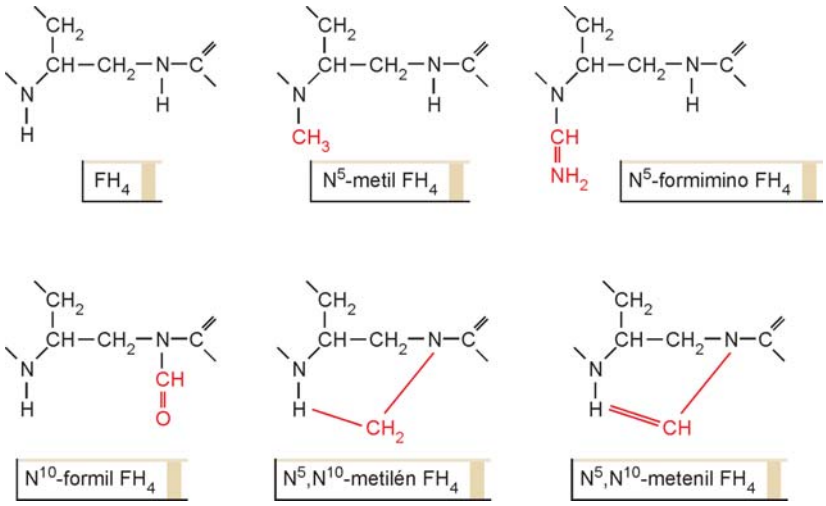
Egy szénatomos töredékek keletkezése az aminosav-anyagcserében

A metabolikus folyamatokban szükség van „egy szénatomos csoportok" áthelyezésére. Az aminosavak anyagcseréjében különböző oxidáltságú egy szénatomos töredék keletkezik a szerin, a glicin, a hisztidin, a triptofán lebontása során. Ezeket az egy szénatomos töredékeket a tetrahidrofolsav (FH_4) az N_5 és N_{10} atomjaihoz kapcsolva szállítja. A folsavat a táplálékkal veszi fel az emberi szervezet, majd két lépésben, NADPH $+H^+$-val működő reduktázokkal alakul ki a FH_4 *(II/12-7. ábra).*

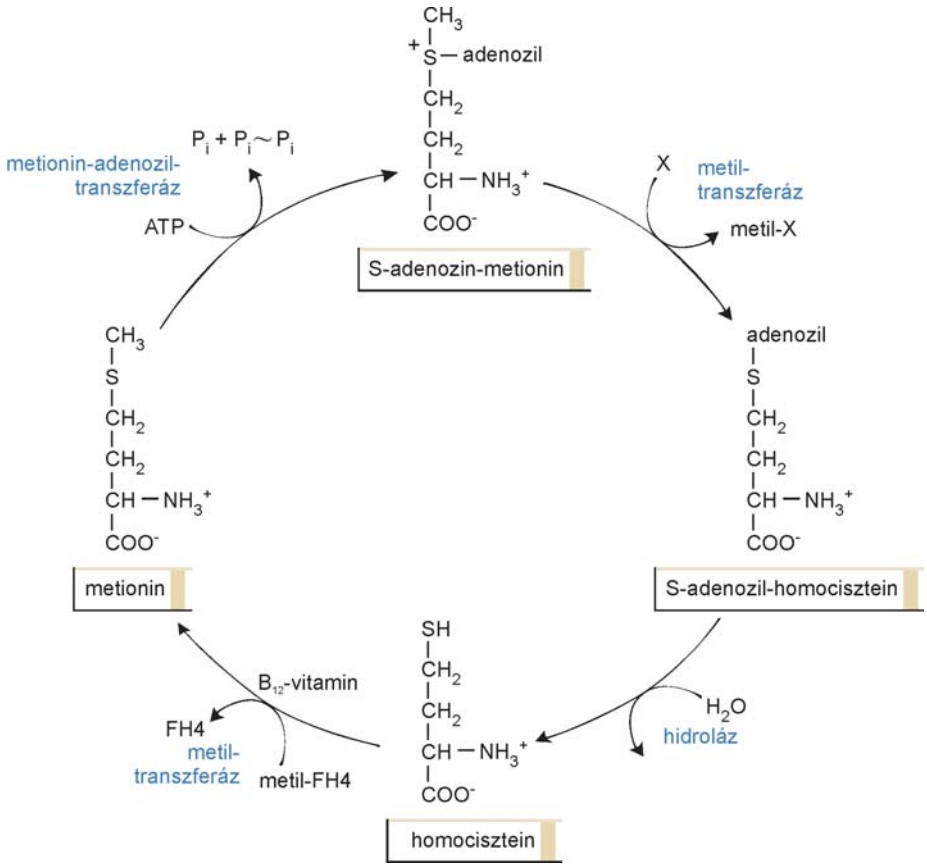


II/12-7. ábra
Folsav, FH2, FH4

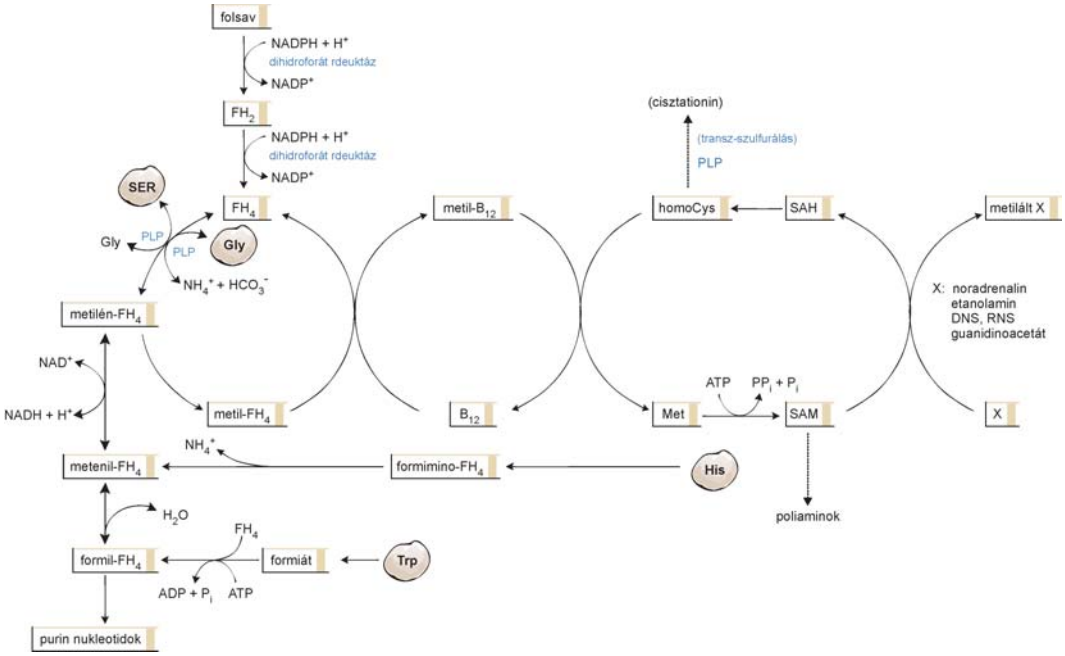
A szénatom redukáltsági állapotától függően a FH_4 szállíthat metil ($-CH_3$), metilén ($-CH_2-$), formil (-CHO) formimino (-CHNH) és metenil (-CH=) csoportot *(II/12-8. ábra)*. A tetrahidrofolsavhoz kötött egy szénatomos intermedierek közül a formil, metenil, metilén átalakulhatnak egymásba, a metilén is redukálódhat a metil-FH_4-vá, az utóbbi viszont egyirányú folyamat. A legoxidáltabb egy szénatomos csoport a karboxil (-COOH) nem FH_4-hoz, hanem biotinhoz kötve lép be az anyagcsere folyamatokba. A legredukáltabb metilcsoportot a FH_4 kizárólag homocisztein-metionin átalakuláshoz szállítja. A metilezési reakciókban elsősorban az S-adenozil–metionin vesz részt mint metilcsoportdonor *(II/12-9. ábra)*. Az S-adenozil-metionin metioninból alakul ki, a metilcsoportot különböző szintézisekhez (kreatin, karnitin, adrenalin, foszfatidilkolin, DNS, RNS metilezés stb.) szállítja. A metilcsoport átadása után S-adenozil-homocisztein marad vissza, amely homociszteinné alakul, a



II/12-8. ábra
Egy szénatomos törmelékek szállítása



II/12-9. ábra
S-adenozil-metionin ciklus



II/12-10. ábra
A folsav és az S-adenozin-metionin szerepe az egy szénatomos tördékek transzferében

homocisztein egy metiltranszferáz katalizálta reakcióban, ahol metil-FH_4 a metilcsoportdonor metioninná alakul. A homocisztein metionin átalakulást katalizáló enzim a homocisztein metil-transzferáz más néven metionin-szintáz B_{12} koenzimmel működik *(II/12-10. ábra)*. Enzimdefektus vagy koenzimhiány esetén a metil-FH_4 nem képes a homociszteinnek átadni a metilcsoportot, a folsav metil-FH_4 formában marad és szabad FH_4-hiány alakul ki („metilcsapda"), gátlódnak szabad FH_4-igényű folyamatok. B_{12}-vitamin hiányában is a metilcsoportok a FH_4 kötve maradnak, egyrészt kialakul egy relatív folsav hiány, s gátlódnak mindazok a reakciók, amelyek szabad folsavat (hisztidin, szerin, glicin, triptofán anyagcsere), illetve más oxidáltsági fokú folsav által szállított egy szénatomos töredéket igényelnek (nukleotidszintézis). A homocisztein felszaporodik, a homocisztein pedig kórosan befolyásolja számos fehérje konformációját, szabad gyök képződését idézi elő.

A nitrogén sorsa

A nitrogén eliminálásnak négy szakasza különíthető el.

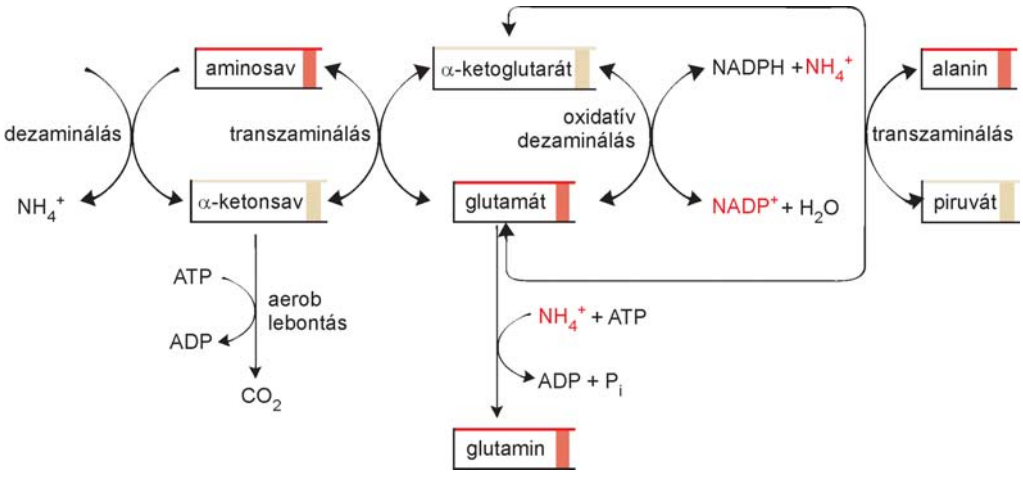
1. transzaminálási reakció révén a nitrogén glutamátba gyűjtése,
2. ammónia szövetek közötti transzportja, glutamin, illetve alanin formában,
3. a glutamát oxidatív dezaminálása,
4. ureaszintézis.

A legtöbb aminosav lebontásában az első lépés az aminocsoport eltávolítása. Ez történhet transzaminálással, vagy az aminosav oxidázok révén oxidatív dezaminálással, illetve egyes aminosavak esetén nem oxidatív úton. A transzaminálási folyamatokban legtöbbször glutaminsav keletkezik. A glutaminsav oxidatíven dezaminálódik és NH_4^+ keletkezik, ezt a folyamatot transzdeaminációnak

nevezzük. Ammónia keletkezik még glutaminból a glutamináz és aszparaginból az aszparagináz enzimek katalizálta reakciókban, a hidroxi-aminosavak lebontása során szerin, treonin-dehidratáz reakcióban, a cisztein-deszulfhidratáz által, hisztidin lebontásában a hisztidináz által, a triptofán és a glicin lebontásában. Jelentős ammónia mennyiség keletkezik a purin nukleotid ciklusban, valamint a purin és a pirimidin gyűrű lebontása folyamán. Ammónia normál körülmények között 30–60 μM–os koncentrációban van jelen a keringésben. Az NH_4^+ eliminálása főként a májban történik. A májon kívül keletkezett NH_4^+-nak el kell jutnia a májba. A perifériás szövetekben keletkező ammónia glutamin formájában kerül a keringésbe.

Ammónia megkötése és transzportja

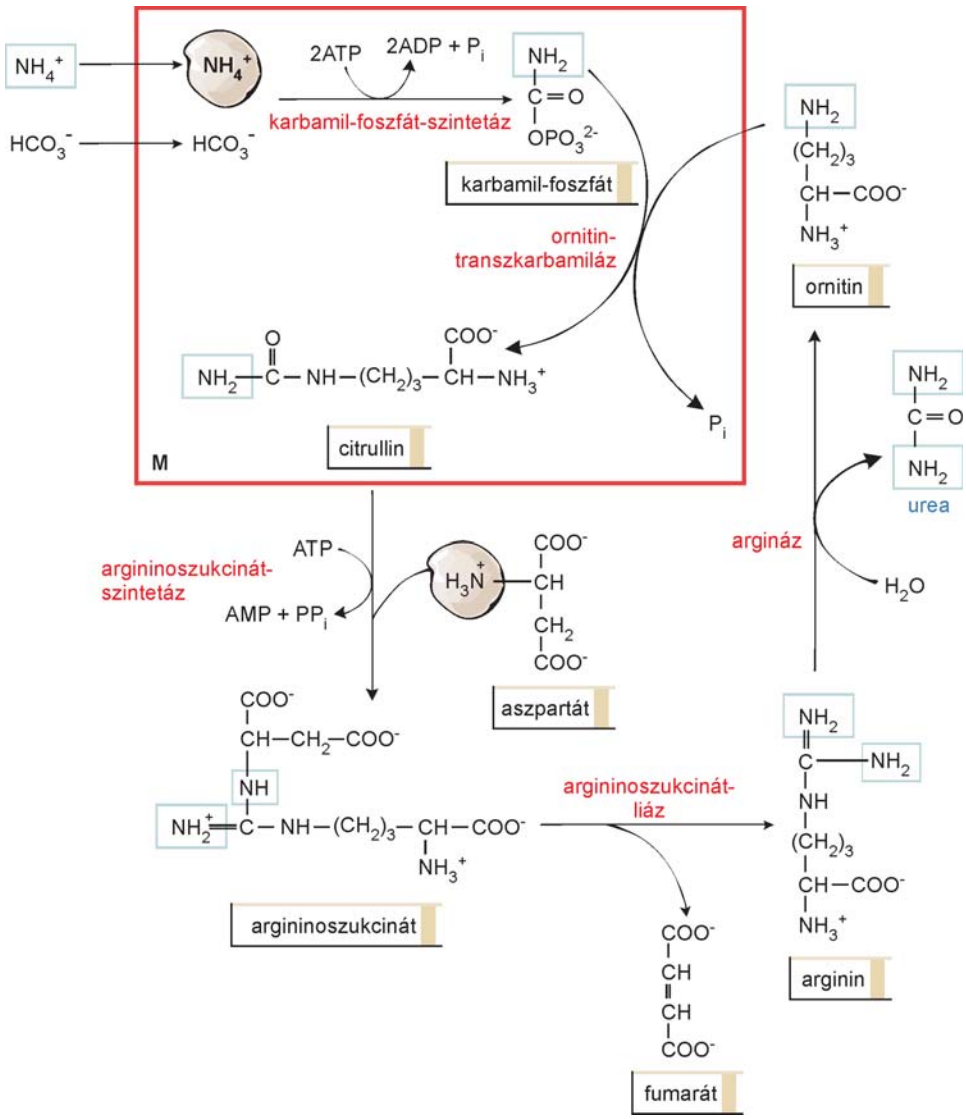
A transzaminálás során legtöbbször glutaminsav keletkezik, amely újabb ammóniát felvéve glutaminná alakulhat. A glutamin-szintetáz reakcióban az amid kötés kialakulása ATP hidrolízisét igénylő folyamat, amely γ-glutamil-foszfát aktivált intermedieren keresztül megy végbe *(II/12-11. ábra)*. A glutamin fontos szerepet játszik az ammónia detoxikálásában a szervek közötti nitrogén szállításban és a sav-bázis homeosztázis fenntartásában. A glutaminsavhoz hasonlóan az aszparaginsav is amidálódik, de ebben a reakcióban nem szabad ammónia, hanem a glutamin a N-donor. A glutamin nem toxikus, s biztosítani tudja a szövetek közötti ammónia forgalmat. Az izom, a tüdő és az adipociták jelentős mennyiségű glutamint bocsátanak a keringésbe, a bél, a vese és a máj pedig felveszi. A glutamin hidrolízise folytán glutamát és ammónia keletkezik, a glutamináz enzim katalizálta reakcióban. A vese glutamináz aktivitása révén leadja az ammóniát, amely ammóniumionként ürül a vizelettel. A N-ürítésnek ez egyik lehetősége, acidózisos állapotban H^+ is közömbösítődik, metabolikus acidózisban a vese glutamináz aktivitása fokozódik, alkalózisban csökken. A bélben szintén magas a glutamináz aktivitás. A keletkezett ammónia részben a májba jut, részben pedig a bélhámsejtekben citrullinná alakul. A glutaminhoz hasonló szerepet játszik a szervek közötti nitrogén transzportban az alanin. Az izomban működő transzaminázoknak nemcsak az α-ketoglutársav, hanem a piruvát is jó ketosav szubsztrátja. A transzaminálás folyamán keletkezett alanin pedig a vérárammal a májba kerül ahol átadja az aminocsoportot, és glutamát keletkezik, a piruvát pedig belép a glukoneogenézisbe; a keletkezett glukóz a keringéssel a peri-



II/12-11. ábra
A glutamát központi szerepe az aminosav-anyagcserében

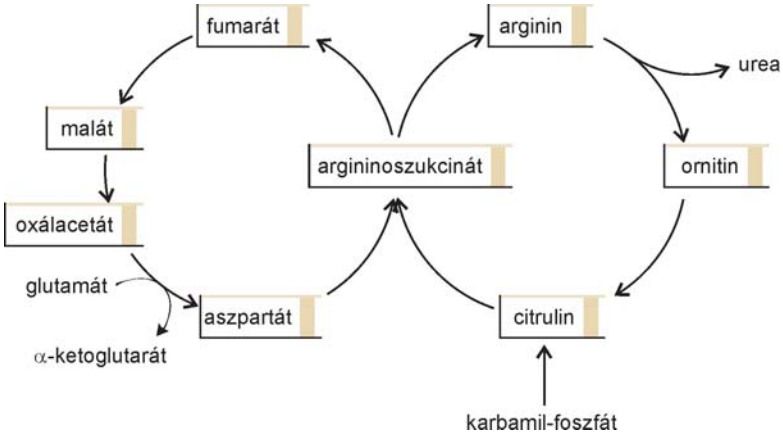
fériás szervekbe, többek között az izomba jut el (alanin-ciklus). Az ammónia méregtelenítésében a máj játszik elsődleges szerepet. A bélbaktériumok ammónia termelése (főként ureáz aktivitása) és a bélhámsejtek glutamináz aktivitása révén az összes metabolizálandó ammónia több mint 30%-a a vena portae-n keresztül kerül a májba. A máj glutamát-dehidrogenáz aktivitása 25%-ban a glutaminázé 6–14 % járul hozzá a metabolizálandó ammónia mennyiségéhez.

Az erősen toxikus ammónia méregtelenítése az ornitinciklusban (Krebs–Henseleit- ciklus, ureaszintézis) történik *(II/12-12. ábra)*. A ciklus során hidrogénkarbonátból, ammóniából, valamint az aszparaginsav aminocsoportjából ATP fel-



II/12-12. ábra
Ornitinciklus

használásával urea (karbamid) keletkezik. A karbamidnak a szervezetben előforduló koncentrációjában biológiai hatása nincsen, a felesleg ép veseműködés esetén a vizelettel eltávozik. A karbamid képződés folyamán lezajló reakciók összesített egyenlete: $NH_4^+ + HCO_3^- + 3ATP +$ aszparaginsav $+2H_2O \rightarrow$ karbamid + 2ADP + AMP+ fumársav + 4 P_i. Egy mol urea szintéziséhez 1 mol ammónia és 1 mol aszpartát N-re és 3 mol ATP-re van szükség, ami négy molekula magas csoportátviteli potenciálú kötés hidrolízisét jelenti. A szintézisben 5 enzim vesz részt. Az ornitinciklus a citrátkörhöz hasonlóan ciklikus folyamat, az ornitin mint karbamil-foszfát akceptor szerepel a ciklus kezdetén és reszintetizálódik a folyamatban. A ciklus kezdő enzimei mitokondriális lokalizációjúak, az urea keletkezése citoplazmatikus. A teljes ciklus csak a májban található, de egyes enzimei más szövetekben is működnek. Az ureaszintézis kezdő lépését a karbamil-foszfát-szintetáz-I enzim katalizálja. A karbamil-foszfát-szintetáz-I enzim a mitokondriumban található szubsztrátjai a NH_4^+ és a HCO_3^-, az enzim működéséhez 2 molekula ATP szolgáltatja az energiát. Az egyik ATP aktiválja a bikarbonátot és karbonil-foszfát intermedier (kevert típusú savanhidrid kötést tartalmazó vegyület) jön létre, majd a NH_4^+ kapcsolódik amid kötéssel, és a karbamát egy másik ATP-vel aktiválódik. A karbamil-foszfát ornitinhez kapcsolódva citrullint alkot, anorganikus foszfát kilép. A citrullin ornitin/citrullin transzporteren át a citoplazmába transzportálódik és aszparaginsavval kondenzálódik. Argininoszukcinát intermedier képződik az argininoszukcinát-szintetáz reakcióban. A folyamat energia igényét az ATP AMP-re és PP_i-ra hasadása biztosítja. A keletkező pirofoszfátot egy pirofoszfatáz enzim bontja. Az argininoszukcinát-liáz enzim hatására fumársav és arginin keletkezik. Az arginint az argináz enzim bontja ureára és ornitinre. Az ornitin belép a mitokondriumba és a kör zárul. A képződött urea egyik nitrogénje tehát ammónium ionból, a másik pedig aszparaginsav aminocsoportjából származik. Az aszparaginsavból keletkezett fumársav a citoplazmában víz felvételével (citoszolikus fumaráz) maláttá alakul, amely egyrészt beléphet a mitokondriumba és ott a citrát ciklusba *(II/12-13. ábra)*. A másik lehetőség, hogy a malát a citoszólban oxálacetáttá oxidálódik, s transzaminálódik aszpartáttá (glutamát az aminocsoport donor), hogy ismét N donor legyen az ornitin ciklusban. A fumársav átalakulási lehetőségeit figyelembe véve, megállapíthatjuk, hogy a ciklus energia igénye kisebb, mint 4 magas csoportátviteli kötés hidrolízise. A fumársavból keletkezett almasav mind a mitokondriumban, mind a citoplazmában



II/12-13. ábra
Az ornitinciklus és a citrátciklus kapcsolata

oxidálódik, miközben NADH $+H^+$ keletkezik, ami közvetlenül vagy az ingarendszeren keresztül emeli a mitokondriális NADH$+H^+$ ($FADH_2$) szintet, a terminális oxidációban ATP szintézist eredményezve.

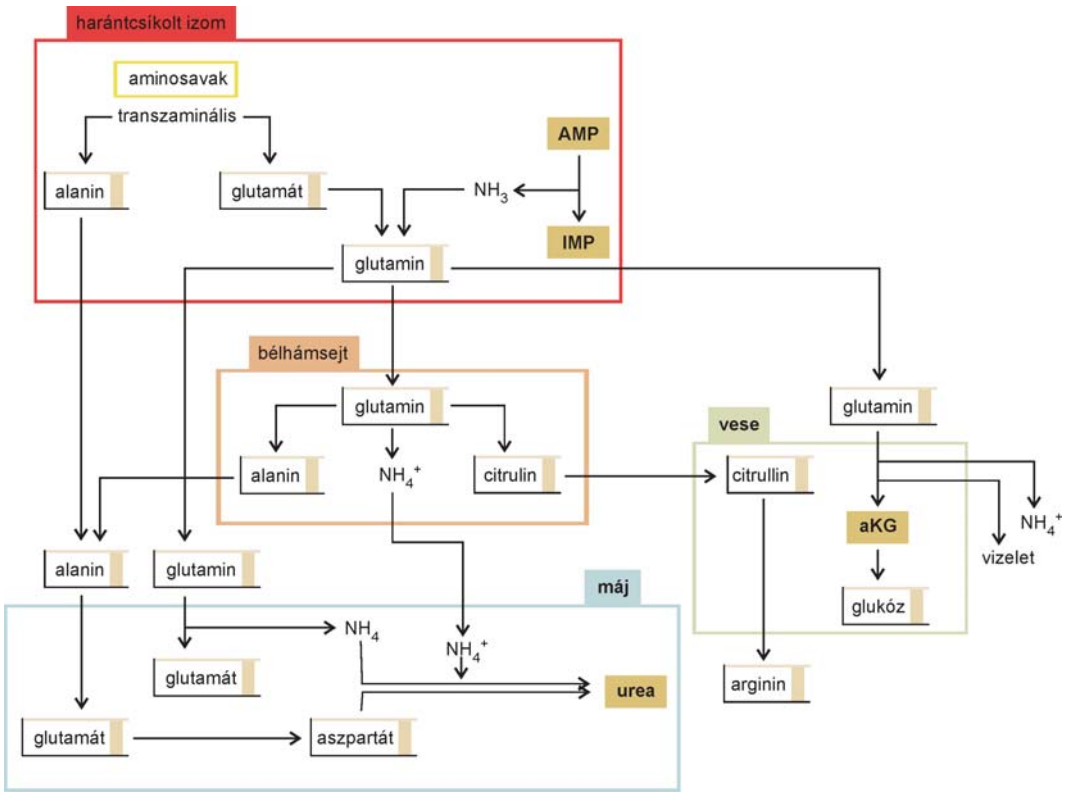
Az ureaszintézis szabályozása

Az ornitinciklus szabályozása különböző szinteken történik. A legfontosabb szabályozó mechanizmus az N-acetil-glutamát allosztérikus aktiváló hatása, egyrészt a karbamil-foszfát-szintetáz enzimen, másrészt és a NH_4^+-t biztosító glutaminázon.

Az N-acetil-glutamát glutamátból és acetil-KoA-ból szintetizálódik a mitokondriumban, a szintetázenzimet az arginin aktiválja. Az ornitinciklus enzimeinek szabályozása hosszú távon is megvalósul, a ciklus aktivitását a fehérje bevitel fokozza. Éhezésben a megemelkedett endogén fehérje katabolizmus következtében szintén emelkedik a ciklus kapacitása. A karbamil-foszfát-szintetáz enzim másik izoformája a citoszolban található a karbamil-foszfát-szintetáz-II, amely egy multifunkciós fehérje részeként a pirimidin bioszintézis enzime

Ureaszintézis enzimei az extrahepatikus szövetekben

A glutamint felveszi a bélhámsejt, amely aktív glutamináz aktivitással bír, ammónia és glutamát képződik *(II/12-14. ábra).* Az ammónia részben a portális keringéssel



II/12-14. ábra
Szöveti kapcsolatok a nitrogénforgalomban

a májba jut, másrészt a bélben is elkezdődik a detoxikálása. A bélhámsejtekben megtalálhatók az urea szintézis mitokondriális lokalizációjú kezdő lépéseinek enzimei: karbamilfoszfát-szintetáz-I, az allosztérikus aktivátor szintéziséhez, az N-acetil-glutamát-szintetáz, az ornitin *de novo* szintézis enzimei és az ornitin transzkarbamiláz, a bélben citrullin képződik. A citrullin a keringéssel a vesébe kerül, ahol argininoszukcinát intermedieren keresztül arginin alakul ki. Az argininből az extrahepatikus szövetekben az NO szintáz reakcióban NO és citrullin alakulhat, vagy részt vehet poliaminok, vesében a kreatin szintézisében vagy a májban belép az ornitin ciklusba.

Az ureaszintézis zavarai

A karbamil foszfát szintetáz enzim hiányában hiperammonémia lép fel, ami toxikus. 100 μM-nál nagyobb koncentráció esetén hiperammonémiás kóma alakul ki. Az ammónia mérgező, átjut a vér-agy gáton, károsítja mind a neuronokat, mind a glia sejteket. A glutamát-dehidrogenáz reakcióban csökkenti az α-ketoglutarát mennyiségét és így a citrátkör kapacitását, növeli az excitatorikus neurotranszmitter a glutamát mennyiségét, valamint szabad gyökök termelését indukálja a mitokondriumokban. Az ureaszintézis enzimeinek károsodása esetén, mindig emelkedett ammóniaszint alakul ki, valamint a károsodott enzim előtti intermedierek felszaporodnak. Az ornitin-transzkarbamiláz hiányában, a keletkezett karmabilfoszfát kijut a mitokondriumból és a citoplazmában belép a pirimidin szintézisbe, fokozott orotsav ürítés egyik jellemző tünete a betegségnek.

II/12.2. AMINOSAVAK LEBONTÁSA

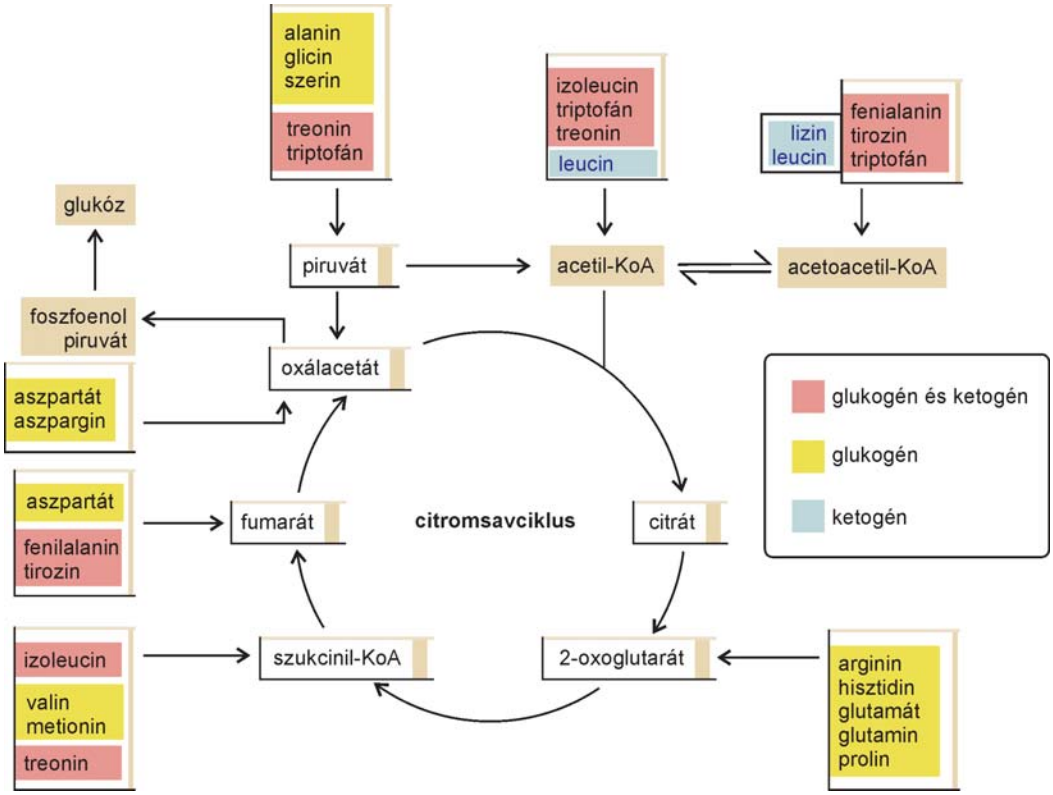
Az aminosavak nitrogén mentes szénláncai, valamely citrátköri intermedierré, vagy piroszőlősavvá, illetve acetoacetil–KoA, acetil–KoA, alakulnak *(II/12-15. ábra).* Azokat az aminosavakat, amelyek szénlánca piruváttá vagy citrátköri intermedierré alakul, glukoplasztikus, amelyeké acetoacetil-KoA-vá vagy acetil-KoA-vá alakul, ketoplasztikus aminosavaknak nevezzük. Néhány aminosav szénláca a lebontás során, mind glukoplasztikus, mind ketoplasztikus intermediereket szolgáltat.

Aszparagin, aszparaginsav

Az aszparagin az aszparagináz reakcióban ammónia felszabadulása mellett aszparaginsavvá alakul. A négyszénatomos aszparaginsav pedig transzaminálás során citrátköri intermedierré, oxálacetsavvá alakul. Az aszparaginsav felhasználódik a pirimidin bioszintézisében. N-donor a purin váz szintézisében, az IMP – AMP átalakulás során, valamint az ureaszintézisben.

Glutamin, glutaminsav

A glutamin, mint ismeretes fontos szerepet játszik a szervek közötti nitrogén transzportban. A lebontása a májban, a vesében és a bélhámsejtekben nagyobb mennyiségben kifejeződő glutamináz enzimmel történik *(II/12-16. ábra)*. A máj glutamináz allosztérikusan szabályozott enzim. Aktivitását fokozza a karbamilfoszfát-szintetáz allosztérikus aktivátora az N-acetil-glutamát, és az ADP. A reakcióban ammónia szabadul fel és glutamát keletkezik. A glutamin amidcsoportját átadhatja a különböző N-tartalmú molekulák szintézisében, miközben glutamát keletke-



II/12-15. ábra
Aminosavak szénláncának bekapcsolódása az anyagcsere-folyamatokba



II/12-16. ábra
A glutamináz reakció

zik belőle. A glutamin N-donor a purin nukleotidok szintézisében, az aszparagin képződésében, az IMP- GMP és az UTP-CTP átalakulásban, az aminocukrok szintézisében.

A glutamát a glutamát-dehidrogenázzal vagy transzaminálással alakul át citrátköri intermedierré, α-ketoglutaráttá. Glutamáton keresztül metabolizálódik a prolin, az arginin és a hisztidin is. Glutamát a központi idegrendszer legjelentősebb excitatórikus neurotranszmittere. Glutamátból szintetizálódik a glutamát-dekarboxiláz enzimmel a gátló hatású neurotranszmitter a gamma-aminobutirát (GABA) is. Glutamátból szintetizálódik a prolin, az arginin, az N-acetil-glutamát. A glutamát részt vesz a glutation felépítésében, ennek kapcsán az aminosav transzportban. Fe-

hérje alkotóként poszttranszlációs változáson mehet keresztül, K-vitamin-igényes reakcióban gamma-karboxi-glutaminsav (Gla) alakul ki, ezáltal megváltozik a fehérje kalciumkötése (véralvadási kaszkád több tagja).

Prolin

A prolin lebontása során a mitokondriális prolin-dehidrogenáz reakcióban oxidálódik, a gyűrűben a N és C atom között kettős kötés alakul ki *(II/12-17. ábra).* Vízbelépéssel a gyűrű felnyílik és L-glutamát-γ-szemialdehiden keresztül glutamát alakul ki. A lebontási folyamat reverzibilis lépései részben megegyenek a prolin szintézissel, az irreverzíbilis lépések enzimei és kofaktorai specifikusak az adott folyamatra. A prolin anyagcsere intermedierje a L-glutamát-γ-szemialdehid egy amino-transzferáz enzim közreműködésével ornitinné alakulhat, amely az ornitin ciklus enzimeivel argininné alakul.

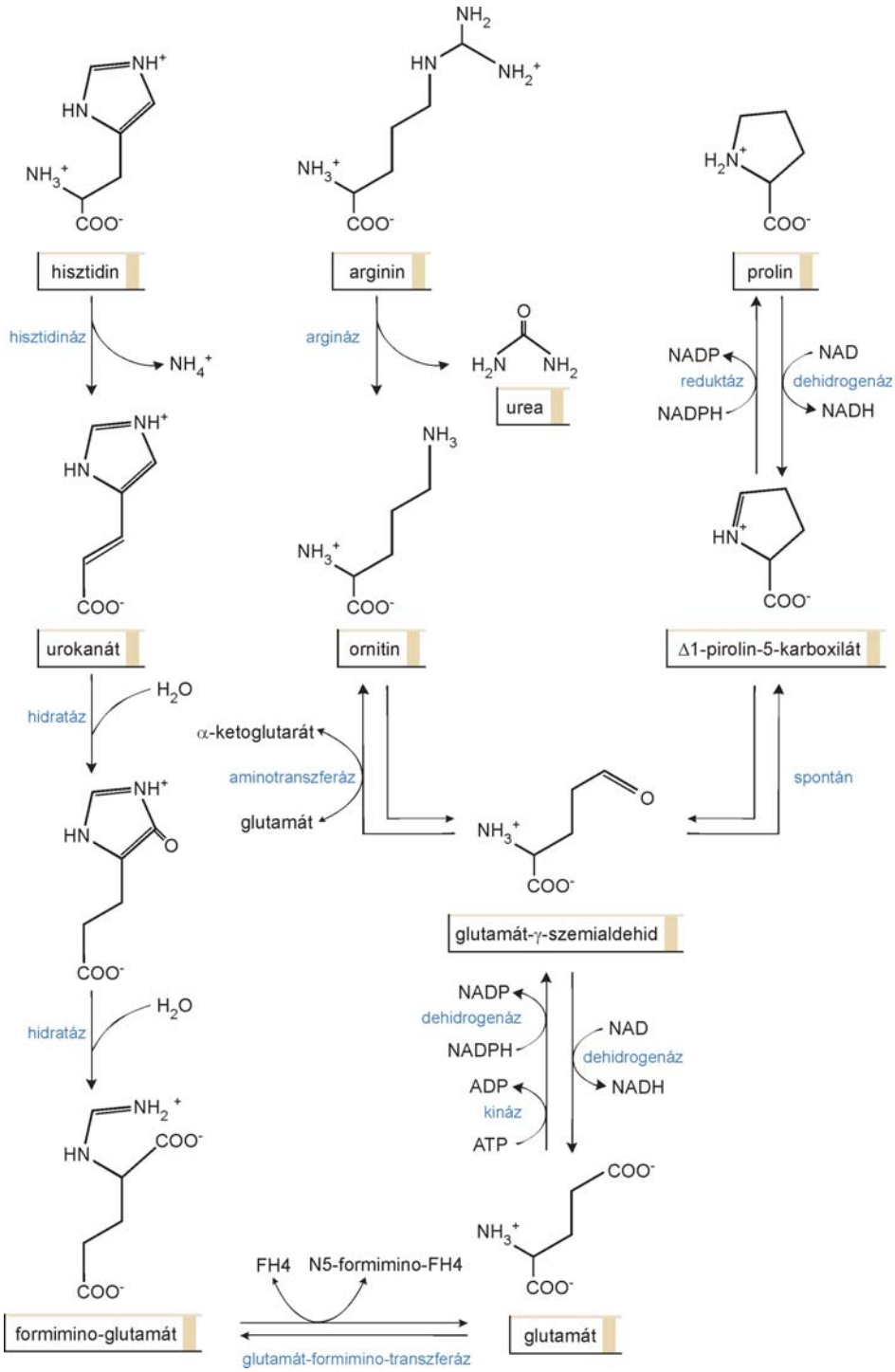
Arginin

Az arginin az urea ciklusban az argináz enzimmel ornitinné alakul, amely egy specifikus transzaminináz enzimmel az ornitin-δ-aminotranszferázzal L-glutamát-γ-szemialdehiddé alakul- az ezt követő lépések megegyeznek a prolin lebontásával *(II/12-17. ábra).* Argininből ornitinen keresztül szintetizálódnak a poliaminok, a szintézishez metionin is szükséges *(II/12-18. ábra)*. Több amino, illetve imino csoporttal rendelkező, kationként funkcionáló poliaminok (spermin, spermidin). Minden sejtben előfordulnak, főleg nukleinsavakhoz és bizonyos fehérjékhez kapcsolódnak, a sejtproliferáció és a sejtnövekedés szabályozásában játszanak szerepet. Szintjük normál körülmények között alig változik, mennyiségük emelkedése és csökkenése viszont egyaránt patológiás állapothoz vezet. Az ornitin-dekarboxilációjával putreszcin keletkezik, ebből S-adenozil-metionin dekarboxiláz és transzferáz enzimek révén aminopropil-csoport kerül át a putreszcinre. A spermin és a spermidin acetilálódik és oxidációval visszaalakul putreszcinné. A poliaminok végső lebontását oxidázok végzik. A kreatin szintézishez arginin, glicin és aktivált metionin szükséges *(II/12-19. ábra)*. A kreatinszintézis első lépése a vesében megy végbe, argininből és glicinből guanidinoacetát keletkezik. A májba szállítódik, ahol S-adenozil-metioninnal metileződik és kialakul a kreatin. A kreatin a különböző szövetekben a kreatin-kináz hatására ATP-vel foszforilálódik. A kreatin-kináz-reakció megfordítható. A kreatin-foszfát a savamid kötésnek köszönhetően magas csoportátviteli potenciálú vegyület. A kreatin-foszfát vízbelépéssel és Pi-felszabadulással spontán gyűrűvé záródik és kreatinin alakul ki, ami a vizelettel ürül. Argininből történik a NO szintézis is az NO-szintáz enzimmel, miközben citrullin keletkezik *(II/12-18. ábra)*.

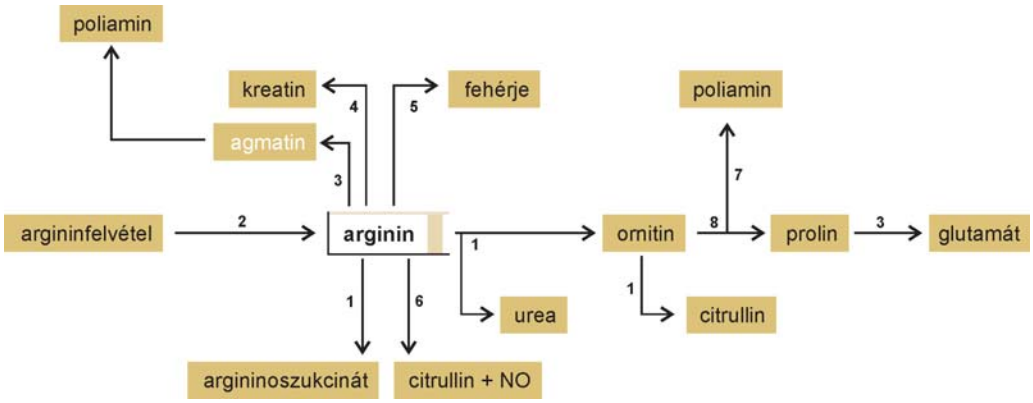
Hisztidin

A hisztidin metabolizmusa szintén glutamáton keresztül történik. A hisztidin azon aminosavak közé tartozik, melyek a lebontása során ammónia szabadul fel, a hisztidináz enzim katalizálta reakcióban, miközben egy urokanát intermedier képződik. Két víz egymást követő belépése során felhasad az imidazol gyűrű N-formimino-glutamát képződik. A következő lépésben a formimino-csoport tetrahidrofolsavra kerül és glutamát keletkezik, amely transzaminálódással α-ketoglutaráttá alakul *(II/12-17. ábra).*

A hisztidin dekarboxilálódik piridoxál-foszfát-függő dekarboxiláz enzimmel, a keletkezett hisztamin biogén amin, szerepet játszik az allergiás reakciókban, hatással van a gyomorsav szekrécióra. A hipotalamuszban cirkadián ritmus szerint változik a koncentrációja.

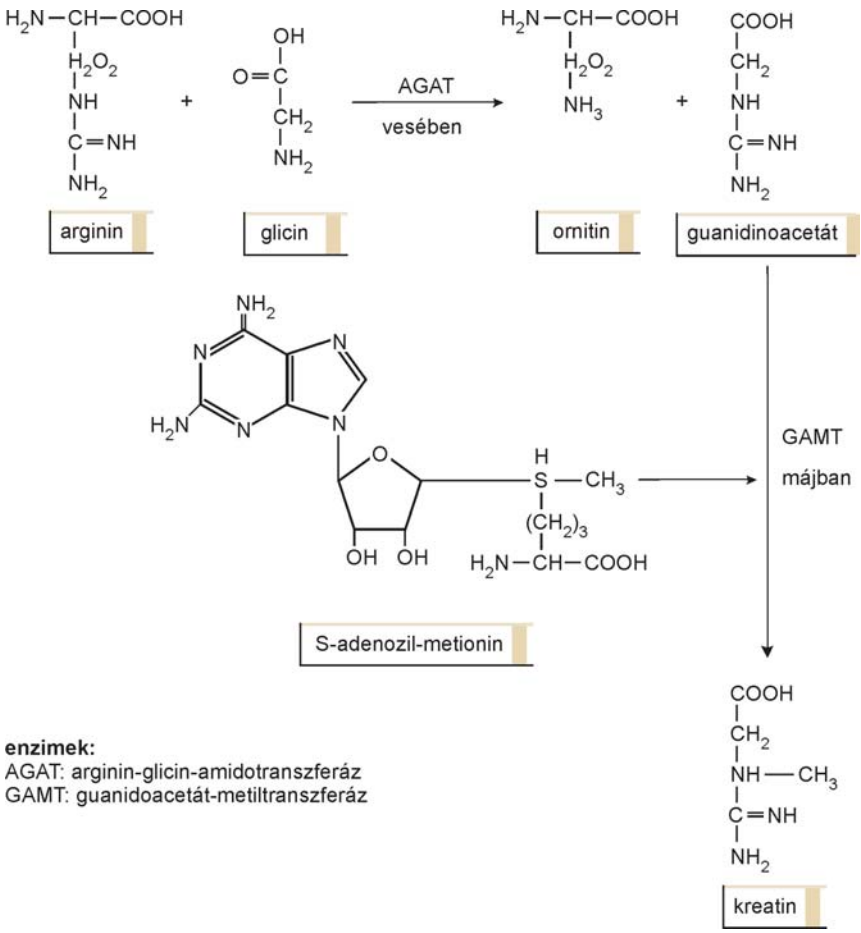


II/12-17. ábra
A hisztidin, arginin és prolin metabolizmusa, ornitinszintézis



II/12-18. ábra

Az arginin-anyagcsere. 1: Ornitinciklus; 2: argininfelvétel; 3: poliamin-szintézis; 4: kreatinszintézis; 5: fehérjeszintézis; 6: NO-szintáz:NO + citrullin; 7: poliaminszintézis; 8: prolinszintézis; 9: prolinlebontás



II/12-19. ábra

A kreatinszintézis

Alanin

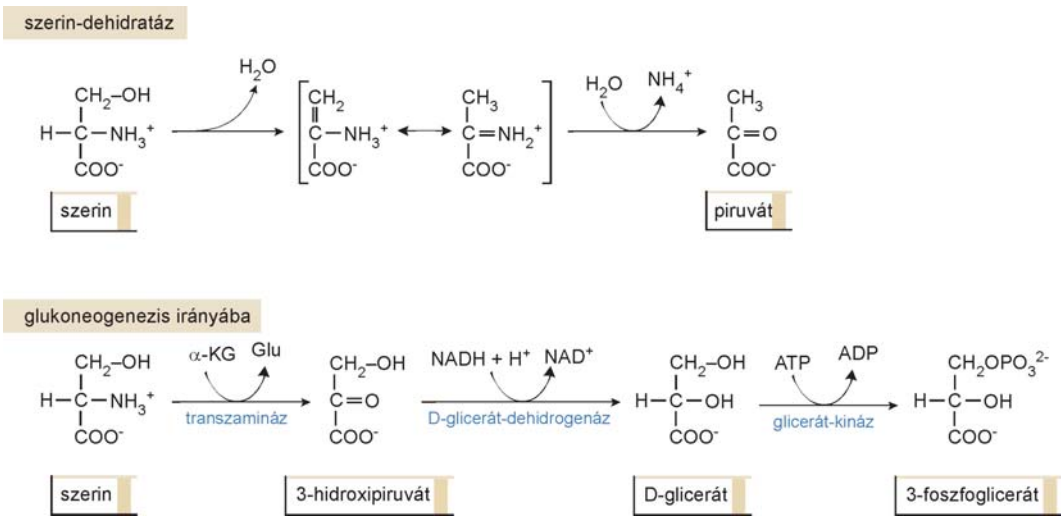
A transzaminálással alaninból piroszőlősav keletkezik. Az alanin aminotraszferáz enzim legnagyobb mennyiségben a májban van jelen, fontos szerepet játszik az izom és a máj közötti fiziológiás alanin ciklusban. A glicinnel együtt a legnagyobb mennyiségben fordul elő a plazmában.

Szerin

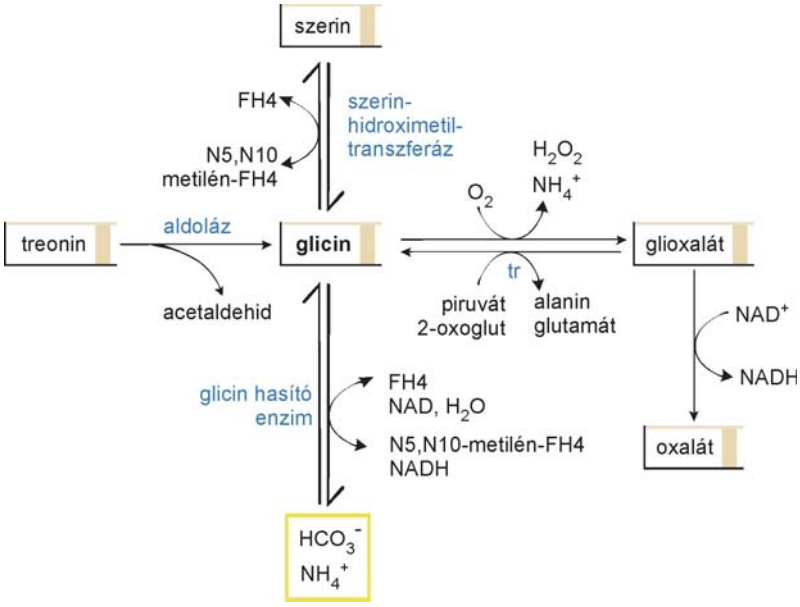
A szerin azon aminosavak csoportjába tartozik, amelyek többféle úton is metabolizálódnak. A hidroxi-aminosavak dehidratáz enzimmel ammónia felszabadulás közben a megfelelő ketosavvá alakulnak, így a szerin piroszőlősavvá. Egy másik lebontási útvonalon a szerin glikolízis intermedierré 3-foszfogliceráttá alakul *(II/12-20. ábra)*. Továbbá a szerin glicinné is alakulhat a szerin-hidroximetiltranszferáz katalizálta reverzíbilis reakcióban *(II/12-21. ábra)*. A folyamatban a szerin hidroxilcsoportja víz formájában távozik, a beta szénatom pedig metilén formában a FH_4-ra kerül. A szerin számos biomolekula kiindulási anyaga, szerinből szintetizálódhat glicinen kívül cisztein, betain, szfingozin, foszfatidil-szerinen keresztül foszfatidil-etanolamin és foszfatidil-kolin.

Glicin

A glicin metabolizmusa szorosan összefügg a szerin metabolizmussal egy reverzibilis reakciót katalizáló enzim a szerin-hidroximetil-transzferáz révén. A glicin alternatív útvonalon is átalakulhat a glicin-hasító enzimmel, amely folyamat H_2O belépésével NAD^+ redukcióval NH_4^+ és HCO_3^- keletkezésével jár, a glicin alfa szénatomja pedig FH_4-ra helyeződik és N_5,N_{10}-metilén- FH_4 keletkezik. A glicin lebontás harmadik útvonala glioxaláton keresztül oxaláttá alakulás. Első lépésben a glicin-oxidáz enzim, molekuláris O_2 felhasználásával glioxalátot képez, miközben NH_4^+ és H_2O_2 keletkezik. A glioxalátból oxidációval oxalát jön létre *(II/12-21. ábra).* A glicin számos



II/12-20. ábra
A szerin lebontása



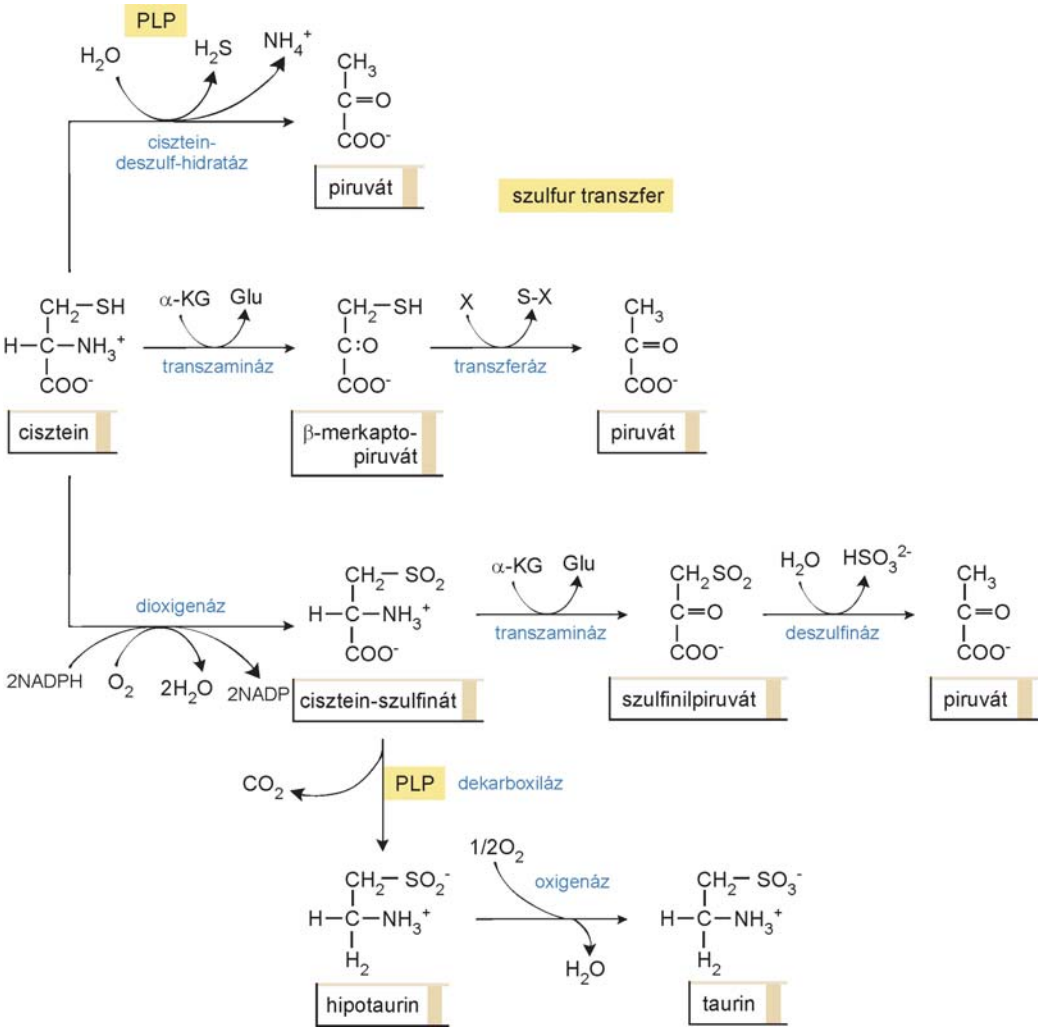
II/12-21. ábra
A glicin metabolizmusa, szerin glicin átalakulás

speciális molekula szintézisében vesz részt így a purinváz, a porfirin gyűrű, a kreatin, a glutation, N_5,N_{10}-metilén-FH_4 keletkezésében, a szerin szintézisben és számos konjugálási reakciókban (pl. epesavak). A glicin gátló neurotranszmitter, mint neuromodulátor (koaktivátor) pedig szerepet játszik a glutaminerg receptorok közül az NMDA receptor működésében.

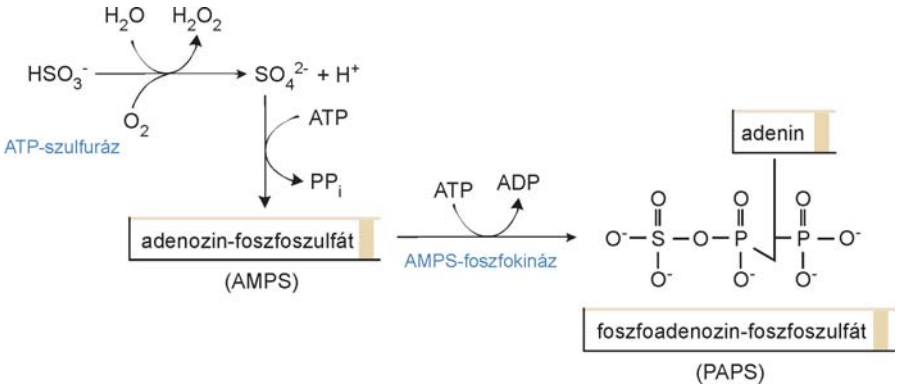
Cisztin, cisztein

A cisztin-reduktáz által katalizált reverzíbilis reakcióban a cisztin két ciszteinre bomlik. A ciszteinlebontás több útvonalon történhet, melyek végén a szénlánc piruváttá alakul és különböző fokban oxidált kén tartalmú intermedier jön létre *(II/12-22. ábra)*. A legtöbb sejtben a cisztein dioxigenáz enzim reakcióban cisztein-szulfinát keletkezik, ami transzaminálódik és szulfinilpiruvát intermedieren keresztül piruváttá alakul. A ciszteinlebontás másik útvonala transzaminálással kezdődik, ebben az esetben egy tiolpiruvát intermedier alakul ki, ami egy szulfur-transzferáz enzim segítségével SO_3^{2-}csoport felhasználásával piroszőlősavvá alakul miközben tioszulfát keletkezik.

A cisztein lebontása még végbemehet a cisztein- deszulfhidratáz által is, víz belépéssel, NH_4^+ és H_2S felszabadulással piroszőlősav keletkezik. A reakciókban keletkezett kénvegyületek oxidálódnak és ATP szulfuriláz által AMP-hez kapcsolódnak, majd egy újabb ATP felhasználásával foszfoadenozin-foszfoszulfát (PAPS) jön létre. A PAPS fontos szerepet játszik a méregtelenítés konjugációs fázisában *(II/12-23. ábra)*. Cisztein 4-foszfopantoténsavval kapcsolódva részt vesz a KoA szintézisében. Kiindulási anyaga a taurin és a hipotaurin szintézisnek.



II/12-22. ábra
A cisztein metabolizmusa



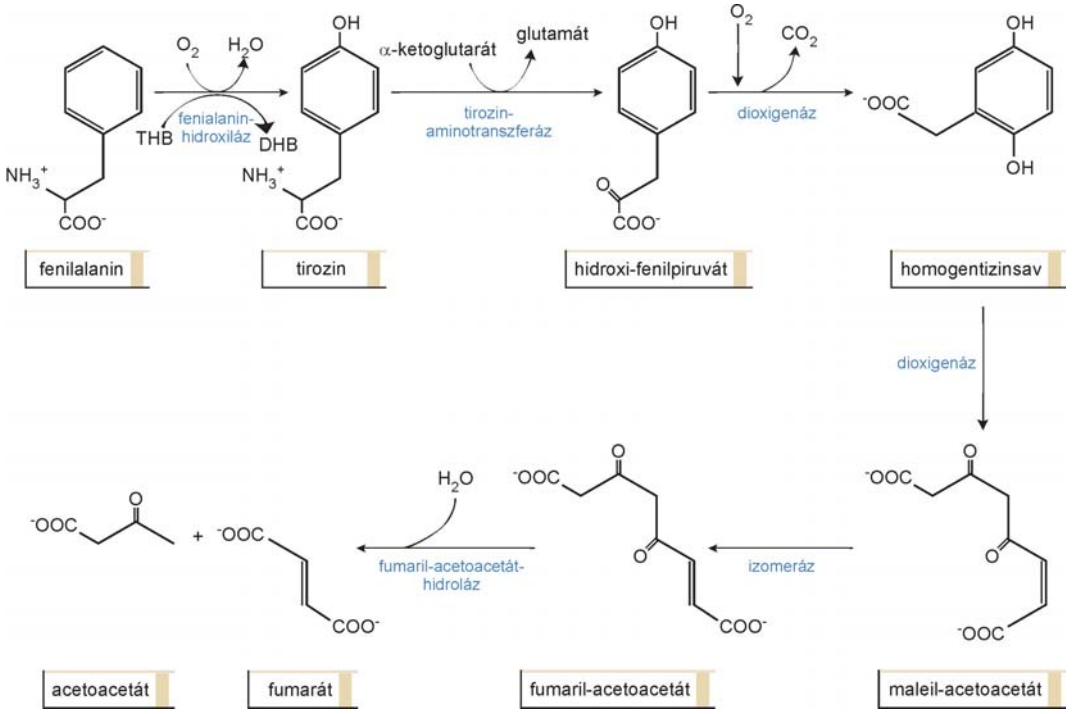
II/12-23. ábra
Az aktív szulfát képződés

Hidroxiprolin

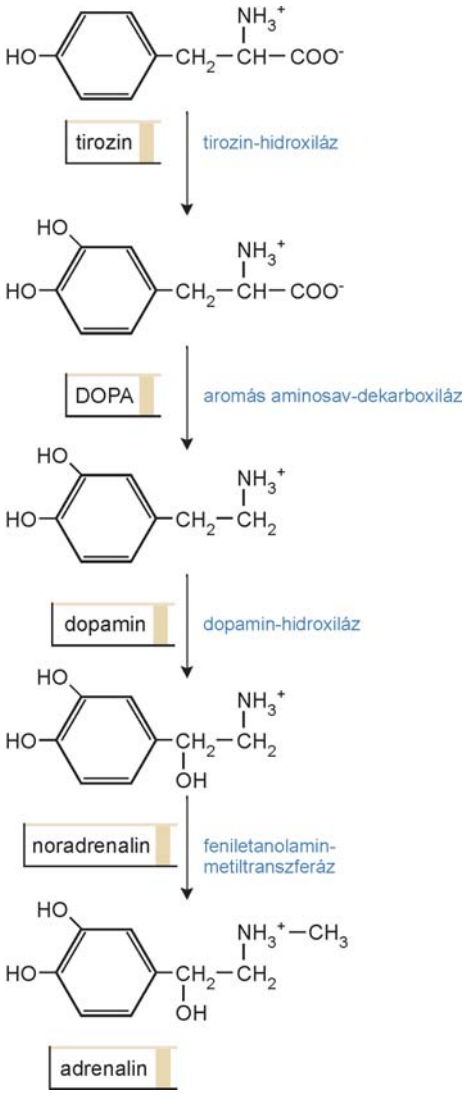
A hidroxiprolin két dehidrogenáz és egy transzamináz katalizálta reakcióban α-keto-γ-hidroxiglutaráttá alakul, amelyet egy aldoláz enzim piruváttá és glioxaláttá hasít.

Fenilalanin, tirozin

A fenilalanin a lebontás során először tirozinná alakul, ezt követően a két aminosav lebontása közös úton megy végbe, gluko- és ketoplasztikus aminosavak közé tartoznak. A fenilalanin a korábbiakban ismertetett fenilalanin-hidroxiláz (kevert típusú oxigenáz) enzim által, molekuláris oxigén felhasználásával, víz kilépése mellett tirozinná alakul, mely folyamathoz tetrahidrobiopterin az elektrondonor *(II/12-24. ábra)*. A keletkező dihidrobiopterint NADPH redukálja vissza tetrahidrobiopterinné. A tirozin transzaminálódik p-hidroxi-fenil-piruváttá, ami egy dioxigenáz (kofaktorai: aszkorbinsav és Cu^{2+}) katalizálta reakcióban HCO_3^- kilépése mellett homogentizinsavvá alakul. A homogentizinsav-dioxigenáz (Fe^{2+}-tartalmú enzim) katalizálta reakcióban a gyűrű felhasad és maleil-acetoacetát keletkezik, amelyből izomeráz és hidroláz enzimek révén fumarát és acetoacetát képződik. A fumársav a citrát-körbe lép, az acetoacetát β-ketotiolázzal két acetil-KoA-ra bomlik. A fenilalanin lebontása során enzimopátiák következtében számos anyagcserebetegség alakulhat ki. Ezek közül a leggyakrabban előfordulók a fenilketonuria és az alkaptonuria. A fenilketonuria a fenilalanin-hidroxiláz enzim hiányos működésének következménye, ami az enzim defektusára vagy a koenzim THB hiányára, illetve DHB reduktáz ab-



II/12-24. ábra
A fenilalanin és tirozin metabolizmusa



II/12-25. ábra
Adrenalinszintézis

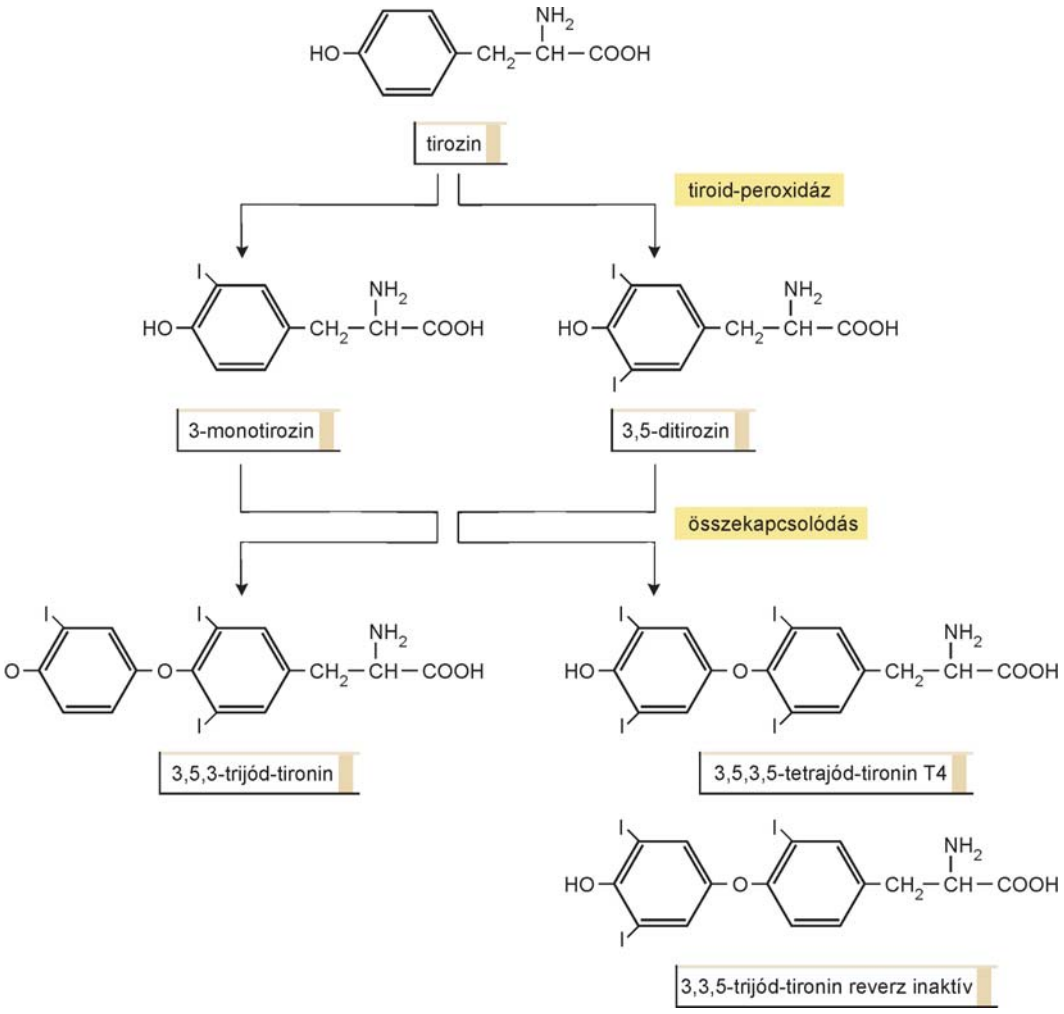
normális működésére vezethető vissza. A fenilalanin egyik esetben sem képes tirozinná alakulni, a tirozin felhalmozódik és fenil-piruváttá transzaminálódik, ami fenillaktáttá, fenilacetáttá alakul. A fel nem ismert betegség mentális retardációhoz vezet. Magyarországon 1:9000 gyakorisággal előforduló betegséget újszülöttkorban szűrik, ugyanis fenilalanin szegény, tirozint tartalmazó diétával a tünetek kialakulása megelőzhető. Az alkaptonuria a homogentizinsav-dioxigenáz enzim defektusa esetén alakul ki. A betegségben felszaporodik a homogentizinsav, megjelenik a kötőszövetekben és súlyos gyulladásos folyamatok indulnak el, ami elsősorban az ízületeket érinti. A homogentizinsav kiválasztódik a vizelettel, állás közben oxidálódik és polimerizálódik, a vizelet sötét színű lesz. Fenilalaninból történik a katekolaminok, a tiroxin és a melanin szintézise is. A tirozinból kialakuló DOPA két reakció: katekolamin szintézis, illetve a melanin szintézis útján alakulhat tovább *(II/12-25. ábra).* Az előbbi a noradrenalin és adrenalin, az utóbbi a bőr, szem és szőr pigmentek kialakulásához vezet. Tirozinból indul ki a tiroxin szintézise is. A pajzsmirigy fehérje, a tireoglobulin tirozin oldalláncai jódozódnak a tiroid-peroxidáz enzim révén. A jódozott tirozin molekulák szubsztituciós reakcióval tetrajódtironinné alakulnak, majd egy specifikus proteáz kihasítja a molekulát a fehérjéből, s kialakul a tetrajódtironin (tiroxin) aktív hormon *(II/12-26. ábra).*

Triptofán

A triptofán amfibolikus intermediereket adó aminosav, amely lebontása nem transzaminációval, hanem oxidációval kezdődik, az enzim a triptofán-oxigenáz, egy hemoprotein. Az enzimet a triptofán mellett a kortikoszteroidok is indukálják, a nikotinsav származékok gátolják. A reakcióban a molekuláris oxigént felhasználásával felnyílik az indolgyűrű és formil-kinurenin intermedier keletkezik. A következő lépésben a formil-csoport FH4-ra kerül és kinurenin keletkezik, amelyből a kinorenin-hidroxiláz és kinurenináz reakcióban molekuláris oxigén és NADPH+H^+ felhasználásával 3-hidroxi-antranilát keletkezik. A 3-hidroxiantranilát a NAD-szintézis kiinduló vegyülete, ezzel magyarázható a NADPH gátló hatása a triptofán-oxigenázra. A nikotinsav intermedierek szintézisére azonban a 3-hidroxi-antranilát 3% fordítódik, az intermedier nagy része α-ketoadipáton keresztül acetoacetil-KoA-vá alakul *(II/12-27. ábra)*.

Lizin

A lizin azon aminosavak közé tartozik amelyek lebontása nem transzaminálással kezdődik, hanem α-ketoglutársav alkotott szacharopin intermedieren keresztül adja

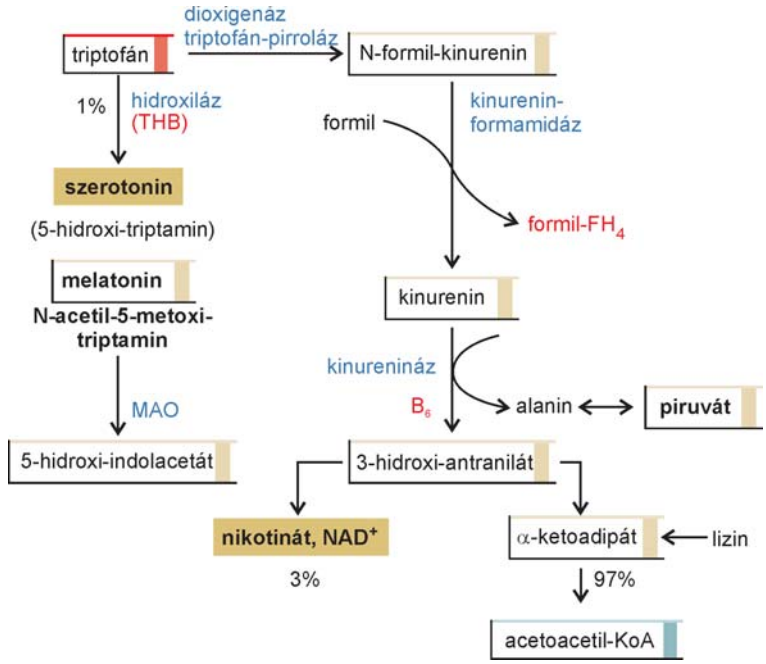


II/12-26. ábra
Tiroxinszintézis

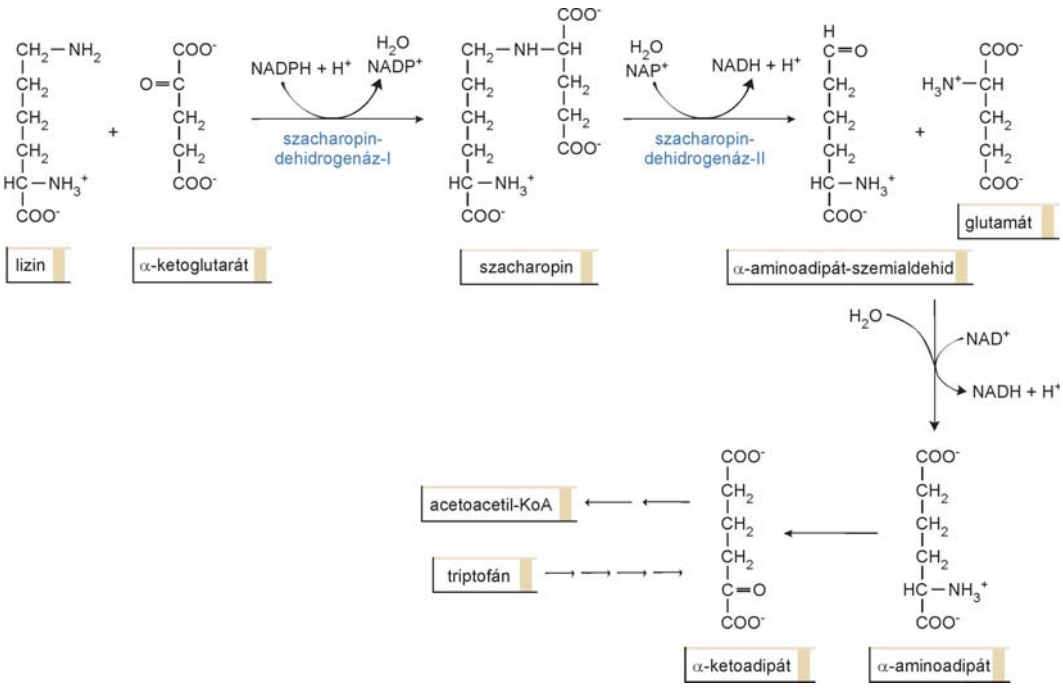
át az ε-aminocsoportját és glutaminsav mellett oxidoredukciós lépések folyamán L-α-aminoadipát keletkezik, ami transzaminálódik és α-ketooadipát keletkezik, ami dekarboxilálódik és oxidálódik, majd mint krotonil-KoA belép a telítetlen zsírsavak oxidációs folyamatába, hogy végül acetil-KoA képződjön *(II/12-28. ábra)*.

Treonin

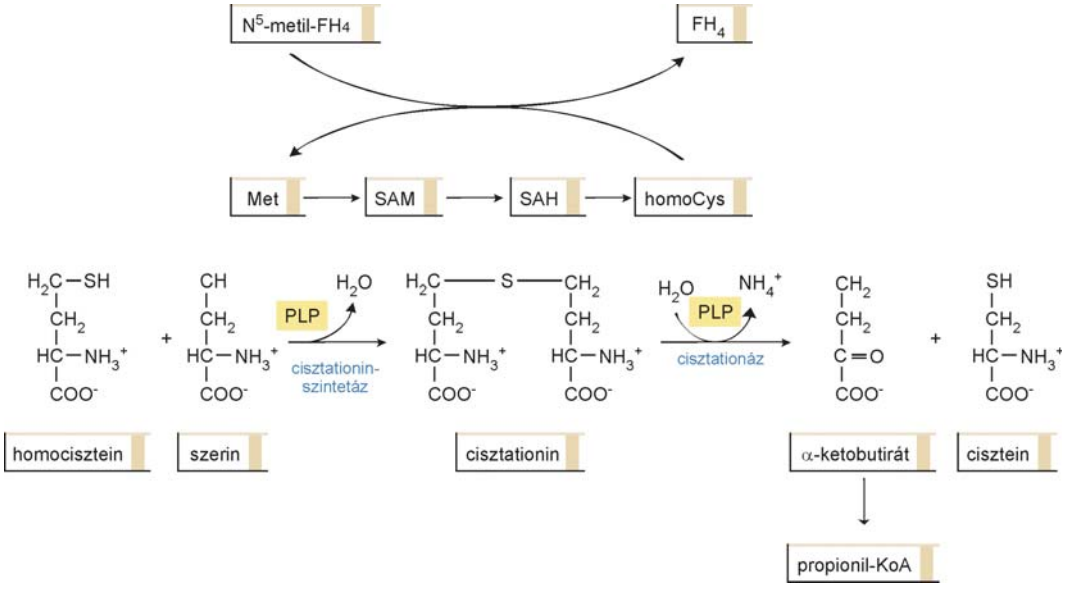
Többféle úton bomlik le. Az egyik úton a mitokondriumban egy dehidrogenáz reakciót követően, α-amino-β-ketobutiráton keresztül acetil-KoA-vá és glicinné alakul, a glicin pedig szerinen keresztül piruváttá alakulhat. A másik fontos útvonalon a treaonin – a szerinhez hasonlóan, mint hidroxiaminosav – egy dehidratáz enzim hatására ketosavvá, jelen esetben 2-oxobutiráttá alakul. Ez dekarboxilálódik, és a keletkező propionát végül szukcinil-KoA-vá alakulva lép be a citrát-ciklusba. A treonin tehát egyaránt gluko-és ketoplasztikus aminosav.



II/12-27. ábra
A triptofán lebontása



II/12-28. ábra
A lizin lebontása



II/12-29. ábra
A metionin lebontása

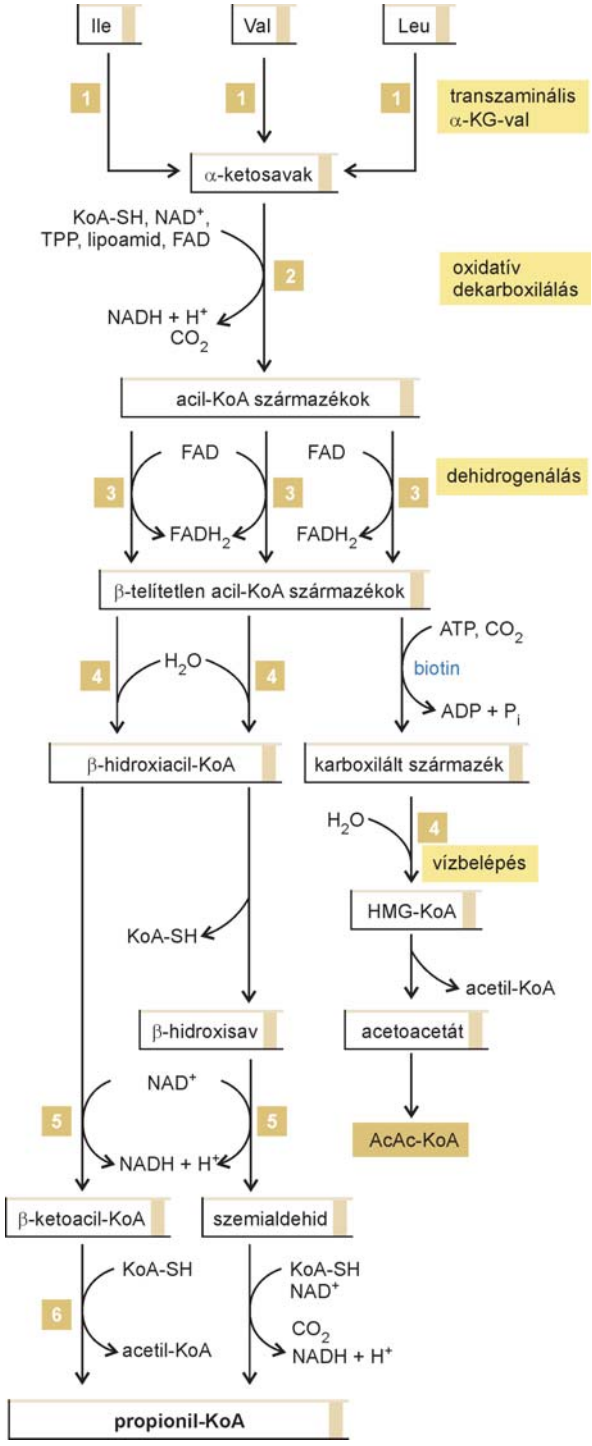
Metionin

A metionin S-adenozil-metioninné aktiválódva, mint metilcsoport donor fontos szerepet játszik a metilezési folyamatokban. A metilcsoport átadásával S-adenozil-homociszteinné, majd homociszteinné, s végül propionil-KoA-vá alakul *(II/12-29. ábra)*. Az S-adenozil-metionin szerepet játszik a poliaminok szintézisében is.

Valin, izoleucin, leucin

Az elágazó szénláncú aminosavak (Esza) lebontása transzaminálással kezdődik. Ezek a transzaminázok az izomban és az agyban expresszálódnak nagyobb mennyiségben.

A transzaminálás során elágazó szénláncú α-ketosavak (Eszk) keletkeznek, amelyek a mitokondrium belső membránhoz kötött α-ketosav-dehidrogenáz enzim szubsztrátjai *(II/12-30. ábra)*. Az elágazó szénláncú ketosav-dehidrogenáz komplex szerkezete hasonlít a piruvát és α-ketoglutarát-dehidrogenáz komplexekhez, a három enzim E_3 alegysége közös. Az elágazó ketosav-dehidrogenáz E_1-alegysége heterotetramer, tiamin pirofoszfát prosztetikus csoporttal, az E_2-alegység liponsavat köt, az E_3 alegységnek pedig FAD prosztetikus csoportja van. Az enzim működéséhez HS-KoA és NAD^+ koenzimek is szükségesek. Az enzimkomlexhez a piruvát-dehidrogenázhoz komplexhez hasonlóan csatlakozik egy kináz és egy foszfatáz enzim. A dehidrogenáz komplex katalizálta reakcióban a leucinból izovalerilsav, az izoleucinból α-metilbutiril-KoA, a valinból izobutiril–KoA keletkezik. Az intermedierekből a β-oxidációhoz hasonló lépéseken keresztül végül leucinből acetil-KoA és acetacetát, az izoleucinból acetil-KoA és propionil-KoA, valinból pedig propionil-KoA keletkezik. A propionil-KoA a páratlan szénatomszámú zsírsavak lebontásából ismeretes útvonalon metil-malonil-KoA-n keresztül alakul szukcinil-KoA-vá. Az utóbbi folyamat koenzime a B_{12}-vitamin. B_{12} vitamin hiányában nemcsak az egy-



II/12-30. ábra
Az elágazó szénláncú aminosavak lebontása

szénatomos transzfer mechanizmusok károsodnak, hanem felszaporodnak az elágazó szénláncú ketosavak is a vizeletben. Az elágazó szénláncú ketosavdehidrogenáz enzim komplex hiányos működése az Esza és Eszk szint megemelkedésével jár és fizikai és szellemi visszamaradottságot okoz. A tünetek kialakulásáért a leucin és a transzaminálással ebből keletkező α-ketoizokapronsav felszaporodása a felelős. Az izoleucin bomlástermékei nem okoznak idegrendszeri tüneteket, de jellegzetes jávorfa illatot adnak, innen a betegség elnevezése is. A valinterhelés nem jár tünetekkel.

II/12.3. AMINOSAVAK SZINTÉZISE

Ebben a fejezetben a táplálkozás szempontjából nem esszenciális aminosavak szintézise kerül ismertetésre. A táplálkozás szempontjából esszenciális aminosavakat az emberi szervezet nem tudja szintetizálni, pl. mert elágazó C-láncúak, vagy aromásak, a táplálkozással kell felvenni. Ezekre jellemző, hogy a prokariota sejtekben a szintézisükhöz nagyszámú enzim szükséges. Az emberi szervezet számára nem esszenciális aminosavak lényegesen kevesebb enzimmel szintetizálódnak. A táplálkozás szempontjából nem esszenciális aminosavak szintézise általában citrátköri vagy glikolízis intermedier-

II/12-2. táblázat
Az aminosavak szintézis prekurzorai az emberi szervezetben

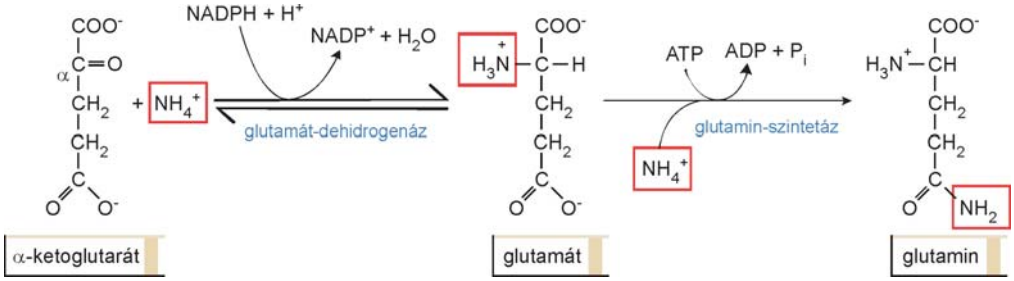
Prekurzor	**Aminosav**
piruvát	Ala
oxálacetát	Asp, Asn
α-ketoglutarát	Glu, Gln, Pro, (Arg)
3-foszfoglicerát	Ser, Gly
Ser + Met	Cys
Phe	Tyr

ből, illetve más aminosavból indulnak ki. Amennyiben a prekurzor aminosav esszenciális, az abból szintetizálódó aminosav sem tekinthető teljes mértékben nem esszenciális aminosavnak (a cisztein szintézishez metionin a kénforrás, tirozinszintézis szintén esszenciális aminosavból, fenilalaninból indul ki). Az arginin az ornitin ciklus során szintetizálódik, de más folyamatokban is metabolizálódik. Fokozott fehérje szintézis esetén esszenciálissá válik. Az aminosavak szintézisében a glutamát, mint N donor, központi szerepet játszik *(II/12.2. táblázat)*.

Glutamát és glutaminszintézis

Glutamát α-ketoglutarátból két úton szintetizálódik. Az egyik az α-ketoglutarát reduktív aminálása, amely folyamatban a NADPH $+H^+$ a hidridion-donor *(II/12-5. ábra)*. A folyamat reverzíbilis, de a glutamát hidrolízise esetében NAD^+ a hidrogén akceptor. A másik útvonal a különböző aminosavak transzaminálási folyamatai, melyekben többnyire az α-ketoglutarát az aminocsoport-akceptor *(II/12-4. ábra)*.

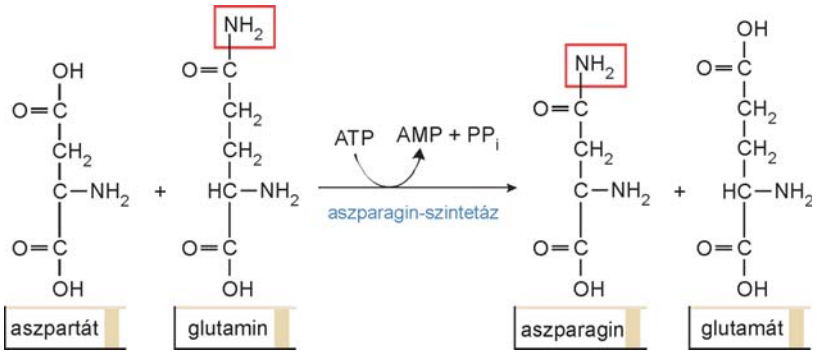
A glutaminszintézis glutamin-szintetáz enzim katalizálta reakció glutamát γ-foszfát intermedieren keresztül valósul meg, amelyhez NH_4^+ kapcsolódik és végül lehasad a foszfát csoport *(II/12-31. ábra)*.



II/12-31. ábra
Glutamát, glutamin szintézis

Alanin és aszpartát, aszparaginszintézis

A szinézis mindkét aminosav esetében transzaminálással történik az alanin-aminotranszferáz (ALAT), illetve az aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) által katalizált reakcióban *(II/12-3. ábra)*. Az aszpartát–aszparagin átalakulás az aszparagin-



II/12-32. ábra
Az aszparaginszintézis

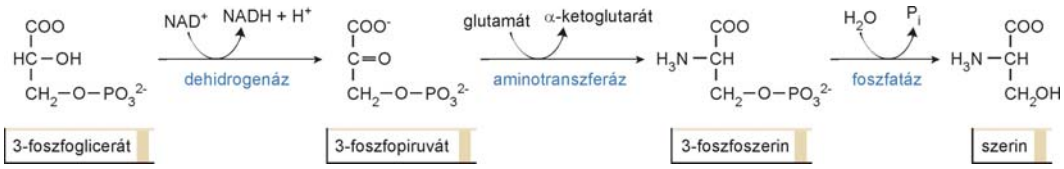
szintetáz enzim által katalizált energiaigényes folyamat, amelyben nem ammónia, hanem glutamin a N donor. A reakcióban felszabaduló PP_i-ot a pirofoszfatáz enzim hasítja, s ezáltal biztosítja a reakció irányát *(II/12-32. ábra)*.

Prolin, argininszintézis

A prolin szintézise szintén a glutamát aktivációjával kezdődik, glutamát γ-foszfát alakul ki, ezt követően a foszfát lehasad és NADPH+H^+ közreműködésével egy redukáltabb intermedier, a glutamát γ-szemialdehid alakul ki, majd egy H_2O-kilépéssel záródik a gyűrű és egy újabb NADPH+H^+-t igénylő redukciós lépést követően kialakul a prolin. A glutamát γ-szemialdehid egy újabb glutamát részvételével aminotranszferáz reakcióban ornitinné alakul, amelyből az ornitin ciklus során arginin szintetizálódik *(II/12-17. ábra)*.

Szerinszintézis

A szerin szintézise glikolízis intermedierből, a 3-foszfoglicerátból indul ki. Az első lépésben 3-foszfohidroxi-piruváttá oxidálódik NADH keletkezése közben, majd glutamát-α-ketoglutarát átalakulás révén transzaminálódik és az ezt követő defoszforilációs lépés eredményeként kialakul a szerin *(II/12-33. ábra)*. Szerin szintetizálódhat glicinből a szerinhidroximetil-transzferáz reakcióban *(II/12-21.ábra)*.



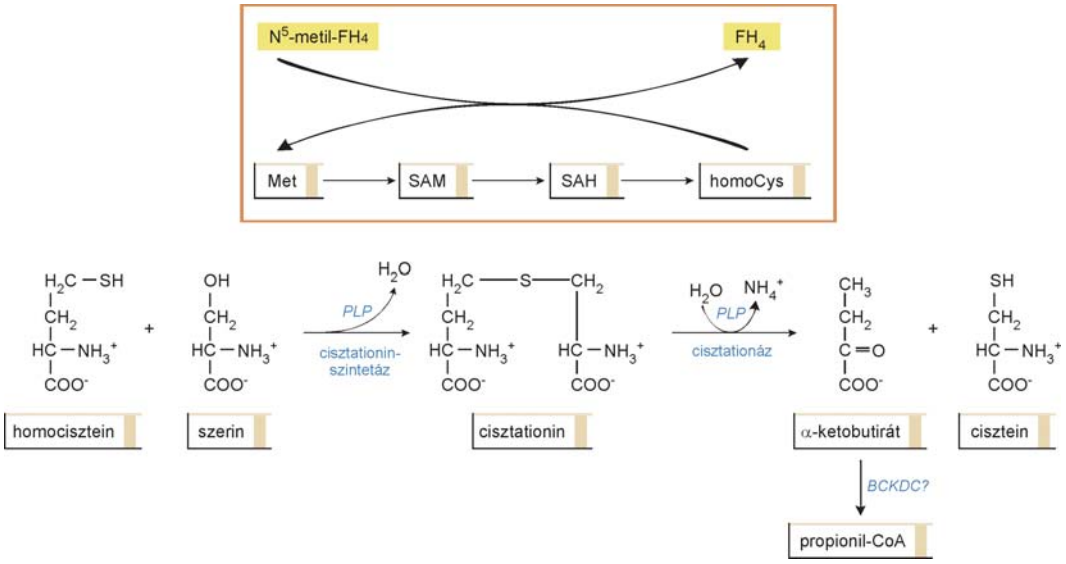
II/12-33. ábra
A szerin szintézise glikolízis intermedierből

Glicinszintézis

A glicin több prekurzorból szintetizálódik. Az emberi szervezetben szerin–glicin átalakulást a szerin-hidroximetil-transzferáz enzim katalizálja. A folyamatban a szerin hidroxilcsoportja víz formában távozik a β-szénatom pedig metilén formában a FH4-ra helyeződik át *(II/12-21. ábra)*. A glicin több lépésben kolinból is szintetizálódik: betainon, dimetilglicinen és szarkozinon keresztül glicin alakul ki. A folyamat során felszabaduló metilcsoport a homocisztein–metionin átalakulásban használódik fel, a formilcsoportok pedig FH4-ra kerülnek át. Glioxalátból transzaminázzal glicin alakul ki, a reakcióban alanin vagy glutamát az aminocsoport donor. A folyamat jelentősége a glicinszintézis mellett, hogy csökkenti a glioxalát mennyiségét, a rosszul oldódó oxálsavvá alakulását, így csökkenti a vesekő kialakulásának lehetőségét *(II/12-21. ábra)*.

Ciszteinszintézis

A cisztein a nem esszenciális szerinből szintetizálódik, de a folyamathoz – a kénatom forrásaként – egy táplálkozási szempontból esszenciális aminosav, a metionin is szükséges. Az S-adenozilmetionin-ciklus intermedierje, a homocisztein szerinnel kondenzálódva cisztationt képez, melyet a cisztationáz (cisztationin-liáz) ammónia



II/12-34. ábra
Ciszteinszintézis

felszabadulás közben ciszteinre és α-ketobutirátra hasít *(II/12-34. ábra)*. Az α-ketobutirát dekarboxilálódik és propionil-KoA-n keresztül szukcinil-KoA-vá alakul.

Hidroxi-aminosavak kialakulása

Poszttranszlációs módosulásként alakul ki mind a hidroxiprolin, mind a hidroxilizin, prolil-, illetve lizilhidroxilázok katalizálta folyamatban. A reakció molekuláris oxigént, aszkorbinsavat, ferro iont és α-ketoglutársavat igényel. A reakció folyamán az α-ketoglutársav szukcináttá dekarboxileződik. A hidroxilázok kevert típusú oxigenázok, az egyik oxigén atom a prolinba vagy a lizinbe, a másik a szukcinátba épül be.

Szelenociszteinszintézis

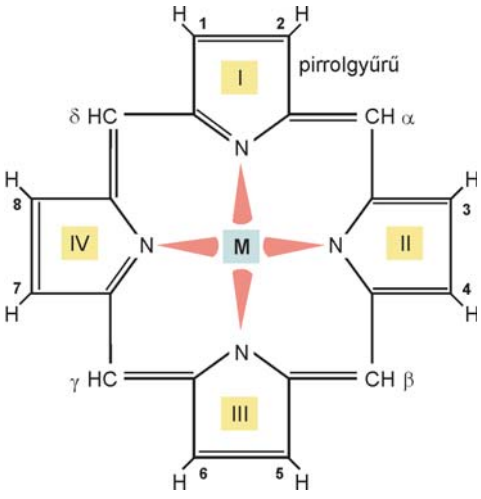
A szelenocisztein néhány redox reakciókat katalizáló enzimben előforduló ritka aminosav. Kotranszlációsan keletkezik, egy szerint szállító speciális tRNS-en végbemenő reakciók során. A szelenát ATP felhasználásával, a szelenofoszfát szintetáz enzim által katalizálva szelenofoszfáttá alakul, majd a szerinbe beépülve több lépésen át szelenociszteinil-tRNS keletkezik. A szelenociszteinil-tRNS polipeptidláncba történő beépüléséhez egy specifikus elongációs faktorra is szükség van.

II.13.
Porfirin- és vasanyagcsere

Vér Ágota

II/13.1. A PORFIRINVÁZ FELÉPÍTÉSE

A porfirinek ciklusos vegyületek, amelyekben négy pirrolgyűrű metenilhidakkal kapcsolódik össze. A porfirinekre jellemző a konjugált kettős kötés rendszer, amelynek köszönhető a molekula abszorpciós képessége, így ezek a molekulák bizonyos hullámhosszú fényt elnyelnek, vagyis színes vegyületek. Fémionokkal komplexet képeznek, a fémion a pirrolgyűrűk N- atomjaihoz kötődik *(II/13-1. ábra*).



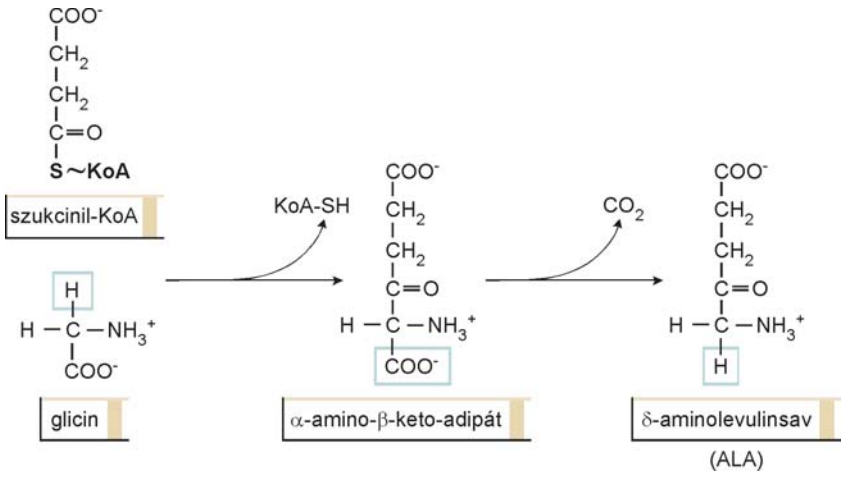
II/13-1. ábra
Porfirinváz

A vastartalmú porfirint hemnek, a magnéziumtartalmút klorofillnek nevezzük. Az emberi szervezetben a fehérjék nagy részében a vas protoporfirin-IX gyűrűben kötött vasként szerepel. Azokat a fehérjéket, amelyek hemvázat tartalmaznak, hemoproteineknek hívjuk. A hemoproteineknek különböző biológiai funkciója van: oxigéntranszport (pl. hemoglobin, mioglobin, neuroglobin, citoglobin), oxigén és/vagy peroxidok reakcióinak katalízise (pl. citokróm-P450 család, citokróm-c-oxidáz, peroxidáz, kataláz, ciklooxigenáz, prosztaglandin-endoperoxid-szintáz, NO-szintáz, szolubilis guanilcikláz), valamint dehidrogenázok által katalizált elektron transzferben való közreműködés (citokróm-a, citokróm-b, citokróm-c).

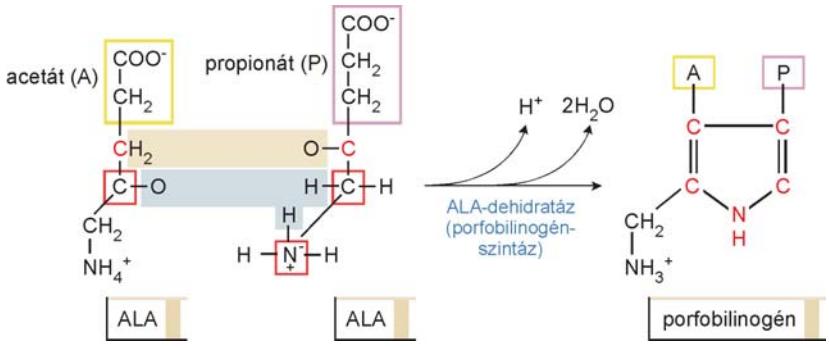
II/13.2. A PORFIRINEK BIOSZINTÉZISE

Hemszintézisre minden sejt képes, legintenzívebben a vörös csontvelő eritroid sejtjeiben és a hepatocitákban zajlik. A szintézis nyolc enzime részben a mitokondriumban, részben pedig a citoplazmában található. A szintézis kiinduló lépése a mitokondriumban megy végbe, egy citrátköri intermedier a szukcinil-KoA és egy glicin kondenzációja révén α-amino-β-keto-adipát intermedieren keresztül δ-aminolevulinsav (ALA) keletkezik *(II/13-2. ábra)*.

Az ALA-szintáz enzim kofaktora a piridoxál-foszfát. A reakció a hemszintézis sebességmeghatározó lépése, hepatocitákban, a hem gátolja az enzimet. Ez azért is lehetséges, mert a hem szintézis a mitokondriumban kezdődik és fejeződik be. Az ALA szintézist követő négy lépés a citoplazmában zajlik. A két molekula ALA kondenzációja révén, két molekula víz kilépésével, a porfobilinogén-szintáz enzim közreműködésével porfobilinogén alakul ki *(II/13-3. ábra).*



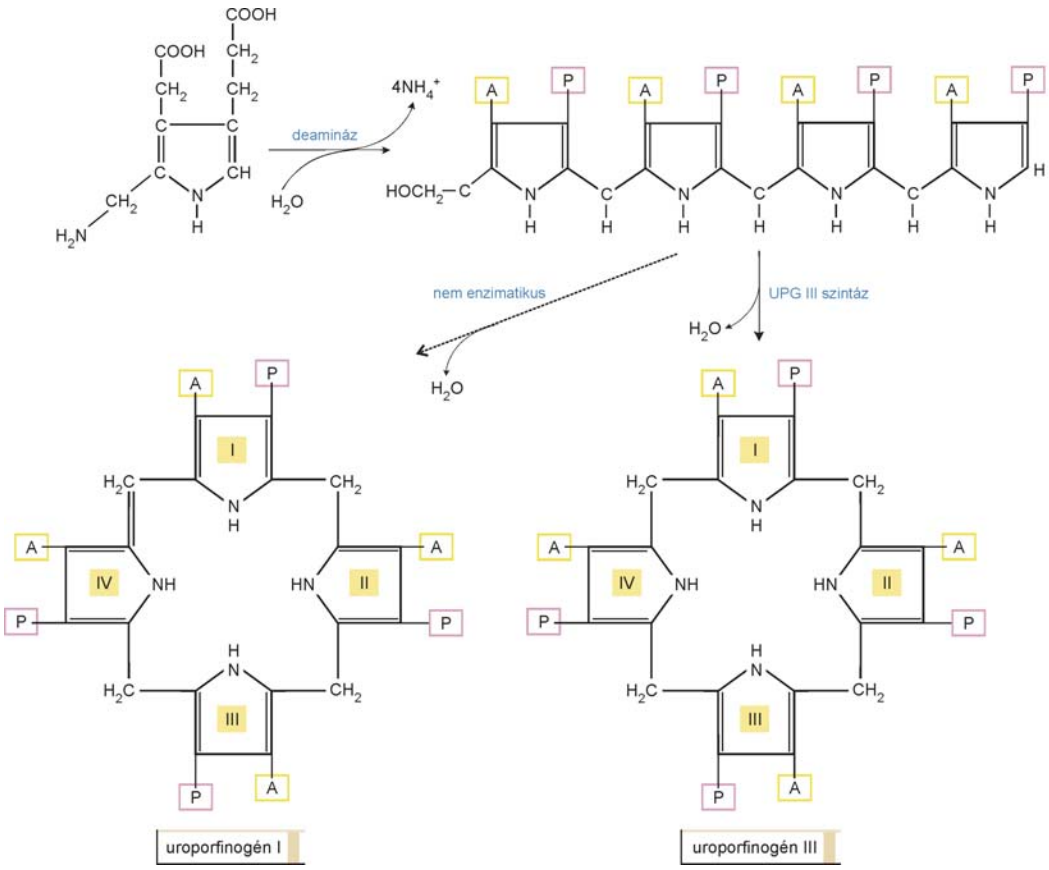
II/13-2. ábra



II/13-3. ábra

Négy molekula porfobilinogénből, négy NH_4^+ kilépése mellett a porfobilinogén-deamináz, más néven hidroximetil-bilán-szintáz katalizálta reakcióban kialakul egy labilis lineáris tetrapirrol intermedier, a hidroximetil-bilán. A gyűrűrendszer záródását az uroporfirinogén-III-szintáz enzim végzi, és uroporfirinogén-III keletkezik. Normál körülmények között többnyire uroporfirinogén-III mutatható ki az emberi szervezetben, s ennek tovább alakulása eredményezi a porfirin vázat. A hidroximetil-bilán azonban nem-enzimatikus úton is gyűrű rendszerré záródhat, ebben az esetben uropofirinogén-I alakul ki, amely bizonyos szintézist érintő betegségekben fel is szaporodhat. A két izomérben a szubsztituensek helyzete a IV. pirrolgyűrűn eltérő *(II/13-4. ábra)*.

Az uroporfirinogének pirrolgyűrűi metilénhidakkal kapcsolódnak egymáshoz, nem alkotnak konjugált gyűrűrendszert, színtelenek, mint általában a porfirinogének, viszont könnyen oxidálódnak színes porfirinekké. Az uroporfirinogének acetát oldalláncai az uroporfirinogén-dekarboxiláz enzimmel metilcsoporttá alakulnak, és az uroporfirinogén-III-ból koproporfirinogén-III, az uroporfirinogén-I-ből pedig koproporfirinogén-I keletkezik. Az uroporfirinogén-I → koproporfirinogén-I irány a



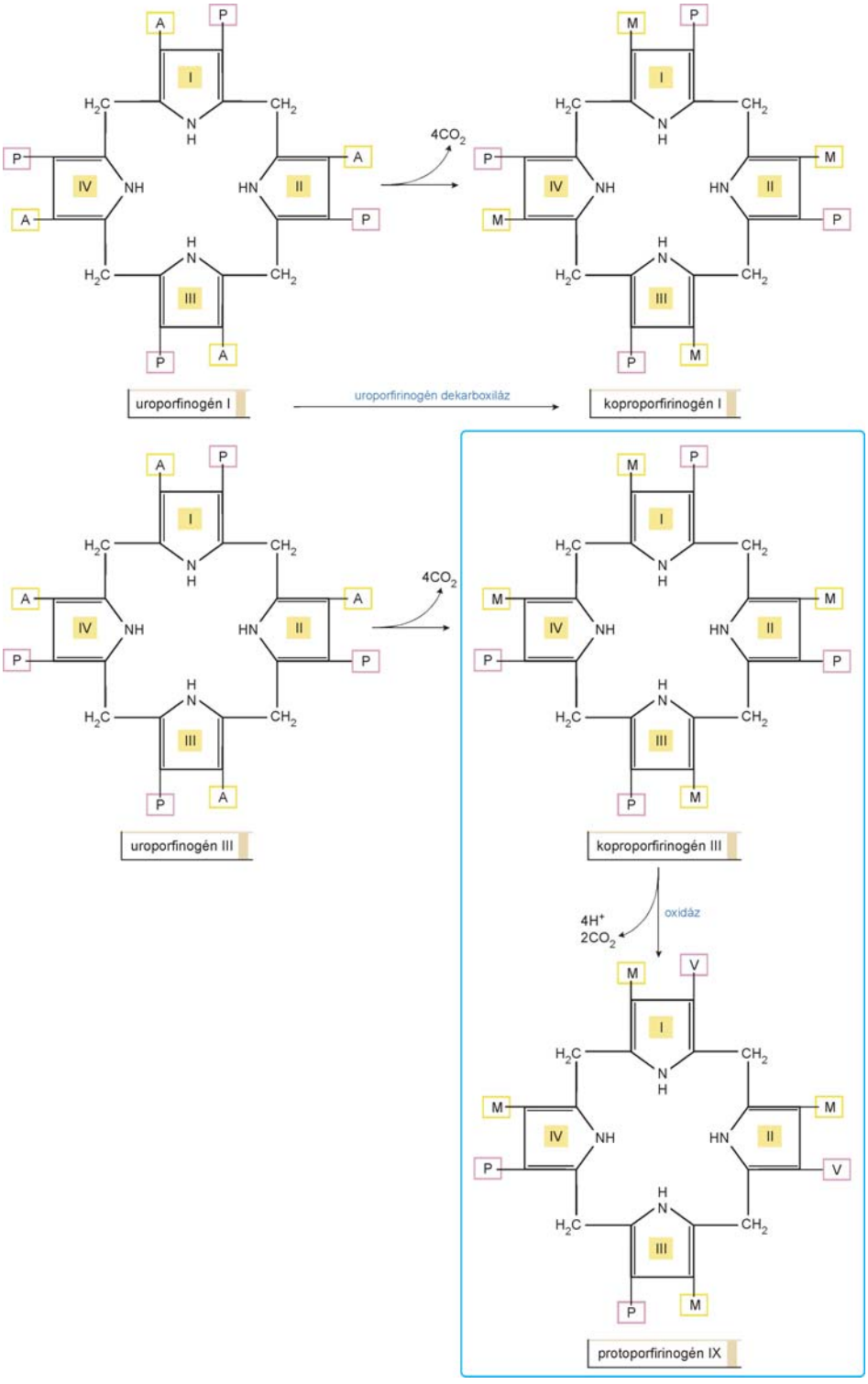
II/13-4. ábra

szintézis szempontjából zsákutca, a porfirinszintézis következő enzime a koproporfirinogén-III-ra specifikus *(II/13-5. ábra)*.

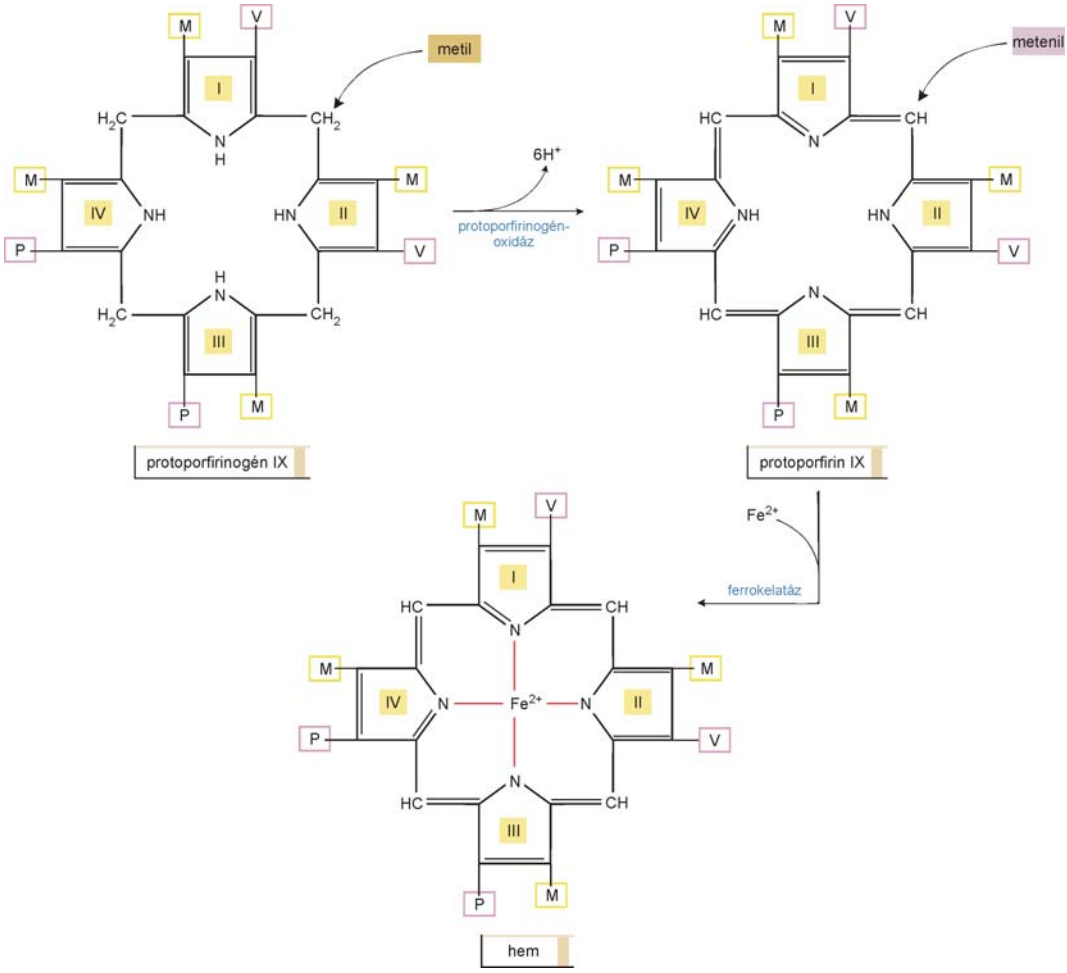
A koproporfirinogén-III belép a mitokondriumba, és itt megy végbe a dekarboxilációja és az oxidációja. A koproporfirinogén-III-oxidáz az I. és II. pirrolgyűrű két propionát oldalláncát dekarboxilálja és vinilcsoporttá oxidálja, így létrejön a protoporfirinogén-IX, amelyből további oxidációs lépéssel a molekulában kialakul a konjugált kettős kötés rendszer, protoporfirin-IX keletkezik *(II/13-6. ábra)*. A hemszintézis utolsó lépése a ferrokelatáz (hem-szintáz) enzim katalizálta reakció, amelyben a kétértékű vasion beépül a protoporfirinvázba *(II/13-6. ábra)*.

II/13.3. A HEMSZINTÉZIS SZABÁLYOZÁSA

ALA-szintáz enzimnek két izoformája fordul elő az emberi szervezetben: a máj típusú ALA1 és az eritroid sejt típusú ALA2. A hem befolyásolja az ALA1 transzkripcióját, transzlációját, a mitokondriumba irányuló transzportját és az aktivitását is. Az ALA1 enzim szintézisét a folyamat végterméke a hem egy aporepresszor fehérje közreműködésével represszálja. Az enzim szintézise tehát hem hiányában növek-


4CO2
uroporfinogén I
uroporfirinogén dekarboxiláz
koproporfirinogén I
uroporfinogén III
koproporfirinogén III
oxidáz
4H+
2CO2
protoporfirinogén IX

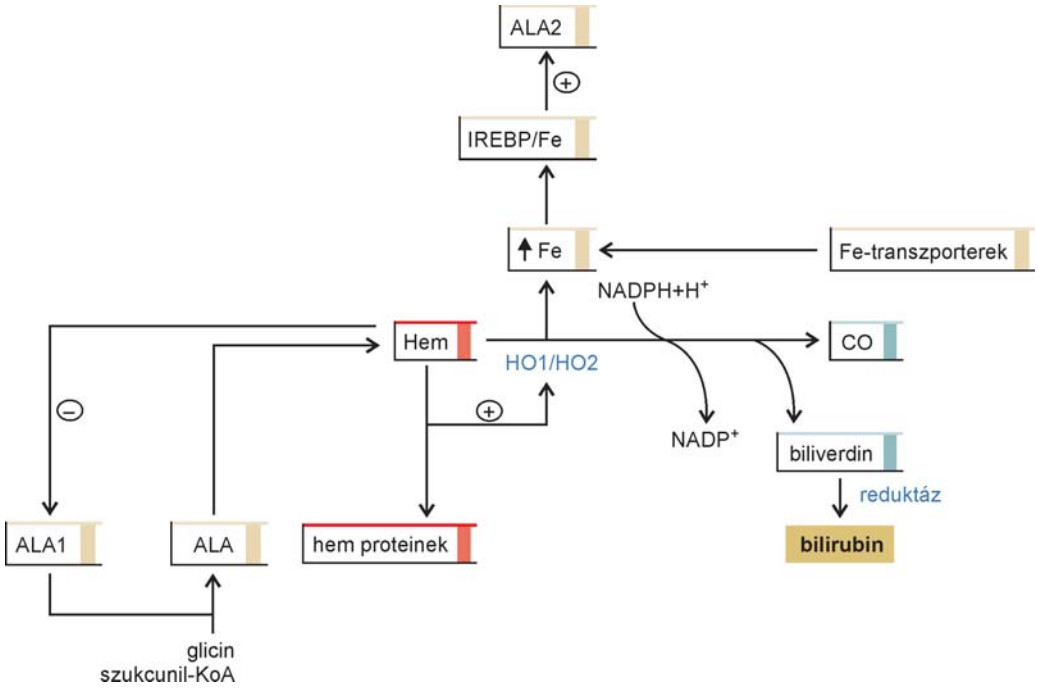
II/13-5. ábra



II/13-6. ábra

szik, jelenlétében csökken. Az enzim féléletideje 1 óra. A citokróm P450 rendszeren keresztül metabolizálódó gyógyszerek fokozzák az ALA1 enzim expresszióját. A citokróm P450 indukálható enzim, amely prosztetikus csoportja a hem, a fokozott enzim szintézis csökkenti a celluláris hem mennyiségét, ami az ALA1 derepresszióján keresztül fokozott hem szintézist eredményez. Az ALA1 allosztérikusan is szabályozott, inhibítora a hem. A szabad hemnek szabályozó szerepe van más, a hemoproteinek anyagcseréjével kapcsolatos folyamatban is, a szabad hem fokozza a hemlebontás kezdő enzimének, a hem-oxigenáznak (HO1) és a hemfüggő apoproteinek expresszióját is *(II/13-7.ábra).*

Az eritroid sejtekben előforduló ALA2 szabályozása eltérő, a hem feedback gátlása hiányzik, valamint az ALA2 enzim nem is indukálható. Az eritroid sejtekben az ALA2 a szabadvas-szinttel szabályozódik, ha alacsony a szabadvas-koncentráció, az IREBP (iron resposive element binding protein) bekötődik az ALA2 mRNS IRE szekveciáihoz, és represszálja az ALA2 transzlációját. Magas vasszint esetén az

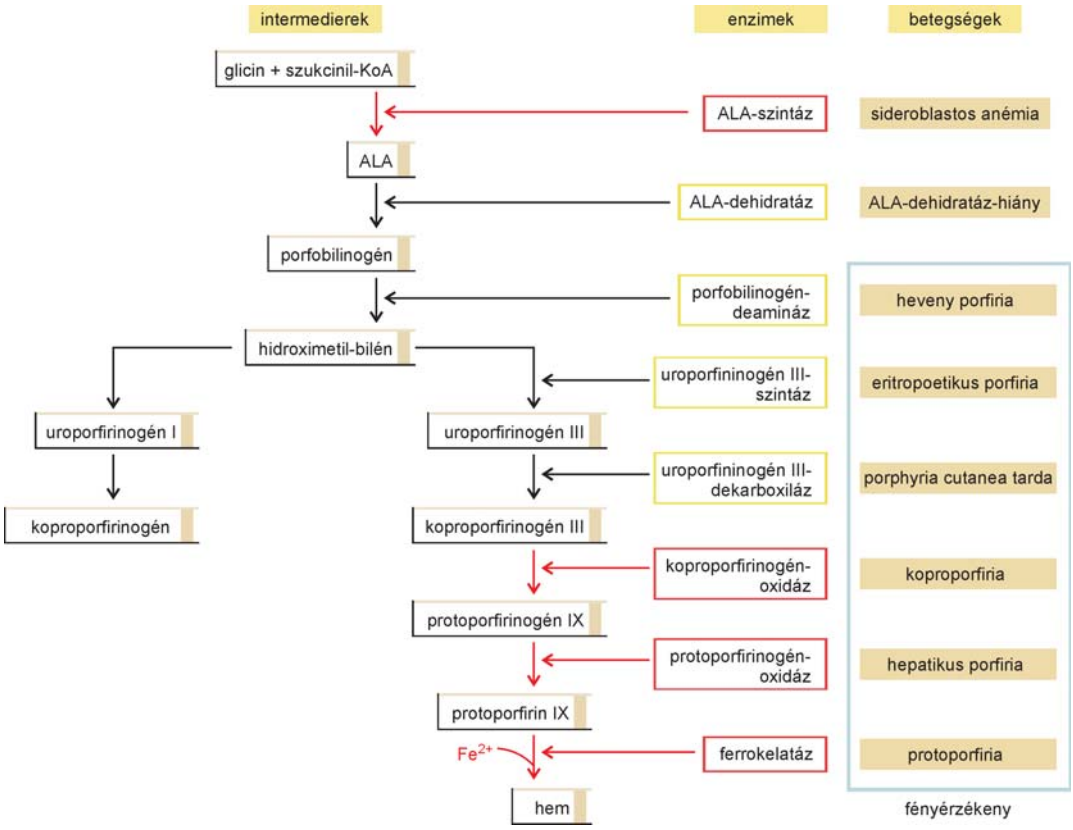


II/13-7. ábra

IREBP vasat köt, és nem kötődik az IRE-szekvenciához, így lehetővé válik az ALA2 transzlációja. Eritroid sejtekben a vasszint a ferrokelatáz expresszióját is szabályozza.

A hemszintézis zavarai, porfíriák

A hemszintézis folyamatában számos köztes anyagcseretermék képződik, ha a hemképződéshez szükséges valamelyik enzim hiányzik vagy elégtelenül működik, az ezt megelőzően keletkező intermedierek felszaporodnak a különböző szövetekben (főleg a csontvelőben, a májban, a vérben, a bőrben és a fogakban). A felszaporodott intermedierek a vizelettel vagy a széklettel kiürülhetnek. Amennyiben a hemszintézis kezdő lépéseinek enzimei kórosak, a hemszintézis elégtelen, így vérszegénység alakul ki. Az ALA felszaporodására a GABA-hoz és a glutamáthoz való hasonlósága miatt neuropszihiátriai kórképek kialakulása a jellemző. A hidroximetil-bilán (HMB) kialakulás utáni enzimdefektusok betegségeit közös néven porfiriáknak nevezzük. A betegség tüneteinek megjelenéséhez bizonyos kiváltó tényezők jelenléte szükséges, mint a stressz, az alkoholfogyasztás, energiaszegény táplálkozás, a hormonkezelés vagy bizonyos gyógyszerek használata. Az enzimhiba helye szerint, beszélhetünk hepatikus és eritropoetikus porfíriákról. Előbbi esetben a hibás enzim a májban, utóbbi esetén az eritropoetikus sejtekben található. A *II/13-8. ábra* összefoglalja a leggyakrabban előforduló enzimdefektusokat. Az uroporfirinogén dekarboxiláz hiánya esetén a reakciót megelőző intermedierek szaporodnak fel, oxidálódnak és lerakódnak a szövetekben és fény (400 nm) hatására gerjesztődnek, molekuláris oxigénnel reagálva oxigén szabadgyököket képeznek,

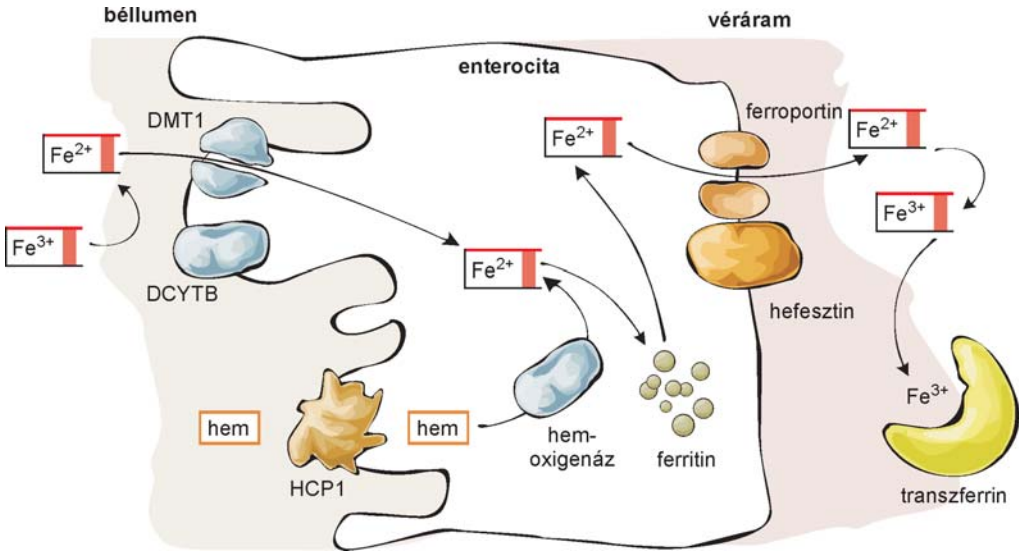


II/13-8. ábra

amelyek különböző sejtkárosodásokat okoznak. A lizoszómális hidrolázok kiszabadulása tehető felelőssé a betegséghez társuló bőrtünetekért. A porfíriáknak egyedi, jellegzetes tünete nincs, ami a diagnózist nagyban megnehezíti. A panaszok nem állandó jellegűek, a betegség lefolyása során, hol erősödnek, hol gyengülnek. A tünetek jelentkezhetnek hirtelen felerősödve, súlyos roham formájában is. Egyes porfiriák esetén főleg idegkárosodás alakul ki, ami fájdalomhoz, vagy akár bénuláshoz is vezet. Más porfiriák főleg hasi görcsöket, fájdalmat és májkárosodást okoznak. A betegség fényérzékenysége miatt gyakori az éjszakai élethez való alkalmazkodás, a bőr és az idegrendszeri elváltozások miatt kialakuló eltérő viselkedés forma (farkasemberek).

II/13.4. VASANYAGCSERE

A vas fontos szerepet játszik az oxigén anyagcserében, a szállítástól a felhasználásig számos folyamatban vesz részt. A különböző reakciókban Fe^{2+} (ferro-) és Fe^{3+} (ferri-)ion formában szerepel. A hem szintézishez szükséges vasat a táplálékból



II/13-9. ábra

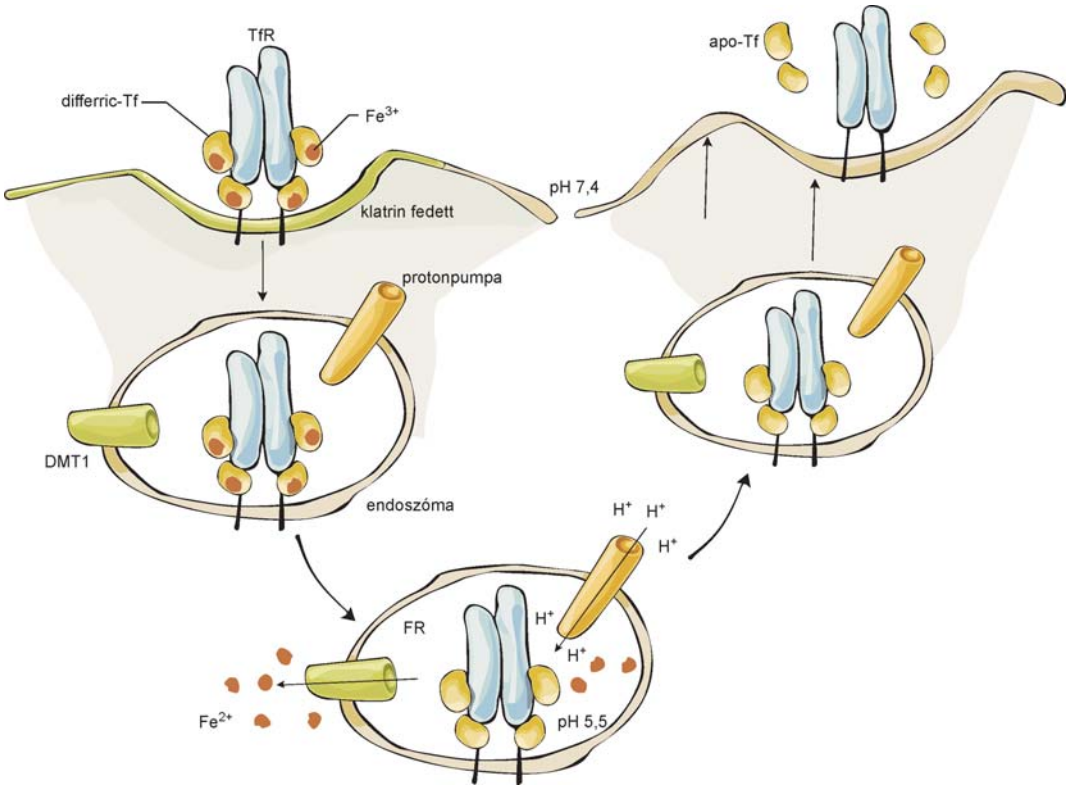
vesszük fel Fe^{2+} formában. A bélhámsejteken keresztüli felszívódásban speciális hemvas (HCP-1; heme carrier protein 1) és nem hemvas (DMT1; divalent metal transporter 1) transzporterek vesznek részt, amelyeken keresztül kétértékű vasion lép be a sejtbe *(II/13-9. ábra)*. A bélben a ferri vasat a duodenális citokróm-b (DCYTB) redukálja, intracelluláris aszkorbátot használva elektrondonorként.

A vasionok az enterocitákban ferritinhez kötve tárolódnak. A ferritin közel 500 kDa molekulatömegű fehérje, amely a vasat Fe^{2+} formában veszi fel és adja le, viszont Fe^{3+} formában tárolja. Az enterocitából a vérplazmába a vas szintén kétértékű vasionként transzportálódik egy ferroportin transzportrendszeren keresztül, majd a hefesztin segítségével oxidálódik és a plazmában három értékű vasionként transzferrinhez kötve szállítódik. A transzferrin a májban szintetizálódó, 80 kDa molekulatömegű glikoprotein, amely két molekula Fe^{3+}-iont köt molekulánként (diferric-Tf). A sejtek felszínén lévő transzferrinreceptorhoz (TfR) kötődik, és receptormediált endocitózissal bekerül a sejtekbe. Az endoszómák kissé savas pH-jának hatására a vas disszociál, és ferritinhez kötődik. A transzferrin-receptor komplex a sejt felszínére helyeződést követően különválik *(II/13-10. ábra)*.

A hem lebontása

A hemtartalmú fehérjék megújulása magában foglalja a hem prosztetikus csoport lebontását (és új szintézisét) is. A metabolizálódó hem legjelentősebb forrása az elpusztuló vörösvértestek hemoglobinja. Fiziológiás körülmények között 10^8 eritrocita pusztul el óránként. Az elöregedett sejteket a retikuloendoteliális rendszer sejtjei felismerik és felveszik. E sejtekben átlagosan 6,5 g hemoglobin bomlik le naponta.

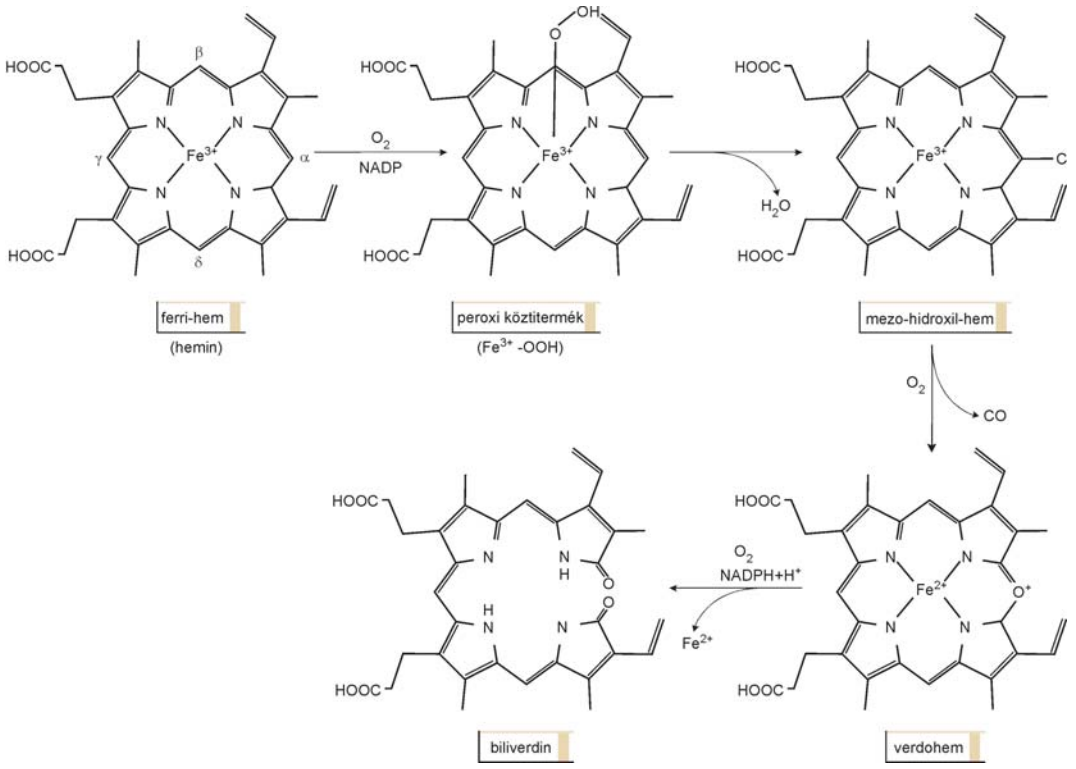
A hemoproteinekből származó hem általában már oxidált állapotban, vagyis Fe^{3+} kötött, hemin formában jut a mikroszomális hem oxigenáz rendszerhez. A hem-oxigenáz (HO) mikroszomális enzimrendszer, amely molekuláris oxigént és NADPH + H^+-t igényel. Az oxigenáz első lépésben NADPH+H^+ felhasználásával át-



II/13-10. ábra

menetileg kétértékűvé redukálja a Fe^{3+}-iont, de azonnal vissza is oxidálja egy molekuláris oxigén hozzákapcsolásával. A következő lépésben a vasionon létrejött peroxid részben hidroxilálja az I. és a II. pirrolgyűrűk közötti metenilhidat, részben víz formájában felszabadul (monooxigenálás). További két O_2 belépésével és egy $NADPH+H^+$ felhasználásával a porfiringyűrű felbomlik, az I. és II. pirrolgyűrűt összekötő metenilcsoport oxidálódott szénatomja CO formában, a vas pedig Fe^{2+}-ionként szabadul fel, és lineáris tetrapirrol, zöld biliverdin képződik *(II/13-11. ábra)*.

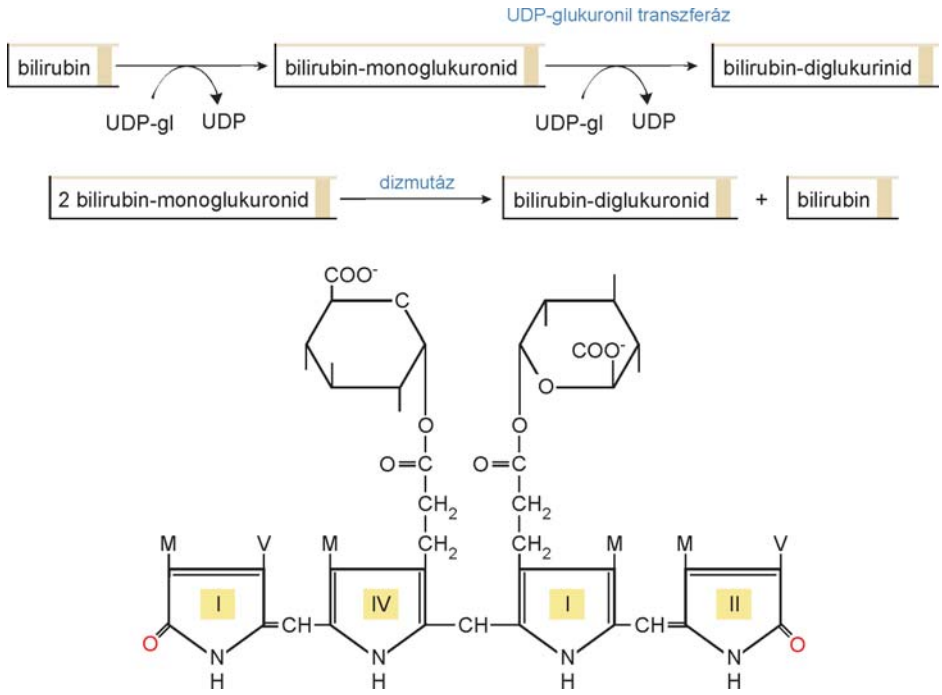
A hem-oxigenáz enzimnek két izoformája ismert, a lépre jellemző HO1 indukálható, főleg az elöregedett vörösvértestek hemoglobinját eliminálja. Az idegszövetre jellemző HO2 nem indukálható, az agy speciális régióira jellemző, ahol fő funkciója a CO mint neurotranszmitter szintézise. A HO reakcióban keletkező biliverdin $NADPH+H^+$ felhasználásával redukálódik, a III. és IV. pirrolgyűrűt összekötő metenilcsoportból metilén alakul ki a biliverdin-reduktáz enzim reakcióban és erős antioxidáns hatású bilirubin (narancssárga színű) keletkezik *(II/13-11. ábra)*. A bilirubin lipidoldékony, és a lipidkörnyezetben keletkező szabadgyökök hatására könnyen visszaoxidálódik biliverdinné, a biliverdin-reduktáz pedig $NADPH+H^+$ jelenlétében ismét bilirubinná alakítja. Így a bilirubin/biliverdin rendszer a lipidfázisban hasonló funkciót tölt be, mint a glutationrendszer a vizesfázisban. A perifériás szövetekben képződött bilirubin ABC transzporteren (MDRP1) keresztül lép ki a sejtből, és alacsony vízoldékonysága miatt a plazmában albuminhoz kötve szállítódik. A májsejtek organikus anion transzporter (OATP) közvetítésével, passzív transzporttal ve-



II/13-11. ábra

szik fel. Az albuminhoz kötött bilirubint indirekt bilirubinnak nevezzük A bilirubin a máj endoplazmás retikulumában UDP-glukuronsavval (UDP-gl) konjugálódik, az UDP-glukuroniltranszferáz egy glukuronsavval észteresíti az egyik (a III. vagy a IV. pirrolgyűrű) propionátcsoportját, és kialakul a bilirubin-monoglukuronid. Ezt követően két útvonal lehetséges, vagy az UDP-glukuronil-transzferáz még egy UDP-glukuronsavval konjugálja a másik propionátcsoportot, és így kialakul a bilirubin-diglukuronid. A másik lehetőség, hogy két bilirubin-monoglukuronidból a dizmutáz enzim közreműködésével kialakul egy bilirubin-diglukuronid és egy bilirubin *(II/13-12. ábra).*

A bilirubin konjugált formáját direkt bilirubinnak nevezzük. A bilirubin-diglukuronid aktív transzporttal (ABC multidrog transzporter = MRP2) kerül az epébe, ez a porfirinlebontás sebességmeghatározó lépése. A bélben bélbaktériumok hatására a bilirubin-diglukuronid hidrolizál, majd a vinilcsoportok etilcsoportokká redukálódnak, egy újabb redukció (a gyűrűk közötti kettős kötések telítődnek) hatására urobilinogén alakul ki. A színtelen, vízoldékony urobilinogén egy része visszaszívódik, és a vena portae-n keresztül a májba, majd a vesébe kerül, ahol oxidálódik és urobilin (sárga) formában ürül. A bélben visszamaradt urobilinogén részben urobilinné, részben szterkobilinné (sötét barnásvörös) alakul, és a széklettel ürül *(II/13-13. ábra)*.

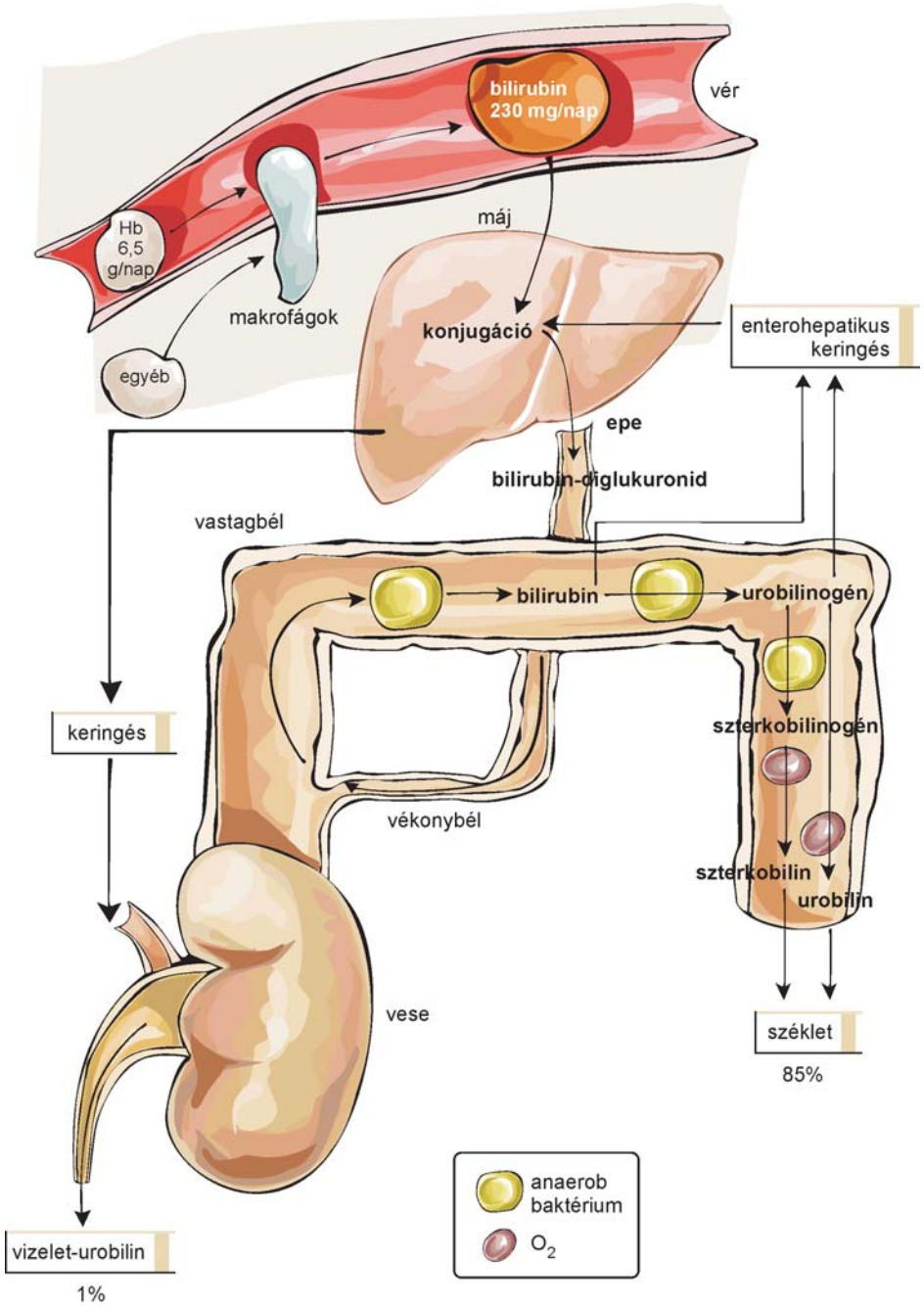


II/13-12. ábra

Hemlebontás zavarai

A porfirin-anyagcsere zavarai sárgaságot (icterust) okozhatnak, ami a bilirubin felszaporodásának következménye. A betegség leggyakoribb oka a vörösvértestek fokozott szétesése, vagy a máj elégtelen működése.

A vörösvérsejtek fokozott szétesése esetén emelkedik a vérben a nem konjugált indirekt bilirubin mennyisége, ez akkor okoz sárgaságot, ha a keletkezett bilirubin mennyisége meghaladja a máj konjugációs kapacitását. Újszülöttekben az ún. fiziológiás sárgaság oka, hogy a májban még nem expresszálódtak az UDP-glukuronil-transzferázok és a transzport rendszerek fehérjéi. A kórosan magas bilirubinszint (20–25 mg/dl; ami meghaladja az albumin kötőkapacitását) veszélye, hogy a bilirubin penetrál a vér-agy gáton és az idegsejtekbe, asztrocitákba kerül felvételre, ahol szabadgyök-képződést, apoptózist indukál, ami mozgáskoordináció zavarokhoz, mentális retardációhoz vezet. A konjugálatlan bilirubin felhalmozódását okozhatja a bilirubin-UDP-glukuroniltranszferáz veleszületett hiánya vagy csökkent működése (Crigler–Najjar-kór), illetve alacsonyabb expressziója (Gilbert-kór), de kialakulhat különböző mérgezések okozta májkárosodásokban is. A konjugált bilirubin felszaporodása legtöbbször epevezeték elzáródásának a következménye, de előfordul a konjugált bilirubin szekréciójáért felelős MRP2 transzporter elégtelen működése esetén is (Dubin–Johnson-kór).


bilirubin
230 mg/nap
vér
Hb
6,5
g/nap
máj
makrofágok
konjugáció
enterohepatikus
keringés
egyéb
epe
bilirubin-diglukuronid
vastagbél
bilirubin
urobilinogén
szterkobilinogén
keringés
vékonybél
szterkobilin
urobilin
vese
széklet
85%
anaerob
baktérium
O2
vizelet-urobilin
1%

II/13-13. ábra

II/14.
A nukleotidok anyagcseréje

Keszler Gergely

A nukleotidok biológiai jelentősége sokrétű: egyrészt a genetikai információt hordozó és átadó nukleinsavak építőkövei, másrészt nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a bioenergetikában (ATP), a jeltovábbításban (ciklikus AMP és GMP, ADP-ribóz), több koenzim felépítésében (NAD, NADP, FAD, koenzim-A), illetve bioszintetikus utak kiinduló vegyületeinek aktiválásában (UDP- és GDP-cukrok, CDP-alkoholok és CDP-DAG). Biológiai jelentőségük miatt alapvetően az összes magvas sejt képes előállításukra, egymásba történő átalakításukra és lebontásukra. A jelen fejezetben ezen folyamatok biokémiáját és szabályzását tekintjük át, illetve röviden összefoglaljuk a nukleotidok nevezéktanát és legfontosabb szerkezeti tulajdonságait.

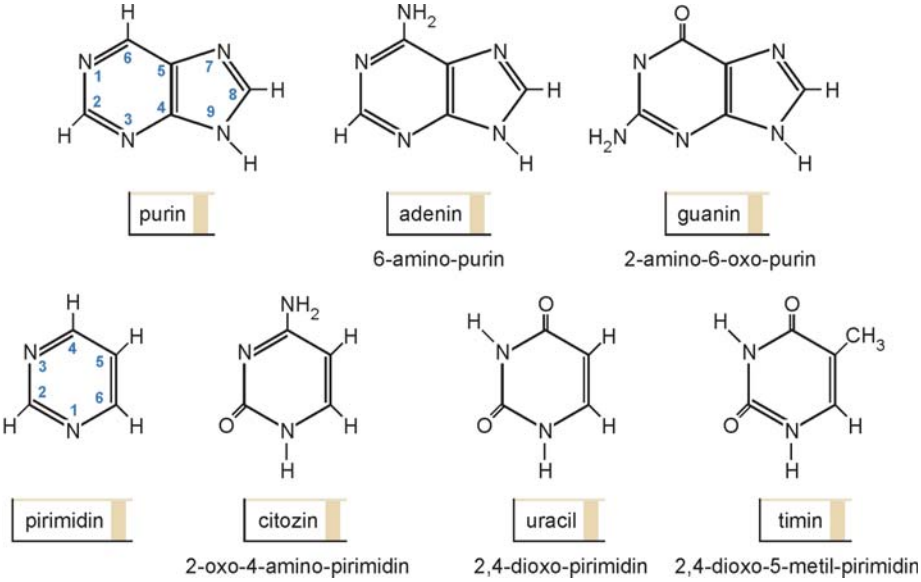
A nukleotid-anyagcsere ismerete a gyakorló orvos számára különösen az enzimhiányon és/vagy kóros szabályzáson alapuló kórképek hátterének, illetve a daganatok kezelésében alkalmazott antimetabolitok támadáspontjának és hatásmechanizmusának megértése miatt kiemelt jelentőségű.

II/14.1. A NUKLEOTIDOK FELÉPÍTÉSE

A nukleotidok három alkotóelemet tartalmaznak: egy szubsztituált, nitrogéntartalmú heterociklusos purin- vagy pirimidingyűrűt (nukleobázis, röviden bázis), egy aldopentózt (β-D-ribózt vagy 2-dezoxiribózt), illetve foszforsavmaradékokat, amelyeket az egyszerűség kedvéért foszfátcsoportoknak nevezünk. A legfontosabb purin- és pirimidinvázas bázisokat és azok szisztematikus elnevezését, illetve a gyűrűt alkotó atomok számozását az *II/14-1. ábra* tartalmazza; a transzfer-RNS-ekben előforduló ritka bázisokról a transzkripciót taglaló fejezet nyújt bővebb információt. A bázisok oxo-enol tautomériát mutatnak, a stabilisabb oxo-formát laktámnak, az enol-tautomert laktimnak nevezzük.

A purintartalmú bázisok 9-es, illetve a pirimidinek 1-es helyzetű nitrogénatomja β-N-glikozidos kötéssel kapcsolódik a cukorkomponens furanózgyűrűjének 1' szénatomjához (a cukorváz szénatomjait vessző segítségével különböztetjük meg a bázisok gyűrűrendszerét felépítő atomok számozásától). A bázis és a pentóz egységét nukleozidnak nevezzük. A β-N-glikozidos kötés, mint szabad forgástengely miatt számtalan konformációs izomer jöhet létre. A termodinamikailag legstabilabb térállást, amikor a sík alkatú bázis a lehető legtávolabbra kerül a boríték alkatú cukorgyűrűtől, *anti* konformációnak hívjuk, míg a legkedvezőtlenebb (együtt)állás a *syn* elnevezést kapta.

A nukleotidokat foszfátcsoport(ok)kal szubsztituált nukleozidként is lehet definiálni, elnevezésük legalábbis ezt az elvet tükrözi (nukleozid-mono-, di- és trifoszfát, ám egyes képviselőik háromnál több foszfátcsoportot is tartalmazhatnak). A nukleozid-monofoszfátokat az -át végződéssel is megnevezhetjük (pl. adenilát), amely a foszforsavmaradék jelenlétéből fakadó gyengén savas tulajdonságát emeli ki.



II/14-1. ábra
A legfontosabb purin- és primidinbázisok szerkezete

A biológiailag legfontosabb nukleotidokban valamennyi foszfátcsoport az 5'-szénatomhoz kapcsolódik. Az α-val jelölt első foszfátcsoport és az 5'-hidroxil-csoport között egy észterkötés, míg az α- és a β-, illetőleg a β- és a γ-foszfát-csoportok között magas csoportátviteli potenciállal bíró savanhidridkötések alakulnak ki.

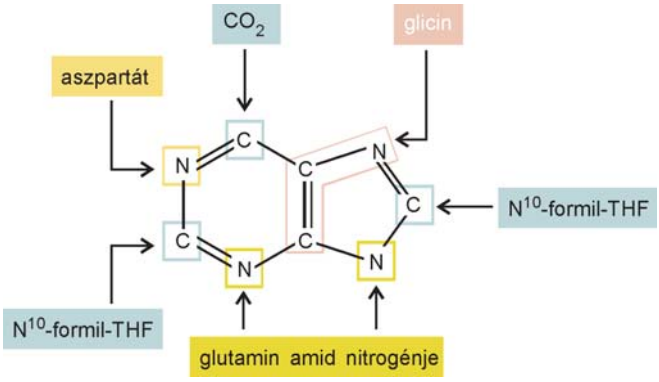
II/14.2. A NUKLEOTIDOK BIOSZINTÉZISE

A nukleotidok szintézise két, egymástól alapvetően eltérő stratégiát követve történhet. A *de novo* szintézis lényege, hogy a molekulát egy viszonylag hosszú és nagyon energiaigényes reakcióút enzimei segítségével, lépésről lépésre (a bázisokat gyakorlatilag atomonként) építjük fel. A másik, jóval egyszerűbb, gazdaságosabb és gyorsabb megoldás a nukleotidok lebomlásakor keletkezett, de kémiailag ép és sértetlen bázisok, illetőleg nukleozidok újrahasznosításán alapul; az ehhez szükséges reakciókat a mentő (salvage) enzimek katalizálják. A mentő utak csak monocitákban, limfocitákban granulocitákban, illetőleg a központi idegrendszerben játszanak lényeges szerepet, elsősorban a DNS-hibajavítás nukleotidszükségletét fedezik. Az osztódó sejtek genomjának megkettőződéséhez szükséges óriási mennyiségű nukleotidot csak a nagyságrendekkel nagyobb kapacitású *de novo* bioszintézis biztosíthatja.

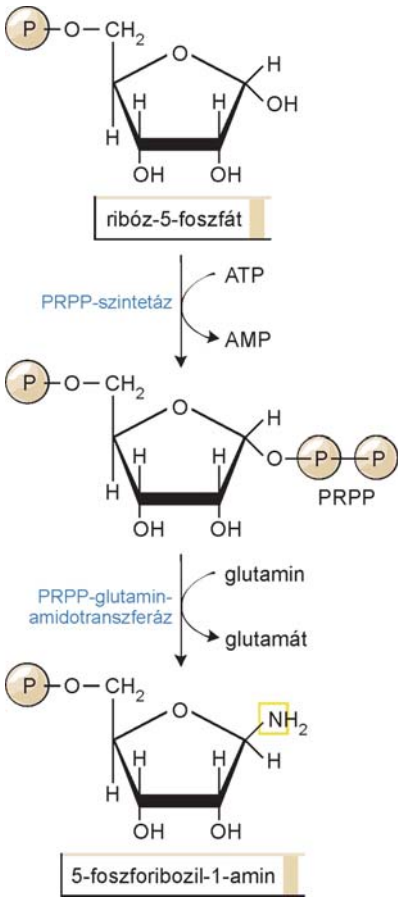
A továbbiakban először a purin és pirimidin nukleotidok de novo szintézisének tárgyalására kerül sor, amelyet a dezoxiribonukleotidok, majd a timin nukleotidok előállításának megbeszélése, majd a mentő utak bemutatása követ.

A purinok és pirimidinek de novo szintézise közötti alapvető különbség az, hogy míg a puringyűrű a ribózt mint hordozó platformot felhasználva, annak 9-es helyzetű nitrogénatomjához kötődve, atomonként épül fel, addig a pirimidinek esetében a már elkészült pirimidinvázhoz fog a ribóz rögzülni.

A purin nukleotidok *de novo* bioszintézise



II/14-2. ábra
A puringyűrűt alkotó atomok eredete



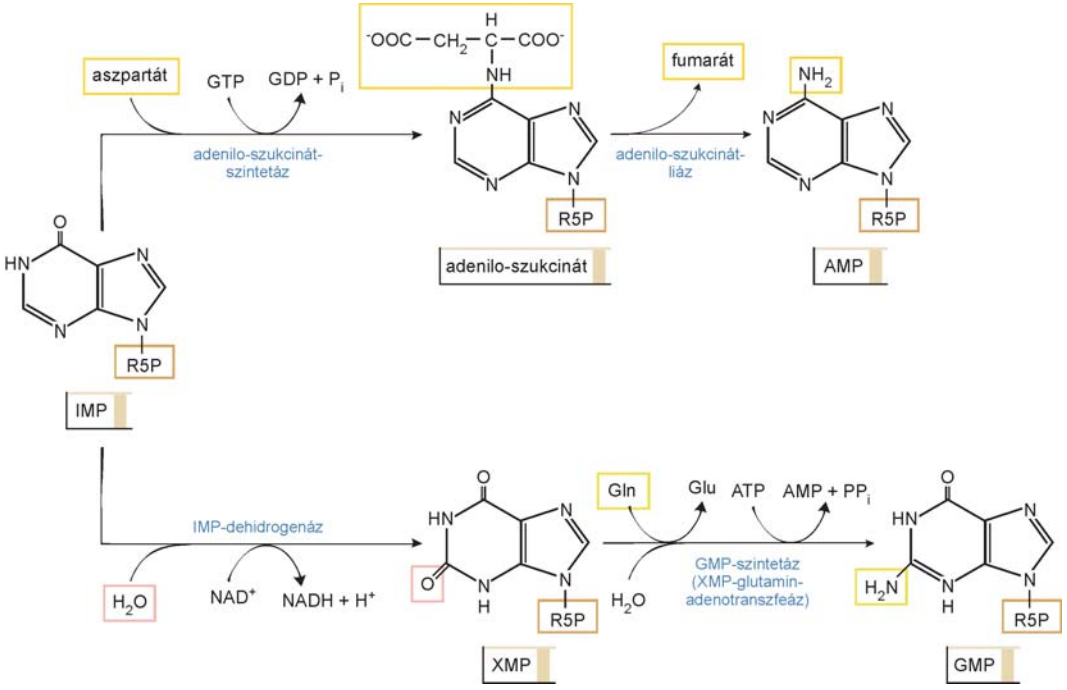
II/14-3. ábra
A purinok de novo bioszintézisének kezdeti (szabályozott) lépései

A purinváz szintézise összesen tíz enzim, számos ATP-molekula és redukáló ekvivalens közreműködését igényli; ezt a folyamatot részleteiben nem tárgyaljuk, csak a szabályozott lépéseket emeljük ki. A puringyűrűt felépítő atomok eredete a *II/14-2. ábrá*ról olvasható le. Kiemelendő, hogy míg a glicinmolekula egésze beépül a purinvázba, addig az aszpartát és a glutamin „csupán" nitrogéndonorként működnek közre, a szén-dioxid-molekula beépítése pedig sem ATP, sem biotin-kofaktor jelenlétét nem igényli.

A purinvázat hordozó ribózgyűrű a glukóz direkt oxidációja révén ribóz-5-foszfát formájában keletkezik, amely ATP segítségével aktiválódik, létrehozva a purinszintézis nagy energiájú kötést tartalmazó kiindulási vegyületét, az 5'-foszforibozil-1'-pirofoszfátot (PRPP). A reakciót a PRPP-szintetáz katalizálja *(II/14-3. ábra)*. A PRPP azonban a pirimidinbázisok *de novo* szintéziséhez, illetve a bázismentő reakciókhoz is szükséges, így a purinszintézis elkötelező és egyben első irreverzibilis lépésének a PRPP-glutamin-amidotranszferázt tekinthetjük, amely pirofoszfát lehasítása mellett a purinváz leendő 9-es N-atomját a ribóz gyűrűjére helyezi *(II/14-3. ábra)*.

A szintézis során elsőként keletkező, teljes purinvázat tartalmazó vegyület az inozinsav (IMP), amely az adenin és guanin nukleotidok közös kiindulási vegyülete *(II/14-4. ábra)*. Az IMP a GTP-függő adeniloszukcinátszintáz és az adeniloszukcinátliáz enzimek által katalizált reakciókban AMP-vé alakul. Az adenin 6-os helyzetű aminocsoportja tehát aszpartátból származik, az

aszpartát szénváza pedig fumarátként távozik, amint azt az ureaciklusban is megfigyelhettük. A GMP szintézise a NAD-függő IMP-dehidrogenáz és a GMP-szintetáz enzimek közreműködését igényli; utóbbi nitrogéndonorként glutamint használ, energiaigényét pedig ATP hasításával fedezi *(II/14-4. ábra)*. Az így keletkezett AMP és GMP két egymást követő transzfoszforilációs reakcióban alakul át biológiailag aktív trifoszfátokká. A reakciókat a specifikus adenilát-, illetve guanilát-kináz, illetve a nem specifikus, valamennyi ribo- és dezoxiribonukleozid-difoszfátot foszforiláló nukleozid-difoszfát-kináz katalizálja.



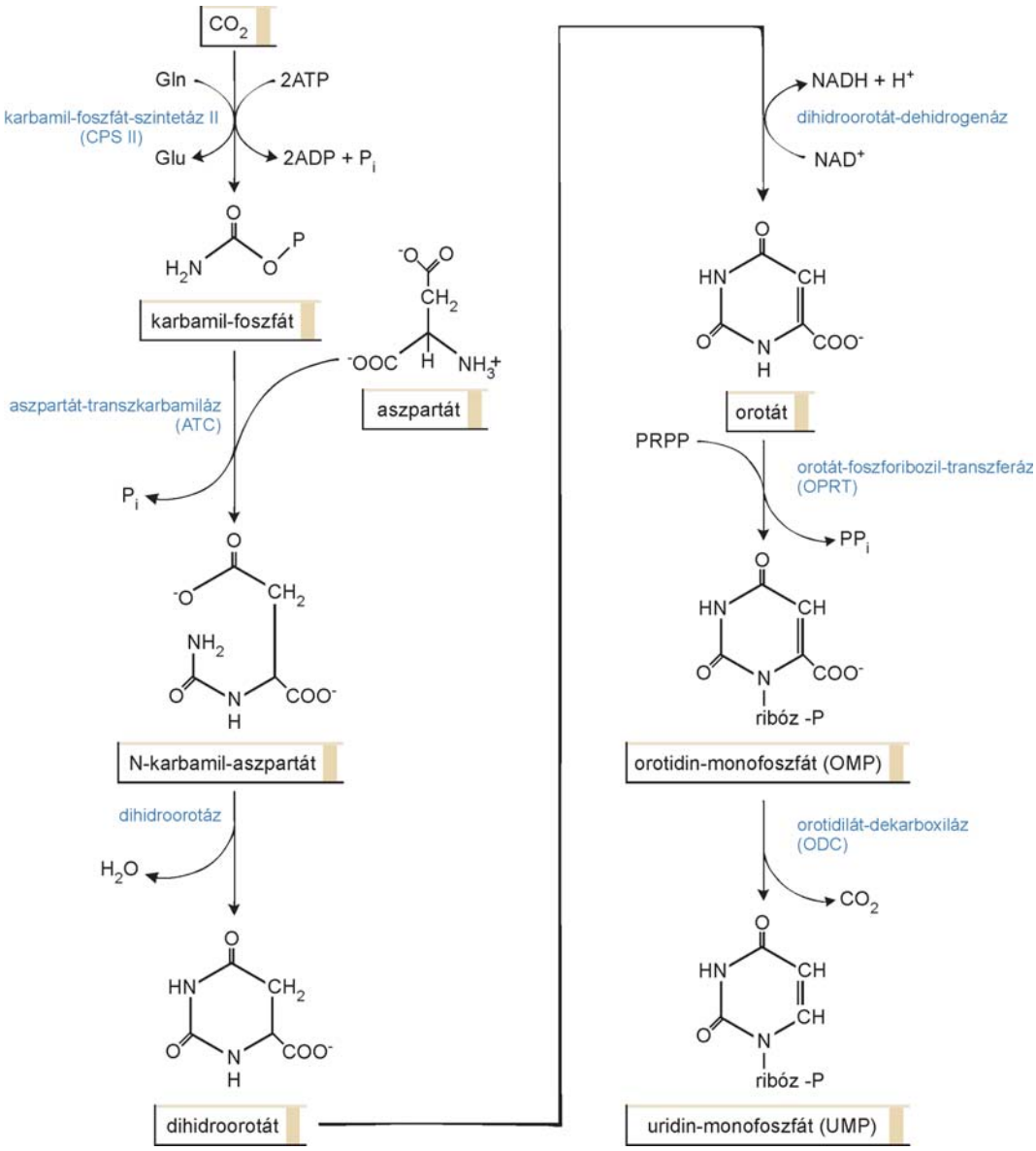
II/14-4. ábra
Az AMP és a GMP szintézise IMP-ből

A *de novo* purinbioszintézis szabályzásában döntően allosztérikus termékgátláson alapuló negatív visszacsatolási körök érvényesülnek. Az AMP az adenilo-szukcinát-szintetáz, míg a GMP az IMP-dehidrogenáz feedback gátlásán keresztül a saját szintézisét gátolhatja; ezen túlmenően az IMP, az AMP és a GMP egyaránt csökkenti a PRPP- glutamin-aminotranszferáz aktivitását, míg a PRPP-szintetáz adenin nukleotidokkal gátolható. Ugyanakkor a PRPP a PRPP-glutamin-amidotranszferázt feed-forward aktiválja. Az AMP képződésének energiaigényét GTP fedezi, a GMP kialakulása pedig ATP-t igényel; ez a kölcsönös energiafüggés az adenin és guanin nukleotidok arányának egyensúlyát biztosítja a purin nukleotid-poolon belül.

A pirimidin nukleotidok *de novo* bioszintézise

A reakcióút során először UMP jön létre, amelyből rövid úton CTP alakítható ki, a timin nukleotidok szintézisének előfeltétele viszont a dezoxiribonukleotidok létrejötte, amit a következő alfejezet tárgyal.

Az UMP hat enzimatikus lépésből álló bioszintézisét az *II/14-5. ábra* illusztrálja. A pirimidingyűrű atomjai glutaminból (N3), szén-dioxidból (C2), illetve aszpartátból

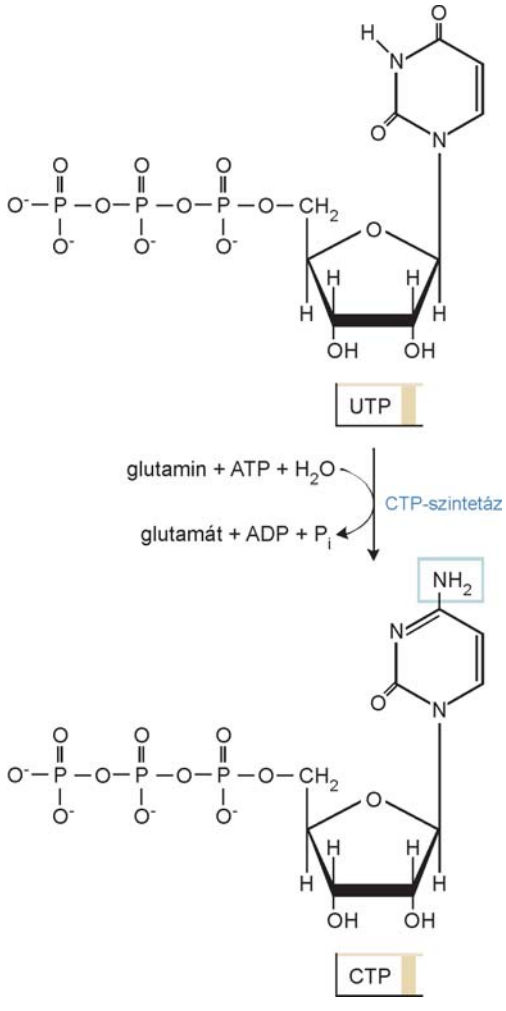


II/14-5. ábra
A pirimidingyűrű de novo szintézisének folyamata

származnak (N1, C4-6). A kiindulási reakciót katalizáló karbamil-foszfát-szintetáz-II a glutamin amid-nitrogénjéből és szén-dioxidból ATP energiájának felhasználásával nagy energiájú karbamil-foszfátot hoz létre, amelyet az aszpartát-transzkarbamiláz aszpartáttal egyesít, majd a keletkező karbamil-aszpartát atomjait a dihidroorotáz egy vízmolekula kiléptetésével zárja dihidroorotáttá, amely egy telitett (redukált) pirimidingyűrűt tartalmaz. A bázis-előalaknak tekinthető orotsav a NAD-függő dihidroorotát-dehidrogenáz hatására jön létre dihidroorotsavból. Az orotsav ezt követően a foszforibozil-pirofoszfátból származó ribózfoszfát-egység átvételével alakul nukleotiddá (orotidinsav, OMP). Az UMP végül az orotidilát dekarboxilációjával jön létre. A hat enzimatikus lépés közül az első három a citoszolban, a dihidroorotát-dehidrogenáz-reakció a mitokondriumban, míg a két utolsó reakció ugyancsak a citoszolban játszódik le. A reakciósor első három enzime egy közös polipeptidlánc három különböző szakaszán (doménjében) található; ezt a multifunkciós enzimet a három aktivitás angol kezdőbetűinek összeolvasásával CAD-komplexnek nevezzük. Hasonló jelenséget figyelhetünk meg az orotát-foszforiboziltranszferáz és az OMP-dekarboxiláz esetében is; e két enzimaktivitást hordozó polipeptidláncot az UMP-szintáz névvel illetik. Több, egymáshoz funkcionálisan kapcsolt enzimaktivitás közös fehérjében való elhelyezkedése sokszorosára növelheti a reakciók hatékonyságát azáltal, hogy az egyik enzim a termékét közvetlenül átirányíthatja a másik enzim aktív centrumához („substrate channeling"), vagyis a közös metabolit nem diffundál az enzim felszínéről, így lokálisan nagyon magas koncentrációt ér el. Hasonló jelenséget egyébként a de novo purinszintézis enzimei között is megfigyelhetünk.

A citidin nukleotidok az UMP foszforilációjával létrejövő UTP-ből keletkeznek a CTP-szintetáz segítségével *(II/14-6. ábra).* A reakció ATP-igényes, nitrogéndonorként pedig glutamint használ.

A karbamil-foszfát-szintetáz két izoenzime közül az I-es az ureaciklus sebességmeghatározó lépését, míg a II-es izoenzim a pirimidinek *de novo* szintézisének elkötelező, szabályozott lépését katalizálja. Az I-es izoformával szemben a II-es izoenzim nem a mitokondrium mátrixában, hanem a citoplazmában található, nitrogéndonorként nem szabad ammónia, hanem glutamin szolgál, aktivitását pedig az UTP gátolja, míg a PRPP – a purinszintézishez hasonlóan – aktivátorként működik. Az aszpartát-transzkarbamiláz az allosztérikus enzimek egyik modelljeként szolgál; aktivitását a CTP gátolja, viszont ATP jelenlétében ez a gátlás felfüggesztődik (vagyis egy purin nukleotid magasabb koncentrációja elősegíti a pirimidin nukleotidok szintézisét, hogy a nukleotidpoolok aránya kiegyenlítődhessen). A CAD-komplex mitogén hatásra bekövetkező foszforilációja a PRPP iránti affinitást növeli, míg az UTP iránti affinitást



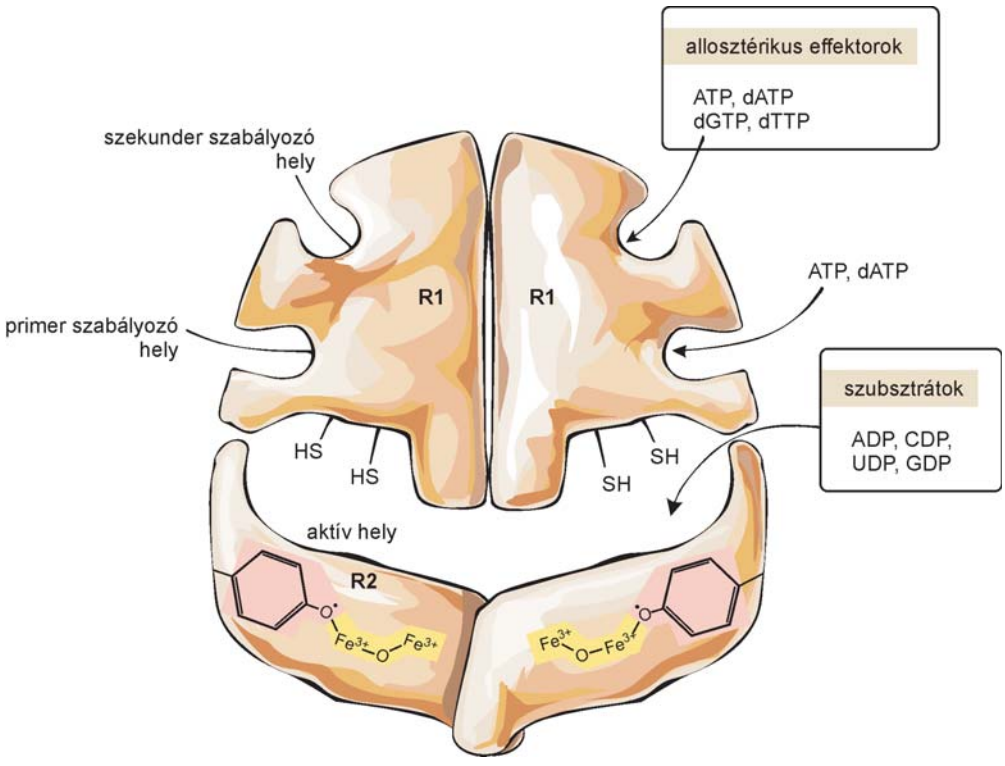
II/14-6. ábra
A CTP szintézise UTP-ből

csökkenti. A CTP-szintetázt a CTP negatív visszacsatolással gátolja, a GTP viszont allosztérikusan aktiválja, aminek a purin- és pirimidin-poolok egyensúlyának fenntartásában van szerepe.

A pirimidinszintézist érintő leggyakoribb öröklött kórkép az orotsavuria, amelynek hátterében leggyakrabban a bifunkcionális UMP-szintáz valamelyik enzimaktivitásának teljes vagy részleges defektusa áll. Ilyenkor uracil nukleotidok nem keletkeznek, a CPS II felszabadul a gátlás alól, ami a metabolikus blokk miatt az orotsav túltermelését és a vizelettel való fokozott ürítését eredményezi. Érdekes módon az ornitin-transzkarbamiláz hiányával fémjelzett II-es típusú hiperammonémia is orotsavuriát okozhat, ugyanis a mitokondriumok mátrixában termelődő, de az ureaciklusban továbbalakulni képtelen karbamil-foszfát a belső membránon át a citoplazmába diffundál, ahol a pirimidin-szintézisbe csatlakozva fokozott orotsavtermelést eredményez.

A dezoxiribonukleotidok szintézise

A sejtekben a különböző ribonukleozid-trifoszfátok koncentrációja jellemzően a millimólos tartományban mozog, s bár a dezoxiribonukleotidoké ennél 2-3 nagyságrenddel kisebb, jelentőségük a DNS-szintézis és hibajavítás szempontjából mégis kiemelkedően fontos. A dezoxiribonukleotidok szintézisének alapelve, hogy nem szabad ribóz alakul át dezoxiribózzá, hanem a már elkészült ribonukleotidok ribózegysége redukálódik dezoxiribóz-egységgé. Az átalakulás kulcsenzime a ribonuk-



II/14-7. ábra
A ribonukleotid-reduktáz alegységei és szabályozása

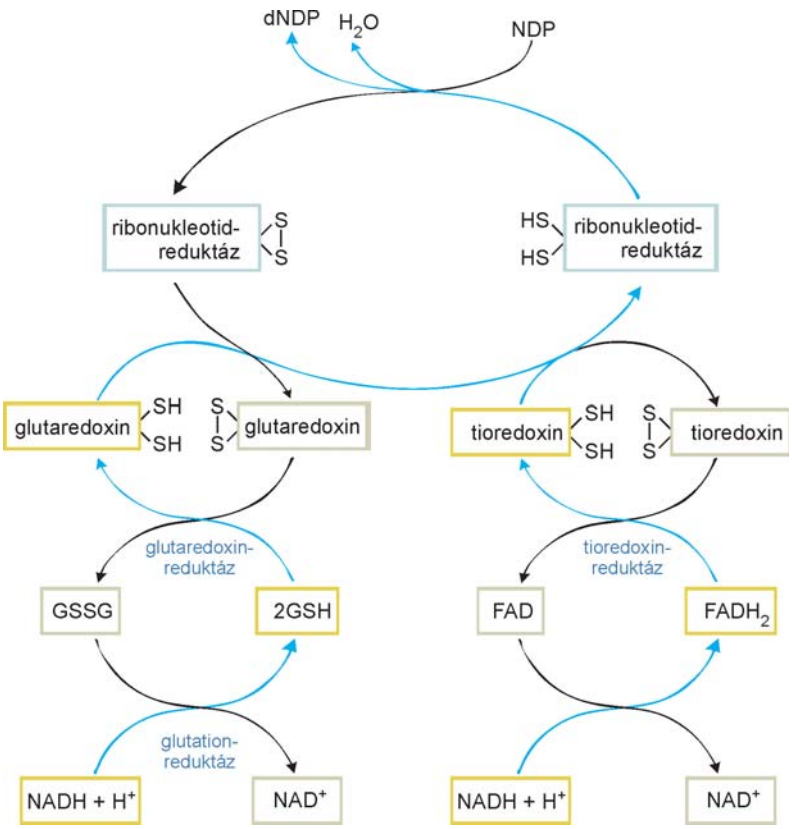
leotid-reduktáz (RR), amely kizárólag ribonukleozid-difoszfátokat (ADP, GDP, UDP és CDP) képes a megfelelő dezoxi-származékokká átalakítani. Az enzim kétbetűs akronimja azért is találó, mert annak alegységszerkezetét (R1 és R2 polipeptidláncok) is tükrözi.

A reakció lényege, hogy a ribonukleotidok 2'-hidroxil-csoportjának oxigénatomja a NADPH által szolgáltatott két hidrogénatommal vizet képezve eliminálódik, így 2'-dezoxiribonukleozid-difoszfátok keletkeznek, amelyeket a nukleozid-difoszfátkináz tovább foszforilálva dNTP-okká alakít.

A ribonukleotid-reduktáz nettó reakcióegyenlete tehát a következő:

$$NDP + NADPH + H^+ \rightarrow dNDP + NADP^+ + H_2O$$

Valójában a reakció mechanizmusa jóval összetettebb, és redukáló ekvivalensek transzportláncát is magában foglalja. Az aktív enzim két R1 és két R2 peptidláncból álló tetramer, amelyben egy-egy R1-R2-pár összesen két aktív centrumot képez. Az R1 alegységen fontos cisztein-oldalláncok találhatók, míg az R2 alegységek hordozzák a katalízis szempontjából nélkülözhetetlen tirozin-szabadgyököt, amelyhez két, oxigénhez kötött vas(III)-ionra is szükség van *(II/14-7. ábra)*. A tirozin-szabadgyök támadása indítja el az oxigénatom eliminációját, amelyhez a hidrogénatomokat az R1 cisztеinjei biztosítják. A diszulfidhíddá oxidálódott SH-csoportok újraaktiválását baktériumokban a tioredoxin vagy a glutaredoxin, emberben inkább ez utóbbi fehérje SH-csoportjai biztosítják *(II/14-8. ábra)*. A redox segédfehérjék visszaredukálását a tioredoxin-reduktáz nevű flavoprotein, illetve a glutation kofaktorral működő glutaredoxin-reduktáz biztosítja. A redukcióhoz szükséges hidrogénatomok forrása végső soron a NADPH. Ez a tény aláhúzza a glukóz direkt oxidációjának jelentőségét osztódó sejtekben, hiszen az oxidatív szakasz révén ribóz és NADPH egyaránt keletkezik.



II/14-8. ábra
A ribonukleotid-reduktáz működése

Az enzim R1-alegységének expressziója konstitutív, míg

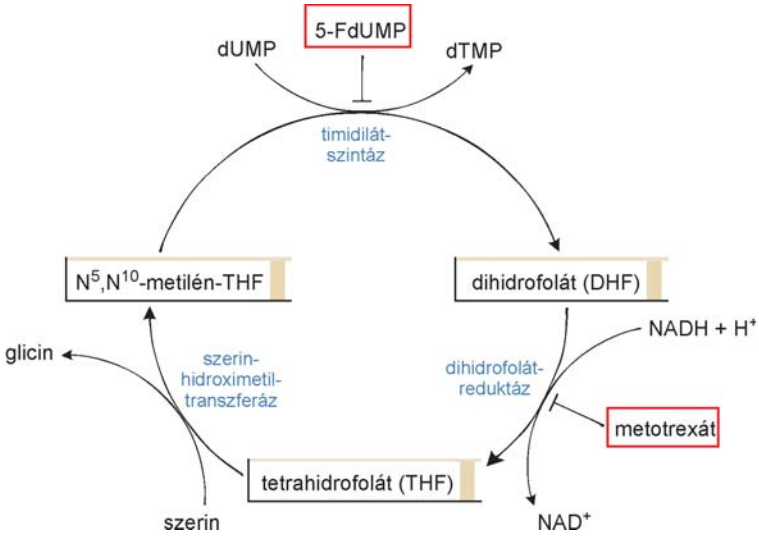
az R2 csak osztódó sejtekben fejeződik ki, mert promotere a sejtciklus S-fázisában aktív E2F transzkripciós faktor kötőhelyét tartalmazza. A RR aktivitása tehát a dezoxiribonukleotid-szükséglettel szigorúan arányos. A közelmúltban a p53R2 elnevezésű R2-izoformát is leírták, amelynek promoterét a DNS-károsodás esetén magas aktivitást mutató p53-fehérje transzaktiválja. A p53R2 változatot tartalmazó RR elsősorban a DNS-károsodások kijavításához szükséges dezoxiribonukleotidokat szolgáltatja.

A DNS szintéziséhez szükséges dNTP-építőkövekre megközelítőleg azonos arányban van szükség; az egyenletes szubsztrátellátásért, a dNTP-poolok egyensúlyáért a RR bonyolult, többszintű allosztérikus szabályozási mechanizmusai a felelősek. Az R1 alegység két allosztérikus kötőhellyel rendelkezik; a primer szabályzó helyen az ATP valamennyi NDP redukcióját serkenti (a sejt energiaállapota megfelelő a DNS osztódásához), a dATP viszont az enzimaktivitás valamennyi szubsztrátra kiterjedő erős gátlását okozza (ezt használhatjuk ki a tumoros sejtosztódást gátló, a dATP-vel megegyező hatást kiváltó dATP-analógokkal, pl. a 2-klór-2'-dezoxi-ATP-vel). Az R1 másik, szekunder, ún. szubsztrátspecificitást meghatározó allosztérikus szabályzó helye biztosítja, hogy a dezoxipurin és dezoxipirimidin nukleotidpoolok aránya megfelelő legyen *(II/14-7. ábra).* Ennek értelmében az ide kötődő dATP a pirimidinszubsztrátok átalakulását serkenti, míg a dTTP éppen fordítva viselkedik: gátolja a pirimidinek és elősegíti a GDP redukcióját. A dGTP mind a saját, mind a pirimidin-dNDP-k keletkezését elnyomja, az ADP redukcióját viszont stimulálja (dezoxipurinpoolok egyensúlya!).

A timin nukleotidok keletkezése

Bár timinbázis található a tRNS-ben is, ez az uracilbázis poszttranszkripciós módosulásának eredménye. Timidilát beépülése tehát csak a DNS-szintézis során fordul elő, vagyis döntően dezoxiribozil formában keletkezik, emiatt a RR katalizálta reakció bemutatását követően tárgyaljuk. A timidilát-szintézis kiindulási anyaga a dUMP, amely a RR által szintetizált dUDP-ből két lépésben keletkezik: a dUDP-t a nukleozid-difoszfát-kináz dUTP-vé foszforilálja, utóbbiból pedig a dUTPáz (dUTP-pirofoszforiláz) egy pirofoszfátion lehasításával dUMP-t szintetizál (a dUTPáz további jelentősége, hogy a dUTP koncentrációját alacsonyan tartva megakadályozza annak beépülését a DNS-be). Az elsőként szintetizált timin nukleotid a dTMP, amely a timidilát-szintáz segítségével, a dUMP uracilgyűrűjének 5-ös helyzetben történő metilációjával keletkezik *(II/14-9. ábra).* Várakozásainkkal ellentétben azonban a metildonor az S-adenozil-metionin helyett az N^5, N^{10}-metilén-tetrahidrofólsav. Ebben a reakcióban a fólsav a metiléncsoportján kívül egy további hidrogénatomot is átad, így dihidrofólsavvá alakul, amelyet a dihidrofolát-reduktáz NADPH terhére alakít vissza a C_1-töredékek szállítására képes tetrahidrofólsavvá. Utóbbi a szerin vagy glicin aminosavak szerin-hidroximetil-transzferáz, illetve glicin hasító enzim katalizálta bontásából származó metiléncsoport felvételével alakul vissza egy további dTMP szintézisére képes metildonorrá. A timidilát-szintáz-reakció tehát voltaképpen a fentiekben bemutatott folátciklus egy kiemelkedően fontos lépése, amelynek pillanatnyi aktivitását a metilén-tetrahidrofolát rendelkezésre álló mennyisége döntő mértékben meghatározza. Ezzel magyarázható, hogy a folátanyagcsere rendellenességei súlyos zavarokat okozhatnak a DNS szintézisében (ezt látjuk a fólsavhiány következtében kialakuló vészes vérszegénység esetében), illetőleg a folátciklus gátlásával előidézett timinhiány következtében a sejt apoptotikus programja is aktiválódik (thymineless cell death). Ez utóbbi jelenséget indukálják a daganatterápiában használt fontos antimetabolitok, többek között a timidilát-szintázt gátló 5-fluoro-uracil, amelyet jó eredménnyel alkalmaznak szolid tumorok kezelésére, illetve a

dihidrofolát-reduktázt bénító aminopterin és amethopterin (metotrexát) folsav-antagonisták, amelyekkel az akut leukémiák kezelésében sikerült döntő áttörést elérni *(II/14-9. ábra).* Az 5-fluoro-uracilt a célsejtekben az orotát-foszforibozil-transzferáz alakítja 5-fluoro-UMP-vé. Az 5-F-UMP-ből pedig kinázok, a ribonukleotid-reduktáz és a dUTPáz közreműködésével keletkezik az 5-FdUMP aktív metabolit, amely a timidilát-szintáz katalitikus centrumához kovalensen kötődve irreverzíbilisen bénítja annak aktivitását.



II/14-9. ábra
A timidilát szintézise, a folátciklus és gátlószerei

A timin nukleotidok túltermelése a sejtciklus gátlásához vezet. Ezt elkerülendő, a timidilát-szintáz fehérje mind a saját, mind a p53 tumorszuppresszor mRNS-éhez kötődik, és azok transzlációját akadályozza. Így nem termelődik több timidinsav, és a p53 sem fogja a sejtciklust megállítani, illetve apoptózist indukálni.

Mentő (salvage) reakciók

A mentő reakciók a lebontástól megmentett bázisok, illetve nukleozidok nukleotidokká történő visszaalakításán alapulnak. A szabad bázisok és nukleozidok elsősorban a sejten belüli nukleinsav-lebontás termékei, de a táplálékkal felvett és a hasnyálmirigy-nukleázok, -nukleotidázok és -nukleozidázok által felszabadított, majd a béltraktusból a keringésbe felszívódott nukleozidok és szabad bázisok is elérhetők a mentő reakciók számára. A bázis, illetve nukleozid újrahasznosítására kétféle reakciótípus létezik: az egy lépésben végbemenő bázis → nukleotid átalakulás, amely elsősorban a purinbázisok újrafelhasználását teszi lehetővé, illetve a nukleozidok többé-kevésbé specifikus kináz-enzimek által katalizált foszforilációja. Ez utóbbi reakciók is két csoportba sorolhatók annak megfelelően, hogy az illető kináz ribo- avagy dezoxiribonukleotidokra specifikus.

Ahhoz, hogy egy bázisból egy lépésben nukleotid készülhessen, egy ribóz-foszfát-egység átvitelére van szükség; a reakciót foszforibozil-transzferázok katalizálják, a foszforibozil-donor szerepét a PRPP tölti be. A purinbázisokat mentő két enzim közül az adenin-foszforibozil-transzferáz (APRT) adeninből AMP-t állít elő, míg a kettős specificitású hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) hipoxantinból és guaninból IMP-t, illetve GMP-t szintetizál az alábbiak szerint:

$$\text{adenin} + \text{PRPP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i,$$

illetve

$$\text{hipoxantin/guanin} + \text{PRPP} \rightarrow \text{IMP/GMP} + \text{PP}_i$$

A két enzim termékei tehát megegyeznek a purin *de novo* bioszintézis termékeivel, és a már leírt módon nukleozid-trifoszfáttá alakíthatók. Az AMP az APRT, az IMP és a GMP pedig a HGPRT aktivitását negatív visszacsatolással gátolja. A de novo, illetve mentő utak révén szintetizálódott nukleotidok egy közös poolba kerülnek, tehát a de novo út termékei a mentő utak aktivitását gátolják és viszont.

A HGPRT enzim hiánya áll a Lesch–Nyhan-szindróma hátterében, amely súlyos szellemi visszamaradottsággal és öncsonkításos rohamokkal jelentkezik. A klinikai kép teljes összhangban áll a mentő utaknak a központi idegrendszer nukleotid-ellátásában játszott fontos szerepével.

A pirimidinbázisok mentése mennyiségileg sokkal kevésbé jelentős; egyedül az uracil-foszforibozil-transzferáz bír fontos gyakorlati jelentőséggel, mert ez az enzim is átalakíthatja az 5-fluoro-uracilt a timidilát-szintázt gátló aktív metabolittá.

A nukleozidok mentésének előfeltétele a nukleozidok sejtbe történő felvétele. A transzport az ekvilibratív nukleozid-transzportereken keresztül a koncentrációgradiens terhére, facilitatív diffúzióval történik, azonban ismeretesek nátrium-kotranszport segítségével működő koncentratív nukleozid-transzporterek is. A purin-ribonukleozidokat a specifikus adenozin-kináz és a guanozin-kináz foszforilálhatja, míg a citidint és az uridint egy közös enzim, a citidin-uridin-kináz hasznosítja. A DNS lebomlásából származó dezoxiribonukleozidokat a citoplazmában működő dezoxicitidin-kináz (dezoxicitidin, dezoxiadenozin, dezoxiguanozin) és timidin-kináz-1 (dezoxitimidin), illetve a mitokondriumok mátrixában található dezoxiguanozin-kináz (dezoxiadenozin, dezoxiguanozin) és a timidin-kináz-2 (dezoxicitidin, dezoxitimidin) foszforilálják; az enzimek neve után zárójelben áll az általuk foszforilált nukleozidok neve. A két enzimpár lokalizációja és szubsztrátspecificitása biztosítja, hogy a genomiális és a mitokondriális DNS-szintézis dNTP-utánpótlása egyaránt biztosítva legyen. A dezoxicitidin-kináz a természetes szubsztrátjain túl számos olyan nukleozidanalógot is foszforilálni képes, amelyeket daganatos betegségek kezelésére használnak (pl. arabinozil-citozin, 2',2'-difluoro-dezoxicitidin, 2-klór-dezoxiadenozin).

II/14.3. A NUKLEOTIDOK EGYMÁSBA TÖRTÉNŐ ÁTALAKULÁSA

A purin nukleotidok IMP-ből keletkeznek (*de novo* szintézis), de vissza is tudnak alakulni IMP-vé az AMP aminocsoportjának hidrolitikus eltávolítását katalizáló AMP-dezamináz, illetve a GMP-t NADPH segítségével reduktívan dezamináló GMP-reduktáz közreműködésével. A fentiekből következik, hogy az AMP és a GMP egymásba kölcsönösen át tudnak alakulni. Ez a lehetőség további eszköz a purin nukleotidpoolok egyensúlyban tartására.

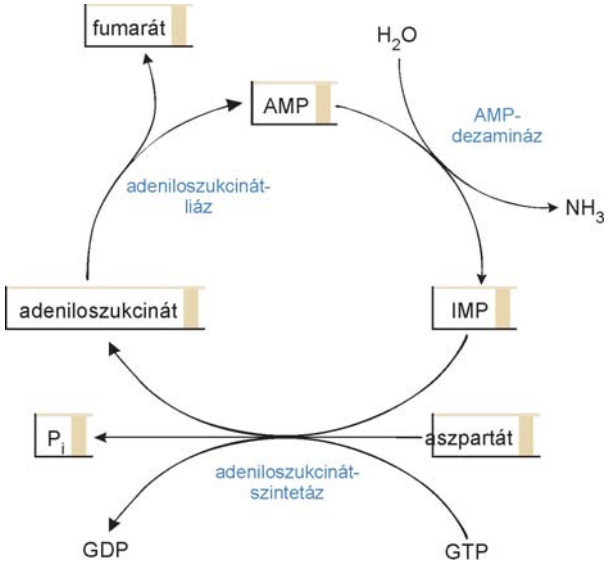
Az AMP-dezamináz fontos szerepet tölt be az elsősorban izomszövetben kiemelt jelentőségű purin nukleotid ciklusban. A három enzim által alkotott körfolyamatban az AMP az AMP-dezamináz révén IMP-vé alakul, amely az adeniloszukcinát-szintetáz és -liáz segítségével AMP-vé alakul vissza *(II/14-10. ábra)*.

A ciklus jelentősége abban áll, hogy eközben egy aszpartátmolekula fumaráttá alakul, utóbbi citrátkörbe történő belépése pedig anaplerotikus reakcióként fogható fel, ami izommunka során segíti az ATP-szintézis sebességét. Ezzel összefüggésben kimutatták, hogy működő izomszövet ammónia-kibocsátása fokozódik.

A körfolyamat egy további szerepét az AMP-koncentráció beállítása jelentheti, aminek működő izomban az ATP-termelő folyamatok beindítása szempontjából kri-

tikus jelentősége van (glikogenolízis és glikolízis allosztérikus aktiválása, béta-oxidáció stimulálása az AMP-aktiválta protein-kinázon keresztül).

Végül, de nem utolsósorban a ciklus az izom aminosav-oxidáló kapacitását is fokozza: az aminosavak alfa-ketoglutaráttal transzaminálódva a megfelelő oxosavakká alakulnak, amelyek ATP-termelésre használhatók. A reakció másik terméke, a glutaminsav oxálecetsavval az aszpartát-transzamináz katalizálta reakcióban alfa-ketoglutarátot és aszpartátot hoz létre. Előbbi újra rendelkezésre áll az első transzaminációs lépéshez, míg utóbbi belép a purin nukleotid ciklusba, ahol aminocsoportja ammónia formájában felszabadul. Az aminosavak dezaminálása, ami az aminosavak lebontásában kulcsfontosságú folyamat, ebben az esetben tehát több lépésen keresztül valósul meg.



II/14-10. ábra
A purin nukleotid ciklus

A ciklusnak az aminosavak oxidációjában és az izomszövet ATP-termelésében játszott fontos szerepét az adenilát-dezamináz defektusakor észlelt súlyos izomgörcsök és izomrost-károsodások is alátámasztják.

A pirimidinek egymásból történő keletkezésére már láttunk példát (CTP-szintetáz, timidilát-szintáz). A timin nukleotidokból citozin- vagy uraciltartalmú nukleotid már nem szintetizálódhat; ez a tény is jelzi, mennyire fontos a sejt számára a timin nukleotidpool biztosítása és fenntartása. A citozin viszont hidrolitikus dezaminálással akár bázis, akár nukleozid vagy nukleotid szinten a megfelelő uraciltartalmú termékké alakulhat; a folyamatokban közreműködő enzimek rendre: citozin-dezamináz, citidin-dezamináz, dezoxicitidilát (dCMP)-dezamináz. Ezen enzimeknek részben a citozin és származékai katabolizmusa, részben pedig a nukleotidpoolok már említett egyensúlyának beállítása szempontjából van jelentősége.

II/14.4. A NUKLEOTIDOK LEBONTÁSA

A purinok és a pirimidinek között nemcsak szintézisüket, hanem lebontásukat tekintve is látványos különbség van: míg emberben nem áll rendelkezésre a puringyűrű lebontására alkalmas enzim, addig a pirimidingyűrű több lépésben teljesen lebomlik ammóniává, szén-dioxiddá és béta-aminosavakká. Érdekes módon a koleszterin és a purin összetett gyűrűrendszerének „lebonthatatlansága” és így a szervezetben való felhalmozódásuk két fontos civilizációs betegségnek teremti meg az alapját: az érelmeszesedésnek és a köszvénynek.

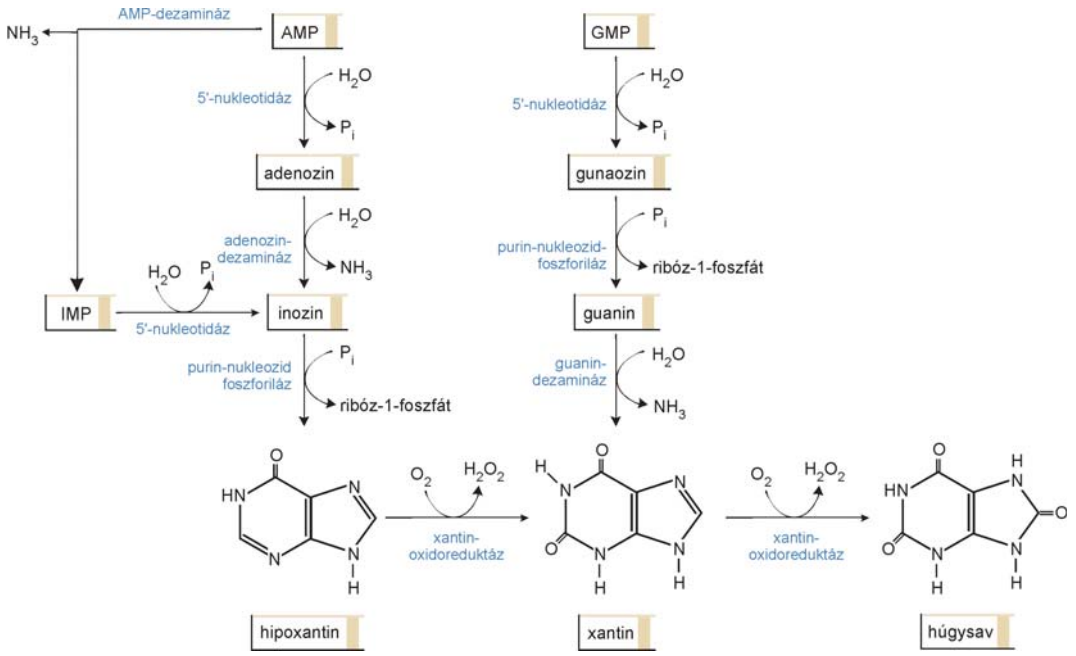
A nukleinsavak endo- és exonukleázok révén történő lebontásakor (dezoxi)ribonukleozid-monofoszfátok keletkeznek, amelyek foszfátcsoportjait a különböző 5’-nukleotidáz izoenzimek lehidrolizálják, így nukleozidokat kapunk, amelyeket a purin- és pirimidin-nukleozid-foszforiláz (PNP) foszforolízissel a megfelelő szabad bázisokká és ribóz-1-foszfáttá bontanak; utóbbit a foszforibomutáz enzim ribóz-5-

foszfáttá alakítva irányítja vissza a pentózfoszfátciklusba. A nukleotidok lebontása elsősorban a májban történik.

A purin nukleotidok lebontása

Az AMP lebontására két alternatív út is kínálkozik, melyek végeredménye ugyanaz. Az első lehetőség az AMP-dezamináz-reakció, melynek termékét, az inozinsavat az 5'-nukleotidáz inozinná és szabad foszfáttá alakítja. A másik lehetőség, hogy az AMP foszfátja hasad le először, majd a keletkező adenozint az adenozin-dezamináz (ADA) inozinná és ammóniává bontja *(II/14-11. ábra).* Az inozint a PNP hipoxantinra és ribóz-1-foszfátra hasítja, majd a hipoxantin két lépésben xantinon keresztül húgysavvá oxidálódik. Mindkét lépést ugyanaz az enzim, a molibdéntartalmú xantin-oxidoreduktáz katalizálja, amelynek két megjelenési formája ismert. Emberben általában az enzim NAD-függő xantin-dehidrogenázként működik, azonban oxidatív környezetben diszulfidhidak kialakulása révén reverzibilisen, vagy limitált proteolízis segítségével irreverzibilisen xantin-oxidázzá alakul, amely NAD helyett molekuláris oxigént redukál, a reakció melléktermékе pedig hidrogén-peroxid. A xantin-oxidáz tehát prooxidáns hatású enzim, hozzájárul a szervezet ROS-termeléséhez, illetve olyan antioxidáns mechanizmusokat tesz szükségessé, amelyek gondoskodnak a keletkező hidrogén-peroxid ártalmatlanításáról.

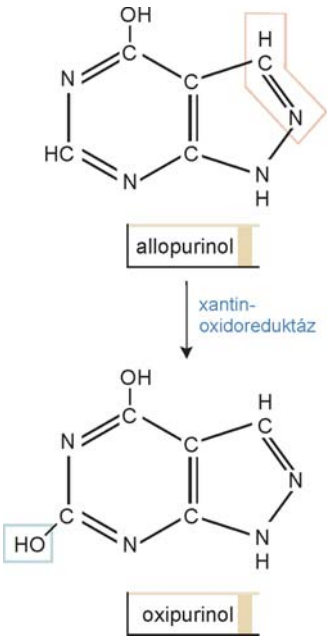
A GMP lebontása egyszerűbb sémát követ: az 5'-nukleotidáz guanozinná alakítja, amit a PNP guaninná bont, végül a guanin xantinná dezaminálódik a guanin-dezamináz segítségével. A xantin tehát a purinbázisok lebomlásának közös termé-



II/14-11. ábra
Purin nukleotidok lebontása

ke, amelyből végül húgysav (urát) keletkezik *(II/14-11. ábra)*. A húgysavat a vese bonyolult transzportrendszerek segítségével választja ki a vizeletbe. Amennyiben a húgysav plazmaszintje túltermelődés vagy a vesefunkció beszűkülése miatt megemelkedik, hiperurikémiáról beszélünk. Az urátszint emelkedése egyrészt előnyös hatású, mert a húgysav az egyik legerősebb endogén antioxidáns, másrészről viszont annak veszélyét is hordozza, hogy a vízben – különösen savas közegben – rosszul oldódó húgysav az ízületekben kicsapódva köszvényes gyulladást okoz, míg a vesetubulusokban keletkező húgysavkristályok veseelégtelenség kialakulásához vezetnek. A húgysav túltermelésének leggyakoribb oka, hogy a PRPP-amidotranszferáz enzimben fellépő mutációk miatt az enzimaktivitás purin nukleotidokkal történő feedback gátlására nincsen lehetőség. A további oki tényezők között a HGPRT részleges hiánya említendő.

A köszvény az xantin-oxidoreduktázt gátló allopurinollal eredményesen kezelhető *(II/14-12. ábra)*. Az allopurinol a hipoxantin konstitúciós izomerje, amely az N7- és C8-as atomok felcserélésével vezethető le. Az allopurinolt a xantin-oxidoreduktáz oxipurinollá oxidálja, amely szuicid inhibitor, vagyis az enzim aktív centrumához kovalensen kötődve irreverzibilis gátlást okoz. A kezelés elve azon alapul, hogy az enzim szubsztrátja, a xantin a húgysavnál jobban oldódik vízben, így könnyebben kiüríthető és vesekövet sokkal ritkábban okoz.

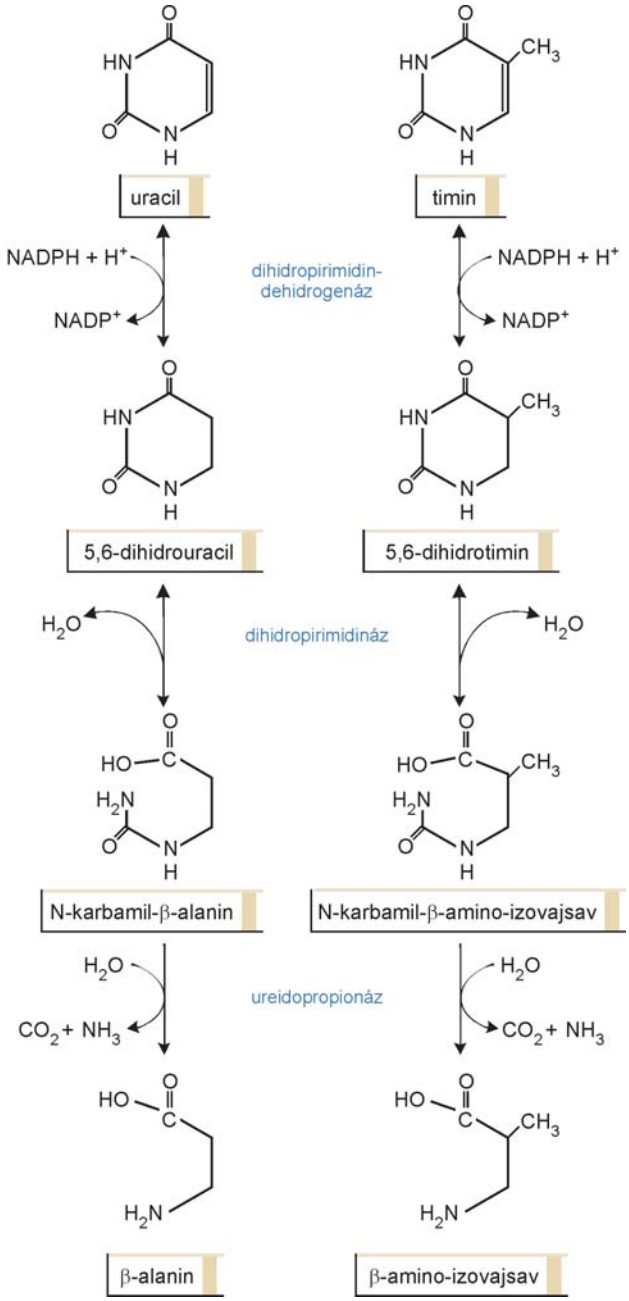


II/14-12. ábra
Az allopurinol képlete és átalakulása

Az adenozin-dezamináz hiánya a súlyos kombinált immundeficiencia (SCID) kórképet okozza, amely a T- és B-limfociták pusztulásával jár. A vérplazmában felhalmozódó dezoxiadenozint a limfociták felveszik és toxikus metabolittá, dATP-vé foszforilálják, amely a ribonukleotid-reduktáz gátlásán keresztül gátolja a limfociták sejtosztódását, a nyugvó sejtekben pedig apoptózist vált ki. A purin-nukleozid-foszforiláz defektusa szelektív T-sejt-pusztulást eredményez, ami a celluláris immunválasz súlyos károsodását okozza.

A pirimidin nukleotidok lebontása

A pirimidin nukleotidok a megfelelő bázisokká alakulnak az ismertetett reakcióséma szerint. A citozin szabad bázisként, de nukleozid vagy nukleotid részeként is uracillá dezaminálható. Az uracil és a timin lebontása ugyanazon enzimeket igényli, a timinben található 5-metilcsoport miatt viszont a közti- és melléktermékek elnevezése kissé eltér egymástól. A reakcióutakat a *II/14-13. ábra* szemlélteti. A folyamat több reakciója is a pirimidinek de novo szintézisének fordított irányú folyamataira hasonlít (vö. dihidropirimidin-dehidrogenáz vs dihidroorotát-dehidrogenáz és dihidropirimidináz vs. dihidroorotáz). Az uracilból (s rajta keresztül a citozinból) keletkező béta-alanin egyrészt bizonyos dipeptidek (pl. a karnozin) szintéziséhez szükséges, illetve transzaminálással malonsav-szemialdehiddé alakul, amelynek oxidatív dekarboxilálásával acetil-KoA jön létre. Ezzel szemben a timin lebontása során béta-amino-izovajsav, majd annak transzaminálásával metilmalonsav-szemialdehid jön létre, amely propionil-KoA-n keresztül szukcinil-KoA-vá alakulva lép be a citrátkörbe. A citozin és uracil tehát ketoplasztikus, míg a timin glukoplasztikus bázis.



II/14-13. ábra
A pirimidinbázisok lebontása

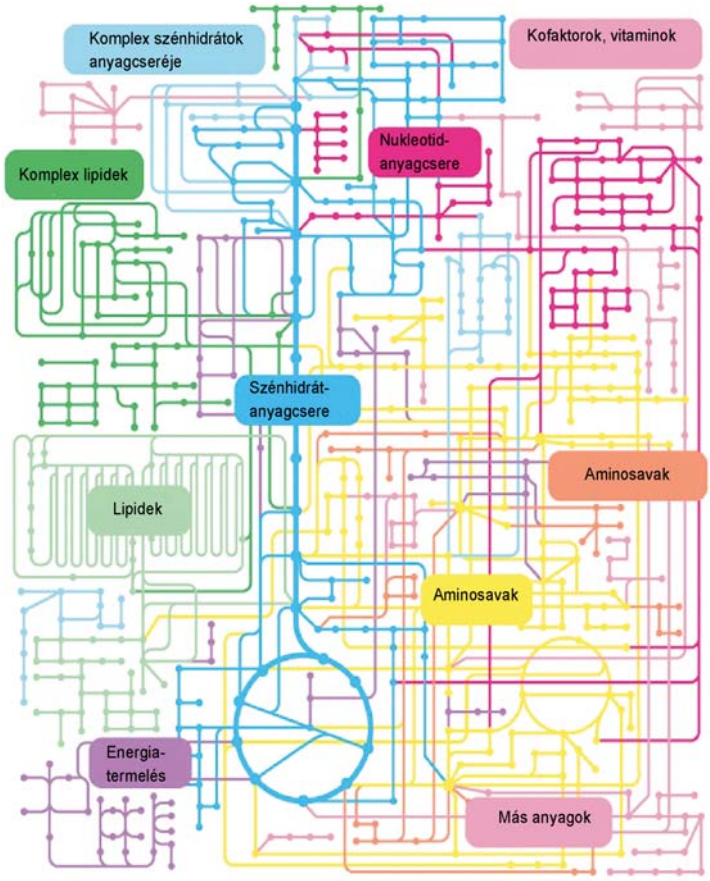
II/15.
A szervezet anyagcseréjének összehangolt szabályozása

Müllner Nándor

Az anyagcsere-folyamatok feladata, hogy ellássák a sejteket megfelelő mennyiségű energiával (ATP), szubsztrátokkal a különböző szintetikus folyamatokhoz és az általában ezekhez szükséges redukáló erővel ($NADPH+H^+$).

Ha megnézzük egy sejt anyagcseréjét leíró biokémiai folyamatok összefoglaló térképét, akkor első szempillantásra nyilvánvalóvá válik, hogy azok rendkívül bonyolult, összetett rendszert alkotnak *(II/15-1. ábra)*.

Természetes, hogy (a) ezek az anyagcsereutak nem működhetnek egyszerre azonos intenzitással egy sejten belül, (b) a sejtek különböző szerveket, szöveteket alkotnak, melyek feladata eltérő, (c) ezek a szervek, szövetek építik fel az egész szervezetet, melynek meg kell felelni a változó külső körülményeknek. Egy ilyen bonyolult, összetett rendszer csak akkor működőképes, ha több szintű, egymásra épülő vagy egymás mellett működő szabályozó rendszer hangolja össze a sejtekben végbemenő anyagcsere-folyamatokat a szervezet szükségleteivel.



II/15-1. ábra
Egy sejt anyagcseréjét leíró biokémiai folyamatok összefoglaló térképe

Ennek különböző szintjei a következők lehetnek:

Az egyes folyamatok szubsztráttal való ellátottsága lényegében a legegyszerűbb szabályozási forma: szubsztrát nélkül egy enzim nem tud működni. Az, hogy a megfelelő szubsztrát a kellő időben és koncentrációban rendelkezésre

álljon, már önmaga szabályozott folyamatok eredménye, feltételezi megfelelő transzporterek és a szubsztrátot előkészítő enzimek jelenlétét és aktivitását.
Izoenzimek. Ezek az enzimek ugyanolyan reakciót katalizálnak, de eltérő lehet a szerkezetük, kifejeződésük helye, szubsztrátspecificitásuk, szubsztráthoz való affinitásuk és szabályozásuk. Rajtuk keresztül valósul meg, hogy azonos körülmények között azonos anyagcsereutak különböző sejtekben eltérő módon működhetnek (pl. hexokináz-glukokináz, GLUT transzporterek stb.).
Kulcsenzimek szabályozása. Egy anyagcsere-folyamat vagy -ciklus minden enzimét szabályozni felesleges, és hihetetlen mértékben tovább bonyolítaná a képet: egyszerűbb, ha általában a folyamat elején lévő, az összes reakció sebességét meghatározó lépést katalizáló enzim a szabályozott. A továbbiakban egyszerűen érvényesül a következő enzimreakció szubsztráttal való ellátottsága vagy annak hiánya.

Az allosztérikus szabályozás nagyon gyors (ezred-tized másodperc nagyságrend), lehetséges gátlás és aktiválás is. Az enzim működését a környezetében lévő vegyületek és azok mennyisége határozza így meg, legegyszerűbb formája a termék gátló hatása.

A kovalens módosítás már lassabb (másodperc-perc nagyságrend). Több formáját is tanultuk, de az anyagcsere szabályozásában a legfontosabb a kulcsenzimek általában szerin vagy treonin oldalláncán történő foszforilációja (kinázok) és defoszforilációja (foszfatázok). Nemcsak a sejten belüli energiaállapot (AMP-kináz, piruvát-dehidrogenáz foszforilációja), de sejten kívüli jelek, hormonok is így szabályozzák az anyagcsere-folyamatokat.

Az enzimek indukciója, szintézise jóval lassabb (óra-nap nagyságrend). Általában olyan enzimek szabályozása valósul meg ily módon, amelyeknek a féléletideje relatíve rövid. Természetes módon kiegészíti ezt a szabályozási formát a fehérjék irányított, általában proteaszomális lebontása (pl. HMG-KoA-reduktáz).

Enzim-enzim kölcsönhatás révén egyrészt lehetségessé válik egymás aktivitásának befolyásolása („scaffold”), másrészt az enzimek komplexbe tömörülve szinte egymásnak adják át termékeiket, és alakítják azt tovább (multienzim komplex).
Sejten belüli *kompartmentalizáció* segítségével hasonló folyamatok eltérő szubsztráttal való ellátása és allosztérikus szabályozása válik lehetővé a membránnal elhatárolt intracelluláris terekben (ureaciklus, pirimidinszintézis; ketontestszintézis, koleszterinszintézis). A másik lehetőség, amikor ellentétes anyagcsereutak elkülönítése történik kompartmentalizációval (zsírsavlebontás, zsírsavszintézis).
A *sejt-sejt kapcsolatok*, legyenek ezek közvetlen fizikai interakciók vagy lokális hormonok révén létrejövő irányítás, összehangolják az egyes sejtek működését.
Az egyes *szervek közti információcserét* hormonok biztosítják, megvalósítva így az egész szervezet anyagcseréjének összehangolt szabályozását.

A sejtek alapvető energiaforrása az ATP, amely a táplálékkal felvett szénhidrátok, zsírok és fehérjék lebontása, szén-dioxiddá való oxidálása révén keletkezik. Az egyes tápanyagok energiatartalma eltérő, de ha egy liter elhasznált oxigénre számoljuk, akkor közel azonos értékeket kapunk, mert a zsírok jóval kevesebb oxigént tartalmaznak.

II/15-1. táblázat			
	kJ/g	**kcal/g**	**kJ/l O_2**
Szénhidrát (glukóz)	16,8	4,0	21,0
Zsír (triglicerid)	39,7	9,46	19,7
Fehérje (alanin)	18,1	4,32	19,3

A legjobb módja annak, hogy megértsük a sejten belüli anyagcsere-folyamatok és az egyes szervek, szövetek működésének a szervezet szintjén történő összehangolását, ha megvizsgáljuk, hogy mi történik két szélsőséges külső hatás során: jóllakott állapotban és éhezésben. A legfontosabb szabályozó két hormon, az inzulin és a glukagon aránya. Mindkettő mindig jelen van szervezetünkben, de jóllakott állapotban az inzulin, míg éhezésben a glukagon túlsúlya jellemző.

Lényegében szervezetünk alkalmazkodása a különböző külső ingerekre és belső hormonális változásokra valamilyen variációja a jóllakott-éhező állapot ciklusnak, legyen az izommunka, stressz vagy terhesség.

Jóllakott állapot

Jóllakott állapotban a felvett táplálék fedezi sejtjeink energiaszükségletét, a felesleget pedig glikogén vagy triglicerid formájában elraktározzuk *(II/15-2. ábra).*

Az emésztés során az összetett szénhidrátok lebomlanak monoszacharidokra, és ezek a vérbe kerülve emelik a vércukor szintjét (glukóz), vagy a májban lebomlanak (fruktóz).

A fehérjék bontása során keletkező aminosavakból a szövetek felépítik saját fehérjéiket, a felesleg pedig lebomlik, főleg a májban, mivel aminosavakat nem tudunk raktározni. Az aminosavak nitrogénje (a szabad ammónia mérgező) belép az ureaciklusba, és urea formájában távozik a vizelettel.

A zsírok emésztése során keletkező zsírsavak és monoacilgliceridek a bélhámsejtekben újra trigliceriddé alakulnak, és a kilomikron szállítja őket a véráram segítségével elsősorban a zsírszövethez. Itt a trigliceridek újra lebomlanak (lipoproteinlipáz) glicerinre és zsírsavakra. A glicerin a májba kerül, míg a zsírsejtekben a zsírsavakból és a glikolízis során keletkező dihidroxiaceton-foszfátból triglicerid szintetizálódik és elraktározódik.

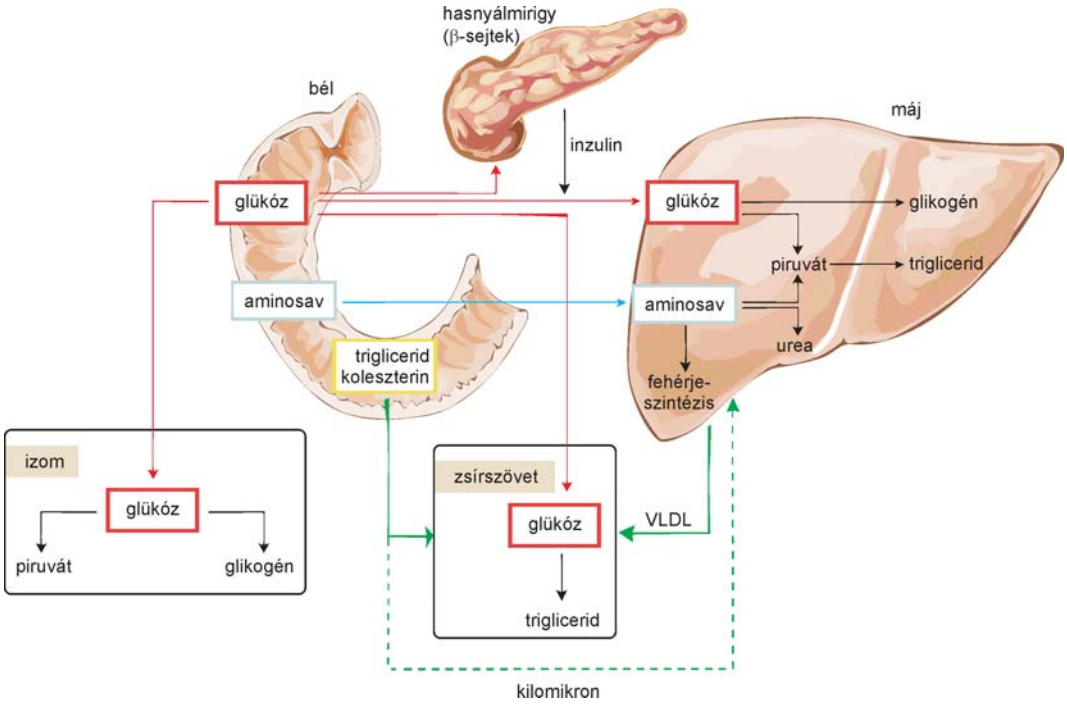
A májsejtek GLUT2 transzporterükön keresztül felveszik a glukózt.

A felvett glukóz:

- lebontásra kerülve energiát szolgáltat (glikolízis, citrátkör),
- magas energiaszint esetén szubsztráttal lát el szintetikus folyamatokat (zsírsavszintézis, koleszterinszintézis),
- átalakulhat más monoszacharid-származékokká (glukuronsav-ciklus),
- a szintetikus folyamatok $NADPH+H^+$ és ribózfoszfát szükségletét biztosítja (direkt oxidáció, pentózfoszfát-ciklus),
- glikogén formájában elraktározódik (glikogénszintézis).

A felesleges glukózból szintetizált zsírsavak trigliceriddé alakulva a VLDL révén kerülnek a májsejtekből a zsírszövetbe.

Izomszövetben a GLUT4 transzporteren keresztül felvett glukóz a sejtek energiaellátását biztosítja (glikolízis, citrátkör), és raktározásra kerül glikogén formájában (glikogénszintézis).



II/15-2. ábra
Sejten belüli anyagcsere-folyamatok szabályozása jóllakott állapotban

A megemelkedett vércukorszint a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben fokozott glukóz-felvételt (GLUT2-transzporter), és így fokozott ATP-szintézist vált ki. A magas ATP-koncentráció gátolva a plazmamembrán ATP-függő K^+-csatornáját depolarizációt okoz, és a beáramló Ca^{2+} kiváltja az inzulin szekrécióját. A glukagonnal szemben túlsúlyba került inzulin hatása a sejtek anyagcsere-folyamataira kettős:

indukálja egyes kulcsenzimek szintézisét:

Folyamat	**Enzim**
Glikolízis	glukokináz
	foszfofruktokináz-I
	piruvát-kináz
Direkt oxidáció	glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz
	6-foszfoglukonát-dehidrogenáz
Zsírsav-, koleszterinszintézis	ATP-citrát-liáz
Zsírsavszintézis	acetil-KoA karboxiláz
Trigliceridszintézis	glicerin-3-foszfát-aciltranszferáz
Koleszterinszintézis	HMG-KoA-reduktáz

foszfatázok aktiválása révén defoszforilálja azokat:

Folyamat	Enzim	Defoszforilált állapotban
Glikogénszintézis	glikogén-szintáz	aktív
Glikogénlebontás	glikogén-foszforiláz	inaktív
Glikolízis-glukoneogenezis koordinált szabályozása	foszfofruktokináz-II	fruktóz-2,6-bifoszfát szintézise
Glikolízis (máj)	piruvát-kináz	aktív
Zsírsavszintézis	acetil-KoA karboxiláz	aktív
Koleszterinszintézis	HMG-KoA reduktáz	aktív
Trigliceridszintézis	glicerin-3-foszfát-aciltranszferáz	aktív
Trigliceridbontás	hormonszenzitív lipáz	inaktív

Mivel a máj központi szerepet játszik a szervezet anyagcseréjében, ezért először a májsejtekben inzulin hatására végbemenő folyamatokat vizsgáljuk. A májsejtek GLUT2 transzporteren keresztül felveszik a glukózt, és a glukokináz enzim segítségével glukóz-6-foszfáttá alakítják. A foszforilált glukóz nem tudja elhagyni a sejtet, nem szubsztrátja többé a glukóz transzporternek. A glukokináz affinitása a glukózhoz alacsony, nagy sebességgel csak a normálisnál magasabb vércukorszintnél működik, így a máj eltávolítja a felesleges glukózt a vérből.

A sejtek saját energiaállapotának mutatója az ATP/ADP és $NADH+H^+/NAD^+$ arány. Amikor ezek alacsonyak, az ADP és AMP allosztérikusan aktiválja a glikolízis foszfo- fruktokináz-I enzimét. A keletkező fruktóz-1,6-bifoszfát és az ADP aktiválja a piruvát-kinázt, a glikolízis energiát termel és piruvátot. A piruvát a mitokondriumba kerülve tovább aktiválja a piruvát-dehidrogenázt, melyet ezen kívül még a sejt energiaszintje szabályoz. A keletkező acetil-KoA egyrészt szubsztrátja a citrátkörnek, ahol eloxidálódva GTP-t és $NADH+H^+$-t termel, másrészt allosztérikusan aktiválja a citrátkör legfontosabb feltöltő reakcióját katalizáló enzimet, a piruvát-karboxilázt. A citrátkör nagy kapacitással működik, az ATP/ADP és $NADH+H^+/NAD^+$ arány emelkedik, ami lassítja a glikolízist és a citrátkört.

Így a glukóz-6-foszfát más reakcióutakon is felhasználódhat:

glukóz-1-foszfáton keresztül UDP-glukózzá aktiválódva szubsztrátja lesz a glikogénszintézisnek,

direkt oxidációja során $NADH+H^+$-t termel (zsírsav- és koleszterinszintézis), illetve pentózokat a pentóz-foszfát-ciklusban (nukleotidszintézis).

Az ATP gátolja a foszfofruktokináz-I aktivitását, de a defoszforilált foszfofruktokináz-II által termelt fruktóz-2,6-bifoszfát aktiválja, azaz megszünteti az ATP gátló hatását. Egyúttal gátolja a fruktóz-1,6-bifoszfát-foszfatázt és így a glukoneogenezist. A keletkező fruktóz-1,6-bifoszfát pedig nem engedi érvényesülni az ATP gátló hatását a piruvát-kinázra, tehát továbbra is működik a glikolízis, és lehetőség nyílik bioszintetikus utak szubsztráttal való ellátására. A piruvát a mitokondriumban aktiválva a piruvát-dehidrogenázt acetil-KoA formájában belép a citrátkörbe, de mivel a magas $NADH+H^+$//NAD arány gátolja az izocitrát-dehidrogenázt, nem tud tovább alakulni. A citoplazmába transzportálódott citrátot az inzulin indukálta ATP-citrát-liáz hasítja el oxálacetátra és acetil-KoA-ra, mely kiindulási vegyülete a koleszterin- és zsírsavszintézisnek. A zsírsavszintézis elkötelező lépése során az acetil-KoA-ból kialakuló malonil-KoA allosztérikusan gátolja a szintetizálódó zsíracil-KoA transzportját a mitokondriumba, lehetetlenné téve a szintetikus és lebontó (β-oxidáció) folyamatok egyidejű végbemenését. Ha a citoplazmai citrát mennyisége meghaladja a zsírsav- és koleszterinszintézis kapacitását, gátolva a foszfofruktokináz-I-et, lassítja a glikolízist, így áttételesen saját szintézisét.

Összefoglalva az allosztérikusan szabályozott enzimeket:

Folyamat	Enzim	Aktivátor	Gátló
Glikolízis	glukokináz (máj)		fruktóz-6-foszfát
	hexokináz (extrahepatikus)		glukóz-6-foszfát
	foszfofruktokináz-I	ADP, AMP, fruktóz-2,6-bifoszfát	ATP, zsírsavak, citrát
	piruvát-kináz	ADP, fruktóz-1,6-bifoszfát	ATP
Glukoneogenezis	Fruktóz-1,6-bifoszfát-foszfatáz		fruktóz-2,6-bifoszfát
Piruvát-dehidrogenáz		Ko-A, NAD, ADP, piruvát	ATP, $NADH+H^+$, acetil-KoA
Citrátkör	citrát-szintáz		ATP, $NADH+H^+$, zsíracil-KoA
	Izocitrát-dehidrogenáz	ADP	ATP, $NADH+H^+$
	α-ketoglutarát-dehidrogenáz		ATP, GTP, $NADH+H^+$, szukcinil-KoA
Glukoneogenezis, feltöltő reakció	piruvát-karboxiláz	acetil-KoA	
Glikogén-anyagcsere	glikogén-szintáz	glukóz	
Pentózfoszfát-ciklus	glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz	$NADP^+$	$NADH+H^+$
Koleszterinszintézis	HMG-KoA-reduktáz		koleszterin
Zsírsavszintézis	acetil-KoA-karboxiláz	citrát	zsíracil-KoA
Zsírsav-oxidáció	karnitintranszporter		malonil-KoA

Izomszövetben inzulin hatására szintetizálódik és kihelyeződik a sejtek plazmamembránjába a GLUT4 transzporter és rajta keresztül kerül a glukóz a sejtek citoplazmájába. Itt a hexokináz foszforilálja, melynek szubsztrátjához való affinitása nagy. A keletkező glukóz-6-foszfát elsősorban energiatermelésre (glikolízis, citrátkör) és glikogén szintézisére fordítódik. Mikor a sejtek energia- és glikogénraktárai feltöltődtek, a megfelelő anyagcsere-folyamatok lelassulnak, és a feldúsuló glukóz-6-foszfát allosztérikusan gátolja a hexokinázt.

Zsírszövetben, elsősorban a kilomikronból és VLDL-ből származó zsírsavak aktiválódásuk után triglicerid formájában raktározásra kerülnek. A folyamat több ponton is szabályozott. Inzulin hatására helyeződik ki az endotelsejtek membránjába a lipoprotein-lipáz, mely képes lebontani a fenti lipoproteinek által szállított trigliceridet zsírsavakra és glicerinre. A glicerin a májban alakul tovább, mert a foszforilálását katalizáló glicerin kináz csak ott expresszálódik. Ahhoz, hogy a zsírsejtekbe került és aktiválódott zsírsavakból triglicerid képződhessen, szükség van a glikolízis működésére. A glukóz az inzulinfüggő GLUT4-transzporteren keresztül kerül a sejtekbe, ahol alapvetően energiát (zsírsavak aktiválása) és szubsztrátot (dihidroxiacetonfoszfát) szolgáltat a trigliceridszintézishez. A szintézis kulcsenzime az inzulin indukálta glicerin-3-foszfát-aciltranszferáz. A zsírsejtekben működik a glukózból történő zsírsavszintézis is, és természetesen az ahhoz szükséges $NADH+H^+$-termelés, de

ez arányaiban kisebb jelentőségű a trigliceridszintézis és -raktározás szempontjából, mint a lipoproteinek szállította mennyiség.

Éhezés

Alacsony vércukorszint csökkenti a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek inzulin- és egyidejűleg növeli az alfa-sejtek glukagonszekrécióját: glukagonhatás érvényesül a szövetekben. A glukagon receptorához kötődve növeli sejten belül a cAMP koncentrációját. Ez cAMP-függő kinázt aktiválva az anyagcsere-folyamatok kulcsenzimeinek foszforilációjához, továbbá egyes enzimek expressziójához vezet.

Glukagon indukálta legfontosabb enzimek a következők:

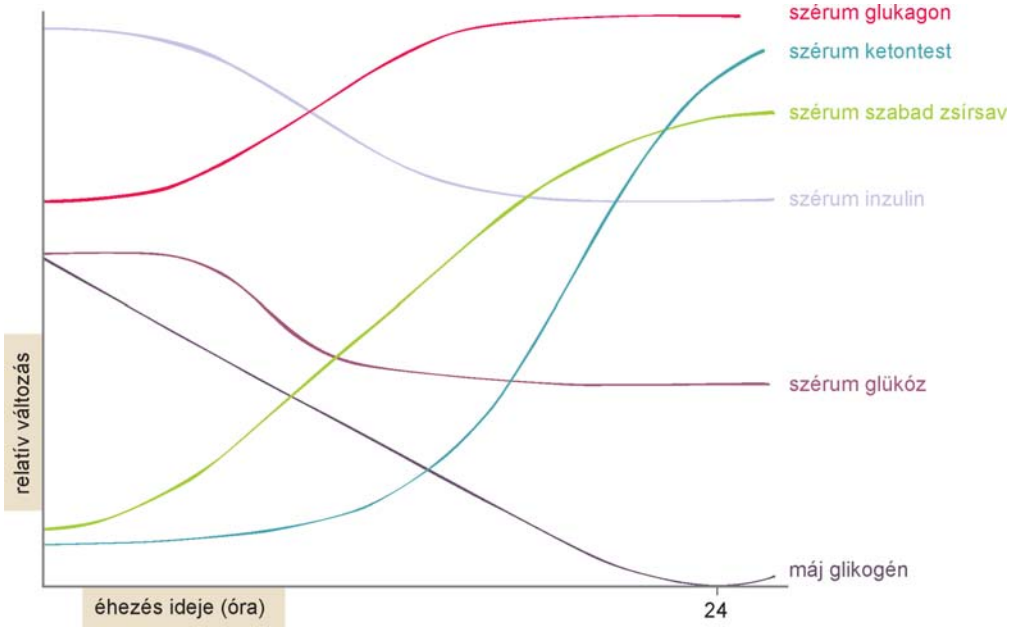
Folyamat	Enzim
Glukoneogenezis	piruvát-karboxiláz
	foszfoenol-piruvát-karboxikináz
	fruktóz-1,6-bifoszfát-foszfatáz
	glukóz-6-foszfát-foszfatáz
Ketontestszintézis	mitokondriális HMG-KoA-szintáz
Zsírsavtranszport (β-oxidáció)	karnitin-palmitoil-transzferáz-I

Az egyes anyagcsere-folyamatok kulcsenzimeinek foszforiláción keresztül történő kovalens szabályozása egyszerűen a fordítottja annak, amit már az inzulinhatás kapcsán láttunk:

Folyamat	Enzim	Foszforilált állapotban
Glikogénszintézis	glikogén-szintáz	inaktív
Glikogénlebontás	glikogén-foszforiláz	aktív
Glikolízis-glukoneogenezis koordinált szabályozása	foszfofruktokináz-II	fruktóz-2,6-bifoszfát elbontása
Glikolízis (máj)	piruvát-kináz	inaktív
Zsírsavszintézis	acetil-KoA-karboxiláz	inaktív
Koleszterinszintézis	HMG-KoA-reduktáz	inaktív
Trigliceridszintézis	glicerin-3-foszfát-aciltranszferáz	inaktív
Trigliceridbontás	hormonszenzitív-lipáz	aktív

A csökkenő vércukorszintet a máj először a glikogén bontásából származó glukózzal kompenzálja. A foszforiláltan aktív glikogén foszforiláz glukóz 1-foszfátot hasít le a glikogénről, mely glukóz-6-foszfáttá alakulva szubsztrátja lesz az endoplazmás retikulumban indukált glukóz-6-foszfát foszfatáznak. A keletkező glukóz a nem inzulinfüggő GLUT2 transzporteren keresztül kerül ki a véráramba. A máj glikogéntartalékai hamar (6-20 óra) kimerülnek.

Szerepét átveszi a glukoneogenezis, mely energiaigényes folyamat. Ezt az energiát a májsejtek zsírsavak oxidációjából szerzik. A zsírszövetben a hormonszenzitív lipáz megkezdi a trigliceridek bontását, melyet a di- és monoacilglicerid-lipázok fejeznek be. A felszabadult zsírsavakat albumin szállítja a májhoz, ahol a mitokondriumokban acetil-KoA és redukált ekvivalensek keletkeznek (ciklusonként 1 FADH2 és 1 $NADH+H^+$), amik ATP-t termelnek a terminális oxidációban. Májsejtekben éhezés



II/15-3. ábra
Éhezés során bekövetkező anyagcsere változások

során tehát az ATP/ADP arány magas. Ez gátolja a foszfofruktokináz-I és piruvátkináz enzimek aktivitását, és ezzel a glikolízis leáll. A foszfofruktokináz-II foszforilált állapotban elbontja a fruktóz-2,6-bifoszfátot, így nincs ami allosztérikusan aktiválva felszabadítsa az ATP gátlás alól a foszfofruktokináz-I-et, és megszűnik a glukoneogenezis gátlása is (fruktóz-1,6-bifoszfát-foszfatáz). A β-oxidációban termelődött acetil-KoA allosztérikusan aktiválja a mitokondriális piruvát karboxilázt, és gátolja a piruvát-dehidrogenázt, így a piruvát csak a szabadon folyó glukoneogenezisbe léphet be.

A következő kérdés, hogy miből keletkezhet glukóz, mi lehet a kiindulási anyaga a glukoneogenezisnek. Mivel lényegében oxálacetátból indul ki a szintézis, bármi lehet, ami oxálacetáttá, illetve glikolitikus intermedierré alakulhat.

Tejsav. A vörösvértestek csak anaerob glikolízis segítségével tudnak energiát termelni, így folyamatosan termelik a tejsavat, mely a májban laktát-dehidrogenáz katalizálta reakcióban piruváttá alakul.

Glukoplasztikus aminosavak. Hosszan tartó éhezés során beindul a fehérjék, elsősorban izom fehérjék proteaszomális bontása. A máj által felvett glukoplasztikus aminosavak szénlánca piruváttá vagy citrátköri intermedierré bomlik le, és oxálacetáttá alakul. Mivel aminocsoportjukat urea formájában választjuk ki, az ureaciklus éhezésben is nagy kapacitással működik.

Glicerin. A zsírsejtekben trigliceridből felszabadított glicerint a májban a glicerin kináz foszforilálja, majd glicerinaldehid-3-foszfáttá alakulva belép a glukoneogenezisbe. Az éhezés előre haladtával egyre nagyobb arányban vesz részt a glukóz szintézisében.

Propionil-KoA. Páratlan szénatomszámú zsírsavak bontásának utolsó lépésében keletkezik, és szukcinil-KoA-vá alakul. Mennyiségét kevésre becsülik, inkább csak elvi lehetőségként jön szóba.

Még két problémát kell „megoldania" a májsejtek anyagcseréjének.

Normális körülmények között sejtjeink alapvetően glukózt használnak energiaforrásként. Éhezésben a máj az egész szervezet összes szövete és sejtje számára nem tud elég glukózt szintetizálni.

A másik probléma a zsírsav-oxidáció végterméke, az acetil-KoA. Az acetil-KoA nem tud belépni a citrátkörbe, mert a májsejt minden oxálacetátból glukózt szintetizál, így tehát felhalmozódik.

A kettős problémára megoldást adnak a ketontestek. A mitokondriumban a „felesleges" acetil-KoA-ból ketontestek képződnek (HMG-KoA-szintáz). Ezek a ketontestek vízoldékonyak, a véráramban a célsejtekhez eljutva aktiválódnak, és energiát termelnek a citrátkörben. Természetesen a vörösvértestek mitokondrium, a májsejtek oxálacetát és aktiváló enzim hiányában nem tudják a ketontesteket felhasználni. Kezdetben olyan szövetek sem tudják ezt, amelyek eredetileg csak glukózt használnak energiaforrásként (pl. idegszövet). Ezeknek idő kell, hogy indukálják, szintetizálják a ketontestek felhasználásához szükséges enzimeket. Az éhezés kezdetén kizárólag glukózt használó agy az éhezés második hetében már anyagcseréjének 60–70%-át fedezi ketontestekből.

Éhező sejtek

Láttuk, hogy a szervezetünket felépítő szövetek anyagcsere-folyamataik szabályozásával hogyan alkalmazkodnak az egész szervezetet ért két szélsőséges külső hatáshoz: éhezéshez és a jóllakott állapothoz. Ettől bizonyos fokig eltérő a sejtek válaszreakciója, ha saját energiaszintjük válik vészesen alacsonnyá, azaz éheznek. Leggyakrabban kitartó munka vagy hipoxia esetén lép fel ilyen hatás. A sejtek energiaszintjének mutatója általában az ATP/ADP arány. Ha az ATP energiaigényes folyamatokban elbomlik ADP-re, és újbóli szintézise lassú, egy citoplazmai enzim (nukleotid-kináz) két ADP-ből ATP-t és AMP-t készít. Normál körülmények között az AMP szintje a citoplazmában alacsony, ezért emelkedő koncentrációja erős éhségjelnek számít. Aktiválja az AMP-kinázt, mely anyagcserefolyamatok kulcsenzimeinek foszforilálása révén gyökeresen megváltoztatja a sejt anyagcseréjét. A szabályozás lényege, hogy gátol minden lehetséges energiaigényes folyamatot: glikogénszintézis, zsírsavszintézis, koleszterinszintézis, glukoneogenezis, ketontestszintézis, fehérjeszintézis. Ezzel ellentétben aktivál minden olyan folyamatot, mely energiatermeléshez vezet: glikolízis, zsírsav-oxidáció. Ezen belül is az aerob glikolízist helyezi előtérbe, hiszen ez jóval több energiát termel.

Elágazási pontok az anyagcserében

Ha újra megnézzük az anyagcsere-folyamatok összesített térképét, láthatjuk (azon túl, hogy még mindig bonyolult), hogy a vonalak egyes helyeken összefutnak, csomópontokat alkotnak. Ezek olyan vegyületeket jeleznek, amelyek többféle reakcióút intermedierei, termékei vagy kiindulópontjai lehetnek.

Tárgyalásuk során a már ismert szabályozási alapelveket követhetjük:

- jóllakott állapotban
  - milyen reakcióutak terméke
  - milyen reakcióutakban alakulhat tovább
- éhezésben
  - milyen reakcióutak terméke
  - milyen reakcióutakban alakulhat tovább.

A következőkben elsősorban a májsejtekben végbemenő folyamatokat tárgyaljuk.

Glukóz-6-foszfát

Jóllakott állapotban keletkezhet:
a vércukorból származó glukózból a glukokináz (vagy hexokináz) hatására,
glukóz-1-foszfátból, ami galaktózból keletkezik a májsejtekben (galaktóz-1-foszfát uridiltranszferáz).

A következő reakciókban alakulhat tovább:
fruktóz-6-foszfáttá alakítja a hexóz-foszfát-izomeráz (glikolízis),
glukóz-1-foszfáttá alakulva aktiválódhat UDP glukózzá (glikogénszintézis, glukuronsavszintézis),
a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz katalizálta reakcióban 6-foszfoglukonolakton lesz belőle (direkt oxidáció).

Éhezésben keletkezhet:
glukóz-1-foszfátból (glikogén bontása),
fruktóz-6-foszfátból a hexóz-foszfát-izomeráz katalizálta reakcióban (glukoneogenezis).

A következő reakcióban alakulhat tovább:
glukózzá alakul a glukóz-6-foszfát foszfatáz katalizálta reakcióban (vércukorszint emelése).

A glukóz-6-foszfát allosztérikusan gátolja a hexokinázt extrahepatikus szövetekben.

UDP-glukóz

Jóllakott állapotban keletkezhet:
glukóz 1-foszfátból, ami a glikolízis glukóz-6-foszfátjából keletkezik (glukóz-1-foszfát-UTP-transzferáz),
UDP galaktózból (epimeráz).

A következő reakciókban alakulhat tovább:
glikogénszintézis (glikogén-szintáz),
galaktózszintézis (epimeráz és uridil-transzferáz),
glukuronidszintézis UDP glukuronsavon keresztül (UDP-glukóz-dehidrogenáz).

Éhezésben elenyésző mértékben keletkezik biotranszformációs utak kiszolgálására.

Piruvát

Jóllakott állapotban keletkezhet:
a glikolízis végső reakciójában foszfoenolpiruvátból a piruvát-kináz katalizálta reakcióban,
a piruváttá alakuló aminosavak lebontása során (alanin, szerin, glicin, treonin, triptofán, cisztein),

tejsavból a laktát-dehidrogenáz aktivitása révén,
malátból a citoplazmai almasav enzim katalizálta reakcióban ($NADH+H^+$ termelés).

A következő reakciókban alakulhat tovább:
acetil-KoA keletkezhet belőle a piruvát-dehidrogenáz komplex hatására,
a piruvát-karboxiláz révén oxálacetát lehet belőle (citrátköri feltöltő reakció),
alaninná alakulhat transzaminálással,
a citoplazmai almasav enzim katalizálta reakcióban malát lehet belőle (citrátköri feltöltő reakció),
tejsavvá alakíthatja a laktát-dehidrogenáz (anaerob glikolízis), májban csak kóros esetekben lehetséges.

Éhezésben keletkezhet:
aminosavak lebontásából,
laktátból.

A következő reakcióban alakulhat tovább:
a piruvát-karboxiláz katalizálta reakcióban oxálacetáttá alakul (glukoneogenezis).

A piruvát kovalens módosítás révén aktiválja a piruvát-dehidrogenázt.

Oxálacetát

Jóllakott állapotban keletkezhet:
malátból a malát-dehidrogenáz hatására (citrátkör),
piruvátból a piruvát-karboxiláz katalizálta reakcióban (citrátköri feltöltő reakció),
aszparaginból és aszparaginsavból transzaminálással,
foszfoenolpiruvátból a foszfoenolpiruvát-karboxikináz reakcióban (citrátköri feltöltő reakció),
citrátból a citoplazmai ATP:citrát-liáz hatására.

A következő reakciókban alakulhat tovább:
a citrát-szintáz hatására acetil-KoA-val egyesülve citráttá alakulhat (citrátkör), maláttá (malát-dehidrogenáz), aszpartáttá (transzamináz) alakulhat reverzíbilisen (redukált ekvivalensek transzportja a mitokondriumba).

Éhezésben keletkezhet:
piruvátból a piruvát-karboxiláz katalizálta reakcióban (glukoneogenezis),
malátból a malát-dehidrogenáz katalizálta reakcióban (a citrátköri intermedierré lebomló glukoplasztikus aminosavak szénláncából).

A következő reakcióban alakulhat tovább:
aszpartáttá, vagy maláttá alakulva transzportálódik a citoplazmába, majd ott visszaalakulva oxálacetáttá szubsztrátja a foszfoenolpiruvát karboxikináznak és foszfoenolpiruvát lesz belőle (glukoneogenezis).

Acetil-KoA

Jóllakott állapotban keletkezhet:
piruvátból a piruvát-dehidrogenáz katalizálta reakcióban,
ketogén aminosavak lebontása során (izoleucin, leucin, triptofán).

A következő reakciókban alakulhat tovább:
beléphet a citrátkörbe, a citrát-szintáz katalizálta reakcióban oxálacetáttal egyesülve citráttá alakul és eloxidálódik,
citrát formájában a mitokondriumból a citoplazmába transzportálódva előanyaga lehet a zsírsavszintézisnek és a koleszterinszintézisnek,
részt vehet acetilálási reakciókban (N-acetil-glutamát képződése).

Éhezésben keletkezhet:
zsírsavakból a mitokondriális β-oxidációban,
ketogén aminosavak lebontásakor.

A következő reakcióban alakulhat tovább:
ketontestek szintézise.

Az acetil-KoA-nak szabályozó szerepe is van, allosztérikusan aktiválja a piruvát-karboxilázt és gátolja a piruvát-dehidrogenáz-komplexet.

Patológiás állapotok

Éhezés

*Minőségi éhezés*nek nevezzük, amikor a táplálék mennyisége és energiatartalma megfelelő, de valamelyik fontos tápanyag, legtöbbször a fehérje, hiányzik vagy nagyon kis mennyiségű (kwashiorkor). Gyermekkorban fordul elő. Jellemző a kifejezetten nagy pocak, amit a szénhidrátban gazdag táplálék miatt kifejlődő ödéma okoz, bőrfertőzések, hasmenés és visszamaradt fizikai, szellemi fejlődés. A negatív nitrogén egyensúly legsúlyosabban az immunrendszer fehérjeszintézisét érinti, gyakori a másodlagos fertőzések okozta halál.

Mennyiségi éhezés (marasmus) egyszerűen a kevés táplálékot, csökkent energia bevitelt jelenti. Anyagcserénk jól alkalmazkodott a hosszan tartó éhezéshez: a felhalmozott zsír mennyiségétől függően hosszú hónapokig, fél évig is akár kibírjuk táplálék nélkül, természetesen, ha csak az energiaszükségletet nézzük. Gyakorlatilag a fellépő vitaminhiány és az immunrendszer hanyatlása mintegy egy hónap éhezés után olyan fokú, hogy fertőzések okozta megbetegedésekhez, halálhoz vezet.

„Kórházi éhezés" komoly problémája a hosszabb ideig tartó gyógykezeléseknek. A beteg rossz közérzete miatt már eredetileg is negatív nitrogén egyensúlyba kerülhet, amit még tovább ront a kezelés előkészítő fázisa (stressz, éhgyomorra történő vizsgálatok stb.). Bármilyen sebészi beavatkozás szintén éhgyomorra történik. A negatív nitrogén egyensúly elsősorban az immunrendszert érinti, pontosan akkor, amikor legnagyobb szüksége lenne a betegnek erős immunrendszerre a fertőzések leküzdésére.

Kövérség, obezitás

A modern nyugati világ betegsége. Ahogy szervezetünk hozzászokott a hosszabb éhezési periódusokhoz, ugyanúgy alkalmazkodott, a szükségesnél nagyobb mennyiségű táplálék felvételéhez és raktározásához. Ha az étkezések között nincs, vagy alig van éhezési periódus, egyre több tápanyagot raktározunk triglicerid formájában. A zsírral feltöltött adipociták ugyan termelnek egy leptin nevű hormont, mely a hipotalamusz éhségközpontját gátolja, de idővel ez a hatás lecsökken, egyfajta rezisztencia alakul ki. A túlsúly elsődleges rizikófaktora a szívinfarktusnak, ateroszklerózisnak, magas vérnyomásnak és a 2-es típusú diabétesznek. Orvosi kezelése elvileg egyszerű: diéta és mozgás.

1-es típusú diabétesz

Relatíve kisebb gyakorisággal fordul elő, gyerekek és fiatalkorúak betegsége. Egyértelműen inzulin hiánnyal jellemezhető, melynek oka a hasnyálmirigy β-sejtjeinek (gyakran fertőzéses vagy autoimmun eredetű) pusztulása.

A sejtek, szövetek energiaellátását szabályozó két hormon, a glukagon és az inzulin mindig jelen vannak a vérben, arányuk határozza meg az anyagcsere-folyamatok irányát. Jelen esetben az inzulin hiányzik, tehát marad a glukagon hatás: a beteg szervei úgy módosítják anyagcsere-folyamataikat, mintha a szervezet éhezne:

máj: vércukorszint emelése, zsírsavak bontása,
- glikogén bontás
- glukoneogenezis
- zsírsavak β-oxidációja
- ketontestek szintézise és szekréciója

izom: inzulinfüggő GLUT4 hiánya miatt csökkent glukózfelvétel,

zsírszövet:
- trigliceridek mobilizálása (hormonszenzitív lipáz),
- inzulinfüggő lipoprotein-lipáz hiánya miatt csökkent zsírsavfelvétel.

Ennek megfelelően nagyon magas vércukorszint (esetenként a glukóz megjelenik a vizeletben is), magas ketontest-koncentráció (acetonos lehelet), a csökkent lipoprotein-lipáz-aktivitás miatt megemelkedet lipoproteinszint a vérben (főleg kilomikron és VLDL) a jellemző tünetek. Kezelés nélkül egyértelműen halállal végződik. A kezelés inzulin rendszeres adása a vércukorszint ellenőrzése mellett.

2-es típusú diabétesz

Gyakori, a diabéteszes betegek mintegy 90–95%-át teszik ki. Általában túlsúlyos, idősebb korú (40–60 év) emberekre jellemző. Az inzulin jelen van a vérben, de a folyamatos (gyakori étkezés) inzulinhatás miatt inzulinrezisztencia alakul ki: a receptorához kötött inzulin nem vagy csak részlegesen fejti ki hatását. A szervezet anyagcseréje a következőképp módosul:

izom: a csökkent inzulin hatás miatt csökken a GLUT4 kihelyeződése a plazmamembránba,

zsírszövet: csökken az lipoprotein lipáz kihelyeződése, így a lipoproteinek (VLDL, kilomikron) felvétele,

máj: funkciója normális, a jóltáplált állapotra jellemző.

A gyakori étkezés és az izmok csökkent glukóz felvétele miatt magas vércukorszint alakul ki, a magas vércukorszint miatt májsejtekben fokozott a zsírsav és VLDL

szintézise. A zsírszövet csökkent lipoprotein lipáz szintje miatt a vérben megemelkedik a lipoproteinek koncentrációja, elsősorban a VLDL-é. Ketontest szintézis nem jellemző.

Kezelés nélkül nagyobb étkezés után a magas glukózszint ozmotikus sokkhoz vezethet, és hosszabb távon katarakta, perifériás és központi erek szűkülete, veseproblémák alakulhatnak ki, s ezek a betegek átlagos életkorát jelentősen megrövidítik. Kezelése során súlyosabb esetekben nem elkerülhető inzulin adása, kevésbé súlyos esetekben a diéta, több mozgás (súlycsökkenés) és gyógyszeres kezelés (glukoneogenezis gátlása, inzulinszekréció fokozása) elegendőnek bizonyulhat.

II/16. Biotranszformáció – gyógyszer-metabolizmus – méregtelenítés

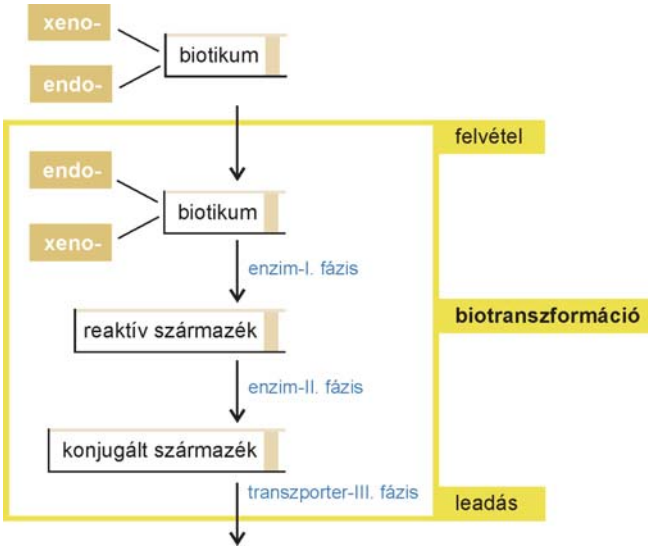
Mandl József

A kis molekulasúlyú anyagok intermedier anyagcseréje azokról a folyamatokról szól, amelyek tápanyagok, a szervezetet alkotó molekulák felvételét, lebontását, átalakítását, szintézisét célozzák. Vannak olyan kis molekulasúlyú molekulák, amelyek nem tápanyagok, de bekerülnek a szervezetbe, illetve olyan szervezetben termelődő anyagok, amelyek nem szubsztrátjai az intermedier anyagcsere enzimeinek. Ezeket biotraszformációs enzimek alakítják át elsősorban azzal a céllal, hogy elősegítsék távozásukat a szervezetből. Ez az átalakítás ezért méregtelenítésnek is felfogható, mivel a biotranszformációs reakciók nélkül e molekulák nem tudnának eliminálódni a szervezetből. A biotranszformációs enzimek külvilágból bekerülő, idegen molekula – xenobiotikum – szubsztrátjainak számát így felbecsülni is nehéz, hiszen étkezéssel, a tüdőn keresztül belégzéssel, a bőrön keresztül felszívódással rengeteg szervezettől idegen, természetes és mesterséges anyag kerül a szervezetbe. Ezek átalakítását igen kisszámú enzim végzi. Ebből adódóan szubsztrát specificitásuk, szemben az intermedier anyagcserében megismert enzimekkel, igen széles, sőt egymással átfedő. További különbség az intermedier anyagcsere enzimekkel történő összehasonlításban, hogy igen alacsony szubsztrát koncentráció ($<10^{-6}$ M) mellett is aktívak. A folyamatrendszer neveként a nemzetközi irodalomban elterjedt a drog (drug) metabolizmus használata is. A drug szó angolul gyógyszert is jelent. A drog metabolizmus így gyógyszer metabolizmusnak is fordítható. A biotranszformációs enzimek szubsztrátjai a gyógyszerek is.

A biotranszformáció szubsztrátjai azonban nemcsak xenobiotikumok. Számos kis molekulasúlyú endobiotikum sem képes belépni az intermedier anyagcserébe. Ezek átalakulása, lebontása és eliminálása szintén a biotranszformáció rendszerében történik.

II/16.1. A BIOTRANSZFORMÁCIÓ FOLYAMATA, FÁZISAI

A biotranszformációs enzimek, transzporterek által bonyolított reakciók általános sémája a következő: egy vegyület bekerül egy sejtbe (egyes értelmezések ezt a bekerülést a biotranszformáció nulladik fázisának tekintik, aminek esetleges transzportereit még nem mindig ismerjük), ahol az első, majd második fázis enzimreakciói során átalakul és a harmadik fázis transzporterei segítségével távozik a sejtből *(II/16-1. ábra).* Általánosságban az első, előkészítő fázis egy konjugációra alkalmas csoport létrejöttét segíti elő a vegyületben. A második, konjugációs fázisban megtörtént konjugáció után az enzimreakciók terméke alkalmassá válik arra, hogy transzporterek szubsztrátja legyen, amelyek segítségével a biotranszformáció harmadik fázisában távozik a sejtből. Ez az általános séma azonban nem jelenti azt, hogy egy vegyület minden esetben mind a három fázison keresztül menve átalakul, illetve így távozik a sejtből. Ezek a fázisok lehetőségeket jelentenek, egy-egy fázison



II/16-1. ábra
A biotranszformáció általános sémája. Különféle endo- és xeno-biotikumok a sejtekbe kerülve biotranszformációs enzimek szubsztrátjaivá válhatnak. A bekerülés után I. fázis-, majd II. fázis-enzimreakciók után a III. fázisban rendszerint transzporterek közvetítésével távoznak a sejtből

belül is több lehetőséget. A reakciósorozat részletekben több sejttípus részvételével is lejátszódhat.

A biotranszformációs enzimek és transzporterek számos sejtben expresszálódnak. A teljes biotranszformációs folyamatrendszer azonban csak kisszámú sejttípusban zajlik. A szervezet szempontjából a biotranszformáció legfontosabb szerve a máj; ezen belül a máj parenchyma sejtjei. A portális keringés kitűntetett szerepet biztosít a májnak. Keringés szempontjából a máj vérkeringése egyirányú utca; a májat gyakran tökéletesen szervezett vegyi üzemnek tekintik. A „kiindulási anyagok" nem keverednek a termékekkel. Az angolszász irodalomban használatos „first pass effect" révén a szájon át bekerülő anyagok a bélcsatornából történő felszívódás után keresztül kell, hogy menjenek a májon. Az ily módon szervezetbe került molekulák a máj parenchyma sejtjeibe kerülnek és ott átalakulnak. Ahogy mindez megtörténik étkezés után a posztprandiális fázisban a glukóz (vércukorszint szempontjából) „felesleggel", úgy a xenobiotikumok esetében is a máj egy fajta szűrő funkciót lát el a biotranszformációs enzim és transzporter rendszer révén. Az átalakulás reakcióinak eredményeképpen egy adott vegyület oldékonysága változik: zsíroldékonyból vízoldékonnyá válik. A máj parenchyma sejtjeiben a biotranszformáció végén az átalakult termék vagy a vérbe, vagy az epekanalikulusokba szecernálódik. A vérbe (vissza)került vegyület vízoldékonnyá válása lehetővé teszi, hogy a vizelettel távozzon, a vesében filtrálódjon a szűrletbe és reabszorpció nem lévén a vizeletben maradva eliminálódjon. A vízoldékonyság a kilégzés és a verejtéken keresztüli távozás lehetőségét is megteremti – biotranszformációs enzimek többek között a tüdőben és a bőrben is expresszálódnak. Az epébe történő transzport pedig a széklet útján történő kiürülés lehetőségét biztosítja. Ebben az értelemben tekinthetjük a biotranszformációt a méregtelenítés molekuláris folyamatrendszerének.

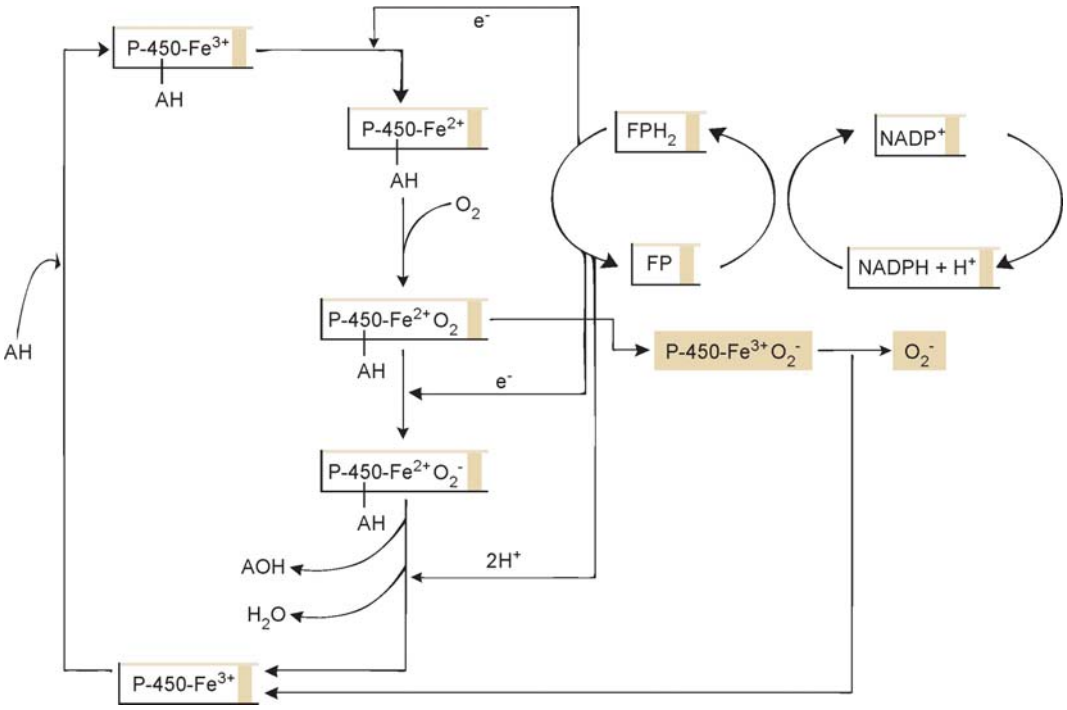
A biotranszformáció első, előkészítő fázisa

Ha az intermedier anyagcseréből indulunk ki, akkor az oxidoredukció a metabolizmus folyamataiban alapvető. Az oxidoredukció a biotranszformációban is meghatározó, míg azonban az intermedier anyagcserében a dehidrogenázok játszanak kulcsszerepet, addig a biotranszformációban a kevert funkciójú oxigenázok.

Az előkészítő fázis reakcióinak eredménye, hogy második fázis reakciókra alkalmas funkciós csoportok alakulnak ki, válnak konjugálhatóvá egy vegyületben. Ezek a reakciók zömében oxigenációk, emellett redukció, hidrolízis, hidratáció is elősegítheti a konjugálható csoport (karboxil, SH, amino, hidroxil) megjelenését.

Az oxigenációkat többkomponensű membránkötött elektrontranszfer lánc katalizálja, amely főként az endoplazmás retikulum (ER) membránjában expresszálódik. Flavoproteinből és citokrómokból áll, ezért a mitokondriális analógiára utalva mikroszomális légzési láncnak is tekintik, nevezik. Folyamatosan változó mennyiségű, indukálódó és represszálódó fehérjék vesznek részt a folyamatban, amelyek a hepatociták ER membránfehérjéinek 20%-át is kitehetik és jelentős – például gyógyszer – terhelés esetén a máj oxigén fogyasztásának 20%-áért is felelősek lehetnek. Ez az oxigén fogyasztás a kevert funkciójú oxigenázok oxigén igénye miatt válik szükségessé, amelyek a citokróm P450 monooxigenázok (P450) közé tartoznak. A névadó jelenség oka, hogy redukált formában CO-val képzett komplexük 450 nm-nél mérve jellemző abszorpciós maximumot mutat. A P450 izoenzimek elektron és proton igényét a NADPH-citokróm-P450-reduktáz flavoenzim elégíti ki. A rendszer működését a *II/16-2. ábra* mutatja.

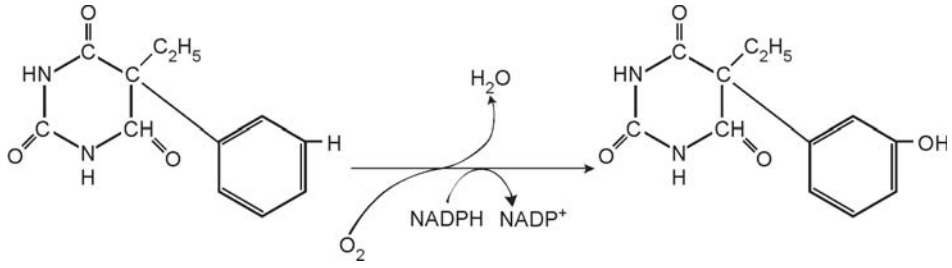
P450 rendszerek elektrondonorként NADH-val és NADPH-val is működhetnek. Biotranszformációs funkciójú ER kötött P450 rendszerek esetén NADPH a redukáló ekvivalens donor. Az elektrontranszfer lánc első tagja a más, ilyen típusú, membránkötött elektron transzfer láncoknál is tapasztalt működési logika szerint (plazmamembrán:NADPH-oxidáz, mitokondrium:terminális oxidáció) flavoprotein. A NAD(P)H miatti két elektron transzfer egy elektron transzfer átmenetet az egy- és két elektron átvitelt egyaránt lehetővé tévő flavoprotein – NADPH-citokróm-P450



II/16-2. ábra

A citokróm P 450 rendszer működése. A szubsztrát (AH) felvétele után a P 450 enzimet (P 450-Fe^{3+}) a NADPH terhére redukálódó citokróm P 450 reduktáz enzim (FP:flavoprotein) két lépésben redukálja. Az ennek során kötődő O_2 egyik oxigén atomja a szubsztrátba épül be (AOH), a másik vízzé redukálódik. A folyamatok során szuperoxid-anion O_2^- (pirossal jelölve) képződhet.

reduktáz – biztosítja, amely két lépésben visz át elektronokat a P450 izoenzimek hemjére *(II/16-2. ábra).* Mivel a hemoprotein O_2-kötésnek feltétele a hem-vas Fe^{2+} állapota, az első elektrontranszfer miatti Fe^{3+}–Fe^{2+} redukció az O_2-kötést teszi lehetővé. A második elektrontranszferrel az O_2 enzimkötött állapotban szuperoxid-anionná alakul. Ez a működés annak a veszélyét is jelenti, hogy a kötött O_2 „elektron-éhsége" nem „várja meg" a flavoproteinről érkező második elektront, hanem a Fe^{2+}-t Fe^{3+}-á oxidálja. Így a képződő szuperoxid aniont viszont a hem-Fe^{3+} már nem tudja kötni. Minden oxigént fogyasztó folyamat melléktermékе lehet ROS (lásd Bioenergetika fejezet). A P450 rendszer működése során ROS, $O_2^{\cdot-}$ képződhet. Ez egyben azt is jelenti, hogy a rendszer anélkül használ el egy NADPH-t, hogy az oxigenáció bekövetkezne. Az oxigenáció bekövetkezésével alakul ki a konjugálható intermedier *(II/16-3. ábra)*.



II/16-3. ábra

A fenobarbitál oxigenációja. Az oxigénmolekula egyik oxigénatomja hidroxilcsoportot képez, a másik redukálódik vízzé

Az első fázis célja további reakcióra képes termék létrehozása, így az esetek nagy részében reaktív, instabil, konjugációra képes, gyakran elektrofil intermedier jön létre. A következő reakció azonban nemcsak konjugáció lehet. Gyakran spontán, nem enzimatikus reakciókba is léphetnek, makromolekulák alkotóival. Az intermedierek hatására adduktok alakulhatnak ki fehérjéket alkotó aminosavakon, nukleinsavakat alkotó bázisokon. Így toxikus, patológiás folyamatok kezdődhetnek, kémiai karcinogenezis, teratogén, mutagén hatások következhetnek be.

A P450 izoenzimek a fehérje evolúció kedvelt objektumai. Ezen túlmenően a különböző izoformák, SNP-k okán a farmakogenomika, az individuális gyógyszerterápia előtérbe kerülése miatt szintén az érdeklődés középpontjába kerültek. Az ős P450 gén korát 3,5 milliárd évesre becsülik, 13 gén „szupercsalád" termékei a P 450 enzimek. Közülük a biotranszformációs izoenzimek 4 géncsaládba sorolhatók. A genetikai családfa különösen az elmúlt 400 millió évben a szárazföldi léttel összefüggésben bekövetkező étkezési és más változások az ezen géncsaládokba tartozó izoenzimek jelentős differenciálódását eredményezte.

A biotranszformációt – poétikus hajlammal is megáldott kutatók – a növény- és állatvilág közti küzdelem egyik terepének tekintik. A rendkívül változatos szerkezetű növényi anyagok a tápláléklánccal óhatatlanul bekerülnek az állati szervezetekbe. Ezeknek az anyagoknak egy része a növényvilág védekezése az őt pusztító élőlényekkel – így az állatvilággal – szemben. Egyes – esetleg éppen biotranszformációs enzimek révén szintetizálódó – növényi molekulák toxikusak állatokra. Míg az állatokban éppen ezen molekulák hatására indukálódó biotranszformációs enzimek ezeket a(z induktor) molekulákat átalakítják, méregtelenítik. Így a biotranszformációs enzimek léte túlélési érték; biztosítja a környezetből bekerülő anyagok átalakítá-

sát és eliminálását. A P450 differenciálódás legfőbb mozgatójának a növényvilágot tartják. A kemizáció a mesterséges induktorok elterjedését hozza, amelyeknek hatásai ma még nehezen mérhetők fel.

A P450 géncsaládokat számokkal jelölik; ezen belül az alcsaládokat nagy betűkkel, majd az egyes izoenzimeket az alcsaládokon belül ismét számokkal (pl. CYP1A1). Az egyes géncsaládok indukálhatósága intracelluláris receptorokhoz köthető. Ezeknek a receptoroknak egy részénél AHR (aryl hydrocarbon receptor: aromás szénhidrogén receptor), CAR (constitutive androstane receptor) a fiziológiás funkció, illetve a természetes ligand máig ismeretlen.

A CYP1 géncsaládhoz tartozó egyes izoenzimek indukciójának mechanizmusában az AHR szerepét igazolták. Az ide sorolható izoenzimek indukálhatósága egyes esetekben (pl. CYP1A1) akár százszoros is lehet. Induktoraik között számos mutagén, karcinogén, toxikus hatású policiklusos aromás szénhidrogént (dioxinszármazékok, cigarettafüst összetevők stb.), de gyógyszereket (pl. teofillin, fenacetin) is találunk. A CYP1A1 indukálhatósága és a bronchus carcinoma kialakulása között összefüggést találtak.

Rendkívül sokféle molekula indukálhatja a CYP2 géncsaládhoz tartozó izoenzimeket. Az aceton, etanol (CYP2E1) éppúgy induktora a több alcsaládba (CYP2A-H) sorolható izoenzimeknek, mint aromás szénhidrogének (benzantracén CYP2D), számos gyógyszer (egyes antiepileptikumok CYP2B, egyes vérnyomáscsökkentők CYP2D, fájdalomcsillapítók – paracetamol-, nyugatatók – diazepamszármazékok CYP2E1), vagy rákkeltő anyag (nitrózamin-származékok CYP2E1). Koincidenciát ismertek fel a CYP2D indukálhatósága és rosszindulatú daganatok – gastrointestinalis traktus, bronchuscarcinoma – előfordulása között.

A CYP3 géncsaládhoz tartozó gének induktorai többek között szteroidok (pl. fogamzásgátlók), antibiotikumok, immunszuppresszív gyógyszerek (ciklosporin) lehetnek. A CYP4 géncsalád induktorok között számos eikozanoid származék, lipid szerepel. A CYP4 indukcióban a PPAR (peroxisoma proliferation activator receptor) magi receptorok szerepe kimutatott.

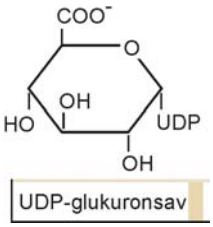
A P450 enzimek ezért a környezeti hatások vizsgálatára is igen alkalmas fehérjék. A TEXB (total effective xenogenic burden) egy újonnan bevezetett fogalom. A környezetből számos endokrin hatásokat utánzó – endocrine disrupter – kerül a szervezetbe, ami rendkívül veszélyes lehet. A környezeti hatások a teljes környezetszennyezést is jelentik. A levegővel és más módon a legkülönbözőbb anyagok kerülnek szervezetünkbe, amelyek egy jelentős részét csak úgy tudjuk eltávolítani, ha előbb biotranszformációs enzimekkel átalakítjuk. Az egyik legkiválóbb rovarirtó szer a DDT (diklór-difenil-triklóretán) azért tiltott, mert felhalmozódik az emberi szervezetben, éppen amiatt, mert nem tudjuk átalakítani. A P450 izoenzimek a biotranszformáció leginkább indukálható enzimei. A P450 profil a gyógyszerszedés, környezeti viszonyok, étkezési szokások függvényében állandóan változik, a mikroszomális légzési láncban a flavoprotein:citokróm arány is folyamatosan módosul.

A biotranszformáció második, konjugációs fázisa

A konjugációs enzimek különböző kofaktorokkal konjugálják a konjugációra képes funkciós csoportokkal rendelkező vegyületeket. Kofaktorok szerint csoportosíthatók, amennyiben ugyanazzal a szabad funkciós csoporttal rendelkező vegyület több konjugációs enzim szubsztrátja is lehet. A leggyakoribb konjugációs forma a konjugációk mintegy 80%-át jelentő glukuronsavas konjugáció. Általában igaz, hogy az első fázis után képződött nukleofil származékok glukuronsavval és szulfáttal, az elektrofil származékok glutationnal konjugálódnak elsősorban. Az elekrofil intermedierek esetében különösen nagy a veszélye a spontán addukt képződésnek.

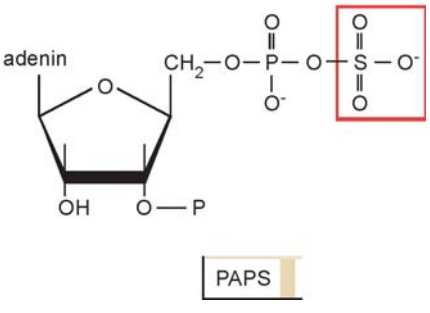
Glukuronidáció

A glukuronid-képződés UDP-glukuronsavval *(II/16-4. ábra)* történő konjugáció eredménye. Az UDP-glukuronsav UDP-glukózból képződik, így egyetlen molekula glukuronidációval történő eliminálása egy glukóz „veszteséggel" jár. A reakciót UDP-glukuronoziltranszferázok (UGT) katalizálják. Indukálhatóságuk átlagban 3-5 szörös – jóval kisebb, mint a P450 enzimeké. Indukciójukban a P450 enzimek indukciójában is résztvevő transzkripciós faktorok, illetve induktorok (pl. fenobarbitál, etanol) játszanak szerepet. Az UGT-k elsősorban a májban találhatóak, de a tüdőben, bőrben, vékonybélben, szaglóhámban is expresszálódnak. (A szaglás folyamatában az odoránsokat konjugáló UGT-k szerepe jelentős.) ER-membrán kötött enzimek, amelyek működése sokban hasonlít a szintén az ER membrán kötött glukóz-6-foszfatáz rendszerhez, amennyiben aktív centrumuk az ER luminális kompartmentben van és ER membrán transzport folyamatok is szükségesek a rendszer működéséhez. A különböző UGT-k két géncsaládba tartoznak. Az I. géncsalád izoenzimei fenolok, bilirubin konjugációját végzik. A II. géncsalád izoenzimei a szteroidok, epesavak konjugációáért felelősek.



II/16-4. ábra
Az UDP-glukuronsav szerkezete

A fiziológiásan és patológiai szempontból legismertebb természetes UGT szubsztrát a hem katabolizmus végterméke, a bilirubin. Glukuronidáció nélkül a bilirubin felhalmozódik, anyagcseréje megakad, sárgaság (icterus) alakul ki, ami megoldatlan esetben fatális. A bilirubint konjugáló UGT izoenzimek hepatocitákban expresszálódnak. A bilirubin- UGT-k indukciója – hasonlóan több, más hepatocitában expresszálódó enzimhez (pl glukokináz, glukóz-6-foszfatáz) – születés után történik; a magzati májban általában még nincs biotranszformáció, miként vércukorszint szabályozás sem. Ez a tény alapjaiban megszabja a szülő nő gyógyszeres kezelését, amennyiben a gyógyszer a magzati vérkeringésbe is bekerül, de a szülés után az újszülött nem tudja metabolizálni (morfium adása fájdalomcsillapítóként szülő nőnek ezért kontraindikált). Az újszülöttek hyperbilirubinémiája, amely főleg koraszülöttek betegsége, az UGT-k nem megfelelő indukciója miatt jön létre. A jóndulatú **Gilbert kór**ban a konjugálatlan bilirubin koncentrációja megemelkedik a szérumban. Ezt a lakosság jelentős részét (amerikai adatok szerint 6%-át) érintő állapotot a bilirubin- UGT-k expressziós zavara, SNP (single nucleotide polymorphism) a promoter régióban, idézi elő. Az I. géncsaládba tartozó enzim korai stop kodonja okozza a jóval súlyosabb *Crigler–Najjar-szindrómát*, amelynek különböző típusai között fatális következményekkel járók is lehetnek.



II/16-5. ábra
A szulfát donor PAPS szerkezete

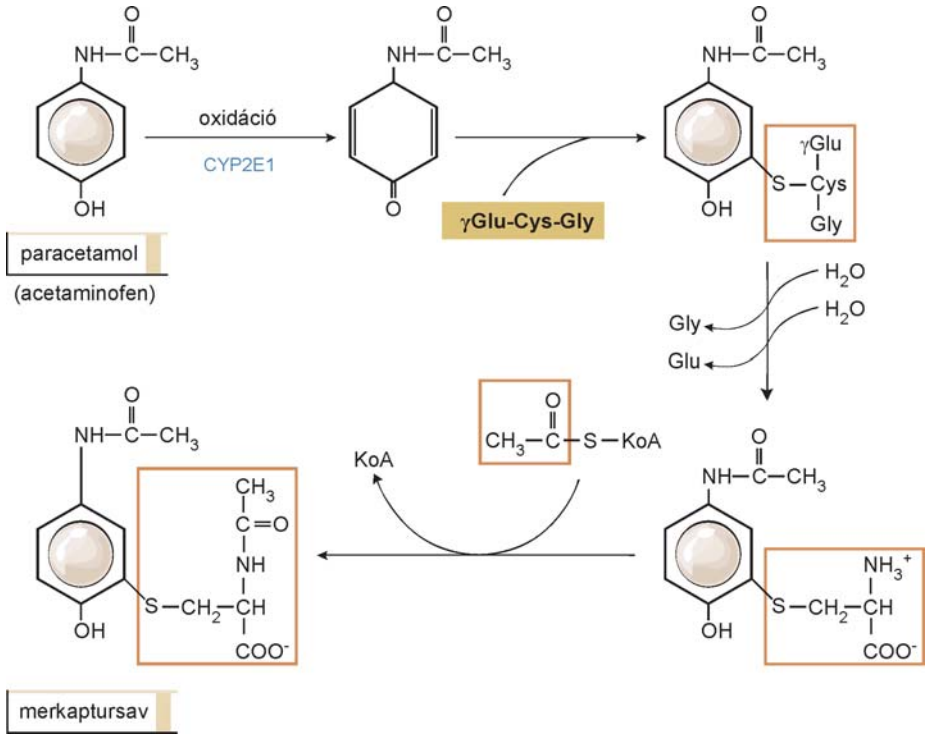
Szulfatálás

A szulfatálást a szulfotranszferázok katalizálják. A konjugáció kofaktora az aktivált szulfát, PAPS (3-foszfo-adenozin-5-foszfoszulfát) *(II/16-5. ábra),* amely szulfátból és ATP-ből képződik. A szulfát eredete kéntartalmú aminosavak oxidációja.

Glutationkonjugáció

Az emberi konjugációk kb. 10%-a glutationnal történik, két lépésben. Ennek első lépése az általában elektrofil szubsztrát glutationnal történő kapcsolódása,

amit a glutation-S-transzferáz (GST) katalizál és a glutation cisztеinje SH csoportjának részvételével jön létre (II/16-6. *ábra*). A második konjugációs lépés a glutationt alkotó glicin, majd a gamma-glutaminsav lehasadása után következik be a cisztein aminocsoportjának acetilálódásával. Az acetilcsoport donor az acetil-KoA.



II/16-6. ábra
A paracetamol konjugációja glutationnal

Metilezés

A metilezés a legkülönbözőbb, részben szabályozási célú, okokból történhet, így a konjugáció egyik formája is lehet. A metildonor kofaktor a SAM (S-adenozil-metionin).

A fentieken túlmenően aminosavakkal (epesavak) és más módon is konjugálódhatnak különböző molekulák. Összességében a kofaktor igény miatt valamennyi konjugációs forma energetikai szempontból is jelentős terhet ró az anyagcserére. Szabályozásuk gyakran koordinált indukcióval történik együtt az első fázisú oxigenázok, és a harmadik fázis transzporterek expressziójának szabályozásával. Erre példa az AHR „gene battery", amelyben a *CYP1A1* mellett *UGT* és *GST* is megtalálható.

A biotranszformáció harmadik fázisa

A biotranszformáció első két fázisa felfogható a sikeres transzport, kiürítés előkészítéseként. A konjugálódott molekulák szekrécióját transzporterek közvetítésével

történik. Az eddigi transzporter kutatások során a legtöbb információ a transzport ATP-ázok közé tartozó ABC (ATP Binding Casette) transzporterek szerepéről gyűlt össze. Az ABC transzporterek különböző biológiai szerepeinek egyike a konjugált molekulák szekréciójában való részvétel. Az ABC transzporterek egyik családja az MRP (multidrog rezisztencia protein). Hepatocitákban vagy a bazolaterális membránon keresztül a vér, majd vizelet, vagy az epén keresztül a széklet a lehetséges kiürítési irány. MRP1 és 3 expresszálódik a bazolaterális membránban, MRP2 az epekanalikulus részen. Az MRP2 károsodott experesszió ja okozza a Dubin-Johnson szindrómát májban, amely szintén icterust okoz. Oka a konjugált bilirubin MRP2 közvetítette transzportjának zavara, amely az icterus mellett pigmentlerakódást és hepatomegáliát is okoz.

A biotranszformáció jelentősége

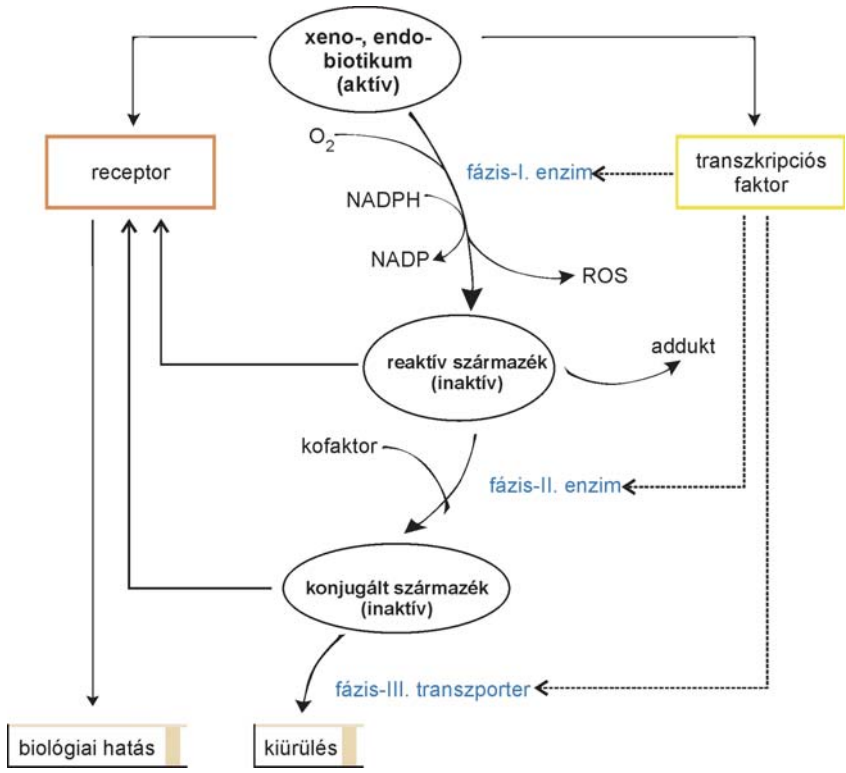
A biotranszformáció annak ellenére, hogy kiürülést, inaktiválást szolgál, metabolikus értelemben inkább szintetikus folyamatnak tekinthető. A NADPH fogyasztása mellett a sikeres biotranszformáció a konjugációs kofaktor szükséglet miatt közvetve jelentős ATP teher a metabolizmus számára. Koordinált szabályozása a gén expresszió szintjén gyakran együtt történik intermedier metabolizmus reakciók és komplex anyagcsere folyamatok szabályozásával (pld NADP redukáló enzimek, hem szintézis – P450 enzimek, ER membrán szintézis).

A biotranszformációs enzimek a legkülönbözőbb biológiai folyamatok részei lehetnek. Számos endogén, szabályozó – szignálként ható – molekula (pl. szteroid, eikozanoid hormonok) így inaktiválódik. Többen a szignál metabolizmust tekintik a biotranszformáció „eredeti", élettani funkciójának. Emellett azonban több szabályozó molekula képződésében is meghatározó reakciókat katalizálnak biotranszformációs enzimek – így például a szteroid hormonok szintézisében, epesavak szintézisében és konjugációjában, D-vitamin hidroxilációjában, peptid-leukotriének – LTD_4 képződésében. A leggyakoribb fiziológiás, biotranszformációs enzimekkel átalakuló anyagok különféle lipidek: retinoidok, szteroidok, zsírsav (különösen arahidonsav) származékok.

A széles szubsztrátspecificitás lehetőség a xenogén anyagok átalakítására. Ez általában inaktiválást jelent például a gyógyszer hatásban és a méregtelenítést biztosítja. Vannak azonban olyan molekulák, köztük gyógyszerek is, amelyeket éppen biotranszformációs enzimek aktiválnak. Ez nemcsak egyes gyógyszerek hatásában lehet előre kalkulált folyamat, hanem súlyosan károsító, mérgező anyagok hatásmechanizmusában is. Például a több élelmiszerben természetes anyagként jelen lévő nitrózamin származékok mindaddig ártalmatlan molekulák, ameddig májsejtjeinkben nem oxigenálódnak CYP2E1 izoenzimekkel. Ekkor válnak rákkeltővé.

Idegen eredetű molekulák, gyógyszerek nemcsak biotranszformáció szubsztrátok, hanem induktorok is. Idegen ligandjai nemcsak gyógyszerhatásokat közvetítő receptoroknak, hanem közvetlenül, vagy közvetve a lebontásukat katalizáló enzimek képződését szabályozó transzkripciós faktoroknak is *(II/16-7. ábra)*. Az indukálhatóság mértéke szubsztrátonként/ligandokként változhat; az indukált/represszált állapot azonban valamennyi metabolikus szubsztrát lebontását megváltoztatja. Az átfedő szubsztrátspecificitás a kölcsönhatások tág rendszerét teremti meg: részint a szubsztrátok ugyanazon enzimekért versengenek, másrészt esetleges indukciós hatásuk szintén több más molekula átalakulását befolyásolhatja; az indukcióban részt vevő transzkripciós faktorok is több enzim indukciójához vezethetnek. Ez alapvetően változtathatja a gyógyszerek, dózisát, toxicitását, kölcsönhatásait, hatásukat.

A farmakogenomika ma már külön tudomány. A biotranszformációs enzimek genetikai polimorfizmusa intenzíven vizsgált terület, gyógyszerfejlesztési szempontból is jelentős kérdéskör, az individuális gyógyszerterápia egyik alap problémája. Különböző személyeknél ugyanaz a gyógyszer eltérő sebességgel alakul át, megkülönböztetnek különböző fenotípusokat: PM (poor: lassú), EM (extensive: gyors) metabolizálókat és ezek altípusait. A gyors metabolizmus nagyobb dózist tesz szükségessé. Ha az első fázist katalizáló enzim indukált állapotban van, ez aztán számos más anyag metabolizmusát is gyorsíthatja, ami azzal is járhat, hogy az első fázis végén keletkező reaktív intermedierek mennyisége megnő. Például az alkohol számos enzim induktora, többek között közvetve befolyásolja a tesztoszteron metabolizmusát, a diazepam típusú nyugtatók anyagcseréjét és gyorsíthatja a nitrózamin származékok metabolizmusát is, ugyanakkor, mint szubsztrát kompetálhat is velük. Mindez része lehet az adverz gyógyszerhatások kialakulásának; egymástól teljesen eltérő hatású, kémiai szerkezetű gyógyszerek befolyásolhatják egymás hatásait, dózisát ennek összes veszélyeivel.



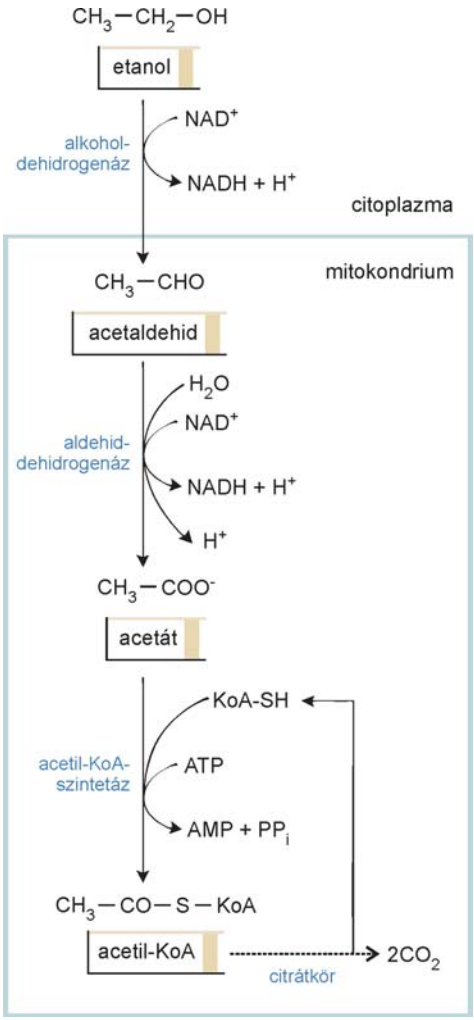
II/16-7. ábra

A gyógyszer-metabolizmus összefoglalása. Az élettani (szignál) vagy idegen eredetű (gyógyszer) kis molekulasúlyú anyag a biotranszformáció szubsztrátja kötődik (kihúzott nyíl) egyrészt a biológiai hatást (pl. vérnyomáscsökkentést) közvetítő receptorhoz és másrészt biotranszformáció szabályozásában részt vevő transzkripciós faktor LBD (ligand binding domain) doménjéhez. A transzkripciós faktor befolyásolja (szaggatott nyíl) biotranszformációs enzimek és transzporterek expresszióját, amelyek a molekulával enzim–szubsztrát, illetve transzporter–szubsztrát komplexet képezve átalakítják (vastag nyíl) a molekulát, illetve származékait.

II/17.
Alkoholmetabolizmus

Csala Miklós

Az etanol orvosi-biokémiai szempontból rendkívül ellentmondásos molekula. A táplálék természetes komponense (egyes élesztőgombák termelik), melyet azonban ipari méretekben mesterségesen állítanak elő. Viszonylag csekély toxicitással rendelkezik (magas az 50%-os elhalálozást kiváltó dózisa – az LD50 értéke), rendszeres fogyasztása mégis rengeteg ember haláláért felelős. Az anyagcserében hasznosítható energiatartalma a szénhidrátoké és a lipideké közé esik, ezekkel összevethető mennyiségben fogyasztjuk, mégsem soroljuk az alapvető tápanyag-molekulák közé. Mindezen ellentmondásokkal összhangban az alkohol metabolizmusa az energiahasznosító intermedier anyagcsere és a (méregtelenítő) biotranszformáció határmezsgyéjén helyezkedik el.



II/17-1. ábra
Az etanol mint tápanyag metabolizmusa

II/17.1. AZ ALKOHOL MINT TÁPANYAG

Az etanolt a májsejtek citoplazmájában *alkohol-dehidrogenáz* alakítja át acetaldehiddé, és a keletkező NADH – a glikolízisben termelthez hasonlóan – megtalálja az utat a légzési lánchoz, így 1,5-2,5 ATP termeléséhez járul hozzá (lásd az Oxidatív foszforiláció fejezetet). Az acetaldehid a mitokondrium mátrixban *aldehid-dehidrogenáz* segítségével továbboxidálódhat acetáttá. Ez újabb – ráadásul az I. komplex által közvetlenül felhasználható, vagyis 2,5 ATP-vel egyenértékű – NADH termelését jelenti. A végtermék acetát pedig 2 ATP-nyi energia ráfordításával acetil-KoA-vá aktiválható *(acetil-KoA szintetáz),* ami a *citrátkör*ben eloxidálódva további 10 ATP keletkezését teszi lehetővé *(II/17-1. ábra).* Amíg a máj jól működik, és az etanol csak alacsony koncentrációban van jelen, a felvázolt folyamat hatékonyan hasznosítja e tápanyag-molekula energiáját. Igaz azonban, hogy a lépések nem szabályozottak, így sebességüket csak az enzimek/szubsztrátok/kofaktorok mennyisége korlátozza. Sőt, az alkohol iránt nagy affinitással rendelkező alkohol-

dehidrogenáz már alacsony szubsztrátkoncentráció esetén telítődik; vagyis aktivitásának csak a NAD^+ elérhetősége szab határt. Ezért az etanol jelentősen emeli a [NADH]:[NAD^+] arányt a májsejtekben, ami az anyagcserét jelentősen megzavarja. Ha a szintén szabályozatlan acetil-KoA-dömpinget is figyelembe vesszük, látható, hogy jelentős hasonlóság van az alkohol és a fruktóz anyagcseréje között. Nem véletlen, hogy mindkettő okozhatja zsírmáj kialakulását, előnytelenül változtatja a vérplazma lipidprofilját, és mindkettő csábításának nehéz ellenállni.

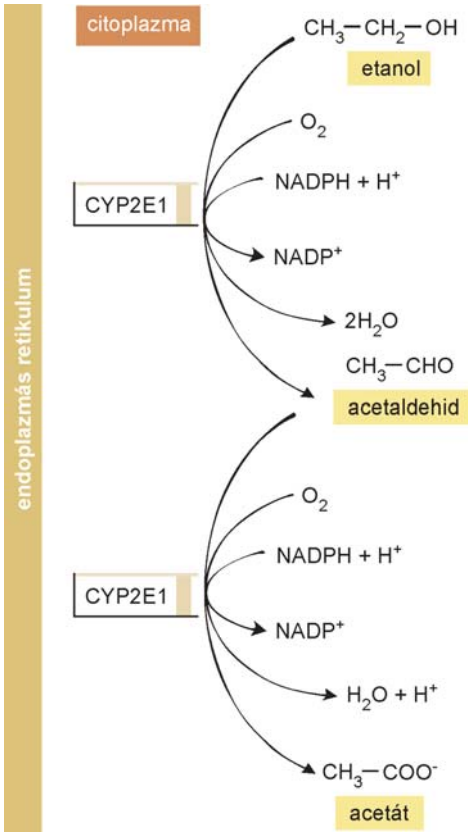
Nagyobb mennyiségű alkohol fogyasztása esetén a helyzet jelentősen megváltozik. Egyrészt a membrán- és fehérjekárosodások miatt sérül az oxidatív foszforiláció (és részben szétkapcsolódik), ezért romlik az energiahasznosítás hatásfoka, ami kihat a többi tápanyag-molekula felhasználására is. Másrészt ilyenkor akcióba lép az etanolt méregtelenítő és energiaigényes biotranszformáció, vagyis az alkohol csak kis mértékben tápanyag, nagy mértékben xenobiotikum.

II/17.2. AZ ALKOHOL MINT XENOBIOTIKUM

Az etanol az alkohol-dehidrogenáz mellett néhány citokróm P450 izoenzimnek, különösen a *CYP2E1*-nek is szubsztrátja. A kisméretű xenobiotikumok (a gyógyszerek jelentős része) monooxigenálására specializálódott, és etanol iránt viszonylag kis affinitást tanúsító enzim mérgektől mentes környezetben igen alacsony mennyiségben van jelen az endoplazmás retikulum membránjában. Induktorai között szerepel maga az etanol is, ezért rendszeres alkoholfogyasztás esetén kapacitása jelentősen emelkedik. Az etanol metabolizmusában tehát akkor vesz részt számottevő mértékben, ha indukált állapotban van (alkoholizmus) és/vagy a szubsztrát koncentrációja magas (ittasság/részegség).

Szerves kémiai szempontból érdekes és tanulságos, hogy a CYP2E1 oxigénatomok beépítésével ugyanazokat az intermediereket hozza létre etanolból, amelyeket az alkohol-dehidrogenáz és az aldehid-dehidrogenáz hidrogénatomok elvonásával *(II/17-2. ábra)*. A NADPH-t és O_2-t igénylő reakciók először acetaldehiddé, majd acetáttá alakítják az alkoholt. Az alkohol mint xenobiotikum a biotranszformációnak csupán az első fázisán megy keresztül, mert annak terméke nem konjugálandó, hanem lebontandó molekula. A méregtelenítés és az energiatermelő metabolizmus tehát ezen a ponton is egybemosódik. Egy-egy NADPH felhasználása ugyanannyi ATP elvesztését jelenti, mint amennyit a sejt a NADH-termeléssel nyer. Hiába folytatódik tehát a lebontás az acetát katabolizmusával, az energiatermelés minimális (nem is beszélve annak romló hatásfokáról).

Az alkohol káros hatásai a redox eltolódás ([NADH]:[NAD^+] arány emelkedése), az acetalde-



II/17-2. ábra
Az etanol mint xenobiotikum metabolizmusa

hidémia (adduktképződés, antioxidáns védelem károsodása), a CYP2E1-indukció (hormon- és gyógyszermetabolizmus felborulása, hipoxia és oxidatív stressz) révén következnek be. E folyamatok részletezése azonban már a patobiokémia tárgykörébe tartozik.

Egyéni különbségek az alkohol metabolizmusában

A szervezetbe kis mennyiségben bejutó xenobiotikumok méregtelenítő folyamatai rendszerint az elsőrendű, illetve látszólagos elsőrendű reakciók kinetikáját mutatja, vagyis a sebesség nagyjából arányos a kiindulási koncentrációval, ezért a folyamat állandó (a kiindulási koncentrációtól független) felezési idővel jellemezhető. Az etanol azonban olyan különleges xenobiotikum, amely nagy mennyiségben jut a szervezetbe, és az őt metabolizáló enzimek telítődnek, vagyis a sebesség lényegében független a kiindulási koncentrációtól. Az ilyen, nulladrendű kinetikát mutató méregtelenítés nem felezési idővel, hanem magával a sebességgel jellemezhető. Ez a sebesség – ugyan nemtől és tápláltsági állapottól valamelyest függ – átlagosan 120 mg/óra/ttkg. Egy 80 kg testtömegű férfi egy „adag" szeszes italt (amely 10 g etanolt tartalmaz; pl. 1 dl bor, 2-3 dl sör, 2-2,5 cl pálinka stb.) valamivel több mint egy óra alatt bont le, egy 50 kg-os nő kb. két óra alatt.

Bár biokémiai szempontból energiaforrásként és/vagy méregként tekintünk az etanolra, annak fogyasztása leginkább a molekula sajátos fiziko-kémiai tulajdonságaival, valamint az ezeknek köszönhető pszichés és neurológiai hatásaival függ össze. A sokak által kedvelt gátlás- és feszültségoldó, euforizáló stb. hatások az etanol (vér)koncentrációjától függenek, és a hatóanyag acetaldehiddé alakulásával átadják helyüket az acetaldehidémia igen kellemetlen szomatikus tüneteinek. Hogy egy adott személyre milyen mértékben hat az alkohol, illetve az élmény mennyire kellemes vagy inkább kellemetlen, azt a fent vázolt metabolizmusban résztvevő enzimek mennyisége és aktivitása jelentős mértékben befolyásolja.

Szeszes italt ritkán fogyasztó személy esetében kulcskérdés az alkohol-dehidrogenáz és az aldehid-dehidrogenáz egymáshoz viszonyított aktivitása. E két enzim indukálhatósága korlátozott, ezért az egyéni különbségek alapvetően a két enzim genetikai polimorfizmusából – és nem a táplálkozási szokások különbözőségéből – adódnak. Ha az alkohol-dehidrogenáz lassú (alacsony expresszió vagy kis v_{max} miatt), a termelődő acetaldehid azonnal tovább tud oxidálódni, a bódulatot (ittasság) csekély mellékhatás kíséri. Ha az alkohol-dehidrogenáz gyors, az ital hatóanyaga hamar eliminálódik, így nehezen fejti ki a kívánt hatást. Ha még ráadásul a folyamat második lépése sebességmeghatározóvá válik, mert az aldehid-dehidrogenáz aktivitása nem tud lépést tartani az acetaldehid keletkezésével, az ivás gyötrelmes következményekkel jár. Ezt a jelenséget az orvostudomány is kihasználja, amikor az aldehid-dehidrogenáz gátlásával próbálja elősegíteni a szeszesitalról való leszokást. Az enzim hatékony inhibitora, a diszulfiram nevű gyógyszer, azt a célt szolgálja, hogy az alkoholfogyasztás következtében kialakuló súlyos acetaldehidémia, illetve ennek tüneteitől (pl. fejfájás, vérbőség az arcon, hányinger, hányás, mellkasi fájdalom, gyengeség, látászavarok, zavarodottság, verítékezés, légszomj) való félelem elvegye a páciens kedvét az ivástól.

Az alkohol biotranszformációjáért felelős CYP2E1 esetében nem is annyira a polimorfizmus, mint inkább az indukáltsági állapot döntő. Etanol (szubsztrát) jelenlétében az enzim konformációja úgy változik meg, hogy gyors, proteaszomális lebontása elmarad, és helyét lassú, autofagoszomális-lizoszomális degradáció veszi át. A fehérje eredeti, 7-órás féléletideje kb. 37-órásra hosszabbodik, ami változatlan fehérjeszintézis mellett jelentősen növeli a működő enzim mennyiségét, és így az út-

vonal kapacitását. Ez tehát a CYP2E1, korábban említett, etanol általi „indukciójának" valódi mechanizmusa. Fontos következménye pedig, hogy (1) rendszeres italozással fokozható az alkoholmetabolizmus sebessége, és csökkenthető annak energiatermelő képessége, (2) alkoholistákban az oxigénfogyasztó és ROS-termelő metabolizmus dominál, ami a hipoxia és az oxidatív stressz kombinációja révén fokozott veszélyt jelent a májra, és (3) az alkoholfogyasztás jelentősen befolyásolja számos xenobiotikum (köztük sok gyógyszer) biotranszformációját. Ez utóbbira fontos példa az acetaminofen (paracetamol), amelynek – indukált CYP2E1 esetén – nagymértékben felhalmozódhat toxikus intermediere, és ez gyakran vezet (akár halálos kimenetelű) májkárosodáshoz.

III.
FEJEZET

JELÁTVITEL, CELLULÁRIS ÉS SZUBCELLULÁRIS BIOKÉMIA

III/1. Jelátvitel
(Buday László, Sipeki Szabolcs)

III/2. Intracelluláris jelek érzékelése és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli pályák
*(*Bánhegyi Gábor*)*

III/3. Kronobiokémia (a cirkadián óra biokémiája)
(Bánhegyi Gábor*)*

III/4. Az eukarióta sejtciklus szabályozása
(Csala Miklós)

III/5. Apoptózis
(Csala Miklós)

III/6. Az öregedés molekuláris biológiai alapjai
(Sőti Csaba)

III/7. Az extracelluláris mátrix
(Csermely Péter)

III/8. Szubcelluláris biokémia
(Bánhegyi Gábor)

III/1.
Jelátvitel

Buday László, Sipeki Szabolcs

A többsejtű szervezet számára alapvető fontosságú, hogy minden sejtje fogadja és feldolgozza a környezetéből származó, őket célzó ingereket, jeleket. A jelek számos formában érkezhetnek a sejthez, úgy, mint hormonok, neurotranszmitterek, növekedési faktorok, de a fény erősségének, vagy az oxigén koncentrációjának változása is lehet jel. Az extracelluláris jelek olyan mechanizmusokat aktiválnak, amelyek a sejt válaszreakciójához vezetnek. Az extracelluláris jel minden esetben információt hordoz a sejt számára, amelyet specifikus receptorokkal fog fel, majd kémiai folyamatokkal alakít át sejtválasszá. Az információ kémia folyamattá alakítását nevezzük jelátvitelnek, amely minden sejt általános képessége. Ugyanakkor ma már ismert, hogy válaszreakciót kiváltó jelek a sejt belsejéből is származhatnak. A belső jelek az extracelluláris jelekhez hasonló, azokkal részben átfedő jelátviteli utakat használhatnak. Példa erre az apoptotikus jelpályák aktiválódása a DNS sérülését követően.

III/1.1. A RECEPTOROK

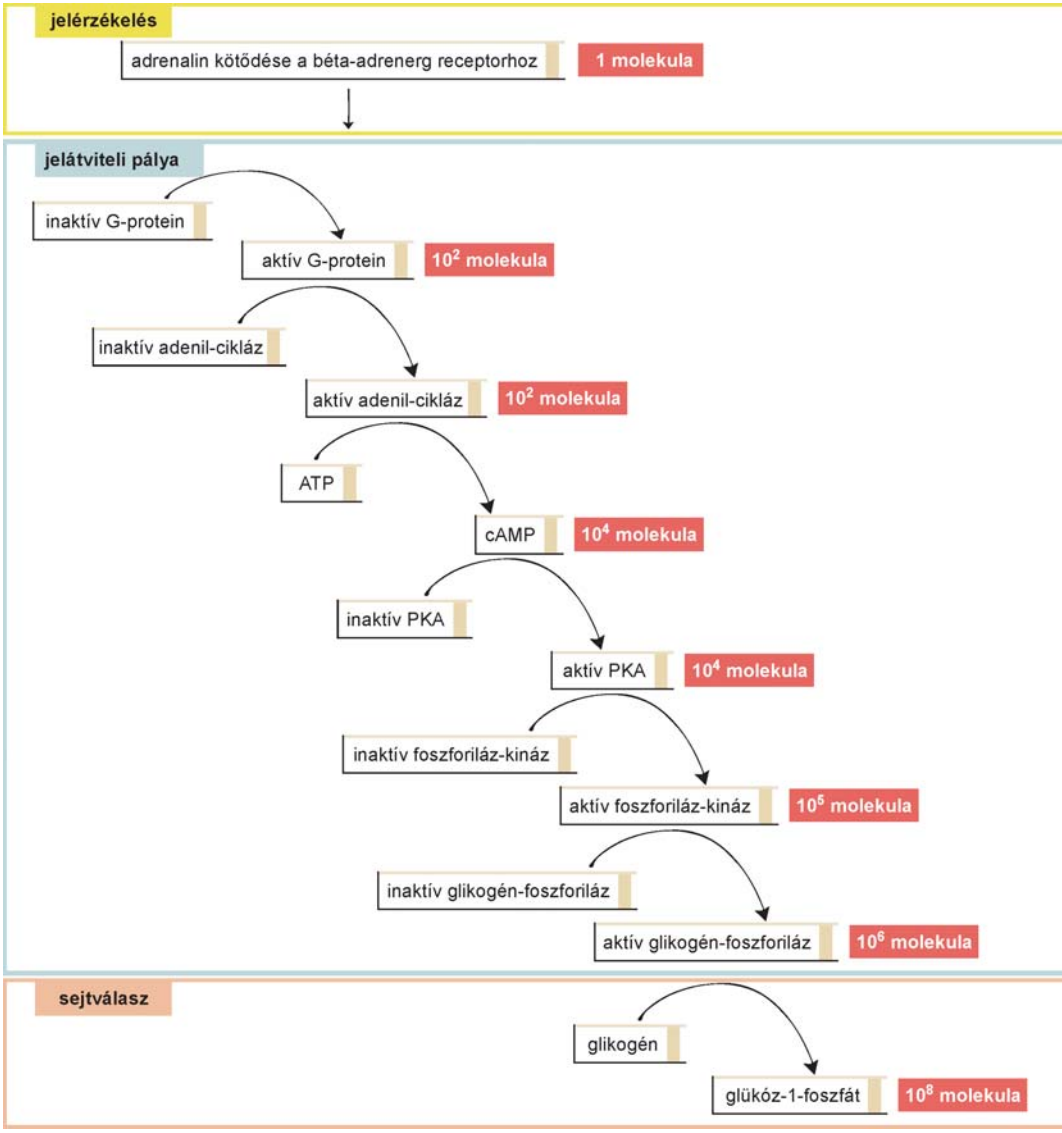
A jelátviteli mechanizmusokat sokféleképpen lehet osztályozni, mégis leggyakrabban az extracelluláris jelet felfogó receptor elhelyezkedése, illetve működési mechanizmusa alapján érdemes kategorizálni őket. Ennek alapján megkülönböztetünk intracelluláris és plazmamembrán receptorokat. Az intracelluláris receptorok a sejten belül, a citoplazmában vagy a sejtmagban helyezkedhetnek el. A plazmamembrán receptorokat további négy csoportba lehet osztani, ezek a receptor-ioncsatornák, az enzimaktivitást mutató receptorok, az enzimhez közvetlenül kapcsolt receptorok, valamint a heterotrimer G-fehérjékkel működő receptorok.

A receptorokhoz kötődni képes molekulák kémiai természetüket tekintve igen eltérőek. A kisméretű, vízoldékony hírvivők, mint az adrenalin vagy az inzulin, plazmamembrán-receptorokhoz kötődnek. Ugyancsak sejtfelszíni receptorok ismerik fel a hidrofób ligandok közül a prosztaglandinok egyes képviselőit. Ezzel szemben intracelluláris receptorokhoz kötődnek a plazmamembránon átdiffundálni képes kis molekulatömegű hidrofób vegyületek. Említést kell tenni a bizonyos sejtek felszínén hordozott, fehérjetermészetű ligandokról is (például ephrinek). Ebben az esetben is sejtfelszíni receptorok fogadják a jelet, de a jelátvitel létrejöttéhez közvetlen sejt-sejt érintkezés szükséges.

Minden receptor nagy szelektivitással és affinitással köti azt a molekulát, amelyre specializálódott. Ligandoknak nevezzük mindazokat az endogén vagy exogén, természetes vagy mesterséges anyagokat, amelyek a receptorhoz kötődnek. A ligandok közül az agonisták azok az anyagok, amelyek a receptort aktiválják. Az antagonisták a receptort nem aktiválják, de még az agonisták hatását is megakadályozzák. Az olyan receptorok esetében, amelyeknek ligand kötése nélkül is van alap- avagy bazális aktivitása, a farmakológiában elkülönítik az úgynevezett inverz

agonistákat, amelyek szelektíven kötődnek a receptorhoz és nemcsak az agonista hatását akadályozzák meg, hanem a receptor bazális aktivitását is gátolják.

Az aktivált receptorok által elindított különböző jelpályák főbb komponensei között találunk GTP-kötő fehérjéket, intracelluláris mediátorokat (másodlagos hírvivő molekulákat) előállító enzimeket, intracelluláris mediátorokat, protein-kinázokat és foszfoprotein-foszfatázokat, illetve specifikus doménekkel rendelkező kapcsoló fehérjéket. A specifikus domének a jelpályák komponenseinek megfelelő szubcelluláris lokalizációját segítik elő. Bizonyos receptorok egyszerre több jelpályát is képesek stimulálni.



III/1-1. ábra
A jel erősödése (amplifikációja): a glikogén bontása izomban adrenalin hatására

A ligand-receptor kötődés hatására, ahogy látni fogjuk, legtöbbször egymást követő enzimreakciók láncolata fog kialakulni, melynek eredményeként bekövetkezik a válaszreakció. Az egy-egy jelpályában szereplő komponenesek láncolatát azonban nem úgy kell elképzelnünk, mint az egymást ledöntő dominókat. A jelpályákban szereplő fehérjék ugyanis nagyon gyakran komplexekbe tömörülnek, másrészt az egymást követő enzimreakciókban egyre több szubsztrát alakul át, így az extracelluláris jel nagyságrendekkel felerősödhet. Ráadásul pozitív visszacsatolási reakciók is erősíthetik a jelet. Így lehetséges például az, hogy az emberi vérben a táplálkozást követően az inzulin koncentrációjában bekövetkező nanomólos nagyságrendű emelkedés a vércukorszint koncentrációjában millimólos változásokat képes indukálni *(III/1-1. ábra)*.

III/1.2. PROTEIN-KINÁZOK ÉS FOSZFOPROTEIN-FOSZFATÁZOK

A fehérjék leggyakoribb reverzíbilis poszttranszlációs módosítása a hidroxilcsoporttal rendelkező aminosavak oldalláncainak észteresítése foszforsavval. Ezt a jelenséget foszforilációnak nevezzük. A foszforiláció az egyik legtöbbször kialakuló jelenség a jelátvitel során. A reakciót protein-kinázok katalizálják, melyek ATP γ-helyzetű foszfátját helyezik át a szubsztrát fehérjére. A foszfát eltávolítását a foszfoprotein-foszfatázok, röviden foszfatázok végzik. Szigorú értelemben véve a foszfatázok nem a protein-kinázokkal ellentétes irányú reakciót katalizálják, mert hidrolízissel hasítják le a foszfát-csoportot, így hatásukra foszforilálatlan fehérje és P_i keletkezik. A fehérjefoszforiláció jelentőségét mutatja, hogy az emberi genom igen sokféle kinázt és foszfatázt kódol. A specifikus funkciók kialakításában fontos szerepet játszik, hogy számtalan kináz és foszfatáz több izoformában létezik, sok esetben pedig alegységekből állnak össze.

A foszforilálható aminosavak a szerin, a treonin és a tirozin. A foszforilált tirozin megjelenése általában új fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását teszi lehetővé, így egyfajta kristályosodási magot szolgáltat jeltovábbító komplexek kialakulásához. A szerin és a treonin foszforilációja szintén hatással lehet a fehérje-fehérje kölcsönhatásokra, de enzim-szubsztrátok esetén sokszor eredményez olyan konformáció-változást, amely közvetlenül befolyásolja a katalitikus aktivitást. Az, hogy a foszforiláció ki- vagy bekapcsolást jelent-e, mindig a regulált fehérje tulajdonsága. Ennek szép példája a glikogén szintézis és lebontás szabályozása: foszforilálva aktív a bontó glikogén-foszforiláz, ellenben foszforilálva inaktív a glikogén-szintáz. Foszforiláció hatására megváltozhat még a fehérje affinitása a ligandja iránt, a fél-életideje, a szubcelluláris lokalizációja, transzkripciós faktorok esetén a DNS-affinitás. Egy-egy fehérjében több foszforilációs hely is előfordulhat, melyek különböző kinázok célpontjai, így hatásaik a fehérje funkciójára eltérők is lehetnek. Olyan esetek is előfordulnak, amikor az első kináz által katalizált foszforiláció teszi a fehérjét a funkciót ténylegesen befolyásoló második kináz szubsztrátjává. Ez a kijelölő foszforiláció (angolul priming).

A protein-kinázok

A protein-kinázokat az általuk foszforilált oldallánc alapján két fő csoportba soroljuk, ezek a szerin/treonin-kinázok és a tirozin-kinázok. Genetikai eredetük közös, de itt nem a családfájuk alapján kerülnek bemutatásra. A továbbiakban, ha másként

nem definiáljuk, az említett kináz mindig szerin/treonin-kináz. Enzimek működését elsősorban ilyen kinázok befolyásolják közvetlenül. A tirozin-kinázok elsőként megismert képviselője az Src citoplazmatikus tirozin-kináz, melynek jellegzetes szerkezeti elemei, az SH2 és SH3 (*S*rc *H*omológia) domének a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását biztosítják és sok egyéb, a tirozin-kinázok rendszerében szereplő jeltovábbító fehérjében előfordulnak. Létezik kettős specificitású protein-kináz is (*M*ap/*E*rk *K*ináz: MEK), amely igen kisszámú szubsztrátját egyetlen aminosavval elválasztott treonin és tirozin oldalláncán egyszerre foszforilálja.

A szubcelluláris lokalizáció alapján megkülönböztethetünk transzmembrán és intracelluláris protein-kinázokat. A transzmembrán kinázok egyben receptorok is, melyek az extracelluláris ligand megkötésével aktiválódnak, ekkor képes az intracelluláris doménjük autofoszforilációja, illetve intracelluláris szubsztrátok foszforilációja révén jelpályákat elindítani. Receptor szerin/treonin-kinázok egy citokin, a TGFβ receptorának polipeptidláncai. Receptor tirozin-kinázok a növekedési faktorok és az inzulinreceptorai.

Az intracelluláris kinázok működésének regulációja igen változatos. A kinázok egy nagy csoportját allosztérikus ligandok aktiválják. Számos jelpálya működésének bizonyos lépésében másodlagos hírvivők jelennek meg, ezek egy része allosztérikus aktivátora a megfelelő enzimnek. A c*A*MP a protein-kináz-*A* (PKA = cAMP-dependens protein-kináz), a c*G*MP a protein-kináz-*G* (PKG = cGMP-dependens protein-kináz), a diacil-glicerin (DAG) a protein-kináz C (PKC) aktivátora.

Az intracelluláris protein-kinázok egy részét más kinázok által katalizált foszforiláció kapcsolja be vagy ki. A másodlagos hírvivő szerepet betöltő foszfatidil-inozitol-3-foszfát membránlipidek úgy segítik elő a protein-kináz-B (PKB/Akt) aktiválódását, hogy a PKB/Akt-ot és a PKB/Akt-ot foszforilációval aktiváló protein-kinázt (3-foszfatidil-inozitol-dependens protein-kináz-1, PDK1) összeterelik. A két enzim egymás szomszédságában kötődik ezekhez a membránlipidekhez, ezért tudja a PDK1 foszforilálni a PKB-t.

Az egymás után aktiválódó kinázok úgynevezett kináz kaszkádokat alkothatnak, melyek egyik funkciója a jel erősítése. A növekedési faktorok jelpályájában megismert MAP-kináz kaszkádok például nevüket az utolsó lépcsőn álló, transzkripciós faktorokat foszforiláló MAP-kinázokról kapták. A kinázkaszkádok többlépcsős felépítése és a bizonyos lépcsőkben álló kinázok többszörös foszforilálhatósága ugyanakkor megteremti a jelpályák közötti kereszt-szabályozás lehetőségét is.

A működést gátló foszforiláció egyik jellegzetes példája a glikogén-szintáz foszforilációja. Ez két lépésben történik, az inaktiválást ténylegesen előidéző második foszforilációt a glikogén-szintáz-kináz-3β (GSK3β) csak akkor tudja katalizálni, ha előzőleg a PKA elvégezte a kijelölő foszforilációt a glikogén-szintázon.

Az anyagcsere szabályozásában fontos szerepet játszó AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) a sejt alacsony energiatöltésekor kapcsol be AMP (nem a cAMP!) hatására. Az AMP olyan konformáció változást okoz, melynek eredményeként a konstitutívan aktív LKB nevű protein-kináz hozzáférhet és képes az AMPK-t foszforilációval bekapcsolni.

Számos esetben a kinázok működését fehérje-fehérje kölcsönhatások szabályozzák. Erre jó példa a Ca^{2+} által szabályozott protein-kinázok működése. A Ca^{2+} ugyancsak intracelluláris mediátor (másodlagos hírvivő) szerepet tölthet be. Ha a citoszolban a nyugalmi, alacsony koncentrációhoz képest megemelkedik a szintje, akkor a kalmodulin nevű fehérjéhez kötődik. A Ca^{2+}-kalmodulin komplex aktiválja a Ca^{2+}-kalmodulin-függő protein-kinázokat (CaMK).

Számos protein-kináz esetében az aktiválódást autofoszforiláció teszi teljessé.

Egy-egy szubsztrát fehérjében szigorúan megszabott, hogy melyek a polipeptidlánc ténylegesen foszforilálható aminosavai, ezeket nevezzük foszforilációs he-

lyeknek. A foszforilációs helyeket a szerin, treonin vagy tirozin környezetében, meghatározott pozícióban található aminosavak, az úgynevezett specificitás-determinánsok jelölik ki. A különböző protein-kinázok az ilyen konszenzus szekvenciáikat szelektíven ismerik fel, ezen alapul a kinázok szubsztrátspecificitása. A kinázok között találunk olyanokat, melyek sokféle szubsztrátot képesek foszforilálni. Ezek a széles subsztrátspecificitású kinázok és többségük szerin/treonin-kináz, mint például a PKA és a PKC. A szűk szubsztrátspecificitású kinázoknak kevés szubsztrátja van. A szubsztrátokban felismert specificitásdeterminánsok alapján a szerin/treonin-kinázok között megkülönböztethetünk bazofil, azaz a foszforilálandó szerin vagy treonin közelében, bizonyos pozícióban bázikus aminosavat igénylő, továbbá prolin-irányított és acidofil kinázokat. Az acidofil kinázok szubsztrátjaiban sokszor a más kinázok által katalizált kijelölő foszforiláció alakítja ki a foszfátcsoport beépítésével a savas specificitásdeterminánsokat. Az egyes típusokon belül persze minden kináznak megvan a maga specifikus konszenzus szekvenciája.

Foszfoprotein-foszfatázok

A fehérjék defoszforilációja ugyanannyira fontos, mint a foszforilációja, hiszen a foszforiláció csak akkor lehet precíz szabályozó funkció, ha reverzibilis és átmeneti. Éppen ezért a foszfoprotein-foszfatázok mindig elemei a kinázok szignál transzdukciós rendszereinek. Tovább árnyalja a képet, hogy számos esetben a foszfatázok funkciója is foszforilációval szabályozott.

A defoszforilálandó aminosav-oldallánc alapján megkülönböztetünk szerin/treonin- és tirozin-foszfatázokat. Érdekes módon ezek nem állnak genetikai rokonságban egymással, mint a kinázok. A szerin/treonin-foszfatázok több alegységből állnak, egyébiránt széles szubsztrát-specificitásukat a katalitikus alegységhez kapcsolódó regulátor alegységek irányítják a célfehérjére. Ezzel szemben a tirozin-foszfatázok mind monomerek, melyek speciális doménjei biztosítják a megfelelő szubcelluláris lokalizációt, a célra irányítást és az aktivitás szabályozását.

A szerin/treonin-foszfatázok között biokémiai tulajdonságaik alapján megkülönböztetünk foszfoprotein-foszfatáz-1 (PP1) és foszfoprotein-foszfatáz-2 (PP2) típusokat. A két típus közötti lényeges különbség egy lehetséges szabályozási mód. A PP1 enzimek aktivitását képesek gátolni az inhibitor fehérjék (inhibitor-1 és inhibitor-2), amelyek a PP2 enzimekre nem hatnak. A PP2 enzimek altípusai közül a PP2A nem igényel extra fémiont, a PP2B avagy kalcineurin aktivitásához a Ca^{2+}-kalmodulin komplex szükséges, míg a PP2C működése Mg^{2+}-ion közvetlen kötődését igényli.

A PP1 széles előfordulású és sokféle sejtfunkciót befolyásol (glikogén-anyagcsere, izomrelaxáció, túlélés, apoptózis, sejtciklus). A katalitikus alegységét PP1c-nek nevezzük, ehhez mintegy félszáz fehérje kapcsolódhat regulátorként. Például a glikogén anyagcserében kifejtett szabályozó funkcióját az inhibitor-1 fehérje mellett izomban a G_M, míg a májban a G_L alegység regulálja. Simaizomban a miozinhoz a foszforilációval is szabályozott működésű MYPT1 alegység kapcsolja, míg a harántcsíkolt izomban a MYPT2 lát el hasonló szerepet.

A foszfotirozin-foszfatázok (PTP) a növekedési faktorok, az inzulin és a citokinek tirozin-kináz jelpályáiban szereplő enzimek. Az intracelluláris PTP család tagjai közül az SHP-1 és SHP-2 szerkezetében megtalálható az SH2 domén. Mások prolin-gazdag szekvenciákat, vagy egyéb jellegzetes domént tartalmaznak. Az SHP-1 általános negatív regulátor, míg az SHP-2 érdekes módon a Ras-MAP kináz kaszkád útvonal stimulátora. A PTP1B szubsztrátja az inzulinreceptor, így ez a foszfatáz az inzulin jelpálya negatív modulátora. Ezen családba tartoznak még kettős specificitású foszfatázok is, melyek a tirozin mellett szerin/treonin defoszforilációját is képesek

katalizálni, mint például a sejtciklus irányításában szerepet játszó Cdc25. A transzmembrán foszfotirozin-foszfatázok C-terminális, intracelluláris része a katalitikus domén. Az extracelluláris domének nagyfokú változatossága azt sugallja, hogy ezek receptorok, de ligandjaik egyelőre nem ismertek.

III/1.3. PROTEIN DOMÉNEK A JELÁTVITELBEN

Az egyes, hasonló funkciót betöltő fehérjék aminosav-sorrendjét összehasonlítva megállapították, hogy bennük gyakran találhatók hosszabb–rövidebb szakaszok, amelyek nagyon hasonlítanak egymásra. Sokszor nemcsak az aminosav-sorrend konzervált, hanem az abból adódó másodlagos szerkezet is. Az ilyen jól definiálható szerkezeti egységeket fehérje doméneknek nevezzük. A fehérje domének alfa-hélixet vagy béta-lemezt alkothatnak, esetenként mindkét másodlagos szerkezeti elemet tartalmazzák. A rendezett térszerkezetű doméneket a polipeptid-lánc viszonylag szabadon mozgó szakaszai kötik össze, amelyek biztosítják a fehérjék flexibilitását.

Az egyes doméneknek nemcsak a szerkezete konzervált, hanem gyakran a funkciója is. Ismerünk katalitikus doméneket, melyek tulajdonképpen az enzimaktivitásért felelős szerkezeti egységek. Ezek közül a jeltovábbító fehérjékben legismertebbek a protein-kináz, a foszfoprotein-foszfatáz, a lipid-kináz, foszfolipáz és a foszfolipid-foszfatáz domének. A jelátvitelben a katalitikus domének mellett azok a domének is rendkívül fontosak, amelyek biztosítják a szabályozást a jeltovábbító fehérje-komplexek összeállása, a működésükhöz megfelelő szubcelluláris lokalizáció, valamint az egyes komponensek aktivitása szempontjából.

A fehérje-fehérje interakciók kialakításában az Src citoplazmatikus tirozin-kináz szerkezetéből kiindulva azonosított *Src-H*omológia 2 és 3 (SH2 és SH3) domének a legismertebbek. A mintegy 100 aminosavból álló SH2 domén olyan fehérjerészekhez tud kapcsolódni, melyek foszforilált tirozin oldalláncokat tartalmaznak. A PTB domén szintén foszforilált tirozint ismer fel. A foszforilált tirozin környezetében található aminosavak, úgynevezett konszenzus szekvenciák határozzák meg azt, hogy melyik SH2 vagy PTB domén kapcsolódhat hozzá, azaz melyik fehérje lesz a kölcsönható partnere. Értelemszerűen az SH2 és a PTB domének a tirozin-kinázokkal működő jelátviteli utakban játszanak kulcsszerepet, ugyanis például a tirozinon autofoszforilált növekedési faktor receptorokhoz, illetve azok szubsztrátjaihoz kötődhetnek az SH2 vagy a PTB domént tartalmazó fehérjék. Amint látható, ebben az esetben a fehérjék asszociációja indukáltan szabályozott folyamat, ugyanis a tirozin-kinázok aktivációja, illetve a tirozin oldalláncok foszforilációja feltétele a fehérje-fehérje interakciónak. A körülbelül 50 aminosavból álló SH3 domén olyan fehérjékhez tud kötődni, amelyek prolinban gazdag szekvenciákat tartalmaznak. A prolin különleges aminosav abból a szempontból, hogy aminocsoportja szekunder, így az általa kialakított peptidkötés környezete speciális térszerkezetű. Emiatt a prolinban gazdag szekvenciák általában sem alfa-hélixet, sem béta-redőstruktúrát nem tudnak kialakítani, ehelyett jellemző



III/1-2. ábra
Az SH3 domén szerkezete. A doménben jól felsimerhető öt béta-redő, illetve az azokat összekötő hurkok

rájuk a flexibilis, úgynevezett rendezetlen proteinszerkezet, amely igen gyakran a fehérje felszínén helyezkedik el. Így a prolingazdag szekvenciák ideálisak fehérje-fehérje interakciók kialakításra. Érdekes módon az SH3 domén, illetve a prolingazdag fehérje kapcsolódása az esetek többségében spontán bekövetkezik, ezért gyakran állandó komplexeket alakítanak ki *(III/1-2. ábra)*.

Specifikus domének játszanak szerepet fehérje-lipid kapcsolatok kialakításában is. A pleksztrin homológia (PH) és a phox homológia (PX) domének segítségével bizonyos fehérjék a membránokban képződő, másodlagos hírvivő szerepet játszó foszfatidil-inozitol-3-foszfátokhoz tudnak kötődni. PH doménnel rendelkezik például a már említett protein-kináz-B (PKB/Akt) és az azt foszforilációval aktiváló PDK1. Egy másik, ugyancsak a membránban megjelenő másodlagos hírvivő szerepet játszó lipidet, a DAG-ot ismeri fel a PKC szerkezetéből azonosított C1 domén. A PKC C2 doménje ezzel szemben a Ca^{2+}-ionok érzékelésében játszhat szerepet. A Ca^{2+}-ionokat kötő más fehérjékben leggyakrabban az EF-kéz nevű domén található meg. A DNS-kötő domének jellegzetes szerkezeti eleme a cink-ujj.

III/1.4. A GTP-KÖTŐ FEHÉRJÉK

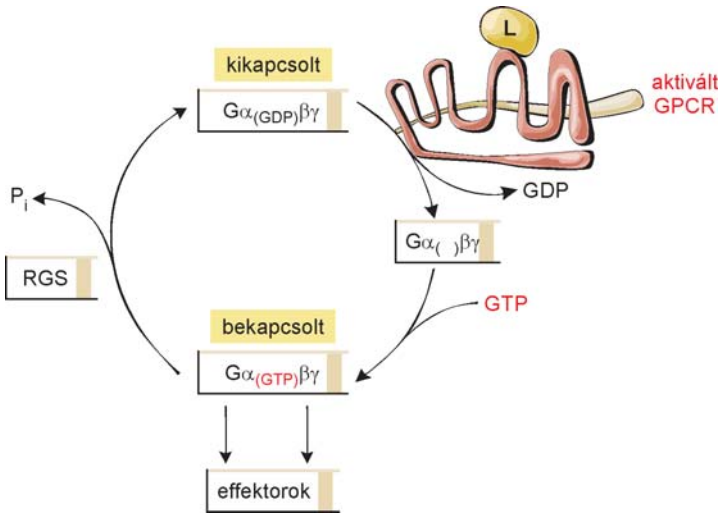
A GTP-kötő fehérjék igen sokféle intracelluláris folyamatot végeznek és irányítanak (például a sejtváz kialakítása, szervezése, a vezikuláris és a nukleáris transzport, a transzláció), jelen fejezet a jelátvitelben szerepet játszó GTP-kötő fehérjéket tárgyalja. A GTP-kötő fehérjék olyan szabályozó proteinek, amelyek akkor aktívak, tehát akkor képesek az általuk szabályozott effektor fehérjék működését befolyásolni, amikor GTP-t kötnek, és inaktiválódnak, ha az általuk kötött GTP-t GDP-re és szervetlen foszfátra hidrolizálják. Az effektor funkciójukat (ellentétben a GTP-vel működő enzimekkel) nem a GTP hidrolízis energiájának a terhére látják el, hanem úgy, hogy a GTP kötése olyan konformációban stabilizálja a fehérjét, amely alkalmassá teszi az általa regulált fehérjével történő kapcsolatra. A GTP-t azonban hidrolizálják is, ez biztosítja a jelpálya aktiválódásának átmeneti jellegét. Minthogy a GDP-t is szorosan kötik, a GTP kötő fehérjék aktiválása úgy történik, hogy egy másik fehérje elősegíti a GDP disszociációját a fehérjétől és lehetővé teszi kicserélődését GTP-re. A jeltovábbító GTP-kötő fehérjék hasonlíthatók egy elemlámpához: a GTP-vel töltött fehérje aktív és jelez (új elem a lámpában), majd a GTP-t hidrolizálva inaktiválódik (az elem kimerül), később újra aktiválható a GDP GTP-re cserélésével (új elem berakása a kimerült helyett).

A szerkezet-szabályozás összefüggésben a GTP-kötő fehérjéket két nagy csoportba soroljuk, ezek a heterotrimer GTP-kötő fehérjék és a kis GTP kötő fehérjék. A heterotrimer GTP-kötő fehérjék aktiválódását a receptorok általában közvetlen kapcsolat útján biztosítják. A hagyományosan G-fehérje névvel illetett heterotrimer GTP-kötő fehérjék három különböző polipeptidlácból (α, β és γ) állnak és a 7 transzmembrán hélixet tartalmazó receptorokkal léphetnek fizikai kapcsolatba, ezért az ilyen receptorokat G-fehérjéhez kapcsolt receptoroknak (GPCR) is szokás nevezni. Sokféle kémiai jel (egyes neurotranszmitterek, hormonok) ezen a rendszeren keresztül befolyásolja a sejtek működését, de a szaglás, az ízlelés és a látás mechanizmusa is hasonlóan működik. Ezzel szemben a ras proto-onkogén és rokonai által kódolt kis GTP-kötő fehérjék, röviden kis G-fehérjék egyetlen polipeptid-láncból álló monomerek és jellemzően a tirozin-kinázokkal működő jelpályákban aktiválódnak. Aktiválódásukat a receptorok közvetve, más fehérjék közreműködésének a segítségével idézik elő.

A heterotrimer G-fehérjék

A heterotrimer G-fehérjék polipeptid-láncai közül a β és a γ kapcsolata olyan szoros, hogy egy egységként viselkednek, ezt nevezzük βγ-alegységnek. A 40-50 kDa molekulatömegű α-alegység a tulajdonképpeni GTP-kötő fehérje és N-terminális régiójával a β-polipeptid-láncon keresztül lazábban csatlakozik a komplexhez. Az egész komplex a plazmamembrán belső oldalához horgonyzott poszttranszlációs módosulással kapott lipid-oldalláncok segítségével. A heterotrimer G-fehérjék α-alegysége nem csupán köti a GTP-t, de képes a GTP hidrolízisére is, a βγ-alegység pedig gátolja a GDP disszociációját.

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, amikor az agonista ligandot megkötik, megváltoztatják konformációjukat, ami lehetővé teszi, hogy meglökve a G-fehérjét annak α-alegységéről a GDP disszociáljon és helyére új guanin-nukleotid kerüljön. Az új nukleotid várhatóan GTP lesz, mivel ennek intracelluláris koncentrációja mintegy tízszeres a GDP-hez képest. Az aktivált, GTP-t kötő α-alegység kapcsolatba lép az általa regulált effektor fehérjével és elvégzi szabályozó funkcióját. A receptor és az aktivált G-fehérje kapcsolata viszont megszűnik, ezért a receptorhoz egy újabb inaktív heterotrimer G-fehérje kötődhet. Mindaddig, amíg az agonista ligand aktiválja a receptort, a receptor újabb és újabb heterotrimer GTP-kötő fehérje aktiválódását stimulálja, lehetővé téve a jel erősítését. Az α-alegységek által szabályozott effektor fehérjék lehetnek másodlagos hírvivő molekulákat szintetizáló, felszabadító vagy elbontó enzimek (adenilát-cikláz, foszfolipáz Cβ (PLCβ), cGMP-specifikus foszfodiészteráz), illetve ioncsatornák. Az α-alegység azonban a GTP-t lassan GDP-re bontja, a G-fehérje inaktív állapotba jut, így a ciklus lezárul. A GTP hidrolízis sebességét az α-alegység partnerei befolyásolják, például az RGS (**R**egulator of **G** protein **S**ignalling) fehérjék fokozzák *(III/1-3. ábra)*.



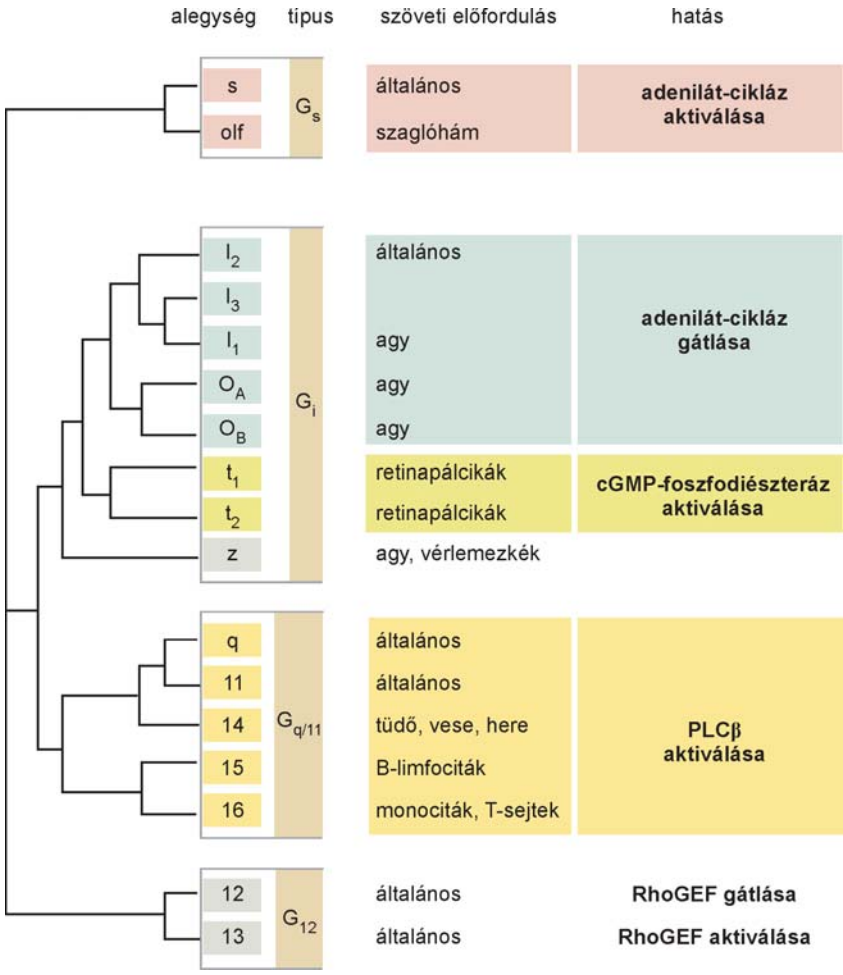
III/1-3. ábra
A heteortrimer G-fehérjék működési ciklusa

A G-fehérjék változatossága az α-alegységek eltérő funkciójából adódik. Az emberi sejtekben 16 gén kódol α-alegységeket, alternatív splicing útján ezekről összesen 20 különböző polipeptid-lánc szintetizálódhat, melyek közül egy-egy sejttípus körülbelül 10 izoformát fejez ki. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorokból nagyságrenddel többféle létezik, mint G-fehérjékből. A specifikus G-fehérje – receptor kapcsolatokat az α-alegységek C-terminális része biztosítja.

A G-fehérjéket az α-alegységek szekvencia hasonlósága és aktív, GTP-kötött állapotban kifejtett fő funkciói alapján 4 típusba sorolhatjuk: G_s, G_i, $G_{q/11}$ és G_{12}, melyből az első három tagjai leginkább másodlagos hírvivő molekulák szintjét befolyásolják. Az s-típusúak az ATP-ből cAMP-t készítő adenilát-ciklázt stimulálják, így a

cAMP-szint emelkedését eredményezik. Az i-típusú (inhibitoros) fehérjék a ciklikus purin nukleotidok szintjének csökkenését okozzák. Az α_i-alegységek az adenilát-ciklázt gátolják, míg a retinapálcikákban található, rodopszinról aktiválódó α_t (transzducin) a cGMP-specifikus foszfodiészetráz (cGMP hidrolizáló enzim) működését serkenti. A q/11 csoport tagjai mind aktiválják a PLCβ-t, amely egy membrán-lipidből, a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátból diacil-glicerint (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfátot (IP_3) szabadít fel. A negyedik, a 12-csoport tagjai az aktin-sejtvázat, sejtmozgásokat szervező Rho kis G-fehérje regulátoraira hatnak. Minden sejtben megtalálható mind a négy alaptípus valamelyik α-izoformája. Az α_t, α_{olf} és az α_{gust} speciális szenzoros (fotoreceptor, szaglóhám és ízérző) sejtekben fordul elő, mások az azonos embrionális eredetű sejtekre jellemzők *(III/1-4. ábra)*.

Bizonyos esetekben a βγ-alegység is rendelkezik effektorokra ható, önálló funkcióval (lásd a foszfatidil-inozitol-3-foszfátokkal működő jelpályáknál).



III/1-4. ábra
A heterotrimer G-fehérjék típusai az alfa-alegység hatása, rokonsága alapján

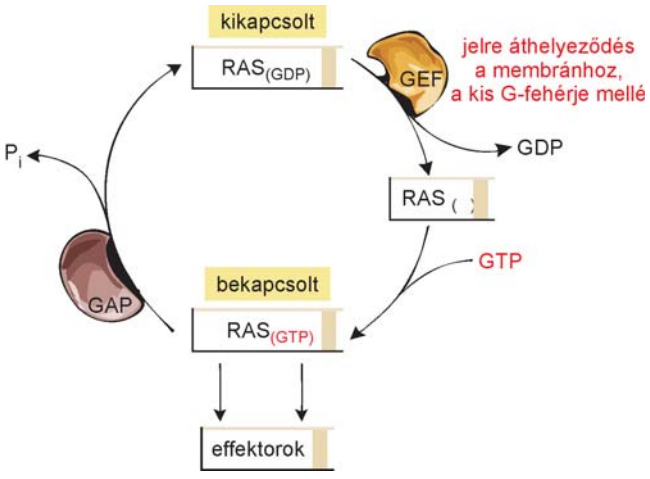
Külön említést érdemel még a G-fehérjék ioncsatornákra kifejtett szabályozó hatása. A muszkarinos kolinerg receptorról érkező jel esetén a G_i típus $\beta\gamma$ alegysége képes a K^+-csatornát kinyitni. A G_s fehérjék bizonyos Ca^{2+}-csatornákat nyitnak, az α_o-t tartalmazó G_i típus fehérjéi pedig egyes feszültség-függő Ca^{2+}-csatornákat gátolnak, bár utóbbi esetben inkább indirekt lehet a hatás.

A G-fehérje működés befolyásolásának eddig nem említett szintje az ADP-riboziláció, melynek során enzimatikus úton NAD^+-ból ADP-ribozil oldallánc kerül a fehérjére. Az α-alegység ilyen fajta módosulását betegségekben, bakteriális toxinok katalizálhatják irreverzibilisen. A kolerát okozó baktérium koleratoxinja az α_s alegységet ADP-ribozilálja, aminek hatására a GTPáz aktivitás megszűnik, azaz az α_s és célfehérjéje, az adenilát-cikláz folyamatosan aktív lesz, így a cAMP által stimulált folyamatok szabályozatlanul felerősödnek. A kórokozó *Vibrio cholerae* baktérium maga a bélcsatornában élősködhet, így toxinja főként az enterociták életfolyamatait, felszívó funkcióját zavarja meg: ezzel magyarázható a véres hasmenés (sejtpusztulás és elektrolitvesztés). A szamárköhögést okozó *Bordetella pertussis* baktérium pertussistoxinja az α_i fehérjék C-termiálisát ADP-ribozilálja. Ez a kapcsolódás helye a receptorral, ezért elmarad az aktiválás, kiesik tehát a G_i fehérje adenilát-ciklázt gátló hatása, így ebben az esetben is emelkedik a cAMP-szint. Ez a toxin a légutakban fokozott váladékképződést, eljutva az idegrendszerbe görcsrohamot, a hasnyálmirigy β-sejtjeit túlműködtetve hiperinzulinémiát, így hipoglikémiát okoz.

A kis G-fehérjék

A kis G-fehérjék molekulatömege 20–25 kDa, sokkal kisebb, mit a heterotrimer G-fehérjék α-alegysége, innen származik a nevük. Lényegi különbség, hogy a kis G-fehérjék egyetlen polipeptid-láncból álló monomerek és a jelpályát indító receptor nem közvetlen kapcsolat útján aktiválja őket. Emellett a kis G-fehérjékre jellemző poszttranszlációs módosulás a lipid-oldalláncok hozzáadása az elsődleges szerkezethez, ami a membránhorgonyzást biztosítja.

A kis G-fehérjék működési ciklusai is a GDP-kötött, inaktív állapotában indulnak és végződnek. Az ő esetükben az aktiválást a GEF (*G*uanin nucleotide *E*xchange *F*actor) fehérjék segítik elő. A GEF fehérjék az inaktív kis G-fehérjéhez kötődve úgy változtatják meg annak konformációját, hogy a nukleotid könnyen disszociálhat. A GDP helyére így új guanin-nukleotid kerülhet, amely a korábban már említett ok miatt GTP lesz. A GEF fehérjék akkor férhetnek hozzá a kis G-fehérjékhez, amikor maguk is a membránok közelébe kerülnek. Ez a membránhoz helyeződés főként tirozin-kinázokkal működő jelpályák stimulálásakor valósul meg. Az aktív, GTP-vel töltött kis G-fehérjékkel kapcsolatba lépő legfontosabb effektorok protein-kinázok, melyek a jelet felerősítő kináz kaszkádokat indítanak el. További effektorok például lipid kinázok, más kis G-fehérjék akti-



III/1-5. ábra
A kis G-fehérjék működési ciklusa a Ras példáján

vátorai, jelátviteli komplexeket szervező állványfehérjék. A kis G-fehérje működési ciklusa a GTP hidrolizálásával jut nyugalomba. A kis G-fehérjék nagyon alacsony saját GTPáz aktivitását a velük kölcsönhatásba lépő GAP (*G*TPase *A*ctivating *P*rotein) fehérjék képesek nagyságrenddel fokozni. Fontos hangsúlyozni, hogy a GAP fehérjék funkciója az angol nevük által sugallttal ellentétben a kis G-fehérjék inaktiválása, mert ugyan a GTPáz aktivitást fokozzák, de ezzel éppen a nyugalmi állapotba kerülést segítik elő *(III/1-5. ábra)*.

A kis G-fehérjék alaptípusa a Ras, mely egy egész fehérje-szupercsalád névadója. A plazmamembrán belső oldalához horgonyzott Ras központi eleme a növekedési faktorok jelpályáinak, így fontos funkciót tölt be a sejtosztódás előmozdításában, helytelen működése pedig kulcslépés lehet a sejtproliferáció szabályozásának elvesztése, azaz a daganatképződés felé. A Ras aktivátora az Sos GEF fehérje, legfontosabb effektora a Raf nevű kináz, amely a bizonyos gének átírását fokozó Erk1/2 MAP-kináz kaszkád első eleme.

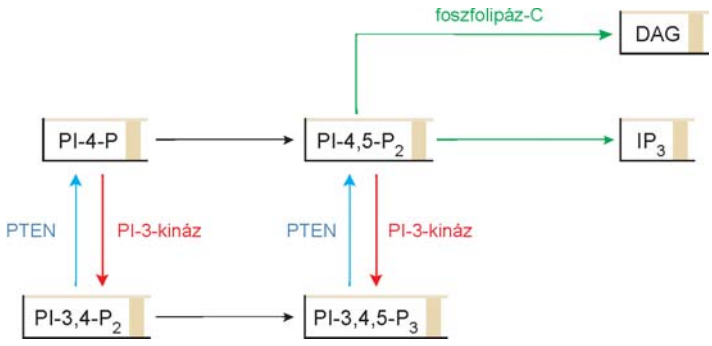
Az inzulin jelpályájában aktiválódó Rheb kis G-fehérje által indított rendszer hatására fokozódik a fehérjeszintézis, így fontos szerepe van a növekedésben, egyes esetekben a sejtciklus gyorsításában is.

A *R*as *ho*mológ, azaz Rho-fehérjecsalád tagjai az aktin-sejtváz szervezése felé jeleket továbbító Rho, Rac és Cdc42 kis G-fehérjék. Ezek membrán-horgonyzása nem mindig korlátozódik a plazmamembránra. A Rac az immunvédekezés egyik mechanizmusában szereplő NADPH-oxidáz komplex szervezésében is fontos szerepet játszik. További jellegzetesség, hogy a Rho-fehérjék működési ciklusait úgynevezett GDI (*G*uanin nukleotid *D*isszociáció *I*nhibitor) fehérjék is befolyásolhatják.

Noha funkciójuk nem a jelátvitel, mégis a szekvencia hasonlóság alapján a Ras szupercsaládba soroljuk még a magi transzportot bonyolító Ran, valamint a vezikulák forgalmát szervező Rab és Arf fehérjéket.

III/1.5. INOZITOL-FOSZFOLIPIDEKKEL MŰKÖDŐ JELPÁLYÁK

Az inozitol-foszfolipidek közül a plazmamembránban helyet foglaló foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát a prekurzora két másodlagos hírvivő molekulának, a diacil-gliceinnek (DAG), illetve az inozitol-1,4,5-tiszfoszfátnak (IP_3). Ezek az intracelluláris mediátorok a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát PLC enzim által katalizált hidrolízise során képződnek. Bizonyos receptorok aktiválódása a PLC működésének szabályozása útján stimulálja a hidrolízist és ezzel a mediátorok megjelenését.



III/1-6. ábra
A foszfotidil-inozitol-foszfátok metabolizmusa

Ezzel szemben az ugyancsak a plazmamembránban helyet foglaló foszfatidil-inozitol 3,4-biszfoszfát (PI-3,4-P_2), ill. foszfatidil- inozitol-3,4,5-triszfoszfát (PI-3,4,5-P_3) önmaguk viselkednek másodlagos hírvivőként, olyan jelpályákban, ahol az extracelluláris jel hatása ezen lipidek képződését stimulálja a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-kináz) enzim segítségével.

A 3-as pozícióban levő foszfát eltávolítása (a PTEN nevű enzim hatására) ennek a mediátornak az inaktiválódását jelenti *(III/1-6. ábra)*.

A inozitol-foszfolipidek hidrolízise mint jeltovábbító lépés

Mint már említettük, bizonyos receptorok aktiválódása a foszfatidil-inozitol származékok hidrolízisét fokozza a sejtek membránjaiban. A PLC enzim a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PI-4,5-P2 vagy röviden PIP_2) hidrolízisét katalizálja. Ennek az enzimnek az izoformái különböző típusú receptorok által stimulált jelpályákban aktiválódnak. A PLCβ a heterotrimer G-fehérjéken keresztül aktiválódik. A PLCγ működését tirozin-kináz jelpályák stimulálják. Azt, hogy az adott jelpályában melyik PLC izoforma működik, az enzimben megtalálható fehérje-interakciós domén dönti el. A PLCβ G-protein interakciós doménnel rendelkezik, ezért tudja a $G_{q/11}$ aktiválni. Ugyanakkor a PLCγ-ban SH2 domén található, melynek segítségével az enzim kapcsolatba léphet az autofoszforilált receptor tirozin-kinázokkal. A PLC hatására bekövetkező hidrolízis eredményeképpen keletkező két másodlagos hírvivő közül a DAG a sejtmembránban marad és a PKC-t aktiválja, ezzel szemben a vízoldékony IP_3 intracelluláris kompartmentekhez, az azokon található IP_3-receptorokhoz kötődik és feladata a citoszol Ca^{2+} szintjének növelése.

A Ca^{2+} intracelluláris mediátor szerepe

A PI-4,5-P_2 hidrolízisével felszabaduló IP_3 hatásának az a lényege, hogy az intracelluláris raktárakból mobilizálja a Ca^{2+}-ionokat, megemelve ezzel a citoszol Ca^{2+} koncentrációját. A Ca^{2+}-ion ugyancsak másodlagos hírvivő funkciót tölt be, mert reverzibilis módon képezhet komplexeket bizonyos fehérjékkel. A Ca^{2+}-iont ézékelő fehérjék szerkezete, így képességei is eltérőek a Ca^{2+}-ot kötő és üres állapotukban. Először azt érdemes áttekinteni, hogy milyen módon szabályozódik a Ca^{2+}-ionok intracelluláris eloszlása. Nyugalomban a Ca^{2+}-ionok koncentrációja a citoplazmában igen alacsony, 0,1 μM körüli az extracelluláris térre jellemző mM-os nagyságrenddel szemben. A Ca^{2+} kijuttatását a sejtből a plazmamembránban található Ca^{2+}-ATPáz és a Na^{+}-Ca^{2+} cseretranszport biztosítja. Ugyanakkor jelentős mennyiségű Ca^{2+} raktározódik is a sejtben. A Ca^{2+} intracelluláris raktárai közül elsősorban az endoplazmás retikulumot, illetve az izomban megtalálható szarkoplazmás retikulumot kell kiemelni, ugyanis ezekből extracelluláris jel hatására mobilizálható a Ca^{2+}. Emellett más intracelluláris organellumok, például a mitokondriumok is részt vehetnek a Ca^{2+} sejten belüli raktározásában. A Ca^{2+}-ot az endoplazmás vagy a szarkoplazmás retikulumba egy Ca^{2+}-ATPáz pumpálja a citoplazmából. Az intracelluláris kompartmentekben két olyan Ca^{2+}-csatorna található, amelyek elősegíthetik a Ca^{2+}-ion kiáramlását a citoplazmába. A plazmamembrán receptorok aktiválódását követően keletkező IP_3 diffúzióval eljuthat az endoplazmás retikulumhoz, ahol az IP_3-receptorhoz kötődik. A ligand-receptor kötődés nyomán az IP_3-receptor alegységeinek konformációja megváltozik, aminek következtében Ca^{2+}-ra nézve áteresztő csatorna képződik, mely az intracelluláris raktárakból kiengedi a Ca^{2+}-ot a citoszolba.

A Ca^{2+} koncentrációja a citoszolban nem csupán az IP_3 hatására, hanem egészen más jeltovábbító rendszerekben is emelkedhet, ezeket a teljesség kedvéért itt megemlítjük, annak ellenére, hogy nincs közük az inozitol lipidek hidrolíziséhez. Egy másik csatorna, melyen keresztül kiszabadulhat az intracellulárisan raktározott Ca^{2+}, az IP_3-receptorhoz szerkezetileg és funkcióban is hasonló rianodinreceptor. A rianodinreceptor család tagjai elsősorban a szív- és harántcsíkolt izom szarkoplazmás retikulumában, illetve neuronok és bizonyos hasnyálmirigy-sejtek endo-

plazmás retikulumában találhatók. A funkcionális hasonlóságok ellenére az IP_3-receptorok és a rianodinreceptorok aktivációja gyökeresen eltérő, ugyanis harántcsíkolt izomban a rianodinreceptorok depolarizáció hatására aktiválódnak, a szívizomban pedig a plazmamembrán depolarizációjának következtében beáramló Ca^{2+} hatására aktiválódnak a rianodinreceptorok, tehát a szívizomban az intracelluláris raktárakból Ca^{2+}-függő módon szabadul fel a Ca^{2+}.

Érdekes módon, az IP_3 által kiváltott citoplazmai Ca^{2+}-koncentráció emelkedéséért nemcsak az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+}-mobilizáció lehet felelős, ugyanis az intracelluláris Ca^{2+} raktárak töltöttségi állapota befolyásolhatja a plazmamembránon keresztüli Ca^{2+} beáramlást. Az intracelluláris raktárak Ca^{2+} tartalmának csökkenése fokozza a Ca^{2+} beáramlását az extracelluláris térből, mert az endoplazmás retikulumban található egyik fehérje érzékeli a Ca^{2+} koncentráció csökkenését és ilyenkor kapcsolatba tud lépni a plazmamembránban található egyik Ca^{2+} csatornával, amelynek fokozza az áteresztő képességét.

A különböző jelekre létrejövő Ca^{2+}-koncentráció emelkedésre mindig az jellemző, hogy rövid ideig tart, átmeneti. Mindamellett gyakran a Ca^{2+}-jel ismétlődő, azaz a citoplazma Ca^{2+}-koncentrációja alacsonyabb és magasabb szintek között oszcillál, ennek frekvenciája a fő jellemezője a különböző módokon kialakuló Ca^{2+}-jeleknek. A Ca^{2+}-koncentráció emelkedését sokféle fehérje érzékeli. Ezek közül elsőként említendő a kalmodulin. A kalmodulin négy kalcium-kötő doménnel, úgynevezett EF-kézzel rendelkezik, Ca^{2+} nélkül nagyon zárt szerkezetű, a Ca^{2+}-mal alkotott komplexében viszont a belsejében eddig eltemetett hidrofób fehérjerészei a felszínére kerülnek. A Ca^{2+}-kalmodulin komplex ilyenkor a hidrofób részekkel rácsavarodva az általa szabályozott fehérjékre megváltoztatja azok konformációját. A konformáció-változás természetesen befolyásolja a Ca^{2+}-kalmodulin-regulált fehérjék képességeit, aktivitását. A Ca^{2+} koncentrációjának csökkenésekor a Ca^{2+}-kalmodulin komplex szétesik, a kalmodulin elengedi partnereit, azok visszarendeződnek eredeti konformációjukba. A kalmodulin több mint 100 enzim aktivitását képes bekapcsolni ezen a módon. A protein-kinázok közül a legfontosabb Ca^{2+}-kalmodulin-függő enzimek a Ca^{2+}-kalmodulin-függő protein-kinázok (CaMK), a simaizom kontrakcióját beindító miozin könnyű lánc-kináz és a glikogén anyagcsere szabályozásában részt vevő foszforiláz-kináz a vázizomban. A foszfoprotein-foszfatázok Ca^{2+}-kalmodulin-függő képviselője a kalcineurin (PP2B).

A ciklikus purin-nukleotidokkal működő jelpályákban Ca^{2+}-kalmodulin-függő adenilát-ciklázok és ciklikus-nukleotid-foszfodiészteráz is ismertek. Sok, a citoszkeleton szervezésében szerepet játszó fehérje is Ca^{2+}-kalmodulin-függő. Az eNOS és az nNOS is Ca^{2+}-kalmodulin-dependens enzimek, amelyek az intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedésére adott válaszként nitrogén-monoxidot szintetizálnak. A Ca^{2+}-kalmodulin komplex a Ca^{2+}-jel kikapcsolásában is segédkezik, fokozza ugyanis a plazmamembrán Ca^{2+}-ATPáz aktivitást. A Troponin C valójában a kalmodulin egy izoformája, amely a harántcsíkolt izomban szabályozza az aktin-miozin kölcsönhatást.

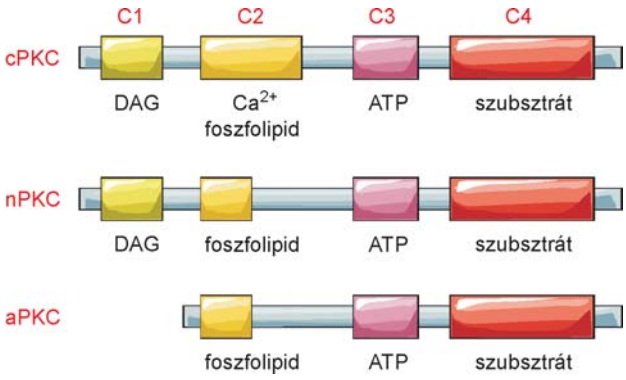
A Ca^{2+} sok más fehérje működését képes a kalmodulin nélkül, közvetlenül befolyásolni. Ezek a fehérjék maguk rendelkeznek kalcium-kötő doménekkel (EF-kéz, C2 domén).

A diacil-glicerin a protein-kináz-C aktivátora

A PLC enzimek által katalizált PI-4,5-P_2 hidrolízis során keletkező másik hírvivő molekula tehát a diacil-glicerin (DAG), amely hidrofób karaktere révén nem tud szabadon diffundálni a citoplazmában, hanem a plazmamembránban marad. Emiatt egy fordított mechanizmusú hírvivői szerepet játszik, ugyanis nem ő megy az aktivá-

landó enzimekhez, hanem azok helyeződnek át a citoszolból a plazmamembránhoz. Az egyik legfontosabb enzim, amely DAG hatására aktiválódik, a PKC.

A PKC többféle izoformával rendelkező szerin/treonin-kináz *(III/1-7. ábra*). Felfedezésekor, Ca^{2+}/foszfolipid-dependens protein-kinázoknak nevezték el, mert az elsőként megismert, klasszikus izoformák (α, β, γ) működőképes szerkezetének fenntartásához Ca^{2+} és a membránban mindig található foszfatidil-szerin szükségesek, az aktivált állapotát azonban a membránban megjelenő DAG hozza létre.



III/1-7. ábra
Az egyes protein-kináz-C (PKC) alcsaládok izoenzimeinek szerkezete. cPKC: klasszikus PKC, nPKC: új PKC, aPKC: atípusos PKC, C1, C2, C3, C4: konzervált domének, DAG: diacil-glicerin

A PKC újabban megismert, ugyancsak DAG-gal aktiválódó izoformáinak (δ, ε, η, θ) nincs szükségük Ca^{2+}-ra. Érdekes módon a DAG-kötő C1 domén érzékeny egy nagyon fontos növényi hatóanyag csoportra is, amely így aktiválhatja a C1 domént tartalmazó PKC izoenzimeket. Ezeket a forbol-észtereknek nevezett molekulákat már évtizedek óta használták a kísérletes karcinogenezisben mint a daganatképződést elősegítő (tumor promoter) anyagokat. Nagy áttörés volt a jelátvitel területén amikor kiderült, hogy a forbol-észterek hatásukat a PKC-n keresztül fejtik ki. A konzervált C1 domén azonban nemcsak a PKC enzimekben figyelhető meg, hanem más fehérjékben is.

Az atípusos PKC alcsalád tagjai (λ, ι, ζ) szerkezetéből teljesen hiányzik a DAG-kötő C1 domén, így működésük nem köthető a DAG mediátorral működő jelpályához.

A foszfatidil-inozitol 3-kináz segítségével működő jelpálya

A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI 3-kináz) a membránokban található foszfatidil-inozitolokban az inozitol gyűrűjének harmadik szénatomjához kapcsolódó hidroxil-csoportját észteresíti foszforsavval ATP γ-helyzetű foszfátjának terhére. Így alakulnak ki a PI-3-kináz legfontosabb lipidtermékei, a PI-3,4-P_2 és a PI-3,4,5-P_3. A PI-3-kináz család izoenzimeit három osztályba szokás sorolni, de itt csak az I. osztály tagjaival foglalkozunk. Az I. A alosztályba sorolható izoenzimek két alegységből épülnek fel: egy 110 kDa molekulatömegű katalitikus (p110) és egy 85 kDa-os regulátor (p85) alegységből. A p85 regulátor alegység a C-terminálisán két SH2 domént tartalmaz. Az I. A osztályba sorolható enzimek a receptor tirozin-kinázokkal működő jelpályákban vesznek részt, ugyanis a p85 regulátor alegység SH2 doménjei képesek az autofoszforilált receptor tirozin-kinázokhoz, vagy azok tirozinon foszforilált szubsztrátjaihoz kötődni. A PI-3-kináz aktivációjának lényege tehát az, hogy jelre a membránhoz helyeződve hozzáfér az ott található szubsztrátjaihoz. A receptor tirozin-kinázok egyszerre több jelpályát is elindítanak, ezek között központi helyen szerepel a Ras GTP-kötő fehérje aktiválódása. Érdekes módon a PI-3-kináz I. A osztályba sorolt tagjai akkor érik el a legerősebb aktivációjukat, amikor a p85 regulátor alegység az autofoszforilált receptorhoz, míg a p110 katalitikus alegység az aktivált, GTP-kötött Ras fehérjéhez kapcsolódik. Az I. B osztályba sorolt PI-3-kináz γ katalitikus alegysége nagyon hasonlít az I. A osztályú katalitikus alegységekre. Ezzel

szemben a PI-3-kináz γ regulátor alegysége (p101) kizárólag a heterotrimer G-fehérjék $\beta\gamma$-alegységéhez tud hozzákötődni. Ez tehát azt jelenti, hogy a PI-3-kináz-γ olyan receptorok ligandkötését követően aktiválódik, amelyek heterotrimer G-fehérjén keresztül hatnak. Az aktiváció lényege azonban ebben az esetben is a hozzáférés biztosítása a membránban található szubsztrátokhoz.

A PI-3-kináz lipidtermékei azt segítik elő, hogy PH doménnel rendelkező fehérjék kötődjenek a plazmamembránhoz és aktiválódjanak. A PH domént tartalmazó fehérjék közül nagyon fontos a protein-kináz-B (PKB/Akt). A PKB/Akt aktiválódáshoz az szükséges, hogy a 3-foszfatidil-inozitol-dependens protein-kináz-1 (PDK1) foszforilálja. A PDK1 konstitutívan aktív és PH doménjével a foszfatidil-inozitol-3-foszfátokhoz szintén erősen kötődik, ezek megjelenése a plazmamembránban tehát azt biztosítja, hogy létrejöhessen a PKB/Akt aktiválódását eredményező találkozó.

A PKB/Akt szubsztrátjai közül rendkívül fontos a Bad fehérje. A mitokondriumban található Bad foszforilált állapotának fenntartása akadályozza meg a programozott sejthalál, az apoptózis mitokondriális útjának spontán beindulását, ezért a PI-3-kináz $\rightarrow$ PKB/Akt $\rightarrow$ Bad útvonalat túlélési jelpályának nevezzük. A PKB/Akt másik fontos funkciója a sejtekben az intermedier anyagcsere befolyásolása anabolikus irányba, amint ez az inzulin jelpályánál bemutatásra kerül. PH doménnel azonban sok más fehérje rendelkezik. Közülük külön említést érdemelnek a kis G-fehérjéket aktiváló GEF-fehérjék. A PI-3-kináz ilyen módon sok jelpálya beindításában játszik szerepet.

A PI3-kináz lipidtermékeinek inaktiválásában nem a foszfolipázok játszanak kulcsszerepet, hanem egy specifikus lipid-foszfatáz. A tumorszuppresszor fehérjék közé sorolt PTEN szelektíven tudja defoszforilálni a PI-3-kináz termékeit, mégpedig úgy, hogy az inozitolgyűrű 3. pozíciójában található foszfát-észter kötést hidrolizálja. A PTEN szerkezetében megtalálható a korábban már a PKC család estében említett C2 domén, melynek segítségével az enzim a membránhoz tud kötődni. Ha a PTEN funkciója normális, akkor a PI-3-kináz által közvetített túlélési jelet az adott sejt precízen tudja szabályozni. Ha azonban a PTEN enzim génjének mutációja következtében nem tudja feladatát ellátni, az a sejtek fokozott osztódásához, az apoptotikus jelpályák felfüggesztéséhez, összességében daganatok kialakulásához vezethet. A PTEN génjét ezért soroljuk a tumorszuppresszor gének közé.

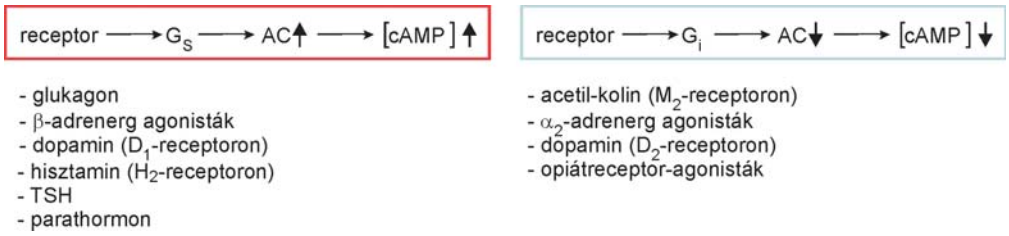
III/1.6. JELTOVÁBBÍTÁS CIKLIKUS PURIN NUKLEOTIDOKKAL

A ciklikus purin nukleotidok, a cAMP és a cGMP vízoldékony másodlagos hírvivő molekulák. A citoplazmában szabadon diffundálnak és allosztérikus aktivátorként funkcionálnak. Keletkezésüket specifikus adenilát-cikláz, illetve guanilát-cikláz enzimek katalizálják, melyek a szubsztrát nukleozid-trifoszfátból (ATP, illetve GTP) pirofoszfátot hasítanak le a ciklikus purin-nukleozid-3'-5'-monofoszfát szintézisekor. A szintézist a pirofoszfát hidrolízise irreverzíbilissé teszi.

A cAMP és a cGMP elbontását a ciklikus-nukleotid-foszfodiészterázok végzik, melyek terméke AMP vagy GMP. A ciklikus-nukleotid-foszfodiészterázok 11 fajtája ismert, melyek kifejeződése a sejttípusra jellemző. Léteznek cAMP-re specifikus, cGMP-re specifikus és mindkét ciklikus nukleotidot szubsztrátjukként felismerő ciklikus nukleotid-foszfodiészterázok. Az egyes enzimek K_M-értéke jelentős eltérést mutat. Aktivitásukat szabályozhatja a Ca^{2+}-kalmodulin komplex, a cGMP és foszforiláció. A ciklikus purin nukleotidok aktuális intracelluláris szintje a cikláz enzimek és a foszfodiészterázok pillanatnyi aktivitásának függvénye.

A cAMP-jelpálya

A cAMP-t előállító adenilát-cikláz (AC) a plazmamembránba ágyazott enzim, melynek katalitikus doménje a citoplazma felé tekint. Aktivitását közvetlenül a G_s és a G_i heterotrimer G-fehérjék szabályozzák. Az cAMP képződését befolyásoló extracelluláris ligandok hét transzmembrán hélixet tartalmazó receptorokhoz kötődnek. A cAMP szintjét emelő molekulák receptorai aktiválják a G_s fehérjéket, melyek az adenilát-cikláz működését serkentik. A cAMP szintjének csökkenését eredményező külső jelek receptorai viszont a G_i fehérjéket kapcsolják be, melyek az adenilát-cikláz aktivitását gátolják. Az adenilát-cikláznak is számos izoformája ismert. A G_s fehérjék az összest aktiválják, de a G_i fehérjék nem gátolják mindegyiket. Némelyeket a Ca^{2+}-kalmodulin komplex is képes aktiválni, mások működését a Ca^{2+} közvetlenül gátolja. Az adenilát-cikláz tehát a különböző jeleket integráló funkciót tölt be *(III/1-8. ábra)*.

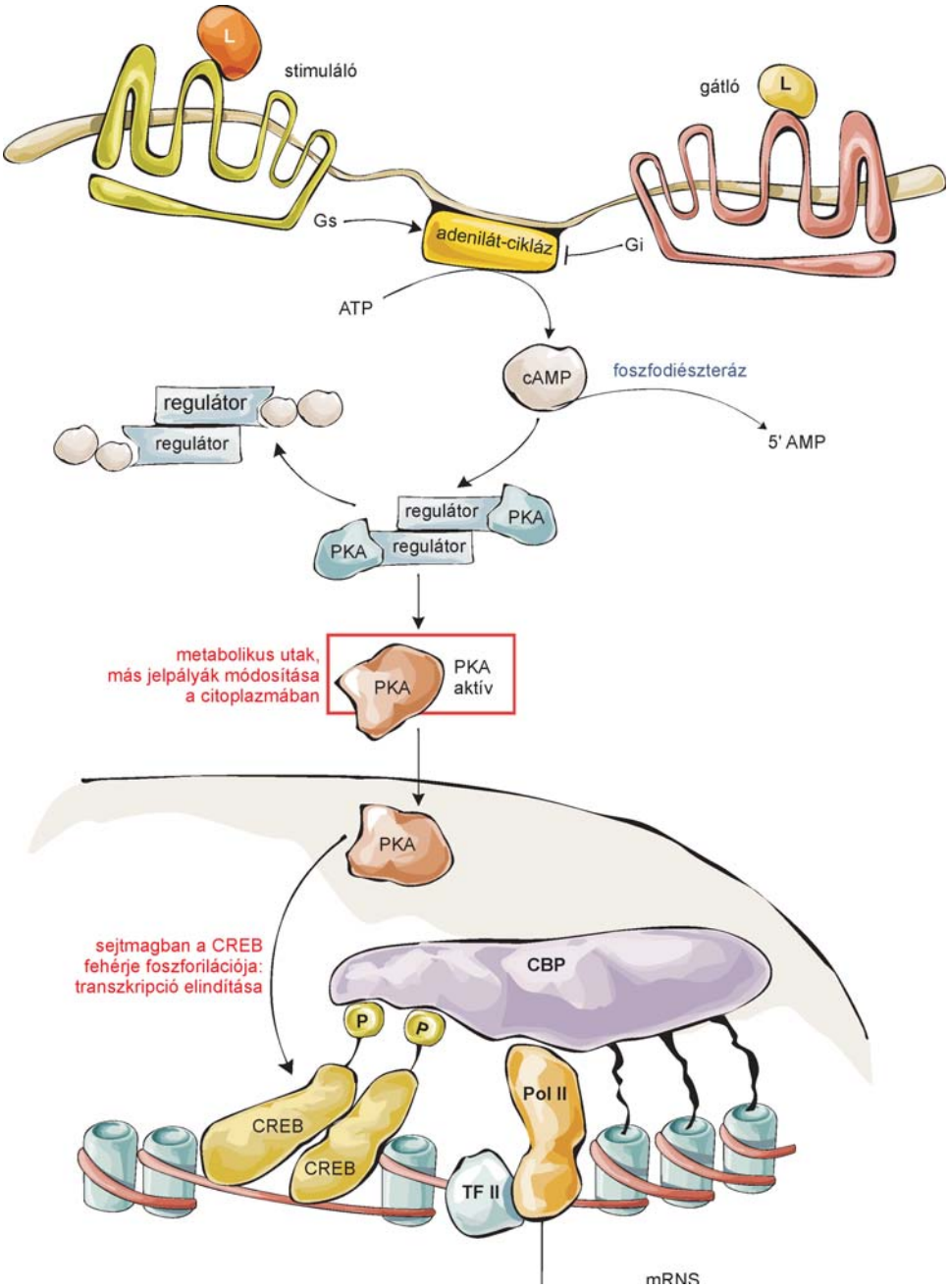


III/1-8. ábra
A cAMP szintjét befolyásoló néhány kémiai jel

A cAMP szinte minden hatásáért a cAMP-dependens protein-kináz (PKA) felelős, így ez az egyik legegyszerűbb eukarióta jelpálya és gyakorlatilag minden sejtben megtalálható. A PKA alapállapotban 4 polipeptid-láncból álló heterotetramer, melyben két katalitikus alegységet tart fogva két regulátor alegység, ez az inaktiv holoenzim. Egy-egy regulátor alegység polipeptidlánca két cAMP kötőhellyel rendelkezik. Amikor a cAMP koncentrációja megemelkedik, akkor allosztérikus ligandként hozzákötődve a regulátor alegységekhez olyan konformációváltozást okoz, melynek hatására a holoenzim-komplex szétesik regulátor alegység dimerre és katalitikus alegység monomerekre. A szabaddá váló, így a gátlás alól felszabaduló katalitikus alegység a specificitásdeterminánsait tartalmazó és hozzáférhető szubsztrátjainak foszforilációját mindaddig folytatja, amíg a cAMP szintje magas a sejtben. A cAMP koncentrációjának csökkenésekor a regulátor alegységekről disszociál a cAMP, a dimer újra képes megragadni két katalitikus alegységet és összeáll az inaktív holoenzim. A jel kikapcsolásában szerepet játszik, hogy bizonyos ciklikus-nukleotid-foszfodiészterázok aktivitását emeli a PKA-katalizálta foszforiláció. A regulátor alegységnek célra irányító funkciója is van, mert az AKAP (*A-K*inase *A*nchor *P*rotein) fehérjékkel karöltve fontos szubsztrátok közelében tarthatja készenlétben az enzimet.

A PKA sokféle fehérje foszforilációját katalizálja. A kész fehérjék, enzimek foszforilációja azonnali sejtválaszt tesz lehetővé. Az extracelluláris jelre adott reakció mindig sejtspecifikus, mert a sejt típusától, differenciáltsági állapotától függ, hogy mely szubsztrátok vannak jelen. Az anyagcserehatásokról általánosságban elmondható, hogy a cAMP-szint emelkedésekor a PKA hatására mobilizálódik az energia a szervezet számára. A zsírszövetben fokozódik a lipolízis. A májban fokozódik a gliko-

genolízis, glukoneogenezis, lassul a glikolízis. A vázizomban ugyancsak fokozódik a glikogén lebontása, de nem gátlódik a glikolízis, mert a májjal ellentétben az itt található foszfofruktokináz-II és piruvát-kináz izoenzimek nem tartalmaznak PKA foszforilációs helyet *(III/1-9. ábra)*.



III/1-9. ábra
A cAMP jelpálya

A cAMP jelpálya nemcsak meglévő fehérjék aktivitását szabályozza, hanem bizonyos gének transzkripciójának serkentésével hatással van a fehérjék mennyiségére, a sejt fehérjekészletének összetételére is. A PKA katalitikus alegysége a stimulust követő 15-20 perc múlva megjelenik a sejtmagban, ahol egyik fő szubsztrátja a CREB transzkripciós faktor. A foszforilált CREB elősegíti a transzkripcióját azoknak a géneknek, amelyek promotere cAMP-reszponziv (CRE) szekvenciát tartalmaz. Foszforiláció hatására a CREB dimerizálódik és kölcsönhatásba lép a DNS cAMP-reszponzív, CRE elemeivel. A CRE elem egy 8 bázispáros palindrom szekvencia (TGACGTCA), amely a cAMP-regulált gének promóterében található meg. A kölcsönhatás során a foszforilált CREB fehérje a CBP és a p300 koaktivátor fehérjék segítségével a promóterhez toborozza a TATA boxhoz kötődő obligát transzkripciós faktorokat (például TF-II), amelyek szükségesek az mRNS-t szintetizáló DNS-dependens RNS-polimeráz-II működésének elindulásához. A koaktivátor fehérjéknek hisztonokat acetiláló enzimatikus aktivitása is van, így a nukleoszóma szerkezet lazításával is segítik a transzkripciót.

Bizonyos sejtekben fokozzák a cAMP-reszponziv gének transzkripcióját az olyan stimulusok is, melyek a Ca^{2+}-koncentráció emelésén keresztül aktiválják a Ca^{2+}-érzékeny adenilát-ciklázt. Ennél meglepőbb, hogy a CREB fehérjét a PKA foszforilációs helyen a Ca^{2+}-kalmodulin-dependens protein-kináz-II (CaMK-II) is képes foszforilálni.

A cAMP nem PKA által közvetített hatásai közül említést érdemel a szaglás folyamatában játszott szerepe: a szaglósejtekben egy kation-csatorna működését tudja közvetlenül befolyásolni.

A cAMP és Ca^{2+} jelpályák között igen sokféle kölcsönhatást ismerünk, ezek sejttípusonként eltérő módon erősíthetik, vagy gyengíthetik egymás hatását, attól függően, hogy az illető sejtben milyen fajta fehérjék expresszálódnak. A cAMP a PKA segítségével foszforiláltat bizonyos fehérjéket, amelyek a Ca^{2+} jel erősségét vagy időtartamát befolyásolják, illetve a foszforiláció bizonyos Ca^{2+} által szabályozott enzimek aktivitását fokozza, vagy csökkenti. A Ca^{2+} viszont bizonyos típusú adenilát-cikláz aktivitásának szabályozásával képes a cAMP szintet befolyásolni.

Jelátvitel cGMP-vel

A cGMP keletkezését kétféle guanilát-cikláz (GC) katalizálhatja. Az egyik a citoplazmában előforduló szolubilis enzim, a másik a partikuláris, a plazmamembránt áttörő típus. Mindkettő egyben receptor is.

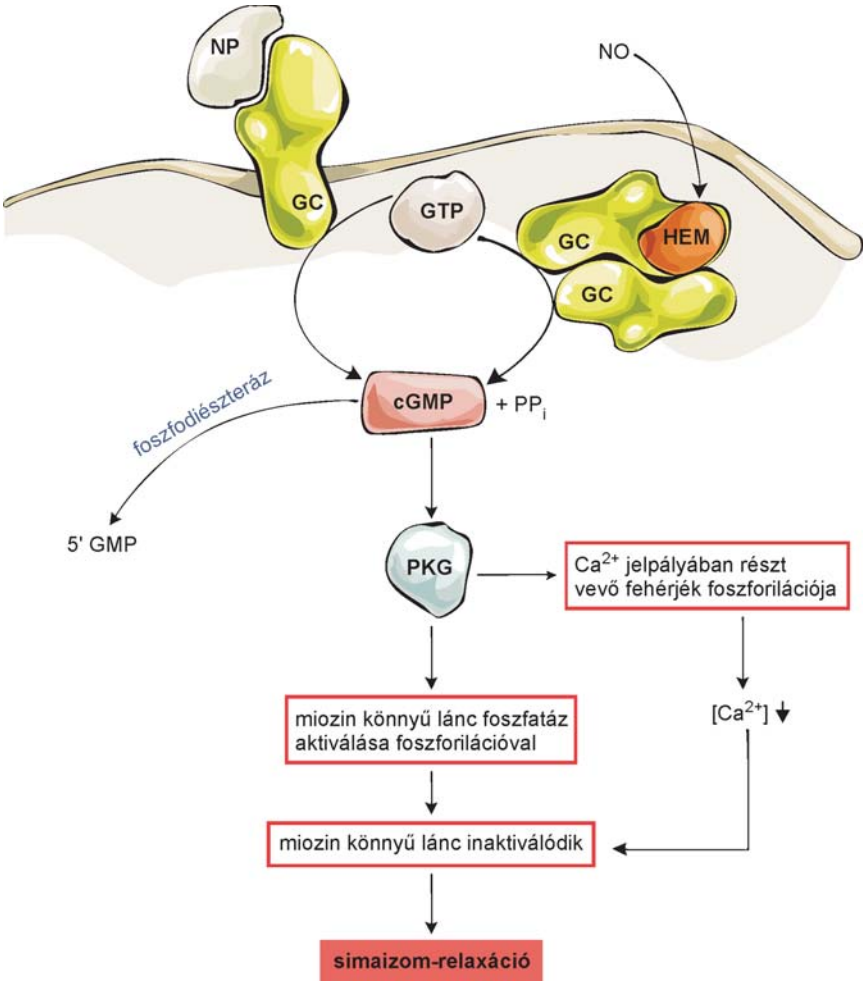
A transzmembrán guanilát-ciklázok legfontosabb képviselőinek extracelluláris ligandjai a nátriuretikus peptidek, amelyek diurézist, nátriurézist, vazodilatációt okozó, és az aldoszteron szintézist gátló hormonok. Az egyetlen polipeptidláncból álló guanilát-cikláz extracelluláris részéhez kötődve aktiválják az intracelluláris katalitikus domént, amely GTP-ből cGMP képződését katalizálja.

A citoplazmában található szolubilis guanilát-cikláz a nitrogén-monoxid (NO) receptora. Két alegységből álló heterodimer, amely hem prosztetikus csoportjával köti meg a NO-ot. A gáz hatására katalitikus aktivitása fokozódik, emelkedik a cGMP szintje. A sejtek közötti, intercelluláris mediátor szerepet játszó nitrogén-monoxid (NO) képződésének és fiziológiai hatásának mechanizmusát ebben a fejezetben később röviden ismertetjük.

A cGMP hatásait elsősorban a cGMP-dependens protein-kináz (PKG) közvetíti. Nyugalmi állapotban a PKG homodimer szerkezetű. A PKA-val szemben a PKG katalitikus aktivitásáért és a regulációjáért felelős elemek mindkét azonos polipeptidláncban megtalálhatók. A cGMP hatására a dimer szerkezetű kináz kinyílik és aktív lesz. Két formája ismert. A PKG-I citoplazmatikus enzim és széles szöveti előfordu-

lást mutat. A PKG-II lipid oldallánccal a plazmamembránhoz horgonyzódik és a bélben, a vesében és az agyban fejeződik ki.

A PKG-I szubsztrátjait ismerjük jobban. Simaizomban a citoszol Ca^{2+} szintjét csökkenti, mert foszforilálja a szarkoplazmás retikulum Ca^{2+}-pumpát szabályozó foszfolambánt, az L-típusú Ca^{2+}-csatornát, a PLCβ-t és az IP_3-receptort reguláló IRAG fehérjét. A közvetlen PKG I foszforiláció hatására a miozin könnyű lánc foszfatáz felszabadul a gátlás alól és inaktiválja a miozin könnyű láncot. Mindezen folyamatok eredménye az érfali simaizom relaxációja, ami a nátriuretikus peptidek vagy NO hatására létrejövő cGMP-szint emelkedéskor mindig bekövetkezik. Az érfali simaizom relaxációja felelős végül a perifériás ellenállás, a vérnyomás csökkenéséért, valamint a vese véráramlásának élénkülésén keresztül a fokozott diurézisért. A Viagra hatóanyaga egy cGMP-t specifikusan bontó foszfodiészteráz izoenzimet gátol, ennek következtében emelkedik a cGMP szintje, aktiválódik a PKG-I és végül fokozódik a véráramlás a barlangos testekben *(III/1-10. ábra)*.



III/1-10. ábra
A guanilát-ciklázok (GC) és hatásaik az érfali simaizomban

Minthogy a citoplazmai guanilát-cikláznak egyetlen aktivátora az NO, itt célszerű megismerkedni az aktivátor NO képződésének módjával és hatásaival. Az egyébként mérgező gázként ismert NO sejtek közötti hírvivő funkciókat lát el mint lokális mediátor és neurotranszmitter. A szabad L-arginin guanidinocsoportjának oxidációjával keletkezik a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) enzimek által katalizált reakcióban. A nitrogén-oxid-szintázok hem-fehérjék és három fajtájuk ismert: a membránhoz kötött endoteliális eNOS (NOS-III), az agyból azonosított szolubilis nNOS (NOS-I) és a makrofágokból felfedezett, citokinek és bakteriális endotoxinok hatására expresszálódó iNOS (NOS-II). Az nNOS az idegsejtekben és a vázizomban található nagyobb mennyiségben, de előfordulása nem korlátozódik ezekre a sejtekre. Az eNOS igen sokféle sejtben megtalálható. Az eNOS és az nNOS konstitutívan fejeződnek ki, a megfelelő sejt fehérjekészletének állandó összetevői. Mindkettő Ca^{2+}-kalmodulin-dependens enzim, az intarcelluláris Ca^{2+}-szint emelkedésére adott válaszként szintetizálják a NO-ot. Ezzel ellentétben az iNOS csak megfelelő külső jelek hatására expresszálódik a sejtben. Ha az iNOS fehérje megszintetizálódott, folyamatosan dolgozik, mert a kalmodulin Ca^{2+} nélkül is aktiválja. Nagy teljesítményű enzim és órákig működik, így maximalizálódik például a makrofágok citotoxikus hatása, melyet a mérgező NO segítségével fejtenek ki. Kezdetben azt hitték, hogy az iNOS csak makrofágokban jelenhet meg például bakteriális endotoxin hatására, de ma már tudjuk, hogy a májban és az endotélsejtekben is kifejeződhet citokin stimulusra.

Az NO nem egy klasszikus hírvivő molekula. Nagyon reaktív, mert párosítatlan spínű elektront tartalmaz, ezért gyorsan tovább alakul. Vizes közegben ugyan sebesen diffundál, de hatásai igen rövid fél-életideje (10-30 s) miatt parakrin jellegűek. A membránokon könnyedén átjut, a citoplazmában a már említett szolubilis guanilát-ciklázt aktiválja. Ezzel magyarázható a NO vaszkuláris hatása. Amikor az érfal endotél sejtjeiben, például acetilkolin hatására, a Ca^{2+} koncentráció megemelkedik, a Ca^{2+}-kalmodulin komplex útján aktiválódik az eNOS, amely az argininből NO-t szintetizál. A felszabaduló NO a környező simaizom sejtekben a szolubilis guanilát-ciklázt aktiválja, amely cGMP-t készít, az pedig aktiválja a PKG I-et. A PKG I már említett tevékenysége miatt relaxálódik a simaizom. Érdemes megjegyezni, hogy az érfal endotél sejtjeiben Ca^{2+}-jelre szintetizálódó NO a szomszédos simaizom sejtekben csökkenti a Ca^{2+} jelpálya hatásait. A szívgyógyászatban régóta használt nitroglicerin is úgy hat, hogy belőle NO keletkezik.

A makrofágokban termelődő NO-nak nemcsak citotoxikus funkciója van, hanem az érfali simaizom sejteken hatva fokozza a fertőzés helyén a véráramlást is. Súlyos fertőzésben a bakteriális endotoxin hatására aktiválódó fehérvérsejtek citokinjei által test-szerte indukált iNOS akkora mennyiségű NO-t termelhet, hogy az általános értágulatot okoz, és emiatt a beteg a saját ereibe mintegy elvérzik (endotoxin sokk).

A cGMP nem PKG által közvetített hatásai közül említést érdemel a látás folyamatában játszott szerepe. A retinapálcikákban a cGMP egy kation-csatornát tart nyitva. Fény hatására a rodopszinról aktiválódó heterotrimer G-fehérje, a G_t (transzducin) egy cGMP-specifikus foszfodiészterázt aktivál, a cGMP szint lecsökken, a csatorna pedig záródik, és az ionkoncentráció csökkenése a plazmamembrán hiperpolarizációját okozza.

A cAMP, a cGMP és a Ca^{2+} jelpálya között számos kapcsolat van. A ciklikus nukleotid-foszfodiészterázok között ismertek ugyanis az egyik vagy a másik nukleotidra specifikus, de mindkét ciklikus nukleotidot szubsztrátjukként felismerő izoenzimek is. Az egyes izoenzimek aktivitását szabályozhatja a cGMP, a Ca^{2+}-kalmodulin komplex, vagy foszforiláció. A ciklikus purin nukleotidok szintjének aktuális aránya, így az egyik vagy a másik jelpálya aktivitása a foszfodiészterázok és a cikláz enzimek pillanatnyi állapotának együttes eredménye.

III/1.7. A TIROZIN-KINÁZOKKAL MŰKÖDŐ JELPÁLYÁK

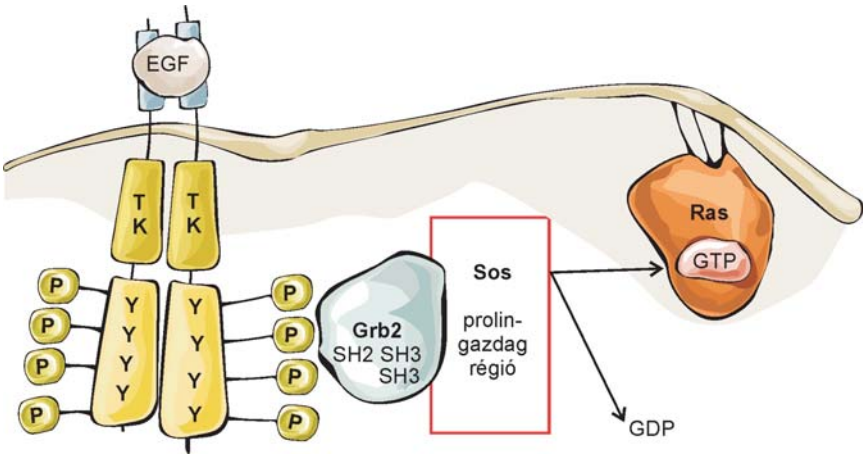
A növekedési faktorok jelátvitele

A sejtek növekedését, illetve differenciációját, közös szóval proliferációját jelentős részben a fehérje természetű növekedési faktorok szabályozzák. Ilyenek az epidermális növekedési faktor (EGF), az idegi növekedési faktor (NGF), a trombocitából származó növekedési faktor (PDGF), a hepatocita növekedési faktor (HGF), de ebbe a csoportba tartozik az inzulin is. Először az olyan növekedési faktorok jelátvitele kerül bemutatásra, amelyek recepora egyben tirozin-kináz aktivitással is rendelkezik. Számos olyan növekedési faktort is ismerünk ugyanis (citokinek, interleukinek), melyek jelpályájában bár találhatóak tirozin kinázok, azok a citoszolban találhatóak és a receptorhoz kötődnek.

A talán legjobban ismert növekedési faktor az EGF, amelynek receptora olyan membránfehérje, mely egyszer fúrja át a plazmamembránt. Az extracelluláris doménje felelős a ligand megkötésért. A tirozin-kináz aktivitást hordozó intracelluláris domént az extracelluláris doméntől a hidrofób aminosavakban gazdag transzmembrán domén választja el. Érdemes megkülönböztetnünk még egy régiót a receptor szerkezetében, mégpedig az intracelluláris C-terminális szakaszt. Ez a régió ugyanis főként olyan aminosavakból áll, melyek flexibilis struktúrát tudnak kialakítani, s ez a szakasz számos tirozint is tartalmaz. EGF kötődés hatására a receptor alegységek dimerizálódnak, illetve oligomerizálódnak, majd ezt követi a receptor autofoszforilációja. Ez a kifejezés bár széles körben elterjedt, nem fedi a valóságot. Az egyes receptor molekulák nem képesek ugyanis önmagukat foszforilálni, hanem az egyes molekulák keresztbe foszforilálják egymást.

A növekedési faktor receptorok aktiválódását követően féltucatnyi foszforilált tirozin oldallánc jelenik meg a receptor intracelluláris doménjében, alapvetően a C-terminális flexibilis régióban. Ezek a foszforilált tirozinok kötőhelyet jelentenek olyan fehérjék számára, amelyek SH2 doménnel rendelkeznek, így az aktivált receptor egyfajta kristályosodási magként beindítja egy számos fehérjéből álló jeltovábbító komplex összeállását. A komplex legfontosabb elemei a PI-3-kináz, a PLCγ és a kizárólag SH2 és SH3 doménekből álló Grb2 kapcsoló fehérje. Az EGF receptor egyes foszforilált tirozinjaihoz eltérő molekulák kötődnek, amelyek számos jelátviteli utat tudnak elindítani. Ezzel magyarázható, hogy egy növekedési faktor hogyan tudja befolyásolni egy sejt általános anyagcseréjét, osztódását, mozgását, vagy túlélését. Az EGF sejtosztódást kiváltó jelátviteli pályája úgy indul, hogy a receptor 1068-as foszforilált tirozinjához kötődik a Grb2 fehérje. A Grb2 fehérje ugyanakkor két SH3 doménjével állandó dimert képez az Sos GEF fehérjével, amely számos prolinban-gazdag régiót tartalmaz. A Grb2 segítségével a citoplazmából a plazmamembránhoz kerülő Sos aktiválni tudja a szigorúan membrán-kötött Ras fehérjét, mégpedig úgy, hogy előmozdítja a Ras-hoz kötött GDP disszociációját. Tekintve, hogy a Ras mindig köt valamilyen guanin-nukleotidot, a citoplazma sajátos viszonyai miatt a disszociált GDP helyett nagy valószínűséggel GTP fog a Ras-hoz bekötődni. A GTP-kötött, aktivált Ras fehérje tulajdonképpen időkapcsolóként működik a növekedési jelpályában, ugyanis képes a GTP hidrolízisével saját magát kikapcsolni. A viszonylag lassú enzimaktivitását a GTP-áz aktiváló proteinek (GAP) fehérjék tudják fokozni *(III/1-11. ábra)*.

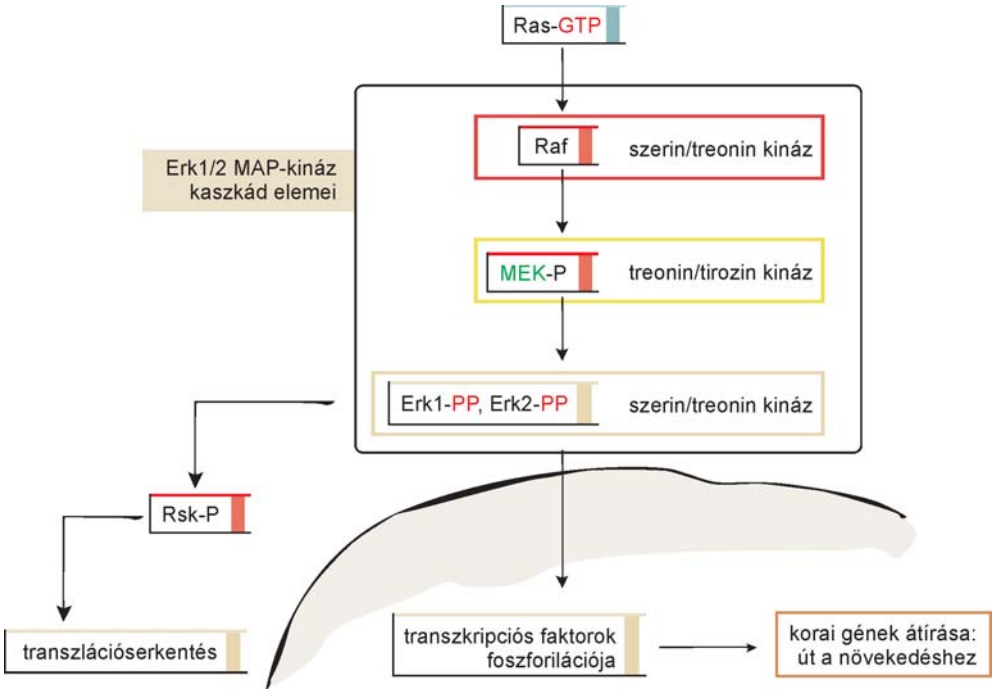
A Ras fehérje tartalmaz egy effektor domént, amelyhez a növekedési jelpálya további komponensei kapcsolódhatnak. A GDP-kötött állapotban az effektor domén nem hozzáférhető, míg GTP-kötött állapotban a fehérje felszínére kerül. Bár az irodalomban számos jelátviteli molekulát azonosítottak, amelyek a felszínre került effektor



III/1-11. ábra
A Ras aktiválása

doménhez tudnak kötődni, igazából két fehérjének van általános jelentősége. Az egyik a már korábban említett PI-3-kináz katalitikus alegysége, amely képes a Ras-sal kölcsönhatásba kerülni, ezzel érve el maximális enzimaktivitását. A másik fehérje a Raf-nak nevezett szerin/treonin-kináz, amely az első tagja az Erk1/2 MAP-kináz kaszkádnak. Bár a növekedési jelpálya minden lépését ma már jól ismerjük, az egyetlen nem teljesen felfedett lépés a Raf kináz aktivációjának pontos mechanizmusa. Ebben biztosan szerepe van a Raf kötődésének az aktív Ras-hoz, a Raf autofoszforilációjának, de még más fehérjék közreműködésére is szükség lehet. A Raf aktiválódását követően foszforilálja a kaszkád második tagját, a kettős (tirozin és treonin) specificitású protein-kináz-családba tartozó MEK-et (*M*AP/*E*RK *k*ináz). Foszforilációját követően a MEK aktiválódik és mind treonin-, mind tirozin-oldalláncokon foszorilálja az Erk1 és Erk2 MAP-kinázokat. A MAP-kináz (*m*itogén *a*ktiválta *p*rotein-kináz) név és az Erk (*e*xtracelluláris szignál *r*egulálta *k*ináz) elnevezés egymás szinonimái. Fontos, hogy az Erk1 és Erk2 MAP-kinázokon kívül más Erk izoenzimek is ismertek, de azok más jelpályák más MAP-kináz kaszkádjainak elemei, és nem a növekedés beindításáért felelősek.

Az Erk1/2 MAP kinázok foszforilációját és aktivációját követően olyan szerkezeti változásokon mennek át, amelyek során felszínre kerül az addig rejtett nukleáris lokalizációs szignáljuk (NLS), így képesek a sejtmagba transzlokálódni, ahol egy transzkripciós faktort foszforilációval tudnak aktiválni. Ez a traszkripciós faktor három alegységből álló komplex, melyek közül kettő az úgynevezett szérum-reszponzív faktor (SRF), míg a harmadik alegység a ternary (hármas) komplex faktor (TCF). Foszorilációját követően a transzkripciós faktor kötődik a DNS-en bizonyos gének promoterében található szérum-reszponzív elemhez (SRE), és aktiválni fogja az úgynevezett korai reagálású gének átíródását, mint például a c-fos génjét. A c-fos génről kifejeződő Fos fehérje maga is transzkripciós faktor. A Fos és a Jun fehérje dimérje az AP-1 transzkripciós faktor, amely a DNS-en az AP-1 helyet elfoglalva a sejtciklus beindulásához szükséges, késői reagálású gének átírását mozdítja elő. A sejtmagi transzlokáció mellett a MAP-kinázoknak a citoszolban is vannak szubsztrátjai. Foszforilálni képes ugyanis a riboszomális S-6 kinázt (Rsk), mely ennek következtében aktiválódik és fokozza a riboszómákon a fehérjék szintézisét. Ennek



III/1-12. ábra
A Ras által indított Erk1/2 MAP-kináz kaszkád és fő funkciói

azért van jelentősége, mert a sejtosztódás során nemcsak a DNS-nek kell megkettőződnie, hanem jelentős mennyiségű új fehérjére is szükség van *(III/1-12. ábra)*.

Az EGF receptor példáján láttuk, hogy a PI-3-kináz is aktiválódik a receptor tirozin-kinázok útján. Az EGF jelpályában fő feladata a korábban már említett túlélési jel biztosítása, hiszen a sejt életben maradása elengedhetetlen a későbbi osztódáshoz. Vannak azonban olyan növekedési faktorok is (HGF, PDGF), amelyek a növekedés mellett mozgásra is késztetnek bizonyos sejteket. Ezek jeltovábbító rendszerében a PI-3-kináz intenzívebben működik. A PI-3-kináz intenzívebb aktiválást például a HGF rendszerében a Gab1 dokkoló fehérje biztosítja. A Gab1 a receptor szubsztrátja és az aktivált receptoron kívül további foszfotirozin konszenzust tartalmaz a PI-3-kináz számára. Az erősebb PI-3-kináz jel specifikus GEF fehérjék útján az aktin-sejtváz szerveződését szabályozó Rho, Rac, és Cdc42 kis G-fehérjék bekapcsolásához vezet. A szelektív biológiai válasz kialakulásában persze mindig fontos tényező, hogy egy adott sejt milyen receptorokkal rendelkezik és milyen funkcióra specializálódott.

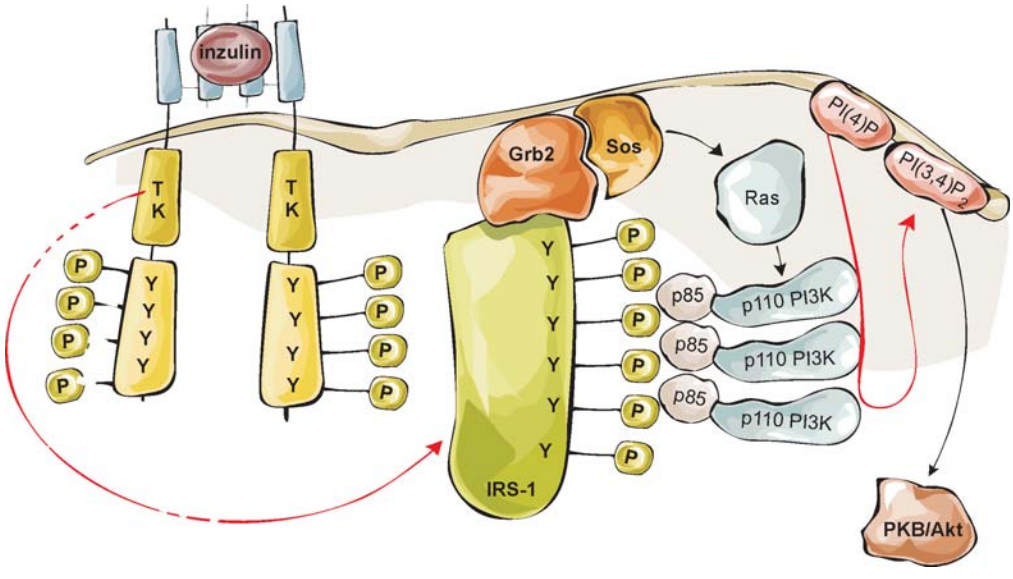
A növekedési faktorok jeltovábbító rendszere térben és időben rendezett események láncolata. Ugyanakkor a jelpálya egyes komponenseinek működését más jelpályák is befolyásolhatják. A Ras aktiválódhat a sejt–extracelluláris mátrix kapcsolatokat létrehozó integrinek, más esetekben a 7 transzmembrán receptorral indított jelpályákon keresztül citoplazmatikus tirozin-kinázok segítségével. A Raf működését a PKA negatív, míg a PKC pozitív irányba befolyásolhatja foszforilációval. Amint ezek a példák is mutatják, a növekedési jelpálya bár elkülönült út, mégis igen precízen szabályozott, integráns része a sejtek összetett szignál transzdukciós rendszerének.

Az inzulin jeltovábbító rendszere

Az inzulin a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek β-sejtjeiben termelődő, az anyagcserét szabályozó peptid hormon, de esetenként növekedési faktor is. Az anyagcserére gyakorolt hatásaira általánosságban jellemző, hogy a tápanyagok raktározására készteti a sejteket. Abszolút vagy relatív hiányának következménye a cukorbetegség.

Az inzulin receptora egy receptor tirozin-kináz, amely egyben az inzulin-szerű növekedési faktor (IGF) receptora is. Az inzulinreceptort egyetlen gén kódolja, az erről kifejeződő polipeptid-lánc a transzlációt követően kettévágódik α és β láncokra, ezeket azonban egy diszulfid-híd összetartja. A funkcionális inzulinreceptor 2 α- és 2 β-láncból álló szerkezet, melyet egy további, a két α-lánc közötti diszulfidhíd kapcsol egybe kovalensen. Az inzulin megkötéséért az extracelluláris α-lánc felelős, míg a transzmembrán β-lánc intracelluláris része foglalja magában a tirozin-kináz domént és foszforilálható tirozin-oldalláncokkal is rendelkezik. Az inzulin receptora tehát a növekedési faktor receptoroktól eltérően nyugvó állapotban is dimer szerkezetű. A ligand megkötése a receptor szerkezetében konformációváltozást eredményez, ekkor a β-láncok tirozin-kináz doménjei először egymás aktivációs szegmenseit, majd további tirozinokat foszforilálnak. Ilyenformán az inzulint megkötött receptor aktív mint tirozin-kináz és foszforilált tirozinjaival kristályosodási magként viselkedik. A jel kikapcsolásáért az inzulinreceptor foszfotirozin-foszfatáza, a PTP1B felelős.

Az inzulinreceptor különlegessége, hogy nagyméretű, enzimaktivitással nem rendelkező dokkoló fehérjéken keresztül adja tovább a jelet. Ezek az *I*nzulin-*R*eceptor-*S*zubsztrát, röviden IRS fehérjék, melyek legfontosabb képviselője az IRS-1. Az IRS-1 a PTB doménje segítségével ragad hozzá az aktív inzulinreceptor egyik foszforilált tirozinjához, ekkor a receptor jó néhány tirozin oldalláncot foszforilál az IRS-1 fehérjén. Az IRS-1 számos foszforilált tirozinjával jelsokszorozó funkciót tölt be. Az IRS-1 foszforilált tirozinjaihoz kötődő fehérjék közül a foszfatidil-inozitol-



III/1-13. ábra
Az inzulinreceptorról induló jelpálya különlegessége az intenzív PKB/Akt aktiválás

3-kináz (PI-3-kináz) a legfontosabb. Lényeges, hogy egyetlen, teljesen tirozin-foszforilált IRS-1 molekula több konszenzust is tartalmaz a PI-3-kináz regulátor alegységének SH2 doménjei számára, így egyszerre több PI-3-kináz molekula gyűlik össze az aktív inzulinreceptor körül. A jel további erősítését szolgálja az is, hogy maga az IRS-1 is rendelkezik a PI-3-kináz termékeihez, a foszfatidil-inozitol-3-foszfátokhoz kötődő PH doménnel. Az IRS-1 egyik foszforilált tirozinja konszenzus szekvencia a Grb2 adapter fehérje SH2 doménje számára. Az aktív inzulinreceptornál összeálló jeltovábbító komplex tehát a Grb2-Sos dimert is magában foglalja, így az Sos segítségével a Ras fehérje is bekapcsolódik inzulin hatására. A Ras közreműködik a PI-3-kináz aktiválásban. Az inzulin által kiváltott nagyon erőteljes PI-3-kináz aktiválódás természetesen igen szorgos PKB/Akt működést eredményez. Az inzulin jelátvitelének különlegessége tehát az, hogy hatására a receptorával rendelkező sejtekben igen intenzíven aktiválódik a PI-3-kináz és a PKB/Akt. Az inzulin-anyagcserére gyakorolt hatásainak döntő többségéért a PKB/Akt működése felelős *(III/1-13. ábra)*.

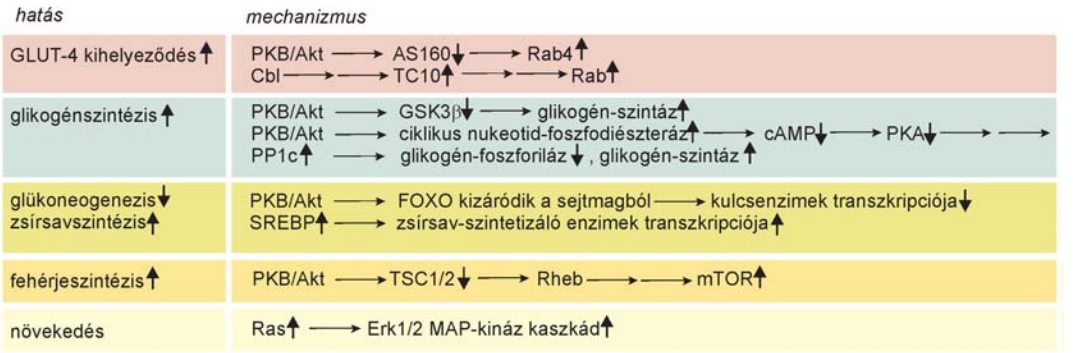
Az inzulin egyik leggyorsabban kialakuló hatása az, hogy izomban, zsírsejtekben serkenti a glukóz felvételét. Ez a GLUT-4 glukóztranszporter szubcelluláris forgalmazásának szabályozásával valósul meg. Inzulin hiányában a GLUT-4 nem a plazmamembránban, hanem intracelluláris membránokban, tároló vezikulákban helyezkedik el a Golgi hálózatban. A GLUT-4 sejtfelszínre helyeződését kis G fehérjék szervezik, amelyek a vezikulák Golgiról történő lefűződését, majd a plazmamembránnal való összeolvadását irányítják. Az előbbiért a Rab, az utóbbiért a TC10 nevű kis G fehérje felelős. A Rab fehérje aktiválásában a PKB/Akt-nak van kulcsszerepe, míg a TC10 kis G fehérjét az inzulinreceptor nem a PKB/Akt segítségével, hanem más módon aktiválja. A GLUT-4 transzporter persze folyamatosan endocitózisra is kerül, ezért az inzulin jel megszűnésével újra az intracelluláris tároló vezikulákban gyűlik össze.

Inzulin hatására a májban és az izomban fokozódik a glikogén szintézise, és csökken a glikogén lebontás sebessége. Az inzulin-hatás kulcslépése itt is a PKB/Akt aktiválódása. A PKB/Akt hatásai ellentétesek a cAMP glikogén-anyagcserére gyakorolt hatásaival. A glikogén szintézise inzulin hatására azért fokozódik, mert ilyenkor a glikogén-szintáz enzimet a cAMP nem tudja kikapcsolni. A glikogén-szintáz enzim ugyanis úgy inaktiválódik, hogy a PKA enzim elvégez rajta egy kijelölő foszforilációt, amelynek segítségével azután a glikogén-szintáz-kináz-3β (GSK3β) képes foszforilálni és inaktiválni a glikogén-szintázt. A PKB/Akt foszforilálja és ezzel inaktiválja a GSK3β enzimet, a GSK3β működésének hiányában tehát nem történik meg a glikogén-szintázt ténylegesen kikapcsoló, végső foszforiláció. A PKB/Akt foszforilációval képes aktiválni egy ciklikus-nukleotid-foszfodiészterázt is. Ennek eredményeként a cAMP szintje csökken, így a PKA beszünteti tevékenységét. Működésbe lép viszont a PP1c nevű foszfoprotein-foszfatáz, melynek defoszforiláló hatására a foszforiláz-kináz és a glikogén-foszforiláz inaktiválódnak, a már foszforilált glikogén-szintáz pedig aktiválódik. Inzulin jelenlétében az egyensúly tehát a glikogénszintézis irányába tolódik el.

A glukóz felvételének, a glikogén szintézisének gyorsításán kívül az inzulin a májban gátolja a glukoneogenezist is. Ennek lényege, hogy a glukoneogenezis két kulcsenzimének, a glukóz-6-foszfatáz és a foszfoenolpiruvát-karboxikináz génjének csökken az expressziója. Mindkét gén transzkripcióját serkentik a FOXO transzkripciós faktorok. Az inzulin jelpályában aktiválódó PKB/Akt a FOXO transzkripciós faktorokat is foszforilálja. Ez a foszforiláció azonban kirekeszti a sejtmagból a FOXO transzkripciós faktorokat, így leáll célgénjeik kifejeződése. Inzulin jelre fokozódik viszont a SREBP transzkripciós faktorok aktivitása, ezért a májban és a zsírszövetben gyorsul a zsírsavszintézis programjának enzimeit kódoló gének átírása.

Inzulin jelenlétében ugyancsak fokozódik a fehérjeszintézis. Itt is a PKB/Akt játszik központi szerepet, mert egy több lépésből álló folyamat elindításával, a Rheb kis G-fehérje aktiválásán keresztül bekapcsolja az mTOR nevű protein-kinázt. Az mTOR a riboszóma kis alegységén a transzlációt szabályozó fehérjék foszforilációjával vezényli az iniciációs komplex összeállását, a fehérjeszintézis elindulását.

Az inzulin bizonyos esetekben növekedési faktor jellegű hatásokat is kifejt, csakúgy, mint az inzulin receptorát használó IGF. A növekedési jel az inzulinreceptor esetében az IRS-1 fehérjéről indul. Említettük, hogy az aktív inzulinreceptornál összeálló jeltovábbító komplex a Grb2-Sos párt is magában foglalja, így a Ras fehérje is bekapcsolódik. A Ras természetesen itt is elindítja az Erk1/2 MAP kináz kaszkádot, ami az inzulinreceptor útján megvalósuló növekedési jelért felelős. A korai reagálású gének transzkripciós faktorainak foszforilálása mellet az Erk1/2 MAP kinázok a fehérjeszintézis fokozódását is segítik az mTOR aktiválásához vezető jelpályában.



III/1-14. ábra
Az inzulin fontosabb hatásai és az ezekért felelős jeltovábbító mechanizmusok

A nem-inzulin-dependens diabétesz hátterében álló inzulinrezisztencia esetében az inzulin jelpálya komponenseinek sérülése figyelhető meg. Az elhízott betegek zsírszövetében érdekes módon nem a zsírsejtek száma növekszik, hanem azok mérete, a nagy térfogatú zsírsejtek felszínén relatíve kevés az inzulinreceptor. A vérkeringésben ilyenkor nagyobb koncentrációban jelennek meg szabad zsírsavak. Ezek hatása, az oxidatív stressz, valamint az emiatt termelődő gyulladásos citokinek együttesen mind kóroki tényezők, amelyek közrejátszanak abban, hogy a különböző sejtekben stimulálódik az IRS-1 szerin/treonin foszforilációja. A szerin/treonin-foszforiláció szétkapcsolja az IRS-1 fehérjét az inzulin- receptortól és az effektoroktól is, ezért az inzulin jelpálya tökéletlenül működik a különböző sejt-típusokban.

Nem-receptor tirozin-kináz segítségével aktiválódó jelpályák: a JAK-Stat jelpálya

A citokinek a sejt-sejt kommunikációt közvetítő, szekretált kis fehérjék, peptidek nagy családja. Sokféle sejt vagy szövet termelhet citokineket, viszont hatásukat a gyulladásban, az immunválaszban részt vevő sejteken fejtik ki. A sokféle citokin (limfokinek, interleukinek, monokinek, interferonok) és rendkívül szerteágazó biológiai hatásaik ismertetése messze meghaladná a fejezet kereteit. Mindennek ellenére a különböző citokinek jelpályáinak váza egy rendkívül egyszerű lépéssorozat.

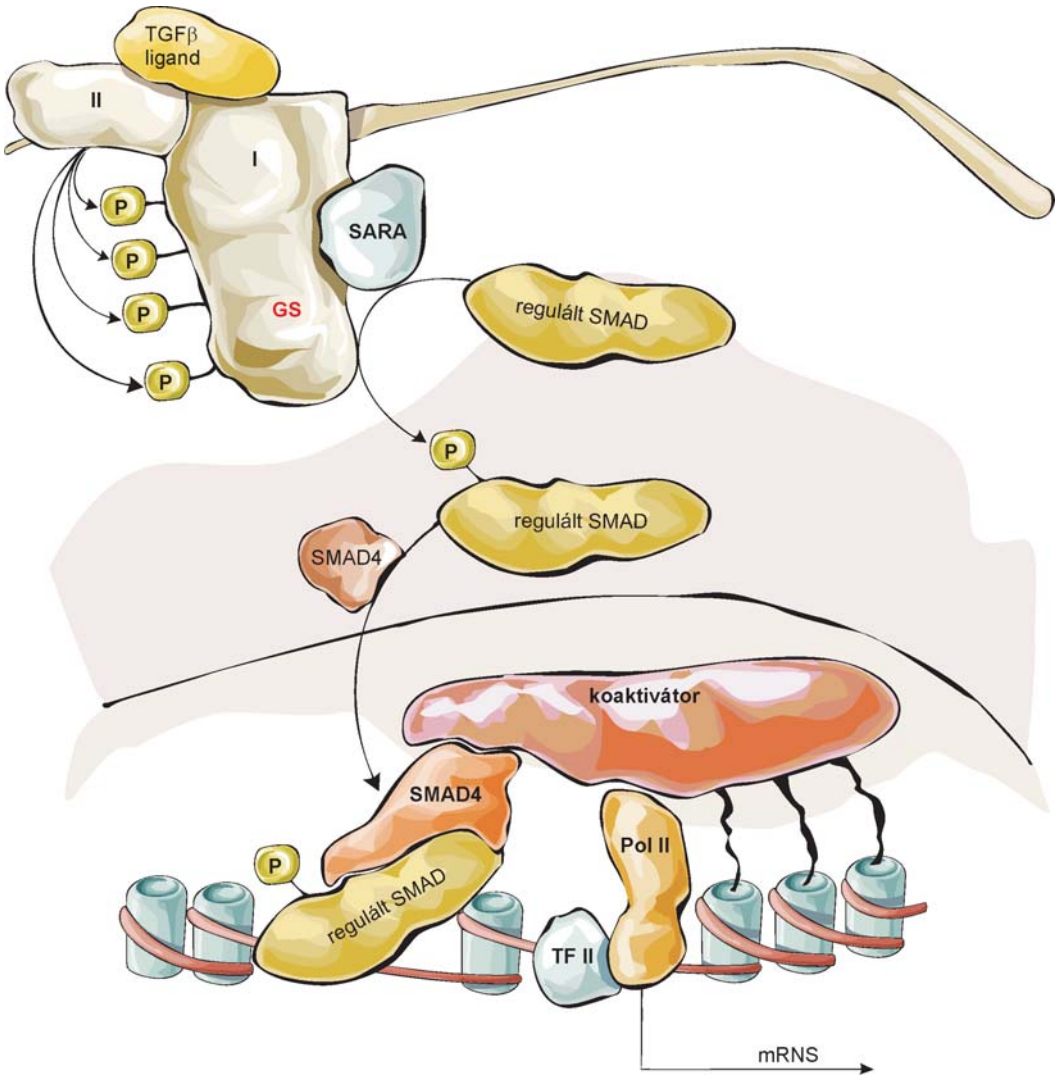
A citokinek specifikus transzmembrán receptorokhoz kötődnek. A citokinreceptorok intracelluláris része szoros fizikai kapcsolatban van az alapállapotban inaktív JAK tirozin-kinázokkal. A ligand megkötése a receptorok dimerizációját eredményezi és konformációjukat is megváltozatja, ez a konformáció-változás áttevődik a JAK tirozin-kinázokra, amelyek ebben az új konformációban autofoszforilációval aktiválódnak. A JAK tirozin-kinázok szubsztrátjai a transzkripciós faktorokként működő, különböző STAT fehérjék. A STAT-ok SH2 domént és foszforilálható tirozint is tartalmaznak. A STAT fehérjék a JAK által katalizált tirozin-foszforiláció nyomán az SH2 doménjeik segítségével dimerizálódnak. A STAT-dimerek a sejtmagba jutva a DNS-en célgénjeik promótereihez kötődnek és elősegítik a transzkripció elindulását. A különböző citokinekre adott biológiai válasz egyediségét segítő tényezők a receptorok változatos szerkezete (monomerek, homo- és hetrodimerek, -trimerek), a JAK tirozin-kináz izoenzimek receptor- és STAT-specificitása, a STAT izoformák változatos dimerizációs lehetőségei, valamint a különböző STAT-dimerek promóter-szelektivitása.

III/1.8. JELÁTVITEL RECEPTOR SZERIN/TREONIN-KINÁZOKKAL: A TGFβ JELPÁLYA

A ma ismert receptor szerin/treonin-kinázok mindegyike arra szolgál, hogy a transzformáló növekedési faktor-β (TGFβ) nevű citokin család jeleit közvetítse. Az emberi genomban található 42 génjével az elsődleges hírvivők egyik legnagyobb tagot számláló családja a TGFβ. Az egyes faktorok az embrionális fejlődésben és a kifejlett szervezetben is igen sokféle folyamatban játszanak szerepet, mint például a növekedésben, a differenciálódásban, az apoptózisban és a sejt homeosztázisában. Általánosságban a TGFβ jelpálya a proliferációt lassító, differenciálódást elősegítő rendszer, ezért kiesése gyakran a daganatképződés irányába hat. A funkciók alapján az emberi TGFβ család tagjai számos alcsoportba sorolhatók, de ezek ismertetése messze meghaladja a fejezet kereteit. A szerteágazó hatások ellenére a TGFβ jelpálya viszonylag egyszerű.

Az extracelluláris ligandot megkötő, aktív receptor egy TGFβ-receptor-I típusból és egy TGFβ-receptor-II típusból összeállt heterodimer szerkezet. Mindkét típusú receptor szerin/treonin-kináz aktivitású intracelluláris domént tartalmaz. A TGFβ-receptor-II típusa állandóan aktív, de igen szűk szubsztrátspecificitású kináz: csak a TGFβ receptor I típusa lehet a szubsztrátja, de ezt is csak akkor képes foszforilálni, ha az extracelluláris ligand hatására felveszi azt a konformációt, melyben kellően rácsavarodhat. Ekkor a II. típusú receptor az I. típusú receptor glicin-szerin ismétlődéseket tartalmazó GS doménjében a TTSGSGS szekvencia mind az öt hidroxilcsoportját foszforilálja. Az I. típusú receptor csak foszforilálva aktív, szubsztrátjai a Smad transzkripciós faktor fehérjék. A TGFβ receptorokat az általuk foszforilált és így regulált Smad izoformák alapján csoportosíthatjuk. A TGFβ/aktivin család receptorai a Smad2 és Smad3, míg a BMP (csont morfogenikus protein) család receptorai a Smad1, Smad5 és Smad8 izoformákat foszforilálják. A szubsztrát Smad receptorhoz terelésében a SARA (*S*mad *A*nchor for *R*eceptor *A*ctivation) fehérje segédkezik.

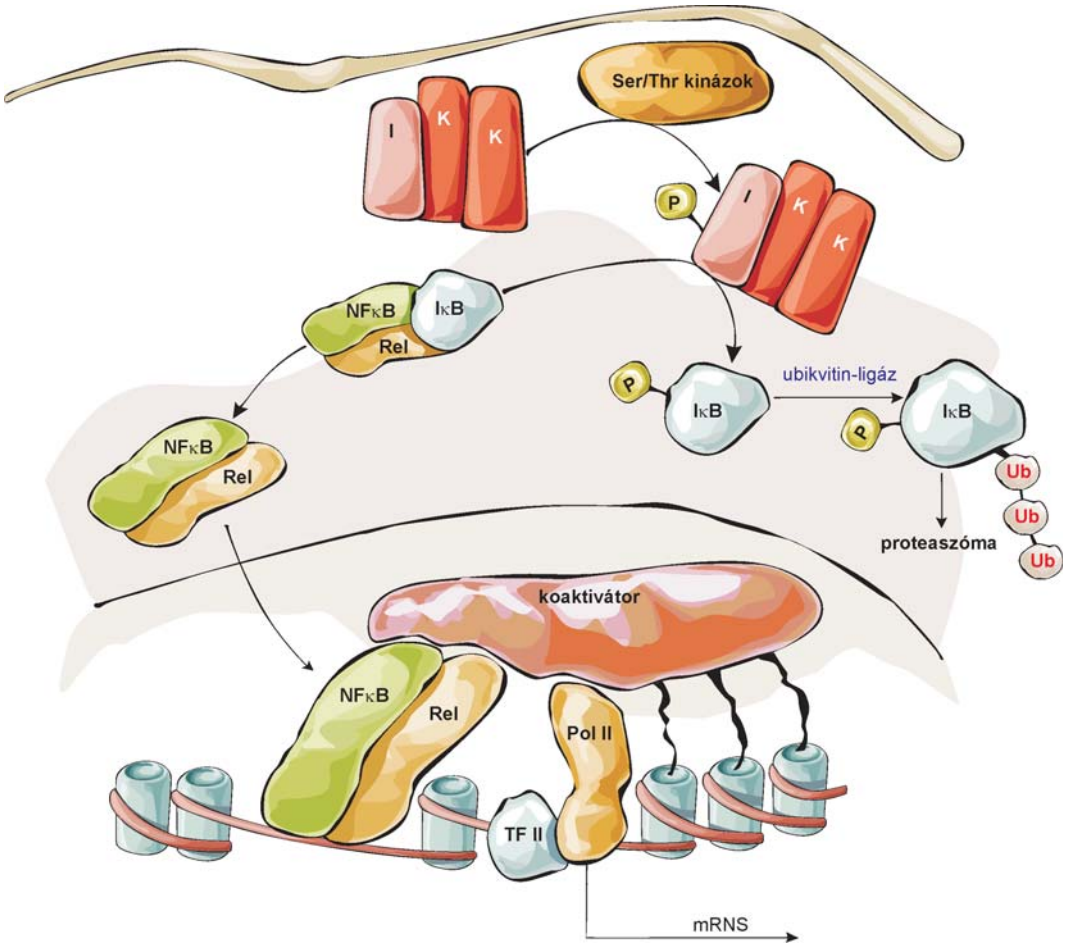
A regulált Smad-ok foszforilált állapotukban ugyanahhoz a közös, Smad4 fehérjéhez kötődnek, amellyel dimert alkotnak. A foszforilált Smad-Smad4 dimer bekerül a sejtmagba és transzkripciós faktor feladatot lát el. A Smad4 toborozza a promóterhez a koaktivátorokat (például CBP és p300), míg a foszforilált Smad komponens felelős a megfelelő gén kiválasztásáért. A TGFβ-reszponzív gének promótereire az SBE (*S*mad *B*inding *E*lement) nevű konszenzus szekvencia jellemző *(III/1-15. ábra)*.



III/1-15. ábra
A TG-béta jelpálya

III/1.9. JELÁTVITEL FOSZFORILÁCIÓVAL SZABÁLYOZOTT FEHÉRJEBONTÁS SEGÍTSÉGÉVEL: AZ NFκB JELPÁLYA

Az NFκB egy transzkripciós faktor család, amely szinte minden sejtben megtalálható. Az NFκB jelpálya aktivációja fontos lépése az immunválasznak, de kóros működése egyrészt gyulladáshoz vezethet, másrészt megfigyelték, hogy a legtöbb daganatsejtben folyamatosan aktív. Az NFκB transzkripciós faktor család különböző tagjai az immunválaszban, a gyulladásban, a proliferációban és a túlélésben szerepet játszó gének promótereiben a κB konszenzus szekvenciákhoz kötődnek. A jel-



III/1-16. ábra
A kanonikus NFκB jelpálya

pálya szabályozása (aktiválása) a transzkripciós faktor citoplazmából sejtmagba jutásának az elősegítését jelenti. Ennek a szabályozásnak létezik egy úgynevezett kanonikus, és alternatív útja is.

A kanonikus út a következő. A kifejlett szervezet legtöbb sejtjében az NFkB transzkripciós faktor a citoplazmában parkol, mert a sejtmagba kerülését egy inhibitor fehérje, az IκB gátolja, mivel úgy kötődik a transzkripciós faktorhoz, hogy lefedi az annak polipeptid láncában található nukleáris lokalizációs szignál szekvenciát. A jelpálya aktivációjának lényege az IκB inhibitor fehérje ubikvitinációval irányított proteolitikus lebontásának az előidézése. Ha az IκB eltűnik, a transzkripciós faktor nukleáris lokalizációs szignálja lelepleződik. Az IκB proteolízise a proteaszómában történik, ehhez azonban az szükséges, hogy az IκB fehérje poliubikvitinálódjon. Az ubikvitinálásért az ubikvitin-ligáz enzim felelős, ez azonban csak akkor tekinti szubsztrátjának az IκB fehérjét, ha az foszforilálva van, a foszforilációt pedig az IκB-kináz (IKK) katalizálja. Az IκB-kináz aktiválódását foszforiláció idézi elő. Az IκB-kinázt sok-

féle szerin/treonin-kináz foszforilálhatja különböző külső jelek (citokinek, növekedési faktorok, patogének) és stressz (szabad gyökök, ionizáló sugárzás) hatására.

Az NFκB transzkripciós faktor családba öt fehérje tartozik. Az NFκB1 és NFκB2 fehérjék egy hosszabb prekurzor formában szintetizálódnak, melyekből a fehérjék C-terminális felének limitált proteolízisével alakulhatnak ki az érett, transzkripciós faktorként funkcionáló formák. Ezek képesek a DNS κB szekvenciáihoz kötődni. A transzkripció beindításához szükséges transzaktivátor doménnel viszont csak a RelA, a RelB és a c-Rel fehérjék rendelkeznek. Ebből az öt fehérjéből sokféle homo- és heterodimer állhat össze, a génexpresszió elindítására azonban csak érett NFκB-Rel dimer képes, a Rel fehérjét nem tartalmazó NFκB dimerek a transzkripciót akadályozzák *(III/1-16. ábra)*.

Az NFκB1 és NFκB2 prekurzor formáiban még megtalálható C-terminális fehérje domén az IκB szerkezetével szinte teljesen azonos. Ennek megfelelően a prekurzorok C-terminális részük segítségével betölthetnek IκB jellegű funkciót, így az NFκB jelpálya a kanonikustól eltérő módokon is aktiválódhat. Az alternatív, nem-kanonikus út esetén a RelB az NFκB2 prekurzor formájához kötődik. A foszforilációval elősegített ubikvitináció és az ezt követő részleges proteolízis ilyenkor a prekurzor fehérjének az IκB szerkezetére hasonlító részét érinti.

III/1.10. A MAGI RECEPTOROK

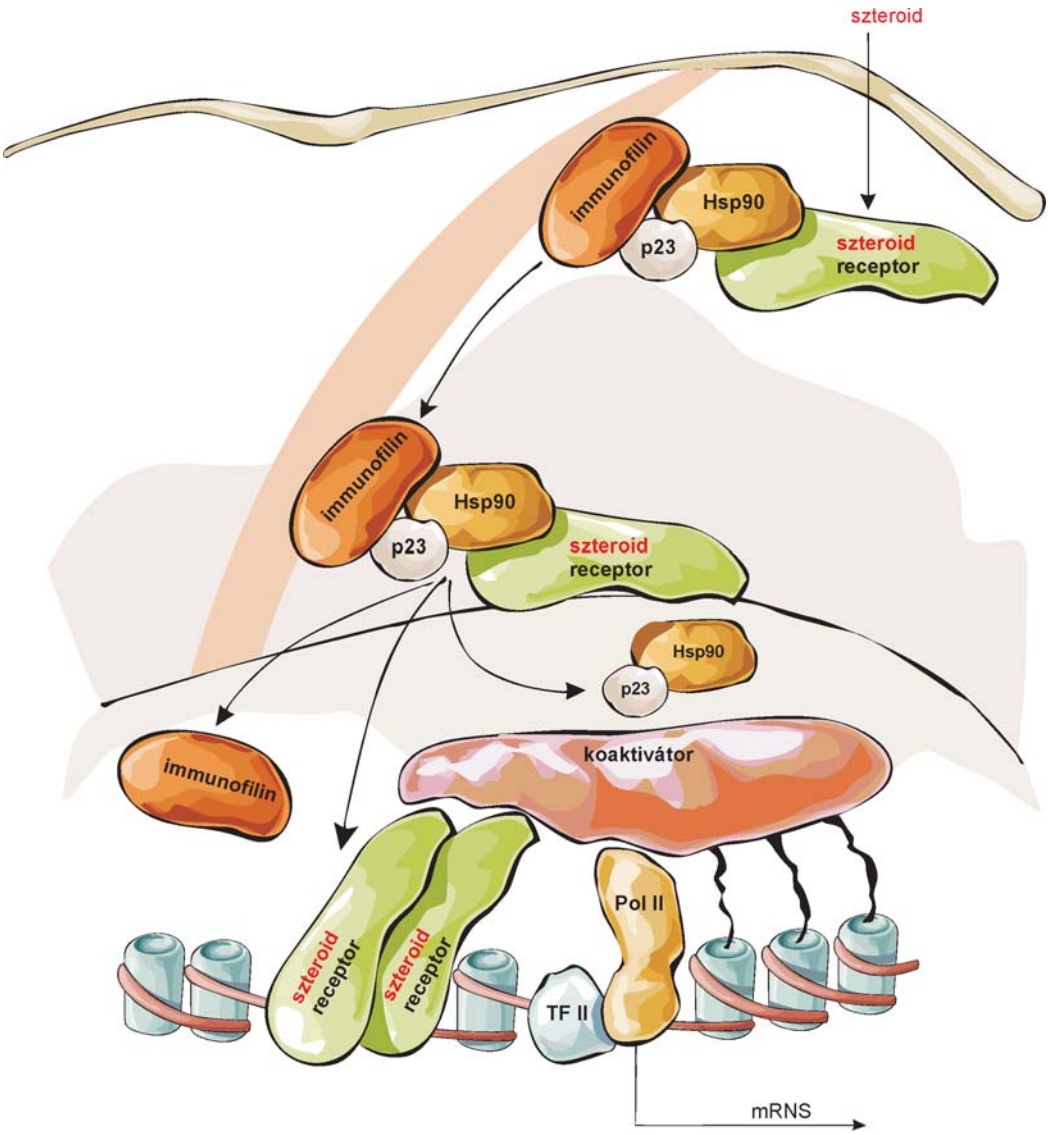
A magi (sejtmagi, nukleáris) receptorok alkotják a lipofil ligandok segítségével aktiválódó transzkripciós faktorok szupercsaládját. Tagjai rendkívül sokféle biológiai funkciót szabályoznak, például az embrionális fejlődést, növekedést, a fenotípus fenntartását, de metabolikus folyamatokat is irányíthatnak, beleértve a koleszterin és az epesavak szintézisét. A rendszer rendellenességei elhízáshoz, diabéteszhez, terméketlenséghez, daganatképződéshez vezethetnek. Transzkripciós faktorok lévén a magi receptorok ligandjaik hatását a génkifejeződés módosításával biztosítják. Ligandjaik lehetnek a membránokon át szabadon közlekedő hormonok, vitaminok, a sejtben előforduló egyéb lipofil molekulák, illetve xenobiotikumok.

Emberben az elsőként megismert ösztrogén és a glukokortikoid receptorokat kódoló gének homológjait keresve közel 50 magi receptort azonosítottak. Felfedezésükkor ezek mintegy felének nem volt ismert ligandja, ezért őket árva (orphan) receptoroknak nevezték el. Az árva receptorok némelyekéről azóta kiderült, hogy mi a ligandjuk, más részük viszont mai ismereteink szerint ligand nélkül vesz részt a transzkripció szabályozásában.

A magi receptorok szerkezete rendkívül konzervált. Szekvenciájuk N-terminálisan a változatos hosszúságú variábilis doménnel (A/B) indul, ezt követi a két cink-ujjat tartalmazó DNS-kötő domén (C), majd a fehérjét két félre osztja egy csukló funkciót betöltő rész (D), a másik fehérje-fél pedig tartalmazza a ligand-kötő domént (E) és a variábilis C-terminális domént (F). A transzkripciós faktor funkcióhoz szükséges aktivációs funkciójú AF1 és AF2 szerkezeti elemek az A/B és az E doménben találhatók. A működési sajátosságok alapján a magi receptorokat két nagy csoportba sorolhatjuk.

A szteroid típusú magi receptorok frissen szintetizálódva, stimulus nélkül a citoplazmában táboroznak és várnak a ligandjukra. A ligand befogásához szükséges konformációjuk kialakítását egy komplex biztosítja, melynek elemei egy receptormolekulán kívül hősokk fehérjék: a Hsp90, a p23 segéd-dajkafehérje és az immunofilin. Utóbbi a komplexet a mikrotubulus motor fehérje dineinhez kapcsolja. A szteroidreceptor ligand iránt érdeklődő, kompetens konformációja azonban nem

maradandó, a komplex időről időre szétesik és újra összeáll. A hormont már elfogott receptor-komplexek a mikrotubulusok segítségével a magpórushoz szállítódnak és bekerülnek a sejtmagba. A sejtmagban a komplex szétszéled, a ligandot hordozó szteroidreceptorok viszont homodimerizálódva hozzákötődnek a regulált gének promótereiben a hormonreszponzív elemhez. A szteroidreceptor homodimer segítségével áll össze a transzkripciót elindító gépezet, melynek ebben az esetben is elemei a már említett koaktivátor fehérjék. Ezek aktiválását a receptorok AF2 elemei teszik lehetővé. Később a receptorok elveszítik ligandjukat, leválnak a DNS-ről, elengedik egymást, és újra összeállnak a hősokk fehérjékkel. Ez a komplex maradhat a magban új hormonmolekulára várva, de csatlakozhat hozzájuk az immunofilin és

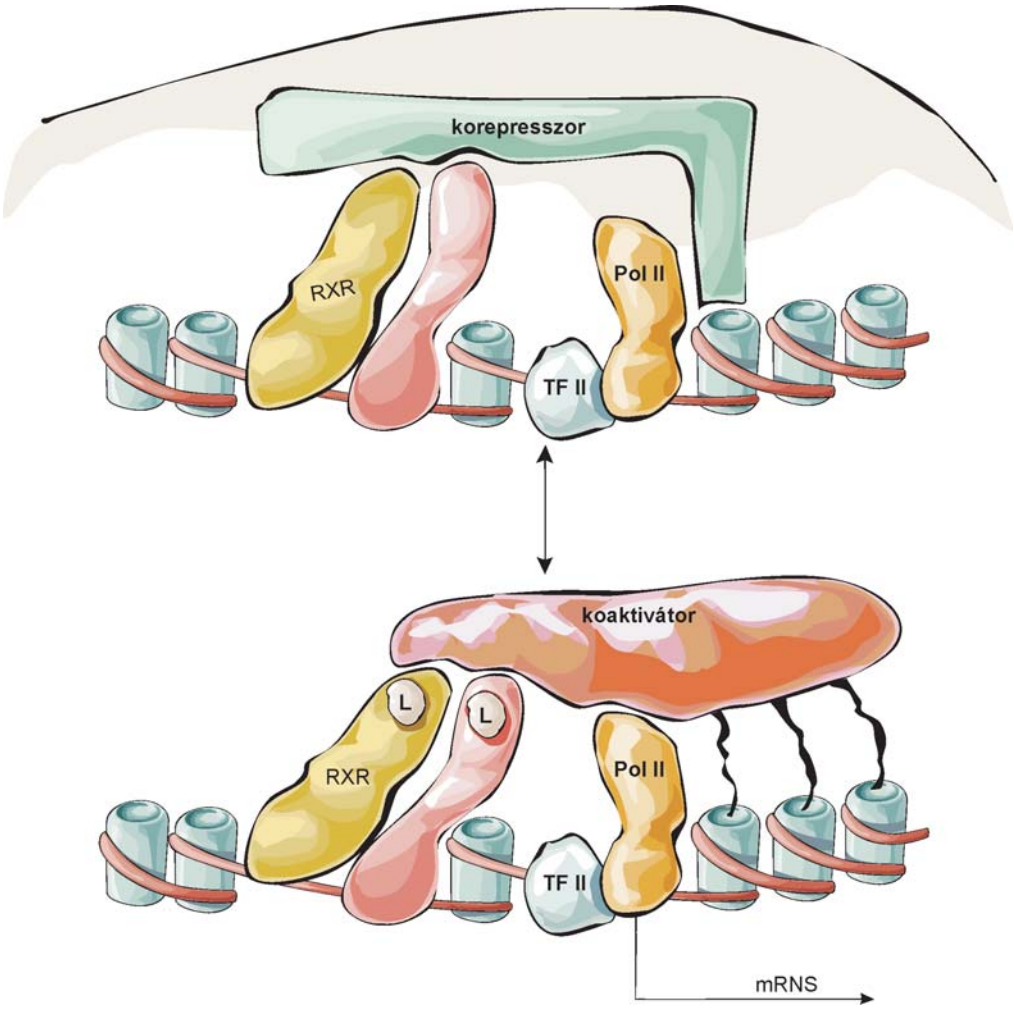


III/1-17. ábra
A szteroid típusú magi receptorok működése

visszakerülhetnek a citoplazmába, ahol a receptor új ligandot köthet meg, vagy lebontásra kerülhet.

A szteroidreceptorok kötőhelyei olyan 15 nukleotidból álló DNS-szakaszok, melyek szélső 6-6 nukleotidja palindrom szekvencia, azaz fordított ismétlődés. (A konszenzus a glukokortikoid (GR), a mineralokortikoid (MR), az androgén (AR) és a progeszteron (PR) receptorok esetében az AGAACAxxxTGTTCT, míg az ösztrogén (ER) receptorokhoz az AGGTCAxxxTGACCT szekvencia.) A saját promóter felismerését a DNS közeli szekvenciái is segítik, de azt is hangsúlyozni kell, hogy a specifikus kötőhelyek egy vagy több nukleotidban különböznek a konszenzus szekvenciától *(III/1-17. ábra)*.

A nemszteroid típusú receptorok már ligand nélkül is a sejtmagban lelhetők fel és a DNS-hez ragadnak. Ide soroljuk például a thyroidhormon (TR), a transzretinsav (RAR), a 9-cisz-retinsav (RXR), a D-vitamin (VDR), a peroxiszóma proli-



III/1-18. ábra
A DNS-hez ligand nélkül is kötődő magi receptorok működése

ferátor aktiválta (PPAR), az epesav (FXR), valamint az árva receptorokat. Ezen receptorok konszenzusai egy hattagú szekvencia 1-5 nukleotiddal elválasztott egyenes ismétlődései (AGGTCAx_{1-5}AGGTCA), melyhez a konkrét esettől függően homodimerként és heterodimerként is kötődhetnek a receptorok. A konszenzus szekvencián ülő heterodimerek jellemző eleme az RXR, amely általában az 5' vég felé esik. Egyes árva receptorok monomerként is elfoglalhatják a konszenzus szekvenciáikat. A nemszteroid típusú receptorok ligand nélkül az AF2 elemükkel korepresszor fehérjéket tartanak a promóteren. A korepresszorok jelenlétükkel csökkentik a transzkripció elindulásának valószínűségét, mert egyrészt gátolják az obligát transzkripciós faktorok hatásainak megvalósulását, másrészt a nukleoszóma szerkezetet tömörítő hiszton-deacetilázokat is toboroznak a promóterhez. A ligand megkötése viszont konformáció-változást eredményez, aminek hatására a receptor elengedi a korepresszort, ennek helyére pedig koaktivátor kerül. Ekkor az obligát transzkripciós faktorok felszabadulnak a gátlás alól, jönnek a nukleoszóma szerkezetet fellazító hiszton-acetiltraszferázok, így beindulhat a transzkripció *(III/1-18. ábra)*.

A változatos dimerizációs lehetőségek és az esetenként közös ligandok biztosítják a specifikus, ugyanakkor sok összetevőjű biológiai válasz kialakulását. A DNS közeli helyei között a magi receptorok ide-oda csalogathatják a koaktivátorokat, represszorokat, hiszton acetilációt módosító fehérjéket. Bizonyos árva receptorok ilyen hatásaik miatt konstitutív represszoroknak, mások aktivátoroknak, összességében a transzkripció bazális szintjét beállító fehérjéknek is tekinthetők. A glukokortikoidok gyulladáscsökkentő hatásának hátterében az áll, hogy a ligandot kötő GR-receptor homodimer képes az NFκB transzkripciós faktor transzrepressziójára. Amint ez a példa is mutatja, a magi receptorok jelpályái nem elkülönült utak, hanem integráns részei a sejtek teljes szignál transzdukciós hálózatának.

III/2.
Intracelluláris jelek érzékelése és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli pályák

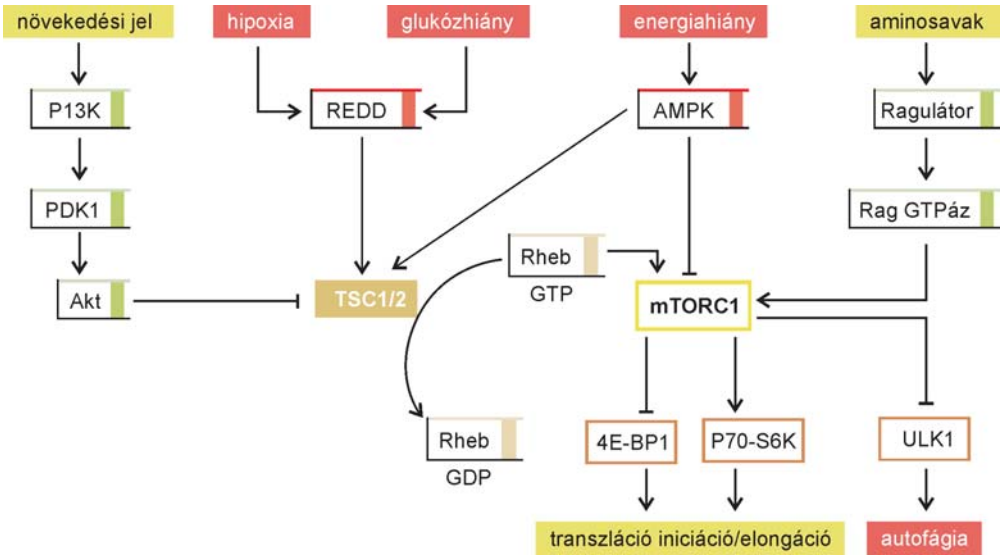
Bánhegyi Gábor

Az egysejtű organizmusokban a legfontosabb növekedési jel a tápanyagok jelenléte. Bőséges tápanyagforrások esetén a sejt proliferatív, anabolikus anyagcserét mutat, míg éhezésben az oxidatív, katabolikus mechanizmusok kerülnek előtérbe. Ugyanez a helyzet a soksejtű szervezetek esetében is, ha növekedési jelek nem érkeznek. A belső (metabolizmusfüggő) és külső (növekedési) jelek összehangolását ősi, több elemből álló jelérzékelő és jelátviteli rendszer látja el. A rendszer elsősorban a redox tényezőket (elektrondonorok és elektronakceptorok, vagyis tápanyagok és oxigén mennyisége) valamint az energetikai állapotot (adenin nukleotidok szintje) érzékeli, és ad rá megfelelő anyagcsereválaszt. A celluláris metabolikus homeosztázist szabályozó jelátviteli mechanizmusok legfontosabb citoplazmában és nukleoplazmában elhelyezkedő elemei az AMP-kináz, az mTOR komplexek és az α-ketoglutarát-függő dioxigenázok. A sejt többi kompartimentumának metabolikus homeosztázisa más jelérzékelő és jelátviteli rendszerek révén szabályozódik és kapcsolódik az itt ismertetett jelpályákhoz, ezeket a „Szubcelluláris biokémia” fejezetben tárgyaljuk.

III/2.1. mTORC1, AZ INTRACELLULÁRIS JELEK FŐ INTEGRÁTORA

Az *mTOR komplexek* (mammalian target of rapamycin) az eukarióta sejtekben általánosan előforduló, több alegységből álló fehérjekomplexek. Az mTOR nevű szerin/treonin protein-kináz játssza ezekben a komplexekben a katalitikus alegység szerepét. Két komplexet ismerünk: az *mTORC2* főleg a citoszkeleton szabályozója, főbb alegységei az mTOR és a rapamicin-inszenzitív RICTOR. Az *mTORC1* a sejt központi tápanyag, energia és redox szenzora és a fehérje homeosztázis legfontosabb szabályozója. Fontosabb alegységei az mTOR és a rapamicin-érzékeny regulációs asszociált protein (RAPTOR). Az mTOR komplexek felfedezéséhez, mint nevük is mutatja, a Húsvét-szigeteken (Rapa Nui) élő baktérium terméke, a *rapamicin* által kifejtett hatások vizsgálata vezetett. A rapamicin sejten belül kötődik az FKBP12 nevű kisméretű fehérjéhez (egy peptidil-prolil-cisz-transz-izomerázhoz), a rapamicin-kötő FKBP12 pedig az mTOR FRB (rapamicin-kötő) doménjéhez. A kötés eredménye az mTORC1 esetében az mTOR és a RAPTOR disszociációja és a komplex aktivitásának megszűnése.

Az mTORC1 négy fő jelet integrál: a tápanyagellátást, a növekedési faktorok szintjét, az energiatöltöttséget és a stresszt érzékeli *(III/2-1. ábra)*. A tápanyagok közül közvetlenül érzékeli az aminosav ellátottságot. Az mTORC1 jelpálya aktiválódása anabolikus anyagcsereválaszhoz és a fehérjeszintézis fokozódásához vezet.



III/2-1. ábra
Az mTORC1-hez kapcsolódó jelátviteli pályák

Aminosavérzékelés

Az intracelluláris aminosavak szintjének érzékelésében a *Rag GTPáz*ok játszanak kulcsszerepet. A Rag fehérjék heterodimerek, melyek a lizoszómákon helyezkednek el. A lizoszómákból kilépő aminosavak elősegítik a dimer egyik tagjának GTP, míg másik tagjának GDP kötését, így aktiválva a Rag fehérjét. A folyamathoz szükséges GEF (guanine exchange factor) a lizoszóma membrán *Ragulátor* (sic!) komplexe. Az intracelluláris leucin szenzora, a leucil-tRNS szintetáz is fontos szabályozója a Rag GTPázoknak, így a leucin központi szereplője az aminosav érzékelésnek. Az aktív Rag kötődik az mTORC1 komplex Raptor komponenséhez, miáltal az mTORC1 a lizoszóma felszínéhez közeledik, ahol a kis GTPáz *Rheb* fehérjével kerül kapcsolatba s ezáltal aktiválódik. A Rheb fehérje a növekedési faktorok hatását is közvetíti a *TSC1*/*TSC2* (*t*uberous *sc*lerosis) tumorszuppresszor fehérjék által. Tehát az mTORC1 aktiválódása megkívánja az aminosavak és a növekedési jelek együttes jelenlétét.

A *GCN2-kináz* az eukarióta sejtek másik fontos aminosav érzékelője. Aminosavhiányban a töltetlen, aminosavat nem kötő tRNS felhalmozódik és kötődik a GCN2-kináz aminoacil-tRNS szintetáz-szerű doménjéhez, ami a GCN2-kináz aktiválódásához vezet. Az aktív GCN2 kináz foszforilálja az eukarióta iniciációs faktor-2α-t (eIF2α), ami a transzláció általános gátlását okozza. Emellett néhány specifikus mRNS transzlációja (mint például az ATF4 transzkripciós faktoré) fokozódik, stresszgének expresszióját váltva ki. Az aminosavhiány tehát a GCN2 aktiválása és az mTORC1 gátlása révén egyaránt csökkenti a fehérjeszintézist. A két jelpálya közötti párbeszéd is valószínű, pontos mechanizmusa azonban még ismeretlen.

Növekedési faktorok hatása

A Rheb alapvető fontosságú az mTORC1 aktiválásában. A növekedési faktorok és az inzulin szabályozzák a Rheb GTP kötését. A PI3K (foszfoinozitid-3-kináz) aktiválódása a PDK1-en (3-foszfoinozitid dependens protein kináz) és Akt-on keresztül a TSC1/TSC2 komplex foszforilálódásához vezet. Ez a komplex látja el a GAP szerepét a Rheb fehérje mellett, foszforilálódása gátolja a GAP aktivitást. Ez előmozdítja az mTORC1–Rheb kapcsolódást, vagyis a növekedési faktorok serkentik az mTORC1 aktivitását.

Energiatöltöttség érzékelése

Az mTORC1 jelpálya az energiatöltöttséget az AMP-kinázon keresztül érzékeli. Az aktív AMPK foszforilálja a TSC2-t (ebben az esetben a foszforiláció aktiválást jelent, szemben az Akt általi foszforilációval, mely gátló hatású) és a RAPTOR-t. Mindkét esetben a végeredmény az mTORC1 gátlása.

Stressz

Hipoxia hatására a HIF1 által közvetített transzkripciós szintű mechanizmussal fokozódik a *REDD1* nevű fehérje expressziója, mely a TSC1/TSC2 komplexet aktiválja. A REDD1 expressziója éhezés, illetve glukózmegvonás hatására is emelkedik, így a fehérje szintje egyaránt érzékeny az elektrondonorok, illetve az elektronakceptor hiányára. Hasonlóképpen, egyes szubcelluláris organellumok homeosztázisának zavarai az organellum stressz mechanizmusán keresztül gátolhatják az mTORC1 aktivitását (lásd Szubcelluláris biokémia).

mTORC1 szubsztrátok

Az mTORC1 kináz aktivitása révén több fehérjét foszforilálhat. Két tipikus szubsztrátja a *p70-S6 kináz 1 (S6K1) és az eukarióta iniciációs faktor 4E (eIF4E) kötő fehérje 1 (4E-BP1)*. Az mTORC1 két helyen foszforilálja az S6K1-et. Az aktivált S6K1 foszforilálja a nagyobb riboszómális alegység S6 fehérjéjét, valamint más transzlációban szerepet játszó fehérjéket, ami a transzláció iniciációjához vezet. Az S6K1 pozitív visszacsatolással fokozza az mTORC1 aktivitást az mTOR negatív regulációs doménjének foszforilációjával.

Az mTORC1 legalább négy helyen képes foszforilálni a 4E-BP1-et. A nem foszforilált 4E-BP1 szorosan köti az iniciációs faktor eIF4E-t, megakadályozva a mRNS 5'-cap kötődését és az iniciációs komplex kialakulását. A foszforiláció hatására a 4E-BP1–eIF4E kapcsolat megszűnik, s utóbbi így kifejtheti feladatát.

Az autofágia szabályozása

A sejt egyik legfontosabb mechanizmusa a tartalékok mozgósítására az autofágia. Megfelelő tápanyagellátottság és energiatöltöttség esetén az mTORC1 jelpálya fékentartja az autofágiát, elsősorban az autofágia iniciációjában kulcsszerepet játszó *ULK1* foszforilációjával. A szabályozás fordított irányban is működik: az aktív, defoszforilált ULK1 gátolja az S6K1 aktivitást, s így a transzlációt.

Az energiahiány természetszerűleg pozitív hatással bír az autofágiára, amit az mTORC1 AMPK-függő gátlása valósít meg. Emellett az AMPK direkt aktiváló hatással is rendelkezik az ULK1 serkentésével.

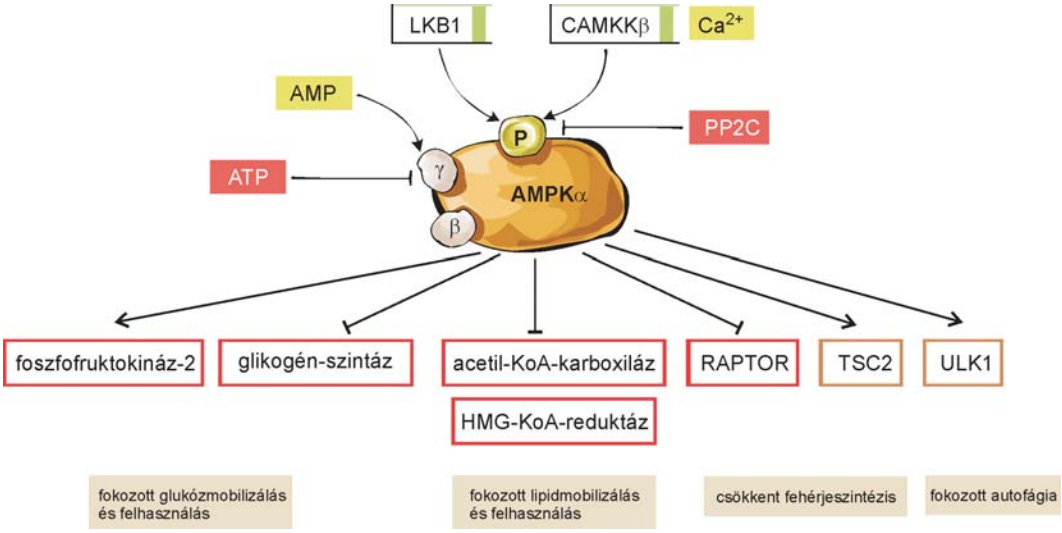
Mitokondrium biogenezis és más transzkripciós szintű mTORC1-hatások

Bár az mTORC1 az anabolikus, míg az AMPK a katabolikus reakciók serkentője, a mitokondriális folyamatok esetében szinergisták. Az AMPK aktiválása fokozza a mitokondriális gének expresszióját és a mitokondrium biogenezist. Az mTORC1 szintén emeli a mitokondriális DNS szintjét, a RAPTOR hiánya pedig a mitokondriális biogenezis defektusát okozza. A két jelpálya a *PGC1*α-n (peroxiszóma-proliferátor-aktivált receptor-γ koaktivátor-1α) fut össze: az AMPK közvetlenül foszforilálja a koaktivátort, míg az mTORC1 a PGC1α transzkripciós aktivitását fokozza azáltal, hogy kölcsönhatást alakít ki más, a transzkripcióhoz szükséges faktorokkal.

Az mTORC1 génexpressziós szinten serkenti a lipid bioszintézist a PPARγ és a SREBP aktiválása révén. Az AMPK ebben az esetben antagonista hatást fejt ki.

III/2.2. AZ ENERGIATÖLTÖTTSÉG ÉRZÉKELÉSE – AZ AMP-KINÁZ

Az élő sejtben az ATP a legfontosabb közvetlen energiaforrás. Az ATP hidrolízise ADP-vé vagy AMP-vé szolgáltatja az energiát a legtöbb anyagcserefolyamathoz. Az adenin nukleotidok koncentrációjának energiatöltöttséget jelző hányadosa (lásd Bioenergetika fejezet) a sejt számára az egyik legfontosabb paraméter, érzékelésé-



III/2-2. ábra
Az AMPK központi szerepe az anyagcsere szabályozásában

re az eukarióta sejtben külön jelátviteli mechanizmus szolgál. Az *AMP-aktivált protein-kináz (AMPK)* a sejt energia szenzora, s egyúttal az anyagcsere befolyásolásán keresztül az energia homeosztázis fenntartásának központi szabályozója *(III/3-2. ábra).* (Az AMPK nem tévesztendő össze a cAMP-dependens protein-kinázzal, bár sok esetben hatásuk azonos.)

Az AMPK heterotrimer fehérje, katalitikus α-, valamint regulátor β- és γ-alegységeket tartalmaz. Az enzim aktiválódásának két feltétele van: az adenin nukleotid kötőhellyel rendelkező γ-alegységen át érvényesülő allosztérikus aktiválódás, és az α-alegység treonin oldalláncon történő foszforilációja. AMP vagy ADP kötődése a γ-alegységhez elősegíti, ATP kötődése gátolja az α-alegység foszforilációját, míg a defoszforiláció reciprok módon szabályozódik: ATP-kötés fokozza, AMP vagy ADP kötése gátolja azt. Ha a treonin már foszforilált állapotban van, az AMP allosztérikusan fokozza az AMPK aktivitását. Az AMP allosztérikus hatása jóval erősebb, mint az ADP-é, így az enzim kétfokozatú választ képes adni enyhe, illetve súlyos energiahiány esetén.

Az α-alegység foszforilációját és defoszforilációját több kináz és foszfatáz képes katalizálni, melyek közül a legfontosabbak a tumorszuppresszor LKB1 (liver kinase B1) és a kalcium-kalmodulinfüggő kináz-kináz-β (CAMKKβ), illetve a protein-foszfatáz-2c (PP2c). A NAD^+-függő deacetiláz aktivitású szirtuinok egyike (SIRT1) deacetilálja az LKB1-et, ezzel fokozza aktivitását. Így a NAD^+ szint érzékelése is bekapcsolódik az AMPK jelpályába.

Az AMPK anyagcserehatásai

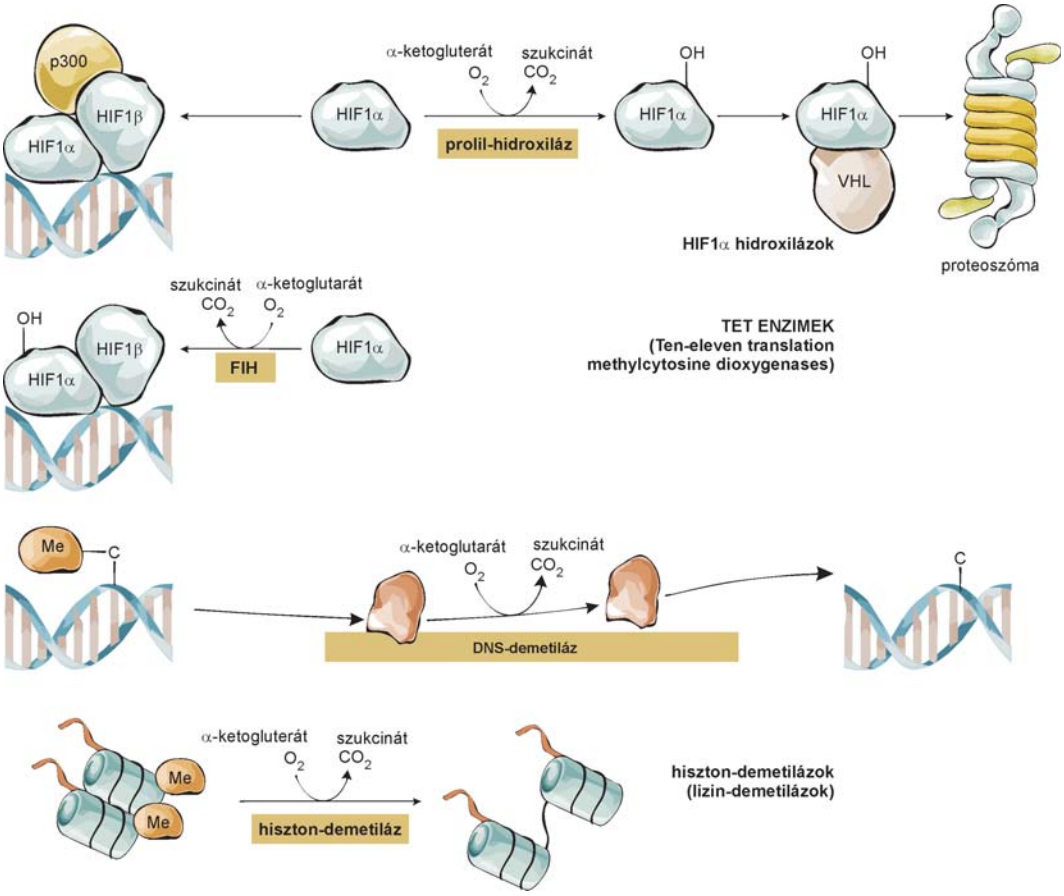
Az mTORC1 komplexen keresztül érvényesülő hatások mellett az AMPK több ponton közvetlenül is befolyásolja a köztes anyagcserét. Hatására a májban fokozódik a zsírsavoxidáció és a ketontestek szintézise, gátlódik a zsírsav-, koleszterin- és triglicerid-szintézis. A vázizomban stimulálja a glukózfelvételt és zsírsavoxidációt. A glikogénmobilizáció és glikolízis is gyorsul. Az AMPK fokozza a GLUT4 expresszióját és a plazmamembránba történő transzlokációját. Foszforilálja a foszfofruktokináz-2 szívizomban előforduló izoformáját. A foszforiláció ebben az esetben fokozza az enzimaktivitást, és az emelkedő fruktóz-2,6-biszfoszfát szint gátolja a glukoneogenezist, serkenti a glikolízist. A hatás tehát ellentétes a májban megismert mechanizmussal. (Megjegyzendő, hogy a májban található foszfofruktokináz-2-izoforma nem rendelkezik AMPK foszforilációs hellyel.) A glikogén-szintáz foszforilációjával a glikogénszintézist, az acetil-KoA karboxiláz-1 foszforilációjával a zsírsavszintézist, a HMG-KoA reduktáz foszforilációjával a koleszterinszintézist gátolja. A RAPTOR és a TSC2 foszforilációjával gátolja az mTORC1 jelpályát, így csökkenti a fehérjeszintézist. Ezt egészíti ki az ULK1 foszforilációján keresztül stimulált makroautofágia. (Az ULK1 több foszforilációs hellyel rendelkezik, így a foszforiláció hatása gátlás és serkentés egyaránt lehet.)

A közvetlen metabolikus hatásokat a transzkripció AMPK-függő szabályozása is támogatja. Transzkripciós regulátorok/faktorok foszforilációjával gátolja bejutásukat a sejtmagba (hiszton deacetilázok), megakadályozza proteolitikus aktiválódásukat (SREBP1), fokozza preteolitikus lebontásukat (Cry1), illetve gátolja a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat (p300).

III/2.3. OXIGÉNÉRZÉKELÉS

Az oxigén, mint a tápanyagokból származó elektronok végső akceptora, szintén alapvető tényezője a metabolizmusnak. A sejtek legfontosabb oxigénérzékelői az *α-ketoglutarát-függő dioxigenázok* közé tartoznak *(III/2-3. ábra)*. Ezek az enzimek szubsztrátként oxigént, α-ketoglutarátot és fehérjék specifikus prolil-oldalláncait használják, a reakció eredményeképpen hidroxi-prolil-oldallánc, szukcinát és szén-dioxid keletkezik. Az enzim kofaktorként ferro iont és aszkorbátot is igényel. Az enzimek affinitása az oxigénhez alacsony, így aktivitásuk a mindenkori oxigénkoncentráció függvénye.

Az α-ketoglutarát-függő dioxigenázok családjának egyik legfontosabb tagja a citoplazmai/sejtmagi prolil-hidroxiláz (nem tévesztendő össze a kollagén poszttranszlációs módosítását azonos mechanizmussal végző endoplazmás retikulum enzimmel), mely normális intracelluláris oxigénszint esetén aktív, hidroxilálja a *HIF1 (hipoxiaindukált faktor-1)* heterodimer transzkripciós faktor HIF1α-alegységét. A hidroxilált HIF1α-t felismeri a *von Hippel–Lindau-tumorszuppresszor protein (pVHL)*, mely egy E3-ubikvitin-ligáz szubsztrátfelismerő alegysége. A folyamat végeredmé-



III/2-3. ábra
A sejtek legfontosabb oxigénérzékelői

nye a HIF1α ubikvitinálása és gyors proteaszomális lebontása. Hipoxia esetén az enzim aktivitása erősen csökken, a HIF1α felhalmozódik, dimerizálódik (dimerizációs partnere a HIF1β = ARNT) és transzkripciós szinten fokozza azoknak a fehérjéknek az expresszióját, melyek a hipoxiához való alkalmazkodásban szükségesek: glikolízis enzimek, GLUT transzporterek, eritropoietin, VEGF. Emellett a HIF1α áttételesen gátolja az mTORC1 aktivitást, megakadályozva az ATP-igényes fehérjeszintézist az energetikailag kedvezőtlen hipoxiás körülmények között. A HIF1α a Myc transzkripciós faktoron keresztül befolyásolja a sejtek növekedését is.

A HIF1α-t egy másik α-ketoglutarát-függő dioxigenáz is hidroxilálhatja. A *FIH (factor inhibiting HIF1α)* aszparagin-oldalláncot hidroxilál, szintén oxigénfüggő módon. Ez a módosítás nem hoz létre proteaszomális lebontási jelet, hanem a heterodimer transzkripciós aktivitását akadályozza a koaktivátorok (pl. a hiszton-acetiltranszferáz-p300) bekötődésének gátlásával. Így a normoxia két ponton is akadályozza a hipoxiás expresszióváltozások bekövetkeztét. (Megjegyzendő, hogy a reakciókhoz szükséges α-ketoglutarát és aszkorbát szintén oxidatív anyagcsereutakban keletkeznek; a α-ketoglutarát-függő dioxigenázokat így nemcsak oxigén, hanem α-ketoglutarát- és aszkorbátszenzornak is tekinthetjük.)

Az utóbbi években az α-ketoglutarát-függő dioxigenázokkal új szerepekben is megismerkedhettünk: a család egyes tagjainak *hiszton- (lizil) demetiláz* és *DNS-demetiláz* aktivitását írták le, melyek összeköthetik a metabolikus szabályozást a génexpresszió epigenetikus módosítások révén megvalósuló szabályozásával. A DNS-demetilázok a metilált citozinbázisokról távolítják el több egymást követő oxidációs lépés során a metilcsoportot, míg a hiszton-demetilázok a hisztonok specifikus lizil-oldalláncait demetilálják.

III/3.
Kronobiokémia (a cirkadián óra biokémiája)

Bánhegyi Gábor

A környezet ismétlődő, ciklusos változásai (szoláris és lunáris ciklusok: napi, árapályhoz köthető, heti, évszakos, éves) alapvetően hatnak a földi élőlények életműködéseire, a baktériumoktól az emberig. Ezek közül a *cirkadián ritmus* (latin: circa diem, jelentése: egynapi, huszonnégy órás), a fény és sötétség 24 órás ismétlődése a legfontosabb. Alkalmazkodva a változó környezeti körülményekhez, az élőlényekben belső szabályozó mechanizmus fejlődött ki, a *cirkadián óra*, mely irányítja és összehangolja a legfontosabb élettani és viselkedésbeli folyamatokat, mint például a táplálkozás, alvás, ébrenlét, mozgás, testhőmérséklet, metabolizmus és hormonszekréció. A biológiai ritmusok, ciklusok vizsgálatával foglalkozó résztudomány neve *kronobiológia*. Jelen fejezetben csak a cirkadián folyamatok biokémiai alapjaival foglalkozunk.

Az ember nappali lény, aktivitásának (táplálkozás, testmozgás, munka) nagy részét nappal fejti ki. A humán cirkadián óra hozza összhangba ezeket az aktivitásokat az anyagcserével, biztosítva az energiaellátást és fenntartva a szervezet homeosztázisát esetenként rendkívül eltérő körülmények között is.

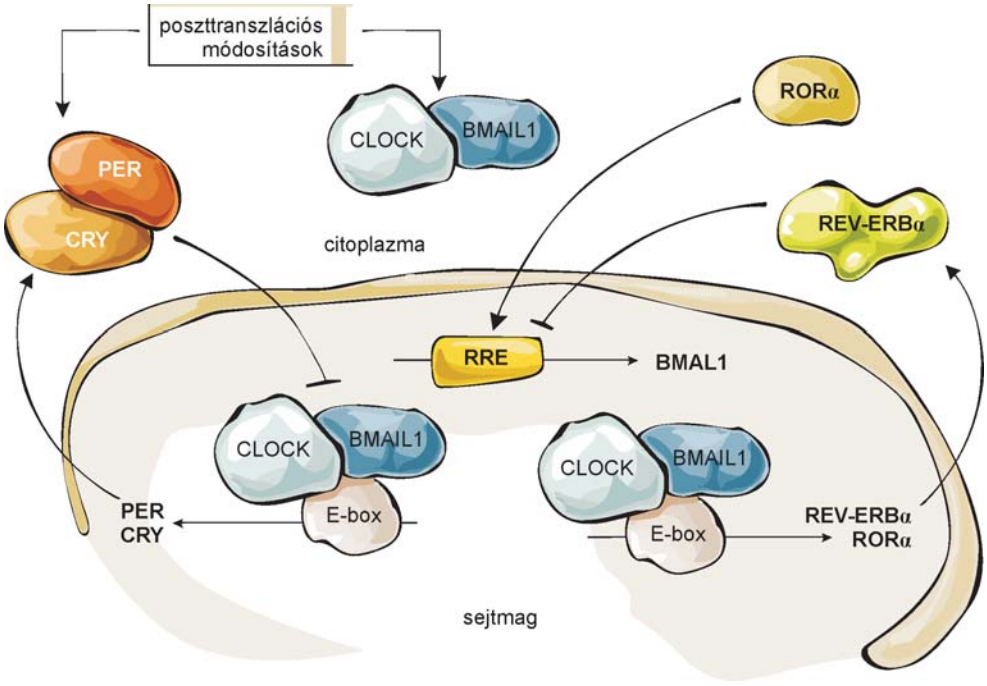
A cirkadián óra biokémiai alapokon nyugvó mechanizmus, mely 24 órás periódusidejű oszcillációt végez és az élőlény cirkadián ritmusát szabályozza. Három fő összetevője:

1. központi oszcillátor;
2. bemenő jelpályák, melyek szerepet játszanak az óra beállításában;
3. kimenő jelpályák, melyek a szervezet anyagcseréjét, élettani folyamatait és viselkedését szabályozzák.

III/3.1. A KÖZPONTI OSZCILLÁTOR

Az emlősök óramechanizmusának központi elemei transzkripciós-transzlációs visszacsatolási hurkok. A bennük szereplő aktivátorok és represszorok több egymásba kapcsolódó szabályozási pályát alkotnak *(III/3-1. ábra)*. Az elsődleges visszacsatolási hurokban a bHLH–PAS (basic helix-loop-helix – Period-Arnt-Singleminded) transzkripciós faktor család két tagja, a *CLOCK* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) és *BMAL1* fehérjék heterodimerizálódnak a citoplazmában, majd a magba áthelyeződvén célgének promóterének E-box elemeihez kapcsolódva azok transzkripcióját indítják el.

A célgének közé tartoznak a központi óramechanizmus *Period* (PER1, PER2, PER3), valamint *kriptokróm* (CRY1, CRY2) fehérjéinek génjei. A PER fehérjék nevüket korán felismert periódikusan oszcilláló természetükről kapták; mind a fehérje, mind az mRNS mennyisége 24 órás ciklusokon belül maximumot és minimumot mutat. A kriptokrómok ősi flavoproteinek, melyek kromofór kofaktort és N-terminális fotoliáz domént is tartalmaznak. Eredeti szerepük az UV sugárzás által okozott DNS károsodás javítása lehetett, de eukariótákban már nem rendelkeznek enzimaktivi-



III/3-1. ábra
A cirkadián óra központi oszcillátora

tással. A PER fehérjékhez hasonló cirkadián ritmust mutatnak, nappali maximummal.

A gátló jellegű visszacsatolást a PER–CRY heterodimérek hozzák létre, melyek a sejtmagba visszajutva gátolják a CLOCK–BMAL1 komplexek aktivitását. Egy további gátló visszacsatolási szabályozást képeznek a *REV-ERB* transzkripciós faktorok. A BMAL1–CLOCK heterodimer fokozza a *Rev-erbα* gén transzkripcióját, míg a REV-ERBα fehérje gátolja a *Bmal1* transzkripcióját. A retinsav receptorokhoz hasonlóan az árva magi receptorok közé tartozó *ROR* fehérjék (retinoic-acid-related orphan receptors; RORα, β és γ) viszont a *Bmal1* és *Rev-erbα* gének promóterében található RRE-szekvenciához kötődve aktiválják transzkripciójukat, míg saját expresszójukat a REV-ERBα gátolja.

A szabályozást a transzkripciós faktorok citoplazmában történő poszttranszlációs módosításai (pl. foszforiláció, ubikvitináció) egészítik ki, melyeken keresztül más jelpályák, illetve metabolikus eredetű hatások is befolyásolhatják a központi óra működését.

A központi óramechanizmus megbízható működését biztosítja a rendszer robosztussága: a rendszer valamennyi összetevője legalább két változatban található meg: BMAL1/BMAL2, CLOCK/NPAS2, PER1/PER2/PER3, CRY1/CRY2, REV-ERBα-RORα/RORβ /RORγ).

Emlősökben az itt leírt óramechanizmus elemei a legtöbb szervben jelen vannak. Az órák hierarchiájában a hipotalamusz elülső részében található ***szuprakiazmatikus mag*** a központi óra, mely beállítja a szervek (máj, zsírszövet, vese, szív, vázizom) perifériás óráit.

Legújabb kutatások szerint transzkripciótól független cirkadián órák is létezhetnek. A szinte minden élő szervezetben előforduló peroxiredoxinok oxidációs állapota ugyanis cirkadián ritmust mutat az algáktól kezdve az emberig, mely transzkripciótól és transzlációtól független, és nem befolyásolja az előbbiekben ismertetett mechanizmust sem. A peroxiredoxinok a reaktív oxigénszármazékok (ROS) lebontásában szerepet játszó peroxidázok, melyek katalitikus ciklusuk közben különböző oxidáltsági állapotot mutatnak. Oxidációs állapotuk így az intracelluláris ROS szint napi ingadozását tükrözi, mely nappal magasabb, éjjel alacsonyabb. A ROS szint érzékelése mellett a különböző oxidáltsági fokú peroxiredoxinok dajkafehérjeként, kötőfehérjeként, redox szenzorként és enzimaktivátorként is viselkedhetnek, összekötve a cirkadián óra funkciót a metabolizmus szabályozásával.

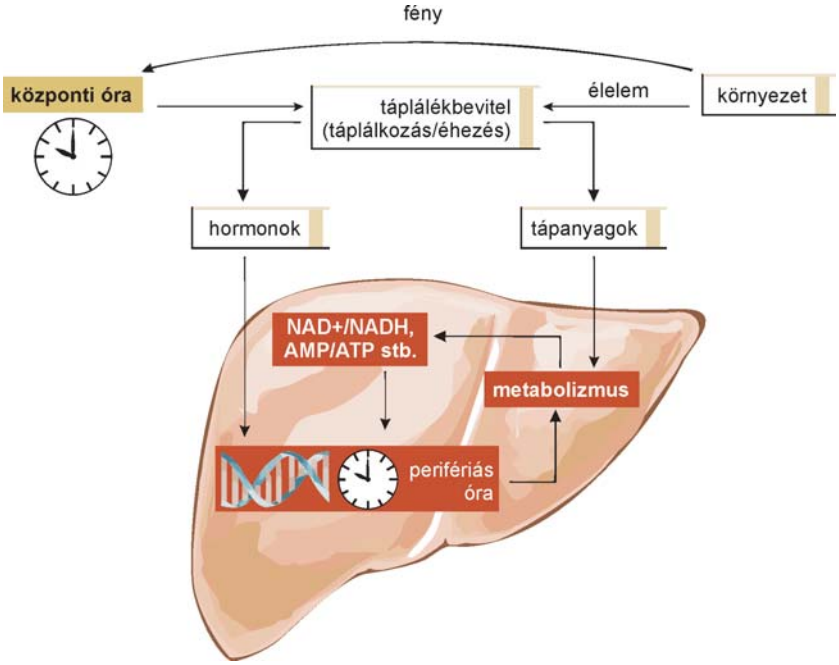
A legegyszerűbb ismert cirkadián óra a prokarióta cianobaktériumoké. Ez a cirkadián óra *in vitro* is működésbe hozható, mindössze három fehérjére (KaiA, B és C) és ATP-re van szükség a központi oszcillátor létrehozásához. Ez az egyszerű mechanizmus több napon keresztül képes fenntartani egy 22 órás ritmust.

A transzkripciós/transzlációs és a fehérjeszintű mechanizmussal működő óraszerkezetek közös vonása az oxigén, illetve redox érzékelés. Az oxigén-érzékelő PAS domén az eukarióta óraszerkezetek transzkripciós faktorainak állandó eleme. Feltételezhető, hogy a környezet redox ciklusai (melyek egybeesnek a fény és sötétség ciklusaival: nappal oxidálóbb, éjjel redukálóbb) kezdték el kialakítani az evolúció korai szakaszában a cirkadián órát, és hozták létre a kapcsolatot a metabolizmus és az óra között. Az elméletet támogatja, hogy anoxiás környezetben élő mikroorganizmusok esetében nem sikerült cirkadián ritmust kimutatni.

III/3.2. BEMENŐ JELPÁLYÁK – „ZEITGEBER”-EK

Mind a központi óra, mind a perifériás órák átállíthatók környezeti hatásokra (így tudunk például alkalmazkodni hosszabbtávú repülőút után). Az órákat átállító környezeti hatásokat Zeitgebereknek nevezik *(III/3-2. ábra)*. A központi óra számára a domináns Zeitgeber a fény. A fény–sötétség ciklusainak érzékelésében a retina sajátos ganglionsejtjei játszanak alapvető szerepet, melyek a látáshoz nem kapcsolódó fényérzékelésért felelősek. (Így a cirkadián ritmus szabályozása látás hiányában is fennmaradhat, például barlangi vagy földalatti életmódot folytató állatokban.) A cirkadián ritmus szabályozása mellett a pupilla fényreflexében is részt vesznek. Ezek a sejtek a csapok és pálcikák mellett egy harmadik fajta fotoreceptort képviselnek, a retina sejtjeinek mintegy 2%-át adva. Speciális fotopigmentjük a *melanopszin*, egy kék fényre (480 nm) érzékeny opszin fehérje. Működési mechanizmusa szerint G-fehérjéhez kötött receptor. A fény hatására keletkező impulzusokat a melanopszint tartalmazó sejtek axonjai az agy különböző területeire juttatják el, így a szuprakiazmatikus magba is. Az axonvégződéseken glutamát vagy PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) szabadul fel neurotranszmitterként.

A perifériás órákat a központi óra idegi és hormonális jelekkel, valamint a testhőmérséklet szabályozásával értesíti a múló időről. Mind a központi óra, mind a perifériás órák érzékenyek a metabolikus hatásokra is, az intracelluláris metabolitok szintje szabályozhatja az órát. A táplálkozás drasztikus változása (mennyiségi és időbeli egyaránt) a perifériás órák működését drámaian megváltoztatva elszakíthatja azokat a központi óra által diktált ritmustól, melyek aztán különböző betegségekhez vezethetnek (lásd később). Ez azt mutatja, hogy a perifériás órák számára a tápanyagellátás az elsődleges Zeitgeber.



III/3-2. ábra
A környezeti és metabolikus hatások, mint a központi és perifériás órák fő Zeitgeberei

A cirkadián óra metabolikus szabályozása

A cirkadián óra fontos szabályozói a metabolikus szignálok. A metabolizmus általános állapotáról, mint más szabályozási mechanizmusok esetében is, redox-, energia- és oxigénszenzorok adnak hírt.

Redox szabályozás: NAD^+/NADH

A NAD^+/NADH arányt a sejtekben a táplálkozás/éhezés ciklusai és a cirkadián ritmus egyaránt befolyásolja. Éhezés során a NAD^+/NADH arány emelkedik. A cirkadián óra a nikotinamid foszforiboziltranszferáz (NAMPT) expresszióján keresztül szabályozza a NAD^+ szintjét. (Az enzim a piridin nukleotid bioszintézis mentő útjának sebességmeghatározó lépését katalizálja, nikotinsavamidból NAD^+-ot szintetizál.) A BMAL1/ CLOCK heterodimer közvetlenül szabályozza az Nampt gén expresszióját. A NAD^+ aktiválja, míg a nikotinsavamid gátolja a SIRT1 (sirtuin-1, NAD^+-dependens protein deacetiláz) enzimet, mely a BMAL1 deacetilálásával gátolja az Nampt gén expresszióját. A NAD^+-dependens SIRT1 aktivitását a NAD^+/NADH redox equilibrium szintén szabályozza. A fenti mechanizmussal tehát a NAD^+ egyrészt negatív visszacsatolással gátolja saját szintézisét (a SIRT1 és a cirkadián óra felhasználásával), másrészt rajta keresztül a sejt metabolikus állapota szabályozza az órát. Ez a visszacsatolási rendszer egyfajta metabolikus oszcillátort („meta-clock“) képez, mely ismét a metabolizmus és a cirkadián óra szoros kapcsolatát mutatja.

Energiatöltöttség: AMP/ATP

Az AMPK, a sejt energiatöltöttségének fő szenzora, több ponton szabályozza a cirkadián órát. Az AMPK egy kazein kináz aktiválásán keresztül a PER2 lebontását fokozza, valamint a CRY1 foszforilációja révén destabilizálja azt. Az energiahiány tehát kiiktatja a cirkadián óra represszorait.

Oxigénérzékelés: hem

A hem bioszintézise cirkadián ritmust mutat, a δ-aminolevulinsav-szintáz expresszióját a BMAL1–CLOCK heterodimer aktiválja. A keletkezett hem negatív visszacsatolással gátolja a BMAL1–CLOCK génexpressziós hatását, így saját bioszintézisét. A hem emellett a REV-ERB fehérjék ligandja, miáltal ezen fehérjék alkalmassá válnak az oxigén és más gázok intracelluláris koncentrációjának érzékelésére. A hem-kötő REV-ERB-k transzkripciós represszor hatása fokozódik, így a hem bioszintézis egyik fontos indukálójának, a PGC-1-nek transzkripciója is csökken.

III/3.3 KIMENŐ JELPÁLYÁK – A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA ÓRAMECHANIZMUSOKKAL

A cirkadián óra elsősorban a transzkripció szabályozása révén befolyásolja a sejt anyagcseréjét és más életműködéseit. Egérben a teljes transzkriptóma mintegy tíz százaléka mutat cirkadián oszcillációt. A cirkadián transzkriptóma szövetspecifikus és szorosan kapcsolódik az adott sejt alapvető feladataihoz. A központi órában, a szuprakiazmatikus magban a fehérje- és neuropeptid-szintézis, valamint a szekréciós aktivitáshoz szükséges fehérjék génjei, míg a májban a glukóz-, lipid- és xenobiotikum-metabolizmus génjei állnak cirkadián szabályozás alatt *(III/3-3. ábra)*.

A transzkripciós szabályozásnak legalább három módozata ismeretes. Először is, a központi óramechanizmus transzkripciós faktorai közvetlenül befolyásolhatják célgének expresszióját. Mind a BMAL1-CLOCK dimer, mind a REV-ERB fehérjék ritmikus DNS kötődést mutatnak, a célgének ritmikus expresszióját okozva. Így például a REV-ERBα közvetlenül szabályozza a glukóz-6-foszfatáz, a foszfoenolpiruvát-karboxikináz, továbbá több lipid bioszintézisben szereplő enzim expresszióját.

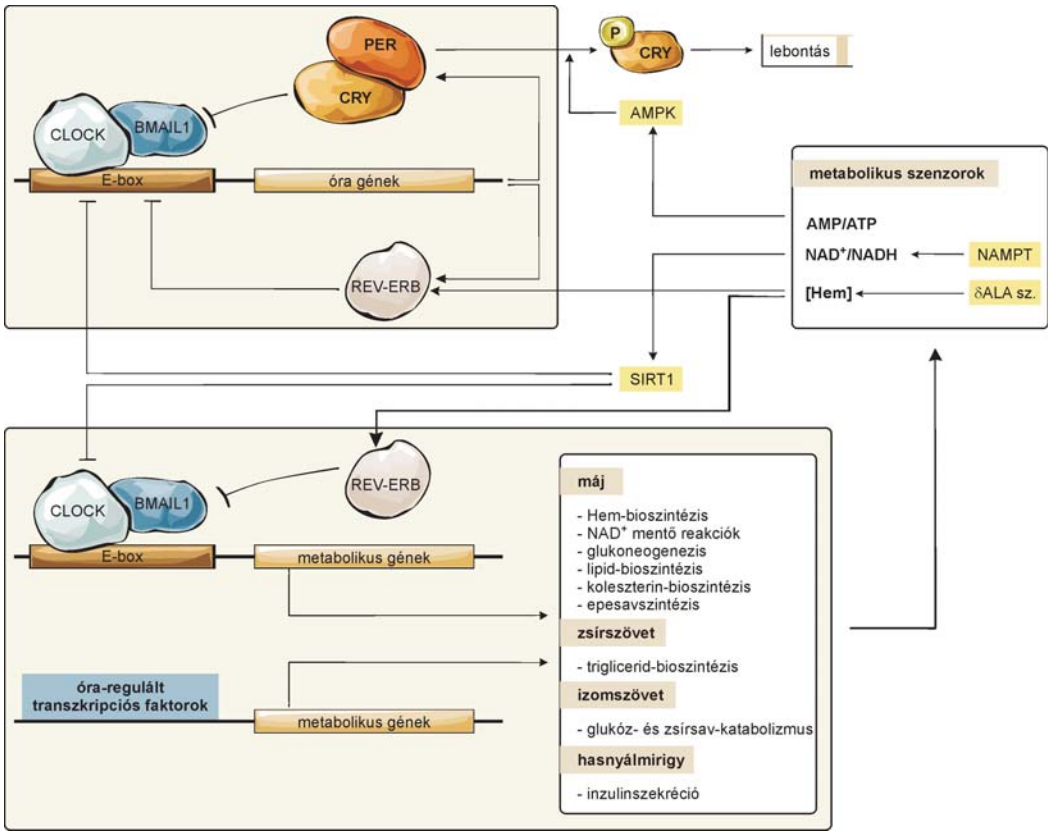
Másodszor, a központi óramechanizmus befolyásolja igen sok transzkripciós faktor – egyebek között a retinsavreceptorok, tiroidreceptorok, glukokortikoid-receptor, PPAR-ek – expresszióját, s ily módon közvetetten az anyagcserét is.

Harmadrészt, az epigenetikus szabályozásban szereplő enzimek (hiszton-acetiltranszferázok, hiszton-deacetilázok, DNS- és hiszton-metilázok és demetilázok) expressziója szintén szabályozódik a cirkadián óra transzkripciós faktorai által.

III/3.4. A CIKADIÁN ÓRA SZEREPE A HUMÁN PATOLÓGIÁBAN

A cirkadián ritmusok zavara általában negatív hatásokkal jár. Egyszerűbb esetben – például, ha az óra nincs szinkronban a helyi idővel – az átmeneti fáradtság és álmatlanság hosszabb-rövidebb idő után megszűnik, és a cirkadián óra szinkronba kerül a helyi fényviszonyokkal (jetlag).

A szezonálisan változó fényviszonyok is megzavarhatja az emberi cirkadián ritmust, melynek szerepe lehet a téli depresszió és egyes alvászavarok kialakulásá-



III/3-3. ábra
A cirkadián transzkriptóma és a metabolikus szenzorok hatása az óragének expressziójára

ban. Megjegyzendő, hogy a sarkvidéki állatokban a téli és nyári időszakban az állandó sötétség, illetve világosság hatására átmenetileg megszűnik a normál cirkadián ritmus.

A legjelentősebb egészségügyi problémát azok az esetek jelentik, amikor a központi és a perifériás órák nincsenek szinkronban; ezt általában metabolikus hatások okozzák. Többműszakos munkavégzés, éjszakai életmód és táplálkozás, alvászavarok a cirkadián ritmusok megzavarásával hosszabb távon jelentős egészségkárosító hatással lehetnek az agyon kívül más szervekre is, különösen elhízás, szív- és érrendszeri megbetegedések kifejlődése vagy súlyosbodása és tumorok képződése formájában. Az elhízás esetén például kimutatták, hogy a táplálékfelvétel időpontja fontosabb tényező, mint a táplálék zsír- és kalóriatartalma.

III/4.
Az eukarióta sejtciklus szabályozása

Csala Miklós

A prokarióta sejtek szaporodási ciklusa az egymással szorosan összekapcsolódó sejtnövekedés és osztódás ciklikus váltakozását jelenti. Szubcelluláris kompartmentek hiányában csupán a citoszol térfogatának kell kellőképpen megnövekednie, majd a cirkuláris DNS megkettőződése után kezdődhet a citokinézis, vagyis befűződhet a sejtmembrán, és épülhetnek a sejtfal elválasztó részei, hogy a két teljesen azonos utódsejt elválhasson egymástól. Kedvező körülmények (tápanyagkínálat, hőmérséklet stb.) esetén a baktériumok akár óránként új generációt képezhetnek, és a populáció napokon belül milliószorosára vagy akár milliárdszorosára gyarapodhat.

A magasabb rendű eukarióta sejtek sejtmagi DNS-e rendszerint lineáris kromoszómákra tagolódik. A legtöbb állati és emberi sejt diploid nukleáris génállománnyal (és a prokariótákéra emlékeztető, mitokondriális génállománnyal) rendelkezik. Kétféleképpen – mitózissal vagy meiózissal – osztódhatnak, melyek közül az előbbi szolgál a sejtek szaporodására, vagyis az eredetivel azonos két utódsejt létrehozására. Az eukarióta sejtek szaporodási ciklusa a prokariótákénál lényegesen összetettebb folyamat. A DNS replikációja itt időben elkülönül az előtte és utána következő osztódásoktól, vagyis az újonnan keletkezett utódsejtekben nem kezdődhet el közvetlenül a citokinézis után, és végbemenetelét nem követheti azonnal a következő mitózis. A magi génállomány mellett egyes sejtorganellumok (endoplazmás retikulum, Golgi-apparátus) kettéosztásáról is gondoskodni kell, míg mások (pl. mitokondriumok) a prokarióta sejtekhez hasonló módon szaporodnak az eukarióta sejten belül.

Ráadásul a többsejtű szervezetek sejtjei számos funkcióra differenciálódhatnak, ami egyben a mitotikus szaporodásra való képesség elvesztésével jár. Új sejtek a kevéssé differenciálódott őssejtek proliferációjával keletkezhetnek, míg a kiszolgált és szükségtelenné váló sejtek programozott sejthalállal elpusztulnak. A proliferáció, a differenciálódás és a sejthalál összetett szabályozása biztosítja, a szövetek, szervek, így végső soron az egész szervezet fajra jellemző struktúrájának és méretének kialakulását, illetve megőrzését. A vezető halálokok között szereplő, rosszindulatú daganatok kialakulása lényegében proliferáció, a differenciálódás és a sejthalál komplex zavarának megnyilvánulása; ezért ezen alapvető biológiai folyamatok szabályozásának minél alaposabb megismerése orvosi szempontból kiemelten fontos.

III/4.1. A SEJTCIKLUS FÁZISAI

A proliferáló sejtek (ismétlődő) osztódása ciklusként írható le, melynek teljes időtartama széles határok között változik, de átlagosan 24 órának tekinthető. Hagyományosan a körfolyamat „kezdetének” (és persze „végének” is) a citokinézist, az utódsejtek szétválását tekintjük, és a ciklust két nagyobb fázisra (interfázis és mitózis) osztjuk *(III/4-1. ábra)*. A ciklus rövidebb (kb. 1 óra), befejező fázisa maga a

mitózis (M fázis), amely további alfázisokra (profázis, prometafázis, metafázis, anafázis, telofázis és citokinézis) oszlik. Az újonnan keletkezett és máris osztódásra szánt sejt idejének nagyobbik részét (kb. 95%-át) a mitózisok közötti interfázisban tölti, vagyis felkészül a következő mitózisra. Az interfázis is tovább oszlik kisebb szakaszokra, melyeket sorrendben G_1, S és G_2 fázisoknak hívunk. A G_1 és G_2 neve a DNS-replikáció előtti és utáni szünetre („gap") utal. Ezekben azonban összetett szabályozási folyamatok zajlanak, és a sejt sorsát érintő fontos döntések születnek. Ráadásul a G_1 fázisban szintetizálódik a replikációhoz, a G_2-ben pedig a mitózishoz szükséges jelentős mennyiségű fehérje. Az S név szintézisre utal; az S fázis ugyanis a DNS-replikáció időszaka, amikor a sejtmag teljes genetikai állománya duplikálódik, és ezzel együtt a centroszóma is megkettőződik.

Fontos megjegyezni, hogy az állati/emberi sejtek zöme nem folytat aktív sejtciklust, vagyis parkoló fázisban (G_0) van. Ez az állapot változó időtartamig – differenciálódott sejtek esetében akár végleg, a sejt pusztulásáig – fennmaradhat. Sok sejtet azonban megfelelő mitogén (mitotikus osztódást serkentő) hatások visszatéríthetnek a G_0 fázisból az aktív ciklus G_1 fázisába. A sejtciklusból való végleges kivonulást kiöregedésnek („senescence"), az osztódás átmeneti felfüggesztését, amelyből van visszaút megpihenésnek („quiescence") nevezik.

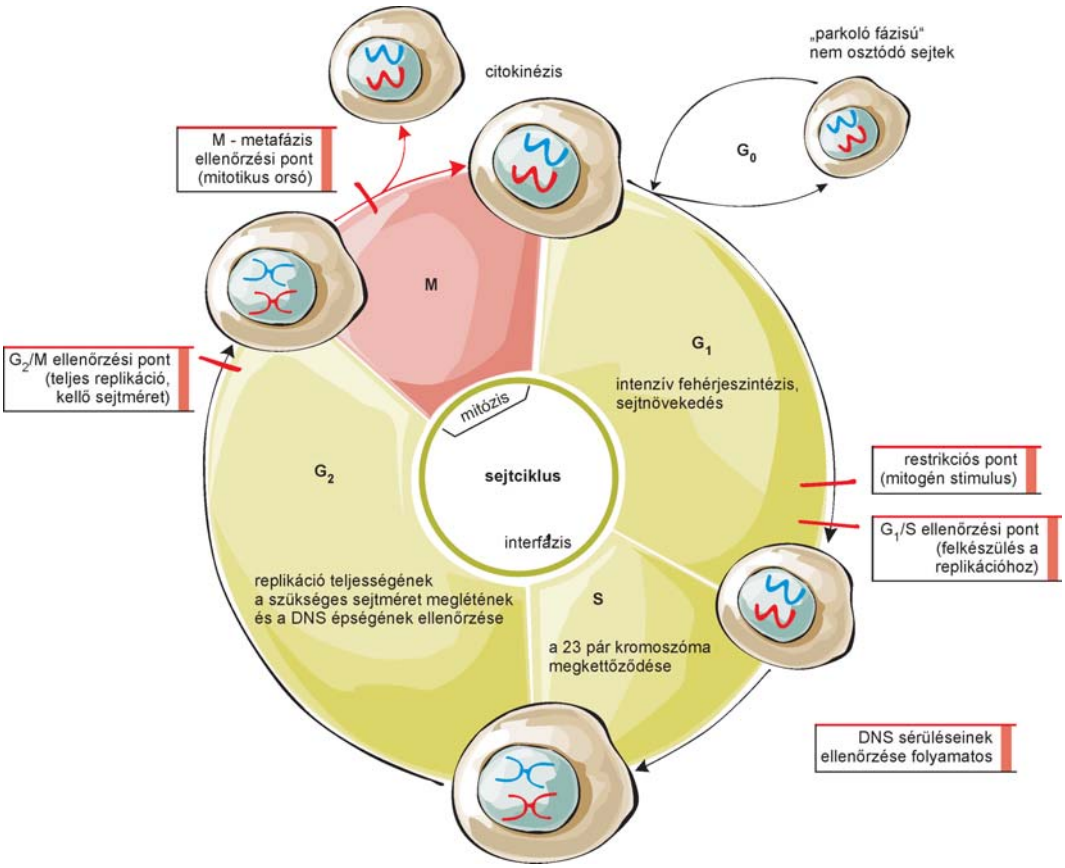
Ellenőrzési pontok a ciklus során

Bár a sejtosztódás állandó szabályozás alatt áll, és a kontroll mechanizmusokat nem lehet elkülönült epizódként értelmezni, a ciklus során előfordul néhány kiemelten fontos ellenőrzési pont („checkpoint"), amelyekben a sejtnek szigorúan mérlegelnie kell, hogy a következő lépés megtételéhez minden feltétel adott-e, beleértve azt is, hogy az előző szakasz feladatait rendben és maradéktalanul végrehajtotta. A négy legfontosabb és legjobban ismert ellenőrzési pont a restrikciós pont, a G_1/S átmenet, a G_2/M átmenet és az M ellenőrzési pont *(III/4-1. ábra)*. A genetikai állomány épségének ellenőrzése folyamatos, a DNS esetleges sérülései a ciklust annak bármely ellenőrzési pontján (akár az S fázis közben) feltartóztathatják. Ezzel a kérdéssel ezért külön foglalkozunk a fejezet végén és az Apoptózis fejezetben.

Restrikciós pont és G_1/S ellenőrzési pont

Egészséges emberi sejt csak akkor indítja el az aktív sejtciklust, ha mitogén hatások érvényesülnek. Az adott sejttípusnak megfelelő specifikus növekedési faktorok (pl. EGF, PDGF, VEGF stb.) mellett az inzulin is általános fokozója a sejtnövekedésnek és osztódásnak. Bizonyos (elsősorban immun-) sejtekre a megfelelő citokinek hatnak növekedési faktorként, de a szteroid hormonok proliferációt fokozó hatásai is ismertek. Ráadásul a mitogén hatásokat jelentősen befolyásolják a sejt-sejt, illetve sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatokért felelős ún. „cell adhesion molecule" (CAM) fehérjéktől kiinduló jelek is.

A mitogén hatások a G_1 fázis jelentős részében szükségesek a ciklus életben tartásához. A G_1 fázis végéhez közeledve azonban a sejt az osztódásra elkötelezetté válik, és külső stimulus nélkül is véghezviszi a teljes programot. Ezt a sorsdöntő, elköteleződési pontot restrikciós pontnak (R pont) nevezik. Tápanyagok megvonása, a mitogén hatás felfüggesztése vagy a fehérjeszintézis gátlása a restrikciós pont előtt kizökkenti a sejtet a G_0 parkoló fázisba, ahonnan a körülmények rendeződése esetén visszahozható, és folytathatja a megkezdett ciklust. A restrikciós ponton való áthaladás után a sejt a replikációra készülődik, megteremti a folyamat metabolikus



III/4-1. ábra
Az eukarióta sejtciklus fázisai és ellenőrzési pontjai

hátterét (nukleotidszintézis) és előállítja a végrehajtáshoz szükséges fehérjéket. Az S fázis tényleges elindítása előtt (G_1/S átmenet) a sejtnek még mérlegelnie kell, hogy a felkészülés befejeződött-e, és saját mérete, valamint tápanyagokkal való ellátottsága előre láthatólag lehetővé teszi-e a sikeres és biztonságos osztódást. Jellemző, hogy a restrikciós pontot megelőzően észlelt súlyosabb DNS-léziók inkább a hibajavítást indukálják, míg az ezt követő sérülések könnyebben generálnak sejthalált.

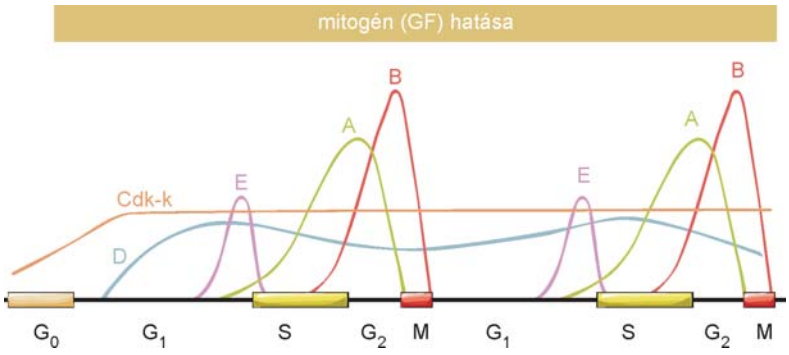
G_2/M ellenőrzési pont

Az S fázist addig nem követheti a mitózis, amíg a sejt meg nem győződik róla, hogy a teljes magi DNS replikációja maradéktalanul végbement, és a sejt megduplázta a méretét. A replikáció végezte előtt megkezdett mitózis esetén az utódsejtek nem rendelkezhetnének az eredeti sejtével azonos genetikai állománnyal. A kellő sejtnövekedés hiánya pedig azt eredményezné, hogy az utódsejtek minden osztódással egyre kisebbekké zsugorodnak. Az itt végbemenő ellenőrzési mechanizmusokat a G_2/M átmenet szabályozásáról szóló rész tárgyalja.

M (metafázis vagy mitotikus orsó) ellenőrzési pont

Ha a G_2 ellenőrzési pont jól működött, és a maradéktalan replikációt sikerült biztosítani, az osztódás még mindig okozhat súlyos genetikai károsodást, amennyiben a leánykromatidák nem egyenlően oszlanak el az utódsejtek között. A metafázis végére a kondenzált kromoszómák az egyenlítői síkba rendeződtek, és kinetokorjaik rögzültek a sejt két pólusából induló húzófonalakhoz. A sejt ilyenkor ellenőrzi, hogy nincs-e rögzítetlen kinetokor vagy laza húzófonal, és csak akkor indítja el a metafázist, ha mindent rendben talál. Ezért ezt az ellenőrzési pontot „mitotikus orsó ellenőrzési pont"-nak is szokás nevezni.

III/4.2. CIKLINEK, CIKLINFÜGGŐ KINÁZOK ÉS INHIBITORAIK



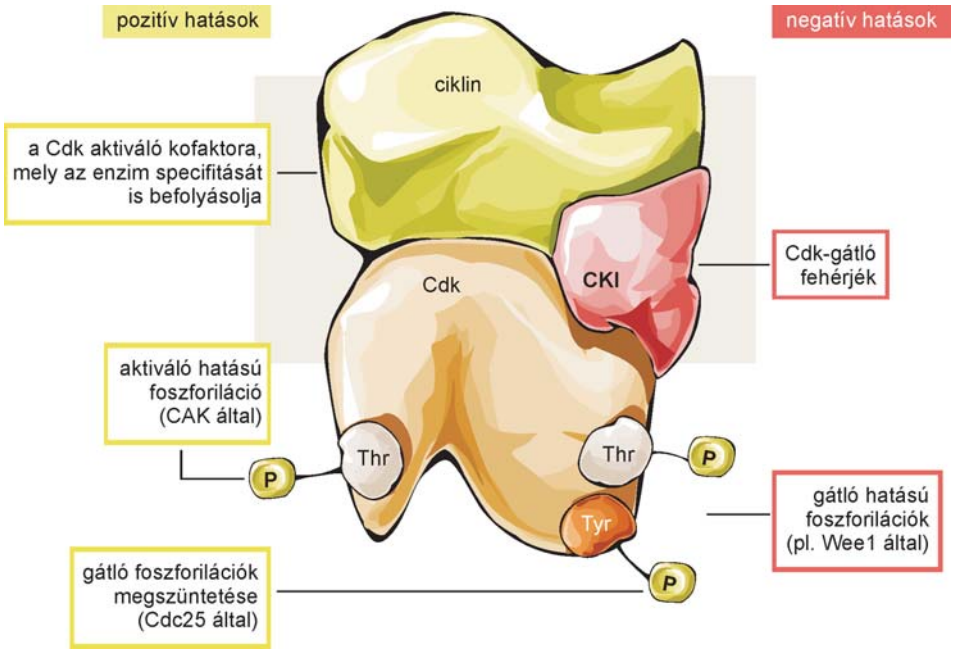
III/4-2. ábra
A ciklinek mennyiségének ciklusos változása a sejtciklus folyamán

A ciklus szabályozásában központi szerepet játszó fehérjék egy részére jellemző, hogy mennyiségük a sejtben fázisos jelleggel változik. E fehérjék tipikusan a ciklus egyik-másik szakaszában megjelennek (gén-indukció következtében), felhalmozódnak, majd hirtelen eltűnnek (célzott proteolízis révén). E viselkedésük alapján nevezték el őket ciklineknek, és típusaikat – nem a funkciójuk sorrendjének megfelelően – a latin abc betűivel jelölik *(III/4-2. ábra)*. A ciklin-D a G_1 fázis elején jelenik meg, és – bár alapvetően a ciklus beindításában játszik szerepet – csak az M fázis végére tűnik el. A ciklin-E a G_1 fázisban, a ciklin-A az S és G_2 fázisban, a ciklin-B pedig a G_2 fázisban, illetve a mitózis anafázisáig van jelen. Ennek alapján szokás két (átfedő) csoportra osztani a ciklineket, vagyis megkülönböztetni G_1/S típusúakat (ciklin-D, -E és -A), illetve G_2/M típusúakat (ciklin-A, -B). A ciklinek családjának különleges tagja a ciklin-H, amely a ciklus során végig – sőt a G_0 fázisban lévő sejtekben is – jelen van, és funkcióval is bír (lásd Cdk-aktiváló kináz).

A ciklinek semmilyen önálló enzimaktivitással nem rendelkeznek. Tisztán szabályozó molekulák, amelyek fehérje-fehérje kölcsönhatás által protein-kinázokat aktiválnak, vagyis ezen enzimek kofaktoraként működnek. A szerin/treonin protein-kinázok egy családja olyan kisméretű (30-40 kDa) fehérjékből áll, amelyek szinte csak a katalitikus domént tartalmazzák, és kináz aktivitásukat kizárólag a megfelelő ciklinekkel komplexben képesek kifejteni. Ez tehát a ciklinfüggő kinázok („cyclin dependent kinase"; Cdk) családja, melynek tagjait arab számokkal különböztetik meg egymástól. A Cdk4 és Cdk6 a ciklus beindításánál, a Cdk2 a G_1/S átmenetnél és az S fázisban, a Cdk1 pedig a G_2/M átmenetnél, illetve az M metafázisáig tölti be funkcióját. A Cdk7 a ciklin-H-val és egy Mat1 nevű fehérjével együtt alkotja a Cdk-aktiváló kinázt (CAK), amely az összes többi Cdk működtetéséhez szükséges, vagyis a teljes ciklus során. Ráadásul a CAK trimernek a sejtciklustól független funk-

ciói is vannak, ugyanis része az RNS-polimeráz II egyik általános transzkripciós faktorának, a TFIIH-nak, amely egyrészt felelős a polimeráz C-terminális doménjének (CTD) foszforilációjáért a hnRNS szintézisének iniciációjakor, másrészt szerepe van a nukleotidkihasításos DNS-hibajavítás folyamatában is (lásd a megfelelő fejezetekben).

A Cdk-k a mitogén stimulusokra indukálódó géntermékek, melyek szintje az aktív szaporodási ciklus során alig változik. Mivel a sejtproliferáció szigorúan kontrollált folyamat, a Cdk-k aktivitásának többszörösen biztosított szabályozása meglehetősen összetett. Ennek legfontosabb mechanizmusai a következők *(III/4-3. ábra*).



III/4-3. ábra
A Cdk-aktivitás meghatározói

Ciklin kötődése

A Cdk-k aktivitáshoz szükséges konformációja csak egy ciklinnel képzett komplexben alakul ki. Előfordul, hogy egy adott ciklin két különböző Cdk-hoz is kapcsolódhat (pl. a ciklin-D a Cdk4-hez és Cdk6-hoz), de arra is van példa, hogy egy Cdk két különböző ciklinnel is komplexet tud alkotni (pl. Cdk2-ciklin-E és Cdk2-ciklin-A). A létrejött enzim szubsztrátspecificitását (vagyis a szabályozásban betöltött szerepét) a benne foglalt ciklin fajtája határozza meg, ezért a Cdk4-ciklin-D és Cdk6-ciklin-D lényegében ugyanazt a feladatot látja el a ciklus beindításakor, ezzel szemben a Cdk2-ciklin-E és a Cdk2-ciklin-A eltérő funkcióval bír.

Foszforiláció/defoszforiláció

A Cdk-ciklin komplex kialakulása szükséges, de nem elégséges feltétele a kináz aktivitásnak. Elengedhetetlen a Cdk egyik meghatározott treonin oldalláncának

foszforilációja is, amelyet a Cdk-aktiváló kináz (CAK) végez. A ciklus során mindvégig szükséges CAK foszforiláció nélkül is aktív, amennyiben a Mat1 fehérje hozzá van kötődve a Cdk7-ciklin-H dimerhez. Ugyanakkor a Cdk-k bizonyos treonin- és tirozin-oldalláncainak foszforilációja domináns gátló hatású (lásd Wee1 a G_2/M átmenetnél), vagyis e foszforil-csoport(ok) eltávolítása nélkül a komplex nem működik. A gátló foszforiláció megszüntetését a Cdc25 foszfatáz enzimek végzik, amelyek így a különböző Cdk-ciklin komplexek végső aktiválóiként funkcionálnak.

Gátló fehérje kötődése

Ha a sejtproliferációt valamilyen okból (pl. súlyos DNS-sérülés vagy gyanúsan intenzív mitogén stimulus) fel kell függeszteni, akkor – jellemzően (de nem kizárólagosan) a G_1 fázisban vagy a G_1/S átmenetnél – a Cdk enzim aktiválódását megakadályozhatja a hozzá közvetlenül kapcsolódó Cdk-inhibitor (CKI) fehérje. A CKI-k két családba sorolhatók. Az INK4 család tagjai ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, $p19^{INK4d}$) a Cdk4,6-ciklin-D komplexet gátolják, így a G_1 fázisban hatnak. A CIP/KIP család legismertebb képviselői a $p21^{CIP1/WAF1}$ és a $p27^{KIP1}$, amelyek a p53 transzkripciós faktor által indukálhatók, és lényegében az összes Cdk-ciklin komplexet képesek gátolni (lásd később).

Egy Cdk tehát akkor léphet működésbe, ha minden feltételnek eleget tett (nem kötődött hozzá CKI, komplexet alkotott egy ciklinnel, aktiváló foszforilációt kapott, és gátló foszforilációjától megszabadult). A ciklus adott szakaszában aktív Cdk-ciklin komplexek egyrészt a folyamat éppen aktuális lépéseit végrehajtó fehérjéket (pl. transzkripciós faktorokat, ubikvitin-ligázokat, a DNS-replikáció komponenseit, szerkezeti építőelemeket stb.) foszforilálják, vagyis levezénylik a teljes ciklus rájuk bízott részét. Másrészt gondoskodnak a soron következő Cdk–ciklin komplex létrejöttéről és/vagy aktiválódásáról, tehát dominóelv szerűen biztosítják a ciklus továbbhaladását is.

Külön említendő a Cdk2–ciklin-A komplex, amelyet „S phase promoting factor” (SPF)-nek, valamint a Cdk1–ciklin-B-komplex, amelyet „Maturation promoting factor” vagy „M phase promoting factor” (MPF)-nek is neveznek, mert beindítják az S, illetve M fázist.

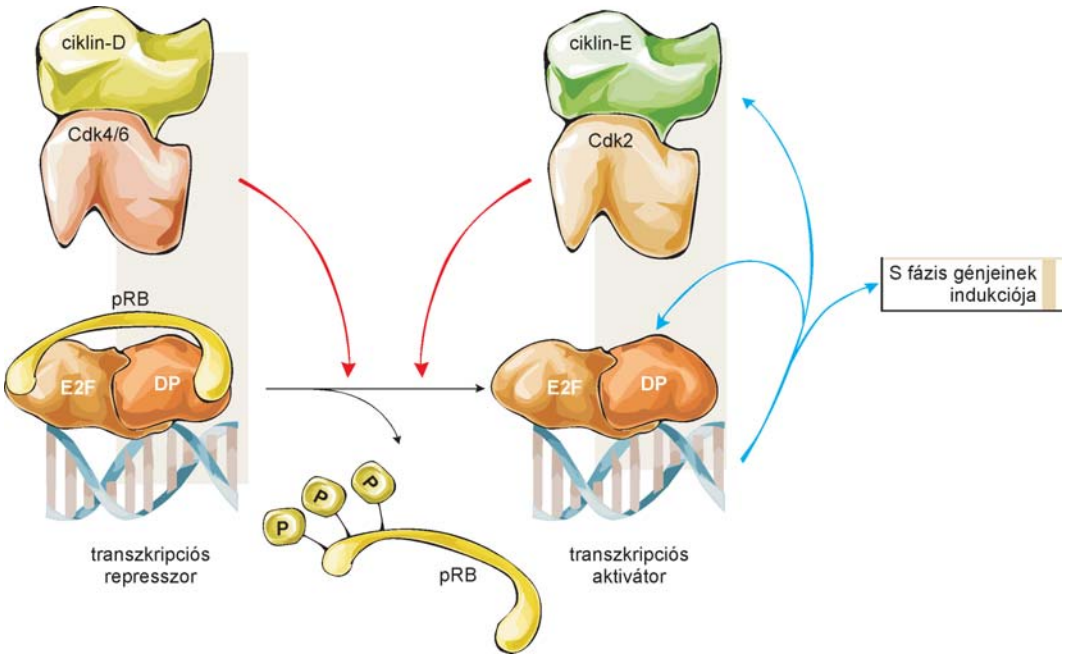
A G_1 fázis és átmenet az S fázisba

Normális esetben a sejtciklus aktiválását és fenntartását kiváltó mitogén stimulus egy sejtfelszíni receptorához kötődő hormontól (növekedési faktor, inzulin, citokin) származik, amit egyéb külső/belső hatások modulálnak. A receptor vagy nem-receptor tirozin-kináztól kiinduló jelátviteli útvonalakat más fejezetek tárgyalják. A sejtciklus szabályozásának szempontjából fontos megemlíteni, hogy a MAP-kinázok által aktivált, illetve a MAP-kinázok aktivitása révén indukált transzkripciós faktorok (pl. c-Jun, c-Fos, c-Myc) a G_1 fázis beindulásához és előre haladásához szükséges géntermékeket indukálják. Idetartoznak a különböző Cdk-k és a ciklin-D, valamint az E2F nevű transzkripciós faktor, amely az S fázis előkészítésének fő szabályozója, és kulcsszerepet játszik a restrikciós ponton való áthaladásban. A mitogének által aktivált, fent említett transzkripciós faktorok egyúttal csökkentik a G_1 Cdk–ciklin komplexeket gátló CKI-k ($p21^{CIP1/WAF1}$ és a $p27^{KIP1}$) expresszióját.

Az E2F dimerizációs partnerével (DP) együtt a sejtmagban olyan gének promóter régiójához kötődik, amelyek a DNS-replikációhoz (replikációs startpontokat felismerő fehérjék, DNS-polimerázok, illetve azok fontos alegységei stb.), annak beindításához (az SPF részét képező ciklin-A, a Cdc25 stb.) és feltételeinek megte-

remtéséhez (a nukleotid-anyagcsere számos enzime) szükségesek. A G_1 fázis elején azonban az E2F-DP dimerhez egy harmadik fehérje is kapcsolódik, a retinoblasztóma fehérje (Rb vagy pRb), és az így kialakuló trimer transzkripciós szuppresszorként működik, vagyis akadályozza e gének expresszióját és így a ciklus továbbjutását az S fázisba *(III/4-4. ábra).* A mitogén stimulus kellő erejű és időtartamú fennállása esetén a ciklin-D emelkedő szintje eléri azt a küszöböt, amelyik már felülmúlja az egyre kevésbé termelődő CKI-k ($p21^{CIP1/WAF1}$, $p27^{KIP1}$ és INK4) gátló hatását, így kialakulnak az aktív Cdk4-ciklin-D/Cdk6-ciklin-D komplexek, amelyek többszörösen foszforilálják a pRb-t. A „hiperfoszforilált" pRb elhagyja a komplexet, és a DNS-hez kötve maradó E2F-DP dimer immár transzkripciós aktivátorként működik, azaz a sejt megteszi a replikációhoz szükséges előkészületeket *(III/4-4. ábra)*. Ezen a ponton a szabályozás pozitív visszacsatolásokat is tartalmaz: az E2F-DP dimer az E2F génjét is indukálja, valamint a ciklin-E-t, amelynek a Cdk2-vel alkotott komplexe tovább foszforilálja a pRb-t *(III/4-4. ábra).* Ha tehát a ciklus eljutott az E2F-DP aktiválásáig, elkötelezetté válik a DNS replikációjára, azaz vagy végrehajtja a sejtosztódási folyamat hátralévő részét, vagy öngyilkosságot kell elkövetnie (lásd apoptózis). Ezért ez a pont molekuláris szinten lényegében megfelel a ciklus restrikciós pontjának.

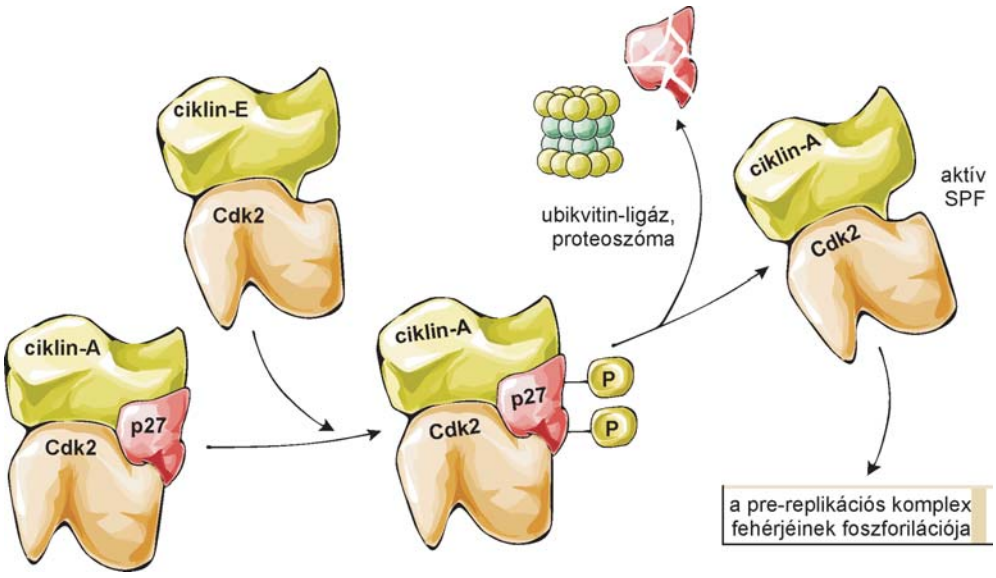
Mivel a ciklin-E a replikációhoz szükséges fehérjékkel együtt indukálódik, az aktív Cdk2–ciklin-E komplex létrejötte egyben azt is jelzi, hogy a DNS-szintézis előkészületei megtörténtek. A sejtek igyekeznek az S fázist a lehető legrövidebbre korlátozni, ugyanis a replikálódó DNS a nyugvó sejt DNS-énél lényegesen védtelenebb, így rendkívül sérülékeny. A G_1 fázis végére kialakult állapot a rövidtávfutás rajtjára emlékeztet, amennyiben a DNS-szintézishez szükséges fehérjék a replikációs ori-



III/4-4. ábra
Elköteleződés a restrikciós pontnál

gókhoz kötődve, ugrásra készen várják a „startpisztoly eldördülését", vagyis ez esetben azt, hogy az SPF foszforilációval aktiválja őket.

Az E2F-DP dimer a ciklin-A-t is indukálja, így fokozatosan összeáll az SPF is, de a hozzá kapcsolódó $p27^{KIP1}$ CKI akadályozza az S fázis beindítását. Az SPF aktiválódását – az S fázisra felkészült sejtben – a Cdk2–ciklin-E komplex biztosítja azáltal, hogy foszforilálja a $p27^{KIP1}$ fehérjét. A $p27^{KIP1}$ ennek hatására elhagyja a komplexet, és specifikus ubikvitin-ligázhoz kötődik, amely előidézi gyors proteaszomális lebomlását. Az így aktiválódott SPF a pre-replikációs komplexek számos fehérje-komponensét foszforilálja, és az átrendeződés következtében azonnal megindul a teljes DNS megkettőződése *(III/4-5. ábra)*.

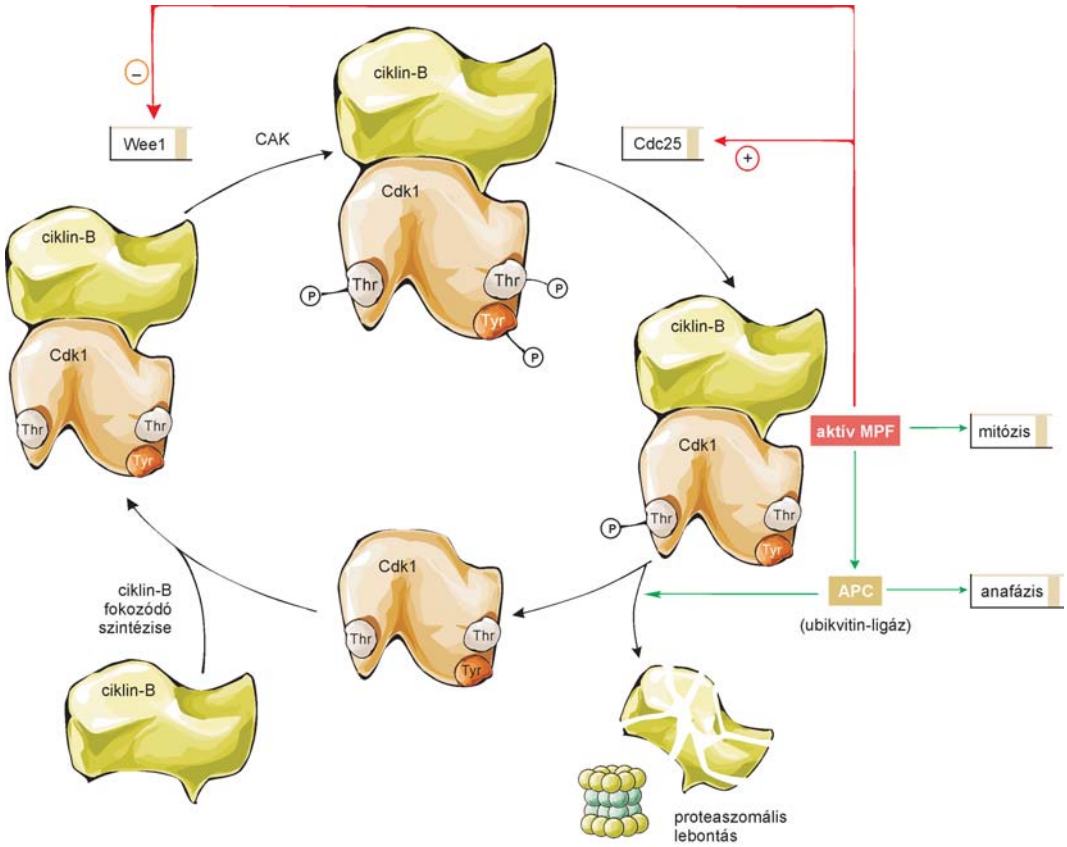


III/4-5. ábra
A G_1/S átmenet

Fontos, hogy az S fázis végére a sejt meg is szünteti a replikációra való felkészülést, vagyis gondosan lezárja a G_1 fázist. Az S fázis során ugyanis a ciklin-E ubikvitinálódik és lebomlik, ezáltal a felszabaduló Cdk2 egyre inkább ciklin-A-hoz kötődik (egyre több SPF alakul ki). A pRb-t foszforiláló és így az E2F-DP által vezérelt transzkripciót fokozó Cdk2-ciklin-E komplexszel ellentétben az SPF az E2F-et foszforiláció révén gátolja, tehát csökkenti a replikációhoz szükséges gének átírását.

A G_2 /M átmenet szabályozása

A DNS-replikáció befejeződésekor egy újabb ciklin, a ciklin-B mennyisége kezd emelkedni, amely kapcsolódik a Cdk1-hez (sok helyen Cdc2-nek nevezik), és kialakul az MPF. A komplex azonban nem aktiválódhat, és nem indíthatja el a mitózist, amíg a G_2 ellenőrzési pont feltételei (sérülésmentes és teljesen replikálódott DNS, megfelelő sejtméret) nem teljesülnek.



III/4-6. ábra
A G_2/M átmenet

Az MPF a CAK általi, aktiváló foszforilációja mellett rendszerint dupla gátló foszforilációban is részesül, amíg a sejt nincs kész a mitózisra. A ciklust feltartóztató protein-kinázok közül legfontosabb a Wee1, amelynek neve – kivételesen – nem rövidítés, hanem a skót-angol „wee" (jelentése parányi, apró) szót tartalmazza. Felfedezéséhez ugyanis az a megfigyelés vezetett, hogy a Wee1 aktivitásukat mutáció következtében elvesztett élesztő (*S. pombe*) sejtek valóban egyre parányibb méretűvé osztódnak. A korábban már említett Cdc25 foszfatáz a Wee1 kináz antagonistája, ugyanis eltávolítja a gátló foszforil-csoportokat az MPF-ről. Aktív CAK esetén tehát az MPF szabályozása a Wee1 és a Cdc25 aktivitásának arányán múlik. A sejtméret növekedésével a Wee1 aktivitása egyre csökken. Az esetleges DNS-sérülések, illetve a még folyamatban lévő DNS-szintézis a Cdc25-öt gátolják, tehát az ép DNS replikációjának befejeződése a Cdc25 aktivitását fokozza. Ily módon az MPF valóban akkor kapcsolódik be, amikor a sejt készen áll a mitózis megkezdésére. Itt is megfigyelték a pozitív visszacsatolás általi elköteleződés jelenségét, ugyanis az aktivált MPF – számos egyéb szubsztrátja mellett – a Wee1-et és a Cdc25-öt is foszforilálja, ami az előbbi gátlását és az utóbbi aktiválódását eredményezi.

Az MPF az M fázist szinte végig vezényli, de a citokinézis addig nem történhet meg, amíg a sejtben le nem bomlott az összes MPF. Ez biztosítja, hogy a kettévált

utódsejtekben nem indulhat meg azonnal egy újabb mitózis, amely – S fázis hiányában – már a DNS-állomány feleződéséhez vezetne. A mitózis folyamatának morfológiai és genetikai aspektusait e tankönyvfejezet nem tárgyalja; itt csupán az MPF legfontosabb funkcióit és további sorsát tekintjük át.

Az MPF által foszforilált fehérjék és az így kiváltott hatások:

Kondenzinek és hisztonok → kromatinkondenzáció (az ún. metafázisos kromoszómák kialakulása).

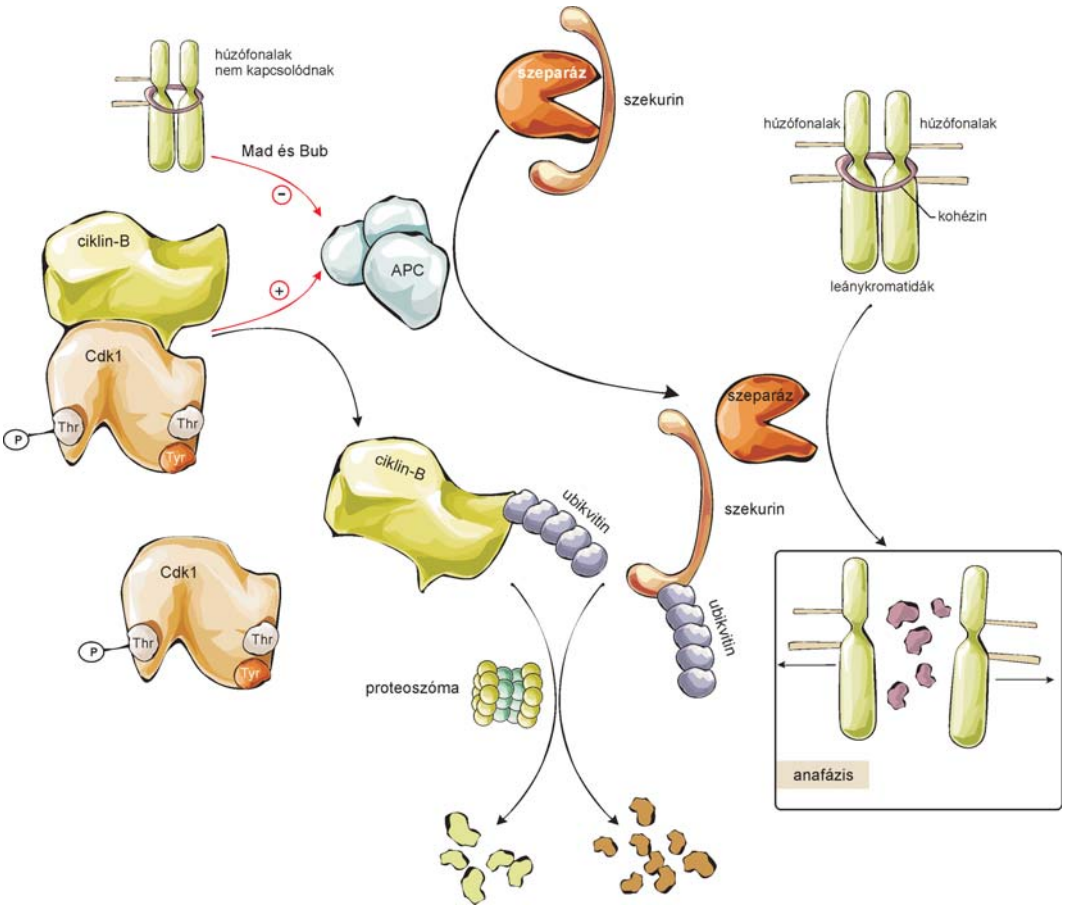
Lamin fehérjék → a sejtmagburok destabilizációja, majd szétesése vezikulumokra.

Mikrotubulushoz kapcsolt fehérjék → a mitotikus orsó kialakulása.

GM130 (cis-Golgi mátrix protein) → a Golgi-apparátus és az endoplazmás retikulum fragmentálódása.

Miozin könnyű lánca → F-aktinhoz való kötődés és ATP-áz aktivitás gátlása a korai citokinezis megelőzésére.

„Anaphase promoting complex" (APC) nevű ubikvitin-ligáz → leánykromatidák szétválása, majd a ciklin-B (és ez által az MPF) lebontása.



III/4-7. ábra
Az M ellenőrzési pont és az APC

A felsorolásból látható, hogy az MPF gondoskodik az osztódási orsó kialakulásáról és rögzüléséről, vagyis eljuttatja a ciklust az M ellenőrzési pontig. Az S fázis kapcsán szó volt róla, hogy a replikációt állóstartszerűen indítja a sejt, hogy minél rövidebb ideig legyen sérülékeny a DNS. Hasonló szempont érvényesül a leánykromatidák szétvándorlásánál, ami a kromoszómaaberrációk kialakulása szempontjából veszélyes folyamat. Amikor a magburoktól megszabadult, egyenlítői síkba rendeződött, kondenzált kromoszómák kinetokor struktúrái a sejt két pólusából induló húzófonalakhoz tapadnak, vége a metafázisnak, és kezdődhetne a leánykromatidák eltávolodása. Ennek most már egyetlen akadálya, hogy a leánykromatidákat a centromeronnál összebilincseli a *kohézin* fehérjékből alkotott gyűrű. A kohézint specifikusan hasító proteázt (*szeparáz*) pedig gátolt állapotban tartja a hozzá kapcsolódó *szekurin* nevű fehérje. Az MPF által foszforilált APC akkor tudja elindítani az anafázist, ha csatlakozik hozzá a Cdc20 nevű alegység. Ezt a kofaktort azonban mindaddig szekvesztrálják a Mad és Bub fehérjék, amíg a mitotikus orsó nem készült fel tökéletesen a kromatidák széthúzására. Amikor minden kinetokor hozzátapadt a húzófonalakhoz, és a fonalak feszesek, a Mad és Bub fehérjék eleresztik a Cdc20-at. A most már teljessé váló APC ubikvitinálja a szekurint, így az lebomlik, és a szeparáz által hasított kohézin gyűrűk felnyílnak, vagyis kezdetét veszi az anafázis. Az APC ezután a ciklin-B-t is ubikvitinálja, így eltűnteti a szükségtelenné vált, sőt az utódsejtek számára veszélyt jelentő MPF-et *(III/4-7. ábra)*.

A sejtciklus egyes fázisaiban, illetve fázisátmeneteinél jelen lévő Cdk-k és ciklinek fent részletezett funkcióit az *III/4-1. táblázat* foglalja össze.

III/4-1. táblázat
Cdk–ciklin komplexek szerepe a ciklus során

Fázis vagy átmenet	Kináz	Ciklin	Legfontosabb funkciók
G1	Cdk4,6	ciklin-D	Mitogén stimulus hatására a pRb fokozódó foszforilációja – a restrikciós ponton való átjutásig
G1/S	Cdk2	ciklin-E	pRb foszforilációja (pozitív visszacsatolás), SPF aktiválása a $p27^{KIP1}$ foszforilációja révén
S	Cdk2	ciklin-A	*SPF:* a DNS-replikáció beindítása és fenntartása, a prereplikációs komplex fehérjéinek foszforilációja
G2/M, M	Cdk1	ciklin-B	*MPF:* a mitózis vezénylése a metafázisig kondenzinek, hisztonok, laminok, mikrotubulus-fehérjék és GM130 foszforilációja; végül az APC aktiválásával az irányítás átadása
Mind	Cdk7	ciklin-H	*CAK:* általános Cdk-aktiváló kináz

III/4.3. DNS-HIBÁK ELLENŐRZÉSE A CIKLUS SORÁN

Mivel a genetikai információ hiteles továbbörökítése a szervezet és a faj fennmaradása szempontjából egyaránt alapvető fontosságú, a DNS sérülései az összes említett ellenőrzési pontban, sőt az S fázis közben is (tehát a sejtciklus bármely szakaszában) feltartóztathatják az osztódási folyamatot. A sejt kísérletet tesz a hibák kijavítására, és a ciklus folytatódhat. Ha azonban a javítási kísérlet sikertelen, vagy a

sérülések mértéke eleve kilátástalanná teszi a próbálkozást, a sejt inkább feláldozza magát, és apoptózissal elpusztul (lásd az Apoptózis fejezetet).

A DNS-hibák keletkezésétől a sejtciklus leállításáig, és ezzel együtt a hibajavítás és/vagy sejthalál beindításáig vezető szabályozási útvonal első lépése a DNS sérüléseinek érzékelése, amelyben két pár protein-szerin/treonin-kináz játszik központi szerepet.

ATR-CHK1

Az „ataxia telangiectasia and Rad3-related protein" (ATR) az egyszálú DNS tartós jelenléte esetén lép működésbe, és foszforiláció révén aktiválja a „checkpoint" kináz- 1-et (CHK1). Az ATR-CHK1 páros hibátlan működése a sejt életben maradásához és a megfelelően kontrollált sejtosztódási ciklus végrehajtásához egyaránt elengedhetetlen. Egyszálú DNS keletkezik a kettős spirál egyik láncát érintő sérülések javítása (nukleotid-kihasítás vagy homológ rekombináció) során, így a legtöbb DNS-lézió beindítja ezt a mechanizmust. A sejtciklus szempontjából azonban talán még fontosabb, hogy széttekert DNS-szálak jelennek meg a replikációs villák feltartóztatása (replikációs stressz) esetén is. Ha a DNS-polimeráz nem tud kellő sebességgel haladni – mert pl. kifogy a nukleotidokból azok elégtelen utánpótlása miatt, vagy egy DNS-sérülésben elakad, a helikáz leválhat róla, és az elakadt villa előtti szakaszon egyedül továbbhaladva kettéválasztja a replikálandó DNS-t. Az ilyenkor aktiválódó ATR a replikációban részt vevő fehérjék foszforilációja révén fontos szerepet tölt be a repliszóma stabilizálásában és a normál replikáció visszacsatolásos szabályozásában. Emellett az ATR-CHK1 páros a sejtciklus szabályozását is a replikáció állapotának megfelelően modulálja, vagyis lassítja, illetve feltartóztatja, amíg a DNS-szintézis rendben le nem zajlik (részleteket lásd később).

ATM-CHK2

Az ataxia-telangiektázia mutáns (ATM) neve arra a ritka, autoszomális, recesszív öröklődésű, humán betegségre utal, amelyet a géntermék defektusa okoz. E protein-kináz a kettős DNS-lánctörések és a kromatin szerkezet szétesése hatására aktiválódik, majd foszforilálja a „checkpoint" kináz-2-t (CHK2), amely ezáltal szintén aktív lesz. Az ATM-CHK2 párost aktiváló léziók agresszív DNS-károsító környezeti hatásokra (ionizáló sugárzás, egyes kémiai ágensek) alakulnak ki, és alig fordulnak elő a sejtek életében, illetve a normál sejtciklus során. Szemben az ATR-CHK1 párossal, az ATM-CHK2 kettős nem esszenciális a szokványos körülmények között élő és szaporodó sejtek számára. A duó tagjainak hiánya vagy működési zavara azonban a DNS-t roncsoló fizikai és kémiai hatásokra rendkívül érzékennyé teszi a sejtet, rontja a DNS-károsodások következményeinek p53-által mediált (lásd később) kivédését, így fokozza a mutációk és daganatok kialakulásának kockázatát.

A CHK1 és CHK2 azáltal képes azonnali hatást kifejteni a sejtciklusra, hogy mindkét kináz egyaránt foszforilálja a Cdc25 foszfatázt, amely ennek hatására inaktiválódik, így nem képes eltávolítani a gátló foszforilcsoportokat az aktuális Cdk–ciklin komplexekről. Ráadásul a foszforilált Cdc25-öt specifikus ubikvitinligázok hamar konjugálják, és proteaszomális lebontás felé irányítják, ezért a Cdc25 alacsonyabb fehérjeszintje késlelteti a ciklus továbbhaladását. Ha a DNS-károsodás, illetve replikációs stressz súlyosabb és/vagy nem sikerül rövid idő alatt kiküszöbölni, a négy említett kináz késleltetett, tartósabb és szélesebb körű (a sejtciklus mellett a hibajavításra, az apoptózisra és a vaszkularizációra is kiterjedő) hatást válthat ki a p53 transzkripciós faktor aktiválása révén.

III/4.4. A P53 FEHÉRJE SZEREPE A SEJTCIKLUS SZABÁLYOZÁSÁBAN

A p53 fehérje az elmúlt két-három évtized legintenzívebben kutatott tumorszuppresszor génterméke. A kiemelt érdeklődést már az is indokolja, hogy a p53 egyaránt központi szerepet játszik a sejtciklus negatív, illetve az apoptózis pozitív szabályozásában, valamint indukálja a DNS-hibajavító rendszereit. Valódi fontossága azonban abban rejlik, hogy a – sejtciklus leállításából, a „repair" erősítéséből és az apoptóziskészség fokozásából összetevődő – vészreakciót nem csupán súlyosabb DNS-károsodások és egyéb stresszállapotok, hanem túl erős mitogén stimulusok esetén is beindítja.

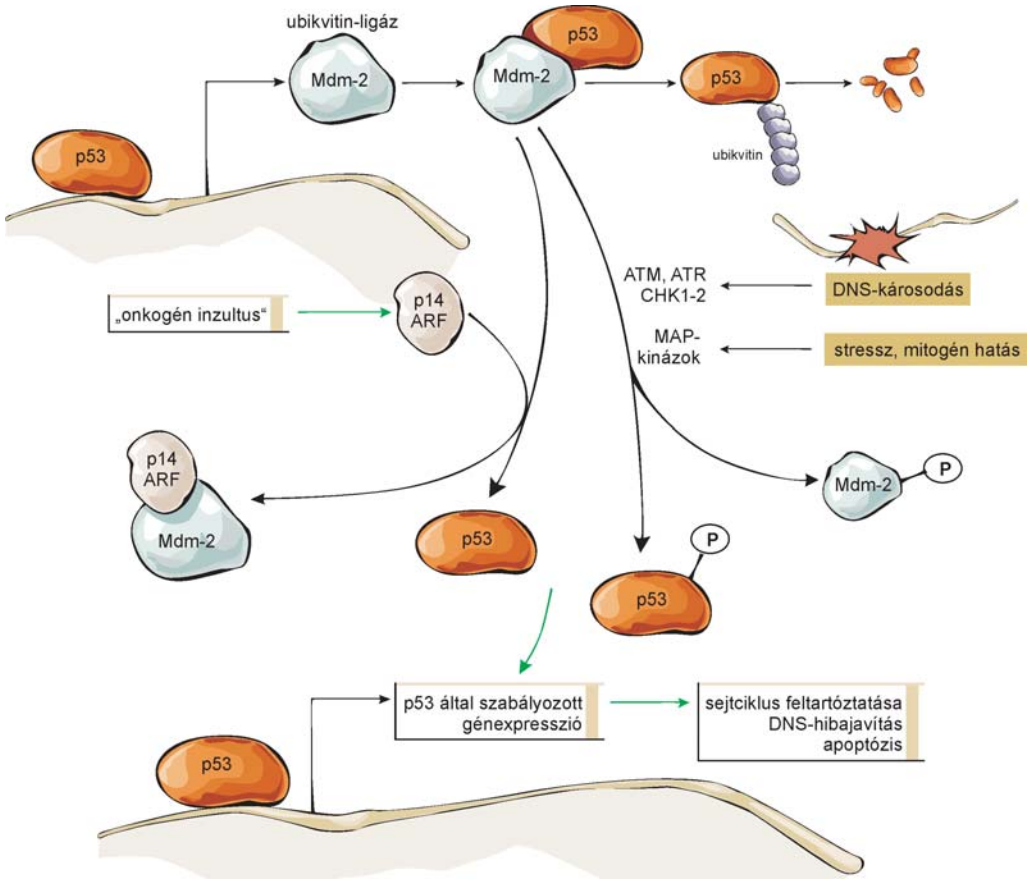
A fehérje neve a látszólagos molekulatömegére (53 kDa) utal. A polipeptid mérete valójában kisebb (44 kDa), amely transz-aktivációs, DNS-kötő, tetramerizációs és szabályozási doménekből áll. A p53 fehérje ugyanis számos gén átírását aktiválni (néhányét gátolni) képes, a DNS megfelelő szekvenciájához tetramerként (kettős dimer) kötődő transzkripciós faktor. A p53 mennyisége az említett, különféle vészhelyzetek esetén megemelkedik, és a fehérje aktív konformációt vesz fel. A sejtmagba jutva felismeri a célgének promóterében található kötőhelyét (p53RE), és – az adott géntől függően – aktivátorként vagy represszorként befolyásolja az RNS-polimeráz II bekötődését. Végeredményben a p53 indukálja a sokrétű válaszreakció kialakításához szükséges géntermékeket (sejtciklusgátló, apoptózisfokozó, DNS-hibajavító fehérjéket), és ezt az effektust tovább erősíti néhány ellentétes hatású (sejtciklus-aktiváló, apoptózisgátló) fehérje expressziójának csökkentése révén. E fejezetben a p53 fehérjének csupán az osztódási ciklusra gyakorolt hatásait részletezzük.

A p53 mennyiségének és aktivitásának szabályozása

Amikor a sejtet nem érik jelentős stresszhatások (pl. oxidatív, ozmotikus vagy organellum-stressz, súlyosabb DNS-károsodás stb.), a p53 fehérje mennyisége alacsony. Ezt az állapotot, sajátos önszabályozás révén, maga a p53 és a vele összekapcsolódó Mdm2 tartja fenn. Említettük, hogy a p53 transzkripciós faktor különböző gének expresszióját fokozza. Ezek egyike az MDM2, mely az Mdm2 (néha Hdm2-nek is nevezett) p53-gátló fehérjét és egyben p53-ra specifikus E3 ubikvitinligázt kódolja. E tények önmagukban magyarázzák az önszabályozás mechanizmusát, hiszen minél magasabb a p53-szint és -aktivitás, annál több Mdm2 keletkezik, ami gátolja és ubikvitinálja a p53-at, amely gyorsabban bomlik le a proteaszómában, ezért mennyisége csökken. Ha pedig csökkenne a p53 mennyisége, a kevesebb Mdm2 miatt megnyúlik a féléletideje, így egyre több lesz belőle. Általában kijelenthető, hogy a p53 mennyiségét emelő hatások ebbe az önszabályozási ciklusba avatkoznak be, mégpedig jellemzően foszforiláció vagy szekvesztráció révén gátolják az Mdm2 működését.

A p53 fehérjefoszforiláció általi aktiválódása

A p53 vagy az Mdm2 fehérjék foszforilációja egyaránt akadályozza a két fehérje egymáshoz való kötődését, így a p53 felszabadul a gátlás alól, és féléletideje meghosszabbodik. A foszforilált p53 ráadásul aktívabb konformációba is kerül, tehát nem csak több transzkripciós faktor kötődik a DNS-hez, de hatékonyabban is fokozza a génátírást *(III/4-8. ábra).* A p53-at és/vagy Mdm2-t foszforiláló számos protein-



III/4-8. ábra
A p53 mennyiségének és aktivitásának szabályozása

szerin/ treonin-kináz közül két csoport kiemelendő. Az egyikbe a DNS-károsodásokra és folyamatban lévő replikációra aktiválódó kinázok (köztük a korábban említett ATR, CHK1, ATM, CHK2, valamint a DNS-függő protein-kináz); a másikba pedig a mitogén stimulusra és stresszre aktiválódó kinázok (MAPK-aktivált kináz, PKC, illetve a MAPK család különböző tagjai: a stressz által aktivált JNK és p38 MAPK, valamint az extracelluláris mitogén stimulusokra aktiválódó, klasszikus MAPK ERK1-2) tartoznak.

A p53 aktiválódása az Mdm2 szekvesztrációjával

A kóros sejtburjánzás kivédésében sajátos funkciót tölt be a $p14^{ARF}$ nevű tumorszuppresszor. Ez a fehérje ugyanis nem csak DNS-hibák, hipoxia vagy oxidatív stressz hatására, hanem az úgynevezett „onkogén inzultus" esetén is indukálódik. Ez utóbbi a mitogén stimulus kóros mértékű felerősödését jelenti, ami rendszerint egy onkogén megjelenésére utal. A fehérje érdekessége, hogy ugyanaz a gén kódolja, amely a $p15^{INK4b}$ és $p16^{INK4a}$ fehérjéket is. Ez utóbbi két CKI alternatív RNS-hasítás („splicing") eredménye. A $p14^{ARF}$ azonban alternatív leolvasási keret („*A*lternative *R*eading *F*rame", innen a név) használatának eredménye, vagyis úgy

jön létre, hogy a transzláció eltérő start kodont használ, ezért a $p14^{ARF}$ – egyébként igen különleges vonásokkal bíró – aminosav-szekvenciája nem is hasonlít a két géntársáéra. A $p14^{ARF}$ fehérje szekvesztrálja az Mdm2 ubikvitin-ligázt: a p53 helyett kötődik hozzá, és magával viszi a nukleóluszba, így a p53 mennyisége megnő, és aktív transzkripciós faktorként a sejtmagban marad *(III/4-8. ábra)*.

A p53-aktiválódás sejtciklusgátló hatása

Akár valamiféle stressz vagy súlyos DNS-károsodás, akár onkogén inzultus váltja ki a p53 aktiválódását, a sejtciklus az éppen aktuális ellenőrzési pontnál leáll (és a sejt vagy megkísérli az ok kiküszöbölését, vagy apoptózissal elpusztul, esetleg végleg parkolófázisba kerül). A p53-által indukált fehérjék közül a sejtciklus feltartóztatásáért elsősorban a $p21^{CIP1/WAF1}$ (és $p27^{KIP1}$), a GADD45 és a 14-3-3σ felelős.

Kiemelendő a $p21^{CIP1/WAF1}$ CKI fehérje, amely lényegében az összes Cdk-ciklin komplexet (a CAK-ot is beleértve) gátolni képes, így szintemelkedése a G_1 és G_2 fázisban egyaránt blokkolja a ciklust. Ráadásul az E2F transzkripciós faktort is közvetlen kötődéssel inaktiválja, ami a sejtciklus fenntartásához szükséges gének kifejeződését akadályozza. Sőt, a $p21^{CIP1/WAF1}$ közvetlenül kötődik a PCNA („proliferating cell nuclear antigen") fehérjéhez, és gátolja annak részvételét a DNS-replikációban. A PCNA a DNS-polimeráz-δ processzivitását biztosítja azáltal, hogy a másolandó DNS-szálhoz bilincseli. Ily módon a $p21^{CIP1/WAF1}$ az S fázisban magát a DNS-szintézist is le tudja állítani.

A p53 – közvetlenül, vagy általa indukált represszoron keresztül – csökkenti néhány ciklin és Cdk expresszióját (pl. ciklin-D, ciklin-B és Cdk1), ami önmagában akadályozza a ciklus előrehaladását. Az MPF (Cdk1–ciklin-B komplex a G2 fázisban) kialakulását ráadásul két p53 által indukált géntermék is gátolja. A („Growth Arrest and DNA Damage-inducible") ***GADD45*** fehérje közvetlenül kapcsolódik a Cdk1-hez, és megakadályozza, hogy az dimert képezzen a ciklin-B-vel. A *14-3-3σ* fehérje (nevét kromatográfiás mobilitása alapján kapta) a Cdk1–ciklin-B dimerhez kötődik, és megakadályozza, hogy az bejusson a sejtmagba. A citoplazmában csapdába ejtett MPF nem tudja beindítani az M fázist. Érdekes, hogy a 14-3-3σ – a Bad pro-apoptotikus fehérje gátlása révén – a sejthalált is gátolja, ezért a daganatképződés kétélű fegyverének tekintik, hiszen ha túl kevés van belőle, nehezebb a proliferációt fékentartani, ha pedig túl sok, akkor nehezebb a transzformált sejtet elpusztítani.

III/4.5. A „TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β" (TGFβ) MINT SEJTCIKLUSGÁTLÓ HORMON

A TGFβ a citokinek családjába tartozó peptid hormon, amely para- és autokrin módon kötődik sajátos sejtfelszíni receptoraihoz, és befolyásolja a sejtnövekedés, -osztódás, apoptózis, differenciáció rendszerét. Szó volt róla, hogy a mitogén növekedési faktorok hogyan lendítik előre a sejtciklust a restrikciós pontig, az S fázis felé. A TGFβ azonban – nevével ellentétben – főként anti-mitogén hatású: különböző típusú, egészséges sejtekben fékezi a proliferációt, illetve elősegíti a differenciálódást vagy apoptózist. Természetesen a TGFβ fő jelátviteli mechanizmusa is alapvetően eltér a mitogén GF-ekétől.

A TGFβ jellemzően a G_1 fázisban képes feltartóztatni sejtciklust. Hatása ugyanis főleg azon alapul, hogy csökkenti a c-Myc és a Cdk4, ugyanakkor fokozza a $p15^{INK4B}$

expresszióját. A $p15^{INK4B}$ a Cdk4/6-ciklin-D komplexeket gátolja, így megakadályozza a pRb hiperfoszforilációját, és a restrikciós ponton való áthaladást. A TGFβ emellett a Cdc25 termelődését is csökkenti, és indukálja a $p21^{CIP1/WAF1}$ és $p27^{KIP1}$ CKI fehérjéket. Fontos azonban megemlíteni, hogy a tumorszupresszor TGFβ nem univerzális rákgyógyszer. Fenti hatásai révén a normál sejtek elfajulásának és a daganatképződésnek fontos gátja ugyan, ám malignusan transzformált sejtekben már általában nem állítja helyre a proliferáció kontrollját, és nem pusztítja el a daganatot, hanem inkább fokozza a tumorinváziót és az áttétképződést.

III/5.
Apoptózis

Csala Miklós

A többsejtű szervezetek bonyolult struktúráját a különböző irányba differenciálódó sejtek folyamatos keletkezésének és pusztulásának egyensúlya alakítja ki és tartja fenn. A test fejlődése és növekedése (magzati vagy akár csecsemő- és gyermekkorban) egyes sejtcsoportok eltűnését éppúgy magában foglalja, mint mások megjelenését. A kéz- és lábujjak pl. úgy válnak el egymástól, hogy a köztük lévő szövetrészek atrofizálnak, és ugyanez történik a köldökzsinór szöveteivel, amikor a testnek ez a része feleslegessé válik. Kevésbé látványos ugyan, de ugyanilyen fontos, hogy a megfelelő sejt-sejt kapcsolatok nélkül maradt, vagyis a hálózatba be nem épült neuronok az agy fejlődése során „felszívódjanak"; és súlyos következményekkel jár, ha nem sorvadnak el idejében azok az immunkompetens sejtek, amelyek véletlenül saját testi antigéneket ismernek fel ellenségükként. A kifejlődött szervezet sejtjei is állandó megújulásban vannak; egyes becslések szerint a felnőtt ember testében sejtek tízmilliárdjai pusztulnak (és keletkeznek) naponta. Az emberi sejtek mitotikus osztódással történő szaporodásának tehát szükségszerű velejárója a feleslegessé vált sejtek halála, és alapvetően mindkettő egyaránt az organizmus egészének javát szolgálja.

A sejtek természetes pusztulása, amely tehát belső indíttatásból és nem külső ártalmak hatására történik, két szempontból is nevezhető *programozott sejthalál*nak. Egyrészt az esemény a szervezet egyedfejlődési programjának megfelelően történik, annak részét képezi. Másrészt – és a név inkább ebből származik – a sejt az ilyen öngyilkosságot gondosan szabályozott genetikai program szerint, erre specializált fehérjék működése révén, aktívan hajtja végre. A programozott sejthalálnak (egyre) több változata ismert, és ezek között akad sejttípus-specifikus folyamat (pl. a bőrhámsejtek kornifikációja, elszarusodása) is. Kiemelendő a két legáltalánosabb és leggyakoribb forma, az apoptózis (I. típus) és az autofágiás sejthalál (II. típus), melyek közül e fejezet csupán az előbbivel foglalkozik.

Az apoptózis nem csak azt a célt szolgálja, hogy az egészséges, de feleslegessé vált sejteket eltakarítsa. Legalább ilyen fontos szerepe, hogy eltüntesse azokat a sejteket, amelyek valamely – akár külső, akár belső okra visszavezethető – működési zavarukkal nem tudnak megbirkózni. Stresszhelyzetekben, amikor a sejt nem képes megfelelni egy vele szemben támasztott követelménynek, próbálja csökkenteni a terhelést és növelni saját teljesítőképességét. Ha azonban nem sikerül helyreállítani az egyensúlyt, előtérbe kerül a szervezet egészének érdeke, és a csődöt mondott sejt lefuttatja az apoptózis programját, mielőtt nagyobb károkat okozna. A programozott sejthalál, így az apoptózis is, aktív, energiaigényes folyamat, ezért beindítását a sejt nem halogathatja túlságosan sokáig. Ha a működési zavar hirtelen jelentkezik és nagyon súlyos, akkor a pusztulás nem programozottan megy végbe (nekrózis). Az apoptózis és nekrózis kiváltó okai tehát jelentős átfedést mutatnak; hogy melyik következik be, függ az ártalom súlyosságától és dinamikájától is. Különböző patológiás állapotokban gyakran észlelhető, hogy két- (vagy többféle) haláltípus

egyszerre pusztít a károsodott szövetben, sőt a nekrózis és apoptózis egy adott sejten belül is keveredhet (nekroapoptózis).

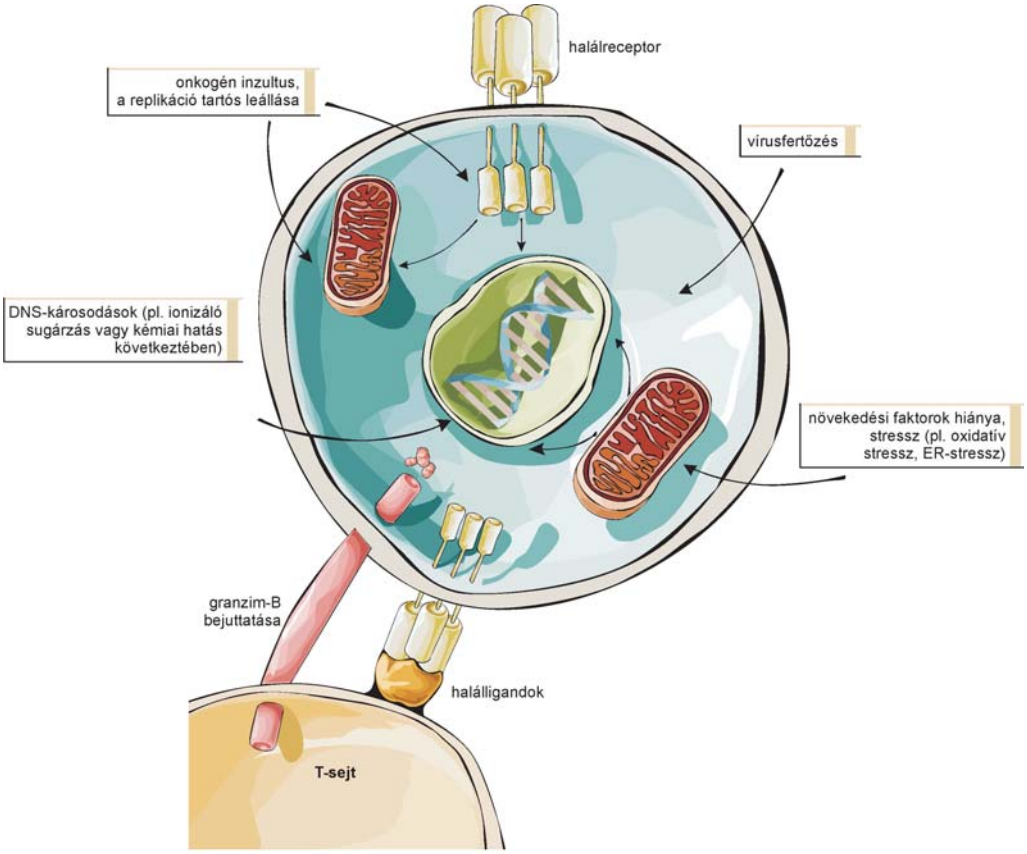
A sejtciklus szabályozásáról szóló fejezetben is szó volt róla, hogy a szövetek, szervek és az egész szervezet ép szerkezetének feltétele a proliferáció, a differenciálódás és a programozott sejthalál dinamikus egyensúlya, amelyet összehangolt szabályozás biztosít. A felesleges és/vagy működésképtelen sejteket eltakarító apoptózis zavarai számos patológiás állapothoz vezethetnek. A túlzásba vitt apoptózis sorvadást, atrófiát okoz, szerepe bizonyított pl. a neurodegeneratív betegségekben és a – kóros folyamatnak ugyan nem tekinthető – öregedésben is. Az elégtelen apoptózis ugyanakkor a genetikai állomány stabilitását veszélyezteti, mert szabad utat enged a mutáció(ka)t hordozó sejtek szaporodásának. Ez pedig ördögi kört alkotva ugrásszerűen megnöveli a mutációk halmozódását, és a sejt malignus transzformációjához, rosszindulatú daganatok kialakulásához vezethet. Az apoptózis szabályozásának orvosi vonatkozása, és a hatékony beavatkozási lehetőségek kutatásának fontossága tehát nem kérdéses.

III/5.1. AZ APOPTÓZIS KIVÁLTÓ OKAI

A programozott sejthalál, sokrétű biológiai funkciójának megfelelően, változatos okokból bekövetkezhet *(III/5-1. ábra).* Az egészséges emberi sejtek saját szempontjaikat a szervezet egészének érdekei alá rendelik. Ahogyan az osztódásra kész sejtek csak megfelelő mitogén stimulusok esetén indítják el a sejtciklust, és a restrikciós pontig folyamatosan igénylik a kívülről jövő bátorítást; ugyanúgy a differenciálódott sejtek csak a megfelelő külső stimulusok esetén maradnak életben. A legtöbb emberi sejt folyamatosan igényli környezetétől azokat a jelzéseket, amelyek megerősítik abban, hogy az organizmusnak továbbra is szüksége van rá. Ilyen *„túlélési jelek" hiányában*, az önmagát feleslegesnek érző sejt – minden egyéb kézzel fogható indok nélkül is – végez magával. Paradox módon tehát alapvetően nem az a kérdés, hogy sejtjeink miért apoptotizálnak, hanem, hogy mi tartja vissza őket ettől. A túlélési jelek rendszerint ugyanazokból a forrásokból származnak, amelyekből a proliferációt stimulálók. A membránban elhelyezkedő receptoroknál szétválik a kétféle jelátviteli útvonal, és a sejt típusától, differenciáltsági fokától függ, hogy „csak" túlél vagy osztódik is.

A programozott sejthalál funkciójáról korábban leírtakból azonban következik, hogy a nem felesleges (tehát túlélési jelet kapó) sejt is elpusztulhat apoptózissal, amit nagyon sokféle ártalom és hatás kiválthat. A lehetséges okok között vannak olyanok, amelyek nekrózist is eredményezhetnek, ilyen az *oxidatív stressz*, az *energiahasznosítás (ATP-termelés) zavara* vagy a *vírusfertőzés*; és vannak, amelyek dominánsan apoptózist indukálnak, mint a különböző *organellumok stresszállapota* (pl. ER-stressz) vagy a *súlyosabb DNS-károsodások*, esetleg a *sejtciklus restrikciós pont utáni, tartós leállása*.

Az apoptózis lehetséges okai közül kiemelendő a *sejtfelszíni receptoron keresztül* érkező utasítás, amikor ölősejtek és halálhormonok késztetik a sejtet az önpusztításra. Az ölősejtek egyébként akár oly módon is beindíthatják az apoptózist, hogy egy erre alkalmas enzimet (*granzim-B*) szó szerint befecskendeznek az áldozat citoplazmájába (lásd később). A rosszindulatú daganatok kialakulásával szembeni egyik legfontosabb védőbástyát az jelenti, hogy a gyanúsan *intenzív mitogén stimulus* (a $p14^{ARF}$, Mdm2 és p53 fehérjék közreműködésével, lásd a sejtciklus szabályozásánál) szintén az apoptózis beindításához vezethet.

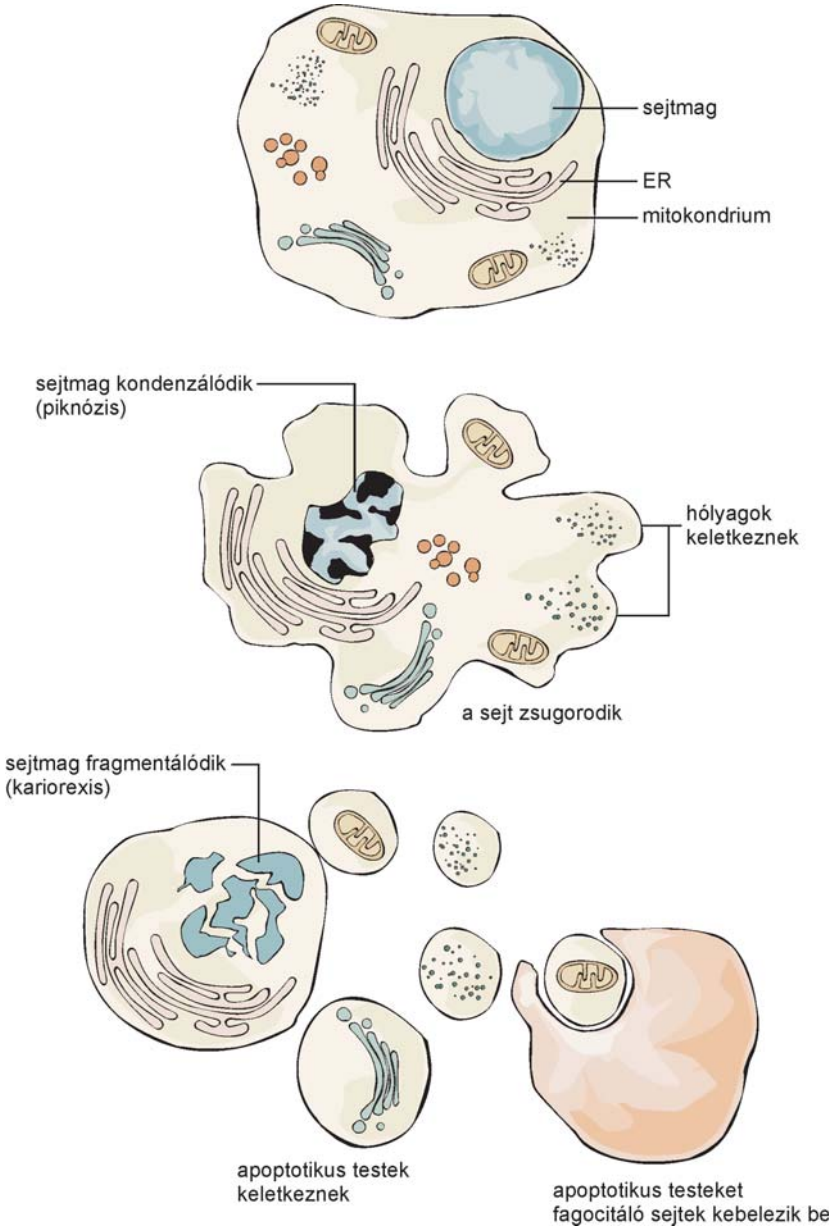


III/5-1. ábra
Az apoptózis legfontosabb kiváltó okai

A sokféle ok egymással is keveredik, és nehezen szétválasztható. Ha pl. a mitokondrium membránja károsodik, és ez részben szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt, a kialakuló energiadeficit mellett a ROS-termelés is fokozódik. Az ATP-hiány csökkentheti az antioxidáns védekezőképességet, így elmélyítheti az oxidatív stresszt, ami DNS-sérüléseket is okoz. Az antioxidáns és redox-homeosztázis felborulása veszélyezteti az ER működését, és az organellum lumenében felhalmozódhatnak az éretlen fehérjék. Az ER elégtelen funkciója persze rövid időn belül kihat az endomembrán rendszer többi tagjára is, így várható pl. a Golgi-apparátus és a lizoszómák működészavara stb.

III/5.2. AZ APOPTÓZIS MORFOLÓGIAI JELLEMZŐI

Bár az apoptózis gyorsan lezajlik, így az előrehaladott folyamat mikroszkóppal ritkán észlelhető, a vele járó jellegzetes morfológiai változások alapján különleges festési és jelölési eljárások nélkül is felismerhető *(III/5-2. ábra).* Az apoptotizáló sejt



III/5-2. ábra
Az apoptózis morfológiája

zsugorodik és, fokozatosan elveszítve kapcsolatait a környezetével, lekerekedik. A sejtmag is zsugorodik, kromatinállománya összesűrűsödik, és sötét foltokban jelenik meg a magburok közelében (piknózis). A DNS fragmentálódása együtt jár a sejtmag feldarabolódásával (kariorexis). A keletkező DNS-fragmentumok gélelektroforézissel elválasztva jellegzetes létrafokokra emlékeztető eloszlást mutatnak, ezért a „DNS-létra” jelenségét gyakran használják is az apoptózis kimutatására.

A citoplazma egyre sötétebbnek látszik, magból keletkező kromatintestek mellett más sejtorganellumok is szorosan összecsomagolódnak. A plazmamembrán szabálytalan kitüremkedései hólyagokká alakulnak, és ezek lefűződésével végül a sejt apoptotikus testnek nevezett élettelen vezikulumokká esik szét, amelyeket a környező sejtek bekebelezhetnek.

Az apoptózis voltaképpen a sejthalál környezetet kímélő, rendkívül tapintatos változata. A pusztulásra ítélt sejt megszűnteti kapcsolódásait a szomszéd sejtekkel, így azok nem érzékelik a mellettük végbemenő gyors leépülést. A plazmamembrán végig nem hasad fel, így a sejt tartalma nem jut ki szabadon az extracelluláris mátrixba, és nem szennyezi be a közeli, ép sejteket. A parányi apoptotikus testeket pedig gyorsan eltakarítják, és tápanyagként hasznosítják a fagocitózisra képes szöveti sejtek. Érdemes mindezt szembeállítani a nekrózis morfológiájával. A nekrózis nem tekinthető programozott sejthalálnak, kiváltó okai olyan súlyos ártalmak, amelyek a sejt működését azonnal ellehetetlenítik, így nincs mód egy energiaigényes program gondos és szabályozott lefuttatására, és az áldozat nem lehet tekintettel a szomszédjaira. A nekrotizáló sejt duzzad, és kipukkadva beborítja tartalmával a mellette lévőket. A sejtbennéket eltakarító sejtek immunválaszt és gyulladásos reakciót generálnak, ami újabb „ártatlan” sejtek életét olthatja ki. A nekrózis részben ezért, részben a súlyos ártalom rendszerint hosszabb hatósugara miatt, jellemzően nagyobb területekre – méretesebb sejtcsoportokra vagy szövetrészekre – terjed ki, míg az apoptózis általában egy-egy különálló sejtet érint.

III/5.3. AZ APOPTÓZIS SZABÁLYOZÁSA – A KASZPÁZOK

A fent leírt morfológiai változásokat, és az életfunkciók fokozatos leépülését célzott és limitált fehérjehasítások sora váltja ki. Alapvető molekuláris biológiai folyama-

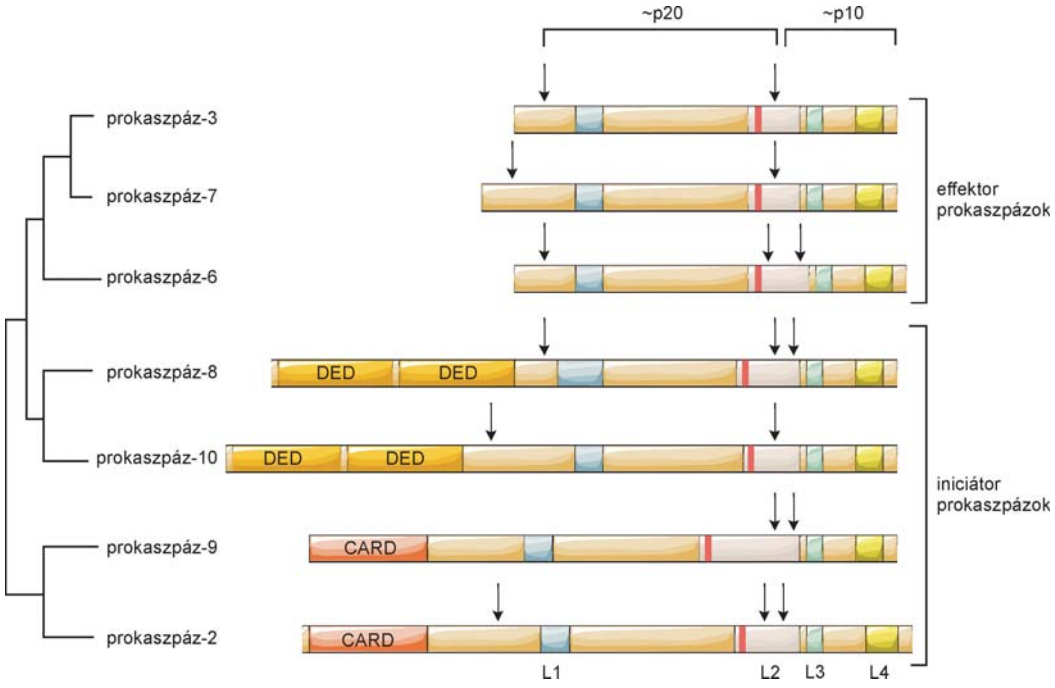
III/5-1. táblázat
A legfontosabb halálszubsztrátok

Kategória	Hatás
Sejtadhéziós fehérjék	Sejt elkülönülése
Citoszkeleton fehérjéi	Zsugorodás, hólyagok, nyúlványok
Magburok szerkezeti fehérjéi	Sejtmag töredezése
ER és Golgi szerkezeti fehérjéi	Organellumok zsugorodása
Sejtciklus szabályozó fehérjéi	Ciklus leállása
DNS-szintézis és -repair enimei	Replikáció és hibajavítás leállása
DNázok gátlófehérjéi	DNS fragmentálódása
DNS-kötő fehérjék, transzkripciós faktorok	Transzkripció leállása
RNS-szintézis és -érés fehérjéi	RNS-szintézis és -érés leállása
Transzláció fehérjéi	Fehérjeszintézis leállása
Citokinek	T-sejt kemotaxis
Receptorok és jelátvivő fehérjék	Jelfogadás, -feldolgozás leállása

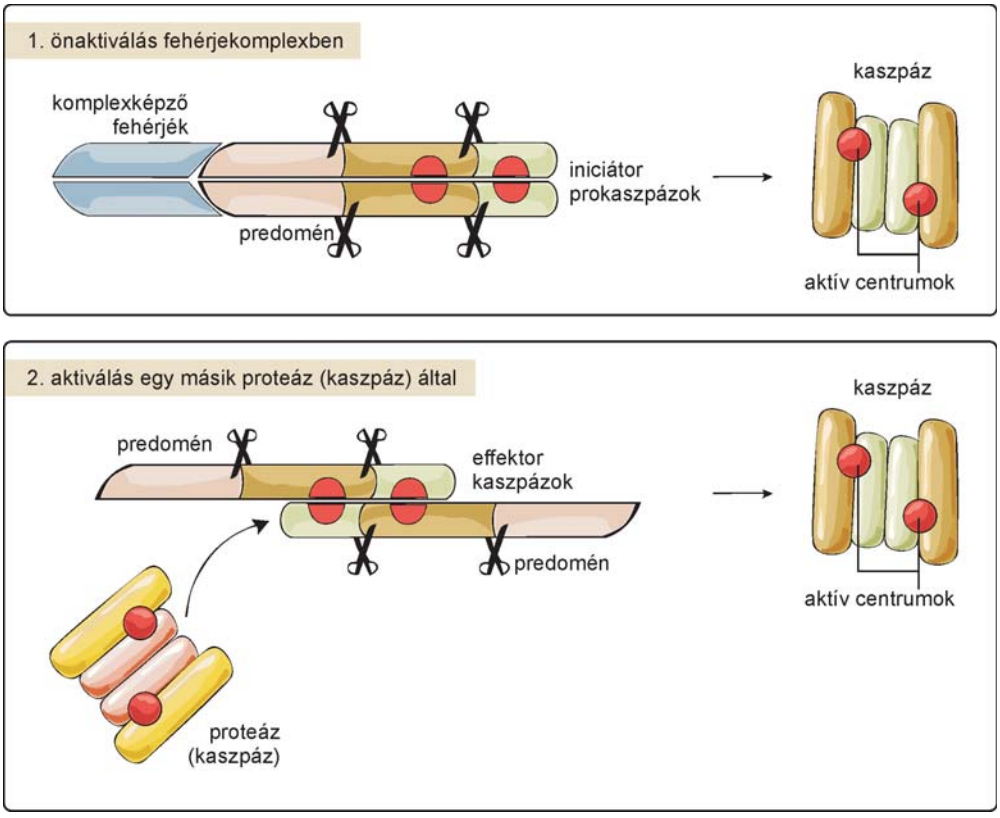
tok (pl. sejtciklus, DNS-szintézis és -hibajavítás, transzkripció, transzláció és jelátvitel) állnak le, mert a bennük kulcsszerepet játszó fehérjék elbomlanak. A sejt elválik környezetétől a sejtadhéziós fehérjék hasítása miatt; és lekerekedik, majd felhólyagosodik a citoszkeleton komponenseinek proteolízise következtében. A magburok, az ER és a Golgi-apparátus szerkezeti fehérjéinek degradációja az organellumok zsugorodásához és töredezéséhez vezet. A kaszpázaktivált DN-áz (CAD) viszont, amely a DNS jellegzetes „létrásodásáért" felel, éppen azáltal lép működésbe, hogy gátló alegysége (az ICAD) lebomlik. Néhány százra tehető azon fehérjék száma, melyek az apoptózis során, annak végrehajtása céljából feldarabolódnak, és amelyeket emiatt gyakran halálszubsztrátoknak is neveznek *(III/5-1. táblázat).* A hasításukat végző kaszpáz enzimek az apoptózis szabályozásában és kivitelezésében központi szereplőknek tekinthetők.

Kaszpázok

A kaszpázok a cisztein proteázok családjába tartozó hidrolázok, amelyek a megfelelő (általában négy aminosavból álló) szakaszban elhelyezkedő aszpartil-alegység melletti peptid-kötés hidrolízisét katalizálják („caspase: *c*ysteine-dependent *asp*artate-directed prote*ase*"). Proteázoktól megszokott módon – inaktív zimogének (prokaszpázok) formájában termelődnek, és ezek limitált proteolízise alakítja ki a véglegesen aktivált enzimeket. A kaszpáz család (számozott) tagjai között vannak olyanok, amelyek elsősorban a gyulladásos jel közvetítésében vesznek részt. E fejezet csak az ún. apoptotikus kaszpázokkal foglalkozik.



III/5-3. ábra
Az apoptotikus kaszpázok doménszerkezete (A nyilak a hasítási helyeket jelzik; L1-4 számozott hurkok a fehérjében)



III/5-4. ábra
A kaszpázok aktiválódása

Az apoptotikus kaszpázok zimogénjeik doménstruktúrája *(III/5-3. ábra)* és aktiválódásuk módja *(III/5-4. ábra)* alapján két csoportba oszthatók. Az *effektor kaszpázok* (kaszpáz-3, -6 és -7) nem képesek autoaktivációra, vagyis csak úgy aktiválódhatnak, ha eleve dimert alkotó zimogénjeiket egy másik – már aktív – proteáz egy vagy két helyen elhasítja. Mivel a prokaszpázok hasítását rendszerint kaszpázok végzik, az egyik enzim bekapcsolása sorban a többi aktiválódását eredményezheti, amit kaszpáz-kaszkádnak neveznek. Az effektor kaszpázok – értelemszerűen – nem képesek a kaszkád beindítására, csak folytatására és a halálszubsztrátok hasítására, ezért kivitelező kaszpázokként is emlegetik őket. Az *iniciátor kaszpázok* (kaszpáz-2, -8, -9 és -10) zimogénjei az effektor prokaszpázoknál nagyobb méretű polipeptidek, és azokkal ellentétben, inaktív állapotban még monomerek. Nagyobb méretük a bennük található, komplexképző doméneknek (DED: „death effector domain” vagy CARD: „caspase-recruitment domain”) köszönhető, melyek segítségével más fehérjékhez tudnak kapcsolódni. Az így kialakított struktúrákban az iniciátor prokaszpázok dimert képezve aktív konformációt vesznek fel, és autoproteolízissel válnak aktív kaszpázzá. A nevük is onnan származik, hogy az ilyen apoptózist beindító komplexekben történő önaktivációjuk után más prokaszpázokat kezdenek hasítani, vagyis ők inicializálják a kaszpáz-kaszkádot. A zimogének limitált proteolízise irreverzibilis lépés, vagyis kaszpázból már nem

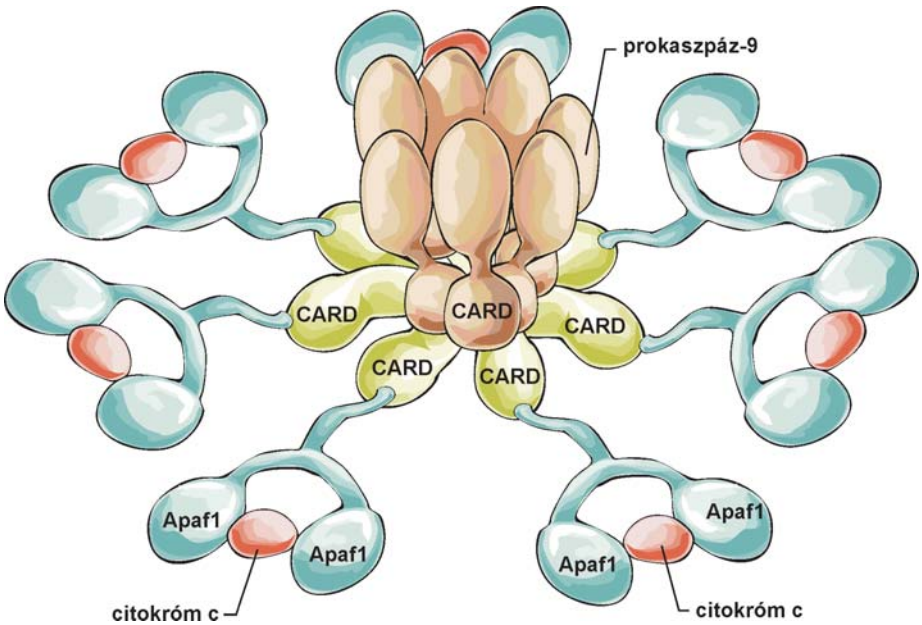
lehet prokaszpáz. A kaszpázokat már csak az aktív centrumukhoz tartósan tapadó gátlófehérjék tudják megfékezni az apoptózis végrehajtásában.

Kaszpázgátló fehérjék

A kaszpázgátló fehérjék családja IAP („*i*nhibitor of *ap*optosis") néven is ismert. Tagjai már azzal kivédik a halálprogram beindulását, hogy a szokásos szubsztrátoknál erősebben és tartósabban kötődnek a megjelenő érett iniciátor vagy effektor kaszpázok aktív centrumához. Ráadásul néhányuk ubikvitin-E3-ligáz aktivitással is rendelkezik, és képes bizonyos kaszpázokat a proteaszomális lebomlás útjára terelni. Az IAP fehérjék jelenléte miatt a prokaszpázok hasítása önmagában nem indítja be, csak előkészíti a sejthalált. Az ugrásra kész sejt akkor veti magát a mélybe, amikor az IAP fehérjéket azok antagonistái leválasztják a kaszpázokról. A legismertebb *IAP-antagonista* (tehát proapoptotikus) fehérjék, melyeket e fejezet is tárgyal, az Omi (vagy HtrA2) és a Smac (vagy DIABLO). Mindkettő a mitokondrium membránközti terében található, és citoplazmába jutásakor fejti ki hatását. A Smac azáltal szabadítja fel a kaszpázokat a gátlás alól, hogy kötésben tartja az IAP fehérjéket. Az Omi hasonlóan működik, de – szerin proteáz lévén – le is bontja azokat.

III/5.4. AZ APOPTÓZIST BEINDÍTÓ KOMPLEXEK

A kaszpáz-kaszkád tehát rendszerint iniciátor prokaszpázok autoaktivációját lehetővé tevő komplexek képződésével indul. A lejjebb bemutatott, apoptózist beindító komplexek (DISC, PIDD-oszóma és apoptoszóma) közös tulajdonsága, hogy a bennük több példányban jelen lévő, egyféle (ritkábban kétféle) iniciátor prokasz-

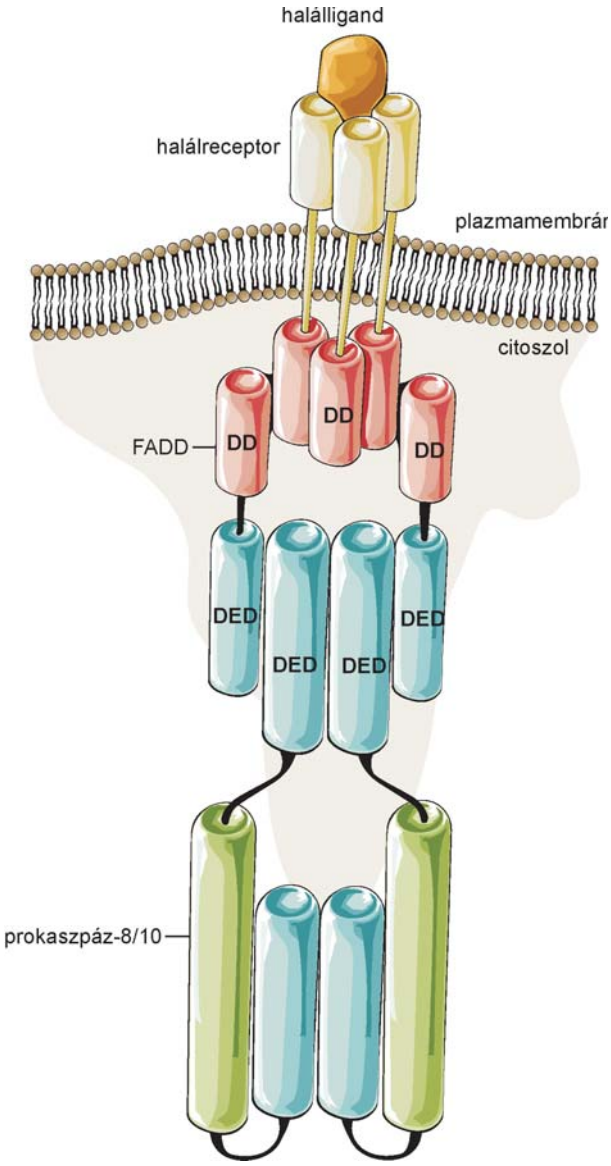


III/5-5. ábra
Az apoptoszóma felépítése

pázok dimereket képeznek, és átmenetileg aktív konformációra tesznek szert, majd aktivációjukat önmaguk (egymás) elhasításával teszik véglegessé.

Apoptoszóma

Az apoptoszóma a legrégebben és legalaposabban megismert apoptózist beindító komplex. Citoplazmában való létrejöttéhez a mitokondriumból származó összetevőre (citokróm-c) is szükség van, így tekinthető a mitokondriális eredetű apoptózis beindítójának. A mitokondrium azonban a kiváltó októl függetlenül kitüntetett szerepet játszik a programozott sejthalál szabályozásában, ezért az apoptoszóma gyakorlatilag minden apoptózisban kialakul. A komplex jellegzetes, hétfogú fogaskerékre emlékeztető szerkezetének alapja az apoptotikus proteázaktiváló faktor-1 (Apaf1) polipeptid heptamerje *(III/5-5. ábra).* Alapesetben az Apaf1 dADP-t kötő, inaktív monomerek formájában található a citoplazmában. Citokróm-c (1:1 arányú) kötődésekor konformációja megváltozik, így képessé válik arra, hogy a dADP-t dATP-re cserélje. Ez további konformációváltozást eredményez, és kialakul a hét Apaf1-ből, hét citokróm-c-ből és hét dATP-ből álló szerkezet, melyben az Apaf1 CARD doménje hozzáférhető a prokaszpáz-9 CARD doménje számára. A bekötődő és dimerizálódó prokaszpáz-9 aktiválódik, és kaszpáz-9-é is hasadhat.



III/5-6. ábra
A DISC felépítése

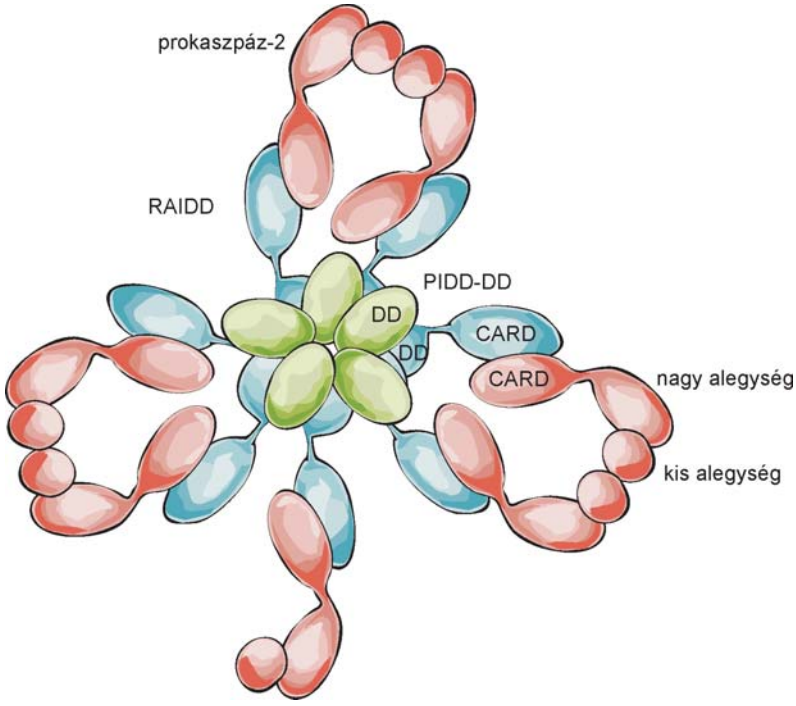
DISC („death-inducing signal complex")

A DISC-ek („death-inducing signal complex") halálreceptorok részvételével, a plazmamembránhoz kötve alakulnak ki. A halálreceptorok a TNFR (tumornekrózis faktor-receptor) szupercsalád DR („death receptor") családjának tagjai. A legfontosabb és legalaposabban ismert DR-ek a *TNFR1* (DR1), a *Fas* (CD95 vagy DR2), valamint a *TRAILR1* és *TRAILR2* („TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 and 2", DR4 és DR5). Közös tulajdonságuk, hogy egy transzmembrán hélixet tartalmazó, azonos alegységek oligomerje, rendszerint trimerje, és az alegységek sejten belüli része haláldomént (DD: „death domain") tartalmaz. Amikor a sejt külső felszínén halálligandok (TNF, FasL vagy TRAIL)

kötődnek a megfelelő DR-hez, a bekövetkező konformációváltozás hozzáférhetővé teszi az intracelluláris DD-ket, és hozzájuk kötődnek az adapter funkciót betöltő FADD („Fas-associated protein with DD") fehérjék. Ezek DD és – a prokaszpázoknál már említett – DED doméneket egyaránt tartalmaznak, így összekapcsolják a DR-t a 8-as és 10-es prokaszpázokkal *(III/5-6. ábra)*. A TNFR1 közreműködésével kialakuló komplex a szokásos DISC-től kissé eltérő összetételű (szokás TRADD-oszómának is nevezni), de azzal azonos funkciót tölt be. A prokaszpázok aktív konformációt vesznek fel, és hasítják egymást, így kaszpáz-8 (és kaszpáz-10) keletkezik. Bizonyos sejtekben a DR-ek mennyisége és a DISC-ek hatékonysága önmagában lehetővé teszi a megfelelő számú effektor kaszpáz létrejöttét és az apoptózist. Más sejtekben azonban a kaszpáz-8 a mitokondriális apoptózis indukálása révén (Bid hasítása, lásd később) tudja csak beindítani a programozott sejthalált.

PIDD-oszóma

A PIDD-oszóma neve arra utal, hogy a PIDD, fehérje részvételével jön létre a citoplazmában. A PIDD neve („p53-induced protein with DD") pedig arra utal, hogy mindez a p53 transzkripciós faktor aktiválódásakor – elsősorban súlyos DNS-sérülések vagy onkogén inzultus esetén – történik, mert ilyenkor jelentősen megnő a PIDD mennyisége a sejtben. Az eredetileg több domént tartalmazó PIDD fehérjéket proteázok hasítják, és így önállósulnak a C-terminális DD domének. Ezekhez olyan adapter fehérjékkel (RAIDD) alkotnak komplexet, amelyek DD-t és CARD-ot egyaránt tartalmaznak, így hidat tudnak képezni a PIDD DD és a prokaszpáz-2 között *(III/5-7. ábra)*. A PIDD-oszómában egymás közelébe került prokaszpáz-2 fehérjék

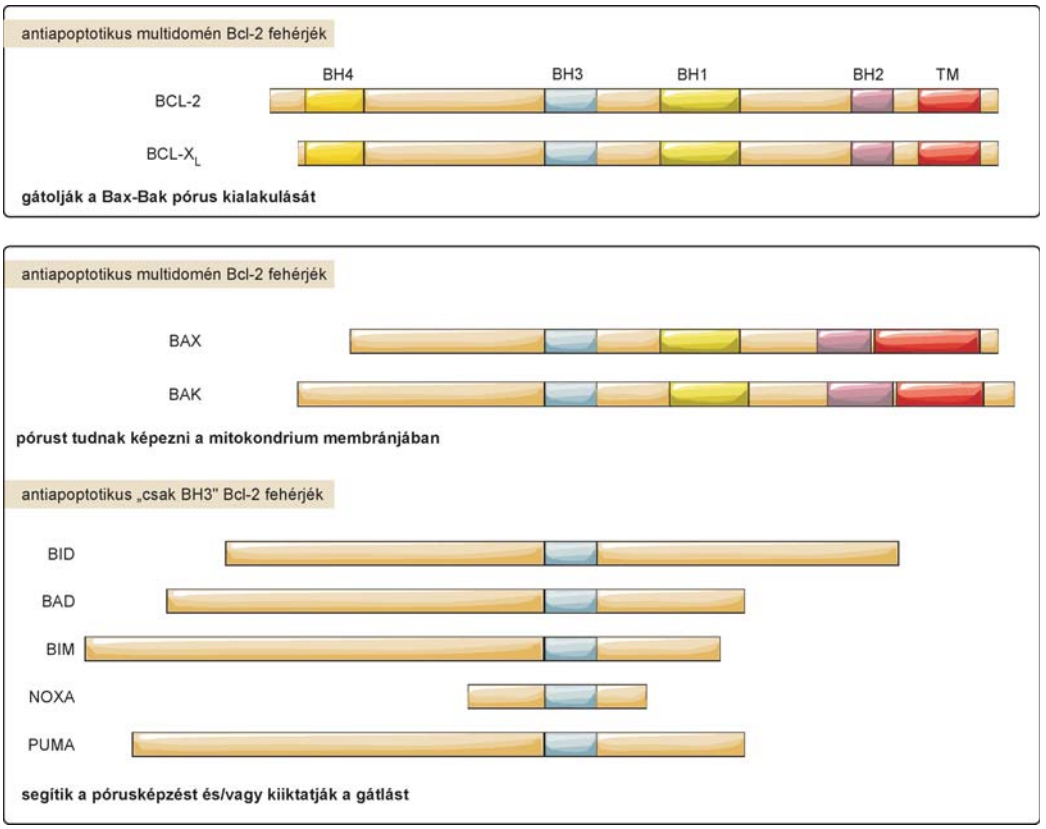


III/5-7. ábra
A PIDD-oszóma felépítése

hasítják egymást, és aktív kaszpázzá válnak. Egyes megfigyelések arra utalnak, hogy a kaszpáz-2 aktiválódásnak van PIDD- és RAIDD-független útja is, de ennek részletei egyelőre nem ismertek.

III/5.5. A BCL-2 FEHÉRJÉK SZEREPE AZ APOPTÓZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN

A mitokondrium külső membránja porin-pórusokat tartalmaz, amelyek kismolekulák számára átjárhatók, de fehérjék átjutását nem teszik lehetővé. A membránközti térben elhelyezkedő fehérjék tehát csak akkor juthatnak a citoplazmába, ha tágabb pórusok keletkeznek. A sejt ki is használja ezt a lehetőséget, és apoptózis aktiválódásakor, annak részeként, olyan fehérjéket szabadít ki e kompartmentből, amelyek a kaszpáz-kaszkád aktiválódását, illetve közvetlenül a magi DNS fragmentálódását segítik elő. A membránpermeabilitás fokozódását a Bcl-2 családhoz tartozó fehérjék szabályozzák, melyek szerkezeti sajátosságaik és funkciójuk alapján három csoportra oszthatók. A szerkezet vonatkozásában az osztályozás alapját az képezi, hogy a négyféle, Bcl-2-re jellemző (BH: „Bcl-2 homology") doménből többet is, vagy csupán a BH3-at tartalmazza a fehérje. Ennek alapján



III/5-8. ábra
A Bcl-2 fehérjecsalád csoportjai és fontosabb tagjai (TM: transzmembrán domén)

megkülönböztetünk „multidomén" és „csak BH3" típusú családtagokat. Az előbbiek rendszerint transzmembrán domént is tartalmaznak, és a membrán integráns fehérjéi, míg az utóbbiak általában szabadon mozognak a citoszolban. Funkció szempontjából meghatározó, hogy az adott fehérje működése elősegíti a pórusképződést (proapoptotikus) vagy akadályozza azt (antiapoptotikus).

Proapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék

A proapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék voltaképpen a pórus kialakítói, és a membránt önállóan permeabilizálják, ha ebben nem akadályozza őket semmi. A csoportba tartozó Bak és a Bax oligomerizációra hajlamos, és az egymáshoz kötődő alegységek gyűrűvé záródásakor meglehetősen nagy átmérőjű lukat képeznek a membránban, így lehetővé téve bizonyos fehérjék átjutását. Mivel ez a jelenség az apoptózis közvetlen kiváltója lehet, az élni akaró sejtben a Bak és Bax fehérjéket folyamatosan gátolt állapotban kell tartani.

Antiapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék

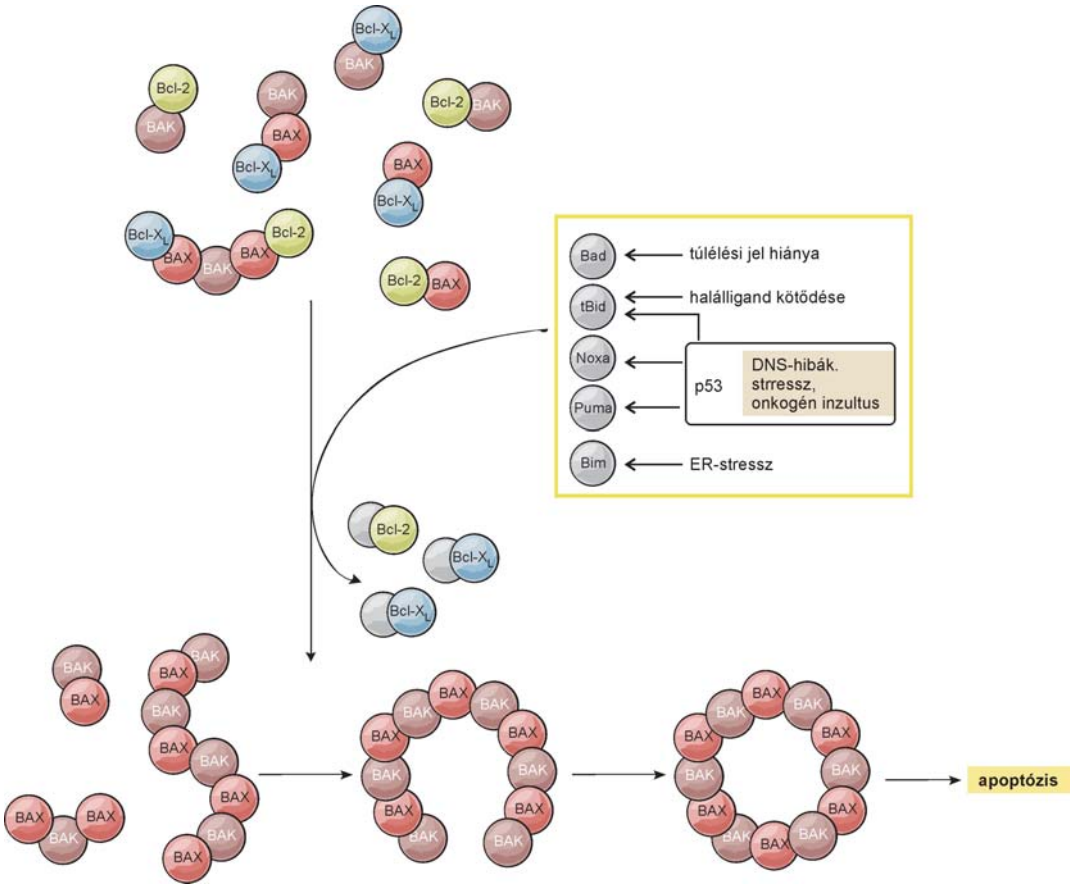
Az antiapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék fő feladata, hogy megakadályozzák a Bak-Bax csatornák kialakulását. Ezt az által érik el, hogy ők is beépülnek a membránban kialakuló oligomerekbe, de nem láncfolytatóként, hanem lánczáróként, vagyis blokkolják a további alegységek beépülését és a gyűrűvé záródást. A csoport két legismertebb tagja a Bcl-2 (az egész család névadója) és a Bcl-X_L. A pro- és antiapoptotikus multidomén fehérjék arányának eltolódása jelentősen változtathatja a sejt apoptóziskészségét. Jellemzően azonban akkor tudnak kellő számban kialakulni a Bak-Bax csatornák, ha a Bcl-2 és Bcl-X_L kötődését valamilyen fehérje gátolja.

Csak BH3 domént tartalmazó Bcl-2 fehérjék

A csak BH3 domént tartalmazó Bcl-2 fehérjék proapoptotikusak, mert a multidomén Bcl-2 fehérjék fent vázolt interakcióját a pórusképződés irányában befolyásolják. Ennek a csoportnak sok ismert tagja van, melyek közül külön említendő a Bad, a Bid, a Bim, a Noxa és a Puma. Aktív formáik a citoszol felől kapcsolódnak a multidomén Bcl-2 fehérjékhez, és vagy közvetlenül elősegítik a Bak-Bax oligomerizációt, vagy közvetett hatást fejtenek ki azáltal, hogy megakadályozzák a Bcl-2 és/vagy a Bcl-X_L beépülését a Bak és Bax alegységek közé. Végeredményben mindegyikük előmozdítja a mitokondriális membránpermeabilitás fokozódását *(III/5-9. ábra).*

A Bad foszforilálatlan formájában aktív (heterodimert képez a Bcl-X_L, és kisebb mértékben a Bcl-2 fehérjékkel), tehát állandóan (többszörösen) foszforilált állapotban kell tartani, hogy a sejt ne pusztuljon el. A Bad-ot foszforiláló enzimek közé tartozik a PKA, PKB (Akt), a Raf és az ERK. Ha kellő intenzitású túlélési (PKB és PKA), valamint mitogén (Raf és ERK) stimulus érkezik a sejthez, a foszforiláció révén inaktivált Bad 14-3-3 fehérjéhez kötődve szekvesztrálódik a citoszolban. Elég csak megszüntetni a túlélési jel forrásait (inzulin, növekedési faktorok, citokinek stb.) és a gátlás alól felszabaduló Bad hozzátapad a Bcl-X_L-hez, és beindítja az apoptózist. A növekedési faktorok hiányában bekövetkező sejtpusztulás leginkább ezzel a mechanizmussal magyarázható.

A Bid inaktív formában termelődik és van jelen a citoszolban. Aktivációja limitált proteolízissel történik: a polipeptid elhasítása hozza létre a valóban proapoptotikus csonkított Bid-et (tBid: „truncated Bid"). A mitokondrium membránjához áthelyeződő tBid elsősorban a Baxhoz kötődik és serkenti annak pórusképző oligo-



III/5-9. ábra
A Bcl-2 fehérjék működése

merizációját, így képes a mitokondriális apoptózis beindítására. Mivel a Bid hasítását különböző kaszpázok végzik, nyilvánvaló, hogy a tBid keletkezése a sejthalál folyamatának pozitív visszacsatolását, illetve különböző apoptotikus útvonalak (lásd lejjebb) összekapcsolását biztosítja. Akár a kaszpáz-8 (halálligand kötődésekor), akár kaszpáz-2 (PIDD-oszóma kialakulása p53-aktiválódáskor), vagy akár a kaszpáz-4 aktiválódása (ER-stesszben) a sejthalál eredeti kiváltó mechanizmusa, az előbb-utóbb bekövetkező Bid-hasítás a masszív mitokondriális útvonalat is bekapcsolja a folyamatba.

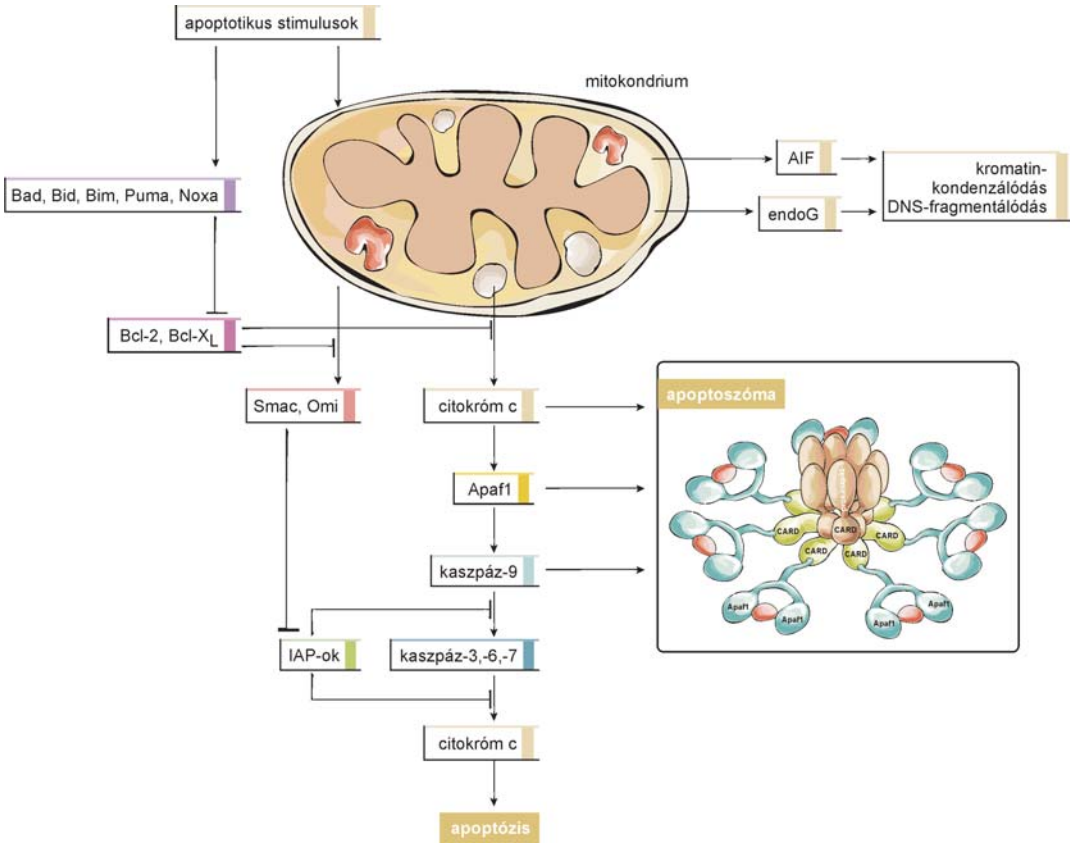
A Bid, a Noxa (hiba vagy büntetés latinul) és a Puma („p53-upregulated modulator of apoptosis") a p53 által szabályozott gének termékei közé tartoznak. Mennyiségük tehát akkor emelkedik meg a sejtben, amikor a p53 aktivitása fokozódik. A Puma és a Noxa – a Badhoz hasonlóan – kötődik az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjékhez és gátolja azok működését. Indukciójuk tehát egyike azon mechanizmusoknak, amelyek halmozott DNS-károsodások, a sejtciklus helyrehozhatatlan elakadása vagy túlságosan erős mitogén stimulus jelentkezése esetén fokozzák a sejt apoptóziskészségét, és akár el is vezethetnek a szervezet egésze szempontjából veszélyt jelentő sejt pusztulásához.

III/5.6. AZ APOPTÓZIS FŐ ÚTVONALAI

Hagyományosan megkülönböztetnek belülről fakadó („intrinsic") és külső késztetésre bekövetkező („extrinsic") apoptózist. Ez a felosztás – a szabályozási mechanizmusok többszörös egymásra hatása és átkereszteződése miatt – egyre kevésbé tartható. Az eredetileg „intrinsic" névvel illetett folyamat valójában szinte obligát velejárója bármilyen okból bekövetkező apoptózisnak, és célszerűbb mitokondriális útvonalnak nevezni. Az „extrinsic" apoptózis lényegét pedig jobban kifejezi, ha halálreceptorról kiinduló apoptózisnak hívjuk. A mitokondrium-, illetve halálreceptor-eredetű útvonalak mellett külön tárgyalandó a p53 közreműködésével beindított sejthalál.

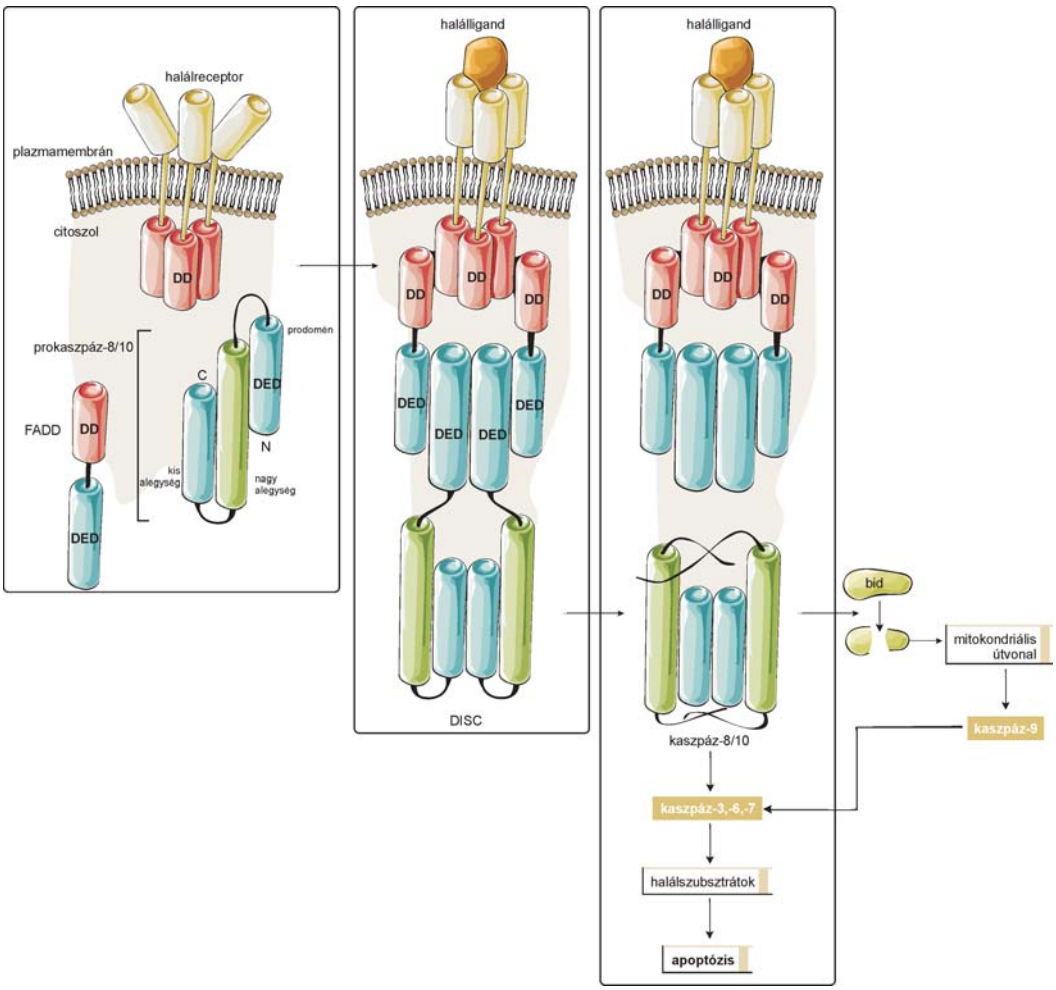
A mitokondriális apoptózis

A mitokondrium különleges szerepet tölt be az apoptózis szabályozásában. Membránközti terében olyan fehérjék találhatók (citokróm c, Omi, Smac/DIABLO, AIF, endonukleáz-G), amelyek kiszabadulásukkor különböző pontokon beindítják,



III/5-10. ábra
A mitokondriális apoptózis

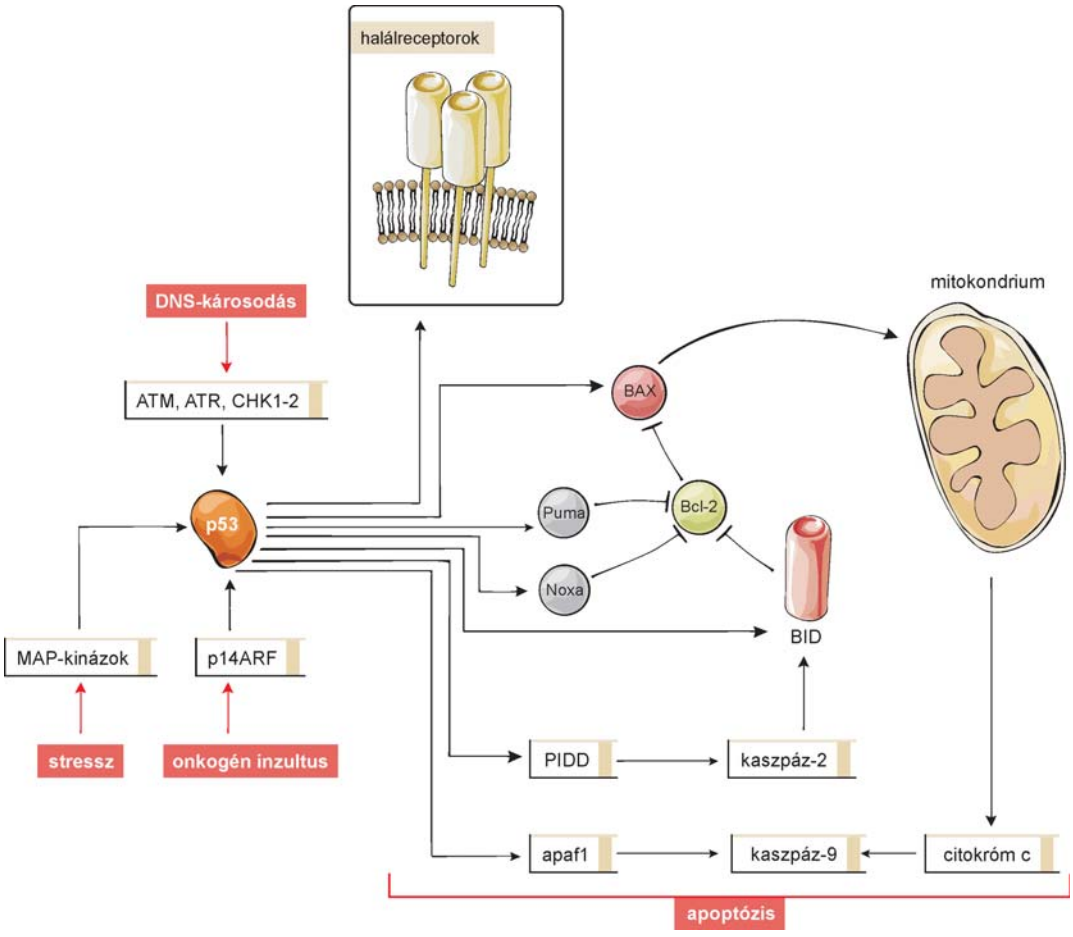
illetve előremozdítják a sejthalál folyamatát. A túlélési jel gyengülése vagy hiánya (foszforilálatlan Bad), a halálreceptor-eredetű útvonal aktiválódása (tBid) vagy a p53 transzkripciós faktor aktiválódása (indukált Bid, Puma és Noxa) egyaránt a Bak-Bax pórusok kialakulásának kedvez. A citoszolba kiáramló citokróm c (ennek alapfunkciója, hogy mobil elektronszállítóként ingázik a légzési lánc III. és IV. komplexe között; lásd az oxidatív foszforilációról szóló fejezetben) lehetővé teszi az apoptoszóma felépülését, amelyben kaszpáz-9 képződik. Ráadásul az Omi és a Smac/DIABLO gátolja, illetve le is bontja a kaszpázgátló IAP fehérjéket, ami szabad utat biztosít a kaszpáz-kaszkádnak. A kaszpáz-9 által aktivált kaszpáz-3, -6 és -7 a halálszubsztrátok hasításával végrehajtja a programot. A kaszpázaktivációk után kikerül a mitokondriumból az a két fehérje is, amelyek közvetlenül hozzájárulnak a sejtmagban végbemenő változásokhoz. Az AIF („apoptosis inducing factor") – nem teljesen tisztázott módon – a kromatinkondenzációt segíti, míg az endonukleáz G – nevének megfelelően – a DNS fragmentálódásában és a létraképződésben segít a CAD-nak *(III/5-10. ábra).*



III/5-11. ábra
A halálreceptorról kiinduló apoptózis

A halálreceptorról kiinduló apoptózis

Hibásan működő, malignusan transzformált vagy vírussal fertőzött sejtek felszínén szokatlan antigének jelenhetnek meg, és ez felkeltheti az immunsejtek figyelmét. A szervezet számára veszélyforrást jelentő sejtek likvidálására szakosodott sejtek (pl. citotoxikus T-sejtek) utasíthatják kiszemelt áldozataikat arra, hogy végezzenek magukkal. Ehhez sejtfelszíni halálligandjaikkal (TNF, FasL vagy TRAIL) közvetlenül kapcsolódnak a halálra ítélt sejt felszínén elhelyezkedő halálreceptorokhoz. Amennyiben a célsejt hajlandó együttműködni, a trimerizált receptor belső DD-in kialakuló DISC-ben aktivált kaszpáz-8 (és kaszpáz-10) beindítja a proteolitikus kaszkádot *(III/5-11. ábra)*. Vannak olyan sejtek, amelyekben ez önmagában nem elegendő, de mégis bekövetkezik a sejthalál, mert a Bid kaszpáz-8 általi hasításával keletkező tBid indukálja a mitokondriális apoptózist. Mivel az immunsejtek is tartalmaznak halálreceptorokat, bizonyos esetekben az ő pusztulásukat is okozhatja a



III/5-12. ábra
A p53-eredetű apoptózis

halálligandok kapcsolódása (pl. immunprivilegizált szövetek határán vagy a visszatámadó daganatszövetben).

A p53-eredetű apoptózis

A p53 transzkripciós faktor az egyik legismertebb tumorszupresszor fehérje. Mind mennyisége, mind transzaktivációs hatékonysága fokozódik, ha súlyos sérülések keletkeznek a kromatin állományban, ha a sejtosztódás folyamatát valamilyen fennakadás miatt nem lehet végrehajtani, ha a sejtet jelentős stressz éri, vagy gyanúsan erőteljes stimulusok próbálják proliferációra bírni. A p53 működése egyaránt köthető a sejtciklus és az apoptózis, valamint a DNS-hibajavítás kontrolljához. Szabályozásának mechanizmusait az eukarióta sejtciklus regulációjával foglalkozó fejezet tartalmazza, itt csupán az aktivált p53 apoptózist fokozó hatásait tekintjük át *(III/5-12. ábra).* A p53 eredetű apoptózis specifikus kiindulópontja a kaszpáz-2 aktiválódást kiváltó PIDD-oszóma, amelynek központi komponense, a PIDD, nevét is p53-függő expressziójáról kapta. E különálló mechanizmus mellett a p53 a halálreceptorról kiinduló és mitokondriális útvonalakat is gerjeszti. Indukálja a Fas és TRAILR2 fehérjéket, így érzékenyebbé („reszponzívabbá") teszi a sejtet a külső – rendszerint T-sejtektől származó – halálstimulusokra. Az „intrinsic" sejthalálban oly kitüntetett szerepet játszó proapoptotikus Bcl-2 fehérjék közül több (Bax, Noxa, Puma, Bid) is a p53-által indukált géntermékek közé tartozik. A Bax közvetlenül a mitokondriális membrán permeabilizálásáért felelős, a Noxa és a Puma pedig a Bcl-2 gátlásával segíti ezt elő. Ahhoz, hogy a Bid a Noxához és Pumához hasonló hatást fejtsen ki, előbb tBid-dé kell hasadnia, amiben a PIDD-oszóma eredetű kaszpáz-2 és a DISC-eredetű kaszpáz-8 egyaránt közreműködik. Ha a proapoptotikus Bcl-2 fehérjék együttműködése előidézi a citokróm c citoszolba áramlását, akkor kezdődhet az apoptoszóma kialakulása, amelyet a p53 az Apaf1 indukciójával is támogat. Összegezve tehát a p53-eredetű sejthalál magában foglalja az apoptózis összes fő mechanizmusát.

Egyéb apoptózisútvonalak

A programozott sejthalál alapvetően a fenti három fő csapásvonal mentén halad. Előfordul azonban, hogy ezekhez valamilyen mellékösvényen csatlakozik, melynek kiindulópontja nem pontosan a mitokondrium, a halálreceptorok vagy a p53 valamelyike. Az ilyen mellékútvonalak közül kiemelendő a sejtorganellumok, különösen az endoplazmás retikulum (ER), működési zavara által kiváltott apoptózis, amely számos betegség (pl. neurodegeneratív kórképek és 2-es típusú diabetes) patomechanizmusában játszik központi szerepet; illetve a granzim-B hatására bekövetkező apoptózis, amely sok esetben szükséges a három fő típus kiváltására.

ER-stressz eredetű apoptózis

Az ER komoly működési zavara lehet általános sejt-stressz része, de lehet maga a baj forrása is. Amikor az ER nem képes megfelelni a vele szemben támasztott követelményeknek, ER-stressz alakul ki, amely az egész sejt működését veszélyezteti. Ez az állapot bekövetkezhet pl. a szekréciós fehérjék túlfokozott termelődése, a lumen oxidáló kapacitásának csökkenése, a Ca^{2+}-homeosztázis zavara vagy mutáns (foldinghibás) fehérje szintézise miatt. Bármilyen okból alakul is ki, az ER-stressz

mindenképpen az éretlen fehérjék luminális felhalmozódásához vezet. Az ER-membrán stresszreceptorai ezt érzékelik, és beindítják az „unfolded protein response" (UPR) jelátviteli mechanizmusokat. Az UPR alapvető célja a terhelés-teljesítőképesség egyensúlyának helyreállítása, amit a fehérjeszintézis visszafogása és a fehérjeérlelési, illetve a selejtfehérje lebontási kapacitás egyidejű fokozása révén próbál elérni. Ha azonban a stressz a foganatosított intézkedések ellenére is fennmarad, a baj továbbterjedésének megakadályozása érdekében a sejt végez magával, vagyis az UPR fontos részét képezi az apoptóziskészség fokozása. Mivel az ER-stressz és az UPR részletes leírása más fejezetben található, itt csupán az apoptózist kiváltó komponenseiről teszünk említést.

A *CHOP* („C/EBP homologous protein") az UPR részeként indukálódó transzkripciós szabályozó fehérje, amely gátolja a BCL-2 és fokozza a BIM gén kifejeződését. Mivel a Bcl-2 a róla elnevezett fehérjecsalád egyik legfontosabb antiapoptotikus multidomén tagja, a Bim pedig a csak BH3 domént tartalmazó, proapoptotikus Bcl-2 fehérjék egyike, a CHOP által kiváltott génexpressziós változások az apoptózis irányába hatnak. Ráadásul az IRE1α nevű ER-stresszreceptor aktiválódása olyan fehérjeasszociációt eredményez, amelyben autoaktiválódik a *kaszpáz-12* (rágcsálókban), illetve a *kaszpáz-4* (emberben), vagyis közvetlenül beindul a kaszpáz-kaszkád. Az IRE1α-hoz kapcsolódó fehérjék a *JNK* aktiválódását is kiváltják, és az aktív JNK a p53 aktivációja révén szintén proapoptotikus hatású. Az ER-stressz által kiváltott apoptózisban az is közrejátszhat, hogy az ER-ből kiáramló Ca^{2+} stimulálja a citoplazma kalcium-aktivált cisztein-proteázait, a *kalpainok*at, amelyek prokaszpázokat is hasíthatnak, de akár nekrózis felé is terelhetik a végkifejletet.

Granzim-B hatására bekövetkező apoptózis

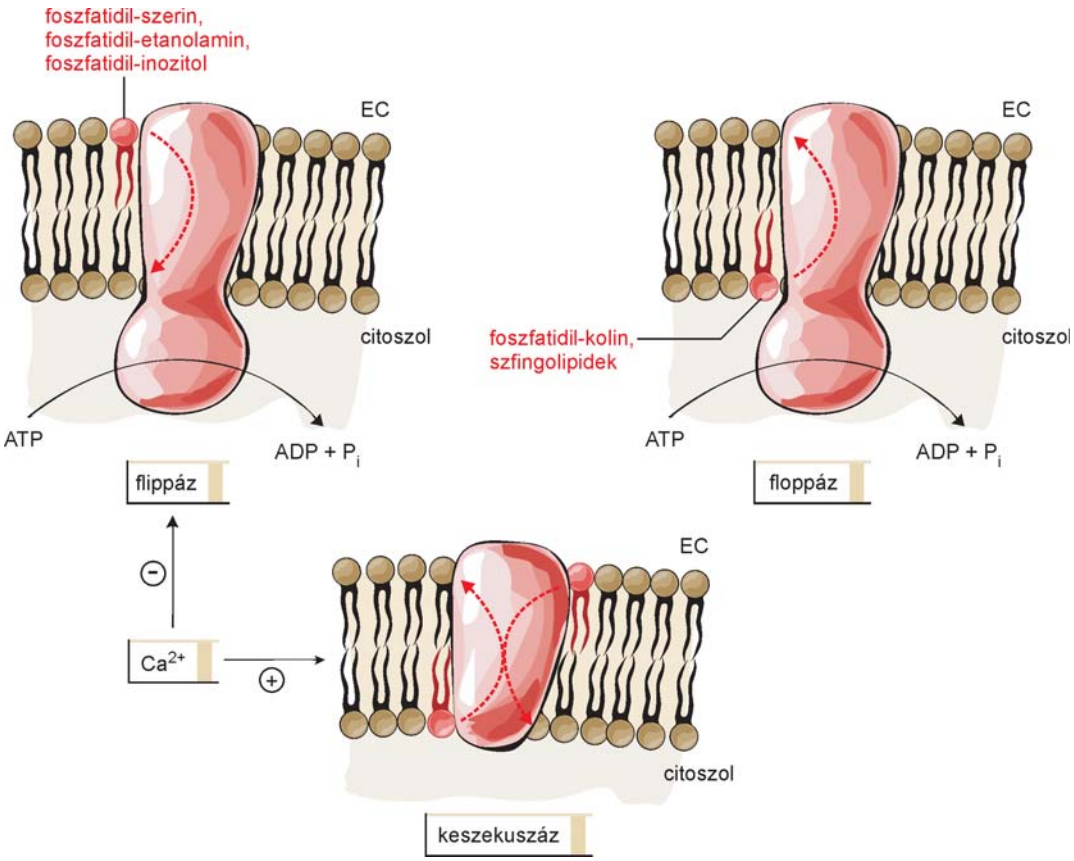
Az ölősejtek által, halálligand-halálreceptor kötődés útján öngyilkosságra felszólított sejtek nem mindig készségesek. A daganatsejtek például nem csupán abban térnek el a normális sejtektől, hogy a sejtciklusuk túlstimulált, hanem, többek között abban is, hogy vonakodnak végrehajtani az apoptózist és igyekeznek kivédeni az immunrendszer támadásait. A halálligandok hatékonyságát részben a célsejt halálreceptorainak alacsonyabb száma, részben csalétek („decoy") receptorok jelenléte csökkentheti. Ez utóbbiak megkötik ugyan a halálligandokat, de DD-jük hiányzik vagy sérült (némelyik a membránba sem ágyazódik be, hanem szekretálódik az extracelluláris térbe), így nem közvetítik a haláljelet, csupán vetélkednek a valódi halálreceptorokkal (kompetitív gátlók). A renitens sejtek nyomatékosabb meggyőzése érdekében a citotoxikus T-limfociták és a természetes ölősejtek (NK) – perforin fehérje közreműködésével – egy szerin-proteázt, a granzim-B-t képesek közvetlenül bejuttatni a halálra ítélt sejt citoplazmájába. Ez a lépés nem sok választási lehetőséget hagy az áldozatnak, ugyanis a granzim-B elhasítja és aktiválja a prokaszpáz-8-at és 3-at, valamint a Bid-et. De elé is vág a végrehajtó kaszpázoknak azzal, hogy közvetlenül hasítja helyettük/mellettük a halálszubsztrátokat is.

III/5.7. AZ APOPTOTIKUS TESTEK ELTAKARÍTÁSA

A bevezetőben már említésre került, hogy apoptózis után a maradványokat a szomszédok súlyosabb megzavarása nélkül gyorsan eltakarítják a fagocitáló sejtek. Az ilyen törmelék bekebelezése nem vált ki gyulladásos válaszreakciót – sőt, gyulladásgátló citokinek (pl. IL10 és TGFβ) szekrécióját serkenti. Ráadásul arra sarkallja az ölősejteket, hogy a nekrózist kiváltó ROS-fegyverzet helyett továbbra is a kí-

méletesebb, apoptózist indukáló FASL használatát részesítse előnyben. Mindezt az apoptotikus testek felszínének karakterisztikus megváltozása okozza. Az apoptózis részeként a sejt felszínéről eltűnnek a fagocita sejteket távol tartó „Ne egyél meg!" jelzések; ugyanakkor olyan jellegzetes fehérjék és lipidek jelennek meg, melyek opszonizáló hatásúak, vagyis „Egyél meg!" jelként szolgálnak, és módosítják a bekebelező sejt válaszreakcióját is. A sok opszonizáló jelzés közül – a molekuláris biológiai kutatásban elterjedt felhasználása és a vérlemezke-aktiválódásban is betöltött szerepe miatt – itt csupán a foszfatidil-szerin felmutatását részletezzük.

A sejtek plazmamembránjának két lipidrétege nem azonos összetételű. Bizonyos lipidek (pl. foszfatidil-kolin, szfingomielin, ceramidok, cerebrozidok és gangliozidok) a külső, míg mások (pl. foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-inozitol és foszfatidil-szerin) a belső rétegben dúsulnak. A nagyobb, vízoldékony molekularészletek nem képesek mérhető sebességgel átfordulni a membrán hidrofób magján keresztül az ellenkező oldalra. Mivel a glikolipidek ilyetén („flip-flop") mozgását katalizáló transzporter nincs, ezek kénytelenek abban a rétegben maradni, amelyben keletkeztek (az ER és a Golgi membránjában a lumen felé, következésképpen a plazmamembránban az extracelluláris tér felé tekintő rétegben). Igaz, hogy a többi membránlipid spontán flip-flop mozgását katalizáló „phospholipid scramblase" –



III/5-13. ábra
A foszfatidil-szerin felmutatásának alapja

nevezzük foszfolipid-keszekuszáznak – megtalálható a membránban, ami lehetővé tenné a részleges szimmetria gyors kialakulását, de ez csak megemelkedett citoplazmai Ca^{2+}-szint esetén működik. A nem-enzimatikus, lassú átfordulások ellensúlyozásával P-típusú transzport-ATPázok és ABC-transzporterek tartják fenn a rendet. A véletlenül befelé forduló foszfatidil-kolint és szfingolipideket floppázok, a véletlenül kifelé forduló foszfatidil-szerint, foszfatidil-etanolamint és foszfatidil-inozitolt pedig flippázok pumpálják vissza a helyükre. Ezen aktív transzporterek normál, alacsony citoplazmai Ca^{2+}-szint esetén működnek, és a Ca^{2+}-szint emelkedésekor gátlódnak *(III/5-13. ábra).* A citoszol kalciumkoncentrációjának tartós emelkedése az apoptózis részjelenségének tekinthető, és hátterében az ER, illetve a mitokondriális membránok permeabilitásának fokozódása áll. Apoptózis során tehát a foszfatidil-szerin mennyisége gyorsan kiegyenlítődik a plazmamembrán két rétegében, vagyis a sejt fagocitózisra serkentő jelzést ad a környezetének.

A foszfatidil-szerinben gazdag membránt részben közvetlenül, részben változatos hídképző fehérjéken keresztül kötik a fagocita sejtek egyes receptorai. A jelenség a korai stádiumú, apoptotikus sejtpusztulás kísérletes detektálására is módot ad. Az annexin-V nevű fehérje ugyanis kalciumfüggő módon kötődik a membrán foszfatidil-szerinjéhez, ezért megfelelő körülmények között az apoptotizáló sejtek fluoreszcensen jelölt annexin-V segítségével azonosíthatók.

III/6.
Az öregedés molekuláris biológiai alapjai

Sőti Csaba

Az élő szervezet alapvető életjelenségei az általa hordozott genetikai információ kifejezése (fejlődés-növekedés), megtartása (önfenntartás) és továbbörökítése (reprodukció). A prokarioták egyszerű életében az osztódást követő mintegy 30 perc alatt a baktériumsejt megfelelő méretre növekedik, majd osztódik, melyet az utódsejtek független élete – és egy újabb ciklus – követ. Az evolúció során az intenzív proliferáció, a sejtek együttmaradása és differenciálódása révén egyre komplexebb sejtközösségek, többsejtű élőlények fejlődtek ki. A többsejtű élőlények hosszabb élettartammal és kitágult életlehetőségekkel rendelkeznek. Az egészséges, önmaga fenntartására és reprodukciójára képes fiatal felnőtt egyed vitalitása és várható élettartama maximális. Hátterében robusztus alkalmazkodási képesség áll, melyet a szervezeti igények és a környezeti adottságok érzékelése, és összehangolt, a szervezet integritását megőrző válaszreakciók jellemeznek. Ennek megfelelően a magasabbrendű szöveti-szervezeti működés, pusztulás és megújulás a testméreteket és élettani határokat tiszteletben tartó egyensúlyban van.

Az *öregedés* az ivarérett kor elérése után a szervezet *funkcionális állapotában és alkalmazkodóképességében bekövetkező progresszív hanyatlás*, mely a *halandóság növekedésével és a reprodukciós készség csökkenésével* jár.

Az öregedés jelenségét évszázadokig természetesnek és egyetemesnek tartották, így nem is kutatták. Azonban az utóbbi évtizedekben modellorganizmusokon és emberi közösségeken valamint betegeken tett megfigyelések egyaránt bizonyítják, hogy az öregedési folyamat és az élettartam alakítható. A fentiek orvosi és biokémiai jelentőségét a járványszerűen terjedő ún. öregedés-asszociált civilizációs betegségek adják, melyek az iparosodott társadalmakban a halálozás 90%-áért felelősek. Ezek az elhízás, cukorbetegség, rák, szív-érrendszeri betegségek (hipertenzió, ateroszklerózis, szívinfarktus, agyvérzés), immunológiai problémák (autoimmunitás, gyulladásos betegségek, fertőzések), neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer- és Parkinson-kór), vázrendszeri betegségek (izomsorvadás, csontritkulás, artrózis). Mindezek betekintést engednek az öregedési folyamat változatos szövetspecifikus megjelenési formáiba. Állatkísérletekben az öregedést lassító beavatkozások szinte valamennyi öregedés-asszociált betegség kialakulását megelőzik vagy késleltetik. Ezért korunk egyik izgalmas kihívása az öregedési folyamat megértése és az egészséges élettartam kiterjesztése. A fejezet célja, hogy a fiatal és képlékeny területről egységes keretbe foglalt képet adjon.

III/6.1. AZ ÖREGEDÉS JELLEMZŐI

Az emlős szervezet megújuló és nem megújuló szövetekből valamint az általuk termelt sejtközötti állományból áll. A megújuló szövetek adult (felnőttkori) őssejtjei a szervezet szükségleteinek megfelelően folyamatosan osztódva és differenciálódva pótolják a hámszövetek, a kötőszövetek és a vér nagy igénybevételnek kitett, el-

használódott sejtjeit. A nem megújuló szövetek (pl. agy, szív, máj) sejtjei az embrionális differenciálódást követően akár a teljes élettartam során G_0 fázisban vannak, és szerény regeneratív kapacitást mutatnak, ezért posztmitotikus sejteknek is nevezik őket. A megújuló szövetek öregedése során a sejtek elvesztik osztódási képességüket és szeneszcens (elöregedett) sejtekké alakulnak. A jelenséget *celluláris szeneszcenciának* (sejtöregedésnek) nevezzük,. A szeneszcens sejtek és az elöregedett posztmitotikus sejtek hasonló jellgzetes változásokat mutatnak *(III/6-1. táblázat)*. Az idős sejtek által szecernált szolubilis faktorok (szeneszcencia-asszociált szekréciós fenotípus, SASP) mélyrehatóan befolyásolják a környező sejteket (lásd később). A sejtközötti állomány az intracelluláris makromolekulákhoz hasonló elváltozásokat mutat, a rugalmas elemek és a parenchímasejtek csökkenését fibrózis kíséri. Összefoglalva, az elöregedett molekulák, sejtek, szövetek és szervezet szintjén egyaránt módosult szerkezet, csökkent rugalmasság és nagyobb sebezhetőség figyelhető meg.

III/6-1. táblázat **Az elöregedett sejtek jellemzői**
Morfológiai jellemzők
Nagyobb sejtméret, kisebb mag/plazma arány
Zegzugos sejthatárok
Vakuólumok, zárványok, lipofuszcin feldúsulása
Dezorganizált alapállomány
Aberrált szerkezetű és feltöredezett mitokondriumok
Molekuláris jellemzők
Módosult hibás szerkezetű makromolekulák felhalmozódása
DNS: sejtmagi és mitokondriális mutációk, telomer rövidülés/károsodás, Heterokromatin feldúsulás
Lipidek: módosult zsírsavak, membránfluiditás változások
Fehérjék: módosult, megváltozott működésű, keresztkötött fehérjék, aggregátumok
Génexpressziós és fehérje készlet változások
Szekréció: szeneszcencia-asszociált szekréciós fenotípus (SASP)
Funkcionális jellemzők
Rezisztencia növekedési jelekre és apoptózisra
Csökkent válasz, fokozott érzékenység stresszre (oxidatív, hő, toxin stb.)
Mitokondriális diszfunkció, erjesztés (glikolízis)
Transzportfolyamatok változásai

III/6.2. AZ ÖREGEDÉS OKA ÉS MECHANIZMUSAI

Az élő szervezet nyílt rendszer, fenntartása optimális energia befektetéssel és a komponensek karbantartásával megoldható lenne: az öregedés tehát nem szükségszerű. Erre az elhanyagolható mértékben (vörös tengeri sün ~200 év, izlandi

kagyló ~400 év) vagy egyáltalán nem öregedő (hidra) fajok adnak példát. Akkor vajon miért jött létre az öregedés? Az evolúciós elméletek szerint a természetes szelekció a létformák (genetikai információ) fenntartása és elterjedése során hat, ezért evolúciós előny a fiatalkori életképesség és termékenység. Az utódlást követően természetes körülmények között a legtöbb egyed elpusztul, így az életkor előrehaladtával gyengül a génekre ható szelekciós nyomás. Ezért *(1)* az öregkorban káros hatást kifejtő génvariánsok nem szóródnak ki *(mutáció-akkumuláció elmélet)*, illetve *(2)* a fiatalkorban segítő, azonban időskorban káros hatást kifejtő gének előnyben részesülnek *(antagonisztikus pleiotrópia elmélete)*. Utóbbira példa az erőteljesebb immunműködés és növekedési hormon/inzulintermelés képessége, mely fiatalkorban hatékonyabb védettséget és nagyobb testet biztosít, időskorban azonban megfelelő körülmények között gyulladásokhoz és cukorbetegséghez vezethet. Fentiek alapján az öregedés kifejlődése a komplexitás, alkalmazkodás és utódlás mellékhatása/ára.

A mechanisztikus elméletek az öregedési folyamat okát és mechanizmusát próbálják megválaszolni. Számos elmélet a környezeti stressz hatására felhalmozódó hibákat, így a szomatikus és mitokondriális mutációs teória a DNS meghibásodásait, a szabadgyökelmélet az oxidatív stresszt, a hibakatasztrófa elmélet a transzláció hibarátáját, a molekuláris károsodás elmélet pedig mindenféle károsodást okozó tényezőt (toxinokat, xenobiotikus és oxidatív ágenseket) jelöl meg az öregedés közvetlen okaként. A hálózatelmélet szerint pedig a halózat dezintegrálódása és flexibilitásának csökkenése okozza az öregedést.

Az evolúciós miértet és mechanizmust integráló *eldobható test* (disposable soma) *elmélet* szerint a stressz és károsodások ellen védelmet adó hibajavító (önfenntartó) folyamatok megtartása az ivarérett kor után már nem jelent előnyt, így a hibák kaotikus felhalmozódása vezet öregedéshez. Ezt támogatja, hogy szinte az összes hibajavító (antioxidatív, fehérje homeosztatikus, xenobiotikus) stresszválasz válaszkészsége hanyatlik, és ezek aktivációja csökkenti a hibák keletkezését és meghosszabbítja az élettartamot.

A legújabb megfigyelések szerint azonban az öregedés nem egyértelműen a hibák következménye (pl. az igen energikus őssejtek és daganatsejtek egyaránt hemzsegnek a hibáktól, illetve számos, hibát okozó génvariáns pedig megnöveli az élettartamot). Ez felveti, hogy a hibák és az öregedés egyazon diszfunkció velejárói. Az erre alapozott *hiperfunkciós teória* feltételezi, hogy az intenzív növekedési-fejlődési folyamatok és szignálok ivarérett kor utáni fennmaradása hipertrófiához és öregedés-asszociált patológiához és károsodáshoz vezet. Hiperfunkció figyelhető meg pl. daganatokban, elhízásban, a hipertenzióban, ateroszklerózisban, gyulladásban, illetve az oszteoporózisban (oszteoklaszt aktiváció). Az öregedési atrófia eszerint a hiperfunkció következményeként illetve kompenzációjaként kialakuló sorvadás. Ugyan az eldobható test az önfenntartás hanyatlására, a hiperfunkciós teória a fenntartott biológiai növekedési szignálokra helyezi a hangsúlyt, mindkét elmélet egyetért abban, hogy az öregedés nem közvetlenül programozott, hanem multifaktoriális: az egyedi élettartamot a genetikai háttér és a környezeti tényezők kölcsönhatása határozza meg.

III/6.3. CELLULÁRIS SZENESZCENCIA

A *celluláris szeneszcencia* a megújuló kompartment osztódó sejtjeit és az adult őssejteket érinti. Meghatározói a G_1 *fázisban történő irreverzíbilis sejtciklus leállás*on túl a *növekedési faktorok*ra és *apoptózisra mutatott rezisztencia,* valamint jellemző *génexpressziós és szekréciós változások*. A celluláris szeneszcencia a genetikai in-

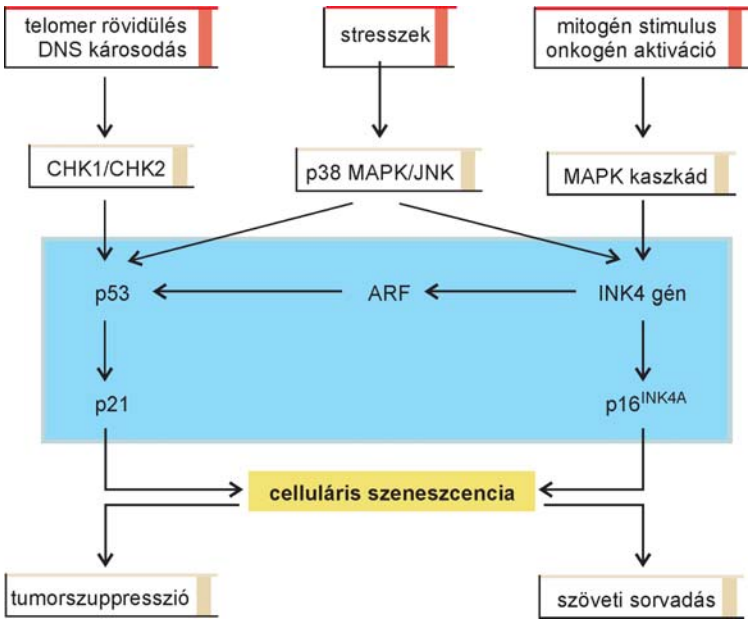
formáció és a sejtműködés integritásának megőrzését és a malignus transzformáció megelőzését szolgáló mechanizmus, mely fontos szerepet játszik a megújuló szövetek öregedésében. Kifejlődéséhez vezet: (1) telomer-függő és (2) telomer-független DNS károsodás és kromatinszerkezeti változások, (3) túl intenzív növekedési stimulus vagy antiproliferatív jel illetve (4) túlzott stressz. A hatásokat főként a p53-p21 és a p16INK4a-pRb tumor szupresszor tengely közvetíti.

Telomer régió és replikatív szeneszcencia

A humán telomer régió kb. 15-20 kilobázis hosszú, ismétlődő, nem-kódoló TTAGGG oligonukleotid szekvencia. A telomer DNS visszahajló hajtűt formál, melyhez egy shelterin nevű, hat fehérjéből felépülő komplex kötődik. A telomer nukleotidláncát a telomeráz nevű enzim a saját RNS templátját felhasználva képes meghosszabbítani. Telomeráz enzim fejeződik ki a nagy megújulási kapacitással rendelkező embrionális és adult őssejtekben, valamint a daganatsejtekben. A telomer-telomeráz rendszer funkciói a genom integritásának védelme és a mitotikus óra működése és visszaállítása.

A kritikus telomer rövidülés a telomerkötő fehérjék leválásával elindítja a genotoxikus stresszválaszt (DNA damage response), mely az ATR/CHK1 és ATM/CHK2 aktivációjával a p53-p21 útvonalon a sejt osztódásának leállásához vezet *(III/6-1. ábra).* A pontos molekuláris mechanizmusokat illetően utalok a megfelelő fejezetekre. A telomeráz génkiütött egér fokozott, transzgenerációsan egyre súlyosbodó telomer rövidülést, gyorsult öregedést, és a genetikai instabilitás ellenére csökkent malignitást mutat. A p53 kikapcsolása elősegíti a szöveti regenerációt, azonban drasztikusan emeli a daganatos elfajulások számát.

Telomer-független szeneszcencia. Megtartott telomerhossz mellett az egyéb genotoxikus ágensek (ionizáló és UV), kromatinszerkezeti változások is aktiválják a



III/6-1. ábra

A celluláris szeneszcencia okai, mechanizmusa és következményei. A hatást a fő tumorszuppresszorok közvetítik

genotoxikus stresszválaszt. A túl intenzív vagy fenntartott növekedési stimulusok, az onkogének aktivációja vagy fenntartott extracelluláris mitogén jelek a $p14^{ARF}$/$p16^{INK4a}$ gént aktiválja. Differenciációt fokozó tényezők, pl. a transzformáló növekedési faktor béta (TGFβ) a $p16^{INK4a}$, p21 és p27 expresszió révén, illetve a nyomás, feszülés, szabadgyökök, hiperglikémia, citotoxikus ágensek által kiváltott túlzott stresszek a stresszaktivált p38MAPK (és JNK valamint FOXO) útvonalon keresztül szintén szeneszcenciát okoznak *(III/6-1. ábra)*. A szeneszcencia a p53 vagy a $p16^{INK4a}$ túltermelésével is kiváltható, mely a növekedési faktorokra mutatott érzéketlenséget is megmagyarázza. A szeneszcencia irreverzibilitásáért és az apoptózis gátlásáért a p16INK4a fenntartott expressziója felelős. A génexpressziós változásokat az összes résztvevő molekula (genotoxikus stresszválasz mediátorok, p53, p38MAPK) hozza létre.

Szeneszcencia-asszociált szekréciós fenotípus (SASP)

A szeneszcens sejtek által szecernált mintegy 40-80 szolubilis faktor összefoglaló neve. A molekulák között *autokrin*, a szeneszcens fenotípust fenntartó molekulák (IGF-kötő fehérjék) mellett *parakrin kemokinek* (pl. az egyik fő proinflammatorikus citokin IL6) és *növekedési faktorok* (GM-CSF), valamint a *szöveti átépülést katalizáló fehérjék* (mátrix metalloproteázok, plazminogén) találhatók. A parakrin hírvivők átmeneti emelkedése fiatal szervezetben az immunrendszer kemotaxisát és aktivációját, a szeneszcens sejtek eliminációját és a szöveti őssejtek proliferációját, a regenerációt segíti. Azonban idősebb korban a nagyszámú szeneszcens sejt a hatékony immunrendszer és őssejtek hiányában fenntartja a szekréciót, ezzel kötőszöveti átépülést, fibrózist és krónikus gyulladást okoz. A növekedési faktorok mitogén stimulusa a szomszédos sejtek transzformációjához vagy szeneszcenciájához járul hozzá *(III/6-2. táblázat)*. Valóban, a szeneszcens sejtek eltávolítása egerekben csökkenti az öregedés-asszociált betegségek megjelenését. Az SASP létrejöttéhez a p38MAPK jelpálya és az NFκB transzkripciós faktor szükséges, a tumor szuppresszorok nem, ami felveti előbbiek szelektív gátlásának terápiás lehetőségét.

III/6-2. táblázat
Az SASP hatásai fiatal és idős szervezetben

SASP faktorok	Fiatal szervezet	Idős szervezet
Növekedési faktorok	szöveti regeneráció	tumor promóció, szeneszcencia aberráns őssejt proliferáció
Kemokinek	szeneszcens sejt eltakarítás tumorsejt elimináció	krónikus gyulladás, tumorsejt szeneszcencia gátlás
Kötőszöveti modulátorok	remodelálás	fibrózis, tumor infiltráció/invázió

III/6.4. A TÁPANYAG ELLÁTOTTSÁG HATÁSA AZ ÖREGEDÉSRE

Kalóriacsökkentés

A tápanyag ellátás kulcsszerepe jól ismert a fejlődésben és növekedésben, és az is ismert, hogy az elhízás olyan öregedés-asszociált betegség, mely számos további

betegség alapját képezi. *A kalóriabevitel mintegy 30-40%-os csökkentése a minőségi tápláltság megtartása mellett az élesztőtől az emlősökig egyaránt 30–40%-os élettartamnövekedéshez, stressztűréshez és az életkor-asszociált betegségek jelentős csökkenéséhez vezet.* A kalóriacsökkentés a ma ismert leghatékonyabb, általánosan működő élettartamnövelő környezeti beavatkozás. Legfontosabb hatásait a *III/6-3. táblázatban* foglaltam össze. Vajon milyen, az evolúció során megtartott biológiai mechanizmus képes ilyen koordinált és szerteágazó hatásokat kiváltani?

III/6-3. táblázat
A kalóriacsökkentés főbb hatásai

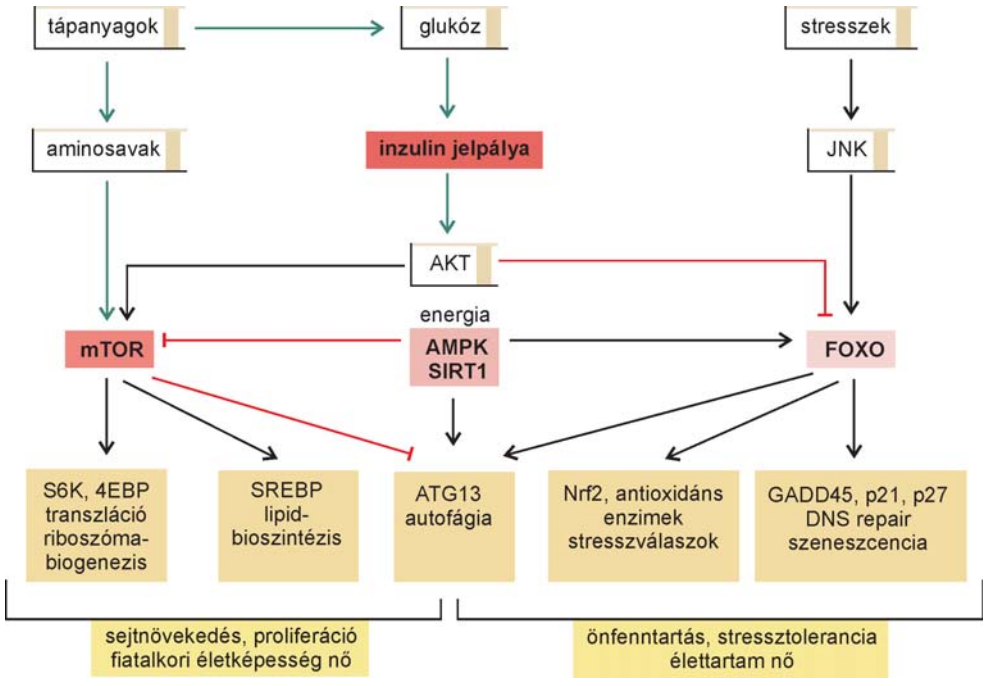
Jelenség	Hatás
Általános	kisebb testméret és zsírmennyiség csökkent, de a kor során megtartott izommennyiség alacsonyabb testhőmérséklet nagyobb fizikai aktivitás növekedett stressz-tolerancia csökkent termékenység
Anyagcsere	csökkent vércukor-, vérzsír-, inzulin- (IGF-1) szintek javult inzulin érzékenység csökkent szabadgyöktermelés és oxidatív károsodás
Szív-érrendszer	csökkent vérnyomás és ateroszklerózis
Idegrendszer	megtartott neuronális plaszticitás és memória
Immunrendszer	javuló hatékony immunitás csökkent gyulladás
Betegségek előfordulása	jelentősen csökkent: diabétesz, kardiovaszkuláris, neurodegeneratív, immun- és daganatos betegségek

A tápanyag-érzékelő jelpályák

A szervezet tápanyag-ellátottságát és a kalória csökkentés hatását *két, egymással szoros kölcsönhatásban működő mechanizmus* érzékeli és közvetíti: *az intracelluláris mTOR és az endokrin inzulin/IGF-1 jelpálya*. A citoszolikus mTOR kináz komplex aktiválódásához két egyidejű szignál szükséges: a sejt által felvett aminosavak (és foszfatidsav, azaz építőkövek) allosztérikus, és növekedési stimulusok (inzulin, növekedési faktorok) foszforiláció általi hatása. Az alacsony energiatöltöttség (magas AMP/ATP arány) az AMP-függő fehérje-kináz általi foszforiláció, illetve (magas NAD^+/NADH arány) a SIRT1 szirtuin NAD^+-függő deacetiláz általi deacetiláció révén gátolja az mTOR komplexet. Az aktív mTOR komplex által foszforilált szabályozó fehérjék serkentik a transzlációt és a riboszóma-biogenezist (eiF4E binding protein: 4E-BP, riboszomális S6-kináz: S6K), a lipid-bioszintézist (szterol válaszelem-kötő fehérje: SREBP), és gátolják a fő lebontó folyamatot, az autofágiát (autofágia protein-13: ATG13). Az Akt mTOR általi foszforilációja és aktivációja – amely kritikus az inzulin hatása szempontjából – visszajelzi az inzulin jelpályának, hogy a sejt képes a növekedésre. A celluláris fehérjemassza szabályozása révén az mTOR aktivitása alapvetően határozza meg a sejtméretet és -proliferációt (emlékeztetőül: a megfelelő sejtméret elengedhetetlen a sejtciklus progressziójához). Ezen túl az S6K erőteljesebb aktivációja az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1)

foszforilációja réven annak inaktivációjához és degradációjához, az Akt tömeges foszforilációja pedig annak fenntartott aktivációjához vezet. Ezáltal a sejt magát védve elszakad a külső inzulin stimulustól, ami viszont szöveti-szervezeti szinten inzulinrezisztenciához vezet.

Az *inzulin/IGF-1 jelpálya* központi szerepet játszik a tápanyag raktározás, anabolizmus és a testméret szervezeti szintű endokrin regulációjában. Számos centrális regulátor közül kiemelendő a hipofízis növekedési hormonja (GH), mely az inzulin és IGF-1 termelését egyaránt serkenti. Az inzulinreceptor aktiválja a Raf/MEK/MAPK és az PI3K/PDK1/Akt útvonalakat. A MAP-kináz és Akt az akut anyagcserehatások túl foszforilációval aktiválja az mTOR komplexet, ami a sejt növekedését segíti. Az inzulinszignál és az mTOR egyaránt elengedhetetlen a zsírsejtek differenciációjához (hiperplázia) és méretbeli növekedéséhez (hipertrófia). Az Akt ugyancsak foszforilálja a FOXO (Forkhead box O) transzkripciós faktort, amely így a 14-3-3 fehérjéhez dokkolva inaktív állapotban a citoplazmában marad, ubikvitinilálódik és lebomlik a proteaszómában. Az inzulin jelpálya csökkent aktivitása mellett a FOXO stabilizációjához, sejtmagba vándorlásához és aktivációjához vezet az energiahiány (AMPK-közvetítette foszforiláció, SIRT1-katalizálta deacetiláció) és különféle stresszek (JNK). A FOXO többszáz, a stresszhez történő alkalmazkodást, a genetikai információ megőrzését és a szervezet önfenntartását segítő gén transzkripcióját fokozza. Továbbá, a megújuló szövetekben a FOXO gátolja a ciklin-D, illetve aktiválja a GADD45, p21 és p27 expresszióját, ezzel a p53-mal együttműködésben hozzájárul a sejtciklus leállás, DNS hibajavítás és celluláris szeneszcencia triádjához, így a genetikai információ védelméhez (*III/6-2. ábra*).



III/6-2. ábra

A tápanyag-érzékelő jelpályák szerveződése és kapcsolatai. Ugyan az ábra ellentétes és szélsőséges állapotokat sejtet, a valóságban az önfenntartás és növekedés kölcsönösen összefonódik

A tápanyag-érzékelő mechanizmusok öregedésben játszott szerepét igazoló eredmények szerint az mTOR funkcióvesztő mutációja megnöveli az élettartamot, mely funkcionáló autofágiát igényel. Az mTOR gátlásával együtt alkalmazott kalória csökkentés nem növeli tovább az élethosszt, illetve a fehérjék illetve bizonyos aminosavak bevitelének megszorításával szintén élettartam növekedés érhető el egerekben. Biztató, hogy az mTOR rapamicinnel történő gátlása nemcsak fiatal, de középkorú egerekben is jelentős élettartamnövekedést okoz.

A telomeráz mellett a FOXO-t teszik felelőssé a hidra és az embrionális őssejtek halhatatlanságáért. A „százévesek" (száz évet megért emberek) robusztus FOXO aktivitással rendelkeznek. Az egér inzulinreceptor zsírszövetben történő kiütése szintén 14%-kal növeli az élethosszt. A jelenleg antidiabetikumként alkalmazott, de daganatgátló hatású metformin és a fizikai aktivitás részben az AMP-függő kináz közvetítésével fejt ki pozitív hatásokat.

Mindezek alapján a tápanyag ellátottság az inzulin és az mTOR (illetve feltehetően egyéb mechanizmusok) révén elősegíti az intenzív fiatalkori növekedést és fejlődést, azonban az ivarérett kor utáni túlzott aktivitása (pl. túltáplálkozás) fokozza az öregedést (innen a hiperfunkciós teória másik neve, „dagadt, felfújt" test – bloated soma). A kalória csökkentés aktiválja az önfenntartó stresszválaszokat, és visszafogja a szervezet szükségleteivel nem koordinált növekedést. Ezért a kalóriacsökkentés mimetikus és egyéb „öregedésgátló" gyógyszerek fejlesztése ígéretes lehetőség az öregedés-asszociált betegségek megelőzésére és kezelésére. Talán a fejezet ismeretei a tudatos, egészséges életmód kialalkításához is motivációt adnak.

III/7.
Az extracelluláris mátrix

Csermely Péter

Az extracelluláris mátrix a sejteket körülvevő, a sejteket szöveti struktúrákba szervező makromolekulák térhálót képező összessége. Az extracelluláris mátrix molekuláris felépítésének megismerése nemcsak azért fontos, mert így érthetjük meg az emberi test felépítésének molekuláris alapjait, hanem azért is, mert a sejtek mozgása és kommunikációja elképzelhetetlen az extracelluláris mátrix közvetítése nélkül. A fejezetben tárgyalni fogjuk azon betegségek molekuláris okait is, amelyek az extracelluláris mátrix néhány kiemelten fontos alkotó elemének, így pl. a kollagénnek, illetve a kollagén szintézisének zavaraival függenek össze. Kitérünk az extracelluláris mátrix szerepére a jelátviteli folyamatokban és a rákos metasztázisokban.

III/7.1. A KOLLAGÉN, AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX FŐ ALKOTÓELEME

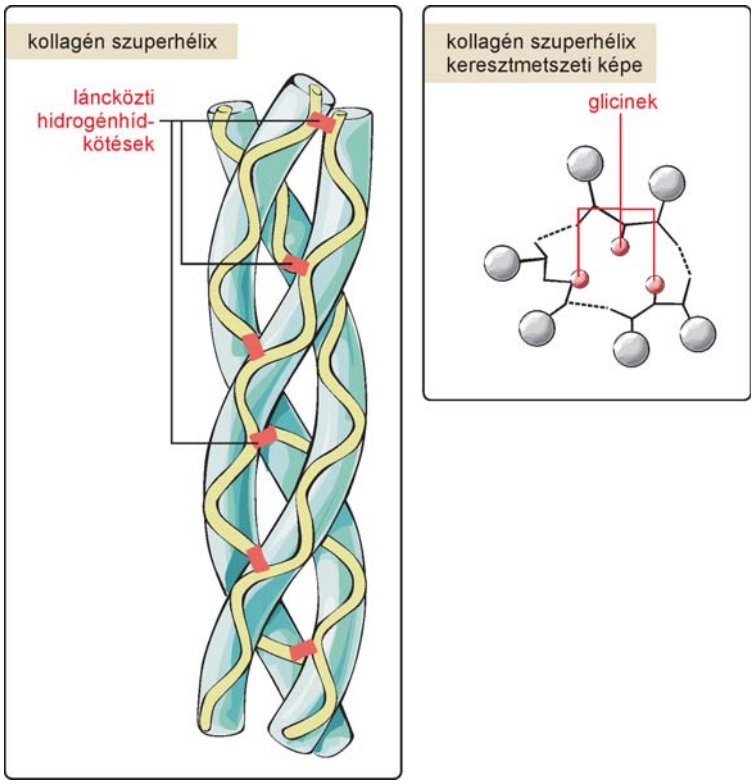
Az extracelluláris mátrix fehérjéinek többsége nem globuláris, hanem fibrózus fehérje. A fibrózus fehérjék hosszúkás alakú, vízben rosszul oldódó, és összetapadással rostokat képző fehérjék. A fibrózus fehérjék egyik fontos példája a *kollagén*, amely a kötőszövet fő alkotó eleme. Az emberi test összes fehérjéjének negyede kollagén. A kollagén a fehérjeszerkezetekhez képest igen nagy szakítószilárdsággal rendelkezik. Egy 1 mm átmérőjű kollagénrost 10 kilogrammnál nagyobb súlyt is képes megtartani. A denaturált kollagén a zselatin.

A kollagénnek számos típusát ismerjük. Ezek közül az I-es típusú kollagén széles rostokat képez, és leginkább az inak, a csontok és a bőr alkotóeleme. A II-es típusú kollagén keskeny rostokat formál, keresztkötésekkel rendelkezik, leginkább a porcban és az üvegtestben fordul elő. A III-as típusú kollagén rugalmasabb szerkezetű, mint a többi kollagén-típus, ezért az érfalak és a bőr alkotóeleme. Végezetül a IV-es típusú kollagén térhálós szerkezettel bír, és ezért a bazális membránok térelválasztó funkcióját segíti elő (pl. a placentában is).

A leggyakrabban előforduló I-es típusú *kollagén* (a továbbiakban: kollagén) *primer szerkezete* kb. 35% glicint, 20% prolint és hidroxiprolint, valamint 10% alanint tartalmaz. Ez a három aminosav (a hidroxiprolin a prolinból keletkezik poszttranszlációs módosítással) együttesen tehát a kollagén aminosavainak kétharmadát adja ki. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a kollagén szerkezetének jelentős részét Gly-X-Y aminosav triádok adják, ahol az X és Y aminosav igen gyakran prolin, hidroxiprolin vagy alanin.

A kollagén másodlagos szerkezetére egy speciális hélix, a kollagén-hélix a jellemző. A prolin aminosavak merevsége miatt a kollagén-hélixet alkotó fehérjelánc sokkal nyújtottabb helikális struktúrát képez, mint a fehérjék fejezetben ismertetett α-hélix fehérjelánca. A kollagén fehérjeláncok helikális szerkezetének menetemelkedése kb. kétszer akkora, mint az α-hélixeké. Ez a lazább szerkezet már nem tud az

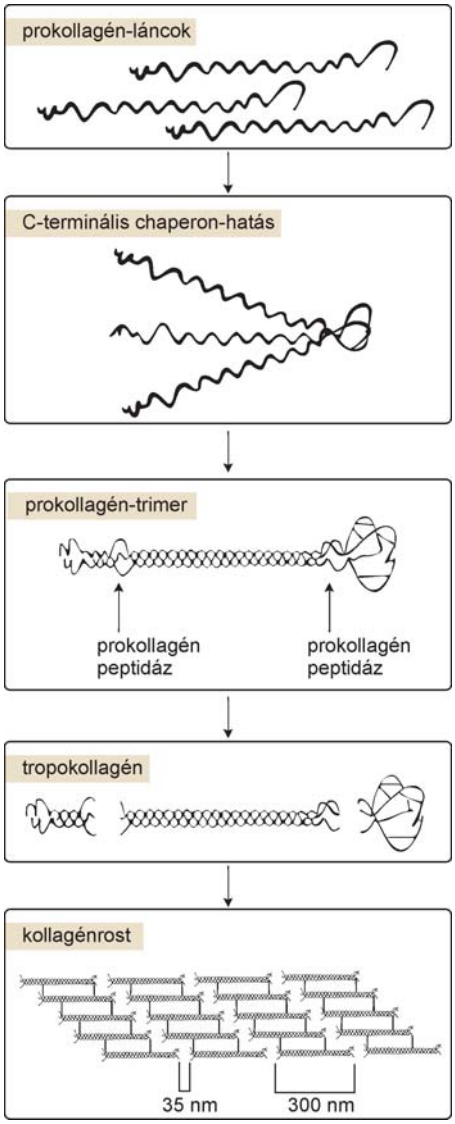
egyes menetek közötti hidrogén-híd kötésekkel stabilizálódni, mint az α-hélixek. Így a három helikális fehérjelánc egy jobbmenetes szuperhélixben egybefonódik *(III/7-1. ábra),* és lánc közötti hidrogénhíd-kötésekkel stabilizálja magát. A kollagén szuperhélix esetén nem minden aminosav-oldallánc nyúlik ki a helikális struktúrából külső irányba, mint az α-hélixek esetén, hanem minden harmadik aminosav „befelé", a három fehérjelánc által határolt térbe mutat (III/7-1. ábra). A kollagén szuperhélix belső tere azonban kicsi. Ez magyarázza azt, hogy miért van szükség minden harmadik aminosav-pozícióban glicinre, hiszen a glicin-oldallánca (egyetlen hidrogénatom) a létező legkisebb helyet foglalja el.



III/7-1. ábra
A kollagén szuperhélix szerkezete

A *kollagén szintézise* során először *prokollagén* keletkezik *(III/7-2. ábra).* A prokollagén a kollagén hélixet tartalmazó központi rész mellett két feji régiót is tartalmaz, amelynek felépítésében a kollagén hélixet alkotó három fehérjelánc N- és a C-terminálisai vesznek részt. A feji régiókat diszulfid-hidak stabilizálják. A feji régióknak a prokollagén-peptidáz enzimek által történő proteolitikus hasításával a prokollagénből a kb. 1000 aminosavat tartalmazó *tropokollagén* keletkezik. A C-terminális feji régió azért is szükséges, hogy intra-molekuláris chaperonként irányítsa, és segítse a tropokollagént alkotó három fehérjelánc kollagén hélixbe való rendeződését.

A *kollagénrost*ban a tropokollagén molekulák hosszanti irányban rendezetten, egymás mellett helyezkednek el. Fontos megfigyelni azt, hogy a 300 nm hosszú tropokollagén molekulák között 35 nm-nyi „lyuk" helyezkedik el. (A kollagénrost szilárdságát az egyes tropokollagén molekulák egymáshoz képest 68 nm-rel elcsúsztatott helyzete segíti, ami az egyes tropokollagén molekuláknak a 35 nm-es „lyuk" mellett még 33 nm-nyi áfedést is biztosít, lásd *III/7-2. ábra*.) A tropokollagén molekulák közötti 35 nm-es „lyukat" a különböző szövetekben más-más anyagok töltik ki. A csontokban a kitöltő anyag kalcium-foszfát (hidroxi-apatit), amely a kollagénrostnak szilárdságot kölcsönöz. A bőrben és az inakban a tropokollagén molekulák közötti helyet poliszacharidok töltik ki, amelyek a kollagénrost rugalmasságát biztosítják.

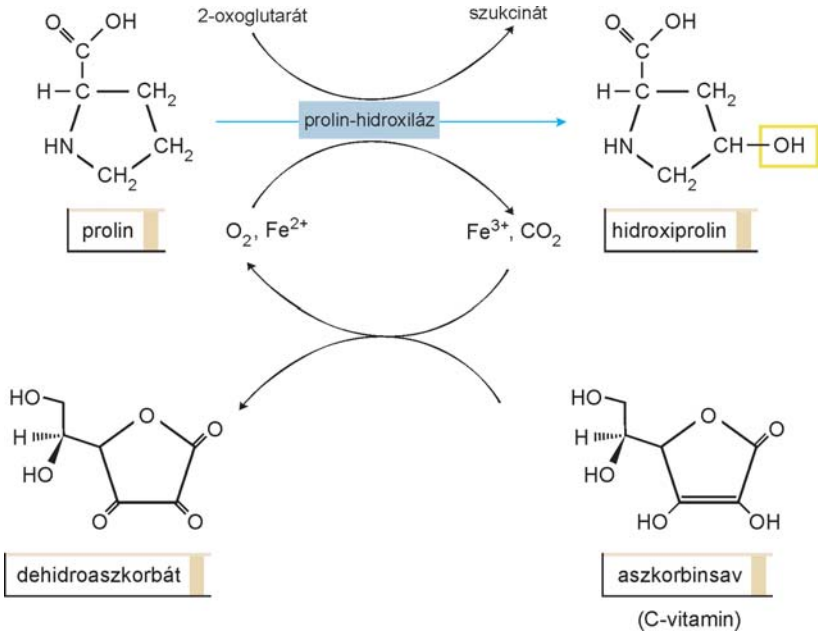


III/7-2. ábra
A kollagén szintézisének fő lépései, a kollagénrost szerkezete

A *kollagén hidroxilezése* a már említett prolin és/illetve lizin aminosav oldalláncokon történhet meg. A hidroxilezett lizin oldalláncokhoz oligoszacharidok kapcsolódhatnak hidrofil doméneket képezve a kollagén szuperhélix felszínén és így elősegítik a tropokollagén molekulák egymáshoz rendeződését. A hidroxi-prolin pedig a kollagén szuper-hélixet stabilizáló hidrogén hidak kialakulásáért felelős. A hidroxilezési reakció kofaktora a C-vitamin *(III/7-3. ábra)*. Ez magyarázza a C-vitamin-hiány, a skorbut egyik alapvető jelenségét, a kötőszövet ellenálló képességének elvesztését és fokozott törékenységét (bevérzéseket a bőrben, a fogak elvesztését stb.). A kollagén hidroxiprolin tartalma az adott faj testhőmérsékletének függvénye. A hidroxi-prolin-tartalom az evolúció során úgy alakult ki, hogy az adott hidroxiprolin aránnyal rendelkező kollagén hélixei a normális testhőmérséklet felett kb. két fokkal már instabilak legyenek *(III/7-1. táblázat)*. Azaz magas láz esetén a kötőszövetekben lévő kollagén destabilizálódik. Ez elősegíti a szervezet védekező reakcióihoz szükséges nagyobb szöveti áteresztő képesség kialakulását.

III/7-1. táblázat
Különböző fajok kollagén molekuláinak eltérő hidroxilezettsége

Állatfaj	Hidroxi-prolin-tartalom (%)	A kollagén hélix „olvadáspontja” (°C)	Az állat testhőmérséklete (°C)
Borjú	15	39	37
Cápa	11	29	24–28
Tőkehal	8,5	16	10–14

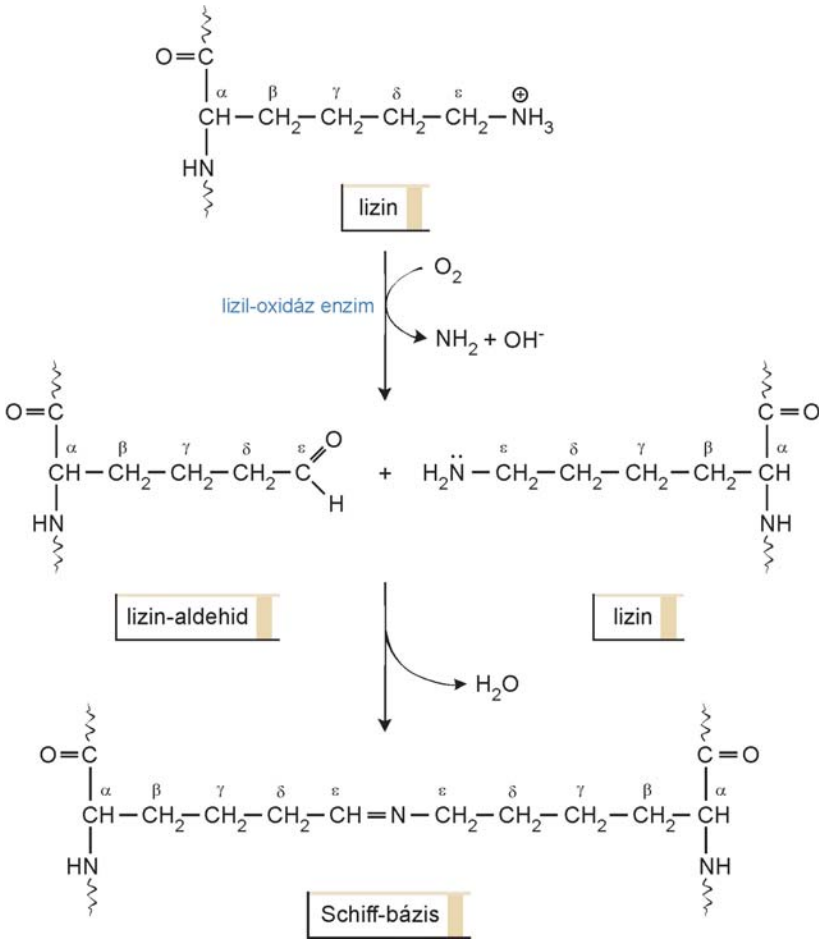


III/7-3. ábra
A kollagén prolinjának hidroxilezése

A *kollagénrostok érése (öregedése)* során a lizin aminosavak között keresztkötések alakulnak ki. A keresztkötések képződését a lizil-oxidáz enzim indítja be, amely a lizinek epszilon-aminsavjait aldehiddé oxidálja *(III/7-4. ábra)*. Az aldehidcsoport egy szomszédos lizin epszilon-aminocsoportjával víz kilépésével Schiff-bázist képez, és így keresztkötést létesít a két polipeptidlánc között. Hasonlóan, két tropokollagént köt össze a két lizin-aldehid reakciója során kialakuló aldolkötés. Lehetséges három tropokollagén keresztkötése is, amikor lizin-, hidroxilizin- és lizinaldehid-oldalláncok pirrol- vagy piridingyűrűt képezhetnek. A keresztkötések mennyiségével és minőségével arányos a kollagén rostok szakítási szilárdsága, másrészt, mivel kialakulásuk időfüggő, hozzájárulnak az öregedő szövetek (pl. bőr) rugalmasságának elvesztéséhez, illetve a csontok és az izületek fokozott sérülékenységéhez.

A *kollagén lebontását* egy speciális proteáz, a kollagenáz enzim végzi el. A keletkező hidroxiprolin mintegy 40%-a a vizelettel kiürül. Ily módon a vizelet hidroxiprolin-tartalmának mérése információt adhat a kollagén anyagcsere zavarairól. A kollagén lebontás mértéke fiziológiás esetekben akkor nő meg, amikor a kötőszövet újraépítésére van szükség, így pl. sebgyógyulás során, vagy az uterus ciklusaiban. A kollagén patológiás lebontása figyelhető meg pl. a *Clostridium histolyticum* baktérium által kiváltott gázgangrénában, a gyulladásos folyamatokban (így pl. a rheumatoid arthritis során), vagy a rosszindulatú tumorok növekedése és metasztázis képzése esetén.

Számos a kollagénnel összefüggő, genetikusan öröklődő betegségcsoport ismeretes. A prokollagén peptidáz enzim elégtelen működése alakítja ki az *Ehlers-Danlos szindróma* különböző változatait, amelyekben a kötőszövet rugalmasabb (áteresztőképesebb), mint normál esetben. A tünetegyüttes szuper-rugalmas bőrrel („gumiember”), flexibilis ízületekkel, könnyen szakadó szövetekkel jellemez-



III/7-4. ábra
A kollagén keresztkötései, érése, öregedése: lizin-keresztkötések kialakulása

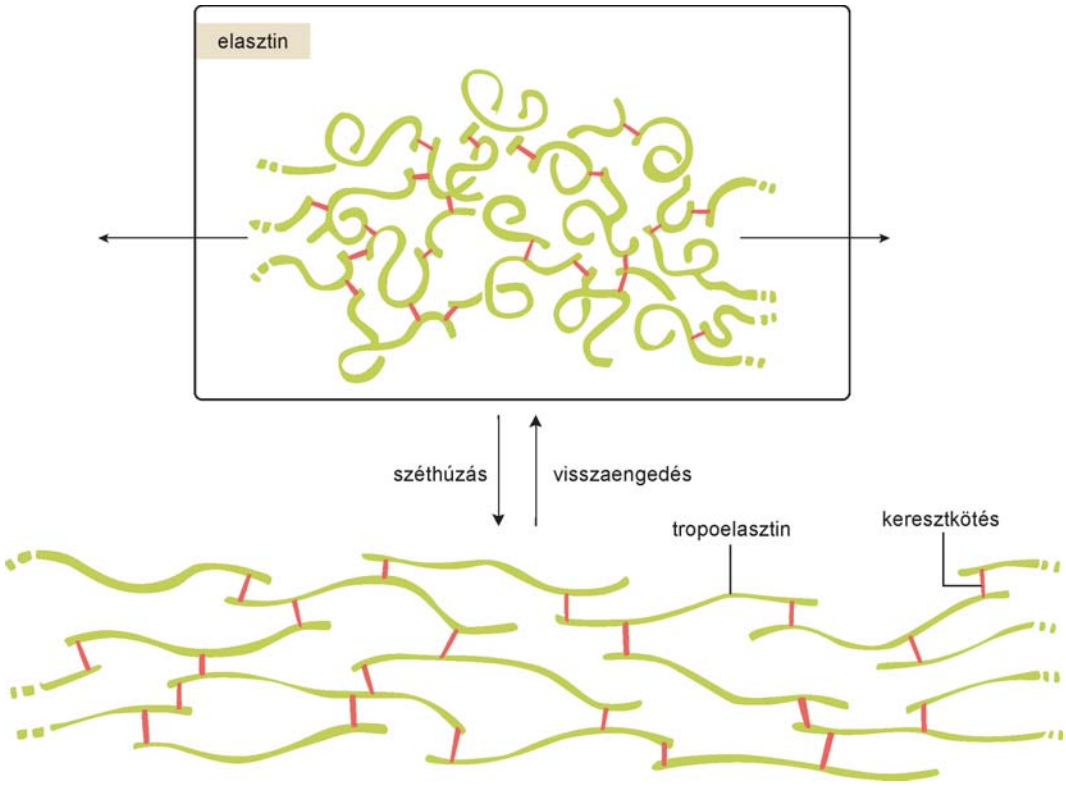
hető. A korral a tünetek általában enyhülnek, mivel a kollagén fokozott keresztkötései (öregedése) a túlzott rugalmasságot csökkentik.

Az *osteogenesis imperfecta* betegség az I-es típusú kollagén génjének genetikus változásaira vezethető vissza. A genetikus változások (pl. a 988-as glicin cisztеinre cserélődése) miatt a kollagén hélix szerkezete megbomlik, hiszen nem teljesül, hogy a kollagén hélix minden harmadik aminosava glicin legyen. A betegséggel súlyos csontdeformitások, csonttörések járnak, sok esetben már az anyaméhen belüli, magzati élet során.

III/7.2. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIXOT A KOLLAGÉN MELLETT FELÉPÍTŐ MÁS MAKROMOLEKULÁK

Ebben a részfejezetben néhány olyan makromolekulát ismertetünk, amely a kollagén mellett fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix felépítésében.

Az *elasztin* fehérjét sokszor rugalmas kollagénnek is szokták nevezni. A kollagénben megismert Gly-X-Y triádokban az X és Y aminosav itt általában alanin, valin és prolin. Az elasztinban tehát igen kevés a hidroxiprolin és hiányzik a hidroxilizin. Az elasztinban a helikális szakaszokat nem helikális részek törik meg. Az aminosav összetétel és a másodlagos szerkezet miatt az elasztin jóval plasztikusabb, mint a kollagén rost. Az elasztin a kollagénhez hasonlóan prekurzor alakban, proelasztin molekulaként szintetizálódik. A proelasztinból az elasztint felépítő tropoelasztin proteolitikus hasítással képződik. A tropoelasztin monomerek közötti keresztkötések biztosítják az elasztin összetartását. Húzás hatására a tropoelasztin molekulák „kiegyenesednek" *(III/7-5. ábra)*. A „kiegyenesedett" elasztin a húzó hatás megszűnése után visszatér az eredeti állapotába. Ez a tulajdonság rugalmasságot kölcsönöz az elasztinnak. Az elasztin az aortában, az artériákban, valamint a tüdőben játszik fontos szerepet, ahol a szöveti rugalmasság a funkciót alapvetően meghatározó tényező. Az elasztint lebontó enzim az elasztáz, amely túlzott működése esetén pl. tüdőtáguláshoz vezet.

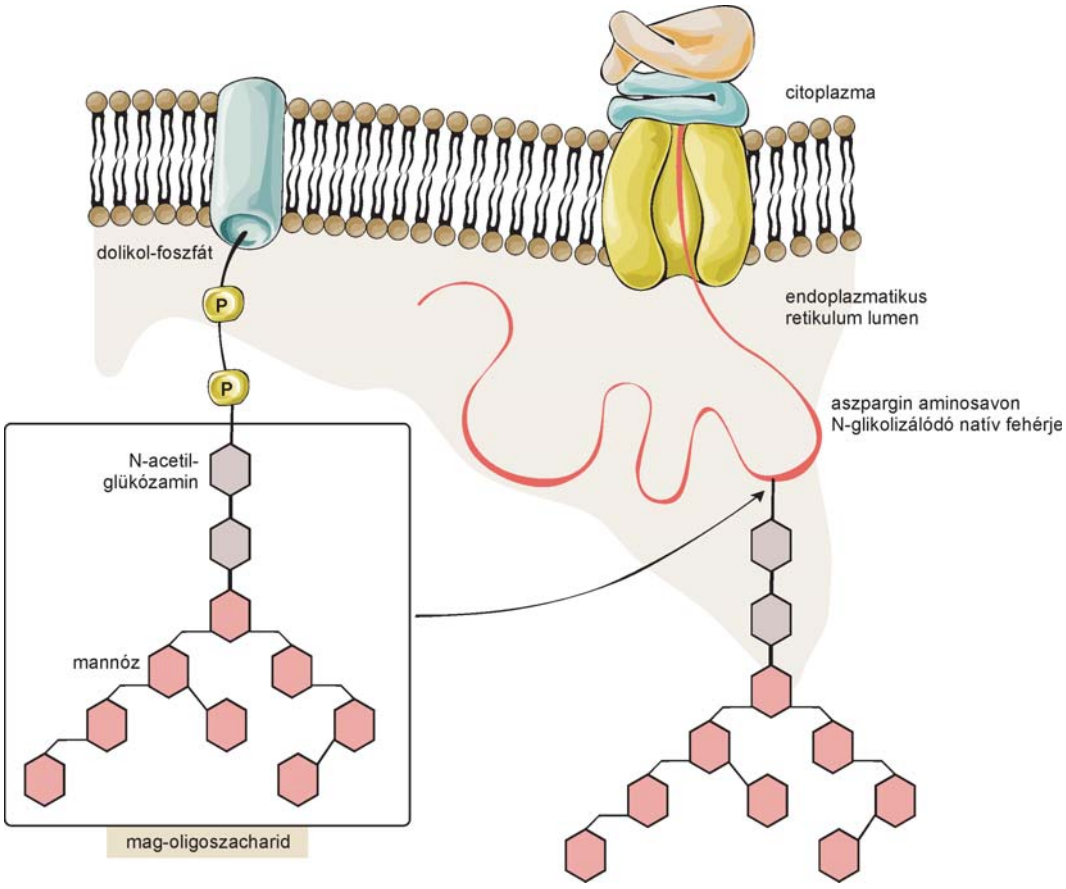


III/7-5. ábra
Az elasztin szerkezete

A *keratin*ok α-hélixekből állnak össze, amelyek egymás köré tekeredve szuperhélixeket alkotnak. A keratin két szuperhélixe egymás köré tekeredve keratin protofibrillumot képez. A protofibrillumot diszulfid hidak stabilizálják. 8 protofibrillumból ugyancsak diszulfidhidak stabilizálásával keratin mikrofibrillum jön létre. A kialakult szerkezet a bőr, a haj, a szőrzet és a köröm fő alkotó eleme. A diszulfidhidak mennyisége a bőrben, a hajban és a szőrzetben kevesebb, a körömben ennél jóval több.

Glikoproteinek. Számos a sejtfelszínre, vagy szekrécióra kerülő fehérje glikozilálódik, azaz egy vagy több aszparagin, szerin (illetve kollagén esetén hidroxilizin) oldalláncára az endoplazmás retikulumban dolikol-foszfát közvetítésével oligoszacharidok kötődnek. Az ilyen glikozilált fehérjéket *glikoprotein*eknek nevezzük *(III/7-6. ábra).*

Az *oligoszacharidok* azért voltak az evolúció szempontjából előnyösek, mert a láncot alkotó cukorkomponensek a továbbépülésre több szerkezeti lehetőséget tartalmaznak, mint a polipeptidlánc. A fehérjealkotó aminosavak szinte kivétel nélkül bifunkciósak, azaz a peptidváz felépítésében aminosav monomerekként két csoporttal, az α-amino- és az a-karboxil-csoporttal vesznek részt. Ezzel szemben az oligoszacharidok minden alkotóeleméhez több helyen is kötődhet a soron következő cukorkomponens. Ezáltal a glikoproteinek oligoszacharidjai már a primer struktú-



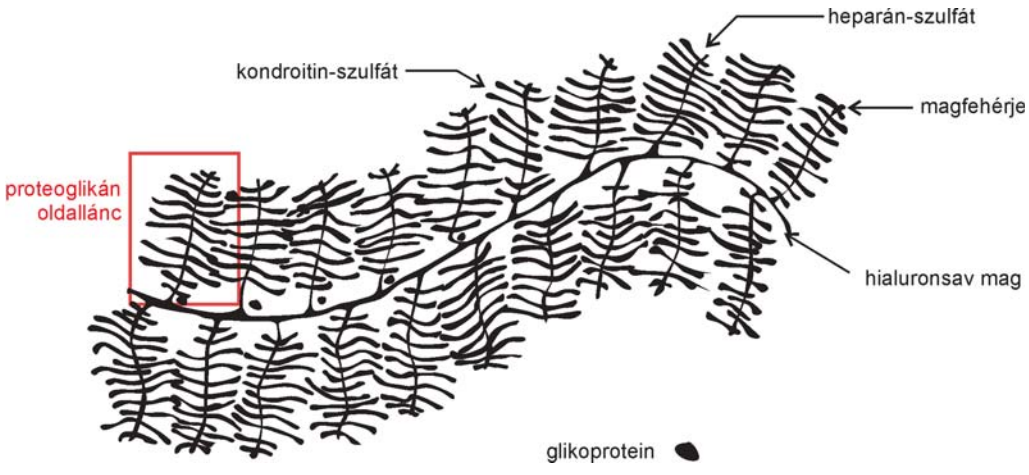
III/7-6. ábra
Fehérjék glikozilációja, glikoproteinek

rájukban is változatosabb szerkezetet hozhatnak létre, mint a megfelelő méretű peptidszakaszok (egy öttagú peptid 120 lehetséges izomerjével szemben egy öttagú oligoszacharid több mint kétmillió izomert képezhet). Valószínűleg ezzel is összefügghet, hogy a sejt-sejt kapcsolatokban és a különböző sejtek felismerésében igen gyakran a felszíni fehérjék oligoszacharid-oldalláncai is részt vesznek.

A *III/7-7. ábra* egy *proteoglikán* vázlatos szerkezetét mutatja be. Az ábra alján lévő kis pötty egy átlagos glikoprotein méretét jelöli. A proteoglikánoknak a III/7-7. ábrán bemutatott szőrös hernyóra (fenyőfalevélre) hasonlító válfaja, az *aggrekán* leginkább a porcszövet felépítésében játszik kitüntetett szerepet. Az óriásmolekula közepét hialuronsav, oldalágait magfehérjék tartják össze. A magfehérjékhez a különböző glukózaminoglikánok (pl. az ábrán is feltüntetett kondroitin-szulfát, illetve heparán-szulfát) szerin aminosavak oldalláncának hidroxilcsoportjain keresztül kötődnek.

A proteoglikánok szerkezetében tehát (a glikoproteinektől eltérően) a kismennyiségű fehérjerészek szerkezetstabilizáló szerepet játszanak. A poliszacharidkomponensek negatív töltései (oxidált cukrok és cukrok szulfát-észterei) ellenionként Na^+-ionokat kötnek meg. Mivel a Na^+-ion rendelkezik a legnagyobb hidrátburokkal a szervezetben előforduló kationok közül, a poliszacharidok hidroxilcsoportjainak hidratálódása mellett a Na^+-ionok is tetemesen hozzájárulnak a proteoglikánok hatalmas vízmegkötő képességének kialakulásához. A proteoglikánok kötött vízben gazdag szerkezete nyomóhatással szemben rendkívül ellenállóvá teszi e molekulákat. Ez az oka annak, hogy bizonyos fajtáik a nyomóhatásoknak nagymértékben kitett porcszövetekben dúsulnak fel.

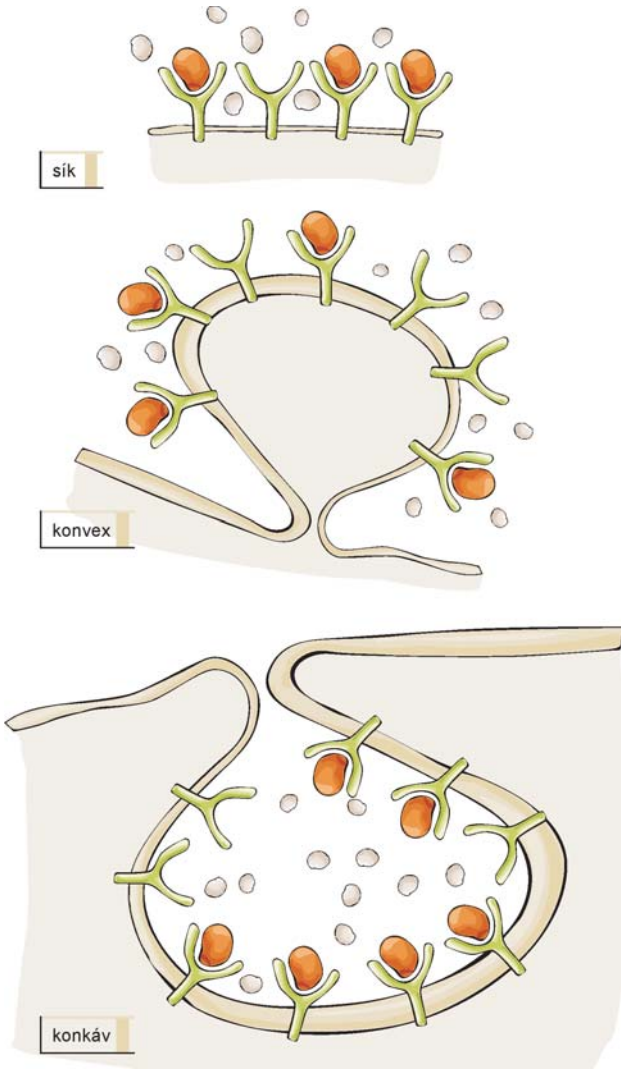
A hialuronsav szerepe. A hialuronsav glukuronsav és N-acetil-glukózamin dimerekből felépülő poliszacharid. A glukuronsav karboxilcsoportjának negatív töltése a proteoglikánok esetében elmondottakhoz hasonlóan a hialuronsavat fokozott vízmegkötésre teszi alkalmassá. A hialuronsav azonban a *III/7-7. ábrán* bemutatott bonyolult, térhálós szerkezettől függetlenül, önmagában is megtalálható az extracelluláris térben. Ilyen körülmények között szerkezete flexibilis, és a kötött víz nem annyira a proteoglikánok esetében fontos nyomásállóságot, hanem a közelben lévő struktúrák (kis molekulák, de akár sejtek) szabadabb diffúzióját, migrációját ered-



III/7-7. ábra
A proteoglikánok vázlatos szerkezete az aggrekán példáján bemutatva. Az összehasonlítás kedvéért az ábrán egy glikoprotein méretét is feltüntettük

ményezi. Nem véletlen, hogy a szöveti állomány gyors átalakulásai során, így pl. az embriogenezisben, illetve a sebgyógyulásban hialuronsav szaporodik fel. Amikor az adott helyen a kiépült sejtstruktúra stabilizálódott, a funkcióját vesztett hialuronsavat a hialuronidáz enzim bontja el.

III/7.3. A CSONTKÉPZŐDÉS NÉHÁNY MOLEKULÁRIS JELLEMZŐJE: MINERALIZÁCIÓS ALAPFOGALMAK



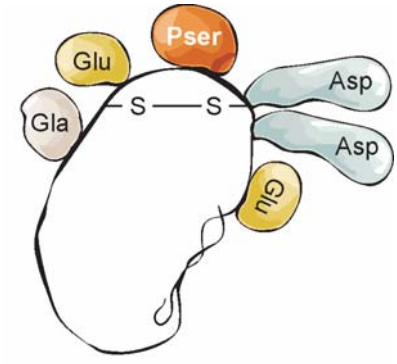
III/7-8. ábra
Kötött ionok egymástól való átlagos távolsága sík, konvex és konkáv felszínen

A kötött víz porcokat stabilizáló, illetve sejtátrendeződést segítő szerepének megismerése után a csontszövetet szilárdságáért felelős kalcium-foszfát-kristályok kialakulásának néhány szabályszerűségét tekintjük át. A *III/7-8. ábra* a kalciumionok kötésére alkalmas felszín három lehetséges alapesetét, a sík-, a konvex és a konkáv felszínt mutatja be a foszfátionok közel egyenletes koncentrációja esetén. Az ábrából jól leolvasható, hogy a kalciumionok legnagyobb sűrűségét a konkáv felszínű kalciumkötőhelyek képesek biztosítani, a síkfelszín már nem ilyen előnyös, a konvex felszín pedig kifejezetten gátló hatású, hiszen az egyenletes, oldatbeli állapothoz képest a kalciumionokat egymástól eltávolítja.

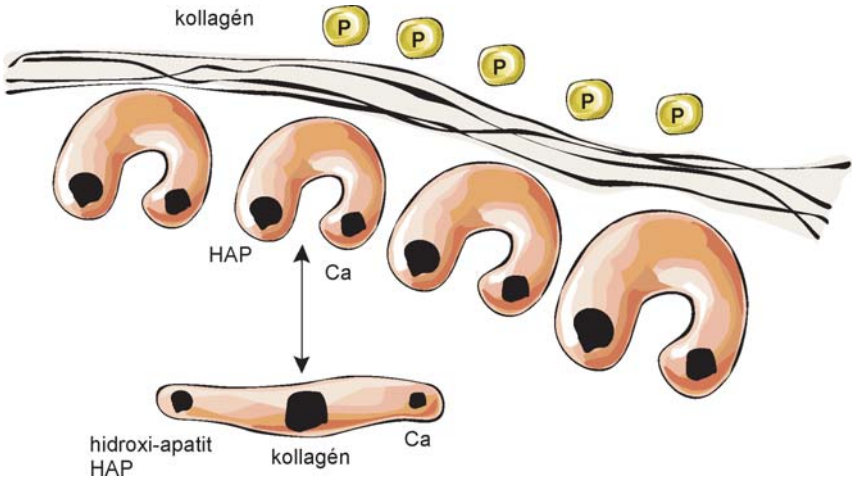
A domború, a kalciumionok lokális koncentrációját lecsökkentő felszín kialakulására jó példa az *oszteokalcin*, amelynek vázlatos szerkezetét *a III/7-9. ábrán* mutatjuk be. Látható, hogy a mindössze 5 kDa molekulatömegű fehérje kalciumkötő glutaminsav, aszparaginsav, foszfoszerin és gamma-karboxiglutamát (Gla) oldalláncai a fehérje másodlagos szerkezettel nem jellemezhető, konvex felszínt alkotó részén koncentrálódnak. (A gamma pozícióban egy harmadik karboxilcsoportot is tartalmazó gamma-karboxiglutamát erős kalciumkötő tulajdonságát szervezetünk a véralvadásban is számos helyen felhasználja.)

A fehérjék alakjának, kalciumkötő tulajdonságának és a mineralizációban való részvételének egyik szép példáját az *oszteonektin* szolgáltatja. Oldott állapotban a fehérje elnyújtott pálcika alakú. Három, egymástól viszonylag távol-

lévő kötőhellyel, a hidroxi-apatit, a kalcium és a kollagén megkötésére alkalmas szerkezeti részlettel rendelkezik (lásd *III/7-10. ábra*). Ilyen, „lapos" állapotban az oszteonektin a mineralizációt gátló hatású. Kollagénnel érintkezve a fehérje behajlik, kalcium- és hidroxi-apatit-kötő helyei egymáshoz közel kerülnek. A csontszöveti kollagén az egyes oszteonektin molekulákat sorba rendezi, így a kalciumfoszfát kristályosodására ideális feltételeket teremt. A csontszöveti kollagén nemcsak az oszteonektin megkötésével segíti elő a mineralizációt. Lizin oldalláncainak epszilon aminocsoportjához ATP felhasználásával pirofoszfátcsoportok kötődhetnek, amelyek ugyancsak részt vehetnek a kalciumionok megkötésében.



III/7-9. ábra
Az oszteokalcin vázlatos szerkezete
(Gla: piroglutaminsav)



III/7-10. ábra
Az oszteonektin oldatbeli (nyújtott) és kollagénhez kötött (hajlott) formája

III/7.4. A SEJTKAPCSOLÓ STRUKTÚRÁK ÉS AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIXHOZ KÖTŐDŐ JELÁTVITELI JELENSÉGEK

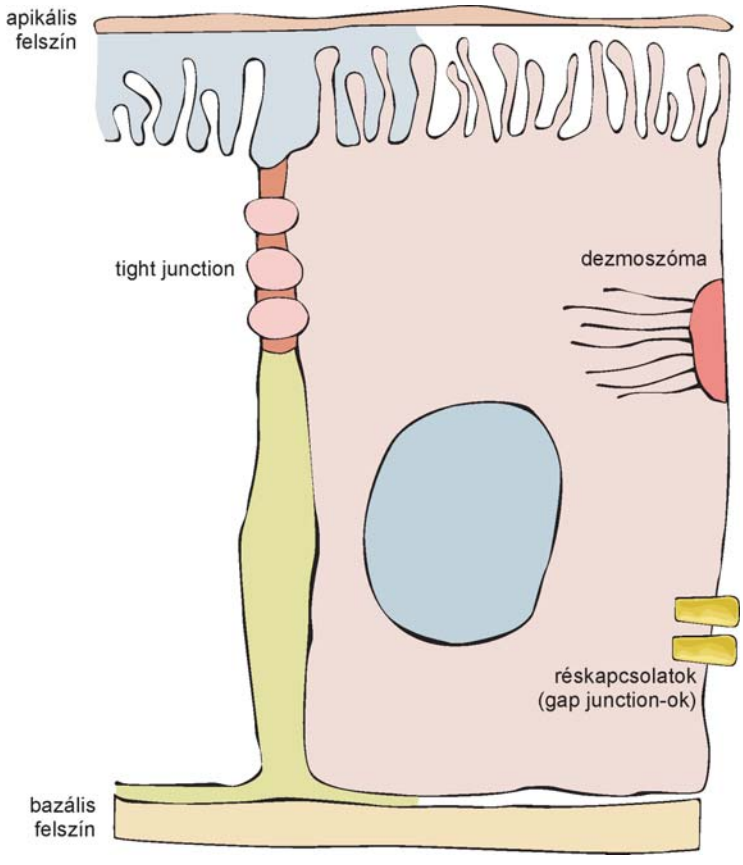
Ebben a részfejezetben a sejteket egymással és az extracelluláris mátrixszal összekapcsoló struktúrákat írjuk le, amelyek fizikai kapcsolatot is teremtenek a sejt és a környezete között. Közöttük számos olyan molekula van, amelyek a sejt és a környezete között kétirányú jelátviteli kapcsolatot is teremtenek, azaz a „szokásos" jelátviteli utak kívülről belülre történő jelátvitele mellett belülről kívülre történő jelátvitelt is biztosítanak.

A *fibronektin* és a *laminin* fehérjék az extracelluláris mátrix különböző elemeinek összekapcsolódásában játszanak fontos szerepet. A fibronektin a sejteket köti

össze a kötőszöveti mátrixszal. A fibronektin fontos szerepet játszik a sebgyógyulásban, az embriogenezisben, a sejtmigrációban és a tumorok metasztatikus folyamataiban. A laminin az epiteliális sejtek és a kötőszövet között teremt kapcsolatot. Így a laminin a bazális membránoknak a IV-es típusú kollagénhez szorosan kötődő, fontos alkotóeleme.

A *sejtadhéziós molekulák* (cell adhesion molecule, CAM) számos tagja az immunoglobulin szupercsalád fehérjéi közé tartozik. E fehérjéknek sok válfaja ismeretes, így a neurális N-CAM, a vaszkuláris V-CAM, vagy az endotél és immunsejtek kötődéséért felelős intercelluláris I-CAM. Az immunoglobulin típusú sejtadhéziós molekulák kalciumionoktól független sejt-sejt, illetve sejt-extracelluláris mátrix kapcsolódásokat tesznek lehetővé. A *szelektinek* a cukor-komponenseket felismerő lektin fehérjék nagy családjába tartoznak. Számos sejtfajta kalciumfüggő felismerését mediálják. A sejtadhéziós molekulák közé tartoznak a kadherinek, illetve az integrinek is. E fehérjék szerepét a későbbiekben foglaljuk össze.

Diffúziós gátat képző kapcsolóstruktúra (tight junction, zonula occludens; *III/7-11. ábra)*. Ez a sejtkapcsoló struktúra a legszorosabb sejt-sejt kapcsolat, amely a folyadékok, illetve a membrán belső diffúziója számára praktikusan átjárhatatlan sejt-sejt kapcsolódást eredményez. A sejtek oldalán övszerűen fut körbe. Kialakításában az *okkludin*, a *klaudin* és más fehérjék mellett a későbbiekben tárgyalt kadherinek is részt vesznek. E fehérje struktúrák a sejt citoszkeletonjához (aktin szálaihoz) kapcsolódnak. A tight junctionok fontos szerepet játszanak a bélhámsejtek szerkezetében és a vér-agy-gát kialakításában.



III/7-11. ábra
A bélhámsejt tight junction-jai, dezmoszómái és réskapcsolatai

A sejtek, illetve a sejt és az extracelluláris mátrix közötti mechanikai kapcsolatot biztosító kapcsoló struktúrák (zonula adherens, dezmoszóma, hemidezmoszóma, fokális kontaktus = adhéziós folt). A zonula adherens igen sokszor a zonula occludens mellett lévő, azt stabilizáló, övszerű kapcsoló struktúra, amely kevésbé szoros kapcsolatot biztosít, mint a zonula occludens. A dezmoszóma a sejtek közötti foltszerű kapcsolat *(III/7.11. ábra)*. A hemidezmoszóma a dezmoszómához hasonlító, foltszerű struktúra, amely a sejteket az extracelluláris mátrixhoz köti. E struktúrák

jelentős részében a kapcsolódást *kadherin* és *katenin* fehérjék biztosítják. A fokális kontaktusok (adhéziós foltok) a sejt mozgásában és biomechanikus érzékelésében résztvevő, kitüntetett pontjai, amelyek jelátvitelét *integrin receptorok* biztosítják. A fokális adhéziós komplexben az integrin receptorok mellett mintegy 150 fajta fehérje vesz részt. A felsorolt mechanikai struktúrák fehérjéi a tight junction-hoz hasonlóan a sejt citoszkeletonjához (aktin szálaihoz) kapcsolódnak.

Réskapcsolat (gap junction)

A réskapcsolat két szomszédos sejt között csatornát képez *(III/7-11. ábra)*. A csatorna az 500 Daltonnál nem nagyobb molekulák számára átjárható. A réskapcsolatot 6 *konnexin* fehérje alkotja, amelyek a csatornát nyitott és zárt állapotban is tarthatják. A csatorna legfontosabb feladatai a sejtek közötti jelátvitel, illetve a sejtek anyagcseréjének az összehangolása. A diffúzióval keresztülhaladó anyagok lehetnek jelátviteli molekulák, így kalcium ionok vagy cAMP, illetve a sejt anyagcseréjében fontos szerepet játszó metabolitok. A réskapcsolatok lehetővé teszik az egymás melletti izomsejtek (pl. a szívizom) szinkronizált összehúzódását, illetve egy „éhező" sejtnek a szomszéd sejt által való „táplálását". A réskapcsolatok fontos szerepet játszanak a neuronális jelátvitelben is.

A kadherin/katenin-függő jelátviteli út

A kadherin szupercsaládba olyan transzmembrán szakasszal rendelkező glikoproteinek tartoznak, amelyek extracelluláris részén ismétlődő kadherin részletek találhatóak. A szomszédos sejteken lévő kadherinek kalcium jelenlétében homodimert képeznek. A kadherinek a citoszkeletonhoz egy jelátviteli fehérjéket is tartalmazó komplexen keresztül kötődnek. E komplex részei a *katenin* fehérje α- és β-izoformái is. Amennyiben a kadherin nem kötődik a szomszédos sejthez, a β-katenin fehérje bejuthat a sejtmagba, ahol a sejt proliferációját elősegítő jelátviteli utakat aktivál. A kadherin/katenin jelpálya tehát a sejtek kontaktgátlásának a része, amely megakadályozza a sejt további növekedését, ha a sejt már „összeér" a szomszédos sejtekkel. A kontaktgátlás a legtöbb rákos sejtben sérül, amely igen gyakran a kadherin/katenin jelpálya mutációival is összefügg.

Az integrin és a hozzá kötődő fokális adhéziós kináz

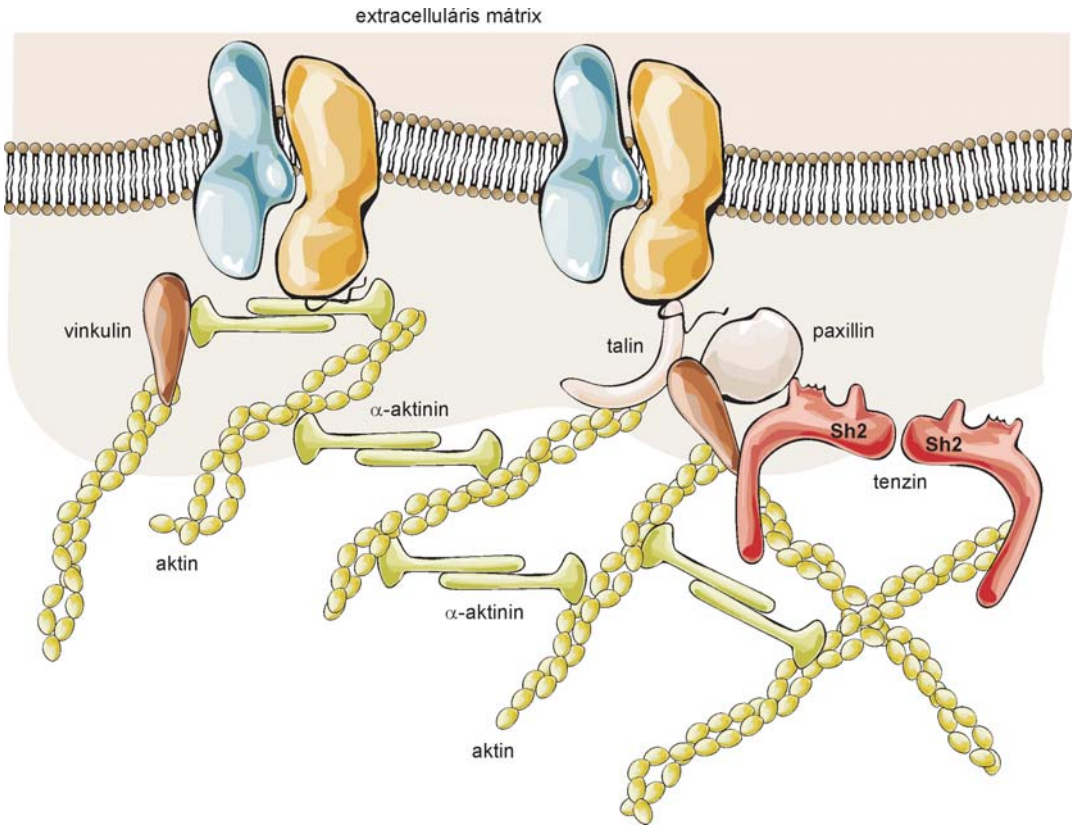
Az integrinek olyan α- és β-láncból összetevődő transzmembrán receptorok, amelyek a sejtek fokális kontaktusait (adhéziós foltjait) az extracelluláris mátrixszal kötik össze, és ezáltal *kétirányú információáramlás*t biztosítanak a sejt és a környezete között. A befele irányuló jelátvitel során az integrinhez specifikusan kötődő extracelluláris mátrix alkotóelemek a később ismertetésre kerülő jelátviteli mechanizmusok révén a sejt különböző válaszait (pl. differenciációját) segíthetik elő. A kifelé irányuló jelátvitel során a citoplazmából közvetített jel (pl. a sejt malignus transzformációja) az integrinek adhéziós képességében (kötődési affinitásában és szelektivitásában) változásokat hoznak létre, amely pl. a metasztázisban, a gyulladás, vagy a sebgyógyulás folyamataiban játszik szerepet. Az integrin több mint 16-féle alfa és több mint 8-féle béta alegysége változatos kombinálódásával igen sokfajta hatás specifikus közvetítésére válik alkalmassá.

Az integrinhez kötődő extracelluláris molekulák

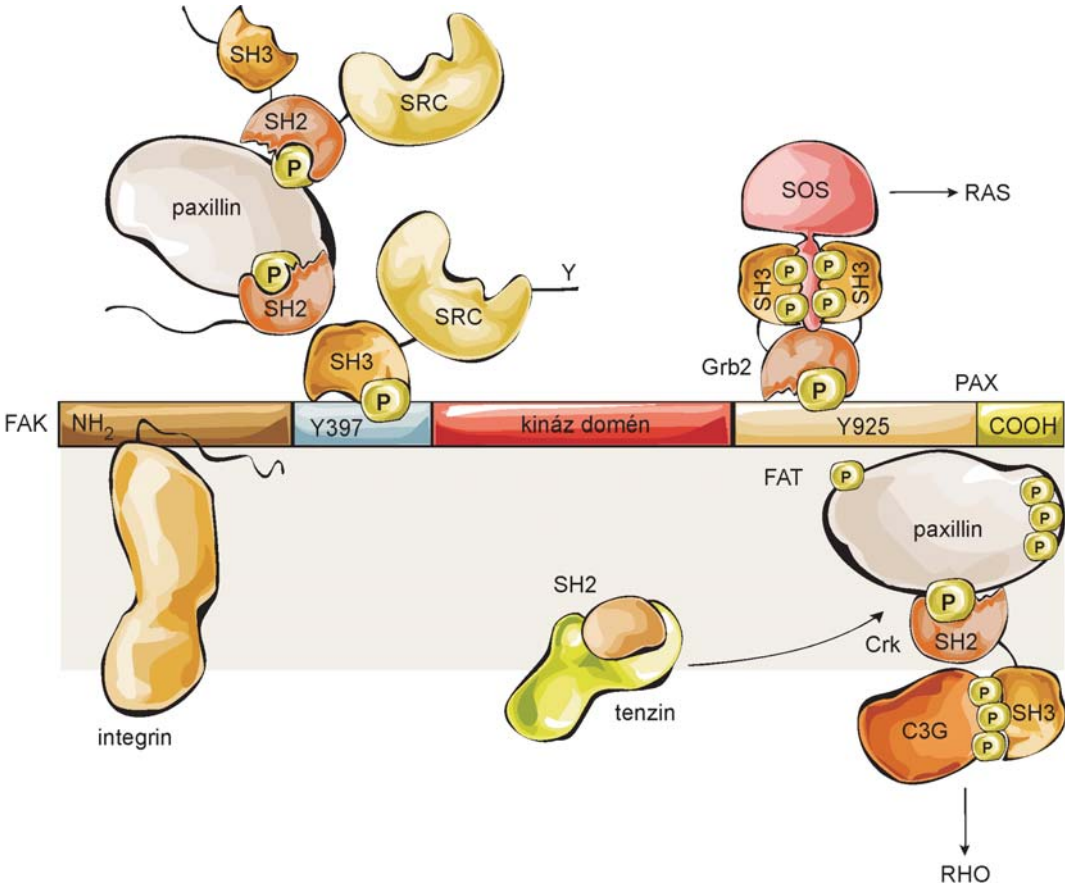
Az integrin az extracelluláris mátrix számos alkotóeleme, így pl. a *kollagén* és a *fibronektin* kötésére képes. A kötődés specificitását a kollagénben és a fibronektinben egyaránt megtalálható *RGD* (arginin-glicin-aszparaginsav) integrinkötő szekvencia biztosítja. Az integrin szolubilis extracelluláris fehérjék, így pl. a *fibrinogén* kötésére is képes. A szomszédos sejtekkel az integrin az *I-CAM* (intercelluláris adhéziós molekulák) révén létesít kapcsolatot. Az I-CAM az integrin aszparaginsavakban és szerinekben gazdag, úgynevezett *MIDAS-motívum*ához köt. A MIDAS (metal ion dependent adhesion site) elnevezés a kapcsolódás kalcium szükségletére utal. (Nem tévesztendő össze a mitokondrium biogenezisében szerepet játszó MIDAS fehérjével: mitochondrial DNA absence sensitive factor).

Integrin által közvetített, kívülről befelé irányuló jelátvitel, a fokális adhéziós kináz

Az integrin receptor a sejtek mikrofilamentális rendszerével igen sokrétű és bonyolult kapcsolatban áll (*III/7-12. ábra*). Az aktinszálakhoz kötődő fehérjék közül



III/7-12. ábra
Az integrin kapcsolódása a mikrofilamentumokhoz



III/7-13. ábra
Példák a fokális adhéziós kináz aktivációja során kötődő fehérjékre. Az integrin béta-lánca által közvetített aktiváció során a fokális adhéziós kináz tirozin oldalláncokon foszforilálja magát, amely különböző SH-2 doménnel rendelkező fehérjék kötődését segíti elő

igen sok (így pl. a paxilin és a tenzin) az integrin extracelluláris kapcsolódásainak megváltozásával szorosabban, vagy gyengébben köti az integrint a sejt mikrofilamentumaihoz.

Az integrin kisebb változatosságot mutató béta alegységéhez a *fokális adhéziós kináz* kötődik. Ez a fehérjemolekula az integrin extracelluláris aktivációja esetén ugyanúgy foszforilálja magát tirozin oldalláncokon, mint ahogy azt a növekedési faktorok receptorai, vagy a B- és T-limfociták receptoraihoz kötődő tirozin-kinázok esetében megfigyelhettük. A tirozin foszforiláció itt is a foszfotirozint felismerő SH-2 doménnel rendelkező fehérjék (pl. az Src kináz, Grb2/Sos/Ras komplex, p130^{cas} adaptor fehérje, PI-3-kináz, foszfolipáz-C-γ) kötődéséhez vezet (*III/7-13. ábra*). A foszforilációval aktivált állapot visszaalakítását a kötődő PTP1B és PTEN foszfatázok végzik el. Masszív defoszforiláció következik be mitózisban is, ahol a fokális adhéziós pontoknak le kell bomlaniuk.

Ha az integrinreceptor által közvetített jel (különösen epithel-endothel sejtekben) tartósan nem képes a fokális adhéziós kinázhoz kötődő PI-3-kináz (és az általa aktivált Akt-kináz) aktivációjára, akkor a kaszpáz proteázok aktivációjára, és ennek következtében az apoptózis egyik formájára, *anoikis***re** (a görög hajléktalan szóból) kerül sor. Azaz az extracelluláris mátrixhoz való kötődés hiánya speciális apoptózist, anoikist indít be. A rákos sejtekben az anoikis mechanizmusa is gyakran sérül, illetve felülíródik a sejt masszív proliferációja által.

Az SH-2 doménnel rendelkező fehérjék kötésén túl az integrin külön aktiválódó kötőhellyel rendelkezik a mikrofilamentumokkal asszociálódó *paxillin* számára is. A paxillin bizonyos mértékig az inzulinreceptorhoz kötődő IRS-1, IRS-2 adaptor molekulákhoz hasonlítható, ugyanis mind az SH-2 domének kötésére alkalmas foszforilálható tirozinokat, mind pedig az SH-3 domének kötésére alkalmas prolingazdag szekvenciát tartalmaz. Így az Src kinázzal többszörös SH-3/SH-2 szendvicset képezhet, vagy kötheti a rá specifikusabb SH-2 doménnal rendelkező ugyancsak aktinkötő tenzint, illetve a Rho-komplexet.

Példák az integrin által közvetített, belülről kifelé irányuló jelátvitelre

Az integrinek extracelluláris részének kötődési specificitását és affinitását az őket hordozó sejtet ért más hatások alapvetően megváltoztathatják. Így pl. a *leukociták adhéziója* során az adhéziót kiváltó PAF (platelet activating factor) az integrin szorosabb kötődését idézi elő. Ennek a fordítottja játszódik le a *sejtek osztódása*, illetve *malignus transzformáció*ja során, ahol az integrin szerinen, illetve az Src-kináz által tirozinon történő foszforilációja az integrin extracelluláris kötődésének csökkenését, és ezáltal a sejt elszabadulását idézi elő.

III/7.5. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX SZEREPE A TUMOR METASZTÁZISBAN

A metasztázisok kialakulásának három fő elemét tudjuk megkülönböztetni, a malignusan transzformált sejtek kiszabadulását, vándorlását és újbóli letapadását. Az extracelluláris mátrix különböző alkotóelemei fontos szerepet játszanak ezekben. A folyamatokban szereplő fontosabb molekulákat a *III/7-2. táblázatban* foglaljuk össze.

Malignus sejtek kiszabadulása

A malignusan transzformált sejtek eredeti helyükről történő elszabadulásának egyik legkézenfekvőbb lehetősége a sejtek körül lévő *extracelluláris mátrix fellazítása*, elbontása különböző hidrolitikus enzimek, proteázok, illetve az extracelluláris poliszacharidokat elbontó enzimek, pl. heparináz szekréciója révén. Az extracellulárisan történő proteolízist a malignus sejt a hemosztatikus rendszer vérben keringő, látens proteázainak a nem megfelelő helyen történő (inadekvát) aktivációjával is el tudja érni. Erre lehetőséget nyújthatnak a malignus sejtek által szekretált proteáz aktivátor fehérjék is. Az előzőekben ismertetett integrinek egyik válfaja, az $\alpha_v\beta_3$ integrin is részt vehet bizonyos proteázok, illetve proteáz aktivátorok metasztázist segítő aktivációjában. A proteázok az extracelluláris mátrixon kívül a sejtet a

III/7.2. táblázat
Példák a metasztázis három szakaszának szabályozásában szerepet játszó fontosabb molekulákra

Metasztázist serkentő hatás	Metasztázist gátló hatás
1. A malignus sejtek kiszabadulása	
– proteázszekréció	– proteázgátlók (TIMP, maspin)
– proteázaktivátorok szekréciója	– retinoblasztóma fehérje
– heparinázszekréció	– p53 fehérje
– $\alpha_v\beta_3$-integrin	– kadherin
	– N-CAM, I-CAM
2. Sejtvándorlás	
– autokrin motility faktorok (néha az extracelluláris proteázok termékei)	– trombospondin (migrációgátlás, antiangiogenezis)
– $\alpha_v\beta_3$-integrin	– az integrint defoszforiláló PTEN-foszfatáz
3. A malignus sejtek letapadása	
– homing receptor (CD44, Hermes antigén) malignus sejteken	
– adresszinek (Lu-ECAM) epitelsejteken	
– szelektinek	
– laminin és receptora	

mátrixhoz, illetve más sejtekhez horgonyzó fehérjék (pl. kadherin) elbontásában is részt vesznek.

A malignus sejtek kiszabadulásának gátlására az előzőekben ismertetett proteázfüggő aktiválódási mechanizmusokból kézenfekvően következik a proteázgátlók (pl. a TIMP, „tissue inhibitor of metalloproteases”, fehérje vagy a szerinproteázokat inhibitáló fehérjecsaládba tartozó maspin) fontos szerepe. Érdekes, hogy a korábban megismert retinoblasztóma és p53 fehérjék nem csak a malignus transzformációt magát, hanem a már transzformált sejtek metasztatizálódását is gátolják.

A malignus sejteket a szomszédjaihoz horgonyzó *kadherin*, illetve az extracelluláris mátrixhoz kötő *sejtadhéziós molekulák* (N-CAM, I-CAM) is a sejtek kiszabadulása ellen dolgoznak. A metasztatizáló vastagbélrákokban gyakran mutáns formában jelenlévő APC-gén (adenomatous poliplosis coli gene) sejtben lévő eredeti formája a kadherinhez kötődő kateninek bizonyos fajtáival képez komplexet. Az APC-hez való kötődés a szükséges a kateninek normális lebontásához. Az APC-gén mutációja során a kateninkötő képessége lecsökken, így a kateninek az adott sejtben felszaporodnak. A kateninfelesleg az embrionális fejlődés során szükséges transzkripciós faktorokat aktiválja, amely egyik közvetlen oka a megfigyelhető sejtburjánzásnak. A metasztatikus potenciál növekedése összefügg a kadherinek ezzel párhuzamos affinitáscsökkenésével.

Malignus sejtek vándorlása

A malignus sejtek vándorlását autokrin (tehát maguk a sejtek által szintetizált) vándorlási faktorok segítik. Gátló hatást fejt ki a trombospondin molekula, amely a tumornövekedés során fontos szerepet játszó angiogenezist is gátolni képes. A lamininreceptor (integrin-$\alpha_6\beta_4$) által aktivált PI-3-kináz (és a beindított jelpályában elhelyezkedő Rac kis G fehérje) elősegíti a rákos sejtek vándorlását a sejtközötti állomány lamininhálózatán. A vándorláshoz is elengedhetetlen a már korábban említett $\alpha_V\beta_3$-integrin, így nem csoda, hogy e receptor ellenes antitestet (megfelelő – paramágneses – jelzőanyaggal kapcsolva) a metasztázisok MRI (magnetic resonance imaging) nyomonkövetésére is használják. Az $\alpha_V\beta_3$-integrin a metasztatizáló tumorok egyik fontos markere.

Malignus sejtek letapadása

A vándorló malignus sejteknek új helyet kell találni maguknak. Megtapadásukat a sejteken lévő, ún. „homing" receptorok segítik, amelyek egyik jó példája a hialuronsavat kötő CD44-molekula. Ahogyan korábban említettük, a hialuronsav a szöveti állomány fellazult helyein (pl. apró sérüléseknél) szaporodik fel, ahol a tumorsejtek inváziója is könnyebb lehet. A CD44-molekula a rákos sejteken megjelenő szelektinek kötésére képes változatai gyakran előfordulnak metasztatizáló tumorokban. A vándorló malignus sejtek kötődését az epithel sejtek adresszin molekulái (pl. a Lu-ECAM fehérje), illetve a már említett szelektinek, a laminin és a laminin receptor is segítik.

A metasztázis során a rákos sejtek igen gyakran epitéliális-mezenchimális átmenetet (EMT) mutatnak. A mezenchimális típusú sejtek nem polarizáltak, kevésbé gyorsan osztódnak, ellenállóbbak a kemoterápiával szemben, és vándorlásra jobban képesek. A mezenchimális sejttípus képes őssejtes formát is felvenni. A "rákos őssejtek" a kezelésekkel szembeni további rezisztenciát, és a ráknak a kezelés utáni újra-fejlődését segítik elő. Sok ráktípus az epitéliális és a mezenchimális állapot közötti, átmeneti állapotban is képes stabilizálódni, amellyel néhány sejtes, összetapadt, egymást védelmező csomókban vándorol. Az epiteliális-mezenchimális és őssejtes átmeneteket számos transzkripciós faktor, mint pl. a ZEB, MYC, OCT4 és mikroRNS, mint pl. a let-7 és a miR-200 kölcsönhatásai mediálják.

A vándorlás végén a mezenchimális sejtek a fogadó szöveteken metalloprotezázok segítségével "rést nyitnak", és oda invadopódiumok segítségével behatolnak. Sok esetben a Rac1/RhoA jelátviteli pálya aktivációjával járó, mezenchimálisból amöboid (amőba-szerű) állapotba való átmenet (MAT) is megfigyelhető, amely a szövetekbe való behatolás útjainak megtalálását segíti elő. A szöveti behatolás után a rákos sejtek igen gyakran mezenchimális-epitéliális átmenetet (MET) mutatnak, amellyel osztódási képességük megnő.

Összefoglalva elmondható, hogy a metasztázisok kialakulásának három fázisra (kiszakadás, vándorlás és letapadás) tagolható igen bonyolult folyamatában a malignus sejteknek mind a három lépést teljesíteniük kell ahhoz, hogy metasztázisok jöjjenek létre. Ebben a folyamatsorozatban a kiszakadást segítő *metalloproteázok*, a vándorlást, és az endotelsejtrétegen való keresztüljutást segítő $\alpha_V\beta_3$*-integrin*, és a letapadást segítő *CD44-receptorok* játszanak kiemelt jelentőségű szerepet.

III/8.
Szubcelluláris biokémia

Bánhegyi Gábor

III/8.1. AZ EUKARIÓTA SEJT KOMPARTIMENTUMAI

Az eukarióta sejt legfontosabb jellegzetessége, mely egyúttal megkülönbözteti a prokariótáktól, a membránnal határolt intracelluláris organellumok jelenléte. A meghatározó, egyben névadó különbség az „igazi" sejtmag (eukaryon) megjelenése. A sejtmag mellett a legtöbb eukarióta sejt citoplazmájában számos más, membránnal határolt sejtszervecskét (mitokondrium, endoplazmás retikulum (ER), Golgi-apparátus, lizoszóma, peroxiszóma stb.) is tartalmaz. A fenti sejtszervecskék csaknem minden eukarióta sejtben megtalálhatók. Néhány fajban ezen organellumok specializált válfajai vannak jelen. A növényi sejtek emellett kloroplasztiszt és vakuólumot is tartalmaznak.

Az eukarióta sejtet a külvilág felől a plazmamembrán határolja. A magmembrán a sejtet citoplazmára és nukleoplazmára osztja. A citoplazmát intracelluláris organellumok és a citoszol építik fel. Az intracelluláris organellumok membránjai egyrészt az úgynevezett endomembrán rendszert alkotják, másrészt a mitokondrium felépítésében vesznek részt.

Az organellumok egyúttal többnyire *kompartimentum*okat is jelentenek. Kompartimentumnak a membránnal körülvett, a sejt többi részétől ilymódon elkülönülő, nagyobb méretű rekeszeket nevezzük. Egyes organellumok (mitokondrium, multivezikuláris test) több kompartimentumra oszlanak. Azonban nem minden organellum kompartimentum: például a riboszóma nem rendelkezik membránstruktúrával. A kisméretű kompartimentumokat, például a transzportvezikulákat nem szokták organellumnak nevezni. Egyes organellumok, például a proteaszómák pedig rendelkeznek elkülönített belső térrel, de az elválasztást nem membrán, hanem sűrű fehérjeszerkezet hozza létre: ezt sem nevezzük kompartimentumnak.

A kompartimentumok mindegyike saját, többé-kevésbé csak rá jellemző *proteóma*val és *metabolóma*val rendelkezik. A proteóma adott időben és adott helyen – szervezetben, szövetben, sejtben, sejtszervecskében – kifejezett fehérjék összessége, a metabolóma pedig hasonlóképpen a kis molekulasúlyú metabolitok összessége. A kompartimentáció révén bizonyos reakciók, funkciók kis helyre összeszervezve sokkal hatékonyabban mehetnek végbe. Emellett a sejten belüli membránok felületet szolgáltatnak enzimek elhelyezésére, elősegítik az enzimek funkcionális láncba szerveződését (lásd például a mitokondriális vagy mikroszomális elektronátvivő láncokat), és a szubsztrátok enzimről-enzimre történő továbbítását. Az intermedier anyagcsere legtöbb, hidrofil metabolitja számára a membránok egyszerű diffúzióval átjárhatatlanok; a specifikus membrán transzporterek jelenléte az anyagcsere egy további fontos szervezője. A membrán átlépése egy adott metabolit számára általában azt is jelenti, hogy az anyagcsere egy másik reakcióútjába lép be. A sejten belüli membránok megjelenése tehát lehetőséget adott az anyagcsere kompartimentációjára, mely az evolúció egyik legjelentősebb vívmánya volt.

III/8.2. AZ EUKARIÓTA SEJT FELÉPÍTÉSE

Plazmamembrán

A sejtet környezetétől a plazmamembrán (sejtmembrán, plazmalemma) választja el. Vastagsága kb. 10 nm, így fénymikroszkóppal láthatatlan. A plazmamembránt alkotó foszfolipid kettős réteg sok membránfehérjét tartalmaz, melyek transzporterként, receptorként, adhéziós molekulaként, ioncsatornaként működhetnek. A plazmamembrán külső felszíne szénhidrátokban gazdag, melyek oligoszacharid láncok formájában membránfehérjékhez (glikoproteinek) vagy lipidekhez (glikolipidek) kapcsolódnak. Ezt a szénhidrátréteget *glikokalix*nak nevezik.

A plazmamembrán felépítésének klasszikus leírása a *Singer–Nicolson*-féle *folyékony mozaik modell* (1972). A modell szerint a foszfolipidek és membránfehérjék oldalirányú elmozdulása szabadon megtörténhet, így a membrán szerkezete többé-kevésbé egységes. Régóta ismert volt azonban, hogy a membránfehérjék mozgását fehérje-fehérje kölcsönhatások vagy sejtkapcsoló struktúrák korlátozhatják. Polarizált sejtekben (endotél, epitél) például az apikális és bazolaterális membrán fehérje-összetétele eltérő. Az apikális és bazolaterális membránfehérjék keveredését a két felszínt elválasztó, a szomszédos sejteket összekapcsoló szoros illeszkedés a tight junction nevű membránképződmény akadályozza meg.

Az utóbbi évek kutatásai megállapították, hogy a membrán lipidösszetétele is helyi variációkat mutat, tehát *membrán mikrodomének* léteznek. A membrán bizonyos területei rendezettebbek, kevésbé folyékonyak, detergenseknek jobban ellenállnak. Összetételüket vizsgálva kiderült, hogy ezek a tulajdonságok a mikrodomének magas koleszterin, szfingolipid és glikolipid tartalmának köszönhetőek. A mikrodomének fehérjetartalma is magas, tipikus a glikofoszfatidilinozitol (GPI) horgonnyal, illetve lipid módosítások (zsírsav, izoprén) révén membránhoz rögzített fehérjék jelenléte. Mivel a mikrodoménekben a membránreceptorok, ioncsatornák és más, a jelátvitelben szereplő fehérjék is feldúsulnak, a mikrodoméneket szignalizációs platformnak vagy *szignaloszómák*nak is nevezik.

A membrán mikrodomének egyik csoportja látható szerkezetet nem képez, csak bonyolult vizsgálóeljárásokkal mutatható ki. Ilyenek a *lipidtutajok* (raft). Elektronmikroszkóppal felismerhető, struktúrát létrehozó mikrodomének a *burkolt gödrök* (coated pit) és a *kaveolák*. Ezekben az esetekben membránhoz asszociált (*klatrin*) vagy integráns membránfehérjék (*kaveolin*) hozzák létre a membrán jellegzetes görbületét. Ezek a struktúrák a jelátvitel mellett internalizációs folyamatokban (endocitózis, pinocitózis, receptor internalizáció) is részt vesznek. A plazmamembrán speciális struktúrákat tartalmaz a citoszkeleton és az extracelluláris mátrix fehérjéinek lehorgonyzására; ezeket lásd az extracelluláris mátrix fejezetnél.

Citoszol

Az eukarióta sejt tartalma, vagyis a plazmamembrán által körülvett tér *citoplazmá*ra és *nukleoplazmá*ra oszlik. A citoplazmának az organellumok által el nem foglalt részét citoszolnak hívják. (A citoplazma és a citoszol a mindennapi használatban gyakran szinonimaként szerepel.)

A citoszol számos sejtfunkció színtere. Az emlős sejt fehérjéinek mintegy fele ebben a kompartimentumban található, ennek megfelelően metabolikus aktivitása is jelentős. A citoszol tipikus reakciói: glikolízis, glukoneogenezis, pentóz-foszfátciklus, aminosav anyagcsere, fehérjeszintézis. A citoszol közvetíti a metabolitok for-

galmát az organellumok között. Míg a hidrofil molekulák forgalmát a diffúzió is kielégíti, specifikus kötőfehérjék szükségesek a hidrofób molekulák (mint például a zsírsavak vagy szterinek) szállításához. A makromolekulák többnyire a vezikuláris transzport mechanizmusaival, a citoszoltól elkülönítve szállítódnak az organellumok között.

A citoszolon haladnak keresztül a jelátviteli pályák a plazmamembrán és az organellumok, valamint a sejtmag között. Ebben a kompartimentumban szerveződik a sejtmozgás és a mitózis gépezete, a citoszkeleton is.

Bár a citoszolban nincsenek membránok által határolt szubkompartimentumok, molekuláinak megoszlása nem random: speciális szerveződések biztosítják a molekulák felhalmozódását a citoszol bizonyos régióiban. A kis molekulák közül a szignál molekulák esetében bizonyították a citoszolon belüli koncentrációgradiens létezését: a nyitott kalcium csatornák környezetében például rövid életidejű „kalcium hullámok", magas kalcium koncentrációjú régiók alakulnak ki. Hasonló mikrodoméneket cAMP, ATP és O_2 esetében is kimutattak. Ezek a megfigyelések valószínűvé teszik, hogy hasonló regionális koncentrációkülönbségek az intermedier anyagcsere metabolitjainak esetében is fennállhatnak.

A szerveződés másik szintje a makromolekuláris fehérje- és nukleoproteinkomplexek kialakulása. A metabolizmusban ezek az enzimkomplexek elősegítik a hatékonyabb enzimfunkciót a „szubsztrát channeling" révén. A citoszkeleton fehérjekomplexei, valamint a *riboszóma*k szintén a citoszolban szerveződnek. A *proteaszóma* fehérjekomplexe még a citoszoltól elkülönülő üreggel is rendelkezik, azonban nem tekinthető különálló kompartimentumnak, mert nem membránnal határolt. A proteaszomális fehérjék által határolt üreg tartalma azonban nem keveredik szabadon a citoszoléval.

Sejtmag

Az eukarióták genetikai állományának túlnyomó része membránnal határolt organellumban, a sejtmagban található. A sejtmag elősegíti a genetikai állomány megőrzését, és hozzájárul a génexpresszió szabályozásához.

A sejtmag általában mintegy 5 μm átmérőjű gömbölyű képlet, gyakran a sejt alakjának megfelelően ellapul, vagy megnyúlik. Bizonyos sejtekben (például a polimorfonukleáris granulocitákban) lebenyes, karéjozott szerkezetű, mely feltehetőleg ezen sejtek speciális sejtfunkcióját, a szűk helyeken való átjutást (diapedesis) szolgálja. A sejtmagot határoló *magmembrán* (ER eredetű kettős membrán) külső lemeze folyamatos az ER hálózatával, míg a belső lemezzel a *magpórus*ok körül kialakuló áthajlások révén közlekedik. A magmembrán alatt található *nukleáris lamina* a citoszkeletonhoz hasonló rostrendszer, mely *lamin* nevű fehérjékből épül fel. A laminok egy része farneziláció (lipidmódosítás) révén kapcsolódik a magmembrán belső felszínéhez. Mivel a membránon a legtöbb molekula nem tud átjutni, magpórusok szükségesek a makromolekulák szabad vándorlásához. Ezeken a helyeken a kettős membrán áthajlása nagy átmérőjű (25-30 nm) pórust képez. A pórus nyílásába az úgynevezett *póruskomplex* illeszkedik, ez a mintegy harmincféle *nukleoporin* fehérjéből álló komplex biztosítja a fehérjék és nukleinsavak vektoriális, irányított transzportját.

A sejtmag belseje nem képez további szubkompartimentumokat, de nem is homogén. A funkcionális sejtmagi régiók közül a legfontosabb a *sejtmagvacska* (nukleólusz), ahol a riboszómák szintézise és érése történik. Érdekes módon a kromoszómák sem véletlenszerű módon helyezkednek el a sejtmagban, hanem saját területtel bírnak, egymáshoz képest helyük meghatározott. A kromoszómák

heterokromatin (transzkripciósan inaktív) régiói általában a sejtmag perifériájára húzódnak, a transzkripciósan aktív eukromatin régiók pedig a centrumhoz vannak közelebb.

Mitokondrium

A mitokondrium az endomembrán rendszertől független, külső és belső membránnal határolt sejtszervecske, mely valószínűleg az eukarióta sejt bakteriális eredetű *endoszimbionta*ja.

A mitokondriumok már fénymikroszkóppal is felismerhető, néhány μm hosszúságú, általában pálcika vagy gömb alakú organellumok, melyeknek finomabb szerkezete csak elektronmikroszkóppal tanulmányozható. Az organellumot *külső* és *belső membrán* határolja, két kompartimentumot, a *membránközti ter*et, illetve a *mátrix*ot hozva létre. A belső membrán felületnagyobbítás céljából *kriszták* (ritkábban tubulusok) formájában betüremkedik a mátrix felé. A membránközti tér a külső membránon található pórusok miatt a citoszol kis molekulái számára viszonylag könnyen megközelíthető, azonban a belső membrán igen zárt, csak transzportereken keresztül átjárható. Ennek megfelelően a mátrix metabolitösszetétel, pH és redoxpotenciál tekintetében meglehetősen különbözik a citoplazmától.

A két membrán, illetve a két kompartimentum saját, jellegzetes proteómával is rendelkezik. A mátrix fehérjetartalma igen magas (>500 mg/ml), itt találhatók a citrát-ciklus, zsírsav α-oxidáció, vas-kén komplex biogenezis és a hem szintézis egyes enzimei. A belső membrán szintén fehérjegazdag, ide lokalizálódnak a terminális oxidáció és az oxidatív foszforiláció enzimkomplexei, valamint a fehérjeimport és metabolit transzport csatornái és transzportfehérjéi. A membránközti tér, mely fehérjében lényegesen szegényebb, citokróm-c-t, apoptotikus faktorokat, antioxidáns és más redox enzimeket tartalmaz. A külső membránban a pórusokat formáló fehérjék, apoptotikus faktorok, és a protein importban szerepet játszó komplexek jelenléte jellegzetes.

A mitokondrium mátrixában található az organellum saját genetikai állománya kétszálú, cirkuláris, 16 600 bázispárból álló DNS formájában. A mitokondriális DNS sok fehérjével együtt a *nukleoid* nevű szerkezetet alkotja, mely a belső membrán mátrix felé néző felszínéhez kapcsolódik. A nukleáris genómától különbözően, egy sejtben a mitokondriális DNS molekulák száma több száz is lehet. A két szál bázisösszetétele különböző, az ún. nehéz lánc sok guanint, míg a könnyű lánc sok citozint tartalmaz. Előbbi 2 riboszomális RNS-t, 14 transzfer RNS-t és 12 mitokondriális fehérjét, míg utóbbi 8 tRNS-t és egy mitokondriális fehérjét kódol. A kódolt fehérjék az oxidatív foszforiláció komponensei. A többi mitokondriális fehérje (körülbelül 1500, melyek közül már több mint ezret azonosítottak) a sejtmagban kódolt. A mitokondriális DNS kevés nem-kódoló szekvenciát tartalmaz, a fehérjét kódoló génekben pedig nincsenek intronok. A mitokondrium genetikai kódja (4 kodon erejéig) különbözik az univerzális genetikai kódtól, így a mitokondriális gének csak a mitokondriumban képesek expresszálódni. Az autonóm genetikai állománynak megfelelően a mátrixban riboszómákat és tRNS-t is találunk. A mitokondrium saját fehérjefolding és proteolitikus apparátussal is el van látva.

A mitokondriális DNS anyai ágon öröklődik. Replikációja független a nukleáris DNS replikációjától. A lokális oxidatív hatások miatt gyakrabban fordulnak elő benne mutációk. Evolúciójának sebessége nagyobb, mint a nukleáris genómáé.

Az endomembrán rendszer

Az endomembrán rendszer felépítésében az ER játszik központi szerepet. Része a sejtmagot burkoló, minden sejtben megtalálható maghártya is. Ezzel összefügg az ER tulajdonképpeni hálózata, melynek kiterjedése sejttípustól függő. Az ER a vezikuláris transzport által fenntartott *szekréciós pálya* révén állandó kétirányú anyagforgalmat bonyolít le a Golgi-apparátussal és a plazmamembránnal. Más organellumok, így a lizoszómák, peroxiszómák, autofág vezikulák, zsírcseppecskék biogenezisében is meghatározó szerepe van.

A szekréciós pálya organellumai

Az endoplazmás retikulum

Az ER lapos zsákszerű képletek (ciszternák) és csövecskék (tubulusok) folytonos hálózata, mely a magmembránt is magába foglalja. Sok eukarióta sejt legnagyobb organelluma, melyet folyamatos membrán határol. Az organellum igen erős metabolikus aktivitással rendelkezik, valamint fontos intracelluláris kalciumraktár. Luminális kompartimentuma a vezikuláris transzport révén állandó összeköttetésben van a szekréciós pálya többi organellumával valamint az extracelluláris térrel; az ER lumenét ennek megfelelően sejten belüli külvilágnak tekinthetjük.

Az ER kétféle típusa különböztethető meg elektronmikroszkóppal: a *sima*, illetve a *riboszómás ER* (SER, illetve RER). Az utóbbi citoszol felé néző felszínéhez a membránhoz kapcsolódó riboszómák tapadnak; ennek megfelelően legfontosabb funkciója a fehérjeszintézis, poszttranszlációs módosítások és folding végrehajtása. A RER felépítésére a ciszternák jellemzőek, melyek egymásra párhuzamosan rendeződnek, és a szekréciós fehérjék intenzív szintézisére berendezkedett (úgynevezett professzionális szekréciós) sejtekben a citoszol nagy részét kitöltik. A SER-t tubulusok szövevényes hálózata alkotja. A két frakció aránya sejttípustól függően különböző: a RER minden sejtben jelen van, a SER viszont a biotranszformációra, hormonszekrécióra, lipidszintézisre specializálódott sejtekben található nagyobb arányban.

A RER speciálisan átalakult ciszternája a magmembrán. Ennek citoszol felé néző felszínén is találhatók riboszómák, míg belső felszíne a kromatinnal érintkezik. Ennek a speciális elrendeződésnek köszönhetően az ER-ből kiinduló jelpályák közvetlenül, a citoszol megkerülésével is elérhetik a sejtmagot.

A csaknem minden sejtben megtalálható RER-en és SER-en kívül egyes sejtekben az organellum specializált formái is megjelennek, mint például a *szarkoplazmás retikulum* (SR), a sima felszínű ER harántcsíkolt és simaizomban előforduló válfaja. Bár az ER lumene egységes, a membrán fehérjeösszetétele helyenként különbözhet, így szubdoménekről is beszélhetünk. A *tranzíciós* ER (vagy ERES, endoplasmic reticulum exit site) a Golgi-apparátusba irányuló vezikuláris transzport kiindulási pontja, melyben felhalmozódnak az ebben a folyamatban szerepet játszó fehérjék. Az ER membránja kapcsolódási pontokat létesít más membránokkal; ezek a pontok strukturálisan és funkcionálisan szintén szubdoménnek tekinthetők. Az ER-nek a peroxiszómákkal és mitokondriumokkal alkotott kapcsolódási helyein az organellumok membránjának foszfolipidjeit szintetizáló enzimek találhatók, illetve olyan lipid bioszintetikus folyamatok, melyek mindkét organellum enzimeinek részvételét igénylik.

A mitokondrium és az ER kapcsolódási pontja, a *MAM* (mitokondrium-asszociált membrán) emellett még a kalcium ionok ER és mitokondrium közötti forgalmában is szerepel; lehetővé teszi a két organellum közötti kalciumáramlást a citoszol kalciumkoncentrációjának jelentős emelkedése nélkül. A plazmamembránnal asszociált *PAM* (plazmamembrán-asszociált membrán) szintén a lipid szintézisben és transzferben, valamint kalcium jelpályákban játszik szerepet.

A szarkoplazmás retikulum a plazmamembránnal vagy a plazmamembrán sajátos invaginációival, a T-tubulusokkal *kapcsolódó (junkcionális) membrán*t hoz létre. Sok fehérje, például a kalcium csatorna rianodin receptor specifikusan ezekben a struktúrákban található. A szarkoplazmás retikulum rezidens fehérjéi, a *junktofilin*ek kötik a membránt a plazmamembrán még azonosítatlan összetevőihez.

Endoplazmás retikulum – Golgi intermedier kompartimentum (ERGIC)

Az ER és a Golgi-apparátus közötti vezikuláris transzport állomása az ER – Golgi intermedier kompartimentum (ERGIC). A kompartimentumot tubulovezikuláris membránstruktúrák alkotják, jellegzetes fehérjéje az *ERGIC-53*, a szénhidrátkötő fehérjék (*lektin*ek) közé tartozó, mannóz-specifikus membrán lektin, mely glikoprotein receptorként szekréciós fehérjéket szállít az ER-ből az ERGIC-be. Az ER-ből kilépő transzportvezikulák elérnek az ERGIC-hez, majd egy második lépésben a Golgi-apparátushoz. Az ERGIC az anterográd és retrográd vezikuláris transzport fontos állomása. Az ERGIC lumen enyhén savas kémhatása is szerepet játszhat a fehérjék irányításában; az ER *KDEL retenciós szekvenciá*t (Lys-Asp-Glu-Leu) tartalmazó rezidens fehérjéi itt kötődnek receptorukhoz (*KDEL receptor*), melynek ligandkötése enyhén savas pH mellett megy végbe. A receptorhoz kötött fehérjék azután visszaszállítódnak az ER-be, ahol a magasabb pH-n disszociálnak a receptorról. Az ERGIC-ban emellett a szekréciós fehérjék koncentrálódása, tekeredése és minőségellenőrzése is folytatódik.

Golgi-apparátus

A Golgi-apparátus rendszerint 5-8 párhuzamos ciszternát képez a sejtmag, illetve az ER közelében. A Golgi-apparátust funkcionálisan öt egység alkotja: a *cisz*-Golgi hálózat, a *cisz*-Golgi, középső-Golgi, *transz*-Golgi, és *transz*-Golgi hálózat. A *cisz* a sejtmaghoz közelebbi, a *transz* az attól távolabbi struktúrákat jelöli. Az ER-ből érkező, az ER – Golgi intermedier kompartimentumon áthaladó transzportvezikulák egyesülnek a *cisz*-Golgi hálózat elemeivel, illetve onnan lefűződve indulnak vissza az ER-be. A szekréciós és membránfehérjék transzportvezikulákba csomagolva végighaladnak a Golgi-apparátus állomásain, ahol különböző poszttranszlációs módosulásokon mennek át, végül a *transz*-Golgi hálózatban szétoszlanak további rendeltetési helyük szerint (plazmamembrán, lizoszóma, peroxiszóma) és újfent transzportvezikulákba csomagolódnak.

Szekréciós vezikulák

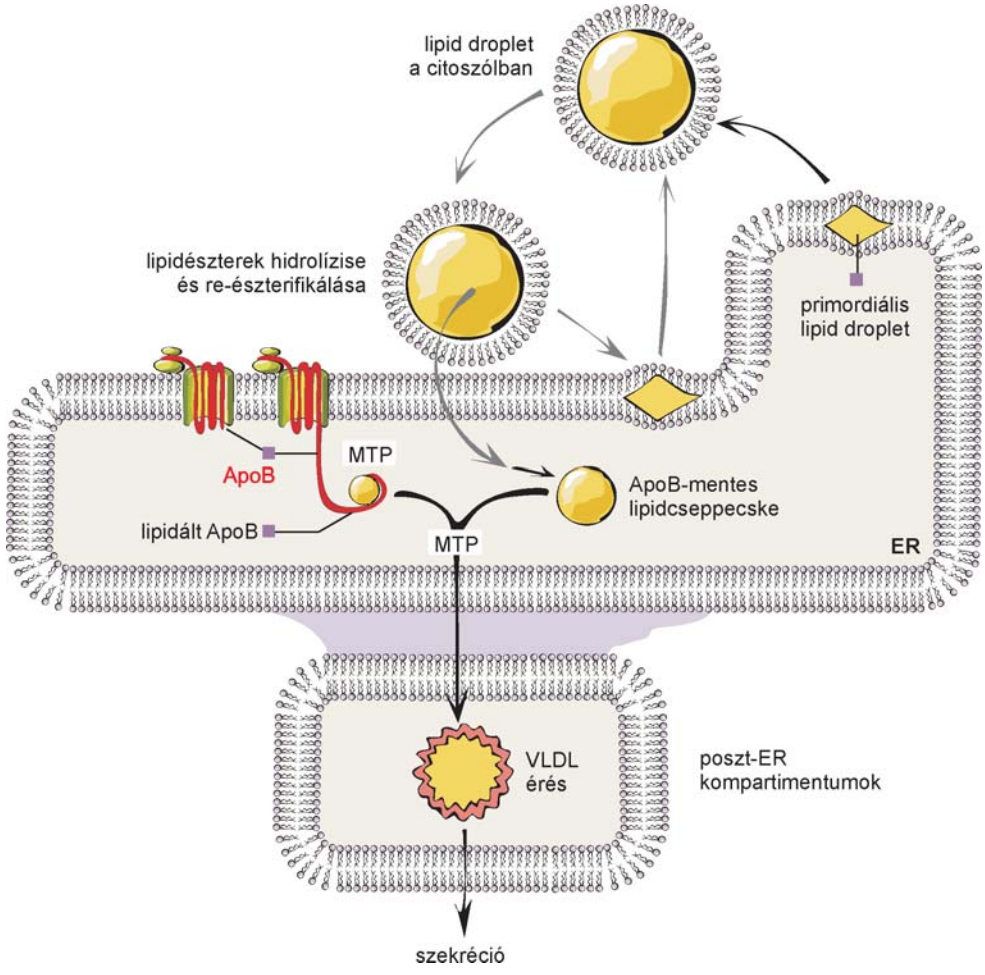
A *transz*-Golgi hálózat és a plazmamembrán közti kétirányú összeköttetést *transzportvezikulák* biztosítják. A vezikula membránja minikompartimentumot hoz létre, luminális tartalmát elzárja a citoszollal történő keveredéstől. A vezikuláris lumen tehát extracelluláris térnek tekinthető. A transzportvezikulák folyamatosan ürülhetnek az extracelluláris térbe (konstitutív szekréció) vagy sejten belül felhalmozódnak és csak bizonyos hatásra érnek célba (szabályozott szekréció).

Az endomembrán rendszer oldalágai

Zsírcseppecske

A neutrális lipidek a sejtek citoplazmájában zsírcseppecskék (lipid droplet) formájában tárolódnak. A triglicerid raktározására szakosodott adipocitákban a zsírcseppecskék az uralkodó organellumok; szinte teljesen kitöltik a citoplazmát. Kisebb mértékben azonban más sejttípusokban is jelen vannak, ahol felszaporodásuk az inzulin rezisztenciával jellemezhető kórképek (elhízás, metabolikus szindróma, 2-es típusú diabétesz) esetében fordul elő.

A zsírcseppecskéket (miként a lipoproteineket is) sajátos módon amfipatikus lipidek (foszfolipidek és koleszterin) egy rétege veszi körül, összhangban a „lumen" hidrofób tartalmával. Az egyrétegű membrán fehérjéi közül a *PAT család* (főbb tagjai: *p*erilipin, *a*dipofilin, *T*IP47) a legismertebb. A családhoz tartozó fehérjék mind-



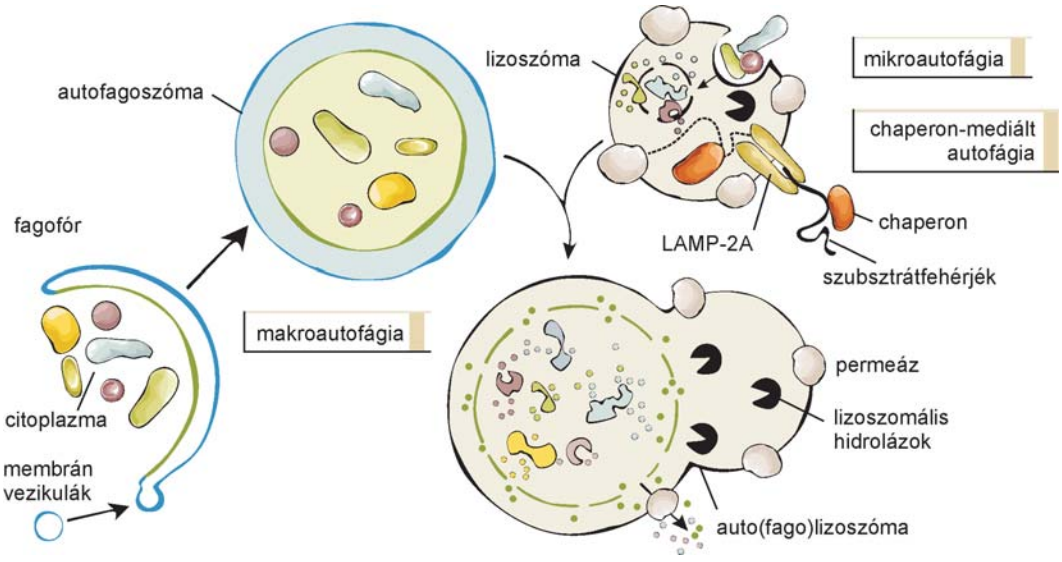
III/8-1. ábra
Kapcsolat a zsírcseppecske és a VLDL-szintézis között

annyian tartalmaznak zsírcseppecske-kötő szekvenciát, mely konstitutív módon vagy metabolikus hatásra az organellumhoz irányítja őket. A zsírcseppecske felszínén azután a raktározott neutrális lipidek szintéziséhez vagy lebontásához szükséges enzimeket toboroznak.

A zsírcseppecskék 0,1–0,4 μm-es átmérőjű *primordiális droplet* formájában az ER membránján belül kezdenek kialakulni. A dropletek bizonyos nagyság elérése után lefűződnek vagy kihasadnak, önálló organellummá válnak, majd sorozatos fúziók révén érik el méretüket. Mind a primordiális dropletek, mind a citoplazmai zsírcseppecskék szoros összeköttetésben vannak a lipoproteinek (kilomikron, VLDL) szintézisével. Az ER lumenébe kerülő apolipoproteineket a *mikroszomális triglicerid transzfer protein* (MTP) tölti fel lipidekkel, melyek forrása a zsírcseppecske is lehet *(III/8-1. ábra)*. A zsírcseppecskék intenzív lipidforgalma miatt méretük dinamikusan változik, a sejt anyagcseréjének függvényében.

Autofagoszóma (autofág vakuóla)

A sejt makromolekuláinak egyensúlyi állapotát biztosító egyik legfontosabb katabolikus folyamat a *makroautofágia*, melynek során a sejt saját összetevőit lizoszomálisan lebontja, majd az építőköveket újrahasznosítja. A makroautofágia folyamatában a sejt lebontásra ítélt részei (citoszol és organellumok egyaránt) dupla, kettős foszfolipidrétegű membránba csomagolódnak. A csomagoló membrán rövid, templátként funkcionáló, valódi lumennel nem rendelkező *izoláló membrán* formájában jelenik meg, mely egymást követő lépésekben, vezikulák és/vagy ciszternális membrándarabok fúziója révén hosszabbodik (elongáció), míg a kialakuló *autofagoszóma* körbe nem éri a szekvesztrálandó sejtrészletet. A membrán forrása valószínűleg az ER, illetve annak MAM frakciója. Az autofagoszóma kialakulásához



III/8-2. ábra
Az autofágia típusai

szükséges fehérjék autofágia-függő gének termékei, *Atg fehérjék*ként ismertek. A szekvesztráció befejeződése után az autofagoszóma külső membránja egyesül a lizoszóma membránnal és *autofagolizoszóma* jön létre, míg a belső membránnal borított vakuóla (melyet autofág testnek is neveznek) a lizoszóma lumenébe kerül. Végül az autofág test membránját és belső tartalmát a lizoszomális hidrolázok lebontják *(III/8-2. ábra)*.

Endoszóma

Az endocitózis során keletkező endocitotikus vezikulák hozzák létre az endoszómákat. Az endocitózis általában a burkolt gödör – klatrinnal burkolt vezikula – klatrinmentes vezikula útvonalon valósul meg (lásd a vezikuláris transzport fejezetet). Az endoszómák képződésének módja lehet a fúzió már létező endoszómákkal, vagy az endocitotikus vezikulák homotipikus fúziója, amikor egyforma vezikulák egyesüléséből jön létre a *korai endoszóma*.

A korai (vagy osztályozó) endoszóma további sorsa kétféle lehet: membránja és tartalma részben visszakerülhet a sejtfelszínre (recirkuláció), vagy továbbalakulhat késői endoszómává. A korai endoszóma luminális pH-ja enyhén savas (~6,0), mivel membránjában proton ATP-ázok működnek. A savi pH elősegíti a receptor – ligand kapcsolatok disszociációját, így ez a mechanizmus felhasználható a receptorok visszajuttatására a plazmamembránba. Így történik az LDL receptorok és transzferrin receptorok újrahasznosítása; az üres receptorok transzportvezikulákban (az endocitotikus recirkuláló kompartimentumban), melyeknek pH-ja 6,5 körüli, visszautaznak a sejtfelszínre, míg ligandjaik (az LDL és a vasionok) a késői endoszóma felé haladnak tovább.

A *késői endoszóma* erősebben savas pH-jú (5-6) organellum, melyben már megkezdődik az extracelluláris eredetű tartalom lebontása; a késői endoszóma a vezikuláris transzport útján összeköttetésben van a *transz*-Golgival, ahonnan hidrolitikus enzimeket kap. A lebontás a lizoszómában fejeződik be: a késői endoszóma fúzionál az elsődleges lizoszómával.

A korai endoszómákból kialakuló sajátos képződmény a *multivezikuláris test*. Az internalizált receptorok a korai endoszóma specializált doménjében ubikvitinálódhatnak (általában monoubikvitináció történik), majd az őket tartalmazó membrán begyűrődik, és vezikula formájában lefűződik. Végül az endoszóma lumene megtelik apró vezikulákkal, innen az organellum neve. Ez a mechanizmus megakadályozza az internalizált receptorok plazmamembránba való visszatérését, az egész képződmény a lizoszómában végzi pályafutását. Az ubikvitináció tehát ebben az esetben is lebontási jelként szerepel, bár a fehérjék hidrolízisét nem a proteaszóma végzi el. A multivezikuláris test fúzionálhat a plazmamembránnal is, ilyenkor a lumenben található apró vezikulák kijutnak az extracelluláris térbe.

Lizoszóma

A lizoszómák membránnal körülvett, 0,05 –1 μm átmérőjű organellumok. Megjelenésük igen változatos lehet. Szerepük a sejt számára már felesleges sejtalkotók, valamint az extracelluláris térből felvett anyagok – elsősorban makromolekulák – lebontása. A katabolikus reakciókat a lizoszóma lumenének savas hidrolázai katalizálják, melyek lipideket, szénhidrátokat, fehérjéket és nukleinsavakat egyaránt képesek bontani. A hidrolitikus reakciók savas pH (~5) mellett működnek optimálisan, melyet a lizoszóma membrán *proton-ATP-áz*a hoz létre. Az alacsony intraluminális pH hozzájárul a szubsztrátok denaturálódásához is. A hidrolázok savas pH-optimu-

ma megakadályozza, hogy esetlegesen a citoplazmába kikerülve nagy aktivitással tovább működjenek.

A lebontandó szubsztrátokat még nem tartalmazó, úgynevezett *elsődleges lizoszóma* elektronmikroszkóposan homogén szerkezetű, szabályos gömb alakú. Az elsődleges lizoszóma az endoszómával, fagoszómával vagy autofagoszómával fúzionálva kialakítja a *másodlagos lizoszóma*t (fagolizoszómát, autofagolizoszómát), mely már tartalmazza a lebontásra ítélt molekulákat és organellumokat, alakja változatos lehet és belseje egyenetlen. Korosabb sejtek lizoszómáiban a lipofuszcin nevű pigment is felhalmozódhat.

Az extracelluláris szubsztrátok endocitózissal, majd az endoszóma és a primer lizoszóma fúziójával jutnak be a lizoszomális lumenbe. Ugyanez a fagocitózisra képes sejtekben fagoszóma képződésen keresztül valósul meg. Az intracelluláris szubsztrátok zömmel a makroautofágia folyamatában, autofág vezikula tartalmaként kerülnek a lizoszómába. *Mikroautofágia* során a lizoszomális membránon kis, lefűződő bemélyedések képződnek, melyek a citoplazma apró porcióit juttatják be, és a citoplazmai fehérjék lassú, de folyamatos lebontását eredményezik *(III/8-2. ábra).* Az internalizálódott vezikula végül tartalmával együtt hidrolizál. Ezek a folyamatok nem-specifikus lebontást eredményeznek.

A lizoszóma azonban képes szelektív fehérjelebontásra is (III/8-2. ábra). Ilyenkor citoplazmai és lizoszomális dajkafehérjék, valamint membránreceptorok is részt vesznek a folyamatban, mely a citoplazmai fehérjebontás mintegy 30%-áért felelős. A lebontandó fehérjék (például ribonukleáz A, glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, aldoláz, foszfoglukomutáz, proteaszomális proteinek) lizoszómába irányító *KFERQ szignál* szekvenciát tartalmaznak. A szekvenciát a hsc70 dajkafehérje ismeri fel és köti a citoplazmában. A komplex a lizoszomális membrán LAMP-2A glikoproteinjéhez kötődik, majd a lizoszomális hsc70 segítségével, egy még azonosítatlan csatornán keresztül bejut a lumenbe. (A lizoszomális hsc70 valószínűleg szintén a citoplazmából származik, hiszen szintén tartalmazza a KFERQ szignál szekvenciát.) A teljes folyamat hőmérsékletfüggő és ATP-t igényel. A makroautofágiához hasonlóan, a *dajkafehérje-mediált lizoszomális proteolízis* szintén fokozódik éhezésben. Ennek fiziológiás szerepe az lehet, hogy csökkenti a glikolízis és a proteaszomális fehérjelebontás sebességét.

Miután a lizoszomális proteázok, nukleázok, lipázok és más hidrolázok elvégezték a makromolekulák lebontását, az építőköveket specifikus transzporterek szállítják vissza a citoplazmába. A luminális hidrolázok és a transzporterek mutációja lizoszomális tárolási betegségekhez vezet, a szubsztrátok és/vagy termékek felhalmozódásával. Hasonlóképpen rontják a lizoszomális funkciókat a lizoszomotróp ágensek; ezek a vegyületek felhalmozódnak a lizoszómákban és ott protonofórként hatva megszüntetik a lumen savas pH-ját, mely előfeltétele a luminális hidrolázok működésének.

Peroxiszóma

A peroxiszóma nevét a rá jellemző marker enzimekről kapta, melyek hidrogén-peroxidot termelnek, vagy bontanak. Az emlős peroxiszómák egyszeres membránnal határolt vezikulák. Belsejükben granuláris mátrix található, gyakran kristályos magot is tartalmaznak. Alakjuk kerek vagy ovális, átmérőjük 0,05–1 μM. Egy átlagos májsejtben körülbelül 1000 db peroxiszóma található, melyek (nem indukált állapotban) a sejt térfogatának 2–3%-át foglalják el, és a teljes májfehérjének 1–1,5%-át teszik ki.

A peroxiszómát eredetileg kevés jelentőséggel bíró, csökevényes organellumnak tartották, az utóbbi évtizedekben fény derült vitális funkcióira; elsősorban a lipid anyagcserében tölt be nélkülözhetetlen szerepet.

Extracelluláris kompartimentumok

Az extracelluláris vezikulák foszfolipid kettősréteggel borított, egyes sejttípusok által kibocsátott különböző méretű képződmények. Az *exoszómák* 40-100 nm átmérőjű vezikulák, méretük így egybevethető a vírusokkal vagy a lipoproteinekkel. A multivezikuláris testek konstitutív vagy regulált exocitózisa során keletkeznek: a multivezikuláris test külső membránja fúzionál a plazmamembránnal, és a kis belső vezikulák kiszabadulnak. A retikulocitákban írták le őket először, emellett elsősorban immunsejtekre és tumorokra jellemzőek. Az exoszómák fehérjéket, mRNS-t, miRNS-t tartalmazhatnak.

A *mikrovezikulák* 100-400 nm átmérőjüek, a plazmamembrán szabályozott lefűződésével keletkeznek. Forrásuk lehet a vérlemezke, a vörösvértest vagy az endotél.

Az *apoptotikus testek* az apoptotikus sejtek plazmamembránjának nagyméretű kitüremkedéseiből fűződnek le, méretük 1000–5000 nm, felületükön foszfatidilszerin található, DNS fragmentumokat tartalmazhatnak.

Az extracelluláris vezikulák funkcióit még csak most kezdjük megismerni. Felhasználhatók a sejt felesleges anyagainak eltávolítására, illetve sejt–sejt közötti kommunikációra, genetikai információ átvitelére. A sejtek közötti anyagforgalomnak ezt a módját *trogocitózis*nak nevezik.

III/8.3. CITOSZKELETON ÉS VEZIKULÁRIS TRANSZPORT

Az intracelluláris diffúzió fontos szerepet játszik a kisméretű molekulák mozgatásában, a sejten belüli anyag- és információvándorlásban. Bizonyos méret felett azonban a diffúzió sebessége igen lassú, illetve rögzített molekulák, makromolekuláris komplexek ezen a módon el sem tudnak mozdulni. Ilyenkor energia-befektetésre van szükség: a kémiai energiát motorfehérjék alakítják mozgási energiává, a vezikulákba csomagolt áru pedig a citoszkeleton vágányhálózatát felhasználva jut el rendeltetési helyére.

A vezikuláris transzport

A szekréciós pálya egyes kompartimentumai, valamint a sejtfelszín között a minden esetben kétirányú forgalmat *transzportvezikulák* bonyolítják le. A vezikulák mindig donormembránokból jönnek létre, *de novo* szintézisük lipidekből és fehérjékből nem lehetséges. A vezikuláris transzportnak biztosítania kell a specificitást, vagyis hogy a feladó organellum a megfelelő molekulákat csomagolja be, illetve azt, hogy a csomag megérkezzék a címzett organellumhoz. Az ezt biztosító molekuláris mechanizmusok még csak részleteiben ismertek és a sejtbiológia legfontosabb kutatási témáinak egyikét képezik.

A vezikula képződésének első lépése a membrán kiboltosulása. Ezeken a helyeken a kialakulóban lévő vezikula citoszol felé néző felszínéhez fehérjék kapcsolódnak. A fehérjeburok kettős funkciójú: elősegíti a membrán konformációjának megváltozását, vagyis a vezikula lefűződését, valamint segít a luminális fehérjék kiválogatásában. Háromféle *coatomer* fehérje (köpenyfehérje) töltheti be ezt a szerepet, ily módon háromféle vezikula alakulhat ki: *klatrin*nal fedett vezikulák (az endo-

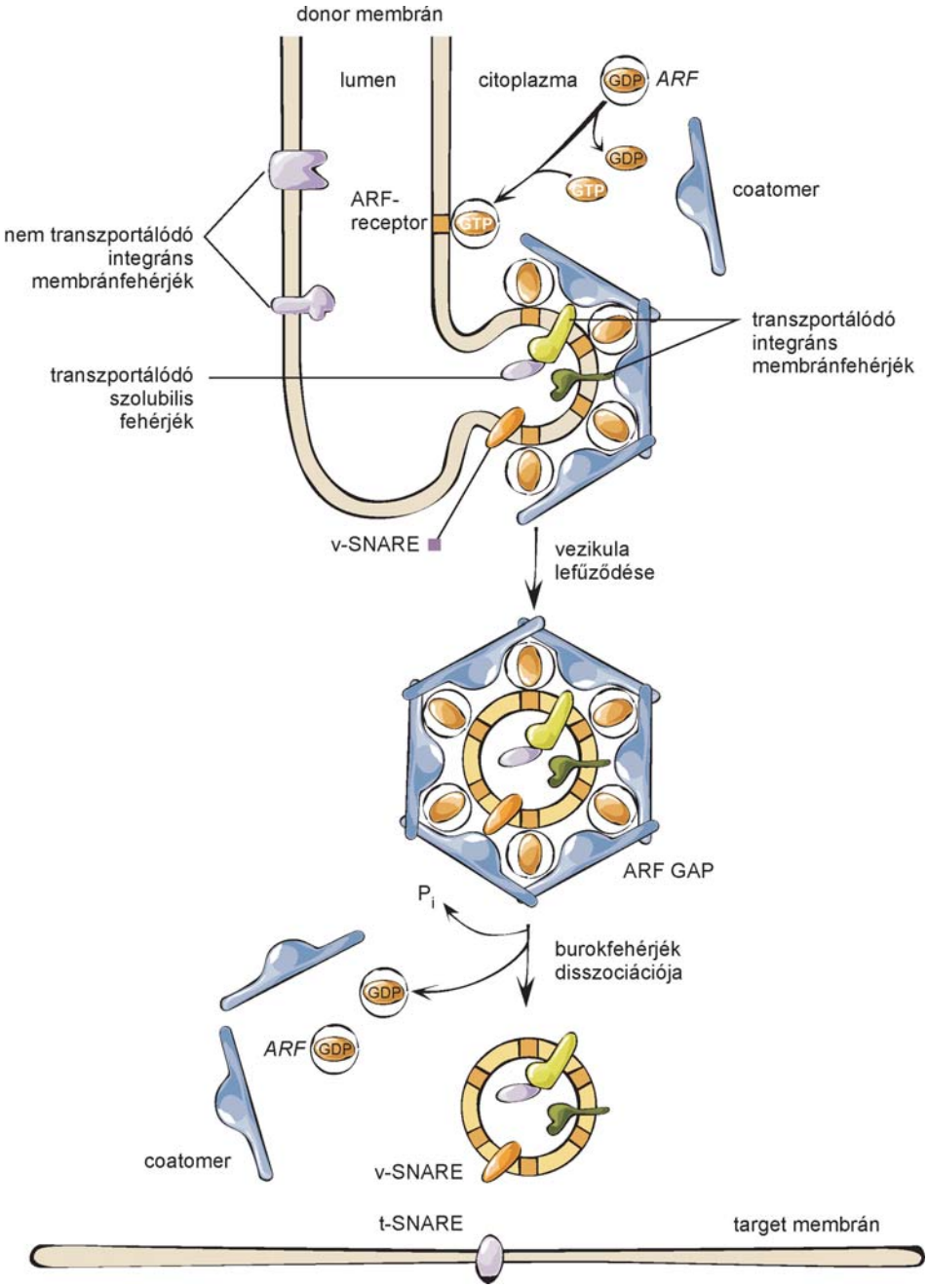
citózisban és a *transz*-Golgi és a lizoszómák közötti transzportvezikulák kialakításában vesznek részt), valamint COP-I és COP-II (*COP* = coat protein) fehérjével burkolt vezikulák, melyek az ER és a Golgi-apparátus közti anterográd és retrográd forgalmat bonyolítják le.

A klatrinnal burkolt vezikulák kialakulásának első lépése a burkolt gödör megjelenése. A leendő gödör helyén klatrin polimerizáció kezdődik a membrán citoszoli felszínén. A klatrin-monomert három könnyű és három nehéz lánc építi fel, tipikus háromlábú szerkezetet hozva létre. A nehéz láncok képezik a lábakat, felépítésükben *N*-terminális globuláris domén, disztális összekötő szakasz és proximális (*C*-terminális) könnyű láncot kötő domén vesz részt. Az ide kapcsolódó könnyű láncok szabályozzák a szerkezet össze- és szétszerelődését. A klatrin polimerizációja öt- és hatszögekből felépített poliédert hoz létre a vezikula felszínén, mely a futball-labdához hasonlít. A klatrin spontán is könnyen polimerizálódik, és a felszabaduló energia elegendő a membrán konformációjának megváltozásához. A klatrinvázhoz járulékos fehérjék is csatlakoznak, közülük az *adaptin*ok a legfontosabbak. Az adaptinok *AP* (assembly particle) fehérjekomplexeket alkotnak, melyek négy alegységből épülnek fel. Az AP1 a *transz*-Golgiban, az AP2 a plazmamembránban vesz részt klatrinburkolatú vezikulák képződésében. Az AP komplexek a klatrinburok és a membrán közötti kapcsolatot erősítik, részt vesznek a vezikulába kerülő fehérjék rövid szignálszekvenciájának (dileucin motívum vagy tirozintartalmú szekvencia) felismerésében, valamint összeköttetést hoznak létre a citoszkeletonnal.

A vezikulák lefűződése már energiaigényes, ezért GTP-áz aktivitású *dinamin* fehérjék közreműködésére van szükség. A polimerizálódó dinamin jobbmenetes hélixet formál a vezikula nyaki részénél, majd GTPáz aktivitása segítségével összeszorítja azt. A lefűződött vezikula ezután gyorsan megszabadul klatrinburkától. A leválás energiaigényes folyamatát a *hsc70* (egy konstitutív módon expresszálódó hősokkfehérje) ATP hidrolízise mellett katalizálja.

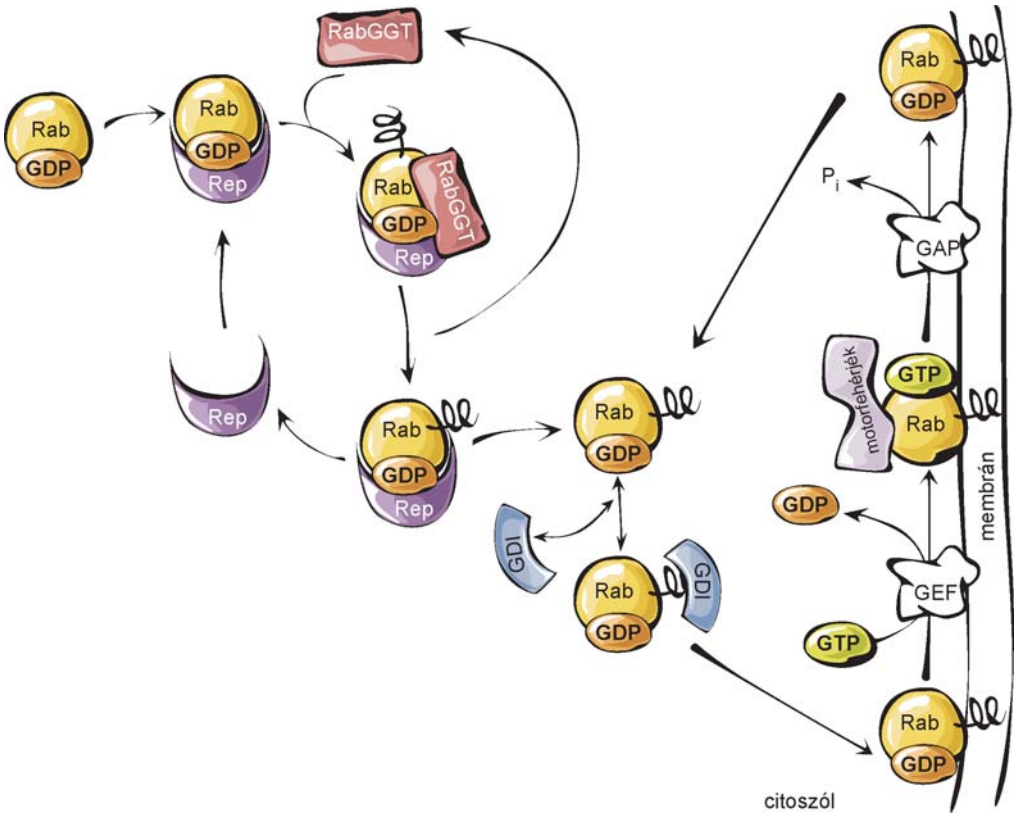
A klatrinmentes vezikula végül eljut a célorganellum membránjához és fuzionál. A beolvadás két elkülöníthető eseményből áll. Először a vezikulának fel kell ismernie a megfelelő célorganellum membránját. A második, aspecifikus fúziós lépésben a vezikula membránja egybeolvad a célorganellum membránjával, a vezikula tartalma pedig bekerül az organellum lumenébe, illetve kijut az extracelluláris térbe.

Az ER és a Golgi-apparátus közötti anterográd forgalmat COP-I típusú vezikulák bonyolítják le *(III/8-3. ábra)*. Kialakulásukhoz a COP-I mellett szükség van még az *ARF* (ADP-ribosylation factor) nevű, a *Ras-fehérjék* közé tartozó kis GTP-kötő fehérjére. Első lépésként az ARF aktiválódik, amit az *ARF GEF* (guanine exchange factor) által végzett GDP-GTP csere tesz lehetővé. Az ARF konformációváltozása elősegíti a membránhoz való kötődést, majd hozzá coatomer egységek (és transzportálandó fehérjék) kötődnek. A GTP hidrolízise, melyet *ARF GAP* (GTP-ase activating protein) stimulál, a burokfehérjék disszociációját váltja ki, ily módon elősegítve a vezikula beolvadását a célorganellum membránjába. A vezikulák gyenge, nem specifikus kölcsönhatásokat hoznak létre más membránokkal az úgynevezett kihorgonyzó faktorok részvételével. Ez megteremti a lehetőséget a specifikus, erősebb kapcsolódásra. A felismerés a *SNARE* (*SNA*P *re*ceptor) hipotézis szerint úgy megy végbe, hogy a célorganellum membránjában található fehérje (t-SNARE; t = target) összekapcsolódik a vezikula membránjában levő v-SNARE-rel (v = vezikula). A szekréciós pálya egyes állomásain különböző, specifikus t- és v-SNARE-fehérjék részvételét tételezik fel. A t- és v-SNARE komplexéhez további fehérjék csatlakoznak. Ilyen az *NSF* (*N*-ethylmaleimide sensitive fusion) nevű szolúbilis citoplazmai ATP-áz aktivitású fehérje, mely a *SNAP* (soluble NSF attachment protein) fehérjével komplexet alkotva kapcsolódhat a membránokhoz. Az összes szükséges komponens együttes jelenléte pedig kiváltja a membránfúziót.



III/8-3. ábra
A COP-I típusú transzportvezikulák életútja

A vezikulák a citoplazmában nem random módon úszkálnak, mozgásukat a citoszkeleton komponensei és ATP-függő molekuláris motorok segítik. A citoszkeleton fehérjéi meghatározzák a lehetséges mozgások pályáit, míg az energiát a mole-



III/8-4. ábra
A Rab-ciklus

kuláris motorok szolgáltatják. Utóbbiak közvetlenül, vagy kapcsolófehérjéken keresztül vannak összeköttetésben a vezikulákkal. A kapcsolófehérjék közül legismertebbek a monomer szerkezetű G-fehérjék közé tartozó *Rab-fehérjék*. A humán genóma mintegy 60 Rab-fehérjét kódol. Működésüket a Rab ciklus révén fejtik ki *(III/8-4. ábra)*. A fehérje inaktív, GDP-t kötő formában van jelen a citoplazmában. A GDP GTP-re történő cseréje (melyet *Rab GEF* katalizál) a Rab-fehérjét aktiválja, s az a membránhoz kötődik, amihez a fehérje poszttranszlációs lipid módosítása (prenilációja) is szükséges. A fehérje a lefűződő vezikula membránjában marad, ahol a Rab-kinezin motorfehérjéhez kötődve kapcsolja a vezikulát a citoszkeletonhoz. A vezikula célbaérése a SNARE-komplex közreműködésével fokozza a Rab GTP-áz aktivitását, majd a Rab-GDP inaktív komplex elhagyja a membránt. A Rab-fehérjék több izoformája létezik, melyek többé-kevésbé specifikusak azokra az organellumokra nézve, melyek között a vezikuláris forgalmat intézik.

A Rab-ciklust kiegészítik a Rab funkcióit szabályozó fehérjék ciklusai. A Rab-kísérőfehérje (*REP*, Rab escort protein) a citoplazmában megköti az inaktív, GDP-kötő, prenilálatlan Rab-fehérjét. A komplex szubsztrátjává válik a Rab geranilgeranil-transzferáznak (*RabGGT*), mely a Rab *C*-terminális ciszteinjeit prenilálja. A geranilgeranilált fehérje így már kapcsolódhat a membránhoz, ahol a Rab GEF aktiválja. A Rab-GDP-disszociációinhibitor (*Rab GDI*) a célmembránból tudja eltávolítani a

funkcióját már betöltött, GDP-t kötő Rab-fehérjét, és stabil komplex formájában a citoplazmában tartja. A Rab-GDI vissza is juttathatja a Rab-fehérjét a donor membránhoz, ahol az reaktiválódhat a Rab-GEF révén, ami a Rab-GDI disszociációjával jár. Mind a REP, mind a GDI több izoformában van jelen az emlőssejtekben.

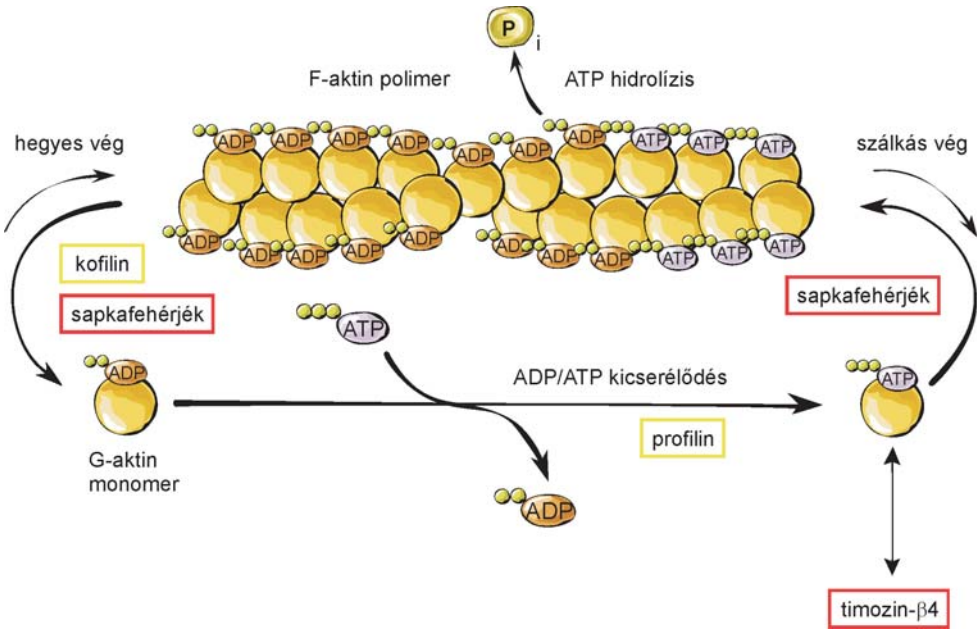
A citoszkeleton

A citoszkeleton eukarióta sejtalkotó, mely nem képez kompartimentumot. Dinamikusan szerveződő struktúra, mely meghatározza a sejt alakját, felelős a sejtmozgásért, szervezi a metabolizmust és a jelátvitelt, részt vesz az intracelluláris transzportban, valamint a sejtosztódásban. A citoszkeleton tehát nemcsak csontváz, hanem izomzat és állvány (scaffold) is. A citoszkeletont három filamentumtípus alkotja: mikrofilamentumok, intermedier filamentumok és mikrotubulusok.

Mikrofilamentumok / aktin filamentumok

A mintegy 6 nm átmérőjű mikrofilamentumokat két összecsavart *aktin* lánc alkotja. A mikrofilamentumok elsősorban a plazmamembrán alatt koncentrálódnak, fenntartva a sejt jellegzetes alakját. Igen dinamikus képződmények, állandó felépülésük és lebomlásuk lényeges funkcióik ellátásában. Szerepük van a sejttérfogat állandóságának fenntartásában, a sejt alakváltozásaiban (például a pszeudopódium képződésében), valamint a sejt – sejt és a sejt – extracelluláris mátrix kapcsolatokban. A *miozin*nal együttműködve a sejten belüli mozgásokban is fontos tényezők.

Az aktin a sejt egyik legnagyobb koncentrációban jelenlevő fehérjéje. Hat izoformája közül négy az izomsejtekben található, míg két izoforma ubikviter. A mikrofilamentumok képződésében elsősorban a β- és γ-aktin vesz részt. A filamentumok a



III/8-5. ábra
Az aktin filamentumok felépülése és lebontása

monomerek (globuláris *G-aktin*) fej – farok polimerizációjával jönnek létre *(III/8-5. ábra)*. A filamentumon belüli aktin alegységeket fibrilláris *F-aktin*nak nevezik. A filamentum két parallel aktinlánc által alkotott hélix. A filamentumok polárisak, gyorsan növekvő úgynevezett szálkás véggel (melyet a miozin kötődése okoz az elektronmikroszkópos képen) és lassan növekvő hegyes véggel. A növekedés tízszer gyorsabb a szálkás végen. Egyensúlyi állapotban a polimerizáció sebessége a szálkás végen egyenlő a depolimerizáció sebességével a hegyes végen.

Az aktin polimerizáció a magképződéssel kezdődik, ilyenkor három G-aktin monomer spontán trimert képez. A polimerizáció elindításáért a *formin* családba tartozó fehérjék felelősek. A forminok dimerizálódva létrehozzák a polimerizáció szempontjából kritikus magot, mely alapját jelentheti a további gyors polimerizációnak. Ezután ATP-aktin kapcsolódik a szálkás végen, majd az ATP gyorsan hidrolizál. Az ATP hidrolízis kevéssé befolyásolja, míg a keletkező anorganikus foszfát távozása gyengíti az F-aktin alegységek közti kötést. Az utóbbi lassú folyamat, néhány perces reakcióidővel. A polimerizációt egyes esetekben molekuláris motorok (aktoklampinok) gyorsítják ATP hidrolízisével.

Az ADP-aktin monomerek lassan disszociálnak a hegyes végen, de a folyamat gyorsítható bizonyos fehérjékkel (*kofilin*). A felszabaduló ADP-aktin egységekben *profilin* hatására az ADP ATP-re cserélődik, ily módon újraképezve az elongációhoz szükséges ATP-aktint. Az ATP-aktin készlet fenntartását segíti elő a *timozin-β4* fehérje, mely sztöchiometrikusan köti az ATP-vel kapcsolódó G-aktint. A gyors turnover általában megkívántatik a mikrofilamentumok működéséhez; ahol ez nem szükséges (például a vázizom aktin esetében), az úgynevezett *sapkafehérjék* gátolják a monomerek asszociációját és/vagy disszociációját.

Az aktin mikrofilamentumok felépülését és lebomlását a sejt jelátviteli mechanizmusai szoros kontroll alatt tartják. A plazmamembrán alatti aktin citoszkeleton állványként szolgál a jelátvitelben szerepet játszó fehérjék számára, azokat a receptorok szomszédságában, a membrán belső felszínéhez közel rögzítve. Ez a szubcelluláris kolokalizáció elősegíti az extracelluláris jelekre adott gyors és pontos sejtválaszt. A jelátviteli folyamatok ugyanakkor a mikrofilamentumok polimerizációját és depolimerizációját is szabályozzák.

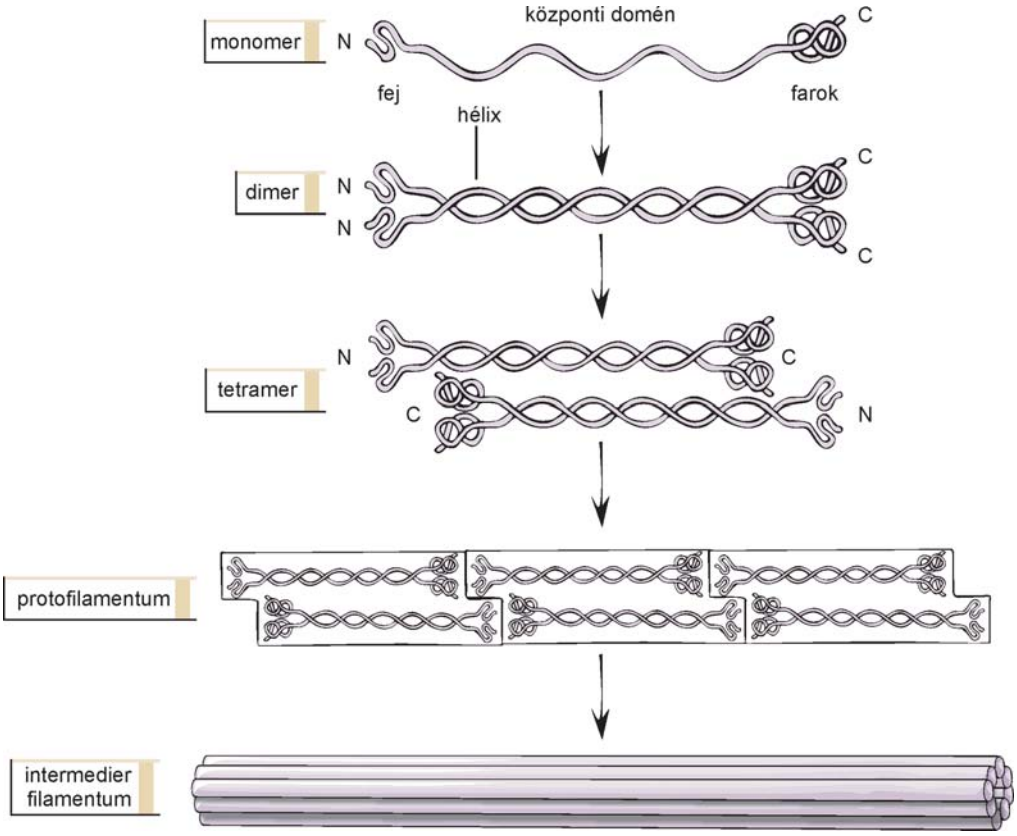
A filamentumok a sejten belül végül kötegekbe vagy hálózatba szerveződnek. A szerkezet kialakításáért aktin-kötő fehérjék (α-aktinin, dematin, faszcin, filamin, fimbrin, villin) a felelősek.

Az aktin mikrofilamentumok jólismert módon kooperálnak a miozinnal az izomsejtekben (lásd később). Emellett az aktomiozin komplex organellumok mozgatásában, a sejtosztódásban (az utódsejteket elválasztó kontrakciós gyűrűt létrehozva), illetve sejtmozgásban (például a neutrofil granulociták uropódiumában) szintén szerepet játszik.

Intermedier filamentumok

Az intermedier filamentumok az aktin filamentumokhoz hasonlóan részt vesznek a sejt alakjának meghatározásában, a sejttérfogat szabályozásában, a sejt–sejt és a sejt–extracelluláris mátrix kapcsolatokban. Emellett, diffúzabb eloszlásuknak köszönhetően, lehorgonyozzák az organellumokat, és felépítik a nukleáris laminát a maghártya alatt.

Az intermedier filamentumok fibrilláris monomerek polimerizációjával jönnek létre *(III/8-6. ábra)*. Az *N*-terminális feji és *C*-terminális farki vég között hosszan elnyúló központi rész található. Két monomer parallel elrendeződésben kettős hélixet formál, melyet a központi domének közötti kölcsönhatások stabilizálnak. A szerveződés magasabb szintjén két dimer antiparallel irányban tetramert hoz létre, melyben



III/8-6. ábra
Az intermedier filamentumok feléptése

a dimerek lépcsőzetesen elcsúsznak egymáson. A tetramerek végei egymással hosszirányban kapcsolódva láncokat, úgynevezett *protofilamentum*okat alkotnak. A protofilamentumok vastagabb kötegeket, előbb *protofibrillum*okat, majd körülbelül 10 nm átmérőjű, általában 32 láncból álló intermedier filamentumokat formálnak. A végleges térhálós szerkezetet az *intermedier filamentum asszociált protein*ek (*IFAP*) alakítják ki. Ezek a fehérjék kölcsönhatásokat hozhatnak létre a mikrofilamentumokkal és a mikrotubulusokkal is.

Az antiparallel elrendeződés miatt az intermedier filamentumok nem polárisak. Stabilabbak, mint a mikrofilamentumok, de szerin foszforiláció hatására gyorsan szétszerelődhetnek. Számos kináznak és foszfatáznak tulajdonítanak szerepet az intermedier filamentumok dinamizmusának biztosításában. A lamin foszforilációja fontos tényezője a sejtmag szétesésének a mitózis során.

Az intermedier filamentumok többféle alegységből képződhetnek. A homo- vagy heteropolimerek alegységei sejt- és organellumspecifikusak: *vimentin* a mezenhimális sejtekben, *neurofilamentum* az idegrendszerben, *keratin* az epitélsejtekben, lamin a sejtmagban található.

Mikrotubulusok

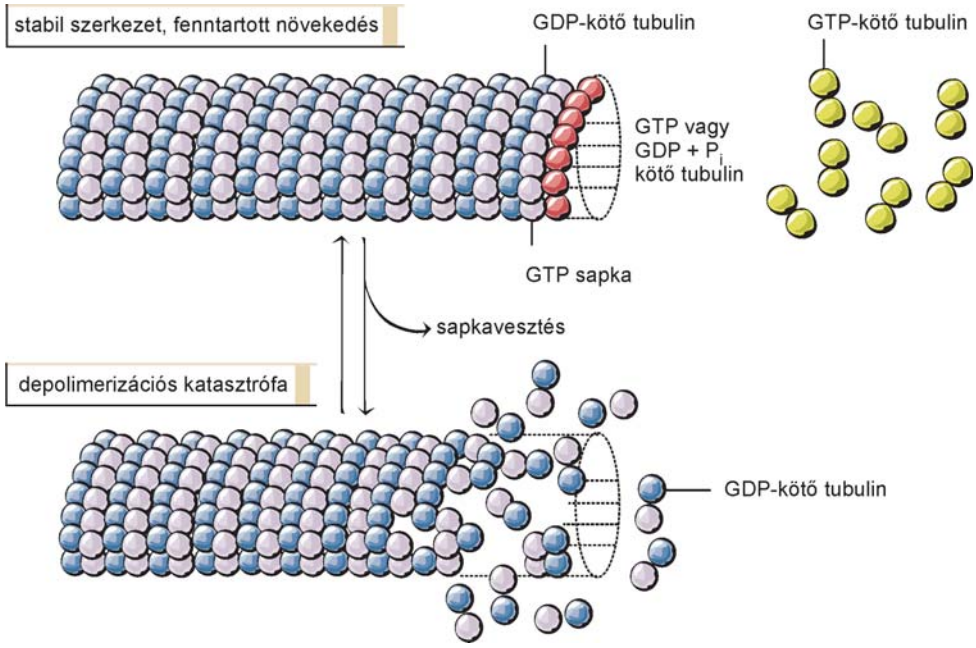
A mikrotubulusok 23 nm átmérőjű csövecskék, 15 nm-es luminális átmérővel. Rigid, de igen dinamikus képződmények, melyek állandó struktúrákat is alkothatnak. Szerepük döntő jelentőségű az intracelluláris anyagszállításban (például a vezikulák és organellumok mozgatásában), a sejtosztódás során a mitotikus orsó létrehozásában, a csillók és az ostorok mozgásában.

A mikrotubulusok a globuláris szerkezetű *tubulin* alegységek polimerjei. Az alegységek α- és β-tubulin dimerjei. A belőlük polimerizálódó protofilamentumokból 13 párhuzamosan elrendeződve hozza létre a csövecske falát.

A mikrotubulusok polárisak. A tubulin-alegységek felváltva vannak jelen a protofilamentumban, és azok parallel módon rendeződnek el. Így a mikrotubulusok egyik végén csak α-tubulin, a másik végén csak β-tubulin-alegységek vannak. A végeket (–) és (+) végként jelölik.

A mikrotubulusok (–) végei a centroszómához kapcsolódnak; a *centroszóma* az állati sejt mikrotubulus-szervező központja (MTOC, microtubule organizing center). A centroszóma parányi sejtszervecske a citoszolban, mely két rövid, merőleges helyzetű centriólumból és pericentrioláris mátrixból áll. A centriólumokat hengerpalást mentén elhelyezkedő kilenc mikrotubulus-triplet képezi. A körülöttük elhelyezkedő, hálózatos szerkezetű pericentrioláris mátrix legfontosabb fehérjéje a γ-tubulin, mely köti a mikrotubulusok (–) végeit. Itt kezdődik a polimerizáció a magképződéssel, melyben a γ-tubulin más mátrixfehérjékkel komplexben vesz részt.

A mikrotubulusok jellegzetes tulajdonsága a *dinamikus instabilitás*. Ez azt jelenti, hogy a polimerizáció megindulása után az egy ideig nagy sebességgel folyik, majd hirtelen átmegy depolimerizációba. A jelenség magyarázata a tubulin GTP-áz aktivitásában rejlik. A tubulin-dimer GTP-t köt, ami a polimerizáció után gyorsan hidrolizál.



III/8-7. ábra
A mikrotubulusok dinamikus instabilitása

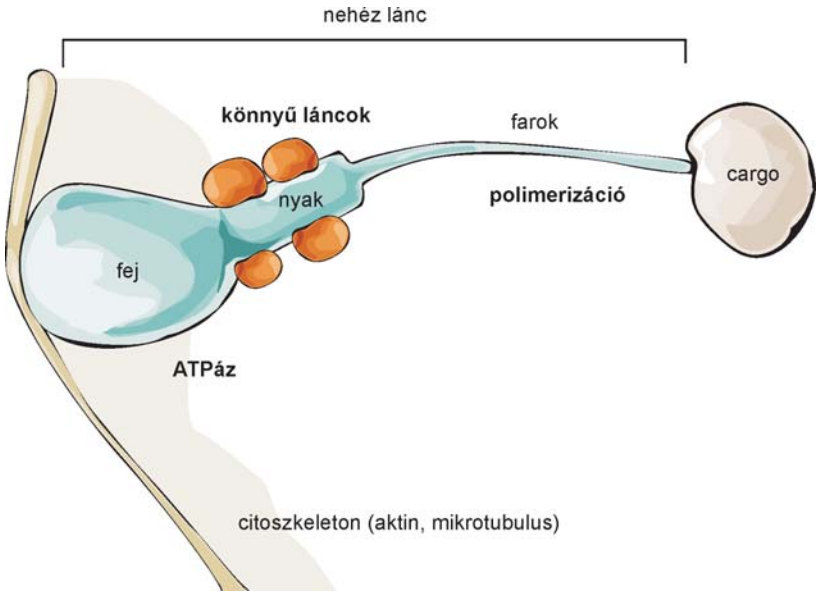
A GTP kötés erős tubulin – tubulin kötéseket eredményez, míg a GDP a disszociáció irányába hat. Ha a polimerizáció sebessége meghaladja a GTP hidrolíziséét, a mikrotubulus növekszik. Ilyenkor a (+) végen GTP-t kötő tubulin egységek vannak, melyet GTP-sapkának neveznek. Ez a sapka stabil szerkezetet és fenntartott növekedést okoz; a láncon belüli GDP-tubulinok természetesen nem tudnak disszociálni. Ha az újabb monomer csatlakozása késlekedik, a GTP-sapka eltűnik, az újabb alegység kötődése energetikailag valószínűtlenné válik. Megindul a mikrotubulusok rohamosan gyorsuló lebomlása, melyet *depolimerizációs katasztrófa*nak neveznek *(III/8-7. ábra)*.

A mikrotubulusok dinamikája *in vivo* igen változatos lehet. A polimerizáció, depolimerizáció és a katasztrófa sebessége a *mikrotubulus-asszociált protein*ektől (MAP) függ. A MAP-ok közé tartozó nagy molekulasúlyú MAP-1 és MAP-2, valamint a kisebb *tau* stabilizálják a mikrotubulusokat és más sejtalkotókhoz kötik őket. A MAP-ok inaktiválásában a foszforilációnak van szerepe.

A mikrotubulusok dinamikáját kísérletesen is befolyásolhatjuk. A *kolchicin*, az őszi kikerics alkaloidja, befagyasztja a dinamikus instabilitást; a tubulin–kolchicin komplex sem beépülni, sem disszociálni nem tud. Magas koncentrációban már inkább polimerizációt gátló hatású, akárcsak a *nokodazol*. A *taxol* és származékai stabilizálják a mikrotubulusokat. A mikrotubulus funkció gátlásával ezek a vegyületek gátolják a mitózist, így a terápiában citosztatikumként használhatók.

Motorfehérjék

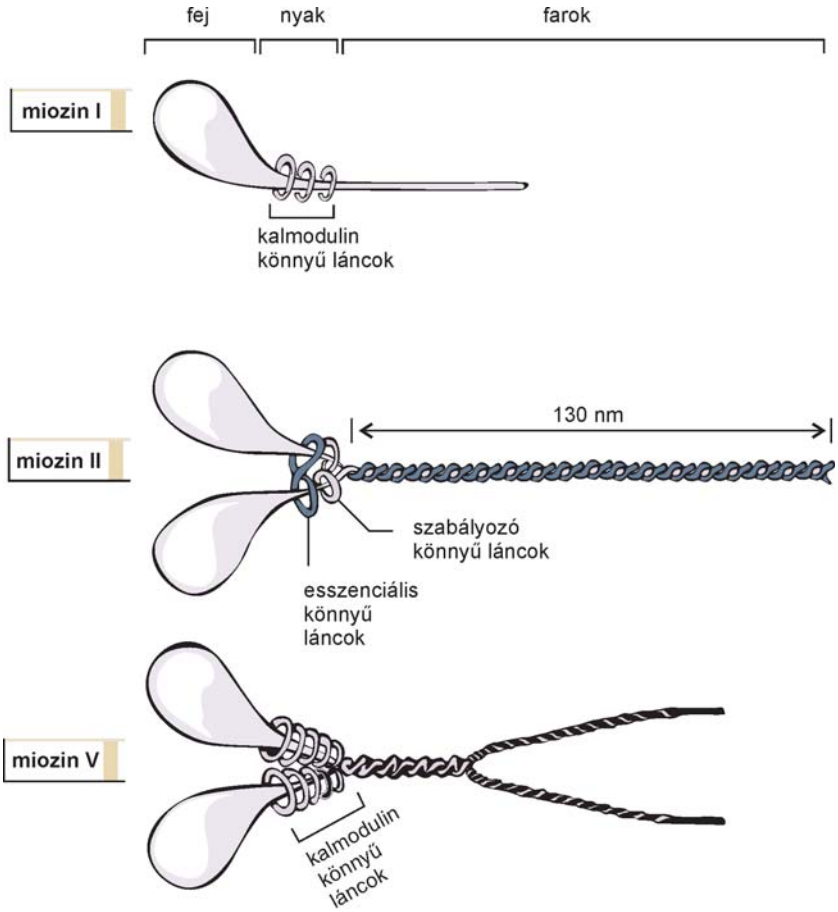
A citoszkeleton elemeinek dinamizmusa önmagában is létrehozhat sejten belüli mozgásokat. Emellett ezek a filamentumok sínekként is szolgálnak, melyeken motorfehérjék közlekednek. A filamentumok egyúttal meghatározzák a mozgás irányát is: a motorfehérjék vagy a (+), vagy a (–) vég irányába haladnak, így megkülönböztethetünk plusz-vég és mínusz-vég motorokat. Az intermedier filamentumokhoz, melyek nem polárisak, nem tartoznak motorfehérjék.



III/8-8. ábra
A molekuláris motorok általános szerkezete

A motorfehérjék néhány közös sajátossággal rendelkeznek *(III/8-8. ábra)*. Globuláris feji végük ATPáz aktivitású, és reverzibilisen kötődik a filamentumokhoz. A fej rövid nyaki szakasszal kapcsolódik a pálcikaszerű farokhoz. A farki rész egyes motorfehérjék (például a miozin-II) esetében oligomerizációra hajlamos és rostokat képez. Más motorfehérjéknél a farki részhez kapcsolódik a szállítandó organellum, vezikula vagy makromolekuláris komplex. A feji rész ATP-áz aktivitását a filamentumhoz való kapcsolódás fokozza. Az ATP hidrolízise egyrészt a kötés affinitását befolyásolja, másrészt konformációváltozást idéz elő, a feji és nyaki rész közötti szög megváltoztatásával. A motorfehérjék tehát mechanokémiai enzimek, melyek az ATP (esetleg GTP) lebontásából származó kémiai energiát közvetlenül mozgási energiává alakítják át.

A mikrofilamentumokhoz kapcsolódó motorfehérjék a miozinok *(III/8-9. ábra).* A 18 osztályt magába foglaló szupercsalád tipikus tagja a vázizomban található miozin-II. A miozinok plusz-vég motorok. A legtöbb miozin (így a miozin-II és -V) dimert képez, míg a miozin-I monomer formájú. A molekula vázát a nehéz láncok alkotják, melyekhez a nyaki régiónál kapcsolódnak a könnyű láncok. A könnyű láncok száma miozintípusonként eltérő lehet, általában a komplex kalciumion kötéséért felelősek.

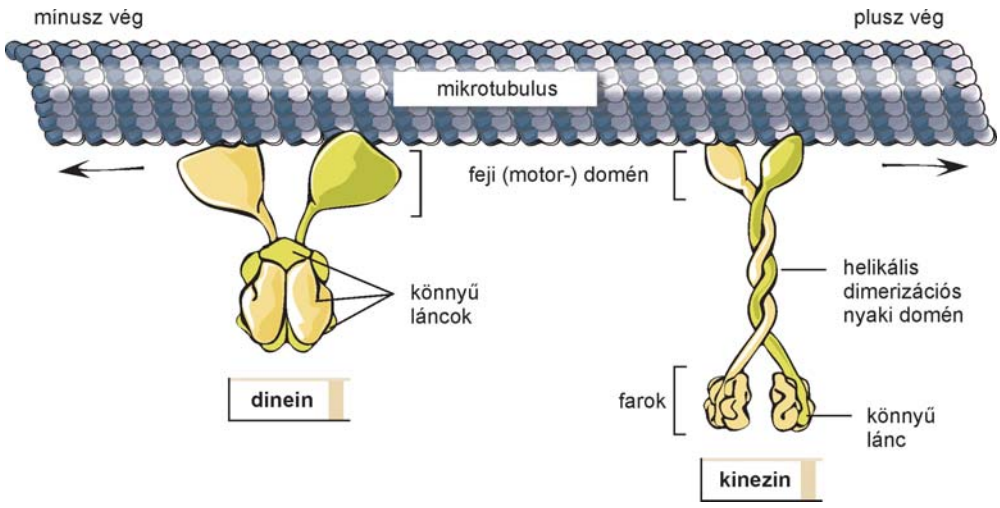


III/8-9. ábra
Néhány miozin szerkezete

A sejten belüli mozgásokat, így a vezikulák szállítását a miozin-I és -V végzik. Ezeknek a motorfehérjéknek a farki része képes membránokhoz kapcsolódni. A miozin-V működése viszonylag jól ismert. A dimer processzív motorként működik, vagyis hosszú utat képes megtenni az aktin filamentumon disszociáció nélkül. Ezt úgy éri el, hogy a dimer egyik feje mindig aktin-kötött, míg a másik leválik és előrelendül (lépegetés). A lépések hosszát az aktin felszínén található kötőhelyek távolsága határozza meg (36 nm). A hosszú lépést a miozin-V megnyúlt nyaki régiója teszi lehetővé. A mechanizmus feltételezi azt is, hogy a két feji rész mindig az ATP hidrolitikus ciklusának eltérő fázisában van.

A mikrotubulusok motorfehérjéi közül a *dinein*ek és *kinezin*ek a legfontosabbak *(III/8-10. ábra)*. Működési alapelvük mindenben megegyezik a motorfehérjék általános sajátosságaival. A kinezinek egy nehéz és egy könnyű láncot tartalmazó alegység dimerjei. A nehéz lánc tartalmazza a motordomént, általában az *N*-terminálison. A globuláris szerkezetű motordomén katalitikus és nyaki régióból áll. A katalitikus régióban található az ATP és a mikrotubulus kötőhely. A nyak az α-helikális szerkezetű dimerizációs doménben folytatódik. A farokrégió gyakran szintén globuláris szerkezetű, ide kötődik a könnyű lánc és a szállítandó teher. A kinezinek viszonylag lassú, processzív motorok, mozgásuk valószínűleg hasonló a miozin-V lépegetéséhez. Plusz-vég és mínusz-vég motorok, sőt nem-motorok egyaránt tagjai a kinezin családnak. A kinezinek organellumok, vezikulák szállításában, az ER és a Golgi-apparátus membránjainak rögzítésében, a mitózis során a kromoszómák mozgatásában vesznek részt. Az axonokban a retrográd transzportot a dineinekkel együttműködve facilitálják. A nem-motor kinezineknek szerepe lehet a mikrotubulusok katasztrófájának előidézésében.

A dineinek mínusz-vég motorok. 1-3 nehéz és változó számú könnyű láncból felépülő nagyméretű fehérjekomplexek. Szerkezetük és mozgási mechanizmusuk jóval bonyolultabb a többi motorfehérjénél, több ATP kötőhelyet is tartalmaznak. Két csoportjuk az *axonémás* és a *citoplazmai dinein*ek: az első csoport tagjai a csillókban és ostorokban vannak jelen. A citoplazmai dineinek vezikulákat, organellumokat mozgatnak, melyekkel adapter fehérjék (*dinaktin*) segítségével létesítenek kapcsolatot.



III/8-10. ábra
Kinezin és dinein: a mikrotubulusokhoz kapcsolódó motorfehérjék

A molekuláris motorok közé sorolják a GTPáz aktivitású *dinamin*okat is; ezek a fehérjék azonban nem citoszkeleton struktúrákhoz, hanem membránokhoz kapcsolódnak, konformációváltozásuk intramolekuláris csavarodásban nyilvánul meg. Az endocitózisban, organellumok biogenezisében játszanak szerepet.

Az izomszövet

Az izomszövetben a citoszkeleton fehérjéi és a motorfehérjék hatalmas mennyiségben fejeződnek ki, létrehozva az izomkontrakció molekuláris alapját. A vázizom fehérjéinek 25%-át kitevő F-aktin (α-aktin polimer) troponinnal és tropomiozinnal együtt képezi az ún. vékony filamentumokat, míg az 50%-ot elérő miozin (miozin-II) az ún. vastag filamentumokat. A hexamer szerkezetű miozin (460 kDa) egy pár nehéz láncból és két pár könnyű láncból épül fel. A nehéz láncok ATP-áz aktivitású globuláris feji véget és két egymásba tekeredő hélix által alkotott fibrilláris farki véget tartalmaznak. A könnyű láncok a globuláris feji véghez csatlakoznak.

Az aktomiozin komplex ciklikus működése hozza létre az izomkontrakciót. Ennek lépései a következők:

a relaxációs fázisban a miozin feji vége hidrolizálja az ATP-t, az ADP és Pi kötve maradnak. A komplex magas energiájú konformációba kerül;
stimulus hatására az aktin kötődik, létrejön az aktin–miozin–ADP–Pi komplex;
a komplex elengedi a Pi-t, majd az ADP-t, ami konformációs változást okoz, megváltozik a fej és a farok által bezárt szög, az aktint mintegy 10 nm-rel elmozdítva. Az aktin–miozin komplexe alacsony energiaállapotba kerül;
ATP kötődik a komplexhez;
a miozin-ATP affinitása kicsi az aktinhoz, így a komplex disszociál, létrejön az izomrelaxáció.

ATP hiányában (például a post mortem megfigyelhető rigor mortis esetén) az aktin-miozin komplex nem tud disszociálni, így az izomzat kontrakcióban rögzül.

A vékony lánc további összetevőinek is fontos funkcionális szerepe van. Az α- és β-láncból felépülő fibrilláris *tropomiozin* minden izomtípusban megtalálható, az aktin árkaiba fekszik be. A csak harántcsíkolt izomban expresszálódó troponin komplex három fehérjéből áll. A *troponin-T* köti a tropomiozint, és a másik két troponint. A *troponin-I* gátolja az aktin-miozin kapcsolódást. A *troponin-C* pedig kalmodulin-analóg kalciumkötő fehérje.

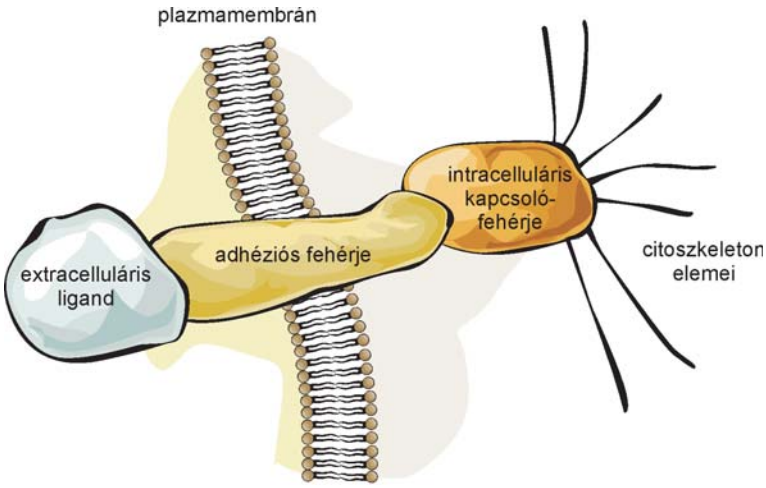
Az izomkontrakció szabályozása kalciummediált. Nyugvó izomban a szarkoplazma kalciumkoncentrációja 10^{-8}– 10^{-7} M körül van. Az alacsony kalcium koncentrációt a szarkoplazmás retikulum *SERCA* pumpái, valamint kalciumkötő fehérjéi (pl. kalszekvesztrin) biztosítják. Idegimpulzus hatására az izom szarkolemmája és a vele összefüggő T-tubulusok membránja depolarizálódik. Ennek hatására megnyílik a T-tubulusok *dihidropiridin receptor*a, egy feszültségfüggő kalcium csatorna. A kalciumbeáramlás megnyitja a szarkoplazmás retikulum *rianodinreceptor* kalciumcsatornáit, miáltal a szarkoplazma kalcium koncentrációja eléri a 10^{-5} M-t. A magas kalciumszint hatására a troponin-C kalciumot köt, a troponinok és tropomiozin komplexe konformációváltozáson megy keresztül, ami megengedi a miozin-ADP-Pi komplex és az aktin kapcsolódását. A relaxáció során az idegimpulzus megszűntével a kalcium visszapumpálódik a szarkoplazmás retikulumba, a troponin-C elveszti kalciumját, és a tropomiozin visszakerül az aktin-miozin kapcsolódást megnehezítő helyzetébe.

A simaizomban nem expresszálódnak a troponinok, ennek ellenére a kontrakció szintén Ca^{2+}-függő. A simaizom szarkoplazmájának miozin könnyű láncai – melyek különböznek a vázizomban kifejeződőektől – gátolják a miozin-aktin kölcsönhatást;

a gátlást a miozin könnyű lánc foszforilációja felfüggeszti. A kalciumkoncentráció emelkedésének hatására a kalmodulin kalciumot köt, a kalmodulin–4Ca^{2+} komplex kötődik egy *miozin könnyű lánc kináz*hoz, mely aktiválódik és foszforilálja a miozin könnyű láncot. A kalciumkoncentráció csökkenésekor pedig *miozin könnyű lánc protein- foszfatáz* távolítja el a foszfát csoportot, és bekövetkezik a relaxáció. A folyamatot szabályozza még a *Rho-kináz*, mely foszforilálja, s így gátolja a miozin könnyű lánc protein-foszfatázt, emellett közvetlenül foszforilálja a könnyű láncot is.

A citoszkeleton és a membránok kapcsolódása

A citoszkeleton funkciójához elengedhetetlenek a membránokkal létesített kapcsolatok, melyek egyrészt lehorgonyozzák a struktúrát, másrészt fokozzák a sejt ellenállását a mechanikai és ozmotikus behatásokkal szemben, harmadrészt lefektetik azokat a pályákat, melyeknek mentén a vezikuláris transzport végbemegy.



III/8-11. ábra
A sejtkapcsoló fehérjék vázlatos szerkezete

Az aktin mikrofilamentumok kapcsolatot tudnak létesíteni a plazmamembrán szinte minden típusú adhéziós molekulájával. Az *adhéziós molekulá*k transzmembrán fehérjék, citoplazmai doménjük a citoszkeletonnal, extracelluláris doménjük pedig egy másik sejt adhéziós molekulájával (homofil kötés), vagy az extracelluláris mátrix makromolekuláival (heterofil kötés) kapcsolódik, többnyire divalens kationfüggő módon *(III/8-11. ábra).* Jellegzetes képviselőik a *kadherin*ek, a *szelektin*ek, az *immunglobulinszerű sejtadhéziós molekulá*k és az *integrin*ek.

Az aktin mikrofilamentumok kötegei (az úgynevezett *stresszfilamentum*ok) a plazmamembrán transzmembrán integrin fehérjéihez kapcsolódnak, melyek a membrán egyes régióiban (fokális adhéziók) kapcsolatot létesítenek az extracelluláris mátrixszal. A stresszfilamentumok kötegeit az α-aktinin által formált keresztkötések tartják össze, az integrinnel létesített kötéshez más fehérjék (*talin* és *vinkulin*) részvétele is szükséges.

Az aktin citoszkeleton a *zonula adherens* (az epitélsejtekre jellemző övszerűen körbefutó sejtkapcsoló struktúra) kadherin fehérjéivel is kapcsolatba lép. A kadherinek transzmembrán fehérjék, nagy extracelluláris doménnel, melynek ismétlődő DXD és DXNDN szekvenciái felelősek a kalcium-függő adhézióért. A kadherinek rövid *C*-terminális citoplazmai doménjéhez a *katenin* fehérjék kötik az aktin filamentumokat.

Az intermedier filamentumok közül a keratin filamentumok szorosan kötődnek az epitélsejtek specializált plazmamembrán struktúráihoz, a *dezmoszóma*khoz és *hemidezmoszóma*khoz. A dezmoszómák a transzmembrán kadherin-szerű fehérjék

által kialakított sejt – sejt közötti kapcsolódási pontok. Az adhéziós molekulák citoplazmai végéhez a *plakin* családhoz tartozó *dezmoplakin* csatlakozik, mely köti az intermedier filamentumokat. A hemidezmoszómák integrin által létrehozott sejt–extracelluláris mátrix kapcsolódási pontok, ahol a keratin filamentumokat szintén a plakin család tagjai kötik a szerkezethez. A plakin fehérjecsalád változatos szerkezetű citoszkeletonkötő fehérjéket foglal magába.

A citoszkeleton nemcsak a plazmamembránhoz, hanem az organellumok membránjához is kihorgonyozódik. Legismertebb a magmembrán külső felszínéhez történő kapcsolódás, melyet a megmembránt képező ER lumenét áthidaló fehérjék kötnek össze a lamin hálózatával.

III/8.4. ORGANELLUM-BIOGENEZIS

Az eukarióta sejt feladatának megfelelően bővelkedik bizonyos organellumokban. Az egyes fehérjéket kitüntetetten szekretáló sejtek – például az immunoglobulinokat termelő plazmasejt – citoplazmáját szinte teljesen kitölti az ER, az adipociták uralkodó organelluma a zsírcseppecske, míg az izomsejtek mitokondriumokban gazdagok. Ezek a sajátosságok természetesen nem a genóma különbözőségével, hanem az eltérő funkciókkal magyarázhatóak; az egyes sejtszervecskék száma és mérete a sejt élete során az igényeknek megfelelően változhat. Sejtosztódáskor pedig az utódsejteket el kell látni organellumokkal. Következésképpen, bonyolult mechanizmusok biztosítják az egyes organellumok biogenezisét, illetve öröklődését. Alapvetően két modell írhatja le az organellum biogenezis folyamatát. Az egyik lehetőség a *de novo* szintézis; a genetikai kód által adott információknak megfelelően szintetizálódnak a sejtszervecske fehérjéi majd membránlipidjei, azután ezek valahogyan összeszerveződnek. A másik elmélet szerint templát (már létező organellum, vagy annak legalább a töredéke) szükséges a biogenezishez. Mivel a *de novo* membránszintézis igen lassú, élő szervezetekben megtörténte valószínűtlen, az organellum membrán a meglevő membránstruktúrák expanziójával és lefűződésével kell, hogy kialakuljon. Később az organellum növekedése (további fehérje és foszfolipid import útján) elérheti azt a méretet, amikor osztódhat.

A mitokondrium biogenezise

A mitokondriális DNS replikációja és a mitokondrium osztódása többé-kevésbé független a sejtciklustól. A sejt interfázisa során a mitokondriumok mérete folyamatosan nő, majd bizonyos méret elérése után osztódnak. Az osztódás átlagosan egyszer történik meg sejtgenerációnként, így biztosítva a mitokondriumok számának az adott sejtre jellemző állandóságát.

A mitokondriális osztódás gépezete GTP-áz aktivitással rendelkező, polimerizációra képes fehérjék (*mitofuzin*ok) részvételét igényli, melyek a külső membrán meghatározott fehérjéivel kapcsolódva spirális kontraktilis szerkezetet alkotnak. A struktúra mindaddig szorítja össze a mitokondriumot, míg a hasadás meg nem történik. A mitokondriumok fúzióra is képesek; ennek a folyamatnak részletei kevéssé ismertek.

Bizonyos körülmények között (hipoxia, mitokondriális betegségek) a mitokondriumok számának növekedését tapasztaljuk, ami azt jelenti, hogy a „konstitutív” biogenezis mellett indukálható folyamat is létezik. A mitokondriális funkciók elégtelensége ezekben az esetekben mitokondrium – sejtmag közötti jelpályákat aktivál, a mitokondriális fehérjék fokozott expresszióját eredményezve. A kalcium ionok rész-

vétele az eddig kevéssé feltárt jelpályákban bizonyítottnak tekinthető. (Lásd később az „Organellum stressz" fejezetnél.)

A funkcióképtelen vagy számfeletti mitokondriumok eltávolítása a sejt homeosztázisának fenntartása szempontjából szintén nélkülözhetetlen. Az autofágia (makroautofágia) a legfontosabb mitokondriumevő folyamat (mitofágia). Mint ismeretes, a mitokondriumok anyai öröklődésűek, a megtermékenyített petesejtben csak az anyai eredetű mitokondriumok maradnak életben és osztódnak tovább. Az apai mitokondriumokat a megtermékenyítés után nem az autofágia, hanem az ubikvitin – proteaszóma rendszer semmisíti meg.

ER és magmembrán

A sejtosztódás során az ER egy része mindig átjut magmembrán formájában az utódsejtbe, ahol templátként szolgálhat. Az ER további növekedése során a membrán sajátos tubuláris-retikuláris elrendeződését a membrán integráns fehérjéi (a *retikulon* család tagjai) alakítják ki; hiányukban a membrán felveszi a ciszternális morfológiát. Ezek a fehérjék foszfolipid vezikulákhoz adva *in vitro* is képesek létrehozni a tubuláris szerkezetet. A GTPázok dinamin családjába tartozó *atlasztin* fehérjék a retikulonokhoz kapcsolódva elősegítik a membránfúziót, így létrehozzák az elágazódási pontokat a tubuláris szerkezetben. A kapcsolódó mikrotubuláris rendszernek is jelentős a szerepe: a kinezin-1 motorfehérje és receptora, az integráns membránfehérje *kinektin* együttesen megnyújtja a membránt, szintén a tubuláris szerkezet felé alakítva az ER-t.

A legtöbb eukarióta sejtben megfigyelhető *nyitott mitózis* során a magmembrán feltöredezik, fehérjéi szétoszlanak az ER-ben, mely szintén jelentős átrendeződésen megy át, de a membrán integritását megőrzi. Kérdéses, hogy a magmembránból származó fragmentumok szétszóródnak-e az ER-ben, vagy egy specifikus szubdoménjében lokalizálódnak. A sejtmag ilyetén meghámozásában a mikrotubulusok és a *dinein* motorfehérje vesznek részt. Végeredményképpen a magmembrán fragmentumai eltűnnek a *mitotikus orsó* útjából; a centroszómából szerveződő mikrotubulusok elérik a kromoszómákat és elősegítik szétválasztásukat. Az ER megoszlik az újonnan létrejövő leánysejtek között, majd a telofázisban a mikrotubulusok közreműködésével újrarendeződik az interfázisra jellemző szerkezet. Érdekes kérdés, hogy a magmembrán hogyan szerveződik újra a kromatin körül, illetve az, hogy miért egyetlen sejtmag jön létre. Néhány, eredetileg a magmembrán belső felszínén található fehérje affinitása nagy a DNS iránt. Ezek a fehérjék a tubuláris ER végein elhelyezkedve kapcsolatot létesítenek a kromatinnal, majd a tubuláris szerkezet ciszternálissá alakul, a retikulon fehérjékben szegény membránrégiók bevonásával. Néhány fajban az egyedfejlődés korai embrionális fázisában megfigyelték, hogy a magmembrán különálló kromoszómák körül alakul ki (*kariomer* képződés). Az egyes kariomerek DNS replikációra képesek, nukleáris laminával és magpórusokkal is el vannak látva. Később a kariomerek egységes sejtmaggá olvadnak össze. Többszörös sejtmag bizonyos tumorokban is előfordul (*mikronukleusz*). Ebben az esetben kromoszómatöredékek vagy teljes kromoszómák különülnek el a kromatin főtömegétől. A jelenséget kromoszómatörés vagy defektív mitózis okozza; a mikronukleuszokat normális magmembrán borítja.

Az endomembrán rendszer további organellumainak biogenezise az ER-ből kiindulva zajlik le. A folyamatokat organellum-specifikus gének termékei (PEX: peroxiszómák, Atg: autofág vakuóla, PAT: lipid droplet,stb.) irányítják.

III/8.5. FEHÉRJEIMPORT: AZ ORGANELLUM PROTEÓMA KIALAKULÁSA

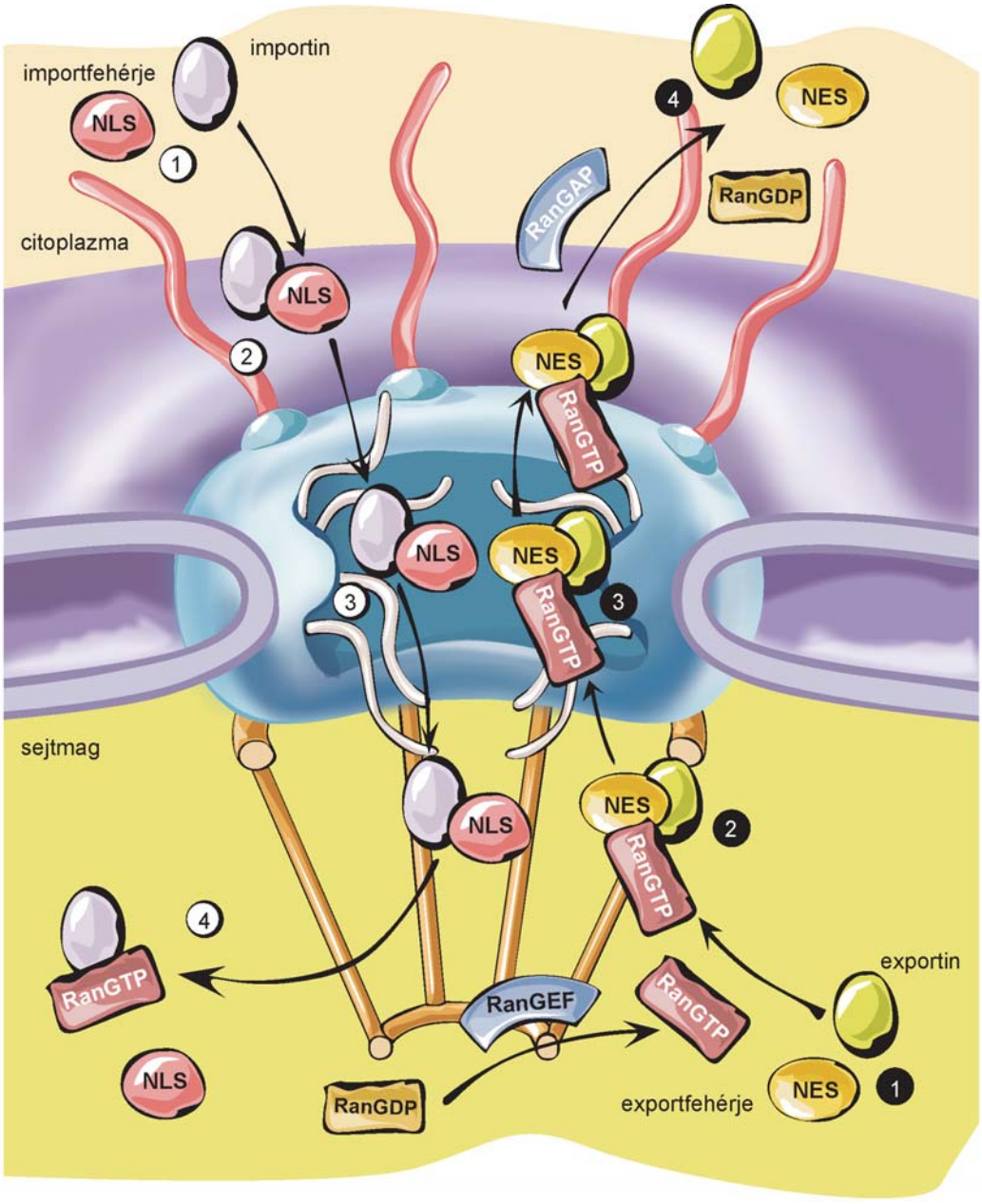
Fehérjék – a néhány, mitokondriális riboszómán szintetizálódó kivételtől eltekintve – csak a citoplazmában képződnek, az ER felszínéhez kapcsolódó, vagy szabad riboszómákon. Ezzel szemben minden organellum sajátos, csak rá jellemző proteómával rendelkezik. A transzlációt követően tehát a fehérjéknek el kell jutniuk, méghozzá célzott módon, rendeltetési helyükre. A folyamat az egyes organellumok esetén különböző lehet, de van néhány általános alapelv.

Az irányításért felelős jel általában a polipeptidláncon belüli rövidebb-hosszabb aminosavszekvencia (lásd *III/8-1.-táblázat*). Az irányító szekvencia gyakran az *N*-terminálison található, és használat után lehasad. Előfordulnak a polipeptidlánc belsejében és *C*-terminálisán is irányító szekvenciák. A másik lehetőség a szignál folt kialakulása: ilyenkor vagy a fehérje tekeredése során egymás mellé kerülő aminosav oldalláncok képezik a jelet, vagy a jel poszttranszlációs módosítással kerül a fehérjére.

III/8-1. táblázat
A legismertebb fehérjeirányító szignálok. A szignál szekvenciák összetétele, valamint fehérjén belüli elhelyezkedése igen változatos. Az N-terminális szignál szekvenciákat a célbaérés után szignál peptidázok általában lehasítják (+)

Irányító szignál	Cél	Helyzet	Összetétel	RECEPTOR	Szignál peptidáz
szignál szekvencia	endoplazmás retikulum	N-term.	10-15 aminosav, sok hidrofób	SRP	+
KDEL szekvencia	Golgi → endoplazmás retikulum	C-term.	Lys-Asp-Glu-Leu	KDEL	
nukleáris lokalizációs szignál (NLS)	sejtmag	belső	bázikus aminosavak, egy vagy két csoportban	importin	
nukleáris export szignál (NES)	sejtmag → citoplazma	belső	5-6 hidrofób aminosav	exportin	
mitokondriális irányító szekvencia	mitokondrium (mátrix)	N-term.	20-25 aminosav, sok bázikus, Ser, Thr	TOM, TIM23	+
peroxiszomális irányító szignál (PTS1, SKL)	peroxiszóma (mátrix)	C-term	Ser-Lys-Leu	Pex5p	
peroxiszomális irányító szignál (PTS2)	peroxiszóma (mátrix)	N-term.	Arg/Lys-Leu/Val/Ile-X5-Gln /His-Leu	Pex7p	+
mannóz-6-foszfát	lizoszóma		mannóz-6-foszfát	MPR	
dileucin (LL) motívum	klatrinnal fedett vezikula (→ endoszóma, lizoszóma)	belső	Leu-Leu	GGA	
fenilalanin-triptofán motívum	klatrinnal fedett vezikula (→ transz-Golgi)	belső	Phe-Trp	TIP47	
KFERQ szignál szekvencia	citoplazma → lizoszóma	belső	Lys-Phe-Glu-Arg-Gln	Hsc73	

A jelet a célorganellumban található receptor ismeri fel.
Az import transzmembrán, vezikuláris vagy magpóruson keresztüli transzporttal történik.
A transzport energiaigényes (vektoriális természete miatt).
A fehérje általában csak a célorganellumban veszi fel végleges, natív szerkezetét.



III/8-12. ábra
Fehérjeforgalom a magpóruson keresztül (a fekete számok az import, a fehérek az export egyes lépéseit jelzik)

Fehérjeimport pórusokon keresztül: a sejtmag

A magmembrán nagyméretű pórusai elvileg lehetővé teszik makromolekulák szabad áramlását, így ebben az esetben inkább a fehérjeforgalom egyirányúsítása a megoldandó probléma.

A 40 kD-nál nagyobb méretű makromolekulák ennek ellenére aktív transzporttal jutnak át a magpórusokon, mozgatásukat hordozófehérjék segítik *(III/8-12. ábra)*. A rendszer egyirányú, célzott működését, vagyis az aktív transzportot a GTP hidrolízisének energiája szolgáltatja. Az import klasszikus mechanizmusa szerint a sejtmagi fehérjék sajátos jelet, *nukleáris lokalizációs szignál*t *(NLS)* tartalmaznak. Az NLS tipikusan bázikus aminosavak két csoportja, melyet körülbelül 10 aminosavnyi szakasz választ el egymástól. Az NLS a polipeptidlánc belsejében található, nem hasad le célbaérkezés után. Az NLS-t tartalmazó fehérjéket a citoplazmában hordozófehérje (például az *importin*) köti meg. Az importin α- és β-alegységből álló heterodimer, melyből az α-alegység köti az NLS-t, a β pedig stabilizálja a komplexet és a magpórus citoplazmai bejáratánál levő fibrillumukhoz köti. Az importin á maga is NLS szekvenciával rendelkező fehérje. A komplex átjut a magpóruson, majd a magban *Ran-GTP* hatására disszociál, és a hordozófehérje (illetve annak alegységei), valamint a Ran-GTP visszajuthatnak a citoplazmába. A disszociációt elősegítik a magpórus komplex befelé tekintő nukleoporin fehérjéi is. A citoplazmában található GAP hatására a Ran-GTP hidrolizálja a GTP-t, a hordozófehérje felszabadul, a Ran-GDP pedig visszajut a magba. Végül a magban a GEF kicseréli a Ran-GDP GDP-jét GTP-re, és a körfolyamat bezárult.

A nukleáris lokalizációs szignált nem tartalmazó fehérjék random ki-be áramlását ismétlődő Phe-Gly szekvenciát tartalmazó nukleoporinok gátolják. Ezek a fehérjék egyúttal elősegítik a hordozófehérjék és más, a nukleocitoplazmai transzferben szerepet játszó molekulák mozgását is.

A magból kifelé irányuló fehérjeszállítás mechanizmusa kevésbé ismert. Az exportálandó fehérjék szintén jelszekvenciát (*NES; nukleáris export szignál*: 5-6 hidrofób aminosavból álló szakasz a polipeptidlánc belsejében) tartalmaznak, a folyamatban hordozófehérjék (*exportin*ok) és a Ran-GTP is szerepet játszik. Az importtal ellentétben, a Ran-GTP itt stabilizálja az exportin – NES komplexet, így a komplex a magban összeáll, a citoplazmában pedig (a GAP hatására) disszociál.

A sejtmag esetében a nukleinsav exportról is meg kell emlékezni. mRNS, rRNS, snRNS és tRNS exportálódik. A transzportot végző fehérjék (szintén exportinok) specifikusan kötődnek a teljesen processzált RNS-hez, így csak érett, funkcióképes formában jutnak ki a citoplazmába. A tRNS esetében az aminoacil-tRNS hatékonyabban kötődik az exportin fehérjéhez, így exportja hatékonyabb, mint a „töltetlen" tRNS-é.

Kotranszlációs fehérjeimport: az endoplazmás retikulum

A folyamat részletes leírása megtalálható a transzláció fejezetben, így itt csak rövid összefoglalást adunk. Az endomembrán rendszer luminális és membránfehérjéi, valamint a szekrécióra kerülő fehérjék az ER-ben kerülnek be a luminális kompartimentumba. A szekréciós pálya további kompartimentumai nem rendelkeznek hatékony transzmembrán fehérjeimport mechanizmussal, fehérjéikhez a vezikuláris transzport révén jutnak. Az endomembrán rendszer fehérjéi *N*-terminális, 10-15 hidrofób aminosavat tartalmazó szignál szekvenciával rendelkeznek, melyhez a ribonukleoprotein szignálfelismerő részecske (*SRP, signal recognition particle*) kötődik, a transzláció megkezdődése után azonnal. Az SRP kötése egyrészt átmenetileg le-

állítja a további transzlációt, másrészt a riboszóma-protein komplexet az ER felszínén található *SRP receptor*hoz (más néven dokkoló fehérje) irányítja. A dokkolás és az SRP leválása után a szintetizálódó fehérje a *transzlokon* csatornán (más néven *Sec61 komplex*) keresztül kotranszlációsan bejut az ER lumenébe. A szignál szekvenciát egy *szignál peptidáz* haladéktalanul lehasítja, és szintén kotranszlációsan megkezdődnek a poszttranszlációs módosítások is. A luminális fehérjék a transzlokon pórusán át jutnak az ER belső terébe, míg a membránfehérjék a csatorna oldalirányú megnyílása után távoznak a csatornából, egyenesen a membránba.

A poszttranszlációs módosításoknak a fehérjeszerkezetet befolyásoló szerepükön kívül jelképző szerepük is van: meghatározhatják a fehérje végső rendeltetési helyét az endomembrán rendszeren belül (pl. mannóz-6-foszfát jel → lizoszóma), illetve információt adhatnak a fehérje érettségéről. A poszttranszlációs módosításokon és foldingon átesett fehérjék ezután a szekréciós pályán elindulnak céljuk felé, két esetet kivéve. A foldinghibás fehérjéket minőségellenőrzési mechanizmusok visszatartják az ER-ben mindaddig, amíg a helyes fehérjeszerkezet létre nem jön. Természetesen az ER-nek vannak saját, rezidens fehérjéi is: ezeket retenciós jelek, illetve retenciós jellel rendelkező más fehérjékkel alkotott kölcsönhatások tartják vissza az elvándorlástól. A klasszikus ER retenciós szignál a szolúbilis fehérjék *C*-terminális KDEL szekvenciája. A jel a fehérjék retrográd transzportját váltja ki az ERGIC-ből vagy a Golgi-apparátusból, a KDEL receptorok közvetítésével.

Molekuláris mechanizmusok az endoplazmás retikulumhoz kötött fehérjeszintézisben

Az ER lumenében az igen magas fehérjekoncentráció megköveteli a hatékony folding és minőségellenőrzési mechanizmusok működését. A polipeptidláncok végleges konformációjának kialakulását az ER lumenben segítő fehérjék három kategóriába sorolhatók.

A *foldázok* fokozzák a folding egyes lépéseinek sebességét. Tipikus képviselőjük a peptidil-prolil cisz/transz-izomeráz, de ide tartoznak még a diszulfid-hidak kialakításáért felelős elektrontranszferlánc oxidoreduktázai (protein diszulfid izomeráz, ERp72, Ero1 stb.) is.

A *molekuláris dajkafehérjé*k elősegítik a natív konformáció kialakulását, de nem katalizálnak kémiai módosításokat. A citoszolban található megfelelőikkel azonos csoportokba sorolhatók, jellegzetes képviselőik a glukóz-regulált dajkafehérjék (GRP78 vagy BiP, GRP94).

A *lektinszerű dajkafehérjé*k (kalnexin, kalretikulin) a glikoproteinek retenciójában és minőségellenőrzésében vesznek részt.

A foldingban részt vevő, a fentiekben felsorolt fehérjék szerepe meglehetősen általános, az újonnan szintetizálódott fehérjék nagy részének tekeredését elősegítik. Ismertek azonban olyan dajkafehérjék is, melyek csak egy vagy néhány ügyfélfehérje foldingjára szakosodtak. Ilyen például a *Hsp47,* a prokollagén chaperonja, vagy az *egazin*, a β-glukuronidázt az ER lumenben megtartó membránfehérje.

Oxidatív fehérjefolding

A luminális poszttranszlációs módosítások közül az egyik legfontosabb a diszulfidhidak kialakulása. Míg a citoszol fehérjéiben a ciszteinil tiolok csak átmenetileg oxidálódhatnak diszulfiddá, az extracelluláris fehérjékben általában nagyszámú diszulfidhíd található. Ezek a kötések stabilizálhatják a fehérjék konformációját a vál-

zékonyabbb és chaperonszegényebb extracelluláris miliőben. A diszulfidhíd képződése oxidatív folyamat, melynek során az elektronokat egy mikroszomális (de intraluminális), fehérjékből álló transzfer lánc juttatja el a szubsztrát fehérjéktől a végső elektronakceptorig. A lánc két állandó tagja a protein diszulfid izomeráz és az Ero1 (endoplazmás retikulum oxidoreduktin 1). Az elektrontranszfert a protein diszulfid izomeráz és az Ero1 cisztein tiol párjai (Cys-X-X-Cys) mediálják. Az Ero1 emellett egy kovalensen kötött és egy szabad FAD molekulát is tartalmaz. Az elektronokat az utolsó lépésben a FAD viszi át az oxigénre, mint elektronakceptorra. A reakció végterméke hidrogén-peroxid, melyet luminális oxidoreduktázok (peroxiredoxin-4, glutation-peroxidázok) felhasználhatnak további tiolcsoportok oxidálására.

Az oxidatív protein folding érthető módon érzékeny a közeg redox viszonyaira, melynek állandóságát a glutation redox puffer biztosítja. A lumenben a GSH/GSSG arány kb. 1:1 (míg a citoszolban 100:1), tehát a lumen oxidáló környezet. A redox viszonyok mindkétirányú változása károsítja az oxidatív foldingot, így mind a redukáló ekvivalensek bősége és/vagy hipoxia, mind oxidatív hatások (intenzív biotranszformáció, antioxidánsok hiánya) foldinghibás fehérjék luminális felhalmozódását okozhatja.

Minőségellenőrzés az endoplazmás retikulumban

A nem-natív konformációjú fehérjék a natívnál magasabb energiaszintet képviselnek. Ezt a hidrofób aminosav oldalláncoknak a fehérje felszínén való megjelenése okozza. A konformációs selejtek tehát egyrészt a felületi hidrofóbicitás, másrészt specifikus poszttranszlációs módosításaik megléte vagy hiánya alapján érzékelhetők. A minőségellenőrzési mechanizmusok felismerik az ilyen fehérjéket, és megakadályozzák továbbhaladásukat a vezikuláris transzport pályáján. A foldinghibás fehérjék legfontosabb szenzorai az ER-ben a GRP78, az UDP-glukóz:glikoprotein glukozil-transzferáz (UGGT) és az EDEM fehérjék.

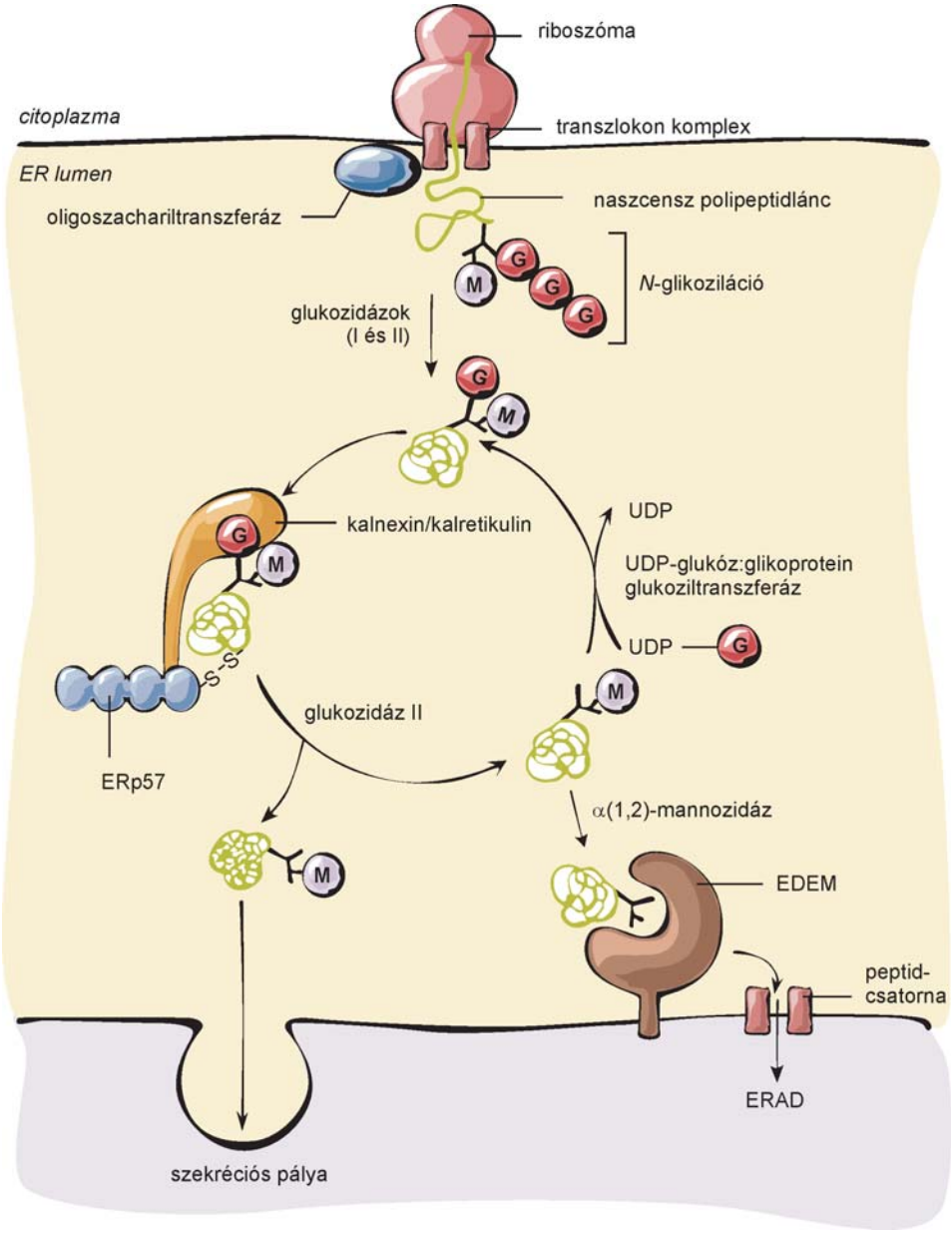
BiP (GRP78)

A BiP N-terminális ATP/ADP és C-terminális szubsztrátkötőhellyel rendelkező, nagy mennyiségben expresszálódó dajkafehérje. Az ADP-t kötő BiP nagy affinitással köti a nem natív konformációjú fehérjék rövid felszíni hidrofób szakaszait. Az ADP cseréje ATP-vel a szubsztrát távozásához és további foldingjához vezet. Mind a nukleotid cserét, mind az ATP hidrolízisét ko-chaperonok szabályozzák. A BiP monomer és oligomer formában is előfordul, de csak a monomer köt szubsztrátot. Az oligomerek raktárkészletet képeznek, melyből igény esetén a monomerek pótlódnak. A BiP a foldinghibás fehérjék felismerésével egyidejűleg részt vesz a stresszválasz receptorainak aktiválásában is (lásd később).

N-glikoziláció és a glikoproteinek minőségellenőrzése

A szekréciós és membránfehérjék nagyrésze glikoprotein. N-glikozilációjuk kotranszlációsan megkezdődik, amint a fehérje megjelenik a lumenben. A transzlokon luminális végénél elhelyezkedő oligoszachariltranszferáz felismeri a konszenzus glikozilációs motívumot (Asn–X–Ser/Thr). Az aszparagin oldalláncra ezután az enzim átviszi a dolichol-pirofoszfát hordozón már összeszerelt oligoszacharid szerkezetet, mely két N-acetil-glukózamin, kilenc mannóz- és három glukózegységből áll. Az N-glikozilált fehérjén ezután megkezdődik az oligoszacharid oldallánc módosítása. A két disztális glukózt a glukozidáz-I és glukozidáz-II enzimek távolítják el, ezután a glikoprotein a kalnexint/kalretikulint és az oxidoreduktáz ERp57-t köti. A tekeredés

befejeztével a végleges konformációját felvett glikoprotein felszabadul a fehérje-fehérje kölcsönhatásokból, és elindulhat a szekréciós pályán. A foldinghibás fehérjék viszont disszociációs-reasszociációs körforgásba (kalnexin ciklus) kerülnek; a disszociált glikoprotein deglukozilálódik/reglukozilálódik a glukozidáz II és az UGGT katalizálásával *(III/8-13. ábra)*. Az ER lumenben az UGGT a foldinghibás fehérjék fe-



III/8-13. ábra
A glikoproteinek minőségellenőrzése (A glikoproteinek szénhidrátláncában a bordó körök a glukóz-, a kékek a mannózegységeket jelzik)

lületi hidrofób szekvenciáit és oligoszacharid oldalláncait egyidejűleg képes felismerni. A glukóz egység újbóli beépítése visszaküldi a fehérjét a kalnexin ciklusba. A fehérje-lektin komplexek nem transzportálódnak tovább a Golgi felé. A fehérje többször is átmehet ezen a glikoziláció-deglikozilációs cikluson, ami időt ad a glikoprotein érésére.

A mannóz egységek lehasítása a glikoproteinről véget vet a folding próbálkozásoknak és a véglegesen selejtnek ítélt fehérjét a citoszolba való visszajuttatásra ítéli, ahol az proteaszomális lebontás áldozata lesz (ER-asszociált degradáció, ERAD, lásd később). A kalnexin ciklusból a kijáratot az α(1,2)-mannozidáz őrzi; a reakció lassú („mannóz-timer") és időt ad a foldingra. A mannózavesztett fehérje nem tud visszalépni a kalnexin ciklusba, hanem EDEM (endoplasmic reticulum degradation enhancing α-mannosidase-like proteins) fehérjékhez, a lektinek egy másik csoportjához kötődik. Az ismert EDEM fehérjék mannozidáz-szerű doménnel és chaperonszerű aktivitással is rendelkeznek.

Endoplazmás retikulumhoz kapcsolt fehérjelebontás (ERAD)

Az ER minőségellenőrzési rendszere által visszatartott fehérjék eliminálására az ER speciális módszert alkalmaz. Mivel proteolitikus rendszer működtetése a lumenben veszélyes lehetne a részlegesen vagy egyáltalán nem korrekt konformációjú fehérjék állandó jelenléte miatt – melyeket egy ilyen rendszer nagy valószínűséggel megtámadna – a degradációra ítélt fehérjéket el kell távolítani a lumenből. Az ERAD lépései: felismerés, kitekeredés, retrotranszlokáció, ubikvitinálódás és proteolízis. Ennek megfelelően a folyamatban N-glikanázok, dajkafehérjék, membráncsatornák, ubikvitin konjugáló enzimek és proteaszómák vesznek részt.

A véglegesen foldinghibás fehérjéket a BiP és az EDEM fehérjék ismerik fel a lumenben. A BiP a felszíni hidrofobicitás alapján válogat, a rendellenes glikoproteineket pedig az EDEM fehérjék ismerik fel. A fehérjék minőségellenőrzése során a kilenc mannózt tartalmazó naszcens polipeptid lektinekhez, kalnexinhez vagy kalretikulinhoz kötődik. Ha az α-mannozidáz eltávolít egy mannózt, a polipeptid felszabadul a kötésből és az EDEM fehérjékhez kötődik. Az EDEM mannozidáz-szerű (de enzimaktivitással nem rendelkező) doménje ismeri fel az oligoszacharid lánc mannózait.

A fenti módon felismert polipeptidek visszakerülnek a citoszolba, vagyis *retrotranszlokálódnak*. A retrotranszlokációhoz a diszulfidhidak redukciója, a szénhidrátlánc levágása, illetve a fehérje kitekerése szükséges, valamint egy transzmembrán protein csatorna működése.

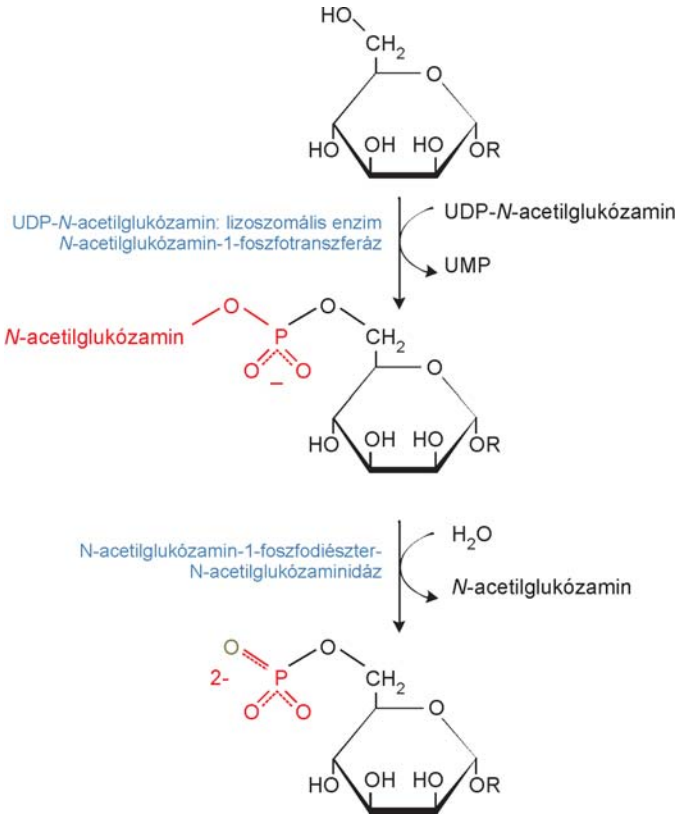
Az ERAD-hoz kapcsolt ubikvitináció ER fehérjékre nézve specifikus enzimekkel működik. A poliubikvitinált fehérjét további ERAD faktorok szállítják az ER citoszol felé néző felszínéhez kapcsolódó proteaszóma komplexhez. Végül végbemegy a proteaszomális lebontás szokásos folyamata (felismerés – deubikvitinálás – transzport a proteaszóma üregébe – inkomplett hidrolízis oligopeptidekre). A folyamatnak ez a szakasza már nem specifikus az ERAD-ra, azonos a citoszolbeli fehérjék proteolízisével.

A lumenben aggregálódó foldinghibás fehérjék nem tudnak retrotranszlokálódni: eltávolításukat a makroautofágia tudja megoldani, viszont ez csak az ER részleges lebontásával lehetséges (ERfágia vagy retikulofágia).

Jelfolt és vezikuláris fehérjeimport: a lizoszóma

A lizoszomális enzimek az ER felszínéhez kapcsolódó riboszómákon szintetizálódnak, majd a lumenbe kerülve vezikuláris transzporttal a Golgi-apparátusba jut-

nak. A *cisz*-Golgiban a leendő lizoszomális fehérjék szénhidrát oldalláncainak mannózai foszforilálódnak, és *mannóz-6-foszfát* keletkezik. A reakciót két enzim katalizálja *(III/8-14. ábra)*. Az első lépésben az *UDP-N-acetilglukózamin:lizoszomális enzim N-acetilglukózamin-1-foszfotranszferáz* a fehérjéhez kötött oligoszacharidlánc mannózához köti az *N*-acetilglukózamin-1-foszfátot és UMP szabadul fel. Ez a lépés igen fontos, hiszen az enzim által módosított fehérjék már mindenképpen a lizoszómába fognak kerülni. Az enzimreakció specificitását ebben az esetben nem a szubsztrátfehérjében felismert szekvencia, hanem a háromdimenziós fehérjeszerkezet felszínén található úgynevezett *jelfolt* biztosítja. A jelfoltot a fehérjetekeredés során egymás mellé kerülő aminosav oldalláncok hozzák létre. A második lépésben az *N-acetilglukózamin-1-foszfodiészter-N-acetil-glukózaminidáz* lehasítja az *N*-acetilglukózamint, így csak a foszfát csoport marad a mannózon.

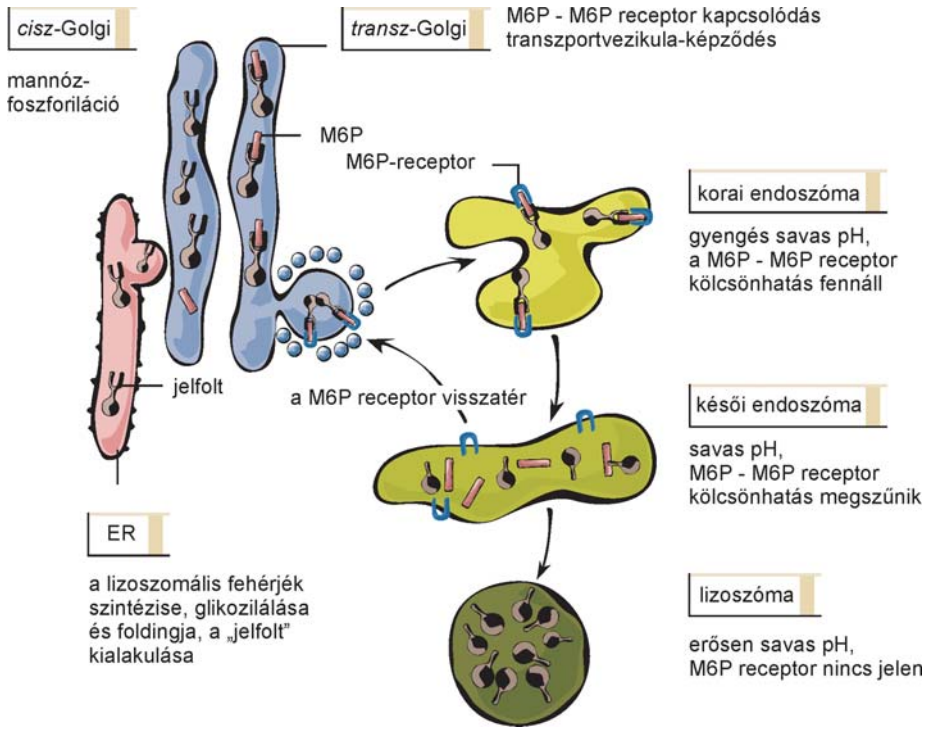


III/8-14. ábra
A lizoszómába irányító mannóz-6-foszfát jel kialakulása

A *transz*-Golgiban a *mannóz-6-foszfát receptor*ok (MPR) felismerik, és specifikusan kötik a mannóz-6-foszfátot tartalmazó fehérjéket *(III/8-15. ábra)*. A kötés feltétele a foszfát csoport negatív töltése, vagyis a környezet semleges vagy enyhén savi pH-ja. A MPR-ok a P-típusú (foszforilált szénhidrátot kötő) lektinek közé tartozó integráns membránfehérjék, luminális doménjük tartalmazza a mannóz-6-foszfát kötőhelyeket. A MPR-ok megtalálhatók a *transz*-Golgiban, a korai, a késői és a sejtfelszínre visszatérő endoszómában valamint a plazmamembránban, de hiányoznak a lizoszómákból. A receptor ezek között az organellumok között vándorol, útvonalát a citoszolikus domén szignál szekvenciái határozzák meg.

A lizoszomális enzim – MPR komplexek a *transz*-Golgit AP1 fehérjét tartalmazó, klatrinnal fedett vezikulákban hagyják el. Az MPR a citoszol irányultságú *C*-terminushoz közel anionos aminosav oldalláncokat és egy *dileucin motívum*ot tartalmaz, melyet *GGA-fehérjé*k (Golgi-localized, gamma-ear containing, ADP-ribosylation factor binding) ismernek fel. A GGA-fehérjék klatrin kötésére is képesek, központi szerepet játszanak a mannóz-6-foszfát receptornak és más fehérjéknek a *transz*-Golgiból az endoszomális – lizoszomális rendszerhez történő szállításában.

A *transz*-Golgit elhagyó vezikulák klatrin burkolatuktól megválnak, a korai endoszóma felé vándorolnak, majd egybeolvadnak azzal. A cél felismerésében és a fúzióban SNARE fehérjék vesznek részt. Az endoszóma érése során a csökkenő pH ha-



III/8-15. ábra
A lizoszomális fehérjék irányítása

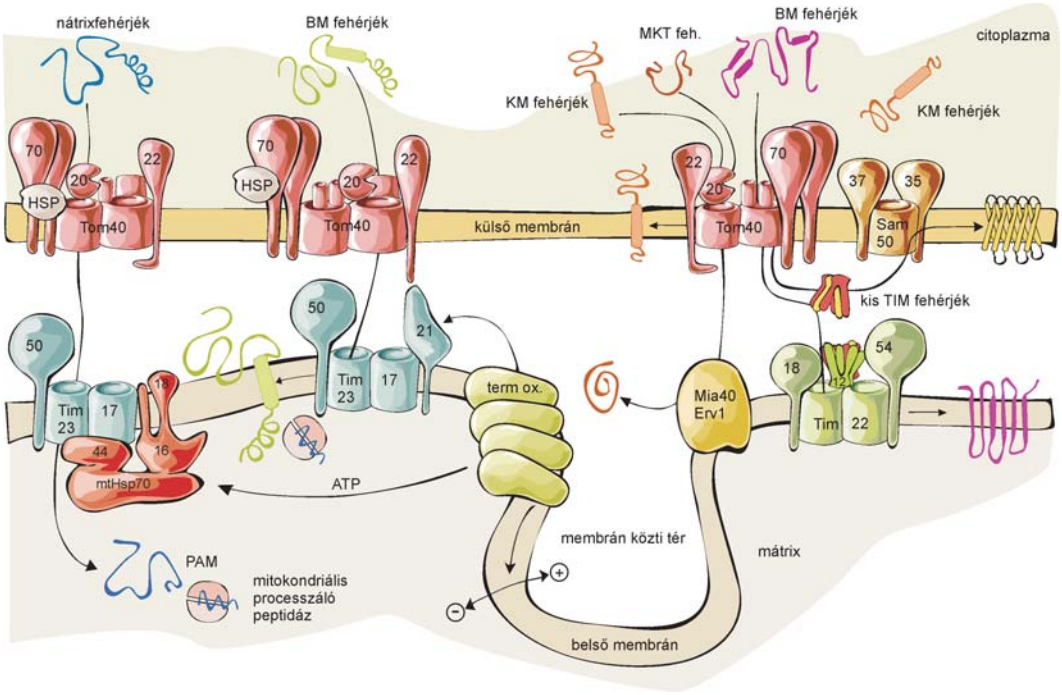
tására a mannóz-6-foszfátot tartalmazó lizoszomális fehérje és az MPR elválik egymástól. Az MPR a korai endoszómából AP1-et tartalmazó, klatrinnal fedett vezikulákban, a késői endoszómákból a MPR citoplazmai fenilalanin-triptofán szekvenciáját felismerő *TIP47* fehérje segítségével visszakerülhet a *transz*-Golgiba. (Ennek a szekvenciának szerepe van a receptor lizoszómából való kizáródásában is.)

A korai és késői endoszómából az MPR egy része további vezikuláris transzporttal eljuthat a plazmamembránig. A sejtfelszínen mannóz-6-foszfát-tartalmú ligandokat és más, nem glikozilált fehérjéket köthetnek. A sejtfelszínről a MPR-ok AP2-t tartalmazó, klatrinnal fedett vezikulák révén gyorsan internalizálódnak, amit több internalizációs szekvencia segít elő. A folyamat végállomása ismét a korai endoszóma, mely így központi szerepet játszik az MPR irányításában.

Poszttranszlációs, transzmembrán fehérjeimport: a mitokondrium

A mintegy 1500 fehérjét számláló mitokondriális proteóma 99%-a a sejtmagban kódolt, így a citoszol szabad riboszómáin képződő fehérjék importtal jutnak be az organellumba. A mitokondriumon belül a fehérjéknek négyféle célja lehet (mátrix, belső membrán, membránközti tér, külső membrán), ennek megfelelően az irányító mechanizmusok is igen változatosak *(III/8-16. ábra)*.

A mátrixfehérjék általában 10–80 aminosav hosszúságú irányító szekvenciát tartalmaznak, többnyire az *N*-terminálisukon. Az elsődleges szerkezetben nem ismerhető fel konszenzus szekvencia, de az aminosavak általában hidrofób vagy kationos



III/8-16. ábra
A mitokondrium fehérjeimportja (KM: külső membrán, BM: belső membrán, MKT: membránközti tér, PAM: preszekvencia transzlokáz asszociált motor)

jellegűek, és amfipatikus hélixet formálnak. A membránokba, illetve a membránközti térbe irányító szekvenciák még bonyolultabbak, és csak részben ismertek.

A citoplazmában dajkafehérjék (HSP70 és HSP90) tartják tekeretlen állapotban a mitokondriális fehérjéket. Az importot két transzlokáz komplex bonyolítja le; a külső membránban a *TOM* (*t*ranslocase of the *o*uter *m*embrane), a belső membránban a *TIM23* (*t*ranslocase of the *i*nner *m*embrane). A komplex egyes fehérjéi receptorként működve felismerik a transzportálandó fehérjét, és kölcsönhatást alakítanak ki a hozzá kapcsolódó dajkafehérjével. A komplex más fehérjéi hozzák létre a tulajdonképpeni membránpórust.

A transzlokáz komplexeken kívül más TIM fehérjék is irányító funkcióval bírnak. A *Tim21* a belső membrán fehérjéinek a TIM23 komplexből történő oldalirányú kilépését segíti. A membránközti térbe kerülő fehérjéket *kis Tim fehérjék* kötik, és juttatják el a külső vagy belső membránhoz. Utóbbi esetben a membránba való belépést a *TIM22* komplex segíti.

A membránon keresztüli transzportot molekuláris motorok gyorsítják. A TIM23 komplex tartalmazza a fehérje mozgatását végrehajtó motor komponenst is, melynek része a mitokondriális HSP70 (*mtHSP70*) és a *PAM* (*p*reszekvencia transzlokáz asszociált *m*otor). A PAM a mtHsp70-hez és a TIM23 komplexhez kapcsolódva szabályozza a teljes komplex ATP-áz aktivitását. A belső membránon keresztüli fehérjetranszport ATP- és membránpotenciál-függő. A mtHSP70 motor funkciója vagy konformációváltozással, vagy a Brown-mozgáson alapuló racsni-mechanizmussal megy végbe.

A rendeltetési helyére kerülő mitokondriális fehérjék gyakran poszttranszlációs módosításokon is átesnek. A mátrixba kerülő fehérjéről *processzáló peptidáz*ok lehasítják a szignál szekvenciát, és a mtHSP70 létrehozza az importált fehérje végső konformációját. A membránközti tér fehérjéiben oxidoreduktáz aktivitású foldázok (*Mia40, Erv1*) működése következtében diszulfidhidak is kialakulhatnak. A diszulfidhíd képződése a membránközti térben nagyon hasonlít az ER lumenében lejátszódó oxidatív foldinghoz; a Mia40 a protein diszulfid izomerázzal, az Erv1 az Ero1-gyel analóg funkciót lát el. Ennek megfelelően, az intracelluláris fehérjék közül csak a szekréciós útvonal és a mitokondriális membránközti tér fehérjéi tartalmaznak stabil diszulfidhidakat.

Érett fehérjék importja: a peroxiszóma

A peroxiszóma biogenezisben szerepet játszó *peroxinok* a peroxiszomális membrán kialakulása mellett a peroxiszomális (mátrix és membrán) fehérjék importjához is szükségesek. A peroxiszomális fehérjéket kódoló gének a sejtmagban találhatók, a fehérjék szabad riboszómákon szintetizálódnak a citoplazmában, és a transzláció után kerülnek csak a peroxiszómákba. Ez a menetrend érvényes mind a mátrix, mind a membrán fehérjéire. Az újonnan szintetizálódott peroxiszomális fehérjéknek tehát specifikus jelet kell hordozniuk, mely célba juttatja őket. A mátrix fehérjéi esetében két szignál ismeretes, mindkettő a fehérjén belüli aminosav szekvencia. A *PTS1* (*p*eroxisomal *t*argeting *s*ignal) *C*-terminális tripeptid Ser-Lys-Leu (*SKL*) *szekvenciá*val, mely a humán peroxiszomális fehérjék több mint 90%-ában megtalálható. Néhány mátrixfehérje az *N*-terminálishoz közel található nonapeptid szekvenciát (*PTS2*) tartalmazza. A PTS2 többnyire proteolízisen megy át a mátrixban. Több fontos mátrixfehérje tartalmazza ezt a szignált. A membránfehérjék esetében is leírtak már néhány irányító szekvenciát (mPTS, m = membrán), ezeknek a felépítése jóval bonyolultabb.

A peroxiszóma fehérjefelvétele több lépésből áll. A felveendő fehérjék szignál szekvenciáját a citoplazmában található szolúbilis receptorok ismerik fel. A *PEX5p* fehérje két izoformája felismeri és köti a PTS1 szekvenciát, míg a *PEX7p* a PTS2-t. A receptor – ligand kapcsolódás feltehetőleg dajkafehérjék közreműködésével történik. A receptor – ligand fehérjekomplexek részleteiben ismeretlen mechanizmussal a peroxiszómához vándorolnak, majd lehorgonyoznak a peroxiszomális membrán külső felszínén. A peroxiszóma membrán integráns fehérjéi ATP-függő módon segítik elő a fehérjeimportot.

A peroxiszomális mátrix fehérjék importja úgy tűnik, hogy nem követi a mitokondriumban és az ER-ben megfigyelt mechanizmust, miszerint dajkafehérjék által nem-natív konformációban tartott fehérjék jutnak keresztül a membránon. A peroxiszóma esetében natív fehérjék, sőt a citoplazmában asszociálódott fehérje oligomerek transzportja is lehetséges. A jelenség pontos magyarázata nem ismert, felvetették pórusok, illetve a transzport során helyileg képződő vezikulák szerepét is.

A peroxiszomális membránfehérjék beépülése szintén peroxinok segítségével történik. A legtöbb peroxiszomális membránfehérje PEX19p-kötő mPTS szekvenciát és transzmembrán domént is tartalmaz. A tyúk és tojás örök problémáját megoldandó feltételezik, hogy a kihorgonyzásban szereplő peroxinok már az ER-ben beépülnek a membránba, majd vezikulákkal jutnak a peroxiszómákba.

III/8.6. METABOLIZMUS ÉS TRANSZPORT: A METABOLÓMA KIALAKULÁSA

A szubcelluláris kompartimentumok proteómája, az ott található enzimaktivitások meghatározzák az organellum metabolikus lehetőségeit. Ugyanilyen fontos azonban a metabolitok transzportja is: mind a szubsztrátok, mind a termékek membrántranszportja, illetve annak hiánya meghatározó a lumen/mátrix metabolit-koncentrációinak szabályozásában. Az organellum metabolómáját tehát a lokális enzimaktivitások és transzporterek együttesen határozzák meg. A kompartimentumok metabolikus specializációja az intermedier anyagcsere integrációjának egyik fontos szintje. A kompartimentációnak számos előnye van.

Az adott reakcióút enzimei egymás közelségébe kerülnek akár a lumen kis térfogatú terében, akár az organellum membránjában. A kolokalizáció emeli a szubsztrátkoncentrációt az enzimek környezetében, szubsztrát „channeling"-et hozhat létre, így fokozva az enzimkatalízis hatékonyságát. Ez látható például a mitokondriális és mikroszomális elektrontranszfer-lánc esetében.

A lokális szubsztrátkoncentráció más módon is emelhető. A szubsztrát prekurzorának befelé irányuló transzportja, az azt átalakító luminális enzimaktivitás a szubsztrát hiányzó kifelé történő transzportjával együtt magas luminális szubsztrátkoncentrációt eredményez. Lipofil szubsztrátok magas koncentrációt érhetnek el az organellum membránjában, ami például előfeltétel a biotranszformáció első fázisának hatékony működéséhez. A citrát-ciklus és a zsírsavak α-oxidációjának intramitokondriális elhelyezkedése miatt a mitokondrium mátrixában a legmagasabb a $NADH/NAD^+$ arány, mely kedvez a terminális oxidáció működésének.

A kompartimentum mikrokörnyezete kedvez a helyi enzimek optimális működésének. A lizoszóma lumen savi pH-ja előfeltétele a savanyú hidrolázok aktivitásának. Az ER lumenének magas kalciumtartalmát több helyi enzim igényli. Az ugyanott észlelhető magas redoxpotenciál szükséges a szekréciós fehérjék diszulfidhídjainak kialakulásához.

Az intraluminális, relatíve aspecifikus enzim specificitását a membrán transzport biztosíthatja. Ezt tapasztaljuk az ER glukóz-6-foszfatáza és hexóz-6-foszfát dehidrogenáza esetében: mindkét enzim specificitását a glukóz-6-foszfát transzporter adja.

A membrán átlépése – a kompartimentumok eltérő proteómája miatt – általában reakcióutak közötti váltást is jelent. Így például a glukóz-6-foszfát a citoplazmában a glikolízisbe vagy a pentóz-foszfát ciklusba léphet be, az ER-be kerülve glukoneogenezisre fordítódik. Ennek megfelelően a transzport gyakran sebességmeghatározó, illetve szabályozott lépés.

Az organellumok metabolikus profilja

Az egyes szubcelluláris kompartimentumokban általában az intermedier anyagcsere egyes jól körülírható folyamatai játszódnak le. A mitokondrium mint a sejt erőműve az oxidatív energiatermeléssel járó folyamatoknak ad otthont; itt található a citrát-ciklus, a zsírsavak β-oxidációja, a teminális oxidáció és oxidatív foszforiláció. A peroxiszóma ezzel szemben olyan oxidatív folyamatokat katalizál, melyekhez ATP szintézise nem kapcsolódik. A peroxiszóma katabolikus működésének alapja különböző szubsztrátok flavoprotein oxidázok által katalizált oxidációja és a keletkező hidrogén-peroxid kataláz általi lebontása. A legfontosabb peroxiszomális oxidázok:

D-aminosav-oxidáz, L-α-hidroxisav-oxidázok, acil-KoA-oxidáz, glutaril-KoA-oxidáz, poliamin-oxidáz, oxalát-oxidáz, urát-oxidáz, pipekolát oxidáz. Az ER elsősorban anabolikus organellum, ahol exportra készülő molekulák szintetizálódnak. Itt találhatók a szénhidrát-anyagcseréből a glukóz-6-foszfatáz-rendszer, a hexuronsav út befejező lépései; a lipidmetabolizmusból a zsírsavak elongációja, deszaturációja, trigliceridek szintézise, a koleszterin, dolichol és más biológiai izoprének szintézise, koleszterin észteresítése (acil-KoA:koleszterin-aciltranszferáz, ACAT), lipoprotein-szintézis, a foszfolipidszintézis több lépése, a biotranszformációból a citokróm P450 izoenzimek által katalizált reakciók zöme és a glukuronidáció; ezenkívül a szekréciós és membránfehérjék szintézise és poszttranszlációs módosításai (prolil- és lizil-hidroxilációk, diszulfidhíd képződés, γ-karboxiláció, N-glikoziláció stb.).

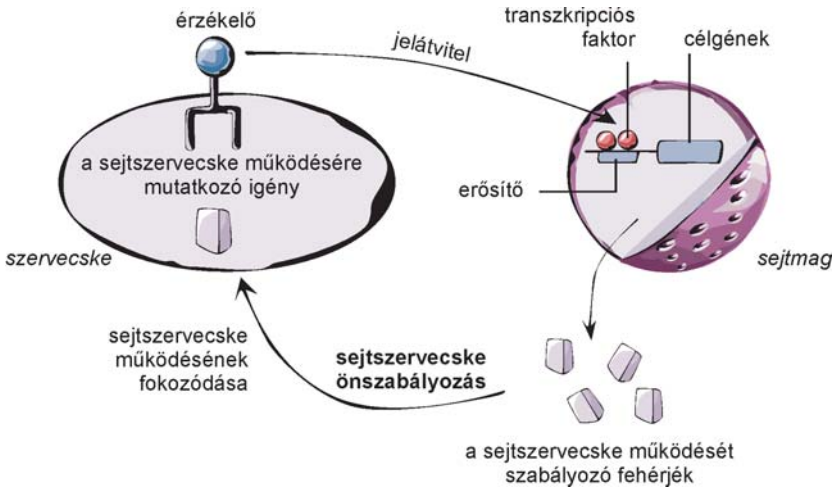
A lizoszóma az intra- és extracelluláris makromolekulák katabolizmusát végzi.

A citoplazmában anaerob energiatermelő folyamatok, valamint bioszintetikus utak lokalizálódnak: itt történik a glikolízis, a glukóz direkt oxidációja, a glikogén anyagcsere, a zsírsav- és nukleotidszintézis. Számos kivételt is találunk persze, melyek eltérnek ettől az általános sémától.

Az organellumok pH- és redox-homeosztázisa

Az organellumok fehérjeimportjához és metabolikus aktivitásához elengedhetetlen a lumen pH- és redox-homeosztázisának fenntartása. Az endomembrán rendszerben a luminális pH-t elsősorban a membrán vakuoláris típusú proton-ATP-áz aktivitása határozza meg. A szekréciós pályán az ER-től kifelé haladva a luminális pH enyhén csökken; hasonló, de meredekebben csökkenő gradienst észlelhetünk az endocitotikus pályán is. A legalacsonyabb pH-t a lizoszómákban találhatjuk. A mitokondriális mátrix magasabb pH-ját a légzési lánc komplexeinek protonpumpa aktivitása tartja fenn.

Az organellumok lumenének redox viszonyait a luminális oxidoreduktázok aktivitása, valamint a redox-aktív molekulák membránon keresztüli transzportja határoz-



III/8-17. ábra

Az organellum homeosztázis önszabályozása. Hosszan fennálló vagy erős UPR apoptózishoz vezethet. Ebben fontos szerepet játszik a CHOP transzkripciós faktor, a c-Jun N-terminális kináz (JNK) és az ER-hez asszociált prokaszpáz (Pc12)

za meg. A citoplazmához képest a mitokondriális mátrix redukáltabb (a citrát-ciklus és a zsírsavoxidáció által termelt NADH miatt), míg az ER lumene a citoplazmánál oxidatívabb környezetnek tekinthető az intenzív oxidatív fehérjefolding miatt.

III/8.7. ORGANELLUM STRESSZ ÉS STRESSZ JELPÁLYÁK

Selye János teljes szervezetre kidolgozott stresszelmélete változtatás nélkül alkalmazható celluláris és szubcelluláris szinten is. A stressz az organellumok szintjén is az alkalmazkodást szolgáló válasz a követelmények és lehetőségek megbillent egyensúlyának helyreállítására. A külső és belső környezet állandó változásai miatt a mérleg mindig billeg; az organellum stressznek tehát alapvetően fiziológiás szerepe van. Kóros állapot (distressz) is kialakulhat azonban öröklött és szerzett módon egyaránt; az organellum proteóma genetikai, epigenetikai, transzkripciós, transzlációs vagy poszttranszlációs eredetű változása, extrém környezeti hatások (elektronakceptorok és donorok bősége vagy hiánya), redox- és pH-változások, toxinok, xenobiotikumok súlyos akut vagy krónikus organellum stresszhez vezetnek *(III/8-17. ábra)*.

Az organellum stressz, kiindulópontjától függetlenül, megzavarja az adott kompartimentum jellegzetes fő funkcióját, így a mitokondriumban a terminális oxidáció – oxidatív foszforilációt, az ER-ben a szekréciós fehérjék foldingját, a lizoszómában a savi hidrolázok működését, a peroxiszómában a zsírsavoxidációt. Ezen folyamatok zavarát (általában helyi) szenzorok észlelik, majd *retrográd jelpályák* (organellum → sejtmag) aktiválásával transzkripciós szinten beindítják az adaptációs próbálkozásokat. Az adaptáció egyrészt fokozza az organellum metabolikus kapacitását, másrészt csökkenteni igyekszik a túlterhelést okozó folyamatot. Sikeres esetben az egyensúly magasabb vagy alacsonyabb szinten újra beáll. Ha az alkalmazkodás sikertelen, általában a programozott sejthalál mechanizmusai kerülnek előtérbe.

Az ER stressz az organellum stressz leginkább ismert válfaja, ezért ezt ismertetjük részletesen.

Az endoplazmás retikulum stressz

Az ER intraluminális környezetének bármilyen külső vagy belső hatás által kiváltott változása, illetve az organellumra jellemző reakciók abszolút vagy relatív elégtelensége egyaránt kiválthatja az ER stresszválaszt. Minthogy az ER legfontosabb funkciója a fehérjeszintézis, a legtöbb ER stresszt kiváltó okot a fehérjeszintézis, poszttranszlációs módosítás és folding területén írták le. Viszonylag keveset tudunk a lipidek, szénhidrátok és xenobiotikumok ER-ben történő metabolizmusával kapcsolatos stresszről.

Az ER stresszre adott sejtválasz igen egyszerű, és két fő összetevője van. Egyrészről a sejt növeli az ER méretét és funkcionális kapacitását a membránfoszfolipidek és az ER dajkafehérjéinek, foldázainak és lektinjeinek fokozott szintézisével. Másrészről megpróbálja az ER-re nehezedő terhelést csökkenteni a transzláció leállításával és a felhalmozódott tekeretlen fehérjék proteolízisével. Ha ezek a mechanizmusok elégtelennek bizonyulnak, a sejt programozott sejthalál révén felszámolja magát.

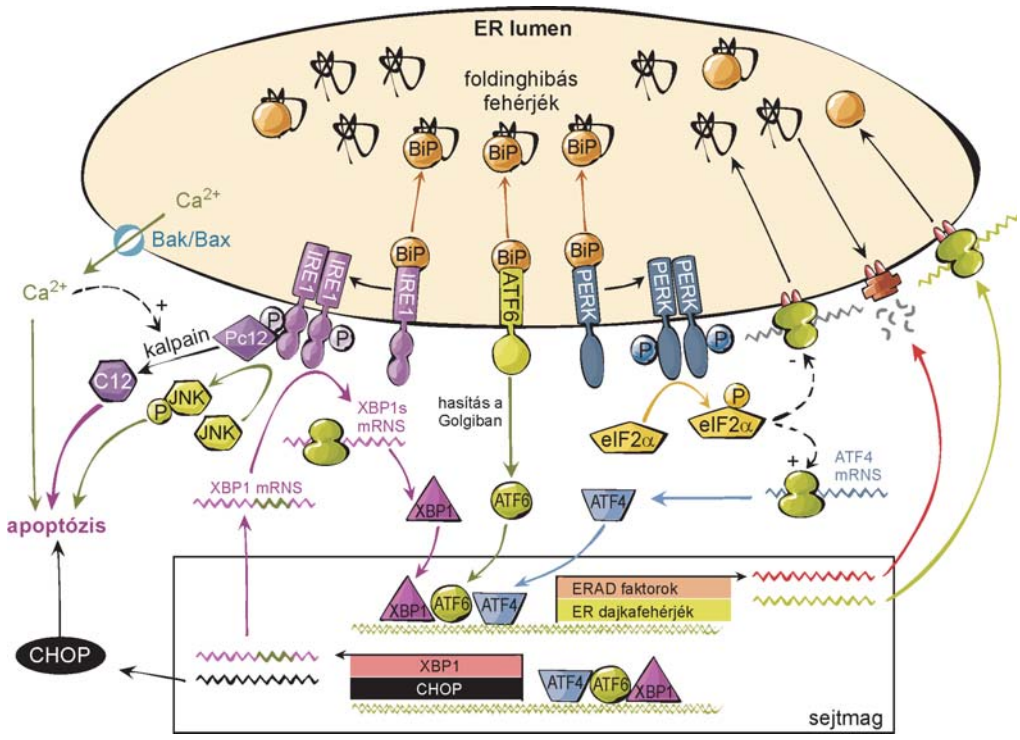
Teljesen stresszmentes helyzet még az ER számára is elképzelhetetlen. Az ER stresszel összefüggő jelátviteli pályák aktivitása minden sejtben kimutatható. Ez az

alapaktivitás feltehetőleg szerepet játszik a külső és belső környezet változásaihoz való állandó alkalmazkodásban, így a tápláltsági állapot fiziológiás érzékelésében és a legfontosabb tápanyagok (glukóz, aminosavak) ingadozó szintjéhez való adaptációban. Ezzel összhangban, az ER stressz mechanizmusainak aktiválódását találták fokozott kalóriabevitel esetén, elhízásban és metabolikus szindrómában, sőt kalóriahiány esetében is.

Az ER stressz több fiziológiás mechanizmusban is fontos szerepet játszik (eustressz). A legismertebb példák: a B-limfocita átalakulása immunoglobulin szekrécióra specializálódott plazmasejtté, valamint a májsejt ER proliferációja a biotranszformációs enzimek xenobiotikumok okozta indukciója esetén, például fenobarbitál hatására. Az igazi patológiás ER stresszt (distressz) okozhatják genetikai eltérések (melyek általában ER tárolási betegségek formájában jelentkeznek), illetve exogén hatások (például vírusinfekció, farmakológiai ágensek). Az utóbbiakat gyakran használják kísérletes ER stressz kiváltására.

Jelátvitel az ER és a sejtmag között

Az ER egyik legfontosabb funkciója az exportra kerülő makromolekulák (fehérjék, lipoproteinek) szintézise, foldingja és poszttranszlációs módosítása, valamint a



III/8-18. ábra
A selejtfehérje-válasz és jelpályái.
Az egyes jelpályák részletes leírását lásd a szövegben. Hosszan fennálló vagy erős UPR apoptózishoz vezet. Ebben fontos szerepet játszik a CHOP transzkripciós faktor, a c-Jun N-terminális kináz (JNK) és az ER-hez asszociált prokaszpáz (Pc12), mely kaszpázzá (c12) aktiválódik.

makromolekuláris proteinkomplexek összeállítása. A lipidek (köztük a koleszterin) szintézisében is központi szereplő az ER. A csökkent fehérje- vagy lipidszintézis, illetve a folding zavara az ER csökkent vagy elégtelen funkciójának fontos jele lehet.

A fenti eseményekről sajátos jelpályák szállítanak információt a sejtmagba. (Mivel a magot körülvevő membrán része az ER-nek, a jelpályának nem kell szükségszerűen érintenie a citoplazmát.) A legismertebb jelpálya a selejtfehérje-válasz (unfolded protein response, UPR, *III/8-18. ábra*).

Selejtfehérje-válasz (unfolded protein response, UPR)

A stressz érzékelése és transzmembrán jelátvitel – A selejtes fehérjék lumenbeli felhalmozódásáról transzmembrán fehérjék adnak hírt. Az UPR-nek három fő receptorát ismerjük: az *IRE1* (inositol requiring-1), *PERK* (RNA-dependent protein kinase-like ER kinase) és az ATF6 (activating transcription factor 6). Ezek a receptorok az ER membrán integráns fehérjéi. Az UPR általánosan elfogadott modellje szerint luminális doménjük stresszmentes állapotban köti a BiP-et, az ER-ben legnagyobb mennyiségben expresszálódó dajkafehérjét; a kötés inaktív állapotban tartja a receptorokat. ER stressz esetén a felhalmozódó selejtfehérjék nagyobb affinitással és kapacitással kötődnek a BiP-hez, kivonva azt a receptorokkal képzett kötéséből, így a transzmembrán fehérjék aktiválódnak. Jelátvitelük két mechanizmussal történhet: dimerizáció és foszforiláció (IRE1 és PERK) az ER membránban, vagy transzlokáció a Golgiba és ott limitált proteolízis (ATF6). Az IRE1 és PERK luminális doménje ER stressz-függő módon szabályozza a citoszolikus domén kináz aktivitását a receptorok di- vagy oligomerizációjával. Az ATF6 C-terminális luminális doménje két Golgi lokalizációs szekvenciát (GLS1 és GLS2) tartalmaz. Az ATF6 működését is a BiP kötődése szabályozza, az ATF6- ot visszatartja az ER-ben.

A membrántól a transzkripció aktiválásáig – Az aktiválódott receptorok különböző mechanizmusú jelátviteli pályákat indítanak be. BiP-kötés hiányában, vagyis ER stressz esetén az ATF6 a Golgiba vándorol és limitált proteolízissel aktiválódik. A fehérjét két helyi proteáz (S1P és S2P) hasítja. A felszabaduló N-terminális citoszolikus rész ezután bázikus leucin húzózár (bZIP) transzkripciós faktorként funkcionál. Kötődik az ERSE-I és ERSE-II (ERSE = endoplasmic reticulum stress element) szekvenciákhoz. A kötés fokozza a legtöbb ER rezidens dajkafehérje és a *CHOP* proapoptotikus transzkripciós faktor expresszióját.

Az IRE1 extraluminális része kináz és endoribonukleáz doméneket tartalmaz. Az oligomerizálódott IRE1 transz-autofoszforilálódik és így aktiválódik. Az aktív IRE1 egy tRNS-ligázzal és egy NAD^+-függő foszfatázzal együttműködve kihasít egy darabot az *XBP1* (X-box binding protein-1) elsődleges mRNS-éből. (A folyamat a pre-tRNS érésére emlékeztet.) Az átalakított mRNS átíródik fehérjévé, s az így képződött XBP1 bZIP típusú transzkripciós faktor fokozza az UPR célgének átíródását. Az ide tartozó gének promotere tartalmaz egy 22 bázispárból álló UPR elemet (UPRE), melyet minden UPR során indukálódó fehérje génjének promoterében megtaláltak. Az indukálódó fehérjék részt vesznek az ER membrán proliferációjához szükséges foszfolipid bioszintézisben, a foldingban (luminális chaperonok, glikoziltranszferázok), a minőségellenőrzésben (EDEM fehérjék), az ERAD-ban.

A PERK citoplazmában lévő doménje oligomerizálódás után protein-kináz aktivitású, az *eukarióta iniciációs faktor 2α (eIF2α)* szerinjét foszforilálja, ezzel gátolja a transzlációt. Ennek hatására először a rövid élettartamú fehérjék tűnnek el a sejtből, például a ciklin-D1. A ciklin-D1 eltűnése az ER stressz során a leállítja a sejtciklust G_1 fázisban. Néhány fehérje transzlációját azonban nem gátolja az eIF2α foszforilációja, mint például az ATF4 transzkripciós faktorét. Az ATF4 fokozza az aminosav importban és a glutation bioszintézisben szereplő gének expresszióját.

A PERK foszforilálja továbbá a bZIP típusú *Nrf2* transzkripciós faktort is. A foszforilált Nrf2 az ARE-hez (antioxidant response element) kötődve indukálja a biotranszformáció második fázisának sok enzimét (glutation-S-transzferáz, NADPH:kinon-oxidoreduktáz, γ-glutamilcisztein-szintetáz, UDP-glukuronozil-transzferáz). Az ER stressz az egész sejt redox (antioxidáns) homeosztázisát felboríthatja, a fenti mechanizmus ez ellen nyújt védelmet. Feltételezhető, hogy az ER lumen tiol-diszulfid oxidoreduktázai általános redoxszenzorként is működhetnek.

Peroxiszomális stressz

A peroxiszomális stressz fogalma ritkán használatos annak ellenére, hogy a stresszválasz elemei a peroxiszómák esetében is jelen vannak. A csökkent peroxiszomális funkció legfontosabb szignáljai az intracellulárisan felszaporodott zsírsavak, illetve a hidrogén-peroxid. A hidrogén-peroxid adása indukálja a peroxiszóma biogenezisben legfontosabb PEX géneket mind növényi, mind állati sejtekben. Ez a megfigyelés azt is sejteti, hogy a peroxiszóma, bár hidrogén-peroxid termelő reakcióknak is a helye, kataláz aktivitása révén inkább a hidrogén-peroxid lebontás irányában hat.

A különböző lipidek intracelluláris felszaporodása a PPAR (peroxiszóma proliferátor aktivált receptor) magi receptorok aktiválódása útján fejti ki peroxiszomális hatását. A PPAR fehérjék ligand által indukált transzkripciós faktorok, melyek a magi hormonreceptorok családjához tartoznak (a szteroid- és pajzsmirigyhormonok, retinoidok és D-vitamin receptoraival együtt). Több izoformájuk van, emlősökben α, δ és γ. A PPARα elsősorban a májban expresszálódik, a PPARγ a zsírszövetben.

A PPAR-ok a szteroid – tiroid – retinoid magi receptorcsaládba tartoznak, így szerkezetük is ennek felel meg: két cinkujj-szerű struktúrát és egy α-helikális szakaszt tartalmazó DNS-kötő régiót és C-terminálisan elhelyezkedő ligand-kötő domént tartalmaznak. A PPAR-ok fiziológiás ligandjai kezdetben ismeretlenek voltak, árva receptorokként írták le őket a mesterséges ligandok (pl. fibrátok) adása után jellegzetesen megjelenő peroxiszóma proliferációs hatás alapján. Azóta a mesterséges ligandokon kívül számos természetes ligandjukat (linolsav, linolénsav, fitánsav, arachidonsav, eikozanoidok stb.) is leírták. A PPAR-ok működésének a dimerizáció alapfeltétele. Heterodimert tudnak képezni a 9-cisz-retinoid receptorral (RXR). A heterodimert alkotó bármelyik partner ligandja aktiválja a dimert, mely így a DNS PPAR reszponzív elemeihez (PPRE) kötődhet. A kötődés eredménye a target gének expessziójának fokozódása.

A *PPARα* elsősorban a májban indukálja a peroxiszomális zsírsavoxidáció teljes enzimkészletét, a zsírsavtranszportban és felvételben szerepet játszó fehérjéket, a májsejt citoplazmájának zsírsavkötő fehérjéjét (FABP, fatty acid binding protein), a mitokondrális zsírsavoxidáció enzimeit, a ketogenezis enzimeit, a mikroszomális zsírsav ω-oxidációban szerepet játszó citokróm P450 izoenzimeket (CYP4A család).

A *PPARγ* hatását főleg a zsírszövetben fejti ki, ahol indukálja a lipoprotein lipázt, a zsírsav transzlokázt, a zsírsavkötő fehérjét, a foszfoenolpiruvát karboxikinázt (a glukoneogenezis prekurzorokból történő glicerinszintézis sebességmeghatározó enzimét).

A PPAR-ok funkciója tehát alapvető a zsírsavmetabolizmusban. Az intracelluláris lipidfelhalmozódás a legtöbb sejtet károsítja (lipotoxicitás). Bármilyen állapot, mely hiperlipémiához vezet (zsírsavdús diéta, éhezés, stressz, diabetes) a PPAR-okat aktiválja. Az azonos ligandok a különböző szervekben a szervre jellemző PPAR-on keresztül különböző célgének expresszióját fokozzák. A májban a zsírsavfelvétel, trigliceridbe beépülés, β- és ω-oxidáció enzimei indukálódnak, míg a zsírszövetben

a zsírlerakódás fokozódik. Minden PPAR által szabályozott reakció tehát a zsírsavszint csökkentése, vagyis a lipotoxicitás kivédése irányába hat.

PPARα-hiányos egérben normál táplálkozás mellett anyagcserezavart nem lehet megfigyelni. Zsírdús diéta vagy éhezés (a fentieknek megfelelően) a máj elzsírosodását okozza. Éhezésben emellett még súlyos hipoglikémia és hipotermia is kifejlődik (a zsírsavoxidáció és a ketontest szintézis károsodása miatt). A PPARγ hiánya embrionális korban letális. A gén kísérletes „kikapcsolása" a születés körül a zsírszövet eltűnéséhez és zsírmáj kialakulásához vezet.

Bár a PPAR első észlelt hatása a peroxiszóma proliferáció fokozódása volt, ennek mechanizmusa mindmáig enigmatikus. Kérdés, hogy a strukturális változások megelőzik-e, vagy pedig követik a peroxiszomális fehérjék indukcióját.

Mitokondriális stressz

A mitokondriális és nukleáris genóma összehangolt válasza szükséges számos környezeti hatás esetén, mint amilyen a hőmérsékletváltozás, tápanyagbevitel túlzott bősége vagy éppen hiánya. Hasonlóképpen a belső környezet fenntartása, az energiaigény kielégítése, a hormonális hatásokra adott válasz is megköveteli az együttes és koordinált reakciót. Anterográd és retrográd jelpályák összessége hozza létre ezeket a válaszokat. A sejtmagból a mitokondriumba irányuló jelpályák elsősorban a mitokondriális biogenezisért felelősek. A mitokondriumból a sejtmagba retrográd úton küldött jelek tájékoztatnak a mitokondrium funkcionális állapotáról, így a mitokondriális stresszről is. A retrográd jelpályák első csoportjába olyan transzkripciós faktorok és koaktivátorok tartoznak, melyek hőmérsékletváltozásra, kalóriabevitelre, izommunkára, hormonhatásra (például pajzsmirigyhormonok) érzékenyek, és mind a nukleáris, mind a mitokondriális genóma expresszióját szabályozzák. A második mechanizmus a csökkent mitokondriális képességekről ad hírt, és *mitokondriális stresszválasz*nak nevezzük. A mitokondriális stresszválasz a stresszből való kilábalást célozza.

Mitokondriális stresszt okoznak mindazon hatások, melyek a membránpotenciál csökkenéséhez, illetve ATP hiányhoz vezetnek, vagyis az oxidatív foszforilációt és/vagy a terminális oxidációt károsítják. Genetikai és környezeti hatások egyaránt mitokondriális stresszhez vezethetnek. Az első csoportba tartoznak egyes mitokondriális fehérjék öröklött defektusai, illetve a sokkal gyakoribb, az öregedés során bekövetkező mtDNS mutációk. Az utóbbi csoportban a leggyakoribb noxák a hipoxia, hősokk, szétkapcsoló hatású xenobiotikumok, mitokondriális foldingzavarok, illetve a programozott sejthalál mechanizmusai.

A mitokondriális stresszválasz jelpályái

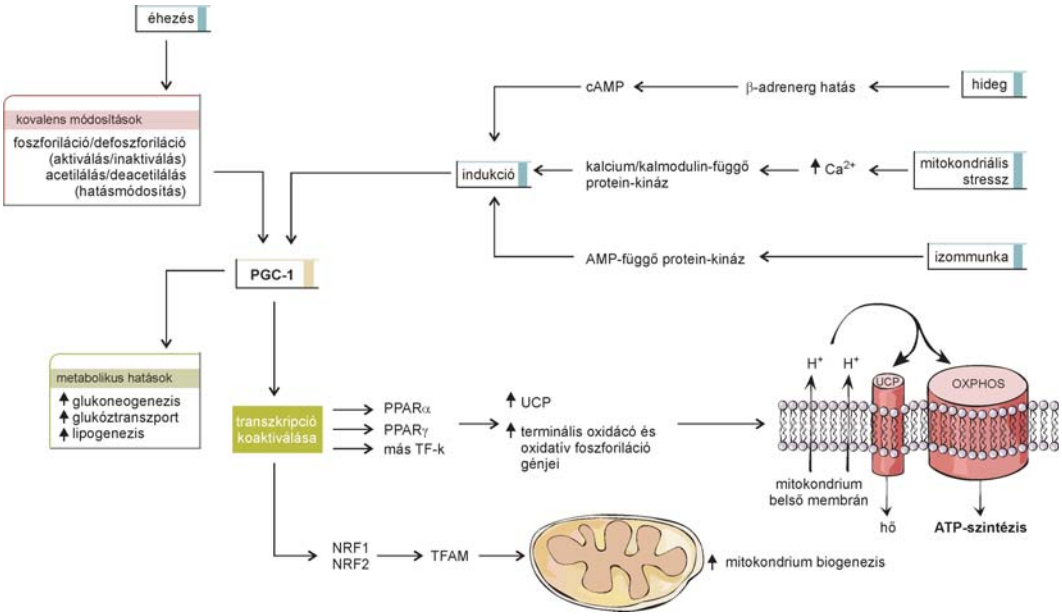
A különböző okokból bekövetkező mitokondriális stresszfolyamatok egyik közös nevezője a kalciumionok koncentrációjának emelkedése a citoplazmában. A kalciumionok aktiválják a kalcium/kalmodulin-függő protein kinázt, a protein-kináz C-t, a kalcineurint (egy kalciumfüggő protein-foszfatázt), valamint a JNK/MAPK útvonalat. A jelpályák végül olyan transzkripciós faktorokat aktiválnak (NFκB, CREB, CHOP stb.), melyek a kalcium transzportban és tárolásban szerepet játszó fehérjék génjeinek expresszióját fokozzák.

A mitokondriális stresszválasz legfontosabb és univerzális összetevőjének azonban a PGC-1 (*P*PARγ *c*oactivator-1; peroxiszóma proliferátor aktivált receptor koaktivátor-1) tűnik *(III/8-19. ábra)*. A fehérjét, nevének megfelelően, mint a PPARγ magi receptor koaktivátorát írták le barna zsírszövetben. A PGC-1 koaktivátorok

(több homológ ismeretes) N-terminális doménje interakcióba lép a kromatin újrarendezésére képes fehérjékkel, a hiszton acetiltranszferázokkal. A kromatin átrendeződése lehetőséget teremt különböző transzkripciós faktoroknak a génexpresszió fokozására. A PGC-1 C-terminális doménje aktiváló komplexet köt, valamint egy RNS-kötő régiót is tartalmaz, mely elősegíti a pre-mRNS splicingot.

A PGC-1 indukálható fehérje. Számos környezeti hatás beindítja az indukciót, a barna zsírszövetben a hideghatás, a vázizomban a fizikai munka. A PGC-1 transzkripciójának szabályozása különböző szövetekben eltérő módon valósulhat meg. A barna zsírszövetben hideg hatására a β-adrenerg receptorok aktiválódnak, a PGC-1 transzkripció cAMP-függő fokozódásához vezetve. Vázizomban a hosszabb ideig tartó izommunka energiadeficitet okoz, melyet az *AMPK* érzékel, és a kalcium/kalmodulin-függő protein kinázzal együtt PGC-1-függő mitokondrium biogenezist indukál. A mitokondriális reaktív oxigéntermékek felszaporodása (például hiperglikémiával járó állapotokban) szintén az AMPK aktiválódásához vezet endotélsejtekben. A szabályozási folyamatok eredményeképpen in vivo a PGC-1 szintje arányos a mitokondriumok számával, overexpressziója sejtkultúrákban pedig mitokondrium biogenezist indukál, a légzés és az oxidálandó szubsztrátok felvételének fokozódásával.

A PGC-1 aktivitása is szabályozás alatt áll. A fehérje rövid életidejű, de foszforilációja (melyet a p38 MAP-kináz végez) stabilizálja azt, így emeli intracelluláris koncentrációját. A foszforiláció a PGC-1 transzkripcióra gyakorolt hatását is emeli, leválasztván róla különböző represszor fehérjéket. A PGC-1 éhezéskor tapasztalt glukoneogenetikus hatását a *lizil-deacetiláz SIRT-1* aktiválja; a deacetilált PGC-1 el-



III/8-19. ábra

A PGC-1 (peroxiszóma proliferátor aktivált receptor koaktivátor-1) szerepe a mitokondriális stresszválaszban, a környezeti hatásokra adott válasz és a mitokondriális funkciók szabályozásában (TF, transzkripciós faktor; OXPHOS, oxidatív foszforiláció; TFAM, mitokondriális transzkripciós faktor A; UCP, uncoupling protein; NRF1, nuclear respiratory factor; NRF2, nuclear factor-like 2)

sősorban a glukóz- homeosztázist, míg az acetilált forma a mitokondriális biogenezist szabályozza.

A PGC-1 pleiotrop hatásait úgy éri el, hogy igen sok magi receptorral, illetve transzkripciós faktorral lép kölcsönhatásba, melyek fokozzák a mitokondriális fehérjék expresszióját, enzimekét és a protein importban szereplő fehérjékét egyaránt. A PPARα aktiválása fokozza a zsírsavoxidáció enzimeinek expresszióját, a PPARγ-é pedig (egyebek mellett, lásd peroxiszomális stressz) a szétkapcsoló fehérjéét (UCP1, uncoupling protein-1), mely a barna zsírszövet mitokondriumainak belső membránjában működve elősegíti a hőtermelést. A Nrf1 és Nrf2 transzkripciós faktorok aktiválása a mtDNS replikációjához vezet, valamint a sejtmagban kódolt légzési lánc komponensek expresszióját is fokozza. (Ezek a transzkripciós faktorok az ER stressz esetén is aktiválódnak, ami jól mutatja a szubcelluláris stresszválasz hálózatos jellegét.)

Végül a PGC-1 számos, nem mitokondriális funkciót is stimulál, így a glukoneogenezist (a foszfoenolpiruvát-karboxikináz és a glukóz-6-foszfatáz indukciójával), a glukóztranszportot, a lipogenezist (a SREBP1 aktiválásával). A PGC-1 tehát egyfajta „master regulator" szerepet játszik mindazokban az állapotokban, melyekben fokozott energiatermelésre van szükség.

A fokozott mitokondriális biogenezis esetén a fehérjeexpresszió fokozása mellett a membrán foszfolipidjeinek szintézisére is szükség van, különös tekintettel a mitokondriumspecifikus kardiolipinre. A PGC-1 azonban nem látja el ezt a funkciót. A mitokondrium biogenezist a mtDNS depléciójával stimulálva egy fehérje, a *MIDAS* (mitochondrial DNA absence sensitive factor) fokozott expresszióját találták. A MIDAS a Golgi-apparátusban és a mitokondriális membránközti térben elhelyezkedő fehérje, mely fokozza a kardiolipin és más membránlipidek szintézisét, de nem befolyásolja a mitokondriális fehérjék expresszióját. A MIDAS hatása tehát hasonló a SREBP ER stresszben kifejtett hatásához. A kísérleti eredményt in vivo megfigyelések is igazolták: a MIDAS szint emelkedett volt azon betegek izomsejtjeiben, akik citokróm oxidáz elégtelenségben szenvedtek.

Mitokondriális UPR

Az ER-hez hasonlóan, a mitokondriális funkciók is nagyban függnek a helyi dajkafehérjék működésétől. A mátrix importált fehérjéit a mtHsp70 húzza át a belső membránon, és ko-chaperonjaival és a mátrix chaperoninjaival együttműködve végrehajtja a foldingot. A mitokondriális stresszválasz a mátrix dajkafehérjéinek indukciójával jár. Ha a mtDNS-t etídiumbromid kezeléssel depletálják, a nukleáris gének által kódolt mátrixfehérjék fokozott kompenzatórikus expressziója kiváltja a mtHsp70 és Hsp60 indukcióját. A hatás független a membránpotenciáltól, illetve a reaktív oxigénszármazékok felszaporodásától. A fehérje akkumuláció érzékelésének mikéntje, illetve a jelpálya még nem tisztázott. A mitokondriális proteázok (az ERAD-hoz hasonlóan) lebonthatják a felhalmozódó mátrixfehérjéket; a keletkező oligopeptid fragmentumoknak szerepe lehet a mitokondriális UPR beindításában.

III/8.8. ORGANELLUM STRESSZ ÉS SEJTHALÁL

Az organellum stressz általában megoldódik a stressz jelpályák által aktivált alkalmazkodási mechanizmusok révén. Akut, erőteljes stresszhatások esetén az organellum adaptációs rendszere nem mindig tudja felvenni a küzdelmet a stresszorral, illetve idővel mechanizmusai kimerülnek. Ezekben az esetekben a stressz vég-

eredménye a sejt halála. A sejt pusztulása történhet apoptózis útján, melyet a hasoncímű fejezet tárgyal részletesen. Ebben a fejezetben az organellum-eredetű autofágia és nekrózis néhány példáját mutatjuk be.

Endoplazmás retikulum stressz és autofágia

A legújabb megfigyelések szerint az apoptózis mellett az autofágia (makroautofágia) is lehetséges kimenete az ER stressznek. Bár az autofágiát eredetileg a programozott sejthalál egyik típusaként tartották számon, újabb megfigyelések alapján inkább preventív mechanizmusnak tűnik: gátlása fokozza az apoptotikus sejtválaszt ER stressz esetén, míg indukciója a sejtet rezisztensebbé teszi az apoptózissal szemben. Az autofágia tulajdonképpen alternatív ERAD mechanizmust jelent, melynek során nagy mennyiségben tudnak eliminálódni az aggregációra hajlamos foldinghibás vagy rendellenes fehérjék. Az autofagoszómák bekebelezhetik és lebonthatják az ER nagyobb darabjait is, annak tartalmával együtt.

Az ER stresszt az autofágiával összekötő jelátviteli módozatok még kevésbé ismertek. Az *mTORC1* az egyik fő szabályozója az autofágiának. Ha az mTOR kináz inaktíválódik (például éhezésben vagy experimentálisan rapamicin adása után), az Atg1-kináz (Atg = autophagy-related protein, az ULK1 analógja) defoszforilálódik, és ettől kinázaktivitása fokozódik. Az Atg1-kináz aktiválódása a makroautofágia fontos markere; megfigyelték aktiválódását ER stressz esetén is. Az összeköttetést az ER stressz és az mTORC1 inaktiválódás között egyrészt létrehozhatja az AKT/TSC/mTORC1 jelpálya gátlása, másrészt az ER stressz által okozott Ca^{2+}-felszabadulás a CaMKK-függő AMPK aktiváláson keresztül gátolhatja az mTORC1 aktivitását. Bár a pontos kapcsolat még nem ismeretes, az autofágia egyre nagyobb jelentőségűnek tűnik az ER stresszel járó betegségek patomechanizmusában.

Mitokondriális eredetű nekrózis

A mitokondriumot érő súlyosabb akut hatások, melyek magas mátrix kalcium koncentrációt, emelkedett szabadgyökszintet, redox egyensúlyzavart okoznak, létrehozzák a mitokondriális permeabilitás tranzíció (MPT) jelenségét. Az MPT alkalmával egy pórus (MPTP) nyílik meg a mátrix és a citoszól között, melyen körülbelül 1500-as tömegig a molekulák szabadon közlekednek. Értelemszerűen a pórus léte a membránpotenciál összeomlásához és a mitokondrium duzzadásához vezet.

Az MPTP molekuláris felépítése vitatott. A pórust a külső és belső membrán összekapcsolódó fehérjéi alkotják, valószínűleg a mitokondriális foszfát transzporter az egyik eleme, a belső membrán ATP/ADP transzlokázának és a belső membránhoz a mátrix felől kapcsolódó ciklofilin D fehérjének szabályozó szerepe lehet.

Az MPT indukciója a mitokondriális depolarizációt teljessé teszi, megszűnik a protongradiens, s így az ATP szintézis is. Ugyanakkor az akceptor-kontroll hiánya fokozza a légzés sebességét, a sejt elhasználja redukáló ekvivalenseit, a reaktív oxigénszármazékok termelése nő. ATP hiányában az ionpumpák működése sejtszerte megszűnik, a redukáló ekvivalensek és az ATP együttes hiánya pedig a bioszintetikus reakciók leállását eredményezi. A póruson keresztül kalcium áramlik ki, mely kalpainokat és más kalcium-függő proapoptotikus faktorokat aktivál. Mindazonáltal, az energiahiány miatt a klasszikus apoptotikus folyamat nem tud lejátszódni, a sejthalál mechanizmusa inkább a nekrózis felé tolódik.

Az MPTP jelensége és a következményes nekrotikus sejthalál megfigyelhető például az idegsejtek excitotoxikus károsodása esetén, melyet túlzott neurotranszmitter (glutamát) hatás vált ki. A szívizom vagy az agy iszkémiát követő reperfúziója során szintén mitokondriális eredetű nekrózis észlelhető.

Lizoszomális eredetű nekrózis

A lizoszómák („suicide bags") a sejthalál mindhárom útvonalában (apoptózis, autofágia, nekrózis) főszereplők. A lizoszomális membrán jelentős károsodása nekrózishoz vezet, a katabolikus enzimek elszabadulása miatt. Azok a molekulák, melyek fokozzák a lizoszóma membrán permeabilitását (kalpain, reaktív oxigénszármazékok, lizoszomotróp ágensek, szfingozin, a Bcl-2 családba tartozó pro-apoptotikus fehérjék), nagy dózisban teljes lizoszomális membránpermeabilitást és nekrózist váltanak ki. A lizoszomális proteázok közül ebből a szempontból a katepszinek a legfontosabbak. A katepszin-B-ciszteinil-proteáz, míg a katepszin-D-aszpartil-proteáz; mindkettő diszulfid-kötésekkel összekötött dimerje egy könnyű és egy nehéz láncnak. Bár a katepszinek gyorsan elvesztik natív konformációjukat és aktivitásukat a citoplazma neutrális pH-ján, rövid ideig feltételezhetően aktívak maradnak és proteolitikus kaszkádot aktiválhatnak.