Tartalom

Előszó az első kiadáshoz XV
Előszó a második kiadáshoz XVI

1. A fehérjék és enzimek szerkezete, funkciója

1.1. A fehérjék szerkezete *(Machovich Raymund)* 3
Aminosavak 3
Az aminosavak szerkezeti tulajdonságai 3
Az aminosavak oldallánc szerinti csoportosítása 3
A fehérjékről általában 6
A proteinszerkezet különböző szintjei: a háromdimenziós struktúra kialakulása 7
A fehérjék elsődleges szerkezete 7
A fehérjék másodlagos szerkezete 9
A fehérjék harmadlagos szerkezete 12
A fehérjék negyedleges szerkezete 14
Multienzim komplexek 14
Szupramolekuláris struktúrák 14
Fehérjék denaturációja 14
A natív állapot kialakulása: a fehérje feltekeredése 15
A fehérjeszerkezet megismerését szolgáló metodikák 17
Gélelektroforézis 17
Izoelektromos fókuszálás 18
Dialízis és gélszűrés 18
Ioncserélő és affinitás kromatográfia 20

1.2. Enzimek *(Faragó Anna)* 21
Az enzimek katalitikus funkciója 21
Az enzim–szubsztrát komplex kialakulása 22
A katalízisben szerepet játszó tényezők 23
Az enzimek osztályai 26
Koenzimek és prosztetikus csoportok 27
A Michaelis–Menten-modell 30
Az enzimaktivitás gátlása 34

Az enzimaktivitás szabályozásának módjai . . . 35
Allosztérikus enzimek . . . 36
Az enzimműködés szabályozása foszforiláció-defoszforiláció segítségével . . . 40
A proenzimek átalakulása aktív enzimmé limitált proteolízis segítségével . . . 41
Az enzimek néhány gyakorlati alkalmazása az orvosi diagnosztikában . . . 42

1.3. A hemoglobin és a mioglobin *(Mandl József)* . . . 44
A hemoglobin és a mioglobin szerkezete, oxigénkötése . . . 44
Az oxigénleadás szabályozása . . . 47
A hemoglobin aminosav-összetételének változásai. A haemoglobinopathiák . . . 48

2. Az anyagcsere

2.1. Bioenergetika. Energiatermelés és -raktározás az anyagcsere során *(Mandl József)* . . . 55
Energiatranszformáció . . . 55
„Kapcsolt reakciók" elve . . . 56
A metabolizmus . . . 56
Csoportátvitel – csoportátviteli potenciál . . . 56
A foszforiltranszfer, az ADP/ATP ciklus . . . 59
Elektrontranszfer –oxidoredukció . . . 63
A legfontosabb elektronátvivők redoxciklusa . . . 64
A biológiai oxidáció . . . 68
Elektrontranszfert katalizáló enzimek – oxidoreduktázok . . . 69
Terminális oxidáció –oxidatív foszforiláció . . . 70
A mitokondriumok szerkezete . . . 70
A mitokondriális légzési lánc alkotói . . . 72
A terminális oxidáció folyamata . . . 74
Az oxidatív foszforiláció . . . 76
Az ADP foszforilációja – az akceptor kontroll . . . 76
A kemiozmotikus elmélet . . . 77
Mitokondriális fehérjék szintézisének zavarai – „mitokondriális betegségek" . . . 78
A citrátciklus . . . 79
A citrátciklus helye az intermedier anyagcserében; a ciklus katabolikus és anabolikus funkciója . . . 79
Az acetil-CoA képződése piruvátból, a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex . . . 81
A citrátkör reakciói . . . 85
A citrátkör szerepe a tápanyagok katabolizmusában . . . 88
A piruvát-dehidrogenáz komplex aktivitásának szabályozása . . . 88
A citrátciklus szabályozása. A ciklust feltöltő (anaplerotikus) reakciók . . . 89
A piruvát-dehidrogenáz csökkent működésének klinikai vonatkozásai . . . 91

2.2. A szénhidrátok anyagcseréje *(Ádám Veronika és Mandl József)* . . . 92
A legfontosabb szénhidrátok és tulajdonságaik . . . 92
A szénhidrátok emésztése, felszívódása és a glukóz bejutása a sejtekbe . . . 100
Glikolízis . . . 103
A glikolízis helye az intermedier anyagcserében . . . 103
A glikolízis reakciói . . . 104

A glikolízis energiamérlege. A glukóz aerob és anaerob lebontásának energiamérlege . . . 108
Sejtspecifikus sajátosságok, klinikai, patológiai vonatkozások . . . 109
Redukáló ekvivalensek transzportja a citoszolból a mitokondriumba . . . 109
Glukoneogenezis – a glukóz de novo szintézise . . . 112
A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása . . . 116
A fruktóz és a galaktóz metabolizmusa . . . 122
A glikogén szintézise és lebontása . . . 126
Glikogénszintézis . . . 126
Glikogénlebontás . . . 128
A glikogén-anyagcsere szabályozása . . . 129
Glikogéntárolási betegségek . . . 133
A vércukorszint szabályozása . . . 133
A glukóz direkt oxidációja, pentóz-foszfát-út . . . 136
A glukóz direkt oxidációjának oxidatív szakasza . . . 136
A glukóz direkt oxidációjának nem oxidatív szakasza. Pentóz-foszfát keletkezése glikolízis intermedierekből . . . 137
A pentóz-foszfát-út szabályozása, jelentősége, lefolyásának különböző formái . . . 139
A pentóz-foszfát-ciklus működésének megváltozásával összefüggő kórképek . . . 140
Bioszintetikus folyamatok a szénhidrátok anyagcseréjében. Glikoproteinek, proteoglikánok szénhidrátláncának szintézise . . . 140

2.3. **A lipidek anyagcseréje** *(Ádám Veronika)* . . . 143
A legfontosabb zsírsavak és jelölésük . . . 144
Acil-gliceridek. Trigliceridek és az energiaraktározás . . . 145
A zsírsavak de novo bioszintézise . . . 146
Az acetil-CoA transzportja a mitokondriumból a citoplazmába . . . 146
A zsírsavszintézis elkötelező lépése és az acetil-CoA-karboxiláz szabályozása . . . 147
A palmitinsav szintézise. A zsírsav-szintáz . . . 148
A NADPH forrása . . . 151
A zsírsavlánc elongációja . . . 151
Speciális zsírsavak, amelyek a zsírsav-szintáz reakcióban keletkezhetnek . . . 153
A trigliceridek szintézise és raktározása . . . 154
Lipolízis – a raktározott zsírsavak mobilizálása a zsírszövetből . . . 157
A zsírsavak oxidációja . . . 159
A páros szénatomszámú zsírsavak oxidációja . . . 160
A páratlan szénatomszámú és a telítetlen zsírsavak oxidációja . . . 162
Alfa-oxidáció és omega-oxidáció . . . 164
A ketontestek keletkezése és felhasználása. Ketonaemia, ketonuria . . . 165
A koleszterin metabolizmusa . . . 168
A koleszterin szintézise . . . 168
A koleszterinszintézis regulációja . . . 172
A koleszterin-észterek keletkezése . . . 173
Az epesavak keletkezése, metabolizmusa és jelentősége . . . 175
A lipidek szállítása. Lipoproteinek . . . 180
A trigliceridek szállítása. Kilomikron, VLDL . . . 182
A koleszterin szállítása. LDL, HDL . . . 184
Szabad zsírsavak . . . 189
A zsírok emésztése és felszívódása . . . 190

A foszfolipidek és szfingolipidek felépítése és jelentősége . . . 193
A foszfatidilkolin szintézise . . . 196
Egyéb foszfolipidek szintézise . . . 201
A szfingolipidek szerkezete és szintézise . . . 203
A foszfolipidek és a szfingolipidek transzportja a sejtmembránba . . . 210
A szteroidhormonok metabolizmusa . . . 210
Szteroidhormonok szintézise a mellékvesekéregben . . . 210
A glukokortikoidok és a mineralokortikoidok inaktiválása és szállítása a plazmában . . . 215
A nemi hormonok szintézise . . . 217
A D_3-vitamin szintézise . . . 219

2.4. Az aminosavak anyagcseréje. Porfirin-anyagcsere *(Machovich Raymund)* . . . 220
Az aminosav-anyagcsere általános ismertetése . . . 220
A táplálékból származó aminosavak. A fehérjék emésztése . . . 221
A fehérjeemésztő enzimek aktivitásának szabályozása . . . 223
Az aminosavak transzportja . . . 226
Az endogén fehérjék lebontása . . . 227
Az aminosavak sorsa . . . 228
Glutamát-dehidrogenáz . . . 228
Transzaminázok . . . 229
Egy szénatomos csoportok transzfer reakciói . . . 232
A nem esszenciális aminosavak bioszintézise . . . 232
Az aminosavak átalakulásai . . . 240
A nitrogén sorsa . . . 240
Az ammónia eliminációja . . . 241
Az ornitinciklus („ureaciklus") . . . 241
Az ureaszintézis szabályozása . . . 243
Az aminosavak szénláncának sorsa és az aminosavakból képződő nitrogéntartalmú vegyületek . . . 246
A glicin, alanin, szerin és cisztein átalakulása . . . 246
A triptofán katabolizmusa . . . 248
A glutamin, prolin, arginin, hisztidin és glutamát átalakulása . . . 250
A metionin, treonin, valin és az izoleucin katabolizmusa: a B_{12}-vitamin szerepe . . . 254
A fenilalanin és tirozin katabolizmusa . . . 254
Az aszparagin és aszpartát metabolizmusa . . . 260
A leucin és lizin katabolizmusa . . . 260
Porfirinek és epefestékek . . . 261
A porfirinek szintézise . . . 261
A porfirinek lebomlása, epefestékek képződése . . . 265
A porfirinek hibás anyagcsere-folyamataival értelmezhető kórképek . . . 265

2.5. A nukleotidok anyagcseréje *(Machovich Raymund)* . . . 269
A nukleotidok szerkezete . . . 269
A mononukleotidok forrása . . . 271
Purin nukleotidok bioszintézise . . . 271
Purin nukleotidok bioszintézisének szabályozása . . . 275
Pirimidin nukleotidok bioszintézise . . . 277

Dezoxi-ribonukleotidok keletkezése . . . 281
A dezoxi-timidilát (dTMP) és a timidin-trifoszfát (dTTP) szintézise . . . 282
Dezoxi-ribonukleotidok bioszintézisének szabályozása . . . 284
Nukleotidok bioszintézisét befolyásoló vegyületek. Terápiás felhasználás . . . 284
Purin és pirimidin nukleotidok lebontása . . . 285
Purinbázisok lebontása . . . 285
Pirimidinbázisok lebontása . . . 288
Nukleotidok egymásba történő átalakulásai . . . 290
B_{12}-vitamin; metil-malonát-acidosis és anaemia . . . 291
A nukleotidok, mint a legkülönbözőbb funkciókkal rendelkező molekulák forrásai . . . 296

2.6. Biotranszformáció – méregtelenítés *(Mandl József)* . . . 297
A biotranszformáció folyamata . . . 298
A biotranszformáció első, előkészítő szakasza, a citokróm P450 enzimek . . . 299
A biotranszformáció második, konjugációs szakasza . . . 302
A biotranszformáció harmadik, transzport szakasza . . . 304
A biotranszformáció szabályozása . . . 306
A biotranszformáció biológiai jelentősége. Méregtelenítés. Klinikai vonatkozások . . . 307
Az „oxigéntoxicitás” . . . 309
ROS képződése nem enzimatikus úton . . . 310
ROS képződése enzimatikus úton . . . 311
A ROS eliminálása . . . 312

2.7. Az anyagcsere összehangolt szabályozása *(Mandl József)* . . . 315
A sejt intermedier anyagcseréjének integrációja és a szabályozás szempontjai . . . 315
Elágazási pontok a sejtek intermedier anyagcseréjében . . . 315
A sejtek redox homeosztázisa . . . 318
Az anyagcsere szabályozása a szervezet szintjén – éhezés, táplálékbevitel . . . 320
A máj . . . 320
Izom . . . 323
Agy (központi idegrendszer) . . . 324
Zsírszövet . . . 324
Az anyagcsere integrációja patológiás állapotokban . . . 325

3. A genetikai információ tárolása és kifejeződése

3.1. DNS: replikáció és hibajavítás (repair) *(Faragó Anna)* . . . 331
A DNS szerkezete . . . 331
A DNS replikációja prokariótákban . . . 336
Az eukarióta kromoszóma szerveződése . . . 343
Az eukarióta sejtben történő replikáció néhány jellegzetessége . . . 344
A sejtciklus szabályozása és a tumorszuppresszor gének által kódolt fehérjék szerepe a sejtciklus szabályozásában . . . 345
Az extranukleáris DNS . . . 347
A DNS károsodásainak javítása: repair mechanizmusok . . . 348
Mutációk . . . 351
Rekombináció . . . 353

3.2. RNS: transzkripció és szabályozása *(Faragó Anna)* . . . 355
Az RNS típusai . . . 355
A transzkripciós egység és a transzkripció menete prokariótában . . . 358
A transzkripció szabályozása prokariótákban . . . 362
A polipeptidláncokat kódoló gének transzkripciója eukariótákban és az elsődleges transzkriptum érése . . . 366
Eukarióta transzkripciós faktorok . . . 371
A riboszóma-RNS és tRNS transzkripciója eukariótákban . . . 374

3.3. A vírusgenom replikációja és az onkogének *(Faragó Anna)* . . . 376
A vírusgenom . . . 376
A bakteriofágok replikációjának litikus és lizogén útja . . . 377
Állati vírusok replikációja . . . 379
Onkogéneket hordozó retrovírusok és a celluláris protoonkogének . . . 383

3.4. Fehérjeszintézis: a transzláció mechanizmusa és a polipeptidlánc további sorsa *(Faragó Anna)* . . . 386
A kódszótár . . . 386
A transzlációs apparátus komponensei . . . 387
A polipeptidlánc szintézisének mechanizmusa . . . 390
A fehérjék sejtorganellumokba irányítása és a transzláció utáni módosulások . . . 394
Fehérjeszintézis a mitokondriumokban . . . 399

3.5. A laboratóriumi géntechnika (rekombináns DNS-technológia) módszerei *(Faragó Anna)* . . . 400
Restrikciós endonukleázok és restrikciós térképek . . . 400
A DNS bázisszekvenciájának meghatározása . . . 403
Rekombináns DNS és klónozás, a génkönyvtár fogalma . . . 405
Nukleinsavak bázisszekvenciájának azonosítására szolgáló módszerek . . . 408
Kromoszómaséta . . . 409
A cDNS és a cDNS könyvtár . . . 410
Expressziós vektorok és fúziós fehérjék . . . 410
Eukarióta vektorok és expressziós rendszerek . . . 411
„Riporter gének" . . . 412
Irányított in vitro mutagenezis . . . 412
Polimeráz láncreakció (PCR) . . . 413
„Antiszenz" nukleinsavak . . . 413
Transzgénikus állatok . . . 415
A DNS-chip . . . 415

4. A membránok szerkezete. Membrántranszport-folyamatok

4.1. A membránok szerkezete *(Ádám Veronika)* . . . 421
A membránok kémiai összetétele . . . 421
Membránlipidek . . . 421
Membránfehérjék . . . 425

4.2. Membrántranszport-folyamatok *(Ádám Veronika)* 428
Facilitált diffúzió 429
A transzportfolyamatok energetikája 431
Aktív transzport 431
Na^+K^+-ATPáz – Na^+K^+-pumpa 432
A transzport ATPázok csoportosítása 435
Másodlagos aktív transzport. A glukóz Na^+-függő transzportja 436
ABC fehérjék. Multidrog-rezisztencia 437
Ioncsatornák 439
A sejtek Ca^{2+}-transzport-rendszerei. Ca^{2+}-homeosztázis 440
Az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció emelkedését kiváltó szignálok és mechanizmusok 441
Az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációt csökkentő mechanizmusok 444

5. Extracelluláris jelek receptorai és a jelátviteli mechanizmusok

5.1. Plazmamembrán-receptorok és jelátviteli mechanizmusaik *(Ádám Veronika és Faragó Anna)* 449
A receptor–ligand kölcsönhatás jellemzői 449
A plazmamembrán-receptorok felosztása és tulajdonságai 451
A receptor ioncsatornák 455
Heterotrimer GTP-kötő fehérjék (G-fehérjék) részvétele a receptorhatások közvetítésében 459
Protein-kinázok és foszfoprotein-foszfatázok 464
A cAMP-mediátorrendszer 471
Inozitol-foszfolipid jelátviteli rendszer. A Ca^{2+} mint intracelluláris mediátor és az inozitol-1,4,5-triszfoszfát szerepe 475
A guanilát-cikláz és a ciklikus GMP jelentősége a jelátvitelben. A nitrogén-monoxid biológiai szerepe 482
A nitrogén-monoxid keletkezése és jelentősége 484
Tirozin-kináz-receptorokkal működő jelpályák és a protoonkogének 486

5.2. Sejtmagreceptorok *(Fésüs László)* 495
A szteroid–tiroid–D-vitamin–retinoid „magreceptor" család 495
A hormonfüggő magreceptorcsalád komplexitása 499
Az „árva" magreceptorok és a reverz endokrinológia kibontakozó világa 500
A magreceptorok tágabb értelmezése 504
Orvosbiológiai jelentőség 504

5.3. A sejtproliferáció és a természetes sejthalál biokémiája *(Fésüs László)* 505
A sejtosztódási ciklus biokémiai sajátságai és szabályozása 505
Proliferációs szignál útvonalak, a mitogén kaszkád 506
A restrikciós pont szabályozása 509
Az M fázis kináz (cdc2, CDK1) 509
A ciklindependens kinázok szabályozásának főbb elvei 509
A proteolízis jelentősége a sejtciklusban 511
A sejtosztódási ciklus szabályozásának kapcsolata a tumoros sejtproliferációval 511
Protoonkogének és onkogének 511
Tumorszuppresszor gének 512

A természetes sejthalál molekuláris háttere . . . 514
A természetes sejthalál formái . . . 514
A sejthalál (apoptózis) elindítása . . . 515
Effektor mechanizmusok . . . 517
Az elhalt sejtek fagocitózisa . . . 518
Az apoptózis gátlása . . . 518
Orvosbiológiai jelentőség . . . 519

6. **Az egyes szervek és szervrendszerek működésének biokémiai alapjai**

6.1. A kémiai idegingerület átvitel (neurotranszmisszió) molekuláris alapjai *(Ádám Veronika)* . . . 525
Az akciós potenciál és a feszültségfüggő Na^+-csatorna . . . 525
A kémiai ingerületátvitel jellemzői . . . 527
Aminosav neurotranszmitterek . . . 532
Glutamát . . . 532
A glutamát neurotranszmisszió szerepe speciális fiziológiás és patológiás folyamatokban . . . 534
GABA és glicin . . . 535
Acetilkolin . . . 531
Az acetilkolin szintézise, raktározása és felszabadulása a kolinerg neuronokban . . . 537
Kolinerg receptorok . . . 538
Az acetilkolin inaktiválása . . . 539
A katecholamin neurotranszmitterek. Noradrenalin, dopamin és adrenalin . . . 540
A katecholaminok bioszintézise és raktározása . . . 540
A katecholaminok metabolizmusa és inaktiválása . . . 543
A noradrenalin és az adrenalin receptorai . . . 543
Dopaminreceptorok . . . 544
Szerotonin . . . 545
Szerotoninreceptorok . . . 545
Neuropeptidek . . . 546
Opioid peptidek . . . 547

6.2. Kontraktilis rendszer *(Dux László)* . . . 549
Az izomszövet kontraktilis rendszere . . . 549
A vastag filamentum rendszer, a miozin fehérje szerkezete . . . 549
A vékony filamentum rendszer . . . 551
A kontrakció mechanizmusa . . . 551
Az érett harántcsíkolt izom felépítés. Szupramolekuláris struktúra . . . 555
A vázizom hossz–feszülés összefüggése, a csúszó filamentum (sliding filament) modell . . . 555
A kalciumszignál keletkezése és eliminációja izomban . . . 556
A kalciumszignál és az izom szarkotubuláris rendszere . . . 556
A kalciumfelszabadulás mechanizmusa . . . 558
A kalciumvisszavétel mechanizmusa . . . 560
Az izomkontrakció energiaszükségletének biztosítása . . . 561
Az izomszövet alkalmazkodási reakciói . . . 561
Az izomfáradás, izomláz . . . 561
Az izom adaptációja, plaszticitása . . . 562

Az izomszövet citoszkeletális vázrendszere . . . 562
Egyes fontosabb izombetegségek biokémiai alapjai . . . 564
Az izomszövet fontosabb anyagcsere-betegségei . . . 564
A citoszkeleton, membrán–citoszkeleton rendszer betegségei izomban . . . 564
Ioncsatorna-betegségek az izomszövetben . . . 565

6.3. A kötőszövet és a hám struktúrfehérjéi *(Machovich Raymund)* . . . 566
Kollagének . . . 566
A kollagén bioszintézise és degradációja . . . 571
Elasztin . . . 573
Egyéb fehérjék . . . 575
Keratinok . . . 575
Fibronektin és laminin . . . 576
Proteoglikánok . . . 576

6.4. Lokális hormonok egyes szervek működését befolyásoló hatása. Az eikozanoidok *(Mandl József)* . . . 579
Prosztanoidok . . . 579
Az arachidonsav metabolizmusa. Arachidonsavellátás. Foszfolipáz A_2 . . . 579
A „ciklooxigenáz"-út. Prosztanoid- és tromboxánszintézis . . . 581
A prosztanoid és a tromboxán katabolizmusa . . . 583
Leukotriének . . . 583
A lipoxigenáz-út. Leukotriének szintézise és lebontása . . . 584
Eikozanoidok biológiai hatásai . . . 584
Eikozanoidreceptorok. Eikozanoidok és szignál transzdukciós rendszerek . . . 587

6.5. Hemosztázis *(Machovich Raymund)* . . . 589
A véralvadék képződése és feloldódása . . . 589
A véralvadás molekuláris és celluláris mechanizmusai . . . 590
A fibrinogén és a fibrin . . . 590
A trombin szabályozása . . . 592
A protrombin aktiválása . . . 592
Az aktivált X-faktor keletkezése . . . 593
A véralvadás beindítása és a véralvadási kaszkád . . . 594
A trombinképződés szabályozása; a protein C . . . 589
A véralvadás inhibitorrendszere . . . 596
A szöveti faktor reakcióút inhibitora (tissue-factor pathway inhibitor; TFPI) . . . 598
A vérlemezkék (trombociták) . . . 599
Fibrinolízis . . . 601
A fibrin feloldása . . . 601
A plazmin keletkezése . . . 602
A plazminogén konformáció változásai . . . 602
A plazminogénaktivátorok . . . 603
A plazminogénaktivátorok inhibitorrendszere . . . 604
A plazmin inhibitorrendszere . . . 604
A fibrinolízis szabályozása . . . 604
A máj szerepe a hemosztázisban . . . 606
Az endothelium szerepe a hemosztázisban . . . 607

6.6. Mitokondriális betegségek *(Sümegi Balázs)* 610
A mitokondriális genom károsodása 610
Mitokondriális genom mutációi és az ehhez kapcsolódó betegségek 613
A mitokondrium oxidatív károsodása, öregedés 614
Terápiás lehetőségek 615

6.7. A klinikai laboratóriumi diagnosztika biokémiai háttere *(Dux László)* 616
A klinikai laboratóriumi diagnosztika célja, feladata 616
A laboratóriumi diagnosztika, mint az élő szervezetek áramlási egyensúlyának nyomon követése 616
Normál-, referenciatartomány fogalma meghatározása 617
Kóros laboratóriumi eredmények típusai 617
Laboratóriumi diagnosztikai eredmények hibái, értékelése 618
Az eredmények valódisága, pontossága, véletlen és szisztémás hibák 618
Laboratóriumi diagnosztikai mérések kalibrálása, standardok típusai 618
Külső minőségellenőrzés a laboratóriumi diagnosztikában 619
A laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok fő fázisai 620
A preanalitikai fázis 620
Az analitikai fázis 621
A posztanalitikai fázis 622
Szűrővizsgálatok 623

Tárgymutató 625

Előszó az első kiadáshoz

1996.

Biokémia könyvet írni egyszerre hálás és nagyon nehéz feladat. Hálás mert az utóbbi évtizedek talán leggyorsabban és legnagyobb mértékben fejlődő tudományágáról van szó, és nehéz, mert a terjedelmi korlátok egy rendkívül nagy anyagból csak szigorú válogatást engednek meg. Könyvünket elsősorban orvostanhallgatóknak szánjuk, ezért az anyag összeállításánál a meghatározó szempont az volt, hogy az orvosi tanulmányokhoz szervesen illeszkedő, az egészséges és kóros működések megértését segítő ismeretanyagot adjunk közre. A harmadik évezredben pályájukat kezdő orvosoknak azzal a nem kis követelménnyel kell szembenézni, hogy megértsék az embert, mint komplex biológiai-társadalmi lényt, de ugyanakkor értelmezzék a szervezet működését a molekulák szintjén is, – azon a szinten, ahol a terápiás tevékenység során a legtöbbször beavatkoznak. Jelen könyvünk az ehhez szükséges molekuláris szemlélet kialakítását kívánja szolgálni. Ennek a célnak a szem előtt tartásával dolgoztak a szerzők, akik a Semmelweis Orvostudományi Egyetem oktatói, és évtizedek óta nagyjából azonos szemlélettel, az orvosi-funkcionális szempontok mindenkori szem előtt tartásával oktatják a biokémiát.

A tankönyv tartalmazza a legalapvetőbb biokémiai ismereteket, a szervezetet felépítő molekulák egyszerű leírásától a folyamatok szabályozásáig. Külön fejezetet szenteltünk a gyakorlati orvostudományban is egyre nagyobb jelentőséggel bíró molekuláris biológiai ismeretek összefoglalásának, amely magyar nyelvű biokémia tankönyvben most kap először fontosságának megfelelő helyet. Szintén a megszokottól nagyobb hangsúllyal, külön fejezetben kaptak helyet a receptorok és a szignál transzdukciós mechanizmusok, amelyek az emberi szervezet szabályozó mechanizmusainak megértése szempontjából kiemelkedő jelentőségűek. A szerzőknek, akik megpróbálták a legújabb – de kellően megerősített és ezért tankönyvbe foglalható – ismereteket összegyűjteni, tudomásul kellett venni, hogy mivel e területeken az ismeretanyag napról-napra gazdagodik, a könyv megjelenésének időpontjában már kezdhetnék a fejezetek kiegészítését.

Az elnevezésekben, a kiadói szándék ellenére, sok helyütt eltértünk az akadémiai kémiai helyesírási szabályzattól és inkább a szakmai nyelvben elfogadott angolszász írásmódot használjuk.

A könyv kéziratát kiváló lektorok olvasták, és látták el megjegyzésekkel. Az észrevételeik és a javaslataik nyomán elkészített módosítások javították a könyv színvonalát. A szerkesztő ezúton is köszöni mindhárom lektor (Alkonyi István egyetemi tanár, Pécsi Orvostudományi Egyetem; Dux László egyetemi tanár, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem; Friedrich Péter akadémikus, MTA Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai Intézete) lelkiismeretes és hozzáértő munkáját. A szerzők az egyes fejezetek végén köszönettel említik meg azoknak a nevét, akik a fejezet megírását javaslataikkal, tanácsaikkal segítették. Külön is szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Szikla Károlynak, aki a szerkesztési munkálatokban nyújtott rendkívül nagy segítséget. Köszönöm a Semmelweis Kiadó szerkesztői kollektívájának, hogy szívükön viselték e könyv sorsát és mindent megtettek azért, hogy a biokémia tankönyv igényes kivitelben kerüljön olvasói kezébe.

Az orvostanhallgatókon kívül a könyvet jó szívvel ajánlom azoknak az orvos kollégáknak is, akik szakmájuk egy-egy problémájának megértéséhez ismerni kívánják a molekuláris történéseket vagy egyszerűen képet kívánnak kapni arról, hogy meddig jutott a biokémia az életfolyamatok megértésében azóta, hogy elhagyták az egyetemet.

Ehelyütt is kérem a könyv minden kedves olvasóját, hogy észrevételét, a jót és rosszat egyaránt, juttassa el hozzám.

Dr. Ádám Veronika

Előszó a második kiadáshoz

2000.

Négy évvel az első kiadás után jelenik meg az Orvosi Biokémia tankönyv második kiadása. Ez a könyv nem teljesen azonos az előzővel. Az a rendkívül gyors fejlődés, ami a biokémiában és különösen a molekuláris biológiában történik, arra késztetett bennünket, hogy könyvünket kiegészítsük a legfontosabbnak tartott új ismeretekkel, azokkal, amelyekre a most orvostudományt tanuló hallgatóknak néhány év múlva már a gyakorlatban is szükségük lehet. Így e könyvben helyet kapott a sejthalál, a sejtproliferáció vagy a mitokondriális betegségek részletesebb leírása is.

A könyv második kiadása a Medicina Könyvkiadó gondozásában jelenik meg. Hálásan köszönöm a Kiadó szerkesztőinek az igényes, szép kivitelt. Ismételten köszönöm Dr. Szikla Károlynak a szerkesztőt segítő gondos munkát.

A könyv szerzői az ország négy egyetemének Orvostudományi Karán a biokémia meghatározó oktatói, akik eltérő tudományos területen dolgoznak, de e könyv írásakor egységesen azt a szempontot tartották szem előtt, hogy az orvostanhallgatók igényeinek, és a leendő orvosoktól elvárható tudásszintnek leginkább megfelelő ismeretanyagot adjanak át.

A szerzők szeretik a biokémiát és szerették írni ezt a könyvet. Remélem sikerül megláttatniuk nemcsak a bonyolult összefüggéseket, hanem azt a rendet és szépségét is, ami molekuláris szinten is jellemzi az emberi szervezet működését.

Változatlanul köszönettel várom a könyvvel kapcsolatos észrevételeket.

Dr. Ádám Veronika

A fehérjék és enzimek szerkezete, funkciója

1. FEJEZET

1.1. A fehérjék szerkezete *(Machovich Raymund)*

Aminosavak
- Az aminosavak szerkezeti tulajdonságai
- Az aminosavak oldallánc szerinti csoportosítása

A fehérjékről általában

A proteinszerkezet különböző szintjei: a háromdimenziós struktúra kialakulása
- Fehérjék elsődleges szerkezete
- Fehérjék másodlagos szerkezete
- Fehérjék harmadlagos szerkezete
- Fehérjék negyedleges szerkezete
- Multienzim komplexek
- Szupramolekuláris struktúrák

Fehérjék denaturációja

A natív állapot kialakulása: a fehérje feltekeredése

A fehérjeszerkezet megismerését szolgáló metodikák
- Gélelektroforézis
- Izoelektromos fókuszálás
- Dialízis és gélszűrés
- Ioncserélő és affinitás kromatográfia

1.2. Enzimek *(Faragó Anna)*

Az enzimek katalitikus funkciója
- Az enzim–szubsztrát komplex kialakulása
- A katalízisben szerepet játszó tényezők

Az enzimek osztályai

Koenzimek és prosztetikus csoportok

A Michaelis–Menten-modell

Az enzimaktivitás gátlása

Az enzimaktivitás szabályozásának módjai
- Allosztérikus enzimek
- Az enzimműködés szabályozása foszforiláció–defoszforiláció segítségével
- A proenzimek átalakulása aktív enzimmé limitált proteolízis segítségével

Az enzimek néhány gyakorlati alkalmazása az orvosi diagnosztikában

1.3. A hemoglobin és a mioglobin *(Mandl József)*

A hemoglobin és a mioglobin szerkezete, oxigénkötése

Az oxigénleadás szabályozása

A hemoglobin aminosav-összetételének változásai. Haemoglobinopathiák

1.1. A fehérjék szerkezete

Machovich Raymund

Aminosavak

Az emberi szervezet fehérjéi gyakorlatilag 20 különböző L,α–aminosavból képződnek, de nem minden fehérjemolekulában fordul elő az összes aminosav. Bizonyos aminosavak, amelyek már jelen vannak a fehérjében, tovább módosulhatnak, ami újabb aminosav kialakulását eredményezi (pl. hidroxi-lizin, hidroxi-prolin, gamma-karboxiglutaminsav). A 20-féle aminosav által biztosított variációs lehetőségek és a változatos molekulatömegek bőven elégségesek a természetben található 10^{12} fehérjeféleség megvalósulásához.

Az aminosavak szerkezeti tulajdonságai

Valamennyi, fehérjét alkotó aminosav karboxil- és aminocsoportot tartalmaz az α C-atomon (alfa-aminosav) *(1-1. ábra)*. Az egyes aminosavak különböző oldalláncokkal rendelkeznek, ennek megfelelően eltérő méretűek, töltésűek és fizikokémiai tulajdonságaik is különbözőek. A glicin kivételével az aminosavak aszimmetrikus C-atomot tartalmaznak, így optikailag aktív molekulák. A fehérjéket L-aminosavak alkotják.

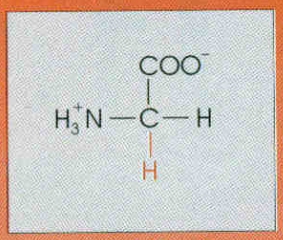
Vizes oldatban az aminosavak ionok, protondonorok vagy protonakceptorok lehetnek az oldat pH-jától függően. Fiziológiai körülmények között, pH 7,4 körül a monoaminomono-karbonsavak szinte teljesen ionizált állapotban vannak (a karboxilcsoport COO^-, az aminocsoport NH_3^+), így egy pozitív és egy negatív töltésük van: ikerionok.

Az aminosavak oldallánc szerinti csoportosítása

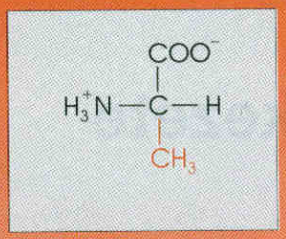
A fehérjék szerkezetének és funkcionális sajátosságainak megértéséhez szükséges az aminosavak kémiai tulajdonságainak ismerete. Az aminosavak oldallánc szerinti csoportosításának alapvető szempontja az oldallánc polaritása, vízzel való kölcsönhatása. A 20 aminosav között apoláros (hidrofób), valamint poláros (hidrofil) aminosavakat egyaránt találunk. Oldalláncok szerinti felosztásban öt csoportot különböztetnek meg.

1. **Apoláros, nem aromás oldalláncal rendelkező aminosavak.** A hidrofób oldallánc az alanin, valin, leucin, izoleucin esetében elősegíti a fehérjén belüli hidrofób kölcsönhatások kialakulását. Ide sorolható még a legkisebb aminosav, a glicin (az apoláros oldallánc egyetlen H), ez a polipeptidlánc legnagyobb flexibilitását teszi lehetővé. Ennek ellentéteként a szekunder gyűrűbe zárt aminocsoport következtében kialakuló merev konformáció miatt a legkisebb szerkezeti flexibilitást megengedő aminosav a prolin.
2. **Aromás aminosavak.** Az aromás aminosavak közé tartozó fenilalanin, tirozin és triptofán szintén hidrofób kölcsönhatások kialakításában vesznek részt, különösen, ha más aromás aminosavakkal kapcsolódnak. A tirozin hidroxilcsoportja hidrogénhídkötéseket alakíthat ki.

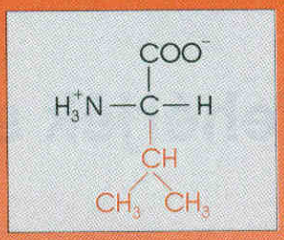
1. Apoláros, nem aromás oldalánccal rendelkező aminosavak



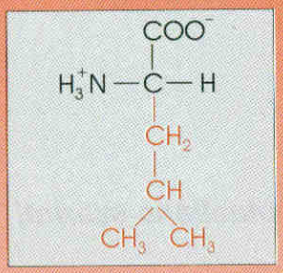
glicin, Gly, G
(5,97)



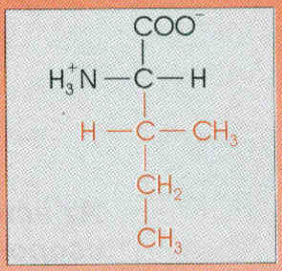
alanin, Ala, A
(6,01)



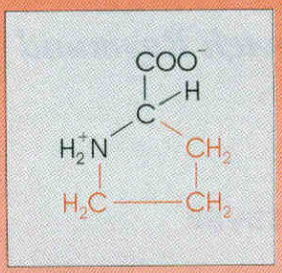
valin, Val, V
(5,97)



leucin, Leu, L
(5,98)

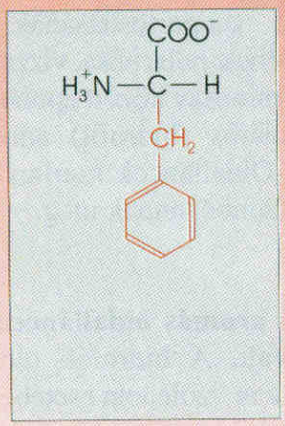


izoleucin, Ile, I
(6,02)

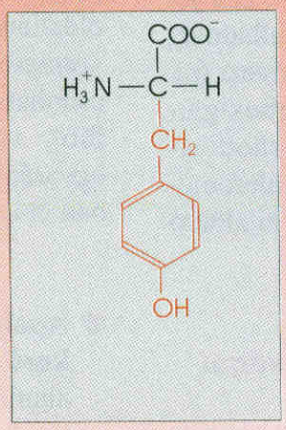


prolin, Pro, P
(6,48)

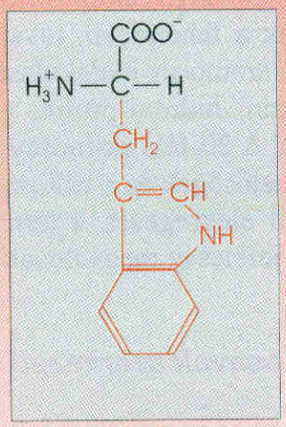
2. Aromás aminosavak



fenilalanin, Phe, F
(5,48)

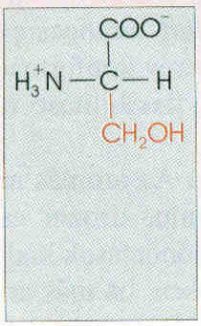


tirozin, Tyr, Y
(5,66)

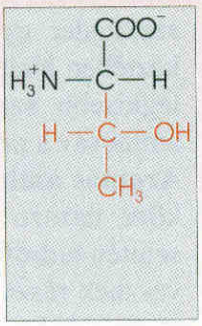


triptofán, Trp, W
(5,89)

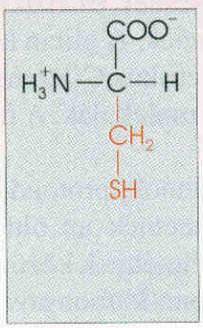
3. Poláros, töltéssel nem rendelkező oldalláncot tartalmazó aminosavak



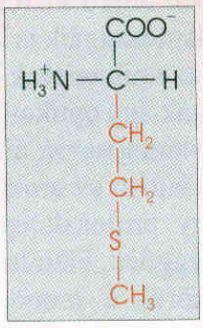
szerin, Ser, S
(5,68)



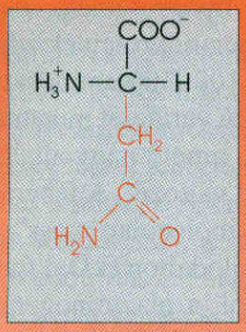
treonin, Thr, T
(5,87)



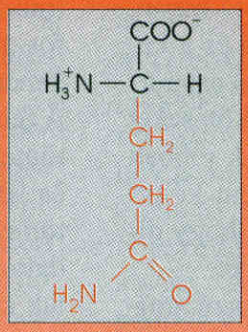
cisztein, Cys, C
(5,07)



metionin, Met, M
(5,74)

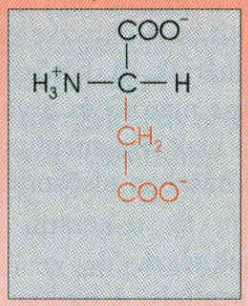


aszparagin, Asn, N
(5,41)

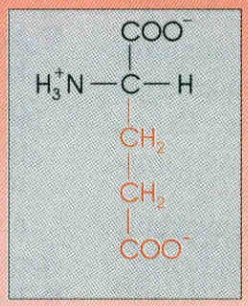


glutamin, Gln, Q
(5,65)

4. Savas karakterű oldalláncot tartalmazó aminosavak

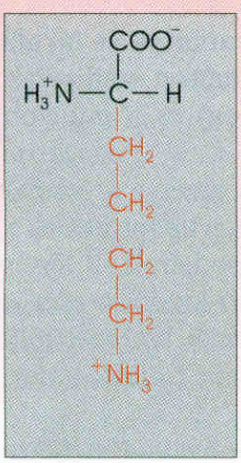


aszpartát, Asp, D
(2,77)

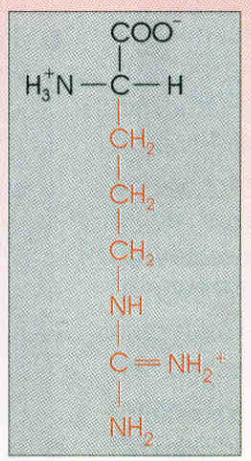


glutamát, Glu, E
(3,22)

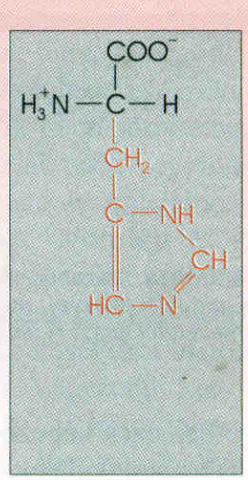
5. Bázikus karakterű oldalláncot tartalmazó aminosavak



lizin, Lys, K
(9,74)



arginin, Arg, R
(10,76)



hisztidin, His, H
(7,59)

1-1. ábra. A fehérjéket alkotó aminosavak képletei. *Feketével a valamennyi aminosavban közös részeket, pirossal az oldalláncokat jelöljük, zárójelben az izoelektromos pontot adjuk meg*

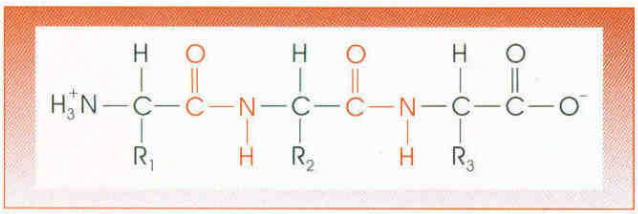
❸ **Poláros, töltéssel nem rendelkező oldalláncot tartalmazó aminosavak.** Az ide tartozó szerin, treonin, cisztein, aszparagin, glutamin és a kevésbé poláros metionin olyan funkciós csoportokat tartalmaznak, amelyek hidrogénkötéseket képeznek vízzel, így ezek a molekulák jobban oldódnak vízben, hidrofilek. A cisztein könnyen oxidálódik cisztinné oly módon, hogy diszulfidhidat képez egy másik ciszteinnel.

❹ **Savas karakterű oldalláncot tartalmazó aminosavak.** Két aminodikarbonsav, az aszparaginsav (aszpartát) és a glutaminsav (glutamát) tartozik ebbe a csoportba.

❺ **Bázisos karakterű oldalláncot tartalmazó aminosavak.** Ezt a csoportot a lizin, az arginin és a hisztidin képezi.

A fehérjékről általában

Fehérjék (proteinek) alatt aminosavakból felépülö polipeptidláncokat értünk, amelyekben az egyik aminosav α-karboxil-csoportja, egy másik aminosav α-amino-csoportjához peptidkötéssel (amidkötés) kapcsolódik. A polipeptidlánc szabályosan ismétlődő részből („fő lánc") és változó részből („oldallánc") épül fel:



A polipeptidlánc váza. *A szabályosan ismétlődő részeket a peptidkötések (pirossal jelezve), míg a változó részeket az aminosav szerkezetétől függő R oldalláncok alkotják*

A természetben ezek képezik a legváltozatosabb biológiai makromolekulákat. A sejtek szárazanyag-tartalmának kb. 50%-át alkotják. Strukturális és funkcionális szerepet töltenek be. Becslések szerint az élővilágban 10^{10}–10^{12} különböző fehérje fordul elő, ebből kb. 10^5-féle található meg az emberi szervezetben. Megkülönböztethetünk egyszerű és összetett fehérjéket; az előbbiek csak aminosavakból épülnek fel (kb. 50% C, 23% O, 16% N, 7% H és 0–4% S), az utóbbiak a fehérjelánc mellett más komponenseket is tartalmaznak (nukleoproteinek, lipoproteinek, glikoproteinek, foszfoproteinek, metalloproteinek stb.). A legtöbb ismert fehérje kb. 100–300 aminosavból épül fel. A fehérjék nagyfokú variációt mutatnak molekulatömegük szerint is, amely nagy általánosságban 5 és 1000 kDa között változik. A fehérjék molekulatömegét „relative molecular mass" (M_r), illetve dalton (Da) vagy kilodalton (kDa) formában szokták kifejezni; így pl. a plazminogén (791 aminosavból épül fel) molekulatömege: M_r 90 000 vagy 90 000 Da, vagy 90 kDa.

A fehérjék különböző biológiai funkciókat látnak el:

❶ **Szerkezetkialakítás.** A citoszkeleton fontos alkotóelemei a fehérjék. A kötőszöveti elemek (pl. extracelluláris mátrix) és a vázszerkezetek (pl. csont, porc, inak, ligamentumok, bőr, köröm, haj) kialakításában elsősorban a kollagének, az elasztin, az α-keratin és a mukoproteinek vesznek részt.

❷ **Enzimatikus katalízis.** A biológiai rendszerek csaknem összes kémiai reakcióját makromolekulák katalizálják, amelyeket enzimeknek nevezünk. Az enzimek legnagyobb részét proteinek alkotják, bár bizonyos RNS- és poliszacharid-féleségek is rendelkezhetnek katalitikus aktivitással.

❸ **Transzportfolyamatok és tárolás.** A fehérjék különféle molekulákat szállítanak. Így pl. a hemoglobin (vérben) és a mioglobin (izomban) szállítja az O_2-t, a transzferrin a vasat, a cöruloplazmin a rezet, a szérumalbumin a zsírsavak egy részét, a lipoproteinek a lipideket stb. A sejtmembránon keresztül történő transzportfolyamatokban is kulcsszerepet játszanak a fehérjék. Raktározási szerepet tölt be a ferritin (vas), az ovalbumin (tojásfehérje) vagy a kazein (tejfehérje).

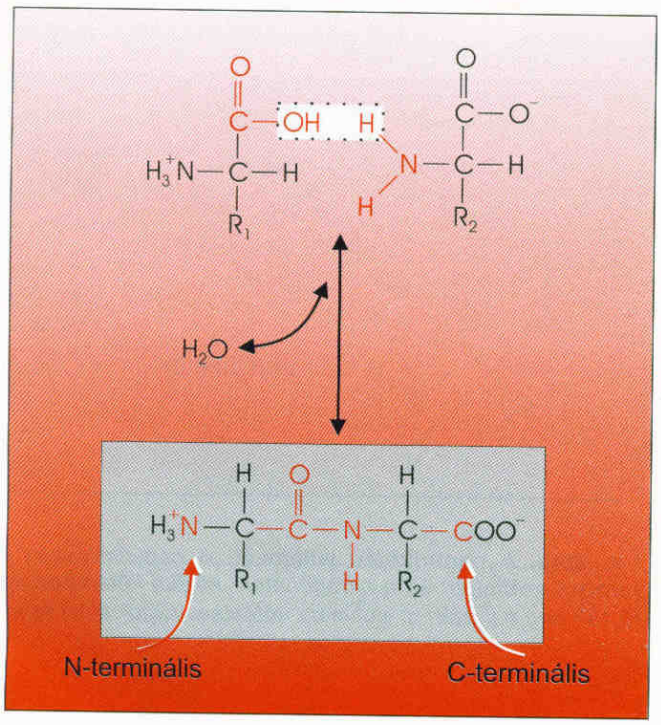
❹ **Hormonok és növekedési faktorok.** Eukariótákban különböző növekedési faktorok és hormonok szabályozzák a növekedést, a fejlődést és a differenciálódást, amelyek egy része fehérje vagy peptid; pl. inzulin, ACTH, szomatosztatin.

❺ Neurotranszmitter és receptor funkciók. A fehérjék fontos szerepet játszanak bizonyos receptorok kialakításában, amelyeken keresztül

különböző ingerek érvényesülhetnek; pl. rodopszin: fotonok érzékelése, vagy hormonok és neurotranszmitterek receptorai. Néhány neurotranszmittert is fehérjék alkotnak.

6. **Kontraktilitás.** Az izomösszehúzódás komponenseinek nagy részét fehérjék alkotják; ilyenek pl. az aktin és a miozin. A sejtmozgásokért (pl. spermiumok vándorlása), a sejtek osztódásáért (kromoszómamotilitás), a sejtszekréciós folyamatokért (pl. a máj vagy a vérlemezke szekréciós rendszerei) is fehérjék a felelősek.
7. **Védekezés.** A szervezet védelmét vírusokkal és baktériumokkal szemben nagymértékben specializálódott fehérjék képezik; mint pl. az immun ellenanyagok (antitestek), a komplementek. A vérveszteség megakadályozását szolgáló rendszerek szintén fehérjék.
8. **A fehérjék mérgekként** is szerepelhetnek; pl. diphtheriatoxin, clostridium botulinum toxin, kígyómérgek.

A fehérjékben az aminosavak **peptidkötésekkel** kapcsolódnak egymáshoz *(1-2. ábra)*; biológiai szintézisük során az első beépülő aminosav α-aminocsoportja szabad marad (N-terminális). Ennek megfelelően az aminosavsorrend le- írását ezzel a résszel kezdjük, így a végső aminosav szabad α-karboxil-csoportot tartalmaz (C-terminális). A peptidkötés savamidkötés, a létrejött peptid szubsztituált amidnak tekinthető, illetve felfogható úgy is, mint acilezett amin. A peptidek elnevezése a reaktív acilcsoport jelzésével történik: pl. ha az N-terminális aminosav glicin és a C-terminális alanin, akkor a dipeptid neve: glicil-alanin. A peptidkötés kialakulása energiaigényes. A fehérjékben a peptidkötés víz jelenlétében spontán hidrolizál, de a hidrolízis sebessége rendkívül kicsi. Katalizátorok (pl. proteázok) jelenlétében azonban extrém módon felgyorsulhat.



1-2. ábra. Két aminosav összekapcsolódása; a peptidkötés kialakulása

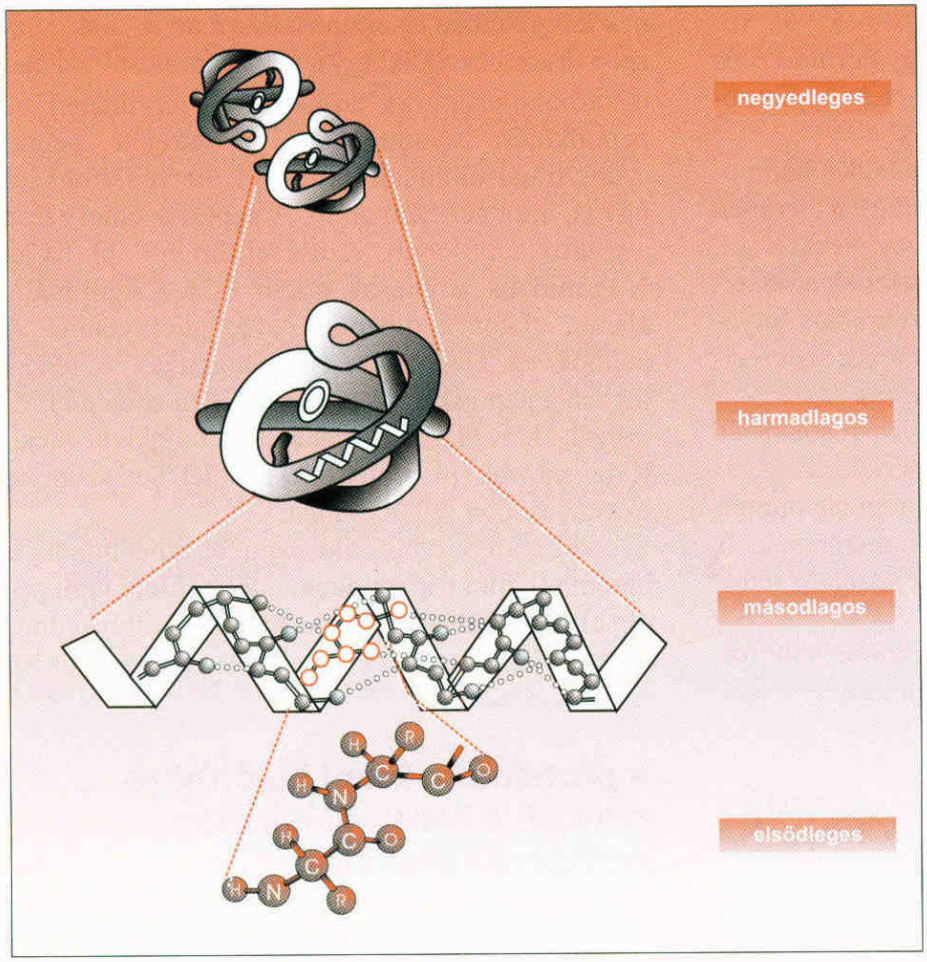
A két aminosavból álló peptidet dipeptidnek, a háromból állót tripeptidnek, a többből felépülőt pedig oligopeptidnek nevezik. Az 50-nél több aminosavból álló peptidet általában polipeptidként tartják számon.

A proteinszerkezet különböző szintjei: a háromdimenziós struktúra kialakulása

A fehérje szerkezetét az aminosavak sorrendje alapvetően meghatározza. Az aminosavsorrendet primer vagy elsődleges szerkezetnek nevezik. A körülményektől függően további, molekulán belüli kölcsönhatások jönnek létre. A peptidkötések között hidrogénhidak alakulnak ki (szekunder vagy másodlagos szerkezet), majd sorrendben egymástól távol álló aminosavak térben egymáshoz közel kerülve stabilizálódhatnak oldalláncaik közötti újabb hidrogénkötések, hidrofób és ionpár-kölcsönhatások, illetve S-S hidak kialakulása révén (tercier vagy harmadlagos szerkezet). Mindez nagyfokú variációs lehetőségeket biztosít a fehérjék térszerkezetének. Végezetül két vagy több polipeptid-„gombolyag" is kölcsönhatásba kerülhet egymással, mint alegységek kapcsolódnak össze (kvaterner vagy negyedleges szerkezet). A különböző szintű szerkezetek vázlatos képe látható az *1-3. ábrán.*

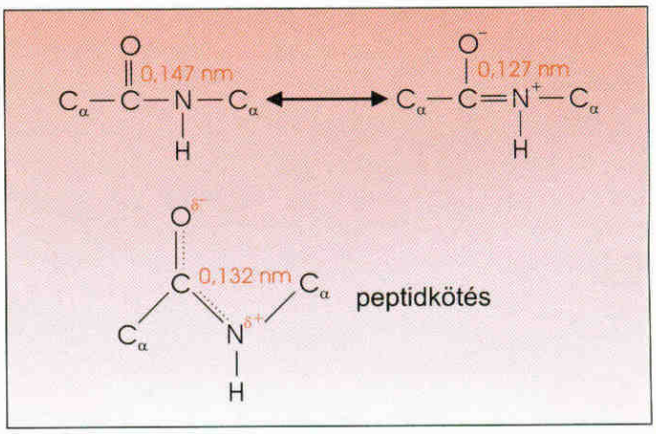
A fehérjék elsődleges szerkezete

A fehérjék elsődleges szerkezetét az aminosavak sorrendje és az azok között kialakított peptidkötés jelenti.

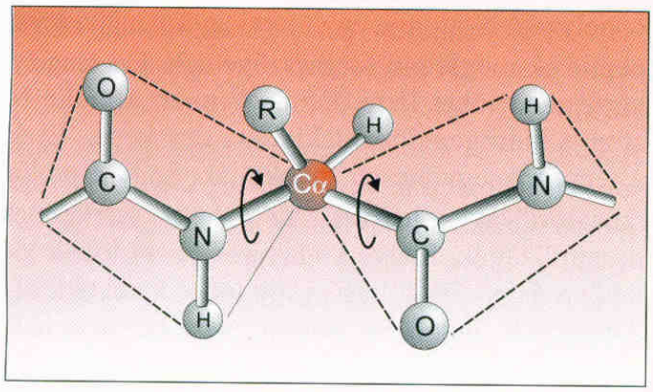


1-3. ábra. A fehérjeszerkezet szintjei

A peptidkötésben a szén- és nitrogénatomok közötti távolság nem jelez sem tisztán σ-, sem tisztán σπ-kötést; a két lehetséges távolság közötti átmenet, π-delokalizáció miatt jön létre *(1-4. ábra)*. A peptidkötésben részt vevő hat atom egy síkban helyezkedik el, és az oxigén a hidrogénhez képest, illetve a két α-szénatom egymáshoz képest mindig *transz*-helyzetet foglal el. Az atomok egymással közel 120°-os szöget zárnak be. A π-delokalizáció hozza létre azt a merev szerkezetet, amelyben a C-N kötés körüli rotáció nem lehetséges. Ezzel szemben az α-szénatom (Cα) és a karbonil szénatom (>C—O), illetve a Cα és a nitrogén között σ-kötések vannak, így ezek mentén rotáció következhet be *(1-5. ábra)*. A rotáció mértékétől függően a peptidekben stabil és instabil konformációk jöhetnek létre, illetve további szabályosan ismétlődő szerkezetek. A rotáció mértékét befolyásolja az oldalláncok térszerkezete, vagyis, hogy a peptidkötést kialakító aminosavak milyen tulajdonságokkal rendelkeznek (lásd később).



1-4. ábra. A peptidkötés jellemzői. *A peptidkötésben a karbonil szénatom és a nitrogénatom közötti kötéstávolság (0,132 nm) a tisztán σ, illetve σπ kötéstávolságok közé esik*

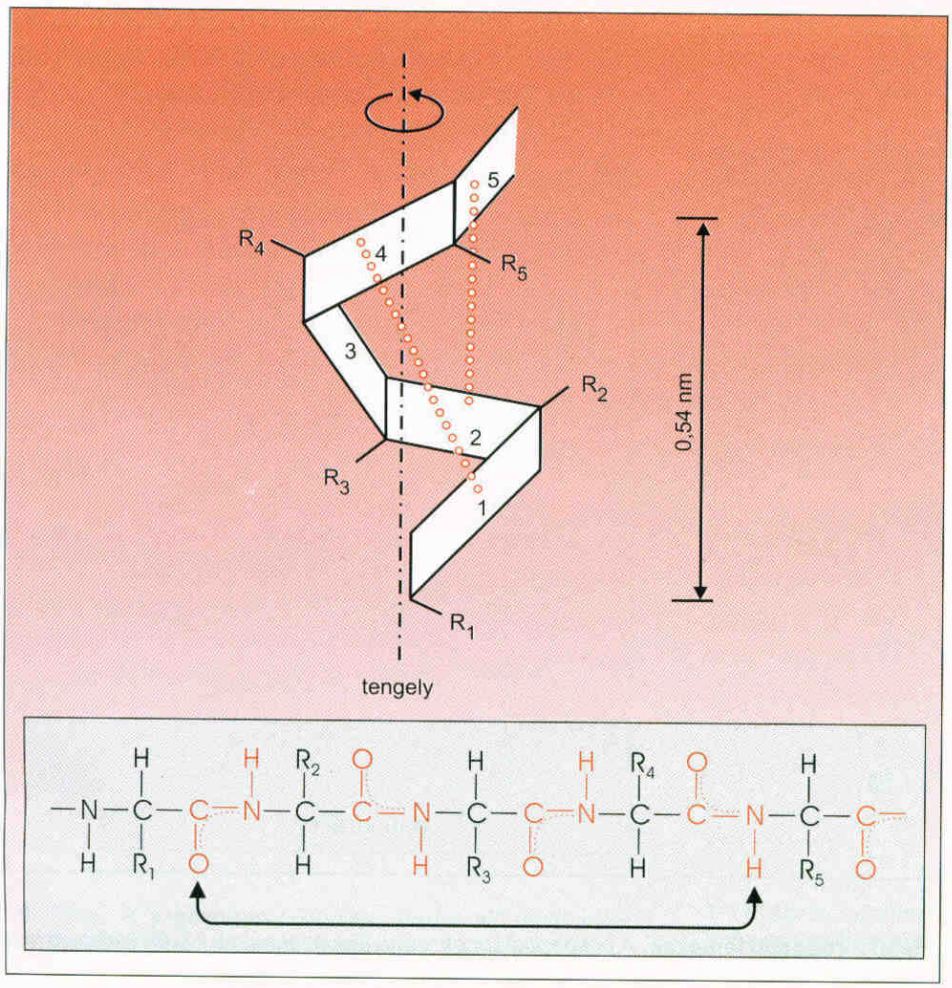


1-5. ábra. Az α-szénatom körüli rotáció lehetősége. *A valóságban az atomok egymás között nem 90°-os, hanem attól eltérő szögeket zárnak be (Cα-nál ~109°, tetraéder)*

A fehérjék másodlagos szerkezete

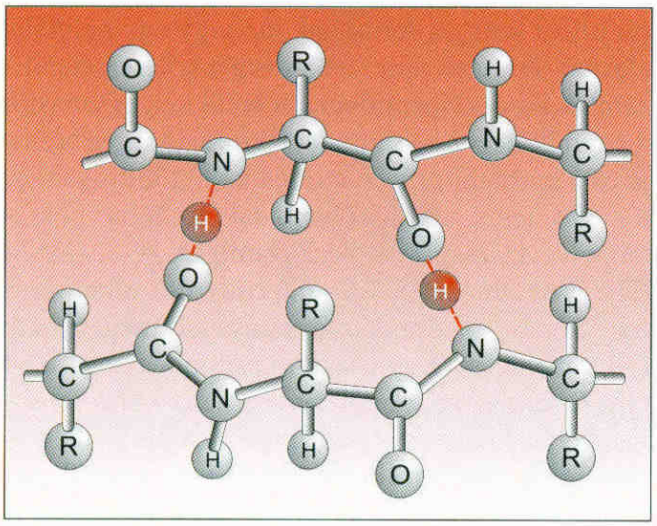
Röntgendiffrakciós vizsgálatok azt mutatják, hogy a fehérjékben periodikusan rendezett szerkezetek találhatók. Ennek két fajtája ismert: az α-hélix és a β-redőzött lemez.

Az **α-hélix** úgy alakul ki, hogy a peptidsíkok a N-Cα- és Cα-C=O σ-kötések, mint tengelyek körül olyan szöggel fordulnak el, hogy egy helikális alakzat jön létre, amelyet hidrogénkötések stabilizálnak. Egy polipeptidláncon belül két, egymástól 4 peptidkötés-távolságra lévő amid nitrogén atomja és a karbonil oxigén atomja között hidrogénkötés jön létre. A hidrogénhidak a hélix hossztengelyével majdnem párhuzamosak *(1-6. ábra)*. Egy csavarmenetet 3,6 aminosavrész alkot és a csavarodás az óramutató járásával megegyezik (jobb menetes). Egy csavarmenet magassága 0,54 nm. Az aminosav-oldalláncok a hélix külső felszínén helyezkednek el („kilógnak"). A molekulaméretek és a tekeredés következtében a peptidkötés körüli atomok olyan közel kerülnek egymáshoz, hogy a hélix belső része nem „üreges", hanem „kitöltött". Minthogy a hélixet nagyszámú hidrogénkötés tartja össze, ezért a polipeptidlánc másod-



1-6. ábra. Az **α-hélix konformációja.** *A képzeletbeli tengely körül csavarodó polipeptidlánc egy csavarmenetét mutatja az ábra. A peptidkötések planáris síkját téglalapok jelzik, a hozzájuk tartozó és a hélix tengelyétől kifelé elhelyezkedő oldalláncokat az R betűk illusztrálják, a hélixet stabilizáló peptidkötések közötti hidrogénhidakat pedig piros pettyek mutatják. A mellékletben az α-hélix stabilitását biztosító egyik hidrogénhíd sematikus szerkezetét jelezzük. További hidrogénhidak jöhetnek létre a második és ötödik, a harmadik és hatodik stb. peptidkötések között is, amelyek csak térbelileg helikálisan feltekeredett formában alakulhatnak ki*

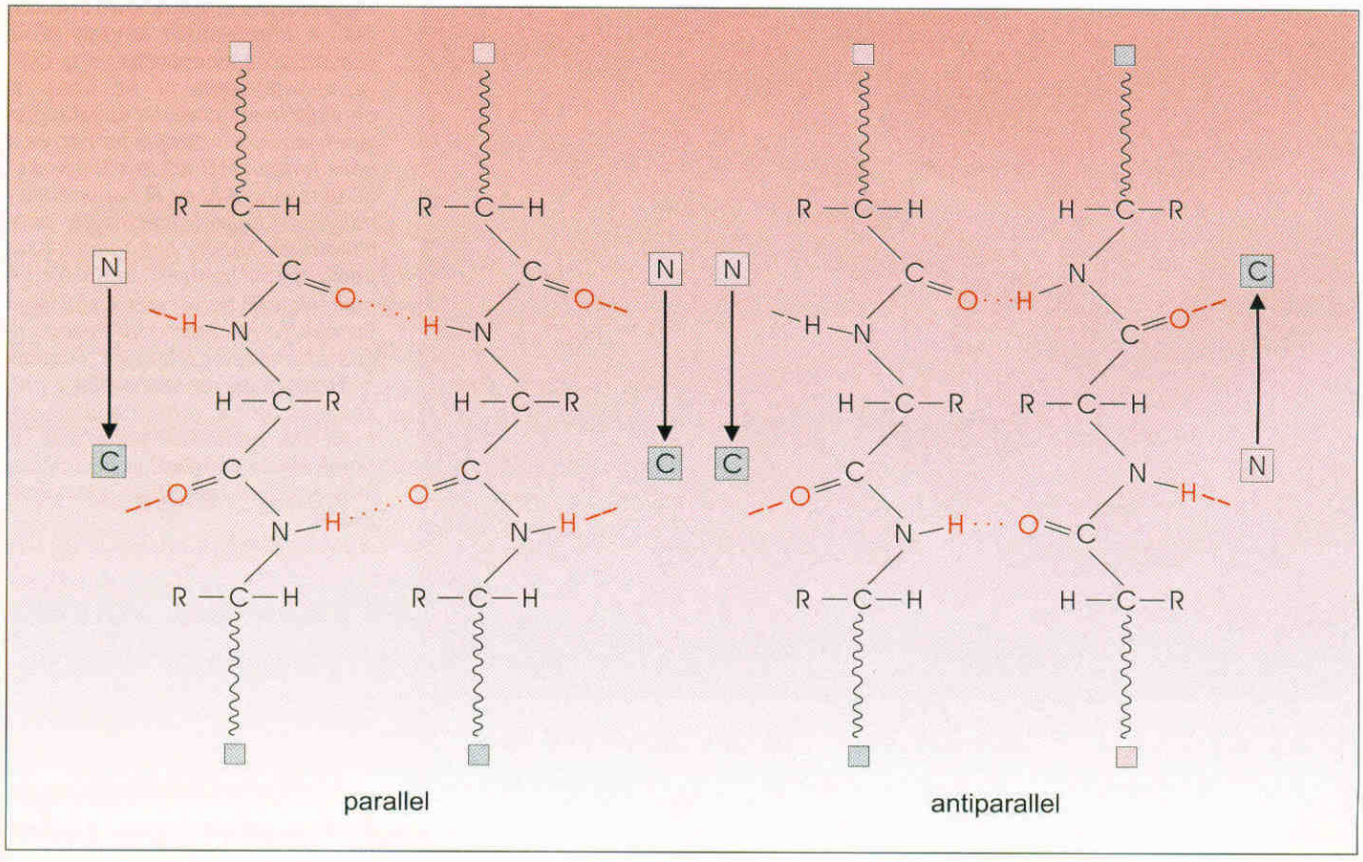
lagos szerkezete nagyon stabil. A hélix azonban megszakad olyan helyeken, ahol prolin foglal helyet az aminosavsorrendben, ugyanis a prolin



1-7. ábra. A β-redőzött lemez stabilitását biztosító hidrogénhidak helyzete

α-helyzetű N-atomja egy merev gyűrű tagja, így a peptidsík megfelelő forgásszöge a N–Cα tengely körül nem jöhet létre. Fenti ok miatt a prolin N atomja hidrogénhíd kialakítására sem képes. Ezek a tényezők együttesen indokolják, hogy a prolin „megtöri" az α-hélixet. Az α-hélix szerkezetet destabilizálják, illetve kialakulását nem teszik lehetővé nagy térkitöltésű vagy ionos karakterű oldallánccal rendelkező aminosavak, ha azok halmozottan követik egymást.

Hidrogénhidak más módon is kialakulhatnak a peptidkötések között. Az egymást követő peptidsíkok az előbbiekben említett tengelyek körül egymáshoz képest úgy is elfordulhatnak, hogy egy kinyújtott, ún. „cikcakk" szerkezet alakul ki. A peptidkötések egymáshoz úgy kerülnek közel, hogy két polipeptidlánc egymás mellett helyezkedik el, vagy egy polipeptidlánc úgy tekeredik fel, hogy annak különböző szakaszai kerülnek egymás közelségébe. A hidrogénhidak az egymás mellett párhuzamosan elhelyezkedő szakaszok peptidjei



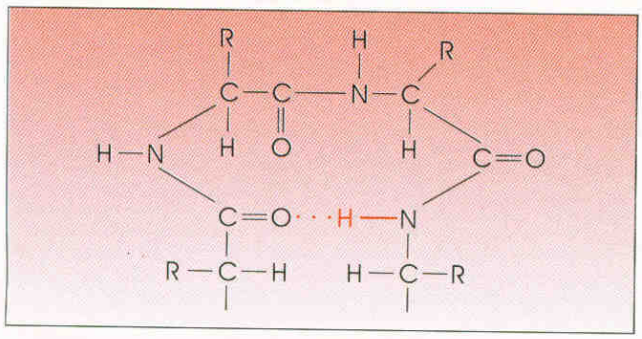
1-8. ábra. Parallel és antiparallel felépítésű β-redőzött lemezek. *A polipeptidláncok vagy -láncszakaszok között kialakuló hidrogénkötéseket piros pettyek jelzik*

között jönnek létre úgy, hogy orientációjuk a szerkezet hossztengelyére merőleges. Az ilyen, hidrogénhidakkal rögzített szerkezetet **β-redőzött lemeznek** (β-pleated sheet) nevezik *(1-7. ábra)*. A láncok lehetnek parallel vagy antiparallel helyzetűek attól függően, hogy milyen a lefutásuk iránya. Ha az egymás mellé került polipeptidlánc-szakaszok N- és C-terminális iránya megegyezik, akkor parallel, ha ellentétes, akkor antiparallel β-redőzött lemezről beszélünk *(1-8. ábra)*. Az R oldalláncok váltakozva a lemez síkja fölé és alá orientálódnak. Míg az α-hélix szerkezetek „rúd"-szerű formátumot mutatnak, a β-redőzött lemezek „lap"-szerű formát alakítanak ki.

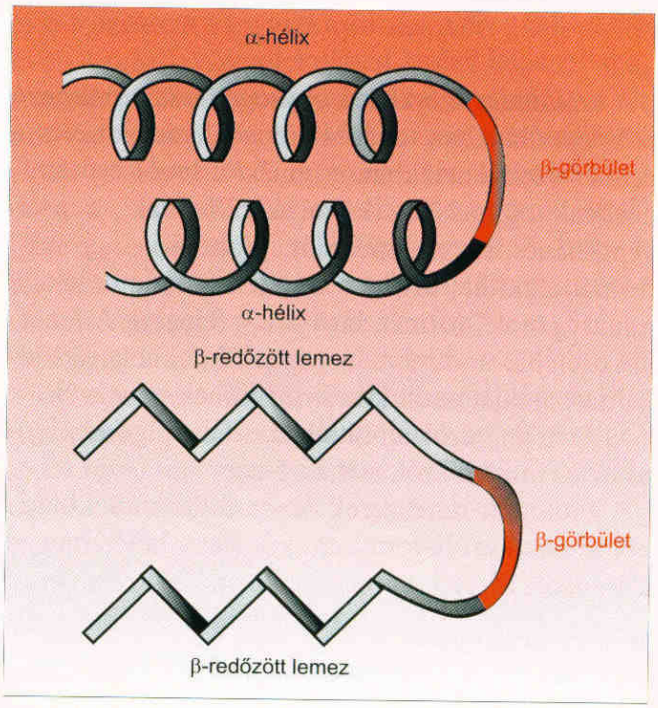
Egy-egy fehérje nem szükségszerűen csupán α-hélixből vagy β-redőzött lemezből áll; ezek és más szabályos (β-turn) vagy szabálytalan struktúrák (random coil) keveredhetnek egymással.

A legtöbb funkcionális fehérje zárt, globuláris formában fordul elő, számos ellentétes irányú fordulat jön létre bennük. Ezek legjellemzőbb alkotóeleme a **β-turn** (β-görbületnek vagy hajtű hajlatnak is nevezik), amely az α-hélix alapszerkezetéhez hasonlít, de a hidrogénhíd az első és harmadik peptidsíkok között jön létre a láncon belüli egyik aminosav C=O csoportja és az ettől harmadik helyzetű NH-csoportja között *(1-9. ábra)*. A β-turn második eleme nagyon gyakran prolin. A β-görbület a polipeptidlánc irányának hirtelen megváltozását eredményezi *(1-10. ábra)*.

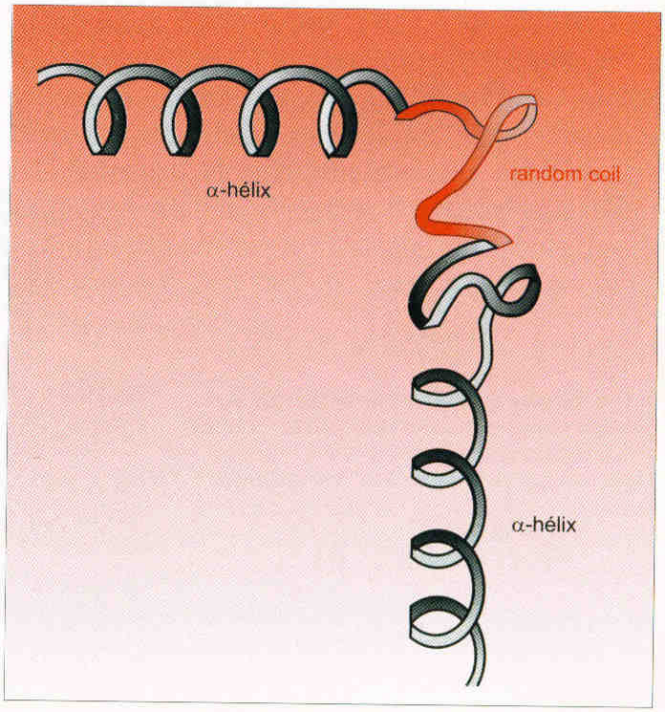
A **random coil** nem tartalmaz szabályosan ismétlődő struktúrát *(1-11. ábra)*.



1-9. ábra. A **β-görbület.** *Gyakran fordul elő antiparallel β-redőzött lemezekben; innen a neve*



1-10. ábra. Egy polipeptidláncon belüli α-hélixek vagy β-redőzött lemezek váltakozása β-görbülettel



1-11. ábra. α-hélixeket összekapcsoló random coil szakasz egy polipeptidláncon belül. *A random coil rendezetlen szerkezetet jelent*

A fehérjék harmadlagos szerkezete

A szekunder szerkezeti egységeket is tartalmazó polipeptidláncban további kölcsönhatások révén a primer szekvenciákban egymástól távol eső aminosavak egymáshoz közel kerülhetnek; a polipeptidlánc háromdimenziós globuláris, „gömb" formát alakíthat ki (nem minden fehérjemolekula mutat „gömb" formát, lásd a 6.3. fejezet). A fehérjék ezen háromdimenziós, specifikus funkcióra alkalmas alakját natív konformációnak nevezzük.

Milyen tényezők alakítják ki ezt a „felgombolyodást" és milyen erők tartják össze?

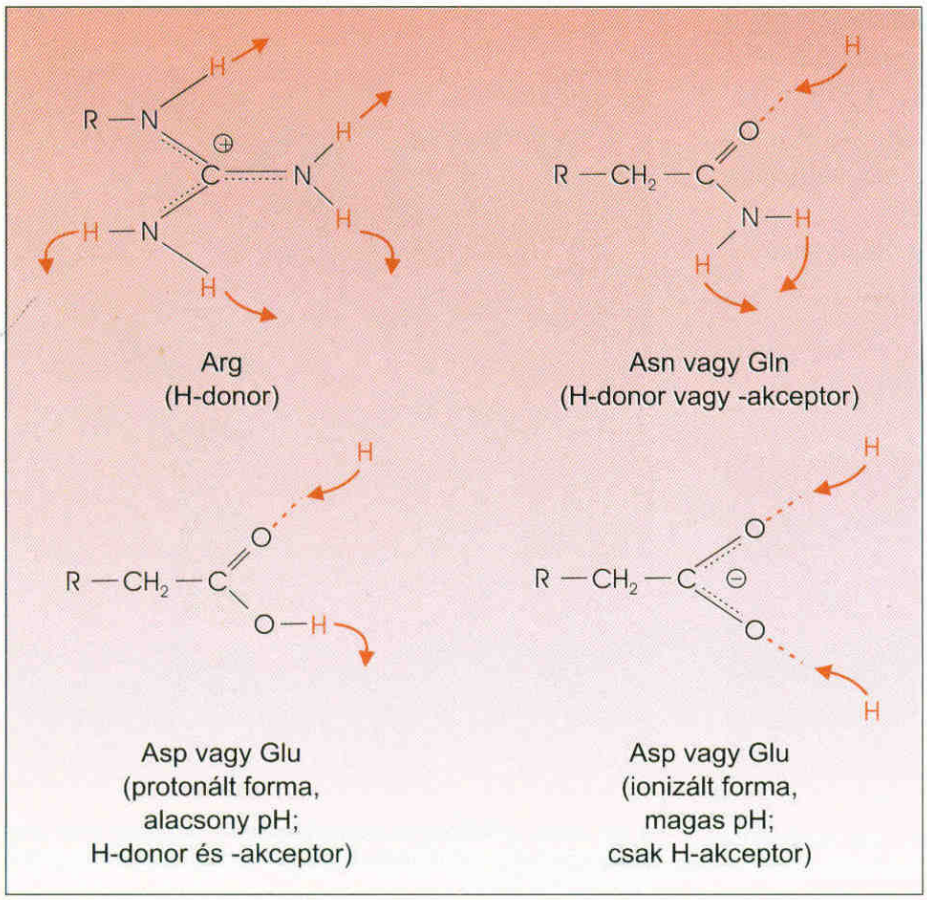
A biológiai rendszerek reverzibilis molekuláris kölcsönhatásai három nem kovalens kötéstípuson alapulnak. Ezek:

1. hidrogénkötések,
2. elektrosztatikus kötések (ionpárok) és
3. apoláros kölcsönhatások (London-féle erők).

Ezeket kiegészíti még egy kovalens kötés, nevezetesen a fehérjeláncban elhelyezkedő ciszteinek oxidálódhatnak úgy, hogy egymás között diszulfidhidakat alkotnak (lásd a fehérjék denaturációjánál).

Hidrogénkötések nemcsak két peptidkötés között jöhetnek létre, hanem az aminosavak peptidkötéseiben részt nem vevő, ún. oldalláncok között is. Egyes aminosavak (pl. Trp, Arg) csak H-donorként szerepelnek, mások donorként és akceptorként egyaránt (pl. Asn, Gln). Végezetül vannak olyan aminosavak (pl. Asp, Glu, Tyr, His), melyek a közeg pH-jától függően szerepelhetnek akceptorként vagy donorként *(1-12. ábra)*, bár ez utóbbi az emberi szervezetben, ahol a pH értéke általában 7,4, nem játszik jelentős szerepet (kivéve a His-t).

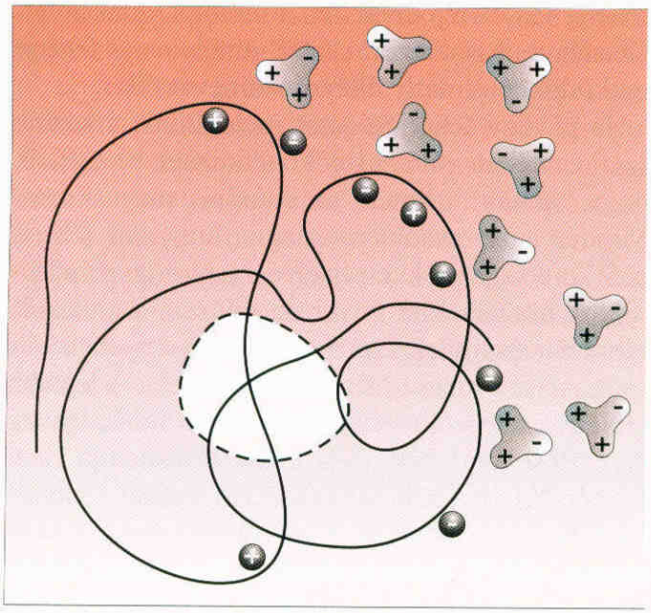
Elektrosztatikus kölcsönhatások (ionpárok) alakulhatnak ki negatív töltésű aminosav-oldalláncok (pl. Glu, Asp) és pozitív töltésű oldalláncok (pl. Lys, Arg) között. (Ezt a kötéstípust sókötésnek vagy sóhídnak is nevezik.) Ezek a kölcsönhatások megszűnnek, ha a pH elég magas vagy alacsony ahhoz, hogy a bázikus vagy a savanyú aminosav elveszítse töltését. Ez részben magyarázza a fehérjék savanyú vagy lúgos közegben történő denaturációját.



1-12. ábra. Az aminosavak oldalláncai között kialakuló hidrogénkötések néhány tipikus példája

A fehérjék natív térszerkezetének kialakulása nagyrészt vizes fázishoz kötött. Az emberi szervezet víztartalma hozzávetőlegesen 60 tömeg%, de még a csontszövetnek is 30%-át víz alkotja.

A vízmolekula dipólus karakterű, az oxigén nagyobb elektronegatívitása következtében részleges negatív, míg a két hidrogén részleges pozitív töltésre tesz szert. Egy vízmolekula hidrogénkötések révén 4 másik vízmolekulával léphet kapcsolatba, azoknak rendezett struktúrát adva. A vízmolekulák azonban nemcsak egymással, hanem más vegyületekkel is képeznek hidrogénkötést. Ilyenek pl. a hidroxil-, az amino- és a karboxilcsoportot tartalmazó szerves vegyületek. Nem meglepő, hogy a fehérjék (primer szerkezetükből következően) nagy mennyiségű vizet képesek megkötni; környezetükben általában rendezett hidrátburok alakul ki. Azok a részek viszont, amelyek nem képeznek a vízzel hidrogénkötést (pl. apoláros aminosavak) a víztől távol, egymás közelébe kerülnek. Vizes fázisban a fehérjék nagy része globuláris formába tekeredik fel („folding"); a poláros és ionos karakterű oldalláncok a fehérje külső felszíne felé, míg a hidrofób oldalláncok a fehérje-„gombolyag" belseje felé orientálódnak *(1-13. ábra)*.



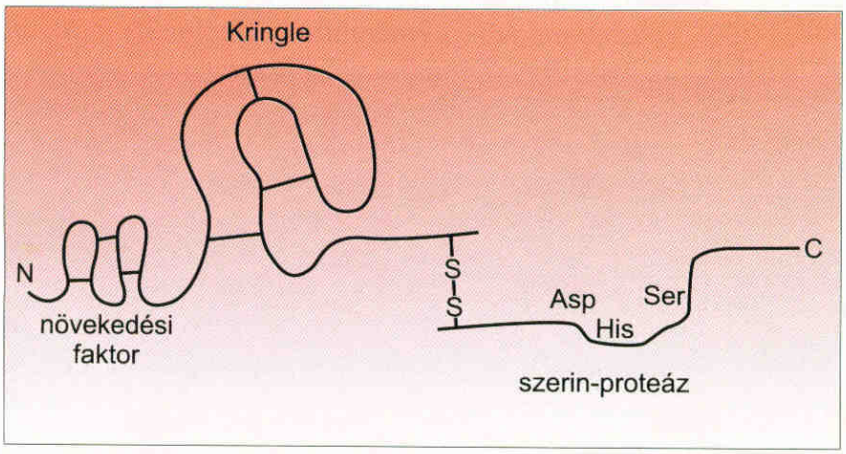
1-13. ábra. A globuláris fehérjék hidrátburkának kialakulása. *Fiziológiás körülmények között (pH 7,4) a legtöbb fehérje felszíni töltése negatív, amely körül a hidrátburok elrendeződik.*

(A vízmolekulákat a  *szimbolizálja.)*

A polipeptidlánc apoláros csoportjai a „gombolyag" centruma felé orientálódva apoláros magot (piros szaggatott vonal) hoznak létre

A fehérje ionos karakterét a pozitív és negatív töltések száma határozza meg; ez természetesen pH-függő. Amikor a fehérje összes pozitív és negatív töltése megegyezik, a hidrátburok szétesik, a fehérje oldékonysága minimumra csökken, a fehérjeoldat labilissá válik. Azt a pH-értéket, ahol ez bekövetkezik, a fehérjék izoelektromos pontjának (pI) nevezzük.

A globuláris fehérjék felgombolyodása tovább módosulhat, ha a polipeptidlánc 200-nál több aminosavat tartalmaz. Egy láncból felépülő fehérjén is különálló „gombolyagok", ún. **domének** képződhetnek *(1-14. ábra)*, amelyek különböző funkciókat láthatnak el (multifunkcionális fehérjék, pl. enzimek). A „tömör" régiót, a doméneket legtöbbször flexibilis részek kötik össze. A hasonló domének valószínűleg egy ős gén duplikálódásából származnak.



1-14. ábra. Funkcionális nagyobb struktúrelemeket tartalmazó egységek egy fehérjemolekulán belül: a domének. *Példaként az urokináz enzim doménjeit (növekedési faktor, kringle, szerin-proteáz) tüntetjük fel sematikusan. További részletekért lásd a 6.5. fejezetet*

A fehérjék negyedleges szerkezete

Egy-egy feltekeredett polipeptidlánc a legkülönbözőbb funkciót töltheti be, de szerepelhet egy funkcionális egység részeként is. Polipeptidláncgombolyagok, mint monomerek vagy alegységek kapcsolódhatnak egymáshoz oligomereket vagy akár polimereket alkotva. Ha két fehérje kapcsolódik, dimerről, ha néhány, oligomerről, ha sok, polimerről beszélünk. Ha azonos szerkezetű fehérjék kötődnek egymással, homomernek, ha különböző szerkezetűek, heteromernek nevezzük.

A monomerek lehetnek szerkezetileg azonosak, de különbözőek is. A kapcsolódás létrejöhet kovalens és nem kovalens kötéseken keresztül (az utóbbi a gyakoribb). Az alegységek közötti funkcionális kapcsolat jelentőségére lásd pl. a hemoglobin szerkezetét. A fehérjék ilyen jellegű rendezettségét kvaterner struktúrának, a fehérjék negyedleges szerkezetének tekintjük.

Multienzim komplexek

A fehérje szerkezet egy további szerveződési szintjét eredményezi, hogy bizonyos enzimek, amelyek külön-külön is jól definiált funkciót töltenek be, összekapcsolódhatnak és ún. multienzim komplexet hoznak létre. Az ilyen szerkezetben az egyes enzimek összehangoltan működnek.

Szupramolekuláris struktúrák

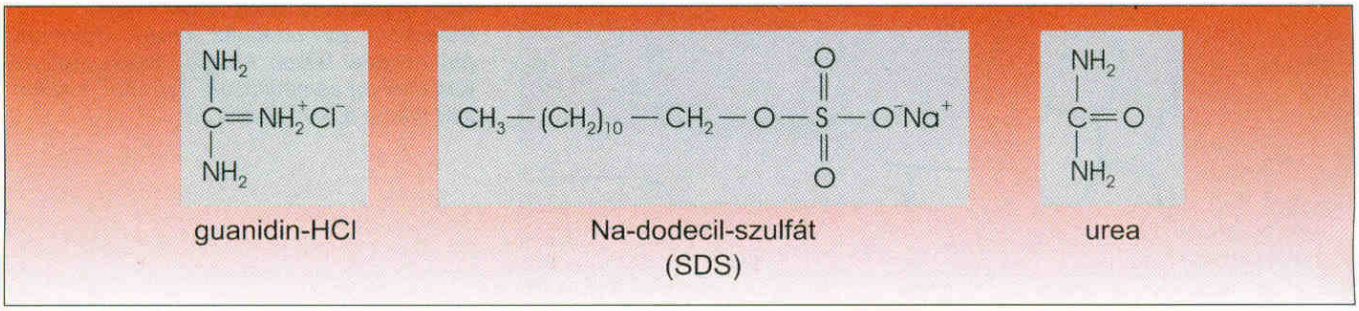
Multienzim komplexek, oligomer proteinek és egyedi enzimek tovább kapcsolódhatnak egymással egy magasabb szintű makromolekuláris organizációt eredményezve; ilyenek például a riboszómák vagy az elektrontranszportlánc membránkomponensei.

Fehérjék denaturációja

Az elsődleges, a másodlagos, a harmadlagos és egyes esetekben a negyedleges szerkezet egy adott fehérjében elengedhetetlen a biológiai funkció ellátásához. Azt a szerkezetet, amelyben a fehérje működőképes, natív állapotnak nevezzük.

Ha pl. egy fehérjeoldatot melegítünk, a fehérje szerkezetében változások következnek be anélkül, hogy annak primer struktúrája megváltozna. Mindez azt eredményezheti, hogy a fehérje oldékonysága csökken és elvész a biológiai funkciója. A hőmérséklet növelése fokozza a molekula vibrációs és rotációs mozgását, és ez a gyenge kölcsönhatások megszűnését eredményezi. A legtöbb élőlény esetében a fehérjék biológiai funkciójának elvesztése általában jóval a víz forráspontja alatti hőmérsékletnél bekövetkezik, bár vannak termofil baktériumok, amelyek forró vízben, magas nyomáson, 100 °C felett is élnek. A folyamatot **fehérjedenaturációnak** nevezzük és úgy magyarázzuk, hogy a különböző aminosavak közötti kölcsönhatások (hidrogénhidak, hidrofób kötések, ionpárok) megváltoznak és/vagy a hidrátburok elvész az elsődleges szerkezet megváltozása nélkül. A fehérjék bizonyos szerves savak (pl. triklórecetsav, szulfoszalicilsav) vagy nehézfémek (Pb, Hg) hatására irreverzibilisen denaturálódnak. Ez utóbbi egyúttal magyarázatul szolgál a nehézfémek mérgező hatására.

A pH-változás az ionpárok megszűnését és a hidrogénhidak felbomlását eredményezheti, amely



1-15. ábra. Fehérjedenaturációhoz gyakran használt vegyületek

szintén a hidrátburok mértékét csökkenti. Ugyancsak a hidrátburok elvesztése révén reverzibilis denaturációt okoznak a könnyűfémek sói (pl. ammónium-szulfát, nátrium-klorid, magnézium-klorid) vagy szerves oldószerek (etanol, aceton stb.). Egyes, ún. denaturáló vegyületek *(1-15. ábra)* direkt hidrogénkötéseket alakítanak ki a fehérjével (urea, guanidin). Mások, pl. a detergensek (Na-dodecil-szulfát), apoláros kölcsönhatásokat létesítenek a fehérje apoláros részével, amelyről tudjuk, hogy a „gombolyag" belső részében helyezkedik el; így a fehérje „kitekeredik". Az eredeti körülmények visszaállítása gyakran a fehérje natív térszerkezetének visszaalakulását eredményezi. Ezek szerint a denaturáció lehet reverzibilis és irreverzibilis. A fehérje e tulajdonsága lehetőséget teremt a fehérjék részleges izolálására, egymástól történő elválasztására. (Pl. bizonyos ammónium-szulfát-koncentrációnál egy adott fehérje kicsapódik, egy másik pedig nem; centrifugálással így elválaszthatók, majd a só eltávolítása után a fehérje natív szerkezete visszaállítható.)

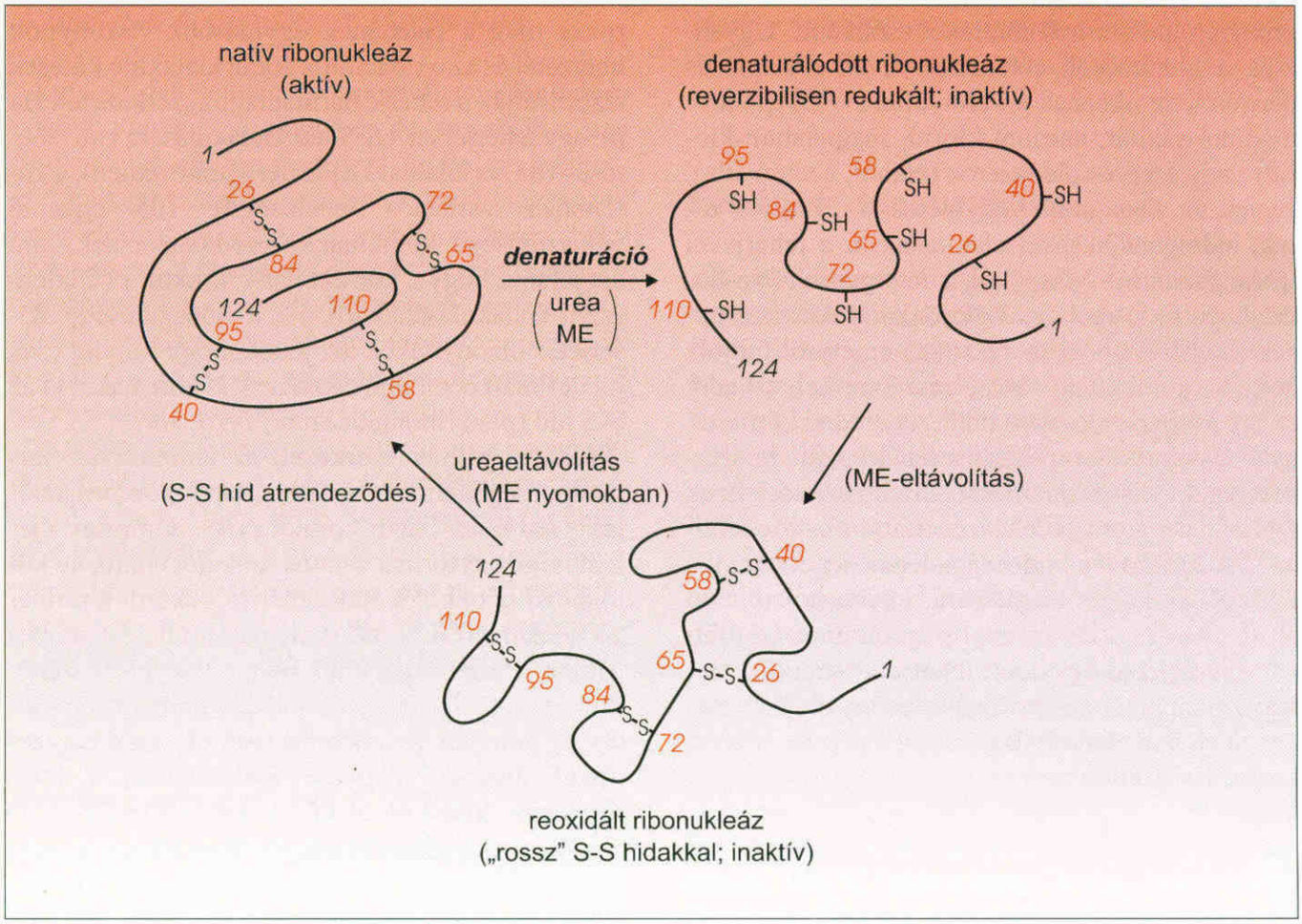
A natív állapot kialakulása: a fehérje feltekeredése

A fehérjék szintézisekor az aminosavak peptidkötésekkel összekapcsolódnak, és az ún. „protein folding" során a peptidlánc úgy „tekeredik", hogy kialakul a natív állapot, a fehérje funkcionális szerkezete.

Ennek termodinamikai oka van: a fehérjelánc feltekeredése a termodinamikailag legkedvezőbb folyamatot követi. A feltekeredett polipeptidstruktúra (fiziológiás körülmények között a natív konformáció) energetikailag a fehérje szerkezetének kedvezőbb állapota, mint a denaturált körülmények között mutatott térszerkezet. A feltekeredés lényegéhez tartozik, hogy a fehérjeláncot hidrátburok veszi körül, amelynek egy része feltekeredéskor elvész, mialatt az aminosavak között kölcsönhatások (elektrosztatikus, hidrogénhíd és apoláros) jönnek létre. Sok fehérje natív szerkezetének kialakulásában további kölcsönhatások is részt vesznek, nevezetesen S-S hidak keletkeznek két cisztein oldallánc között. A feltekeredés határozza meg a ciszteinek egymáshoz viszonyított helyzetét és az oxidációjuk során kialakuló kötések stabilizálják a fehérje harmadlagos szerkezetét. Ha pl. egy fehérjében 4 S-S híd kialakulására van lehetőség (8 Cys található a primer szerkezetben), a különböző variációs lehetőségek 105 egyenlő valószínűségű kombinációt eredményeznek, ami azt jelenti, hogy a korrekt natív struktúra véletlenszerű kialakulásának kb. 1% a valószínűsége. Kísérletes bizonyítékok azt jelzik, hogy mindig csak jól definiált pozíciójú ciszteinek között alakul ki az S-S híd (pl. a ribonukleáznál; *1-16. ábra)*.

Tehát a primer szerkezet, az aminosavak sorrendje meghatározza a natív állapot konformációját. Azonban nem mindegyik aminosav jelentősége egyforma: azonos funkciót ellátó, de különböző fajokból izolált fehérjék sokszor a primer szerkezetben 50%-nál is nagyobb eltérést mutathatnak, s konformációjuk mégis nagyon hasonló. Mindez azt jelzi, hogy vannak „kitüntetett" aminosavak, amelyek a szekvenciában elfoglalt helyzetüktől függően alapvető fontosságúak a konformáció kialakításában. Ezek elsősorban az α-hélix és a β-lemez kialakításában, illetve az aminosav-oldalláncok közötti kölcsönhatások létrejöttében játszanak szerepet.

Az elsődleges szerkezet és a natív konformáció kialakulása közötti összefüggés egyik szép kísérletes bizonyítéka a ribonukleáz denaturálása és renaturálása (lásd 1-16. ábra). Merkaptoetanol ($HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SH$) és urea jelenlétében a ribonukleázban jelen lévő 4 S-S híd redukálódik (merkaptoetanol hatására) és a hidrogénhidak megszűnnek (urea hatására), aminek következtében a fehérjegombolyag kitekeredik és elveszti enzimaktivitását. Ha ezután egyszerre eltávolítjuk a merkaptoetanolt és az ureát, a fehérje lassan reoxidálódik és visszanyeri eredeti aktivitását. Ha a denaturált fehérje urea jelenlétében reoxidálódik, akkor csak 1% aktivitást lehet visszanyerni. Ilyenkor, bár újra S-S kötések alakulnak ki, azok nem a natív konformációnak megfelelő ciszteinek között jönnek létre, hanem random, a 104 maradék kombinációs lehetőség szerint. Ha viszont az S-S kötések kialakulása teljesen gátolt, pl. erélyes oxidációval a ciszteinből ciszteinsav képződik (az -SH átalakul $-SO_3^-$-má), a denaturáció irreverzibilissé válik és semmiféle enzimaktivitást nem lehet visszanyerni.



1-16. ábra. Fehérjedenaturáció és -renaturáció. *A natív ribonukleáz konformációjának stabilizálásában a 26–84, 40–95, 58–110 és 65–72 ciszteinpárok vesznek részt. Denaturáció során az urea a hidrogénhidakat, a merkaptoetanol (ME) pedig az S-S hidakat szünteti meg. A merkaptoetanol eltávolításakor oldott oxigén jelenlétében a ciszteinek reoxidálódhatnak, de az S-S hidak nem a natív szerkezetnek megfelelő helyzetekben jönnek létre (reoxidált ribonukleáz). Az urea eltávolítása után a hidrogénhidak újra kialakulhatnak a fehérje elsődleges szerkezetének megfelelően, ha nyomnyi mennyiségű SH jelenlétében a „rossz" S-S hidak redukálódnak. Majd a nyomnyi merkaptoetanol eltávolítása és további reoxidáció során a ribonukleáz felveheti újra natív térszerkezetét, amelyet a natív konformációnak megfelelően egymáshoz közel került ciszteinek között kialakuló S-S hidak (további reoxidáció) rögzítenek*

Ezek a kísérletek azt is jelzik, hogy az elsődleges szerkezet ismerete nem elégséges a fehérjék felgombolyodásának pontos megértéséhez. A fehérjék környezete nagyon változatos lehet a szintézis helyétől (riboszómák) történő vándorlásuktól, az aminosavmódosulásoktól, a szénhidrátláncok kapcsolódásától függően, illetve lipidmembrán-komponensekkel történő kölcsönhatások következtében. Ezen utak több konformációváltozás lehetőségét teremtik meg. Az ún. natív konformáció megváltozhat, amikor pl. egy enzim más fehérjével vagy lipiddel kerül kölcsönhatásba, vagy egy allosztérikus regulátor molekula kötődik hozzá (lásd 1.2. fejezetet). A környezettől függő konformációváltozások lényeges szerepet játszanak az anyagcsere-folyamatok szabályozásában. Ehhez szorosan kapcsolódik, hogy bizonyos fehérjék, az ún. chaperonok speciális szerepet játszanak más, in vivo funkcióképes polipeptid-szerkezet kialakításában. Alapvető funkciójuk, hogy denaturált, de legalábbis nem szabályosan feltekeredett fehérjékhez kötődnek és meggátolják azok aggregálódását, illetve elősegítik a natív konformáció kialakulását. De szerepük lehet a denaturált fehérjék eltávolításában is. A chaperonok különböző proteincsaládból származnak és szerkezetük nem szükségszerűen hasonló. Több közülük ATP-t igényel funkciója ellátásához.

A fehérjedenaturációval kapcsolatban összefoglalóan el kell mondani, hogy a denaturáció mindig egy bizonyos proteinfunkció elvesztésével jár, de egy fehérjefunkció csökkenése vagy elvesztése nem szükségszerűen azonos a denaturáció jelenségével. A protein natív szerkezetében bekövetkezett kis változás eredményezheti pl. egy enzim katalitikus aktivitásának elvesztését, de ez nem feltétlenül jelenti a másodlagos és annál magasabb fokú szerkezeti szintek teljes felbomlását.

A biológiai jelentőséget illetően az az elképzelés, hogy sok esetben a denaturáció jelenti a fehérjék degradációjának a szabályozását, mert az emésztő enzimek nagy általánosságban nem a natív, hanem a denaturált fehérjéket „ismerik fel".

Végezetül, egy elméleti szempontból figyelemreméltó tényt érdemes még megemlíteni. Nevezetesen, hogy bár a fehérjék elvileg szinte végtelen sok konformációt vehetnek fel, a szintézis során a natív konformációjuk hihetetlenül rövid idő, a másodperc tört részei alatt kialakul. Hogy miért és hogyan, az ma még kutatás tárgyát képezi.

A fehérjeszerkezet megismerését szolgáló metodikák

A fehérjék izolálása alapvető feltétel a szerkezet-funkció megismerése szempontjából. A legjellemzőbb tulajdonságok, amelyek alapján a fehérjék elválaszthatók egymástól és más komponensektől: a méret, az oldékonyság, a töltés és a kötődési affinitás.

Oldékonyság alapján történő izolálás: lipidek, szénhidrátok és a legkülönbözőbb fehérjék oldékonysága vizes fázisban, poláros vagy apoláros oldószerekben, detergensek jelenlétében, a pH-értéktől és/vagy az ionerősségtől függően, más és más. Ezek alapján részlegesen egymástól elválaszthatók.

1. **Méretek szerinti elválasztásra alkalmas módszerek:** (i) SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (amely denaturált körülmények között jellemzi a fehérje tömegét), (ii) gélszűréses kromatográfia és (iii) ultracentrifugálás.
2. **Töltéstől függő szeparálás:** (i) elektroforézis, (ii) elektroforézis pH-grádiensben (izoelektromos fókuszálás) és (iii) ioncserélő kromatográfia.
3. **Ligand (kötődési) affinitás alapján történő elválasztás:** sok fehérjefeléség nagy affinitással kötődik bizonyos kémiai csoportokhoz és így a nagy affinitással kötődő fehérje elválasztható a többitől. Ezek a csoportok (lehetnek szintetikus vegyületek, enzimgátlók vagy szubsztrátok, antitestek) kovalensen ún. hordozó anyagokhoz köthetők. Az ún. affinitás kromatográfiás módszerek elvét a fentiekben röviden ismertetett tulajdonságok képezik.

A fehérjék aminosav-összetételének meghatározására a kérdéses proteint izolálni kell, majd savas hidrolízis után (6 N HCl, 110 °C) az aminosavak ioncserélő kromatográfiával egymástól elválaszthatók és ninhidrinnel vagy fluoreszkaminnal mennyiségileg meghatározhatók.

Az aminosavszekvencia meghatározására a fehérje N-terminális aminosavát reagáltatni kell olyan vegyülettel, amely az aminosavval együtt (hidrolízissel) eltávolítható a polipeptidlánctól. Az aminosav nagy nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) azonosítható. Egy következő ciklusban az egy aminocsoporttal rövidült peptid „új" N-terminális aminosavával történik egy újabb reakció. A ciklus többször ismételhető ún. automatikus szekvenátorokkal. Az aminosavszekvencia meghatározását forradalmasította a rekombináns DNS-technika; a DNS nukleotidszekvenciájából következtetni lehet az aminosavak sorrendjére. A DNS-szekvencia meghatározása egyszerűbb és esetenként pontosabb módszer, mint a direkt aminosavszekvenálás, viszont nem ad információt a poszttranszlációs módosulásra.

A polipeptidláncok mesterségesen is szintetizálhatók. A módszer lényege, hogy egy adott aminosav karboxilcsoportját vízben oldhatatlan anyaghoz kapcsolják, és ezután az α-aminocsoportját reagáltatják egy következő aminosav aktivált α-karboxilcsoportjával.

Fehérjék detektálására és kvantitatív meghatározására antitestek is felhasználhatók. Az enzimkötött immunoassay (ELISA) és western blot SDS-poliakrilamid gél használata nagyon elterjedt metodika. A fehérjék lokalizációját immun-fluoreszcenciával és immuno-elektronmikroszkóppal (jelzett antitesttel) lehet követni.

Fehérjék funkcióinak megismerésére, így például kölcsönhatásaik (kötődéseik) leírására gyakran használnak radioaktív izotóp jelzési technikákat. Ezek leggyakoribb módszere, hogy a fehérjékben a tirozinokat és hisztidineket jóddal (^{125}I vagy/és ^{131}I) jeleznek és azután a polipeptideket a legkülönbözőbb reakciókhoz használják fel. A radioaktivitás mértékéből, lokalizációjából következtetni lehet a funkcióra.

A fehérjék háromdimenziós szerkezetének a megismerésére röntgen-krisztallográfiát és mágneses magrezonanciát (NMR) használnak.

Gélelektroforézis

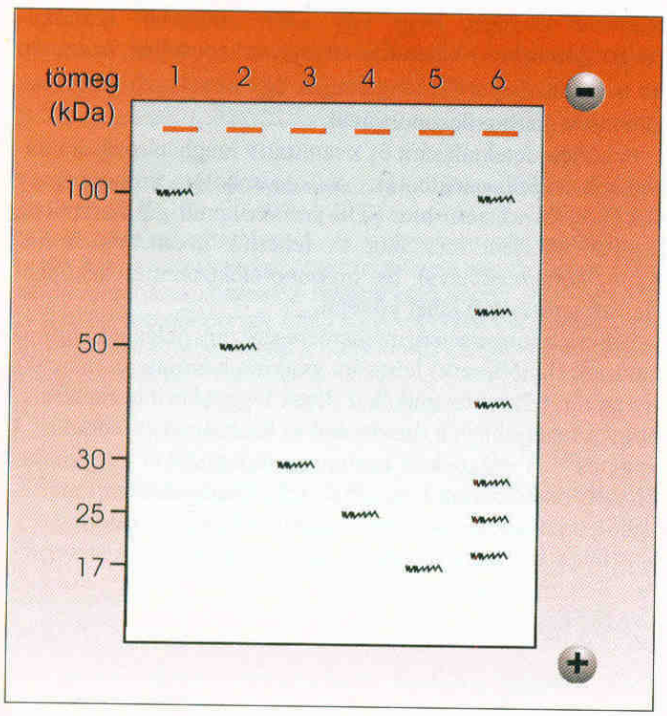
A gélelektroforézis alapelve az, hogy a töltéssel rendelkező molekulák az össztöltésüknek megfelelően elektromos térben az ellentétes töltéssel rendelkező elektród felé vándorolnak. A vándorlás sebessége (v) függ a molekula töltésétől (z), töme-

gétől és alakjától függő súrlódási együtthatótól (f) továbbá az elektromos térerőtől (E):

$$v = \frac{E \cdot z}{f}$$

A fehérjék elválasztásához leggyakrabban olyan porózus gélt használnak, amellyel a proteinek nem reagálnak és amely egyben molekulaszűrőként is szolgál. A pórusok nagyságától függően a különböző méretű fehérjék vándorlása befolyásolható: ha a molekula mérete kicsi a pórusokhoz képest, gyorsan mozog, ha nagy, a fehérje szinte mozdulatlan marad a gélben (a pórus mérete változtatható). Ha a fehérjék denaturálódnak, nátrium-dodecil-szulfát (SDS: 1-15. ábra) jelenlétében, akkor a fehérjék jól elválaszthatók egymástól molekulatömegük alapján. Az SDS erősen kötődik a polipeptid apoláros oldalláncaihoz (általában egy SDS-molekula jut két aminosavra), és így a fehérjének nagy negatív össztöltése lesz. Ha a fehérje több láncból épül fel, amelyeket diszulfidhidak tartanak össze, akkor azok redukciója után (pl. merkaptoetanol jelenlétében) az egyes láncok elválaszthatók egymástól és relatív tömegük meghatározható. A polipeptidláncok elválasztás után láthatóvá tehetők különböző, festési eljárásokkal. Sok fehérje (bár nem az összes) elektroforetikus mobilitása SDS-poliakrilamid gélben logaritmikusan arányos a tömegével. Így, ha ismert molekulatömegű fehérjék (markerek) is rendelkezésünkre állnak, a módszer különböző fehérjék relatív molekulatömegének meghatározására is alkalmas. Az elektroforetikus mobilitás eredményét mutatja az *1-17. ábra.*

A módszer már 0,1 μg protein detektálását is lehetővé teszi és olyan fehérjék, amelyeknek molekulatömege több mint két százalékkal eltér, általában már megkülönböztethetők. Az elektroforézises módszer nemcsak analitikai, hanem preparatív célokra is felhasználható.



1-17. ábra. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis. *Ismert molekulatömegű fehérjék láthatók az első öt pozícióban, míg a hatodikban egy ismeretlen fehérjekeverék komponenseinek elválasztása követhető. A fehérjeoldatokat a start helyre (szaggatott vonal) juttatják. A fehérjék az SDS-„burokban" negatív töltésűek, így a feszültség rákapcsolása után a pozitív pólus felé vándorolnak. A gyakorlatban az ismert molekulatömegű fehérjéket összekeverik és egy startponthoz juttatják, ahol elektroforézis után elválnak*

Izoelektromos fókuszálás

Fehérjék elválaszthatók egymástól azon az alapon is, hogy milyen a savas és bázisos aminosav tartalmuk. Azon pH-értéknél, amelynél a fehérjék össztöltése nulla, a fehérjék nem vándorolnak SDS-mentes elektroforézis során. Ezt a pH-értéket izoelektromos pontnak (pI) nevezik, ami jellemző a fehérjékre. Különböző töltéstartalmú polimerekkel (poliamfolitokkal) olyan pH-grádiens hozható létre, amelyben a fehérjék addig vándorolnak, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő tartományt. A fehérjék ilyen alapon történő elválasztását izoelektromos fókuszálásnak nevezik.

A módszer kombinálható az SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, nagy érzékenységű szétválást eredményezve. Így először izoelektromos elválasztást végeznek az egyik irányba, majd utána erre merőlegesen SDS-gélelektroforézist. A módszer, amelyet kétdimenziós elektroforézisnek neveznek, alkalmas egy-egy sejtféleség közel ezer különféle fehérjéinek elkülönítésére.

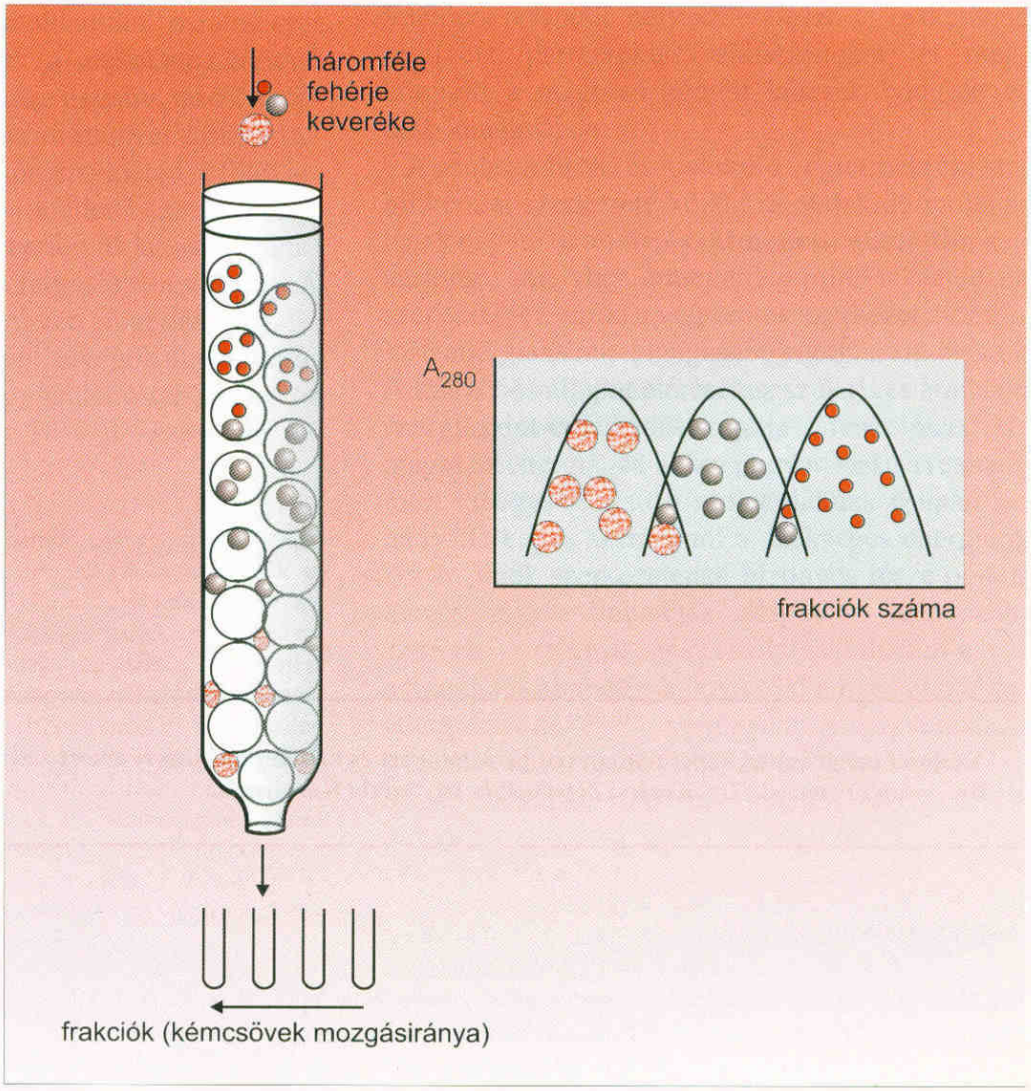
Dialízis és gélszűrés

A fehérjék könnyen elválaszthatók kis molekulatömegű vegyületektől dialízis segítségével. Az el-

járás lényege, hogy szemipermeábilis membránon (pl. pórusos cellulóz), amelynek pórusátmérői jelentősen kisebbek, mint a fehérjék mérete, a polipeptidek nem tudnak átdiffundálni, míg a pórusméreteknél kisebb molekulák szabadon vándorolnak. A módszert elsősorban fehérjéknek ionoktól, sóktól és általában kis molekulatömegű vegyületektől történő elválasztására vagy kicserélésére használják.

Hasonló elven működik a gélszűréses kromatográfia, de a dialízisnél sokkal kifinomultabb eljárás. Ez a módszer fehérjék egymástól történő elválasztását is lehetővé teszi és alkalmas a relatív molekulatömeg meghatározására is. A módszer lényege, hogy vízben oldhatatlan, de nagymértékben hidratált polimereket hoznak létre, amelyekben különböző méretű pórusok alakulnak ki. A gélt ezután vékony csövekbe töltik (oszlopnak nevezik) és rárétegezik a kérdéses fehérjeoldatot. Egy határértéknél nagyobb molekulatömegű fehérjék nem tudnak belépni a pórusokba, azok mellett gyorsan áthaladnak, míg a kisebb méretűek belépnek, így tovább időznek az oszlopon *(1-18. ábra)*.

A gélszűrés során (az elektroforézissel ellentétben) a molekulák töltése nem, alakjuk viszont lényegesen befolyásolja vándorlásuk sebességét. A módszer ugyan alkalmas a relatív molekulatömeg meghatározásra, de figyelembe kell venni, hogy ez csak globuláris fehérjék esetén értékelhető (az elnyújtott alakú polipeptidek úgy viselkednek, mintha nagyobb molekulatömegük lenne a valós értéknél). Bár a módszer alkalmas fehérjék egymástól történő elválasztására, felbontóképessége nem olyan jó, mint a gélelektroforézisé, viszont nagyobb mennyiségű fehérje izolálása érhető el vele.



1-18. ábra. A gélszűréses kromatográfia elve. *A különböző molekulatömegű fehérjék keverékét az „oszlop" tetejére helyezik, majd azon átfolyatják. A kis molekulatömegű peptidek bejutnak az üregekbe és így tovább időznek az oszlopon, mint a nagyobbak. A nagy molekulatömegűek egyáltalán nem férnek be az üregekbe (lásd a szöveget is). Az átfolyó oldatot az „oszlop" alján gyűjtik (pl. 1 ml-es térfogatokban), amelyeket frakcióknak nevezznek. Végül az egyes frakciók fényelnyelés mértékét meghatározzák fotométerrel 280 nm-nél (A_{280}). Az abszorbció arányos a fehérjekoncentrációval*

Ioncserélő és affinitás kromatográfia

Ha egy fehérje pH 7-nél pozitív töltésű, akkor általában kötődik olyan szilárd fázisú „oszlophoz", amelyen negatív töltésű csoportok vannak kovalensen rögzítve (kationcserélő kromatográfia), míg a negatív töltésű fehérjék nem kötődnek hozzá. Ez a tulajdonság lehetővé teszi a fehérjék töltéstől függő elválasztását, illetve izolálását. Ezután (ha a pozitív töltésű fehérjére van szükség) a kötött protein visszanyerhető elúcióval; amely azt jelenti, hogy növekvő sókoncentrációval (pl. NaCl) vagy a pH emelésével a fehérje leválasztható az oszlopról. A Na^+ kompetál a fehérje pozitív töltésével, amelyen keresztül az az oszlophoz kötődik. Minél kisebb egy adott fehérje pozitív töltése, annál gyengébb a kötődése és annál alacsonyabb sókoncentrációval választható le. Így nemcsak a pozitív töltésű választható el a negatív töltésűtől, hanem a pozitív töltésűek is részben szeparálódhatnak egymástól. Negatív töltésű fehérjék viszont, a fentiekhez hasonló elvek alapján, pozitív töltésű (anioncserélő) oszlopokhoz kötődnek.

Az affinitás kromatográfia módszer elválasztási elve, hogy ha egy fehérje nagy affinitással megköt egy másik molekulát (ami lehet pl. glukóz vagy peptid, vagy egy szintetikus vegyület is), akkor, ha ezt (pl. a szintetikus vegyületet) kovalensen hozzákapcsoljuk egy oszlophoz, ahhoz a kérdéses fehérje nagy affinitással kötődni fog, míg a többi fehérje nem. Ezután az oszlophoz kovalensen kötött vegyület kötetlen formájával (magas koncentrációban) szabaddá lehet tenni („eluálás") a kérdéses fehérjét, hisz a kötetlen molekula kompetál a kötöttel. Végül a szabad vegyület (ligand) dialízissel eltávolítható az izolált fehérjétől. Az elúció egy másik lehetséges módja, hogy a nagy affinitással kötött fehérjét reverzibilisen denaturáljuk (pl. pH-változtatás); így annak affinitása lecsökken, és nem kötődik tovább az oszlophoz.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Arányi Péternek, Dr. Krajcsi Péternek és Dr. Szikla Károlynak.

Ajánlott irodalom

Biochemistry, Ed. L. Stryer, W. H. Freeman and Company New York, N. Y. USA, 1988.
Biochemistry, Ed. J. D. Rawn, Neil Patterson Publisher, Burlington, N. C. USA, 1993.
Principles of Biochemistry, Eds. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cos, Worth Publishers, New York, NY, USA, 1993.

1.2. Enzimek

Faragó Anna

Az enzimek katalitikus funkciója

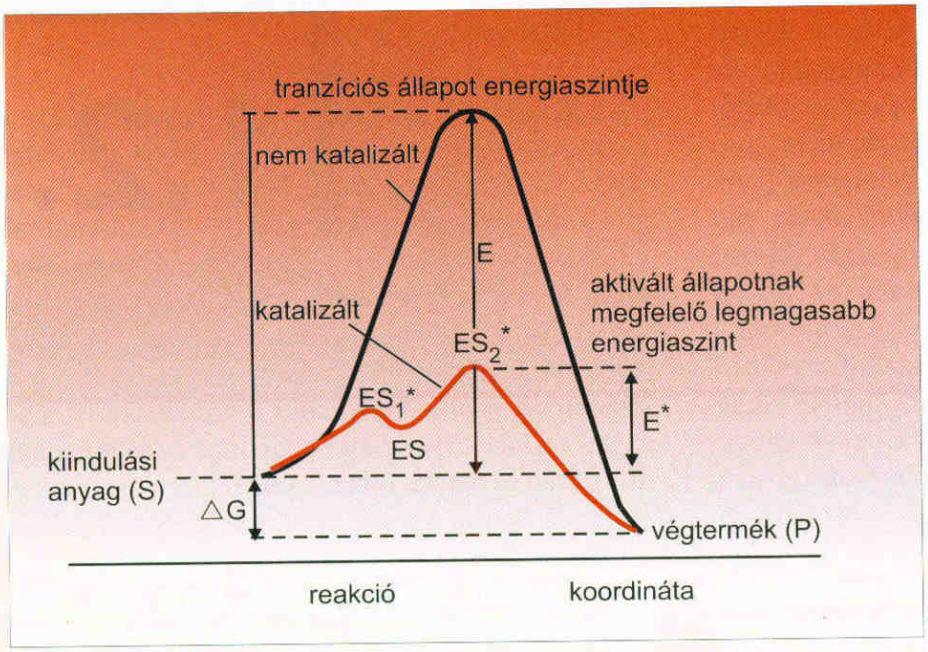
Az élő szervezetben nagyon kevés kémiai reakció megy végbe önmagától, bár a kiindulási anyagok és végtermékek termodinamikai paraméterei lehetővé tennék a reakciót (a reakcióhoz tartozó szabadenergia-változás értéke negatív, lásd 2.1. fejezet). Az élő szervezet körülményei között (az élettel összeegyeztethető hőmérsékleten, a földi atmoszféra nyomásviszonyai mellett) azonban ezek a reakciók önmagukban rendkívül lassúak lennének, meggyorsításukhoz katalízisre van szükség. A katalízist enzimeknek nevezett fehérjék végzik, amelyek lerövidítik a kémiai anyagok átalakulásához szükséges időt, egy-egy reakció sebességét az adott körülmények között 10^9–10^{12}-szeresére fokozhatják.

Újabban megfigyelték, hogy néhány egészen speciális biokémiai folyamatban bizonyos ribonukleinsavmolekulák is képesek a katalizátor feladatát ellátni (**„ribonukleinsavak mint enzimek"**). A katalitikus képességekkel rendelkező ribonukleinsavakat **„ribozim"-nek** nevezik. Az ismert ribozimek közül három típus önmaga átszerkesztődését katalizálja, de van egy olyan típus is (ribonukleáz P), amely valódi katalizátornak tekinthető. Mindazonáltal jó hatásfokkal kizárólag RNS-molekulákon végbemenő reakciót katalizálnak a ribozimok. Felfedezésüknek az evolúció molekuláris mechanizmusával foglalkozó elméletek szempontjából nagy jelentősége van, az evolúció során azonban a 20-féle építőelemből álló fehérjék szerkezete sokkal alkalmasabbnak bizonyult az élő szervezetben folyó katalízisre.

A különböző fehérjék szerkezete együttesen igen nagy variációs lehetőségeket rejt magában, így a legkülönbözőbb kémiai anyagok számára is rendelkezésre állhat olyan fehérjemolekula, amely – az összes lehetséges intermolekuláris erők igénybevételével – megköti, egymáshoz közeli és megfelelően orientált helyzetbe hozza a reakcióban résztvevő partnereket (szubsztrátokat) és megkönnyíti a meglévő kémiai kötések bontását és újak kialakulását.

A szubsztrát(ok) és kialakuló végtermék(ek) stabil kémiai szerkezete között az átalakuló molekulának egy ún. **tranzíciós (átmeneti) állapotba** kell kerülnie, amelyben átmenetileg mind a kiindulási szerkezethez, mind a végtermék szerkezetéhez tartozó energiaszintnél magasabb energiaszintet ér el. A tranzíciós állapot eléréséhez szükséges átmeneti energiaszint-emelkedés a gátja a reakciónak. Ha magas az energiagát, akkor nagyon lassú a reakció, mert időegység alatt a molekuláknak csupán kis hányada képes szert tenni a szükséges energiára. Az enzimek szerkezetének bizonyos része pontos kiegészítője a tranzíciós állapotban levő szubsztrátja(i) szerkezetének, ezáltal stabilizálni képes a tranzíciós állapotot és így csökkenti az aktiválási energiának nevezett energiagátat, amely a reakció gyorsulásához vezet. Az enzimek által végzett katalízis általában ezen elv alapján folyik *(1-19. ábra)*.

A tranzíciós állapotban levő molekula már nem azonos a szubsztráttal és még nem azonos a produktummal, bármelyikké alakulhat vagy visszaalakulhat. Enzim nélkül nem stabil, izolálni nem lehet. A tranzíciós állapot stabilizálásának fontosságát a katalízisben az is bizonyítja, hogy kísérleti úton sikerült olyan immunglobulin antitesteket produkálni, ame-



1-19. ábra. A nem katalizált reakció és az enzim által katalizált reakció során kialakuló energiaszintek. *A ΔG-érték a kiindulási anyag és végtermék szabadenergia-tartalma közti különbség, amely a reakció irányát megszabja. A reakció sebességét az aktivált állapot eléréséhez szükséges legmagasabb energiaszint határozza meg, ez minél kisebb, annál gyorsabb a reakció. E és E* a nem katalizált, illetve katalizált reakció aktiválási energiáját jelölik*

lyeknek antigént kötő felszíne pontos kiegészítője egy-egy molekula tranzíciós állapotnak megfelelő szerkezetének, és így az antitesthez kötődő antigén időegység alatt sokkal nagyobb valószínűséggel fordul elő tranzíciós állapotban, mint szabadon. Az ilyen antitest **(„abzim")** képes katalizálni a megfelelő molekula átalakulását, noha eredetileg nem enzimfehérje.

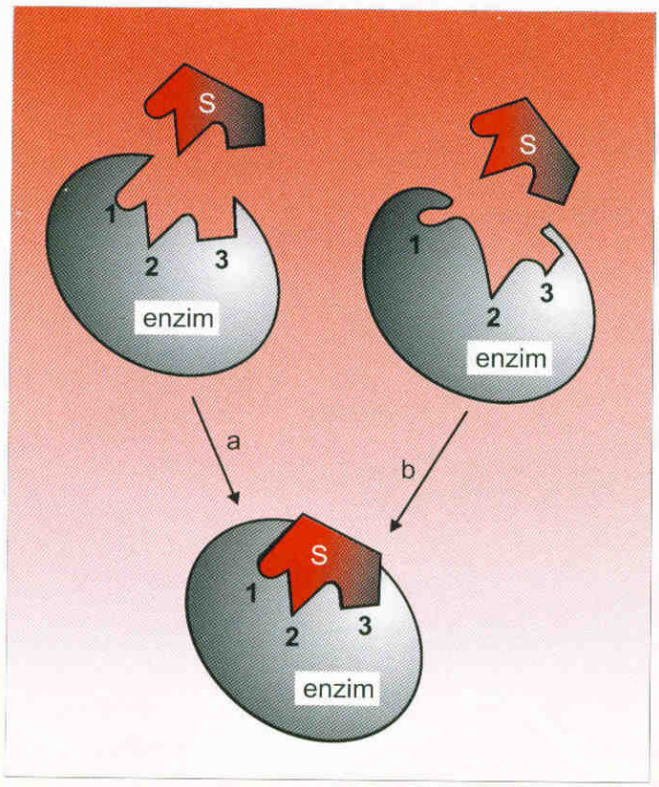
Az enzimek szerkezete olyan mértékben specializálódott egy-egy bizonyos molekulával történő kapcsolatra, hogy csak azzal nagyon analóg szerkezetű molekulát képes felismerni és már nagyon kis különbségek (mint pl. a diasztereoizomérek közti különbség) esetén sem jön létre a kapcsolat. Ezért az enzimek igen specifikusak a szubsztrátjukra nézve. Ugyancsak igen specifikusak abból a szempontból, hogy egy adott enzim egy adott molekulának csak bizonyos átalakulását képes katalizálni, másfajta reakcióhoz egy másik fehérje szükséges.

Minthogy az enzimek kizárólag egy bizonyos reakció aktiválási energiáját csökkentik, de nem változtatják meg a szubsztrátjaik, illetve produktumaik kezdeti és végállapotához tartozó termodinamikai paramétereket, nem változtatják meg a reakció egyensúlyi állapotát. Egy enzim mindkét irányban képes meggyorsítani a reakciót (vagyis a szubsztrátok átalakulását produktummá, illetve a produktum visszaalakulását szubsztráttá), a reakció tényleges irányát nem a működő enzim, hanem a kiindulási és végállapot közti szabadenergia-változás iránya határozza meg. (A szabadenergia-változásnak van a kiindulási anyagok és végtermékek koncentrációjától függő komponense is, lásd 2.1. fejezet). Az élő szervezetben az enzimek által katalizált reakciók nettó eredményüket tekintve mindig a szabadenergia-csökkenés irányában mennek végbe. Ez nem azt jelenti, hogy az élő szervezetben nem mehetnek végbe olyan reakciók, amelyek önmagukban szabadenergia-növekedéssel járnának, csak azt jelenti, hogy egy ilyen típusú reakcióhoz mindig kapcsolódik egy másik reakció is, amely viszont szabadenergia-csökkenéssel jár (kapcsolt reakciók). Az enzimek szerkezete megengedi, hogy rajtuk több, különféle kötőhely egyszerre, koordináltan funkcionáljon és ezért léteznek olyan enzimek, melyek több reakciót képesek összekapcsolni. Az átalakulás irányát ilyenkor az együttes reakciók nettó szabadenergia-csökkenése határozza meg.

Az enzim–szubsztrát komplex kialakulása

A szubsztrátok az enzim szerkezetének egy speciális régiójához kötődnek **(szubsztrátkötő hely)**, amely az ún. **aktív helyhez** tartozik. Az aktív helyhez tartoznak még azok a katalitikus csoportoknak nevezett aminosav-oldalláncok is, amelyek részt vesznek a szubsztrátok átalakításának folyamatában. (Vannak olyan enzimek is, amelyek működé-

sükhöz **prosztetikus csoportokat** vesznek segítségül. Ezek kis molekulatömegű, nem polipeptid természetű molekulák, igen sok közülük vitamin természetű anyag származéka. Az enzimre jellemző prosztetikus csoport ugyancsak az aktív helyhez kötődik. Vannak olyan enzimek is, amelyekben egy fémion is fontos szerepet játszik az aktív hely funkciójában.) Az aktív hely felépítésében az enzim szerkezetének csak kis része vesz részt. Azok az aminosav-oldalláncok, amelyek az aktív helyet alkotják, a polipeptidlánc elsődleges, lineáris szerkezetét jelentő aminosavszekvenciában gyakran egymástól távol helyezkednek el és csak az enzim harmadlagos szerkezetének kialakulásakor kerülnek egymás közelébe és hozzák létre azt a pontos, háromdimenziós struktúrát, amely az aktív helyet jelenti. Az enzim szubsztrátkötő helyét alkotó oldalláncok és a szubsztrát közötti kapcsolatot **gyenge, reverzibilis kölcsönhatások** (elektrosztatikus kötések, hidrogénhidak és hidrofób kölcsönhatások) sokasága biztosítja.



1-20. ábra. A szubsztrát enzimhez való kötődése a kulcs-zár modell szerint, illetve az indukált illeszkedés alapján. *(a) Kulcs-zár modell: a szubsztrátkötő hely térben pontosan meghatározott szerkezete már az enzim szabad állapotában is pontos kiegészítője a szubsztrát szerkezetének. (b) Indukált illeszkedés (induced fit): a szubsztrát és a szubsztrátkötő helyet alkotó egyes csoportok kölcsönhatása hozza létre a komplementer szerkezetet*

Az aktív hely az ismert szerkezetű enzimek esetén az enzim harmadlagos szerkezete által alkotott résben vagy nyílásban helyezkedik el, a szubsztrátok kötődésekor a víz kizáródik e résből, hacsak nem vesz részt partnerként a reakcióban.

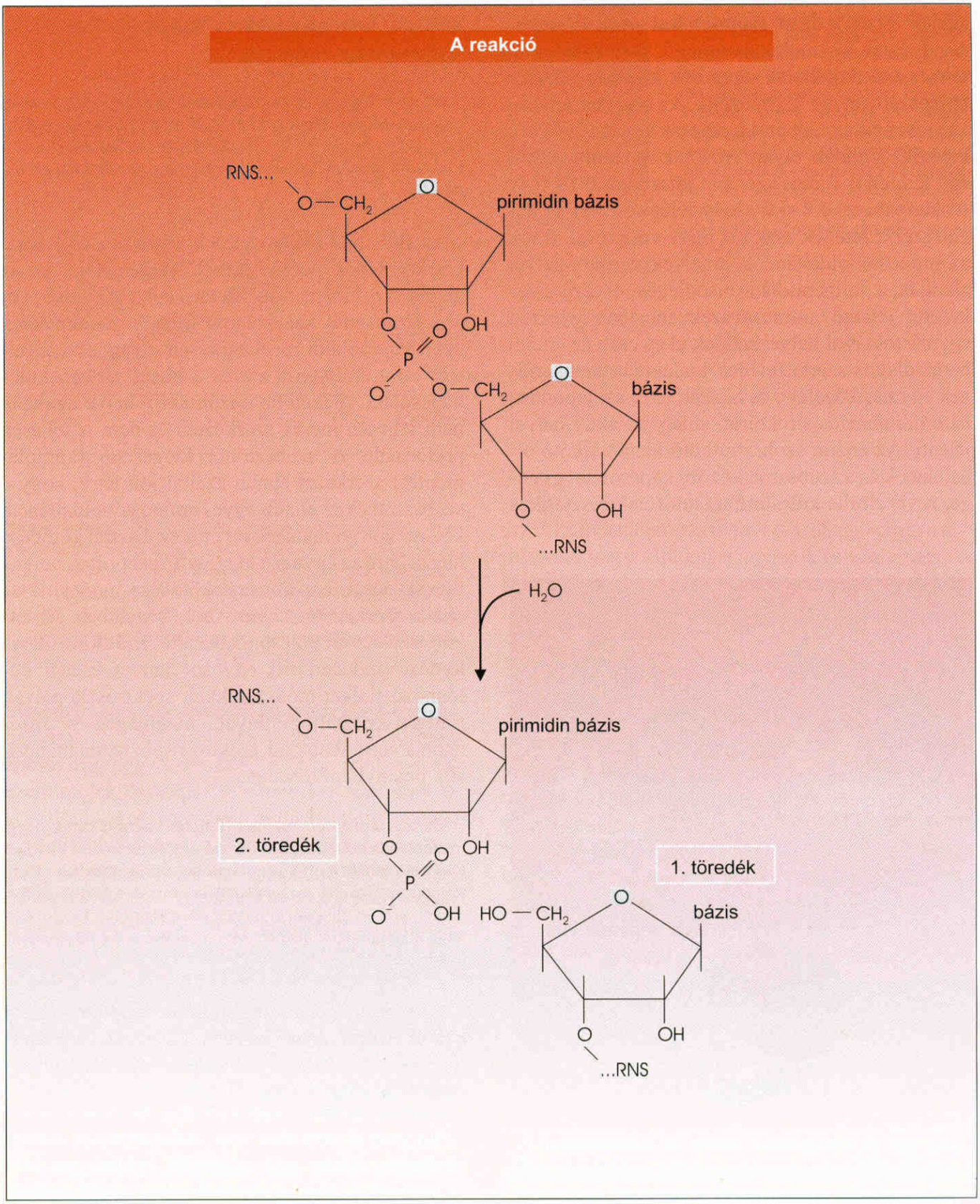
Az aktív hely szubsztrátot kötő része a szubsztrát szerkezetének pontos térbeli kiegészítője, ez az alapja az enzim specificitásának. Az első enzim–szubsztrát kapcsolattal foglalkozó elméletek ezt a kapcsolatot mechanikusan olyannak képzelték, mint amilyen a zár és a hozzá tartozó kulcs kapcsolata. A legtöbb enzim aktív helye azonban nem teljesen merev szerkezetű és nem is teljesen preformált. A szubsztrátot kiegészítő (komplementer) szerkezet éppen azáltal jön létre, hogy a szubsztrát és az enzim egyes aminosav-oldalláncai közötti kölcsönhatások révén a szubsztrát kötődése hozza létre az egymást kiegészítő csoportok pontos illeszkedését, a szubsztrát kötődése módosítja az enzim szerkezetét az aktív hely közelében. Az enzim–szubsztrát kölcsönhatás által **indukált illeszkedést** (induced fit) egy sor enzim esetén különböző fizikai módszerekkel: spektroszkópiával, röntgen-krisztallográfiával, magmágneses rezonancia vizsgálatokkal, elektron-spin rezonanciával stb. bizonyítani lehetett.

Ma már a legtöbb enzimet (fehérjét) nem tekintik rideg, mozdulatlan szerkezetnek, hanem úgy vélik és erre bizonyítékok is vannak, hogy egy enzimfehérje több, meghatározott, termodinamikailag megengedett konformációban is előfordulhat, szabad állapotban mozog ezen állapotok között, és a natív állapot tulajdonképen ezen megengedett konformációk összesége.

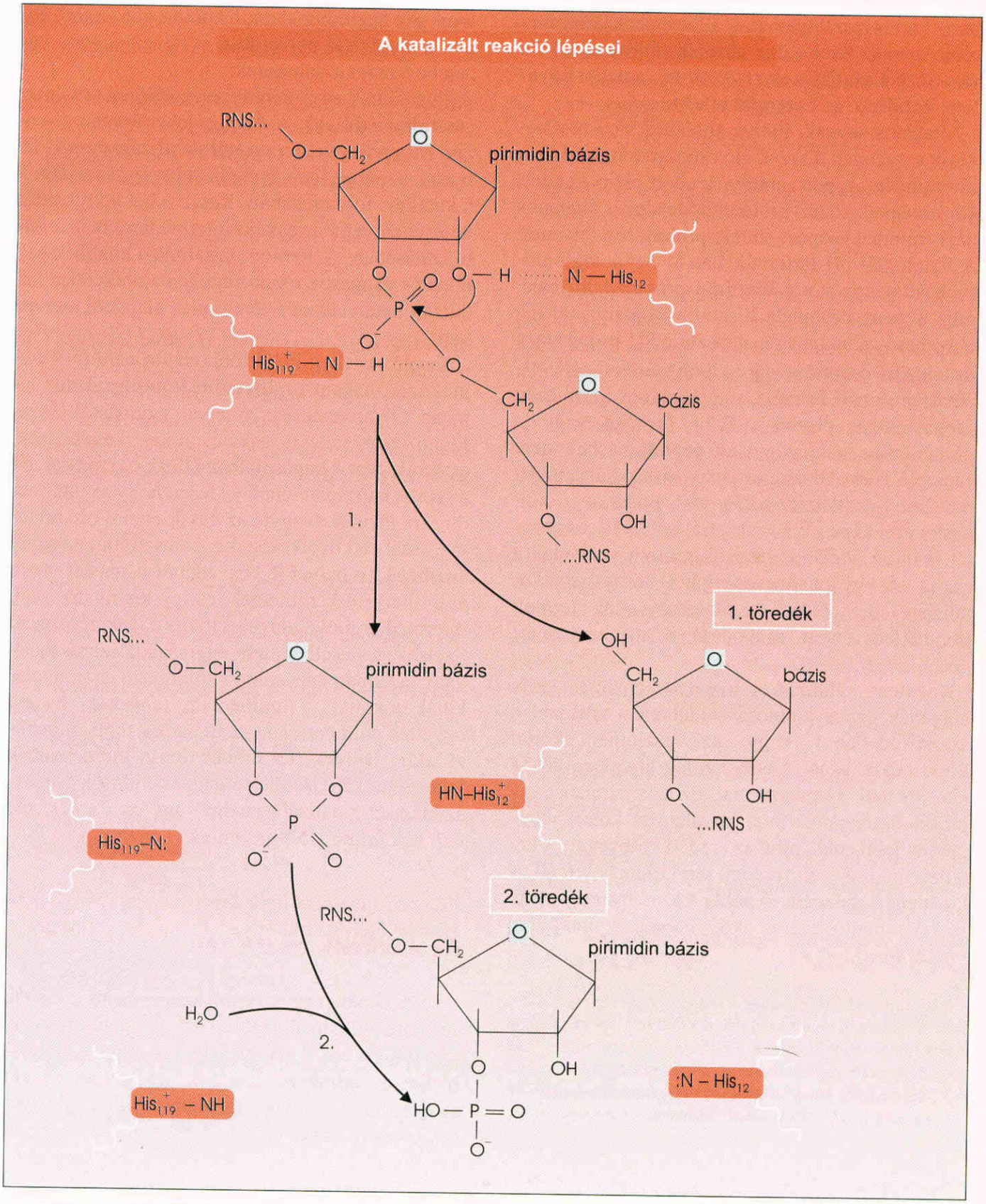
A szubsztrát és a szubsztrátkötő hely oldalláncai közötti kölcsönhatás a szubsztrát szerkezetében is torzulást okozhat, ez a torzulás is hozzájárulhat a tranzíciós állapot kialakulásához *(1-20. ábra)*.

A katalízisben szerepet játszó tényezők

Ma már igen jól ismerik egy sor enzim által katalizált reakció esetén az enzim aktív helyét alkotó aminosav-oldalláncok pontos szerepét a szubsztrát átalakulásában. A legtöbb reakció lényegében né-



1-21. ábra. Sav-bázis katalízis mechanizmusa a ribonukleáz enzim aktív helyén. *A pancreas-ribonukleáz a ribonukleinsav molekulákat úgy hasítja rövidebb molekulákra, hogy egy pirimidinbázist tartalmazó nukleotid ribózának 3'OH-ja és a szomszédos ribóz egység 5'OH-ja közti foszfodiészter kötést az 5'-oldalon hidrolitikusan elbont. A ribonukleáz aktív centrumában két* **hisztidin oldallánc**, *az aminosavsorrendben a 12. és 119. helyen levő két csoport végzi a sav-bázis katalízist. A* His_{12} *a reakció első lépésében bázisként működik és a foszfodiészterkötés 3'-oldalán levő ribóz 2'OH-jától protont von el. A* His_{119} *viszont savként viselkedik*



és protont ad át, aminek következtében a foszfodiészterkötés az 5'-oldalon elhasad. Az új szabad 5'OH-val rendelkező RNS-töredék disszociál az enzimről, a foszfodiészterkötés 3' oldalán levő ribózon pedig kialakul egy 2'-észter-kötés is (ciklikus 2',3'-foszfát képződik.). A katalízis második lépéseként a His_{119} *működik bázisként és protont vesz fel egy vízmolekulától, amelynek maradéka megbontja a ciklikus foszfátésztert, miközben a* His_{12} *most már savként viselkedik és visszaadja a protont a ribóz 2' pozícióban levő OH-jának. Így már disszociálhat az enzimről a második RNS-töredék is, amely 3'-végén foszfátésztert tartalmaz*

hány fontos részfolyamaton, illetve azok kombinációin alapul. Ezek közé tartozik többek között a **sav-bázis katalízisnek** nevezett folyamat, a **kovalens katalízis**, az **entrópia effektus**.

Általános savnak, illetve általános bázisnak nevezik a gyengén disszociáló csoportokat, általános sav minden csoport, amely az adott pH-n és adott körülmények között protont tud leadni és általános bázis minden csoport, amely protont tud felvenni. A fiziológiás pH-tartományban az egyik legfontosabb általános sav a hisztidin protonált formája, míg a nem protonált hisztidin általános bázis. Ugyancsak általános sav a cisztein SH-csoportja, a tirozin OH-csoportja vagy a lizin ε-amino-csoportjának protonált formája, míg általános bázis ezen csoportoknak proton nélküli formája vagy a glutaminsav, aszparaginsav peptidkötésben nem szereplő karboxil-csoportjának disszociált alakja. Sav-bázis katalízis során az általános savak protonálni képesek a szubsztrát valamely csoportját, míg az általános bázisok protont vonzanak a szubsztrát egy másik csoportjától. A sav-bázis katalízisre jó példa a pancreas által termelt ribonukleáz enzim működésének mechanizmusa *(1-21. ábra)*.

Kovalens katalíziskor bizonyos enzimek aktív helyének egyes aminosav-oldalláncai (például a szerin-oldallánc) vagy az enzimhez kötött prosztetikus csoport átmenetileg kovalens kötést létesíthetnek a szubsztráttal. Ez az enzimhez vagy prosztetikus csoporthoz kovalensen kötött intermedier labilisabb, mint az eredeti szubsztrát. A katalízis után az enzim eredeti szerkezete helyreáll. A kovalens katalízisre jó példa a kimotripszin nevű, fehérjét bontó enzim aktív helyének működése *(1-22. ábra)*.

A fehérjéket bontó enzimeket proteázoknak nevezik. Aktív helyük jellemző, fontos szerepet betöltő komponense alapján megkülönböztetnek szerin-, cisztein-, aszparaginsav- és metalloproteázokat. A kimotripszin a **szerin-proteázok** közé tartozik, az általa katalizált reakció mechanizmusa jellemző a többi szerin-proteáz által katalizált reakció mechanizmusára is.

Az entrópia effektus több szubsztrátos reakcióknál érvényesül, és a rendszer rendezetlenségének átmeneti csökkentését jelenti. Ha két szubsztrát oldatban van, annak valószínűsége, hogy megfelelő orientációban kerülnek egymás közelébe, nagyon kicsi. Az enzimhez történő kötődéskor viszont éppen a megfelelő pozícióban kerülnek egymás közelébe a reagáló partnerek.

Az enzimek egy jelentős része fémiont tartalmaz **(metalloenzimek)**. A fémion lehet csupán az enzim harmadlagos szerkezetét stabilizáló passzív tényező, azonban igen gyakran aktív szerepet játszik a katalízis folyamatában. Részt vehet a szubsztrát kötésében vagy a reakció intermedierjeinek a stabilizálásában. A fémiont tartalmazó enzimek egy jelentős csoportja oxido-redukciós reakciókat katalizál, amelyekben a fémionnak alapvető szerepe van.

Az élő sejteken belül több enzim nem önállóan működik, hanem **multienzim komplexek** formájában. Olyan enzimek, amelyek egymással összefüggő reakciókat, reakciósorokat katalizálnak, gyakran szoros kapcsolatban állnak egymással. Ez a szoros kapcsolat lehetővé teszi, hogy az intermedier molekulák (vagyis az egyik enzim produktuma, amely a következőnek a szubsztrátja) az egyik enzim aktív helyéről közvetlenül a másik enzim aktív helyére kerülhetnek, és így kis mennyiségű intermedier molekulával is gyors a reakciósorozat. Szélsőséges esetben nem egymáshoz szorosabban vagy lazábban kapcsolódó különböző enzimmolekulák alkotják a multienzim rendszert, hanem egyetlen polipeptidlánc rendelkezik több különböző aktív hellyel. (Ez utóbbi típusú multienzimek jellegzetes képviselője például az emlősök zsírsavszintézisét katalizáló enzim vagy az *Escherichia coli* baktérium DNS-polimeráz I enzime.)

Az enzimek osztályai

Az enzimeket egyszerűbb azonosításuk céljából, az általuk katalizált reakció jellege szerint hat osztályba sorolták. A hat osztály mindegyike alosztályokat is tartalmaz, amelyek ugyancsak további csoportokra oszlanak. Az osztályokat, alosztályokat, csoportokat és ezeken belül magukat az egyes enzimeket arab számokkal jelölik, egy-egy enzimet ilyen módon négy szám határoz meg (például az alkohol:NAD-oxidoreduktáz enzim száma 1.1.1.1.).

Az enzimek szisztematikus nevében előbb a szubsztrát(ok) neve, majd a katalizált reakció (-áz

végződéssel) szerepel. A hat nagy osztály a következők szerint csoportosítja az enzimeket.

❶ **Oxidoreduktázok.** Az ebbe az osztályba sorolt enzimek mind oxidációs-redukciós reakciókat katalizálnak, a különböző alosztályokat a különböző mechanizmussal működő enzimek alkotják.

Például:
etanol + NAD^+ ↔ acetaldehid + NADH + H^+.

❷ **Transzferázok.** Az ebbe az osztályba sorolt enzimek funkcionális csoportokat visznek át egyik szubsztrátról a másikra (vagy ugyanazon szubsztrát egyik csoportjáról a másikra). A különböző alosztályokat a különböző típusú funkcionális csoportok átvitelét katalizáló enzimek képezik.

Például:
glukóz + ATP → glukóz-6-foszfát + ADP.

A foszfotranszferáz aktivitással rendelkező enzimeket kinázoknak is szokták nevezni.

❸ **Hidrolázok.** Az ebbe az osztályba sorolt enzimek jellegzetessége, hogy víz segítségével hasítanak el különböző kötéseket.

Például:
glukóz-6-foszfát + H_2O → glukóz + anorganikus foszfát.

❹ **Liázok.** Ezen enzimek által katalizált reakciók során víz, ammónia, szén-dioxid vagy valamilyen más molekula adódik egy molekulához, vagy vonódik el egy molekulából.

Például:
2-foszfoglicerát ↔ foszfoenol-piruvát + H_2O.

❺ **Izomerázok.** Különböző típusú izomerizációkat (cisz-transz, aldóz-ketóz, epimerizáció stb.) katalizáló enzimek.

Például:
glukóz-6-foszfát ↔ fruktóz-6-foszfát.

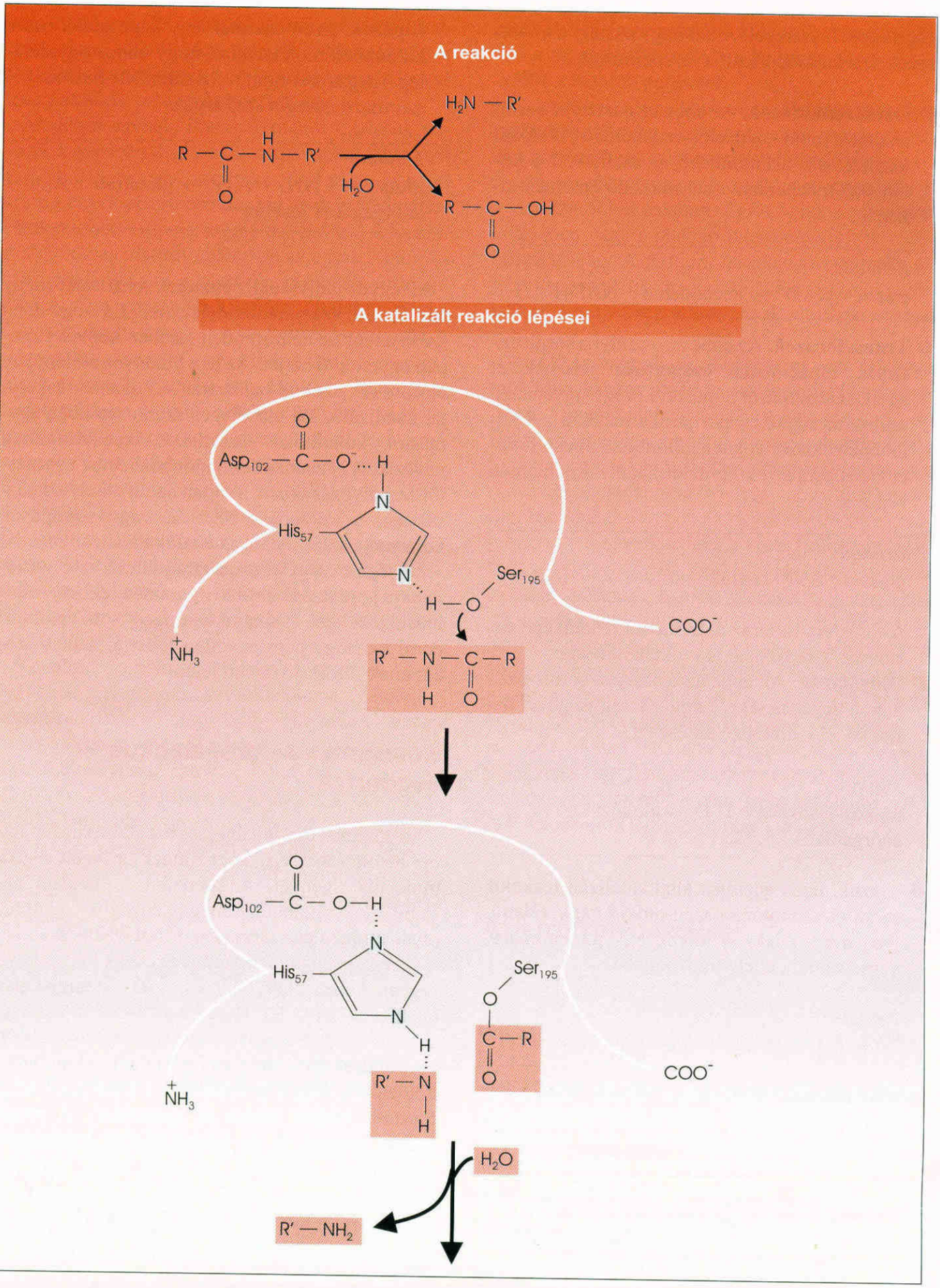
❻ **Ligázok.** Ezen enzimek úgy kapcsolnak össze különböző molekulákat, hogy ehhez egyidejűleg magas energiájú foszfátkötés hasításából származó energia szükséges.

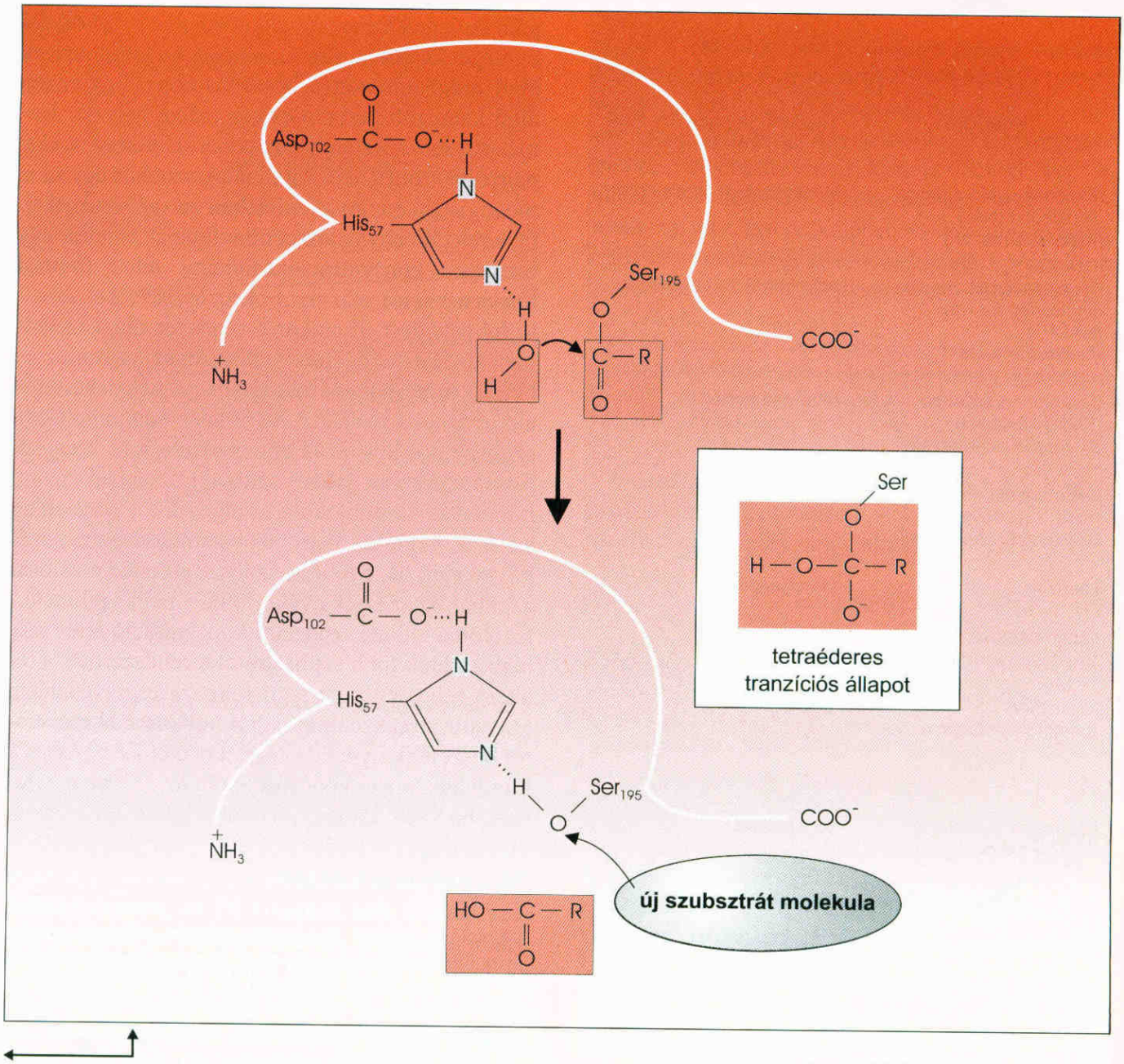
Például:
glutamát + NH_3 + ATP → glutamin + ADP + anorganikus foszfát.

Az egyes individuális enzimek tehát saját (négy tagból álló) számmal rendelkeznek. Egy-egy ilyen szám azonban nem minden esetben képvisel csupán egyetlen fehérjét. Az egy bizonyos élőlényben előforduló, azonos szubsztrát(ok) azonos reakcióját katalizáló, ám elsődleges szerkezetükben egymástól különböző enzimeket **izoenzimeknek** nevezik. Az izoenzimek különbözhetnek egymástól szabályozásukban, a sejten belüli elhelyezkedésükben, a különböző szervek vagy sejttípusok közti megoszlásukban, az általuk katalizált reakció sebességére vagy a szubsztrátjukhoz való viszonyukra jellemző kvantitatív paraméterekben, stabilitásukban stb. Napjainkban igen sok enzimről derül ki, hogy nem egyetlen fehérje, hanem izoenzimek formájában van jelen.

Koenzimek és prosztetikus csoportok

Az enzimek egy jelentős része katalitikus funkciója betöltéséhez egy koenzimnek nevezett segédmolekulát igényel. A koenzimek általában hőstabil, kis molekulatömegű anyagok, gyakran olyan molekulák származékai, amelyeket az emberi szervezet egyáltalán nem vagy csak kis mennyiségben képes előállítani és ezért vitaminként a táplálékból vesz fel. Ha a koenzim és enzim kapcsolata nagyon szoros, a koenzimet **prosztetikus csoportnak** nevezik. (Az így kialakuló komplex a holoenzim, míg a prosztetikus csoportjától megfosztott, inaktív enzim az apoenzim). A prosztetikus csoport és az enzim közötti kapcsolatot szélsőséges esetekben kovalens kötés biztosítja (például liponsav, biotin esetében), máskor a szoros kapcsolat kovalens kötés nélkül is létrejön. A koenzim és enzim kapcsolatának másik szélsősé-


A reakció
H2N — R'
R — C — H N — R'
O
H2O
R — C — OH
O
A katalizált reakció lépései
Asp102 — C — O⁻ ... H
O
N
His57
N
Ser195
H — O
COO⁻
+NH3
R' — N — C — R
H O
Asp102 — C — O — H
O
N
His57
N
H
Ser195
O
C — R
O
COO⁻
+NH3
R' — N
H
H2O
R' — NH2



1-22. ábra. Kovalens katalízis a kimotripszin aktív helyén. *A kimotripszin fehérjék peptidkötését hidrolitikusan bontó enzim, amely katalitikus centrumában* **reaktív szerin oldalláncot** *tartalmaz* **(szerin-proteáz)**. *A katalízis során átmenetileg a reaktív szerin- (Ser_{195}) oldalláncához kovalensen kötve tartja az egyik fehérjetöredéket. Ahhoz, hogy a Ser_{195} reaktív legyen, az aktív helyhez tartozó más csoportok, egy aszparaginsav- (Asp_{102}) és egy hisztidin- (His_{57}) oldallánc közreműködése is szükséges. A (pH 7,4-en) disszociált állapotban levő Asp_{102} protont von el a His_{57}-től, ez viszont a Ser_{195}-től von el protont. Az ilyen módon reaktivvá tett szerin megtámadja a szubsztrátban levő stabil peptidkötést és a karbonilcsoportot tartalmazó töredékkel instabil kovalens kötést létesít (instabil acilált enzim képződik), míg a peptidkötésben levő nitrogén oldalához tartozó töredéken szabad NH_2-vég alakul ki és disszociál az enzimről. A Ser_{195}-höz instabil észterkötéssel csatlakozó másik töredék hidrolitikus hasítása a reakció leglassabban végbemenő lépése. Egy vízmolekula megbontja ezt az észterkötést, ennek eredményeként az újonnan kialakuló szabad karboxilcsoporttal rendelkező második töredék is disszociálhat az enzimről, míg a vízből származó proton helyreállítja a katalitikus helyhez tartozó csoportok eredeti állapotát*

ges esetével találkozunk olyankor, amikor a koenzim sokkal lazább, asszociációs-disszociációs viszonyban áll az enzimmel, úgy viselkedik mint egy szubsztrát (leggyakrabban így viselkedik, például, a NAD^+, $NADP^+$, tetrahidrofolsav). A biokémiai reakciókban leggyakrabban előforduló koenzimeket az *1-1. táblázat* foglalja össze.

1-1. táblázat. A leggyakrabban működő koenzimek és szerepük

Koenzim	Reakció (a koenzim által szállított csoport)
Nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) (niacinszármazék)	hidrogénatom és elektron
Nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát ($NADP^+$) (niacinszármazék)	hidrogénatom és elektron
flavin-mononukleotid (FMN) (riboflavin, B_2-vitamin-származék)	hidrogénatom
flavin-adenin-dinukleotid (FAD) (riboflavin, B_2-vitamin-származék)	hidrogénatom
koenzim Q	hidrogénatom
tiamin-pirofoszfát (tiamin, B_1-vitamin-származék)	aldehid
koenzim-A (pantoténsavszármazék)	acilcsoport
liponsav	acilcsoport
kobalamid (kobalamin, B_{12}-vitamin-származék)	alkilcsoport
biotin (B-vitamin-csoport)	szén-dioxid-fixálás
piridoxál-foszfát (piridoxin, B_6-vitamin-származék)	aminocsoport
tetrahidrofolsav (folsavszármazék)	metil-, metilén-, formil- és formiminocsoport

A Michaelis–Menten-modell

Az enzim–szubsztrát komplex létezésének első bizonyítékát, már jóval a modern fizikokémiai módszerek használata előtt, az enzim által katalizált reakció sebességének az analízise nyújtotta.

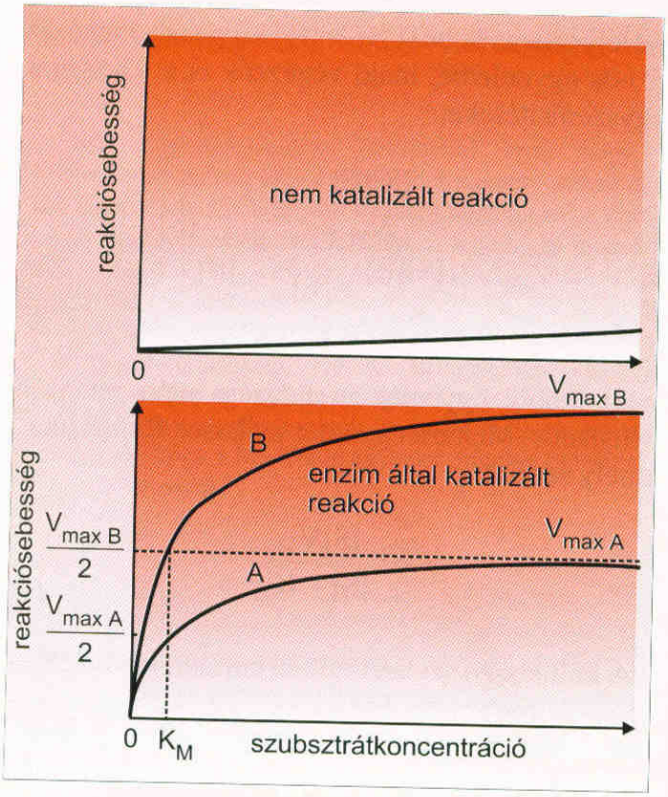
Reakciósebesség **(v)** alatt az időegység alatt átalakuló szubsztrát vagy időegység alatt képződő produktum mennyiségét értjük. A nem katalizált kémiai reakciók sebessége a reakcióban részt vevő anyag(ok) koncentrációjának a függvénye, a reagáló anyagok koncentrációját emelve a reakció sebessége folyamatosan emelkedik (a körülmények által meghatározott sebességhatárig). Egy enzim által katalizált reakció esetén más a helyzet. Természetesen a katalizált reakció sebessége sokkal nagyobb, mint a nem katalizálté, azonban egy adott mennyiségű enzim jelenlétében vizsgálva a reakciót, a reagáló anyag koncentrációjának emelése egy bizonyos koncentrációtartomány felett **(telítési koncentráció)** már nem okoz észrevehető sebességnövekedést. Ilyenkor a rendszer megközelítőleg az elérhető maximális reakciósebességgel **(V_{max})** működik. A maximális reakciósebességet akkor éri el a rendszer, ha minden enzimmolekula szubsztrátot köt, azaz enzim–szubsztrát komplex formájában van jelen, nincs több szabad enzim, minden enzimmolekula „dolgozik". (Elméletileg ez csak végtelen nagy szubsztrátkoncentrációnál következik be, a telítési szubsztrátkoncentrációnál azonban ez az érték gyakorlatilag megközelíthető.) E fölött a telítési szubsztrátkoncentráció felett már hiába adunk több szubsztrátot a rendszerhez, a reakció sebességét ez nem fokozza észrevehetően. (A szubsztrát szempontjából nulladrendű reakcióról beszélünk ilyenkor, mert a reakció sebességét a kiindulási anyag koncentrációja tovább nem befolyásolja.) Ha azonban a rendszerben levő enzim mennyiségét növeljük, ezzel már tovább növelhetjük a reakció sebességét.

A telítést mutató koncentrációfüggés jellemző minden olyan biokémiai jelenségre, amelyben egy fehérje molekula egy másik molekulát **(ligandot)** köt reverzibilis kölcsönhatások segítségével, és így disszociációra képes fehérje–ligand komplex jön létre *(1-23. ábra)*.

A modell, amely leírja az enzimek által katalizált legegyszerűbb reakció menetét, *L. Michaelis*től és *M. Menten*től származik. A lényege e modellnek, hogy a katalízis folyamatának elkerülhetetlen lépése a specifikus enzim–szubsztrát komplex létrejötte. Bizonyos egyszerűsítések figyelembevételével a reakciót a következő egyenlet írja le:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad (1)$$

Az enzim–szubsztrát komplex (ES) a szabad enzimből (E) és szabad szubsztrátból (S) jön létre (k_1



1-23. ábra. Egy enzim által katalizált reakció sebessége a szubsztrátkoncentráció függvényében. *B görbe esetében az enzim mennyisége kétszerese az A görbéhez tartozó értéknek*

sebességi állandóval), kialakulása azonban reverzibilis folyamat, az ES komplex szét is eshet szabad enzimre és szubsztrátra (k_2 sebességi állandóval). Másrészt viszont a produktum (P) csak az ES komplexen keresztül képződhet, az ES komplex, átalakulása után szabad enzimre és produktumra esik szét (k_3 sebességi állandóval). Ha a reakciónak csak a **kezdeti sebességét** vizsgáljuk, amikor még nagyon kevés produktum képződött és ezért P koncentrációja nagyon kicsi, akkor P visszaalakulásának a sebessége gyakorlatilag elhanyagolható, és az ES-ből (E + P)-vé történő átalakulást egyirányúnak tekinthetjük.

A modell egyszerű kezelésének ugyancsak fontos feltételei, hogy a szubsztrát koncentrációjának az enzim koncentrációjánál nagyságrendekkel kell nagyobbnak lennie és hogy a vizsgált időtartam alatt az eredeti szubsztrátkoncentrációhoz képest gyakorlatilag elhanyagolható mennyiségű szubsztrát alakuljon át. Ilyen feltételek mellett a szabad szubsztrát koncentrációját gyakorlatilag azonosíthatjuk azzal a kiindulási szubsztrátkoncentrációval, amelyet mi állítunk be, és amely mellett vizsgálni kívánjuk a reakció sebességét. Vizsgáljuk meg tehát, hogy egy adott enzimkoncentráció mellett (az összes enzim koncentrációja $[E_t]$), az általunk kiválasztott szubsztrátkoncentráció [S] mekkora kezdeti reakciósebességet eredményez. (A reakciósebesség, azaz a v egyenlő a produktum koncentrációjának időegységre eső változásával.)

Ha valóban kezdeti sebességet vizsgálunk és tartjuk magunkat az előzőekben ismertetett feltételekhez, akkor a kiválasztott szubsztrátkoncentrációnál mérhető v érték a vizsgálat tartama alatt nem változik!

A Michaelis–Menten-modellből látható, hogy a produktum képződésének sebessége az enzim–szubsztrát komplex koncentrációjától [ES] függ.

$$v = k_3[ES] \qquad (2)$$

Egy adott $[E_t]$ enzimkoncentráció mellett az enzimmolekulák egy része szabad enzimként, más része enzim-szubsztrát komplexként van jelen:

$$[E_t] = [ES] + [E] \qquad (3)$$

A reakciót katalizáló enzimünk akkor működik a maximális sebességgel (V_{max}), ha az összes enzimmolekula (E_t) enzim–szubsztrát komplex formában van (ilyenkor [ES] = $[E_t]$), a maximális sebesség tehát:

$$V_{max} = k_3[E_t] \qquad (4)$$

Könnyen belátható, hogy egy általunk választott szubsztrátkoncentrációnál mérhető kezdeti reakciósebesség úgy aránylik a lehetséges maximális sebességhez, ahogy az ennél a szubsztrátkoncentrációnál kialakuló enzim–szubsztrát komplex koncentráció [ES] aránylik az összes enzim koncentrációjához $[E_t]$:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E_t]} \qquad (5)$$

Mi határozza meg az enzim–szubsztrát komplex koncentrációját az általunk választott szubsztrátkoncentráció mellett? Mint az *(1)* egyenletből lát-

ható, ES koncentrációja [ES] attól függ, hogy kialakulásának sebessége hogyan viszonylik elbomlásának sebességéhez. ES csak egyféle módon alakul ki, egy k_1 sebességi állandóval, kialakulásának sebessége a szabad enzim koncentrációjától és a szabad szubsztrát koncentrációjától függ (feltételeink között a szabad szubsztrát koncentráció azonos a kiválasztott szubsztrát koncentrációval):

ES kialakulásának sebessége = k_1 [E][S]

Elbomlani azonban az enzim–szubsztrát komplex két úton is tud. Vagy szétesik szabad enzimre és szubsztrátra egy k_2 sebességi állandóval, vagy átalakul és k_3 sebességi állandóval szabad enzim és produktum képződik belőle.

ES elbomlásának sebessége = k_2[ES] + k_3[ES] = (k_2+k_3)[ES]

A reakció megindulása után igen gyorsan beáll a **stacionárius állapot** (steady state), amelyre jellemző, hogy ES kialakulásának és elbomlásának sebessége azonos:

$$k_1[E][S] = (k_2+k_3)[ES] \qquad (6)$$

A stacionárius állapotot leíró egyenletből az enzim–szubsztrát komplex koncentrációja kifejezhető:

$$[E]\,[S]=\frac{(k_2 + k_3)}{k_1}\,[ES], \text{ vagyis } [ES]=\frac{[E][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1}}$$

A $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$ összefüggésből adódó érték konstans érték, ezt Michaelis-konstansnak (K_M) nevezik.

A K_M felhasználásával összefüggésünk a következőképen alakul:

$$[ES]=\frac{[E]\,[S]}{K_M} \qquad (7)$$

A *(3)*-as egyenletet figyelembe véve:

$$[E_t]=\frac{[E]\,[S]}{K_M}+[E]$$

Helyettesítsük be [ES] és [E_t] kifejezett értékét az *(5)*-ös egyenletbe, majd végezzük el a lehetséges egyszerűsítéseket:

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

Ez utóbbi egyenlet átrendezése után jutunk a Michaelis–Menten-egyenlet szokásos formájához, amely szerint:

$$\mathbf{v}=\frac{\mathbf{[S]V_{max}}}{\mathbf{[S]+K_M}} \qquad (8)$$

A különböző szubsztrátkoncentrációknál mérhető reakciósebesség értékét egy derékszögű hiperbola egyenlete írja le. Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor a reakciósebesség éppen a fele a maximális reakciósebességnek, vagyis

$$v = 0{,}5\ V_{max.}$$

$$0{,}5\ V_{max} = \frac{[S]V_{max}}{[S]+K_M}$$

átrendezve

$$[S]+ K_M = 2\ [S],$$

ilyenkor tehát K_M=[S].

A Michaelis-konstanst ezek szerint úgy is definiálhatjuk, hogy számértékileg egyenlő azzal a **szubsztrátkoncentrációval, amely mellett egy adott enzimmennyiség az általa elérhető maximális reakciósebesség felét éri el.** A különböző enzimek K_M értéke 10^{-7} és 10^{-2} mol/liter között van általában és meghatározott körülmények (hőmérséklet, pH, ionerősség stb.) között jellemző az enzim bizonyos szubsztráthoz fűződő viszonyára. (Minél kisebb érték a K_M, annál alacsonyabb szubsztrátkoncentrációnál képes az enzim „dolgozni". Fiziológiás viszonyok között az enzimek általában a K_M értékéhez közel álló szubsztrátkoncentrációknál működnek).

Egy enzim K_M és V_{max} értékét meghatározhatjuk, ha megmérjük az enzim által katalizált reakció

kezdeti sebességét különböző szubsztrátkoncentrációknál.

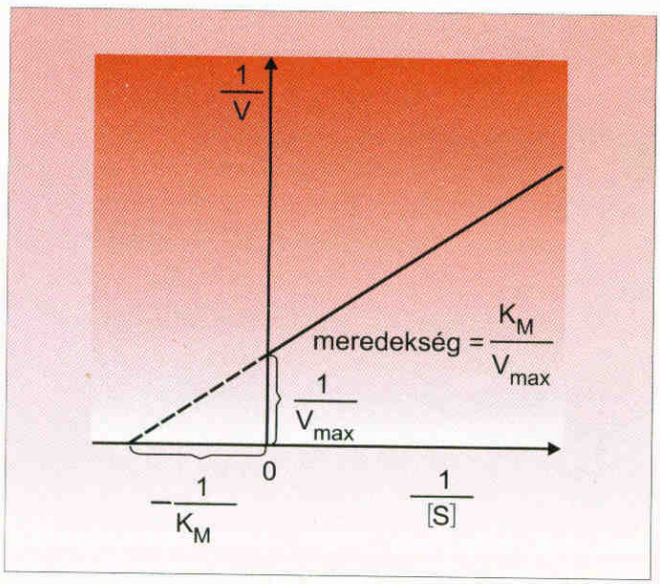
Ezek meghatározásához (tekintettel arra, hogy a Michaelis-egyenletet több évtizeddel a személyi számítógépek általános használata előtt kezdték alkalmazni) a derékszögű hiperbola egyenletét különböző lehetséges módokon transzformálták, így egyenes egyenletté alakították. Ezzel egyszerűbbé és jobban áttekinthetővé vált a K_M és V_{max} értékek számítása. A sok ismert linearizálási forma közül az itt bemutatásra kerülő kettős reciprok (Lineweaver–Burk-féle) ábrázolás csupán az egyik lehetséges változat, azonban meglehetősen gyakran alkalmazzák. A kettős reciprok értékhez úgy jutunk, hogy a Michaelis-egyenlet mindkét oldalának a reciprokát vesszük:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{[S]V_{max}}$$

az elvégezhető egyszerűsítések után:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$ (lásd 1-*24. ábra*)

Az elérhető maximális reakciósebesség (V_{max}) részben az enzim mennyiségétől, részben annak katalitikus képességétől függ. A katalitikus képességet az **átviteli szám** jellemzi, amely azt mondja meg, hogy egy molekula enzim időegység alatt hány molekula szubsztrát átalakulását képes katalizálni. (Az átviteli szám a Michaelis–Menten-modellben k_3-ként szerepel). A különböző enzimek átviteli száma általában másodpercenként 0,1 és 10^6 között van. Az átviteli szám ismeretében egy enzim koncentrációja (mennyisége) a maximális reakciósebességből kiszámítható. Ismert enzimek esetén (pl. a klinikai laboratóriumi gyakorlatban, gyári készítmények jellemzésekor) az enzim mennyiségét az **enzim aktivitásával** szokták jellemezni. Ez lényegében reakciósebességet jelent, vagyis azt, hogy a jelen levő enzimmennyiség szigorúan meghatározott feltételek és pontosan meghatározott (lehetőleg telítési) szubsztrátkoncentráció mellett, időegység alatt mennyi szubsztrát átalakulását (produktum képződését) katalizálja. Egysége (U) 1 mikromol/perc. (SI egysége a catal, 1 mol/s a gyakorlatban nem használható.) Egy enzim **fajlagos aktivitásáról** leginkább az enzim tisztítása során szoktak említést tenni. Fajlagos aktivitás alatt az egységnyi mennyiségű fehérjére eső enzimaktivitást (mikromol/perc/mg fehérje) értjük. Egy enzimpreparátum fajlagos aktivitása a tisztítás során növekszik, majd a teljesen tiszta enzim fehérjére jellemző értéken megáll. A növekedés oka a szennyező fehérjék mennyiségének csökkenése. (Egy enzim tisztítása során az enzim fehérjéből is veszítünk, de megfelelően megválasztott eljárás esetén csak a szennyező fehérjéktől szabadulunk meg, az enzim fehérje jelentős része megmarad.)



1-24. ábra. A Michaelis–Menten-egyenletnek megfelelő szubsztráttelítési görbe kettős reciprok (Lineweaver–Burk-féle) ábrázolásban

Enzimaktivitás mérésekor figyelembe kell venni, hogy az enzim meghatározott környezeti feltételek mellett (pH, hőmérséklet, ionerősség, esetleg fémionok jelenléte) működik. Az enzimek aktivitása egy bizonyos pH-tartományban általában optimumot mutat, de vannak olyan enzimek is, amelyek jól működnek egy meglehetősen széles pH-tartományban (amelyben szerkezetük még nem sérül). Az optimális pH a szubsztrát, illetve az enzim katalízis szempontjából fontos disszociáló csoportjaitól függ. A hőmérséklet emelése minden kémiai reakció sebességét fokozza, a fehérjék azonban a fiziológiásnál magasabb hőmérsékleten denaturálódnak, ezért aktivitásuknak hőmérsékleti optimuma is van. Az enzim–szubsztrát közötti reverzíbilis kölcsönhatásokat gyengíthetik, illetve a katalízis folyamatát befolyásolhatják a jelen levő ionok. Fémionok egyes enzimek esetében kofaktorként működhetnek.

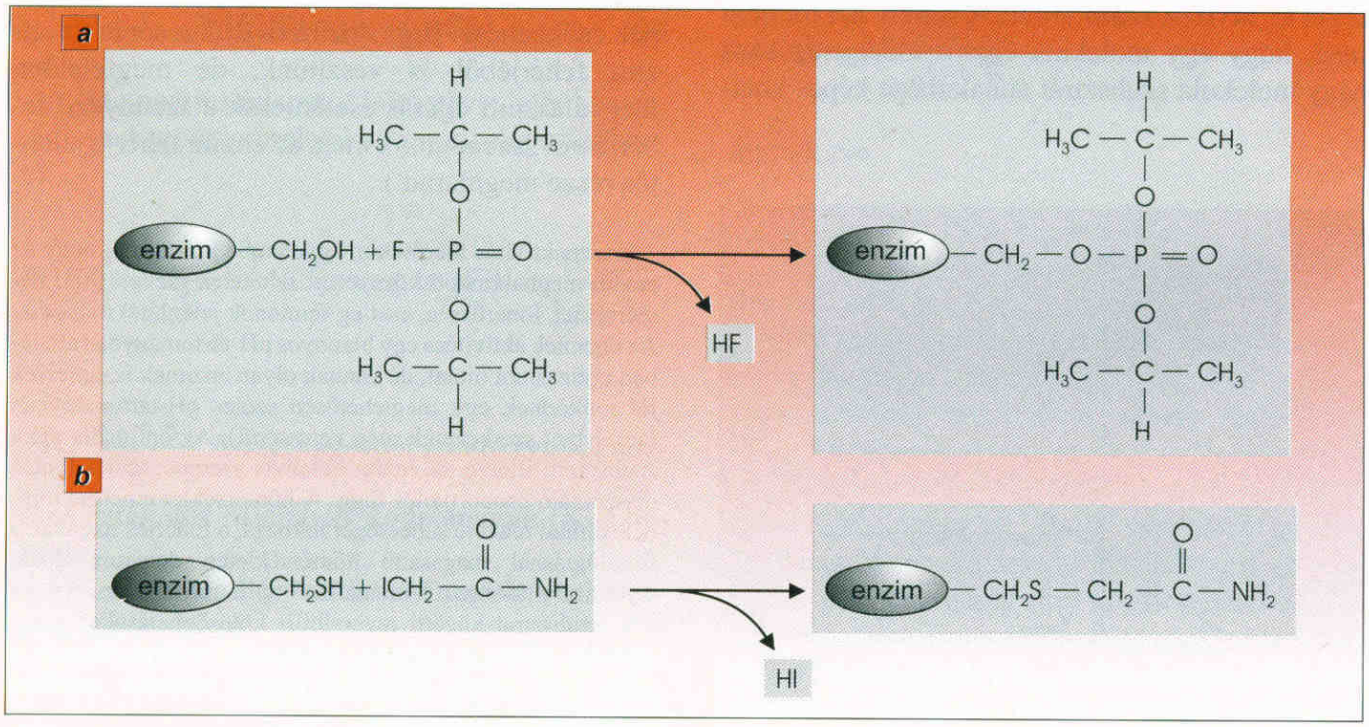
A Michaelis–Menten-modell és az ennek felhasználásával levezetett egyenlet a létező legegyszerűbb enzimreakcióra vonatkozik, csupán egyetlen szubsztrátot vesz figyelembe. A valóság-

ban azonban nagyon kevés enzim van, amelynek csupán egyetlen szubsztrát átalakulását kell katalizálnia, a legtöbb esetben legalább két szubsztrát vesz részt a reakcióban. Ezeket a reakciókat sokkal bonyolultabb módon lehet csak modellezni, a reakció jellege szerint. Ez lehet **szekvenciális**, amikor előbb az egyik, majd a másik szubsztrát kötődik az enzimhez egy hármas komplexet eredményezve és az átalakulás, majd a produktumok disszociációja is csak a hármas komplex kialakulása után történik meg. A szekvenciális reakciók csoportjában vannak olyanok, amelyekben a szubsztrátok csak szigorúan meghatározott sorrendben kötődhetnek, és vannak olyan reakciók, amelyekben a szubsztrátok kötődésének sorrendje véletlenszerű lehet. A másik csoportba tartoznak az ún. **ping-pong reakciók**, az ilyen reakciókban az első szubsztrát kötődését és átalakulását követi az első produktum disszociálása és csak ezután kötődik az enzimhez a második szubsztrát, amelynek átalakulása a második produktumot eredményezi. Ez utóbbi reakciótípusnál nem alakul ki hármas komplex.

Több szubsztrátos reakcióknál a maximális reakciósebességet telítési szubsztrátkoncentrációknál nem a Michaelis modellből ismert k_3 határozza meg egyedül, hanem több sebességi konstanstól függ. Ezért ezen reakciók maximális sebességének jellemzésére a k_3 helyett egy $\mathbf{k_{cat}}$ - tal jelzett, összetett sebességi konstanst szoktak használni. Egy enzim hatékonyságát valamely szubsztrát átalakításakor a $\mathbf{k_{cat}/KM}$ hányadossal szokták jellemezni.

Az enzimaktivitás gátlása

Az enzimek működését gátolni lehet reverzibilisen vagy irreverzibilisen. **Reverzibilis** gátláskor a gátló anyag (inhibitor molekula) gyenge kölcsönhatások segítségével kötődik az enzimhez és gyorsan disszociálni tud. **Irreverzibilis** gátlás akkor következik be, ha a gátló anyag nagyon erősen, legtöbbször kovalens kötéssel kapcsolódik az enzimhez, ezért nagyon lassan, vagy egyáltalán nem disszociál az enzimről.



1-25. ábra. Enzimek irreverzibilis gátlása aktív centrumuk kovalens módosításával. *(a) Az aktív centrumukban* **reaktív szerint** *tartalmazó enzimek gátolhatók diizopropil-fluor-foszfáttal (vagy ezzel analóg módon ható vegyületekkel). A diizopropil-fluor-foszfát az enzimet inaktív diizopropil-foszforil enzimmé alakítja. (b) Az aktív centrumukban levő vagy az aktív centrumukon kívül található, azonban a katalitikusan aktív konformáció fenntartása szempontjából kritikus ciszteinoldalláncot tartalmazó enzimek gátolhatóak alkilezőszerekkel (pl. jódacetamiddal), amelyek a ciszteinnel kovalens kötést képeznek*

Az irreverzibilis gátlás egyik "klasszikus" példája a katalitikus centrumukban reaktív szerin-oldalláncal rendelkező enzimek, pl. **szerin-proteázok** (kimotripszin, tripszin stb.), **észteráz** aktivitású enzimek (pl. az acetilkolin-észteráz) gátlása foszfortartalmú szerves vegyületekkel *(1-25a ábra)*. A katalitikus centrumukban cisztein-oldalláncot tartalmazó enzimeket pl. alkilezőszerekkel lehet irrevezíbilisen gátolni *(1-25b ábra)*.

Reverzibilis gátlások esetén a reakciósebesség analízise információt nyújt arra vonatkozólag, hogy a gátló anyag a szubsztrát enzimhez való kötődését akadályozza, vagy nem az enzim–szubsztrát komplex kialakulását befolyásolja, hanem a katalízis folyamatát gátolja. Ha a gátló anyag a szubsztrát enzimhez való kötődését akadályozza, **kompetitív gátlásról** beszélünk. Ilyenkor a szubsztrát és az inhibitor verseng egymással az enzimért, mert csak egyikük kötődhet az enzimhez. Ha az enzim–szubsztrát komplex kialakul, az inhibitor nem tud kötődni. A kompetitív inhibitor ezért csökkenti az enzim–szubsztrát kialakulásának valószínűségét egy adott szubsztrátkoncentrációnál, ha azonban emeljük a szubsztrát koncentrációját, az enzim–szubsztrát komplex mégis kialakul. Végtelen szubsztrátkoncentrációnál már sokkal nagyobb a valószínűsége a szubsztrát kötődésének, mint az inhibitorénak, ez utóbbi valószínűsége elhanyagolható (egy adott, véges inhibitorkoncentráció mellett). A kompetitív inhibitor tehát nem változtatja meg a végtelen szubsztrátkoncentráció mellett kialakuló maximális reakciósebességet (V_{max}), azonban látszólag megnöveli a K_M értékét. **Valódi kompetitív inhibitorok** az olyan molekulák, amelyeknek kémiai szerkezete nagyon hasonlít a szubsztrátéra és ezért az enzimen a szubsztrát helyére képesek kötődni. A leghatásosabbak azok az anyagok, amelyek a szubsztrát tranzíciós állapotának szerkezetére hasonlítanak (tranzíciós analógok).

A valódi kompetitív inhibitorok közül igen nagy jelentősége van az orvosi gyakorlatban az ún. **antimetabolitoknak** (lásd később). A kompetitív gátlás kinetikai képét azonban nemcsak a szubsztrátra hasonlító, valódi kompetitív inhibitorok képesek létrehozni, hanem más olyan mechanizmus is, amelyben az inhibitor és szubsztrát kölcsönösen lehetetlenné teszik egymás kötődését (lásd **allosztérikus** enzimeknél). A kompetitív gátlás kinetikai képe alapján csak azt lehet állítani, hogy az inhibitor és szubsztrát kölcsö-nösen kizárják egymás kötődését, de azt, hogy az inhibitor hova kötődik, más módszerrel kell meghatározni.

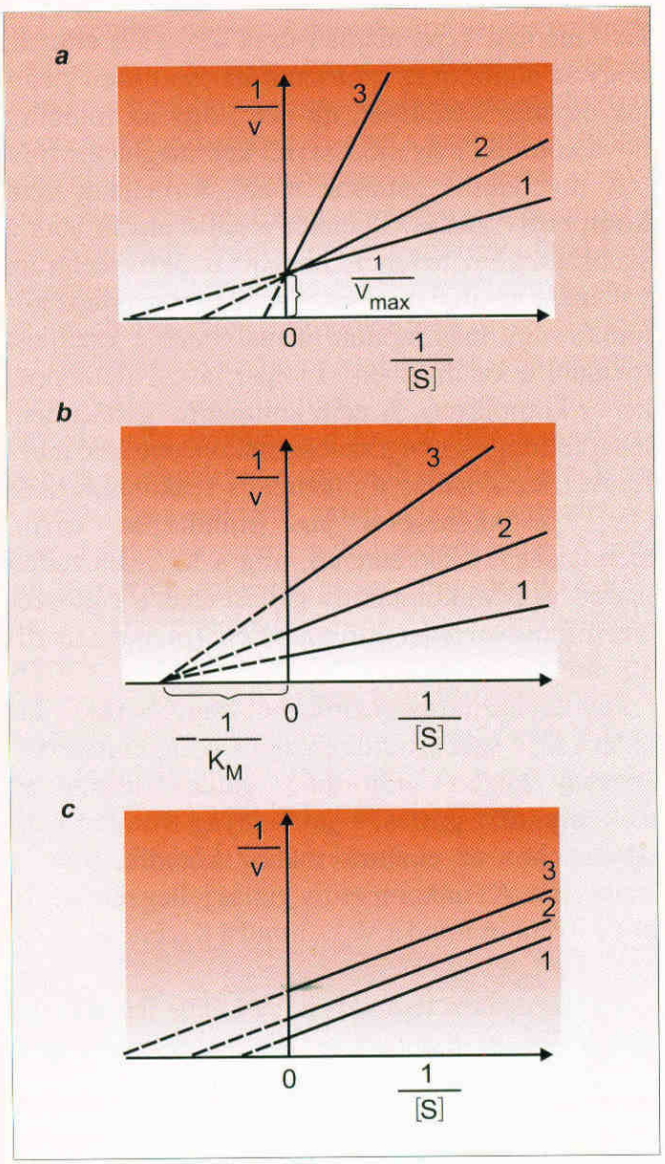
A reverzibilis gátlások másik formája a **nem kompetitív gátlás**. Ilyenkor a gátló anyag nem a szubsztrátkötő helyhez, hanem az aktív centrum valamely katalízisben részt vevő csoportjához kötődik, vagy más módon akadályozza a katalízist (például a katalízisben szerepet játszó fémionnal képez komplexet). A nem kompetitív gátlást nem lehet felfüggeszteni a szubsztrátkoncentráció emelésével, ez a gátlás a maximális reakciósebesség (V_{max}) csökkenésével jár, (mintha az enzim mennyiségét csökkentené), míg a K_M változatlan marad. A nem kompetitív gátlást csak a gátlószer eltávolításával lehet felfüggeszteni (pl. intenzív dialízissel).

Egy szubsztrátos enzimeknél nagyon ritka, inkább a több szubsztrátos enzimek bonyolultabb viszonyai között előforduló gátlási forma az **unkompetitív gátlás**, a gátló anyag ilyenkor nem ugyanahhoz az enzimformához kötődik, mint a szubsztrát. Az unkompetitív gátlás jellegzetessége, hogy ilyenkor mind a V_{max}, mind a K_M értéke csökken *(1-26. ábra)*.

A gyógyszeres terápiában igen nagy jelentősége van a valódi kompetíció alkalmazásának, azaz olyan molekulák tervezésének, amelyek szerkezete hasonlít egy-egy speciális enzim természetes szubsztrátjához (vagy bizonyos más fehérjék – ún. receptorok – természetes ligandjához), és ezért képesek elfoglalni annak helyét, s így megakadályozni kötődését. **Antimetabolitoknak** nevezzük az enzimek természetes szubsztrátjára hasonlító gátlószereket, amelyek bizonyos anyagcsereutak blokkolásával fejtik ki hatásukat, és ez a hatás egyes esetekben a gyógyító tevékenységben is felhasználható.

Az enzimaktivitás szabályozásának módjai

Az eddigiekből kitűnt, hogy egy élő sejtben, szervezetben vagy akár a kémcsőben történő vizsgálatok során, adott, konstans feltételek mellett, két tényező határozza meg egy enzim aktivitásának mértékét. Az egyik tényező az enzim mennyisége (a jelen lévő enzimmolekulák száma), a másik



1-26. ábra. A reverzibilis enzimgátlások kinetikai képe kettős reciprok ábrázolásban. *(a) Kompetitív gátlás, (b) nem kompetitív gátlás, (c) unkompetitív gátlás. Az 1. számmal jelölt egyenes gátlószer nélkül, a 2. számmal jelzett egyenes egy kisebb, míg a 3. számú egyenes egy nagyobb inhibitorkoncentráció mellett mutatja az enzim működését. Kompetitív gátlás esetén az $1/V_{max}$ változatlan, míg az X-tengely negatív részén kimetszett $1/K_M$ érték csökken (vagyis a K_M növekszik). Nem kompetitív gátlás esetén az X-tengely negatív részén kimetszett $1/K_M$ érték nem változik, míg az $1/V_{max}$ érték növekszik (tehát V_{max} csökken). Unkompetitív gátlás esetén mind az $1/V_{max}$, mind az $1/K_M$ érték növekszik (tehát V_{max} és K_M értéke csökken)*

tényező pedig az egyes enzimmolekulák működésének sebessége. Az élő szervezetben az enzimek mennyiségét egy adott időpontban a kérdéses enzimfehérje szintézisének, illetve lebomlásának sebessége határozza meg, e folyamatokkal majd a későbbi fejezetekben foglalkozunk. A már megszintetizálódott enzimmolekulák működésének sebességét (a rendelkezésre álló szubsztrátkoncentráció, koenzim stb. mellett) többféle regulációs mechanizmus módosíthatja. A három legismertebb ilyen mechanizmus az enzimműködés allosztérikus szabályozása, a szabályozás az enzimfehérjék oldalláncainak kovalens módosítása, ezen belül elsősorban foszforiláció, illetve defoszforiláció útján és a proenzimek átalakulása aktív enzimmé limitált proteolízis segítségével.

Sejten belül egy-egy enzim vagy enzimcsoport tevékenységét nagymértékben elősegíti vagy éppen lehetővé teszi a **kompartmentalizáció** jelensége. A kompartmentalizáció azt jelenti, hogy egyes enzimek a sejten belül bizonyos "rekeszekben" helyezkednek el, és e rekeszekben kialakuló lokális szubsztrátkoncentráció határozza meg működésüket. A lokális szubsztrátkoncentráció a "rekeszben" gyakran sokkal nagyobb, mintha a szubsztrátoknak a teljes intracelluláris térbe kellene szétdiffundálni, továbbá a "rekeszben" képződő szubsztrátokon nem kell megosztozni egy másik enzimmel, amely a rekeszen kívül helyezkedik el és esetleg ugyanazt az anyagot képes szubsztrátként használni. A kompartmentalizáció egyszerű példáját mutatják a sejtorganellumokban elhelyezkedő enzimek, amelyek a sejtorganellum membránja által határolt térben található szubsztrátokkal működnek. Ha egy sejtorganellumban működő enzim szubsztrátjának valamilyen transzportmechanizmussal kell a membránon keresztül bejutnia az organellum belsejébe, e transzportmechanizmus szabályozása közvetve a kompartmentben levő enzim működését is szabályozza.

Kompartmentalizációs "rekesznek" tekintjük a multienzim komplexek által létrehozott szerkezetet is, amely akár sejtorganellumon belül, akár a citoszolban is létrejöhet. Ez a szerkezet szinte irányítja a közös intermedier molekulát (amely az egyik enzimnek a produktuma és a következőnek a szubsztrátja) a megfelelő katalitikus helyhez, magas lokális szubsztrátkoncentrációt biztosítva a következő enzimnek, a teljes sejtre (esetleg a teljes organellumra) vonatkoztatott lényegesen alacsonyabb intermedier koncentráció mellett. A multienzim komplexek szerveződése e komplexek egy részénél nagyon stabil, más komplexek tagjai lazább, dinamikusabb kölcsönhatásban vannak egymással.

Fontos komponense lehet a biológiai szabályozás molekuláris mechanizmusának egy-egy enzim (fehérje) kompartmentalizációs helyének változtatása, a **fehérje sejten belüli transzlokációja**, például citoszolból a sejtmagba vagy citoszolból a plazmamembránhoz.

Allosztérikus enzimek

Az enzimek egy igen nagy csoportját képező allosztérikus enzimek a katalízis szempontjából kiemelt, aktív helyhez tartozó szubsztrátkötő helyen

kívül rendelkeznek még más ligand (vagy ligandok) számára is kötőhellyel (kötőhelyekkel). Ez a szubsztrátétól eltérő szerkezetű ligand kötésére alkalmas második (vagy harmadik stb.) kötőhely az enzimmolekula szerkezetének az aktív helytől jól megkülönböztethető részét foglalja el **(allosztérikus kötőhely)**, gyakran az aktív helytől távol található. Az aktív hely és az allosztérikus helyre kötődő ligand (allosztérikus effektor) közötti funkcionális kapcsolatot az enzim harmadlagos szerkezetének, az enzim konformációjának a változása biztosítja **(allosztérikus konformációváltozás)**, amely akkor következik be, ha a szubsztrátkötő helyre vagy az allosztérikus kötőhelyre bekötődik a megfelelő ligand.

A szubsztrát kötődését kísérő indukált illeszkedés (induced fit) leírásakor már említettük, hogy az enzimek túlnyomó többségének a szerkezete nem merev struktúra, hanem bizonyos mozgásokra képes. Az allosztérikus konformációváltozás az indukált illeszkedést kísérő változásoknál kiterjedtebb, az enzim szerkezetének nagyobb részét érinti.

Több polipeptidláncból (több alegységből) álló enzimek esetén a szubsztrátkötő hely lehet az egyik, az allosztérikus kötőhely a másik polipeptidláncon, a funkcionális kapcsolat ilyenkor nemcsak a harmadlagos, hanem a negyedleges szerkezet változásain keresztül is érvényesül. Az allosztérikus helyre kötődő ligand megváltoztathatja az enzim szerkezetét úgy, hogy az a katalízisre alkalmasabbá váljon, ilyenkor **allosztérikus aktivátorról** beszélünk. Gyakran azonban ennek az ellenkezője történik, az allosztérikus helyre kötődő ligand a katalitikus tevékenységet gátolja **(allosztérikus inhibitor)**. Mind az aktiválás, mind a gátlás többféle mechanizmus segítségével érvényesülhet. Az enzimaktivitás allosztérikus szabályozásának fontos jellemzője, hogy az allosztérikus ligandok kötődése ugyanazon típusú gyenge kölcsönhatások sokaságán alapul, mint a szubsztrát kötődése, ezért nyilvánvalóan **reverzibilis** folyamat. Az asszociáció–disszociáció **általában pillanatszerű** és az allosztérikus ligand (illetve bizonyos esetekben az allosztérikus ligand és a szubsztrát) aktuális koncentrációjától függ.

Egy allosztérikus aktivátor létrehozhat olyan konformációváltozást, amely elősegítheti a szubsztrát kötődését (megnövelheti az enzim affinitását a szubsztrát iránt, ilyenkor az aktivátor jelenlétében csökken az enzimnek az illető szubsztrátra vonatkozó K_M értéke), vagy segíthet a katalízis folyamatában részt vevő aminosav-oldalláncok legmegfelelőbb orientációjának kialakulásában (ilyenkor növeli a V_{max} értékét). Vannak olyan enzimek is, amelyeknek működőképes szerkezete kizárólag akkor alakul ki, amikor allosztérikus aktivátoruk kötődik hozzájuk. (A legegyszerűbbnek látszó ilyen mechanizmus az, amikor az enzim alapállapotában a szubsztrátkötő helyet elfedi az enzimfehérje egy másik része, az allosztérikus aktivátor hatására ez a fedő rész elmozdul és szabaddá válik a szubsztrátkötő hely. Ez természetesen csak egy, a lehetséges aktiválási mechanizmusok sokféle változatából.)

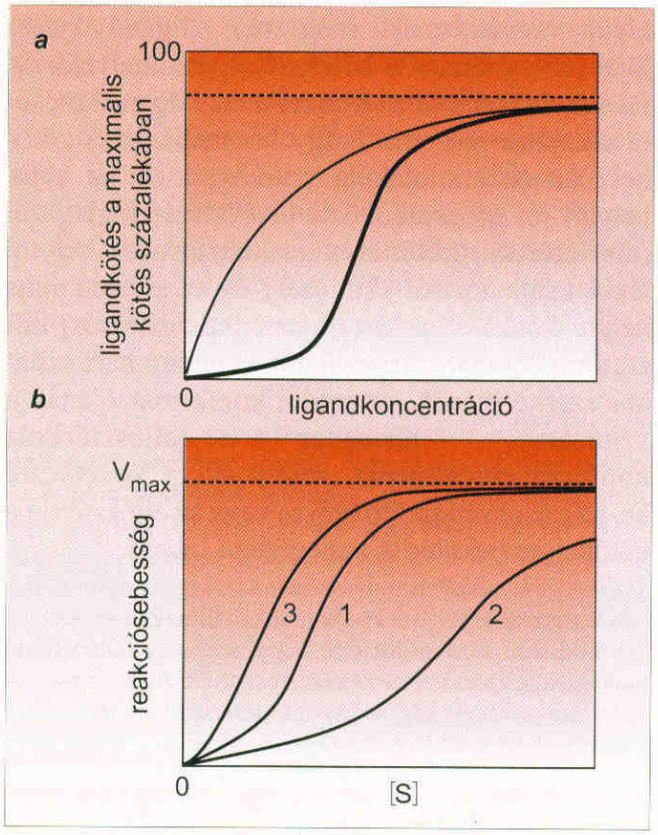
Az allosztérikus inhibitorok által okozott gátlás ugyancsak többféle módon érvényesülhet. Előfordul, hogy az allosztérikus inhibitor kötődése által létrehozott vagy stabilizált konformáció nem alkalmas a szubsztrát kötésére. Ezzel a mechanizmussal gyakran együtt jár az is, hogy a szubsztrát kötődése viszont olyan konformációban stabilizálja az enzimet, amely az allosztérikus inhibitor kötésére nem alkalmas. Ha a kétféle ligand kölcsönösen kizárja egymás kötődésének lehetőségét (vagy legalább erősen csökkenti a másik ligand kötődésének valószínűségét), az allosztérikus inhibitor jelenlétében mérve az enzim aktivitását, a kompetitív gátlás kinetikai képét kapjuk **(látszólag kompetitív gátlás)**, holott a szubsztrát és a gátlószer nem ugyanazon kötőhelyért versengenek egymással. Az allosztérikus inhibitorok más csoportja viszont nem befolyásolja az enzim szubsztrátkötő képességét, de olyan konfomációváltozást hoz létre, amely erősen csökkenti a katalízis sebességét. A **nem kompetitív** kinetikát mutató gátlóanyagok között gyakran találhatunk allosztérikus inhibitorokat.

A sejten belüli anyagcsere-folyamatok összehangolásában, a különböző anyagcsereutak sebességének szükség szerinti gyorsításában és lassításában elsőrendű szerepe van az allosztérikus szabályozásnak.

A szubsztrátétól eltérő szerkezetű allosztérikus aktivátorok és inhibitorok hatását **heterotrop hatásnak** nevezik. Míg a heterotrop hatás létrejöhet egyetlen polipeptidláncból álló allosztérikus enzimeken is, a több azonos polipeptidláncból álló, azonos alegységeket tartalmazó (oligomer szerke-

zetű) enzimek (fehérjék) esetén az allosztéria jelenségének egy sajátságos változatát, a **homotrop hatást** is megfigyelték. A homotrop hatás lényege, hogy egyetlen fajta molekula, enzimek esetén maga a szubsztrát, képes betölteni az allosztérikus ligand szerepét is. A jelenségnek az oligomer enzimek negyedleges szerkezetét érintő konformációváltozás a magyarázata. Ha egy oligomer enzim egyetlen alegységének szubsztrátkötő helyéhez kötődik egy ligand, az nem csupán ezen egyetlen alegység konformációját képes megváltoztatni, hanem a változás átterjed a többi alegységre is. Ezért az a ligand, amely az első alegység esetében a szubsztrát szerepét tölti be, a többi alegység szempontjából allosztérikus szabályozóként szerepel. Részletesen csak a pozitív homotrop hatással foglalkozunk, vagyis azzal a jelenséggel, amikor az első molekula ligand (szubsztrát) kötődése elősegíti a második (harmadik stb.) molekula kötődését a többi alegységen.

A pozitív homotrop hatás (homotrop kooperatív hatásnak is nevezik) a Michaelis–Menten-modell által leírt, derékszögű hiperbolának megfelelő szubsztrát telítési görbétől eltérő, jellegzetes S alakú (szigmoid) telítési görbét eredményez *(1-27. ábra)*. Kis szubsztrátkoncentrációknál a szubsztrát kötődésének a valószínűsége kicsi. Az első molekula szubsztrát kötődése azonban úgy változtatja meg az enzim negyedleges szerkezetét, hogy a következő molekula szubsztrát kötődésének a valószínűsége megnövekszik, a szubsztrát koncentrációjának növelésével a telítési görbe meredeken emelkedni kezd (1-27. ábra).



1-27. ábra. A homotrop kooperatív hatás kinetikai képe. *(a) A vékony vonal egy Michaelis–Menten-egyenlet szerint működő, a vastag vonal egy homotrop kooperatív hatást mutató enzim szubsztráttelítési viszonyait ábrázolja. (b) Az 1-es görbe egy homotrop kooperatív hatást mutató enzim szubsztráttelítési görbéjét, a 2-es görbe ugyanezt a látszólag kompetitív gátlást mutató allosztérikus inhibitor, míg a 3-as görbe ugyanezt, egy, a szubsztrát iránti affinitást növelő allosztérikus aktivátor jelenlétében ábrázolja*

A homotrop hatást kétféle modell segítségével magyarázzák, valószínűleg egyes fehérjék az egyik, más fehérjék a másik mechanizmust követik. A **szimmetria modell** feltételezi, hogy az oligomer enzim számára kétféle konformáció lehetséges, az egyik a katalízisre alkalmas, szubsztrát iránt nagy affinitást mutató relaxált (R) konformáció, a másik a szubsztrát iránt kis affinitással rendelkező, feszített (T, tense) konformáció és a szimmetriaelv értelmében az összes alegység vagy az egyik, vagy a másik konformációban fordul elő, hibrid enzim nem lehetséges *(1-28a ábra)*. A szabad enzim állandó mozgásban van az R- és T-állapot között, ezek egyensúlya azonban a T irányában van eltolva. Ezért az első szubsztrátmolekula esélye kicsi arra, hogy a csak kis valószínűséggel előforduló R-konformációban találkozzék az enzimmel. Amikor azonban ez mégis megtörténik, az első molekula szubsztrát kötődése nemcsak a saját alegységét, hanem az egész oligomer enzimet az R-konformációban stabilizálja, ezért azután a következő molekula szubsztrát már a nagy affinitással rendelkező többi alegységgel találkozik, és így kötődésének a valószínűsége a következő alegységen megnövekszik. A szubsztrát tehát a másik alegység(ek) számára aktivátorként is működik. Ha egy ilyen mechanizmussal működő enzimnek allosztérikus inhibitora is van, az az egész enzim konformációját a T-állapotban stabilizálja. A homotrop hatáson kívül az enzimnek még heterotrop aktivátora is lehet, ez ismét az R-konformáció felé tolja az egyensúlyt.

A **szekvenciális modell** szerint nem kötelező az enzim összes alegységeinek azonos konformációs állapota, hibrid állapot is lehetséges *(1-28b ábra)*. Ez a modell nem állítja, hogy a szabad enzim konformációja is az R- és T-állapot között változik és a szubsztrát vagy inhibitor csak stabilizálja az egyiket vagy másikat, hanem feltételezi, hogy a szubsztrát kötődése hozza létre azt az új konformációt, amely alkalmas a katalízisre (mintegy az indukált illeszkedés kiterjedtebb változataként). Az első alegység konformációjának változása átterjed a következő alegységre is, de nem szükségszerűen

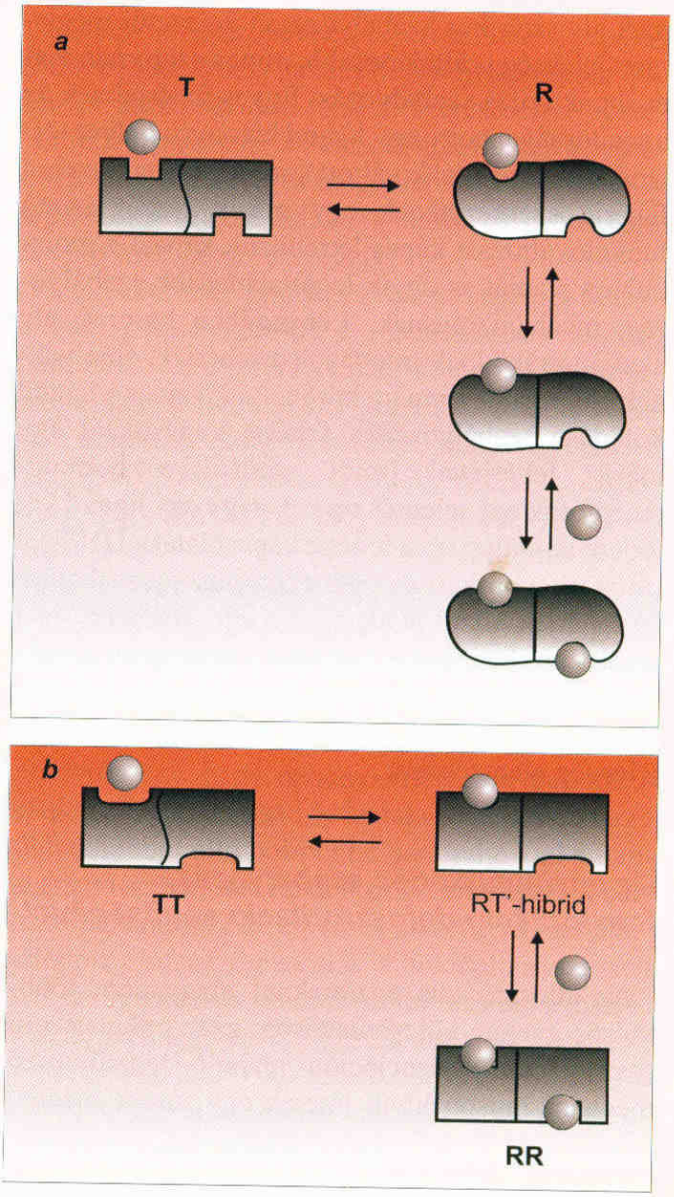
hozza létre ugyanazt a konformációt, amelyet a szubsztrát által már elfoglalt alegység mutat. A második molekula szubsztrát kötődése ismét változást indukál, amelyik átterjed a következő alegységre, és így tovább.

A pozitív homotrop (vagy homotrop kooperatív) hatás fiziológiai jelentősége az, hogy az S alakú telítési görbének megfelelően az enzim (fehérje) valódi működésének tartományát sokkal szűkebb szubsztrát- (ligand-) koncentrációkeretek között tartja, és így a ligand koncentrációjának változásával sokkal élesebb működésbeli változásokat hoz létre, mint a Michaelis-egyenlet szerinti szubsztrátkötődés. Csökkenő ligandkoncentráció esetén például sokkal nagyobb mértékben veszíti el ligandját egy ilyen fehérje, mint egy nem allosztérikusan szabályozott, és ennek komoly regulációs jelentősége lehet. A homotrop kooperatív hatás nem korlátozódik enzimfehérjékre, gyakran megfigyelhető valamely ligandot kötni képes oligomer szerkezetű nem enzimfehérje esetében is.

A legtöbbet vizsgált példa a négy alegységből álló **hemo-globin szigmoid oxigéntelítési görbéje**. Ha a hemoglobin nem volna allosztérikus fehérje és a derékszögű hiperbolának megfelelő oxigéntelítést mutatná, az artériás kapillárisokban nem tudná leadni az általa szállított oxigént, mert a normál telítési görbe alapján a kapillárisokban levő oxigéntenzió mellett még az oxigén jelentős részét kötésben kellene tartania. Az S alakú oxigéntelítési görbének megfelelően azonban, a kapillárisokban levő oxigéntenzió mellett olyan kicsi a hemoglobin oxigénnel szemben mutatott affinitása, hogy az oxigént már nem képes kötésben tartani.

Ismert néhány olyan enzim is, amelynek egyetlen polipeptidláncán több kötőhely van egy bizonyos ligand számára. Ilyen esetekben a homotrop kooperatív hatás egyetlen polipeptidláncon belül is létrejöhet.

Az allosztérikus szabályozás minden formájának elsőrendű szerepe van a sejten belüli anyagcserefolyamatok összehangolásában, a különböző anyagcsereutak sebességének szükség szerinti gyorsításában vagy lassításában. A különböző anyagcsereutakat katalizáló enzimsorok működésének szabályozása általában **az út első specifikus lépését katalizáló enzimnél** történik, amely allosztérikus enzim szokott lenni. Ez a „karmester" vagy „közlekedési rendőr" szerepét betöltő enzim allosztérikus aktivátora vagy inhibitora koncentrációjának változásán keresztül érzékeli, hogy az általa irányított reakciósornak gyorsan, lassan vagy éppen egyáltalán nem kell működnie.



1-28. ábra. A homotrop kooperatív hatás modelljei. *(a) A szimmetria modell és (b) a szekvenciális modell. A modellek leírását lásd a szövegben*

Bioszintetikus utak első enzimeit gyakran allosztérikusan gátolja a kérdéses bioszintetikus út végterméke, és így nem történhet meg az, hogy a végtermék szükségtelen nagy mennyiségben felszaporodik **(feedback gátlás)**. Más esetekben egy anyagcsereút valamelyik előanyagának felhalmozódása aktiválja az anyagcsereút specifikus első lépését katalizáló enzimet **(prekurzor aktiválás)**. Arra is van példa, hogy egymással ellentétes folyamatok esetén egy bizonyos molekula az egyik út számára allosztérikus aktivátor, míg a visszafelé folyó út egyik enzimének allosztérikus inhibitora és így biztosítja az ellentétes utak koordinált működését.

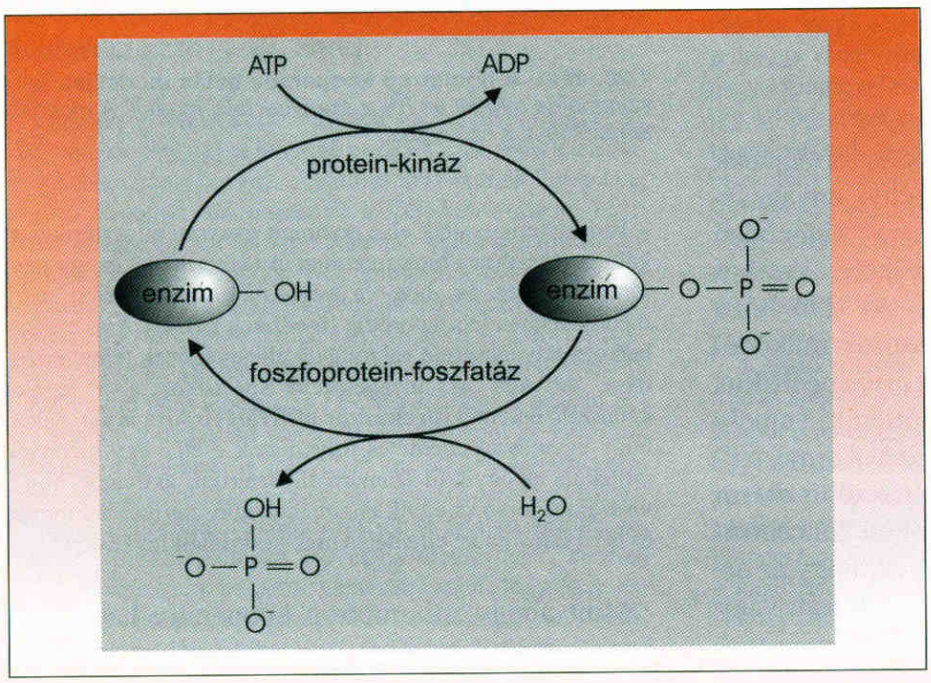
Mint ahogy a homotrop kooperatív hatás sem korlátozódik kizárólag enzimfehérjékre, az enzi-

mek allosztérikus szabályozásán keresztül megismert jelenség is általánosabb, mint a szigorúan vett enzimaktivitás-szabályozás. Egyes fehérjéknek az a sajátossága, hogy egy ligand bizonyos helyre történő kötődése által kiváltott konformációváltozás a fehérje szerkezetének egy másik részét érintő funkcióváltozást képes létrehozni, képezi a molekuláris alapját az egyik legáltalánosabb szabályozási mechanizmusnak. Lényegében hasonló elv alapján működnek mindazok a fehérjék, amelyeknek egy ligand számára kötőhelyük van és a ligand kötődése szabályozza a fehérje kapcsolatát egy másik fehérjével (mint például a hormonreceptorok egy jelentős része), vagy egy ligand kötődése szabályozza a fehérje kapcsolatát a DNS-sel (mint pl. a prokarioták génexpresszióját szabályozó fehérjék közül néhány). Az allosztériának ez a tágabb értelmezése a biológiai folyamatok szabályozásában olyan általános, hogy ma már hangsúlyozni sem szokták egy-egy speciális regulációs jelenség elemzésekor.

Az enzimműködés szabályozása foszforiláció-defoszforiláció segítségével

Az allosztérikus enzimeknél megismert, többszörös gyenge kölcsönhatáson, azaz pillanatszerű asszociáción-disszociáción alapuló szabályozási mechanizmuson kívül létezik egy másik mechanizmus is, amely magasabbrendű szervezetekben éppen olyan általános és nagy jelentőségű szabályozási rendszer kialakulását teszi lehetővé, mint az allosztérikus szabályozás. A kétféle szabályozási rendszer kiegészíti egymást. Ez a második szabályozó mechanizmus az enzim- (és nem enzim) fehérjék foszforilációján és defoszforilációján alapul. Minthogy kovalens módosításról van szó, ez nem megy végbe önmagától, a szabályozás a kovalens kötés létrejöttét, illetve elbontását katalizáló speciális enzimeket igényel *(1-29. ábra)*. A szerkezetmódosítás valamelyest hosszabb időt igényel és tartósabb, mint az allosztérikus ligand által létrehozott konformációváltozás.

A különböző fehérjék foszforilációjáért felelős enzimek a transzferázok osztályába tartoznak, **protein-kinázoknak** nevezik őket (1-29. ábra). Általában az ATP γ-helyzetű foszfátcsoportjának terhére alakítják ki az észterkötést az ilyen módon regulálódó fehérjék bizonyos, az aminosavsorrendben pontosan meghatározott helyen levő szerin/treonin vagy tirozin oldalláncának OH-csoportjával. A legtöbb protein-kináz vagy csak szerin/treonin, vagy csak tirozinoldalláncot foszforilál. A fehérje meghatározott oldalláncán bekövetkező foszforiláció módosítani képes a fehérje harmadlagos szerkezetét, és így megváltoztatja annak funkcionális állapotát. Bizonyos enzimek esetén a foszforiláció az enzim aktivitásának fokozódását, más enzimek esetén az aktivitás csök-



1-29. ábra. Az enzimaktivitás kovalens szabályozása foszforiláció–defoszforiláció segítségével

kenését, esetleg az enzimaktivitás teljes gátlását idézheti elő. Az enzimműködés nyilvánvaló módosításán kívül a foszforiláció még más módon is befolyásolhatja az enzim (vagy nem enzimfehérje) funkcionális állapotát. A foszforiláció által indukált konformáció például alkalmasabb lehet más fehérjékhez vagy kis molekulatömegű ligandokhoz, esetleg a DNS-hez történő kapcsolódásra, más esetben éppen ellenkező irányú lehet a változás.

A defoszforilációt katalizáló enzimeket **foszfoprotein-foszfatázoknak** nevezik. Ezek az enzimek a hidrolázok osztályába tartoznak, a protein-kinázok által létrehozott észterkötéseket hidrolitikusan hasítják, ilyen módon egy adott enzim (fehérje) esetében a protein-kináz hatásával éppen ellentétes hatást váltanak ki.

Mind protein-kinázból, mind protein-foszfatázból igen sokféle ismert, az egyes kinázok és foszfatázok különböző módon szabályozódnak. A protein-kinázok abban is nagyon különböznek egymástól, hogy melyikük milyen enzimet vagy fehérjét és annak mely pontján foszforilál. A foszfoprotein-foszfatázok szubsztrátspecifitása valamelyest kisebbnek látszik, mint a protein-kinázoké.

A protein-kinázok aktiválódása különböző ligandok által indukált allosztérikus szabályozás (pl. cAMP-függő protein-kinázról, vagy Ca^{2+}-kalmodulin függő protein-kinázról stb. beszélünk), vagy egy másik protein-kinázzal történő foszforiláció útján megy végbe. Az egymást foszforiláló protein-kinázok (ún. foszforilációs kaszkád) segítségével az első protein-kinázt aktiváló kémiai jel hatása megsokszorozódhat. A protein-kinázok és foszfoprotein-foszfatázok némelykor „targettáló" alegységgel is rendelkeznek, amelynek feladata az enzim megfelelő sejtkompartmentbe irányítása. A reverzibilis fehérjefoszforilációnak leggyakrabban az extracelluláris jelre adott sejtválaszok kialakulásában, illetve a sejtproliferáció és differenciálódás szabályozásában van fontos szerepe.

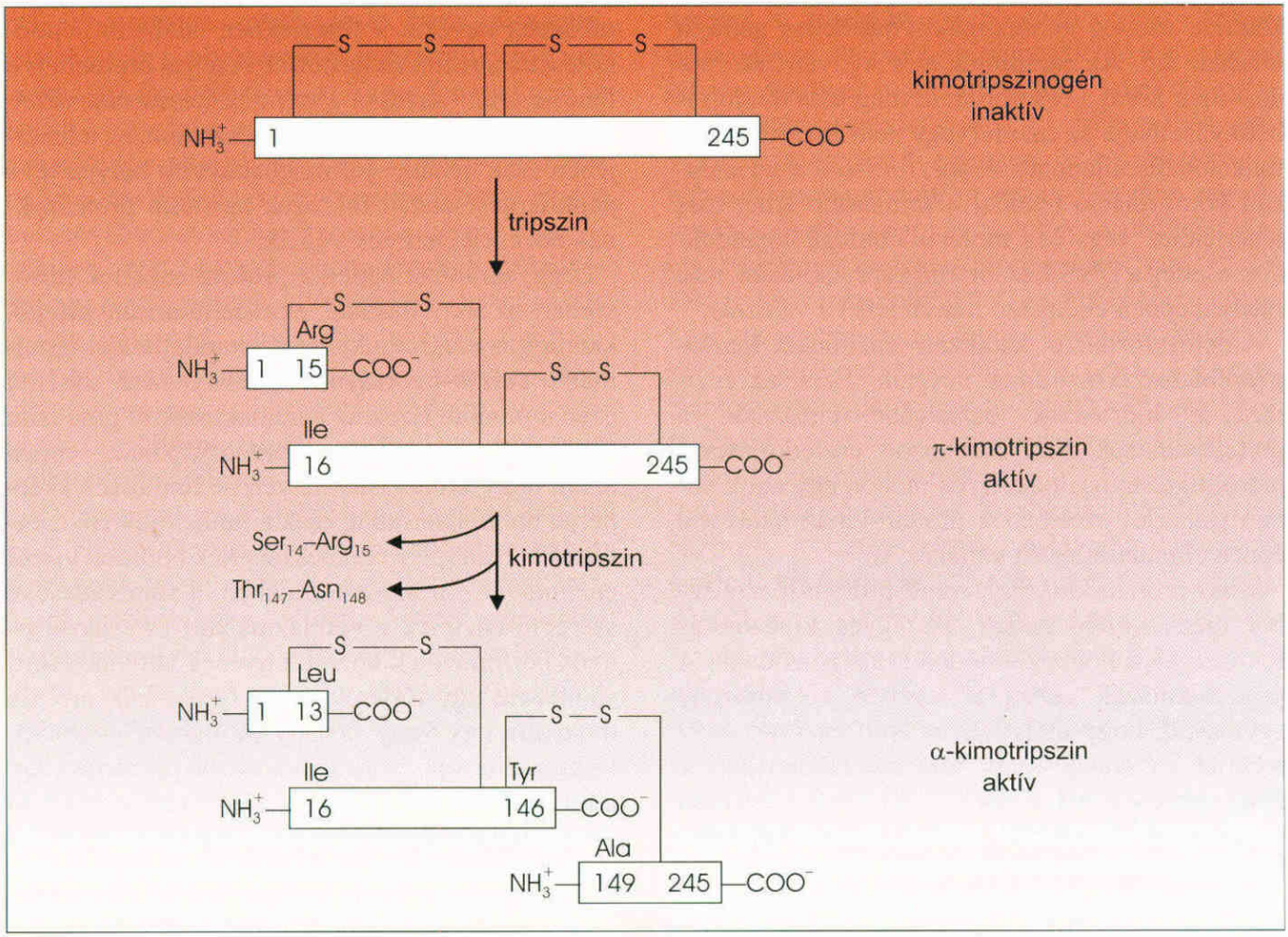
A proenzimek átalakulása aktív enzimmé limitált proteolízis segítségével

Az enzim-fehérjék szintézis utáni kovalens módosítással történő szabályozásának ugyancsak jól ismert mechanizmusa a limitált proteolízis. Proteolízisnek nevezik a fehérjékben található peptidkötések hidrolitikus hasítását. A teljes proteolízis a fehérje aminosavakra történő széteséséhez vezet. Limitált proteolízisről akkor beszélünk, ha a fehérjében csak néhány, jól meghatározott helyen levő peptidkötés szakad fel, ezek hasítását proteázoknak nevezett enzimek végzik.

Leggyakrabban éppen a proteáz enzimek (elsősorban az aktivitásukat extracellulárisan kifejtő, katalitikus centrumukban szerinoldalláncot tartalmazó **szerin-proteázok**) szabályozása történik ezen a módon. Ezek az enzimek inaktív proenzim (zimogén) formájában szintetizálódnak, éppen azért, hogy szintézisük helyén ne fejthessék ki fehérjét bontó hatásukat, csak a funkciójuknak megfelelő helyen (pl. a táplálékfehérjék bontását végző enzimek az emésztőcsatornában, a véralvadásban szereplő enzimek a vérplazmában) és csak bizonyos körülmények között legyenek aktívak. Aktiválódásuk úgy történik, hogy egy másik proteáz molekula egy vagy néhány kitüntetett peptidkötésüket elhasítja, és az így kialakuló rövidebb vagy több darabból álló polipeptidlánc tudja kialakítani az enzimaktivitással rendelkező szerkezetet. A bélcsatornában működő enzimek esetében a már aktiválódott proteáz molekulák autokatalízis-szerűen is részt vehetnek a limitált proteolízis elősegítésében, de szükség van az egymást aktiváló proteázok (proteáz-kaszkád) közreműködésére is *(1-30. ábra)*. Az egymást aktiváló proteázok kaszkádszerű sorozata még kifejezettebb a véralvadás szabályozásában. (A kaszkádjelenség itt is az első kémiai jel hatásának megsokszorozódásához vezet).

A limitált proteolízissel történő aktiválódás, mely a fehérje elsődleges szerkezetének a megváltozásával jár, irrevezibilis folyamat. Ha egy ilyen enzim aktivitására már nincs szükség, akkor vagy teljesen lebomlik az enzim, vagy valamilyen fehérjetermészetű gátló molekula kötődik hozzá.

A fehérjetermészetű gátló molekulák egyik jellegzetes képviselője a **tripszin inhibitor**. A tripszin inhibitor szerkezete a tripszin számára olyan szubsztrát analógot jelent, amelyet a tripszin rendkívül lassan képes csak elbontani (egy molekula bontása hónapokig tartana). A tripszin és a tripszin inhibitor gyenge kölcsönhatások sokaságával kötődik egymáshoz, ezek a kölcsönhatások azonban együttesen olyan erősek, hogy a gátlás irreverzibi-



1-30. ábra. A kimotripszinogén átalakulása aktív kimotripszinné. *A pancreas által szintetizált kimotripszinogén, a kimotripszin proenzime egyáltalán nem rendelkezik enzimaktivitással. A duodenumba kerülve aktiválódik limitált proteolízis segítségével. A proenzimet egyetlen, 245 aminosavból álló polipeptidlánc alkotja, amely öt diszulfidhidat tartalmaz. (Az ábrán csak két diszulfidhíd van feltűntetve, amelyek a végleges molekulában összetartják a polipeptidláncokat.) Az aktiválódás első lépését egy másik proteáz, a tripszin katalizálja, amely elhasítja a peptidkötést a kimotripszinogén polipeptid 15. helyén levő arginin és 16. helyén levő izoleucin között. Az így módosuló fehérje, amelyet π-kimotripszinnek neveznek, már rendelkezik proteázaktivitással, de még nem a véglegesen kialakuló enzim. A π-kimotripszin egy másik π-kimotripszin-molekulát hasít úgy, hogy két dipeptidet vág ki belőle, a 14–15. helyen levő Ser-Arg és a 147–148. helyen levő Thr-Asn dipeptideket. Az így képződő fehérjemolekula a stabil formája az enzimnek, ez az α-kimotripszin. Az α-kimotripszin három polipeptidlánca diszulfidhidakkal van egymáshoz rögzítve. Az enzim aktivált formáját már az első proteolitikus hasítás létrehozza, amely a 16. helyen álló izoleucin szabad NH_2-jét produkálja. Ez az oldallánc kerül elektrosztatikus kölcsönhatásba egy, az enzimmolekula belsejében levő aszpartátoldallánccal, amelynek következtében a fehérjemolekula körülírt, nem nagy kiterjedésű részén bekövetkező elmozdulások hozzák létre a szubsztrátkötő hely megfelelő szerkezetét és stabilizálják az aktív helyet*

lissé válik (a komplex disszociációs állandója 10^{-13} M). Orvosi szempontból jelentős az **α_1-antitripszin**. Ez az inhibitor a sejtek lizoszomáiban működő proteázok gátlására szolgál, a lizoszomán kívül. Az α_1-antitripszin génjének az öröklődő hibája a tüdőszövet proteázok elleni védelmének csökkenése miatt annak súlyos károsodását eredményezi.

Az enzimek néhány gyakorlati alkalmazása az orvosi diagnosztikában

Egyes enzimek (fehérjék) **enzymopathiának** nevezett genetikai károsodása (az illető enzimfehérjét kódoló gén szerkezetének károsodása) jellegzetes anyagcsere-be-

tegségekhez vezet. A jelenséget az érintett anyagcsere-folyamatok analízisével szokták diagnosztizálni.

Bizonyos szervek, sejttípusok károsodása az intracelluláris enzimek kiáramlásához, ezen enzimek vérplazmai koncentrációjának az emelkedéséhez vezet. Léteznek olyan **enzimek** vagy bizonyos enzimek egyes szervekre jellemző izoenzim változatai, amelyek megjelenése, illetve **koncentrációjának emelkedése a vérplazmában** jól meghatározható jele lehet az adott szerv megbetegedésének. Más esetekben a betegség lefolyásának menetét lehet figyelemmel kísérni, pl. a szívizom károsodásakor kiáramló enzimek vérplazmai koncentrációjának változásával. A klinikai diagnosztikában gyakran használt enzimek a glutamát-oxálacetát-transzaminász (GOT, másik nevén aszpartát-aminotranszferáz, ASAT), a glutamát-piruvát-transzaminász (GPT, másik nevén alanin-aminotranszferáz, ALAT), tejsav-dehidrogenáz (laktát-dehidrogenáz) izoenzimek, savanyú foszfatáz, alkalikus foszfatáz, amiláz, kreatin-kináz stb.

A vérplazmában előforduló és bizonyos betegségekben vagy betegségeket előidéző állapotokban kórosan magas koncentrációt elérő nem fehérje természetű anyagok koncentrációjának meghatározásához (pl. koleszterin, triglicerid) gyakran használnak enzimeket segédeszközként. A legmodernebb diagnosztikai segédeszközök között találhatunk **immobilizált enzimeket** is, amelyek valamilyen hordozó anyaghoz vannak rögzítve, és nagyon egyszerűvé teszik a próba alkalmazását. Általában olyan enzimek jöhetnek számításba, amelyek a kérdéses vegyület felhasználásával egy színes vagy színessé tehető produktum képződését katalizálják. Az oldhatatlan hordozó anyagokhoz kovalens keresztkötéssel immobilizált enzimeket a modern gyógyszeripar is felhasználja specifikus kémiai reaktorként.

Az enzimkémia és immunológia együttes alkalmazásának eredménye az **ELISA**-ként ismert vizsgálati módszer. Az ELISA betűszó a módszer angol nyelvű meghatározásának (enzyme-linked immunosorbent assay) a rövidítéséből származik. Itt az enzimet indikátorként alkalmazzák. A módszer lényege, hogy egy antigén-antitest reakció létrejöttét, illetve mennyiségi viszonyait az első antitest ellen előállított, és azzal reagáló második antitesthez kovalensen kötött enzim által produkált színes (vagy fényeffektust létrehozó) termék alapján tudják meghatározni.

Néhány esetben bizonyos enzimeket **terápiás** célokra is alkalmaznak. A legismertebb példa a véralvadékot oldó proteázok alkalmazása.

Ajánlott irodalom

Mechanism of Enzyme Action. Control of Enzyme Activity. In Lubert Stryer: Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York, 1988

Enzymes: Classification, Kinetics and Control. by J. Lyndal York. In Thomas M. Devlin editor: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Wiley-Liss, Inc., USA, 1992

Enzymes in Albert L. Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox: Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., USA, 1993

A hemoglobin és a mioglobin 1.3.

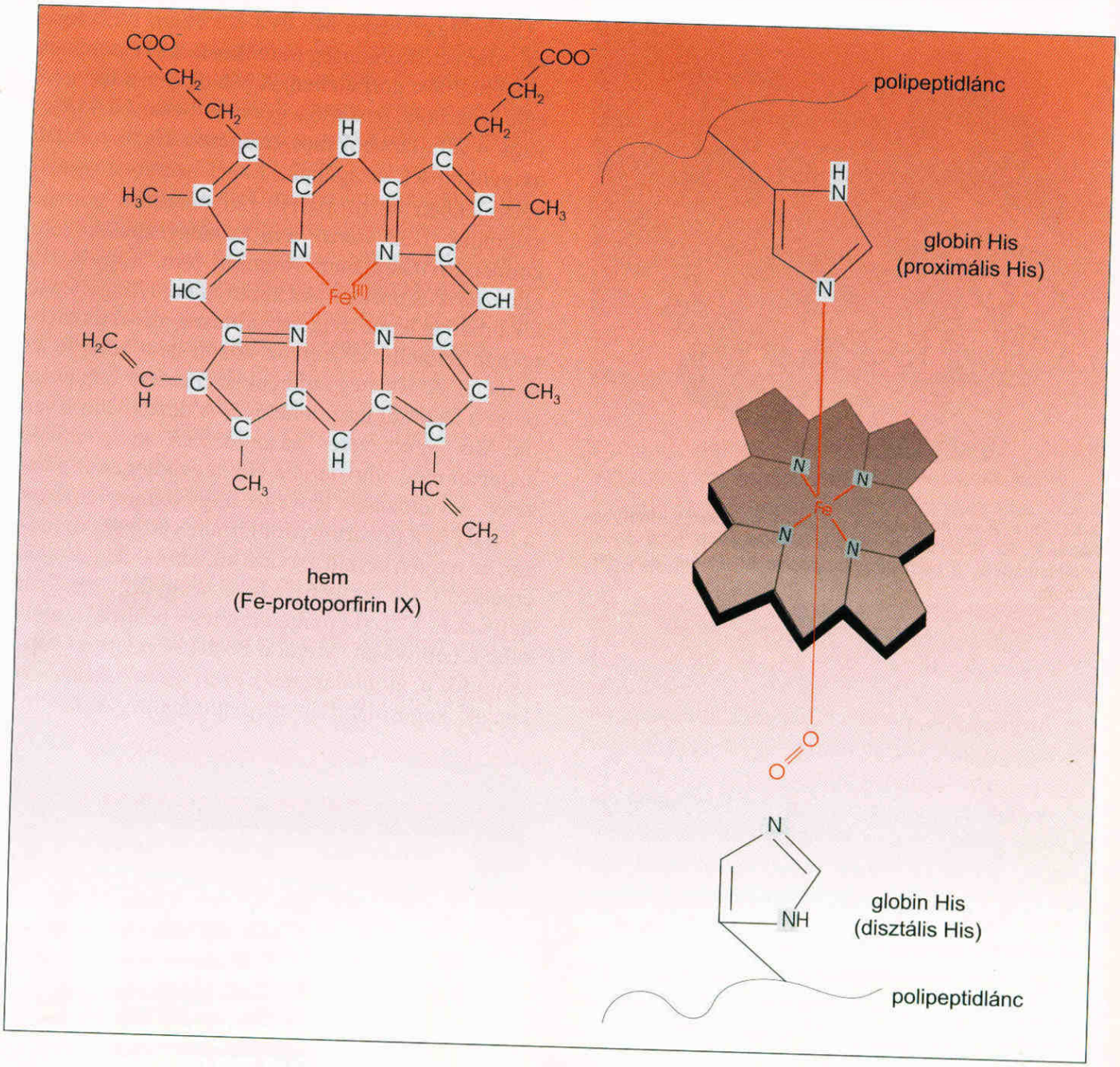
Mandl József

Az energiatranszformáció során a tápanyagokkal felvett energia kémiailag hasznosítható formákba (ATP stb.) alakul (lásd 2.1. fejezet). Ez a folyamat aerob körülmények között, oxigén jelenlétében körülbelül tizennyolcszor hatékonyabban történik, mint anaerob viszonyok esetén. Ehhez azonban az oxigén állandó jelenléte szükséges. A keringési rendszer önmagában a sejtek oxigénellátását a szükséges szinten nem lenne képes biztosítani, mivel az oxigén oldékonysága vízben nagyon kicsi. A megfelelő oxigénkoncentrációt speciális oxigénkötő, illetve szállító molekulák biztosítják. Ilyen oxigént kötő, szállító molekula a vörösvértestekben a hemoglobin (Hb), izomsejtekben pedig a mioglobin (Mb). A két molekula funkciója különbözik egymástól. A Mb főként oxigén tárolására, a Hb az oxigén szállítására szolgál. A Hb-mentes vér oxigénkoncentrációja 5 ml normál állapotú O_2/l, a normális Hb-tartalmú véré 250 ml O_2/l.

Mind a Hb, mind a Mb rendkívül részletesen és aprólékosan tanulmányozott fehérje. Szerkezetük megismerése, a Hb negyedleges szerkezetének és allosztérikus szabályozásának tanulmányozása a röntgen-krisztallográfiás módszerek alkalmazásával tudománytörténeti jelentőségű. Ezek a módszerek lehetővé tették a Hb (és a Mb) térszerkezetének igen alapos megismerését, az oxigénkötődés következményeinek pontos elemzését. A Hb „Nobel-díjas" molekula, *Max Perutz* és *John Kendrew* a Hb és a Mb háromdimenziós szerkezetének feltárásáért nyerte el a kitüntető címet. Ezeknek a kutatásoknak óriási, szemléletformáló hatása volt.

A hemoglobin és a mioglobin szerkezete, oxigénkötése

Mindkét molekula hemoprotein, prosztetikus csoportként hemet tartalmaz. A hemet vas Fe(II) és protoporfirin IX alkotja (ez adja a Hb és a Mb jellegzetes színét). Hem prosztetikus csoportot tartalmazó fehérjék az oxigénkötésen, -transzporton kívül redoxreakciókban is részt vesznek. Ezek különböző folyamatok, azonban a molekulán belül az oxigén- és az elektronakceptor azonos: a hem-vas. A vas a hemben a tetrapirrol gyűrűrendszer közepén mind a négy nitrogénhez kötődik, ezenkívül azonban további két koordinatív kötésre képes a hem síkjának két oldalán *(1-31. ábra)*. Az egyik kötés révén a hem a globinhoz kapcsolódik, a másik az oxigénkötő hely. Az oxigén O_2-molekula formájában kötődik. A hem-vas ötödik koordinációs kötőhelyéhez a globinlánc egyik hisztidinje (proximális His) kapcsolódik. A dezoxi Hb-ban a vas a porfiringyűrű síkjából a proximális His irányába kiemelkedik. Az O_2-molekula a vas hatodik koordinációs kötőhelyéhez kapcsolódik a hem másik oldalán. Az oxigénkötő hely kialakításában meghatározó funkciója van a globinláncban egy másik hisztidinnek (disztális His), amely nem kötődik a vasatomhoz. A szén-monoxid az O_2-nél jóval erősebben kötődik mind a Hb, mind a Mb hem-vasához (ezért is olyan veszélyes a CO-mérgezés). A Hb és a Mb affinitását a CO-hoz éppen a disztális His mérsékli. Az oxigénkötés képessége a hem-Fe oxidáltsági állapotától függ. O_2-kötésre csak a hem-vas [Fe(II), ferro-] alkalmas, a hem-vas



1-31. ábra. A hem szerkezete, a hem-Fe hat kötőhelye

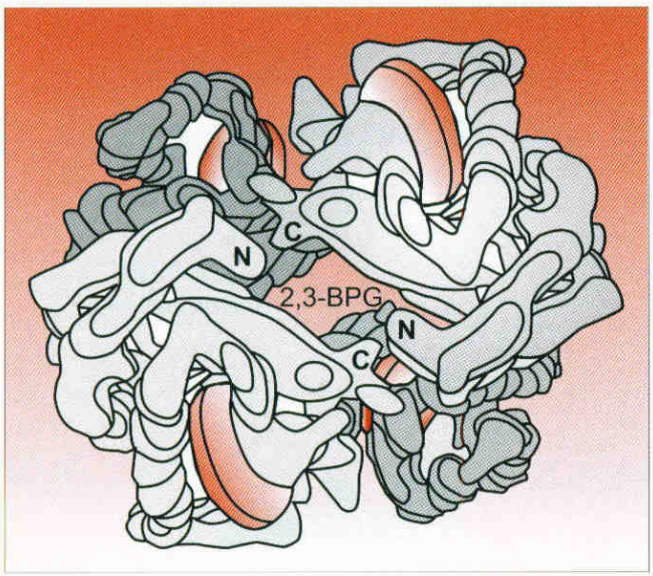
oxidált állapotban [Fe(III), ferri-; methemoglobin] erre nem képes. Ez a feltétel nemcsak a Hb-ra és Mb-ra, hanem más hemoproteinekre is igaz.

Ily módon elektronfelvétellel, illetve -leadással az oxigénkötés szabályozható (pl. citokróm P450 enzimek működése, lásd 2.6. fejezet). A hemoproteinek egy része ugyanis enzim, amely szintén köti az oxigént, azonban a kötődést valamilyen enzimatikus folyamat követi, amelynek során az oxigén átalakul (lásd pl. terminális oxidáció, oxigenizáció).

Így a hemoproteinek egy része:

- Fe(II)-állapotban O2-transzportot bonyolít le (Hb, Mb),
- Fe(II) ↔ Fe(III) redoxrendszer, elektrontranszferben vesz részt (citokrómok),
- Fe(II)-állapotban O_2-t köt majd Fe(II) ↔ Fe(III) redoxreakcióban az O_2-t redukálja (citokróm P450 enzimek).

A Mb, illetve Hb oxigénkötése reverzibilis.



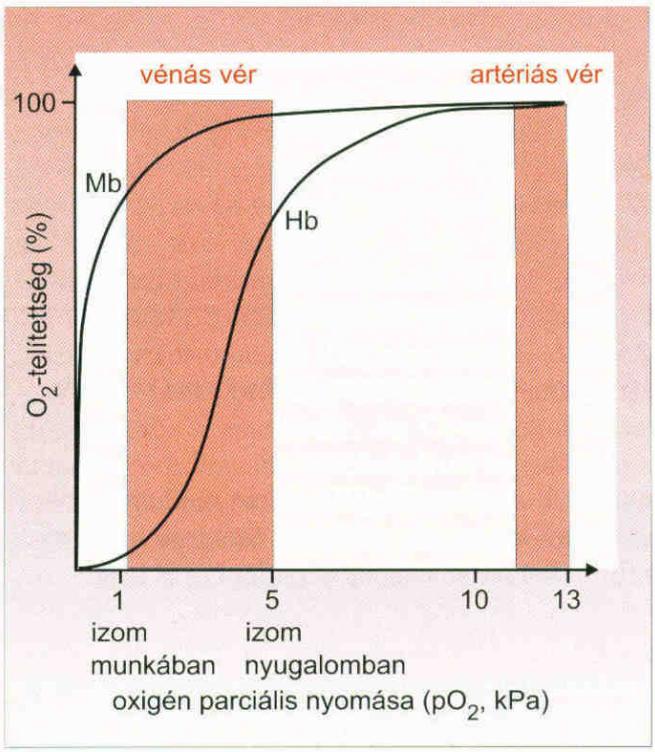
1-32. ábra. A hemoglobin 4 polipeptidláncának elhelyezkedése. *Az alfa-láncok világos szürkével, a béta-láncok sötétszürkével, a hem pirossal jelölve M. Perutz kísérletei alapján*

A Mb egyetlen polipeptidláncból, illetve az ehhez kapcsolódó hemből áll. A Hb globinrészét négy polipeptidlánc alkotja. A négy polipeptidlánc mindegyikéhez egy-egy hem tartozik, amelyhez egy-egy oxigénmolekula kötődhet. A Hb A-t (adult = felnőtt) két alfa- és két béta-lánc alkotja. Az alfa-láncot 141, a béta-láncot 146 aminosav építi fel, mindkét láncban, valamint a Mb polipeptidláncában több (8) α-hélix-szakasz található. A Hb négy polipeptidlánca (α_2 β_2) szorosan kapcsolódik egymáshoz tetraéderes formában gömbölyű, tömör molekulát alkotva, amelynek az átmérője kb. 5,5 nm *(1-32. ábra)*. A négy láncot apoláros és ionos kölcsönhatások (8 ionpár) tartják együtt. A magzati Hb F (foetalis) két alfa- és két gamma-láncból áll.

Az oxigénkötő fehérjéket telítési görbéjükkel jellemzhetjük, amely azt mutatja, hány százalékuk köt O_2-t különböző parciális O_2-nyomásoknál.

A Mb-t, illetve a Hb-t alkotó polipeptidláncok szerkezete, felépítése rendkívül hasonló az élővilágban. Ezek a fehérjék nemcsak a szerkezet–funkció, hanem a génevolúció tanulmányozásának is kedvelt objektumai. A Mb-t, illetve a Hb-t alkotó polipeptidláncokat kódoló gének három exont tartalmaznak; aminosavszekvencia-azonossági vizsgálatok alapján is a közös ős bizonyíthatóan létezett.

Összefüggésben a Mb és a Hb eltérő funkciójával, alapvető különbség mutatkozik a két molekula oxigéntelítési görbéjében. A Mb oxigénkötési görbéje hiperbola, hasonló a görbe lefutása, ha 4 béta- vagy 4 alfa-láncból mesterségesen kialakított Hb oxigénkötését vizsgálják. Ezzel szemben vörösvértestekben az α_2 β_2 Hb oxigéntelítési görbéje szigmoid *(1-33. ábra)*, ami az alegységek közötti kooperatovitásra utal, valamint arra, hogy a Hb allosztérikus protein. Az ábrán látható, hogy a Mb alkalmatlan lenne oxigénszállításra, mivel a szövetekben fennálló viszonyok között nem adná le az oxigént. A Hb negyedleges szerkezete éppen az oxigén leadását teszi lehetővé. A dezoxi-Mb és az oxi-Mb szerkezete hasonló, az oxigénkötés azonban megváltoztatja a Hb negyedleges szerkezetét. A változások lényege, hogy oxigén hatására a Fe(II) és a porfiringyűrű térbeli viszonya módosul, az oxigén nélkül a gyűrű síkjából 0,06 nm-t kiemelkedő Fe oxigént kötve a gyűrű síkjában helyezkedik el. Az oxigén mintegy behúzza a gyűrűbe a hem-vasat. Mivel a Fe(II) kovalensen kapcsolódik a globinlánchoz, ezért az oxigenálás a láncok kapcsolatát is megváltoztatja. A láncok



1-33. ábra. A hemoglobin és a mioglobin oxigéntelítési görbéje in vivo

oxigenálás következtében egymáshoz képest elmozdulnak. Az oxigenálás két lényegi következménnyel jár: megváltoznak az alfa- és béta-láncok közti hidrogénhídkötések és apoláros kölcsönhatások, valamint felszakad a deoxi-Hb-t stabilizáló 8 ionpár.

A nem kovalens elektrosztatikus kereszt kötéseket létrehozó sókötések láncvégi szabad karboxilcsoportok és láncvégi szabad aminocsoportok, a szabad karboxilcsoportok és az a-láncban adott pozícióban található Lys, valamint Asp-His, Asp-Arg között jönnek létre pontosan ismert helyeken.

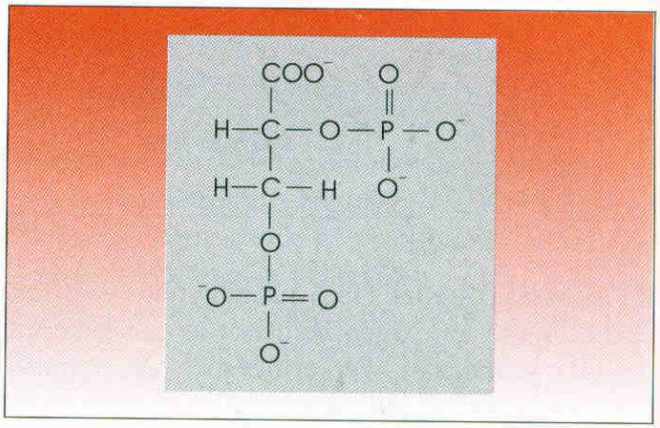
A sókötések kialakulása tehát akadályozza az oxigén kötését. A dezoxi-Hb sókötésekkel "összehúzott" negyedleges szerkezetét T- (tense) módosulatnak nevezik, szemben az oxi-Hb R- (relaxed) formájával. Allosztérikus fehérjék esetében T-formának nevezik azt a módosulatot, ahol a molekulának a szubsztráthoz való affinitása kisebb.

A kérdés az volt, hogy mi stabilizálja a deoxi-Hb negyedleges szerkezetét. Megoldását egy furcsa megfigyelés készítette elő, a Hb oldatban nagyobb affinitással kötötte az oxigént, mint a vörösvérsejten belül, tehát a sejten belül valami rontja a Hb O_2 iránti affinitását.

Az oxigénleadás szabályozása

A hemoglobin negyedleges szerkezetét befolyásoló effektorok, a 2,3-biszfoszfoglicerát szerepe. A hemoglobin oxigénleadása acidosisban

A 2,3-biszfoszfoglicerát (2,3-BPG, *1-34. ábra*) a vörösvértestekben igen nagy mennyiségben termelődik (lásd 2.2. fejezet). Kötődik a dezoxi-Hb-hoz, a kötés ekvimoláris; 1 tetramer Hb-molekula egy molekula 2,3-BPG-t köt. A 2,3-BPG-nek fiziológiás viszonyok között 5 negatív töltése van. A Hb 2,3-BPG kötőhelyét a béta-láncok négy His, illetve 2 Lys aminosava alakítja ki. A pozitív töltésű aminosav-oldalláncok és a negatív töltésű 2,3-BPG közötti kölcsönhatások olyan kötődést hoznak létre, amely stabilizálja a deoxi-Hb negyedleges szerkezetét. A 2,3-BPG oxi-Hb-hoz nem kötődik, ugyanis az oxigenálódás folyamán a láncok elmozdulása miatt a BPG-kötő hely megváltozik, szűk lesz a 2,3-BPG számára. Megváltozik a kötőhelyet



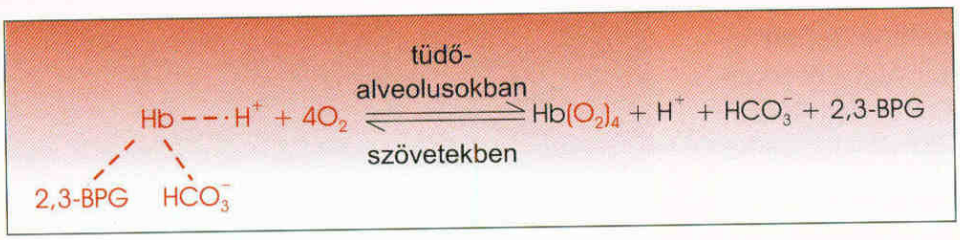
1-34. ábra. A 2,3-biszfoszfoglicerát képlete

kialakító aminosavak közti távolság is, így a Hb egyszerre O_2 és 2,3-BPG kötésre nem képes. A 2,3-BPG koncentrációja kb. 4,5 mM, szabályozott, a szabályozás pontos mechanizmusa azonban ismeretlen.

A glikolízisben (lásd 2.2. fejezet) részt vevő egyes enzimek szintézisének zavarai vörösvértestekben befolyásolják a 2,3-BPG-szintet. Így hexokináz-hiányos állapotokban a 2,3-BPG-szint csökken, ezért az oxigéntelítési görbe balra tolódik, a Hb oxigénaffinitása nő. Piruvát-kináz-hiányos állapotokban a görbe jobbra tolódik, mert a 2,3-BPG-koncentráció emelkedett, a Hb oxigénaffinitása csökken. Azokban a betegségekben, ahol krónikus hypoxia jön létre (pl. krónikus emphysemában, amikor a tüdő „légzőfelülete" jelentősen csökken) a 2,3-BPG-szint megemelkedik 4,5 mM-rol 8,0 mM-ra, s ezzel az oxigénellátás feltételei lényegesen javulnak. Hasonló folyamat játszódik le a magassági viszonyokhoz történő alkalmazkodás során. 2 nap alatt 7,0 mM-ra emelkedik a 2,3-BPG-szint a tengerszint felett 4500 m-hez való alkalmazkodáskor. A koncentrációemelkedés reverzibilis, a „tengerszintre" visszatérés után a 2,3-BPG-koncentráció is eredeti értékére csökken.

Ha a vörösvértest nem tartalmaz 2,3-BPG-t, a Hb telítési görbéje hasonlóvá válik a Mb telítési görbéjéhez. A tárolt vér 2,3-BPG-tartalma folyamatosan csökken, ezért oxigén-affinitása nő. Ez igen előnytelen transzfúziók esetén, amikor a vérpótlás egyik legfontosabb célja az oxigénszállító kapacitás biztosítása. Ezért a tárolt vérhez inozint adnak, amelyből a vörösvérsejtekbe bejutva 2,3-BPG képződik a glikolízis során.

A Hb F kevésbé köti a 2,3-BPG-t, mint a Hb A, így a Hb F O_2-affinitása nagyobb, mint a Hb A



1-35. ábra. A hemoglobin O_2- és CO_2-szállítása

O_2-affinitása. A Hb F Hb A-nál nagyobb O_2-affinitása elősegíti az oxigén bejutását az anyai keringésből a magzati vérkeringésbe. A magzati vörösvértestekben lévő dezoxi-Hb F az anyai vörösvértestekben lévő oxi-Hb A-ból kapja az oxigént a placentáris keringésben. Így az anyaitól eltérő szerkezetű magzati Hb szerepet játszik a magzat optimális oxigénellátásában.

A Hb és a Mb között további lényeges különbség az, hogy a Hb protonokat és CO_2-ot is köt, illetve szállít. Régi megfigyelés, hogy a pH csökkenésével a Hb O_2-affinitása csökken (pH 7,6, valamint a szövetekben szokásos oxigén parciális nyomás esetében, 40 Hgmm pO_2-értéknél a Hb az oxigén 80%-át visszatartja, pH 6,8-nál ez a mennyiség 45%). A metabolizmus során a Hb által leadott O_2-ből mintegy 80%-ban CO_2 lesz és a keletkezett CO_2 kb. 15%-a a Hb-hoz kötődik. Intenzívebb metabolizmus esetén több CO_2 termelődik és az O_2-szükséglet is fokozódik. Ugyanakkor, elsősorban fokozott izomműködésben a laktáttermelés is megemelkedik, a vér-pH csökken, a Hb telítési görbe jobbra tolódik. Ez a Bohr-effektus. A képződött CO_2, illetve a protonok egy részét a Hb úgy köti meg, hogy a béta-lánc N-terminális aminocsoportjával karbamátot ($^-$OOC-HN-R) képez. (Nem ez a CO_2-transzport fő mechanizmusa a vérben, hanem a bikarbonáttranszport). További sókötések jönnek létre, ami tovább csökkenti a Hb oxigénaffinitását. A tüdőalveolusokban a Hb leadja a felvett CO_2-ot, illetve protonokat és O_2-t vesz fel *(1-35. ábra)*.

A hemoglobin aminosav-összetételének változásai. A haemoglobinopathiák

Nemcsak a Hb „molekuláris anatómiája" ismert igen jól, a „molekuláris pathologiája" is. Több mint 300 humán haemoglobinopathiát írtak le, amelyek mint a természet experimentumai (természet alkotta site directed mutagenesis, lásd 3. fejezet) hozzájárultak a Hb szerkezet–funkció megértéséhez. Legtöbbjük, mindössze egyetlen aminosav változásával és csak kisebb szerkezeti és funkcionális hatásokkal jár, azonban bizonyos esetekben egyetlen aminosaveltérés súlyos kórkép kialakulásához is vezethet.

Amikor 1904-ben Chicagoban egy vérszegény feketebőrű diák vérében furcsa sarló alakú vörösvértesteket észlelt egy orvos, hat évig nem merte leközölni új, szokatlan megfigyelését. A kórkép – amelyben egyébként 1000 fekete amerikaiból 4 szenved – leírását 1949-ben követte *Linus Pauling* felfedezése: a Hb S, a **molekuláris betegség** szemléletváltoztató fogalmának kialakítása.

A Hb S mindössze egyetlen aminosavban tér el a Hb A-tól; a béta-lánc 6. aminosava Glu helyett Val. Ez a Hb S fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltozását okozza, a dezoxi-Hb S ol- dékonysága csökken, a Hb aggregálódik. A Hb S-aggregáció hosszú helikális rostok képződéséhez vezet, amely megváltoztatja a vörösvértest alakját, ozmotikus rezisztenciáját, élettartamát, (sickle cell) **sarlósejtes anaemia** alakul ki.

Amikor a megváltozott aminosav a molekula külső részének változását idézi elő, ez rendszerint ártalmatlan, nem jár klinikai tünetekkel, kivéve épp a Hb S-t. Az aktív hely körüli változások már patológiai történésekkel járnak.

A $Hb_{Heathrow}$ esetében egy Phe helyén szerepel Leu, amely a hemoglobin (relaxált) R módosulatát stabilizáló tényező. Az eredmény az O_2-affinitás fokozódása, aminek következtében polycythaemia alakul ki. A Hb_{Boston} Tyr-t (genetikai kódja UAU, UAC) tartalmaz a

proximális His (CAU, CAC) helyén, ennek a változásnak a következtében a Fe(II) kiemelkedik a porfiringyűrű síkjából és Fe(III)-má oxidálódik; methaemoglobinaemia alakul ki. Ezért ezt a Hb-t Hb M-nek nevezik. Ilyenkor a Fe(III) H_2O-t köt O_2 helyett.

A Hb számos más formáját is leírták a Hb_{Boston}-on kívül, a $Hb_{Milwaukee}$, $Hb_{Saskatoon}$, $Hb_{Hyde\ Park}$ mind-mind egyetlen alfa-, illetve béta-láncban elhelyezkedő aminosav mutációja nyomán alakulnak ki. Magyarországon is leírtak abnormális Hb-t. A methaemoglobinaemiával járó $Hb_{Kiskunhalas}$ a Hb_{Boston}-nal azonos defektus eredményének bizonyult. Az irodalomban ismert a Hb_{Buda} és a Hb_{Pest} is.

Egy-egy aminosaveltérés a harmadlagos szerkezet megváltozásához, instabil Hb-ok kialakulásához vagy a negyedleges szerkezet módosulásához, ez esetben az allosztérikus effektorokra való reagálás készségének változásához vezet. A hemoglobin egy vagy több polipeptidlánca szintézisének genetikai rendellenessége a **thalassaemiáknak** nevezett betegségcsoport létrejöttét eredményezi. Különböző mutációk nem stabil, gyorsan bomló Hb-láncok képződését is okozhatják.

A Hb-szintézis öröklődő zavarai a thalassaemia-szindrómák, a Hb F ($\alpha_2\ \gamma_2$) előfordulása felnőttkorban a béta-láncok szintézisének elégtelensége miatt alakul ki. A thalassaemia-szindróma súlyos, az esetek egy részében gyerekkorban fatális betegség, anaemiával, vörösvértest-rendellenességekkel okozhat magzati halált is. Az alfa-lánc-szintézis zavarait α-thalassaemiának a béta-lánc zavarait β-thalassaemiának nevezik.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Csala Miklósnak, Dr. Csermely Péternek, Garzó Tamásnak és Dr. Tóth Miklósnak.

Az anyagcsere

2.
FEJEZET

2.1. Bioenergetika. Energiatermelés és -raktározás az anyagcsere során *(Mandl József)*

Energiatranszformáció
- „Kapcsolt reakciók" elve
- A metabolizmus
- Csoportátvitel – csoportátviteli potenciál

A foszforiltranszfer, ADP/ATP ciklus
- Elektrontranszfer – oxidoredukció
- A legfontosabb elektronátvivők redoxciklusa

A biológiai oxidáció
- Elektrontranszfert katalizáló enzimek – oxidoreduktázok

Terminális oxidáció – oxidatív foszforiláció
- A mitokondriumok szerkezete
- A mitokondriális légzési lánc alkotói
- A terminális oxidáció folyamata
- Az oxidatív foszforiláció
- Az ADP foszforilációja – az akceptor kontroll
- A kemiozmotikus elmélet
- Mitokondriális fehérjék szintézisének zavarai – „mitokondriális betegségek"

A citrátciklus
- A citrátciklus helye az intermedier anyagcserében; a ciklus katabolikus és anabolikus funkciója
- Acetil-CoA képződése piruvátból, a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex
- A citrátkör reakciói
- A citrátkör szerepe a tápanyagok katabolizmusában
- A piruvát-dehidrogenáz komplex aktivitásának szabályozása
- A citrátciklus szabályozása. A ciklust felöltő (anaplerotikus) reakciók
- A piruvát-dehidrogenáz csökkent működésének klinikai vonatkozásai

2.2. A szénhidrátok anyagcseréje *(Ádám Veronika és Mandl József)*

- A legfontosabb szénhidrátok és tulajdonságaik
- A szénhidrátok emésztése, felszívódása és a glukóz bejutása a sejtekbe
- Glikolízis
  - A glikolízis helye az intermedier anyagcserében
  - A glikolízis reakciói
  - A glikolízis energiamérlege. A glukóz aerob és anaerob lebontásának energiamérlege
  - Sejtspecifikus sajátosságok, klinikai, patológiai vonatkozások
  - Redukáló ekvivalensek transzportja a citoszolból a mitokondriumba
- Glukoneogenezis – a glukóz de novo szintézise

A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása
A fruktóz és a galaktóz metabolizmusa
A glikogén szintézise és lebontása
Glikogénszintézis
Glikogénlebontás
A glikogén-anyagcsere szabályozása
Glikogéntárolási betegségek
A vércukorszint szabályozása
A glukóz direkt oxidációja, pentóz-foszfát-út
A glukóz direkt oxidációjának oxidatív szakasza
A glukóz direkt oxidációjának nem oxidatív szakasza. Pentóz-foszfát keletkezése glikolízis intermedierekből
A pentóz-foszfát-út szabályozása, jelentősége, lefolyásának különböző formái
A pentóz-foszfát-ciklus működésének megváltozásával összefüggő kórképek
Bioszintetikus folyamatok a szénhidrátok anyagcseréjében. Glikoproteinek, proteoglikánok szénhidrátláncának szintézise

2.3. A lipidek anyagcseréje *(Ádám Veronika)*
A legfontosabb zsírsavak és jelölésük
Acil-gliceridek. Trigliceridek és az energiaraktározás
A zsírsavak *de novo* bioszintézise
Az acetil-CoA transzportja a mitokondriumból a citoplazmába
A zsírsavszintézis elkötelező lépése és az acetil-CoA-karboxiláz szabályozása
A palmitinsav szintézise. A zsírsav-szintáz
A NADPH forrása
A zsírsavlánc elongációja
Speciális zsírsavak, melyek a zsírsav-szintáz-reakcióban keletkezhetnek
A trigliceridek szintézise és raktározása
Lipolízis – a raktározott zsírsavak mobilizálása a zsírszövetből
A zsírsavak oxidációja
A páros szénatomszámú zsírsavak oxidációja
A páratlan szénatomszámú és a telítetlen zsírsavak oxidációja
Alfa-oxidáció és omega-oxidáció
A ketontestek keletkezése és felhasználása. Ketonaemia, ketonuria
A koleszterin metabolizmusa
A koleszterin szintézise
A koleszterinszintézis regulációja
A koleszterin-észterek keletkezése
Az epesavak keletkezése, metabolizmusa és jelentősége
A lipidek szállítása. Lipoproteinek
A trigliceridek szállítása. Kilomikron, VLDL
A koleszterin szállítása. LDL, HDL
Szabad zsírsavak
A zsírok emésztése és felszívódása
A foszfolipidek és szfingolipidek felépítése és jelentősége
A foszfatidilkolin szintézise

Egyéb foszfolipidek szintézise
A szfingolipidek szerkezete és szintézise
A foszfolipidek és a szfingolipidek transzportja a sejtmembránba
A szteroidhormonok metabolizmusa
Szteroidhormonok szintézise a mellékvesekéregben
A glukokortikoidok és a mineralokortikoidok inaktiválása és szállítása a plazmában
A nemi hormonok szintézise
A D_3-vitamin szintézise

2.4. Az aminosavak anyagcseréje. Porfirin-anyagcsere *(Machovich Raymund)*
Az aminosav-anyagcsere általános ismertetése
A táplálékból származó aminosavak. A fehérjék emésztése
A fehérjeemésztő enzimek aktivitásának szabályozása
Az aminosavak transzportja
Az endogén fehérjék lebontása
Az aminosavak sorsa
Glutamát-dehidrogenáz
Transzaminázok
Egy szénatomos csoportok transzfer reakciói
A nem esszenciális aminosavak bioszintézise
Az aminosavak átalakulásai
A nitrogén sorsa
Az ammónia eliminációja
Az ornitinciklus („ureaciklus")
Az ureaszintézis szabályozása
Az aminosavak szénláncának sorsa és az aminosavakból képződő nitrogéntartalmú vegyületek
A glicin, alanin, szerin és cisztein átalakulása
A triptofán katabolizmusa
A glutamin, prolin, arginin, hisztidin és glutamát átalakulása
A metionin, treonin, valin és az izoleucin katabolizmusa; a B_{12}-vitamin szerepe
A fenilalanin és tirozin katabolizmusa
Az aszparagin és aszpartát metabolizmusa
A leucin és lizin katabolizmusa
Porfirinek és epefestékek
A porfirinek szintézise
A porfirinek lebomlása, epefestékek képződése
A porfirinek hibás anyagcsere-folyamataival értelmezhető kórképek

2.5. A nukleotidok anyagcseréje *(Machovich Raymund)*
A nukleotidok szerkezete
A mononukleotidok forrása
Purin nukleotidok bioszintézise
Purin nukleotidok bioszintézisének szabályozása
Pirimidin nukleotidok bioszintézise
Dezoxiribonukleotidok keletkezése

A dezoxi-timidilát (dTMP) és a timidin-trifoszfát (dTTP) szintézise
Dezoxi-ribonukleotidok bioszintézisének szabályozása
Nukleotidok bioszintézisét befolyásoló vegyületek. Terápiás felhasználás
Purin és pirimidin nukleotidok lebontása
Purinbázisok lebontása
Pirimidinbázisok lebontása
Nukleotidok egymásba történő átalakulásai
B_{12}-vitamin; metil-malonát-acidosis és anaemia
A nukleotidok, mint a legkülönbözőbb funkciókkal rendelkező molekulák forrásai

2.6. Biotranszformáció – méregtelenítés *(Mandl József)*

A biotranszformáció szakaszai
A biotranszformáció első, előkészítő szakasza, a citokróm P450 enzimek
A biotranszformáció második, konjugációs szakasza
A biotranszformáció harmadik, transzport szakasza
A biotranszformáció szabályozása
A biotranszformáció biológiai jelentősége. Méregtelenítés. Klinikai vonatkozások
Az „oxigéntoxicitás"
ROS képződése nem enzimatikus úton
ROS képződése enzimatikus úton
A ROS eliminálása

2.7. Az anyagcsere összehangolt szabályozása *(Mandl József)*

A sejt intermedier anyagcseréjének integrációja és a szabályozás szempontjai
Elágazási pontok a sejtek intermedier anyagcseréjében
A sejtek redox homeosztázisa
Az anyagcsere szabályozása a szervezet szintjén – éhezés, táplálékbevitel
Máj
Izom
Agy (központi idegrendszer)
Zsírszövet
Az anyagcsere integrációja patológiás állapotokban

2.1.

Bioenergetika. Energia-termelés és -raktározás az anyagcsere során

Mandl József

Energiatranszformáció

A biológiai rendszerek működésének az az alapja, hogy folyamatosan képesek a szabadenergia-növekedéssel járó (endergonikus) folyamatok energiaigényét biztosítani. Az élőlények alapvetően izoterm és izobar rendszerek, amelyek térfogatingadozása is viszonylag csekély. Ezért a heterotróf sejtek fő energiaforrása a kémiai energia; a fotoszintézisre képes sejtekkel ez a könyv nem foglalkozik.

Az alapkérdés az, hogy hogyan képes az élőlény a környezetéből folyamatosan energiát felvenni, hogyan képes azt olyan formává átalakítani, amivel fedezni tudja az endergonikus folyamatok energiaigényét. Ez a kérdés nemcsak a szervezet egésze szintjén, hanem egyetlen kiragadott reakció szintjén is felvetődik.

Az energiaigény kielégítését a heterotróf élőlény tápanyagok felvételével biztosítja. A tápanyagokat kémiai reakciók sorozata segítségével lebontja, és az ebből nyert kémiai energiából fedezi a bioszintézis, a mechanikai munka, az aktív transzportok és más folyamatok energiaigényét.

A bioenergetikát, amely a biokémiai reakciókat kísérő energiaváltozásokkal foglalkozik, biokémiai termodinamikának is nevezik.

A termodinamika megkülönbözteti az energia- és entalpiaváltozás (ΔE, illetve ΔH)* mintájára a szabadenergia- és szabadentalpia-változás (ΔF és ΔG) fogalmait. Minthogy az élő szervezetben $\Delta E \approx \Delta H$, $\Delta F \approx \Delta G$ a továbbiakban a biokémiai irodalomban megszokott módon (a Gibbs-féle szabadenergia után) a szabadenergia-változást a szabadentalpia-változás betűszimbólumával (ΔG) jelöljük.

A szabadenergia-változás (ΔG) a termodinamika második főtétele alapján:

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

Egy reakció szabadenergia-változása a termékek és kiindulási anyagok szabadenergia-tartalmából kiszámítható:

$$\Delta G = \Sigma\, G_{\text{termékek}} - \Sigma\, G_{\text{kiindulási anyagok}}$$

Standard körülmények között (a reakcióban részt vevő molekulák koncentrációja 1,0 mol/l, pH 7,0, 25 °C, 101,3 kPa) az egyensúlyi konstans K_e' ismeretében meghatározható egy reakció standard szabadenergia-változása ($\Delta G^{0'}$), amely az adott reakcióra jellemző konstans érték. Egy reakció aktuális szabadenergia-változása (ΔG) azonban mindig a termékek és a kiindulási anyagok aktuális koncentrációjától (és az aktuális hőmérséklettől) függ.

A ΔG és $\Delta G^{0'}$ értéke egy A+B ↔ C+D reakcióban:

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT\ ln\ \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

ahol a dőlt betűvel jelölt értékek az aktuálisan jelen levő mennyiségeket, illetve koncentrációkat jelölik (R: gázállandó, 8,31 J $mol^{-1}K^{-1}$; T: abszolút hőmérséklet, °K)

Ha $\Delta G = 0$

$$\Delta G^{0'} = -2{,}303\ RT \log K_e'\ \text{(J)},$$

ha T= 298 °K, akkor

$$\Delta G^{0'} = -5{,}69 \log K_e'\ \text{(kJ)}$$

---

* ΔH: entalpiaváltozás (a reakcióhő); $\Delta H = \Delta E + p\,\Delta V$: biokémiai reakciók feltételei között a nyomás (p) nem, a térfogat (V) csak kismértékben változik, ezért a ΔH közel azonos a belsőenergia-változással (ΔE); T: abszolút hőmérésklet; ΔS: entrópiaváltozás

Gyakoribb az összefüggés fordított felhasználása, mivel redoxfolyamatokban redoxpotenciál-mérésekkel a $\Delta G^{0'}$ meghatározható, s ebből számítható a K_e'.

A ΔG állapotfüggvény, így értéke független a reakcióúttól. A ΔG ugyanakkor termodinamikai és nem kinetikai fogalom, így értékéből nem következtethetünk a reakció sebességére.

„Kapcsolt reakciók" elve

Ha ΔG értéke negatív (exergonikus reakció), a reakció energiabevitel nélkül „spontán" végbemehet; ha ΔG értéke pozitív (endergonikus reakció), akkor a reakció nem megy végbe („magától") csak megfelelő feltételek esetén. A megfelelő feltételt az exergonikus és endergonikus reakciók kapcsolása jelenti. Ennek lényege, hogy a kapcsolt exergonikus/endergonikus reakciók „eredő", nettó szabadenergia-változása negatív.

Ez a kapcsolódás a szervezet szintjén (azaz folyamatok rendszerét szemlélve) elv, absztrakció; az egyes kapcsolt reakciók szintjén azonban konkrét fehérjék (elsősorban enzimmolekulák) felszínén és részvételével zajló történés. Az élő szervezetben végbemenő (bio)kémiai reakciók döntő többsége gyakorlatilag nem megy végbe „spontán" akkor sem, ha a ΔG értéke negatív, mivel e reakciók aktiválási energiája többnyire nagy. Sebességük az enzimaktivitások aktuális szabályozottságától függ. Endergonikus reakció spontán végbemenetele termodinamikailag nem lehetséges, ez enzim közreműködésével sem következhet be.

A metabolizmus

A **metabolizmus** során a környezetből a szervezetbe, sejtbe kerülő (táp-) anyagok lebomlanak, átalakulnak a sejt saját anyagaivá. A lebontó (az esetek többségében exergonikus) reakciók összességét **katabolizmusnak**, a felépítő (az esetek többségében endergonikus) reakciókat **anabolizmusnak** nevezik. Az anabolikus és katabolikus reakciók együtt jelentik a metabolizmust az élő szervezetek sejtjeiben.

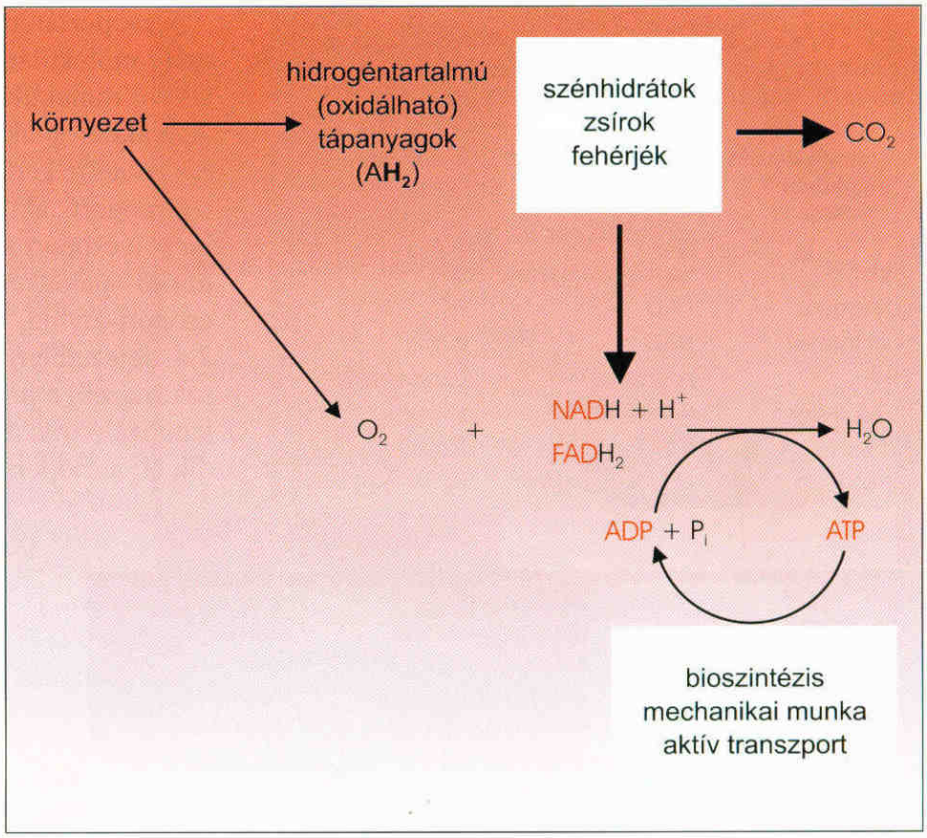
A szintetikus folyamatok során formálódnak a sejt különböző speciális funkciójú molekulái és a monomerekből felépülnek a sejtet alkotó polimer (makro-) molekulák – fehérjék, nukleinsavak, poliszacharidok, lipidek –, amelyek szintén lebomlanak és átalakulnak. A metabolizmusban képződő molekulák egy része a sejt biológiai funkcióiból adódóan miután megtermelődött, távozik a sejtből, illetve a sejtek a számukra nem hasznosítható anyagaikat is kiürítik.

Anyagcserén, metabolizmuson a szervezetben a felszívódástól a kiürülésig lejátszódó összes kémiai átalakulást értjük, amelyek enzimek által katalizált reakciósorozatok útján valósulnak meg. Az **intermedier anyagcsere**, illetve intermedier metabolizmus fogalmát gyakran a kis molekulatömegű anyagok átalakítását célzó sejten belüli folyamatok összességére értik.

Csoportátvitel – csoportátviteli potenciál

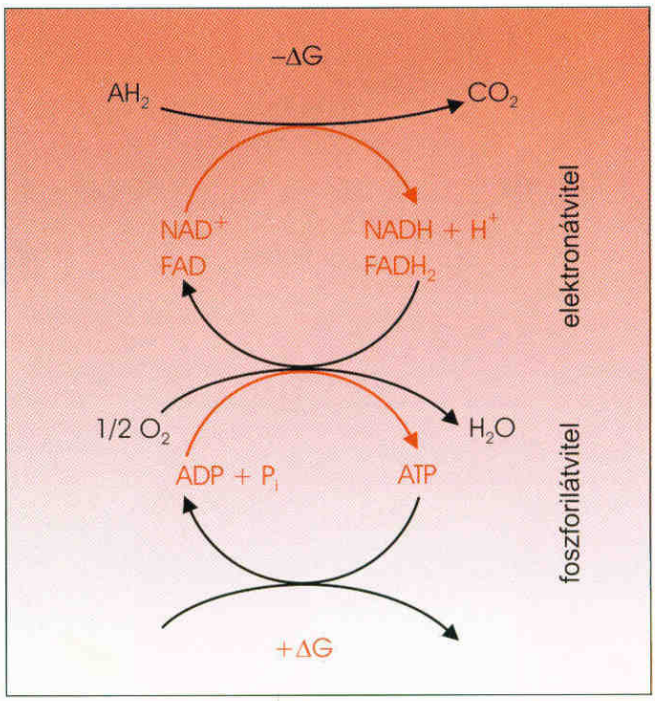
A (heterotróf) szervezet sejtjeinek szintjén az alapkérdés az, hogy milyen mechanizmussal oldható meg az endergonikus reakciók +ΔG igényének fedezése? A megoldás általános, egyszerűsített sémáját aerob kürülmények között a *2-1. ábra* szemlélteti. A tápanyagok (szénhidrátok, zsírok, fehérjék) szerves molekulák, amelyek olyan kötésekben tartalmaznak hidrogént, hogy azt oxidoredukciók révén képesek átadni speciális hidrogén- (elektron-) szállító, (átvivő) molekuláknak. Több, különböző funkciójú hidrogént szállító molekula játszik szerepet az anyagcserében, az energiatranszformáció folyamatában azonban a NAD^+ és a FAD redoxciklusa (részletesen lásd 64. oldalt) döntő jelentőségű. A metabolizmus során képződő NADH-t és $FADH_2$-t képes a sejt végül úgy oxidálni **(terminális oxidáció)**, hogy ehhez kapcsoltan egy endergonikus foszforiltranszfer történik; ADP foszforilálódik és ATP keletkezik **(oxidatív foszforiláció)**. Az ATP terminális foszfátjának hidrolíziséhez számos endergonikus reakció kapcsolható. A *2-2. ábrán* látható sémán különböző exergonikus és endergonikus reakciósorozatok, illetve reakciók kapcsolódnak. Az energetikai szempontból lényegi történések elektron-, illetve foszforiltranszferek.

Viszonylag egyszerű élő szervezetekben, pl. egy baktériumban is legalább ezerféle kémiai reakció történhet. A reakciók jelentős része valamilyen



2-1. ábra. Energiatranszformáció sémája az aerob heterotróf anyagcserében

atomcsoport vagy adott esetben elektron, proton, átvitelével jár. Rendszerezésüknek az egyik – számos következtetés levonására alkalmat adó – módja, amikor a kategorizálás az átvitt csoport alapján történik. A csoportátvitel, illetve -szállítás eszköze egy közös intermedier, szállító, átvivő molekula. Azonos típusú csoportátviteli reakciók különböző molekulák között, azonos átvivő közbeiktatásával bonyolódnak. Az átvivők az élővilágban többnyire univerzális molekulák. Egyaránt donorok és akceptorok; képesek a csoport felvételére és leadására. A csoportátvitelt enzimek katalizálják, kivételek azonban vannak. Számos biokémiai reakció esetében ezért a reakció feltétele nemcsak a reagáló molekulák és az enzim, hanem a koenzimfunkciót betöltő, átvivő molekula jelenléte is. Az átvivő molekulák, illetve előanyagaik (prekurzoraik) egy részének szintézisére az emberi szervezet nem képes. Táplálkozásélettani szempontból ezek a vegyületek legtöbbször vízoldékony **vitaminok**, illetve azok származékai *(2-1. táblázat)*.



2-2. ábra. Elektronátvitel és foszforilátvitel az energiatranszformációban. *Piros nyíl: endergonikus folyamat, fekete nyíl: exergonikus folyamat)*

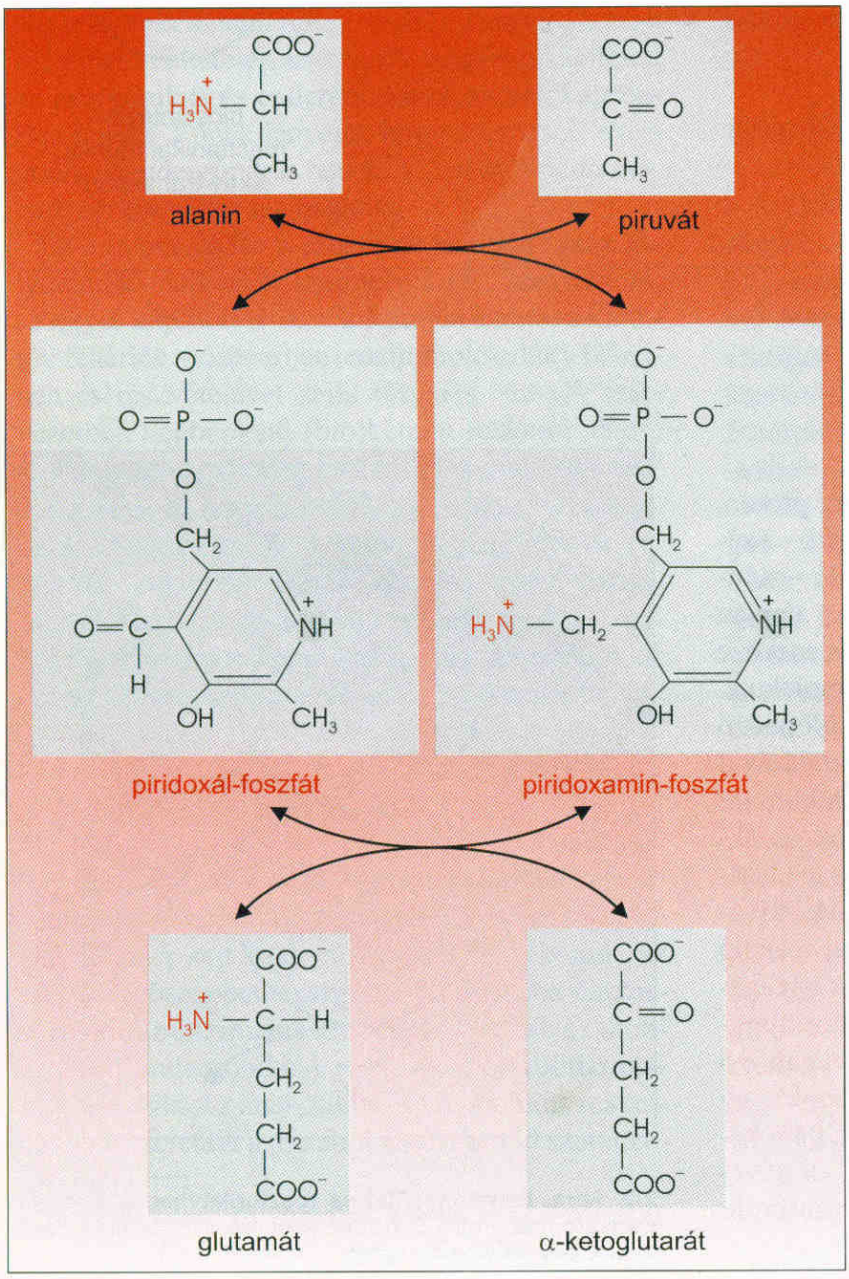
2-1. táblázat. Egyes, csoportátvitelben szerepet játszó vízoldékony vitaminok és azok néhány koenzimszármazéka

Átvitelre kerülő „aktivált" csoport	Átvivő, „carrier" koenzim	Vitamin
aldehid	tiamin-pirofoszfát	B_1
elektronok	FAD	B_2
elektronok	NAD	niacin
acil-	koenzim-A	pantoténsav
C1-töredék	tetrahidrofolsav	folsav
CO_2	biotin	biotin
amino-	piridoxál-foszfát	B_6

A csoportátvitel iránya változó: a csoport valamely molekuláról az átvivő molekulára, illetve az átvivő molekuláról egy más molekulára kerülhet. A reakció gyakran mindkét irányban lehetséges. Az átvitelre kerülő csoportnak az átvivőre kerülése – a csoport „aktiválása" – átmenet; „végleges" helyére a csoport az átvivő molekuláról kerül. A *2-3. ábrán* példaként bemutatott folyamat aminocsoport-átvitel, transzaminálás (részleteket lásd a 2.4. fejezetben). Az átvivő molekula B_6-vitaminszármazék, a piridoxálfoszfát, amely a folyamatot katalizáló transzamináz enzimhez kötve helyezkedik el; a csoportátvitel reverzibilis.

A csoportátvitel tendenciája a csoportátviteli potenciállal jellemezhető. A csoportátviteli potenciált a csoportátviteli reakció $\Delta G^{0'}$-értéke határozza meg.

Az energiatranszformáció szempontjából elsősorban a foszforil- és az elektron- (hidrogén-) transzfer kitüntetett fontosságú.



2-3. ábra. Aminocsoport átvitele alaninról α-ketoglutarátra, illetve glutamátról piruvátra

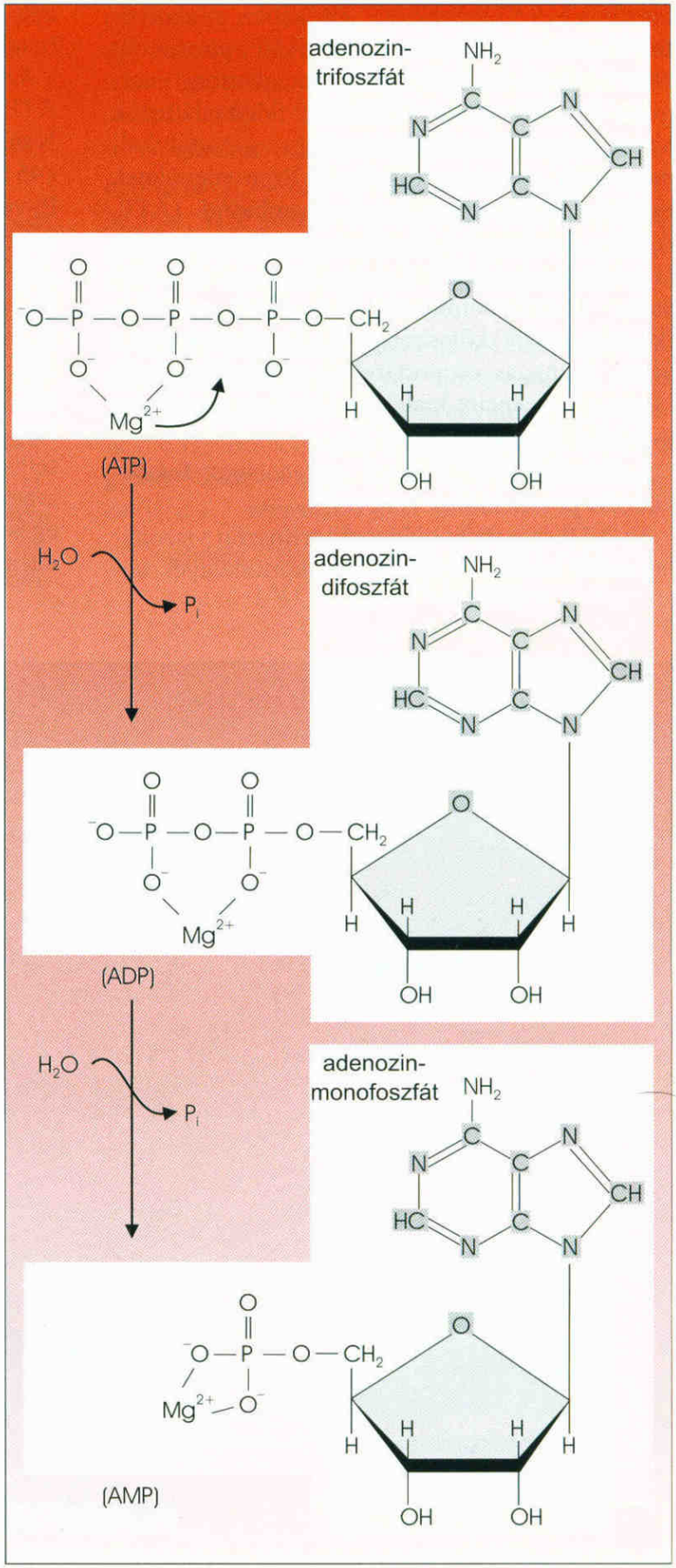
A foszforiltranszfer, az ADP/ATP ciklus

A foszforilcsoport átvitele alapvető az exergonikus és endergonikus reakciók közötti szabadenergia-transzferben. A *2-2. táblázat* egyes, az anyagcserében jelentős foszfátvegyületek foszfátcsoportjai hidrolízisének $\Delta G^{0'}$-értékeit mutatja. A csoportátvitel logikája szerint foszforilcsoport átvivő funkcióra olyan vegyület alkalmas, amely lehet foszforildonor és -akceptor is, vagyis csoportátviteli potenciálja közepesen nagy. A foszforil-transzferben az adenozin-foszfátok szerepe a legfontosabb. Az ATP adeninból, ribózból és három foszfátcsoportból áll, a sejtben Mg^{2+}-komplexet alkot *(2-4. ábra)*, terminális foszfátjának hidrolízise, mint exergonikus reakció, számos endergonikus reakcióhoz kapcsolódhat. A 2-2. táblázatban felsorolt foszfátvegyületek aszerint, hogy a foszfátcsoport hidrolízisének $\Delta G^{0'}$ értékei hogyan viszonyulnak az ATP terminális

2-2. táblázat. Az anyagcserében jelentős néhány foszfátvegyület foszfátcsoportjai hidrolízisének $\Delta G^{0'}$-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
glukóz-1-foszfát	–20,9
glukóz-6-foszfát	–13,8
fruktóz-6-foszfát	–15,9

* A C3-foszfát-csoport hidrolízisének $\Delta G^{0'}$-értéke



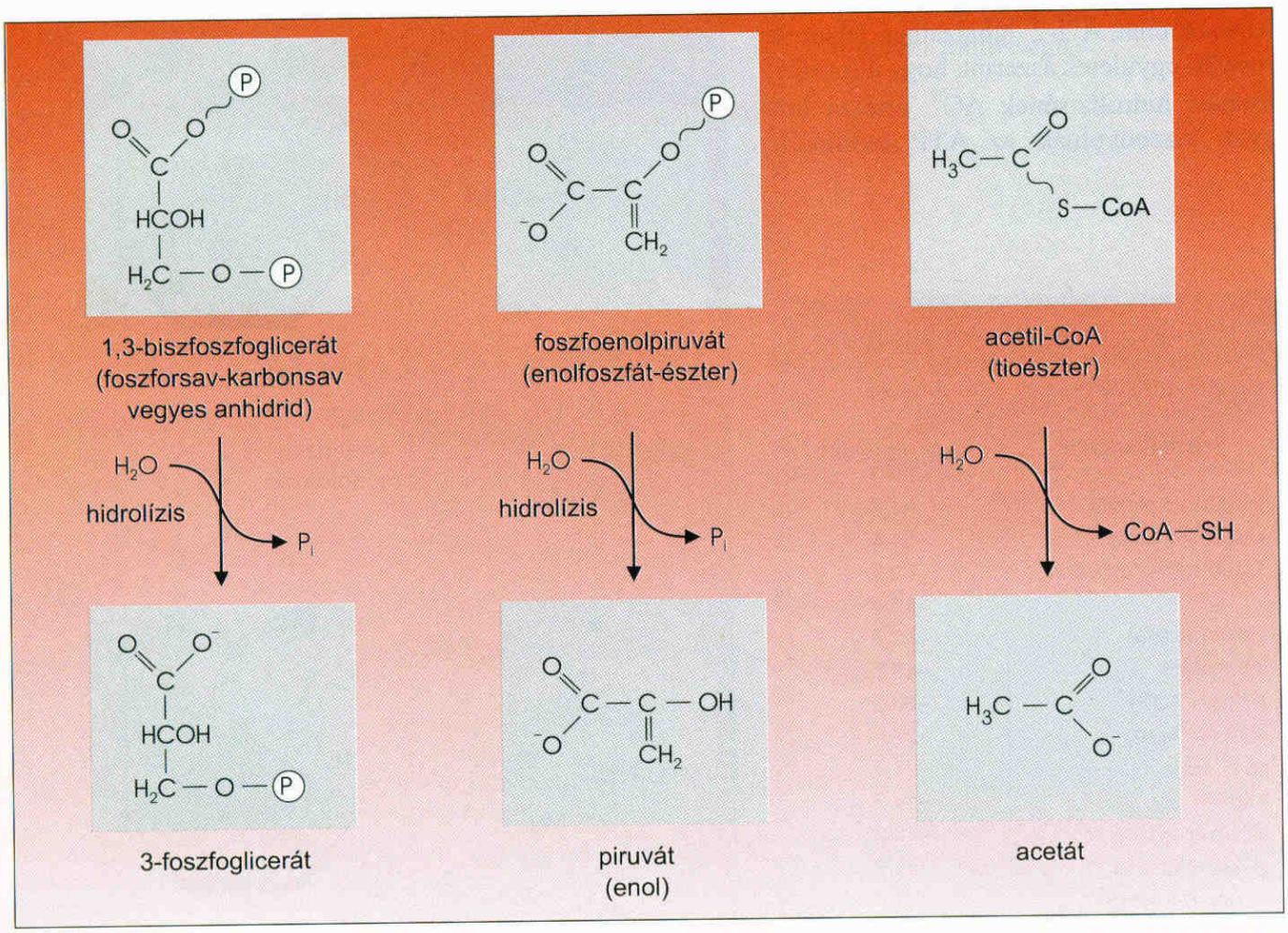
2-4. ábra. ATP, ADP, AMP

foszfátja hidrolízisének $\Delta G^{0'}$ értékéhez, ez alatti és feletti részre osztható. Az ATP, ADP, pirofoszfát alatt található észterfoszfátok ún. „alacsony energiájú" foszfátvegyületek. Az ATP felett találhatók az ún. „magas energiájú", azaz nagy csoportátviteli potenciálú, makroerg foszfátok. Ezen vegyületek esetében hidrolíziskor foszforsavanhidrid- (ATP, ADP), foszforsav-karbonsav vegyes anhidrid- (1,3-biszfoszfoglicerát C-1 foszfátja), enolfoszfát-észter- (foszfoenolpiruvát) *(2-5. ábra)*, savamid- (kreatin-foszfát) kötésből kerül a foszforilcsoport a vízre. A magas csoportátviteli potenciálra utaló kötést a koncepciót kialakító *Lipmann* javaslatára „~"-jellel jelölik.

A foszfátcsoport átviteli potenciálját **foszforilációs potenciálnak** is nevezik.

Az ATP és a többi nukleozid-trifoszfát viszonylag stabil molekula. Fiziológiai körülmények között enzimek hatására defoszforilálódnak, illetve bomlanak le.

Az **ADP/ATP ciklus** központi jelentőségű. Az ATP intracelluláris koncentrációja 2–10 mmol/l. Nyugalomban egy 70 kg-os férfi 24 óra alatt kb. 145 kg ATP-t „fogyaszt", azaz alakít át ADP-vé és P_i-vé. Ezt a szervezet úgy valósítja meg, hogy kb. 51 g ATP áll rendelkezésére. Az ATP-készlet így „nyugalomban" mintegy 30 s-ra elég; a szükséglet kb. 0,1 kg/perc. E szerint a számítás szerint naponta mintegy 3000-szer kell az ADP-molekulának újra foszforilálódnia. Aktív izommunka esetén azonban az ATP-„fogyasztás" pillanatok alatt 0,5 kg/perc-re emelkedhet. Az ATP folyamatosan felhasználódik és újratermelődik. Az ADP/ATP arány meghatározza a sejt energiaállapotát, az egész metabolizmus sebességét és irányát. Az adenilát rendszer kiemelkedő fontosságú a fosz-



2-5. ábra. Magas csoportátviteli potenciálú vegyületek hidrolízise. *A foszfátvegyületek hidrolízise mellett az acetil-CoA hidrolízise a magas energiájú tioészterkötés hidrolízisére példa. Az ATP, ADP hidrolízisét a 2-4. ábra mutatja be*

foriltcsoport-transzferben. A rendszer kapacitását az **energiatöltéssel** (energy charge) is jellemzik.

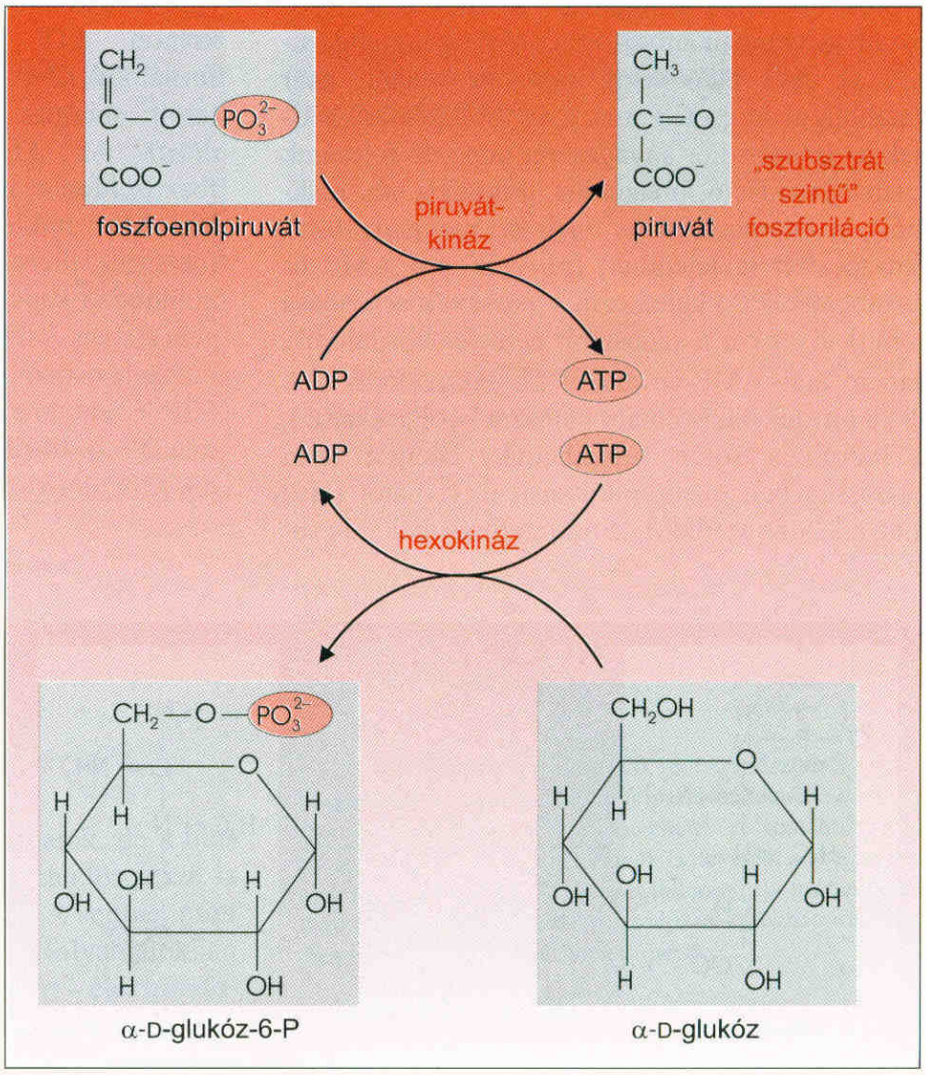
$$\text{energiatöltés} = \frac{1}{2}\,\frac{2\,[ATP] + [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

A nevező a teljes adenilátkészlet (pool) ([ATP]+[ADP]+[AMP]), a számláló a magas csoportátviteli potenciálú savanhidridkötések száma a poolban: 1 molekula ATP-ben 2, egy molekula ADP-ben 1. Az energiatöltés értéke így 1–0 között ingadozhat; ha minden adenilát ATP lenne, akkor 1, ha minden AMP, akkor 0.

Aerob körülmények között legnagyobb mennyiségben ADP a mitokondriumban, a terminális oxidációhoz kapcsoltan az **oxidatív foszforiláció** során foszforilálódik ATP-vé. Azok a vegyületek azonban, amelyeknek a foszforilcsoport-átviteli potenciálja magasabb, mint az ATP-é, az esetek egy részében képesek közvetlenül az ADP-nek átadni foszforilcsoportjaikat. Ilyen reakció a citoszolban zajló glikolízis során az 1,3-biszfoszfoglicerát → 3-foszfoglicerát, illetve a foszfoenol-piruvát → piruvát reakció, amelyekhez kapcsoltan ADP foszforilálódik ATP-vé. (A reakció mechanizmusát részletesen tárgyaljuk a 106. oldalon.) Ezt **szubsztrátszintű foszforilációnak** nevezzük *(2-6. ábra)*.

Az ATP mint foszfátdonor képes átadni a terminális foszfátcsoportot. Ilyen típusú reakciók során „alacsony energiájú" foszfátvegyületek keletkeznek. Klasszikus példája e kapcsolt reakcióknak a glukóz foszforilációja, amely a glikolízis első lépése (lásd 2.2. fejezet):

$$\text{glukóz} + P_i \rightarrow \text{glukóz-6-foszfát} + H_2O$$
$$\Delta G^{0'} = +\,13{,}8\ \text{kJ/mol}.$$



2-6. ábra. Szubsztrátszintű foszforiláció a foszfoenolpiruvát → piruvát átalakulás során. Foszfátcsoport-átvitel a glukóz → glukóz-6-foszfát átalakulásban

Ez a reakció endergonikus, tehát spontán nem mehet végbe, azonban hozzákapcsolható egy másik exergonikus reakció:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$$
$$\Delta G^{0'} = -30{,}5 \text{ kJ/mol.}$$

A két reakció a sejtekben a hexokináz enzim segítségével kapcsolódik (2-6. ábra):

$$\text{glukóz} + ATP \rightarrow \text{glukóz-6-foszfát} + ADP$$
$$\Delta G^{0'} = -16{,}7 \text{ kJ/mol.}$$

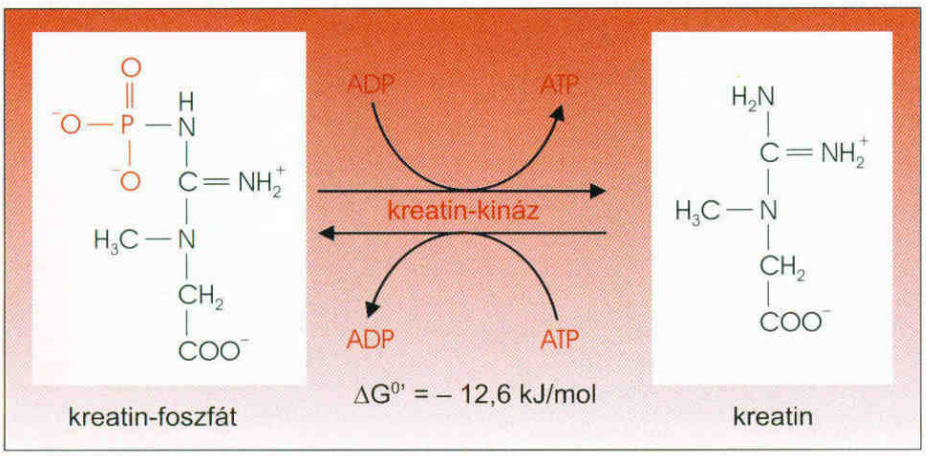
Több lépéses reakció, illetve részreakciók esetén az egyes reakciók $\Delta G^{0'}$-értékei additívak; az eredő $\Delta G^{0'}$ a részreakciók $\Delta G^{0'}$-értékeinek matematikai összege.

A kapcsolt reakció végbemegy, sőt eléggé exergonikus folyamat ahhoz, hogy a sejtben gyakorlatilag irreverzibilis legyen. Az ilyen típusú reakciók funkciója különböző. Számos reakciósorozatban azonban a foszforilációs reakció rendszerint az első, elkötelező, „aktiváló" lépés, akár katabolikus út esetében is. Erre több példát kínálnak az intermedier anyagcserét tárgyaló fejezetek (zsírsav-oxidáció, ureaciklus, glikolízis stb. reakciói), az energia-„átadás" akár két makroerg foszfáttranszfert is jelenthet; [pl. ATP-ből AMP és pirofoszfát (PP_i) keletkezik a zsírsavak aktiválása során]. Ilyenkor a szubsztrát nem foszforilálódik, hanem acil~AMP-vé alakul át, „aktiválódik". A PP_i a pirofoszfatáz enzim hatására két P_i-re hasad; e hidrolízis során felszabaduló energia teszi összességében exergonikussá a folyamatot (lásd még a 2.3. fejezetben). Bioszintetikus reakciók során gyakran a foszforiláció a bevezető lépés, illetve szerepelhet a bioszintézis további reakcióiban is. Nukleinsavszintézis során a prekurzor nukleozid-trifoszfátok szintén PP_i-t vesztenek és így épülnek be az RNS-, illetve DNS-láncba.

Az ATP nemcsak bioszintetikus reakciókban energiadonor. A transzportfolyamatok egy része igen jelentős energiafogyasztók. Például az emberi vesében, illetve agyban az energiafelhasználás mintegy fele, esetenként kétharmada a Na^+/K^+-ATPáz működését fedezi, amely a K^+ és a Na^+ koncentrációgrádiens ellenében történő transzportját teszi lehetővé.

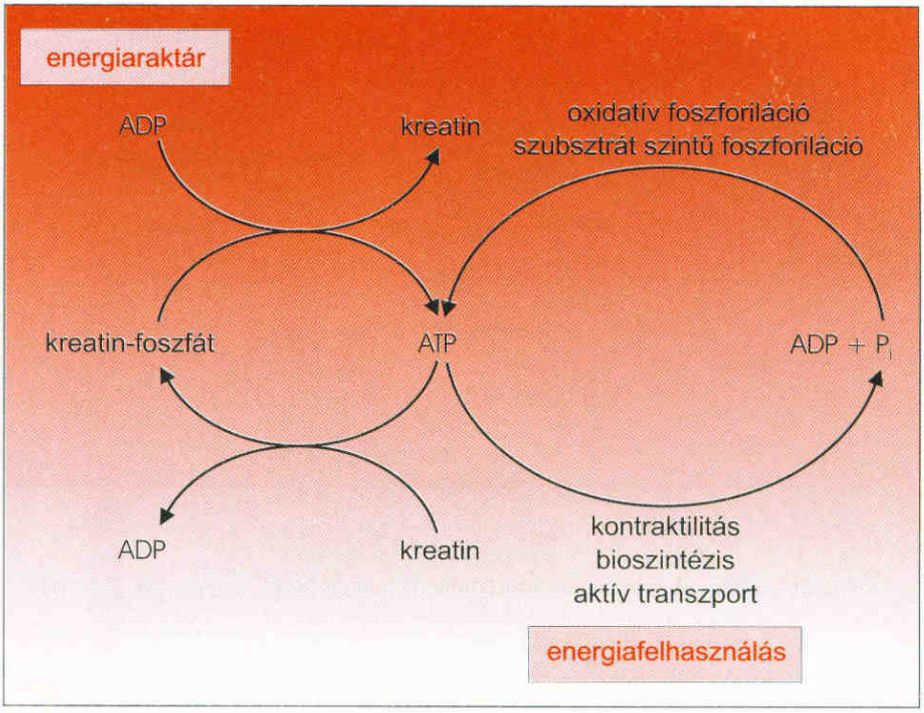
Az ATP kötődése egy fehérjéhez, majd hidrolízise ADP-re, illetve P_i-ra és az ezt követő fehérje-konformáció-változás az alapja a kontraktilitásnak, a mechanikai mozgásnak is (lásd a 6.2. fejezetet).

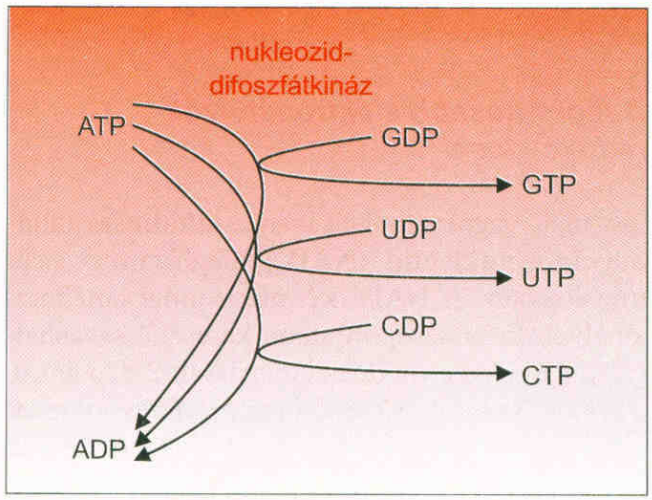
Az ATP-nek nincs energiaraktározó funkciója. Ezt a szerepet elsősorban az izomszövetben és az agyban a kreatin-foszfát (2-2. táblázat) tölti be. A kreatin ATP terhére kreatin-foszfáttá foszforilálódik *(2-7. ábra)*. Kreatin-foszfát formájában tárolt energia közvetlenül mobilizálható *(2-8. ábra)*. Az ADP/ATP ugyan a legfontosabb foszforildonor, illetve -akceptor, de nem az egyetlen. Más nukleozid-trifoszfátok is szerepelnek foszforil-, illetve végső soron energiadonorként a különböző kapcsolt reakciókban: pl. a glukoneogenezisben, a fehérjeszintézisben GTP, a szénhidrátszintézisben általában UTP, lipidszintézisben CTP. Ezekben a reakciókban keletkező GDP, UDP és CDP foszforilációja azonban ATP terhére történik *(2-9. ábra)*.



2-7. ábra. A kreatin foszforilációja

2-8. ábra. A kreatin-foszfát-energiaraktár szerepe





2-9. ábra. A GDP, UDP, CDP foszforilációja

2-3. táblázat. Néhány fontos vegyület által alkotott redoxielektródok standard redoxipotenciálja

	E_0' (V)
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/malát	–0,17
Fumarát/szukcinát	+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

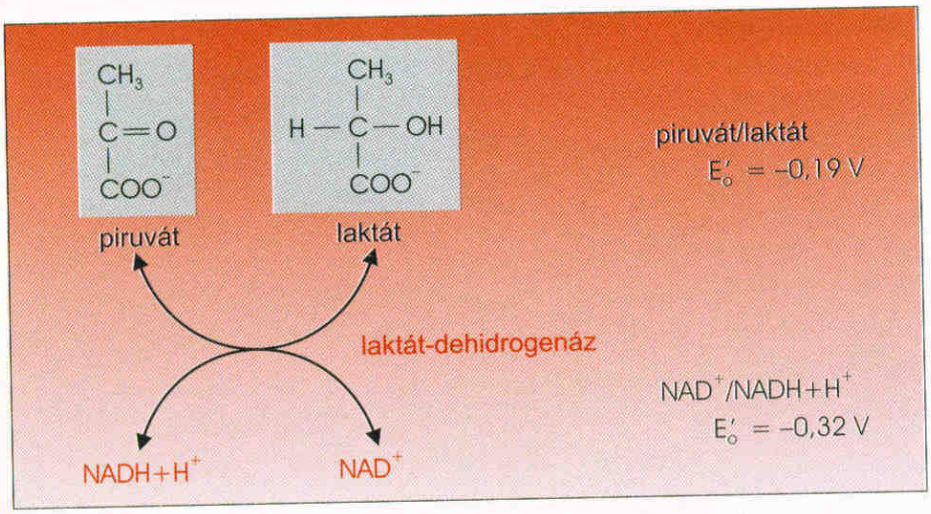
Elektrontranszfer –oxidoredukció

Elsősorban a katabolikus folyamatok, de a bioszintetikus, anabolikus reakciók jelentős része is oxidoredukció – elektrontranszfer. A sejtben mint vizes oldatban a különböző redoxfolyamatokban részt vevő molekulák redoxrendszert – elektrondonor/elektronakceptor konjugált párt képeznek *(2-3. táblázat)*.

Az elektronátadás iránya egyik redoxrendszerből a másikba, az elektronvesztés, illetve -felvétel tendenciája a standard redoxipotenciállal (E_0') jellemezhető. A standard redoxipotenciált redukciós potenciálnak is nevezik, ami a rendszer elektronfelvétel iránti készségét jellemzi. Ily módon a standard redoxpotenciál funkciója redoxreakciókban megfelel a csoportátviteli potenciál funkciójának.

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta E_0'$$

(n: az átvitt elektronok száma; F: a Faraday-konstans)



2-10. ábra. A piruvát ↔ laktát átalakulás

Az aktuális redoxpotenciál egy oxidoredukciós reakcióban azonban a Nernst-egyenlet szerint a résztvevő anyagok koncentrációinak hányadosától függő érték, amely az oldat pH-jától is függ. Az E_0'-értékek arra az esetre vonatkoznak, amikor a mérendő redoxrendszer oldatában a pH 7,0, az oxidált/redukált komponensek koncentrációjának aránya 1 és a vonatkoztatási alap a standard H-elektród.

$$E = E_0' + \frac{RT}{nF} \log \frac{[ox]}{[red]}$$

Így például a piruvát/laktát és a $NAD^+/NADH+H^+$ redoxrendszer *(2-10. ábra)* redoxpotenciálja – ennek megfelelően a reakció aktuális ΔG értéke is – a piruvát- és a laktát-, illetve a NAD^+- és NADH-koncentráció arányának függvénye.

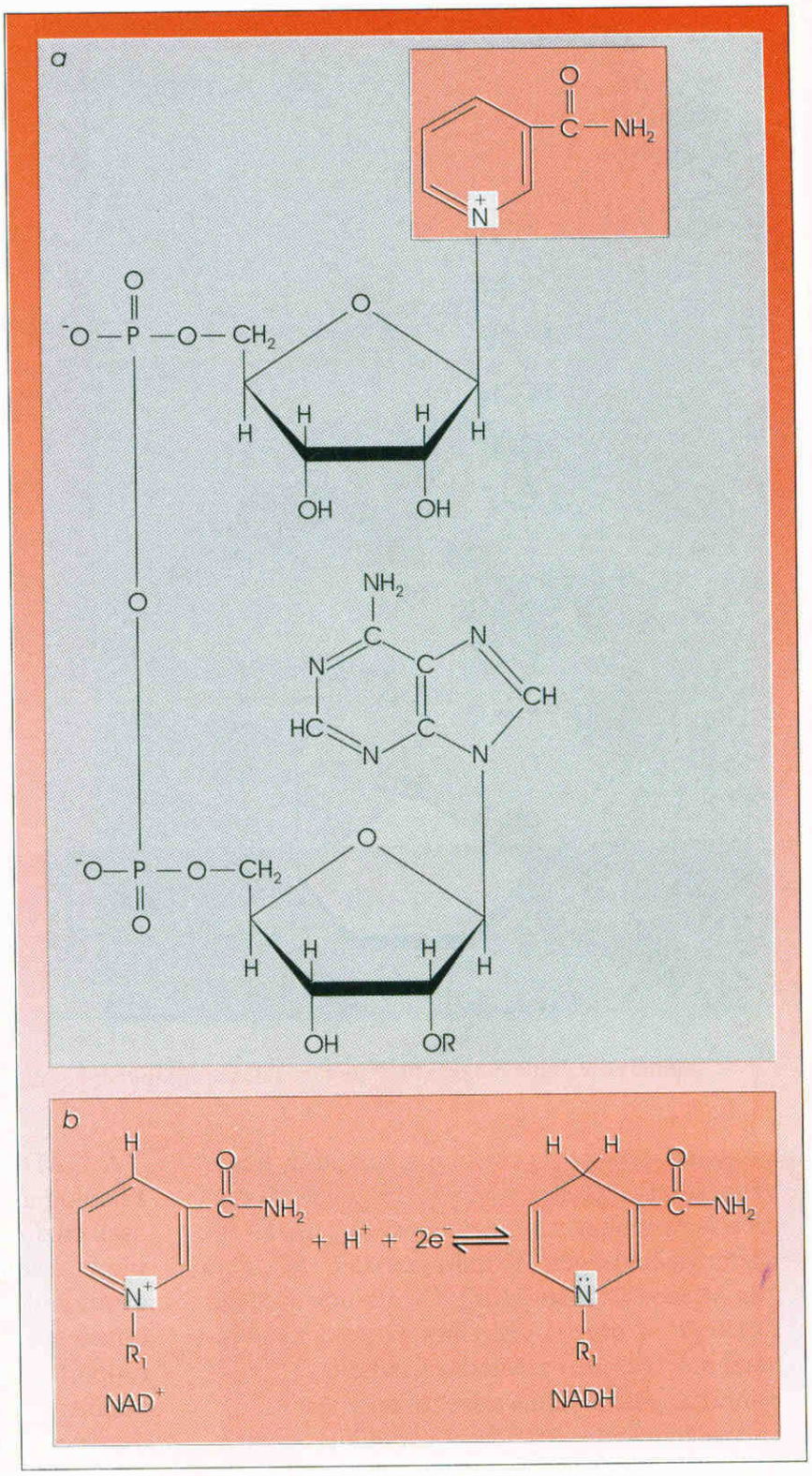
$$\Delta G = -nF\Delta E$$

Az elektrontranszferrel járó reakciókban az elektronok először speciális átvivő molekulára kerülnek. A legfontosabb elektronátvivő molekulák a NAD^+, FAD, $NADP^+$, glutation, aszkorbinsav. A *2-10. ábrán* látható, hogy a piruvát ↔ laktát átalakulás esetén az elektronátvivő a NAD^+. Az átvivő molekulák redukáltsági foka meghatározó jelentőségű, determinálja a sejt metabolizmusát. Az ATP/ADP arány mellett a $NAD^+/NADH + H^+$ arány jellemzi a sejt intermedier metabolizmusának állapotát, illetve megszabja annak irányát. Emellett azonban más-más aspektusokból rendkívül fontos a többi nukleozid-trifoszfát/nukleozid-difoszfát, illetve oxidált/redukált elektronátvivő arány is. Különbség a két csoportátviteli rendszer között, hogy valamennyi foszforilálási reakció enzimatikus, azonban a sejtben folyó oxidoredukciók egy része nem enzimatikus folyamat. A nukleozid tri-, illetve difoszfátok így enzimek szubsztrátjaként (koenzimként) funkcionálnak. A redoxfolyamatokban részt vevő elektronátvivő molekulák egy kisebb része (glutation, aszkorbinsav) viszont nemcsak koenzim, hanem spontán, nem enzimatikus reakció résztvevője is lehet.

A legfontosabb elektronátvivők redoxciklusa

A tápanyagok lebontásában a **nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (NAD^+)** meghatározó elektronakceptor. A NAD^+ két nukleotidot tartalmaz, amelyek foszfátcsoportjaikon keresztül savanhidridkötéssel kapcsolódnak egymással *(2-11a ábra)*. A nikotinsavamidban található piridingyűrű miatt a NAD^+-ot (és a $NADP^+$-t) piridinnukleotidoknak is nevezték. A tápanyaglebontás különböző enzimatikus reakciói során lépésenként a különböző molekulák 2 hidrogénatomot adnak le. Ebből a NAD^+ nikotinsavamid-gyűrűje két elektront és egy protont (H^-, hidridion) vesz át az oxidálódó szubsztráttól, míg a szubsztrát másik H-je H^+ formájában az oldatban jelenik meg *(2-11b ábra)*. A dehidrogenálás általában a *2-12. ábra* szerinti módon történik. (Erre példa a 2-10. ábrán szemléltetett laktát ↔ piruvát reakció is.)

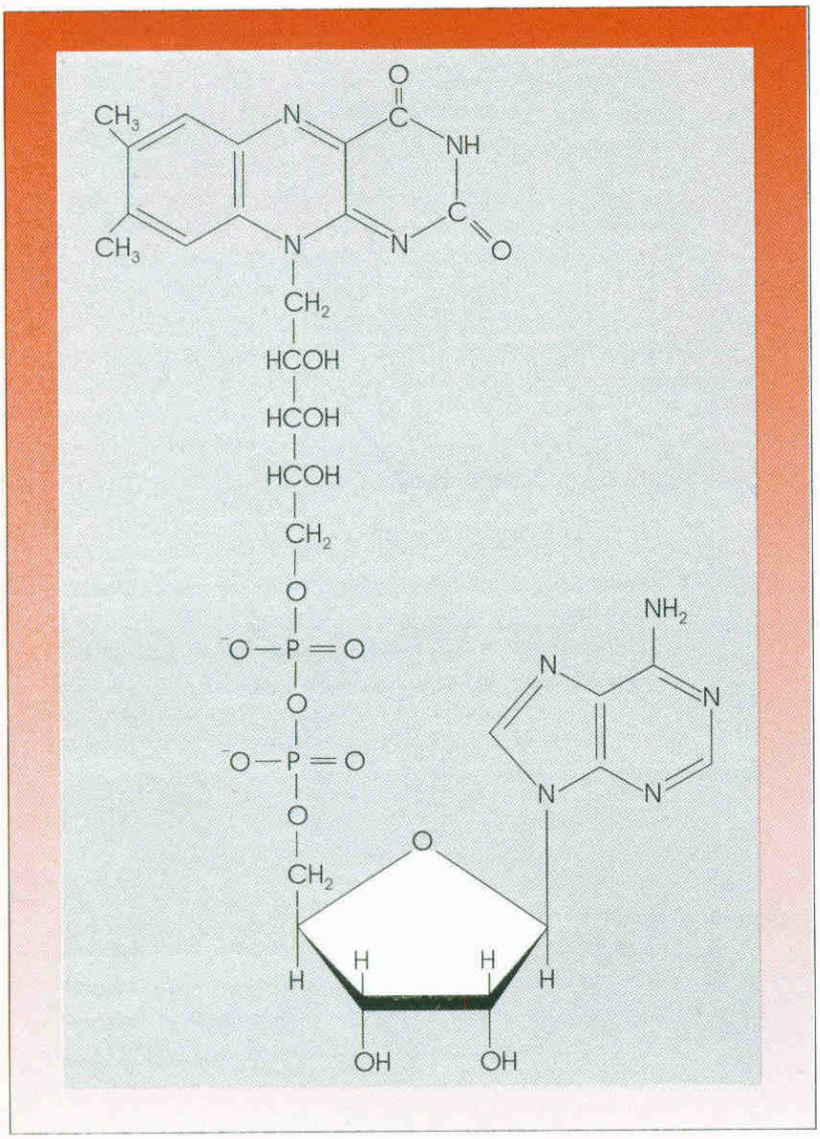
A NAD^+ mellett fontos elektron- (hidrogén-) akceptor a **flavin-mononukleotid (FMN)** és a **flavin-adenin-dinukleotid (FAD)** *(2-13. ábra)*. A FAD izoalloxazint, ribitolt, foszfátot és AMP-t tartalmaz, az FMN izoalloxazint, ribitolt és foszfátot. Szemben a nikotinsavamid-gyűrűvel, az izoallo-



2-11. ábra. A NAD(P)$^+$ szerkezete. NAD$^+$ esetében R = H. *(a) A NADP$^+$ esetében az R helyén foszforilcsoport található, (b) a NAD nikotinamidgyűrűjének hidridion-felvétele és -leadása*



2-12. ábra. A NAD$^+$-koenzimmel működő dehidrogenázok által katalizált reakció általános sémája



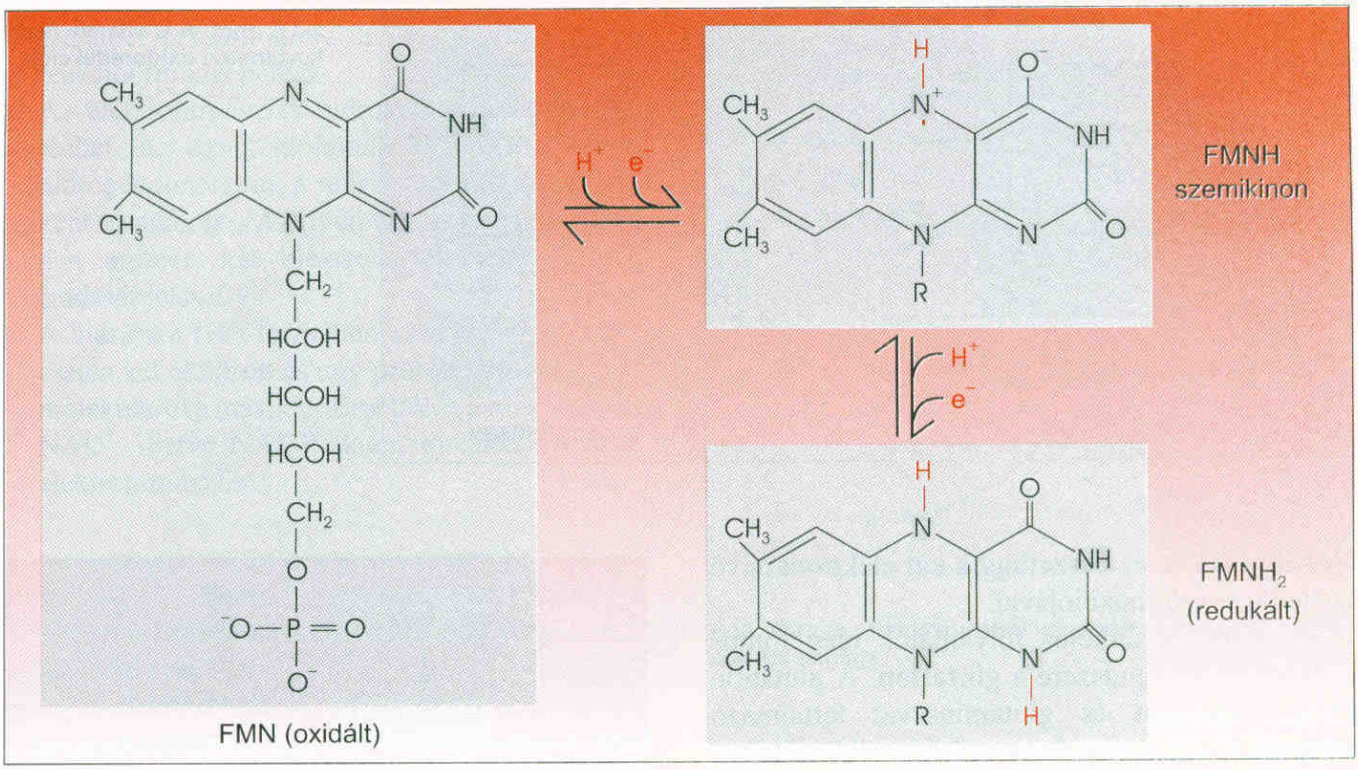
2-13. ábra. A FAD szerkezete

xazin-gyűrű egy vagy két hidrogénatomot képes felvenni, illetve leadni. A felvétel és leadás két lépésben is történhet; ez megteremti az 1 elektrontranszfer lehetőségét. 1 hidrogénatom felvétele esetén az izoalloxazin gyűrű szemikinon formája alakul ki *(2-14. ábra)*. A flavincsoportokkal működő enzimek esetében a dehidrogenálás a *2-15. ábrán* ábrázolt reakciótípus szerint megy végbe.

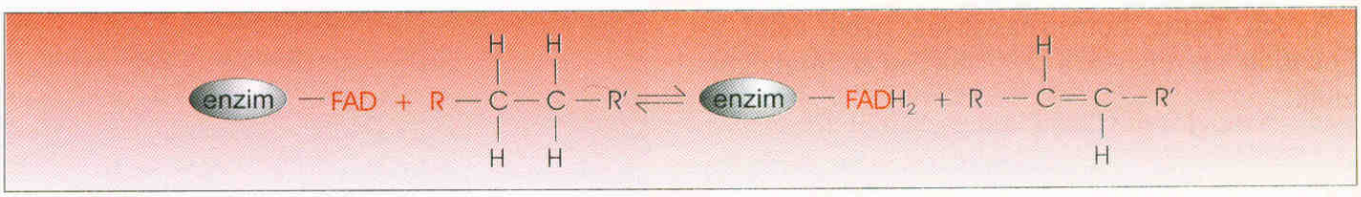
Az oxidáció leggyakrabban katabolikus, a redukció anabolikus folyamat. A bioszintetikus, reduktív folyamatok (redukciós szintézisek) esetében „redukáló erőre" , elektrondonor koenzimre van szükség. A nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát $NADP^+$ redukált formája több redukciót katalizáló enzim koenzime (2-11a ábra). A NADPH a NADH-hoz hasonlóan hidridion formájában adja le és veszi fel az elektronokat.

A NADH, NADPH, $FADH_2$ stabil molekulák. Fiziológiai körülmények között elektronjaikat csak enzimek által katalizált reakciókban adják le, illetve veszik fel. A NAD^+, illetve $NADP^+$ ezekben a reakciókban koenzim (az enzimhez lazán, nem kovalensen kötődnek), a FAD, FMN prosztetikus csoportok (kovalens kötéssel kapcsolódnak az enzimhez). A NAD^+ oxidált és redukált formában összesen kb. 10^{-5} M koncentrációban van jelen a szövetekben. A NAD^+/NADH arány a sejtben nagyobb egynél. A NADP és a NADPH összmennyisége egy nagyságrenddel kisebb, mint a NAD^+ és NADH összmennyisége. A $NADP^+$/NADPH arány, szemben az előzővel, a NADPH irányába van eltolva.

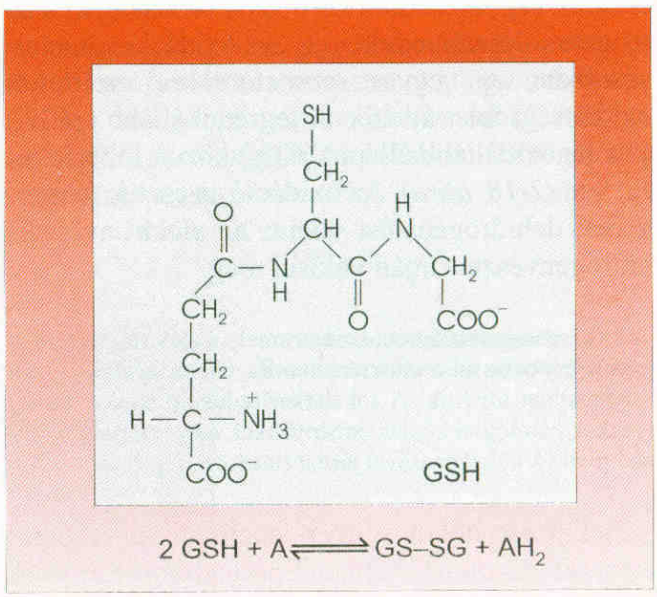
A sejtben így fiziológiai körülmények között elsősorban NAD^+ és NADPH van nagyobb mennyi-



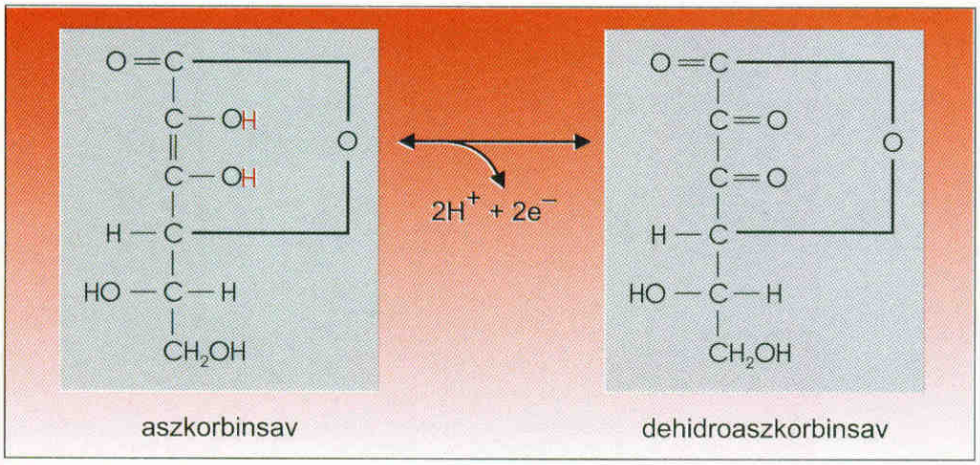
2-14. ábra. Az FMN redukciója



2-15. ábra. A FAD prosztetikus csoporttal működő dehidrogenázok által katalizált reakció általános sémája



2-16. ábra. A glutation (GSH) szerkezete. *Oxidációja során két molekula glutation diszulfidkötéssel kapcsolódik egymáshoz (GSSG), s ezzel párhuzamosan egy másik anyag (A) redukálódik*



2-17. ábra. A C-vitamin (aszkorbinsav) oxidoredukciója

ségben jelen és ez összefügg a két elektronátvivő koenzim eltérő funkciójával.

Egyes oxidoredukciós folyamatok igen fontos elektronátvivő rendszere a **glutation**. A glutation glicint, ciszteint és glutaminsavat tartalmazó tripeptid *(2-16. ábra)*. Redoxciklusa több sejttípus – például vörösvértest, hepatocita – működésében rendkívül fontos; kapcsolatban lehet egy másik, szintén igen jelentős elektronátvivő rendszerrel, a **C-vitaminnal** (aszkorbinsavval) *(2-17. ábra)*.

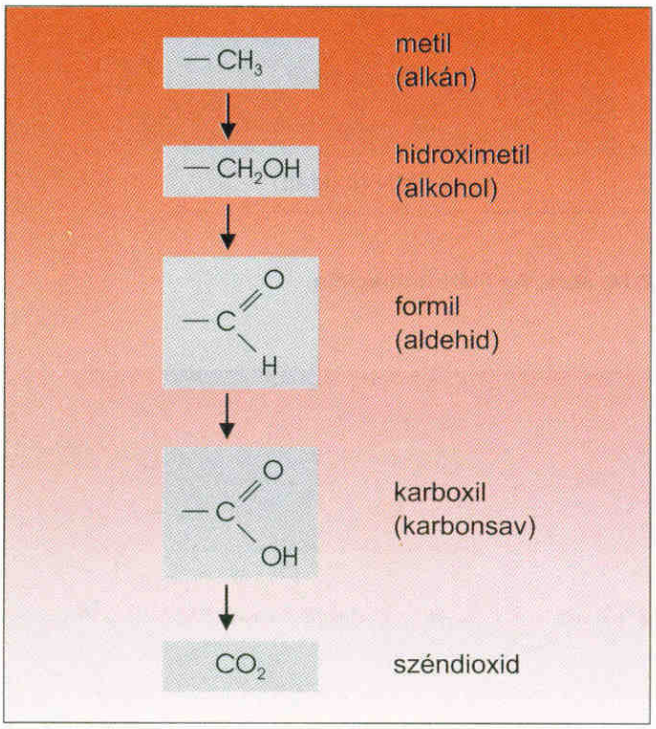
A sejt redox homeostasisával, ezen belül a glutation szerepével a 2.7. fejezetben foglalkozunk.

A biológiai oxidáció

A biológiai oxidáció két alapvető folyamata a szerves vegyületekben levő szén oxidációja és az oxigénmolekula redukciója. Az oxidáció során elsősorban az egyes szénatomokra számított oxidáltsági fok változik. A legredukáltabb ($-CH_3$) és a legoxidáltabb állapot (CO_2) között több fokozat van *(2-18. ábra)*. Az oxidáció az esetek többségében dehidrogenálást jelent; az elektronvesztés hidrogénvesztés útján valósul meg.

Az oxigénmolekula redukciója, amely 4 elektron felvételét jelenti, rendszerint a citokróm-oxidáz enzim által katalizált folyamatban történik. A tökéletlen redukció súlyos veszélyekkel, patológiai következményekkel, oxigéntartalmú szabad gyökök keletkezésével járhat (lásd 2.6. fejezetet).

Elektronátvitel a sejtben enzimatikus és nem enzimatikus úton történhet. Energiatranszformáció



2-18. ábra. A szerves vegyületekben levő szén oxidációja

szempontjából az enzimatikus úton történő elektronátvitelnek van jelentősége.

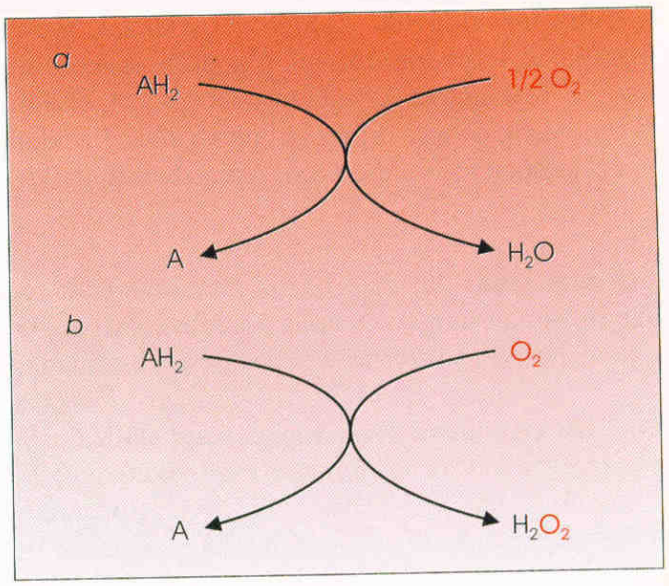
A molekulák közötti elektrontranszfer az intermedier anyagcserében az alábbi módokon jön létre:

- Direkt módon elektronok kerülhetnek át egyik molekuláról a másikra. Ez főként olyan molekulák között történik, amelyek fémionokat tartalmaznak. Vas- és réztartalmú fehérjék között valósul meg például ilyen típusú elektrontransz-

fer, amelyre a mitokondriális légzési lánc egyes reakciói tipikus példák.

❷ Az elektrontranszfer hidrogénátvitellel is történhet. Az egyik molekula ebben az esetben hidrogéndonorként, a másik hidrogénakceptorként viselkedik. (Az ilyen típusú transzfer minden esetben két elektron felvételét, illetve leadását jelenti.)

❸ A hidridion (H^-) formában való elektronátvitel esetén két elektron és egy proton kerül át egyik molekuláról a másikra. Erre példa a már tárgyalt NAD^+, illetve $NADP^+$ koenzimekkel működő elektrontranszfer.



2-19. ábra. Az oxidázok által katalizált oxidoredukciók általános sémája

Elektrontranszfert katalizáló enzimek – oxidoreduktázok

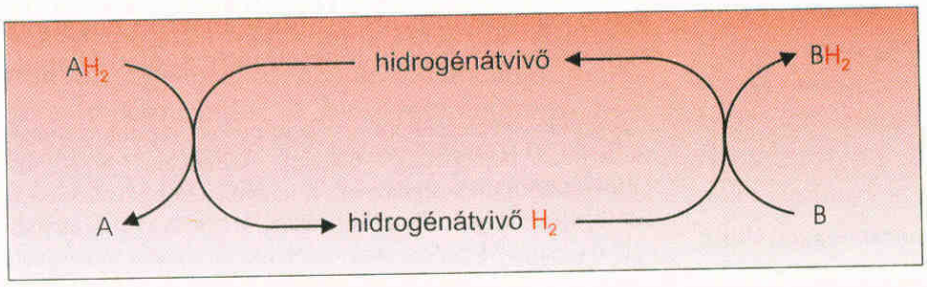
Az oxidoredukciós folyamatokat katalizáló enzimek négy csoportba sorolhatók: oxidázok, dehidrogenázok, hidroperoxidázok, oxigenázok.

Oxidázok. Az oxidázok által katalizált reakcióban az **oxigén a hidrogénakceptor**. Két alcsoportot különböztetünk meg.

❶ víz keletkezésével járó, oxidációt katalizáló oxidázok Cu-iont tartalmaznak *(2-19a ábra)*. Jellemző képviselőjük a terminális oxidációban a citokróm-oxidáz.

❷ A második alcsoportba tartozó oxidázok FAD-, illetve FMN-tartalmú fehérjék, flavoproteinek. A reakció végterméke hidrogén-peroxid *(2-19b ábra)*. Számos esetben a flavoproteinek fémet is tartalmaznak (metalloflavoprotein). Erre példa a nukleotid-anyagcserében részt vevő molibdéntartalmú xantin-oxidáz . Ezekben az esetekben a fém is részt vesz az elektrontranszferben.

Dehidrogenázok. A dehidrogenázok olyan oxidoredukciókat katalizálnak, ahol **oxigén nem vesz részt a reakcióban** *(2-20. ábra)*. Számos enzim tartozik ebbe a csoportba (például a citrátkör dehidrogenázai); dehidrogenázok katalizálnak redukciós bioszintetikus folyamatokat is. A dehidrogenázok többsége által katalizált folyamatokban az elektronátvivő molekula a NAD^+, $NADP^+$, a FAD és az FMN. A FAD és FMN rendszerint a nikotinsavamid koenzimeknél sokkal szorosabban kötődik az apoenzimhez. A flavoproteinek esetében a FAD, illetve az FMN prosztetikus csoportként működik, szemben a piridinnukleotid koenzimekkel, amelyek könnyen disszociálnak az enzimről, illetve juttatnak el elektronokat egy másik enzimhez. A flavoprotein-dehidrogenázok többsége az elektron-transzportlánc(ok)hoz kapcsolódik vagy azok része.

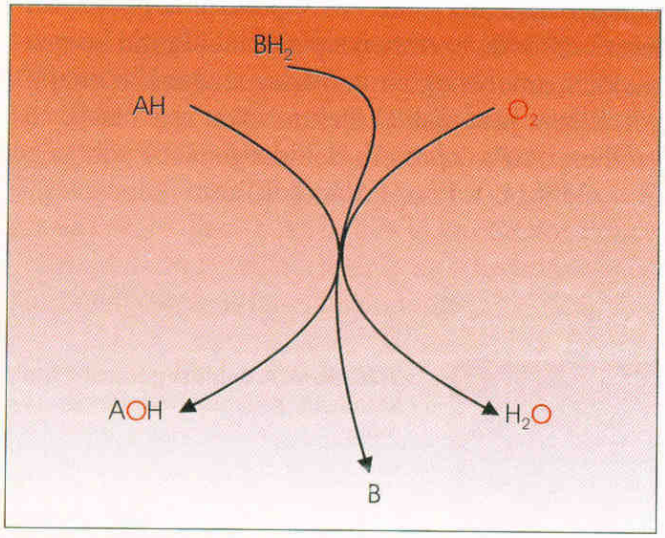


2-20. ábra. A dehidrogenázok által katalizált reakciók általános sémája

Hidroperoxidázok. A hidroperoxidázok szubsztrátjai elektrondonorok (pl. glutation, aszkorbinsav); a reakcióban az elektronakceptorok a hidrogén-peroxid vagy organikus peroxidok. Ezekkel a reakciókkal részletesen 2.6. fejezetben foglalkozunk.

Oxigenázok. Az oxigenázok által katalizált reakciókban az **oxigén beépül a szubsztrátba.** Az oxigén beépülése szerint két alcsoportra oszthatók:

1. A **dioxigenázok** olyan reakciókat katalizálnak, amelyekben az O_2-molekula mindkét oxigénatomja beépül a szubsztrátba. Ilyen típusú enzim például az aminosav-anyagcserében a triptofán-dioxigenáz.
2. A **monooxigenázokat** kevert funkciójú oxigenázoknak is nevezik, mert csak az egyik oxigén épül be a szubsztrátba, a másik oxigén vízzé redukálódik *(2-21. ábra)*. A monooxigenázok működéséhez elektrondonor szükséges, amely a NADPH vagy a NADH lehet. A monooxigenázokhoz az elektronok speciális elektrontranszportlánc útján jutnak el; e fehérjék egy több komponensű, membránhoz kötött enzimrendszer részei. Ilyen rendszerhez tartoznak például a májban az endoplazmás retikulum membránjához kötött drogmetabolizmus, vagy a mellékvesekéreg, a here, az ovarium mitokondriális belső membránjában a szteroidszintézis oxidoreduktázai.



2-21. ábra. A monooxigenázok által katalizált reakciók általános sémája

Terminális oxidáció – oxidatív foszforiláció

A terminális oxidáció – oxidatív foszforiláció helye a mitokondrium belső membránja. A katabolizmus konvergens, az anabolizmus divergens folyamatrendszer. A katabolizmus konvergenciája eredményeképpen a különböző tápanyagokban található hidrogén redox reakciók sorozata után NAD^+-ra, illetve FAD-ra kerül (lásd 2-1. ábra). A NAD^+ részben a citoszolban, de főként a mitokondriumban, a FAD a mitokondriumban redukálódik. A katabolizmus végső, „terminális" lépése a terminális oxidáció, amikor a kofaktorokhoz kötött hidrogén a mitokondriumban vízzé oxidálódik.

A **terminális oxidáció** exergonikus folyamat; a hidrogén oxidálódik, illetve O_2 redukálódik vízzé:

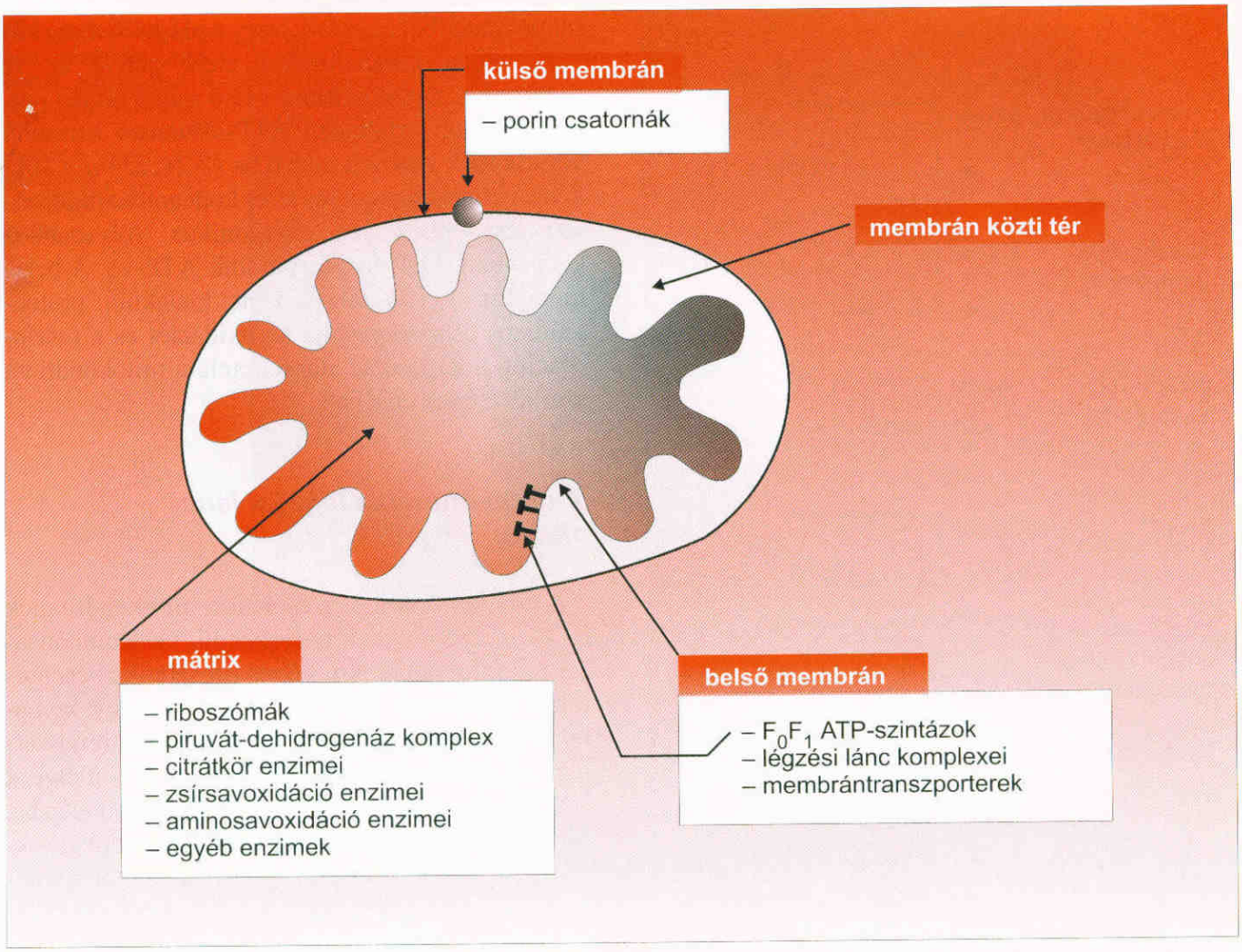
$$1/2\ O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$$

a $1/2\ O_2/H_2O$ redoxelektród; $E_o' = +0{,}82$ V. Az oxigén redukciójának fő hidrogénforrása a $NADH+H^+/NAD^+$ redoxelektród; $E_o' = -0{,}32$ V. A potenciálkülönbség $\Delta E_o' = 1{,}14$ V, az ennek megfelelő $\Delta G^{0'}$-érték = –220 kJ/mol. Ehhez kapcsoltan történik az **oxidatív foszforiláció,** amelynek során ADP foszforilálódik ATP-vé endergonikus folyamatban. A terminális oxidáció – oxidatív foszforiláció térben és időben összerendezett, kapcsolt folyamatrendszer. Összehangolt működése nemcsak az ebben részt vevő enzimek, hanem egy egész sejtorganellum, a **mitokondrium** strukturális épségéhez kötött.

A mitokondriumok szerkezete

A mitokondriumok átlagosan 2 μm hosszú, 0,5 μm átmérőjű sejtorganellumok. Feltételezhetően a mitokondriumok, mint eukariota sejtorganellumok az evolúció során prokariotákból származnak: aerob baktériumok és primitív anaerob eukariota sejtek szimbiózisából jöhetett létre a jelen állapot.

Számuk speciesenként és sejttípusok szerint változó. Eukariota hepatociták például sejtenként 800–2500 mitokondriumot tartalmaznak. A nagyon aerob szívizomszövet sejtjei citoplazma-térfogatának kb. a felét mitokondriumok képezik. Az érett vörösvértestekben nincsenek

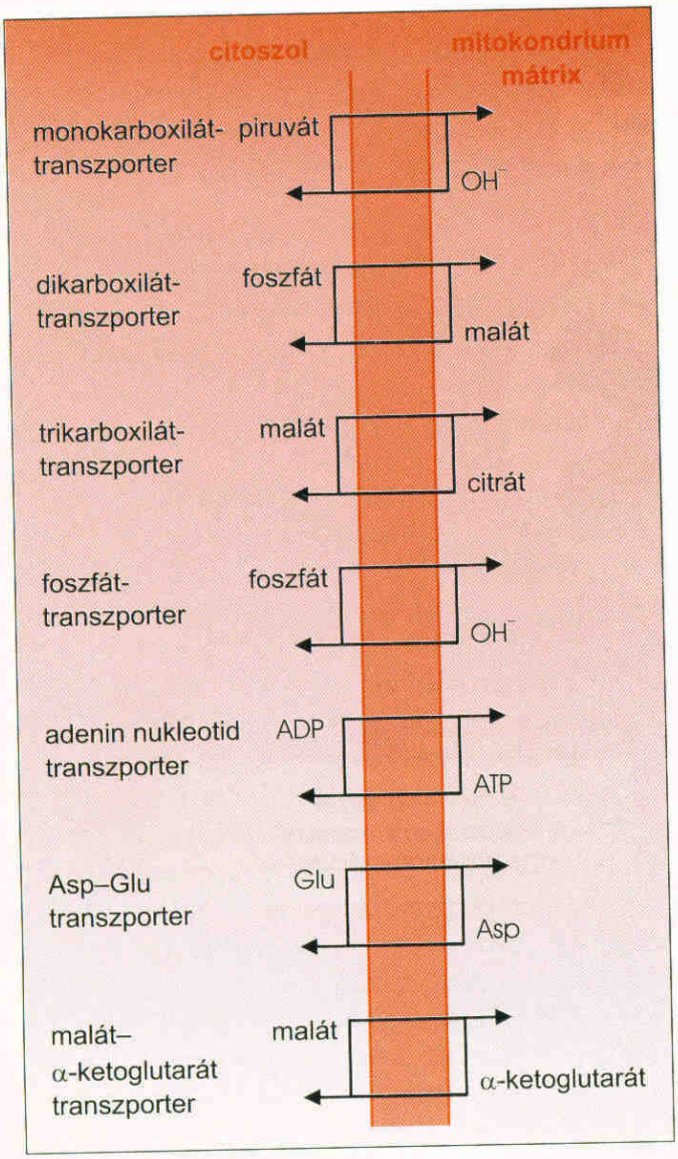


2-22. ábra. A mitokondrium felépítése

mitokondriumok, így nem képesek oxidatív foszforiláció útján ATP-t termelni.

A mitokondriumokat két membrán határolja *(2-22. ábra)*. A külső membrán kb. 50%-ban lipidekből, 50%-ban fehérjékből áll, viszonylag egyszerűbb szerkezetű. A belső membrán szerkezete igen bonyolult, kb. 75%-ban fehérjéket tartalmaz. A külső membrán permeábilis az intermedier anyagcsere több intermedierje számára, mivel egy porin nevű fehérje viszonylag nagy átmérőjű csatornákat formál a membránon keresztül. A belső membrán ugyanakkor szinte valamennyi ionra nézve impermeábilis. A belső membránban helyezkedik el a légzési lánc elektronátvivő rendszere és az ATP-szintáz. Máj mitokondriumokban például több mint 10 000 légzési lánc és ATP-szintáz található egyetlen sejtorganellumban. A belső membrán által határolt mitokondriális mátrixban található számos alapvető enzimrendszer (pl. a citrátkör, zsírsav-oxidáció enzimei). A belső membrán transzporter rendszerei biztosítják a kapcsolatot a citoszol és a mátrix között. Az anion-kicserélődési transzportereket a *2-23. ábra* foglalja össze.

A NADH-ról, illetve a $FADH_2$-ről az elektronok, illetve a proton(ok) a belső membránban elhelyezkedő légzési lánc komponensein, oxidoredukciók sorozatán keresztül jutnak el az O_2-re, és ily módon H_2O keletkezik. A lánc meghatározott komponensei oxidoredukciókhoz, tehát elektrontranszferhez kapcsoltan protonokat pumpálnak ki a mitokondriális mátrixból a membránok közti térbe. A protonok kipumpálása elektrokémiai grádiens kialakulásához vezet. Proton motoros erő generálódik, amely két komponensből tevődik össze: a memb-



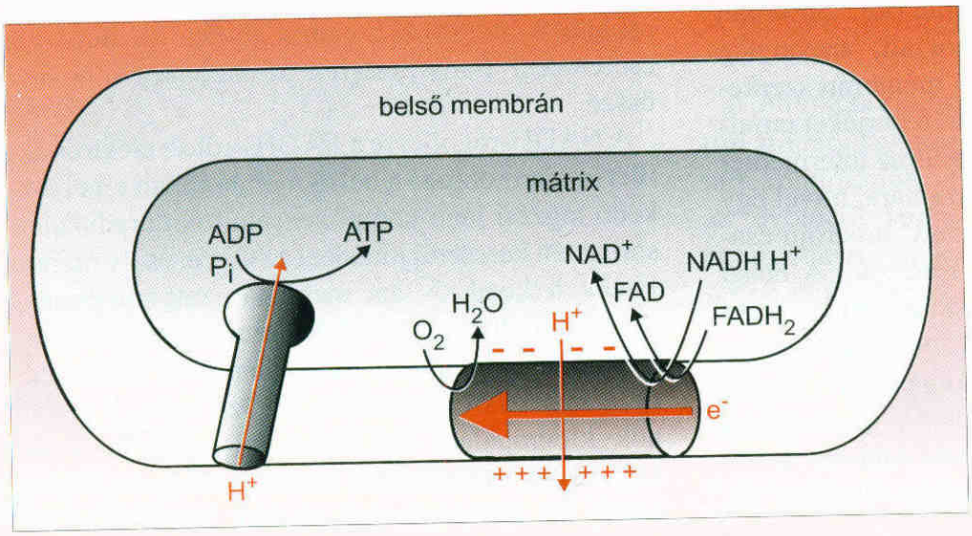
2-23. ábra. A mitokondrium belső membránjának néhány bioenergetikai szempontból fontos transzportrendszere

ránpotenciálból és abból, hogy a pH-különbség következtében koncentrációs elem alakul ki. A protonok a mitokondrium belső membránján protoncsatornát tartalmazó ATP-szintázon keresztül kerülhetnek vissza a mátrixba *(2-24. ábra)*. Csökken az iongrádiens, a töltés és koncentrációkülönbség és ehhez az exergonikus folyamathoz kapcsoltan ADP foszforilálódik ATP-vé. A belső membrán két oldala között kialakuló protongrádiens összekapcsolja az oxidációt és a foszforilációt, a kapcsolás alapfeltétele a mitokondrium szerkezetének épsége.

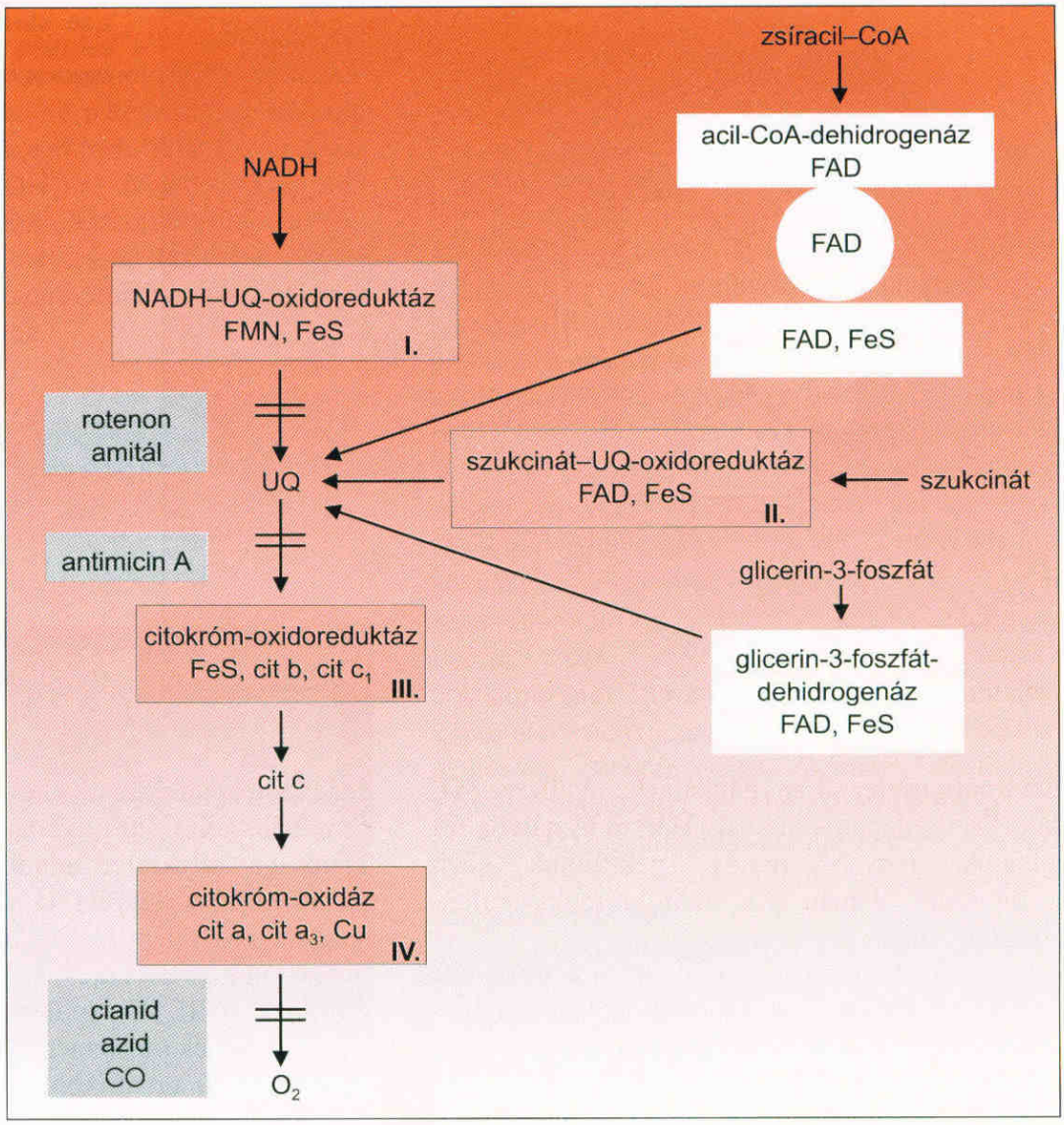
A mitokondriális légzési lánc alkotói

A mitokondriális légzési lánc a mitokondriumok belső membránjában helyezkedik el. Komponensei redoxfolyamatokra képes prosztetikus csoportokat tartalmazó fehérjék, amelyek négy komplexet alkotnak *(2-25. ábra)*. A folyamatrendszerben az elektrondonor a NADH + H^+, illetve a $FADH_2$; így a láncba egyszerre két elektron lép be. A biológiai oxidáció egységének ezt a redukáló ekvivalens párt tekintik. Az elektronakceptor a rendszerben az oxigénmolekula O_2, amelynek redukálásához 4 elektron átvitele szükséges:

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$$



2-24. ábra. Proton- és elektrontranszport a mitokondrium belső membránján



2-25. ábra. A légzési lánc alkotói és gátlószerei. *Rövidítések a szövegben találhatók. A pirossal satírozott részek a légzési lánc komplexei. A gátlószerek szürkével satírozottak*

A NADH mint a dehidrogenázokkal reverzibilisen asszociálódó vízoldékony elektronátvivő, a különböző oxidoredukciók során nyert elektronokat a légzési lánc első komplexéhez szállítja.

A NADPH az anabolikus folyamatok elektronigényét biztosítja. A két koenzim közti kapcsolatot a belső membrán belső felszínén elhelyezkedő piridinnukleotid-transzhidrogenáz által katalizált reakció teszi lehetővé.

$$NADPH + NAD^+ \rightarrow NADP^+ + NADH$$

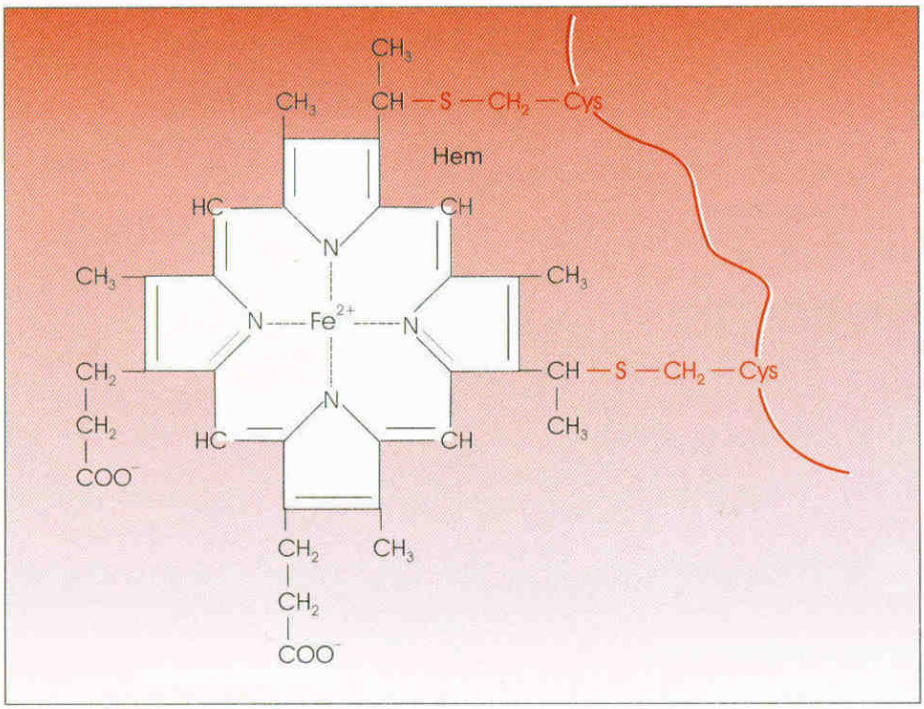
A reakció irányát a proton motoros erő szabályozza.

A $FADH_2$, illetve az $FMNH_2$ szorosan, néha kovalens kötéssel kapcsolódik a dehidrogenázokhoz. A standard redoxpotenciáljuk ezért attól a fehérjétől függ, amihez asszociálódnak.

A flavoproteinek akár egy, akár két elektront képesek felvenni, illetve leadni. Ezért közvetítenek olyan reakciókban, ahol két elektron átadása megy végbe (NADH), de ők maguk csak egy elektront adnak tovább; mind a mitokondriális, mind a mikroszómális elektrontranszportlánc első tagja flavoprotein.

A légzési láncot alkotó komplexek fehérjéi közötti elektronátvitelben a flavoproteineken kívül különböző típusú, fémtartalmú prosztetikus csoportok vesznek részt.

A **citokrómok (cit)** olyan elektrontranszferben részt vevő fehérjék, amelyek **prosztetikus csoportként hemet tartalmaznak**. Vasatomjuk az



2-26. ábra. A citokróm C, C_1 hem kovalens kötődése a polipeptidlánc két ciszteinjéhez

elektrontranszfer során redukált (Fe^{2+}), illetve oxidált (Fe^{3+}) állapotokban van. Három osztályba sorolhatók: fényabszorpciós spektrumuk közti különbségek alapján a, b, c citokrómokat különböztetnek meg.

Az a és b citokrómok hemcsoportjai szorosan, de nem kovalens kötéssel kapcsolódnak a polipeptidláncokhoz, a c citokrómok hemcsoportjai tioéter kötést képeznek Cys-en keresztül és így asszociálódnak a fehérjéhez *(2-26. ábra)*. A flavoproteinekhez hasonlóan, a citokrómok fehérje alkotórésze jelentősen befolyásolja a standard redoxpotenciáljukat (lásd a 2-3. táblázatot).

Többféle **vas-kén komplex (FeS) prosztetikus csoportot** tartalmazó fehérjét találunk a légzési láncban. A citokrómoktól megkülönböztetendő, nem hem-vasat tartalmazó fehérjéknek is nevezik őket. A vasionok a komplexekben redukált (Fe^{2+}) vagy oxidált (Fe^{3+}) állapotban vannak; anorganikus S-atomokkal, illetve a polipeptidláncban előforduló cisztein S-atommal asszociálódnak.

A légzési lánc egyes fehérjéi rézionokat is tartalmaznak. A rézionok redukált (Cu^{+}) vagy oxidált (Cu^{2+}) állapotban fordulnak elő.

A légzési láncot alkotó fehérjekomplexeket két elektronszállító molekula, a koenzim Q vagy ubikinon (UQ) és a viszonylag kis molekulatömegű citokróm c köti össze. Komponenseinek standard redoxpotenciál-értékeit (lásd 2-3. táblázatot) és a terminális oxidáció folyamatát, a lépések egymás utániságát áttekintve adódik a következtetés: a mitokondriális légzési láncnak mint membránstruktúrának felépítésében a rendező elv a redoxpotenciálok sorrendje. Három fehérjekomplex (Komplex I, III, IV) tartalmaz olyan polipeptidláncokat, amelyek transzmembrán fehérjék és protont pumpálnak ki a mátrixból.

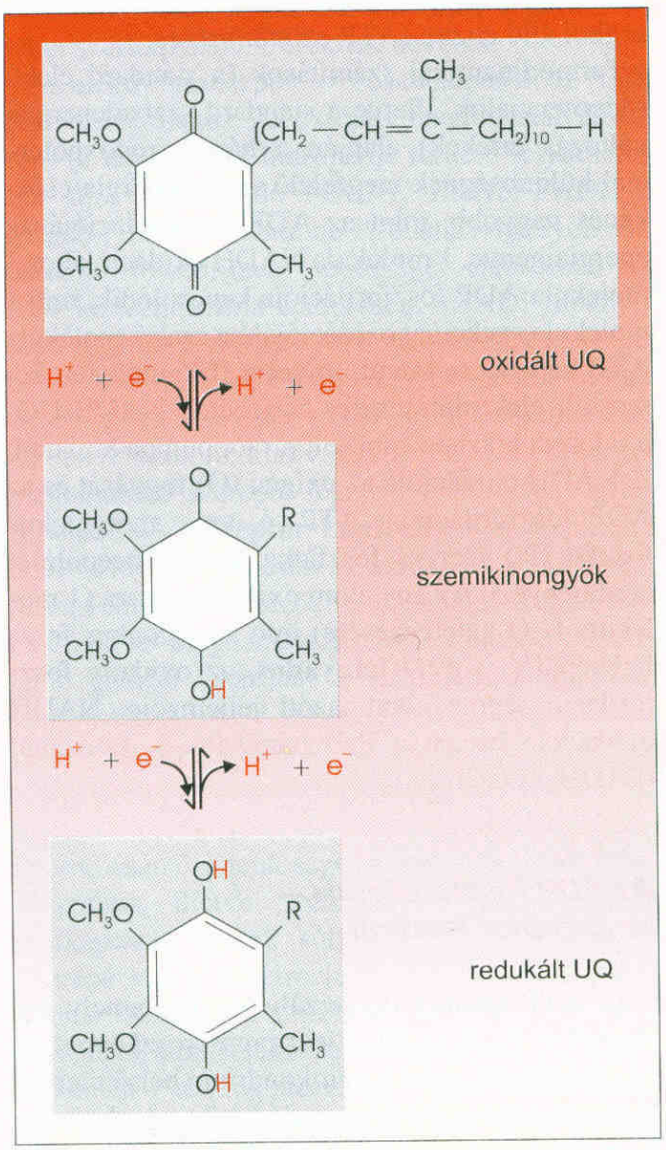
A terminális oxidáció folyamata

A lánc első komplexe a **NADH-UQ-oxidoreduktáz** (NADH-dehidrogenáz) 25 polipeptidláncból álló nagy (850 kD) fehérjekomplex. A NADH-ról hidridionok formájában érkező elektronok transzferében FMN-t, majd több különböző FeS-központokat prosztetikus csoportként tartalmazó fehérjék vesznek részt. A komplex NADH-kötő helye a mátrix felé néz, így a mátrixban képződő NADH-t megköti és oxidálja.

Az első komplexről az elektronok az élővilágban mindenütt előforduló ubikinonra – innen a név – kerülnek (lásd 2-25. ábra). Az ubikinon (UQ) speciesenként változóan hosszú izoprénegységekből álló láncot tartalmazó, hidrofób, a membránban könnyen diffundáló kinonszármazék. Emlősökben

általában a lánc tíz izoprénegységből áll. Az ubikinon, hasonlóan a flavoprotein átvivőkhöz, képes egy elektron felvételére; a képződő szemikinon intermedier a második elektron felvételével redukálódik ubikinollá (UQH_2) *(2-27. ábra)*. Ez a légzési lánc egyetlen olyan elektron átvivője, amely nem kötődik kovalens kötéssel fehérjéhez, így a mitokondrium belső membránjában viszonylagos mozgási szabadsága van.

Az ubikinon rendkívül fontos antioxidáns (lásd 2.6. fejezet). A korral az UQ mennyisége csökken, ez alátámasztani látszik azokat az elképzeléseket, amelyek az öregedés folyamatát az oxidatív károsodásokkal hozzák összefüggésbe. Oxidatív stressz esetén ugyanis az UQ mennyisége fokozódik. Fokozott oxigénfelvétel (például intenzív testedzés) az érintett szövetekben szintén az UQ mennyiségének fokozódásával jár.



2-27. ábra. Az ubikinon (UQ) két lépéses redukciója

A komplex I-től az ubikinon az elektronokat a komplex III-hoz szállítja. Az ubikinon nemcsak a komplex I-től képes átvenni elektronokat, elektrondonorként más $FADH_2$ prosztetikus csoporttal rendelkező enzim(komplex) is szerepelhet (lásd 2-25. ábra). Így elektronok nemcsak a NADH közvetítésével kerülhetnek a légzési láncba. Ha a szukcinát oxidálódik fumaráttá és az ebből származó elektronok kerülnek O_2-re, akkor a $\Delta E_o'$ kisebb, mivel fumarát/szukcinát $E_o' = 0{,}031$ V; ennek alapján $\Delta G^{0'}$-érték = –152 kJ/mol.

A **szukcinát-UQ-oxidoreduktáz** a szukcinátról képes elektronokat átvinni az ubikinonra. Ezt a reakciót a szukcinát-dehidrogenázt tartalmazó komplex katalizálja, amelynek prosztetikus csoportja FAD. A szukcinát-dehidrogenáz a citrátkör egyetlen membránhoz kötődő enzime, amely a szukcinátot fumaráttá oxidálja (lásd később a 2-36. ábrát). A szukcinát-dehidrogenáz eközben redukálódott $FADH_2$ prosztetikus csoportjáról FeS-fehérjéken keresztül kerülnek az elektronok az ubikinonra. Ennek a komplexnek, szemben a hasonló működésű NADH-UQ-reduktázzal, azonban nincs protonpumpa-aktivitása.

A $NADH+H^+/NAD^+$:UQ/UQH_2 redoxpárok közötti redoxpotenciál-különbséggel összehasonlítva, a $FADH_2/FAD$:UQ/UQH_2 redoxpárok közötti redoxpotenciál-különbség kisebb; nem elégséges ahhoz, hogy a protonpumpának mint endergonikus folyamatnak az energiaigényét kielégítse és a komplex II nem is tartalmaz protonpumpát.

A glicerol-foszfát-dehidrogenázról, amely a redukáló ekvivalens transzportban játszik szerepet (lásd 2.2. fejezetet), illetve a zsíracil–CoA-dehidrogenázról, amely a zsírsavoxidációban szerepel (lásd 2.3. fejezetet) mint szintén FAD-dal működő oxidoreduktázokról FeS-központú prosztetikus csoportot tartalmazó fehérjék közbeiktatásával kerülnek az elektronok az ubikinonra.

A légzési lánc második protonpumpa-aktivitással rendelkező komplexe a komplex III, az **UQH_2-citokróm c-oxidoreduktáz**. Az elektronok

ezen komplex segítségével a UQH_2-ról egy vízoldékony fehérjére, a citokróm c-re kerülnek, amely a belső membrán külső felszínén helyezkedik el. A III komplexet többek között citokrómok (citokróm b és c_1), valamint FeS fehérje alkotja. A citokróm b, c_1 és c ugyanolyan hemet (protoporfirin IX) tartalmaz, mint a mioglobin vagy a hemoglobin.

A citokróm c, az ubikinonhoz hasonlóan, az élővilág rendkívül elterjedt molekulája. A növényektől kezdve minden olyan organizmusban megtalálható, ahol van légzési lánc.

A **citokróm-oxidáz** a légzési lánc harmadik protonpumpa-aktivitású fehérjekomplexe. A citokróm-oxidáz redukálja az oxigénmolekulát vízzé. Az elektrondonor a redukált citokróm c:

$$4 \text{ cit c (red)} + 4H^+ + O_2 \rightarrow 4 \text{ cit c (ox)} + 2H_2O$$

A citokróm-oxidáz négy elektron átvitelét katalizálja. Minden olyan körülmény, amely részlegesen redukált oxigénszármazék szabaddá válását eredményezi, súlyos veszélyeket jelent (lásd 2.6 fejezetet). Ezért az oxigén redukciója rendkívül pontosan és szigorúan szervezett folyamat. A komplex legalább nyolc alegységből áll. A négy elektron transzferjében négy fém vesz részt. Két hem-vas (citokróm a, a_3), illetve két rézion kapcsolódik be a két oxigénatom-kötésébe, valamint a négy elektronátvitel lebonyolításába. A citokróm-oxidáz az egyik legtöbbet tanulmányozott és legrészletesebben megismert fehérjekomplex.

A légzési láncban az elektronok átvitele különböző pontokon különböző gátlószerekkel megakadályozható. A legfontosabb gátlószerek támadáspontjai a 2-25. ábrán láthatók.

Az oxidatív foszforiláció

A terminális oxidáció a mitokondriumban – elektrontranszferek sorozata – exergonikus folyamat. Az oxidatív foszforiláció – az ADP és P_i kondenzációja – a NADH oxidációjához, mint exergonikus folyamathoz kapcsolt foszforiltranszfer, endergonikus folyamat.

A légzési láncban végigmenő elektronpár redoxrendszerről redoxrendszerre vándorol. Mindegyik folyamathoz rendelhető két redoxelektród (redoxelektródpár), amellyel a lépés redoxpotenciál-változása mérhető. A légzési lánc, mint a mitokondrium belső membránjában kialakított struktúra a standard redoxpotenciálok sorrendjének, mint rendező elvnek megfelelően szerveződött. A különböző redoxelektródok közötti redoxpotenciál-különbség három esetben tesz lehetővé a belső membránon keresztül a mátrixból kifelé történő protonpumpálást, ami endergonikus folyamat. A protongrádiens azért alakul ki, mert a belső membrán impermeábilis protonokra nézve. Mind a három esetben a létrejött protongrádiens egy-egy ADP-molekula foszforilációját teszi lehetővé ATP-vé. A kitüntetett hely, ahol a protonok visszatérhetnek a mátrixba – ami exergonikus folyamat, s ezáltal a kialakult elektrokémiai grádiens megszűnik – egy protoncsatorna, amely egy több alegységből álló enzim (ATP-szintáz) része.

Termodinamikai számítások (a standard elektródpotenciálok, illetve a standard szabadenergia-változás értékek) alapján a három redoxpotenciál-különbségnek megfelelő szabadenergia-csökkenés nagyobb, mint az ADP foszforilációjának energiaigénye. 1 molekula NADH oxidációjához 3 molekula ADP foszforilációja kapcsolódik, míg 1 molekula szukcinát oxidációjához csak 2 molekula ATP képződése társul, mivel a II komplexen keresztüli elektrontranszfer esetében a NADH-UQ-oxidoreduktázhoz kapcsolt protonpumpa kimarad. A NADH oxidációja az oxigén (O) fogyását és az ADP foszforilációját ATP-vé, azaz anorganikus foszfát (P_i) szerves foszfátba történő beépülését eredményezi. Az egy atom oxigénfogyásra (1 molekula H_2O keletkezésére) jutó anorganikus foszfátbeépülés, a **P:O hányados**, az oxidatív foszforiláció régóta alkalmazott jellemzője. NADH oxidációja esetén a P:O hányados 3, szukcinát ($FADH_2$) esetén 2.

Az ADP foszforilációja – az akceptor kontroll

Az **ATP-szintáz** univerzális enzim, amely két részből – F_1, F_o – áll. Elektronmikroszkóppal az F_1-rész látható, mint a mitokondrium belső membránjának a mátrix felé irányuló betüremkedése. Az F_1-et ötféle polipeptidláncból álló kilenc alegység építi fel (α_3, β_3, γ, δ, ε, molekulatömeg: 380 kD).

Ez az egység felelős az ADP foszforilációjáért. A négy különböző polipeptidláncból képződő F_o-egység képezi a protoncsatornát. Ez az egység, így a protongrádiens kiegyenlítődése, oligomycinnel gátolható – ily módon az ATP szintézisét gátolni lehet.

Ezzel ellentétben a mitokondrium belső membránja különböző szerekkel protonokra permeábilissá tehető. Ilyen „klasszikus" protonofor pl. a 2,4-dinitrofenol. Az eredmény az ATP szempontjából nézve azonos, az ATP szintézise gátlódik. A 2,4-dinitrofenol a membránt protonokra permeábilissá teszi, ezért szétkapcsolja az elektrontranszportot és a foszforilációt, mert nem jöhet létre a protongrádiens. Az elektrontranszport nem akadályozott, sőt az oxigénfogyasztás szabályozatlanul fokozódik. Az ATP-szintézist ily módon gátló szereket **szétkapcsoló** szereknek nevezik.

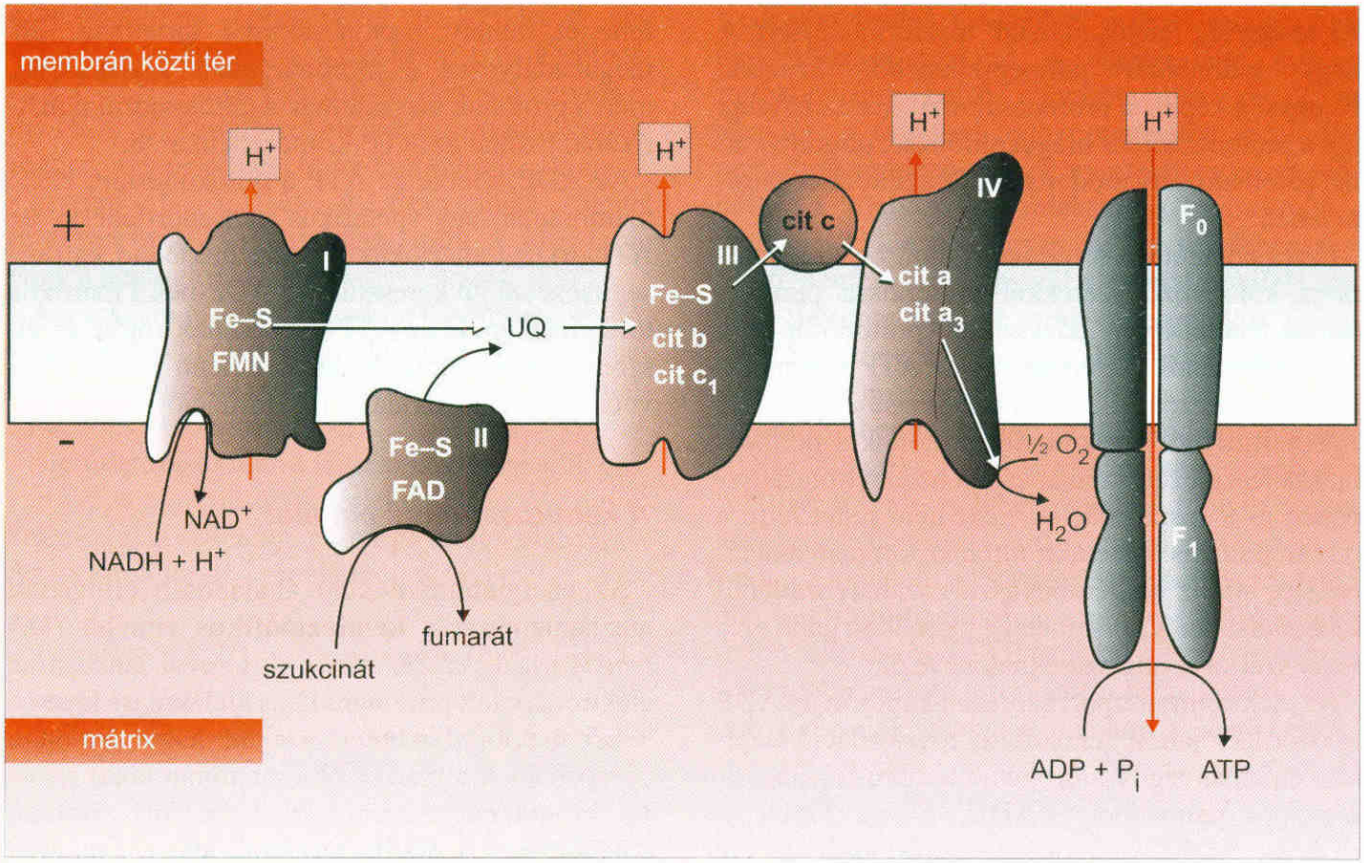
Az elektrontranszport szorosan kapcsolt az ADP foszforilációjához. Az oxidatív foszforiláció elektron- (a tápanyagok hidrogénje terhére folyamatosan újra redukálódó NADH, illetve $FADH_2$), oxigén-, ADP-, valamint P_i-ellátást igényel. Az oxidatív foszforiláció sebességét elsősorban az ADP koncentrációja szabja meg. Az ADP mennyisége attól függ, mennyi ATP használódik el a sejtben. Ha az ATP/ADP arány az ADP javára tolódik el, ez jelzés az oxidatív foszforiláció fokozására. Az ADP-szint oxidatív foszforiláció sebességét meghatározó szerepét légzési (respirációs) kontrollnak vagy **akceptor kontrollnak** nevezik. Az ADP-szint így nemcsak az oxidatív foszforiláció, hanem ebből következően a terminális oxidáció sebességét is meghatározza. Az oxidatív foszforiláció gátlása visszahat a terminális oxidációra, gátolja azt. Az ATP szintézisének gátlása tehát az elektrontranszfert, a NADH oxidációját, végső soron pedig a sejtben a tápanyag fogyását gátolja. Az oxidatív foszforiláció és terminális oxidáció szétkapcsolásának jelentősége azonban nemcsak experimentális, illetve toxikológiai, amennyiben a szétkapcsoló szerek súlyos, mérgező hatásúak. Szerepe van a hőtermelésben, a testhőmérséklet fenntartásában, téli álmot alvó állatok, újszülöttek (ember is) hőmérséklet-adaptációjában. A hőtermelésben – termogenezisben – igen fontos szerepet játszik a mitokondriumokban igen gazdag barna zsírszövet. A benne található mitokondriumok tartalmaznak termogenint, egy szétkapcsoló fehérjét, amely protoncsatornát tartalmaz, így megakadályozza a protongrádiens kialakulását, mert a protonok visszajutnak a mitokondrium mátrixába. Ezáltal az ATP-szintézis elmarad.

Az ADP, illetve az ATP a mitokondrium belső membránján egy specifikus transzportfehérje, az ATP-ADP transzlokáz (adenin nukleotid karrier) segítségével jut keresztül. Az ADP-nek a mátrixba történő belépése az ATP kilépéséhez kötött, és viszont. (Ennek atraktiloziddal történő gátlása közvetve gátolja az oxidatív foszforilációt).

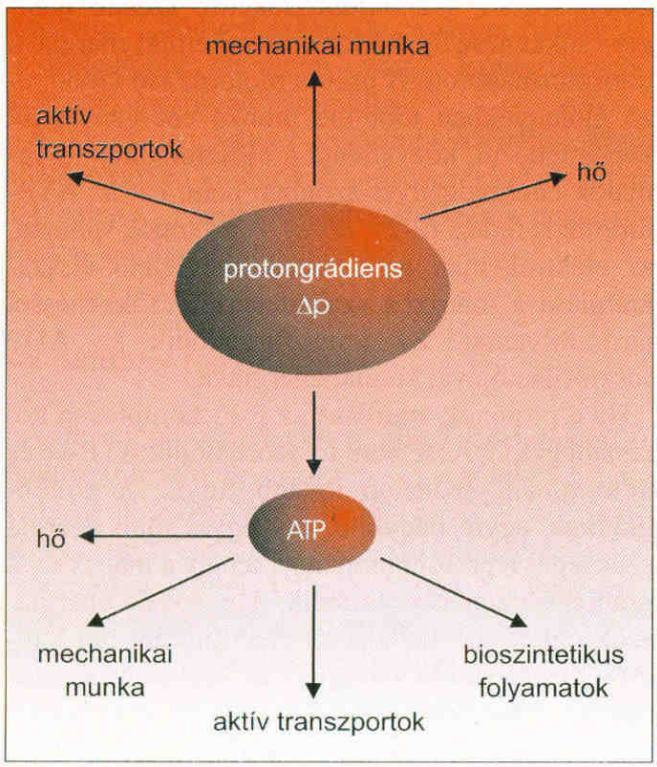
A kemiozmotikus elmélet

Az energiatranszdukció általánosan elfogadott mechanizmusát a **kemiozmotikus elmélet** (*Mitchell*) írja le *(2-28. ábra)*. A légzési láncban az elektronátvitelt protongrádiens kialakulása kíséri a belső membrán mentén azáltal, hogy protonok pumpálódnak a mátrixból a membrán közti térbe. A protonkoncentráció-különbség pH-változást eredményez. A mátrix lúgosabb lesz a membrán közti térhez viszonyítva, illetve töltéskülönbség alakul ki, amennyiben a mátrix negatívabb lesz. Az így kialakuló elektrokémiai potenciál, **proton motoros erő** (Δp) tehát két komponensből tevődik össze: a membránpotenciálból és H^+-koncentráció különbségből. Az oxidoredukciók szabad energia-csökkenése ily módon elektrokémiai energiává transzformálódott. A proton motoros erő különböző élőlényekben többféle munka energiaigényét képes fedezni, közvetlenül a bioszintetikus folyamatok energiaigényét azonban nem, ezt az ATP-hidrolízis fedezi *(2-29. ábra)*. A protonok spontán, az elektrokémiai grádiensnek megfelelő visszaáramlása a mátrixba szabadenergia-csökkenéssel járó folyamat. Ez transzformálódik az ADP foszforilációjával kémiai energiává.

Ha a protonok áramlása az F_oF_1 komplexen keresztül gátolt, ADP nem foszforilálódik ATP-vé és a terminális oxidáció tovább folyik, a protongrádiens egyre nagyobb, így egyre több energia szükséges a protonpumpához, amely a mátrixból a grádiens ellenében történik. Ha ennek energiaszükséglete meghaladja az elektrontranszfer kapcsán felszabaduló energiát, az elektrontranszfer megáll, a NADH oxidációja csökken, majd abbamarad. Ez a légzési, akceptor kontroll magyaráza-



2-28. ábra. A kemiozmotikus hipotézis modellje. *A pirossal satírozott részek a légzési komplexek, a szürkén satírozott rész a protoncsatornát alkotó ATP-szintáz*



2-29. ábra. A protongrádiens szerepe a különböző sejttevékenységek energiaigényének fedezésében. *A protongrádiens egyes egysejtűekben a mechanikai munka energiaigényét fedezi. Protongrádiens terhére megvalósuló aktív transzportok emlős szervezetekben is vannak (pl. szekréciós vezikulák transzportjai, lásd 6.1. fejezet). Δp = proton motoros erő*

ta. Az egész folyamatrendszer ép struktúrához, kompartmentalizáltsághoz, a mitokondrium épségéhez kötött.

Mitokondriális fehérjék szintézisének zavarai – „mitokondriális betegségek"

A mitokondriális fehérjék egy része a mitokondriumban szintetizálódik, illetve a mitokondriális DNS által kódolt. A viszonylag kis molekulatömegű (16 000 bázispár) DNS-ről 13 polipeptidlánc képződik, köztük a légzési lánc komponen-

seinek egy része, a komplex I, III, IV protonpumpával rendelkező alegységeinek egy része, valamint az ATP-szintáz egyes alegységei. Ezenkívül a mitokondriális DNS tRNS és rRNS géneket is tartalmaz.

A magi és mitokondriális DNS-károsodásokhoz kötődő mitokondriális elváltozások súlyos kórképek kialakulásához vezetnek, amelyek az esetek egy részében lassan progrediáló, fatális betegségek. Több kóros, illetve elégtelenné váló, izomsorvadásos betegség (myopathia) oka a mitokondriális fehérjeszintézis zavara. Szívizombetegségek (cardiomyopathiák), idegműködési zavarok (neuropathiák), szemelváltozások egy részében a betegség mitokondriális eredetű (lásd részletesebben a 66. fejezetben). A mitokondriális fehérjék szintézisét a tiroxin fokozza. Pajzsmirigytúlműködés esetén a mitokondriumok száma nő, a légzési lánc komponensei fokozott mértékben szintetizálódnak.

A citrátciklus

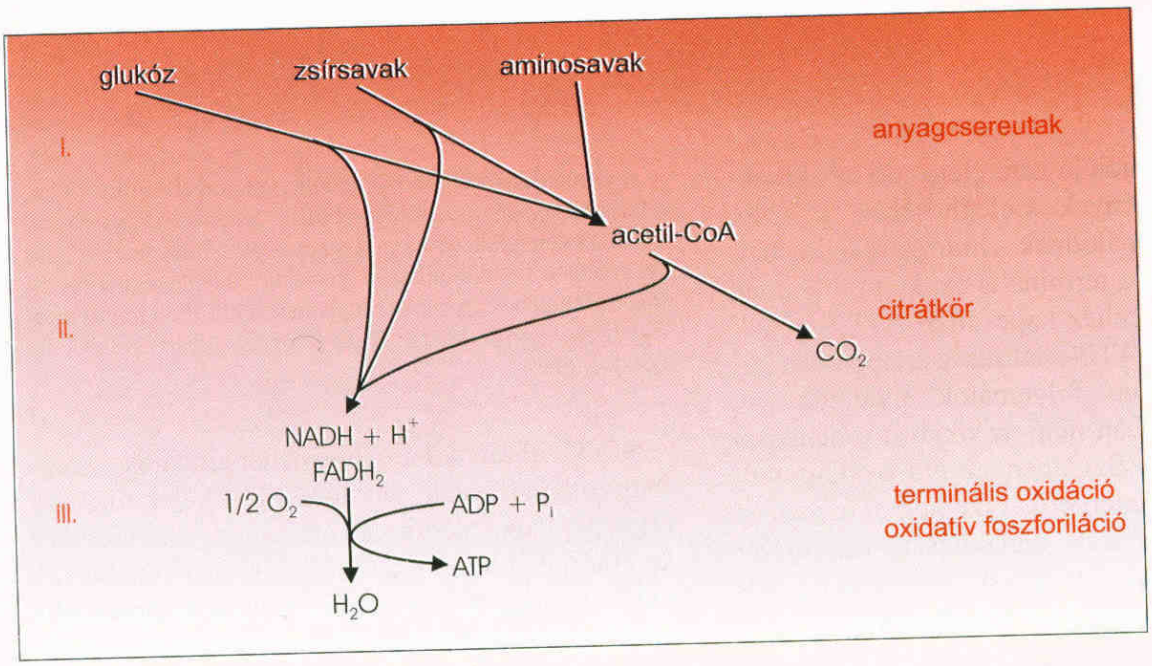
A citrátciklus helye az intermedier anyagcserében; a ciklus katabolikus és anabolikus funkciója

A metabolizmus katabolikus részében három szakaszt különböztetnek meg *(2-30. ábra)*.

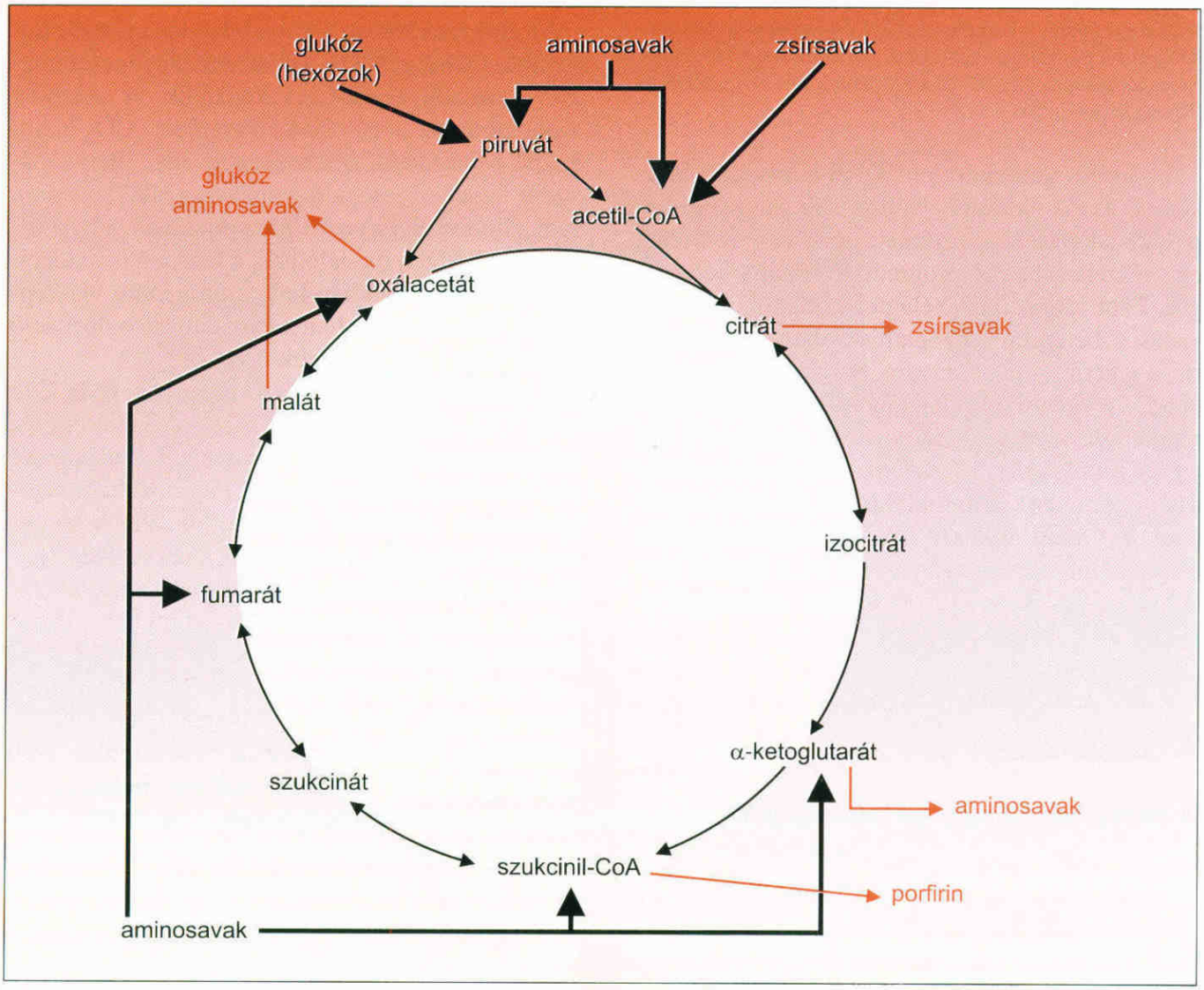
Az első szakaszban a különböző tápanyagok túlnyomó többségéből a különböző anyagcsereutakon keresztül acetil-CoA képződik. A második szakaszban az acetil-CoA oxidálódik, CO_2 keletkezik. A harmadik szakaszban az első, illetve második szakasz dehidrogenálási reakciói során redukálódott elektronszállító molekulák, a NADH, illetve a $FADH_2$ oxidálódnak a terminális oxidációban, a tápanyagokban levő hidrogénből víz képződik, ehhez kapcsoltan az oxidatív foszforiláció révén ADP foszforilálódik ATP-vé.

A katabolizmus így teljes; a tápanyagokban lévő szén CO_2-dá, a hidrogén vízzé oxidálódik, az energiatranszformáció, a tápanyagok oxidáció során felszabaduló energiájának hasznosítható energiaforrássá alakítása foszforiltranszferek segítségével, optimális. Az optimális hasznosítás feltétele az O_2 felvételének és felhasználásának lehetősége. A három szakaszból álló komplett katabolizmust **sejtlégzésnek** nevezik.

A metabolizmus katabolikus folyamataiban a konvergencia, anabolikus folyamataiban a divergencia úgy érvényesül, hogy a bioszintetikus utak során termelődő, rendkívül sokféle molekula viszonylag kisszámú molekulából képződik, amelyek egyben a különböző lebontási utak termékei *(2-31. ábra)*. A sejt anyagcseréjének középpontjában egy elosztórendszer működik, amelynek funkciója az aktuális energetikai viszonyok (ATP/ADP, $NADH/NAD^+$) szerint változik. Ha a



2-30. ábra. A katabolizmus konvergenciája, a tápanyagok lebontásának három szakasza



2-31. ábra. A citrátkör anabolikus és katabolikus jellege. *Vastag fekete nyilak: lebontó folyamatok, piros nyilak: anabolikus folyamatok*

sejt ATP-koncentrációja nem elegendő az aktuálisan jelentkező igények kielégítéséhez, a szubsztrátok dehidrogenálódnak – hidrogénjük koenzimekre kerül, majd a terminális oxidáció folyamán oxidálódik, hogy ehhez kapcsoltan ATP képződhessen. Megfelelő ATP-ellátottság állapotában különböző szintetikus folyamatok indulnak be, amelyekben általában nem az oxidáció, hanem a redukció dominál. Szemben az előző állapottal, ezek a folyamatok energetikai szempontból nem az energia felszabadítását, átalakítását, hanem az energia raktározását szolgálják. Az elosztórendszer funkcióját a citrátciklus valósítja meg.

A citrátciklus különböző tankönyvekben citromsavciklus, trikarbonsav-ciklus, Krebs-ciklus, Szent-Györgyi–Krebs-ciklus néven található meg. Reakcióinak felfedezése, a ciklus felismerése szemléletileg is igen nagy jelentőségű a biokémia történetében. A ciklus megismeréséhez több fontos megfigyeléssel járult hozzá *Szent-Györgyi Albert* szegedi laboratóriuma.

A 2-31. ábrán látható, hogy a tápanyagok – szénhidrátok, zsírsavak, aminosavak – katabolizmusa hogyan kapcsolódik a ciklushoz. A citrátkör katabolikus szempontból a különböző tápanyagok oxidációjának közös szakasza. Bár a citrátkörbe való belépés lehetősége több ponton adott, a szub-

sztrátok zöme acetil-CoA formájában kerül be. A citrátkör végső soron acetil-CoA-t „fogyaszt"; a szénből CO_2 lesz, a hidrogén koenzimekre kerül, majd vízzé oxidálódik.

A citrátciklus és bevezető reakciói azonban nemcsak a tápanyagok katabolizmusának közös szakaszai, hanem az anabolizmus kiinduló pontjai is. A 2-31. ábrán látható, hogy ezek a reakciók jelentik a különböző molekulák átalakításának lehetőségét. Ez elsősorban a szénhidrátok zsírokká történő átalakítása miatt igen jelentős. A katabolizmus második szakaszát jelentő reakciók egy része tehát a sejt energiaállapotától függően fontos anabolikus célokat is szolgálhat.

Az acetil-CoA képződése piruvátból, a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex

A tápanyagok döntő többsége lebontása során vagy piruváttá, vagy acetil-CoA-vá alakul. Ez igen lényeges különbség, amelynek jelentőségét a 2.7. fejezet tárgyalja.

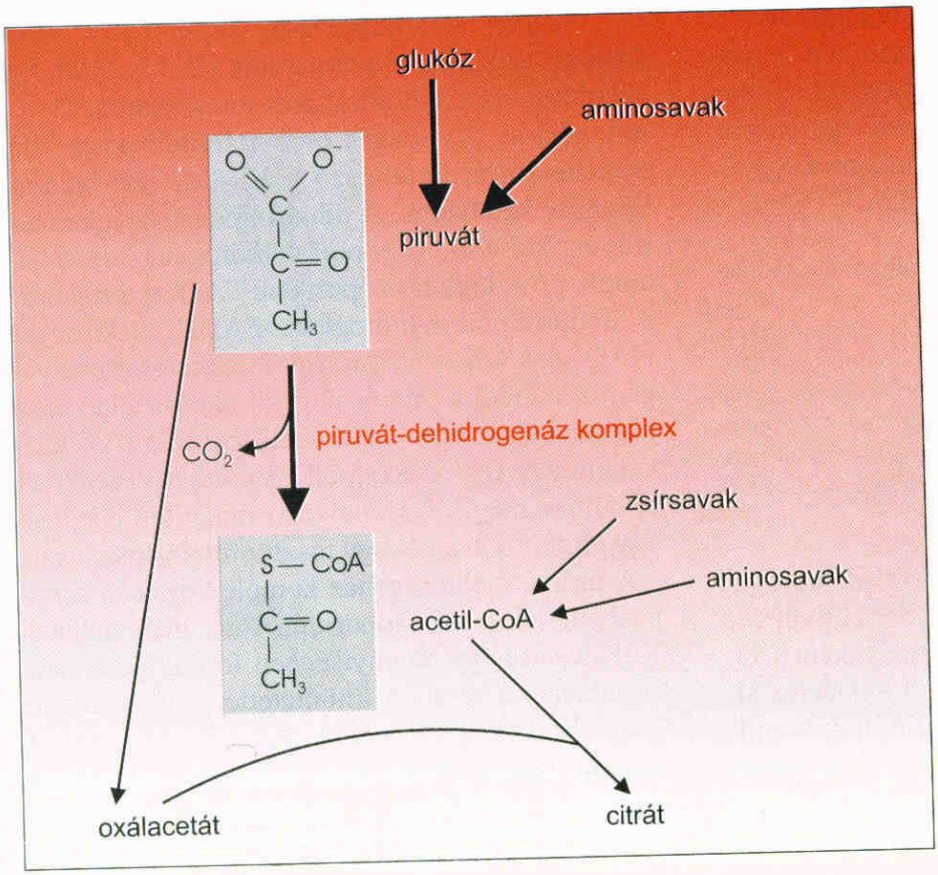
Ha az acetil-CoA glukózból vagy olyan aminosavakból keletkezik, melyek lebontásának közti terméke a piruvát, akkor az acetil-CoA-képződés meghatározó lépése a piruvát → acetil-CoA átalakulás.

A piruvát oxidációja a citrátkörrel együtt koordináltan zajló folyamat. A citrátciklus kezdeti koncepciója a piruvát oxidációjára vonatkozott.

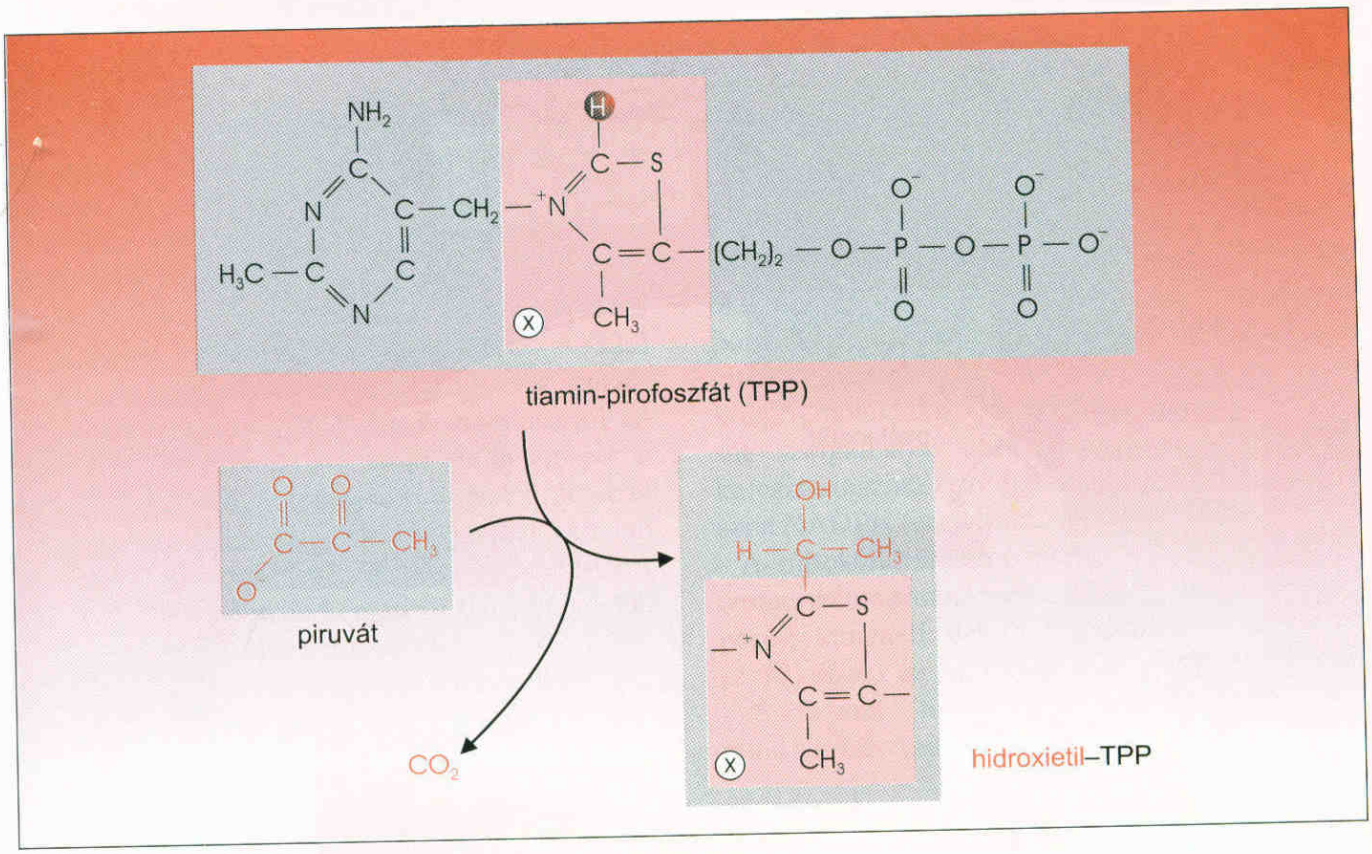
Az acetil-CoA képződése során irreverzibilis reakciósorozatban piruvát oxidatív dekarboxilezése történik.

$$\text{piruvát} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow$$
$$\text{acetil-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$$
$$\Delta G^0 = -33{,}4 \text{ kJ/mol}$$

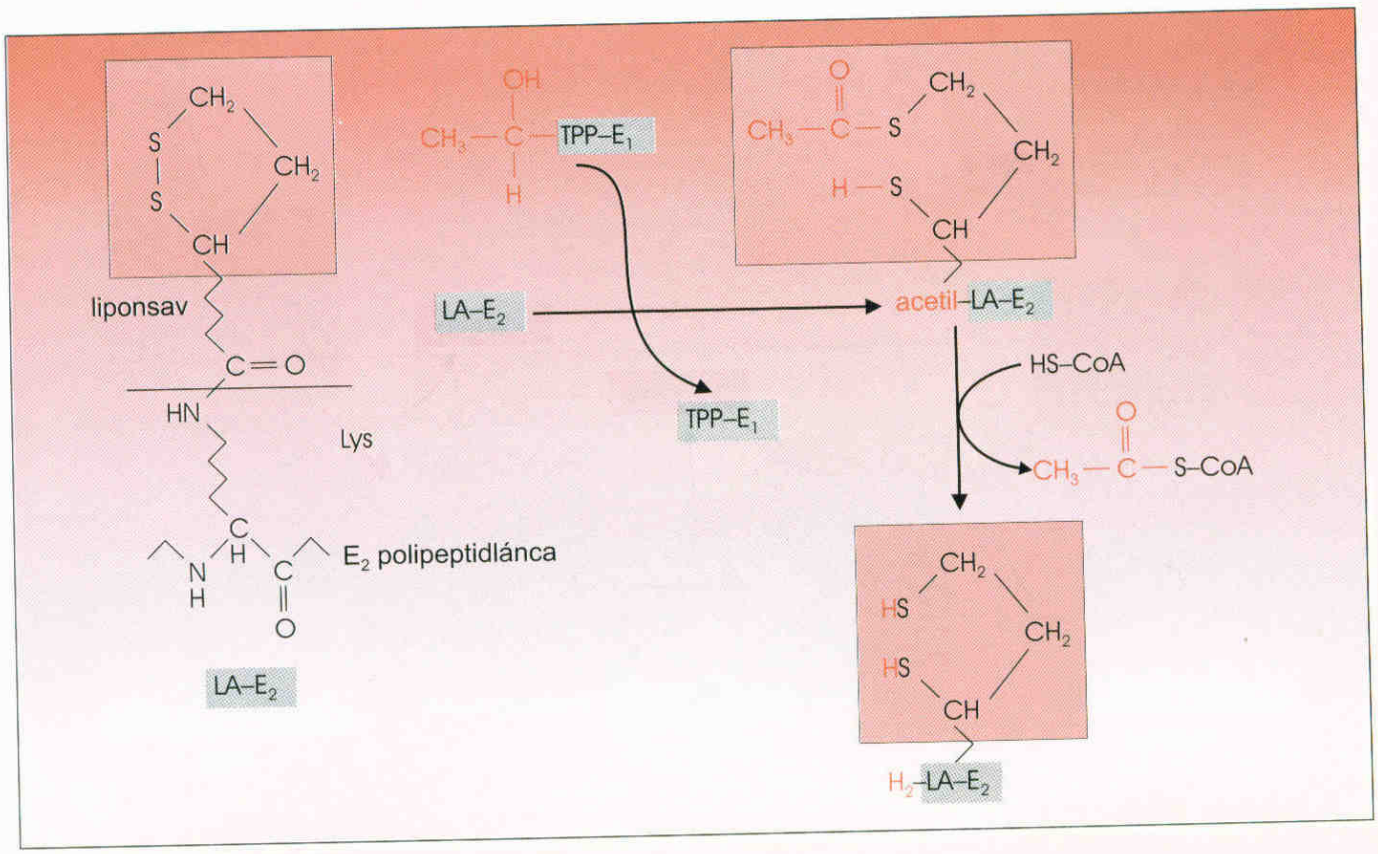
A reakciókat eukarióta sejtekben a mitokondriumban található piruvát-dehidrogenáz komplex katalizálja *(2-32. ábra)*. A komplexet meghatározott térbeli elrendezésben és arányban három enzim, a **piruvát-dehidrogenáz,** a **dihidrolipoil-transzacetiláz,** valamint a **dihidrolipoil-dehid-**



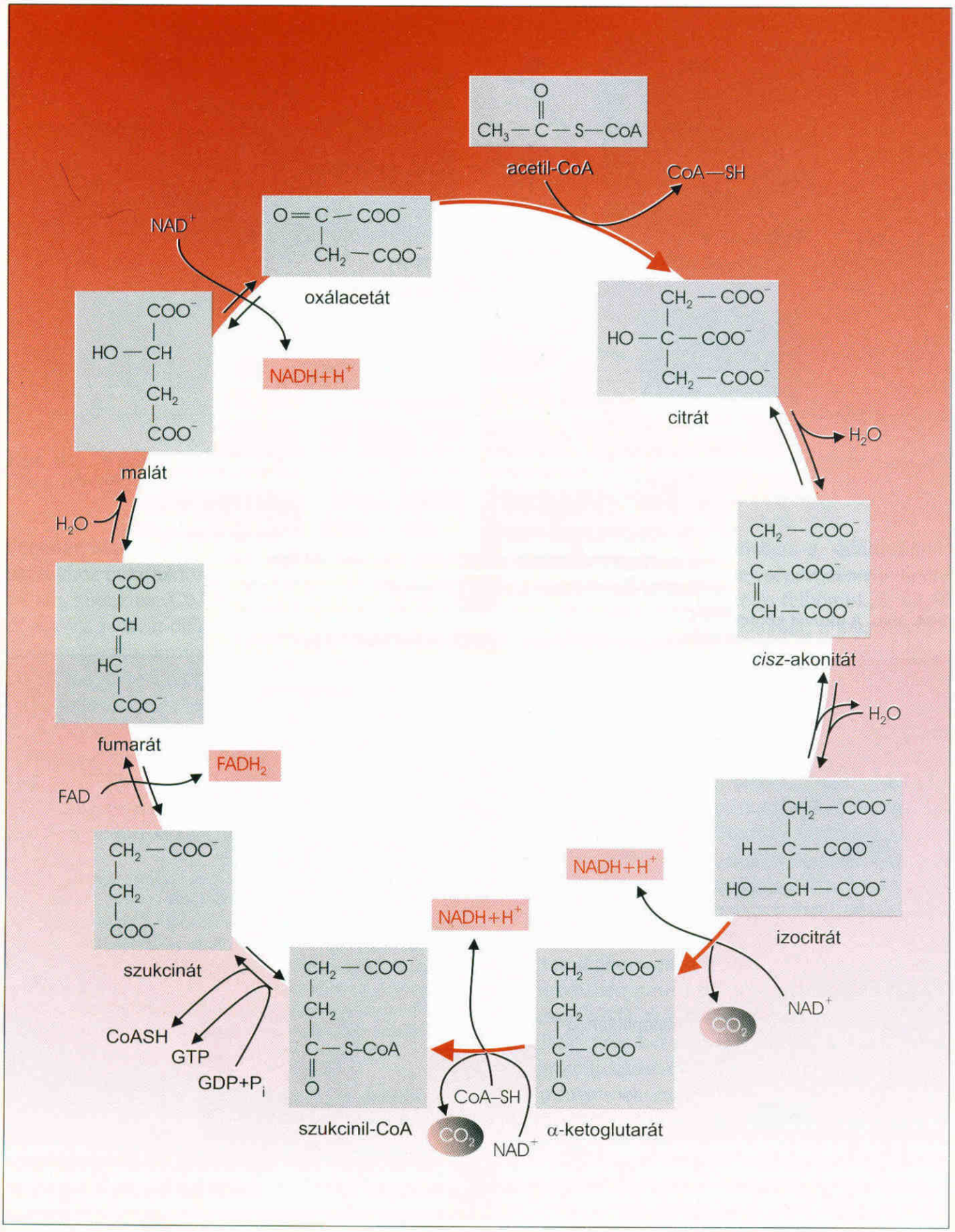
2-32. ábra. Acetil-CoA képződése piruvátból. *A vékony fekete nyilak az egyéb reakcióúton történő keletkezést, illetve átalakulást jelzik*



2-34. ábra. A piruvát kötődése a TPP-hez a piruvát-dehidrogenáz által katalizált reakcióban



2-35. ábra. A liponsav szerepe a dihidrolipoil-transzacetiláz által katalizált reakcióban.
Rövidítések: E_1-TPP: piruvát-dehidrogenáz–TPP; LA-E_2: dihidrolipoil-transzacetiláz–lipoamid



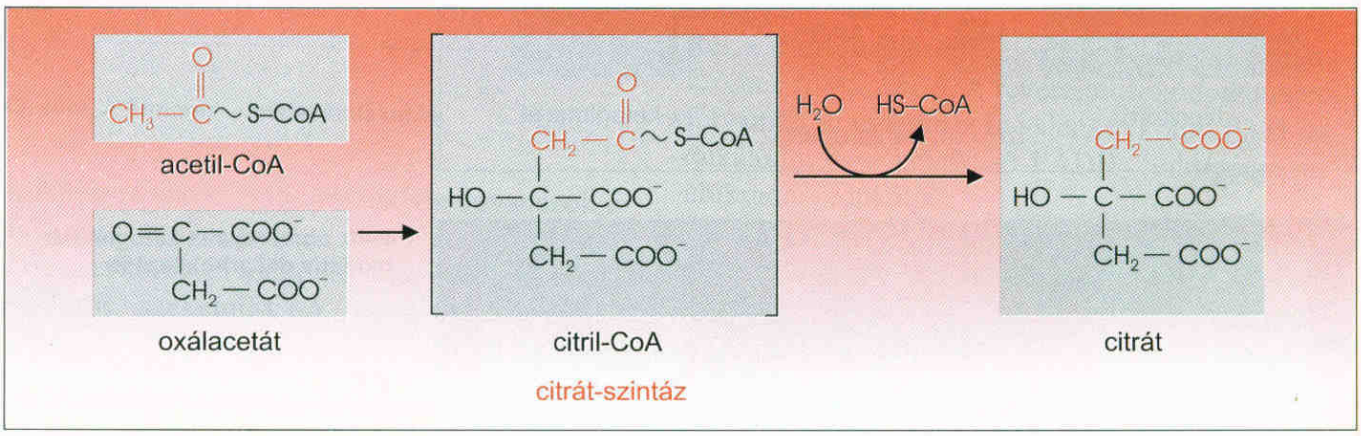
2-36. ábra. A citrátciklus. *A ciklus irreverzibilis reakcióit pirossal kiemeltük*

A citrátkör reakciói

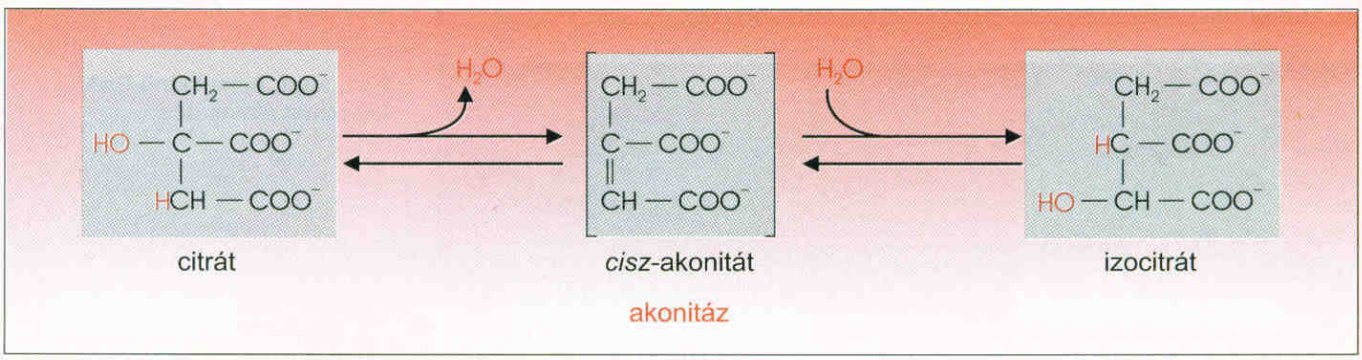
A citrátkört reverzibilis és irreverzibilis reakciók alkotják, amelyeket intramitokondriális enzimek katalizálnak *(2-36. ábra)*.

A ciklus első reakciója a citrát képződése. Acetil-CoA oxálacetáttal citrátot képez aldolkondenzáció, illetve az ezt követő hidrolízis során *(2-37. ábra)*. Az irreverzibilis reakciót ($G^{0'} = -32{,}2$ kJ/mol) a **citrát-szintáz** katalizálja. Az enzim szerkezete, illetve a reakciómechanizmusa jól ismert. A citrát-szintáz a reakció során először a mitokondriumban igen alacsony koncentrációban jelen levő oxálacetátot köti; az ezt követő konformációváltozás teszi lehetővé az acetil-CoA megkötését. Intermedierként citril-CoA képződik, amiből víz belépésével felszabadul a CoA. A magas csoportátviteli potenciálú tioészterkötés hidrolízise teszi a reakciót erősen exergonikussá. Ez fontos, mivel az oxálacetát koncentrációja a mitokondriumban igen alacsony. Az, hogy az enzim csak akkor köti az acetil-CoA-t, ha az oxálacetátot már megkötötte, jelentős körülmény, mert a citrátszintáz ezért nem képes az acetil-CoA-t hidrolizálni. A kondenzációt követő tioészter hidrolízis előfeltétele a citril-CoA létrejöttéhez kötődő újabb konformációváltozás. A keletkezett citrát tovább alakulhat a mitokondriumban, vagy egy transzportrendszeren keresztül a citoszolba kerülhet. A citrát citoszolba történő transzportja a mitokondriumban képződő acetil-CoA citoszolba jutását szolgálhatja, ahol elsősorban zsírsav- és koleszterinszintézisre használódik, és lehetővé teszi a NADPH termelését.

A mitokondriumban maradó citrát reverzibilis izomerizáció során izocitráttá alakulhat át. A kétlépéses, átmeneti dehidratálással járó folyamatot *(2-38. ábra)* az **akonitáz** katalizálja, amely egy FeS-központot tartalmazó fehérje. A FeS-központ mind a szubsztrátkötésben, mind a H_2O-addíció, il-



2-37. ábra. A citrát-szintáz által katalizált reakció

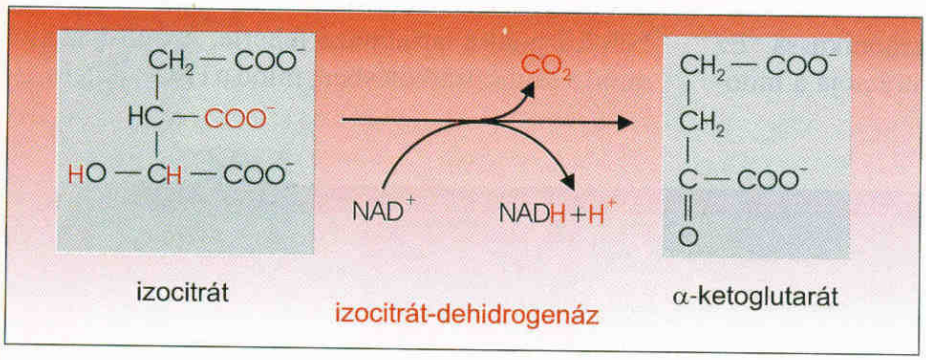


2-38. ábra. A citrát ↔ izocitrát átalakulás

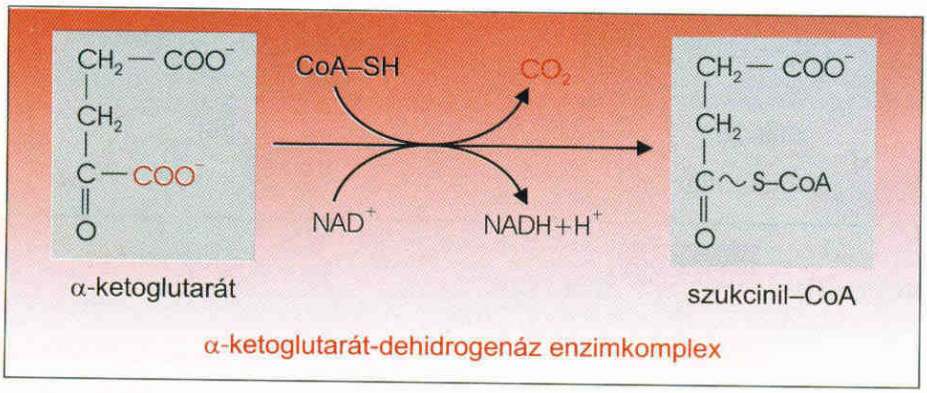
letve dehidratálás folyamatában részt vesz. A reakció során intermedierként képződő *cisz*-akonitát kötődik az enzimhez. Egyensúlyi állapotban a citrát mindössze kb. 7%-a alakul izocitráttá. A tényleges helyzet az aktuális koncentrációviszonyok függvénye, ami a sejt energiaállapota szerint változik. Az izocitrát fogyásának sebessége az izocitrát-dehidrogenáz aktivitásától függ.

Az **izocitrát-dehidrogenáz** a citrátkör „katabolikus részének" tekinthető reakciósorozat elkötelező lépését, az első dehidrogenálást katalizálja. Ennek során alfa-ketoglutarát és CO_2 keletkezik, valamint NAD^+ redukálódik *(2-39. ábra)*. Az irreverzibilis reakció ($\Delta G^{0'} = -20{,}9$ kJ/mol) oxidatív dekarboxilezés. (A citoszolban található izocitrát-dehidrogenáz funkciója elsősorban a $NADP^+$ redukciója, amely bioszintetikus folyamatok fontos feltétele, lásd 2.7. fejezetet). Az alfa-ketoglutarát a mitokondriumban különböző reakciókban vehet részt, amelyekről a 2.4. fejezetben lesz szó.

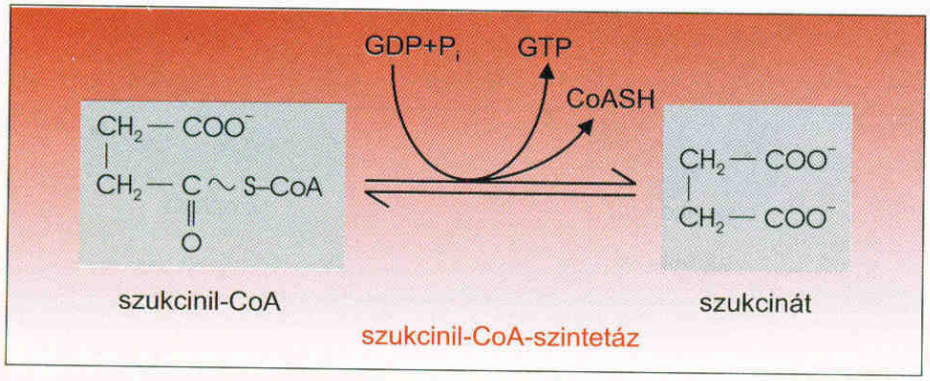
Az **alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz** enzimkomplex katalizálja az alfa-ketoglutarát átalakítását szukcinil-CoA-vá (2-40. ábra), működése a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplexhez hasonló. A komplex irreverzibilis ($\Delta G^{0'} = -33{,}5$ kJ/mol) oxidatív dekarboxilezést katalizál, amelynek során az alfa-ketosav oxidációjából származó energia segítségével magas csoportátviteli potenciálú tioészterkötés jön létre. Az enzimkomplexet háromféle enzim alkotja: az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz, a dihidrolipoil-transzszukciniláz és a di-



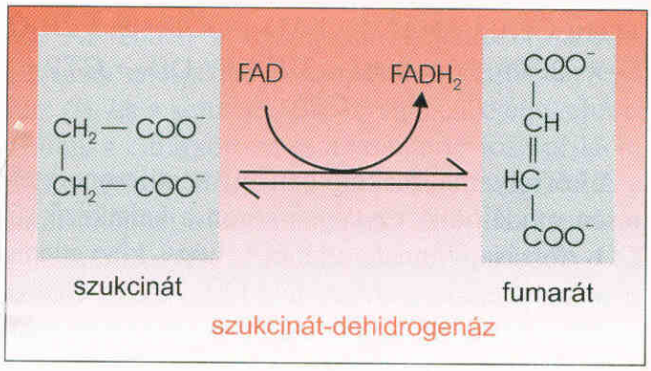
2-39. ábra. Az izocitrát → alfa-ketoglutarát átalakulás



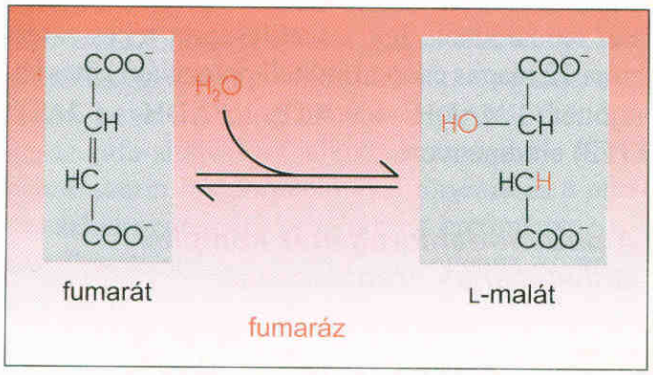
2-40. ábra. Az alfa-ketoglutarát oxidatív dekarboxilezése



2-41. ábra. A szukcinil-CoA → szukcinát átalakulás



2-42. ábra. A szukcinát-dehidrogenáz által katalizált reakció



2-43. ábra. A fumarát → malát átalakulás

hidrolipoil-reduktáz. Működésükhöz ugyanazok a kofaktorok szükségesek, mint a piruvát-dehidrogenáz komplex működéséhez; a reakció eredményeként szukcinil-CoA és CO_2 képződik, valamint NAD^+ redukálódik. Szemben a piruvát-dehidrogenáz komplexszel, ez a komplex nem tartalmaz kinázt, illetve foszfatázt. A szukcinil-CoA szintén lehetséges „kijárat" a ciklusból, mivel ez a vegyület a porfirinszintézis előanyaga (lásd 2.4. fejezetet).

A **szukcinil-CoA-szintetáz** hatására szukcinil-CoA-ból hidrolízissel szukcinát és CoA lesz *(2-41. ábra)*. A magas csoportátviteli potenciálú tioészterkötés felbomlásához kapcsolt reakció a foszforiltranszfer. Először átmenetileg az enzim, majd GDP foszforilálódik GTP-vé a reakció során.

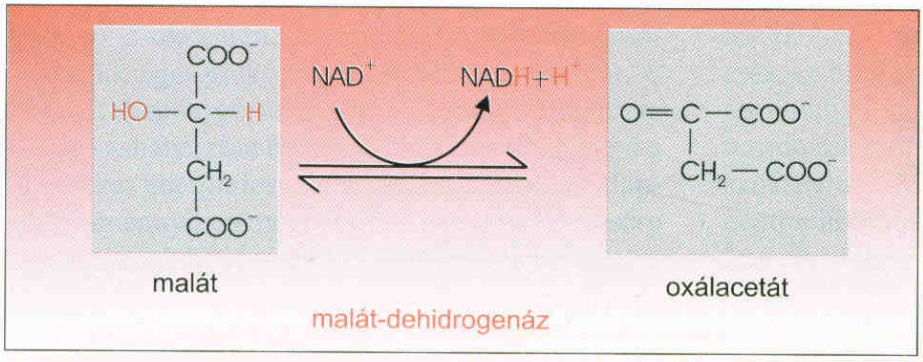
A GTP energetikailag ekvivalens az ATP-vel, amennyiben a nukleozid-difoszfát-kináz által katalizált reakcióban terminális foszfátját képes ADP-nek reverzibilis módon átadni.

A szukcinil-CoA által katalizált reverzibilis reakció **szubsztrátszintű foszforiláció**, azaz nagy energiájú kötés alakul ki függetlenül a légzési lánctól, jóllehet a mitokondriumban történik.

A citrátciklust a keletkezett szukcinátot fumaráttá oxidáló enzim, a **szukcinát-dehidrogenáz** a légzési lánchoz kapcsolja. A szukcinát-dehidrogenáz több FeS-központot tartalmazó flavoprotein, az általa katalizált reakció sztereospecifikus, benne csak fumarát képződik. Ez a citrátkör egyetlen olyan enzime, amely a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el. Része a terminális oxidációs légzési lánc II. komplexének *(2-42. ábra)*. A reverzibilis oxidoredukció folyamán az enzimhez kovalensen kötött FAD redukálódik és a keletkező $FADH_2$ hidrogénjei az ubikinont redukálják.

A fumarátból víz belépésével reverzibilis reakcióban malát képződik a **fumaráz** enzim közreműködésével *(2-43. ábra)*. Az addíció szigorúan sztereospecifikus, kizárólag a malát L-izomerje képződik, illetve ellenkező irányban csak fumarát képződhet. (Maleát a fumarát *cisz*-izomérje, illetve D-malát nem szubsztrátjai az enzimnek.)

A malát → oxálacetát átalakulásért felelős **malát-dehidrogenáz** a citrátkör utolsó, a ciklust bezáró enzime *(2-44. ábra)*. A malát-dehidrogenáz



2-44. ábra. A malát-dehidrogenáz által katalizált reakció

NAD^+ koenzimmel működik. A reakció $\Delta G^{0'}$ = +29,7 kJ/mol értéke ellenére reverzibilis. Az egyensúlyi koncentrációviszonyok szerint a reakció a malátképződés irányába lenne eltolva. Az aktuális oxálacetát-koncentráció azonban igen alacsony (10^{-6}M), illetve a reakció a $NADH/NAD^+$ arány szerint tolódhat az oxálacetát-képződés irányába.

A ciklus aerob állati és növényi sejtekben, valamint számos aerob prokariota sejtben megtalálható.

A citrátkör szerepe a tápanyagok katabolizmusában

A citrátkör a katabolizmus terminális részének előkészítő fázisa. A szén oxidálódik, a hidrogén pedig redox koenzimekre kerül. A piruvát-dehidrogenáz és a citrátkör reakciói 1 piruvát, illetve 1 acetil-CoA molekula teljes oxidációját eredményezik: a három oxidatív dekarboxilálás során a piruvát három C atomja CO_2-dá oxidálódik.

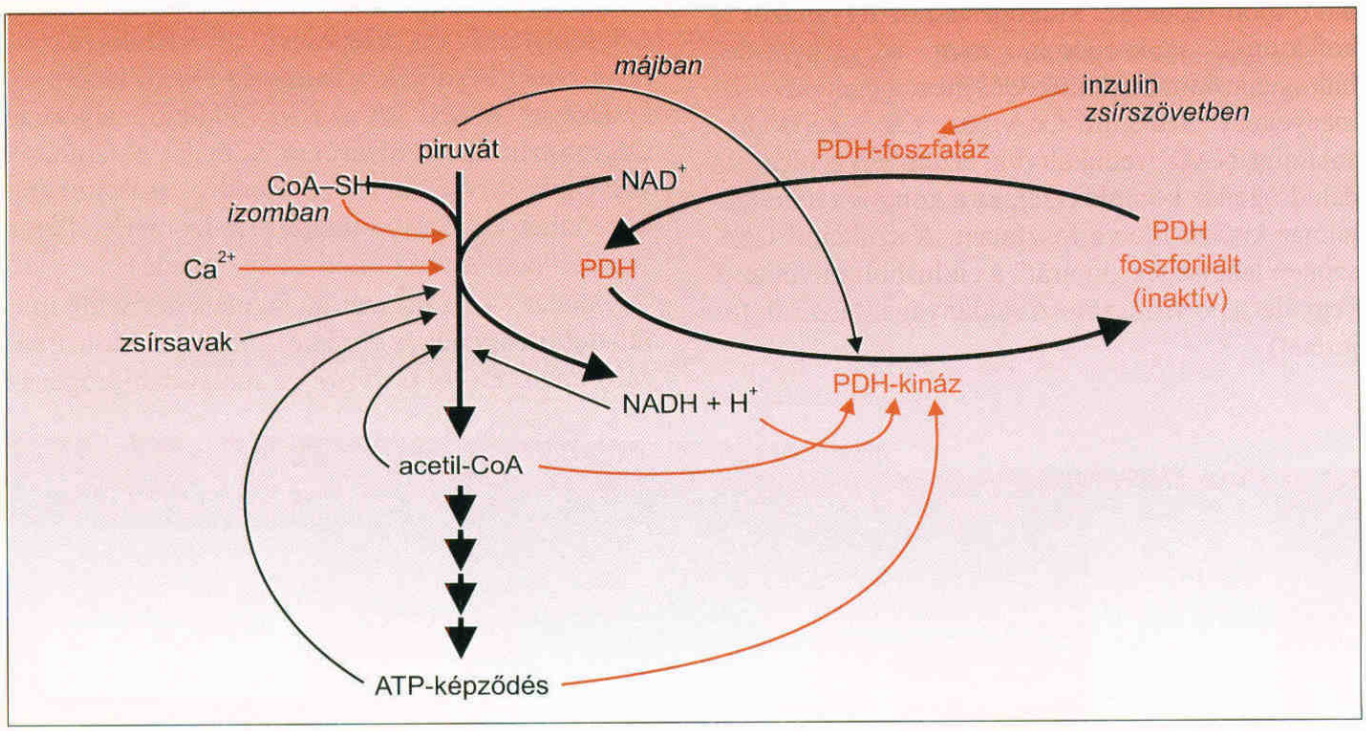
Acetil-CoA-ból indulva a citrátkör reakcióinak összessége a következőképpen írható fel:

$$\text{acetil-CoA} + 3NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 3NADH + 3H^+ + FADH_2 + GTP + CoA$$

A körfolyamat reakcióiban egy acetilcsoport teljesen oxidálódik, ez végső soron a keletkező két CO_2 forrása, (annak ellenére, hogy közvetlenül nem az acetilcsoport oxidálódik). Négy dehidrogenálási reakcióban négy pár hidrogén kerül elektronkarrierekre (3 NAD^+, 1 FAD redukálódik). Ezzel összefüggésben fontos körülmény, hogy egy ciklushoz 2 molekula víz is szükséges. Egy ciklus folyamán egy GDP foszforilálódik GTP-vé. A redukált, elektront szállító molekulák a légzési láncban oxidálódnak, így 1 acetilcsoport teljes oxidációja 12 magas csoportátviteli potenciálú kötés létrejöttét (3 NADH → 9 ATP, 1 $FADH_2$ → 2ATP, GTP) eredményezi.

A piruvát-dehidrogenáz komplex aktivitásának szabályozása

A piruvát-dehidrogenáz komplex energetikai funkciója kettős, szabályozása kétszintű *(2-45. áb-*



2-45. ábra. A piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex aktivitásának szabályozása. *PDH: piruvát-dehidrogenáz; vastag fekete nyilak: reakciófolyamatok; vékony fekete nyilak: gátlás; piros nyilak: serkentés*

ra). Az ebben a reakcióban keletkezett acetil-CoA-nak energetikai szempontból kettős szerepe van: (i), ha a sejtnek ATP-re van szüksége, eloxidálódik a citrátkörben és az oxidatív foszforiláció ATP-t termel; (ii) ha az ATP-szint megfelelő, a citrát kiléphet a citoplazmába, ahol a zsírsav- és koleszterinszintézishez szolgáltat acetil-CoA-t és az energia neutrális lipidek formájában raktározódik.

A szabályozás egyrészt az enzimaktivitás allosztérikus befolyásolása; a keletkezett acetil-CoA és NADH, valamint az ATP allosztérikus gátlói a piruvát-dehidrogenáznak. Ez a gátlás jelentősen fokozódik hosszú láncú zsírsavak jelenlétében. Másrészt azonban részben ugyanezek a molekulák serkentik az enzim foszforilációját; a poszttranszlációs kovalens modifikáció a piruvát-dehidrogenáz alfa-alegységét alkotó aminosavak közül három szerin foszforilációjával történik és a piruvát-dehidrogenáz inaktiválódását eredményezi. A szabályozásban a piruvát-dehidrogenáz komplex további két komponense, a piruvát-dehidrogenáz-kináz és a piruvát-dehidrogenáz-foszfatáz vesz részt. ATP, acetil-CoA és NADH aktiválják a kinázt, a piruvát-dehidrogenáz foszforilálódik és inaktiválódik. Az enzim defoszforilálódik és aktiválódik, ha csökken az acetil-CoA, illetve emelkedik az ADP-szint. A CoA, a NAD^+, illetve az AMP-koncentráció növekedése viszont allosztérikusan aktiválja az enzimet, és így fokozza az acetil-CoA belépését a ciklusba. Különböző szövetekben a piruvátkoncentráció emelkedése, illetve az inzulin serkentik a piruvát-dehidrogenáz aktivitását. Májban a piruvát gátolja a kinázt, zsírszövetben az inzulin serkenti a foszfoprotein-foszfatázt. Ez szoros kapcsolatban van azzal a követelménnyel, hogy amikor glukóztöbblet van, az enzimnek intenzívebben kell működnie a glukóz hasznosítása érdekében. Étkezések között azonban az aktivitást csökkenteni kell (az agy kivételével), mert az csökkentené a vércukorszint fenntartásához szükséges glukózprekurzorok mennyiségét. A piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált reakció szabályozása nemcsak az adott sejt, hanem a szervezet energiaforgalma szempontjából is alapvető, amennyiben meghatározó a glukóz képzésére alkalmas (glukogén) prekurzorok szintjének alakításában. Ezt a kérdéskört a 2.7. fejezetben tárgyaljuk.

A citrátciklus szabályozása. A ciklust feltöltő (anaplerotikus) reakciók

A citrátciklus reakciói mind az anabolizmus, mind a katabolizmus szempontjából központi reakcióutak, ezért a ciklus szabályozása különböző energiaállapotoknak kell, hogy megfeleljen. A szabályozás összehangolt mind a ciklust bevezető piruvát-dehidrogenáz komplex, mind az oxidatív foszforiláció regulációjával.

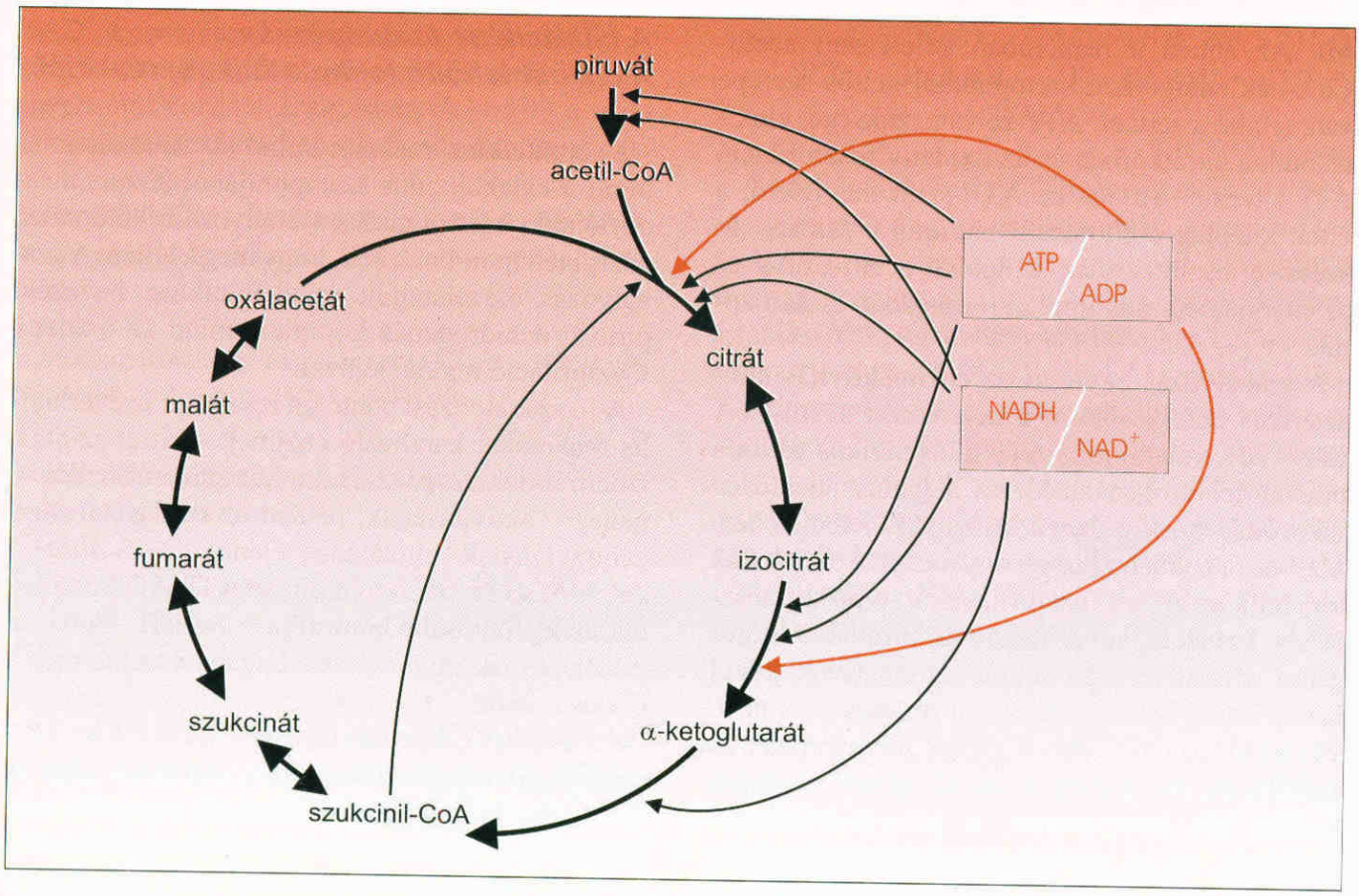
A fő szabályozási pontokat részint az irreverzibilis reakciókat katalizáló enzimek – citrát-szintáz, izocitrát-dehidrogenáz, alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz – aktivitásának, részint az oxálacetát koncentrációjának változtatása jelentik *(2-46. ábra)*.

A NADH/NAD^+, valamint az ATP/ADP arány a ciklus legfontosabb kontrollja, a NADH, illetve az ATP optimális képződésének igénye szabja meg a ciklus működését.

Az irreverzibilis reakciók közül a citrát képződése a **citrát-szintáz** aktivitásán, illetve részben az oxálacetát-koncentráció változásán keresztül szabályozott. A citrát-szintáz allosztérikus gátlószerei az ATP, NADH, valamint a zsíracil-CoA. Ez jól demonstrálja a citrát szintézisének kettős funkcióját: egyrészt szerepét a katabolizmusban, másrészt a citrátszintézis és a zsírsavszintézis összefüggését. A ciklus intermedierjeinek koncentrációemelkedése szintén gátló hatású, a szukcinil-CoA a citrát-szintáz allosztérikus gátlója. A citrát-szintáz allosztérikus aktivátora az ADP.

A citrátciklus katabolikus részének bevezető, ebben az irányban elkötelező lépését, a második irreverzibilis reakciót katalizáló **izocitrát-dehidrogenáz** aktivitását elsősorban az ATP/ADP, illetve a NADH/NAD^+ arány szabályozza. Az allosztérikus szabályozásban a legfontosabb aktivátor az ADP, míg az ATP, illetve NADH az izocitrát-dehidrogenáz allosztérikus gátlói.

Ez szoros összefüggésben van az akceptor kontrollal. Az ADP-koncentráció emelkedése így nemcsak az oxidatív foszforilációt és ezen keresztül a terminális oxidációt gyorsítja, hanem biztosítja a terminális oxidáció fokozott redukáló ekvivalens szükségletének kielégítését is. Ha az ATP-koncentráció emelkedik, a terminális oxidáció ennek következtében lassul, ezért a NADH oxidációja csökken, az izocitrát oxidációjának sebessége visszaszorul. A citráttermelés ettől függetlenül



2-46. ábra. A citrátciklus szabályozása. *Vastag fekete nyilak: a ciklus reakciói; vékony fekete nyilak: gátlás, vékony piros nyilak: serkentés*

még folyhat, a piruvát-dehidrogenáz a kétszintű szabályozás miatt még aktív állapotban lehet. Ilyenkor a termelődő citrát inkább bioszintézisre, energiaraktározásra fordítódik.

A harmadik irreverzibilis lépést katalizáló **alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz** enzimkomplex a piruvát-dehidrogenáz komplexhez hasonlóan szabályozott. Ebben az esetben azonban nincs kétszintű szabályozás, hiányzik a kináz, illetve foszfatáz által katalizált foszforilációs–defoszforilációs mechanizmus. A komplex aktivitását gátolja az ATP és a NADH, valamint a szukcinil-CoA és a GTP.

Izomszövetben – ahol a Ca^{2+}-ionok szerepe igen jelentős a kontrakció mechanizmusában, a kontrakció viszont ATP-t fogyasztó folyamat – a piruvát-dehidrogenáz komplex, az izocitrát-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz aktivitását Ca^{2+} ionok fokozzák. Ez az összehangolt Ca^{2+}-függő reguláció más szövetekben is kialakul.

A szabályozás másik fontos szempontja az oxálacetát koncentrációjának alakulása. A citrátkör intermedierjei egyben bioszintetikus prekurzorok is, ezért igen fontosak a ciklust feltöltő **(anaplerotikus)** reakciók. Ezek emelik, illetve biztosítják az oxálacetát mennyiségét. A legfontosabb anaplerotikus reakció a piruvát → oxálacetát átalakulás. A reverzibilis reakciót a **piruvát-karboxiláz** katalizálja:

$$\text{piruvát} + HCO_3^- + \text{ATP} \leftrightarrow \text{oxálacetát} + \text{ADP} + P_i$$

Elsősorban a glukóz de novo szintézisére képes májban, illetve vesében fontos ez a reakció, mivel a keletkezett oxálacetát glukoneogenezis intermedierként közvetve elhagyhatja a citrátkört (lásd 2.2. fejezetet). A piruvát-karboxiláz CO_2 fixálást katalizál, prosztetikus csoportja a biotin. Az enzim allosztérikus serkentője az acetil-CoA. Emelkedett acetil-CoA-koncentráció serkenti a piruvát → oxálacetát átalakulást, így a ciklus több acetil-CoA-t képes felvenni.

További anaplerotikus lehetőség elsősorban szívben és vázizomban a **foszfoenol-piruvát-karboxikináz** által katalizált reverzibilis reakció:

$$\text{foszfoenol-piruvát} + CO_2 + GDP \leftrightarrow \text{oxálacetát} + GTP$$

Anaplerotikus szerepe lehet a **malát (almasav) enzim** által katalizált reverzibilis reakciónak is:

$$\text{piruvát} + HCO_3^- + NAD(P)H \leftrightarrow \text{malát} + NAD(P)^+$$

Anaplerotikus reakciók közé sorolható még a glutamát oxidatív dezaminálása is (lásd 2.4. fejezet), amit a **glutamát-dehidrogenáz** katalizál.

$$\text{glutamát} + NAD(P)^+ \leftrightarrow \alpha\text{-ketoglutarát} + NAD(P)H + H^+ + NH_4^+$$

A piruvát-dehidrogenáz csökkent működésének klinikai vonatkozásai

A piruvát-dehidrogenáz működéséhez több vitamin származéka is szükséges. B_1-vitamin (tiamin) hiányában a piruvátoxidáció, így a glukózoxidáció zavara alakul ki. Ez a **beriberi kór** tünetegyüttesét okozza, többek között gyengeséget, idegrendszeri és kardiológiai tüneteket. A betegség tökéletlen, tiaminhiányos táplálkozás miatt gyakran olyan helyeken lép fel, ahol alacsony tiamintartalmú rizs a fő táplálék. De kialakulhat alkoholistáknál is, a rendszerint nem megfelelő táplálkozás miatt.

A piruvát-dehidrogenáz csökkent működése, a tiamin hiánya a glukózoxidáció súlyos zavarát okozva elsősorban az agy működését veszélyezteti. Az agy fő energiaforrása a glukóz.

Piruvát-dehidrogenáz csökkent működésével járó állapotokban a glukóz nem alakulhat át acetil-CoA-vá, ezért csak a glikolízisben tud ATP termelődni. Ez komoly tüneteket, eszméletvesztést, kómás állapotot is okozhat. A keletkezett piruvát nem tud továbbalakulni, laktát képződik, a laktátkoncentráció emelkedik, laktátacidosis jön létre (lásd 116. oldal). Ilyenkor egy B_1-vitamin nélkül adott glukózinfúzió csak súlyosbítja az állapotot, mivel fokozza a laktátacidosist és fatális kimenetelű lehet. Alkoholisták esetében az acidosist csak fokozza az ilyenkor fellépő ketosis.

A piruvát-dehidrogenáz csökkent működése gyerekkorban fellépő, neurológiai tünetek esetén gyakran halálos kimenetelű betegség. A piruvát-dehidrogenáz komplex különböző összetevőinek károsodott expressziója okozhat klinikai tüneteket. Az emelkedett szérumlaktát-, -piruvát-, -alaninszint krónikus laktátacidosissal jár. A piruvát-dehidrogenáz funkciójának kiesése miatt az anaerob metabolizmus válik dominánssá, mivel a citrátkör nem jut elegendő mennyiségben acetil-CoA-hoz. Az acetil-CoA hiányos képződését ketogén diétával lehet részben ellensúlyozni, illetve csökkentett szénhidrátbevitellel lehet egyes esetekben javulást elérni.

Anaerob körülmények természetesen nem teszik lehetővé a katabolizmus három szakaszát. A redukált koenzimek nem oxidálódnak a légzési láncban. Az aerob és anaerob anyagcsere „elágazási pontja" a piruvát (lád 2.7. fejezetet). Ha egyes aerob sejttípusok anaerob viszonyok közé kerülnek (pl. elégtelen O_2-ellátás izomkontrakciók esetén), energiaigényüket csak egy inkomplett oxidáció – glikolízis – megvalósításával képesek fedezni, amelynek legoxidáltabb molekulája a piruvát. Anaerob sejtek és organizmusok, így az emberi szervezet azon sejtjei, amelyekben nincs mitokondrium (pl. vörösvértest), energiaigényüket csak glikolízissel fedezik.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Bánhegyi Gábornak, Dr. Braun Lászlónak, Dr. Csermely Péternek, Garzó Tamásnak, Dr. Kőnig Tamásnak, Dr. Müllner Nándornak és Dr. Tóth Miklósnak.

2.2. A szénhidrátok anyagcseréje

Ádám Veronika és Mandl József

A szénhidrátok a szervezet számára alapvető tápanyagok. Anyagcseréjük központi folyamata a **glikolízis**, amelyben a glukóz piruváttá oxidálódik. Ebből anaerob körülmények között laktát, aerob körülmények között pedig acetil-CoA-n keresztül CO_2 és H_2O keletkezik.

A sejtek a **glukoneogenezis** folyamán nem szénhidrát-természetű anyagokból glukózt képesek szintetizálni. A glukóz mellett fontos egyéb szénhidrátok metabolizmusa is ezekhez a folyamatokhoz csatlakozik, illetve a szervezetben keletkező szénhidrátok szintézise innen indul.

A glukóz a **glikogenezisben** glikogénbe épül be, raktározódik és innen mobilizálható **(glikogenolízis)**. Pentóz-foszfátok képződnek a **glukóz direkt oxidációja** során. Mindezeket a folyamatokat vázlatosan a *2-47. ábrán* jelezzük és ebben a fejezetben tárgyaljuk.

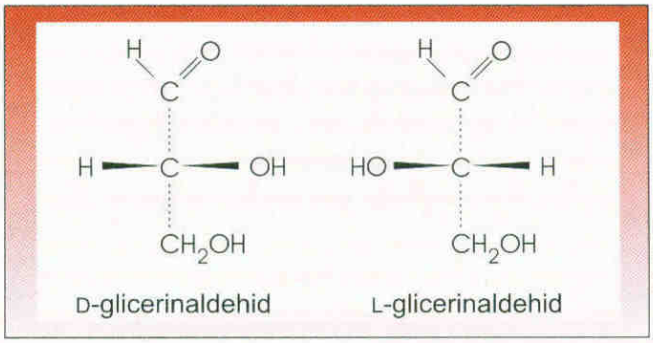
A legfontosabb szénhidrátok és tulajdonságaik

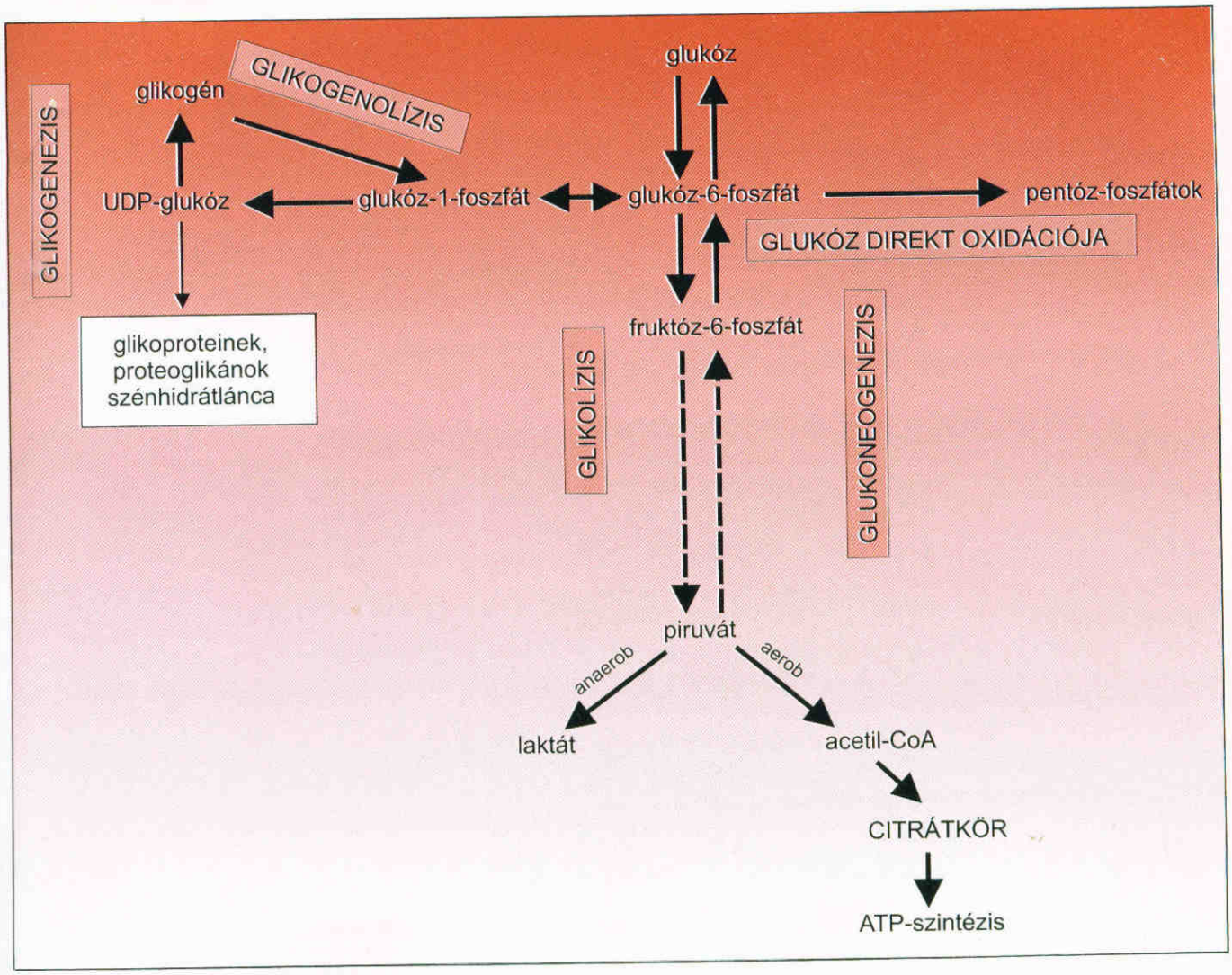
A szénhidrátok aldehid- vagy ketocsoportot tartalmazó több szénatomos molekulák, amelyek minimálisan két vagy több alkoholos OH funkciós csoportot tartalmaznak.

Osztályozásuk több szempont szerint történik:

1. A fenti definíciónak megfelelő legkisebb egységek a monoszacharidok. Két monoszacharidból összekapcsolt molekulák a diszacharidok, több monoszacharid-egységet tartalmaznak az oligoszacharidok, míg több száz, illetve ezer monoszacharidból épülnek fel a poliszacharidok.
2. A monoszacharidok a jellegzetes funkciós csoport szerint lehetnek aldózok (aldehidet tartalmaznak) vagy ketózok (ketont tartalmaznak).
3. A molekulát felépítő C-atomok száma szerint a monoszacharidok lehetnek: triózok (3 C-atom), tetrózok (4 C), pentózok (5 C), hexózok (6 C), heptózok (7 C).
4. A diszacharidok redukáló tulajdonságuk alapján két fő csoportra oszthatók: redukáló és nem redukáló diszacharidok.
5. A poliszacharidok két fő csoportot képeznek: a homopoliszacharidok azonos monoszacharid-egységekből, a heteropoliszacharidok különböző monoszacharid-egységekből, illetve azok származékaiból felépülő polimerek.

Monoszacharidok. A monoszacharidok szerkezetileg legegyszerűbb képviselői a triózok: a glicerinaldehid és a dihidroxi-aceton, az előbbi aldotrióz, míg az utóbbi ketotrióz. A glicerinaldehid királis molekula, tartalmaz egy aszimmetrikus C-atomot, a dihidroxi-aceton nem. A glicerinaldehid két sztereoizomér módosulata D-, illetve L-glicerinaldehid.





2-47. ábra. A szénhidrát-metabolizmus fő útjai

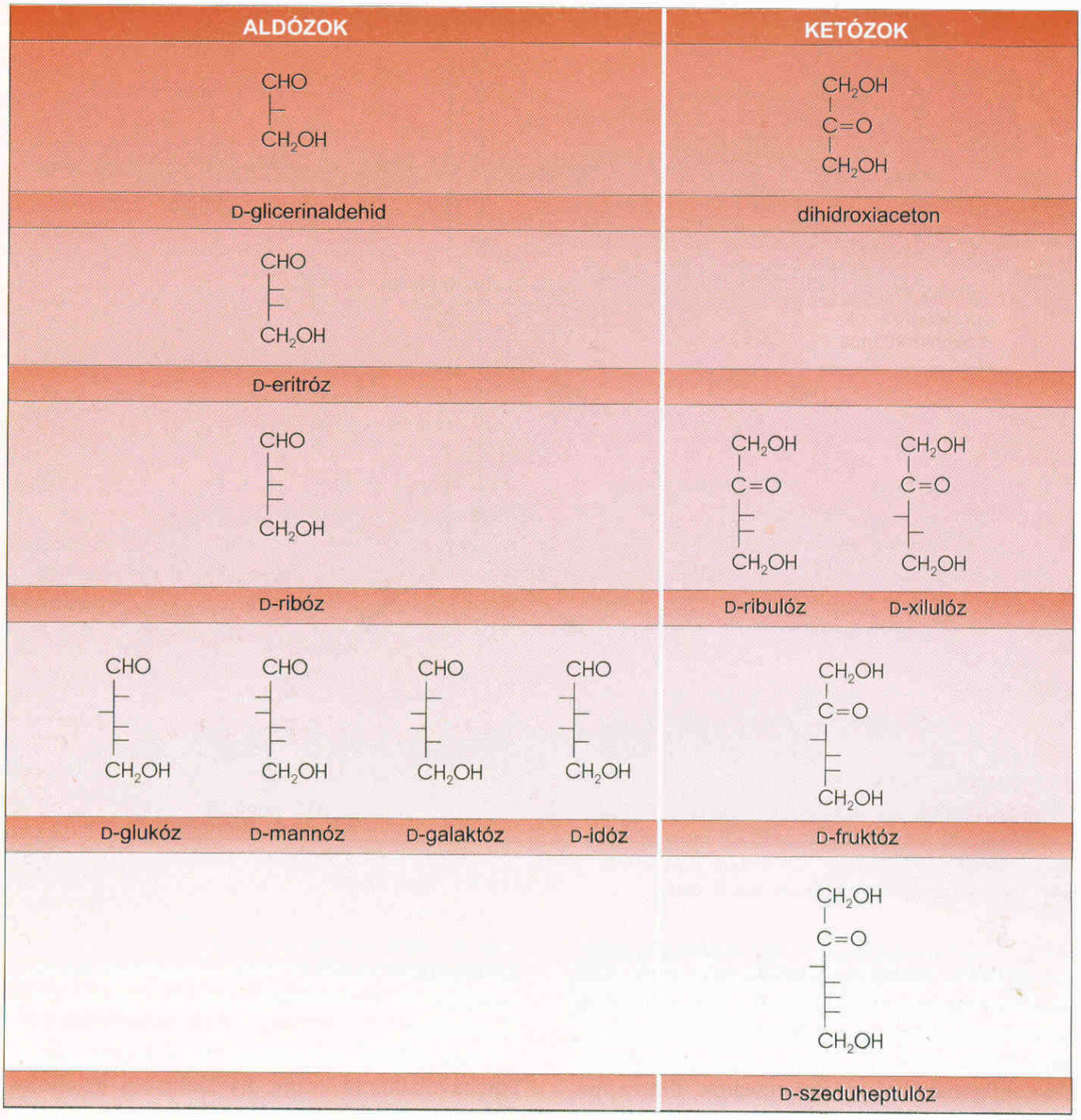
A további monoszacharidok egy vagy több kiralitáscentrumot tartalmaznak, így különböző sztereoizomérek léteznek. Rendszerezésük alapja, hogy kémiai reakciók útján melyik glicerinaldehid-konfigurációból származtathatók, illetve melyikké bonthatók le. Ezek alapján D-, illetve L-konfigurációval rendelkező monoszacharidokat különböztetünk meg. Általános szabályként elfogadott, hogy a D-, illetve L-konfiguráció úgy állapítható meg, hogy a karbonil szénatomtól legtávolabbi kiralitáscentrum körül a konfiguráció a D- vagy L-glicerinaldehiddel megegyező. Az emberi szervezetben a D-monoszacharidok fordulnak elő, legfontosabb képviselőik szerkezetét vázlatos formában a *2-48. ábra* mutatja be.

Ha két monoszacharid csak egyetlen kiralitáscentrum körüli konfigurációban tér el egymástól, azokat epimereknek nevezik. Ilyen epimerek pl. a D-glukóz és a D-mannóz vagy a D-glukóz és a D-galaktóz.

Vizes oldatban az aldehid- vagy a ketocsoport egy távolabbi (4. vagy 5.) szénatom alkoholos OH-csoportjához térben közel kerül és félacetál vagy félketál jön létre, amely a molekula egyidejű gyűrűvé záródását is maga után vonja *(2-49. ábra)*.

A glukóz bemutatott gyűrűs (ciklusos) félacetálszerkezete a heterociklusos piránmolekulára emlékeztet, illetve abból származtathatónak is felfogható, piranóz típusú monoszacharid. Ezzel szemben a D-ribóz ugyanilyen reakció következtében a furánhoz hasonló 5 tagú gyűrűt, ciklusos félacetált alakít ki: furanóz típusú monoszacharid.

A D-fruktóz szintén furanóz típusú szerkezetet formál azzal a különbséggel, hogy a reakció ciklu-

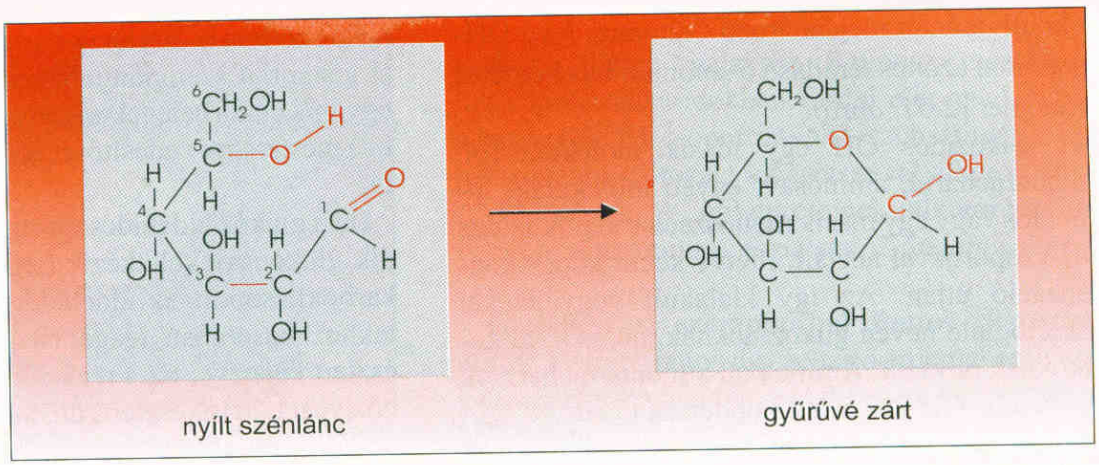


2-48. ábra. A szervezetben előforduló legfontosabb monoszacharidok. *A képletekben vízszintes vonalak az OH-csoportok helyzetét jelzik*

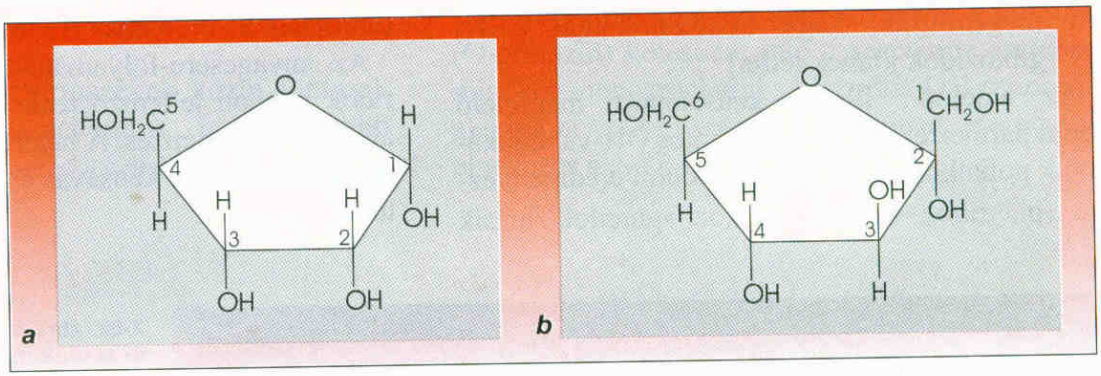
sos félketált eredményez *(2-50. ábra)*. A ciklusos félacetál, illetve félketál létrejöttének van egy további következménye, nevezetesen az eredeti C=O csoport szénatomja a reakció után egy újabb királitáscentrummá vált, a hozzá kapcsolódó OH-csoport viszont a többi alkoholos OH-csoporthoz képest némileg eltérő tulajdonságokkal rendelkezik. Ezért megkülönböztetésül **glikozidos OH-csoportnak** nevezik.

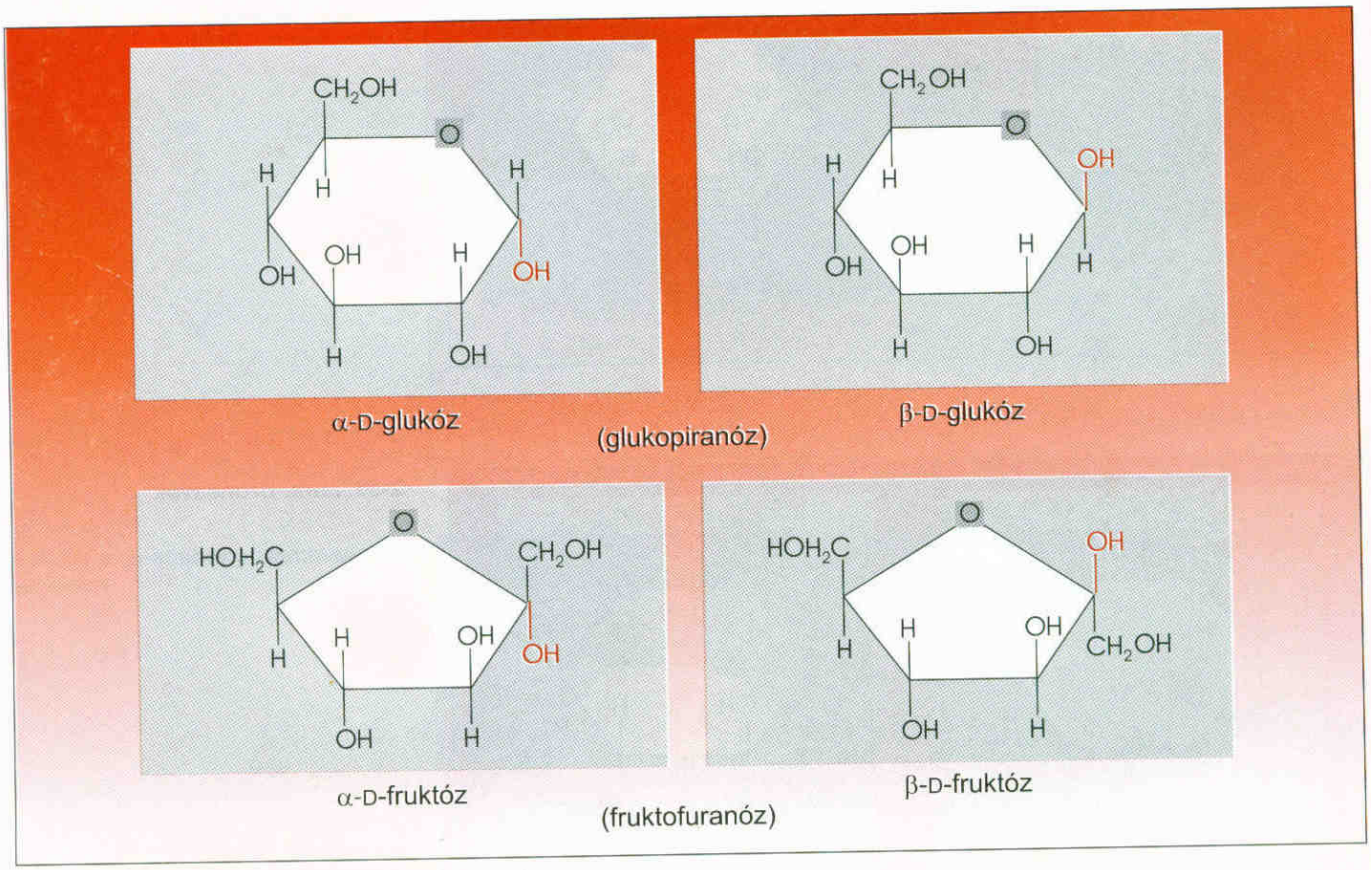
A glikozidos OH csoport térbeli elrendeződése újabb két konfigurációt eredményezhet, ezeket anomereknek nevezik. Ha a glikozidos OH a

2-49. ábra. D-glukóz



2-50. ábra.
α-D-ribofuranóz (a)
és
α-D-fruktofuranóz (b)





2-51. ábra. α- és β-anomerek

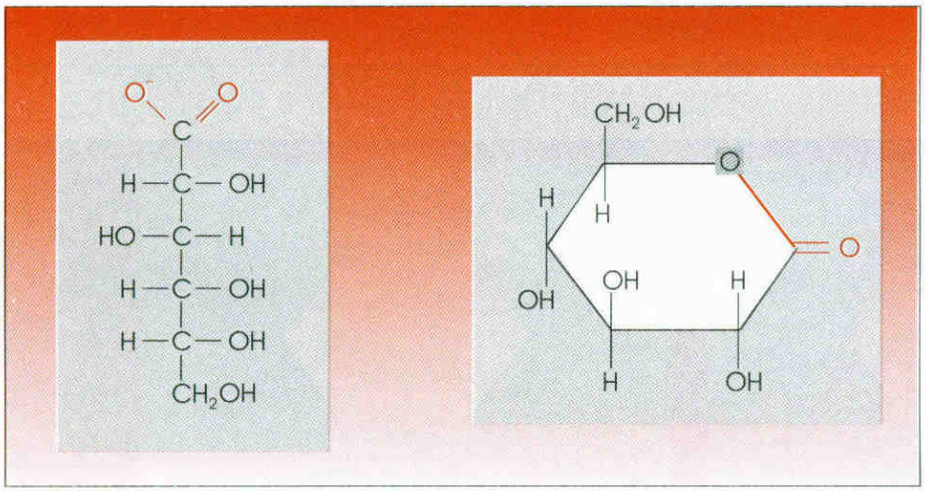
D-konfigurációt meghatározó C-atomon levő OH-csoporttal azonos térállású α-anomer, ha ellentétes β-anomer *(2-51. ábra)*.

A glikozidos OH egy másik molekula (pl. monoszacharid, aminosav, egyéb molekulák) alkoholos vagy egy másik monoszacharid glikozidos OH-csoportjával acetált, illetve ketált képez kondenzáció útján. Az így kialakult vegyületeket összefoglaló néven glikozidoknak, ún. „O"-glikozidoknak nevezik. Aminokkal a monoszacharidok glikozidos OH-ja szintén kondenzációval „N"-glikozidokat képez (pl. purin- vagy pirimidinbázisok ribózzal vagy dezoxi-ribózzal). [A teljesség kedvéért megemlítjük, hogy tioalkoholokkal (-SH) „S"-glikozidok jönnek létre.]

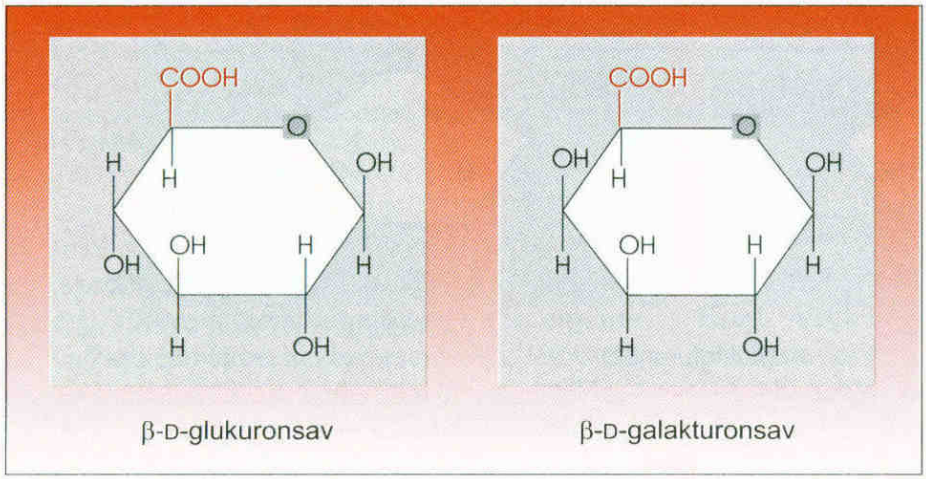
Az aldehid-, illetve ketocsoport megfelelő redoxpartnerrel reagálva alkoholos OH-vá redukálódik polialkoholt, ún. cukoralkoholt eredményezve (pl. ribóz→ribitol, glukóz→glucitol, másik neve szorbitol). Ezeknek a vegyületeknek az orvosi gyakorlat szempontjából nagy jelentősége van, ugyanis cukorbetegek részére pl. a szorbitol (szorbit) mesterséges édesítőszerként kerül alkalmazásra.

Ha a glukóz aldehidcsoportja karboxillá oxidálódik glukonsav keletkezik (anionja a glukonát). A karboxilcsoport az aldehiddel kapcsolatban leírtakhoz hasonlóan reagálhat a C5 OH-csoporttal észtert képezve. Ez a reakció ismét gyűrűzáródáshoz vezet, belső észtert, ún. laktonszerkezetet hozva létre (pl. glukonolakton, *2-52. ábra)*. A primer alkoholos OH-csoport oxidációja ún. uronsavakat (anionjaik az uronátok) eredményez *(2-53. ábra)*.

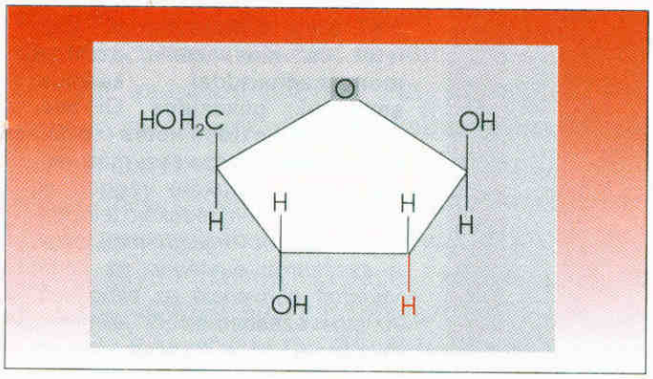
Az anyagcsere-folyamatokban a monoszacharidok nagyon jellemző reakciója a foszforsavval alkotott észterképzés. A heteropoliszacharidokban monoszacharidok kénsavas észterei is megtalálhatóak.



2-52. ábra. D-glukonát és D-glukonolakton



2-53. ábra. Uronsavak

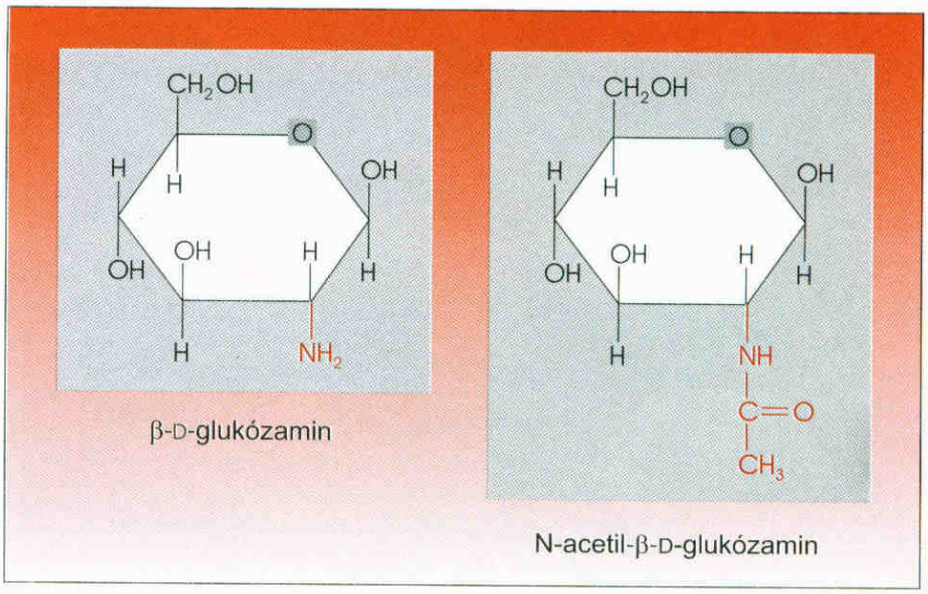


2-54. ábra. β-2-dezoxi-D-ribóz

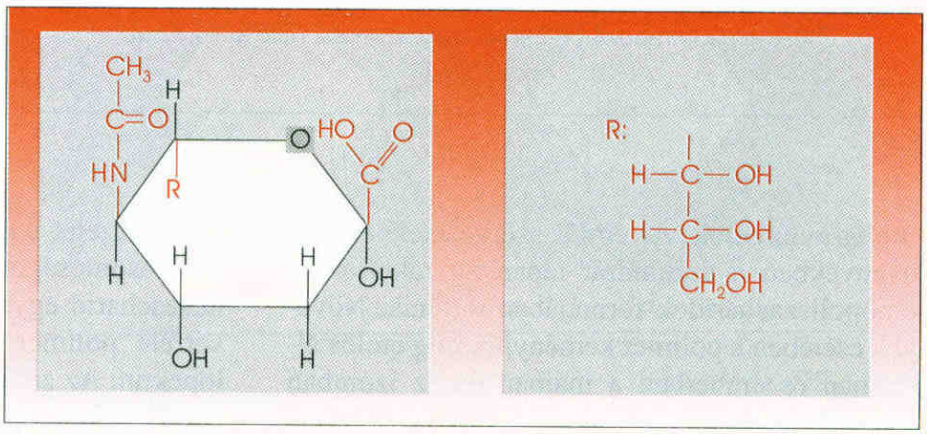
A monoszacharid-származékok közül fontosak az ún. dezoxi-monoszacharidok. Legismertebbb képviselőjük a β-2-dezoxi-D-ribóz *(2-54. ábra)*. A glukóz, illetve galaktóz aminoszármazéka a heteropoliszacharidokban fordul elő, amelyekben a hexóz C2 OH-csoportját -NH_2 szubsztituálja. Ennek további változata az ecetsavval alkotott amid *(2-55. ábra)*. A glikoproteinek alkotórésze az N-acetil-neuraminsav (sziálsav, *2-56. ábra)*.

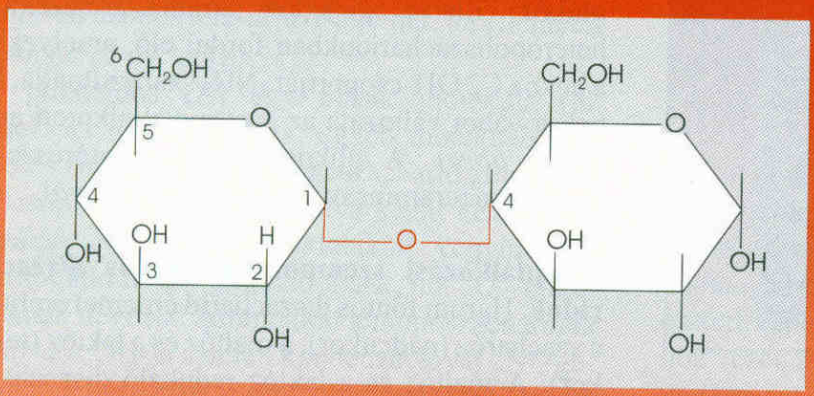
Táplálkozási szempontból fontos diszacharidok. Három fontos diszacharid érdemel említést: a szacharóz (nádcukor), a maltóz és a laktóz (tejcukor). A maltóz és a laktóz redukáló diszacharid, ugyanis az egyik monoszacharid glikozidos OH-csoportja „szabad", nem vesz részt a glikozid (O-glikozid) kötésben, míg a szacharóz esetében mindkét monoszacharid glikozidos OH-csoportja alakítja ki az O-glikozidot. (A képletek és a pontos elnevezés a *2-57. ábrán* látható).

2-55. ábra. Glukózamin és acetilszármazékai

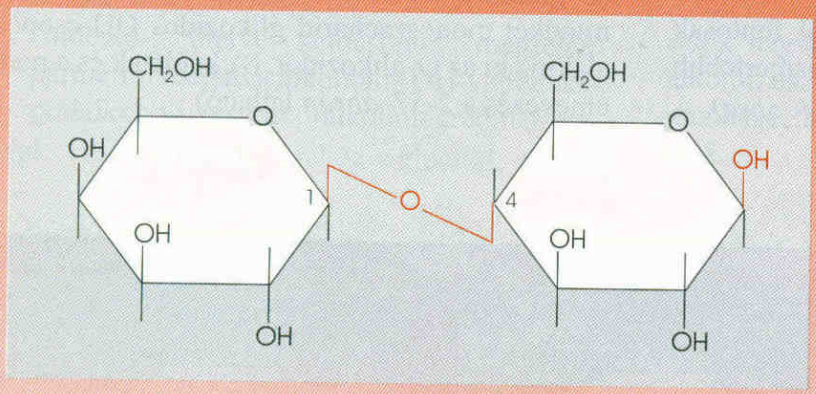


2-56. ábra. N-acetil-neuraminsav (sziálsav)

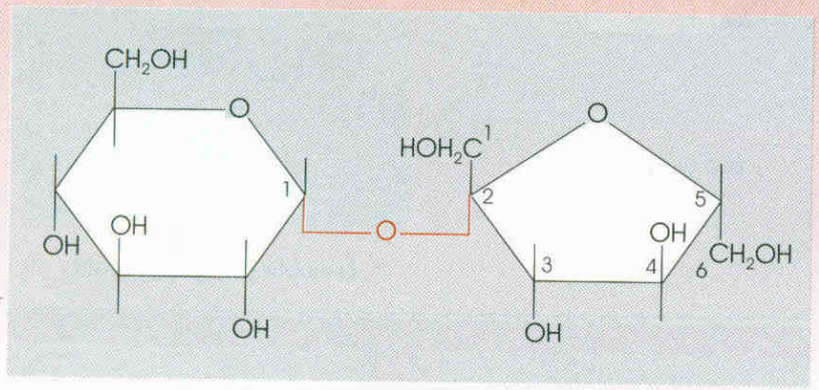




O-α-D-glukopiranozil-(1-4)-α-D-glukopiranóz [Glc (α1-4)Glc]
maltóz



O-β-D-galaktopiranozil-(1-4)-β-D-glukopiranóz [Gal (β1-4)Glc]
laktóz



O-α-D-glukopiranozil-(1-2)-β-D-fruktofuranóz [Glc (α1-2)Fru]
szacharóz

2-57. ábra. A diszacharidok képletét és elnevezését azzal a monoszachariddal kezdjük, amelynek glikozidos OH-csoportja a glikozidos kötés (acetál) képzésében részt vesz, más szóval a nem redukáló véggel. *Ha mindkét vég nem redukáló tetszőleges sorrendet választhatunk, de pl. a szacharóz esetében az ábrán mutatott konvenció az elfogadott. Az elnevezésben az „O" jelentése: O-glikozid. Az α, illetve β jelölés a monoszacharid anomer konfigurációját jelöli. A D betű a D-glicerinaldehidre vonatkoztatott relatív konfigurációra utal. Az egyes monoszacharidok öt- vagy hattagú gyűrűs szerkezetét is fel kell tüntetni a névben. A zárójelbe tett számok pl. (1-4) jelzik, hogy az O-glikozid-kötés az első és második monoszacharid melyik szénatomja között alakul ki. A diszacharidok részletes, pontos elnevezése meglehetősen bonyolult, nehézkes; ezért általában közismert diszacharidok esetében a pirossal jelzett egyszerűsített változat (az ún. triviális név) gyakrabban kerül alkalmazásra. Az ábrán a H-atomokat nem tüntettük fel, helyüket rövid függőleges vonalak jelzik*

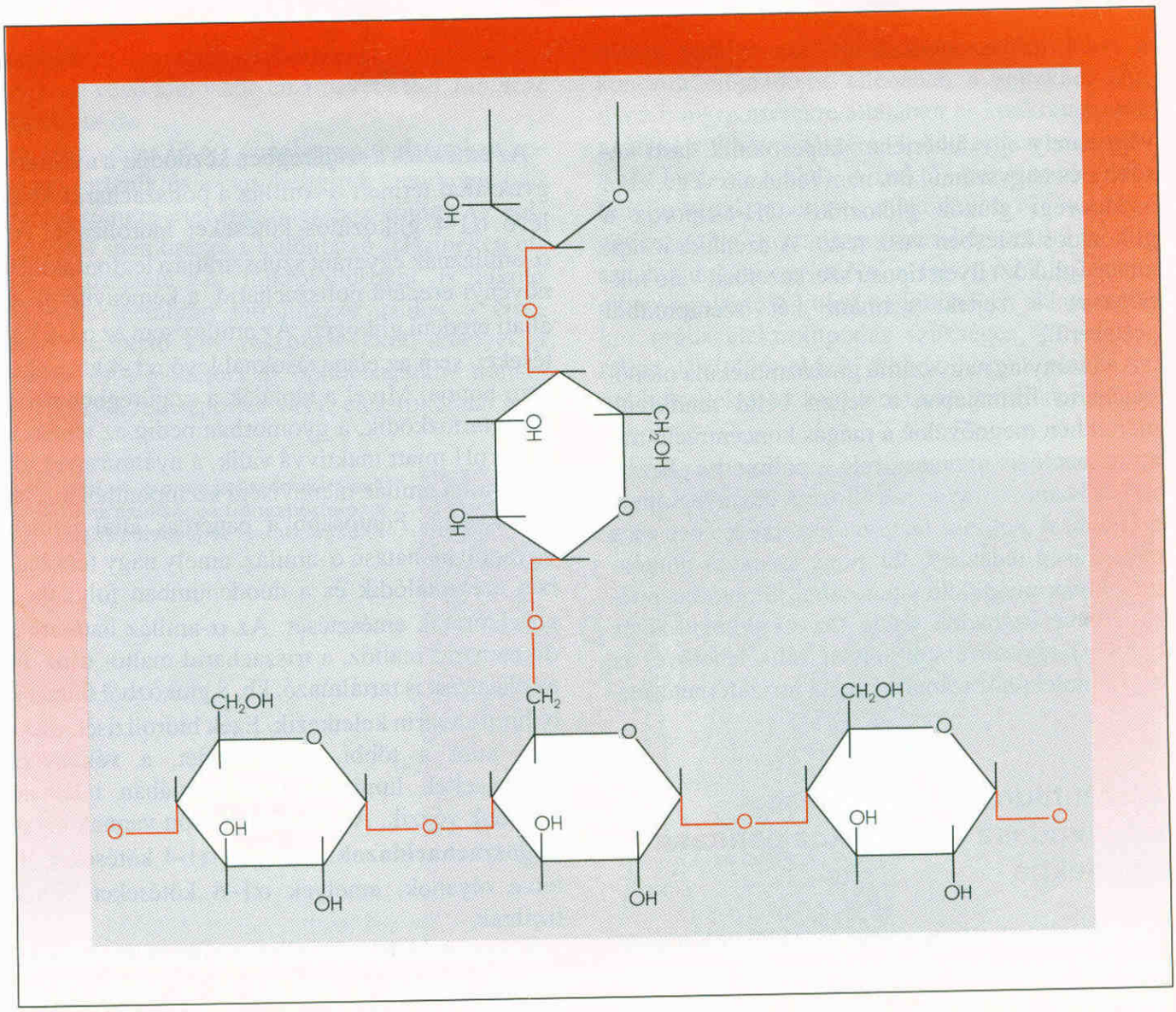
Poliszacharidok. Az emlős szervezetekben és a növényekben a szénhidrát tápanyag raktározása homopoliszacharidok formájában történik. Növények esetében a polimer keményítő, míg emlős állatokban és emberben a májban és az izomban tárolt glikogén.

Szerkezetét tekintve a keményítő és a glikogén sok hasonlóságot mutat. Mindkettő D-glukóz monoszacharid-egységekből épül fel. A keményítőt kétféle polimer alkotja: az amilóz és az amilopektin. Az amilóz felépítésében több száztól néhány ezerig terjedő számú α-D-glukóz vesz részt,

amelyek egymással kizárólag α1-4 glikozidos kötések révén kapcsolódnak, ugyanúgy, ahogy a maltóz két monoszacharidja. Az egymással kapcsolódó piranózgyűrűk egy helikális szerkezetet hoznak létre, amely hélix egy menetemelkedését hat egymást követő glukóz alkotja. Az amilopektin szerkezete annyiban tér el az amilóztól, hogy a hosszirányú láncot képező minden 24–30. glukózegységnél egy-egy elágazás alakul ki. Az elágazásokat szintén O-glikozidos kötések hozzák létre, ez viszont α1-6 kötés *(2-58. ábra)*. A hosszirányú láncban az elágazási pontban lévő glukóz C6 alkoholos OH-csoportja és az elágazást indító glukóz glikozidos OH-csoportja kondenzál.

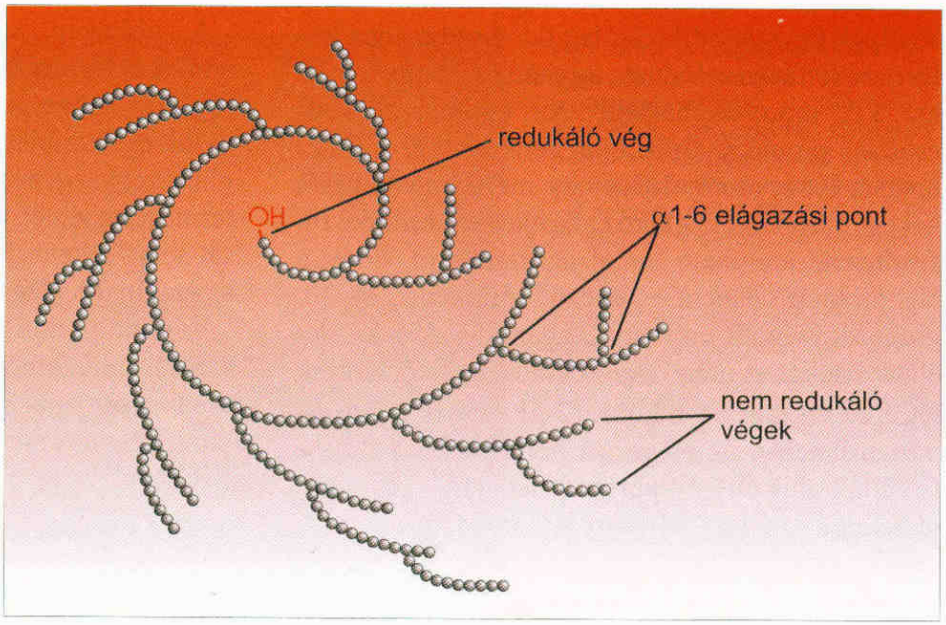
A glikogén szerkezete nagyon hasonló az amilopektin struktúrájához *(2-59. ábra)*, a különbség csak abban van, hogy a glikogénben az elágazások gyakoribbak; a hosszanti lánc minden 8-12. glukózegységénél található egy elágazási pont. Ez természetesen egy újabb hosszanti lánc kialakulását teszi lehetővé, amelyről ugyanilyen gyakorisággal újabb elágazások fejlődnek ki.

Végül a polimer egy faágra emlékeztető szerkezetet formál, amelynek hajlékony „ágai" egyetlen gömb formába, granulumba tömörülnek (2-59. ábra). A szerkezet ily módon történő kialakulásából következik, hogy a polimernek egyetlen olyan vége van, ahol a glikozidos OH szabad (redukáló



2-58. ábra. Elágazásokat létrehozó α1–6 glikozidos kötések

2-59. ábra. A glikogén szerkezete



vég, amely egy fehérjéhez kapcsolódik; lásd később), és nagyszámú, ún. nem redukáló vége, ahol a láncvégi glukóz glikozidos OH-csoportja a glikozidos kötésben vesz részt. A szénhidrát tápanyag (glukóz) ilyen típusú szerkezetben való raktározása a sejtek számára két szempontból „célszerű".

A viszonylag nagyszámú glukózmolekula monoszacharid formájában a sejten belül rendkívüli mértékben megnövelné a magas koncentráció miatt az ozmózis nyomást, míg a polimerbe „bezárva" az ozmózis nyomás változása elhanyagolható mértékű. A polimer faágszerű szerkezetében az a célszerűség fedezhető fel, hogy az egyes glukózmolekulák megfelelő enzim által történő beépítése, illetve szabaddá tétele (az O-glikozid-kötés bontása) egyszerre sok helyen válik lehetővé, az enzimmolekulák számára jobb a hozzáférhetőség.

A szénhidrátok emésztése, felszívódása és a glukóz bejutása a sejtekbe

A táplálékkal elfogyasztott szénhidrátok a gyomor–bél traktusban enzimek hatására monoszacharidokra bomlanak, amelyek a vékonybél hámsejtjein keresztül felszívódnak.

Az emésztés a szájüregben kezdődik; a nyálmirigyek által termelt **α-amiláz** a poliszacharidokban lévő α1-4 glikozidos kötéseket hidrolizálja. Az α-amiláznak egyaránt szubsztrátja a legfontosabbb növényi eredetű poliszacharid, a keményítő és az állati eredetű glikogén. Az amiláz sem az α1-6 kötéseket, sem az elágazásoknál lévő α1-4 kötéseket nem bontja. Mivel a táplálék a szájüregben rövid ideig tartózkodik, a gyomorban pedig az amiláz a savas pH miatt inaktívvá válik, a nyálmirigyek által termelt amiláz mennyiségi szempontból kisebb jelentőségű. Fontosabb a pancreas által termelt ugyanolyan hatású α-amiláz, amely nagy feleslegben szekretálódik és a duodenumban folytatja a szénhidrátok emésztését. Az α-amiláz hatására a diszacharid maltóz, a triszacharid malto- trióz, és az elágazást is tartalmazó, kb. 8 glukózból felépülő α-limit-dextrin keletkezik. Ezek hidrolízisét, csakúgy mint a többi diszacharidét, a vékonybél epithelsejtek luminális membránjában található enzimek végzik. Az enzimek között vannak olyan **oligoszacharidázok**, amelyek α1-4 kötéseket, illetve olyanok, amelyek α1–6 kötéseket hidrolizálnak.

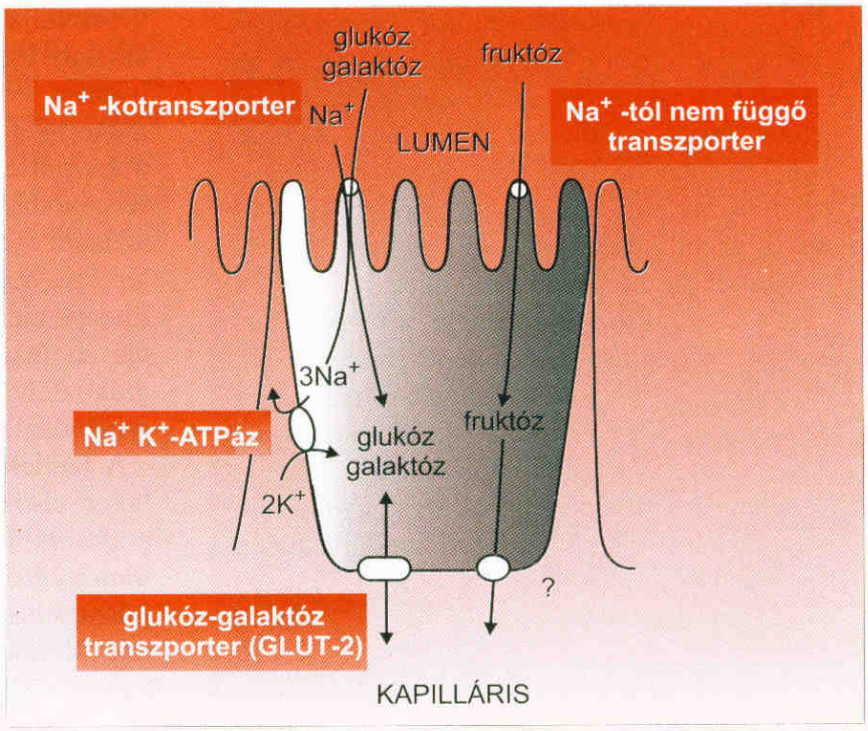
A megfelelő diszacharidokat a **diszacharidázok**, azaz a maltáz, a szukráz és a laktáz (β-galaktozidáz) bontja. A vékonybél lumenében végeredményben monoszacharidok keletkeznek,

2-4. táblázat. A szénhidrátok emésztésében részt vevő fontosabb enzimek

Enzim	Eredet	Specificitás	Szubsztrát	Termék
α-amiláz	nyálmirigyek, pancreas	α1-4	amilóz, amilopektin, glikogén	maltóz, maltotrióz, α-limit-dextrin
oligoszacharidáz	vékonybél	α1-4	amilóz	glukóz
oligoszacharidáz	vékonybél	α1-6	izomaltóz, α-limit-dextrin	glukóz
maltáz	vékonybél	α1-4	maltóz	glukóz
szukráz	vékonybél	α1-β2	szukróz (szacharóz)	glukóz, fruktóz
laktáz (β-galaktozidáz)	vékonybél	β1-4	laktóz	glukóz, galaktóz

amelyek az ileumban szívódnak fel. Az emésztésben részt vevő fontosabb enzimeket a *2-4. táblázat* foglalja össze.

A felszívódás *(2-60. ábra)* az epithelsejteken keresztül történik és az epithelsejtek membránjában számos transzporter működéséhez kötött. Az epithelsejtek membránja a különböző felszíneken eltérő összetételű. A mikrovillusokat is alkotó luminális membrán tartalmazza azokat a **Na^+-monoszacharid kotranszportereket,** amelyek a glukózt és a galaktózt az epithelsejtekbe transzportálják. A transzporter a Na^+ elektrokémiai grádiense terhére szállítja a monoszacharidokat a koncentrációgrádiens ellenében a sejtekbe. (Az ilyen transzporterekre általában és konkrétan még a glukóz felszívódásra a 4. fejezetben visszatérünk; lásd 436. oldal). A fruktóz transzportját más fehérje végzi, amelynek működése a Na^+-tól független. A Na^+-kotranszporteren keresztül a monoszacharidokkal együtt Na^+ is felszívódik, s ez nem elhanyagolható körülmény különösen akkor, amikor orális elektrolitpótlás szükséges (pl. cholerában, lásd 436. oldal). Ahhoz, hogy a glukóz az epithelsejtekből a kapillárisokba kerüljön, a bazá-



2-60. ábra. A monoszacharidok felszívódásához szükséges transzporterek a vékonybél epithelsejtek membránjában

lis membránban egy másik transzporternek is működni kell. Ez egy Na^+-tól nem függő transzporter, s mivel kétirányú, glukóz ekvilibriumot biztosít az epithelsejtek és a kapillárisok között. A glukózon kívül galaktózt, mannózt és dezoxiglukózt is transzportál. Ilyen, facilitált glukóztranszporterek biztosítják a keringésből a sejtekbe történő glukóz felvételt is (lásd alább).

Mivel a luminális membránban található Na^+-kotranszporter is két irányban képes transzportálni, és az epithelsejtekben a glukózkoncentráció magasabb, mint a lumenben, a glukózfelszívódás szempontjából kritikus a Na^+-grádiens fenntartása. A bazális, illetve az interstitium felé néző membránban helyet foglaló Na^+K^+-ATPáznak az a feladata, hogy a Na^+-t az elektrokémiai grádiens ellenében a sejtből kipumpálja (és cserébe K^+-t pum- páljon be). Az enzim működéséről a 4. fejezetben szólunk.

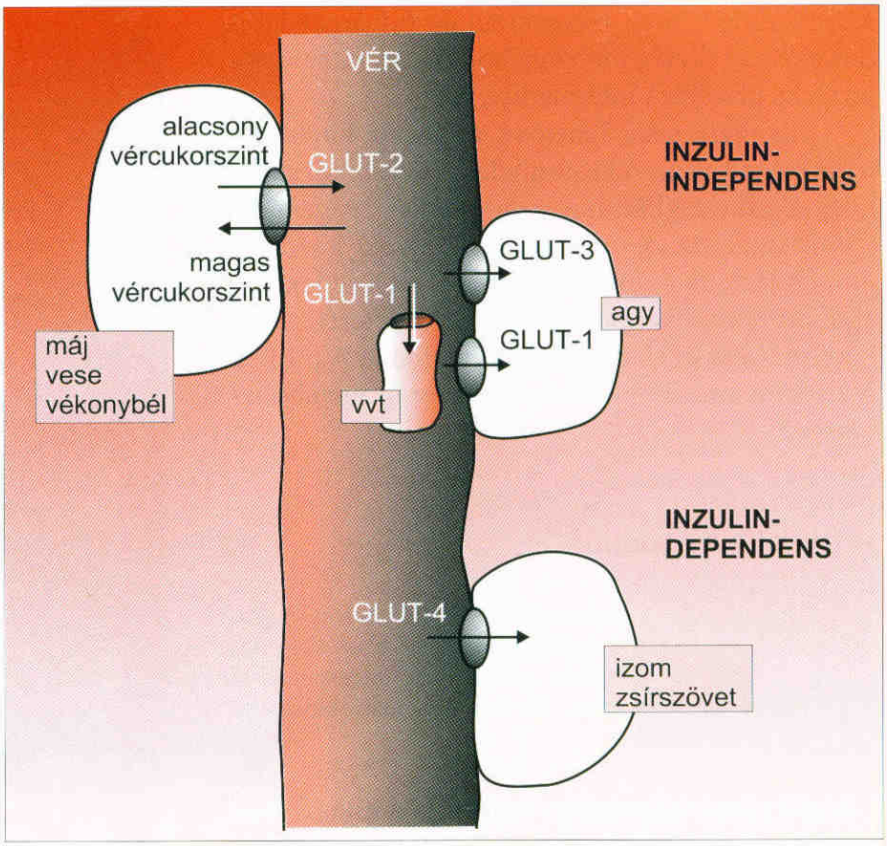
Az epithelsejtek transzporterein keresztül csak monoszacharidok transzportálódnak, sem a poliszacharidok, sem az oligoszacharidok, sem a diszacharidok nem szívódnak fel, de normális körülmények között ez nem jelent problémát, mert a szénhidrátok lebomlása az enzimek nagy feleslege miatt tökéletes. Előfordul, leggyakrabban a laktóz esetében (mert a laktáz viszonylag kis mennyiségben termelődik), hogy az enzimatikus hidrolízis nem teljes. Ilyenkor a laktóz a béllumenben marad, ez az ozmotikus viszonyok miatt vízvisszatartást is jelent, amely diarrhoea-t (hasmenés) eredményez. Az alsóbb bélszakaszokban bakteriális enzimek hatására anaerob metabolizmus történik és gázok keletkeznek, ami kellemetlen tüneteket és diszkomfort érzést okoz.

Ez az ún. **laktózintolerancia**, a tej és tejtermékek fogyasztása után fellépő emésztési panaszokkal jár. (A joghurt általában nem okoz panaszokat, mert benne a laktóz részlegesen már emésztett.) A laktózintoleranciát ritkán veleszületett enzimdefektus okozza, gyakoribb, hogy valamilyen bélrendszeri rendellenesség következtében alakul ki (pl. colitis, vírusos gastroenteritis).

A glukóz transzportja a vérből a sejtekbe. A glukóz a legfontosabb tápanyag, amelyhez a keringésből jutnak hozzá a sejtek. A vérben a glukóz konstans szinten tartása (fiziológiásan ~ 5 mM) szigorú szabályozás alatt áll. Az egyes szervekben, amelyek a szénhidrát-anyagcsere szempontjából eltérő tulajdonságúak, különböző sajátossággal bíró glukóztranszporterek találhatók *(2-61. ábra)*. Közös bennük, hogy a D-glukóz facilitált, vagyis a koncentráció-grádiens irányába történő transzportját végzik. (Működésük nem Na^+-függő és nem kapcsolt az ATP hidrolíziséhez.) Ezidáig négy olyan glukóztranszporter (GLUT) ismert, amelyek szerkezete, lokalizációja és funkciója jól definiált, de molekuláris biológiai módszerekkel ennél több transzporter különíthető el. A GLUT-1 sok szövetben, elsősorban a vörösvértestben, de az agy-, izom-, zsírszövetben is megtalálható, s működése nem függ az inzulintól (inzulinindependens). Ilyen a GLUT-3 is, amely az agyban található, s a GLUT-1-gyel együtt biztosítja az agy számára elsődleges tápanyagként szolgáló glukóz felvételét. A GLUT-2 főleg a májsejtek membránjában található, de ilyen transzporter működik a pancreas β-sejtjeiben, a vesében és a vékonybél-epithelsejtek basalis membránjában is. Jellemzője a magas K_M-érték és a nagy kapacitás, ami különösen a májsejtek esetében fontos, ahol két irányú transzportot biztosít a koncentrációviszonyoknak megfelelően. Magas vércukorszint esetén a GLUT-2-n keresztül a máj glukózt vesz fel, alacsony vércukorszint esetén pedig a májban de novo szintetizált glukózt a keringésbe transzportálja. Hasonlóan működik a vesében található GLUT-2, illetve az a transzporter is, amelyik a vékonybélben a glukóz felszívódásban vesz részt. A GLUT-4 elsősorban az izom és zsírszövetben található és az a jellegzetessége, hogy inzulin jelenlétében működik (inzulindependens). Megnövekedett vércukorszint esetén az inzulin ezekben a szervekben fokozza a glukózfelvételt (lásd még a vércukorszint szabályozásánál, 133. oldal).

A fentieken kívül leírt GLUT-5-ről kimutatták, hogy elsősorban nagy affinitású fruktóztranszporter és valószínűleg a vékonybélben a fruktóztranszportért felelős. A szintén leírt GLUT-6 pedig jelentős hasonlóságot mutat a GLUT-3-mal. Feltételezik, hogy a GLUT-7 a máj endoplazmás retikulum glukóztranszportjáért felelős fehérje. Azok

2-61. ábra. Glukóztranszporterek (GLUT) az egyes szervekben



a sejtek tehát, amelyek glukózt képesek a keringésbe küldeni, így döntően a hepatociták, elsősorban GLUT-2-t tartalmaznak. A glukózigényüket a vérglukózszint terhére kielégítő sejtek a GLUT-1, -3, -4 segítségével veszik fel a glukózt. Ezek közül azokban a szervekben, amelyekben kizárólag (vörösvértest) vagy elsősorban (agy) glukóz a tápanyag, a transzporter működése nem függ az inzulintól (GLUT-1,-3). Azok a szervek, amelyek alternatív tápanyagokat is oxidálnak (izom) vagy tápanyagot raktároznak (zsírszövet) csak magas vércukorszint esetén, inzulin hatására jutnak hozzá a glukózhoz (GLUT-4).

Glikolízis

A glikolízis helye az intermedier anyagcserében

A glikolízis során egy molekula glukózból két molekula piruvát lesz; a glukóz lebontása árán ATP keletkezik. Valamennyi emberi sejt képes glikolízisre. A **glukóz** a metabolizmus „központi" tápanyaga, mivel **minden sejt képes hasznosítani** és szénvázából a szervezetben képződő valamennyi anyag szénváza fel(át)épülhet. A glikolízisben klasszikusan érvényesül a metabolizmus kettős – anabolikus és katabolikus – jellege. A glikolízis (glykys = édes, lysis = hasítás, görög) a legősibb, univerzális energiatermelő folyamat; a katabolizmus három szakaszát tekintve (lásd 2-30. ábra) a glikolízis a glukóz katabolizmusának első, előkészítő szakasza.

A szervezetet alkotó különböző sejttípusok működésükhöz különböző mértékben igényelnek glukózt. A emberi szervezet igénye kb. 160 g glukóz naponta. A központi idegrendszer, az agy sejtjeinek napi glukózigénye 120 g, és napi kb. 40 g glukóz fordítódik ATP-szintézisre főleg azokban a sejtekben, amelyek döntően vagy kizárólag csak a glukóz hasznosításával tudják működésük energiaszükségletét fedezni. Ilyen sejtek a vörösvértestek, a leukociták, a cornea, a szemlencse, részben a retina sejtjei, a vese velőállományát alkotó sejtek, a testis sejtjeinek jelentős része, a mitokondriumokban szegény „fehér" izomrostok sejtjei.

A glikolízis reakciói a sejt energiaállapotától függően anabolikus szerepet is betölthetnek.

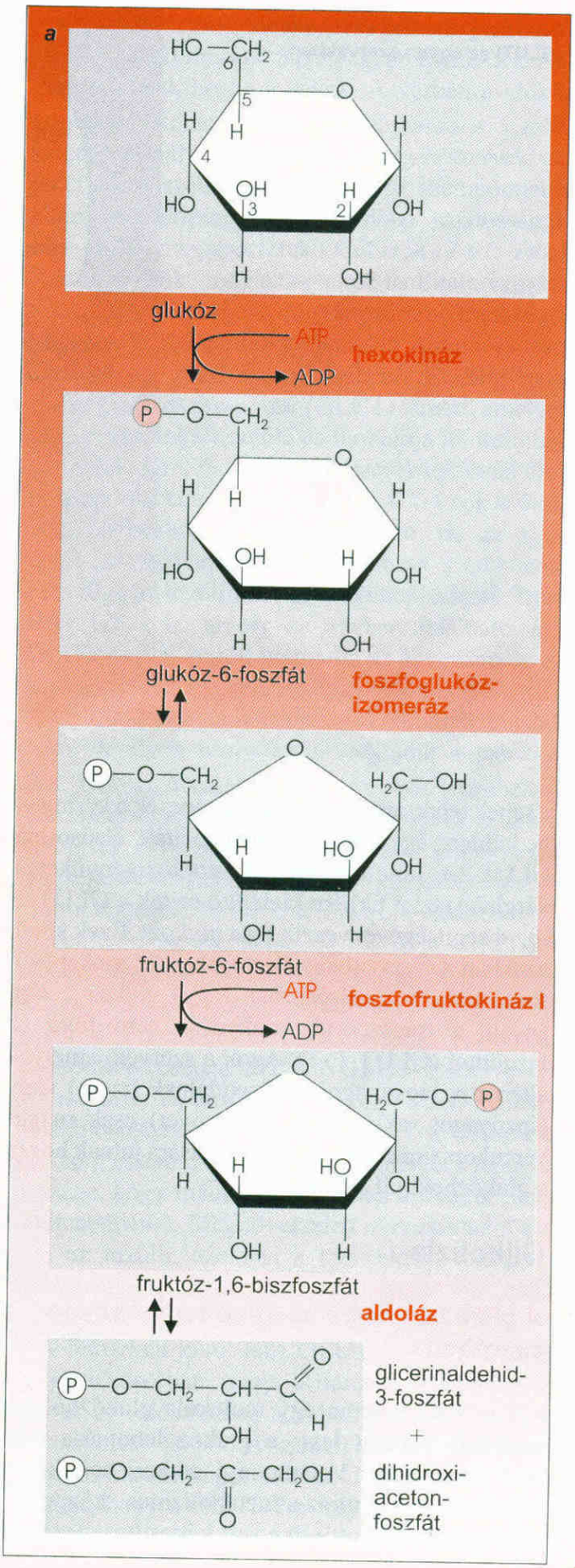
Intermedierjei több bioszintetikus folyamat kiindulópontjai, illetve több katabolikus folyamat végterméke glikolízis intermedier.

A glikolízis teszi lehetővé **anaerob körülmények** között is az ATP-termelést. Aerob körülmények között a glikolízis a piruvátnál „végződik" (aerob glikolízis), anaerob viszonyok között a piruvát laktáttá redukálódik. Azokban a sejtekben, ahol nincs mitokondrium (pl. vörösvértest), aerob körülmények között is laktát termelődik. A piruvát így fontos metabolit az aerob-anaerob metabolizmusban.

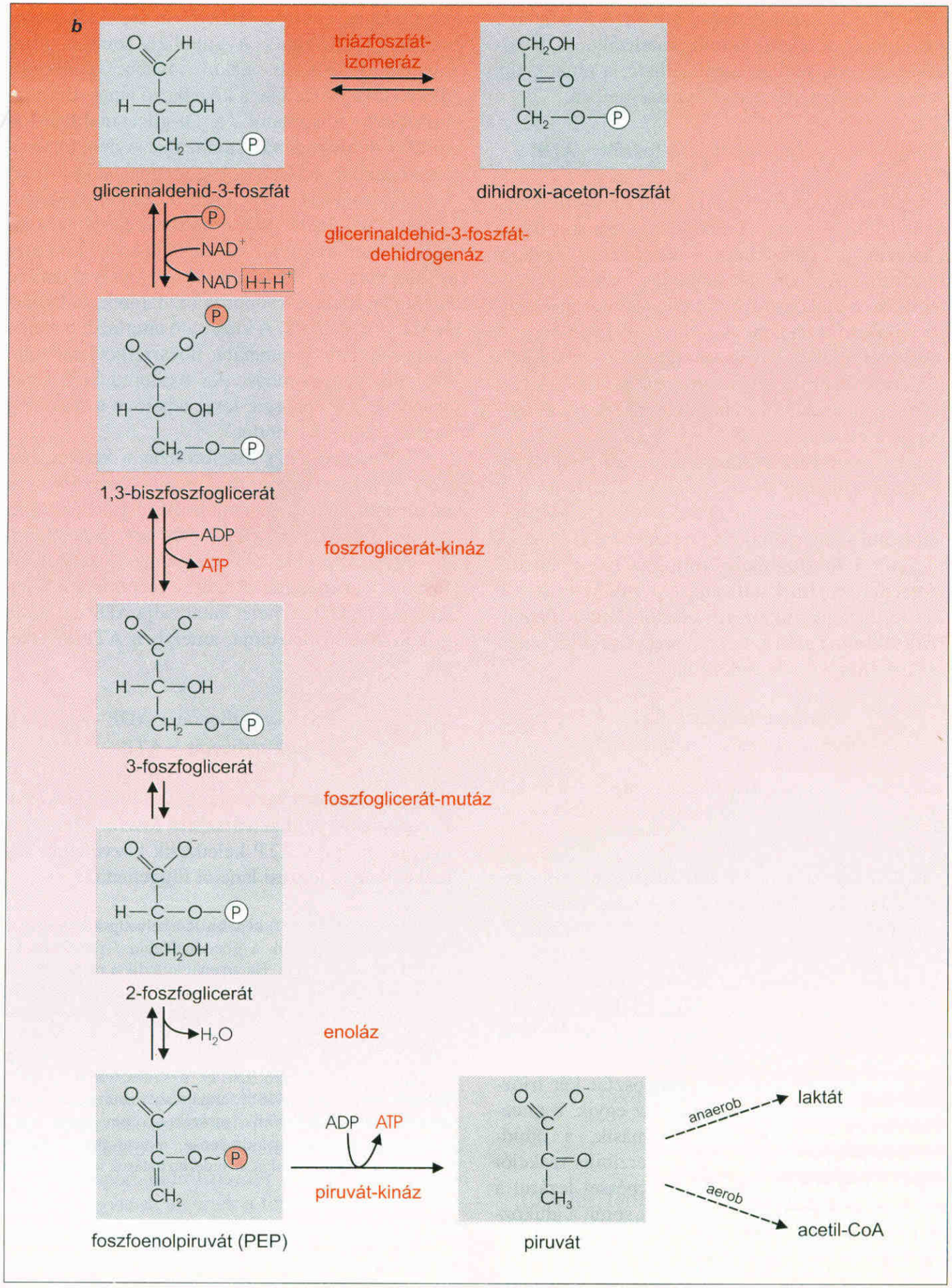
A glikolízis reakciói

A glikolízis volt az első metabolikus út, amelyet megismertek a huszadik század első harmadában. A klasszikus biokémia nagyjai a glikolízis reakcióinak megismerésén keresztül jutottak el számos, korszakot formáló biokémiai felfedezéshez.

A glikolízis valamennyi reakciója a citoszolban zajlik le. Számos vizsgálat arra utal, hogy a glikolízis enzimei a citoszolban multienzim komplexeket képeznek. Ezek a nem kovalens, stabil komplexek a glikolízis intermedierek igen gyors „csatornázott" útját, transzferét biztosítják egyik enzimtől a másikhoz. A glikolízisben hat-, illetve három C-atomos foszfátvegyületek vesznek részt, amelyekben a foszfát vagy észter-, vagy savanhidrid-kötéssel kapcsolódik az intermedierekhez. A foszforiláció a glikolízis első lépésében megtörténik, s mivel a keletkező és minden további intermedier negatív töltésű, számukra a plazmamembrán nem permeábilis. Ez biztosítja, hogy a sejtet nem tudják elhagyni. A hat C-atomos hexózok (valamennyi D-izomer) részvételével folyó reakciók jelentik a glikolízis 1. szakaszát *(2-62a ábra)*, a három-C-atomos glikolízis intermedierek reakciói a 2. szakaszát *(2-62b ábra)*. A glikolízist reverzibilis és irreverzibilis reakciók alkotják.



2-62. ábra. (a) A glikolízis folyamatának első szakasza (glukóz → glicerinaldehid-3-foszfát). (b) A glikolízis folyamatának második szakasza (glicerinaldehid-3-foszfát → piruvát)


b
triázfoszfát-izomeráz
glicerinaldehid-3-foszfát
dihidroxi-aceton-foszfát
NAD+
NADH+H+
glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
1,3-biszfoszfoglicerát
ADP
ATP
foszfoglicerát-kináz
3-foszfoglicerát
foszfoglicerát-mutáz
2-foszfoglicerát
H2O
enoláz
foszfoenolpiruvát (PEP)
ADP ATP
piruvát-kináz
piruvát
anaerob
laktát
aerob
acetil-CoA

A glukóz foszforilációját glukóz-6-foszfáttá a **hexokináz** és a **glukokináz** katalizálja. A hexokináz minden sejtben megtalálható, a glukokináz azonban csak a máj parenchymasejtjeiben.

glukóz + ATP → glukóz-6-foszfát + ADP

A két enzim (izoenzimek) között fontos funkcionális különbség van. A hexokináz nem specifikus glukózra, a glukokináz viszont csak glukózt foszforilál. A hexokináz működését a reakció végterméke, a glukóz-6-foszfát allosztérikusan gátolja, a glukokinázét nem. A gátlás nagy jelentőségű a szervezet glukóz-anyagcseréjében. A hexokináz K_M-értéke 0,1 mM, a vércukorszint 4,5 mM. A vércukorszint szabályozatlan hexokinázaktivitás esetén igen gyorsan leesne.

A glukóz-6-foszfát fontos elágazási pont az intermedier metabolizmusban (lásd 2.7. fejezetet). reverzibilis reakcióban alakul át fruktóz-6-foszfáttá, ami szintén több enzim szubsztrátja lehet. A reakciót a **foszfoglukóz-izomeráz** (foszfohexóz-izomeráz) enzim katalizálja. A fruktóz-6-foszfát foszforilációja fruktóz-1,6-biszfoszfáttá a **foszfofruktokináz I** által katalizált, irreverzibilis reakcióban a glikolízis elkötelező lépése:

fruktóz-6-foszfát + ATP →
fruktóz-1,6-biszfoszfát + ADP

A foszfofruktokináz II a fruktóz-6-foszfát fruktóz-2,6-biszfoszfáttá történő foszforilációját katalizálja (lásd 120. oldal).

A foszfofruktokináz I aktivitását több allosztérikus aktivátor és inhibitor szabályozza. A leghatékonyabb aktivátor a fruktóz-2,6-biszfoszfát, melynek szerepét a glikolízis és a glukoneogenezis hormonális szabályozásánál tárgyaljuk. Allosztérikus aktivátor még az AMP; inhibitor az ATP (szubsztrát!), a citrát és a zsírsavak. Ez a glikolízis legfontosabb szabályozási pontja.

A keletkezett fruktóz-1,6-biszfoszfát két triózfoszfátra hasad, amelyek közül az egyik, a glicerinaldehid-3-foszfát, aldóz, a másik, a dihidroxi-aceton-foszfát, ketóz. A reverzibilis reakciót az **aldoláz** katalizálja. Ezzel a lépéssel lezárul a glikolízis első szakasza, amelynek során a glukózból két 3 C-atomos termék keletkezik (2-62a ábra). A két triózfoszfát, a **triózfoszfát-izomeráz** által katalizált reverzibilis reakcióban átalakulhat egymásba (2-62b ábra). A glikolízis során a glicerinaldehid-3-foszfát alakul tovább; oxidációja, illetve foszforilációja a következő lépés. Ezt a reverzibilis folyamatot a **D-glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz** katalizálja. A dehidrogenálás koenzime a NAD^+. A glicerinaldehid 3-foszfát-dehidrogenáz SH enzim, ezért monojódacetáttal gátolható. Aktív centruma ciszteint tartalmaz, s ezen keresztül kovalens kötéssel köti meg az aldehidcsoportot *(2-63. ábra)*, amely a reakció folyamán karboxilcsoporttá oxidálódik, miközben NAD^+ redukálódik. A kialakuló intermedier magas csoportátviteli potenciálú tioészterkötéssel kapcsolódik az enzimhez. Az oxidoredukció során szabaddá váló energia teszi lehetővé a makroerg tioészterkötés létrejöttét.

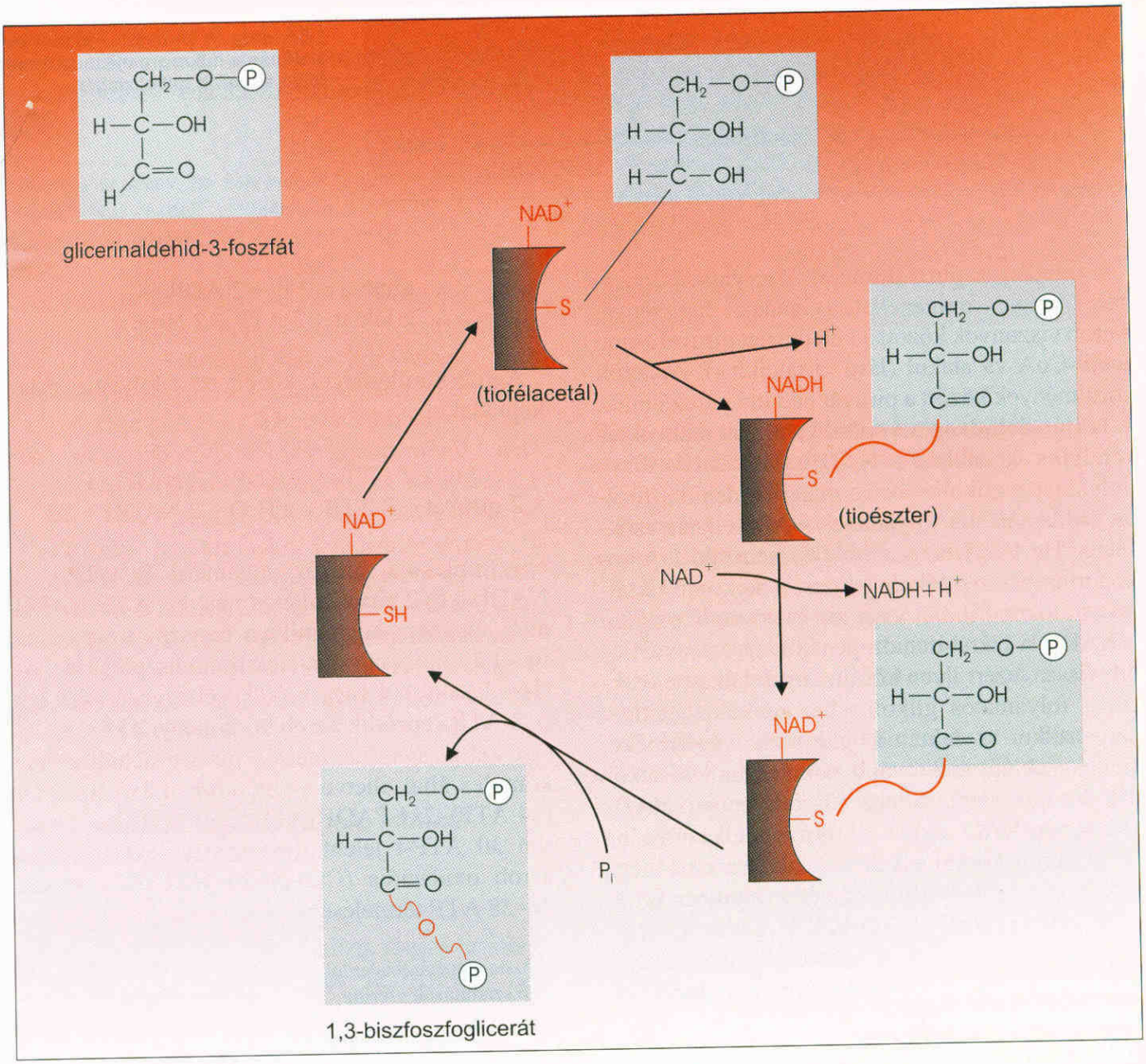
A következő lépés foszforolízis, a karboxilcsoport egy foszfátcsoporttal magas csoportátviteli potenciálú vegyes savanhidridkötést képez, így a létrejövő 1,3-biszfoszfoglicerát egy savanhidrid- és egy észterkötésben tartalmaz foszfátot. A **foszfoglicerát-kináz** a magas csoportátviteli potenciálú foszfát átvitelét katalizálja ADP-re, s ez a glikolízis első reakciója, amelyben ATP keletkezik.

1,3-biszfoszfoglicerát + ADP →
3-foszfoglicerát + ATP

Ez a reakciósorozat anaerob körülmények között is végbemenő **szubsztrátszintű foszforiláció**, ami azt jelenti, hogy ATP keletkezik közvetlenül egy reakcióban, a légzési lánctól függetlenül.

Az arzenát ($HAsO_4^{2-}$) képes a P_i-t helyettesíteni, ezért az arzenát szintén kötődik a glicerinaldehid 3-foszfát-dehidrogenáz P_i kötőhelyére. Ha arzenát kötődik a reakcióban az enzimhez P_i helyett, 1-arzenato-3-foszfoglicerát keletkezik, így nem képződik ATP. A képződött arzenát vegyes savanhidrid, nem stabil, bomlékony, spontán továbbalakul 3-foszfogliceráttá és a glikolízis folytatódik. Az arzenát így „szétkapcsolja" a glikolízist és a szubsztrátszintű foszforilálást. Az arzén további formája az arzenit (AsO_2^-) már olyan enzimekhez kötődik, melyek liponsav koenzimmel működnek (piruvát- dehidrogenáz, α-keto-glutarát-dehidrogenáz), és bénítja azokat. Mindezen hatások miatt az arzén mérgező.

A képződött 3-foszfoglicerát 2-foszfogliceráttá alakul a **foszfoglicerát-mutáz** által katalizált reak-

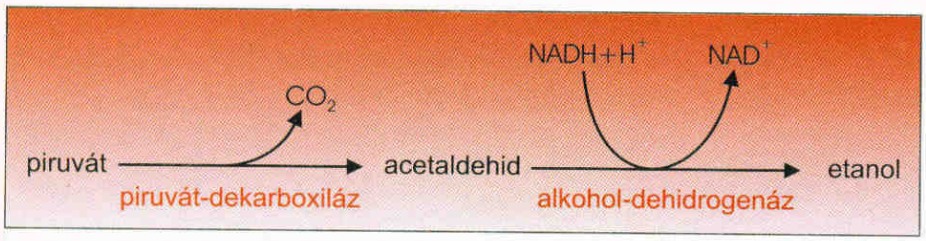


2-63. ábra. A glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz enzim által katalizált reakció *(a piros ~ jel makroerg kötést szimbolizál)*

cióban. A 2-foszfoglicerátból a 2-foszfoglicerát-anhidratáz, ismertebb, triviális nevén az **enoláz** enzim hatására foszfoenolpiruvát jön létre. Az enoláz aktivitása fluoriddal gátolható. A víz kilépésével egy magas csoportátviteli potenciálú enol-foszfát észter keletkezik. A 2-foszfoglicerát esetében a foszfátcsoport hidrolízisekor a $\Delta G^{0'}$ érték –17,6 kJ/mol, ugyanez az érték a foszfoenolpiruvát esetében –61,9 kJ/mol (közel kétszerese az ATP hidrolízisekor felszabaduló energiának). A foszfoenolpiruvát ezt a magas csoportátviteli potenciálú kötésben levő foszfátot képes az ADP-re átvinni a **piruvát-kináz** enzim segítségével.

foszfoenolpiruvát + ADP →
piruvát + ATP

Ez a foszforiláció szintén szubsztrátszintű foszforiláció, azonban az előző reakcióval szemben irreverzibilis folyamat. A piruvát-kináznak az ATP allosztérikus inhibitora.



2-64. ábra. A piruvát → etanol átalakulás a mikroorganizmusokban folyó anaerob glikolízisben

A keletkezett piruvát további sorsa a sejt típusának, illetve oxigénellátottságának függvénye. Aerob viszonyok között a keletkezett piruvát zöme acetil-CoA-vá alakul (lásd citrátciklus). Anaerob körülmények között a piruvát laktáttá redukálódik. A **laktát-dehidrogenáz** által katalizált reakció reverzibilis, koenzime a NADH (lásd 2-10. ábra). Folyamatos glikolízisben a glicerinaldehid 3-foszfát oxidációjához folyamatos NAD^+-ellátás szükséges. Ha a keletkezett NADH nem tud a mitokondriumban oxidálódni, (mert a sejt nem tartalmaz mitokondriumot vagy nincs elegendő oxigén) a NADH a laktát-dehidrogenáz hatására oxidálódik vissza, ezért ilyen körülmények között e reakció a folyamatos glikolízishez nélkülözhetetlen. Ugyanakkor a laktát a glikolízis végterméke, amely csak úgy tud tovább alakulni, ha visszaoxidálódik piruváttá. Ehhez viszont éppen NAD^+ szükséges. NAD^+ akkor áll újra rendelkezésre, ha ismét aerob körülmények vannak. Ha erre nincs mód, a laktát szecernálódik a vérbe, ahonnan aerob sejtek veszik fel (lásd Cori-kör, 115. oldal).

A szérumlaktát-szint a szervezet anyagcseréjének fontos jellemzője, emelkedése fontos patológiás állapotok jelzője.

Egyes mikroorganizmusokban az anaerob glikolízisnek egy másik formája, az **alkoholos erjedés** megy végbe. A piruvát-dehidrogenáz által katalizált reakcióhoz hasonlóan a piruvát először dekarboxilálódik a **piruvát-dekarboxiláz** hatására (ennek TPP – tiamin-pirofoszfát – a prosztetikus csoportja). Ez a dekarboxilezés azonban nem oxidatív, a keletkezett acetaldehid második lépésben az **alkohol-dehidrogenáz** hatására NADH segítségével etanollá redukálódik *(2-64. ábra)*.

A glikolízis energiamérlege. A glukóz aerob és anaerob lebontásának energiamérlege

A glikolízis során anaerob körülmények között egy molekula glukózból 2 molekula laktát keletkezik, két ADP foszforilálódik ATP-vé:

$$\text{glukóz} + 2\ P_i + 2\ ADP \rightarrow 2\ \text{laktát} + 2\ ATP + 2\ H_2O.$$

Aerob körülmények között ez a folyamat másként alakul:

$$\text{glukóz} + 2\ P_i + 2\ ADP + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ \text{piruvát} + 2\ ATP + 2\ H_2O + 2\ NADH + 2H^+$$

egy molekula glukóz lebontása 2 ATP-t, 2 NADH-t és 2 piruvátot eredményez. A két NADH attól függően, hogy milyen transzportrendszeren jut el a mitokondriális elektrontranszport-lánchoz (lásd később), 4 vagy 6 ATP-vel egyenértékű, így 6–8 ATP képződik aerob körülmények között.

A két piruvát lebontása a piruvát-dehidrogenáz komplex által, illetve a citrátkörben 2x4 NADH-t (24 ATP), 2x1 $FADH_2$-t (4 ATP), 2 GTP-t, összesen 30 ATP-t jelent. Így egy molekula glukóz aerob oxidációja (CO_2-dá és H_2O-zé) összesen 36–38 ATP termeléséhez vezet.

A standard szabadentalpia-változások értékei alapján történő számítások szerint:

$$\text{glukóz} \rightarrow CO_2 + H_2O,$$

$$\Delta G^{0'} = -2840\ \text{kJ/mol, illetve}$$

$$38\ ADP + 38\ P_i \rightarrow 38\ ATP,$$

$$\Delta G^{0'} = 38 \times 30{,}5\ \text{kJ/mol} = 1160\ \text{kJ/mol},$$

ez kb. 40%-os hatásfokot jelent, a glukóz energiájának 40%-a „őrződik" így meg ATP formájában. A valóságban ilyen számítások végzése rendkívül bonyolult, mivel az aktuális koncentrációviszonyok értékei alapján az ADP foszforilációjának tényleges energiaigényét nem könnyű meghatározni. Hasonló számítások alapján egy molekula glukóz 2 molekula piruváttá alakulásához (illetve a két molekula NAD^+ redukciójához), mint exergonikus folyamathoz ($\Delta G^{0'} = -146$ kJ/mol) két molekula ADP foszforilációját ($\Delta G^{0'} = 2 \times 30{,}5$ kJ/mol = 61 kJ/mol), mint endergonikus folyamatot kapcsolva a glukóz→ piruvát átalakulás hatásfoka a glikolízisben energetikai szempontból az aktuális intracelluláris koncentrációértékekkel számolva kb. 60%-os.

Anaerob viszonyok közepette azonban mindössze 2 ATP termelődik a 38 (36) helyett, ami tizenkilencszeres (tizennyolcszoros) különbséget jelent.

Hasonló az arány, ha összevetjük a glukóz oxidációját CO_2-dá és H_2O-zé ($\Delta G^{0'} = -2840$ kJ/mol) a piruváttá történő részleges oxidációjával ($\Delta G^{0'} = -146$ kJ/mol).

A glikolízis sebessége – olyan szövetekben, ahol az oxigén ellátás változhat – alapvetően attól függ, hogy aerob vagy anaerob viszonyok vannak.

Louis Pasteur fedezte fel, hogy anaerob körülmények között a glikolízis sebessége többszöröse annak, amit aerob körülmények között mérni lehet. Ez a jelenség a **Pasteur-effektus,** és magyarázata éppen az, hogy az ATP allosztérikusan gátolja az irreverzibilis foszforilációt katalizáló enzim, a foszfofruktokináz I aktivitását. Aerob körülmények között a fentiek alapján jóval kevesebb glukóz szükséges a megfelelő ATP-szint eléréséhez.

A glikolízis sebességének szabályozását a glukoneogenezis szabályozásával együtt tárgyaljuk (lásd 116. oldalt).

Sejtspecifikus sajátosságok, klinikai, patológiai vonatkozások

Vörösvértestekben a glikolízis fontos terméke a 2,3-biszfoszfoglicerát (2,3-BPG). A 2,3-BPG 1,3-biszfoszfoglicerátból képződik a foszfoglicerát-mutáz enzim segítségével. A 2,3-BPG foszfatáz hatására veszíti el az egyik foszfátcsoportot és 3-foszfoglicerátté alakulva bomlik le. A 2,3-BPG jelentőségét a hemoglobin oxigén szállításában az 1.3. fejezetben tárgyaljuk. A 2,3-BPG koncentrációja vörösvérsejtekben 4–4,5 mM, a szabályozás mechanizmusát nem ismerjük.

A glikolitikus kapacitás a különböző szövetekben eltérő, s ennek fontos patológiai következményei lehetnek. Vázizomban például nagy a glikolitikus kapacitás, ezért a vázizom jól alkalmazkodik a hypoxiás körülményekhez, nincs vázizominfarctus. A szívizom glikolitikus kapacitása viszont kisebb, ezért hypoxia következtében infarctus alakulhat ki.

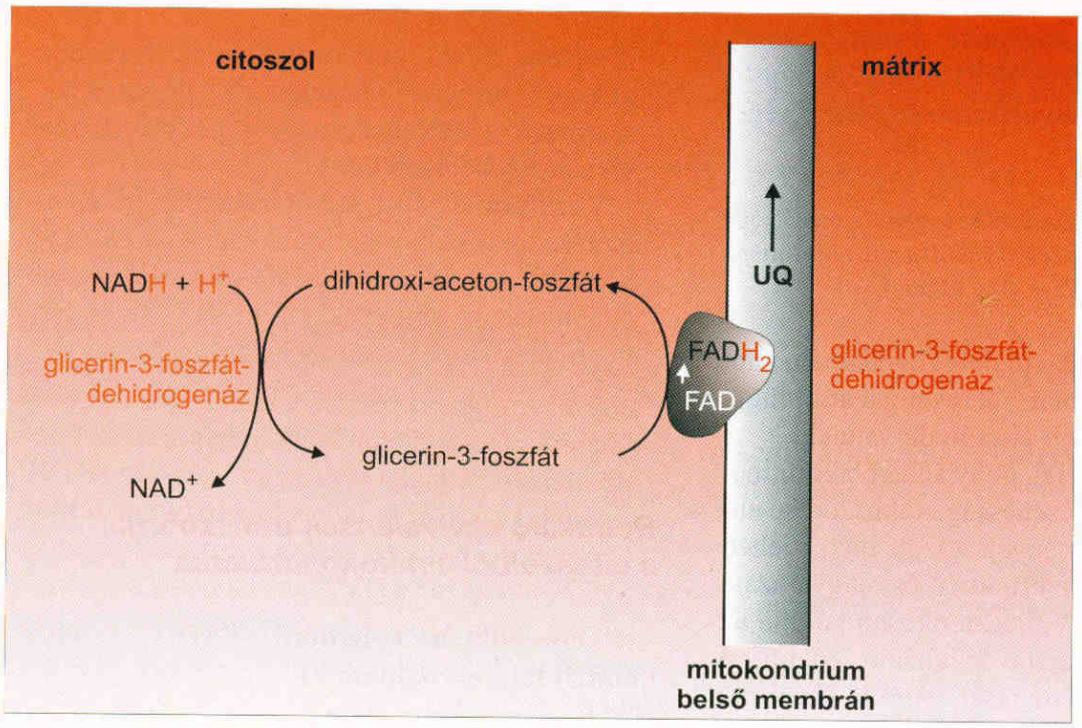
Gyorsan növő tumorsejtekben a jelentős glikolízis piruváttúltermelést idéz elő, az ebből származó laktátfelhalmozódás következtében lokális acidosis jön létre.

A szérum laktát-dehidrogenáz aktivitásának mérése fontos laboratóriumi diagnosztikai eszköz több szövetkárosodással járó kórkép megállapításában, amelyekben a szövetszétesés miatt az enzim a sejtekből a keringésbe kerül.

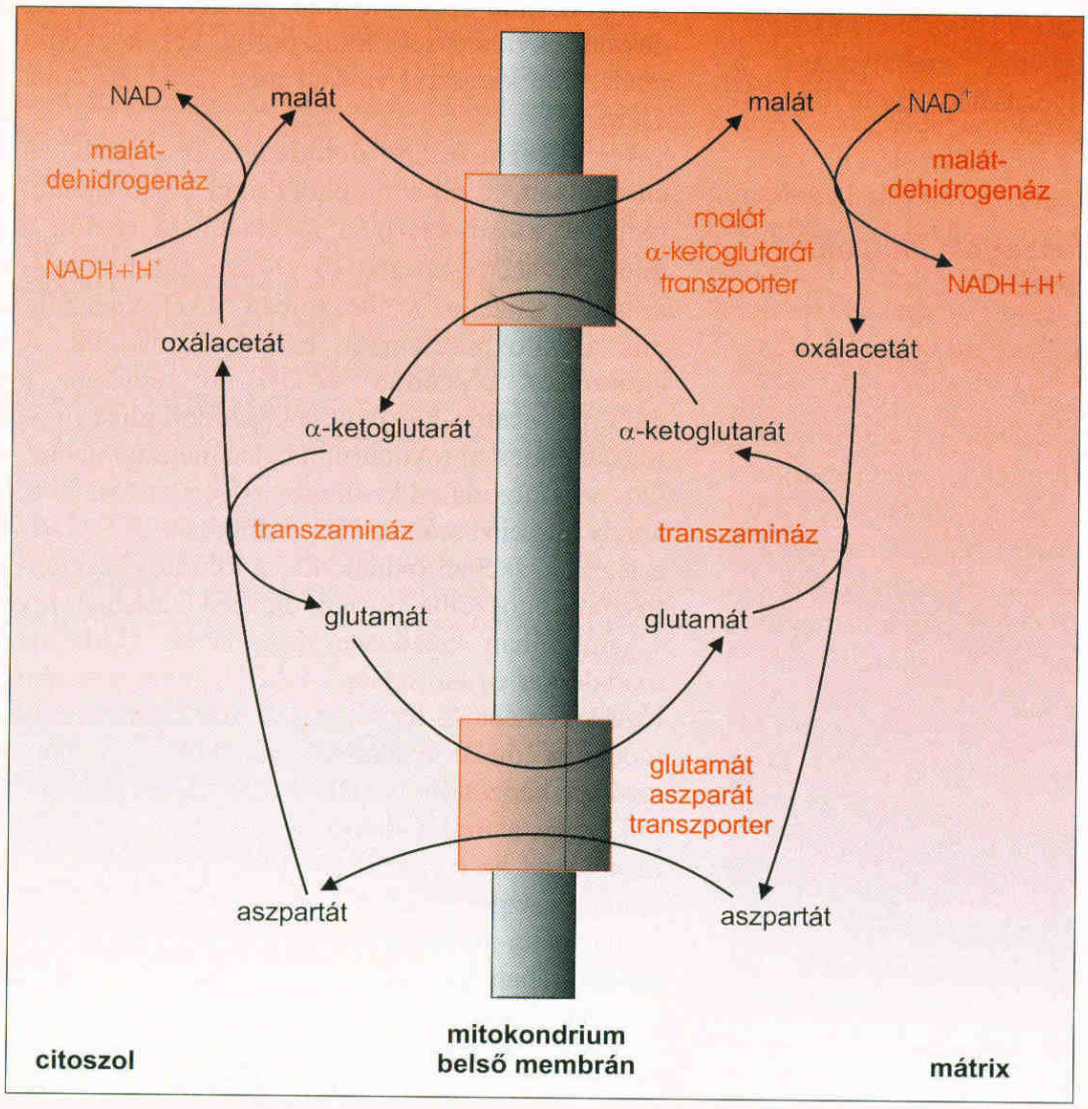
Redukáló ekvivalensek transzportja a citoszolból a mitokondriumba

A citoszolban keletkező NADH a mitokondriumban oxidálódik, a NAD^+, illetve NADH azonban nem transzportálódik a mitokondrium belső membránján keresztül. A redukáló ekvivalensek transzportja két közvetítő rendszeren keresztül valósul meg *(2-65. és 2-66. ábra)*.

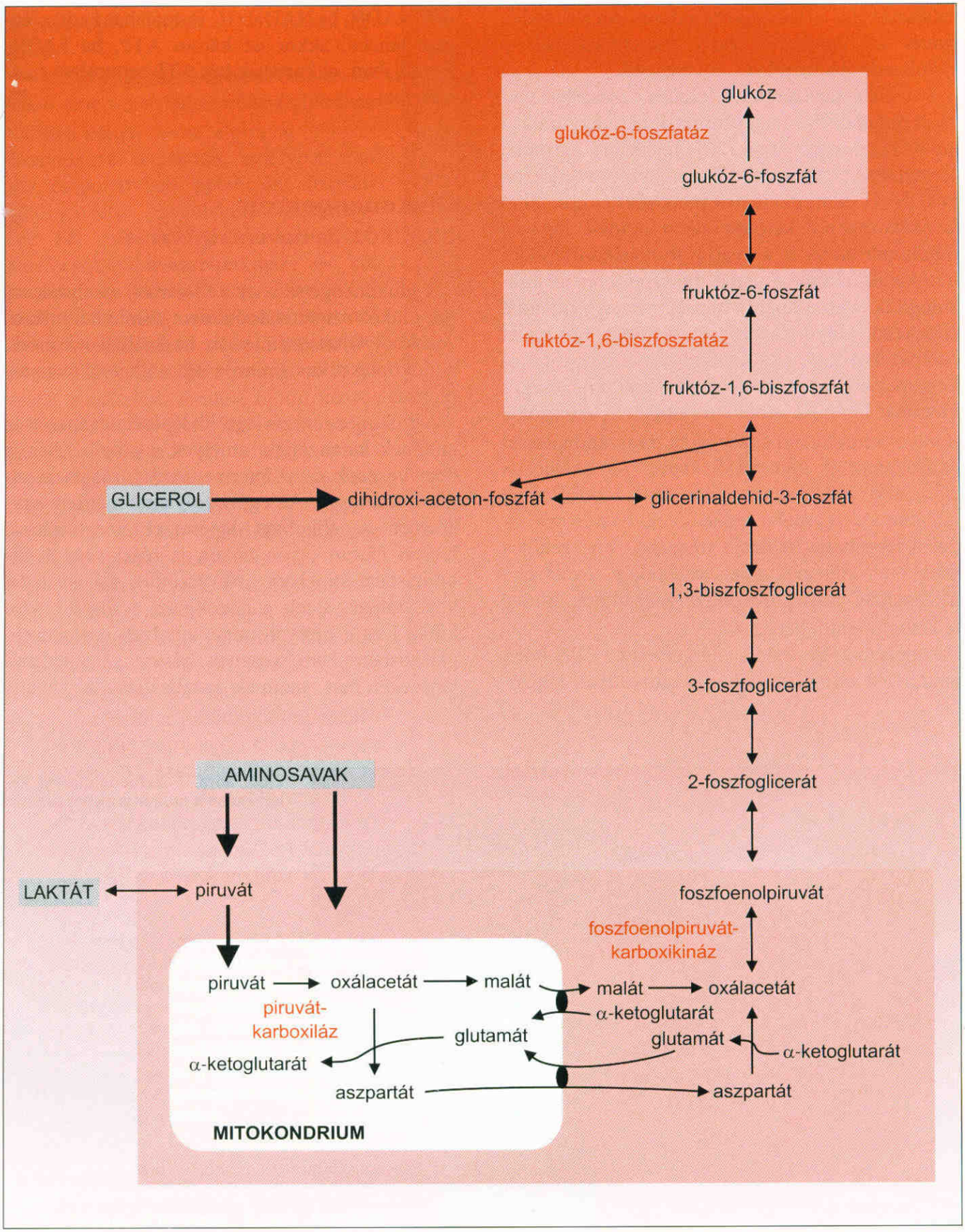
A **glicerin-foszfát-dehidrogenáz** mind a citoszolban, mind a mitokondrium belső membránjának külső felszínén megtalálható enzim, a dihidroxi-aceton-foszfát ↔ glicerin-foszfát átalakulást katalizálja. A citoszolban NAD^+ koenzimmel a mitokondriumban FAD-dal működik. A citoszolban képződött NADH így redukálja a dihidroxi-aceton-foszfátot, a képződött glicerin-3-foszfát eljut a mitokondrium belső membránjához. Ott visszaoxidálódik dihidroxi-aceton-foszfáttá, amely reakció során $FADH_2$ keletkezik. A $FADH_2$ a légzési láncban oxidálódik, a dihidroxi-aceton-foszfát a citoszolba jut, ahol újra redukálódhat. Így a citoszolban keletkezett $NADH+H^+$ NAD^+-dá oxidálódott és hidrogénjei $FADH_2$ útján érik el a légzési láncot (2-65. ábra). A transzport másik módja a malát–oxálacetát átalakulás. A citoszolban képződött NADH NAD^+-dá oxidálódik, miközben a **malát-dehidrogenáz** által katalizált reakcióban az oxálacetát redukálódik maláttá. A malát transzportálódni tud a mitokondriumba, ahol oxálacetáttá oxidálódik, ennek kapcsán a mitokondriumban NAD^+ redukálódik, $NADH+H^+$ keletkezik, és ez a légzési láncba kerül. Ily módon a citoplazmában képződött NADH intramitokondriális NADH formájában éri el a terminális



2-65. ábra. Redukáló ekvivalens transzport a citoszolból a mitokondriumba I *(glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz)*



2-66. ábra. Redukáló ekvivalens transzport a citoszolból a mitokondriumba II. *(malát-dehidrogenáz)*



2-67. ábra. A glukoneogenezis lépései és az oxálacetát transzportjához szükséges transzaminász reakciók. *Keretben és pirossal azokat az enzimeket és reakciókat jelezzük, amelyek nem a glikolízis enzimei és reakcióinak megfordításai*

oxidációt. Ez a transzportrendszer bonyolultabb, mivel az oxálacetát nem transzportálódik a mitokondriális membránon keresztül.

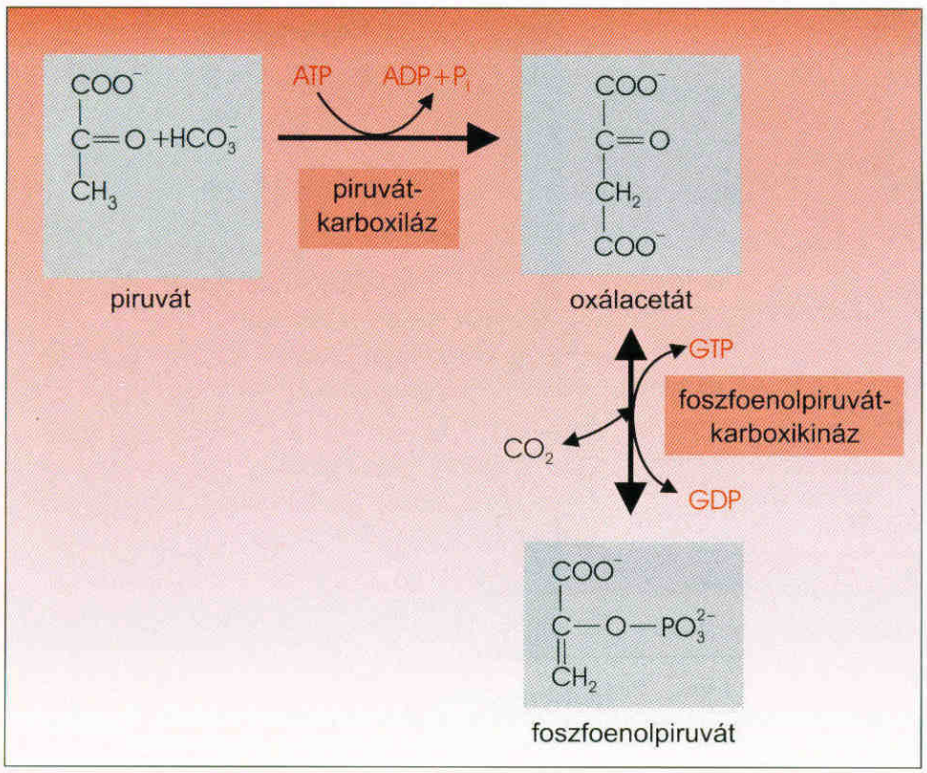
Az oxálacetát két módon juthat a citoszolba: egyrészt redukálódva malát formájában, vagy transzaminálódás után (lásd 2.4. fejezetet) aszpartát formájában (2-66. ábra). Ez a transzportrendszer a $NADH+H^+$ hidrogénjeinek transzportját szolgálja: az oxálacetát redukálódás után mint malát lép be a mitokondriumba és aszpartát formájában lép ki a mitokondriumból. A malát transzporteren az alfa-ketoglutarát, az aszpartát transzporteren a glutamát ellenkező irányú transzportja történik. Így malát belépésekor egy alfa-ketoglutarát kilép a mitokondriumból a citoszolba, aszpartát kilépésekor glutamát lép be a mitokondriumba. A citoszolba jutott α-ketoglutarát és aszpartát transzaminálással oxálacetátot és glutamátot képez. Az oxálacetát egy újabb NADH segítségével ismét redukálódhat maláttá, s ezzel újabb redukáló ekvivalens pár indul a terminális oxidáció irányába. Végezetül, a mitokondriumban „visszaoxidálódott" oxálacetát glutamáttal transzaminálódva aszpartátot, illetve α-ketoglutarátot képez.

A transzport két módja energetikailag különböző eredményt ad, amennyiben a citoszolban képződött NADH, ha $NADH+H^+$ formájában kerül a légzési láncba, akkor ez három ATP, ha $FADH_2$ formájában, akkor csak két ATP termelését eredményezi.

Glukoneogenezis – a glukóz *de novo* szintézise

A glukoneogenezis az a folyamat, amelynek során glukóz szintetizálódik nem szénhidrát prekurzorokból. Glukózszintézisre használódhat a tejsav, a glukoplasztikus aminosavak, a glicerol és a propionsav.

A glukoneogenezis legtöbb lépését ugyanazok az enzimek katalizálják, amelyek a glikolízisben is részt vesznek, és az intermedierek is majdnem teljesen azonosak. Az egész folyamat mégsem egyszerűen a glikolízis lépéseinek megfordítása, hiszen három olyan enzim is részt vesz a glikolízisben, amelyek irreverzibilis folyamatokat katalizálnak. Ezek a hexokináz, a foszfofruktokináz I és a piruvát-kináz, amelyek a glukoneogenezisben nem vesznek részt, az ellentétes lépéseket más enzimek katalizálják. A glukóz-



2-68. ábra. Foszfoenolpiruvát keletkezése a glukoneogenezisben

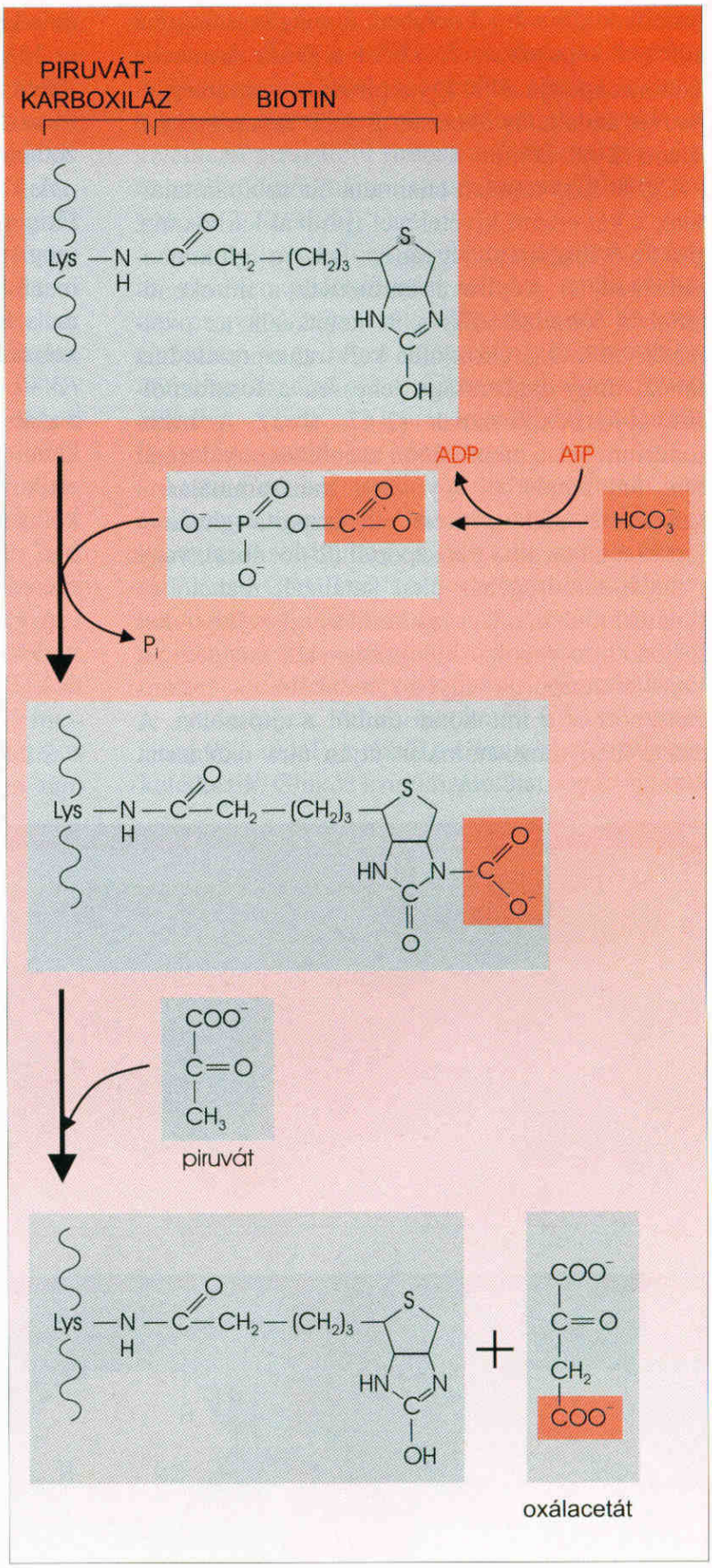
szintézis egyes lépései az *2-67. ábrán* láthatók.

A glukoneogenezisben az első olyan reakció, amely nem egyszerűen a glikolízis fordított irányú lépése, a piruvát → foszfoenolpiruvát átalakulás, amelyben magas csoportátviteli potenciálú foszfátkötés jön létre. Az átalakulásban, amelyhez két enzimre (piruvát-karboxiláz, foszfoenolpiruvát-karboxikináz) és két magas energiájú foszfátvegyületre (ATP, GTP) van szükség, oxálecetsav intermedier keletkezik *(2-68. ábra)*. A **piruvát-karboxiláz** katalizálja a piruvát → oxálacetát átalakulást, amihez biotin közreműködése szükséges. Az enzim négy azonos alegységből áll, amelyek mindegyike egy molekula biotint köt egy lizin ε-aminocsoporton keresztül. A biotin a karboxiláz reakciót katalizáló enzimek kofaktora (prosztetikus csoportja). A folyamat energiaigényes, mert ATP hidrolízise szükséges ahhoz, hogy a bikarbonát „aktiválódjon". Az ATP-ről lehasadó foszfát és a bikarbonát között vegyes savanhidridkötés jön létre, innen a CO_2 először az enzimen kötött biotinra, majd a biotinról a piruvátra kerül és kialakul az oxálacetát. A reakciómechanizmust az *2-69. ábra* mutatja. Hasonló mechanizmussal, biotin kofaktorral működnek más karboxilázok is (pl. acetil-CoA-karboxiláz, propionil-CoA-karboxiláz, lásd 2.3. fejezetet).

A biotin számos táplálékban megtalálható vitamin, amelyekből a szervezet hozzájut a szükséges mennyiséghez. Hiánybetegség nagyon ritkán alakul ki, általában csak nagy mennyiségű nyers tojás fogyasztása esetén, mivel a tojásfehérje tartalmaz egy avidin nevű fehérjét, amely biotint köt és megakadályozza a bélcsatornából történő felszívódást. (Főzött tojásban az avidin természetesen denaturált és inaktív.)

A piruvát-karboxiláz működéséhez acetil-CoA-ra van szükség, ami az enzim allosztérikus aktivátora. Ennek reguláló szerepére még visszatérünk.

A **foszfoenolpiruvát-karboxikináz** hatására az oxálacetátból alakul ki a



2-69. ábra. A piruvát-karboxiláz reakciómechanizmusa

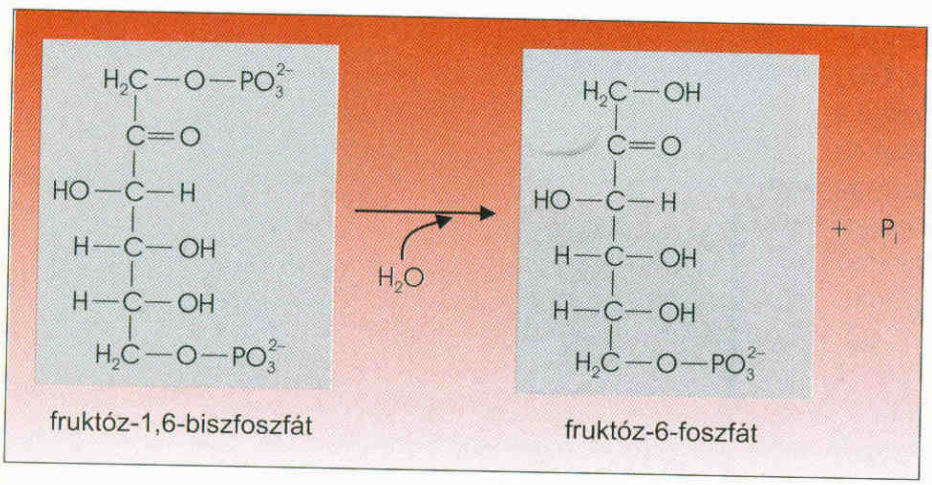
foszfoenolpiruvát, amelyben a magas energiájú kötéssel kapcsolódó foszfátot a GTP terminális foszfátcsoportja adja. Így a piruvát → foszfoenolpiruvát átalakulás összesen 2 ATP felhasználását jelenti (2-68. ábra).

A glikolízis minden enzime a citoszolban található, s két enzim kivételével (piruvát-karboxiláz, glukóz-6-foszfatáz) ugyanez igaz a glukoneogenezisre is. A piruvát-karboxiláz a mitokondriumban lokalizálódik, s itt keletkezik az oxálacetát, aminek a citoszolba kell transzportálódnia ahhoz, hogy szubsztrátja lehessen a foszfoenolpiruvát-karboxikináznak (2-67. ábra). A mitokondrium belső membránon azonban az oxálacetát nem tud áthaladni, így vagy transzaminálással aszpartáttá alakul, amit az aszpartát-glutamát carrier a citoszolba transzportál (2-66. ábra), vagy a malát-dehidrogenáz által katalizált reakcióban maláttá redukálódik és így kerül a citoszolba. A két út között energetikai különbség van, mégpedig a malát transzportja egyben redukáló ekvivalens transzport is a mitokondriumból a citoszolba. A citoszolban transzaminálás útján újra oxálacetát keletkezik, illetve a malát oxálacetáttá oxidálódik és $NADH+H^+$ keletkezik. A glukoneogenezis további lépései a citoszolban történnek. (A transzaminálási reakciókról részletesen a 2.4. fejezetben lesz szó.)

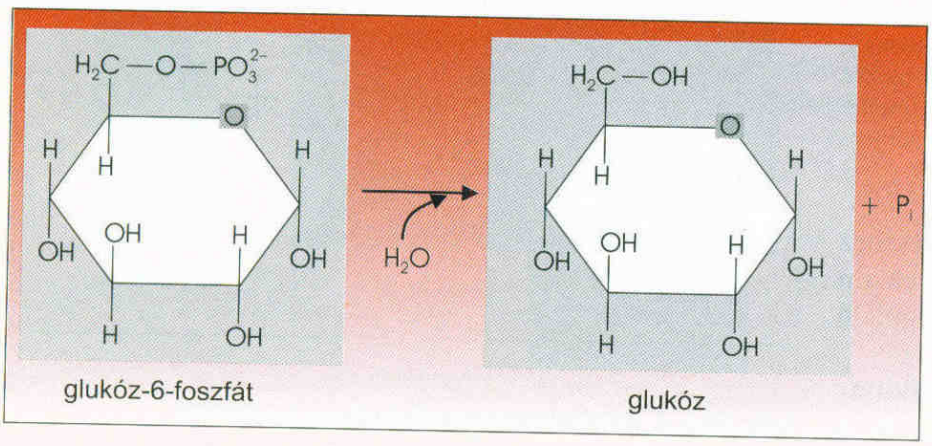
A foszfoenolpiruváttól a fruktóz-1,6-biszfoszfátig az intermedierek keletkezését a glikolízisnél megismert enzimek katalizálják. A fruktóz-1,6-biszfoszfátból a **fruktóz-1,6-biszfoszfatáz** hatására, a foszfátészter hidrolizál, anorganikus foszfát keletkezése közben jön létre a fruktóz-6-foszfát *(2-70. ábra)*. A glukoneogenezis utolsó lépésében, a szabad glukóz keletkezését a **glukóz-6-foszfatáz** katalizálja *(2-71. ábra)*. Az enzim az endoplazmás retikulumban membránhoz kötve található. A glukóz a májsejtet elhagyva a keringésbe kerül. (Ebben a folyamatban feltételezik a GLUT-7 szerepét.)

A glukóz szintézise energiaigényes folyamat, 1 molekula glukóz keletkezése 2 molekula laktátból 6 ATP felhasználását jelenti:

$$2 \text{ laktát} + 6 \text{ ATP} \rightarrow 1 \text{ glukóz} + 6 \text{ ADP} + 6 \text{ P}_i.$$



2-70. ábra. A fruktóz-1,6-biszfoszfatáz által katalizált reakció



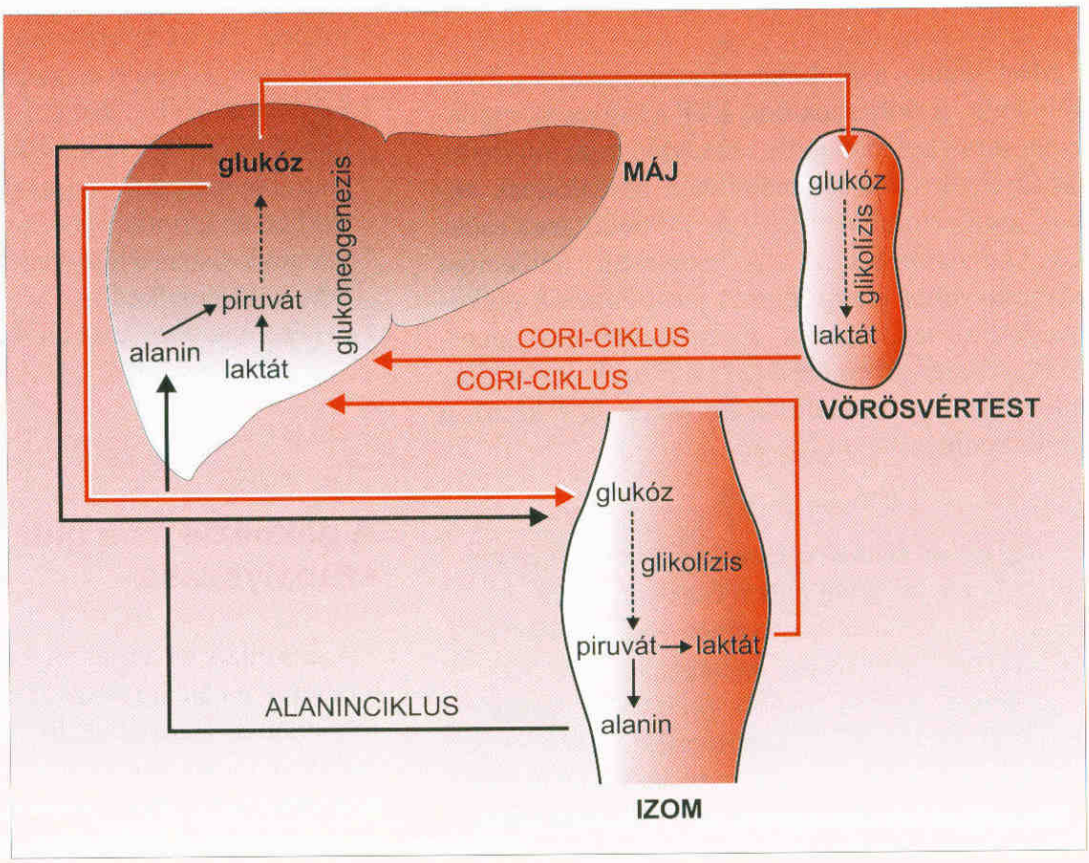
2-71. ábra. A glukóz-6-foszfatáz által katalizált reakció

Glukoneogenezis szempontjából a legfontosabb szerv a máj. Bár a vesékben is folyik glukoneogenezis, a máj, tömegénél fogva ennél jelentősebb kapacitást jelent. A glukoneogenezis enzimei, a glukóz-6-foszfatáz kivételével az izmokban is jelen vannak, azonban itt szabad glukóz nem keletkezik, a glukóz-6-foszfát a glikogénszintézis irányában alakul tovább.

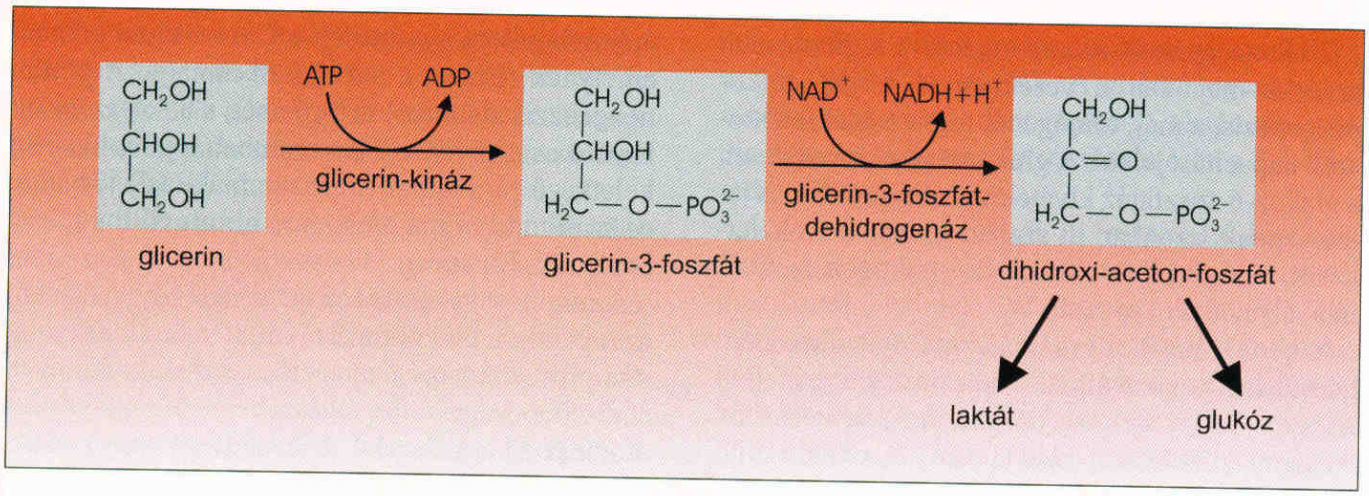
A kérdés az, hogy a májban folyó glukoneogenezishez honnan állnak szubsztrátok a rendelkezésre. A laktát az anaerob glikolízis végterméke. Anaerob glikolízis a vérellátástól és oxigén ellátottságtól függően kisebb-nagyobb mértékben minden szervben történik. Jelentékeny és folyamatos a laktátképződés a vörösvértestekben, ahol nem lévén mitokondrium, a glikolízis az egyetlen ATP-termelő folyamat. A harántcsíkolt izomban is a többi szervet meghaladó mértékben keletkezhet laktát, mert fokozott izommunkában, a relatív hypoxia miatt az anaerob glikolízis kerül előtérbe. A laktát a keringéssel jut el a májba, az itt szintetizált glukóz pedig a keringéssel jut vissza, egyebek mellett ezekbe a szervekbe. A máj és az extrahepatikus szervek közötti ilyen munkamegosztás és tápanyagforgalom együttesen a **Cori-ciklust** alkotja, amelynek sémáját a *2-72. ábra* mutatja. A glukoneogenezis alaninból is történhet, s ha ez az extrahepatikus szervekben, pl. izomban a glikolízisben keletkező piruvátból (transzaminálással) jön létre és szállítódik a májba, az ún. **alaninciklus** részét képezi (2-72. ábra).

Az aminosavak közül az alanin a legfőbb, de nem az egyetlen glukózforrás: minden aminosavból, ami piruváttá vagy oxálacetáttá tud alakulni (ezek a részben vagy teljes egészében glukoplasztikus aminosavak, lásd a 2.4. fejezetet) glukóz szintetizálódhat. A lizin és a leucin kivételével gyakorlatilag minden aminosav képes erre.

Acetil-CoA-ból nem képződik sem piruvát, sem oxálacetát, így acetil-CoA-ból nem történik glukózszintézis. Minthogy a zsírsavak oxidációja során acetil-CoA keletkezik, a zsírsavakból nem keletkezhet glukóz. Ezalól kivételt a páratlan szénatomszámú zsírsavak jelentenek, amelyek oxidációja molekulánként egy propionil-CoA keletkezést is eredményez, amely szukcinil-CoA-vá alakul (lásd 162. oldal), s ebből a citrátkörben oxálacetát keletkezik. Glukóz szintetizálódhat a zsírsavraktá-



2-72. ábra. A Cori-ciklus *(piros nyilak) és az alaninciklus (fekete vastag nyilak)*



2-73. ábra. Dihidroxi-aceton-foszfát keletkezése glicerinből

rakban található trigliceridek glicerinkomponenséből is, amely két lépésben dihidroxi-aceton-foszfáttá alakulhat *(2-73. ábra)*. Az a megállapítás tehát, hogy lipidekből nem keletkeznek szénhidrátok általában igaz, de csak e két kivétel figyelembevételével.

Emellett acetonból is képződhet glukóz citokróm P450 enzimek segítségével a májban. Diabetes mellitusban és hyperacetonaemiával járó állapotokban (pl. éhezés) lehet ennek a reakcióútnak jelentősége (lásd 2.6. fejezet).

Mint láttuk, a glukoneogenezis energiaigényes folyamat. A felhasználódó ATP a zsírsavak oxidációja során keletkezik. A zsírsavak, mint alternatív tápanyagok fokozott mértékben oxidálódnak akkor, amikor glukoneogenezis történik, azaz csökken a vércukorszint. A zsírsavak oxidációja nemcsak mint energiaforrás járul hozzá a glukoneogenezishez, hanem a mitokondrium acetil-CoA-szintjének emelésével, a piruvát-karboxiláz allosztérikus stimulálásán keresztül is fokozza a glukózszintézist.

Tejsavas acidosis. Fiziológiás körülmények között a tejsav a sejtekben csak kis mennyiségben képződik, mert oxigén jelenlétében a piruvátból acetil-CoA keletkezik, ami a citrátkörben alakul tovább (kivételt képeznek azok a sejtek, pl. vörösvértest, ahol csak glikolízis folyik). Megnő a tejsav mennyisége fiziológiás körülmények között fokozott izommunkában, vagy ha az oxigénellátás patológiás okból csökkent (pl. görcsök, shock, cardiopulmonalis betegségekben). A keletkezett tejsav a plazmamembrán laktát/H^+ transzporteren keresztül a sejteket elhagyja és a keringésbe kerül. A laktáteliminációt a szervezetben vagy a CO_2-dá és H_2O-zé történő oxidáció, vagy a májban, a glukoneogenezisben a glukózzá történő átalakulás biztosítja. Minthogy e folyamatokhoz is oxigénre van szükség, általános hypoxiás állapotban nemcsak a laktátkeletkezés fokozódik, hanem csökken a laktáteliminiáció is. Az utóbbi bekövetkezik a májparenchymasejtek pusztulásával járó kórképekben és krónikus alkoholizmusban is. Tejsavas acidosisban a tejsavkoncentráció a vérben 5 mM fölé emelkedhet, ugyanekkor csökken a pH és a bikarbonátkoncentráció.

A glikolízis és a glukoneogenezis szabályozása

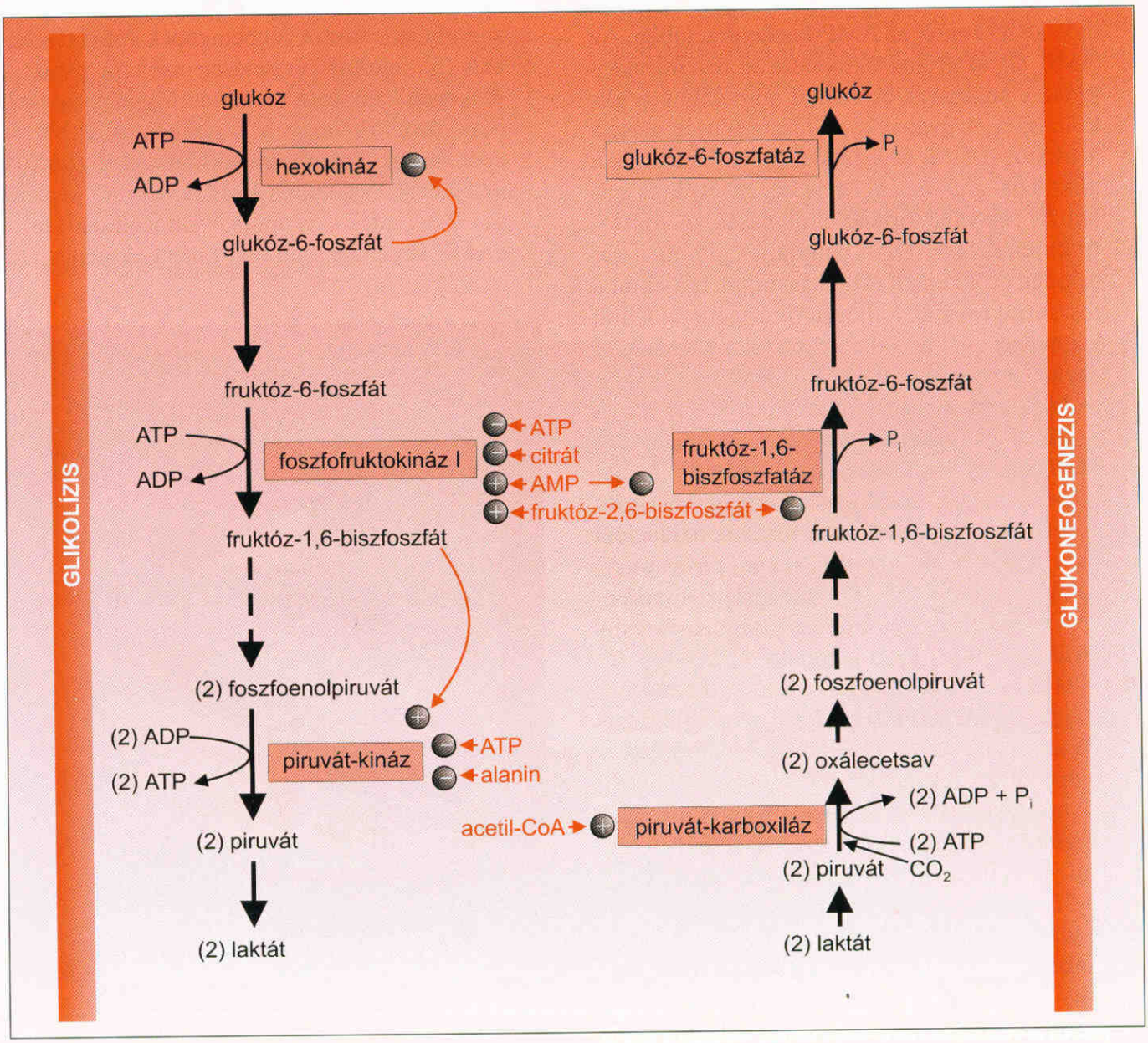
A glikolízis és a glukoneogenezis a közös intermedierek és enzimek okán egymással összefüggő folyamatok. Bármelyik folyamat gátlása egyszersmind a másik stimulálását is jelenti; amikor a glikolízis sebessége csökken, fokozódik a glukoneogenezis és ellenkezőleg, a glikolízis stimuláci-

ójával párhuzamosan csökken a glukoneogenezis. Mindkét folyamat szabályozása az irreverzibilis lépéseket katalizáló enzimeken keresztül történik.

A glikolízisben a regulált enzimek a hexokináz, a foszfofruktokináz I és a piruvát-kináz, a glukoneogenezisben pedig a piruvát-karboxiláz és a fruktóz-1,6-biszfoszfatáz. A reguláció allosztérikus mechanizmusokkal történik, de szerepe van enzimek kovalens módosításának (foszforilálás) is. Az allosztérikus regulátorok a glikolízis és a glukoneogenezis sebességét annak függvényében módosítják, hogy (i) milyen az adott sejt energiaállapota (ATP, AMP, citrát), (ii) változik-e az intracelluláris pH, illetve (iii) milyen a szervezet energiaállapota (fruktóz-2,6-biszfoszfát). Az utóbbi hatást hormonok, főleg a glukagon közvetíti. A regulációban a felsorolt enzimek közül kiemelkedően a legfontosabb szerepet a **foszfo-fruktokináz I** játssza.

Az allosztérikus reguláció összefoglalása az *2-74. ábrán* látható.

❶ A glikolízis sebessége a **sejt energiaállapotának** megfelelően az **ATP**, illetve az **AMP** hatá-



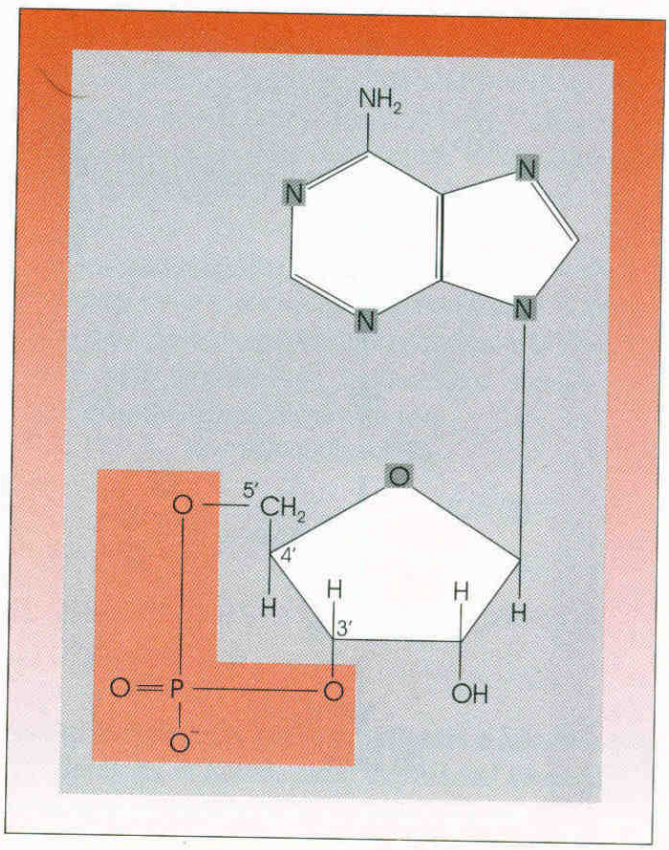
2-74. ábra. A glikolízis és a glukoneogenezis allosztérikus regulátorai

sára változik. ATP allosztérikusan gátolja a glikolízis legfontosabb szabályozó enzimét a foszfofruktokináz I-t, valamint a piruvát-kinázt. Ennek eredményeképpen a glikolízis lelassul, amikor az ATP-koncentráció megnő a sejtekben. Az ATP-szinttel ellentétes irányban változik az AMP koncentrációja. Az ATP + ADP + AMP mennyisége a sejtekben közel állandó, az egyensúlyt a citoszolban az **adenilát-kináz** (miokináz) biztosítja, ami a 2ADP ↔ ATP + AMP reakciót katalizálja. Normális körülmények között az ATP-koncentráció mindig sokkal nagyobb, mint az ADP és még inkább, mint az AMP (ATP>>ADP>>AMP). Kis csökkenés az ATP-koncentrációban viszonylag jelentős emelkedést okoz az AMP-koncentrációban. Az AMP allosztérikus aktivátora a foszfofruktokináz I enzimnek és ezáltal stimulálója a glikolízisnek. Ugyanakkor allosztérikusan gátolja a fruktóz-1,6-biszfoszfatázt, így is biztosítva a glikolízis–glukoneogenezis egyensúlyának glikolízis irányába történő eltolódását. (A foszfofruktokinázt az ADP is gátolja.) A glikolízis sebessége csökken **citrát** hatására, mert a citrát a foszfofruktokináz I allosztérikus gátlója. Citrát keletkezik a citrátkörben nemcsak a szénhidrátok, hanem a zsírsavak vagy a ketontestek oxidációja során is. Így azokban a sejtekben, amelyek zsírsavat oxidálnak, csökken a glukózfelhasználás és ez glukózt takarít meg pl. az agy számára, amely majdnem kizárólag csak glukózt oxidál. Ugyanakkor a zsírsavak oxidációja során keletkező **acetil-CoA** a piruvát-karboxilázt aktiválja és a glukoneogenezist serkenti. Az acetil-CoA és a hosszú szénláncú zsírsavak a piruvát-kinázt gátolják.

❷ **A H^+-koncentráció** emelkedése a foszfofruktokináz I gátlását okozza. Az anaerob glikolízis fokozódása a laktát mellett H^+-felszaporodást is jelent, ami „fékezi" a glikolízist. A laktát a H^+-nal együtt egy transzporteren keresztül a keringésbe jut és a glukoneogenezis folyamatában, a májban glukózszintézisre használódik (2-72. ábra).

❸ A glikolízis és a glukoneogenezis **hormonális szabályozásában** a glukagon és az inzulin játszik szerepet. A glukagon a pancreas α-sejtjeiből a vércukorszint-csökkenés hatására kerül a keringésbe. Hatásának az a lényege, hogy a májban csökkenti a glukózfelhasználást, és serkenti a glukózszintézis és -mobilizáció folyamatait. A metabolizmusra gyakorolt hatása ennél összetettebb, mert a szénhidrát-anyagcserével párhuzamosan a lipidek metabolizmusát is befolyásolja. Hatásainak tárgyalására az egyes metabolikus utaknál, majd „A metabolizmus integrációja" című fejezetben újra visszatérünk, ezen a helyen csak a glikolízis–glukoneogenezisre gyakorolt szabályozó hatással foglalkozunk.

A májsejtek membránjában receptorok vannak, amelyek felismerik és kötik a keringésben jelen lévő **glukagont**. A receptorról és mindazokról a folyamatokról, amelyek a sejtben a receptorstimulálás hatására végbemennek külön fejezetben (5. fejezet) részletesen szólunk majd. A glukagon hatásának megértéséhez itt annyit kell csak ismerni, hogy a sejtekben ATP-ből az adenilát-cikláz hatására ciklikus AMP (cAMP) keletkezik. A ciklikus AMP, amelynek képletét az *2-75. ábra* mutatja, intracellulárisan a cAMP-dependens protein-kinázt aktiválja, ami

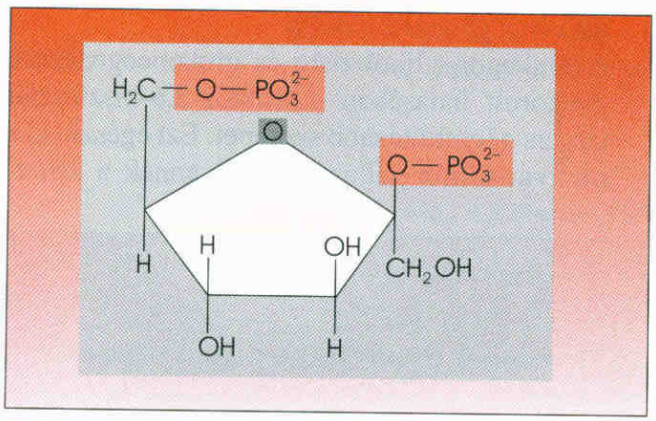


2-75. ábra. cAMP képlete

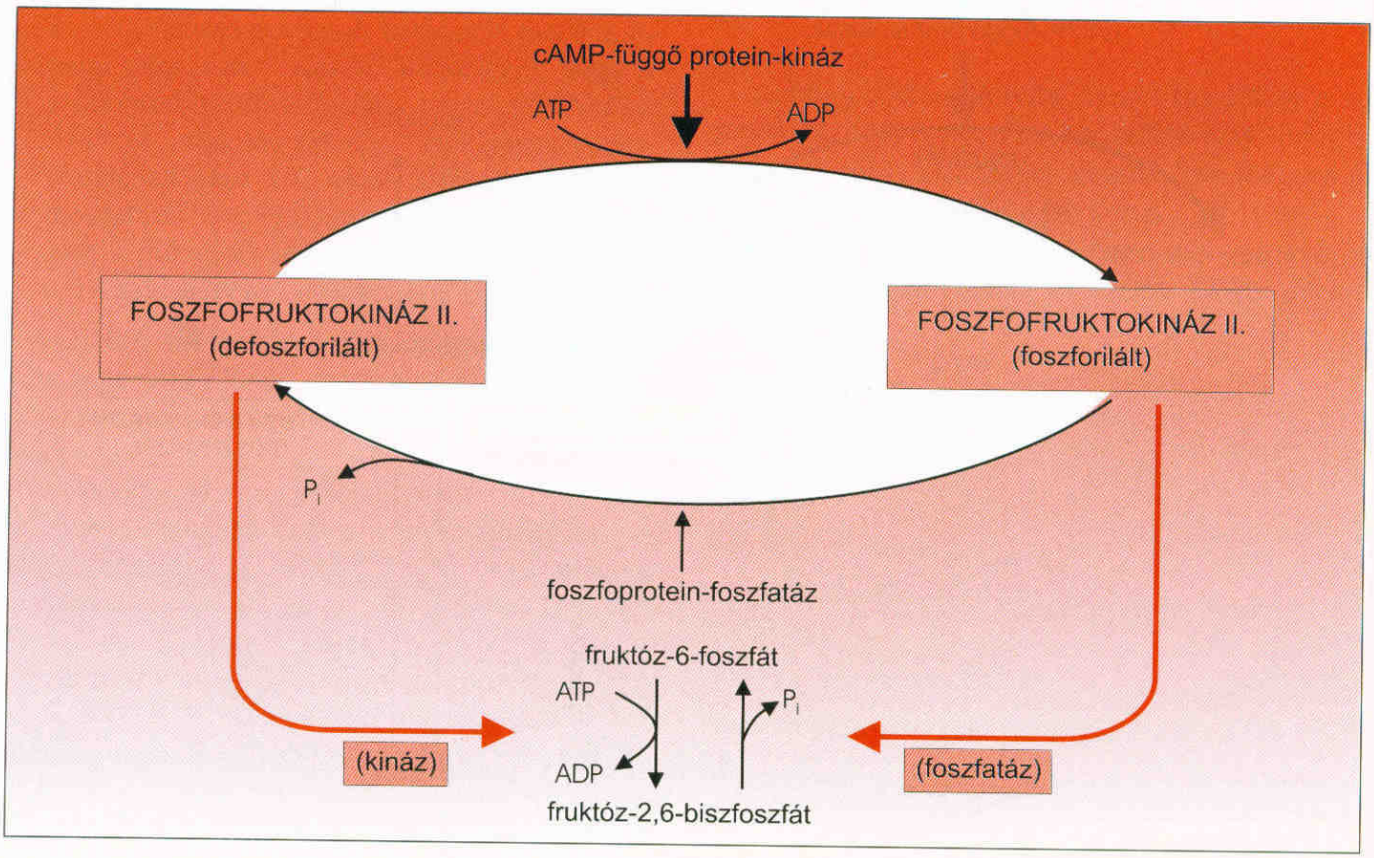
fehérjéket képes szerin/treonin OH-csoporton foszforilálni. A cAMP-függő protein-kináz számos olyan enzimet foszforilál, amelyek a metabolizmusban jelentős szerepet játszanak, s ez egyes enzimek esetében az aktivitást csökkenti, mások esetében az aktivitást fokozza.

A májsejtekben a glukagon hatása a glikolízisre és a glukoneogenezisre a **fruktóz-2,6-biszfoszfát** szintjének változásán keresztül érvényesül. A fruktóz-2,6-biszfoszfát *(2-76. ábra)* a fruktóz-6-foszfátból keletkezik a foszfofruktokináz II hatására. A foszfofruktokináz II egy sajátos, kettős funkciójú enzim, amely a fruktóz 2,6-biszfoszfát fruktóz 6-foszfáttá történő visszaalakulását is katalizálni képes. Az, hogy melyik funkcióját tudja ellátni, attól függ, hogy az enzim foszforilált vagy defoszforilált állapotban van-e. Az enzimet a cAMP-függő protein-kináz foszforilálja és a foszfoprotein-foszfatáz defoszforilálja. A foszforilált enzim foszfatázként működik és a fruktóz-2,6-biszfoszfát → fruktóz-6-foszfát átalakulást katalizálja, míg a defoszforilált enzim kináz aktivitású és a fruktóz-2,6-biszfoszfát keletkezését katalizálja. A szabályozás vázlatát az *2-77. ábra* mutatja.

A fruktóz-2,6-biszfoszfát a glikolízis sebességét fokozza, a glukoneogenezis sebességét pedig csökkenti, mert pozitív allosztérikus regulátora a glikolízis sebességmeghatározó lépését katalizáló foszfofruktokináz I enzimnek és ne-



2-76. ábra. Fruktóz-2,6-biszfoszfát

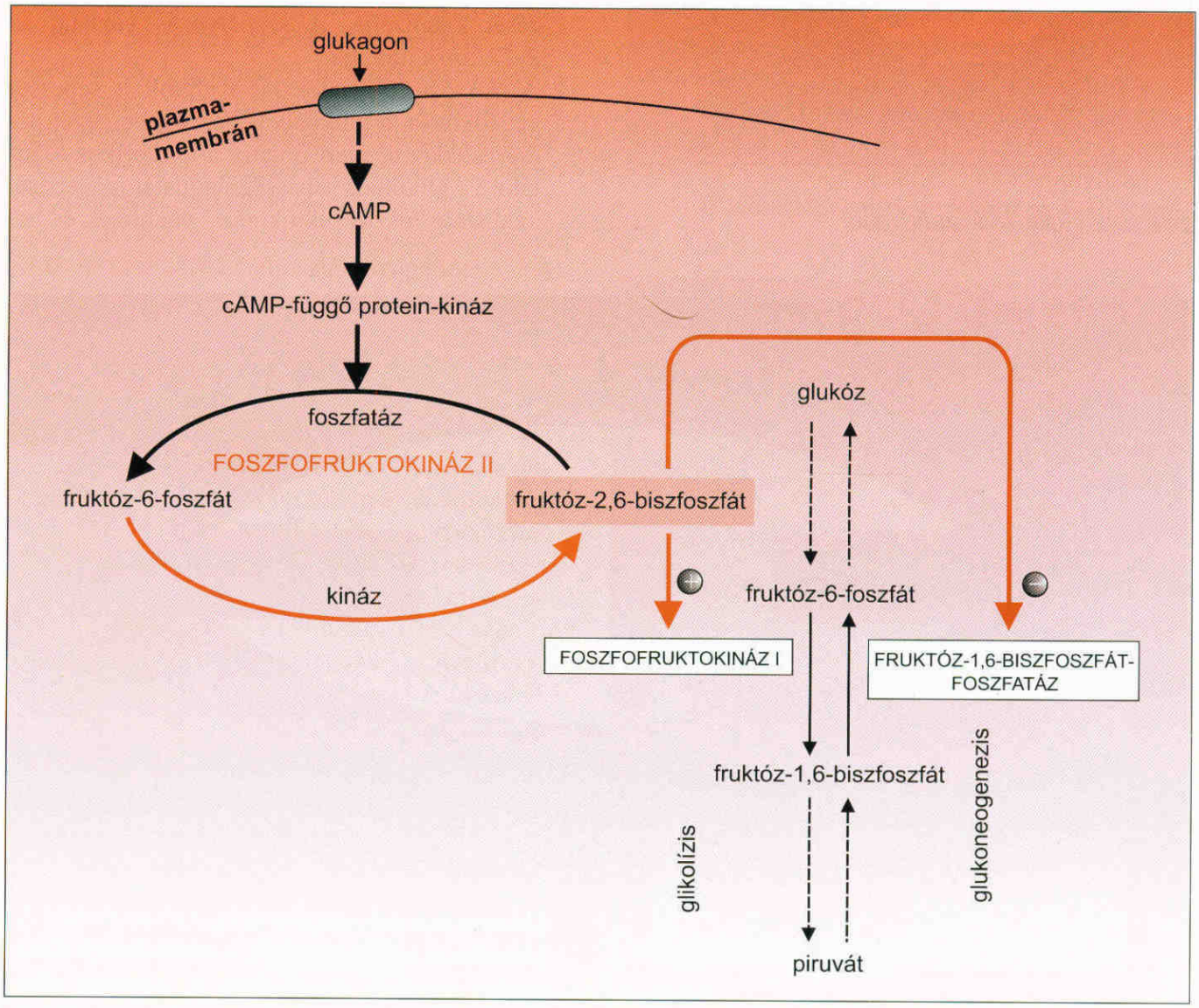


2-77. ábra. A bifunkcionális foszfofruktokináz II-kináz és -foszfatáz aktivitása és foszforilációval történő szabályozása

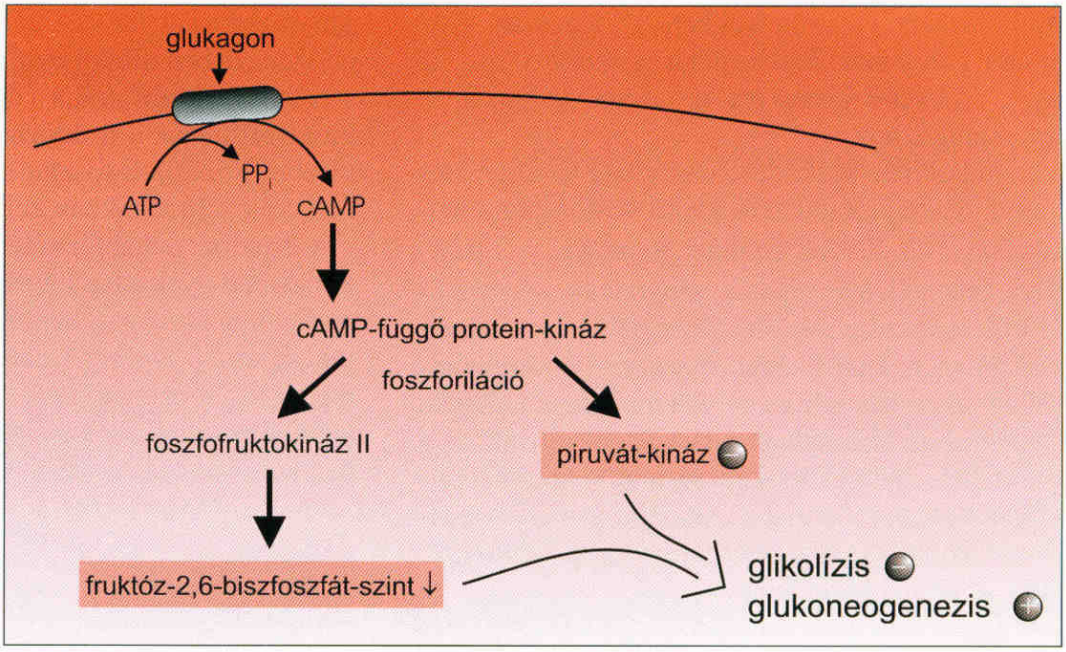
gatív allosztérikus effektora a fruktóz 1,6-biszfoszfatáznak. Fruktóz-2,6-biszfoszfát nélkül a foszfofruktokináz I aktivitása elégtelen, a fruktóz-1,6-biszfoszfatázé viszont fokozott.

Mindezek ismeretében a glukagon hatására végbemenő folyamatok a következőképpen foglalhatók össze *(2-78. ábra)*. Glukagon hatására foszforilálódik a bifunkcionális foszfofruktokináz II, amely ennek eredményeképpen foszfatázként működik és a fruktóz-2,6-biszfoszfát → fruktóz 6-foszfát átalakulást katalizálja. Lecsökken a sejtekben a fruktóz-2,6-biszfoszfát-koncentráció és megszűnik a foszfofruktokináz I aktiválása, illetve a fruktóz-1,6-biszfoszfatáz gátlása. Ez azt jelenti, hogy a folyamatok a glukoneogenezis irányában működnek. Glukagon hiányában ezzel szemben a foszfofruktokináz II a foszfoprotein-foszfatázok hatására defoszforilálódik, a kináz aktivitása válik dominánssá és katalizálja a fruktóz-6-foszfát → fruktóz-2,6-biszfoszfát átalakulást. A fruktóz-2,6-biszfoszfát mint a foszfofruktokináz I leghatékonyabb allosztérikus aktivátora, a glikolízis sebességét fokozza, ugyanakkor a fruktóz-1,6 biszfoszfatázon keresztül a glukoneogenezist gátolja.

A glukagon glikolízisre és glukoneogenezisre gyakorolt hatásában a fruktóz-2,6-biszfoszfát játssza a legfontosabb szerepet. Ezt egészíti ki a **piruvát-kináz** gátlása, amely annak a követ-



2-78. ábra. Fruktóz-2,6-biszfoszfát hatása a glikolízisre és a glukoneogenezisre. *Glukagon hatására a vastag fekete nyilakkal, glukagon hiányában a vastag piros nyilakkal jelzett folyamatok dominálnak*



2-79. ábra. A glukagon glikolízisre és glukoneogenezisre gyakorolt hatásában szerepet játszó tényezők vázlata

kezménye, hogy a cAMP-függő protein-kináz a piruvát-kinázt is foszforilálja és ezáltal inaktiválja *(2-79. ábra)*.

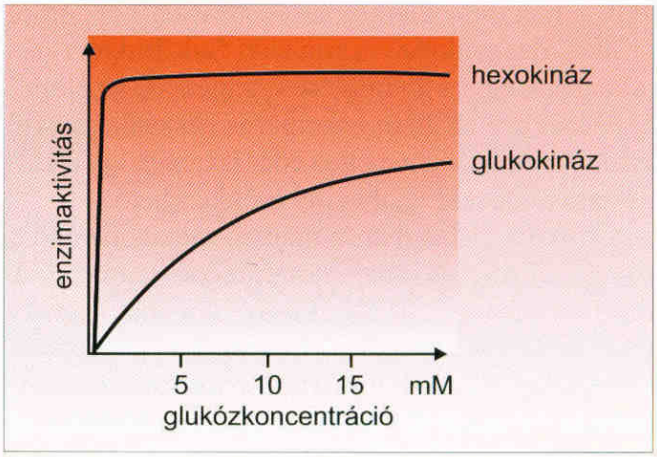
A glukagonnal ellentétes hatású hormon az **inzulin**, amely a pancreas β-sejtjeiből a vércukorszint-emelkedés hatására választódik el. Glikolízisre gyakorolt hatásának mechanizmusa még nem tisztázott. Lehetséges, hogy a foszfoprotein-foszfatázokat vagy a cAMP-t AMP-vé alakító ciklikus nukleotid-foszfodiészterázt (lásd 470. oldal) aktiválja. Mindkét mechanizmus a glukagonnal ellentétes hatást, azaz a glikolízis serkentését és a glukoneogenezis sebességének csökkenését eredményezi.

A glikolízis szabályozásában és az egyes szervek vércukorszinttől függő eltérő glikolitikus aktivitásában fontos szerepet játszanak a hexokináz izoenzimek.

A különböző szervekben eltérő **hexokináz** izoenzimek találhatók, de a legtöbb helyen az enzim glukóz iránti K_M-értéke <1 mM, és gátolható a reakcióban keletkező glukóz-6-foszfáttal. Így nem fordulhat elő, hogy a sejtek anorganikus foszfát készlete glukóz-6-foszfátban halmozódjon fel, amikor a glikolízis folyamata valamiért gátolt. (Ez történik viszont a fruktóz → fruktóz-1-foszfát átalakulásban, amikor a fruktóz anyagcserezavart szenved.) A máj parenchymasejtekben található a **glukokináz**, amelynek K_M-értéke 10 mM körüli és nem gátolható glukóz-6-foszfáttal.

Gátolja viszont a glukokinázt egy inhibitor fehérje. A fruktóz-6-foszfát elősegíti a gátló fehérje kötődését a glukokinázhoz és ezáltal gátolja az enzimet. A fruktóz-1-foszfát ezzel szemben gátolja ezt a kölcsönhatást, aminek következtében a glukokinázt aktiválja. Ez a hatás jelentőssé válik akkor, amikor a fruktóz-1-foszfát felszaporodik a sejtekben, fokozott fruktózfelvétel vagy a fruktózanyagcsere zavara miatt.

A glukokináz viszonylag magas K_M-értéke magyarázza, hogy a vércukor-koncentráció (fiziológiásan ~ 5 mM) kismértékű emelkedése fokozza a glukóz → glukóz-6-foszfát átalakulást, vagyis a májban a glukózfelhasználást, amely egyszersmind a vércukorszintet csökkenti *(2-80. ábra)*.



2-80. ábra. A hexokináz és a glukokináz aktivitása a glukózkoncentráció függvényében

Azok a szervek, amelyekben az alacsony K_M-értékű hexokináz foszforilálja a glukózt (pl. az agy), csökkenő vércukorszint esetén is hozzájutnak a glukózhoz.

A glukokináz működése összefügg az ellentétes irányú reakciót katalizáló glukóz-6-foszfatáz működésével is. Ezt az enzimet is magas (~3 mM) K_M-érték jellemzi, így a glukóz ↔ glukóz-6-foszfát átalakulás irányát a koncentrációviszonyok szabják meg. 5 mM körüli vércukor-koncentrációnál az ellentétes irányú folyamatok egyensúlyban vannak. Ez ATP-felhasználást jelent ugyan, de a két enzim együttes működése fontos szerepet játszik abban, hogy a máj az aktuális igényekhez alkalmazkodva glukózt vesz fel, vagy ha szükséges, glukózt küld a keringésbe.

A glukokináz gén transzkripcióját az inzulin fokozza, azaz glukokinázindukciót okoz. A megnövekedett enzimmennyiség a máj alkalmazkodását jelzi a megnövekedett glukózfogyasztáshoz. Inzulinhiányban a glukokináz elégtelenné válik és a megemelkedett vércukorszint ellenére a máj csökkent kapacitással képes a glukózt felvenni.

A fruktóz és a galaktóz metabolizmusa

Mindkét monoszacharid metabolizmusára jellemző, hogy olyan intermedierek keletkeznek, amelyek vagy a glikolízis vagy a glukoneogenezis folyamataiban alakulnak tovább. A **fruktóz** igen jelentős emberi tápanyag, a napi fruktózbevitel kb. 100 g, melynek jelentős része az asztali cukorból (szacharóz, szukróz) származik. Sok fruktózt tartalmaznak egyes gyümölcsök, a méz, de az elmúlt évtizedekben az élelmiszeripar is használja, mivel kisebb mennyiségben okoz édes ízérzést, így alkalmazásával az energiabevitel csökkenthető.

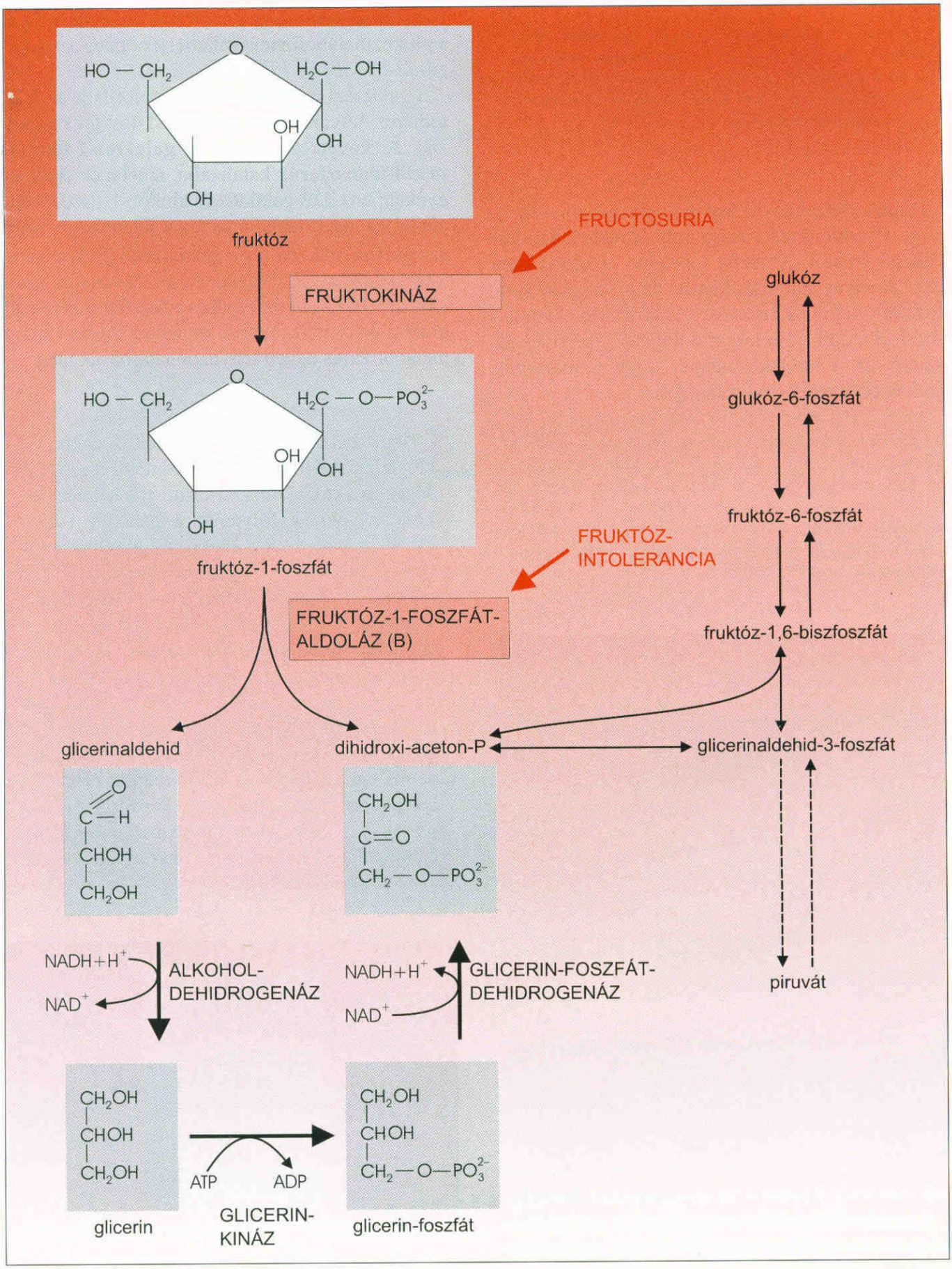
A fruktóz elsősorban a májban metabolizálódik *(2-81. ábra)*. A máj tartalmazza legnagyobb mennyiségben a **fruktokináz** enzimet, amely foszforilálja a fruktózt és fruktóz-1-foszfát keletkezik. A fruktóz-1-foszfát a **fruktóz-1-foszfát-aldoláz** (aldoláz B) hatására glicerinaldehidre és dihidroxiaceton-foszfátra hasad. A glicerinaldehidből glicerin-foszfáton keresztül dihidroxi-aceton-foszfát keletkezik. A fruktóz így vagy a glikolízisbe csatlakozik és lebomlik, vagy a glukoneogenezisben glukózzá alakulhat.

A fruktóz szubsztrátja a hexokináznak is, a hexokináz affinitása a fruktózhoz azonban lényegesen kisebb. Fruktóz-6-foszfát számottevő mennyiségben csak adipocitákban keletkezik.

A fruktóz metabolizmusának sebessége a glikolízisben gyakorlatilag csak a fruktóz mennyiségétől függ, mivel kikerüli a glikolízis sebességmeghatározó lépését katalizáló, szabályozó enzimet, a foszfofruktokináz I-t. A fruktóz így gyorsan metabolizálódik, és a keletkező acetil-CoA a májban könnyen zsírsavvá alakul.

Ha a fruktóz továbbalakulása enzimdefektus miatt akadályozott, a fruktóz-1-foszfát-felszaporodás súlyos következményekkel jár. Ez történik **fruktózintolerancia** esetén, amikor elégtelen a fruktóz-1-foszfát-aldoláz működése. Ilyenkor lecsökken a májsejtekben az anorganikus foszfát mennyisége, mert a foszfát a továbbalakulni nem tudó fruktóz-1-foszfát „csapdájában" marad. Foszfát hiányában csökken a terminális oxidációban az ATP keletkezése, aminek súlyos sejtkárosító hatása van, ha olyan fokú, hogy a Na^+K^+-ATPáz nem tud a működésének eleget tenni. (Az enzimről lásd a 4. fejezetben.) Az anorganikus foszfát hiánya miatt következik be a fruktózintolerancia egyik legsúlyosabb akut tünete is, a hypoglykaemia, ami fruktózfogyasztás után lép fel. A hypoglykaemia oka az, hogy anorganikus foszfát hiányában nem tud glikogénből glukóz-1-foszfát keletkezni, s így kiesik egy, a vércukorszint fenntartásához elengedhetetlen akut szabályozás.

Nagy mennyiségű fruktóz hasonló problémákat okozhat enzimdefektus nélkül is, mert az aldoláz B kapacitása normálisan is lényegesen kisebb, mint a fruktokinázé, és a korlátozás nélküli fruktózfoszforiláció az ATP-szint csökkenését okozza. Ezért kell elvetni a fruktóz adását parenterális táplálásban, noha sok szempontból a glukóznál kedvezőbb lenne (felvétele a sejtekbe nem függ az inzulintól, metabolizmusa gyors). A fruktózhoz hasonlóan, májsejtkárosító hatású a szorbitol glukóz helyett történő parenterális alkalmazása is.

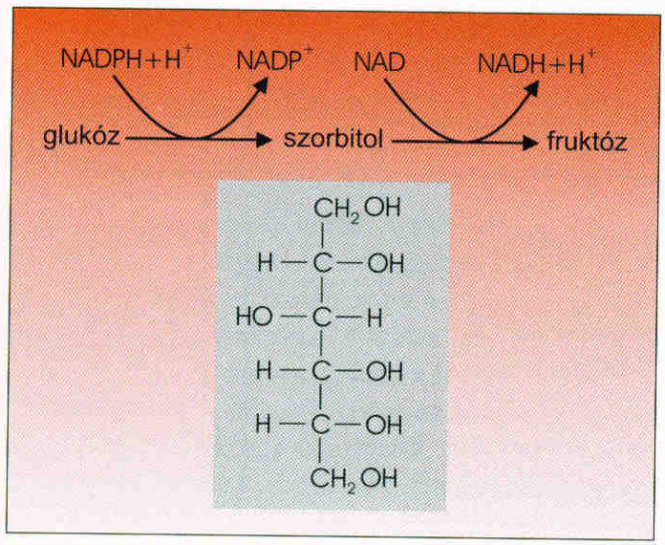


2-81. ábra. A fruktóz metabolizmusa

Előfordul, de jóindulatú állapot az **esszenciális fructosuria**, amelyben elégtelen a fruktokináz működése. Fruktózfogyasztást követően ilyenkor a vérben nagymértékben megnő a fruktózkoncentráció és a fruktóz megjelenik a vizeletben is.

Fontos körülmény a fruktóz metabolizmusában, hogy a fruktokinázt nem gátolja a reakcióban keletkező fruktóz-1-foszfát (szemben a hexokinázzal, amelyet allosztérikusan gátol a glukóz-6-foszfát), vagyis a sejtekbe került fruktóz azonnal foszforilálódik. Ennek fiziológiás körülmények között az a következménye, hogy a májsejtek fruktózfelvétele nem korlátozott.

Fruktóz keletkezhet is az emberi szervezetben glukózból, szorbitolon keresztül *(2-82. ábra)*. A fruktóz a spermiumok legfőbb energiaforrása, amihez a fruktóz a vesicula seminalisban keletkezik és innen szekretálódik. A spermiumokban a fruktóz a glikolízis és a citrátkör folyamataiban CO_2-dá és H_2O-zé oxidálódik, a keletkező energia pedig a spermiumok mozgását fedezi.



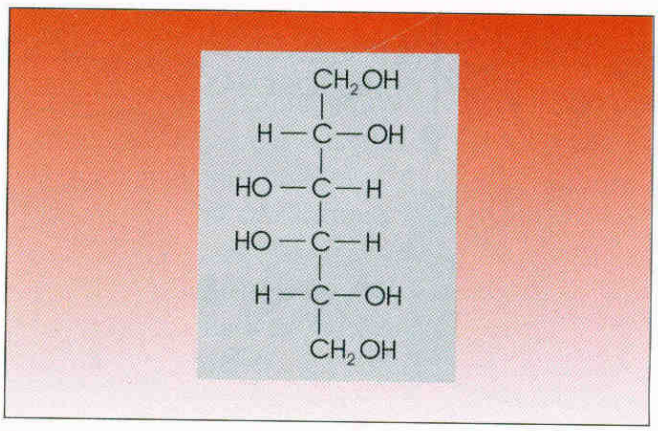
2-82. ábra. Fruktóz keletkezése glukózból és a szorbitol képlete

A **galaktóz** szintén fontos tápanyag, különösen születés után, amikor a tej meghatározó táplálék.

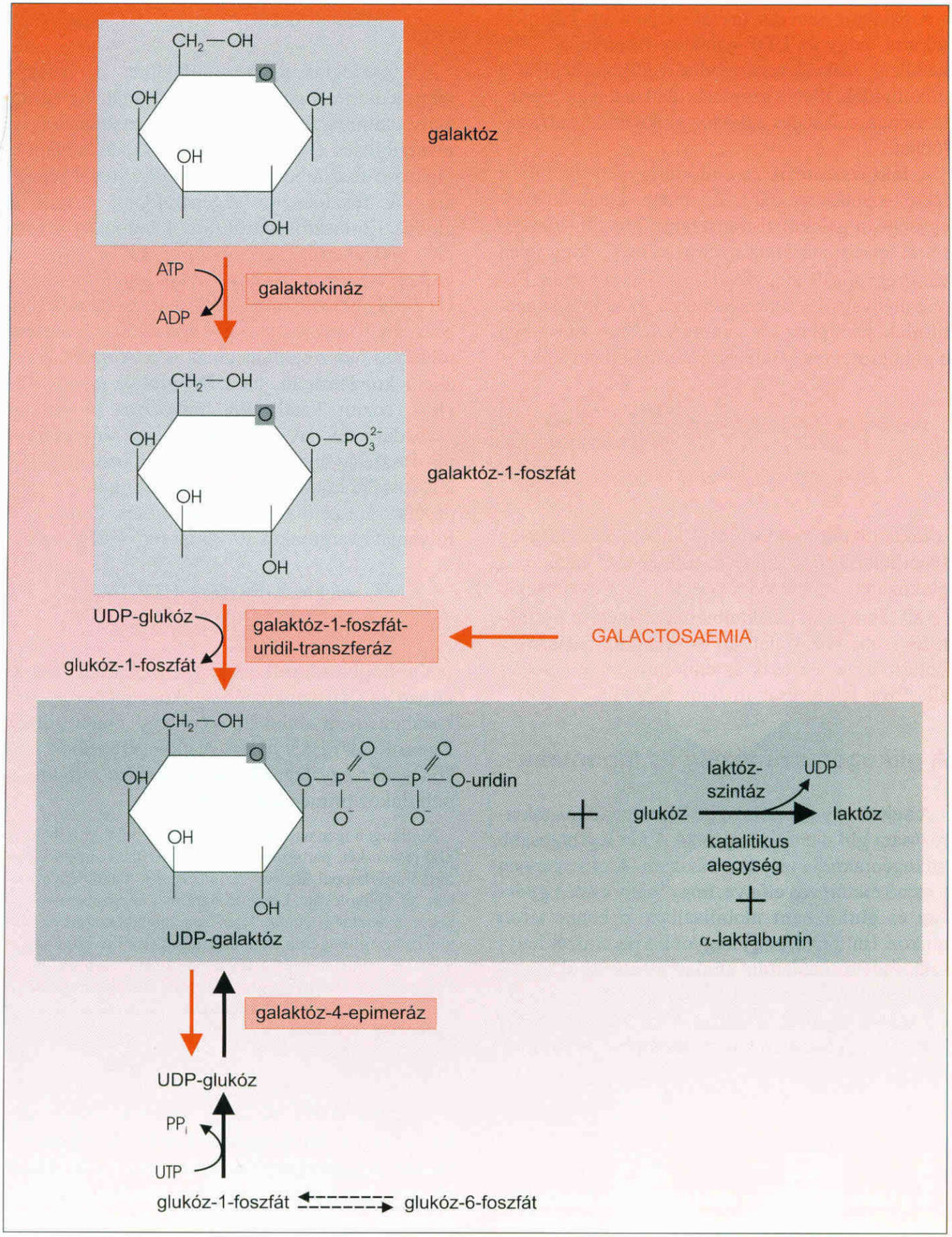
A tejcukorból (laktóz) az emésztés során keletkező galaktóz a májban metabolizálódik. Az átalakulásban a glukózmetabolizmus intermedierjei keletkeznek, tehát csakúgy mint a fruktóz, a galaktóz is a glukózmetabolizmus valamelyik útjába csatlakozik *(2-83. ábra)*.

A galaktózt a **galaktokináz** foszforilálja az ATP terhére. A reakcióban galaktóz-1-foszfát keletkezik. A következő lépést a **galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz** katalizálja, amelynek eredményeképpen UDP-galaktóz és glukóz-1-foszfát képződik. Ennek a reakciónak az a jelentősége, hogy az epimeráznak, amely a galaktóz ↔ glukóz átalakítást végzi, az UDP-galaktóz a szubsztrátja. A keletkező UDP-glukóz glukóz-1-foszfáton keresztül glukóz-6-foszfáttá alakul, amelynek további útját a metabolizmus egyéb tényezői határozzák meg.

Nem metabolizálódik a galaktóz akkor, ha elégtelen az UDP-galaktóz szintéziséhez szükséges galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz működése, mert a folyamat a galaktóz-1-foszfátnál megáll. Ez az állapot a **galactosaemia**, amelyre jellemző a tejfogyasztás után fellépő hányás, hasmenés, a máj megnagyobbodása, sárgaság és mentális retardáció kialakulása. A galactosaemia galactosuriával jár. A tejet és tejtermékeket a beteg étrendjéből ki kell hagyni, s így valamennyi klinikai tünet visszafejlődik, a mentális retardációt kivéve. Ezért nagyon fontos a betegség korai felismerése. Galactosaemiában a galaktóz az aldóz-reduktáz hatására redukálódik és galaktitol képződik *(2-84. ábra)*. A galaktitol képződése a szemlencsében cataracta (szürkehályog) kialakulásához vezet.



2-84. ábra. Galaktitol



2-83. ábra. A galaktóz metabolizmusa. *A sötétebb szürkével satírozott keretben az emlőmirigyben történő laktózszintézis látható*

A galaktóz nem esszenciális tápanyag. Tekintettel arra, hogy az UDP-galaktóz-4-epimeráz által katalizált reakció reverzibilis, a glikoproteinek, a glikolipidek, illetve szoptatás alatt, a tejcukor szintéziséhez szükséges galaktóz glukózból szintetizálódhat.

A **laktózszintézis** az emlőmirigyben történik a laktóz-szintáz hatására. Az enzim katalitikus alegysége, a galaktozil-transzferáz, amelynek szubsztrát specificitását az határozza meg, hogy jelen van-e egy másik alegység is, az α-laktalbumin. Ennek hiányában a laktóz-szintáz a galaktózt N-acetil-glukózaminhoz köti, aminek számos szövetben a glikoproteinek szintézisében van jelentősége.

UDP-galaktóz + N-acetil-glukózamin $\xrightarrow[\text{katalitikus alegység}]{\text{laktóz-szintáz}}$ galaktóz-N-acetil-glukózamin (1-4) + UDP

α-laktalbumin módosítja a katalitikus alegység specificitását úgy, hogy jelenlétében a galaktóz a glukózhoz kapcsolódik és tejcukor keletkezik (2-83. ábra). Az α-laktalbumin szintézise hormonális szabályozás alatt áll és prolaktin hatására, a szülést követően csak az emlőmirigyben keletkezik. Ezért laktóz csak itt szintetizálódik.

A glikogén szintézise és lebontása

A sejtek egy jelentős része képes a glukóz raktározására glikogén formájában. A két legfontosabb glikogénraktár a máj és a vázizom. A glikogénben történő raktározás előnye, hogy igény esetén **gyorsan** és **glukózként** mobilizálható a benne tárolt glukóz. Hátránya, hogy nagyobb a raktározás helyszükséglete annál, mint amikor a glukózból zsírsavak képződnek és a tárolás lipid formában történik. Ez utóbbi esetben azonban a mobilizálás során képződő intermedierek nem glukoplasztikus anyagok.

Glikogénszintézis

A glukóz-6-foszfát – amely a glukóz foszforilációja, illetve a glukoneogenezis során képződik – szubsztrátja a **foszfoglukomutáz** enzimnek; reverzibilis reakcióban glukóz-1-foszfáttá alakulhat:

glukóz-6-foszfát ↔ glukóz-1-foszfát

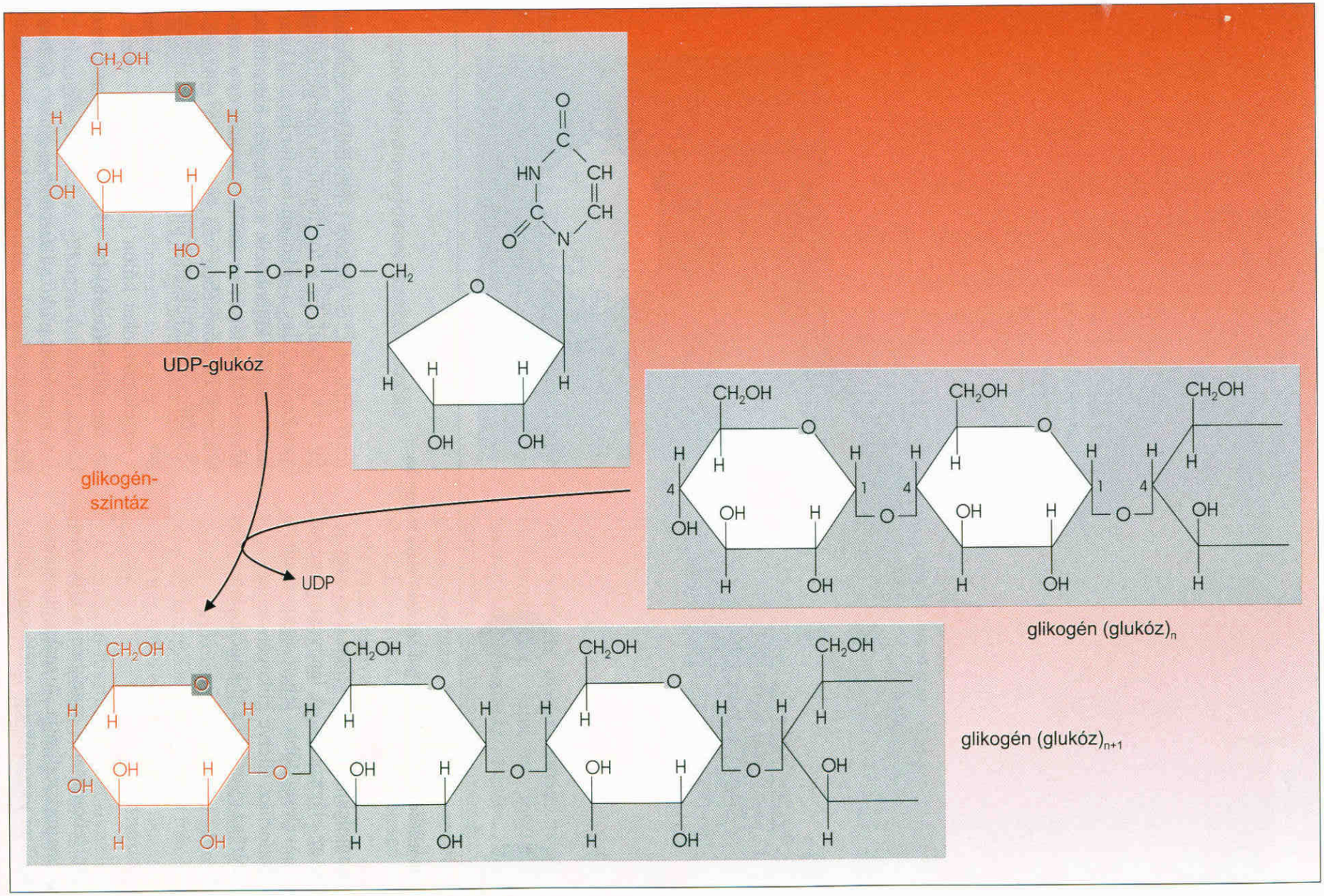
A foszfoglukomutáz kofaktora a reakció intermedierje, a glukóz-1,6-biszfoszfát. Az enzim aktív centruma foszforilált szerint tartalmaz, amely reverzibilisen elveszti foszfátcsoportját, amikor a glukóz-6-foszfátból glukóz-1,6-biszfoszfát képződik. A foszfoenzim regenerálódik, amikor a glukóz-1,6-biszfoszfátról (a 6. C-atomról) a foszfát visszakerül az enzimre és kialakul a glukóz-1-foszfát. A keletkezett glukóz-1-foszfát UTP-vel nukleotidhoz kötött „aktivált" glukózt képez, amely nemcsak a glikogénszintézis, hanem több más bioszintetikus útnak is prekurzora. A reakció kondenzáció, az **UDP-glukóz-pirofoszforiláz** enzim katalizálja, miközben pirofoszfát szabadul fel. A pirofoszfát az anorganikus pirofoszfatáz által katalizált reakcióban anorganikus foszfátokra hasad, így az UDP-glukóz képződésének ára két nagy energiájú kötés. Emiatt ez a folyamat exergonikus folyamat ($G^{0'}$=–25kJ/mol).

glukóz-1-foszfát + UTP →
UDP-glukóz + PP_i

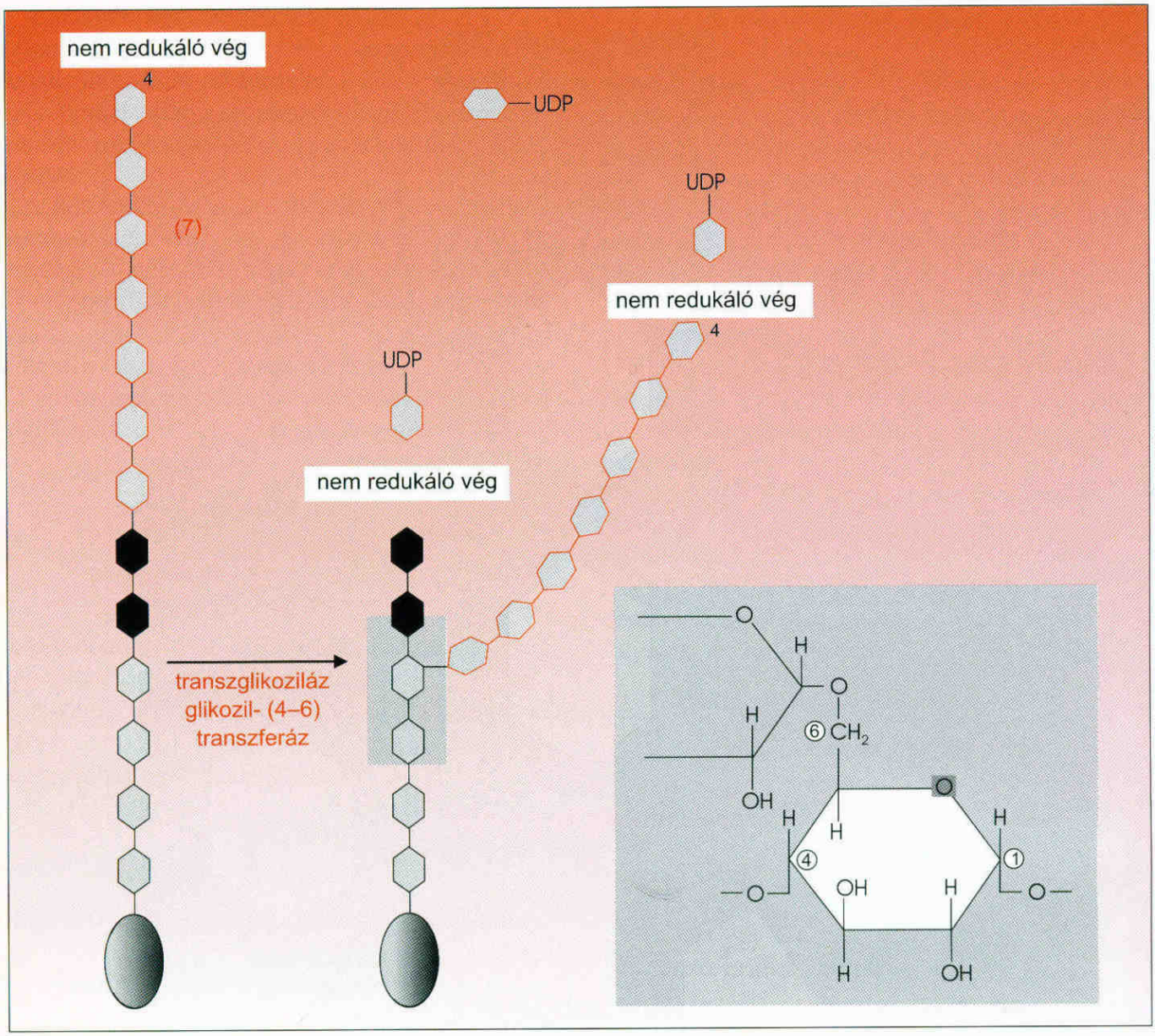
A **glikogén-szintáz** által katalizált glukóz transzferben az UDP-glukózról a glikogén láncvégi glukózához (nem redukáló vég) egy újabb glukóz kapcsolódik *(2-85. ábra)*. A glikogén-szintáz működéséhez egy legalább négy glukózt tartalmazó poliglukóz primer szükséges.

A glikogén igen nagy molekulatömegű polimer (több ezer kD) részecskét, partikulumot képez a sejtben, amely elektronmikroszkóppal látható. Szintézisének tanulmányozásában az új molekula kezdete, a primer megismerése igen nehéz feladatot jelentett. Jelen ismereteink szerint az első glukóz egy **glikogenin** nevű fehérjében egy Tyr-hoz kapcsolódik. A glikogenin és a glikogén-szintáz együttes hatása szükséges az első nyolc glukózegység összekapcsolásához. A glikogenin a glikogénrészecske képződése során a partikulum belsejében a poli-glukózlánchoz kovalensen kötve helyezkedik el.

A glikogén-szintáz mellett a glikogén szintézisében igen jelentős az elágazásokat kialakító **amilo-(1→4)-(1→6)-transzglikoziláz** vagy glikozil-(4→6)-transzferáz enzim működése *(2-86. ábra)*. Ha egy, legalább 11 glukózból álló lánc elkészül, az enzim egy kb. 7 glukóz által alkotott láncrészt áthelyez és α1-6 kötéssel kapcsolja a poliglukózlánchoz.



2-85. ábra. A glikogén-szintáz által katalizált reakció



2-86. ábra. Elágazások képződése a glikogénszintézis folyamán

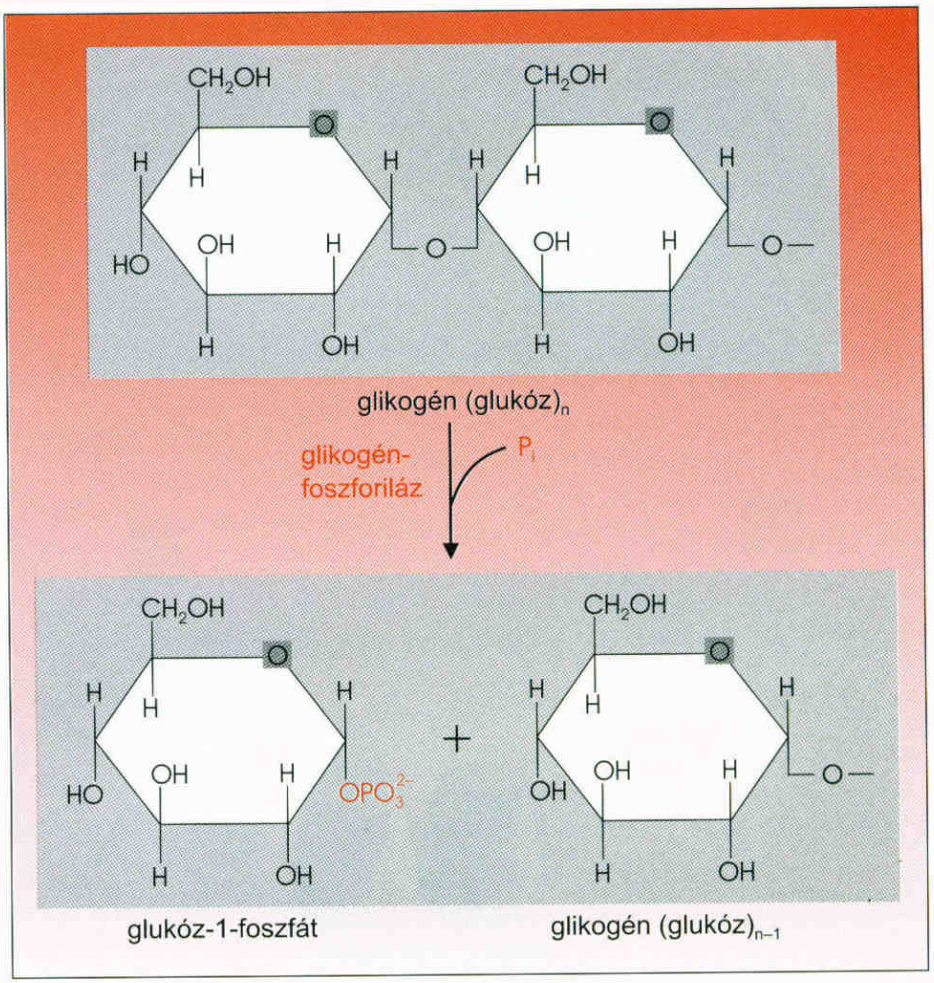
A glikogénmolekula felépítésében igen nagy jelentőségűek az elágazások. A láncvégi glukózok számának növelése több lehetőséget nyújt a glikogén-foszforiláz, illetve glikogén-szintáz működésére, ezért ez gyorsítja a glikogénszintézist és a lebontást.

Glikogénlebontás

A glikogén lebontását a sejtekben a **glikogén-foszforiláz** enzim katalizálja. A reakcióhoz anorganikus foszfátra van szükség, a lehasadó glukóz foszforilálódik, és glukóz-1-foszfátként szabadul fel *(2-87. ábra)*. Ez a foszforolízis energetikailag igen kedvező. Így a glikogén-foszforiláz által katalizált reakció különbözik a glikogén hidrolitikus bontásától, amelyet az amiláz katalizál és a szénhidrátok emésztésében van szerepe. A glikogén-foszforiláz működéséhez piridoxál-foszfát szükséges.

Az elágazásokat külön („debranching") enzim, az ún. **oligo-(α→6)-(α→4)-glukán-transzferáz** bontja.

A képződött glukóz-1-foszfátból glukóz-6-foszfát lesz a foszfoglukomutáz által katalizált reakció-



2-87. ábra. A glikogén-foszforiláz által katalizált reakció

ban, amely vagy a glikolízisben alakul tovább (izom), vagy a glukóz-6-foszfatáz hatására glukózzá alakul (máj) és a keringésbe jut.

A glikogén-anyagcsere szabályozása

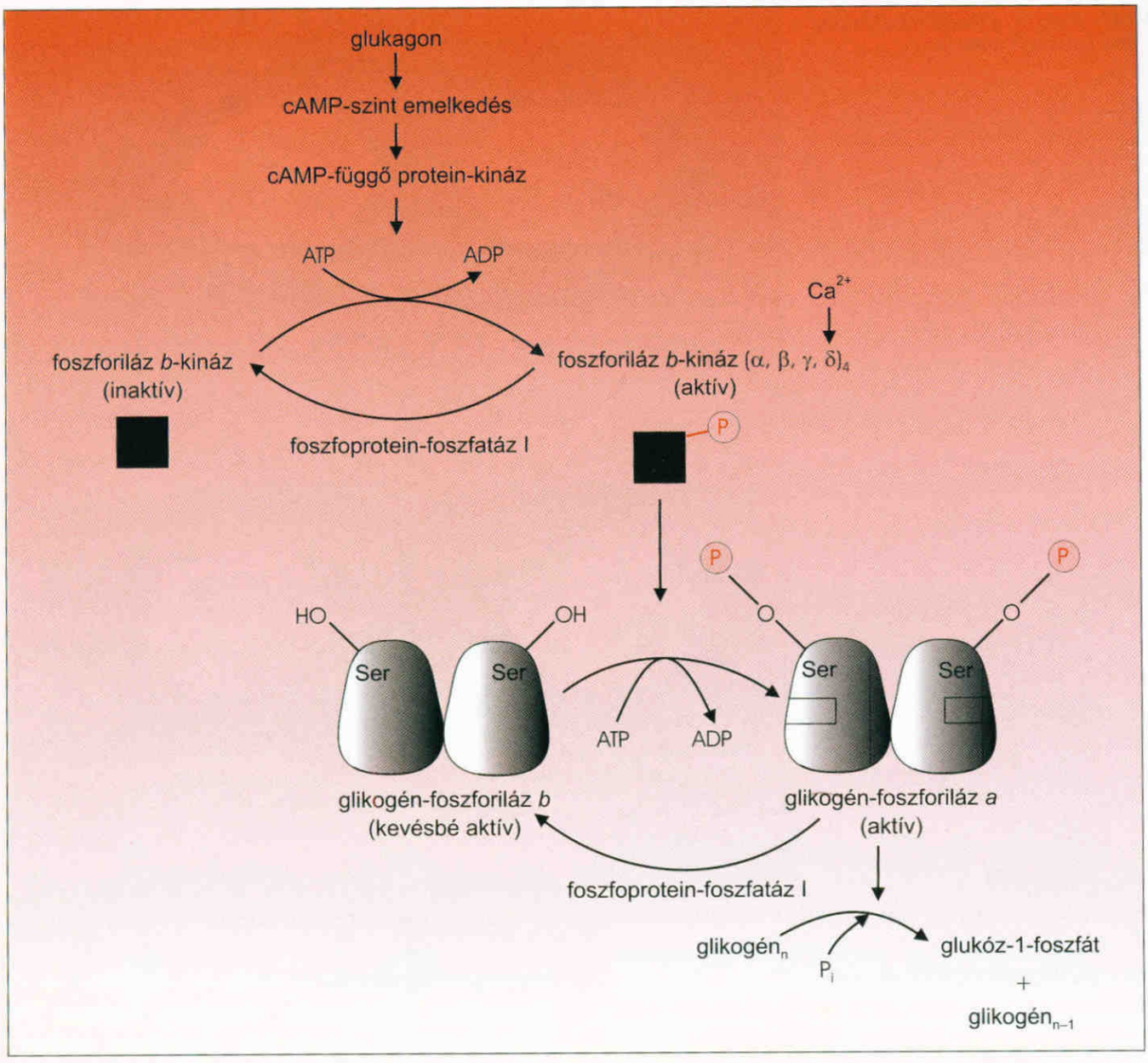
A glikogén-anyagcsere szabályozásának részletes megismerése igen nagy jelentőségű volt mind a cAMP-függő szabályozások mechanizmusának, mind a poszttranszlációs kovalens módosítások regulációs szerepének megértésében. A glikogén-foszforiláz volt az első olyan allosztérikus enzim, ahol a reverzibilis fehérjefoszforiláció szerepét a szabályozásban feltárták. Így ez az enzim az enzimaktivitás szabályozásának gyakran használt „iskolapéldája". Röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokkal megismerték mind az aktív, mind az inaktív enzim háromdimenziós szerkezetét.

A glikogénszintézis és -lebontás két kulcsenzime a **glikogén-szintáz és glikogén-foszforiláz foszforilált és foszforilálatlan** formában létezhet. Mindkét enzim polipeptidláncaiban több Ser-OH foszforilálódik **protein-kináz** hatására, illetve foszfoszerinek vesztik el foszfátcsoportjaikat **foszfoprotein-foszfatáz** hatására. A foszforiláció lényegesen befolyásolja enzimaktivitásukat. A glikogén-szintáz foszforilált formában inaktív, míg a glikogén-foszforiláz foszforilált formában aktív. Így a foszforiláció ellentétesen befolyásolja a két enzim aktivitását.

Az izom- és májglikogén funkciója az anyagcserében különbözik egymástól, a glikogénmetabolizmus szabályozása is eltérő a májban és az izomban.

Izomban a glikogénből felszabaduló glukóz-1-foszfát a glikolízisbe kerül. Az izomglikogén az izomsejt energiaraktára, amely a fokozott izommű-ködés megnövekedett energiaszükségletét hivatott fedezni.

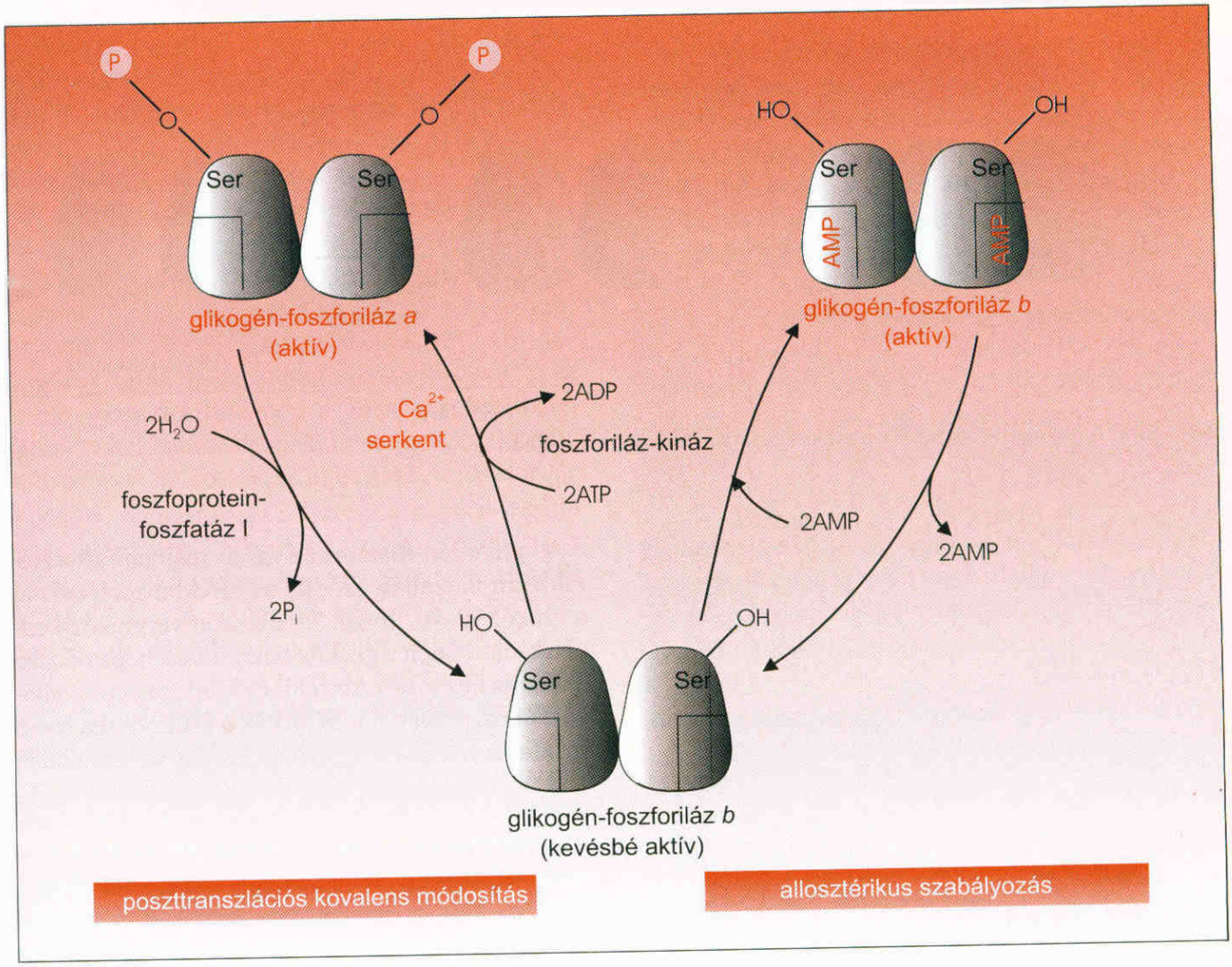
A glikogén-foszforiláz szabályozását az *2-88. ábra* mutatja. Az enzim nyugalmi állapotban zömmel foszforilálatlan **glikogén-foszforiláz *b*** (kevésbé aktív). A foszforiláció a két identikus



2-88. ábra. A glikogén-foszforiláz szabályozása

alegységből álló enzim egy-egy Ser OH csoportján következik be a **foszforiláz *b*-kináz** enzim által katalizált reakcióban. A foszforiláz-kináz 4-féle alegységből álló enzim $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)_4$. Az α- és β-alegység tartalmazza azokat a Ser oldalláncokat, amelyek a cAMP-dependens protein-kináz hatására foszforilálódnak. A δ-alegység 4 Ca^{2+} kötőhellyel rendelkezik és megfelel a kalmodulinnak (e fehérjéről az 5. fejezetben lesz szó). A Ca^{2+}-kötés hatására aktiválódik a γ-katalitikus alegység, defoszforilált enzim esetében is. A foszforilált enzim is csak Ca^{2+} jelenlétében működik teljes aktivitással. Ezért vázizomban a **kalciumot** a foszforiláz *b*-kináz **allosztérikus** aktivátorának tekintik.

Izomkontrakció során az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedik és serkenti a foszforiláz *b* átalakulását foszforiláz *a*-vá. Így alakul ki a **glikogén-foszforiláz *a*** (aktív). A glikogén-foszforiláz *a* és a foszforiláz-kináz defoszforilációval kerül a kevésbé aktív *b* állapotba, ezt a folyamatot a **foszforiláz *a*-foszfatáz** (vagy **foszfoprotein-foszfatáz-1**) enzim katalizálja (2-88. ábra). A foszforilációval tör-

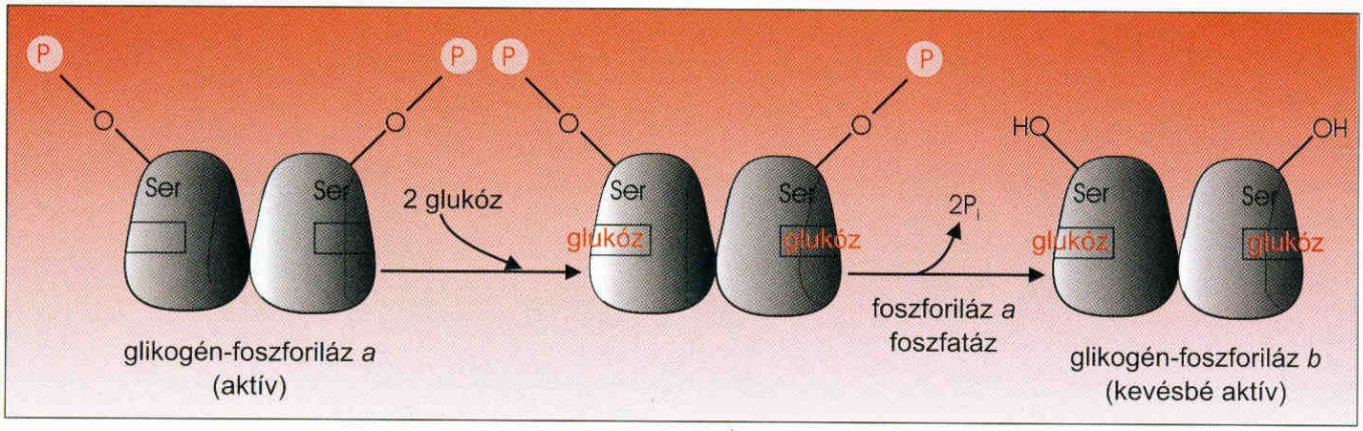


2-89. ábra. A glikogénlebontás kovalens és allosztérikus szabályozása vázizomban

ténő szabályozás másodpercek alatt megy végbe **hormonok** – vázizomban elsősorban az **adrenalin** – hatására, β-receptor közreműködésével, cAMP által mediált szignál transzdukcióval (lásd 5. fejezet). A glikogén-foszforiláz *a* hatására keletkező glukóz-1-foszfát glukóz-6-foszfáton keresztül a glikolízisbe áramlik, fokozódik az ATP-termelés, ami az intenzív izommunka energiaigényét biztosítja.

A hormonális szabályozáson kívül a glikogén foszforiláz *b* **allosztérikusan** is aktiválható **AMP**-vel *(2-89. ábra)*. A foszforiláz *b* AMP-kötőhellyel rendelkezik. AMP hatására ms-ok alatt a foszforiláz *b* aktív lesz, így az allosztérikus szabályozás gyorsabb, mint a poszttranszlációs kovalens modifikáció. Az AMP-koncentráció akkor emelkedik, ha fokozódik az ATP-bontás, pl. intenzív izommunkában. Ha az ATP magas koncentrációban rendelkezésre áll, az AMP nem aktiválja az enzimet, mert az ATP gátolja az AMP kötődését az allosztérikus kötőhelyre. Így ez a szabályozás az AMP/ATP aránytól függ.

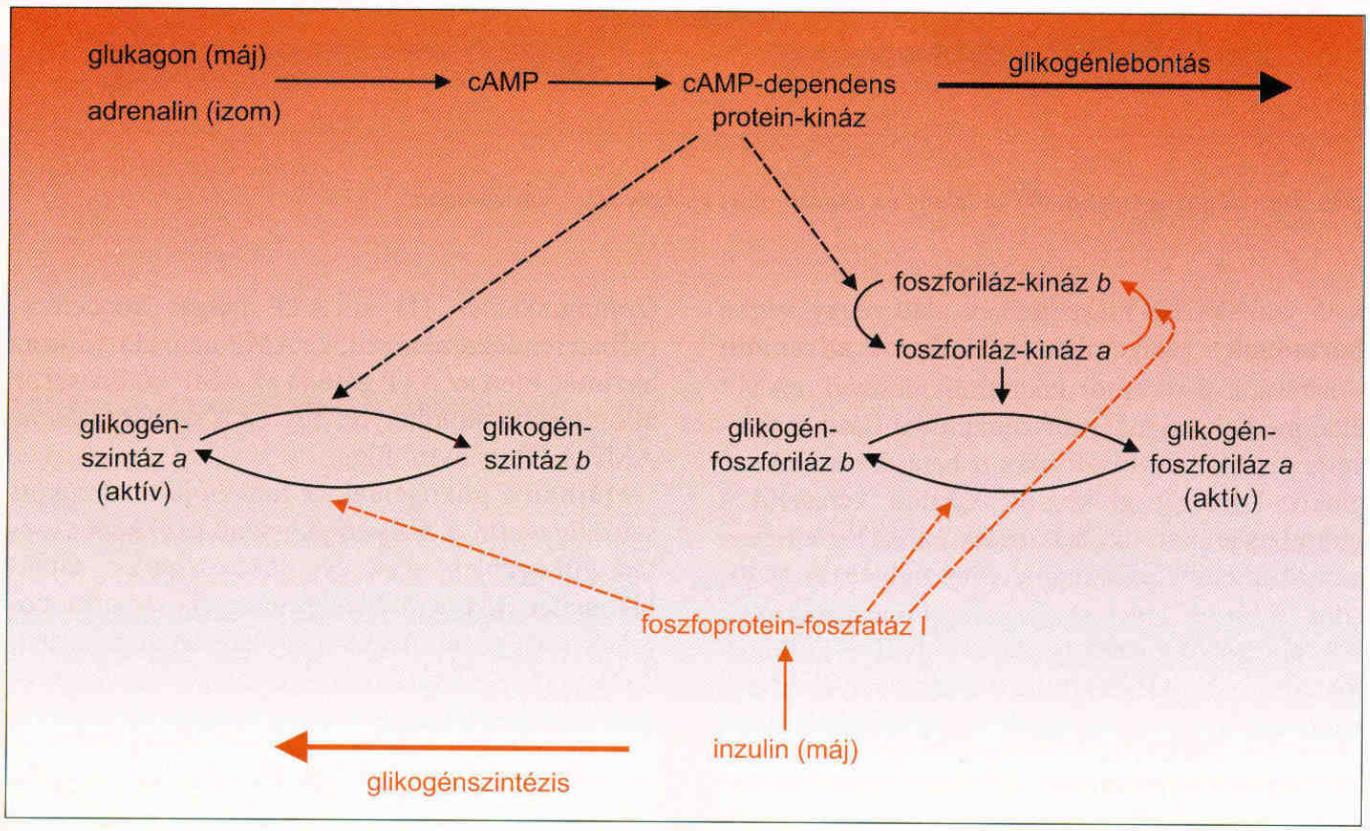
Májban a glikogénraktár funkciója a vércukorszint fenntartása. Ez vércukorszint-csökkenés esetén glikogénlebontást és glukózexportot, táplálékbevitel, illetve többlet esetén glukózimportot és raktározást jelent. A glikogenolízis során felszabaduló glukóz-1-foszfátból, hasonlóan az izomhoz, glukóz-6-foszfát lesz. A glukóz-6-foszfátot azonban a hepatocita endoplazmás retikulum luminális kompartmentjében levő glukóz-6-foszfatáz defoszforilálja és a glukóz a vérpályába szecernálódik. A májban a glikogén-foszforiláz *b*→*a* átalakulás fő **hormonális** serkentője a **glukagon,**



2-90. ábra. A glikogén-foszforiláz a glukóz szenzor funkciója a májban

cAMP mediált jelátvitellel. A cAMP dependens szabályozás mellett a májban is létezik egy, az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció emelkedésén keresztül, α_1-adrenerg receptorokkal mediált jelátviteli út, amelynek révén az adrenalin fokozza a glikogénlebontást. Hasonló hatású a vazopresszin, az oxitocin és az angiotenzin II is.

A glikogén-foszforiláz *a* a májban **allosztérikusan** is szabályozódik; az effektor molekula itt a glukóz *(2-90. ábra)*. Emelkedett vérglukóz-koncentráció esetén a **glukóz** bekerülve a hepatocitába a foszforiláz *a*-hoz kötődik és konformációs változást okoz. Emiatt a foszforiláz *a* szubsztrátja lesz a foszfatáznak és a foszforilált Ser defoszforilálódik,



2-91. ábra. A glikogén-anyagcsere cAMP-függő reciprok szabályozása. *Feketével a glukagon, pirossal az inzulin hatására végbemenő folyamatokat jelezzük*

a foszforiláz *a* foszforiláz *b*-vé alakul és a glikogénlebontás abbamarad. A máj glikogén-foszforiláz *a*-t ezért **glukózszenzor** molekulának tekintik, ami a máj glikogén metabolizmusát a vércukorszintnek megfelelően alakítja.

A **glikogén-szintáz** regulációja ezzel éppen ellentétes. A foszforilálatlan állapotban aktív enzim a **glikogén-szintáz *a***. Többféle – köztük cAMP és kalmodulinfüggő – protein-kináz hatására foszforilálódik és az enzim foszforilált, kevésbé aktív **glikogén szintáz *b***-vé alakul. Aktív állapotba az enzim defoszforilációval, a **foszfoprotein-foszfatáz-1** által katalizált reakció segítségével kerül. A foszfoprotein-foszfatáz aktivitását a foszforiláz *a* gátolja. A foszforiláz *a*→*b* átalakulással a gátló hatás kiesik, így a glukóz hatására nemcsak a glikogenolízis csökken, hanem a glikogénszintézis is fokozódik. A glikogén-szintáz *b* defoszforilálását, így aktiválását az inzulin serkenti. Összefoglalva: a szabályozás azt biztosítja, hogy egyszerre teljes intenzitással ne történjen glikogénszintézis és -lebontás *(2-91. ábra)*.

A glikogénszintézis és -lebontás enzimei, a glikogén partikulum részeként, együtt helyezkednek el. A hormonális, allosztérikus mechanizmusokon, szabályozásokon kívül a fehérje–fehérje kölcsönhatások is igen jelentős szerepet játszanak a sok enzimből álló összetett rendszer működésében.

Glikogéntárolási betegségek

A glikogén-anyagcsere öröklődő rendellenességei a „glycogenosisok", a glikogéntárolási betegségek. Ezeknek a nem túl gyakori betegségeknek a segítségével igen jól értelmezhetők és érthetők a glikogénmetabolizmus összefüggései és szervspecifikus tulajdonságai. Nyolc típusú glycogenosist írtak le, amelyek a glikogén-anyagcsere különböző enzimeinek defectusai. Közülük csak a legismertebb és legfontosabb betegségeket említjük.

von Gierke-kórban egy nem glikogén metabolizmus enzim, a glukóz-6-foszfatáz expressziója igen alacsony a májban, vesében és vékonybélben. A von Gierke-kór volt nemcsak az első leírt glikogéntárolási betegség, hanem az első megismert öröklődő májenzimdefektus is.

A glukóz-6-foszfatáz hiánya következtében a glikogén nem tud lebomlani, mivel nincs meg a glukózszekréció lehetősége. Ezért hypoglykaemia alakul ki, étkezések közötti éhségrohamok jellemzik az állapotot, ketosis és hyperlipaemia lép fel. A máj glikogénszerkezete normális, de a mennyisége igen nagy és hepatomegalia jön létre.

A **McArdle-szindróma** az izom glikogén-foszforiláz hiánya miatt alakul ki. Hiába magas az izom glikogéntartalma, az egyébként normálisan fejlett betegek képtelenek aktív izommunkára. A laktátkoncentráció ilyen esetekben nem emelkedik meg az izomban, illetve a pH nem csökken (lásd 2.7. fejezetet). Az izomglikogén nem tudja fedezni az izomsejt energiaszükségletét és ezt a szerepét nem lehet helyettesíteni mással. Ugyanakkor a betegségből az is következik, hogy a izomglikogén megfelelő hasznosítása nélkül is lehet élni.

Az **Andersen-betegségben** a májban az elágazásokat katalizáló enzim expressziója károsodik. Az így szintetizálódott glikogén kevés elágazást tartalmaz, mennyisége nagy és funkcióját nem képes ellátni. A betegség az első életévben halálos.

A vércukorszint szabályozása

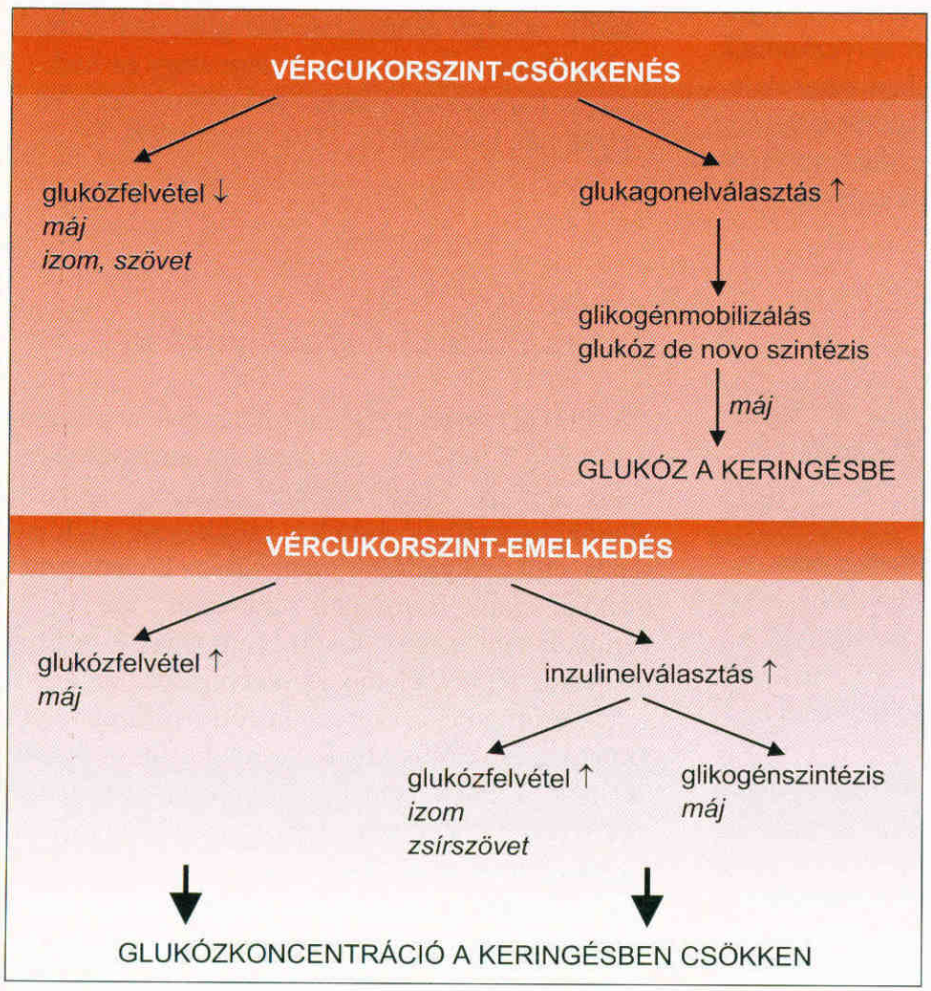
A glukózkoncentráció normálértéke a plazmában 4,5–5,5 mM. A vércukorszint normálértéken belül tartása életfontosságú feladat, mert a glukózkoncentráció hirtelen csökkenése az idegsejtek glukózfüggősége miatt súlyos következményekkel jár. Bármelyik irányban tér el a vércukorszint a normálistól, kompenzáló mechanizmusok lépnek életbe. A szervezetben az egyes sejtek szintjén és a szervek között is összehangolt szabályozások működnek a vércukor normálszinten tartása érdekében. Ebben a szabályozásban a döntő szerepet két hasnyálmirigy eredetű hormon, a glukagon és az inzulin játssza.

A glukagon a Langerhans-szigetek α-sejtjeiben termelődő 29 aminosavból álló polipeptid. Az inzulint, amely két diszulfidkötéssel összekapcsolt

láncból áll (A lánc 21; B lánc 30 aminosav) a β-sejtek termelik.

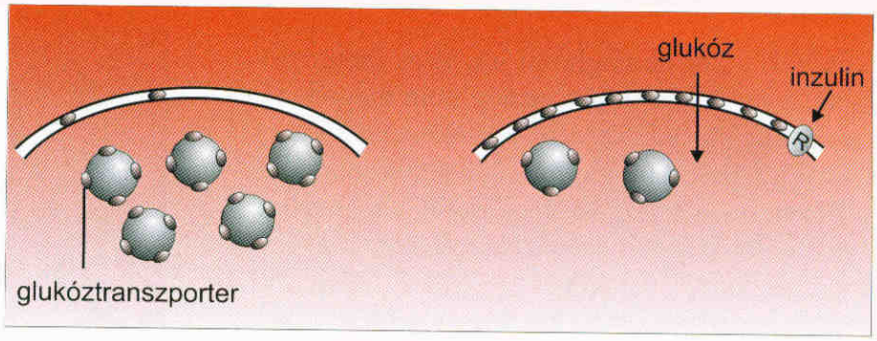
A hormonok nagyobb, prohormonok formájában szintetizálódnak, amelyből proteolitikus hasítással alakulnak ki a hatékony molekulák. Pl. a proinzulinból, amely egy 86 aminosavból álló peptidlánc, proteolítikus hasítás távolít el egy ún. C-peptidet úgy, hogy két lánc jön létre, amelyet az addig intramolekuláris diszulfidhidak fognak össze.

Amikor a vércukorszint lecsökken, csökken az egyes szervek glukózfelvétele, megszűnik a pancreasból az inzulin szekréciója és glukagon mobilizálódik. Csökken a glukózfelvétel az izomban és a zsírszövetben, ahol inzulin szükséges a glukóz transzporter működéséhez. (Viszonylag ép marad a glukózfelvétel pl. az agyban, ahol a glukóz transzporter inzulinindependens és az alacsony K_M-értékű hexokináz a glukózt azonnal foszforilálja, biztosítva a glukózgrádienst). A hepatociták membránjában található glukóz transzporter (GLUT-2) K_M-értéke magas. A transzporter ilyenkor „fordított" irányban működik, mert a sejten belül a glukagon hatására megindulnak azok a folyamatok, amelyek a glukóz szekrécióját eredményezik. Glukagon hatására a májsejtekben aktiválódik a cAMP-dependens, foszforilációs kaszkád és a glikogénből glukóz-1-foszfát keletkezik, miközben a glikogén-szintáz inaktiválódik. A glukóz-1-foszfátból glukóz-6-foszfát keletkezik, ami a glukóz-6-foszfatáz hatására glukózzá alakul. A glukagon a glikolízis–glukoneogenezis egyensúlyát is a glukózkeletkezés irányába tolja el, mert a cAMP-dependens foszforiláció a fruktóz 2,6-biszfoszfát szintjének csökkentésével a glikolízist gátolja és a glukoneogenezist stimulálja. A glikolízis gátlásához hozzájárul a piruvát-kináz foszforilációval történő gátlása is. A májban tehát ilyenkor glukóz keletkezik – a glikogénből és a glukoneogenezisben egyaránt –, s ez a glukóz transzporteren keresztül a keringésbe kerül *(2-92. ábra)*.

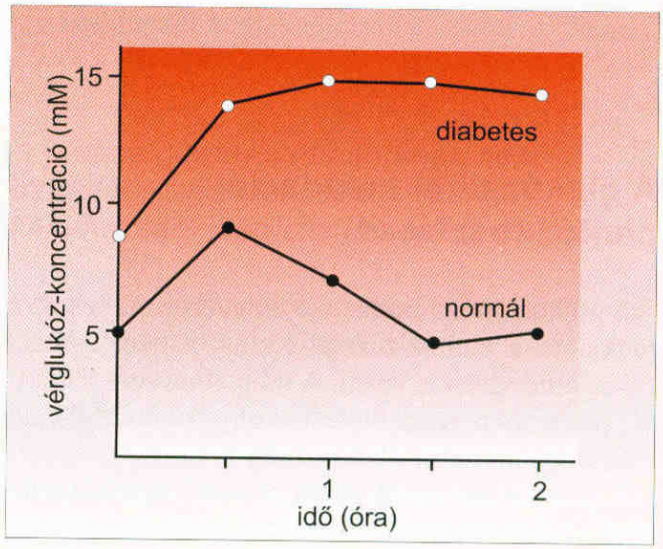


2-92. ábra. A glukagon- és inzulinelválasztás szerepe a vércukorszint szabályozásban

2-93. ábra. A glukóz transzporter plazmamembránba kerülése inzulin hatására az izom- és zsírszövetben

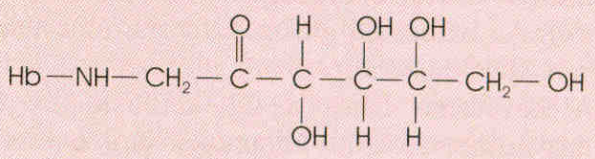


A vércukorszint-emelkedés, ami étkezések után fiziológiás, éppen ellentétes hatású. Azonnali – és hormonoktól nem függő – hatás a májsejtekbe történő glukózfelvétel-fokozódás, a GLUT-2 transzporteren keresztül. A glukóz-transzportot nemcsak az teszi lehetővé, hogy a transzporter magas K_M-értékű és nagy kapacitású, hanem az is, hogy aktiválódik a szintén magas K_M-értékű glukokináz és a felvett glukózt azonnal foszforilálja. Ilyenkor válik jelentőssé, hogy a májban a többi szervtől eltérően magas K_M-értékű hexokináz izoenzim található. Magasabb vércukorszint mellett a pancreas β-sejtek glukózfelvétele is fokozódik és inzulinelválasztás történik, miközben az α-sejtekből csökken a glukagonelválasztás. Az inzulin stimulálja a glukózfelvételt a harántcsíkolt izomban és az adipocitákban. A glukóz transzporter ezekben a sejtekben inzulin hiányában intracellulárisan vezikulák membránjában található, inzulin hatására pedig a plazmamembránba kerül *(2-93. ábra)*. Az inzulin azonnali vércukorszint-csökkentő hatását az izom és a zsírszövet fokozott glukózfelvétele magyarázza. (Az inzulin nem befolyásolja a máj glukóztranszportját, ennek fokozódását közvetlenül a vércukorszint-emelkedés okozza). Az inzulin hatása a májsejtek glukózmetabolizmusára a glukagonéval ellentétes. A hatásmechanizmus nem teljesen tisztázott, de az eredmény a foszforilációval regulálható enzimek defoszforilációja. Ez a glikogén-foszforiláz inaktiválását és egyidejűleg a glikogén-szintáz aktiválását jelenti, továbbá a glikolízis stimulálását a fruktóz-2,6-biszfoszfát szintjének emelése következtében. A májsejtek ilyenkor a glukózt a glikogénbe építik vagy a glukózból zsírsavakat szintetizálnak, tehát hatékonyan távolítják el a glukózt a keringésből. Inzulin hatásának tulajdonítható, hogy glukózfelvételt követően két órán belül visszaáll a vércukorszint a normálértékre. Inzulin hiányában, diabetes mellitusban a már eleve magasabb vércukorszint a glukózfelvételt követően nagymértékben emelkedik és a kétórás vizsgálati perióduson belül alig csökken *(2-94. ábra)*.



2-94. ábra. Glukóztolerancia-teszt. *A vér glukózkoncentrációjának változása 100 g glukóz éhgyomorra történő elfogyasztását (nulla időpont) követően*

Tartósan magas vércukorszint esetén spontán (nem enzimatikus) reakcióban a glukóz az aldehidcsoporton keresztül a hemoglobin β-lánc NH_2 terminális aminocsoportjához kötődik (Schiff-bázison keresztül)



és glikozilált hemoglobin jön létre (hemoglobin A_{1C}). A glikozilált hemoglobin megjelenése elhúzódó emelkedett vércukorszint jele, s akár a teljes hemoglobin 12%-át alkothatja. A diabeteses betegek kezelése során a glikozilált hemoglobin mennyiségének csökkenése a terápia hatékonyságát jelzi.

A diabetes mellitus késői szövődményeinek kialakulásában (retinopathia, nephropathia, neuropathia, kardiológiai szövődmények) szerepet tulajdonítanak más glikozilált fehérjéknek is, amelyek fizikokémiai tulajdonságai a glikozilálás hatására megváltoznak. Ilyenek például a kollagén, a fibrin és az antitrombin III. (lásd 6.3. és 6.5. fejezetet). A diabeteses cataracta patomechanizmusában az α-krisztallin glikozilálása a szemlencsében bizonyított.

A glukóz direkt oxidációja, pentóz-foszfát-út

A glukóz direkt oxidációja elnevezés mellett ez a reakcióút a pentóz-foszfát-ciklus, a pentóz-foszfát-út elnevezést is viseli. A több elnevezés azt jelzi, hogy több rendeltetésű, különböző módokon megvalósuló reakciók sorozatáról van szó.

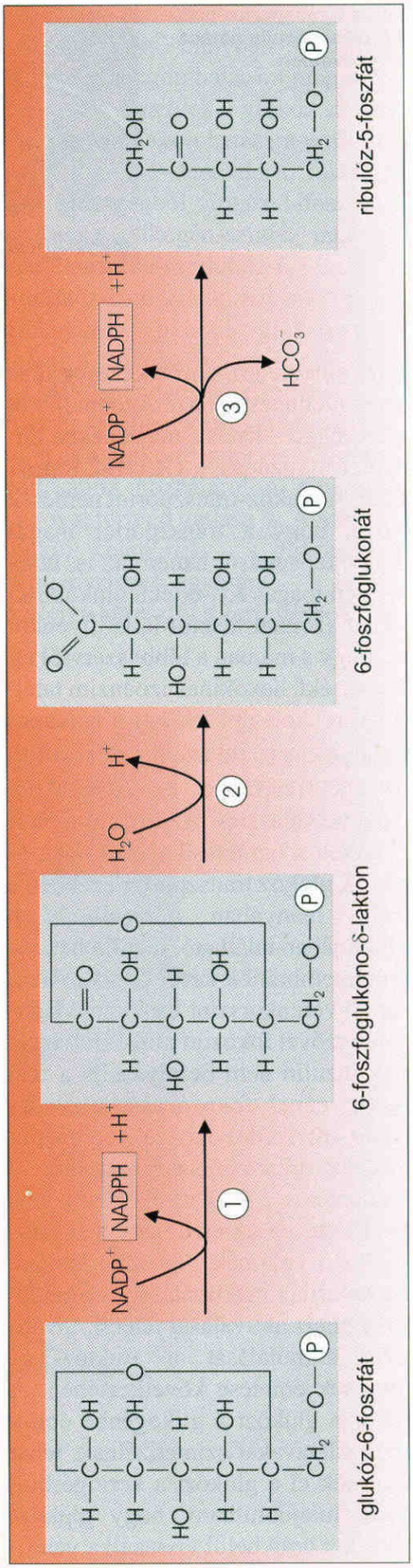
A pentóz-foszfát-út során $NADP^+$ redukálódik, illetve ribóz-5-foszfát termelődik glukóz-6-foszfátból. A citoszolban lejátszódó reakciósorozat két részre osztható, az oxidatív szakaszra és a nem oxidatív szakaszra.

A glukóz direkt oxidációjának oxidatív szakasza

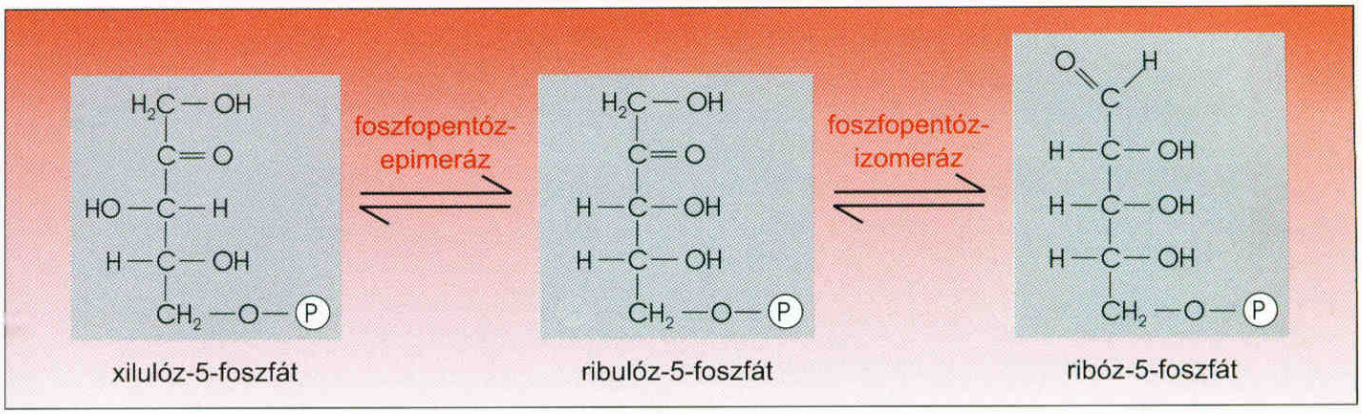
A pentóz-foszfát-út első, elkötelező lépése a glukóz-6-foszfát átalakulása 6-foszfoglukono-delta-laktonná.

A reakció irreverzibilis oxidoredukció, amelyet a **glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz** katalizál *(2-95. ábra)*. Az oxidálódó glukóz-6-foszfátról a hidrogén $NADP^+$-re kerül.

A következő lépés a C1 karboxil- és C5 hidroxilcsoport közötti intramolekuláris észterkötés (laktongyűrű) felszakadásával – a reakciót a



2-95. ábra. A pentóz-foszfát-út oxidatív szakasza. *(1) glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz; (2) laktonáz; (3) 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz*



2-96. ábra. A ribulóz-5-foszfát izomerizációja és epimerizációja

laktonáz katalizálja – a 6-foszfoglukonát képződése. Ez a reakció újabb dehidrogenálást készít elő. A **6-foszfoglukonát-dehidrogenáz** által katalizált oxidoredukció részben hasonlít az első dehidrogenálásra, amennyiben a hidrogénakceptor itt is a $NADP^+$, részben különbözik attól, mert ez egyúttal a szubsztrát dekarboxilezését eredményezi (oxidatív dekarboxilálás). Így a hexóz pentózzá – D-ribulóz-5-foszfáttá – rövidül.

Az oxidatív szakasz során tehát két NADPH, illetve egy CO_2 (HCO_3^-) képződik, miközben egy glukóz-6-foszfátból D-ribulóz-5-foszfát lesz.

A D-ribulóz-5-foszfát két módon alakulhat tovább *(2-96. ábra)*:

1. izomerizációval a **foszfopentóz-izomeráz** szubsztrátjaként D-ribóz-5-foszfát képződik. A reakció mechanizmusa hasonló a glikolízis során megismert többi, aldóz-ketóz (glukóz-6-foszfát ↔ fruktóz-6-foszfát, glicerinaldehid-3-foszfát ↔ dihidroxi-aceton-foszfát) izomerizációhoz.
2. D-xilulóz-5-foszfát képződik belőle a **foszfopentóz-epimeráz** által katalizált reakció során.

A D-ribóz-5-foszfát a nukleotidszintézis (lásd 2.5. fejezet) előanyaga.

Abban az esetben azonban, ha a sejtben erre éppen nincsen igény, további reakciók segítségével glikolízis intermedierekké alakulhat.

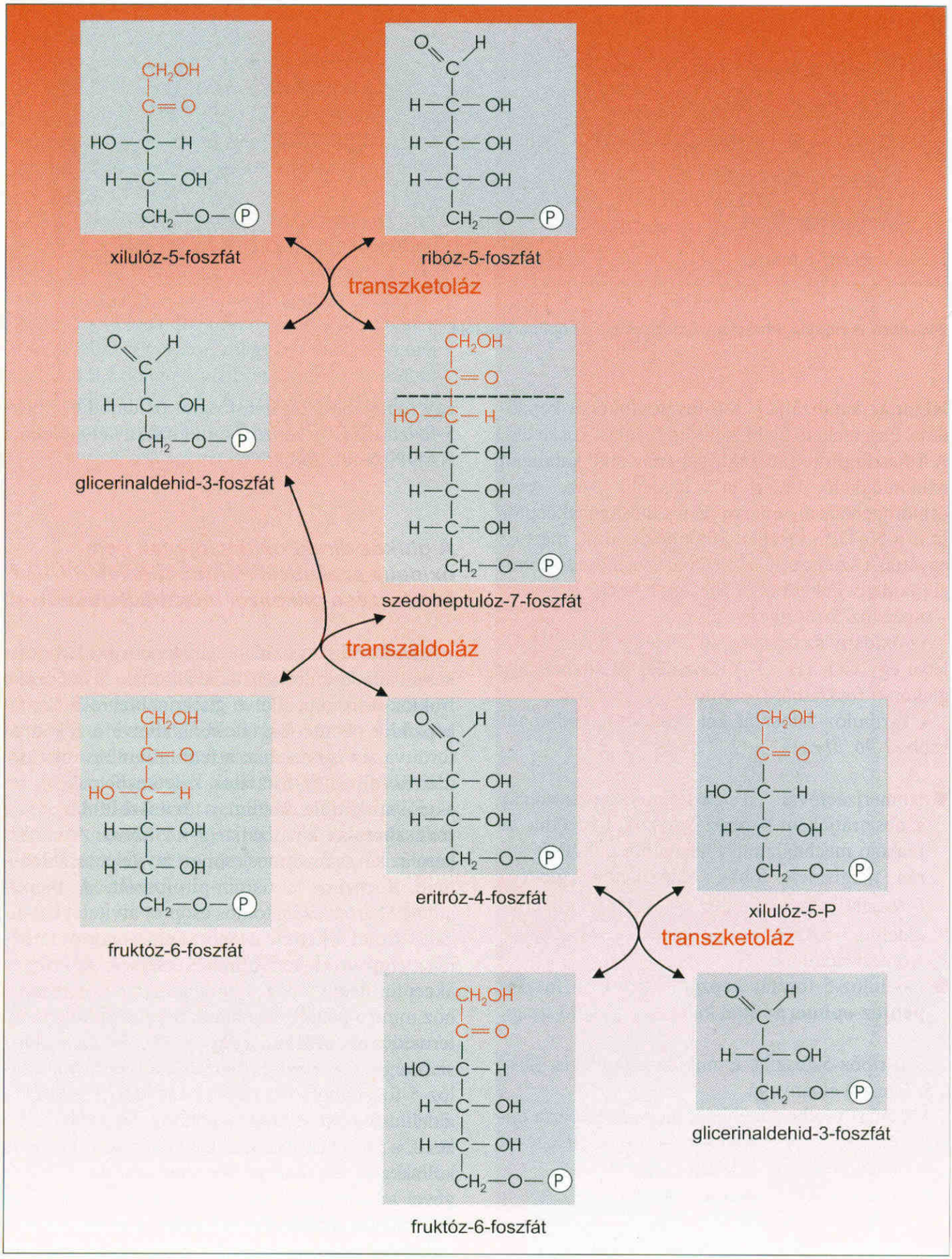
Az oxidatív út eredményeképpen:

$$\text{glukóz-6-foszfát} + 2NADP^+ + H_2O \rightarrow$$
$$\text{ribóz-5-foszfát} + 2NADPH + 2H^+ + CO_2,$$

egy molekula glukóz-6-foszfát oxidálódik, ribóz-5-foszfát és CO_2 képződik, miközben két molekula $NADP^+$ redukálódik.

A glukóz direkt oxidációjának nem oxidatív szakasza. Pentóz-foszfát keletkezése glikolízis intermedierekből

A glukóz direkt oxidációjának nem oxidatív szakaszát reverzibilis reakciók alkotják. Ezek során fruktóz-6-foszfát, illetve glicerinaldehid-3-foszfát képződik pentóz-foszfátokból, illetve a folyamat fordítva is végbemehet: a fenti glikolízis intermedierekből pentóz-foszfátok keletkezhetnek. A reakciókat kétféle enzim, a **transzaldoláz** és a **transzketoláz** katalizálja *(2-97. ábra)*. A transzketoláz két szénatomos csoport átvitelét teszi lehetővé, koenzime a tiamin-pirofoszfát. A transzaldoláz három szénatomos csoport átvitelét katalizálja. Mind a kétféle csoport ketocsoportot tartalmaz, így a donor minden esetben ketóz, az akceptor pedig aldóz. Ebből adódóan a kiinduláshoz mind a pentóz-foszfátok, mind a glikolízis intermedierek oldaláról egy ketóz és egy aldóz szükséges. A pentóz-foszfátokból indulva xilulóz-5-foszfátból és ribóz-5-foszfátból glicerinaldehid-foszfát és szedoheptulóz-7-foszfát keletkezik a transzketoláz által katalizált reakcióban. A keletkezett két intermedier transzaldoláz segítségével továbbalakul fruktóz-6-foszfáttá és eritróz-4-foszfáttá. A fruktóz-6-foszfát további sorsa a glikolízis (glukoneogenezis) állapotának függvénye. Az eritróz-4-foszfát további metabolizmusá-



2-97. ábra. A pentóz-foszfát-út nem oxidatív szakasza

hoz egy újabb ketopentóz – xilulóz-5-foszfát – kell, valamint transzketoláz. A reakció eredménye két glikolízis intermedier, a fruktóz-6-foszfát és a glicerinaldehid-3-foszfát.

Összefoglalva, két molekula xilulóz-5-foszfátból és egy molekula ribóz-5-foszfátból két molekula fruktóz-6-foszfát, illetve egy molekula glicerinaldehid-3-foszfát keletkezik három reverzibilis reakció során. Ebből következően mindez fordítva is végbemehet.

2 xilulóz-5-foszfát + ribóz-5-foszfát ↔ 2 fruktóz-6-foszfát + glicerinaldehid-3-foszfát

A pentóz-foszfát-út szabályozása, jelentősége, lefolyásának különböző formái

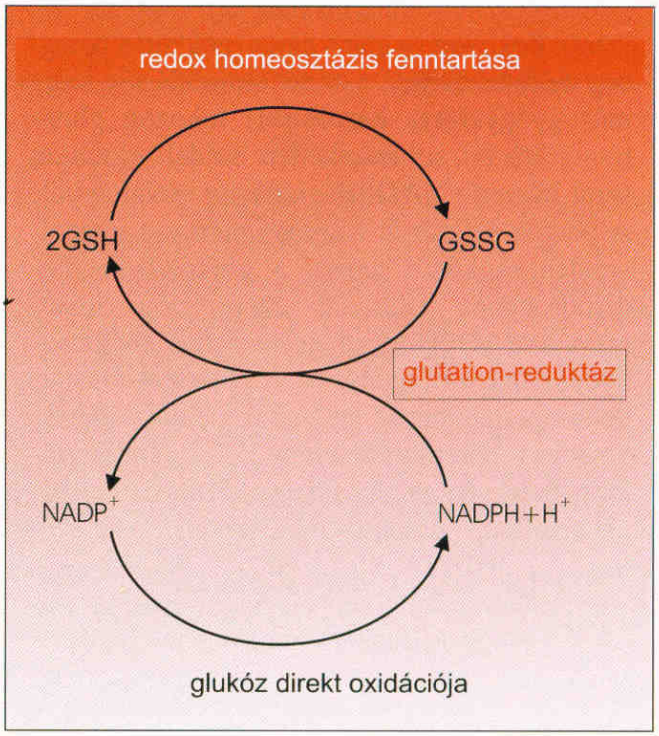
A pentóz-foszfát út jelentősége kettős, egyrészt **NADPH**-termelés, másrészt a **pentóz-foszfát szintézise.** A NADPH-ra sokféle bioszintetikus folyamat redukciós lépésében van szükség, ilyen pl. a zsírsavak, a koleszterin, a szteroidhormonok szintézise. A $NADP^+$ redukciójának ez az egyik legfontosabb helye. A ribóz-5-foszfát, illetve származékai nélkülözhetetlenek a nukleotidok, nukleinsavak szintézisében. A $NADP^+$-redukció és a pentóz-foszfát-termelés igénye azonban nem mindig esik egybe. Vannak esetek, amikor NADPH-ra van szükség, pentóz-foszfátra azonban nem és fordítva. A reakcióút különböző módokon működhet a sejt különböző metabolikus állapotainak megfelelően.

Irreverzibilis, elkötelező és ily módon sebességmeghatározó lépés az oxidatív szakaszban a glukóz-6-foszfát dehidrogenálása. Ha a pentóz-foszfát-igény a domináns és NADPH-ra nincs szükség, a nem oxidatív szakasz aktív, az oxidatív szakasz nem működik. Ilyenkor a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz – amelynek aktivitását elsősorban a $NADP^+$/NADPH arány szabályozza – gátlás alatt áll. Pentóz-foszfát fruktóz-6-foszfátból és glicerinaldehid-3-foszfátból keletkezik.

Azokban az állapotokban, amikor NADPH-ra és pentóz-foszfátra egyaránt szükség van, az oxidatív szakasz működik egyedül, a nem oxidatív szakaszra nincsen igény. Megjegyzendő körülmény, hogy az oxidatív szakasz enzimei indukálható enzimek, amelyek például más NADPH-igényes folyamatok enzimeivel együtt (pl. citokróm P450 enzimek) koordinatíven indukálódnak. Fokozott nukleinsavszintézis – ennek megfelelően fokozott nukleotidfogyás – esetén is az oxidatív szakasz intenzívebb működése szükséges.

Végül lehetnek esetek, amikor nincs pentóz-foszfátra igény, NADPH viszont kell. Ez az az eset, amikor a reakcióút cikluskénti működik; a glukóz-6-foszfátból keletkezett pentóz-foszfátok tovább alakulnak fruktóz-6-foszfáttá, illetve glicerinaldehid-3-foszfáttá, amelyek, mint glikolízis/glukoneogenezis intermedierek visszaalakulnak glukóz-6-foszfáttá. Ez egyben valóban a glukóz direkt oxidációja. Hat ciklus alatt a glukóz valamennyi szénatomja CO_2-dá oxidálódik, miközben 12 molekula $NADP^+$ redukálódik NADPH-vá.

Különböző típusú sejtekben a ciklus különbözőképpen regulált és intenzitásának mértéke eltérő. Alacsony a ciklus intenzitása például izomsejtekben, ugyanakkor magas a zsírszövetben a zsírsavszintézis fokozott NADPH-igénye miatt, és daganatokban az intenzív nukleinsavszintézis miatt emelkedett pentóz-foszfát-igényt kompenzá-



2-98. ábra. A glukóz direkt oxidációjának szerepe a redox homeosztázis fenntartásához szükséges redukált glutation (GSH) szint fenntartásában *(GSSG = oxidált glutation)*

landó. Intenzív a pentóz-foszfát-ciklus azokban a sejtekben, szövetekben is, ahol a glutation fontos a sejthomeosztázis biztosításában, így pl. vörösvértestekben, májszövetben. Az oxidált glutationt (lásd 2-16. ábra) a glutation-reduktáz redukálja, a reakcióban az elektrondonor a NADPH. Ezért nem megfelelő NADPH-ellátottság esetén a redukált glutation szintje csökken *(2-98. ábra)*.

A pentóz-foszfát-ciklus működésének megváltozásával összefüggő kórképek

A **glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz-hiány** vörösvértestekben kb. 100 millió embert érintő öröklődő betegség. Fő tünete a rendszerint gyógyszer által indukált hemolitikus anaemia. A glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz csökkent expressziója vörösvértestekben – ahol nincs mitokondrium, ezért a pentóz-foszfát-út jelentősége a NADPH-termelésben kiemelten fontos – különösen csökkenti a $NADP^+$ fokozott redukciójának lehetőségét. Vörösvértestekben a NADPH elsősorban az antioxidáns redukált glutation szint fenntartásához kell (lásd 2.7. fejezet). Fokozott oxidáns hatás (például a betegség felfedezéséhez vezető antimaláriás vagy más gyógyszeres kezeléssel) fokozott glutationoxidációt, az emelkedett oxidált glutation szint intenzív NADPH-oxidációt eredményez. A pentóz-foszfát-út azonban nem tud intenzívebben működni éppen a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz csökkent expressziója miatt, ezért a NADPH-termelés nem tud alkalmazkodni a fokozott igényhez. A glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz-hiány jellemző példája annak, hogy egy genetikai defektus akkor manifesztálódik betegségben, ha ezt egy környezeti terhelés kiváltja. A defektus prediszponáló tényező. Más genetikai okok miatt bekövetkező anaemiához hasonlóan, maláriás fertőzés esetén a glukóz 6-foszfát-dehidrogenáz-hiány is szelekciós előny, mivel az élősködő szaporodásának ez nem kedvez.

A **Wernicke–Korsakoff-szindróma** szintén olyan kórkép, amikor a genetikai ok (a transzketolázhiány) meghatározott környezeti feltétel (B-vitamin-hiány–TPP) esetén manifesztálódik betegséggé. A kórkép krónikusan alultáplált, alkoholista betegeken fejlődik ki főként neuropszichiátriai tüneteket okozva.

Bioszintetikus folyamatok a szénhidrátok anyagcseréjében. Glikoproteinek, proteoglikánok szénhidrátláncának szintézise

A szénhidrát-anyagcsere bioszintetikus folyamatai glukóz-1-foszfátból vagy fruktóz-6-foszfátból indulnak ki. A *2-99. ábrán* összefoglaljuk a legfontosabb bioszintetikus folyamatokat.

A bioszintetikus lépések kiindulási pontja a nukleotid cukorszármazékok képződése. Az UDP-glukóz képződésével a glikogén-anyagcsere tárgyalásánál foglalkoztunk. Elsősorban UDP-cukrok, de ezenkívül CMP- és GDP-származékok is szerepelnek az „aktivált" nukleotidcukrok között.

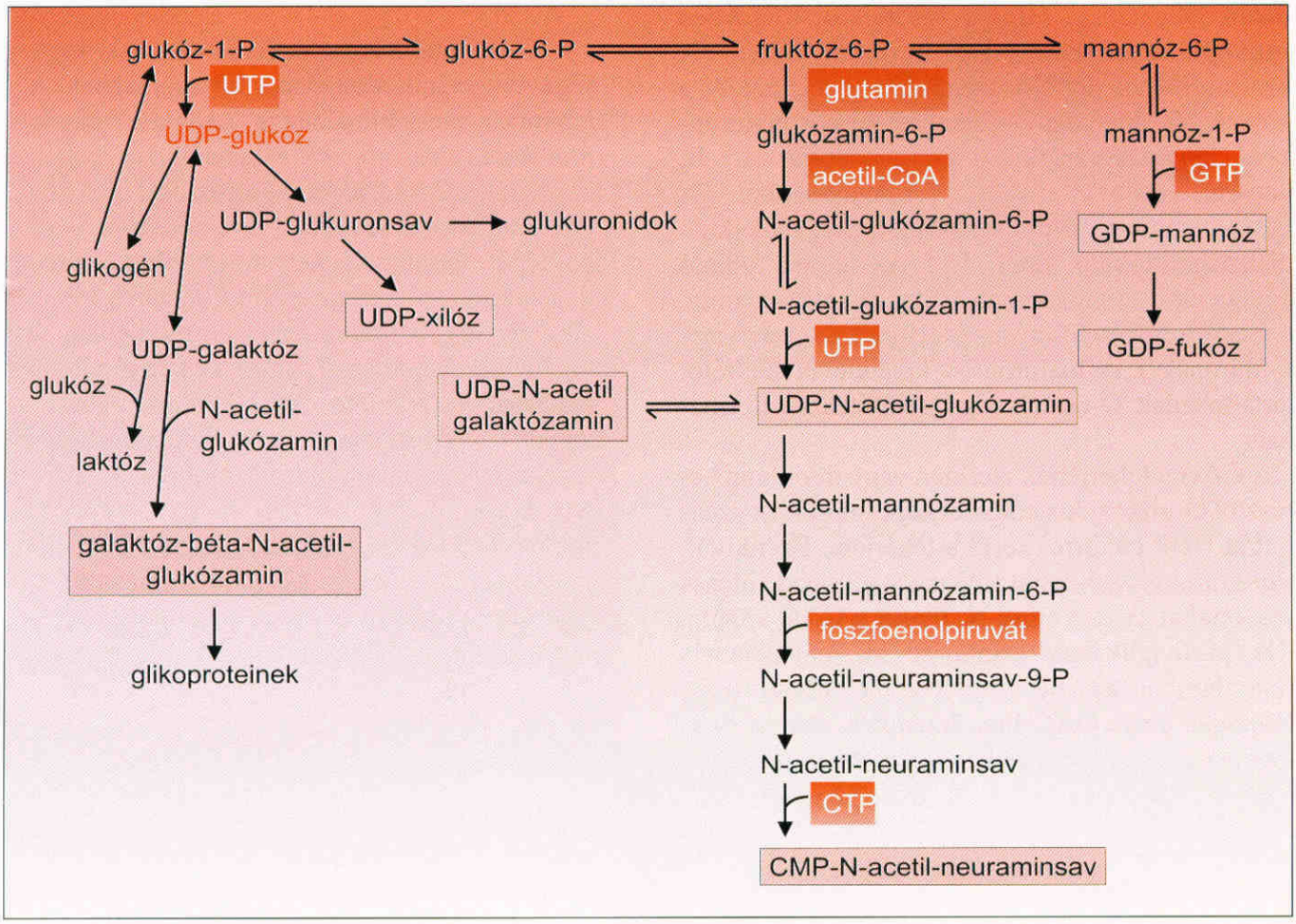
Az **UDP-glukóz** fontos elágazási pont a szénhidrátszármazékok képződésében. UDP-glukózból **UDP-galaktóz** képződhet epimerizációval. Az **UDP-glukóz-dehidrogenáz** által katalizált reakcióban **UDP-glukuronsav** képződik UDP-glukózból.

$$\text{UDP-glukóz} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow \text{UDP-glukuronsav} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$$

Az UDP-glukuronsav részben glukuronidáció kofaktora (lásd 2.6. fejezet), részben különböző más metabolikus utak kiindulópontja (így a C-vitamin-szintézisnek is, az ehhez szükséges enzimek azonban emberben hiányoznak).

Az **UDP-xilóz**, amely a glikoproteinek szénhidrátláncának alkotórésze, dekarboxilezéssel keletkezik UDP-glukuronsavból.

A glikoproteinek és proteoglikánok szénhidrátláncában előforduló **aminocukrok** aminocsoportja glutaminból származik. A különböző aminocukrok a glikoproteinek, glikoszfingolipidek és glukózaminoglikánok fontos alkotórészei. A legfontosabb aminocukrok a hexózaminok –



2-99. ábra. Szénhidrátok bioszintézisének fontosabb útjai. *A glikoproteinek, proteogikánok szénhidrátláncának egyes alkotóit külön kiemeltük*

glukózamin, galaktózamin és mannózamin és a 9 szénatomos sziálsav (N-acetil-neuraminsav). A szintézis során az aminocsoport-donor a glutamin. Az aminocukrok zömmel N-acetilált formában fordulnak elő, az acetildonor az acetil-CoA.

A **glikoproteinek** szénhidráttartalma 1–85% között ingadozhat. A humán glikoproteinek hétféle monoszacharidot tartalmaznak. Közülük a legjelentősebbek az oligoszacharidlánc végén elhelyezkedő N-acetil-neuraminsav, amely rendszerint galaktózhoz, vagy N-acetil-galaktózaminhoz kapcsolódik. Ezenkívül a glikoproteinek szénhidrát oldalláncában glukóz, mannóz, fukóz és N-acetil-glukózamin fordul elő. Az oldalláncok komponensei először „aktiválódnak" és aztán kerülnek rá az oldalláncra. Az egyes „aktivált" nukleotidcukrok képződését a 2-99. ábra mutatja. A szénhidrátoldalláncra egymás után kerülnek rá a komponensek. A különböző **glikozil-transzferázok** által katalizált glikozilációs lépések a Golgi-hálózat lumenében történnek, az UDP-cukrok antiport-rendszereken keresztül transzportálódnak a citoszolból a lumenbe. A nukleotidcukor belépéséhez a vonatkozó nukleotid kilépése társul.

A szénhidrátoldallánc a polipeptidlánc szerinjéhez, treoninjához vagy hidroxilizinjéhez O-glikozidos kötéssel, vagy aszparaginhoz N-glikozidos kötéssel kapcsolódik. Ennek megfelelően O-kötött és N-kötött glikoproteineket különböztetnek meg. Egy fehérjének több mint 30 oligoszacharid-lánca lehet, amelyek hosszúsága különböző.

A glikoproteinek szénhidrátláncát specifikus **glikozidázok** bontják.

Proteoglikánok azok a fehérjék, amelyek kovalensen kötött glukózaminoglikánokat (GAG) tartalmaznak. Tulajdonságaik inkább a poliszachari-

dokra jellemzőek, mint a fehérjékre. Régebben **mukopoliszacharidoknak** nevezték őket. A proteoglikánok 95%-a szénhidrát lehet, amely a következő glukózaminoglikánokból áll: hialuronsav, kondroitin-szulfát, keratán-szulfát I, II, heparin, heparán-szulfát, dermatán-szulfát. A GAG nem elágazó poliszaharid, amely ismétlődő di-szacharidokból épül fel. Az egyik alkotó aminocukor D-glukózamin vagy D-galaktózamin, a másik komponens uronsav (D-glukuronsav vagy L-iduronsav). A hialuronsav kivételével szulfátot tartalmaznak O-észter vagy szulfátészter formában.

A GAG a fehérjéhez szerinen vagy treoninon keresztül O-glikozidos kötéssel kapcsolódik. A szénhidrát UDP-cukorról kerül a fehérjére. Ezenkívül, a glikoproteinekhez hasonlóan, N-glikozid kötés is kialakulhat az Asn amid-N, illetve a GAG között.

A proteoglikánok szintézise az endoplazmás retikulumban történik, illetve a Golgi-hálózatban fejeződik be. A GAG-lánc szintézise után további módosítások történhetnek, például szulfatálás.

A GAG lebontása specifikus enzimek segítségével történik általában a lizoszomákban. A lebontást endoglikozidázok, exoglikozidázok, proteázok, deacetilázok és szulfatázok katalizálják. A lebontó enzimek öröklődő hiánya a GAG felhalmozódásához vezet. Számos ilyen kórképet leírtak, ezeket **mucopolysaccharidosisoknak**, illetve mucolipidosisoknak nevezik. Ezeket a betegségeket proteoglikánok tökéletlen lebontása során képződő oligoszacharidok felhalmozódása jellemzi a szövetekben. A dermatán-, illetve heparán-szulfát lebontását katalizáló hidrolázok hiánya különféle kóros állapotokat eredményez, amelyek súlyos, halálos betegségek lehetnek. Szellemi visszamaradottság és különböző más tünetegyüttesek alakulnak ki. A mucopolysaccharidosis ritka, 30 000 születésből egy ilyen beteg jön a világra.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerzők köszönetet mondanak Garzó Tamásnak, Dr. Szikla Károlynak és Dr. Tretter Lászlónak.

2.3. A lipidek anyagcseréje

Ádám Veronika

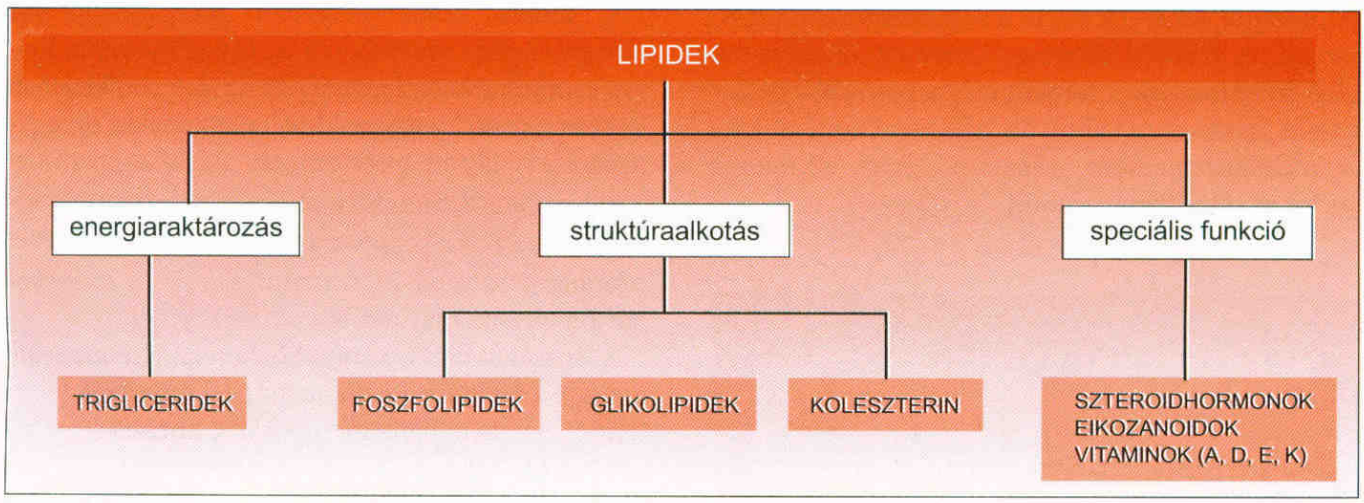
A lipidek olyan eltérő felépítésű és funkciójú molekulák, amelyek közös tulajdonsága, hogy vízben nem vagy csak nagyon rosszul oldódnak, ezért szövetekből csak apoláros oldószerekkel vonhatók ki. Az emberi szervezetben számos fontos feladatot látnak el, amelyek közül a legfontosabbak:

1. A metabolizmusban játszott szerep; a zsírsavak oxidációja a sejtek számára energiát szolgáltat, illetve a trigliceridek formájában a zsírok biztosítják az energiaraktározás leggazdaságosabb formáját.
2. A sejtmembrán felépítésében meghatározó szerepet játszanak. A membránok alapszerkezete egy lipidstruktúra, amely a membránok barrier tulajdonságát biztosítja és megfelelő közeget jelent a fehérjék számára.

Mennyiségileg kevésbé, ám az emberi szervezet működése szempontjából nem kevésbé fontos a szteroidhormonok, a zsírsavakból keletkező másodlagos messengerek és mediátorok, az epesavak vagy a felületaktivitással bíró lipidek szerepe. (Oldékonysági tulajdonságaik miatt a lipidekhez sorolhatók még az A-, D-, E-, valamint a K-vitaminok is.)

Hidrofób tulajdonságuk következtében a zsírok legtöbb funkciója (pl. membránstruktúra felépítése), raktározása (triglicerideseppek az adipocitákban) és szállítása (lipoproteinek) a vizes környezettől elkülönülve, kompartmentekben történik.

A *2-100. ábra* a lipidek funkció szerinti felosztását mutatja.



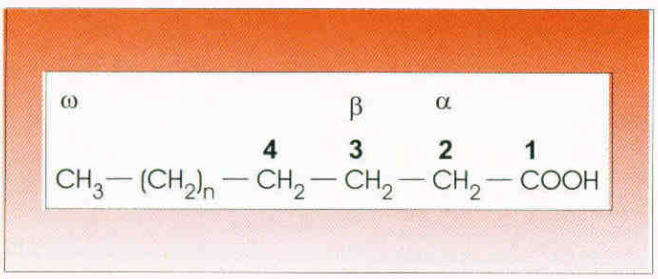
2-100. ábra. A legfontosabb lipidek és funkcióik

A legfontosabb zsírsavak és jelölésük

A legtöbb lipidtermészetű anyag vagy zsírsavat tartalmaz, vagy zsírsavakból származik. Kisebb mennyiségben a zsírsavak nem észter formában, nagyrészt azonban komplexebb molekulák részeként, zsírsavészterekként fordulnak elő. A lipidek két legfontosabb funkciója szempontjából is meghatározó a zsírsavak szerepe; oxidációjuk során a sejtekben (elsősorban a máj és izomszövetben) felszabaduló energia ATP-szintézist eredményez, a triglicerídek részeként a legfontosabb energiaraktárként szolgálnak, a foszfolipidek (és szfingolipidek) részeként pedig meghatározzák a membránok felépítését és számos tulajdonságát. Részt vesznek a glikolipidek, a prosztaglandinok és a koleszterinészterek alkotásában is.

A zsírsavak egy szénhidrogénláncból és egy terminális karboxilcsoportból állnak, amelyet legegyszerűbben a CH_3-$(CH_2)_n$-COOH képlettel lehet leírni. A szénhidrogénlánc hossza különböző lehet, így önkényes felosztás alapján rövid szénláncú a 2–5, közepes szénláncú a 6–11, hosszú szénláncú a 12–26 szénatomot tartalmazó zsírsav. A szénhidrogénlánc hidrofób karaktere meghatározó a zsírsavak két legfontosabb funkciója szempontjából. Ez a tulajdonság határozza meg a membránokat felépítő lipidekben a zsírsavak orientációját, így végső soron a membránok alapszerkezetét, és ez teszi lehetővé azt is, hogy a triglicerídekben az energiaraktározásnak egy gazdaságos és koncentrált formája valósul meg.

A zsírsavakban a szénatomokat többféle módon jelölhetjük, amelyek közül a legáltalánosabb a számozás, a karboxilcsoport C-atomját tekintve az első szénatomnak. Elterjedt még a görög abc betűinek a használata, ahol az alfa-szénatom a karboxilcsoport melletti szénatomot jelzi, az omega pedig az ettől legtávolabbit.



A zsírsavak ezen általános képlete kettős kötést nem tartalmazó, **telített** zsírsavat mutat. A szervezetben jelentőséggel bíró zsírsavak egy része azonban egy vagy több kettős kötést tartalmaz, azaz egyszeresen vagy többszörösen **telítetlen**. A szervezetben szintetizálódó zsírsavakban a kettős kötés mindig *cisz*-konfigurációjú, s ha a molekulában egynél több kettős kötés található, ezek soha nem egymás mellett, hanem három szénatomnyi távolságra helyezkednek el. A kettős kötést általában a delta és egy szám jelöli, amely megadja a kettős kötések pontos helyét is. A 16:1Δ9 tehát a palmitoleinsavat írja le, amely 16 szénatomot és egy kettős kötést tartalmaz a 9. és 10. szénatom között. A szervezetben előforduló legfontosabb zsírsavakat és jelöléseiket az *2-5. táblázat* mutatja.

2-5. táblázat. A szervezetben előforduló legfontosabb zsírsavak

Zsírsav neve	C-atomok száma	Kettős kötések száma	Kettős kötések helyzete	
palmitinsav	16	0		
palmitoleinsav	16	1	Δ9	ω-7
sztearinsav	18	0		
olajsav	18	1	Δ9	ω-9
linolsav	18	2	Δ9, 12	ω-6
linolénsav	18	3	Δ9, 12, 15	ω-3
arachidonsav	20	4	Δ5, 8, 11, 14	ω-6

A Δ és ω jelek magyarázatát lásd a szövegben

A kettős kötés helyzetét megadhatjuk az omega-véghez viszonyítva is, így négy olyan fontos csoport írható le, melyek az 2-5. táblázatban látható „szülő" zsírsavakból keletkeznek, de egymásba átalakulni nem tudnak. A 20 szénatomot tartalmazó arachidonsav pl. az ω-6-csoportba tartozó linolsavból szintetizálódik, nem keletkezhet azonban a szintén 18 szénatomos, de az ω-9-csoportba tartozó olajsavból.

A zsírsavakban a kettős kötés jelenléte megváltoztatja a szénhidrogénlánc mozgékonyságát, mely telített zsírsavakban egy flexibilis, lineáris struktúra. A telítetlen zsírsavak az emlős szervezetekben *cisz*-konfigurációban fordulnak elő, ezért a molekula hossztengelye megtörik.

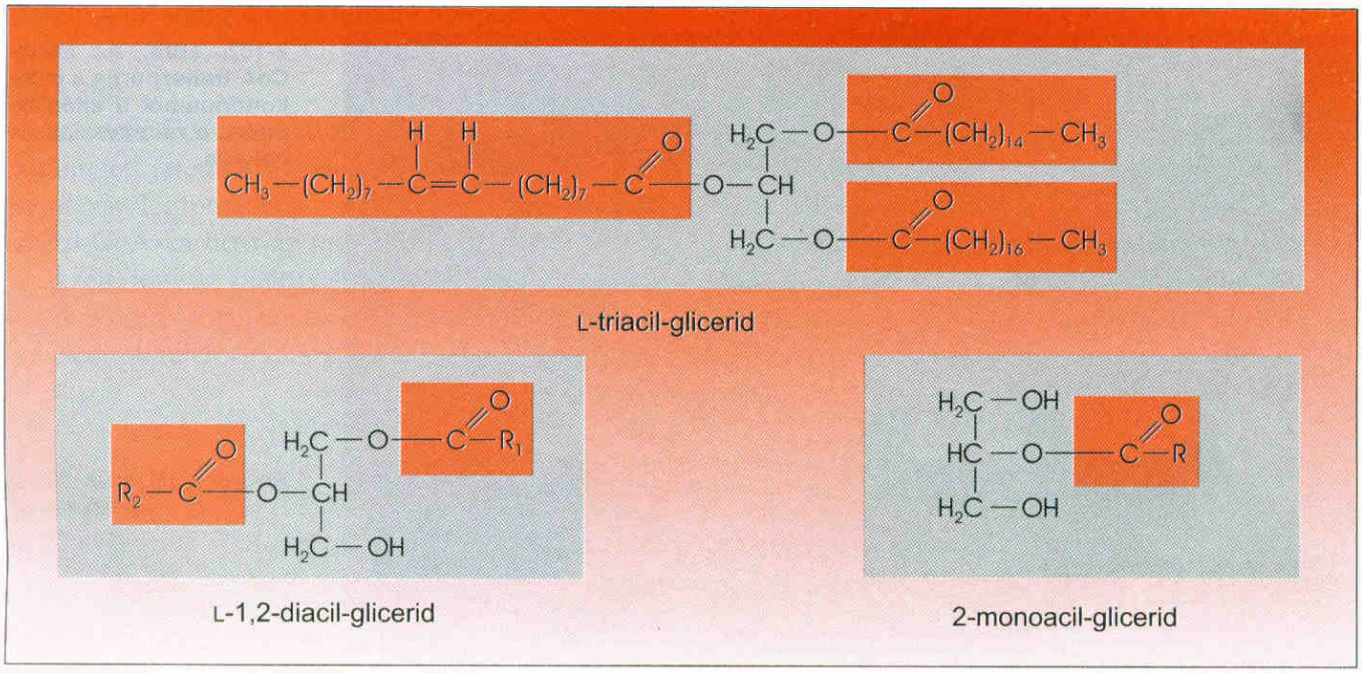
A szervezet számára szükséges zsírsavak részben a bioszintézis során a szervezetben keletkeznek, részben a táplálékkal elfogyasztott zsírsavakból származnak. Mivel a metabolizmus során a zsírsavak jelentősen módosulhatnak a szervezet, illetve az adott sejt pillanatnyi igényeinek megfelelően, a táplálékkal elfogyasztott zsírsavak összetétele nincs közvetlen befolyással a sejtek zsírsav-összetételére.

Két szempontból is meghatározó azonban a táplálékban található többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége, valamint a telített és telítetlen zsírsavak aránya. A bioszintézisben a 9. szénatomtól disztálisan nem tud kettős kötés kialakulni, ezért linolsav (ω-6) és linolénsav (ω-3) nem szintetizálódik. Ezek az **esszenciális zsírsavak**, melyeket a táplálékkal kell a szervezetbe juttatni, s amelyek szükségesek a membránalkotó többszörösen telítetlen zsírsavak és az eikozanoidok szintéziséhez (lásd 6.4. fejezet). Valószínűleg ezek hiánya magyarázza azoknak a tüneteknek egy részét (dermatitis, rossz sebgyógyulás), amelyek tartósan zsírmentes diétán tartott egyénekben alakulnak ki.

Egy, az Egyesült Államokban folytatott vizsgálat azt mutatja, hogy a táplálékban található többszörösen telítetlen és telített zsírsavak aránya fontos tényező a szérumkoleszterin-szint szabályozásában is, ez utóbbi viszont a szívinfarctus szempontjából meghatározó, ún. rizikófaktor. Az ω-6-linolsav, amely növényi olajokban található, elsősorban a szérumkoleszterin-szintet csökkenti és kevésbé befolyásolja a trigliceridszintet, míg az ω-3-linolénsav, a tengeri halakban nagy mennyiségben található zsírsav, inkább a trigliceridszintet csökkenti, a koleszterinszint lényeges változtatása nélkül. Ezeknek a rendkívül fontos változásoknak a biokémiai mechanizmusa ma még nem ismert.

Acil-gliceridek. Trigliceridek és az energiaraktározás

A glicerin zsírsavakkal alkotott észterei az acil-gliceridek, amelyek – attól függően, hogy a glicerin hány alkoholos OH-csoportja észteresített – lehetnek monoacil-, diacil- és triacil-gliceridek vagy egyszerűbb néven mono-, di- vagy triglyceridek *(2-101. ábra)*. A trigliceridek ún. neutrális zsírok. Ha a glicerin 1. és 3. szénatomjához kapcsolódó primer alkoholos OH-csoport két különböző zsírsavval alkot észtert, vagy csak az egyik vesz részt észterkötésben, a molekula optikailag



2-101. ábra. Acil-gliceridek. *Az R; R_1; R_2 a zsírsavak szénhidrogénláncát jelölik*

aktív, a glicerin 2. szénatomja a kiralitás centrum. Az emlős szervezetekben ezek a vegyületek L-konfigurációban fordulnak elő.

A trigliceridek telítetlen zsírsav (pl. olajsav-) tartalma jelentősen befolyásolja a zsírok olvadáspontját, a zsírok „keménységét". A *cisz*-konfigurációval rendelkező telítetlen zsírsavakban a kettős kötésnél a lánc megtörik, így a környező apoláros zsírsavláncokkal kisebb mértékű apoláros (London-féle) kölcsönhatás kialakítására van lehetőség. A magasabb telítetlen zsírsav tartalom a zsírok olvadáspontját csökkenti, „lágyítja" a zsírokat. A telített és telítetlen zsírsav aránya fajonként eltérő, ugyanazon faj esetében is változó lehet a földrajzi helytől és az évszakoktól függően.

A **monoacil-gliceridekben** a glicerinnek vagy a primer, vagy a szekunder alkoholos OH-csoportja észteresített, így 1-monoacil-glicerid vagy a 2-101. ábrán látható 2-monoacil-glicerid fordulhat elő. A monoacil-gliceridek a zsírok felszívódása során a bélhámsejtekben, illetve a lipidek intermedier metabolizmusa során keletkeznek.

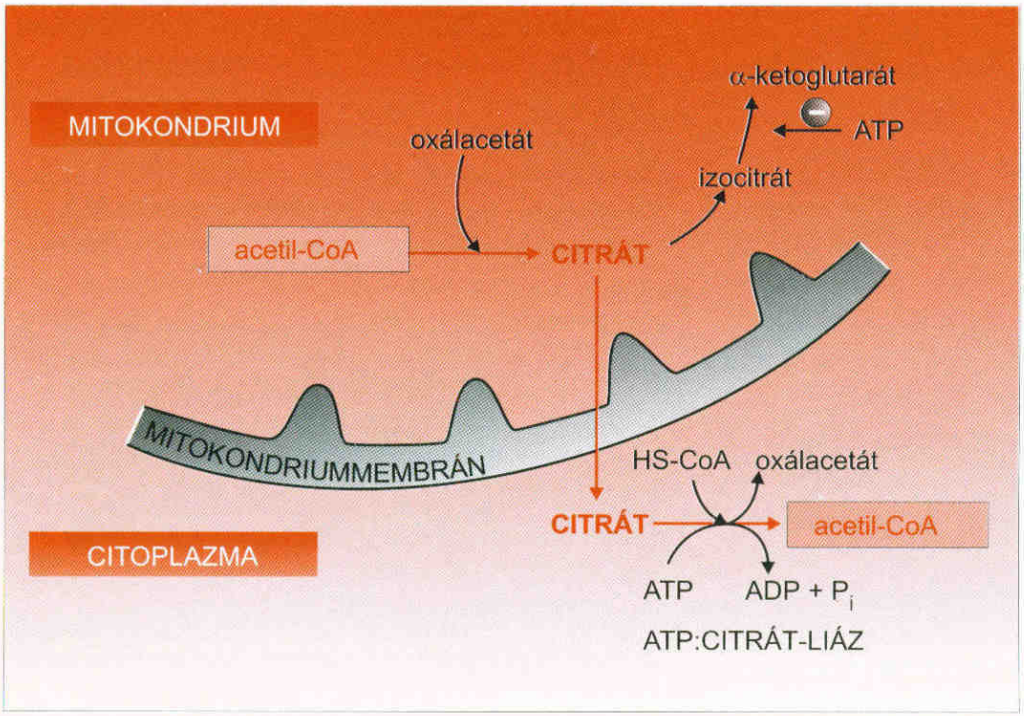
Szintén a zsírsavak molekulán belüli helyzete alapján különíthetünk el 1,2- és 1,3-**digliceridet**. Ezek is részben a lipidanyagcsere intermedierjei, részben fontos szerepet játszanak bizonyos hormonok és neurotranszmitterek hatásának közvetítésében.

A zsíranyagcsere szempontjából a **trigliceridek** a legnagyobb jelentőségűek, mivel triglicerid formában történik a zsírsavak raktározása és részben szállítása is. A trigliceridek szintézise, raktározása és mobilizálása a zsírszövetben, az adipocitákban történik. Az energiaraktározás hatékonyságát két tényező biztosítja; részben az, hogy a zsírsavak erősen redukált molekulák, részben pedig az, hogy hidrofób tulajdonságúak.

A zsírsavak *de novo* bioszintézise

Az acetil-CoA transzportja a mitokondriumból a citoplazmába

A zsírsavak bioszintézise az emberi szervezetben a **májban,** a **zsírszövetben,** a **laktáló emlő mirigyeiben** és kisebb mértékben a **vesében,** a **sejtek citoplazmájában** történik. A szintézis kiinduló anyaga az acetil-CoA, amely a szénhidrátok, az aminosavak és a zsírsavak lebomlása során keletkezhet. A zsírsavakba beépülő acetil-CoA elsősorban a szénhidrátok metabolizmusából származik, tehát közvetlenül a piruvát-dehidrogenáz-komplex által katalizált reakcióban keletkezik. Ez az enzim a mitokondriumban található, ahonnan az acetil-



2-102. ábra. Az acetil-CoA transzportja a mitokondriumból a citoplazmába, a zsírsavszintézis helyére

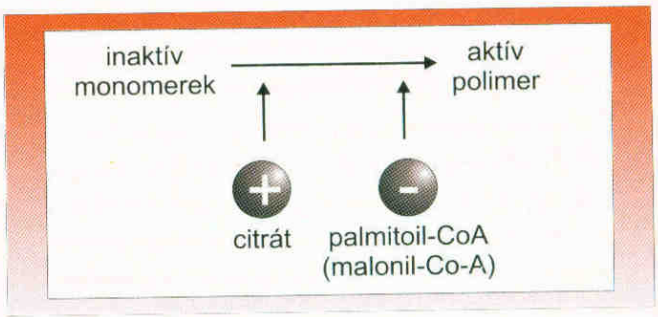
CoA-nak el kell jutni a citoplazmába, a zsírsavszintézis helyére. A molekula koenzim-A része a mitokondrium membránján nem tud átjutni, az acetilgyök pedig citrát formában transzportálódik. A mitokondriumban az acetil-CoA oxálacetáttal citráttá kondenzálódik, ami a citromsavciklusban alakulhat tovább. A citrát citoplazmába történő transzportjára akkor kerül sor, amikor az izocitrát-dehidrogenáz gátlása miatt a citrát és az izocitrát felszaporodik. Az izocitrát-dehidrogenáz gátlását a megnövekedett koncentrációjú ATP okozza (lásd citrátkör), ami egyben annak a lehetőségét és szükségességét is megteremti, hogy az energia zsírsav formában raktározódjon. A citoplazmában az ATP:citrát-liáz enzim hatására a citoplazmatikus CoA felhasználásával, ATP energiájának terhére ismét acetil-CoA és oxálacetát keletkezik *(2-102. ábra)*. Az oxálacetát visszakerül a mitokondriumba (lásd 110. oldal).

A zsírsavszintézis elkötelező lépése és az acetil-CoA-karboxiláz szabályozása

A zsírsavszintézisben az elkötelező lépés a malonil-CoA keletkezése acetil-CoA-ból az **acetil-CoA-karboxiláz** hatására *(2-103. ábra)*.

Az acetil-CoA-karboxiláz működése hasonló a piruvát-karboxiláz enziméhez; kofaktora a biotin, amely ATP energiájának terhére megköti a CO_2-ot, s ez az „aktivált" CO_2 kapcsolódik az acetil-CoA-hoz.

Az acetil-CoA → malonil-CoA átalakulás azért kitüntetett jelentőségű, mert itt történik a zsírsavszintézis legfontosabb **regulációja**. In vitro az acetil-CoA-karboxiláz működéséhez **citrátra** van szükség, ami az inaktív monomerekből az enzim aktív polimer formájának kialakulását teszi lehetővé. A citrát tehát egyrészt a szubsztrátot szállítja az enzim számára, másrészt, mint allosztérikus aktivátor, serkenti az enzim működését. A citrát hatása in vivo is logikusnak tűnik; az enzim aktiválásához akkor áll elegendő mennyiségű citrát rendelkezésre, amikor a sejt energiaállapota megfelelő az energia zsírsavakban történő raktározásához.

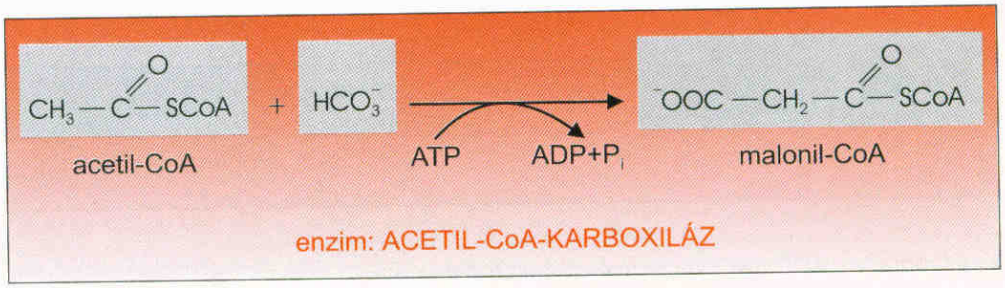


Ugyanígy ésszerű, hogy a reakció terméke, a malonil-CoA és a zsírsavszintézis végterméke, a palmitoil-CoA gátolják az acetil-CoA-karboxiláz enzimet, az aktív polimer kialakulásának gátlása révén.

A metabolizmus általános állapota, konkrétan a vércukorszint **hormonális** úton is befolyásolja az enzim működését. Az acetil-CoA-karboxilázt a cAMP-függő protein-kináz foszforilálja és ennek következtében gátolja. A glukagon és az inzulin ezen a módon szabályozza a zsírsavszintézist: a glukagon hatására az enzim foszforilálódik, azaz amikor a vércukorszint csökken, a sejtekben nem történik zsírsavszintézis és energiaraktározás. Az inzulin akkor szekretálódik, amikor a szervezet „jóllakott", és ezzel ellentétes hatású.

Mind az allosztérikus, mind a foszforiláció–defoszforilációval történő szabályozás azonnali változást jelent a zsírsavak szintézisének sebességében a metabolizmus pillanatnyi állapotának megfelelően. A zsírsavszintézis tartós alkalmazkodását a szervezet tápláltsági állapotához az enzim szintézisének vagyis **mennyiségének** válto-

2-103. ábra. Malonil-CoA keletkezése



zása biztosítja: szénhidrátokban gazdag vagy zsírszegény étrend az enzim szintézisét fokozza, míg tartós éhezés vagy nagy mennyiségű zsír fogyasztása csökkenti az acetil-CoA-karboxiláz mennyiségét.

A palmitinsav szintézise. A zsírsav-szintáz

A zsírsavszintézis következő lépéseiben megtörténik a 16 szénatomos palmitinsav szintézise, a többi zsírsav a palmitinsavból alakul ki. A szintézis lényege az, hogy a zsírsavlánc két szénatomonként hosszabbodik, s ezek a szénatomok az acetil-CoA acetilcsoportjából származnak. Az első acetil-CoA metilcsoportja lesz a palmitinsav omega-szénatomja, a további két szénatomos egységeket a malonil-CoA adja, amelyben az acetil-CoA metilcsoportja karboxilálással aktiválódott. A lánc felépülése során azonban a malonil-CoA dekarboxileződik, így a zsírsav minden szénatomja az acetil-CoA-ból származik.

A szintézist egy multifunkcionális enzimkomplex, a **zsírsav-szintáz** végzi. Emlős sejtekben ez az enzimkomplex, két azonos alegységet tartalmaz, amelyekben hét, különböző enzimaktivitással rendelkező fehérje kapcsolódik össze. Mindegyik alegységen két kitüntetett SH-csoport található, amelyek az acetil- és az acilcsoportokat kötik meg. Az egyik SH-csoportot a 4'-foszfopantetein tartalmazza, amely a pantoténsav származéka és megtalálható a koenzim-A-ban is *(2-104. ábra)*. A 4'-foszfopanteteint kötő fehérjét acil carrier proteinnek (ACP) nevezik, mert a zsírsavlánc az ACP-hez kötődve épül fel.

A lánc indítása, az alacsonyabb rendű szervezetektől eltérően, emlősökben úgy történik, hogy az acetilcsoport az acetil-transzferáz enzimhez, a malonilcsoport a malonil-transzferáz enzimhez kötődik. Az acetilcsoport innen átmenetileg egy másik nevezetes SH-csoportra, a kondenzáló enzim (béta-ketoacil-szintáz) cisztein SH-csoportjára tevődik át, amely a továbbiakban is kitüntetett szerepet játszik majd.

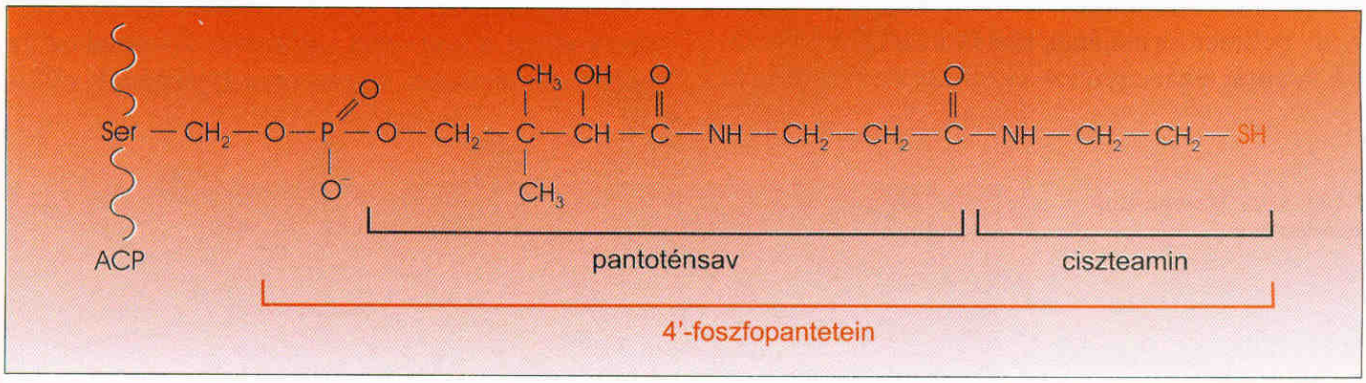
❶ acetil-CoA + enzim-SH → acetil-S-enzim + CoA-SH
enzim: **acetil-transzferáz**

A malonil-CoA pedig átkerül a zsírsav-szintáz másik alegységén található ACP-SH csoportra.

❷ malonil-CoA + ACP-SH → malonil-S-ACP + CoA-SH
enzim: **malonil-CoA–ACP-transzaciláz (malonil-transzferáz)**

Ezt követően kerül sor az acetil- és a malonilcsoport kondenzációjára, miközben felszabadul az a CO_2, amely az acetil-CoA-karboxiláz reakcióban beépült a molekulába. Ez a dekarboxiláció fedezi a két molekula összekapcsolódásához szükséges energiát (ami így végül is az acetil-CoA-karboxiláz reakcióban felhasznált ATP energiájából származik). A reakciót a **béta-ketoacil-ACP-szintáz (kondenzáló enzim)** katalizálja.

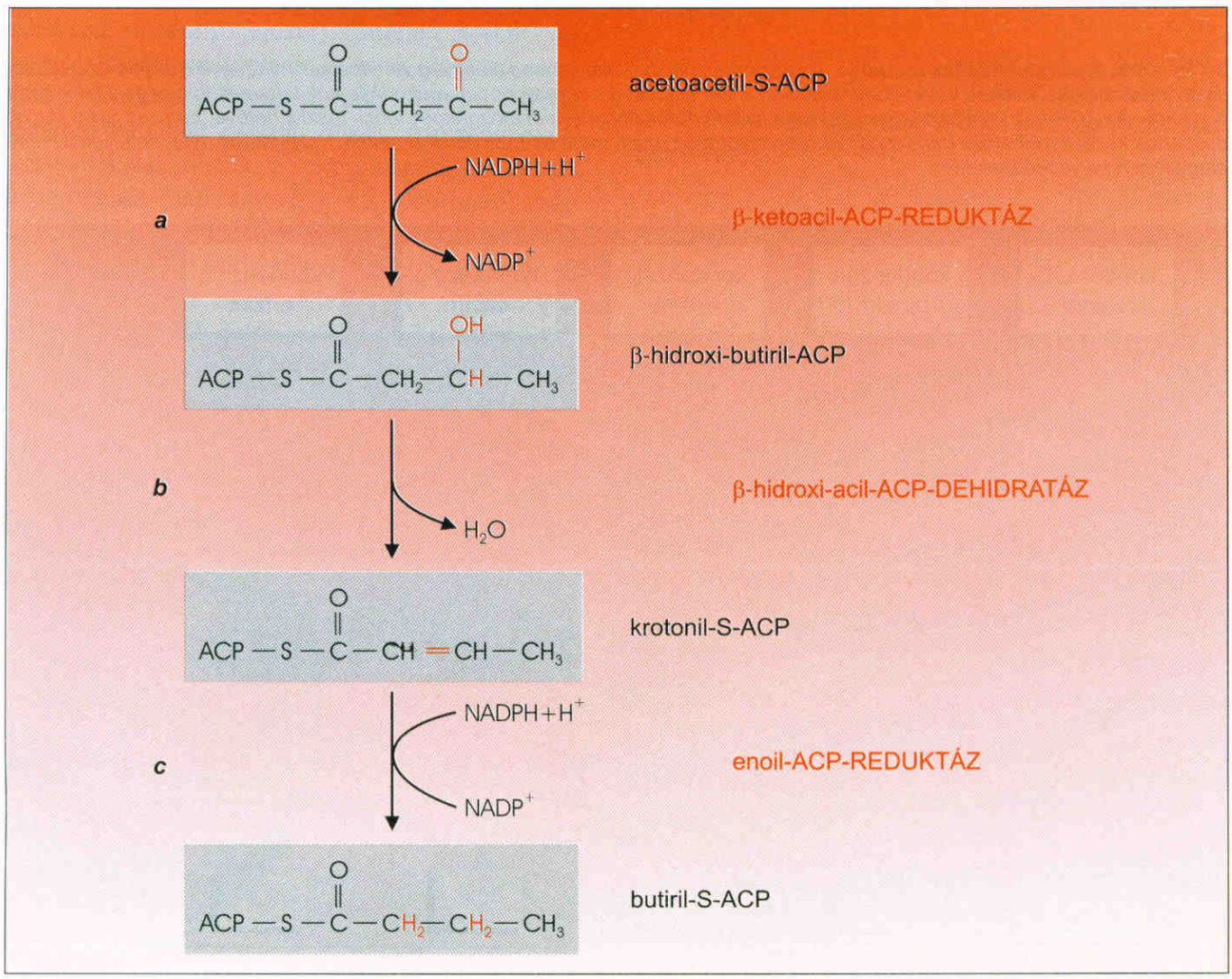
❸ malonil-S-ACP + acetil-S-enzim → acetoacetil-S-ACP + CO_2



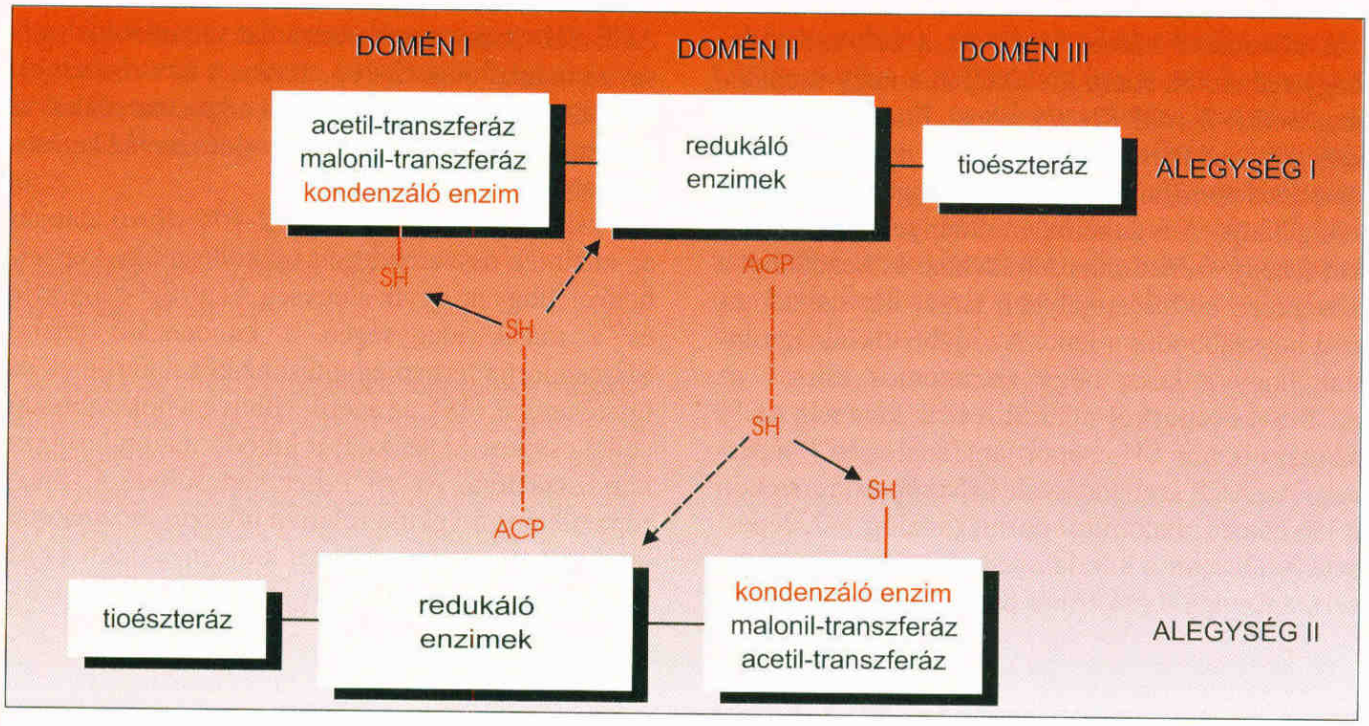
2-104. ábra. Az ACP-hez kapcsolódó 4'-foszfopantetein

A következő három lépés azt a célt szolgálja, hogy redukciók során kialakuljon a négy szénatomos butiril-S-ACP *(2-105. ábra)*. Ennek során először egy redukció történik, majd dehidratálás és újabb redukció, amelyekhez a hidrogént a NADPH szolgáltatja. A redukciók eredményeképpen kialakul a négy szénatomos zsírsavlánc és kezdődhet a következő ciklus, amelyben ismét két szénatommal hosszabbodik a lánc. Az újabb ciklus úgy indul, hogy a kész, négy szénatomos zsírsav az ACP-SH-csoportról átkerül a béta-ketoacil-ACP-szintáz cisztein SH-csoportjára (analóg az 1. lépéssel). Az ACP szabaddá vált SH-csoportja megköti a következő malonilcsoportot (analóg a 2. lépéssel) és létrejön a kondenzáció (analóg a 3. lépéssel), ami után a most már hat szénatomos lánc az ACP-SH-csoporton maradva hat szénatomos zsírsavvá redukálódik (2-105. ábra a, b és c reakciók). Ily módon, egymást követő hét ciklusban alakul ki a palmitoil-S-CoA, amiből egy **tioészteráz** hatására szabadul fel a palmitinsav.

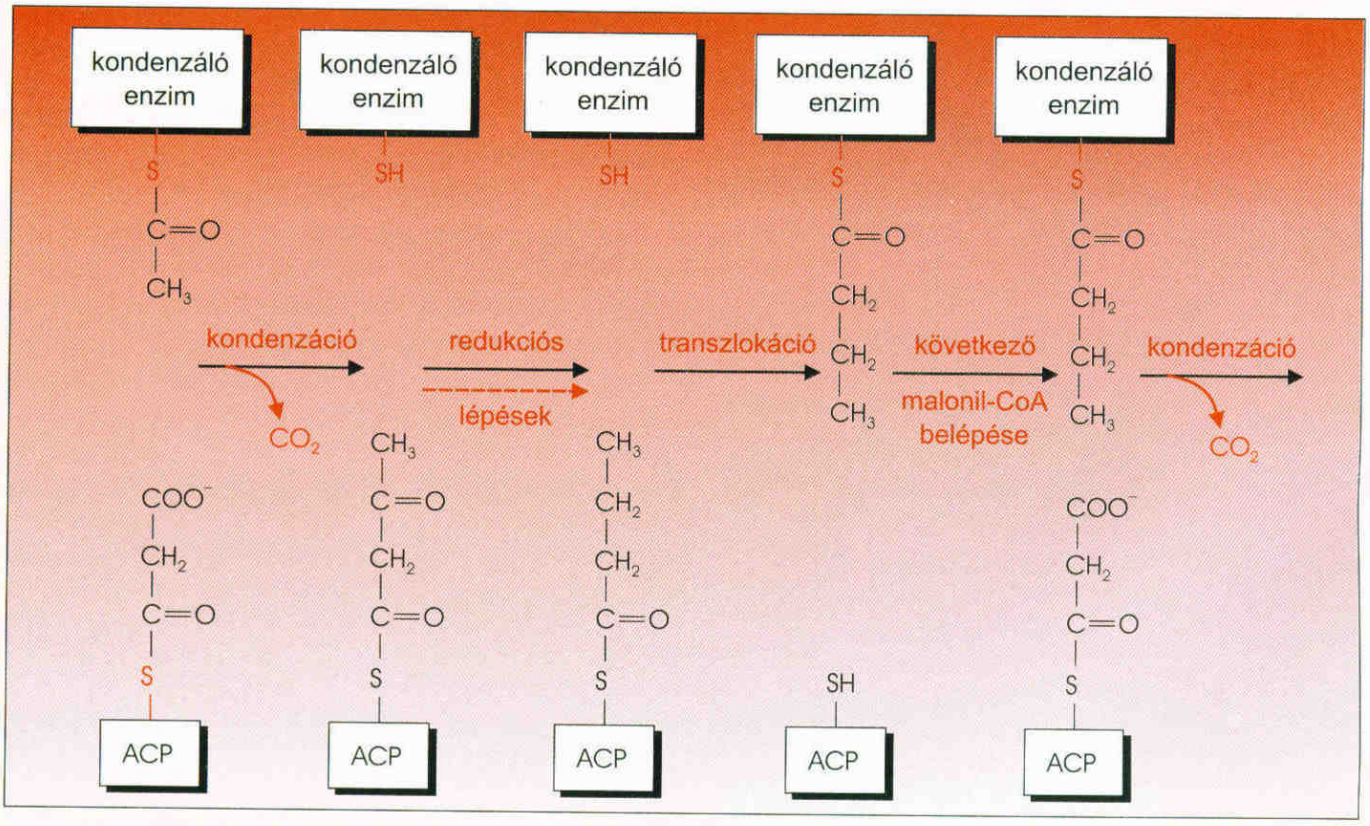
A zsírsav-szintáz modellje *(2-106. ábra)* alapján az enzimek összerendezett működése úgy képzelhető el, hogy az egyik alegység ACP-SH-csoportja és a másik alegységen a kondenzáló enzim SH-csoportja térben egymáshoz közel kerülnek és így lehetővé válik az acetil- (illetve a hosszabbodó acil-) csoport és az ACP-n kötődő malonilcsoport kondenzációja. Az ACP-hez kapcsolódó 4'-foszfopantetein-molekula relatíve hosszú, mozgékony lánca teszi lehetővé, hogy a kondenzálódott és az ACP-n kötve maradó láncrész a másik alegység re-



2-105. ábra. Redukciós lépések a zsírsavszintézisben



2-106. ábra. A zsírsav-szintáz modellje. *Az enzimkomplexben két azonos alegység van, melyek mindegyike tartalmazza a zsírsavszintézishez szükséges valamennyi enzimet. A két alegység összerendezett működése két zsírsavlánc egyidejű felépítését biztosítja. Az ACP-hez (acil carrier protein) kapcsolódó 4'-foszfopantetein mozgékony lánca teszi lehetővé, hogy az SH-n kötődő csoportok közel kerülhetnek mind a kondenzáló enzimhez (nyíl), mind a redukáló enzimekhez (szaggatott nyíl), amelyek a másik alegységen helyezkednek el*



2-107. ábra. A felépülő zsírsavlánc „ingajárata" az ACP-SH és a kondenzáló enzim-SH között

dukáló enzimeihez (domén II) közel kerülhet és szubsztrátul szolgálhat. Minden ciklus végén az ACP-ről a redukált acilcsoport átmenetileg a másik alegység kondenzáló enzim SH-csoportjára transzlokálódik és az ACP-SH-csoport megkötheti a malonil-CoA-ról a következő malonilcsoportot *(2-107. ábra)*. Egy molekula palmitinsav szintézise tehát az alábbiak szerint foglalható össze:

$$8 \text{ acetil-CoA} + 14 \text{ NADPH} + 14 \text{ H}^+ + 7 \text{ ATP} \rightarrow \text{palmitinsav} + 14 \text{ NADP}^+ + 7 \text{ ADP} + 7 \text{ P}_i + 7 \text{ H}_2\text{O} + 8 \text{ CoA}$$

A NADPH forrása

A zsírsavszintézishez elengedhetetlen, hogy a sejtekben elegendő NADPH álljon rendelkezésre. Ez elsősorban a **glukóz direkt oxidációja** során keletkezik (lásd 2.2. fejezet). Emellett $NADP^+$ redukciója kíséri a citoplazmában az almasav piruváttá alakulását, amit az **almasav enzim (malic enzyme)** katalizál *(2-108. ábra)*. Almasav oxálecetsavból keletkezik a citoplazmatikus malátdehidrogenáz hatására. Így végsősoron a zsírsav-szintézishez a szubsztrátot szállító citrát hozzájárul a szintézis egy másik komponensének, a NADPH-nak a keletkezéséhez is. Az almasav enzim által katalizált folyamat reverzibilis, fordított irányban malát keletkezését teszi lehetővé piruvátból, ami a citrátkör intermedierjeit pótló, ún. anaplerotikus reakció (lásd 2.1. fejezet).

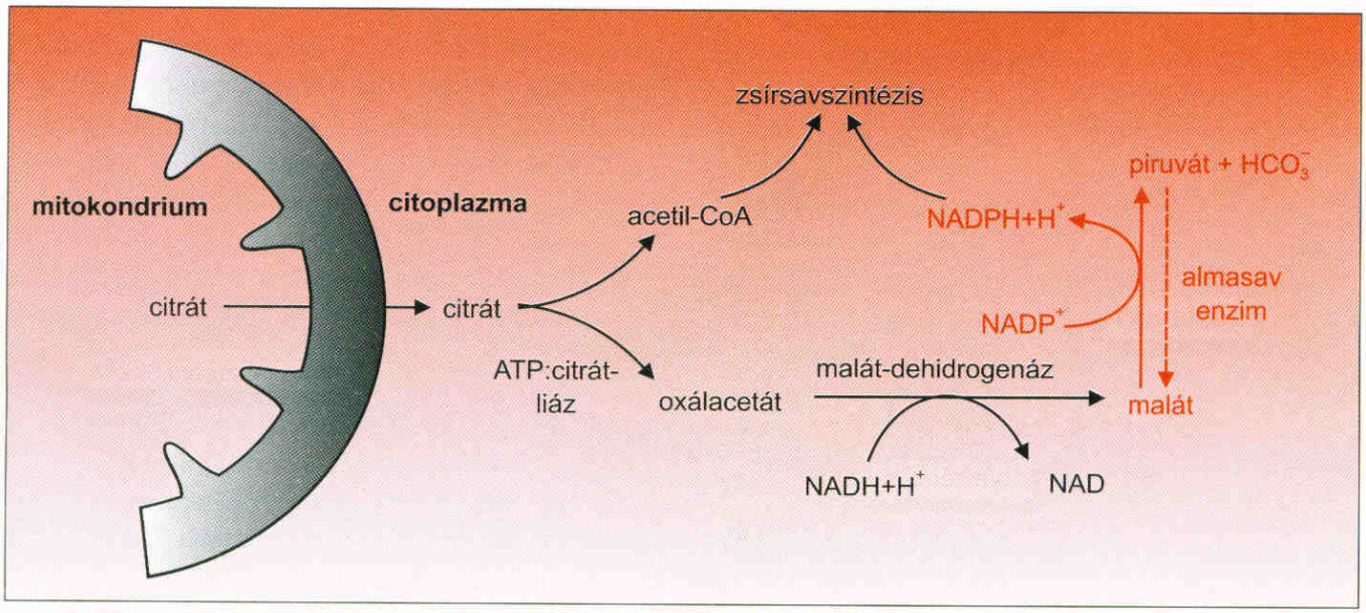
NADPH keletkezhet még a **citoplazmában** az **izocitrát-dehidrogenáz** által katalizált reakcióban.

Nem tisztázott, hogy in vivo melyik reakció, milyen mértékben vesz részt a zsírsavszintézishez szükséges NADPH előállításában, valószínű, hogy ez a sejten belüli egyéb reakcióutaknak is függvénye.

A zsírsavszintézis sebességét elsősorban a már említett acetil-CoA-karboxiláz szabályozása határozza meg. Ezt egészíti ki a zsírsav-szintáz szintézisének a szabályozása, ami úgyszintén a zsírsavszintézis tartós alkalmazkodását segíti elő. Szénhidrátdús vagy zsírszegény étrend az enzim mennyiségének növekedésével jár, míg éhezés vagy zsírdús táplálkozás az enzim szintézisét csökkenti. Az acetil-CoA-karboxiláz és a zsírsav-szintáz enzim mellett az ATP:citrát-liáz, a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz és az almasav enzim is ezen a módon tud tartósan adaptálódni a zsírsavszintézis igényeihez.

A zsírsavlánc elongációja

Mint az eddigiekből kitűnt, a de novo zsírsavszintézis végterméke a 16 szénatomos telített zsírsav, a palmitinsav. Ez alól néhány kivétel van csak,

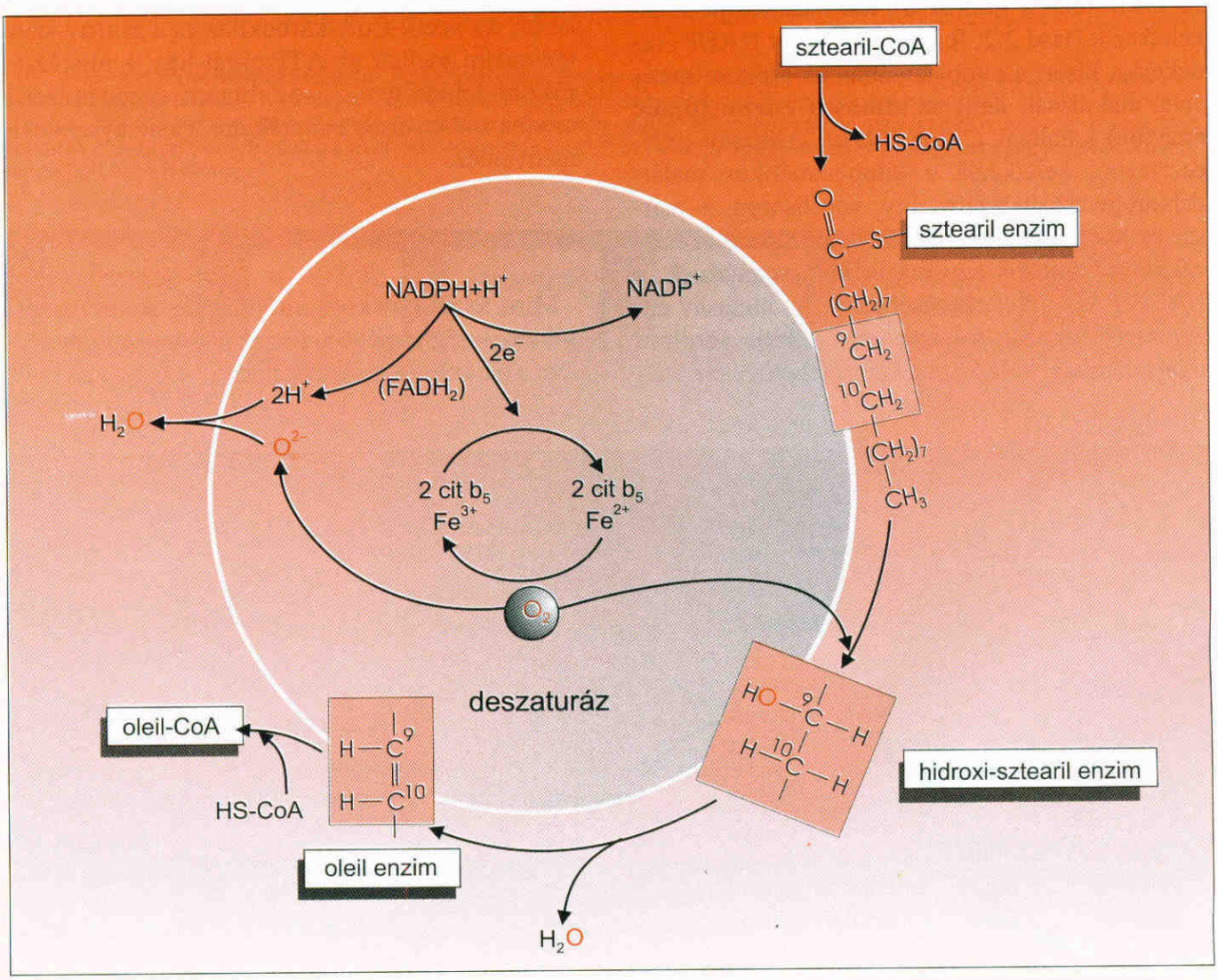


2-108. ábra. NADPH keletkezése az almasav enzim által katalizált reakcióban

amelyekről később szólunk. A szervezet számára szükséges egyéb zsírsavak – a többszörösen telítetlen zsírsavak kivételével – a palmitinsavból alakulnak ki a lánc hosszabbításával (ez az elongáció), illetve kettős kötések kialakításával (ez a deszaturáció).

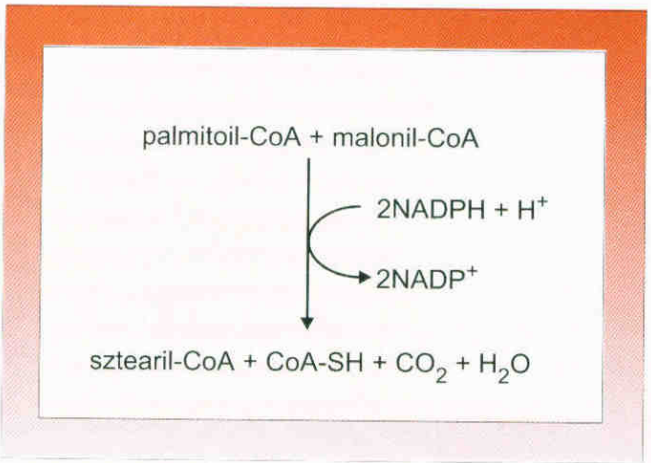
Az **elongáció** vagy a mitokondriumban, vagy az endoplazmás retikulumban történik, s ennek során a zsírsavlánc két szénatomos egységekkel hosszabbodik. A mitokondriumban a két szénatomos egységet az acetil-CoA, az endoplazmás retikulumban – ahol az elongáció a legtöbb vizsgált emlős sejtben aktívabb, mint a mitokondriumban – a malonil-CoA szolgáltatja. Ez utóbbi esetben a dekarboxilációval éppúgy elvész az a CO_2, ami a malonil-CoA keletkezésekor a molekulába beépült, mint a de novo szintézisben. A kialakult béta-ketoacil-CoA redukciója is ugyanúgy három lépésben, NADPH részvételével történik, mint a zsírsavak de novo szintézisénél láttuk. A különbség az, hogy a részt vevő enzimek különállóak és nem részei egy enzimkomplexnek, továbbá, hogy a hosszabbodó zsírsav nem egy carrier fehérjéhez kötve, hanem CoA-val aktivált formában (makroerg tioészterkötés) vesz részt a folyamatban. A mitokondriumban a redukció ettől némileg eltérően NADH és NADPH igénybevételével, lényegében a béta-oxidáció fordított irányú lépéseiben történik, ahol az utolsó lépésben a FADH helyett NADPH vesz részt a redukcióban.

A legtöbb sejtben az elongáció során az endoplazmás retikulumban palmitinsavból sztearinsav



2-109. ábra. A zsírsavak deszaturációjában részt vevő elektrontranszport-rendszer

keletkezik, amit az alábbiak szerint lehet összefoglalni:



A telítetlen zsírsavak kialakulása, a **deszaturáció** szintén az endoplazmás retikulumban történik. A *cisz* kettős kötések kialakításában NADP, O_2, továbbá három enzim vesz részt – egy flavoprotein, a citokróm b_5 és egy nem hem-vasat tartalmazó deszaturáz –, melyek a mikroszómális elektrontranszportlánc részei *(109. ábra)*. A deszaturáz enzimek szubsztrátja, az acil-CoA a deszaturázok specificitásától függően lehet telített vagy telítetlen. A Δ9-deszaturáznak a sztearil-CoA a szubsztrátja, a másik három deszaturáz, a Δ6-, Δ5- és Δ4-deszaturázok a kettős kötést már tartalmazó zsírsavba visznek be további kettős kötéseket a már meglévő kettős kötés és a tioészter közé. Hangsúlyozni kell, hogy az ω vég és a meglévő kettős kötés között egyik enzim sem tud kettős kötést kialakítani, azaz a 18:2Δ9,12 és a 18:3Δ9,12,15 a szervezetben nem tud szintetizálódni, amiért is az ember számára ezek esszenciális zsírsavak.

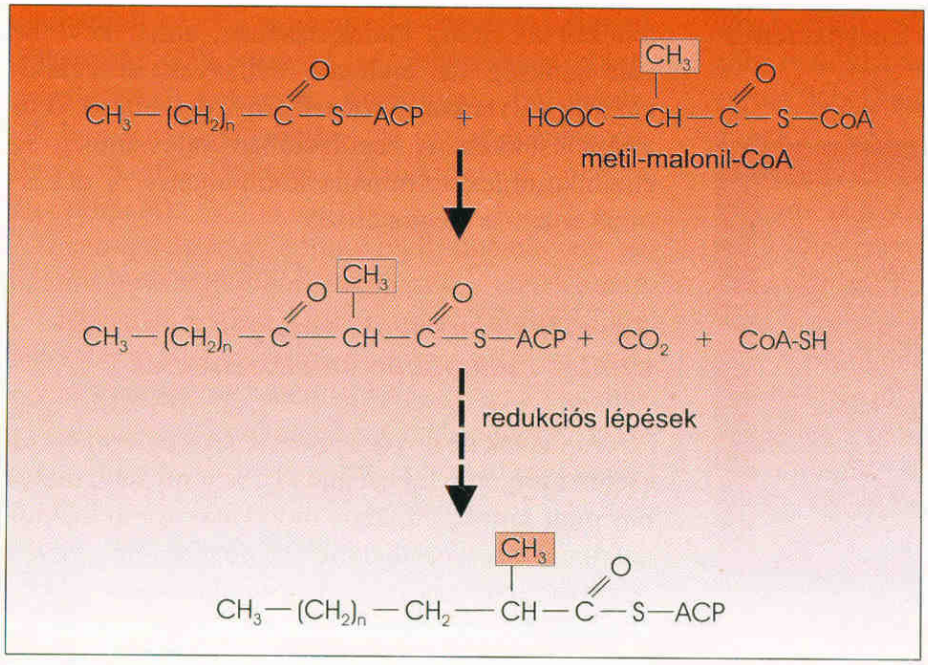
A deszaturáció regulációja a szervezet aktuális igényeinek megfelelően működik. A májban található sztearil-CoA deszaturáz enzim aktivitása éhezésben jelentősen csökken, míg a táplálkozás megindulása után fokozódik. Ez utóbbi állapotban alakulnak ki a telítetlen zsírsavak olyan mennyiségben, ami biztosítja a membránlipidek optimális fluiditását. A deszaturációt jelentősen befolyásolja a táplálékban található telítetlen zsírsavak mennyisége is. Minél nagyobb mértékben járul ez hozzá az optimális fluiditáshoz szükséges telítetlen/telített zsírsav arány kialakulásához, annál kevésbé van szükség az endogén zsírsavak deszaturációjára, s ilyenkor a sztearil-CoA deszaturáz aktivitása csökken. A regulációban valószínűleg az enzimkomplex terminális komponense, a deszaturáz enzim a meghatározó.

Speciális zsírsavak, amelyek a zsírsav-szintáz reakcióban keletkezhetnek

A zsírsavak de novo szintézisének végterméke az esetek túlnyomó többségében a palmitinsav, melyből mint láttuk, utólagos módosítás során alakulnak ki a szervezetben jelentőséggel bíró egyéb zsírsavak. Néhány speciális esetben azonban ettől eltérően is létrejöhetnek zsírsavak, mégpedig a zsírsav-szintáz által katalizált reakcióban. A palmitinsavnál **rövidebb szénláncú zsírsavak** találhatók a legkülönbözőbb állatokban keletkező **tejben**. Valószínűleg igaz az emberi szervezetre is, hogy az emlőmirigyben a zsírsav-szintáz rövidebb szénláncú zsírsavakat is képes szintetizálni, mégpedig úgy, hogy a lánc lehasad az acil carrier proteinről még azelőtt, hogy a 16 szénatomos lánc kialakult volna. Ezt a lehasítást egy szolubilis tioészteráz végzi, amely hormonális szabályozás alatt áll.

Egy másik lehetőség az **elágazó szénláncú zsírsavak** szintézise. Ezek a zsírsavak a magasabb rendű szervezetekben speciális funkciókat szolgálnak (pl. az izzadságmirigyekben termelődő viasz). A legtöbb elágazó szénláncú zsírsav a telített egyenes szénláncú zsírsav metilált származéka, amelynek szintézisét a zsírsav-szintáz végzi. Amikor a malonil-CoA helyett a metil-malonil-CoA a szubsztrát, a zsírsavba egy metilcsoport épül be a *2-110. ábrán* látható módon.

Ezek a reakciók számos sejtben megtörténnek, csak több nagyságrenddel lassabban, mint amikor malonil-CoA a szubsztrát. Az elágazó szénláncú zsírsavak keletkezését valószínűleg az határozza meg, hogy a szubsztrátok, azaz a malonil-CoA és a metil-malonil-CoA milyen arányban állnak rendelkezésre. Fokozódik az elágazó szénláncú zsírsavak szintézise akkor, amikor a malonil-CoA mennyisége csökken, ami számos szövetben a malonil-CoA-dekarboxiláz enzim hatására bekövetkezhet. Patológiás körülmények között is, pl.



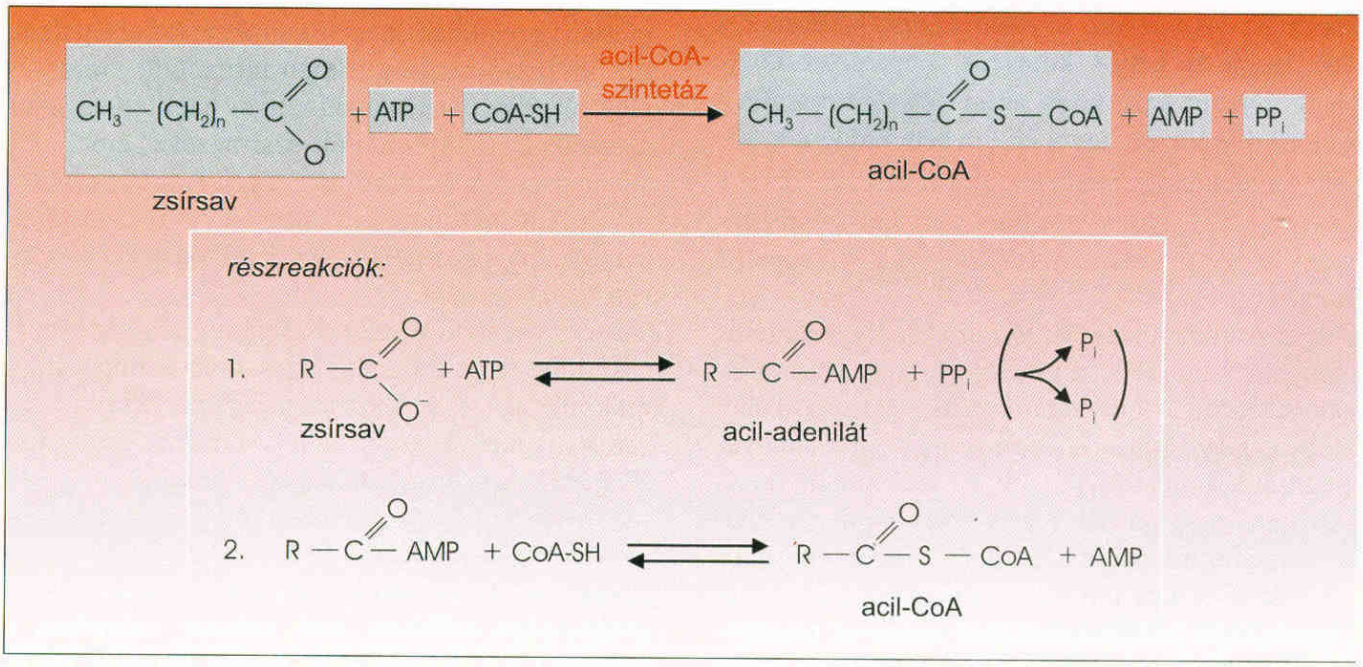
2-110. ábra. Elágazó szénláncú zsírsavak keletkezése a zsírsav-szintáz reakcióban

B_{12}-vitamin hiányában emelkedhet a metil-malonil-CoA mennyisége, ami az elágazó szénláncú zsírsavak keletkezésének fokozódásához vezet.

A trigliceridek szintézise és raktározása

A szervezetben a zsírsavak trigliceridek formájában raktározódnak. A legtöbb szövet képes triglicerideket szintetizálni, azonban legnagyobb mennyiségben a **májban** és a **zsírszövetben** keletkeznek. A szintézis aktivált zsírsavakból és glicerin-3-foszfátból történik.

A **zsírsavak aktiválását** az endoplazmás retikulumban vagy a mitokondriumok külső membránjában az acil-CoA-szintetáz (tiokináz) végzi *(2-111. ábra)*. A reakció két lépésben történik, amelynek során először egy acil-adenilát interme-

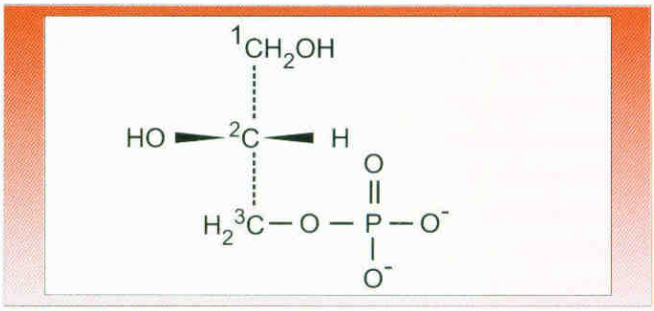


2-111. ábra. A zsírsavak aktiválása

dier keletkezik, miközben az ATP-ről pirofoszfát hasad le. A koenzim-A SH-csoportja az enzimhez szorosan kötődő acil-adeniláttal reagál és létrejön az aktivált zsírsav, az acil-CoA (2-111. ábra), amelyben a zsírsav nagy energiájú tioészterkötéssel kapcsolódik a koenzim-A-hoz. Az aktiválás részreakciói reverzibilisek, irreverzibilissé az teszi a reakciót, hogy a pirofoszfatáz hatására a PP_i (inorganikus) foszfátokra hidrolizál. Ez a mechanizmus nemcsak a zsírsavak aktiválásában, hanem számos egyéb bioszintetikus folyamatban biztosítja azt, hogy a folyamat irreverzibilis legyen. Az acil-adenilát intermedier keletkezése úgyszintén általános mechanizmusnak tekinthető a karboxilcsoportok aktiválásában, ez történik pl. a fehérjeszintézisben felhasználódó aminosavak esetében is.

A trigliceridek szintézisében az aktivált zsírsav vagy a dihidroxi-aceton-foszfáthoz, vagy a glicerin-3-foszfáthoz kapcsolódik. A dihidroxi-aceton-foszfát mind a májban, mind a zsírszövetben a glukózból a glikolízis során keletkezik, s ebből NADH-val történő redukcióval a glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz hatására alakul ki a glicerin-3-foszfát *(2-112.* és *2-113. ábra)*.

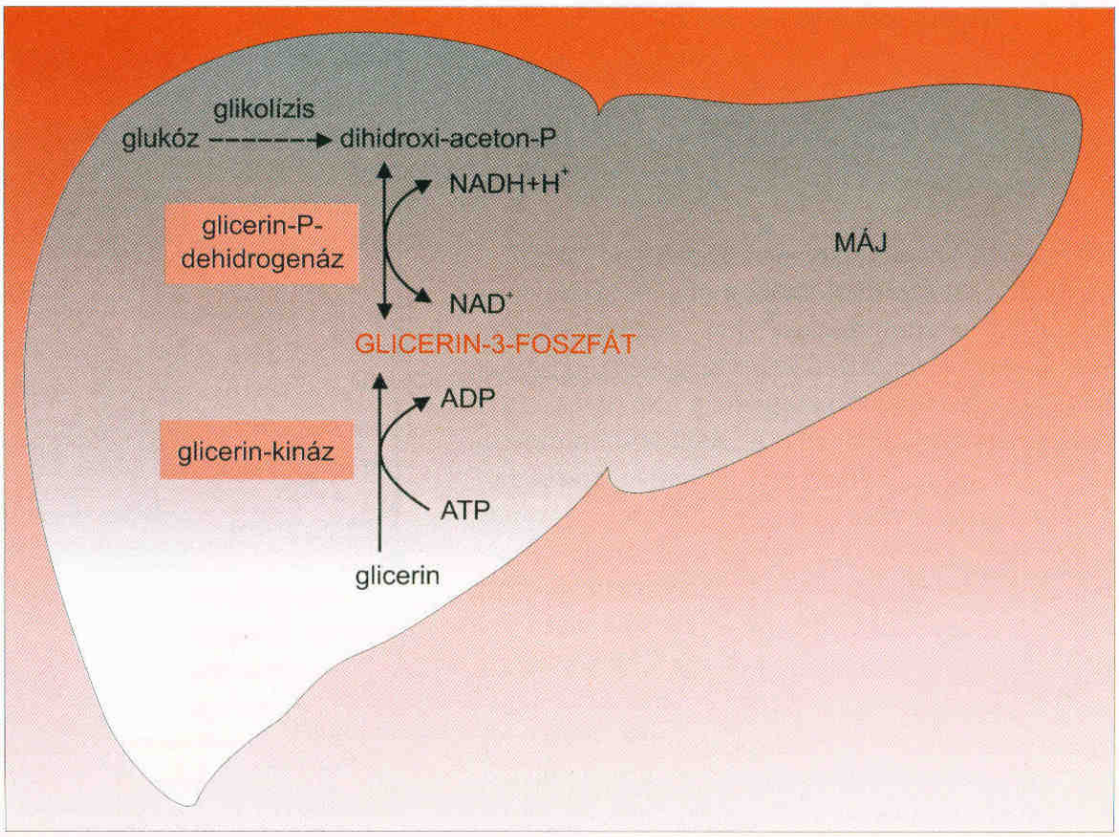
Ha a glicerin egyik primer alkohol OH-csoportját foszforsav észteresíti, a molekula királis lesz. A konfiguráció egyértelmű leírásához a glicerin szénatomjait ún. „sn" (stereospecific numbering) számozással látjuk el.



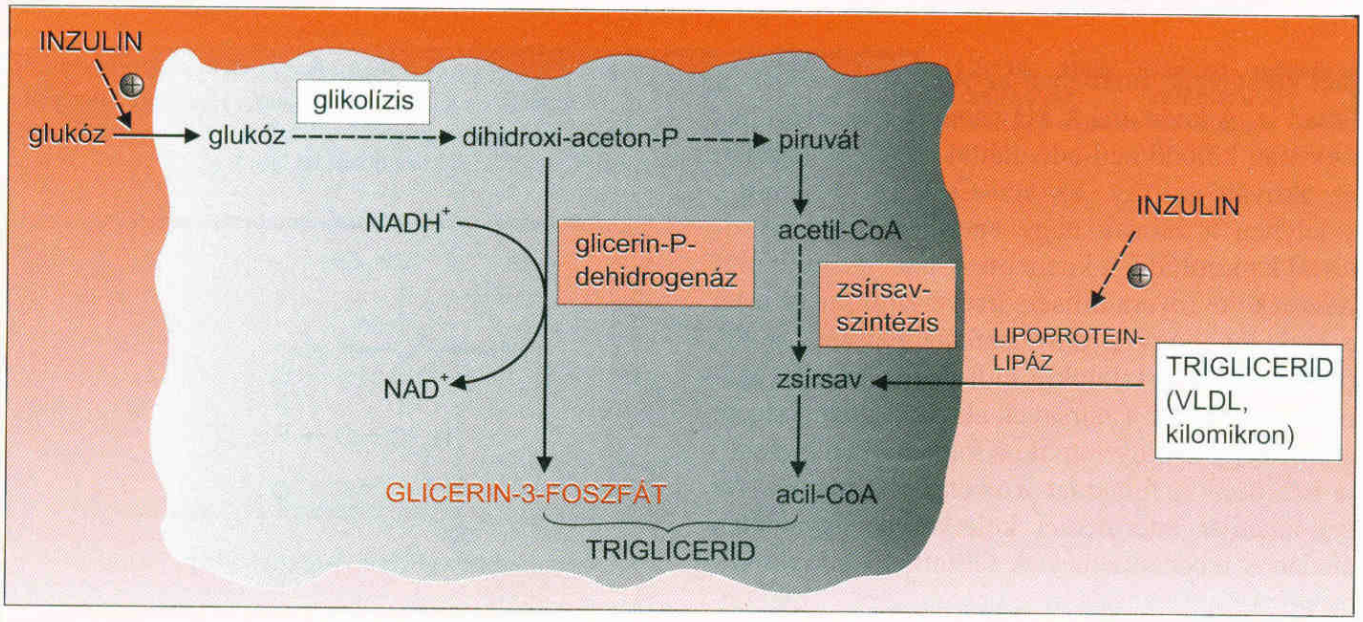
A szervezetben a glicerin-3-foszfát L-konfigurációban fordul elő, így a belőle származtatható valamennyi királis lipidmolekula L-konfigurációjú.

A májban egy másik lehetőség is van a glicerin-3-foszfát kialakulására, mégpedig a glicerinből a glicerin-kináz hatására. Ez az enzim a zsírszövetben hiányzik, így ott a glicerin-3-foszfát kizárólag a glukózmetabolizmusból származik (2-113. ábra).

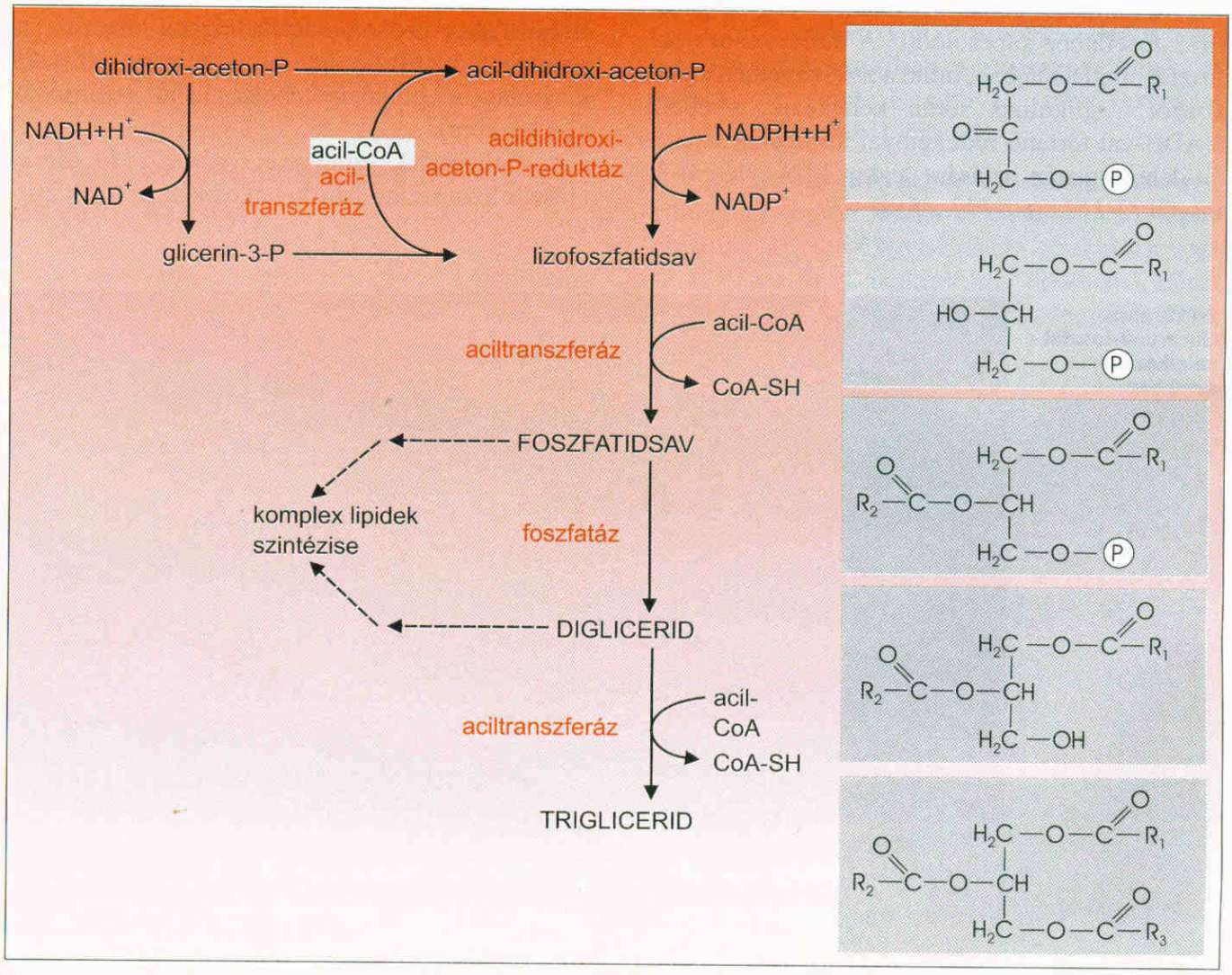
A trigliceridek szintézise során *(2-114. ábra)* először lizofoszfatidsav keletkezik az aktivált zsír-



2-112. ábra. Glicerin-3-foszfát keletkezése a májban



2-113. ábra. A trigliceridekbe beépülő glicerin-3-foszfát és a zsírsavak forrásai az adipocitákban



2-114. ábra. Trigliceridek szintézise

savból és a glicerin-3-foszfátból vagy egy acil-dihidroxi-aceton-foszfát intermedieren keresztül dihidroxi-aceton-foszfátból. A lizofoszfatidsavat egy további aktivált zsírsav észteresíti és kialakul a **foszfatidsav**, ami kulcs intermedier más lipidek szintézisében is. A foszfatidsavról a foszfatidsav-foszfatáz hatására a foszfátcsoport hidrolizál és diglicerid keletkezik, ami végül egy harmadik acil-CoA-val trigliceriddé alakul.

A bélhámsejtekben a trigliceridszintézis során nem keletkezik foszfatidsav, mivel a béllumenben az emésztés eredményeképpen 2-monoacil-glicerol keletkezik és abszorbeálódik a mucosasejtekbe, ahol is acil-CoA-val először 1,2-diglicerid, majd triglicerid alakul ki (lásd A zsírok emésztése és felszívódása című alfejezetet).

Bizonyos törvényszerűséget mutat a különböző zsírsavak helyzete a glicerin három szénatomján. Az első szénatomon általában telített zsírsav, gyakran palmitinsav, a 2. szénatomon telítetlen zsírsav található, a 3. szénatomon bármelyik előfordulhat. A trigliceridekbe beépülő zsírsavak milyenségét és helyzetét valószínűleg részben az aciltranszferázok specificitása, részben pedig az határozza meg, hogy az acil-CoA készletben milyen arányban találhatók a különböző zsírsavak.

A trigliceridek szintézise, mint láttuk, némileg eltérő lehet a májban és a zsírszövetben, további sorsuk pedig markánsan különbözik e két szervben.

A májban a szintetizált triglicerid lipoproteinekbe, elsősorban a very low density lipoprotein-be (VLDL) épül, amely a keringésbe kerül és szállítja a lipideket a perifériás szervekhez (lásd később).

A **zsírszövet** (ún. „fehér" zsírszövet) a trigliceridek szintézisére, raktározására és mobilizálására specializálódott szövet. A szintézisben a glicerin-3-foszfát kizárólag a glukózanyagcseréből származik, s a beépülő zsírsavak egy része is glukózból szintetizálódik az adipocitákban (2-113. ábra). A többi zsírsavat trigliceridek formájában lipoproteinek (VLDL, kilomikron) szállítják a zsírszövethez, ahonnan a kapillárisok endothelsejtjeinek felszínén található lipoprotein-lipáz szabadítja fel a zsírsavakat (lásd később), s ezt az adipociták felveszik. A szénhidrát-ellátottság tehát komplex módon határozza meg a trigliceridek keletkezését és raktározását. A glukóz-ellátottságtól függ a glicerin-3-foszfát keletkezése és mint láttuk a zsírsavak szintézise is (lásd acetil-CoA-karboxiláz szabályozása). A zsírszövet – szemben a májjal – glukózt csak inzulin jelenlétében képes felvenni, s inzulin aktiválja a lipoprotein-lipázt is, ami a trigliceridekben ideszállított zsírsavakhoz hozzájuttatja a zsírszövetet (2-113. ábra). Bőséges szénhidrát-ellátottság esetén tehát a zsírszövet trigliceridet szintetizál és ezeket az adipociták citoplazmájában raktározza. A szervezet fehérjéket, illetve aminosavakat gyakorlatilag nem raktároz, szénhidrátot is csak korlátozott mennyiségben, jórészt csak a máj és izomszövetben, glikogén formájában. Ezzel szemben a zsírokat tartósan, nagy mennyiségben, egy erre specializálódott szövetben tudja raktározni. A metabolizmus regulációi úgy működnek, hogy a szénhidrátokkal elfogyasztott felesleges energia zsírsavakba, majd trigliceridekbe épül be. Ez a raktár jelenti a szervezet legfontosabb energiatartalékát, ahonnan a zsírsavak, a szervezet igényeinek megfelelően mobilizálódnak. A trigliceridek féléletideje néhány nap, ami azt mutatja, hogy a zsírszövetben folyamatos és intenzív triglicerid-szintézis és -lebontás folyik.

Amikor a zsírszövetben túlzott mértékűvé válik a zsírok felszaporodása, kialakul az **obesitas** (elhízás), amelynek során az adipociták száma és az egyes adipociták mérete egyaránt megnő.

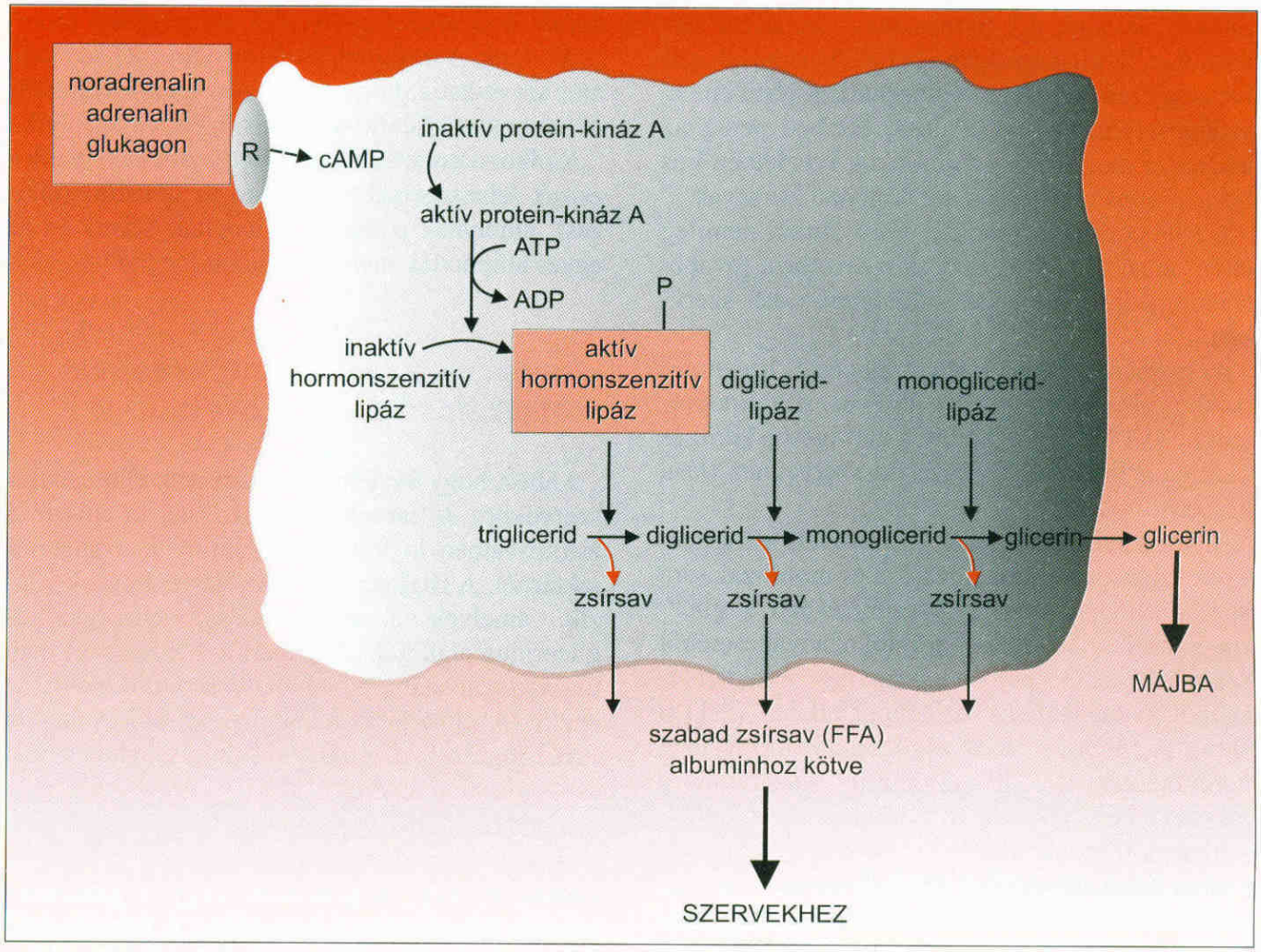
Lipolízis – a raktározott zsírsavak mobilizálása a zsírszövetből

Ahhoz, hogy a raktározott zsírsavak eljussanak a szervekhez és energiát szolgáltassanak, először a zsírszövetben ki kell szabadulniuk a triglicerid-raktárból. A trigliceridek hidrolízisét lipázok végzik, amelyek a trigliceridet zsírsavvá és glicerinné alakítják. A glicerint a zsírszövet nem tudja hasznosítani, mivel hiányzik a glicerin-kináz enzim. A glicerin az adipocitákból kidiffundál, a vérkeringéssel a májba szállítódik, ahol glicerin-3-foszfáttá alakul. Itt vagy trigliceridszintézisre használódik, vagy dihidroxi-aceton-foszfáttá alakul a 2-112. ábrán bemutatott reverzibilis reakcióban és vagy a glikolízis, vagy a glukoneogenezis folyamatába kapcsolódik. A felszabaduló zsírsavak az adipociták membránján átdiffundálva a vérpályába kerülnek, ahol azonnal albuminhoz

kötődnek és szabad (nem észteresített) zsírsavként (FFA; free fatty acid) szállítódnak a szervekhez.

A trigliceridek mobilizálásában meghatározó szerepe van annak a lipáznak, amelyik az első zsírsavat felszabadítja, általában a glicerin első vagy harmadik szénatomjáról. Ez az enzim hormonális szabályozás alatt áll, s megkülönböztetendő a másik két zsírsavat lehasító enzimtől (diglicerid-lipáz és monoglicerid-lipáz) a **hormonszenzitív lipáz** elnevezést kapta. Ennek az enzimnek a regulációja biztosítja, hogy a keringésben mindig legyen elegendő mennyiségű zsírsav a szervek ellátásához. Zsírsavak mobilizálódnak a zsírszövetből, amikor a vércukorszint csökken, így étkezések közötti időszakban, éhezés alatt, valamint tartós fizikai és pszichés igénybevétel során. Ezzel szemben étkezések után, állandó, bőséges táplálékbevitel mellett, testi és lelki nyugalomban a zsírsavak nem mobilizálódnak, hanem éppen ellenkezőleg, triglicerid raktárba épülnek be. A folyamatot a *2-115. ábrán* látható módon hormonok szabályozzák. Az adipociták membránjában receptorok kötik a szimpatikus neurotranszmitter noradrenalint, illetve számos, a vérben keringő hormont (glukagon, adrenalin), aminek következtében aktiválódik az adenilát-cikláz, cAMP keletkezik és aktiválódik a cAMP-függő protein-kináz. Az adipocitákban a cAMP-függő protein-kináz egyik szubsztrátja a hormonszenzitív lipáz, ami foszforiláció hatására aktiválódik és elindítja a trigliceridek hidrolízisét. Az enzim foszfatázok hatására defoszforilálódik és inaktiválódik, amikor a vérben emelkedik a glukóz, illetve az inzulinkoncentráció.

Stimulálják a lipolízist egyéb hormonok is, mint pl. a kortikoszteroidok, a tiroxin és különböző nö-



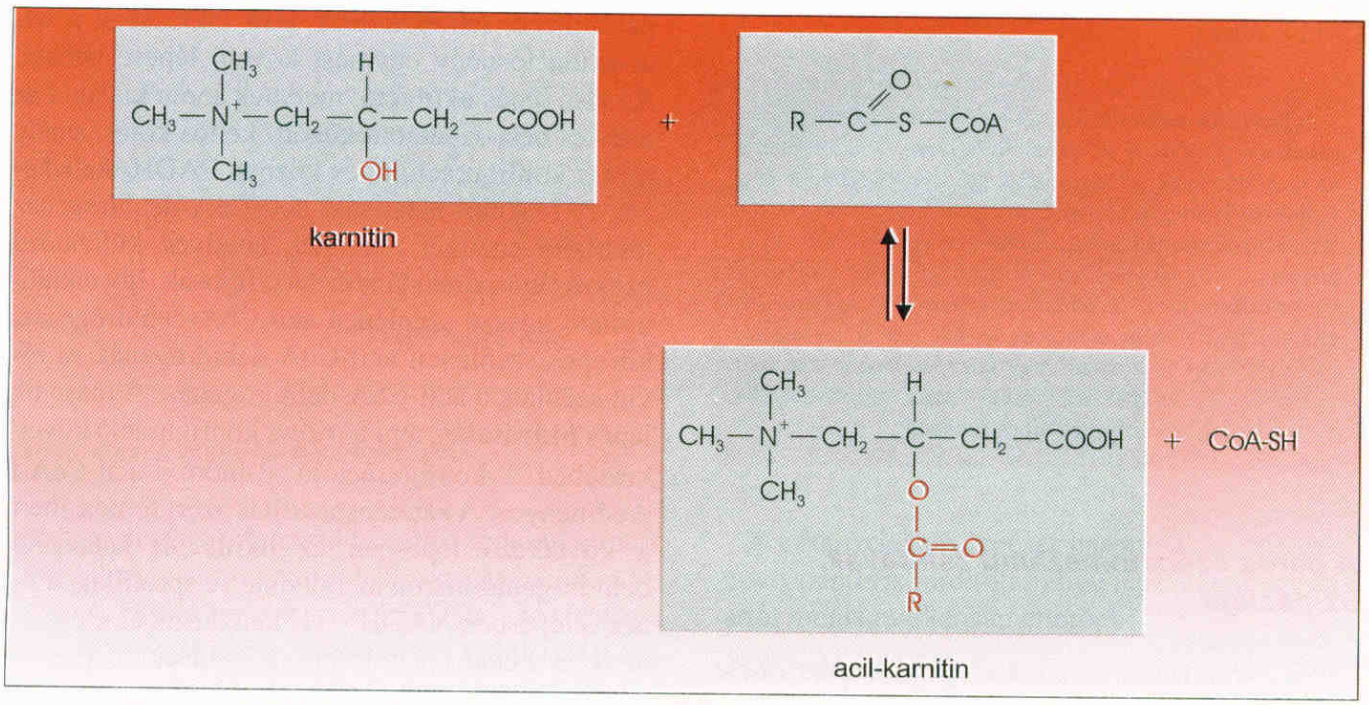
2-115. ábra. Zsírsavak mobilizálása a zsírszövet trigliceridraktárából

vekedési hormonok, amelyek azonban az enzimek mennyiségét növelik és ezért hatásuk lassúbb és hosszan tartóbb.

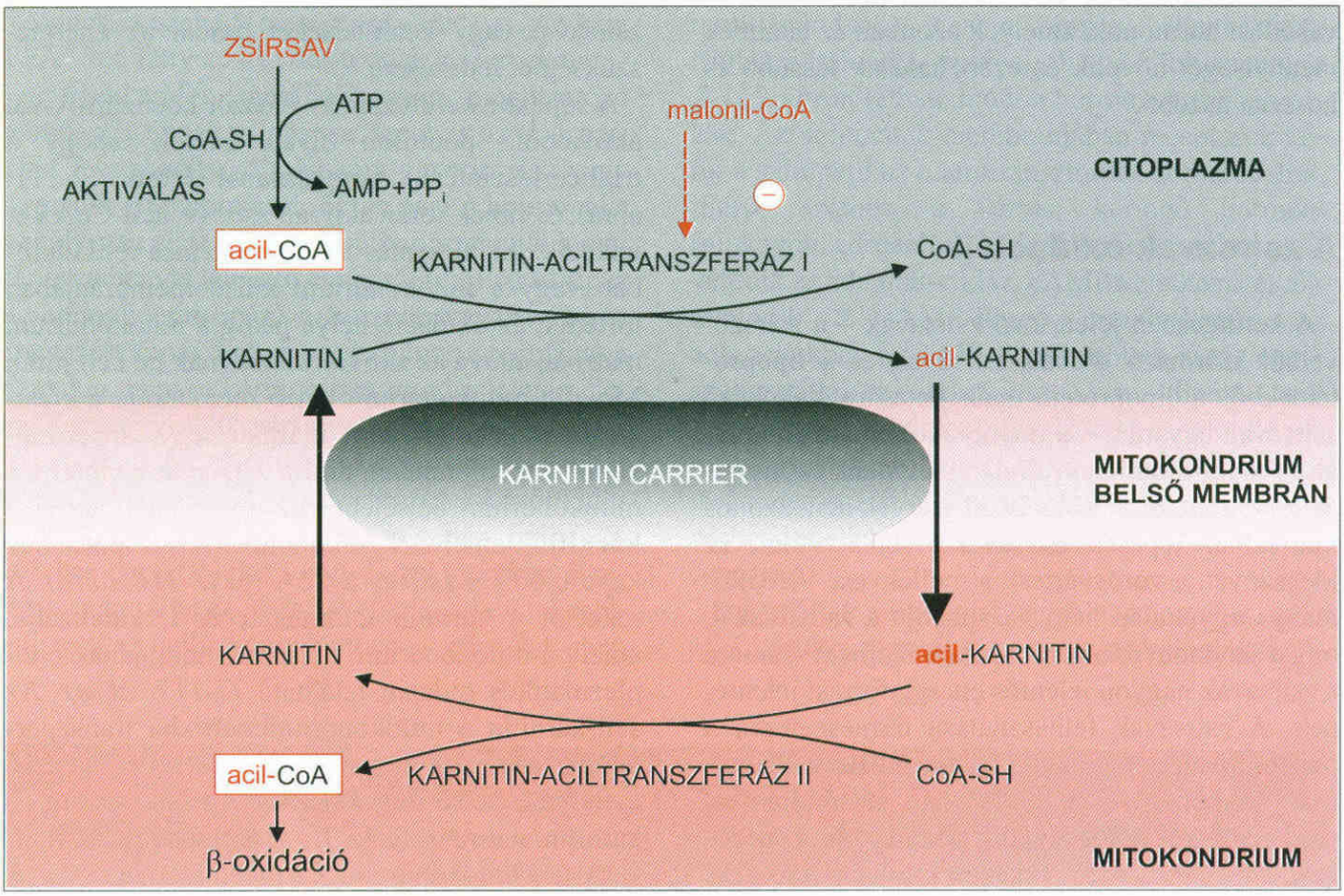
A zsírsavak oxidációja

A keringésben jelen lévő zsírsavak – a zsírszövetből származó szabad zsírsavak és a lipoproteinekből a lipoprotein-lipáz hatására keletkező zsírsavak egyaránt – a membránokon átdiffundálva a sejtekbe kerülnek, ahol oxidálódnak és energiát szolgáltatnak. A különböző szervek nem azonos mértékben képesek zsírsavakat felhasználni; az idegszövet, a vörösvértest, a mellékvese velőállománya egyáltalán nem hasznosítja a zsírsavakat, míg a szívizom és a harántcsíkolt izomzat számára a zsírsavak nagyon jelentős energiaforrást jelentenek. A zsírsavak felhasználása természetesen a metabolizmus állapotától is függ. Jóllakott állapotban, amikor a sejtek elsősorban szénhidrátokat oxidálnak, a felesleget pedig raktározzák, nem folyik zsírsav-oxidáció. Étkezések közötti időszakban, tartós fizikai munkavégzés közben és különösen éhezésben a zsírsav-oxidáció jelentősége megnő. Hosszan tartó éhezésben a legtöbb sejt zsírsavat vagy ketontesteket oxidál az energiaszükséglet fedezésére.

A sejtekbe került zsírsav először koenzim-A-val aktiválódik pontosan olyan módon, ahogy a trigliceridszintézis tárgyalásánál láttuk (2-111. ábra), és ennek során aktivált zsírsav, acil-CoA keletkezik. Az aktiválás az endoplazmás retikulumban vagy a mitokondrium külső membránjában történik, az oxidáció helye pedig a mitokondrium matrixa, ahová az aktivált zsírsavnak be kell jutni. Mivel a mitokondrium belső membránja a koenzim-A molekulára nem átjárható, egy carrier működik a membránban, ami a zsírsavat bejuttatja a mitokondrium belsejébe. Ez a speciális carrier a **karnitin**, amelynek alkoholos OH-csoportjához kapcsolódik a zsírsav a CoA-ról *(2-116. ábra)*. A reakciót a karnitin-aciltranszferáz I. katalizálja, amely a mitokondrium belső membránjának citoplazmatikus oldalán található *(2-117. ábra)*. Az acil-karnitin a mitokondriummatrixba transzportálódik egy karnitinmolekuláért cserébe. A belső membrán belső felszínén egy másik enzim, a karnitin-aciltranszferáz II. visszaalakítja az acil-CoA-t, a mitokondriális CoA felhasználásával. A szabaddá váló karnitin azon a cseretranszporton keresztül jut vissza a citoplazmába, amely az acil-karnitint a mitokondriumba juttatja, az acil-CoA



2-116. ábra. A karnitin-aciltranszferáz által katalizált reakció



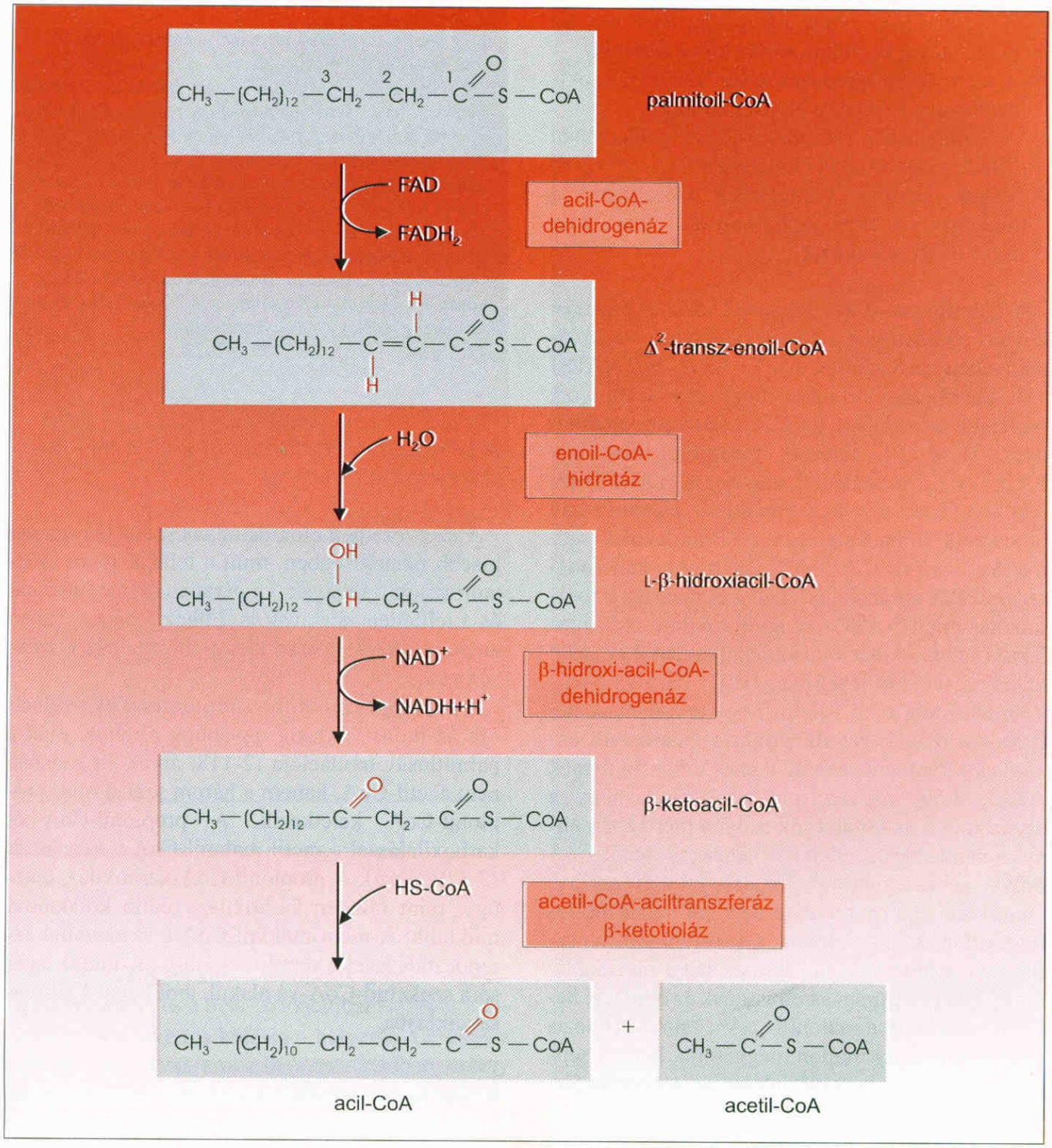
2-117. ábra. Zsírsavak transzportja a citoplazmából a mitokondriumba

pedig a mitokondriumban készen áll az oxidációra (2-117. ábra).

A **karnitin-aciltranszferáz enzim hiányában** a zsírsavak nem jutnak el az oxidáció helyére és lehetetlenné válik a zsírsavak felhasználása. Az ilyen egyénekben a fájdalmas izomgörcsök már kora gyermekkorban megjelennek izommunka során, éhezésben vagy zsírdús étkezés után, vagyis azokban az állapotokban, amikor a harántcsíkolt izom normálisan zsírsavakat égetne. Az enzimdefektus nem érinti az izmok egyéb anyagcsere-folyamatait és a rövid vagy közepes láncosszúságú zsírsavak égetését sem, mivel ezek mitokondriális transzportjához karnitinre nincs szükség.

A páros szénatomszámú zsírsavak oxidációja

A mitokondriumban a zsírsavak a **béta-oxidáció** során bomlanak le, ciklusonként két szénatommal rövidülnek, miközben egy acetil-CoA, egy $FADH_2$ és egy $NADH+H^+$ keletkezik. A *2-118. ábrán* a palmitinsav lebomlásának első ciklusában a béta-oxidáció négy egymást követő lépése látható. Az első lépés **oxidáció**, melynek során kialakul az alfa- és béta-szénatom közötti kettős kötés, amely *transz* konfigurációjú, és közben $FADH_2$ keletkezik. A reakciót katalizáló acil-CoA-dehidrogenáz többfajta enzimet jelenthet, amelyek különböző hosszúságú zsírsavláncra specifikusak. Így elkülöníthető hosszú szénláncú acil-CoA-dehidrogenáz, közepes szénláncú acil-CoA-dehidrogenáz és rövid szénláncú acil-CoA-dehidrogenáz. A második lépés **hidratálás**, ami a *transz* konfiguráció következtében L-konfigurációjú β-hidroxi-acil-CoA-t eredményez. A sztereospecifitás azért fontos, mert a következő lépésben az **oxidációt** katalizáló dehidrogenáz enzim az L-izomérre specifikus. Ebben a lépésben $NADH + H^+$ keletkezik és megtörténik a béta-szénatomon az oxidáció (innen a béta-oxidáció elnevezés). Az utolsó lépésben **tiolízis** történik, amelynek során újabb CoA belé-



2-118. ábra. A zsírsavak béta-oxidációja

pésével acetil-CoA hasad le, s így kialakul a most már két szénatommal rövidebb aktivált zsírsav. Az utóbbi három enzim a zsírsavlánc hosszúsága szempontjából széles specifitású. A tiolízissel keletkező két szénatommal rövidebb acil-CoA egy újabb béta-oxidációs ciklusban alakulhat tovább.

A béta-oxidáció lépései hasonlóak a zsírsav de novo szintézis fordított irányú lépéseihez, azonban attól mégis markánsan eltérőek.

❶ Mindenekelőtt, más kompartmentben történnek; a zsírsavszintézis a citoplazmában, az oxidáció a mitokondriumban folyik.

❷ A zsírsavszintézisben a folyamat ACP-hez, az oxidációban koenzim-A-hoz kötve történik.
❸ A szintézisben a redukciókban NADPH, az oxidációban a FAD és a NAD a kofaktor.
❹ A szintézisben D-hidroxi-, az oxidációban L-hidroxi-intermedier keletkezik.
❺ Végül pedig a szintézisben közvetlenül a malonil-CoA vesz részt, míg az oxidációban acetil-CoA keletkezik.

A palmitinsav teljes lebontásához hét egymást követő ciklusra van szükség, amelynek végeredményeképpen 8 acetil-CoA, 7 $FADH_2$ és 7 NADH $+H^+$ keletkezik. Tekintve, hogy egy acetil-CoA molekula eloxidálása 12 ATP szintézisét eredményezi (lásd 2.1. fejezet), valamint, hogy egy $FADH_2$ visszaoxidálása 2, míg egy NADH-é 3 molekula ATP szintézisét eredményezi, a palmitinsav oxidációja során keletkező ATP-molekulák száma: 8x12 + 7x2 + 7x3 =131, viszont le kell vonni az aktiválás során felhasznált két makroerg foszfátkötés miatt 2 ATP-t. Vagyis a palmitinsav-molekula teljes oxidációja molekulánként 129 ATP keletkezését teszi lehetővé.

Mindezideig nem ismert, hogy a zsírsavak béta-oxidációjának **regulációjában** valamelyik enzimnek kitüntetett szerepe lenne. Valószínűbbnek látszik, hogy az oxidáció attól függ, hogy a szubsztrátok és kofaktorok milyen mértékben állnak rendelkezésre, illetve a keletkező acetil-CoA milyen sebességgel tud eloxidálódni a citromsavciklusban. Fontos reguláló szerepe van a **malonil-CoA-nak**, ami gátolja a karnitin-acil-transzferáz I. enzimet (2-117. ábra), ezáltal megakadályozza, hogy a zsírsavak eljussanak az oxidáció helyére. Minthogy a malonil-CoA a zsírsavszintézis intermedierje, ily módon meggátolja, hogy a sejtben egyidejűleg zsírsavszintézis és -lebomlás történjen, vagyis a citoplazmában szintetizálódó zsírsavak a mitokondriumba jussanak és eloxidálódjanak.

A zsírsavak béta-oxidációjának károsodását okozza az a nemrégiben felfedezett öröklődő enzimdefektus, amelynek lényege az **acil-CoA-dehidrogenáz elégtelen működése.** Attól függően, hogy melyik dehidrogenáz érintett, különböző hosszúságú zsírsavak oxidációja károsodhat; a leggyakoribb a közepes hosszúságú acil-CoA-dehidrogenáz elégtelensége. A tünetek többnyire több óráig tartó éhezést követően jelentkeznek, általában már az első két életévben, hányás, letargia, gyakran coma formájában. A zsírsav-oxidáció gátlása következtében ketontestek sem keletkeznek, az izmok csak glukózt égetnek, ami következményes hypoglykaemiához vezet. A közepes szénlánchosszúságú zsírsavak alternatív úton alakulnak át, részben az omega-szénatomon oxidálódnak és közepes hosszúságú dikarbonsavak jönnek létre, részben glicinnel és karnitinnel észtereket alkotnak, amelyek a vizeletben megjelennek és a diagnózis megállapítását teszik lehetővé. Hosszan tartó éhezés elkerülésével a metabolikus komplikációk elkerülhetők és az érintett egyének egyensúlyban tarthatók.

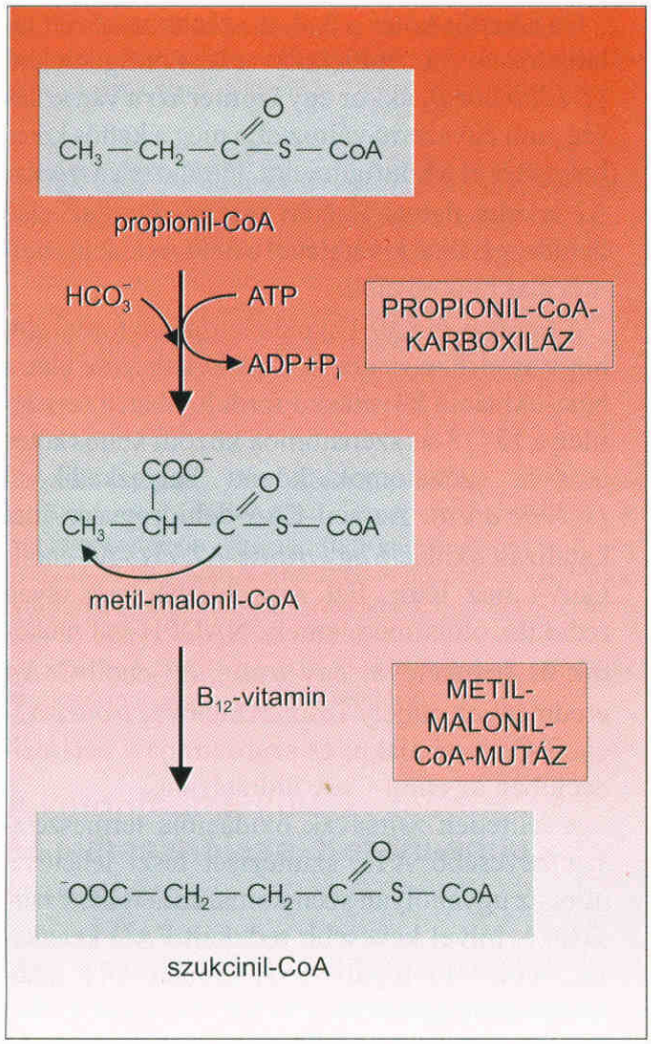
A páratlan szénatomszámú és a telítetlen zsírsavak oxidációja

A szervezetben eloxidálódnak – bár lényegesen kisebb mennyiségben, mint a telített, páros szénatomszámú zsírsavak – a páratlan szénatomszámú és a telítetlen zsírsavak is. Ehhez a béta-oxidáció enzimjein kívül néhány kiegészítő enzimre is szükség van.

A páratlan szénatomszámú zsírsavak oxidációja az utolsó ciklusig ugyanúgy történik, mint a palmitinsav oxidációja (2-118. ábra). Itt azonban nem acetil-CoA, hanem a három szénatomos propionil-CoA keletkezik. A propionil-CoA-ból karboxilálással metil-malonil-CoA keletkezik *(2-119. ábra)*. A propionil-CoA-karboxiláz, csakúgy, mint minden karboxiláz, biotin kofaktorral működik. A metil-malonil-CoA a szénatomok átrendeződésével a metil-malonil-CoA-mutáz hatására szukcinil-CoA-vá alakul, ami belép a citromsavciklusba.

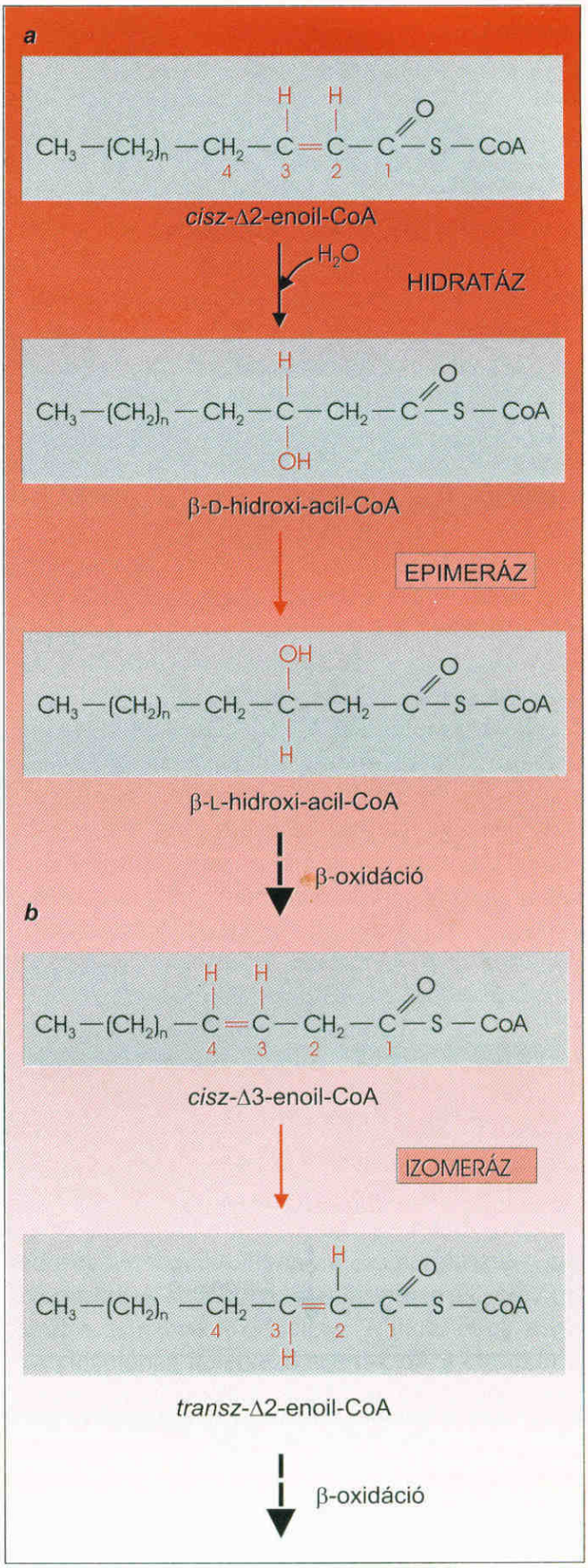
A metil-malonil-CoA-mutáz működéséhez B_{12}-vitaminra van szükség, melynek hiányában ez a reakció nem történik meg és propionsav és metil-malonsav jelenik meg a vizeletben. A mutáz enzim veleszületett hiánya okozza az **öröklődő metilmalonsavas acidaemiát és aciduriát**, melyben metilmalonsav szaporodik fel a vérben és jelenik meg a vizeletben.

A telítetlen zsírsavak oxidációját is nagyrészt a béta-oxidáció enzimei végzik.

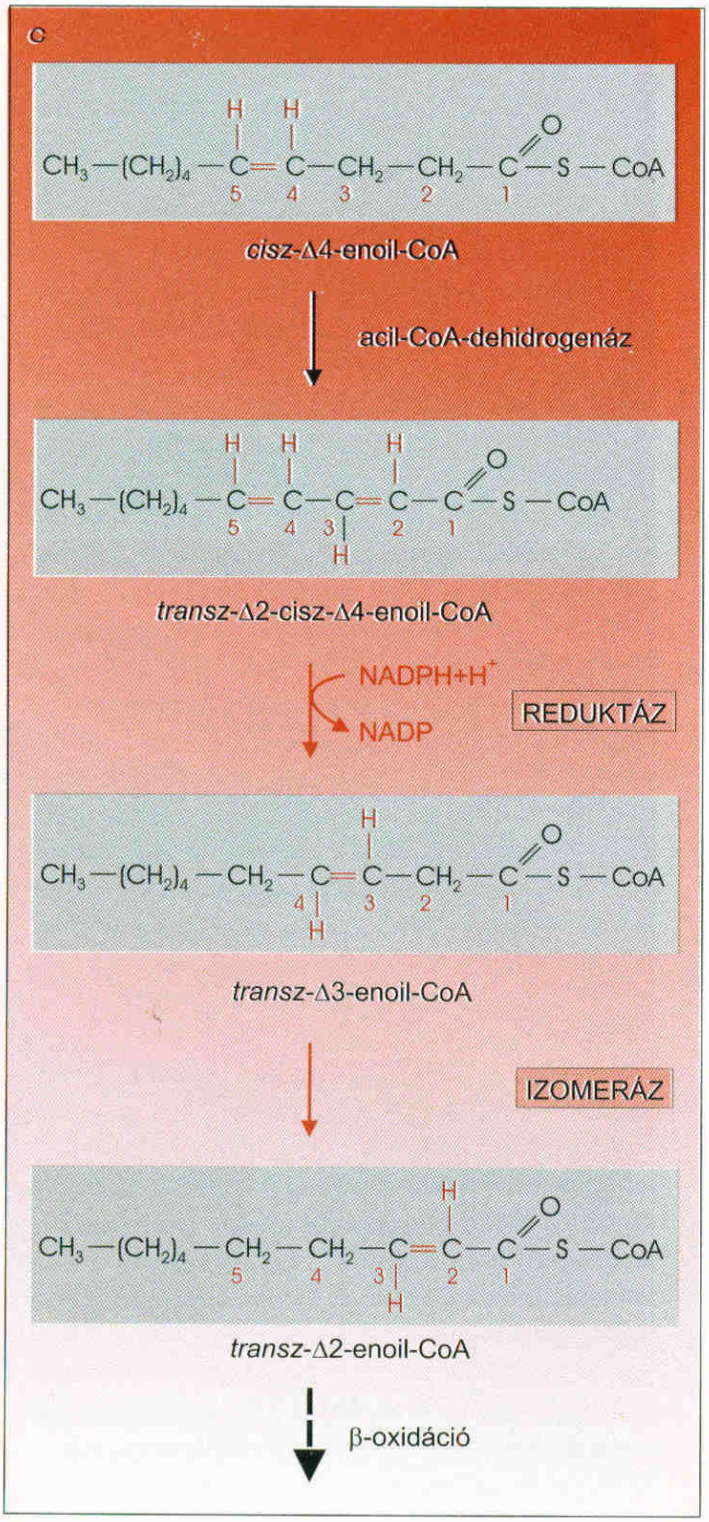


2-119. ábra. A propionil-CoA metabolizmusa

Ha a zsírsavban a kettős kötés *transz*-konfigurációjú és a béta-oxidációban, amikor a folyamat eljut a kettős kötésig – helyzete Δ2, vagyis megegyezik azzal, ami a béta-oxidációban amúgy is kialakulna –, akkor az első dehidrogenálási lépés kivételével az oxidációt a béta-oxidáció további enzimei végzik. Néhány ettől eltérő helyzet is lehetséges, melynek megoldására további enzimekre van szükség. Ha a kettős kötés a megfelelő helyen van, de a molekula *cisz*-konfigurációjú *(2-120a ábra)*, akkor a béta-oxidációban megtörténik a hidratálás, mely azonban nem L-, hanem D-hidroxi-acil-CoA-t eredményez, s ez nem szubsztrátja a következő, NAD^+-dal működő dehidrogenáznak. Ilyenkor egy **epimeráz** megváltoztatja a konfigurációt, és a molekula már tovább alakulhat.



2-120a-b ábra. A telítetlen zsírsavak oxidációjának kiegészítő lépései. *Az a, b reakciókhoz lásd a szöveget*



2-120c ábra. A telítetlen zsírsavak oxidációjának kiegészítő lépései. *A c reakciókhoz lásd a szöveget*

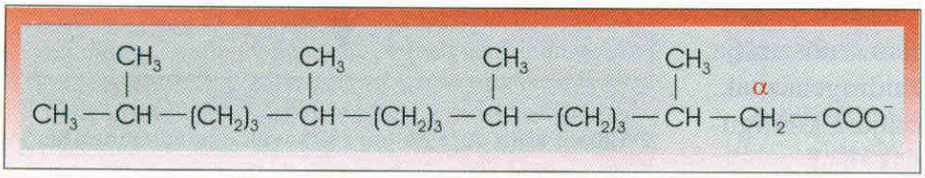
Ha a kettős kötés a 3–4-es szénatom között található, s a molekula *cisz*-konfigurációjú *(2-120b ábra)*, akkor egy **izomerázra** van szükség, ami egyszerre változtatja meg a kettős kötés helyzetét és a konfigurációt, létrehozva a *transz*-Δ2 módosulatot. Ezt az intermediert az első dehidrogenálás kivételével a béta-oxidáció enzimei alakítják tovább.

A linolsav (18Δ9,12) oxidációjában fordul elő, hogy az első négy acetil-CoA keletkezése után a béta-oxidáció következő fordulójában az eredetileg a 12–13-as szénatomok közötti kettős kötés a 4–5. szénatomok között helyezkedik el *(2-120c ábra)*. Az acil-CoA-dehidrogenáz által katalizált oxidáció egy *transz*-Δ2, *cisz*-Δ4-enoil-CoA-t hoz létre. Ezt a problémát egy olyan reduktáz oldja meg, amely NADPH-val működik és redukcióval egy *transz*-Δ3-enoil-CoA-t eredményez, amely izomerizációval *transz*-Δ2-enoil-CoA-vá alakul és szubsztrátja a béta-oxidációban az enoil-CoA-hidratáznak.

A telítetlen zsírsavak oxidációja természetesen kevesebb ATP szintézisét teszi lehetővé, mint az ugyanolyan szénatomszámú telített zsírsavaké, mivel kevesebb redukált FAD keletkezik, ami a terminális oxidációban ATP szintézisét eredményezné.

Alfa-oxidáció és omega-oxidáció

Néhány esetben a béta-oxidációnál leírtaktól némileg eltérően is történhet a zsírsavak oxidációja, ami mennyiségileg nem jelentős ugyan, azonban egy-egy esetben fiziológiai vagy patofiziológiai jelentőségű lehet. Ilyen az alfa-oxidáció, amikor rövidebb szénatomszámú zsírsavak alfa-szénatomján történik egy hidroxilálás, s az ezt követő dekarboxilálás után kezdődik el a béta-oxidáció. Ez történik a *2-121. ábrán* látható fitánsav oxidációjában. Fitánsav a fitol metabolizmusában keletkezik és nagyobb mennyiségben a tejben és állati zsírokban található. A béta-oxidáció a 3. szénatomon lévő -CH_3-csoport miatt csak akkor tud elkezdődni, ha először megtörténik az alfa-szénatomon a hidroxilálás, majd a dekarboxilálás. Ezt követően a béta-oxidációban három propionil-CoA, három acetil-CoA és egy izobutiril-CoA molekula keletke-



2-121. ábra. Fitánsav

zik. A hidroxilálás valószínűleg az endoplazmás retikulumban és a mitokondriumban történik az ún. kevert funkciójú oxigenázok részvételével.

Egy ritka genetikai betegségben, a **Refsum-kórban** nem történik meg az alfa-hidroxiláció, a fitánsav nem bomlik le, hanem felhalmozódik a szövetekben és a szérumban, aminek súlyos neurológiai következményei vannak (retinitis pigmentosa, perifériás neuropathia, cerebellaris ataxia stb.). A tejtermékek és a hús fogyasztásának visszaszorításával az állapot lényegesen javítható.

Szintén ritkán, de előfordul, főleg a közepes szénatomszámú zsírsavakkal, hogy a hidroxilálás az omega-szénatomon történik (omega-oxidáció), s további oxidációval dikarbonsav alakul ki. A dikarbonsavak bármelyik karboxilcsoporton aktiválódhatnak és a béta-oxidációban rövidebb szénláncú dikarbonsavvá alakulnak. A folyamat elsősorban a peroxiszómákban történik, szintén kevert funkciójú oxigenázok részvételével.

A ketontestek keletkezése és felhasználása. Ketonaemia, ketonuria

A ketontestek az acetil-CoA-ból keletkező, vízoldékony molekulák, amelyek elsősorban a **májban**, kisebb mértékben a **vesében** szintetizálódnak és a perifériás szövetek számára alternatív energiaforrásul szolgálnak.

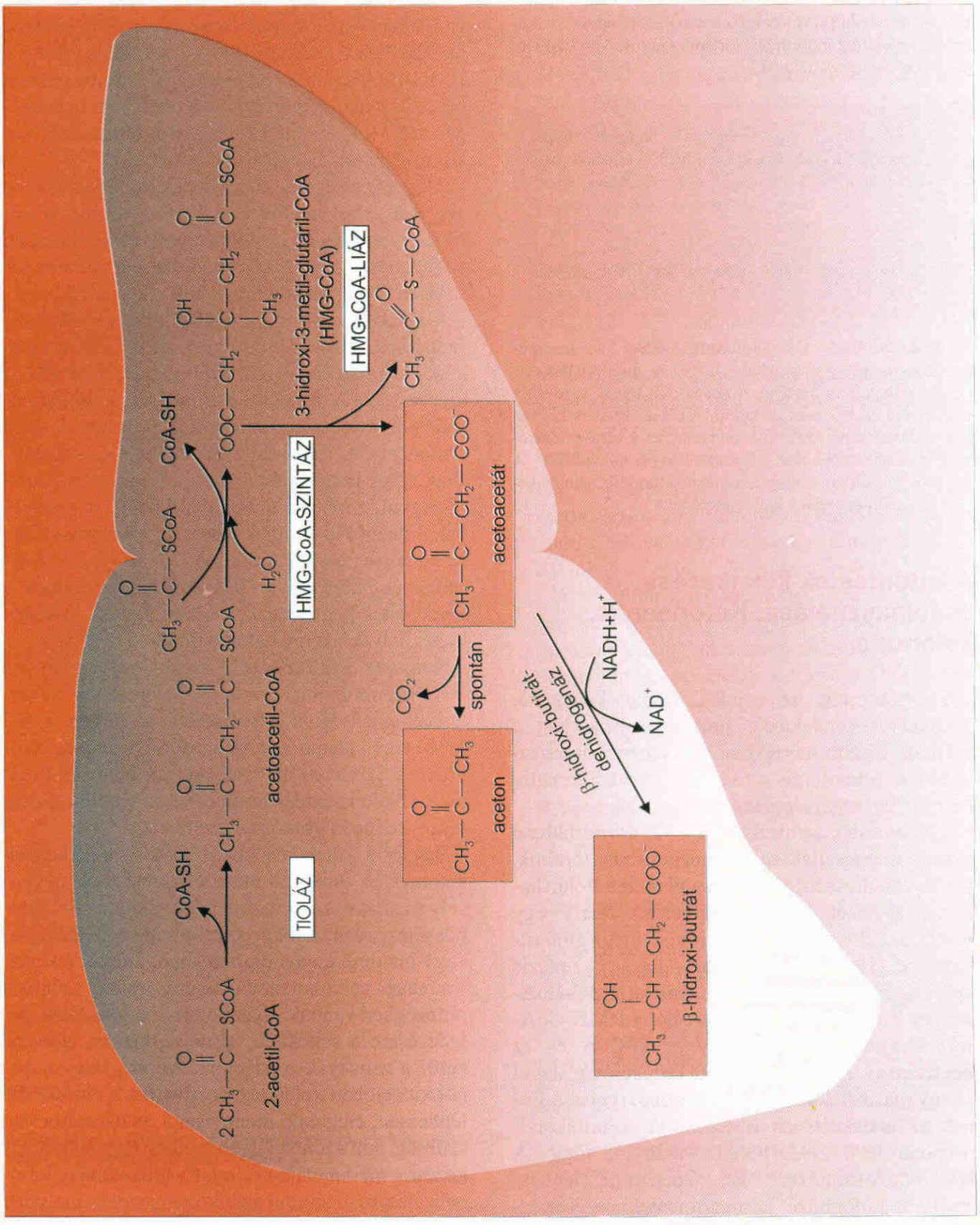
A ketontestek szintézise a *2-122. ábrán* látható módon a májsejtek mitokondriumában történik. Két molekula acetil-CoA-ból a béta-ketotioláz hatására acetoacetil-CoA keletkezik, amely egy újabb acetil-CoA-val 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-vá (HMG-CoA) alakul. Ez a szintézis sebességmeghatározó lépése, amit a HMG-CoA-szintáz katalizál. A HMG-CoA-ból a HMG-CoA-liáz hatására keletkezik egy acetil-CoA és az **acetecetsav**. Az acetecetsavból redukcióval alakul ki egy másik ketontest, a **béta-hidroxivajsav.** Ennek az átalakulásnak a sebessége a mitokondriumban lévő NADH/NAD^+ aránytól függ. A HMG-CoA-szintáznak két izoenzimje létezik, amelyek különböző kompartmentekben helyezkednek el: a mitokondriumban található az egyik izoenzim, a citoplazmában pedig a másik. Intramitokondriálisan HMG-CoA-szintáz csak a májban található, ezért ketontestszintézisre csak itt van lehetőség. A citoplazmában csaknem minden sejtben keletkezik HMG-CoA a citoplazmatikus HMG-CoA-szintáz hatására. A citoplazmában nincs liáz enzim, vagyis ketontestek nem keletkeznek, a HMG-CoA itt a koleszterinszintézisben alakul tovább (lásd később).

Kis mennyiségben, spontán dekarboxilációval az acetecetsavból **aceton** keletkezik, patológiás körülmények között, pl. diabeteses ketoacidosisban ez olyan mennyiséget érhet el, hogy a tüdőben kiválasztódva érzékelhetővé válik a leheletben.

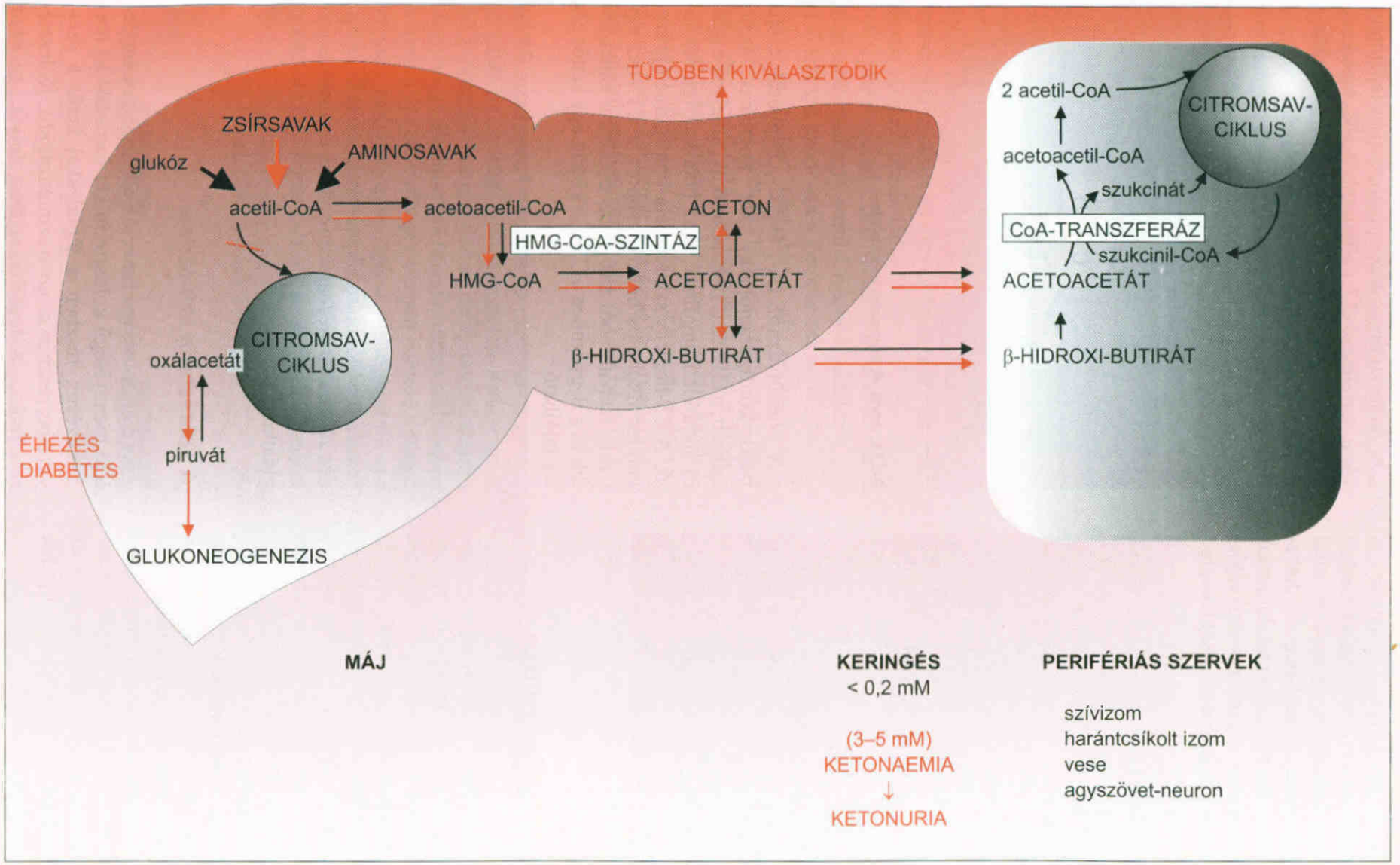
A ketontestek a májsejtekből a keringésbe diffundálnak, s mivel viszonylag jól oldódnak vizes közegben, carrier nélkül szállítódnak a perifériás szervekhez. A sejtekbe diffundálva a mitokondriumban a béta-hidroxi-butirát visszaoxidálódik acetoacetáttá, az pedig az aceto-acetát:szukcinil-CoA CoA-transzferáz hatására acetoacetil-CoA-vá alakul, amiből a tioláz által katalizált reakcióban 2 acetil-CoA keletkezik, s ez a citromsavciklusba lépve eloxidálódik *(2-123. ábra)*. A májsejtekben hiányzik a CoA-transzferáz, vagyis a ketontestek nem tudnak – értelmetlenül – a keletkezés helyén azonnal eloxidálódni.

Normális körülmények között, egyensúlyban lévő metabolizmus során is keletkeznek ketontestek, amelyek koncentrációja a vérben a 0,2 mM-t nem haladja meg. A perifériás szervek, különösen a szívizom és a vesekéreg ilyen körülmények között is oxidál ketontesteket, sőt előnyben is részesíti őket a glukózzal szemben.

Nagyobb mennyiségben akkor keletkeznek ketontestek, amikor a metabolizmusban az egyensúly a zsírsavak oxidációja felé tolódik el. Ez történik **éhezésben,** amikor szénhidráthiány alakul ki, vagy inzulinhiányos **diabetesben**, amikor a sejtek – a magas vércukorszint ellenére – relatív szénhidrátínségben vannak. Ilyenkor az energiaszükséglet fedezésére a sejtekben, a májsejtben is, előtérbe kerül a zsírsavak oxidációja. Ahhoz, hogy a béta-oxidációban keletkező acetil-CoA a citrátkörbe léphessen, elegendő mennyiségű oxálacetátra van szükség, ami azonban ilyen esetben nem áll rendelkezésre, mert a májban a relatív glukózhiány kompenzálására megindul a glukoneogenezis, melyben elhasználódik az oxálacetát egy része. A citrátkör nem tudja felvenni a nagy mennyiségben keletkező acetil-CoA-t, ami ilyenkor fokozott mértékben terelődik a ketontest-keletkezés irányába (2-123. áb-



2-122. ábra. A ketontestek keletkezése a májban



2-123. ábra. A ketontestek keletkezésének és felhasználásának összefoglalása. *A piros nyilak azokat a folyamatokat jelzik, amelyek fokozottan érvényesülnek éhezésben és inzulinhiányos diabetesben*

ra, piros nyilak). A periférián a sejtekben a glukózhiány miatt fokozott jelentőségűvé válik a ketontestek égetése, különösen az agyban, ahol elenyésző a zsírsavégetés. Éhezésben és diabetesben az agyszövet – ahol normális metabolizmus mellett glukózégetés folyik – az energiaszükségletének akár 75%-át is képes ketontestekből fedezni.

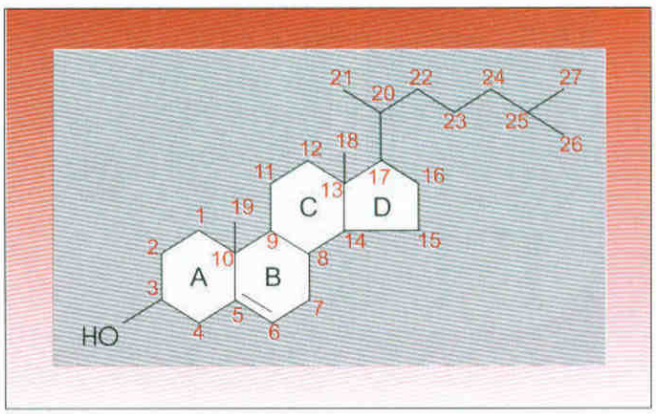
Amikor a ketontestek keletkezésével nem tart egyensúlyt a periférián történő oxidáció, ketonaemia alakul ki. A ketontestek fokozott mértékű keletkezése éhezésben normális regulációnak tekinthető, s ilyenkor a vérben a koncentráció 3–5 mM is lehet (fiziológiás ketosis). Ezzel szemben a **diabeteses ketoacidosis** olyan patológiás körülmény, amikor a vérben a ketontestek koncentrációja a 20 mM-t is elérheti. Tekintettel arra, hogy a ketontestek savak (pK_s 3,5), jelentősen csökkentik a vér pH-ját (metabolikus acidosis). A ketontestek megjelennek a vizeletben (ketonuria), súlyos diabetesben a napi ketontestürítés elérheti az 5 g-ot. A ketontestek hidrofil molekulák, kiválasztásuk jelentős vízveszteséggel is jár, ami a keringő vértérfogat csökkentésével tovább rontja a beteg állapotát.

A koleszterin metabolizmusa

A koleszterin a szervezet egyik legellentmondásosabb molekulája, amely minden sejtben megtalálható és életfontosságú funkciók ellátásához nélkülözhetetlen, ugyanakkor ha a normálisnál nagyobb mennyiségben fordul elő, korunk egyik leggyakoribb betegségének, az atherosclerosisnak és ennek következtében a szívinfarctus és az agyvérzés kialakulásának lehet kiinduló tényezője.

A koleszterin minden sejtmembránnak alkotórésze és fontos feladata a **membránok fluiditásának szabályozása.** Koleszterinből történik a különböző **szteroidhormonok szintézise**, amelyek esszenciálisak a normális metabolizmus, a só- és vízháztartás és a nemi működések szabályozásához egyaránt. Koleszterin a kiinduló anyaga az **epesavak szintézisének** is, amelyek a lipidek emésztéséhez szükségesek.

A koleszterin ciklopentanoperhidrofenantrénvázat tartalmazó 27 szénatomból álló molekula, amelynek képletét és a szénatomok számozását a *2-124. ábra* mutatja.



2-124. ábra. A koleszterin képlete

A szteránvázhoz (A-, B-, C-, D-gyűrűk csupa *transz*-konfigurációjúak) két anguláris metilcsoport, a C18 és C19 kapcsolódik, amelyek a gyűrű síkja elé irányulnak, azaz béta-konfigurációjúak. A C3-hoz egy szintén béta-konfigurációjú szekunder alkoholos hidroxilcsoport, a C17-hez egy nyolc szénatomból álló alifás oldallánc kapcsolódik és a B-gyűrűben a C5–C6 között egy kettős kötés található.

A szervezetben előforduló koleszterin 70%-a nem szabad koleszterinként, hanem koleszterinészterként van jelen, amelyben az alkoholos OH-csoporthoz észterkötéssel kapcsolódik egy zsírsav, legtöbb esetben olajsav vagy linolsav. A koleszterin fontos tulajdonsága, hogy vízben nagyon rosszul oldódó, hidrofób molekula, ezért kulcskérdés azoknak a mechanizmusoknak a normális működése, amelyek a szervezetben a koleszterint oldatban tartják.

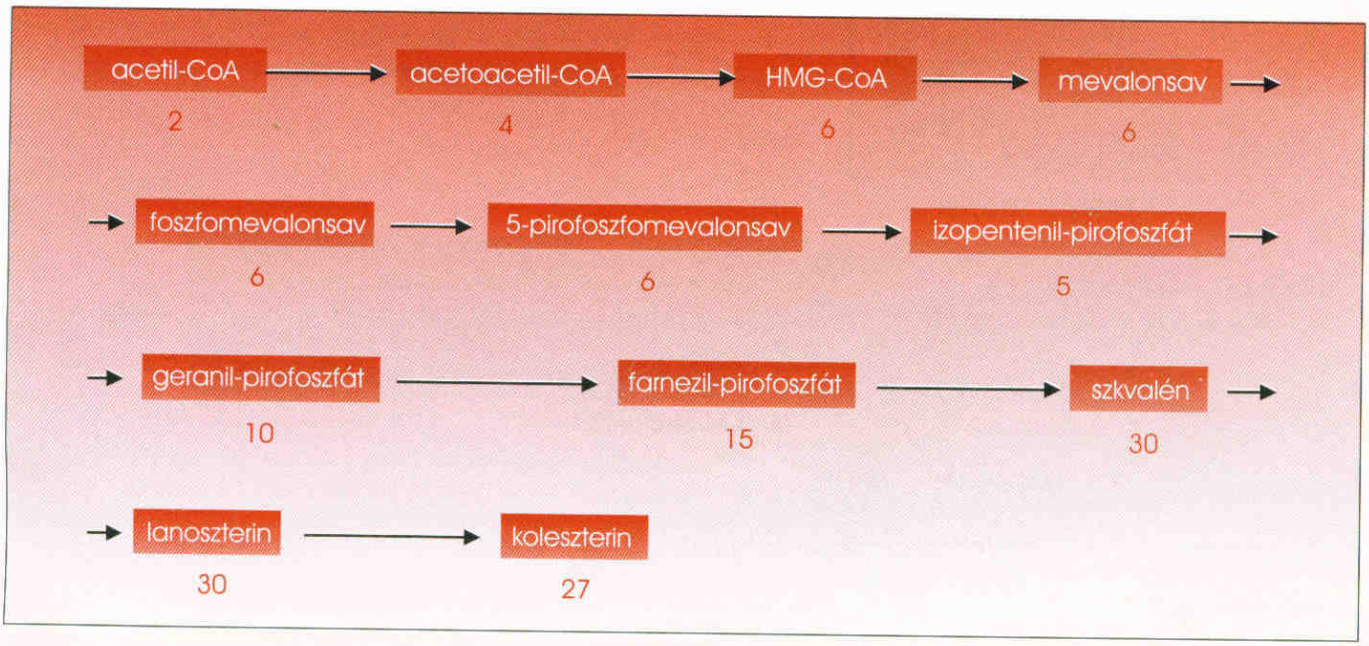
A koleszterin szintézise

Az életfontosságú funkciók ellátásához a megfelelő mennyiségű koleszterin két forrásból áll rendelkezésre; részben a táplálékkal kerül a szervezetbe, részben *de novo* szintetizálódik. Koleszterinszintézis a legtöbb sejtben folyik, azonban

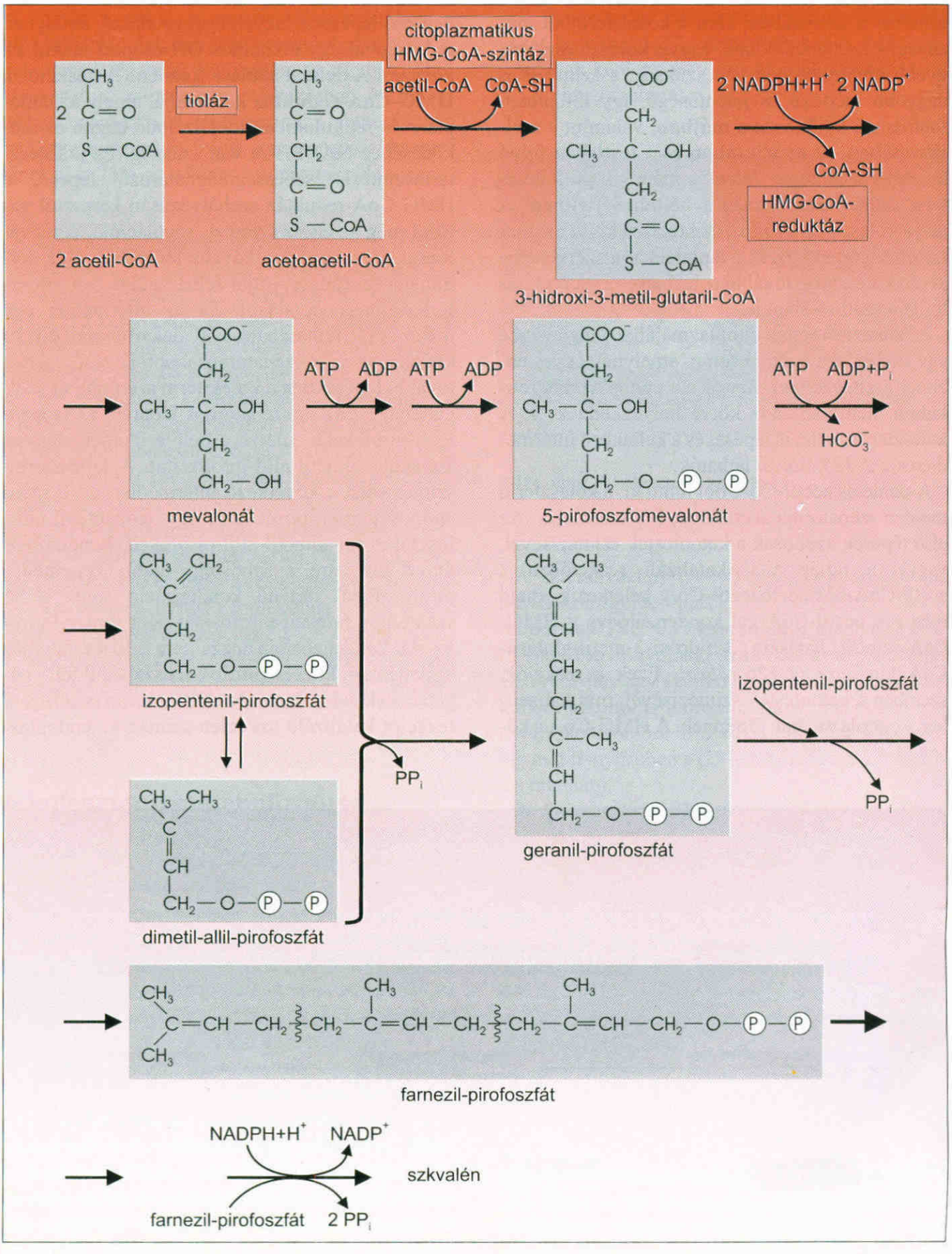
azokban a szervekben, ahol a koleszterinből más anyagok szintetizálódnak, vagyis koleszterinre nagyobb mennyiségben van szükség, a szintézis is nagyobb mértékű és jelentőségű. Így kitüntetett fontosságú különösen a **májban**, valamint a **mellékvesében**, az **ovariumban** és a **testisben** folyó koleszterinszintézis. Jelentős mennyiségű koleszterin szintetizálódik még a **bélhámsejtekben**. A máj a koleszterin *de novo* szintézisén kívül meghatározó szerepet játszik a táplálékkal a szervezetbe került koleszterin további sorsában és a szervekhez történő szállításában is.

A szintézis a sejtek citoplazmájában megy végbe egy soklépéses reakció során, amelynek egyes enzimei a citoszolban, mások az endoplazmás retikulum membránjához kötve helyezkednek el. A koleszterinszintézis lépései és a keletkező intermedierek a *2-125. ábrán* láthatók.

A szintézis acetil-CoA-ból indul ki; a koleszterin minden szénatomja acetil-CoA-ból származik. Az első lépések azonosak a ketontestek szintézisével, vagyis a tioláz által katalizált reakcióban 2 acetil-CoA-ból acetoacetil-CoA keletkezik, majd még egy acetil-CoA-val kondenzálódva a HMG-CoA-szintáz hatására 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA jön létre *(2-126. ábra)*. Ezek a reakciók, szemben a ketontestek szintézisével, minden sejtben a citoplazmában történnek. A HMG-CoA a következő lépésben mevalonsavvá alakul, amelyben redukcióval egy alkoholos OH-csoport alakul ki, koenzim-A felszabadulása közben. A reakciót a **HMG-CoA-reduktáz** katalizálja, amely az endoplazmás retikulumban lokalizálódó enzim és működéséhez NADPH-ra van szükség. Ez a koleszterinszintézis sebességmeghatározó lépése, a HMG-CoA-reduktáz szabályozásán keresztül valósul meg az egész szintézis regulációja. A mevalonsav két, egymást követő lépésben, ATP terminális foszfátcsoportját felhasználva 5-pirofoszfomevalonsavvá alakul. Ez az intermedier egy újabb ATP felhasználásával dekarboxilálódik és kialakul az az öt szénatomos izoprénegység, ami a további lépésekben a koleszterin széntomjait szolgáltatja. Ez az öt szénatomos izoprén, az izopentenil-pirofoszfát, illetve a belőle izomerizációval kialakuló dimetil-allil-pirofoszfát. A koleszterinszintézisben a következő intermedier, a 10 szénatomos geranil-pirofoszfát egy izopentenil-pirofoszfát és egy dimetil-allil-pirofoszfát kondenzációjával jön létre, s ebből egy újabb izopentenil-pirofoszfáttal történő kondenzáció során a 15 széntomos farnezil-pirofoszfát. Két farnezil-pirofoszfát kondenzációja hozza létre a 30 szénatomos szkvalént, miközben pirofoszfát szabadul fel, s ebben a reakcióban ismét NADPH-ra van szükség. A reakciót katalizáló szkvalén-szintáz az endoplaz-

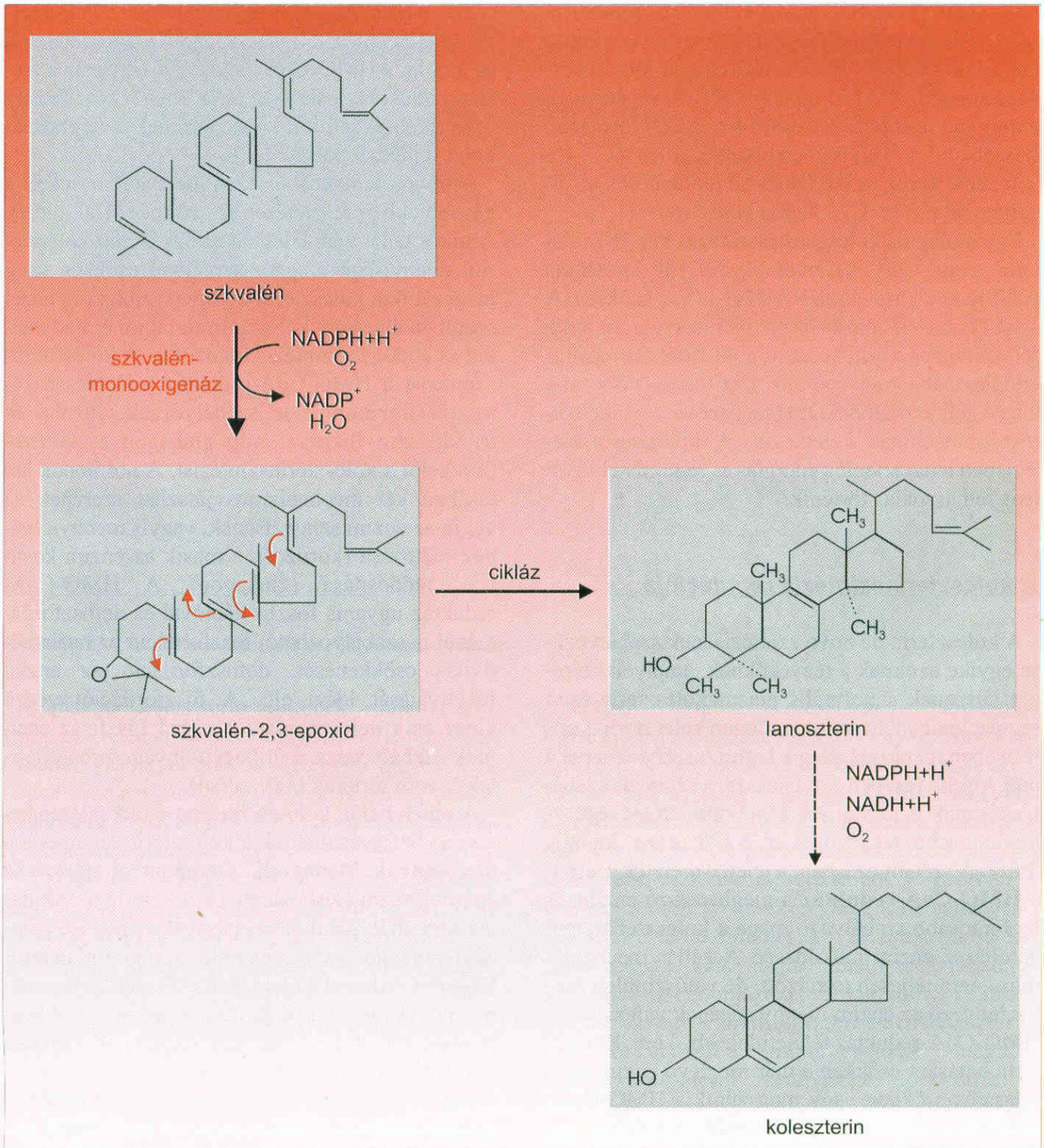


2-125. ábra. A koleszterinszintézisben keletkező intermedierek. *A piros számok az intermedierek szénatomszámát mutatják*



2-126. ábra. A koleszterinszintézis lépései a szkvalén kialakulásáig

más retikulumban található. A szkvalénben a gyűrűs szerkezet még nem alakult ki, noha a molekula már bizonyos mértékben emlékeztet a koleszterinvázra *(2-127. ábra)*. A gyűrű záródása egy epoxid kialakulásával kezdődik, ugyanis egy monooxigenáz hatására molekuláris O_2-ből egy oxigénatom épül be úgy, hogy kapcsolódik mind a C2-, mind a C3-atomokhoz. A kialakuló szkvalén-2,3-epoxidban a kettős kötések π-elektronjai a 2-127. ábrán jelzett módon elmozdulnak és meg-



2-127. ábra. A koleszterin keletkezése szkvalénből

történik egy cikláz által katalizált reakcióban a gyűrűzáródás. A lanoszterin kialakulásához még két metilcsoport helyeződik át; a C14-ről a C13-ra (ebből lesz a C18 metilcsoport) és a C8-ról a C14-re. A lanoszterinben jelen van már a béta-orientációjú C3-OH csoport. A gyűrűzáródáshoz a szkvalén egy carrier fehérjéhez (sterol carrier protein$_1$; SCP$_1$) kötődik, majd a keletkező lanoszterin egy másik fehérjéhez (SCP$_2$) kapcsolódik és kialakul a koleszterin. Ebben a reakcióban több lépésben, oxigén, NADH és NADPH részvételével, három metilcsoport (C4 és C14-ről) CO_2 formában felszabadul, a B-gyűrűben a kettős kötés a C5–C6 helyzetbe kerül, és NADPH-val redukálódik az oldalláncon a C24–C25 kettős kötés.

Egy molekula koleszterin szintéziséhez 18 molekula acetil-CoA használódik fel, 36 molekula ATP-re és 16 molekula NADPH-ra van szükség. A 18 ATP az ATP:citrát-liáz reakcióban használódik fel, amelyben a mitokondriumból citrát formában a citoplazmába transzportált acetil-CoA visszaalakul. A felhasznált NADPH nagy része a glukóz direkt oxidációban keletkezik. A koleszterinszintézisben tehát jelentős energia- és reduktív ekvivalens felhasználás történik.

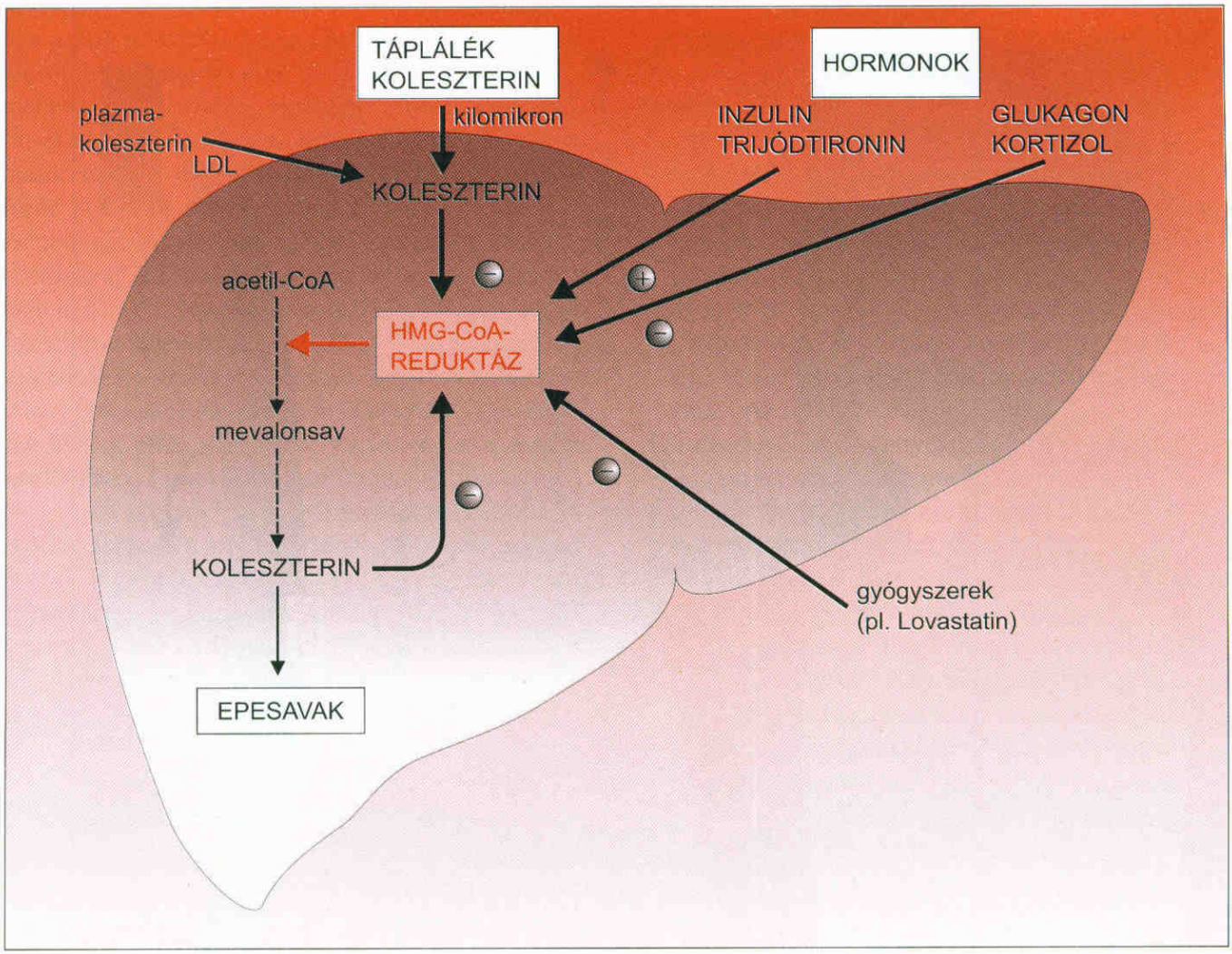
A koleszterinszintézis regulációja

A koleszterin de novo szintézisének szabályozása egyike azoknak a tényezőknek, amelyek szerepet játszanak a normális plazmakoleszterin-szint regulációjában. Mivel az endogén koleszterin szintézisében mennyiségileg a legfontosabb szerepet a máj, kisebb részben a bél játssza, a szintézis szabályozásának is itt van a legnagyobb jelentősége. A legfontosabb tényezőket a *2-128. ábra* foglalja össze. A szabályozásban, a jelen ismeretek szerint, a **HMG-CoA-reduktáz** a meghatározó enzim. A legfontosabb szabályozó maga a **koleszterin**, ami gátolja az enzim működését. A gátlás mechanizmusa nem teljesen tisztázott, de valószínűleg fontos tényező az enzim mennyiségének változása. A HMG-CoA-reduktáz féléletideje kb. 4 óra. Koleszterin hatására csökken a már meglevő enzim aktivitása és csökken vagy megszűnik a HMG-CoA-reduktáz szintézise. Két forrásból származhat koleszterin, ami szabályozza az endogén szintézist: az egyik a szintézis végtermékeként keletkező koleszterin, amely negatív feedback gátlással csökkenti a további szintézist, a másik a táplálékkal elfogyasztott koleszterin. Ezt, mint a későbbiekben részletesen ismertetjük (182. oldal), a vékonybélből lipoproteinek – kilomikronok – szállítják a májhoz. A hepatociták membránjában receptorok ismerik fel és kötik meg a lipoproteineket, majd ezeket a koleszterinnel együtt internalizálják, a sejten belül a koleszterin felszabadul a lipoproteinből és gátolja a HMG-CoA-reduktázt. Ugyanez a mechanizmus biztosítja az LDL-ben (low density lipoprotein) szállított koleszterinnek a vérplazmából a sejtekbe jutását.

A lipoproteinekről és ezen mechanizmusokról a későbbiekben részletesen is szó lesz (180. oldal). Amikor tehát a táplálékkal elfogyasztott koleszterin mennyisége megnő, a májban csökken vagy megszűnik a koleszterin de novo szintézise. Ezzel szemben alacsony koleszterintartalmú étrend mellett az endogén szintézis fokozódik. A koleszterinszintézist a HMG-CoA-reduktáz működésén keresztül **hormonok** is szabályozzák. Inzulin és trijódtironin fokozza, míg glukagon és kortizol csökkenti a koleszterinszintézist. A hormonok hatásában két mechanizmus játszhat szerepet, az egyik az enzim szintézisének, vagyis mennyiségének változása (kortizol), a másik az enzim kovalens módosítása (glukagon). A HMG-CoA-reduktáz ugyanis foszforilációval és defoszforilációval is szabályozható; foszforiláció az enzimaktivitás csökkenését, defoszforiláció az enzim reaktiválását idézi elő. A foszforilációt végző kináz és a defoszforilációt végző foszfatáz enzimek szabályozása a glikogén-anyagcserénél leírtak szerint történik (129. oldal).

A sejten belüli koleszterinszint csökkentésén keresztül befolyásolhatják a koleszterin-anyagcserét az **epesavak.** Mennyiségi szempontból ugyanis az epesavak szintézise jelenti a koleszterin átalakulás legfőbb útját. Amikor az epesavak szintézise fokozódik, megnő a májsejtek koleszterin iránti igénye. Ez azért érdemel külön említést, mert a kórosan megnövekedett plazmakoleszterin-szint csökkentésében ennek a mechanizmusnak a kihasználása jó lehetőség az orvos számára (187. oldal).

Úgyszintén terápiás jelentőségű azoknak a gyógyszereknek a hatása, amelyek közvetlenül gátolják a HMG-CoA-reduktázt és ezáltal csökkentik az endogén koleszterinszintézist (pl. Lovastatin).



2-128. ábra. A koleszterinszintézis szabályozása a májban

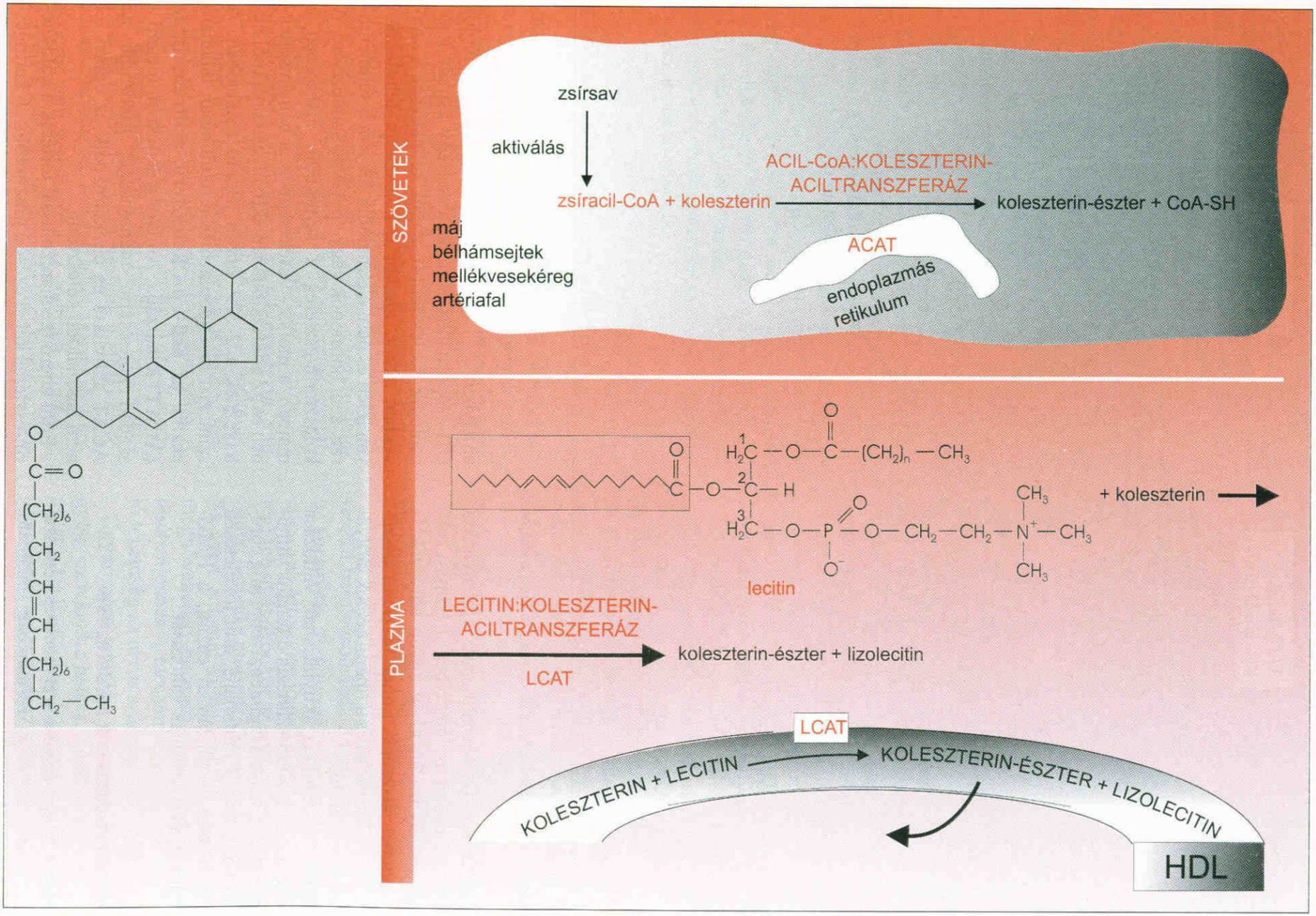
A plazma koleszterinszintjének szabályozása komplex mechanizmus, amelyben a HMG-CoA-reduktáz szabályozásán kívül egyéb tényezők is fontos szerepet játszanak. Ennek részletes összefoglalására a felszívódás és a lipoproteinek tárgyalása után visszatérünk.

A HMG-CoA-reduktáz aktivitásának változása magyarázza a koleszterinszintézis diurnális ritmusát. A szintézis éjszaka a legintenzívebb, míg ébredés után kb. 6 órával minimális, ami tökéletesen követi a sebességmeghatározó enzim, a HMG-CoA-reduktáz aktivitásának változását.

A koleszterin-észterek keletkezése

A koleszterin egy része a szervezetben nem szabadon, hanem észterek formájában található, amelyben a koleszterin alkoholos OH-csoportjához észterkötéssel egy zsírsav kapcsolódik. Koleszterin-észterek keletkeznek a szervekben akkor, amikor a koleszterin feleslegben van jelen és nem használódik fel sem a sejtmembrán, sem hormonok vagy epesavak szintézisére. A koleszterin-észterek a **sejtekben**, elsősorban a májban, a mellék- vesekéregben, a bélhámsejtekben és az artériák falában aktivált zsírsavakból keletkeznek a *2-129. ábrán* látható reakcióban. A szintézist az endoplazmás retikulumban található enzim, az **acil-CoA:koleszterin-aciltranszferáz (ACAT)** katalizálja. Amikor a sejtekben megnő a szabad koleszterin mennyisége, fokozódik az ACAT aktivitása és elraktározódik az éppen fel nem használódó koleszterin.

Ettől eltérő mechanizmussal történik a koleszterin-észterek keletkezése a **plazmában.** A keringés-



2-129. ábra. A koleszterin-észterek keletkezése

ben a koleszterint – tekintettel arra, hogy erősen hidrofób – lipoproteinek szállítják. A lipoproteinekben a koleszterin mintegy 70%-a koleszterin-észterként van jelen. Ennek keletkezését egy másik enzim, a **lecitin:koleszterin-acil-transzferáz (LCAT)** katalizálja, a zsírsav a lecitin 2. szénatomjáról származik, ahol általában linolsav található (2-129. ábra). A plazmában a reakció a high density lipoproteinekben (HDL) történik és a foszfolipid szubsztrát is a HDL-ből származik. A keletkező koleszterin-észterek hidrofób tulajdonsága a koleszterinnél erősebb, s azonnal a keletkezés után a HDL belsejébe kerülnek, s a májba szállítódnak. Ennek a mechanizmusnak fontos szerepe van a szervekben felhalmozódott koleszterin eltávolításában és májba történő szállításában (lásd még a lipoproteineknél). Az LCAT enzimet a máj szintetizálja és juttatja a keringésbe. Májsejtkárosodással járó kórképekben csökken a plazmában a koleszterin-észterek mennyisége annak következtében, hogy károsodik a májban részben az enzim, részben a foszfolipidek szintézise.

A koleszterin-észtereket a **koleszterin-észterázok** hasítják és koleszterin, valamint zsírsav keletkezik. Koleszterin-észterázok találhatók intracellulárisan a lizoszómákban, itt történik a lipoproteinekkel a sejtekbe felvett koleszterin-észterek hidrolízise. Az endoplazmás retikulum is tartalmaz koleszterin-észterázokat, amelyek speciális körülmények között, reverzibilis reakcióban koleszterin-észterek keletkezését katalizálhatják. A bélhámsejtekben szintetizálódó koleszterin-észterek egy része valószínűleg ilyen módon keletkezik. Koleszterin-észterázok szekretálódnak a pancreasból is, amelyek hatása extracelluláris és feladata a táplálékkal a bélbe került koleszterin-észterek hasítása.

Az epesavak keletkezése, metabolizmusa és jelentősége

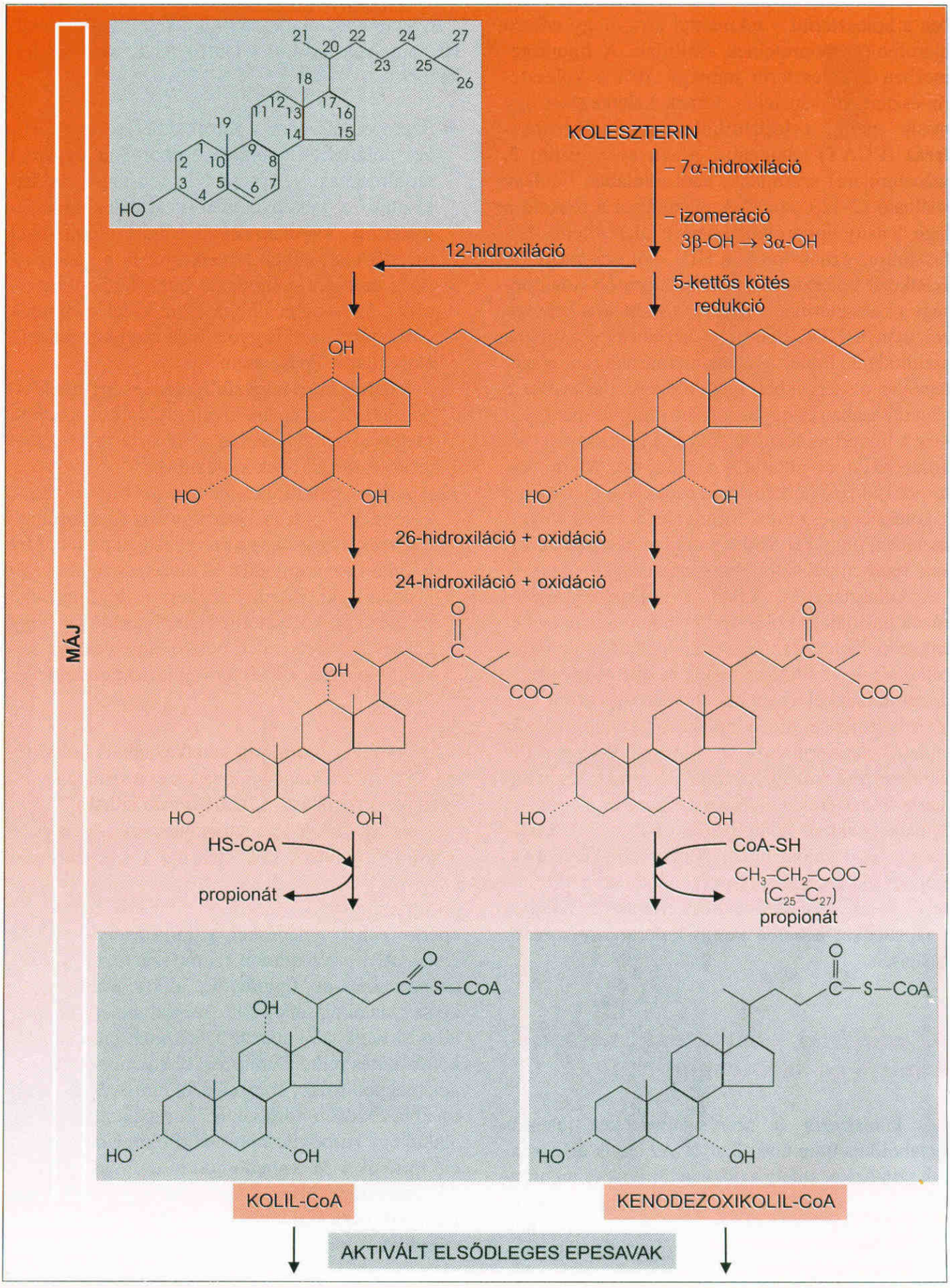
A koleszterin a szervezetben két jelentős metabolikus úton alakulhat át. Az egyik az epesavak szintézise, amely a májban történik és mennyiségileg jelentősebb koleszterinfelhasználást jelent, mint a másik metabolikus út, a szteroidhormonok szintézise, amely azonban a hormonok funkciója miatt kitüntetett jelentőségű.

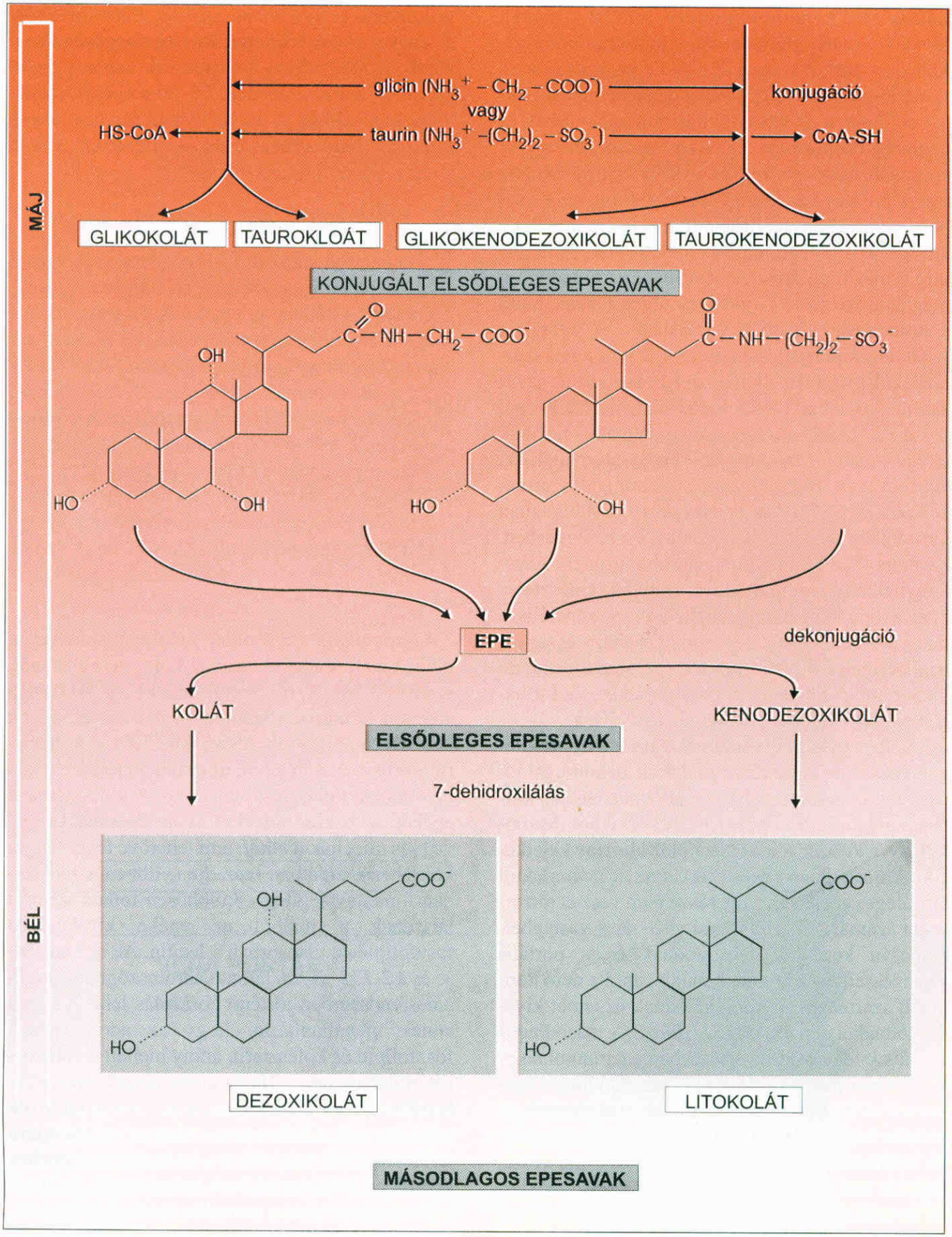
Az epesavak a koleszterinből keletkező molekulák, amelyek számos jelentős funkcióval rendelkeznek.

1. Szerepet játszanak a zsírok emésztésében. Mivel poláros és apoláros csoportokat egyaránt tartalmaznak, detergens tulajdonsággal rendelkeznek; a vékonybélben a táplálékkal elfogyasztott zsírokat emulgeálják, felületüket megnövelik, ennek következtében a pancreaslipáz számára a lipideket hozzáférhetőbbé teszik. Az emulgeáló hatáson kívül a lipidek emésztését azért is gyorsítják, mert közvetlenül aktiválják a lipáz enzimet.
2. Feladatuk, hogy a foszfolipidekkel együtt oldatban tartsák az epébe kiválasztódó koleszterint, megakadályozva ezáltal a koleszterin kiválását és koleszterinkövek kialakulását.
3. A koleszterinkiürülés lehetőségét biztosítják. A koleszterin gyűrűs váza ugyanis (a megfelelő enzimek hiányában) a szervezetben nem tud lebomlani széndioxiddá és vízzé, és nem is választódik ki. Mennyiségileg a legfontosabb lehetőség a koleszterin eltávolítására az, hogy epesavak keletkeznek belőle, amelyek egy része fiziológiás körülmények között a széklettel kiürül.

Az epesavak a **májban** keletkeznek. A koleszterinmolekulán történő változások és a szintézis vázlatos összefoglalása a *2-130. ábrán* látható.

A szintézis sebességmeghatározó lépését a 7-alfa-hidroxiláz katalizálja, ami a koleszterin 7. szénatomján egy alfa-helyzetű alkoholos OH-csoportot eredményez. A kólsav, az egyik elsődleges epesav ebben a lépésben gátolja az epesavszintézist. A 3. szénatomon izomerizációval az OH-csoport béta-konfigurációja alfára változik. A kólsav kialakulásában a 12. szénatomon is hidroxilálás történik, ami után az 5-6. szénatomok közötti kettős kötés redukálódik. Az oldalláncok rövidülnek mégpedig úgy, hogy először hidroxilálás, majd további oxidáció történik a 26. szénatomon és kialakul egy karboxilcsoport. Hidroxiláció és oxidáció történik a 24. szénatomon is, ami után a 24. és 25. szénatom között a kötés felhasad, miközben CoA-SH-val a kialakuló elsődleges epesavak aktiválódnak és propionsav keletkezik (páratlan szénatomszámú zsírsav). Az **elsődleges epesavak, a**


MÁJ
KOLESZTERIN
– 7α-hidroxiláció
– izomeráció
3β-OH → 3α-OH
12-hidroxiláció
5-kettős kötés redukció
26-hidroxiláció + oxidáció
24-hidroxiláció + oxidáció
HS-CoA
propionát
CoA-SH
CH3–CH2–COO⁻
(C25–C27)
propionát
KOLIL-CoA
KENODEZOXIKOLIL-CoA
AKTIVÁLT ELSŐDLEGES EPESAVAK



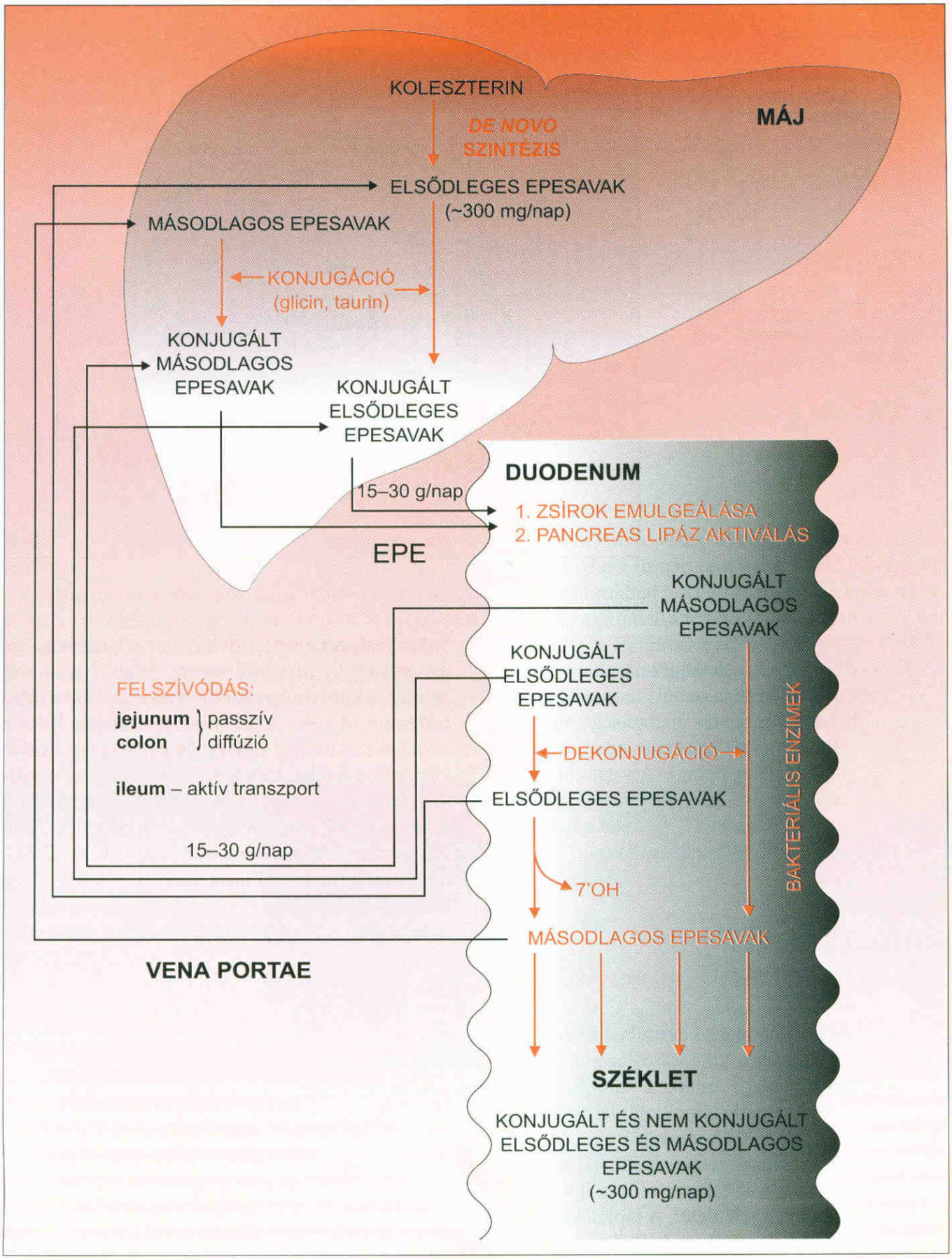
2-130. ábra. Az epesavak szintézise és metabolizmusa

kólsav és a kenodezoxikólsav, mielőtt a májból kiválasztódnak, glicinnel vagy taurinnal konjugálódnak, s ezek a konjugált elsődleges epesavak az epecsatornák felé hagyják el a májsejteket. Az epesavak, mint a szerkezetükből látható, poláros és apoláros csoportokat egyaránt tartalmaznak. Az epesavak esetében az AB gyűrűk konfigurációja *cisz*, a poláros karakterű valamennyi funkciós csoport azonos irányba orientálódik. Így a molekula amfipatikus jellegű: egyik oldala tisztán apoláros, míg a másik poláros. Az amfipatikus tulajdonság meghatározó mind a lipidek emulgeálásában, mind a koleszterin oldatban tartásában. Az epesavak -COOH csoportja, csakúgy mint a konjugált származékok -COOH, illetve $-SO_3H$ csoportjai savasan disszociálnak, az anionok Na^+, illetve K^+-nal sókat alkotnak, amiért epesavas sóknak is nevezik őket. A nevezéktan nem egységes, használják ezt az elnevezést az epesavakra és a konjugált származékokra egyaránt. Az epesavak az epehólyagban tárolódnak és a táplálkozással összefüggésben, hormonok hatására a duodenumba ürülnek. A vékonybélben közreműködnek a lipidek emésztésében, a lipideket emulgeálják, ami esszenciális a pancreas-lipáz hatékony működéséhez, és így a trigliceridek és egyéb lipidek (pl. zsírban oldódó vita- minok) tökéletes felszívódásához. Ezt a hatást egészíti ki a pancreas-lipáz aktiválása.

A bélben bakteriális enzimek hatására az elsődleges epesavak nagy része átalakul; dekonjugálódnak, a 7. C-atomon dehidroxilálódnak és kialakulnak a **másodlagos epesavak.** A kólsavból **dezoxikólsav,** a kenodezoxikólsavból **litokólsav** keletkezik. A másodlagos epesavak és az át nem alakult elsődleges epesavak nagy része nem vész el a szervezet számára, mert a vékonybél- és a vastagbélmucosán keresztül felszívódnak és a portális keringéssel visszajutnak a májba, ahol a nem konjugált származékok konjugálódnak és ismét kiválasztódnak az epébe *(2-131. ábra)*. A másodlagos epesavak felszívódása elsősorban a jejunumban és a colonban passzív diffúzióval, az elsődleges epesavaké az ileumban aktív transzporttal történik. A portális keringésben az epesavak albuminhoz kötve szállítódnak. Az epesavaknak egy kis része, napi kb. 300 mg nem szívódik fel, hanem a széklettel távozik. Ez viszonylag kis mennyiség, de biztosítja, hogy érdemleges mennyiségű koleszterin a szervezetből eltávozhat. A többi epesav a májba visszakerül és újra felhasználódik. Ezt a körforgást az **epesavak enterohepatikus körforgásának** nevezik (2-131. ábra). Az epesavak naponta 5–10-szer megjárják ezt az utat, 15–30 g epesav választódik ki a májból. A parenchymasejtekben történő szintézis lényegében csak a széklettel kiürült mennyiség pótlására szolgál.

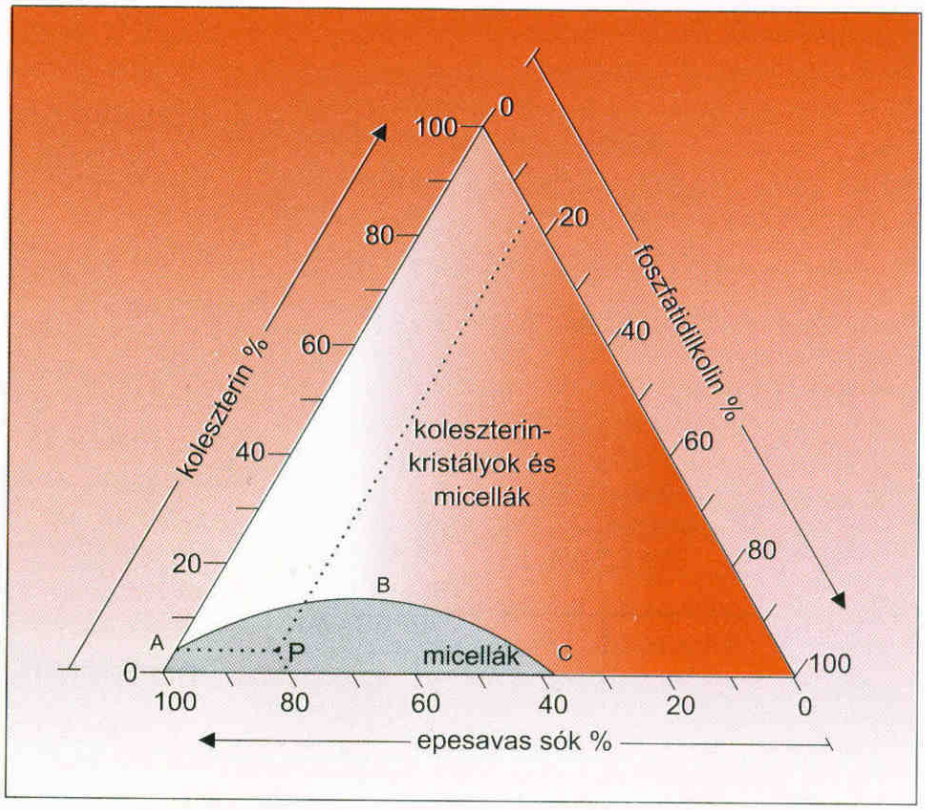
Az enterohepatikus körforgást meg lehet szakítani olyan gyanták per os alkalmazásával, amelyek a bélben az epesavakat megkötik, és az a széklettel kiürülnek. A májban ilyenkor, a teljes kiürült mennyiség pótlására fokozódik az epesavak szintézise. Ilyen gyógyszereket a kórosan megnövekedett plazmalipoprotein-szint csökkentése céljából alkalmaznak. A terápiás lehetőséget éppen az biztosítja, hogy az epesavak szintéziséhez fokozott mennyiségben használódik fel és ürül ki a szervezetből a koleszterin (lásd még a 187. oldalt).

Az epe olyan vizes oldat, amely az epesavakon kívül foszfolipideket, szabad koleszterint és más, számos szerves (pl. epefestékek) és szervetlen anyagot tartalmaz. Szemben a plazmával, ahol a koleszterin nagyobb része, kb. 70%-a koleszterin-észterként van jelen, itt csaknem teljes egészében szabad koleszterin található. A koleszterin az epében a foszfolipidekkel és az epesavakkal ún. vegyes micellákat alkot, ami lehetővé teszi, hogy a koleszterin oldatban maradjon. Ebben a funkcióban – mennyiségileg – különösen fontos szerepet játszanak a májból az epébe kiválasztódó foszfolipidek, elsősorban a lecitin. Az epe analízise és a *2-132. ábrán* látható háromszögletű koordináta-rendszerben történő ábrázolás lehetővé teszi annak megállapítását, hogy az adott epesav, foszfolipid és koleszterin arány mellett a koleszterin oldatban van-e. Ha az alkotórészek ilyetén ábrázolása olyan metszéspontot ad, ami a satírozott területbe esik, a koleszterin oldatban van, ha ezen a területen kívül van, akkor a koleszterin az epében kiválik és koleszterinkövek keletkeznek. Az ábrán a P-vel jelzett pont a normális epeösszetételt jelzi, amelyben 5% a koleszterin, 15% a foszfatidilkolin és 80% az epesavak aránya.



2-131. ábra. Az epesavak enterohepatikus körforgása

2-132. ábra. Az epe három fő alkotórészének ábrázolása

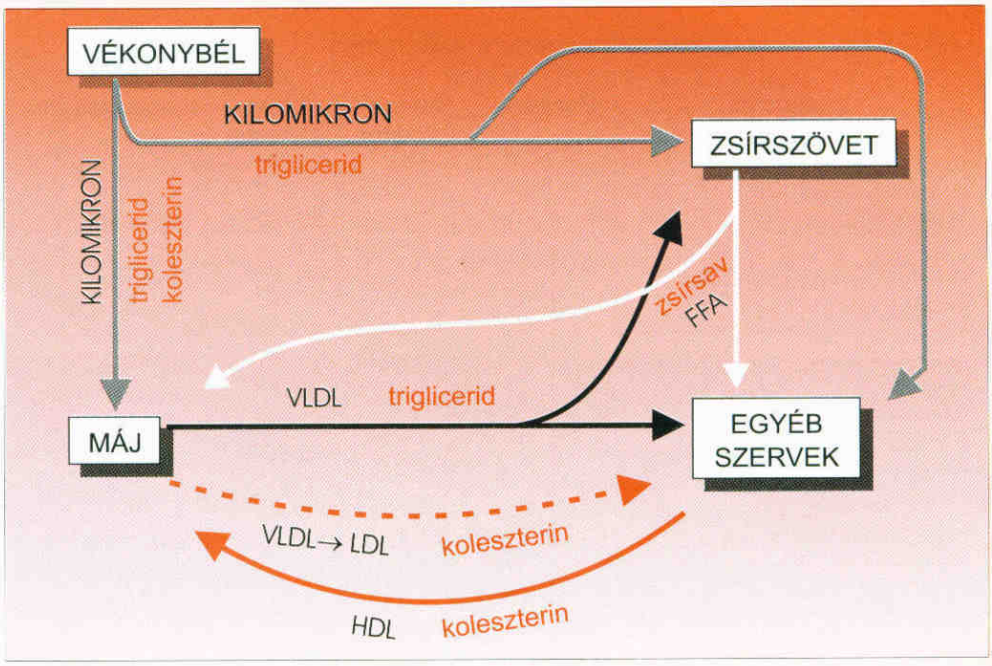


Koleszterinkövek keletkezésére akkor kerül sor, amikor – ismeretlen okból – az epébe kiválasztott koleszterin relatív mennyisége megnő, s a foszfolipidek és az epesavak nem tudják a koleszterint oldatban tartani. Az epekőbetegség, a **cholelithiasis**, korunk egyik leggyakoribb betegsége, s az esetek 80%-ában a köveket elsősorban a kivált koleszterin alkotja.

A lipidek szállítása. Lipoproteinek

A lipidek a plazma vizes közegében nem oldódnak, ezért szállításuk a különböző szervek között bonyolultabb feladat, mint a glukózé, ami vízoldékony molekula lévén oldott állapotban van a keringésben. Miért és hogyan történik a zsírok szállítása? A szervezet részben a táplálékkal jut lipidekhez, részben a bioszintézis biztosítja megfelelő mennyiségű zsír jelenlétét. A táplálékkal elfogyasztott lipideknek a vékonybélből el kell jutni azokhoz a szervekhez, amelyek zsírok oxidálásával tudnak energiát termelni, illetve a májhoz, ami az anyagcsere központi szerve. Mint ilyen, a máj szintetizál is zsírokat a többi szerv táplálása céljából, amit el kell szállítani a felhasználás helyére azokkal a zsírokkal együtt, amelyek a táplálékból kerülnek a májba. Egy harmadik „központ" a zsírszövet, ahol a raktározás történik, s ahonnan a szükségletnek megfelelően mobilizálódnak a zsírok és szállítódnak a megfelelő szervekhez *(2-133. ábra)*. A lipidek szállítása azért is érdemel külön figyelmet, mert az arterioscrelosis és a coronariabetegségek kialakulásában a lipidszállítási rendellenességek meghatározó jelentőségűek, és ezért ún. rizikó faktornak tekinthetők. Lipidszállítási rendellenességek gyakran fellépnek olyan általános anyagcsere-betegségben is, mint pl. a diabetes vagy az elhízás.

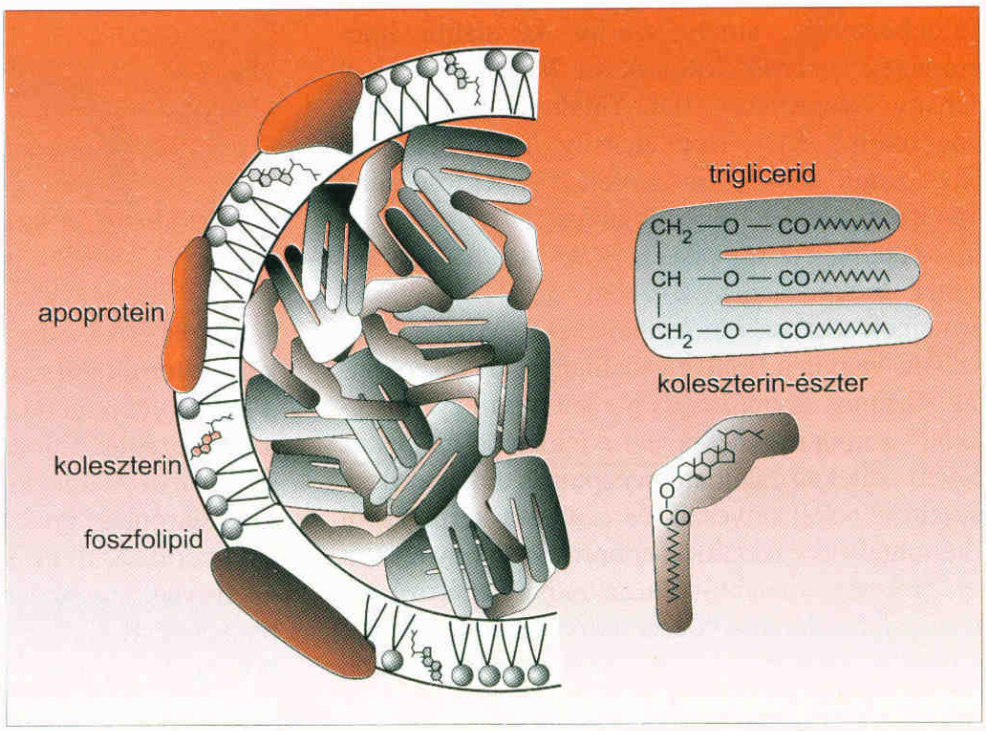
A problémát leginkább a zsírsavak, a triglicéridek és a koleszterin, illetve a koleszterin-észterek szállítása jelenti, mert ezek a leginkább hidrofób molekulák. A legegyszerűbb mechanizmus a zsírsavak szállítására alakult ki, amelyek a plazmában albuminhoz kötődnek és ezáltal oldatban maradnak (lásd később). Bonyolultabb a triglicéridek, a koleszterin és a koleszterin-észterek szállítása.



2-133. ábra. A lipidek szállításának vázlata

Ezeket komplex struktúrák, az ún. **lipoproteinek** szállítják.

A lipoproteinek általános jellemzője, hogy bennük a hidrofób lipidek egy hidrofil burokba csomagolva és ezáltal a plazma vizes közegétől elválasztva találhatók *(2-134. ábra)*. A burok részben fehérjékből áll, amelyeket **apoproteineknek** nevezünk, továbbá foszfolipidekből, amelyek poláros csoportjaikkal a vizes közeg, apoláros csoportjaikkal pedig a lipoprotein belseje felé irányulnak. Ebben a burokban tud helyet foglalni a koleszterin, 3-OH-csoportjával a foszfolipidek poláros feje felé fordulva. A lipoproteinek belsejében helyezkednek el az apoláros lipidek, a trigliceridek és a koleszterin-észterek, amelyekkel kölcsönhatásba lépnek a burokban elhelyezkedő foszfolipidek



2-134. ábra. A lipoproteinek felépítése

2-6. táblázat. A lipoproteinek néhány tulajdonsága

Lipoprotein	Denzitás	Fehérje-tartalom (%)	Lipid-tartalom (%)	Legfontosabb lipid	Legfontosabb apoprotein
kilomikron	↓	1–2	98–99	triglicerid	B 48, 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-észter	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

apoláros csoportjai. Ez a szerkezeti adottság minden lipoproteinre jellemző, függetlenül attól, hogy mely szervben keletkezett és milyen lipid szállítására specializálódott. A különböző lipoproteinekben azonban eltérő a lipid- és a fehérjetartalom, és ennek következtében a denzitásuk is különböző (minél magasabb a fehérjetartalom, annál nagyobb a denzitás). A lipoproteinek ultracentrifugálással és elektroforézissel választhatók el egymástól. A denzitás alapján történt meg a lipoproteinek megkülönböztetése, amely szerint az alábbi lipoproteinek ismertek: kilomikron, VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), és HDL (high density lipoprotein). A legfontosabb lipoproteineket és főbb tulajdonságait a *2-6. táblázat* mutatja. Az apoproteinek szerepe a lipoproteinek működésében összetett. Egyrészt a lipoproteinek szerkezetének alkotásában veszik ki részüket, vagyis a lipidek oldatban tartását szolgálják. Számos apoprotein emellett mintegy „megjelöli" a lipoproteineket, ezt a jelölést a máj és az egyéb sejteken található receptorok felismerik, a lipoproteineket felveszik és ezáltal a keringésből eltávolítják. Végezetül az apoproteinek egy része a lipoproteinek metabolizmusában meghatározó enzimek, fehérjék működését aktiválja vagy gátolja. Az apoproteinek eddig megismert, legfontosabb funkcióit a *2-7. táblázat* foglalja össze.

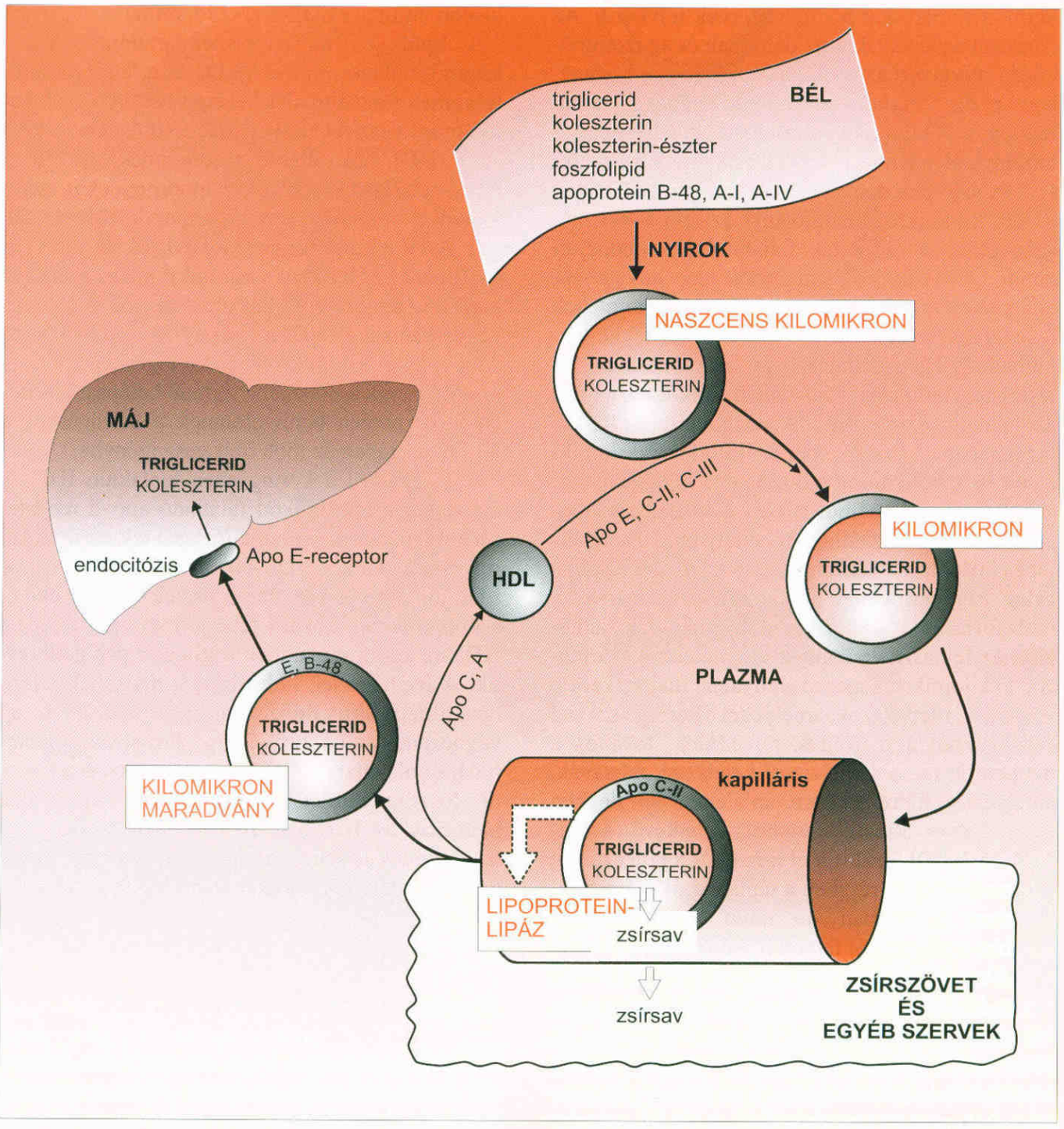
2-7. táblázat. Az apoproteinek néhány fontos funkciója

Apoprotein	Funkció
A-I	aktiválja a LCAT enzimet
B-100	kötődik az LDL-receptorhoz
C-II	aktiválja a lipoprotein-lipázt
C-III	gátolja a VLDL felvételét a májban
E	elősegíti a kilomikron remnant felvételét a májban

A triglicerídek szállítása. Kilomikron, VLDL

A táplálékkal elfogyasztott és felszívódott zsírokat a **kilomikron** szállítja el a bélből. A kilomikron a legnagyobb méretű és százalékos összetételében a legnagyobb lipidtartalmú (a száraztömeg 98–99%-a), ezért a legkisebb denzitású lipoprotein. A kilomikronban található lipidek legnagyobb része triglicerid. A kilomikron a bélhámsejtekben keletkezik a béllumenből abszorbeálódott és a sejtekben reszintetizálódott triglicerídekből és koleszterinből (lásd zsírok emésztése és felszívódása). Ezek a foszfolipidekkel együtt a sima felszínű endoplaz-

más retikulumban micellákat alkotnak, majd kiegészülnek azokkal az apoproteinekkel, amelyek szintén a bélhámsejtekben szintetizálódnak (apo B-48, A-I, A-IV) és létrejön az ún. naszcens kilomikron *(2-135. ábra)*. A koleszterin-észterek még a kilomikronba történő beépülés előtt kialakulnak a koleszterinből. A naszcens kilomikron – ami tehát a táplálékból származó, de a bélhámsejtekben közben lebomlott és újraszintetizálódott triglicerideket és a koleszterint tartalmazza – a sejteket a nyirok kapillárisok felé hagyja el és a nyirokereken, majd a ductus thoracicuson keresztül jut a véráramba. Itt további apoproteinekkel kiegészülve érett kilomikronná alakul. A zsírszövetben,



2-135. ábra. A kilomikron metabolizmusa. Koleszterin- és trigliceridszállítás a bélből

a szívben, a harántcsíkolt izomban és a laktáló emlőben a kapillárisok tartalmaznak egy extracelluláris enzimet, a **lipoprotein-lipázt**, amely a kilomikron (és VLDL – lásd később) által szállított triglicerideket zsírsavra és glicerinre bontja. A lipoprotein-lipáz a sejtfelszíni glukózaminglikánokhoz kötődik és onnan heparinnal szabadítható fel. Az enzim kofaktora a C-II apoprotein, amely aktiváló hatású. A glicerin a keringéssel a májba kerül, a zsírsavakat pedig a szervek felveszik. Az izomban a zsírsavak eloxidálódnak és az izomműködés energiaszükségletét biztosítják, a zsírszövetben pedig trigliceriddé szintetizálódva raktározódnak. A kilomikron, ami ily módon triglicerid-tartalmának jelentős részét elveszítette, kisebb méretű és nagyobb denzitású részecskévé alakul. Ezt az ún. kilomikron maradványt az apo E-nek köszönhetően a májsejtek felismerik és endocitózissal felveszik a keringésből. Az anyagcsere állapotától függően a triglicerideket itt lebomlanak és energiát szolgáltatnak vagy ketontestekké alakulhatnak. Ha a táplálék nagy mennyiségben, feleslegben tartalmaz zsírsavakat, akkor a májban azonnal újra szintetizálódik a triglicerid, és VLDL formájában a zsírszövethez szállítódik. A kilomikronok metabolizmusát a 2-135. ábra foglalja össze.

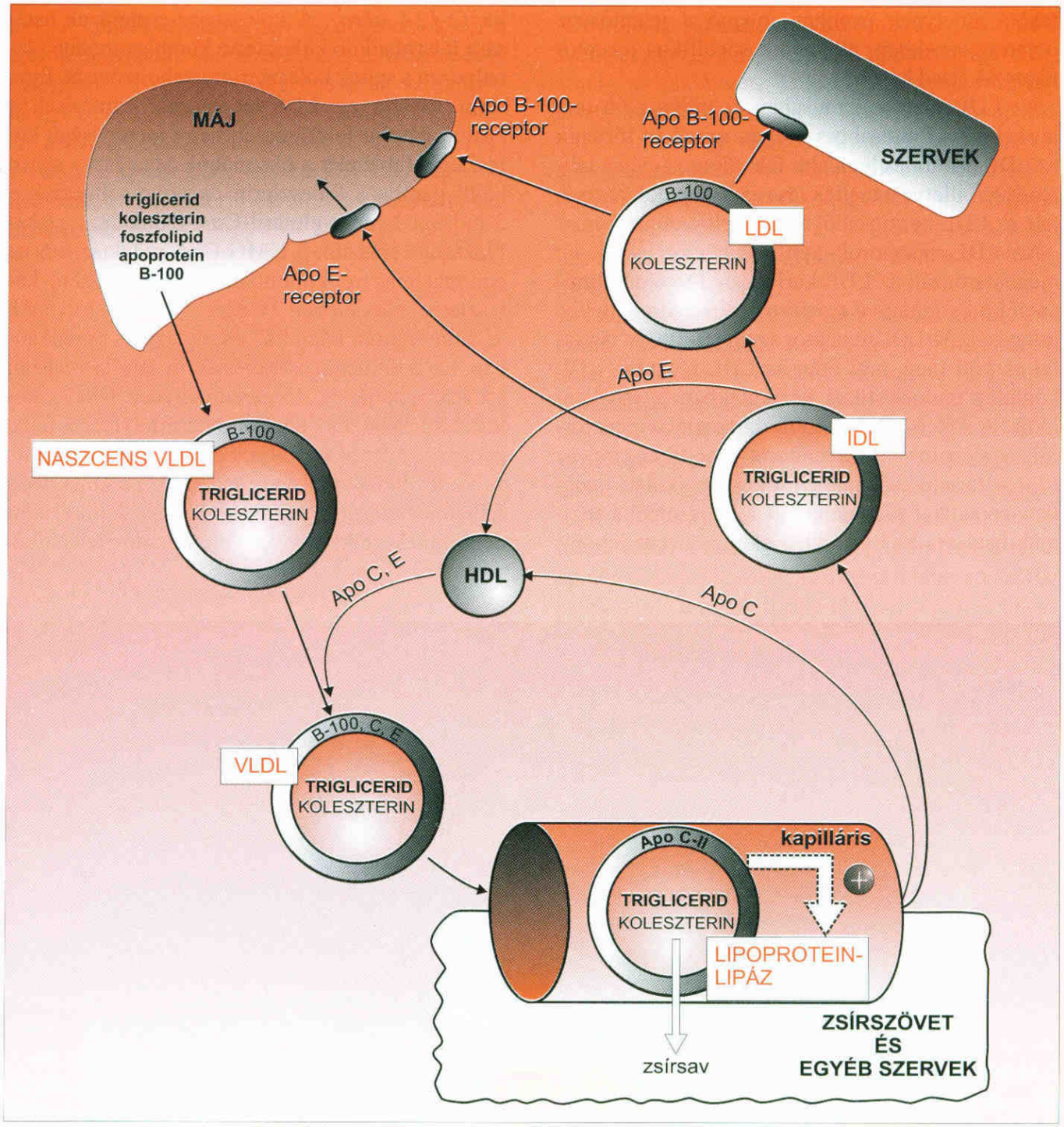
A lipideket a májból a very low density lipoprotein, a **VLDL** szállítja el, amely kb. 10% fehérjét és 90% lipidet tartalmaz. A VLDL zsírtartalma főleg triglicerideket áll, amelyhez a zsírsavak több forrásból származnak. A triglicerideket szintéziséhez felhasználódhatnak a táplálékból származó, a kilomikron maradvánnyal a májba kerülő zsírsavak, illetve azok, amelyeket a keringő szabad zsírsavakból a májsejtek felvesznek, továbbá a májban de novo szintézissel keletkező zsírsavak, amelyek legfőbb forrása a táplálékkal feleslegben elfogyasztott szénhidrátokból keletkező acetil-CoA. A VLDL szállítja el a májból a koleszterint is, amely szintén részben a táplálékból származik, másrészt a májban de novo szintetizálódik, továbbá a plazmából felvett lipoproteinekkel kerül a májba. A VLDL-ben a koleszterin/triglicerid arány általában 1:4, ami azonban koleszterindús étkezést követően akár 1:1 is lehet. Jellegzetes fehérje a VLDL-ben a B-100 apoprotein, ami a VLDL-ből keletkező LDL (low density lipoprotein) felismerését teszi lehetővé. A VLDL a keringéssel transzportálódik a szervekhez, elsősorban a zsírszövethez, ahol a már említett lipoprotein-lipáz – amit az apo C-II aktivál – a triglicerideket hasítja. A keletkező zsírsavakat a sejtek felveszik, oxidálják vagy újraszintetizálják a triglicerideket és intracelluláris lipidcseppek formájában raktározzák. A VLDL-ből a plazmában ily módon kialakuló IDL (intermediate density lipoprotein) koleszterint és kevés maradék trigliceridet tartalmaz, relatív fehérjetartalma nagyobb, zsírtartalma kisebb, mint a VLDL-é *(2-136. ábra)*.

A lipid- és az apoproteintartalom mind a kilomikronban, mind a VLDL-ben lényegesen és folyamatosan változik a keringésben. A VLDL koleszterint vesz fel közvetlenül a vörösvértestekből és a HDL-ből, illetve triglicerideket ad le a HDL-nek (lásd később). Az apoproteinek is cserélődnek a különböző lipoproteinek között, az apo A-I, A-IV a kilomikronról a HDL-re, az apo C-II, C-III pedig a HDL-ről a kilomikronra és VLDL-re kerül. Az apoprotein transzfer reakciók gyorsak és végbemennek az alatt a viszonylag rövid idő alatt, amit pl. a kilomikron a keringésben tölt. A kilomikronok a plazmába történő belépést követően 5–10 percen belül eltűnnek a keringésből, a VLDL esetében ez több órát vesz igénybe.

A VLDL-ből a keringésben kialakuló IDL-t a májsejtek a felszínükön található apo E receptorokkal felismerik és endocitózissal felveszik. A keringésben maradó IDL-ből további átalakulással LDL jön létre (2-136. ábra). Ennek során az apo E, a lipoproteinek közötti fehérje transzport révén a HDL-re kerül, a maradék triglicerid pedig elbomlik. A triglicerideket hidrolízise a májsejtek felszínén, a **hepatikus lipáz** (máj-lipáz) hatására megy végbe, amely a lipoprotein lipázhoz sok szempontból hasonló enzim. A triglicerideken kívül a felszíni foszfogliceridek hidrolízisét is katalizálja. Nemcsak az IDL-ben, hanem a HDL_2-ben levő triglicerideket is szubsztrátjai, ezért szerepet játszik a HDL_2 HDL_3-má történő átalakításában (lásd később).

A koleszterin szállítása. LDL, HDL

A keringésben lévő VLDL mintegy fele fokozatos átalakulás után, melynek során triglicerid-tartalmát elveszti és az apoproteinek nagy részét a HDL-nek átadja, **LDL**-lé alakul. Az LDL-ben a



2-136. ábra. Triglicerid- és koleszterinszállítás a májból. *VLDL, IDL, LDL; TG: triglicerid; KE: koleszterin-észter*

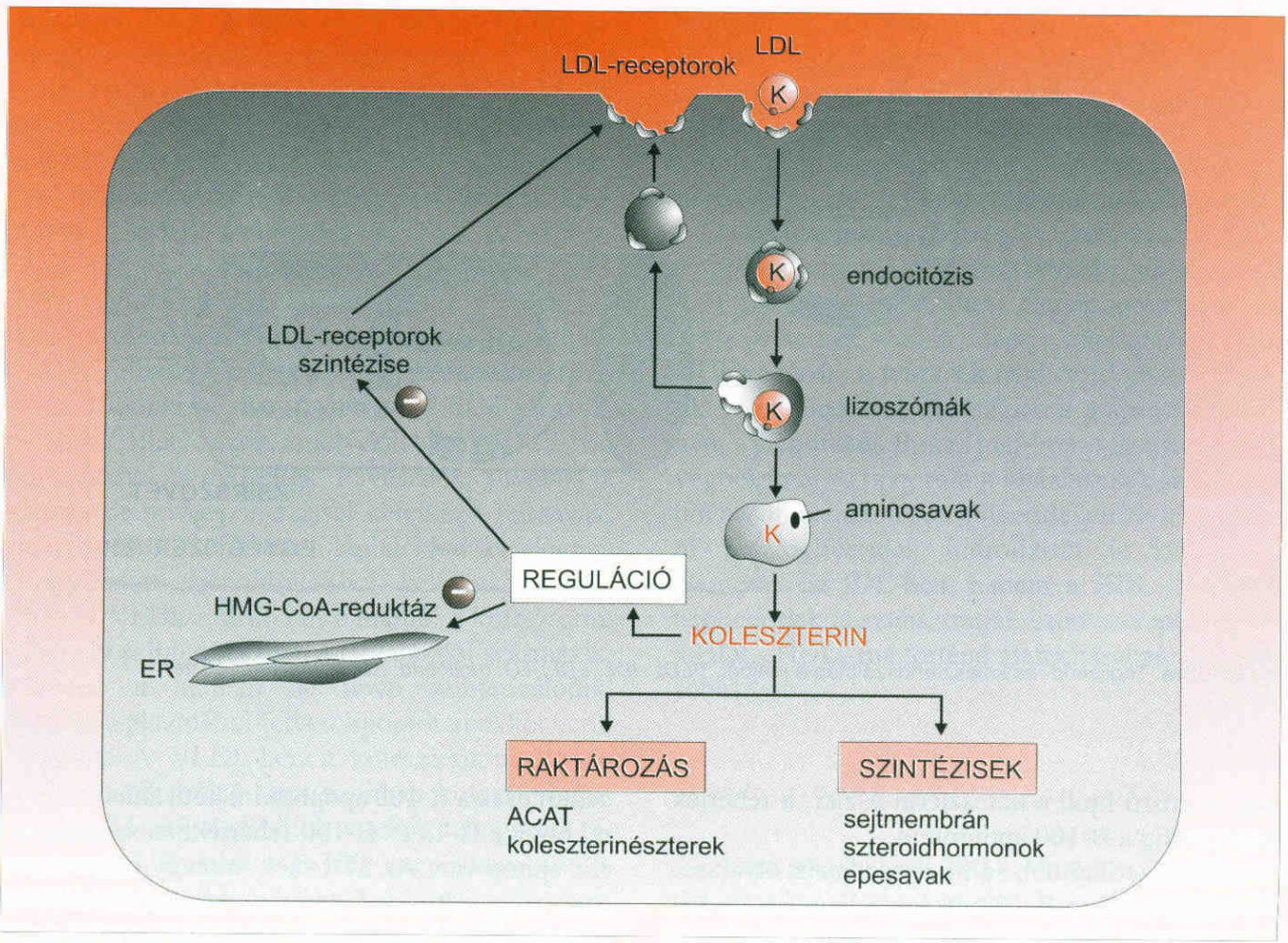
meghatározó lipid a koleszterin-észter, a fehérjék közül pedig a B-100 apoprotein.

A szervezet legtöbb sejtje rendelkezik olyan receptorral, amely a B-100 fehérje felismerésére képes, azonban mégis kevés szervnek van meghatározó szerepe az LDL metabolizmusában. A receptor csak a B-100 apoproteint köti, annak ellenére, hogy a B-48 és B-100 fehérjékben számos közös epitop van. Az LDL-nek mintegy kétharmada ezen nagy affinitású receptor közreműködésével hagyja el a keringést. Az LDL kisebb része más mechanizmussal, lassabban kerül felvételre a sej-

tekbe, amelynek azonban megnő a jelentősége olyan egyénekben, akikben a specifikus receptor hiányzik (lásd később).

Az LDL metabolizmusában kvantitatíve a máj játssza a legfontosabb szerepet, mivel itt történik az LDL-lebomlás legalább fele. Fontos még a bélrendszer, illetve a mellékvese és a gonádok részvétele az LDL keringésből történő eltávolításában.

Az LDL-receptorok kettős funkciót látnak el: meghatározzák az LDL keringésből történő eliminációját és lehetővé teszik a koleszterin sejtekbe juttatását. Az LDL-receptor az apo B-100-at ismeri fel és köti meg, ami után az LDL-receptor–LDL komplex endocitotikus vezikulákban internalizálódik. A sejten belül az LDL disszociál a receptorról, a receptor visszavándorol a sejtfelszínre, az LDL-t tartalmazó endocitotikus vezikulák pedig lizoszomákkal fúzionálnak, s a lizoszomális enzimek hatására az LDL fehérjekomponense lebomlik *(2-137. ábra)*. A koleszterin-észterázok hatására felszabaduló koleszterin komplex módon szabályozza a sejtek koleszterinmetabolizmusát. Egyrészt gátolja az LDL-receptorok szintézisét, s ezáltal gátolja feleslegesen nagy mennyiségű koleszterin felvételét a plazmából. Másrészt a sejten belül gátolja a koleszterin de novo szintézisét a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-reduktáz szabályozásán keresztül. A HMG-CoA-reduktáz, ami az endoplazmás retikulumban található enzim, koleszterin jelenlétében 10-szer gyorsabban bomlik le, mint a többi enzim az endoplazmás retikulumban. Ezen túlmenően a koleszterin gátolja az enzim transzkripcióját is. Végeredményben tehát a koleszterin mind a sejtek koleszterinfelvételét, mind pedig a szintézisét gátolja, s ezáltal megakadályozza kontrollálatlanul nagy mennyiségű koleszterin felhalmozódását a sejtekben. Koleszterinre minden sejtnek szüksége van a membránok felépítésé-



2-137. ábra. LDL-receptorok felvétele a sejtekbe. A koleszterinszint szabályozása

hez. A mellékvesekéregben és a gonádokban a szteroidhormonok szintéziséhez is felhasználódik koleszterin, a májban pedig epesavak szintetizálódnak belőle. A felesleges koleszterint a sejtekben az acil-CoA:koleszterin-aciltranszferáz (ACAT) észteresíti, ami az LDL-felvétel következtében aktiválódik, s a koleszterin-észterek a citoplazmában raktározódnak.

Az LDL-receptorok számának vagy funkciójának elégtelensége súlyos zavarokat okoz a koleszterin-anyagcserében. Az ún. **familiaris hypercholesterinaemiák** mutációk következtében jönnek létre, amelyek leggyakrabban a receptorok szintézisének hiányát okozzák. Sérülhet mutációk következtében a receptorok poszttranszlációs módosítása, vagy szerkezeti módosulás jöhet létre a ligandkötő doménben.

A familiaris hypercholesterinaemia heterozigóta formájában, amelyben egy LDL-receptor gén hibás (szemben a homozigótával, ahol kettő), a receptorok száma a normálisnak a fele, s ennek megfelelően csökken az LDL keringésből történő eliminációja. A homozigóta formában gyakorlatilag nincs LDL-receptor-szintézis.

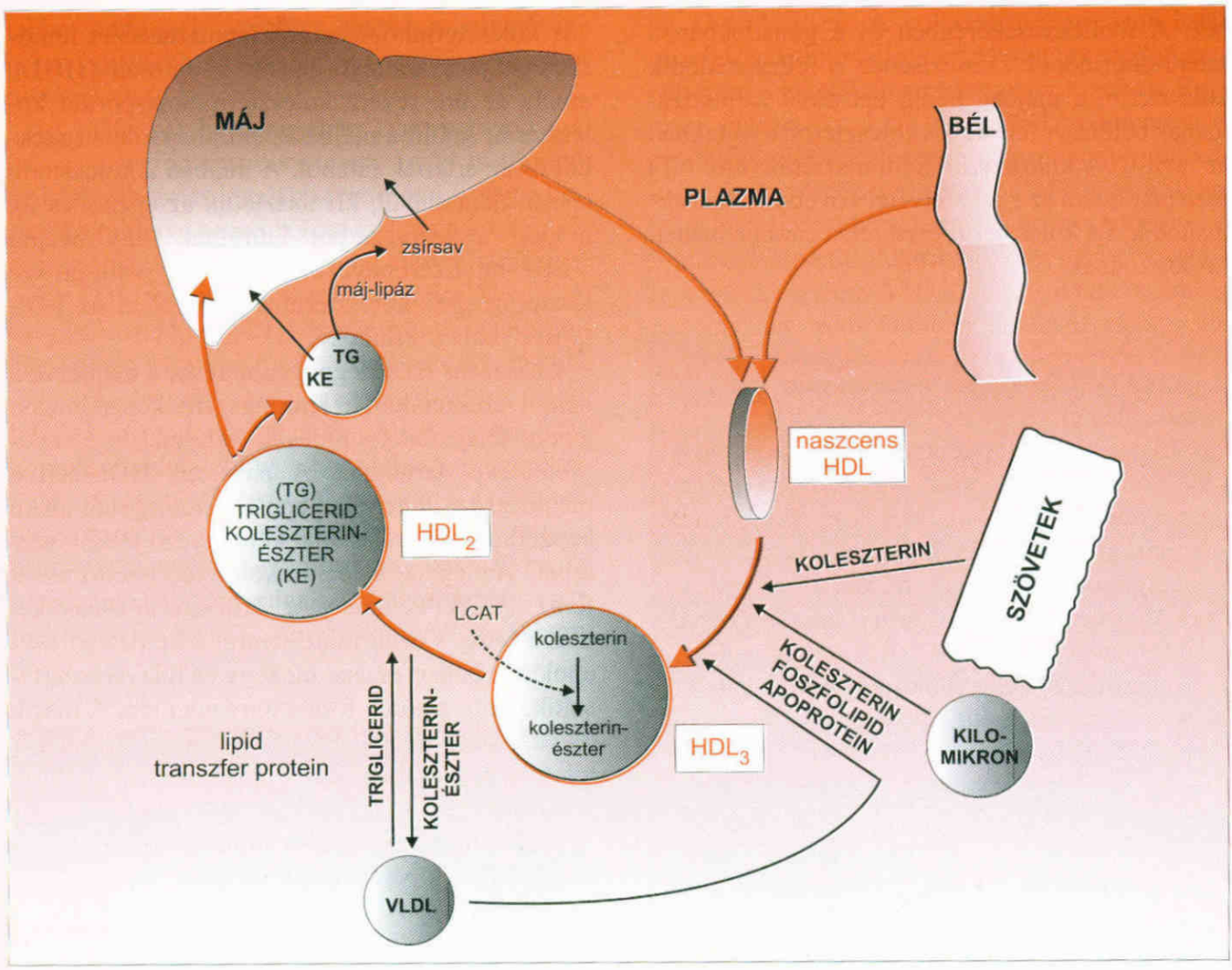
A familiaris hypercholesterinaemia heterozigóta formájában hatékony terápiás lehetőség a HMG-CoA-reduktáz gátlók (Lovastatin) alkalmazása. Ezek a *de novo* koleszterinszintézis gátlásával csökkentik a sejtek koleszterintartalmát, amely következményes LDL-receptorszám-emelkedéssel és a plazmából történő fokozott LDL-felvétellel jár. Jó hatásúak lehetnek olyan epesavkötő gyanták is, amelyek a bélben megakadályozzák az epesavak felszívódását, vagyis az enterohepatikus körforgást. A májsejtekben ilyen körülmények között a koleszterinből fokozott epesavszintézis történik, ami a LDL-receptorok számát nagymértékben fokozza, és ennek következtében csökken a plazma LDL-szintje. A familiaris hypercholesterinaemia homozigóta formájában a gyógyszeres terápiának nincs hatása, egyedüli lehetőségként a korai életkorban elvégzett májtranszplantáció jöhetne szóba.

A koleszterinhomeostasis fenntartásában fontos szerepet játszik a high-density lipoprotein **(HDL)**, amely az ún. reverz koleszterintranszporttal koleszterint szállít a májba az extrahepatikus sejtekből és az artériák falából. A májban a koleszterin epesavakká alakul, kiválasztódik az epébe, és ily módon a szervezetből kiürülhet vagy beépül VLDL-be. Ezért nevezik a HDL-ben szállított koleszterint „jó" koleszterinnek, szemben az LDL „rossz" koleszterinnel.

A naszcens HDL legnagyobb része a májból és a bélből szekretálódik. Korongszerű képződmény, amely főleg foszfolipideket, koleszterint és apoproteineket tartalmaz. A naszcens HDL-ben a meghatározó fehérje az apo E. Érett, gömb alakú képződménnyé válásában két tényező játszik szerepet. Az egyik a lecitin:koleszterin-acil-transzferáz (LCAT), amely a koleszterin-észtereket hozza létre, s ezek mint neutrális lipidek a HDL apoláros, belső részébe mozogva a bilayert szétfeszítik, amíg a gömb forma létre nem jön. A másik tényező az apo E helyett apo A-I beépülése a struktúrába, ami az érett HDL legjellegzetesebb apoproteinje.

A HDL nem egy statikus struktúra, összetétele a keringésben folyamatosan változik. Ennek során koleszterint vesz fel más lipoproteinektől és a sejtek membránjából, amit az LCAT koleszterin-észterré alakít (biztosítva ezáltal a koleszterindiffúzió irányát), foszfolipidek és triglicerid épülnek be, koleszterin-észtereket ad le, illetve apoproteineket ad le vagy vesz fel más lipoproteinektől. A lipidek felvétele a HDL-be részben egy lassú spontán folyamat, részben az ún. lipid transzfer fehérjék közreműködésével megy végbe. A HDL foszfatidilkolin komponense egyszersmind az LCAT enzim egyik szubsztrátja, és más foszfolipidekkel együtt szubsztrátja a máj-lipáznak is. Az apoproteinek is cserélődnek a lipoproteinek között. Az érett HDL-ben az apo A-I egy része apo A-II-re cserélődhet, az apo C számára pedig a HDL egy olyan „raktár", ahonnan a trigliceridtartalmú naszcens lipoproteinekre transzferálódhat.

A HDL-nek szubpopulációi léteznek, amelyek főleg a lipidösszetételben különböznek. A HDL_2 trigliceridekben gazdagabb és nagyobb méretű, mint a HDL_3. A trigliceridek a VLDL-ről kerülnek a HDL-re, amelyek viszont koleszterin-észtereket vesznek fel a HDL-ről. Kilinikailag is megfigyel-



2-138. ábra. HDL-metabolizmus

hető, hogy posztprandiálisan (táplálkozás után) megnő a HDL triglyceridtartalma. A HDL-triglyceridek a máj-lipáz szubsztrátjai, a belőlük keletkező zsírsavakat a májsejtek veszik fel. A HDL_2 a máj-lipáz hatására alakul át HDL_3-má. A HDL-ből a koleszterin-észtereket is a máj veszi fel, ahol a koleszterin a már megbeszélt utakon alakulhat tovább. A HDL-metabolizmus összefoglalása a *2-138. ábrán* látható.

Epidemiológiai vizsgálatokban egyértelmű negatív összefüggést találtak a plazma HDL-, ezen belül is a HDL_2-koleszterin-szint és az arteriosclerosis kialakulása között. A HDL védő hatásának nem teljesen tisztázott a mechanizmusa. Lehetséges, hogy egyszerűen a reverz koleszterin-transzport normális funkciójáról van szó, amely megszabadítja a sejteket és az artériák falát a feleslegeles koleszterintől. Nem kizárt azonban az sem, hogy a HDL – ma még nem ismert módon – közvetlenül befolyásolja az atherogenesis folyamatát.

Olyan kórképekben, amelyek a lipidek transzportjának zavara következtében jönnek létre, extrém magas plazma-triglicerid- és/vagy -koleszterinszint figyelhető meg. Ritka, de súlyos állapot a lipoprotein-lipáz működésének elégtelensége vagy hiánya, amelyben lehetetlenné válik a kilomikron keringésből történő eliminációja. Az állapoton, amelyben zsírdepozitok jelennek meg a bőrben és pancreatitis alakul ki, zsírszegény diétával javítani lehet.

2-8. táblázat. A hyperlipidaemiák felosztása

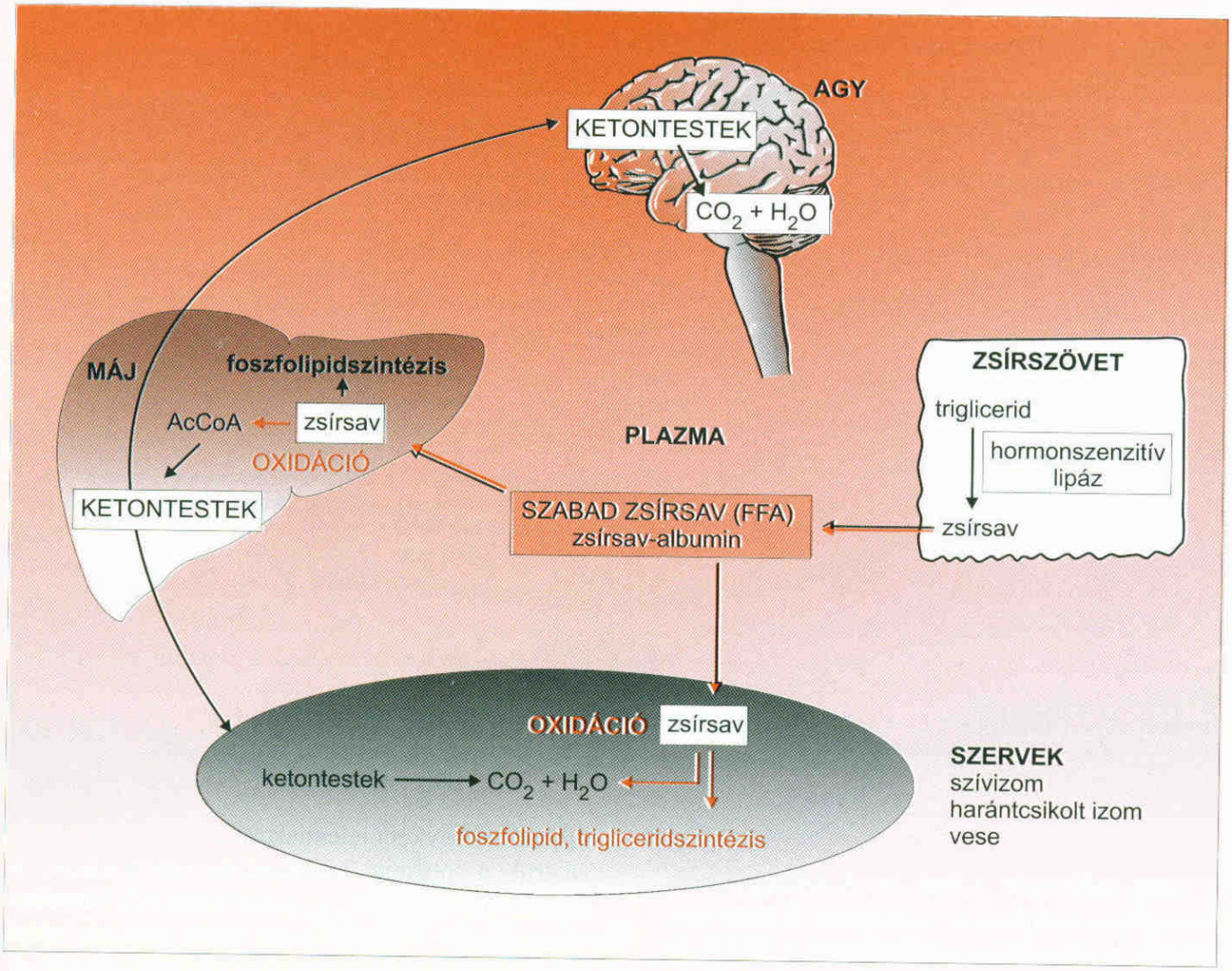
Általános elnevezés (az érintett lipoprotein)	Típus	Elsődleges károsodás
exogén hyperlipaemia (kilomikron)	I.	familiáris lipoprotein-lipáz elégtelenség C-II apolipoprotein elégtelenség
endogén hyperlipaemia (VLDL)	IV.	familiáris hypertrigliceridaemia (enyhe) familiáris többszörös lipoprotein típusú hyperlipidaemia sporadikus hypertrigliceridaemia Tangier-betegség
vegyes hyperlipaemia (VLDL + kilomikron)	V.	familiáris hypertrigliceridaemia (súlyos) familiaris lipoprotein-lipáz elégtelenség C-II apolipoprotein elégtelenség
hypercholesterinaemia (LDL)	IIa	familiáris hypercholesterinaemia (LDL-receptor-elégtelenség) familiáris többszörös lipoprotein típusú hyperlipidaemia különböző eredetű hypercholesterinaemia
összetett hyperlipidaemia (LDL + VLDL)	IIb	familiáris többszörös lipoprotein típusú hyperlipidaemia ismeretlen eredetű
egyéb hyperlipidaemia (β-VLDL)	III.	familiáris dysbetalipoproteinaemia ismeretlen eredetű
lamelláris hyperlipoproteinaemia (vezikuláris és diszkoid lipoproteinek)	–	familiáris lecitin: koleszterin-aciltranszferáz elégtelenség

Még súlyosabb a kép az abetalipoproteinaemiában, melyben az apoprotein B szintézise sérült. A plazmában a kilomikron, a VLDL és LDL egyaránt hiányzik, ami nagyon súlyos lipidfelszívódási és anyagcserezavarokat okoz.

A hyperlipidaemiával járó egyes kórképek felosztását a *2-8. összefoglaló táblázat* mutatja.

Szabad zsírsavak

A keringésben a zsírsavak több mint 95%-a triglicerídekben, foszfolipidekben és koleszterin-észterekben található, amelyeket a fent összefoglalt lipoproteinek szállítanak. A keringő zsírsavaknak néhány százaléka nem észteresített formában és nem lipoproteinekben található, ezek az ún. szabad zsírsavak (FFA; free fatty acids) amelyek albuminhoz kötve szállítódnak. Bár mennyiségileg ez nem tűnik jelentősnek, a metabolizmusban a szabad zsírsavak nagyon fontos szerepet játszanak. A zsírszövetben raktározott triglicerídekből mobilizált zsírsavak a keringésben szabad zsírsavként jelennek meg. Kis részben hozzájárul a plazma szabadzsírsav-tartalmához a lipoprotein-lipáz által a lipoproteinekből felszabadított zsírsav is, ennek nagy része azonban, mint láttuk korábban, közvetlenül a szervekbe kerül. A keringésben a zsírsavaknak egy kis hányada ténylegesen szabadon, albuminhoz nem kötve van jelen, ami egyensúlyban van az erős albuminkötésben található zsírsavval (zsírsav/albumin ↔ zsírsav + albumin). A szervek a nem kötött zsírsavat veszik fel, ami azonnal pótlódik a zsírsav/albumin kötésből disszociáló zsírsavval, s ez újra a szervek rendelkezésére áll. A keringő szabad zsírsavak így nagyon gyorsan a szervekbe kerülnek. A szabad zsírsavak mennyisége a keringésben a metabolizmus állapotától függ: éhezésben és erőteljes izommunka során megnő, étkezés után, amikor elegendő glukóz áll rendelkezésre az energiaigény fedezésére, csökken a szabadzsírsav-tartalom. Éhezésben a szervek számára az energia nagy részét a szabad zsírsavak lebomlása biztosítja. A szabad zsírsavak a szöveti lipidek szintézisére is felhasználhatók. A májba felvett szabad zsírsavak a ketontestek szintézisével az agy számára is fontos energiaforrást jelentenek, de közvetlenül, zsír-



2-139. ábra. Szabadzsírsav-forgalom az egyes szervek között

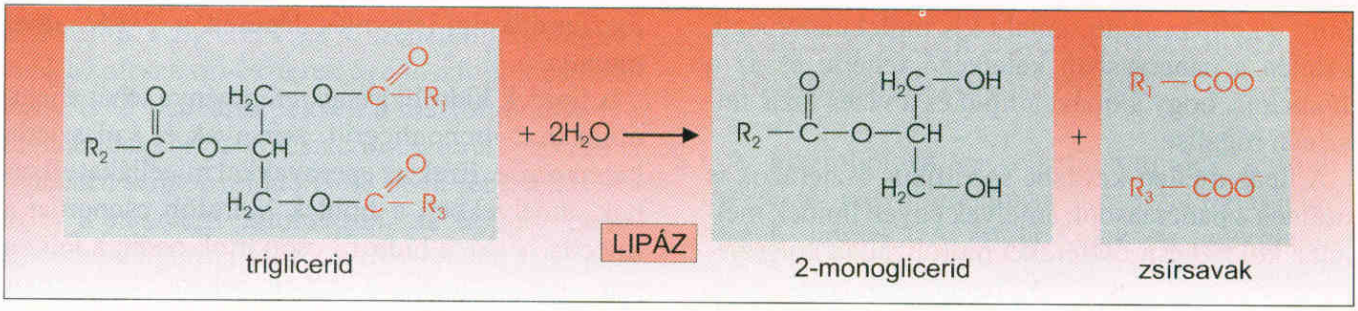
savként az agyban nem hasznosíthatók. A plazma szabadzsírsav-matabolizmusának legfontosabb tényezőit a *2-139. ábra* foglalja össze.

A zsírok emésztése és felszívódása

Egy felnőtt ember napi átlagos zsírfogyasztása 50–150 g, amelynek 90%-át triglicerídek, a többit koleszterin, koleszterin-észterek, foszfolipidek és zsírsavak alkotják.

A zsírok enzimatikus bontása kismértékben bár, de megkezdődik a szájüregben a nyelv mirigyei által termelt lipáz hatására, amely aktív marad a gyomorban is a savas közeg ellenére. A hidrolízis lassú, mivel a zsírok vízben nem oldódó molekulák lévén, elkülönülő fázisban, lipidcseppekben vannak jelen, s a vizes közeg felé, ahonnan az enzimek a zsírokhoz hozzáférnek, kis felülettel rendelkeznek. Ezt a problémát az epesavak oldják meg, amelyek a májban szintetizálódnak, az epehólyagban raktározódnak és az epével a duodenumba választódnak ki. Az epesavak detergens hatásúak, kölcsönhatásba lépnek a cseppekbe tömörült lipidekkel és a vékonybél vizes közegével egyaránt, s ennek következtében a lipideket emulgeálják. A lipidcseppek emulgeálásához hozzájárul a perisztaltika is, a béltartalom mechanikus keverésével.

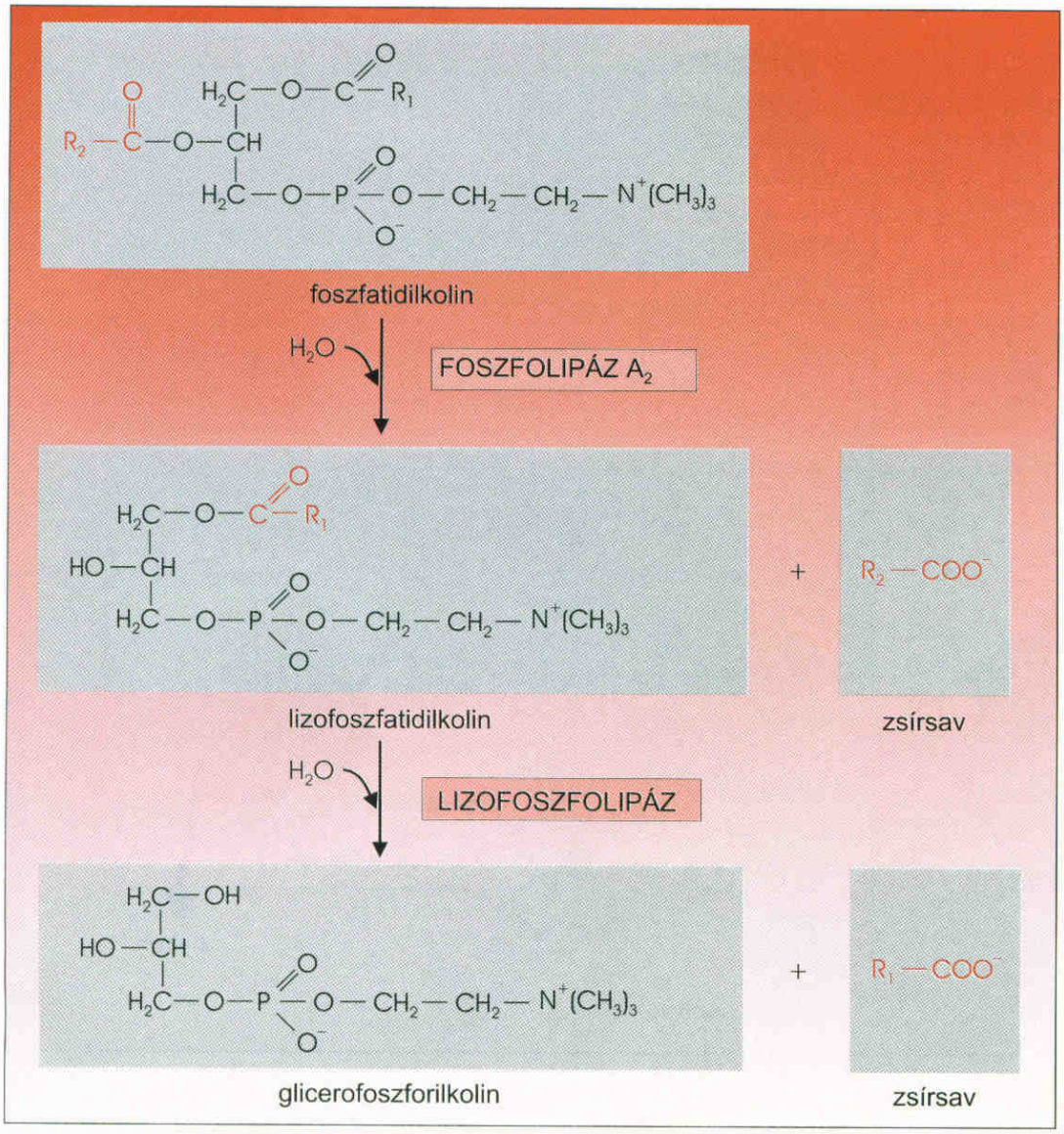
A lipidek tényleges emésztése a vékonybélben történik, s az enzimek a pancreasból hormonhatásra ürülnek a duodenumba. A jejunumban és a duodenumban a béltartalommal megjelenő zsírok és fehérjék hatására kolecisztokinin szekretálódik, amely a keringéssel transzportálódik és az epehó-



2-140. ábra. A trigliceridek hidrolízise lipáz hatására

lyag kontrakcióját, valamint a pancreas-enzimek kiválasztását okozza. A másik hormon a szekretin, amelynek hatására a pancreasból bikarbonátban gazdag nedv ürül.

A trigliceridek emésztését a **hasnyálmirigy-lipáz** végzi. Az enzim a glicerin 1. és 3. szénatomján lévő észterkötéseket hidrolizálja, így zsírsav és 2-monoacil-glicerin (2-monoglicerid) keletkezik *(2-140. ábra)*. A lipáz működését egy másik en-

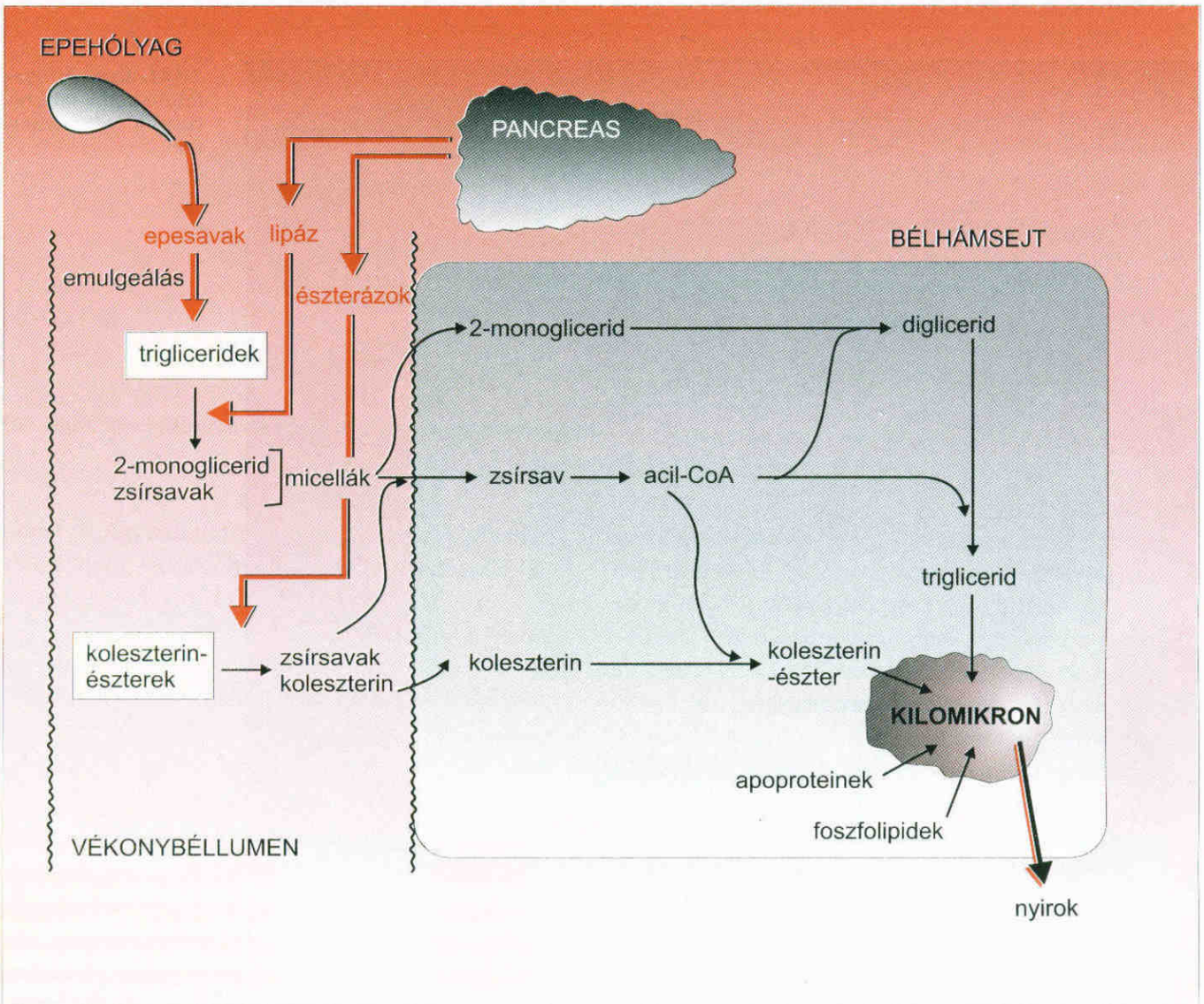


2-141. ábra. A foszfatidil-kolin lebomlása a vékonybélben

zim, a kolipáz segíti, amely kis molekulatömegű, szintén a pancreasban keletkező fehérje és az a funkciója, hogy a lipázt a lipid és a vizes fázis felszínén rögzítse.

A lipáz mellett kevésbé specifikus észterázok is ürülnek a pancreasból, amelyek egyéb lipidek mellett a koleszterin-észtereket hidrolizálják koleszterinre és zsírsavakra. A pancreasnedvvel nagy mennyiségű foszfolipáz A_2 proenzim is a vékonybélbe kerül, ahol tripszin hatására aktiválódik. A foszfolipáz A_2 a foszfolipidek 2. szénatomjáról távolítja el a zsírsavat, a keletkező lizofoszfolipidről további észteráz hatásra a másik zsírsav is hidrolizál. A keletkező glicerofoszfokolin a széklettel távozik vagy további hidrolízis után felszívódik. A foszfatidilkolin-lebomlás lépéseit a *2-141. ábra* mutatja.

A lipidek hidrolízisének eredménye tehát a jejunumban 2-monoglicerid, zsírsavak és koleszterin keletkezése. Ezek az epesavakkal micellákat alkotnak, amelyekben a lipidek hidrofób csoportjai a micella belső, a hidrofil csoportok pedig a felszín felé orientálódnak, így az egyébként vízben rosszul oldódó lipidek a bél vizes közegében oldott állapotban vannak. A lipideket a micellák viszik a béllumenben a mucosasejtekhez, ahol a lipidkomponensek a sejtmembránon áthaladva a sejtekbe abszorbeálódnak. A sejtekben a 2-monogliceridből a trigliceridek újraszintetizálódnak. Az abszorbeált zsírsavak aktiválódnak, és az aciltranszferázok



2-142. ábra. A trigliceridek emésztése és felszívódása

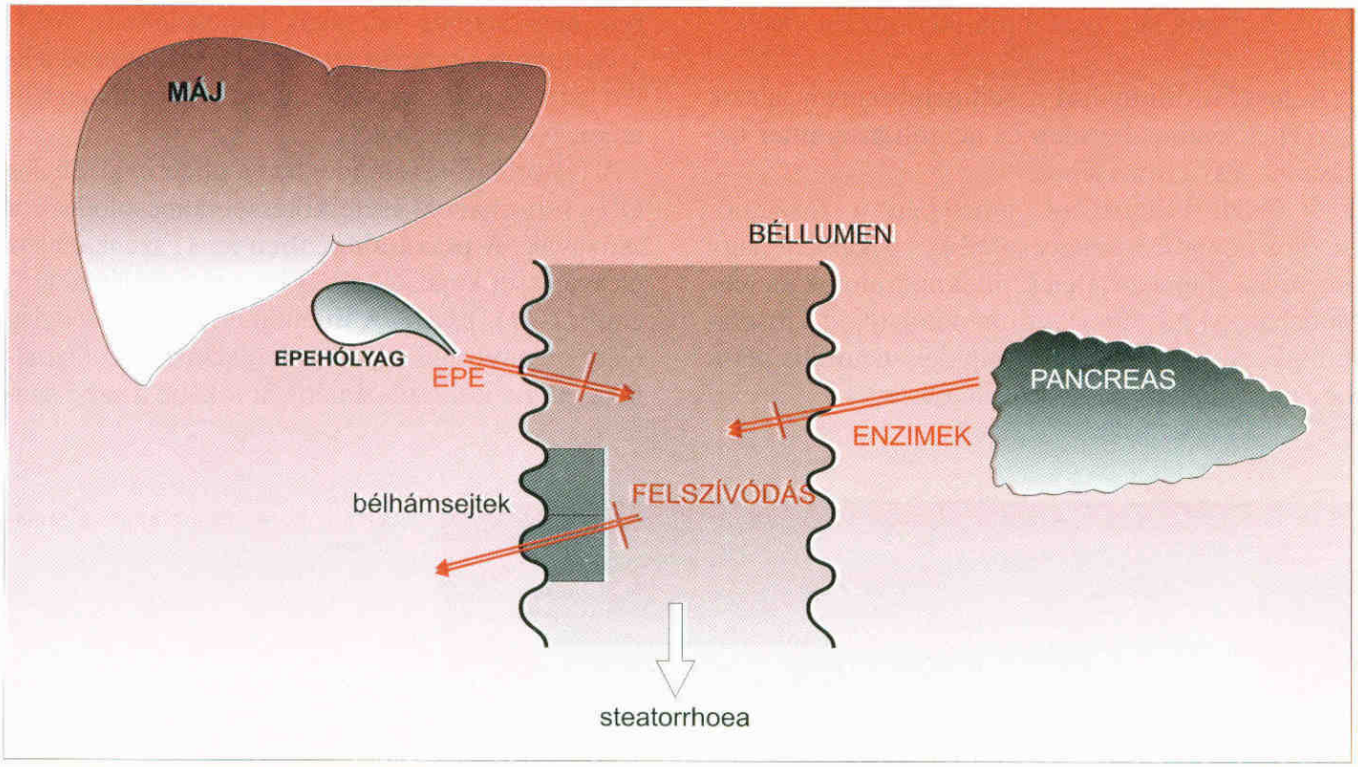
észteresítik a glicerin 1. és 3. szénatomját. Megtörténik a koleszterin-észterek és a foszfolipidek szintézise is. A bélhámsejtekben a foszfolipidekből, a trigliceridekből, a koleszterin-észterek- ből és a sejtekben szintetizálódó B-48 nevű fehérjéből létrejön a naszcens kilomikron, az a lipoprotein, amely a bélhámsejteket a nyirokutakon hagyja el és feladata a táplálékkal elfogyasztott lipidek elszállítása a májba és egyéb szervekbe. Ezalól kivétel a 12-nél kisebb szénatomszámú zsírsavak felszívódása, amelyek a sejteken keresztül közvetlenül a vérpályába szívódnak fel. A lipidek felszívódásának vázlata a *2-142. ábrán* látható.

Fiziológiás körülmények között a lipidek emésztése és felszívódása teljes, a székletben gyakorlatilag nincs zsír. **Steatorrhoea** az az állapot, amikor nagy mennyiségű zsír jelenik meg a székletben, ami azt jelzi, hogy az emésztés és felszívódás folyamatának valamely eleme károsodott. Ez a máj, az epehólyag vagy az epeutak betegsége, a pancreas vagy a bélhámsejtek elváltozása következtében jöhet létre *(2-143. ábra)*.

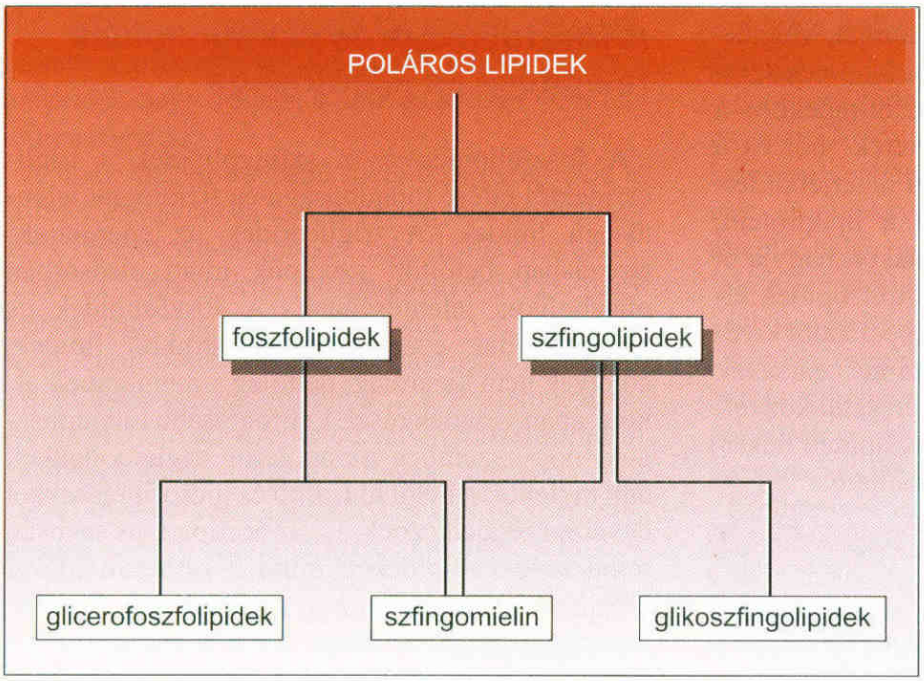
A foszfolipidek és szfingolipidek felépítése és jelentősége

A foszfolipidek és a szfingolipidek a trigliceridektől eltérő tulajdonságú és fiziológiai jelentőségű lipidek. A trigliceridek az energiaraktározásban betöltött szerepük miatt elsősorban metabolikus jelentőségűek. A foszfolipidek és szfingolipidek ezzel szemben struktúr lipidek, amelyek nem kizárólag, de főleg a membránok alkotásában vesznek részt. Legfontosabb tulajdonságuk, hogy szemben az apoláros trigliceridekkel, egy molekulán belül hidrofób és hidrofil részekkel egyaránt rendelkeznek. Ez az amfipatikus sajátság mind a foszfolipideket, mind a szfingolipideket jellemzi és meghatározza a molekulák legfőbb funkcióját is *(2-144. ábra)*. Bár a foszfolipidek jelen vannak a plazmában és az epében is, legfontosabb funkciójuk mégis az, hogy a membránok alkotásában vesznek részt (lásd a 4. fejezetet).

A foszfolipidekben a szfingomielin kivételével az alapvegyület a foszfatidsav. A legfontosabb glicerofoszfolipidek szerkezetét a *2-9. táblázat* mutatja. Az emberi szervezetben a membránok al-



2-143. ábra. A steatorrhoea lehetséges okai



2-144. ábra. A membránalkotó lipidek csoportosítása. *A koleszterin részt vesz a membránok alkotásában, de a jelen felosztásból kimarad*

kotásában legnagyobb mennyiségben a **foszfatidilkolin** (más néven lecitin), a **foszfatidiletanolamin** (más néven kefalin) és a **foszfatidilszerin** vesz részt. Közülük a fiziológiás pH mellett a foszfatidilszerin rendelkezik egy netto negatív töltéssel, amiért is savanyú foszfolipidnek tekinthető. A másik két foszfolipid ikerionként viselkedik.

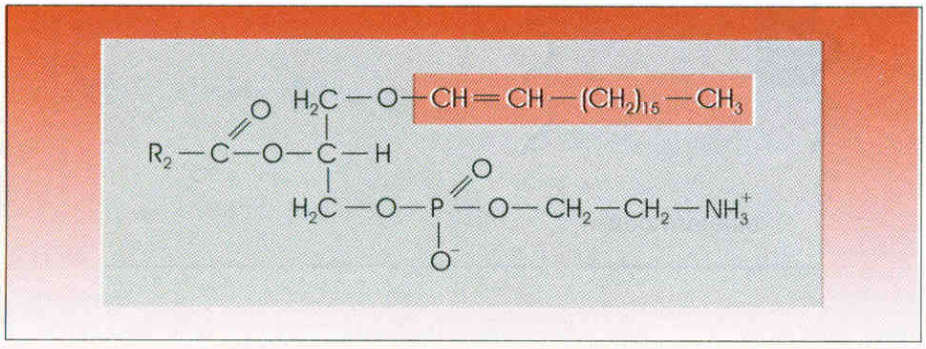
A **foszfatidilinozitol** a sejtmembránban játszik szerepet számos hormon és neurotranszmitter hatásának a közvetítésében.

A **foszfatidilglicerol**, amelyben a foszfatidsavhoz egy glicerin kapcsolódik, viszonylag nagy mennyiségben van jelen a mitokondriumok membránjában. Mind a foszfatidilinozitol, mind a foszfatidilglicerol savanyú foszfolipidek, neutrális pH-n egy netto negatív töltéssel rendelkeznek.

A **kardiolipin** savanyú tulajdonsága még kifejezettebb, mivel a molekula, amelyben két foszfatidsav kapcsolódik össze egy glicerinen keresztül, két negatív töltéssel rendelkezik. Kardiolipin főleg a mitokondriumok belső membránjában található.

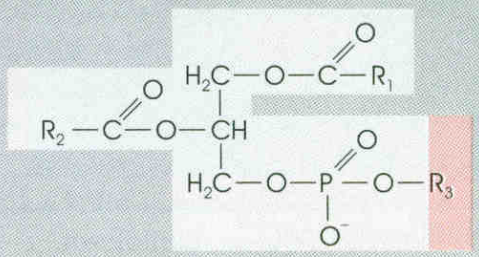
A foszfolipidekben a glicerin 1. és 2. szénatomjához nem azonos zsírsavak kapcsolódnak, az 1. szénatomon általában 16 vagy 18 szénatomos telített zsírsav, a 2. szénatomon pedig valamilyen telítetlen zsírsav található.

A felsorolt foszfolipidekben a glicerin alkoholos OH-csoportjához észterkötéssel kapcsolódnak a zsírsavak. A **plazmalogénben** az 1. szénatomhoz éterkötéssel kapcsolódik a hosszú szénláncú (18) enol *(2-145. ábra)*. A mielinmembrán viszonylag nagy mennyiségű etanolamin plazmalogént tartalmaz, míg a kolin plazmalogén inkább a szívizom-

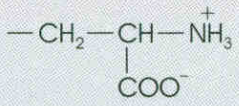
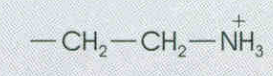
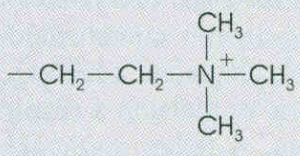
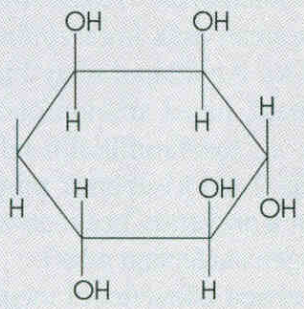
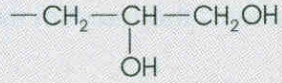
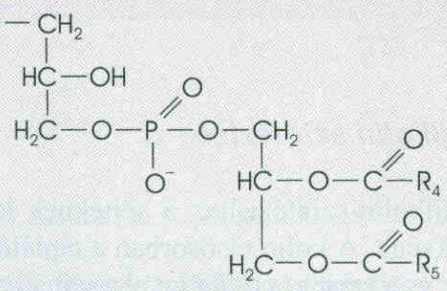


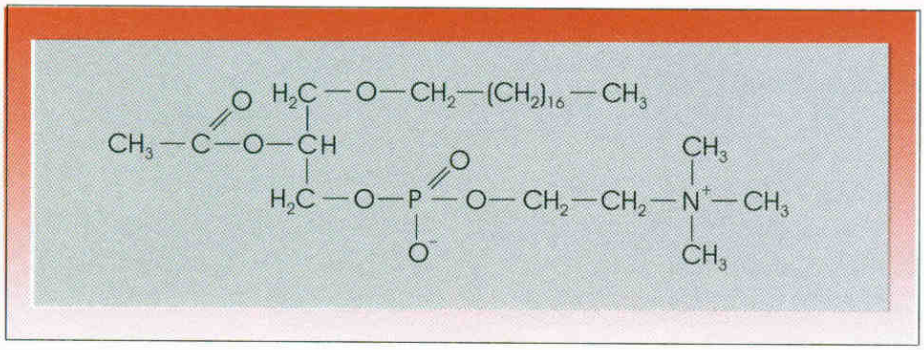
2-145. ábra. Etanolamin plazmalogén

2-9. táblázat
A legfontosabb glicerofoszfolipidek felépítése

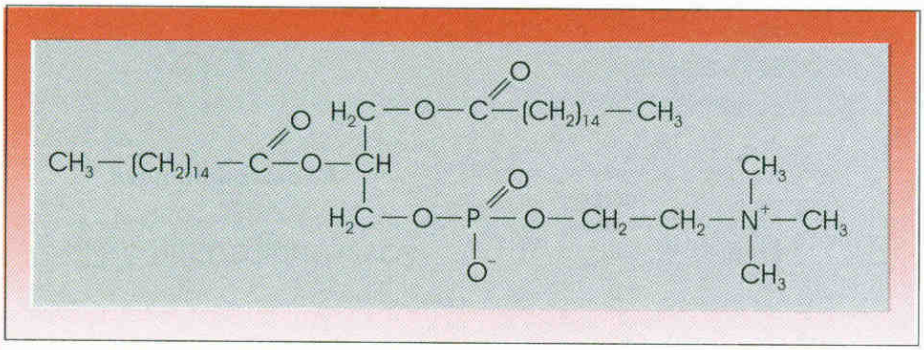


DIGLICERID-FOSZFORSAV-ALKOHOL
FOSZFATIDSAV

R_3		A foszfolipid neve
képlete	neve	
	szerin	FOSZFATIDILSZERIN
	etanolamin	FOSZFATIDILETANOLAMIN
	kolin	FOSZFATIDILKOLIN
	inozitol	FOSZFATIDILINOZITOL
	glicerol	FOSZFATIDILGLICEROL
	foszfatidilglicerol	KARDIOLIPIN



2-146. ábra. Trombocitaaktiváló faktor (PAF)



2-147. ábra. Dipalmitoil-lecitin. Tüdő-„surfactant"

ban található. Foszfolipidnek tekinthető a trombocitaaktiváló faktor (platelet activating factor; PAF). A PAF *(2-146. ábra)* a polimorfonukleáris leukocitákban, makrofágokban és monocitákban keletkezik és innen szabadul fel antigénhatásra. A PAF a trombociták aggregációját és a trombocitákból szerotoninfelszabadulást okoz, s szerepe van a gyulladásos és allergiás folyamatok létrejöttében.

Különleges szerepet tölt be a **dipalmitoil-lecitin** *(2-147. ábra)*, egy olyan foszfatidilkolin, amelyben a glicerin 1. és 2. szénatomján a OH-csoportot palmitinsav észteresíti. A dipalmitoil-lecitin alkotja azoknak az extracelluláris foszfolipideknek a 80%-át, amelyek a tüdőben az alveolusokkal közvetlenül érintkező extracelluláris folyadékban találhatók. A dipalmitoil-lecitin („surfactant") csökkenti a felületi feszültséget az alveolusok felszínén, s ezáltal megakadályozza, hogy az alveolusok a kilégzés végére teljesen összeessenek. Ez a felületaktív hatás csak a dipalmitoil-lecitint jellemzi; olyan foszfatidilkolin, amely nem tartalmaz két palmitinsavat, nem rendelkezik ezzel a képességgel.

A dipalmitoil-lecitint a II. típusú pneumociták termelik, s mennyisége az intrauterin élet 34. hetére éri el azt a szintet, ami a tüdő normális működéséhez szükséges. Ezen kor előtt a tüdőben főleg szfingomielin szintetizálódik. Ha a „surfactant" hatás elégtelen, a tüdő éretlen a funkciója ellátására, és kialakul a **respiratory distress syndroma**. A fejlett országokban az újszülöttkori elhalálozás 15–20%-át RDS okozza, ami azonban csak koraszülött csecsemőkben alakul ki. Az állapot nagy biztonsággal előre jelezhető, ha az amnionfolyadékban meghatározzák a foszfatidilkolin/szfingomielin arányt és az 2-nél kisebbnek mutatkozik. Szóba jön ekkor a preventív beavatkozás szükségessége (exogén surfactant adás).

Az utóbbi években közvetlenül meghatározzák a dipalmitoil-foszfatidilkolin, a foszfatidilglicerol, valamint a foszfatidilinozitol mennyiségét.

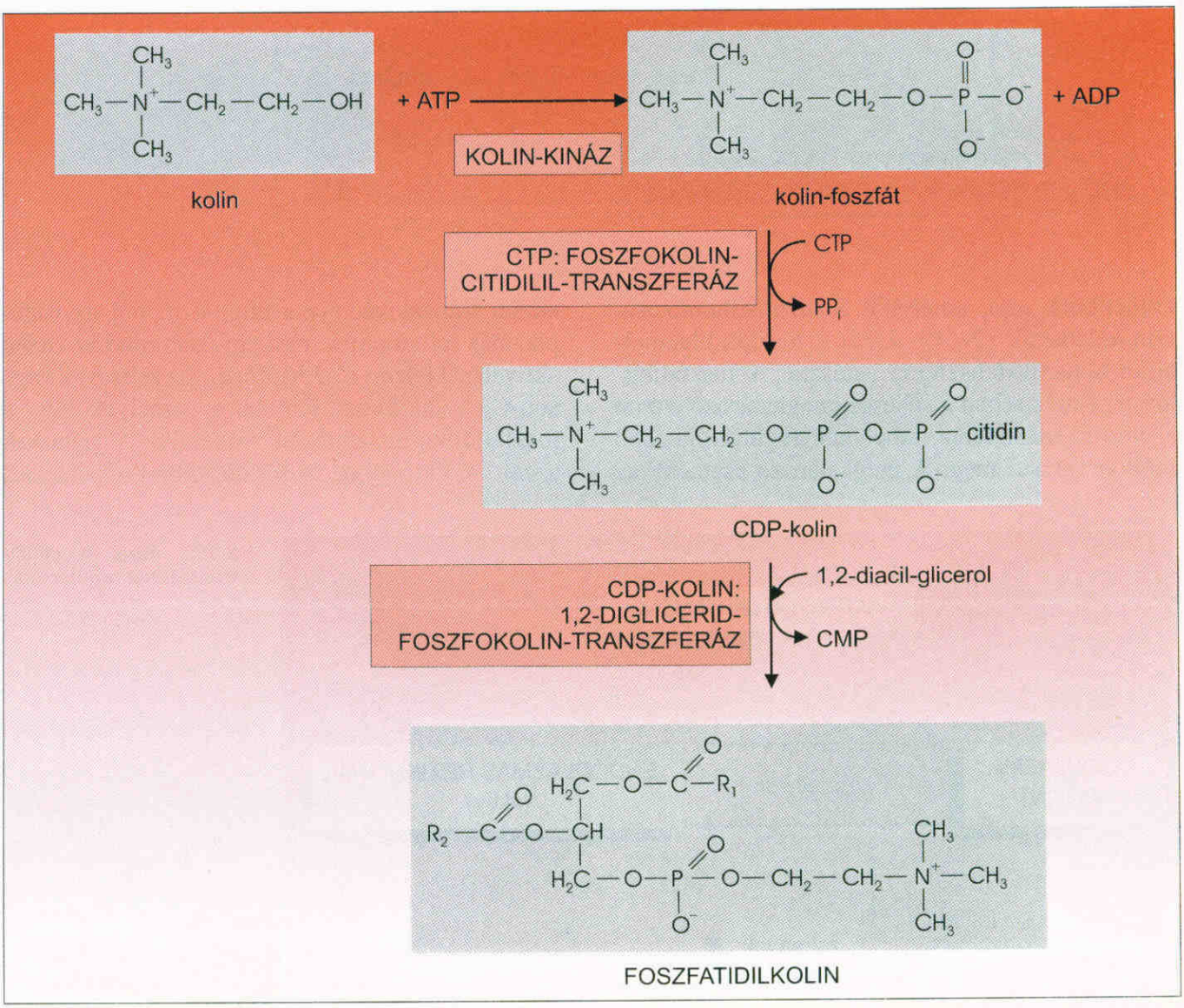
A foszfatidilkolin szintézise

A foszfatidilkolin-szintézishez a sejteknek kolinra van szüksége. A kolin elsősorban a táplálékból származik és a keringés útján jut el a sejtekhez,

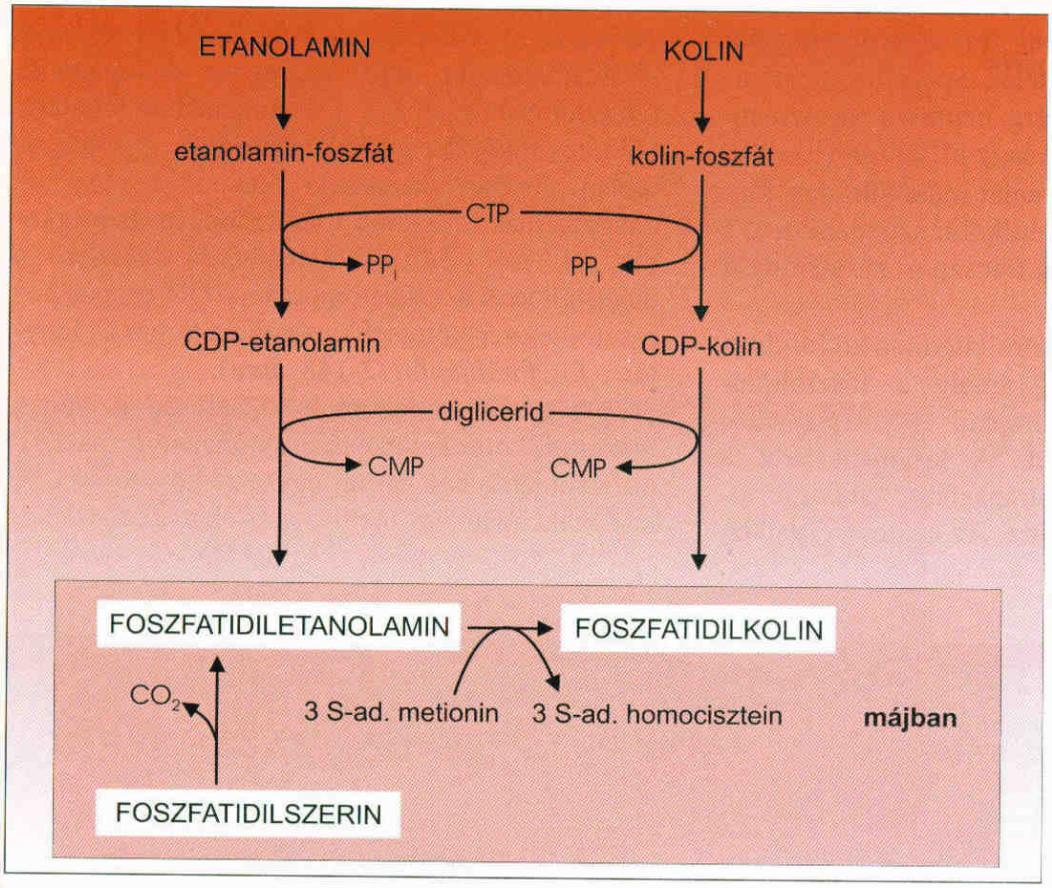
ahol a plazmamembránban transzportfolyamatok biztosítják a kolin felvételét. Speciális membránokban, például a kolinerg neuronok preszinaptikus membránjában, ún. nagy affinitású (K_M <10 μM) kolintranszport-folyamat működik, ami fontos szerepet játszik az acetilkolin szintézisében, a legtöbb sejtben azonban a transzport kis affinitású (K_M >10 μM).

A sejtekben a kolin foszforilálódik a kolin-kináz hatására *(2-148. ábra)*, amely a foszfolipid-bioszintézis legtöbb enzimjétől eltérően, a citoplazmában foglal helyet. A kolin-foszfátot a CTP:foszfokolin-citidilil-transzferáz alakítja tovább és CDP-kolin jön létre. Az enzim a citoplazmában és az endoplazmás retikulumban egyaránt kimutatható. Az aktív enzim az endoplazmás retikulumban található, a citoplazmában lokalizálódó enzimkészlet raktárként szolgál. A szintézis utolsó lépését katalizáló enzim szintén az endoplazmás retikulum membránjában helyezkedik el és CMP felszabadulása közben a diacil-glicerol 3. szénatomján lévő OH-csoporthoz foszfodiészter-kötéssel kapcsolja a kolint és létrejön a *foszfatidilkolin* (2-148. ábra).

Csak a májban alternatív lehetőség is van a foszfatidilkolin keletkezésére, mégpedig foszfatidil-etanolaminból három egymást követő metilálási reakcióban. A metilcsoportokat az S-adeno-

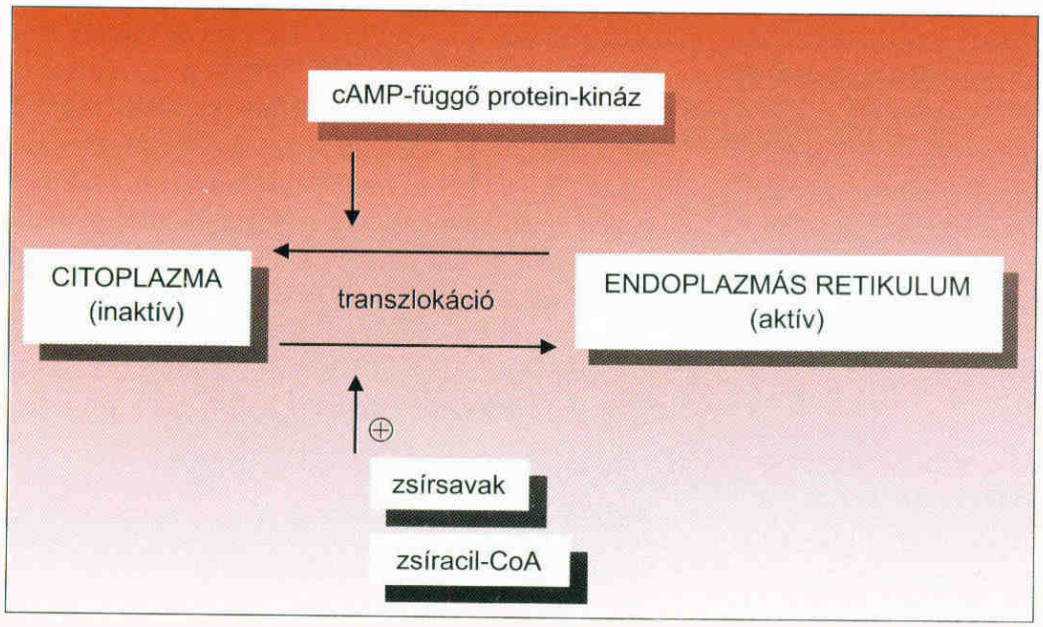


2-148. ábra. A foszfatidilkolin szintézise



2-149. ábra. A foszfatidiletanolamin- és a foszfatidilkolin-szintézis vázlata

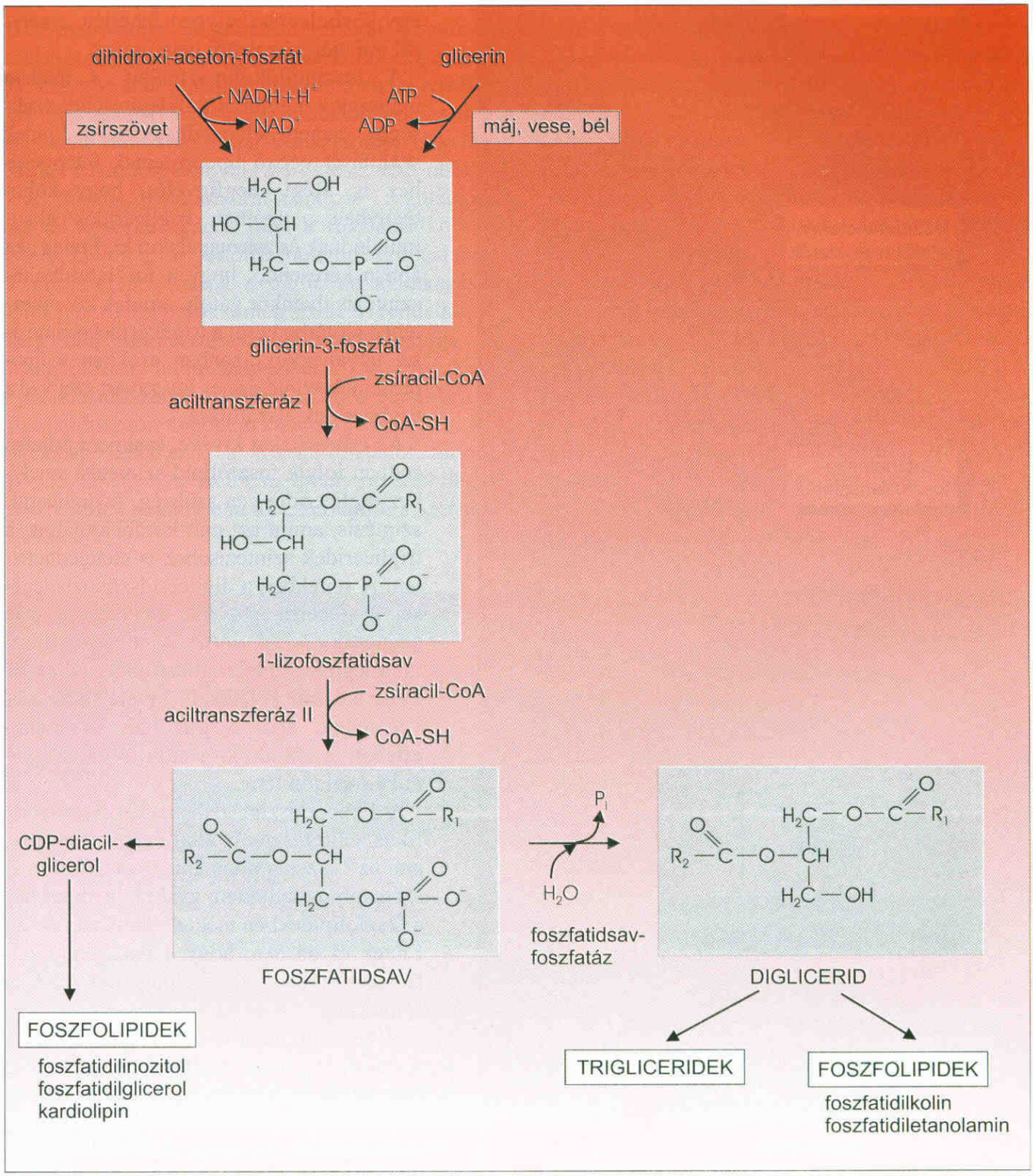
zilmetionin adja, amelyből S-adenozilhomocisztein keletkezik *(2-149. ábra)* a foszfatidiletanolamin-N-metil-transzferáz hatására. A foszfatidilkolin szintézisében a sebességmeghatározó enzim a citidilil-transzferáz, amelynek regulációja több módon valósul meg. A meghatározó esemény az enzim transzlokációja a citoplazmából az endoplazmás retikulumba, ami egyszersmind az enzim aktiválását jelenti *(2-150. ábra)*. Ez zsírsavak vagy acil-CoA hatására jön létre, amelyek így a foszfatidilkolin-szintézist serkentik. A zsírsavak azzal is aktiválják a foszfatidilkolin-szintézist,



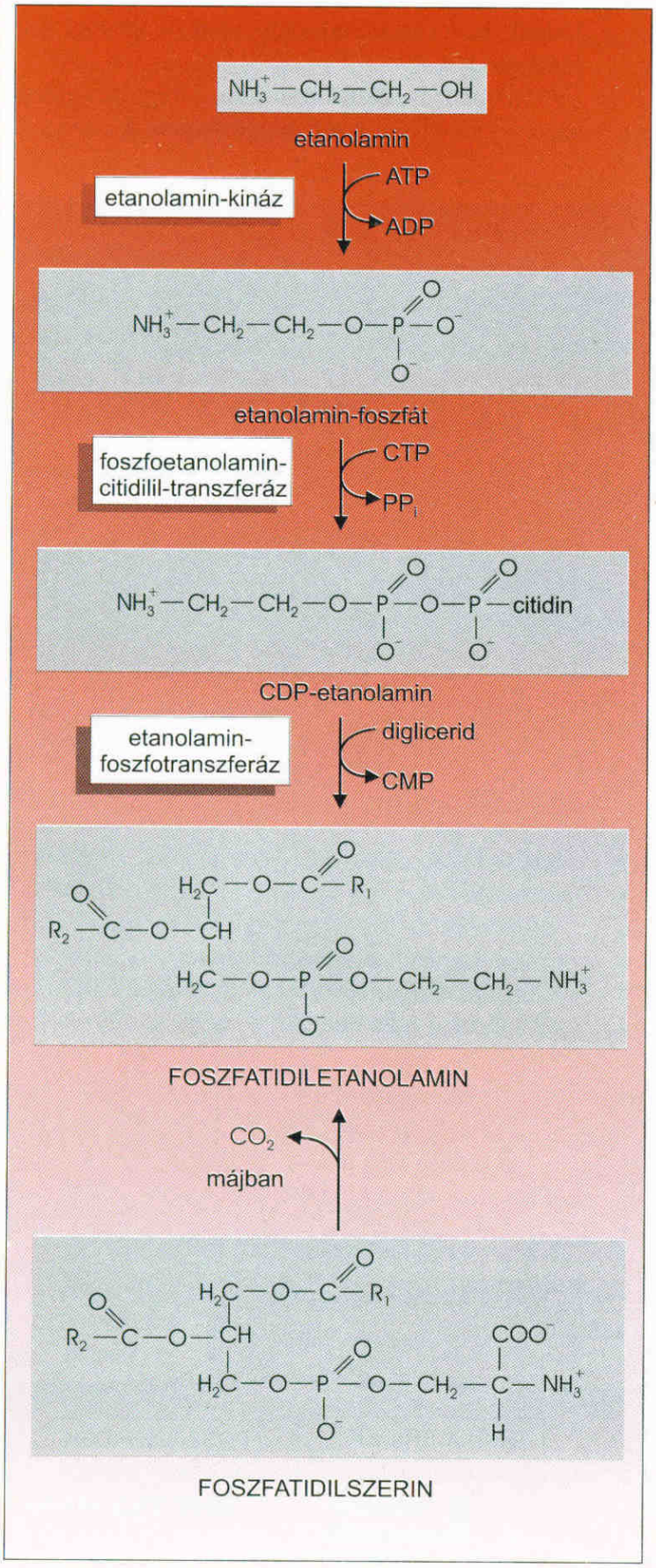
2-150. ábra. A citidiltranszferáz regulációja

hogy a belőlük keletkező acil-CoA a diacil-glicerol-szintézishez is hozzájárul, amire pedig szükség van a foszfatidilkolin-szintézishez. A májban a zsírsavak trigliceridszintézisre csak akkor használódnak, ha a foszfatidilkolin-szintézis igényei már kielégítődtek.

A májban a citidilil-transzferáz regulációjában szerepet játszik a cAMP-függő protein-kináz is. A



2-151. ábra. A foszfatidsav és a diglicerid szintézise



2-152. ábra. A foszfatidiletanolamin szintézise

protein-kináz hatására az enzim inaktiválódik, mert az endoplazmás retikulum membránjáról disszociál, a protein-foszfatáz hatására pedig aktiválódik. A foszforiláció–defoszforiláció valószínűleg nem közvetlenül a citidilil-transzferázon történik, hanem egy közbülső szabályozó fehérjén, amelyről ma még közelebbi nem ismert.

A foszfatidilkolin-szintézis a májban nemcsak a membránok felépítéséhez szükséges, hanem elengedhetetlen a lipidek szállítását végző lipoproteinek felépítéséhez is. Régi megfigyelés, hogy kolinhiányban a májban trigliceridek akkumulálódnak és zsírmáj alakul ki. Ennek oka abban keresendő, hogy a foszfatidilkolin-szintézis ilyenkor gátolt, aminek következtében előtérbe kerül a trigliceridek szintézise, ugyanekkor azonban csökken a lipoproteinek szintézise és így zavart szenved a trigliceridek elszállítása.

Az eritrocitákat kivéve, csaknem minden sejtben folyik foszfolipid-szintézis, amelyhez digliceridre van szükség. A diglicerid-szintézis, amint azt már korábban láttuk, a trigliceridek szintéziséhez is elengedhetetlen. A sejtekben a digliceridszintézis lépései a glicerin-3-foszfát keletkezése után azonosak *(2-151. ábra)*. A glicerin-3-foszfát a legtöbb sejtben glicerinből a glicerinkináz hatására keletkezik, kivételt a zsírszövet jelent, ahol a glikolízis intermedierjéből, a dihidroxi-aceton-foszfátból redukcióval jön létre.

A digliceridszintézisben a két, nem specifikus aciltranszferáz által beépített zsírsav, ami az 1. szénatomon általában telített, a 2. szénatomon telítetlen, gyakran nem azonos a foszfolipidekben megtalálható zsírsavval. Ennek az az oka, hogy a foszfolipidszintézisben utólag kicserélődhetnek ezek a zsírsavak.

Mivel a diglicerid közös intermedier a foszfolipidek és a trigliceridek szintézisében, a foszfatidsav-foszfatáz enzim regulációja szerepet játszik mindkét lipidféleség szintézisében. Az enzim aktivitását növelik a legkülönfélébb stress körülmények, az alkoholfogyasztás és a glukokortikoidok.

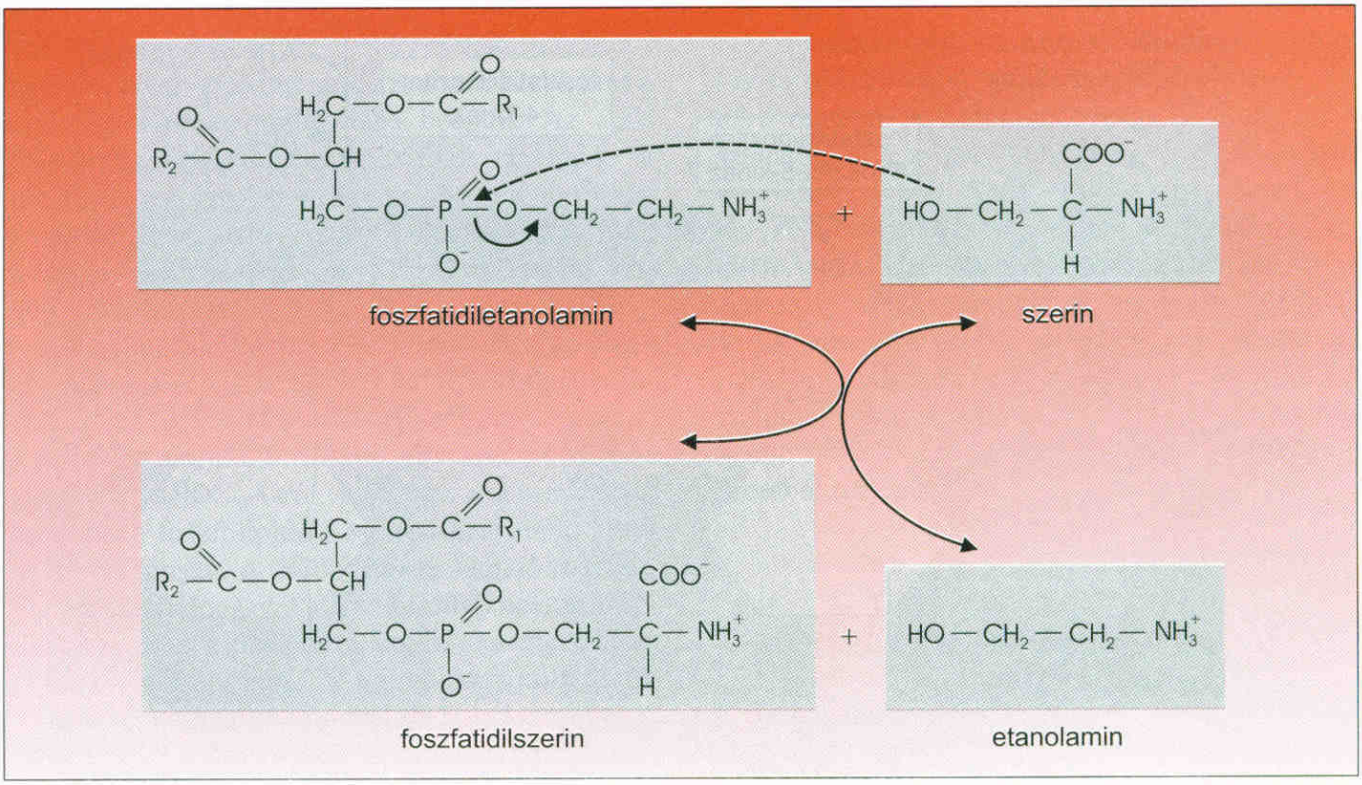
Egyéb foszfolipidek szintézise

A foszfatidiletanolamin szintézise hasonló lépésekben valósul meg, mint a foszfatidilkoliné (2-149. és *2-152. ábra)*. A szintézishez itt is CTP-vel az etanolamin-foszfát aktiválódik és a CDP-etanolamin a digliceriddel reagál. Ez utóbbi reakciót az etanolamin-foszfotranszferáz katalizálja, amely az endoplazmás retikulumban lokalizálódik. Kis mennyiségű foszfatidiletanolamin a máj mitokondriumokban foszfatidilszerinből is keletkezhet dekarboxilációval (2-149. és 2-152. ábra).

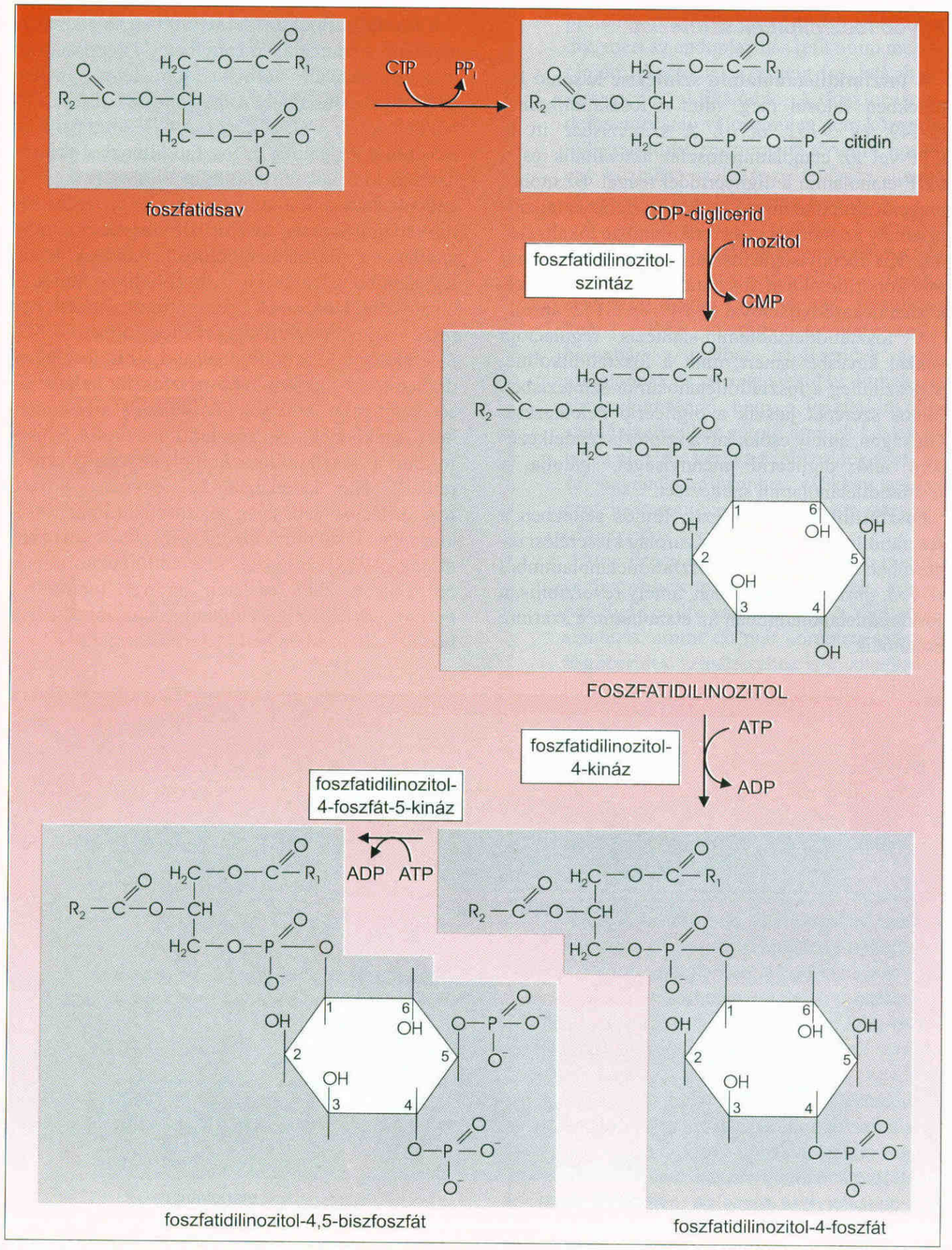
A foszfatidiletanolamin-szintézis regulációja sokkal kevésbé ismert, mint a foszfatidilkoliné. Valószínűleg a foszfatidiletanolamin-szintézisben fontos szerepet játszik a diglicerid keletkezése. Glukagon, amely csökkenti a szintézis rendelkezésére álló diglicerid mennyiségét, gátolja a foszfatidiletanolamin szintézisét.

Foszfatidilszerin-szintézis. Emlős sejtekben a foszfatidilszerin majdnem kizárólag kicserélési reakcióban keletkezik a foszfatidiletanolaminból *(2-153. ábra)*. A reakcióban, amely reverzibilis, a foszfatidiletanolaminban az etanolamin a szerinre cserélődik.

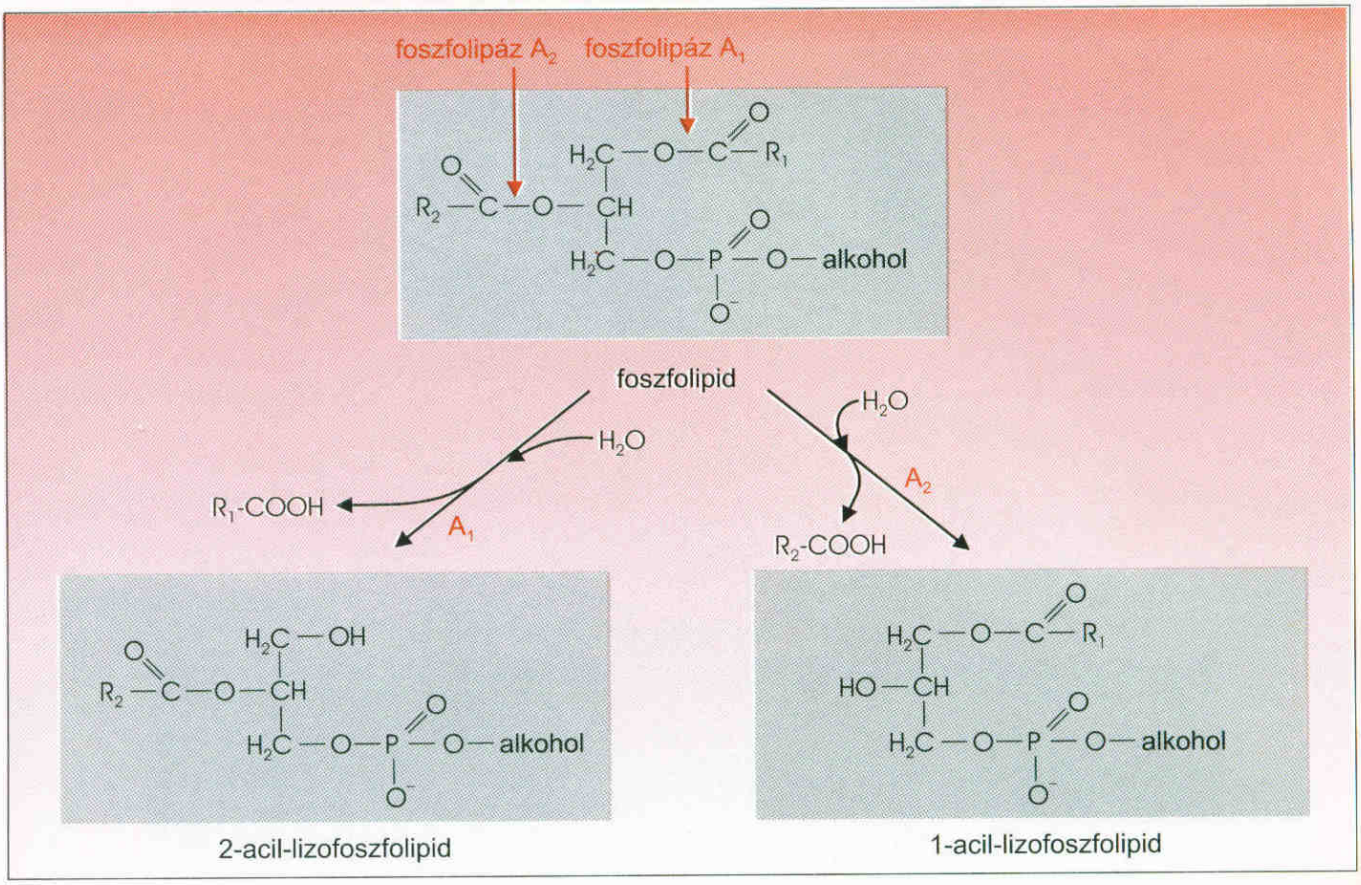
A foszfatidilinozitol szintézisében az eddigiektől eltérő a stratégia, amennyiben CTP-vel nem az inozitol aktivált formája jön létre, hanem CDP-diglicerid, amely a foszfatidsavból és CTP-ből keletkezik *(2-154. ábra)*. A CDP-diglicerid az inozitollal reagál és a foszfatidilinozitol-szintáz hatására kialakul a foszfatidilinozitol. A reakció az endoplazmás retikulumban játszódik le. A foszfatidilinozitol számos foszforilált származéka megtalálható a plazmamembránban, amelyek közül legnagyobb jelentőségű a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát. Hormonok és neurotranszmitterek egy része a sejtekben aktiválja azt a foszfolipáz C enzimet, amely a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátból diglicerid és inozitol 1,4,5-triszfoszfát keletkezését katalizálja, amelyek másodlagos messengerként működnek. A foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát a foszfatidilinozitolból az endoplazmás retikulumban keletkezik két egymást követő foszforilációs lépésben, a foszfatidilinozitol-4-kináz és a foszfatidilinozitol-4-foszfát-5-kináz hatására (2-154. ábra). A foszfatidilinozitol-metabolizmus további részletei, amelyek fontosak a hormon- és neurotranszmitter hatások közvetítésében az 5. fejezetben kerülnek ismertetésre.



2-153. ábra. A foszfatidilszerin keletkezése



2-154. ábra. A foszfatidilinozitol keletkezése



2-155. ábra. A foszfolipáz A_1 és foszfolipáz A2 által katalizált reakciók

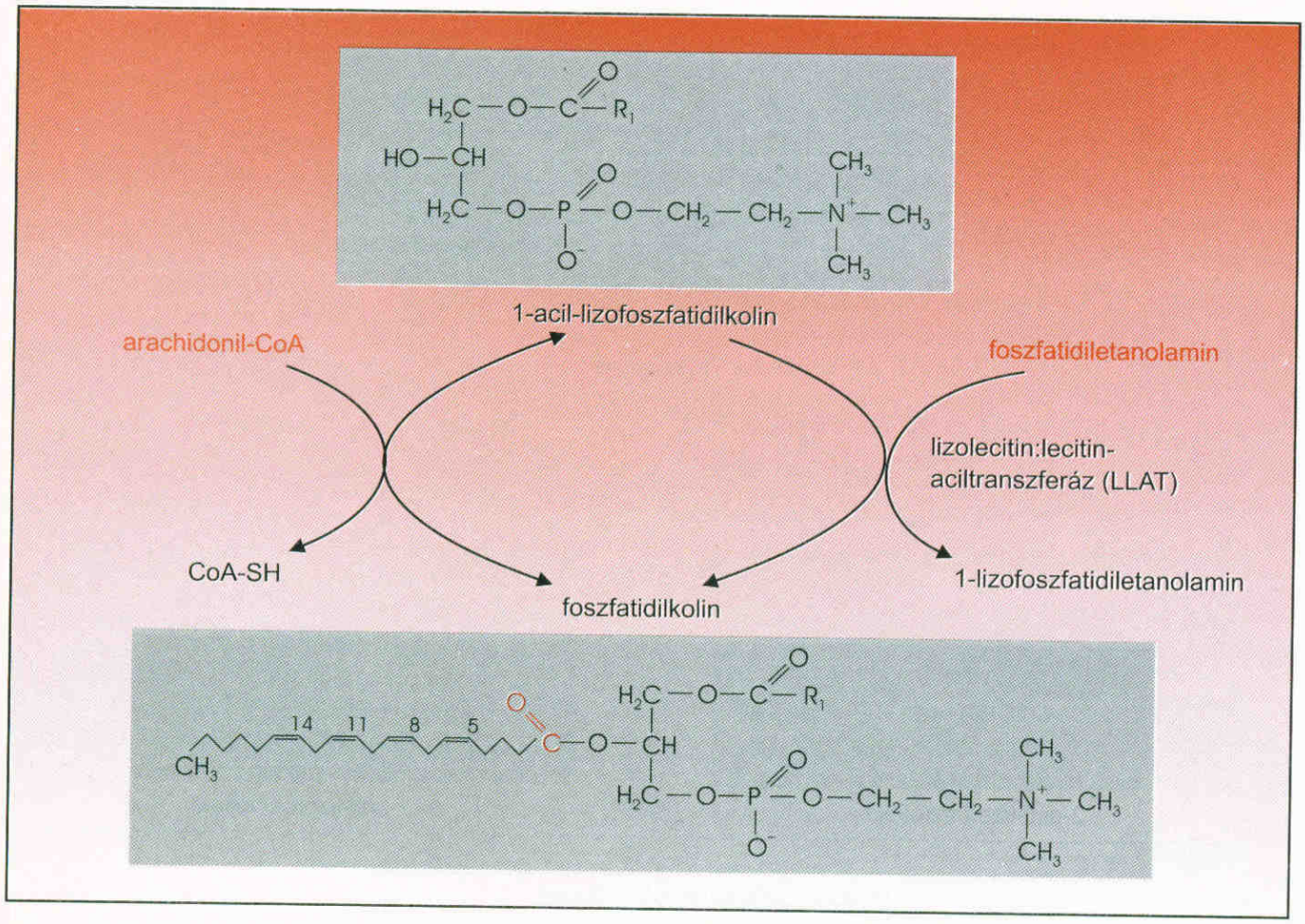
A foszfolipidekben az 1. és 2. szénatomon található zsírsavak gyakran nem azonosak azzal, ami a szintézis során a molekulába beépült. Az acil-CoA-transzferázok nem specifikus enzimek, a megfelelő zsírsavakat utólag kell beépíteni. Ehhez a foszfolipáz A_1 és A_2 enzimek először eltávolítják a meglévő zsírsavakat a *2-155. ábrán* látható módon.

A foszfatidilkolinban a 2. szénatomra gyakran arachidonsav épül be, amihez két lehetőség áll rendelkezésre. A foszfolipáz A_2 hatására keletkező 1-lizofoszfatidilkolinra vagy egy arachidonsavat tartalmazó acil-CoA-ról vagy más, arachidonsavat tartalmazó foszfolipidről cserereakció útján kerül az arachidonsav. A *2-156. ábrán* látható reakcióban az arachidonsavat a foszfatidiletanolamin tartalmazza és ez a lizolecitin:lecitin-acil-transzferáz (LLAT) hatására kerül át a lizofoszfatidilkolinra. Ezzel a reakcióval analóg módon keletkezik a tüdő „surfactant", a dipalmitoil-lecitin, amelyhez a palmitinsavat a 1-palmitoil-lizolecitin szolgáltathatja *(2-157. ábra)*.

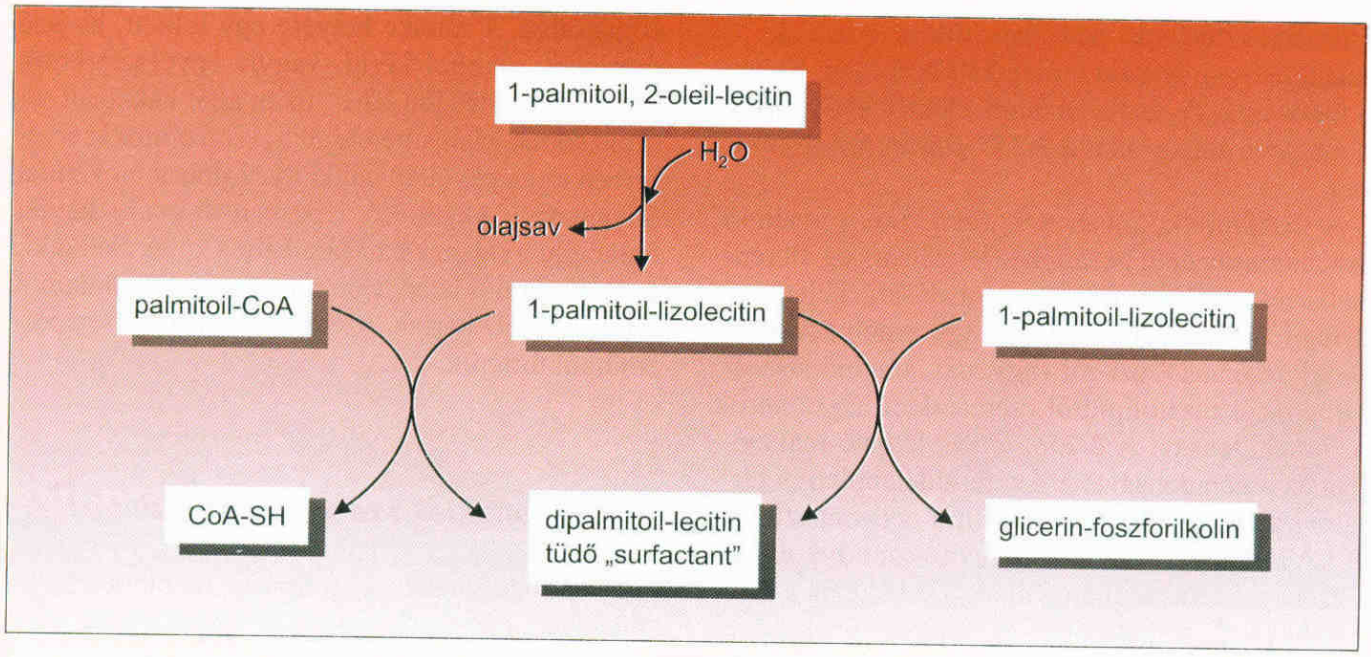
A plazmalogén szintézise dihidroxi-aceton-foszfátból történik, amelynek lépéseit a *2-158. ábra* mutatja. A szintézis lényege az, hogy az 1. szénatomra, a zsírsav helyére egy telített, hosszú szénláncú alkohol kerül, vagyis egy észterkötés helyett éterkötés jön létre enzim által katalizált reakció során. Mai ismereteink szerint emlős szervezetben ez az egyetlen példa ilyen típusú biokémiai folyamatra. Az utolsó lépésben egy ún. kevert funkciójú oxigenáz hatására kettős kötés alakul ki. Az etanolamin beépülése a foszfatidil-etanolamin szintézisénél leírtak szerint, azaz CDP-etanolaminból történik.

A szfingolipidek szerkezete és szintézise

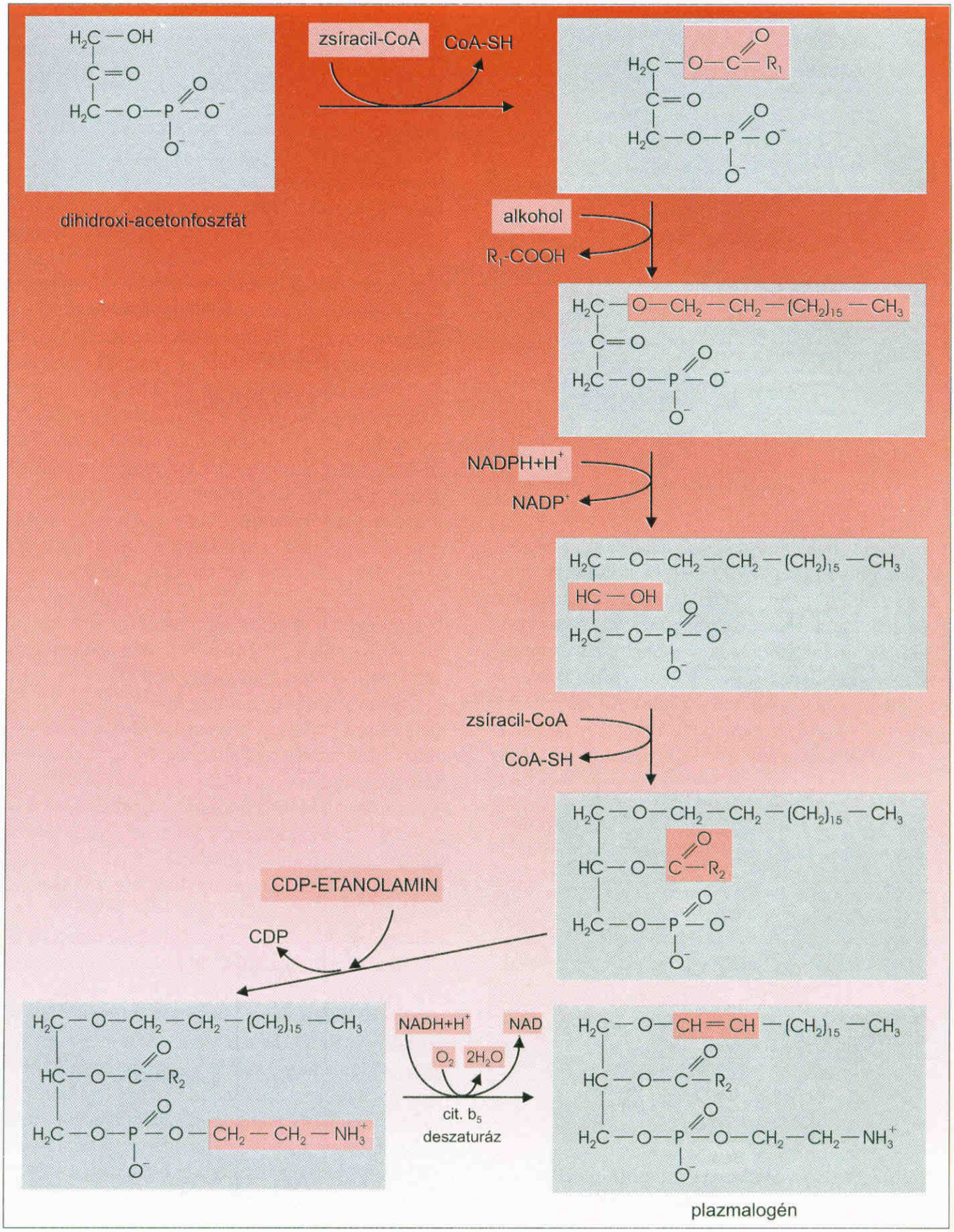
A szfingolipidek a poláros, membránalkotó lipidekhez tartoznak, melyekben azonban az alkoholkomponens nem a glicerin, hanem a szfingozin *(2-10. táblázat)*. A szfingozin szerkezetileg némi-



2-156. ábra. Az arachidonsav beépülése a foszfatidilkolinba

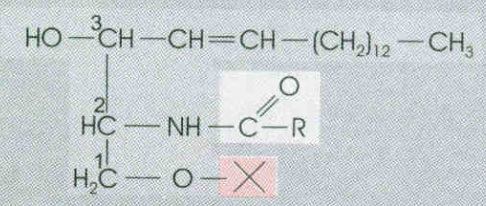


2-157. ábra. A dipalmitoil-lecitin keletkezése

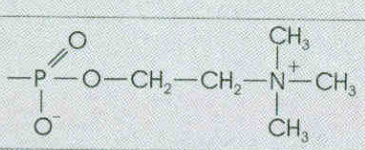
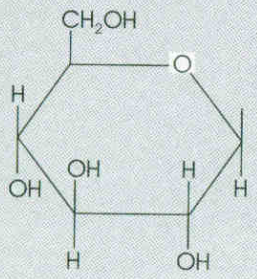
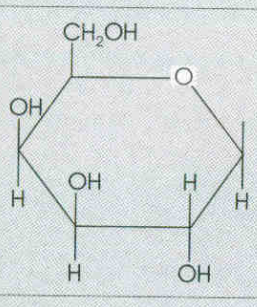
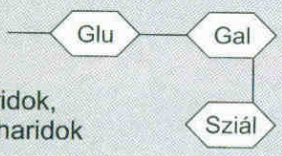
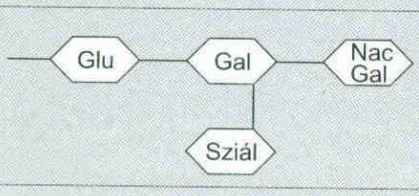
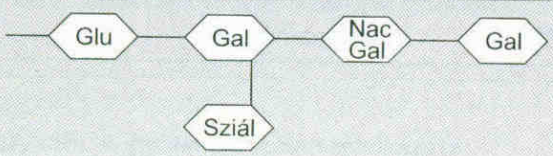


2-158. ábra. A plazmalogénszintézis lépései

2-10. táblázat
A szfingolipidek szerkezete



szfingozin-zsírsav-x

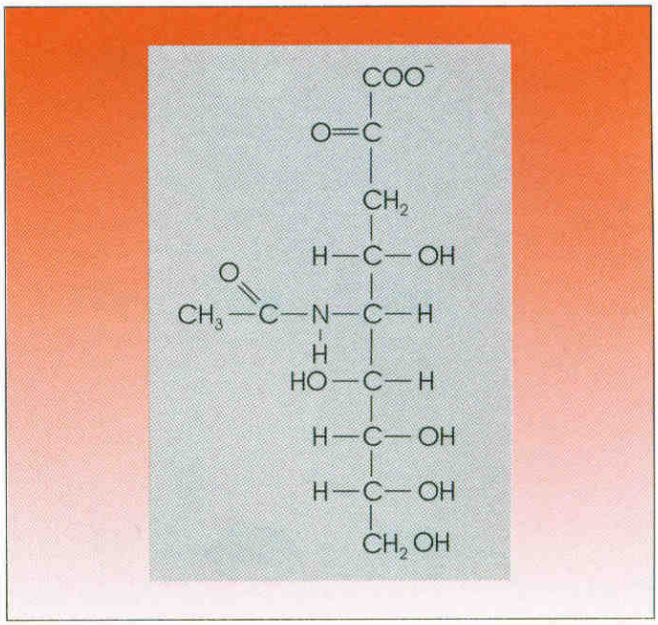
x képlete	x neve	A szfingolipid neve	
—H		CERAMID	
	foszfokolin	SZFINGOMIELIN	
	glukóz	cerebrozidok	neutrális glikoszfingolipidek
	galaktóz		
	laktóz		
 triszacharidok, oligoszacharidok		G_{M3}	
		G_{M2}	gangliozidok
		G_{M1}	

leg hasonlít a glicerinhez, amennyiben az 1. és 3. szénatomhoz alkoholos OH-, a 2. szénatomhoz azonban NH_2-csoport kapcsolódik. A 2. szénatomon szabad NH_2-csoportot tartalmazó szfingozin az emberi szervezetben nem fordul elő, hanem csak származéka, amelyben az NH_2-csoporthoz hosszú szénláncú zsírsav kapcsolódik (savamid). Ez a molekula a **ceramid**, amely minden, a természetben előforduló szfingolipidnek építőeleme. A szfingozin *transz*-konfigurációjú, a kapcsolódó zsírsav pedig hosszú szénláncú, gyakran telített és meghatározza a molekula hidrofób karakterét. A szfingolipidek csaknem minden sejt membránjában jelen vannak, legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszer fehér állományában.

A szfingolipidek közül a **szfingomielin** az egyetlen foszfolipid, mivel a ceramid 1. szénatomjához foszfodiészterkötéssel kapcsolódik a kolin (2-10. táblázat). A szfingomielin a foszfatidilkolinhoz hasonló szerkezetű és tulajdonságú lipid, amely a sejtmembránok alkotórésze. Különösen nagy mennyiségben található az axonokat körülvevő mielinhüvelyben.

A neutrális glikoszfingolipidekben a ceramid 1. szénatomján lévő OH-csoporthoz glikozidos kötéssel egy vagy több szénhidrátegység kapcsolódik. Ha a kapcsolódó szénhidrát monoszacharid, a molekulát **cerebrozidnak** nevezzük. Ez általában galaktocerebrozid vagy glukocerebrozid, külön megjelölés nélkül a cerebrozid elnevezés alatt galaktocerebrozid értendő. Ez utóbbi fontos alkotórésze az idegsejtek membránjának, míg a glukocerebrozid inkább mint intermedier fordul elő komplex glikoszfingolipidek szintézisében és lebomlásában.

A legkomplexebb szfingolipidek a **gangliozidok**, amelyekben a kapcsolódó szénhidrátok között mindig megtalálható a 9 szénatomos, pH 7,4-nél negatív töltéssel rendelkező N-acetil-neuraminsav, azaz más néven sziálsav *(2-159. ábra)*. A gangliozidok nevüket onnan kapták, hogy nagy mennyiségben találhatók az idegrendszerben, a ganglionsejtekben, azonban kevésbé jellemző az előfordulásuk a nem idegi sejtek membránjában. Ma már nagyszámú gangliozid szerkezete ismert, amelyekből három jellemző látható a 2-10. táblázatban. Az elnevezésben az M azt jelzi, hogy a molekulában egy (mono) sziálsav található, a számokkal pedig a szénhidrátláncokat jelölik.

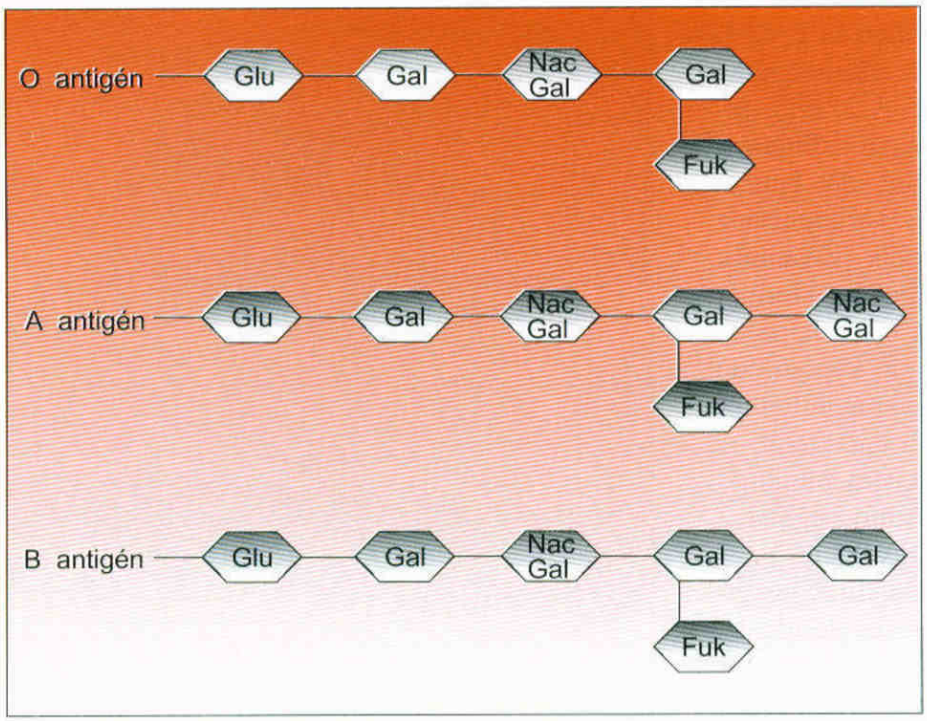


2-159. ábra. N-acetil-neuraminsav (NANA). Sziálsav

A szfingolipideknek, ezen belül is különösen a glikoszfingolipideknek és a gangliozidoknak a sejtmembránokban nemcsak az a jelentőségük, hogy a membrán szerkezetének kialakításában vesznek részt, hanem mint sejtfelszíni molekulák a felismerési folyamatokban játszanak fontos szerepet. Glikoszfingolipidek határozzák meg az emberi A, B és 0 vércsoportokat, amelyekben a jellegzetes szénhidrátláncokat a *2-160. ábra* mutatja.

A gangliozidok, amelyek funkciója ma még csak részben ismert, receptorként szolgálnak különböző toxinok és vírusok számára, szerepük ezért meghatározó a toxikus hatások közvetítésében. A *vibrio cholerae* toxinja, a choleratoxin pl. úgy jut be a sejtekbe, hogy a toxin egyik alegységét (B) a sejtek felszínén a G_{M1} gangliozid ismeri fel és köti meg, s ezt követően a toxin másik, aktív alegysége (A) a sejtekbe penetrál. A sejtekben a toxin tartósan aktiválja az adenilát-ciklázt (lásd 5. fejezet), ami a legkülönbözőbb kóros funkciókat eredményezi. A bélhámsejtekből például ennek eredményeként elektrolitok szekretálódnak a béllumenbe, aminek következtében létrejön a cholera egyik legjellegzetesebb tünete, a diarrhoea.

A **szfingolipidek szintézise** *(2-161. ábra)* szerinből és palmitoil-CoA-ból indul. A szintézisben a redukcióhoz NADPH-ra van szükség, a zsírsav pedig acil-CoA-ból épül be. Jellegzetessége a szfingomielin szintézisének, hogy a kolin nem a



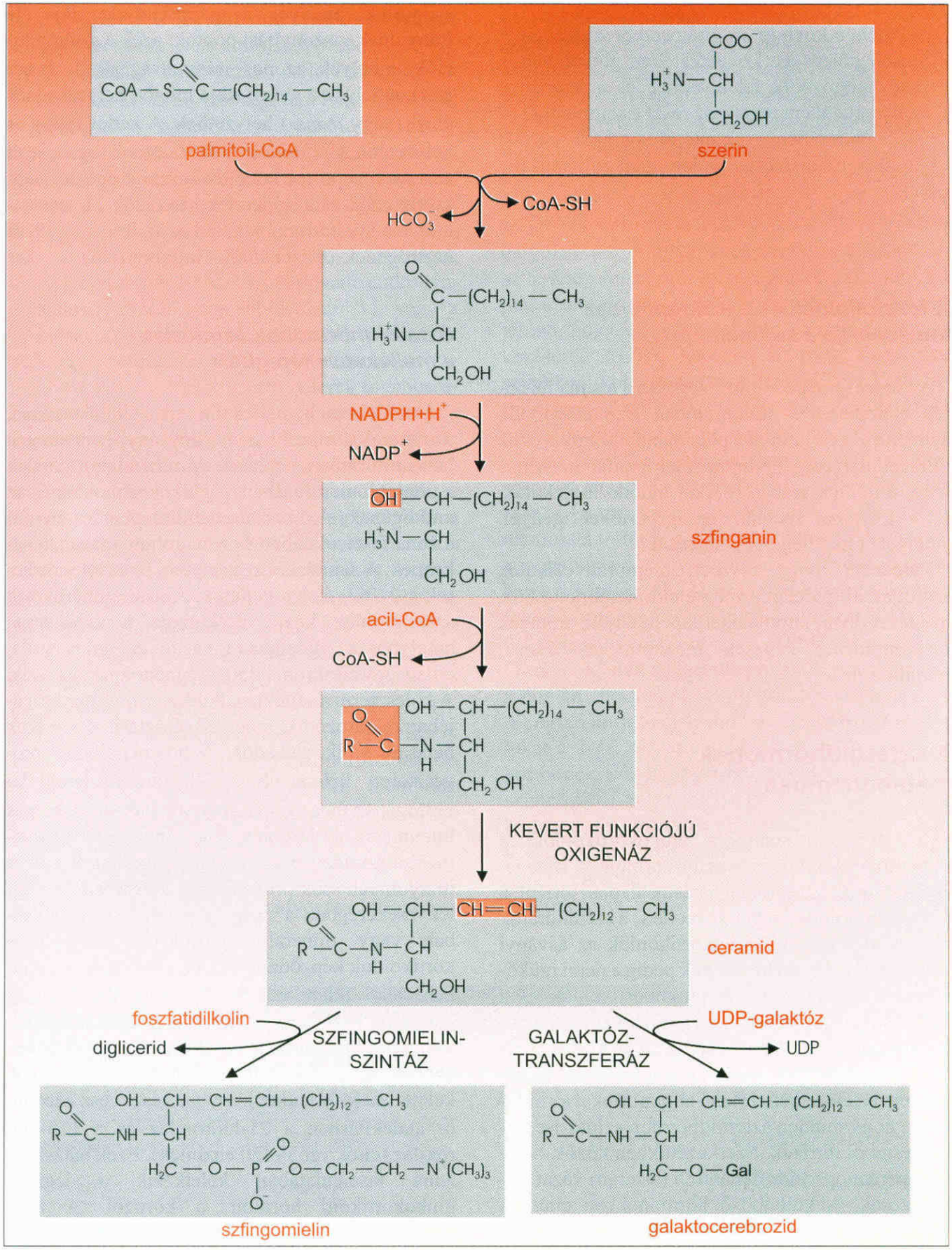
2-160. ábra. Az A, B és 0 vércsoportokat meghatározó szénhidrátláncok a glikoszfingolipidekben

CDP-kolinból, hanem foszfatidilkolinból származik és a reakciót a szfingomielin-szintáz katalizálja. A cerebrozidok és a gangliozidok szintéziséhez a szénhidrátok először UTP-vel aktiválódnak, s a közvetlen szénhidrátdonor az UDP-galaktóz, UDP-glukóz vagy más aktivált szénhidrát. A glukozil-, illetve galaktozil-transzferáz enzimek az endoplazmás retikulumban lokalizálódnak.

Normális körülmények között a szfingolipidek szintézise és lebomlása egyensúlyban van. A lebontó enzimek hidrolázok, amelyek a lizoszómákban találhatók és lépésről lépésre, egyenként hidrolizálják a szfingolipidek alkotórészeit. A szfingolipidek szerkezetének megfelelően az enzimek között α- és β-galaktozidáz, β-glukozidáz, neuraminidáz, hexózaminidáz, szfingomielinre specifikus foszfodiészteráz, valamint ceramidra specifikus amidáz található. Normálisan ezek az enzimek a szfingolipideket építő elemeire bontják. Ha azonban a hidrolázok valamelyike genetikai okból hiányzik vagy elégtelenül működik, az enzim szubsztrátja felhalmozódik és általában súlyos klinikai állapot jön létre.

A **Niemann–Pick-betegségben** szfingomielin akkumulálódik az agyban, a lépben és a májban, mert hiányzik a szfingomielinre specifikus foszfodiészteráz, a szfingomielinidáz. Az enzim egyik formája a lizoszomákban található, pH-optimuma a savas pH-tartományban van. Az agy szürkeállománya nagy mennyiségben tartalmaz nem lizoszómális enzimet (pH-optimum 7,4), különösen a bazális ganglionokban, amelynek aktivitása az agy fejlődésével párhuzamosan nő. A betegség változatos klinikai megjelenésű és ismert olyan formája is, amelyben ismeretlen primer defektus következtében jön létre a szfingomielinfelszaporodás. Az enzimdefektus, amely szerencsére ritka, súlyos mentális retardációhoz és korai életkorban bekövetkező halálhoz vezet.

Gyakoribb a **Tay–Sachs-kór**, amelyben a hexózaminidáz A hiányzik, vagyis az az enzim, amely a gangliozidokban az N-acetil-D-galaktózamin és a D-galaktóz közötti kötést bontja. Az idegrendszerben felhalmozódnak a részlegesen lebontott gangliozidok, súlyos mentális retardáció, vakság alakul ki, s a gyermekek 3–4 éves kor előtt elhaláloznak. A betegség viszonylag gyakori a kelet-európai eredetű zsidó populációban.



2-161. ábra. A szfingolipidek szintézise

Gaucher-kórban a glukocerebrozidáz enzim elégtelensége következtében glukocerebrozid halmozódik fel a lépben és a májban, amely egyébként nem vesz részt a sejtmembránok felépítésében, csak intermedierként szerepel más glikoszfingolipidek metabolizmusában.

A foszfolipidek és a szfingolipidek transzportja a sejtmembránba

Az összes poláros lipid a sejtekben a sima felszínű endoplazmás retikulumban szintetizálódik, ahonnan el kell jutniuk a plazmamembránhoz és az intracelluláris organellumok membránjához. Minthogy a lipidek vízben rosszul oldódó molekulák, ez a folyamat speciális transzportokat igényel, amelyeket ma még nem ismerünk.

Valószínű, hogy részben membránvezikulák szállítják a lipideket a megfelelő membránokhoz, másrészt olyan citoplazmatikus fehérjék, amelyek foszfolipideket képesek megkötni és transzportálni.

A szteroidhormonok metabolizmusa

A szteroidhormonok a glukokortikoidok, a mineralkortikoidok és a nemi hormonok. Elnevezésük domináns biológiai hatásuk alapján történt: a glukokortikoidok (egyebek mellett) a szénhidrátok anyagcseréjét, a mineralokortikoidok az ásványi anyagcserét, a nemi hormonok pedig a nemi működéseket befolyásolják. A glukokortikoidok és a mineralokortikoidok a mellékvesekéregben, a nemi hormonok kisebb részben a mellékvesekéregben, nagyobbrészt pedig a gonádokban keletkeznek. E fejezetben történő tárgyalásukat az indokolja, hogy minden szteroidhormon szintézise koleszterinből történik. Szerkezetükben közös, hogy ciklopentanoperhidrofenantrén (szterán) vázat tartalmaznak. A különböző hormonokban eltérő a szubsztitúciók száma, a kettős kötések száma, pozíciója és konfigurációja. A C18 és C19 metilcsoportok, amelyek a gyűrűrendszer síkja elé irányulnak viszonyítási pontok; azok a szubsztitúciók, amelyek azonos irányultságúak β- (vagy *cisz*), amelyek a gyűrű síkja mögött helyezkednek el α- (vagy *transz*) helyzetűek. A kettős kötést és helyzetét a $\Delta^{szám}$ jelöli. A szénatomok száma segít az egyes csoportok közötti eligazodásban: a glukokortikoidok és a mineralokortikoidok 21 szénatomot, a nemi hormonok közül az androgének 19, az ösztrogének 18 szénatomot tartalmaznak.

Szteroidhormonok szintézise a mellékvesekéregben

A mellékvesekéregben történik a glukokortikoid, a mineralokortikoid és néhány enyhén androgén hatású hormon szintézise. A mineralokortikoidok a zona glomerulosában, a glukokortikoidok és az androgének (elsősorban a dehidroepiandroszteron) a zona fasciculatában és zona reticularisban keletkeznek. A szintézis egyes lépései és az intermedierek a *2-162. ábrán* láthatók. A szteroidhormonok szintézisének közös prekurzora a koleszterin, amelyből az oldalláncot hasító enzim hatására, amely egy citokróm P450, pregnenolon keletkezik. A koleszterin a sejtekben koleszterin-észter formájában raktározódik, innen a koleszterin-észterázok hatására válik szabaddá. A pregnenolonból progeszteron keletkezik a 3β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz és a $\Delta^{5,4}$ izomeráz hatására. A corpus luteumban, ahol szintén jelen vannak ezek az enzimek, a szintézis ezen a ponton részben megáll és túlnyomóan csak progeszteron keletkezik. A mellékvesekéregben a progeszteronból a továbbiakban vagy mineralokortikoidok, vagy glukokortikoidok képződnek. A zona fasciculata sejtjeiben, ahol jelen van a 17α-hidroxiláz (szintén citokróm P-450), a szintézis a glukokortikoidok irányában folytatódik, a zona glomerulosában, ahol ez az enzim hiányzik, mineralokortikoidok keletkeznek. Mindkét irányban részt vesz a további átalakításban a 21-hidroxiláz és a 11β-hidroxiláz (citokróm P-450 enzimek). Ezek hatására a zona fasciculatában keletkezik a legfőbb glukokortikoid hormon, a kortizol. A zona glomerulosában a multifunkcionális 11β-hidroxiláz, amelynek 18-hidroxiláz és oxidáz aktivitása is

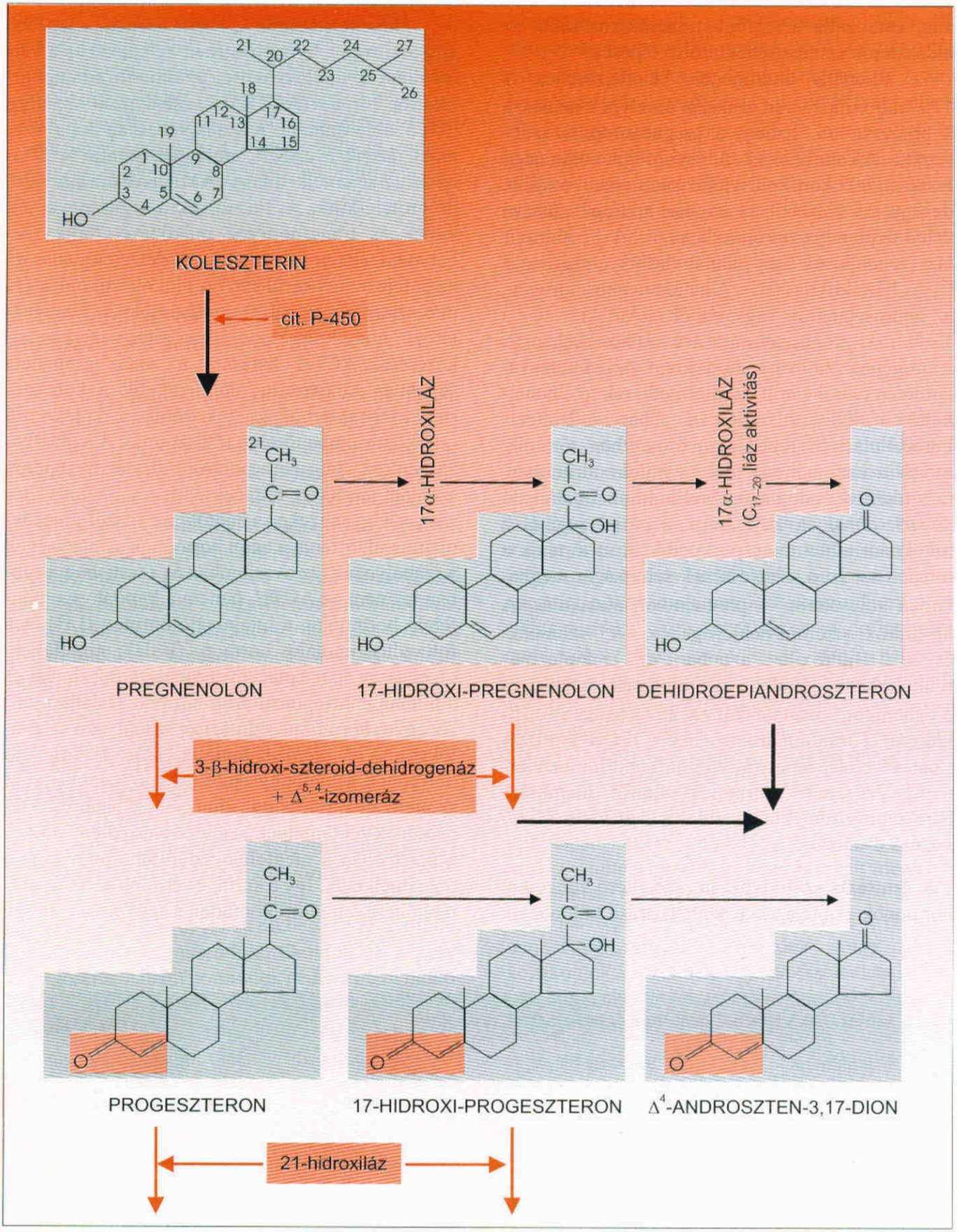
van, katalizálja a legfőbb mineralokortikoid, az aldoszteron szintézisének utolsó lépését.

Az adrenális androgének keletkezéséhez is 17α-hidroxilázra van szükség, amelynek nemcsak a progeszteron, hanem a pregnenolon is szubsztrátja. A keletkező 17-hidroxi-pregnenolon nagy része a glukokortikoidszintézisben alakul tovább, de egy kis részéből az enyhén androgén hatású dehidroepiandroszteron keletkezik. A 17-hidroxiláz rendelkezik az átalakuláshoz szükséges C_{17-20}-liáz aktivitással is. A hatékonyabb androgén, az androsztendion vagy ebből alakul ki, vagy a 17-hidroxi-progeszteronból. A mellékvesében az androgének szintézise akkor kerül előtérbe, ha valamilyen okból gátolt az intermedierek továbbalakulása a glukokortikoidok irányában. A szintézis intracellulárisan több kompartmentben történik, mivel az enzimek egy része a mitokondriumban, más része az endoplazmás retikulumban található *(2-163. ábra)*. A koleszterin a citoplazmából a mitokondriumba transzportálódik és itt történik a minden szteroid szintézisének sebességét meghatározó koleszterin → pregnenolon átalakulás. A 3β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz, a $\Delta^{5,4}$-izomeráz és a 21-hidroxiláz azonban az endoplazmás retikulumban lokalizálódó enzimek, vagyis a pregnenolon továbbalakulása itt történik. A 11β-hidroxiláz mitokondriális enzim, így a kortizol-szintézis utolsó lépése újra a mitokondriumban történik. A szteroidhormonok lipofil, membránpermeábilis molekulák, amelyek diffúzióval távoznak a sejtekből.

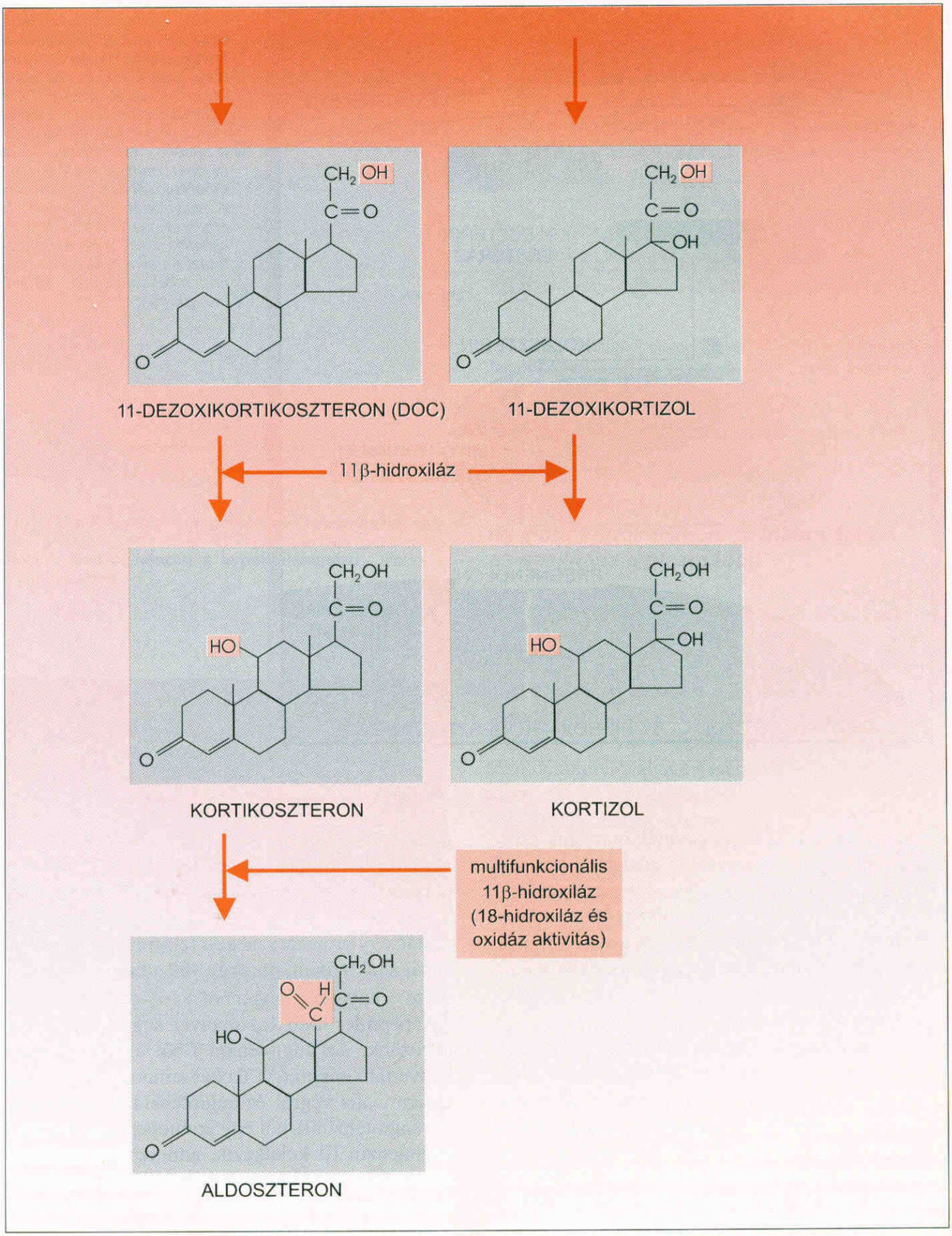
A szintézis szabályozása. Az eltérő funkciójú hormonok szintézisének szabályozása különböző. A glukokortikoidok szintézisének legfőbb szabályozója a hypophysisben keletkező és a vérárammal a mellékveséhez szállítódó adrenokortikotrop hormon (ACTH). A szabályozás vázlatát a 2-163. ábra mutatja. A szabályozásban döntő szerepet játszik a cAMP, amelynek szintje ACTH-hatásra megemelkedik. A cAMP hatására aktiválódó protein-kináz A, foszforiláció segítségével enzimek és transzporterek működését tudja szabályozni. (Ezen folyamatok részletes tárgyalására az 5. fejezetben kerül sor.) A glukokortikoidok (és más szteroidhormonok) szintézisében az a meghatározó, hogy koleszterin álljon a szintézis rendelkezésére. ACTH hatására a zona fasciculata sejtekben koleszterin mobilizálódik a koleszterin-észter-raktárból és fokozódik a koleszterin mitokondriumba történő transzportja. A szabályozásban, ez idáig nem pontosan tisztázott módon, szerepet játszik az intracelluláris Ca^{2+}-szint változása is. Ugyanezeken a pontokon és ezzel a mechanizmussal történik a nemi hormonok szintézisének a szabályozása az ovariumban és a testisben, azonban ezt nem az ACTH, hanem a hypophysis megfelelő hormonjai, a luteinizáló hormon (LH) és a folliculusstimuláló hormon (FSH) stimulálják. (Terhesség alatt a placenta progeszteronszintézisét a humán choriogonadotrop hormon szabályozza.) Az egyes hormonok szintézisét szabályozó szignálokat a *2-11. táblázat* foglalja össze. A stimuláló hormonok a hypophysisből a hypothalamus által szintetizált („releasing") hormonok hatására szabadulnak fel, amelyek szintézise csökken, amikor a plazmában a megfelelő szteroidhormon szintje megemelkedik. Így a keringés és több szerv közreműködésével, indirekt módon a szteroidhormonok

2-11. táblázat. A szteroidhormonok szintézisének stimulálói

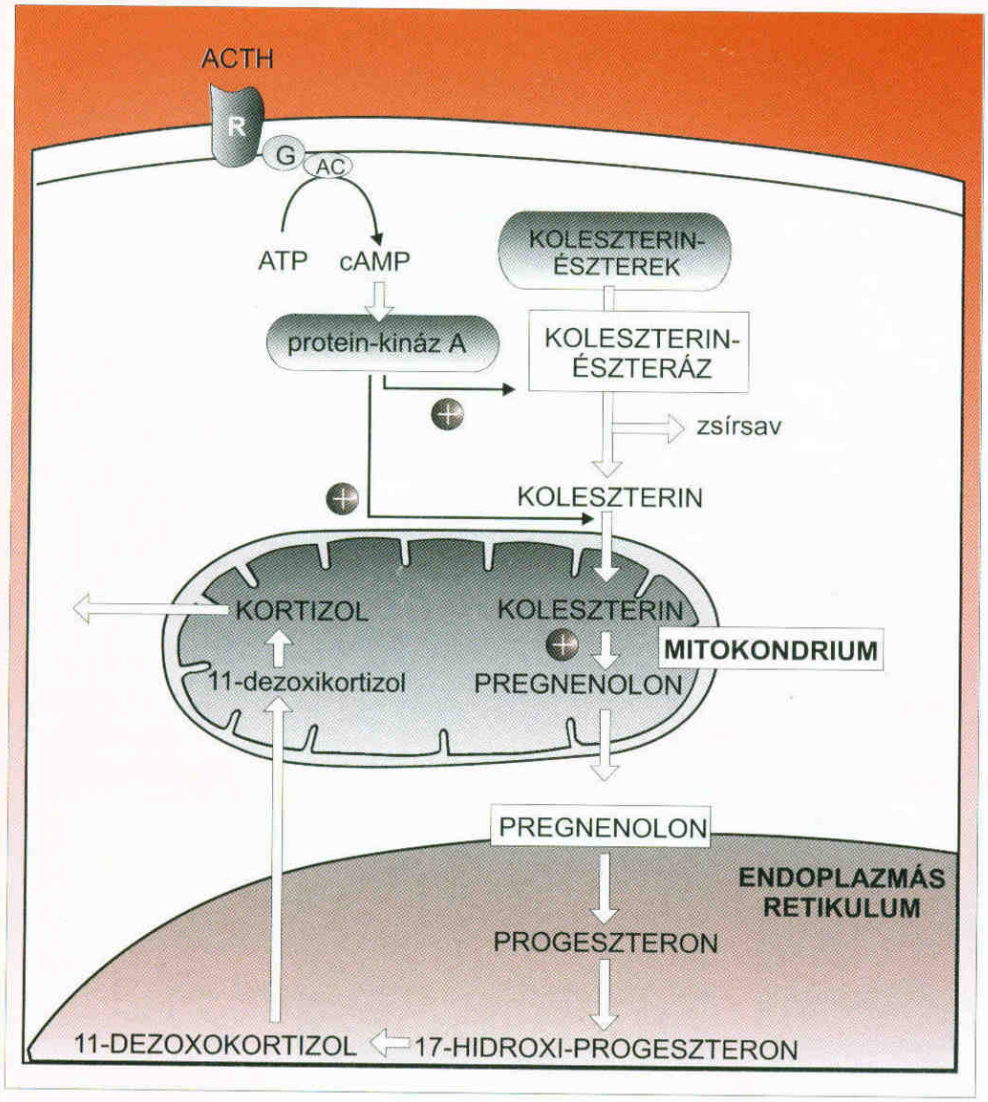
Szteroidhormon	Szintézis helye	Stimuláló	Stimulus eredete
kortizol	zona fasciculata	ACTH	hypothalamus–hypophysis
progeszteron	corpus luteum	LH	hypothalamus–hypophysis
tesztoszteron	Leydig-sejt	LH	hypothalamus–hypophysis
17β-ösztradiol	ovariumtüsző	FSH	hypothalamus–hypophysis
aldoszteron	zona glomerulosa	angiotenzin II	renin–angiotenzin rendszer



2-162. ábra. A szteroidhormonok szintézise a mellékvesekéregben. *A piros nyilak a mineralokortikoidok és a glukokortikoidok szintézisútját jelzik*



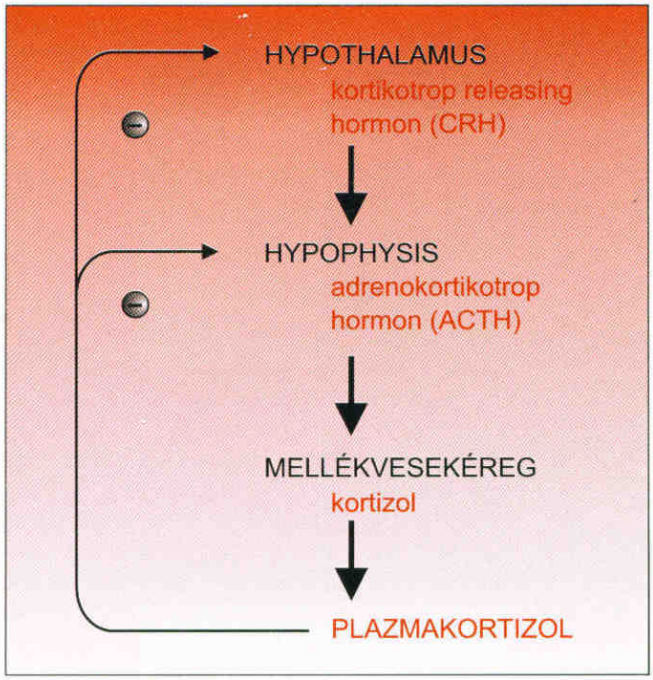
2-162. ábra folytatása (A szteroidhormonok szintézise a mellékvesekéregben)



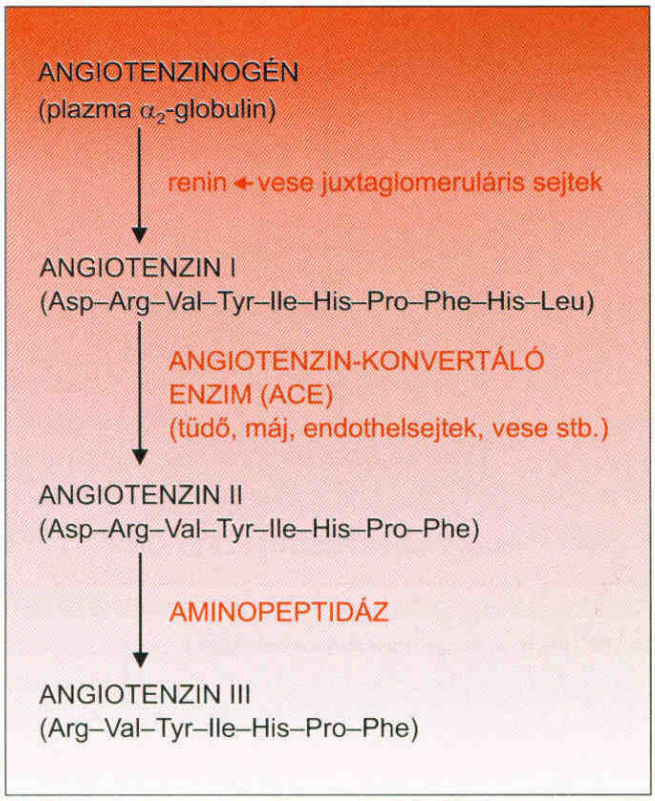
2-163. ábra. Intracelluláris kompartmentek részvétele a kortizolszintézisben. A szintézis szabályozása. *Az adrenokortikotrop hormon (ACTH) a plazmamembránban receptoraihoz (R) kötődik, ami az 5. fejezetben részletesen leírt mechanizmussal a cAMP-szint emelkedését és a protein-kináz A aktiválását eredményezi. A protein-kináz A foszforilálja és aktiválja a koleszterin-észterázt és stimulálja a koleszterin mitokondriumba történő transzportját*

negatív feedback hatással gátolják önmaguk szintézisét. Ennek a rendszernek a vázlatát a kortizol esetében mutatja a *2-164. ábra*. A rendszer erősen leegyszerűsített, mert a kortizolszintézisre a központi idegrendszer is befolyást gyakorol: a fizikai és a pszichés állapot, a stress, a hőmérséklet-változás, fertőzések és számos más tényező is, amelyekkel itt nem foglalkozunk.

A mineralkortikoidok legfontosabb hatása az, hogy a vese disztális tubulusaiban a Na^+-transzportot fokozzák, vagyis Na^+-retenciót okoznak. Szintézisüknek legfőbb stimulálója az angiotenzin II, amely egy oktapeptid és hatását a zona glomerulosa sejtek membránjában lévő receptorán keresztül fejti ki. (A receptoraktiválás nem befolyásolja a cAMP-szintet, hanem az intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedését váltja ki, lásd 5. fejezet.) Angiotenzin II akkor keletkezik, amikor szükségessé válik a plazma Na^+-koncentrációjának, illetve a vérnyomásnak az emelése *(2-165. ábra)*. A plazma Na^+-koncentrációjának csökkenése vagy hypovolaemia a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből renint, egy proteázt szabadít fel, ami a keringésben a máj által termelt, mintegy 400 aminosavat tartalmazó angiotenzinogénből (α_2-globulin) egy dekapeptidet hasít le, amelyet angiotenzin I-nek nevezünk. Az angiotenzin I-ből az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) két aminosavat lehasít a C-terminalis végről és angiotenzin II keletkezik. Az angiotenzin II-ből egy aminopeptidáz hatására angiotenzin III keletkezik, ami szintén hatékony stimulálója az aldoszteronszintézisnek, azonban a keringésben az angiotenzin II-nél sokkal kisebb mennyiségben van jelen.



2-164. ábra. A kortizol – megemelkedett plazmaszint esetén – gátolja a CRH és az ACTH szintézisét (géntranszkripciót; lásd 3. fejezet) a hypothalamusban, illetve a hypophysisben



2-165. ábra. A renin–angiotenzin rendszer

Az angiotenzin II az aldoszteronszintézis stimulálása mellett nagyon hatékony vazokonstriktor is, ezért keletkezésének gátlása (ACE-gátlókkal) bizonyos típusú hypertensiókban vérnyomáscsökkentő hatású. (Az ACE-gátlók hatásához hozzájárul a vazodilatátor hatású bradikinin elbontásának gátlása is, tekintettel arra, hogy az ACE nem specifikus lévén, a bradikinint is elbontja.)

Az angiotenzinnel ellentétes hatású a pitvari nátriumürítő faktor (ANF), amely a pitvarban keletkezik és receptora található a zona glomerulosa sejtek membránjában. A receptor guanilát-cikláz-aktivitással rendelkezik (lásd 482. oldal) és hatására csökken az aldoszteron szintézise és szekréciója.

A glukokortikoidok és a mineralokortikoidok inaktiválása és szállítása a plazmában

A szteroidhormonok inaktiválása, amelynek során a molekula a 3-ketocsoporton és az A-gyűrűben redukálódik, elsősorban a májban történik és NADPH-val működő reduktázok katalizálják. A redukált (dihidro- és tetrahidro-) metabolitok glukuronsavval vagy szulfáttal konjugálódnak, s vízoldékonnyá válva a vesében kerülnek kiválasztásra.

A vérplazmában a szteroidok fehérjéhez kötve szállítódnak. A mineralokortikoidok albuminhoz, a glukokortikoidok specifikus fehérjéhez, a transzkortinhoz (más néven kortikoszteroidkötő fehérje, CBG) kötődnek. A transzkortin köti még a dezoxikortikoszteront és a progeszteront is. A keringésben lévő kortizol kb. 8%-a szabadon található, s ez képezi a biológiailag aktív kortizolfrakciót.

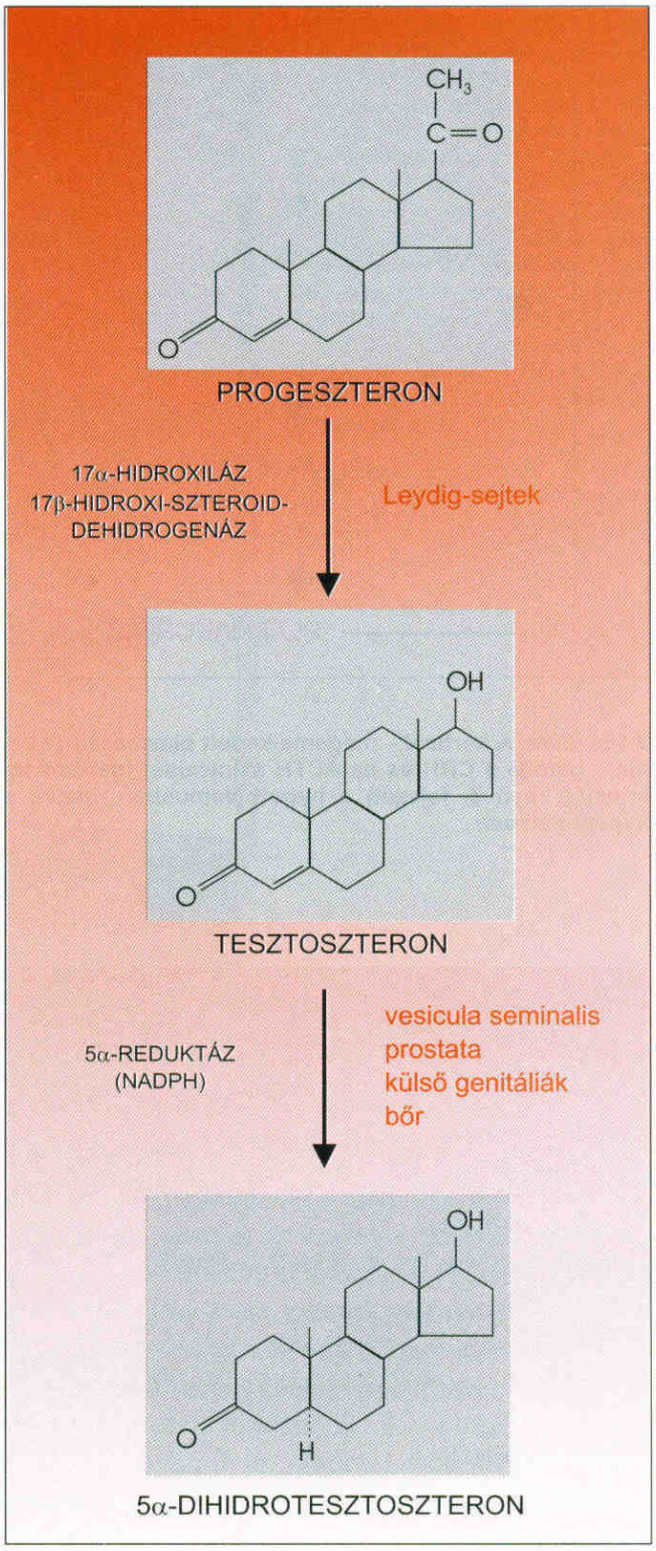
A szteroidhormonok biológiai hatásukat specifikus receptoraikon keresztül fejtik ki. Receptoraikról, amelyek intracelluláris lokalizációjúak az 5. fejezetben külön szólunk.

A mellékvesekéreg-hormonok szintézise számos okból zavart szenvedhet, s akár túlprodukció, akár csökkent szintézis bekövet-

kezhet. A kóros állapotok közül csak egy enzimdefektusról, a **21-hidroxiláz-elégtelenségről** teszünk említést. Azokat az állapotokat, amelyekben genetikai enzimdefektus következtében elégtelen a kortizolszintézis congenitalis adrenalis hyperplasiáknak nevezzük, mert a csökkent kortizolszint a negatív feedback gátlás csökkenése következtében ACTH-túlprodukcióhoz és mellékvese-hyperplasiához vezet. Az esetek 90%-ában az ok a 21-hidroxiláz elégtelen működése, ami lehet részleges vagy teljes. A 21-hidroxiláz elégtelen működése következtében csökken a kortizol és a mineralokortikoidok szintézise. A fokozott ACTH-stimulus viszont serkenti a koleszterin → pregnenolon lépésben azon intermedierek keletkezését (lásd 2-162. ábra), amelyek nem lévén más lehetőség, az androgének irányában alakulnak tovább. Az androgén-túlprodukció a külső genitáliák férfi nemi jellegű differenciálódását okozza és – nemtől függően különböző mértékben, de általában – már újszülöttkorban felismerhető jeleket okoz a genitáliákon. Később korai nemi éréshez és nőkben férfias másodlagos nemi jelleg kialakuláshoz vezethet. Ez az adrenogenitalis szindrómában nyilvánul meg, mint pl. virilismus, hirsutismus, jellegzetes kopaszodás, kis emlők stb. Az aldoszteron hiánya vagy erősen csökkent szintje súlyos sóveszteséggel jár.

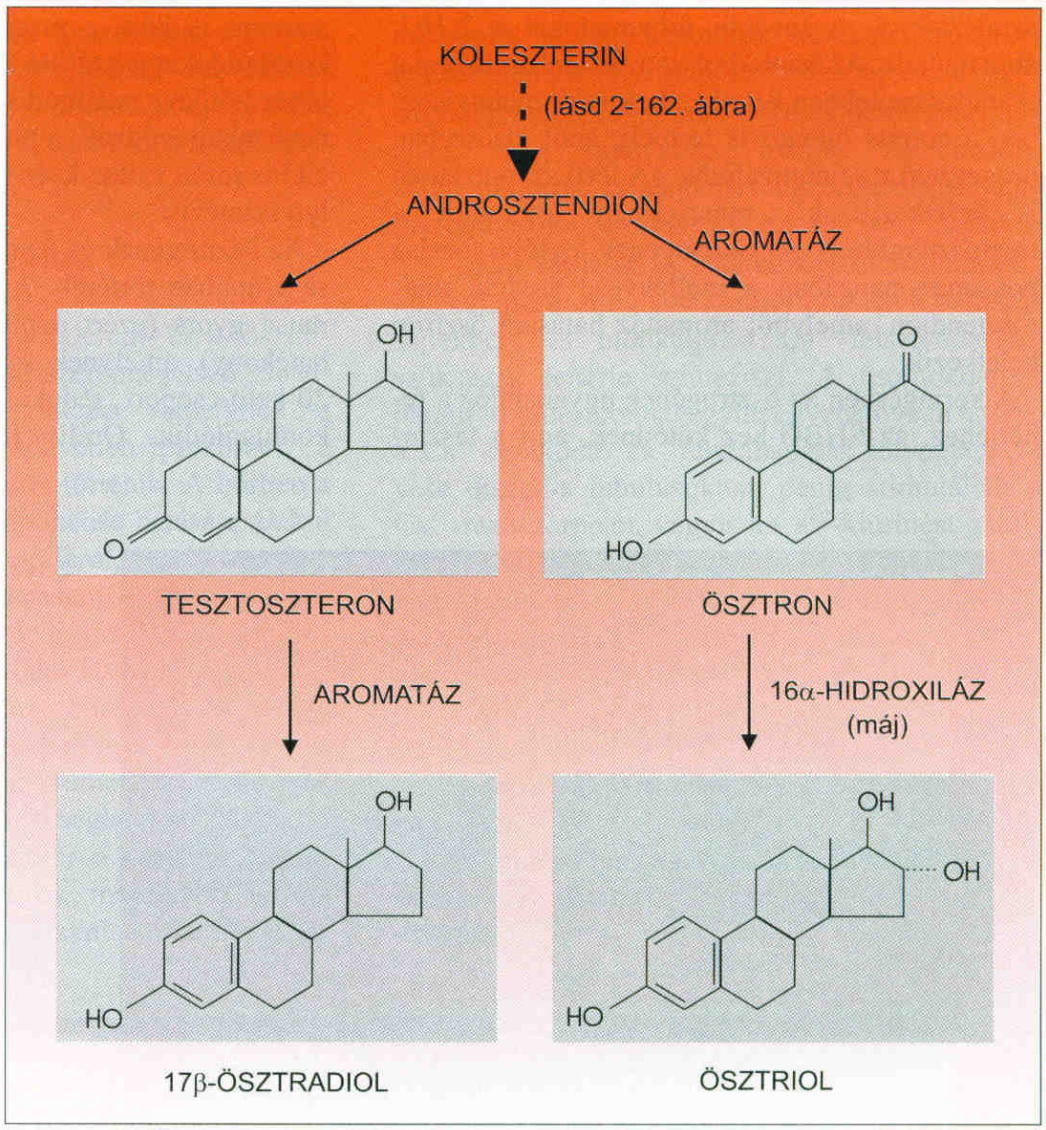
A nemi hormonok szintézise

A tesztoszteron a here Leydig-sejtjeiben koleszterinből szintetizálódik, s a koleszterin → pregnenolon → progeszteron átalakulás analóg azzal, ami a 2-162. ábrán látható. A további átalakulást *(2-166. ábra)* a 17α-hidroxiláz és a 17β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz végzi és kialakul a tesztoszteron. Tesztoszteron keletkezhet a pregnenolonból dehidroepiandroszteronon keresztül is, amelyből először androszténdion (lásd 2-162. ábra), majd a 17β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz hatására tesztoszteron keletkezik. A tesztoszteronból a herében csak kis mennyiségű, a célsejtekben (vesicula seminalis, prostata, külső genitáliák) nagyobb mennyiségű 5α-dihidrotesztoszteron keletkezik, ami a tesztoszteron aktív metabolitja. Ebben az átalakulásban az A-gyűrűben levő kettős kötés redukálódik (2-166. ábra). A herében és



2-166. ábra. A tesztoszteron keletkezése

2-167. ábra. Az ösztrogének szintézise



egyes célsejtekben a tesztoszteronból 17β-ösztradiol is keletkezik, amelynek során az A-gyűrű aromássá válik *(2-167. ábra)*.

A tesztoszteronszintézist a hypophysis által termelt luteinizáló hormon szabályozza, ugyanolyan módon és receptorhatással, ahogyan az ACTH a glukokortikoidok szintézisét.

A tesztoszteront a keringésben jórészt a tesztoszteron-ösztrogén-kötő globulin (TEBG), más néven a szexuálhormonokat kötő globulin (SHBG) szállítja, kisebb mennyiségben albuminhoz kötődik. A keringésben lévő teljes mennyiség 97–99%-a fehérjékhez kötve található, s csak néhány százalék van szabadon, ami a biológiailag aktív frakció.

A tesztoszteronmetabolizmusban, amely elsősorban a májban zajlik, a 17. szénatomon oxidáció történik, az A-gyűrű és a 3-keto-csoport redukálódik. A kialakuló 17-ketoszteroidok androgén hatással nem rendelkeznek.

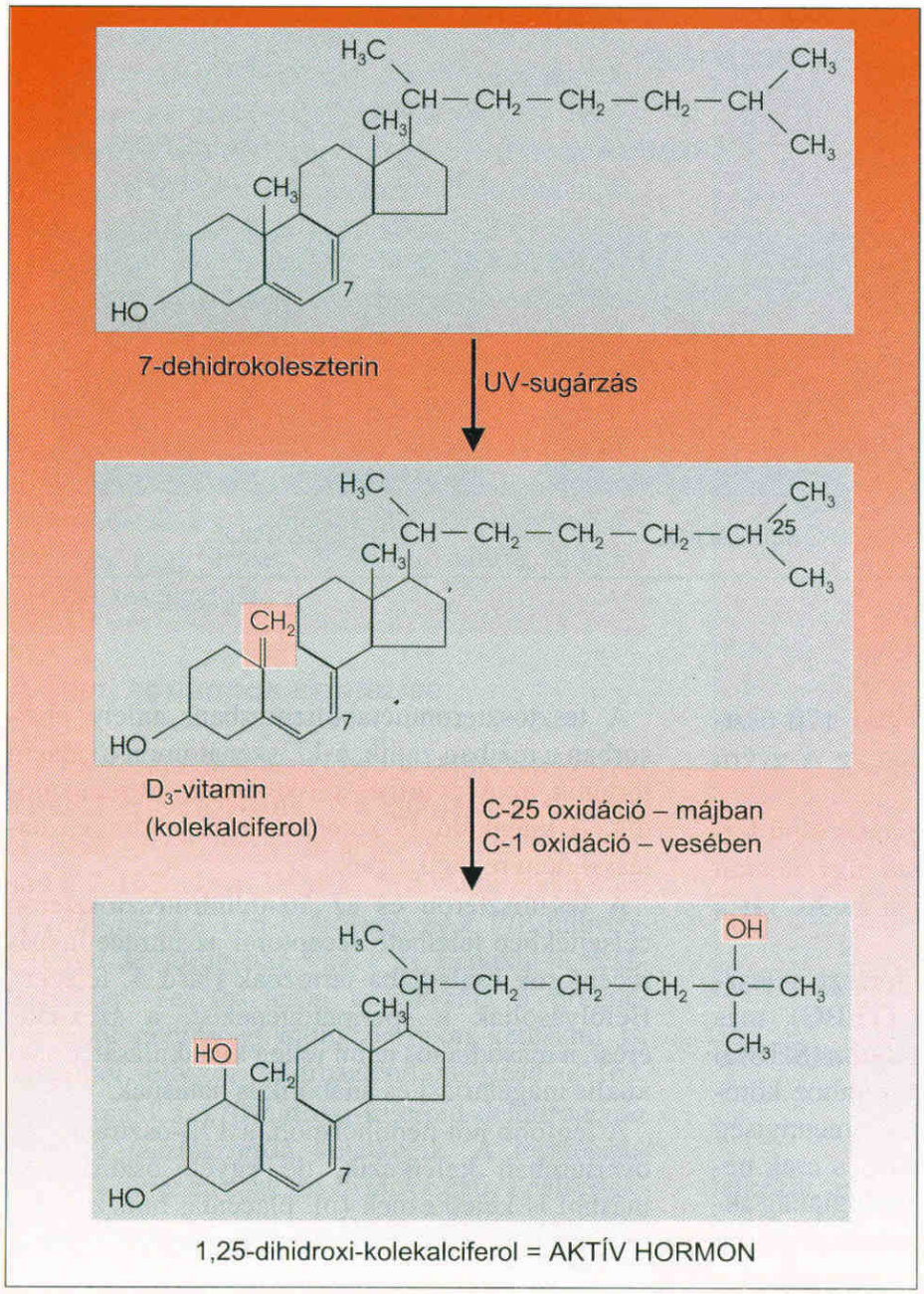
A tesztoszteron és az 5α-dihidrotesztoszteron célsejtekben található receptorai az intracelluláris receptorok családjába tartoznak (lásd 5. fejezet). Befolyásolják a spermatogenezist, a szexuális érést, a másodlagos nemi jelleg kialakulását, a szexuális magatartást és anabolikus hatásúak.

A legfőbb női nemihormon, a 17β-ösztradiol az ovariumban keletkezik, de egyéb ösztrogének máshol is keletkeznek (pl. placenta, bőr, zsírszövet, máj). A szintézis kezdeti lépései koleszterinből azonosak a mellékvesekéreg szteroidjainak

szintézisével. A további folyamatokat a 2-167. ábra mutatja. Az ösztradiol az ovariumban főként a granulosasejtekben keletkezik, kisebb mennyiségben a corpus luteum is termeli, ahol elsősorban progeszteron szintetizálódik. (A férfi szervezetben is keletkezik kis mennyiségű ösztradiol a tesztoszteronból). Az ösztrogének legfőbb forrása posztmenopauzában a mellékvese eredetű androszténdion, amelyből aromatáz hatására ösztron keletkezik.

A keringésben az ösztrogének ugyanahhoz a fehérjéhez, az SHBG-hez kötődnek, ami a tesztoszteront is köti, a progeszteron pedig a glukokortikoidokat is szállító kortikoszteroidkötő fehérjéhez kötődve szállítódik. Az ovariális szteroidok nem raktározódnak, a plazmaszint a menstruációs ciklus során változik, és tükrözi az ovariumban folyó szintézist.

Az ösztrogének és a progeszteron metabolizmusa a májban történik. A progeszteron metabolizmusa gyors (ezért a progeszteron orálisan nem hatékony), amelynek során az A-gyűrű, a 3- és 20-keto-csoport redukálódik és glukuronsavval konjugálódik. Orális fogamzásgátláshoz olyan



2-168. ábra. A D_3-vitamin és aktív metabolitjának keletkezése

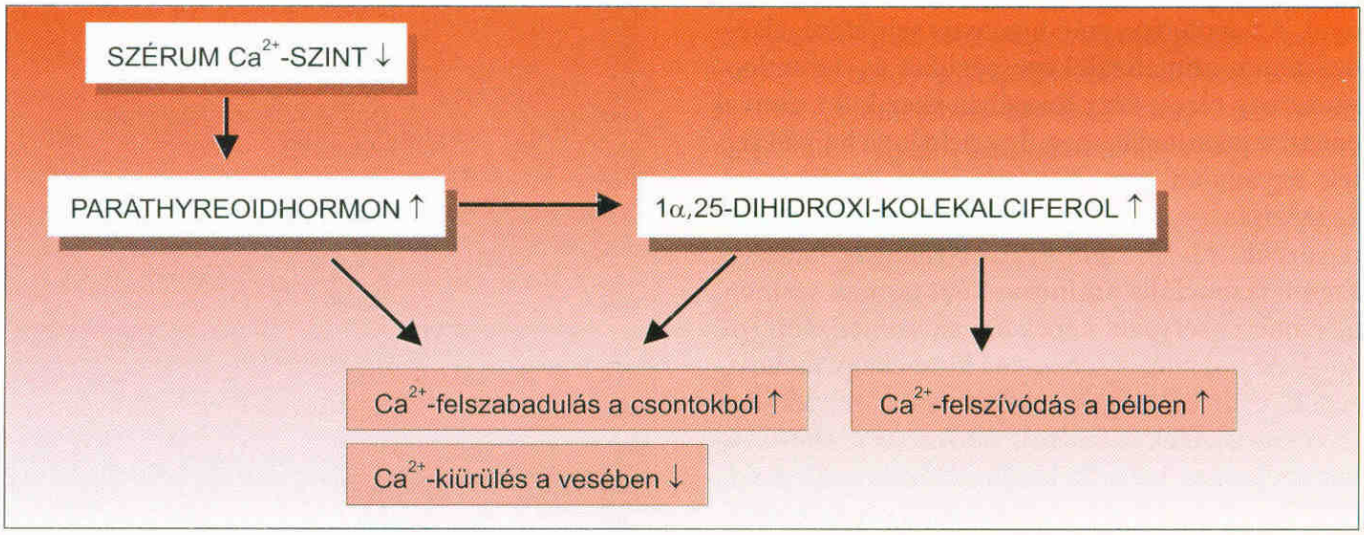
progeszteronszármazékokat használnak, amelyek a májban kevéssé metabolizálódnak. Az ösztrogének glukuronsavval és szulfáttal konjugálódva választódnak ki a vizeletbe, epébe és a székletbe.

A D_3-vitamin szintézise

Koleszterinből történik a kalcium- és a foszfát-metabolizmusban alapvető szerepet játszó D_3-vitamin szintézise. A szintézis, amelyhez a 7-dehidrokoleszterin a közvetlen prekurzor, a *2-168. ábrán* látható módon történik. A bőrben a napsugár ultraibolya-komponense hatására alakul ki a D_3-vitamin, a kolekalciferol, amely azonban még nem a biológiailag aktív anyag. A D_3-vitamin keletkezéshez elégséges, de egyszersmind szükséges is, hogy naponta legalább 10–15 percig a bőrt kis felületen (arc, kéz) napsugárzás érje. D_3-vitamin számos táplálékban megtalálható (tengeri halak, máj, tojássárga), amelyek alkalmasak arra, hogy a D_3-vitamin-szükségletet pótolják.

A kolekalciferolból először a májban 25-hidroxi-kolekalciferol keletkezik, majd ebből a vese proximális tubulusaiban alakul ki a hatékony metabolit, az 1α,25-dihidroxi-kolekalciferol. Keletkezését a parathyroidhormon szabályozza, mely stimulálja a 1α,25-dihidroxi-kolekalciferol szintézisét, míg hiányában inkább az inaktív 24,25-dihidroxi-kolekalciferol keletkezik. A parathyroidhormon-elválasztást az alacsony szérum-Ca^{2+}-szint váltja ki. A keletkező 1α,25-dihidroxi-kolekalciferol mint szteroidhormon hat a bélhámsejtekben, és indukálja a Ca^{2+}-felszívódáshoz szükséges fehérje szintézisét. A csontokban a parathyroidhormonnal együtt egyensúlyban tartják a Ca^{2+}-lerakódás és -felszabadulás folyamatát, a vese disztális tubulusokban pedig stimulálják a Ca^{2+}-reabszorpciót, vagyis a Ca^{2+}-kiürülést gátolják. Az alacsony Ca^{2+}-szint esetén végbemenő folyamatokat a *2-169. ábra* mutatja. Amikor megnő a szérumban a Ca^{2+}-koncentráció, csökken a parathyroidhormon-elválasztás, a 25-hidroxi-kolekalciferolból az inaktív 24,25-dihidroxi-kolekalciferol keletkezik és a Ca^{2+}-forgalom a szervezetben ellentétesen változik azzal, ami a 2-169. ábrán látható.

A D-vitamin-hiány súlyos formájában alakul ki a csontelváltozásokkal járó rachitis, illetve osteomalacia.



2-169. ábra. A kalcium-anyagcsere változása alacsony szérum-Ca^{2+}-szint esetén

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Kőnig Tamásnak, Dr. Szabados Györgynek, Dr. Tóth Miklósnak és Dr. Tretter Lászlónak.

Az aminosavak anyagcseréje. Porfirin-anyagcsere

2.4.

Machovich Raymund

Az aminosav-anyagcsere általános ismertetése

Az aminosavak azonkívül, hogy a fehérjék építőelemei, szerepet játszhatnak a szervezet energiagazdálkodásában és kulcsszerepet töltenek be a nitrogéntartalmú molekulák (pl. nukleotidok, porfirinek, hormonok) szintézisében.

Az aminosavak szintéziséhez elsősorban szénhidrátokra és nitrogénre van szükség; szintézisük nagy mennyiségű ATP-t és közel 80 enzimet igényel. Az evolúció során bizonyos sejtféleségek elvesztették szintetizálóképességüket és az aminosavak egy részét kész formában veszik fel, amivel energiát takarítanak meg. Így például a humán sejtek egyáltalán nem képesek egyes aminosavak szintézisére; ezeket **esszenciális aminosavaknak** nevezzük *(2-12. táblázat)*. Néhányat, amelyet **szemiesszenciális aminosavként** tartunk számon, az emberi szervezet képes ugyan szintetizálni (pl. Arg), de a szintézis sebessége kicsi és így mennyiségük nem elégséges (elsősorban a fejlődésben lévő szervezetek számára). Azokat az aminosavakat pedig, amelyeket a humán szervezet elegendő mennyiségben képes szintetizálni, **nem esszenciális aminosavaknak** nevezzük.

A Föld légköre bőségesen tartalmaz molekuláris nitrogént, ez azonban nem hozzáférhető az eukarioták és a legtöbb prokarióta számára, amelyek a nitrogént csak redukált formában tudják felhasználni. A nitrogén redukciója csak nagy nyomáson (a légkörinél 10 000-szer magasabb), magas hőmérsékleten (500 °C felett) és vas kata-

2-12. táblázat. Az emberi szervezetben leggyakrabban megtalálható aminosavak

Nem esszenciális	
Ala	alanin
Asn	aszparagin
Asp	aszpartát, aszparaginsav
Cys	cisztein
Gln	glutamin
Glu	glutamát, glutaminsav
Gly	glicin
Pro	prolin
Ser	szerin
Tyr	tirozin
Gla[+]	gamma-karboxi-glutaminsav
Hyl[+]	hidroxilizin
Hyp[+]	hidroxiprolin
Szemiesszenciális	
Arg	arginin
Esszenciális	
His	hisztidin
Ile	izoleucin
Leu	leucin
Lys	lizin
Met	metionin
Phe	fenilalanin
Thr	treonin
Trp	triptofán
Val	valin

[+] Aminosavak, amelyek fehérjébe történő beépülésük után (poszttranszlációs módosulással) keletkeznek

lizátor jelenlétében következik be. Egyes organizmusok azonban, mint pl. a kékeszöld algák és többféle talajbaktérium is, rendelkeznek olyan enzimrendszerrel (nitrogenáz komplex), amely „helyettesíteni" tudja a magas nyomást és hőmérsékletet. A **nitrogenáz komplex** leglényegesebb komponense a nitrogenáz és reduktáz; ATP energia felhasználásával és 6 e^- transzportja révén N_2-ből NH_4^+-t képez. Az ammónia ezután már több úton is beépülhet organikus vegyületekbe.

Mind prokariótákban, mind eukariótákban központi szerepet játszik a glutamát-glutamin rendszer az ammónia beépítésében, majd mint aminodonor a transzfer reakciókban a különböző aminosavak szintézise során (lásd később).

Az ember aminosavszükségletét elsősorban a táplálkozással biztosítja, bár bizonyos aminosavak szintézisére képes, valamint a saját fehérjéinek lebontásából származó aminosavakat is újra felhasználhatja. Normál körülmények között az utóbbiak 75%-a ismét fehérjék szintézisére fordítódik, míg csupán a fennmaradó 25% kerül lebontásra energiát szolgáltatva vagy válik elérhetővé speciális molekulák szintéziséhez. Jóllehet az emberi szervezetben mindig találhatók szabad aminosavak, azokból nem jönnek létre olyan energiaraktárak, mint a zsírsavakból a trigliceridek vagy a glukózból a glikogén. Egy 70 kg-os embernek napi kb. 40 g fehérjére van szüksége. Elégtelen fehérjebevitel esetén a szervezet saját szöveti fehérjéit nagyobb mértékben kezdi lebontani, mint az a normális fehérjeturnover során történik, s a felszabadult aminosavak nagy mennyiségű energiaforrásként szolgálhatnak. A fehérjékből származó legjelentősebb energiaforrás az izomszövet *(2-13. táblázat)*.

2-13. táblázat Az energiaraktárak megoszlása (kJ)

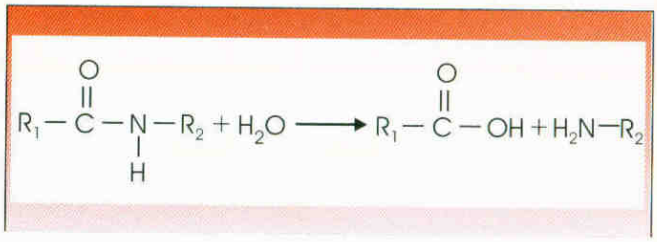
Szervek	Glikogén (glukóz)	Zsír	Fehérje
Vér	250	190	0
máj	1680	1890	1680
agy	30	0	0
izom	5040	1890	100800
zsírszövet	340	567000	170

Fehérjehiányos táplálkozásból származó orvosi problémák a „fejlett" társadalmakat alig érintik, ezzel szemben a harmadik világban súlyos gondokat okoznak; általános energia- és proteinhiány a marasmus nevű kórképet hozza létre, míg a fehérjebevitel elégtelensége önmagában a kwashiorkort eredményezi.

A táplálékból származó aminosavak. A fehérjék emésztése

A táplálékkal elfogyasztott fehérjék a gastrointestinalis traktusban emésztő enzimek hatására kis peptidekre és aminosavakra degradálódnak.

A peptidkötések vizes fázisban spontán hidrolízissel bomlanak:

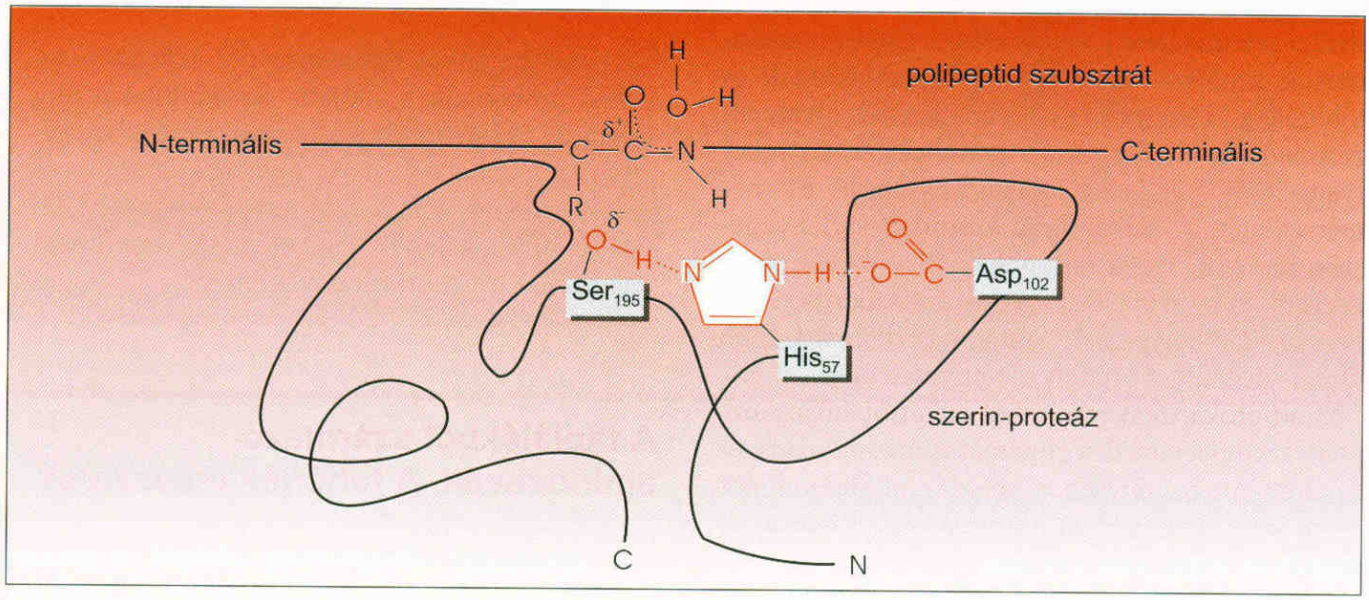


A reakció irreverzibilis (jelentős mértékben exergonikus), de sebessége a fiziológiás pH- és hőmérséklet-tartományokban rendkívül kicsi. Katalizátorok jelenlétében azonban nagy mértékben felgyorsul. Ilyen katalizátorként szolgálnak a proteázok.

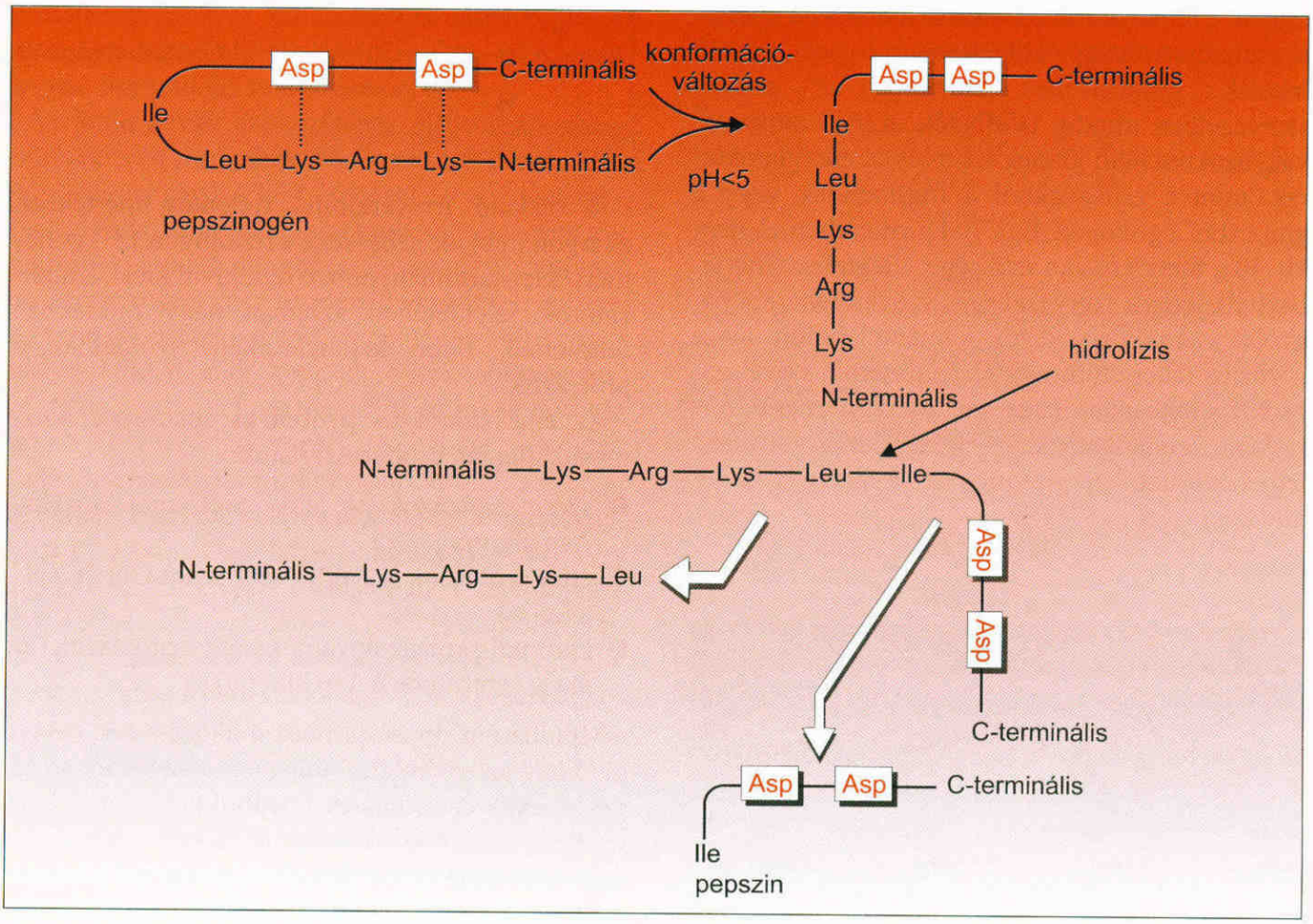
Az emésztőtraktus **proteázai** hatásmechanizmusuk alapján csoportosíthatók:

1. szerin-proteázok (az aktív centrumot Ser-His-Asp alkotja),
2. cink-proteázok (az aktív centrumot Glu és Zn^{2+} alkotja),
3. karboxil-proteázok vagy savanyú proteázok (az aktív centrumot 2 Asp alkotja).

Mindhárom típusú proteáz működésének lényege, hogy az enzim által felismert szubsztrátban az enzim aktív centruma és a peptidkötés szén-, illetve nitrogénatomja között labilis kötés alakul ki, és egy olyan intermedier jön létre, amely víz jelenlétében gyorsan hidrolizál. A működés egyszerű sémáját az *2-170. ábra* mutatja, a szerin-proteázok részletes mechanizmusa a 1-22. ábrán látható.



2-170. ábra. Az emésztő traktus szerin-proteázainak hatásmechanizmusa. A proteáz szubsztrátkötő helye „felismeri" a hidrolízisre kerülő polipeptid „megfelelő" aminosav-oldalláncát, amely az enzimhez kapcsolódik. Ez az illeszkedés biztosítja, hogy a „megfelelő" aminosav peptidkötésben részt vevő C=O csoport C-atomja az enzim *aktív centrumában lévő Ser OH-csoportja közelébe kerül és a proteolízist elindító nukleofil reakció támadáspontjául szolgál. (A katalitikus hely Ser-His-Asp aminosav-oldalláncok funkcionális „egysége" piros színnel van kiemelve)*



2-171. ábra. A pepszinogén aktiválódása. *Az ábrán csak az aktiválás szempontjából fontos peptidrészlet látszik. Az ábra értelmezéséhez lásd a szöveget*

A gyomor széles szubsztrátspecificitással rendelkező proteáza a **pepszin** (karboxil-proteáz), amely aromás aminosavak és dikarbonsavak melletti peptidkötéseket bont, elsősorban denaturált fehérjékben. Az enzim savanyú proteáz (pH-optimuma 1–2 között van). Az optimális pH-t a gyomor sósavszekréciója biztosítja, amely egyben felelős a fehérjék denaturációjáért is. A fehérjék degradálása „nagy" peptideket eredményez.

Annak ellenére, hogy a fehérjék totális gastrectomia (a gyomor műtéti úton történő eltávolítása) után is lebomlanak (a gyomor nem esszenciális szerv a fehérjeemésztés szempontjából), a gyomor funkciózavarai különböző kórképekhez vezethetnek. Így pl. a fokozott sósavtermelés (bár a pepszin működésének előfeltétele) gyomorfekélyt válthat ki, csökkent termelődése viszont gyomorcarcinoma kialakulásának kedvez. Mindkét szélsőséges eset emésztési zavarokban nyilvánul meg, melyekkel a klinikus gyakran találkozik. A gyomorfunkció károsodása, az intrinsic faktor elégtelenség következtében B_{12}-vitamin-hiányt is eredményezhet, amely aminosavanyagcsere-zavarokhoz és a nukleotidszintézis elégtelenségéhez vezethet (lásd 2.5. fejezet).

A gyomorban kezdődött fehérjeemésztés a bélben folytatódik, ahol a legjelentősebb enzimek a **tripszin**, a **kimotripszin** és az **elasztáz** (szerinproteázok), illetve a **karboxipeptidáz A** (cinkproteáz). Ezek pH 7–8 közegben aktív enzimek és az egyes fehérjeféleségekre nem specifikusak. Míg a karboxipeptidáz A a peptidek C-terminális végét ismeri fel, a tripszin Lys és Arg melletti kötéseket hidrolizál, a kimotripszin aromás aminosavak mellett bont, az elasztáz pedig Gly, Ala, Ile és Ser melletti hidrolízist katalizál.

A fehérjeemésztő enzimek aktivitásának szabályozása

A nem megfelelő helyen és időben működő proteázok súlyos károsodásokat hozhatnak létre a különböző szövetekben. A proteázok által okozott destrukció és önemésztődés ellen a szervezet főleg két módon védekezik:

1. a gastrointestinalis proteázok **inaktív prekurzorok** (zimogének, proenzimek) formájában szintetizálódnak, amelyek megfelelő stimulusra aktiválódnak;
2. hatásos **proteáz inhibitor** rendszer működik, amely a nem megfelelő helyen lévő enzimeket inaktiválja.

A zimogének két okból lehetnek enzimatikusan inaktívak:

1. bár az aktív centrumuk kialakult, mégsem működőképesek, mert a fehérje egy másik része „lefedi" (pepszinogén),
2. az aktív centrum azért nem alakulhat ki, mert az azt alkotó aminosavak távol vannak egymástól és csak a részleges proteolízist követő konformációváltozás után jöhet létre térbeli közelségük, illetve kölcsönhatásuk (tripszinogén, kimotripszinogén, proelasztáz, prokarboxipeptidáz A).

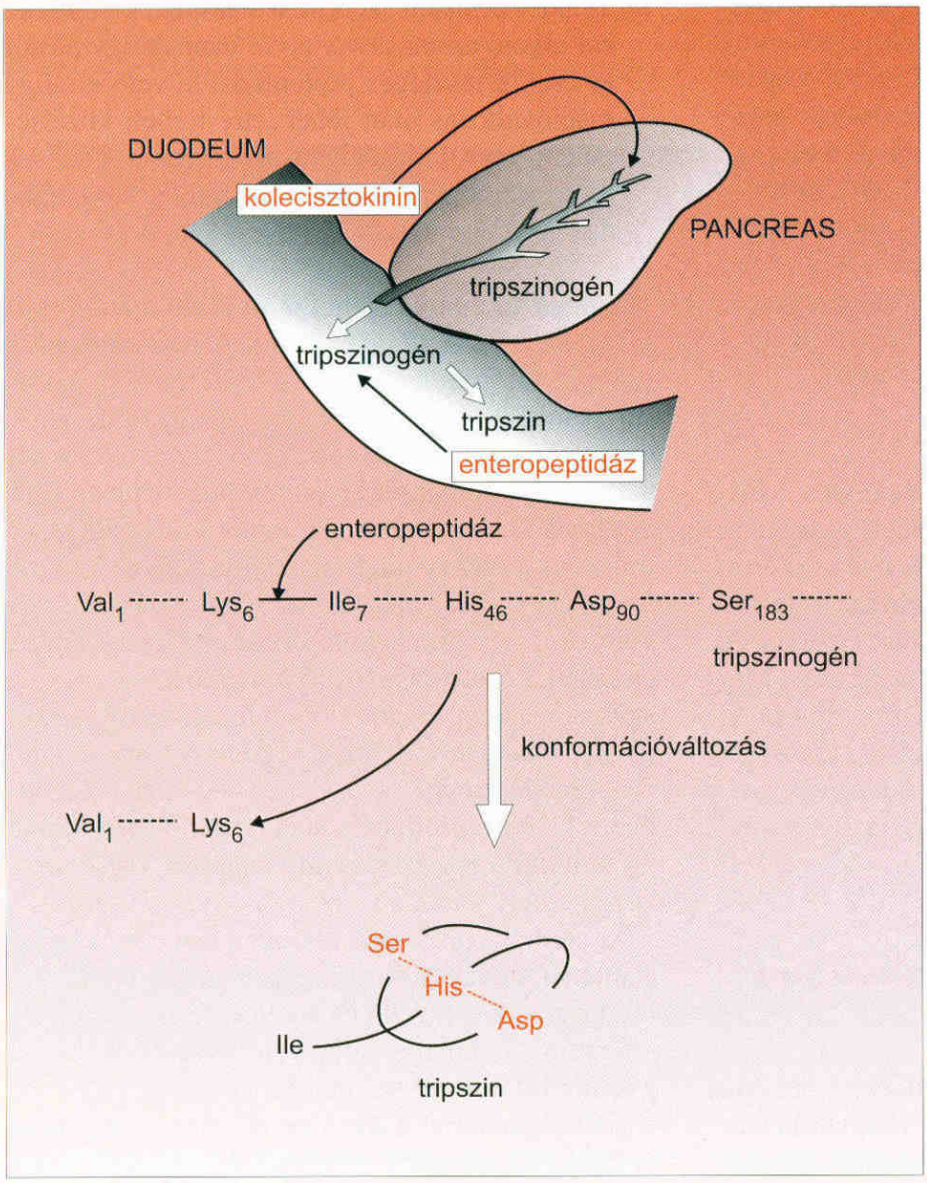
A **pepszin** zimogénjéből, a **pepszinogénből** (40 kDa), keletkezik *(2-171. ábra)*. A pepszinogént a gyomor fősejtjei termelik, és szekrécióját a gasztrin indukálja. A pepszinogénben ugyan az aktív centrum már kialakult, de az aktivitásért felelős két aszpartát, a prekurzor távolabbi poziciójában lévő argininekkel és lizinekkel ionos kötést képezve működésképtelen neutrális pH-tartományban. A savas pH (pH<5) hatására létrejövő konformációváltozás során ezek a kölcsönhatások megszűnnek és az aktív centrum hozzáférhet szubsztrátjaihoz, a savas közegben denaturálódott fehérjékhez. Az aktív pepszinogén még nem kellően hatásos enzim, de önemésztődés (egy Ile és Leu közötti peptidkötés hidrolízise) után a gátló szekvencia proteolitikus eltávolításával kialakul a végső szerkezet, amely jellemző a pepszinre (2-171. ábra).

Az enterális proteázok zimogénjei a pancreasban szintetizálódnak és tárolódnak. Bélbe történő kiválasztásukat a szekretin és a kolecisztokinin (pankreozimin) indukálja, amelyek felszabadulását a gyomortartalom duodenumba érkezése váltja ki. Ezután a duodenumban termelődő **enteropeptidáz** indítja el az aktiválási folyamatok sokaságát, ame-

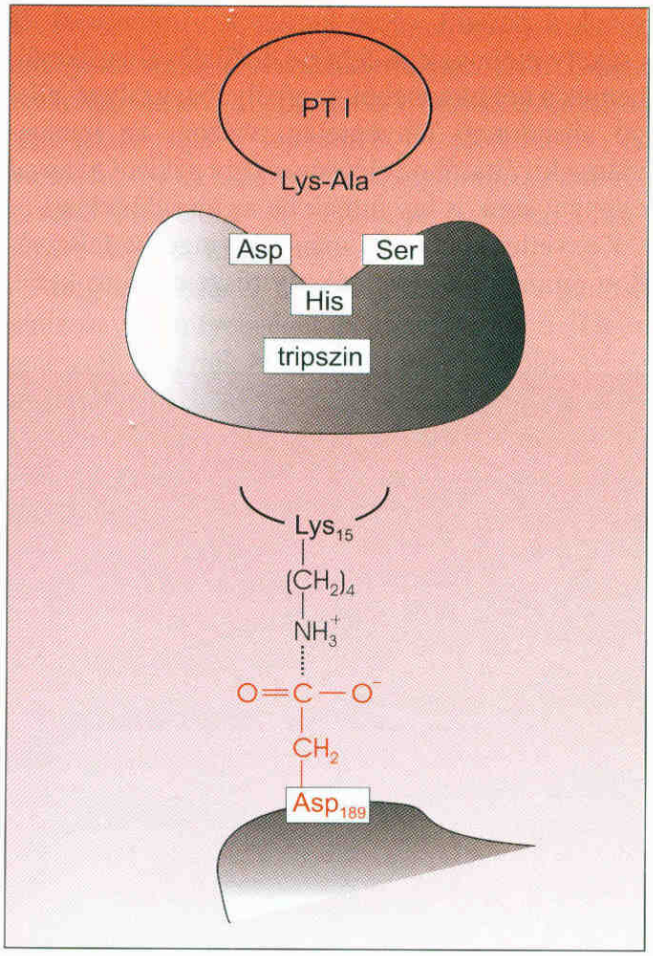
lyek során először egy specifikus peptidkötés hidrolizálásával a **tripszinogént** tripszinné alakítja *(2-172. ábra)*, majd a keletkezett tripszin aktiválja az összes többi proenzimet: a **kimotripszinogént**, a **proelasztázt** és a **prokarboxipeptidáz A**-t.

A pancreas zimogének szintézisének és szekréciójának zavarai vagy elégtelen aktiválásuk a bélben az emésztési zavaroknak megfelelő klinikai tüneteket eredményezhetnek. Más oldalról, pancreasban történő aktiválásuk a pancreas önemésztődéséhez és nagy mennyiségű proteolitikus enzim véráramba jutásához vezethet, amely távolabbi szövetek roncsolódását is kiválthatja. Ez utóbbi folyamat az alapja egy súlyos betegségnek, az akut pancreatitisnek, amely közel 30%-os mortalitással jár.

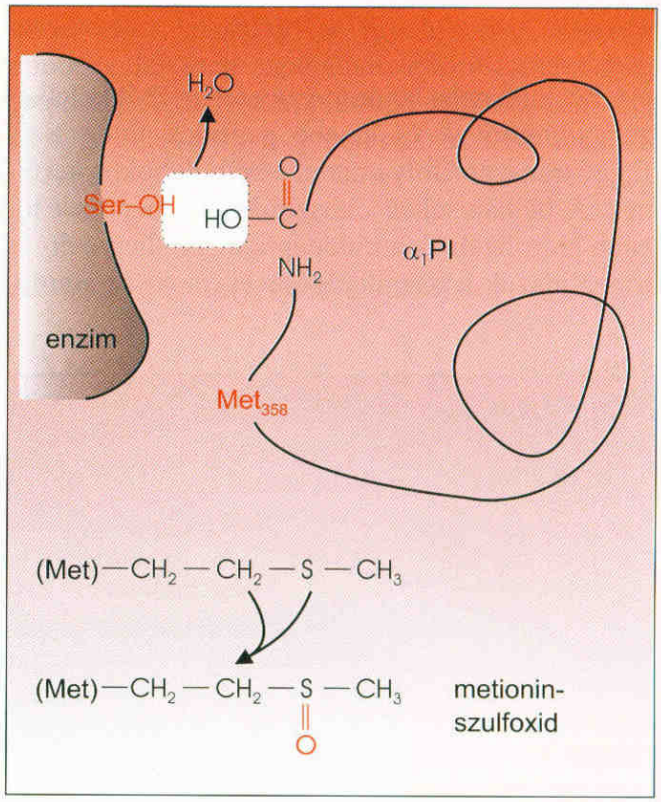
A pancreas-proteázok aktivitásának szabályozásában részt vevő inhibitor rendszer két legjellemzőbb képviselője a **pancreas tripszin inhibitor** és az **α_1-proteáz inhibitor** (α_1-antitripszin néven is ismert), amelyek akkor játszanak szerepet, amikor az enzimek nem az emésztő apparátusban működnek.



2-172. ábra. A tripszinogén aktiválódása. *A tripszinogén szerkezetéből csak az aktiválódás szempontjából fontos részek látszanak. Az aminosavak számozása az aminosavak fehérjeláncon belüli helyét jelenti: az aktív centrum kialakításáért felelős His, Asp és Ser a natív zimogénben egymástól távol helyezkednek el. A proteolízist követő konformációváltozás teszi lehetővé egymáshoz közel kerülésüket, az aktív centrum kialakulását*



2-173. ábra. A pancreas tripszin inhibitor (PTI). *A pancreas tripszin inhibitor egyik lizinje (Lys_{15}) és a proteáz aktív centrumához közel elhelyezkedő aszpartát (Asp_{189}) között ionos kötés jön létre*



2-174. ábra. Az α_1-proteáz inhibitor (α_1-antitripszin; α_1PI). *Az inhibitor kovalens komplexet képez a szerin-proteázokkal (köztük az elasztázokkal is). Az enzim Ser hidroxilcsoportja és az inhibitor egyik proteolízis után szabaddá vált karboxilcsoportja között észterkötés alakul ki. Az inhibitor működéséhez annak egyik metionja (Met_{358}) szükséges. Ez a metionin oxidábilis, amikor is metionin-szulfoxiddá alakul*

A pancreas tripszin inhibitor relatíve kis molekulatömegű fehérje (6000 Da), amely nagy affinitással kötődik a tripszin aktív centrumához ($K_d \sim 10^{-13}$ M) elektrosztatikus kölcsönhatásokon keresztül *(2-173. ábra)*. Az inhibitorban a proteáz hatására egy peptidkötés (Lys_{15}-Ala_{16}) ugyan elhasad, de a hidrolízis sebessége kicsi: a komplex féléletideje több hónap.

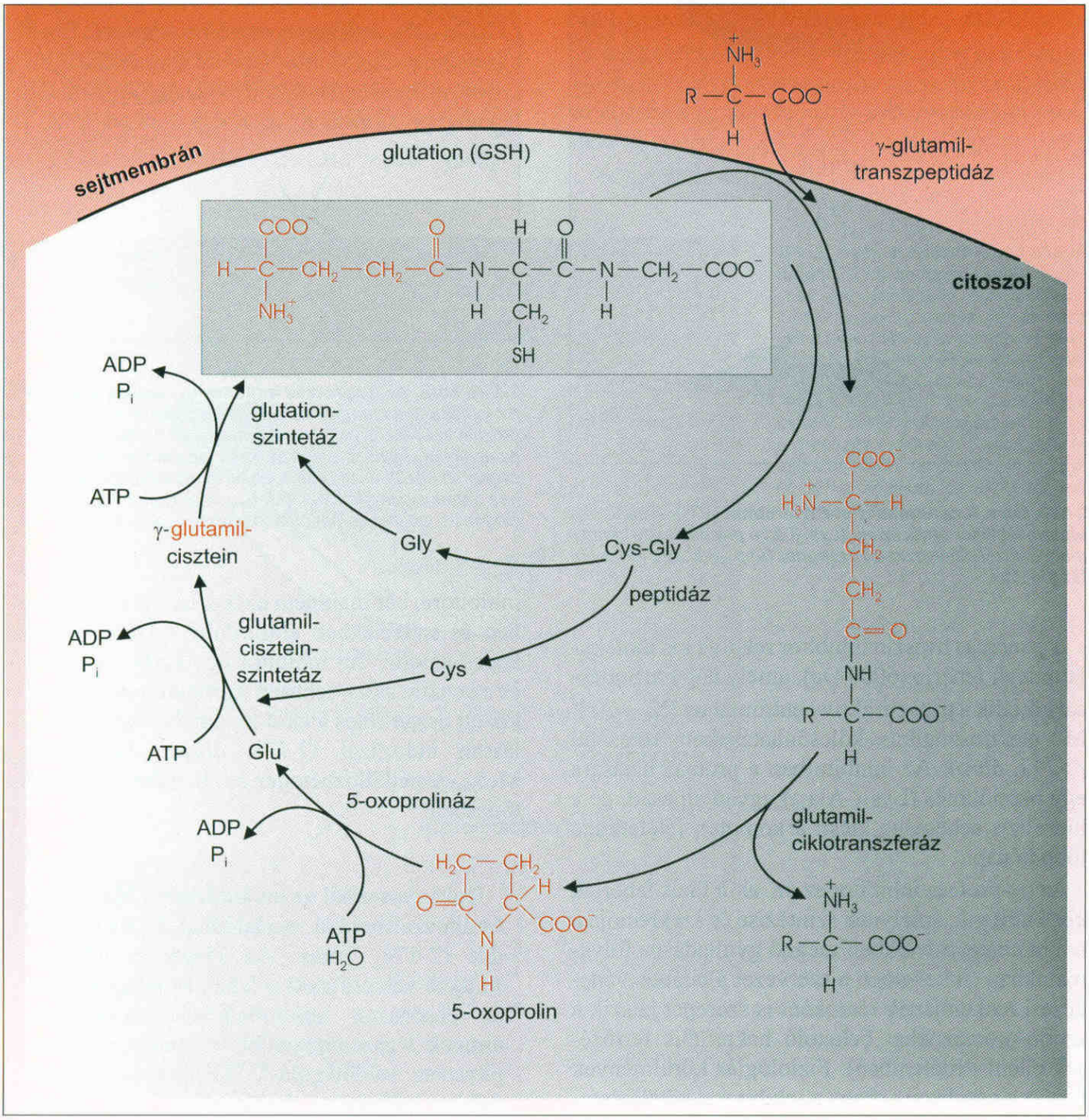
Az α_1-proteáz inhibitor az ún. akut fázis fehérjék közé tartozik, amelynek szintézise és szekréciója a májban nagymértékben megnő gyulladásos folyamatokban (feltehetően a szervezet általános védekezési reakciójának részeként is szerepet játszik a szerin-proteázokkal behatoló bakteriális fertőzések elleni védelemben). Fiziológiás körülmények között a vérplazma proteáz inhibitorai közül ez található a legmagasabb koncentrációban (≥20 μM). Az α_1-proteáz inhibitor az elasztáz legjelentősebb inhibitora, bár majdnem az összes – a vérkeringésben és szövetekben előforduló – szerin-proteázt képes gátolni. Az inhibitor egy karboxilcsoportja és az enzim aktív centrum szerin hidroxilcsoportja között észterkötés alakul ki, amely csak rendkívül lassan hidrolizál *(2-174. ábra)*. Az inhibitor Met_{358}-je nélkülözhetetlen az enzimhez történő kötődésben.

Dohányosoknál az inhibitorban a Met_{358} metionin-szulfoxiddá oxidálódhat és inaktiválódik (2-174. ábra). Az elégtelen inhibitor funkció veleszületett is lehet. Mindkét esetben az elasztázok kontrollálatlanul működnek, aminek legszembetűnőbb eredménye az emphysema (tüdőtágulás). Az elégtelen légzőfelület hajlamosít fertőzésekre, ami azután további patológiás folyamatokhoz vezet.

Az aminosavak transzportja

A bél lumenébe bejutott vagy fehérjéből keletkezett aminosavak és kisebb peptidek főleg Na^+-függő transzportfolyamattal a bélbolyhokba kerülnek. A bélhámsejtek citoszoljában a peptidek tovább hidrolizálnak aminopeptidázok, illetve di- és tripeptidázok közreműködésével, majd az aminosavak a portális vérbe kerülnek. Aminosavak és csekély mennyiségű fehérje diffúzióval is átkerülhetnek a bél lumenéből az érpályába; az ilyen jellegű abszorpció lényegtelen, viszont az immunválasz kiváltásához elégséges (így például az anyai ellenanyagok is így jutnak be az újszülöttekbe).

Közvetlenül étkezés után a keringésbe felszívódott aminosavak jelentékeny része a májba kerül,



2-175. ábra. A gamma-glutamil-ciklus

kivéve a Gln-t és az elágazó láncú aminosavakat, amelyeket a máj kevésbé tud transzportálni. Ennek eredményeként a periféria aminosavtartalma „meggazdagszik" leucinben, izoleucinben és valinban, így ez a „keverék" szolgáltatja az aminosavakat a többi szövetek, mint pl. az izom, a zsírszövet vagy az agy számára.

Amíg közvetlenül a táplálkozás után a szabad aminosavak milyenségét és mennyiségét a bélben emésztett fehérjék határozzák meg, később a máj és az izom funkciói tartanak fenn egyensúlyi állapotot. Posztabszorpciós fázisban, jóval az étkezés után, az izomból jóformán az összes aminosavféleség felszabadul és bekerül a keringésbe. Az izomból szabaddá vált aminosavak 50%-a Ala és Gln. Az alanin a májon keresztül bekapcsolódik a szénhidrát-anyagcserébe és ott glukózzá alakulhat (lásd a 2.2. fejezetben).

Az aminosavak hepatocitákba történő felvételére különböző transzportrendszerek alakultak ki (legkevesebb 7 ilyen rendszer ismert). Ezek zömmel Na^+-függő transzportmechanizmusok, kivéve az aromás aminosavak (Tyr, Phe, Trp) és az elágazó láncú aminosavak (Leu, Ile, Val) felvételére szolgáló rendszereket, amelyek nem igényelnek nátriumiont. A transzportok kinetikai paraméterei általánosságban azt jelzik, hogy a felvétel nagymértékben függ az aminosavak vena portae-ban lévő koncentrációjától, mert a fiziológiás aminosavkoncentrációk 1 mmol/l alatt vannak, míg a K_M-értékek néhány mmol/l tartományba esnek. Ezalól kivétel a glutamát (amely legalább egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban is felvételre kerül) és a valin (amely ellenkezőleg, egy nagyságrenddel magasabb vérplazma koncentrációt igényelne a hepatocitákba történő hatékony felvételéhez). Az aminosavfelvételek folyamatát tovább bonyolítja, hogy a transzportrendszerek hormonális (inzulin, glukagon, glukokortikoidok, thyreoid) szabályozás alatt is állnak és az, hogy patológiás folyamatok (pl. diabetes mellitus) is befolyásolják. Ezen mechanizmusok biokémiai alapjai még nem pontosan ismertek.

Az aminosavak sejtekbe történő transzportjának egy másik (meglehetősen speciális) mechanizmusa a **gamma-glutamil-ciklus** *(2-175. ábra)*. A ciklus lényege, hogy a redukált **glutation** (glutamil-ciszteinil-glicin; GSH) glutamil gamma-karboxil-csoportja és egy transzportált aminosav aminocsoportja között kötés jön létre a sejtmembránban, és így egy külső aminosav a sejt citoszoljába kerül, ahol aztán felszabadul. A ciklus további része a hidrolizált GSH reszintézisét szolgálja. Egy ciklus végbemeneteléhez 3 ATP szükséges. Az első lépést kivéve az összes reakció a citoszolban játszódik le. Így a ciklus egyrészt aminosavfelvételt szolgálhat, másrészt, ami még fontosabb, a ciklusban működő enzimek Glu, Cys és Gly jelenlétében glutationszintézist eredményeznek.

Az endogén fehérjék lebontása

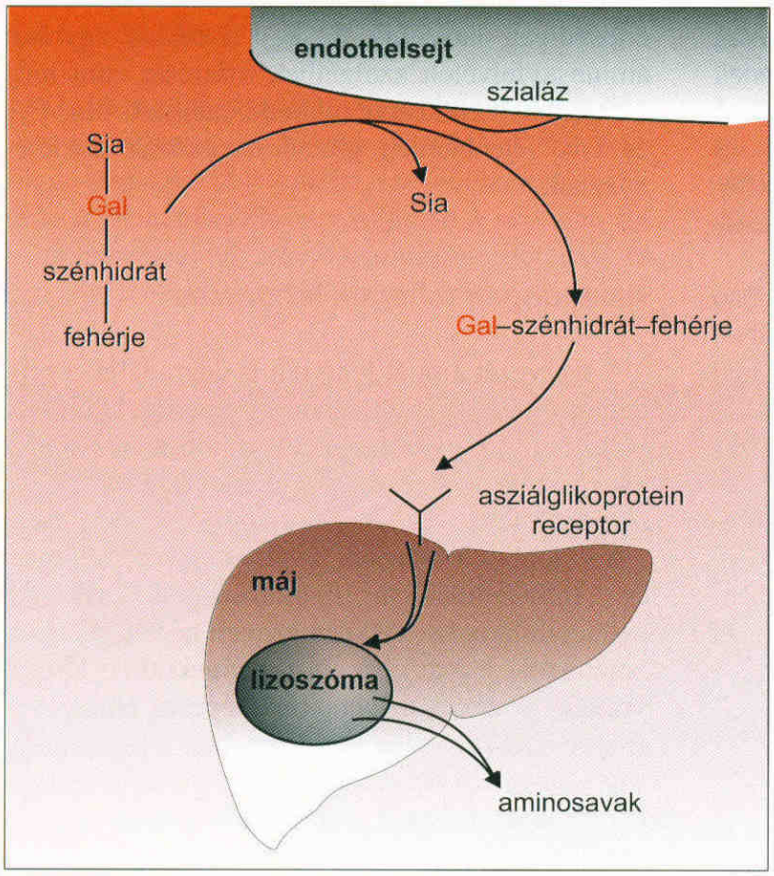
A szervezet a saját fehérjéit is degradálja; a proteinek féléletideje általában 30 perctől 150 óráig változhat. Az így felszabadult aminosavak a fehérjék reszintéziséhez vagy energiatermelésre használódnak fel.

A különböző szövetek fehérjéi extracellulárisan és intracellulárisan is hidrolizálódhatnak. Az extracelluláris fehérjéket a szöveti proteázok (**kollagenázok**, a matrix **metalloproteázok**, a **katepszinek** egy része, az **elasztáz)** képesek emészteni. Ezen enzimek is zimogén formában szintetizálódnak elsősorban makrofágokban és neutrofilekben. A prokollagenázokat, a prometalloproteázokat elsősorban a plazmin aktiválja (további részletekért lásd a 6.3 fejezetet).

A szöveti proteázok szerepet játszanak a sebgyógyulásban, a bakteriális invázióban, valamint a tumorinvázió és metasztázisképződés során. A sebgyógyuláshoz elkerülhetetlen a roncsolt szövetek eltávolítása, aminek egyik részfolyamata a károsodott fehérjék, pl. kollagének, elasztin emésztése. A baktériumok és a tumorsejtek is csak úgy képesek invázióra, ha a környező szövetek, elsősorban a kötőszöveti elemek, megemésztődnek.

A fehérjék intracelluláris degradációja során a vérplazma glikoproteinjei és a sejten belüli fehérjék nagy része a **lizoszomákban** katepszinekkel degradálódik. Az intracelluláris proteolízisek receptormediált endocitózissal vagy ATP-függő fehérjeemésztéssel kapcsolt folyamatok.

❶ *Receptormediált endocitózis.* A vérkeringésben elöregedett fehérjéket a májsejtek felszínén található receptorok „ismerik" fel. Azok a vérplazma-glikoproteinek, melyek cukorvázának végén sziálsav van, nem vagy csak kis affi-



2-176. ábra. Az asziálglikoprotein receptor szerepe. *A fehérje szénhidrátláncának végén lévő sziálsavat (Sia) az endothel felszínén lévő enzim, a szialáz távolítja el*

nitással kötődnek a májsejtekhez. Ha a sziálsav lehasad az endothel felszínén lévő szialáz enzim hatására, **asziálglikoproteinek** keletkeznek, amelyeket a májsejtek felszínén lévő receptorok felismernek. Az így megkötött fehérjék **endocitózissal** a lizoszómákba kerülnek, ahol aminosavakra bomlanak *(2-176. ábra)*. Így szabályozódik a vérplazma-proteinek nagy részének élettartama, mint pl. a protein hormonoké, a növekedési faktoroké, illetve így kerülnek lebontásra az antigén–antitest komplexek, a vírusok és a toxinok egy része.

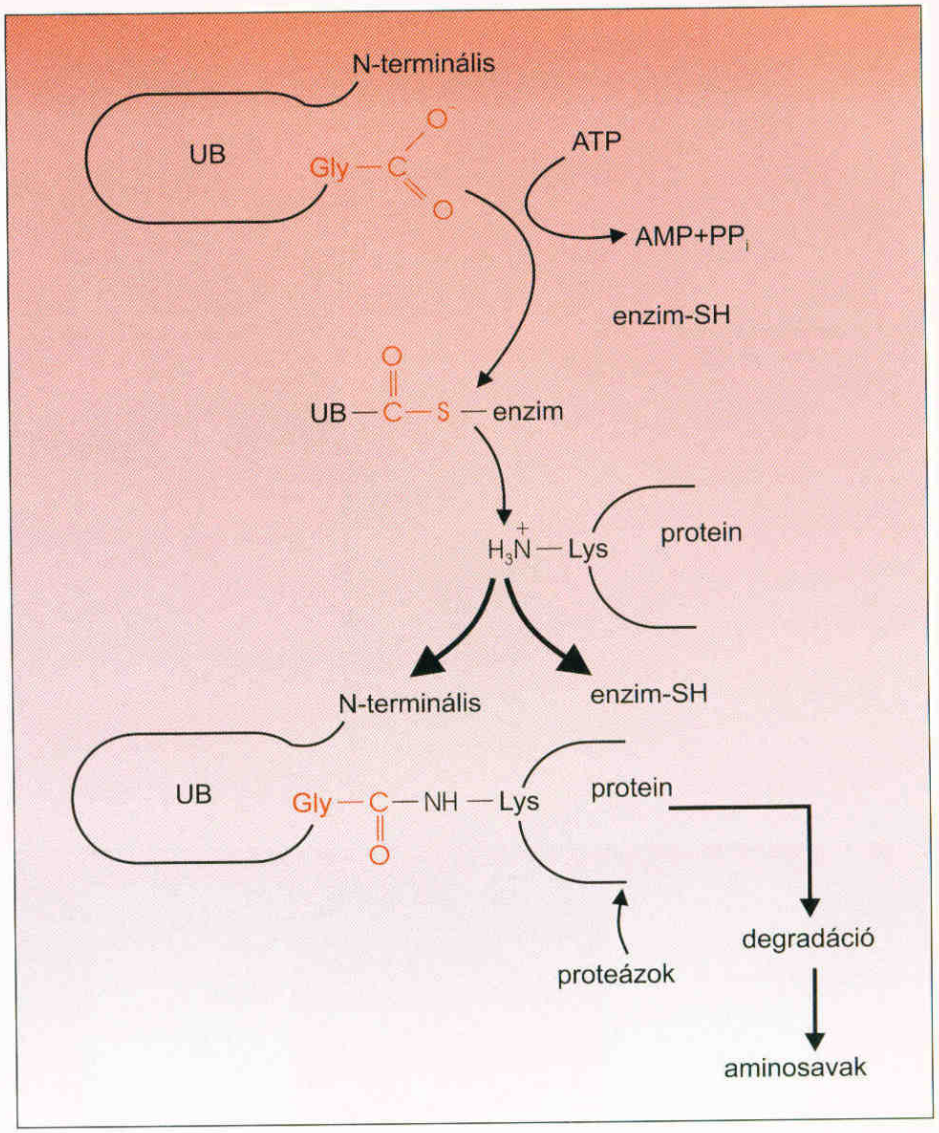
❷ *ATP-függő fehérjeemésztés.* A sejten belüli rövid élettartamú proteinek, abnormális fehérjék (pl. fehérjeszintézisben bekövetkezett hibák) és károsodott fehérjék (pl. denaturált vagy részlegesen proteolizált fehérjék) **ubikvitinhez** kötődve kerülnek degradációra. Az ubikvitin viszonylag kis molekulatömegű protein (8500 Da), amelynek C-terminális glicinjének karboxilcsoportja és a lebontásra kerülő fehérje egy lizinjének ε-aminocsoportja kö- zött izopeptidkötés jön létre *(2-177. ábra)*. Az ubikvitin előbb több lépésben (a részleteket az ábrán nem tüntetjük fel) aktiválódik ATP-vel és SH-tartalmú enzimekkel. Ezután az ubikvitin enzimkomplex tioésztercsoportja reagál a „felismert" fehérje lizin ε-aminocsoportjával és ubikvitin–protein komplex jön létre. A felszabadult enzimek (enzim-SH) további ubikvitinmolekulákat aktiválnak, míg a komplexet specifikus proteázok hidrolizálják.

Az aminosavak sorsa

Az aminosavak anyagcseréje során több olyan általános reakció játszódik le, amely mind az aminosavak szintézisében és lebomlásában, mind a nitrogént tartalmazó molekulák képződésében (pl. nukleotidszintézis) szerepet játszik.

Glutamát-dehidrogenáz

A glutamát központi helyet foglal el az aminosavak anyagcseréjében. A Glu keletkezésében, illetve lebontásában a transzaminázok mellett a



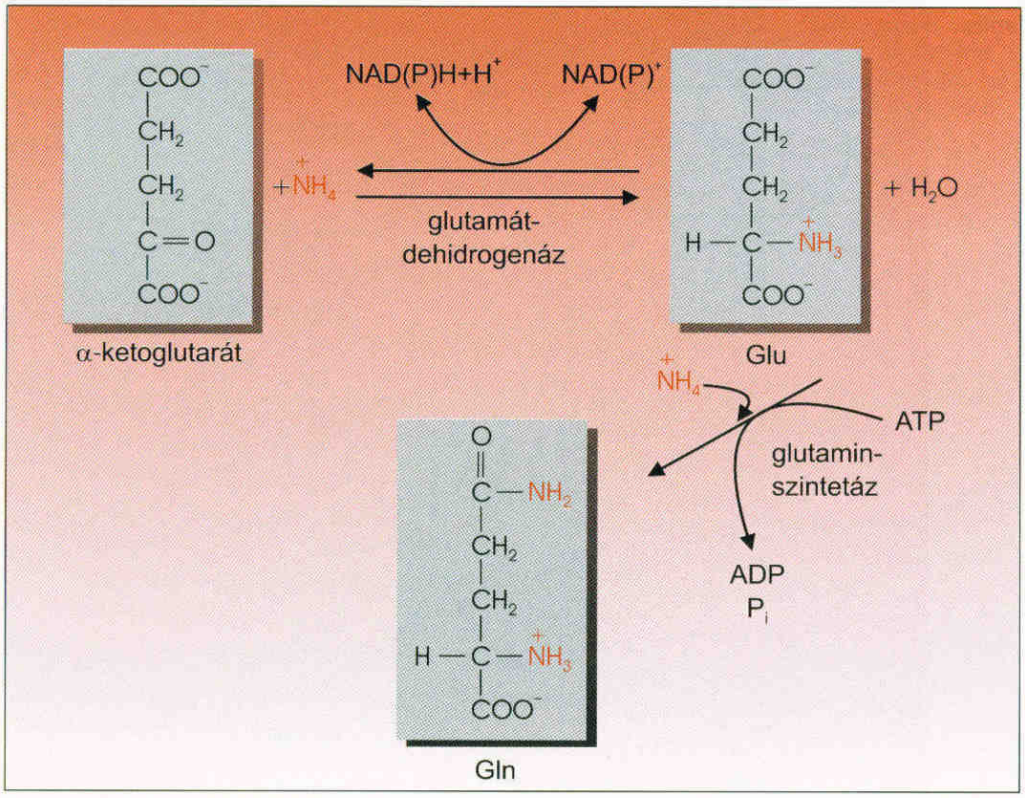
2-177. ábra. Az ubikvitin (UB) működése

glutamát-dehidrogenáz játssza a kulcsszerepet *(2-178. ábra)*. Az enzim részt vesz mind a katabolikus, mind pedig az anabolikus folyamatokban; szorosan kapcsolódik a citrátciklushoz (lásd később). Működése elsősorban a szubsztrátok [Glu, α-keto-glutarát, NH_4^+ és NAD(P)H] koncentrációjától függ. A glutamát főleg akkor szintetizálódik, amikor a szervezet energiaraktárai „feltöltött" állapotban vannak, lebomlásának viszont az energiahiányos állapot kedvez. Meg kell még jegyezni, hogy bár a glutamát-dehidrogenáz által katalizált reakciók reverzibilisek, a baktériumokban és a növényekben inkább az aminosavak szintézisét (a nitrogén beépülését) szolgálják, az állati–emberi szervezetben pedig elsősorban a nitrogéneliminációt útját jelentik.

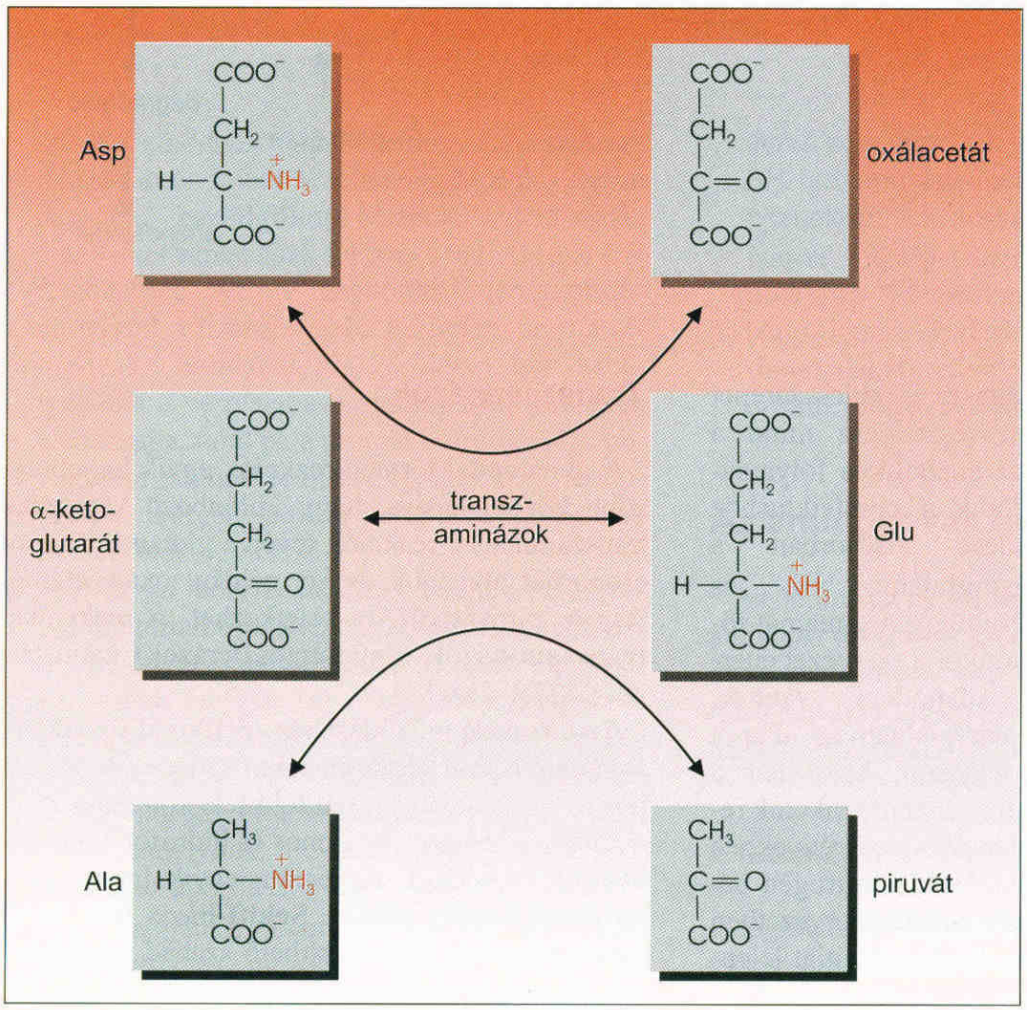
Transzaminázok

A glutamáttal történő reakciók egyik legjellemzőbb közös vonása, hogy különböző ketosavak transzaminálási reakciók révén a glutamát aminocsoportját átvehetik és így például oxálacetátból Asp és piruvátból Ala keletkezhet. A reakciókat **transzaminázok** (aminotranszferázok) katalizálják *(2-179. ábra)*.

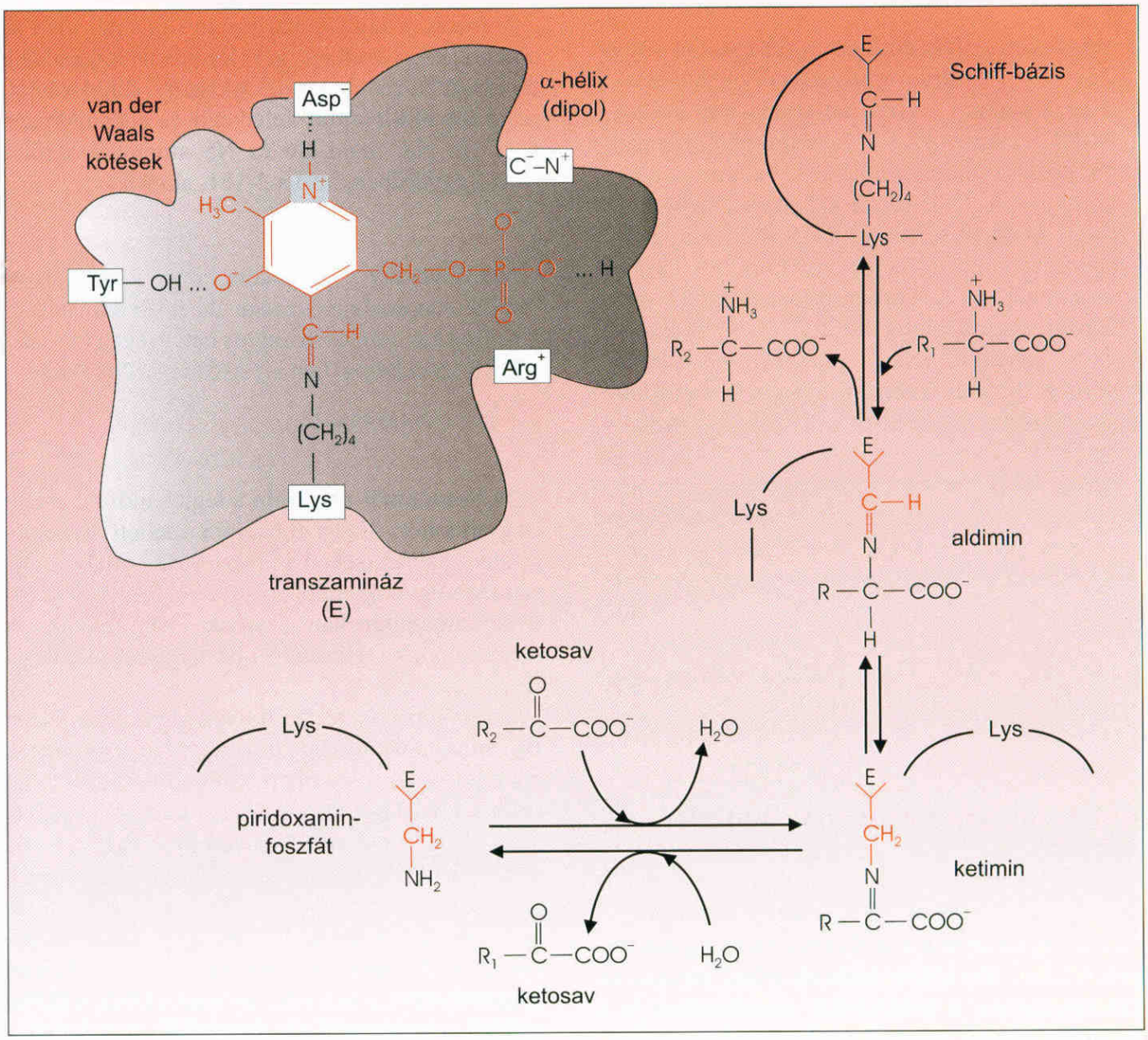
Az enzimek működéséhez **piridoxál-foszfát** (a B_6-vitamin foszfátszármazéka) szükséges *(2-180. ábra)*. A piridoxál-foszfát többféle kötéssel rögzül a fehérje szerkezetébe (ionos és hidrofób kölcsönhatások, H-hidak). Az enzim egyik Lys-je és a piridoxál-foszfát között **Schiff-bázis** jön létre, amely könnyen helyettesíthető szabad aminosavval. Ezután az aminosav és a piridoxál-foszfát kö-



2-178. ábra. Az ammónia beépülése α-kelogluta-rátba és glutamátba



2-179. ábra. A leggyakoribb transzaminálási reakciók. *A glutamát–α-ketoglutarát átalakulás általában központi szerepet játszik a transzaminálásokban. A transzaminázok (amino-transzferázok) specifikusak az egyes aminosavakra*



2-180. ábra. A transzaminázok működése. *Az ábra az enzim működéséért felelős szerkezeti részt mutatja. Az enzimen belüli piridoxál-foszfát és lizin közötti Schiff-bázis szabad aminosav (R_1-) jelenlétében elbomlik és az aminosav lép reakcióba a piridoxál-foszfáttal. Molekuláris átrendeződések után a ketamin hidrolizál R_1-ketosav keletkezik, míg az aminocsoport a piridoxál-foszfáton marad (piridoxamin-foszfát). A reakciósorozat reverzibilis és egy másik ketosav (R_2-) magas koncentrációja esetén visszafelé játszódik le R_2-aminosavat eredményezve*

zött létrejött kötések átrendeződnek, végül hidrolízis során **piridoxamin-foszfát** jön létre, és az aminosavból keletkezett ketosav (R_1) leválik az enzimről. Ha egy másik ketosav (R_2) magas koncentrációban van jelen, akkor a reakciósor elindul az ellenkező irányba, és az enzim piridoxamin-foszfátjához kötött aminocsoport átkerül a ketosavra. A reakciók végén az R_2-csoportot tartalmazó aminosav szabaddá válik. Ezzel a transzaminálási ciklus lezárul (lásd 2-180. ábra). A végső eredmény egy aminocsoport kicserélődése: egy aminosavból ketosav és egy másik ketosavból aminosav keletkezik.

A transzaminálással kapcsolatban nagyon kevés anyagcserezavar ismert, minden bizonnyal azért, mert a transzaminázok teljes hiánya nem egyeztethető össze az élettel. Figyelemreméltó még, hogy az aminotranszferázoknak klinikai

diagnosztikai jelentőségük is van (**SGOT** vagy ASAT, szérum-glutaminsav-oxálecetsav-transzamináz, aszpartát-amino-transzferáz; **SGPT** vagy ALAT szérum-glutaminsav-piroszőlősav-transzamináz, alanin-amino-transzferáz). Különböző szövetek károsodása során az elhalt sejtekből nagyobb mennyiségben szabadulnak fel és így koncentrációjuk megemelkedik a vérkeringésben. Egyéb enzimaktivitások változásától függően diagnosztikus értéket jelent- hetnek elsősorban **myocardialis infarctusban** és toxikus **májkárosodásban**. Továbbá terápiásan is felhasználhatók: esszenciális aminosavakból képzett ketosavak bevitelekor a szö- vetekben normálisan jelen lévő transzaminázok esszenciális aminosavakat produkálnak a felesleges ammónia felhasználásával. A reakció egyszerre jelent esszenciális aminosav pótlást és ammóniamentesítést. A kezelésnek főleg vese- és májbetegségekben lehet létjogosultsága (lásd az aminosavkatabolizmust is).

Egy szénatomos csoportok transzfer reakciói

Az egy szénatomos „töredékekre" az aminosavak anyagcseréjén kívül szükség van még a nitrogéntartalmú specifikus funkciót ellátó molekulák keletkezéséhez, a nukleotidok szintéziséhez és a makromolekulák posztszintetikus módosulásához. Az egy szénatomos töredékeket a tetrahidrofolát és az S-adenozil-metionin rendszer szolgáltatja.

A **tetrahidrofolát** az egy szénatomos csoportokat, amelyeket elsősorban szerintől és hisztidintől kap, az N5 és N10-hez kapcsolva szállítja *(2-181. ábra)*. A szénatom redukáltsági állapotától függően lehet metil ($-CH_3$), metilén ($-CH_2-$), formil (–CHO), formimino (–CHNH) vagy metenil (–CH=). A legoxidáltabb formát (CO_2) a biotin szállítja, míg a legredukáltabbat ($-CH_3$) elsősorban az S-adenozil-metionin. A különböző redukáltsági fokú szénatomtöredékek egymásba átalakulhatnak, így ezek donor és akceptor szerepeket is játszhatnak. Nemcsak a szénatomtöredék, hanem magának a folsav pteridingyűrűjének a redukáltsági foka is változhat.

A folsav a táplálékkal történő felvétel után az emberi szervezetben két lépésben redukálódik dihidrofolát-reduktázzal, először **dihidrofolát**, majd **tetrahidrofolát** keletkezik (a négy hidrogén a C7 és N8, majd C6 és N5 atomokra kerül a pteridingyűrűben, lásd a 2-181. ábrát).

Folsavhiány a „harmadik világ" legáltalánosabb vitaminelégtelensége, de előfordulhat terhesség kapcsán és bizonyos betegségek folytán jóléti társadalmakban is (lásd még a 2.5. fejezetet).

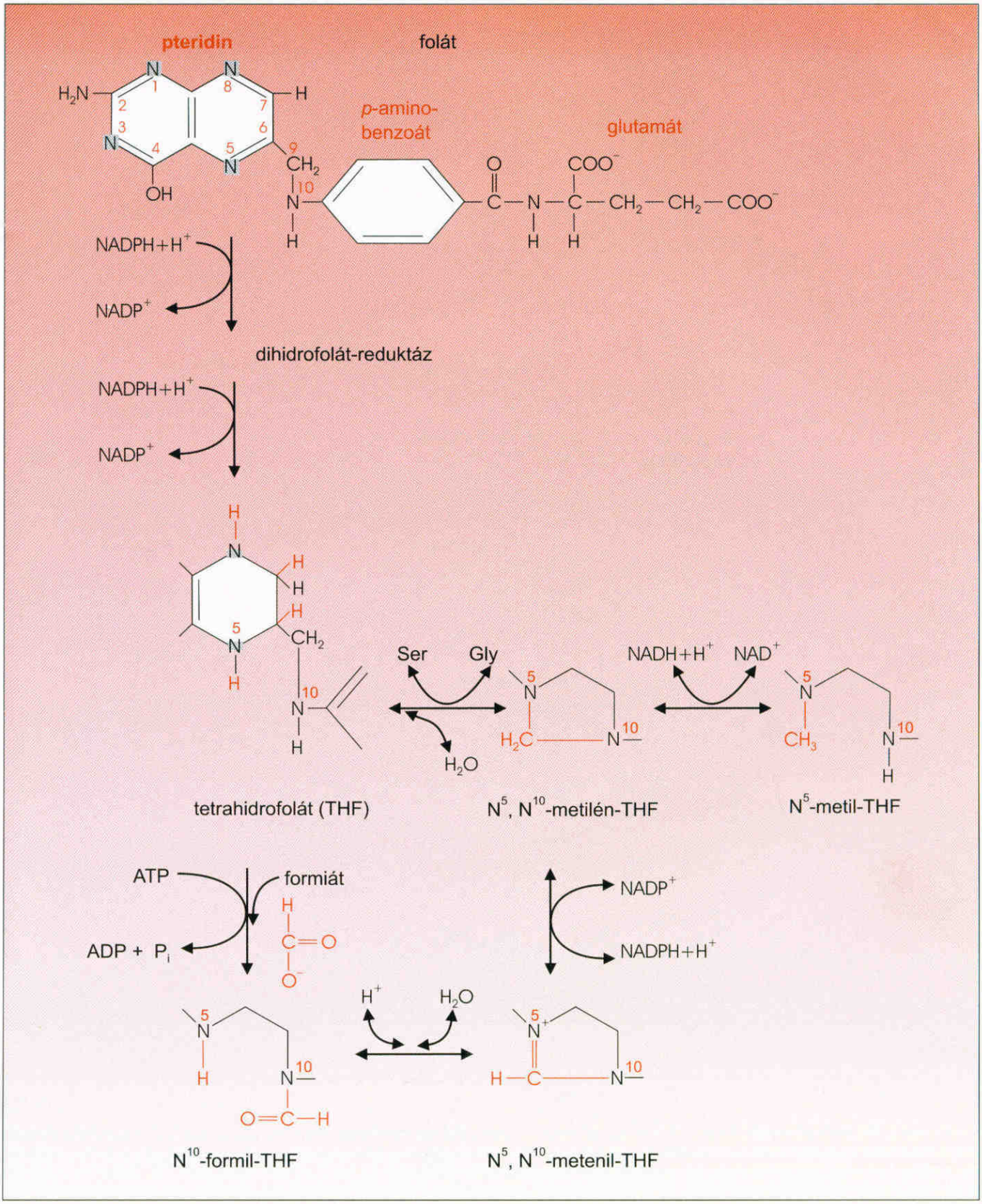
Az **S-adenozil-metionin** a legjelentősebb metilcsoportdonor. Ezen funkciója mellett a homocisztein szintézisében is részt vesz, amely a Cys szintézis egyik komponense. A két folyamat az aktivált metilciklusban szorosan kapcsolódik, és maga a ciklus a tetrahidrofolát-rendszerrel is társul *(2-182. ábra)*.

A tetrahidrofolát és az aktivált metilciklus között B_{12}-vitaminnal működő enzim tartja a kapcsolatot. Az S-adenozil-metionin metildonor szerepét az teszi lehetővé, hogy az S-adenozil-metionin keletkezésével a metionin kénatomja, valamint az adenozin C5 atomja között történő reakció során, a kénatomhoz kapcsolódó metilcsoport kötéserőssége csökken. Ha megfelelő akceptor van jelen, akkor a metilcsoport arra átkerül, azok metilezését eredményezve. Ilyen lehet például a DNS, a rRNS, a tRNS, a noradrenalin, a foszfatidil-etanolamin, a kemotaktikus protein és még számos egyéb molekula.

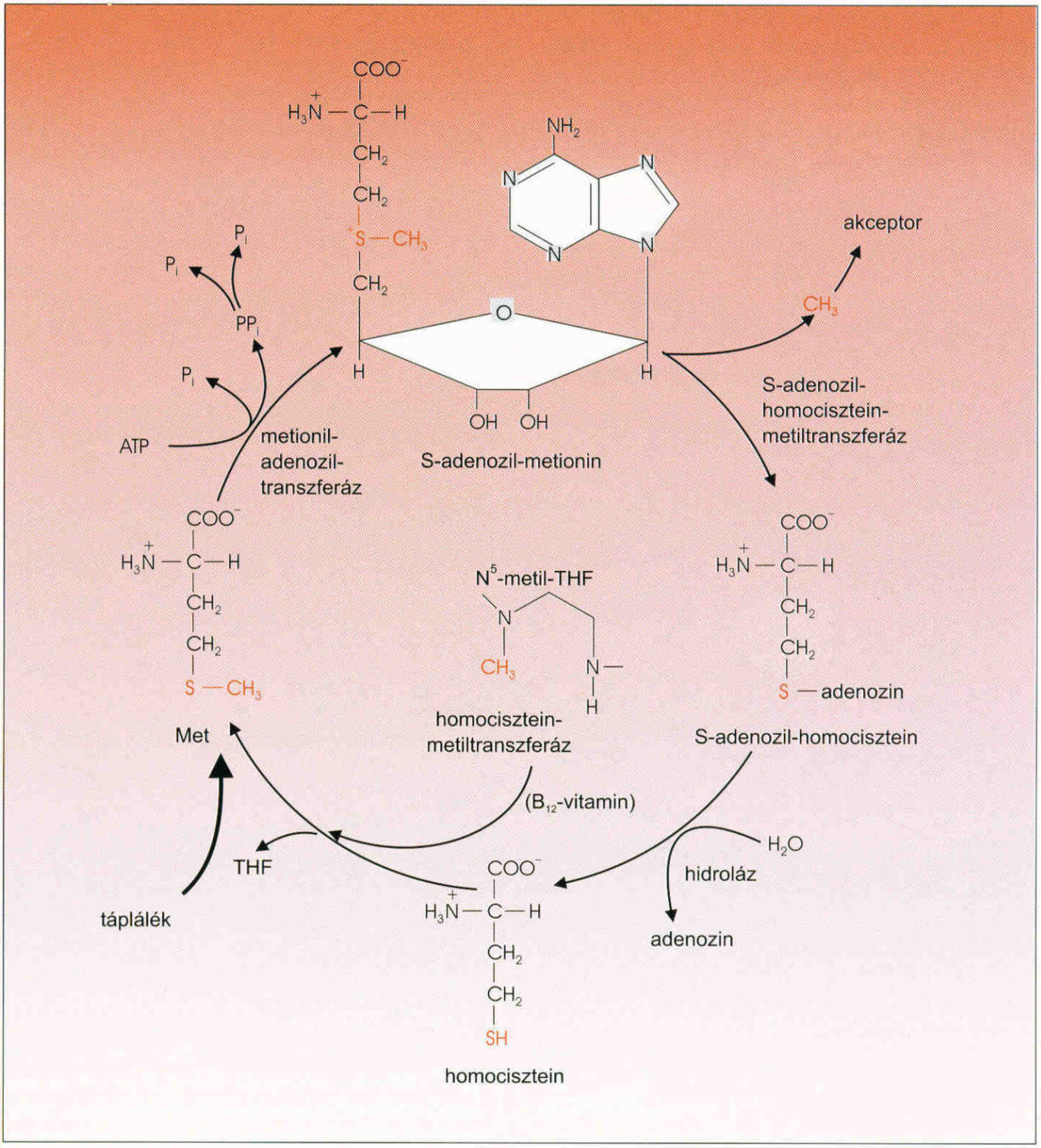
A nem esszenciális aminosavak bioszintézise

A Tyr kivételével a nem esszenciális aminosavak bioszintézise a citrátkörhöz, illetve a glikolízishez kapcsolódik és a **glutamát** centrális szerepet játszik a folyamatokban *(2-183. ábra)*.

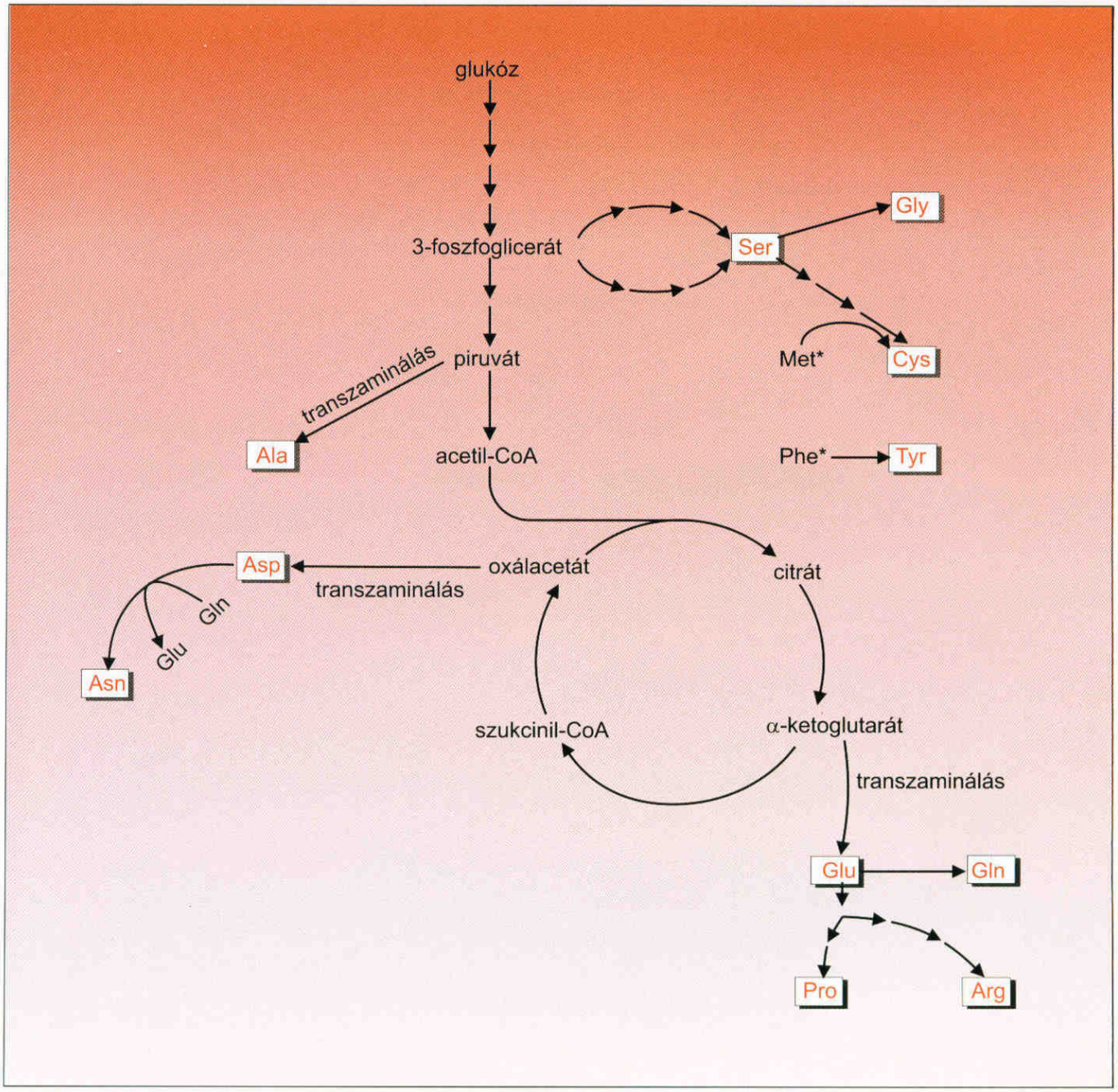
Glutamát szénváza szükséges a Pro, Arg, Gln szintéziséhez, aminocsoportja pedig az Ala, Asp és az Asn szintéziséhez. A Pro és Arg szintézisében közös intermedier a glutamát-gamma-szemialdehid (Glu-ból történő szintézishez ATP és



2-181. ábra. Különböző redukáltsági fokú folsavszármazékok. *A folsav három fő alkotórésze a pteridinváz, a p-aminobenzoát és a glutamát. A folsavat a dihidrofolát-reduktáz két lépésben redukálja. A tetrahidrofolát különböző mértékben redukált C_1 töredékei egymásba átalakulhatnak*



2-182. ábra. Az aktivált metilciklus. *A metilcsoport átadása után az S-adenozil-metioninból S-adenozil-homocisztein keletkezik, majd hidrolízist követően adenozin leválása után homocisztein marad vissza. A homocisztein felhasználódhat ciszteinszintézisre, de a ciklusban metilcsoportot vesz fel, amelyet metil-tetrahidrofolát szolgáltat és így metionin keletkezik. Az utóbbi reakciót egy B_{12}-vitamin kofaktort tartalmazó enzim, a homocisztein-metiltranszferáz katalizálja (metionin-szintáz) (ennek jelentőségét lásd később, illetve a 2.5. fejezetben). A Met-ből ATP jelenlétében S-adenozil-metionin képződik és ezzel a ciklus záródik*



2-183. ábra. A nem esszenciális aminosavak bioszintézisének kapcsolata a szénhidrát-anyagcserével. **A szintézishez két esszenciális aminosav is szükséges*

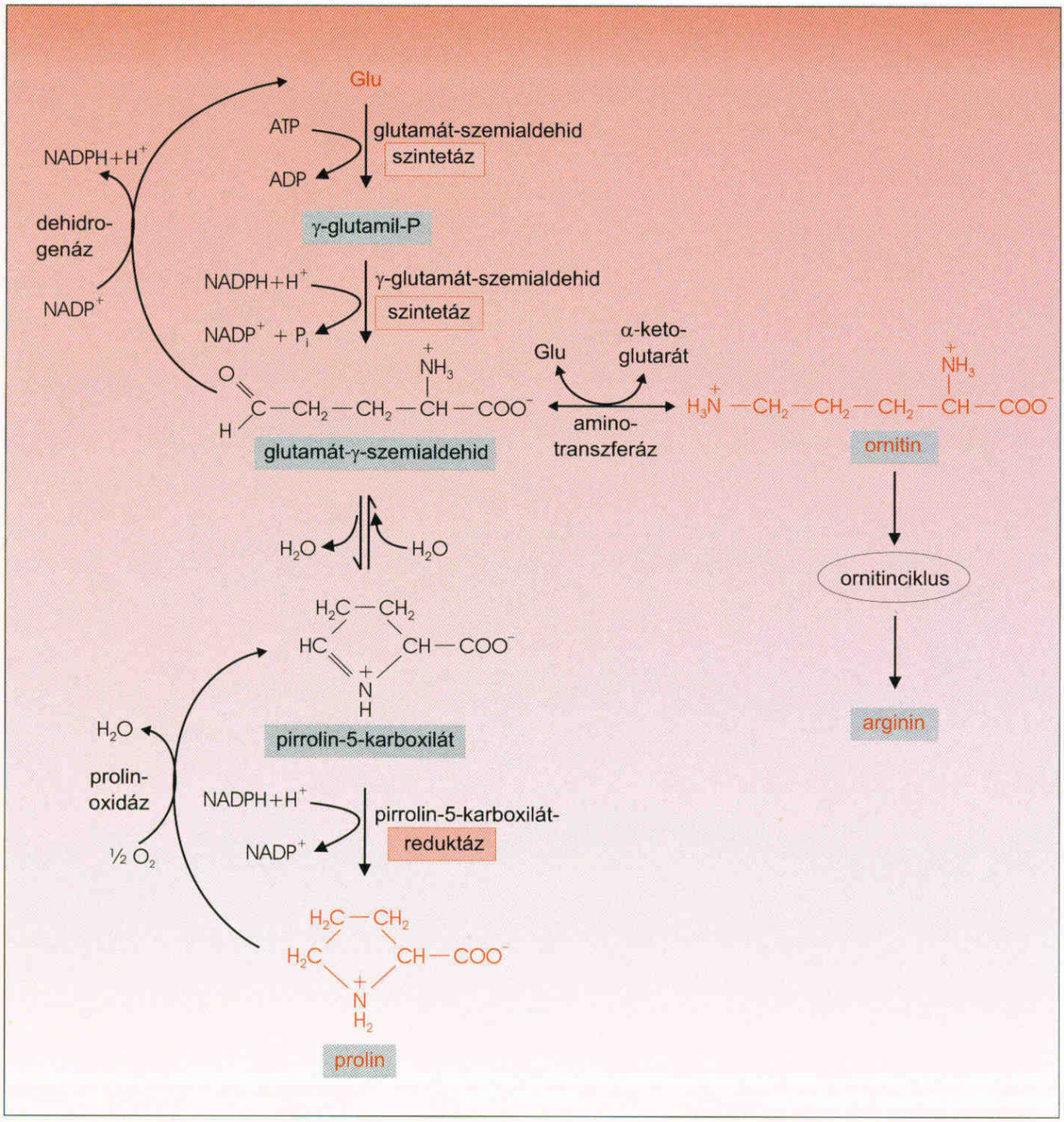
NADPH szükséges), amelyből két lépésben Pro keletkezhet vagy ornitin egy újabb Glu részvételével *(2-184. ábra)*. Az ornitinből Arg keletkezhet. A Pro és Arg katabolizmus köztitermékei sok vonatkozásban megegyeznek a szintézis intermedierjeivel, a lebontási reakciósor Glu-t eredményez.

A nem esszenciális aminosavak közül a Gln bioszintézise Glu-ból történik (a glutamin-szintetáz ammónia és ATP felhasználásával működik, lásd a 2-178. ábrát).

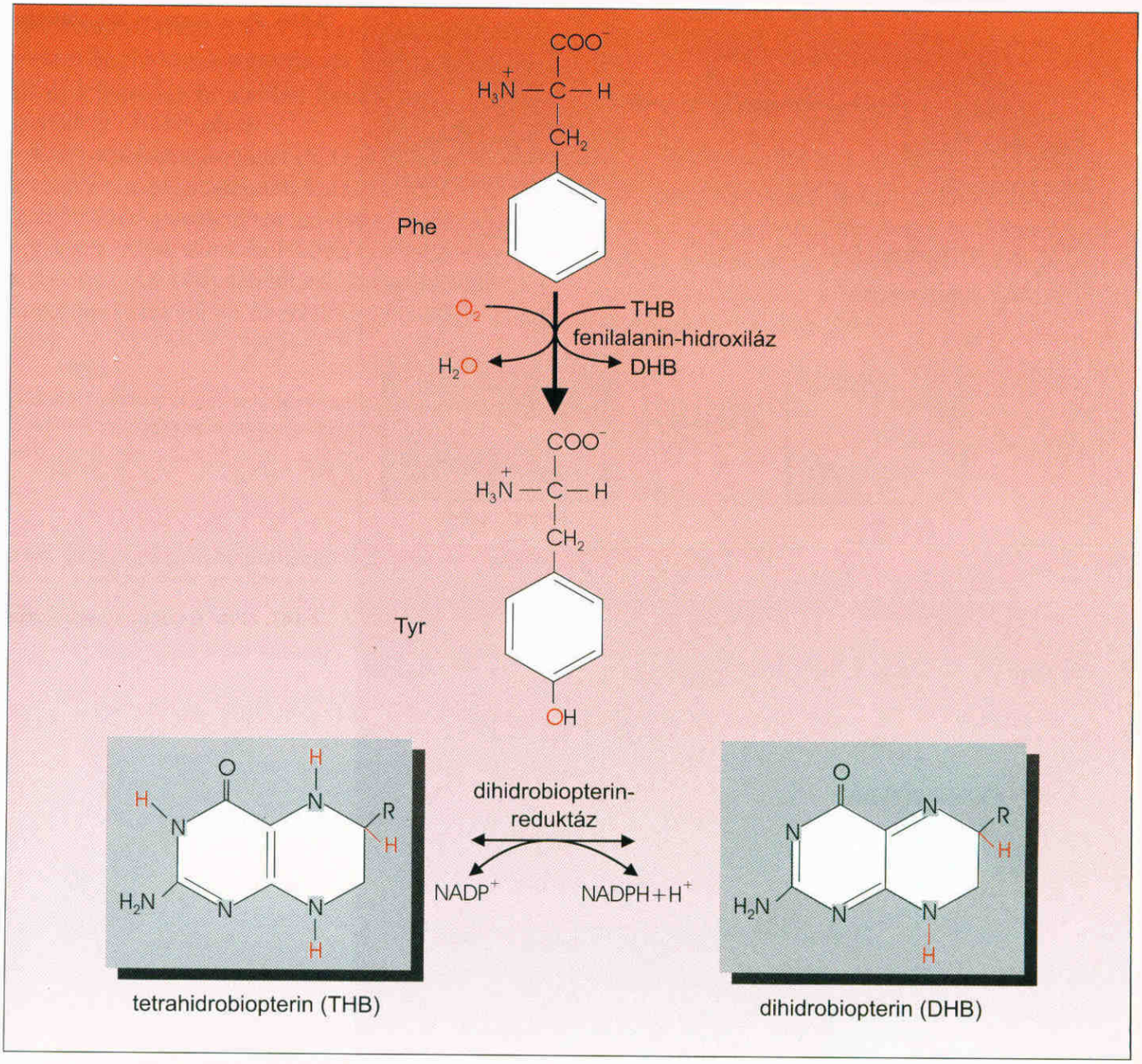
Az enzim a központi idegrendszerben is megtalálható és szerepet játszhat az ammónia agyi károsító hatásának csökkentésében (lásd még az aminosavkatabolizmust is).

Az aszpartátból történő aszparaginszintézishez, az eddigiektől eltérően nem Glu, hanem Gln szolgáltatja az amidcsoportot humán sejtekben.

A **tirozin** fenilalaninból (esszenciális aminosav) szintetizálódik a **fenilalanin-hidroxiláz** katalízisével *(2-185. ábra)*. A reakció oxigént és **tetra-**



2-184. ábra. A prolin és az arginin bioszintézise. *A glutamát szemialdehid keletkezése két lépésben játszódik le. A szintetáz enzim először foszfátcsoportot transzferál ATP-ről a glutamát γ-karboxil-csoportjára, majd az aktivált karboxilcsoportot redukálja aldehiddé. Ezután az aldehid a primer aminnal (α-amino-csoport) addicionál egyidejű H_2O-eliminációval. Ez utóbbi nem igényel enzimkatalízist. A prolinszintézis utolsó lépése a pirrolingyűrű redukciója. A prolin lebontása glutamáttá a γ-glutamil-P kivételével azonos közti termékeket eredményez, az enzimek és kofaktorok viszont eltérőek a szintézisben résztvevőktől. Az argininszintézis irányába először ornitin keletkezik transzaminálással kapcsolt reakció során, amikor glutamát α-ketoglutaráttá alakul (a transzaminázt ornitin-aminotranszferáznak nevezik). A reakció megfordítható, lehetővé téve prolin↔ornitin átalakulásokat. Az ornitin→arginin de novo szintézis az ornitinciklusban valósul meg*



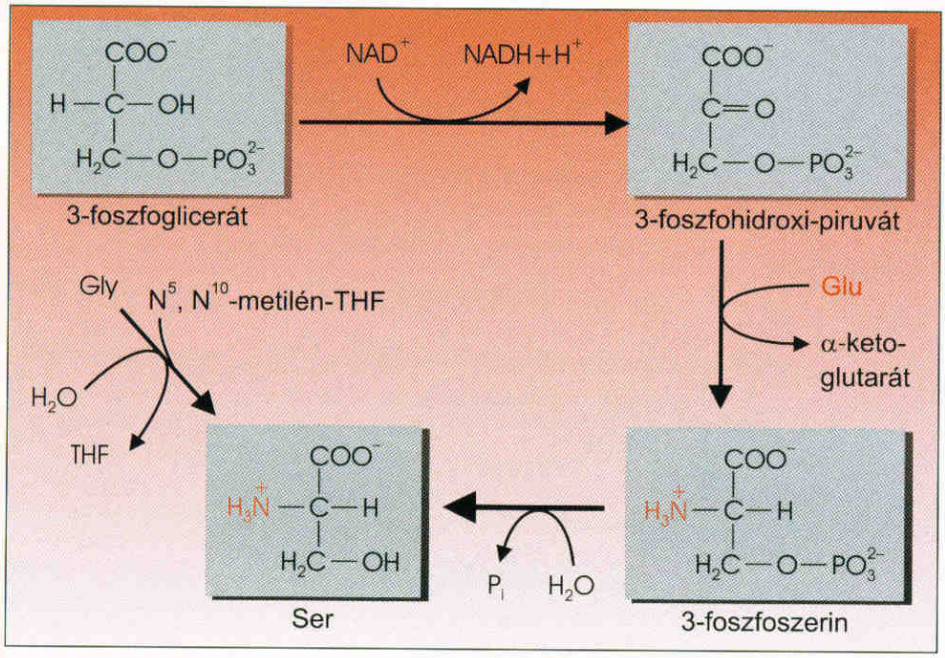
2-185. ábra. A tirozin bioszintézise. *A tetrahidrobiopterint (THB) és a dihidrobiopterint (DHB) az irodalomban BH_4, illetve BH_2 formában is rövidítik*

hidrobiopterint (THB) igényel. A THB-ből dihidrobiopterin (DHB) keletkezik, amely visszaredukálódhat NADPH-val THB-vé dihidrobiopterin-reduktáz közreműködésével.

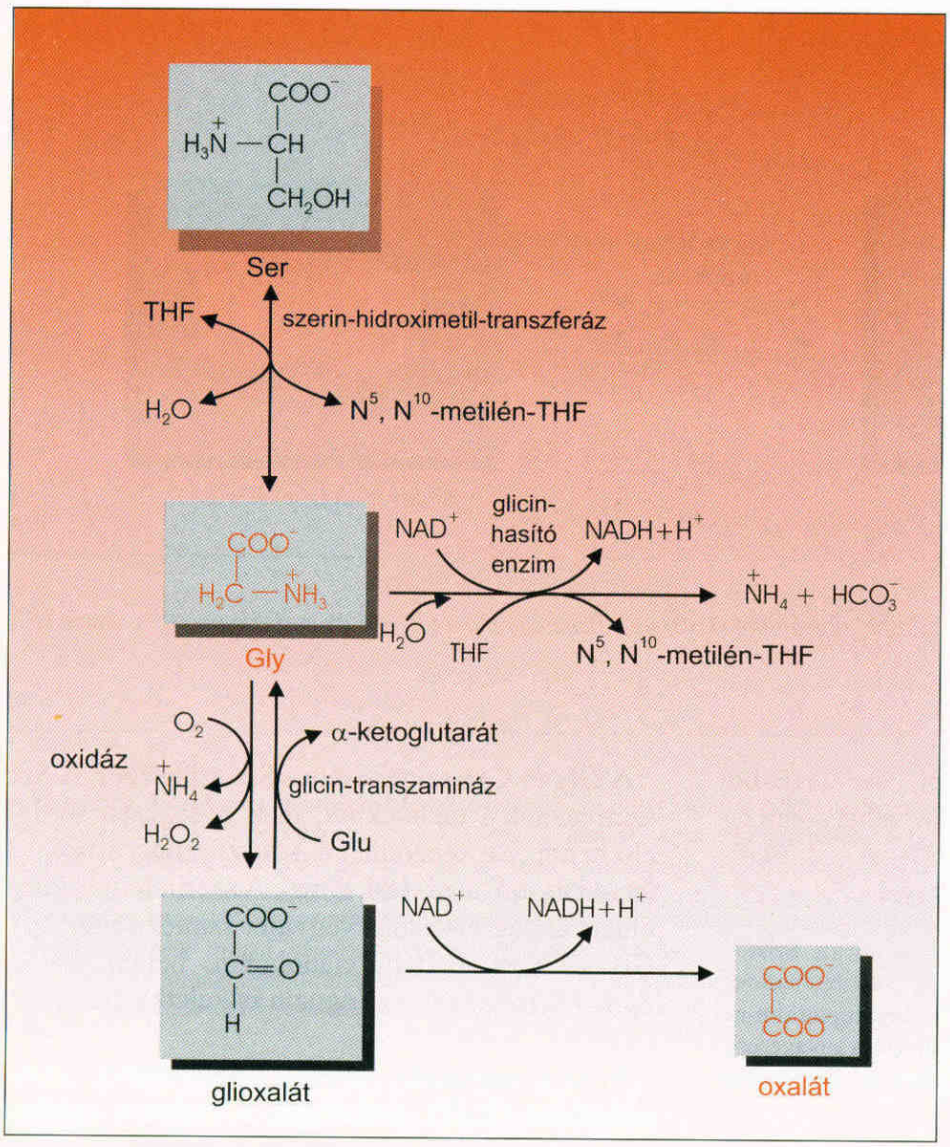
Akár a fenilalanin-hidroxiláz, akár a dihidropteridin-reduktáz defektusa vagy a THB hiánya fenilalanin anyagcserezavarához (phenylketonuria) vezethet (lásd az aminosavak katabolizmusánál).

A **Gly** és **Cys** szintéziséhez Ser szükséges. A Ser származhat a táplálékból, hisz bőségesen fordul elő benne, de képződhet a **3-foszfoglicerátból**, illetve Gly-ból is *(2-186. ábra)*. A szerin fontos kiindulási anyag több más vegyület szintéziséhez; így Gly és Cys mellett, etanolamin, betain, kolin, szerin-foszfatidok, szfingozin is keletkezhet belőle.

A Gly szerinből történő szintéziséhez tetrahidrofolát (THF) szükséges; a reakciót **szerin-**



2-186. ábra. A szerin bioszintézise



2-187. ábra. A glicin bioszintézise

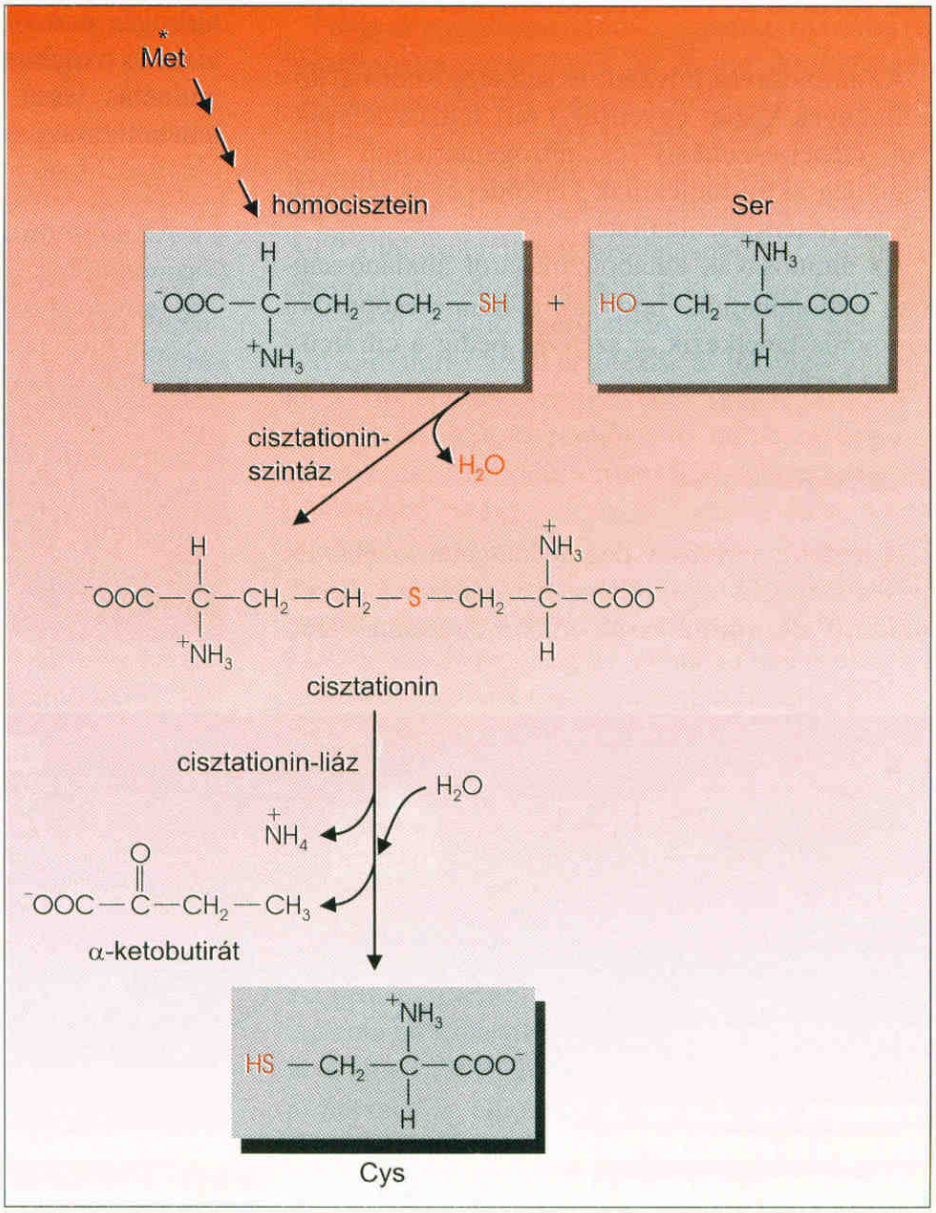
hidroximetil-transzferáz katalizálja, amelynek során a Ser hidroxilcsoportja víz formájában távozik és a β-szénatom metilén formájában a THF-ra tevődik át *(2-187. ábra)*.

A Gly-szintézis történhet HCO_3^-- és NH_4^+-ból is; a reakciót a glicin-szintáz katalizálja NADH és metilén-THF jelenlétében növényi és bakteriális sejtekben. Állati szervezetekben a glicinhasító enzim elsősorban a Gly lebontását szolgálja, aktivitása sokszorosára nőhet éhezéskor (glukagon hatására).

Glicin szintetizálódhat még kolinból vagy etanolaminból is. Az utóbbi jelentőségét orvosi szempontból az adja, hogy a bioszintézis utolsó lépésében glioxilátból transzaminálási reakcióval keletkezik a Gly (2-187. ábra). A májban működő glicin-transzamináz defektusakor a glioxilátból nem keletkezik Gly, és a glioxilát eloxidálódik oxaláttá, amely rosszul oldódik és a vesében kicsapódhat (hyperoxaluria; vesekőképződés).

A szerin kondenzálódhat homociszteinnel is, ilyenkor cisztationin intermedieren keresztül **cisztein** és α-ketobutirát keletkezik *(2-188. ábra)*. A kétlépéses reakciót a **cisztationin-szintáz** és a **cisztationin-liáz** katalizálja.

Utóbbi defektusa cystationinuriához vezethet, míg a kondenzáló enzim elégtelen műkö-



2-188. ábra. A cisztein bioszintézise. *A homocisztein esszenciális aminosavból* (Met) szintetizálódik (lásd a 2-182. ábrát is)*

dése homocisztein felhalmozódását eredményezheti. A vér emelkedett homociszteinszintje károsítja a trombomodulint (lásd 6.5. fejezet), amely thrombosist vált ki és a fokozott mértékben kiválasztásra kerülő homocisztein a vizeletben homocisztinné oxidálódik (homocystinuria).

A poszttranszláció során módosult aminosavak szintézisét az orvosi szempontból releváns fejezetben tárgyaljuk, így a hidroxi-prolin és hidroxi-lizin a 6.3., míg a gamma-karboxiglutaminsav a 6.5. fejezetben található meg.

Az aminosavak átalakulásai

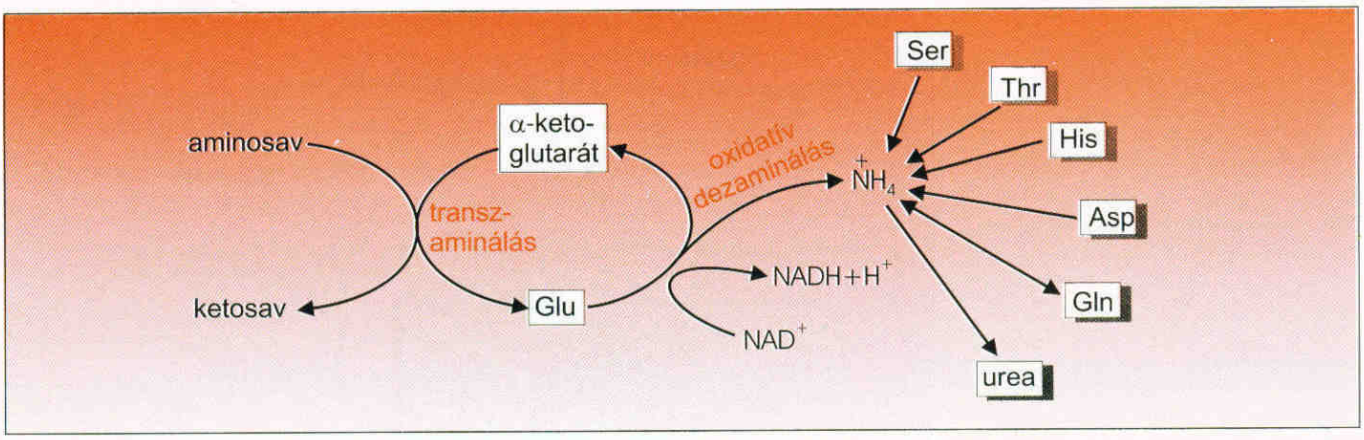
Az aminosavak felvétele és szintézise normál körülmények között egyensúlyt tart felhasználásukkal (fehérjeszintézis és nitrogéntartalmú biológiailag aktív molekulák képződése) és lebontásukkal (energiaszolgáltatás).

Az aminosavak katabolizmusáról általánosságban elmondhatjuk, hogy az α-amino-csoportból ammónia keletkezik, a szénváz pedig a citrátciklusba kerül.

A nitrogén sorsa

A legtöbb aminosav degradációjánál az első lépés a nitrogén eltávolítása. Ez történhet direkt, **oxidatív dezaminálással**, amikor ammónia keletkezik, de leggyakrabban **transzaminálással** kezdődik és a közös intermedier a glutamát, amely a glutamát-dehidrogenázzal dezaminálódik *(2-189. ábra)*. A reakciók végeredményeként Glu-ból ammónia és α-ketoglutarát keletkezik (transz-dezaminálás). Ammónia keletkezhet még a glutamin amidjából is; a **glutamináz** által katalizált hidrolízis során glutamát marad vissza. A szerin, a hisztidin és a treonin direkt dezaminálódhat dehidratázok katalízisével, amikor is szabad ammónia keletkezik. A fent leírt folyamatok elsősorban a májban játszódnak le. Dezaminálás történhet azonban a vesében is. Az aminosavakból α-ketosavak keletkeznek és ammónia szabadul fel. A reakciót az -aminosav-oxidázok katalizálják, amelyek koenzime flavin-mononukleotid (FMN). A keletkezett $FMNH_2$-t molekuláris oxigén oxidálja hidrogén-peroxiddá, amelyet végül kataláz bont vízre és oxigénre. A vesében történő oxidatív dezaminálás lassú reakció és így az aminosavak katabolizmusa szempontjából kisebb jelentőségű.

Az **ammónia** rendkívül fontos a szervezet számára, hisz nélküle nem történik nukleotid- és aminosavszintézis és nem keletkezhetnek egyéb nitrogéntartalmú vegyületek. Az ammónia, más oldalról nézve viszont rendkívül toxikus, elsősorban a központi idegrendszer számára (hatásának pontos biokémiai mechanizmusa még nem ismert). Emelkedett vérplazmaszintje hallucinációt, tremort, zavartságot okoz, súlyos májbetegségekben pedig comát, majd halált eredményez.



2-189. ábra. Az aminosavak transzaminálása és dezaminálása *A bélből nagy mennyiségű ammónia kerül a vérkeringésbe*

A központi idegrendszer működése közben folyamatosan képződik ammónia. Normál körülmények között ez a NH_4^+ a glutamin-szintetáz katalízisével glutamint képez, amely a keringéssel a májba juthat.

Az ammónia eliminációja

Az emberi szervezet szabad ammóniájának legfőbb forrásai:

1. a bélből történő NH_3 közvetlen felszívódása (főleg enterális baktériumok terméke; az összes szabad ammónia közel 40%-át alkotja),
2. különböző sejtek aminosavdegradációjából származó ammónia, illetve a glutamát-dehidrogenáz által szolgáltatott NH_4^+.

Ahogy már említettük, a szervezet számára létfontosságú a vérplazma-ammóniakoncentráció normál szinten tartása (<50 μmol/l). Erre több lehetőség is adódik:

1. A máj az ammóniából **ureát** szintetizál, amelyet elsősorban a vese választ ki (az urea egy része azonban a bélbe kerül, ahol a baktériumok **ureáza** elbontja és az ammónia újra a vena portae-ba jut).
2. Az ammóniából és a glutamátból a májban is glutamin keletkezhet a pericentrális hepatocitákban, amikor a periportális hepatociták nem tudják kiszűrni a bélből felszívódott ammóniát. A reakciót a **glutamin-szintetáz** katalizálja, melynek K_M-értéke ammóniára 180 μmol/l, glutamátra 5 mmol/l; tehát hatékony működésének előfeltétele a relatív magas szabadglutamát-koncentráció. A Gln azután mint nem toxikus vegyület az ammónia szervek közötti transzportjában vesz részt (pl. májból vesébe).
3. A vese képes mind szabad aminosavakat, mind ammóniát direkt is kiválasztani a vizeleten keresztül.
4. Nitrogéneltávolítást és így ammóniaterhelés csökkenését jelenti a **kreatinin** ürítése is.
5. A húgysav ürítése pedig az ammóniaeltávolítás közvetett módja.

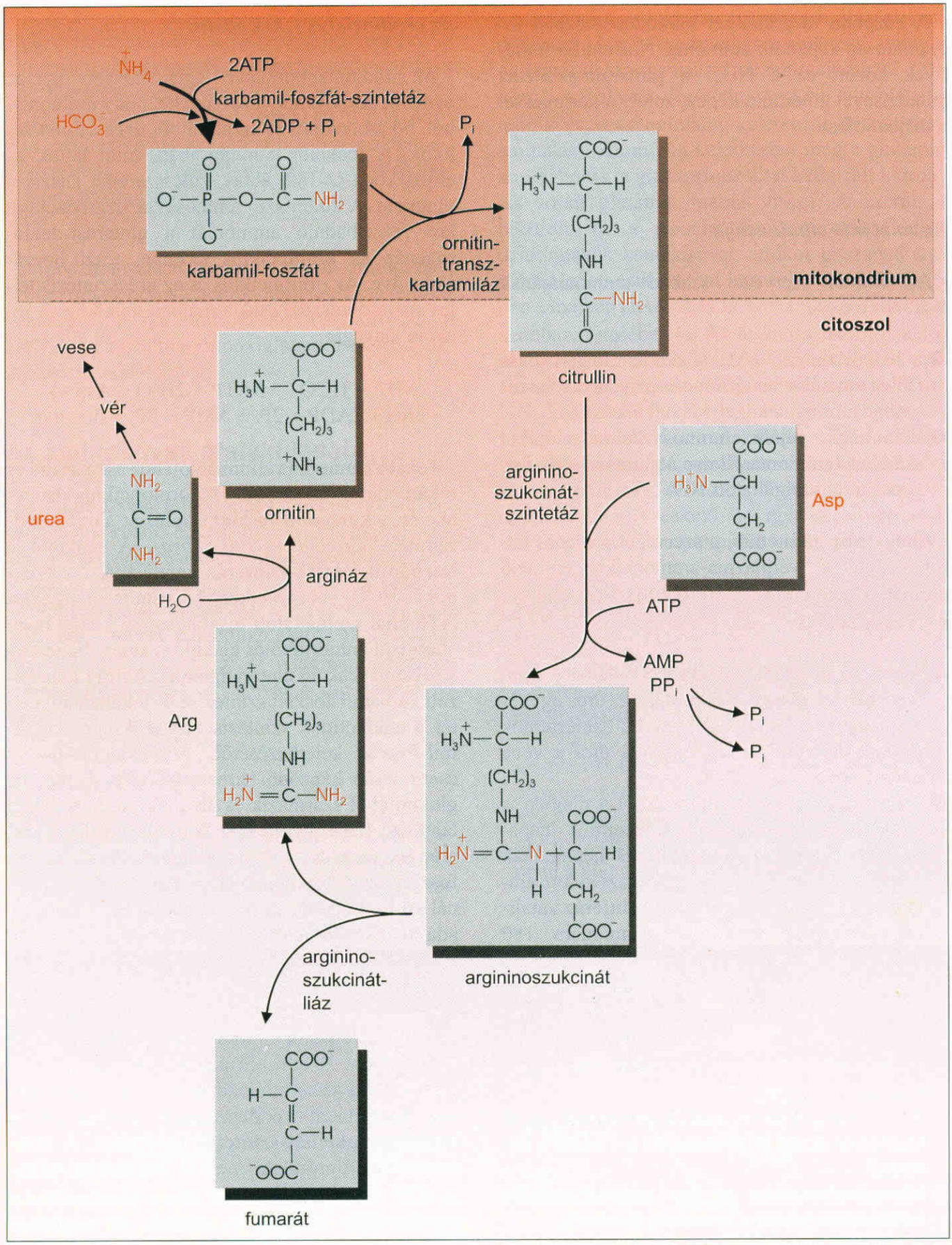
Az ornitinciklus („ureaciklus")

Az ammóniaelimináció legjelentősebb útja az **ornitinciklus,** amelynek lényege, hogy ammóniából, bikarbonátból és aszpartátból **urea** szintetizálódik. A reakciók elindításában, mint láttuk az előzőekben (2-189. ábra), kulcsszerepet játszik a glutamát. A különböző aminosavak degradációjakor felszabaduló ammóniát a glutamát-dehidrogenáz az ornitinciklus számára teszi hozzáférhetővé. Az ornitinciklus és az ureaszintézis teljes enzimrendszere csak a májban működik. A reakció lényege:

$$NH_4^+ + HCO_3^- + 3ATP + 2H_2O + Asp \rightarrow$$
$$urea + 2ADP + 2P_i + AMP + PP_i + fumarát$$

Tehát az ammónia eliminációjához aszpartátra és bikarbonátra van szükség. Az ornitinciklus első reakciója a **karbamil-foszfát** szintézise a mitokondriumban történik *(2-190. ábra)*. A reakciót a **karbamil-foszfát-szintetáz** katalizálja. Az NH_3-ból és HCO_3^--ból keletkező karbamilcsoport és az ATP által szolgáltatott foszfátcsoport között nagy energiájú anhidridkötés alakul ki, amely biztosítja a további reakció energiaigényét. Az így keletkezett karbamil-foszfát szintézise és lokalizációja eltér a nukleotidok szintéziséhez szükséges karbamil-foszfát keletkezésétől. A nukleotid-anyagcsere során képződő karbamil-foszfát nitrogénje glutaminból származik és az enzim a citoszolban található (lásd még a 2.5. fejezetet is). Meg kell még jegyeznünk, hogy az ureaszintézis karbamil-foszfát-szintetáza nem NH_4^+-t, hanem NH_3-t használ szubsztrátként, vagyis a reakció egy proton leadásával kezdődik (ezt nem tüntettük fel az 2-190. ábrán).

Az ornitinciklus második reakciója egy transzfer, amelynek során ornitinből és karbamil-foszfátból citrullin keletkezik az **ornitin-transzkarbamiláz** jelenlétében. A citrullin ezután transzport folyamattal elhagyja a mitokondriumot és a citoplazmában aszpartáttal kondenzálódik, a reakciót az **argininoszukcinát-szintetáz** katalizálja. A reakció nem megfordítható, mert az energiát szolgáltató ATP → AMP átalakulás után a pirofoszfátot a pirofoszfatáz elbontja. A termék, az **argininoszukcinát-liáz** jelenlétében, fumarátra és argininre bomlik. A reakciók eddig az arginin szintéziseként



2-190. ábra. Az ornitinciklus

is felfoghatók. Az arginin ezután argináz jelenlétében ureára és ornitinre hidrolizál. Ezen lépés jelenti lényegében az urea szintézisét, vagyis két molekula ammónia eliminációját. Érdemes megjegyeznünk, hogy bár az urea két aminocsoportja többféle aminosavból származhat, azok **glutamáton** és **aszpartáton** keresztül kerülnek az ornitinciklusba. Az urea ezután a citoszolból a vérkeringésbe kerül, majd a vese kiválasztja. A vizeletben ürülő nitrogén 86%-át az urea szolgáltatja, míg a többit a kreatinin, ammónia, urát és egyéb. Az ornitin ezután a citoplazmából visszakerül a mitokondriumba, és ott egy újabb citrullinszintézisben vesz részt. Ezzel a lépéssel zárul a ciklus, s mint látható, az ornitin hasonló szerepet tölt be az ornitinciklusban, mint az oxálecetsav a citrátkörben.

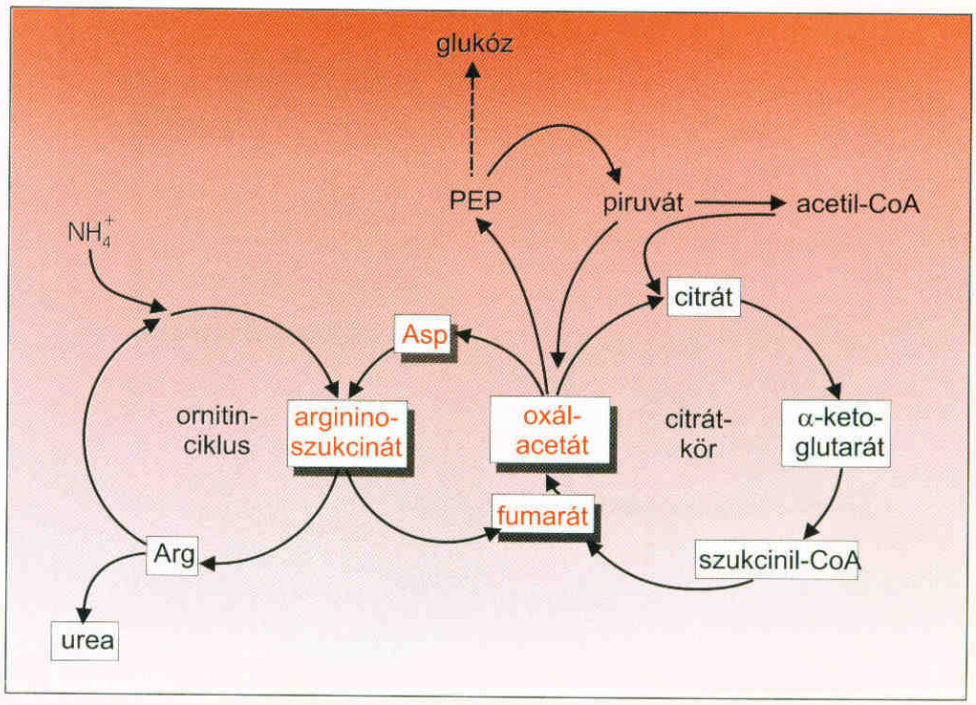
Az arginin azonban nem feltétlenül alakul át ureává, hanem felhasználódhat más reakciókra is a szervezetben. Ilyenkor a ciklus működéséhez (az ammónia eltávolításához) az ornitint de novo szintetizálni kell. Az ornitin glutamátból történő szintézise azonban lassú, aminek eredményeként, ha a ciklus argininszintézisre (nem ureaszintézisre) használódik, csak akkor elégséges az argininszükséglet fedezésére, ha a szervezetben nem folyik gyors fehérjeszintézis. Ezért terhességben vagy például növekedésben az arginint a táplálékkal kell biztosítani (szemiesszenciális).

Azzal, hogy az ureaszintézishez aszpartátra van szükség, az ornitinciklus szorosan kapcsolódik a citrátciklushoz, mert az aszpartátot az oxál-acetát glutaminnal történő transzaminálása szolgáltatja *(2-191. ábra)*. Minthogy lebomlásuk során a többi aminosav is bekerülhet a citrátkörbe, éhezés következtében nemcsak a Glu és Asp, hanem egyéb aminosavak is felelősek lehetnek az ornitinciklus fenntartásáért.

Az ureaszintézis szabályozása

Az urea szintézisének semmiféle direkt feedback szabályozása nem ismert (csak nagyon magas ureakoncentráció – ami uraemiában fordulhat elő – gátolja az argininoszukcinát-liázt). Mégis, akkor mi szabályozza az urea és a vérplazma ammóniaszintjét?

Enzimológiailag az ornitinciklus reakciói közül a leglassúbb a karbamil-foszfát képződése, vagyis ez a sebesség meghatározó reakció, amelyet a **karbamil-foszfát-szintetáz** katalizál. Tehát az enzim aktivitását befolyásoló tényezők szabályozhatják az ornitinciklust és így az ammónia eliminációját. Az ornitinciklus nyilvánvaló szubsztrátjai az ammónia, a bikarbonát és az aszpartát. Ezek a vegyületek azonban in vivo nem jelentik az ureaszintézis kezdetét, hisz ezek az ami-



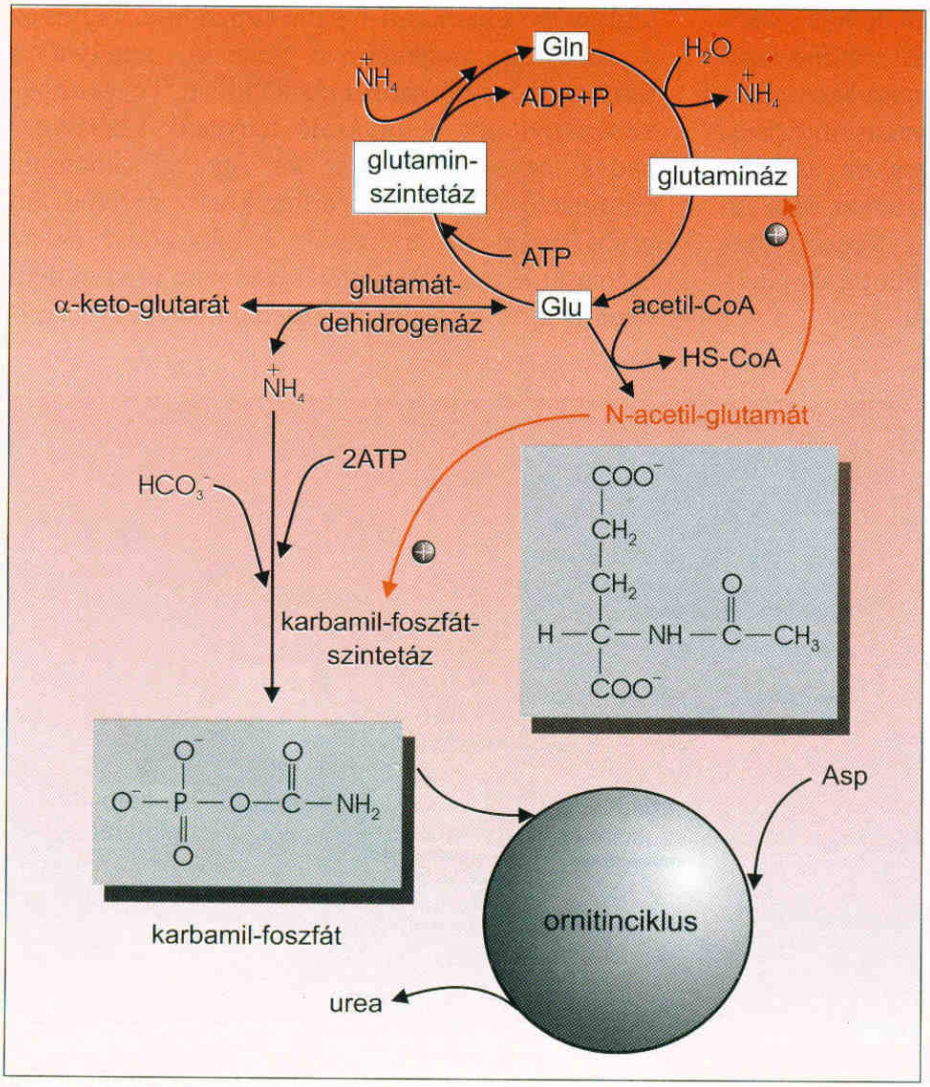
2-191. ábra. Az ornitinciklus a citrátkörhöz kapcsolódik. *PEP: foszfoenolpiruvát. Az ábra könnyebb áttekinthetősége céljából nem tüntetjük fel, hogy az oxál- acetát maláttranszporttal kerül a mitokondriumból a citoplazmába (lásd a 2.2. fejezetet)*

nosavak degradációjának közti termékei. Vagyis az ornitinciklus egyik szabályozási lehetősége, az ammónia mennyiségének változása, ami függ az aminosavak mennyiségétől (proteolízis és transzportfolyamatoktól és azok szabályozásától), illetve az aminosavszintézis és -degradáció arányától. Ami a karbamil-foszfát-szintetáz aktivitását módosító faktorokat illeti, a legismertebb az **N-acetil-glutamát**, amely a karbamil-foszfát-szintetáz allosztérikus aktivátora. Az enzim maximálisan aktív, ha 1 mol enzimhez 1 mol aktivátor kötődik. Az N-acetil-glutamát nemcsak a karbamil-foszfát-szintetáz aktivátora, hanem a **glutaminázé** is *(2-192. ábra)*. Az N-acetil-glutamát glutamátból szintetizálódik:

$$Glu + Acetil\text{-}CoA \rightarrow N\text{-}acetil\text{-}Glu + HS\text{-}CoA$$

A reakciót a mitokondriális **N-acetil-glutamát-szintetáz** katalizálja. Az N-acetil-glutamát koncentrációja függ az arginin koncentrációjától is, mert az N-acetil-glutamát-szintetáz egyik leghatásosabb aktivátora az arginin. Már 10 μmol/l argininkoncentrációnál az enzim maximálisan működik.

Mi történik tehát, ha pl. az NH_4^+ koncentrációja megnő? A magasabb szubsztrátkoncentráció következtében több glutamát, N-acetil-glutamát és glutamin képződik (lásd a 2-192. ábrát). A magasabb N-acetil-glutamát-koncentráció növeli a karbamil-foszfát-szintetáz aktivitását, aminek eredményeként több ammónia alakul át ureává (felgyorsult ureaszintézis). A fokozott ornitinciklushoz megnövekedett Asp-fogyasztás társul és ez ugyancsak az NH_4^+-csökkenés irányába hat. Végeredményként az ammóniaszint visszaáll eredeti értékére.

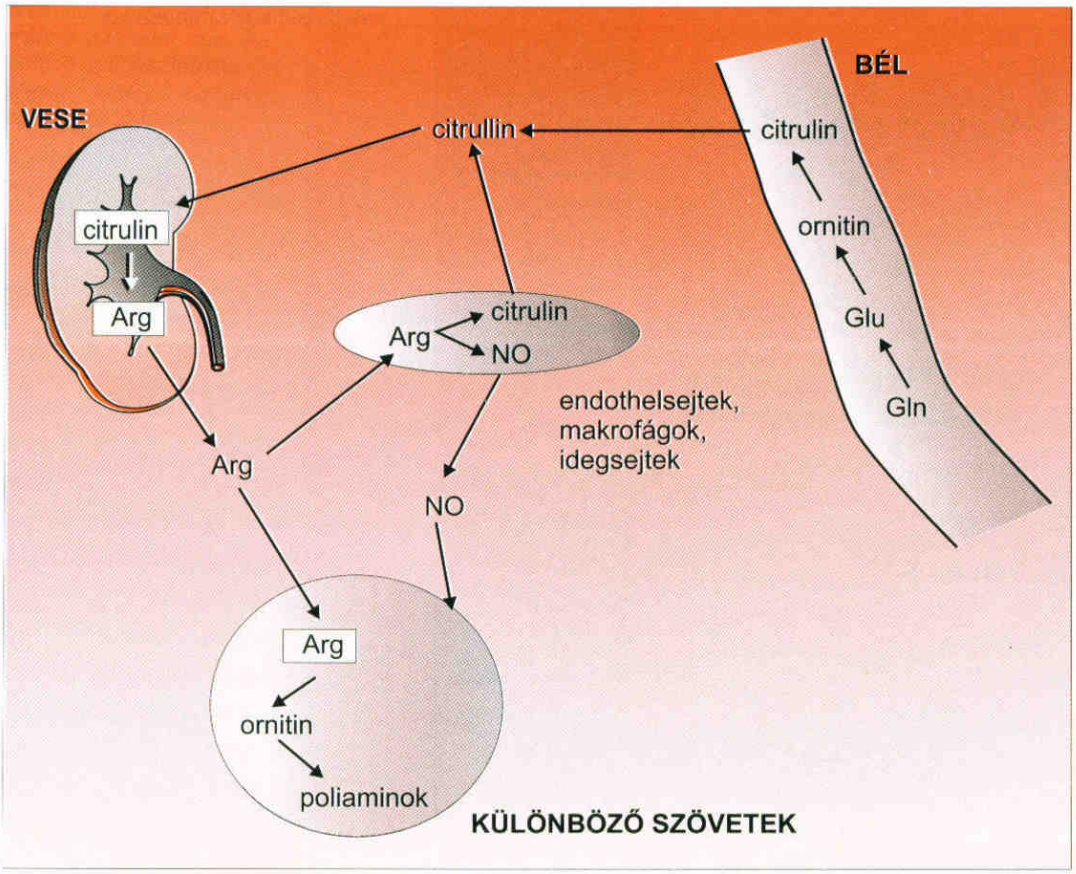


2-192. ábra. Az N-acetil-glutamát hatásai

Bár az ureaszintézis teljes enzimrendszere csak a májban működik, az ornitinciklus egyes enzimei megtalálhatók más szövetféleségekben is. N-acetil-glutamát-szintetáz, karbamil-foszfát-szintetáz és ornitin-karbamil-transzferáz a vékonybél mucosájában citrullin szintézisét teszi lehetővé, az argininoszukcinát-szintetáz és -liáz a vesében citrullinból arginint készít, az argináz jelenléte pedig különböző sejtféleségekben ornitin szintéziséhez vezet, amelyből poliaminok keletkezhetnek. Az argininből két lépésben citrullin is keletkezhet, miközben nitrogén-monoxid (NO) szintetizálódik. Az utóbbi reakcióút elsősorban az endothelsejtekben, a makrofágokban és az idegrendszerben játszódik le. A különböző utak egymással kapcsolódhatnak *(2-193. ábra)*.

Az ornitinciklus fenntartása létfontosságú, hiánya nem egyeztethető össze az élettel. Így az ornitinciklus enzimdefektusait illetően csak részleges blokkokkal (például egy enzim K_M-változása) találkozhatunk. A különböző enzimek defektusait különböző nevekkel illetik (I és II típusú **hyperammonaemia**, citrullinuria, argininosuccinaturia, hyperargininaemia, argininuria stb., attól függően, hogy az ureaciklus melyik intermediere halmozódik fel nagyobb mértékben).

A defektusok legjellemzőbb közös megnyilvánulása a vér és a liquor ammóniakoncentrációjának emelkedése és a jellegzetes klinikai tünetek megjelenése (hányás, görcsök, letargia, később krónikus fázisban EEG-elváltozások, mentális retardáció). Kezelésként fehérjeszegény diétára van szükség, illetve az esszenciális aminosavaknak megfelelő ketosavak szervezetbe juttatására; ezek transzaminálása csökkenti az ammóniaterhelést és pótolja az esszenciális aminosav hiányát.



2-193. ábra. Az ornitinciklus egyes reakcióinak előfordulása különböző szövetekben

Az aminosavak szénláncának sorsa és az aminosavakból képződő nitrogéntartalmú vegyületek

Az aminosavak dezaminálásuk után részben acetoacetáttá alakulnak és zsírsav, illetve ketontest keletkezhet belőlük (**ketoplasztikus** aminosav: Leu, Lys), részben piruváttá, α-ketoglutaráttá, szukcináttá vagy oxálacetáttá alakulnak és a glukoneogenezisben vehetnek részt (**glukoplasztikus** aminosavak: Ala, Cys, Ser, Gly, Glu, Gln, His, Pro, Arg, Val, Met, Thr, Asp, Asn). Több aminosav azonban mind ketoplasztikus, mind glukoplasztikus is lehet (Trp, Tyr, Phe, Ile). Az aminosavak szénláncrészének és a glikolízis–citrátkör intermedierek találkozását a *2-194. ábra* foglalja össze.

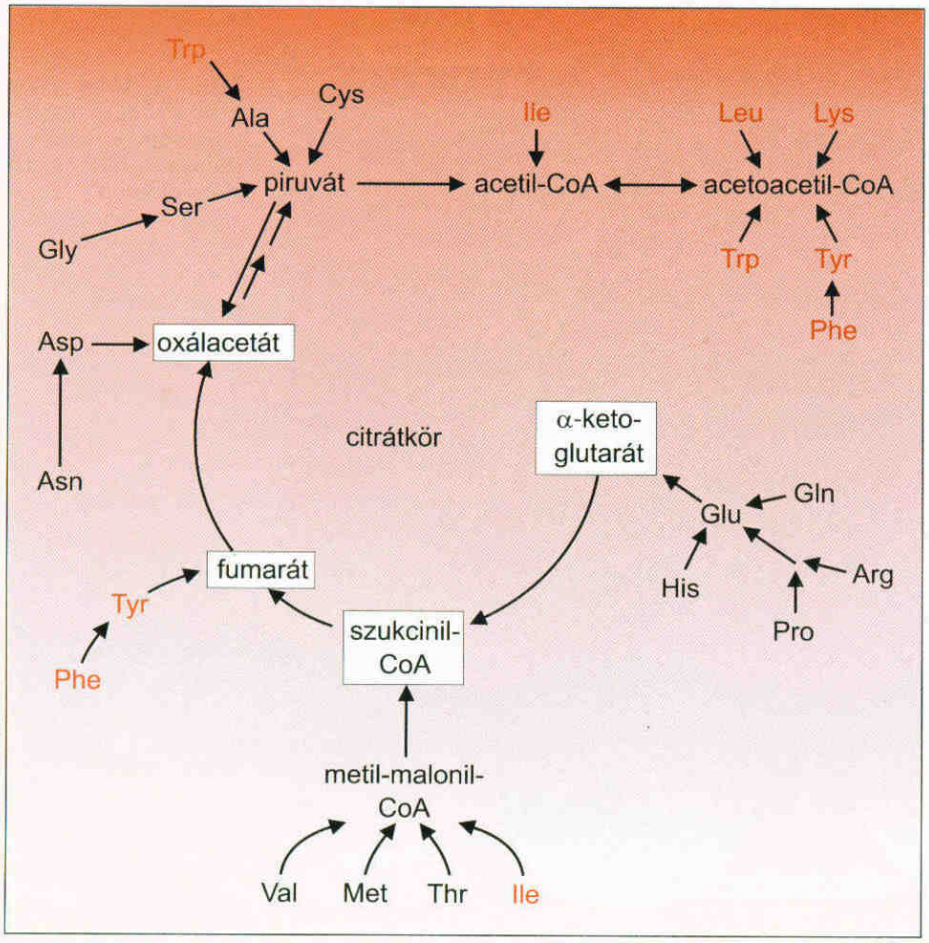
A glicin, alanin, szerin és cisztein átalakulása

Mind a négy aminosav tisztán glukoplasztikus és lebontásuk piruvát képződéséhez vezethet, bár a humán szervezetben a szerin elsősorban glicinné alakul át tetrahidrofolát jelenlétében (2-187. ábra).

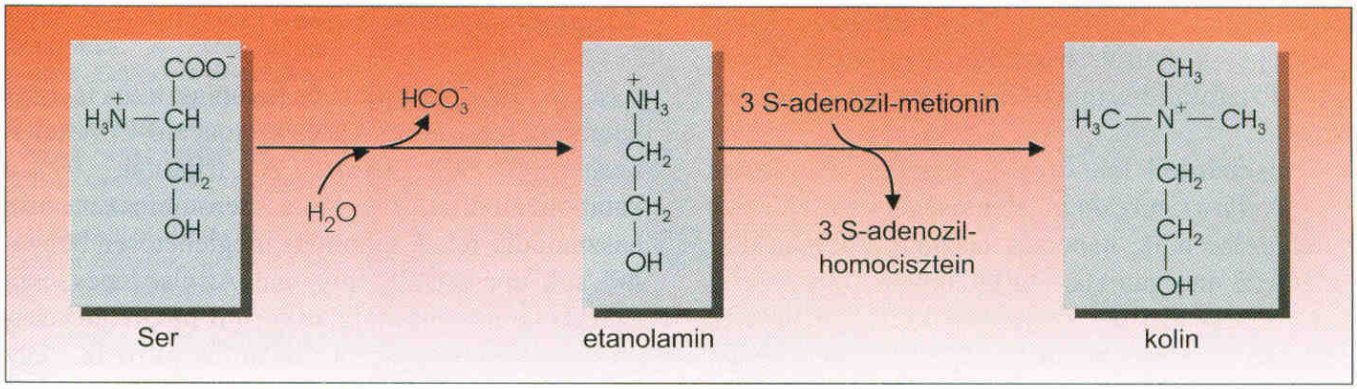
A **glicin** több speciális molekula szintézisében is részt vehet, így szükséges a glutation, a kreatin, a purinváz, a konjugált epesavak és a hem szintéziséhez is (lásd még a 2.4. és 2.5. fejezeteket is). A Gly NAD^+ és tetrahidrofolát jelenlétében HCO_3^- és NH_4^+-ra bomolhat; a megfordítható reakciót a glicin-szintáz katalizálja (2-187. ábra).

Az **alanin** transzaminálása piroszőlősav képződéséhez vezet (2-179. ábra).

A **szerin** részt vehet transzaminálási reakcióban, amelynek során hidroxi-piruváton keresztül piruváttá alakul. Szerinből történhet Gly-, Cys-, etanolamin-, betain-, szfingozin- és foszfatidil-szerin-szintézis is. Amikor szerinből kolin szintetizálódik, az első lépésben a Ser dekarboxilálódik, majd a keletkezett etanolamin metilálódik 3 molekula S-adenozil-metioninnal és kolin, illetve 3 molekula S-adenozil-homocisztein keletkezik *(2-195. ábra)*. A kolinszintézis az emberi szervezet számára nem feltétlenül szükséges, mert a táplálék általá-

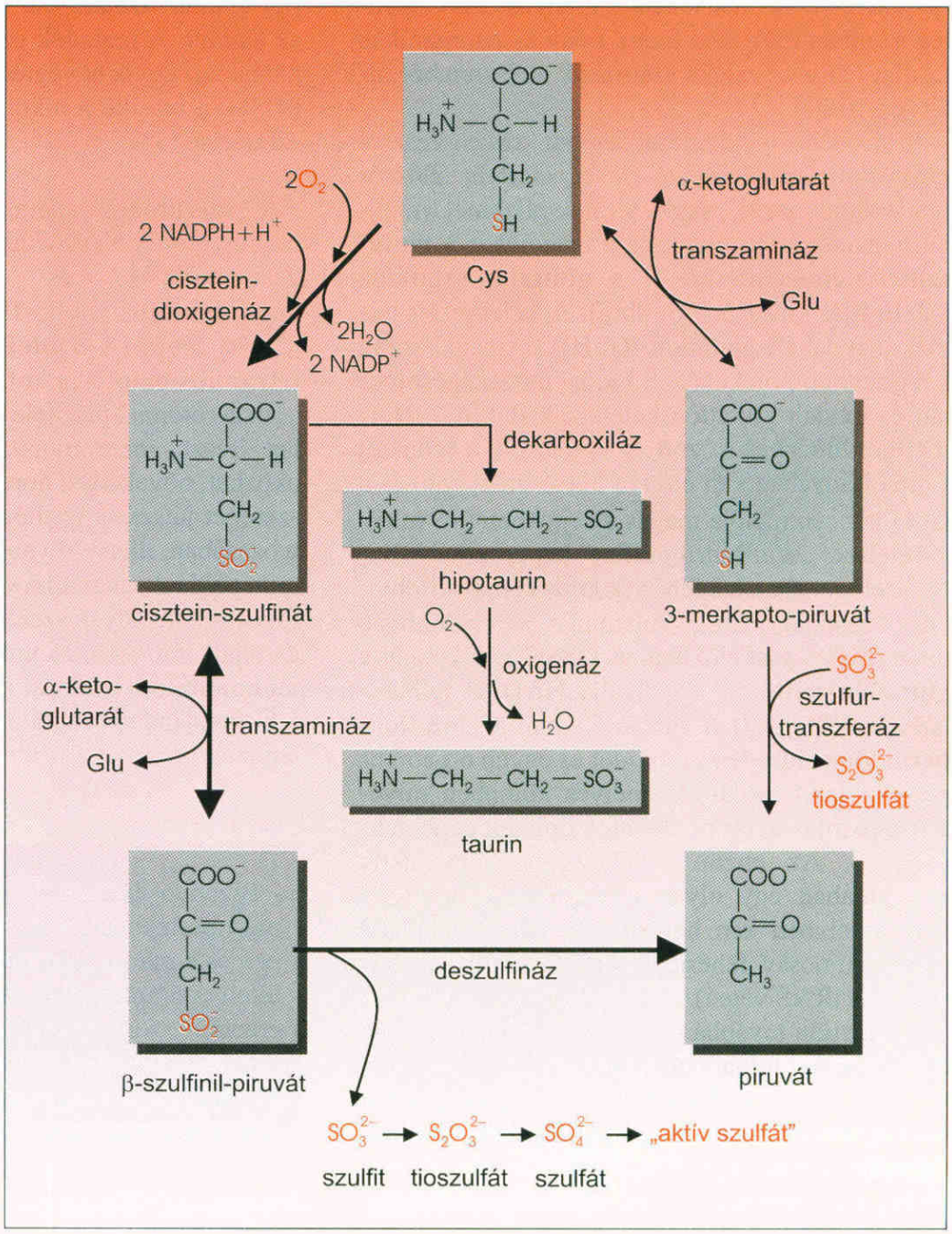


2-194. ábra. Az aminosavak szénláncának sorsa; glukoplasztikus és ketoplasztikus aminosavak



2-195. ábra. A kolin szintézise

2-196. ábra. A cisztein-katabolizmus két útja: a direkt oxidáció és a redukció. *Az oxidációs út (vastag nyíllal jelezve) a gyakoribb. A deszulfatáció enzim nélkül is gyors reakció. A szulfitból tioszulfáton keresztül szulfát keletkezik, amely két ATP-vel reagálva „aktív szulfátot" eredményez (lásd 2-244. ábrát). A 3-merkapto-piruvát redukcióját NADH-függő enzim is katalizálhatja; ilyenkor merkaptolaktát keletkezik (az utóbbit az ábrán nem tüntettük fel), amely a vizelettel ürül. Az ábrán a taurinszintézis is látható, amely cisztein-szulfinátból történik*



ban elégséges mennyiségű kolint tartalmaz. Kolin szükséges a neurotranszmitter acetilkolin és némely foszfolipid szintéziséhez (lásd a 6.1. fejezetben).

A **cisztein**ből két úton is keletkezhet piruvát *(2-196. ábra)*. A reakció jelentőségét nem a piruvát keletkezése adja, hanem a cisztein lebomlásakor keletkező anorganikus szulfát, amely aktív szulfáton keresztül a szulfáttartalmú vegyületek (heparin, kondroitin-szulfát stb.) szintéziséhez járulhat hozzá. Ilyenkor az anorganikus szulfát először ATP-vel reagál és **3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát** („aktív szulfát") keletkezik (lásd még a 2.5. fejezetet is). Jelenleg azonban még nem tudni, hogy az anorganikus szulfát hány százaléka származik a ciszteinből, illetve a bélből.

A cisztein a glicinnel együtt részt vesz a **glutation** szintézisében is. A cisztein először glutamáttal reagál, majd a termék glicinnel (mindkét reakció ATP-igényes); a reakciókat a **glutamil-cisztein-szintetáz** és a **glutation-szintetáz** katalizálják (lásd 2-175. ábra). A keletkezett termék a redukált glutation (GSH). Oxidáció során két glutationmolekula S-S híddal összekapcsolódhat és oxidált glutation keletkezik (GSSG). Normál körülmények között az egyensúly a redukált forma irányában van eltolva 500:1 arányban, és a GSH koncentrációja magas a sejtekben (~5 mM). A rendszer „szulfhidril puffert" képez, amely fontos szerepet játszik a fehérjék korrekt diszulfidhídjai kialakításában, valamint a különböző detoxikációs reakciókban. A GSSG redukcióját a **glutation-reduktáz** katalizálja NADPH felhasználásával. A GSH oxidációja során a **glutation-peroxidáz** hidrogén-peroxidot és egyéb organikus peroxidokat bonthat el, amelyek különben súlyosan károsítják a sejtmembránok lipidjeit és a fehérjéket is. Az enzim érdekessége, hogy aktív centrumában egy olyan ciszteinszerű aminosav van, amelyben kén helyett szelénatom található (ezen aminosav fehérjébe történő szállítását egy speciális tRNS végzi).

A glutation továbbá részt vesz a májban történő detoxikációs folyamatokban is, amelyek során metabolitok vagy oldhatatlan és a szervezetre káros vegyületek kiválasztásra kerülhetnek (lásd 2.6. fejezet).

A triptofán katabolizmusa

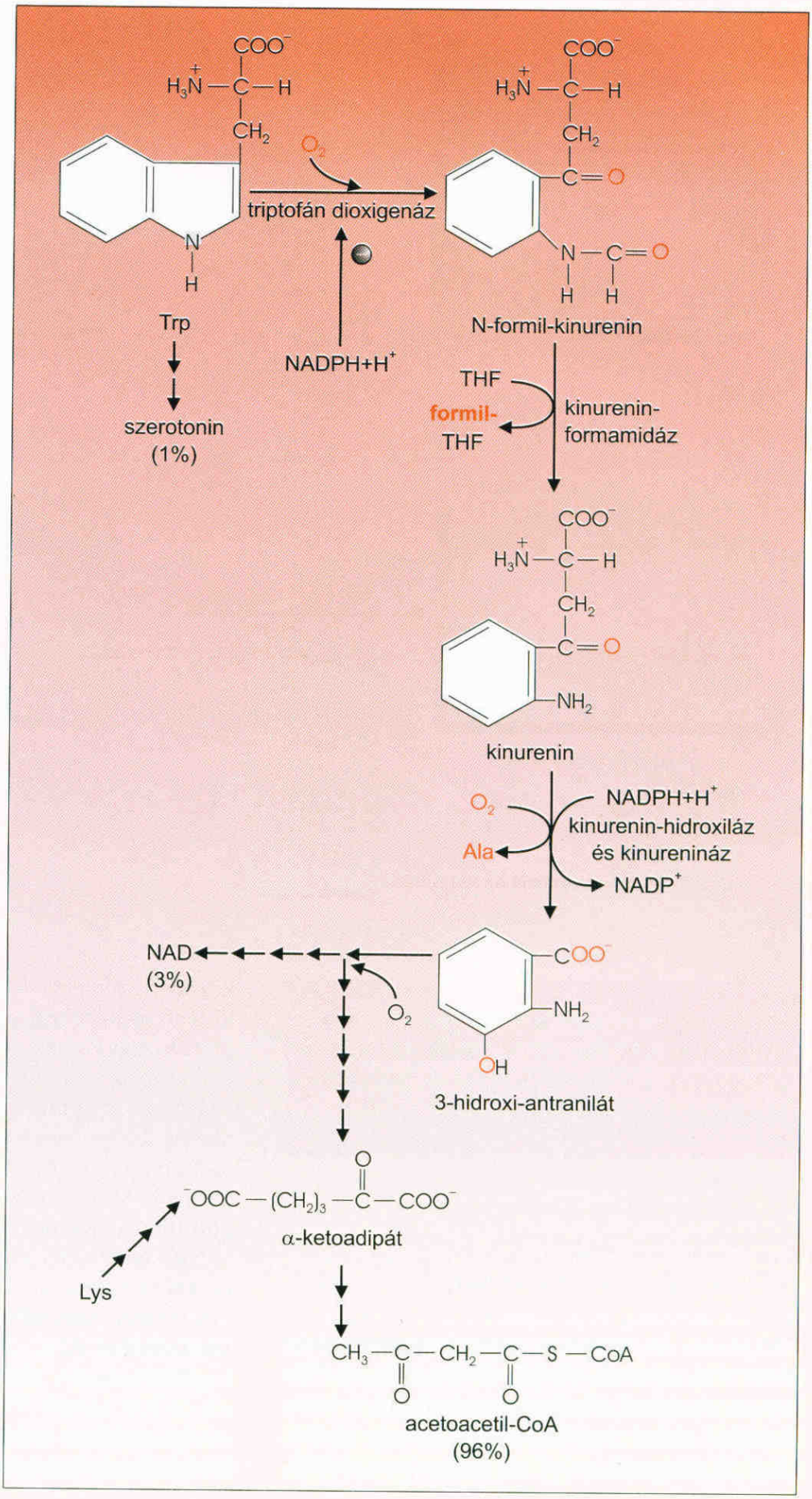
A Trp glukoplasztikus és ketoplasztikus is, mert katabolizmusa során Ala és acetoacetil-CoA keletkezhet *(2-197. ábra)*. A triptofán 99%-a katabolizálódhat, míg 1%-a szerotoninszintézisre használódik fel. A lebomlás meglehetősen bonyolult, sok lépésből álló folyamat. Az első lépés során az indolgyűrű bomlik fel és formil-kinurenin keletkezik. A reakciót a triptofán-pirroláz, egy dioxigenáz enzim katalizálja. A második lépésben kinurenin keletkezik, miközben a formilcsoport tetrahidrofolátra kerül. Ezután a kinurenináz (B_6-vitamin-kofaktorral működő enzim) lehasítja az alanint. A reakciók ezután két irányban haladhatnak; az egyik út végterméke az acetoacetil-CoA (97%), a másiké a nikotinsavamid, illetve NAD^+ szintézise (3%).

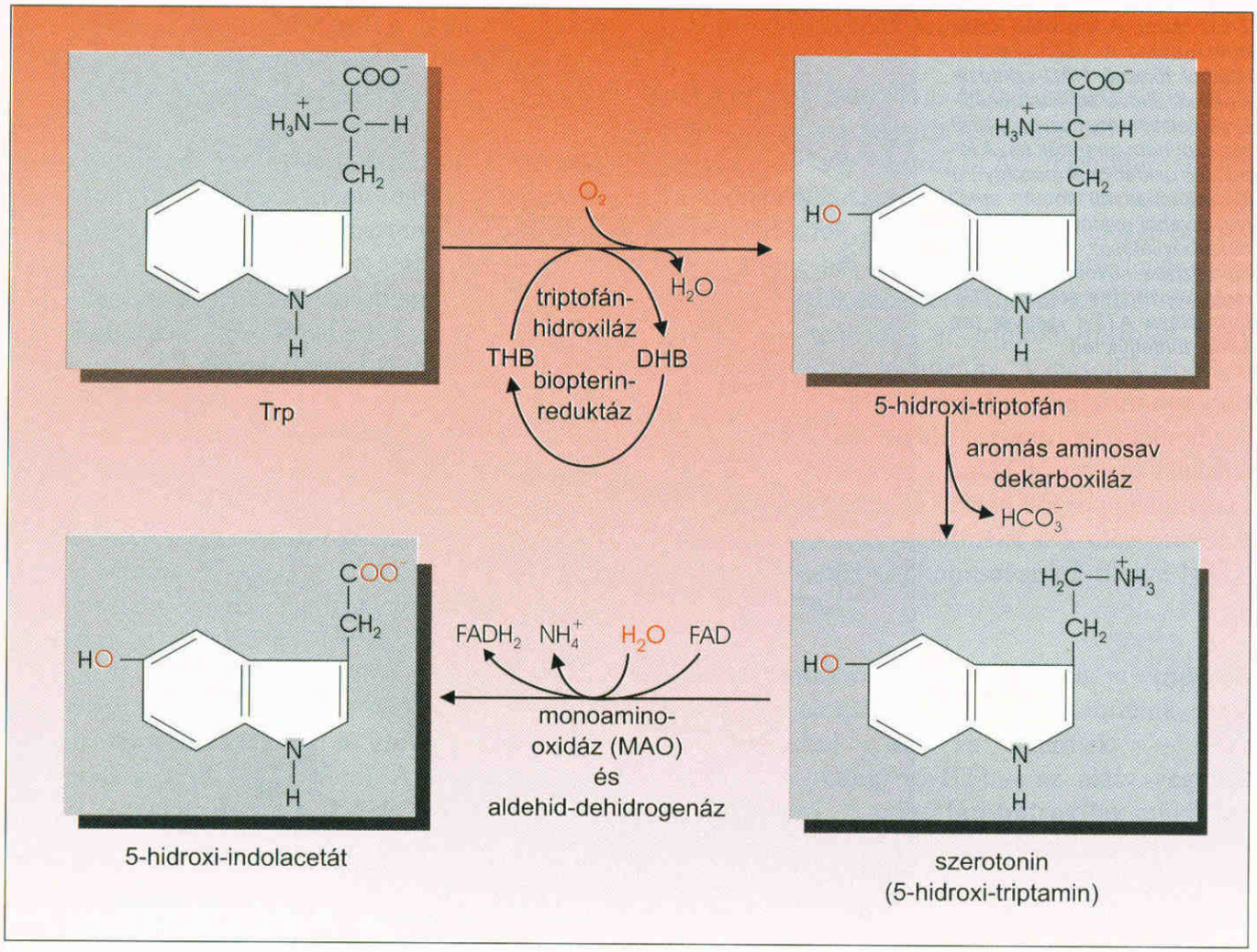
A **szerotonin** szintézise során a triptofán indolgyűrűjén először hidroxilálás történik, majd dekarboxilálás, és a termék – az 5-hidroxi-triptamin (5-HT) – az aktív vegyület *(2-198. ábra)*. A **triptofán-hidroxiláz** működése **tetrahidrobiopterin** kofaktorhoz kötött.

A szerotonin különféle biológiai reakciókban vehet részt; neurotranszmitter, vazokonstrikciót okozhat, növekedési hormon szekréciót válthat ki, szerepet játszik a testhőmérséklet és alvás szabályozásában, illetve olyan pszichés folyamatokban, mint például a hangulat vagy hallucináció. Hatását fokozni lehet olyan szerekkel, amelyek elbomlását gátolják, ún. MAO-inhibitorokkal. A szerotonin **monoamino-oxidázzal** (MAO) dezaminálódik és 5-hidroxi-indolacetáttá alakul át, amely biológiailag inaktív.

Bizonyos betegségekben a szerotonin szintje nagymértékben megnőhet az emberi szervezetben és a már fent említett változásoknak megfelelő szimptómákat okozhatja. Bizonyos bél eredetű rosszindulatú daganatokban, pl. argentaffinoma, a triptofán 60%-a (a normális 1% helyett) szerotoninná alakul. Az ilyen betegeken fokozott vazomotoros reakciók észlelhe-

2-197. ábra. A triptofán katabolizmusa. *A hidroxi-antranilátból történő NAD-szintézis lépéseit, illetve az acetoacetil-CoA keletkezéséhez vezető 8 reakciót nem tüntettük fel. A lebomlás oxidációval (pirrolgyűrű felszakadásával) indul, amelyet további oxidációs lépések, dekarboxilálások, redukciók és hidrolízisek követnek. A kinurenin képződése során a THF formilálása ATP-t igényel (az ábrán tüntetjük fel)*





2-198. ábra. Szerotoninszintézis és -lebontás

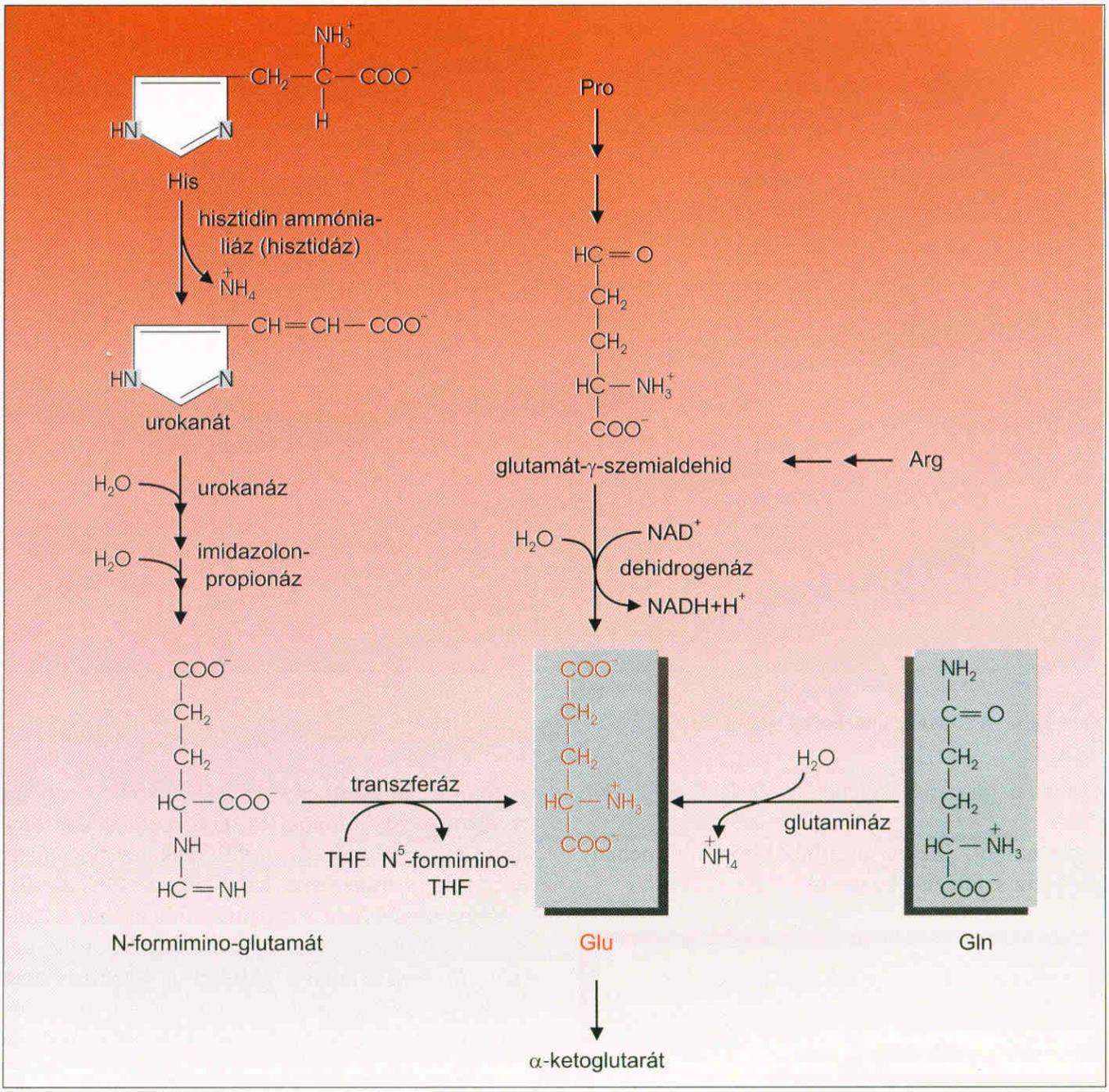
tők (rohamszerű kipirulás, tachycardia, fokozott bélperisztaltika stb.), amelyhez még a csökkent NAD^+-szintézis miatt pellagraszerű tünetek is társulhatnak.

A glutamin, prolin, arginin, hisztidin és glutamát átalakulása

Mind az öt aminosav glukoplasztikus, mert glutamáttá történő átalakulásuk után a Glu transzaminálással, illetve dezaminálással, α-ketoglutaráttá alakul, amely a citrátkör tagja *(2-199. ábra)*. A **glutamát**, mint már többször említettük, központi szerepet játszik az aminosavak egymásba történő átalakulásában, a Gla (gamma-karboxi-glutaminsav) képződésben (lásd 6.5. fejezet), az aminosavak transzportjában, a glutationszintézisben és az ornitinciklusban. A Glu a központi idegrendszer legjelentősebb excitátoros neurotranszmittere és belőle szintetizálódik egy másik, de gátló neurotranszmitter, a GABA. A Glu **glutamát-dekarboxiláz** katalízisével dekarboxilálódik és így egy lépésben gamma-aminobutirát **(GABA)** keletkezik *(2-200. ábra)*.

A GABA inaktiválódása két lépésben történik a transzamináz és a szukcinát-szemialdehid-dehidrogenáz enzimek katalízisével szukcinát keletkezik (2-200. ábra).

A **glutamin** az amidcsoportját átadhatja többféle molekulának, miközben glutamát keletkezik; így

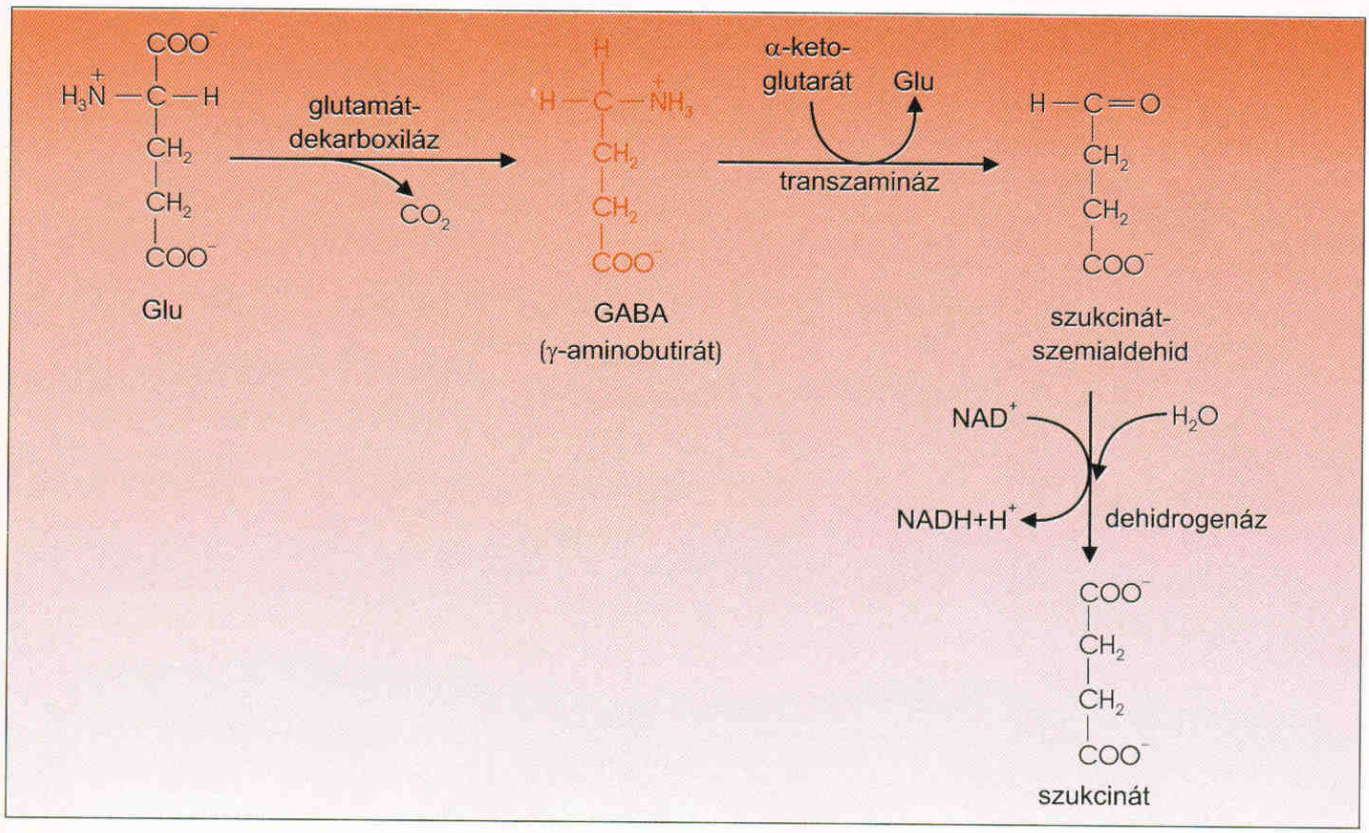


2-199. ábra. Az arginin, a prolin, a hisztidin és a glutamin glutamáton keresztüli katabolizmusa *(lásd még a 2-184. ábrát is)*

vesz részt a purin és pirimidin nukleotidok szintézisében (lásd a 2.5. fejezetben), illetve aminosavak képződésében. A Gln amidcsoportjának eltávolítása szabad ammónia keletkezéséhez is vezethet, miközben glutamát keletkezik; a reakciót a **glutaminász** katalizálja (2-199. ábra).

A **prolin** lebomlása három lépésben glutamát-gamma-szemialdehid intermedieren keresztül glutamátképződéshez vezet (2-199. és 2-184. ábra).

Az **arginin** lebomlása is a glutamát-gamma-szemialdehid intermedieren keresztül vezet glutamátképződéshez. Az Arg először **argináz** katalízisével ornitinné alakul (lásd ornitinciklus), amelyet azután egy transzaminálási lépés követ. Végeredményben egy ornitin és egy α-ketoglutarátból két



2-200. ábra. A GABA szintézise és lebontása

molekula glutamát keletkezik (2-199. és 2-184. ábra).

Argininből, illetve ornitinből történik néhány poliamin szintézise is, így pl.

putreszciné	$H_3\overset{+}{N}\text{-}(CH_2)_4\text{-}\overset{+}{N}H_3$
spermidiné	$H_3\overset{+}{N}\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH\text{-}(CH_2)_3\text{-}\overset{+}{N}H_3$
sperminé	$H_3\overset{+}{N}\text{-}(CH_2)_3\text{-}NH\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH\text{-}(CH_2)_3\text{-}\overset{+}{N}H_3$

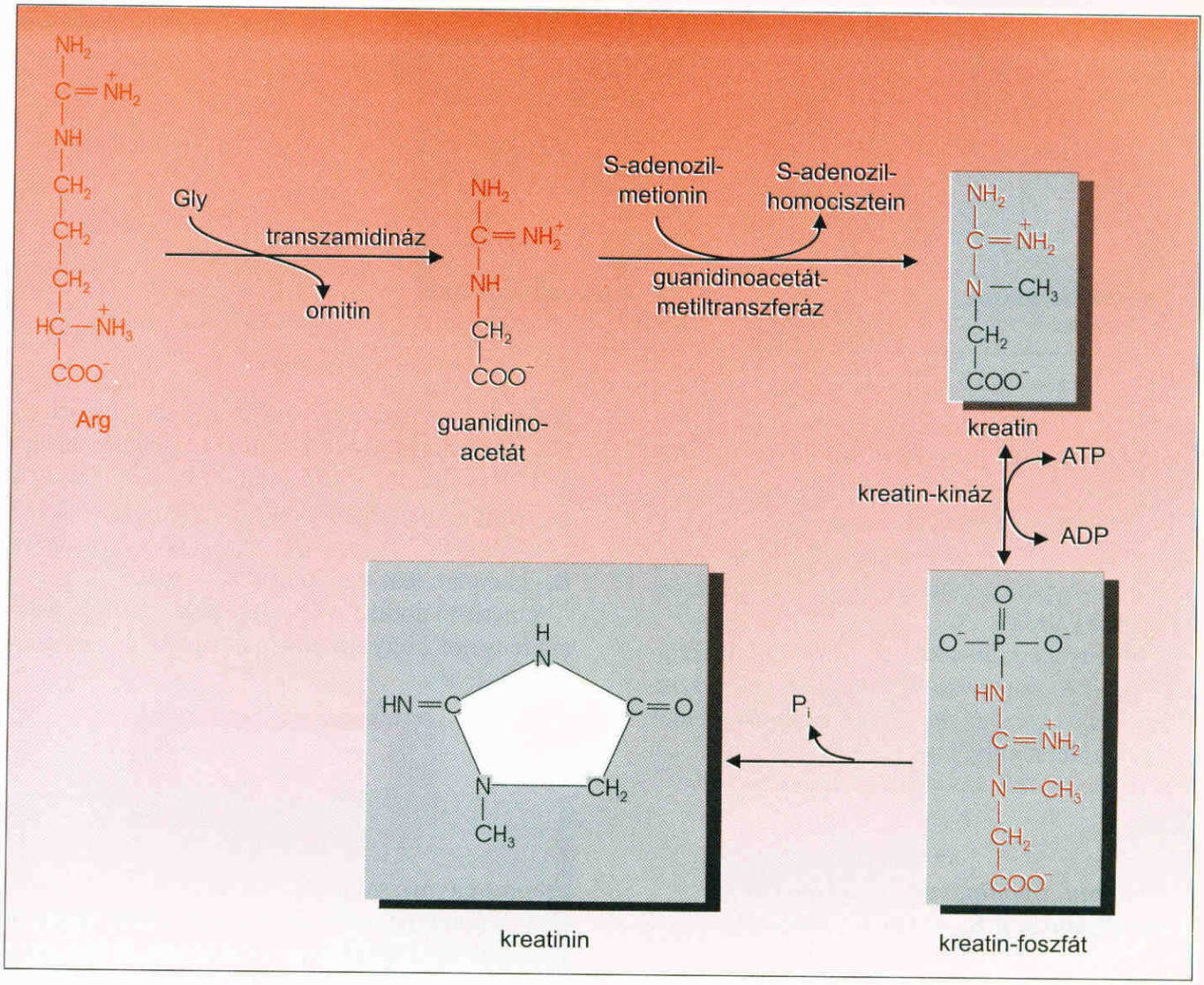
A poliaminok eukariótákban növekedési faktorként szerepelhetnek, és részt vesznek a sejtnövekedés és -proliferáció szabályozásában, de pontos biokémiai szerepük és jelentőségük ma még nem ismert.

Az arginin más biológiailag jelentős speciális molekulák szintézisének is kiindulópontja; Arg-ból szintetizálódik a **kreatin**, illetve kreatin-foszfát. A kreatinszintézis első lépése transzamidinálás, amelynek során Arg és Gly-ből guanidino-acetát keletkezik a vesében, majd a májban S-adenozil-metioninnal történő metilezéssel kreatin szintetizálódik. Ez utóbbi reakciót guanidino-acetát-metil-transzferáz katalizálja *(2-201. ábra)*.

Végeredményben a kreatin szintéziséhez 3 aminosav szükséges: Arg, Gly és Met. A kreatin ezután foszforilálódhat ATP-vel a **kreatin-kináz** hatására. A keletkezett savamidkötés magas csoportátviteli potenciálja révén energiát tárol. A reakció megfordítható. Elsősorban az izomban és az agyban játszik szerepet a gyors ATP-reszintézisben. A kreatin spontán gyűrűvé záródhat (ez a nem enzimatikus reakció elsősorban az izomban történik) és az így képződött **kreatinin** (2-201. ábra) a vizeletben jelenik meg.

A vesében történő kiválasztás („kreatinin-clearence") klinikailag jól felhasználható a vesefunkció diagnosztikájában.

Az arginin átalakulásával kapcsolatban végezetül meg kell említenünk, hogy Arg-ből történik a



2-201. ábra. A kreatin-foszfát szintézise és átalakulása kreatininné

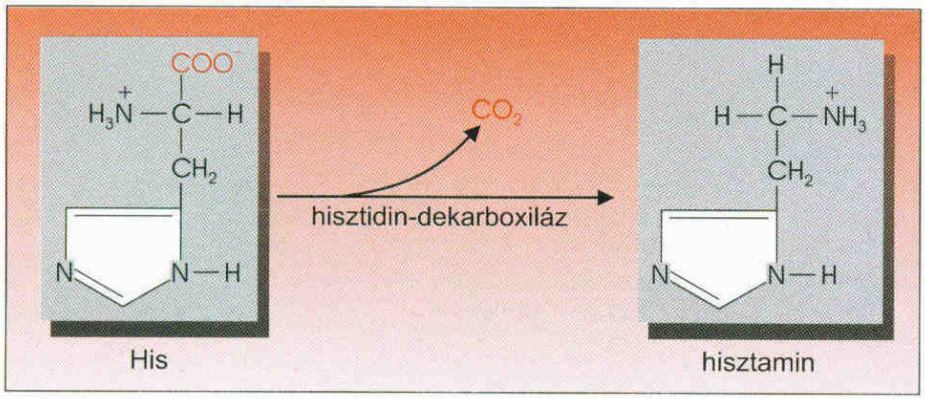
nitrogén-monoxid (NO) képződése is, amelyről részletesen az 5. fejezetben szólunk.

A **hisztidin** katabolizmusa szintén glutamát képződéséhez vezet. Az első lépésben **hisztidáz** (hisztidin-liáz) dezaminálja a hisztidint, majd az **urokanáz** által katalizált H_2O beépülést követően az imidazolgyűrű hidrolízisével N-formiminoglutamát keletkezik mint köztitermék. Ez utóbbi egy formiminocsoport tetrahidrofolátnak történt átadásával glutamáttá alakul (2-199. ábra).

A hisztidáz enzim defektusa histidinaemiát eredményez, amelynek érdekes tüneti megnyilvánulása, hogy jellegzetes beszédzavarok lépnek fel.

A hisztidin dekarboxilálása **hisztamin** képződéséhez vezet *(2-202. ábra)*. A reakciót a **hisztidin-dekarboxiláz** katalizálja több sejtféleségben is, így tüdőben, gyomorban, de legfőképpen a hízósejtekben. Normál körülmények között a hisztamin a májban metilálással és oxidációval inaktiválódik.

A hisztamin különböző fiziológiás és patológiás hatással rendelkezik: érfaldilatációt okoz a kapillárisokban, amely helyi oedemák kialakulását eredményezi, illetve vérnyomáscsökkenéssel, súlyos esetben shock kialakulásával járhat. A bronchusokban konstrikciót vált ki, a



2-202. ábra. A hisztamin szintézise

gyomorban HCl-szekréciót stimulál. Allergiás reakciók, illetve anaphylaxia során is hisztamin szabadul fel. Az orvosi beavatkozás egyik gyakori eszköze pl. allergiás reakcióban, vagy gyomor-hyperaciditasban a hisztaminreceptorok blokkolása.

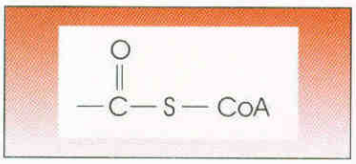
Növényekben hisztidinből történik az ergotalkaloidok szintézise is, amelyek gyógyszerként használva az uterus simaizomsejtjeinek kontrakcióját váltják ki.

A metionin, treonin, valin és az izoleucin katabolizmusa: a B_{12}-vitamin szerepe

Mind a négy aminosav lebomlásában közös, hogy **metil-malonil-CoA,** illetve **szukcinil-CoA** képződéséhez vezet (2-194. és *2-203. ábra*) és ilyen értelemben glukoplasztikus aminosavak. Az izoleucin katabolizmusa során azonban acetil-CoA is keletkezik, ezért ez az aminosav egyaránt glukoplasztikus és ketoplasztikus.

A **metionin** katabolizmus kezdeti lépései megegyeznek a Cys szintézisével (2-188. ábra), melynek során α-ketobutirát keletkezik. Ugyancsak α-ketobutirát keletkezik a Thr-ből, úgy hogy dezaminálódik a treonin-dehidratáz hatására. Az α-ketobutirát oxidatív dekarboxilálás után propionil-CoA-vá alakul. Az Ile-ből több lépés után szintén propionil-CoA is képződik. Ezután a propionil-CoA-karboxiláz katalízise révén metil-malonil-CoA-vá alakul át. Ugyancsak metil-malonil-CoA keletkezik a valinból több intermedieren keresztül. A metil-malonil-CoA átalakulása szukcinil-CoA-vá már közös reakció mind a négy aminosav anyagcseréjében (2-203. ábra). A reakciót a **metil-malonil-CoA-mutáz** katalizálja, amelynek B_{12}-vitamin (kobalamin) a kofaktora. A B_{12}-vitamin azonban önmagában nem funkcionál; csak akkor lesz reaktív, ha ATP-vel reagálva **B_{12}-koenzim** lesz belőle *(2-204. ábra)*.

A metil-malonil-CoA-mutáz által katalizált reakció lényege, hogy a metil-malonát egyik hidrogénatomja és a



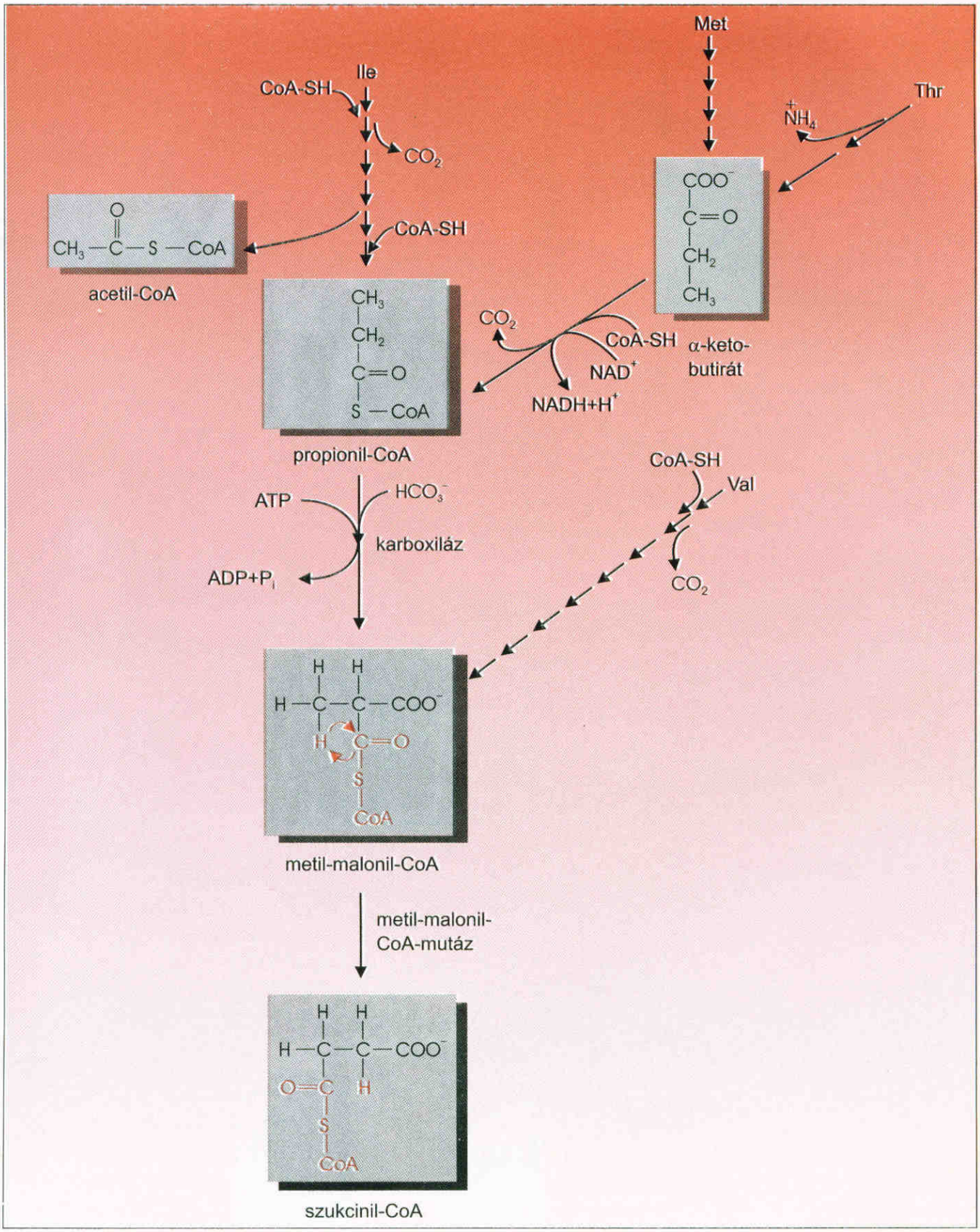
csoport egymással helyet cserélnek (2-203. ábra). Ezen intramolekuláris átrendeződés több lépésben játszódik le (a részleteket nem mutatjuk be), amelyekben a mutáz enzimhez (a kobaltionon keresztül) kapcsolt B_{12}-koenzim adenozinjának 5'-szénatomja (2-204. ábra) kulcsszerepet játszik.

B_{12}-vitamin a kofaktora még a homocisztein-metil-transzferáz enzimnek az S-adenozil-metionin-ciklusban (2-182. ábra). A B_{12}-vitamin anyagcserezavarai és annak következményei a 2.5. fejezetben kerülnek ismertetésre.

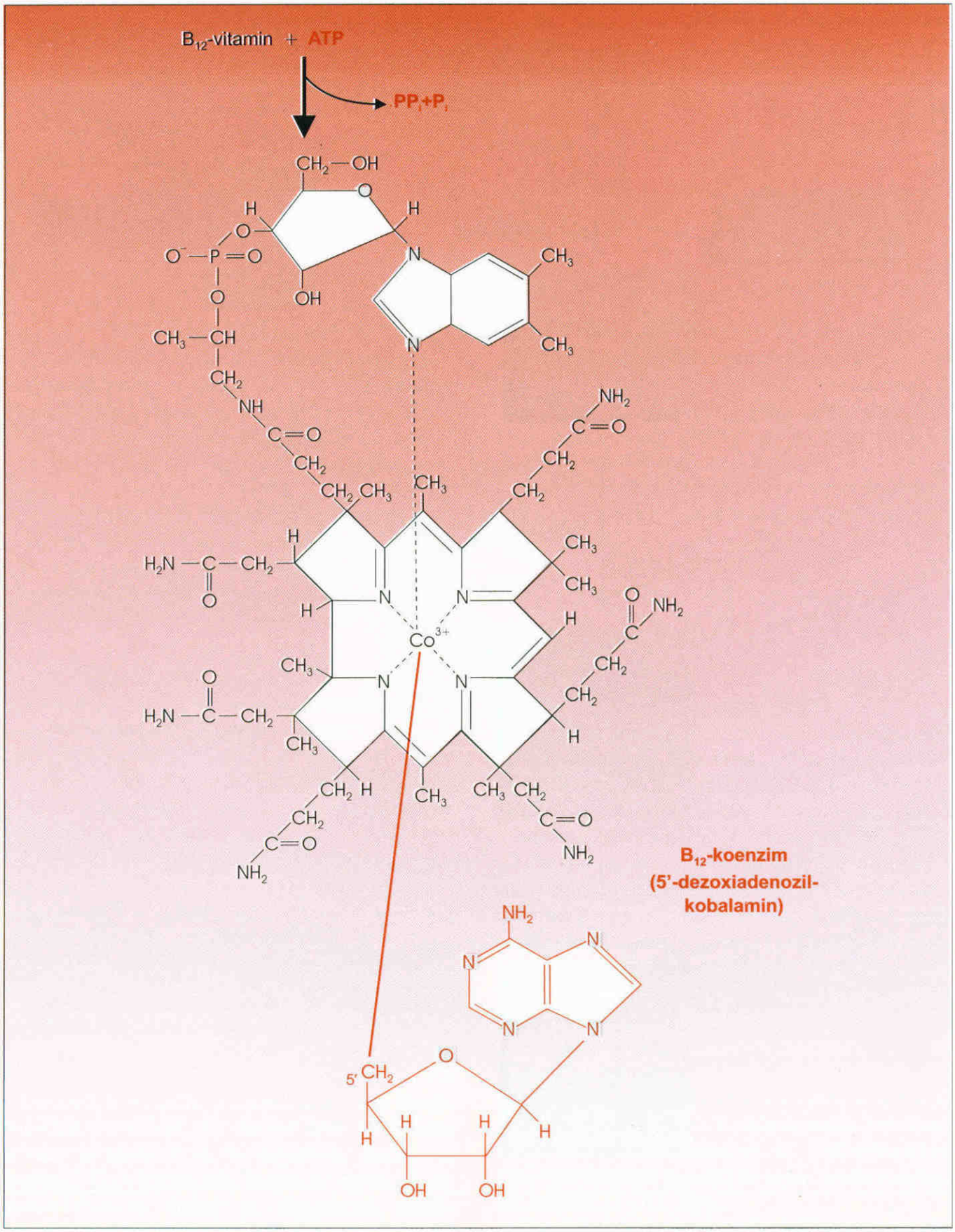
A fenilalanin és tirozin katabolizmusa

A **fenilalanin** katabolizmusa a Tyr képződésével kezdődik (2-185. ábra). Ezután mindkét aminosav sorsa közös; ketoplasztikus és glukoplasztikus aminosavak, mert fumarát és aceto-acetát keletkezik belőlük *(2-205. ábra)*.

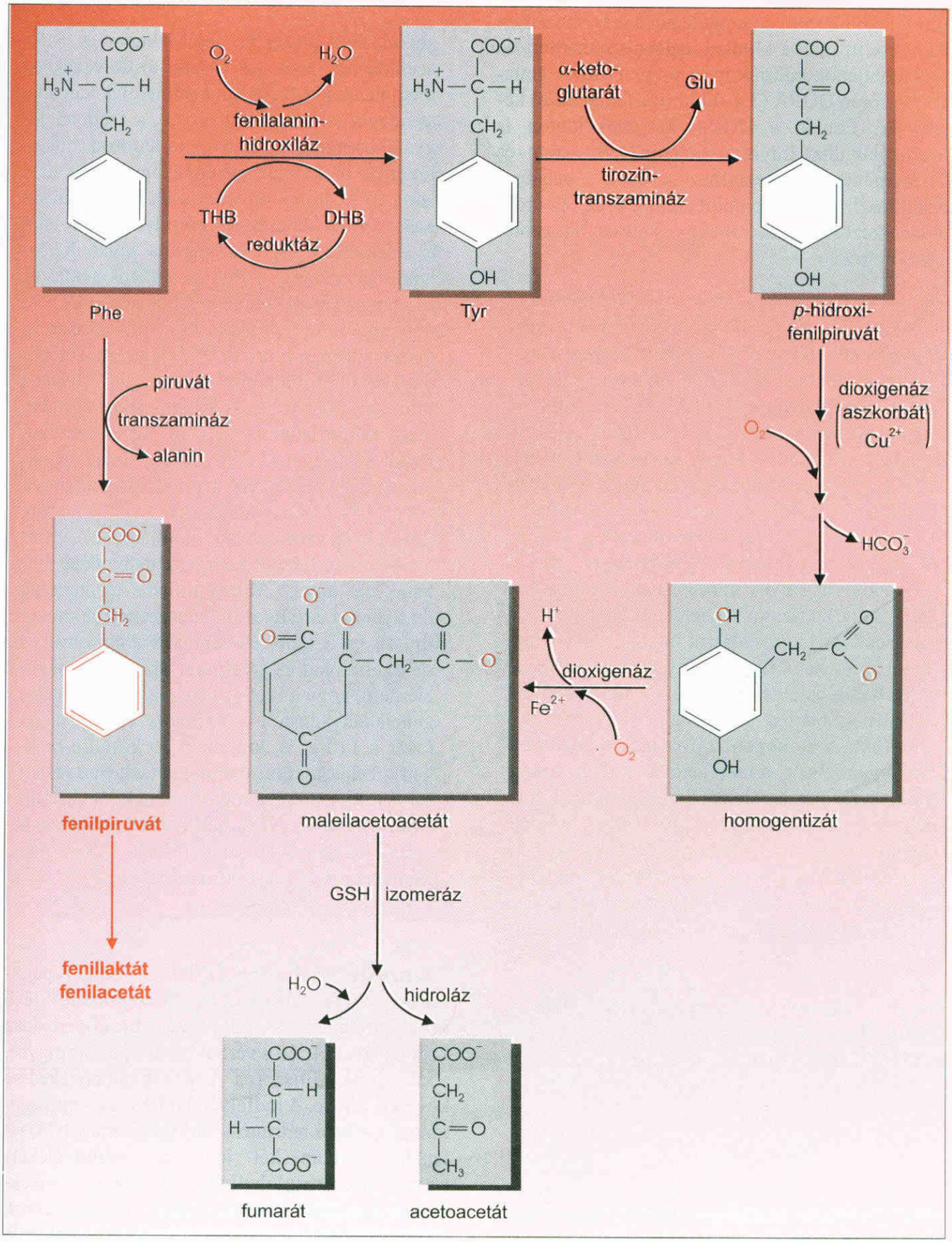
Tirozinból történik a **katecholaminok**, a **tiroxin** és a **melanin** szintézise. A katecholaminok (a dopamin, a noradrenalin és az adrenalin) szintézi-



2-203. ábra. Aminosavak, amelyek lebontása szukcinil-CoA képződéséhez vezet. *Mind a négy aminosav (Met, Thr, Val, Ile) számos reakción keresztül (a könnyebb áttekinthetőség céljából nem tüntetjük fel) metil-malonil-CoA szintéziséhez vezet. Ezután a metil-malonil-CoA szukcinil-CoA-vá alakul át. A reakciót a metil-malonil-CoA-mutáz katalizálja. Az enzim működéséhez B_{12}-vitamin szükséges*



2-204. ábra. A B_{12}-vitamin és a B12-koenzim képződése



2-205. ábra. A fenilalanin és tirozin katabolizmusa *(lásd még a 2-185. ábrát)*

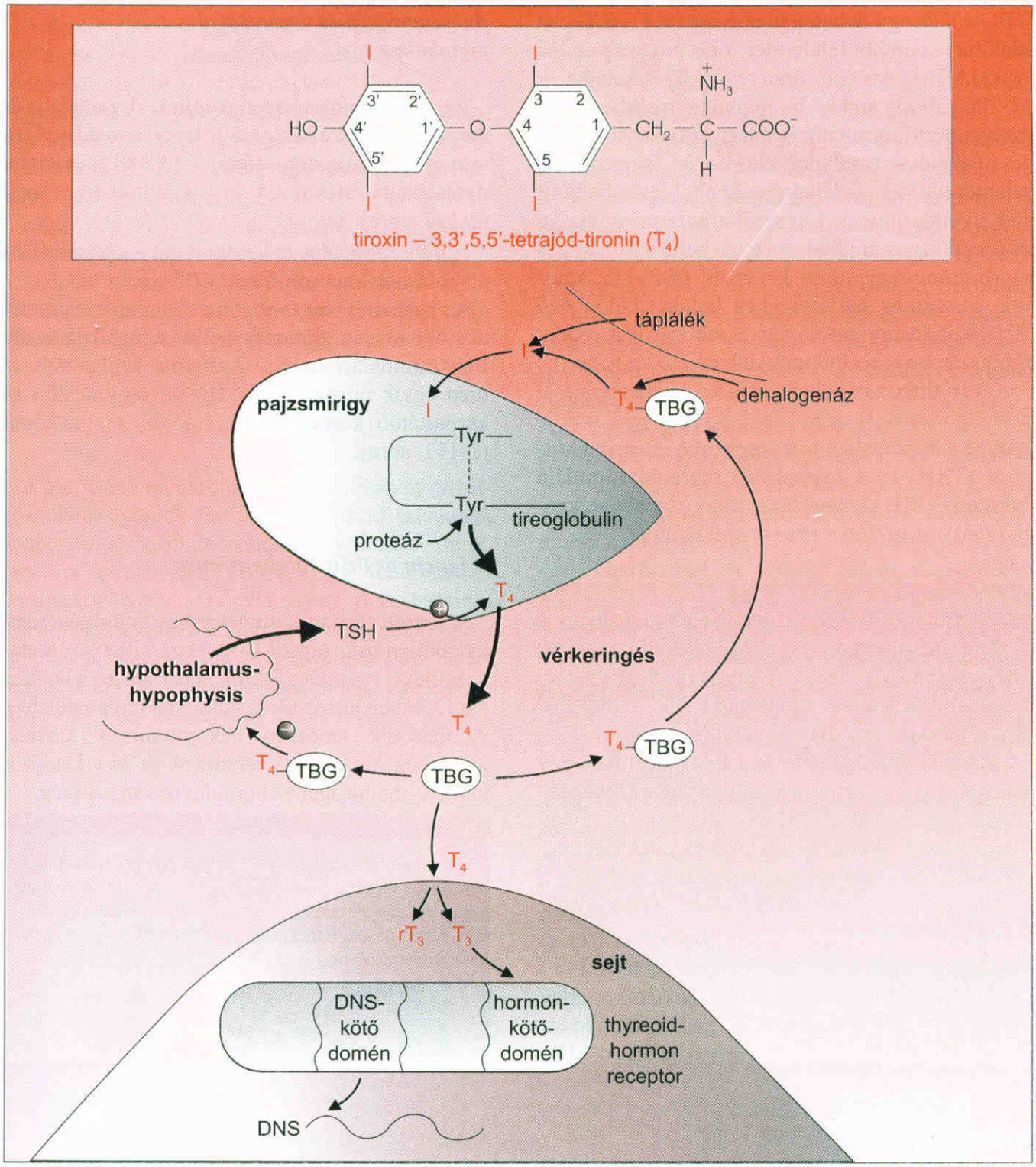
séről, lebomlásáról és funkcióiról a 6.1. fejezetben lesz szó. Itt csak a klinikai aspektusok megértése szempontjából említjük meg, hogy a tirozin átalakulása során DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanin) keletkezik. Ezután a DOPA két reakcióúton is továbbalakulhat. Egyrészt melanin (szőr-, szem- és bőrpigment) szintéziséhez vezet, másrészt dekarboxilezéssel dopamint eredményez. Az utóbbi keletkezése a noradrenalin- és adrenalin-szintézis előfeltétele.

A fenilalanin katabolizmusa során enzimopathiák következtében különböző anyagcserezavarok jöhetnek létre. Ilyenek a tyrosinaemiák, a phenylketonuria (PKU) és az alcaptonuria. (Az utóbbi volt az első felismert veleszületett enzymopathia, amely az egy gén–egy enzim koncepció kiindulópontja lett.) A defektusok helyének követéséhez lásd a 2-205. ábrát.

A tirozin katabolizmus enzimeinek genetikai defektusa **tyrosinaemiát** eredményez. Ritka, de rendkívül súlyos kórkép; májelégtelenséggel, „káposztaszagú" lehelettel, szem, bőr és idegrendszeri károsodással társul és az enzimhiány mértékétől függően egy, de legkésőbb 10 éven belüli halált eredményez. A tünetek kifejlődésének pontos biokémiai oka(i) nem ismert(ek). A **homogentizát-oxidáz** defektusa a homogentizinsav felhalmozódásával jár, amely részben a kötőszövetekbe kerül és pigment formában tárolódik, illetve arthritist okoz, részben szekretálódik a vizeletbe, ahol állás közben oxidálódik és polimerizálódik (sötét színű vizelet; alcaptonuria). A betegség nem veszélyezteti az életet (a homogentizát felszaporodása nem jár tirozinfelszaporodással, s így nem alakul ki a tyrosinaemia).

A fenilalanin anyagcserezavarok közül a **phenylketonuria** (PKU) a leggyakoribb kórkép (1:9000) Magyarországon (pl. Finnországban ritka). Létrejöhet (2-185. és 2-205. ábra) a fenilalanin-hidroxiláz defektusaként („klasszikus PKU", hyper-phenylalaninaemia) vagy a tetrahidrobiopterin, illetve a dihidrobiopterin-reduktáz képzés hiányosságainak következtében („kofaktor defektusos PKU"). A fenilalanin egyik esetben sem tud tirozinná alakulni, felhalmozódik, illetve transzaminázokkal átalakul fenil-piruváttá, fenil-laktáttá és fenil-acetáttá, és ezek az összes testfolyadékban megjelennek. Magas koncentrációjuk károsítja az idegsejtek myelinhüvelyét és szellemi fogyatékosságot eredményez (a károsodás létrejöttének biokémiai mechanizmusa még nem ismert). A „kofaktor defektusos PKU" klinikai szimptómái színesebbek és súlyosabbak, mint a „klasszikus PKU-é", mert a kofaktorelégtelenség nemcsak a Phe és a fenilketontestek felszaporodását eredményezi, hanem a DOPA, dopamin és noradrenalin hiányos képzését is, hiszen a tirozin-hidroxiláz is elégtelenül működik tetrahidrobiopterin hiányában. Továbbá nitrogén-monoxid és szerotonin sem képződik, mert szintézisükhöz szintén ugyanezen kofaktor szükséges (2-198. ábra). Elmegyógyintézetekben (pl. az USA-ban) az összes betegek közel 1%-a phenylketonuriás volt korábban, 20–30 éves várható élettartammal. Ha születés után pár héten belül fehérjeszegény diétát állítanak be (amely csak minimális mennyiségű fenilalanint tartalmaz, mint esszenciális aminosavat), és a többi esszenciális aminosavat, a szénhidrátokat és a zsírokat biztosítják, akkor elérhető, hogy a PKU-s betegek IQ-ja („intelligenciahányadosa") a normális értéket elérje (akár a 110-et is, különben 50 körülire csökken). Tehát a korai diagnózis (szűrővizsgálat) fontos: a vér fenilalaninszintjének meghatározása, illetve a DNS-próba fenilalanin-hidroxilázra (a szűrővizsgálat hosszú ideje már Magyarországon is kötelező).

A **tiroxin** is a tirozinból szintetizálódik. A pajzsmirigy egyik fehérjéjében (tireoglobulin) lévő tirozin oldalláncok jódozódnak tiroid-peroxidáz katalízisével. A jód a vérből kerül a pajzsmirigybe, ahol annak 30-szoros koncentrációnövekedése következ- zik be. A jódfelvétel feltétele a sejtmembránon található nátrium-jodid szimporter (NIS) jelenléte. Ezután két jódozott tirozinmolekula (továbbra is tireoglobulinban) szubsztitúciós reakcióval tetrajód-tironinné alakul *(2-206. ábra)*, amely biológiailag még inaktív és csak akkor válik aktív hormonná, amikor a fehérjéből specifikus proteáz hatására kihasad és a véráramba kerül. A



2-206. ábra. A tiroxin képződése. *Rövidítések: T_4 (tiroxin), TBG (tiroxinkötő globulin), TSH (thyreoidstimuláló hormon), T_3 (3,5,3'-trijód-tironin), rT_3 (reverz, 3,3',5'-trijód-tironin)*

jódozottság fokától függően egy molekula tironin három (3,3',5-trijód-tironin) vagy négy jódatomot (tetrajód-tironin, tiroxin) tartalmazhat (az orvosi gyakorlatban T_3 és T_4-nek nevezik); a vérben a pajzsmirigyhormonok 90%-a T_4 formában fordul elő. Élettartamát (féléletideje kb. 8 nap) a vérben egy fehérje, a tiroxinkötő globulin (TBG) határozza meg; a tiroxin a célsejteken disszociál a

TBG-ről és egy dehalogenáz enzim a T_4-et T_3-má alakítja (az utóbbi féléletideje órás nagyságrendbe esik). A T_3 konverzió során reverz T_3 is keletkezik (2-206. ábra), amely biológiailag inaktív. A T_3 konverzió a hormonaktivitás gyors szabályozását teszi lehetővé, amelynek klinikai és diagnosztikai jelentősége van. A dehalogenáz által felszabadított jód a vérkeringésen keresztül a pajzsmirigybe jut és újra felhasználódhat. A sejten belül a T_3 a thyreoid-hormon-receptoron keresztül DNS-hez kötődik, és számos sejtféleségben indukál különböző fiziológiás vagy patológiás elváltozásokat (eddig több száz tiroxin által indukálható enzim ismert).

A vér tiroxinszintje feedback mechanizmussal szabályozza saját szintézisét. A T_4 magas szintje gátolja a hypothalamus thyreotropin releasing hormon (TRH) és a hypophysis thyreoid stimuláló hormon (TSH) kiválasztását, amely utóbbi serkenti a pajzsmirigyben a tiroxin szekrécióját.

A tiroxin csökkent szintézise az alapanyagcsere lassulásához és a pszichés történések renyheségéhez vezet (gyermekkorban testi-szellemi visszamaradottsággal jár), amelyet újszülöttkori szűrővizsgálattal (ma már kötelező) és T_4-szubsztitúcióval lehet megelőzni. A jód hiánya a hipofunkciós struma kórképet (golyva) hozza létre. A fokozott tiroxintermelés (hyperthyreosis) viszont az anyagcsere-folyamatok felgyorsulását váltja ki, jellegzetes klinikai tüneteket okozva (Basedow- vagy Graves-kór).

Az aszparagin és aszpartát metabolizmusa

Az aszparagint az **aszparagináz** dezamidálja és aszpartát keletkezik, amely transzaminálással az aszpartát aminotranszferáz (ASAT) hatására oxálacetáttá alakul és így a citrátkörbe kerül (2-194. ábra).

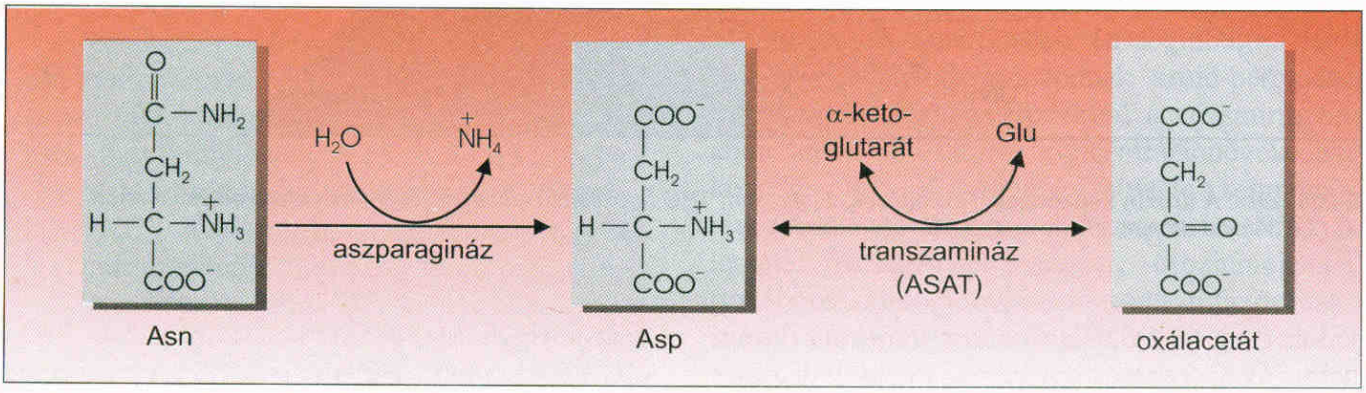
A transzaminálás α-ketoglutarát → glutamát átalakuláshoz kapcsolódik *(2-207. ábra)*.

Az aszpartát részt vehet más transzaminálási reakciókban is; a glutamát mellett a legáltalánosabb transzaminálási donor. Aszpartát szolgáltatja az urea egyik nitrogénjét is, így az ornitinciklus az aszpartáton keresztül kapcsolódik a citrátkörrel (2-191. ábra).

A leucin és lizin katabolizmusa

A **leucin** tisztán ketoplasztikus aminosav, mert katabolizmusa acetil-CoA-hoz, illetve acetoacetáthoz vezet (lásd 2-194. ábra). A Leu lebontása hat lépésben játszódik le (ábrán nem tüntetjük fel). A második lépésben dekarboxilezés történik, amelyhez NAD^+-ra, koenzim-A-ra és a keto-izokaproát-dehidrogenáz komplexre van szükség.

Az enzim defektusa az ún. „Maple Syrup" (jávorfaszörp) betegséget okozza; a Leu és a ketoizokaproát felhalmozódik a liquorban, a vérben és a vizeletben, miközben súlyos mentális károsodások jönnek létre. Kezelés nélkül egy éven belül halál következik be.



2-207. ábra. Az aszparagináz

A **lizin** katabolizmusa is több lépésben történik és a negyedik lépés intermedierétől a Trp katabolizmusával közös az út (lásd 2-197. ábra).

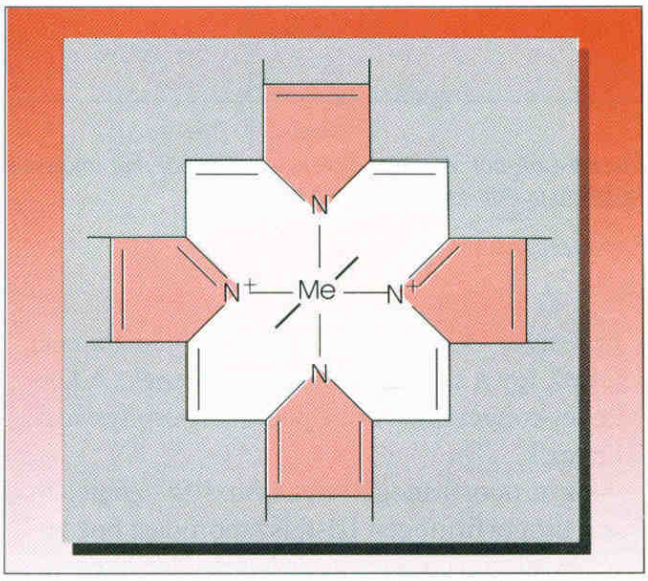
Az aminosav anyagcserezavara során az emelkedett lizinszint (hyperlysinaemia) kompetitív módon gátolhatja az arginináz aktivitását és hyperammonaemiát okozhat.

Növényekben lizinből alkaloidák szintetizálódnak, amelyeket a gyógyászatban felhasználnak.

Lizinből történik a **karnitin** szintézise is. A karnitin a zsírsavak mitokondriumba történő szállításában játszik szerepet (lásd 2.3. fejezet).

Porfirinek és epefestékek

A porfirinek metenilhidakkal összekötött pirrolgyűrűkből épülnek fel, amelyek rövid szénláncú csoportokkal szubsztituáltak és jellemző rájuk, hogy a pirrolgyűrűk nitrogénjei fémionokkal komplexet képeznek *(2-208. ábra)*. A vastartalmú porfirinek alkotják a hemet, míg a magnéziumtartalmúak a klorofilleket. A **hem** különböző fehérjékhez kötődhet, hemoglobint, mioglobint, citokrómokat vagy katalázokat alkotva.



2-208. ábra. A porfirinváz szerkezete. A porfirinvázat 4 pirrolgyűrű alkotja, melyeket metenil- (=CH-) hidak tartanak össze. A pirrolgyűrűk rövid szénláncú csoportokkal (metil: $-CH_3$, vinil: $-CH=CH_2$, acetát: $-CH_2-COO^-$, propionát: $-CH_2-CH_2-COO^-$) szubsztituáltak. A pirrolgyűrűk között fémion (metál; Me) helyezkedik el

A porfirinek szintézise

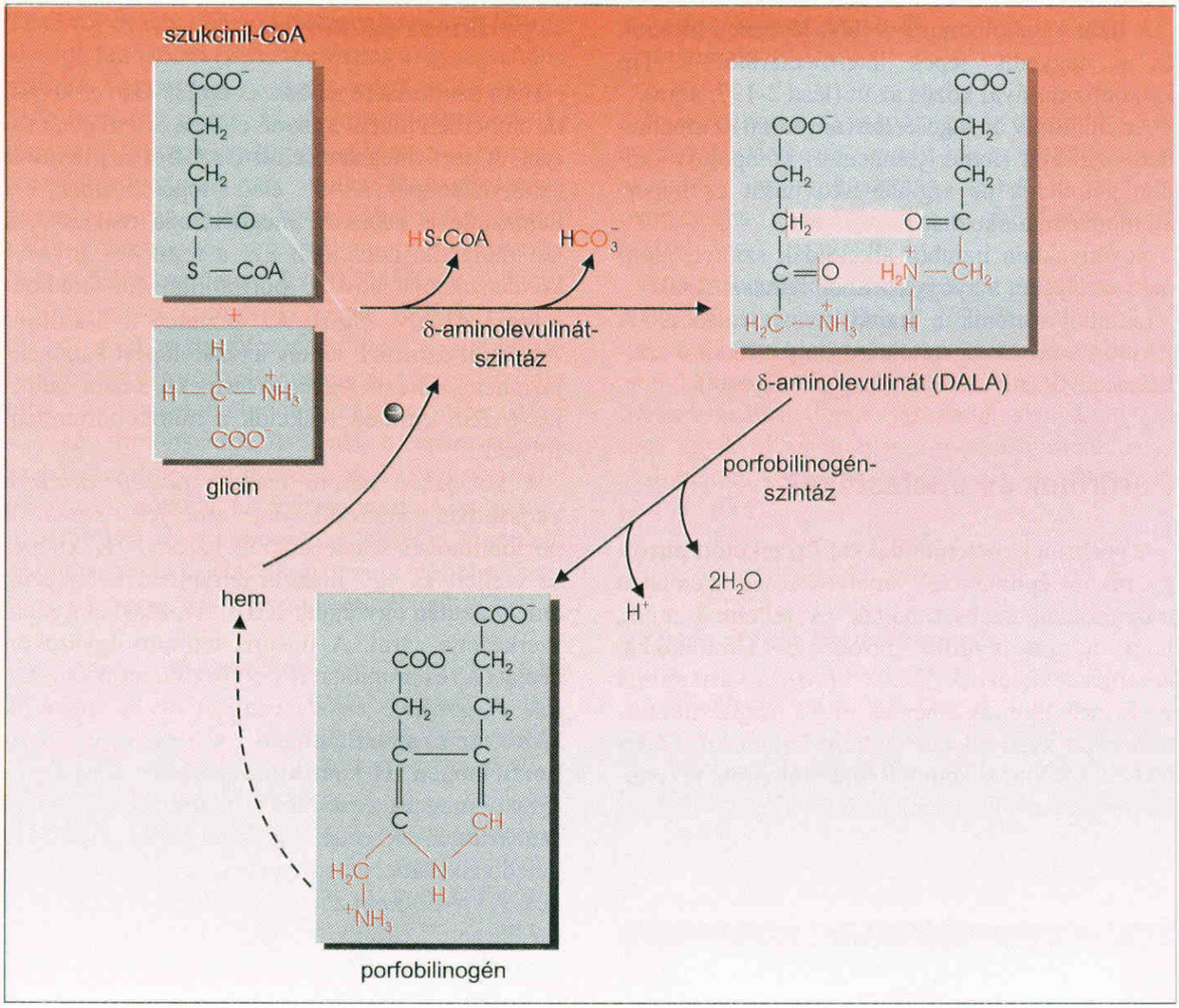
Hem szintézisére az összes emlős szövet képes, de emberben főként a csontvelőben és a májban folyik. A porfirinek **szukcinil-CoA-ból** és **glicinből** szintetizálódnak. Az első lépés, amely a hemszintézis sebesség meghatározó reakciója, a két molekula addíciója. Ezt a termékek további kondenzációja követi, porfobilinogént eredményezve *(2-209. ábra)*. Az enzimet, a **δ-aminolevulinát-szintázt**, amely az első lépést katalizálja, a hemszintézis legvégső terméke, a hem gátolja. A fent említett reakciók a mitokondriumban folynak.

A következő három reakció *(2-210. ábra)* a citoszólban játszódik le, amelyek során 4 porfobilinogén kondenzálódik három NH_4^+ kilépése mellett és egy lineáris tetrapirrol keletkezik, amely azután egy újabb NH_4^+ távozásával gyűrűs szerkezetté zárul. A lineáris tetrapirrolgyűrűkön acetát (A) és propionát (P) szubsztituensek találhatók. A gyűrűvé záródásban két enzim működik közre, az **uroporfirinogén I-szintáz** és az **uroporfirinogén III-koszintáz.** A szintáz a gyűrű zárásakor megtartja a tetrapirrolgyűrűn elhelyezkedő szubsztituensek eredeti helyzetét és így egy izomer keletkezik, amelyet uroporfirinogén I-nek neveznek. A koszintáz közben két szubsztituens sorrendjét felcseréli és egy másik izomer struktúrát hoz létre, az uroporfirinogén III-at. A szervezetben normál körülmények között a szintáz és koszintáz összehangolva működik és mindig uroporfirinogén III keletkezik.

A következő lépésekben dekarboxilezéssel és további oxidációkkal koproporfirinogén III, majd a mitokondriumban protoporfirin IX keletkezik. A reakciósorozat befejezéseképpen a ferritinből (lásd később) kétértékű vasion (Fe^{2+}) épül be a protoporfirin IX molekulába a **ferrokelatáz** katalízisével, és létrejön a hem, amely a hemoglobin, mioglobin, citokrómok és peroxidázok prosztetikus csoportját képezi.

A hem szintézise során három enzim genetikai károsodása ismert (2-210. ábra).

Az uroporfirinogén I-szintáz defektusa esetén a májban és a vizeletben δ-amino-levulinát



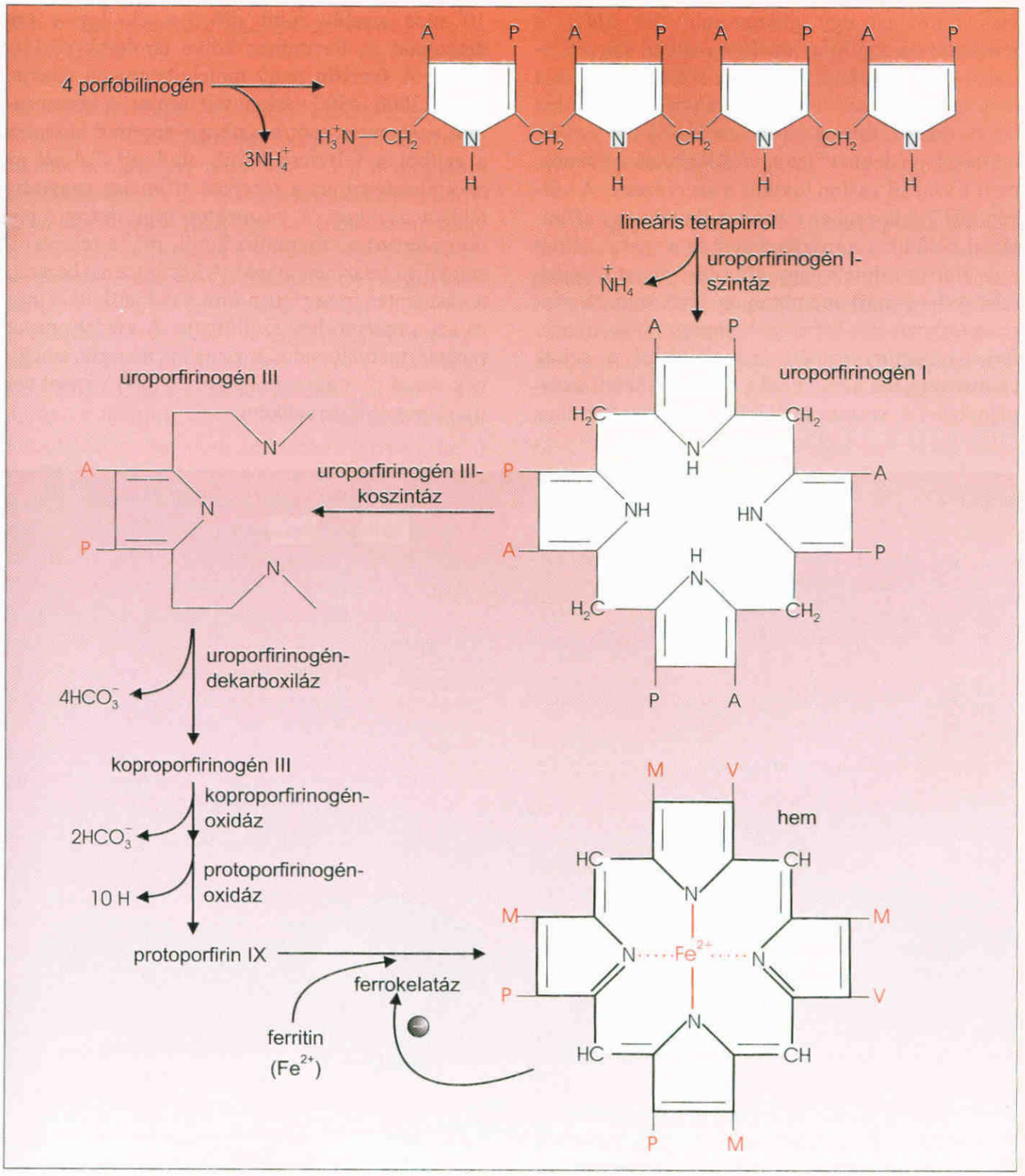
2-209. ábra. A porfobilinogén szintézise. *Két molekula szukcinil-CoA-ból és két molekula glicinből két molekula δ-aminolevulinát képződik, majd az utóbbi kondenzációja során 1 molekula porfobilinogén szintetizálódik*

és porfobilinogén halmozódik fel, amely az idegszövet károsítását, abdominális fájdalmakat és neuropszichiátriai szimptómákat eredményez, akut intermittens porphyrinuria kórképet hozva létre.

A koszintáz defektusa miatt az izomerizáció elmarad, így nem uroporfirinogen III, hanem uroporfirinogén I keletkezik és halmozódik fel a fogakban (amelyek ezért vörösen fluoreszkálnak UV-fényben), a bőrben (fényérzékenységet eredményezve) és a vizeletben (azt pirosra festve). Az eritrociták érési folyamata nem teljes, így a sejtek rövidesen szétesnek. A kórképet kongenitális eritropoetikus porphyriának nevezik.

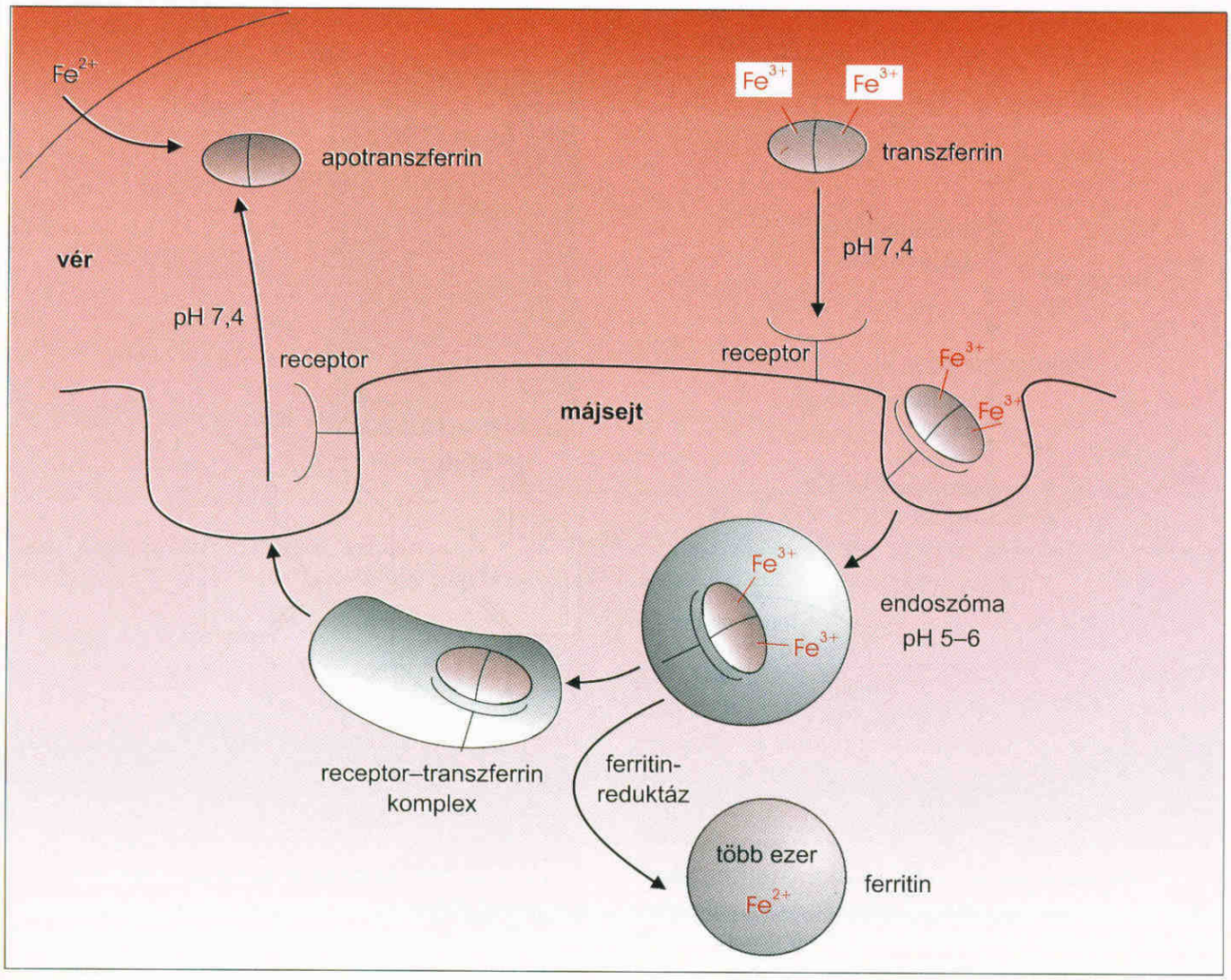
Az uroporfirinogén-dekarboxiláz elégtelenség uroporfirinogén III-felszaporodást hoz létre, porphyria cutanea tarda betegséget okozva.

Vasanyagcsere. A hem szintéziséhez szükséges vas a táplálékból Fe^{2+} formában transzportálódik a bélmucosán keresztül. A vérkeringésben a vasat



2-210. ábra. A hem képződése porfobilinogénekből. *Az uroporfirinogén I szintézise után a további reakciók részleteit nem tüntetjük fel, csak azt a változást jelezzük, amely orvosi szempontból jelentőséggel bírhat. Az uroporfirinogén III az uroporfirinogén I-től csak abban tér el, hogy az egyik pirrolgyűrű propionátjának (P) és acetátjának (A) helyzete felcserélődik. Az uroporfirinogén-dekarboxiláz az acetát szubsztituenseket dekarboxilálja, amelyek így metilcsoporttá alakulnak át. A következő lépések során további változások történnek (a porfirinváz deszaturációja és vinilszubsztituensek képződése), amelyek a protoporfirin IX kialakulása után már nem változnak. A protoporfirin IX és a hem szerkezeti váza és szubsztituciós csoportjai, a metil (M), a propionát (P) és a vinil (V) azonos pozícióban vannak, a különbség csak a vas beépülésében található*

Fe^{3+} formában egy glikoprotein (80 kDa), a **transzferrin** szállítja, amely a májban szintetizálódik. Egy molekula transzferrin két vasiont köt meg; a transzferrin egyrészt transzfer funkciókat lát el, oda szállítja a vasat, ahol szükség van rá, másrészt „védelmet" jelent a különböző sejteknek, mert a szabad vasion toxikus a szervezetre. A vérben, pH 7,4 közegben a vas rendkívül nagy affinitással kötődik a transzferrinhez és a vassal telített transzferrin szintén nagy affinitást mutat a sejtek (elsősorban máj) membránján lévő transzferrin-receptorhoz. A hármas komplex (vas–transzferrin–receptor) ezután endocitózissal a sejtek endoszomájába kerül, ahol a pH 5–6 közötti tartományban a vasion affinitása a transzferrinhez 10^6-szor kisebb, mint pH 7,4-nél. Így a vas disszociál és ferritinhez kötve tárolódik *(2-211. ábra)*. A **ferritin** nagy molekulatömegű fehérje, amely 3000–4500 vasiont tud tárolni. A visszamaradt vasmentes apotranszferrin–receptor komplex a sejtből a felszínre kerül, ahol pH 7,4-nél az apotranszferrin és a receptor affinitása nagymértékben csökken; a vasmentes transzferrin (apotranszferrin) a véráramba kerül, míg a receptor a sejt külső felszínén marad. A körfolyamat bezárul; a vasmentes transzferrin újra vas-iont köthet meg és azt a receptorhoz szállíthatja. A körfolyamatot receptormediált endocitózisnak is nevezik, amelynek során pl. egy májsejt kb. 20 000 vasiont tud transzportálni percenként.



2-211. ábra. A vas transzportja. *A vasionok affinitását a transzferrinhez, illetve a receptor affinitását az apotranszferrinhez a pH határozza meg*

A porfirinek lebomlása, epefestékek képződése

A vörösvértestek életideje a keringésben átlag 120 nap (kb. 10^8 eritrocita pusztul el óránként), aminek eredménye, hogy közel 6 g hemoglobin bomlik le naponta egy 70 kg-os emberben. A porfirinek lebomlása a **RES**-ben kezdődik azzal, hogy ezek a sejtek felismerik a vörösvértestek öregedésével járó membránváltozásokat. A degradáció komplex folyamat eredménye, amelyben oxidációs és redukciós reakciók vesznek részt. A hem oxidációja még a globinhoz kötött formában kezdődik, s ennek eredményeként a porfirin gyűrűs váza felbomlik, verdoglobin keletkezik. Ezután felszabadul a Fe^{2+}-ion, miközben ferrivé (Fe^{3+}) oxidálódik, majd a transzferrinhez kötődve újra felhasználódik. Az utóbbi azért figyelemreméltó, mert a vasürítő mechanizmusok nagyon korlátozottak; elsősorban vérvesztés során történik vasvesztés. A destabilizálódott gyűrű ezután lehasad a globinról és a fehérje proteolízissel aminosavakra bomlik. A porfiringyűrű pedig további oxidációs és redukciós reakciók során degradálódik a máj, a lép és csontvelő RES mikroszómáiban. Az oxidációs lépéseket a hem-oxigenáz rendszer katalizálja és **biliverdin** keletkezik, míg a redukciót a biliverdin-reduktáz, **bilirubint** eredményezve *(2-212. ábra)*. A biliverdin színe sötétzöld, a bilirubiné pedig narancssárga. Az utóbbi molekula ezután a vérkeringésbe kerül, ahol oldékonysága nagyon alacsony: a vérkeringésben albuminhoz kötve szállítódik a májhoz. A bilirubin ezen formáját „indirekt bilirubinnak" is nevezik. Jelentőségét a hem degradációján, illetve az epefestékek képződésén kívül az adja, hogy a bilirubin, hasonlóan a C-vitaminhoz, az E-vitaminhoz és uráthoz, erős antioxidáns. Az albumin–bilirubin komplex a májba facilitált transzporttal kerül, ahol a bilirubin felszabadul. A vízben rosszul oldódó bilirubin 2 propionátcsoportja 2 UDP-glukuronáttal konjugálódik UDP-glukuronát-transzferáz és -dizmutáz jelenlétében; a keletkezett bilirubin-diglukuronid már jó oldékonyságú és az epével kiürül *(2-213. ábra)*.

Az **UDP-glukuronil-transzferáz** a legkülönbözőbb gyógyszerekkel (pl. barbiturát) indukálható. A bilirubin konjugált formáját „direkt bilirubinnak" is nevezik a klinikumban.

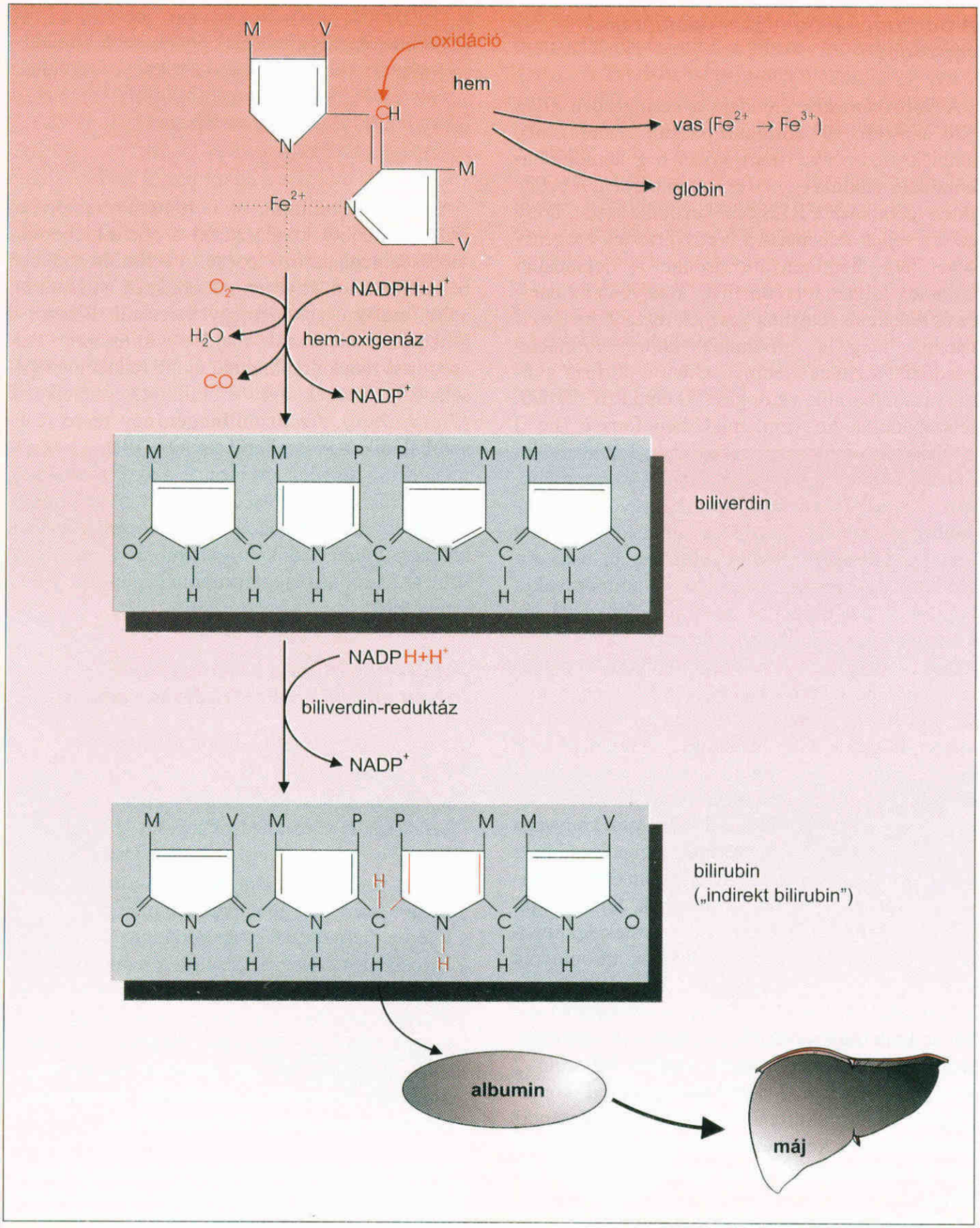
A „direkt" és „indirekt" elnevezés a klinikai laboratóriumban használt kimutatási reakcióra utal; a jól oldódó konjugált bilirubin könnyebben reagál a diazotált szulfanilsavval és ezért nevezik „direktnek".

A konjugált bilirubin aktív transzporttal történő ürülése (májból kiválasztása) a porfirinlebomlás sebességmeghatározó lépése. A bilirubin a bélben bélbaktériumok által termelt enzimek hatására további átalakulásokon megy keresztül. Először a glukuronát hidrolizál, majd a vinilcsoport etilcsoporttá redukálódik, majd újabb redukciós lépések következnek, és urobilinogén keletkezik *(2-214. ábra)*. Az **urobilinogén** egy része reabszorbálódik és visszakerül a májba, illetve a körülményektől függően urobilinné alakul (oxidáció), felszívódik, majd a vesén keresztül kiválasztódik. A vissza nem szívódott urobilinogén a bélben szterkobilinné (redukció) alakul és a széklettel ürül. (Az urobilin és szterkobilin képletét nem tüntetjük fel.)

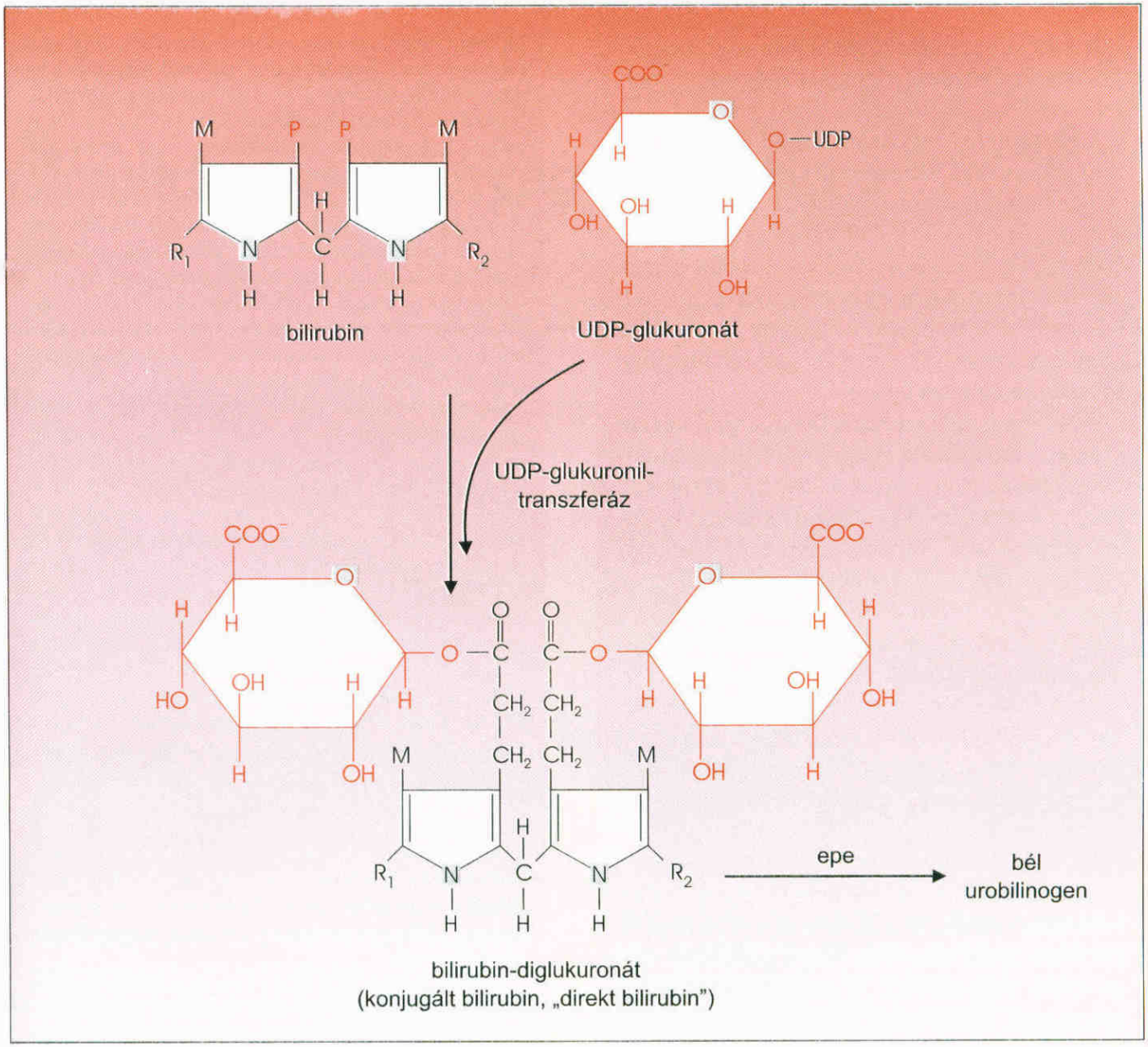
A porfirinek hibás anyagcsere-folyamataival értelmezhető kórképek

A porfirin anyagcsere változásai többféle betegséggel kapcsolódhatnak részben oki, részben tüneti vonatkozásokban. A porphyriák többféle enzim genetikai károsodására vezethetők vissza. Az emelkedett **δ-amino-levulinsav**-szint, de általában a porfirinszintézis intermedierjeinek felszaporodása az idegsejtek károsodását okozza. Ennek eredményeként időnkénti abdominális fájdalmak lépnek fel (a klinikusnak differenciáldiagnosztikai problémákat okozva). Neuropszichiátriai szimptómák alakulnak ki, így pszichés izgatottság, konfúzió, pulzusszám-emelkedés, hypertonia, általános gyengeség, illetve paralysis.

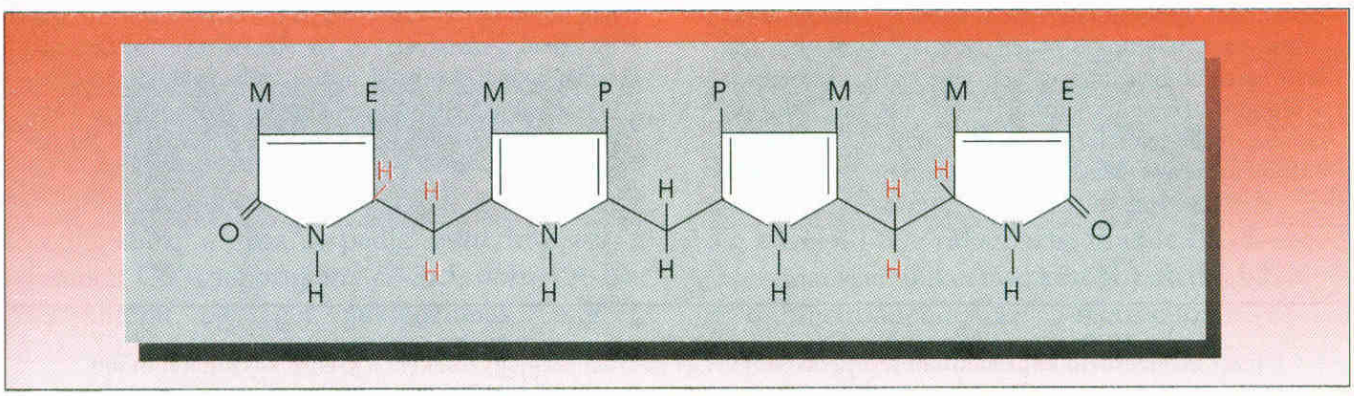
Több történelmi személy furcsa viselkedése (pl. Stuart Mária és III. György király családjában előforduló elmezavarok) vagy az ún. „farkas emberek" cselekedetei (fotoszenzitivitás miatt fokozott éjszakai tevékenység) a porphyria utólagos diagnózisát teszi lehetővé. Újabban Van Gogh-ról is feltételezik, hogy porphyriában szenvedett.



2-212. ábra. A hem degradációja; a bilirubin képződése és transzportja a vérplazmában. *Könnyebb áttekinthetőség céljából a hem porfirinvázának csak azt a részét ábrázoljuk, ahol a váz oxidáció során felnyílik*



2-213. ábra. A bilirubin sorsa a májban; az urobilinogén képződése. *A bilirubin a májban UDP-glukuronáttal konjugálódik, majd a bilirubin diglukuronid aktív transzporttal a bélbe ürül. (Az ábrán a bilirubinnak csak a reaktív részét tüntetjük fel)*



2-214. ábra. Az urobilinogén. *M: metil, E: etil, P: propionát*

A klinikai tünetek kiváltásában szerepet játszó biokémiai mechanizmusok még nem ismertek.

Az **uroporfirinogének** a látható fénytől (400 nm) reaktívakká válnak molekuláris oxigénnel; oxigéntartalmú szabad gyököket és egyéb reaktív oxigénszármazékokat hoznak létre, amelyek lizoszómakárosodást okoznak. Ennek eredményeképpen emésztő enzimek aktiválódnak és bőrkárosodásokat váltanak ki. Ez áll a „fényérzékenységi" betegségek hátterében (porphyria cutanea tarda).

Nemcsak genetikai rendellenességek, hanem szerzett károsodások is előfordulhatnak. Mindehhez társul, hogy egyes külső behatások (pl. alkoholfogyasztás) következtében az enyhe enzimkárosodások különben tünetmentes állapotát a betegség kifejlődése váltja fel. A leggyakoribb elváltozások a fent említetteken kívül hepatocitákban és eritrocitákban fordulnak elő, mivel ezekben a sejtekben különösen intenzív a porfirinszintézis. Ólommérgezés során pl. az SH-reaktív ólom inaktiválhatja a porfobinilogén-szintázt és a ferrokelatáz enzimeket, ezzel a porfirin-anyagcsere zavarát és az ennek megfelelő tüneteket okozza.

A porfirin anyagcserezavarai sárgaságot (icterust) okozhatnak, amelynek lényege, hogy **bilirubin** rakódik le a bőrben és a sclerában (a porfirinogének színtelen, míg a porfirinek sárga színű vegyületek). A sárgaság különböző betegségek tünete lehet. Leggyakrabban a máj elégtelen működése vagy a vörösvértestek fokozott szétesése váltja ki.

Hemolitikus anaemia (a vörösvértestek érpályán belüli pusztulása) során emelkedett a szérum „indirekt bilirubin"-, a vizelet urobilinogén- és a faeces urobilin-, illetve szterkobilinszintje, de nem emelkedik a vizeletben a bilirubin. Hepatitis, cirrhosis vagy mérgek, mint pl. gomba, szén-tetraklorid okozta májkárosodásokban emelkedett elsősorban az „indirekt bilirubin" és a „direkt bilirubin" szérumszintje és kismértékben a vizelet urobilinogénje, a vizeletben bilirubin jelenik meg, csökkent vagy normál viszont a széklet urobilin- és szterkobilinszintje. Elzáródásos icterusban (mechanikus okok miatt: leggyakrabban epekő vagy pancreasfej-carcinoma következtében) a szérumban emelkedett a „direkt bilirubin"-szint, a vizeletben bilirubin jelenik meg, de hiányzik a vizeletben és a székletben az urobilinogén, illetve a szterkobilin, mert a máj képes ugyan konjugált („direkt") bilirubint készíteni, de az nem kerül be a bélbe. (Ha az elzáródásos icterus hosszabb ideje áll fenn, akkor májkárosodás is létrejön, amely megnehezíti a pontos diagnózist.) A laboratóriumi leletek különben logikusan tükrözik a károsodás okát.

Ismert újszülöttek fiziológiás sárgasága is; az UDP-glukuronil-transzferáz és a szekrécióért felelős enzimek szintézise a májban még nem történt meg, aminek következménye, hogy fokozott hemolízis során a bilirubin nem kerül kiválasztásra (emelkedett az „indirekt bilirubin"). A rosszul oldódó bilirubin penetrál az agy–vér gáton és a mozgáskoordináció teljes zavarát okozhatja. Minthogy a bilirubin-anyagcsere enzimrendszere fenobarbituráttal indukálható, az ilyen csecsemőket korábban fenobarbituráttal kezelték. Újabban kék fénnyel sugározzák be, mert a 420–470 nm tartományú fény a bőrben a bilirubin szerkezetében izomerizációt hoz létre. Az így átalakult nem konjugált („indirekt") bilirubin oxidálódik és elveszti toxikus hatását, mert glukuronidáció nélkül is kiürül a vesén és a bélen keresztül.

A fenti, aránylag gyakran előforduló károsodások mellett több ritka, örökletes enzimdefektus is ismert. Az UDP-glukuronát-transzferáz hiánya vagy csökkent működése (I és II típusú Crigler–Najjar-szindrómák), a bilirubin májfelvétel-zavara (Gilbert-szindróma) vagy a konjugált bilirubin szekréciós zavara (Dubin–Johnson-szindróma) stb.

Említést érdemelnek még a hem degradáció rendellenességeihez társuló vagy attól független vasanyagcsere-zavarok is. Fokozott vérzékenység vagy vérveszteség (haemostasiszavarok, elhúzódó menstruációk stb.) vashiányos anaemiákat okozhatnak. A vas tárolási rendellenességei pedig haemosiderosishoz (a ferritin nem tud működni, mert részlegesen degradálódik, a vasat azonban kötve tartja) vagy haemochromatosishoz (fokozott intestinalis vasfelvétel és következményes szöveti vasfelhalmozódás) vezethetnek. A szabad vas, mint említettük, toxikus, elsősorban a májra (cirrhosis), a bőrre (pigmentációs zavarok) és a pancreasra (bronzdiabetes).

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Farkas Gyöngyinek, Dr. Kolev Kraszimirnak, Dr. Kőnig Tamásnak, Dr. Léránt Istvánnak, Dr. Mészáros Károlynak, Dr. Schuler Ágnesnek, Dr. Tretter Lászlónak és Dr. Vodnyánszky Lajosnak.

2.5. A nukleotidok anyagcseréje

Machovich Raymund

A nukleotidok széleskörű szerepet játszanak a biológiai folyamatokban:

1. a DNS és az RNS prekurzorai,
2. energiaközvetítők (pl. ATP),
3. regulációs molekulák (pl. cAMP, cGMP, ADP),
4. koenzimkomponensek (pl. NAD, FAD, CoA),
5. származékaik a szénhidrát- és lipidanyagcsere intermedierei (pl. UDP-galaktóz, CDP-diacilglicerol).

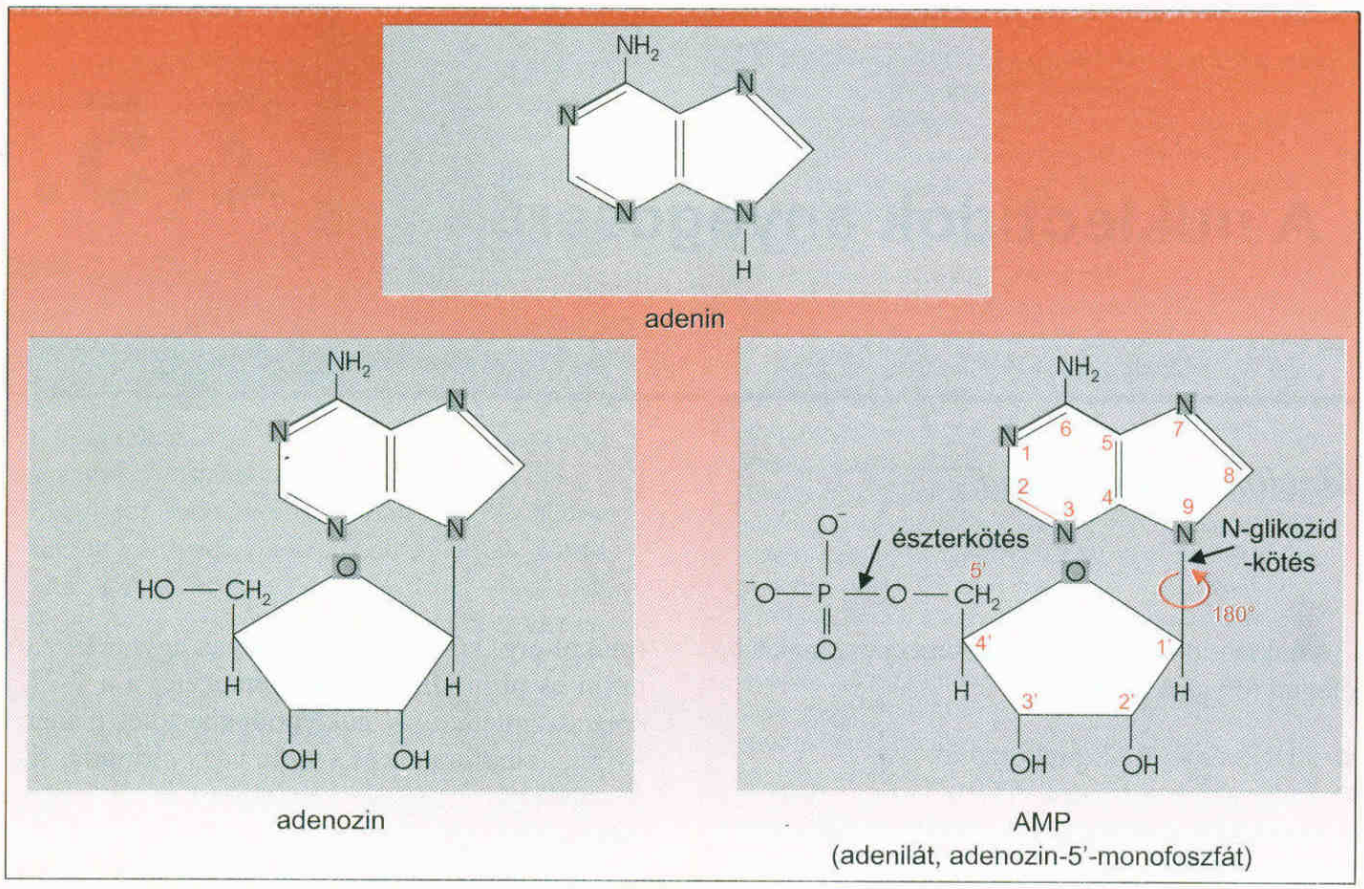
Szintézisük és lebontásuk sebessége, illetve azok szabályozása nagymértékben eltér a különböző szövetféleségekben. Ez utóbbi orvosi szempontból figyelemreméltó: a nukleotidok anyagcseréjébe történő beavatkozás terápiás lehetőséget kínál bizonyos betegségek (pl. rosszindulatú daganatok) kezelésében.

A nukleotidok szerkezete

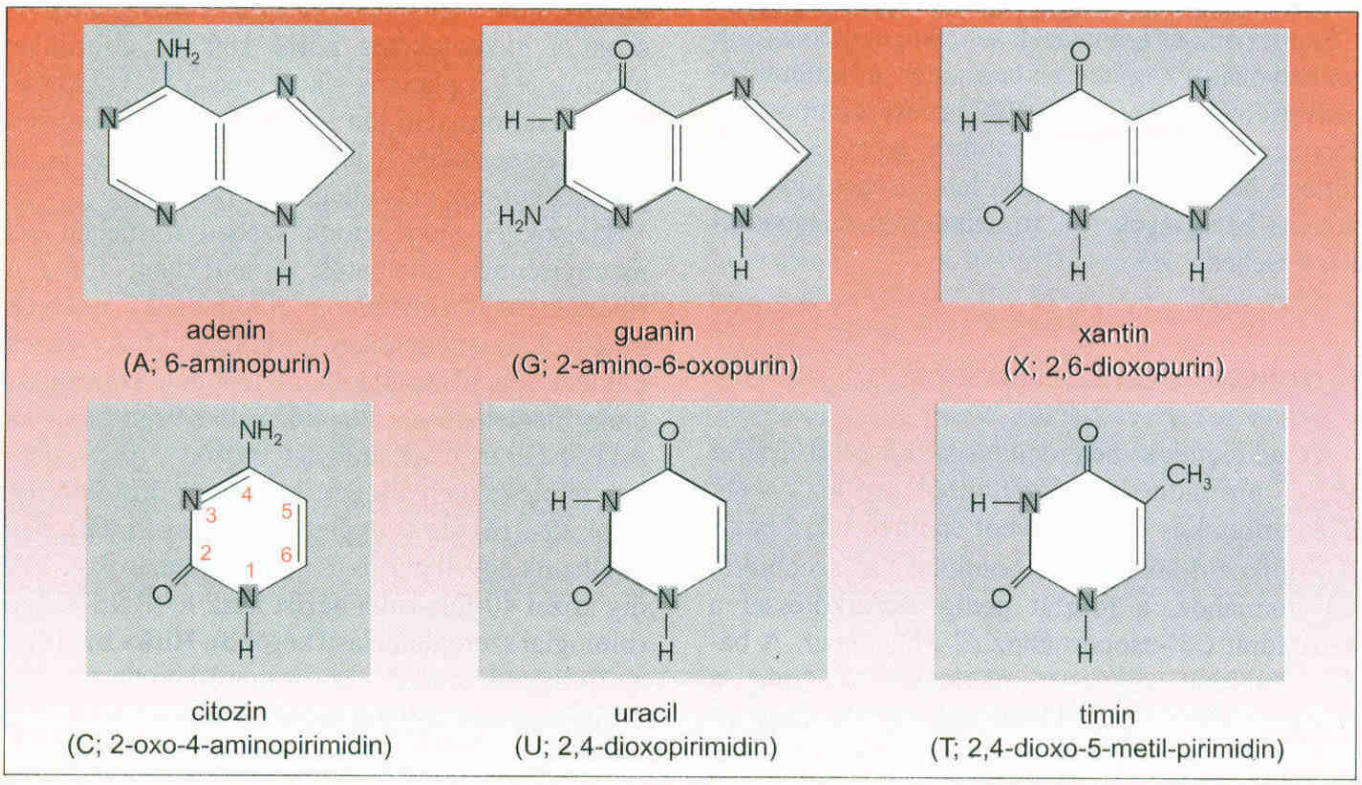
A nukleotidok heterociklusos bázisból (purin vagy pirimidin), szénhidrátból (ribóz vagy dezoxiribóz) és foszforsavból épülnek fel: a bázis β-N-glikozid-kötéssel kapcsolódik a szénhidrát C1-atomjához, a foszfát pedig észterkötéssel a szénhidrát C5'-csoportjához *(2-215. ábra)*. A bázis-szénhidrát egységet nukleozidnak, míg a nukleozid-foszfátot nukleotidnak (NMP) vagy attól függően, hogy hány molekula foszfát épül be, nukleozid-mono-, -di- vagy -trifoszfátnak nevezik. A di- és trifoszfátokban a foszfátok savanhidrid- (makro-erg) kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A purin és pirimidinbázisok szerkezetét a a *2-216. ábra* szemlélteti. A nukleotidokban két planáris gyűrű, a ribofuranóz és a purin vagy pirimidin síkja található, amelyek egymáshoz képest közel vagy távol helyezkedhetnek el. A rotáció az N-glikozidos kötés körül történhet. Ha a purinbázisok N3 atomja vagy a pirimidinbázisok C2 atomja (2-215. és 216. ábrák) közel kerül a szénhidrátgyűrűhöz, „syn"-konformációról beszélünk (a 2-215. ábrán ez a szerkezet látható), ha viszont a glikozidkötés körül 180°-os elfordulás történik, a két planáris sík egymástól távol kerül, „anti"-konformáció jön létre. A nukleotidok ezen „mozgásképessége" jelentősen befolyásolja a polinukleotidok másodlagos szerkezetét.

Bázisok és nukleozidok szabad formában kis mennyiségben találhatók a sejtekben; főleg a ribonukleozid-trifoszfátok dominálnak, amelyek mM-os koncentrációban fordulnak elő. Az egyes nukleotidok, pl. az adenin nukleotidok koncentrációja meglehetősen állandó, habár ezen belül az ATP, ADP és AMP aránya változó.

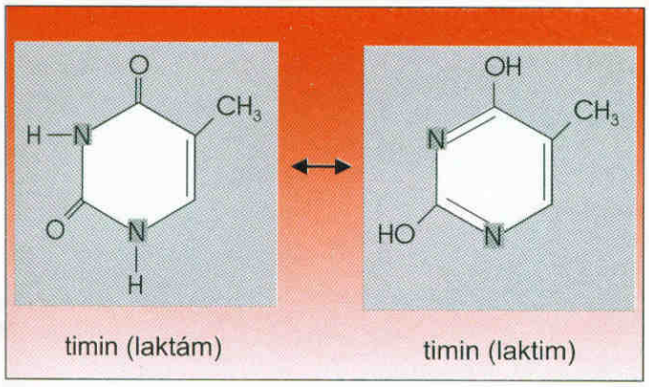
A természetben a leggyakrabban előforduló bázisok (2-216. ábra) mellett kisebb mennyiségben találhatók egyéb purin- és pirimidinbázisok is. Eddig közel 40-féle ritka bázist írtak le tRNS-ekben (biológiai szerepüket lásd később). **Ritka bázis** pl. a 6-dimetil-adenin, az 5-metil-citozin és az 5-hidroxi-metil-citozin (a purinbázisokban a szubsztitúció többnyire az aminocsoportokon történik, míg a pirimidinvázban az 5-ös szénatomon). A növényekben található, élettani hatással rendelkező



2-215. ábra. Az adenilát szerkezeti elemei



2-216. ábra. Purin- és pirimidinbázisok szerkezete



2-217. ábra. A timin tautomér formái

metilált xantinszármazékok: kávéban a koffein (1,3,7-trimetil-xantin), teában a teofillin (1,3-dimetil-xantin), kakaóban a teobromin (3,7-dimetil-xantin).

Mind a purin, mind a pirimidinbázisok származékai **laktám–laktim tautomer** formában fordulhatnak elő *(2-217. ábra)*, de fiziológiás körülmények között általában a laktám forma dominál, amely a pirimidineknél az N-glikozid kialakulásának előfeltétele.

Orvosi szempontból a purinbázisok fontos tulajdonsága, hogy „rossz" az oldékonyságuk; ez különösen érvényes a xantinra és a guaninra, illetve származékukra, az urátra (húgysav). Az oldékonyságot a pH értéke nagymértékben befolyásolja, például savas pH-tartományban a húgysav és a xantin oldékonysága rendkívül alacsony. Ezen tulajdonság biológiai–orvosi jelentőségére, az ember számára kedvező vagy kedvezőtlen hatásaira a purin és pirimidin nukleotidok lebontásáról szóló fejezetrészben (lásd 242. oldal) még visszatérünk.

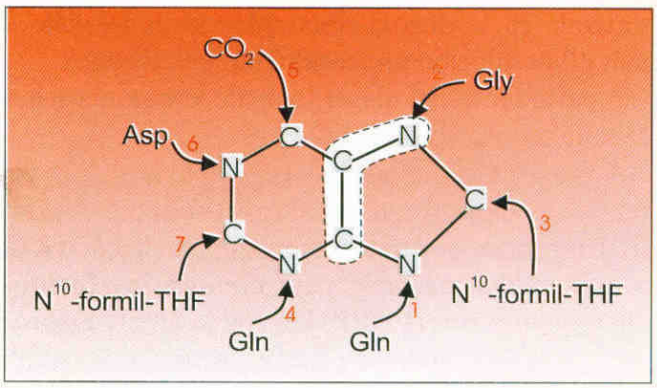
A mononukleotidok forrása

A purin és pirimidin nukleotidok aminosavakból, C1-töredékből, széndioxidból, ribózból és foszfátból de novo szintetizálódhatnak minden emberi sejtben. Habár az emésztő apparátus bőségesen tartalmaz nukleázokat (ribonukleáz és dezoxiribonukleáz), foszfatázokat, nukleozidázokat, amelyek hatékonyan degradálják a táplálék nukleinsavait, ezáltal lehetővé téve azok felszívódását, ez mégsem elégíti ki a legtöbb eukarióta sejt nukleotidigényét. Az emésztőrendszer nukleinsav degradációjánál jelentősebbnek látszik a szövetekben (elsősorban a májban, lépben és vesében) végbemenő degradáció. A szöveti nukleozidázokkal történő hidrolízis dezoxi-ribózt és pirimidinbázisokat, míg foszfát jelenlétében történő foszforolízis purinbázisokat és ribóz-1-foszfátot eredményez. Mind a nukleozidok, mind a bázisok, a ribóz, a dezoxi-ribóz és a foszfát, újra felhasználódhatnak.

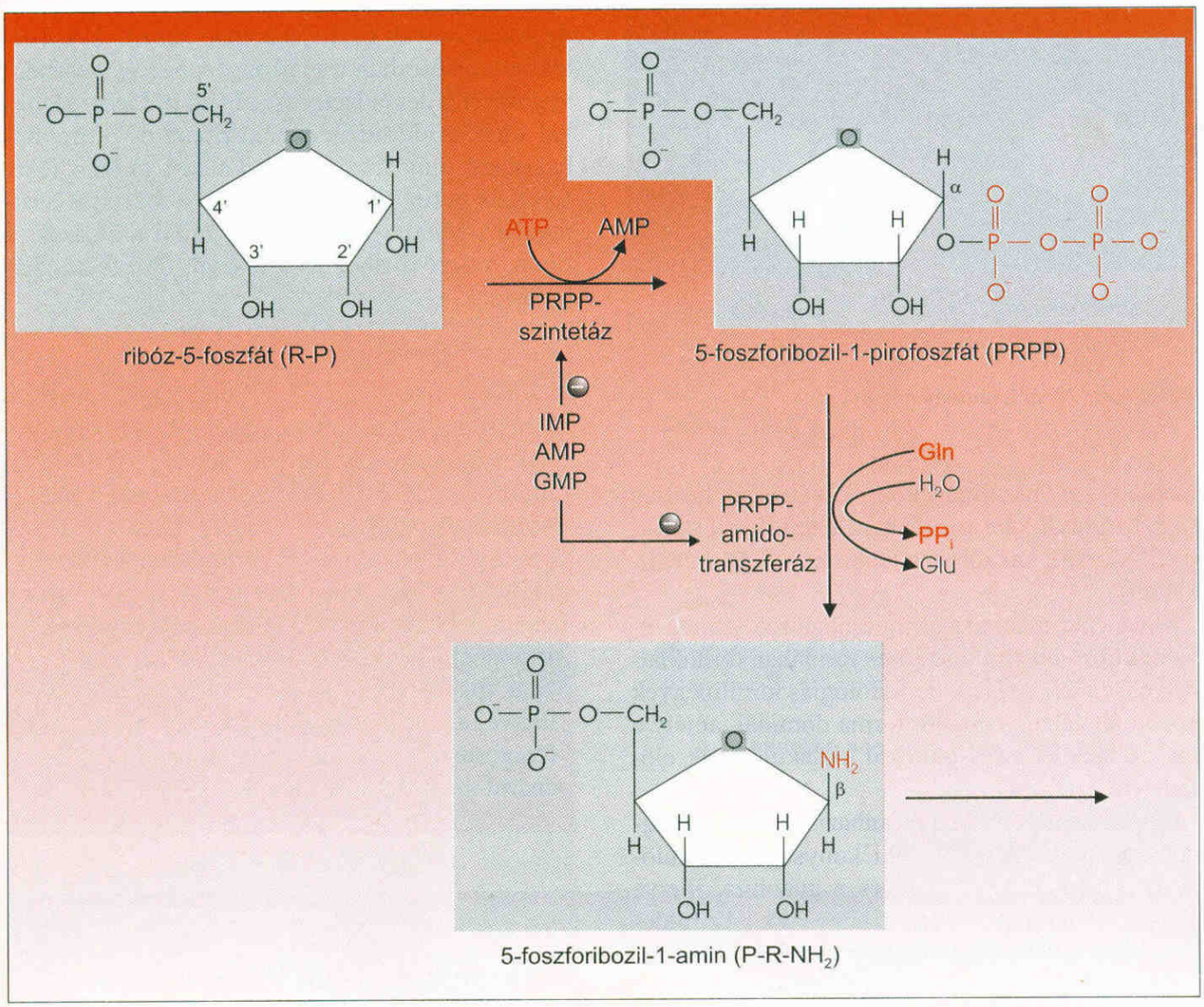
Orvosi szempontból fontos, hogy parenterálisan alkalmazott nukleozidok jól beépülnek újonnan szintetizálódott nukleinsavmolekulákba. Ez lehetőséget teremt a DNS-szintézis követésére; ^{3}H vagy ^{14}C-jelzett dezoxi-timidin nukleinsavba történő beépülésének mértéke széles körben használatos in vitro és in vivo DNS-szintézis mérésére. Ha radioaktív izotóppal jelzett egyéb nukleozidokat alkalmazunk (pl. ^{3}H-uridin), akkor az RNS szintézisre, illetve az uridin-foszfátok egyéb funkcióira (epefestékképzés, biotranszformáció, poliszacharid-szintézis stb.) kaphatunk információt.

Purin nukleotidok bioszintézise

A purin nukleotidok bioszintézisének jellemzője, hogy a bázisok kialakulása ribózfoszfáthoz kötve



2-218. ábra. A purinvázat alkotó atomok eredete. *A számozás a bioszintetikus lépések időbeli sorrendiségét jelenti*

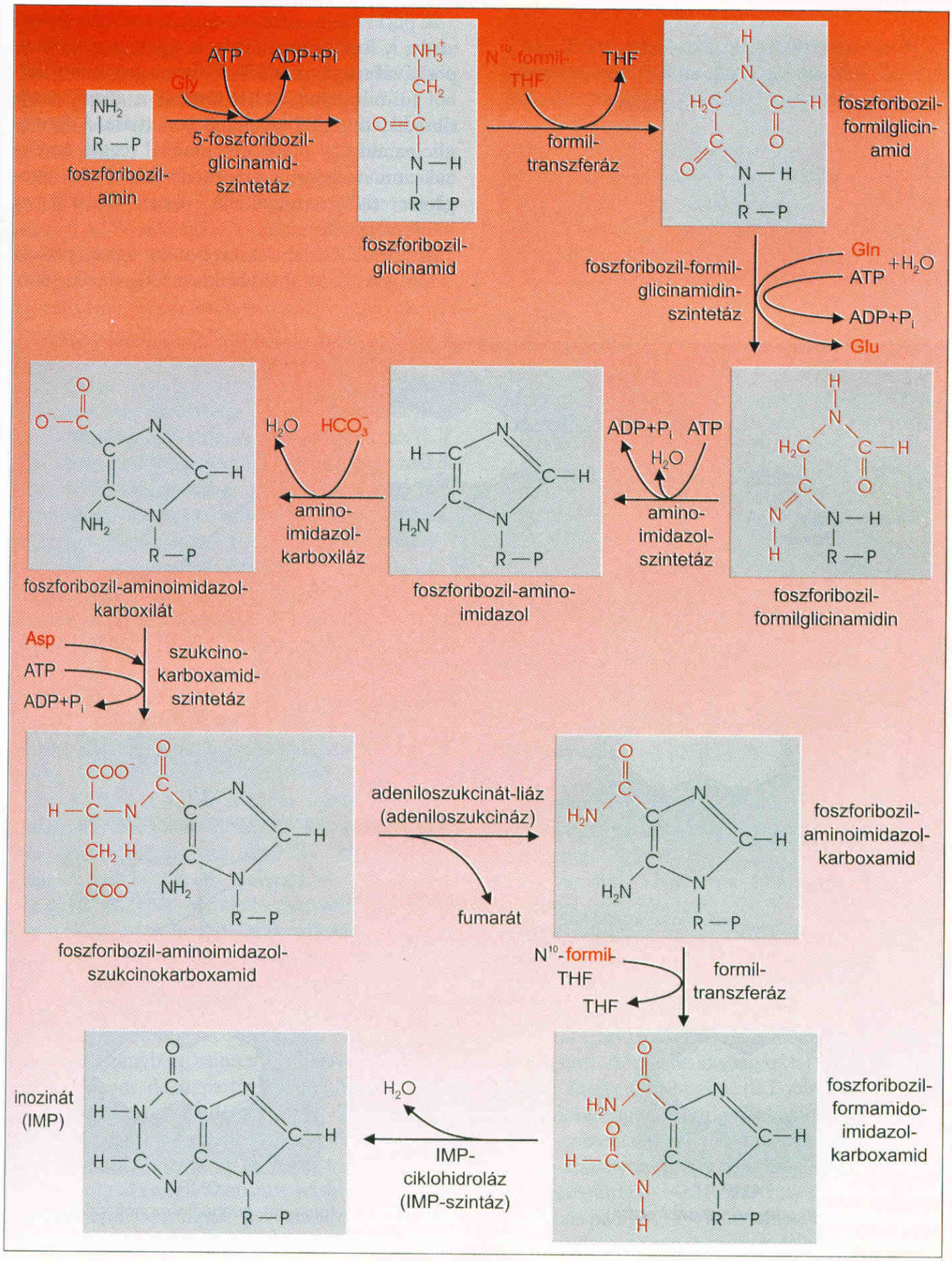


2-219. ábra. A foszforibozil-pirofoszfát szerepe a purin nukleotidok szintézisében

történik és a dezoxi-ribonukleotid-molekulák a már elkészült ribonukleotidokból keletkeznek.

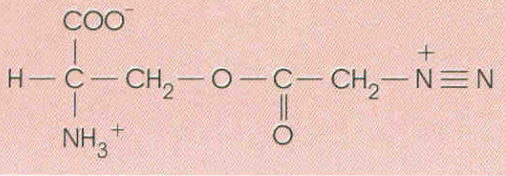
A purinváz kialakulását szolgáló komponenseket szemlélteti a *2-218. ábra*.

A bioszintézis kiindulási vegyülete a glukóz direkt oxidációja során keletkező D-ribóz-5-foszfát (R-P). A ribóz-foszfáton azonban nem kezdődik el a nukleotidszintézis, hanem előbb **5-foszforibozil-1-pirofoszfát (PRPP)** képződik, amely makroerg kötéseket tartalmaz *(2-219. ábra)*. Csak ezután történik a purinváz első tagjának szintézise, amikor glutamin jelenlétében 5-foszforibozil-1-amin keletkezik. Az utóbbi reakció során konfigurációváltozás is történik: a C1 α-helyzet a PRPP-ben β-konfigurációjú lesz. A C-N glikozidkötés β-konfigurációja jellemző a természetben előforduló nukleotidokra. A reakciók energiát és specifikus enzimeket igényelnek. Figyelemreméltó, hogy a PRPP és az 5-foszforibozil-1-amin szintézisét katalizáló enzimek, a **PRPP-szintetáz** (ribóz-foszfát-pirofoszfokináz) és a **PRPP-glutamin-amidotranszferáz** a nukleotidszintézis közti és végtermékeivel, az IMP-vel, az AMP-vel és a GMP-vel gátolhatók negatív feedback szabályozást eredményezve.



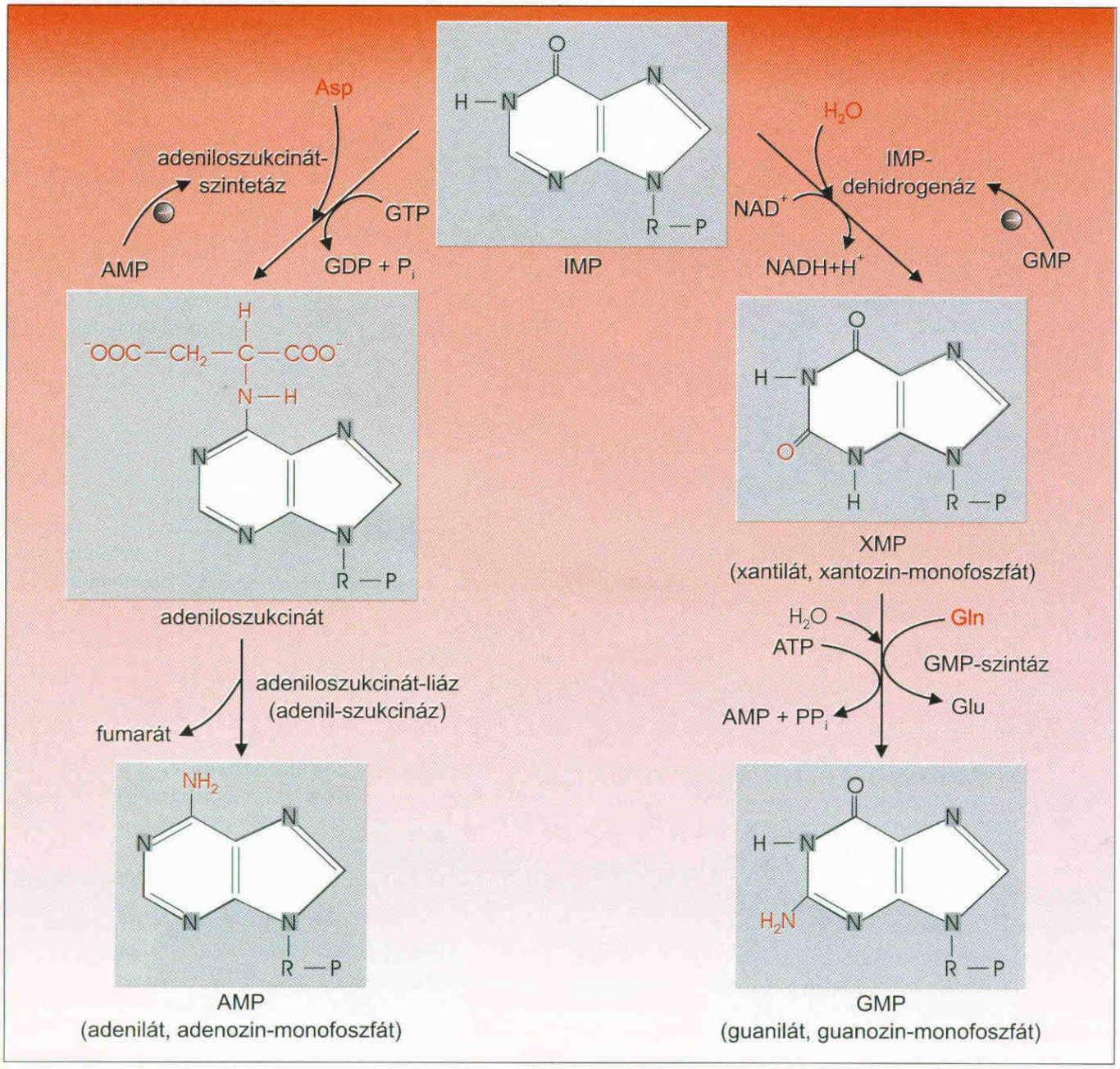
2-220. ábra. Az IMP szintézise

A második enzim (az amidotranszferáz) gátolható Gln-analógokkal, amely hasznosítható kemoterápia során. Ilyen vegyület pl. az azaszerin:



A purinváz bioszintézisének következő lépései során a foszforibozil-amin a glicin karboxilcsoportjával reagál, majd N10-formil-tetrahidrofolátból formilcsoport-átvitel történik a glicin- amid-ribonukleotid szabad aminocsoportjára. A formil-glicinamid egy újabb glutaminnal reagál, amelynek aminocsoportja a purinváz következő nitrogénjét (N3) szolgáltatja, majd kialakul az imidazolgyűrű.

A formilálási lépést kivéve az összes reakció ATP-igényes. A továbbiakban CO_2-fixálás törté-



2-221. ábra. Az IMP átalakulása adeniláttá és guaniláttá

nik (ami kivételesen sem biotint, sem ATP-t nem igényel), majd egy aszpartát szolgáltatja a purinváz N1-atomját, végezetül egy újabb THF (N10-formil-tetrahidrofolát) által nyújtott C1-töredék lehetővé teszi az inozinsav (IMP) képződését *(2-220. ábra)*.

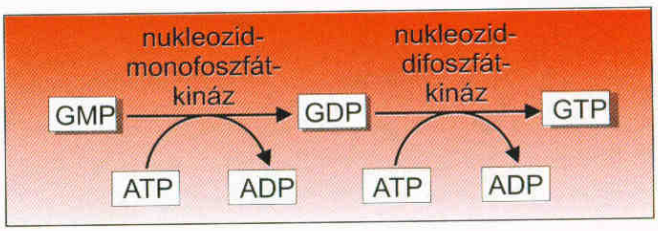
Az IMP bioszintézise energiaigényes; a reakciókhoz 4 ATP, illetve a PRPP szintéziséhez még további 2 ATP szükséges. A prokariótákban minden egyes reakciót külön enzim katalizál, míg eukariótákban az evolúció során génfúzióval multifunkcionális enzimrendszerek jöttek létre, melyek sokkal hatékonyabbak, pontosabban és így „gazdaságosabban" szabályozzák a szükséges metabolit intermedierek mennyiségét. Eukariótákban három enzimrendszer katalizálja az IMP bioszintézisét; az 5'-foszforibozil-aminoimidazol-szintetáz (a 2-220. ábrán az első, a második és a negyedik reakciót), az 5'-foszforibozil-amino-imidazol-szukcinokarboxamid-szintetáz (az ötödik és a hatodik reakciót) és az IMP-szintetáz (a két utolsó reakciót).

Orvosi szempontból figyelemreméltó, hogy a C1-töredéket szállító THF a purin- és pirimidinbázisok szintézisében „elkötelezett" molekula; képződésének vagy a különböző redukáltsági fokú C_1 töredékek egymásba történő átalakulásának gátlásával a nukleotidok de novo szintézise is gátlódik. Gátlás történhet patológiás körülmények között, illetve orvosi beavatkozás során (lásd később).

Az **ATP** és a **GTP** adenilát (AMP), illetve a guanilát (GMP) intermediereken keresztül IMP-ből szintetizálódik. Az IMP-ből adenilát vagy guanilát keletkezhet egy aminocsoport bevitelével. Az egyik irányban a reakció aszpartátot és GTP-t igényel; az **adeniloszukcinát-szintetáz** enzim az inozinát-6-karbonil oxigénatomját az aszpartát aminocsoportjára cseréli ki, majd az **adeniloszukcinát-liáz** fumarátot hasít le az adeniloszukcinátból, adenilátot eredményezve *(2-221. ábra)*. A másik irányban szintén aminosav az aminocsoport-donor, de aszpartát helyett glutamin reagál és a reakciót egy oxidációs lépés előzi meg. Az oxidációs lépés során az inozinsavból xantilsav keletkezik (az inozinsavban lévő 6-hidroxipurint hipoxantinnak, míg a xantilsavban található 2,6-dihidroxipurint xantinnak nevezik). A GMP-szintézis reakcióit az **IMP-dehidrogenáz** és a **GMP-szintetáz** katalizálják (2-221. ábra). A purin nukleotid bioszintézis ezen szakaszában is található feedback szabályozás, nevezetesen az AMP az adeniloszukcinát-szintetáz aktivitását, a GMP az IMP-dehidrogenáz aktivitását gátolja.

Orvosi szempontból ismét megjegyzendő, hogy a GMP-szintetáz is, hasonlóan az amidofoszforibozil-transzferázhoz, gátolható glutamin analógokkal.

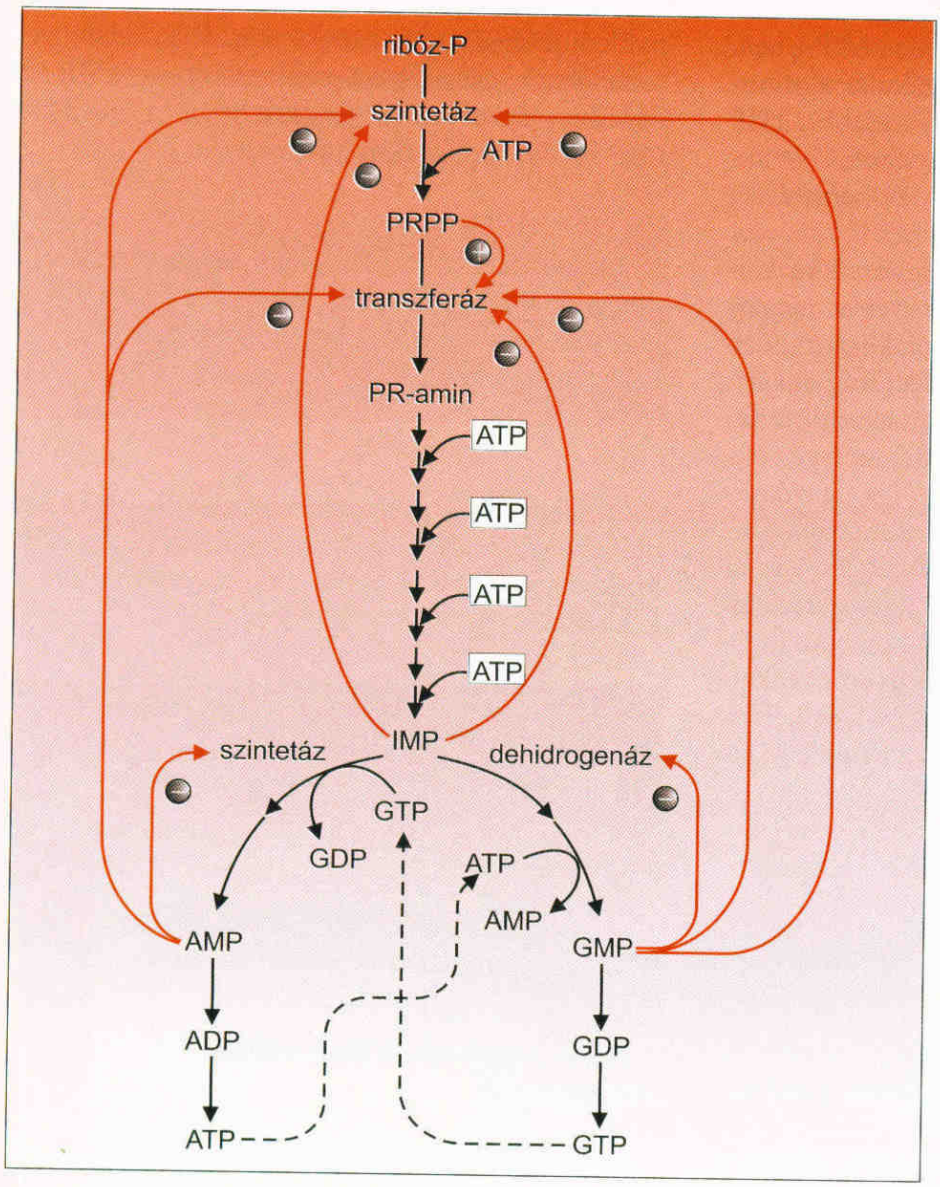
Az adenilátból és guanilátból ezután ATP és nukleozid-monofoszfát-kináz, illetve difoszfát-kináz enzimek katalízisével nukleozid-trifoszfátok képződhetnek *(2-222. ábra)*.



2-222. ábra. Purin nukleozid di- és trifoszfátok képződése

Purin nukleotidok bioszintézisének szabályozása

Minthogy a purin nukleotidok de novo szintézise energiaigényes folyamat, érthető, hogy ha elegendő mennyiségű végtermék áll a sejtek rendelkezésére, további szintézisük felesleges. A szabályozásra többféle lehetőség is van. Az egyik a **PRPP-szintetáz** és a **PRPP-amidotranszferáz** feedback gátlása IMP és AMP, illetve GMP jelenlétében. Az amidotranszferáz inaktív dimer és aktív monomer lehet. IMP és az összes „A", illetve „G" nukleotid a dimer felé tolja az egyensúlyt, tehát gátol. A másik szabályozási út az IMP-ből AMP- illetve GMP-szintézis kontrollja; a GMP az IMP-dehidrogenázt, míg az AMP az adeniloszukcinát-szintetázt gátolja. Ezeket a negatív visszacsatolási szabályozási módokat kiegészíti az, hogy az IMP-ből történő AMP-szintézis GTP-t, a GMP-szintézis pedig ATP-t igényel. Ez kereszt regulációt eredményez és hozzájárul a két nukleotid-koncentráció egymáshoz viszonyított egyensú-

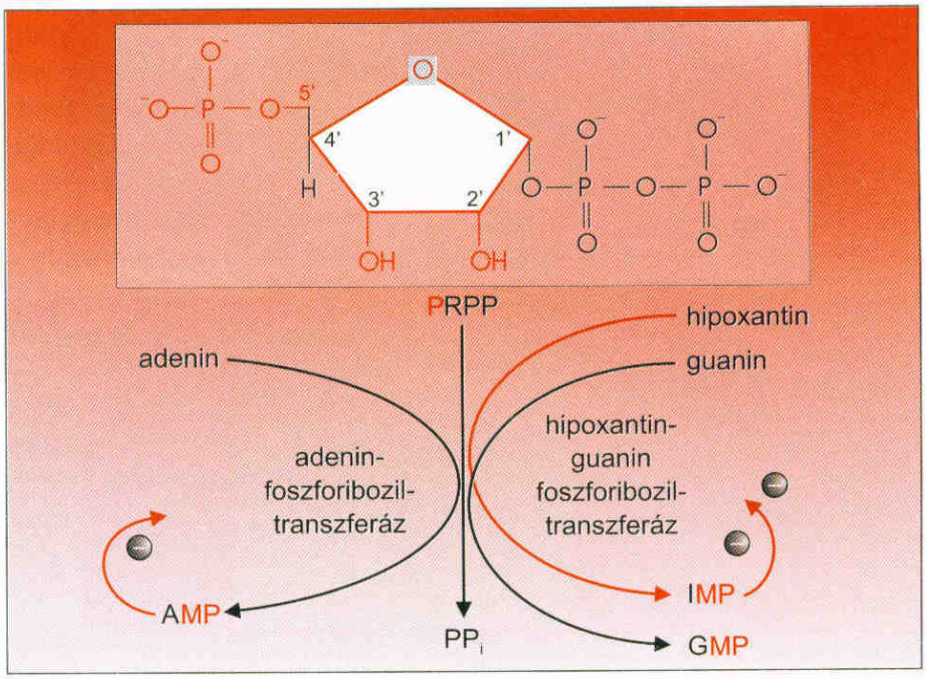


2-223. ábra. Purin nukleotidok szintézisének szabályozása. A visszacsatolásos gátlásokat (-), az aktiválásokat (+) szimbólumok jelzik

lyának fenntartásához. A különböző szabályozási lehetőségeket foglalja össze a *2-223. ábra*.

A „mentő" (ún. salvage) mechanizmusok is fontos szerepet játszanak a purin nukleotidok anyagcseréjében. A purinbázisok és nukleozidok közvetlenül átalakulhatnak mononukleotidokká és így a nukleinsavak degradációja során keletkező purinbázisok újra felhasználásra kerülhetnek. A mentő utakat nagymértékben a polimorfonukleáris sejtek, az immunrendszer és az agy használja fel. A purinbázisok származhatnak még a táplálékból, illetve az adenin az S-adenozil-metioninból is (lásd 2.4. fejezet).

A mentő utak egyik típusa, amikor egy szabad purinbázis PRPP-tal reagál és mononukleotid keletkezik; a reakcióhoz az energiát a PRPP pirofoszfát hidrolízise szolgáltatja. A reakciókat az **adenin-foszforibozil-transzferáz** és a **hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz** katalizálják, aminek eredményeként AMP és GMP, illetve IMP keletkezik *(2-224. ábra)*. Ezen mechanizmusnak az ad különösen nagy jelentőséget, hogy a PRPP mennyisége a purin nukleotid bioszintézis sebességének legfőbb meghatározója. A PRPP mennyiségét viszont az határozza meg, hogy mennyi az elérhető ribóz-5-foszfát és milyen a **PRPP-szintetáz** aktivitása. Az utóbbi nagymértékben függ a purin nukleotidok koncentrációjától, mert az IMP és a GMP gátolja az enzim aktivitását (alloszterikus reguláció; 2-223. ábra). A mentő út



2-224. ábra. Purinbázisok újra hasznosítása; „mentő utak"

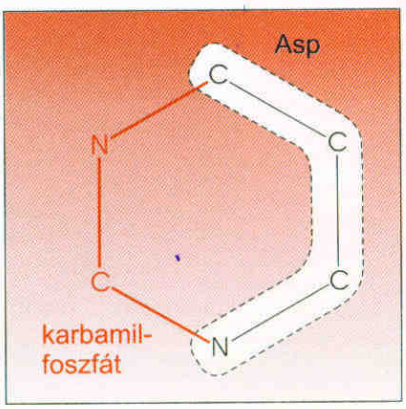
további szabályozását jelenti, hogy az IMP és a GMP, illetve az AMP gátolják saját keletkezésüket hipoxantinból és guaninból, illetve adeninből (2-224. ábra). Ezen mentő útról kihangsúlyozandó, hogy működése hatékonyan gátolja a de novo nukleotid szintézist; (i) elhasználja a PRPP-t és (ii) a termékek, az AMP és a GMP gátolják az IMP szintézisét (2-223. ábra). Így tehát a nukleotidok de novo szintézise és a bázismentő út összehangolt működése nagy jelentőséggel bír. Ennek orvosi vonatkozásait lásd a nukleotidok katabolizmusánál.

A mentő út másik típusa, amikor nem a szabad bázis, hanem a purin-ribonukleozid (adenozin és guanozin) ATP-vel foszforilálódik és AMP, illetve GMP keletkezik. A reakciókat **kinázok** (pl. adenozin-kináz) katalizálják, amelyek nem specifikusak a ribo- vagy dezoxiribonukleozidokra. Mennyiségi szempontból a ribo- és a dezoxiribonukleozidok direkt foszforilációja nem látszik olyan fontosnak, mint a foszforibozilációs út. Az emlős sejtek egy része (pl. agy, eritrociták, polimorfonukleáris sejtek, illetve általában a magasan differenciálódott sejtek) nem tudnak *de novo* purin nukleotidot szintetizálni, és szükségletüket exogén purin nukleozidok felvételével fedezik. Minthogy a sejtek foszforilált nukleozidokat (nukleotidokat) általában nem tudnak a környezetükből felvenni – csak purinbázisokat vagy nukleozidokat –, a nukleotidszintetizáló kapacitás nélküli sejtek nukleotiddal történő ellátásában a két mentő út lényeges szerepet játszik. Emberben a táplálék mellett a máj a nukleozidok fő forrása.

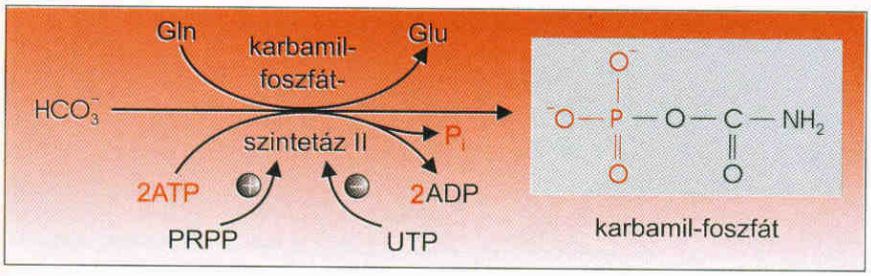
Pirimidin nukleotidok bioszintézise

A pirimidinbázis vázatomjai **karbamil-foszfátból** és **aszpartátból** származnak *(2-225. ábra)*.

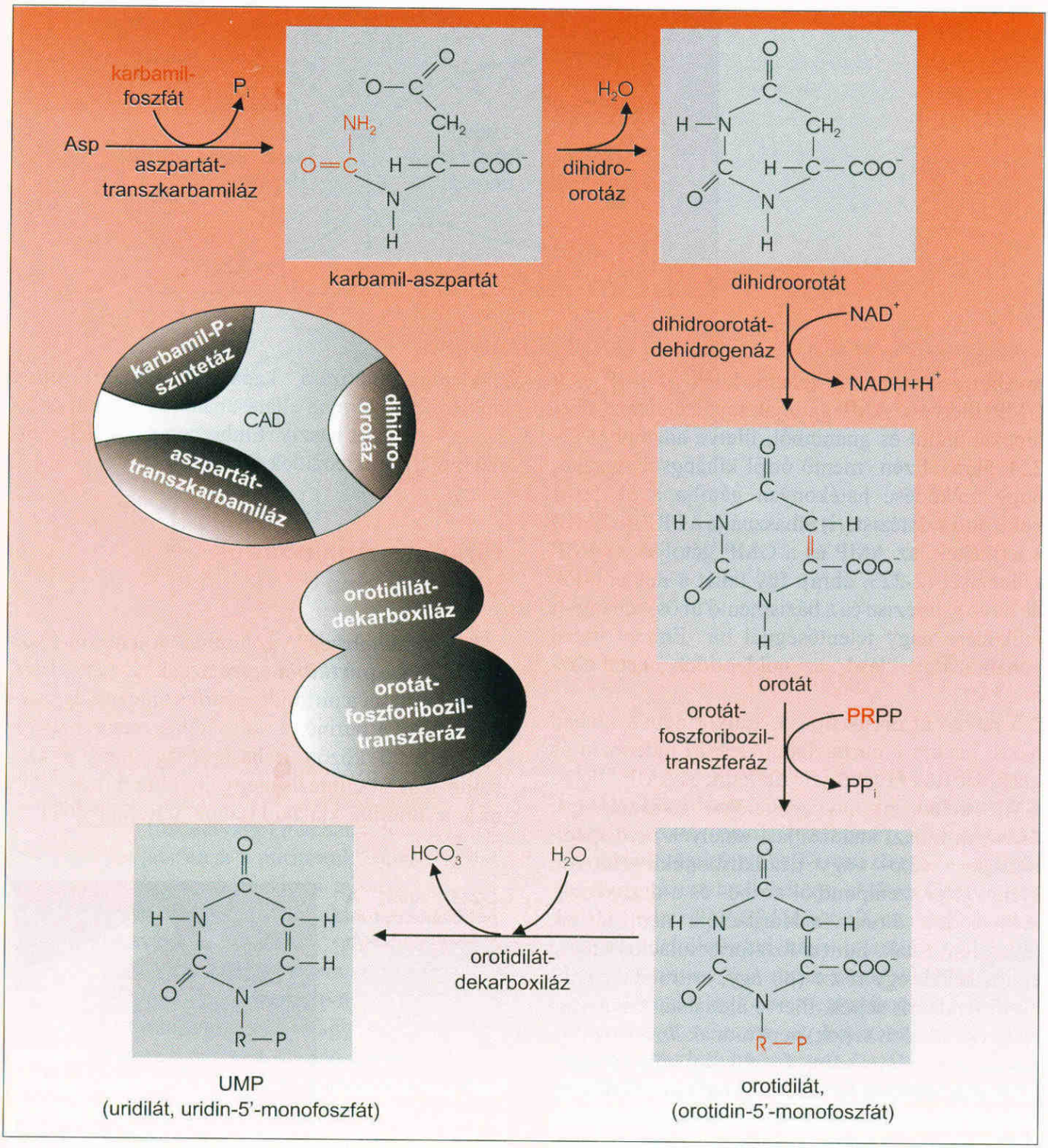
Bár látszatra a pirimidingyűrű szintézise egyszerűbb, mint a puriné, a valóságban mégis nagyon sok a kettő között a hasonlóság, mert a karbamil-foszfát szintéziséhez CO_2, glutamin és ATP, míg a timidin kialakulásához tetrahidrofolát is



2-225. ábra. A pirimidinvázat alkotó atomok eredete



2-226. ábra. A citoszolban működő karbamil-foszfát-szintetáz II



2-227. ábra. Az UMP szintézise. *A komplexekben működő enzimeket külön jelezzük (sötétpiros satírozás)*

szükséges. Így a pirimidin- és a purinbázisok bioszintézisében a purin bioszintéziséhez szükséges Gly-t leszámítva az elemek közösek. Az enzimek specificitásán kívül a legszembetűnőbb eltérés az, hogy a pirimidin nukleotidokban az N-glikozidos kötés (ugyancsak PRPP közvetítésével) a szintézis későbbi fázisában alakul ki, mint a purin nukleotidokban.

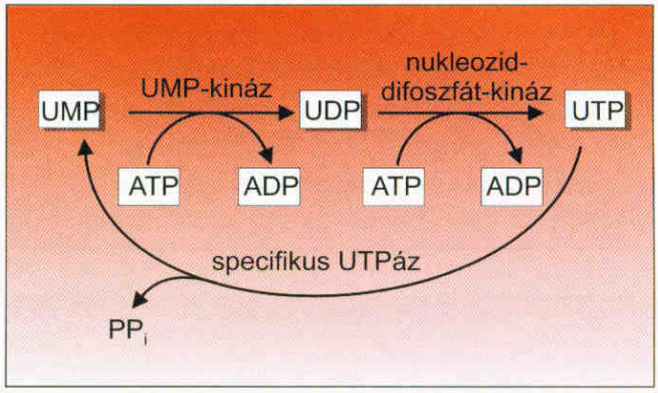
A bioszintézis során először karbamil-foszfát keletkezik HCO_3^--ból és glutaminból. A reakcióhoz két ATP-re és **karbamil-foszfát-szintetáz II-re** van szükség *(2-226. ábra)*. A szintézis a citoszolban játszódik le. (Az ornitinciklushoz szükséges karbamil-foszfát a mitokondriumban szintetizálódik és nem Gln, hanem NH_4^+ szolgáltatja az aminocsoportot.) A citoszolban a karbamil-foszfát-szintetáz II allosztérikus regulátora az UTP, amely gátolja aktivitását, illetve a PRPP, amely stimulálja.

A pirimidinbázis szintézisének következő lépése a karbamil-foszfát és aszpartát kondenzációja, majd a gyűrű záródása vízvesztés közben. A keletkezett dihidroorotsav ezután oxidálódik és orotsav keletkezik. A reakció oxidált NAD-ot és dihidroorotát-dehidrogenázt igényel *(2-227. ábra)*. Az első három lépést prokariótákban három különböző enzim katalizálja; a már említett **karbamil-foszfát-szintetáz**, az **aszpartát-transzkarbamiláz** és a **dihidroorotáz**. Emlősökben a három enzim, hasonlóan a purinszintézisben résztvevő enzimkomplexekhez, multifunkcionális egységet képez: a három enzim egyetlen polipeptidláncon helyezkedik el (240 kDa) és mint CAD ismert az irodalomban.

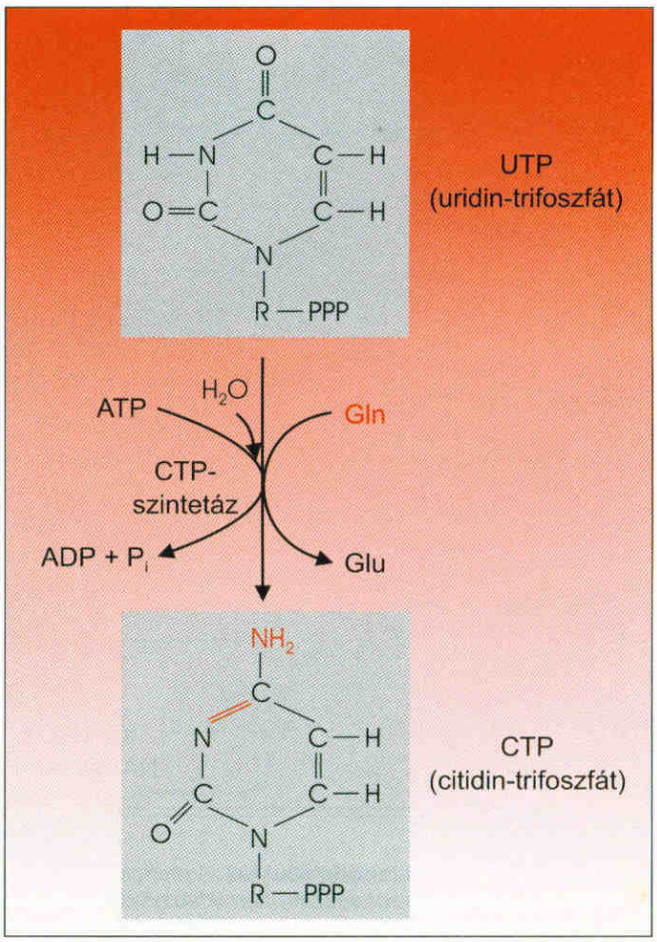
A pirimidin nukleotidok bioszintézise során csak ezután következik be a ribóz-foszfát kapcsolódása; a donor ismételten a PRPP. Az N-glikozidos kötés kialakulását az **orotát-foszforibozil-transzferáz** katalizálja. Az ezt követő dekarboxilálás révén UMP keletkezik. A két utóbbi enzim ugyancsak komplexet képez eukariótákban.

A bioszintézis során képződött UMP ezután foszforilálódhat *(2-228. ábra)*.

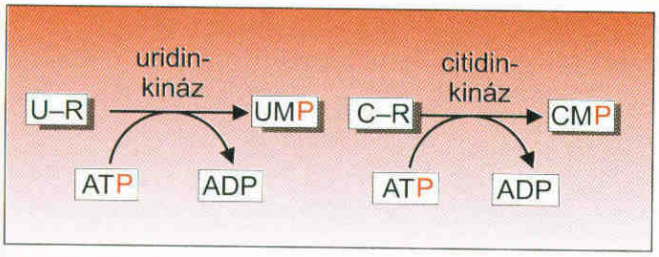
Az UDP a dUDP és dTTP kiindulási vegyülete. Az UTP, azon kívül, hogy a nukleinsavszintézis egyik komponense, a CTP szintézisét is szolgálja. Az UTP-ből Gln és ATP jelenlétében CTP keletkezhet. A reakciót a **CTP-szintetáz** katalizálja *(2-229. ábra)*. A reakciómechanizmus hasonló a purinbázisok szintézisénél leírtakhoz, nevezetesen valamelyik aminosav szolgáltatja az aminocsoportot.



2-228. ábra. Pirimidin nukleozid di- és trifoszfátok képződése



2-229. ábra. A CTP keletkezése

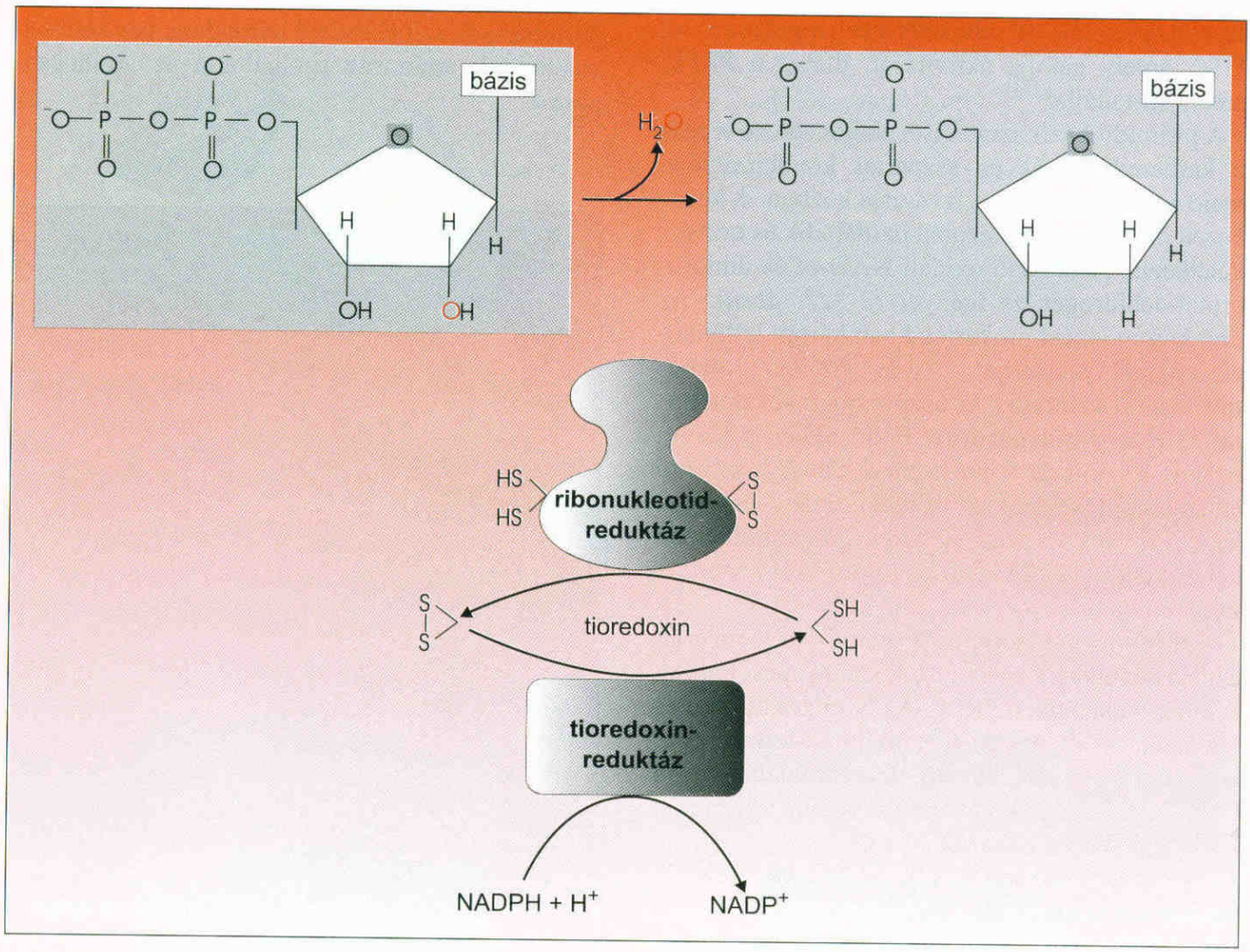


2-230. ábra. Az uridin és citidin nukleozidok „mentő útja". *Az R ribózt jelent*

Az uridin és citidin nukleotidok egyik „mentő útját" az uridin-citidin kinázok alkotják. A reakciók eredményeként a nukleozidokból nukleozid-monofoszfát képződik *(2-230. ábra)*. A másik „mentő út" hasonlít a purinbázisoknál leírtakhoz (2-224. ábra), amikor is a pirimidinbázis PRPP-tal reagál, pl.

$$\text{uracil} + \text{PRPP} \rightarrow \text{UMP} + \text{PP}_i.$$

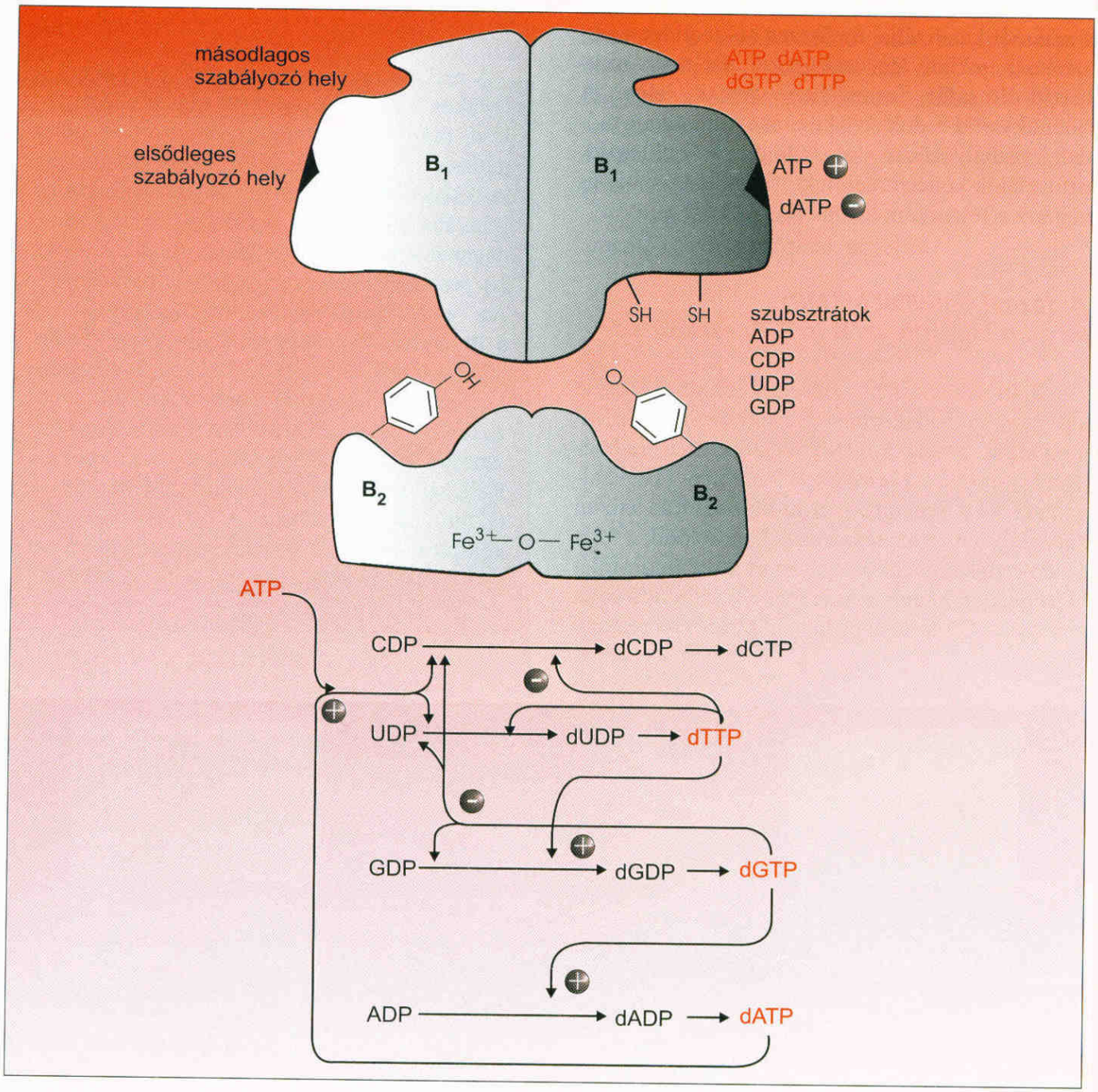
A pirimidin nukleotidok szintézisének legfőbb feedback szabályozói emlős sejtekben a PRPP, amely stimulálja, illetve az UTP, amely gátolja a karbamil-foszfát-szintetáz II aktivitását (2-226. ábra). Továbbá az UMP gátolja az orotidilát-dekarboxiláz aktivitását (2-227. ábra).



2-231a ábra. A ribonukleotid-reduktáz. *A reakció, amelyet a ribonukleotid-reduktáz katalizál, egy nukleozid-difoszfát redukciója, aminek eredményeként dezoxi-ribonukleozid-difoszfát keletkezik. Az enzim két alegységből épül fel; dimer szerkezetű. A kisebb alegység teszi lehetővé a nukleotid ribóz 2-oxigénjének eltávolítását. A nagyobbó alegység tartalmazza az -SH csoportokat, amelyek oxidálódásuk során a hidrogént szolgáltatják, továbbá felelős a szubsztrát megkötéséért, a specificitásért és az aktivitás mértékéért: a különböző dezoxinukleotidok allosztérikusan szabályozzák saját szintézisüket. A működés közben oxidálódott SH-csoportokat a tioredoxin redukálja vissza, amely tioredoxin-reduktázzal és NADPH-val kapcsolt reakció.*

Dezoxiribonukleotidok keletkezése

A dezoxiribonukleotidok kialakulásáért a ribonukleotid-reduktáz komplex a felelős, amely csak olyan sejtekben aktív, amelyek sejtosztódás irányába elkötelezettek. A reakció lényege, hogy a ribóz 2' szénatomján lévő hidroxilcsoport redukálódik és az oxigénből víz keletkezik *(2-231. ábra)*. A reakciót katalizáló enzimrendszer azonban több komponensből épül fel. A **ribonukleotid-reduktáz** SH-tartalmú fehérje, amely a **tioredoxin** nevű kofaktorral működik. Az enzim működése közben



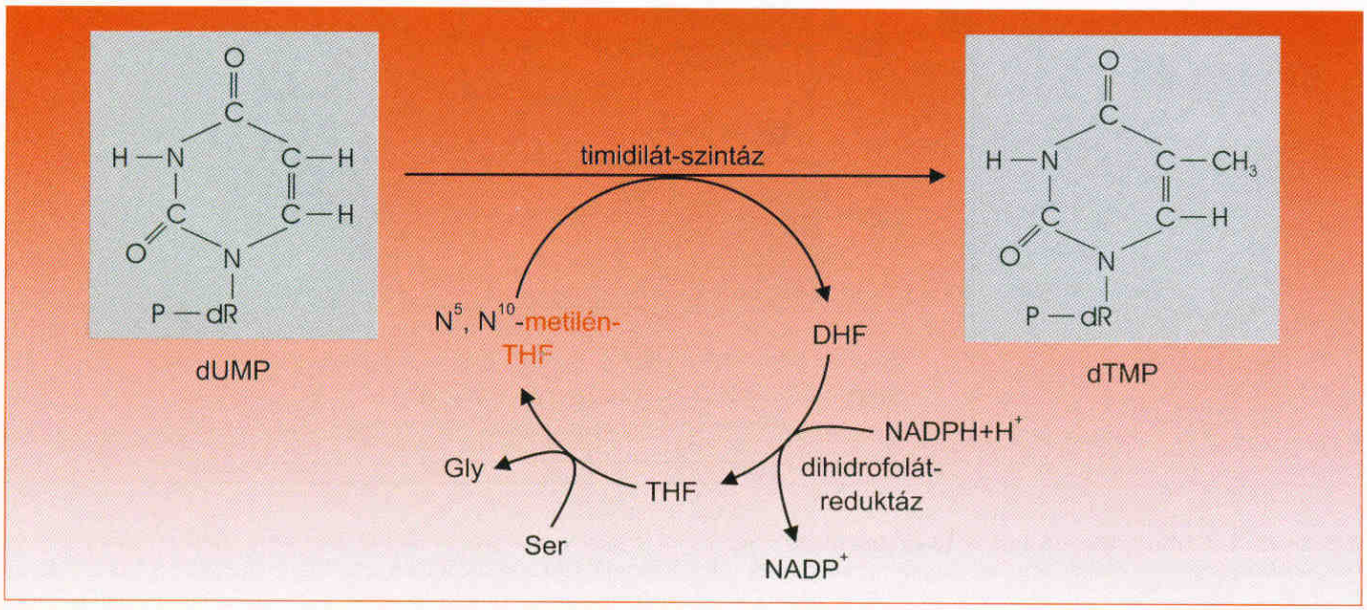
2-231b ábra. A ribonukleotid-reduktáz szabályozása. Az enzim B_2-alegysége tirozil-hidroxil-csoporton keresztül szabad gyök típusú reakcióban vesz részt, amihez oxigénhez kötött vas kofaktorra van szükség. Az enzim aktív centruma a két alegység (B_1 és B_2) határán alakul ki úgy, hogy a katalízisben a B1-alegység két SH-csoportja is részt vesz. A B_1-alegység egyben felelős az enzimaktivitás szabályozásáért is. Az elsődleges szabályozó helyhez kötődő ATP fokozza, míg a dATP gátolja az enzim aktivitását. A másodlagos szabálylozó hely (szubsztrát specificitásért felelős rész) komplikáltan működik; az ATP, dATP, dGTP, dTTP pozitív és negatív allosztérikus hatásokon keresztül a szubsztrátok átalakításának arányát befolyásolják az ábra alsó részében jelzett módon.

az SH-csoportok oxidálódnak (S-S). A kofaktor visszaredukálását eukariótákban glutation-reduktáz (prokariótákban tioredoxin-reduktáz) katalizálja, amely NADPH-ot használ hidrogéndonorként. Végeredményben a dezoxinukleotidok szintézise úgy írható le, hogy a ribóz hidroxilcsoportja redukálódik, és a reakcióhoz szükséges hidrogént a NADPH szolgáltatja. Az enzimrendszer, amely ezt a reakciót katalizálja, az összes nukleotidot szubsztrátnak tekinti, de csak akkor, ha azok **nukleozid-difoszfát** formájában vannak jelen. A ribonukleotid-reduktáz aktivitása komplikált módon szabályozódik; a különböző nukleozid-trifoszfátok koncentrációjuktól függően pozitív és negatív effektorként hatnak *(2-231b ábra)*.

A dezoxi-timidilát (dTMP) és a timidin-trifoszfát (dTTP) szintézise

A DNS-szintézishez szükséges timidin-trifoszfát két úton is keletkezhet. Az egyik út a dUMP metilálása, amely a dTMP keletkezését eredményezi. A metilcsoportot N^5,N^{10}-metilén-THF szolgáltatja és a reakciót a **timidilát-szintáz** enzim katalizálja. A reakció szorosan kapcsolódik a folát oxido-redukciós ciklusával, mert a tetrahidrofolát hidrogéndonorként is szerepel. A tetrahidrofolát nemcsak a C1-töredéket, hanem a transzfer reakció során a metilén → metil redukcióhoz szükséges hidrogént is szolgáltatja; így az N^5-N^{10}-metilén-tetrahidrofolátból dihidrofolát keletkezik. A dihidrofolát tetrahidrofoláttá redukálását a NADPH-függő dihidrofolát-reduktáz katalizálja, míg a metiléncsoport szerinből származik *(2-232. ábra;* lásd 2-181. ábrát is).

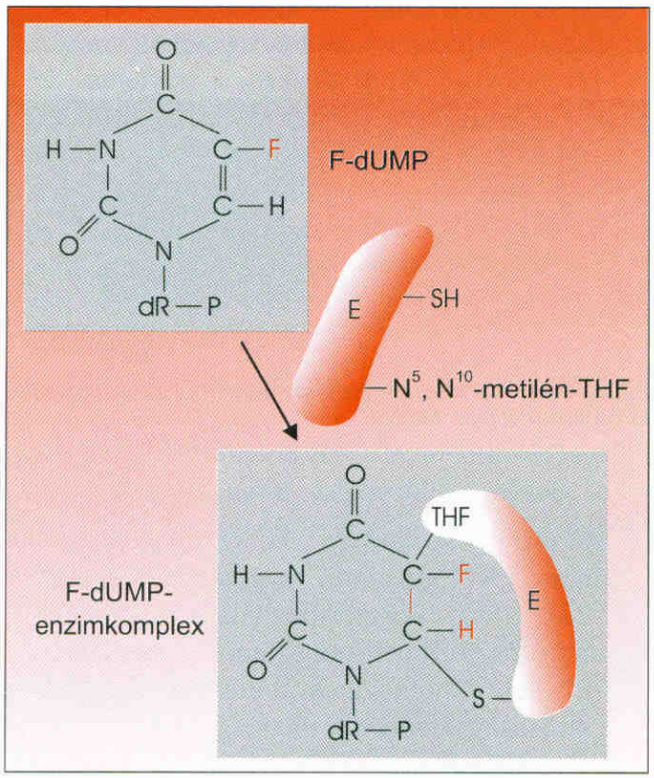
A reakció orvosi szempontból több okból is érdekes. Egyrészt a *timidilát-szintáz* enzim gátlása, másrészt a tetrahidro-dihidrofolát ciklus gátlása is csökkentheti a DNS-szintézishez szükséges dTTP- szintet, amely sejtosztódás irányába elkötelezett sejtek (pl. rosszindulatú daganat sejtek, de a vérképző rendszer sejtjei is) proliferációjának gátlására felhasználható. Az első típusú gátlás mechanizmusát az 5-fluorouracil szemlélteti. Emberi szervezetbe juttatása után a sejtekbe kerülve a pirimidin nukleozidok foszforilációját katalizáló kinázokkal – ATP jelenlétében – a fluor-uridin-származék is foszforilálódik és a keletkezett F-dUMP-t a timidilát-szintáz szubsztrátjának tekinti *(2-233. ábra)*. A szubsztrát–enzim komplex kialakulása után azonban az enzim nem tudja elereszteni „hamis" szubsztrátját, az-



2-232. ábra. A dezoxi-timidilát (dTMP) szintézise

zal kovalens komplexet képez és elveszti katalitikus funkcióját („szuicid enzim").

A második típusú gátlást a tetrahidrofolát-analógok (pl. metotrexat, aminopterin) szemléltetik, amelyek az N^5,N^{10}-metilén-THF reszintéziséhez szükséges dihidrofolát-reduktáz kompetitív gátlószerei (K_i $<10^{-9}$ M) és így teszik lehetetlenné a dUMP metilálását.

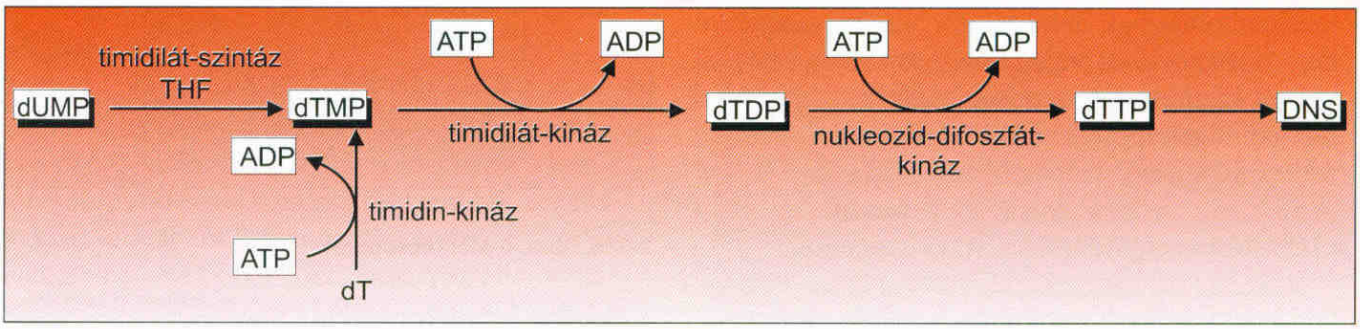


2-233. ábra. A timidilát-szintáz gátlása fluorouracillal. *A szervezetbe juttatott fluorouracilból először F-UDP, majd abból F-dUDP, végül pedig F-dUMP lesz. A timidilát-szintáz (E-SH) reagál az F-dUMP-vel N^5,N^{10}-metilén-tetrahidrofolát (THF) jelenlétében. Az enzimről a „hamis" szubsztrát nem disszociál, ezáltal inaktív enzimkomplex jön létre*

A dTMP keletkezésének egy másik lehetséges útja a sejtek által felvett dezoxi-timidin direkt foszforilációja. A reakciót a **timidin-kináz** katalizálja ATP felhasználásával. A két út pontos biológiai jelentősége ma sem ismert. Azonban bármelyik úton keletkezik is a dTMP, az timidilát-kinázzal, majd nukleozid-difoszfát-kinázzal tovább foszforilálódik. Foszfatázok jelenlétében azonban a timidin-mono-, di- és trifoszfátok defoszforilálód- hatnak. A reakciók sebességétől függően a DNS-szintézishez szükséges dTTP-szubsztrát a sejtek rendelkezésére állhat *(2-234. ábra)*. Az enzimek aktivitása a sejtciklusoktól függően változik.

A timidin-kinázzal történő timidilátszintézist „mentő útnak" is szokták nevezni.

A timidin-kináz lehetséges biológiai szerepén kívül (pl. tumorokban és proliferáló normál szövetekben is általában fokozott az aktivitása) az enzimaktivitás meghatározásának gyakorlati jelentősége is van. A medicinában széleskörűen elterjedt a különböző szövetek, sejtek DNS-szintézisének mérése. A módszer lényege, hogy a radioaktív izotóppal jelzett (^3H vagy ^{14}C) dezoxi-timidint a sejtek felveszik, majd foszforilálás után beépítik a DNS-be. A DNS-be történő radioaktív timidin beépülés sebessége hasznos információt adhat a DNS-szintézisről.



2-234. ábra. A dezoxi-timidin-trifoszfoszfát képződése. *A timidin di- és trifoszfát képződését kinázok, míg lebontásukat foszfatázok katalizálják; tehát a reakciók nemcsak a koncentrációktól, hanem a különböző enzimek mennyiségétől és aktivitásától is függnek*

Dezoxiribonukleotidok bioszintézisének szabályozása

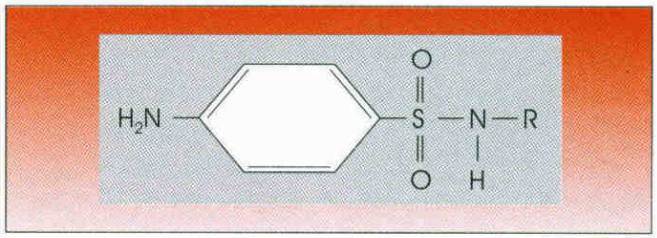
A DNS szintézis pontos szabályozásának egyik feltétele, hogy a különböző **dezoxi-nukleozid-trifoszfátok**, mint szubsztrátok, megfelelő arányban álljanak rendelkezésre. Ezt a feltételt szolgálják a meglehetősen komplex regulációs rendszerek. Ebben kulcsszerepet játszik a ribonukleotid-reduktáz, amely a nukleozid-difoszfátokból készít dezoxi-nukleozid-difoszfátokat. Az enzim működése azonban nagyon jól szabályozott azáltal, hogy a különböző lehetséges termékek az enzim regulátor alegységén keresztül egyes reakciókat aktiválnak, másokat gátolnak. A rendszer működését szemlélteti a 2-231b ábra.

Nukleotidok bioszintézisét befolyásoló vegyületek. Terápiás felhasználás

A kemoterápia törekvése, hogy nem kedvező proliferációs folyamatokat (pl. rosszindulatú daganatok, vírusok, autoimmun betegségek) gátolni tudjon. Ennek egyik útja a nukleotidok bioszintézisének befolyásolása. Természetesen hátránya az ilyen jellegű gyógyszeres kezelésnek, hogy nemcsak a nem kedvező, hanem a fontos és „hasznos" funkciókat szolgáló és gyors DNS-turnoverrel rendelkező sejteket (pl. vérképző-, bélhám-, ivarsejt, immunrendszer) is érinti. A fenti célt szolgáló vegyületek hatásmechanizmusának legtöbbször az az alapja, hogy a természetes anyagcseretermékekhez hasonló szerkezettel rendelkeznek és így a nukleotid-anyagcsere különböző enzimeinek reverzibilis vagy irreverzibilis gátlószerei lehetnek. Ilyenek a **folsav-**, a **purin-** és a **pirimidinantagonisták**, illetve **-analógok**.

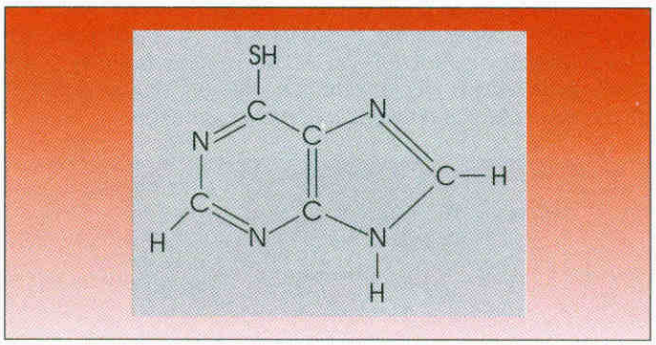
A timidilát szintézisénél már említett aminopterin a folsav antagonistája, mert a dihidrofolát-reduktáz a tetrahidrofolát mellett ezt is szubsztrátjának tekinti.

A folsav az ember számára vitamin, baktériumok azonban képesek szintetizálni és felhasználni saját nukleotid- és aminosav-anyagcseréjükhöz. A **szulfonamidok** *(2-235. ábra)* a folsavban lévő *p*-amino-benzoesav (lásd 2.4. fejezet) analógjai, és így a bakteriális folsavszintézis gátlásával – a bakteriumok osztódásának késleltetésével – antibakteriális gyógyszerként használhatók (A szulfonamid volt az első specifikus antibakteriális szer.)



2-235. ábra. A szulfonamidok szerkezete. *Az R változtatható vegyületcsoportot jelent*

A **6-merkaptopurin** és származéka (pl. Imuran) a hipoxantin szerkezeti analógja *(2-236. ábra)*. Foszforibozilálása hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz jelenlétében (2-224. ábra) tioinozinsavat eredményez, mely az inozinsav adeniláttá, illetve guaniláttá történő átalakulását gátolja (2-221. ábra).



2-236. ábra. 6-Merkaptopurin

A citozinmetabolizmussal interferáló antimetabolit származékok közül a **citozin-arabinozid** a legismertebb vegyület. Szerkezete

mindössze annyiban tér el a citozinétól, hogy a ribóz helyett arabinóz a cukorkomponens. A sejtekben foszforilálódik (lásd még a 2-230. ábrát) és így mint a dCTP analógja, a DNS-szintézis gátlószere.

Az **5-fluorouracil**, azon kívül, hogy a timidilát-szintáz inhibitora (mint ezt a timidilátszintézisénél már említettük), beépül az RNS-be is, annak funkcióit gátolva.

A herpesvírusok által okozott betegségek kezelésére is felhasználhatók nukleozid analógok, amelyek a vírusok timidin-kinázát felhasználva gátolják szaporodásukat (a vírus timidin-kináz nem specifikus, így a nukleozid analógokat is foszforilálja és az azokból képződött nukleozid-trifoszfátok gátolják a DNS-polimerázokat). Ma ezek képezik a leghatásosabb antivirális szereket (pl. „Acyclo G", „Zovirax").

A felsorolt vegyületeket csak példaként említettük, hogy illusztráljuk azokat a törekvéseket, amelyekkel az orvos a nukleotid-anyagcsere befolyásolásán keresztül igyekszik a leukaemiát és más rosszindulatú daganatos megbetegedéseket gyógyítani. Ismételten hangsúlyozni kell azonban, hogy ezen kezelések azon az elven alapulnak, hogy a leggyorsabban osztódó sejtek károsodnak a legnagyobb mértékben, de nem kizárólag. Így például a rákos sejtek pusztulása mellett a bélhámsejtek és a vérképző rendszer elemei is károsodnak.

Purin és pirimidin nukleotidok lebontása

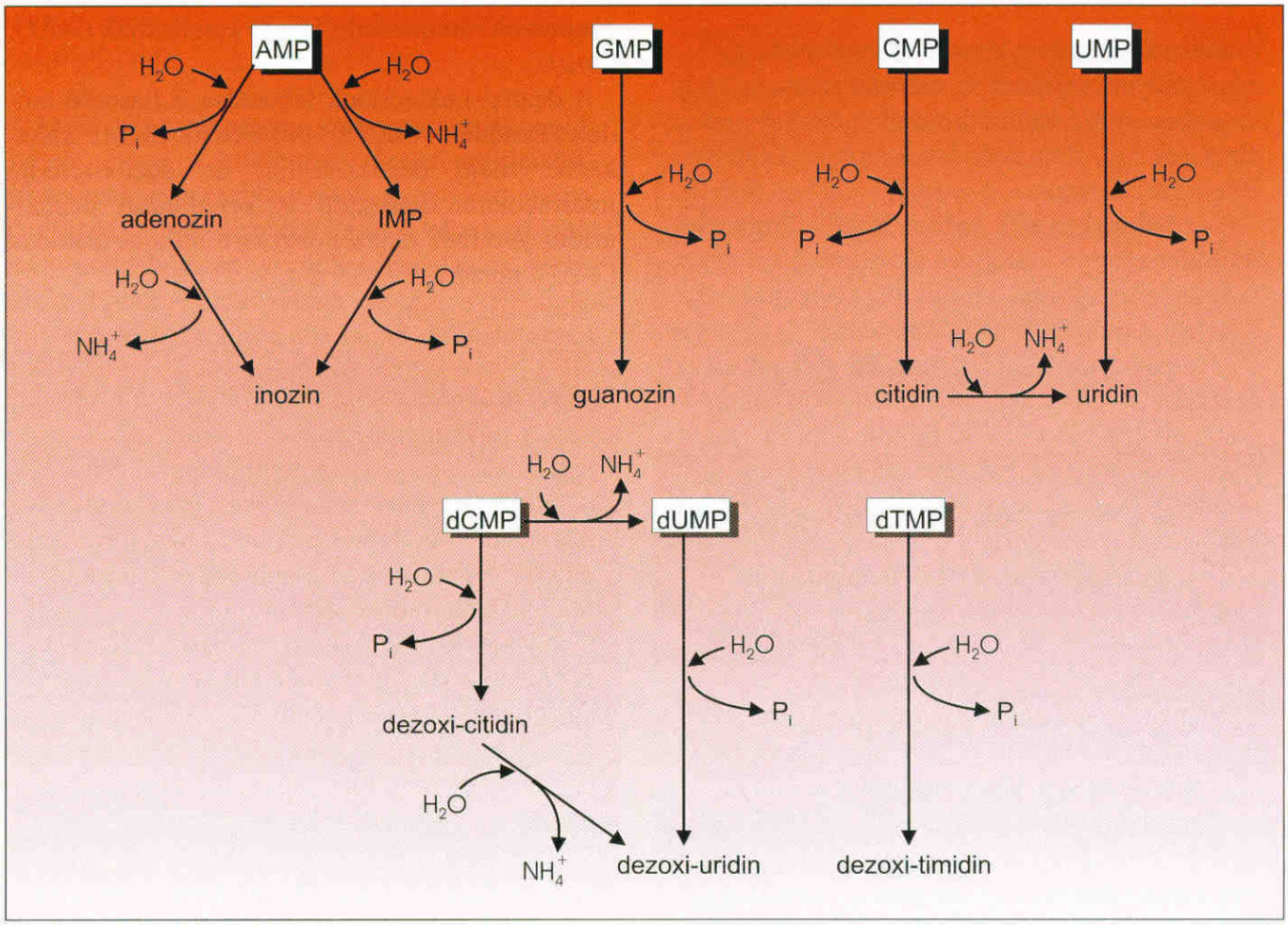
A purin és pirimidin nukleotidok degradálása a foszfátcsoportok eltávolításával kezdődik. A reakciót **nukleotidázok** katalizálják, aminek eredményeként adenozin, guanozin, citidin és uridin keletkezik. Az AMP az első lépésben dezaminálódhat is, és IMP keletkezése után történik a foszfát leadása inozint eredményezve. Ha adenozin keletkezik, akkor abból dezaminálás után inozin jön létre. A dezaminálási lépéseket **dezaminázok** (amino-hidrolázok) katalizálják *(2-237. ábra)*.

A dezoxi-nukleotidok lebontása is hasonló módon kezdődik. A dCMP-ből először dUMP keletkezik, majd dezoxi-uridin, de dezoxi-citidin intermedieren keresztül is keletkezhet dezoxi-uridin. A dTMP először dezoxi-timidinné alakul át (2-237. ábra).

A purinbázisokból emberben urát (húgysav), míg a pirimidinbázisokból β-aminosavak keletkeznek. Orvosi szempontból a purinbázisok degradációja két szempontból is jelentős. A degradáció végterméke az urát, vízben rosszul oldódó vegyület és az emberben egy nagyságrenddel magasabb a szérumszintje, mint a többi emlősben. Koncentrációjának bármilyen okból bekövetkező további emelkedése kóros. A magas szint ugyanakkor „előnyös" is lehet, ugyanis a bilirubin, a C- és E-vitaminok mellett az urát a legjelentősebb antioxidáns, amely szerepet játszhat a tumoros betegségek kifejlődésének késleltetésében vagy az emberi élettartam meghosszabbításában. Az emberrel szemben más emlősökben az urát tovább katabolizálhat; urikáz enzim hatására (ez az emberben hiányzik) a puringyűrű felszakad és rendkívül jó vízoldékonyságú vegyület, allantoin keletkezik, amely kiválasztásra kerül.

Purinbázisok lebontása

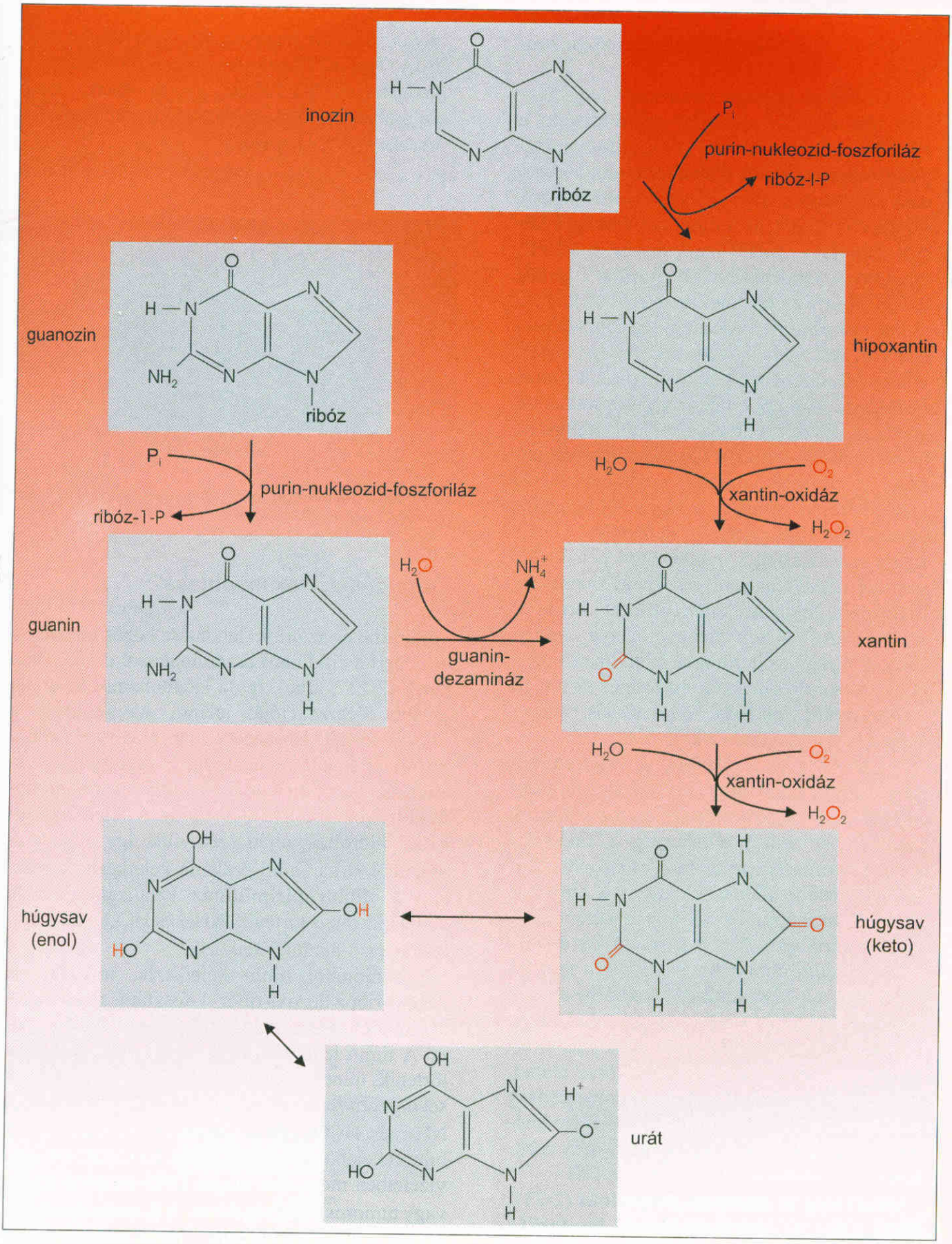
A reakciók lényege az, hogy az adenozinból inozin, majd az inozinból és a guanozinból is xantin keletkezik. Ez utóbbi oxidációjával urát képződik. A reakciók több lépésben játszódnak le *(2-238. ábra)*. Az adenozinból először inozin keletkezik az **adenozin-dezamináz** katalízise révén, majd a ribóz-1-foszfát lehasadásával, amely reakciót nem specifikus **purin-nukleozid-foszforiláz** katalizálja, **hipoxantin** jön létre. A hipoxantin a továbbiakban xantinná oxidálódik; a reakcióhoz oxigénre és **xantin-oxidáz** enzimre van szükség. A xantin-oxidáz hatására vízből és oxigénből hidrogén-peroxid keletkezik.



2-237. ábra. A nukleotidok degradálásának kezdeti lépései: a nukleozidok keletkezése

Guanozinlebontás esetében a reakció a ribóz-1-foszfát eltávolításával kezdődik, amelyet ugyancsak purin-nukleozid-foszforiláz katalizál, majd a következő lépés a dezaminálás, amelyet a **guanin-dezaminász** katalizál. A xantin végül O_2 és víz felhasználásával a xantin-oxidáz által katalizált rekacióban **húgysavvá** oxidálódik. A húgysav keto-enol tautomér formában jelenhet meg. A dezaminációs lépések során keletkezett ammóniából karbamid keletkezik az ornitinciklusban, a xantin-oxidázok működése során keletkező hidrogén-peroxidból pedig **kataláz** hatására víz és oxigén képződik.

Alacsony oldékonyságának következtében az urátszint emelkedése patológiás elváltozásokat okozhat; a tünetek egy részét a különböző szövetekben kicsapódott urátkristályok váltják ki. Egyik legjellegzetesebb tünetcsoportot, a **köszvényt**, az ízületekben felhalmozódott urát által indukált aspecifikus (nem bakteriális) gyulladásos reakciók idézik elő. A vesében felgyülemlett urát viszont **vesekő** panaszokat okozhat. A tünetek súlyosbodhatnak vagy enyhülhetnek az életformától vagy bizonyos betegségektől függően; nagy mennyiségű purinban gazdag táplálék vagy olyan társult betegségek, melyek fokozott sejtszéteséssel járnak (pl. leukaemia, polycythaemia, krónikus nephritis) tovább terhelhetik a már amúgy is magas urátszintet. Alkoholfogyasztás fokozza a glukóz direkt oxidációját, ami a ribóz-5-foszfát felszaporodását eredményezheti. Az utóbbi fokozza a foszforibozil-pirofoszfát szintézisét, ez a purinszintézisnek kedvez és így további purintúltermelést okozhat. Hasonló következményekkel jár a glukóz-6-foszfatáz-deficiencia is (von-Gierke-kór); a felhalmozódó



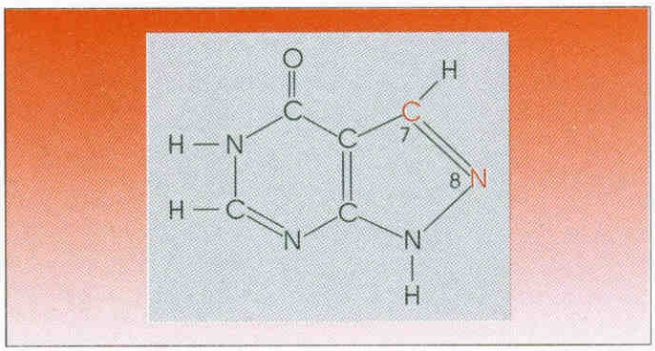
2-238. ábra. A purin nukleozidok lebomlása; a húgysav képződése

ribóz-5-foszfát fokozott PRPP-szintézist produkál.

A purinbázis-anyagcserezavarok leggyakoribb oka azonban a **PRPP-szintetáznak**, a **PRPP-amidotranszferáz** vagy a **hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáznak** károsodása vagy teljes hiánya. Ha a purin nukleotidok szintje emelkedik, az normál körülmények között gátolja a PRPP-szintetáz és a PRPP-amidotranszferáz aktivitását (feedback gátlás; 2-223. ábra); az enzimek bizonyos defektusa esetén (az allosztérikus alegység károsodása) azonban ez nem következik be, a magas nukleotidszintet követő fokozott purinlebontás (urátképződés) mellé intenzív purin nukleotid szintézis társul. Ismert olyan enzimdefektus is, amely a PRPP-szintetáz hiperaktivitásával jár. Még frappánsabb tüneteket eredményezhet a „mentő út" károsodása, a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz defektusa, mert ilyenkor a „felesleges" nukleozidok nem kerülnek újra felhasználásra és a nukleotidok lebomlanak fokozott urátképződést eredményezve. Az enzim teljes hiánya esetén (Lesch–Nyhan-szindróma) a fenti tünetek mellé bizarr pszichés magatartási formák társulnak (agresszivitás, görcsök, öncsonkítás, illetve mentális visszamaradottság).

A köszvény, legalábbis a húgysavfelszaporodás, klinikailag kezelhető **allopurinollal** vagy **alloxantinnal.** A gyógyszerek hatásmechanizmusa emlékeztet a timidilátszintáz fluordezoxi-uridinnel történő gátlására. Az allopurinol, illetve alloxantin a hipoxantintól és a xantintól csak abban különbözik, hogy a purinbázis 7 és 8 helyzetű két atomja felcserélődött, mint azt a *2-239. ábra* mutatja (lásd még a 2-238. ábrát is). A **xantin-oxidáz** mindkét molekulát szubsztrátjaként használja, de a xantin- vagy a hipoxantin-analóggal történő reakció után irreverzibilisen kötve marad, ún. „szuicid enzim". Az enzimmennyiség csökkenése csökkent urátképződést eredményez (a PRPP-szint természetesen nem csökken).

Ismert még az **adenozin-dezaminász** (2-237. ábra) és a **purin-nukleozid-foszforiláz** (2-238. ábra) hiánya, amely súlyos immundeficienciát eredményez. Az ilyen betegekben a dATP és dGTP szintje százszorosára is emelkedhet. (Jelenleg 20 beteg gyerek ismert az irodalomban, akiket rekombináns enzimekkel kezelnek és jól vannak.)

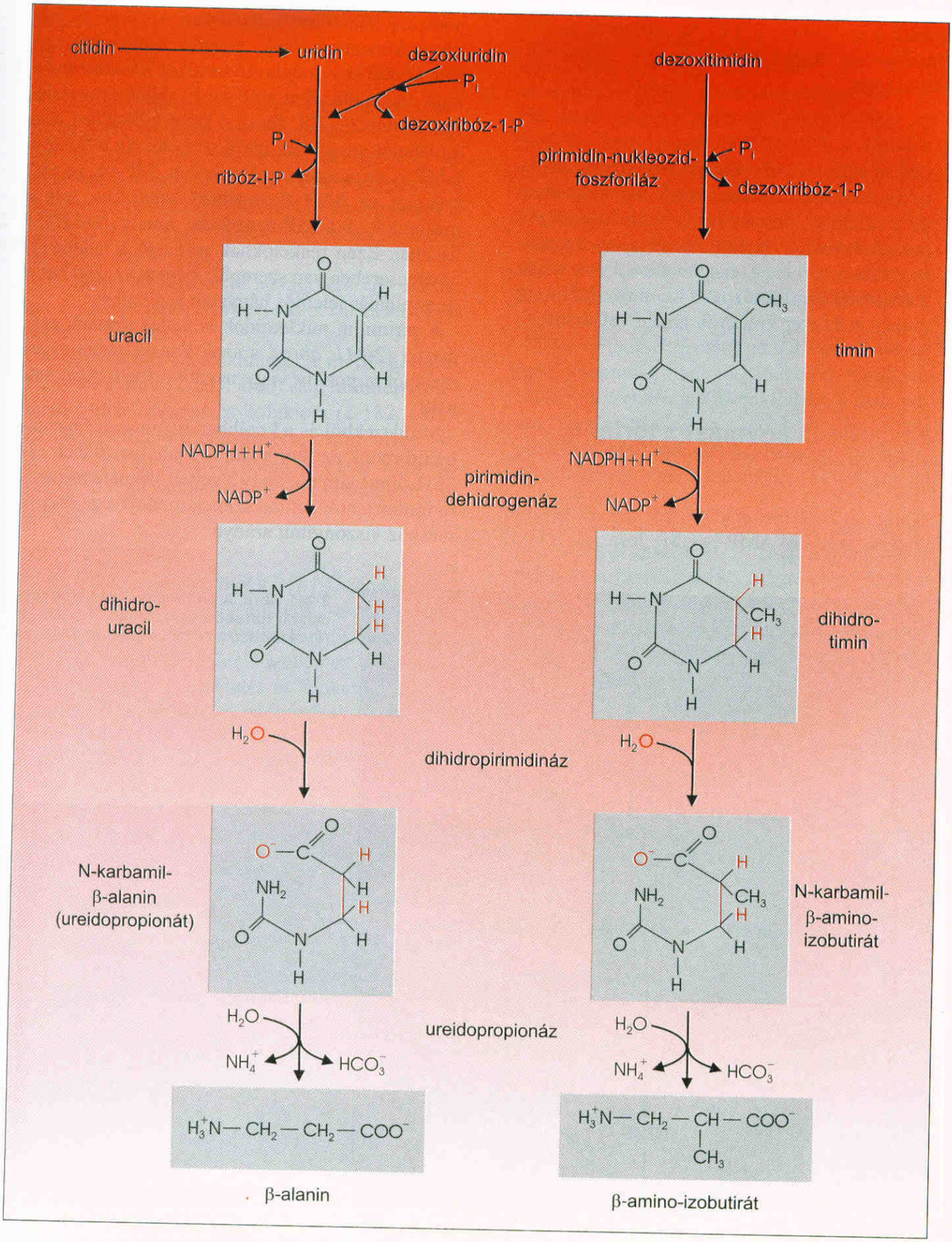


2-239. ábra. Az allopurinol. *A hatásmechanizmusért felelős szerkezeti része pirossal jelölve*

Pirimidinbázisok lebontása

A citidin és az uridin lebontása közös úton történik, mert a citidinből dezaminálással uridin keletkezik (2-237. ábra). Így a katabolizmus az uridin további degradációját jelenti. Az uridinből a ribóz-1-foszfát lehasadása után uracil keletkezik. Az uracil ezután redukálódik és dihidrouracil keletkezik. A reakcióhoz NADPH és **pirimidin-dehidrogenáz** kell *(2-240. ábra)*. A heterociklusos gyűrű hidrolízis útján szétnyílik, így a dihidrouracilból N-karbamil-β-alanin keletkezik; a reakciót a **dihidropirimidináz** katalizálja. Ezután újabb hidrolízis történik, NH_4^+ és HCO_3^- válik szabaddá, és β-alanin keletkezik.

A timidinből timin keletkezik, miközben a dezoxi-ribóz dezoxi-ribóz-1-foszfáttá alakul; a reakciót a pirimidin-nukleozid-foszforiláz katalizálja. A timin lebontása ezután hasonló reakciókkal történik, mint az uracilé; redukció után hidrolízissel a gyűrű felhasad, majd újabb hidrolízissel itt is NH_4^+ és HCO_3^- válik szabaddá, és β-aminoizobutirát keletkezik (2-240. ábra). Ez utóbbi szintje a vizeletben megnőhet magas DNS-tartalmú diétán vagy tumoros betegségekben. A β-aminoizobutirát ezután transzaminálódik metil-malonil-CoA-t eredményezve, amely azután szukcinil-CoA-n ke-



2-240. ábra. A pirimidinbázisok lebomlása. *Az uracil és a timin lebontásában hasonló enzimek működnek közre*

resztül a citrátkörbe kerül. Az ammónia az ornitinciklusban ureává alakul és így hagyja el a szervezetet.

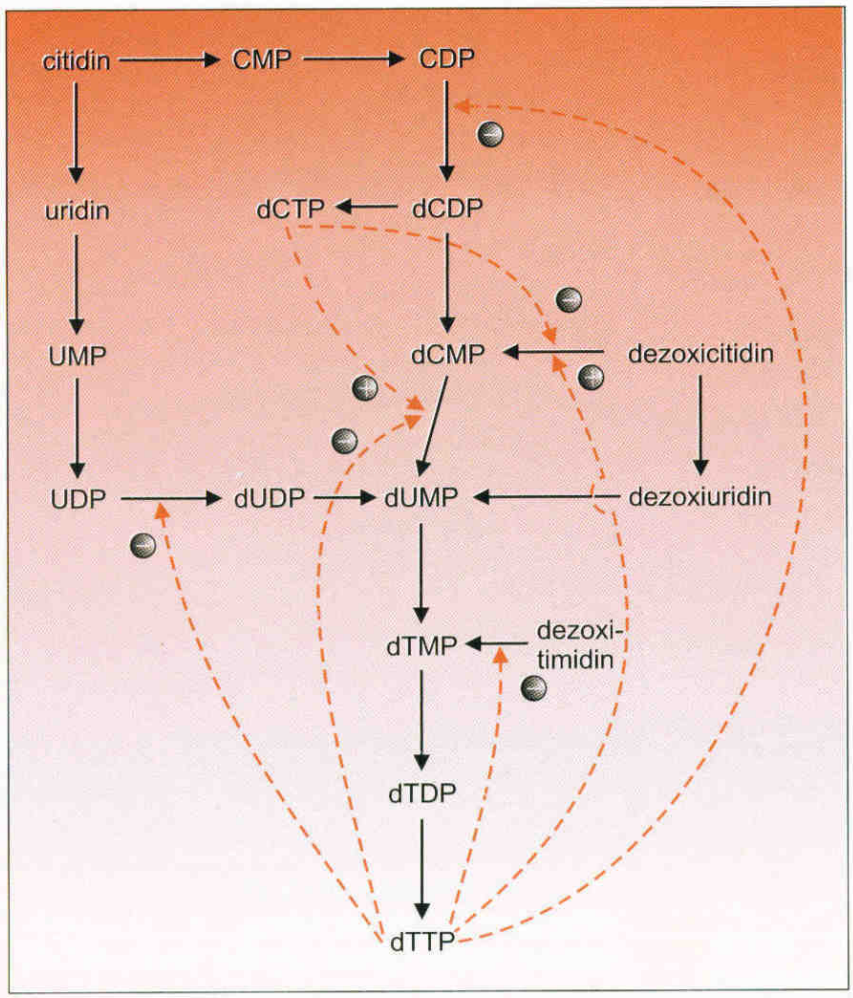
Minthogy a pirimidinbázisok degradációja során keletkező intermedierek vizes fázisban jól oldódnak, köszvényes jellegű betegségek nem alakulnak ki. Ismert a timidinszint megnövekedése a vérben, és megjelenése a vizeletben a **dihidropirimidináz** (2-240. ábra) defektusa esetén. A kórkép epilepsia tüneteivel társul.

Nukleotidok egymásba történő átalakulásai

Ahogy azt a purin nukleotidok szintézise során láttuk, az IMP-ből AMP és GMP lesz. Bár a GMP nem tud közvetlenül átalakulni AMP-vé és vice versa, koncentrációjuk, a sejtek szükséglete szerint, kerülő úton mégis módosulhat. Mindkét molekula visszaalakulhat IMP-vé és abból újra reszintetizálódhat (2-221. ábra). A két út különböző, nem a reakciók megfordításáról van szó. Az AMP és a GMP is dezaminálással alakul át IMP-vé, az első reakciót az **AMP-dezaminász** katalizálja, míg a másodikat a **GMP-reduktáz**, amely NADPH-t használ. Ezen reakcióknak nemcsak a nukleotid-anyagcserében van szerepük, hanem az izomban a dezaminálás jelentős hányadát is alkotják.

A pirimidin nukleotidok is átalakulhatnak egymásba *(2-241. ábra)*, s azok koncentrációi egyes reakciókra pozitív vagy negatív effektorként hatnak.

Mindezekből és a korábban bemutatott ribonukleotid-reduktáz komplikált szabályozásából (2-231b ábra) látható, hogy a sejtek számára mennyire fontos a nukleotidkészletek mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya.



2-241. ábra. A pirimidin nukleotidok egymásba történő átalakulásai. *A pozitív jel (+) aktiválást, a negatív (-) gátlást jelent*

B_{12}-vitamin; metil-malonát-acidosis és anaemia

A nukleotid-anyagcsere több szinten is szorosan kapcsolódik az aminosav-anyagcserével. A nukleotidok szintézise aminosavakból történik, az aminosav-anyagcsere és nukleotid-anyagcsere a purinnukleotid-ciklus révén regulációs egységet is képez *(2-242. ábra)*. Ennek elsősorban az izomszövetben van szerepe.

Az aminosav–nukleotid anyagcsere egy másik, orvosi szempontból is érdekes kapcsolata a B_{12}-vitamin (2-204. ábra).

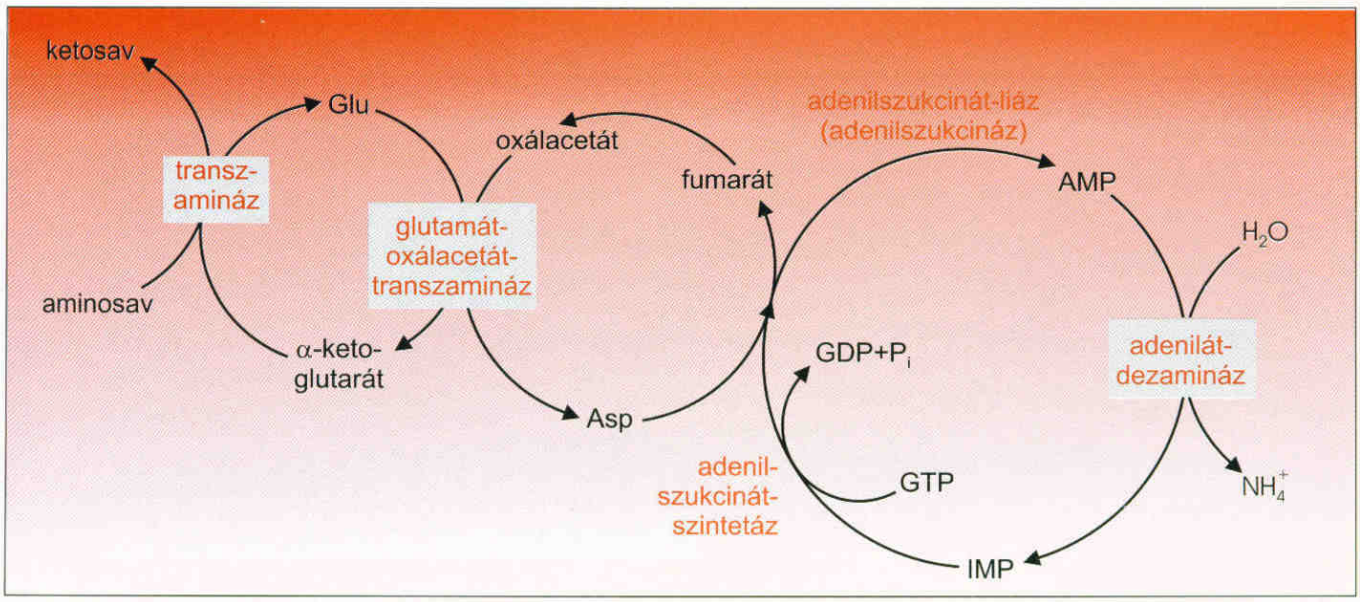
A **B_{12}-vitamin két enzimnek, a metil-malonil-CoA-mutáznak** (2-203. ábra) és a **homocisztein-metil-transzferáznak** is kofaktora (2-182. ábra). Ez utóbbi tetrahidrofolát-függő enzimrendszert alkot (2-181. ábra). Láttuk azt is, hogy az aminosavakból történő nukleotidszintézis is tetrahidrofolát-függő.

Így nem meglepő, hogy a B_{12}-vitamin hiánya vagy funkciózavara a nukleotid-anyagcserét súlyosan érinti és két kórképet is okozhat; anaemiát és metil-malonát-acidosist.

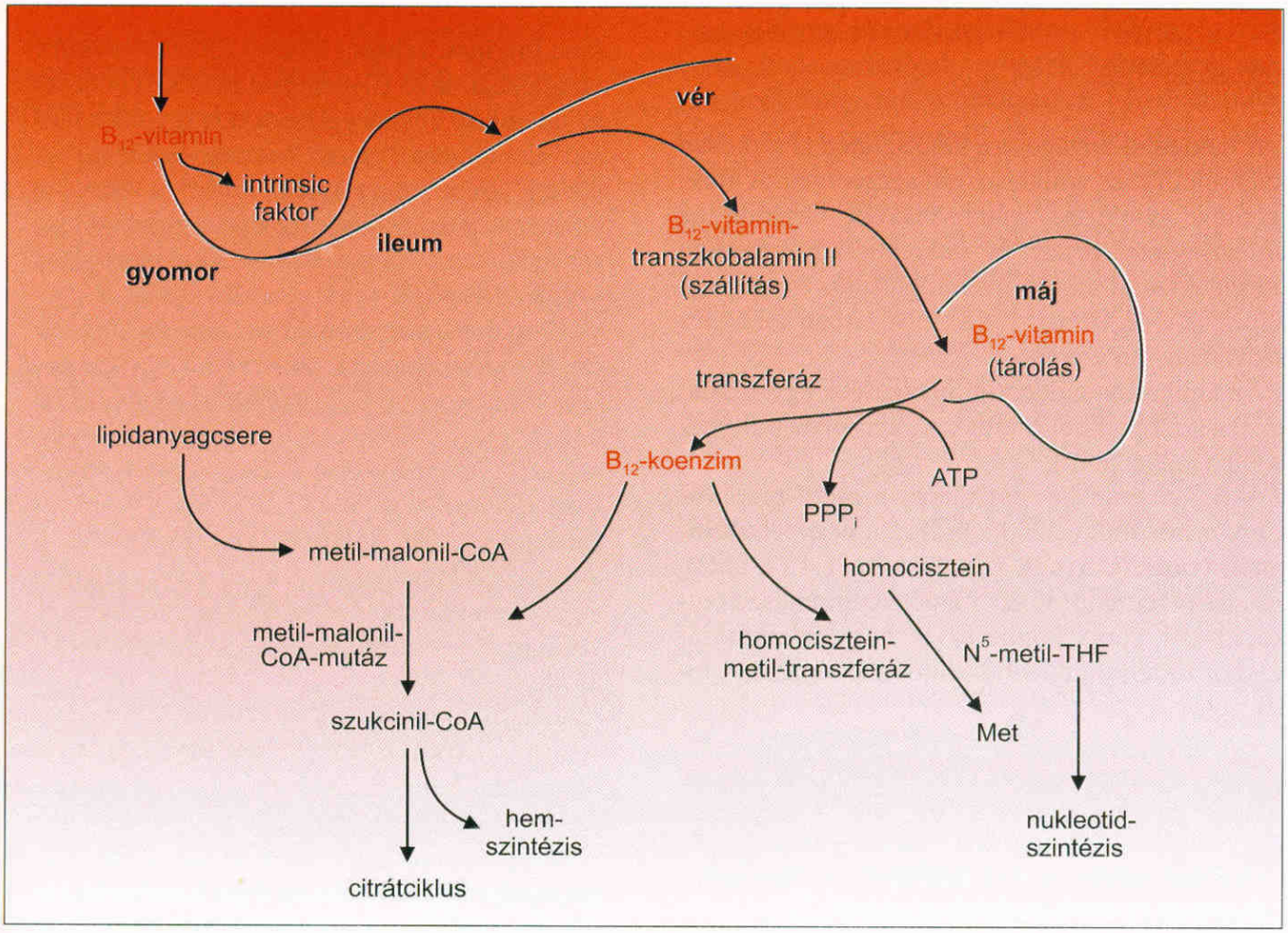
A B_{12}-vitamin felvételét és funkcióját több faktor is befolyásolja. A gyomorban szintetizálódó **intrinsic faktor** (fehérje, 59 kDa) nélkül a táplálékban lévő B_{12}-vitamin nem szívódik fel az ileumból. Totális gastrectomia (gyomor műtéti eltávolítása) ugyan összeegyeztethető az élettel („nem esszenciális szerv" a táplálék emésztése szempontjából), de az intrinsic faktor hiánya már súlyos problémákat okoz (lásd később). Normál körülmények között a B_{12}-vitamin transzportálódik a bél lumenéből és az ún. a transzkobalamin II révén a véráramba, majd a májba jut, ahol raktározódik *(2-243. ábra)*.

A B_{12}-vitamin koenzim nélkül a **metil-malonil-CoA-mutáz** nem tud működni; csökkent funkciója esetén a metil-malonil-CoA nem alakul át szukcinil-CoA-vá (2-203. ábra) és felszaporodása metil-malonát-acidosist eredményez. Az enzim teljes hiánya nem egyeztethető össze az élettel.

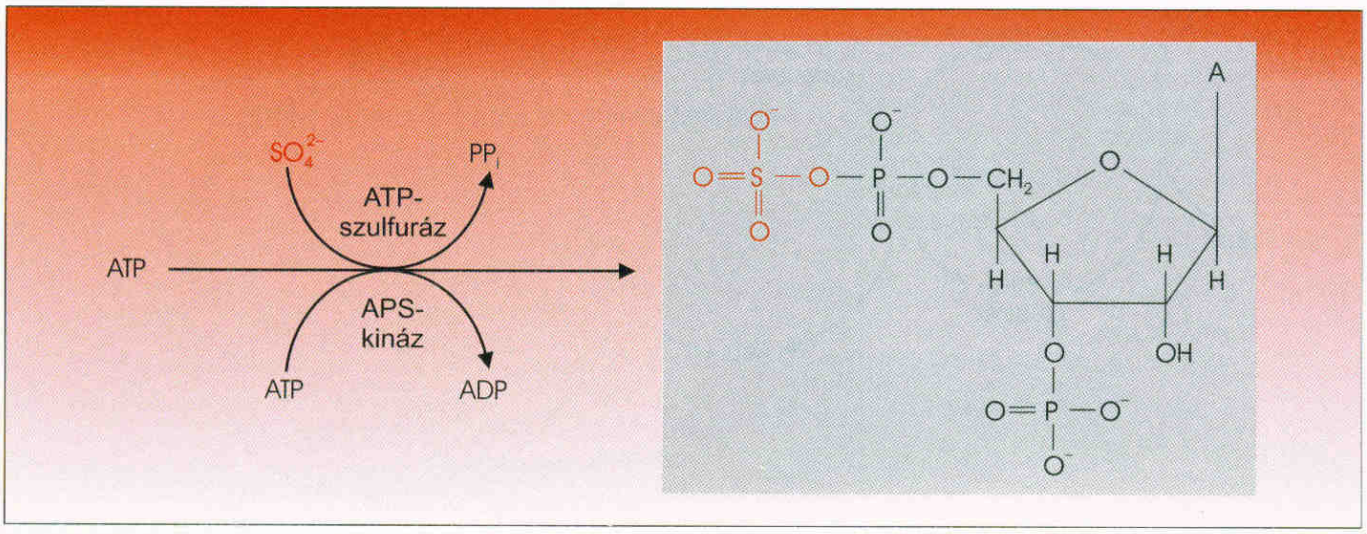
A B_{12}-vitamin másik szerepe a **homocisztein-metil-transzferáz** enzimfunkciójának biztosítása (2-182. ábra). Elégtelen működése (pl. B_{12}-vitamin-hiány vagy koenzim-B_{12}-elégtelenség) esetén az N^5-metil-tetrahidrofolát nem tudja átadni metilcsoportját és felhalmozódik, ún. „folátcsapda" jön létre. Nem keletkezik elegendő N^5,N^{10}-metilén-THF, illetve N^{10}-for-



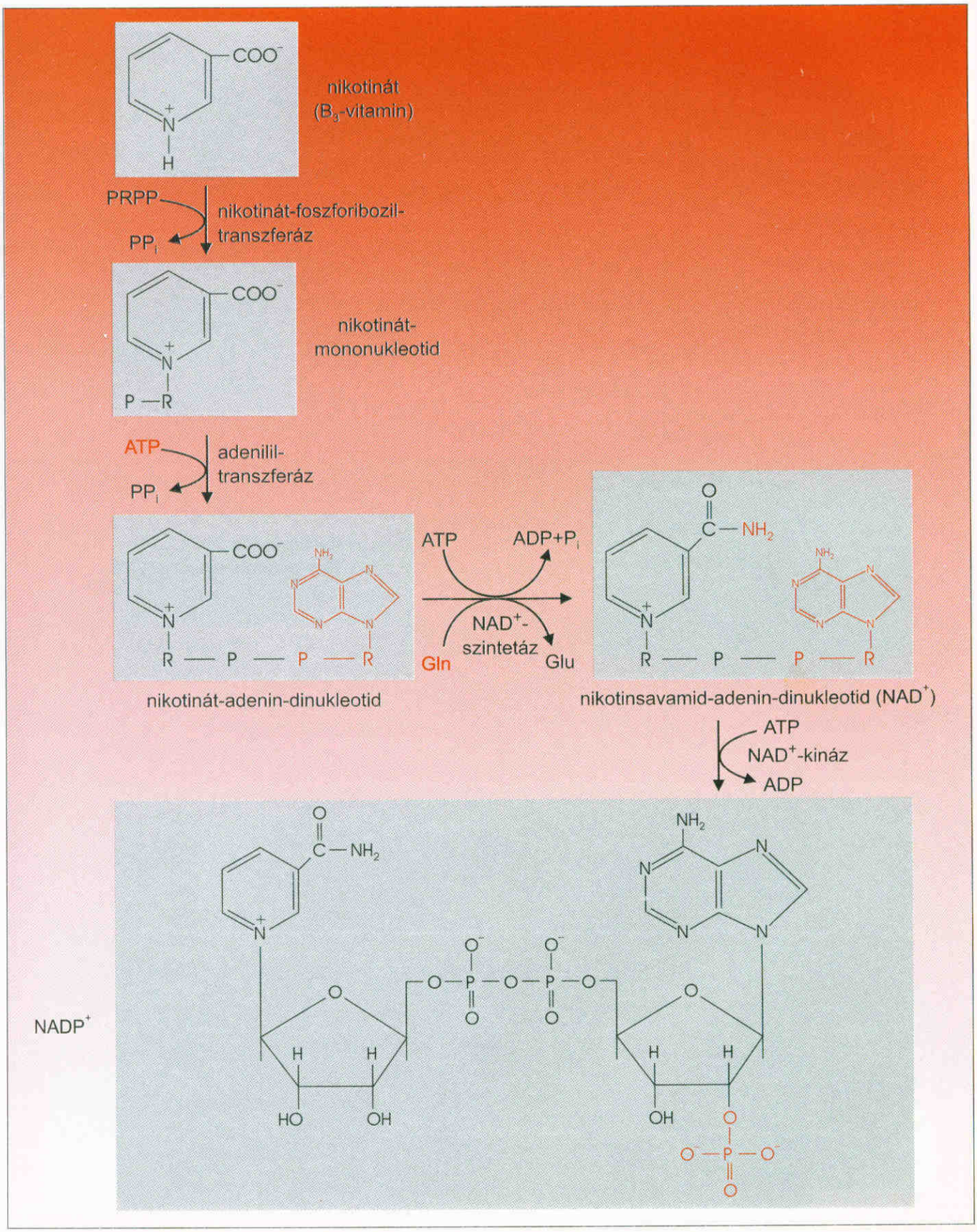
2-242. ábra. A purinnukleotid-ciklus *(lásd még a 2-221. ábrát)*



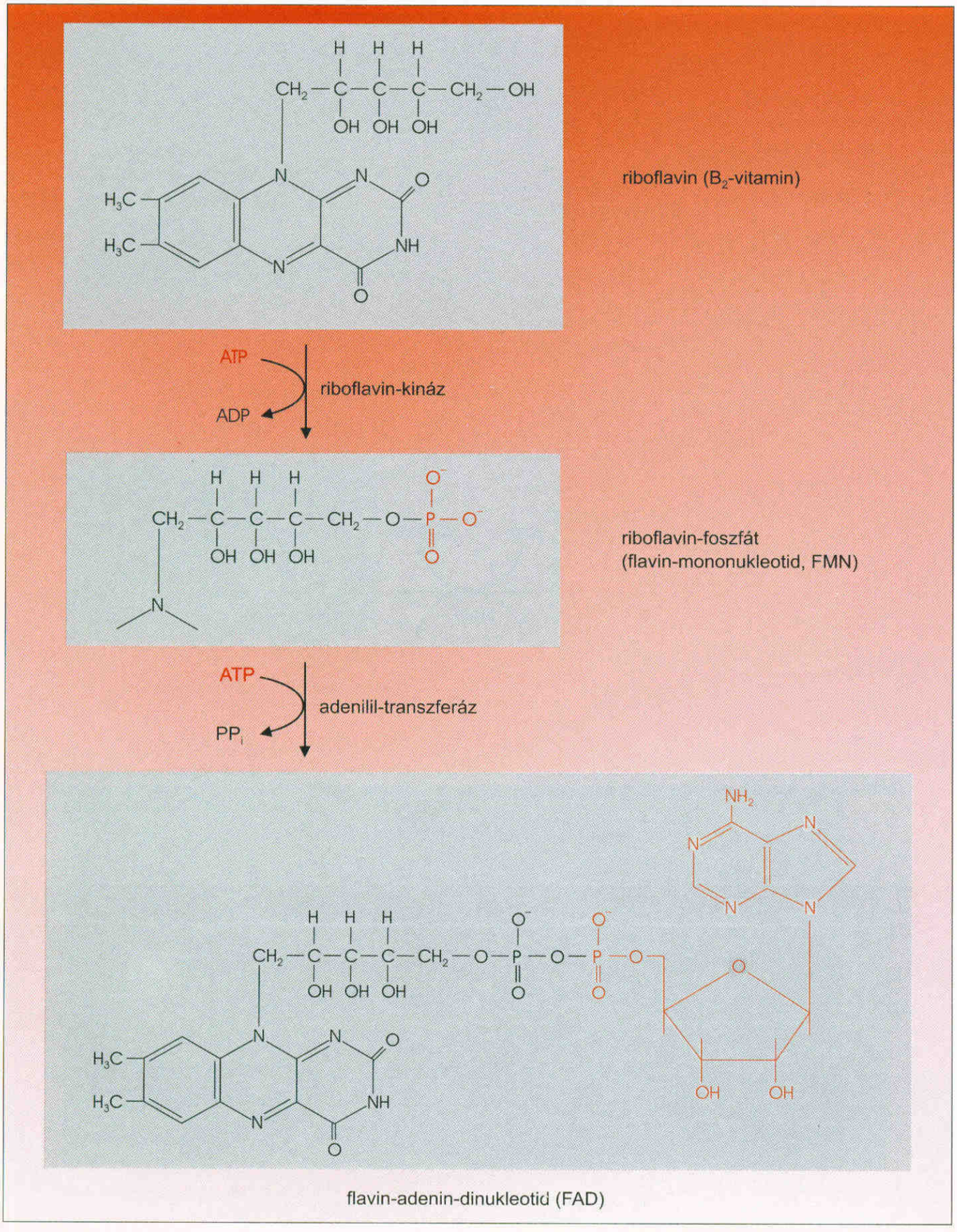
2-243. ábra. A B_{12}-vitamin transzportja, aktiválása és szerepe. *A táplálékból származó B_{12}-vitamin az intrinsic faktorral a vérkeringésbe kerül, ahol a transzkobalamin II szállítja és juttatja el a májba. A B_{12}-vitamin ATP-vel történő aktiválása után alakul ki a funkcióképes B_{12}-koenzim (2-204. ábra), amely két enzimnek, a metil-malonil-CoA-mutáznak (2-203.ábra) és a homocisztein-metil-transzferáznak (2-182. ábra) is a kofaktora*



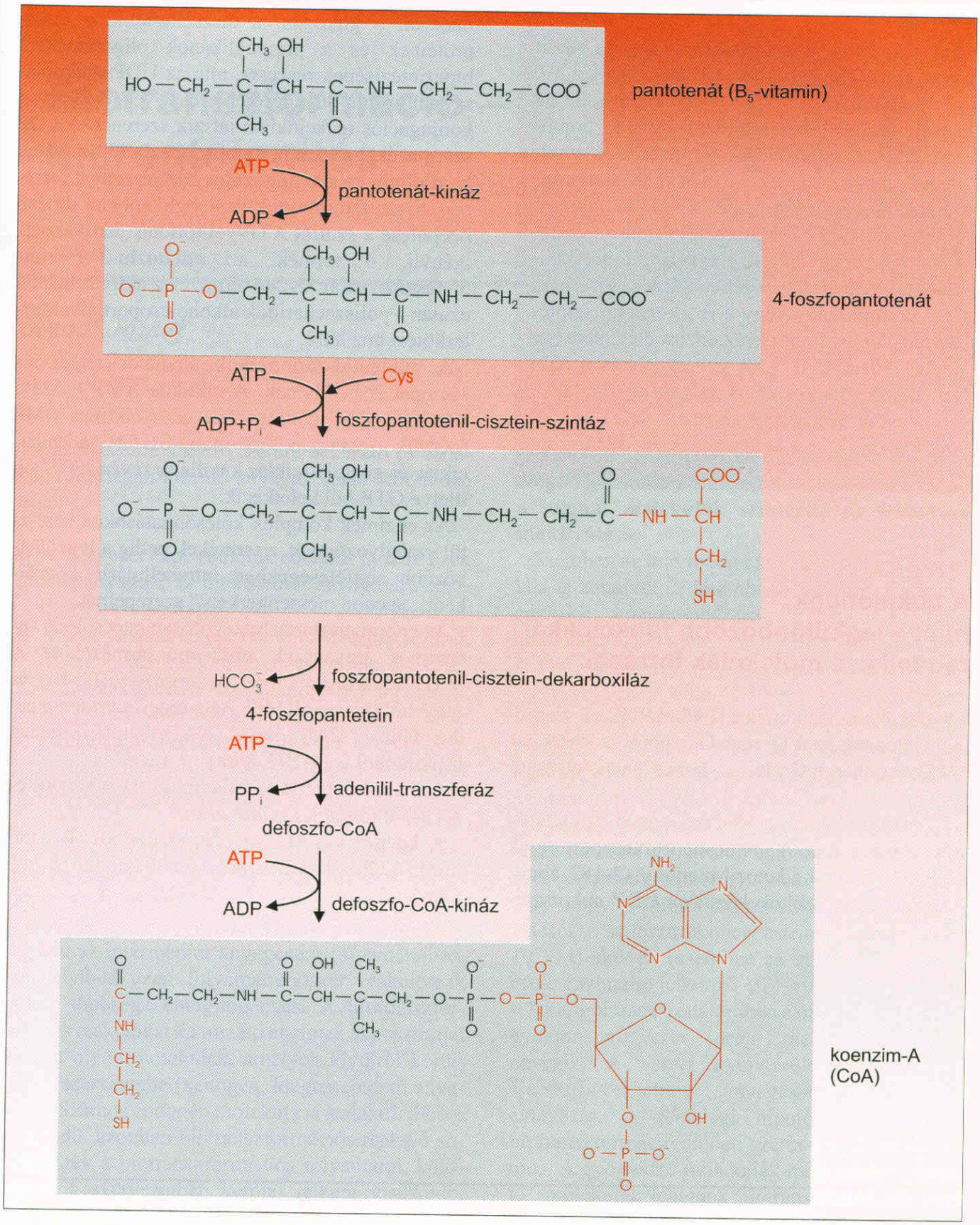
2-244. ábra. Az adenozin-3'-foszfát-5'-foszfoszulfát („aktív szulfát") képződése



2-245. ábra. A NAD^+ és a $NADP^+$ szintézise. *A NAD^+ szintézise után történik a ribóz 2'-hidroxilcsoportjának foszforilálása ATP felhasználásával, amikor a NAD^+-ból $NADP^+$ keletkezik; a reakciót a NAD^+-kináz katalizálja. Rövidítések: PRPP, foszforibozil-pirofoszfát; P_i, anorganikus foszfát*



2-246. ábra. A FAD szintézise és redukciója. *Az első reakciótermékben a flavinrész megegyezik a riboflavinban látható szerkezettel*



2-247. ábra. A koenzim-A szintézise és képlete *Először a pantotenát primer alkoholos hidroxilcsoportja foszforilálódik, majd karboxilcsoportja egy cisztein aminocsoportjával savamid kötést hoz létre. A következő lépésben a Cys dekarboxilálódik és a foszfopantotein foszfátcsoportja ATP-vel reagál. Végezetül a ribóz 3'-szénatom hidroxilcsoportja foszforilálódik.*

mil-THF és így a nukleotidok szintézise gátolt lesz, ami főleg a gyorsan osztódó sejteket, pl. erythroblastokat érinti. Következményként az anaemiák egy fajtája alakul ki. A homocisztein-metil-transzferáz elégtelensége emelkedett homocisztein- és csökkent metioninszintet is eredményezhet; az előbbi atherosclerosist (a homocisztein károsítja az endotheliumot; lásd 6.5. fejezet), az utóbbi neurológiai rendellenességeket válthat ki. Ha a B_{12}-vitamin-hiány vagy a B_{12}-koenzim szintéziséért felelős transzferáz enzim elégtelensége (a B_{12}-vitaminból ATP felhasználásával nem keletkezik B_{12}-koenzim) okozza a tüneteket, B_{12}-vitamin adagolásával, illetve B_{12}-koenzim im. injekciójával a betegség jól kezelhető.

A nukleotidok, mint a legkülönbözőbb funkciókkal rendelkező molekulák forrásai

A nukleotidok alkotják a DNS és RNS-ek szerkezeti elemeit és az ATP révén központi szerepet játszanak az energiatárolás és -felhasználás folyamatában.

A nukleotidok részt vesznek egyéb szintetikus folyamatokban is. A metilcsoporttranszport egyik fő szereplője az S-adenozil-metionin (2-182. ábra). Az uracilszármazékok közül az UDP cukorszármazékai a glikogén, a diszacharidok, a glikoproteinek és a proteoglikánok oligoszacharid bioszintézisének részesei, míg az UDP-glukuronsav a bilirubin-anyagcserében és egyéb, elsősorban konjugációs reakciókban játszik szerepet. A CDP származékai a lecitin, kefalin, foszfatidil-inozitol, kardiolipin és a szfingozidok szintézisének részesei. A szulfátcsoportok proteoglikánokba történő beépülése a szulfát ATP-vel történő „aktiválását" igényli. A termék, az **adenozin-3'-foszfát-5'-foszfoszulfát** *(2-244. ábra)*. Az aktivált szulfát ezután a poliszacharidok alkoholcsoportjaival észterkötést hoz létre.

A nukleotidszármazékok általános regulációs szerepet is betöltenek. A ciklikus AMP (cAMP; adenozin-3',5'-monofoszfát) és a ciklikus GMP (cGMP; guanozin-3',5'-monofoszfát) adenilátcikláz és guanilát-cikláz katalízise révén ATP-ből, illetve GTP-ből keletkezik.

Az enzimek komplex kölcsönhatásokon keresztül szabályozódnak, a termékek pedig a legkülönbözőbb sejtféleségekben intracelluláris szignálként, „second messengerként" szerepelnek.

Az energiaháztartáshoz szorosan kapcsolódó koenzimek ugyancsak nukleotidszármazékok. A NAD nikotinsavból (B_3-vitamin), PRPP-ból és ATP-ból szintetizálódik. Az amidcsoportdonor pedig Gln *(2-245. ábra)*. NAD szintetizálódhat triptofánból is (2-197. ábra).

A FAD szintézise riboflavinból (B_2-vitamin) és ATP-ből történik *(2-246. ábra)*.

A koenzim A (CoA) pantoténsavból (B_5-vitamin), ATP-ből és Cys-ből szintetizálódik *(2-247. ábra)*.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Bartha Katalinnak, Dr. Kolev Kraszimirnak, Dr. Staub Máriának, Dr. Szikla Károlynak és Dr. Vodnyánszky Lajosnak.

Biotranszformáció – méregtelenítés

2.6.

Mandl József

A szervezetbe a környezetből bekerülő és átalakított formában kiürülő anyagok sorsa különböző lehet:

1. A szervezet képes belőlük energiát nyerni: ezek a tápanyagok, az intermedier anyagcsere enzimeinek szubsztrátjai.
2. A szervezet nem képes belőlük energiát nyerni, de rendelkezik olyan enzimekkel, amelyek révén átalakítja őket. Így alkalmassá válnak arra, hogy a szervezetből kiválasztódjanak: ez tehát alapjában **méregtelenítő funkció**. Ezen funkciót megvalósító folyamatokat **biotranszformációnak** nevezzük.

Azok az anyagok, amelyeket a szervezet nem képes átalakítani és átalakítva kiüríteni, azok a szervezetre mérgezőek.

A biotranszformációs reakciók közvetve kapcsolódnak az intermedier anyagcsere folyamataihoz, amennyiben ezen folyamatrendszer reakcióinak döntő többsége energiaigényes. A biotranszformációs reakciókat katalizáló enzimek szubsztrátjai főként olyan molekulák, amelyek kívülről kerülnek a szervezetbe (xenogén, idegen eredetű anyagok). Számos endogén molekula is átalakul, illetve képződik azonban biotranszformációs reakció során. Ezek a biotranszformációs folyamatok különösen a szervezetben kémiai jelként viselkedő, „szignál" molekulák (pl. számos hormon, neurotranszmitter) metabolizmusában játszanak szerepet. Közülük is elsősorban azon szignál molekulák metabolizmusában, amelyek intracelluláris magi receptorok ligandjai. Ezért a biotranszformáció biológiai jelentősége a méregtelenítő funkció mellett **a szignál molekulák szintézise és lebontása, inaktiválása.**

Szemben az intermedier anyagcsere igen specifikus enzimeivel, a különböző biotranszformációs enzimek, enzimrendszerek szubsztrátspecifitása általában sokkal szélesebb, egymást átfedő. Széles szubsztrátspecifitásuk révén alkalmasak arra, hogy részt vegyenek különböző anyagcsere-folyamatokban, bioszintetikus lépésekben (szteroidhormonok, katecholaminok szintézisének egyes reakciói stb.), lebontásokban (porfirin-anyagcsere, szteránvázas vegyületek anyagcseréje stb.), valamint az idegen eredetű anyagok (pl. gyógyszerek) átalakításában is. További különbség az intermedier anyagcsere enzimeivel történő összehasonlításban, hogy a biotranszformációs enzimek igen alacsony szubsztrátkoncentráció mellett (10^{-15}–10^{-6} M) aktívak (szemben az intermedier anyagcsere enzimeire jellemző 10^{-5}–10^{-2} M-lal).

Az angolszász irodalomban a biotranszformációt gyakran gyógyszer- (drog-) metabolizmusnak is nevezik. A német nyelvterületen használatos Verstoffwechselung („anyagcserésítés") találóbb elnevezés. A jelenlegi hipotézisek szerint a biotranszformáció eredeti szerepe a jel metabolizmus. A gyógyszer-molekulák mint jeleket „imitáló" molekulák lehetnek biotranszformációs enzimek szusztrátjai fenti sajátosságaik miatt.

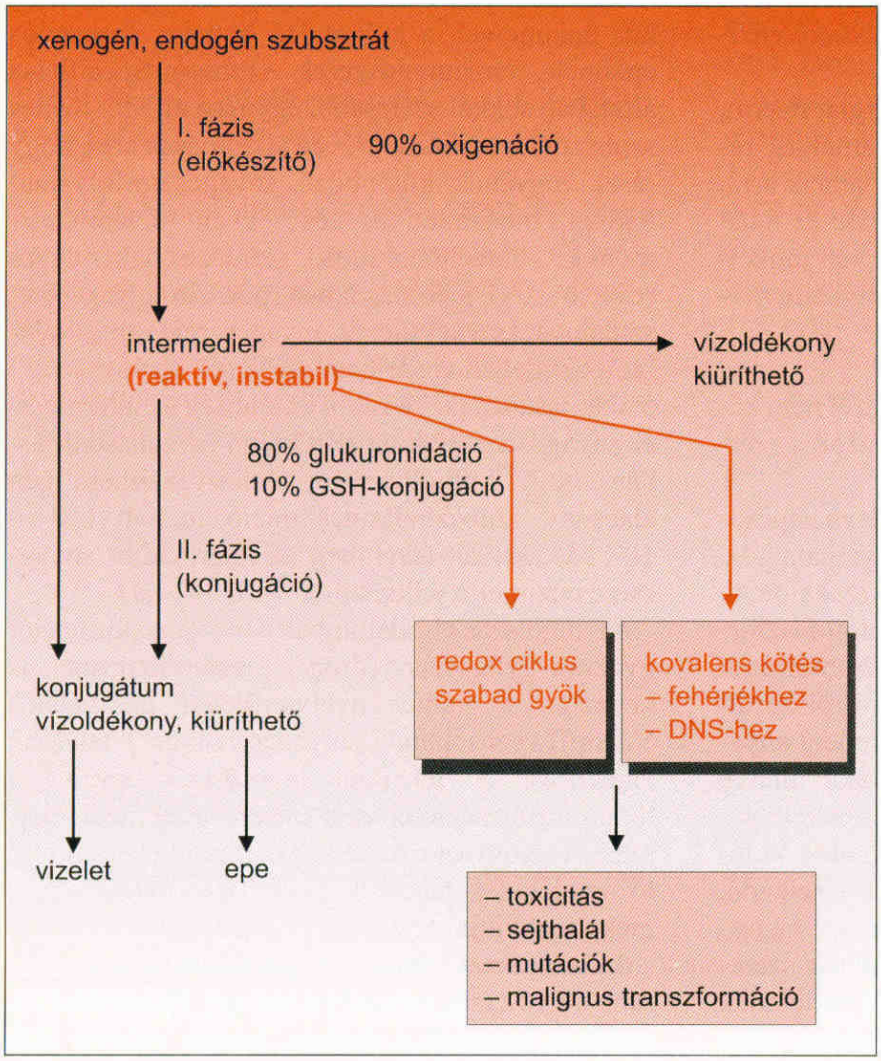
A biotranszformáció folyamatainak legfontosabb helye a máj parenchymasejtjei. Ilyen reakciók azonban nemcsak a májban, hanem számos más

szervben is lejátszódnak (így a tüdőben, bőrben, bélben, vesében), biológiai funkciójuk részben még nem ismert.

A biotranszformáció folyamata

A biotranszformációs folyamatokat három szakaszra osztják. Megkülönböztetnek előkészítő 1. Fázist, konjugációs 2. fázist, transzport 3. fázist. Az első, előkészítő fázis reakcióinak kb. 90%-át monooxigenázok katalizálják; ily módon reaktív molekulák keletkeznek, amelyek képesek konjugálódni. A második fázisban a konjugációk 80%-át UDP-glukuronil-transzferázok végzik, a maradék 20% zömmel glutationnal, aminosavval, szulfáttal történő kapcsolódás. Vannak molekulák, amelyek előkészítő reakciók nélkül is képesek konjugálódni, mert rendelkeznek olyan csoporttal, ami erre őket alkalmassá teszi; illetve bizonyos vegyületek az előkészítő fázis után konjugálódás nélkül is képesek kiürülni a szervezetből. Biotranszformációs reakciók eredményeként általában egy adott vegyület oldékonysági viszonyai megváltoznak, a **zsíroldékony vegyületek vízoldékonnyá** válnak. Ez az oldékonysági változás lehetővé teszi, hogy a vegyület távozzon a szervezetből. Ez előtt azonban az általában konjugált vegyület transzporterek segítségével – harmadik fázis – kijut a sejtből. A transzport után (i) a már vízoldékony vegyület a vérpályán keresztül a vesébe kerül, ott aspecifikusan filtrálódik és specifikus reabszorpciója nem lévén, a vizelettel a szervezetből kiürül; (ii) hepatocitákból szecernálódik az epecanaliculusokba, majd az epével a bélcsatornába kerül és a széklettel távozik a szervezetből *(2-248. ábra)*.

Az oxigenáció során keletkező (aktiválódó) reaktív, gyakran elektrofil molekulák azonban nem-



2-248. ábra. A biotranszformáció két szakasza

csak konjugációt katalizáló enzimek szubsztrátjai lehetnek, hanem spontán, nem enzimatikus reakciókba is léphetnek. Ezekben a reakciókban igen reaktív, instabil intermedierek, oxigéntartalmú szabad gyökök keletkezhetnek. Az ilyen intermedierek kapcsolatba kerülnek makromolekulákkal, hatásukra ún. **adduktok** alakulhatnak ki fehérjéket alkotó aminosavakon, nukleinsavakat alkotó bázisokon. Ezek a (2-248. ábrán pirossal jelzett) nem enzimatikus reakciók képezik az így kialakuló citotoxikus, teratogén, karcinogén, mutagén folyamatok és hatások molekuláris alapjait. Ily módon egyes molekulák éppen a biotranszformáció során „aktiválódnak", illetve válhatnak toxikus származékká.

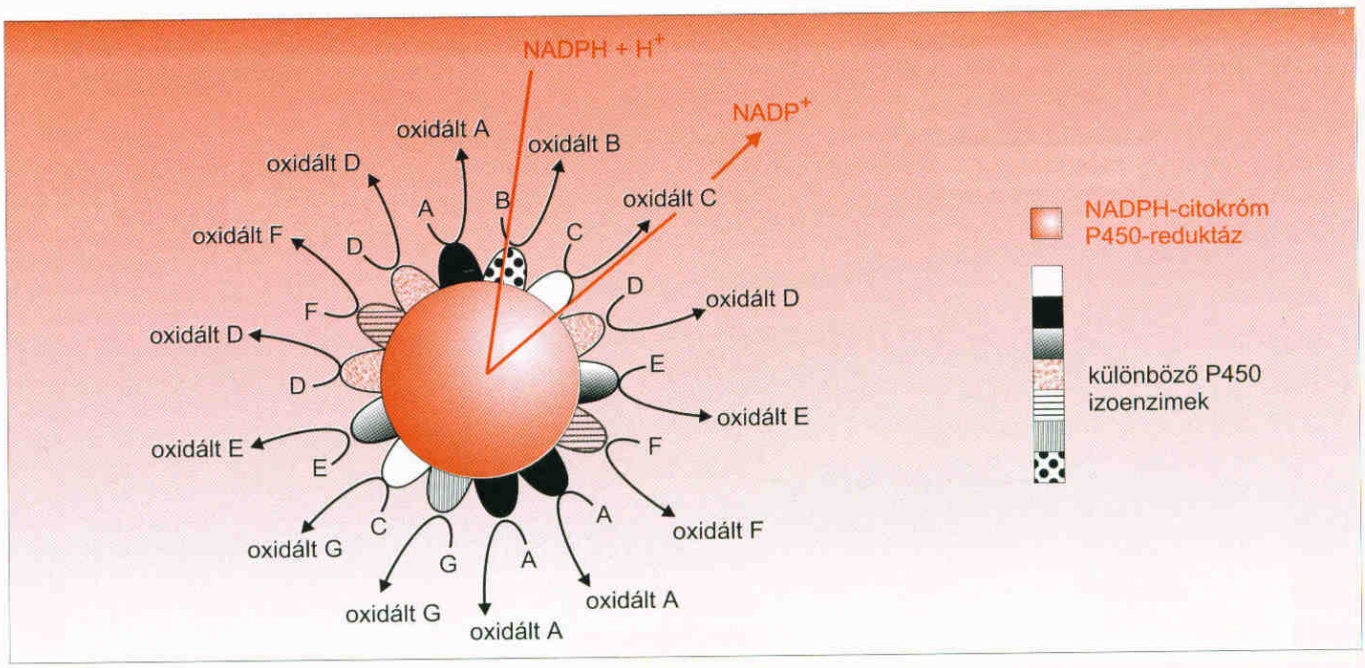
A biotranszformáció első, előkészítő szakasza, a citokróm P450 enzimek

A biotranszformáció előkészítő szakasza során az adott vegyület funkcionális csoportja(i) megváltoznak, új csoport(ok) jöhet(nek) létre. Konjugációra alkalmas csoport: karboxil, SH, amino, hidroxil alakul ki, vagy kerül az előkészítő reakció(k) folytán olyan pozícióba, hogy a vegyület konjugációs enzimek szubsztrátja lehet. Konjugációra alkalmas csoport háromféle reakció következtében alakul ki:

1. oxidáció (zömében oxigenáció),
2. redukció,
3. hidrolízis.

A vegyületek döntő többsége oxigenálódik az előkészítő fázisban, ezért részletesen az oxigenációval foglalkozunk.

A biotranszformáció első szakaszában zajló oxidációs folyamatokat többkomponensű enzimrendszer katalizálja. Az enzimrendszer membránhoz kötött; a légzési láncra emlékeztető működési és felépítési hasonlóságok miatt **mikroszomális légzési láncnak** nevezik. A májban az endoplazmás retikulum teljes fehérjetartalmának kb. 20%-át alkotják az ide tartozó fehérjék. Állandó és változó komponensei vannak. Állandó komponens a NADPH-citokróm P450-reduktáz, amely flavoprotein, és egy citokróm, az elektrontranszportban pontosan nem tisztázott funkcióval részt vevő citokróm b_5. Változó komponens a citokróm P450 nevet viselő monooxigenáz (a továbbiakban P450). Nevét onnan kapta, hogy redukált formájá-



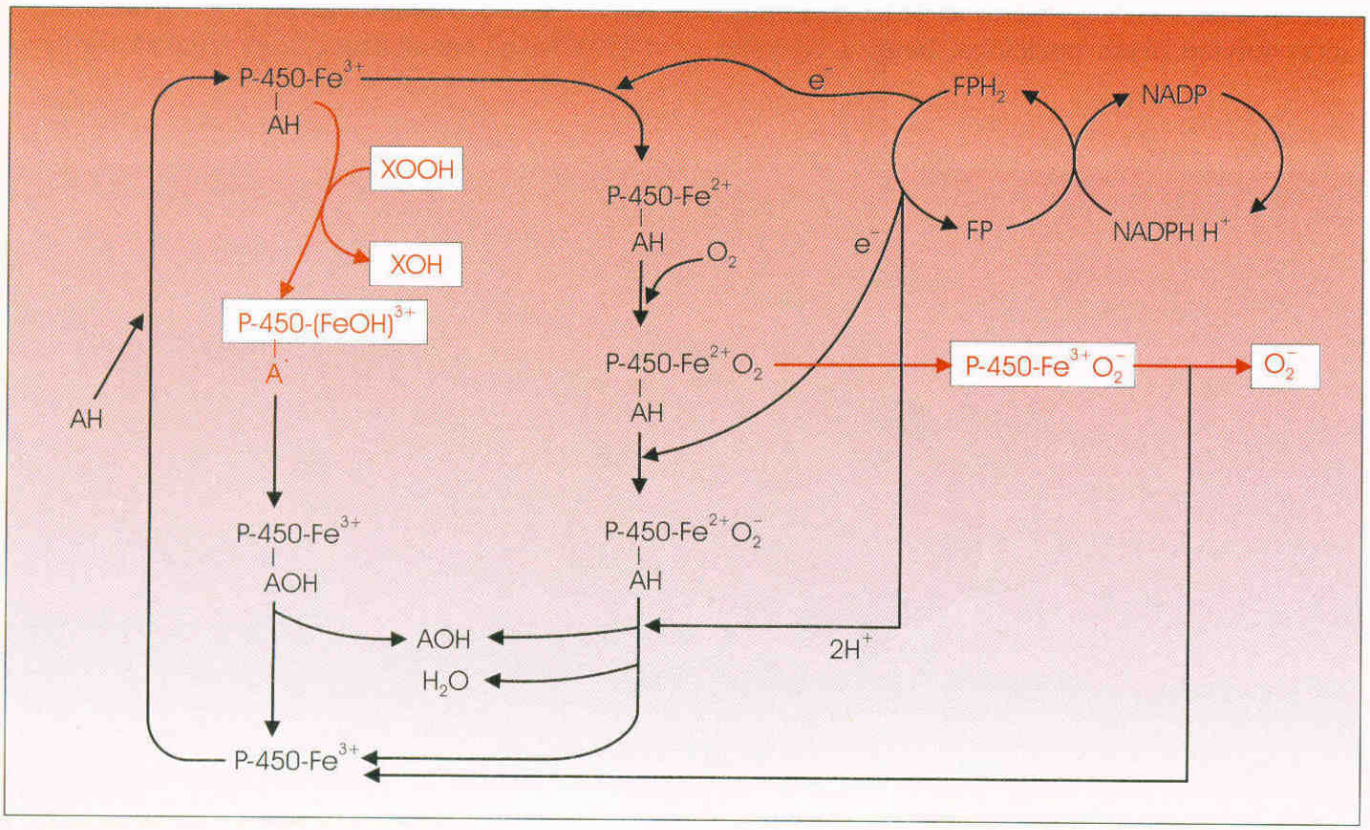
2-249. ábra. A NADP-citokróm P450-reduktáz és a citokróm P450 enzimek elhelyezkedésének sematikus képe a mikroszómális membrán citoszol felé néző felszínén felülnézetből. *A, B, C, D, E: különböző citokróm P450 izoenzimek szubsztrátjai*

nak CO-dal képzett komplexe 450 nm-nél mérve jellemző abszorpciós maximumot mutat. Jelenleg mintegy 650 P450 izoenzimet ismernek *(2-249. ábra)*. Biotranszformációs folyamatokat katalizáló kevert funkciójú oxigenázok esetén az elektrondonor a NADPH. A NADPH-t oxidálja a NADPH-citokróm P450-reduktáz, majd első lépésben a P450 hem Fe^{3+}-ionját redukálja Fe^{2+}-ionra *(2-250. ábra)*. A Fe^{2+}-t tartalmazó P450 így képes O_2-t kötni. A kötődött O_2-t a második elektron átvitelével redukálja $O_2^{\bullet-}$-vé, s ezután kerül az egyik oxigénatom a P450 által már megkötött szubsztrátra, a másikból pedig víz képződik.

A rendszer működéséhez tehát NADPH és O_2 szükséges, így fokozott biotranszformációs igény (pl. számos gyógyszer bevitele) esetén a NADPH-termelésnek fokozódnia kell, illetve a máj oxigénfogyasztása is nő. Ez a rendszer O_2-, illetve elektronforrásként peroxidokkal is működhet; ez esetben az oxigenációhoz O_2 és NADPH nem szükséges. Lipid-peroxidáció, amely egy patológiai folyamat, esetén van az ún. peroxid shuntnek elsősorban jelentősége, mivel ilyenkor a keletkezett lipid-peroxidok szubsztrátként szolgálnak. Az egyetlen elektron átvitele, amire a flavoproteinek alkalmasak, szabadgyök-képzéshez is vezethet. Az $O_2^{\bullet-}$ (szuperoxid) anion képződése a rendszerben szintén káros folyamatok kiinduló pontja lehet.

A különböző **P450 izoenzimek** szubsztrátspecificitásában számos átfedés van. Osztályozásuk az aminosavszekvenciában talált azonosságok alapján történik. A P450 izoenzimek és evolúciójuk tanulmányozása a molekuláris biológia kedvelt objektuma.

Az ős P450 gén minimum 22 exont tartalmazott mintegy 3,5 milliárd évvel ezelőtt. A P450 izoenzimek az ebből származó 13 gén „szuper" család produktumai. A 13 családból 2 bakteriális, 2 élesztő, 1 rovar és 8 emlőssejtekben – a 8-ból 4 főként a máj parenchymasejtjeiben – expresszálódik. A biotranszformációs reakciók szempontjából ez a 4, elsősorban a májban, de kis mennyiségben a tüdőben, bélben, bőrben és a vesében is expresszálódó géncsalád a jelentős. Az elmúlt közel 400 millió év a szárazföldi léttel összefüggő étkezési szokásváltozások miatt az ezen géncsaládokba tartozó izoenzimek rendkívüli differenciálódását eredményezte.



2-250. ábra. Kevert funkciójú oxidáz-rendszer működése. *Rövidítések: P450 Fe^{3+}, citokróm P450; FP, NADP-citokróm P450 reduktáz; AH, oxidálandó szubsztrát; XOOH, lipid-peroxid. Pirossal a szabadgyök-képződés lehetőségét jelöljük*

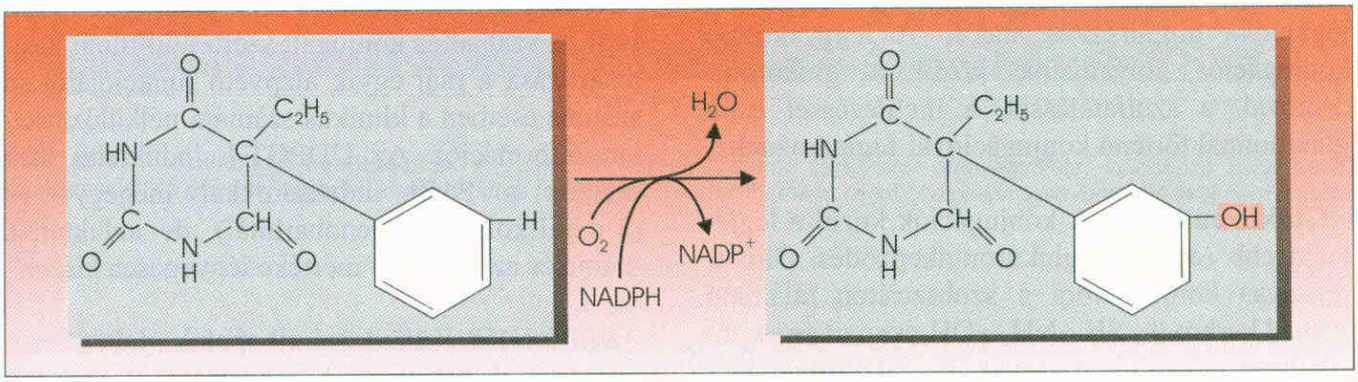
A differenciálódás legfőbb mozgatója az a növényvilág, amely a szárazföldön már korábban elterjedt. A növényi tápanyagokkal együtt olyan rendkívül változatos, növényekben éppen biotranszformációs enzimek segítségével szintetizálódott anyagok is óhatatlanul bekerülnek az állati, illetve emberi szervezetbe, amelyekre a szervezetnek nincs szüksége, amelyekből nem képes hidrogént kivonni, viszont ki kell ürítenie. Ezek a változatos szerkezetű molekulák így részben felfoghatók úgy is, mint a növényvilág védekezése az őt pusztító élőlényekkel szemben. A citokróm P450 enzimek ugyanakkor az állatvilág védekezését is szolgálják a növényi eredetű „mérgekkel" szemben. A citokróm P450 enzimek leghatékonyabb induktorai között szerepelnek a különböző növényi (fokhagyma, káposzta, petrezselyem, répa, zeller, kelbimbó stb.) eredetű molekulák (indol-3-karbinol, diallil-szulfid, psoralen stb.). Hatásukra egyes P450 izoenzimek fokozottan expresszálódnak, mások expressziója ugyanakkor visszaszorul. Különböző táplálkozási szokásokat követő állatfajok összehasonlító vizsgálata alapján egyértelmű a növényi toxinok szerepe a citokróm P450 családfa kialakulásában: a P450 izoenzimek száma a bevitt növényi toxinok számával együtt emelkedik. Kérdés, mit hoztak ebből a szempontból az elmúlt évtizedek? A kemizáció, a gyógyszerek elterjedése, a környezetszennyezés további kihívás, amelyhez az alkalmazkodást elsősorban a P450 enzimek teszik lehetővé.

A P450 géncsaládokat számokkal jelölik, az alcsaládokat betűvel, az egyes izoenzimeket ezen belül ismét számmal (pl. CYP2E1). Az egyes géncsaládok, alcsaládok, illetve izoenzimek megismerésében igen nagy szerepük volt egyes gyógyszereknek, illetve ipari vagy más szempontból fontos molekuláknak, amelyekkel ezen enzimek képződését indukálni lehetett.

A CYP1-gyel jelölt géncsaládba eddigi ismereteink szerint legalább négy gén tartozik. Produktumaik szubsztrátjai között számos mutagén hatású policiklusos aromás szénhidrogént, alapvető fontosságú gyógyszereket találunk (benzpirén, teofillin, phenacetin stb). Az ide tartozó izoenzimek többféle módon indukálhatók, így „klasszikus" induktorokkal (3-metil-kolantrén), vegyipari technológiák környezetszennyező melléktermékeként ismert dioxinszármazékokkal (2,3,7,8-tetraklór-dibenzo-*p*-dioxin, TCDD), cigarettafüsttel. Koincidencia van CYP1A1 izoenzim indukálhatósága és a bronchuscarcinoma jelentkezése között. Az ide tartozó izoenzimek jelentős része extrahepatikus. Élettani funkciójuk nagyrészt nem ismert. Indukálhatóságuk rendkívül nagymérvű, néha százszoros is lehet.

A CYP2 géncsalád több alcsaládból áll (CYP2A-H). Az ide sorolható izoenzimek szubsztrátjai rendkívül különböző molekulák: számos szteroid hormon, illetve szteroid gyógyszer [tesztoszteron-7-alfa és -15-alfa-hidroxiláció (CYP2A); progeszteron, D_3-vitamin], más gyógyszerek [számos antiepileptikum (CYP2B); vérnyomáscsökkentő, így a debrisoquine (CYP2D); fájdalomcsillapítók (paracetamol, nyugtatók, diazepamszármazékok stb. (CYP2E)]; policiklusos szénhidrogének [benzantracén (CYP2B)] és a karcinogén hatású nitrozamin-származékok (CYP2E). A CYP2E-hez tartozó izoenzimek felelősek az aceton és etanol oxigenációjáért. Itt is kimutatható koincidencia az egyes izoenzimek (CYP2D) indukálhatósága és egyes rosszindulatú daganatok (máj és gastrointestinalis traktus carcinomái, bronchuscarcinoma) előfordulása között. A géncsalád különböző alcsaládjaihoz sorolt izoenzimek induktorai között szerepel a szintén „klasszikus" fenobarbitál, amely fénymikroszkóppal is látható proliferációt okoz a sima felszínű endoplazmás retikulumban *(2-251. ábra)*, de induktor hatású az etanol és az aceton is. Éhezésben és diabetes mellitusban a CYP2E izoenzimek ugyancsak indukálódnak.

A CYP3 géncsaládhoz legalább 3 gén tartozik az emberi szervezetben. Több antibiotikum, szteroid (pl. orális fogamzásgátlók), más gyógyszerek (pl. az immunszuppresszív ciklosporin, a nifedipin, az etil-morfin) oxigenációjáért fele-



2-251. ábra. A CYP2B és CYP2C induktor, illetve CYP2B szubsztrát fenobarbitál-hidroxilációja

lős izoenzim sorolható ide. A tesztoszteron-6-béta hidroxilációját CYP3 izoenzim katalizálja. Ezeket az izoenzimeket elsősorban szteroidok indukálják. Igen fontos induktor a PCN (pregnenolon-16-alfa-karbonitril).

A CYP4 géncsaládhoz tartozó izoenzimek klofibráttal, egy antihyperlipaemiás gyógyszerrel indukálhatók. Szubsztrátjaik elsősorban endogén anyagok, különböző zsírsavak, így az arachidonsav, illetve az eikozanoidok.

A szubsztrátok sokfélesége miatt az oxidáció típusa szerint is igen sokfélék a P450 típusú enzimek által katalizált reakciók, amelyek között van – többek között – aromás hidroxiláció (ilyen a 2-251. ábrán látható reakció), N-dezalkilálás vagy oxidatív dezaminálás.

A biotranszformáció második, konjugációs szakasza

A biotranszformáció második szakaszában a vegyületek aszerint, hogy milyen konjugálódásra alkalmas csoportot tartalmaznak, különböző endogén kofaktorokkal konjugálódnak. A konjugáció leggyakrabban glukuronsavval, aminosavval, metil-, szulfát- vagy acetilcsoporttal, illetve glutationnal történik. A konjugációk viszonylag aspecifikus folyamatok: egyazon vegyület ugyanazon csoportja különböző csoportokkal konjugálódhat. A szalicilátok (Kalmopyrin, Aspirin stb.) alapvegyületének, a szalicilsavnak a karboxilcsoportja pl. konjugálódhat akár glicinnel, akár glukuronsavval, de a glukuronsavas konjugáció a szalicilsav OH-csoportjával is kialakulhat *(2-252. ábra)*. A konjugáció a májsejten belül aszerint is változhat, hogy a citoplazmában vagy a mitokondriumban történik: a benzoesav a citoplazmában glukuronsavval konjugálódva benzoil-glukuronidot képez, a mitokondriumban glicinnel konjugálódva hippursavvá alakul. A leggyakoribb konjugációs folyamatok közül a glukuronidációval, a szulfatálással, a metilezéssel és a glutationnal történő konjugációval foglalkozunk.

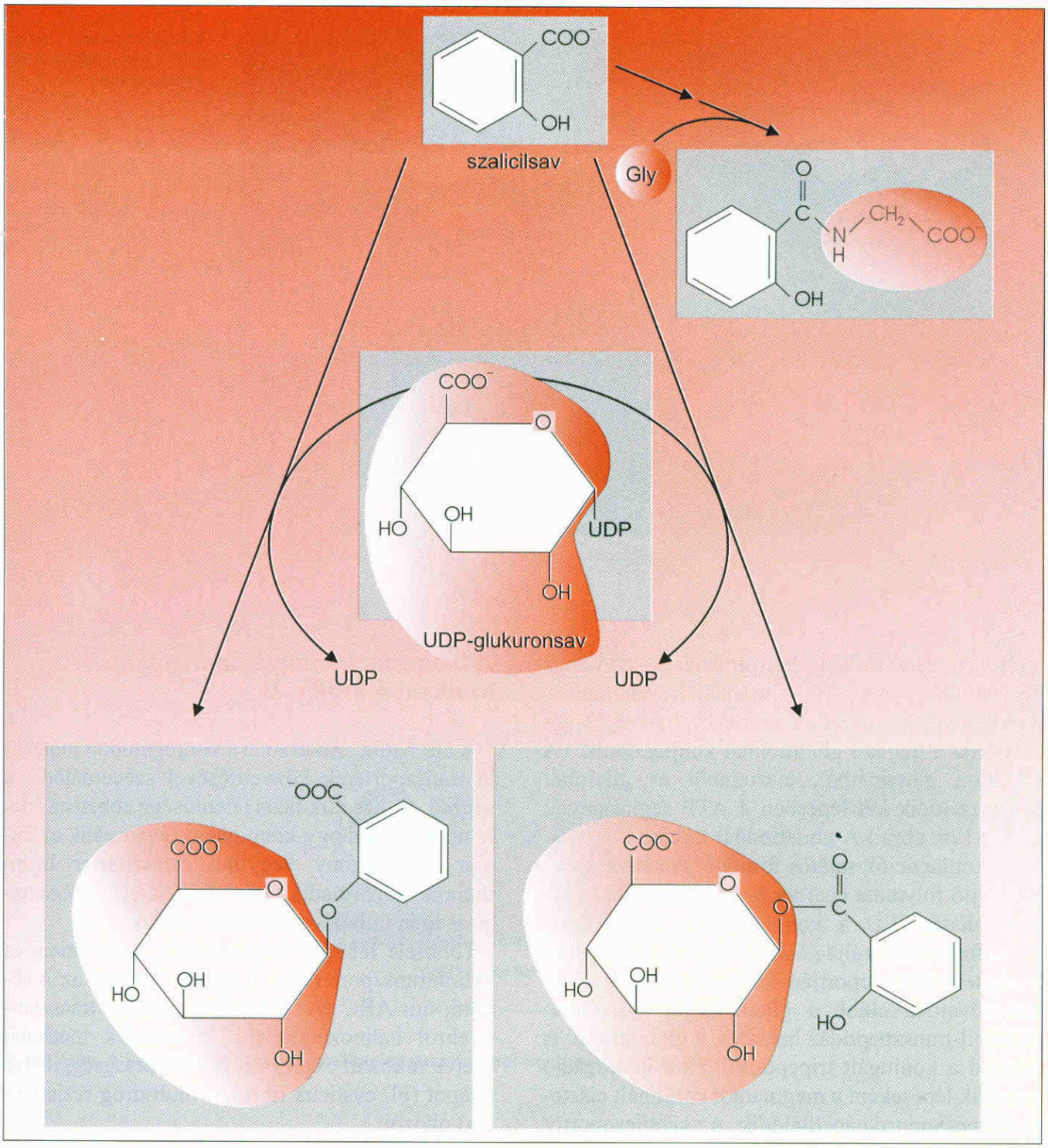
Glukuronidáció. A konjugációk közül a legjelentősebb reakció a glukuronidképződés. Glukuronsavas konjugációra a szubsztráton található szabad karboxil-, SH-, NH_2-, OH-csoport egyaránt alkalmas. A glukuronsavat az UDP-glukózból képződő UDP-glukuronsav szolgáltatja. Egy molekula glukuronid képződése tehát egy molekula glukóz-„veszteséget" jelent a máj számára. A különböző szerkezetű szubsztrátok glukuronidációját különböző UDP-glukuronil-transzferáz (UDPGT) izoenzimek katalizálják. Az UDPGT-k elsősorban a májban, kisebb mértékben a (külső környezettel kapcsolatba kerülő) tüdőben, bőrben, vékonybélben, szaglóhámban expresszálódnak. A különböző izomerek szubsztrátspecificitása eltérő, de itt is számos átfedés van. Az UDPGT-k az endoplazmás retikulumban található membránhoz kötött enzimek.

Eddig 17 humán UDPGT-t azonosítottak, amelyek két géncsaládba sorolhatók. Az I. géncsaládhoz tartoznak többek között a fenolok és a bilirubin glukuronidációjáért felelős izoenzimek, a II. géncsalád produktumai elsősorban a szteroidok, epesavak glukuronsavas konjugációját katalizálják. Az azonos géncsaládhoz tartozó izoenzimek C-terminális doménjét kódoló exonok azonosak. Ez felelős a membránhoz történő kötődésért, valamint az UDP-glukuronsav kötésért. A szubsztrátkötésért felelős N-terminális régiót kódoló nukleotidszekvenciákban izoenzimenként jelentős különbségek vannak. A jelenlegi kutatások szerint az UDPGT-k aktív centruma az endoplazmás retikulum luminális kompartmentjében van, így a glukuronidok itt keletkeznek.

Elsősorban (egyes izoenzimek, pl. a bilirubin-UDPGT kizárólag) a májban expresszálódnak. Egyes izoenzimeknek azonban élettani szerepe van más sejttípusokban, illetve méregtelenítéstől független folyamatokban is. A szaglás mechanizmusában például az odoráns anyagok UDPGT-szubsztrátok a szaglóhámban.

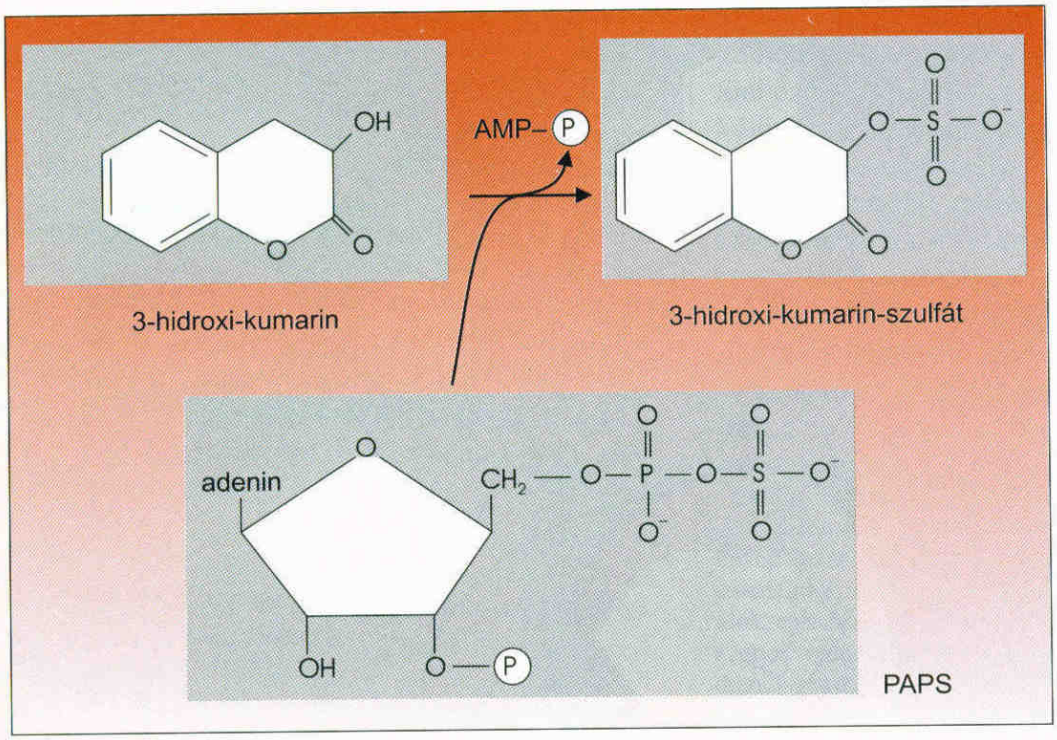
A természetes, endogén szubsztrátok közül a legfontosabb a bilirubin glukuronsavas konjugációja. Ez a szervezet hem katabolizmusában meghatározó jelentőségű lépés, enélkül a bilirubin nem tud a szervezetből kiürülni. A bilirubinfelhalmozódásnak látható jelei is vannak, mint pl. icterus (sárgaság). A szabad és konjugált szérumbilirubin meghatározása a máj egyik alapvető funkciójáról ad számos esetben a klinikus számára nélkülözhetetlen információt. Az UDPGT-k induktorai több esetben a P450 induktorokkal megegyeznek (3-metil-kolantrén, fenobarbitál), de induktoraik száma és az indukció mértéke lényegesen kisebb.

Szulfatálás. Különböző alkoholok, tiolok, fenolok, aminok (pl. thyroidok, szteroidok) a szulfatálást katalizáló különböző szulfotranszferázok



2-252. ábra. A szalicilsav konjugációja. *A szalicilsav, amely számos gyógyszer alapvegyülete, különböző csoportjain glukuronsavval és glicinnel egyaránt konjugálódhat (a könnyebb áttekinthetőség céljából a glukuronsavban a H-eket nem tüntettük fel)*

szubsztrátjai. Eddig tíz humán szulfotranszferáz ismert. A reakcióban szulfátdonor a PAPS (3-foszfo-adenozin-5-foszfoszulfát), mely a szubsztrátokkal szulfátésztereket *(2-253. ábra)* és amino- szulfátokat (-NH-SO_3^-) képez. A PAPS szulfátból és ATP-ből képződik. A szulfát elsősorban kéntartalmú aminosavak (Cys, Met) oxidációjából származik.



2-253. ábra. Az antikoagulánsként használt 3-hidroxi-kumarin szulfatálása

Glutationnal történő konjugáció. A szervezetbe kerülő elektrofil vegyületek (halogén-, nitrobenzol-származékok, aromás vegyületek) egy csoportja a májban glutationnal konjugálódik. (A glutation glutamátból, ciszteinből és glicinből szintetizálódik két lépésben 2 ATP segítségével; lásd 2-175. ábra.) A glutationnal történő konjugáció a konjugációk sajátos formája. A két szakaszban zajló folyamat első lépése a glutationnal való kapcsolódás. Ezt a konjugációt a glutation-S-transzferáz katalizálja *(2-254. ábra)*. A konjugáció a cisztein SH-csoportján keresztül valósul meg. Ezt követően előbb a glicin majd, a gamma-glutamil-transzpeptidáz hatására, a glutaminsav is lehasad a konjugált tripeptidről, és a konjugáció második lépéseként a megmaradt konjugált cisztein aminocsoportja acetilálódik. Az acetilcsoportot acetil-CoA szolgáltatja. A glutationnal történő konjugáció tehát egy aminosav és egy acetilcsoport beépítését jelenti molekulánként.

Metilezés. A metilezés a konjugációk viszonylag ritkább formája, amelyben a szabad SH-, NH_2- és OH-csoportok vehetnek részt. A metildonor a SAM (S-adenozil-metionin). (Ez a reakció a katecholaminok szintézisében és inaktiválásában is meghatározó reakció; lásd 19–20. oldal.)

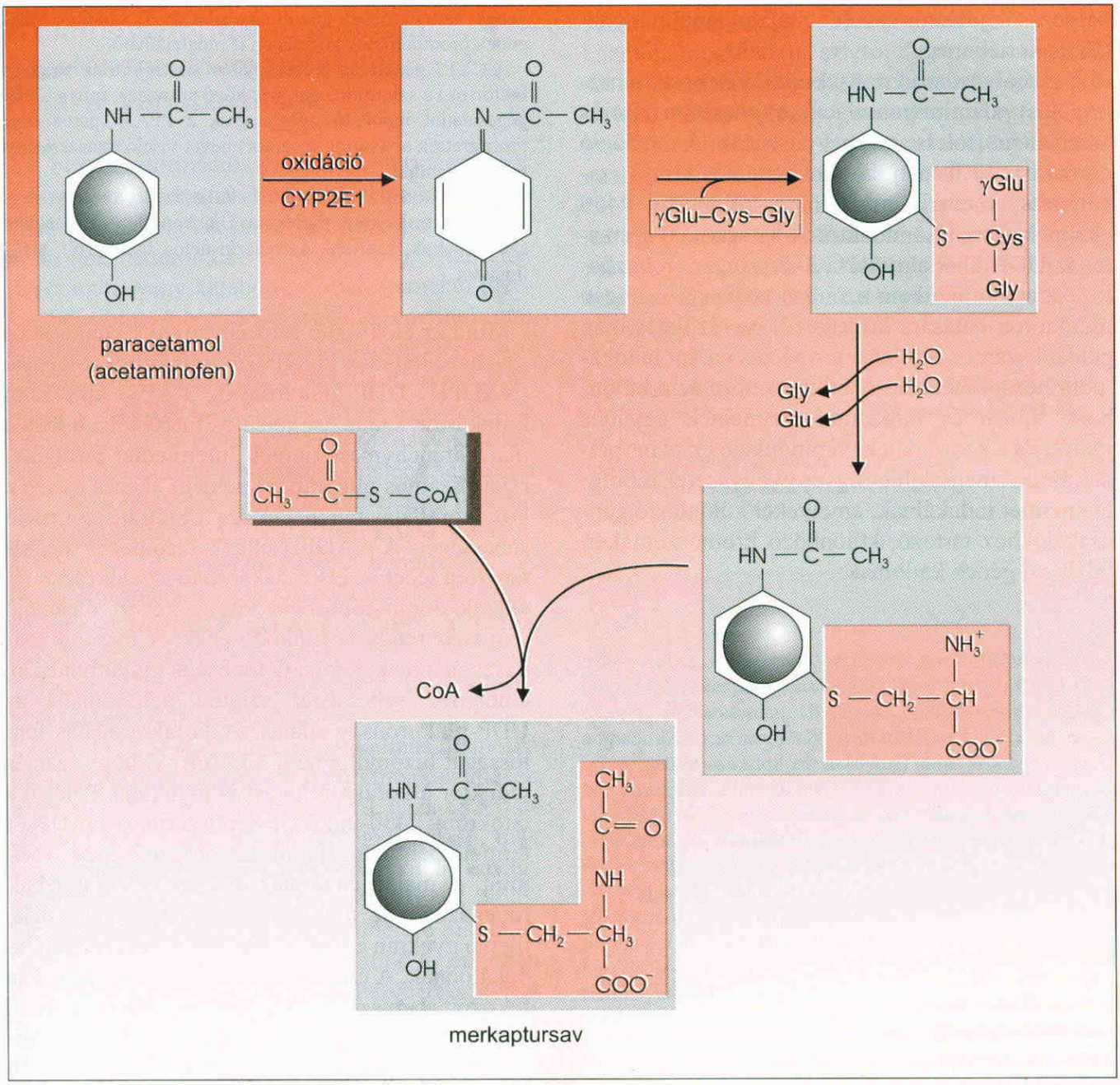
A biotranszformáció harmadik, transzport szakasza

A harmadik szakaszban a konjugálódott molekula transzporterek közvetítésével szecernálódik a sejtből. A második fázis jelentősége ebben az értelemben az is, hogy konjugáció révén válik az immár vízoldékony vegyület transzporter ligandummá. A harmadik fázis klinikai jelentősége miatt is igen intenzíven kutatott terület.

Többféle fehérjét azonosítottak, mint anion- és kationtranszportereket. Legtöbb ismeret az ATP-kötő, ún: ABC (ATP binding casette) transzporterekről halmozódott fel. E fehérjék mutációi, illetve fokozott expressziója több betegség, illetve állapot (pl. cysticus fibrosis, multidrog rezisztencia) okozói.

A multidrog-rezisztencia jelensége a rosszindulatú daganatos betegségek kemoterápiájában fontos. Több daganat ellenáll a daganatellenes gyógyszerterápiának. A gyógyszermolekulákat a daganatsejt transzporterek segítségével kipumpálja, így azok nem képesek sejtkárosító hatásaikat kifejteni.

Transzport ATPázok közé tartoznak; a folyamat során a transzporter foszforilálódik (P-típusú fehérjék). Az ide tartozó integráns, membrán kötött



2-254. ábra. A hőcsökkentő fájdalomcsillapító paracetamol konjugációja glutationnal

multidrog-rezisztencia pumpa fehérjék (MDR, MRP) közül többet leírtak, amelyek szerepet játszanak glukuronsavval, glutationnal konjugált vagy konjugálatlan gyógyszerek és endogén molekulák (pl. bilirubin-glukuronidok, epesavak, szteroidok) transzportjában, szekréciójában. Májspecifikus formáik a hepatociták epecanaliculus és laterális plazma membránjában találhatók. További részleteket lásd még a 4. fejezetben.

A biotranszformáció szabályozása

A máj metabolizmusáról ismert, hogy a környezeti változásokat követve változik, és az is, hogy kapacitása adott körülmények között sokszorosára fokozható. Különösen érvényes ez a biotranszformációs folyamatokra. A biotranszformáció szabályozása különböző szinteken történik. A sza-

bályozások jelentős részét a májban tanulmányozták, ismerték meg.

A szabályozásban transzkripciós és poszttranszkripciós, valamint transzlációs és poszttranszlációs mechanizmusok is szerepet játszanak. A reguláció régóta ismert formája a transzkripciós szintű szabályozás, az enzimindukció. A különböző P450 enzimek aktivitása induktorok hatására 70-szeresre, az UDPGT-k aktivitása 3–5-szörösre fokozható. Az enzimindukció azonban nemcsak xenogén induktorok hatására következik be. Születés után például számos biotranszformációs enzim indukálódik hormonhatásra. A biotranszformáció különböző típusú és funkciójú enzimeinek együttes indukciói a koordinált enzimindukció eklatáns példái. Ennek megfelelően egyes gyógyszerek többféle enzimet indukálnak, amelyeket különböző géncsaládokhoz tartozó, különböző kromoszómákon található gének kódolnak.

Biotranszformációs enzimek koordinált indukciójában több transzkripciós faktor, illetve szignál transzdukciós út szerepét bizonyították. A CYP1 géncsaládhoz tartozó izoenzimek indukciójában az AHR-t (aromatic hydrocarbon receptor) először, mint (súlyosan toxikus környezetszennyező) aromás szénhidrogének hatását közvetítő receptort, majd később transzkripciós faktort írták le. Az AHR fiziológiai funkciója, valamint természetes induktora ma is ismeretlen, Legújabb kutatások szerint szerepe az embriogenezisben alapvető, endogén ligandja eikozanoid metabolit lehet.

Az AHR a bHLH (basic helix-loop-helix) transzkripciós faktorok közé tartozik. Miután kis molekulasúlyú induktorát megköti, egy másik bHLH fehérjével, az ARNT-vel (aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator) dimert képezve kötődik specifikus DNS-szakaszokhoz (XRE xenobitic responsive element). XRE szekvenciák több gén 5' végi enhancerében is előfordulnak, ezáltal segítik elő ezen gének indukcióját az AHR-ARNT heterodimer bekötődése után. Az ARNT más transzkripciós faktorokkal is dimert képezhet, így több jelpálya komponense. Az AHR „gene battery"-hez minimum hét gén tartozik, köztük a CYP1A1, egy UGT és egy glutation-transzferáz is. Legismertebb induktora a már említett dioxin, amely több szakmai közlemény és politikai publicisztika tárgya egyben. Ezt tartalmazza például a vietnami háborúban növényirtóként használt hírhedt „agent orange"; ez a jelenleg ismert leghatékonyabb rákkeltő anyag. A dioxin biológiai féléletideje emberben 6–50 év, 90%-a zsírszövetben található, állati zsírokkal is kerülhet szervezetünkbe.

A CYP2 géncsalád indukciójában résztvevő transzkripciós faktor(ok)ról kevesebb az ismeretanyag. Az az(oka)t kötő DNS-szekvencia a még biokémikusokban is meglevő találékonyság, valamint a „vezér" induktor fenobarbitál jóvoltából a „barbie box" nevet viseli. Ez a szekvencia nemcsak CYP2 gének, hanem többek között egyes UDPGT, valamint MDR gének promoterének közelében is megtalálható.

A CYP3 géncsalád indukciójában szereplő transzkripciós faktor(ok) a szteroidreceptorok közé tartoznak, míg a CYP4 géncsaládot indukáló gyógyszerek a PPAR (peroxisome proliferation activating receptor) nevet viselő transzkripciós faktor ligandjai.

Az induktorok zöme, az intracelluláris receptoroknak megfelelően zsíroldékony molekula. Újabban több eikozanoidot azonosítottak, mint pl. a transzkripciós faktor (pl. AHR) ligandot.

Mind az előkészítő szakasz, mind a konjugációs szakasz általában különböző kofaktorokat igényel (NADPH, UDP-glukuronsav, PAPS stb). Ezen kofaktorok szintézise jelentős mértékben terheli a máj parenchymasejtjeinek intermedier anyagcseréjét. Számos állapotban, például éhezés esetén a kofaktorellátás meghatározza a biotranszformáció sebességét. A NADPH-ellátás elsődleges meghatározója lehet az első szakaszban az előkészítő reakciók döntő többségét kitevő kevert funkciójú oxigenáz rendszer működésének. A második szakaszban a reakciók nagy többsége glukuronidáció, amelynek sebességét szintén determinálja az UDP-glukuronsav-ellátás. A kofaktorellátás fontosságát bizonyítja az a körülmény, hogy számos induktor a kofaktorellátást is indukálja. Például a citokróm P450-indukció rendszerint a NADPH-t termelő pentózfoszfát út dehidrogenázainak, valamint a malát enzimnek és az izocitrát-dehidrogenáznak az indukcióját is maga után vonja, illetve gyakran egyes UDPGT-k is ezzel együtt indukálódnak. A citokróm P450 enzimek indukciója fokozott hemszintézist is igényel. A szervezet hemszintézisének körülbelül 15%-a a májban történik, s ennek körülbelül 65%-a a citokróm P 450 és mintegy 8% a citokróm b_5 porfirinváz-igényét fedezi. A hemszintézis és a fehérjeszintézis a májban összehangoltan szabályozott. Számos induktor hatására a delta-aminolevulinsav-szintáz, mint a porfirinszintézis elkötelező lépésének enzime (lásd 2.4. fejezet) is indukálódik. Ez az indukció az összhang megbomlását is eredményezheti, hemtúlprodukcióhoz vezethet. A súlyos környezetszennyezési problémákat jelentő dioxin, különböző vegyipari technológiák igen mérgező hulladéka például így is okoz megbetegedést, akut intermittáló porphyriát.

A máj oxigénfogyasztása is jelentősen változhat; gyógyszerterhelés hatására akár 30%-kal is nőhet.

A biotranszformáció biológiai jelentősége. Méregtelenítés. Klinikai vonatkozások

A biotranszformációs enzimek „természetes", endogén szubsztrátjai a szervezetben különböző funkciójú molekulák, amelyek között vannak pl. hormonok (szteroidok, eikozanoidok), vitaminok (D-vitamin) vagy katabolikus utak termékei (aceton, bilirubin). A biotranszformációs enzimek által katalizált reakciók szerepet játszhatnak egyes molekulák szintézisében (pl. szteroidhormonok szintézise a mellékvesében, epesavak szintézise és konjugációja, D-vitamin 25-hidroxilációja májban, LTD_4 szintézise immunkompetens sejtekben stb.). A biotranszformációs méregtelenítő funkció a gyógyszerfogyasztás és a kemizáció korában adaptációs mechanizmusnak tekinthető. A biotranszformációs reakciók sokfélesége, az indukálhatóság lehetősége „survival value", a túlélés lehetősége a szervezet számára.

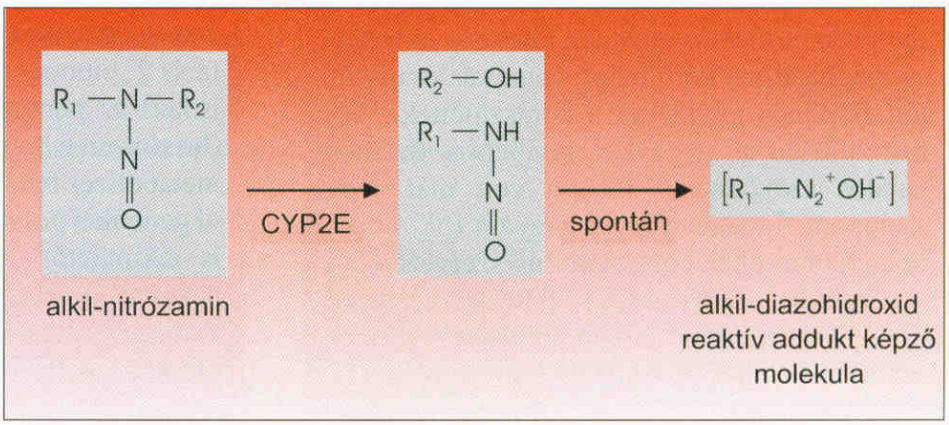
Összességében, biotranszformációs reakciók következtében számos biológiailag aktív molekula inaktiválódik, majd kiürülésre alkalmas állapotba kerül. A biotranszformáció újabb megközelítések szerint az a folyamat, amely szabályozza a szervezetben képződő különböző biológiai hatású, más sejtek működését befolyásoló molekulák anyagcseréjét. Így a biotranszformációs enzimek biológiai jelentősége nemcsak a méregtelenítő funkció.

Ezen túlmenően részt vesznek mind az endogén és idegen eredetű szabályozó, illetve receptorral rendelkező molekulák egy jelentős részének (pl. szisztémás és lokális hormonok, szagérzékelést kiváltó molekulák) bioszintézisében, illetve katabolizmusában (pl. szteroidhormonok képződésében és lebontásában). A lebontó folyamatokba történő bekapcsolódás „endogén méregtelenítésként" is felfogható. Az oxigenációt követő nem enzimatikus folyamatok következtében bekövetkező változások azonban éppen a méregtelenítéssel ellentétes toxikus hatásokhoz vezethetnek. Ily módon ugyanazok a "méregtelenítő" enzimek adott esetben más szubsztrátokat átalakítva inaktív anyagokat toxikussá tesznek.

Az ily módon „aktiválódó" anyagok jellemző példái a nitrózaminszármazékok. A nitrózaminszármazékokat a CYP2E géncsalád izoenzimei oxigenálják. Az oxigenáció hatására keletkező igen reaktív intermedier könnyen reakcióba lép nukleinsavak bázisaival, fehérjék aminosavaival *(2-255. ábra)*.

A nitrózaminszármazékok rákkeltő, karcinogén anyagok, amelyek különböző tápanyagokból, élelmiszer-tartósító szerekből képződhetnek az emberi szervezetben (pl. a gyomorban). Karcinogén hatásuk molekuláris mechanizmusában a toxikus anyag a CYP2E által katalizált reakció során képződő intermedier. A CYP2E izoenzimeket az etanol, az aceton, az enzimfehérje szintjén indukálja. Ezért alkoholizmusban, illetve a hyperacetonaemiás állapotokban, ha egyidejűleg nitrózaminszármazékok is kerülnek a szervezetbe ez a folyamat is felgyorsul.

A biotranszformációs folyamatok gyakorlati jelentőségét nehéz túlbecsülni. Korunkban a kórházban fekvő betegek átlag 5–10 fajta gyógyszert



2-255. ábra. Nitrozaminszármazékok aktiválódása a CYP2E hatására

szednek. A gyógyszerek számával az ellentétes gyógyszerhatások előfordulása ugrásszerűen megnő. Ennek az az oka, hogy a biotranszformációban részt vevő egymást átfedő széles szubsztrátspecifitású enzimek miatt különböző szubsztrátok együttes adásakor kompetíció alakul ki. Ez befolyásolja a gyógyszerek inaktiválását, ezzel a tényleges dózisát, toxicitását, így közvetve a hatását. Talán ennél is fontosabb körülmény az, hogy a különböző szubsztrátok egyben különböző induktorok is. Indukciós hatásuk viszont befolyásol(hat)ja a betegen alkalmazott, többi gyógyszer metabolizmusát. Így például egyes induktor hatású gyógyszerek elhagyása, az indukciót megszüntetve lassíthatja a másik gyógyszer lebontását: ennek következtében azonos dózisban, de más kombinációban adott gyógyszerek esetén túladagolási tünetek léphetnek fel (például antikoaguláns hatású kumarinszármazékok adagolása igényel különös figyelmet ebből az aspektusból is). Tekintve, hogy ugyanannak az enzimnek természetes, endogén és xenogén szubsztrátjai egyaránt vannak, a kompetíció igen bonyolult példái adódhatnak *(2-256. ábra).*

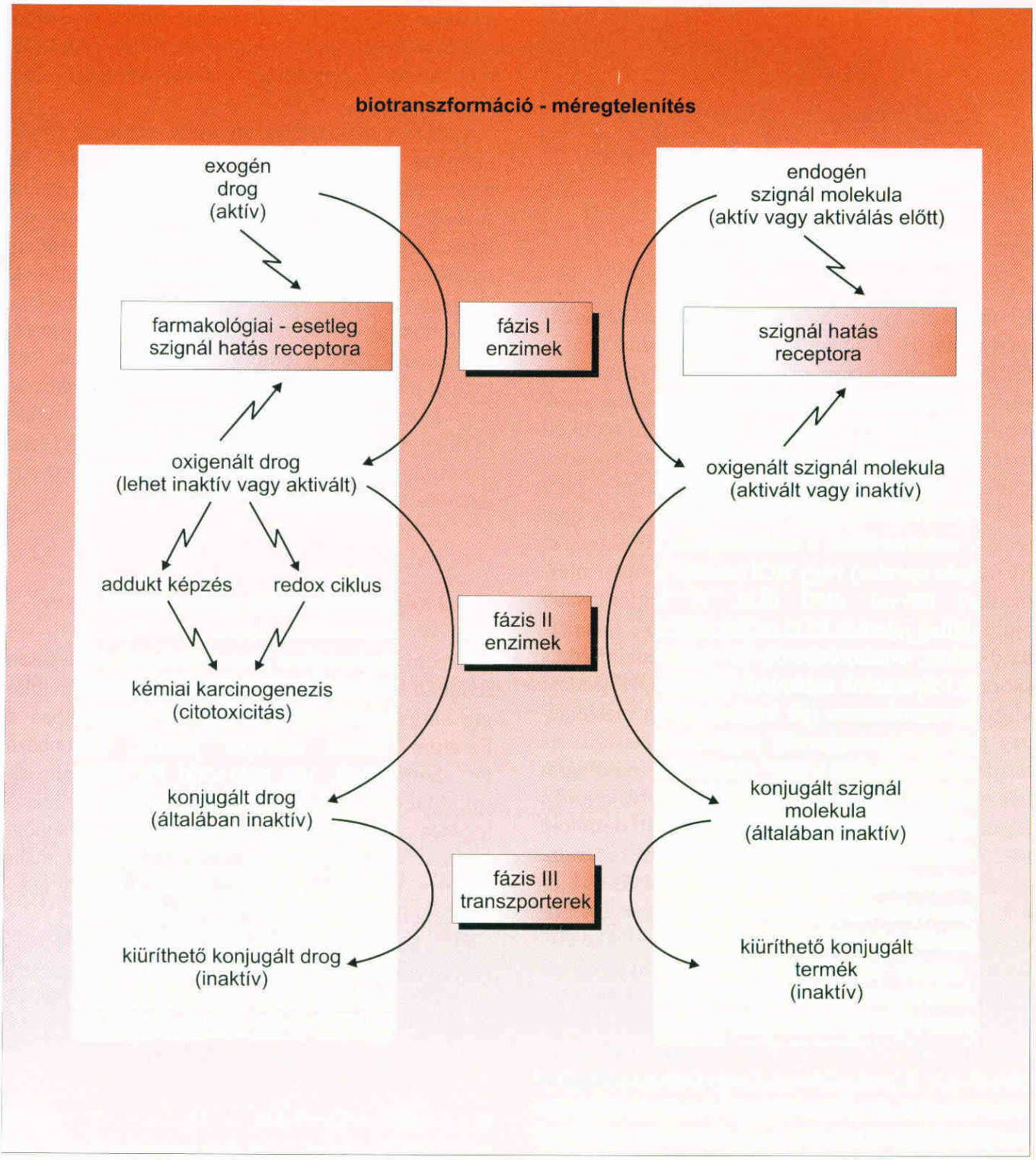
Hasonlóan egyes más enzimekhez (pl. glukokináz), újszülöttek májában a biotranszformációs enzimek aktivitása alacsony, hiszen a „fiziológiás" indukció, a szülést követő hormonális változások egyik következménye még nem történt meg. Ez okozza az **újszülöttek** (elsősorban a koraszülöttek) **hyperbilirubinaemiáját,** ami igen veszélyes állapotot idézhet elő. Az újszülöttkori sárgaság kialakulásában szerepet játszik a fokozott hemolízis is. A biotranszformációs enzimek alacsony aktivitása meghatározó körülmény nemcsak az újszülött (különös tekintettel a koraszülöttek), hanem a szülő nő gyógykezelésében is. Számos halálos szövődmény forrása volt már ezen szempont figyelmen kívül hagyása (pl. morfium, chloramphenicol a szülő nő szervezetéből a magzatba, illetve az újszülött szervezetébe kerülve ott nem tud lebomlani és ez végzetes szövődményeket okozott).

Az indukció terápiás lehetőséget is ad az orvos kezébe. A **Gilbert-kór** „fázis 2 biotranszformációs betegség" (amerikai statisztikák szerint ez a lakosság kb. 6%-át érinti), amelyben a konjugálatlan bilirubin koncentrációja megemelkedik a szérumban. Gilbert-kóros betegeket fenobarbitállal kezelnek, mert a fenobarbital indukálja a bilirubin-UDPGT-t, így fokozza a bilirubinkonjugáció sebességét, tehát mérsékli a konjugálatlan bilirubin koncentrációjának megemelkedését a szérumban. A konjugálatlan hyperbilirubinaemiát okozó jóindulatú Gilbert-kór és súlyos neurológiai károsodásokat okozó **Crigler–Najjar-szindróma** mellett a már konjugált bilirubin transzportjának zavarai is bekövetkezhetnek. A **Dubin–Johnson-**, illetve a **Rotor-szindróma** konjugált hyperbilirubinaemiával jár.

A hyperbilirubinaemiák egy részének hátterében a bilirubin UDPGT expressziójának zavara áll. Pontosan ismerik emberben például, hogy a viszonylag jóindulatú Gilbert-kórban vagy a sokkal súlyosabb Crigler–Najjar-betegségben az I. géncsaládhoz tartozó izoenzimet kódoló gén melyik exonjában van például C-T szubsztitució vagy korai stop kodon.

A Dubin–Johnson-szindrómás betegek májában az exkréciós zavar pigmentlerakódást, májmegnagyobbodást (hepatomegalia) és változó intenzitású sárgaságot okoz. A betegséget az MRP transzporterek családjába tartozó egyik fehérje génjének károsodott expressziója okozza. így ez „fázis 3 betegségnek" tekinthető.

A biotranszformációs enzimek aktivitása populációnként, nemenként és személyenként is rendkívül különböző és jelentősen változhat az életkorral. Ez mind populációk gyógykezelésekor, mind egyéni érzékenységek megállapításánál fontos körülmény, amelynek számos munka- és közegészségügyi stb. vonatkozása van. A genetikai polimorfizmus több fázis 1. és fázis 2. biotranszformációs enzim esetében jól ismert és pontosan meghatározott [PM, poor (lassú) metabolizer; EM, extensive (gyors) metabolizer fenotípusok). A Gilbert-kór például genetikai polimorfizmus következményének is tekinthető. A genetikai polimorfizmussal szorosan összefüggő indukálhatóság, a kémiai karcinogenezisben játszott szerep több gyakorlati kérdést is felvet, így például egyes szűrő-

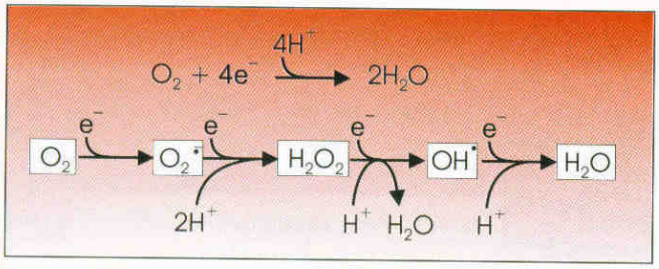


2-256. ábra. A biotranszformáció folyamatainak és hatásainak összefoglalása

vizsgálatok szükségességét. Ugyancsak előrevetíti az ún. individuális, személyre szabott gyógyszerterápia lehetőségét.

Az „oxigéntoxicitás"

Az intermedier anyagcsere alapfolyamata az oxigénmolekula redukciója. Ez a redukció a citokróm oxidáz által katalizált reakcióban négy elektron



2-257. ábra. Az oxigén redukciója

felvételével megy végbe (lásd 2.1. fejezet), eredményeként H_2O képződik. Több évtizede megismertek azonban olyan állapotokat és folyamatokat, amikor tökéletlenül redukált oxigénszármazékok jönnek létre *(2-257. ábra)*. A tökéletlenül redukált oxigénszármazékok egy része egy vagy több párosítatlan spinű elektront tartalmaz atom- vagy molekulaorbitálon, azaz szabad gyök. Ezek igen reaktív származékok; a szakirodalom **ROS (reaktív oxigén species)** vagy ROI (reaktív oxigén intermedier) névvel illeti őket. A legfontosabb biológiailag jelentős ROS molekulák: $O_2^{\bullet-}$ (szuperoxid-anion; enzimreakciók és nem enzimatikus spontán folyamatok során keletkezik), $OH^{\bullet}$ [hidroxilgyök; természetes (pl. kozmikus) és mesterséges (pl. gamma-sugarak) sugárzás hatására víz hasításával képződik], $NO^{\bullet}$ (élettani és patológiai jelentőségű mediátor, amely enzimreakcióban képződik, lásd 5.1. fejezet); illetve a fenti definíció szerint nem szabad gyök H_2O_2 (egyaránt képződik spontán és enzimatikus úton). Keletkezésük és biológiai szerepük megítélése ma sem egységes. Ennek számos oka van. Többek között a következők: (i) az oxigén hiánya és többlete (a hypoxia és hyperoxia) egyaránt veszélyeket hordoz. Egyes kézikönyvek a görög mitológiát, a két „klasszikus", elkerülendő veszélyhelyzetet (Scylla és Charybdis) hívják segítségül e jelenség szemléltetéséhez. A ROS keletkezése összefügg fiziológiás, de gyakran patológiás állapotok kialakulásával. (ii) ROS keletkezhet nem enzimatikus úton. Ezért kialakulásában a „kémiai baleset" elmélet, mint legfontosabb etiológiai tényező korábban szinte egyeduralkodó volt, és korábban meghatározta a szabad gyökökről kialakított egyoldalú biológiai szemléletet. (iii) Bár azt régóta ismerik, hogy ROS enzimatikus úton is keletkezhet, de ennek jelentőségét inkább egyes részfolyamatokra (pl. fagocitózis) korlátozták. A közelmúlt kutatásai azonban gyökeresen változtatják meg e szemléletet. Több jelátviteli folyamatban bizonyítják ROS meghatározó részvételét, szabályozottságát (pl. NO).

A ROS-t antioxidáns enzimek, anyagok folyamatosan inaktiválják, eliminálják. Ha az antioxidáns mechanizmusok nem tudják ezt a funkciót betölteni súlyos károsodásokat okozó állapot, **„oxidatív stressz"** alakulhat ki. Ebben az állapotban spontán nem enzimatikus folyamatok sorozata történik. Ennek eredményeképpen a legkülönbözőbb típusú molekulák, így nukleinsavak, lipidek, fehérjék, szénhidrátok alakulnak át, változnak meg; ezért az oxidatív stresszben bekövetkező károsodások a legkülönbözőbb folyamatokat indíthatják el, pl. mutagenezis, karcinogenezis, membránkárosodás, lipid-peroxidáció, fehérjeoxidáció és fragmentáció.

ROS képződése nem enzimatikus úton

A nem enzimatikus úton keletkező részlegesen redukált oxigénszármazékok keletkezése a patológia tárgykörébe is tartozik. A folyamatban a Fe-atom fontos szerepet játszik. Különböző Fe^{2+}-komplexek, így nukleotid Fe^{2+}-komplexek (pl. ADP-Fe^{2+}) O_2-nel reagálva hoznak létre részlegesen redukált oxigén származékokat. A hemoglobin O_2-felvételekor a mikroszomális elektron-transzportláncban, illetve a légzési láncban „melléktermékként" $O_2^{\bullet-}$ keletkezhet.

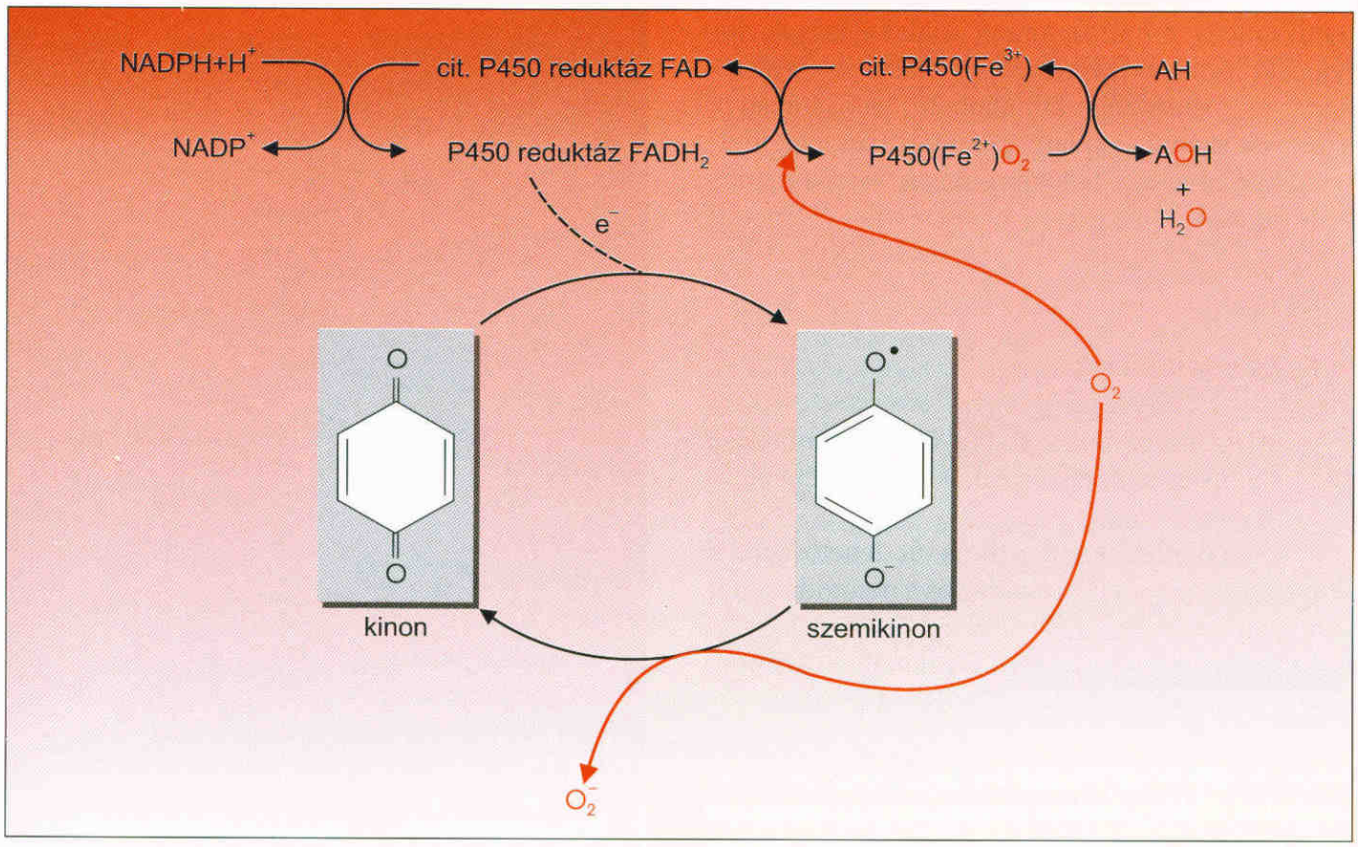
$O_2^{\bullet-}$ keletkezhet kinoidális szerkezetet tartalmazó vegyületek enzimatikus metabolizmusa során a keletkező szemikinonok nem enzimatikus autooxidációja folyamán. Több szemikinon lehet szabadgyök-képző ily módon *(2-258. ábra)*.

a. $Fe^{2+} + O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$

b. $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$
(Fenton-reakció)

c. $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$
(Haber–Weiss-reakció)

A belégzett levegő O_2-je 1–3%-ban $O_2^{\bullet-}$-ná alakul. A „normális" $O_2^{\bullet-}$-termelés évente kb. 2 kg. Krónikus gyulladásokban ez a mennyiség jóval nagyobb.



2-258. ábra. A szemikinonok enzimatikus úton történő keletkezése és autooxidációja

ROS képződése enzimatikus úton

Enzimatikus úton $O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 termelődhet. Fagocitózisra képes sejtekben fedezték fel a **NADPH-oxidázt**. Mai tudásunk szerint – bár előfordulása nem univerzális – számos szövet tartalmazza, sőt több növényben is kimutatták. Flavoprotein; tehát olyan prosztetikus csoporttal rendelkező fehérje, amely egy elektrontranszfert is képes katalizálni.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$$

A reakcióban NADPH az elektrondonor. Főként a plazmamembránban található. A NADPH-oxidáz antipatogén enzim, mikroorganizmusok hatására aktiválódik és a termékeként képződő ROS károsítja, megöli a baktériumokat. Nem megfelelő működése esetén (krónikus granulomatosus betegségek) az ismétlődő fertőzések halálhoz vezethetnek fiatalkorban. A FAD, illetve Mo-tartalmú **xantin-oxidáz**, valamint a **flavin-oxidázok** (pl. D-aminosav-oxidáz) által katalizált reakciókban $O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 termelődik. Más enzimatikus reakciókban is átmenetileg keletkezhet a reakció során $O_2^{\bullet-}$, például a mikroszomális légzési láncban, azonban normális körülmények között ez nem szabadul fel. Prooxidáns enzimnek tekintik az **NO-szintázt** is (lásd 5.1. fejezet).

A keletkezett szabad gyökök más szabad gyökökkel és nem gyökökkel reagálhatnak, így további szabad gyökök képződhetnek és reakciósorozatok indulhatnak. Ezek között a **lipidperoxidáció** és a **DNS-károsodások** patológiai jelentősége emelendő ki. Lipidperoxidáció során a reaktív szabad gyök H-t von el többszörösen telítetlen (membrán- vagy lipoprotein) zsírsav oldallánctól. Ennek következtében membránkárosodások jönnek létre, LDL-peroxidáció alakul ki. Mindezen folyamatok az atherosclerosis kialakulásában, az ischaemiás károsodások patomechanizmusában (stroke, myocardialis infarctus) jelen vannak. Reaktív $OH^{\bullet}$ hatására mutációkra vezető DNS-bázis-károsodások (pl. 5-hidroxi-

metil-uracil) 8-hidroxi-uracil kialakulásának folyamata jól ismert. Egészséges emberek vizeletében ezek mennyisége kimutatható, valószínűsítve a jelentős számú „oxidatív találatot" naponta, illetve feltételezve egy hatékony repair mechanizmus védő hatását.

A ROS eliminálása

Az oxigéntartalmú szabadgyökök eliminálása enzimatikus és nem enzimatikus uton történhet:

a. A **közvetlen enzimatikus** út lehetőségei a szuperoxid-dizmutáz, a kataláz és a peroxidáz által katalizált reakciók.

A minden aerob szövetben megtalálható **szuperoxid-dizmutáz** az alábbi reakciót katalizálja:

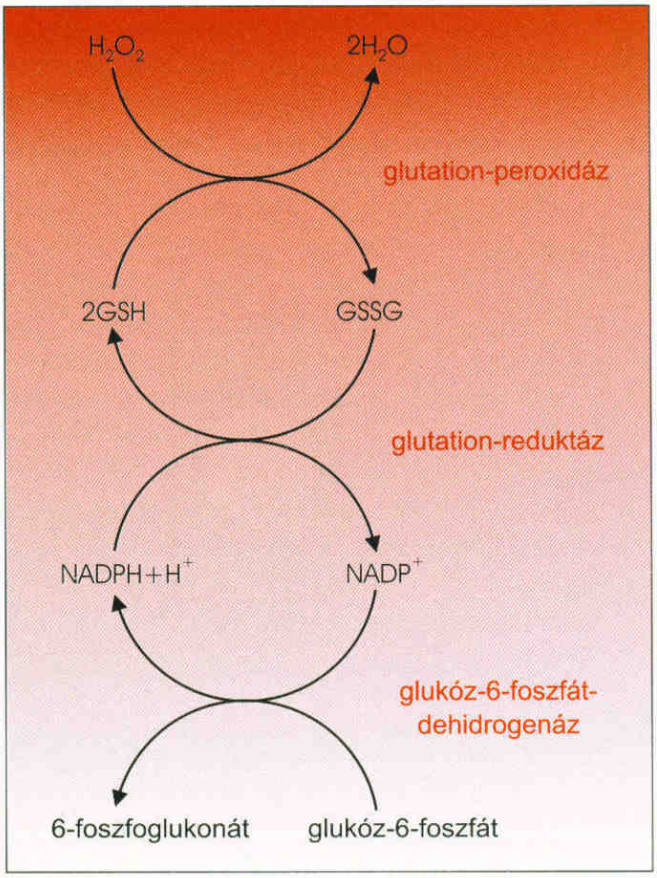
$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Így a szuperoxid-anion redukálódik, illetve oxidálódik. A citoplazmában Cu-, illetve Zn-, a mitokondriumban Mn-tartalmú izoenzimek vannak.

A **peroxidáz** szintén elterjedt enzim az élővilágban. Különösen jelentős a vörösvértestek, trombociták, leukociták peroxidáztartalma. A peroxidáz által katalizált reakcióban a hidrogén-peroxid, illetve a lipid-peroxid vízzé redukálódik. Glutation-peroxidáz esetében az elektron/hidrogén donor a **redukált glutation**, az enzim pedig szelént tartalmaz *(2-259. ábra)*. Szelénhiányos táplálkozás esetén a peroxidszint emelkedik, ami szövetkárosodást okoz. A redukált glutation szint csökkenéséhez vezető állapotok, mint például a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz-hiány a glutation-peroxidáz elégtelen működésén át az oxigéntartalmú szabad gyökök felhalmozódását eredményezik. Ezért jelentős a peroxidáz szerepe a membránlipidek, illetve a hemoglobin épségének védelmében a vörösvértestekben.

A **kataláz** elsősorban a májban, vesében és a vér alakos elemeiben található. Hemoprotein, főleg a peroxiszómák tartalmazzák. Segítségével a hidrogén-peroxid vízzé és oxigénné alakul.

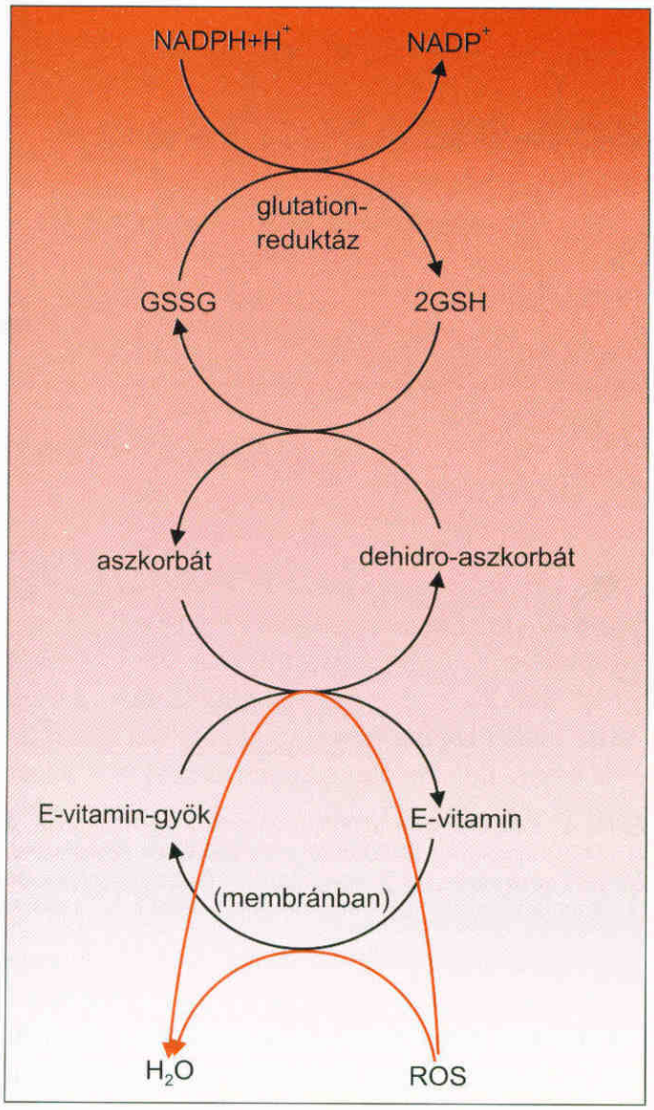
$$2H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$



2-259. ábra. A glutation-peroxidáz által katalizált reakció. *GSH, redukált glutation; GSSG, oxidált glutation*

A fentieken kívül közvetve antioxidáns hatású enzimek többek között egyes, konjugációkat katalizáló UDP-glukuronil-transzferázok, a glutation-S-transzferázok, a kinonokat két elektronnal redukáló NADPH-kinon-oxidoreduktáz, a glutation-reduktáz, mivel megelőzik, gátolják a ROS keletkezését.

b. A **nem enzimatikus úton** történő szabadgyök-eliminációban az antioxidáns hatású anyagok játszanak jelentős szerepet. Kiemelkedő fontosságú a **C-vitamin** és az **E-vitamin**, valamint a **glutation**. Az antioxidánsok standard redoxpotenciálja alapján egymást redukálni képesek *(2-260. ábra)*. Az E-vitamin elsősorban a membránkomponensek védelmében fontos antioxidáns. Természetes antioxidáns a már említett ubikinon (lásd 2.1 fejezet), a bilirubin, a retinol (A-vitamin), az urát és számos más molekula. Az antioxidáns hatású gyógyszerek adása igen fontos terápiás lehetőség.



2-260. ábra. Természetes, nem enzimatikus antioxidánsok „hierarchiája"

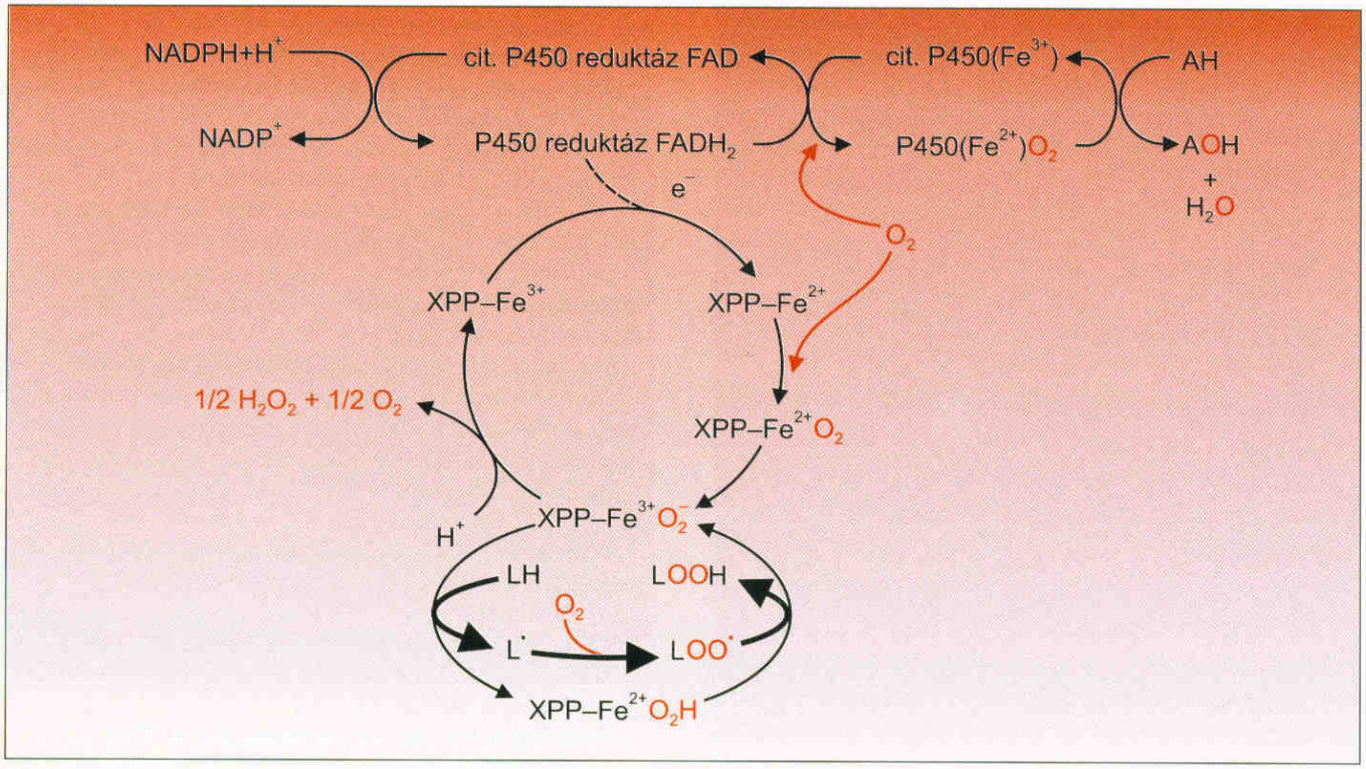
Az oxigéntartalmú szabad gyökök sejtkárosító hatásai több módon jelentkeznek. A különböző membránlipidek, lipoproteinek peroxidálódnak. Lipidperoxidáció *(2-261. ábra)* következtében, a membrán permeabilitási viszonyok megváltoznak, a membránban elhelyezkedő enzimek inaktiválódnak. A különböző aktív reakcióképes gyökök kovalensen kötődnek fehérjékhez és nukleinsavakhoz, így enzimeket inaktiválnak, illetve mutagén, teratogén, karcinogén hatásúak. Szabad gyökök képződésével magyarázzák az öregedés mechanizmusát is, a lipid-peroxidok és fehérjék oldhatatlan komplexeket, granulumokat képeznek, amelyek lerakódnak.

Átmeneti oxigénellátási zavarokkal járó állapotok (infarctus, szervtranszplantáció, sebészi beavatkozások) ismert szövődménye az ischaemia-reperfusio szindróma. A vérellátás (oxigénellátás) helyreállítása jelentős további szövetkárosodást eredményez, oxidatív stressz alakulhat ki. Ilyen típusú károsodások léphetnek fel szívben (pl. infarctus), agyban (agyi vascularis katasztrófák), vesében, májban (transzplantáció), belekben (műtéti következmények). Az intenzív ATP-lebomlás, fokozódó xantin-oxidáz-aktivitás, illetve más mechanizmusok (citoszolba történő kalciumkiáramlás hatására fokozódó leukotriénszintézis leukociták adherenciáját, kitapadását, a NADPH-oxidáz-aktivitás emelkedését okozza) szabad gyökök képződéséhez vezetnek, amelyet az oxigénellátás javulása jelentősen fokoz. Mindez lipid-peroxidációt, membránkárosodást, enzimek inaktiválódását stb. okozza. Az oxidatív stressz megelőzésére számos szintetikus antioxidánst, xantin-oxidáz-bénítókat, kalciumcsatorna-blokkolókat, vas kelátorokat stb. alkalmaznak.

Összefoglalva, az oxidoreduktázok által katalizált reakciókban, valamint nem enzimatikus úton a sejtekben oxigéntartalmú szabad gyökök keletkezhetnek, amelyek ha felszabadulnak, spontán nem enzimatikus folyamatokat indítanak el. Eliminálásuk részben antioxidáns enzimekkel, illetve más antioxidáns hatású anyagokkal történik. Az oxigéntartalmú szabad gyökök többféle mechanizmussal sejtkárosító hatásúak és a génexpresszió szintjén is befolyásolják a sejtek működését.

Az intracelluláris redox status változásainak szerepe a génexpresszió szabályozásában egyike a legfontosabb kutatási irányoknak napjainkban. Számos transzkripciós faktor aktiválása hypoxia vagy éppen a hyperoxia következménye, az esetek egy részében, más tényezők között egyes ROS molekulák megjelenése, koncentrációjának változása kimutatott, illetve közvetve bizonyított. Az NFκB (nuclear factor κB), AP-1 (transcription factor activating protein-1) hyperoxia (oxidatív stressz) esetén; a HIF-1α (hypoxia inducible factor-1 alpha) hypoxia hatására aktiválódik, kötődik megfelelő DNS szekvenciákhoz.

Oxidatív stresszben például citokinek (pl. macrophage colony stimulating factor), növekedési faktorok, adhéziós molekulák, enzimek (pl. a hem-oxigenáz vagy az antioxidáns szuperoxid-dizmutáz) fokozott indukcióját mutatták ki, s ebben az NFκB és AP-1 szerepét. Hypoxiában pedig a bHLH fehérjék családjába tartozó HIF-1α dimert



2-261. ábra. A lipidperoxidáció folyamata. *XPP, nukleozid-difoszfát; L, többszörösen telítetlen zsírsav a membránban. A membránhoz kötődő kevert funkciójú elektrontranszport-láncban a NADPH:citokróm P450-reduktáz $FADH_2$-ről egy elektron transzferrel redukálódhat nukleozid difoszfát–vas komplex is. Az XPP-Fe^{2+} már képes az O_2 megkötésére és ezáltal molekulán belüli átrendeződéssel jön létre az igen reakcióképes XPP-$Fe^{3+}O_2^-$ komplex, amely nem enzimatikus reakciók sorozatával lipid-peroxidok képződéséhez vezet*

képezve az ARNT-vel a HRE (hypoxia responsive element) nevet viselő DNS- szekvenciához kapcsolódik, amely több gén promóterében megtalálható. Ezeket a géneket oxigénszenzitív géneknek is nevezik. Hypoxiában például ily módon fokozódik több fehérje expressziója. Ezek közé egyes növekedési faktorok (pl. VEGF, vascular endothelial growth factor), transzporterek (pl. GLUT-2), enzimek (pl. laktát-dehidrogenáz) tartoznak.

Több betegség patomechanizmusában bizonyított e transzkripciós faktorok mediálta szignál transzdukciós utak módosulása, illetve ennek közvetett hatása, így például diabetes mellitusban, ischaemiás szívbetegségekben, egyes neurodegeneratív betegségekben, számos krónikus gyulladással járó kórképben. Ezért gyakorlati jelentőségük igen nagy új gyógyszerek kutatásában, illetve a kóros/normális folyamatok megismerésében.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai megjegyzésekért a szerző köszönetet mond Dr. Bánhegyi Gábornak, Dr. Braun Lászlónak, Dr. Csala Miklósnak és Dr. Kardon Tamásnak

Az anyagcsere összehangolt szabályozása

2.7.

Mandl József

Az anyagcsere szabályozása több szinten megvalósuló folyamat. A különböző egymásra épülő regulációs mechanizmusok jelentik végül az e szabályozások eredményeként megvalósuló integrációt. A **sejt szintjén** megvalósuló integráció kapcsán áttekintjük az intermedier anyagcsere fontosabb elágazási pontjait, a sejt redox homeosztázisát. A **szervezet szintjén** megvalósuló integráció tárgyalása kapcsán az anyagcsere egyes fontosabb sejt-, szövet-, szervspecifikus sajátosságaival foglalkozunk. Tekintettel a máj kitüntetett funkciójára, kiemelt részletességgel tárgyaljuk a máj működését.

A sejt intermedier anyagcseréjének integrációja és a szabályozás szempontjai

Az intermedier metabolizmus feltétele a folyamatos energiatranszformáció, ATP-termelés. A megtermelődött ATP sejttípusonként különböző mértékben különböző célokra fordítódik. A legfontosabb felhasználási területek a következők: kontraktilitás, aktív transzport, szignál amplifikáció, bioszintézis. Az energiatranszformáció és -felhasználás folyamatainak szabályozása általában enzimaktivitás szabályozáson keresztül valósul meg. A metabolikus szabályozás eszközei:

1. **Allosztérikus kölcsönhatások**, amelyek rendszerint az intracelluláris szubsztrátkoncentráció szintjén szabályoznak. Az allosztérikus effektor hatással bíró szubsztrátok általában a sejt metabolizmusának aktuális állapotát (ATP/ADP, NAD^+/NADH arány stb.) jelzik. Az ilyen típusú szabályozások legfontosabb célpontjai a reakciósorozatok „elkötelező", irreverzibilis reakciói (pl. foszfofruktokináz I, δ-amino-levulinsav-szintáz acetil-CoA-karboxiláz, karnitin-palmitoil-transzferáz) vagy más irreverzibilis reakciók (piruvát-kináz, piruvát-dehidrogenáz).
2. A poszttranszlációs **kovalens módosítások** – zömében fehérjefoszforiláció – révén megvalósult enzimaktivitás-változások rendszerint nem az intracelluláris metabolizmus aktuális állapotának „üzenetét" közvetítik, hanem extracelluláris szignálokat, amelyek a szervezet energiaállapotának megfelelően változtatják az intracelluláris enzimek aktivitását (pl. piruvát-kináz, glikogén-foszforiláz, glikogén-szintáz, foszfofruktokináz II, acetil-CoA-karboxiláz, fenilalanin-hidroxiláz, hormonszenzitív lipáz). Hormonok, neurotranszmitterek több esetben ilyen mechanizmusokon keresztül hatnak.
3. Az enzimaktivitás szabályozásának további fontos lehetősége az **enzimek mennyiségének** szabályozása. Ez a génexpresszió szintjén történő szabályozást jelent. (Az éhezés vagy a túlzott táplálékbevitel, illetve a táplálék összetétele hatására több enzim indukálódik, például foszfoenol-piruvát-karboxikináz, glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz, glukokináz, piruvát-kináz, malát enzim, citrát-liáz, acetil-CoA-karboxiláz, zsírsav-szintáz). Mint látható, a szabályozások

egymásra épülnek. Egy enzim aktivitását szabályozhatja allosztérikus hatás, poszttranszlációs módosítás vagy reguláció történhet a génexpresszió szintjén is.

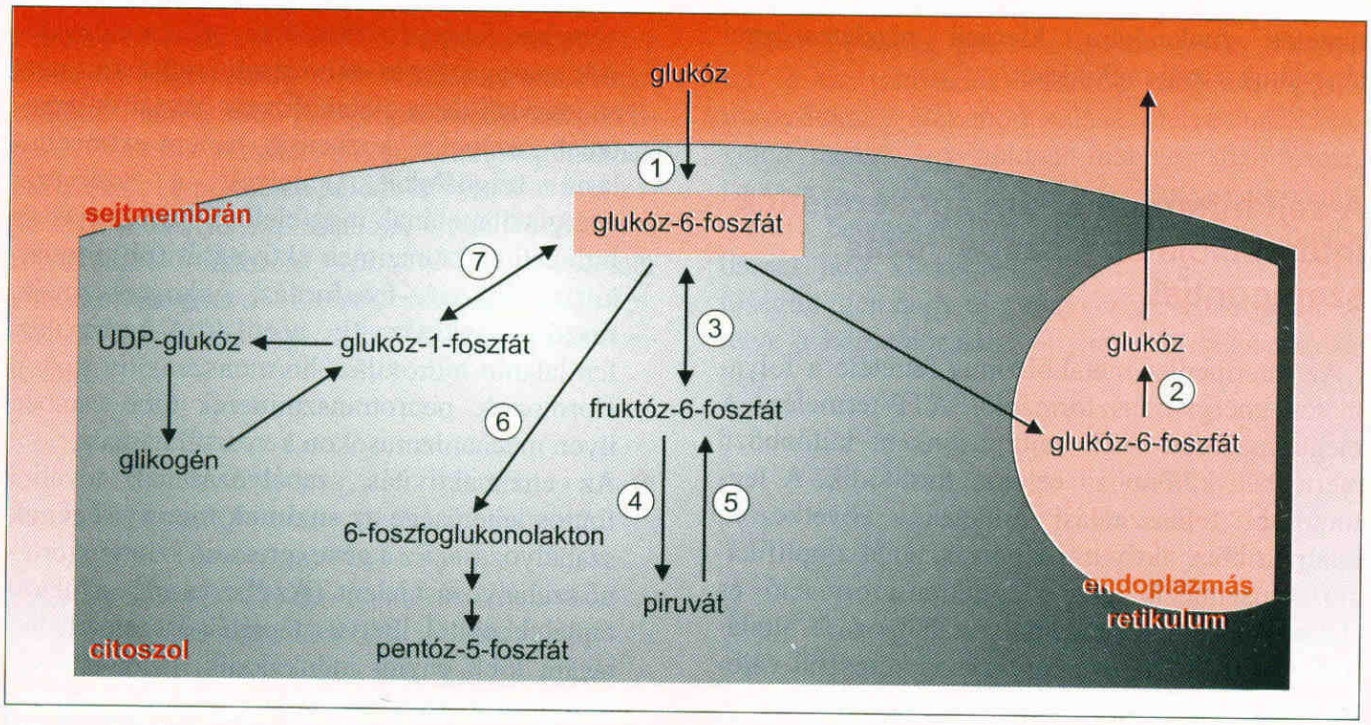
❹ Rendkívül fontos körülmény a **sejten belüli kompartmentalizáció** a szabályozásban. Az ún. elágazási pontok esetében a különböző enzimek által katalizált reakciók eredményeként olyan intermedier képződik, amely más kompartmentbe transzportálódik. Így az elágazási pont egyben abban az értelemben is elágazási pont, hogy az adott molekula metabolizmusa a továbbiakban mely kompartmentben zajlik. A kompartmentek közti kapcsolatot a transzportrendszerek biztosítják. Igen fontos, hogy számos esetben a lebontó és szintetikus folyamatok külön kompartementekben zajlanak (pl. zsírsav-szintézis és -lebontás).

❺ A folyamatok elkülönültsége egy **szerven belül** a szervet alkotó sejtek között is kialakul, ami a szerv, illetve a **szervezet szintjén** megvalósuló regulációt szolgálja (ilyen pl. a glukokortikoidok és a mineralokortikoidok szintézise a mellékvesekéreg különböző részeiben).

Elágazási pontok a sejtek intermedier anyagcseréjében

Az anyagcserében a katabolizmus konvergenciája és az anabolizmus divergenciája az elágazási pontok szabályozásán keresztül valósul meg, ami a sejt (szervezet) igényei szerint változik. A bioszintézishez bioszintetikus prekurzorok kellenek. A bioszintetikus prekurzorok száma alacsony, e folyamatok zöme a glikolízis és a citrátciklus intermedierjeiből indul. **A katabolikus és anabolikus utak találkozási pontjai az intermedier anyagcsere elágazási pontjai.** A különböző elágazási utak, közvetlenül vagy közvetve „elkötelező", rendszerint irreverzibilis reakciókat katalizáló enzimek belépését jelentik. A reakciók sok esetben azt is eredményezik, hogy az adott metabolit a sejten belül belép egy másik kompartmentbe.

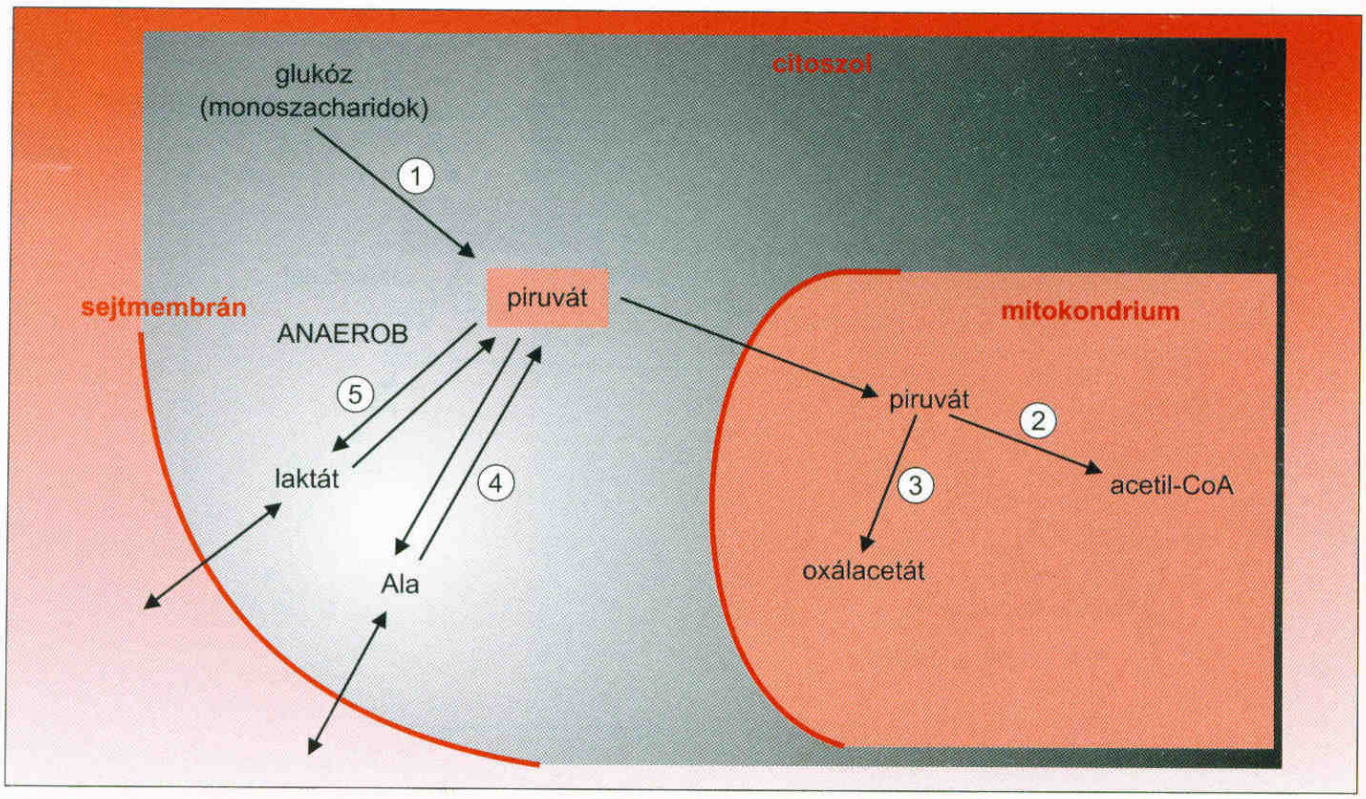
Glukóz-6-foszfát a sejtben a glukóz felvétele után, a glikogén lebontása során vagy a glukoneogenezis intermedierjeként képződik. A glukóz-6-foszfát metabolizmusa különböző kompartmentekbe való kerülést és különböző funkciójú reakcióutakba való belépést eredményez *(2-262.*



2-262. ábra. A glukóz-6-foszfát képződésének és továbbalakulásának fontosabb útjai. *1. Hexokináz (glukokináz) által katalizált reakció, 2. a glukóz 6-foszfatáz által katalizált reakció, 3. foszfoglukóz-izomeráz által katalizált reakció, 4. glikolízis, 5. glukoneogenezis, 6. glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz által katalizált reakció, 7. foszfoglukomutáz által katalizált reakció*

ábra). A glukóz-1-foszfáttá alakulás az UDP-glukóz képződéséhez vezet, ami bioszintetikus utak, mindenekelőtt a glikogénszintézis lehetőségét jelenti. A fruktóz-6-foszfáttá alakulás elsősorban a glikolízis, mint főként katabolikusnak tekintett út kezdete. A glukóz-6-foszfát, ha transzportálódik az endoplazmás retikulum luminális kompartmentjébe, akkor a májban a glukóz-6-foszfatáz szubsztrátja lesz, amely glukózszekréciót, a sejtből történő kilépést és egyben tápanyag-transzportot tesz lehetővé más sejtek számára. Végül a pentóz-foszfát-útba történő belépés bioszintézist, illetve a reduktív bioszintézishez szükséges NADPH regenerálást biztosít.

Piruvát elsősorban a glikolízis során glukózból és más monoszaharidokból képződik. A piruvát további metabolizmusa a sejt, illetve szövet típusától és metabolikus állapotától függ *(2-263. ábra)*. Meghatározó körülmény, hogy belép-e a mitokondriumba vagy a citoszolban marad. Az esetek egy részében ez egyben az aerob és anaerob metabolizmus találkozási pontját is jelenti. A mitokondriális metabolizmus lehetőségét az O_2 jelenléte adja. A citoszolban maradó piruvát laktáttá redukálódik, ami a sejt metabolizmusa szempontjából zsákutca, illetve a katabolizmus végállomása; a szervezet szempontjából viszont megteremti a piruvát transzportjának lehetőségét más sejtekbe (pl. izomból a májba, a Cori-kör részeként). Ebben az értelemben ez a piruvát mint glukogénprekurzor megőrzése. A máj számára az izmokban képződő laktát a glukoneogenezis fontos prekurzora. A piruvát–alanin átalakulás a szénhidrát és az aminosavanyagcsere kapcsolatát biztosítja. Több aminosav katabolizmusa ezen a transzaminálási reakción keresztül kapcsolódik a metabolizmushoz, illetve ez a reakció több aminosav *de novo* szintézisének is lépése. A piruvát mitokondriális metabolizmusa a glukogén és ketogén metabolizmus szétválása. Míg az acetil-CoA keletkezése a glukogénprekurzor irreverzibilis elvesztése, a piruvát–oxálacetát átalakulás az új glukózszintézis lehetőségének megtartása. Így a piruvát-dehidrogenáz komplex által katalizált reakció a glukózdependens sejtek számára (központi idegrendszer) alapvető, a szervezet gluko-



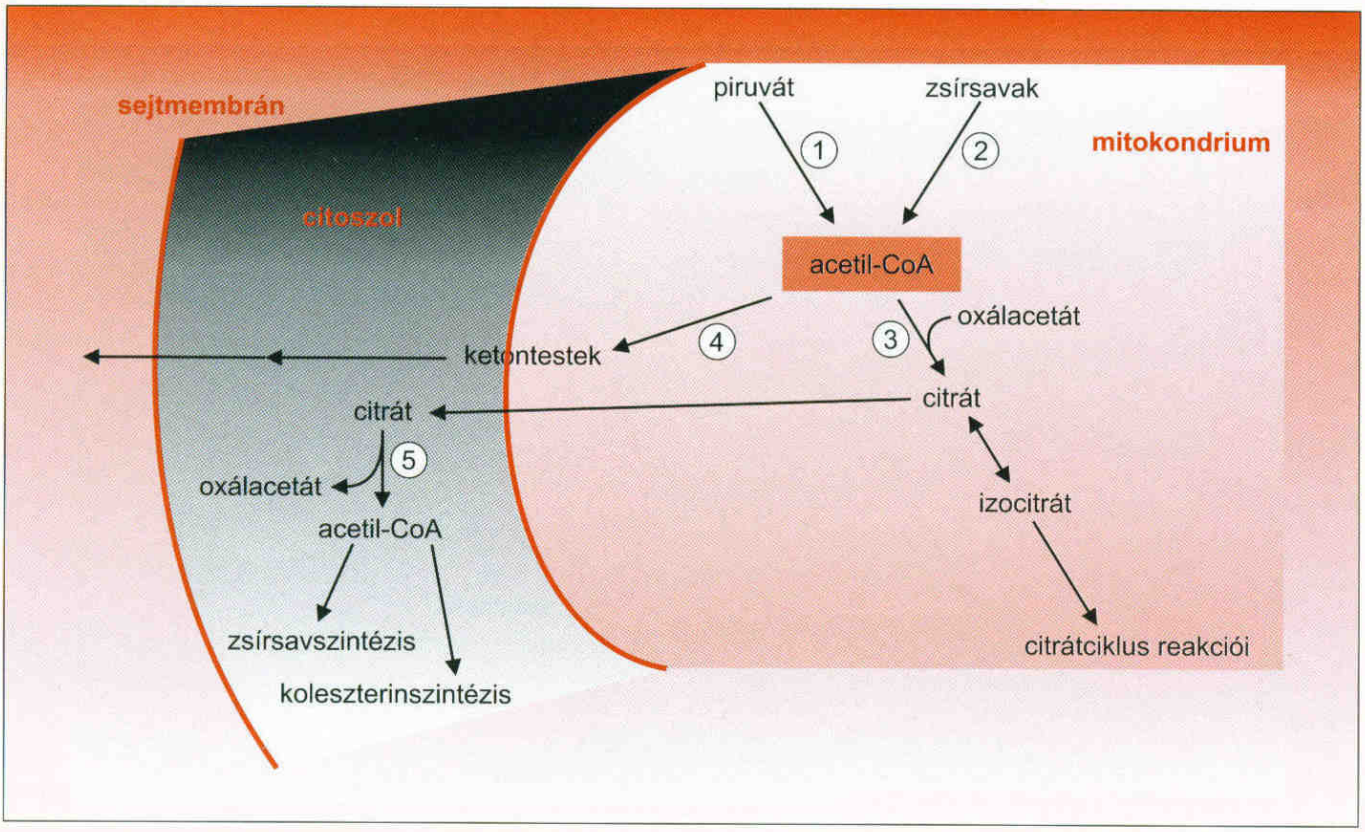
2-263. ábra. A piruvát képződésének fontosabb útjai és további metabolizmusa. *1. Glikolízis, 2. a piruvát-dehidrogenáz által katalizált oxidatív dekarboxilezés, 3. a piruvát-karboxiláz által katalizált karboxilezés, 4. transzaminálás, 5. laktát-dehidrogenáz által katalizált oxidoredukció*

génmetabolitjai anyagcseréje szempontjából (elsősorban a májban) rendkívül fontos szabályozási, elágazási pont. A piruvát–oxálacetát reakció a citrátkör jelentős anaplerotikus folyamata, amelyet az acetil-CoA serkent.

Acetil-CoA a mitokondriumban képződik elsősorban a piruvát oxidatív dekarboxilezése és a zsírsav-oxidáció, valamint egyes ketogén aminosavak lebontása során *(2-264. ábra)*. A keletkezett acetilcsoport a citrátkörben oxidálódhat, ez esetben energia termelődik vagy citrát formájában a citoszolba transzportálódhat, ahol a zsírsav- és a szteroidszintézis előanyaga lehet; ennek a transzportnak energiaraktározó és bioszintetikus funkciója van. Az acetil-CoA-ból a májban ketontestek képződhetnek, ez az átalakulás szintén tápanyag-átalakítás, -ellátás, végső soron energia transzfernek is tekinthető, amennyiben az acetilcsoport a ketontestek révén a májból más szervekbe, szövetekbe jut. Ennek az útnak a jelentősége éhezésben megnő.

A sejtek redox homeosztázisa

A redox homeosztázis fenntartásához, valamint a bioszintetikus folyamatokhoz általában szükség van redukáló ekvivalensekre, mivel számos bioszintetikus folyamat redukció. A sejt redox állapota a sejten belüli különböző redox rendszerek aktuális helyzetétől függ. Ezek a rendszerek összefüggenek egymással, a bioszintetikus, valamint más, nem energiatermelő folyamatokhoz szükséges **„redukáló erő”** (reductive power) folyamatos újratermelése azonban a sejt redukáló ekvivalens integrációján belül elkülönült rész. A bioszintetikus folyamatokat katalizáló oxidoreduktázok koenzime általában a **NADPH**. A szintézis és a degradáció a redukáló ekvivalensek anyagcseréjében is különvált; a NAD^+/NADH és a $NADP^+$/NADPH arány nem szükségszerűen azonos irányban változik (lásd 2.1. fejezet). A NADPH-termelést táplált állapotban a citoszolban a pentóz-foszfát-út biztosítja. A pentóz-foszfát-út során glukóz-6-foszfát terhére redukálódik a



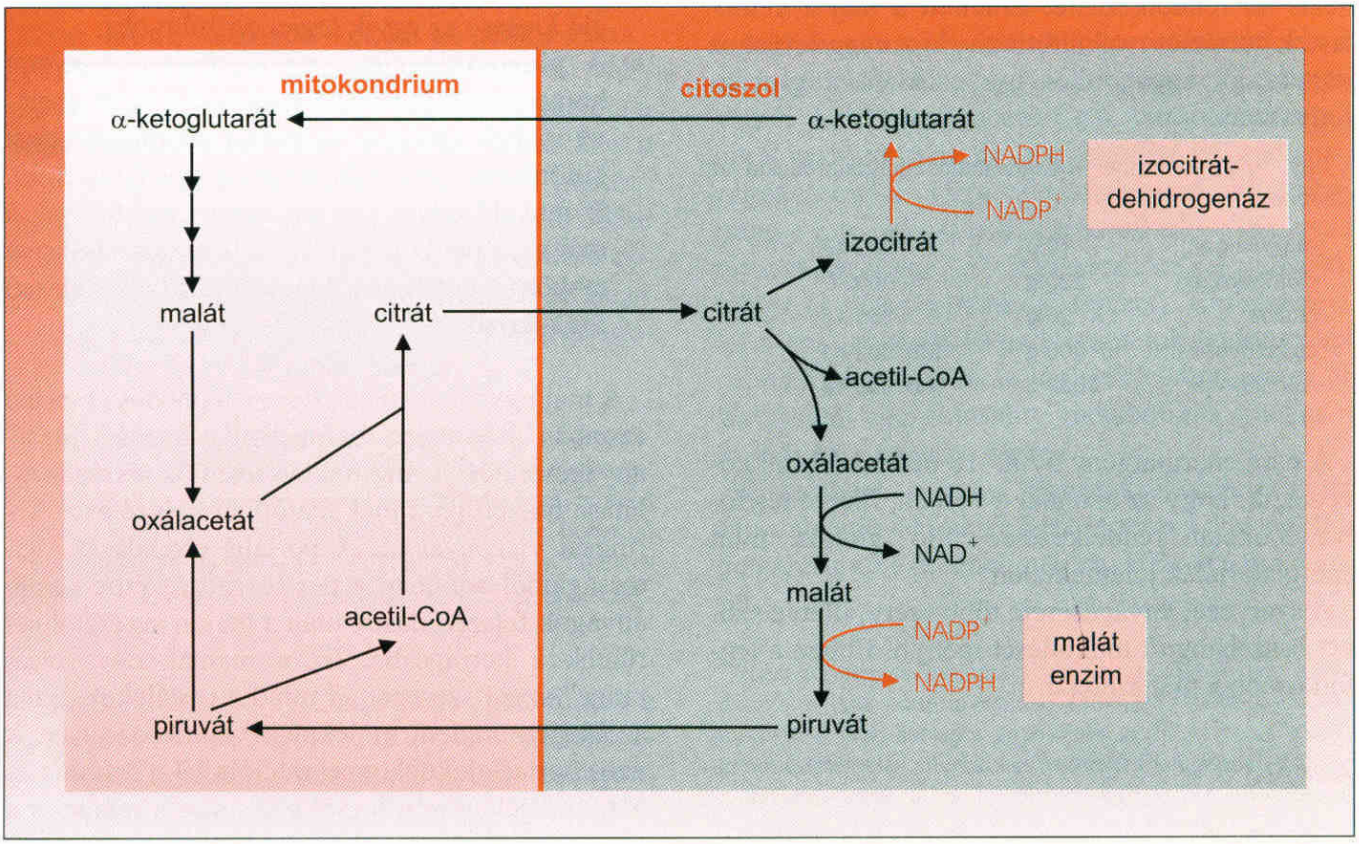
2-264. ábra. Az acetil-CoA képződésének fontosabb útjai és továbbalakulásának lehetősége. *1. Piruvát oxidatív dekarboxilezése, 2. zsírsav-oxidáció, 3. a citrát-szintetáz által katalizált kondenzáció oxálacetáttal, 4. ketontestek szintézise, 5. ATP:citrát-liáz által katalizált reakció*

$NADP^+$. A NADPH-termelés másik lehetősége mitokondriumból származó szubsztrátellátást igényel *(2-265. ábra)*. A citoszolban az izocitrát-dehidrogenáz, valamint a malát enzim játszik ebben szerepet. A $NADP^+$-redukció nemcsak a citoszolban, hanem a mitokondriumban is megtörténik NADH-ból transzhidrogenálással.

A sejtek redox homeosztázisában igen fontos az intracelluláris **redukált glutation szint** fenntartása. A redukált glutation kofaktora az oxigéntartalmú szabad gyökök eliminációjában részt vevő glutation-peroxidáznak (lásd 2.6. fejezet), emellett elektrondonor nem enzimatikus folyamatokban is. A redukált glutation regenerálását a **glutation-reduktáz** katalizálja. A glutation-reduktáz flavoprotein. Az elektrondonor, NADPH, először a glutation-reduktáz prosztetikus csoportját, a FAD-ot redukálja, majd innen kerül át a hidrogén az oxidált glutation diszulfidkötésére, redukált glutation képződik (lásd 313. oldal).

A redukált glutation szintézisének legfontosabb helye a máj. Koncentrációja a hepatocitákban 2–10 mM között ingadozik, éhezésben alacsonyabb. A redukált glutation szinuszoidális transzporterrel a májszinuszoidokba transzportálódik, illetve kanalikuláris transzporterrel mediált transzport útján az epébe kerül. Innen exportálódik mind a vérrel, mind biliáris úton a felhasználás legfontosabb helyeire, a vesébe, a tüdőbe, illetve a belekbe. Ez összefügg a kéntartalmú aminosavak szervezetbeli homeosztázisával, mivel a máj a szervezet ciszteinraktára. Éhezésben és májbetegségekben a glutationszintézis és -export csökken.

Több kóros állapotban ismert a redukált glutation szint csökkenésének szerepe a patogenezisben, így pl. a felnőtt respiratory distress szindrómában, a gastrointestinalis traktus több betegségében (pl. fekélybetegség).



2-265. ábra. $NADP^+$ redukció a citoszolban a mitokondriumból származó szubsztrátok terhére

Az anyagcsere szabályozása a szervezet szintjén – éhezés, táplálékbevitel

A szervezet szintjén az anyagcsere két „szélső" állapota az éhezés és a táplálék felvétele. A táplálékfelvétel esetében a cél a felvett táplálék felhasználása, raktározása, míg éhezés esetén a raktárokból történő tápanyag mobilizálása.

Az emberi szervezet rendelkezik azokkal az energiaraktárakkal, amelyek segítségével nemcsak az étkezések közti „éhezéseket", hanem jóval tartósabb éhezést is átvészel.

A gyors, azonnal mobilizálható energiatartalék a szervezetben a glukózraktár, a **májglikogén**. A szervezet időben lassabban mobilizálható energiaraktárai a **trigliceridek a zsírszövetben**, majd a **mobilizálható fehérjék a vázizomban**. Éhezésben a legfontosabb feladat a vércukorszint fenntartása. Éhezésben ezért a glukogénprekurzorok megtartása igen lényeges. Ehhez a máj részben a glukóz szintézisével és szekréciójával járul hozzá. Ennek során kb. 24 óráig a májglikogénraktár (kiürüléséig), illetve hosszabb távon a glukoneogenezis áll rendelkezésre. Emellett a máj a ketontestek termelésével alternatív tápanyagforráshoz juttatja az agyat, ahol így csökken a glukózfogyasztás.

Egy 70 kg-os ember mozgósítható energiatartalékai az alábbiak:

májglikogén:	70 g	1200 kJ
izomglikogén	120 g	2000 kJ
glukóz:	20 g	750 kJ
zsírszövet-zsír:	15 000 g	565 000 kJ
izomfehérje:	6000 g	100 000 kJ

A napi energiaigény 6700–10 000 kJ. Ebből következik, hogy az azonnal a vérben, illetve testfolyadékokban rendelkezésre álló glukóz mint energiatartalék jelentéktelen.

A szervezet anyagcseréje több szerv, illetve szövet összehangolt működését igényli. Ebben a legfontosabb a máj szerepe.

A máj

A máj szerteágazó funkciói az intermedier anyagcsere integrációjában az adaptáció kulcsszóval jellemezhetők. A szervezetben betöltött funkcióit négy csoportba szokták sorolni:

1. **Integráló funkció** a különböző tápanyagok anyagcseréjének alakításában. Ez alkalmazkodás az éhezés, valamint a táplálékbevitel állapotaihoz; ebben a fejezetben elsősorban ezzel a funkcióval foglalkozunk.
2. A szervezetbe kerülő nem tápanyag, valamint a szervezetben keletkező, az energiatranszformációban közvetlenül részt nem vevő molekulák metabolizmusa, **eliminációjuk előkészítése**. Ezzel a tankönyv külön fejezete foglalkozik (lásd 2.6. fejezet). E funkció ellátása azonban energiaigényes, így több ponton kapcsolódik az első funkcióhoz. A biotranszformáció változásával képes a máj alkalmazkodni idegen anyagok (pl. gyógyszerek) fokozott beviteléhez vagy endogén toxikus állapotokhoz (pl. icterus).
3. A szervezet **nitrogénegyensúlyának** fenntartása – ureaciklus. A máj ezen funcióját más fejezetben tárgyaljuk (lásd 2.4. fejezet). A májműködés felborulásának, a májcoma klinikai tünetegyüttese kialakulásának éppen e funkció kiesése az egyik legjellemzőbb oka.
4. A **plazmafehérjék szintézisével** a szervezet homeosztázisának fenntartása. Ez teszi lehetővé többek között a szervezet alkalmazkodását különböző kóros állapotokhoz (pl. fertőzések). E funkció egyik legfontosabb aspektusával, a máj szerepével a hemosztázis fenntartásában a tankönyv egy másik fejezete (lásd 6.5. fejezet) foglalkozik.

A máj ugyan altruista szerv, valamennyi funkció azonban jelentősen befolyásolja a máj „saját" anyagcseréjét. A májfunkció jelentős részének ellátása összefügg a máj anatómiai helyzetével, keringési viszonyaival. A portalis érrendszer sajátosságaiból adódóan a per os szervezetbe kerülő anyagok felszívódásuk után a májon keresztül kerülnek a keringésbe. Ez a májnak egy „clearance"-szerű szerepet ad mind a táplálékok, mind az idegen eredetű molekulák vonatkozásában. A vena portae glukózkoncentrációja 10–12 mM is lehet, ami jelentősen lecsökken, mire a májon át a vér a vena hepaticae-ba, majd a vena cava inferiorba jut. Ugyanez érvényesül az ammónia, vala-

mint más, idegen eredetű molekulák esetében is. A perctérfogat mintegy 30%-a megy át a májon. A májlebenyek szerkezete a vena portae-n beáramló kiindulási anyagok, illetve a vena hepaticán kikerülő termékek teljes elkülönülését, egy vegyi üzem szervezettségét, biztosítja. A májműködés megértésének további fontos szempontja az epeszekréción keresztül a vérkeringés és a bélcsatorna kapcsolata. Ily módon a májon keresztül a vérből a bélcsatornába kerülhetnek különböző anyagok.

A máj éhezésben fokozza a glikogenolízis, glukoneogenezis sebességét a glukóztermelés érdekében. Fokozódik a zsírsav-oxidáció a saját, megnövekedett energiaigényének fedezésére, valamint a ketontestképzés fokozása miatt.

Táplálékbevitel esetén a máj a glikogenezis fokozásával feltölti az éhezésben csökkenő glikogénraktárait. A megfelelő glikogénszint fenntartása igen fontos a májfunkciók ellátásában. A „felesleges" táplálékot zsírsav-szintézisre használja fel, amelyet trigliceridként a zsírszövetben raktároz. Ezen funkciók ellátását az alábbi molekuláris mechanizmusok segítik elő.

Táplálékbevitel esetén valamennyi tápanyag felszívódás után, a vena portae-ba kerül és átmegy a májon. Ez az „első kör" főként az „extra cukor" felvétele és hasznosítása miatt fontos. A vena portae már említett magas glukózkoncentrációja a vena hepaticae-ben már jelentősen lecsökken a hepatocitákban található nagy kapacitású glukóztranszporter (GLUT-2) és a glukokináz működése miatt. A glukokináz csak glukózt foszforiláló enzim. Funkciója, szemben a hexokinázéval az, hogy a táplálékfelvételnél jelentősen megemelkedő glukózt foszforilálja a hepatocitákban.

A glukokináz születés után indukálódó enzim. Újszülötteknél még kis mennyiségben expresszálódik. Ez is oka annak, hogy az újszülött nem képes hosszabb éhezésre, mivel a máj nem tudja hirtelen felvenni a táplálékbevitellel bekerülő „extra glukózt". Májon kívül glukokinázt még a pancreas β-sejtjei tartalmaznak, ahol „glukózszenzor" szerepet tulajdonítanak neki.

A máj glukózfelvevő képessége igen fontos a vércukorszint szabályozásában. Májelégtelenségben ezért egyaránt kialakulhat hyper- és hypoglykaemia.

A glukokináz a magas vérukorszint csökkenését szolgálja. Közvetve a vércukorszintet csökkentő mechanizmus a glikogénszintézis lehetősége is. Hyperglykaemia az egyik legfontosabb serkentője a máj glikogénszintézisének (lásd glikogén-anyagcsere szabályozása). A máj a táplálékbevitellel felvett „extra glukózból", amit nem glikogén formájában tárol, trigliceridet szintetizál, amelyeket VLDL-ben exportál. Fokozott szénhidráttartalmú táplálkozás esetén a zsírsavak kb. 30%-a a májban termelődik.

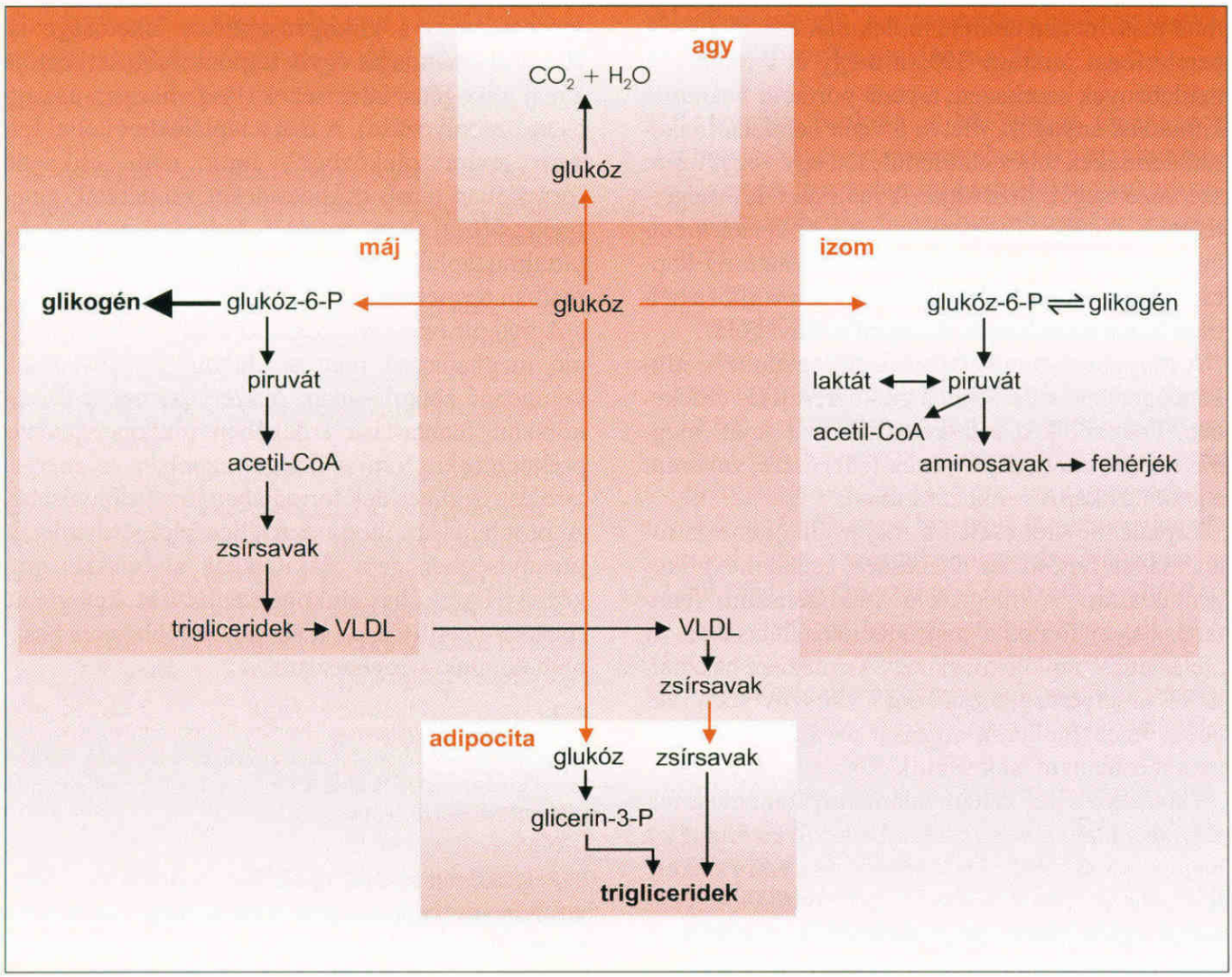
A máj piruvát-dehidrogenáz által katalizált reakció meghatározó pont a glukogén szubsztrátok ketogénné alakulásában. A szervezetnek a vércukorszint fenntartása érdekében glukoneogenezis prekurzorokra van szüksége, azonban az energia tárolása trigliceridek formájában jóval előnyösebb. A probléma az, hogy a trigliceridek érdemleges mennyiségben nem alakíthatóak át (vissza) glukózzá. Ezért, ha glukogénszubsztrát ketogénné (piruvát-acetil-CoA-vá) alakul, az többé nem használható glukoneogenezisre.

Éhezésben, diabetes mellitusban, hyperacetonaemiás állapotokban az acetonból biotranszformációs reakciók segítségével glukóz képződhet, de ez mennyiségileg nem pótolja a glukogénprekurzorok hiányát.

A glukogén szubsztrátok fokozott lebontása miatt megemelkedik a piruvát koncentrációja, a piruvátból keletkezett acetil-CoA citráttá alakul, a citrát transzportálódik a citoszolba és gyorsul a zsírsavszintézis. Hepatocitákban mind az **inzulin-**, mind a piruvátkoncentráció emelkedése fokozza a piruvát-dehidrogenáz defoszforilációját, tehát aktiválja az enzimet (lásd 2.1. fejezet). Táplálékbevitel esetén az anabolikus folyamatok legfontosabb serkentője az inzulin. A táplálékfelvétel esetén érvényesülő legfontosabb metabolikus utakat a *2-266. ábra* foglalja össze.

Éhezésben a máj energiaszükségletét zsírsav-oxidációval fedezi. Erre fedezet a megemelkedett szérum FFA, amelynek kb. 50%-át a máj veszi fel.

Karnitinszint-csökkenéssel járó állapotokban (pl. hemodialízis miatti karnitinvesztés) csökken a béta-oxidáció a májban. Ennek hatására emelkedik az FFA, és csökken a ketontesttermelés, mert kevés az acetil-CoA. Emiatt csökken a glukoneogenezis is (a piruvát-karboxiláz allosztérikus aktivátora az acetil-CoA), ami hypoglykaemiát okozhat. A béta-oxidáció csökkenése az izomban izomgyengeséget és myoglobinuriát okoz.



2-266. ábra. Metabolikus kapcsolatok a fő energiafogyasztó és -termelő sejtek (szövetek) között táplálékfelvétel esetén

A máj glukózszekrécióját két folyamat biztosítja, a glikogenolízis és a glukoneogenezis. A legfontosabb glukoneogenezis prekurzorok a laktát (izomszövetből és vörösvértestekből), glicerin (zsírszövetből) és a glukoplasztikus aminosavak (izomszövetből). A glikogenolízis és a glukoneogenezis serkentése a májban együtt regulált, szemben az izommal, ahol a glikogenolízissel glikolízis történik egyidejűleg. Ezért is fontos, hogy a zsírsav-oxidáció fedezi a hepatocita energiaigényeit, mivel a glukoneogenezis miatt a glikolízis éhezésben csökkent intenzitású. A glikogén-szintáz és -foszforiláz, a foszfofruktokináz II és a fruktóz 2,6-biszfoszfatáz, valamint a piruvát-kináz koordinált cAMP-dependens szabályozása, amelynek legfontosabb mozgatója májban a **glukagon**, ezt az összerendezettség biztosítja. Mindez kiegészül a zsírsavak citoszolból a mitkondriumba történő transzportjának cAMP-függő serkentésével (karnitin-zsíracil-transzferáz). Ezzel párhuzamosan a kovalens módosítások a zsírsavszintézis és koleszterinszintézis elkötelező enzimeit gátolják (acetil-CoA karboxiláz, β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA-reduktáz).

Az éhezés esetén érvényesülő legfontosabb metabolikus utak a *2-267. ábrán* láthatók.

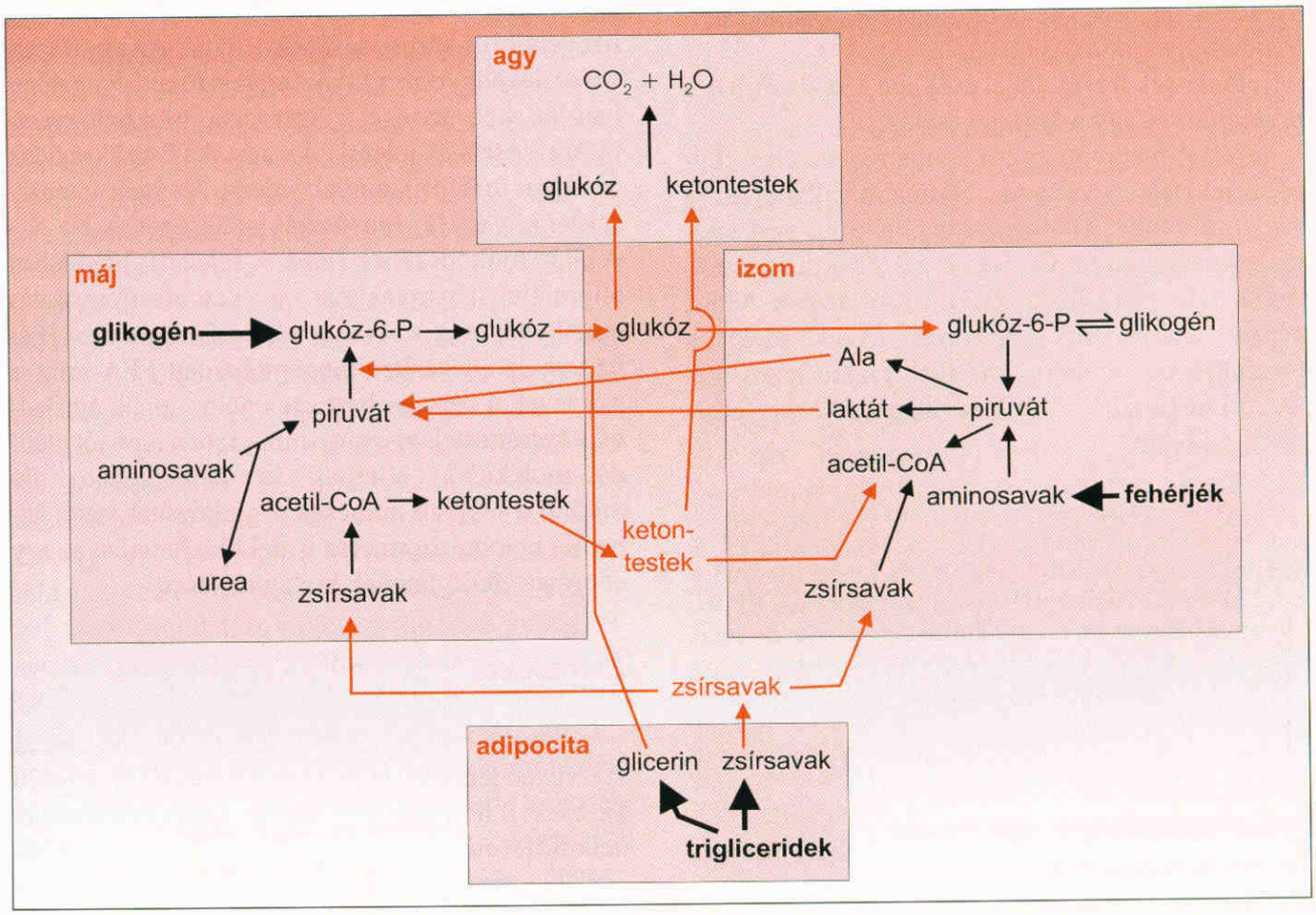
Hormonok és az étrend jelentős szerepet játszanak több szabályozó enzim, így például a glukokináz, piruvát-kináz génexpressziójában is. Indukálódó enzimek táplált állapotban a NADPH generáló enzimek, acetil-CoA-karboxiláz, a zsírsavszintézis enzimei. Éhezésben a foszfoenolpiruvát-karboxikináz, glukóz-6-foszfatáz indukálódik a glukoneogenezist elősegítendő.

A máj aminosavak lebontásából is képes funkcióit ellátni. A glukoplasztikus aminosavak gluko-neogenezis prekurzorok; a ketogén aminosavakból a máj ketontestet termel. Az aminocsoportok az ureaszintézissel távoznak.

Összefoglalva, a máj glikogén-, illetve triacil-glicerol-készlete energiatartalék az egész szervezet számára. A máj képes glukóz-, ketontest- és zsírsavszintézisre, illetve exportra. **Éhezésben a máj glukózt és ketontesteket termel, illetve exportál; táplálékbevitelkor zsírsavakat. Ennek megfelelően éhezésben a glikogenolízis, gluko-neogenezis, ketogenezis dominál, a glikogenezis, glikolízis, lipogenezis gátolt.**

Izom

Az izomsejt energiaszükségletét glukóz-, zsírsav-, ketontest- (elsősorban a szívizom) felvétellel fedezi. Éhezésben a zsírsavoxidáció preferált; ezzel csökken a glikolízis és így a glukózfogyasztás. Az izomsejtek glikogéntartalma jelentős; a szervezet glikogéntartalmának mintegy háromnegyede az izomszövetben található. Ez a glikogén azonban nem tartalék a vércukorszint fenntartása szempontjából, mivel az izomban nincs glukóz-6-foszfatáz, ezért nem tud glukózt szecernálni a vérbe. A glikogén lebontása az izomsejt saját, izomkontrakcióhoz szükséges intenzív energiaigényét fedezi. Ennek megfelelően a működő izomban a glikolízis a glikogenolízissel párhuzamosan regulált, a piruvát termelése meghaladhatja a citrátkör felvevőképességét, illetve a működő izomban a kontrakciók miatt átmeneti oxigénhiány léphet fel. Ez a mitokondriumban a NADH-oxidáció csökkenéséhez és a laktáttermelés fokozódásához vezet. A vérbe került laktátot a máj veszi fel (Cori-kör). A piruvát májba jutásának másik útja az, amikor transzaminálással alaninná alakulva kerül a vérbe



2-267. ábra. Metabolikus kapcsolatok a fő energiafogyasztó és -termelő sejtek (szövetek) között éhezésben

és veszik fel a hepatociták. A májban mind a laktát, mind az alanin glukózprekurzor. Az izomszövet ily módon jelentős energiatartalék a szervezet szempontjából, amennyiben mobilizálható fehéjetartalma a legmagasabb a szervezetben. Az izomszövet transzaminációs kapacitása nagy, a szervezetbe kerülő aminosavak egy része a vázizomban és a szívizomban bomlik le. Éhezésben az inzulin plazmakoncentrációja csökkent. Inzulin mint anabolikum, proteolízisgátló, ezért hiányában a proteolízis glukoneogenezis prekurzorokat szabadít fel a máj számára. Az izomszövetben éhezésben proteolízissel keletkezett aminosavak részben az izomszövetben bomlanak le. Nagyobb mennyiségben alanint, glutamint és glicint szekretál az izom. A többi aminosavból részben piruvát és α-keto-glutarát képződik, amelyekből aztán alanin és glutamin keletkezik.

A szecernálódott glutamin zöme a bélepitheliumban részben lebomlik, alanin, valamint NH_4^+ kerül vissza a vérbe, majd jut a májba. A glutamin átalakulása a citrátkörben oxálacetáton, majd foszfoenolpiruváton, piruváton keresztül történik. A képződött piruvát transzaminálódik alaninná.

Ketontestek felvételével csökken a vázizomban a proteolízis és így a fehérjevesztés.

Az izom metabolizmusa az igénybevételtől függően jelentősen változik. Nyugalmi állapotban a vázizom a teljes O_2-fogyasztás kb. 30%-áért felelős, aktív izommunka esetén ez 90%-ra is emelkedhet. Az izom foszfokreatin formájában ATP-t képes „raktározni" és igen rövid ideig a foszfokreatin terhére ADP-t foszforilálni. A foszfokreatinraktár kiürülése után a fő energiaforrás a glikogén.

Intenzív izommunka esetén jelentős izomfáradtság lép fel, ami átmenetileg alkalmatlanná teheti az izmot a kontrakcióra. Ennek oka az intramuscularis pH csökkenése. Egy molekula glukóz két molekula laktáttá alakítása két H^+ felszabadulását eredményezi a glikolízis során. Intenzív izommőködés esetén a pH 6,4-re csökkenhet. Feltételezik, hogy ezen a pH-n a foszforuktokináz már nem képes működni, így a glikolízis átmenetileg leáll. Ezt a sejt „önvédelmi" reakciójának tekintik, mivel a foszfofruktokináz így nem fogyaszt több ATP-t és az ATP-szint nem esik tovább.

A szívizom működése állandó, és teljesen aerob. Ezt lehetővé teszi a mitokondriumok igen magas száma. A szívizom energiatartaléka igen csekély, kevés foszfokreatin, illetve glikogén áll rendelkezésre. Ezért a szívizom folyamatos zsírsav-, glukóz-, illetve ketontest-, valamint O_2-ellátást igényel. A szívizom-anyagcsere ezen sajátossága jól magyarázza az átmeneti vérellátási zavar (ischaemia) veszélyét (szívinfarctus).

Agy (központi idegrendszer)

Az agy anyagcseréje rendkívül intenzív. Az agy a testtömeg kb. 2%-a, mégis nyugalomban az egész szervezet által elfogyasztott oxigén 20%-át használja el. Az oxigénfelhasználás független az agy különböző rendeltetésű igénybevételétől, alvás alatt sem csökken.

Az agy tápanyag-szükségletét elsősorban glukóz felvételével fedezi. Nem rendelkezik tápanyagraktárral, nincs jelentősebb olyan glikogén-, fehérje- vagy lipidraktár, ami akár csak rövid időre fedezhetné az agy táplálékszükségletét. Ezért állandó folyamatos glukózellátásra szorul. Ha a glukózellátás akár csak egy rövid időre is kiesik (például agyi vaszkuláris történések), ez az adott agyszövet irreverzibilis károsodását okozhatja. Az agy a szervezet legnagyobb glukózfogyasztója. Nyugalomban ez kb. az egész szervezet glukózfogyasztásának 60%-át jelenti. Az agy ATP-szükségletét oxidatív foszforilációval fedezi. Az igen intenzív sejtlégzés és O_2-fogyasztás szükséges a Na^+K^+-ATPáz működéséhez (lásd 4. fejezet). Éhezésben alternatív tápanyagként a ketontestfogyasztás emelkedik meg, ez részben kiváltja a glukózt. Hiába van az éhezésben megemelkedett FFA-szint, a zsírsavak a vér-agy barrieren nem tudnak áthaladni, a ketontestek viszont, mint vízben igen jól oldódó molekulák, eljutnak az idegsejtekhez. Ily módon a májban nemcsak a glukózszekréció, hanem a ketontesttermelés is nélkülözhetetlen az agy energiaszükségletének kielégítéséhez.

Zsírszövet

A zsírszövetben tárolt trigliceridek jelentik a szervezet legfontosabb energiatartalékát. Egy 70 kg-os férfi három hónapig is kibírja energiabevitel nélkül (természetesen nem számítva más tényezőket pl. vitaminhiány, nitrogénegyensúly). A zsírszövetet alkotó adipociták metabolizmusa (glikolízis, citrátkör, oxidatív foszforiláció) igen in-

tenzív. A főként a májban termelődött és VLDL-ben ide szállított zsírsavak az adipocitákban raktározódnak észterifikálódás után. Az ehhez szükséges glicerin-foszfát a dihidroxi-aceton-foszfát redukciójával keletkezik, amely a glukózból induló glikolízis intermedierje. Ezért adipocitákban a trigliceridképződéshez glukóz is szükséges, NADPH-igényüket a pentóz-foszfát-út fedezi. Trigliceridek folyamatosan hidrolizálódnak zsírsavakra, glicerolra és újra képződnek. A hidrolízis első lépését a hormonszenzitív lipáz katalizálja. A felszabaduló glicerin az adipocitákban nem tud foszforilálódni, mert hiányzik a glicerin-kináz. Mind a glicerin, mind az FFA a májhoz szállítódik. A glicerin glukoneogenezis prekurzor a májban.

Az elhízás (obesitas) gyakori probléma. Az elhízás okai különbözőek. Hormonális okokból történő elhízás esetén (pl. Cushing-kór) a fehérjekatabolizmus fokozódik az izmokban, az aminosavakból zsír képződik, ami az adipocitákban rakódik le. A zsírszövetben a hormonális szabályozás a hormonszenzitív lipáz aktivitásának szabályozásán kívül is több enzim működését befolyásolja. Foszforilációs szabályozás alatt áll pl. a piruvátkináz, acetil-CoA-karboxiláz. A fő hormonális szabályozó a glukagon/inzulin arány. Éhezésben a lipolízis, táplálékbevitelnél a lipogenezis dominál.

Összefoglalva, különböző típusú sejtek, szervek, szövetek összehangolt, szabályozott működésének eredményeképpen a szervezet sejtjei számára a tápanyagok felvételének lehetősége biztosított. A kalorikus homeosztázis azt teszi lehetővé, hogy függetlenül a táplálékbevitel, illetve az éhezés aktuális állapotától, a vérben a szükséges tápanyagok – elsősorban a glukóz – szintje a sejtek szükségleteinek megfeleljen. A vércukorszint ingadozása a táplálékbeviteltől függően viszonylag kicsi (lásd 2.2. fejezet). (Patológiás körülmények között, 1,5 mM alatti vércukorszint esetén az agy nem megfelelő tápanyagellátása miatt olyan fokú hypoglykaemiás coma alakul ki, ami glukóz adása nélkül fatális, 30–40 mM körüli vércukorszint viszont hyperglykaemiás, hyperosmolaris comát okoz.)

A zsírsavak koncentrációja ugyanakkor táplálékbevitelkor alacsony (kb. 0,14 mM) tartós éhezésben azonban egy nagyságrenddel magasabb (1,2–1,4 mM). A különböző ketontestek koncentrációja táplálékbevitelkor szintén alacsony (0,03–0,4 mM), éhezésben viszont akár két nagyságrenddel is magasabb (1,3–6,0 mM). A vércukorszint állandóságát és az alternatív tápanyagforrások koncentrációjának szabályozását az inzulin/glukagon arány változása biztosítja, amely kb. egy nagyságrenddel alacsonyabb éhezésben, mint táplálékbevitel esetén (0,50–0,05).

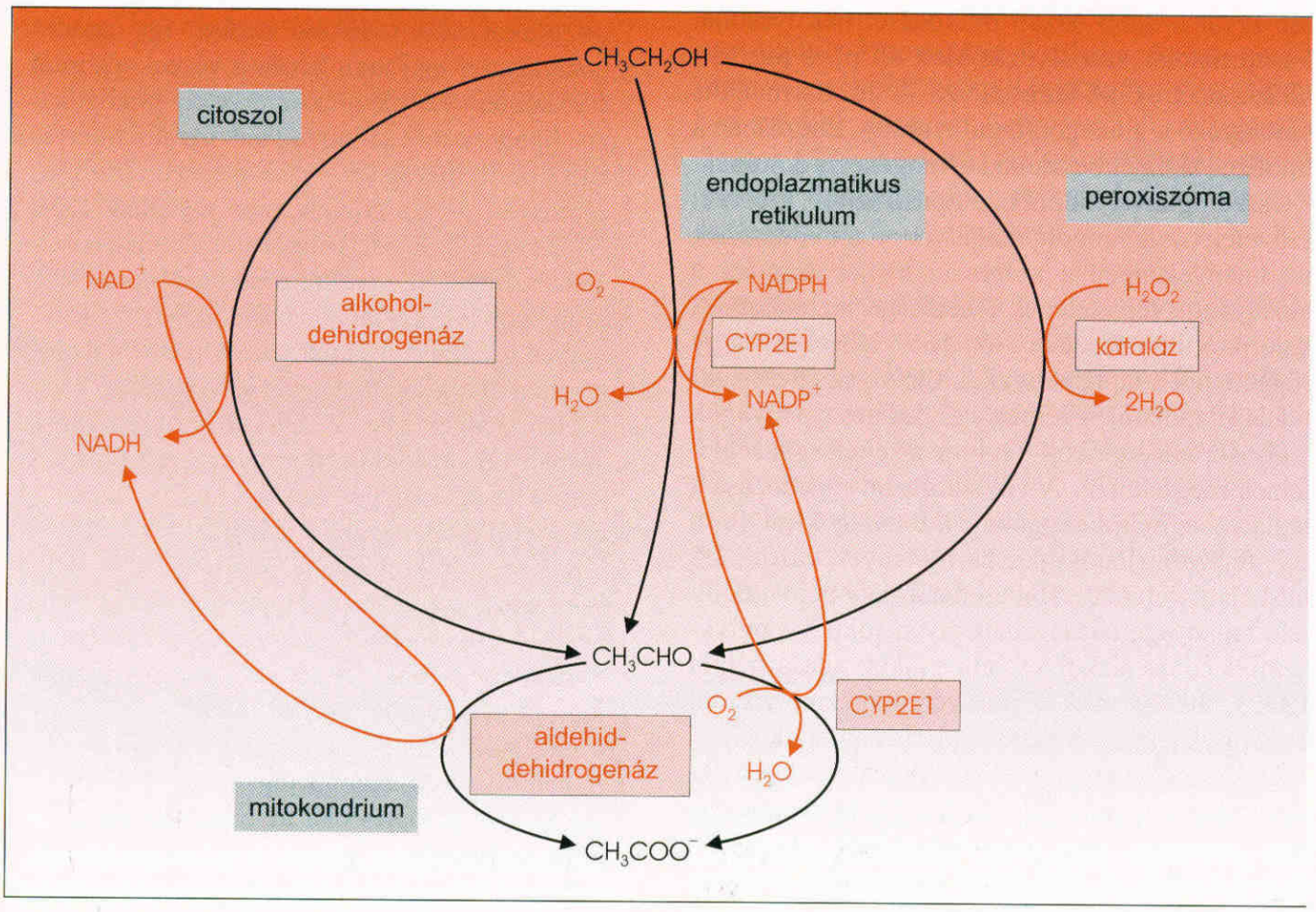
Az anyagcsere integrációja patológiás állapotokban

Számos olyan anyagcserezavar alakulhat ki, amelyben a metabolizmus integrációja felborul és a folyamatok egyensúlya megváltozik. Az **inzulinfüggő diabetes mellitus** az anyagcsere szabályozásának súlyos zavara, amelyet a katabolizmus túlsúlya jellemez. Az egyik legfontosabb szabályozó hormon az inzulin hatása nem érvényesül, ezért magas vércukorszint esetén a máj éhező májként viselkedik: glukoneogenezis és ketogenezis dominál. Ismert az inzulin glukokinázt indukáló hatása, így inzulin hiányában a máj nem képes a vércukorszintet csökkenteni (extra glukózfelvétel, glikogenezis, lipogenezis), sőt növeli azt. Inzulin hiányában a perifériás sejtek – elsősorban az izom- és zsírszövet – glukózfelvétele csökken (lásd GLUT-4; 2.2. fejezet), ami szintén emeli a vércukorszintet. Az inzulin, mint anabolikus hormon kiesése izomban proteolízist, zsírszövetben lipolízist eredményez. A proteolízis fokozza a máj glukogén aminosavellátását, s így a glukoneogenezist. A zsírsav-koncentráció a vérben nő, a ketontesttermelés fokozódik. A ketontest-túltermelés ketoacidosist okoz. A zsírsavtúlkínálat miatt a zsírsavak észterifikálódnak és fokozódik a májban a VLDL-szintézis és -szekréció. Hypertriglyceridaemia alakul ki, mert a lipoprotein-lipáz működése az emelkedett VLDL-szintet nem képes csökkenteni, illetve a kilomikron katabolizmus ugyanezen okok miatt bekövetkező zavara miatt hyperchilomicronaemia jön létre. Az inzulin-dependens diabetes oka az inzulinszintézis és -szekréció súlyos zavara a pancreas β-sejtjeiben. A betegség kilinikai képe inzulin adásával jelentősen javul, mert az inzulin csökkenti a

vércukorszintet a glukózfelvétel fokozásával, a glukoneogenezis és proteolízis, gátlásával. A lipolízis gátlása a ketoacidosist szünteti meg.

Reye-szindrómában, amely vírusfertőzéseket követő súlyos gyermekbetegség, a máj integráló funkciójának teljes zavara alakul ki. A hepatociták mitokondriumainak működése felborul: a zsírsav-oxidáció elégtelenül működik, nem termelődik karbamil-foszfát és ornitin, valamint oxál-acetát. Feltételezik a karbamil-foszfát-szintetáz I, a piruvát-dehidrogenáz, a piruvát-karboxiláz és az adenin nukleotid transzporter hiányos működését. A fentiek következtében többek között emelkedett FFA-szint (zsírsav-oxidáció zavara), hypoglykaemia (glukoneogenezis zavara), hyperammonaemia (ureaszintézis zavara) alakul ki. Ez idegrendszeri tünetekkel is jár, agyi funkciókárosodások, oedema, coma következményekkel.

Számos **májbetegségben** súlyos anyagcserezavar jöhet létre. Mivel csak a máj képes ureatermelésre, az aminosavmetabolizmus zavara alakul ki. Krónikus májbetegségekben, például cirrhosisban (a máj kötőszövetes átépülése, parenchymakárosodás) a májkárosodás a portalis keringés zavarával is társul, mindez hyperammonaemiát okoz. Az ammónia központi idegrendszeri hatásai miatt comatosus állapot jöhet létre. Az akut májkárosodásoknak is jellemző tünete a hyperammonaemia. A májkárosodások másik jellemző tünete a bilirubinkonjugáció zavara, s az ennek következtében fellépő hyperbilirubinaemia, ami szintén súlyos idegrendszeri károsodásokhoz vezethet.



2-268. ábra. Az etanol metabolizmusa

Az **alkoholizmusban** kialakuló májkárosodás szintén a májmetabolizmus zavarára vezethető vissza. Az etanolbevitel egyebek mellett jelentős és nem regulált energiabevitel is (az etanol energiatartalma 7,1 kcal/g (27 kJ/g). Az etanol acetaldehiddé, majd acetáttá oxidálódik, és eközben NADH keletkezik. Az intenzív NADH-képződés megváltoztatja a NAD^+/NADH arányt. Ez elsősorban a zsírsavoxidációt csökkenti, amely hosszútávon a triglicéridek felhalmozódását idézi elő a hepatocitákban, s zsírmáj alakul ki. A glukoneogenezis gátlása éhezési hypoglykaemiát okoz, valamint a laktátkoncentráció emelkedését. Ez acidosist eredményezhet. A magas NADH-szint gátolja a citrátkört, ugyanakkor az acetil-CoA-koncentráció magas. Az acetaldehid-koncentráció emelkedése addukt képződéshez (lásd 2.6 fejezet) vezet, amely további májkárosodások kiindulópontja lehet.

Az etanolmetabolizmus másik útja a kevert funkciójú oxigenáz CYP2E1 izoenzim (lásd 2.6. fejezet) által katalizált reakció *(2-268. ábra)*. Ez szintén acetaldehidet, majd acetátot eredményez, azonban ez NADPH-t fogyasztó reakció. Az endoplazmatikus retikulum membrán kötött CYP2E1 izoenzim K_M értéke etanolra egy nagyságrenddel magasabb (8–12 mM), mint az alkohol-dehidrogenázé (0,2–2 mM). Ez a reakcióút elsősorban fokozott alkoholfogyasztás esetén, alkoholizmusban jelentős, az etanol ezúton befolyásolhatja gyógyszerek metabolizmusát, adverz gyógyszerhatásokat, karcinogének aktiválását, más toxikus hatásokat okozhat. A különböző könyvekben MEOS (microsomal ethanol oxidizing system = mikroszómális etanol oxidáló rendszer) néven is szereplő rendszer indukálható különböző módokon és anyagokkal. Így indukálódik éhezésben, diabetes mellitusban, hyperacetonaemiás állapotokban is.

A fentieken kívül az etanol a kataláz enzimnek is szubsztrátja.

Ajánlott irodalom az „Anyagcsere" című fejezethez

Biochemistry, Ed. L. Stryer, W. H. Freeman and Company, New York, N. Y. USA, 1995.

Textbook of Biochemistry, with Clinical Correlations, Ed. T. M. Devlin, Wiley-Liss Publication, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1992.

Biochemistry, A case-oriented approach, Eds. R. Montgomery, T. W. Conway, A. A. Spector, The C. V. Mosby Company, St. Lous, Baltimore, Philadelphia, Toronto, 1990.

The metabolic basis of inherited disease (Vol. I-II.) Eds. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Vale, McGraw-Hill Information Service Company, 1995.

A genetikai információ tárolása és kifejeződése

3.
FEJEZET

3.1. DNS: replikáció és hibajavítás (repair) *(Faragó Anna)*
A DNS szerkezete
A DNS replikációja prokariótákban
Az eukarióta kromoszóma szerveződése
Az eukarióta sejtben történő replikáció néhány jellegzetessége
A sejtciklus szabályozása és a tumorszuppresszor gének által kódolt fehérjék szerepe a sejtciklus szabályozásában
Az extranukleáris DNS
A DNS károsodásainak javítása: repair mechanizmusok
Mutációk
Rekombináció

3.2. RNS: transzkripció és a transzkripció szabályozása *(Faragó Anna)*
Az RNS típusai
A transzkripciós egység és a transzkripció menete prokariótákban
A transzkripció szabályozása prokariótákban
A polipeptidláncokat kódoló gének transzkripciója eukariótákban és az elsődleges transzkriptum érése
Eukarióta transzkripciós faktorok
A riboszóma-RNS és tRNS transzkripciója eukariótákban

3.3. A vírusgenom replikációja és az onkogének *(Faragó Anna)*
A vírusgenom
A bakteriofágok replikációjának litikus és lizogén útja
Állati vírusok replikációja
Onkogéneket hordozó retrovírusok és a celluláris protoonkogének

3.4. Fehérjeszintézis: a transzláció mechanizmusa és a polipeptidlánc további sorsa *(Faragó Anna)*
A kódszótár
A transzlációs apparátus komponensei
A polipeptidlánc szintézisének mechanizmusa
A fehérjék sejtorganellumokba irányítása és a transzláció utáni módosulások
Fehérjeszintézis a mitokondriumokban

3.5. A laboratóriumi géntechnika (rekombináns DNS-technológia) módszerei *(Faragó Anna)*
Restrikciós endonukleázok és restrikciós térképek
A DNS bázisszekvenciájának meghatározása

Rekombináns DNS és klónozás, a génkönyvtár fogalma
Nukleinsavak bázisszekvenciájának azonosítására szolgáló módszerek
Kromoszómaséta
A cDNS és a cDNS-könyvtár
Expressziós vektorok és fúziós fehérjék
Eukarióta vektorok és expressziós rendszerek
„Riporter gének"
Irányított in vitro mutagenezis
Polimeráz láncreakció (PCR)
„Antiszenz" nukleinsavak
Transzgénikus állatok
A DNS-chip

3.1.

DNS: replikáció és hibajavítás (repair)

Faragó Anna

A DNS szerkezete

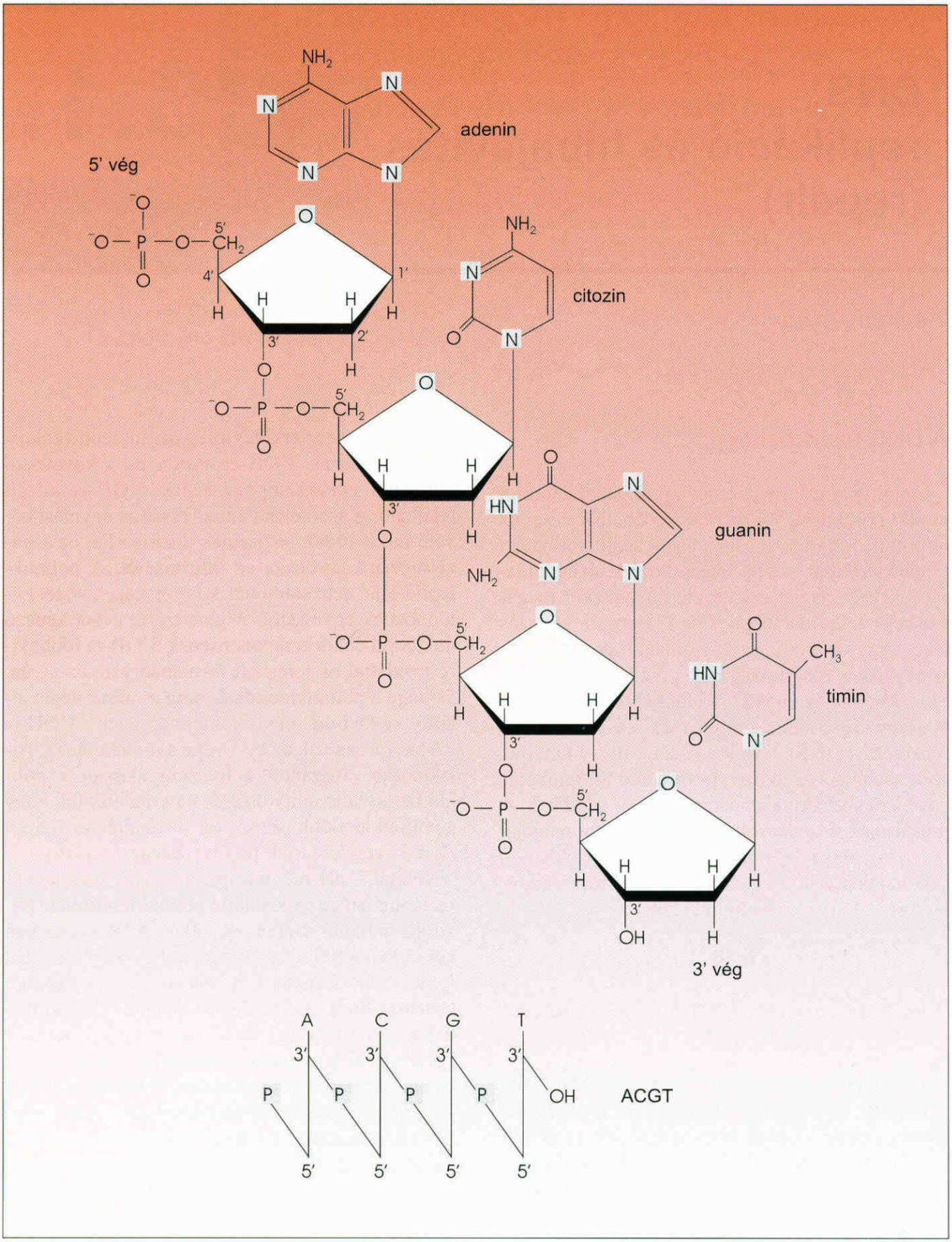
A biológiai információt az egyik generációtól a másikra örökítő DNS szerkezete lehetővé teszi az információ majdnem tökéletesen stabil formában történő tárolását, pontos megkettőződését és átadását. A DNS kémiai szerkezete ugyanakkor magában rejti az evolúcióban fontos szerkezetváltozás lehetőségét is. Az információ nemcsak a fehérjék szerkezetére vonatkozik, hanem módot nyújt azok szintézisének mennyiségi és időbeli szabályozására is, így végső soron a sejtek csaknem valamennyi funkciója a DNS ellenőrzése alatt áll. A fehérjék szerkezetére vonatkozó információ hárombetűs genetikai kód formájában tárolódik és adódik át. A prokarióták és eukarióták genetikai információját hordozó anyag (genom) a DNS, vírusokban a genom lehet DNS vagy RNS. Az információáramlás iránya kevés kivételtől eltekintve:

$$\text{DNS} \rightarrow \text{RNS} \rightarrow \text{fehérje}$$

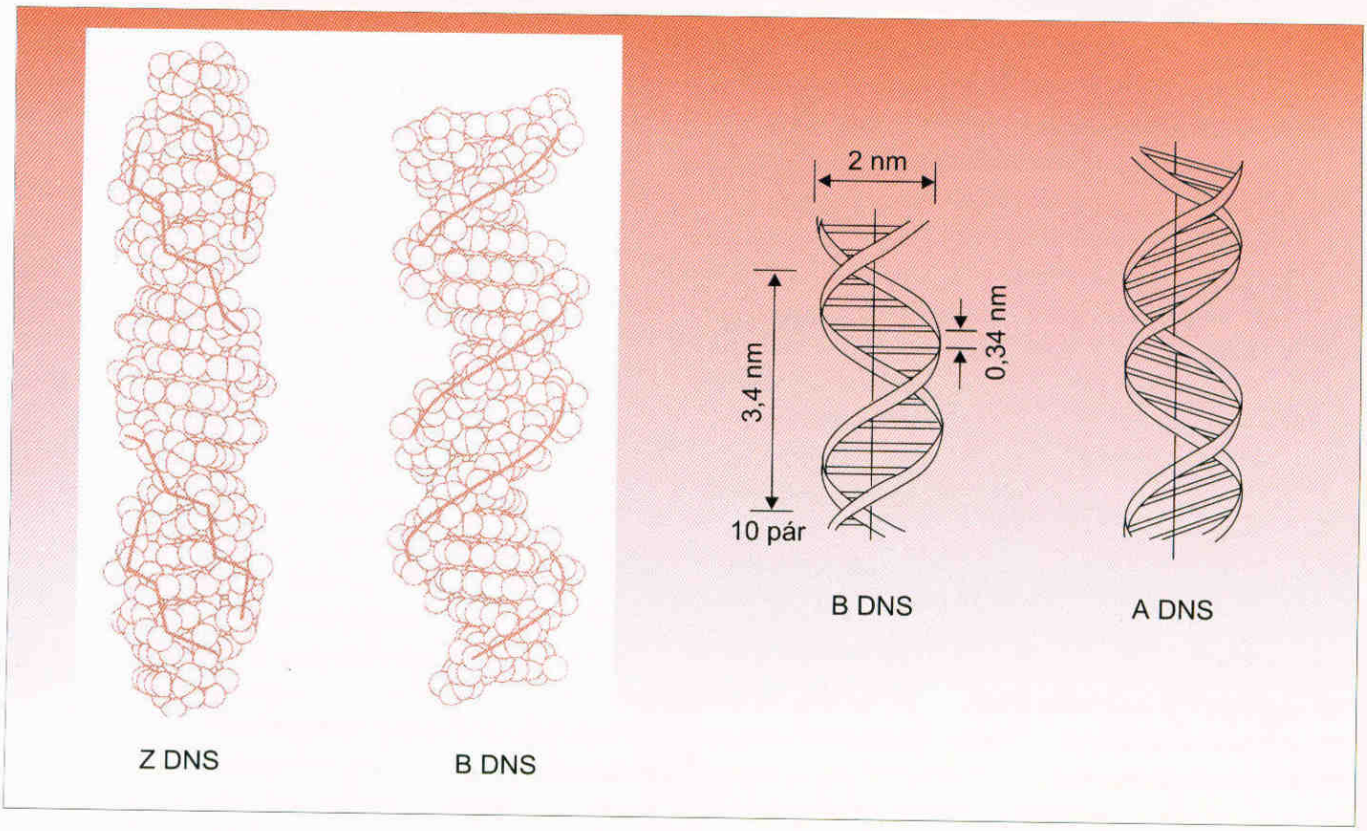
(A kivételekre, amikor RNS-ről DNS felé áramlik az információ később részletesen kitérünk).

A nukleinsavak nukleotid egységekből álló polimérek. A polimérek építőelemei RNS esetén adenin, guanin, citozin- vagy uracilbázist tartalmazó ribonukleotidok, DNS esetén dezoxi-ribonukleotidok amelyek uracil helyett timinbázist tartalmaznak. A polimerek váza a nukleotidok foszfodiészter kötéssel egymáshoz kapcsolódó ribóz (RNS) vagy dezoxi-ribóz (DNS) részeiből áll, a foszfodiészterkötés az egyik nukleotid cukorkomponensének 3'OH-csoportja és a következő nukleotid cukorkomponensének 5'OH-ja között található. A szerkezet változó része az egymást követő nukleotidok bázisainak a sorrendje, ez a **bázissorrend** hordozza az információt. A polinukleotid-lánc nem szimmetrikus szerkezet, végei különböznek egymástól. A lánc egyik végét képező nukleotid cukorkomponensének 5'OH-ja többnyire foszfáttal észteresített formában van, ez az ún. 5'-vége a polinukleotidnak, míg a másik végét alkotó nukleotid cukorkomponensének 3'OH-ja többnyire szabad, ez a 3'-vége a molekulának. Általánosan elfogadott konvenció alapján a polinukleotid-lánc irányultságát úgy tüntetik fel, hogy a polinukleotidok bázisainak sorrendjét az 5'-végtől a 3'-vég felé írják fel *(3-1. ábra)*.

Neutrális pH-n, viszonylag magas sókoncentráció mellett az egyedülálló polinukleotid-lánc flexibilis helikális szerkezetet alkot. A DNS azonban kevés kivételtől eltekintve nem egyszálú láncként fordul elő, hanem két ellentétes irányultságú **(antiparallel)** polinukleotid-láncból álló **kettős helix**. A két lánc egy (képzeletbeli) közös tengely körül van feltekeredve, a tekeredés a leggyakrabban előforduló szerkezet, az ún. **B forma** esetében jobbmenetes. (A B forma tekinthető a fiziológiás DNS-szerkezetnek.) A foszfát-egységekkel összekötött dezoxi-ribóz-egységekből álló váz a kettős spirál külső részén, míg a purin- (adenin, guanin) és pirimidin- (timin, citozin) bázisok belül találhatók. A bázisok síkja merőleges a spirál tengelyére, a cukoregységek síkja majdnem derékszöget zár be



3-1. ábra. A DNS elsődleges szerkezete

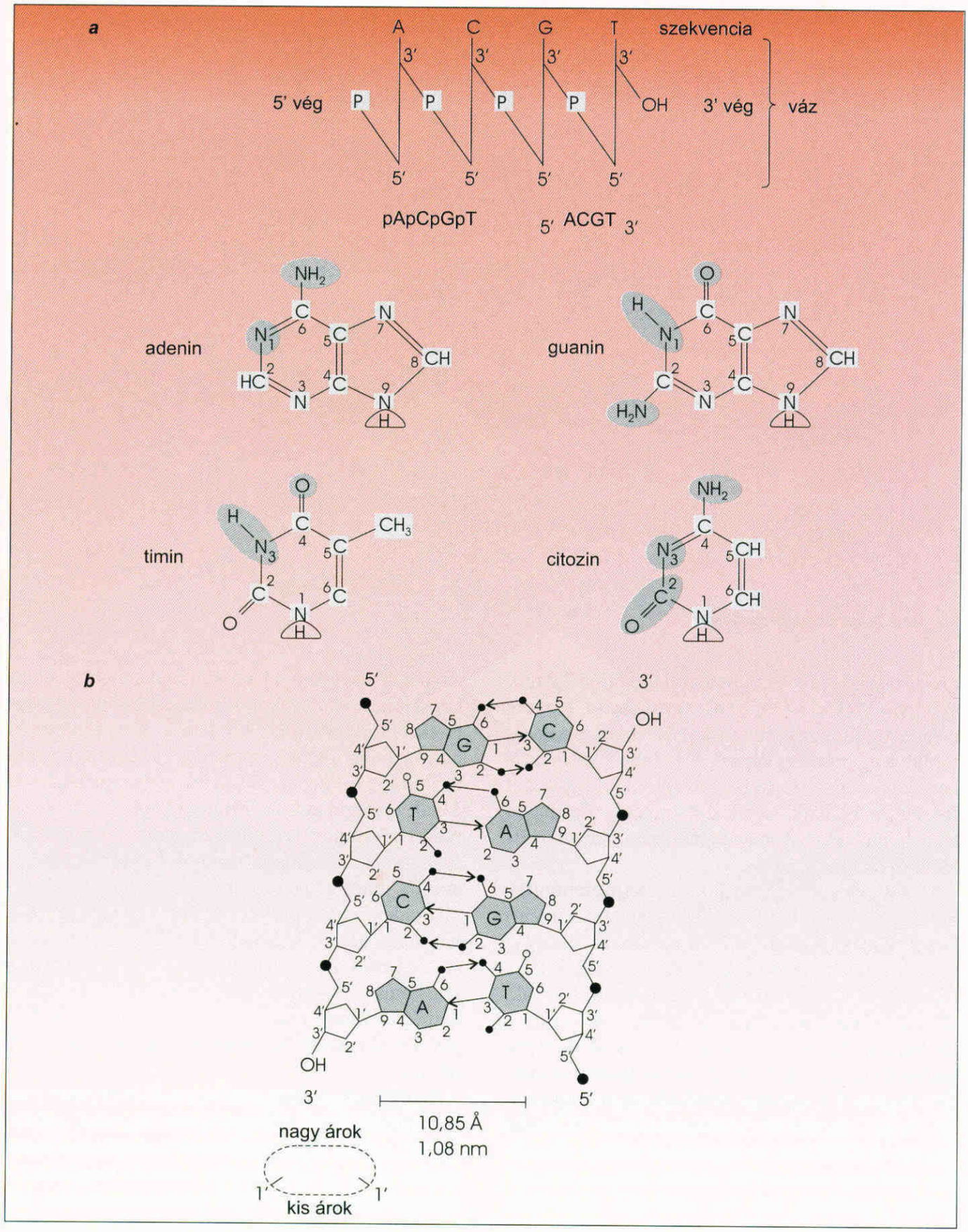


3-2. ábra. A kettős hélix modellje

a bázisok síkjával. A kettős spirál átmérője 2,0 nm, az egymást követő bázisok távolsága a tengely mentén 0,34 nm és (átlagosan) 36°-kal vannak elfordulva egymáshoz képest. A helikális szerkezetben egy teljes fordulat 10 nukleotidegységet igényel, a helikális szerkezet mindkét láncon (a tengely mentén) 3,4 nm-nyi távolságonként ismétlődik *(3-2. ábra)*.

A két láncot egymáshoz a **komplementer** bázispárok (adenin–timin, illetve guanin–citozin) között kialakuló hidrogénhidak rögzítik. Az egymást kiegészítő bázispárok szigorú specificitása (komplementaritása) az információ stabilitásának, illetve továbbadhatóságának lényege. A komplementaritás oka, hogy csak az egymással szemben beilleszkedő adenin és timin, illetve guanin és citozin megfelelő csoportjai kerülnek abba a helyzetbe, hogy egymással hidrogénhidakat tudjanak alkotni. A DNS-ben az egyébként szabad állapotban enol-oxo tautomériát mutató bázisok oxoformában fordulnak elő. Az enol-oxo tautoméria egyensúlyának az oxoforma felé történő eltolódása a DNS szerkezeti stabilitásának egyik alapja, a bázisok nagyon ritkán, de mégis előforduló enolformája lehetőséget nyújt az evolúcióban fontos spontán szerkezetváltozásra. Az oxocsoportok ugyanis H-akceptorként, míg a bázisok NH_2-odalláncai hidrogéndonorként szerepelnek. Ezen túl, a timin pirimidingyűrűjének N3-ja és a guanin purinvázának N1-atomja hidrogéndonorként (ezek eredetileg NH-csoportok), míg az adenin purinvázának N1-atomja és a citozin pirimidin gyűrűjének N3-atomja hidrogénakceptorként viselkedik. A timin–adenin bázispárt kettő, míg a guanin–citozin bázispárt három hidrogénhíd rögzíti egymáshoz. Az egymással szemben levő nukleotidok glikozidos kötései közötti távolság szigorúan meghatározott (1,085 nm), csak egy purin- és egy pirimidingyűrű tud egymással szemben elhelyezkedni *(3-3. ábra)*.

Az egymás mellett elhelyezkedő komplementer bázispárok közti hidrogénhidak egymást stabilizálják. A natív DNS szerkezetét melegítéssel denaturálni lehet. A hőmérséklet emelése megbontja a hidrogénhidakat és a DNS bázisösszetételére jellemző hőmérsékleten a két lánc elválik egymástól. (Azt a hőmérsékletet, ahol a bázispárok közötti hidrogénhidak 50%-a megbomlik a DNS „olva-



3-3. ábra. A DNS komplementer láncait összetartó hidrogénhidak. *Az (a) ábrán a bázisok hidrogéndonor, illetve hidrogénakceptor csoportjait tüntettük fel, a (b) ábrán az antiparallel láncok közti kapcsolat planáris modellje látható*

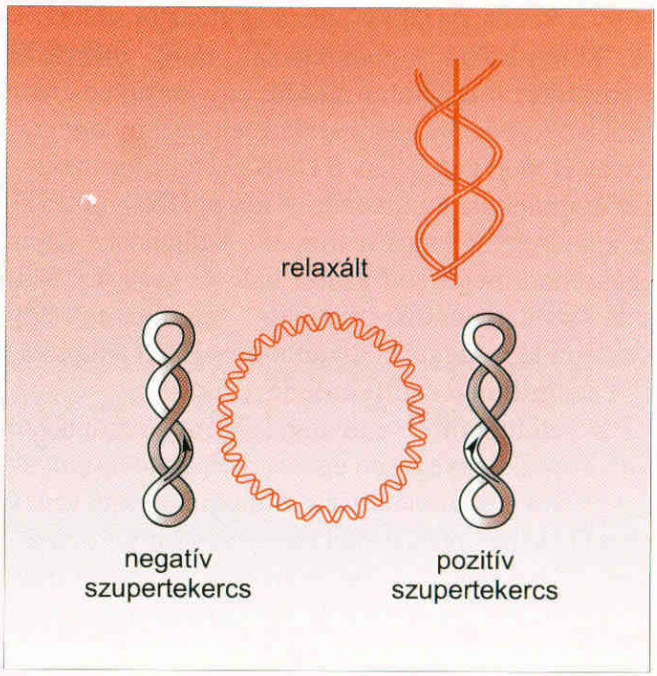
dáspontjának" nevezik.) A komplementer bázisszekvenciákat tartalmazó nukleotidláncok egymás iránti affinitása azonban olyan nagy, hogy az elválasztott láncok megfelelő körülmények között ismét egymásra találnak és pontosan illeszkednek egymáshoz. A komplementaritás ugyanilyen vonzerőt jelent akkor is, ha nem két DNS-lánc, hanem DNS-RNS vagy RNS-RNS láncok találkoznak. Ez a jelenség az alapja a **hibridizáció** lehetőségének. Komplementaritás szempontjából az RNS-ben található uracilbázis ugyanúgy viselkedik, mint a DNS-ben található timin.

Vizes oldatban és in vivo túlnyomórészt a DNS kettős helix fentebb jellemzett B formája fordul elő. Ebben a formában a kettős helix külső részét képező dezoxi-ribóz-foszfát-váz csavarulatai között két, ugyancsak helikális árok helyezkedik el, az egyik szélesebb **(nagy árok)**, mint a másik **(kis árok**, 3-2. ábra). Ez abból adódik, hogy a glikozidos kötések a párokat alkotó bázisok és a hozzájuk tartozó cukoregységek között nem pontosan egymással szemben helyezkednek el, az egyik oldalon 180°-nál nagyobb, a másik oldalon 180°-nál kisebb szöget zárnak be egymással. Azon az oldalon, ahol a bezárt szög nagyobb, található a nagy árok, a másik oldalon a kis árok. A DNS-hez közvetlenül kapcsolódni képes fehérjék egy jelentős része bizonyos meghatározott bázisszekvenciájú részeket ismer fel a DNS-en. Ezek a fehérjék főként a nagy árokban tudnak kapcsolatot kialakítani a kettős helix belső részét alkotó bázisok megfelelő csoportjaival.

A környezet alacsony sókoncentrációja és nedvességtartalma mellett a DNS B-formája átalakulhat **A-formává**, ebben a formában nem 10, hanem 11 nukleotid alkot egy csavarulatot, és a helix megrövidül. A **C-forma** nagyon hasonlít az B-hez, egy csavarulatot 9 bázis alkot. A **Z** (vagy „zig-zag") **DNS** nevét onnan kapta, hogy benne a polinukleotid-vázat alkotó szerkezet cikk-cakkokat alkot. A Z-formában a helix balmenetes, a DNS sokkal hosszabb és vékonyabb, mint a B-formában, 12 bázispár hoz létre egy teljes csavarulatot és csak egy árok található rajta. A nagy árok mintegy kipúposodik és konvex szerkezetet alkot. A Z-forma kialakulásának kedvez, ha purin és pirimidin nukleotidok egymást váltva fordulnak elő a DNS egy rövidebb szakaszán, a Z-forma általában egy-két tucat nukleotidot érintő szakaszon található. Azt feltételezik, hogy a DNS-szabályozásért felelős régióiban van szerepe a Z-formának. Z-formát stabilizáló tényező a guanin- és citozinbázisok posztszintetikus metileződése.

A kettős szálú DNS hajlékony szerkezet, előfordulhat cirkuláris vagy lineáris formában. A mag nélküli, (prokarióta) sejtek DNS-e cirkuláris, a sejtmaggal rendelkező (eukarióta) sejtek nukleáris DNS-e lineáris molekula. A zárt, cirkuláris DNS (illetve az a DNS-szakasz amelynek végei valamilyen módon rögzítve vannak), topológiai izomereket képez. A topológiai izomérek úgy jöhetnek létre, hogy a zárt kettősgyűrű a térben a saját tengelye körül feltekeredik, **szupertekercsek** (szuperhelix) keletkeznek. (Nyitott, végükön nem rögzített molekulák spontánul újra kitekeredhetnek, a zárt kettősgyűrű vagy a láncok mindkét végének rögzítése esetében azonban erre nincs lehetőség. A zártság mindkét láncra vonatkozik, ha az egyik láncon törés van, a molekula kitekeredhet.)

Azokat a molekulákat, amelyeken ilyen szupertekercs nem található **relaxált DNS**-nek nevezik. A szupertekercselődés lehet azonos irányú a kettős spirál csavarulataival, ilyenkor **pozitív szupertekercsről** beszélünk vagy ezzel ellentétes irányú, ez a **negatív szupertekercs**. A pozitív szupertekercsben kialakuló feszülések a helikális szerkezetet



3-4. ábra. A DNS topoizomérjei

még zártabbá, tömörebbé teszik, míg a negatív szupertekercs lazítja, kitekeri a két láncot egymásból. Topológiai izoméreknek nevezik azokat a DNS-molekulákat, amelyek csak a szupertekercs szerkezetében, mértékében vagy hiányában különböznek egymástól *(3-4. ábra)*.

A negatív szupertekercs kialakulása fontos azokban a DNS-t érintő folyamatokban, amikor a két szál időleges kitekeredése szükséges. A tekercselést végző, illetve azt feloldó enzimek a DNS-**topoizomerázok**. A topoizimerázok működésük közben a kettős láncú DNS egyik szálát (I. típusú topoizomerázok) vagy mindkét láncát (II. típusú topoizomerázok) időlegesen elhasítják, majd a molekula megfelelő átalakulása után a láncot ismét egyesítik. A topoizomeráz I a DNS relaxációját katalizálja, a topoizomeráz II negatív szupertekercset vezet a DNS-be. A negatív szupertekercs kialakítása energiaigényes folyamat, az energiát ATP hidrolízise biztosítja. DNS-giráznak nevezik azt a II. típusú bakteriális topoizomerázt, amely az ATP hidrolíziséből származó energia terhére a baktériumok zárt gyűrű alakú kettős helixébe negatív szupertekercseket vezet, és elősegíti a DNS replikációját.

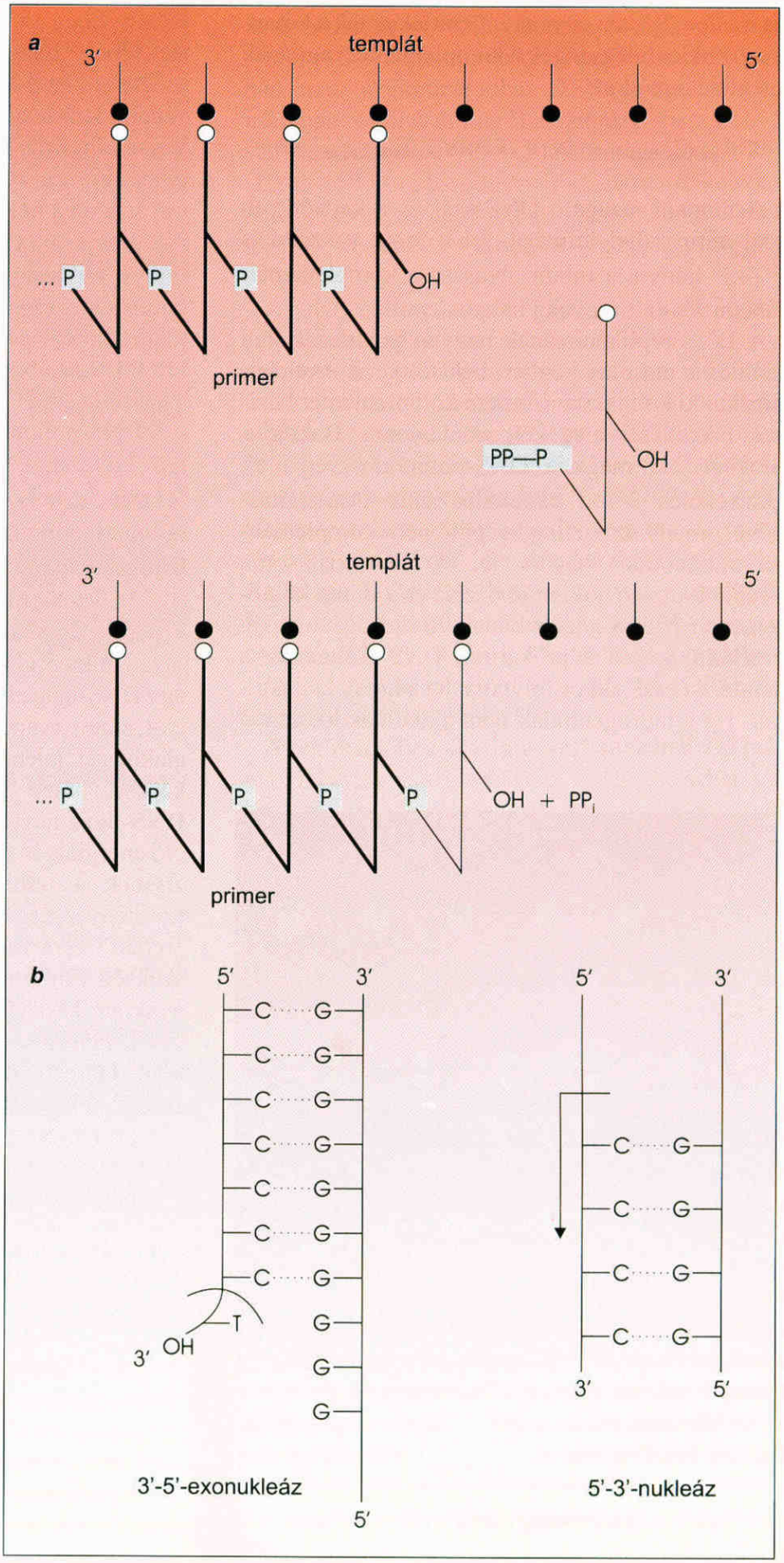
A DNS replikációja prokariótákban

Minthogy a DNS két lánca egymással komplementer bázisszekvenciával rendelkezik, a replikáció szempontjából mindkettő tartalmazza ugyanazt az információt. A DNS replikációjának lényege, hogy a kettős spirál két lánca egymástól szétválik és külön-külön mindkettőről, mint **mintáról (template)** megszintetizálódik egy komplementer bázisszekvenciájú, antiparallel lefutású új lánc, tehát az eredeti kettős láncú DNS-sel teljesen azonos két új molekula keletkezik. A két új DNS-molekula egyik-egyik lánca a mintául szolgáló és teljes egészében megőrzött szülői lánc és csak a másik szál szintetizálódik újonnan, mindig egy-egy nukleotidegységgel hosszabbodva. Ezért a replikációt **szemikonzervatívnak** nevezik.

Az elkülönült sejtmaggal nem rendelkező prokarióták lényegesen egyszerűbb sejtek, mint az eukarióták. A molekuláris biológia fejlődésének első fázisában prokariótákon nyert adatok szolgáltak ismereteink alapjául, amelyeket csak később egészítettek ki az eukarióták bonyolultabb viszonyait tükröző eredmények. A replikáció alapvető problémáinak megértéséhez a prokariótákban történő DNS-szintézis jó modellt nyújt.

A mintául szolgáló DNS-lánccal komplementer, új DNS-lánc szintézisét a DNS-polimeráz enzimek **(DNS-dependens DNS-polimerázok)** végzik. A bakteriális polimerázok közül a DNS-polimeráz III-nak nevezett enzim felelős a replikációért, míg az elsőként megismert DNS-polimeráz I enzim a DNS sérüléseinek helyreállításában (repair) játszik szerepet elsősorban, bár a replikáció egyik segédenzimeként is működik. A DNS-polimeráz I enzim háromféle katalitikus aktivitással rendelkezik. Szintetikus aktivitásán kívül van ezzel látszólag ellentétes, polinukleotidokat hidrolitikusan hasító nukleáz aktivitása is, ez utóbbiból kétféle, aszerint, hogy a DNS lánc 5'- vagy 3'-végéről hasít le nukleotidot (korrekciós 3'-5'-exonukleáz és hibajavító 5'-3'-exonukleáz aktivitás). Egyetlen polipeptidláncból áll, mindháromféle katalitikus aktivitásáért ugyanaz a polipeptidlánc felelős. (A polipeptidlánc megfelelő helyen történő hasításával, mesterségesen olyan fragmentumhoz lehet jutni, amely az 5'→3' irányú exonukleáz aktivitást elvesztette, csak a másik két aktivitását tartotta meg. Ezt a laboratóriumi géntechnikában gyakran használt DNS-polimeráz I fragmentumot nevezik Klenow-fragmentnek). A DNS-polimeráz III kétféle katalitikus aktivitással rendelkezik, szintetikus és 3'-5'-exonukleáz aktivitással, 5'→3' irányban nem hasít le nukleotidot. A replikációkor folyó DNS-szintézisért felelős DNS-polimeráz III több, részben azonos, részben különböző alegységből álló aszimmetrikus molekula (4-4 alegység azonos, a többi különbözik).

A nukleinsavak szintézise mindig az 5'-végüktől a 3'-végük irányában történik. A szintetikus reakció mind a 4 különböző dezoxi-ribonukleozid-5'-trifoszfát (dNTP-ok, azaz dATP, dGTP, dTTP, dCTP), továbbá magnéziumionok és a mintául szolgáló (template) DNS egyidejű jelenlétében megy végbe, mindez azonban nem elégséges a DNS-polimeráz szintetikus aktivitásához. A DNS-polimerázok nem képesek megszintetizálni egy nukleotidlánc első néhány nukleotidegysége közti foszfodiészterkötéseket, hanem **indító láncot (primer)** igényelnek. Az indító lánc lehet a mintául szolgáló DNS-sel komplementer DNS- vagy RNS-lánc, amelynek utolsó nukleotidja szabad 3'OH-val rendelkezik. Ehhez kapcsolódik a szintézis során az első dezoxi-ribonukleotid 5'OH-csoportját észteresítő foszfát, pirofoszfát lehasadá-



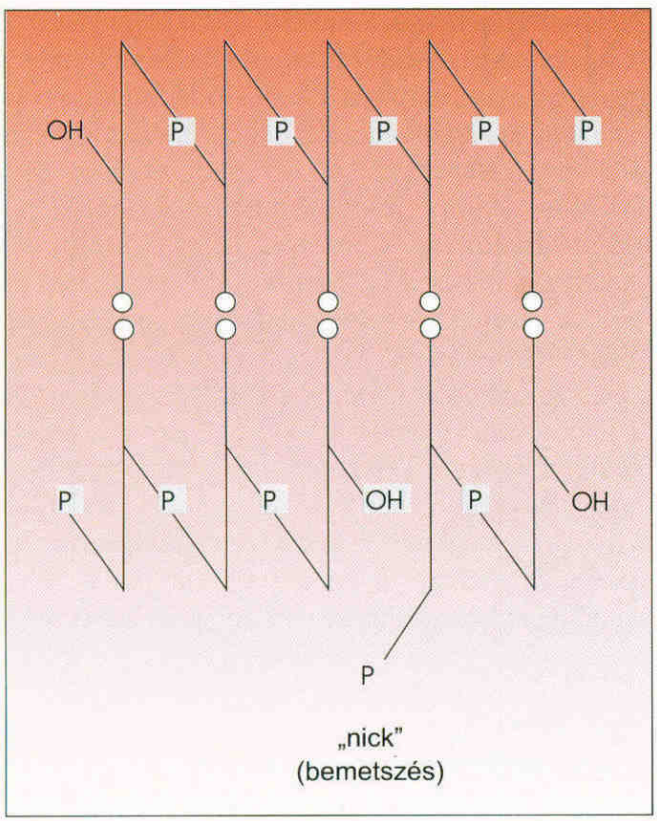
3-5. ábra. A DNS-polimeráz I. aktivitásai. *(a) Szintetikus aktivitás és (b) nukleáz aktivitások. A 3'-5'-exonukleáz aktivitás az utolsóként beépülő nem komplementer nukleotidot hasítja le (a szintetikus aktivitás során elkövetett esetleges hiba korrekcióját szolgálja). Az 5'-3'-exonukleáz aktivitás komplementer, de valamilyen okból mégis eltávolításra szoruló DNS-szakaszon működik és a kihasított szakaszt a szintetikus aktivitás azonnal pótolja (például az RNS-indító darabok eltávolítása során)*

sa mellett. Ezután egyenként csatlakoznak a következő nukleotidegységek a komplementer mintának megfelelő módon.

$$DNS_{(n\ nukleotid\ egység)} + dNTP \rightarrow DNS_{(n+1\ nukleotid\ egység)} + PP_i$$

A mintául szolgáló DNS-szál és a képződő új szál antiparallel lefutású, tehát amíg a szintézis 5'→3' irányú, a minta olvasása a komplementer láncon 3'→5' irányban halad.

A DNS replikációjának nagyon pontosnak kell lennie, a másolás közben bekövetkező esetleges hibákat ki kell javítani, a nem komplementer bázisok beépülését meg kell akadályozni. Baktériumokban ezt maga a DNS-polimeráz végzi el, „korrekciós" 3'→5' exonukleáz aktivitása segítségével, amely az esetleg beépülő nem komplementer nukleotidot hasítja le. A szintézis során beépített utolsó nukleotid bázisa és a minta komplementer bázisa között kialakuló hidrogénhidakat érzékelni képes a prokarióta DNS-polimeráz, a szintézist csak akkor folytatja, ha a hidak kialakultak. Ha a hidrogénhidak nem alakulnak ki, ez azt jelenti, hogy az utolsóként csatlakoztatott nukleotid hibás, bázisa nem komplementer a minta megfelelő bázisával. Ilyenkor a polimeráz az utolsóként létrehozott foszfodiészterkötést hidrolitikusan elhasítja, ezen a módon a hibás nukleotidot eltávolítja és csak ezután folytatja a szintézist ugyanazon a helyen.



3-6. ábra. A DNS-ligáz aktivitását igénylő bemetszés

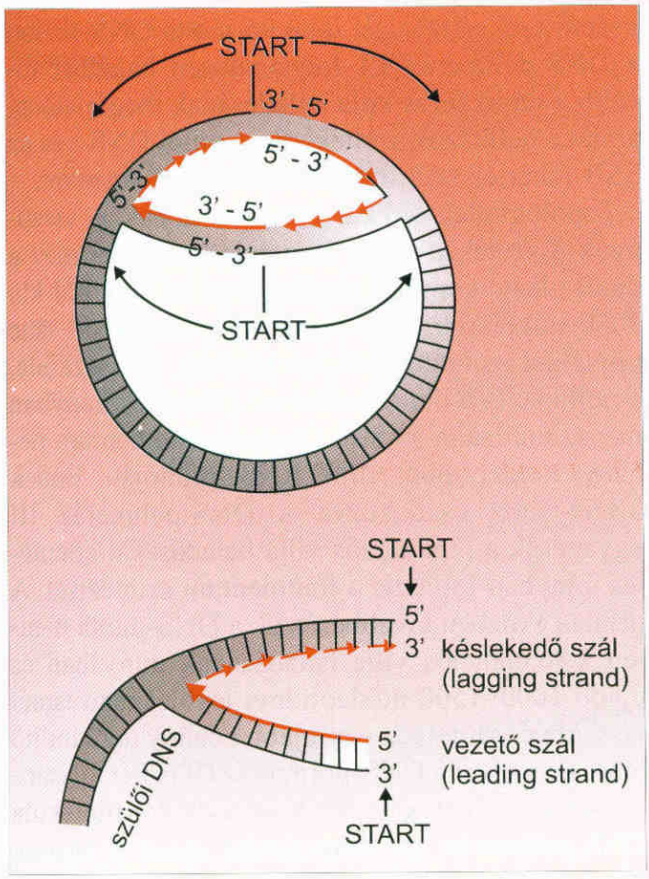
A prokarióta DNS-polimeráz I hibajavító 5'→3' irányú nukleáz aktivitása viszont komplementer kettős szálú régiókban képes hasításra, a DNS egyidejű szintézise közben. A DNS-replikáció bonyolult folyamatában (mint ez később látható lesz) erre az aktivitásra is szükség van *(3-5. ábra)*.

A DNS-polimerázok nukleotidokat csak úgy tudnak összekötni, hogy egy szabad nukleozid 5'-trifoszfát α-helyzetű foszfátját kötik hozzá a polinukleotid láncvégi 3'OH-jához, az α- és β-foszfátok közti pirofoszfátkötés hidrolízise és a (β,γ-helyzetű) pirofoszfát lehasadása közben. Nem képesek azonban összekötni a 3'OH-véggel egy olyan nukleotid 5'-foszfátját, amely nukleotid már egy DNS-lánc első tagja (azaz 5'-vége). Ezt a reakciót, amely csupán egyetlen foszfodiészterkötés kialakulását jelenti, viszont ezzel két DNS-láncot kapcsol össze (vagy egyet kör alakúvá tesz) a **DNS-ligáz** nevű enzim végzi *(3-6. ábra)*. A reakció energiaigényes, prokariótákban NAD^+ hidrolízisének a terhére megy végbe. A DNS-ligáz tevékenységére nemcsak a replikációban, hanem a „repair" és a rekombináció mechanizmusában is szükség van, a rekombináns géntechnikában igen gyakran használt enzim. (A kettős szálú DNS egyik láncán előforduló egyetlen foszfodiészterkötés hiányát, amelyet a DNS-ligáz szüntet meg, „nick"-nek nevezik.)

A prokarióta genom zárt, cirkuláris DNS-molekula, amelyen a replikáció startpontja pontosan meghatározott helyen van.

A cirkuláris prokarióta DNS kapcsolatban van a plazmamembrán belső oldalával. Bár a prokarióta DNS-t szabad DNS-nek tartják, újabban találtak olyan fehérjéket prokariótákban is, amelyek az eukarióták hisztonjaira emlékeztetnek.

A replikáció a cirkuláris DNS-en a startponttól kiindulva halad előre a kör mentén mindkét irányban és végződik a kör startponttal szemben levő részén *(3-7. ábra)*. A replikáció előrehaladásakor a szülői kettős szálú DNS folyamatosan felnyílik. A **replikációs villa** a felnyílás helyén kialakuló Y



3-7. ábra. A cirkuláris prokarióta DNS replikációja és a replikációs villa

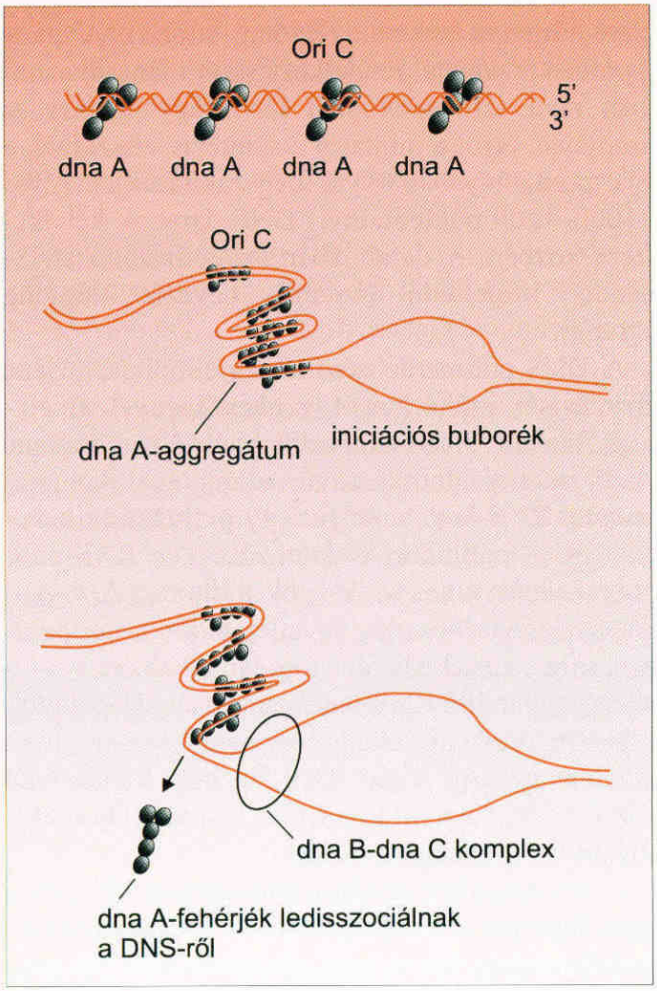
alakú képződmény, amelynek elágazódó szárait a már megszintetizálódott két új DNS kettős lánc alkotja, középső szárát pedig a még érintetlen szülői DNS. A kör alakú DNS két irányba induló replikációjakor mindig két replikációs villa halad előre, egy az óramutató járásával megegyező, egy pedig azzal ellentétes irányban (miközben a még érintetlen szülői DNS hossza egyre csökken).

Ha bármelyik replikációs villa előrehaladását külön vizsgáljuk, nyilvánvaló, hogy a két új DNS-szál szintézise nem történhet teljesen azonos módon. A replikáció startpontját a mintául szolgáló szülői DNS egyik láncának 5'-vége a másiknak 3'-vége szolgáltatja. A DNS-polimeráz, amely az új DNS-t 5'→3' irányban építi fel, a komplementer mintát csak 3'→5' irányban tudja leolvasni. Folyamatos szintézis, amelynek iránya megegyezik a replikációs villa előrehaladásának irányával, csak arról a szülői láncról mint mintáról történhet, amelynek a startpontban 3'-vége van. Az erről a mintáról folyamatosan szintetizálódó új láncot **vezető láncnak** nevezik (leading strand). A startpontban 5'-véggel rendelkező szülői láncról azonban nem szintetizálódhat DNS ugyanebben az irányban, erről a mintáról a szintézis visszafelé, a startpont irányában folyik megszakításokkal, rövid (1000–1500 nukleotidnyi) DNS-darabok keletkezése közben. A darabokban szintetizálódó DNS-láncot **késlekedő láncnak** nevezik (lagging strand).

A DNS-polimeráz nem képes elindítani a lánc szintézisét, indító láncot (primer) igényel, amelynek szabad 3'OH-csoportja van. Az indítólánc 4–10 nukleotidhosszúságú, a mintával komplementer RNS-lánc, amelyet egy **primáznak** nevezett RNS-polimeráz szintetizál. (Az RNS-polimerázoknak nincs szükségük indítóra.) A vezető lánc szintéziséhez elég egyetlen indító a startpontnál, míg a késlekedő lánc minden darabjának szintézise egy indító RNS-lánc szintézisével kezdődik. Ilyen módon a késlekedő lánc szintézisekor átmenetileg néhány tagú RNS-lánchoz kapcsolódó 1000–1500 nukleotidnyi DNS-darabok **(Okazaki-fragmentumok)** jönnek létre.

A replikációhoz az eddig említetteken kívül még más fehérjék is szükségesek. Az Escherichia coli baktériumban (ez a leggyakrabban vizsgált prokariótamodell) a replikáció startpontján (origo) levő meghatározott bázisszekvenciájú DNS-szakaszhoz **(oriC)** több molekula **dnaA**-nak nevezett fehérje kötődik. A dnaA fehérje kötődéséhez negatív szupertekercs szükséges. A dnaA indítja el a replikációhoz szükséges fehérjék együttese által alkotott szerkezet **(repliszóma)** kialakulását, és elősegíti a kettős helix kinyílását (a DNS lokális „olvadását") egy néhány száz nukleotidot érintő szakaszon, amelyen egy „iniciációs buborék" képződik. A komplexhez **dnaC** fehérje segítségével **dnaB** fehérje kötődik, ez utóbbinak a két láncot széttekerő, helikáz aktivitása van *(3-8. ábra)*.

A repliszóma maga előtt szorosabbá teszi a „DNS-fonatot", az állapot hasonlít a pozitív szupertekercshez. Ezért szükséges a DNS széttekeredését megkönnyítő negatív szupertekercsek bevezetése a DNS-be. A replikációt a **DNS-giráz** (II. típusú topoizomeráz) segíti, amely ATP energiájának terhére negatív szupertekercsek kialakulását katalizálja. Az iniciációs buborékban a széttekeredett szülői DNS két szálát egyszálú formában stabilizálni kell, ezt az egyes láncú



3-8. ábra. A replikáció iniciációja prokariótában

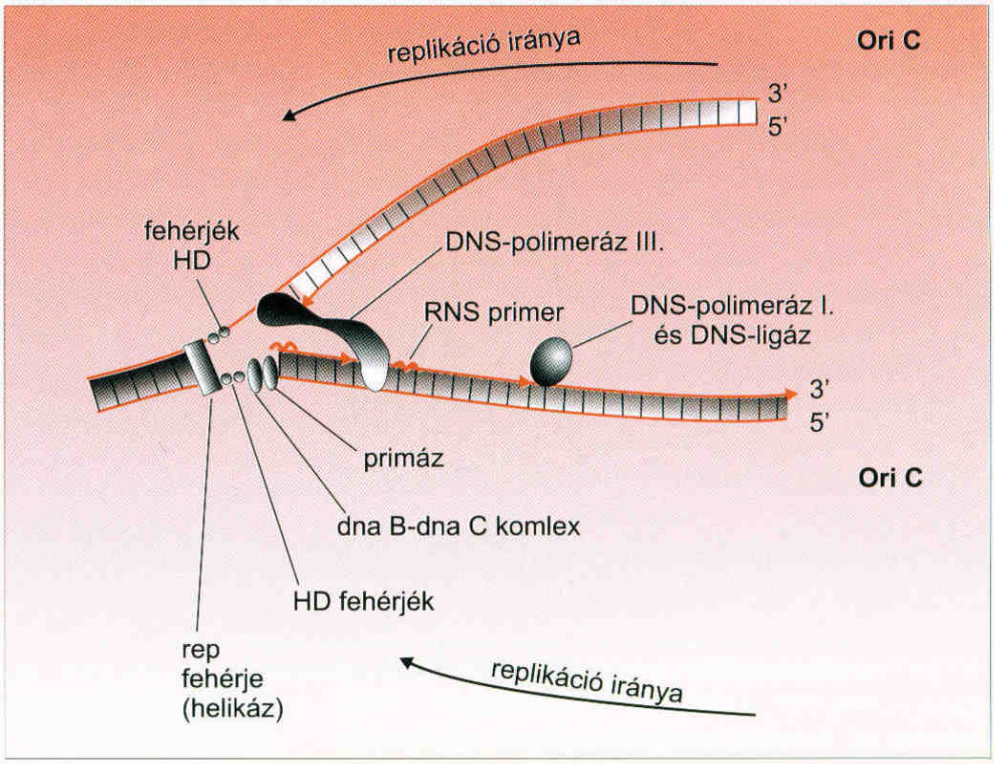
DNS-hez kötődő speciális fehérjemolekulák (hélix destabilizáló **HD**-nek vagy **SSB**-nek nevezett molekulák) végzik.

Az iniciációs „buborék" megjelenése után kezdődhet az első indító RNS-láncok szintézise. (A két replikációs villát véve figyelembe mindkét irányban a vezető szálnak megfelelő láncon.) A dnaB–dnaC komplexhez négy másik fehérje kötődik (N fehérjék), majd ezekhez csatlakozik az indító szintézisét végző primáz (dnaG-nek is szokták jelölni). Az így kialakuló szerkezet a **primoszóma**. A primoszóma megkezdi az RNS indítólánc szintézisét a vezető láncon, csatlakozik hozzá a **DNS-polimeráz III** és a **rep fehérjék**. Ez utóbbiaknak helikáz aktivitása van, és a DNS további szétkeréséért felelősek. (Ezt az „operatív" fehérjeegyüttest nevezik repliszómának, mindkét replikációs villában egy-egy repliszóma működik.) A vezető szál szintézisét irányító minta DNS-szálon a DNS-polimeráz III folyamatosan haladhat tovább a replikációs villa haladásának megfelelően, amint a helikázok széttekerik a szülői DNS-t és az SSB-fehérjék stabilizálják a széttekert láncokat.

Topológiailag sokkal bonyolultabbak a viszonyok a késlekedő lánc szintézisekor. A primáz a dnaB–dnaC komplex segítségével az origótól kb. 1000 nukleotidnyi távolságban a késlekedő lánc mintájául szolgáló DNS-hez kötődik, és visszafelé, a replikációs villa haladásával ellentétes irányban megszintetizálja az első Okazaki-fragmentum néhány nukleotidból álló RNS indítóját. Ennek 3'OH-jához csatlakozva a DNS-polimeráz III ugyancsak a replikációs villa haladásával ellentétes irányban folytatja a fragmentum szintézisét. A primáz eközben továbbcsúszik a DNS-minta mentén a replikációs villa haladásának irányában és újabb 1000–1500 nukleotidnyi távolságban ismét visszafelé szintetizál egy újabb néhány tagú indító láncot, amelyet a DNS-polimeráz III ismét folytat.

A folyamat érdekessége, hogy egyetlen molekula DNS-polimeráz III szintetizálja mind a vezető, mind a késlekedő láncot, amelyek szintézise ellentétes irányban folyik. A DNS-polimeráz III több alegységből álló, két aszimmetrikus karral rendelkező molekula, egyik karja a folyamatos vezető láncot, a másik karja az ezzel ellentétes irányban növekvő Okazaki-fragmentumokat szintetizálja. Ez csak úgy lehetséges, hogy az Okazaki-fragmentumok szintézisekor a késlekedő lánc mintájául szolgáló szülői DNS átmenetileg hurkot képez, és visszafelé hajlik. A visszafelé hajló hurok mentén a DNS-polimeráz III a replikációs villa haladásának irányában haladhat a késlekedő szálon is (miközben a szintézis tényleges iránya ezzel ellentétes, *3-9. ábra*).

Az Okazaki-fragmentumok folyamatos nukleinsavlánccá történő alakítása és az RNS-indítók eltávolítása a következő lépés, itt van szükség az 5'-3'-exonukleáz aktivitással rendelkező DNS-polimeráz I közreműködésére. A második Okazaki-fragmentum addig szintetizálódik, amíg 3'OH-vége el nem éri az első fragmentum RNS-indítójának 5'-végét. A második fragmentum szintézisének befejeződésekor a DNS-polimeráz I 5'→3' irányú (hibajavító) exonukleáz aktivitása segítségével egyenként lehasítja a ribonukleotid-egységeket az első fragmentumról, és helyüket a

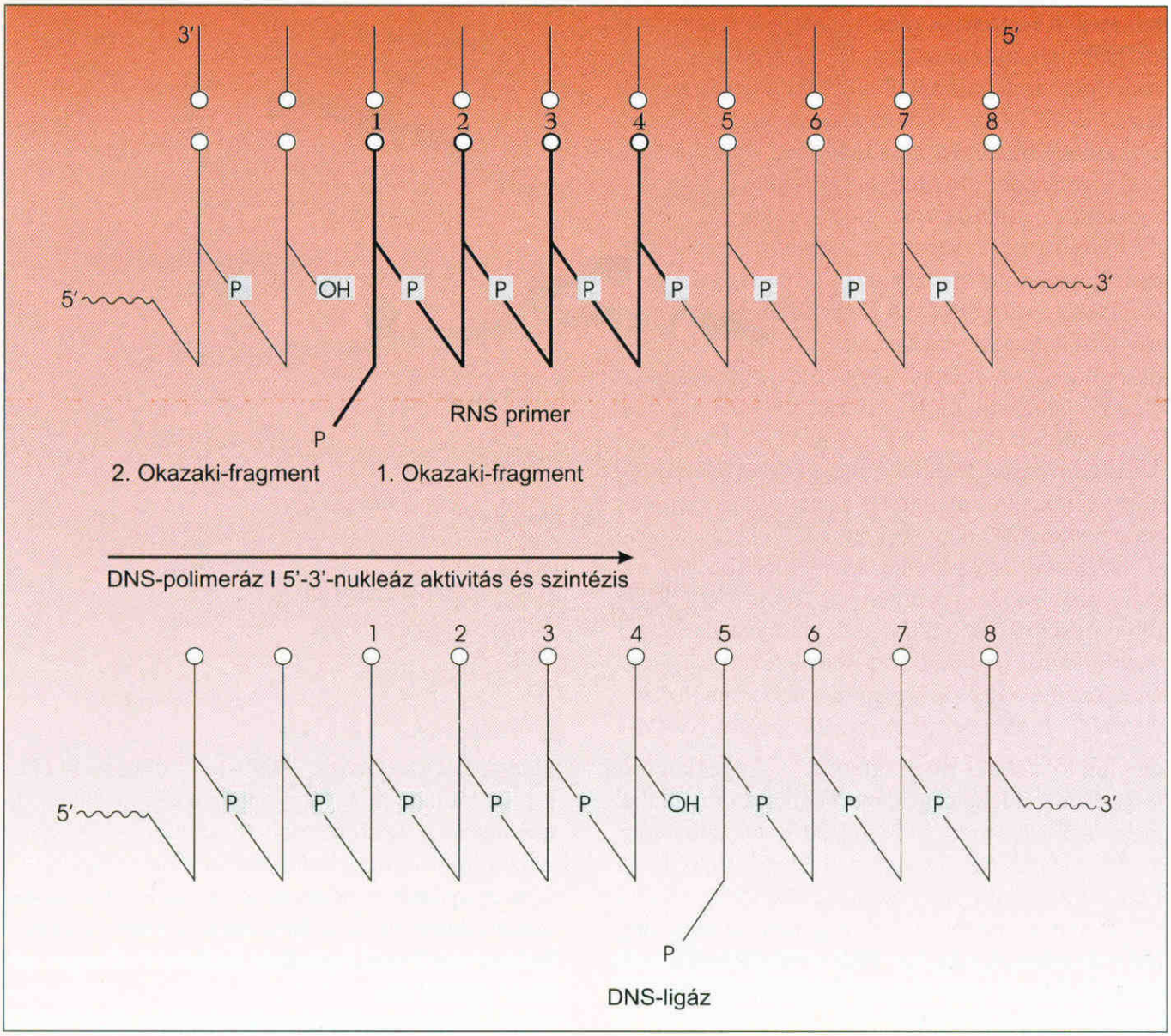


3-9. ábra. A replikációs villa haladása

megfelelő dezoxi-ribonukleotid-egységekkel pótolja. Ez azért lehetséges, mert ehhez a művelethez most már az indítót a második Okazaki-fragmentum láncvégi szabad 3'OH-ja szolgáltatja. Ilyen módon mintegy meghosszabbítódik a második fragmentum az előző fragmentum első dezoxi-nukleotid-egységéig. Ekkor már minden nukleotid a helyén van, csupán egyetlen foszfodiészterkötés hiányzik („nick" van a DNS-szálon). A DNS-polimerázok azonban nem tudják összekötni az RNS-indító helyére utolsóként beépített egység 3'OH-ját a következő nukleotid 5'-foszfátjával. Ezt a reakciót (a „nick" megszűntetését) katalizálja a **DNS-ligáz** *(3-10. ábra)*. A fenti folyamat minden Okazaki-fragmentnél ismétlődik. A két replikációs villában szintetizálódott láncok egyesítését az origónak megfelelően, illetve a replikációs villák találkozásakor ugyancsak a ligáz végzi.

A prokarióta sejt a nagy cirkuláris DNS-en kívül (ezt nem egészen pontos szóhasználattal a baktérium kromoszómájaként is szokták emlegetni és pl. az Escherichia coliban mintegy négymillió bázispárt tartalmaz) rendelkezhet még a nagy DNS-től elkülönülő, kisebb (néhány ezertől százezer bázispárig terjedő) ugyancsak kör alakú DNS-sel is. Ezt a kis cirkuláris DNS-t plazmidnak nevezik. A plazmidok a nagy DNS-től függetlenül is replikálódhatnak, így egy-egy baktériumsejt tartalmazhat akár száznál több másolatot is egy adott plazmidból. A plazmidok három típusát különböztetik meg: az F vagy szexfaktort, az R vagy rezisztenciafaktort és a kolicinogén faktort, amely a kolicin nevű toxin produkciójához szükséges néhány génből áll.

Az **F vagy szexfaktornak** a baktériumok konjugációjában van szerepe, az F plazmidot tartalmazó baktériumot (F+) hím jellegűnek tekintik. Az F+ baktérium kis nyúlványa segítségével összetapad az F- (nőnemű) baktériummal (ezt a folyamatot hívják konjugációnak), az F plazmid egyik DNS-szála felnyílik és az összetapadás helyén képződő csatornán keresztül átjut az F- baktériumba. Ott megszintetizálódik a komplementer lánc és a konjugáció után az F- baktérium is F+ baktériummá alakul. Az F plazmid integrálódhat a nagy DNS-be is annak pontosan meghatározott helyén. Az integrált F faktort hordozó baktériumot Hfr baktériumnak nevezik. A Hfr baktérium konjugáció során a teljes kromoszóma egyik láncát át tudja adni az F- baktériumnak, ahol az kiegészül a komplementer lánccal és lehetőség van a saját és újonnan kapott DNS rekombinációjára. (A prokarióta genom hap-



3-10. ábra. Az Okazaki-fragmentumok egyesítése

loid, ilyenkor átmenetileg diploiddá válik.) Az E. coliban 90 perc alatt jut át a teljes genomnak megfelelő egyik lánc a Hfr sejtből az F- sejtbe, az integráció helyétől kiindulva. (Ilyenkor utoljára az F faktornak megfelelő szakasz jut át.) A DNS-nek a szexfaktor segítségével történő bejuttatását egy baktériumba szexdukciónak nevezik.

Az **R faktor** olyan géneket hordoz, amelyek különböző **antibiotikumok elleni rezisztencia** kialakulásához szükséges fehérjéket kódolnak. A nagyobb R plazmidok rendelkeznek azokkal a génekkel is, amelyek lehetővé teszik, hogy egyik baktériumból a másikba átjussanak (rezisztencia-transzfer faktor). Ilyen módon az egyik baktérium átadhatja a másiknak azt a képességét, hogy a baktériumellenes gyógyszerként alkalmazott antibiotikummal szemben ellenálló legyen. Az R plazmidokat a rekombináns géntechnikában gyakran alkalmazzák gének átvitelére vektorként (lásd később).

A rezisztenziafaktorok érdekes példáját mutatják az „ugráló gének" jelenségének. Az „ugráló gének" **(transzpozonok)** mobil genetikai elemek, olyan DNS-darabok, amelyek másolatai a DNS egyik helyéről a másikra vagy egyik DNS-ről a másikra kerülhetnek. A transzpozonok hossza kü-

lönböző lehet, egyesek csupán két-három gént hordoznak, mások ennél lényegesen több gént is tartalmaznak. Minden transzpozon tartalmaz legalább egy olyan gént amelyik a transzpozáz enzimet kódolja, ez az enzim katalizálja a beékelődés biokémiai reakcióit. Tartalmaz továbbá a két szélén bizonyos fordítottan ismétlődő szekvenciákat, amelyek a gazda-DNS-hez való beilleszkedéshez szükségesek (inzerciós szekvencia).

A rezisztenciafaktorok olyan transzpozonokból állnak, amelyek közül az egyik pl. a penicillint és cefalosporinokat bontó β-laktamáz enzimet kódoló gént tartalmazza, a másik a klóramfenikol-acetil-transzferázt kódoló gént, amely a klóramfenikol nevű antibiotikumot inaktiválja, vagy olyan foszfotranszferáz génjét, amely a neomicint és gentamicint módosítja. Egyetlen R plazmidon több ilyen transzpozon is jelen lehet. Orvosok gyakran megdöbbenve tapasztalják, hogy egy baktériumtörzs egyszerre lesz rezisztens igen sok antibiotikum ellen.

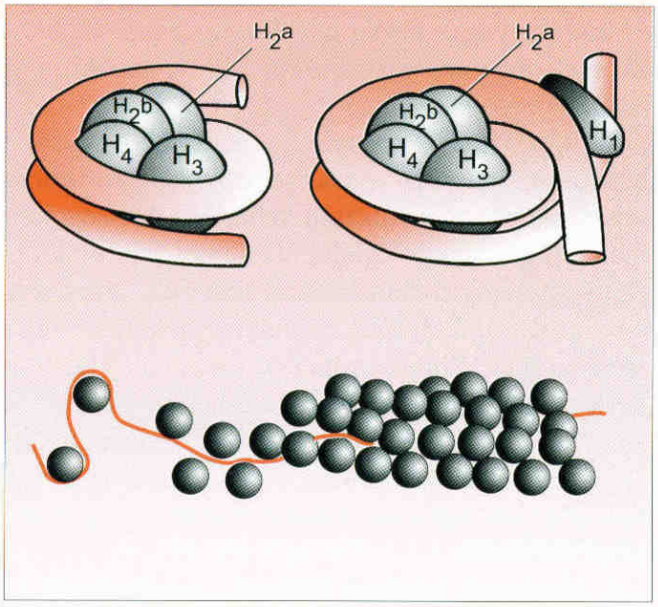
Az eukarióta kromoszóma szerveződése

A maggal rendelkező eukarióta sejtekben a DNS mennyisége és a kettős spirál szerkezetének további szerveződése más, mint a prokariótákban. Az emberi sejt kb. ezerszer annyi DNS-t tartalmaz, mint az E. coli sejt (10^9 nagyságrendű bázispárt). Az eukarióta DNS nem egy molekula, hanem annyi, ahány kromoszóma van a sejtben (az emberi sejtben 46). Nyugvó, nem osztódó sejtben minden kromoszóma egy molekula lineáris DNS-nek felel meg. A DNS az eukarióta kromoszómában nem szabadon fordul elő, hanem fehérjékkel képez komplexet és többszörösen feltekeredve igen kompakt szerkezetet alkot. A komplex szerkezete változik a sejtciklus folyamán. Mitózis közben a legkompaktabb a kromoszóma szerkezete, a mitózisok közötti ún. interfázisban lazább a szerkezet, de a DNS ilyenkor is sokszorosan feltekeredett állapotban van. (Az egy sejt 46 kromoszomájában található, összesen kb. 180 cm hosszú emberi DNS interfázisban 100–1000-szer, mitóziskor kb. 10 000-szer rövidebb).

A DNS sokszoros feltekeredése több célt szolgál. Egyrészt a hosszú DNS molekula „összecsomagolását" biztosítja, másrészt a feltekeredés módjának, a lazább vagy tömörebb szerkezetek váltakozásának meghatározó szerepe van a génaktivitás szabályozásában.

A DNS-hez kapcsolódó fehérjék egyrészt hisztonok, másrészt a sokkal nagyobb változatosságot mutató nem hiszton fehérjék. A hisztonok igen nagyszámú molekulája kapcsolódik a DNS-hez, míg a nem hiszton fehérjék heterogén, különböző funkciókkal rendelkező fehérjepopulációt alkotnak. Ebbe a csoportba tartoznak a DNS és RNS szintézisében részt vevő fehérjék és azok is, amelyek a génkifejeződés szabályozásában játszanak szerepet. A nem hiszton fehérjék egyik-másik típusából esetleg csak néhány molekula kapcsolódik a DNS-hez.

A hisztonok bázikus fehérjék, amelyeknek az aminosavszekvenciája nagyon hasonló az egymástól távoli fajokban is (az evolúció során konzervatívan megőrzött szekvencia) mutatva, hogy valamilyen alapvető feladatot töltenek be minden eukarióta sejtben. Négyféle hiszton molekula (H2a, H2b, H3, és H4) tartozik az ún. „core-hisztonok" közé, ezek molekulatömege 10 és 20 kDa között van. A H2a és H2b bázikus aminosavai között a lizin van túlsúlyban, a H3 és H4 pedig argininban igen gazdag. A hisztonok polipeptidláncának N-terminális és C-terminális szakasza igen bázikus, a középső szakasz kevésbé poláros jellegű. Ez a szerkezet lehetőséget nyújt mind a DNS-hez, mind egymáshoz és más fehérjékhez való kapcsolódásra. A kromoszóma szerkezetének alapja a nukleoszóma, amely a DNS-en kb. 200 bázispáronként ismétlődik. A négy „core-hiszton" két-két molekulája (együttesen nyolc molekula hiszton) alkot egy-egy korongszerű képződményt, amelyre a DNS rátekeredik kb. 150 bázispár hosszúságban, a „core-hiszton"–DNS komplexet hívják **nukleoszómának**. Két nukleoszóma között kb. 50 bázispárnyi hosszúságú „kapcsoló DNS" van. A nukleoszómaszerkezet a DNS teljes hossza mentén kialakult, gyöngysorszerű képződmény (átmérője 11 nm). Az ötödik féle hisztonmolekula a **H1-hiszton**, részben a DNS-hez, részben a core-hisztonokhoz kapcsolódva, közel húzza egymáshoz és bonyolultabb szerkezetbe rendezi a nukleoszómákat *(3-11. ábra)*. A H1-hiszton kb. 21 kDa molekulatömegű, lizinben igen gazdag fehérje. A hisztonok közül ennek az aminosavszekvenciája a legkevésbé konzervatívan megőrzött. A



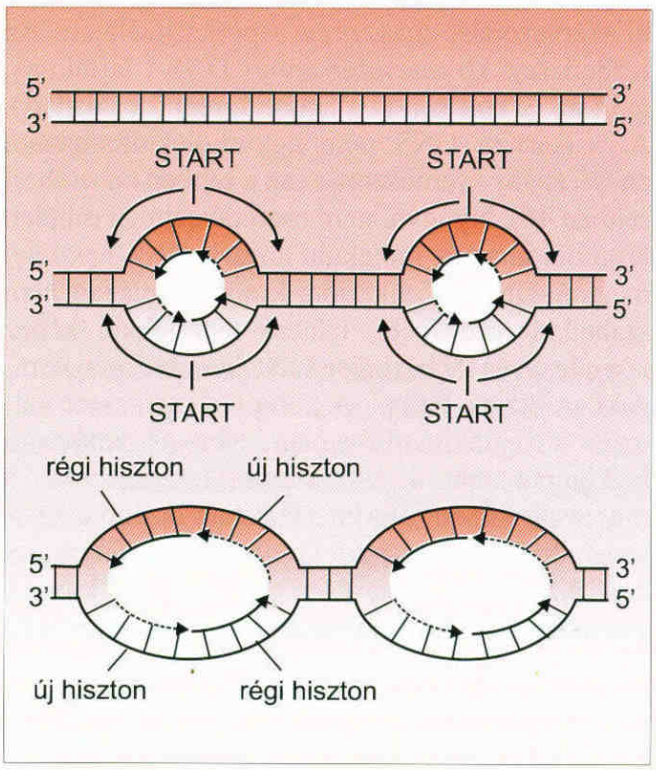
3-11. ábra. Az eukarióta kromoszóma szerveződése

H1-hiszton szerin, illetve treonin oldalláncai közül némelyek foszforilálódhatnak különböző proteinkináz enzimek hatására. A foszforilációnak regulációs szerepe van abban, hogy a H1-hiszton mennyire kompakt szerkezetet rögzít. (Mitóziskor pl. a H1-hisztonok erősen foszforilált állapotban vannak.) A H1-hisztonok által tömörített kromatinrost még kompaktabbá válik azáltal, hogy egymás mellett elrendeződő hurkokat képez, ezek 300 nm átmérőjűek, azonban még mindig az extendált kromoszómának felelnek meg. Az extendált kromoszóma további hurokképződéssel kondenzált szerkezetet alakít ki. Mitóziskor ez a szerkezet még tovább kondenzálódik. A mitózis metafázisából ismert 1400 nm átmérőjű tipikus kromoszóma két molekula DNS-t (két kromatidot) tartalmaz.

A kromoszóma kondenzáltsági foka az interfázisban nem mindenütt azonos. A heterogenitás eddig ismert okai között számon tartják az egyes hisztonmolekulák oldalláncainak kovalens módosulásait (acetiláció, foszforiláció, ADP-ribozilláció), az ubikvitin nevű fehérje kötődését, a hisztonmolekulák variációit (pl. H1-hisztonnak léteznek olyan variánsai ugyanazon sejtben, amelyek aminosavszekvenciája néhány aminosavban különbözik egymástól) és különböző nem hiszton fehérjék jelenlétét.

Az eukarióta sejtben történő replikáció néhány jellegzetessége

Az eukarióták DNS szintézisének menete elvileg hasonlít a prokariótákéhoz, néhány lényeges különbség azonban megfigyelhető. Az eukarióta DNS nem cirkuláris, hanem lineáris és sokkal hosszabb, mint a prokarióta genom. A replikáció a hosszú DNS-molekula mentén egyszerre sok startponton indul meg, mindenütt két irányban, „replikációs buborékok" keletkezése közben *(3-12. ábra)*. A vezető szál és a késlekedő szál szintézisét nem ugyanaz a DNS-polimeráz molekula, hanem két különböző enzim végzi, az α-DNS-polimeráz a késlekedő szál, míg a δ-polimeráz a vezető szál szintézisét katalizálja. (A β-polimeráz a DNS-t ért károsodások javításában, a repair mechanizmusban vesz részt, a γ-polimeráz az extranukleáris DNS-t szintetizálja.) Az eukarióta DNS-polimerázoknak nincs saját exonukleáz aktivitásuk, a 3'→5' hibajavítást és az indító RNS-darabok kimetszését önálló nukleáz enzimek végzik, amelyek azonban a DNS-polimerázzal komplexet képeznek. Az eukarióta DNS-ligáz nem NAD^+, hanem ATP hidrolízise közben működik.



3-12. ábra. A lineáris eukarióta DNS-replikációja

Az eukarióta DNS egyes bázisainak posztszintetikus metilációja a génexpresszió szabályozásában játszhat szerepet.

A nukleoszómaszerkezet kialakulásához szükséges hisztonok, a fehérjék többségétől eltérően, az S fázisban szintetizálódnak, szintézisük szigorúan koordinált a DNS replikációjával. A hisztonok megoszlása az új DNS-láncok mentén tulnyomórészt konzervatív, zömében az összes régi hiszton arra a DNS-re kerül, amely a vezető láncot tartalmazza, és az összes újonnan szintetizált hiszton a késlekedő szálat tartalmazó DNS-szakaszon foglal helyet.

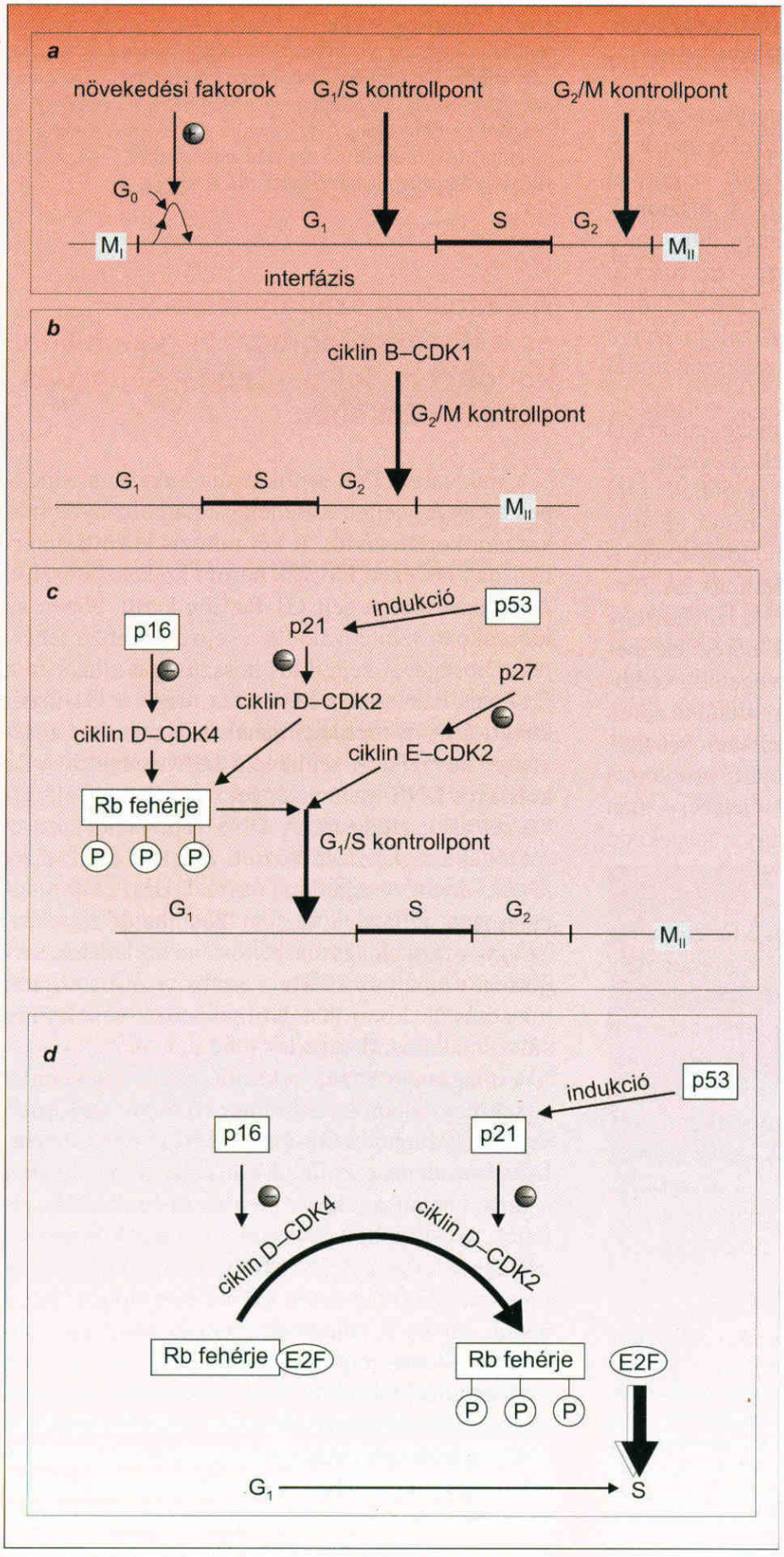
A hosszú lineáris DNS-t tartalmazó eukarióta kromoszóma végeit teloméreknek nevezik. A telomérekben a DNS 3'-végének megfelelő szál „túlnyúlik", a túlnyúló egyes lánc rövid, guanin nukleotidban gazdag, kétszer ismétlődő szekvenciákat **(telomér szekvenciákat)** tartalmaz. A replikációk közötti időszakban a túlnyúló lánchoz egy telomervégi fehérje kötődik. A teloméreknek speciális feladata van a kromoszóma végeinek védelmében, nélkülük a kromoszóma a replikáció során egyre rövidülne. A lineáris DNS replikációja a késlekedő lánc 5'-végén ugyanis speciális problémát vet fel. A láncvégi RNS-indító kimetszése után nem pótlódik a helye DNS-sel és így a késlekedő lánc rövidebb lesz, mint a minta DNS. Azért, hogy emiatt információt hordozó nukleotidszekvencia ne vesszen el, egy sajátságosan működő telomeráz enzim meghosszabbítja a késlekedő szál mintájául szolgáló lánc 3'-végét. A késlekedő láncon az ennek megfelelő komplementer szekvenciára nincs szükség, ezért nem károsodik a DNS, ha a késlekedő lánc 5'-vége a szintézis során rövidebb lesz. A telomeráz enzim „prosztetikus csoportként" egy RNS-darabot tartalmaz, és ennek az RNS-nek megfelelő komplementer DNS-sel hosszabbítja meg a DNS 3'-végét. (A telomeráz enzim működése az egyik példa arra, hogy DNS szintetizálódhat RNS-minta alapján).

A telomeráz enzim aktivitásának eredményeket a telomer szekvenciák a kromoszómák végén a kétszer ismétlődő szekvencia egységet még sokszorosan ismétlő láncot alkotnak, amelyek rövidülése az egymást követő replikációk során nem okoz kromoszómakárosodást. A felnőtt soksejtű szervezet differenciált szomatikus sejtjeiben a telomeráz enzim már nem expresszálódik, ezekben a sejtekben már nincs telomeráz aktivitás. Ezért feltételezik, hogy felnőtt emberi szervezetben a már megszintetizálódott telomer szekvenciák hossza meghatározhatja a szomatikus sejtek további replikációinak azt az elvileg lehetséges maximális számát, amelyekben az információt hordozó kromoszómavégek még nem károsodnak. Ez a feltételezés még további megerősítésre szorul, azonban tény, hogy a szomatikus sejtek rosszindulatú daganatsejtté történő transzformációjakor a telomeráz aktivitás általában ismét megjelenik a sejtben

A sejtciklus szabályozása és a tumorszuppresszor gének által kódolt fehérjék szerepe a sejtciklus szabályozásában

A nukleáris DNS replikációja eukarióta sejtekben az egyes sejtek életének csupán bizonyos szakaszára korlátozódik. A két mitózis közötti, interfázisnak nevezett időszak három szakaszra oszlik. A mitózis után a sejt G1-fázisba kerül, ebben az időszakban szintetizálódik a sejtre jellemző fehérjék többsége. A sejtciklus hosszúságát általában a G1-fázis hosszúsága határozza meg. A G1-fázist követi a DNS replikációjának időszaka, ezt S-fázisnak nevezik. A replikáció befejeztével a (már kétszeres DNS-mennyiséggel rendelkező) sejt felkészül az osztódásra. A DNS replikációja és az osztódás megkezdése közötti időszak a G2-fázis *(3-13. ábra)*. A sejtciklus egyes fázisai csak meghatározott feltételek mellett követhetik egymást, az egyes fázisok egymásba történő átmenetele szigorúan szabályozott. Ha e szabályozásba valami hiba csúszik, kontroll nélkül szaporodó sejtek vagy súlyosan károsodott sejtek jöhetnek létre.

A magasabbrendű, soksejtű szervezetekben a sejtek egy jelentős része nyugvó, nem szaporodó sejt. Ezek a sejtek a G1-fázisból, a G1-fázis speciális változatának tekinthető G0-fázisba jutnak, ahol a differenciáltságuknak megfelelő funkciókat ellátják. G0-fázisban levő, nyugvó sejtek bizonyos esetekben extracelluláris kémiai jelek hatására ismét visszakerülhetnek a G1-be és szaporodó sejtekké válnak. A sejteknek a G0-fázisból a szaporodási ciklusba jutását stimuláló kémiai szignálok a **növekedési faktorok** (és a citokineknek nevezett anyagok közül némelyek). A növekedési faktorok által szolgáltatott jeleket a sejt belseje, majd a DNS felé, sok fehérjéből álló, bonyolult **szignál transzdukciós rendszerek** közvetítik. (Ezek ismertetésére az 5. fejezetben kerül sor.) A polipep-



3-13. ábra. A sejtciklus kontroll pontjai és tumorszuppresszor gének által kódolt fehérjék szerepe a sejtciklus szabályozásában. *(a) Két mitózis (M_I és $_M$II) közötti interfázis szakaszai a kontrollpontokkal, (b) a G2/M átmenetet elősegítő ciklin–protein-kináz komplex (CDK1: ciklin-dependens protein-kináz 1), (c) a G1/S átmenetet elősegítő ciklin–protein kináz komplexek (CDK2: ciklin-dependens protein-kináz 2, CDK4: ciklindependens protein-kináz 4) és az ezek aktivitását gátló fehérjék. A p53-fehérje a p21-fehérje szintézisét elősegítő transzkripciós faktor. Az Rb-fehérje foszforilálatlan formája gátolja a G1/S átmenetet, foszforilált formája nem rendelkezik gátló hatással. A bekeretezett fehérjék tumorszuppresszor gének termékei. (d) az Rb fekérje foszforilációja az E2F transzkripciós faktort felszabadítja az inaktív Rb-E2F komplexből. Az E2F aktiválódása elindítja az S fázist*

tid természetű növekedési faktorokat, illetve az általuk szolgáltatott jeleket közvetítő fehérjék szerkezetét kódoló gének között sok olyan van, amelynek meghibásodása kontrollálatlan sejtszaporodáshoz, rosszindulatú daganat képződéséhez vezethet. Az ép sejtben jelen levő, a növekedés fiziológiás stimulálását szolgáló fehérjéket kódoló géneket, amelyek szerkezetének vagy expressziójának hibája daganatok képződését idézi elő, **protoonkogéneknek** nevezik.

A sejtciklus maga ugyancsak többszörös szabályozás alatt áll. A szabályozás egyik kotrollpontja a G1/S fázis határán, a másik a G2/M határán van. A szabályozásban **ciklineknek** nevezett fehérjék (ezek szintézise és lebontása a sejtciklusnak megfelelően ismétlődik) és a ciklinek által szabályozott, ún. **ciklindependens protein-kinázok** vesznek részt. A G2/M határán működő szabályozási rendszert ismerik részletesebben, amelyért a **ciklin B**-nek nevezett fehérje által aktivált **ciklindependens protein-kináz 1** felelős.

A ciklindependens protein-kináz 1 mennyisége gyakorlatilag azonos a teljes sejtcikluson keresztül, azonban önmagában inaktív. A ciklin B a mitózis közben degradálódik és csak az S-fázisban szintetizálódik ismét. A ciklindependens kináz 1-nek bizonyos oldalláncán (Thr-161) foszforilálódnia kell ahhoz, hogy stabil ciklin-B-protein-kináz komplex jöjjön létre, ez a komplex azonban inaktív az S- és G2-fázisban, mert az enzimnek két másik oldallánca is foszforilálódva van (Thr-14, Tyr-15), ezek foszforilációja akadályozza az ATP kötődését az enzimhez. A G2/M határán e két utóbbi oldallánc defoszforilálódik, ekkor az enzimkomplex aktív lesz. Foszforilálja a H1 hisztonokat, a magmembrán és citoszkeleton fehérjéit, amelyeknek módosulásai segítik elő a mitózist. Az enzimkomplex aktivitását a ciklin B degradációja szünteti meg, a kináz ismét inaktívvá válik. Ennek az enzimnek a szabályozása biztosítja, hogy a mitózis nem kezdődhet meg azelőtt, mielőtt a DNS-replikáció tökéletesen befejeződött volna. A ciklindependens protein-kinázokat foszforiláló és defoszforiláló enzimeket a sejt „órájának" is tekinthetjük.

A G1/S határán történő szabályozás orvosi szempontból még fontosabbnak látszik. Ez az a pont, ahol egy sejt végleg elkötelezi magát a szaporodásra. A Gl/S átmenet szabályozásában a **ciklin D és E**, a **ciklindependens protein-kináz 2** (Cdk2) és a **ciklindependens protein-kináz 4** (Cdk4) vesz részt, ezek elősegítik az átmenetet. (A mechanizmust itt erősen leegyszerűsítve tárgyaljuk, nem minden komponensét ismertetjük). Az S fázis megindulásában egy E2F-nek nevezett transzkripciós faktornak van központi szerepe, ez aktiválja azokat a géneket, amelyek a DNS-replikáció megindulásához szükséges fehérjéket kódolják. Az E2F transzkripciós faktort azonban inaktív komplexben tartja a **retinoblastoma** gén által kódolt retinoblastoma vagy Rb fehérje. Ha a ciklinekkel aktivált Cdk2 és Cdk4 foszforilálja az Rb fehérjét, az Rb fehérje–E2F komplex szétesik, és az így felszabaduló E2F elindíthatja az S fázis programját. Az Rb fehérje foszforilációja tehát egy nagyon fontos regulációs pont a G1-ből S fázisba történő átmenetben. A foszforiláció gátlása a sejtet visszatartja a G1 fázisban addig, amíg a fiziológiás sejtproliferáció körülményei között erre szükség van. Az Rb fehérje foszforilációját gátló legismertebb fehérjék, a molekulatömegük alapján elnevezett **p16** és p21 fehérje. A p21 fehérje mennyiségét transzkripciójának sebessége határozza meg. Azt a transzkripciós faktort, amelyik (többek között) a p21 expresszióját is indukálja p53 fehérjének nevezik (3-13ábra). A sejtciklus szabályozásáról további részletek olvashatók az 5.2. fejezetben.

A retinoblastoma fehérjét, a p16 fehérjét és a p53 fehérjét kódoló gének ún. **tumorszuppresszor gének**. A tumorszuppresszor gének termékei a sejtproliferációt gátolják, ezeknek a géneknek, illetve az általuk kódolt fehérjéknek nem a túlzott aktivitása (mint a protoonkogének esetében), hanem éppen a kiesése vezet daganatsejtek képződéséhez.

A retinoblastoma gén kiesése (mindkét allélen) a retina fejlődésének bizonyos fázisában már önmagában is daganatot hoz létre (innen az elnevezése), más sejttípusokban csak a többi tumorszuppresszor gén kieséséhez hasonlóan, csupán egyike a daganatsejt képződését előidéző több tényezőnek. A p53 gén meghibásodását a humán daganatok közel 50%-ában megfigyelték, míg a p16 fehérjét kódoló gén kiesése a humán tumorok mintegy 70%-ában előfordul.

Az extranukleáris DNS

Eukarióta sejtekben található DNS a magon kívül is, a mitokondriumokban és a növények kloroplasztiszában. A mitokondriális DNS a prokarióta DNS-re emlékeztető cirkuláris forma, a mitokondrium fehérjéinek mintegy 5%-át kódolja (a

többit a nukleáris DNS). Ezenkívül a mitokondriumokban folyó önálló fehérjeszintézishez szükséges riboszóma RNS-ek és tRNS-ek szerkezetéhez szükséges információt is tartalmazza. A mitokondriális DNS a sejtciklustól függetlenül replikálódik és a petesejt citoplazmájából kiindulva **anyai** úton öröklődik. További részleteket lásd a 6.6 fejezetben.

A DNS-szekvencia-vizsgálatok legújabb módszerei, amelyekről egy későbbi fejezetben lesz szó, lehetővé tették a mitokondriális DNS szerkezetének felhasználását antropológiai kutatásokban. (A mitokondriális DNS teljes szekvenciája ismert.) Ezeknek a vizsgálatoknak az alapján alkották meg az „Éva-hipotézist", amelynek feltevése szerint a ma élő egész emberiség egy kb. 200 000 évvel ezelőtt Kelet-Afrikában élő asszonytól származik.

A DNS károsodásainak javítása: repair mechanizmusok

A DNS szerkezetének megőrzése az öröklődés alapja, a DNS azonban sérülékeny vegyület. Sérülését okozhatják ionizáló sugárzások, UV-fény, kémiai hatások. Ezen hatások következtében bázisok változhatnak, elveszhetnek, foszfodiészterkötések elhasadhatnak, a szálakon belül vagy a szálak között keresztkötések jöhetnek létre. Ezek a hibák meglehetős gyakorisággal létre is jönnek. Ha a károsodás egy adott szakaszon a DNS-láncnak csak az egyik szálát érinti, ez a replikáció előtt a legtöbb esetben még javítható, mert az épségben maradt komplementer szál még őrzi az eredeti információt, amely a javítás (repair) mintájául szolgál. Ha a javítás a replikációig nem következik be, a hiba a replikáció során rögzül, az érintett szálat tartalmazó új utód DNS-nek már mindkét láncán megváltozik a DNS bázis-szekvenciája, ilyenkor mutációról beszélünk. A DNS sérüléseit előidéző kémiai anyagok illetve sugárzások mutagén és karcinogén hatásuak.

A repair bizonyos hatásfokkal megy végbe, minél több helyet érint a DNS-t ért károsodás, illetve minél gyakrabban történik károsodás, annál kisebb a valószínűsége annak, hogy a hibák kivétel nélkül javításra kerülnek. Ez az oka annak, hogy a sérüléseket kiváltó tényezők túl nagy dózisa, vagy túl sokszor történő ismétlődése erősen megnöveli a mutációk valószínűségét. A csírasejtek DNS-ét érintő mutációk megváltoztatják a generációról-generációra öröklődő információt. Az állati szervezet egyes szomatikus sejtjeiben létrejövő mutációk egyrészt előidézhetik a sejt életfolyamatainak károsodását, csökkent funkciójú vagy életképtelen sejteket hozhatnak létre, ezek elpusztulnak. Másrészt viszont, a már említett protoonkogéneket és tumorszuppresszor géneket érintő mutációk **kontrollálatlan sejtszaporodáshoz** vezethetnek, az ilyen módon károsodott sejtek nem pusztulnak el, hanem éppen ellenkezőleg, daganatok kiindulásául szolgálnak.

A **p53**-ként ismert tumorszuppresszor gén termékének egyik funkciója éppen a repair elősegítése, a szomatikus mutációk elkerülése. A p53 fehérje aránylag kis mennyiségben fordul elő a sejtekben normál körülmények között, de pl. az UV-fény által okozott DNS-károsodás hatására mennyisége erősen megnövekszik és a sejtciklusnál ismertetett mechanizmus segítségével a sejteket nem engedi S fázisba jutni addig, amíg a repair nem történt meg. Ha viszont a sérülések olyan nagyok voltak, hogy nem javíthatók, elősegíti a sejtek programozott halálát **(apoptózisát)**. Ez magyarázatul szolgál arra, hogy magának a p53 génnek a meghibásodása miért járul hozzá olyan gyakran a további szomatikus mutációk és így tumorok kialakulásához.

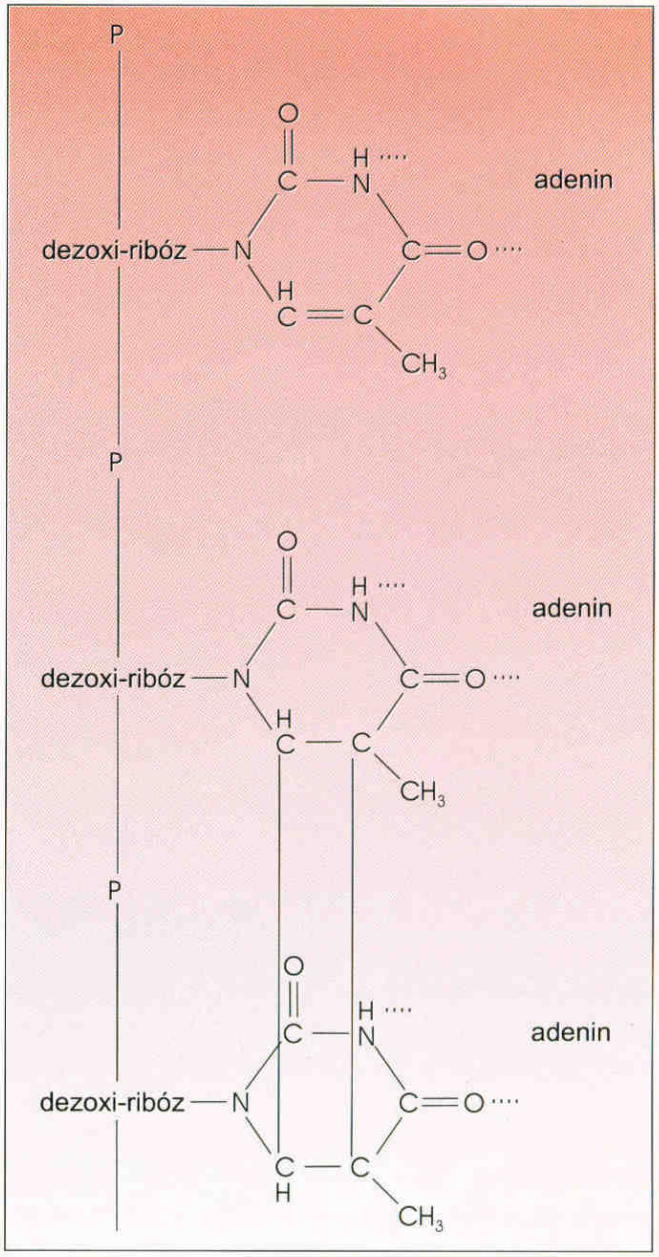
Géntechnikai módszerek segítségével állatok csírasejtjeiben is működésképtelenné lehet tenni egyes géneket, ezt nevezik a gének kiütésének (knock-out). A „knock-out" állatok minden sejtjében károsodik a kérdéses gén. Ez érintheti vagy csak az egyik szülőtől örökölt allélt (heterozigóta), vagy a gén mindkét alléljét (homozigóta). A p53 fehérje károsodott génjét hordozó „knock-out" egerek életképesek, azonban bennük tumorok kialakulása sokkal gyorsabban és nagyobb valószínűséggel megy végbe, mint a kontroll állatokban. Ismeretes olyan örökletes emberi génkárosodás is, amikor az egyén egyik p53 génje normális, a másik allél viszont mutáns. Ezekben az egyénekben a tumorok kialakulása sokkal gyakoribb, mint az átlag népességben.

A leggyakoribb DNS-károsodások közé tartozik a depurinizáció, a bázisok oldalláncainak dezaminációja, timin dimérek képződése, nukleotidok kiesése vagy felesleges nukleotidok beékelődése, a lánctörések, láncok kereszkötései stb. A javítás (repair) folyamatokban specifikus glikozidázok, specifikus endonukleázok, prokariótákban a DNS-polimeráz I, eukariótákban a β-DNS-polimeráz és a DNS-ligáz vesznek részt.

Igen gyakori sérülés az egymás mellett, azonos láncban levő **timinbázisok UV-fény hatására történő dimerizációja.** Az egymás mellett levő timinek 5. és 6. szénatomjai között kovalens kötések alakulnak ki *(3-14. ábra)*. (Citozinok és timin-citozin párok között is kialakulhat a dimerizáció, de timinpárok esetében a leggyakoribb.)

Prokarióta sejtek többféle mechanizmussal rendelkeznek a pirimidin dimérek eltávolítására a DNS-ből. Az egyik mechanizmus, amely kizárólag prokariótákban található, egy fotoaktivált enzim segítségével (dezoxi-pirimidin-fotoliáz) működik. Ez az enzim a látható, kék fény hatására aktiválódik és képes elvágni timinpárok között kialakult kovalens kötéseket.

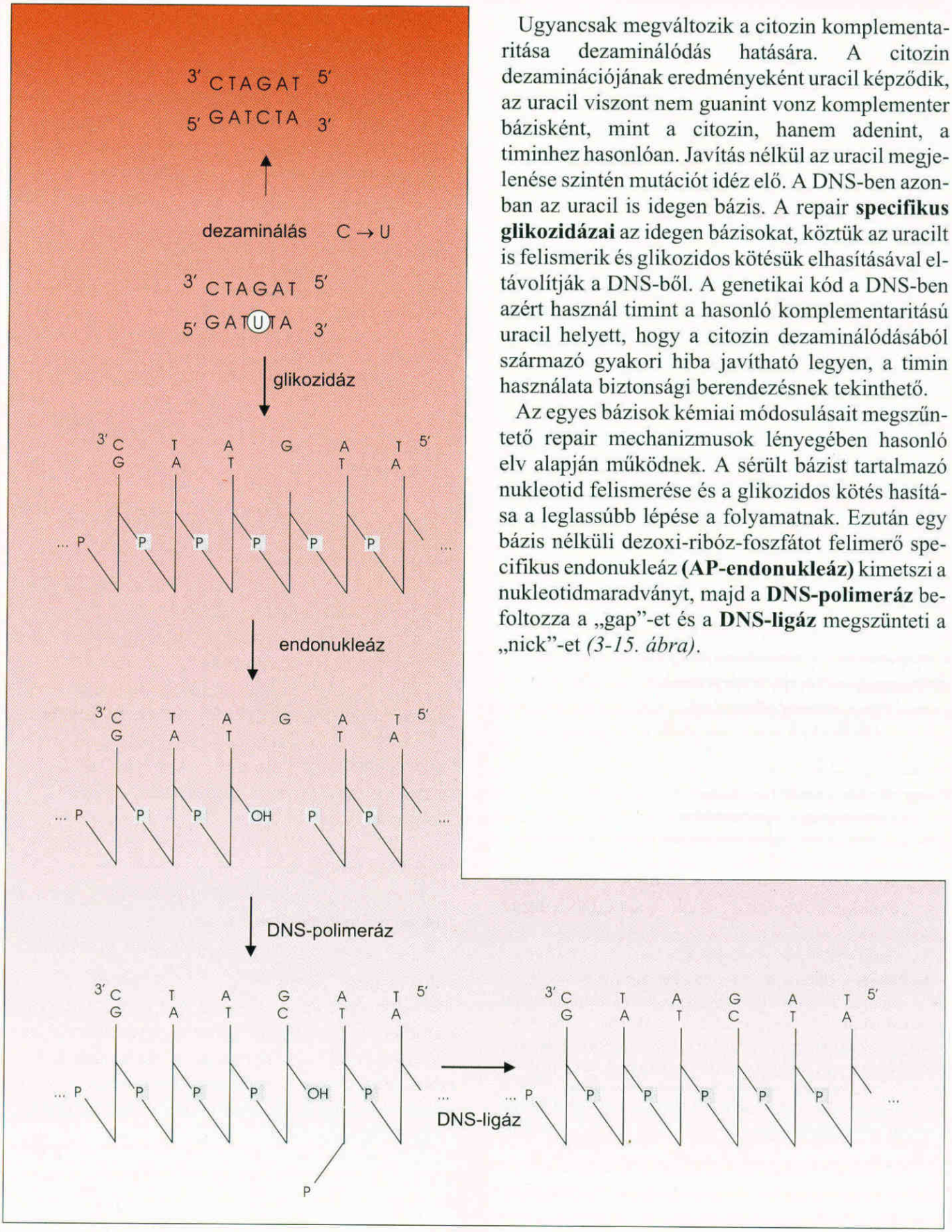
Egy másik mechanizmus gyakorlatilag azonosan működik prokariótákban és eukariótákban. Egy **specifikus endonukleáz** felismeri a kovalensen összekötött bázisokat (feltehetőleg azok terjedelmes szerkezete miatt), és a sérült nukleotid 5'-foszfátját a sérülés előtti nukleotiddal összekötő, illetve a sérült nukleotid 3'OH-ját a sérülés utáni nukleotiddal összekötő foszfodiészterkötéseket elhasítja. Ezáltal a sérült nukleotidokat eltávolítja a DNS-láncból. (A DNS-láncban képződő egy vagy néhány nukleotidnyi hiányt **„gap"**-nek nevezik.) A hiányt a **DNS-polimeráz I (prokariótáknál) vagy a β-DNS-polimeráz** (eukariótáknál) a komplementer láncnak megfelelően "befoltozza", minden lépésnél az újonnan beépített nukleotidok 5'-végén alakítva ki a foszfodiészterkötést. Mikor minden nukleotid a helyére került, az utolsó foszfodiészterkötés hiányzik (**„nick"** van a láncon), ennek a kötésnek a kialakulását a **DNS-ligáz** katalizálja.



3-14. ábra. Timin dimérek

Az UV-fény által okozott módosulásokat felismerő specifikus endonukleáz örökletes hiánya okozza a **xeroderma pigmentosum** nevű betegséget. Ez az UV specifikus endonukleáz valószínűleg nem egyetlen enzim, hanem többtagú enzimkomplex. A komplex valamely tagjának genetikai károsodásával született egyének bőrén a napsugárzás előbb a bőr elváltozásaihoz, majd bőrből kiinduló rosszindulatú daganatok kifejlődéséhez vezet.

A **depurinizáció** ugyancsak gyakori károsodás, savak vagy hő hatására fordul elő (gyakorisága átlagosan 10^4 purinbázis naponta, sejtenként). Ilyenkor az adenin- vagy guanintartalmú bázisok glikozidos kötése hasad el és bázis nélküli dezoxiribóz-foszfát marad vissza a láncban. A **dezaminálódás** bekövetkezhet spontán, ionizáló sugarak, alkiláló szerek stb. hatására. A dezaminálódás a DNS-ben „idegen" bázisok megjelenését eredményezi. Az adenin dezaminálódása hipoxantint, a guanin dezaminálódása xantint eredményez. Az adenin esetében a változás a hidrogéndonor NH_2-csoport helyett hidrogénakceptor oxocsoportot hoz létre és megváltoztatja a nukleotid komplementaritását. Javításnélkül ez a változás mutációhoz vezet.



Ugyancsak megváltozik a citozin komplementaritása dezaminálódás hatására. A citozin dezaminációjának eredményeként uracil képződik, az uracil viszont nem guanint vonz komplementer bázisként, mint a citozin, hanem adenint, a timinhez hasonlóan. Javítás nélkül az uracil megjelenése szintén mutációt idéz elő. A DNS-ben azonban az uracil is idegen bázis. A repair **specifikus glikozidázai** az idegen bázisokat, köztük az uracilt is felismerik és glikozidos kötésük elhasításával eltávolítják a DNS-ből. A genetikai kód a DNS-ben azért használ timint a hasonló komplementaritású uracil helyett, hogy a citozin dezaminálódásából származó gyakori hiba javítható legyen, a timin használata biztonsági berendezésnek tekinthető.

Az egyes bázisok kémiai módosulásait megszűntető repair mechanizmusok lényegében hasonló elv alapján működnek. A sérült bázist tartalmazó nukleotid felismerése és a glikozidos kötés hasítása a leglassúbb lépése a folyamatnak. Ezután egy bázis nélküli dezoxi-ribóz-foszfátot felimerő specifikus endonukleáz **(AP-endonukleáz)** kimetszi a nukleotidmaradványt, majd a **DNS-polimeráz** befoltozza a „gap"-et és a **DNS-ligáz** megszünteti a „nick"-et *(3-15. ábra)*.

3-15. ábra. Repair enzimek szerepe

DNS-polimeráz esetleges tévedésének (rossz bázispárok kialakulásának) az utólagos javítása a **„mismatch repair"**. Dacára a DNS-szintézis nagyfokú hűségének, amelyet a 3'-5' korrekciós exonukleáz aktivitás jelentősen fokoz, mégis előfordul, hogy a replikáció során nem a megfelelő bázist tartalmazó nukleotid épül be. (Egy lehetséges oka a rossz párosodásnak a bázisok átmenetileg előforduló enol-tautomér formája, lásd később.) A korrekt bázispárosodás hiányát a repair mechanizmus érzékeli ugyan, azonban információt kell kapnia arról is, hogy a rosszul illeszkedő két bázis közül melyik a hibás és melyik a jó. Ez az információ a replikációt követő rövid időszakban (néhány másodpercig vagy néhány percig) még rendelkezésre áll. Az ép lánc felismeréséhez a DNS metilációja nyújt segítséget. A szülői DNS-lánc bizonyos specifikus nukleotidszekvenciáknál – ez az E. coli baktériumban például minden GATC szekvenciában előforduló adenin – metilálva van, a metiláció az újonnan szintetizálódott szálon csak pár perc késéssel történik meg.

Ameddig az új lánc nincs metilálva, egy specifikus enzimekből álló enzimrendszer felismeri a rosszul illeszkedő nukleotidpárt és például E. coli-ban a legközelebbi még nem metilált GATC szekvenciánál elmetszi az új láncot. A hibát is tartalmazó hosszú (E. coliban kb. 1000 nukleotid hosszuságú) láncdarabok kimetszése és az így keletkező hiány szülői lánc alapján történő pótlása a „mismatch repair". Ez a fajta javítás, a hosszú darabok pótlása miatt nagyon költséges a sejt számára. Éppen ennek a pazarlónak tűnő mechanizmusnak a fenntartása mutatja, hogy mennyire fontos a DNS-replikáció folyamán előforduló esetleges hibák javítása.

A humán „mismatch repair" enzimeinek a genetikai károsodását, rossz funkcióját tartják felelősnek az öröklődő vastagbélrák (HNPCC) iránti hajlam kialakulásáért.

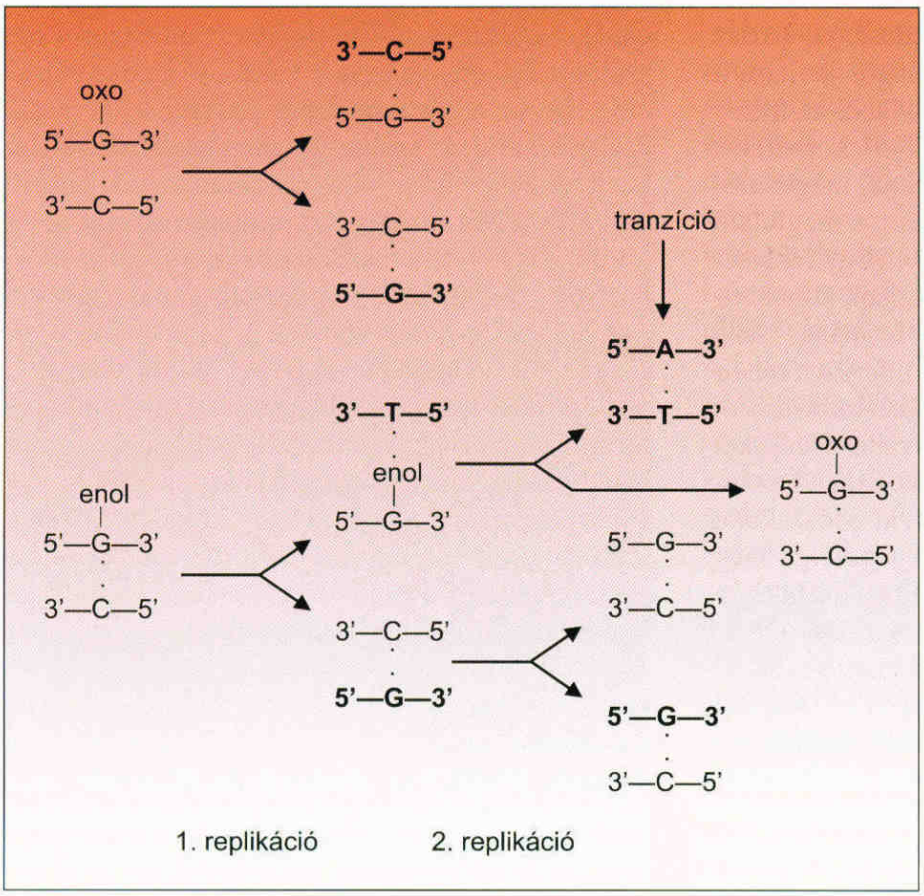
Mutációk

Ha a DNS sérüléseit a repair enzimek nem javítják ki a replikáció előtt, vagy a hiba a replikáció közben történik, megváltozik a DNS mindkét láncának bázisszekvenciája. Ilyenkor mutációról beszélünk. Egyetlen bázispár változása a pont- mutáció. Ha az eredeti bázispár helyére egy másik bázispár kerül, ez szubsztitució. A szubsztitúció lehet **tranzíció**, ha a változás során egyik pirimidinbázis helyét a másik pirimidinbázis, vagy egyik purinbázis helyét a másik purinbázis foglalja el. A bázisok dezaminálása tranzíciót idéz elő. A tranzíció előfordulhat spontán is (minden külső károsító tényező nélkül).

A spontán tranzíció előfordulási valószínűsége kicsi, azonban mégis előfordul (különböző fajokban 10^{-8}–10^{-10} bázispár/replikációra becsülik, egy 10^{9} bázispárból álló DNS minden tizedik replikációja során egyszer előfordul. Az evolúció során ennek a mutációs hányadosnak komoly jelentősége van.) Oka a bázisok enol-oxo tautomériája. A DNS-ben az oxoforma fordul elő és a komplementer bázisok közötti hidrogénhídkötések kialakításában az oxocsoport hidrogénakceptor szerepet játszik. Az enolos hidroxilcsoport nem hidrogén-akceptorként, hanem hidrogéndonorként szerepel, ezért az enolformában levő bázisnak más a komplementaritása, mint az oxoformában levőnek. Ha a replikáció pillanatában a mintául szolgáló láncon például egy guanin enolalakban van, ennek komplementereként a DNS-polimeráz nem citozint, hanem timint fog beépíteni. A DNS-polimeráz továbbhaladása után a mintául szolgáló guanin már hiába változik vissza oxoformába, az új láncon citozin helyett ott van a timin. A hibát a „mismatch repair" még kijavíthatja. Amennyiben azonban ez nem történik meg, az új láncot ért változás a következő replikáció során rögzül és véglegessé válik a guanin–citozin helyett timin–adenin tranzíció *(3-16. ábra)*. Az enolforma megjelenésének valószínűségét az ionizációs sugárzások fokozzák.

A **transzverziós** jellegű szubsztitúció, amikor egy pirimidin helyén egy purin van (vagy fordítva) a DNS-ben, a DNS-polimeráz hibás működéséből ered.

A szubsztitúciós mutációk mellett léteznek olyan pontmutációk is, amelyeket egy-egy nukleotid kiesése **(deléció)** vagy egy-egy nukleotidtöbblet beépülése **(inzerció)** hoz létre. Ha a deléció vagy inzerció a DNS-fehérjéket kódoló szakaszain történik, **kereteltolódással** járó (frame-shift) mutációkról beszélünk *(3-17. ábra)*.



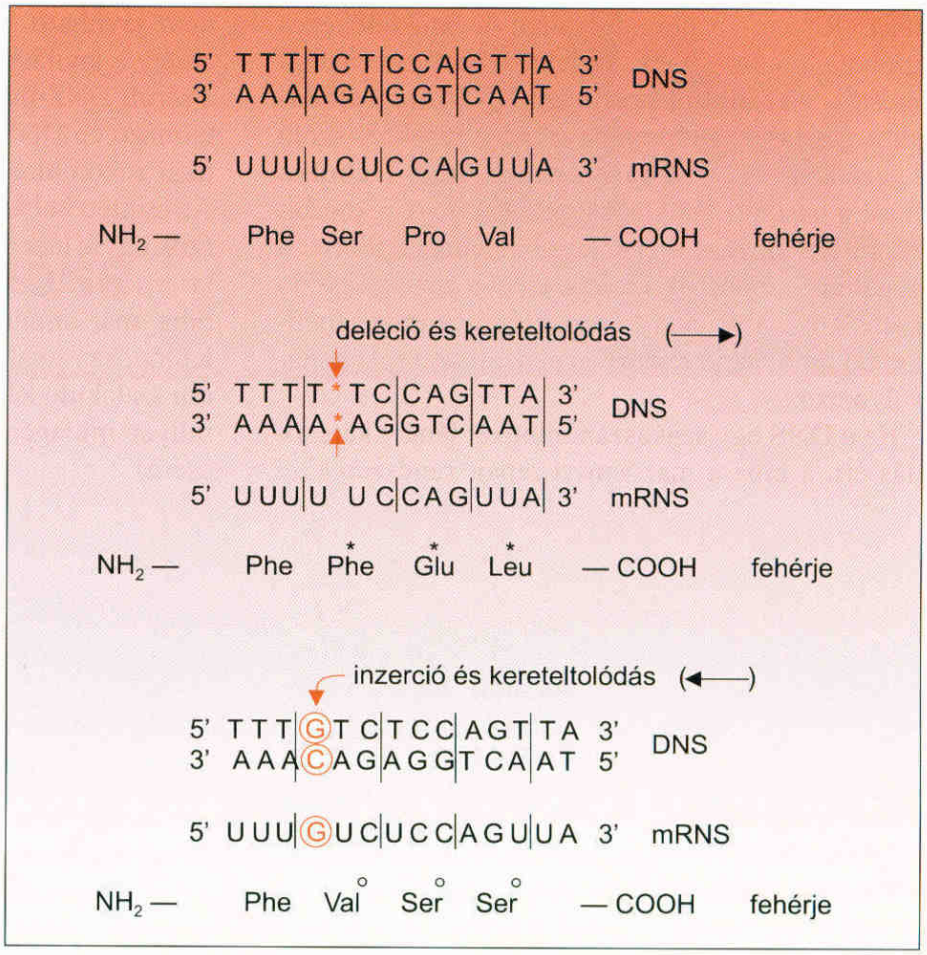
3-16. ábra. A G-C → T-A spontán tranzíció mechanizmusa

A genetikai kód tulajdonságainak ismertetésére a fehérjeszintézisről szóló fejezetben kerül sor. A kereteltolódás megértéséhez csupán a genetikai kód azon tulajdonságát kell figyelembe venni, hogy három egymás mellett levő nukleotid (kodon) kódol egy aminosavat és a kodonok folyamatosan, közbeiktatott nukleotid nélkül ("vesszőmentesen") követik egymást. Ha egy n számú kodont tartalmazó sorból kiesik egy nukleotid, ez a mutáció helyétől kezdődően eltolja a trinukleotidok kereteit és ezért a mutációtól disztálisan minden kodon megváltozik. Ugyanez történik akkor is, ha egy számfeletti nukleotid beépülése okozza a trinukleotidok kereteinek elcsúszását.

Deléciót idézhet elő a depurinizáció, mert az ilyen sérülést tartalmazó mintáról történő szintéziskor a depurinizáció helyén a DNS-polimeráz egy nukleotidot nem épít be az új szálba. Inzerciót okozhatnak bizonyos aromás gyűrűs molekulák (pl. akridin festékek). Ezek beékelődnek a DNS szomszédos bázispárjai közé (interkaláció) és megzavarják a DNS-polimeráz működését, amely ezeken a helyeken egy számfeletti nukleotidot épít be az új láncba.

Napjainkban rengeteg kémiai anyagot használunk gyógyszerként, élelmiszer-ipari adalékanyagként, kozmetikai- és háztartási szerként, mezőgazdaságban gyomírtóként stb. amelyek szervezetünkbe kerülnek. Ezért még akkor is, ha ezen anyagoknak rövid idő alatt nincs egészségkárosító hatása, tudnunk kell, hogy nincs-e genetikai károsodást előidéző vagy karcinogén hatása. A prokarióta sejtekben könnyen kimutatható mutagén hatás és a karcinogén hatás között szoros az összefüggés. A mutagén hatás kimutatásának az egyik legegyszerűbb módja az **Ames-próba**.

Az Ames-próba az ún. szuppresszor mutáció jelenségén alapul. Szuppresszor mutációnak nevezzük azt a második mutációt, amelyik az első mutáció által okozott genetikai változás megnyilvánulását megszűnteti. A második mutáció szuppresszor hatásának a mechanizmusa igen sokféle lehet, történhet az első mutációval érintett génben vagy azon kívül. Az Ames-tesztben használt (Salmonellák közé tartozó) laboratóriumi baktériumtörzs egy genetikailag pontosan feltérképezett mutáció következtében elvesztette azt a képességét, hogy hisztidint tudjon előállítani, ún. hisz-



3-17. ábra. Kereteltolódással járó mutációk

tidinhiányos mutáns. Ez a baktérium csak akkor növekszik, ha táptalajában hisztidin van. Mutagén anyag hatására igen sok és sokféle mutáció alakul ki, ezek között lehet olyan szuppresszor mutáció is, amelynek következtében a baktérium ismét képes lesz hisztidint előállítani és kívülről adott hisztidin nélkül szaporodni. (A használt baktériumtörzs repair rendszere szándékosan tönkre van téve, hogy a mutagén anyag által okozott DNS-változás ne kerüljön javításra, és a baktérium felszínéről hiányzik a lipopoliszaharid réteg, hogy a vizsgált anyag könnyebben bejusson a baktériumba.) Az Ames-próba lényege annak vizsgálata, hogy egy kérdéses anyag hatására 10^9 hisztidinhiányos baktériumból hány alakul át hisztidint termelni képes baktériummá, azaz hány baktérium lesz képes szaporodni hisztidin nélkül.

A szervezetünkbe kerülő anyagok egy része eredeti formájában nem karcinogén, azonban a máj biotranszformációs enzimeinek a hatására átalakulhat mutagén hatásúvá. Ezért az Ames-próbában használt anyagok indukált citokróm P450 rendszert tartalmazó májkivonattal történt kezelése után is megvizsgálják azok mutagén hatását.

Rekombináció

Rekombinációnak nevezzük egy új DNS-molekula képződését különböző eredetű DNS-darabokból. E tág meghatározáson belül az **általános genetikai rekombináció** a homológ DNS-szakaszok cseréjét jelenti két kettős szálú szülői DNS között, ennek létrehozásában speciális enzimrendszerek vesznek részt. A rekombináció fogalomkörébe tartozó más folyamatok nem homológ DNS-szakaszokat érintenek. Ez utóbbiak közé tartozik pl. a **transzpozíció**, azaz egy gén mozgása egyik DNS-molekuláról a másikra, vagy ugyanazon kromoszóma egyik helyéről a másikra (a transzpozonoknak nevezett mobil genetikai elemeket a bakteriális plazmidok ismertetésekor említet-

tük). Rekombinációs folyamat a működőképes immunglobulin gének kialakulásának mechanizmusa, a **vírusokból származó DNS integrálódása** a gazdasejt genomjába (lásd vírusokról szóló fejezetben) és a **laboratóriumi DNS-technika** (lásd a hasonló című alfejezetben) is. A rekombináció létrehozhat új génkombinációkat, illetve a génátrendeződésnek szerepe lehet a génexpresszió szabályozásában is. Itt csupán az általános genetikai rekombináció repairben játszott szerepét hangsúlyozzuk.

Ha a DNS egy szakaszán mindkét láncot károsodás éri, a hiba a már ismert repair rendszerekkel nem javítható, mert nincs olyan ép szülői lánc, amely a javításhoz mintaként szolgálhat. Ilyenkor a sérült DNS-molekula és a homológ szakaszt tartalmazó ép DNS-molekula közötti általános genetikai rekombináció lehetőséget teremt a repairre. Az érintett helyet tartalmazó homológ DNS-szakaszok egyik láncának cseréje egy ép láncdarabot juttat a sérült DNS-be, és így az ép láncok alapján a hiba már mindkét DNS-molekulában javítható. Különösen gyakori ez a folyamat a replikáció során kialakuló két azonos kromatid között, ha valamilyen mutagén hatás éri a sejtet (testvérkromatid csere).

3.2.

RNS: transzkripció és szabályozása

Faragó Anna

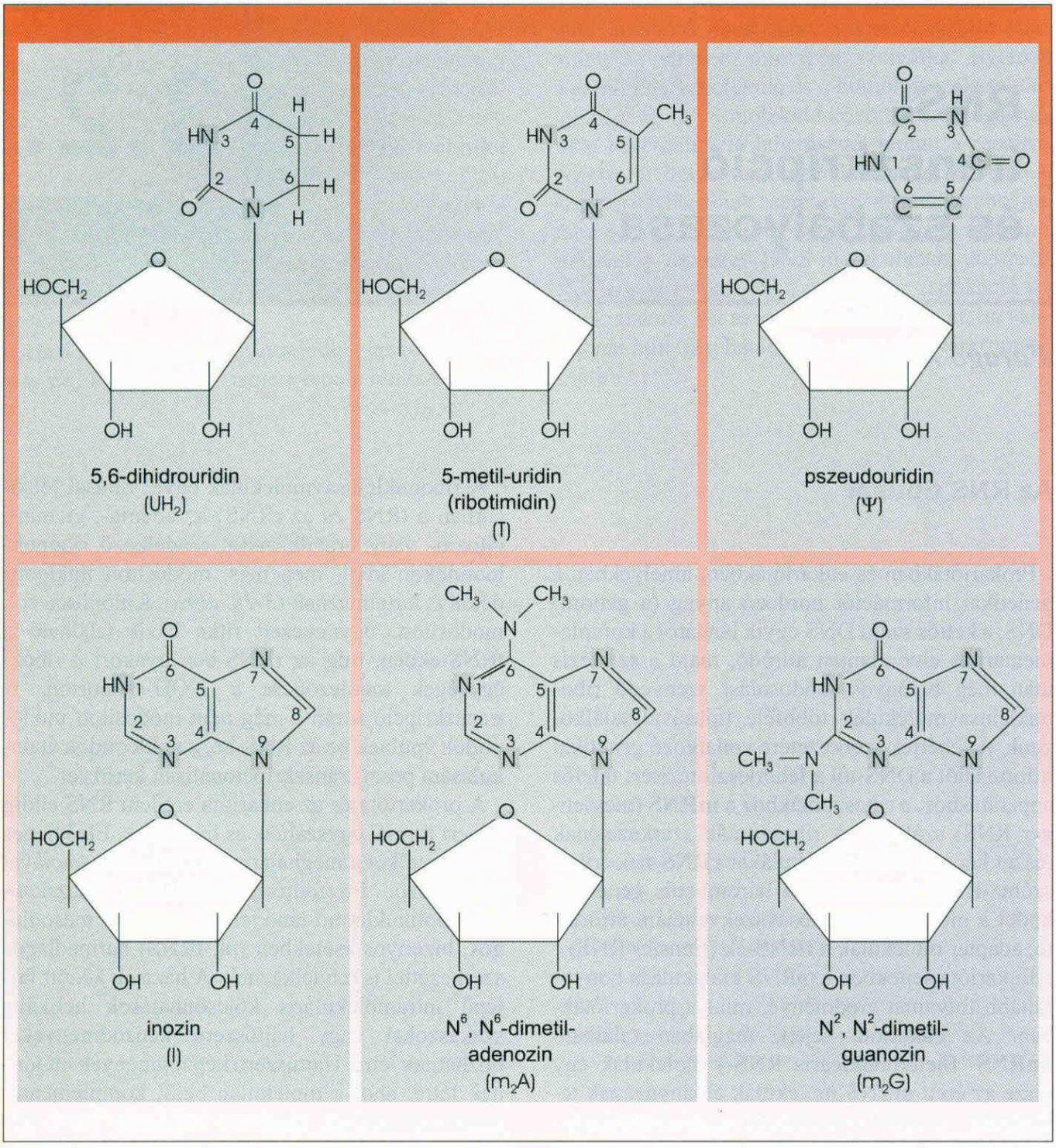
Az RNS típusai

Prokariótákban és eukariótákban, amelyekben a genetikai információt hordozó anyag (a genom) DNS, a kettős szálú DNS egyik láncáról a komplementaritás elve alapján átíródó, majd a szintézis után még bizonyos módosulást szenvedő ribonukleinsavmolekulák többféle típusával találkozunk. A fehérjék szerkezetére vonatkozó genetikai információt a DNS-től a fehérjeszintézisért felelős apparátushoz, a riboszomákhoz a **mRNS** (messenger RNS) szállítja. A riboszomák szerkezetének részét képező RNS-molekulákat **rRNS**-nek (riboszóma-RNS) nevezik és a hárombetűs genetikai kódot a megfelelő aminosavszekvenciára átfordító, adapter molekulák a **tRNS**-ek (transfer RNS).

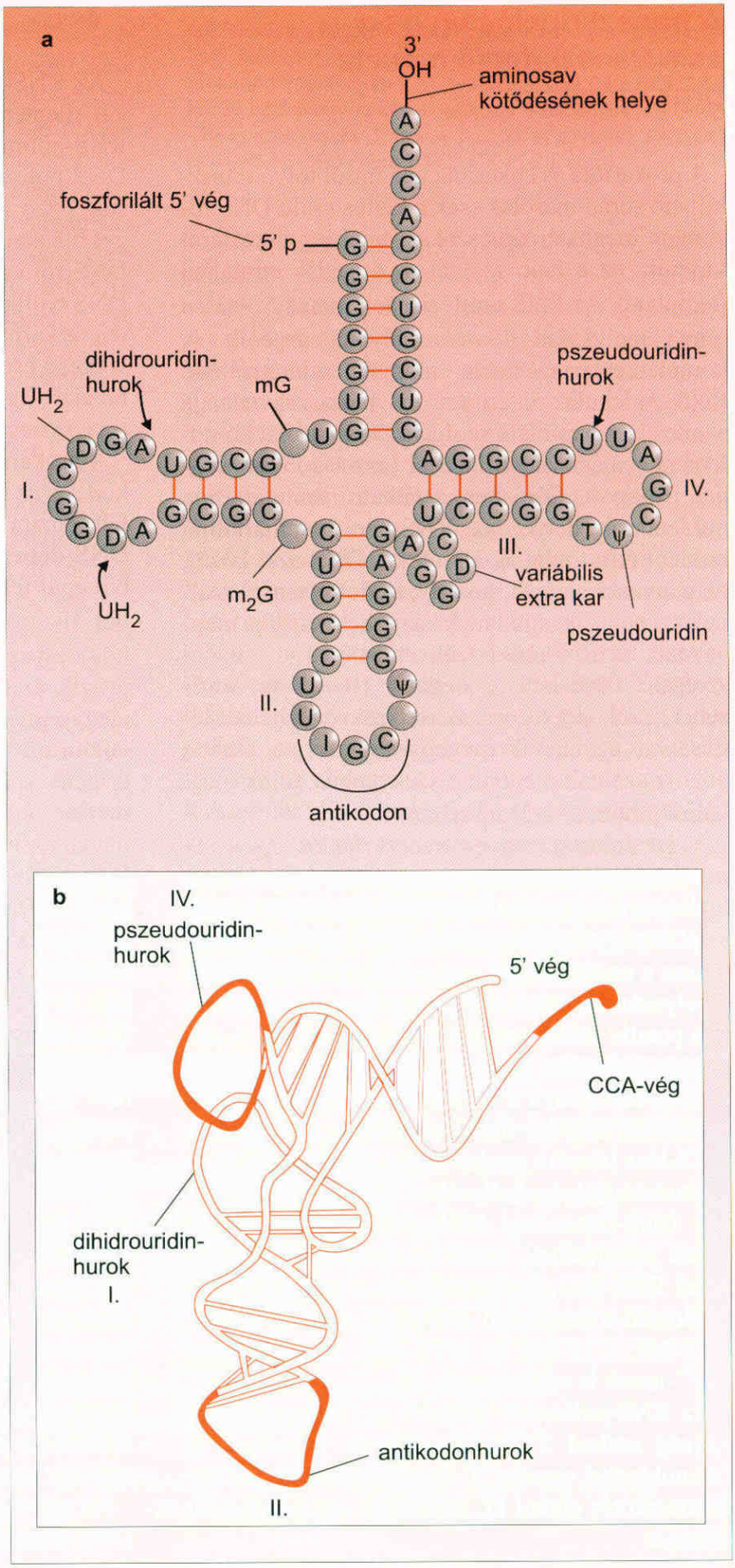
Eukarióta sejtekben a mRNS kialakulása bonyolultabb folyamat eredménye, mint a prokariótákban. Az eukarióta sejtek magjában található **hnRNS**- (heteronukleáris RNS-) molekulák egy része az érett mRNS-molekulák előanyagának tekinthető. Az **snRNS**-molekulák (kisméretű nukleáris RNS) az eukarióta mRNS érésében játszanak szerepet, az **scRNS**-molekulák (kisméretű citoplazmai RNS) a szekretálódó fehérjéket szintetizáló riboszómákat irányítják az endoplazmás retikulumhoz. A citoplazmai sejtorganellumokban (állati sejtekben a **mitokondriumokban**) levő DNS speciális, **a nukleáris eredetűtől eltérő rRNS**-eket és **tRNS**-eket kódol, melyek az organellumon belül lezajló fehérjeszintézis komponensei.

A ribonukleinsavmolekulák egyes típusai (elsősorban a tRNS és az rRNS) az adenin-, guanin-, citozin- vagy uracilbázissal rendelkező ribonukleotidokon kívül még más, módosított nukleotidokat is tartalmaznak *(3-18. ábra)*. Különösen sok módosított, úgynevezett ritka bázis található a tRNS-ekben, míg az rRNS-ben gyakori a ribózegységek metileződése a 2'OH-csoporton. A transzkripció során a még nem módosított nukleotidok épülnek be az RNS-be, a nukleotidok átalakulására poszt-transzkripcionálisan kerül sor.

A prokarióta és az eukarióta eredetű RNS eddig ismert formái egyszálúak és lineárisak. Elsődleges szerkezetüket a meghatározott bázisszekvenciával rendelkező, foszfodiészterkötésekkel összekapcsolt polinukleotid-lánc jelenti, ezen túl másodlagos, bizonyos esetekben (pl. tRNS) harmadlagos szerkezettel is rendelkeznek. A bázisok között fellépő intramolekuláris kölcsönhatások helikális szakaszokat vagy hajtűszerű képződményeket hozhatnak létre. Hajtűszerű képződmények ott jönnek létre, ahol a molekulán belül komplementer bázisszekvenciájú szakaszok találhatók. Ezek egymással a bázispárosodásnak megfelelően hidrogénhidakat képezve, rövidebb-hosszabb kettős hélix szerkezetet alkotnak, melynek egyik végén a nem komplementer bázisokat tartalmazó nukleotidok gyakran hurkot formálnak. A nem komplementer szakaszokon kialakuló helikális szerkezetet az adenin-, guanin- és citozinbázisok közötti, nem hidrogénhidakból álló kölcsönhatások hozzák létre *(3-19. ábra)*.



3-18. ábra. Módosított bázisokat tartalmazó nukleozidok



3-19. ábra. Az élesztősejtből izolált $tRNS^{Ala}$ bázisszekvenciája (a) és térbeli szerkezete (b)

A transzkripciós egység és a transzkripció menete prokariótában

A prokarióta és eukarióta genomról folyó transzkripció során másolás csak a kettős szálú DNS bizonyos, meghatározott szakaszainak egyik száláról történik, ez a lánc szolgál az átíródás mintájául (template). Az RNS szintézisének iránya 5'→3', a minta leolvasása 3'→5' irányban történik. A komplementaritás elve alapján szintetizálódó RNS-molekula polaritása és bázisszekvenciája azonos lesz a mintául szolgáló DNS-szállal komplementer másik DNS-lánccal (azzal a különbséggel, hogy a DNS-ben található timintartalmú nukleotidok helyét az RNS-ben uraciltartalmú nukleotidok foglalják el). A két DNS-szál közül, megegyezés alapján, **pozitív, kódoló (sense)** szálnak azt nevezik, amelynek bázisszekvenciája megegyezik az RNS bázisszekvenciájával, a mintául szolgáló DNS-lánc a **negatív (template, antisense)** szál. (Egy génszakasz szekvenciájának leírásakor, ugyancsak megegyezés szerint, csak a pozitív szálnak megfelelő szekvenciát adjuk meg, balról jobbra 5'→3' irányban).

A genomon az egyes transzkripciós egységek orientációja különbözhet egymástól. Míg a DNS bizonyos szakaszán elhelyezkedő egyik transzkripciós egység számára az egyik DNS-szál tartalmazza a pozitív szálat, egy másik DNS-szakaszon elhelyezkedő, másik transzkripciós egység számára a pozitív szálat a másik DNS-lánc jelenti. A cirkuláris prokarióta genomon az óramutató járásával megegyező irányú a transzkripció a genom egyik szakaszán, míg egy másik szakaszon, ahol a másik DNS-lánc jelenti a pozitív szálat, a transzkripció az óramutató járásával ellentétes irányban folyik.

A DNS-dependens RNS-polimerázok a DNS-minta jelenlétében, azzal komplementer, antiparallel RNS-láncot szintetizálnak a négyféle ribonukleozid-trifoszfátból (NTP-ből, azaz ATP-ből, GTP-ből, CTP-ből és UTP-ből). A reakcióhoz Mg^{2+}-ionok is szükségesek.

Az RNS-polimeráz hatására egy ribonukleotid-egység szabad 3'OH-csoportja és a belépő, új ribonukleotid egység 5'-foszfátja között foszfodiészterkötés alakul ki, miközben egy pirofoszfát lehasad:

$$RNS_{(n\ nukleotidegység)} + NTP \rightarrow RNS_{(n+1\ nukleotidegység)} + PP_i$$

Az RNS-polimerázoknak, a DNS-polimerázokkal ellentétben, nincs szükségük indító láncra. Az RNS-polimerázok abban is eltérnek a prokarióta DNS-polimerázoktól, hogy nincs nukleáz aktivitásuk, ezért a szintézis közben bekövetkező esetleges hibákat nem képesek javítani. Az RNS átírása a DNS-ről ezért nem történik annyira hűen, mint a DNS replikációja, viszont ez nem is okoz olyan jelentős károsodást, mint a DNS szintézisében bekövetkező esetleges hiba, hiszen egy RNS-molekula hibáját egy következő RNS-molekula helyes transzkripciója hatástalanítja.

A prokarióta RNS-polimeráz szerkezetét és működését az Escherichia coli nevű baktériumból izolált enzim vizsgálatából ismerjük. Az E. coli **DNS-dependens RNS-polimeráz** több alegységből épül fel. Az ún. **„core" enzim** négy alegységből áll, $\alpha_2\beta\beta'$ szerkezetű, a β' a DNS-hez való kötődésben, a β a nukleozid-trifoszfátok kötésében játszik szerepet. A „core" enzimet egy szigma-alegységnek nevezett fehérje egészíti ki **holoenzimmé**. A **szigma- alegység** feladata a transzkripció specifikus iniciációs helyének a felismerése a DNS-en. A transzkripció specifikus iniciációs helyét tartalmazó DNS-szakaszt **promoternek** nevezik. A szigma-alegység felelős azért, hogy az RNS-polimeráz a promoterszakaszon kötődjék a DNS-hez és a megfelelő helyen kezdje el a másolást, csak az egyik láncról és csak egy irányban. A szigma-alegység a promoteren levő specifikus bázisszekvenciát ismeri fel.

A prokarióta genom minden transzkripcióra kerülő egysége egy promoter régióval kezdődik (a pozitív DNS-szálat véve alapul, a promoter a transzkripciós egységek 5'-végén található). A promoter régió nem kódol fehérjét hanem a DNS-dependens RNS-polimeráz bekötődésének helyét tartalmazza, és ezen kívül elhelyezkedhetnek rajta még más specifikus bázisszekvenciák is, amelyekhez olyan fehérjék kötődnek, amelyek a transzkripciós egység átíródásának a sebességét befolyásolják. A promoter régiót követik a transzkripciós egységen a **struktúr gének**. Struktúr géneknek nevezzük a genom azon szakaszait, melyek egy-egy adott polipeptidláncot kódolnak.

Az egy-egy polipeptidlánc szintéziséért felelős DNS-szakaszok szerkezete a prokarióta genomban

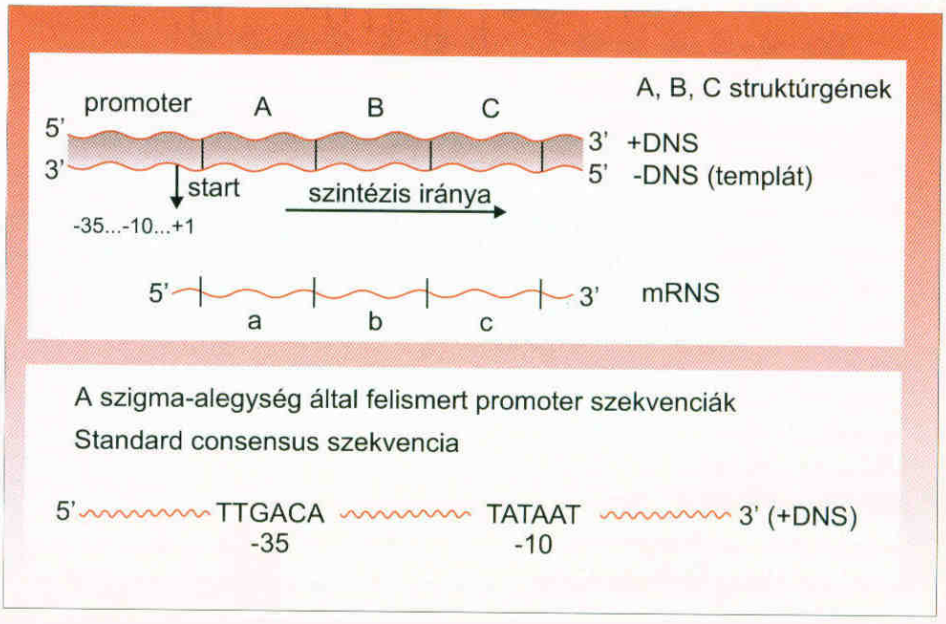
folytonos, ezeket **cisztronoknak** is szokták nevezni. A prokarióta genomban egy-egy polipeptidlánc struktúr génjéből (cisztronjából) csak egy található. Jellegzetes prokarióta sajátosság – eukariótában nem fordul elő – a policisztronos transzkripciós egység. Ez azt jelenti, hogy prokariótákban gyakran egyetlen promotertől kiindulva, folyamatosan kerül transzkripcióra egy több polipeptidlánc szerkezetét kódoló mRNS **(policisztronos mRNS)**. (Prokariótákban gyakran, de nem mindig, egy-egy azonos anyagcsereúthoz tartozó több vagy összes enzimet egy-egy hosszú, policisztronos mRNS kódol).

A különböző transzkripciós egységeket irányító promotereken az RNS-polimeráz bekötődésére szolgáló szekvenciák hasonlítanak egymásra (hasonlítanak az ún. „consensus"-szekvenciához), de nem teljesen azonosak egymással *(3-20. ábra)*. Azokat a promotereket, amelyeknek szekvenciája megegyezik a „consensus" szekvenciával, **erős promotereknek**, amelyeknél e szekvenciákban előfordulnak kisebb-nagyobb eltérések, **gyengébb promotereknek** nevezik, az eltérés mértéke szerint.

A promoter régió nem átíródó szakaszát követő, átíródó szakasza sem kódol még polipeptidláncot, a mRNS 5'-végén ezért a struktúrgénekről átíródó szekvencia előtt, egy néhány nukleotidból álló nem kódoló szakasz található. Az első átíródó nukleotidnak megfelelő nukleotidot szokták +1-gyel jelölni, ez a transzkripció startpontja. A startponttól felfelé (a transzkripciós egység +DNS szálának 5'-vége felé) levő nukleotidokat negatív számokkal, a startponttól lefelé található nukleotidokat pozitív számokkal szokták jelölni. A prokarióta promoteren a +1-es nukleotidtól felfelé kb. 10 és kb. 35 bázispárnyira két „consensus" szekvencia található, a **–10-es szekvencia** (Pribnow boxnak is nevezik) **TA**TAA**T** és a **–35-ös szekvencia TTG**ACA (3-20. ábra).

A promoter erős vagy gyenge karaktere már önmagában is meghatározhatja az általa irányított struktúrgénekről folyó transzkripció sebességét. Az erős promoterek iránt az RNS-polimeráz szigma-alegysége nagyobb affinitást mutat, mint a gyenge promoterek iránt, gyakrabban bekötődik ezekhez a promoterekhez az RNS-polimeráz, mint a gyengébbekhez, ezért időegység alatt több mRNS szintetizálódik az erős promoterekkel rendelkező transzkripciós egységekről, mint a gyengébb promoterek irányítása alatt állókról. Ha kizárólag a promoter gyenge vagy erős karaktere befolyásolja az RNS-polimeráz bekötődését és az RNS-szintézis sebességét, **konstitutív** mRNS-szintézisről (és azt követően konstitutív fehérjeszintézisről) beszélünk. A konstitutív szintézis azt jelenti, hogy a prokarióta sejt életciklusa alatt az illető mRNS (fehérje) egyenletes sebességgel szintetizálódik. Konstitutív erős promoterrel rendelkező struktúrgén egyenletes ütemben sok fehérjemolekula szintézisét, a konstitutív gyenge promoterrel rendelkező struktúrgén egyenletes ütemben szintetizálódó, kevés fehérjemolekula képződését teszi lehetővé.

3-20. ábra. A prokarióta promoter



Az Escherichia coli baktériumban találtak olyan transzkripciós egységet is (ún. hőshock fehérjék génjeinél), amelyek promoterei más fajta szekvenciákat tartalmaznak. Ezen gének transzkripciójához az E. coli baktérium egy másik szigma-faktort is tartalmaz.

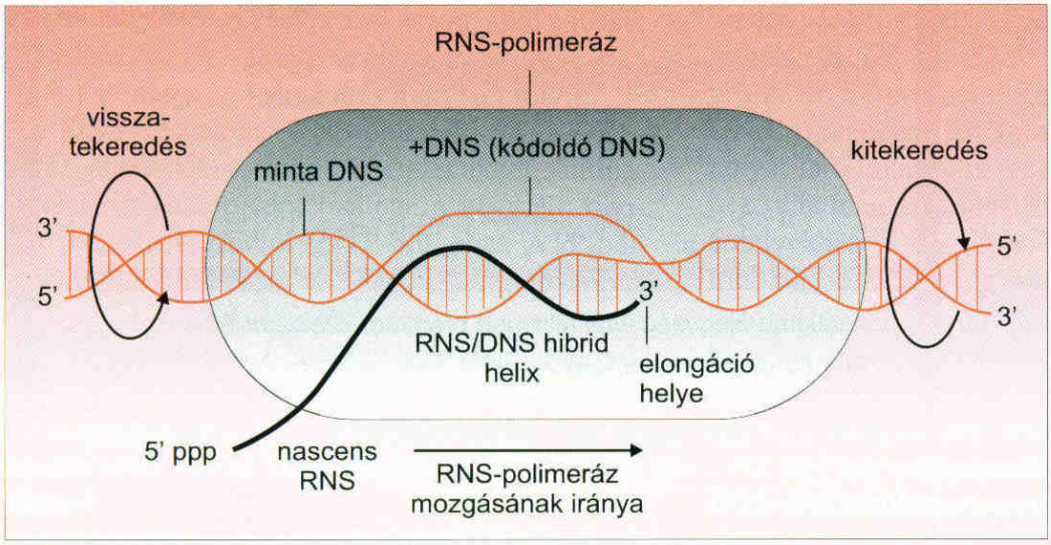
A transzkripció a transzkripciós egység 5'-végén, az RNS-polimeráz promoteren történő bekötődésével és a transzkripció iniciációjával kezdődik, az elongációval folytatódik, s a transzkripciós egység átírása után, annak 3'-végén terminálódik.

Az **iniciáció** első lépése, az RNS-polimeráz holoenzim bekötődése a promoterhez, egy zárt promoter komplexet eredményez. Ennek átalakulása hozza létre a nyitott promoter komplexet, melyben a DNS kettőslánc széttekeredik egy rövid szakaszon. A széttekeredés szükséges ahhoz, hogy a mintaszálról a komplementer RNS-lánc szintézise megindulhasson. Az újonnan szintetizálódó RNS-be belépő első nukleotid általában purinbázist tartalmaz, az RNS 5'-végi nukleotidja vagy pppA vagy pppG. Az iniciáció befejezését az első, láncvégi nukleozid-trifoszfát 3'OH-ja és a belépő második nukleotid 5'OH-ját észteresítő foszfát közti foszfodiészterkötés kialakulása jelenti. Ezután a szigma-faktor disszociál a komplextől, s a transzkripció elongációját az RNS-polimeráz „core"-enzim folytatja tovább.

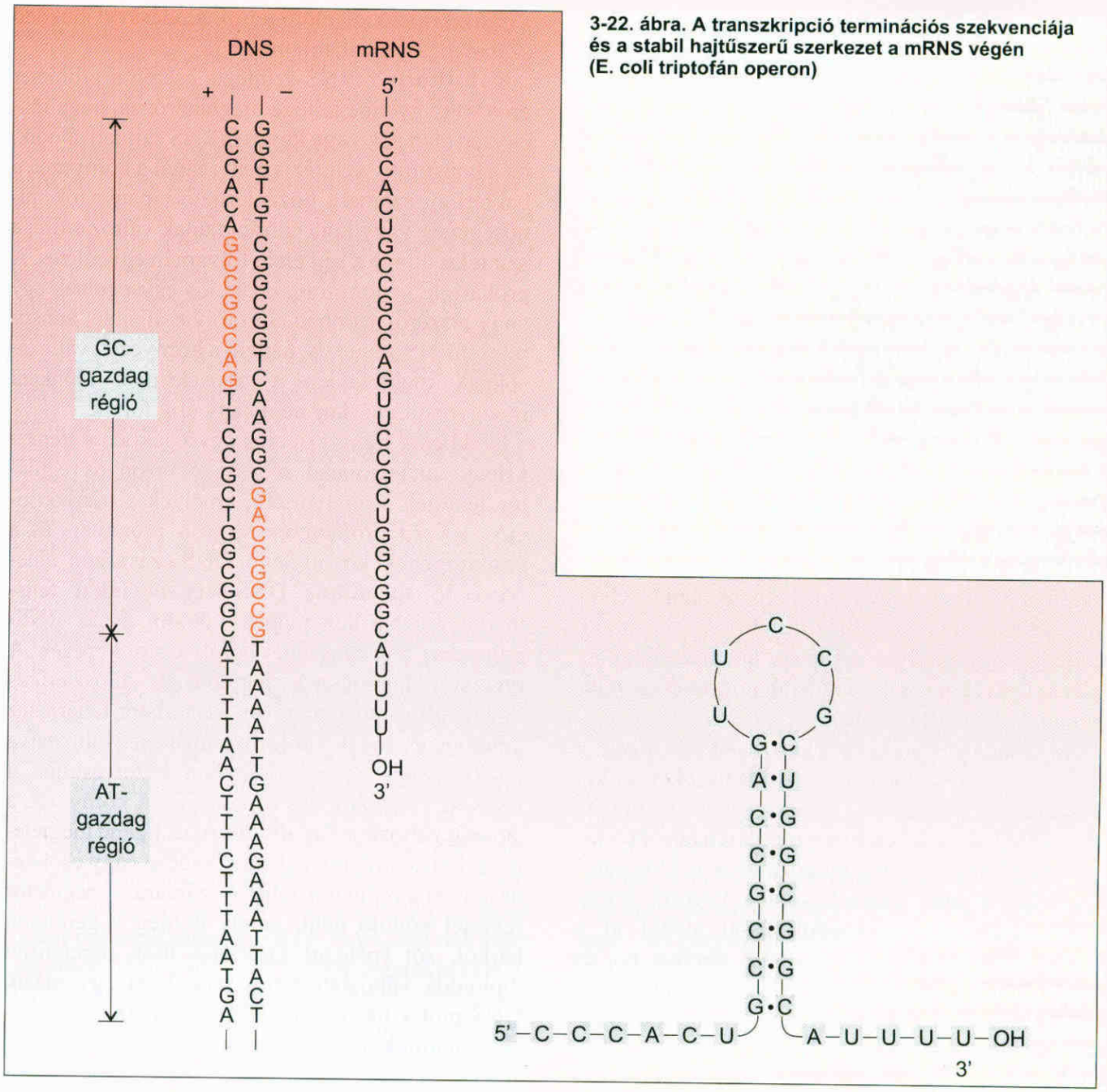
Az **elongáció** a szintézis helyén a DNS kettőslánc rövid szakaszának folyamatos széttekeredésével, a –DNS szál és a vele komplementer naszcens RNS közti hibrid kialakulásával, majd az RNS leválásával és a DNS visszatekeredésével jár. A DNS rövid szakaszán a DNS széttekeredése és a hibridképződés következményeként kialakuló „transzkripciós buborék" halad lefelé a transzkripciós egységen a pozitív DNS-szál 5'-végétől a 3'-vége felé *(3-21. ábra)*. Minthogy a prokarióták-nak nincs sejtmagjuk, prokariótákban a transzkripció és transzláció térben nincs szétválasztva. A nascens mRNS 5'-vége felől a mRNS-ről már előbb megindul a polipeptidlánc szintézise, még mielőtt a mRNS 3'-vége teljesen megszintetizálódna.

A transzkripció **terminációját** némely esetben kizárólag a transzkripciós egységek végén (a +DNS szál 3'-végének megfelelően) elhelyezkedő specifikus terminációs nukleotidszekvencia segíti elő, míg más transzkripciós egységek transzkripciójának terminációjához a terminációs szekvencián kívül még egy rho-fehérjének nevezett terminációs faktor is szükséges. A transzkripció terminációjakor az RNS-DNS hibrid disszociál és az RNS-polimeráz leválik a DNS-ről. A rho-fehérjére nincs szükség akkor, ha a transzkripciós egység olyan terminációs szekvenciával rendelkezik, amely az RNS-re átíródva annak 3'-végén hajtűszerű képződményt hoz létre. A termináció érdekessége, hogy **a terminációt előidéző aktív jel** mindkét esetben az RNS-en jön létre. A rho-fehérje az RNS-en ismeri fel a terminációs szekvenciákat és a rho-independens termináció is akkor következik be, amikor a terminátor szekvencia átíródott az RNS-re.

A hajtűszerű képződmény kialakulása egy speciális RNS-szekvencia következménye. A transzkripciós egység végén, az utolsó vagy egyetlen struktúrgén után elhelyezke-



3-21. ábra. A transzkripciós buborék



3-22. ábra. A transzkripció terminációs szekvenciája és a stabil hajtűszerű szerkezet a mRNS végén (E. coli triptofán operon)

dő, már nem kódoló DNS GC-gazdag régiójában levő palindrom szerkezetet AT-ben gazdag régió követi. A **palindrom szerkezet** olyan DNS-szekvenciákat jelent, amelyek az egyik DNS-szálon balról jobbra és a komplementer DNS-szálon jobbról balra olvasva azonosak. A transzkripció terminációját előidéző, viszonylag hosszú palindrom szekvencia átíródása az RNS-re, azon egymással komplementer szakaszokat eredményez. A komplementer bázisok között az RNS-molekulán belül kialakuló hidrogénhidak hozzák létre a hajtűszerű képződményt, amelynek 3'-végén néhány uraciltartalmú nukleotid található. Ez a képződmény megakadályozza az RNS további átíródását és leválasztja az RNS-t a DNS-ről *(3-22. ábra)*.

Riboszóma-RNS gén (a fehérjék struktúrgénjeivel ellentétben) nem egy, hanem több van a prokarióta genomban (E. coliban pl. 7 ilyen gén található). A riboszóma-RNS génről átíródó RNS még nem a kész rRNS, hanem az elsődleges transzkriptum további módosuláson megy keresztül, hogy kialakuljon az érett rRNS. Ugyanez vonatkozik a tRNS-re is.

Prokariótában háromféle érett rRNS-t ismerünk, ebből kettő, a 23S rRNS és az 5S rRNS (nagyságukat szedimentációs koefficiensük alapján határoz-

zák meg), a riboszóma nagy alegységéhez tartozik, a 16S rRNS a kis alegység komponense. E. coliban a háromféle rRNS a megfelelő transzkripciós egységről nem külön-külön, hanem egy hosszú, folyamatos elsődleges transzkriptum formájában szintetizálódik. Ez az elsődleges transzkriptum tartalmaz még egy tRNS-nek megfelelő szakaszt is, és a különböző rRNS molekuláknak, illetve a tRNS-nek megfelelő szakaszokat közbeeső RNS-szakaszok („spacer régiók") választják el egymástól. Más transzkripciós egységekről többféle tRNS szintetizálódik hasonló módon, hosszú, elsődleges transzkriptumként. A riboszóma-RNS-eket kódoló transzkripciós egységek promotere erős promoter.

Az **elsődleges transzkriptumból** a megfelelő darabok kimetszése nagyon precízen történik. Ebben a kimetszésben egy **kisméretű RNS** is szerepet játszik, amely bizonyos esetekben fehérje nélkül is képes katalizálni az elsődleges transzkriptum hasítását. (Az ilyen enzimszerűen viselkedő RNS-t nevezik **ribozimnek**. A ribozimek felfedezése komoly érvet jelent amellett, hogy az élet keletkezése során a legősibb információs makromolekula az RNS volt.)

Az elsődleges transzkriptum hasításán kívül a rRNS és a tRNS még más módosulásokon is keresztülmegy. A rRNS bázisai közül némelyek metilálódnak, a tRNS-ben a metilált bázisokon kívül még más, speciális módosulások is előfordulnak, így a ritka bázisok sorába tartozó, timin, hipoxantin utólagos módosulással alakul ki a tRNS-ben (lásd a 3-18. és 3-19. ábrákat is), és posztszintetikus módosulás a pszeudouridin szerkezet kialakulása is. A tRNS-ek 3'-végére ugyancsak utólag kerül a tRNS-re jellemző CCA nukleotidhármas.

A transzkripció szabályozása prokariótákban

Prokariótákban a mRNS életideje rövid (a féléletidő percekben mérhető), és a fehérjék proteolitikus bontásának a sebessége kicsi. A prokarióta sejtben található egyes fehérjék mennyiségét ezért elsősorban az azokat kódoló mRNS-ek transzkripciójának a sebessége befolyásolja. A transzkripció sebessége általában a transzkripció iniciációjának a sebességével szabályozódik, de ismerünk példát a transzkripció idő előtti terminálódásával működő szabályozási mechanizmusra is.

Konstitutív mRNS-szintézis esetén a promoter erős vagy gyenge jellege meghatározza, hogy időegység alatt sok vagy kevés mRNS szintetizálódik, de a konstitutív szintézis nem reagál a környezet, a baktérium számára hozzáférhető tápanyagok minőségének vagy koncentrációjának változásaira, a szintézis üteme a sejt élete folyamán egyenletes. A prokarióta genom transzkripciós egységeinek egy nagy részéről azonban nem folyik állandó, konstitutív mRNS szintézis, hanem a környezeti változásoknak megfelelően a transzkripció időnként meggyorsul, máskor nem vagy alig folyik.

Ezekben a transzkripciós egységekben a transzkripció iniciációjának sebességét bizonyos regulátor fehérjék szabályozzák, amelyek a transzkripciós egység promoterén vagy a promoter- és a struktúrgének között levő DNS-szakaszon elhelyezkedő **specifikus DNS-szekvenciákat** felismerve a DNS-hez tudnak kötődni és az RNS-polimeráz tevékenységét befolyásolni képesek. A regulátor fehérjéknek legtöbbször allosztérikus ligandjaik vannak, amelyek a regulátor fehérjéhez kötődve, és annak konformációját megváltoztatva pozitív vagy negatív irányban befolyásolják a DNS-hez való kötődés képességét. A környezet, a táptalaj változásait az allosztérikus ligand megjelenése, koncentrációjának emelkedése vagy csökkenése jelzi a regulátor fehérje számára. A regulátor fehérjét kódoló gént, amely elvileg a genomon bárhol, sőt (például kísérletes úton parciálisan diploiddá változtatott prokariótában) egy másik DNS-molekulán is elhelyezkedhet, **transz-regulációs elemnek** nevezik. A regulátor fehérje szerkezetéért felelős struktúrgén (transz-elem) azért helyezkedhet el bárhol a DNS-en vagy akár egy másik DNS molekulán is, mert a regulátor fehérje a citoplazmában szintetizálódik, s a citoplazmán keresztül haladva elérheti a számára specifikus DNS-szekvenciát, amelyhez kötődni képes. Azoknak a DNS-szakaszoknak azonban, amelyekhez egy ilyen regulációs fehérje kötődik és ilyen módon befolyásolja az adott transzkripciós egység transzkripciójának sebességét, a transzkripciós egységgel azonos DNS-molekulán, pontosan meghatározott helyen kell lenniük. Ezeket a DNS-szakaszokat nevezik **cisz-regulációs elemeknek**. Ezek nem kódolnak fehérjét. Prokariótákban a

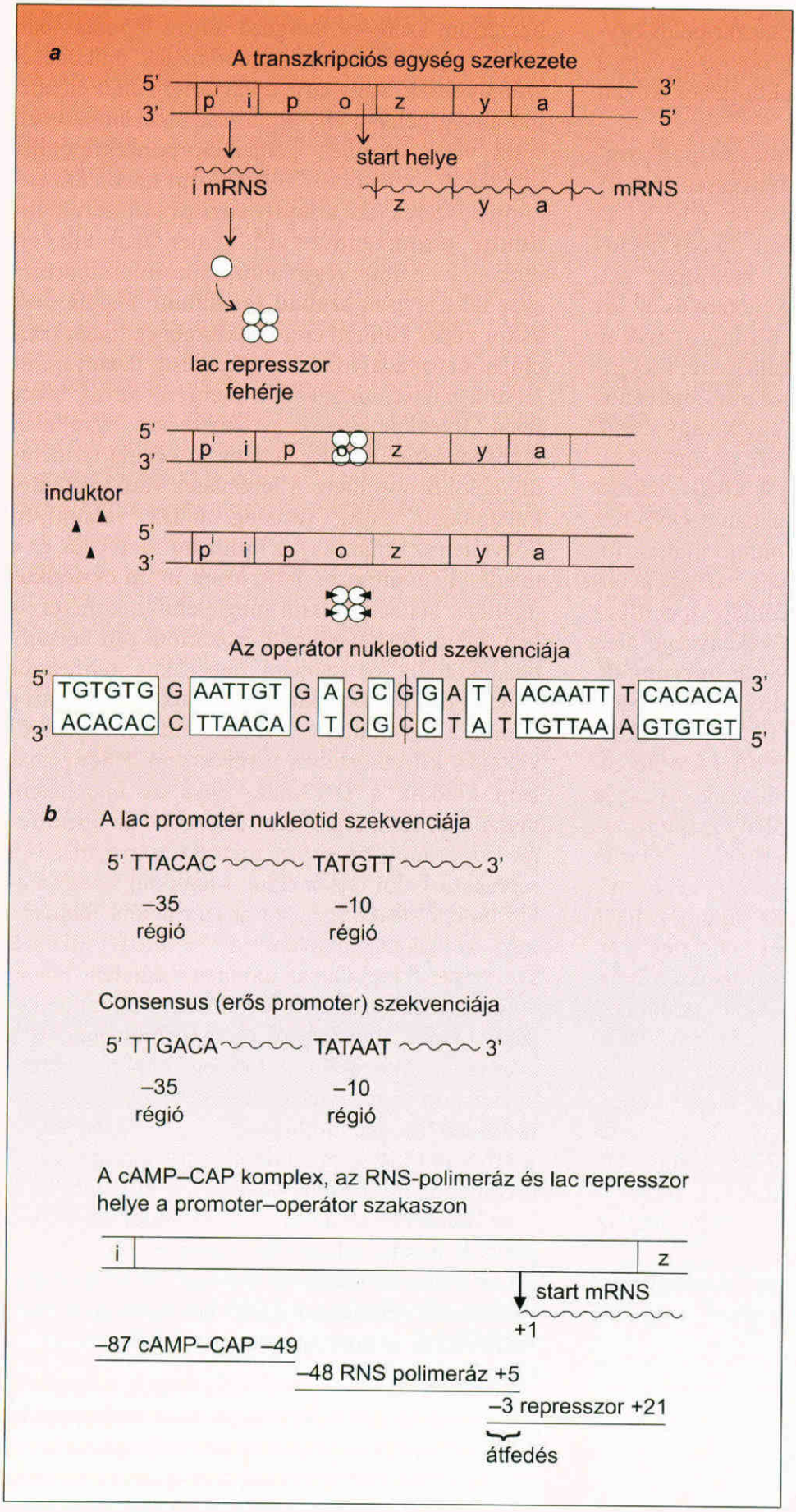
cisz-elemek az általuk regulált transzkripciós egység közvetlen közelében, annak promoterén vagy a promoter- és az azt követő struktúrgének között foglalnak helyet.

A prokariótákban előforduló, transzkripciót szabályozó fehérjék egy csoportját **represszor fehérjének** nevezik. Egy-egy represszor fehérje az esetek többségében csak egyetlen transzkripciós egység működését szabályozza, mégpedig azt, amelynek promoterén, illetve promotere és az azt követő struktúrgének között egy bizonyos, csak az illető represszor fehérje által felismerhető, specifikus bázisszekvenciával rendelkező cisz-regulációs elem, az **operátor** található. Az egyik vagy másik transzkripciós egységet szabályozó, egymástól eltérő szerkezetű represszor fehérjék közös sajátossága, hogy saját operátor régiójukban a DNS-hez kötődve az érintett promoterről induló transzkripciót meggátolják. Az egy bizonyos bázisszekvenciájú operátor és az ahhoz kötődő specifikus represszor fehérje szabályozó tevékenysége alatt álló transzkripciós egységet nevezik **operonnak**. (Legtöbbször egy-egy policisztronos egységről van szó.) A különböző policisztronos operonok általában egy-egy anyagcsereút egymást követő enzimeinek struktúrgénjeit tartalmazzák és azok transzkripciójának koordinált szabályozását teszik lehetővé. (A legjobban ismert operonok közé tartozik pl. a laktóz metabolizmusában részt vevő enzimeket kódoló laktóz operon, az arabinóz nevű cukor metabolizmusában részt vevő enzimek szerkezetéért felelős arabinóz operon, a galaktóz átalakulását katalizáló enzimek génjeit tartalmazó galaktóz operon vagy a triptofán bioszintéziséért felelős enzimek génjeit tartalmazó triptofán operon stb.). A represszor fehérjét magát kódoló struktúrgén, a **regulátor gén** transz-elem, a regulált transzkripciós egységen kívül helyezkedik el a DNS-en, saját (gyakran konstitutíven működő, gyenge) promoterrel rendelkező, önálló transzkripciós egységként.

A represszor fehérje megfelelő formája igen nagy affinitással kötődik a DNS-hez a számára specifikus operátor régióban, ezért az egyik vagy másik represszor fehérjéből sejtenként már néhány molekula is elegendő a szabályozáshoz. A represszor fehérjék működésének módja különbözik aszerint, hogy a környezetben nem mindig jelen levő, de időnként megjelenő tápanyag, illetve a baktérium számára mérgező anyag lebontásában szerepet játszó enzimek operonjának működését szabályozzák, vagy egy, a baktérium által előállított anyag például egy aminosav bioszintézisében részt vevő enzimek génjeinek transzkripcióját regulálják. A lebontó folyamatokat katalizáló enzimrendszerek (ún. **adaptív enzimrendszerek, induktív enzimrendszerek**) génjei által alkotott operonok operátor régiójához a specifikus represszor fehérje csak **szabad formában**, vagyis csak akkor képes kötődni és a struktúrgének transzkripcióját megakadályozni, ha a kérdéses tápanyag, illetve a baktérium számára mérgező anyag nincs jelen. Ilyenkor ezekre az enzimekre egyáltalán nincs szükség, esetleg néhány molekula termelődik belőlük a sejtben. A lebontásra váró kis molekulatömegű anyag (esetleg annak valamilyen közvetlen származéka) az **induktor** molekula, ez a megfelelő represszor fehérjének az allosztérikus ligandja. Ha az induktor megjelenik a környezetben, majd azt követően a prokarióta sejt belsejében, kötődik a számára specifikus represszor fehérjéhez és kialakul az induktor–represszor komplex. Az induktor által okozott konformációváltozás következtében a represszor fehérje már nem kötődik a DNS-hez, ezért az operátorról disszociál. Ha a represszor disszociál az operátorról, az érintett operon a transzkripció gátlása (a represszió) alól felszabadul. Megindul az egységhez tartozó struktúrgének transzkripciója, majd ennek következményeként az érintett enzimek szintézise. A táptalajban újonnan megjelenő anyag lebontásához szükséges enzimek ezért rendelkezésre fognak állni (a prokarióta sejt adaptálódik a környezet változásához). Egy-egy enzim vagy enzimcsoport szintézisének szelektív fokozódása az **indukció**. Az operátorhoz kötődő represszor fehérje RNS-polimeráz működését gátló pontos mechanizmusa operononként valamelyest különbözhet.

Az induktív szabályozás egyik legjobban ismert példáját mutató laktóz (lac-) operon elrendeződését, a promoter szerkezetét és az RNS polimeráz működését sztérikusan gátló lac-represszor elhelyezkedését az operátor régión a *3-23. ábra* szemlélteti.

Bioszintetikus utak enzimei génjeinek szabályozásánál az érintett operon represszor fehérjéje másképpen viselkedik. Ezeknél az anyagcsereutaknál a reguláció célja az, hogy az alapállapotban funkcio-



3-23. ábra. A laktóz (lac-) operon szerkezete és működésének szabályozása.
(a) *A laktóz operonban (a +DNS szál 5'-végétől a 3'-vég felé) a promoter (p) és operátor (o) után következnek a koordináltan szabályozott struktúrgének, ezek a β-galaktozidáz (z), a permeáz (y) és transzacetiláz (a) enzimeket kódoló gének. Az operátor palindrom bázisszekvenciáját felismerni képes lac-represszor fehérjét kódoló struktúrgén (i) másik transzkripciós egységhez tartozik, saját promotere (p^i) van, amely konstitutív, gyenge promoter. Ezért a represszor fehérjéből egyenletes sebességgel kevés szintetizálódik (a tetramer szerkezetű lac-represszor fehérjéből mintegy 10 molekula van egy E. coli sejtben). A represszor fehérje affinitása az operátorhoz igen nagy. Az operátor és az RNS-polimeráz bekötődésének a helye részben átfedi egymást, tehát ha a represszor fehérje az operátorhoz kötődik, az RNS-polimeráz működése sztérikusan gátlódik. Az induktor (β-galaktozid-származék) kötődése a represszor fehérjéhez (mind a négy alegységhez egy-egy molekula) erősen csökkenti a represszor affinitását az operátorhoz, ezért az induktor–represszor komplex a DNS-ről disszociál.*
(b) *A lac promoter (p) maga is gyenge promoter, a transzkripció iniciációjának a gyakoribbá tételéhez, az RNS-polimeráz bekötődésének elősegítéséhez egy másik fehérjének, a cAMP–CAP komplexnek is a promoterhez kell kötődnie. A CAP dimér szerkezetű fehérje, két molekula cAMP-t köt. A cAMP-CAP helye a promoteren (ugyancsak palindrom szerkezetű), pontosan az RNS-polimeráz bekötődésének helye előtt van (+1 az első átíródó nukleotid helye). cAMP nélkül a CAP nem képes a DNS-hez kötődni*

náló operonról ne történjen mRNS-szintézis akkor, ha az operon által kódolt enzimek működésének végterméke feleslegben van jelen a sejtben. Ezeknek a transzkripciós egységeknek a represszora önmagában nem tud az operátorhoz kötődni, csak akkor, ha allosztérikus ligandjával, a **korepreszszor** molekulával komplexet képez. A korepresszor a kérdéses bioszintetikus út végterméke. Ameddig ez az anyag a sejtben a szükséglethez képest nincs feleslegben, a transzkripció folyik. Ha a korepresszor koncentrációja a sejtben a szükséglethez képest megnövekszik, kialakul a **represszor–korepresszor komplex**, amely az operátorhoz kötődve megakadályozza az érintett gének transzkripcióját. Ennek következményeként a bioszintetikus út enzimeinek szintézise leáll (represszív szabályozás).

Az aminosavak bioszintézisében részt vevő enzimeket kódoló transzkripciós egységeket nem kizárólag, illetve bizonyos transzkripciós egységek esetében egyáltalán nem represszor fehérjék szabályozzák, hanem a meginduló transzkripció **idő előtti terminációjának** lehetősége a struktúrgének átíródása előtt, a DNS-en elhelyezkedő, feltételes terminációs helyként viselkedő **attenuátor** régió segítségével. Az attenuátor a promoter után (a triptofán operonban a promoter és operátor után), a struktúrgének előtt helyezkedik el. Az attenuátorral történő szabályozás kizárólag a prokarióták aminosav-bioszintézisében részt vevő egyes bioszintetikus utak (pl. triptofánszintézis, hisztidinszintézis stb.) enzimei szintézisében szerepet játszó mechanizmus, amelyre az ad lehetőséget, hogy a prokariótákban a transzkripció térben és időben nincs elválasztva a polipeptidlánc szintézisétől, a transzlációtól. Amennyiben a kérdéses aminosavból elegendő mennyiséggel rendelkezik a sejt, a transzkripció az attenuátor régiónál terminálódik, és a struktúrgének nem íródnak át. A jelzést nem maga az aminosav, hanem az illető **aminosavval töltött tRNS** megfelelő mennyisége adja. Ha a töltött tRNS mennyisége nem elég nagy a fehérjeszintézishez, a transzkripció túlhalad az attenuátoron és a struktúrgének átíródnak.

A represszor fehérje–operátor DNS-szakasz közti kapcsolat az érintett transzkripciós egység **negatív szabályozását** jelenti, minthogy a represszor a transzkripció iniciációját gátolja. A prokarióta transzkripció szabályozásában azonban szerepet játszik a **pozitív reguláció** is. Ismerünk olyan regulátor fehérjéket amelyek a transzkripció iniciációját elősegítik. Ezek egyik legismertebb példája a **cAMP-akceptor fehérje** (CAP). A cAMP-akceptor fehérje allosztérikus ligandja a cAMP. A pozitív szabályozásért, vagyis az RNS-polimeráz bekötődésének elősegítéséért a **cAMP–CAP komplex** felelős. A cAMP–CAP komplex ugyancsak specifikus DNS-szekvenciát ismer fel, amely nemcsak egy, hanem több transzkripciós egység promoterén is megtalálható. Ezekről a transzkripciós egységekről csak akkor folyik mRNS-szintézis, ha a sejtben a cAMP-koncentráció elég magas. A cAMP–CAP komplex általában olyan indukcióval szabályozott operonok transzkripcióját segíti elő, amelyek bizonyos, a táptalajban nem állandóan jelen levő, csak időnként megjelenő cukrok lebontásáért felelős enzimeket kódolnak (pl. laktóz, arabinóz, galaktóz). Ezen operonok működéséhez nem elegendő a specifikus induktor jelenléte, az operonok csak akkor működnek, ha a specifikus induktor és a cAMP is egyidejűleg jelen van. Ez csak olyankor fordul elő, ha a táptalajban a megfelelő cukor megjelenik, de ugyanakkor nincs jelen glukóz. Ha a táptalajban glukóz is van, a glukóz transzportja csökkenti a cAMP-szintet, nem alakul ki a cAMP–CAP komplex, és az illető operon akkor sem működik (a pozitív reguláció hiánya miatt), ha a másik cukor (pl. laktóz) induktorként a specifikus represszor fehérjét az operátorról eltávolította (és így a negatív regulációt megszüntette). Ez azt jelenti, hogy a baktérium szívesebben használja fel a glukózt a többi cukroknál és csak glukóz hiányában fanyalodik másik fajta cukor felhasználására, amelynek lebontása több új enzim szintézisét igénylő, nagyobb energiabefektetéssel járó folyamat. Amennyiben viszont tényleg szükséges a másik cukor felhasználása, akkor ezt igen jó hatásfokkal képes megtenni. A glukóznak a többi cukor lebontásáért felelős enzimek szintézisét gátló hatását (amely a **cAMP-szint csökkentésén** alapul) **katabolitrepressziónak** nevezik. A cAMP–CAP komplex által felismert specifikus DNS-szakaszt és ennek elhelyezkedését a laktóz (lac) operon promoterén a 3-23. ábra mutatja.

A prokarióta transzkripció szabályozásában részt vevő regulátor fehérjék gyakran oligomer szerkezetűek és az általuk a DNS-en felismert szekvenciák gyakran szimmetrikus szerkezetű **palindromokat** alkotnak. A palindrom DNS-szekvenciákban az egyik láncon, illetve egy vagy néhány nukleotidpár közbeiktatásával a másik láncon (mindkettőn 5'→3' irányban, tehát egymással ellenkező irányban olvasva) ugyanaz a bázissorrend

található. Ez a szerkezet lehetővé teszi a szimmetrikus szerkezetű oligomerek elhelyezkedését.

Bár a prokarióták génexpressziójának szabályozása túlnyomórészt a transzkripció szabályozásán alapul, kivételek is vannak. Ezek közé a kivételek közé tartozik a **riboszómafehérjék** szintézisének a szabályozása. A riboszómák a baktérium száraztömegének csaknem 40%-át teszik ki, komponenseik szintézisének koordinált szabályozása nagyon fontos. A riboszómafehérjék génjei mintegy 20 különböző transzkripciós egységben lokalizálódnak, ezen fehérjéknek egymáshoz képest megfelelő arányban kell szintetizálódniuk. A riboszómafehérjék szintézisének szabályozása főként a **transzláció szabályozásának** segítségével történik.

A **riboszóma-RNS** transzkripciójának szabályozását az ún. **sztringens kontroll** biztosítja. Ha a baktérium éhezik és nem rendelkezik elég aminosavval a fehérjeszintézishez, a tRNS-ek nem töltődnek aminosavval. A töltetlen tRNS kötődése a kész riboszomákhoz egy érdekes nukleotid, a guanozin-3',5'-tetrafoszfát **(ppGpp)** szintézisét idézi elő. A ppGpp segíti elő a riboszóma-RNS transzkripciójának gátlását, ilyenkor több riboszóma nem keletkezik.

A polipeptidláncokat kódoló gének transzkripciója eukariótákban és az elsődleges transzkriptum érése

Az eukarióta genom és az **eukarióta gén szerkezete** is bonyolultabb, mint a prokariótáké. Míg a prokarióta gén folyamatos, az eukarióta gének szerkezetében a polipeptidláncot kódoló régiókat megszakítják olyan DNS-szakaszok, amelyek az érintett polipeptidláncot nem kódolják. A kódoló DNS-szakaszokat **exonnak**, míg az exonok közé illeszkedő, a kérdéses polipeptidláncot nem kódoló, annak kész, érett mRNS-ében már nem megtalálható bázisszekvenciákat tartalmazó szakaszokat **intronnak** nevezik. Az intronok hosszúsága többszöröse lehet azon exonszakaszok együttes hosszának, amelyeket megszakítanak. Az exon–intron szerkezetnek nagy szerepe van a fehérjék evolúciójában.

Ellentétben a prokariótákéval, az eukarióta genom egy jelentős része nem kódol fehérjét. (Az emberi sejtek DNS-ének megközelítően csak 10%-a kódol fehérjét, ez kb. 50 000 génnek felel meg.) A nem kódoló DNS-szakaszok között találhatók olyanok, melyek bázisszekvenciája csak egyszer fordul elő a genomon. Ezek lehetnek pszeudogének, amelyek szekvenciája hasonlít egyes működő gének szekvenciájára, de olyan mutációt hordoznak, ami miatt nem fejeződnek ki. A legtöbb esetben azonban nem ismert ezen szekvenciák funkciója.

Szemben a prokarióta DNS-sel, amelyben csak nagyon kevés többször ismétlődő szekvencia található, az eukarióta DNS jelentős része tartalmaz **ismétlődő szekvenciákat**. Ezen szekvenciák lehetnek csupán **néhányszor** ismétlődő szekvenciák, mint például a hisztonokat kódoló gének vagy a riboszóma-RNS-eket kódoló gének, amelyekből több azonos is található az eukarióta genomon.

Az ismétlődő szekvenciák túlnyomó része azonban nem kódoló DNS-szakasz. Ezek között vannak **néhány százszor** ismétlődő szekvenciák, amelyek valószínűleg a transzkripció szabályozásában részt vevő elemek. Az eukarióta genom egy jelentős részét azonban, ún. egyszerű szekvenciák **többezerszer**, akár milliószor ismétlődő elemei alkotják. Az egyszerű szekvencia egy néhány (pl. 6) nukleotidból álló sorrendet jelent, amely speciesenként különbözik.

Az egyszerű szekvenciák egymás után többször ismétlődnek, és ez az ismétlődő szerkezet a genomon több helyen is megtalálható. Ezen szekvenciák nem íródnak át, valószínűleg a kromoszómák szerkezetének a szerveződésében van szerepük, a kromoszómák centromerjeiben és telomérjeiben koncentráltan vannak jelen.

Eukarióta sejtek magjában a transzkripciót három különböző **DNS-dependens RNS-polimeráz** végzi. Az **RNS-polimeráz I** a riboszóma-RNS-ek szintéziséért felelős (pontosabban a riboszóma-RNS-ek közül három, a kis alegységhez tartozó 18S és a nagy alegységhez tartozó 5,8S és 28S rRNS szintéziséért) és a nukleoluszban működik. A fehérjék szerkezetét kódoló gének transzkripcióját az **RNS-polimeráz II** végzi, míg a tRNS-ek és az 5S rRNS átíródásában az **RNS-polimeráz III**-nak van szerepe. Az RNS-polimeráz II jellegzetessége, hogy a gyilkos galóca nevű gomba toxinja, az α-amanitin már nagyon alacsony koncentrációban erősen gátolja az aktivitását, míg a polimeráz III csak mérsékelten, a polimeráz I pedig egyáltalán nem érzékeny e toxinra.

A mitokondriumokban a nukleáris enzimektől különböző, speciális RNS-polimeráz működik, a mitokondriális DNS-ről folyó transzkripcióért felelős.

A transzkripciót eukariótákban és prokariótákban is az **aktinomicin D** és a **rifamicin** nevű anti-

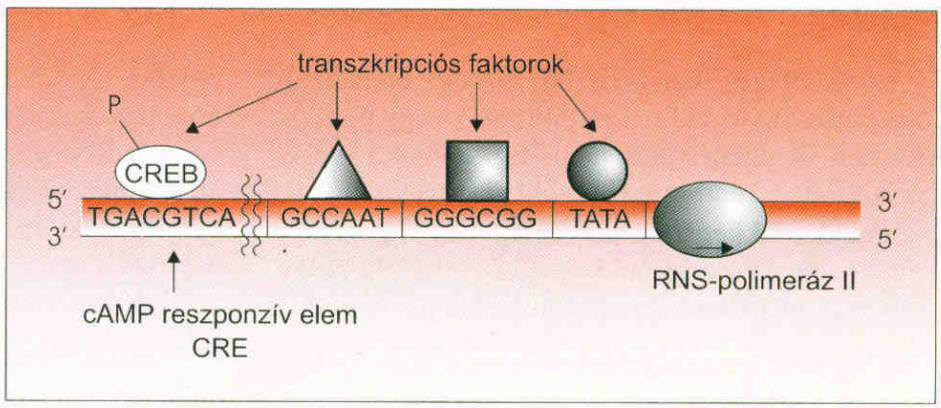
biotikumok gátolják. Az aktinomicin D kettőslláncú DNS-hez kötődve akadályozza a transzkripciót. A rifamicin félszintetikus változata, a **rifampicin** eukariótákban nem, csak prokariótákban gátolja a transzkripció iniciációját.

A fehérjéket kódoló gének transzkripciójának iniciációja eukariótákban lényegesen bonyolultabb, mint prokariótákban. Az RNS-polimeráz II önmagában nem tud a promoterhez kötődni. Bekötődéséhez elengedhetetlen a **promoteren** levő specifikus DNS-szakaszokhoz (cisz-elemekhez) kötődő, transzkrip- ciót elősegítő fehérjék **(transzkripciós faktorok)** jelenléte. A regulált génhez közel, annak 5'-végén elhelyezkedő promoter régión kívül másféle specifikus bázisszekvenciával rendelkező cisz-elem, az **„erősítő DNS-szakasz", (enhancer)** is közreműködik a transzkripció elősegítésében. Az enhancer DNS-szakasz a regulált géntől távolabb (többszáz vagy akár ezer nukleotidnyi távolságban), a gén 5'-végének vagy 3'-végének irányában, vagy esetleg a gén közepén levő, polipeptidláncot nem kódoló intronban is elhelyezkedhet, és ugyancsak a transzkripciót elősegítő fehérjék **(specifikus transzkripciós faktorok)** kötődésére szolgál. A promoteren elhelyezkedő cisz regulációs elemekkel ellentétben, amelyek csak 3'-irányban hatnak, az enhancer elemek 5'- és 3'-irányban is kifejthetik hatásukat. Újabban **„csendesítő" (silencer)** cisz regulációs elemeket is megfigyeltek, amelyekhez egyes gének transzkripcióját specifikusan gátló fehérjék kötődhetnek.

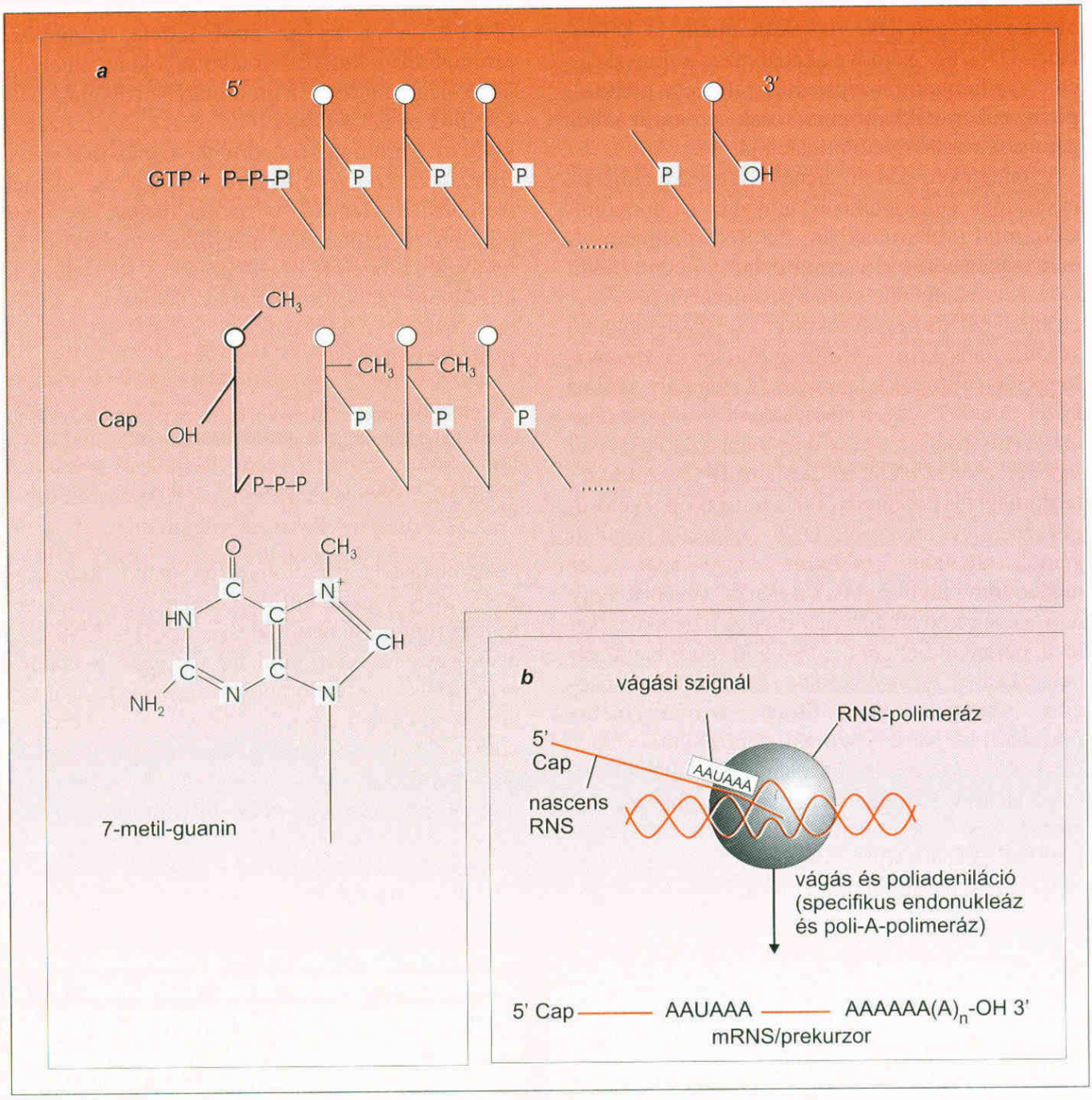
Az eukarióta gének promoterén leggyakrabban megtalálható, az obligát transzkripciós faktorok kötődésére szolgáló „consensus" szekvenciák: a (start nukleotidtól kb. 25 nukleotidnyira felfelé található) „-25 szekvencia", az ún. **TATA-box** ($TATA^{A}_{T}A^{A}_{T}$), és az ettől felfelé, különböző promotereken különböző távolságokban elhelyezkedő, nem minden gén promoterében megtalálható **GC-box** és **CAAT-box** ($GG^{T}_{C}CAATCT$). Ezeken kívül még promoter csoportonként más-más specifikus DNS-szekvenciával rendelkező cisz-elemek (responsive elemek) is szolgálhatnak az illető promoterre jellemző, specifikus transzkripciós faktorok kötődésére *(3-24. ábra)*. A transzkripció iniciációját elősegítő fehérjék nemcsak a DNS-hez, hanem egymáshoz és az RNS-polimeráz II-höz is kötődnek.

Az RNS-polimeráz III működésének a polimeráz I és II-től eltérő jellegzetessége, hogy az iniciációt elősegítő fehérjék nem a kódoló szakasz 5'-végén elhelyezkedő promoteren, hanem a kódoló DNS bizonyos szakaszán kötődnek a DNS-hez.

Az eukarióta gén transzkripciójakor keletkező RNS még nem a mRNS, hanem az elsődleges transzkriptum (heteronukleáris RNS, hnRNS). Az elsődleges transzkriptum nem csupán a kódoló, exonoknak megfelelő nukleotidszekvenciákat tartalmazza, hanem a közéjük illeszkedő, a kérdéses polipeptidlánc szerkezetét nemkódoló, intronoknak megfelelő szekvenciákat is. Az elsődleges transzkriptumnak egy **érési folyamaton** kell keresztülmennie ahhoz, hogy egy polipeptidlánc szintézisét irányítani tudó, folyamatos, kész mRNS-sé alakuljon. Az érési folyamat lépései közé tartozik az RNS 5'-végének módosulása, azaz a **Cap-képződés**, a 3'-vég módosulása, azaz a poliadenilsav **(poliA) farok** kialakulása és az intronoknak megfelelő RNS-darabok pontos kimetszése az exonoknak megfelelő részek ugyancsak pontos összeillesztésével. Ez utóbbi folyamatot „splicing"-nak nevezik.



3-24. ábra. Egy eukarióta gén promotere. *A promoteren több transzkripciós faktor képes kötődni specifikus szekvenciákon, amelyek egymással és az RNS-polimerázzal kölcsönhatásba lépve segítik elő a transzkripció iniciációját. A CRE-vel jelzett elem azokon a promotereken van jelen, amelyek regulációjában egy cAMP-dependens protein-kináz által foszforilált transzkripciós faktor is részt vesz*



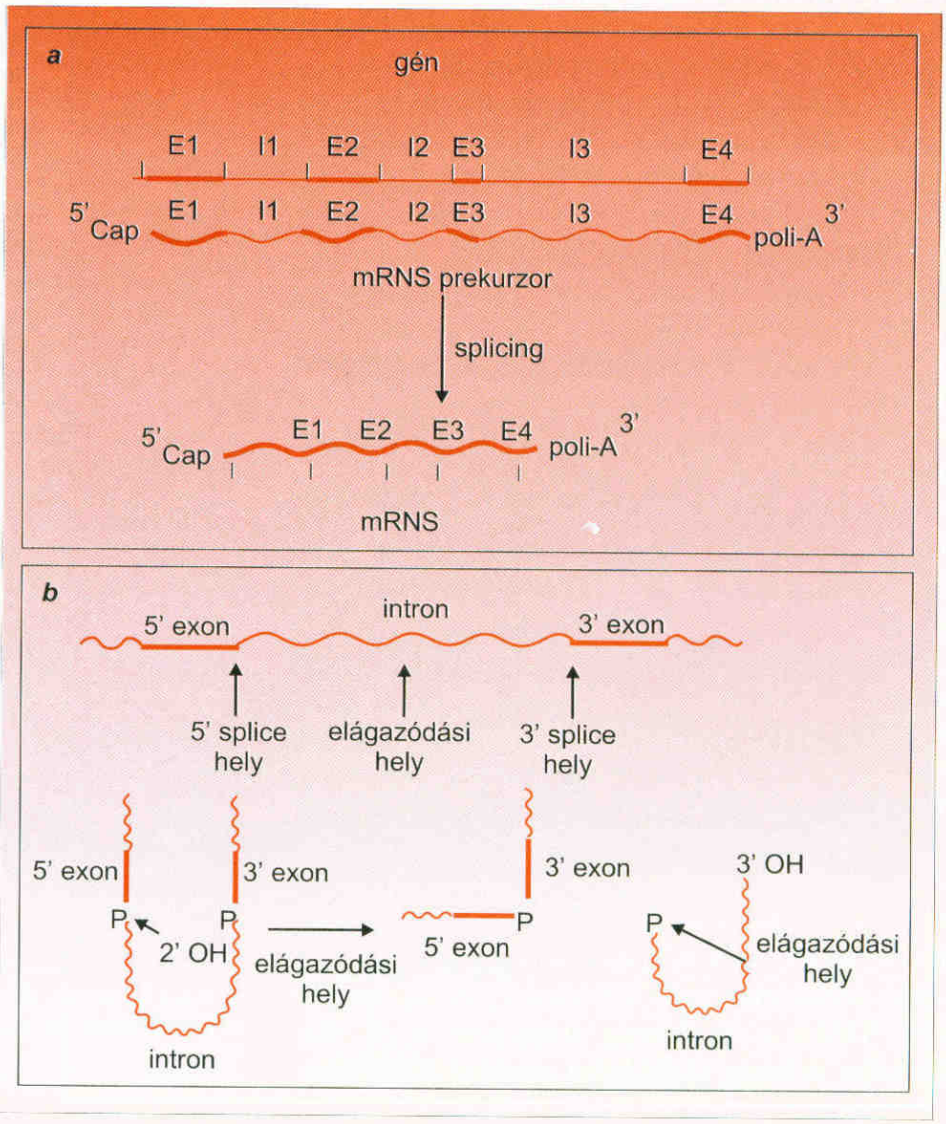
3-25. ábra. Az eukarióta mRNS 5'-végének és 3'-végének transzkripció utáni módosulásai. (a) *Cap-képződés az 5'-végen;* **(b)** *az RNS 3'-végének elmetszése és a poli-A-farok kialakulása*

Az elsődleges transzkriptum 5'-vége eredetileg egy purin-nukleozid-trifoszfát (pppA vagy pppG). A „Cap"-képződés után nem lesz szabad 5'-vége az RNS-nek, mert egy GTP-ből származó, módosult nukleotid kerül a lánc végére 3'→5' pozícióban. Az új láncvégi nukleotid egy olyan metileződött (7-metil-guanin-tartalmú) guanin nukleotid, melynek 5'-foszfátja pirofoszfátkötéssel kapcsolódik az eredeti láncvégi nukleotid β-helyzetű foszfátjához. Az eredeti szekvencia első és második ribóza ugyancsak metileződik *(3-25. ábra)*. A „Cap" védi a mRNS-t a lebomlástól és szükséges a transzláció iniciációjához. A „Cap"-képződés előbb megtörténik, mint ahogy a transzkripció terminálódik.

A poli-A-farok kialakulása a transzkripció terminálását követően megy végbe. A transzkripció terminálásához szükséges jelnek át kell íródnia

az RNS-re, ez az AAUAAA szekvencia és **poli-A-helynek** nevezik. A poli-A-helyet egy specifikus endonukleáz enzim az RNS-en ismeri fel. Az AAUAAA szekvencia átíródása után egy kb. 20 nukleotidból álló szakasz következik (terminátor régiónak megfelelő szakasz), ennek átíródása után az endonukleáz elvágja az elsődleges transzkriptumot és a transzkripció befejeződik. Ezután a **poli-A-polimeráz** nevű enzim egyenként, ATP-ből, egy kb. 250 nukleotidból álló láncot szintetizál az RNS 3'-végére.

A splicing mechanizmusának, azaz az intronoknak megfelelő RNS-szakaszok kivágásának és az exonoknak megfelelő RNS-szakaszok összeillesztésének rendkívüli pontossággal kell végbemennie, hiszen egyetlen nukleotidnyi elcsúszás a nukleotidtripletből álló kodonok határainak elcsúszásához és így egy teljesen más polipeptidláncot kódoló RNS kialakulásához vezethet. Az intronoknak megfelelő szakaszok pontos kimetszésében három kitüntetett nukleotidszekvencia játszik szerepet, az 5'-splice hely (az intronnak megfelelő szakasz 5'-végén), a 3'-splice hely (az intronnak megfelelő szakasz 3'-végén) és az elágazódási hely (20–50 nukleotidnyira 5'-irányban az intron 3'-végétől). Splicing csak akkor történhet, ha az elsődleges transzkriptumon mindhárom hely megtalálható (ahány intron van az elsődleges transzkriptumon, annyiszor). Az összes gerincesek intronjainak kitűntetett szekvenciái hasonlítanak egymásra (consensus szekvenciák) és az összes eukarióta sejteké megegyezik abban, hogy az intron 5'-végén GU, 3- végén AG található *(3-26. ábra)*. (Természetesen a consensus szekvenciák



3-26. ábra. Az eukarióta gén exon–intron szerkezete és a splicing mechanizmusa. **(a)** *A modell gén exonjai (E) és intronjai (I) a transzkripció során átmásolódnak és az elsődleges transzkriptumban, illetve az 5'-vég és 3'-vég módosulásai után a mRNS prekurzorban még az intronoknak megfelelő szekvenciák is megtalálhatók. A splicing segítségével az intronszekvenciák kimetszésre kerülnek és az érett mRNS-ben az exonok folyamatos szekvenciát alkotnak.* **(b)** *Az intronok a splicing folyamata számára consensus szekvenciákkal rendelkeznek (5'-splice-hely, 3'-splice-hely, elágazódási hely). Az elágazási hely egyik nukleotidjának szabad 2'OH-ja megtámadja az intront az 5'-oldalon levő exonnal összekötő foszfodiészterkötést. Az 5'-oldalon levő exon így felszabaduló 3'OH-ja megtámadja az intront a 3'-oldalon levő exonnal összekötő foszfodiészterkötést. Az eredmény a két exon darab közti foszfodiészterkötés kialakulása és a hurokszerű szerkezetté alakuló intron eltávolítása*

ennél hosszabbak.) A kitüntetett splicing szekvenciákon kívül az intron nukleotidszekvenciája a splicing szempontjából érdektelen, az intron hossza lehet 50 nukleotid vagy akár 10 000 nukleotid.

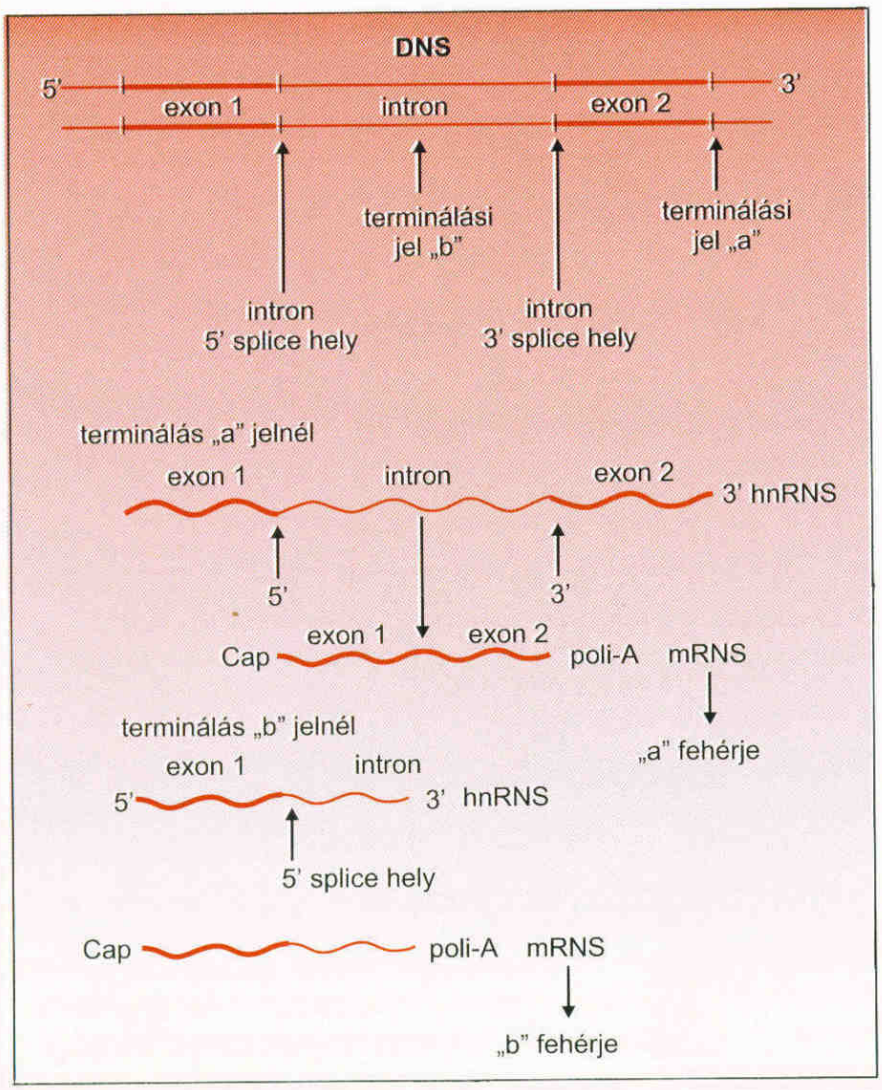
A splicing mechanizmusát az indítja el, hogy az elágazódási helyen levő adenin nukleotid 2'OH-ja megtámadja az intron 5'-végén levő nukleotidot és foszfodiészterkötést létesít annak 5'-foszfátjával. Az intron hurokszerű képződményt alkot, míg az intron 5'-végén levő exon (1. exon) 3'-végi nukleotidjának 3'OH-ja átmenetileg szabaddá válik. Az 1. exon szabad 3'OH-ja ezután megtámadja az intron és a 2. exon közötti foszfodiészterkötést. Az intron lehasad és kialakul a foszfodiészterkötés az 1. intron 3'OH-ja és a 2. intron 5'-foszfátja között (3-26. ábra).

A splicing mechanizmusában az **snRNS-ek** (kismeretű nukleáris RNS-ek) játszanak szerepet. Az snRNS-ek fehérjékkel komplexet képezve kis nukleáris ribonukleoprotein-részecskéket (snRNP) alkotnak. Az snRNS-eket **U-RNS**-eknek is nevezik, magas uraciltartalmuk miatt.

Ezek közül az egyik az 5'-splice helyet, a másik a 3'-splice helyet, a harmadik az elágazódási helyet ismeri fel, de a splicing mechanizmusában még további néhány snRNS (snRNP) is szerepet játszik.

A splicing mechanizmusának tanulmányozása vezetett a **ribozimok** felfedezéséhez. A riboszóma-RNS splicingja a Tetrahymena nevű egysejtű élőlényből izolált rendszerben guanin nukleotidok jelenlétében fehérje nélkül is végbemegy, a Tetrahymena rRNS prekurzor saját maga képes katalizálni a foszfodiészterkötés megfelelő helyen történő bontását és megfelelő helyen annak kialakulását. Ehhez a folyamathoz az intron szerkezetének nagy része, és az RNS speciális másodlagos és harmadlagos szerkezete is szükséges. Ez az RNS-nukleáz és -polimeráz aktivitással rendelkezik nemcsak saját magán, hanem bizonyos exogén oligonukleotidok esetében is, tehát valódi enzimnek tekinthető.

Az **alternatív splicing** lehetősége ad magyarázatot arra a jelenségre, hogy eukariótákban egy adott DNS-szakasz nem minden esetben kódol kizárólag egyetlen polipeptidláncot. Ezért is bonyolultabb a



3-27. ábra. Az alternatív splicing egyik lehetséges mechanizmusa. *Az „a" jelnél történő terminálás után az intron szabályosan kivágódik és az érett mRNS szerkezetében a két exon szekvenciája található. A „b" jelnél történő termináláskor az intron 3'-splice-helye és a második exon nem íródik át. A 3'-splice-hely hiányában az introndarab nem vágódik le, az érett mRNS az első exon és az introndarab szekvenciáját tartalmazza. Az „a" fehérje számára intronként viselkedő DNS-darab a „b" fehérje számára kódoló szekvencia (exon)*

gén meghatározása eukariótákban, mint prokariótákban. Ezekben az esetekben nem arról van szó, hogy két, egymástól teljesen különböző polipeptidláncot kódol ugyanaz a DNS-szakasz, csak arról, hogy a két polipeptidlánc egyik vagy másik része (pl. C-terminális aminosavszekvenciája) különbözik egymásétól. Alternatív splicing esetén az egyik polipeptid szempontjából intronként viselkedő DNS-szakasz (vagy annak egy része) a másik polipeptidlánc számára kódoló szekvenciaként viselkedik és benne marad annak érett mRNS-ében.

Az alternatív splicing jelenségére jó példa az immunglobulinok nehéz láncának szintézise. Egy bizonyos nehéz lánc szintetizálódhat olyan C-terminális szekvenciával, amely igen sok hidrofób aminosavat tartalmaz, ilyenkor, az immunglobulin a plazmamembránhoz kötve marad. Az N-terminálistól számított szekvencia nagyobb részén azonos nehéz lánc szintetizálódhat olyan C-terminális szakasszal is, amely főként hidrofil aminosavakat tartalmaz, ilyenkor az immunglobulint a sejt szekretálja. Az alternatív splicing úgy jöhet létre, hogy ebben az esetben a DNS-en a transzkripció számára két terminációs jel van és a transzkripció valamilyen regulációs mechanizmus hatására vagy az egyik terminációs helyen, vagy a másikon fejeződik be. Az első terminációs jel az utolsó intronon, a második terminációs jel az azt követő exon után található. Ha a transzkripció megáll az első terminációs helyen, valahol az intron közepén, az RNS csak az 5'-splice helyet tartalmazza a 3'-splice helyet nem, ezért az introndarabnak megfelelő szekvencia nem vágódik le az RNS-ről. Az így képződő mRNS-ben ez az introndarab kódoló szekvenciaként viselkedik, ez felelős a C-terminális aminosavszekveciáért. Ha a transzkripció a második terminációs helyen áll meg, a teljes intron, majd az azt követő exon is átíródik. Ilyenkor azonban az intronnak mind az 5'-, mind a 3'-splice-helye megjelenik az RNS-en, ezért az intronnak megfelelő szakasz kivágódik és a polipeptidlánc C-terminális szekvenciáját az átíródott utolsó exon kódolja *(3-27. ábra)*.

Bizonyos fehérjék esetén a sok exon- és sok intronszekvenciát tartalmazó egyetlen fajta elsődleges transzkriptum többféle mRNS képződésére is lehetőséget ad, sejttípustól függően különbözhet a splicing.

A splicing mechanizmusának károsodása ismert néhány betegségben. A thalassaemia (a hemoglobin egyik vagy másik lánca szintézisének zavara) egyes formáiban a hemoglobin egyik láncát kódoló gén egyik intronján mutáció miatt egy új splice hely alakult ki, amely aberrált splicinghoz, kóros mRNS-hez és a polipeptidlánc szintézisének korai befejeződéséhez vezet. A szisztémás lupus erythematosus nevű autoimmun betegségben a kisméretű ribonukleoprotein-részecskék egyik csoportja ellen termel a beteg ellenanyagot, amely igen sok szövet kóros elváltozását okozza.

Eukarióta transzkripciós faktorok

Az eukarióta gén transzkripciójának szabályozása több szinten szerveződő, bonyolult folyamat, amelyet sokkal kevésbé ismerünk még, mint a prokarióták génexpressziójának szabályozását. Eukariótákban egy gén vagy géncsoport transzkripciójához szükséges első feltétel a gén környezetében levő kromatin szerkezetének az aktív, transzkripció számára hozzáférhető állapota. Az **„aktív kromatin"** szerkezete lazább, mint a transzkripció szempontjából inaktív kromatiné. Egyrészt a promoterek bizonyos szakaszai egyáltalán nem rendeződnek nukleoszomákba, másrészt a transzkripcióra kerülő rész nukleoszomába rendeződő szakaszán a nukleoszomák nem alkotnak olyan szoros struktúrát, mint az inaktív kromatinban. A kromatin lokális elrendeződését minden valószínűség szerint speciális, az illető sejt differenciáltságának megfelelő fehérjék irányítják. A DNS metilációjának ugyancsak van szerepe a génexpressszió szempontjából aktív, illetve inaktív régiók kialakulásában.

Az RNS-polimeráz II bekötődését elősegítő obligát transzkripciós faktorok mellett, amelyek a promoterek speciális szekvenciáihoz (TATA-box, GC-box, CAAT-box) kötődnek, az egyes géncsoportokra jellemző, más, specifikus transzkripciós faktorokra is szükség van (3-24. ábra). (A transzkripciós faktorok szerkezetét kódoló gének a transz regulációs elemek.) A gén vagy géncsoport transzkripciójának specifikus szabályozását elősegítő specifikus cisz-elem **(reszponzív elem)** a gén **promoterén** vagy a géntől (a DNS lineáris szerkezetét véve figyelembe) távolabb elhelyezkedő **enhanceren** található. Ezekhez a cisz-elemekhez kötődnek a specifikus transzkripciós faktorok. (A kromatinhurkok elrendeződése lehetővé teszi, hogy az enhancer régióban, illetve a promoteren kötődő fehérjék egymással és az RNS-polimeráz II-vel is kapcsolatba kerüljenek.) Egy adott transzkripciós egység transzkripciójának regulációjáért több transzkripciós faktor kölcsönhatása felelős.

Reszponzív elemnek azokat a specifikus consensus DNS-szekvenciákat nevezik, amelyeket egy-egy specifikus kémiai jelre adott sejtválaszban érintett gének promoterén vagy enhancerén találtak. Ilyen reszponzív elemek pl. a cAMP-szint emelkedés hatására indukálódó génekre jellemző

cisz-elemek (CRE, cAMP-reszponzív elem) vagy a szteroidhormonok által regulált gének specifikus cisz regulációs elemei (szteroid reszponzív elemek), a növekedési faktorok által regulált génekre jellemző cisz regulációs elemek (szérum reszponzív elem, AP-1 hely) stb. Ezek 10 nukleotidnál nem hosszabb, specifikus nukleotidszekvenciával rendelkező szakaszok.

A nukleotidszekvenciát a megfelelő reszponzív elemekhez kötődő specifikus transzkripciós faktorok ismerik fel. Ezek rendszerint a DNS nagy árkában elhelyezkedve képesek ionos kötésekkel, van der Waals-kötésekkel vagy hidrogénhidakkal kapcsolatot létesíteni a megfelelő nukleotidokkal. A reszponzív elemekhez kötődő transzkripciós faktorok szerkezetét és működését a kémiai jelek különféle módon szabályozhatják. Bizonyos esetekben a kémiai jel közvetlenül, allosztérikus ligandként fejti ki hatását (pl. szteroidhormonok esetében), más esetekben egy szignáltovábbító mechanizmus eredményeként fehérje foszforiláció–defoszforiláció útján (pl. cAMP-szintet emelő jelek esetében). Szerepe lehet e kettő kombinációjának is és nagy jelentősége lehet a transzkripciós faktorok működésének szabályozásában ma még nem pontosan ismert fehérje–fehérje kölcsönhatásoknak. A transzkripciós faktorok nagyon gyakran dimérként fejtik ki hatásukat, kialakulhatnak egyetlen transzkripciós faktor két molekulájából álló homodimérek, de gyakori jelenség, hogy két különböző transzkripciós faktorból alakul ki egy heterodimér. Egy kémiai jellel szabályozott transzkripciós faktor regulálhatja egy másik transzkripciós faktor génjét is, ilyen módon regulációs kaszkádok alakulhatnak ki. A transzkripciós faktorok között olyanok is vannak, amelyek az általuk regulált gén transzkripcióját nem elősegítik, hanem akadályozzák.

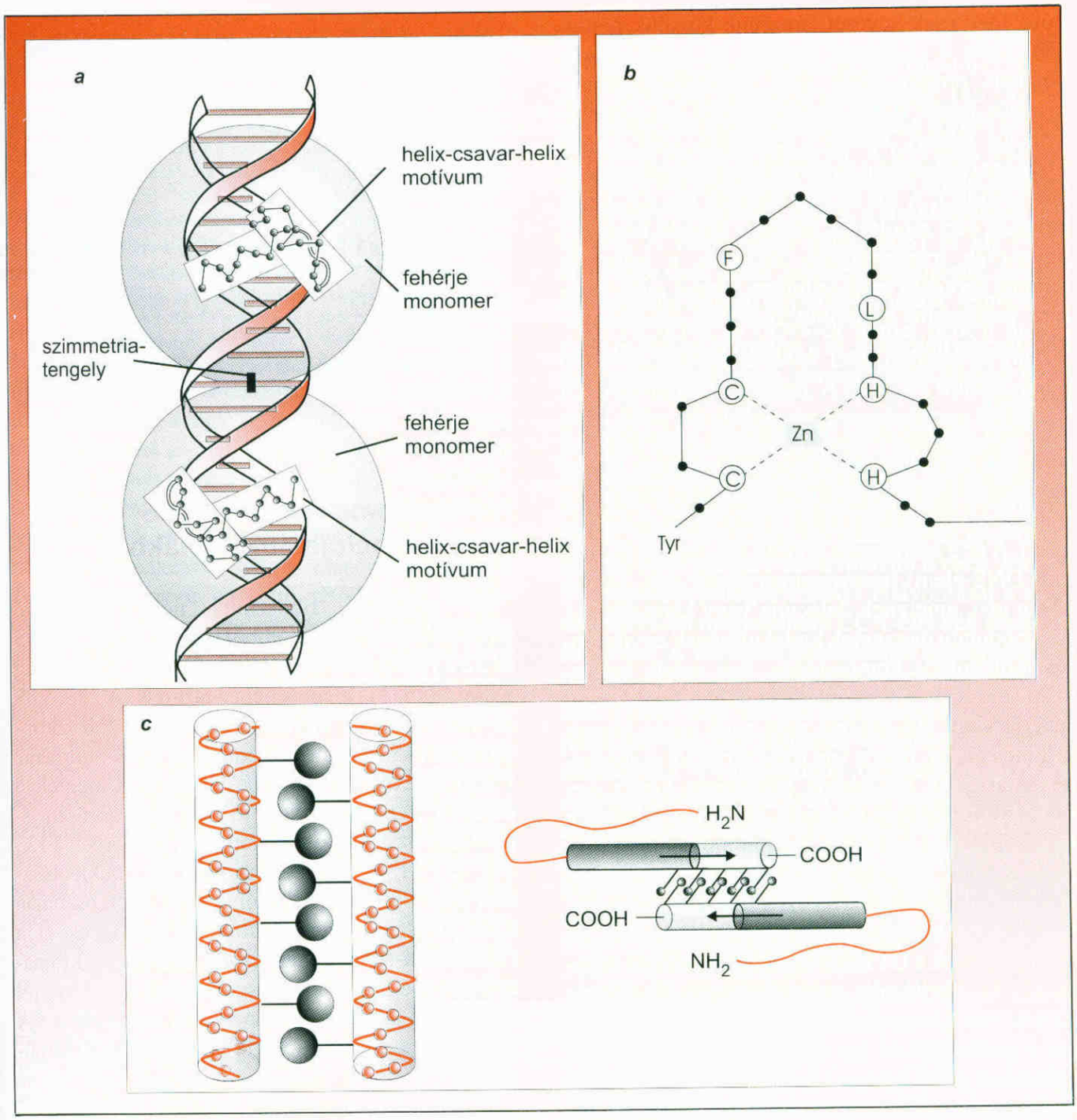
A legújabb megfigyelések azt mutatták, hogy az eukarióta gének transzkripciójának szabályozásában fontos szerepe van a hisztonok acetilációjának és dezacetilációjának is. A **hisztonok acetilációja** megbontja a nukleoszóma szerkezetet és ez szükséges a transzkripció iniciációjához. A TATA-boxhoz kötődő obligát transzkripciós faktorok és az egyes gének promoterén vagy enhancerén elhelyezkedő reszponzív elemekhez kötődő specifikus transzkripciós faktorok közti kapcsolatot **koaktivátor** fehérjék hozzák létre. Ezeknek hisztonacetiltranszferáz aktivitása is van, így egyrészt elősegítik az RNS-polimeráz II bekötődését, másrészt elvégzik a hisztonok acetilezését is.

A DNS-hez kötődő fehérjék szerkezeti motívumaik alapján többféle csoportba sorolhatóak. Ezek a szerkezeti sajátságok a helix-kanyar-helix motívum, a cinkujj motívum és a leucincippzár motívum.

A **helix-kanyar-helix** szerkezetű fehérjékre jellemző egy rövid alfa-helikális rész, amely a DNS nagy árkába illeszkedik, ahol a nukleotidokkal kölcsönhatásba lép, majd egy második rövid alfa-helikális szerkezetű része a fehérjének csupán részben fekszik be a nagy árokba. Ezek a fehérjék, amelyek többnyire dimérként kötődnek a DNS-hez, megfelelő motivumaikkal egymással szomszédos nagy árkokban helyezkednek el *(3-28a ábra)*. A **cinkujjal** rendelkező fehérjékre jellemző ismétlődő szerkezetben található négy, speciálisan elrendezett Zn^{2+}-iont kötő aminosav-oldallánc, a négy oldallánc lehet 2 hisztidin és két cisztein vagy négy cisztein. Két-két Zn^{2+}-iont kötő egymáshoz közeli oldalláncot kb. 12 aminosav-oldallánc választ el a távolabbiaktól.

Az ilyen módon kialakuló motívumnak van egy alfa-helikális szegmentje, amely képes kapcsolatot kialakítani a DNS nagy árkában található nukleotidokkal *(3-28b ábra)*. A DNS-hez kötődő fehérjékre jellemző harmadik motívum a **leucincippzár.** A leucincippzár-szerkezet nem a DNS-hez történő kötődésben játszik szerepet, hanem a fehérjemolekulák dimerizációjában, minthogy a DNS-hez kötődő regulációs fehérjék dimerizációja igen gyakori jelenség. A leucincippzár úgy alakul ki, hogy a fehérje alfa-helikális szakaszán legalább négy leucin helyezkedik el, amelyeket egymástól hat-hat más aminosav választ el. Így az alfa-hélix minden második csavarulatánál egy leucin kerül a helix ugyanazon oldalára. Ha két ilyen szerkezetet tartalmazó fehérjemolekula kerül egymás mellé megfelelő pozícióban, a leucin oldalláncok egymás közé ékelődve összetartják a két fehérjemolekulát *(3-28c ábra)*. A cippzár motívum közelében bázikus aminosavak találhatók, amelyeknek a DNS-hez történő kötődésben van szerepük.

A liganddal regulált transzkripciós faktorok (transzaktivátor fehérjék) csoportjába a **sejten belül elhelyezkedő hormonreceptorok** tartoznak. Ligandjaik nélkül ezek aktiválatlan állapotban



3-28. ábra. Az eukarióta DNS-hez kötődő fehérjék közös szerkezeti motívumai. (a) *Helix-kanyar-helix szerkezettel rendelkező dimer fehérjék elhelyezkedése a DNS nagyárokban,* **(b)** *cinkujj szerkezet,* **(c)** *leucincippzárral rendelkező fehérjék dimerizációja*

vannak, egyesek a citoszolban, mások a sejtmagban helyezkednek el. A megfelelő hormon kötődése specifikus receptorához átalakítja, aktiválja a receptort, amely azután a DNS-en a specifikus reszponzív elemhez kötődve elősegíti (illetve egyes esetekben gátolja) bizonyos gének transzkripcióját. Ebbe a csoportba tartoznak a szteroidhormonok receptorai, a thyreoideahormon receptora, a D-vitamin-receptor, a reténsav (A-vitamin-származék) receptorai és az aril szénhidrogén-receptor.

A foszforiláció–defoszforiláció segítségével szabályozott transzkripciós faktorok (transzaktivátor fehérjék) száma valószínűleg sokkal nagyobb,

noha még csak keveset ismerünk közülük pontosan. Ebbe a csoportba tartozik pl. a cAMP-dependens protein-kináz által foszforilált transzkripciós faktor (**CREB**-nek nevezik azt a transzkripciós faktort, amely a CRE-hez, azaz cAMP reszponzív elemként ismert consensus szekvenciához kötődik). A **fos** és **jun** fehérjék (az AP-1-nek nevezett cisz regulációs elemhez kötődő fehérjék) ugyancsak transzkripciós faktorok, a sejtproliferációt serkentő extracelluláris kémiai jelek hatására meginduló bonyolult folyamat eredményeként foszforilálódnak, és a sejtproliferációban részt vevő gének működésének szabályozásában van szerepük.

Orvosi szempontból kiemelkedő jelentőségű a **p53-nak nevezett fehérje**, amely többek között egy sejtproliferációt gátló fehérje (p21) génjének a transzkripciós faktora (lásd a sejtciklus szabályozása). A p53 szerkezetét kódoló gén (transz regulációs DNS-elem) **tumorszuppresszor gén**, vagyis olyan gén, amelynek deléciója vagy károsodása a rosszindulatú daganatok kialakulásának egyik fontos molekuláris komponense. Egy másik tumorszup- presszor a retinoblasztoma gén által kódolt fehérje vagy **Rb-fehérje** nem saját maga transzkripciós faktor, mégis van transzkripciót szabályozó hatása. Az Rb-fehérje komplexet képez egy olyan transzkripciós faktorral, amelynek feladata a G1-fázisból az S-fázisba történő átmenetet elősegítő fehérjék génjeinek aktiválása. Az Rb-fehérje inaktív komplexben tartja ezt a transzkripciós faktort és ilyen módon gátolja a G1/S átmenetet. Az Rb-fehérjének a G1 fázis végén bekövetkező többszörös foszforilációja megszűnteti az Rb-fehérje kapcsolatát a transzkripciós faktorral, az felszabadul a gátlás alól és így megszűnik az Rb-fehérje sejtciklust gátló hatása. (Az Rb-fehérje és a G1/S átmenetet indukáló E2F transzkripciós faktor kapcsolatát a 3-13. ábra mutatja.)

A **p53**-nak nevezett (53 kDa nagyságú fehérje) transzkripciós faktor jelentőségét az adja, hogy az ezt kódoló (a 17-es kromoszómán elhelyezkedő) gén (mindkét allélt érintő) szomatikus mutációi a legkülönfélébb humán daganatok mintegy 50%-ban kimutathatók és a daganat kifejlődésének egyik okaként szerepelnek. A gén csírasejtben előforduló, örökletes (csupán egyik allélban megtalálható) mutációi is ismertek. Az ezt a fajta mutációt hordozó egyének egészségesen fejlődnek, de nagy valószínűséggel betegszenek meg rosszindulatú daganatos betegségben még 30 éves koruk előtt, mert az épen maradt allél szomatikus mutációja a p53 funkciójának kieséséhez vezet. A p53-as fehérje kiesése további szomatikus mutációkat idéz elő. E fehérjének eddig ismert fő funkciója (molekuláris mechanizmusát lásd a sejtciklus szabályozásánál), hogy lassítja a sejt proliferációját, a G1-fázis határán késlelteti az átmenetet az S-fázisba mindaddig, míg a DNS-t ért károsodások nincsenek kijavítva. DNS-t károsító sugárzások hatására a p53 mennyisége megemelkedik. Ha a DNS-t ért károsodások mennyisége, nagysága olyan nagy, hogy nem kijavíthatók, a p53 a sérült sejt **apoptozisát (a sejt programmozott halálát)** idézi elő, ilyen módon akadályozva meg a sérült sejt daganatos átalakulását.

A riboszóma-RNS és tRNS transzkripciója eukariótákban

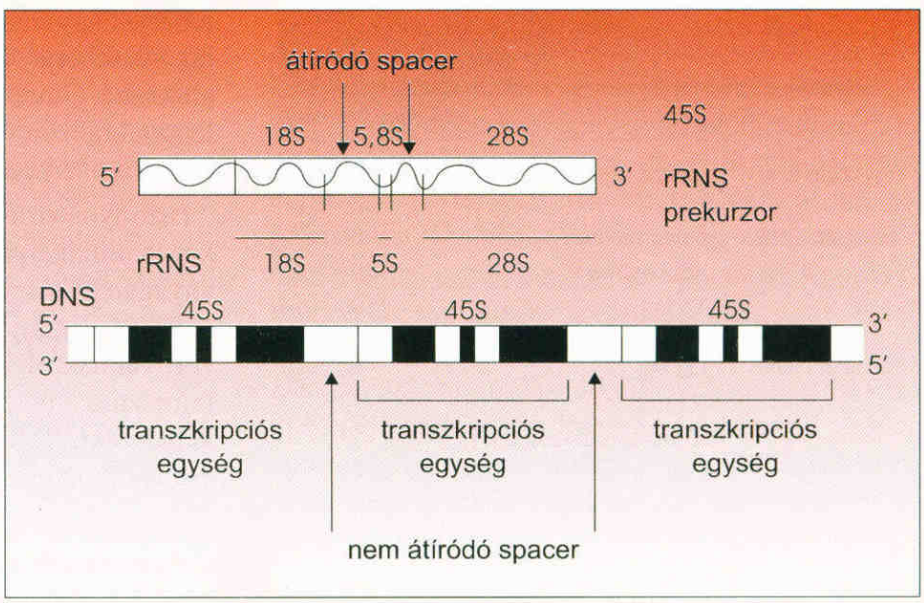
Az eukarióta riboszóma négy különböző RNS-láncot tartalmaz, ebből három, a 28S, az 5,8S és 5S a riboszóma nagy alegységéhez, a 18S pedig a riboszóma kis alegységéhez tartozik. A 28S, 5,8S és 18S rRNS-ek egyetlen elsődleges transzkriptumként (45S) szintetizálódnak az RNS-polimeráz I segítségével, és ebből hasadnak ki a megfelelő darabok. Az ezeket kódoló gén többszörösen ismétlődik az eukarióta genomban. Emberben a 13., 14., 15., 21. és 22. kromoszóma ún. „nukleoluszszervező" régiójában (mindegyik kromoszomán többszörösen), egymás után helyezkednek el a **riboszóma-RNS-gének** és az interfázisú kromatinban a megfelelő kromoszomáknak ez a része jól elkülönülő szerkezetet alkot, ez a **nukleolusz**. (A haploid genom összesen kb. 200 rRNS-gént tartalmaz.)

A sejtek RNS-tartalmának legnagyobb része rRNS, illetve tRNS. (Egy mRNS-ről egymás után igen sok fehérjemolekula szintetizálódhat, egy adott mRNS-ből tehát sokkal kevesebbre van szükség, mint egy rRNS-ből, amely önmaga vesz részt a szerkezet kialakításában.) Békapetében a riboszóma-RNS-génnel kapcsolatban ismert egy speciális jelenség, a **génamplifikáció**. A béka szomatikus sejtjei kb. 500 rRNS gént tartalmaznak. A megtermékenyített petesejt osztódásakor azonban ez nem elég a riboszómák megfelelő gyors szintéziséhez. Ilyenkor szelektív génsokszorozódás (génamplifikáció) történik, extrakromoszomális DNS képződik, amely csak a rRNS-gént tartalmazza (milliós nagyságrendű másolatot), ezekről már megfelelő sebességgel szintetizálódhat az rRNS.

A nukleoluszban elhelyezkedő rRNS transzkripciós egységek elrendeződését a *3-29. ábra* mutatja. Az egymás után következő transzkripciós egységek között nem átíródó, elkülönítő, „spacer" régiók találhatók. Az egyes transzkripciós egységek promoterei a transzkripciós egységet megelőző spacer régióban találhatók, közel a transzkripciós egységhez. Specifikus transzkripciós faktor segíti az RNS-polimeráz I bekötődését. Valamivel távolabb, ugyancsak a spacer szakaszon elhelyezkedő enhancer régió is hozzájárul a transzkripció iniciációjának a gyorsításához. A rRNS-génekről a transzkripció nagy sebességgel megy végbe. Az RNS-polimeráz I egy 45S nagyságú elsődleges transzkriptumot szintetizál, melyből több lépésben kerülnek kimetszésre a végleges hosszúságú darabok (3-29. ábra). A kimetszésben specifikus fehérjék és RNS-ek, pl. egy ribonukleáz P-nek nevezett ribozim segédkezik. (Mint már említettük, a Tetrahymena nevű egysejtű rRNS-ének önsplicingja volt az egyik leglényegesebb megfigyelés, amely a **ribozimok** felfedezéséhez vezetett.) Az érett rRNS-ben, különösen a nagyobbakban gyakori **poszttranszkripciós módosulás** a ribózegységek metilációja.

A riboszómák képződésének folyamata azonnal megkezdődik, amint a 45S rRNS-prekurzor megszintetizálódott. Ekkor kialakulnak a nukleoluszban a **nagy nukleáris ribonukleoprotein részecskék (lnRNP)**, melyek a 45S RNS-en kívül a citoplazmából a nukleoluszba kerülő riboszómafehérjéket, a nukleoluszon kívül szintetizálódott 5S rRNS-t és a 45S RNS éréséhez szükséges RNS-, illetve fehérjemolekulákat tartalmazzák. A nagy RNP-ből először a riboszómák 18S rRNS-t tartalmazó kis alegységei jutnak ki a citoplazmába, a sejtmag pórusain keresztül. A legvégső lépések, melyek a két riboszóma-alegységet éretté, fehérjeszintézisre alkalmassá teszik, a citoplazmában történnek. A riboszómák nagy (60S) és kis (40S) alegysége csak akkor asszociál egymással, amikor a riboszóma elkezdi egy polipeptidlánc szintézisét.

Az 5S rRNS és tRNS-ek génjei nem a nukleoluszban helyezkednek el. Ezek transzkripcióját az RNS-polimeráz III végzi. A tRNS-ek transzkripció utáni érése az elsődleges transzkriptum hasítását, utólagos nukleotid addíciót és a nukleozidok módosulását igényli. Az elsődleges transzkriptum mind 5'-, mind 3'-végén hosszabb, mint a végleges tRNS. Az 5'-vég felesleges szakaszának eltávolításában a ribonukleáz P nevű ribozim is részt vesz. A 3'-végen a felesleges szakasz eltávolítását a minden tRNS-en megtalálható CCA-OH vég szintézise követi. A tRNS-ek nukleotidjai tartalmazzák a legtöbb módosulást az összes RNS-molekulák között. (Több mint 60-féle módosulás ismert, létrejöttükhöz kb. 100 különféle enzimatikus reakció szükséges.) A nukleozidok bázisainak és ribózegységének a metilezésén kívül olyan bázisok és nukleozidok is találhatók a tRNS-ekben, amelyek más RNS-molekulákban nem fordulnak elő (pl. hipoxantin, dihidrouracil, pszeudouridin) (3-18. ábra).



3-29.ábra. A riboszóma-RNS transzkripciója eukariótákban. *A nukleoszomában levő transzkripciós egység 45S nagyságú prekurzor RNS-sé íródik át. Ezen belül található a 18S, az 5,8S és a 28S rRNS-ek szekvenciája és közöttük átíródó elválasztó (spacer) szakaszok vannak, amelyek az elsődleges transzkriptumból kivágódnak. Emberben a 13., 14., 15., 21. és 22. kromoszóma nukleoszomában levő részén több rRNS transzkripciós egység található egymás után sorozatban, a transzkripciós egységek között nem átíródó elválasztó szakaszok (spacer) találhatók. (Az 5S rRNS-t kódoló DNS önálló transzkripciós egység, nem a nukleoszomában helyezkedik el és ugyancsak több példányban fordul elő)*

A vírusgenom replikációja és az onkogének

3.3.

Faragó Anna

A vírusgenom

A vírusok fertőzőképes nukleinsavból és azt körülvevő fehérjeköpenyből álló részecskék. (Az egyedi részecske neve virion). Nem rendelkeznek energiaszolgáltató és fehérjeszintetizáló rendszerrel, ezért csak élő sejtben képesek önmaguk reprodukciójára, **abszolút paraziták**. A baktériumokban élősködő vírusokat **bakteriofágoknak** nevezik.

Ellentétben a prokariótákkal és eukariótákkal, a vírusok genetikai információját hordozó nukleinsav nem minden vírus esetében kettős szálú DNS, a vírusgenom sokkal nagyobb változatosságot mutat. A kettős szálú DNS-en kívül bizonyos vírusokban egyszálú DNS, másokban egyszálú vagy kétszálú RNS tölti be a genetikai információt hordozó nukleinsav szerepét. A vírusgenom nagysága is különböző lehet, vannak csupán 4–5 gént tartalmazó vírusok és vannak több száz génnel rendelkezők. (Néhány vírus genomjának nagyságát az *3-1. táblázat* szemlélteti.)

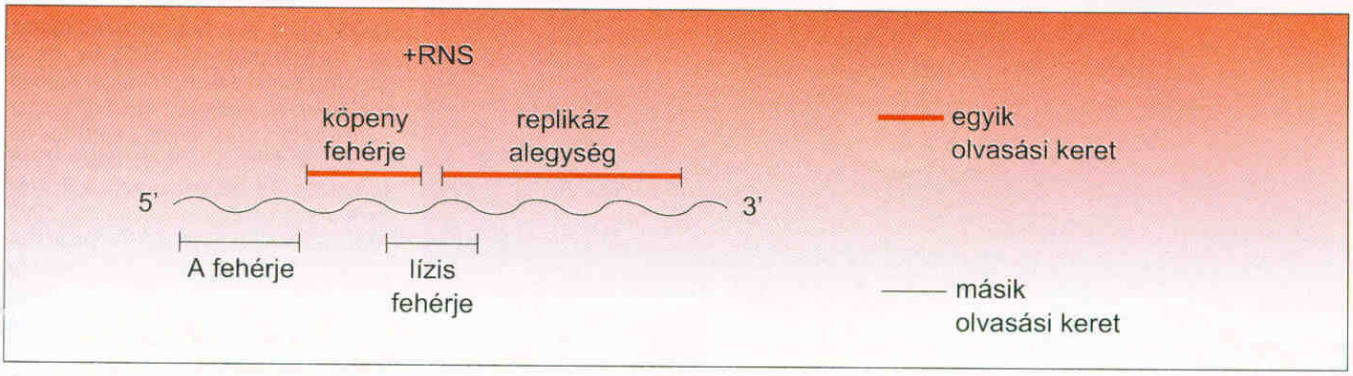
3-1. táblázat. Néhány reprezentatív vírus genomja

Nukleinsav	Reprezentatív vírus	Gének hozzávetőleges száma
Egyszálú DNS	ϕX174 fág	5
Kétszálú DNS	polyomavírus	6
	adenovírus 2	30
	T4 fág	150
Egyszálú RNS	Qβ fág	4
	R2 fág	4
	Rous-sarcoma vírus	4
	poliovírus	8
	influenzavírus	12
Kétszálú RNS	reovírus	22

Az RNS-genommal rendelkező vírusok replikációjához olyan enzimekre is szükség van, amelyeknek a gazdasejt genomjának replikációjában nincs szerepük. A tisztán RNS-vírusok replikációjához az **RNS-dependens RNS-polimeráz (replikáz)** szükséges, míg a retrovírusok replikációjában az **RNS-dependens DNS-polimeráz (reverz transzkriptáz)** vesz részt. Ezeket az enzimeket (illetve a replikáznak legalább egy alegységét) a megfelelő vírusgenom kódolja.

A vírusok köpenyét általában egy- vagy kétfajta fehérje nagyszámú molekulájának együttese alkotja. A fehérje alegységek szabályos geometriai alakzattá állnak össze, a virionok köpenye ezért leggyakrabban vagy hengeres-spirális, vagy ikozahédrális szerkezetet alkot.

Bizonyos vírusok genomja még további eltéréseket is mutat a prokarióták és eukarióták genetikai anyagának viselkedésétől. A kis, egyszálú RNS-(+RNS) genommal rendelkező bakteriofágok között vannak olyanok, melyek **átfedő géneket** tartalmaznak, mert a kis RNS-molekula csak így képes raktározni az információt. Az átfedő gének esetében nemcsak a transzkripció kezdeti pontjai, hanem a különböző génekhez tartozó kodonok leolvasásának keretei is elcsúsztak egymáshoz képest *(3-30. ábra)*.



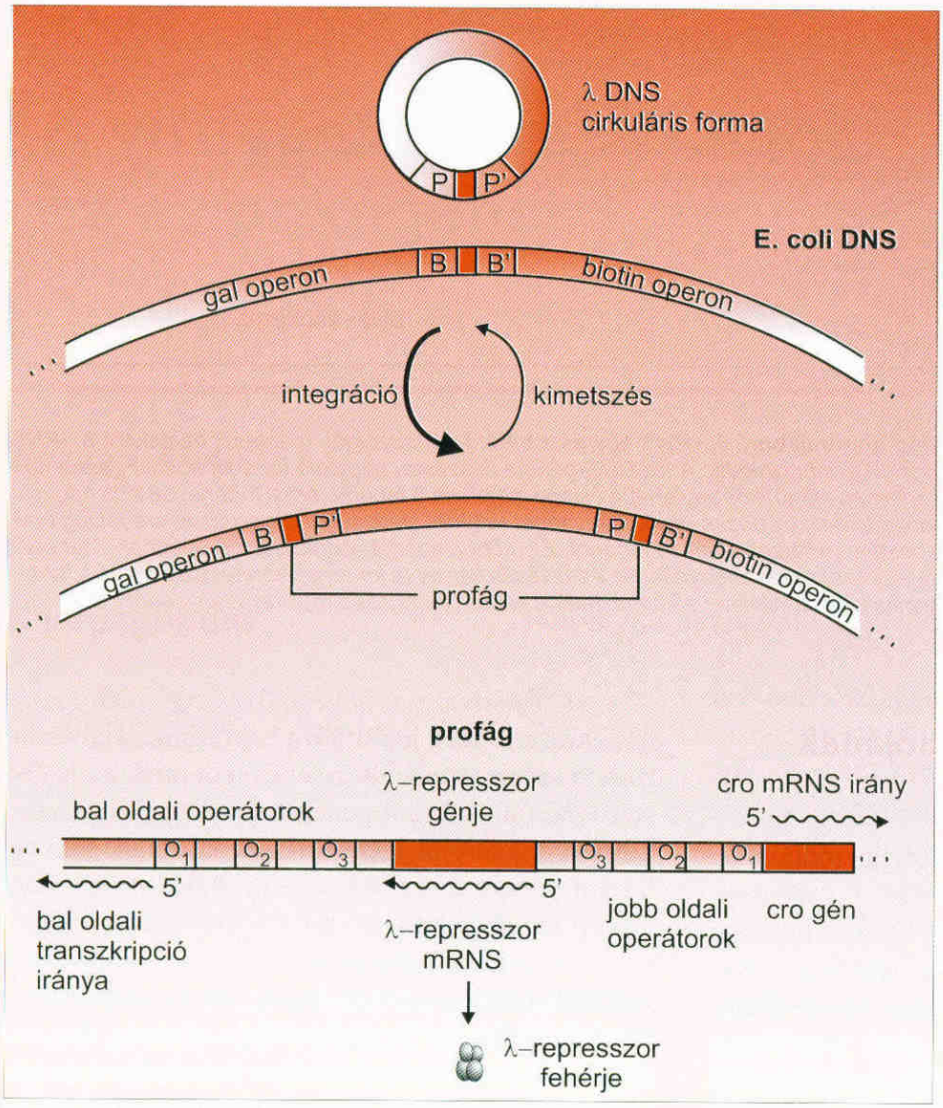
3-30. ábra. Átfedő gének egy kis RNS-fág genomjában. *A +RNS egyrészt mRNS-ként szolgál, másrészt mintaként a –RNS szintéziséhez. A –RNS-ről azután sok új +RNS szintetizálódik. A kis RNS-genom összesen négyféle fehérjét kódoló gént tartalmaz. A köpenyt 180 azonos molekula (14 kDa nagyságú) köpenyfehérje és egy molekula A fehérje (érési fehérje, 38 kDa nagyságú) alkotja. Ezeken kívül a fág genom kódolja a replikáz enzim egyik alegységét (a többi alegységet a gazdasejt eredetileg más funkciójú fehérjéiből alakítja ki a fág) és a baktérium lízisét előidéző fehérjét. Ez utóbbi fehérjét kódoló gén csak a köpenyfehérjét és a replikáz alegységet kódoló gének egy-egy szakaszát átfedve fér el. Az olvasás kerete (a kodonok kerete) azonos az A fehérje és a lízis fehérje génjei számára és egy másik olvasási keret alkalmazható a köpenyfehérjét és replikáz alegységet kódoló génekre*

A bakteriofágok replikációjának litikus és lizogén útja

A bakteriofágok replikációja kétféle módon is bekövetkezhet, az egyik (litikus út) a gazdasejt azonnali pusztulásával jár, míg a másik (lizogén út) a gazdasejtet generációkon keresztül nem károsítja. A bakteriofágok replikációjának **litikus útját** jól szemlélteti az Escherichia coli baktérium T4-fágjának szaporodása. A T4-fág a bonyolultabb szerkezetű vírusok közé tartozik, ikozahedrális feje, farka és farokrostjai vannak. A T4-fág genomja kettős szálú DNS, teljesen kitölti a köpenyfehérjékből álló ikozahedrális fej belsejét. Az E. coli baktérium fertőzésekor a T4-fág a farokrostjai segítségével a baktérium külső membránjának egy specifikus helyéhez kötődik és kizárólag a meztelen DNS injektálódik a baktériumsejtbe. Pár perccel azután, hogy a fág-DNS a baktériumsejtbe jutott, a baktérium saját DNS-ének, RNS-ének és fehérjéinek a szintézise leáll és megkezdődik a vírus komponenseinek a szintézise. A vírus-DNS átveszi az irányítást és a baktérium minden szintetizáló apparátusa a vírus szaporodásának a szolgálatába áll.

A T4-DNS által kódolt gének három csoportba tartoznak: azonnali korai, késleltetett korai és késői gének. A korai génekről már akkor folyik transzkripció, mielőtt még a fág DNS-replikációja megtörténik. A korai gének kódolják azokat a fehérjéket, amelyek leállítják a baktérium saját makromolekuláinak a szintézisét és lebontják a gazdasejt DNS-ét. A késői gének transzkripciója a fág-DNS replikációját igényli. Ezek kódolják többek közt a köpenyfehérjéket és egy **lizozim** enzimet, amely a baktérium sejtfalát képes elbontani. A virion fehérjekomponensei szigorúan meghatározott sorrendű lépésekben állnak össze a végső szerkezetté. A fág-DNS replikációja és a virion alkotórészeinek az összerendeződése után a lizozim kilyukasztja a baktérium sejtfalát, és az érett virionok újabb infekcióra készen kijutnak a külvilágba, miközben a baktériumsejt szétesik **(bakteriolízis)**.

Vannak olyan bakteriofágok is, amelyek – a körülményektől függően – két különböző életutat választhatnak. Követhetik az előbb ismertetett litikus utat, amely a fertőzés után rövid időn belül a gazdasejt pusztulásához vezet, de választhatnak egy olyan utat is **(lizogén út)**, amelyik nem öli meg a gazdasejtet azonnal. Azokat a fágokat, amelyek nem minden esetben pusztítják el a gazdasejtjüket, **temperált fágoknak** nevezik. A temperált fágok viselkedését jól szemlélteti az E. coli baktérium λ-fágjának szaporodási ciklusa. A λ-fág kettős szálú DNS-e a virionban lineáris, a gazdasejtbe jutva cirkuláris formává alakul. A cirkuláris DNS replikálódhat önállóan, ehhez részben a saját maga által kódolt fehérjéket, részben a gazdasejt saját fehérjéit veszi igénybe és ebben az esetben a fág a



3-31. ábra. A λ-fág integrációja az E. coli baktérium DNS-be és a profág szerkezete. *A baktériumban cirkulárissá alakuló fág-DNS a specifikus P/P' szekvencia segítségével integrálódik a bakteriális DNS galaktóz és biotin operonok közötti szakaszán, ahol a bakteriális DNS egy specifikus B/B' szekvenciát tartalmaz. A profág génjei közül ezután csupán a λ-represszor fehérjét kódoló gén kerül expresszióra. A λ-represszor fehérje sztérikusan gátolja a saját génjétől jobbra és balra elhelyezkedő, egymással szemben orientált gének transzkripcióját, a jobb oldali, illetve bal oldali operátor régiókhoz kötődve, amelyek mindegyike 3 kötőhellyel rendelkezik a represszor számára. (A λ-represszor affinitása a legnagyobb az O1 kötőhelyekhez). A λ-represszor mennyiségének valamilyen a baktériumot érő károsító hatás miatt bekövetkező csökkenése a cro gén derepresszióját idézi elő. A cro gén által kódolt fehérje a λ-represszor fehérjét kódoló gén represszora, ezért a cro gén derepressziója a λ-represszor szintézisének a megszűnéséhez, és a fág többi génjének a derepressziójához vezet. A profág átvált a litikus ciklusba*

litikus utat választja. Bizonyos körülmények között azonban a fág DNS-replikáció helyett, rekombináció segítségével integrálódik a gazda DNS-be a baktérium genomjának egy pontosan meghatározott helyére *(3-31. ábra)*. (Ez a hely a baktérium kromoszómáján a galaktóz operon és a biotin operon között helyezkedik el.) Az integrálódott fággenom a **profág**, és a baktérium amelynek kromoszomája most már a profágot is tartalmazza a **lizogén baktérium**.

A profág stabilan megmarad a baktérium-DNS-be integráltan mindaddig, míg egy specifikus enzim – amely a kihasítását katalizálja – nincs jelen. Ezt az enzimet a profág kódolja, de a hasító enzim génjének transzkripcióját és így az enzim szintézisét a λ **represszor fehérje** megakadályozza. Mindaddig, míg a hasító enzim génje represszálva van, a profág együtt replikálódik a gazda-DNS-sel, ezért a baktérium minden utód sejtjének genomja tartalmazni fogja a profágot anélkül, hogy ez a sejt károsodását okozná. A lizogén baktérium utódai sok osztódáson keresztül változatlanul fennmaradhatnak.

A profág által kódolt fehérjék közül ilyenkor kizárólag a λ-represszor génje kerül transzkripcióra. A megszintetizálódott λ-represszor fehérje a profág operátor régióihoz kötődve megakadályozza az összes többi fágfehérjét kódoló traszkripciós egység transzkripcióját. Ha a λ-represszor fehérje molekuláinak száma csökken a baktériumsejtben (bizonyos környezeti változások, UV-besugárzás stb. hatására), az első gén, amely a represszió alól

felszabadul egy cro fehérjének nevezett, másik represszor fehérjét kódoló gén. A cro fehérje a λ-represszor génjének transzkripcióját gátolja, és nem engedi, hogy több λ-represszor szintetizálódjék. Ezen a ponton a lizogén út irreverzíbilisen átvált litikus úttá. A λ-represszor fehérje hiányában a profág többi génje a represszió alól felszabadul, megszintetizálódik a profág kihasítását katalizáló enzim és a fág-DNS a baktérium-DNS-ből kiszakadva, önálló, gyors replikációba kezd. A virionok alkotóelemeinek összerendeződése után a gazdasejt lizál és a virionok a környezetbe kerülnek (3-31. ábra).

Állati vírusok replikációja

A vírusoknak nemcsak a genetikai anyaga változatos, de replikációjukhoz, illetve annak gyorsításához is meglehetősen változatos trükköket alkalmaznak. Minthogy szaporodásukhoz – a bakteriumoktól eltérően – a gazdaszervezet saját sejtjeinek molekuláit, a gazdasejt saját fehérjeszintetizáló apparátusát veszik igénybe, továbbá nem rendelkeznek olyan, a gazdasejtjétől biokémiailag teljesen különböző komponenssel, mint a baktériumok sejtfala, az olyan típusú antibiotikumok, mint amelyek a baktériumok szaporodását gátolják vagy képesek megölni a baktériumokat a gazdaszervezet lényeges károsítása nélkül, a vírusok ellen nem hatásosak. Az emberi szervezetet megtámadó vírusok elleni gyógyszeres védekezésre csupán az egyes vírustípusok szaporodására jellemző, speciális molekuláris trükkök megismerése adhat reményt.

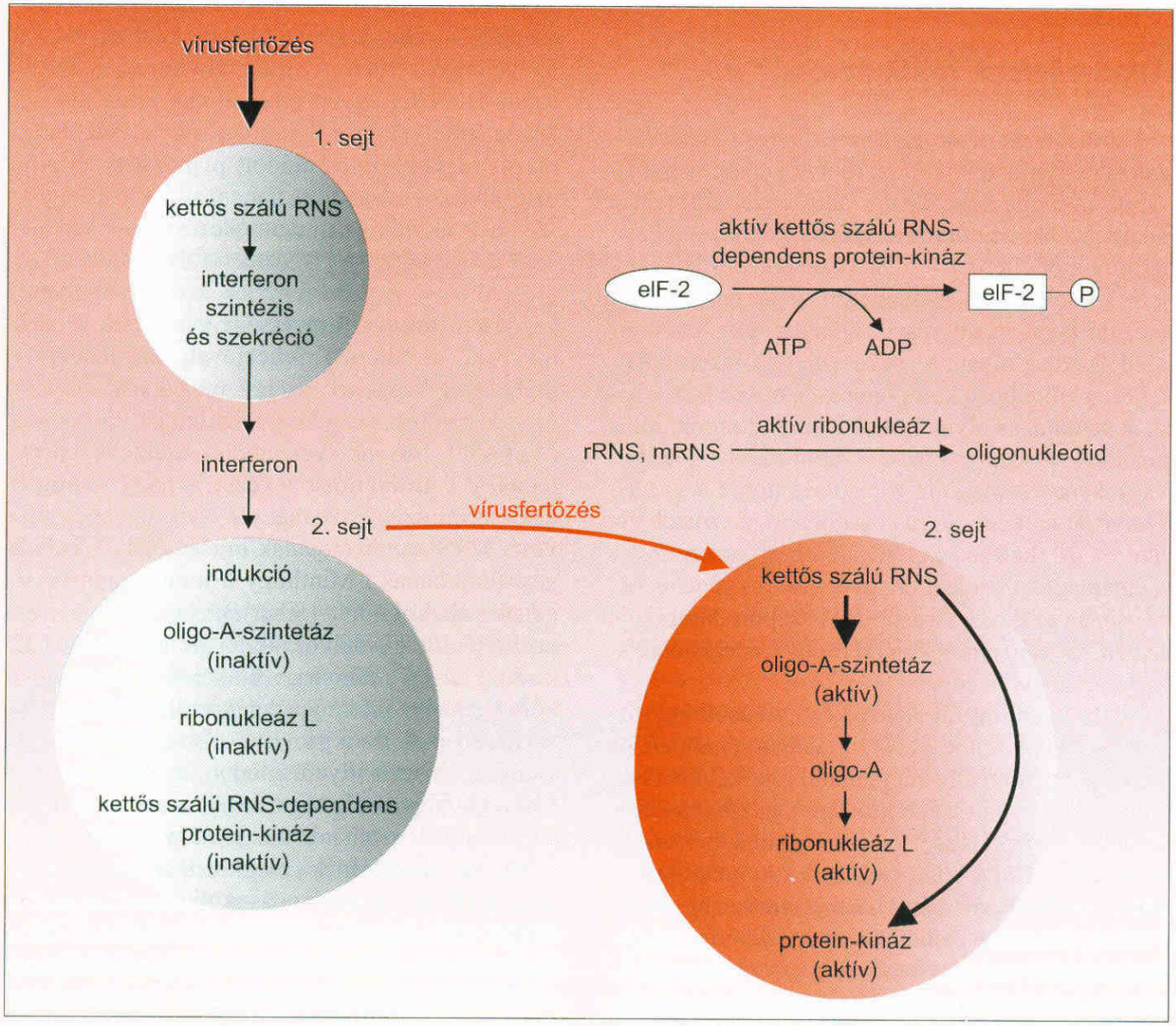
A **DNS-genommal rendelkező vírusok** egy fogékony gazdasejtbe jutva általában önállóan, a gazdasejt genomjától függetlenül replikálódnak és rövidebb vagy hosszabb idő alatt a gazdasejt károsodását, esetleg lízisét okozzák, miközben az új virionok a környezetbe kerülnek. (Az állati sejtek vírusai a T4-fágtól eltérően nem csupán a meztelen DNS-t juttatják a sejtekbe, hanem fehérjekomponenseket is.) Vannak azonban a DNS-vírusok között ún. **transzformáló DNS-vírusok**, például a polyomavírus, vagy a simianvírus (SV40 vírus), amelyek a fertőzött sejtek csak bizonyos típusaiban járják végig a szaporodás szokásos, önálló replikációval járó ciklusát, ezeket a gazdasejteket **permisszív gazdasejtnek** nevezik.

Más sejttípusokban, az ún. **nem permisszív gazdasejtek**ben ezek a vírusok nem képesek önállóan szaporodni, a nem permisszív gazdasejtben a fertőzés után nem képződnek utódvirionok. A nem permisszív gazdasejtek egy nagyon kis hányadában (egyetlen sejtben mintegy százezer sejt közül) azonban a transzformáló DNS-vírusok genetikai anyaga integrálódik a gazdasejt DNS-ébe és rövidebb vagy hosszabb idő alatt a gazdasejt rosszindulatú tumorsejtté történő transzformációját okozza. A transzformáló DNS-vírusok, pl. SV40 genomja a temperált fágokkal ellentétben, nem egyetlen, meghatározott helyen integrálódik a gazdasejt DNS-ébe, hanem több hely közül is választhat véletlenszerűen. Az integrálódott vírus-DNS a gazda-DNS-sel együtt replikálódik és az utódsejtek valamelyik kromoszómája ugyancsak tartalmazni fogja az integrálódott **provírust**. Gyakran nem a teljes vírusgenom, hanem annak csak egy része integrálódik. Az integrálódott vírusgenom által kódolt fehérjék egy része folyamatosan expresszálódik. A vírusfehérjék közül némelyek a gazdasejt **tumorszuppresszor génjeinek** produktumával, pl. a **p53 fehérjével, Rb-fehérjével** komplexet képeznek és így megakadályozzák a tumorszuppresszor gének fehérjéinek működését. (Az SV40 vírusnak ilyen módon viselkedő fehérjéjét **nagy T antigénnek** nevezik. A nagy T antigénnek permisszív gazdában is van szerepe, itt a vírus-DNS replikációjának iniciációjához szükséges komponens.) Minthogy a tumorszuppresszor gének által kódolt fehérjék lassítják a sejtproliferációt, akadályozzák az átmenetet a G1 fázisból az S fázisba, funkciójuk kiesése a komplex-képződés miatt a sejtproliferáció gyorsulásához vezet. Ez a provírus szemszögéből nézve előnyös, hiszen ilyen módon a provírus replikációja is gyorsul. A gazdasejt azonban elveszíti azt a kontroll mechanizmust, amely akadályozza a DNS replikációjának megkezdését mindaddig, amíg a DNS-t ért károsodások nincsenek kijavítva és így védi a sejtet a szomatikus mutációk kialakulása ellen. A szomatikus mutációk gyakoriságának emelkedése fontos komponense a rossszindulatú daganatok kialakulásának. A tumorszuppresszor gének fehérjéi működésének gátlása a valószínű oka a transzformáló DNS-vírusok által (hosszabb

idő alatt) előidézett daganatsejtté történő átalakulásnak.

Az RNS-genomot tartalmazó állati vírusok replikációja szempontjából megkülönböztetünk tisztán RNS-vírusokat és retrovírusokat. A **tisztán RNS-vírusok** genomjának replikációját az **RNS-dependens RNS-polimeráz (replikáz)** végzi. Ezeknél a vírusoknál a mutációk gyakorisága nagy, mert az RNS-polimeráznak nincs hibajavító nukleáz aktivitása. A tisztán RNS-vírusoknak a replikációs stratégiája különbözik aszerint, hogy a vírusgenom egyszálú +RNS, egyszálú –RNS vagy kettős szálú RNS. A gazdasejtbe jutott egyszálú +RNS betöltheti azonnal a mRNS szerepét is, és a vírusreplikációhoz szükséges speciális fehérjék, pl. a replikáz enzim szintézisét is biztosítja. A replikációhoz meg kell szintetizálódnia a komplementer, azaz –RNS-láncnak, majd erről másolódhat gyors ütemben az új +RNS-genom.

A –RNS-genommal rendelkező vírusok genomja nem használható mRNS-ként, ezért ezeknek meg kell szintetizálniuk a komplementer +RNS-láncot, mielőtt bármilyen vírus fehérje-szintézise sorra kerülne. A –RNS-genommal rendelkező vírusoknak ezért a fertőzéskor a gazdasejtbe kell juttatniuk a replikáz enzimet is. Kettős szálú RNS-vírusok ese-



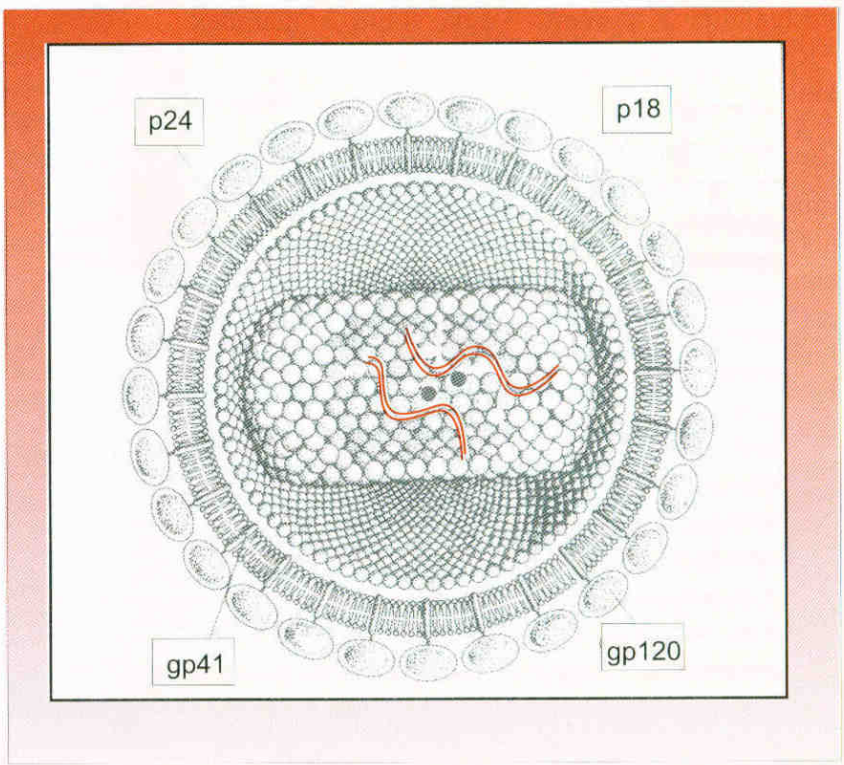
3-32. ábra. A gazdaszervezet kettős szálú RNS által kiváltott védekezési mechanizmusa α- és β-interferonok segítségével

tében is előbb a mRNS-ként szolgáló +RNS-t kell megszintetizálni, mielőtt a teljes genom replikációjára sor kerülne. Tisztán RNS-vírusok replikációja közben átmenetileg, minden esetben meg kell jelennie a **kettős szálú RNS-nek**. A kettős szálú RNS megjelenése a gazdasejtben, a gazdaszervezet védekezési reakcióját váltja ki, amelyet az **interferonok** közvetítenek *(3-32. ábra)*.

A gazdaszervezet vírusfertőzését követően, kettős szálú RNS megjelenésére bizonyos sejttípusok a citokinek családjába tartozó, interferonoknak nevezett fehérjéket szintetizálnak és szekretálnak. (Leukociták által szintetizált α-, fibroblasztok által szintetizált β- és limfociták által szintetizált immun-, más néven γ-interferonok különböztethetők meg, ez utóbbiak hatásmechanizmusa sokkal több komponenst tartalmaz.) Az interferonok a gazdaszervezet más, még nem fertőzött sejtjeiben három enzim szintézisét indukálják: egy **2',5'-oligo-adenilát- (oligoA) szintetáz** enzimét, egy specifikus, **oligoA-dependens endonukleáz** enzimét (ribonukleáz L) és egy specifikus, **kettős szálú RNS-dependens protein-kinázét**. A három enzim a szintézist követően nem aktív, de jelenlétük a sejtben egy vírusellenes készültséget jelent. Ha az ilyen módon felkészült sejtben a vírusfertőzés következtében megjelenik a kettős szálú RNS, működni kezdenek ezek az enzimek is. Ekkor aktiválódik a kettős szálú RNS-dependens protein-kináz, amely a gazdasejt fehérjeszintetizáló rendszerének egyik fontos fehérjekomponensét (az eIF-2 iniciációs faktort) foszforilálja és így inaktiválja. Ezzel a sejtben a fehérjeszintézis leáll és nem képződnek a vírus szaporodásához szükséges komponensek. A kettős szálú RNS aktiválja az oligoA-szintetáz enzimet is, a gyorsan szintetizálódó oligoA viszont az oligoA-dependens ribonukleázt aktiválja. A mRNS- és a rRNS-molekulák a ribonukleáz hatására degradálódnak és a fertőzött sejt nem termel új virionokat. A fenti mechanizmus az interferonok hatásának csupán egyik komponense.

A **retrovírusok** felfedezése változtatta meg (részben) a genetikai információ áramlásának irányáról korábban alkotott centrális dogmát, miszerint a genetikai információ iránya DNS → RNS → fehérje. Az RNS-genommal rendelkező retrovírusok esetében ugyanis a genetikai információ RNS-ről kerül DNS-re, innen származik a retrovírus elnevezés. Az RNS-mintáról történő DNS-szintézist az **RNS-dependens DNS-polimeráz (reverz transzkriptáz)** katalizálja, ezt az enzimet a retrovírusok genomja kódolja.

A retrovírusok genomja egyszálú +RNS-molekula, amelynek két azonos kópiáját tartalmazza a virion. Az RNS egy ikozahedrális fehérjeköpennyel van körülvéve. A köpenyen belül található a reverz transzkriptáz enzim is, amelyet a virion a gazdasejt fertőzésekor ugyancsak a gazdasejtbe juttat. A köpeny körül egy lipid kettősréteg helyezkedik el, amely glikoprotein-„tüskéket" tartalmaz. A glikoproteinek a vírusgenom által kódolt fehér-



3-33. ábra. A humán immundeficiencia vírus (AIDS vírus) szerkezetének vázlatos képe

jék, a lipid kettősréteget a virion az előző gazdasejt membránjából „rabolta". A retrovírusokra jellemző szerkezetet mutatja a humán immundefficiencia vírus **(HIV, AIDS vírus)** képe *(3-33. ábra)*. A retrovírusok életciklusa akkor kezdődik, amikor a vírus glikoproteintüskéi segítségével egy fogékony gazdasejtnek e glikoproteinre érzékeny receptorához kötődik. Ezután a vírus és gazdasejt lipidmembránja összeolvad és a virion belső alkotóelemei a sejt belsejébe kerülnek.

A retrovírusok szaporodásának kötelező, elkerülhetetlen feltétele a vírusrészecske +RNS-genomjáról a reverz transzkriptáz segítségével másolódó **kettős szálú DNS integrálódása** a gazdasejt genomjába. A reverz transzkriptáz által katalizált folyamat bonyolult, több lépésből áll. A fertőzés után a +RNS-láncról először a –DNS-lánc szintetizálódik meg, majd a DNS–RNS hibridből az RNS legnagyobb része lebontásra kerül. Ezután az elkészült –DNS-láncról másolódik a +DNS-lánc. Mint minden DNS-polimeráz, a reverz transzkriptáz is primert igényel, az első néhány nukleotid közti foszfodiészterkötéseket nem tudja megszintetizálni. A retrovírusok érdekes trükköt alkalmaznak ennek a problémának az áthidalására;, a –DNS-lánc szintézisekor a primer szerepét egy tRNS 3'OH-vége szolgáltatja. A +DNS-szál szintézisekor az eredeti vírusgenomból származó RNS-molekulának egy nem lebontott kis darabja szolgáltatja a primert. Végül mind a maradék +RNS-lánctól, mind a tRNS-től megszabadul a kettős szálú DNS.

A lineáris RNS DNS-sé történő átírásában jelentős tényező, hogy a retrovírusgenom mind az 5'- mind a 3'-végén tartalmazza ugyanazt a szekvenciát (R-szekvenciának nevezik). A reverz transzkriptáz működését kísérő bonyolult folyamatok eredményeként az elkészülő DNS kettős helix hosszabb lesz, mint az eredeti +RNS-genom, az R-szekvencián kívül még két másik, eredetileg csak az RNS egyik, illetve másik végén szereplő szekvencia is megduplázódik, így az elkészülő DNS mindkét végén tartalmazni fogja ugyanazt a hosszabb szekvenciát (hosszú, terminális ismétlődés, LTR-szekvencia). A kettős szálú DNS cirkuláris formát vesz fel, a gazdasejt magjába jut és integrálódik a gazdasejt genomjába. Az integrálódás véletlenszerűen, különböző helyeken történhet, ahol a gazdasejt genomjában TCAG szekvencia van. Ellentétben a transzformáló DNS-vírusokkal, retrovírusok esetén az integráció gyakorisága igen nagy, a fertőzött sejtek igen nagy hányadában megtörténik.

A transzkripció, illetve a +RNS vírusgenom sokasodása, amely ugyancsak valódi transzkripciónak tekinthető, csak az integrálódott **provírusról** indul el a gazdasejt enzimeinek a segítségével. Az LTR szakaszoknak nagy szerepük van a gazdasejt DNS-be történő integrációban és a transzkripció szabályozásában is. A retrovírusgenom és a virion alkotórészeinek mérsékelt ütemű szintézise nem jár együtt a gazdasejt pusztulásával, a legtöbb retrovírus nem öli meg a gazdasejtet. A virion összeáll, majd a gazdasejt membránjának egy részén kidudorodik és a gazdasejt plazmamembránjának lipid kettősrétegéből egy darabot kiszakítva kerül a külvilágba. (A gazdasejt líziséhez csak a vírus nagyon gyors szaporodása vezet.) Mérsékelt ütemben szaporodó retrovírus a gazdasejt DNS-ébe integrálódva, provírusként a gazdasejt szaporodásakor generációról-generációra öröklődik és az utódsejtekben is jelen van.

Az embert fertőző retrovírusok közül az orvostudomány számára legfontosabb a már említett HIV, az **AIDS vírusa** (3-33. ábra). Az AIDS vírus fertőzésre legfogékonyabb sejttípus a T4 limfocita. A T4 limfociták nevüket egy sejtmembránjukban jellemzően jelen levő (T4 antigénnek) nevezett fehérjéről kapták. Ezek a sejtek az immunrendszerben életfontosságú feladatot látnak el a B limfociták és más T limfociták működésének elősegítésével. Az AIDS vírus membránburok glikoproteinjei közül a gp 120-nak nevezett fehérje nagy affinitással kötődik a T4 antigénhez és az ilyen módon a T4 sejtmembránjához kötődő vírus fertőzni képes a T4 limfocitákat. A gazdasejtbe jutva, a reverz transzkriptáz által katalizált folyamatok után a gazdasejt DNS-ébe integrálódva azután provírus formájában hosszú ideig jelen lehet úgy, hogy a vírushordozó szervezetet látszólag nem betegíti meg, bár a fertőzést követő néhány hetes periódus után a fertőzött egyén szervezetében a vírusfehérje kimutatható. A hordozó T4 limfociták aktiválódásával egyidejűleg a provírus is aktiválódik, a virionrészecskék szintézise erősen meggyorsul és a T4 limfocita elpusztul. A gp 120 fehérje más módon is működésképtelenné tudja tenni a T4 sejteket, több T4 sejtet membránjánál összekötve szinciciumokat alakít ki. A T4 sejtek működésképtelensége vezet az immunrendszer összeomlásához és a betegség kialakulásához. A betegek az immunrendszer összeomlását követő másodlagos fertőzések következtében halnak meg. Bár a T4 limfocita a legfogékonyabb

gazdasejt az AIDS vírus számára, néhány más sejttípus is megfertőződik az AIDS betegség folyamán. A gp 120 fehérjét kódoló gén mutációinak frekvenciája igen nagy, ezért a HIV ellen való oltáshoz az ellenanyag termeltetés egyenlőre nem látszik megvalósíthatónak. Az AIDS vírus ellen alkalmazott gyógyszerek főként a reverz transzkriptáz aktivitásának gátlására irányulnak. Ezek a vegyületek meglehetősen toxikusak, általában gátolják a mitokondriumokban levő DNS-polimerázt is.

Onkogéneket hordozó retrovírusok és a celluláris protoonkogének

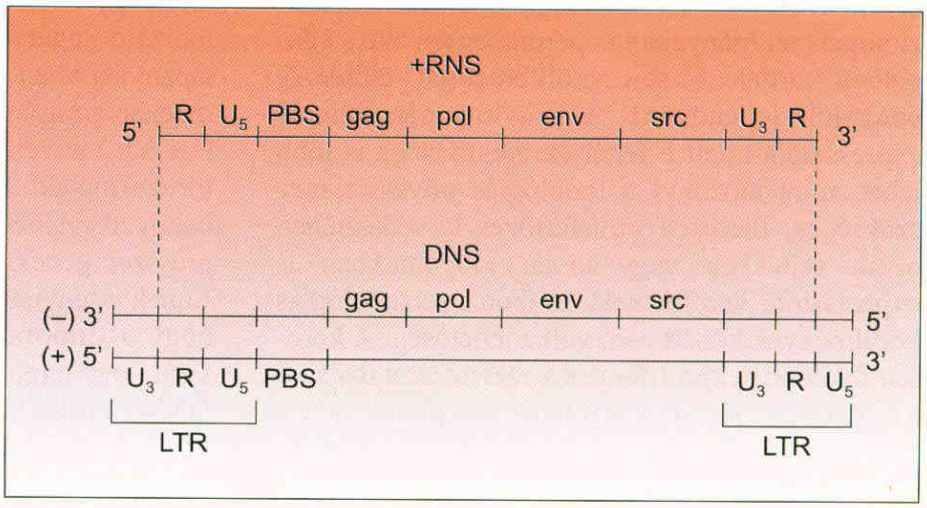
Különböző állati sejteket fertőző retrovírusok genomjai olyan géneket hordoznak, amelyek az integrálódott provírusról folyamatosan transzkripcióra kerülve, a gazdasejt rosszindulatú daganatos sejtté történő transzformációját előidéző fehérjék szintézisét teszik lehetővé. A daganatos átalakulás az ilyen típusú vírusokkal fertőzött sejtekben – ellentétben a transzformáló DNS-vírusok által okozott folyamattal – a fertőzés után gyorsan bekövetkező, akut változás. A retrovírusok által hordozott, **akut transzformációt** előidéző géneknek **(onkogének, v-onc gének)**, illetve az általuk kódolt fehérjéknek a megismerése nagymértékben járult hozzá a daganatos betegségek kialakulásának molekuláris mechanizmusáról rendelkezésre álló ismeretekhez.

Az első megismert, akut transzformációt okozó retrovírus, a madarakat fertőző Rous-sarcoma vírus genomjának szerkezetét a *3-34. ábra* mutatja.

A +RNS-genom csupán néhány fehérjeszerkezetet kódoló gént tartalmaz. Az 5'-, illetve 3'-végen elhelyezkedő, a provírus LTR-szekvenciájának kialakításában részt vevő régiók között találhatók a köpeny és a külső burok fehérjéit kódoló gének, a reverz transzkriptáz génje és az **src-gén**, amely a Rous-sarcoma vírus által fertőzött állatokban felelős a rosszindulatú daganatok kialakulásáért, illetve sejttenyészetekben a fertőzött sejtek transzformációjáért.

Más állatfajták daganatait előidéző retrovírusok esetében más-más transzformációért felelős gént (onkogént) találtak, ezeket többnyire az állat és a betegség nevét jelző betűnevekkel nevezték el *(3-2. táblázat)*. A legtöbb retrovírus csupán egyetlen transzformációért felelős gént tartalmaz. Az igazi meglepetés akkor érte a kutatókat, amikor kiderült, hogy a retrovírusok daganatos betegséget okozó onkogénjeivel homológ bázisszekvenciát mutató gének minden egészséges sejtben megtalálhatók. Ezeket a minden egészséges sejtben megtalálható, a vírus onkogénekkel (v-onc génekkel) homológ bázisszekvenciát mutató géneket **protoonkogéneknek** (c-onc géneknek) nevezték el.

A protoonkogének által kódolt fehérjék intenzív vizsgálata felderítette, hogy a celluláris protoonkogének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek a sejtek fiziológiás proliferációjának és differenciálódásának a szabályozásában vesznek részt. Mint azt egy későbbi fejezetben (lásd 5. fejezet) részletezzük, a protoonkogének által kódolt fehérjék között vannak ún. **növekedési faktorok**, amelyek a sejtproliferáció extracelluláris jeléül szolgálnak, vannak olyanok amelyek e növekedési faktorok



3-34. ábra. Egy onkogént hordozó retrovírusgenom (madár sarcoma vírus) szerkezete. *Az 5'- és 3'-végeken jelen lévő ismétlődő R szekvenciák, illetve az U5 és U3 szekvenciák a reverz transzkriptáz által létrehozott szerkezetben az LTR- (hossszú terminális ismétlődés) régiók kialakításában vesznek részt. A PBS-szakasz a reverz transzkriptáz primeréül szolgáló tRNS kötődésének helye. A köpenyfehérjéket a gag, a reverz transzkriptáz enzimet a pol és a külső burok fehérjéit az env gén kódolja. Az src gén a vírus által hordozott onkogén, egy protein-tirozin-kináz enzimet kódol*

3-2. táblázat. Néhány retrovírus onkogén (v-onc gén) által kódolt fehérje

Fehérje	Onkogén	Retrovírus
Növekedési faktor	sis	majom sarcoma
Növekedési faktor receptora	erbB	madár erythroblastosis
Nem receptor protein-tirozin-kináz	src	Rous madár sarcoma
GTP-kötő fehérje	H-ras K-ras	Harvey rágcsáló sarcoma Kirsten rágcsáló sarcoma
Transzkripciós faktor	fos myc	FBJ osteosarcoma madár myelocytomatosis

receptoraként működnek, vannak olyanok, amelyek a növekedési faktor–receptor komplex sejt belseje felé irányuló bonyolult jeltovábbító rendszerében játszanak szerepet **(speciális GTP-kötő fehérje és különböző protein-kinázok)** és vannak közöttük a növekedési jelre működésbe jövő génszabályozó fehérjék **(transzkripciós faktorok)** (3-2. táblázat).

Ezeknek a fehérjéknek a működése a sejtproliferáció fiziológiás szabályozása során nagyon pontosan koordinált. A retrovírusok által hordozott v-onc gének az egészséges sejtek protoonkogénjeinek mutációt szenvedett és az eukarióta gének exon-intron szerkezetét elvesztett, intron nélküli változatai. Akut transzformáló hatásukban különböző tényezők játszanak szerepet. A kódoló gén szerkezetét érintő mutáció következtében nem tökéletes fehérjék szintézisét idézik elő, hanem olyanokét, amelyek regulációjukat elveszítve, a fiziológiás jel hiányában is permanensen aktív állapotban tartják a sejt proliferációját előidéző, bonyolult jelrendszert. A provírus gén állandó expressziója miatt e fehérjék mennyisége is több lehet, mint amennyi a fiziológiás növekedéshez szükséges, illetve a vírusfertőzés következtében olyan sejtekben vagy olyan időpontokban is expresszióra kerülhetnek, amikor erre fiziológiás körülmények között nem volna lehetőség. A krónosan fokozott sejtproliferáció vezet az akut daganatos transzformációhoz bizonyos sejtekben.

Maguk a retrovírusok kevés esetben okoznak emberben daganatos megbetegedést, a v-onc gének, illetve az ezekkel homológ celluláris protoonkogének felfedezésének azonban óriási jelentősége van a daganatos megbetegedések patomechanizmusának a felderítése szempontjából. Ezen gének megismerését követően emberi daganatok sejtjeiben is analizálni kezdték a protoonkogéneknek megfelelő géneket és már az eddig analizált esetekben is az derült ki, hogy az emberi tumorok kifejlődésének nagyon fontos komponense a **protoonkogének átalakulása onkogénekké szomatikus mutáció következtében**. Az onkogénné átalakult gén fehérjéje ebben az esetben is permanensen aktivált állapotba hozza a sejtproliferáció fiziológiás körülmények között szigorúan szabályozott jelrendszerét. Emberi tumorok kifejlődésekor általában nem egyetlen gén mutációjáról van szó, hanem a regulációban szerepet játszó több gén egymást követő sérüléséről. A szomatikus mutációk gyakoriságának növekedése (UV-sugárzás, ionizáló sugárzások, mutagén kémiai anyagok a tápanyagokban vagy környezetben, a DNS repair mechanizmusának öröklött gyengesége vagy sérülése stb.) növelik a protoonkogének onkogénekké történő átalakulásának valószínűségét. A mutációk bekövetkeztének valószínűségét a tumorszuppresszor gének által kódolt fehérjék csökkentik. Ennek a ténynek az ismeretében könnyen érthető, hogy a **tumorszuppresszor gének kiesése** azok saját mutációja miatt vagy a **transzformáló DNS-vírusok** tumorszuppresszor gének fehérjéit közömbösítő fehérjéi elősegítik a protoonkogének esetleges átalakulását onkogénekké.

A protoonkogének közül eddig a növekedési faktorok jeltovábbító rendszerében szerepet játszó GTP-kötő fehérjét kódoló **ras gén** mutációit találták meg leggyakrabban (a vizsgált daganattípusok mintegy 30%-ában). E mutációk gyakoriságának az is oka lehet, hogy az emberi genom három különböző ras gént (H-ras, K-ras, N-ras) tartalmaz (mindháromból két-két allélt). Az emberi daganokban eddig talált, egyik leggyakoribb mutáció a p53 szuppresszor gén károsodása (mintegy 50%-ban fordul elő). Gyakori a p53 és ras mutációjának együttes előfordulása. Még gyakoribb a p16 tumorszuppresszor gén mutációja.

Az állati retrovírusok v-onc génjei valamikor a gazdasejtek c-onc génjeiből eredhettek (amelyekhez az integráció révén jutott közel a provírus), az evolució során intronjukat elvesztették és mutációkat szenvedtek.

3.4. Fehérjeszintézis: a transzláció mechanizmusa és a polipeptidlánc további sorsa

Faragó Anna

A kódszótár

A transzkripció, illetve eukariótákban az elsődleges transzkriptum érése után a fehérjék szerkezetére vonatkozó genetikai információ a mRNS nukleotidsorrendjében jelenik meg. Az egyes aminosavakat a mRNS 5'-vége felől a 3'-vég irányában egymást folyamatosan követő nukleotidhármasok határozzák meg, az egy-egy aminosavnak megfelelő nukleotidhármast nevezik **kodonnak**. A mRNS-ben jelen levő 4 különböző bázis mindegyike a kodonban 3 lehetséges helyen fordulhat elő. Ennek alapján összesen 64 különböző kodon jön létre, viszont a fehérjékbe csak 20 aminosav épül be. A 64 lehetséges kodon közül 3 nem jelent aminosavat (UGA, UAG, UAA, ún. **nonsense kodonok, stopkodonok**), ezek a polipeptidlánc szintézisekor a szintézis végének helyét mutató stopjelek. Az AUG kodon metioninnak felel meg, azonban az AUG kodonnak kitűntetett szerepe is van. Az **AUG kodon** jelzi ugyanis a mRNS-en a polipeptidlánc szintézisének startpontját. A polipeptidlánc szintézise során az első beépülő, a polipeptid NH_2-végén elhelyezkedő aminosav mindig metionin (prokariótákban a metionin formilezett származéka, N-formil-metionin). A startkodon első nukleotidjától a stopkodonig tart a polipeptidláncra vonatkozó **olvasási keret**.

A többi 60 kodon oszlik meg 19 aminosav között. Ebből következik, hogy az egyes aminosavakat egynél több kodon képes meghatározni (a genetikai kód „degenerált"), egy-egy kodon azonban mindig csak egy bizonyos aminosavnak felel meg. A metioninon és triptofánon kívül minden aminosavnak egynél több kodonja van *(3-35. ábra)*. A genetikai kód univerzális, néhány kivételtől eltekintve minden élőlényre ugyanaz a kódszótár érvényes. A kivételek közé tartozik néhány, az evolúció „zsákutcájának" tartott egysejtű organizmus, illetve az eukarióta sejtek sejtorganellumaiban elhelyezkedő fehérjeszintetizáló apparátus (ez utóbbira még visszatérünk.)

első hely 5' vég	második hely				harmadik hely 3' vég
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Ser	A
	Met	Thr	Lys	Ser	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

3-35. ábra. A kódszótár

A transzlációs apparátus komponensei

A nukleotidsorrend aminosavsorrenddé történő átfordításához szükség van egy adapter molekulára, amely pontosan felismeri az adott kodont, és a kodon által jelzett aminosavat a megfelelő helyre illeszti. Az adapter szerepét látja el a **tRNS** molekula. A tRNS-ekben található komplementer és nem komplementer nukleotidszakaszok által létrehozott másodlagos szerkezet síkban kivetítve lóhere alakú (lásd 3-19. ábra). Minden tRNS-ben található három nagyobb, jellegzetes szerkezetű hurok (I., II. és IV. hurok), míg egy kisebb hurok szerkezete variábilis (III. hurok). A tRNS 5'-vége foszforilált, 3'OH-végén minden tRNS CCA nukleotidsorrenddel rendelkezik, ez a transzkripció utáni módosulásként rakódik a molekulára. A tRNS három dimenziós térbeli szerkezete a már ismert kölcsönhatások miatt L alakú, az 5'-vég és a 3'-vég egymáshoz közel kerül és komplementer bázisok révén hidrogénhidakat alkot egymással. A 3'-vég CCA nukleotidjai már nem vesznek részt a komplementer szerkezetben, az adenilsav szabad 3'OH-jához vagy 2'OH-jához kötődik az adott tRNS-molekula által szállított meghatározott aminosav. A tRNS a hidrogénhidak miatt meglehetősen rideg szerkezetű, csak a CCA vég mozgékony.

A CCA végtől az L alakú térbeli szerkezetben legtávolabb elhelyezkedő hurok az antikodon hurok (II. hurok). Ez hét nukleotidból áll, de magát az **antikodont**, amely a tRNS által szállított aminosavat meghatározó kodont felismeri a mRNS-en, három nukleotid alkotja. Egy adott tRNS-molekulában levő antikodon nukleotidtriplet komplementer az általa felismert kodonnal és azzal antiparallel irányban illeszkedik össze. Ez az összeilleszkedés teszi lehetővé, hogy a polipeptidláncba a megfelelő aminosav épüljön be. Az antikodon 5'-oldalán mindig egy pirimidint tartalmazó nukleotid, 3'-oldalán általában egy módosított purint tartalmazó nukleotid helyezkedik el.

A lóhere alakúnak ábrázolt tRNS-molekulákban az 5'-végtől indulva megfigyelhető I. hurokban mindig megtalálható egy dihidrouracil tartalmú nukleotid, míg a IV. hurok jellegzetessége a timidin-pszeudouridin-citidin szekvencia, amelyet egy purintartalmú nukleotid követ. A különböző tRNS-molekulák nagyságának változatosságát (65–110 nukleotid) elsősorban a III. hurok nagyságának variábilitása okozza. A tRNS-ek szerkezete lehetővé teszi az aminoacil–tRNS kapcsolat kialakulását katalizáló, az adott tRNS-re és a hozzátartozó aminosavra egyaránt specifikus aminoacil-tRNS-szintetázhoz történő kötődést és a fehérjeszintézisben részt vevő riboszómákkal való kapcsolatot is.

Az aminosavakat jelentő különböző kodonok száma nagyobb, mint egy adott sejtben (eukarióta citoszolban) található különböző tRNS-ek száma. Minden aminosavnak más-más tRNS-molekula felel meg, azonban nem minden kodonhoz tartozik egy másik tRNS. Az azonos aminosavat jelző különböző kodonokat, ha azok csak 3. betűjükben különböznek egymástól, gyakran (de nem mindig) ugyanaz a tRNS-molekula ismeri fel. E jelenség magyarázatául a kodon–antikodon közötti speciális kapcsolat, **a kodon–antikodon lötyögés** szolgál. A kodon–antikodon kapcsolatban a komplementer, antiparallel nukleotidok elrendeződése nem olyan szigorú mint a DNS kettős hélix esetében, hiszen itt csupán három bázispár alakul ki, és a mellettük levő nukleotidok nem alkotnak olyan szoros, zárt szerkezetet, mint a DNS-ben. Ezért a kodon–antikodon kapcsolat egyik szélén, amely a kodon 3. helyen levő bázisa és az antikodon 1. helyen levő bázisa között jön létre, a DNS-ben soha elő nem forduló bázispárosodások is megengedettek. Ilyen „lötyögős" szerkezetek alakulnak ki akkor, ha az antikodon 1. helyén levő bázisa uracil (ez a szokásos adeninen kívül itt, még a guaninnal is tud hidrogénhidakat képezni), ha az antikodon 1. helyén guanin van (ez itt, a citozinon kívül még uracillal is tud kapcsolatot teremteni) és ha az antikodon 1. helyén levő nukleotid inozinsav. (Ez a nukleotid a nukleinsavak közül csak a tRNS-ben fordul elő, posztszintetikus módosulás útján alakul ki. Az inozinsavban levő hipoxantin különböző elrendeződésben az uracillal, citozinnal, de még az adeninnal is képes hidrogénhidak kialakítására, mert a kodon–antikodon szerkezet szélén a purin–purin kapcsolat nem ütközik olyan sztérikus akadályokba, mint a DNS-ben.) Az ilyen antikodonnal rendelkező tRNS-ek kettő vagy három, egymástól csak harmadik betűjükben különböző kodont is képesek felismerni. Az egy azonos tRNS által felismert különböző kodonok természetesen

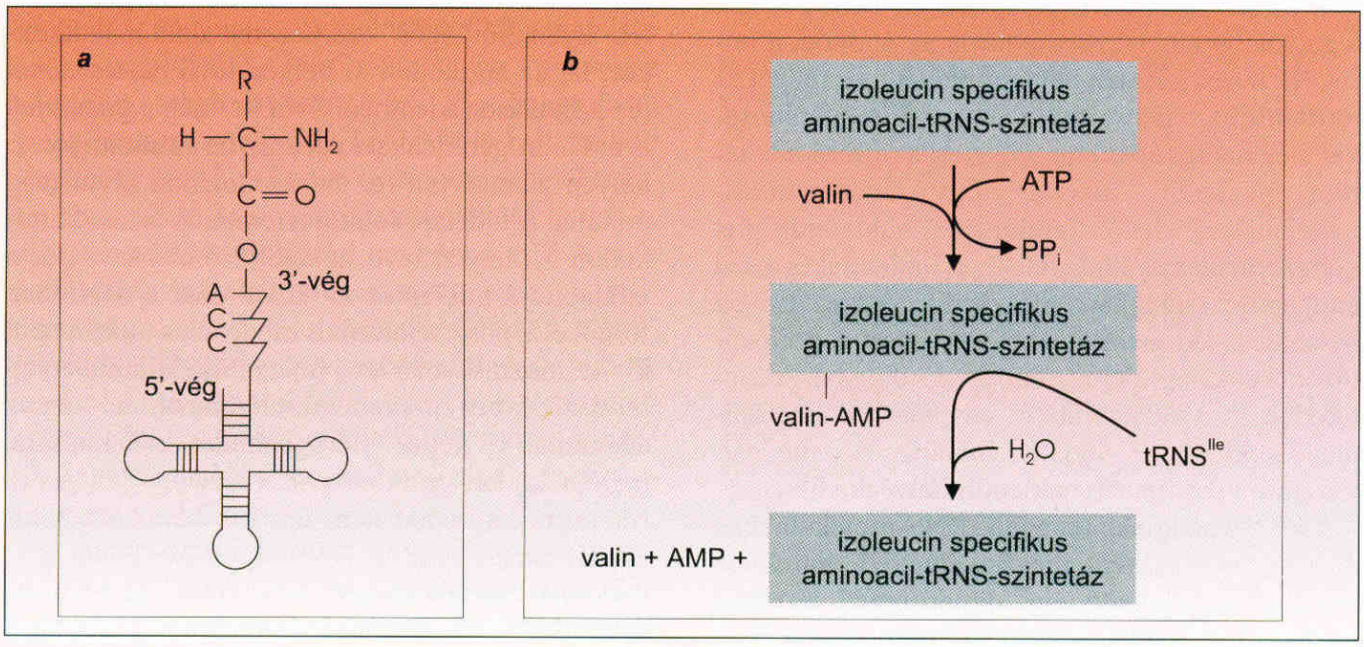
ugyanazt az aminosavat jelentik. Azoknak az aminosavaknak, amelyeknek kodonjai nemcsak a 3. betűben különböznek egymástól, egynél több tRNS-ük van.

A tRNS csak az antikodonnak megfelelő kodont ismeri fel és beilleszti a mRNS által meghatározott helyre az általa szállított aminosavat. Ha kísérleti úton összekapcsolnak egy tRNS-t a nem a specificitásának megfelelő aminosavval, akkor az hibás aminosav beépülését segíti elő a polipeptidláncba. Egy bizonyos tRNS-molekula és az antikodonjának megfelelő aminosav közti kapcsolat kialakulásának specificitásáért az **aminoacil-tRNS-szintetázok** felelősek. Az aminoacil-tRNS kialakulása két lépésben végbemenő folyamat, a köztitermék azonban nem disszociál le a reakciót katalizáló aminoacil-tRNS-szintetázról. Az első lépés az aminosav aktiválása ATP segítségével, e reakció eredményeként aminoacil-AMP képződik és pirofoszfát hasad le az ATP-ből (tehát két magas energiájú foszfát hidrolízisével kell számolnunk). Az aminoacil-AMP-ben az aminosavak karboxilcsoportja és az AMP foszfátcsoportja savanhidridkötést alkot egymással. A második lépés az aktivált aminosav átvitele a specifikus tRNS-re, az AMP lehasadása közben. Az aminosav karboxilcsoportja ekkor a tRNS 3'CCA végén levő adenilsav ribózának 2' vagy 3'OH-jára kötődik észterkötéssel *(3-36. ábra)*. Ez a kötés – eltérően a legtöbb észterkötéstől – makroerg, az e kötésben konzervált energia a polipeptidlánc szintézisekor használódik fel. Az aminoacil-tRNS-szintetáz által katalizált reakciók netto egyenlete a következő:

$$\text{ATP} + \text{aminosav} + \text{tRNS} \rightarrow \text{aminoacil-tRNS} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Az egy bizonyos aminosavnak megfelelő kodont felismerő tRNS-t az aminosav felső indexbe tett rövidítésével szoktuk jelezni, pl. $tRNS^{Ala}$, $tRNS^{Ile}$, míg az aminosav és a tRNS közti észterkötés kialakulásának (a töltött tRNS-nek) a jelzése pl. alanil-$tRNS^{Ala}$, izoleucil-$tRNS^{Ile}$ stb.

Minden aminosavat saját, csak rá specifikus aminoacil-tRNS-szintetáz köt a megfelelő tRNS-hez. A fehérjeszintézis genetikai kódhoz való hűségét kizárólag az aminoacil-tRNS-szintetázok nagyfokú specifitása biztosítja. A tRNS azt az aminosavat segíti beépíteni a polipeptidláncba az antikodonja által felismert kodonnak megfelelő pozícióba, amelyiket a szintetáz hozzákötötte, csak a specifikus aminoacil-tRNS-szintetáz ismeri fel egyszerre az adott aminosavat és a neki megfelelő tRNS-t. Az aminoacil-tRNS-szintetázok a sejt legnagyobb specifitású enzimei közé tartoznak. A megfelelő tRNS felismerése könnyű feladat, mert



3-36. ábra. Az aminoacil-tRNS kialakulása. (a) *Aminoacil-tRNS szerkezete,* **(b)** *az aminoacil-tRNS-szintetáz hibajavító mechanizmusa*

a különböző aminosavakat szállító tRNS-ek bázisszekvenciája különbözik egymástól. Nehezebb pontosan felismerni az egyes aminosavakat, mert bizonyos aminosavak szerkezete meglehetősen hasonlít egymáshoz (pl. izoleucin–valin). Az aminoacil-tRNS-szintetázok kettős szűrővel rendelkeznek. Az esetleges (ritkán) elkövetett hibás reakciók korrigálására egy második szubsztrátfelismerő helyet is tartalmaznak. Ha véletlenül egy téves aminosavat aktiválnak (pl. az izoleucinra specifikus enzim a valint), a specifikus tRNS (jelen esetben $tRNS^{Ile}$) kötődésekor hidrolizálják a hibás kötést. (Az aminoacil-tRNS-szintetázoknak ez a sajátossága emlékeztet a DNS-replikációnál megismert hibajavító készségre, 3-36. ábra).

A polipeptidlánc szintézise a **riboszómák** segítségével zajlik. A riboszómák egy kisebb és egy nagyobb alegységből álló ribonukleoprotein-részecskék, amelyeknek prokariótákban, illetve eukariótákban megtalálható formái különböznek egymástól. A **prokarióta riboszóma** aktív, asszociált szerkezete **(70S riboszóma)** molekulatömege kb. 2 800 000 Da, hossza 29 nm, szélessége 21 nm. A nagyobb alegység (50S alegység) két rRNS-t, a mintegy 120 nukleotidból álló 5S rRNS-t és a mintegy 3000 nukleotidból álló 23S rRNS-t tartalmazza és ezeken kívül még mintegy 34 különböző fehérjét. A kisebb alegységben (30S alegység) egyetlen, kb. 1500 nukleotidból álló 16S rRNS van és kb. 21 fehérje.

Az **eukarióta riboszóma** (eltekintve a mitokondriumokban levő riboszómától) nagyobb és több komponensből áll. Az eukarióta riboszóma nagyobb alegysége (60S alegység) három molekula rRNS-t tartalmaz. Ezek közül az egyik egy nagy, kb. 5000 nukleotidból álló 28S rRNS, a másik kettő kisebb, 160 nukleotidból álló 5,8S, illetve 120 nukleotidból álló 5S rRNS. A nagyobb alegységhez kb. 45 fehérjemolekula tartozik. A kis alegység (40S alegység) egyetlen, kb. 2000 nukleotidból álló 18S rRNS-t és mintegy 33 különböző fehérjemolekulát tartalmaz. Az aktív, asszociált szerkezet **(80S riboszóma)** hossza 32 nm, szélessége 22 nm.

A transzlációban éppen részt nem vevő, inaktív riboszómák két alegysége egymástól disszociált állapotban van. A polipeptidlánc szintézisének iniciációjakor a két alegység egyesül és kialakul az aktív riboszómaszerkezet, a polipeptidlánc szintézisének terminációjakor pedig a két alegység ismét disszociál egymástól. A folyamatos fehérjeszintézist a két riboszóma-alegység ciklikus asszociációja és disszociációja **(ismétlődő riboszómaciklus)** kíséri.

A mRNS 5'-vége felől 3'-végének irányában folyamatosan, megszakítás nélkül kódolja a polipeptidláncot annak NH_2-végétől kezdődően a COOH-vége felé. A **prokarióta mRNS**, a policisztronos prokarióta transzkripciós egységeknek megfelelően gyakran policisztronos mRNS, vagyis több, különböző polipeptidlánc szerkezetére vonatkozó információt hordoz. A mRNS 5'-végén levő nukleotidszakasz még nem tartalmaz polipeptidszerkezetet kódoló információt, az információ a **startjelül** szolgáló AUG kodonnál kezdődik. Az AUG kodont megelőző puringazdag régióban 3–9 bázis komplementer a prokarióta riboszóma kis alegység 16S rRNS-ének 3'-végével és így elősegíti a riboszóma kis alegység asszociációját a mRNS-sel. Egyben azt is meghatározza, hogy a mRNS-en előforduló metionint kódoló AUG kodonok közül melyik az első polipeptidlánc startpontját jelző **iniciátor kodon**. Az első polipeptidnek megfelelő szakasz a policisztronos mRNS-en egy **stopkodonnal** fejeződik be. Nem ritka, hogy a nagyobb biztonság kedvéért több stopkodon követi egymást. A policisztronos mRNS-en a stopkodont néhány nukleotidnyi távolságban követi a következő polipeptid szintézisének startpontjául szolgáló AUG, majd a második polipeptidlánc végét jelző újabb stopkodon. A startjel és stopjel annyiszor ismétlődik, ahány polipeptidláncra vonatkozó információt tartalmaz a mRNS. A mRNS 3'-vége túlnyúlik a kódoló régión.

Az **eukarióta mRNS** mindig csak egyetlen polipetidláncra vonatkozó információt hordoz. Az eukarióta mRNS 5'-végén Cap található és ugyancsak tartalmaz egy nem kódoló szakaszt a szintézis startpontját jelentő AUG kodon előtt. A polipeptidlánc befejezését jelző stopkodon után, a 3'-végen ismét egy nem kódoló szakasz és a poliA-farok található.

A transzlációhoz vagyis a polipeptidlánc szintéziséhez a fentebb említett komponenseken kívül még különböző enzimek, illetve **transzlációs faktoroknak** nevezett fehérjék szükségesek. A prokariótákban és eukariótákban található transzlációs faktorok különböznek egymástól, az euka-

rióták fehérjeszintézisében lényegesen nagyobb számú fehérjekomponens vesz részt, mint a prokariótákéban. Ezek csoportosítása aszerint történik, hogy a transzláció melyik szakaszában van szerepük.

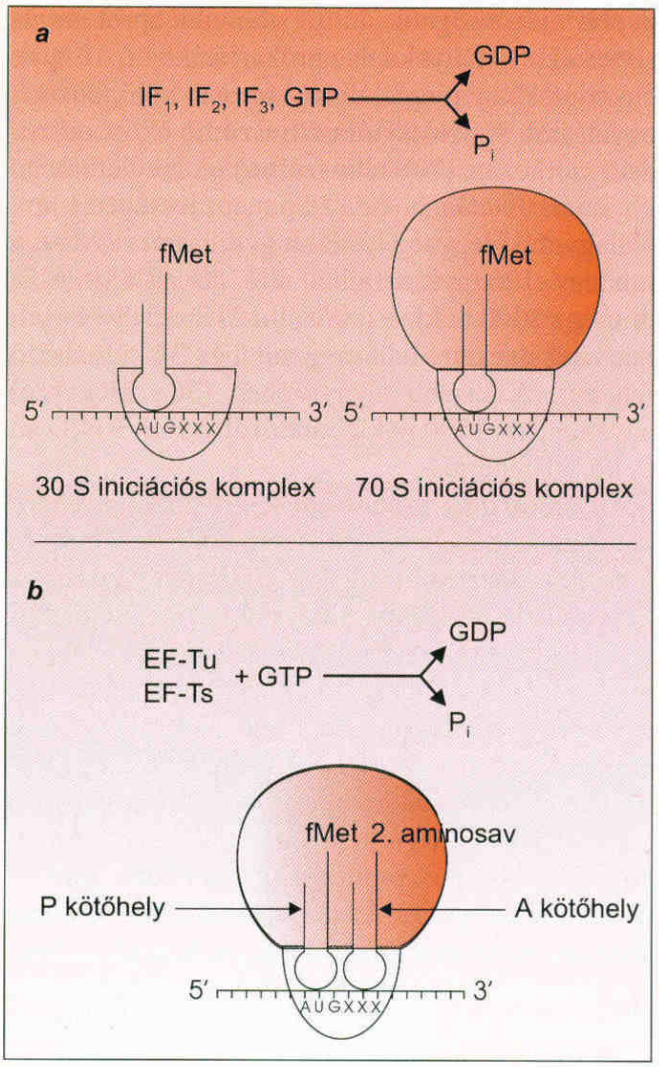
A polipeptidlánc szintézisének mechanizmusa

Miközben a mRNS-ben kódolt információ a mRNS 5'-vége felől a 3'-vég irányában fordítódik le, a polipeptidlánc az NH_2-végétől a COOH-vége felé növekszik. A polipeptidlánc szintézisében megkülönböztetünk iniciációs, elongációs és terminációs lépéseket. A szintézis menetét a **prokariótákban** megismert egyszerűbb mechanizmuson mutatjuk be.

A polipeptidlánc szintézise az iniciációs komplex kialakulásával kezdődik. A mRNS a riboszóma kis alegységéhez kötődik, a polipeptidlánc startjelét alkotó AUG kodonhoz az **iniciátor-tRNS** antikodonja illeszkedik, az így kialakuló szerkezetet nevezik **30S iniciációs komplexnek**. Az iniciátor tRNS metionint szállít, azonban prokariótákban az iniciátor tRNS által szállított metionin aminocsoportja formileződik. A metionin formileződése a metionin iniciátor tRNS-hez kötött állapotában megy végbe. A láncközi metionineket ugyancsk AUG kódolja, azonban a láncközi AUG kodonhoz egy másik tRNS szállítja a nem formilezett metionint. (Az iniciátor tRNS jelzése $tRNS^{fMet}$, a láncközi metionint szállító másik tRNS jelzése $tRNS^{Met}$.)

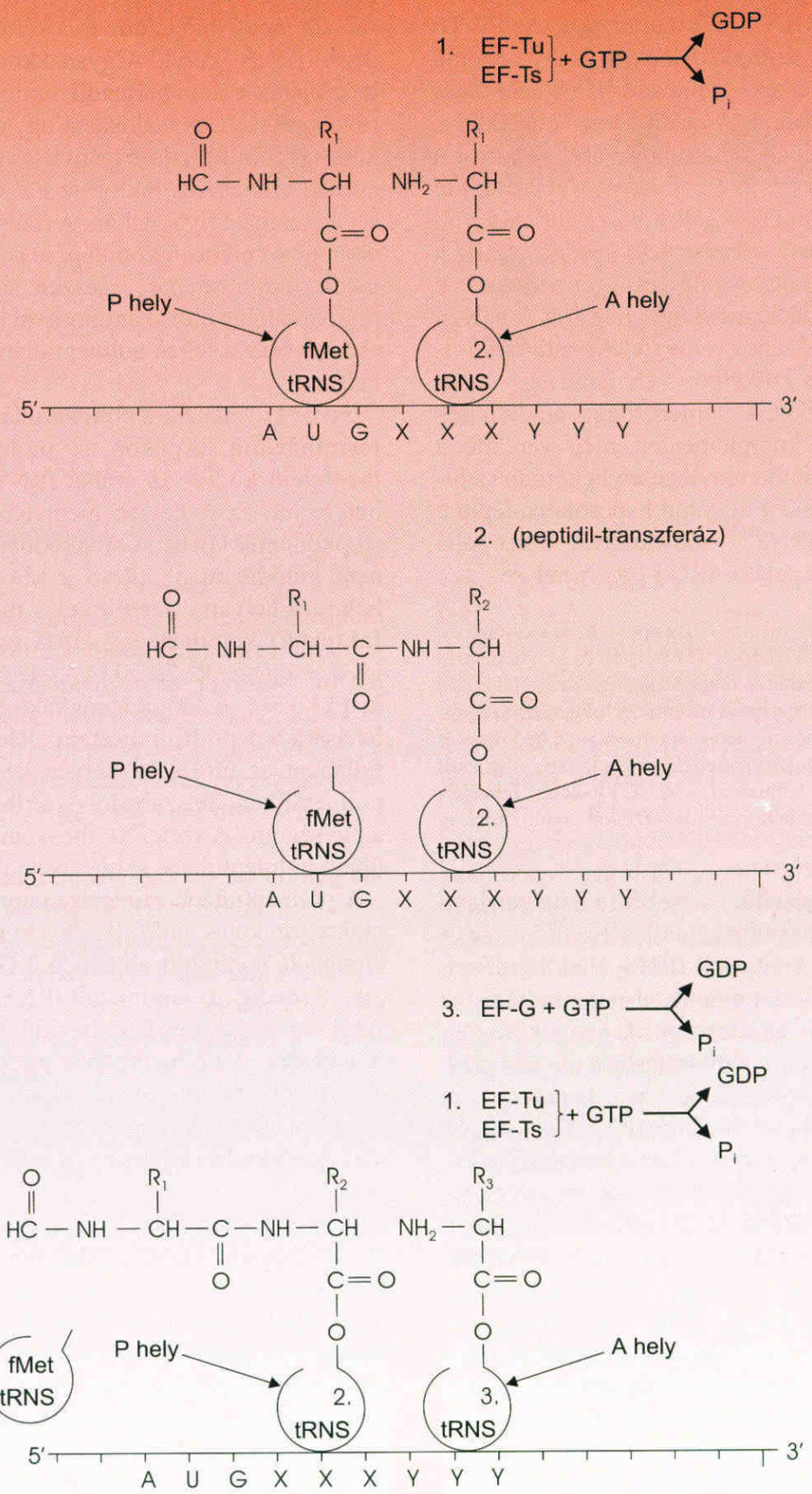
A 30S iniciációs komplex kialakulásához GTP, továbbá speciális fehérjék, az ún. iniciációs faktorok szükségesek. Prokariótában három **iniciációs faktor** ismert (jelzésük IF1, IF2, IF3). Az IF3 megakadályozza, hogy az üres 30S és 50S riboszóma alegységek egymáshoz kötődjenek. Az IF2 GTP-kötő fehérje és segíti a mRNS és az iniciátor tRNS (formil-metionil-$tRNS^{fMet}$) kötődését a 30S alegységhez. A mRNS és az iniciátor tRNS bekötődése után az 50S riboszóma alegység is csatlakozik a 30S alegységhez, a GTP ezen folyamat közben hidrolizál és az iniciációs faktorok ledisszociálnak. A GTP hidrolízisét az 50S alegységhez tartozó fehérjék segítik elő. A most már teljes riboszómát tartalmazó **70S iniciációs komplexen** két kötőhely alakul ki, a P (peptidil), illetve A (aminoacil) kötőhely. Az AUG kodon és a hozzá illeszkedő formil-metionil-$tRNS^{fMet}$ a P kötőhelyre kerül. Az A helynek megfelelően helyezkedik el a polipeptidlánc második aminosavának kodonja. Ezzel megtörtént a polipeptidlánc szintézisének **iniciációja** *(3-37a ábra)*.

A polipeptidlánc szintézisének **elongációja** ciklikusan ismétlődő három lépésből áll *(3-37b. és 3-37c. ábra)*, a ciklus annyiszor ismétlődik, ahány peptidkötés van a polipeptidláncban. Első lépésként először a polipeptid második aminosavát hordozó aminoacil-tRNS kötődik be az A (aminoacil) kötőhelyre, a második kodonnak megfelelő pozícióba illeszkedve. Az aminoacil-tRNS bekötődése GTP-t igényel, a bekötődésnél az **EF-Tu** nevű



3-37. ábra. A polipeptidlánc szintézisének menete prokariótában. (a) *Az iniciációs komplexek,* **(b)** *a P (peptidil-) és A (aminoacil-) kötőhely, és (***c***, a túloldalon) az elongáció lépései*

c


1. EF-Tu
EF-Ts
+ GTP
GDP
Pi
P hely
A hely
fMet tRNS
2. tRNS
5′
3′
A U G X X X Y Y Y
2. (peptidil-transzferáz)
3. EF-G + GTP
GDP
Pi
1. EF-Tu
EF-Ts
+ GTP
GDP
Pi
fMet tRNS
P hely
A hely
2. tRNS
3. tRNS
5′
3′
A U G X X X Y Y Y

elongációs faktor segédkezik. Az EF-Tu egy **GTP-kötő fehérje**, a bekötődés folyamán a GTP-t hidrolizálja és a GDP kötve marad rajta. Az EF-Tu GDP-vel alkotott komplexe inaktív és így nem tud részt venni a következő aminoacil-tRNS bekötődésének folyamatában. Egy másik elongációs faktor, az **EF-Ts** szükséges ahhoz, hogy az EF-Tu-ról a GDP disszociáljon és az EF-Tu ismét GTP-t tudjon kötni. Az EF-Tu GTP-GDP kötő ciklusa nagyon fontos komponense a transzláció hűségének. Ez a ciklus ugyanis bizonyos időt vesz igénybe és ez az időmennyiség szükséges ahhoz, hogy az A helyen elhelyezkedő kodonhoz a megfelelő antikodon illeszkedjék. Ha a kodonhoz véletlenül egy olyan antikodon illeszkedik átmenetileg, amelyiknek csak két betűje komplementer, még van idő a disszociációra mielőtt ténylegesen bekötődne a hibás tRNS. Az EF-Tu nem tud kapcsolatba lépni a formil-metionil-tRNS^{fMet}-molekulával, ezért soha nem szállítja az iniciátor tRNS-t az A helyre.

A ciklikusan GTP-t, illetve GDP-t kötő fehérjék különböző típusainak (GTP-kötő fehérjék, G fehérjék) és a GDP disszociációját elősegítő speciális fehérjéknek (exchange fehérjék) igen fontos szerepük van a sejt különböző folyamatainak szabályozásában, e kérdés részletes ismertetésére még visszatérünk (elsősorban az eukarióta sejtek extracelluláris jelre adott válaszának mechanizmusánál). A **GTP-kötő fehérjék** guanilkötő helye konzervatívan megőrződött évmilliárdokon keresztül.

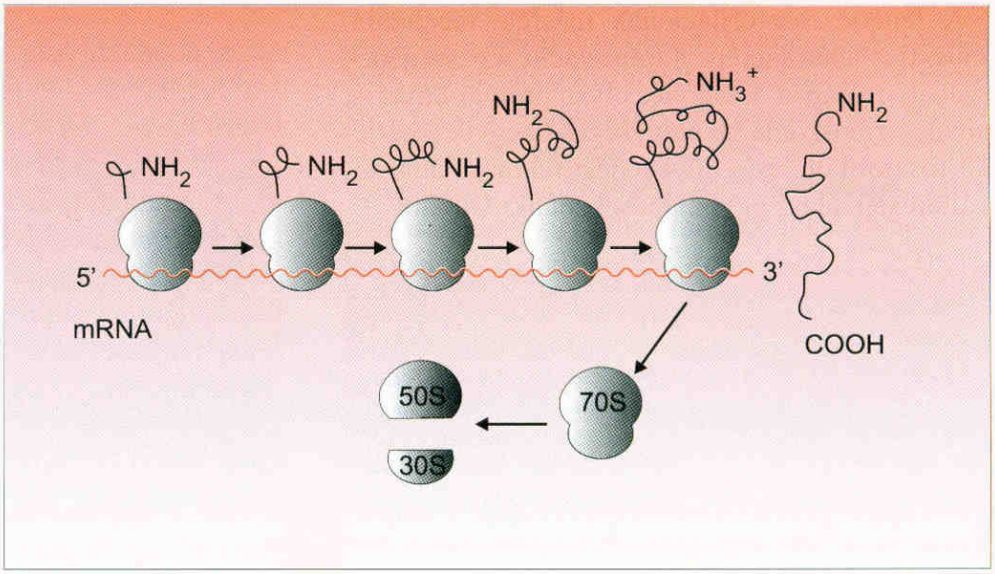
Az elongáció második lépéseként a P helyen levő iniciátor tRNS (formil-metionil-tRNS^{fMet}) és az A helyen bekötött aminoacil-tRNS által hordozott aminosavak között létrejön az első peptidkötés. A második aminosav aminocsoportja peptidkötést alkot a formil-metionin karboxilcsoportjával, ennek következtében megszűnik a kapcsolat a formil-metionin és az iniciátor tRNS CCA végén levő OH-ja között. A peptidkötés kialakulása külön energiát nem igényel, mert az aminoacil-tRNS (jelen esetben a formil-metionil-tRNS^{fMet}) kialakulásakor felhasználódott ATP aminoacil-tRNS kötésben konzerválódott energiája hajtja a reakciót. A peptidkötés kialakulását a riboszóma 50S alegység saját fehérjéi közé tartozó **peptidil-transzferáz** katalizálja. A peptidkötés kialakulása után a második aminosav tRNS-éhez kötve helyezkedik el a kéttagú peptid a riboszóma A kötőhelyén.

Az elongáció harmadik lépése a transzlokáció, amelynek során a riboszóma elgördül a mRNS-hez képest. Az AUG kodon és az üres iniciátor tRNS legördül a P helyről, a P helyre a második aminosavnak megfelelő kodon és a kéttagú peptidet hordozó tRNS kerül. Ugyanakkor az A helyen megjelenik a lánc harmadik aminosavát meghatározó kodon. A transzlokáció ugyancsak egy molekula GTP hidrolízisét igényli és a harmadik prokarióta elongációs faktor az **EF-G (transzlokáz)** segédkezik a folyamatban. A transzlokáció után az elongációs ciklus három lépése ismétlődik minden újabb aminosavnál egészen addig, amíg a polipeptidlánc utolsó aminosavát hordozó tRNS és ehhez kötve a teljes polipeptidlánc nem kerül a P helyre.

Ekkor következik a polipeptidlánc szintézisének **terminációja**. Amikor az utolsó aminosavnak megfelelő kodon az utolsó tRNS-sel együtt a P helyre jut, az A helyen megjelenik valamelyik a stopkodonok közül. A stopkodonnak megfelelően nem kötődik újabb tRNS a riboszómához az A helyre. Ehelyett a **terminációs faktorok (release faktorok)** kötődnek (az UAG esetében RF1, az UGA esetében RF2, az UAA esetében bármelyik a kettő közül). A terminációs faktorok kötődésének hatására a peptidil-transzferáz lehasítja a polipeptidláncot az utolsó (P helyen levő) tRNS-ről. A polipeptidlánc felszabadul és a riboszóma szétesik alegységeire. A szétesett riboszóma elkezdheti egy újabb polipeptidlánc szintézisét.

A polipeptidlánc szintézise peptidkötésenként 4 makroerg kötés hidrolízisébe kerül. Ebből 2 az elongáció során hidrolizálódó 2 GTP-ből származik, 2 pedig az aminoacil-tRNS kialakulásakor AMP-vé és pirofoszfáttá hasadó ATP hidrolíziséből adódik. A polipeptidlánc iniciációja 3 makroerg kötés hidrolízisével emeli a teljes lánc szintézisének energiaigényét, 2 az iniciátor aminoacil-tRNS kialakulásához, 1 a bekötődéséhez szükséges.

Egy riboszóma kb. 80 nukleotidnyi helyet foglal el a mRNS-en. Amint az első riboszóma a mRNS leolvasása közben elhagyja az első, kb. 80 nukleotid hosszúságú szakaszt, egy második riboszóma is megkezdheti a mRNS leolvasását, illetve a polipeptidlánc szintézisét. Ezután egy harmadik, negyedik stb., annyi riboszóma, amennyi elfér az adott mRNS-en. A mRNS-sel ilyen módon összefűzött riboszómák alkotják a **poliszómát** *(3-38. ábra)*. A fehérjeszintézis közben mindig poliszó-



3-38. ábra. A poliszóma az egyes riboszómákon szintetizálódó (növekvő) polipeptidláncokkal

mák alakulnak ki. A poliszóma szerkezete stabilizálja a mRNS-t. A prokariótákban a transzkripció sem időben sem térben nincs elválasztva a transzlációtól. A transzkripció során képződő mRNS 5'-végén már kialakulhat a poliszómaszerkezet az egyre növekvő polipeptidláncokkal, mikor a mRNS 3'-vége még nincs teljesen megszintetizálva és a mRNS 3'-vége még nem disszociált le a DNS-ről.

Eukariótákban a transzláció lépései elvileg hasonlóak a prokariótában folyó transzláció lépéseihez, bár a prokariótákétól eltérő riboszómák és a prokariótákénál sokkal jelentősebb számú transzlációs faktor vesz részt a folyamatban. Az eukarióta sejtekben is AUG a polipeptidlánc startpontját jelző iniciátor kodon, amelyhez az iniciátor tRNS ($tRNS^{fMet}$) szállítja a metionint. Eukariótákban azonban a $tRNS^{fMet}$ által szállított metionin nem formileződik meg a prokariótákéhoz hasonló módon, mivel eukariótákban az ezt a reakciót katalizáló enzim hiányzik. Az eukarióta mRNS csak egyetlen polipeptidláncot kódol, ezért csak egyetlen startkodont tartalmaz, ez a mRNS 5'-végéhez legközelebb eső AUG. Az eukarióta mRNS-en az iniciátor kodont nem előzi meg puringazdag régió, a 40S riboszóma kis alegység a mRNS 5'Cap-jéhez kötődik és a 3'-irányban mozogva keresi az első AUG-t. Ez a mozgás ATP hidrolízisével jár. A nagyszámú eukarióta transzlációs faktor vagy az iniciációban (eukarióta iniciációs faktorok, eIF), vagy az elongációban (eukarióta elongációs faktorok, eEF), vagy a terminációban és a polipeptidlánc felszabadításában (eukarióta release faktorok, eRF) segédkezik. E csoportokon belül az egyes faktorokat számokkal jelölik. (Eukarióta iniciációs faktorból pl. kilencet ismernek és közülük néhány több alegységből áll.)

Az eIF2 az iniciációban szerepet játszó egyik fehérje, amely az iniciátor tRNS (metionil-$tRNS^{fMet}$) bekötődését segíti elő. Az **eIF2 foszforilációja** és defoszforilációja fontos komponense eukariótákban a **transzláció szabályozásának**. Az eIF2 foszforilálva inaktív. Az interferonok által indukált **kettős láncú RNS-dependens protein-kináz** (lásd 3.3. fejezetben) ezt a fehérjét foszforilálja és így gátolja a fehérjeszintézist, amíg a kettős láncú RNS jelen van a sejtben. **Retikulocitákban**, ahol a fehérjeszintézis 90%-át a hemoglobin fehérjekomponensének a szintézise teszi ki, ugyancsak az eIF2 reverzíbilis foszforilációja regulálja a hemoglobin globinláncának a hem szintézisével koordinált sebességgel történő transzlációját (ha nincs jelen szabad hem az eIF2 egy specifikus enzim segítségével foszforilálódik és ezért inaktiválódik, nem szintetizálódik felesleges globin. A szabad hem a specifikus protein-kinázt gátolja, amíg egy specifikus foszfatáz defoszforilálja az eIF2-t). Az eIF2 egy **GTP-GDP kötő fehérje**, a foszforilált eIF2 nem tudja a GDP-t GTP-re cserélni, ezért inaktív.

A fehérje foszforilációnak másféle mechanizmussal is lehet szerepe a transzláció sebességének szabályozásában. Ismeretes olyan protein-kináz is, amely a riboszóma kis alegységének egyik fehérjéjét foszforilálja és a növekedési faktorok által kiváltott sejtválasz egyik lépéseként aktiválódik.

A diphtheria nevű betegség (amelyet a Corynebacterium diphtheriae okoz) egyik súlyos komplikációja a fehérjeszintézis gátlásával magyarázható. A gátlás okozója egy **exotoxin** (érdekes módon a baktérium lizogén törzsének a fágból származó működő génje kódolja), nem immunizált egyénben gyakran halálos szövődményhez vezetett. A diphtheria exotoxin egyik komponense segíti a sejtmembránhoz való kötődést, míg a másik komponense bejut a sejtbe. A sejt belsejébe jutó komponens egy olyan enzim, amely a NAD^+-ból lehasítja a nikotinsavamidot és a maradék ADP-ribózt kovalensen az eEF2 transzlációs faktor egy módosult hisztidin oldalláncához köti. Az **ADP-riboziláció** következtében az eEF2, amely az elongáció transzlokációs lépésében vesz részt, irreverzíbilisen inaktiválódik és így a fehérjeszintézis az érintett sejtben leáll. Baktériumok exotoxinjai gyakran hasonló jellegű katalitikus aktivitást mutató enzimek, amelyeknek szubsztrátjai különböző **GTP-kötő fehérjék**.

A fehérjeszintézis mechanizmusában részt vevő komponensek működésének a gátlása az egyik igen gyakran használt fegyver a kórokozó baktériumok ellen.

A módszer alapjául az szolgál, hogy a prokarióták és eukarióták riboszómái és transzlációs faktorai különböznek egymástól és így bizonyos vegyületek gátolják a fertőzést okozó baktériumok transzlációját és ezzel szaporodását (bakteriosztatikus hatásúak), míg a gazdaszervezet sejtjeinek citoszoljában folyó fehérjeszintézist nem károsítják. Bizonyos gombák által termelt vegyületek, illetve ezek szintetikus származékai és továbbfejlesztett módosulatai tartoznak az **antibiotikumok** ezen csoportjába.

A sztreptomicin gátolja az iniciációt és a mRNS téves leolvasását, kódtévesztést okoz prokariótákban. A riboszóma kis alegységének egyik fehérjéje (S12 fehérje) felelős a sztreptomicin hatásáért, az e fehérjében bekövetkező mutáció sztreptomicinrezisztenciához vezethet, sőt, a mutált baktériumok egy csoportja csak sztreptomicin jelenlétében szaporodik.

A neomicin és a gentamicin ugyancsak a kis alegységhez kötődik, de a sztreptomicintől eltérő helyen. Ezek az antibiotikumok is kódtévesztést és így hibás transzlációt okoznak.

A tetraciklinek a prokarióta riboszóma kis alegységéhez kötődve az aminoacil-tRNS-ek beépülését gátolják.

A kloramfenikol gátolja a prokarióta riboszóma nagy alegységének peptidil-transzferáz aktivitását.

Az eritromicin ugyancsak a nagy alegységhez kötődve gátolja a transzlokációt.

A prokarióták fehérjeszintézisét gátló antibiotikumok használatánál figyelmet érdemel, hogy az eukarióta sejtek mitokondriumaiban levő transzlációs apparátus komponensei eltérnek a citoszolban találhatótól és hasonlítanak prokarióta megfelelőjükre. Ezért nem állítható, hogy ezek a gyógyszerek egyáltalán nem károsítják a gazdaszervezetet és csak a feltételek mérlegelése mellett használják azokat.

A **transzlációt eukarióta sejtekben gátló vegyületek** nem gyógyszerek, de fontos szerepük volt a fehérjeszintézis mechanizmusának a megismerésében és a sejtműködés szabályozásának a tanulmányozásában. Ezek közül a vegyületek közül említést érdemel a puromicin, amely mind a prokarióták, mind az eukarióták transzlációját gátolja. A puromicin szerkezete emlékeztet az aminosavat hordozó tRNS 3'-végére és aminocsoportja hozzákötődik a P helyen levő peptidil-tRNS utolsó aminosavának karboxilcsoportjához. Ezután azonban a puromicinre végződő peptidnek disszociálnia kell a riboszómáról és így korai láncterminációt okoz. A cikloheximid a kloramfenikol analógjaként viselkedik eukariótákban, gátolja az eukarióta riboszóma nagy alegységének peptidil-transzferáz aktivitását.

A fehérjék sejtorganellumokba irányítása és a transzláció utáni módosulások

Az újonnan szintetizálódó nascens fehérjék olyan jeleket tartalmaznak, amelyek meghatározzák, hogy az adott fehérje hol fog elhelyezkedni a sejtben. Baktériumokban, pl. E. coliban a fehérjemolekulák nagy része a citoszolban marad, más része a plazmamembránba, a külső membránba, esetleg a kettő közötti térbe kerül vagy kikerülhet a

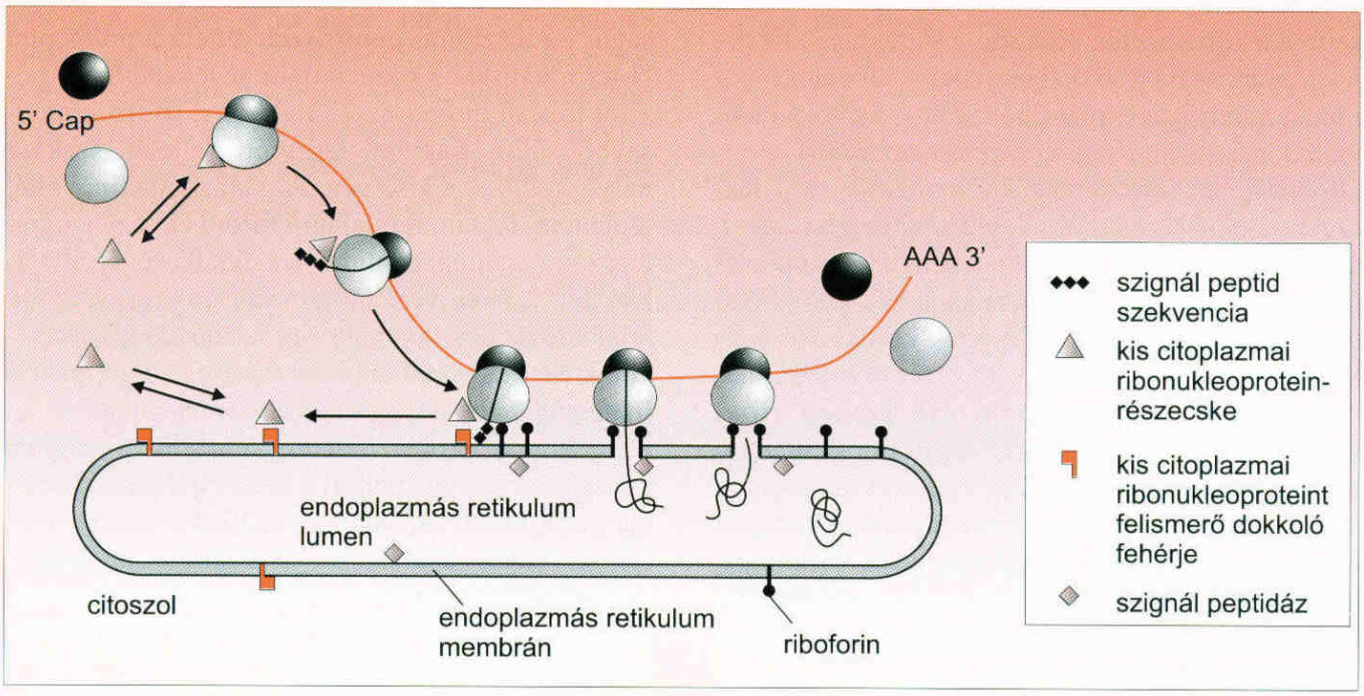
sejtből a környezetbe. Eukarióta sejtekben a fehérjék irányítása még sokkal nagyobb változatosságot mutat. A fehérjék egy csoportja itt is a citoszolban marad, más csoportjaik a plazmamembránba integrálódnak, a lizoszómák komponensei lesznek, szekretálódnak a sejtből, illetve a sejtmagba vagy a mitokondriumokba (növényekben a kloroplasztokba is) kerülnek. Az eukarióta sejtek különböző stratégiát alkalmaznak a fehérjék különböző sejtkompartmentekbe irányítására. A citoszolban maradó fehérjék a **citoszolban levő szabad riboszómákon** szintetizálódnak. Ugyanitt szintetizálódnak a mitokondriumokba illetve a sejtmagba kerülő fehérjék is. Ezek aminosavszekvenciája azonban valamilyen specifikus jelet tartalmaz, amelynek alapján a megfelelő sejtkompartmentbe kerülhetnek, és aktív (energiaigényes) mechanizmus segíti elő odajutásukat.

Ezzel szemben azok a fehérjék, amelyek a lizoszómákba kerülnek vagy a plazmamembrán integráns részei lesznek, vagy szekretálódnak, nem a citoszolban levő szabad riboszómákon szintetizálódnak, hanem a **durva endoplazmás retikulum membránhoz kötött riboszómáin**. A jelzés, melyet ezek a polipeptidláncok tartalmaznak, a durva endoplazmás retikulum membránján keresztül annak lumenébe irányítja az elkészülő fehérjét. Ez a fajta jelzés nagyon ősi. Baktériumokban, melyek nem rendelkeznek endoplazmás retikulummal, a szabad riboszómákon szintetizálódó fehérjék közül hasonló jelzés alapján választódnak ki azok a fehérjemolekulák, amelyek a plazmamembrán felé veszik útjukat.

Az endoplazmás retikulum az eukarióták membránkomponensének mintegy felét teszi ki. Egyik részéhez riboszómák kötődnek, ezért ezt morfológiai képe alapján durva endoplazmás retikulumnak nevezik, míg a sima endoplazmás retikulum nem tartalmaz riboszómákat. A riboszómák, amelyek az endoplazmás retikulumhoz kötődnek, minden tulajdonságukban hasonlóak a szabad riboszómákhoz. Az éppen szintetizálódó polipeptidlánc tartalmazza azt a jelet, amelynek alapján a szintézisben részt vevő riboszóma az endoplazmás retikulum membránjának külső (citoszol felé néző) oldalához kötődik. A jel a készülő polipeptidlánc NH_2-végéhez közel található aminosavszekvencia, amely egy sor hasonló módon szintetizálódó fehérjemolekula analízise alapján 13–36 aminosavhosszúságú. Ez a **szignál peptidszekvencia** a polipeptid N-terminálisához közel tartalmaz legalább egy pozitív töltésű aminosavat, majd egy 10–15 aminosavból álló, nagyon hidrofób jellegű szakasz helyezkedik el a közepén. Általában alanin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin fordul elő ezen a szakaszon. A szignál peptid C-terminális végén általában öt, valamelyest polárosabb aminosavegység található és a szekvencia egy hasítási hellyel fejeződik be. A szignál peptidet tartalmazó ún. **prefehérjéről** annak posztszintetikus módosulása során egy szignál proteáz enzim lehasítja a szignál peptidet. A szignál peptid a kész, például szekrécióra kerülő fehérjén már nem található meg. (Ismertek kivételes esetek, pl. a tojásalbuminban a szignál szekvencia nem a polipeptidlánc N-terminálisán, hanem a fehérje belsejében található és nem vágódik ki a fehérjéből.)

A szignál peptidet tartalmazó prefehérje nem tévesztendő össze a profehérjékkel. Profehérjéknek azokat a fehérjéket nevezik, amelyek inaktív formában szintetizálódnak és a szintézisük után a megfelelő helyen (esetleg sejten belül, mint a proinzulin–inzulin, de gyakrabban szekréciójuk után mint az emésztő enzimek, véralvadásban részt vevő fehérjék stb.) limitált proteolízis segítségével aktiválódnak (lásd 1.2. fejezet). A proenzimek (profehérjék) szintézise során általában pre-profehérje képződik, a szignál peptid lehasadása után alakul ki a profehérje.

A szignál peptid felismerésében és a szignál peptidet tartalmazó fehérjét szintetizáló riboszómának az endoplazmás retikulumhoz irányításában egy **kis citoplazmai ribonukleoprotein részecskének**, a **szignálfelismerő részecskének** van szerepe. Ez a részecske egy kb. 300 nukleotid hosszúságú ribonukleinsavból és hat különböző fehérjemolekulából áll. A ribonukleinsav olyan nukleotidszekvenciákat tartalmaz (**Alu-szekvenciáknak** nevezik őket), amelyek az eukarióta DNS gyakran ismétlődő szekvenciái közé tartoznak. A szignálfelismerő részecske szorosan kötődik azokhoz a riboszómákhoz, amelyek éppen egy szignál peptiddel rendelkező fehérjét szintetizálnak, de nem kötődik más riboszómákhoz. Miután a szignál peptidnek megfelelő szakasz megszintetizálódott egy szabad riboszómán a citoszolban, a szignálfelismerő részecske a riboszómához kötődik és átmenetileg megállítja vagy lassítja a polipeptidlánc elongációját. A képződő komplex az endoplazmás retikulum membránjához diffundál, amelyen a



3-39. ábra. A szignál peptidszekvenciával rendelkező fehérjéket szintetizáló riboszómák endoplazmás retikulumhoz irányítása és a polipeptidlánc transzlokációja a lumenbe

szignálfelismerő részecske számára egy specifikus receptor **(dokkoló fehérje)** található. A részecske ehhez a dokkoló fehérjéhez kötődik, miközben a riboszóma, amely a készülő polipeptidet hordozza, továbbítódik a fehérjét az endoplazmás retikulum lumenébe irányító transzlokációs szerkezethez. Ez a szerkezet két membránfehérjéből áll, nevük **riboforin I és riboforin II** *(3-39. ábra)*. A transzlokáció az endoplazmás retikulum membránján keresztül aktív folyamat, ATP hidrolízisével jár és a polipeptidlánc további növekedésével egyidejűleg történik. (A transzlokációt az könnyíti meg, hogy az éppen szintetizálódó szakasz még nem csavarodik fel úgy, mint a kész fehérjében). A transzlokáció után az endoplazmás retikulum lumenében a fehérjék posztszintetikus módosulásokon mennek keresztül. Az N-terminális szignál peptidszekvenciát tartalmazó prefehérjékről a szignál peptid egy specifikus proteáz hatására lehasad és a fehérjék glikozilálódnak.

A prokarióták az eukariótákhoz hasonló szignál peptidszekvenciákat használnak arra a célra, hogy a plazmamembránon áthajtva a baktérium külső membránjába vagy a két membrán közötti térbe juttassák a fehérjéket. A helyükre került fehérjékről a szignál peptidszekvencia ugyancsak lehasad.

A **transzláció utáni módosulások** bizonyos típusai a citoszol szabad riboszómáin szintetizálódó fehérjék éréséhez is szükségesek. A kész, funkcionáló fehérjéknek, enzimeknek legtöbbször nem formil-metionin (prokariótában), illetve metionin (eukariótában) az N-terminális aminosava, holott szintéziskor mindig ez az aminosav jelenik meg az NH_2-végen. A formil-metionin egyrészt deformileződik a prokariótákban található deformilező enzim segítségével, másrészt a láncvégi metionin vagy az első egy-két láncvégi aminosav lehasad az aminopeptidázok hatására. Mind prokariótákban, mind eukariótákban a láncvégi metionin némelykor előbb lehidrolizál a polipeptidláncról, mint annak szintézise befejeződik. A metionin mellett a 2. helyen levő alanin például elősegíti a metionin lehasadását és ugyanakkor az alanin aminocsoportja acetilálódik, tehát a fehérjének nem lesz szabad NH_2-vége.

Az endoplazmás retikulumhoz kötött riboszómákon szintetizálódó fehérjék közül sokban alakulnak ki diszulfidhidak a megfelelő pozícióban levő SH-csoportok oxidációja révén, részben az egyes polipeptidláncokon belül, részben a több polipeptidláncból álló fehérjék láncainak összekapcsolására. A megfelelő SH-csoportok közötti

kapcsolat kialakulását a protein-diszulfid-izomeráz enzim (**„tekeráz"**) segíti. Ugyancsak egy enzim segédkezik a polipeptidláncba beépült prolinok melletti peptidkötések *cisz-transz* izomerizációjában.

Ahhoz, hogy a fehérjemolekulák stabil, natív harmadlagos szerkezete kialakuljon, előbb az egész polipeptidláncnak meg kell szintetizálódnia. A polipeptidlánc megfelelő konformációjának kialakulásában **molekuláris chaperonoknak** nevezett fehérjék vesznek részt. A molekuláris chaperonok olyan fehérjék, amelyek más fehérjék instabil konformációban levő formáihoz kötődve, elősegítik a stabil, natív szerkezet kialakulását. (Erre nemcsak a polipeptidlánc szintézisekor lehet szükség, hanem például egy hőhatás, ún. hősshock következményeinek kivédésénél is. A molekuláris chaperonok csoportjába tartozó fehérjék egy részét hősshockfehérjéknek nevezik.) A riboszómákhoz asszociált molekuláris chaperonok a frissen szintetizálódó (nascens) polipeptidlánc N-terminális szakaszához kötődve megakadályozzák annak idő előtti, nem a natív szerkezetnek megfelelő összetekeredését.

Egyes fehérjék a szintézisük után **hosszú szénláncú zsírsavakkal acileződnek**. A kovalensen kötött palmitil-, farnezil-, geranilgeranil-, illetve mirisztilcsoportoknak fontos szerepük van abban, hogy olyan fehérjék, amelyek nem integráns részei a membránoknak, a mebránhoz tudnak kihorgonyozódni.

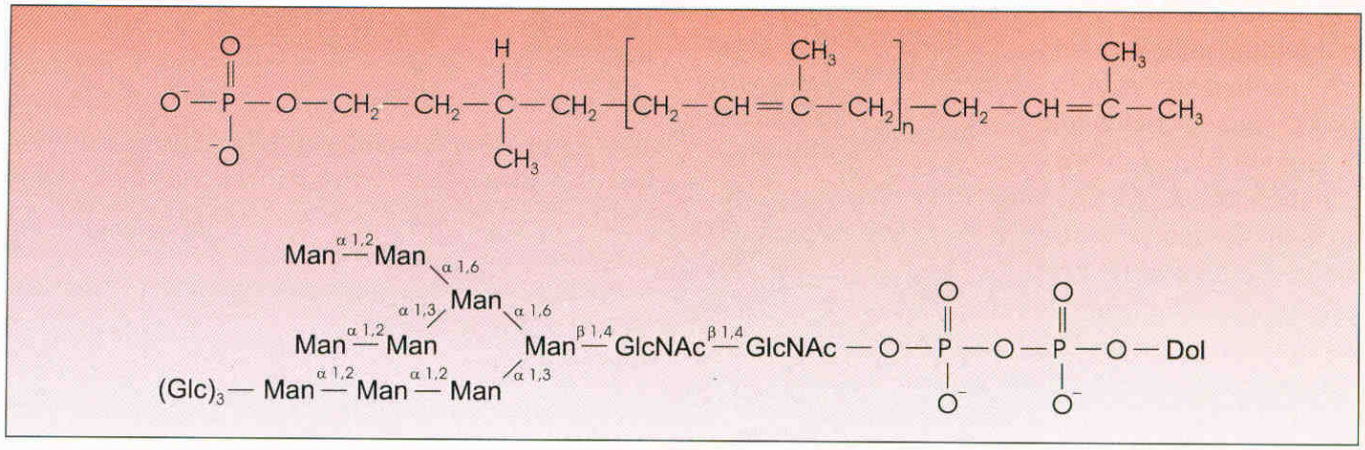
A fehérjék mintegy 30%-a **foszforilálódik**. A foszforiláció némely esetben hozzátartozik a fehérje végleges szerkezetéhez, míg az esetek nagyobb részében regulációs szerepet játszik.

Bizonyos fehérjék (kollagén) érése során a lizin és prolin oldalláncok módosulhatnak (hidroxi-prolin, hidroxi-lizin alakul ki). Speciális, nem a fehérjemolekula éréséhez tartozó módosulást jelent a **transzglutamináz** enzim által katalizált reakció, amely az egyik polipeptidlánc glutaminjának amidcsoportját cseréli egy másik polipeptid lizin oldalláncának NH-csoportjára és így keresztkötések jöhetnek létre fehérje molekulák között.

Egyes enzimmolekulák posztszintetikus módosulásának tekinthető a kovalensen kötött prosztetikus csoportok kapcsolódása is.

Az endoplazmás retikulumhoz kötött riboszómákon szintetizálódó lizoszomális, plazmamembrán és szekretálódó fehérjék általában glikoproteinek. A **glikoproteinek** kovalensen kötött szénhidrátkomponensének a kialakulása több lépésben történik, ezek közül az első az endoplazmás retikulum lumenében megy végbe. Az oligoszacharidegységek a polipeptidlánchoz vagy egy aszparagin oldalláncon N-glikozidos kötéssel vagy szerin, treonin oldalláncon O-glikozidos kötéssel kötődnek.

Az N-glikozidos kötések kialakulása során első lépésként egy 14 tagú oligoszaharid kötődik a fehérjék specifikus szekvenciával körülvett aszparaginjához **(core-glikoziláció)**. A reakciót egy transzferáz enzim katalizálja, a 14 tagú „egységcsomagot" a **dolikol-foszfát** szállítja *(3-40. ábra)*. A dolikol-foszfát 15–19 izoprénegységből álló, hosszú, apoláros lipid. A segítségével aktivált core-oligoszaharid-egység a polipeptidhez kötődik, a dolikol-pirofoszfát pedig felszabadul. A glikoprotein core-oligoszaharid-egységének vé-



3-40. ábra. A dolikol-foszfát és a dolikol-foszfát által szállított oligoszacharid „egységcsomag". Rövidítések: Man, mannóz; Glc, glukóz, GlcNAc, N-acetil-glukózamin

gén levő három glukózegységet és egy mannózegységet még az endoplazmás retikulum lumenében levő enzimek lehidrolizálják, így továbbítódik a fehérje a Golgi-komplexbe.

A Golgi-komplexnek két fontos feladata van. Egyrészt szerepe van a glikoproteinek szintézisében, minthogy az N-glikozidos kötésben levő oligoszacharidegységek itt módosulnak és az O-glikozidos kötésben levők itt alakulnak ki. Másrészt a Golgi-komplex feladatai közé tartozik a fehérjék válogatása és irányítása rendeltetési helyükre. A membránzsákocskákból álló Golgi-komplex három kompartmentre differenciálódott. A *cisz*-kompartment közel van az endoplazmás retikulumhoz, ez fogadja az endoplazmás retikulumból származó, fehérjéket tartalmazó, membránnal határolt transzfer hólyagocskákat. A középső kompartmentet követi a *transz*-kompartment, amely a fehérjéket továbbítja rendeltetési helyükre. A különböző kompartmentek között, illetve a Golgi-komplextől a plazmamembránhoz stb. ugyancsak transzfer hólyagocskák szállítják a fehérjéket. Ezek a transzfer hólyagocskák aszerint, hogy mely kompartmentek között szállítanak, különböznek egymástól *(3-41. ábra)*.

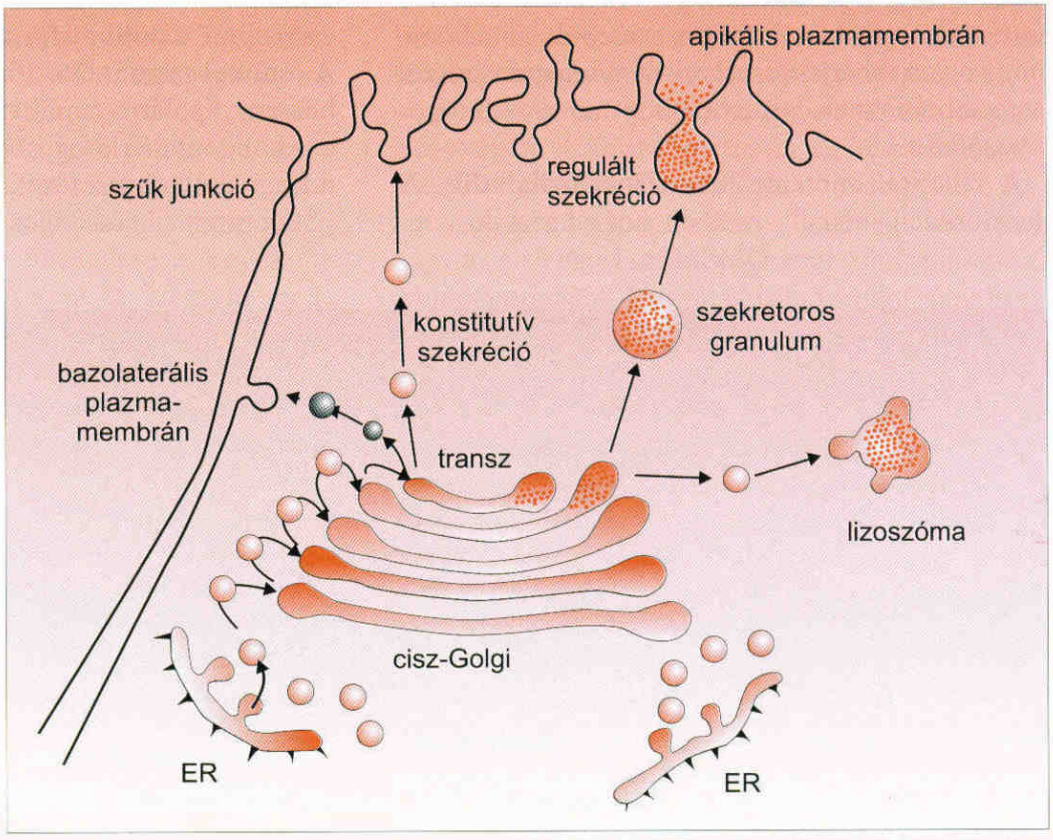
A glikoproteinek szénhidrátegységei a Golgi minden kompartmentjében módosulhatnak, ezt a folyamatot nevezik **terminális glikozilációnak**.

A *cisz*-Golgi-kompartmentben mannózegységek hasadnak le azoknak a fehérjéknek az oligoszacharid oldalláncairól, amelyek a plazmamembránba vagy szekrécióra kerülnek.

A középső Golgi-ban N-acetil-glukózamin- és fukózegységek rakódnak az oligoszacharid oldalláncra, a *transz*-Golgi-kompartmentben galaktóz és sziálsav adódik az oldallánchoz. Az oldallánc végleges formáját részben a fehérje konformációja, részben az határozza meg, hogy a Golgi melyik részében alakul ki.

A *cisz*-Golgi-kompartmentben kapják meg a jelzést azok a fehérjék, melyek a lizoszomákba kerülnek. Egy rendkívül specifikus foszfotranszferáz enzim alakítja ki a mannóz-6-foszfátot ezen fehérjék (lizoszomális enzimek) glikoprotein oldalláncán. A mannóz-6-foszfát szolgál a továbbiakban irányító jelül ezeknek a fehérjéknek a kiválogatására és lizoszómákba való transzportjára. A mannóz-6-foszfátot egy receptor ismeri fel, amely a fehérjéhez kötődik és a komplex körül kialakuló hólyagocska kapcsolatba kerül egy speciális

3-41. ábra.
A Golgi-komplex



transzport hólyagocskával, melynek belsejében a pH alacsonyabb. Az alacsonyabb pH-n a receptor disszociál a mannóz-6-foszfáttal jelzett fehérjéről és a transzport hólyagocska a lizoszómákkal fúzionál. A mannóz-6-foszfát foszfátját még az alacsony pH-jú transzport hólyagocskában lehasítja egy foszfatáz.

A plazmamembránba kerülő és szekretálódó fehérjéket általában nem a glikoprotein sajátságuk irányítja a megfelelő helyre, ezeknél a fehérjéknél az oligoszaharid oldallánc más célt szolgál. Az endoplazmás retikulumban megjelenő, hidrofób jellegű integráns membránfehérjék a plazmamembránba jutnak, a jól oldódó, hidrofil fehérjék pedig a szekréciós zsákocskákba. A szekréciós zsákocskák különbözőek aszerint, hogy a szekréció konstitutív (állandóan azonos sebességgel folyik, mint pl. a májsejtek által szekretált fehérjék nagy részénél) vagy regulált (pl. az emésztő enzimek proenzim formájánál). Ha a fehérje nem tartalmaz valamilyen speciális jelet, akkor a konstitutív szekréciós hólyagocskába kerül.

A polipeptidlánc transzláció utáni kovalens módosulásai közül említést érdemel még a bonyolult **glikozil-foszfatidilinozitol- (GPI)** csoport kötődése a COOH-terminális aminosavhoz. A GPI-t kötött fehérjék a sejtmembrán extracelluláris felszínére kerülnek.

A mitokondriumok fehérjéinek egy kisebb része magában a mitokondriumban, lényegesen nagyobb része a citoszol szabad riboszómáin szintetizálódik és innen jut a mitokondriumba, ahol elhelyezkedhet a külső membránban, a két membrán közötti térben, a belső membránban vagy a matrixban. A fehérjék mitokondriumba irányítása is a polipeptid N-terminális szakaszán levő speciális peptidszekvenciával történik, amelyik nem hasonlít az endoplazmás retikulumba irányító szekvenciához. A **mitokondriális belépő szekvencia** sok pozitívan töltött aminosavat és sok szerin és treonin oldalláncot tartalmaz. Azok a fehérjék, amelyek a külső membránba kerülnek két pozitív töltést tartalmazó szakasz között egy „horgonyzó" szekvenciával rendelkeznek. A többi fehérje a protongrádiens terhére jut rendeltetési helyére, ahol a mitokondriális belépő szekvencia lehasad a polipeptidláncról.

A sejtmagba jutó fehérjék, kivétel nélkül a citoszol szabad riboszómáin szintetizálódnak. (A magmembrán külső és belső rétege az endoplazmás retikulum membránnal, a két réteg közötti perinukleáris rés az endoplazmás retikulum lumenével mutat folytonosságot.) A magmembránon nyílások, pórusok vannak, amelyek átmérője 0,7 nM. Kis fehérjék, mint amilyenek a hisztonok, könnyen átjutnak a pórusokon, a nagyobb fehérjék azonban csak akkor, ha specifikus jelet tartalmaznak. A **nukleáris lokalizáció jele** egymást követő öt bázikus aminosavat tartalmazó szekvencia, amely nem a fehérje N-terminálisán helyezkedik el és nem vágódik le a fehérjéről célbaérkezése után. A jelzést tartalmazó fehérje átjuttatása a nukleáris pórusokon bonyolult folyamat, egy specifikus **GTP-kötő fehérje** is részt vesz benne.

Fehérjeszintézis a mitokondriumokban

A mitokondrium (növényekben a kloroplaszt is) önálló genetikai rendszerrel rendelkezik és osztódással szaporodik. Az emberi mitokondrium cirkuláris DNS-t tartalmaz, amely a nukleáris DNS-től függetlenül replikálódik, és mintegy 1%-a a sejt DNS-ének (átlagosan). A mitokondriális fehérjék egy részét a nukleáris DNS kódolja, a mitokondriális DNS 2 rRNS-gént, 22 tRNS-gént és 13 fehérjét kódoló gént tartalmaz.

A mitokondrium saját fehérjeszintetizáló apparátusa teljesen eltér az eukarióta sejt citoszoljában található transzlációs berendezéstől és a prokariótákéra emlékeztet, a riboszómák a prokariótákéra hasonlítanak. A citoplazmában levő 31-féle tRNS-sel szemben a mitokondriumokban csak 22 tRNS található, több a „kodon–antikodon lötyögést" mutató tRNS, mint a citoszolban. Az élővilág teljes egészében univerzális genetikai kód nem tökéletesen érvényes a mitokondriumokra, 4 kodonnak más az értelme. Az UGA stopkodon a mitokondriumokban triptofánt jelent és nem a polipeptidlánc végét jelzi. Az AUA az univerzális kódban izoleucint, a mitokondriumban metionint jelent. Az arginin kodonjai közül kettő, az AGA és AGG viszont a mitokondriumban nem arginint kódol, hanem stopkodonként szolgál. A mitokondriális mRNS 5'-végén nem jelenik meg Cap, de a 3'-végén megtalálható a poli-A-farok. A transzláció a matrixban folyik.

3.5. A laboratóriumi géntechnika (rekombináns DNS-technológia) módszerei

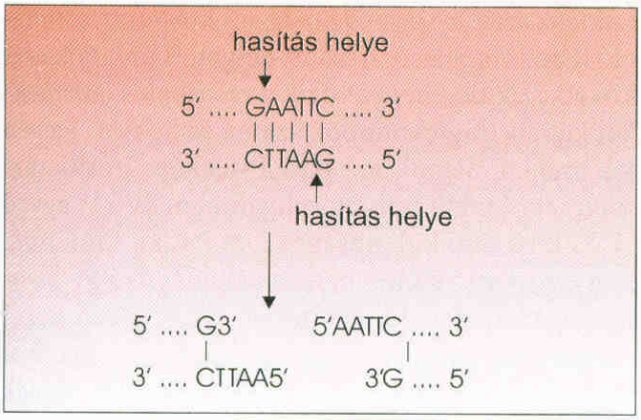
Faragó Anna

A elmúlt húsz évben a molekuláris biológia által kifejlesztett módszerek addig sosem látott ütemben vitték előre az élő szervezetekkel foglalkozó tudományokat, ezen belül az elméleti orvostudományt. A rekombináns DNS-technológiát a 20. század második felében zajló második ipari forradalom egyik csúcstechnikájaként tartják számon, várható hatását az emberiség életére az elektronika megjelenésének hatásához hasonlítják. A molekuláris biológia módszerei ma már elkerülhetetlenül jelen vannak az elméleti orvostudomány modern kutatólaboratóriumaiban, fontos komponensei a gyógyszergyárak által alkalmazott technológiáknak, és mindezen túl megjelentek a klinikai gyakorlatban is. A következő évtizedben minden bizonnyal mélyen beépülnek a diagnosztikába, és talán a terápia egyes területein is rutinszerűen alkalmazhatóak lesznek. Mindez szükségessé teszi az orvosok számára a molekuláris biológiai módszerek alapfogalmainak ismeretét.

Restrikciós endonukleázok és restrikciós térképek

A **restrikciós endonukleázok** a DNS-t specifikus nukleotidszekvenciáknál hasító enzimek, amelyek felfedezése fontos szerepet játszott a laboratóriumi géntechnika megindulásában. A restrikciós endonukleázok a természetben a baktériumok fágok elleni védekezésének eszközei. Bizonyos baktériumokban bizonyos fágok nem tudnak szaporodni, ezt a jelenséget nevezik restrikciónak. A restrikcióért specifikus endonukleáz-metiláz enzimpárok felelősek, amelyek a DNS-en azonos nukleotidszekvenciát ismernek fel. A restrikciót az enzimpár endonukleázkomponense biztosítja, amely ha megtalálja az idegen DNS-en a számára specifikus nukleotidszekvenciát, elhasítja a DNS-t. A hasítás a DNS mindkét szálát érinti. A restrikciós metiláz feladata a baktérium saját DNS-ének megóvása az endonukleáztól. A metiláz ugyanazt a nukleotidszekvenciát ismeri fel, mint saját endonukleáz párja, és a baktérium DNS replikációja után azonnal metilálja a felismert szakasz bizonyos nukleotidját. A gazdasejt DNS-e ezért az endonukleáz által felismerhető szakaszon metilált és ez megakadályoza az endonukleáz tevékenységét. (A metilezéshez S-adenozil-metionin adja a metilcsoportot.) Az a fág, amelynek DNS-e a baktériumban található restrikciós endonukleázok által felismert nukleotidszekvenciákat tartalmazza, az adott baktériumban nem szaporodhat.

Az azonos DNS-szekvenciákat felismerő **restrikciós endonukleáz-metiláz párok** többféle csoportja (I., II. és III-as típusú) ismert, ezek közül csak a II. típusba tartozó enzimpárok endonukleáz tagjait használják a DNS-specifikus nukleotidszekvenciánál történő laboratóriumi hasításához. Az ebbe a csoportba tartozó endonukleáz-metiláz párok egymástól elkülönülve megjelenő, önálló aktivitással rendelkező enzimek, amelyek katalitikus aktivitásukat azonos nukleotidszekvencián fejtik ki. E csoport tagjai a DNS-en szimmetrikus szerkezetű, általában 4–10 nukleotidegységből álló **palindrom** szekvenciákat ismernek fel és az



3-42. ábra. A ragadós végeket generáló restrikciós endonukleázok működése. *A restrikciós enzimek II. típusába tartozó egyik enzimpár által felismert szekvencia és az endonukleáz által katalizált reakció során képződő ragadós végek*

endonukleázok a két DNS-láncon egymással szemben ellentétes irányban elhelyezkedő két azonos szekvencia azonos nukleotidja mellett hasítanak *(3-42. ábra)*. Különböző baktériumok különböző nukleotidszekvenciákat felismerő restrikciós endonukleáz-metiláz párokat tartalmaznak.

Ha egy bizonyos restrikciós enzimmel elhasított DNS-en a hasítási helyek éppen egymással szemben helyezkednek el, tompa végek képződnek. Azonban gyakran előfordul, hogy a két láncon keletkező metszéspontok között néhány nukleotid távolság van, ezért a metszett végek egymástól való eltávolodása után néhány nukleotidhosszúságú egyszálú végek alakulnak ki, a komplementer szakasz a másik DNS-darabon található. Minthogy a komplementer egyszálú láncok egymással nagy affinitással alakítanak ki kapcsolatot, ezeket a képződményeket **„ragadós DNS-végeknek"** nevezik. Laboratóriumi körülmények között, ha két különböző DNS-molekula (pl. egy prokarióta plazmid és egy eukarióta kromoszóma-DNS) hasítható egy bizonyos restrikciós endonukleázzal, jelezve, hogy a restrikciós enzim számára felismerhető nukleotidszekvenciát mindkét DNS tartalmazza, akkor mindkét DNS-molekulán kialakulnak olyan ragadós végek, amelyek egymással is komplementerek. A két különböző DNS-molekulából származó komplementer, „ragadós", egyszálú végek önmaguktól képesek egymással összeilleszkedni. Az így, spontán összeilleszkedő végeken a **DNS-ligáz** segítségével kialakítják a hiányzó foszfodiészterkötést (mindkét láncon egyet-egyet) és így előállítható a két különböző molekulából származó DNS-darabokból az új, **rekombináns DNS-molekula**. A restrikciós endonukleázokat ezért a rekombináns DNS-molekulák készítésének (génsebészetnek) egyik alapvető eszközeként tartják számon.

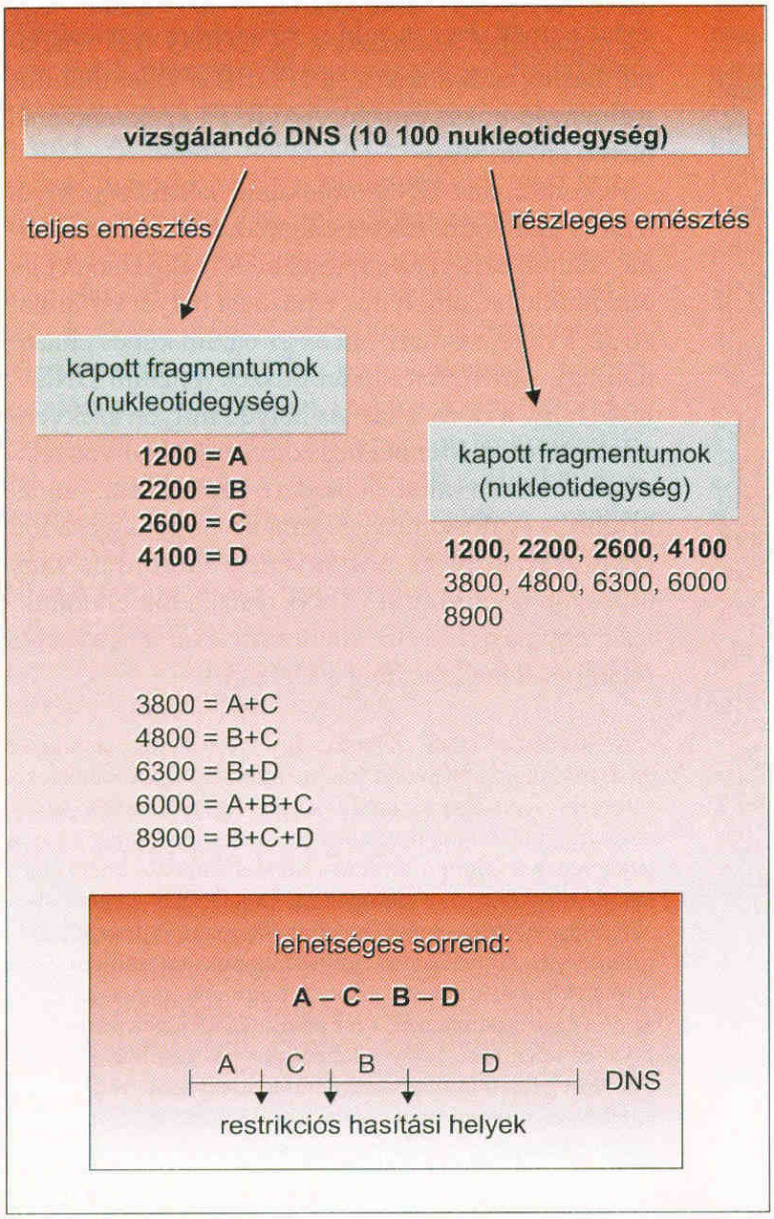
A különböző baktériumok által termelt, különböző specifikus szekvenciákat felismerő restrikciós enzimekből ma már száznál többet jellemeztek, tisztítottak és ezek kereskedelmi forgalomban kaphatók. (Az egyes endonukleázokat az őket termelő baktérium nevéből származó betűkkel jelölik és római számokkal jelzik, ha egy baktérium több fajta restrikciós endonukleázt tartalmaz. Például az EcoRI az E. coliból származó GAATTC szekvenciát felismerő endonukleáz, az SmaI egy Salmonellából származó, a CCCGGG szekvenciánál hasító endonukleáz, a HindIII a Haemophilus influenzae-ből származó, AAGCTT szekvenciánál hasító enzim stb.)

Rekombináns DNS-molekulák készítésén kívül a DNS nukleotidszekvenciájának analízisére is felhasználják ezeket az enzimeket. Kiválasztanak egy endonukleázt, amelynek a hasítási helyét tartalmazó szekvencia ismert. Ha ez az enzim képes elhasítani egy ismeretlen nukleotidszekvenciájú DNS-t, jelzi, hogy a DNS a hasítás helyén milyen szekvenciát tartalmaz. Mennél hosszabb egy bizonyos restrikciós enzim által felismert szekvencia, annál kisebb a valószínűsége annak, hogy egy adott DNS-szakaszon ez a szekvencia előfordul, vagy többször is előfordul. Több restrikciós endonukleáz egymást követő alkalmazásával **restrikciós térképet** lehet készíteni a DNS-ről.

A kérdéses DNS-szakaszt egy restrikciós enzimmel emésztik, majd a képződő fragmentumokat agaróz-gélelektroforézis segítségével méret szerint szétválasztják és az egyes fragmentumok pozícióját (hosszát) detektálják. (Ezt el lehet végezni etidium-bromid-festéssel fluoreszcencia alapján, de megkönnyíti a térképezést, ha a DNS 5'-végét radioaktív foszfát segítségével megjelölik, mert így a gélelektroforézissel szétválasztott fragmentumok autoradiográfiája alapján könnyű kimutatni azokat a fragmentumokat, amelyek az 5'-véget tartalmazzák.) Az emésztés idejének változtatásával el lehet érni, hogy a lehetséges hasítási helyek közül csak az egyiken (véletlenszerűen valamelyiken) vagy mindegyiken megtörténjen a hasítás. A különböző módon végzett hasításokban kapott fragmentumok hossza és száma alapján a kirakós játékokhoz hasonlóan lehet egymás mögé rendelni a DNS darabjait és meghatározni a restrikciós szekvencia po-

zícióját. A műveletet több, különböző restrikciós enzimmel megismételve az ismert szekvenciák előfordulásának helyéről részletes és a DNS-szakaszra jellemző képet lehet nyerni *(3-43. ábra.)*

A restrikciós térképek egyrészt bevezethetik a DNS szekvenciájának részletesebb vizsgálatát, másrészt segítségükkel könnyen kimutathatók két vizsgálandó DNS-darab szekvenciájában megjelenő hasonlóságok, de méginkább a biztos eltérések. Ezzel a módszerrel vizsgálták például a mitokondriális DNS-ek evolúcióját és megállapították, hogy a pontmutációk valószínűsége az evolúció során tízszer nagyobb volt, mint a genomiális DNS-é. Ha egy mutáció egy restrikciós helyet érint, az endonukleáz azon a helyen nem hasít. Másrészt, a mutáció létre is hozhat új hasítási helyet. Bármelyik eset következik be, megváltozik a restrikciós enzimekkel kapott fragmentumok száma és hossza. Ezen a jelenségen alapul az **RFLP-térkép** (restriction fragment length polymorphism), amely két egyed DNS-e közötti különbségeket mutat ki. Előfordul, hogy egy restrikciós hely mutációja és egy bizonyos gén mutációja egybeesik, vagy olyan közel vannak egymáshoz, hogy az általános genetikai rekombináció eseményei során sohasem válnak szét egymástól. Ez esetben a restrikciós változás (restrikciós marker) használható a gén mutációja által okozott betegség diagnosztikájában is.



3-43. ábra. Resrikciós térkép készítésének vázlata. *A vizsgálandó DNS-t elkülönítik (megtisztítják) és a tisztított DNS-ből származó mintákat egy restrikciós enzimmel különböző ideig emésztik. Ezáltal részlegesen vagy teljesen emésztett mintákat kapnak, vagyis olyanokat, amelyek csak a DNS-en jelen levő restrikciós szekvenciák egyikénél vagy másikánál, vagy mindegyikénél elmetszett DNS fragmentumait tartalmazzák. A darabokat hosszúságuk szerint agaróz-gélelektroforézissel szétválasztják. A gélelektroforézis után az etidium-bromiddal festett DNS-fragmentumok UV-fényben kimutathatók és a kapott kép alapján a darabok hosszúsága meghatározható. A teljes emésztés során képződnek a legkisebb DNS-darabok, a részleges emésztés ezek különböző kombinációjából származó hosszabb darabokat hoz létre. A különböző kombinációjú darabok és a legkisebb darabok hosszának összehasonlításával lehet kikövetkeztetni, hogy a legkisebb darabok milyen sorrendben követik egymást. Ebből meghatározható a restrikciós hasítási helyek pozíciója a vizsgált DNS-darabon. A gyakorlatban a fenti folyamatot többféle típusú restrikciós enzimmel megismételve készülnek a restrikciós térképek*

A DNS bázisszekvenciájának meghatározása

A restrikciós enzimekkel elhasított DNS kisebb, néhány száz nukleotidhosszúságú fragmentumai bázisszekvenciájának meghatározására kétféle módszert is használtak: a specifikus kémiai hasítás módszerét (Maxam–Gilbert) és a didezoxi-módszert, a megszakított enzimatikus szintézis segítségével kapott fragmentumok analízisét (Sanger-módszer). A nagyobb DNS-molekulát restrikciós enzimekkel kisebb darabokra hasítják és a restrikciós fragmentumokat szétválasztják.

A **specifikus kémiai hasítás** segítségével történő analízishez a két különböző specifitású restrikciós endonukleáz által kihasított, vizsgálni kívánt DNS-darab egyik vagy másik láncának 3'-végét szelektíven megjelölik egy ^{32}P-vel jelzett foszfátot tartalmazó dezoxi-ribonukleotid segítségével. (Nemcsak a 3'-véget, az 5'-láncvéget is meg lehet jelölni.) Egy-egy kísérletsorozatban csak azt a láncot analizálják, amelynek a vége a radioaktív jelzést kapta, a két lánc hődenaturációval szétválasztható. A vizsgálni kívánt lánc kémiai hasításához a 3'-végen radioaktívan jelzett preparátumot négy részre osztják. A specifikus kémiai hasítás során az egyik vagy másik bázist hasítják le az N-glikozidos kötésnél és a sérült nukleotid az alkalmazott feltételek mellett a láncból kihasad. A négy elkülönített mintában végbemenő specifikus reakciók eredményeként egy-egy minta mindig az egyik fajta bázis hasításával kapott eredményt mutatja. (Az egyik reakcióelegyben mindkét purin hasad, a másikban preferenciálisan a guanin, a harmadik reakcióelegyben mindkét pirimidin, a negyedikben preferenciálisan a citozin hasad le. Az első és második minta különbségéből az adeninre, a harmadik és negyedik minta különbségéből a timinre vonatkozó adatokat lehet leolvasni.)

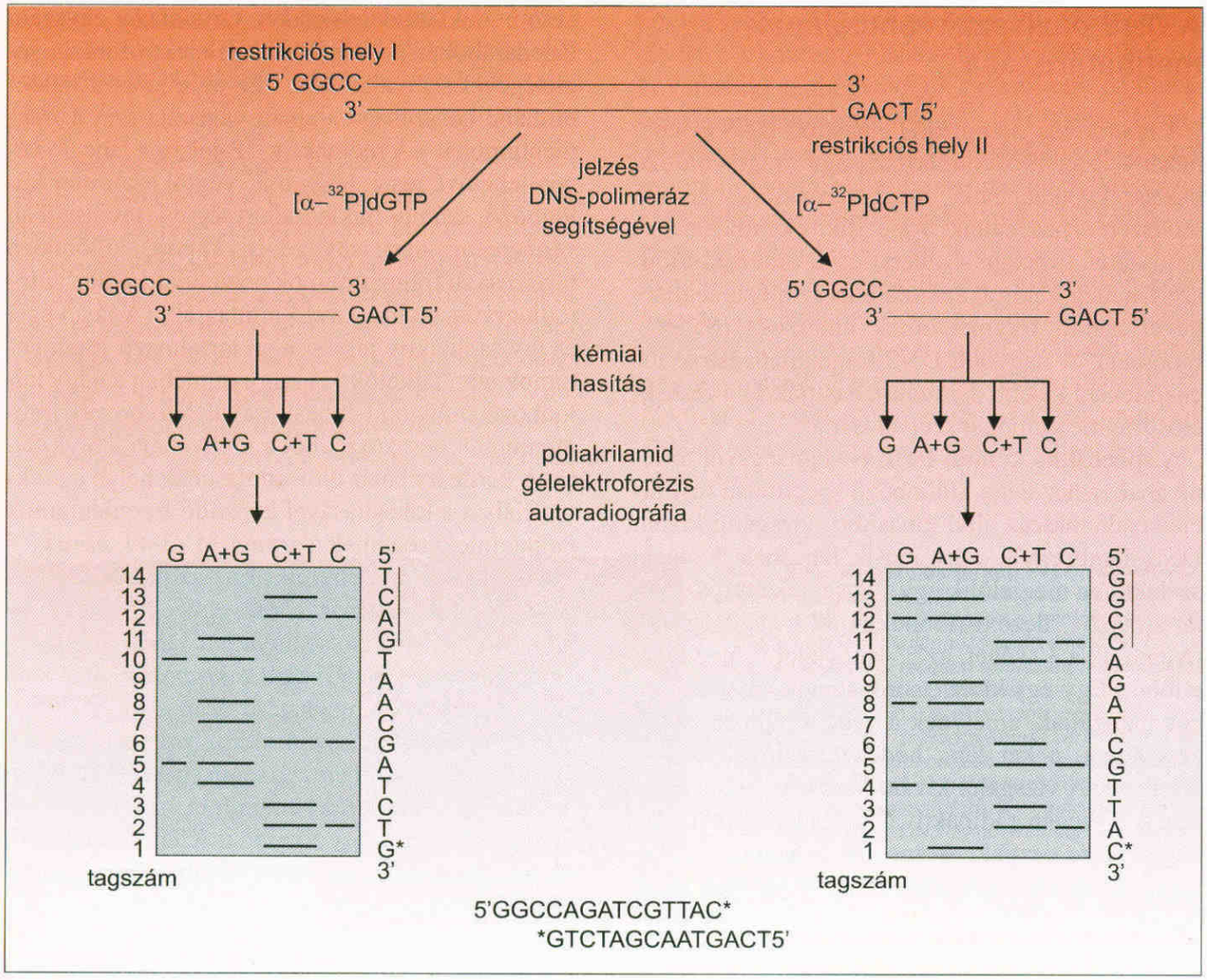
A hasítást előidéző kémiai reakciót olyan feltételek mellett engedik végbemenni, hogy csak részleges hasítás történjen, vagyis a lehetséges több hasítási hely közül egy molekulában mindig csak kevés helyen (a sok molekulát tartalmazó mintában statisztikus megoszlásban mindig más-más pozícióban levő nukleotidnál) történjen meg a reakció.

Az egy-egy minta különböző pozícióban levő nukleotidjai kihasítása révén keletkező, különböző számú nukleotidegységeket tartalmazó egyszálú láncdarabokat poliakrilamid-gélelektroforézis segítségével szétválasztják. (Ez az eljárás a nukleotidlánc hosszúsága alapján választja szét a fragmentumokat.) A radioaktív ^{32}P-jelzés a lánc 3'-végén lehetővé teszi, hogy a 3'-végtől számított különböző számú nukleotidegységnyi távolságban végbemenő hasítások révén kapott, különböző hosszúságú fragmentumok pozícióját a gélen autoradiográfia segítségével kimutassák. (A láncvéget és így radioaktív jelzést nem tartalmazó fragmentumok nem láthatók.) A négy mintában a négy különböző nukleotid kihasításával létrehozott fragmentumok hosszúságából a szekvencia leolvasható. A kérdéses bázis előfordulásának helye a szekvenciában a kihasításával képződő fragmentumok nukleotidegységeinek a száma +1 *(3-44. ábra)*.

A **megszakított enzimatikus szintézis** segítségével történő analízis során egy egyszálú vagy hődenaturációval egyszálúvá tett DNS-lánc szekvenciájának meghatározása a komplementer lánc szekvenciájának a meghatározásán alapul.

A komplementer láncot indító (primer) jelenlétében, a DNS-polimeráz I segítségével (általában nem a teljes polimeráz I enzimmel, hanem az 5'-3' exonukleáz aktivitást elvesztett Klenow-fragmentummal) szintetizálják, a DNS-szintézis megszakításához didezoxi-ribonukleotidokat használnak. Ezekben a nukleotidokban a ribóznak nemcsak a 2'-, hanem a 3'-szénatomján is hiányzik az OH-csoport, ezért ha a DNS-polimeráz beépíti ezeket a nukleotidláncba, a lánc további szintézise megszakad, mert a következő nukleotiddal a foszfodiészterkötés nem tud kialakulni. A szintetizálódó új lánc 5'-végét jelölik meg radioaktív foszfáttal, az így előkészített preparátumot itt is négy részre osztják. A négy minta mindegyikéhez hozzáadják az enzimatikus szintézishez szükséges komponenseket, köztük mind a négy dezoxi-ribonukleotidot és minden mintához egy-egy különböző bázist tartalmazó didezoxi-ribonukleotidot. Az adott didezoxi-ribonukleotid a DNS-polimeráz I által katalizált reakcióban kompetál a megfelelő dezoxi-ribonukleotiddal és beépül a láncba.

A feltételeket úgy választják meg, hogy a beépülés a lehetséges helyek egyikére vagy másikára statisztikus valószínűség szerint történjen meg. A beépülő didezoxi-nukleotid megszakítja a szintézist és a radioaktívan jelölt 5'-véget tartalmazó



3-44. ábra. A DNS bázisszekvenciájának meghatározása a kémiai hasítás módszerével. *A tisztított, kettős láncú DNS-ből két különböző restrikciós enzim segítségével kihasított darabot két részre osztják. Az egyik az egyik DNS-szál, a másik a másik szál vizsgálatára szolgál, a kétféle restrikciós enzim használata miatt a két szál 5'-végén maradó rövid egyszálú szekvencia nem azonos. Az egyik mintában az egyik, a másik mintában a másik szál 3'-végét meghosszabbítják egy-egy radioaktív jelzést tartalmazó nukleotiddal. (Az egyik minta az egyik DNS-szál, a másik a komplementer DNS-szál szekvenciájának meghatározására szolgál, az egyikben pl. guanint tartalmazó, a másikban citozint tartalmazó nukleotid adja a 3'-vég radioaktív jelzését.) Mindkét radioaktívan jelzett mintát négy részre osztják. A négy alminta mindegyikében más-más bázisra specifikus kémiai hasítást alkalmaznak, amelynek eredményeként a megcélzott bázist tartalmazó nukleotid a láncból az egyik vagy másik helyen kihasad, és különböző hosszúságú fragmentumok jönnek létre. A DNS két szálát ezután denaturációval elválasztják. Így mindkét láncból (külön-külön almintákban) olyan radioaktívan jelzett egyszálú fragmentumok képződnek, amelyek 3'-végi első (radioaktív) nukleotidjának a bázisa ismert és a fragmentumok hossza poliakrilamid gélelektroforézis és a gél-autoradiográfiája alapján a 3'-vég felől meghatározható. (A hasadás során a radioaktív 3'-véget elvesztő fragmentumok a gélen nem mutathatók ki. Ugyancsak nem mutathatók ki a jelen levő, de a kérdéses mintában radioaktív jelzést nem kapott komplementer DNS-szál fragmentumai). Az egyik lánc négy különböző specifitású hasításából származó négy almintában kapott fragmentumok hosszából a kihasadt nukleotid helye, ennek alapján a bázisszekvencia leolvasható. (Ha pl. a citozin kihasítása révén kéttagú, hattagú, tizenkéttagú stb. fragmentumok képződnek, akkor a citozin a láncban a harmadik, hetedik, tizenharmadik stb. nukleotid volt. Azért végzik el mindkét lánc szekvenciájának meghatározását, hogy az egyik láncon kapott eredmény helyességét a komplementer láncon ellenőrizzék)*

fragmentum utolsó, 3'-nukleotidja lesz. Az előző módszernél ismertetett gélelektroforézis alkalmazásával meg lehet állapítani a négy mintából, hogy egy-egy bizonyos bázist tartalmazó didezoxi-nukleotid hány nukleotidegységből álló fragmentumokat eredményezett. A fragmentum nukleotidjainak száma jelzi a kérdéses bázis helyét a komplementer lánc bázisszekvenciájában.

A didezoxi-nukleotidokkal történő megszakításon alapuló DNS-szekvenálás ma már automatizált. Létezik olyan módszer is, amelyik a fragmentumok pozíciójának jelzésére nem radioaktivitást használ, hanem a négyféle nukleotidnak megfelelő négy mintában nukleotidonként kálönböző színeket mutató kémiai jelzést alkalmaz A színes jelzés után a négy minta együtt kezelhető, mert a DNS-fragmentumok hossza alapján történő szétválasztás után minden szín egy másik nukleotidnak felel meg. Az egyes színeket mutató láncok pozíciójának sorrendje alapján a szekvencia leolvasható

Rekombináns DNS és klónozás, a génkönyvtár fogalma

A rekombináns DNS-technológia kialakulásához az a lehetőség vezetett, hogy különböző DNS-molekulák restrikciós endonukleázokkal meghatározott nukleotidszekvenciáknál szelektíven elhasíthatók és a különböző molekulákból származó darabok összeilleszthetők, majd a DNS-ligázzal kovalensen összeköthetők. Az ilyen módon előállított DNS **(rekombináns DNS)** sokszorosítható, elkülöníthető, azonosítható, a belőle kihasított darabok tisztíthatók, szekvenciájuk meghatározható. Rekombináns DNS készítésének többféle célja lehet, az első feladat egy kiválasztott DNS-darab sokszorosítása.

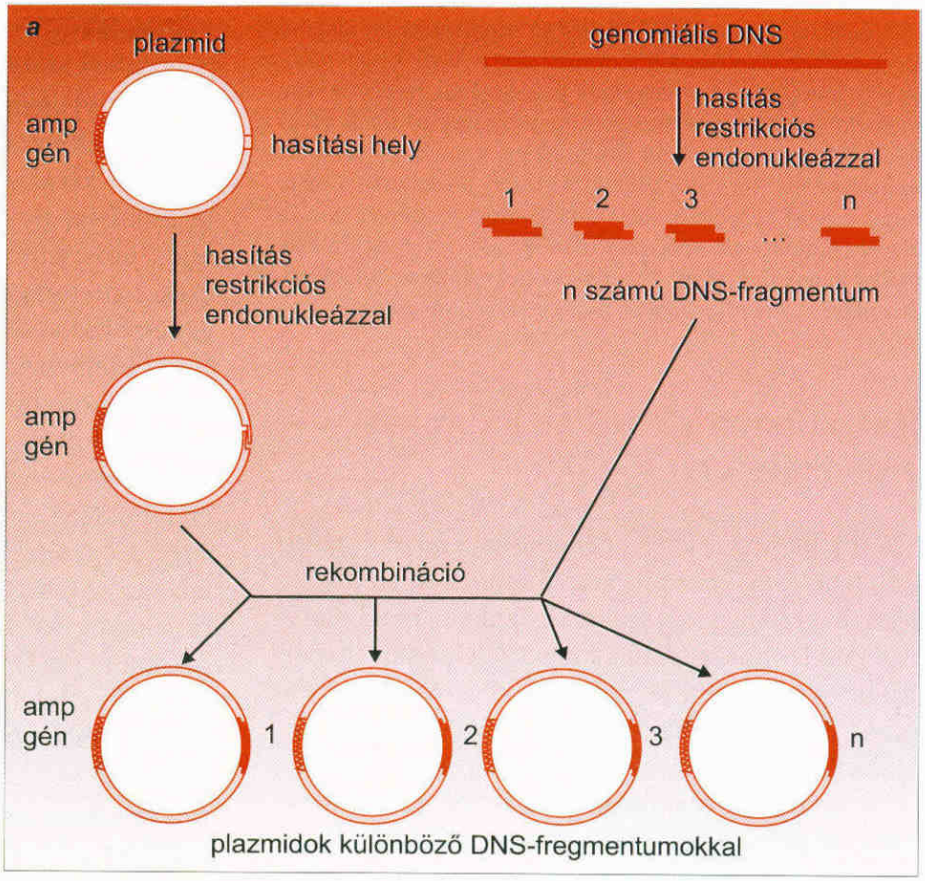
A sokszorosítás történhet baktériumokban **(klónozás)**, ehhez olyan DNS-konstrukciót kell előállítani, amely a baktériumokban gyorsan replikálódik. Erre a célra a vizsgálni kívánt DNS-darabból és egy baktériumba könnyen bejuttatható, ott gyorsan replikálódó **vektor** DNS-ből kell létrehozni a rekombináns DNS-t. A vektor szerepét betöltheti egy plazmid-DNS. A plazmidok csak 5–10 000 bázisnál nem hosszabb DNS-darabok esetén jó vektorok, ennél nagyobb DNS-szakaszok esetén más vektorral, pl. fág-DNS-sel kell dolgozni. Gyakran használt vektor az E. coli baktérium λ-fágja.

A leggyakrabban használt vektorok közé tartoznak azok a **plazmidok,** amelyek antibiotikumok elleni rezisztenciáért felelős géneket hordoznak és fehérjeszintézist gátló antibiotikumok jelenlétében is gyorsan képesek replikálódni. A vektorba épített DNS-t egy transzformációnak nevezett művelet segítségével juttatják a baktériumba. Kétértékű kationok (Ca^{2+}, Mg^{2+}) hatására a baktérium membránja átmenetileg permeábilis lesz kis DNS-molekulákra, ezért a baktériumok egy részébe bejut a rekombináns plazmid, majd a baktériumsejtben gyorsan replikálódik. A rekombináns DNS-t tartalmazó **transzformált baktériumok** könnyen kiválaszthatók az eredeti baktériumpopulációból, ha olyan antibiotikumot tartalmazó táptalajon növesztjük a baktériumokat, amelyek ellen csak a vektorként használt plazmid által hordozott gének által kódolt fehérjék okoznak rezisztenciát. Ilyen esetben kizárólag a transzformált baktériumok szaporodnak.

Előfordulhat, hogy egy vizsgálni kívánt DNS-molekulán egy adott specifitású restrikciós endonukleáz által felismerhető nukleotidszekvencia egyáltalán nem fordul elő, egyszer fordul elő vagy többször fordul elő. Természetesen olyan restrikciós enzimet kell kiválasztani, amely a rekombináns DNS készítéséhez használt kiindulási DNS-molekulákat hasítani képes. Ha a vizsgálni kívánt DNS-szakaszt tartalmazó DNS-t (pl. egy eukarióta sejt teljes genomját) a kiválasztott restrikciós enzim sok helyen képes elhasítani, sok különböző DNS-fragmentum jön létre, amelyek azonban hasonlítanak egymásra abban, hogy azonos „ragadós egyszálú végeket" tartalmaznak. Ha a vektorként használt cirkuláris plazmidot is elhasítjuk egy helyen ugyanazzal a restrikciós enzimmel, akkor a hasítás helyére az eukarióta DNS-ből származó restrikciós fragmentumok bármelyike (véletlenszerűen) beépülhet. Az ilyen módon készített rekombináns plazmidpopuláció különböző molekulákból fog állni, aszerint, hogy a vektorba melyik fragmentum épült be. Természetesen az is előfordulhat, hogy a plazmid-DNS a hasítás helyén ismét helyreállítódik anélkül, hogy az idegen DNS beépülne, ezért a plazmidpopuláció nem rekombináns molekulákat is tartalmazni fog *(3-45a ábra)*.

Az utóbbi években rekombináns DNS készítéséhez nem kizárólag a restrikciós enzimek által generált „ragadós végge" rendelkező DNS-darabokat tudják felhasználni, a DNS-darabok összeillesztésére más lehetőségek is vannak, pl. a DNS-fragmentumok végére poli-dA.dT farkat illesztenek vagy kémiailag szintetizált kapcsoló szakaszokat stb.

Ha jól választottuk meg a használt restrikciós enzimet, olyan rekombináns plazmidpopulációt kapunk, amelynek tagjai együttesen a kiindulási eukarióta genom minden darabját tartalmazni fog-



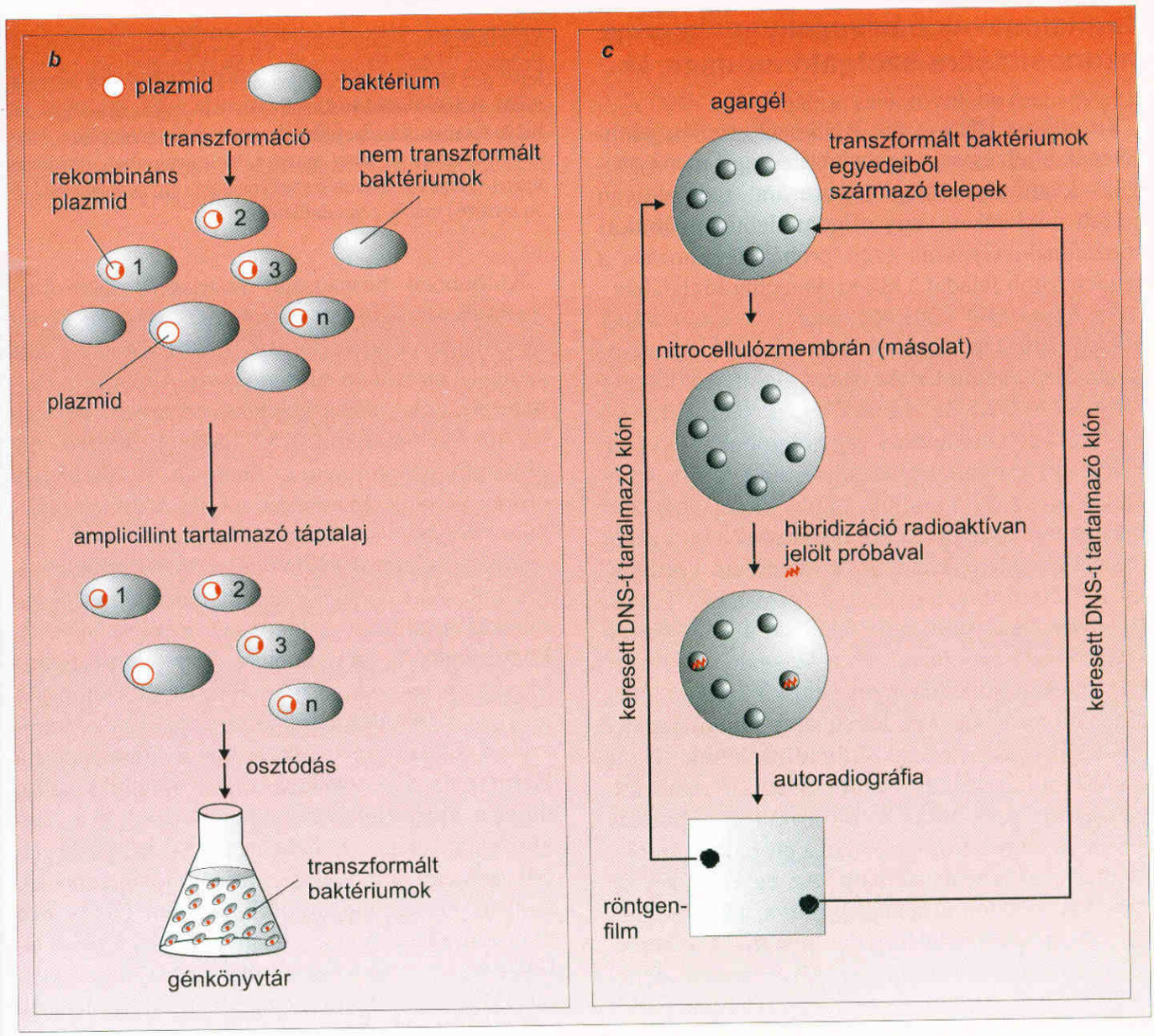
3-45. ábra. A klónozás folyamata. **(a)** *Rekombináns DNS készítése egy vizsgálni kívánt gént tartalmazó genomiális DNS-ből és egy vektorként használt plazmidból. A plazmid az ampicillin elleni rezisztenciáért felelős gént tartalmazza (amp gén) és egy hasítási helyet a használt restrikciós endonukleáz számára. A ragadós végüknél összeilleszkedő DNS- darabokból a DNS-ligáz folyamatos láncokat hoz létre. A képződő rekombináns plazmid egyedei különböző genomiális DNS-darabokat tartalmaznak.*

(b) *Génkönyvtár létrehozása. Egy alkalmas, ampicillinre érzékeny baktériumtenyészet transzformációja a rekombináns plazmid preparátummal. Az egyik baktériumba az egyik fragmentumot hordozó plazmid, a másikba a másik fragmentumot hordozó plazmid stb. jut be. A baktériumokat ampicillint tartalmazó táptalajra oltva, csak a transzformált baktériumok növekednek. Az ilyen módon sokasított transzformált baktériumtenyészet alkotja a génkönyvtárat.*

(c) *A vizsgálni kívánt DNS-darabot tartalmazó klón kiválasztása a génkönyvtárból. A baktériumtenyészet egy kis részét megfelelő hígításban szilárd táptalajra oltják. Minden egyes baktériumból osztódása során egy elkülönülő telep jön létre. Az agargélen elkülönülő telepekből pontosan ugyanabban a pozícióban, ahogy a táptalajon elhelyezkednek, másolatot (replika) készítenek egy nitrocellulózmembránra, amelyen a DNS hibridizációs próbája elvégezhető. A kiválasztani kívánt DNS egy szakaszával komplementer, radioaktívan jelzett oligonukleotid vagy hosszabb nukleinsavlánc szolgál próbaként. A nem hibridizáló, felesleges próbát eltávolítják, majd a nitrocellulózmembránról autoradiográfiás képet készítenek. Ha a kívánt DNS-darab jelen volt valamelyik telepben, a kérdéses telep (klón) az autoradiografiás kép alapján az agargélen azonosítható, onnan izolálható és tovább szaporítható. Ha a kívánt DNS-t a telepek közül egy sem tartalmazza, a génkönyvtár-tenyészetből újabb mintát kell szilárd táptalajra vinni és az eljárást addig ismételni, míg a kívánt DNS-darabot hordozó baktériumból származó telep a szilárd táptalajon azonosítható*

ják. (Az egyik féle rekombináns plazmid az egyik darabot, a másik a másikat, igen nagy számú különböző fragmentumot igen nagy számú különböző rekombináns plazmidmolekula hordoz.) A teljes genom darabjait hordozó plazmidpopulációval transzformált baktériumpopuláció egyes egyedeibe az egyik plazmid jut be, másokba a másik plazmid stb. A transzformált baktériumok összes egyedét figyelembe véve, a teljes eukarióta genom minden egyes darabját tartalmazó plazmid bejuthat a baktériumokba. Ha egy baktériumba egy bizonyos rekombináns plazmid bejutott, ezen baktériumegyed replikációja során kapott minden utód tartalmazhatja ugyanazt a rekombináns DNS-molekulát. A transzformált baktériumok szaporodása után kapott baktériumpopulációt, amelynek egyedeiben együttesen a vizsgálandó genom összes géndarabjának a másolata megtalálható, nevezik **génkönyvtárnak**.

A génkönyvtár előállítása sokkal könnyebb feladat, mint a vizsgálni kívánt DNS-darabot tartalmazó rekombináns plazmiddal transzformált baktériumegyed szaporodása révén létrejövő klón (azonos DNS-t tartalmazó utódok) kiválasztása. Erre a célra egy olyan **próbát** kell használni, amely biztosan jelzi, hogy a kívánt DNS-darab a génkönyvtárt alkotó baktériumpopuláció mely egyedeiből származó klónban található meg. Hosszadalmas munkával kell megvizsgálni, hogy a génkönyvtár egyes baktériumainak szaporodása révén



képződő, elkülönülő baktériumtelepek közül pontosan melyik az, amelyet éppen a vizsgálni kívánt DNS-darabot hordozó baktériumok alkotnak. A kívánt DNS-darab jelenlétének jelzésére a **hibridizáció** jelenségén alapuló módszereket használják a leggyakrabban *(3-45b* és *c ábra)*.

A kívánt klón megtalálása után az abból származó baktériumokat tovább szaporítják, majd izolálják a baktériális DNS-től a most már sokszorosára növekedett mennyiségű rekombináns plazmidot. Ha a cél a DNS-darab nukleotidszekvenciájának vizsgálata, akkor a vizsgálni kívánt DNS-darabot az eredetileg használt restrikciós endonukleázzal kimetszik a vektorból és megtisztítják a vektor DNS-től.

Hosszabb DNS-szakaszok klónozásához fág vektor-DNS segítségével készítenek megfelelő rekombinánst. A fág DNS-ből a végein levő bizonyos szakaszok (cos) kerülnek bele a konstrukcióba, ezek közé a karok közé 25–50 000 bázishosszúságú DNS-darabok is beilleszthetők, így alakulnak ki a **cosmidnak** nevezett szerkezetek. A cosmid mindig tartalmazza a bakteriális replikációs origot is. A cosmid szerkezet biztosítja a baktériumsejtben a replikáció lehetőségét.

Nukleinsavak bázisszekvenciájának azonosítására szolgáló módszerek

Specifikus DNS- vagy RNS-szekvenciák jelenlétének a jelzésére, azonosítására vagy mennyiségük kvantitatív meghatározására radioaktívan jelzett nukleinsav vagy oligonukleotid **próbákat** használnak. Gyakran ezen próbák létrehozása a legnehezebb feladat a klónozás technológiájában.

Az egymással komplementer nukleinsavszálak erősen vonzzák egymást és megfelelő körülmények között stabil kettős láncot alakítanak ki egymással. A DNS-sel (annak egyik láncával) egy kívülről adott nukleinsav vagy oligonukleotid csak akkor tud kapcsolatot létesíteni, ha a kettős szálú DNS-t előbb denaturáljuk, vagyis a két láncot egymástól elválasztjuk. Ekkor hozzáadva a próbaként használt nukleinsavláncot és megfelelő körülményeket létrehozva, ha a használt próbánkkal komplementer bázisszekvencia található a DNS-ben, a kívülről adott molekula és a vizsgált nukleinsav között a kapcsolat bizonyos valószínűséggel létrejön. A mesterségesen létrehozott komplementer lánckapcsolatot nevezik **hibridizációnak**. Ha a próbaként használt egyszálú nukleinsav radioaktívan jelzett, csak akkor és ott alakul ki radioaktív jelzést mutató kettős lánc, ahol a próbával komplementer szekvencia található. Az egyes láncú fel nem használódott próbát eltávolítva, a kettős láncban megjelenő radioaktivitás mutatja a komplementer szekvencia létezését, sőt, bizonyos feltételek mellett ennek mennyisége kvantitatíven is meghatározható. A hibridizációt különböző körülmények között létrehozva különbséget lehet tenni a tökéletesen komplementer, illetve attól kis mértékben különböző, de többé-kevésbé mégis hibridizáló homológ szekvenciák között.

A megfelelő próbák létrehozása nehéz munka. Gyakori módszer, pl. hogy egy fehérjét megtisztítanak, egy kisebb darabjának az aminosavsorrendjét meghatározzák és a kódszótár alapján visszakövetkeztetnek arra, hogy ezt a darabot milyen nukleotidsorrend kódolja. A megfelelő szekvenciájú rövid oligonukleotiddarabot kémiai úton megszintetizálják és radioaktívan jelzik (egy 20–25 tagú oligonukleotid DNS-szintetizátorban könnyen megszintetizálható. Minthogy a genetikai kód degenerált, vagyis egy aminosavat nem csupán egy fajta kodon határoz meg, az összes lehetséges változatot figyelembe vevő oligonukleotidkeveréket, „degenerált oligonukleotidokat" állítanak elő.) Ennek a próbának a segítségével már ki lehet választani a génkönyvtárból a kérdéses fehérje génjét vagy géndarabjait tartalmazó klónokat. Ezek felszaporítása és izolálása után meg lehet határozni a gén, illetve gén környezetének teljes szekvenciáját (ebből a fehérje teljes aminosavszekvenciájára, illetve a génexpresszió szabályozásában szerepet játszó nukleotidszekvenciákra lehet következtetni), ki lehet mutatni, ha a genomban a kérdéses fehérje génjével homológ szekvenciájú (ugyanabba a családba tartozó) másik gén található stb.

Különböző hosszúságú restrikciós DNS-fragmentumok közül egy bizonyos, vizsgálni kívánt DNS-darab kiválasztására, illetve azonosítására szolgál a **Southern-blot** módszer. A blottolás a denaturált, egyszálú, a gélelektroforézissel hosszuk szerint szétválasztott DNS-darabok átvitele egy nitrocellulózmembránra, amelyen a nukleinsav erősen kötődik, és az ilyen módon rögzített molekula további analízisre alkalmassá válik. Az agaróz-gélelektroforézis után, a hosszúságuk szerint különböző pozícióban elhelyezkedő DNS-darabokat tartalmazó géllapot szűrőpapírra helyezik, közvetlenül a gél tetejére egy nitrocellulózmembránt tesznek, majd e fölé ismét szűrőpapírt helyeznek. Az alsó szűrőpapírréteget egy koncentrált sóoldattal nedvesítik. A koncentrált sóoldat a kapillaritás elve alapján keresztülnyomul a gélen, majd a nitrocellulózmembránon és eljut a felső szűrőpapírrétegig. Eközben a DNS-t az agaróz gélből mintegy átmossa a nitrocellulózmembránra, ahol az erősen megkötődik, minden DNS-darab pontosan abban a pozícióban, ahogyan a gélen elhelyezkedett, ezért nukleotidjainak száma meghatározható. A nitrocellulózon fixált DNS-darabok közül hibridizáció (megfelelő próba) segítségével kiválasztható a kérdéses DNS-fragmentum.

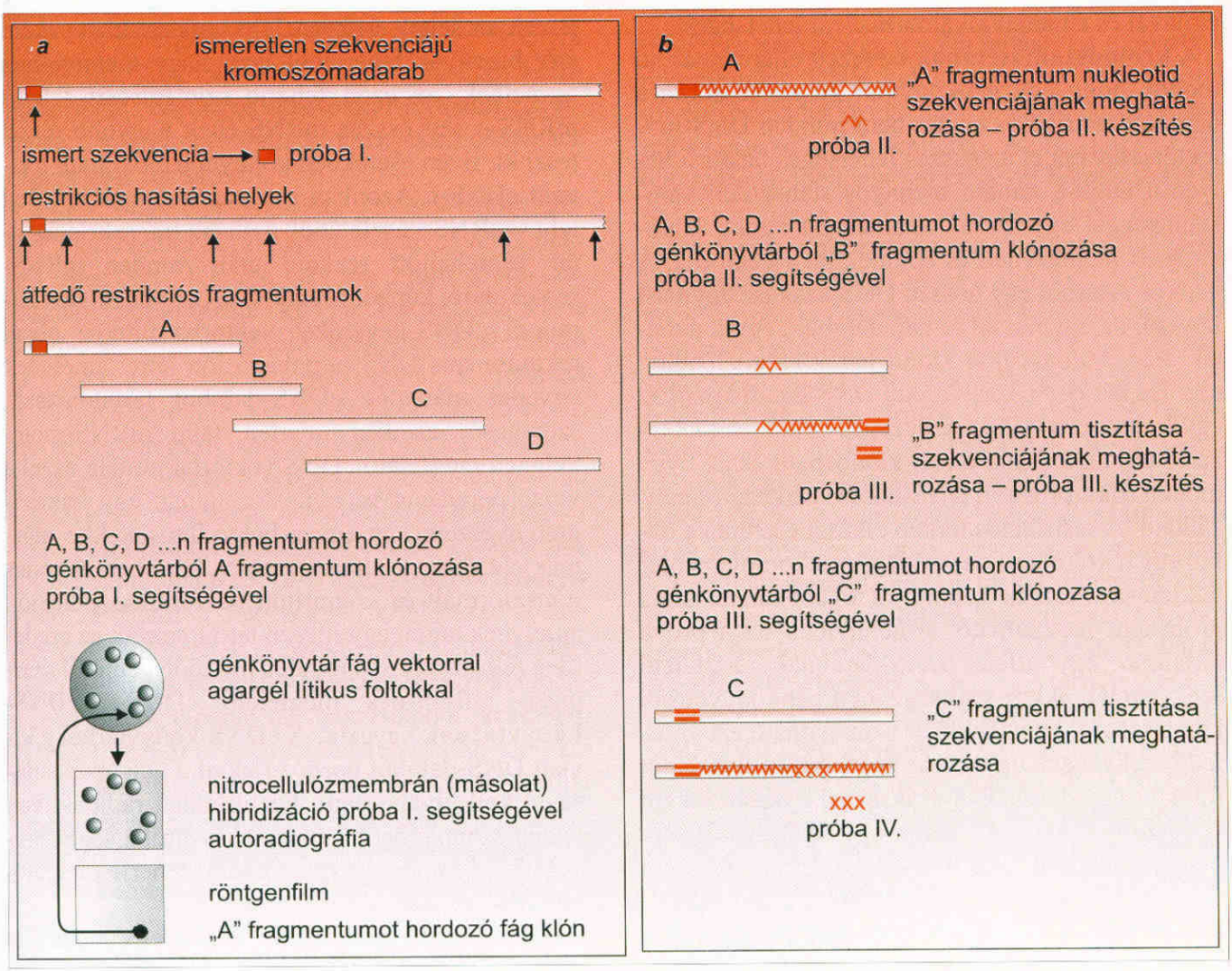
Hasonló eljárás segítségével lehet kiválasztani és kimutatni egy bizonyos RNS-molekulát is például egy sejtkivonat összes RNS-ei közül. Az RNS analízisére szolgáló analóg módszert **Northern-blot** eljárásnak nevezik, ez a módszer megkönnyíti a génexpresszió vizsgálatát.

Hibridizáció segítségével meg lehet határozni egy kérdéses DNS-szekvencia helyét a kromoszómán, a sejten belül. Ezt az eljárást **in situ hibridizációnak** nevezik. A sejtet nagyon rövid ideig magas pH-jú oldattal kezelik, ezalatt a DNS két szála szétválik (a DNS denaturálódik), majd a próbát hibridizáltatják a komplementer szekvenciájú DNS-szakasszal. Az *in situ* hibridizációhoz használt próbákat ma már inkább kémiailag jelölik,

mint radioaktívan, olyan nukleotidot is tartalmaznak, amelynek oldallánca módosítva van. Az ilyen oldalláncot egy specifikus immunglobulin felismeri, és a Western-blot eljárásnál is használt módszer (lásd később) segítségével a hibridizáció helyét láthatóvá lehet tenni.

Kromoszómaséta

A DNS szekvenálása csak rövidebb (néhány száz nukleotidot tartalmazó) szakaszokkal lehetséges, a teljes gének ennél jóval hosszabbak. A restrikciós enzimek hasítási helyei véletlenszerűen helyez-



3-46. ábra. Kromoszómaséta. (a) *Az első gén klónozása és analízise. A kromoszóma-DNS egymással átfedő szakaszokat is tartalmazó restrikciós fragmentumait fág vektorba ültetik és a rekombináns fággal egy alkalmas baktériumtenyészetet transzformálnak (génkönyvtár kialakítása). A transzformáció sikerét, a fág jelenlétét egy-egy baktériumban, illetve a belőle kifejlődő klónban a szilárd táptalajra oltott összefüggő baktériumtenyészet litikus foltjai alapján mutatják ki. A litikus foltokat tartalmazó baktériumtenyészetről másolatot (replika) készítenek nitrocellulózmembránra, és az első génszakasz azonosítására rendelkezésre álló próba I. segítségével hibridizálnak. A keresett gén jelenlétét a nitrocellulózmembrán autoradiográfiája során a röntgenfilmen megjelenő folt mutatja. A folt elhelyezkedése alapján azonosítják a szilárd táptalaj litikus foltjai közül azt, amely az első génszakaszt hordozó fágokat (klónt) tartalmazza. Innen a fág visszanyerhető és tovább szaporítható, majd az eredetileg használt restrikciós enzimmel a kromoszómális gén vagy géndarab kihasítható, tisztítható és bázisszekvenciája meghatározható. Egy újonnan meghatározott szakaszának bázisszekvenciája alapján készül az ezzel komplementer próba II.* ***(b)*** *A próba II segítségével egy második, az elsővel átfedő részt tartalmazó géndarabot azonosítanak a génkönyvtárból hasonló módon. Sokszorosítás és tisztítás után analizálják a második géndarabot is, és most már ennek egy újonnan meghatározott szakaszával komplementer oligonukleotidot készítenek, ez a próba III. Ezzel egy újabb átfedő génszakaszt azonosítanak a génkönyvtárból stb. Az eljárást annyiszor és addig ismétlik, ameddig átfedő szekvenciákat tartalmazó egymást követő kromoszómadarabokat lehet találni a génkönyvtárban*

kednek el a DNS-en, ezért a restrikciós fragmentumok sem feltétlenül tartalmaznak egy teljes gént, esetleg annak csak egyik vagy másik darabját a gén előtti vagy mögötti DNS-szakasszal együtt. A teljes génszakaszok vizsgálata, illetve annak felderítése, hogy az egyes gének és azokat reguláló elemek hol és hogyan helyezkednek el a kromoszómákon, hosszú DNS-szakaszok analízisét igényli, ez csak a különböző módszerek kombinációjával és ismételt alkalmazásával lehetséges.

A **kromoszómasétának** nevezett eljárásra az ad módot, hogy egy génkönyvtár készítése során a használt restrikciós enzim nem minden DNS-molekulán hasítja el az összes lehetséges hasítási helyen a DNS-t, hanem bizonyos statisztikai valószínűséggel egymással valamelyest átfedő DNS-darabok keletkeznek és épülnek be a vektorba. A génkönyvtárból egy hosszú DNS-szakasz egymást követő, de egymással átfedő darabjai, egyik a másik után, külön-külön klónozhatók és analizálhatók. Ha két egymással átfedő DNS-darab közül az egyik azonosításához szükséges próba rendelkezésre áll, akkor ez a darab klónozható és az ilyen módon sokszorosított DNS-darab szerkezete analizálható. A restrikciós térkép elkészítése után e darab egy részéről radioaktívan jelzett komplementer nukleinsav készíthető, amely a továbbiakban ismét próbaként használható. Amennyiben ez a próba tartalmaz egy átfedő DNS-darabnak megfelelő szekvenciát, akkor segítségével a génkönyvtárból kihalászható, klónozható és azonosítható ezt az átfedő szekvenciát ugyancsak hordozó, az első darab folytatását jelentő DNS-szakasz is. E másodikként klónozott és analizált darab egy szakaszáról megint próba készül, amelynek segítségével a folytatást jelentő harmadik DNS-darab is azonosítható. Természetesen csak abban az esetben, ha van a génkönyvtárban olyan restrikciós fragmentum, amely a folytatást képező harmadik DNS-darabon kívül a másodikként klónozott DNS-darabbal átfedő szakaszt is tartalmaz. A fenti lépések ismétlése igen hosszú, összefüggő DNS-szakaszok pontos analízisét is lehetővé teszi *(3-46. ábra)*.

A cDNS és a cDNS könyvtár

A DNS-szekvencia-meghatározás egyszerűsége és a DNS-klónozás által nyújtott sokszorosítás lehetősége miatt mRNS-ek, vírus-RNS-ek szekvenciáját nem magán az RNS-en végzett vizsgálatokkal határozzák meg. A mRNS-ről reverz transzkriptáz segítségével komplementer DNS-t készítenek (ez a **cDNS**), a cDNS-molekulákat ugyanúgy be lehet építeni egy vektorba és klónozni lehet, mint a genomiális DNS fragmentumait. (A reverz transzkriptáz működéséhez szükséges primer előállítását leegyszerűsíti az eukarióta sejtek mRNS-einek 3'-végén jelen levő poli-A-farok). Bizonyos sejtek differenciáltságuk eredményeként egy bizonyos fehérjéből igen nagy mennyiséget termelnek, az ezen fehérje szintéziséért felelős mRNS a sejt összes mRNS-ének nagyobb részét teszi ki. Ilyen esetekben könnyebb előállítani a kívánt cDNS-t. Azonban gyakran indulnak ki a sejt teljes mRNS-készletéből, a reverz transzkriptáz által végrehajtott reakció után minden mRNS-molekuláról képződhet cDNS. Az ilyen módon létrejövő cDNS-keveréket vektorba ültetve olyan rekombináns DNS populáció jön létre, amelynek egyedei más-más cDNS-darabot tartalmaznak, szerencsés esetben minden fajta mRNS-molekulának megfelelő cDNS vektorba jut. Ha ezzel a vektorpopulációval transzformálnak egy baktériumtenyészetet, az egyes baktériumsejtekbe más-más cDNS-t tartalmazó vektor kerülhet. A teljes transzformált és szaporított baktériumpopulációt, amelynek tagjai együttesen tartalmazzák az eredetileg felhasznált sejt minden működő génjéről származó mRNS-nek megfelelő cDNS-t, **cDNS-könyvtárnak** nevezik. A cDNS-könyvtárból a kívánt DNS-darabot hordozó klónt a gén azonosításával kell kiválasztani. Ez történhet radioaktívan jelzett komplementer nukleinsav próba segítségével hibridizációval vagy a kódolt fehérje megjelenésének alapján.

cDNS-t készítenek akkor is, ha egy eukarióta mRNS-nek megfelelő fehérjét baktériumokkal akarnak termeltetni nagy mennyiségben ipari célokra (pl. polipeptid hormonokat gyógyszerként). Fehérjemolekulák teljes aminosavszekvenciájára ma már leggyakrabban a kódoló cDNS nukleotidszekvenciájából következtetnek.

Expressziós vektorok és fúziós fehérjék

A rekombináns-DNS készítésének gyakori célja egy gén működésének a tanulmányozása vagy egy

kívánt fehérje termeltetése. Ezekben az esetekben olyan vektorokat kell alkalmazni, amelyek nemcsak bejuttatják a kívánt DNS-szakaszt egy sejtbe, ahol az replikálódni képes, hanem lehetővé teszik a gén vagy génszakasz expresszióját, a mRNS, illetve a DNS által kódolt fehérje termelődését is. Expressziós rendszerként nemcsak baktériumokat használnak, eukarióta gének esetén előnyösebbek lehetnek az eukarióta expressziós rendszerek, mert azok tartalmazzák az RNS, illetve fehérjék posztszintetikus módosulásaihoz szükséges komponenseket. Bizonyos vírusokkal fertőzött rovarsejtek gyakran szolgálnak fehérjetermeltetéshez expressziós rendszerül.

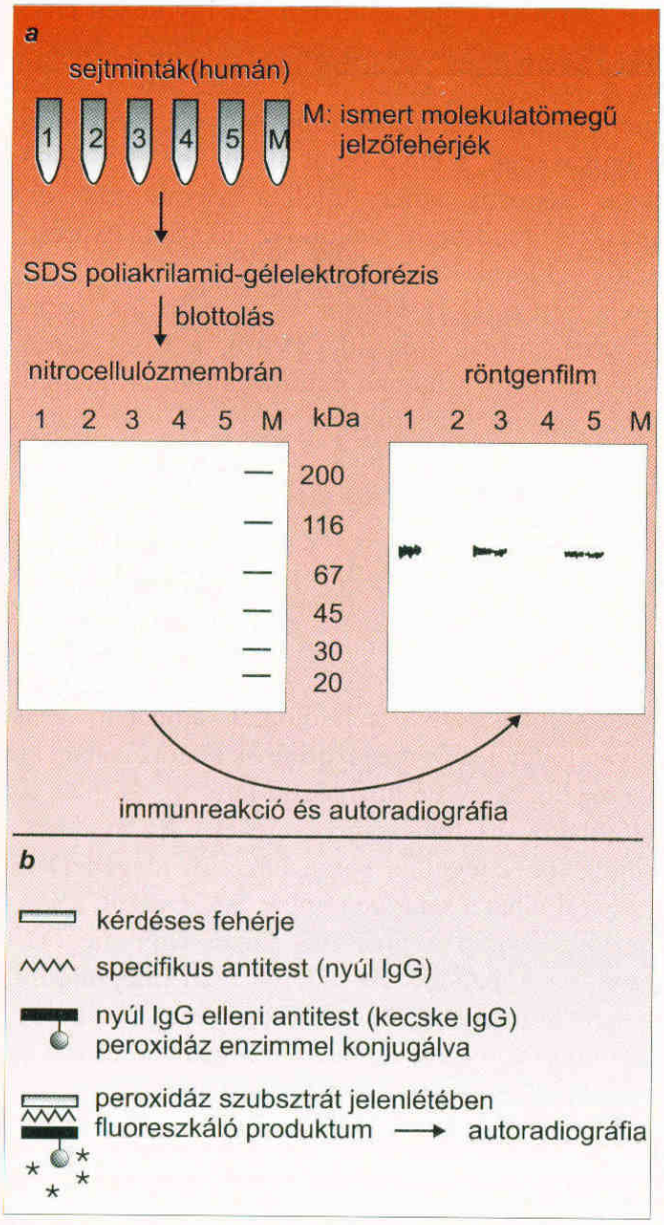
Ahhoz, hogy egy eukarióta gén egy baktériumban expresszióra kerülhessen, bizonyos feltételeknek meg kell felelnie. A gén előtti DNS-szakasznak tartalmaznia kell a bakteriális RNS-polimeráz szigma-faktora számára felismerhető promotert és esetleg még más regulációs elemeket is. A transzkripcióra kerülő szakasz sem állhat kizárólag a fehérjére vonatkozó információból, mert a bakteriális mRNS 5'-végén a riboszómához való kötődést és megfelelő orientációt biztosító szekvencia van. E problémák megoldására készítenek olyan rekombináns DNS-t, amely **fúziós fehérjét** kódol. Például a fág vektor tartalmazza a lac-operon promoterét és az azt követő β-galaktozidázt kódoló gén egy részét, és ehhez csatlakozik a megfelelő orientációban az eukariótából származó **cDNS**. Ilyenkor az expressziós rendszerül szolgáló baktériumban olyan fúziós fehérje szintetizálódik, amelynek aminoterminális szakaszát a β-galaktozidáz enzim egy darabja képezi és ez folytatódik a kívánt polipeptidlánccal. A megszintetizálódott fúziós fehérjéből annak tisztítása után kémiai vagy enzimatikus módszerrel le lehet hasítani a termeltetni kívánt fehérjét. A fúziós fehérjék egy részét többszörös rekombinációval létrehozott ravasz konstrukciók kódolják. A baktériális fehérjék extracelluláris térbe történő szekrécióját (az eukariótákhoz hasonlóan) szignál peptidszekvenciák segítik elő. Ha a fúziós fehérjét kódoló konstrukció tartalmazza (a megfelelő helyzetben) a szignál szekvenciát is, akkor a termeltetni kívánt fehérjét a baktérium szekretálja és sokkal könnyebb elkülöníteni a bakteriális fehérjéktől.

Eukarióta vektorok és expressziós rendszerek

Számos olyan vektort is kifejlesztettek, amelyek eukarióta expressziós rendszerek létrehozására is alkalmasak. Az eukarióta sejtek **transzfekciója** (a DNS bejuttatása, a baktériumok transzformációjával analóg folyamat eukarióta sejtek esetében) különböző módon történhet. Az egyik legegyszerűbb, bár nem a legnagyobb hatásfokú módszer a rekombináns DNS kalcium-foszfát segítségével történő csapadékká alakítása in vitro sejttenyészetből származó sejtek felületén. Az így kezelt DNS egy része endocitózis segítségével bejut a sejtekbe és a sejtmagba kerül. Más esetekben a sejtek membránját elektromos úton nagyon rövid időre kilyukasztják, a DNS bejut a sejtekbe és a sejtek azon csoportja, amely túléli a beavatkozást, expressziós rendszerré alakul. Az eukarióta expressziós vektorok között gyakoriak az eukarióta sejteket fertőző DNS-vírusok és retrovírusok [papovavírus, simianvírus 40 (SV40), a Rous sarcomavírus vagy a humán cytomegalovírus] genomjából készült konstrukciók. Ezekből származnak azok a regulációs elemek, amelyek az expressziót biztosítják, e regulációs elemeket általában valamilyen antibiotikum elleni rezisztenciáért felelős gént is hordozó plazmidvektorba ültetik. (E konstrukciókat úgy készítik el, hogy ne tartalmazzák az eredeti vírusgenom minden komponensét és csak kontrollált körülmények között szaporodjanak. A rekombináns DNS-technológiát általában csak olyan feltételek és megszorítások között szabad alkalmazni, hogy ne hozhasson létre új, fertőző, az élővilágra ártalmas szerkezeteket.) Az eukarióta sejtek transzfekciója során bekerült idegen DNS integrálódhat a saját genomba, ekkor stabil, a sejtosztódás során expressziós képességét megőrző rendszer képződik. Ha a DNS nem integrálódik, hanem különálló DNS-ként (episzóma) viselkedik, az expresszió csak átmeneti, a transzfektált sejt az idegen DNS-t nem tudja utódaiba átörökíteni.

A transzfektált sejtpopulációból ugyancsak ki kell választani azokat a sejteket (klónokat), amelyekben a bevitt gén működik. A képződő mRNS a már említett **Northern-blot** segítségével kimutatható. A szintetizálódó fehérje kimutatására többféle módszer szolgálhat, ezek között csak nagyon ritkán van lehetőség a fehérje enzimaktivitásának

közvetlen mérésére. Az egyik leggyakrabban használt, immunológiai reakción alapuló eljárást **Western-blot** módszernek nevezik. A blottolás itt is a nagyságuk szerint SDS poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szétválasztott fehérjemolekulák nitrocellulózmembránra történő juttatását jelenti. A fehérjék blottolása elektromos úton történik. A nitrocellulózon a gélelektroforézissel kialakult pozícióban rögzült fehérjék közül az Elisa-eljárással analóg immunológiai eljárással mutatják ki a kérdéses fehérjét *(3-47. ábra)*.



3-47. ábra. Western-blot. (a) *A vizsgálni kívánt sejtek lizátumában levő fehérjék SDS poliakrilamid-gélelektroforézise és blottolása nitrocellulózmembránra.* **(b)** *A kérdéses fehérje kimutatása*

Az eljáráshoz a fehérjét specifikusan felismerni képes antitest szükséges, amely reagál a fehérjével, és így a kimutatni kívánt fehérjecsík pozíciójában szintén rögzül a membránon. A specifikus antitesttel történő reakciót egy második antitest segítségével teszik láthatóvá. Az első antitestre specifikus második antitest kovalens kötéssel hordoz egy jelző enzimet (legtöbbször peroxidázt vagy foszfatázt), amelynek aktivitását produktumának színreakciója vagy fluoreszcenciája alapján nagyon könnyű kimutatni. Ha például egy emberi sejtből származó fehérjét egy nyúlból nyert, a kérdéses fehérjére specifikus immunglobulin G segítségével akarnak azonosítani, a második reakcióban olyan másik állatból származó antitestet használnak, amely felismer minden nyúlból származó IgG-molekulát, de kizárólag a nyúlból származó IgG-t. Ilyen második, jelző antitesteket ipari méretekben állítanak elő és forgalmaznak. Az első reakció után a membránt a második antitesttel kezelik, amely viszont kizárólag az elsőként használt antitestet felismerve és ezzel reagálva ugyancsak rögzül a megfelelő pozícióban. A hordozott enzim szubsztrátját a membránra juttatva a képződő színes vagy fluoreszkáló (autoradiografálható) produktum csíkszerű megjelenése, pozíciója és intenzitása mutatja a vizsgálni kívánt fehérje jelenlétét, pozícióját (nagyságát), illetve mennyiségét (3-47. ábra).

„Riporter gének"

Bizonyos esetekben egy gén expresszióját vagy egy génszakasz regulációs szerepét ún. **riporter gének** segítségével vizsgálják. A leggyakrabban használt riporter gén a klóramfenikol acetiltranszferáz enzimet (CAT) kódoló plazmid gén. Egy eukarióta promoter viselkedését, a promotert szabályozó komponensek jelenlétét vagy hiányát például vizsgálni lehet, ha a promotert a CAT-gén elé ültetik és az ilyen módon előállított plazmiddal transzfektálnak egy eukarióta sejtet. A CAT aktivitása nagyon könnyen mérhető, eredetileg nem termelődik eukarióta sejtekben, csak a bevitt génkonstrukció hatására. Ezért a vizsgálni kívánt promoter funkcióképességét, illetve az azt reguláló komponensek jelenlétét vagy viselkedését a CAT enzim megjelenése és mennyisége jól mutatja.

Irányított in vitro mutagenezis

Egy klónozott DNS bizonyos kiválasztott szakaszán vagy egyetlen nukleotidján végrehajtott változtatás, mutáció **(site directed mutagenesis)** segít felderíteni a kérdéses DNS-szekvencia regulációs szerepét, vagy ha kódoló régióban található,

a fehérje megfelelő aminosavainak jelentőségét a fehérje funkciójában. Kontrollált, előre tervezett mutagenezisről van szó, egy darab DNS-t beilleszthetnek (inzerció) vagy kivágnak (deléció), vagy éppen kicserélnek egy másik szekvenciára. (Megválasztott szekvenciájú oligonukleotidok kémiai szintézise megoldott probléma, ahhoz, hogy az oligonukleotidból a kérdéses polinukleotid DNS szintetizálódjék és tovább replikálódjék, a rekombináns DNS-technika segítsége is szükséges. Az irányított mutagenezis több lépésből álló eljárás.) Az ilyen módon mutációt szenvedett DNS-t expressziós rendszerbe juttatják, ahol a mutáció következményei megfigyelhetők.

Polimeráz láncreakció (PCR)

Egy kívánt DNS-szakasz homogén formában történő szaporítása klónozás útján hosszú és munkaigényes folyamat. Az elmúlt évtizedben DNS-polimeráz I. segítségével egy olyan módszert is kidolgoztak **(polimeráz lánc-reakció, PCR)**, amely nagyon gyorsan, automatizálva is képes egy kívánt DNS-szakasz akár milliószoros mennyiségre történő sokszorosítására, feltéve, ha annak szekvenciája vagy legalább az elején és végén levő szekvenciája ismert. A szekvencia ismeretében DNS-szintetizátorban két olyan 20–25 tagú egyszálú oligonukleotidot készítenek, amelyek komplementerek a kérdéses DNS-darab egyik, illetve másik láncának 3'-végével, ezek töltik be a primer szerepét. A reakcióelegy tartalmazza a sokszorosítani kívánt DNS-mintát, a nagy moláris feleslegben levő primereket, a négy dezoxi-ribonukleozid-trifoszfátot és egy olyan DNS-polimerázt, amely igen magas hőmérsékletű hőforrásokban élő baktériumból származik (Taq polimeráz), és ezért nagy a hőtűrése. Aktivitását megőrzi olyan hőmérsékleten is, amikor a DNS denaturálódik.

A reakcióelegyet kb 95 °C emelve a DNS denaturálódik, két lánca elválik egymástól. A reakcióelegyet alacsonyabb hőfokra hűtve a nagy moláris feleslegben levő szintetikus primer molekulák hibridizálnak a megfelelő lánccal. A reakcióelegyet a polimeráz aktivitásának megfelelő hőmérsékleten tartva az enzim megszintetizálja a primerek folytatását képező láncokat és így az eredeti DNS megkétszereződik. Egy újabb ciklus elindítható a reakcióelegy ismételt felmelegítésével. Ekkor az újonnan szintetizált DNS-molekulák ismét denaturálódnak és így az eredetinél már kétszer több mintát (template) szolgáltatnak a reakcióhoz. Hűtés után a nagy feleslegben jelen levő primer ismét hibridizál a megfelelő láncokkal és a polimeráz reakció végbemegy, ennek végén a DNS mennyisége ismét megkétszereződik. A ciklus 20–25-ször ismételhető, a folyamat végén a DNS mennyisége 2^n-szeresére növekszik, n a ciklusok száma *(3-48. ábra)*.

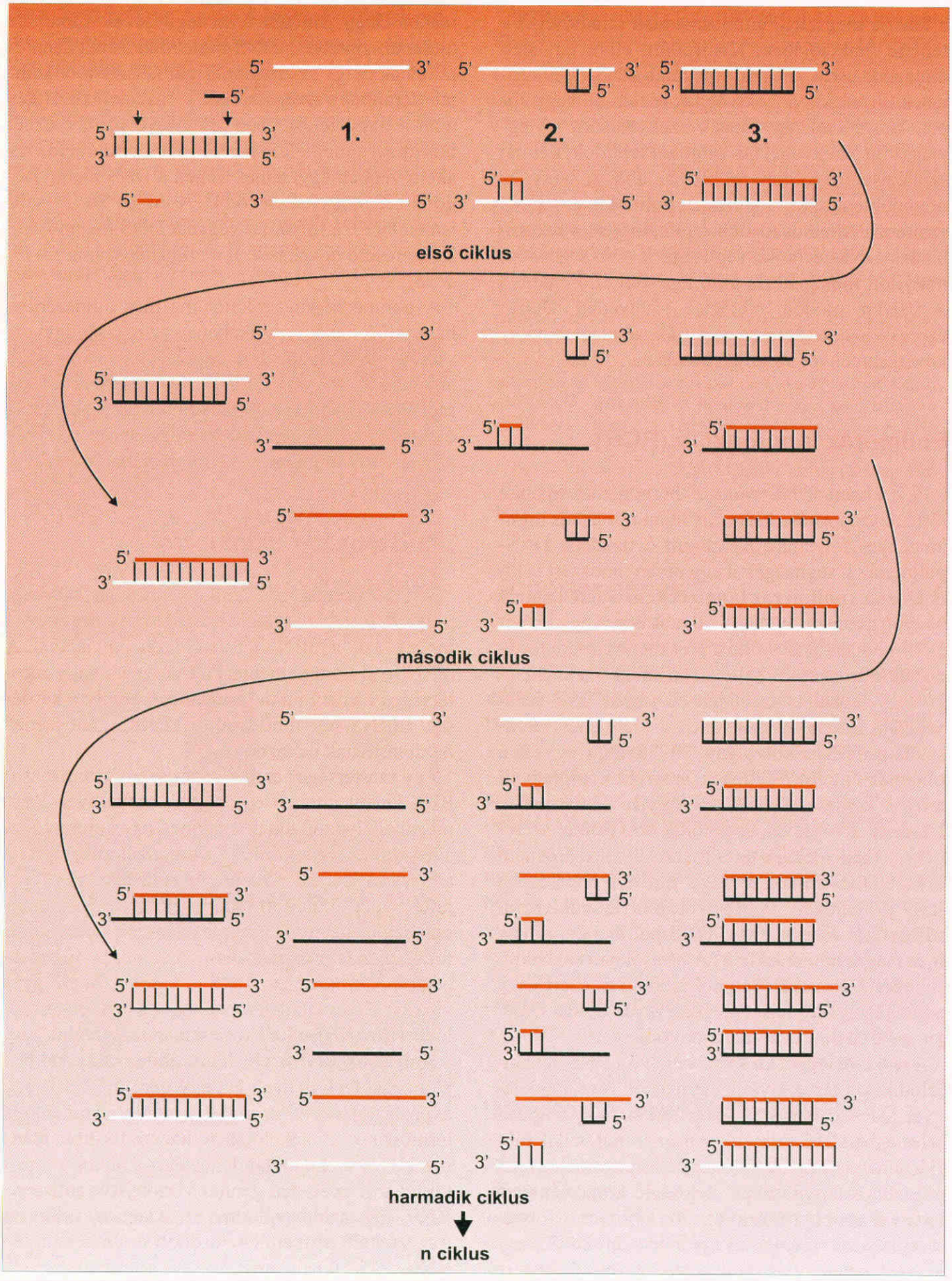
A polimeráz láncreakciót ma már rutinszerűen használják a diagnosztikában és az igazságügyi orvosi gyakorlatban, ahol nagyon kis mennyiségű anyagból (pl. egy hajszálból vagy egy csepp beszáradt vérből) kell kiindulni. Fontos szerepe van az evolúciós vizsgálatokban, és gyakran alkalmazzák az irányított mutagenezis stratégiájában is.

„Antiszenz" nukleinsavak

A DNS két szála közül az értelmes, kódoló, „szenz" (sense) szálnak a nukleotidszekvenciája megegyezik a mRNS nukleotidszekvenciájával. A mRNS-sel komplementer, természetes vagy mesterséges eredetű nukleinsavláncot, amely a kérdéses mRNS-sel hibridizálni képes, „antiszenz" nukleinsavnak nevezik.

Egy mesterséges eredetű „antiszenz" (antisense) RNS-láncot juttatva egy sejtbe, szelektíven lehet megakadályozni annak a génnek az expresszióját, amelyről az eredeti mRNS szintetizálódik, mert az antiszenz lánccal történő hibridizáció gátolja a mRNS által irányított fehérjeszintézist. Ez a módszer segítséget nyújt az egyes fehérjék sejten belüli funkciójának vizsgálatában. Különösen ígéretesnek tűnik az antiszenz RNS felhasználása az egyes vírusok elleni küzdelemben, ahol a sejtben termelődő vírus-RNS-t kell szelektíven inaktíválni.

Antiszenz RNS-t elő lehet állítani egy sejtben klónozási technikával. Ha egy gént (cDNS-t) egy expressziós vektorba annak promotere után nem a természetes orientációjában, hanem fordítva ültetnek be (ez technikailag lehetséges), akkor a fordított génről az eredeti génhez viszonyítva antiszenz RNS fog szintetizálódni az ezzel a vektorral transzfektált sejtben. (A fordított orientációjú gén DNS-szálai közül most az lesz a kódoló, + szál,


1.
2.
3.
első ciklus
második ciklus
harmadik ciklus
n ciklus

amely eredetileg a minta (template) szerepét betöltő komplementer, –szál volt.)

Ezenn a helyen említjük azt a kísérleti irányvonalat is, amelyet **tripla-hélix génterápiának** neveznek. A módszer a DNS-nek azt a tulajdonságát használja ki, hogy a kettőslán-cot stabiliziló hidrogénhidak kialakulása után, bizonyos bázispárok még képesek további hidrogénhidakat is kialakítani egy harmadik bázissal (Floogsteen hidrogénhidak). A legstabilabban a G kőtődik a GC párhoz és a T az AT bázispárhoz. Ennek a mechanizmusnak az alapján rövid, génspecifikus szekvenciájú oligonukleotidok a DNS nagy árkában elhelyezkedve, a megfelelő rövid szakaszon stabil DNS tripla-hélixet hoznak létre. Replikáció közben a tripla-hélix kitekeredik, azonban a tripla-hélix szerkezet megakadályozhatja a transzkripciós faktorok bekötődését és a gén expresszióját.

Transzgénikus állatok

Az eddig a fejezetig tárgyalt módszerek során idegen géneket vezetnek be baktériumokba, illetve egyedi, szomatikus eukarióta sejtekbe. E módszerek lehetőséget teremtenek arra, hogy a kérdéses gén működésének hatását vizsgálják egy bizonyos sejtben. Ha egy gén funkcióját egy állat teljes szervezetében kívánják vizsgálni, a kérdéses gént egy megtermékenyített petesejtbe kell bevezetni. Annak az állatnak, amely ebből a petesejtből kifejlődik, minden sejtje tartalmazni fogja az idegen gént. Az ilyen módon kifejlődő állatokat nevezik **transzgénikus állatoknak**.

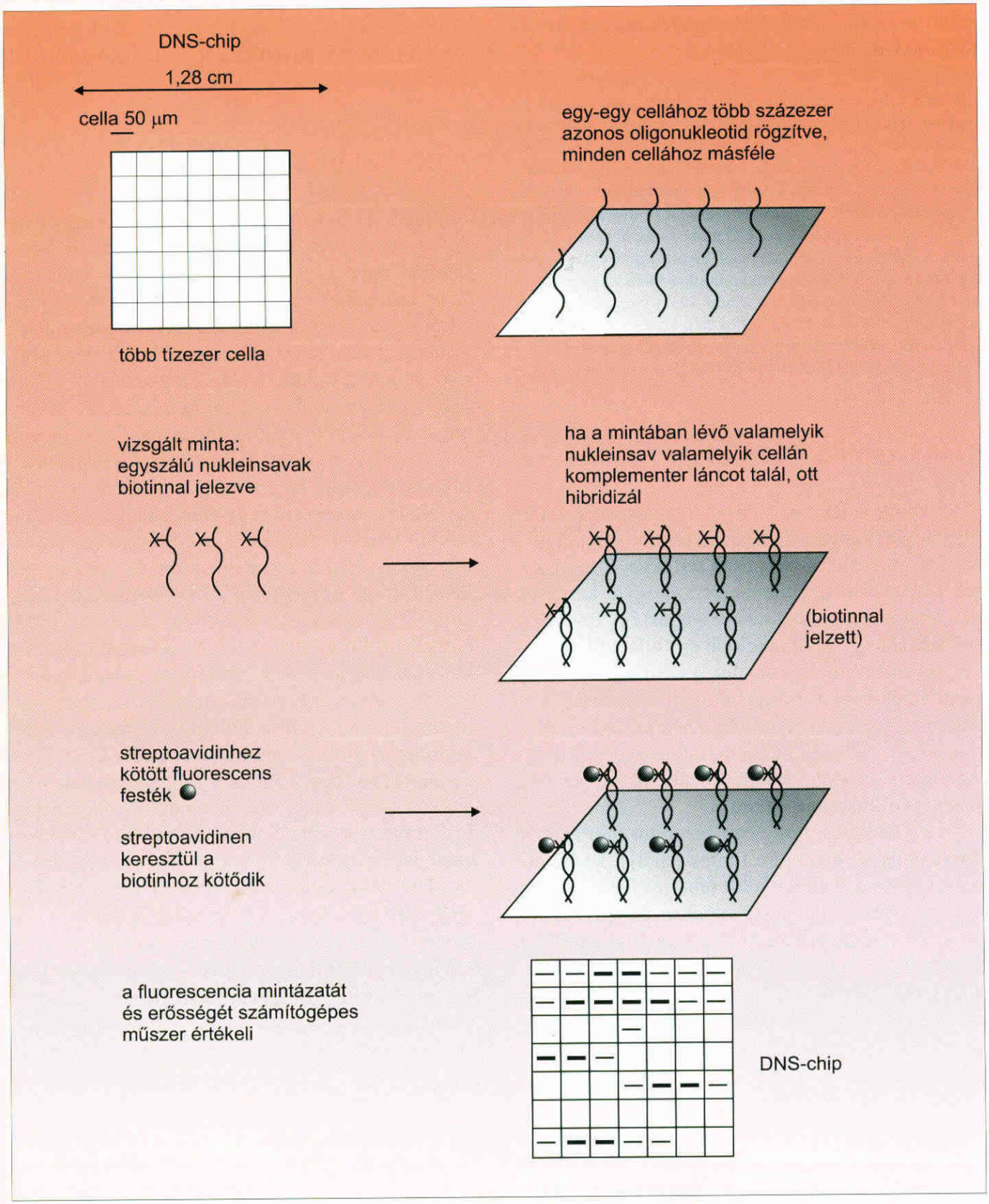
Arra a kérdésre, hogy egy bizonyos gén az élet szempontjából mennyire fontos fehérjét kódol, illetve hogy a gén által kódolt fehérje elvesztésének milyen következményei lehetnek az élőlényre nézve, az ún. **knock-out állatok** tudnak felvilágosítást nyújtani. Ezeket az állatokat úgy hozzák létre, hogy a megtermékenyített petesejtbe a kérdéses saját gén elrontott változatát vezetik be, és a rossz gén az általános genetikai rekombináció folyamatában kicserélődik az eredeti génnel. Ha a gén által kódolt fehérje hiánya összeegyeztethető az élettel, életképes állat jöhet a világra.

A DNS-chip

A laboratóriumi géntechnika, a DNS-sokszorosítás és szekvenciameghatározás automatizálása lehetővé tette egy-egy élőlény teljes genomja szekvenciájának meghatározását. Az E. coli és néhány egyszerűbb eukarióta szervezet genomjának felderítése után nagy sebességgel halad előre a humán genom program, amely a legközelebbi időkre ígéri a teljes emberi genom nukleotidszekvenciájának ismeretét. Ez azonban még nem jelenti azt, hogy a genom minden szakaszáról azt is tudni fogjuk, hogy mi a funkciója, például történik-e róla egyáltalán expresszió vagy nem. Mind a genom további vizsgálatának, mind az eddigi és ezutáni ismeretek gyakorlati alkalmazásának lehetőségét kiszélesíti az új találmány, a **DNS-chip.** A DNS-chip (DNS mikroelrendezés) egy adott vizsgálati anyagban előforduló többezer nukleinsavmolekula hibridizáción alapuló szekvenciaazonosítását teszi lehetővé, egymással párhuzamosan. Az expresszió monitorozásán kívül a különböző egyének DNS polimorfizmusának tanulmányozására (DNS ujjlenyomat) és az egyes egyének különböző génjeiben levő mutációk analízisére is rendkívül nagy hatásfokú módszert szolgáltat kis mennyiségű vizsgálati anyag felhasználásával.

A DNS-chip egy kis alapterületű (gyakran nem több mint 1,5–2 cm^2) lemez, amelyik cellákra van osztva (az egyes cellák mérete lehet pl. 50 x 50 μm) és a cellák mindegyikéhez egy másik, szintetikusan előállított oligonukleotid néhány százezer molekulája van odaerősítve. A különböző oligonukleotidokat tartalmazó cellák sorokat alkotnak,

3-48. ábra. Polimeráz láncreakció. A sokszorosítani kívánt DNS-szakasz mindkét láncához dezoxiribonukleotid primert készitünk, ezt nagy feleslegben adjuk a reakcióelegyhez. (A kis nyilak a sokszorosítani kívánt DNS-szakasz kezdetét és végét mutatják). A ciklus lépései: I. DNS kettőslánc szétválasztása magas hőmérsékleten, 2. alacsonyabb hőmérsékleten a primer hibridizál a minta-DNS komplementer szakaszával, 3. a DNS pofimeráz a számára megfelelő hőmérsékleten megszintetizálja az új DNS-láncokat. A kialakuló DNS kettőslláncokat a következő ciklus első lépéseként ismét szét kell választani és a folyamat megismétlődik Az első néhány ciklus után, a ciklusok számának növekedésével a két primerrel pontosan baltatárolt DNS-szakasz mennyisége növekszik a legjobban



3-49. ábra. A DNS-chip

előre tetvezett, meghatározott elrendezésben. A vizsgálni kívánt nukleinsavakat egyszálúvá kell tenni, és jelölni kell. (Jelölni lehet radioaktivitás alkalmazásával is, de mostanában a radioaktivitás alkalmazásának elkerülésére nagyon gyakran használják a biotin és az avidin nevű anyag egymás iránti rendkívül nagy affinitását. A mintához kovalens kötéssel biotint erősítenek, az avidinhez pedig fluoreszcens anyagot kötnek.). A mintaanyagban levő egyszálú nukleinsavmolekulák sokaságát megfelelő körülmények között összehozva a DNS-chippel, a mintában levő nukleinsavmolekulák közül azok, amelyek valamelyik cella oligonukleotidjaival komplementer szekvenciát tartalmaznak, hibridizálni fognak a megfelelő cellán levő oligonukleotidmolekulákkal. A nem hibridizáló nukleinsavmolekulákat le lehet mosni a lemezről. A hibridizáció tényét és erősségét mutatja a vizsgálni kívánt nukleinsav jelzése (pl. ha biotinnal volt jelölve a minta, a hibridizáció után a biotinhoz avidinnel kapcsolódó fluoreszcens festék). A jelzés által adott mintázatot (amelyik a hibridizáló oligonukleotidokat tartalmazó egyes cellák elrendeződéséből ered) egy műszer leolvassa és értékeli. Így egyszerre több ezer oligonukleotid-szekvenciáról lehet kideríteni, hogy előfordult-e a vizsgált mintában vagy nem. *(3-49. ábra)*.

A 3. fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerző köszönetet mond Dr. Bauer Pálnak, Dr. Krajcsi Péternek, Dr. Váradi Andrásnak, Szpaszokukockaja Tatjanának.

Ajánlott irodalom

DNA and RNA: Molecules of Heredity

Flow of Genetic Information

Exploring Genes: Analyzing, Contructing and Cloning DNA

Genetic Information: storage, transmission and expression in Lubert Stryer: Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York, 1988

DNA: The Replicative Process and Repair by Stelios Aktipis

RNA: Structure, Transcripition and Posttranscriptional Modification by Francis J. Schmidt

Protein Synthesis: Translation and Posttranslational Modifications by Dohn Glitz

Regulation of Gene Expression by John E. Donelson

Recombinant DNA and Biotechnology by Gerald Soslau in Thomas M. Devlin editor: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Wiley-Liss, Inc., USA, 1992

Information Pathways in Albert L. Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox: Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., USA, 1993

Basic Genetic Mechanism

Control of Gene Expression

Recombinant DNA Technology

Cancer in Bruce Alberts, Dennis Broy, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York and London, 1994

Animal Cell Cycles and Their Control by Chris Norbury and Paul Nurse in Annual Rev. Biochem. 1992, 61, 44–70.

Genes That Can Antagonize Tumor Development by George Klein: FASEB J. 1993, 7, 821–825.

Principles of CDK Regulation by David O. Morgan: Nature, 1995, 374, 131–133.

A membránok szerkezete. Membrántranszport-folyamatok

4.
FEJEZET

4.1. A membránok szerkezete *(Ádám Veronika)*
A membránok kémiai összetétele
Membránlipidek
Membránfehérjék

4.2. Membrántranszport-folyamatok *(Ádám Veronika)*
Facilitált diffúzió
A transzportfolyamatok energetikája
Aktív transzport
Na^+K^+-ATPáz–Na^+K^+-pumpa
A transzport ATPázok csoportosítása
Másodlagos aktív transzport. A glukóz Na^+-függő transzportja
ABC fehérjék. Multidrog-rezisztencia
Ioncsatornák
A sejtek Ca^{2+}-transzport-rendszerei. Ca^{2+}-homeosztázis
Az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció emelkedését kiváltó szignálok és mechanizmusok
Az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációt csökkentő mechanizmusok

4.1. A membránok szerkezete

Ádám Veronika

A membránok olyan dinamikus struktúrák, amelyek elhatárolják a sejteket a környezetüktől, a sejten belüli, a különböző intracelluláris kompartmenteket pedig egymástól. A szerkezeti elhatárolás mellett a membránok a korlátozott permeabilitás következtében megakadályozzák az ionok és molekulák szabad diffúzióját és ezáltal biztosítják az intracelluláris tér és az intracelluláris kompartmentek sajátos összetételét. A membránokban ugyanakkor speciális transzportfolyamatok teszik lehetővé, hogy a sejtek hozzájussanak a szükséges anyagokhoz, másokat pedig eltávolíthassanak. Fontos szerepet játszanak a sejtek energiatermelésében, a sejtek közötti kommunikációban: szinte minden sejtfunkció feltétele, hogy szerkezetileg és funkcionálisan ép membránok biztosítsák a megfelelő intracelluláris környezetet.

A membránok kémiai összetétele

A sejtmembránok komplex funkciója a sajátos kémiai összetételből és szerkezeti tulajdonságokból adódik. A membrán alapszerkezetét lipidek és fehérjék alkotják, leegyszerűsítve azt szokták mondani, hogy körülbelül azonos arányban. Ez általában igaz a sejtek plazmamembránjára, azonban nagyon nagy eltérések lehetnek a különböző membránok között a speciális funkciónak megfelelően. Egyik végletnek tekinthető az egyes neuronokat határoló myelinmembrán, ahol a lipidek aránya a 80%-ot is eléri, ami jól szolgálja a myelin védő, szigetelő funkcióját. A másik véglet a mitokondrium belső membránja, ahol viszont a fehérjék vannak túlsúlyban, s ez tükrözi a belső membrán komplex funkcióját a sejtek anyagcseréjében és az ATP-szintézisben.

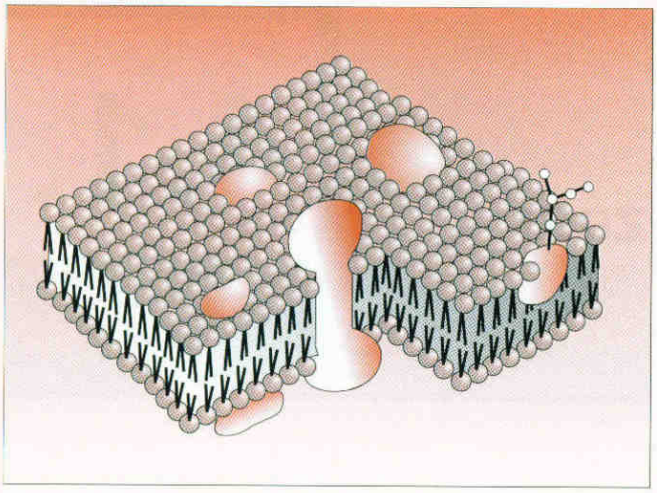
Kis mennyiségben szénhidrátok is jelen vannak a membránban. Ezek soha nem szabadon, hanem vagy lipidekhez, vagy fehérjéhez kötve fordulnak elő. A *4-1. táblázat* néhány membrán lipid és fehérje összetételét mutatja.

Membránlipidek

A membránok 7,0–9,0 nm vastagságú képződmények, amelyek alapszerkezetét egy lipid kettős réteg alkotja, s ebben, különböző mélységig ágyazódva találhatók a fehérjék *(4-1. ábra)*. A kettős ré-

4-1. táblázat. Néhány membrán kémiai összetétele a teljes tömeg százalékában

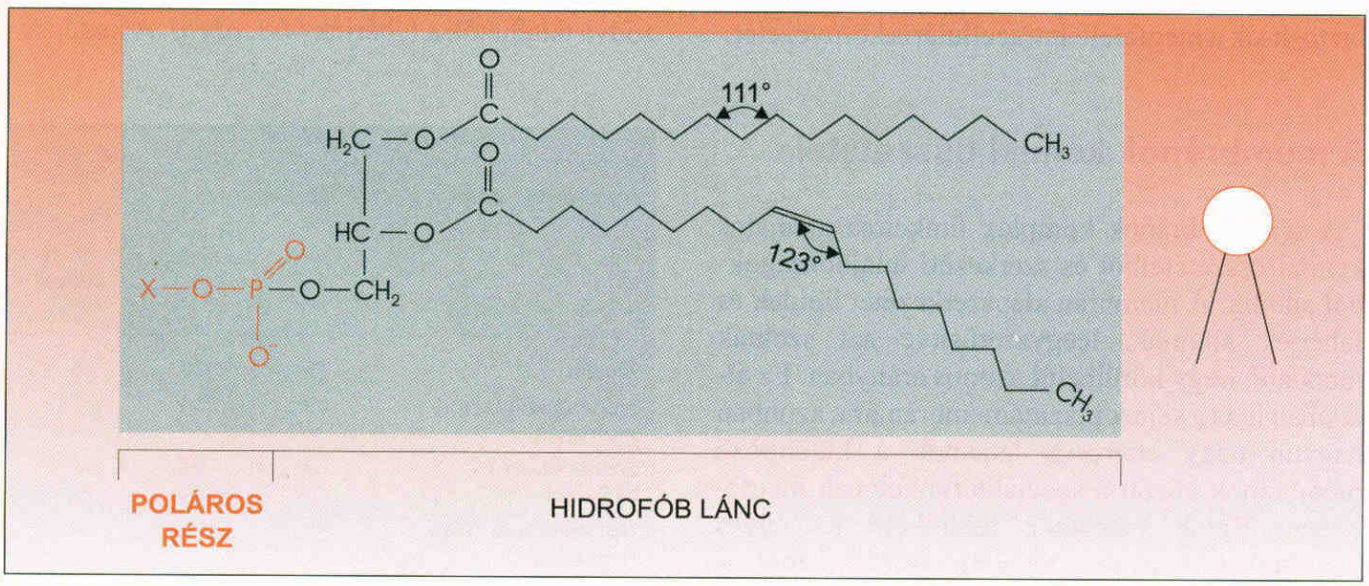
	Lipid (%)	Fehérje (%)	Szénhidrát (%)
Myelin	75	20	5
Hepatocita plazmamembrán	39	54	7
Szarkoplazmás retikulum	32	64	4
Mitokondrium külső membrán	46	50	4
Mitokondrium belső membrán	23	75	2



4-1. ábra. A membrán alapszerkezete. *A fluid-mozaik modell*

teg (kb. 4,5–5,5 nm) mint membrán alapszerkezet a membránalkotó lipidek molekuláris sajátosságából következik. A membrán alkotásában alapvető szerepet a foszfolipidek játszanak, azaz a foszfogliceridek és a szfingomielin. A foszfogliceridek közül a foszfatidilkolin, a foszfatidiletanol-amin, a foszfatidilszerin, a foszfatidilinozitol és a kardiolipin a legjelentősebbek, amelyekről a 2.3. fejezetben szóltunk. A glicerofoszfatidok közös jellemzője, hogy bennük a glicerin 1. és 2. C-atomját hosszú szénláncú zsírsavak észteresítik, a 3. C-atomhoz pedig foszforsavon keresztül valamilyen alkohol kapcsolódik *(4-2. ábra)*. Az 1. C-atomon általában telített, a 2.-on telítetlen zsírsav található, s bizonyos törvényszerűség van abban, hogy melyik foszfolipidben melyek ezek a telített, illetve telítetlen zsírsavak. A foszfatidilkolinban általában sok a palmitinsav és a linolsav, míg a foszfatidiletanolamin és a foszfatidilszerin különösen gazdag arachidonsavban. A telítetlen zsírsavak kettős kötése körüli *cisz*-konfiguráció következtében a szénhidrogénlánc megtörik, ennek a membrán fluiditás szempontjából van jelentősége (lásd később). Úgy tűnik, hogy bizonyos összefüggés van a táplálékkal elfogyasztott és a membránban található zsírsavak összetétele között. Ha a táplálék elsősorban telített zsírsavakat tartalmaz, a membránfoszfolipidekben is megnő a telített zsírsavak aránya, míg a telítetlen zsírsavakban gazdag étrend növeli a membránokban a telítetlen zsírsav arányát. Ismeretes, hogy a telítetlen zsírsavak fogyasztása kedvezően befolyásolja a plazmakoleszterin-szintet és valószínűleg nem kedvez a trombociták aggregációjának, azaz csökkenti a coronariabetegségek valószínűségét. Nem tisztázott, hogy ez a hatás összefügg-e a sejtmembránok megváltozott zsírsavösszetételével.

A foszfolipidek amfipatikus tulajdonságúak, a molekulában poláros és apoláros csoportok egyaránt megtalálhatók. A poláros molekularészt a foszforsav és a hozzákapcsolódó csoport jelenti, ezt a molekula „fej"-részének is hívják, míg a zsírsavak hidrofób tulajdonságúak. Ábrázolásuk gyak-



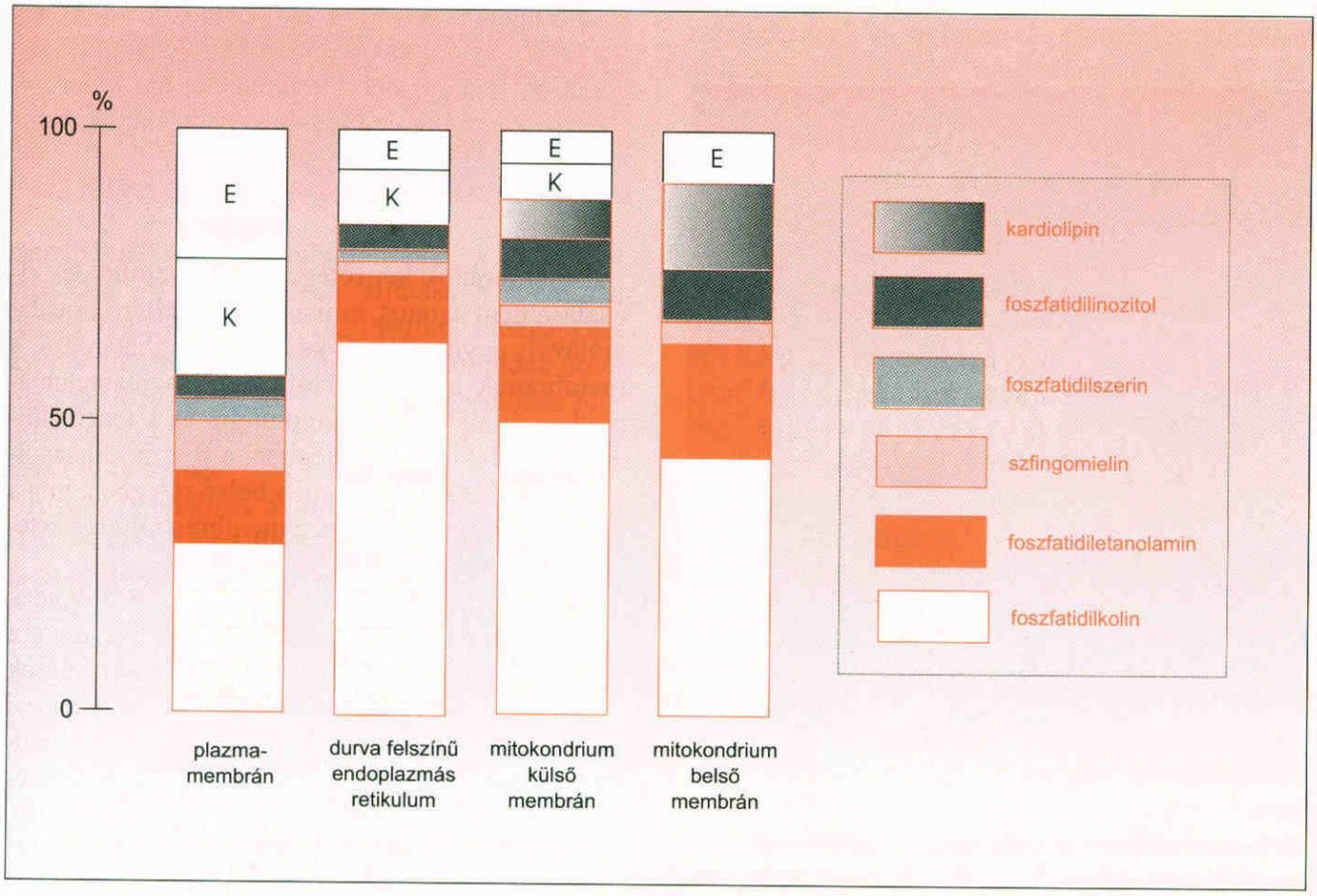
4-2. ábra. A foszfogliceridek általános képlete és szokványos jelölése a membránokban

ran egyszerűsített formában a 4-2. ábrán látható módon történik. Ugyanez az amfipatikus tulajdonság jellemzi a szfingomielint is, amelyben a poláros rész a foszforsav és a hozzákapcsolódó kolin.

A membránokban a foszfolipidek olyan kettős réteget alkotnak, amelyben a poláros csoportok a vizes közeg, vagyis az extracelluláris és az intracelluláris tér felé, míg a hidrofób oldalláncok egymás felé fordulnak (4-1. ábra). A töltéssel rendelkező részek a vízzel poláros, az oldalláncok pedig egymással hidrofób kölcsönhatásba lépnek. A szerkezet így nagyon stabil, s az utóbbi kölcsönhatás azt is biztosítja, hogy a víz gyakorlatilag kiszorul a kettős réteg belsejéből. A sejtmembránokban koleszterin is jelen van, amelynek orientációja ugyanezen törvényszerűség alapján történik: a poláros 3-OH-csoport a felszín felé fordul és kölcsönhatásba léphet a foszfolipidek poláros csoport- jával, míg az apoláros gyűrű és a szénhidrogénlánc a membrán belsejében a foszfolipidek zsírsav oldalláncával lép kölcsönhatásba.

Az egyes foszfolipidek és a koleszterin aránya eltérő a különböző típusú membránokban, de az egyes egyének között nagyfokú hasonlóság van az adott membrántípus lipidösszetételében. A legnagyobb egyéni variáció a plazmamembrán lipidösszetételében lehet, mivel ezt a táplálék zsírsavösszetétele is befolyásolja. Koleszterin és szfingomielin legnagyobb arányban a plazmamembránban található, míg kardiolipin jórészt csak a mitokondrium belső membránban fordul elő. A glicerofoszfolipidek közül minden membránban a foszfatidilkolin van túlsúlyban *(4-3. ábra)*.

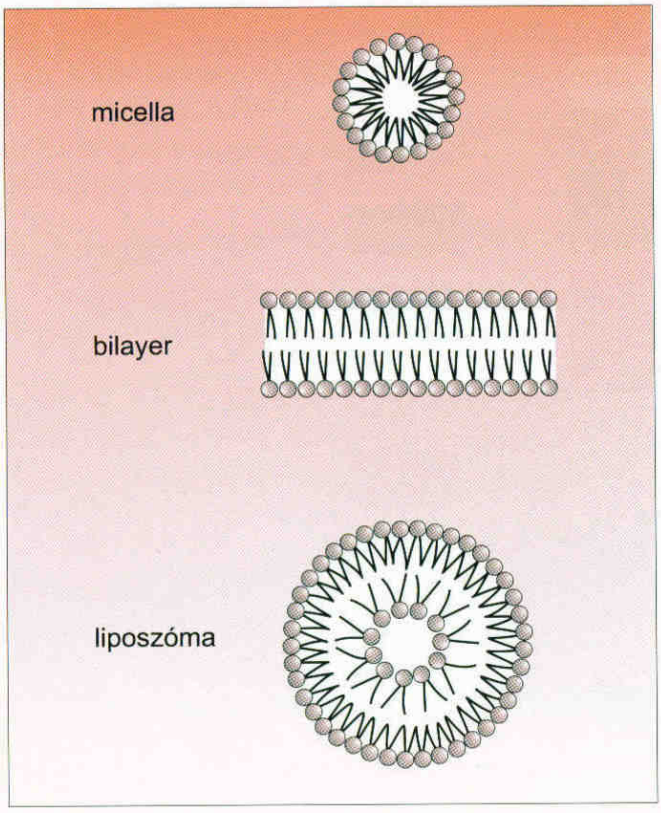
A lipid kettős réteg létrejötte a foszfolipidek amfipatikus tulajdonságából következik és ez érvényesül akkor is, ha foszfolipidek vizes közegbe kerülnek. A foszfolipidek oly módon orientálódnak, hogy apoláros lipid oldalláncaikat a vizes közeg elől elrejtsék, poláros **csoportjaikkal** pedig a víz felé forduljanak. Megfelelő koncentráció és hőmérséklet esetén spontán módon ún. **micellák** jöhetnek létre, amelyekben az egyetlen lipidréteg a



4-3. ábra. Néhány sejtmembránban a lipidek aránya. *A piros a foszfolipideket, s ezen belül az egyes jelölések a megfelelő foszfolipideket jelzik. K; koleszterin. E; egyéb lipidek (koleszterin-észterek, gangliozidok stb.)*

poláros csoportjai a felszín felé, az apoláros oldalláncok a micella belseje felé orientálódnak *(4-4. ábra)*. A foszfolipid **kettős réteg** kialakulása szintén spontán folyamat. A stabil struktúrát az oldalláncok közötti apoláros, valamint a poláros csoportok és a víz között létrejövő poláros kölcsönhatások hozzák létre.

In vitro körülmények között, vizes közegben olyan foszfolipidstruktúrák is létrehozhatók, amelyekben a foszfolipid kettős réteg záródik és vezikulák, ún. **liposzómák** jönnek létre (4-4. ábra). A liposzómák létrejöttéhez a vizes közegbe tett foszfolipideket ultrahanggal kell kezelni, s kialakulnak a kb. 250 nm átmérőjű gömböcskék. A különböző foszfolipid-összetételű liposzómákkal jól vizsgálhatók a lipid kettős réteg tulajdonságai és mivel a lipidrétegbe alkalmas körülmények között fehérjéket is be lehet építeni, transzportfolyamatok, membránenzim- és receptorfunkciók is modellezhetők.

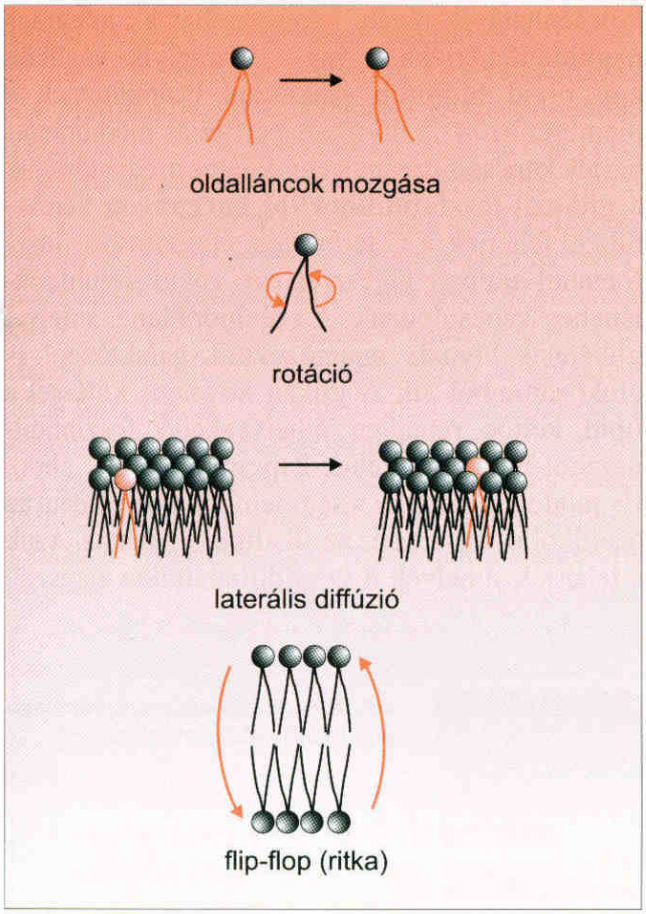


4-4. ábra. Vizes közegben létrejövő foszfolipidképződmények

Potenciálisan nagyon jelentős lehet a liposzómák felhasználása az orvosi gyakorlatban. Mivel a liposzómák keletkezésekor a vizes közeg, amelyben a foszfolipideket elegyítették a liposzómák belső terébe zárva, „csapdában" marad, létrehozhatók olyan liposzómák, amelyek tetszőleges enzimeket vagy gyógyszereket tartalmaznak. Jövőbeni jelentőségüket az adja, hogy a liposzómákkal célzottan lehet gyógyszereket a megfelelő szervekhez eljuttatni (pl. specifikus antigének vagy felismerő anyagok liposzómamembránba ültetésével), amelyek a sejtmembránnal fuzionálva a gyógyszert közvetlenül a kívánt sejtekbe juttatják. Így a nem kívánatos, sokszor nagyon súlyos toxikus mellékhatások csökkenthetők, amelyek pl. a daganatellenes terápiában komoly problémát jelentenek. Antibiotikumok, vírus- és gombaellenes szerek liposzómában történő alkalmazása stabilabb koncentrációt biztosíthat a plazmában, s javulhat azoknak a gyógyszereknek a hatékonysága is, amelyek egyébként túl gyorsan metabolizálódnak. A liposzómák tehát új lehetőséget jelenthetnek a terápiában, bár felhasználásuk e téren még csak a kezdeti stádiumban van.

A membránok két rétegében a foszfolipidek eloszlása nem azonos, ami a fehérjék eltérő orientációjával együtt (lásd később) meghatározza a membránok **aszimmetriáját.** A plazmamembránokban általában a szfingomielin és a foszfatidilkolin inkább a külső rétegben, a foszfatidiletanolamin és a foszfatidilszerin a belső rétegben, míg a koleszterin egyenletesen, a membrán mindkét rétegében megtalálható.

A lipid kettős rétegben az egyes foszfolipidek nagyfokú mozgékonysággal rendelkeznek, mivel a foszfolipidek között nem kovalens kölcsönhatások működnek. A foszfolipidek zsírsav oldalláncai egymáshoz képest elmozdulhatnak, a foszfolipidmolekulák a saját tengelyük mentén rotálhatnak és a membrán síkjában elmozdulhatnak *(4-5. ábra)*. Ezek a mozgások, amelyek a másodperc töredékei alatt végbemennek, a membránnak nagyfokú dinamizmust adnak, megteremtik a membránfehérjék mozgásához is a lehetőséget és ez együttesen a



4-5. ábra. A foszfolipidek mozgásai a membránokban

membránok alapvető tulajdonságát, a **fluiditást** biztosítja. A foszfolipidek átjutása a membrán egyik rétegéből a másikba („flip-flop" mozgás) nagyon korlátozott, mert ehhez a foszfolipidek poláros csoportjának át kell hatolni a membrán hidrofób belső közegén, ami termodinamikailag nem kedvező folyamat.

A membránokban a lipidek mozgékonysága a hőmérséklettől és a lipidek összetételétől függ. A **fázis-átalakulási hőmérséklet** alatt a membrán merev, ún. gélkristályos állapotban van, amelyben a lipidek mozgása rendkívül korlátozott. A hőmérséklet emelésével az ún. folyadékkristály állapot alakul ki, amelyben a fluiditás növekszik. A lipidek, illetve a lipidek és fehérjék közötti kölcsönhatás különbözősége miatt a membránok egyes területei között eltérő lehet a fluiditás mértéke. A szervezetben a normális testhőmérsékleten a membránok általában folyadékkristály (fluid) állapotban vannak. Minél inkább fluid egy membrán, annál nagyobb a permeabilitása.

A membrán fluiditást befolyásolja a lipidek összetétele is. A foszfolipidekben a telítetlen zsírsavak jelenléte a fluiditást fokozza, mert a kettős kötések törést okoznak az oldalláncban, s ez megakadályozza az oldalláncok közötti túl szoros kapcsolat létrejöttét. Ezzel szemben nagy mennyiségű telített zsírsav a membránokban a fluiditást, következésképpen a permeabilitást is csökkenti. A membránfluiditás mértékét jelentősen befolyásolja a koleszterin. A merev szteránváz, amely a zsírsav oldalláncok közé ékelődik, kettős hatású. Egy kevéssé fluid membránban a koleszterin a fluiditást növeli azáltal, hogy a zsírsav oldalláncok közötti kölcsönhatásokat csökkenti, míg egy nagymértékben fluid membránban a koleszterin jelenléte a fluiditást csökkenti, mert korlátozza a zsírsav oldalláncok szabad mozgását.

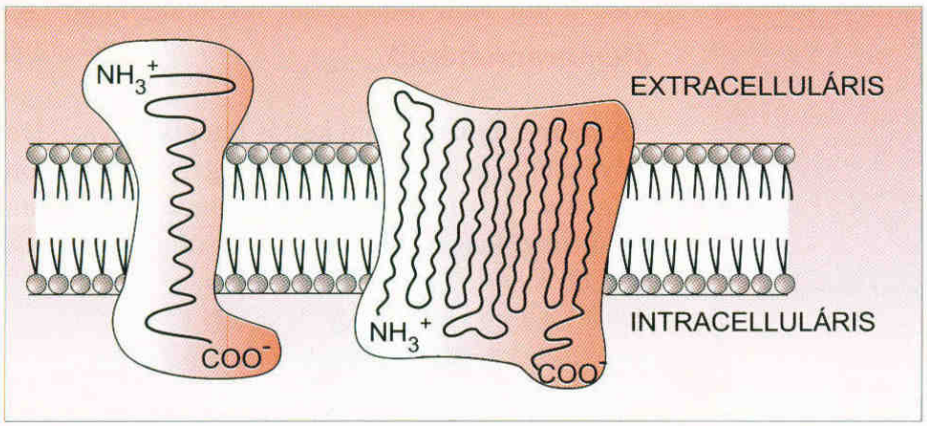
Membránfehérjék

A membránban a lipid kettős rétegbe ágyazódva helyezkednek el a fehérjék. Singer és Nicolson dolgozta ki azt a membránmodellt, az ún. **fluid-mozaic modellt**, amelyet később a legkülönbözőbb kísérleti módszerekkel igazoltak, s amely szerint a lipid kettős réteg nem folyamatos, hanem a lipidszerkezetbe különböző mélységig ágyazódva fehérjék épülnek be (4-1. ábra).

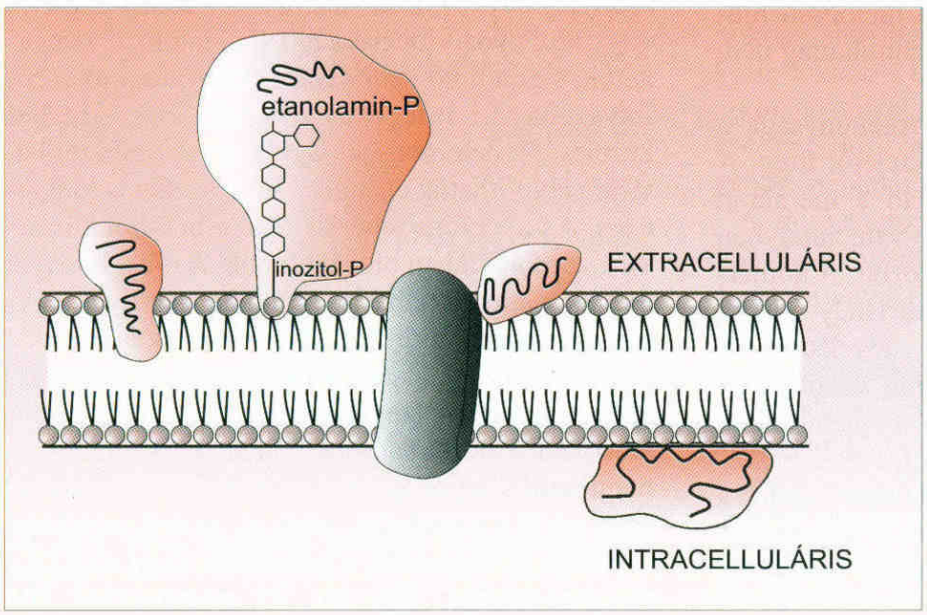
A membránfehérjék csoportosítása aszerint történik, hogy milyen erőteljes behatással vonhatók ki a membránból. A **perifériás** mebránfehérjék viszonylag enyhe kezeléssel, pl. a pH változtatásával vagy különböző ionerősségű sóoldatokkal kinyerhetők, s ez a lipid kettős réteg integritását nem befolyásolja. Az **integráns** fehérjék, csak erőteljes kezelés, pl. detergensek vagy szerves oldószer hatására távolíthatók el, amely a membránt is tönkreteszi. Az integráns fehérjék a membránból kinyerve vízben általában oldhatatlanok. Azok a fehérjék tudnak a membránba integrálódni, amelyek egy-egy szakaszon hidrofób aminosav oldalláncokat tartalmaznak (pl. alanin, valin, leucin, izoleucin), s így a lipid kettős rétegben a hidrofób zsírsav oldalláncokkal kölcsönhatásba léphetnek. Az integráns membránfehérjék egy része csak egyetlen szakaszon éri át a membránt, mint pl. az eritrocitákban található glikoprotein, a glikoforin vagy az LDL-receptor-fehérje. Egy kb. 25 aminosavból álló

α-helix-szakasz elegendő ahhoz, hogy a membránt átérje. Számos membránfehérjében több olyan szakasz van, amit jórészt apoláros aminosavak alkotnak, s éppen ezért ezek több transzmembrán-régióval rendelkeznek, amelyeket a lipid rétegből „kilógó" hajtűszakaszok kötnek össze *(4-6. ábra)*. Ilyen, több transzmembránszakasszal rendelkező fehérje pl. az eritrociták bikarbonát–klorid anion-cseretranszportere, a β-adrenerg receptor vagy a Ca^{2+}-ATPáz. A 4-6. ábra az egy transzmembránszakasszal rendelkező glikoforin- és a 12 transzmembránszakasszal rendelkező glukóz-transzporter sémáját mutatja.

A perifériás membránfehérjék a lipid kettős réteghez lazán kapcsolódó, vízben oldékony fehérjék. Rögzülhetnek a lipidekhez elektrosztatikus kölcsönhatások révén, kapcsolódhatnak integráns membránfehérjékhez vagy valamelyik végükön egy rövid hidrofób szakaszon beépülhetnek a membránba *(4-7. ábra)*. A perifériás membránfehérjék kapcsolódásának egy sajátos módja történik a **glikozil-foszfatidilinozitol horgonyon** keresztül. A fehérjék a C-terminális aminosavval foszfoetanol-aminon keresztül egy rövid szénhidrátlánchoz kapcsolódnak. A szénhidrátlánc, amelyet glikánnak hívnak, mannózokból, galaktózból és glukózaminból áll. A glikán kovalens kötéssel a lipid kettős rétegben elhelyezkedő foszfatidil-inozitol inozitolrészéhez kapcsolódik (4-7. ábra). Ily módon rögzítődik a sejtmembránhoz például az acetilkolin-észteráz és az alkalikus foszfatáz. Azok a fehérjék, amelyek foszfatidilinozitolon keresztül



4-6. ábra. Integráns membránfehérjék a lipid kettősrétegben

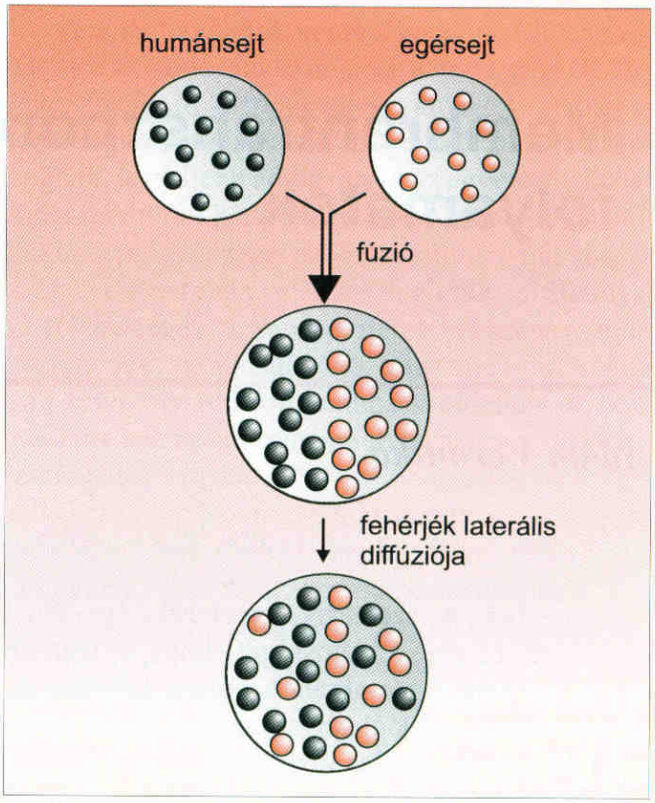


4-7. ábra. Perifériás membránfehérjék

kapcsolódnak a membránhoz foszfolipáz C hatására (amely a foszfát és a glicerin 3-OH közötti kötést hidrolizálja; lásd 5. fejezet) felszabadíthatók. Tekintettel arra, hogy ezt az enzimet bizonyos receptorok aktiválják, a fehérjemobilizálásnak szerepe lehet a hormonok és neurotranszmitterek hatásának közvetítésében. Egyes perifériás fehérjékhez az N-terminális glicinen keresztül mirisztát (14 C-atomos telített zsírsav) kapcsolódik és ez rögzíti a fehérjét a plazmamembrán citoplazmatikus felszínéhez. Így rögzül pl. a $p21^{ras}$ fehérje a plazmamembrán belső felszínéhez.

A membránfehérjék egy része glikoprotein, amelyekben kovalens kötéssel szénhidrátok kapcsolódnak a fehérjékhez. A membránok szénhidrát alkotórésze így glikoproteinek (kisebb részben glikolipidek) részeként fordul elő. A szénhidrátláncban glukóz, galaktóz, N-acetil-glukózamin, N-acetil-galaktózamin, mannóz, fukóz és sziálsav található. A szénhidrátok a plazmamembránban mindig az extracelluláris oldal, az endoplazmás retikulumban pedig a luminális oldal felé orientálódnak. A legtöbb plazmamembrán-receptor és transzport fehérje glikoprotein.

A membránfehérjék hozzájárulnak a membránok fluiditásához és a membránaszimmetria kialakulásához egyaránt. A fehérjék a fluid lipid kettős rétegben laterálisan elmozdulhatnak, bár ez a mozgás lassúbb, mint a foszfolipidek laterális mozgása. Integráns fehérjék diffúzióját a membránban látványosan demonstrálták egérből és emberből származó sejtek fúziójával. A sejtek antigén tulajdonságú membránfehérjéit előzőleg olyan markerekkel jelölték, amelyek fluoreszcens mikroszkóp alatt eltérő színt mutattak. A sejtek fúziója után a mikroszkóp alatt a két szín az új sejt két felén jól elkülönült, azonban mintegy 40 perccel a fúzió után a kétféle szín, azaz a két sejtből származó két különböző fehérje egyenletes eloszlást mutatott az új sejt membránjában *(4-8. ábra)*. Bizonyos fehérjék esetében az elmozdulási lehetőség korlátozott és az eloszlás a membránban nem random, hanem szigorú funkcionális szervezettség szerint történik. Erre a legjellemzőbb példa a mitokondrium belső membránban helyezkedő elektrontranszport-lánc, amelyben az egyes funkcionális egységek meghatározott szervezettségben kapcsolódnak egymáshoz. Más fehérjék intracelluláris struktúrákhoz rögzülnek, ami szintén gátolja a szabad elmozdulást.



4-8. ábra. A plazmamembrán-fehérjék laterális diffúziójának kimutatása humán- és egérsejtek fúziójával. *A fehérjéket fajspecifikus antigénekkel, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt eltérő színt mutató markerrel jelölték. A fúzió után a két szín random elhelyezkedést mutatott a sejt felszínén.*

A membránfehérjék változatos orientációja a membránok aszimmetriáját eredményezi. Mint láttuk, a membrán két rétegében eltérő a foszfolipidek összetétele, ami önmaga aszimmetriát okoz. Ehhez járul az integráns és perifériás fehérjék eltérő extracelluláris és intracelluláris felszínéből és a glikoproteinek szigorú orientációjából eredő további aszimmetria.

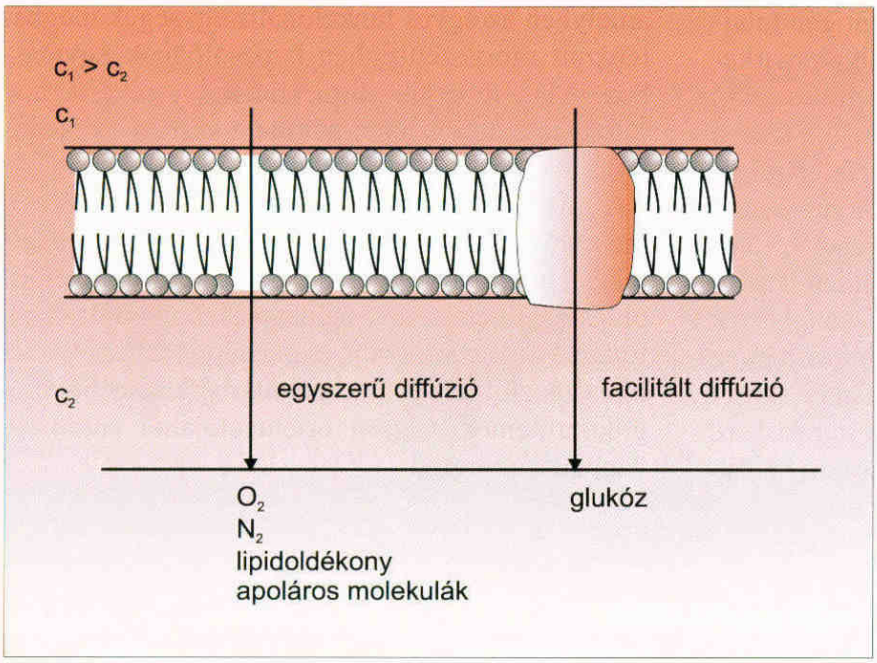
Membrántranszport-folyamatok

4.2.

Ádám Veronika

A membránok **szelektív barrierek.** Így lehet összefoglalni azt a kettősséget, hogy a legtöbb anyag átjutása a membránon erősen korlátozott, ugyanakkor a sejtek életében szerepet játszó anyagok felvétele és leadása biztosított.

A sejtmembrán lipid kettős rétegének korlátozott permeabilitása adja a membránok barrier tulajdonságát, így a töltéssel rendelkező és poláros anyagok gyakorlatilag nem vagy csak nagyon limitált mértékben képesek áthaladni. Ez a nagyfokú impermeabilitás abból adódik, hogy jelentős energiát igényel a poláros csoportok átjutása a lipid kettős réteg belső, erősen hidrofób közegén. Egyszerű diffúzióval gázok (molekuláris O_2, N_2, metán stb.) jutnak át a membránon. Permeabilis membrán a zsírban oldódó, töltéssel nem bíró anyagok számára, mint amilyenek pl. a zsírsavak vagy a koleszterin. Exogén, lipidoldékony anyagok is átjutnak a membránokon, s ennek terápiás (pl. altatók, gáz narkotikumok) és toxikus (pl. szerves foszfát növényvédő szerekkel történő kontamináció) jelentősége egyaránt nagy. Vízben oldódó és töltéssel rendelkező anyagok átjutása a membránokon erősen korlátozott. Ez alól kivételt maga a víz képez, ami szabadon permeál, ha a membrán két oldalán ozmotikus különbség áll fenn. A víz és más kis po-



4-9. ábra. A koncentrációgrádiens irányában történő anyagmozgás a membránokban, néhány példával

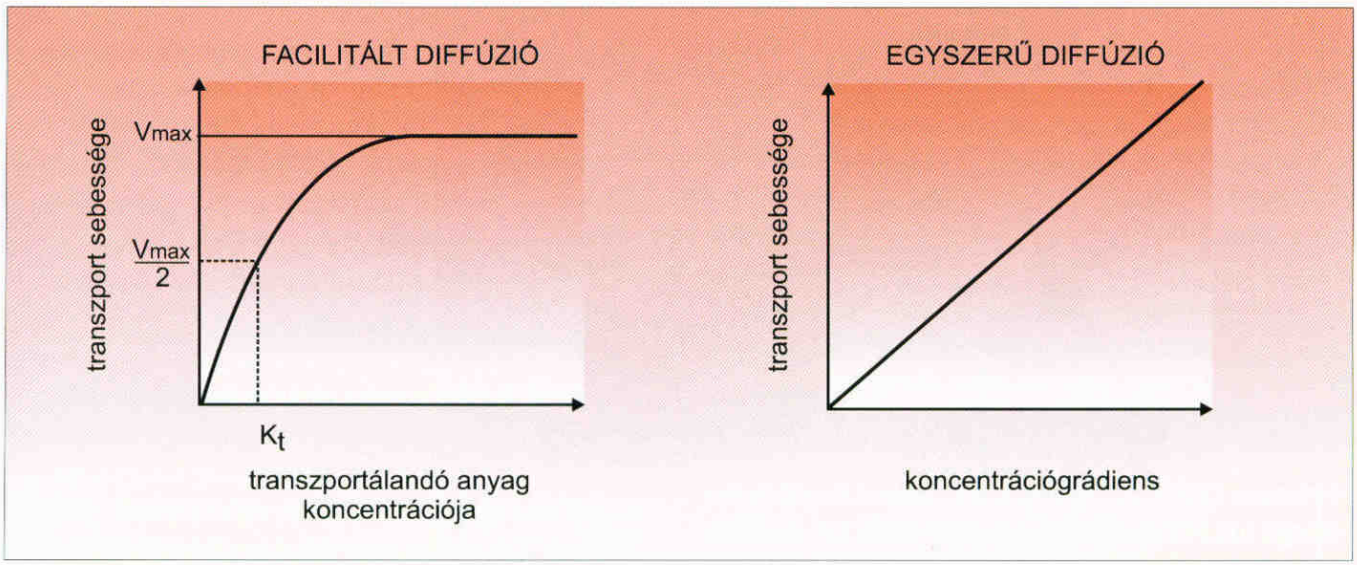
láros molekulák valószínűleg azokon a réseken jutnak át, amelyek a membránban a foszfolipidek zsírsav oldalláncának mozgása közben időről időre keletkeznek.

Facilitált diffúzió

Az **egyszerű diffúzió**, amikor tehát egy anyag a koncentráció-grádiens irányában szabadon permeál a membránon keresztül, a szervezetben nagyon korlátozott mértékben áll csak rendelkezésre. A legtöbb anyag – tápanyag, metabolit, ionok – átjutását a membránban fehérjék biztosítják, melyeket transzportereknek, magát a folyamatot pedig transzportnak nevezzük. A transzportot, amely fehérje közreműködésével a koncentrációgrádiens irányában történik, passzív transzportnak, más néven facilitált diffúziónak nevezzük.

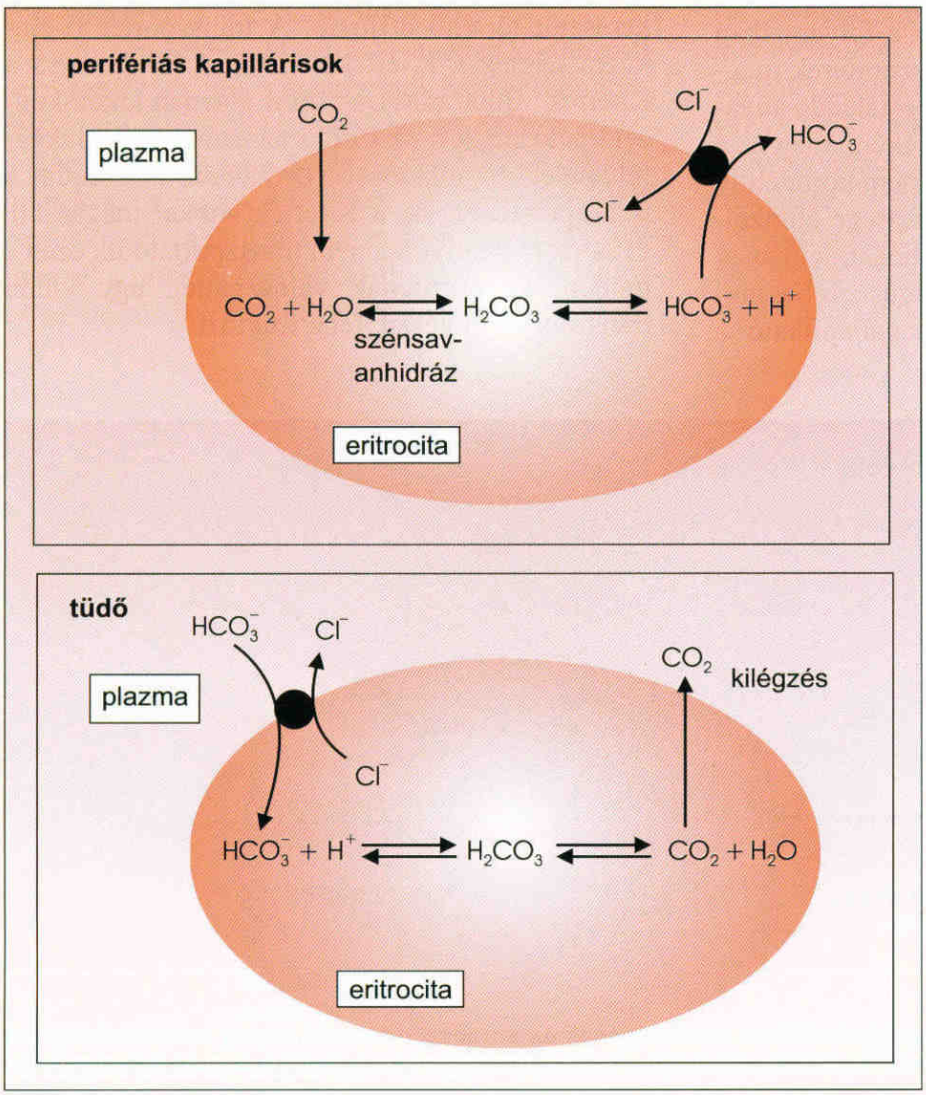
A **facilitált diffúzió** *(4-9. ábra)* sok szempontból hasonlít az enzimreakciókhoz, bár a folyamatban nem keletkezik új termék. A transzporterek megkötik a szubsztrátot, azaz a transzportálandó anyagot. A felismerés specifikus sztereokémiailag is, a transzport gátolható kompetitív és nem kompetitív módon egyaránt. A transzport sebessége ábrázolható a transzportálandó anyag koncentrációjának függvényében, s az összefüggés telítési görbét mutat *(4-10. ábra)*. Az ábrából megállapítható a transzport maximális sebessége és (a Michaelis–Menten-állandó analógiájára) a transzport K_t-értéke. Facilitált diffúzióval az anyagok mindig a koncentrációgrádiensnek megfelelő irányban mozognak, legfeljebb addig, amíg az egyensúly kialakul a membrán két oldalán. Anyagok sejten belüli akkumulációja, azaz az extracellulárisnál magasabb koncentráció elérése facilitált diffúzióval nem lehetséges. A transzporterek integráns membránfehérjék, általában több transzmembránrégióval, amelyben hidrofil aminosav-oldalláncok hozzák létre azt a csatornát, amelyen az anyagok áthaladhatnak.

A facilitált diffúzióra példa az eritrociták membránjában lévő **glukóz-transzporter** (GLUT-1), amelynek feladata az eritrociták folyamatos glukózellátásának biztosítása. A glukóztranszporter 12 transzmembránszegmenttel rendelkező fehérje, amelyen keresztül a glukóztranszport sebessége 50 000-szer nagyobb, mint a lipid kettős rétegen keresztül történő diffúzió. A transzporter D-glukózra specifikus, K_t-értéke 1,5 mM (L-glukózra a K_t-érték >3000 mM), s 5 mM plazmaglukóz-koncentráció mellett biztosítja az eritrociták glukózfelvételét. D-galaktóz és D-mannóz is kötődik a transzporterhez, de a K_t-érték sokkal magasabb. Fruktóz gyakorlatilag nem transzportálódik ezen a módon, az eritrociták valószínűleg egy külön transzporterrel veszik fel a fruktózt.



4-10. ábra. A facilitált diffúzió és az egyszerű diffúzió sebességének és a transzportálandó anyag koncentrációjának összefüggése. *K_t a transzportálandó anyagnak az a koncentrációja, amelynél a transzport a maximális sebesség felével működik*

Szintén az eritrociták membránjában található egy másik fontos transzporter, amely a széndioxid-transzportban játszik szerepet *(4-11. ábra)*. A **klorid–bikarbonát** cseretranszport HCO_3^- és Cl^- ellentétes irányú transzportját végzi az eritrociták membránján keresztül, a koncentrációviszonyok által meghatározott irányban. A szervekből, a katabolizmus során keletkező CO_2 a kapillárisokba kerül, ahol az eritrocitákba diffundál. Az eritrocitákban a szénsavanhidráz enzim hatására H_2CO_3 keletkezik, amely reakcióban 1 s-on belül – azaz rövidebb idő alatt, mint amit a vér a kapillárisokban tölt – egyensúly alakul ki. A H_2CO_3 spontán reakcióban, gyakorlatilag azonnal disszociál, HCO_3^- és H^+ keletkezik. A HCO_3^- a klorid–bikarbonát cseretranszporton keresztül visszakerül a plazmába, s így szállítódik a tüdőbe. Mivel a HCO_3^- jobban oldódik a plazmában, mint a CO_2, az eritrocitáknak ez a funkciója lényegesen megnöveli a vérplazma szén-dioxid-szállító kapacitását. A tüdőben a HCO_3^- a cseretranszporton ellentétes irányban transzportálódva visszakerül az eritrocitákba, ahol a fenti folyamatok ellentétes irányban zajlanak le, CO_2 keletkezik, ami diffúzióval elhagyja az eritrocitákat és kilégzésre kerül. A plazmában szállítódó CO_2 80%-a kerül így a perifériáról a tüdőbe, s ehhez a folyamathoz esszenciális a HCO_3^-–Cl^- cseretranszport, vagy másnéven anion-cseretranszport működése. A transzporter – amit neveznek még *band* 3 fehérjének is, az SDS poliakrilamid gélen elektroforézissel látható helyzete miatt – integráns membránfehérje, valószínűleg 12 transzmembránrégióval rendelkezik. A transzport során nem történik netto töltésváltozás a membrán két oldalán, vagyis a folyamat nem elektrogén.



4-11. ábra. HCO_3^-–Cl^- cseretranszport az eritrociták membránjában és a CO_2-szállítás

A mitokondriumok belső membránja is számos olyan transzporterrel rendelkezik (lásd 2.1. fejezet), amelyen az anyagok koncentrációgrádiens irányában történő transzportja történik. Ezek is, a HCO_3^-–Cl^- cseretranszporthoz hasonlóan többnyire két anyag egyidejű, ellentétes irányú elmozdulását teszik lehetővé. Az ilyen transzportokat **kotranszportnak** nevezzük, szemben az egyetlen anyag transzportját végző **uniporttal**. A kotranszport, ha az anyagok azonos irányban transzportálódnak, a **szimport**, ha ellentétes irányban, akkor az **antiport** nevet viseli.

A transzportfolyamatok energetikája

A transzportokat jellemzi az a szabadenergia-változás, ami akkor történik, amikor egy anyag a membrán egyik oldaláról, ahol c_1 koncentrációban van, átkerül a másik c_2 koncentrációjú oldalra. Töltéssel nem rendelkező molekulák esetében a szabadenergia-változás csak a két koncentráció arányától függ és a következő képlettel fejezhető ki:

$$\Delta G' = 2{,}3\ RT\ \log\frac{[c_2]}{[c_1]}$$

ahol R az egyetemes gázállandó (8,315 J/mol·K), T az abszolút hőmérséklet (K), $[c_1]$ és $[c_2]$ az illető anyag koncentrációja a membrán két oldalán. Ha az anyag a nagyobb koncentrációjú oldatból az alacsonyabb koncentrációjú közeg felé transzportálódik ($c_1 > c_2$, a transzport iránya $c_1 \rightarrow c_2$), a $\Delta G'$ negatív, s ez azt jelenti, hogy passzív transzport történik, ami energiafelszabadulással jár. Ha a transzport $c_2 \rightarrow c_1$ irányba történik a $\Delta G'$ értéke pozitív, azaz szabadenergia-növekedés történik. Az ilyen transzportot aktív transzportnak hívjuk és feltétele az, hogy valamely más folyamat fedezze a transzport energiaigényét.

Ionok transzportja esetén nem egyszerűen a koncentrációgrádiens határozza meg a $\Delta G'$ értékét, hanem a membrán két oldalán lévő eltérő polaritásból adódó membránpotenciál is, azaz

$$\Delta G' = 2{,}3\ RT\ \log\frac{[c_2]}{[c_1]} + zF\Psi$$

ahol z az ion töltése, F a Faraday-állandó (96 480 J/V·mol), Ψ pedig a membránpotenciál (V). Egy ion transzportjának az energiaigényét tehát az **elektrokémiai potenciál**, azaz a koncentrációkülönbség és az elektromos potenciálkülönbség együttesen határozza meg. Passzív transzport esetén az ion az elektrokémiai grádiensnek megfelelő irányba transzportálódik, míg aktív transzport esetén ezzel ellentétesen. Az aktív transzporthoz ionok esetében is energia befektetése szükséges.

Aktív transzport

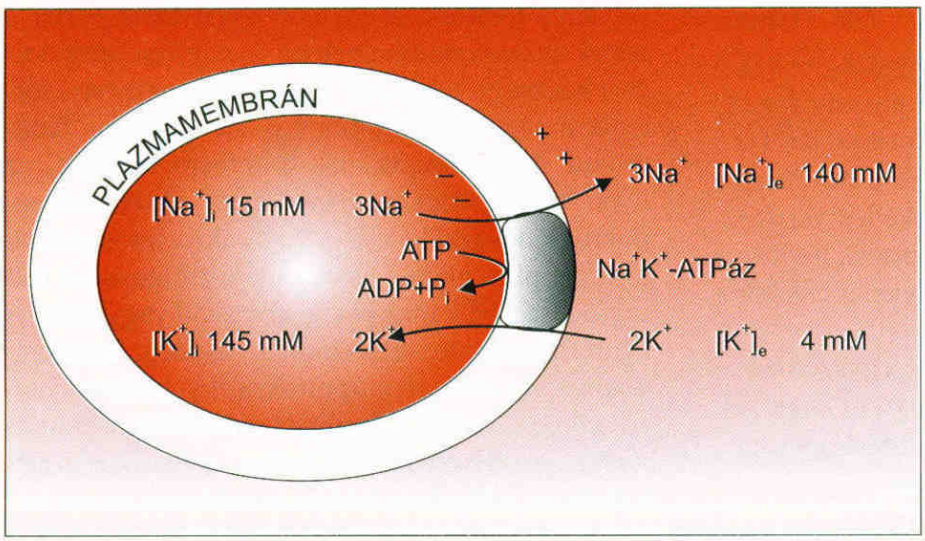
A sejtek fiziológiai működéséhez elengedhetetlen számos olyan transzport működése, amelynek segítségével anyagok a koncentráció- vagy az elektrokémiai grádienssel ellentétes irányban mozognak. A legtöbb ilyen transzport közvetlenül kapcsolt az ATP terminális foszfátjának hidrolíziséhez, ami a transzport energiaigényét fedezi. Ezek az ún. elsődleges **aktív transzportok**. Ilyen a plazmamembránban található, a sejtek Na^+ és K^+ eloszlását meghatározó Na^+K^+-ATPáz vagy a sejtek Ca^{2+} homeosztázisában fontos szerepet játszó Ca^{2+}-ATPáz. Vannak olyan transzporterek, amelyekben az ATP hidrolízise nem közvetlenül része a folyamatnak, hanem az aktív transzport energiaigényét az fedezi, hogy egyidejűleg egy másik anyag az elektrokémiai grádiensnek megfelelő irányban transzportálódik, vagyis egy exergonikus folyamat történik. A legtöbb ilyen transzporter a sejtek plazmamembránjában a nátriumion-grádienst használja fel és Na^+ egyidejű transzportja történik a sejtekbe. Minthogy a Na^+-grádiens fenntartása ATP energiájának a terhére történik, az ilyen transzportokat **másodlagos aktív transzportnak** nevezzük. Másodlagos aktív transzporttal történik pl. a glukóz és bizonyos aminosavak felszívódása a bélhámsejteken keresztül vagy számos neurotranszmitter transzportja az idegi membránokban. Az aktív transzportokra egyébként ugyanaz jellemző, mint a facilitált diffúzióra: a transzporter specifikus a szubsztrátra, specifikusan gátolható és működése telítési kinetikával írható le.

Na^+K^+-ATPáz – Na^+K^+-pumpa

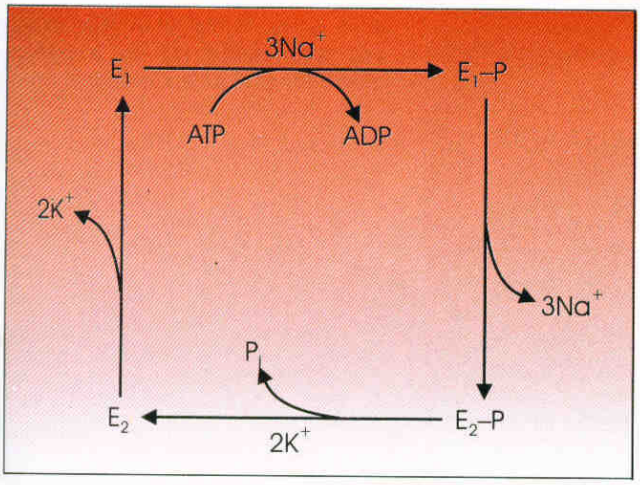
Az élő sejtek jellemzője, hogy belső terükben az egyes ionok koncentrációja lényegesen eltér az extracelluláris közegben található ionkoncentrációktól. Ehelyütt csak a Na^+ és K^+ eloszlásról lesz szó, amelyekről ismert, hogy nagyságrendbeli eltérés van az intracelluláris és extracelluláris koncentrációik között *(4-12. ábra)*. A Na^+ 140 mM koncentrációban van jelen a plazmában, míg intracelluláris koncentrációja a különböző sejtekben 10–15 mM, szemben a K^+-mal, amelynek koncentrációja a plazmában 4 mM, intracellulárisan pedig 140–150 mM. Ez az ioneloszlás meghatározó a sejtek nyugalmi potenciáljának létrejöttében, ami –60 és –90 mV közötti tartományban van. A nyugalmi potenciál megközelíti a K^+-egyensúlyi potenciált, vagyis a K^+-eloszlás a plazmamembrán két oldalán közel egyensúlyi helyzetet jelent. Na^+-ra nézve azonban a koncentrációkülönbség és a belső negatív potenciál együttesen olyan jelentős elektrokémiai grádienst jelent, ami – a korlátozott plazmamembrán-permeábilitás ellenére – a Na^+-t a sejtbe hajtja, s ezzel párhuzamosan K^+ lép ki a sejtből. Ha ez a folyamat nem kompenzálódna, a sejtek képtelenek lennének az ioneloszlást és így a nyugalmi potenciált fenntartani, s ez a sejt halálát jelentené. A Na^+K^+-ATPáz – mely minden sejt plazmamembránjában jelen lévő enzim – feladata, hogy a Na^+-ot visszapumpálja az extracelluláris térbe, a K^+-ot pedig a sejtbe. (Ezért nevezik ezt a transzportrendszert Na^+K^+-pumpának, vagy egyszerűen csak Na^+-pumpának.) Az elektrokémiai grádiens ellenében történő iontranszporthoz az energiát az ATP hidrolízise biztosítja, amely szintén a Na^+K^+-ATPáz hatására megy végbe (4-12. ábra).

Az enzim fontosságát jelzi, hogy a sejtek a teljes ATP-termelésnek mintegy 30%-át e funkció fenntartására fordítják (ideg- és izomsejtekben 65–70%-ot). Az enzim működése úgy is felfogható, mint ami az ATP-hidrolízis energiáját egy iongrádienssé alakítja, amely számos sejtfunkcióhoz közvetlenül hasznosítható (lásd másodlagos aktív transzportok).

A Na^+K^+-ATPáz integráns fehérje a plazmamembránban, amelyet intracellulárisan a Na^+, extracellulárisan a K^+ aktivál; az enzim működéséhez mindkét ion együttes hatása szükséges. Működése közben ATP-t hidrolizál és az enzim egy meghatározott aszparaginsav oldalláncon foszforilálódik. Az enzim két különböző konformációban létezik, ezeket E_1 és E_2-vel jelöljük. Az E_1 konformációjú enzim az intracelluláris oldalon köti a Na^+-ot, az ATP-t hidrolizálja és foszforilálódik *(4-13. ábra)*. Az E_1-P foszfoenzim konformációváltozással átalakul, miközben a Na^+-t a sejtből kipumpálja. Az E_2-P foszfoenzim köti a K^+-ot az extracelluláris oldalon és az enzim defoszforilálódik. Miközben az eredeti konformáció visszaalakul, az enzim a K^+-ot a sejtbe transzportálja. A legtöbb sejtben az enzim egy ATP-molekula hidrolízisével párhuzamosan 3 Na^+ és 2 K^+ transzportját végzi. Ez extra pozitív töltések megjelenését okozza az extracelluláris közegben, amely néhány mV-tal közvetlenül hozzájárul a nyugalmi potenci-



4-12. ábra. A Na^+K^+-ATPáz működésének sémája. *Extracelluláris és intracelluláris Na^+- és K^+-koncentrációk*



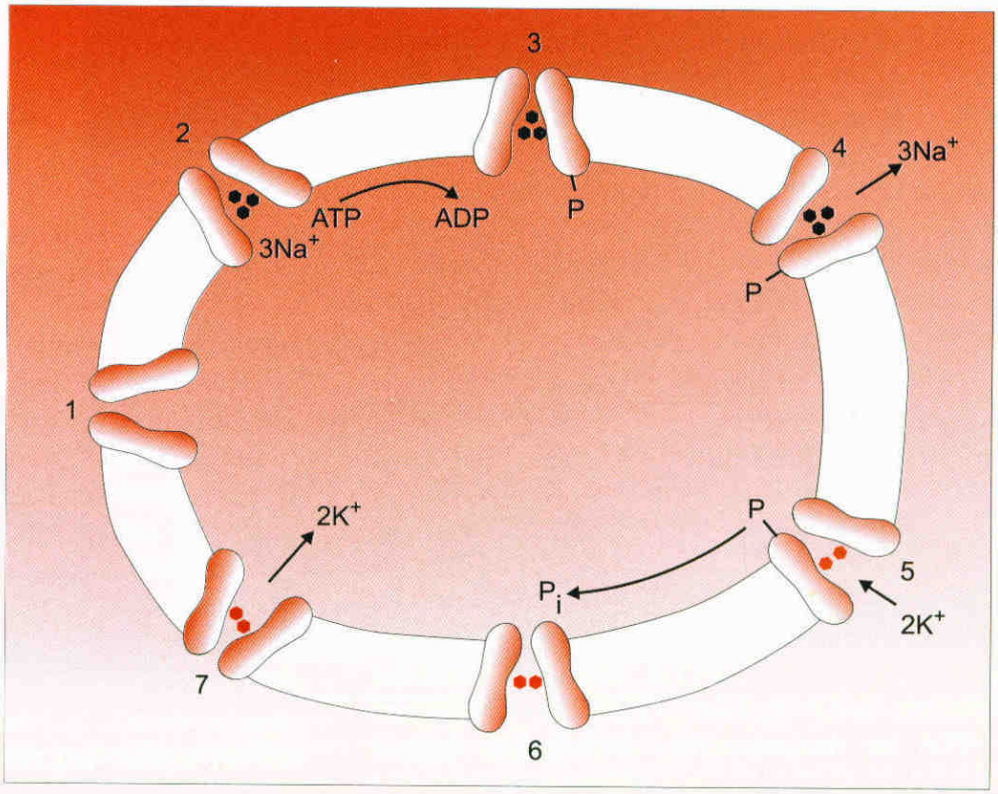
4-13. ábra. A Na^+K^+-ATPáz működésének egyes lépései

álhoz, ezért a pumpa elektrogén. A Na^+K^+-ATPáz működésének ma legvalószínűbbnek tartott modelljét a *4-14. ábra* mutatja.

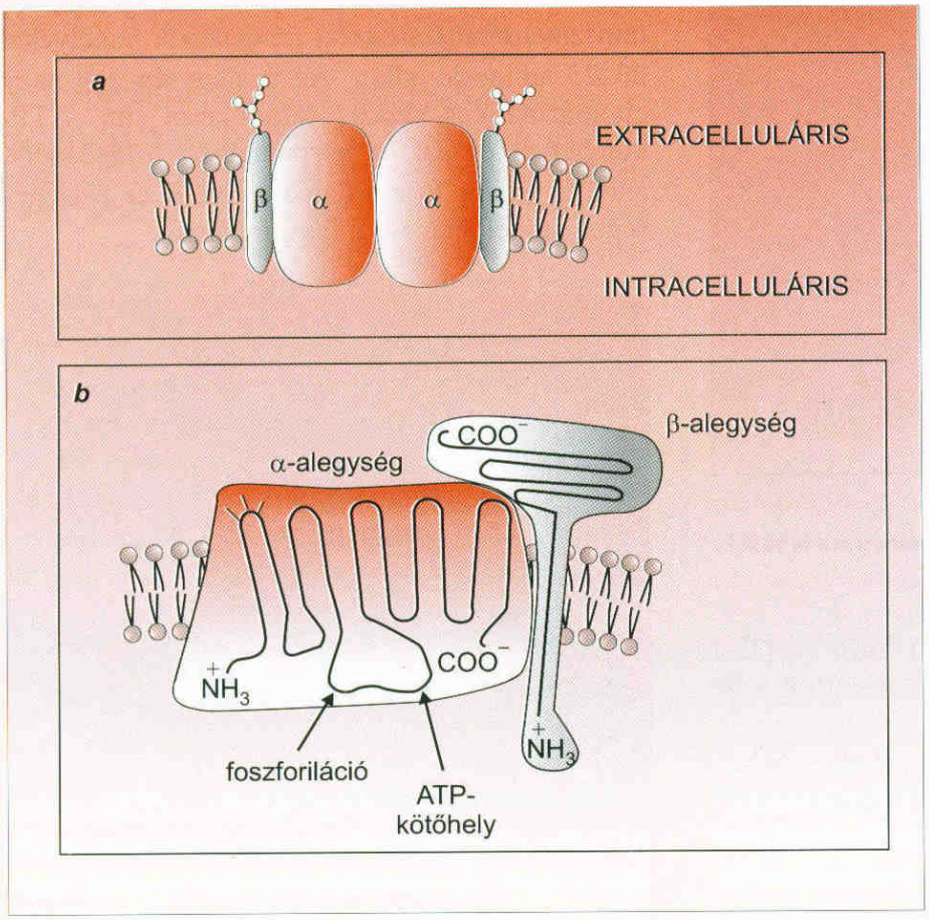
Az enzimfehérjét két alegység alkotja; az α-alegység (112 kDa) rendelkezik a katalitikus sajátsággal, míg a β-alegység (35 kDa) feltehetően a megfelelő membránorientációhoz szükséges. A transzportfunkció működéséhez mindkét alegységre szükség van. Az α-alegység 10, a β egy transzmembránszakasszal rendelkezik, amelyeket 20–25 aminosav alkot. Az α-alegység egy nagy citoplazmatikus része tartalmazza az ATP-kötőhelyet és azt az aszparaginsav oldalláncot, ahol az enzim foszforilálódik. Az α és β-alegységek modelljét a *4-15. ábra* mutatja.

Az enzim specifikus gátlói az extracelluláris oldalon kötődni képes ún. szívglikozidok, amelyek szteránvázas vegyületek és a terápiában kiterjedten használatosak a szívműködés fokozására. Az egyik legaktívabb vegyület az ouabain vagy sztrofantin G *(4-16. ábra)*. Hatása azzal magyarázható, hogy a Na^+K^+-ATPáz gátlás következményeképpen emelkedik az intracelluláris Na^+-koncentráció, ennek hatására a két irányban működni képes Na^+–Ca^{2+} cseretranszporton keresztül (lásd alább) Ca^{2+} lép be a sejtekbe, s közvetlenül ez felelős a szívizom-kontrakció fokozásáért *(4-17. ábra)*.

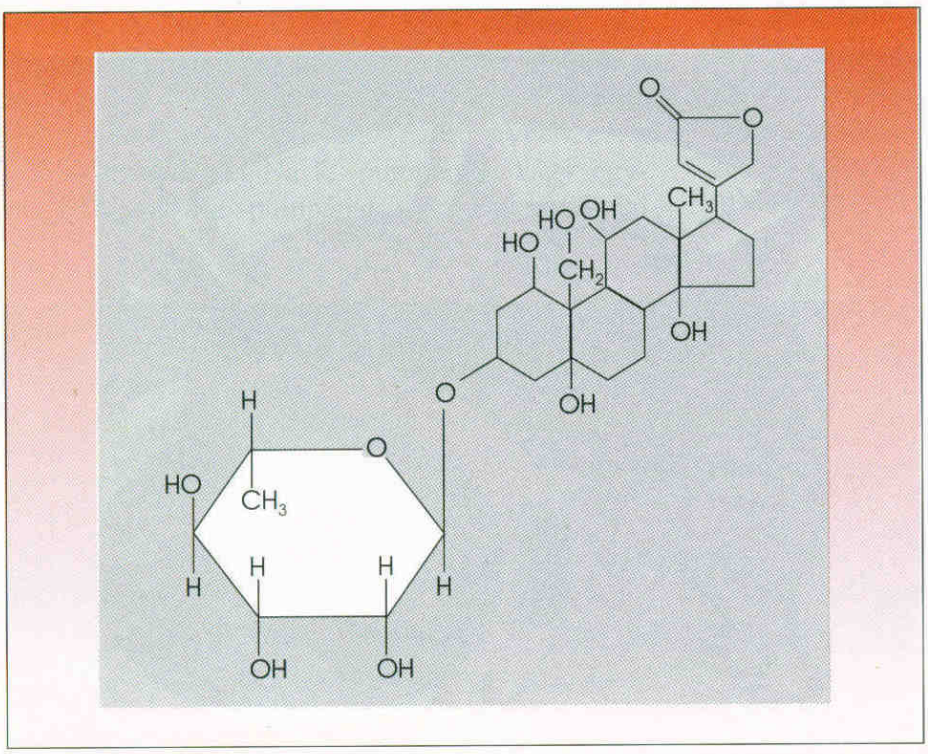
Az α-alegység több izoformában létezik (α_1, α_2, α_3), amelyek eltérő érzékenységűek a szívglikozi-



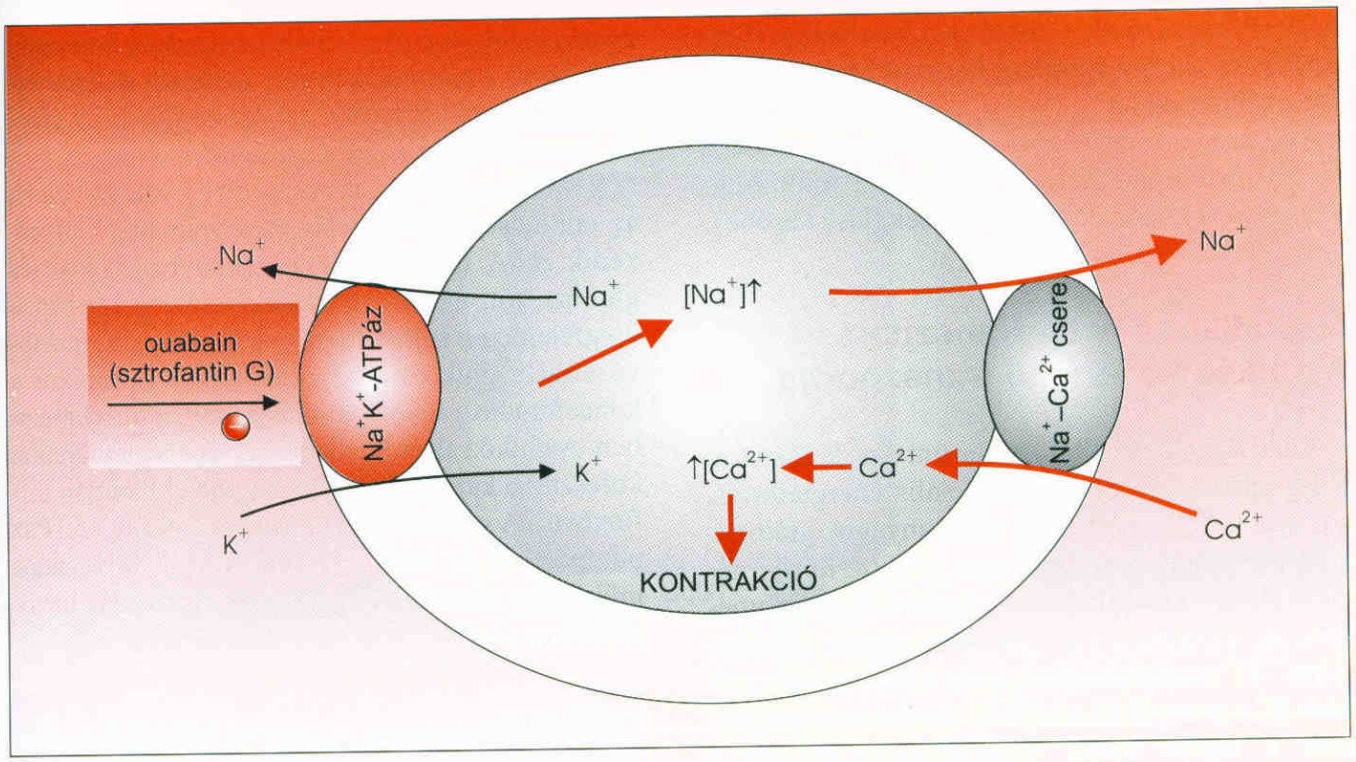
4-14. ábra. A Na^+K^+-ATPáz működésének modellje.
1. Alapállapot,
2. Na^+ megkötése az intracelluláris oldalon,
3. ATP hidrolízise, foszfoenzim kialakulása,
4. Na^+-kipumpálás, konformációváltozás,
5. K^+ megkötése az extracelluláris oldalon,
6. defoszforiláció,
7. K^+-bepumpálás, az eredeti konformáció kialakulása



4-15. ábra. A Na^+K^+-ATPáz alegység szerkezete (a) és a transzmembránszakaszok modellje (b)



4-16. ábra. Az ouabain (sztrofantin G) képlete



4-17. ábra. A sztrofantin G hatására létrejövő szívizom-kontrakció legvalószínűbb mechanizmusa. *Az ábra értelmezéséhez lásd még a szöveget*

dokkal szemben és különböző arányban fordulnak elő az egyes szövetekben. Ez valószínűleg fontos szerepet játszik a szívglikozidok mellékhatásainak kialakulásában.

A transzport ATPázok csoportosítása

A Na^+K^+-ATPáz-hoz hasonlóan néhány más ATPáz is úgy működik, hogy az iontranszporttal párhuzamosan az enzim foszforilálódik és defoszforilálódik. Ezeket **P típusú ATPázoknak** nevezzük. Közös jellemzőjük, hogy integráns membránfehérjék, foszforilációjuk egy meghatározott aszparaginsav oldalláncon történik, aminosavsorrendjükben nagyfokú hasonlóság van és mindegyik gátolható a foszfát analóg vanadáttal (HVO_4^{2-}). P típusú ATPáz a Ca^{2+}-ATPáz, amely a plazmamembránban, valamint az endoplazmás (és szarkoplazmás) retikulum membránjában található és az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció szabályozásában játszik szerepet (lásd Ca^{2+} homeosztázis). Hasonló működésű a gyomor parietális sejtjeiben található K^+H^+-ATPáz, amely a lumenből K^+-t pumpál a sejtbe, a sejtből pedig H^+-t a lumenbe, s ezáltal a gyomornedv savas pH-jának létrehozásában van meghatározó szerepe.

Eltérő, de mindezideig nem egészen tisztázott mechanizmussal működnek azok az ATPázok, amelyek az intracelluláris organellumok – lizoszómák, endoszómák, szekréciós és szinaptikus vezikulák, Golgi komplex – membránjában találhatók és protont transzportálnak. Ezek a **V típusú ATPázok** (vakuola), amelyeknek az a feladata, hogy a citoplazmáénál alacsonyabb pH-t hozzanak létre ezen organellumok belsejében. A szekréciós vezikulák vagy a szinaptikus vezikulák például a kialakuló protongrádiens terhére veszik fel az egyes hormonokat és neurotranszmittereket, ahol ezek raktározódnak (lásd 6.1. fejezet). A V típusú ATPázok nem foszforilálódnak és nem gátolhatók vanadáttal.

Végezetül az ATPázok egy harmadik csoportjába tartozik a mitokondrium belső membránjában található **F típusú ATPáz**, amely a protonok transzmembrán, koncentrációgrádiens irányában történő áramlásával párhuzamosan az ATP –

ADP+P_i-ból történő – szintézisét katalizálja. (Eredetileg ezt energy-coupling factornak tartották, innen az elnevezés.)

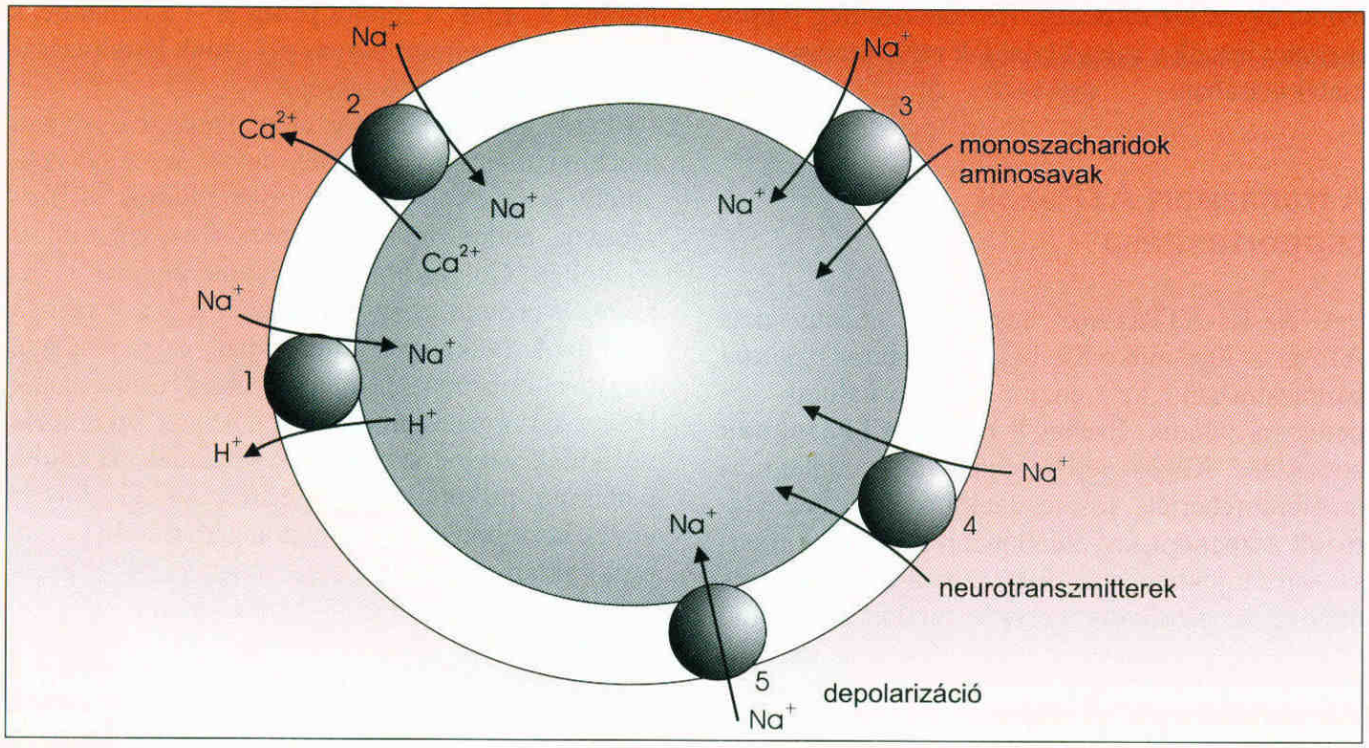
A transzport ATPázokhoz sorolhatók azok a plazmamembrán-fehérjék, amelyek a multidrug-rezisztencia kialakulásáért felelősek (lásd később).

Másodlagos aktív transzport. A glukóz Na^+-függő transzportja

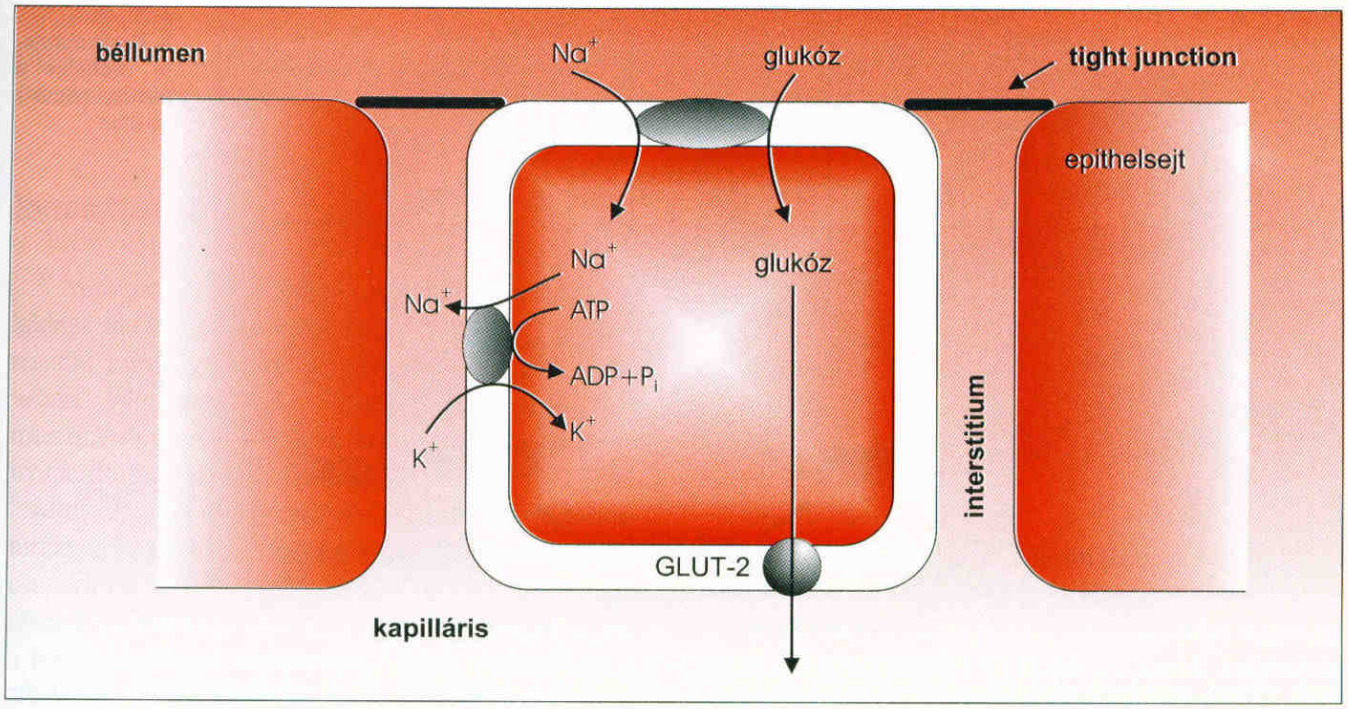
A Na^+K^+-ATPáz által fenntartott Na^+ koncentráció grádiens egy olyan potenciális energiaforrás, amelynek terhére lehetővé válik anyagok grádiens ellenében történő transzportja. A *4-18. ábrán* néhány olyan transzport, illetve funkció látható, amelyek közvetlenül a Na^+-grádienst veszik igénybe. A Na^+–H^+ cseretranszport, mely a Na^+-belépés terhére H^+-t pumpál ki a sejtből, fontos szerepet játszik a sejten belüli intracelluláris pH és a sejttérfogat szabályozásában. A Na^+–Ca^{2+} cseretranszport (lásd később) a sejtek Ca^{2+}-homeosztázisának fenntartásában vesz részt. Na^+ egyidejű transzportjával történik a glukóz és bizonyos aminosavak felszívódása a bélhámsejteken keresztül, és számos neurotranszmitter felvétele az idegsejtekbe. Közvetlenül a Na^+-belépés váltja ki az ideg- és izomsejtekben a depolarizációt.

A Na^+-függő glukóztranszporter a vékonybélben az epithelsejtek luminális membránjában helyezkedik el. A transzporter 1:1 arányban Na^+-ot és glukózt köt, a Na^+ az elektrokémiai grádiensnek megfelelően a sejtbe transzportálódik, s ez lehetővé teszi a glukóztranszportot akkor is, amikor a koncentráció a sejten belül nagyobb, mint a lumenben. A glukóz az epithelsejtet a basalis membránon keresztül a kapillárisok felé hagyja el facilitált diffúzióval. A sejtekbe felvett Na^+-ot a Na^+K^+-ATPáz pumpálja ki az interstitiumba. Ennek folyamatos működése esszenciális a glukózfelszívódás biztosításához *(4-19. ábra)*.

Fontos aspektusa ennek a transzportnak, hogy a Na^+ felszívódását is lehetővé teszi. Ebből a szemponból a transzporter működése kritikus olyan állapotokban, amikor a szervezet diarrhoea (hasmenés) következtében nagy



4-18. ábra. Néhány sejtfunkció, amely a Na^+-grádiens hasznosításával működik. *1. Na^+–H^+ cseretranszport. 2. Na^+–Ca^{2+} cseretranszport. 3. Bizonyos monoszacharidok és aminosavak transzportja. 4. Egyes neurotranszmitterek transzportja. 5. Depolarizáció a neuronokban és izomsejtekben*



4-19. ábra. Glukózfelszívódás a vékonybélepithel-sejteken keresztül

mennyiségű folyadékot és sókat veszít. Ez történik cholerában, a Vibrio cholerae fertőzés következtében. A kórokozó toxinja, a cholera toxin ADP-ribozilálja az adenilát-ciklázt aktiváló G_s fehérje α-alegységét (lásd 5. fejezet) és elektrolitszekréciót okoz. A sók és a folyadék pótlása ilyenkor kritikus a beteg élete szempontjából. Kihasználva a glukóz és a Na^+ kotranszportját, a korszerű terápiában a sók (Na^+, K^+, Cl^-) mellett az orálisan alkalmazott oldat glukózt is tartalmaz, ami gyorsítja a Na^+-felszívódást.

Na^+-kotranszporttal történik az epithelsejteken keresztül egyes aminosavak felszívódása is, továbbá a vesetubulus-sejtekben a glukóz visszaszívása.

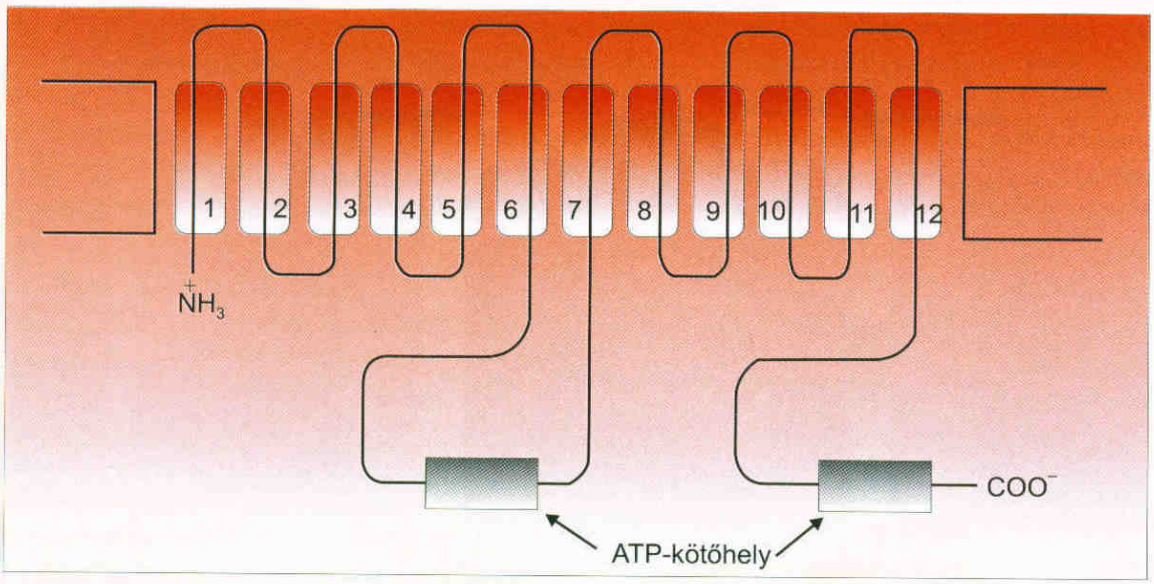
ABC fehérjék. Multidrog-rezisztencia

A plazmamembránban találhatók olyan fiziológiás, patológiás és terápiás szempontból egyaránt nagy jelentőségű speciális transzporterek, amelyek az ún. ABC fehérjék családjába tartoznak.

Az ABC fehérjékhez eltérő szerkezetű fehérjéket sorolunk, amelyek mindegyikére jellemző azonban, hogy felépítésükben hat transzmembránszakaszt tartalmazó transzmembrán domének és citoplazmatikus nukelotidkötő domének vesznek részt. (Az ATP kötőhely jellegzetessége miatt kapták az angol szakirodalomban az „ATP binding cassette" fehérje elnevezést.)

A ma ismert ABC fehérjék eltérő funkciókat láthatnak el, de legtöbbjükre az a jellemző, hogy ATP hidrolízisének terhére, aktív transzporttal különböző anyagokat pumpálnak ki a sejtekből. Ezek lehetnek ionok, aminosavak, fehérjék, foszfolipidek, szteroidok, epesavak, toxinok, antibiotikumok, tumorellenes szerek.

Az emberi szervezetben található ABC fehérjék a szerkezeti és funkcionális sajátosságok alapján több csoportba sorolhatók. Orvosi szempontból is nagyon jelentős a **multidrog transzporter** (MDR1 vagy másnéven P-glikoprotein), amely az epithelsejtek apikális membránjában található. Vázlatos szerkezetét a *4-20. ábra* mutatja. Különösen jelentős a P-glikoprotein előfordulása a vékonybél epithelsejtek luminális membránjában, a hepatociták canalicularis membránjában és az agyi kapilláris endothelsejtekben (vér–agy gát). Olyan, a sejtek számára toxikus hatású anyagok kipumpá-



4-20. ábra.
A P-glikoprotein modellje a plazmamembránban

lását végzi, amelyek eltérő szerkezetűek lehetnek, de közös jellemzőjük, hogy hidrofób karakterűek. A P-glikoprotein fiziológiás jelentősége valószínűleg az, hogy védi a szervezetet és a sejteket a táplálékban és a környezetben előforduló toxikus anyagokkal szemben. Tumorsejtekben a kemoterápiás kezelés során gyakran fordul elő a P-glikoprotein fokozott expressziója, melynek következtében a sejtek kipumpálják a daganatos betegségek kezelésében alkalmazott citosztatikumokat, nagymértékben lerontva ezáltal a kezelés hatékonyságát. Emiatt a kezelés során szükségessé válhat újabb és újabb, eltérő szerkezetű gyógyszerek bevonása a terápiába. Fontos tulajdonsága a transzporternek, hogy gátolható: az alkalmas gátlószerek megtalálása jelentős hatással lehet a daganatterápiára, mert ezek a szerek fokozzák a citotoxikus hatású drogok akkumulációját a daganatos sejtekben.

A hepatociták canalicularis membránjában található további ABC transzporterek, a foszfolipidek (MDR 3), illetve az epesavak (BSEP, „bile salt export pump") epébe történő kiválasztásában játszanak szerepet.

A tumorsejtek citosztatikumok iránti érzéketlenségének kialakulásában jelentős szerepet játszik egy másik transzporter is, a **multidrug-rezisztencia fehérje** (MRP1), amelynek specificitása nem korlátozódik a hidrofób karakterű molekulákra. Epithelsejtekben a bazolaterális membránban lokalizálódik. A multidrug-rezisztencia fehérjék családjába tartozik az a transzporter is (MRP2), amely a glutation és a glukuronsavas konjugátumok epébe történő kiválasztásához szükséges. A transzportert kódoló gén mutációja következtében jön létre a Dubin–Johnson-szindróma, amelyre jellemző, hogy nem történik meg a konjugált bilirubin szekréciója az epébe. (Erről részletesebben a 2.6 fejezetben szólunk.)

Szintén nagy jelentőségű egy másik ABC fehérje, az ún. CFTR fehérje (cysctic fibrosis transmembrane conductance regulator), ami tulajdonképpen kloridcsatorna és az intracelluláris ciklikus AMP hatására kinyílva kloridáramlást tesz lehetővé az elektrokémiai grádiens irányában. A transzportert kódoló gén mutációja következtében jön létre a cysticus fibrosis. Ilyenkor a kóros transzporter (az esetek 70%-ában egy fenilalanin-hiány) elsősorban a légutak és a gastrointestinalis traktus epithelsejtjeiben okoz hiánytüneteket. Ennek az a következménye, hogy sűrű nyák halmozódik fel a légutakban, a pancreasvezetékben, ami következményes fertőzéssel, illetve a légutak, a pancreasvezeték elzáródásával és magzati bélelzáródással járhat.

Orvosi jelentősége miatt meg kell még említeni azt a transzportert, amely a retinában található (retinális ABC transzporter), és ma még nem tisztázott mechanizmussal fontos szerepet játszik a fotoreceptorok homeosztázisában. A retinális ABC transzporterek mutációja felelős számos, nagyon súlyos öröklődő szembetegség (pl. retinitis pigmentosa bizonyos formáinak) kialakulásáért.

Egy legújabban felfedezett ABC transzporter (ABCA1) feltehetően a celluláris koleszterin transzportért felelős.

Ioncsatornák

A transzporterektől eltérő mechanizmussal működnek azok a membránfehérjék, amelyeken keresztül, mint egy hidrofil csatornán, ionok áthaladása lehetséges. Az ioncsatornák integráns membránfehérjék, amelyek konformációváltozása nyitja, illetve zárja a csatornát.

Attól függően, hogy milyen szignál nyitja a csatornát, a legtöbb eddig megismert ioncsatorna két csoportra osztható *(4-21. ábra)*. A csatornák egy része a membránpotenciál-változásra reagál, ezek a **feszültségfüggő csatornák**. Ezek elsősorban a neuronok, izomsejtek és egyes szekréciót végző sejtek membránjában találhatók. A feszültségfüggő csatornák közül a Na^+-csatornáról és a Ca^{2+}-csatornáról részletesebben később (441. oldal és 6.1 fejezet) lesz szó.

A csatornák másik csoportja egyszersmind receptor is, amely a megfelelő agonista hatására válik átjárhatóvá. Ezek a **receptor ioncsatornák**. Legismertebb ioncsatorna az acetilkolin nikotinreceptora, erről és más ioncsatornákról szintén másutt lesz részletesebben szó (6.1 fejezet).

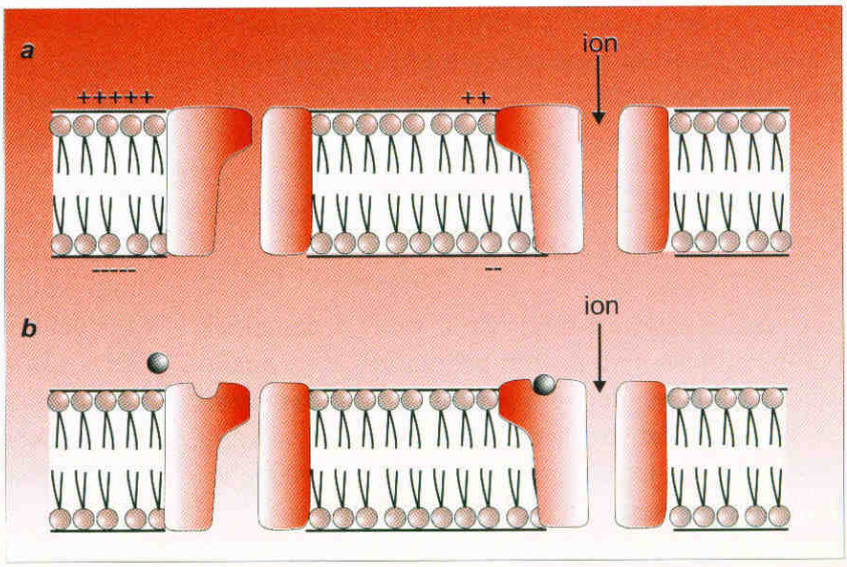
A csatornákon ionok kizárólag a koncentrációgrádiensnek megfelelő irányban haladnak át és az ionáramlás rendkívül gyors (a nikotinreceptor esetében pl. $2 \cdot 10^7 Na^+/s$). A folyamat nem telíthető, az ionáramlás az extracelluláris koncentrációval arányos. A csatornák szelektíven átjárhatók egy-egy ionra. A specificitást gyakran az ionok mérete és töltése határozza meg.

4-2. táblázat. Néhány fontosabb ionofór

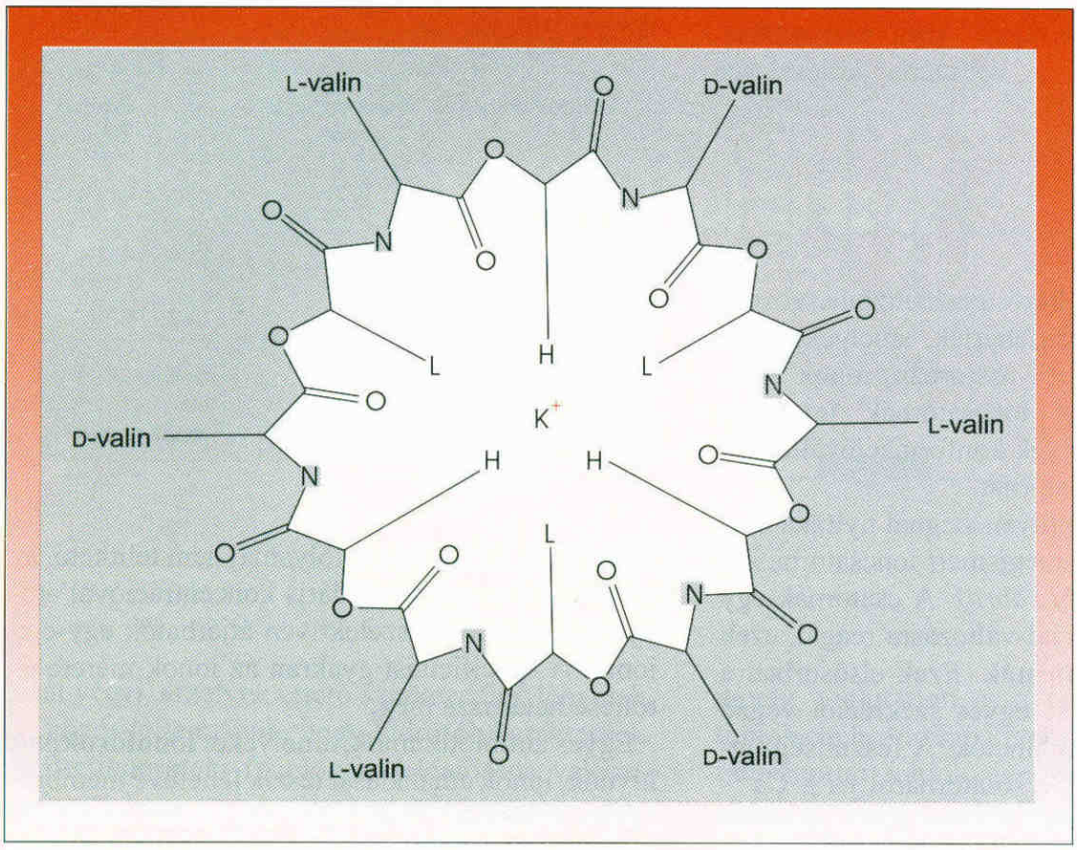
Ionofór neve	A transzportált ion	Az ionofór jellege
Gramicidin	Na^+, K^+, H^+	csatornaképző
Nigericin	K^+/H^+	mobil carrier
Valinomicin	K^+	mobil carrier
Monensin	Na^+/H^+	mobil carrier
A 23187	$Ca^{2+}/2H^+$	mobil carrier

Egyes antibiotikumok, amelyeket **ionofóroknak** hívunk, ionok áthaladását teszik lehetővé membránokon keresztül. Ezek vagy ún. mobil carrierek, amelyek az iont megkötik és a membránban diffundálva viszik az egyik oldalról a másikra, vagy csatornaképző ionofórok, amelyek a membránban csatornát képezve átengednek ionokat a koncentrációgrádiens irányában. Az ionofórok egy-egy ionra szelektívek. Néhány ionofórt és a transzportált ionokat a *4-2. táblázat* mutatja.

A mobil carrierek megkötik a szállítandó iont, ami elveszti hidrátburkát és például a K^+-ionofór valinomicin esetén egy hidrofób burokba kerül



4-21. ábra. A feszültségfüggő ioncsatornák (a) és a receptor ioncsatornák (b) modellje



4-22. ábra. Valinomicin–K^+ komplex. L: laktát; H: D-hidroxi-izovalerát

(4-22. ábra). A lipidoldékony komplex a membránban diffundálni képes. Egyes ionofór antibiotikumok antiporterként működnek (A 23187, monensin, nigericin) és H^+-t szállítanak valamilyen kationnal ellentétes irányban.

A csatornaképző ionofórok nem diffundálnak a membránon keresztül, az ion az ionofór által alkotott póruson halad át. Az ionofórok kis molekulatömegű anyagok, esetleg peptidek (pl. gramicidin). Hasznos kísérleti eszközök a sejtek ionösszetételének változtatására.

A sejtek Ca^{2+}-transzport-rendszerei. Ca^{2+}-homeosztázis

A Ca^{2+}-transzport-rendszerek azért érdemelnek külön említést, mert az intracelluláris Ca^{2+} reguláló szerepet tölt be alapvető sejtfolyamatokban, mint amilyen pl. az anyagcsere, az izomkontrakció vagy a szekréció. A Ca^{2+} reguláló szerepét az teszi lehetővé, hogy a sejteket érő szignálok egy része az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációt változtatja meg, amit egyébként számos, a plazmamembránban és az intracelluláris organellum membránjában található Ca^{2+}-transzport-rendszer működése szabályoz.

A sejtekben a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció 0,1 μM körül van, míg az extracelluláris koncentráció mM-os nagyságrendű. Ez a négy nagyságrendnyi koncentrációkülönbség és az intracelluláris –60 és –90 mV közötti nyugalmi potenciál nagyon jelentős hajtóerő az extracelluláris Ca^{2+}-belépés irányába. A plazmamembrán nyugalmi körülmények között csak nagyon korlátozottan permeábilis a Ca^{2+}-ra, azonban a sejtet érő stimulusok átmenetileg nagyfokú Ca^{2+}-áthaladást engedhetnek meg a plazmamembránon keresztül, ami megemeli az intracelluláris szabad Ca^{2+}-koncentrációt. Ez utóbbi nemcsak az extracelluláris Ca^{2+} belépésének, hanem az intracelluláris kompartmentekben jelen lévő Ca^{2+} citoplazmába kerülésének is lehet az eredménye. Ehelyütt áttekintjük azokat a folyamatokat, amelyek a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció fenntartásában és az átmeneti intracelluláris Ca^{2+}-koncent-

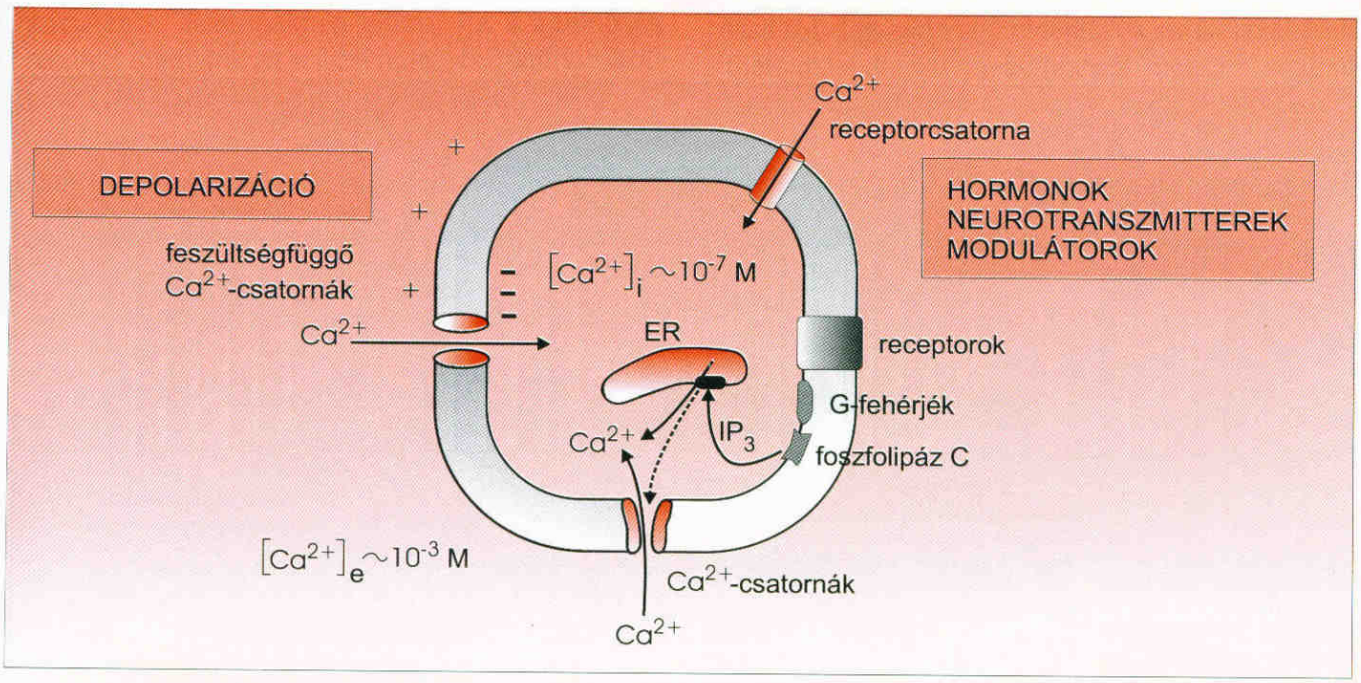
ráció emelkedésében szerepet játszanak. A Ca^{2+} mediátor szerepével az 5.1 fejezet külön is foglalkozik.

Az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció emelkedését kiváltó szignálok és mechanizmusok

A sejtek Ca^{2+}-homeosztázisának fenntartásában számos membrán (plazmamembrán, az endoplazmás és szarkoplazmás retikulum membránja, a mitokondrium belső membránja) és kompartment (extracelluláris és intracelluláris tér, endoplazmás retikulum és mitokondrium) vesz részt. Azok a fiziológiás jelenségek, amelyek a citoplazma szabad Ca^{2+}-koncentrációjának az emelkedését okozzák vagy a plazmamembrán vagy/és az endoplazmás retikulum membránjának Ca^{2+}-transzportját változtatják meg. Kétféle fiziológiás szignál hatásának közvetítésében van központi szerepe a Ca^{2+}-nak. Az egyik az elektromos szignál, amikor a sejtek nyugalmi potenciálja csökken, ami kinyitja a plazmamembrán feszültségre érzékeny Ca^{2+}-csatornáit, s ezen keresztül az elektrokémiai grádiensnek megfelelően átmeneti Ca^{2+}-belépés jön létre. A másik az extracelluláris kémiai anyagok – hormonok, neurotranszmitterek és modulátorok – hatása, amelyek a plazmamembránban receptorokhoz kötődnek, s ez – meghatározott receptorok esetében – egy több lépésből álló reakciósort elindítva végül is Ca^{2+}-koncentráció-emelkedéshez vezet. Ebben része van az endoplazmás retikulumból felszabaduló, valamint a plazmamembránon keresztül a sejtbe áramló Ca^{2+}-nak egyaránt. Van néhány olyan receptor is, amely önmaga ioncsatorna és a receptor–agonista kölcsönhatás eredményeképpen nyílik *(4-23. ábra)*. A receptorokhoz kapcsolódó Ca^{2+}-szignált a későbbiekben (5.1 fejezet) részletesen ismertetjük.

A feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák. A depolarizációra aktiválódó, Ca^{2+}-ra permeábilis csatornák az excitábilis sejtek membránjában találhatók és az általuk létrehozott Ca^{2+}-szignál fontos szerepet játszik a neurotranszmitterek felszabadulásában, a simaizom-kontrakcióban és számos hormon szekréciójában. Ez a csatorna a támadáspontja sok fontos, a terápiában használatos gyógyszernek is. A Ca^{2+}-csatornák heterogén fehérjepopulációt jelentenek, amelyek eltérő összetételben találhatók a különböző szövetekben. A csatornák biofizikai és farmakológiai tulajdonsága alapján jelenleg négyféle, jól karakterizált Ca^{2+}-csatornát lehet elkülöníteníteni *(4-3. táblázat)*.

A T csatornák – szemben a másik hárommal – kis küszöbpotenciálnál aktiválódnak. Gyors inaktivá-



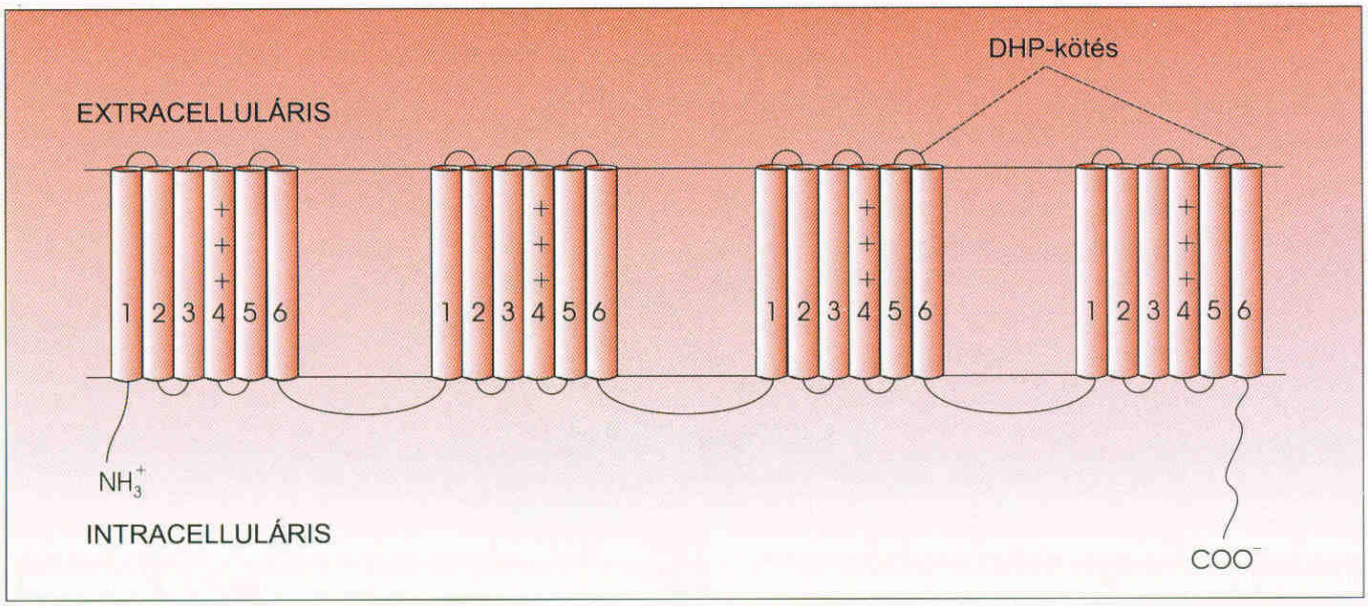
4-23. ábra. A citoplazma Ca^{2+}-koncentrációját növelő fiziológiás körülmények. Az ábra vázlatos összefoglalás, a G fehérjék–foszfolipáz C–IP_3 (inozitol 1,4,5-triszfoszfát) rendszert az 5. fejezetben részletesen tárgyaljuk

4-3. táblázat. A feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák néhány biofizikai és farmakológiai sajátossága és lokalizációja

	T	L	N	P
Aktiváláshoz szükséges depolarizáció mértéke	kicsi	nagy	nagy	nagy
Inaktiválás	gyors	nagyon lassú	lassú	alig
Kadmiumgátlás	rezisztens	szenzitív	szenzitív	szenzitív
Gátolható	amilorid	dihidropiridin	ω-conotoxin	ω-agatoxin
Lokalizáció	endokrin sejtek szívizom simaizom neuronok	endokrin sejtek szívizom simaizom harántcsíkolt izom neuronok	neuronok endokrin sejtek	Purkinje-sejtek és egyéb központi idegrendszeri neuronok

lódásuk miatt kapták a nevüket (transient). Az L csatornák lassan inaktiválódnak (long-lasting) és jellemzőjük, hogy az 1,4-dihidropiridin (DHP) származékai – amelyek antiaritmiás és vérnyomáscsökkentő gyógyszerek is – a csatornát gátolják. Az N csatornák (**n**either T **n**or L, sem T sem L) a tengeri csigából (Conus geographus) tisztított ω-conotoxinnal, míg a P csatornák, amelyeket legelőször a Purkinje-sejtekben találtak meg, egy pókból (Agelenopsis aperta) előállított toxinnal, az ω-agatoxin-IVA-val gátolhatók.

A legtöbbet az L csatornákról tudunk, amelyek nagy mennyiségben találhatók a szívizomban és a harántcsíkolt izmokban, ahonnan először sikerült tisztán kinyerni. A fehérje négy alegységből áll (α_1, α_2/δ, β és γ). Az α_1-alegység (210 kDa) – amely nagyfokú homológiát mutat a feszültségfüggő Na^+-csatornával – alkotja a csatornát és szolgál a DHP kötőhelyéül. A fehérje szerkezete és elhelyezkedése a membránban nagyon hasonló a Na^+-csatornához: négy, közel homológ ismétlődés van a molekulában, amelyek mindegyike 6 transz-



4-24. ábra. Az L típusú Ca^{2+}-csatorna α_1-alegységének modellje. *DHP, dihidropiridin*

membrán-szakasszal rendelkezik *(4-24. ábra)*. A feszültségérzékelő részt valószínűleg a 4. transzmembránrégiók adják, ahol sok a pozitív töltésű aminosav oldallánc. A többi alegység szerkezete és funkciója kevésbé ismert, ezek valószínűleg a csatorna regulációjában és membránon belüli helyzetének rögzítésében játszanak szerepet. A szívizomban az L csatornákon belépő Ca^{2+} az elindítója az izomkontrakcióhoz vezető folyamatoknak. A harántcsíkolt izomban ez bonyolultabb; itt a kontrakció kiváltója a szarkoplazmás retikulumból felszabaduló Ca^{2+}, azonban a Ca^{2+}-felszabadulást kiváltó depolarizáció „érzékelője" valószínűleg a transzverzális tubulusokban levő L csatorna. Ez a csatorna, amit DHP-receptornak hívnak szoros morfológiai kapcsolatban van a szarkoplazmás retikulum terminális ciszternáival, amelyek membránjában egy növényi alkaloidra, a rianodinra érzékeny fehérje található, amely Ca^{2+}-csatorna. A két struktúra nagyon közel van egymáshoz (~12 nm), s a depolarizáció hatására, a DHP-receptor közreműködésével jön létre a szarkoplazmás retikulumból a Ca^{2+}-felszabadulás a rianodinreceptoron keresztül *(4-25. ábra*, lásd még 5.1 fejezetben).

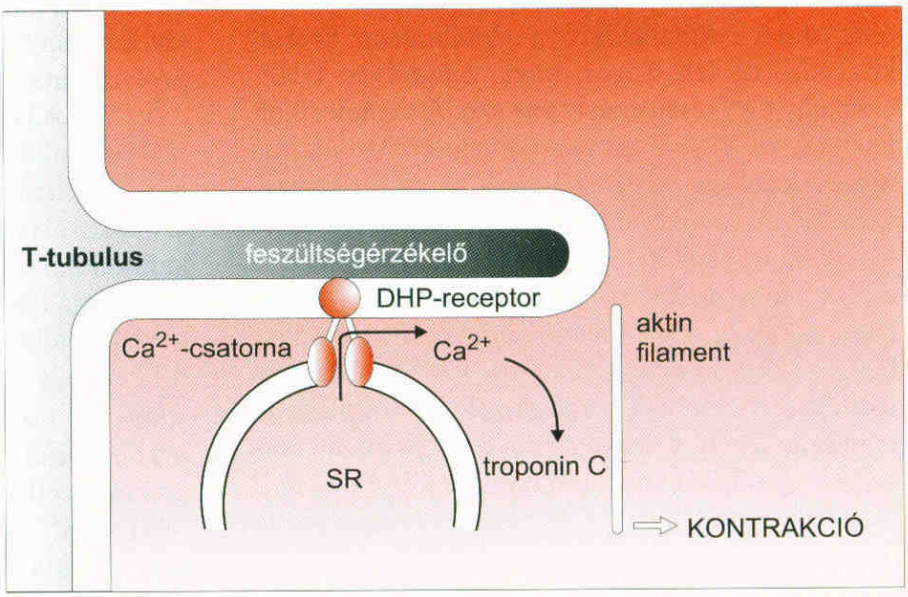
A két struktúra közötti kapcsolat létrejöttében fontos szerepet játszik a DHP-receptor II. és III. homológ doménje közötti citoplazmában található hurok (lásd 4-24. ábra), amelynek szerkezete a szívizom L csatornákban eltérő. Ez a különbség részben magyarázza a szívizom és harántcsíkolt izom eltérő aktivációs mechanizmusát.

Az N csatornák, amelyek a neuronokban és számos endokrin szövetben (pl. pancreas, mellékvesevelő, hypophysis elülső lebeny), valamint a P csatornák, amelyek a központi idegrendszeri neuronokban találhatók, a depolarizációra létrejövő neurotranszmitter felszabadulás és hormonszekréciók kiváltásában játszanak szerepet.

Egyes szövetekben a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák az α_1- és β-alegységen foszforilálódnak, ami a reguláció egyik lehetősége. Szívizomban az L csatornákat a cAMP függő protein-kináz foszforilálja, s ez a csatornák aktiválásának valószínűségét fokozza. A szimpatikus izgalom β-receptorokon keresztül ily módon fokozza a Ca^{2+}-belépést, s ezáltal pozitív inotrop hatású.

A β-receptor-stimuláció pozitív kronotrop hatást is jelent, amely egy 27 kDa molekulatömegű fehérje, a foszfolambán közreműködésével jön létre. Ezt a fehérjét protein-kinázok (cAMP-dependens, Ca^{2+}-kalmodulin-dependens és Ca^{2+}-foszfolipid-dependens) foszforilálják. A foszforilált foszfolambán aktiválja a szarkoplazmás retikulum Ca^{2+}-ATPázt, és stimulálja a Ca^{2+}-felvételt a citoplazmából a szarkoplazmás retikulumba (lásd még 5.1 fejezetben).

A feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat meg kell különböztetni a plazmamembrán egyéb Ca^{2+}-csatornáitól, amelyek vagy receptor ioncsatornák (glutamát-NMDA receptor, P_2 purinerg receptor – lásd 6.1. fejezet) vagy receptorok aktiválását követően másodlagos messengerek hatására nyílnak. Ezek a feszültségre nem vagy csak nagyon kevéssé



4-25. ábra. Ca^{2+}-felszabadulás a szarkoplazmás retikulumból a harántcsíkolt izomban. *A szarkoplazmás retikulum (SR) membránban található rianodinreceptor négy monomerből álló fehérje, amelyek hidrofób része alkotja a membránon belüli struktúrát, hidrofil része pedig a citoplazmában, az ún. „feet" struktúrát. Ez utóbbi kerül kapcsolatba a dihidropiridinre érzékeny L csatornával (DHP-receptor)*

érzékenyek és – szemben a feszültségfüggő csatornákkal – nem jellemző rájuk a nagyfokú Ca^{2+}-szelektivitás.

Ca^{2+}-felszabadulás az endoplazmás (szarkoplazmás) retikulumból. A Ca^{2+} mobilizáló receptorok szignál transzdukciójával külön fejezet foglalkozik, itt csak a folyamat vázlatos ismertetésére és az endoplazmás retikulumból történő Ca^{2+}-mobilizálás ismertetésére szorítkozunk. A Ca^{2+}-homeosztázis szempontjából az endoplazmás retikulum (ER) a legfontosabb Ca^{2+}-raktározó intracelluláris organellum, amelyből a Ca^{2+} felszabadítható és ahova a citoplazmából ismét felvehető. Az ER-ból Ca^{2+}-ot mobilizál nagyszámú hormon, neurotranszmitter és modulátor, amelyek receptorai a plazmamembránban vannak. A receptor és az agonista kötése G-fehérjék (guanin nukleotidot kötő fehérjék; lásd 5.1 fejezet) közreműködésével aktiválja a foszfolipáz C-t, amely a membránban a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot hasítja és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) keletkezik. Az IP_3 az az intracelluláris messenger, amely nagy affinitású kötőhellyel rendelkezik a ER membránján, s a kötés eredménye Ca^{2+} kiáramlása az ER-ból a citoplazmába. A folyamat a részletei a 475. oldalon olvashatók.

Az izomban az intracelluláris Ca^{2+}-raktár szerepét a szarkoplazmás retikulum (SR) tölti be, s itt a Ca^{2+}-mobilizálásnak más a mechanizmusa és a fiziológiai szerepe. Harántcsíkolt izomban a T tubulusok (a sarcolemma betüremkedései) depolarizációja váltja ki a SR-ból a Ca^{2+}-felszabadulást s a Ca^{2+} a troponin C-hez kötődve elindítja a kontrakciót (4-25. ábra). Nem tisztázott az a mechanizmus, ami a T tubulusokról a depolarizáció hatását közvetíti, de lehetséges, hogy valamilyen DHP-érzékeny Ca^{2+}-csatornáról van szó. A harántcsíkolt izomban az SR-ból történő Ca^{2+}-felszabaduláshoz nincs szükség extracelluláris Ca^{2+}-belépésre, szemben a szívizommal, ahol a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákon belépő Ca^{2+} indukálja az SR-ból a Ca^{2+}-felszabadulást (Ca^{2+}-függő Ca^{2+}-felszabadulás) és ez a kontrakció triggere. Simaizmokban a depolarizáció okozta Ca^{2+}-mobilizálás mellett, a SR-ból IP_3 is mobilizál Ca^{2+}-ot plazmamembrán receptoraktiválás következtében, harántcsíkolt izomban ennek a működése kétséges (lásd még 478. oldal).

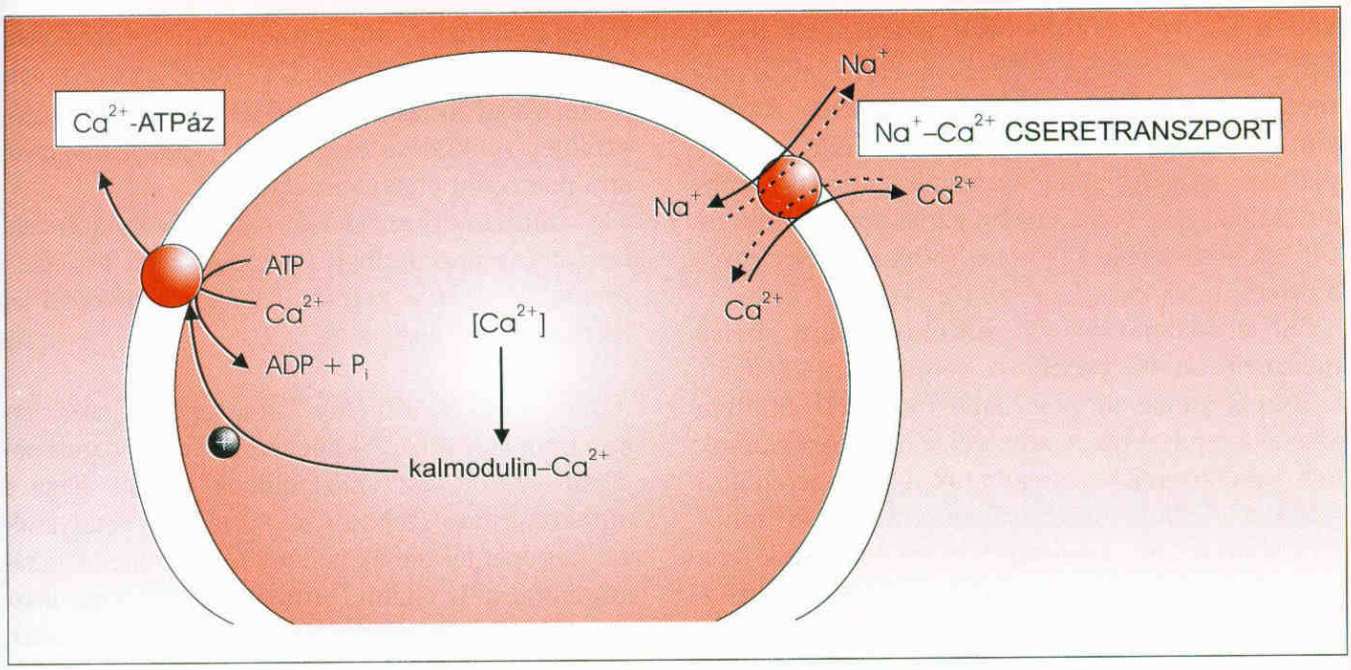
Az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációt csökkentő mechanizmusok

A fiziológiás stimulusok hatására létrejövő Ca^{2+}-koncentráció-emelkedés a citoplazmában átmeneti, mivel a plazmamembránban és az endoplazmás retikulum membránjában hatékony transzportrendszerek működnek a Ca^{2+} citoplazmából történő eltávolítására.

Ca^{2+}-ATPáz a plazmamembránban. A Ca^{2+} transzportja a citoplazmából az extracelluláris térbe az elektrokémiai grádiens ellenében aktív transzporttal történik *(4-26. ábra)*. A **Ca^{2+}**-ATPáz minden sejt plazmamembránjában megtalálható enzim, amely a P típusú ATPázok közé sorolható. Ennek megfelelően számos tulajdonsága hasonló a Na^+K^+-ATPáz-éhoz; átmenetileg egy aszparaginsav oldalláncon foszforilálódik, két konformációs állapotban fordul elő és vanadáttal gátolható. A pumpa sztöchiometriája (Ca^{2+}/ATP) a plazmamembránban 1. Az enzim fontos tulajdonsága, hogy kalmodulinnal stimulálható (4-26. ábra). A kalmodulin talán a legáltalánosabb, a legtöbb sejtben megtalálható Ca^{2+}-kötő fehérje, amely számos, a Ca^{2+} által kiváltott sejtválasz közvetítője. A kalmodulin azonban a Ca^{2+}-homeosztázist is befolyásolja azáltal, hogy a Ca^{2+}-ATPázt, így a Ca^{2+}-kipumpálást stimulálja. Az enzim, a C-terminálishoz közeli szakaszon megköti a kalmodulint, ez a V_{max}-értéket növeli, a Ca^{2+}-mal szembeni K_M-értéket pedig 20 μM-ról 0,5 μM-ra csökkenti. Ez utóbbi azt jelenti, hogy az enzim már viszonylag kis $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés mellett aktiválódik. Az enzimet aktiválják a savanyú foszfolipidek, a protein-kináz A és protein-kináz C-vel történő foszforiláció is.

A Ca^{2+}-ATPáznak több izoenzimje ismert, amelyek különböző gének és alternatív splicing termékei. Az izoenzimek alapvető pumpafunkciója azonos, azonban regulációjuk – különösen a kalmodulin iránti érzékenységük – eltérő lehet. (A hepatocitákban található Ca^{2+}-ATPáz izoenzim például kalmodulinnal nem aktiválható.) A Ca^{2+}-ATPáz egy 138 kDa molekulatömegű fehérje, amely 10 transzmembrán α-helix-szakaszt tartalmaz és mind a foszforiláció, mind a reguláció helyei intracellulárisan találhatók *(4-27. ábra)*.

Na^+–Ca^{2+} cseretranszport. A Ca^{2+}-ATPázhoz képest kis affinitású, de nagy kapacitású transz-

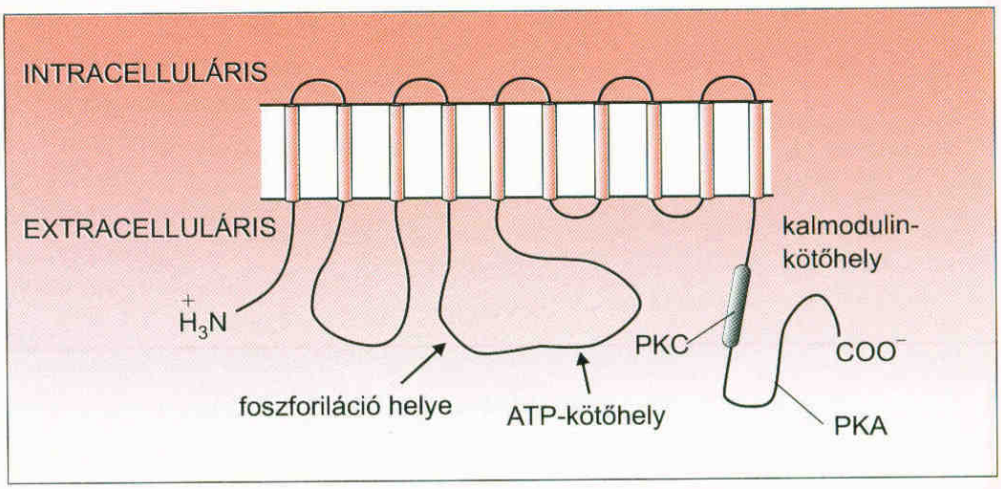


4-26. ábra. Aktív Ca^{2+}-transzportok a plazmamembránban

portnak tekinthető (4-26. ábra). Optimális aktivitását μM-os intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációnál éri el, míg a Ca^{2+}-ATPáz már kis $[Ca^{2+}]_i$ változásra reagál. A Ca^{2+}-kipumpálás a Na^+ elektrokémiai grádiensének terhére történik, amelynek sztöchiometriája az egyes szervekben eltérő, de $2Na^+/Ca^{2+}$-nál nagyobb, vagyis a pumpa elektrogén. Működése reverzibilis, az extra- és intracelluláris Na^+- és Ca^{2+}-koncentrációktól függően ellenkező irányban is működhet, amikor Ca^{2+} belépésre adhat alternatív lehetőséget. A Na^+–Ca^{2+} cseretranszport nincs jelen minden sejtben (hiányzik például a májsejtek membránjából), legnagyobb aktivitással a neuronokban és a szívizomban működik.

Ca^{2+}-pumpa az endoplazmás retikulumban. A Ca^{2+}-ot a citoplazmából az ER (és SR) raktáraiba Ca^{2+}-ATPáz pumpálja. Az enzim működése sok szempontból hasonlít a plazmamembrán Ca^{2+}-ATPázéra, de attól eltérő fehérje, amelyet több különböző gén kódol és számos izoformában fordul elő. P típusú ATPáz, amely a citoplazmatikus oldalon köti az ATP-t és foszforilálódik. Sztöchiometriája $2Ca^{2+}$/ATP. Az enzim nagy affinitással

4-27. ábra. A Ca^{2+}-ATPáz modellje a plazmamembránban. *PKC: protein-kináz C; PKA: protein-kináz A*



köti a Ca^{2+}-ot, a különböző izoenzimek K_M-je 0,1–1 μM, ezért nagyon érzékenyen reagál az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció-változásra. Az enzim jelentőségét nemcsak az adja, hogy a citoplazma nyugalmi Ca^{2+}-koncentrációjának fenntartásában vesz részt, hanem az is, hogy feltölti az ER Ca^{2+}-raktárait, ahonnan hormonok és neurotranszmitterek mobilizálnak Ca^{2+}-ot.

Ca^{2+}-transzportok a mitokondrium belső membránon keresztül. A sejtmembránok Ca^{2+} transzportjainak tárgyalásánál meg kell említeni azokat a rendszereket, amelyek a mitokondriumok belső membránjában találhatók, noha szerepük a sejtek Ca^{2+}-homeosztázisában vitatott. A mitokondriumok egy uniporteren keresztül veszik fel a citoplazmából a Ca^{2+}-t, amelyhez az energiát a protongrádiens szolgáltatja. Intenzív Ca^{2+}-felvétel a mitokondrium belső membránján keresztül csökkenti a protongrádienst és értelemszerűen minden olyan körülmény, ami a protongrádienst csökkenti, gátolja a mitokondrium Ca^{2+}-felvételét. Az uniporter kis affinitású ($K_t \sim 10$ μM Ca^{2+}), ezért valószínűleg működése olyan $[Ca^{2+}]_i$-nél számottevő, ami már a sejt életét veszélyezteti.

A mitokondrium belső membránon keresztül Ca^{2+} transzportálódhat a citoplazmába Na^+–Ca^{2+} cseretranszporton keresztül, ennek fiziológiai jelentősége nem tisztázott.

Bár a mitokondrium Ca^{2+}-transzportjainak szerepe a citoplazma Ca^{2+}-koncentrációjának regulációjában vitatott, az valószínűnek látszik, hogy a mitokondrium szabad-Ca^{2+}-tartalmát befolyásolva, szerepet játszanak néhány Ca^{2+}-szenzitív intramitokondriális enzim (piruvát-dehidrogenáz-foszfatáz, NAD^+-dal működő izocitrát-dehidrogenáz, α-ketoglutarát-dehidrogenáz) aktiválásában, s ezáltal az ATP-termelés szabályozásában.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerző köszönetet mond Dr. Csermely Péternek, Dr. Kőnig Tamásnak, Dr. Sarkadi Balázsnak és Dr. Tretter Lászlónak.

Extracelluláris jelek receptorai és a jelátviteli mechanizmusok

5.
FEJEZET

5.1. Plazmamembrán-receptorok és jelátviteli mechanizmusaik *(Ádám Veronika és Faragó Anna)*

A receptor–ligand kölcsönhatás jellemzői
A plazmamembrán-receptorok felosztása és tulajdonságai
A receptor ioncsatornák
Heterotrimer GTP-kötő fehérjék (G-fehérjék) részvétele a receptorhatások közvetítésében
Protein-kinázok és foszfoprotein-foszfatázok
A cAMP-mediátorrendszer
Inozitol-foszfolipid jelátviteli rendszer. A Ca^{2+} mint intracelluláris mediátor és az inozitol-1,4,5-triszfoszfát szerepe
A guanilát-cikláz és a ciklikus GMP jelentősége a jelátvitelben. A nitrogén-monoxid biológiai szerepe
A nitrogén-monoxid keletkezése és jelentősége
Tirozin-kináz receptorokkal működő jelpályák és a protoonkogének

5.2. Sejtmagreceptorok *(Fésüs László)*

A szteroid–tiroid–D-vitamin „magreceptor" család
Hormonfüggő magreceptor család komplexitása
Az „árva" magreceptorok és a reverz endokrinológia kibontakozó világa
A magreceptorok tágabb értelemzése
Orvosbiológiai jelentőség

5.3. A sejtproliferáció és a természetes sejthalál biokémiája *(Fésüs László)*

A sejtosztódási ciklus biokémiai sajátságai és szabályozása
Proliferációs szignál útvonalak, a mitogén kaszkád
A restrikciós pont szabályozása
Az M fázis kináz (cdc2, CDK1)
A ciklindependens kinázok szabályozásának főbb elvei
A proteolízis jelentősége a sejtciklusban
A sejtosztódási ciklus szabályozásának kapcsolata a tumoros sejtproliferációval
Protoonkogének és onkogének
Tumorszuppresszor gének
A természetes sejthalál molekuláris háttere
A természetes sejthalál formái
A sejthalál (apoptózis) elindítása
Effektor mechanizmusok
Az elhalt sejtek fagocitózisa
Az apoptózis gátlása
Orvosbiológiai jelentőség

Plazmamembrán-receptorok és jelátviteli mechanizmusaik

5.1.

Ádám Veronika és Faragó Anna

A sejt és környezete közötti kölcsönhatásnak feltétele, hogy a sejtek érzékeljék a környezetükbe érkező extracelluláris jeleket – kémiai anyagokat –, s továbbítsák a sejthez érkező jelzést azokhoz az intracelluláris mechanizmusokhoz, amelyek a sejt válaszreakcióját kiváltják. A sejtek bonyolult kölcsönhatásban vannak a velük közvetlenül érintkező sejtekkel, de utasítást kapnak neurotranszmitterek formájában a beidegző neuronoktól és hormonok formájában a vérpályán keresztül távolabbi szervektől is. Ezeket, a sejt számára külső jeleket, összefoglalóan extracelluláris jeleknek (szignáloknak), azt a több lépéses folyamatot pedig, amelyben a jelzés a sejt válaszát kiváltja, jelátvitelnek, **szignál transzdukciónak** nevezzük.

Az extracelluláris jelek érzékelői a receptorok. A receptorok fehérjék, amelyek egy-egy jelként szolgáló anyag felismerésére és megkötésére specializálódtak. A receptorok specificitása azt jelenti, hogy minden egyes extracelluláris jel receptora egyedi, csak az adott jelre jellemző struktúra, amely kisebb, nagyobb vagy igen nagy mértékben különbözik minden más szignál receptorától. Egy adott hormon vagy neurotranszmitter megkötésére több fajta receptor is rendelkezésre állhat, azaz valójában több fajta receptor ismert, mint ahány extracelluláris jel létezik. Ennek megfelelően vannak adrenerg, kolinerg, dopaminerg, szteroid, inzulin stb. receptorok, amely elnevezés a receptorról nem árul el mást, csak azt, hogy milyen extracelluláris molekula megkötésére képes. Amint azt látni fogjuk, a nagyszámú, eltérő molekulák felismerésére specializálódott, egyedi szerkezeti sajátosságú receptorok néhány jól definiálható csoportba sorolhatók.

A receptor–ligand kölcsönhatás jellemzői

Függetlenül a receptorok egyedi sajátosságától, minden receptor nagy szelektivitással és affinitással köti azt az extracelluláris molekulát, amelyre specializálódott. Mindazokat az endogén, valamint természetes anyagokat és szintetikus származékokat, amelyek a receptorhoz kötődnek, **ligandoknak** nevezzük. Azok az anyagok, amelyek a receptort aktiválják az **agonisták**, azok pedig, amelyek a receptort gátolják az **antagonisták**. A receptor és a ligand közötti kötés (asszociáció) a receptor–ligand komplex (RL) létrejöttét eredményezi és ez leírható az alábbi összefüggéssel:

$$R + L \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} RL$$

ahol R a szabad receptor, L a szabad ligand, k_1 az asszociáció és k_2 a disszociáció sebességi konstansa. A receptor–ligand komplex koncentrációjának időegység alatti változását az RL komplex keletkezésének és disszociációjának eredője adja:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_1 \cdot [R] \cdot [L] - k_2 \cdot [RL]$$

Egyensúlyi helyzetben (equilibrium); amikor

$$\frac{d[RL]}{dt} = 0$$

a keletkezés és a visszaalakulás sebessége azonos:

$$k_1 \cdot [R] \cdot [L] = k_2 \cdot [RL]$$

azaz:

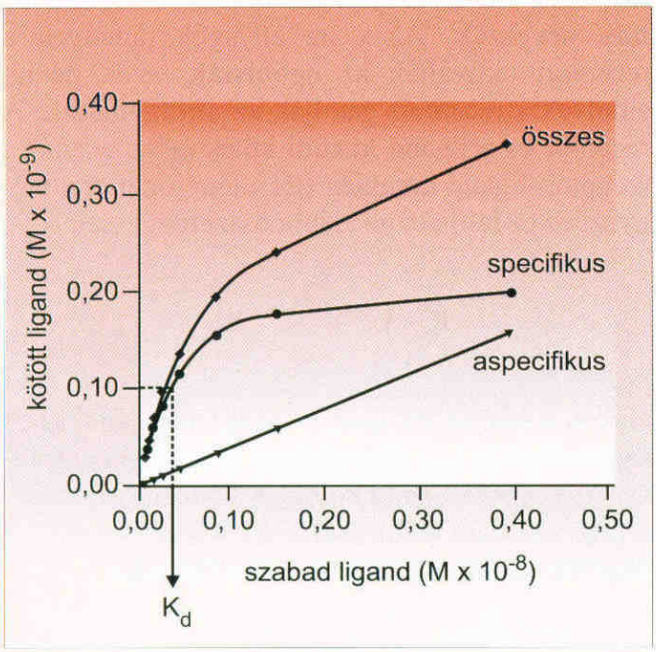
$$\frac{k_1}{k_2} \cdot [R] \cdot [L] = [RL]$$

Az asszociációs egyensúlyi konstans (K_a) az asszociáció és a disszociáció sebességi konstansának a hányadosa:

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \qquad (1)$$

A receptor–ligand kötés **disszociációs konstansa (K_d)** az asszociációs konstans reciprokával azonos, azaz:

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{k_2}{k_1} = [R] \cdot \frac{[L]}{[RL]} \qquad (2)$$



5-1. ábra. A receptor–ligand kötés telítési görbéje

Kísérleti körülmények között radioaktív jelzett liganddal megmérhető, hogy különböző ligandkoncentrációknál mennyi a keletkező RL komplex mennyisége. Az *5-1. ábra* mutatja, hogy az összefüggést telítési görbe írja le. A receptor–ligand kötéshez olyan membránpreparátumokat használnak, amelyek nagyszámú receptorfehérjét tartalmaznak. A ligand azonban nemcsak a receptorhoz kötődhet, hanem aspecifikusan más fehérjékhez vagy membránlipidekhez is. Ezt oly módon veszik figyelembe, hogy megmérik a radioaktív ligand kötődését akkor is, amikor nem jelzett ligand nagy feleslegben (100–1000-szer nagyobb koncentrációban) van jelen, ami a specifikus kötőhelyekről leszorítja a jelzett ligandot, de az aspecifikus kötőhelyről nem (mert az aspecifikus kötőhelyek száma igen nagy). A kötött radioaktív ligand teljes mennyiségéből az aspecifikusan kötött ligand mennyiségének levonásával kiszámítható a specifikus, receptor–ligand kölcsönhatást jelző ligandkötés.

A specifikus kötés görbéjéből bizonyos feltételek mellett hozzávetőlegesen megbecsülhető a K_d értéke: az a szabadligand-koncentráció, amelynél a specifikus kötőhelyek 50%-a ligandot köt (5-1. ábra).

A K_d pontosabb meghatározása Scatchard-analízissel történhet. Ehhez számításba kell venni, hogy egyensúlyi helyzetben az összes receptor kötőhelyek száma (R_t) egyenlő a liganddal kötésben levő (RL) és a szabadon lévő (R) kötőhelyek számával:

$$R_t = RL + R$$

$$R = R_t - RL$$

Ha figyelembe vesszük a kötésben lévő és a szabadon maradt receptor kötőhelyek számát az (1) egyenlet felírásához:

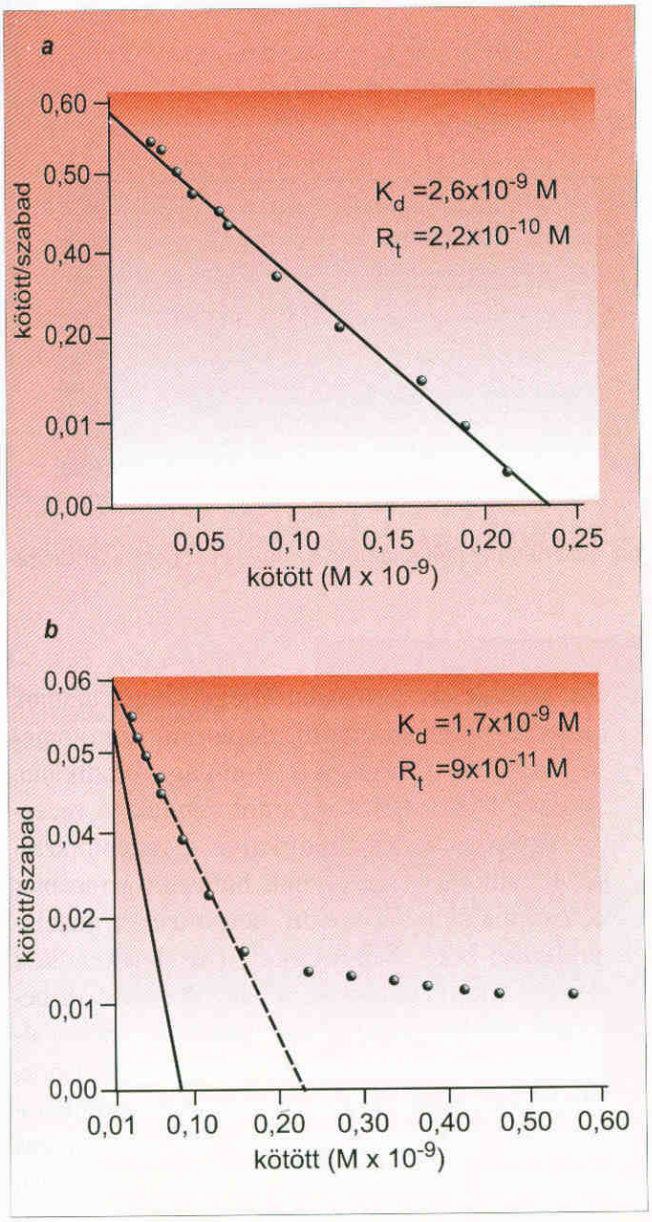
$$K_a = \frac{[RL]}{[L] \cdot ([R_t] - [RL])} \qquad (3)$$

$$\frac{[RL]}{[L]} = K_a ([R_t] - [RL]) = \frac{1}{K_d} ([R_t] - [RL])$$

átrendezve:

$$\frac{[RL]}{[L]} = -\frac{1}{K_d} [RL] + \frac{1}{K_d} [R_t] \qquad (4)$$

A Scatchard-görbe meghatározásához a kötött ligand és szabad ligand koncentrációjának hányadosát $\left(\frac{[RL]}{[L]}\right)$ ábrázolják a kötöttligand-koncentráció függvényében. (A kötött ligand koncentrációja azonos a kötésben lévő receptor koncentrációjával [RL]). A K_d értéke az egyenes meredekségéből számítható. A görbe metszéspontja az abszcisszán az összes kötőhelyek számát (R_t) jelöli ki *(5-2a ábra)*. A Scatchard-görbe egy komponensű, ha a ligand egyfajta kötőhelyhez kapcsolódik (5-2a ábra). Több fajta kötőhely esetén a Schatchard-görbe több komponensű, amikor a számítás egy kicsit bonyolultabb. A görbe meredek szára megtörik és egy másik szakasz különíthető el, amely a kis affinitású (nagyobb disszociációs konstansú) kötőhelyeket jelzi. A meredek szakasz meghosszabbítása kijelöl az abszcisszán egy R_t-értéket, amely azonban pontatlan, mert ez a görbe a nagy affinitású kötőhelyek mellett a kis affinitású kötőhelyeket is reprezentálja. A nagy affinitású kötőhelyek K_d-értékének pontos meghatározása a kis affinitású kötés értékeinek levonása után lehetséges, mert ez jelöli ki a specifikus, nagy affinitású kötés görbéjét *(5-2b ábra)*.



5-2. ábra. Egy (a) és két (b) komponensű Scatchard görbe. *Szaggatott vonal: K_d=2,6·10^{-9} M; R_t=2,2·10^{-10} M – kis affinitású kötőhelyek korrekciója nélkül*

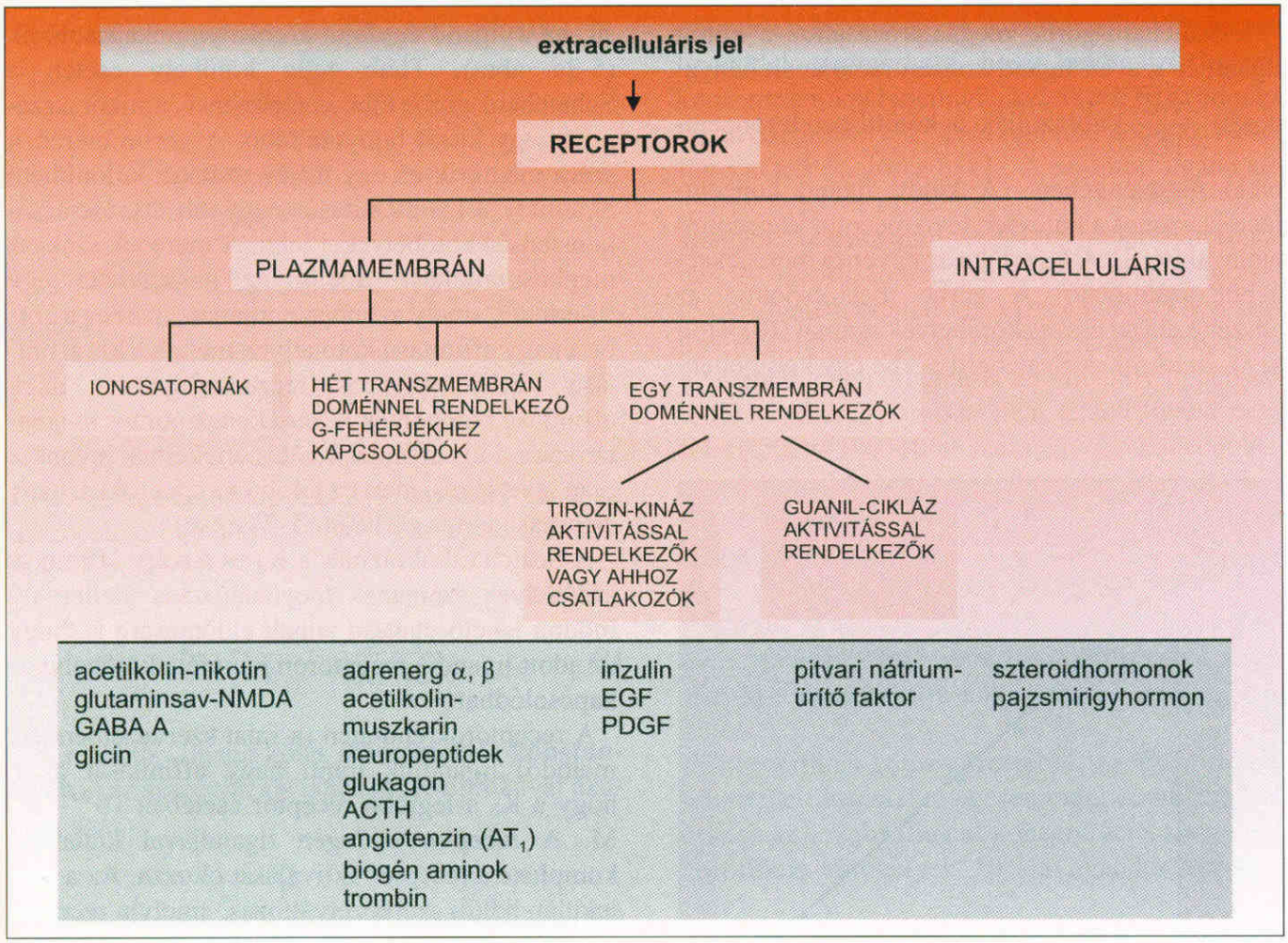
A Scatchard-ábrázolás a K_d és a nagy affinitású kötőhelyek számának meghatározása mellett ily módon lehetőséget ad annak eldöntésére is, hogy az adott ligand a receptoron hányféle kötőhelyhez kapcsolódhat.

A receptorok endogén (a saját szervezetben termelődő) ligandjuk iránti nagy affinitását jelzi, hogy a K_d a legtöbb receptor esetében 10^{-11}–10^{-9} M. A receptor endogén ligandjával kialakuló komplexe a receptor aktiválását okozza. Az a molekulán belüli szerkezetváltozás, amely a receptor aktiválás mechanizmusát jelenti, még nem tisztázott, sokkal inkább ismertek az aktiválást követő molekuláris következmények.

A plazmamembrán-receptorok felosztása és tulajdonságai

A receptorok lokalizációja alapján elkülönítjük a plazmamembránban és az intracellulárisan található receptorok két csoportját, amelyeket külön alfejezetekben tárgyalunk.

A **plazmamembrán-receptorok** közös jellemzője, hogy integráns membránfehérjék, általában glikoproteinek, amelyek egy vagy több transzmembránszakasszal rendelkeznek. A receptort egy (monomer) vagy több (polimer) – azonos vagy különböző – alegység alkothatja. A plazmamembrán-receptorok a receptor fehérjeszerkezete és a szignál transzdukciós mechanizmusok alapján néhány csoportba sorolhatók. A legjobban ismert receptorcsoportokat az *5-3. ábra* mutatja.



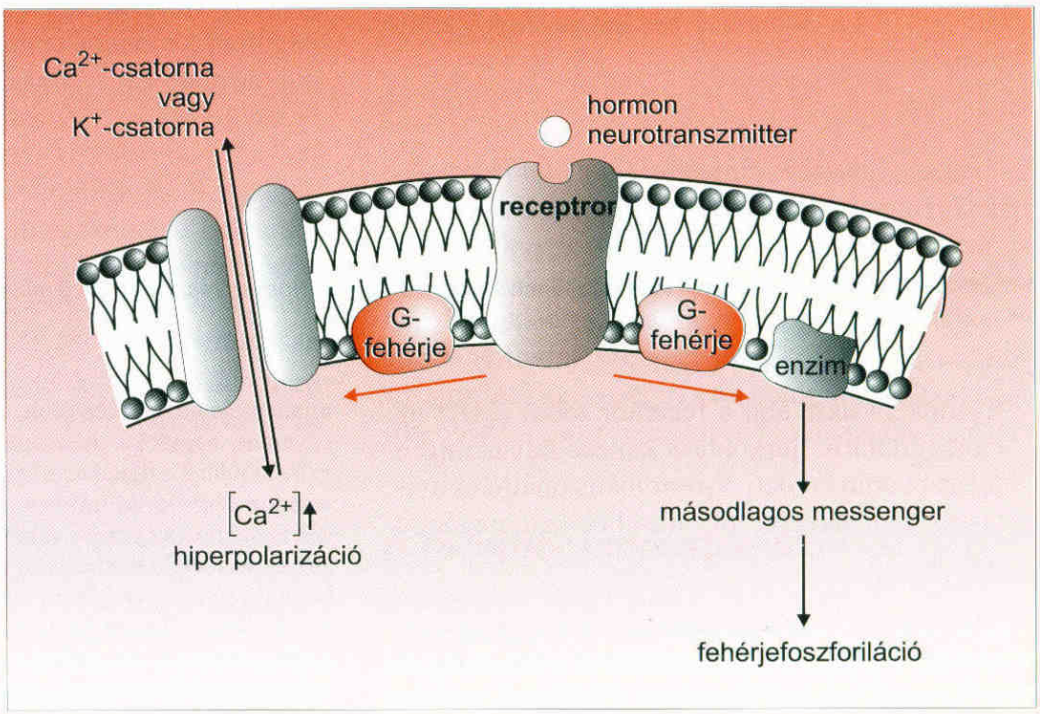
5-3. ábra. Az extracelluláris szignál receptorok felosztása. A vonal alatt néhány példa látható az egyes csoportba tartozó receptorokról

❶ **Receptor ioncsatornák.** A receptort alkotó alegységek több transzmembránszakasszal rendelkeznek és a membránban egy pórus vagy csatorna körül rendeződnek, amely a receptor–ligand kötés hatására átjárhatóvá válik. A csatornák anionok vagy kationok számára permeábilisak, az extracelluláris jeleket ezen receptorokon keresztül ionok közvetítik a sejt belső környezetéhez. Ilyen pl. az acetilkolin nikotinreceptora, a glutaminsav NMDA-receptora, a $GABA_A$-receptor és a glicin receptora, amelyekről részletesebben is szólunk.

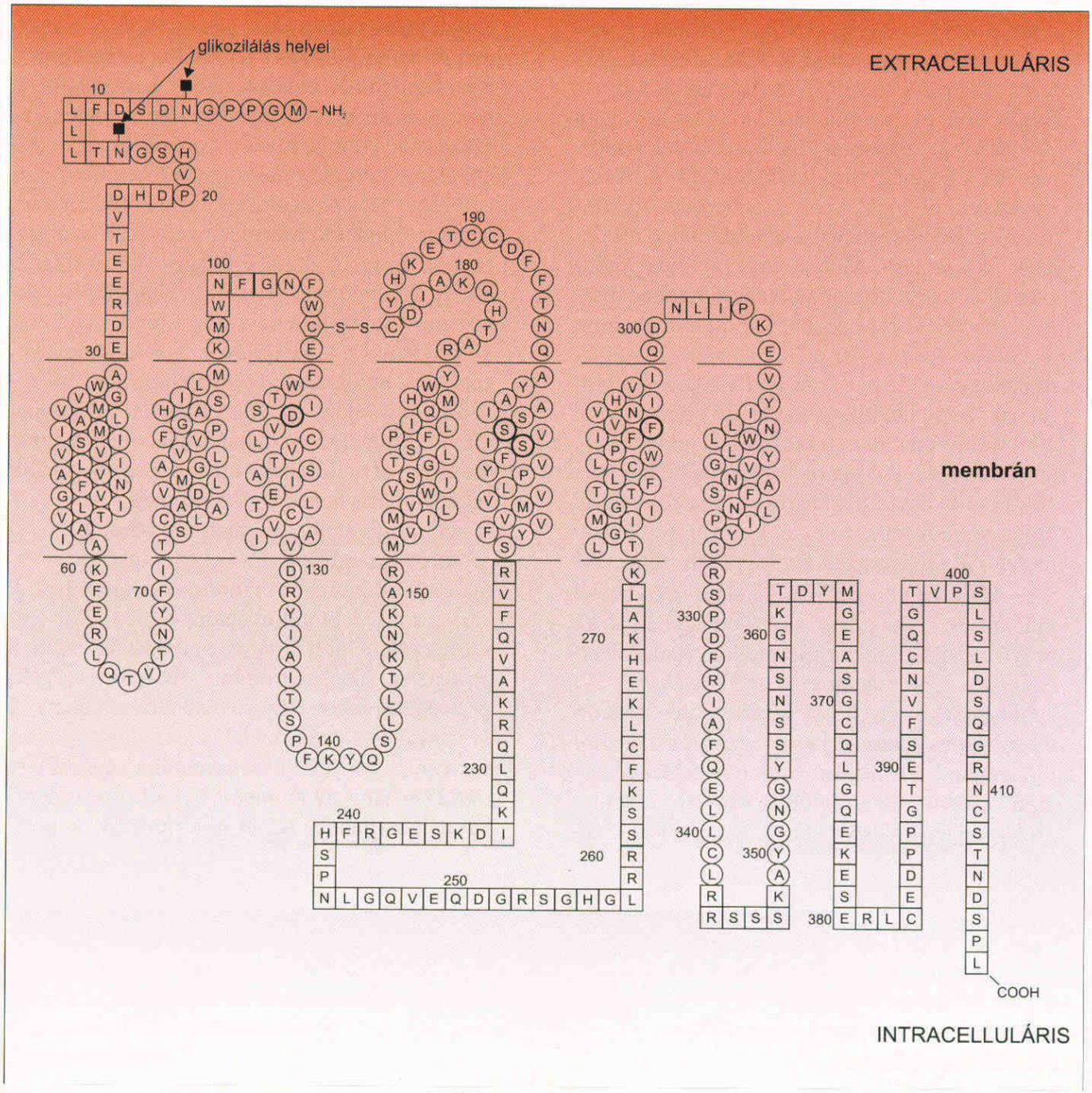
❷ A receptorok egy csoportja hét transzmembrándoménnel rendelkező, egymásra nagymértékben hasonló fehérjékből áll. Ezekről a receptorokról a jelzést **heterotrimer GTP-kötő fehérjék** közvetítik a sejt számára. A receptorokat aktiváló ligandok eltérő szerkezetű molekulák, köztük kis molekulatömegű biogén aminok (adrenalin, noradrenalin, dopamin, szerotonin) és peptidek (glukagon, P-anyag, bradikinin, luteinizáló hormon) egyaránt vannak. A receptor–agonista kötés eredménye a receptorszerkezet változása, amelynek hatására a receptor kölcsönhatásba lép az ún. heterotrimer guaninnukleotid-kötő fehérjékkel (részleteket lásd alább), amelyek aktiválódnak. Az aktivált heterotrimer G-fehérje disszociál és bizonyos alegysége kapcsolódik egy effektor molekulához, általában egy enzimhez, amelynek az a funkciója, hogy egy vagy többféle ún. másodlagos messenger (intracelluláris mediátor) molekulát szintetizál. A G-fehérjékkel történő kölcsönhatás következtében az enzimek általában aktiválódnak, de előfordul, hogy gátlás jön létre. A legáltalánosabban ismert effektor enzimek az

adenilát-cikláz és a foszfolipáz C, illetve a retinapálcikákban egy ciklikus GMP-foszfodiészteráz. Kapcsolódhat a G-fehérje ioncsatornákhoz is, mint pl. bizonyos Ca^{2+}-csatornák vagy a K^+-csatorna, amelynek következtében a csatornák aktiválódnak vagy gátlódnak *(5-4. ábra)*. Ezeknek a folyamatoknak a részleteiről és funkcionális jelentőségükről a későbbiekben részletesen is szó lesz. Molekuláris biológiai módszerekkel nagyobb számú receptort azonosítottak, amelyek G-fehérjékhez kapcsolódnak, mint ahányhoz – jelen ismereteink szerint – biológiai funkció rendelhető. Közös jellemzője a receptoroknak, hogy hét hidrofób, 20–25 aminosavból álló, transzmembránszakasszal rendelkeznek, amelyeket extracelluláris és intracelluláris hurkok kötnek össze. Az egyes receptorok között mind a hidrofób, mind a hidrofil régiókban nagyfokú szekvenciahomológia áll fenn. Az *5-5. ábra* az adrenerg β-receptor szerkezetét mutatja, amelynek megismerése nagyban járult hozzá a G-fehérjéhez kapcsolódó receptorok általános sajátosságainak tisztázásához. Az agonisták és a receptorok közötti kötés létrejöttében fontos szerepet játszik a 3. transzmembrándomén. A biogén aminok esetében az aminocsoport, az e régióban található aszparaginsavval lép kölcsönhatásra. Az agonista kötőhely kialakításában részt vesz az 5. és 6. transzmembránrégió is. A G-fehérjékkel a receptor a citoplazmatikus oldalon létesít kapcsolatot, a kölcsönhatás kialakításában a transz-membránszakaszok citoplazmatikus oldala és az intracelluláris hurkok transzmembránrégióhoz közeli része vesz részt. Az agonista kötődése a receptoron olyan konformációváltozást idéz elő, ami az intracelluláris G-fehérje kötőhelyet – amely a receptor ún. nyugalmi állapotában rejtve van – hozzáférhetővé teszi, és létrejöhet a kölcsönhatás a G-fehérjével. A G-fehérje a receptort is befolyásolja, ami a kölcsönhatást követően egy ideig ún. kis affinitású állapotban marad. Mutációs vizsgálatok igazolták, hogy a receptor affinitásának állapotát a harmadik intracelluláris hurok határozza meg.

A hét transzmembrán szakasszal rendelkező receptorok ligand hatására bekövetkező aktivációja ettől eltérő mechanizmussal is történhet. A változatos receptoraktiváción belül is külön említést érdemelnek sajátos működésük miatt a proteázok, pl. a trombin receptora (PAR; **p**roteáz**a**ktivált **r**eceptoroknak nevezik őket). A proteázaktivitással rendelkező ligandok a receptor extracelluláris N-terminális végéről egy rövid (néhány tíz aminosavból álló) peptidszakaszt lehasítanak. Az új N-terminális „rejtett"



5-4. ábra. A G-fehérjéhez kapcsolódó receptorok hatásának általános sémája



5-5. ábra. A β-**adrenerg receptor szerkezetének vázlata.** *A ligandkötésben részt nem vevő aminosavakat négyszögekkel jelöltük*

ligandként aktiválja a receptor többi részét az extracelluláris hurkokhoz kapcsolódva, míg a felszabaduló eredeti N-terminális önálló aktivitással rendelkezik, pl. trombocitaaggregációt tud okozni.

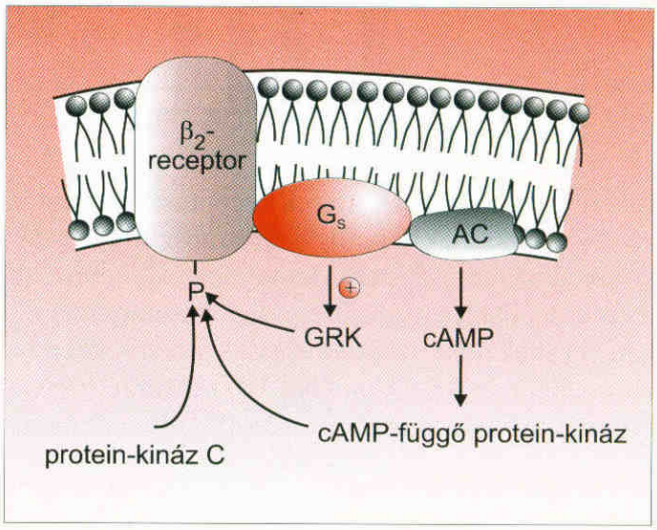
A fentiekben ismertetett alapséma rendkívül nagyszámú és változékony sejtfunkció-változásnak lehet a hátterében. A változékonyságot az biztosítja, hogy a jelátviteli rendszer minden eleme, a receptorok, a G-fehérjék és az effektorok egyaránt nagyfokú heterogenitást mutatnak. Egy adott extracelluláris szignál érzékelésére a szervezetben többféle receptor létezhet és ugyanazon receptor, esetleg egy adott sejten belül is, egyszerre többféle szignál transzdukciós mechanizmust működtethet. További heterogenitást okozhat az, hogy ugyanazon G-fehérje többféle effektorhoz kapcsolódhat. Jó példa a heterogenitásra, hogy a szervezetben a szimpatikus hormon (adrenalin) és neurotranszmitter (noradrenalin) megkötésére eltérő struktúrájú és farmakológiai sajá-

tosságú receptorok találhatók (α_1, α_2, β_1–β_4), amelyek különböző G-fehérjékhez kapcsolódnak, az α_2-receptorok adott sejten belül esetleg többféle G-fehérjéhez is. A β-receptorokhoz kapcsolódó G_s-fehérje pedig a membránban többféle effektorral is kölcsönhatásra léphet. Ez a heterogenitás sokféle, az egyes szervekre, sejtekre specifikus válaszreakciók kialakulását eredményezi. (Előfordul, hogy az irodalomban egyes G-fehérjével működő receptorokat metabotrop receptornak hívnak, megkülönböztetendő az ionotrop – ioncsatorna – receptoroktól.)

❸ A receptorok harmadik csoportjának szerkezetére jellemző, hogy a receptorfehérje minimálisan érintkezik a lipidmembránnal. A receptorokat egy vagy több alegység alkotja, de alegységenként legfeljebb egy transzmembránrégióval rendelkeznek. (Ismert olyan receptor is ebben a csoportban, amelyet glikozil-foszfatidilinozitol horgonyoz a membránhoz.) A receptor aktiválása nyomán – az eltérő azonnali hatások mellett – hosszú távú, a sejtmagból kiinduló sejtválaszok is létrejönnek. Az ide tartozó receptorok között sok olyan van, amelynek ligandkötő alegysége protein-tirozin-kináz aktivitással rendelkezik. Ide tartoznak pl. az inzulin, a növekedési faktorok és neurotrof hormonok receptorai. A receptorszerkezet szempontjából ide tartozik a guanilát-cikláz aktivitású pitvari nátriumürítő peptidreceptor is.

A legtöbb receptor működésekor a stimulációt követően olyan fázis következik, amikor egy ideig a stimulus folyamatos megléte ellenére a biológiai válasz hatékonysága csökken, a receptorok ún. deszenzitizációja alakul ki. Az „érzéketlenség" akut komponense, ami perceken (esetleg másodperceken) belül kialakul reverzíbilis és megszűnik a deszenzitizáló stimulus megszűntével. Lassabban, órákon belül alakul ki az ún. down-reguláció, amikor a receptorok száma csökken. Ezek a jelenségek nagymértékben befolyásolják a terápiásan alkalmazott receptor ligandok (pl. β-adrenerg agonisták) hatékonyságát és az alkalmazhatóság időtartamát.

A folyamatok pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert, de az biztosnak látszik, hogy mind a deszenzitizáció, mind a down-reguláció kialakulásában fehérjék foszforilációja fontos szerepet játszik. A β_2-adrenerg receptor – amelynek aktiválása cAMP szint emelkedést és protein-kináz A aktiválást okoz - szubsztrátja is a protein-kináz A-nak. A receptor foszforilációja a receptor és a G-fehérje szétkapcsolását, s így a receptorstimuláció hatásának csökkenését okozza, ami egy akut, negatív feedback regulációnak tekinthető. Természetesen, a cAMP-szint emelkedése és a β-receptor foszforilációja létrejöhet minden olyan stimulus hatására, amely az adott sejtben a cAMP-szintet emeli. A deszenzitizációnak azt a formáját, amely egy receptoron más receptorok aktiválásának hatására alakul ki heterológ deszenzitizációnak hívjuk, szemben a saját receptor izgalom következtében kialakuló homológ deszenzitizációval. A receptorok foszforilációjában a protein-kináz A mellett a protein kináz C és egy külön kináz család, a G-fehérjéhez kapcsolódó receptor-kinázok (GRK) is részt vesznek. Ezek is szerin- vagy treonincsoportokat foszforilálnak az aktivált receptor karboxi-terminális régiójában *(5-6. ábra)*.

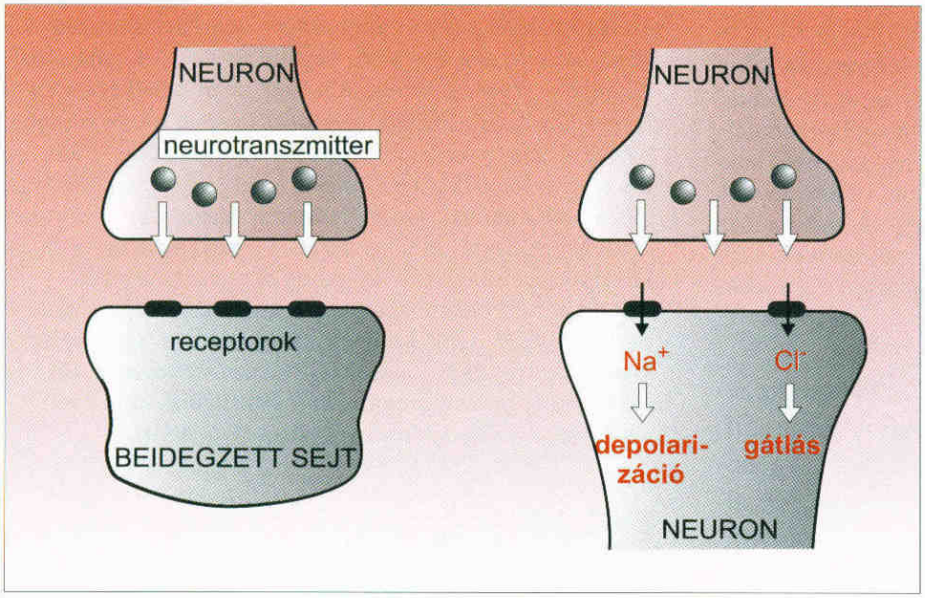


5-6. ábra. A β_2-receptor foszforilációja (deszenzitizációja). *G_s, adenilát-ciklázt stimuláló G fehérje; AC, adenilát-cikláz; GRK, G-fehérjéhez kapcsolt receptor-kinázok*

A receptorszám-csökkenés lassúbb folyamat, amiben szerepe lehet a receptorok megnövekedett proteolitikus lebomlásának és csökkent receptorszintézisnek egyaránt. A cAMP-függő protein-kináz – legalábbis bizonyos receptorok esetében – ebben is fontos szerepet játszik, mivel a receptor foszforilációja elősegíti a receptor internalizációját (melynek során a receptor a citoplazmába kerül).

A receptor ioncsatornák

A receptor ioncsatornák néhány alegységből álló integráns membránfehérjék, amelyben az alegységek ionpermeábilis csatornát hoznak létre. Ezek a



5-7. ábra. A receptor ioncsatornák lokalizációja és a kiváltott sejtválasz

fehérjék neurotranszmitterek receptorai és fontos szerepet játszanak számos neurotranszmitter hatásának közvetítésében. Megtalálhatók neuronok membránjában, s így az ideg-idegi kommunikációban vesznek részt, de jelen vannak a szervekben is, ahol a beidegző neuronokból felszabaduló transzmitterek hatását közvetítik. Attól függően, hogy a receptor aktiválása milyen ion áthaladását teszi lehetővé, depolarizációt, azaz stimulációt, vagy ellenkezőleg, gátlást okozhatnak. Azok a csatornák, amelyek átmenetileg Na^+-t engednek át az elektrokémiai grádiens irányába, a sejteket depolarizálják, amelyek Cl^--ra permeábilisak, a depolarizáció gátlását hozzák létre *(5-7. ábra)*. Mind a stimuláció, mind a gátlás gyors; szemben a G-fehérjével működő receptorokkal, amelyek hatása másodperceket vesz igénybe, a receptor ioncsatornák hatására a membránpotenciál-változás ms-okon belül létrejön. A nyitott csatornákon keresztül az ionáthaladás 10^7 ion/s sebességet is elérhet, ami magyarázza a gyors és hatékony receptorműködést. Ide tartozik az acetilkolin nikotin-receptora, a γ-aminovajsav (GABA) A típusú receptora, a glicin, a glutaminsav NMDA (N-metil-D-aszpartát), a szerotonin 5-HT_3 receptora és a P_2 purinerg receptorok egy csoportja. Az *5-1. táblázat* a receptor ioncsatornák néhány fontos tulajdonságát foglalja össze.

5-1. táblázat. A legfontosabb receptor ioncsatornák tulajdonságai

Receptor	Ionszelektivitás	Agonista	Antagonista
nikotin	$Na^+ > K^+ > Ca^{2+}$	acetilkolin, nikotin	d-tubokurarin
$GABA_A$	Cl^-, HCO_3^-	GABA	bicucullin
glicin	Cl^-, HCO_3^-	glicin	sztrichnin
NMDA	Na^+, K^+, Ca^{2+}	glutaminsav-glicin, N-metil-D-aszpartát	D-(-)2-amino-5-foszfono-valerát
nem NMDA	Na^+, K^+, (Ca^{2+})	AMPA, kainát	6-ciano-7-nitro- kvinoxalin-2,3-dione
5-HT_3	Na^+, K^+	szerotonin	
P_{2x}	Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+}	ATP	szuramin

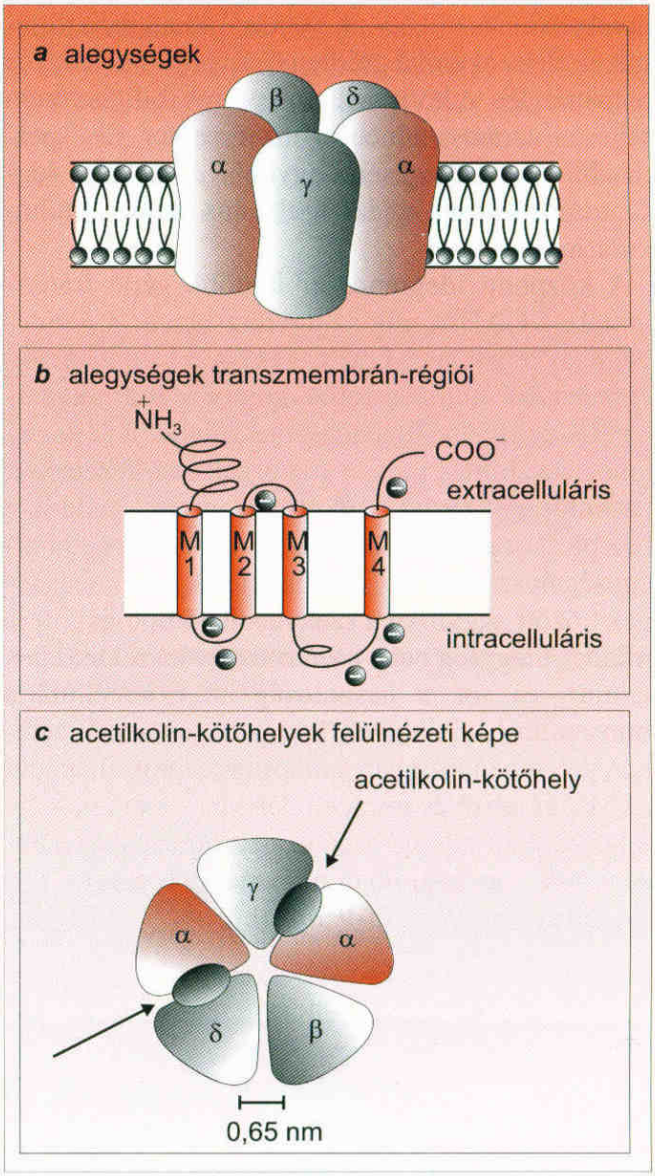
Előfordul, hogy az egyes receptorokon belül az alcsoportok megkülönböztetése valamilyen szintetikus vagy természetes (de nem endogén) agonista iránti szelektivitás alapján történik. Ilyen pl. a glutaminsav NMDA, az acetilkolin muszkarin- vagy nikotinreceptora, amelyekről később még szó lesz.

Jelen felosztásban az extracelluláris ligandok receptorait tárgyaljuk, de meg kell említeni, hogy receptor ioncsatornának tekinthetők azok a csatornák is, amelyeken intracelluláris mediátorok kötődnek és okoznak ionpermeabilitás növekedést. Ilyen pl. az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) receptora az endoplazmás retikulumban vagy a szarkoplazmás retikulumban a Ca^{2+} által indukált Ca^{2+}-felszabadulást közvetítő receptor. Ezekről más helyen szólunk (475. oldal).

Az ioncsatornák közül legtöbbet az **acetilkolin nikotinreceptoráról** tudunk, amelyet elsőként sikerült megtisztítani, a molekuláris biológia módszereivel vizsgálni és működéséről modellt felállítani. Későbbi vizsgálatok igazolták, hogy a többi receptor ioncsatorna szerkezete a nikotinreceptoréhoz nagyon hasonló. A nikotinreceptornak lokalizációja és szerkezete alapján két altípusa különíthető el, az izom és a neuron típusú receptor. A harántcsíkolt izomban a receptor egy 280 kDa molekulatömegű, öt alegységből álló fehérje (pentamer), amelyben az egyik alegység két példányban található ($\alpha_2\beta\gamma\delta$). (A neuronális nikotinreceptor ettől eltérő szerkezetű, α- és β-alegységekből áll.) Az alegységek egy csatorna köré rendeződnek, amely a receptor nyugalmi helyzetében nem átjárható. Az alegységek mindegyike 4 transzmembránszakasszal rendelkezik *(5-8. ábra)*. Ez a membránon belüli orientáció jellemző a többi receptor ioncsatorna alegységeire is. Az acetilkolin kötőhelyek, minden receptoron kettő, az α–γ és az α–δ alegységek egymással érintkező felszínén találhatók. Ide kötődnek a többi agonisták és a kompetitív antagonisták egyaránt.

A szignál transzdukciókban részt vevő receptorok (és G-fehérjék) különleges tulajdonsága, hogy gyakran nagy affinitással kötnek természetben előforduló toxinokat. A nikotinreceptor a kígyó egyik toxinját az α-bungarotoxint köti, s ezt jól ki lehetett használni a receptor tisztításában.

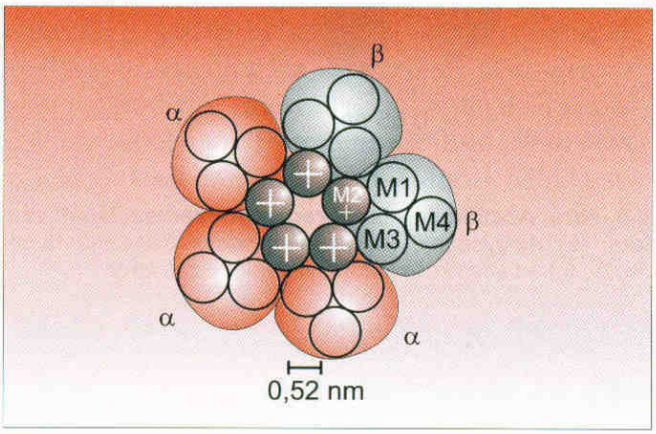
Minden, a nikotinreceptorhoz specifikusan kötődő ligand pozitív töltésű kvaterner ammóniumcsoportot tartalmaz. A receptor–ligand kötés kialakításában tirozin és triptofán, valamint aszparaginsav és glutaminsav oldalláncok játszanak szerepet. Az acetilkolin kötődése megváltoztatja a kötőhely szerkezetét és ez az alegységek elmozdulását okozva kinyitja a csatorna „kapuját", ami a receptor citoplazmatikus részén található. A csatorna alkotásában az alegységek M_2 transzmembránszakasza vesz részt. Nyitott állapotban a kationokra permeábilis csatorna átmérője 0,65 nm, s ez meghatározza, hogy melyek azok a kationok, amelyek a csatornán áthaladhatnak. A nikotinreceptort nem szelektív kationcsatornának lehet tekinteni,



5-8. ábra. Acetilkolin nikotinreceptor-szerkezetének vázlata. (a) *Alegységek,* **(b)** *az alegységek transzmembrán-régiói,* **(c)** *az acetilkolin kötőhelyek felülnézeti képe*

amelyen keresztül Na^+, K^+ és Ca^{2+} áthaladása történik az elektrokémiai grádiens irányába. Az izom és a neuronális nikotinreceptor permeabilitása nem teljesen azonos; a neuronális receptor Ca^{2+}-permeabilitása lényegesen nagyobb. A receptor legfontosabb gátlója az izomrelaxáns hatású d-tubokurarin.

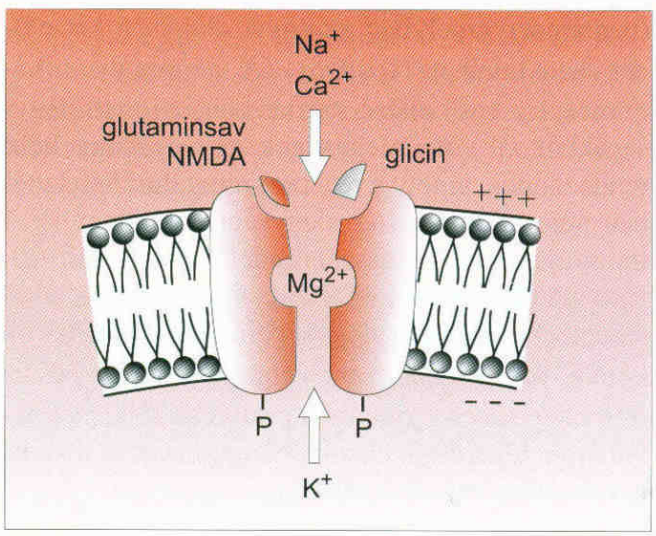
A központi idegrendszer legfőbb gátló transzmittere a GABA, míg az agytörzsben és a gerincvelőben a glicin. Mind a **$GABA_A$-**, mind a **glicinreceptor** anioncsatorna, amely nyitott állapotban Cl^- és HCO_3^- áthaladását teszi lehetővé. Bár az ionpermeabilitás más, a csatornák szerkezete sok hasonlóságot mutat a nikotinreceptorral. Mindkét receptort öt alegység alkotja ($GABA_A$-receptor alegységek számos izoformája létezik). Az alegységek között nagyfokú a szekvenciahomológia, itt is minden alegység négy transzmembránszakaszt tartalmaz, és sok a hasonlóság az extracelluláris transzmitter kötőhelyek harmadlagos szerkezetében. Szemben azonban a nikotinreceptorral, amely az M_2 régióban és intracellulárisan inkább negatív töltéseket tartalmaz, a gátló neurotranszmitter receptorok ezen régióiban nagymértékű pozitív töltés túlsúly található *(5-9. ábra)*.



5-9. ábra. A glicinreceptor transzmembránrégióinak modellje

A glicinreceptor gátlója a sztrichnin, amely nagy mennyiségben a központi idegrendszeri gátló folyamatok felfüggesztése révén a motoros rendszer izgalmát váltja ki, ami izomgörcsök kialakulásához vezet.

Külön említést érdemelnek az **L-glutaminsav** neurotranszmitter **receptorai**, mivel a glutaminsav a legfontosabb excitátoros neurotranszmitter a központi idegrendszerben. Több fajta receptora ismert, melyek közül néhány a receptor ioncsatornák családjába tartozik. Szelektív agonisták és antagonisták alapján az ún. ionotrop glutaminsav receptorokon belül elkülöníthető az NMDA (N-metil-D-aszpartát), az AMPA- (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav) és a kainát- (hatékony neurotoxin) receptor. Legtöbbet vizsgált és legjobban ismert az NMDA-receptor, amelynek szerepet tulajdonítanak a neuronális plaszticitás – a tanulás és emlékezés – folyamataiban és a glutaminsav neurotoxikus hatásának közvetítésében. Az NMDA-receptor, hasonlóan a többi receptor ioncsatornához, alegységekből épül fel, amelyek négy transzmembránrégiót tartalmaznak, azonban a receptor számos tulajdonsága egyedülálló az ioncsatornákon belül. A receptorműködés fontos eleme a csatorna Ca^{2+}-permeabilitása, mert a Ca^{2+}-beáramlás tehető felelőssé az említett receptorhatásokért. Az eddig ismert receptor ioncsatornák közül az NMDA-receptor relatív (a többi ionhoz viszonyított) Ca^{2+}-permeabilitása a legnagyobb. A receptor alegységek a glutaminsav mellett glicint is kötnek, a kettő együttes jelenléte szükséges a receptor aktiválásához. Sajátos tulajdonsága a receptornak, hogy működését nemcsak



5-10. ábra. Az NMDA-receptor modellje

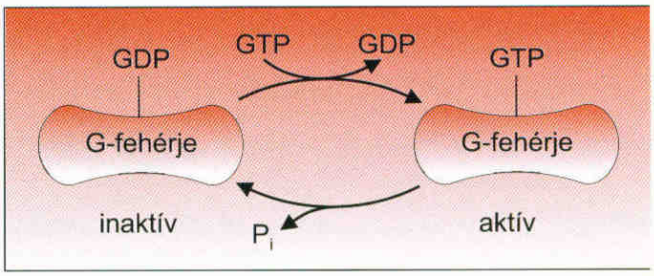
ligandok, hanem a membrán- potenciál is befolyásolja. A nyugalmi, negatív membránpotenciálnál a Mg^{2+} blokkolja a csatornát és gátolja a transzmitter okozta ionpermeabilitás-növekedést. A preszinaptikusan felszabaduló glutaminsav csak akkor okoz jelentős ion- áramlást a csatornán keresztül, ha a posztszinaptikus sejt megfelelő mértékben depolarizált ahhoz, hogy a Mg^{2+} gátló hatása megszűnjön. Az is jellemző tulajdonsága az NMDA-receptornak, hogy a 3. és 4. transzmembránrégió közötti intracelluláris szakaszon olyan konszenzus helyek vannak, ahol a Ca^{2+}-kalmodulin dependens protein-kináz és a protein-kináz C a csatornát foszforilálhatja és ezáltal a működését szabályozhatja. Az NMDA-receptor modelljét a *5-10. ábra* mutatja.

Heterotrimer GTP-kötő fehérjék (G-fehérjék) részvétele a receptorhatások közvetítésében

A GTP-kötő fehérjéknek nagy szerepe van az extracelluláris szignálok továbbításában. A GTP-kötő fehérjék családjába számos fehérje tartozik – a transzlációs faktorok, a ras protoonkogén terméke ($p21^{ras}$ fehérje), az egyéb kis molekulatömegű GTP-kötő fehérjék (rab, rap, rho, rac, ARF stb. gének termékei), a tubulinok és a heterotrimer GTP-kötő fehérjék –, amelyek közül ez utóbbiak játszanak fontos szerepet a hét transzmembrándoménnel rendelkező plazmamembrán-receptorok hatásának közvetítésében.

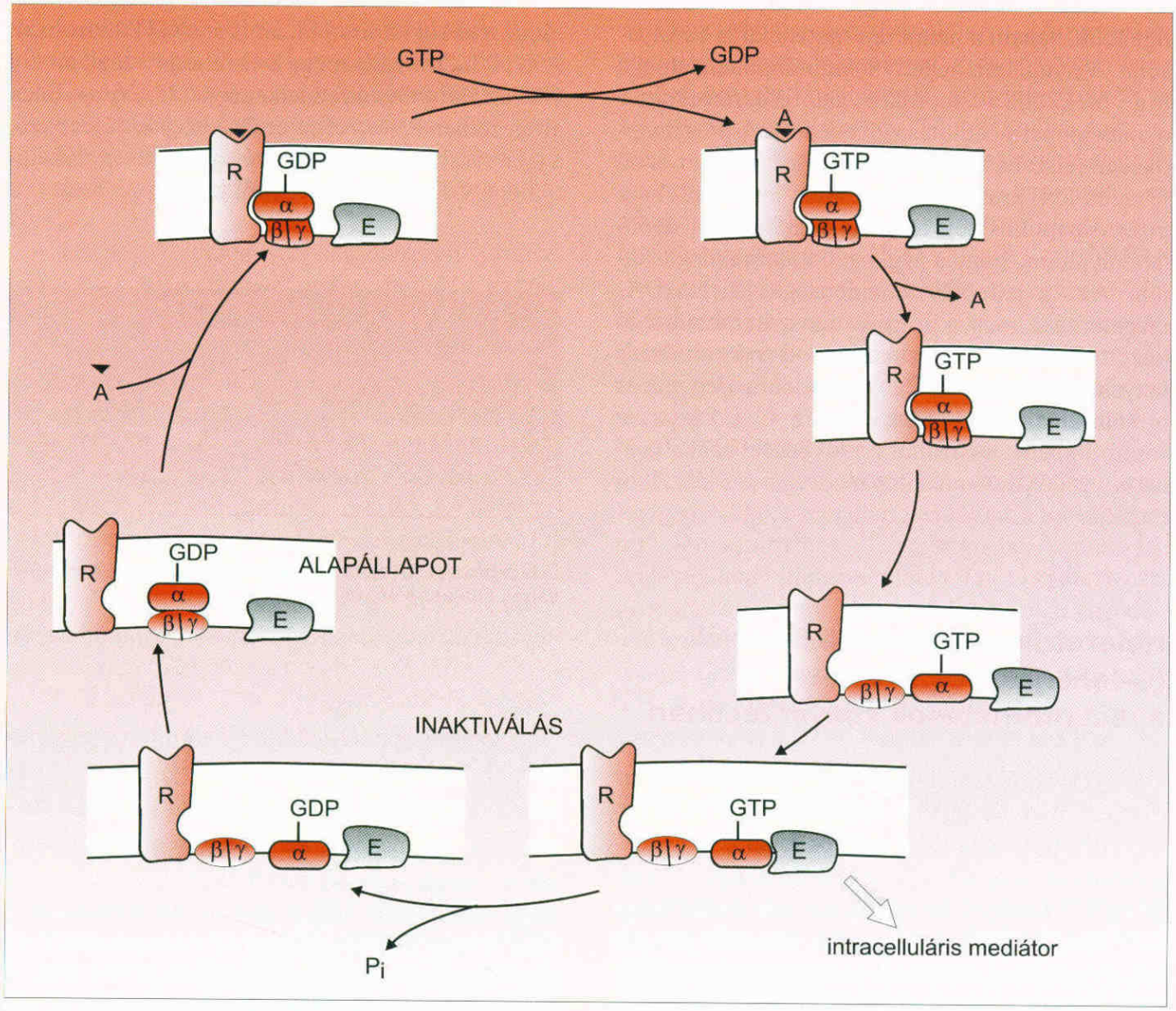
A **heterotrimer GTP-kötő fehérjék** (ezeket röviden G-fehérjéknek hívják) három különböző alegységből állnak. A G-fehérjék jelátalakítóként (transducer) is felfoghatók, amelyek közvetítik a receptoraktiváció hatását egy effektor molekulához. Nagyszámú kémia ingerület – hormonok, neurotranszmitterek – ily módon befolyásolja a sejtműködést, de ide tartoznak a látás és a szaglás folyamatában meghatározó receptorok is.

A heterotrimer G-fehérjék közös jellemzője, hogy GTP-t kötnek, ami aktiválja a G-fehérjét, beindítja a jel közvetítést, majd a GTP GDP-vé történő hidrolízise leállítja a működést. Egy olyan molekuláris „kapcsolóról" van tehát szó, ami akkor kapcsol be, amikor a GDP ismét GTP-re cserélődik, s akkor kapcsol ki, amikor a GTP hidrolizál. A GTP hidrolízisét maga a G-fehérje végzi, amely GTPáz aktivitással rendelkezik *(5-11. ábra)*. Jelen alfejezetben a heterotrimer G-fehérjékről lesz szó, a jelátvitelben szerepet játszó egyéb, kis molekulatömegű GTP-kötő fehérjékről később szólunk.



5-11. ábra. A GTP-kötő fehérjék aktiválásának–inaktiválásának általános sémája

A heterotrimer G-fehérjék három alegysége az α- (39–51 kDa), a β- (35–36 kDa) és a γ- (7–10 kDa) alegység. A β- és γ-alegység szorosan kapcsolódik egymáshoz, az α-alegység kötődése lazább, s képes a βγ-ról disszociálni. Az α-alegység nagy affinitással köti a guanin nukleotidokat, a GDP-t vagy a GTP-t, a jelátvitel szempontjából aktív állapotban akkor van, amikor GTP-t köt. A G-fehérjék aktiválódását a receptor indítja el, akkor amikor az extracelluláris agonista kötődik a receptorhoz. A receptor–ligand komplex szerkezetváltozása a G-fehérje α-alegységhez kötődött GDP disszociációját és GTP-re történő kicserélődését okozza. A GTP-t kötő α-alegység (α-GTP) disszociál a βγ-alegységről és kölcsönhatásba lép az effektorral (adenilát-cikláz, foszfolipáz C stb.), amelynek működését módosítja, s ez intracelluláris mediátorok szintjének változását eredményezi a sejten belül. Az α-alegység, amely egyszersmind enzim is, GTPáz aktivitása révén a GTP-t hidrolizálja, ezzel aktív állapota megszűnik. A keletkező α-GDP disszociál az effektorról, ismét kötődik a βγ-alegységhez, létrejön az inaktív GDP–αβγ komplex, amely ismét kölcsönhatásba léphet a receptorral és újra kész a jelátvitel közvetítésére *(5-12. ábra)*.



5-12. ábra. A G-fehérjék működése a jelátvitel során. *R, receptor; A, agonista; E, effektor*

A G-fehérjék csoportosítása az α-alegységek szekvencia hasonlósága alapján történik. Eszerint a ma ismert, mintegy 20 α-alegység (amelyek legalább kilenc gén és alternatív splicing termékei) 4 nagyobb csoportba sorolható, a G_s-, G_i-, G_q- és a G_{12}-fehérjék családjába. Ezekről ad áttekintést az *5-2. táblázat.*

Legjobban ismert a **G_s**-fehérje-család, amely nagyszámú hormon- és neurotranszmitter, valamint a szaglás receptorához kapcsolódik, és nevét onnan kapta, hogy az adenilát-ciklázt stimulálja **(s)**, s így a cAMP-szintézist fokozza. Az adenilát-ciklázoknak öt izoformája ismert, amelyek mindegyikét aktiválja a G_s-fehérje. A $G_{s\alpha}$ aktiválja még a dihidropiridin-érzékeny (L típusú) feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat is.

Ettől eltérő szerkezetük és funkciójuk van a **G_q**-fehérje-családba tartozó fehérjéknek, melyek csaknem minden szövetben megtalálhatók. A G_q-fehérjék a sejtmembránban a foszfolipáz C enzimet aktiválják, ami a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot inozitol-1,4,5-triszfoszfátra (IP_3) és diglicéridre hidrolizálja (lásd 475. oldal). A receptor és a foszfolipáz C között a G_q-családba tartozó G-fehérjék létesítenek kapcsolatot.

Eltérő tulajdonságú fehérjék tartoznak a **G_i**-fehérje-családba, amelyek közös jellemzője, hogy pertussistoxin iránt érzékenyek. Legjobban azok a

5-2. táblázat. A legfontosabb G-fehérjék α-alegységeinek csoportosítása és tulajdonságai

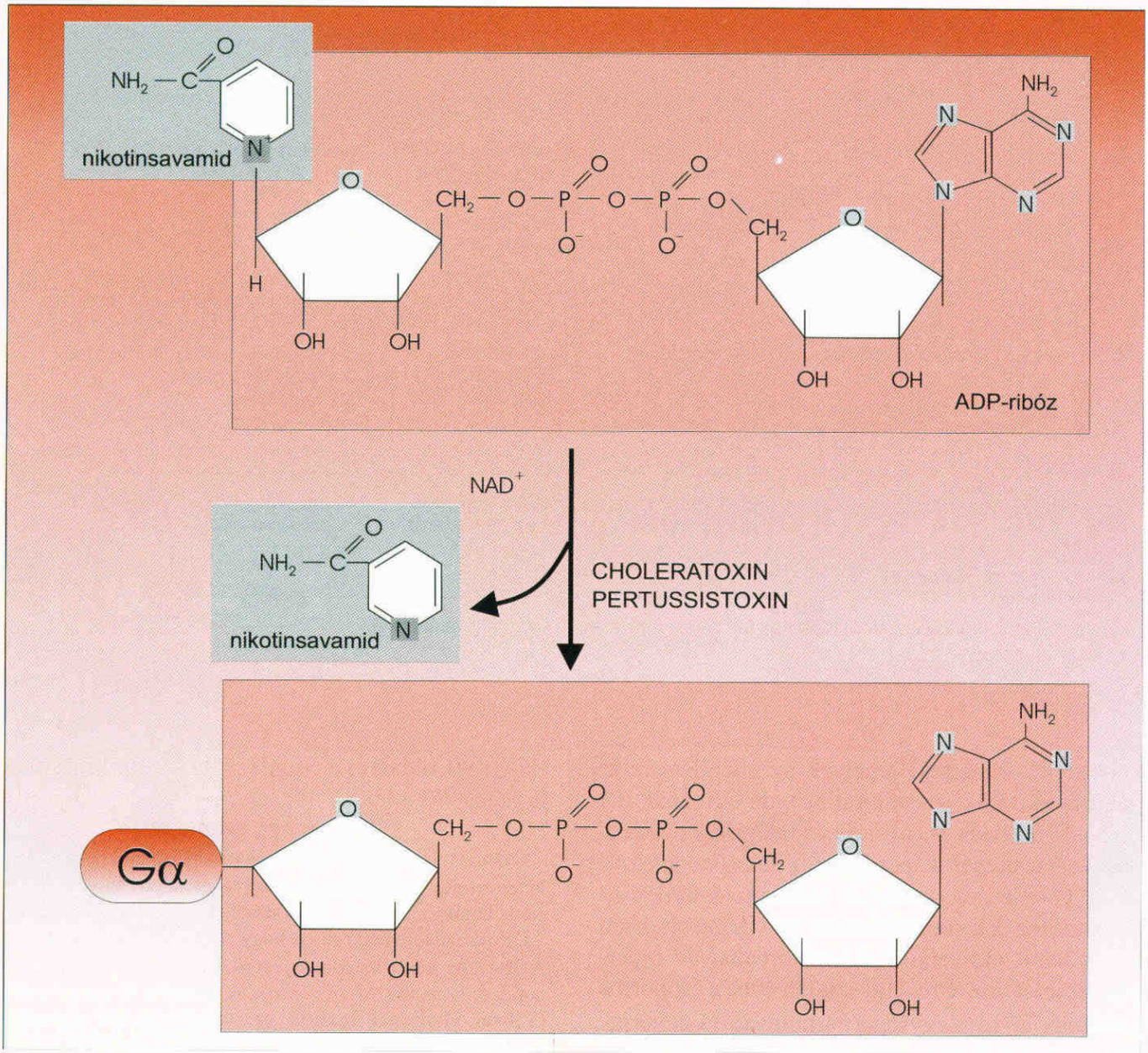
		Előfordulása	ADP-riboziláció	Effektor	Fontosabb receptorok
G_s	α (4)	minden szövet	choleratoxin	adenilát-cikláz (+) Ca^{2+}-csatorna (+)	β-adrenerg, glukagon, dopamin (D_1), TSH, ACTH, LH
	$\alpha_{olf.}$	szaglóideg	choleratoxin	adenilát-cikláz (+)	szag
G_q	α	csaknem mindenütt		foszfolipáz C_β	α_1-adrenerg, kolinerg-muszkarin, kolecisztokinin, TRH, vazopresszin
G_i	α_i (3)	csaknem mindenütt	pertussistoxin	adenilát-cikláz (-) K^+-csatorna (+) foszfolipáz C (+)	α_2-adrenerg, kolinerg-muszkarin, dopamin (D_2), opioidok, szomatosztatin
	α_0 (2)	agy	pertussistoxin	Ca^{2+}-csatorna (-)	α_2-adrenerg, met-enkefalin, $GABA_B$
	α_t (2)	retina	choleratoxin pertussistoxin	cGMP-specifikus foszfodiészteráz	rodopszin
G_{12}		mindenütt		?	?

Zárójelben az izoformák számát tüntettük fel. (+) az aktiválást, (-) az inaktiválást jelzi.

G_i-fehérjék ismertek, amelyek az adenilát-cikláz gátlását okozzák (i = inhibition), de tartoznak ide olyan G-fehérjék is, pl. a G_o, amelyek ioncsatornákkal létesítenek kapcsolatot. Fontos ezek közül az a G_i-fehérje, amely a kolinerg muszkarin-receptorhoz kapcsolódik és a szívizomsejtekben közvetlenül aktiválja a K^+-csatornákat és hiperpolarizációt hoz létre. Úgyszintén ebbe a csoportba tartoznak az α_t-alegységet tartalmazó G_t-fehérjék (G_t; t = transzducin), amelyek a retinapálcikákban találhatók. Ezeket a rodopszin aktiválja, s a cGMP-re specifikus foszfodiészterázt stimulálják, aminek következtében meghatározó szerepet játszanak a látás folyamatában.

Az α-alegységeknek számos doménje van, külön doménhez kötött a specifikus receptor felismerése, a guanin nukleotid kötés, a GTP-hidrolízis, a βγ-alegységek kötése és az effektorral történő interakció. A βγ-alegységek funkciója kevésbé tisztázott, az biztosnak látszik, hogy szerepük van az α-alegység membránhoz történő rögzítésében, de egyes esetekben közvetlenül effektorral is kapcsolatba léphetnek. Így egyes szövetekben a βγ-alegység aktiválja K^+-, Ca^{2+}- és Na^+-csatornákat, aktiválhatja a foszfatidilinozitol-3-kinázt (lásd 490. oldal) és a citoplazmás tirozin-kinázokat is (lásd 470. oldal).

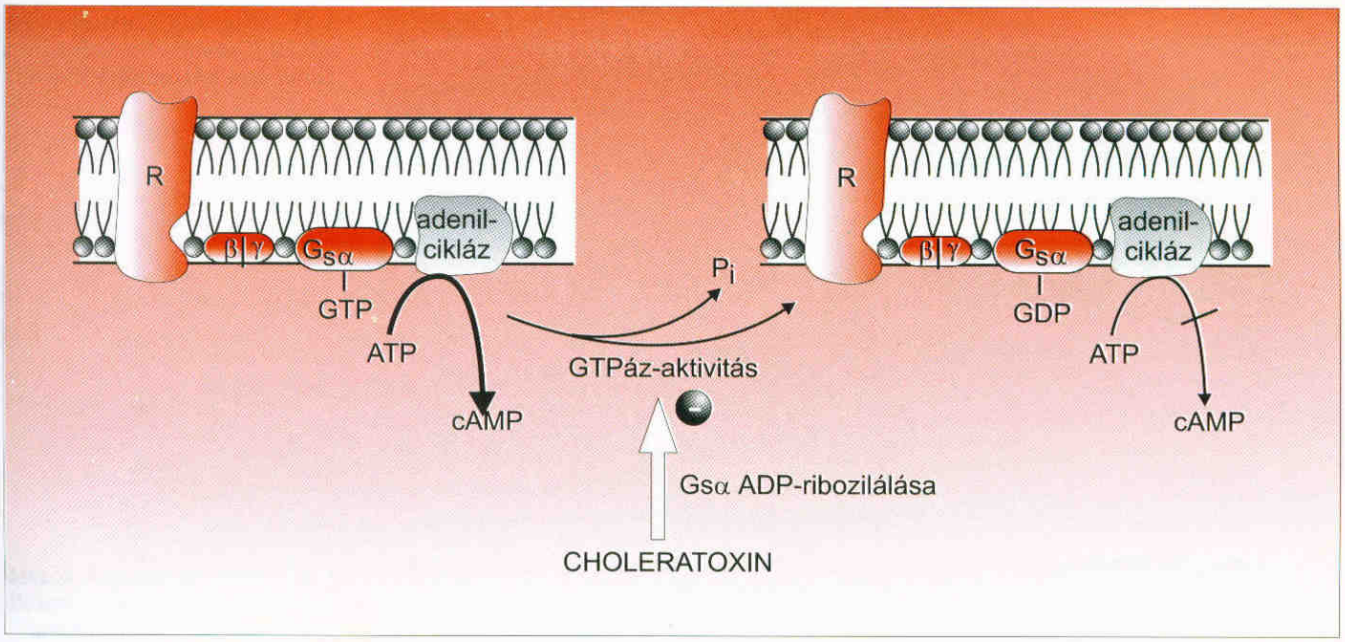
Sajátos tulajdonsága egyes bakteriális toxinoknak, hogy a heterotrimer G-fehérjék α-alegységét adott helyen ADP-ribozilálják s ezáltal működésüket megváltoztatják. Az ADP-riboziláció lényege az, hogy NAD^+-ról a toxin hatására ADP-ribóz kerül az α-alegységre, miközben a nikotinsavamid felszabadul *(5-13. ábra)*. A **cholera** kórokozójának **(Vibrio cholerae) toxinja** az adenilát-ciklázt stimuláló $G_{s\alpha}$-alegységet ADP ribozilálja a GTPáz aktivitásért felelős doménen (201-arginin), aminek következtében az α-alegység GTPáz aktivitása megszűnik *(5-14. ábra)*. Ennek funkcionálisan az a következménye, hogy a G-fehérje nem tud „kikapcsolni", az adenilát-cikláz folyamatosan aktív marad, és kontrollálatlanul felerősödnek azok a sejtfolyamatok, amelyeket a cAMP stimulál. Minthogy a cholera vibrio a gyomor-bélcsatorna sejtjeivel kerül kapcsolatba, az adenilátcikláz permanens aktiválása ezeket a sejteket érinti és magyarázza a cholerában kialakuló súlyos elektrolit- és folyadékfelszívódási zavarokat. A **szamárköhögés** kórokozójának **(Bordetella pertussis)** a toxinja, a **pertussistoxin** más α-alegységeket ($G_{i\alpha}$) ADP ribozilál közel az α-alegység karboxi-terminálishoz (egy ciszteinen), amely a receptorral történő kapcsolódás helye. Az ADP-riboziláció következtében nem jön létre a receptor és a G-fehérje közötti asszociáció, vagyis mindazon receptorok, amelyek pertussistoxin-érzékeny G-fehérje közreműködésével működnek, a toxin jelenlétében nem képesek a sejtműködést befolyásolni *(5-15. ábra)*.



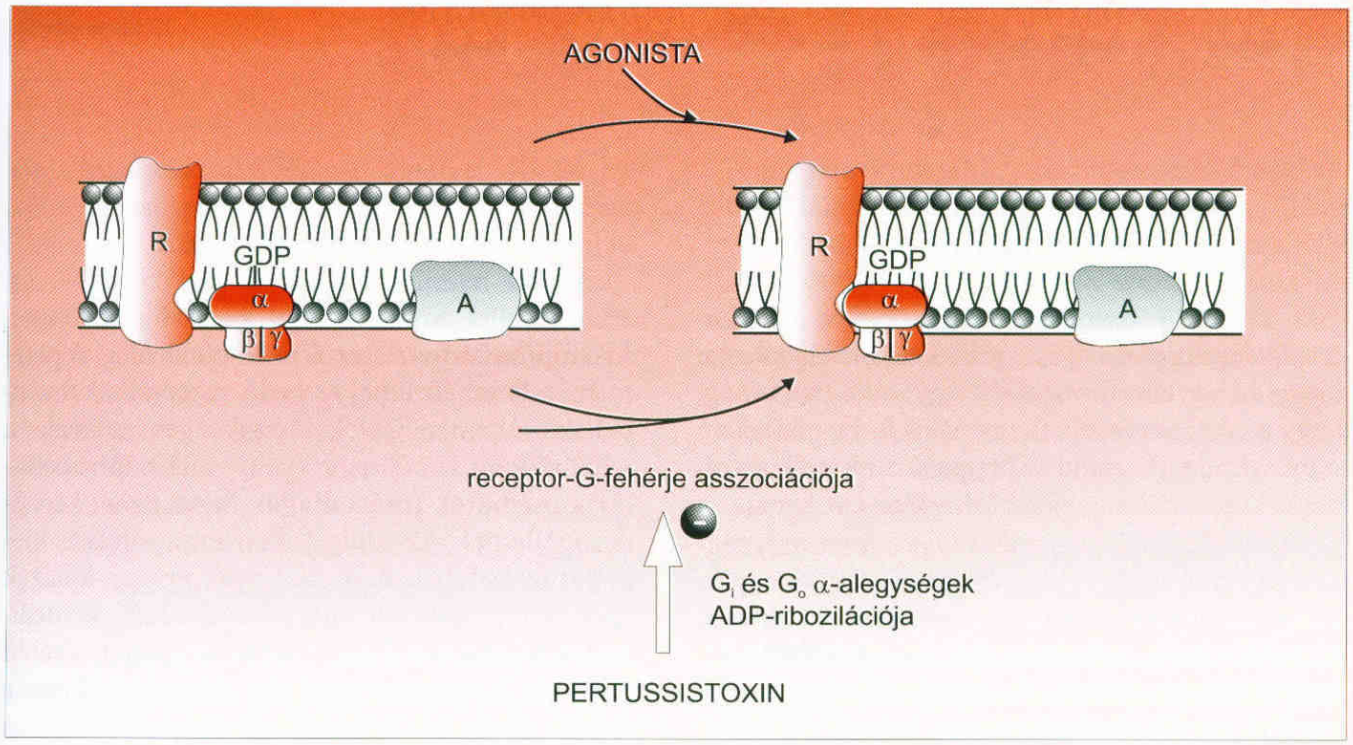
5-13. ábra. A G-fehérje α-alegységek ADP-ribozilációja bakteriális toxinok hatására

Mint az 5-2. táblázatban látható, a G-fehérjék nagy többsége a sejtmembránban enzimekkel lép kölcsönhatásba, amelyek intracelluláris mediátorok képződését katalizálják, mint pl. az adenilátcikláz és a foszfolipáz C, amelyek hatására cAMP, illetve IP_3 és diacil-glicerol keletkezik. Ezek a mediátorok viszik tovább a sejt számára az utasítást. Ez a folyamat a jel felerősödését (amplifikációját) okozza, mert az effektor enzim aktiválása több katalitikus ciklusban fokozza az intracelluláris mediátorok képződését. A jelamplifikációban tényező az is, hogy egy receptor többféle G-fehérjével is kölcsönhatásba léphet.

Külön kell említést tenni azokról a folyamatokról, amelyekben a G-fehérjék nem enzimekhez, hanem közvetlenül ioncsatornákhoz kapcsolódnak és azok működését modulálják. Közvetlen G-fehérje kölcsönhatás révén aktiválódik a K^+-csatorna a muszkarinreceptorok stimulációja következtében a szimpatikus és a paraszimpatikus ganglionban, központi idegrendszeri neuronokban, valamint a pitvari szívizomsejtekben. Ennek K^+-kiáramlás és

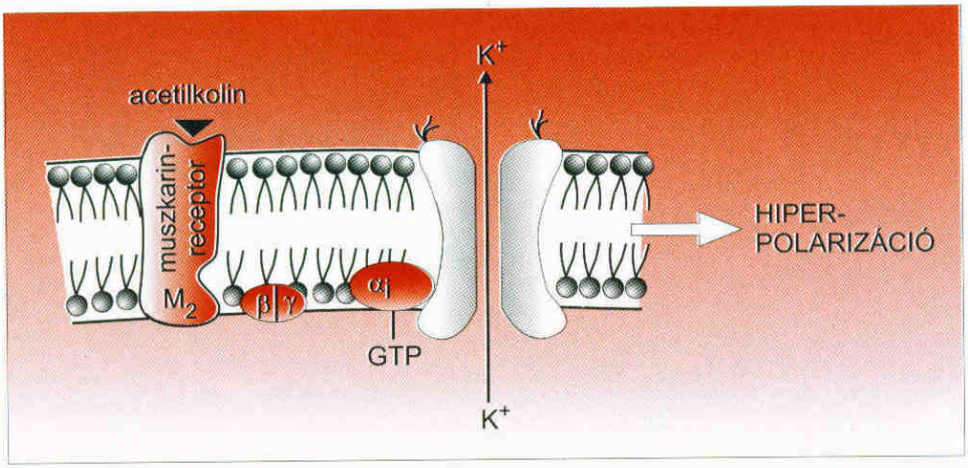


5-14. ábra. A $G_{s\alpha}$ GTPáz aktivitásának gátlása choleratoxin által okozott ADP-riboziláció következtében

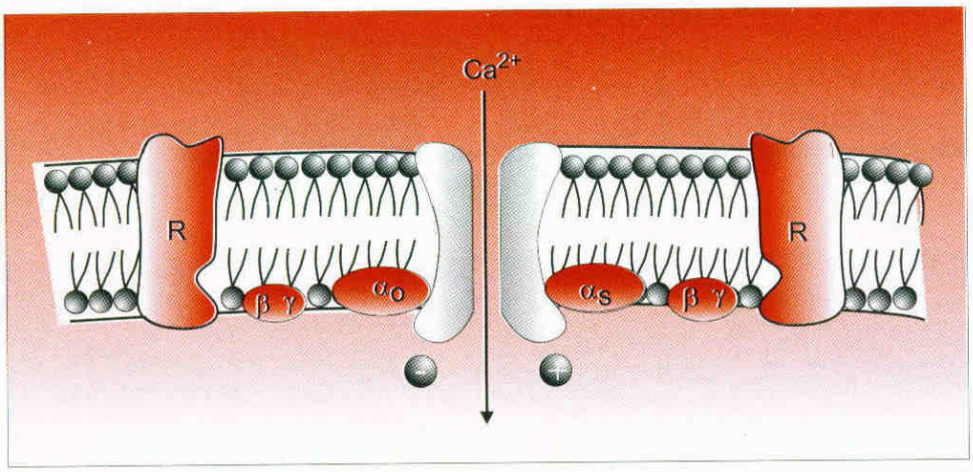


5-15. ábra. A receptor–G-fehérje asszociáció gátlása pertussistoxin által okozott ADP-riboziláció következtében

hiperpolarizáció a következménye, ami neuronokban az idegi vezetés és ingerületátvitel gátlását, a szívben pedig negatív kronotrop hatást eredményez *(5-16. ábra)*. Úgyszintén közvetlen kölcsönhatás jöhet létre a G-fehérjék és a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák között *(5-17. ábra)*. Az α_2-adrenerg receptorok, a $GABA_B$, valamint a szomatosztatinreceptorok aktiválják a G_o-fehérjét, ami a



5-16. ábra. A K^+-csatorna aktivációja acetilkolin hatására a G_i-fehérje közreműködésével

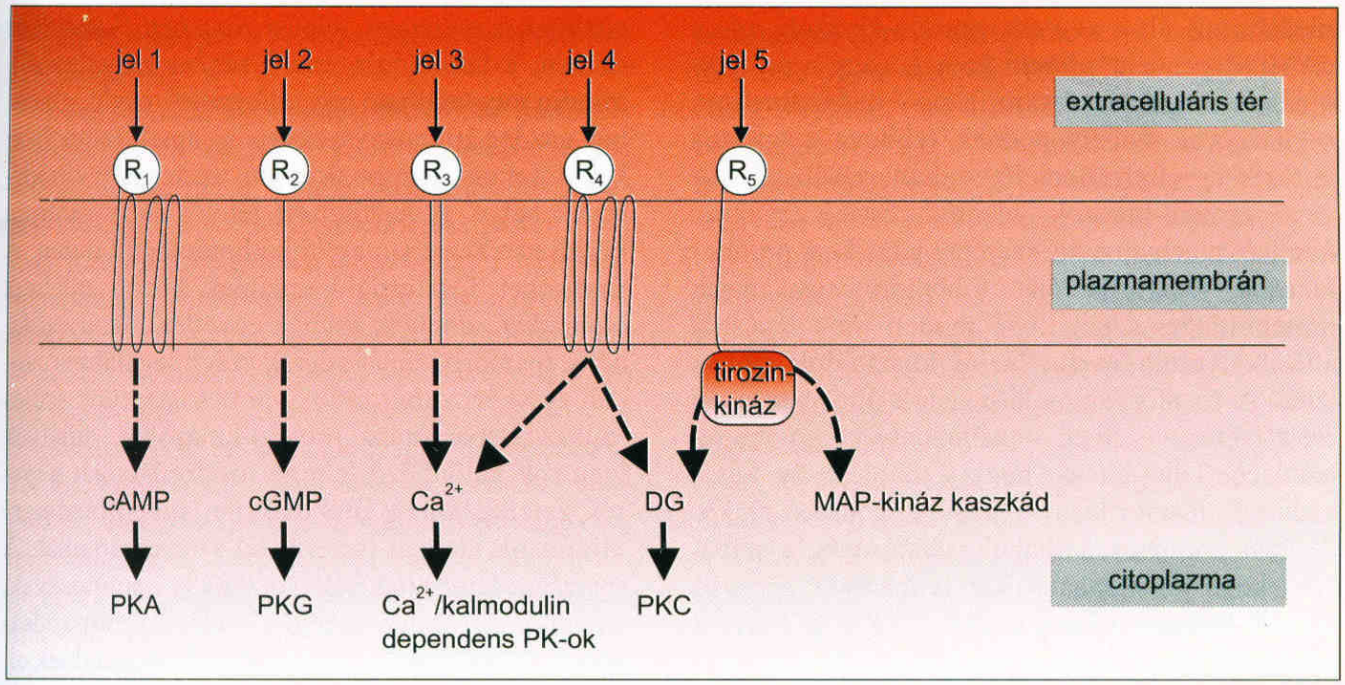


5-17. ábra. G-fehérjék közvetlen kölcsönhatása a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákkal

feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákkal kölcsönhatásba lépve annak komformációját úgy változtatja meg, hogy a csatorna érzéketlenné válik a depolarizáció iránt. Mind az L, mind az N típusú csatornák gátolhatók ily módon. Ezzel ellentétesen hatnak a G_s-fehérjék, amelyek α-alegysége a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat aktiválja és Ca^{2+}-belépést okoz. Ez a hatás hormonok és neurotranszmitterek hatására számos szövetben (pl. neuronokban, szívben, endokrin sejtekben) megfigyelhető.

Protein-kinázok és foszfoprotein-foszfatázok

Az extracelluláris jelre adott sejtválasz kialakulásának molekuláris mechanizmusában alapvető szerepet játszik a **reverzibilis fehérjefoszforiláció**, amelyet protein-kinázok hoznak létre és foszfoprotein-foszfatázok szüntetnek meg. A plazmamembránban elhelyezkedő receptorokkal rendelkező kémiai jelek közül igen soknak a jelpálya-rendszerét egy (vagy több) **intracelluláris mediátor (másodlagos messenger)** képződése jellemzi. Az eddig ismert intracelluláris mediátorok befolyásolják bizonyos protein-kinázok és foszfoprotein-foszfatázok aktivitását. E mediátorok között van olyan, amelynek minden további hatásáért a mediátor által aktivált protein-kináz a felelős (ilyen pl. a cAMP-mediátor-rendszer) és van olyan is, amelynek molekuláris hatásmechanizmusában a fehérjefoszforiláció nem kizárólagos, de nagyon fontos tényező (ilyen pl. a Ca^{2+}-mediátor-rendszer). A plazmamembránban elhelyezkedő receptorokkal rendelkező kémiai jelek egy másik csoportjánál a kémiai jel–receptor komplex kialakulása intracelluláris mediátor közbeiktatása nélkül, **közvetlenül fehérjefoszforilá-**



5-18. ábra. Protein-kinázok szerepe a különböző jelpályák működésében. *A cAMP, cGMP, Ca^{2+} és DG (diglicerid, diacil-glicerol) a legjobban ismert intracelluláris mediátorok, amelyek a sejtspecifikus választ kiváltják. A MAP-kináz (mitogén aktivált protein-kináz) kaszkád egy sor egymást aktiváló protein-kinázból áll (PKA, protein-kináz A; PKG, protein-kináz G; PKC, protein-kináz C)*

ció segítségével aktiválja a jelpályát. (Ilyen jelpályájuk van például a növekedési faktoroknak; *5-18. ábra*). A különböző extracelluláris kémiai jelek által aktivált, egymástól teljesen különböző **jelpályarendszerek között szoros kölcsönhatás** van (ezt az irodalomban cross-talk-nak nevezik). E kölcsönhatás vagyis az egyes jelpályák közötti információcsere molekuláris alapját az esetek túlnyomó többségében ugyancsak a fehérjefoszforiláció teremti meg.

A fehérjék foszforilációja az ATP γ-helyzetű foszfátcsoportjának a terhére megy végbe, míg a defoszforiláció hidrolitikus hasítás útján történik (lásd 1.2. fejezet). A folyamat lényegéhez tartozik, hogy a fehérjéken található OH-csoportok közül csupán bizonyos, az aminosavsorrend alapján meghatározott oldalláncot vagy oldalláncokat érinti, míg a többi OH-csoport nem foszforilálódik. A folyamat jelentőségét mutatja, hogy az eukarióta sejtek génállományának 2–3%-a protein-kinázokat és foszfoprotein-foszfatázokat kódol, ezernél több különböző protein-kinázt, illetve foszfoprotein-foszfatázt ismertek fel eddig, és az ismereteink ezen a téren még meglehetősen hiányosak.

A **protein-kinázokat** aszerint szokták csoportosítani, hogy a fehérjék valamely szerin, illetve treonin oldalláncának OH-csoportján hoznak létre foszfát-észter kötést **(protein-szerin/treonin-kinázok)**, vagy valamelyik tirozin oldallánc OH-csoportját foszforilálják **(protein-tirozin-kinázok)**. Az enzimek általában vagy az egyik, vagy a másik csoportba tartoznak, azonban ismert olyan kivételes enzim is, amely szubsztrátjának bizonyos treonin és tirozin oldalláncait is képes foszforilálni. Egy sejten belül a fehérjék mintegy 30%-a képes foszforilálódni valamelyik protein-kináz segítségével, a szerin/treonin-csoportok foszforilációja nagyságrendekkel gyakoribb, mint a tirozinfoszforiláció. A protein-tirozin-kinázok általában a sejtek szaporodásának, illetve differenciálódásának a szabályozásában vesznek részt, míg a szerin/treonin-kinázok a metabolikus utak szabályozásától a növekedés és differenciálódás szabályozásáig, minden folyamatban megtalálhatóak. A protein-kinázok katalitikus aktivitása a legtöbb ismert esetben szigorúan szabályozott. Az aktiválás vagy egy ligand által kiváltott allosztérikus szabályozás (ilyenek többek közt az intracelluláris

mediátorok által aktivált protein-kinázok, pl. a cAMP-dependens protein-kináz), vagy a protein-kinázok maguk is foszforiláció– defoszforiláció segítségével szabályozódnak (ebbe a csoportba tartozik a sejtproliferáció szabályozásában részt vevő protein-kinázok jelentős része.) Gyakran mindkét mechanizmus szerepet játszik. A protein-kinázok foszforilációját többnyire egy másik protein-kináz végzi, ilyen módon több lépésből álló, bonyolult **foszforilációs kaszkádok** jönnek létre. A foszforilációs kaszkádok általában a jel erősítéséhez vezetnek, ennél azonban nagyobb jelentősége lehet annak, hogy a többlépcsős, kaszkádszerű foszforiláció a jelpályarendszer működésének többirányú szabályozhatóságát, a jelpályák közti kölcsönhatásokat is lehetővé teszi. A protein-kinázok néhány képviselőjét az *5-3. táblázat* mutatja be.

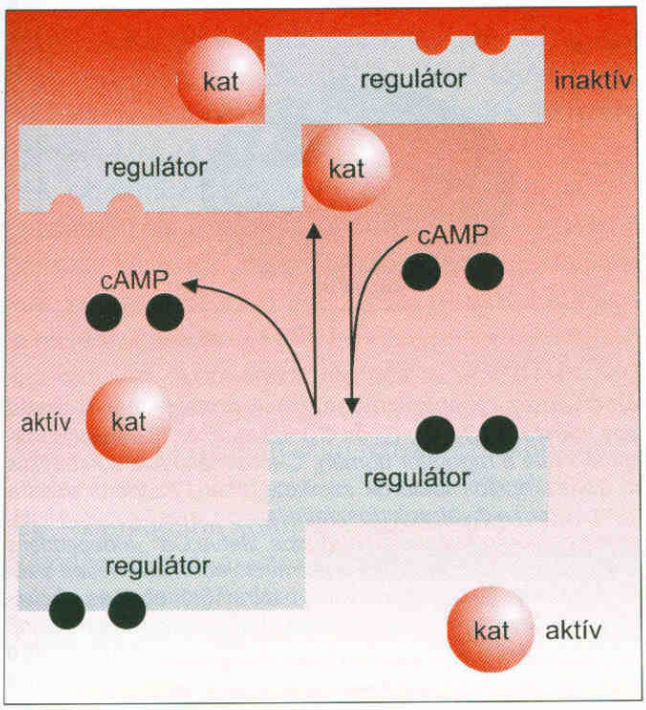
A protein-kinázok szerkezetét – funkciójuk, regulációjuk, szubsztrátjaik minden különbözősége ellenére – bizonyos fokú hasonlóság jellemzi. Az enzimek katalízisért felelős részében (katalitikus domén, a homológia erre a szakaszra jellemző), mindig megtalálható egy jellegzetes, rövid, glicinben gazdag aminosavszekvencia, amelyet egy lizin követ a megfelelő pozícióban, ez az ATP kötődésének helye. A katalízisért felelős aktív centrum körüli szerkezet is nagyfokú homológiát mutat. A fehérjéket foszforiláló enzimek között találunk olyanokat, amelyek csupán egyetlen bizonyos fehérje foszforilációját végzik (vagy legalábbis csupán egy-két szubsztrátjuk van) és ismerünk széles szubsztrátspecifitású protein-kinázokat, amelyek igen sok különböző fehérje foszforilációját képesek katalizálni. Ez utóbbiak ún. **specifitásdeterminánsok** alapján ismerik fel szubsztrátjaikat. A specifitásdeterminánsok bizonyos aminosavak, amelyek a foszforilálandó oldallánc szomszédságában, meghatározott pozícióban helyezkednek el. (Specifitásdeterminánsok között több enzim esetében szerepelnek bázikus aminosavak, egyes enzimeknél ilyen feladatot savanyú oldalláncok látnak

5-3. táblázat. Néhány jól ismert szerin/treonin protein-kináz szabályozásának legfontosabb mechanizmusai

Protein-kináz neve	Regulátor	Egyéb szabályozás
protein-kináz A	cAMP (allosztérikus aktiválás)	
protein-kináz G	cGMP (allosztérikus aktiválás)	
protein-kináz C „klasszikus" izoenzimek	Ca^{2+}, foszfatidil-szerin, diacil-glicerol (allosztérikus aktiválás)	más lipidek, pl. arachidonsav (aktiválás)
kettős szálú RNS-dependens protein-kináz	kettős szálú RNS (allosztérikus aktiválás)	
miozin-könnyűlánc-kináz	Ca^{2+}–kalmodulin (allosztérikus aktiválás)	foszforiláció protein-kináz A (gátlás)
protein-kináz B	foszfatidilinozitol-3-4-biszfoszfát (transzlokáció)	a foszforilációt egy másik kináz végzi, amelyet a PI-3-4-biszfoszfát aktivál
foszforiláz-kináz	Ca^{2+}–kalmodulin (allosztérikus aktiválás)	foszforiláció protein-kináz A (aktiválás)
Ca^{2+}–kalmodulin-dependens kináz II	Ca^{2+}–kalmodulin (allosztérikus aktiválás)	autofoszforiláció (aktiválás)
raf-kináz (MAP-kináz-kináz-kináz)	ras GTP-kötő fehérje (aktiválás)	foszforiláció protein-kináz C (aktiválás) protein-kináz A (gátlás)

el, más enzimeknél a prolin oldalláncnak van irányító szerepe.)

Az intracelluláris mediátorrendszerek hatásmechanizmusában központi szerepet játszó, széles szubsztrátspecifitású szerin/treonin-protein-kinázok közül néhányat részletesebben is jellemzünk. Ezek közül a legrégebben ismert enzim a **cAMP-dependens protein-kináz**, más néven **protein-kináz A**. Aktiválatlan állapotában a protein-kináz A két-két azonos katalitikus, illetve regulátor alegységből álló tetramer szerkezetű fehérje (ez a holoenzim). A katalitikus alegység felelős a fehérjék foszforilációjáért, a tetramerben azonban a regulátor alegység gátolja a katalitikus alegység működését, ezért inaktív a tetramer holoenzim. A regulátor alegységen helyezkednek el a cAMP kötőhelyek (két-két kötőhely egy-egy regulátor monoméren). Ha a cAMP koncentrációja növekszik, a cAMP a regulátor alegységekhez kötődik és az allosztérikus szerkezetváltozás következtében a holoenzim regulátor alegység dimérre és katalitikus alegység monomérekre disszociál. A katalitikus alegység ezáltal felszabadul a gátlás alól és aktívvá válik. A katalitikus alegység a szubsztrát specifitásának megfelelő (specifitásdeterminánsait tartalmazó) és más szempontból (pl. intracelluláris lokalizáció) is elérhető fehérjék foszforilációját addig folytatja, míg a cAMP-koncentráció a sejtben magas. Ha a cAMP-szint csökken, a cAMP a regulátor alegységekről disszociál és a regulátor alegység dimér ismét asszociál két katalitikus alegység monomérrel, az enzim ismét az inaktív holoenzim-szerkezetet veszi fel *(5-19. ábra)*. A protein-kináz A regulátor alegységeiből kétféle izotípus (R^{I} és R^{II}) ismert, ezek funkcionálisan valamelyest különböznek egymástól. Az R^{II} alegységnek ún. **targettáló** szerepe is van. Ez azt jelenti, hogy az R^{II}-alegység fehérje–fehérje kölcsönhatások révén a szubsztrátjai közelében horgonyozza ki a holoenzimet, így a katalitikus alegység disszociációja után gyorsan elérheti ezeket a szubsztrátokat.

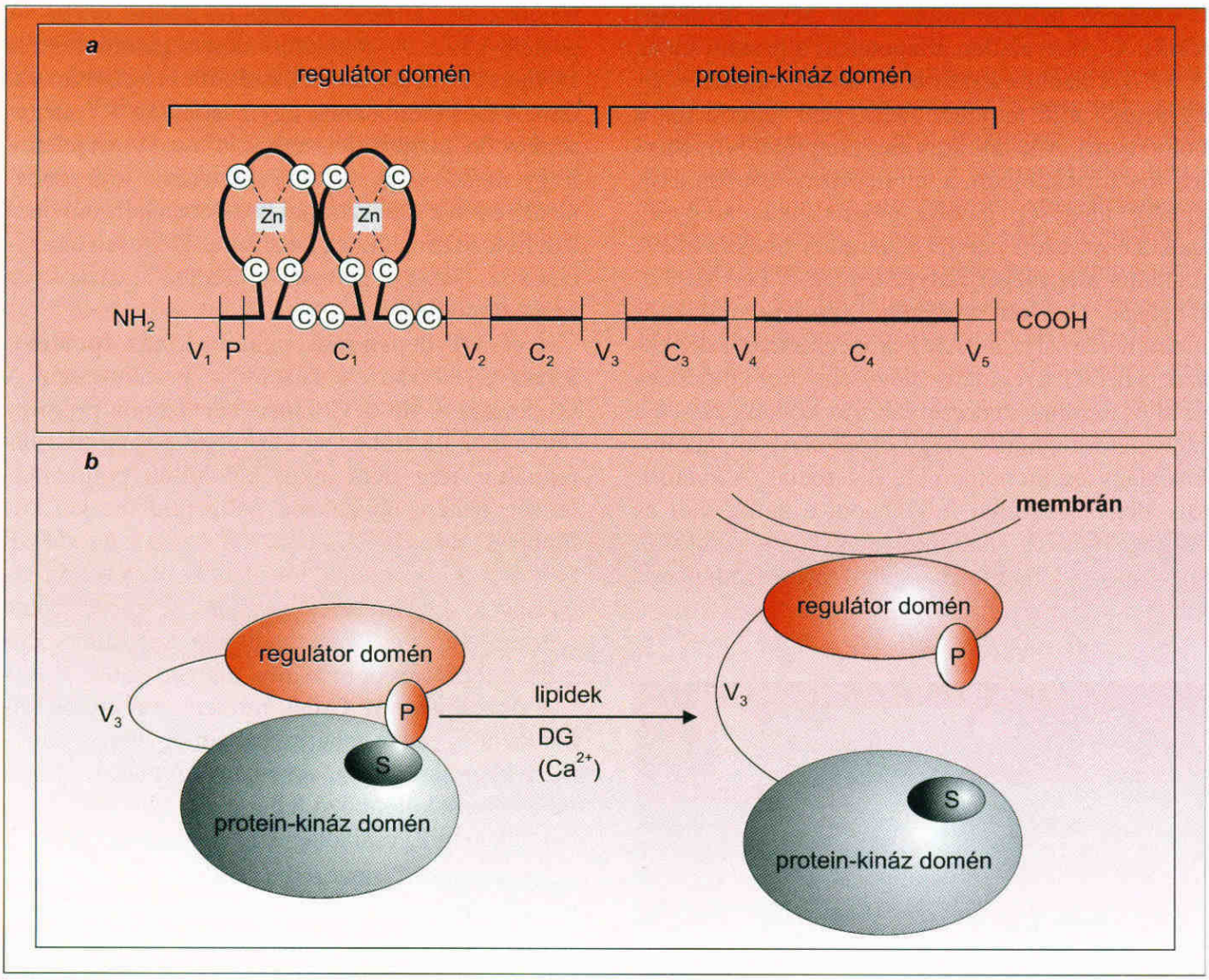


5-19. ábra. A cAMP-dependens protein-kináz aktiválódásának mechanizmusa *(kat, katalitikus alegység)*

A **cGMP-dependens protein-kináz (protein-kináz G)** szerkezete hasonlít a protein-kináz A szerkezetére, de a G kináz két azonos polipeptidláncból áll. Ebben az enzimben a katalitikus és regulátor rész nem alkot két külön polipeptidláncot, hanem ugyanazon polipeptidlánc két különböző doménjén helyezkedik el. A cGMP kötődése a regulátor doménhez nem vezet az alegységek disszociációjához, de az allosztérikus szerkezetváltozás felszabadítja a katalitikus domént a regulátor domén által okozott gátlás alól.

A **protein-kináz C**-nek nevezett enzim valójában nem egyetlen fehérje, hanem egymásra nagymértékben hasonlító, azonban egymástól mégis valamelyest különböző fehérjékből álló enzimcsalád (jelenleg 12 családtag ismert). A család tipikus, „klasszikusnak" nevezett tagjai (α, β^{I}, β^{II} és γ-protein-kináz C) a **Ca^{2+}/foszfolipid-dependens protein-kinázok**, a család többi, atípusos tagja Ca^{2+}-independens. Az izoenzimek különbözőképpen expresszálódnak különböző szövetekben (a γ-izoforma pl. csak a központi idegrendszerben fordul elő) és valamelyest eltérő módon történő aktiválódásuk miatt az is valószínűsíthető, hogy a család minden tagjának saját, speciális szerepe van. A protein-kináz C család tagjai egyetlen, több doménből álló polipeptidláncból állnak, az alapállapotban az N-terminális oldalon levő regulátor domén (amely maga is több részből áll), gátolja a C-terminális félen elhelyezkedő katalitikus domén működését. A regulátor doménhez kötődő allosztérikus ligandok együttes hatására szabadul fel a

katalitikus domén a gátlás alól. A klasszikus protein-kináz C izoenzimek aktiválódásához in vitro Ca^{2+} és foszfatidilszerin szükséges, az enzim Ca^{2+} iránti affinitását azonban igen nagy mértékben növeli egy másik intracelluláris mediátor, a **diglicerid (diacil-glicerol, DG)**. Sejten belül elsősorban a DG megjelenése, illetve felhalmozódása a plazmamembránban (vagy valamely más membránban) indítja el a protein-kináz C aktiválódását, ez nyugalmi Ca^{2+}-koncentráció mellett is megtör-



5-20. ábra. A protein-kináz C izoenzimek szerkezete és aktiválódásának mechanizmusa. (a) *A protein-kináz C család klasszikus tagjait α, βI, βII, γ-izoenzimek) alkotó polipeptidláncon négy konstans (C_1, C_2, C_3 és C_4) szakasz és öt variábilis szakasz (V1, V2, V3, V4 és V5) helyezkedik el. A polipeptidlánc N-terminális fele a regulátor domén, C-terminális fele a katalitikus domén. A C_1 szakaszon két ún. „cinkujj"-szerkezet található (lásd transzkripciós faktorok szerkezeténél), azonban ezzel a protein-kináz C nem a DNS-hez kötődik, hanem a C_1 szakasz a lipid természetű aktivátorok (foszfatidilszerin, diacil-glicerol) kötőhelye. A C_2 szakasz tartalmazza a kötőhelyet a Ca^{2+} számára. Ez a szakasz hiányzik a család atípusos, illetve Ca^{2+}-independens tagjaiból. A regulátor domént a katalitikus doménnel összekötő V_3 szakasz az enzim aktivált konformációjában különösen érzékeny a proteolitikus enzimekre. A C_3 szakaszon helyezkedik el az ATP-kötőhely. A C_4 szakasz a szubsztrátkötőhelyet és a katalitikus centrum többi részét tartalmazza. A regulátor doménen a C_1 szakasztól N-terminális irányban található a pszeudoszubsztrát (P) hely. A pszeudoszubsztrát hely az enzim specifitásdeterminánsainak megfelelő aminosavsorrendet tartalmazó szakasz, de a foszforilálható szerin vagy treonin oldallánc helyett alanint tartalmaz.* **(b)** *Az enzim inaktív konformációja úgy alakul ki, hogy a pszeudoszubsztrát hely (P) kapcsolatba lép a katalitikus részen található szubsztrátkötőhellyel (S), mintegy lefedi azt. Az aktivátor molekulák kötődésekor (DG, diacil-glicerol) az enzim konformációja megváltozik, a pszeudoszubsztrát hely eltávolodik a szubsztrátkötőhelytől és így az hozzáférhetővé válik a szubsztrátok számára*

ténhet. A DG gyorsan metabolizálódik, a DG-koncentráció csökkenése az enzim inaktiválódásához vezet. Az inaktív enzim jelentős része a citoszolban található (legfeljebb Ca^{2+} segítségével alakul ki egy laza kapcsolat a membránnal), DG hatására azonban az aktivált enzim szorosan a membránhoz kötődik. A protein-kináz C család szerkezetét és aktiválódásának mechanizmusát az *5-20. ábra* mutatja.

A protein-kináz C segítségével működő jelpálya-rendszerek megismerésében fontos szerepe van a **forbol-észtereknek**, amelyekben található egy DG-ra emlékeztető szerkezet, ezért aktiválják a protein-kináz C izoenzimeket. A forbol-észterek azonban a DG-del ellentétben a sejtekben nem metabolizálódnak és így a protein-kináz C izoenzimek permanens aktiválódását idézik elő. Az aktivált protein-kináz C nyitott konformációja érzékennyé teszi az enzimet a sejtekben található proteolitikus enzimek iránt és ezért a forbol-észterekkel tartósan aktivált protein-kináz C-t a proteolitikus enzimek lebontják. Ezt a folyamatot nevezik a protein-kináz C down-regulációjának. Sejten belül a különböző izoenzimek aktivitását még különféle más lipidek is befolyásolhatják, ezek között elsősorban az arachidonsavat tartják számon.

A protein-kináz A és C ún. **széles szubsztrátspecifitású protein-kinázok**, igen sok különféle fehérjét tudnak foszforilálni. Specifitásuk alapja (specifitásdeterminánsuk) bázikus aminosavak jelenléte a foszforilálandó szerin/treonin csoportok környezetében, a foszforilálandó OH-tól N-terminálisan (protein-kináz A) vagy mindkét irányban (protein-kináz C).

A citoszolban megemelkedő Ca^{2+}-szint **(Ca^{2+}-mediátor)** hatása nemcsak protein-kinázok aktiválódásán keresztül érvényesül, a protein-kinázoknak azonban a Ca^{2+}-mediátorral működő jelpálya molekuláris eseményeiben is nagy szerepe van. A citoszol Ca^{2+}-koncentrációjának növekedését elsősorban (de nem kizárólag) egy **kalmodulinnak** nevezett kb. 17 kDa nagyságú fehérje érzékeli, amely molekulánként négy Ca^{2+}-t tud megkötni. A Ca^{2+}–kalmodulin komplex különböző enzimekhez kötődve aktiválja azokat (lásd inozitol-lipid jelpályarendszernél). A citoszol Ca^{2+}-koncentrációjának csökkenésekor a Ca^{2+} disszociál a kalmodulinról és ezzel együtt a kalmodulin disszociál az aktivált enzimről, amely (egy speciális enzim kivételével, lásd később) ismét inaktív állapotba kerül. A Ca^{2+}–kalmodulin komplex segítségével aktiválódó enzimek között több, különböző protein-kináz is található. Ezek között vannak **szűk szubsztrátspecifitású protein-kinázok**, amelyek egy-egy bizonyos fehérje foszforilációjára specializálódtak. Ilyen enzim a **foszforiláz-kináz** és a **miozin-könnyűlánc-kináz**. Több széles szubsztrátspecifitású Ca^{2+}–kalmodulin dependens protein-kináz is ismert, ezeket számokkal különböztetik meg egymástól, Ca^{2+}–kalmodulin dependens protein-kináz I, Ca^{2+}–kalmodulin dependens protein-kináz II stb. Ez utóbbi enzimek több fehérje foszforilációját képesek katalizálni.

A **Ca^{2+}–kalmodulin dependens protein-kináz II**-nek fontos szerepe van a Ca^{2+}-mediátorral működő jelpályák működésében, különösen a központi idegrendszerben. Ennek az enzimnek lényeges tulajdonsága, hogy a Ca^{2+}–kalmodulin komplex segítségével történő aktiválódása után önmagát is képes foszforilálni és az autofoszforilált enzim még a Ca^{2+}–kalmodulin komplex disszociációja után is aktív marad. Az elsődleges aktiválás utáni, hosszan tartó, már Ca^{2+}-independens aktivitásnak nagy szerepet tulajdonítanak a szinaptikus plasztikitásban.

A felsoroltakon kívül még igen sok protein-szerin/treonin-kináz ismert. Ezek közül némelyek említésre kerültek korábbi fejezetekben (pl. a ciklindependens protein-kinázok az eukarióta sejtek sejtciklusának szabályozásakor, a kettős szálú RNS-dependens protein-kináz az eukarióta sejtek vírusokkal szembeni védekezésével kapcsolatban), mások ismertetésére később, a növekedési faktorok jelpályarendszerének leírásakor kerül sor.

A **protein-tirozin-kinázok** egyik csoportjába a plazmamembrán integráns komponensét képező, egyetlen transzmembrándomént tartalmazó, a **növekedési faktorok receptorainak** feladatát ellátó fehérjék tartoznak. Ezekben a fehérjékben a polipeptidlánc extracelluláris részén (a fehérje N-terminális részén) helyezkedik el az extracelluláris jelre (növekedési faktorra) specifikus receptor domén, és intracellulárisan (a C terminális részen) helyezkedik el a kináz domén, illetve azok a tirozin oldalláncok, amelyeket az enzim saját magán foszforilálni képes. Az extracelluláris oldalon kötődő növekedési faktor hatására intracellulárisan foszforilálódó tirozin oldalláncok indítják el a jelpálya működését (lásd a növekedési faktorok jelpályarendszerét leíró fejezetben).

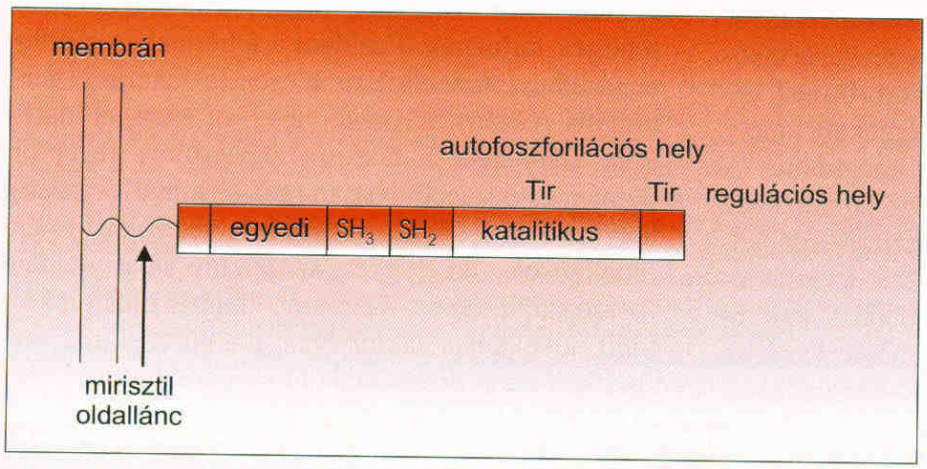
A protein-tirozin-kinázok egy másik csoportjába tartozó enzimek **(nem receptor protein tirozin kinázok)** nem a plazmamembrán integráns alkotórészei, önmagukban nem látnak el receptorfunkciót, hanem a citoszolban találhatók (esetleg zsírsavakkal vannak a membránhoz kihorgonyozva). Azonban valamilyen extracelluláris jelre (növekedési faktor, citokineknek nevezett regulátor molekulák, limfocitákat aktiváló jelek stb.) a jelet felfogó, gyakran nem tirozin-kináz természetű receptor intracelluláris részéhez képesek kötődni és így indítják el a jel átvitelét.

Ebben a csoportban a legrégebben ismert enzim, a daganatkeltő retrovírusokban elsőként leírt onkogén, illetve celluláris protoonkogén, az src gén által kódolt **src-kináz** (illetve a homológ gének által kódolt src-kináz család). Az src-kináz szerkezetét az *5-21. ábra* mutatja. A katalitikus doménen (src homológia domén 1) kívül még két másik olyan domént is tartalmaz, amelyekhez hasonló domének más fehérjékben is megtalálhatók. Az **SH2 domén** (src homológia domén 2) jellegzetessége, hogy foszforilált tirozin oldalláncokhoz tud kötődni és így az SH2 domént tartalmazó fehérjék egy kiválasztott, tirozin oldalláncán foszforilált fehérjéhez tudnak kapcsolódni. Az **SH3 domén** (src homológia domén 3) pedig bizonyos prolinban gazdag aminosavszekvenciákat képes felismerni és azokhoz kötődik. Az SH2/SH3 doménekkel rendelkező fehér- jék bonyolult fehérje–fehérje kapcsolatokat tudnak kialakítani, amelyeknek nagy szerepük van a növekedési faktorok jelpályarendszerének kialakulásában (lásd később). Az src-kináz molekulák jelentős részét a fehérjéhez kovalensen kapcsolódó zsírsav-oldallánc kihorgonyozza a membránhoz.

Említésre méltóak a **JAK** (Janus arcú) protein-tirozin-kinázok is, amelyek a citokinek tirozin-kináz aktivitással nem rendelkező receptorairól közvetítik a jeleket a sejt számára. A nem receptor tirozin-kinázok csoportjába tartoznak a sejtmagban elhelyezkedő tirozin-kinázok is.

A foszfoprotein-foszfatázok csoportosítása ugyancsak azon az alapon történik, hogy szerin/treonin vagy tirozin OH-t észteresítő foszfátcsoport hidrolitikus hasítását katalizálják-e. Ezek a csoportok itt is elhatárolódnak egymástól, annak ellenére, hogy a legutóbbi időben ismertté vált néhány speciális szubsztrátra szakosodó enzim, amelyek szubsztrátjuknak mind treonin-foszfát, mind pedig tirozin-foszfát oldalláncát képesek defoszforilálni.

A **szerin/treonin foszfoprotein-foszfatázok** között korábban négy enzimcsaládot különítettek el, a **PP1, PP2A, PP2B és PP2C** enzimeket, de a klónozási eljárásokkal újabb enzimek felismerése és karakterizálása történt meg. Nem tisztázott még teljesen az sem, milyen módon regulálódnak ezek az enzimek. Kivétel a **PP2B** enzim, amely Ca^{2+}–kalmodulin dependens foszfoprotein-foszfatáz, **kalcineurinnak** is nevezik. A PP2C aktivitásához Mg^{2+} szükséges. A PP1 és PP2 katalitikus alegységből és különböző regulátor, illetve targettáló alegységekből összeálló holoenzimeket hoznak létre. A PP1 aktivitását közvetve (regulátor-targettáló alegységei, vagy specifikus, fehérjetermészetű, nem minden szövetben megtalálható inhibitora foszforilációjának segítségével) a



5-21. ábra Az src protein-tirozin-kináz család szerkezete. *A család tagjai három homológ domént tartalmaznak (katalitikus, SH2 és SH3 domének), a negyedik minden izoenzimben egyedi. Az SH2 domén foszforilált tirozin oldallánchoz tud kötődni, az SH3 prolinban gazdag szekvenciát ismer fel. Az enzimek maguk is tartalmaznak foszforilálható tirozin oldalláncot. A polipeptid N-terminális szakaszán levő tirozin foszforilációja inaktiválja az enzimet*

cAMP-dependens protein-kináz szabályozhatja (csökkenti az aktivitását).

A foszfoprotein-foszfatázok kutatásában is segítséget jelent a különböző (nem endogén) inhibitor vegyületek alkalmazása. A PP2 enzim aktivitását már kis koncentrációban, a PP1-et csak nagyobb koncentrációban gátolja az **okadánsav**, a többi foszfoprotein-foszfatáz nem érzékeny erre a vegyületre. A kalcineurin aktivitását a **ciklosporin** gátolja.

A **tirozin-foszfoprotein-foszfatázok** között ugyancsak ismertek receptor természetű molekulák, pl. a limfociták aktiválódásának folyamatában játszik szerepet egy ilyen enzim (CD45-nek nevezik), azonban oldható tirozin-foszfoprotein-foszfatázok is vannak.

A fehérjék foszforiláltsági állapota mindig (legalább) két komponensű folyamat eredménye, az illetékes protein-kináz(ok) és a folyamatot visszafordító foszfoprotein-foszfatáz(ok) pillanatnyi aktivitásától függ.

5-4. táblázat. Néhány extracelluláris kémiai jel, amely az adenilát-cikláz működésének módosításával fejti ki hatását

Extracelluláris kémia jel	Hetero trimer G-fehérje	Hatás
Glukagon	G_s	aktiválás
ACTH	G_s	aktiválás
β-adrenerg agonisták	G_s	aktiválás
Parathyreoideahormon	G_s	aktiválás
tireotrop hormon	G_s	aktiválás
luteinizáló hormon	G_s	aktiválás
vazopresszin (VP_2-receptoron)	G_s	aktiválás
dopamin (D_1-receptoron)	G_s	aktiválás
hisztamin (H_2-receptoron)	G_s	aktiválás
α_2-adrenerg agonisták	G_i	gátlás
dopamin (D_2-receptoron)	G_i	gátlás
acetilkolin (M_2-receptoron)	G_i	gátlás
opiát receptor agonisták	G_i	gátlás

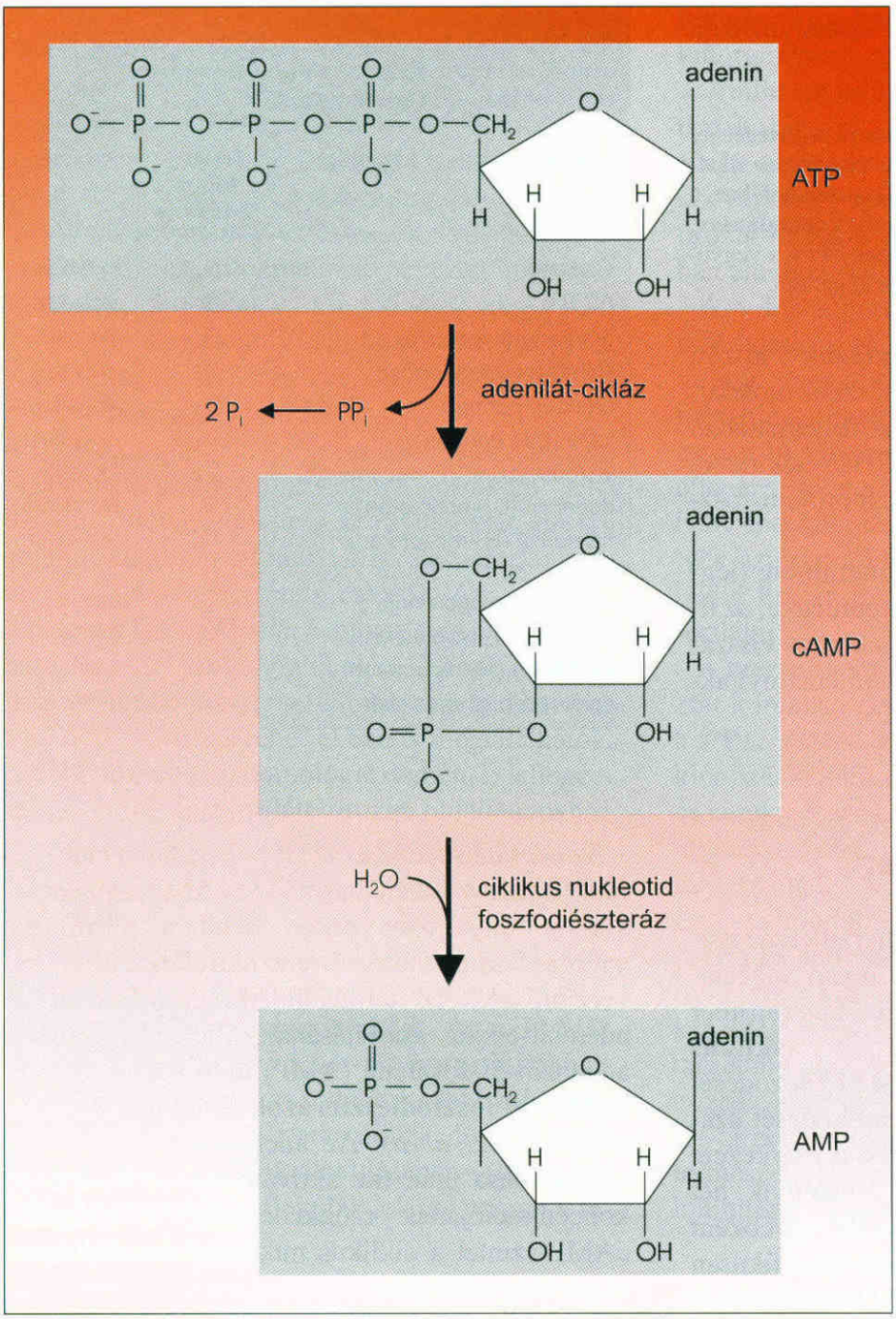
A cAMP-mediátorrendszer

Igen sok hormon, neurotranszmitter, illetve lokális kémiai mediátor rendelkezik olyan plazmamembrán-receptorral, amely egy heterotrimer GTP-kötő fehérje segítségével az **ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát (cAMP)** képződését katalizáló **adenilát-cikláz** enzim működését szabályozza. Ezeknek a receptoroknak a szerkezete hasonlít egymásra abban, hogy mindegyik hét transzmembrándoménnel rendelkezik, egyébként azonban mindegyik receptor nagyon specifikusan köti a saját ligandját. Az adenilát-cikláz működését szabályozó ligandok, pontosabban receptoraik két csoportba tartoznak, az egyik csoport a heterotrimer G_s- **(stimuláló)** fehérjével áll kapcsolatban, ezek a ligand–receptor komplexek aktiválják az adenilát-ciklázt. A másik csoportba tartoznak azok a ligand–receptor komplexek amelyek a G_i (inhibitor) heterotrimer GTP-kötő fehérje segítségével gátolni képesek az adenilát-cikláz működését *(5-4. táblázat)*.

Adenilát-cikláz enzimből is többféle izotípus létezik, a központi idegrendszer egyes sejtjeiben található olyan adenilát-cikláz is, amelyet Ca^{2+}–kalmodulin is aktivál.

Az adenilát-cikláz az ATP β- és γ-helyzetű foszfátját pirofoszfátként hasítja le a cAMP képződésekor, a folyamatot sejten belül a pirofoszfát anorganikus foszfátra történő hidrolízise teszi irreverzíbilissé. Az intracelluláris cAMP-szint az adenilát-cikláz aktivitásának, illetve a cAMP-t adenozin-5'-foszfáttá (AMP) hidrolizáló **ciklikus nukleotid foszfodiészterázok** aktivitásának függvénye *(5-22. ábra)*. Az adenilát-cikláz átmeneti aktiválódása után (az aktiváló extracelluláris jel koncentrációjának csökkenésekor) a nyugalmi cAMP-szintet a ciklikus nukleotid-foszfodiészterázok helyreállítják.

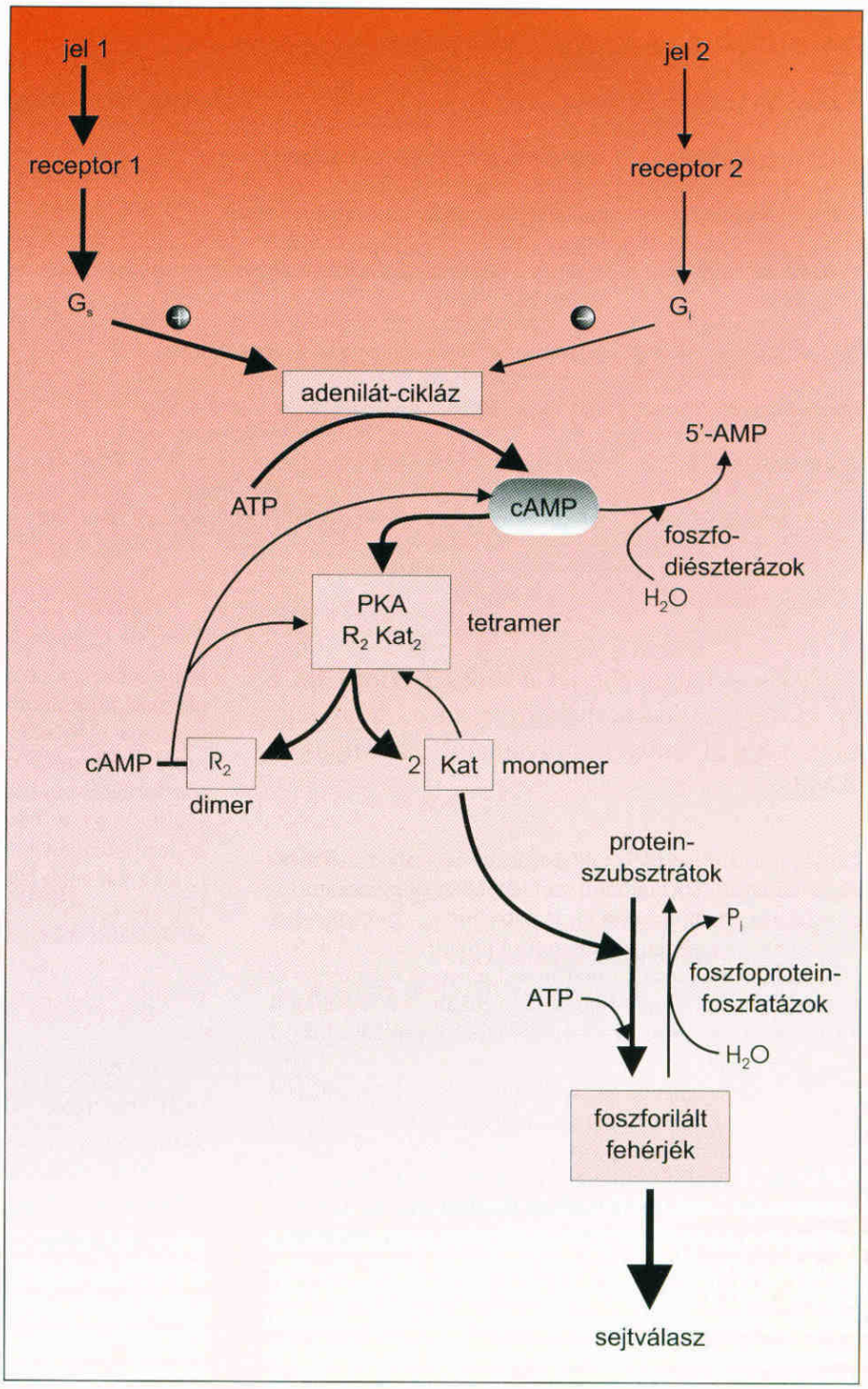
Többféle típusú ciklikus nukleotid-foszfodiészteráz ismert, nem minden sejtben található meg mindegyik típus. A legáltalánosabban elterjedt az alacsony K_M-értékű (10^{-6} M nagyságrendű) ciklikus nukleotid-foszfodiészteráz és a magas K_M-értékű (10^{-4} M nagyságrendű) ciklikus nukleotid-foszfodiészteráz. Ez utóbbi nemcsak a cAMP, hanem az analóg szerkezetű cGMP hidrolízisét is katalizálja és aktivitását a Ca^{2+}–kalmodulin komplex fokozza. Bizonyos sejtekben található olyan cAMP-t bontó foszfodiészteráz, amelynek aktivitását cGMP fokozza, míg zsírsejtekben például ismert egy olyan enzimtípus, amelyet az inzulin egy



5-22. ábra. cAMP képződése és elbontása

hosszú, bonyolult foszforilációs kaszkád segítségével aktivál. A fentiek is jól mutatják, hogy a cAMP-rendszer működését más jelpályák is befolyásolhatják.

A cAMP mediátorrendszer a legegyszerűbb ismert jelpálya, mert eukarióta sejtekben a cAMP szinte minden hatásáért a **cAMP-dependens protein-kináz (protein-kináz A)** felelős *(5-23. ábra)*. A protein-kináz A (már ismertetett módon történő) aktiválódásakor felszabaduló katalitikus alegysége a legkülönbözőbb fehérjék foszforilációját katalizálja. Ezáltal egyes metabolikus utakat gyorsít, más metabolikus utakat gátol, a metabolikus utakban részt vevő enzimek aktivitásának a módosítása segítségével *(5-5. táblázat)*. Nemcsak metabolikus enzimeket foszforilál a protein-kináz A, hanem például bizonyos ioncsatornák fehérjekomponenseit, a szívizom szarkoplazmás retikulumában levő kalciumpumpa egy regulátor fehérjéjét (foszfolambán), a simaizom



5-23. ábra. A cAMP-jelpálya komponensei *(G_s, stimuláló G-fehérje; G_i, gátló G-fehérje; PKA, protein-kináz A; Kat, katalitikus alegység; R_2, regulátor alegység dimér)*

kontrakcióját szabályozó Ca^{2+}–kalmodulin dependens miozin-könnyűlánc-kinázt stb., és így befolyásolni képes a Ca^{2+}-jelpálya működését is, illetve egy később ismertetendő protein-kináz foszforilációja segítségével még a növekedési faktorok jelpályájának működését is modulálhatja.

Noha különböző extracelluláris jelek, különböző sejtekben ugyanazon jelpályarendszert használják, az extracelluláris jelre adott válasz mindig sejtspecifikus, vagyis az adott sejtre jellemző. Ennek pedig az a magyarázata, hogy a cAMP-dependens protein-kináz egy adott sejtben a sejt differenciált-

5-5. táblázat. A cAMP-dependens protein-kináz néhány szubsztrátja

Szubsztrát fehérje	Foszforiláció hatása
foszforiláz-kináz	aktiválás (glikogénbontás fokozódása)
glikogén-szintetáz	gátlás (glikogénszintézis csökkenése)
foszfofruktokináz II (májban)	fruktóz-2,6-biszfoszfát bontása (glikolízis sebességének csökkenése, glukoneogenezis sebességének növelése)
piruvát-kináz (májban)	gátlás (glikolízis sebességének csökkenése)
hormonszenzitív lipáz	aktiválás (lipolízis sebességének fokozódása)
acetil-CoA- karboxiláz	gátlás (zsírsavszintézis sebességének csökkenése)
CREB-fehérje	cAMP reszponzív elemmel (CRE) szabályozott génekről transzkripció sebességének fokozódása

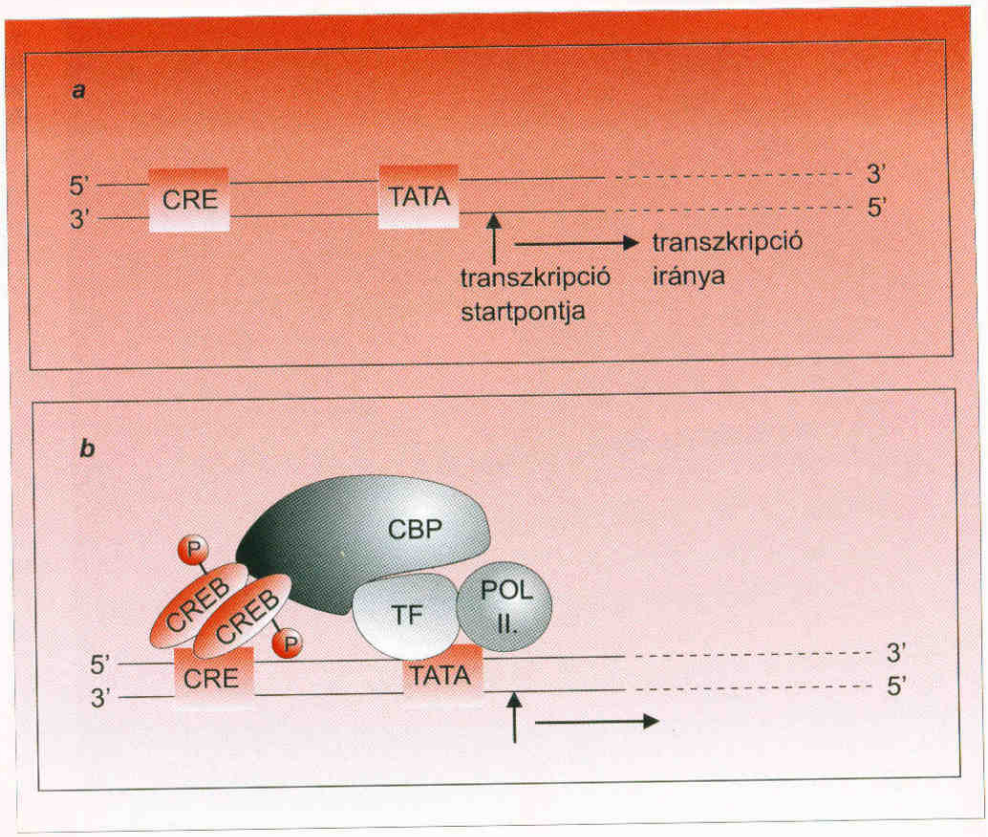
ságának megfelelő fehérjéket képes foszforilálni, a sejt differenciáltsága határozza meg, hogy egy adott sejtben milyen folyamatot szabályoz a cAMP.

Például a trigliceridek raktározására és szabad zsírsavak felszabadítására speciálódott zsírsejtekben dominánsan expresszálódó enzim a hormonszenzitív lipáz, a zsírsejtekben ez az enzim az elsődleges célpontja a protein-kináz A aktivitásának. A mellékvese kromaffin sejtjeiben és a szimpatikus neuronokban a tirozin-hidroxiláz enzim expresszálódik sejtspecifikusan, ezért ez az enzim lehet a protein-kináz A egyik szubsztrátja.

A sejtek differenciáltsági állapotának megfelelő fehérjék expressziójának fontosságát a szabályozásban jól mutatja a foszfofruktokináz II és a piruvát-kináz példája. A májsejtekben található foszfofruktokináz II és piruvát-kináz enzimeket a cAMP-dependens protein-kináz foszforilálja, ez a már ismert módon a cAMP-szint növekedésekor a májsejtekben a glikolízis sebességének a csökkenéséhez vezet és megkönnyíti, hogy a glikogén bontásából származó glukóz a vércukorszint növelésére fordítódjék. (A foszfofruktokináz II foszforilációja egyben a glukoneogenezist is gyorsítja.) A vázizomsejtekben expresszálódó foszfofruktokináz II és piruvát-kináz izoenzimek szerkezetéből hiányzik az az aminosavszekvencia, amelyet a protein-kináz A foszforilálni képes, így vázizomban a cAMP-szint emelkedése nem vezet a glikolízis gátlásához, sőt, a glikogén bontásának célja éppen a glikolízis sebességének a fokozása.

További példa a cAMP sejtspecifikus hatásaira, hogy a cAMP egyes sejttípusokban erősíti, más sejtekben éppen gátolja a Ca^{2+}-jelpálya működését. Ezt szépen mutatja a szívizomsejtekre, illetve a simaizomsejtekre gyakorolt hatása. Szívizomsejtekben a szarkoplazmás retikulum Ca^{2+}-pumpájának regulációjáért felelős foszfolambán foszforilációja segítségével, relaxációkor elősegíti a citoszolból a szarkoplazmás retikulumba történő Ca^{2+} szekvesztrálódást, és így gyorsítja a relaxációt (pozitív kronotrop hatás). Másrészt mind ezzel, mind egy lassú plazmamembrán Ca^{2+}-csatorna foszforiláció segítségével történő aktiválásán keresztül elősegíti, hogy a következő kontrakciókor a citoszol Ca^{2+}-koncentrációjának emelkedése és ezért az összehúzódás ereje még nagyobb legyen (pozitív inotrop hatás). Ezzel szemben simaizomsejtekben a protein-kináz A fő szubsztrátja a kontrakciót elindító miozin-könnyűlánc-kináz, amelynek Ca^{2+}-szenzitivitását a foszforiláció gátolja, ezért itt cAMP/Ca^{2+} antagonizmus áll fenn.

A cAMP-dependens protein-kináz azonban nemcsak meglévő fehérjék aktivitásának a szabályozására képes, hanem a transzkripció sebességének a szabályozása révén befolyásolja az egyes enzimek (fehérjék) mennyiségét is. A cAMP-dependens transzkripciós szintű szabályozás jelentős részéért a DNS-en található **CRE**-nek nevezett cisz-regulációs elem **(cAMP-reszponzív elem)** és az ezt az elemet felismerő, ehhez specifikusan kötődni képes és a cAMP-dependens protein-kináz által foszforilált, **CREB**-nek nevezett fehérje **(transzkripciós faktor)** felelős. A CRE egy rövid, palindrom nukleotidszekvencia (TGACGTCA), amely a cAMP-vel szabályozott gének promoterén helyezkedik el. Az eukarióta gének transzkripciójához mindig több transzkripciós faktorra van szükség, mert a DNS-dependens RNS-polimeráz II nem képes a transzkripciót egyedül elkezdeni *(5-24. ábra)*.

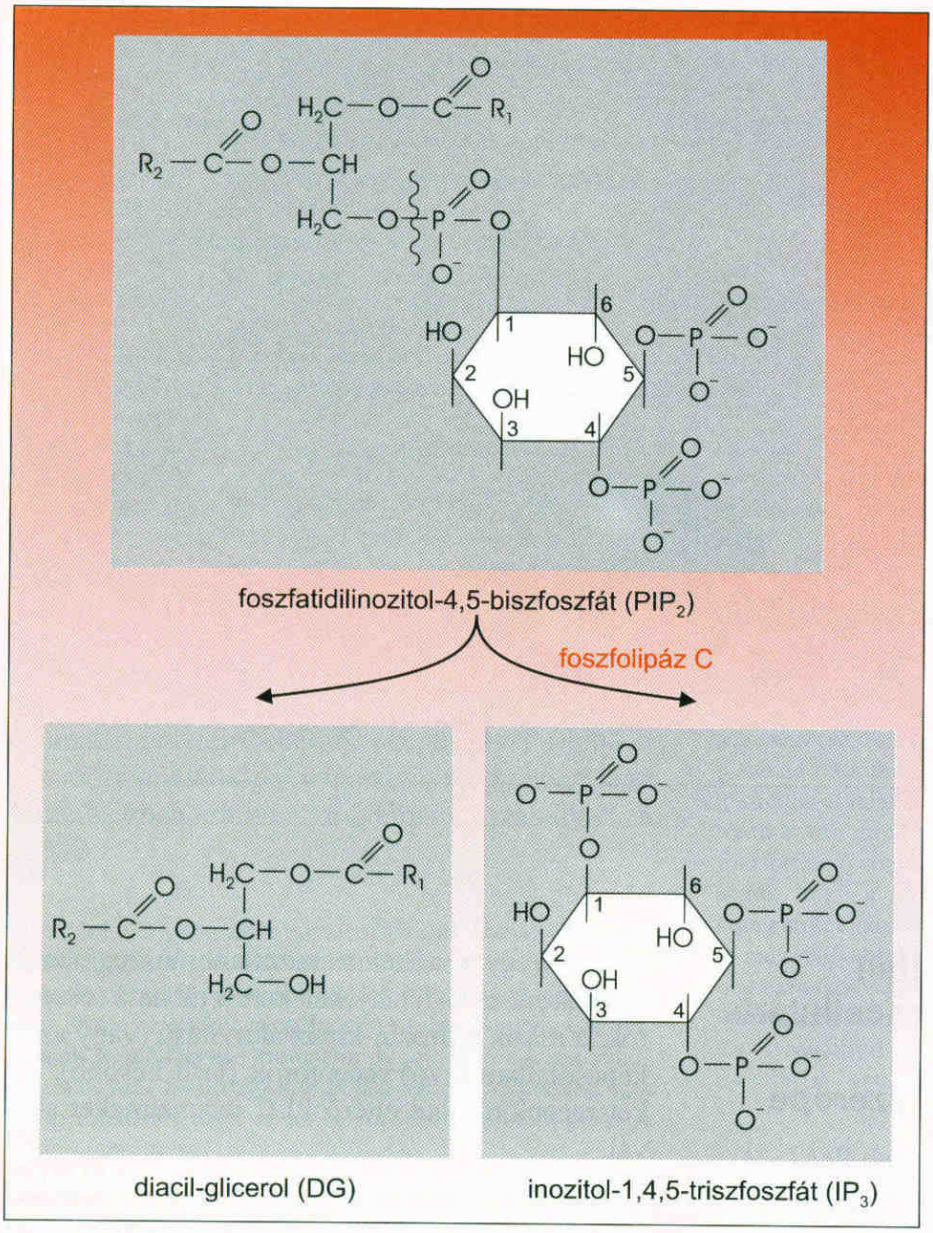


5-24. ábra. A cAMP reszponzív elem (CRE) és a CREB-fehérje foszforilációjának szerepe a cAMP-vel szabályozott gének transzkripciójának iniciációjában. (a) *A CRE és TATA elemek elhelyezkedése egy cAMP-vel regulált gén promoterén. A CREB-dimér a CRE-helyhez, a TF obligát transzkripciós faktor a TATA-boxhoz kötődik.* **(b)** *A CREB-dimér foszforilációja szükséges ahhoz, hogy egy CBP-nek nevezett közvetítő fehérje kötődjön a CREB-hez. A CBP segítségével alakul ki egy olyan komplex a CREB és a TF transzkripciós faktorok között, amelyik erősen segíti az RNS-polimeráz II bekötődését a promoter megfelelő helyére. A* **CBP koaktivátor** *fehérje, amelynek hisztonokat acetiláló aktivitása is van*

Inozitol-foszfolipid jelátviteli rendszer. A Ca^{2+} mint intracelluláris mediátor és az inozitol-1,4,5-triszfoszfát szerepe

A receptorok egy jelentős részének aktiválása a sejtekben foszfatidilinozitol-származékok hidrolízisét fokozza. Ebben a jelátviteli rendszerben a intracelluláris mediátorok a foszfatidilinozitolokra specifikus foszfolipáz C-enzim hatására keletkeznek. Jelen fejezetben az egyszerűség kedvéért, foszfolipáz C enzimről (PLC) szólunk, de ezalatt a foszfatidilinozitolokra specifikus enzim értendő. Az enzim legfontosabb szubsztrátja a plazmamembrán lipid kettős rétegében helyet foglaló foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2). A PLC hatására végbemenő hidrolízis eredménye diacil-glicerol (DG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) keletkezése, amelyek e jelpálya intracelluláris mediátorai és a sejten belül a jelátvitelt két különböző irányban viszik tovább *(5-25. ábra)*. Azok a receptorok, amelyek hatására a foszfolipáz C aktiválódik két eltérő receptorcsaládhoz tartoznak: az egyik a hét transzmembránszegmenttel rendelkező és G-fehérjéken keresztül ható receptorok, a másik a tirozin-kináz aktivitású (vagy azzal kapcsolatban levő) receptorok (lásd később), s e két receptorcsalád eltérő PLC izoenzimeket aktivál.

A **foszfolipáz C** enzimnek, amely működéséhez Ca^{2+}-ot igényel, több izoformája ismert, (β, δ és γ) amelyek között minimális a szekvenciahomológia. Az egyes izoformákon belül további alcsoportok különíthetők el (PLC-β_1, -β_2, -γ_1, -γ_2 stb). A jelátviteli folyamatokban a β- és a γ-PLC szerepét igazolták, a PLC-δ funkciója egyelőre nem ismert. **PLC–β_1** a legtöbb szövetben megtalálható és G-fehérjék hatására aktiválódik. A foszfolipáz C–β_1 enzimet a G_q-fehérjék aktiválják, az α-alegység kölcsönhatásba lép az enzimmel és a V_{max}-ot növeli. A másik két PLC izoformát (γ és δ) a $G_{q\alpha}$ nem befolyásolja. Mindazok a neurotranszmitterek, hormonok és mediátorok, amelyek receptora a membránban a G_q- (esetleg a G_i/G_0) fehérjékhez kapcsolt PLC–β-aktiválást okoznak, és ily módon indítják el a sejtválaszt *(5-26. ábra)*.

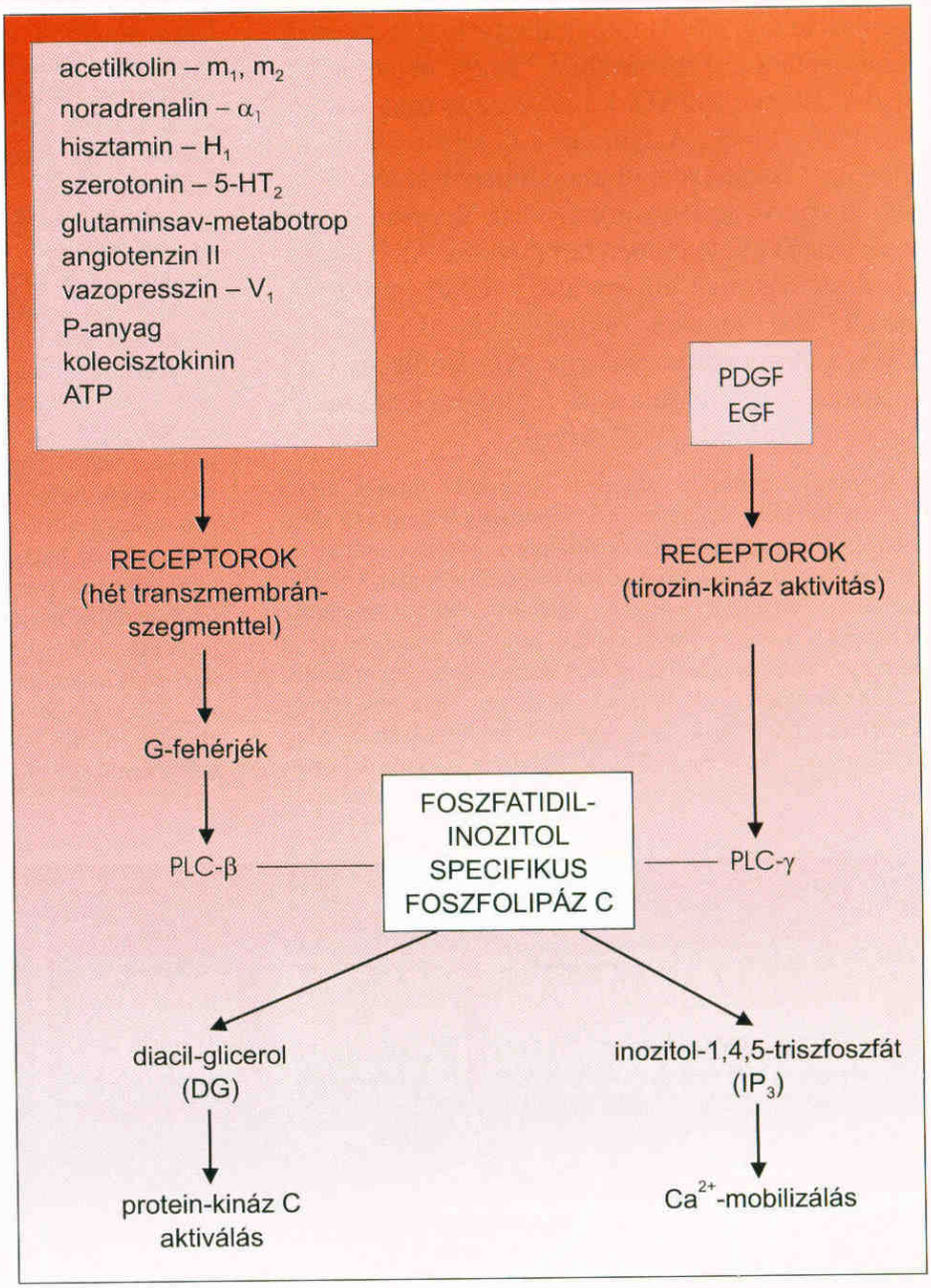


5-25. ábra. Diacil-glicerol és inozitol-1,4,5-triszfoszfát keletkezése foszfatidilinozil-4,5-biszfoszfátból a foszfolipáz C hatására

A másik PLC izoformát, a **PLC-γ**-t a tirozin-kináz receptorok aktiválják. A PLC-γ tartalmaz egy SH2-nek nevezett domént, amely sok más fehérjében is megtalálható, amelyek szintén a tirozin-kinázhoz kötődnek (lásd tirozin-kinázok). A receptor és a PLC-γ közötti kölcsönhatás az enzim foszforilációját és azt eredményezi, hogy az egyébként citoplazmában lokalizálódó enzim a membránhoz kerül, ahol szubsztrátja is található. Így nemcsak a G_q-fehérjén keresztül ható hormonok, hanem a tirozin-kináz receptorral működő növekedési faktorok is (pl. a PDGF és az EGF) IP_3 és DG keletkezést stimulálnak (5-26. ábra).

Eltérő receptorok eltérő PLC izoenzimek közreműködésével, de végül is IP_3 és vele párhuzamosan DG keletkezést okoznak. E két mediátor felelős a sejten belüli további eseményekért, amelyek közül elsőként az IP_3 irányában követjük tovább a jelátvitel folyamatát.

Az **IP_3** hatásának az a lényege, hogy emeli a citoszol szabad Ca^{2+} koncentrációját, mert vízoldékony molekula lévén eljut az intracelluláris Ca^{2+} raktárakhoz és onnan Ca^{2+}-ot mobilizál. E helyütt szót kell ejteni azokról az **intracelluláris Ca^{2+}**-raktárakról, amelyekből IP_3 és egyéb stimulusok hatására Ca^{2+} mobilizálható. A sejtek könnyen mo-



5-26. ábra. A foszfatidilinozitolra specifikus foszfolipáz C (PLC) izoenzimek aktiválása két eltérő receptormechanizmussal. *Piros keretben felsorolva néhány példa látható azokból az agonistákból és receptortípusokból, amelyek PLC-aktiválást okoznak (PDGF, trombocita eredetű növekedési faktor; EGF, epidermális növekedési faktor)*

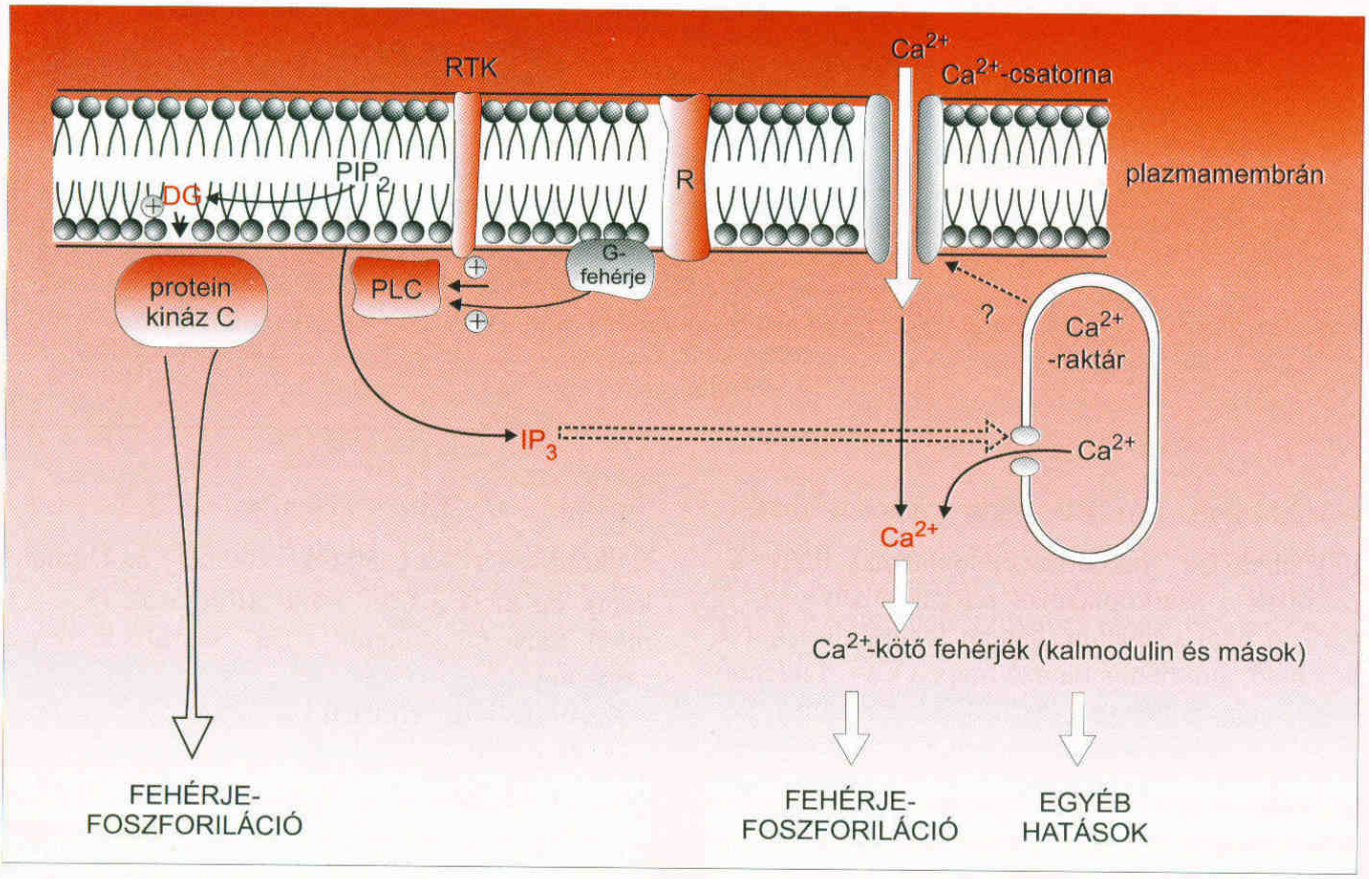
bilizálható Ca^{2+}-raktára az endoplazmás, illetve az izomban a szarkoplazmás retikulumban van. A Ca^{2+} itt nem szabadon, hanem fehérjékhez kötve található, ami biztosítja azt, hogy a Ca^{2+} a jelentékeny magas koncentráció (mM-os tartomány) ellenére nem csapódik ki. A számos Ca^{2+}-kötő fehérje közül, amelyek az endoplazmás és szarkoplazmás retikulumban jelen vannak, a kalszekvesztrin (63 kDa) és a kalretikulin (46 kDa) szerepe látszik egyértelműnek. A kalszekvesztrin a harántcsíkolt, a szív- és a simaizomban található, a kalretikulin a legtöbb sejtféleségben jelen van. Nagy kapacitással kötik a Ca^{2+}-ot (~50 Ca^{2+} kötőhely molekulánként), de kicsi a Ca^{2+} iránti affinitásuk (K_d ~ 1 mM), tehát megengedik a Ca^{2+} kiszabadulását a raktárból.

Két olyan intracelluláris Ca^{2+}-csatorna van, amelyen keresztül Ca^{2+}-felszabadulás történhet intracelluláris Ca^{2+}-raktárból, s ezek egyike az IP_3-receptor az endoplazmás retikulumban.

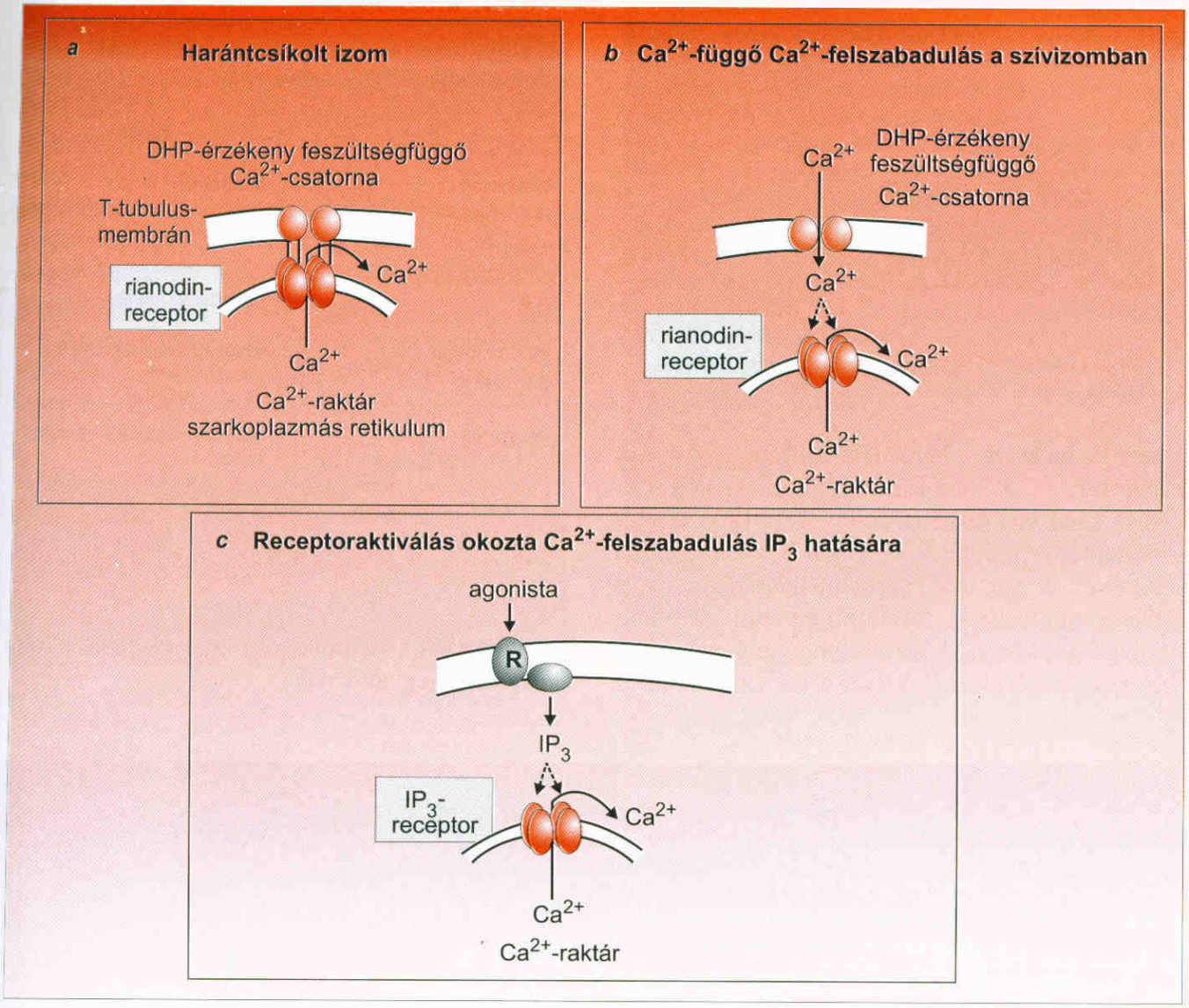
A plazmamembrán-receptorok aktiválásának hatására keletkező IP_3 diffúzióval eljut az endoplazmás retikulumhoz, ahol kötődik a receptorához, ami egyszersmind Ca^{2+}-csatorna is. Az IP_3-recep-

tor-család tagjai (>3) több különböző gén és alternatív splicing produktumai, négy nagy alegységből állnak (300 kDa), melyek egy csatorna körül rendeződnek. A fehérjét a C terminális intramembrán domén rögzíti az endoplazmás retikulum membránhoz, az IP_3 kötőhelyet az N-terminális citoplazmába nyúló domén tartalmazza. Az IP_3 kötődése egymás után a négy alegységhez konformációváltozást indukál, aminek következtében a Ca^{2+}-ra permeábilis csatorna aktiválódik és Ca^{2+} szabadul ki az endoplazmás retikulum Ca^{2+}-raktáraiból a citoszolba *(5-27. ábra)*.

A másik csatorna, amelyen keresztül intracelluláris Ca^{2+}-mobilizálás történhet az endoplazmás, valamint a szívizom és a harántcsíkolt izom szarkoplazmás retikulumban található, az IP_3 receptorhoz szerkezet és funkció szempontjából egyaránt nagyon hasonló **rianodinreceptor** (család-3). Nevüket onnan kapták, hogy egy rianodin nevű növényi alkaloida is aktiválja őket. A rianodinreceptor sokféle sejtben (harántcsíkolt izom, szívizom, neuronok, simaizom stb.) hozzájárul Ca^{2+}-szignálok kialakulásához. Meg kell említeni, hogy bár az IP_3 és a rianodinreceptorok között sok a hasonlóság, nagyon lényegesen különbözhet a működésük és a funkciójuk. Ez különösen igaz a harántcsíkolt izomban és a szívizomban található rianodinreceptorokra. A **harántcsíkolt izomban** a szarkoplazmás retikulum rianodinreceptorai a depolarizáció hatására aktiválódnak. A feszültségváltozást a T-tubulusok dihidropiridin-érzékeny csatornái (lásd 441. oldal) érzékelik, amelyek strukturálisan és funkcionálisan egyaránt kapcsolódnak a rianodinreceptorokhoz, s a létrejövő konformációváltozás a rianodinreceptor Ca^{2+}-csatorna aktiválását eredményezi. A szarkoplazmás retikulumból ily módon felszabaduló Ca^{2+} indítja el az izomkontrakció folyamatát. A **szívizomban** ezzel szemben a plazmamembrán-depolarizáció következtében, a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákon keresztül az extracelluláris térből a sejtbe lépő Ca^{2+} váltja ki az intracelluláris Ca^{2+}-raktárakból történő Ca^{2+}-mobilizálást. A szívizomban minden egyes kontrakció kiváltója a kismértékű extracelluláris Ca^{2+}-belépés hatására létrejövő hirtelen Ca^{2+}-kiáramlás a szarkoplazmás retikulumból. Ez az ún. Ca^{2+}-függő Ca^{2+}-felszabadulás a rianodinreceptorokon keresztül történik, s nemcsak a szívizomban, hanem más sejtekben, pl. a neuronokban is hasonlóan működik. Az agonisták hatására létrejövő intracelluláris Ca^{2+}-felszabadulást, az iméntiektől eltérően, a már ismertetett módon keletkező IP_3 váltja ki, közvetlenül aktiválva az IP_3-receptor-csatornát *(5-28. ábra)*.



5-27. ábra. A foszfatidilinozitol jelátviteli rendszer vázlata. *Rövidítések: DG, diacilglicerol; PIP_2, foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; PLC, foszfolipáz C; R, receptor; IP_3, inozitol-1,4,5-triszfoszfát; RTK, receptor-tirozin-kináz*



5-28. ábra. Ca^{2+}-felszabadulás az intracelluláris Ca^{2+}-raktárakból. *Az ábrához a magyarázatot lásd a szövegben (DHP, dihidro-piridin; IP_3, inozitol-1,4,5-triszfoszfát)*

Az intracelluláris Ca^{2+}-szignál ($[Ca^{2+}]_i$-emelkedés) számos sejtben nem kizárólag az endoplazmás retikulumból a citoszolba történő Ca^{2+}-felszabadulás eredménye, hanem hozzájárul ehhez a plazmamembránon keresztül létrejövő extracelluláris Ca^{2+}-beáramlás is (5-27. ábra). A Ca^{2+}-raktárak feltöltöttsége eddig nem tisztázott mechanizmussal befolyásolja a plazmamembránon keresztüli Ca^{2+}-beáramlást: amikor a Ca^{2+}-raktárak feltöltöttek, nincs Ca^{2+}-beáramlás a sejtbe, amikor a plazmamembrán közelében elhelyezkedő Ca^{2+}-raktárakból az IP_3 mobilizálja a Ca^{2+}-ot a „raktárkészlet" csökken, aktiválódik az extracelluláris Ca^{2+}-belépés („store-operated" Ca^{2+}-belépés). Ez egyszersmind az intracelluláris Ca^{2+}-raktárak feltöltését is lehetővé teszi.

Kísérleti körülmények között, számos sejtféleségben az agonisták által okozott intracelluláris Ca^{2+}-szignál nem folyamatos $[Ca^{2+}]_i$-emelkedést jelent, hanem fluktuálva ún. kalciumoszcilláció lép fel, amely egy pontról kiindulva terjed a sejten belül. Ennek pontos magyarázata és jelentősége még nem ismert.

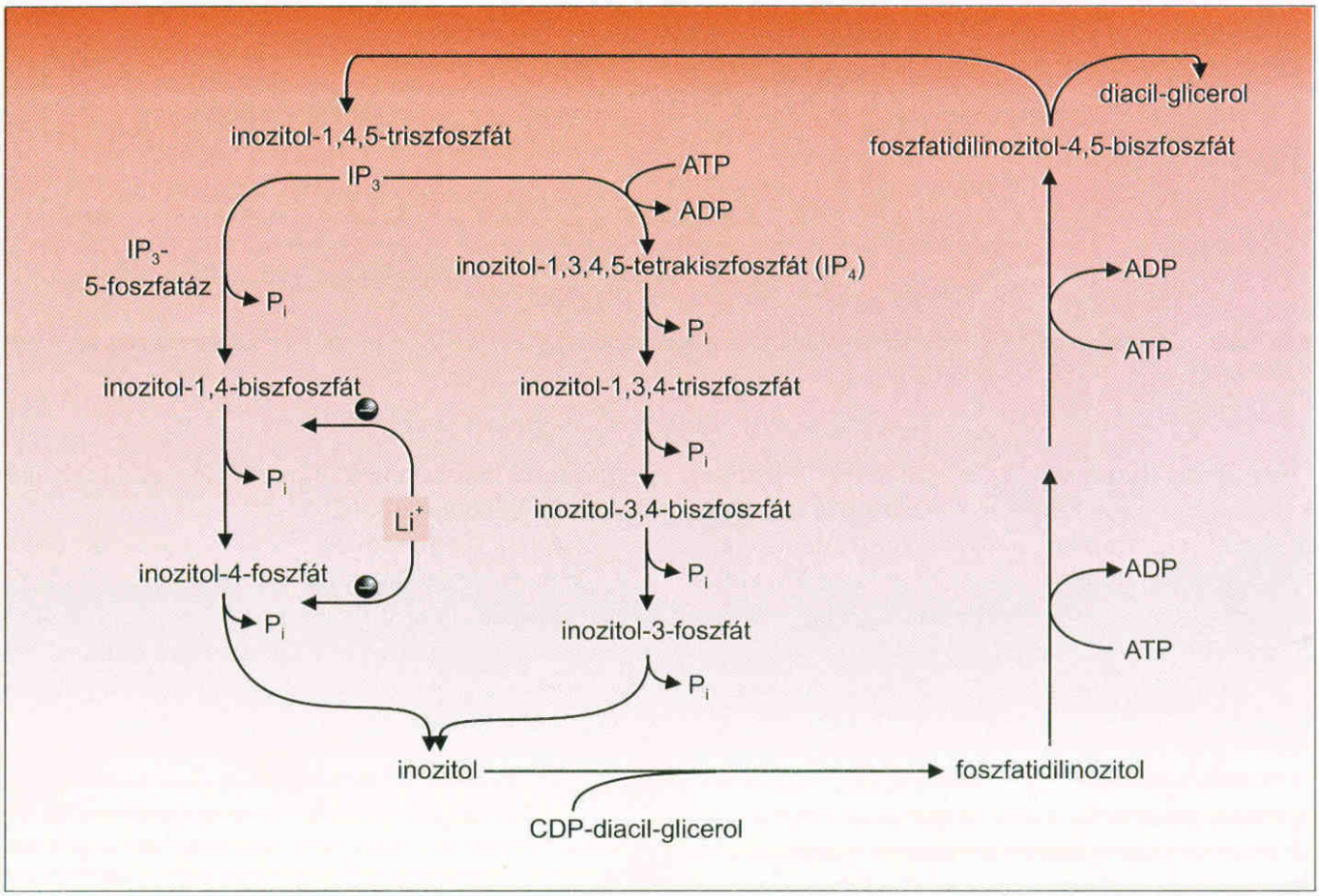
Természetesen az IP_3 metabolizálódik is, amelynek során intracelluláris foszfatázok hatására három lépésben defoszforilálódik és inozitol keletkezik, ami felhasználódik a foszfatidilinozitol újraszintéziséhez. Az IP_3-ból egy kináz hatására a citoplazmában inozitol-1,3,4,5-tetrakiszfoszfát

(IP_4) is keletkezik, amelynek közvetlen szerepe lehet az intracelluláris [Ca^{2+}] növelésében. (Az IP_3-at foszforiláló kináz enzim K_M-je alacsonyabb, mint az IP_3-5-foszfatáz enzimé, azaz az IP_4 keletkezés elsődleges az IP_3-ról történő foszfát hidrolízishez képest.) Az IP_4 metabolizmusa is egymást követő defoszforilációs lépések eredményeképpen inozitol keletkezéséhez vezet. Az IP_3-metabolizmus vázlatát a *5-29. ábra* mutatja. Az inozitol-foszfátok metabolizmusát a **Li^+** befolyásolja, amely gátolja az 1,4-IP_2 → IP átalakulást, ezáltal a foszfatidilinozitolok újraszintézisét. A Li^+ hatékony gyógyszer a psychosis maniacodepressiva kezelésében, lehetséges, hogy terápiás hatékonysága összefügg az inozitol-foszfolipid jelátviteli rendszerrel ható receptorhatások csökkentésével.

5-6. táblázat. Az inozitol-lipid jelpálya által közvetített néhány sejtválasz

Sejt	Hatás
simaizom bronchus érfal	kontrakció
máj	glikogénlebomlás
nyálmirigyek pancreas	emésztőenzimek szekréciója
neuronok	neurotranszmitter-felszabadulás

Az IP_3 hatására tehát a **citoszolban** egy másik **mediátor**, a **Ca^{2+}** mobilizálódik, s azoknak a sejtválaszoknak egy részéért, amelyeket PLC-t aktiváló receptorok indítanak el, végül is a Ca^{2+} tehető felelőssé. Az *5-6. táblázatban* néhány olyan hatás látható, amelyeket a foszfatidilinozitol jelátviteli úton, a Ca^{2+} vált ki. A kérdés, hogy melyek azok a fehérjék, amelyek működését a Ca^{2+} regulálja és melyek azok a sejtfunkciók, amelyek ennek következtében megváltoznak.



5-29. ábra. Az inozitol-foszfát-metabolizmus vázlata

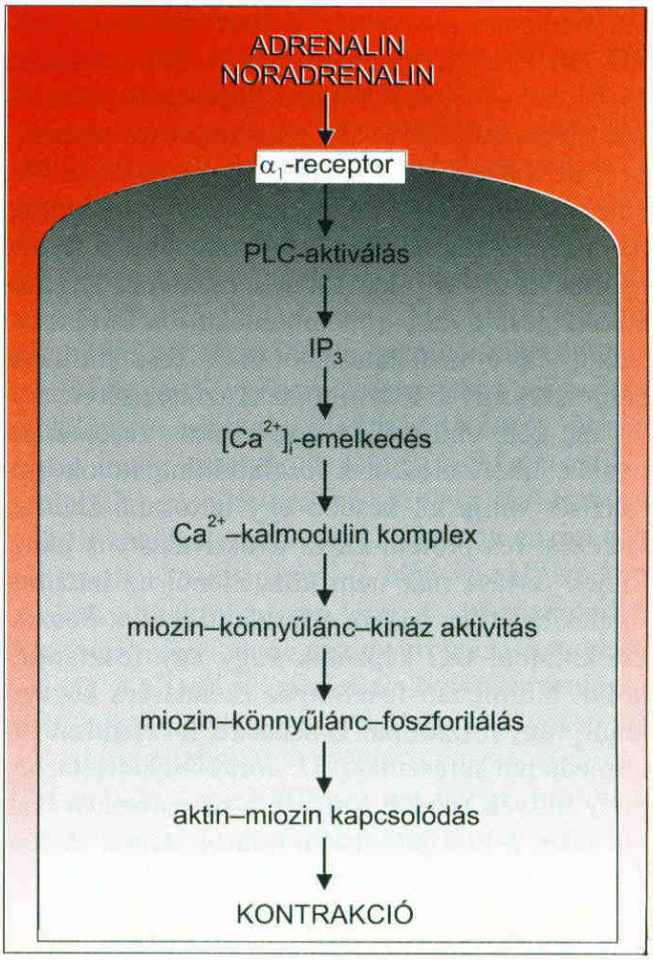
A legáltalánosabb és minden sejtben megtalálható Ca^{2+}-kötő fehérje a már említett kalmodulin (469. oldal). A Ca^{2+}–kalmodulin komplex különböző enzimekhez kapcsolódik, amelyeket aktivál. Az *5-7. táblázatban* néhány ilyen enzim látható, közülük a Ca^{2+}–kalmodulin függő protein-kinázokról, amelyek számos fehérjét foszforilálnak és ezáltal regulálnak, már szó volt. A táblázatban felsorolt többi enzimhez a Ca^{2+}–kalmodulin közvetlenül kapcsolódik. Nagyon jelentős sejtfunkció változások magyarázhatók a Ca^{2+}–kalmodulin komplex közvetlen aktiváló hatásával.

5-7. táblázat. Néhány fehérje, amelyek a $[Ca^{2+}]_i$-növekedés hatására létrejövő sejtválaszokban játszanak szerepet

Ca^{2+}–kalmodulin által aktivált enzimek	Egyéb Ca^{2+}- kötő fehérjék
Ca^{2+}–kalmodulin függő protein-kinázok plazmamembrán Ca^{2+}-pumpa miozin-könnyűlánc-kináz ciklikus nukleotid-foszfodiészteráz (magas K_M-ű) glikogén-foszforiláz-kináz kalcineurin (protein foszfatázok) nitrogén-monoxid-szintáz	protein-kináz C troponin C kalpainok annexinek

Ilyen pl. a simaizmok kontrakciója (5-6. táblázat), amely a miozin-könnyűlánc-kináz (lásd 6.2. fejezet) aktiválásának a következménye. A szimpatikus izgalom hatására az érfalban létrejövő simaizom-kontrakció (vérnyomás emelkedés) mechanizmusa tehát lépésről lépésre nyomon követhető és molekuláris szinten értelmezhető *(5-30. ábra)*. Hasonlóképpen, minden elemében ismert a glikogénmobilizálás mechanizmusa a májban pl. az adrenerg α_1-receptor aktiválás következtében. Erről a 2.2. fejezetben már szó esett.

Ma még nem minden sejtfunkció pontos molekuláris mechanizmusa ismert vagy azért, mert nem tudjuk, hogy az ismert sejtfunkció, pl. szekréciók, neurotranszmitter-felszabadulás mögött milyen



5-30. ábra. Az érfal simaizom-kontrakció mechanizmusa α_1-receptor-aktiválás következtében

molekuláris történés van, vagy azért, mert ismert Ca^{2+}-kötő és Ca^{2+} hatására regulálódó fehérjékhez egyelőre nem tudunk funkciót rendelni. Részben ilyenek az 5-7. táblázatban bemutatott Ca^{2+}-kötő fehérjék. Ezek közül a harántcsíkolt izom kontrakciójának regulációjában szerepet játszó troponin C szerkezetileg nagyon hasonló a kalmodulinhoz. Ismert Ca^{2+}-kötő fehérjék a kalpainok, amelyek intracelluláris neutrális proteázok és Ca^{2+} hatására aktiválódva számos fehérje részleges vagy teljes proteolízisét katalizálják. Fiziológiás szerepük kevéssé ismert csakúgy, mint az annexinek családjáé, amelyek Ca^{2+} segítségével a membránban jórészt a savanyú foszfolipidekhez kötődnek (aminek következtében megakadályozzák, hogy ezek a foszfolipáz A_2 szubsztrátjai legyenek). A család egyes tagjai az exocitózisban játszanak szerepet.

Mint az eddigiekben láttuk az IP_3 és a Ca^{2+} az inozitol-lipid jelpálya egyik irányát jelenti. A má-

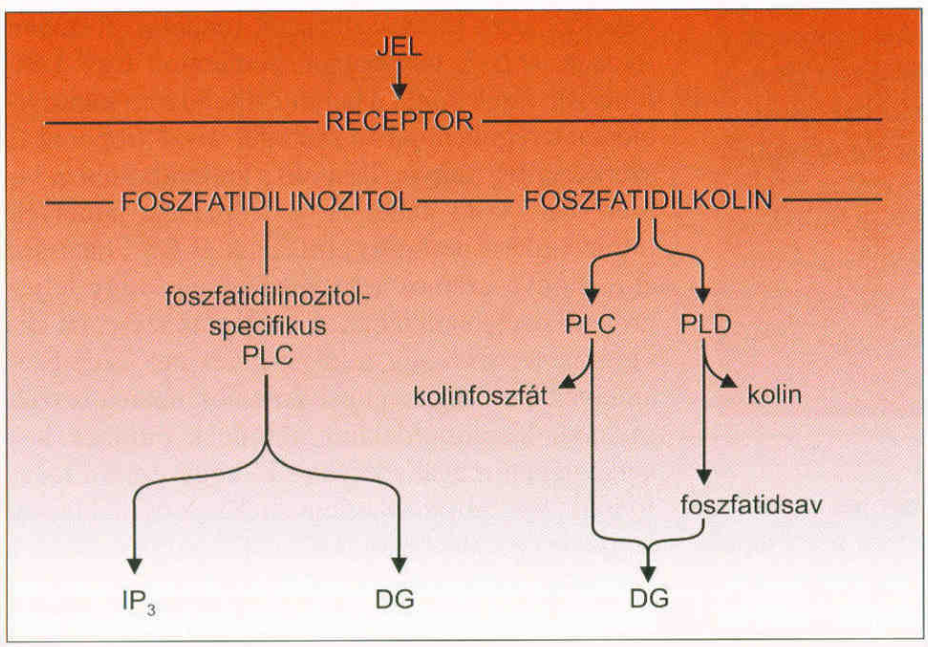
sik irányban a jelátvitelért a **diacil-glicerol** a felelős, amely a PLC hatására a PIP_2-ből keletkezik (5-25. és 5-27. ábra). A diacil-glicerol a sejtmembránban marad és aktiválja a membrán környezetében, de a citoszolban található protein-kináz C-t, ami ennek hatására a membránhoz asszociálódik. Az aktiválás, amelynek mechanizmusát már tárgyaltuk (lásd 468. oldal) átmeneti, mivel a DG metabolizmusa gyors, a membránban foszfatidsavvá alakul és újra felhasználódik a foszfatidilinozitolok (és egyéb foszfolipidek) szintézisére.

Meg kell említeni, hogy számos receptoraktiválás, amely először a foszfatidilinozitolok hidrolízisét váltja ki, később egy tartósabb DG-keletkezést (és protein-kináz C aktiválást) is okoz. Ennek forrása már nem közvetlenül az inozitollipidek hasítása, hanem a foszfatidilkolin. Foszfatidilkolinból DG képződik vagy egy foszfatidilkolint hidrolizáló foszfolipáz C hatására közvetlenül, vagy foszfolipáz D hatására, foszfatidsav intermedieren keresztül *(5-31. ábra)*. Nem tisztázott, hogy milyen módon történik a receptoraktiválást követően a foszfatidilkolin hidrolízisének aktiválása. A két fázisú – egy átmeneti gyors és egy tartósabb – DG keletkezésnek megfelelően aktiválódnak a protein-kináz C különböző izoenzimei. Jelen pillanatban még nagyon hiányosak az ismereteink arról, hogy milyen PKC szubsztrátok milyen sejtfunkciók regulálásában játszanak szerepet. A rendszer komplexitásához hozzájárul az izoenzimek nagy száma (~12), és a szöveti specificitás, mind az egyes izoenzimek, mind a lehetséges szubsztrátok tekintetében. Néhány szubsztrát és a foszforiláció hatására bekövetkező funkcióváltozás azonban jól definiálható. A PKC egyik fontos szubsztrátja pl. az EGF-receptor, amiről a 487. oldalon lesz szó. PKC hatásra foszforilálódik számos ioncsatorna (K^+-csatorna, Ca^{2+}-csatorna) az idegrendszerben, receptor (pl. nikotinreceptor) és membrántranszport fehérje (Na^+–H^+ cseretranszport).

A guanilát-cikláz és a ciklikus GMP jelentősége a jelátvitelben. A nitrogén-monoxid biológiai szerepe

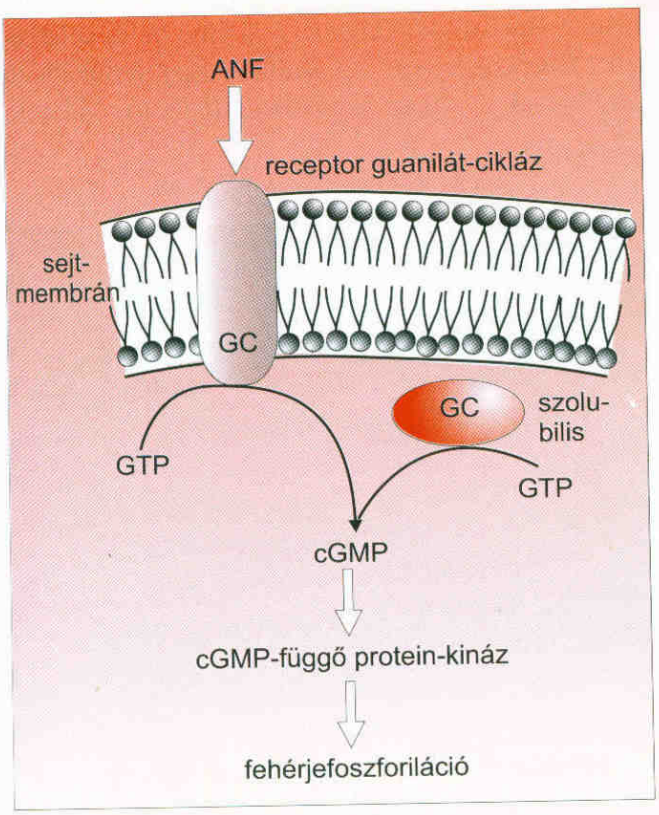
A ciklikus GMP (cGMP) a sejtekben GTP-ből keletkezik (a cAMP analógiájára) a guanilát-cikláz hatására. Bár a cGMP-nek egyértelműen intracelluláris mediátor szerepet tulajdonítanak, az egész rendszer működéséről sokkal kevesebbet tudunk, mint a cAMP-vel működő receptor–jelátviteli rendszerről.

Lokalizációját, alapvető szerkezetét és működését illetően kétféle guanilát-cikláz ismert, amelyek ugyanazt a folyamatot, a cGMP keletkezését katalizálják: az egyik a plazmamembránban lokalizáló-



5-31. ábra. Diacil-glicerol keletkezése a jelátvitel során. *(PLC, foszfolipáz C; IP_3, inozitol-1,4,5-trisz-foszfát; DG, diacilglicerol; PLD, foszfolipáz D)*

dó ún. **partikuláris enzim**, a másik a citoplazmában található **szolubilis enzim** *(5-32. ábra)*. A partikuláris enzim egyszersmind receptor is, bár még kevés extracelluláris szignál ismert, amely guanilát-cikláz aktivitású receptorhoz kötődik. Az első és mindezideig a legfontosabb ezek közül a pitvari nátriumürítő faktor (ANF – atrial natriuretic factor), amely vazodilatációt, diuresist, natriuresist és aldoszteronszintézis-gátlást okoz. Először a pitvarban azonosították, később kiderült, hogy sok más helyen is szintetizálódik. A plazmamembránban található kétfajta receptora közül az egyik a G-fehérjékhez kapcsolódik, a foszfolipáz C stimulációját és az adenilát-cikláz gátlását okozza. A másik ANF-receptor egy 130 kDa molekulatömegű monomer, amelynek aktiválása cGMP képződéséhez vezet. Szintén a membránban lokalizálódik az a receptor, amelynek endogén ligandja ismeretlen, de amely az E. coli és egyéb bélbaktériumok hőstabil toxinjának a receptora a vékony- és vastagbélben. A toxinok hatására guanilát-cikláz aktiválás jön létre, cGMP keletkezik és a következményes klorid- és egyéb iontranszport-zavarok miatt diarrhoea (hasmenés) lép fel.



5-32. ábra. cGMP keletkezése a partikuláris és a szolubilis guanil-cikláz hatására. *ANF, pitvari nátrium ürítő faktor; GC, guanilát-cikláz (Lehet a cGMP-nek közvetlen, a cGMP-dependens protein-kináztól független hatása is pl. cGMP-dependens cAMP foszfodiészteráz)*

Eltérő szerkezetű az ún. **szolubilis guanilát-cikláz**, amely a citoplazmában lokalizálódik. A fehérje két alegységből (77 és 70 kDa) álló heterodimer. Mindkét alegység karboxi-terminális régiója nagyfokú szekvenciahomológiát mutat a membránban lokalizálódó guanilát-cikláz karboxi-terminális régióval. A szolubilis guanilát-cikláz fontos tulajdonsága, hogy **hem prosztetikus csoporttal** működik. A **nitrogén-monoxid (NO)** és minden olyan anyag, amelyből a sejtben NO keletkezik, a szolubilis guanilát-ciklázt aktiválja és fokozott cGMP keletkezéshez vezet. A NO az enzim hem prosztetikus csoportjával (a hem vassal) lép kapcsolatba, nitrozohem jön létre, s – bár nem tudjuk pontosan miért – ez az enzimaktivitás fokozódásával jár. A NO nagyszámú fiziológiás és patológiás hatásainak hátterében ez a molekuláris kölcsönhatás áll (lásd alább).

A cGMP – a cAMP-hez hasonlóan – protein-kinázt aktivál, amit cGMP-függő protein-kináznak (protein-kináz G) hívunk (lásd még 467. oldalt). Szubsztrátjai között több olyan ioncsatorna (pl. feszültségfüggő Ca^{2+}-csatorna) és transzportfehérje (pl. Na^{+}–Ca^{2+} cseretranszporter) van, amellyel magyarázható a cGMP-szint emelkedéssel párhuzamosan, simaizmokban észlelt $[Ca^{2+}]_i$-csökkenés. Ez lehet a molekuláris mechanizmusa az érfal simaizom-relaxációjának, ami minden olyan esetben létrejön, amikor a guanilát-cikláz (akár a partikuláris, akár a szolubilis) aktiválódik (pl. ANF vagy NO hatására).

Létezik olyan speciális jeltovábbító rendszer is, amelynek működése során az extracelluláris jel nem a citoszol cGMP szintjének a növekedését, hanem éppen ellenkezőleg a **cGMP szint csökkenését** idézi elő. Ez a rendszer a fényt érzékelő retinapálcikákban található. Ezekben a sejtekben (sötétben) a cGMP nyugalmi koncentrációja nagyságrendekkel magasabb mint a többi sejtekben általában és a **cGMP közvetlenül** (nem a protein-kináz G segítségével) egy kationcsatornát tart nyitva, annak egyik fehérjekomponenséhez kötődve. A sejtmembrán nyugalmi polarizációját (a membránpotenciál a szokásos –70 mV helyett –30 mV) az ezen ioncsatornán beáramló és a pumpaenzimek segítségével a sejtből eltávolított ionok által terem-

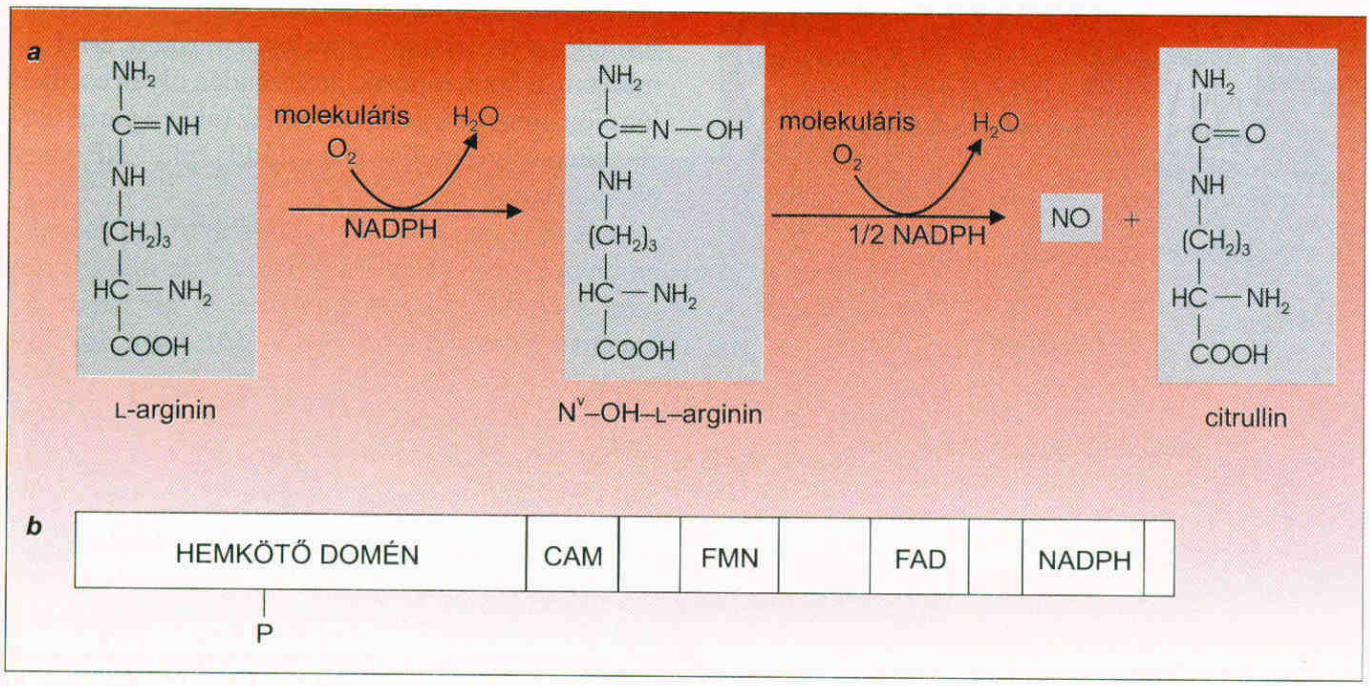
tett egyensúly határozza meg. Fény (fotonok) hatására (itt nem részletezett mechanizmus segítségével) a pálcikák külső korongjában elhelyezkedő rodopszin aktiválódik. A rodopszin a heterotrimer G-fehérjék családjába tartozó G_t (transzducin) segítségével aktivál egy **specifikus cGMP-foszfodiészterázt**, amely a cGMP-t 5' GMP-vé hidrolizálja. A cGMP-szint csökkenésekor az ioncsatorna záródik, de mert az ionpumpa tovább működik, az ionkoncentráció csökkenése a plazmamembrán hiperpolarizációját hozza létre. A retinapálcikák plazmamembránjában történő változás az alapja a fény érzékelésének.

A nitrogén-monoxid keletkezése és jelentősége

A nitrogén-monoxid (NO) a legkisebb és az első gáz halmazállapotú molekula, amelyről az utóbbi években igazolták, hogy fontos mediátor és neurotranszmitter funkciót tölt be és jelentőséggel bír a cardiovascularis rendszerben, az immunfolyamatokban és az idegrendszerben. A terápiában régóta értágítóként használt nitrovegyületekről beigazolódott, hogy hatékonyságukért a szervezetben belőlük keletkező NO a felelős.

In vivo a NO a sejtekben argininből keletkezik a **nitrogén-oxid-szintáz (NOS)** hatására. A reakció az *5-33. ábrán* bemutatott módon, két lépésben megy végbe, melynek során N^{ω}-OH-L-arginin köztitermék keletkezik. A reakcióban az arginin guanidincsoportján oxidáció történik, a reakció végeredménye a NO mellett citrullin keletkezése. Az oxidációban öt kofaktor vesz részt: a hem, NADPH, FAD, FMN és a tetrahidro-biopterin. A NOS klónozása és a szerkezetvizsgálat alapján azonosították azokat a szekvenciákat, amelyekhez a kofaktorok kötődnek. (Jelentős szekvenciahomológia van a NOS és a citokrom P450-reduktáz között.)

A nitrogén-oxid-szintáz **konstitutív** és **indukálható** formában fordul elő. Konstitutív enzimet, vagyis amely permanensen része egy sejt enzimkészletének az endothelsejtekben és az idegrendszerben találtak. Indukálható enzim van a makrofágokban, ahol normálisan nincs detektálható mennyiségben jelen, csak stimulusra – citokinek vagy bakteriális lipopoliszacharid endotoxinok hatására – a stimulust követő 2–4 órán belül keletkezik. Bár kezdetben azt hitték, hogy indukálható NOS csak a makrofágokban található, kiderült,



5-33. ábra. A nitrogén-monoxid-szintáz által katalizált reakció (a) és az enzimen a kofaktor kötőhelyek, valamint a cAMP-függő foszforiláció helyének a sematikus ábrázolása (b). *Rövidítés: CAM, kalmodulin*

hogy sok más szövetben, pl. a májban és az endothelsejtekben is jelen van.

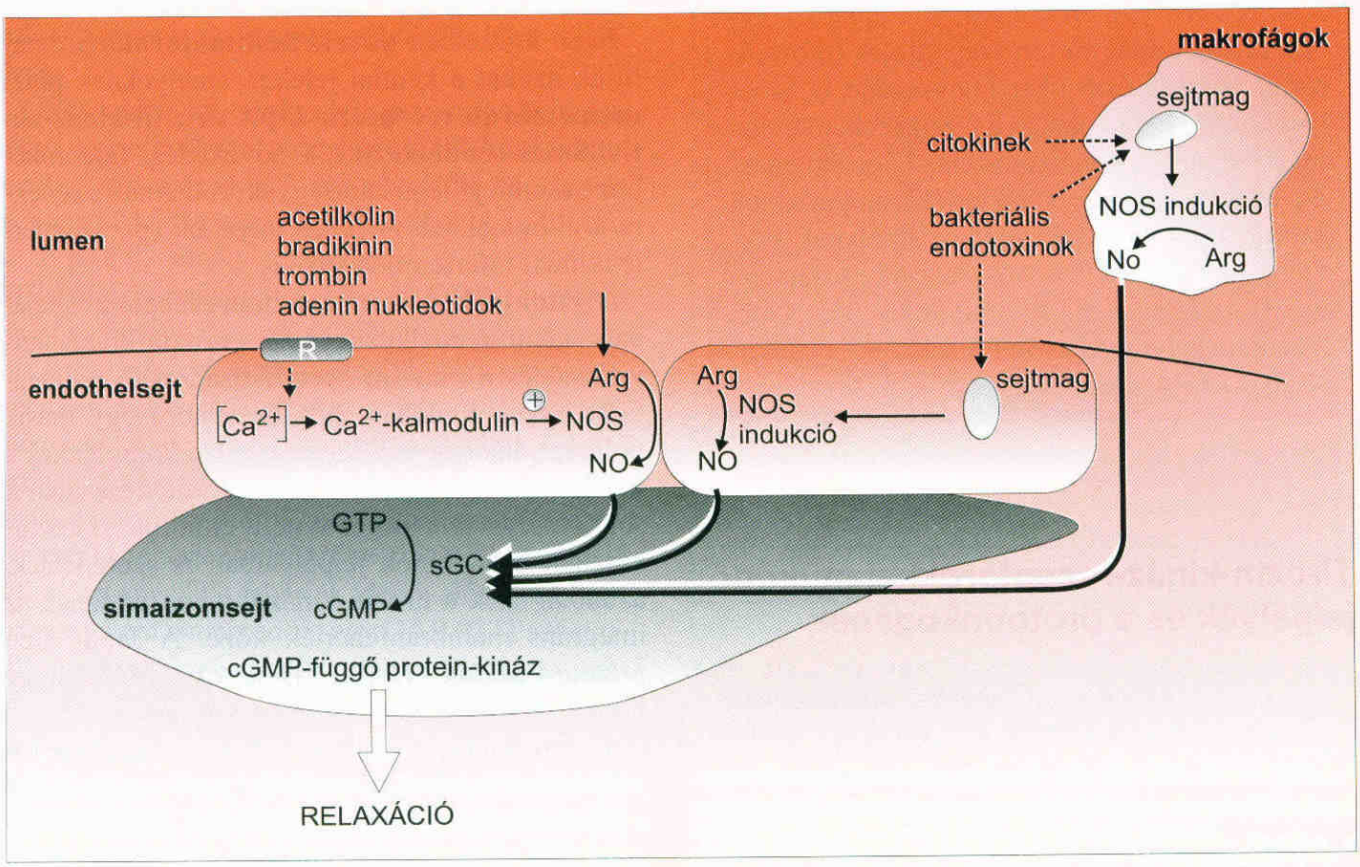
Jelentősen különbözik a konstitutív és az indukálható enzimek regulációja. Az agyban és az endothelsejtekben az enzim legfontosabb stimulálója a kalcium; a Ca^{2+}–kalmodulin a NOS-hoz kötődik és aktiválja az enzimet. Olyan stimulusok tehát, amelyek a citoszol Ca^{2+}-szintjét emelik, az endothelsejtekben és a neuronokban (azokban, amelyek rendelkeznek NOS enzimmel) NO-szintézist indítanak el. Ezekben a sejtekben a kalmodulinantagonisták (pl. trifluoperazin) a NO szintézisét gátolják.

Az indukálható NOS aktivitása nem függ az intracelluláris Ca^{2+}-tól, annak ellenére, hogy az enzim szorosan köti a kalmodulint. (Szemben a konstitutív enzimmel, amely csak a Ca^{2+}–kalmodulin komplexet köti.) Ha egyszer a NOS megszintetizálódott, a sejtekben permanens NO-szintézis történik.

A NOS-t protein-kinázok (A, C, G és Ca^{2+}–kalmodulin függő) foszforilálják, ami a katalitikus aktivitást csökkenti. A NO-szintézis kompetitív gátlói az argininanalógok (amelyekben a guanidincsoportban különböző szubsztitúciók vannak), amelyekhez nagy terápiás reményeket fűznek.

A NO gáz halmazállapotú molekula és a keletkezés helyéről diffúzióval jut el a környező sejtekhez. Hatásának erőssége és tartama attól függ, hogy milyen távolságra diffundál. A NO féléletideje általában 10–30 s, mert a sejtekben és a keringésben gyorsan átalakul. A keringésben többek között az oxihemoglobinnal, a sejtekben az oxigénnel és oxigén szabad gyökökkel reagál és nitritté, illetve nitráttá alakul.

A nitrogén-oxid számos enzimmel kölcsönhatásba lép, amelyek vasat tartalmaznak. Jól ismert a guanilát-cikláz aktív centrumában lévő



5-34. ábra. Simaizom-relaxáció az érfalban NO hatására. *Az endothelsejtekben a konstitutív NOS-t (nitrogén-monoxid-szintázt) receptorstimuláció aktiválja. A NOS makrofágokban és endothelsejtekben indukálható. (Arg, arginin; NO, nitrogén-monoxid; sGC, szolubilis guanilát-cikláz)*

hem prosztetikus csoporttal történő kölcsönhatása és a következményes enzimaktiválás. Ez azért érdemel külön kiemelést, mert megmagyarázza a NO vaszkuláris hatását. Az érfal endothelsejtjeiben a NOS aktiválódik, amikor az intracelluláris [Ca^{2+}] emelkedik és a létrejövő Ca^{2+}–kalmodulin komplex a NOS-hoz kötődik. Az argininből keletkező NO a környező simaizomsejtekbe diffundál, ahol aktiválja a szolubilis guanilát-cikláz enzimet. A létrejövő simaizom-relaxációnak jelen ismereteink szerint az a legvalószínűbb oka, hogy a cGMP-függő protein-kináz hatására csökken a $[Ca^{2+}]_i$. Az endothelsejtekben számos stimulus IP_3-keletkezésen (vagy közvetlen Ca^{2+}-beáramláson) keresztül Ca^{2+}-szignált okoz, közülük elsőként az acetilkolin hatása volt ismert. Hosszú időn keresztül csak EDRF (endothel-derived relaxing factor)-nak nevezték azt a feltételezett anyagot, ami az acetilkolin hatására az endothelsejtekből felszabadul és érfal-relaxációt okoz. Erről az anyagról bebizonyosodott, hogy azonos a NO-dal. NO felelős a terápiában régóta használt értágító nitrovegyületek (nitroglicerin, nitromint stb.) hatékonyságáért is, amelyekből NO keletkezik és a fenti mechanizmussal az érfalban simaizom-relaxációt okoznak. Az endothelsejtekben bakteriális endotoxinok hatására a NOS indukálható is, amelynek aktivitása nem függ a Ca^{2+}-tól, hatása hosszan tartó, s szerepe van az endotoxin shockban kialakuló súlyos vérnyomáscsökkenés kialakulásában *(5-34. ábra)*.

Tirozin-kináz-receptorokkal működő jelpályák és a protoonkogének

A soksejtű, differenciált sejteket tartalmazó szervezetek számára alapvető fontosságú, hogy sejtjeik a megfelelő időben és módon szaporodjanak, és funkciójuknak megfelelően specializálódjanak. Az e célnak megfelelő szabályozás, túlnyomórészt, ugyancsak extracelluláris kémiai jelek segítségével történik. A sejtproliferáció és differenciálódás szabályozásában részt vevő kémiai jelek közé tartoznak a növekedési faktorok (growth factor) pl. az epidermális növekedési faktor (EGF), a trombocitákból származó növekedési faktor (PDGF), a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a neurotrofinok (pl. az NGF), vagy a metabolikus hatásai mellett növekedési faktorként is ismert inzulin stb. A sejtproliferáció és -differenciálódás mellett ezen anyagok a sejt mozgását, illetve alakját is befolyásolhatják.

A növekedési faktorokat a mesterségesen fenntartott sejtkultúrák viselkedésének a vizsgálatakor fedezték fel. Annak ellenére, hogy minden szükséges tápanyag rendelkezésre állt, a különböző típusú állati sejtek csak akkor sokasodtak, ha a táptalajhoz szérumot is adtak. A szérumból elkülöníthetők voltak azok a sejtproliferációt (differenciálódást, túlélést, migrációt stb.) stimuláló extracelluláris kémiai jelként szolgáló, polipeptid természetű anyagok, amelyeket összefoglaló néven növekedési faktoroknak nevezünk. Ezek az anyagok a keringésben és így a szérumban is jelen vannak, azonban az esetek többségében az érintett sejtekkel szomszédos sejtek által termelt lokális kémiai mediátorokként viselkednek. A felsorolt növekedési faktorok (EGF, PDGF, NGF, FGF, inzulin stb.) egy-egy szerkezetileg többé-kevésbbé hasonló tagokból álló családba tartoznak.

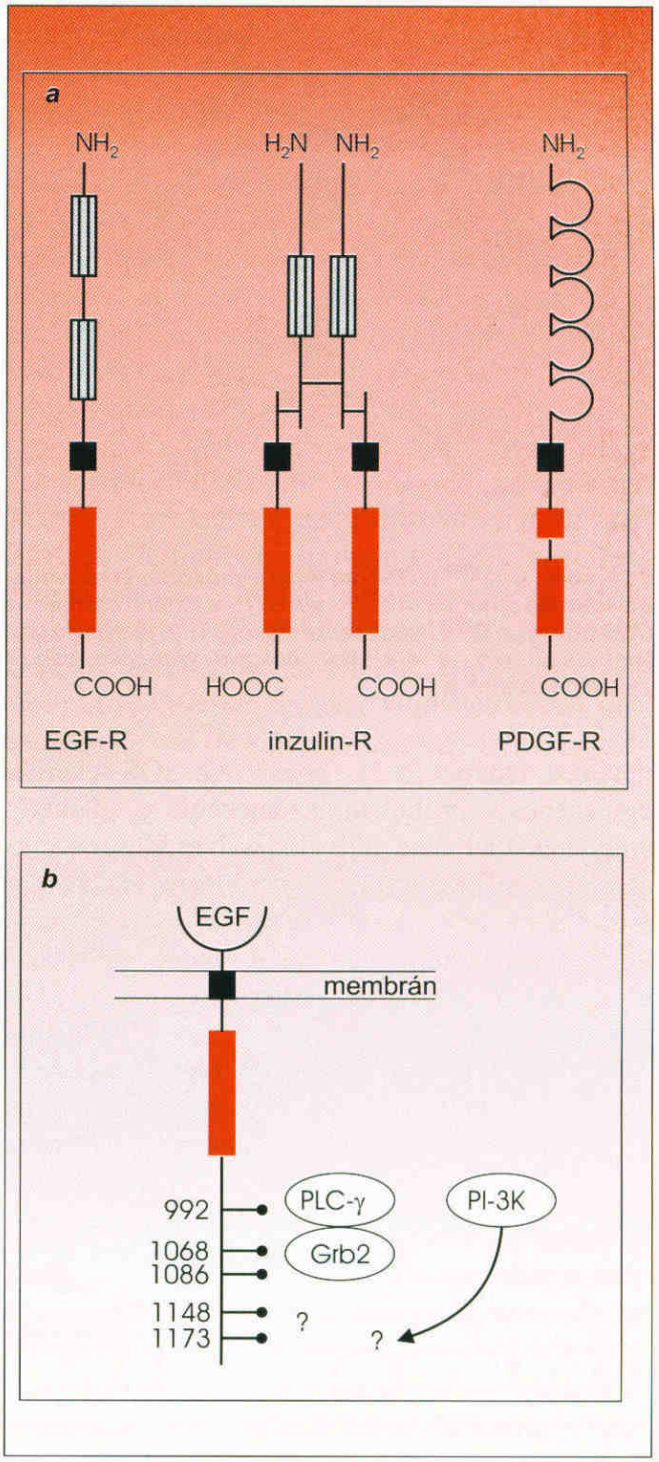
Jelen fejezetben **növekedési faktorokként** említjük azokat a kémiai jeleket, amelyeknek **plazmamembrán-receptora saját tirozin-kináz-aktivitással rendelkezik**. A növekedési faktorokéhoz hasonló jellegű hatást gyakorolhatnak a sejtekre a citokineknek nevezett anyagok (pl. az interleukinok, interferonok stb.) is.

A **citokinek** plazmamembrán-receptora általában nem rendelkezik saját tirozin-kináz-aktivitással és a citokint specifikusan kötő polipeptiden kívül általában még (legalább) egy másik polipeptidlánc is szükséges annak a komplexnek a kialakulásához, amely a citokin kötődése után a sejt belseje felé a jelátvitelt elindítja. Tirozin-kinázok a citokinek jelpályáiban is szerepelnek, azonban ezek a tirozin-kinázok nem tartoznak az integráns membránfehérjék közé. A Janus arcú protein-kinázok (JAK) ismertek arról, hogy citokinek jelpályarendszerében vesznek részt.

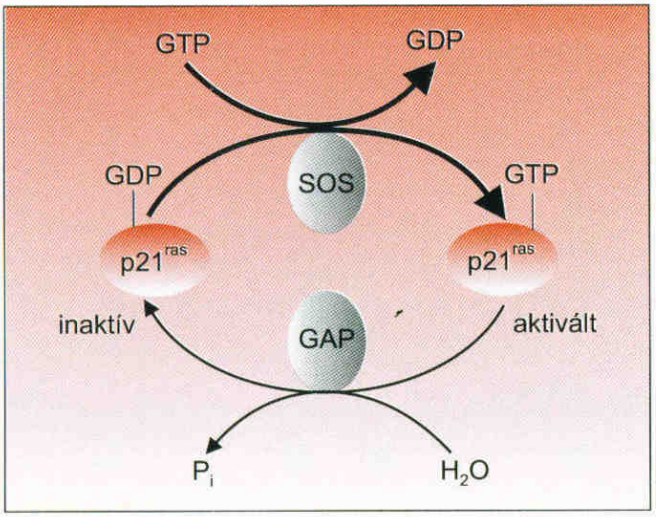
A növekedési faktorok jelpályarendszerében még sok az ismeretlen tényező, ezért csupán annak a mechanizmusnak az ismertetésére szorítkozunk, amelynek elve ma már általánosnak látszik. Ez a mechanizmus a legjobban tisztázott az EGF-receptor segítségével induló jelátvitel esetében. Az **EGF receptora** tipikus példája az egy transz-

membránrégióval rendelkező tirozin-kináz-receptoroknak *(5-35. ábra)*, amelyekből e könyv írásakor már több mint ötvenet ismerünk. Az extracelluláris doménen kötődő EGF két receptormolekula dimerizációját hozza létre, a dimerizáció elengedhetetlen feltétele a jelpálya aktiválódásának. A dimerizált receptor intracelluláris doménjén autofoszforiláció segítségével bizonyos tirozin oldalláncok foszforilálódnak (a két receptormolekula egymást foszforilálja), a foszforilált tirozin oldalláncokhoz különböző fehérjék kötődnek, amelyek a jelet továbbítják. Azok a fehérjék, amelyek a foszfotirozinokhoz tudnak kötődni **SH2 doménnel** rendelkeznek (lásd protein-kinázoknál). A tirozin oldalláncok körüli aminosavszekvencia határozza meg, hogy melyik foszfotirozin oldallánchoz milyen SH2 doménnel rendelkező fehérje kötődhet. Az EGF-receptoron legalább öt helyen foszforilálódik tirozin oldallánc, ha mindegyikhez másik fehérje kötődik, legalább ötféle irányban indulhat el a jeltovábbítás. Ez is jellemzően hozzátartozik a növekedési faktorok jelátviteli mechanizmusához, a hatásuk **többféle irányban induló változások összességéből** jön létre (5-35. ábra).

A növekedési faktorokra jellemző sajátságos jelátvitel egy jelentős részéért a **ras GTP-kötő fehérje** aktiválódása felelős. A **ras gének (H-ras, K-ras és N-ras)** 21 kDa nagyságú proteineket kódolnak, ez a **p21^{ras}**, amely (hasonlóan a heterotrimer GTP-kötő fehérjékhez) GTP-t és GDP-t is képes kötésben tartani, de csak a GTP-t kötő formája aktív. A ras fehérje zsírsav oldallánccal a plazmamembrán belső oldalához van kihorgonyozva és működését más fehérjék segítik elő. Nem rendelkezik jelentős saját GTPáz (GTP-t GDP-re és anorganikus foszfátra hidrolizáló) aktivitással (a heterotrimer G-fehérjéktől eltérően), GTP-t hidrolizáló aktivitását speciális fehérjék idézik elő. Ilyen típusú fehérjeként ismert eddig egy GAP (GTPázt aktiváló protein) nevű fehérje, illetve bizonyos sejttípusokban egy neurofibromin nevű fehérje. Ezek a fehérjék a p21^{ras} inaktiválódásában játszanak szerepet. A p21^{ras} aktiválásához olyan fehérje szükséges, amelynek hatására a GDP disszociál a ras fehérje felszínéről, ilyenkor a disszociált GDP helyére a sejtben nagyobb koncentrációban jelen levő GTP kötődik. Ezt a folyamatot cserélő (exchange) fehérjék irányítják, ilyen fehérje pl. az SOS-nek



5-35. ábra. Az EGF receptor szerkezete. (a) *Az EGF (epidermális növekedési faktor), az inzulin és a trombocitából származó növekedési faktor (PDGF) szerkezetének hasonló elemei. A tirozin-kináz domének piros, a transzmembrán domének fekete négyszögekkel vannak jelölve. A csíkos négyszögek ciszteinben gazdag doméneket, az oválisok immunglobulinokra emlékeztető doméneket jelölnek.* **(b)** *Az EGF-receptor (a receptornak csak az intracelluláris részét ábrázoltuk részletesebben) foszforilált tirozinjaihoz kötődő SH2 doménnel rendelkező fehérjék (PLC, foszfolipáz C; Grb2, kapcsoló fehérje; PI-3K, foszfatidilinozitol 3-kináz). A számok a tirozinok helyét mutatják a polipeptidláncban*



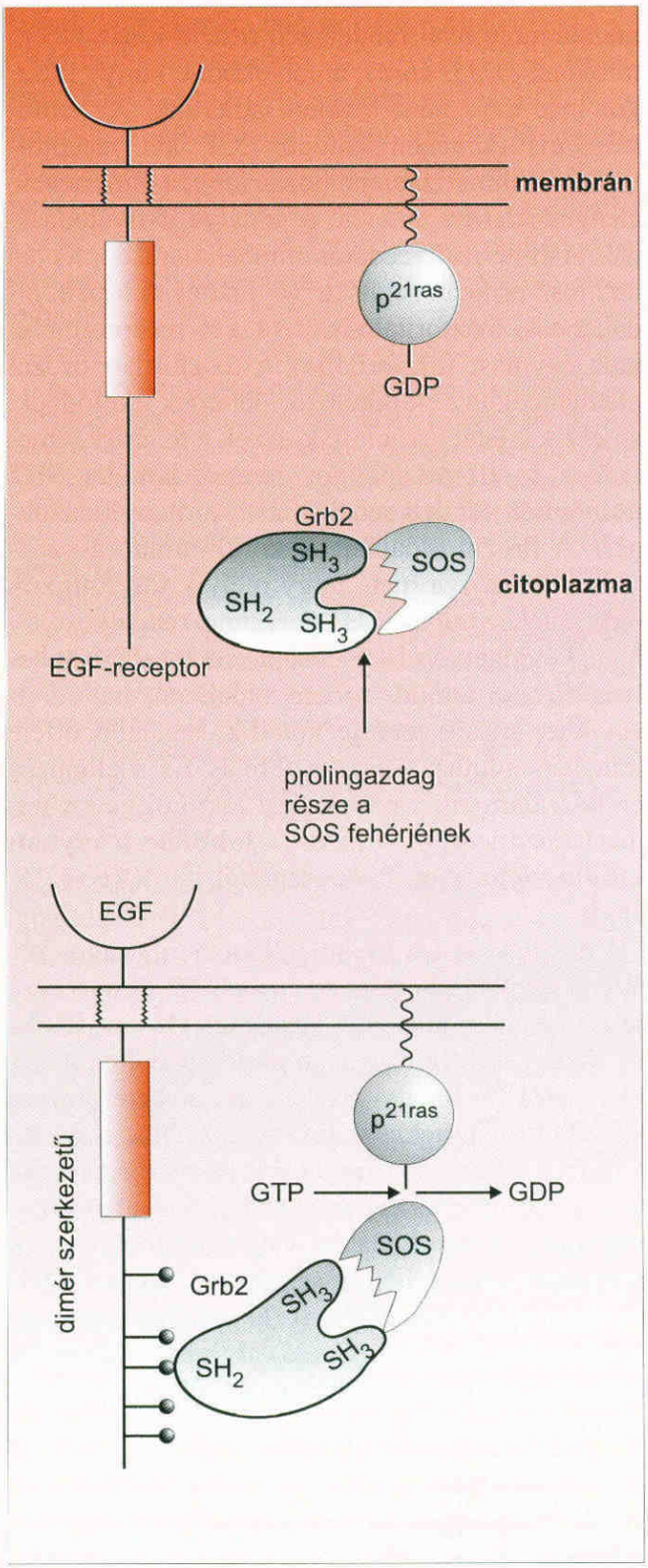
5-36. ábra. A p21^{ras} GTP-kötő fehérje működését közvetlenül irányító fehérjék. *A GDP-nek GTP-re történő cseréjét az SOS-fehérje, a GTP hidrolízisét a GAP (GTP-ázt aktiváló protein) segíti elő. A GAP-hoz hasonló aktivitása van a neurofibrominnak is*

nevezett fehérje *(5-36. ábra)*. Az SOS-fehérjén egy speciális, prolinban gazdag régió is található, amelynek a jelpálya aktiválódásában fontos szerepe van. (Emlékeztetőül: a heterotrimer G-fehérjék esetében a GDP-nek GTP-re történő cseréjét maga a hét transzmembrándoménnal rendelkező receptor segíti elő, amely közvetlen kapcsolatban áll a G-fehérjével.)

Az aktiválatlan sejtben az **SOS cserélő fehérje** a citoplazmában helyezkedik el és így nem jut a ras fehérje közelébe. A rendszer aktiválásának az a feltétele, hogy a cserélő fehérje a citoplazmából a ras közelébe helyeződjön át. Ezt egy **kapcsoló (adapter) fehérje**, pl. egy Grb2-nek nevezett fehérje biztosítja (más kapcsoló fehérjéket is ismernek, amelyek analóg módon működnek).

A **Grb2** fehérjén egy **SH2 domén és** két **SH3** domén található (lásd protein-kinázok fejezetben). Az SH3 doménekkel a kapcsoló fehérje a cserélő fehérje (SOS-fehérje) speciális, prolinban gazdag régiójához tud kötődni. Ez a kapcsolat már a citoplazmában is megtörténik, hiszen az aktiválatlan sejtben mindkét fehérje a citoplazmában található.

A növekedési faktor receptorához történő kötődésekor bekövetkező változásoknak a lényege a transzlokáció, azaz a kapcsoló fehérjével összeköttetésben levő (Grb2 fehérje SH3 doménje–SOS-fehérje prolingazdag régiója közti kölcsönhatás miatt) cserélő fehérje a plazmamembránhoz kerül

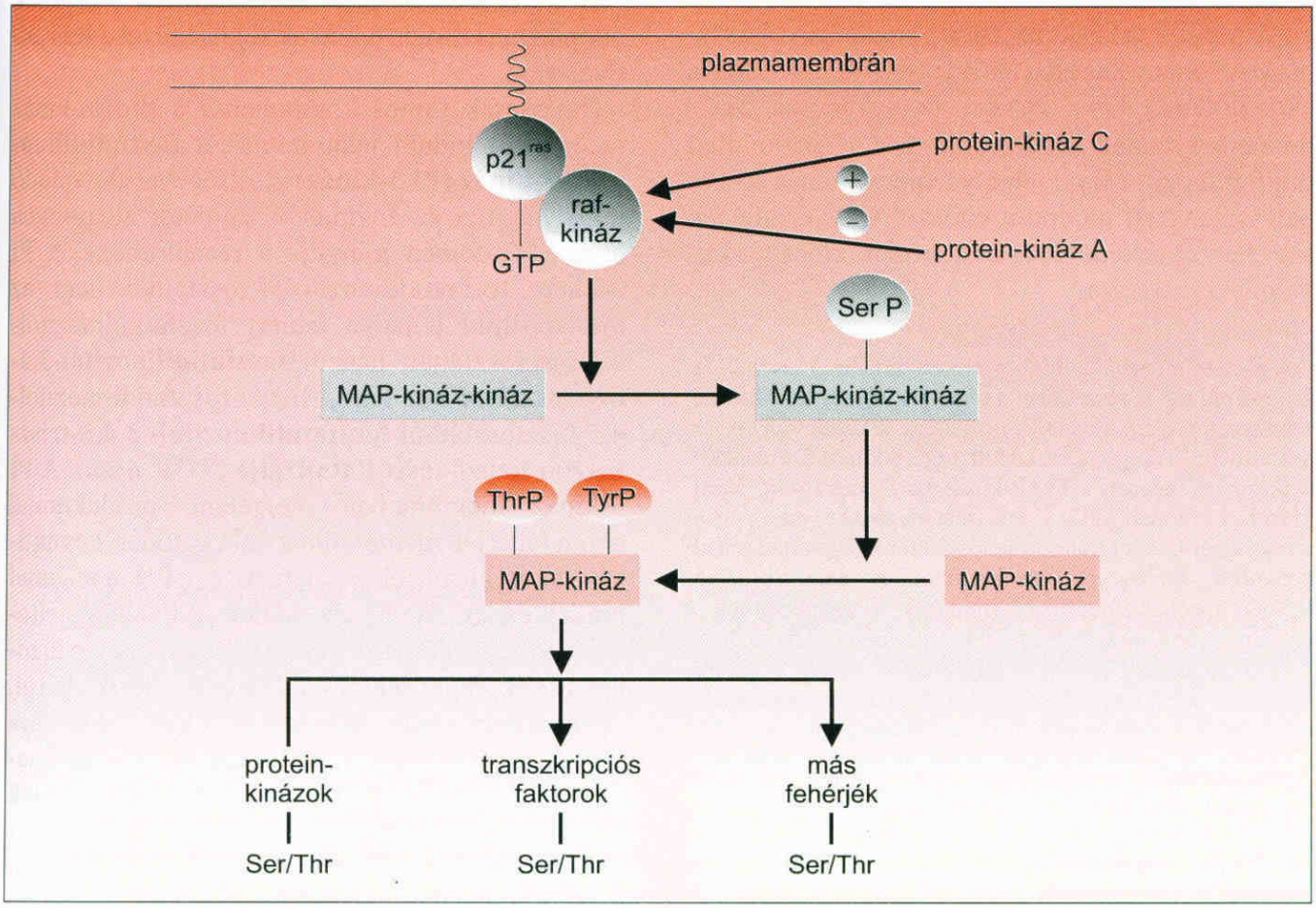


5-37. ábra. A Grb2 kapcsoló (adapter) fehérje szerepe a p21^{ras} GTP-kötő fehérje aktiválásában. *Az EGF-receptoron a pirossal jelzett rész a tirozin-kinázt tartalmazó domént mutatja, a fekete körökkel ellátott nyúlványok a foszforilált tirozin oldalláncokat szimbolizálják. A p21^{ras} fehérje zsírsav oldallánccal van kihorgonyozva a plazmamembránhoz. Az EGF receptor aktiválódása dimerizációval jár*

a $p21^{ras}$ közelébe, és így aktiválni tudja a ras fehérjét. Ebben a transzlokációban van alapvető szerepe a receptor autofoszforilációja során kialakuló foszfotirozin oldalláncoknak és az ezek közül egyet (esetleg többet) felismerő kapcsoló fehérjének (Grb2 fehérje), amely SH2 doménjével kötődik a foszfotirozinhoz.

A receptorhoz kötődő kapcsoló fehérje segítségével a cserélő fehérje is a plazmamembránhoz transzlokálódik, a ras fehérje aktiválásához szükséges helyre. Itt segít kicserélni a ras fehérjéhez kötött GDP-t GTP-re *(5-37. ábra)*.

A $p21^{ras}$ GTP-t kötött formája aktivál egy különböző protein-kinázokból álló foszforilációs kaszkádrendszert **(MAP-kináz kaszkádnak nevezik)**, amely végül egy sor különféle fehérje, közöttük transzkripciós faktorok foszforilációjának segítségével indítja el a növekedési faktorok által szabályozott folyamatokat *(5-38. ábra)*. A kaszkád első enzime egy **raf**-nak nevezett gén által kódolt szerin/treonin-protein-kináz. A raf protein-kináz aktiválódásához szükséges a $p21^{ras}$–GTP kötött formájával kialakuló komplex. A raf protein-kináz (nevezhetjük MAP-kináz-kináz-kináznak is) foszforilál és ezzel aktivál egy sajátságos enzimet, ez a MAP-kináz-kináz. A MAP-kináz-kináz kivételes enzim, amely specifikus szubsztrátján, a MAP-kinázon (mitogén aktivált protein-kináz), mind egy treonin, mind egy tirozin oldalláncot képes foszforilálni. E kettős foszforilációval aktiválódik a MAP-kináz. A MAP-kináz tulajdonképpen nem egyetlen enzim, hanem enzimcsalád, tagjait ERK-nek (extracelluláris jelre regulálódó protein-kinázoknak) is szokták nevezni. A MAP-kinázok vagy ERK-ek szerin/treonin-protein-kinázok, specifitás determinánsaik prolint tartalmaznak és szubsztrátjaik között további protein-kinázok, transzkripciós faktorok és más fehérjék találhatók (5-38. ábra). A MAP-kináz kaszkád aktiválódásának fontos szerepe van többek között az **AP-1** cisz-regulá-



5-38. ábra. A MAP-kináz kaszkád aktiválódásának mechanizmusa

ciós elemhez kötődő transzkripciós faktorok (fos és jun gének által által kódolt fehérjék, lásd transzkripció szabályozása fejezetben) működésének szabályozásában. A MAP-kináz kaszkád elsősorban a génexpresszió szabályozásában vesz részt. (A raf gén által kódolt protein-kinázzal induló MAP-kináz kaszkád az **Erk1** és **Erk2** kinázok aktiválódásához vezet. Hasonlóan működő, de reguláció szempontjából ma még kevésbé ismert protein-kináz kaszkádból, amely más Erk-kinázokat aktivál, több is létezik).

A növekedési faktorok receptorának autofoszforilációja a receptoron több tirozin oldallánc foszforilációjához vezet, ezek mindegyike dokkoló helyet létesít SH2-doménnel rendelkező, különböző fehérjék számára. Ezáltal az autofoszforilált receptorról egyszerre több jelpálya is elindulhat. (Egyes receptorok esetében, a dokkoló helyek számának növelése céljából a receptor foszforilál egy másik fehérjét is. Ilyen például az ugyancsak tirozin-kináz aktivitással rendelkező **inzulinreceptor**, amelyről a jelpályák indulását az **inzulinreceptor-szubsztrát** foszforilációja segíti elő.) A $p21^{ras}$ GTP-kötő fehérje segítségével történő MAP-kináz kaszkád aktiváláson túl, más utak is aktiválódnak. Ezek egyike az ugyancsak SH2-doménnel rendelkező **foszfolipáz C-γ** enzim által indított inozitol-lipid jelpálya, amely a már korábban ismertetett módon a citoszol Ca^{2+}-szintjének átmeneti növekedéséhez és a protein-kináz C aktiválódásához vezet.

A protein-kináz C (különböző izoenzimeinek) aktiválódása több ponton is részt vehet a teljes jelpálya működésében. Egyrészt a protein-kináz C a ras fehérje kikerülésével is képes aktiválni a raf gén által kódolt protein-kinázt és ennek következményeképpen a MAP-kináz kaszkádot (5-38. ábra). Másrészt a protein-kináz C-nek saját magának is szerepe van a fos és jun (AP-1) transzkripciós faktorok aktiválódásának bonyolult, többszörös foszforilációt és defoszforilációt igénylő mechanizmusában. Mindezek a momentumok a protein-kináz C-nek az EGF jelpályarendszer aktiválódásának irányában ható (ún. forward) funkciói. Ennek az enzimcsaládnak azonban jellegzetessége a duális szerep, szinte minden olyan rendszerben, amelyben aktiválódik, visszafelé ható (feedback) regulációt is végez. Ennek tipikus példája az EGF-receptor protein-kináz C által katalizált foszforilációja és deszenzitizációja ligandjával szemben. Mindez arra mutat, hogy a növekedési faktorok jelpályarendszere időben nagyon finoman összerendezett, egymással párhuzamos, sőt egymással ellentétes folyamatokat is magában foglaló láncolata a különböző molekuláris eseményeknek.

A különböző jelpályák közötti kölcsönhatás (cross-talk) szép példája a raf fehérje **cAMP-dependens protein-kináz** által katalizált foszforilációja. Ez a foszforiláció gátolja a MAP-kináz kaszkád aktiválódását, és magyarázatul szolgál arra a jelenségre, hogy miért van a cAMP-nek igen sok sejttípusban antiproliferatív hatása.

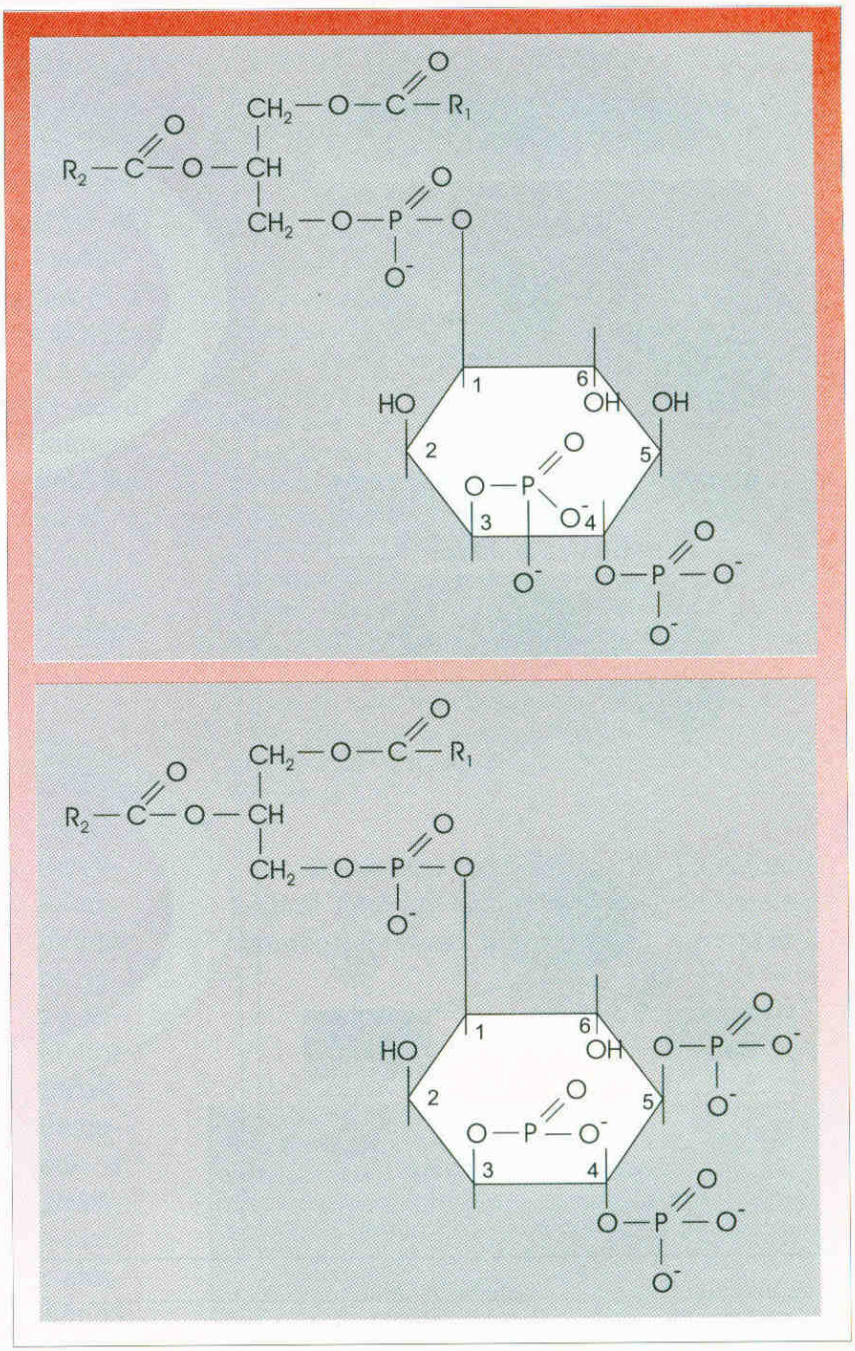
A tirozin-kináz receptorral indított jelpályákon kívül ismertek más olyan jelpályák is, amelyek a Grb2 adapter fehérje segítségével a Ras GTP-kötő fehérje aktiválásához és így az Erk1/Erk2 MAP-kipáz kaszkád aktiválásához vezetnek.

Néhány, 7 transzmembrán-régióval rendelkező receptor (pl. bombezin vagy a trombin receptora) szintén képes a Ras aktiválására és így proliferációs jel képzésére. Ezekben a jelpályákban a G fehérje βγ alegysége egy citoplazmás tirozin-kinázt (az src-kináz családjába tartozó enzimet) aktivál, és így indul el a foszforilált tirozinról az SH2 doménnel rendelkező adapter fehérje segítségével a Ras aktiválása.

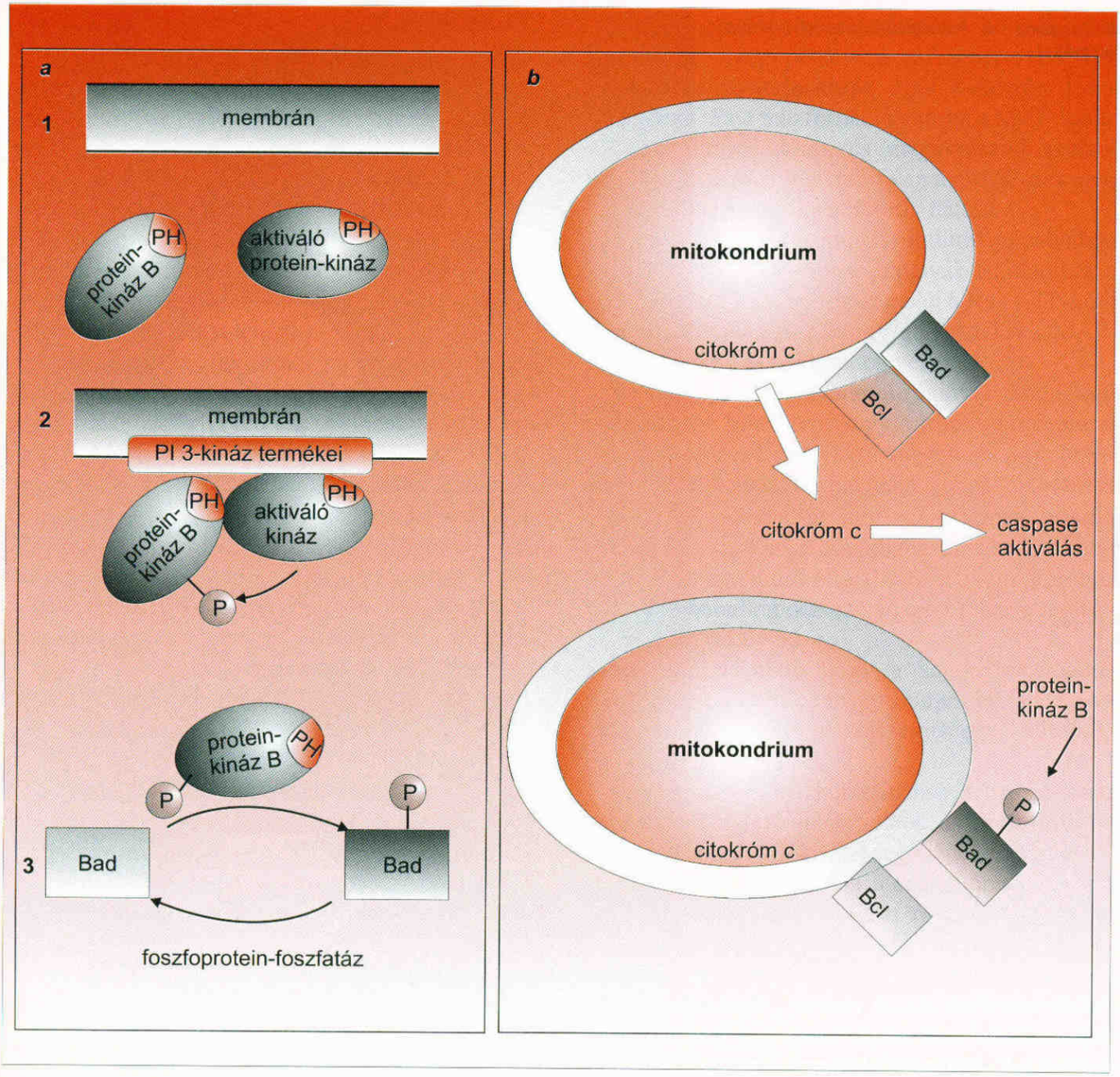
Itt említjük meg, hogy a sejt–extracelluláris matrix kapcsolatot biztosító integrinek is képesek citoplazmás tirozin-kinázok segítségével a Ras aktiválására.

Ugyancsak fontos komponense a tirozin-kináz receptorról induló jelátvitelnek a **foszfatidilinozitol-3-kináz (PI 3-kináz)** segítségével aktiválódó jelpálya. (Ezt az enzimet a regulátor alegységén levő SH2-domén irányítja a receptorhoz). A PI 3-kináz foszfatidilinozitol-4-foszfátból nem az inozitol-lipid jelpálya ismert foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátját, hanem **foszfatidilinozitol-3,4-biszfoszfátot** hoz létre, illetve foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátból **foszfatidilinozitol- 3,4,5-triszfoszfát képződését katalizálja** *(5-39. ábra)*. A PI 3-kináz membránban megjelenő produktumai olyan fehérjék membránhoz való kötődését és aktiválódását idézik elő, amelyek ún. PH doménnel rendelkeznek. Az ilyen módon aktiválódó jeltovábbító utak egy része a citoszkeleton, illetve bizonyos sejtkompartmentek változásait idézik elő (pl. az inzulinreceptor esetében a PI 3-kináz aktivitása szükséges a GLUT-4 glukóztranszporter plazmamembránba történő transzlokációjához). Ezeknek a változásoknak a pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert. Ismert azonban az a folyamat, amellyel a PI 3-kináz aktiválódása létrehozza az úgynevezett **„túlélési jel"**-et.

5-39. ábra. A foszfatidilinozotol-3-kináz termékei



A „túlélési jel" fogalma részletesebb magyarázatot igényel. Megértéséhez tudni kell, hogy a magasabbrendű, soksejtű eukarióta szervezet sejtjei erősen szocializálódtak. Ezek között a sejtek között fiziológiás körülmények között nincs kompetición alapuló szelekció, az egyes sejtek élete, szaporodása vagy halála a teljes organizmus érdekeinek van alárendelve. Nagyon pontos szabályozórendszer határozza meg azt, hogy az egyes sejteknek mikor kell szaporodniuk (erre szolgáló jelzés a növekedési faktorok megjelenése), de ugyanakkor arra is van saját, szabályozott molekuláris programjuk, hogy „öngyilkosságot" kövessenek el, ha a teljes organizmus érdeke ezt így kívánja. A sejthalálprogramot beindíthatja egy külső jel (ligand) vagy a DNS súlyos, nem kijavítható sérülése, sejtkultúrákban meg lehet figyelni a növekedési faktorokat tartalmazó szérum megvonásakor stb. A különböző kiindulási mechanizmusok különböző utakon **caspase**-nak (cisztein-aszpartát-proteáz) nevezett speciális proteáz enzimek aktiválódásához vezetnek, amelyek felelősek



5-40. ábra. *A „túlélési jel". A: a protein-kináz B aktiválódása a foszfatidilinozitol3-kináz termékeinek megjelenésekor. b: A Bad fehérje foszforilációja megakadályozza a citokróm c kiáramlását a mitokondriumból*

a sejthalált okozó végső lépésekért. (A programmozott sejthalál jelentőségével és molekuláris mechanizmusaival az 5.3 fejezet foglalkozik részletesen.) A sejthalálprogram egyik fontos lépése a citokróm c kiáramlása a mitokondriumból. A citokróm c a citoszolban caspase enzimek aktiválódását idézi elő. Minthogy a sejtben létezik olyan molekuláris program, amelyik a citokróm c halált okozó kiáramlásához vezethet, léteznie kell egy olyan mechanizmusnak is, amelyik ezt a programot csak speciális esetben engedi működésbe lépni, a fiziológiás sejtproliferáció közben megakadályozza, hogy ez megtörténjen. Ez a mechanizmus a „túlélési jel". A fiziológiás sejtproliferáció egyes fázisaiban a sejt időről-időre megkapja ezt a jelet, mintegy biztosítékául annak, hogy szaporodása a szervezet egésze szempontjából is hasznos. A „túlélési jel" lényegét tekintve egy fehérje

foszforilációja, amelyet a protein kináz B katalizál. A protein-kináz B PH-doménnel rendelkező enzim, amelyet egy másik, ugyancsak PH-doménnel rendelkező protein-kináz foszforilál és ezáltal aktivál. Amikor a foszfatidilinozitol-3-kináz aktiválódik és a membránban megjelennek termékei (a foszfátidilinozitol-3,4-biszfosztát, illetve foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát), a protein-kináz B a membránhoz kötődik, ahol találkozik az őt aktiváló, ugyancsak PI 3-kináz függő kinázzal. Az aktivált protein kináz B foszforilál egy Bad nevű fehérjét és ezzel gátolja annak citokróm c kiáramlást előidéző hatását. A Bad fehérje foszforilálatlan formája a Bcl fehérjéhez kötődve előidézi a citokróm c kiáramlását. A Bad fehérje időről-időre (foszfoprotein foszfatázok hatására) defoszforilálódik, ezért a sejtproliferáció során ismételten foszforilálni kell. A „túlélési jel" a Bad fehérje foszforilációja *(5-40. ábra)*.

A növekedési faktorok jelpályarendszerének megismerése tette világossá a **protoonkogének,** illetve **onkogének** szerepét a rosszindulatú daganatok kialakulásában. A rosszindulatú daganatsejtté történő átalakulást bizonyos gének (együttes) szomatikus mutációja hozza létre, az egyes szomatikus mutációk némelykor öröklött, prediszponáló mutációkhoz társulnak. A növekedési faktorok jelátvivő mechanizmusában szereplő fehérjéket kódoló gének a protoonkogének, amelyek mutációja, meghibásodása onkogénné történő átalakuláshoz vezethet. Az onkogének által kódolt fehérjék aktivitása kontrollálatlanná válik, és olyankor is növekedési jelet közvetítenek a sejt felé, amikor nem volna szabad. A növekedési faktorok jelpályája szinte minden tagjának megfelelő génnek ismert az onkogén változata is (retrovírusokban is megtalálható onkogének), kezdve magától az extracelluláris jelet képviselő, polipeptid természetű **növekedési faktortól**, a **növekedési faktor receptorán (v-erbB)**, a **ras** GTP-kötő fehérjén, a **raf** által kódolt protein-kinázon és más protein-kinázokon keresztül a folyamatban részt vevő **fos** és **jun** transzkripciós faktorokig *(5-8. táblázat)*. A ras protoonkogén mutációja következtében kialakuló állandóan aktivált ras fehérje pl. a humán tumorok kb. 30%-ában az egyik összetevője a daganatsejtek kifejlődését előidéző változásoknak.

A rosszindulatú daganat sejtté történő átalakulás azonban nem egyetlen gén mutációjának az eredménye, hanem majdnem minden esetben többszörös mutáció következménye. A mutáció nem csupán a **protoonkogének aktiválódását** jelenti, igen nagy szerepet játszik a **tumorszuppresszor gének inaktiválódása** is. A tumor szuppresszor gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek a sejtproliferáció fiziológiás kereteinek biztosításában vesznek részt, pl. a sejtciklus G1/S határon levő kontrollpontjain késleltetik vagy gátolják az S fázisba történő átmenetet (lásd DNS-ről szóló fejezetben). Ezeknek a tumorszuppresszor géneknek (pl. a p53 fehérjét kódoló génnek, illetve a p16 fehérjét kódoló génnek) a delécionja, az általuk kódolt fehérje hiánya vagy rossz funkciója nagy gyakorisággal szerepel a tumorsejt kialakulásának egyik összetevőjeként. (Irodalmi adatok 50, illetve 70%-os gyakoriságúra becsülik a p53, illetve p16 gén hibás változatának jelenlétét a különböző humán tumorokban.)

A növekedési faktorok jelpályarendszerét képező fehérjék között is van olyan, amelyet tumorszuppresszor gén kódol, pl. a ras GTPáz

5-8. táblázat. A növekedési faktorok jelátvivő rendszeréből ismert néhány fehérje és az azt kódoló protoonkogén daganatkeltő retrovírusokból is ismert onkogén változata

A fehérje funkciója	Vírus-onkogén elnevezése
trombocitából származó növekedési faktor (PDGF)	v-sis
EGF receptorfehérje	v-erbB
$p21^{ras}$ GTP-kötő fehérje	v-ras (többféle változata is ismert)
raf-protein-kináz (MAP-kináz-kináz-kináz)	v-raf
fos transzkripciós faktor jun transzkripciós faktor	v-fos v-jun
src-kináz (nem receptor protein-tirozin-kináz)	v-src

aktivitását fokozó (a GAP-fehérjéhez hasonló aktivitással rendelkező) és így az inaktiválódását előidéző **neurofibromin** nevű fehérjét kódoló NF1 gén. Ennek a génnek a kiesése okozza a neurofibromatosis nevű, torzító (elefántember) daganatos megbetegedést. Itt kell megemlítenünk, hogy bizonyos protein-kinázokra vagy foszfatázokra ható vegyületekkel is elő lehet segíteni tumorok kialakulását, ilyen **tumorpromoter** hatása lehet a protein kináz C-t permanensen aktiváló forbolészteroknak vagy a PP2A és PP1 foszfoprotein-foszfatázokat gátló okadánsavnak.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerzők köszönetet mondanak Dr. Buday Lászlónak.

Ajánlott irodalom

Cell Signaling in Bruce Alberts, Dennis Broy, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Wattson: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York and London, 1994

Signalling by Receptor Tyrosine Kinases by Fantl W. J., Johnson D. E., Williams L. T. in Annual Rev. of Biochem. 1993, 62, 453–481.

Berridge M. J.: Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling. Nature, 361, 315–325, 1993

Strader C. D., Fong T. M., Tota M. R., Underwood D.: Structure and Function of G-protein-Coupled Receptors. Ann Rev. Biochem. 63, 101–132, 1994

Hepler J. R. and Gilman A. G.: G-proteins Trends in Biochem. Sci. 17, 383–387, 1992

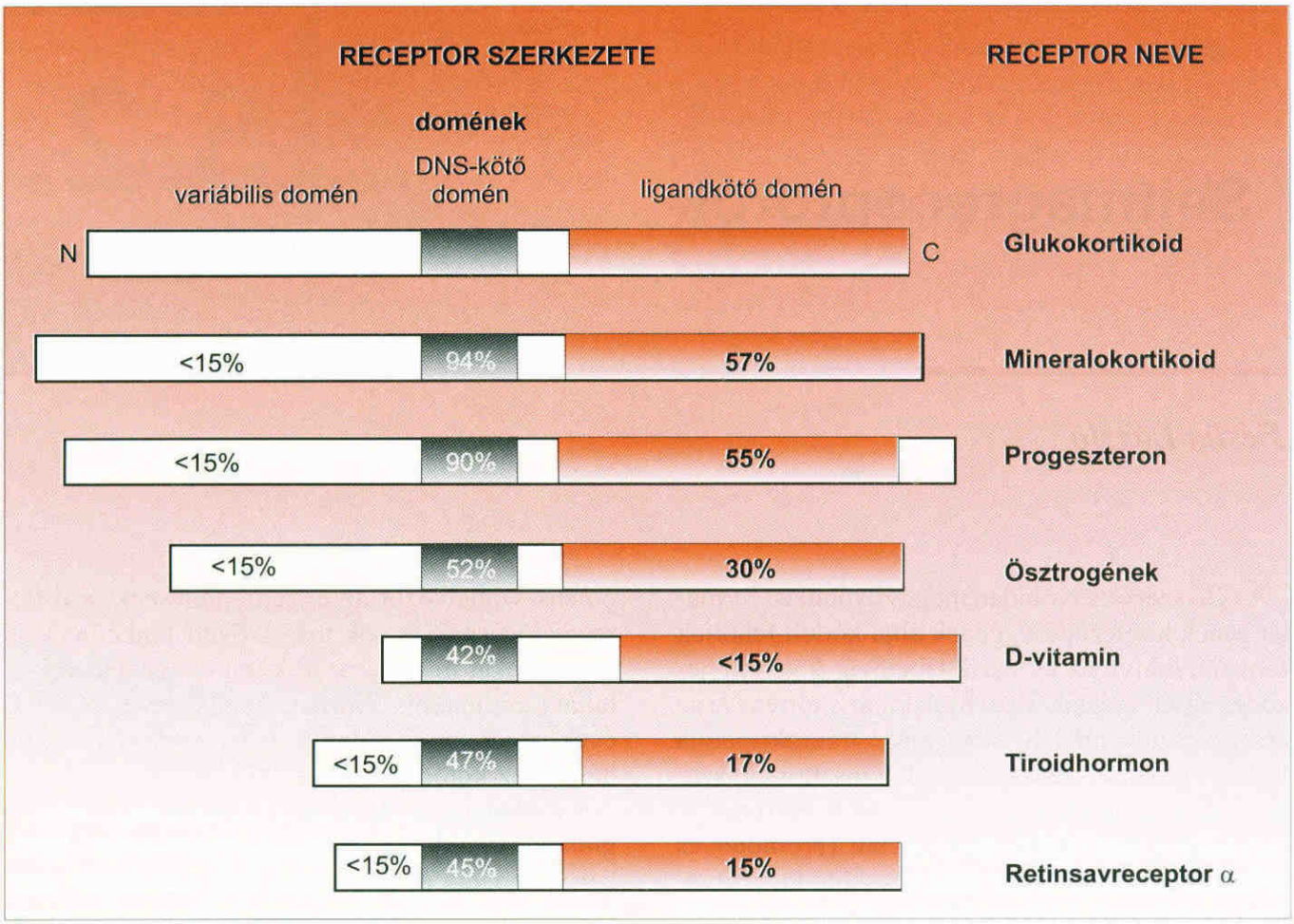
5.2. Sejtmagreceptorok

Fésüs László

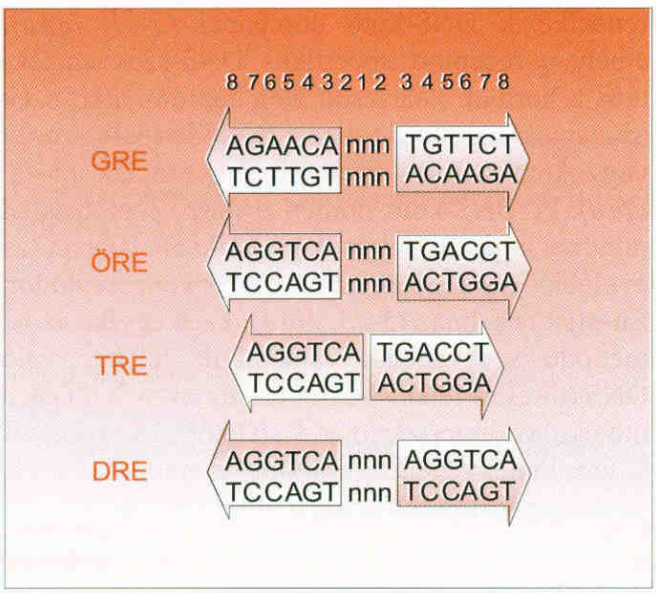
Az élő szervezet minden megnyilvánulási formáját gének kifejeződése, gének által kódolt fehérjék funkciói irányítják és teszik lehetővé. A génkifejeződés egyik meghatározó molekuláris története az arról készült mRNS szintézise, transzkripciója RNS-polimeráz segítségével. A transzkripció szabályozása specifikus kölcsönhatások eredménye *cisz*-módon ható DNS-szekvenciák (promoter és enhancer elemek) és az azokhoz kötődő, *transz*-ható szabályozó fehérjék között. A transzkripciót szabályozó transzkripciós faktorok általában a sejtmagban, a szabályozandó gének fehérjét kódoló részein kívül eső speciális DNS-szakaszokhoz kötődve indítják el, illetve gyorsítják vagy lassítják az RNS-szintézist. A transzkripciós faktorok hatását hozzájuk tapadó fehérjék, poszt-transzlációs módosítás (pl. foszforiláció) és ligandok kötődése befolyásolja (aktiválja vagy gátolja). Azokat a transzkripciós faktorokat, amelyeket kis molekulatömegű, a sejtmembránokon áthatoló, így a sejtmagba könnyen bejutó lipofil természetű anyagok szabályoznak, magreceptoroknak nevezzük.

A szteroid–tiroid–D-vitamin–retinoid „magreceptor" család

A génkifejeződés szövet- és funkcióspecifikus szabályozásának meghatározó formája kisméretű lipofil hormonok segítségével történik. A szteroidok, tiroidok, retinoidszármazékok és a D-vitamin potens szabályozói az egyedfejlődésnek, a differenciálódásnak és sok más szöveti funkciónak. E hormonokat már a század korai évtizedeiben izolálták, radioaktív formáik segítségével a 60-as évek végére az is kiderült, hogy a sejtmagban fehérjékhez kötődve hatnak, feltehetően transzkripciót szabályozva. Az első ilyen két magfehérjét, a glukokortikoid- és ösztrogénreceptorokat 1985-ben klónozták és határozták meg elsődleges szerkezetüket. Ezt követően sorra írták le valamennyi zsíroldékony hormon (beleértve a hormonhatású vitaminszármazékok) magreceptorát és kiderült, hogy közös szerkezeti sajátságaik alapján egy molekulacsaládba sorolhatók. Valamennyi családtag rendelkezik DNS-kötő doménnel *(5-41. ábra)*, amely a receptort specifikus DNS-szekvenciákhoz, a hormon válaszadó elemhez irányítja; ezek az elemek vagy fordítottan ismétlődő (palindróm), vagy közvetlenül ismétlődő szekvenciák *(5-42. ábra)*. A DNS-kötő domén e magreceptorcsalád minden tagja esetében két, szekvenciájában az evolúció során nagymértékben konzerválódott Zn-ujjat tartalmaz *(5-43. ábra)*; ezek egyike az ismétlődő szekvenciák valamelyik feléhez való DNS-kötésért felelős régiót tartalmazza, a másik a molekula dimerizációjáért felelős. A receptor C-terminális végén található a ligandkötő domén, amely a hormon felismerést és ebből következően a fiziológiás válasz specificitását és szelektivitását biztosítja. Leegyszerűsítve azt mondhatjuk, hogy a ligandkötő domén megkötve a hormont, a receptor molekulát transzkipciót aktiválni képes állapotba hozza. A hormonhatás specificitásának másik leté-



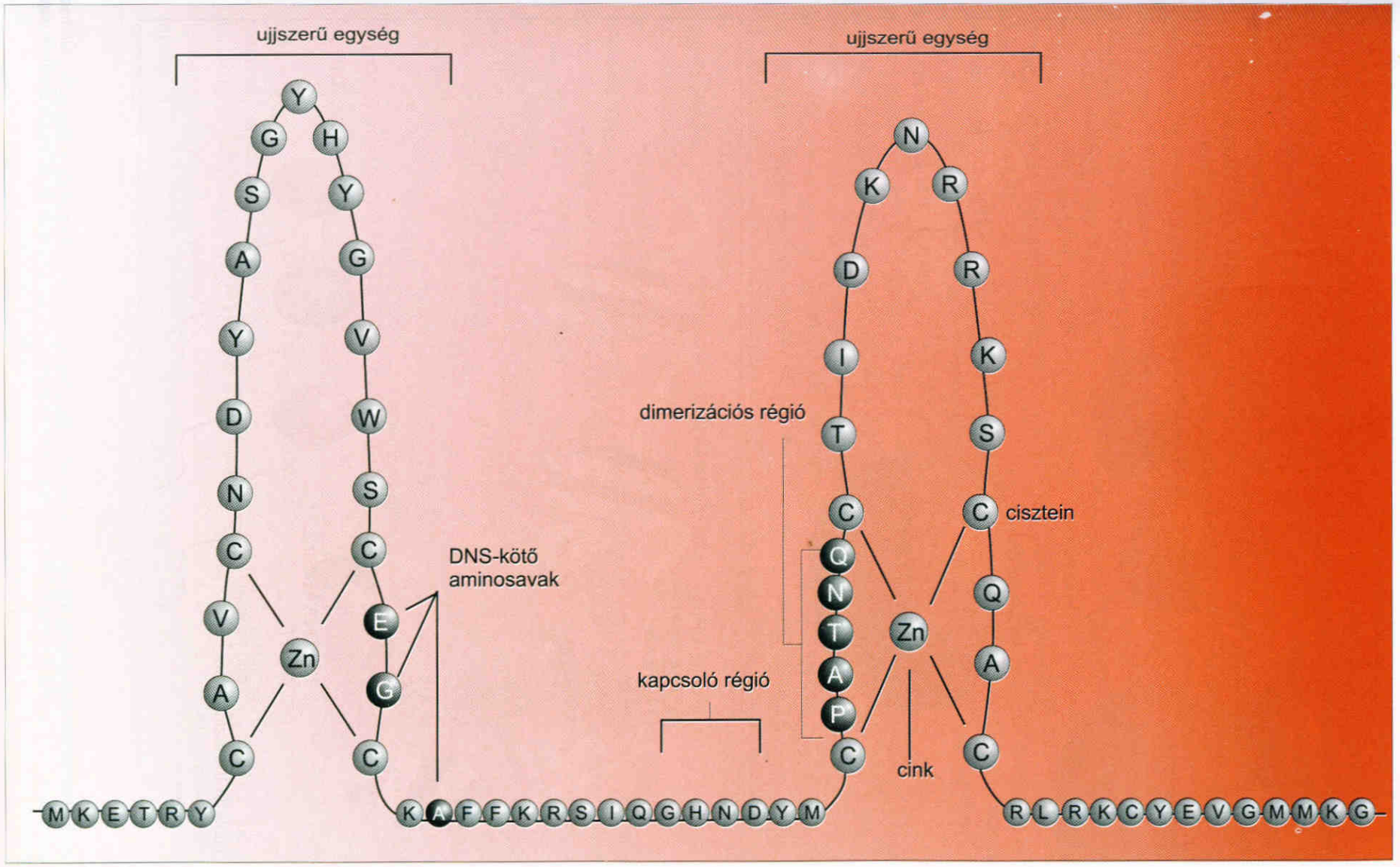
5-41. ábra. A klasszikus hormonreceptorok szerkezetének összehasonlítása



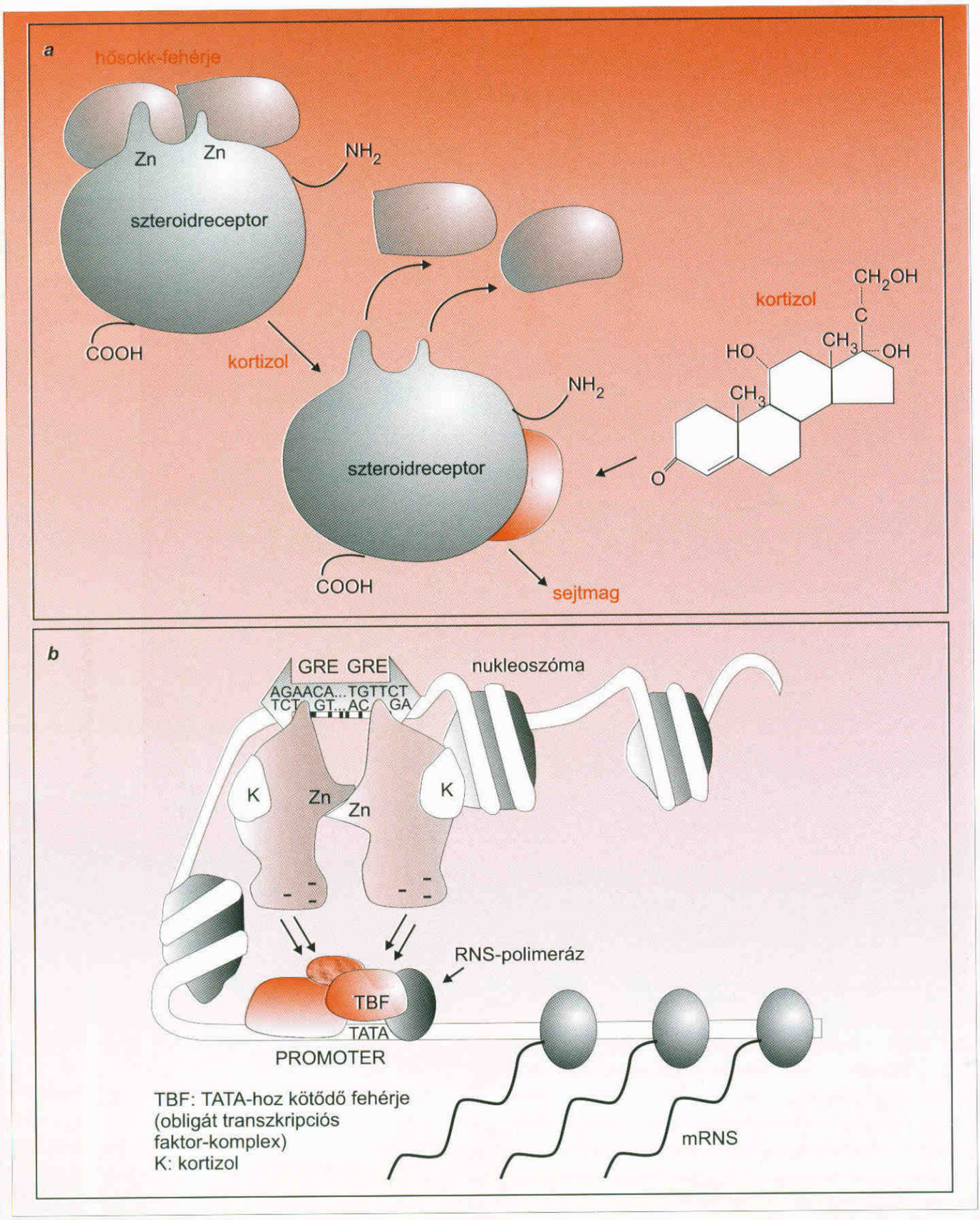
5-42. ábra. Példák specifikus hormon *(G, glukokortikoid; Ö, ösztrogén; T, tiroid; D, D-vitamin)* **válaszadó elemek** *(RE)* **DNS-szekvenciájára**

teményese a receptor DNS-kötő Zn-ujjában található szekvencia, amely biztosítja, hogy csak az ennek megfelelő DNS-válaszadó elemmel lépjen az adott receptor kapcsolatba.

A szerkezeti sajátságok megismerése és sok kísérletes munka alapján ma már pontosan tudjuk a magreceptorok részvételével létrejövő hormonális hatás molekuláris részleteit. Ez a szteroid hatás példáján bemutatva a következőképpen foglalható össze. A sejtek citoplazmájában található glukokortikoid-receptor Zn-ujjait lefedik, és ezzel inaktív állapotban tartják *(5-44a ábra)* a hozzájuk kötődő hősokk-fehérjéket (hsp 90). A sejtbe diffundáló *kortizol kötődik a ligandkötő helyhez,* aminek következtében a receptor leválik a hősokkfehérjéről és a sejtmagba kerül. Ott az egyik Zn-ujjával *kapcsolódik a szabályozandó gének glukokortikoid-receptor specifikus válaszadó elemének egyik feléhez,* míg a másik félhez egy másik



5-43. ábra. Az ösztrogénreceptor DNS-kötő régiója két Zn-ujjának elsődleges szerkezete



5-44. ábra A kortizol hatásmechanizmusának molekuláris szintű magyarázata. (a) *A kortizol kötődik a citoszólban található receptorhoz és a sejtmagba tereli azt.* **(b)** *A kortizolt kötött receptor dimerizálódik, hozzákapcsolódik a válaszadó elemhez, majd transzaktiválja a szteroid specifikus gén promóter régióját és annak részeként az RNS polimerázt*

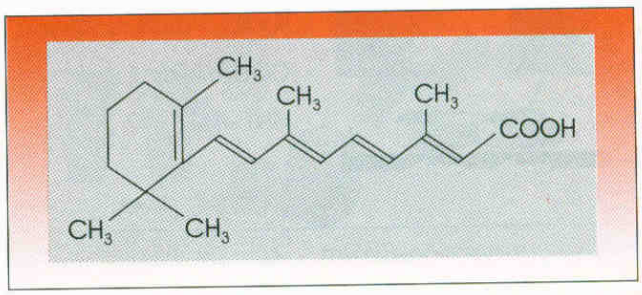
kortizolt kötött glukokortikoid-receptor kapcsolódik Zn-ujja igénybevételével. A két receptormolekula második Zn-ujjaik segítségével *dimerizálódik*. Ezt követően a DNS-hez kapcsolódó, kortizolt kötő, dimerizálódott receptormolekulák konformációja olyan módon változik meg, hogy felszínükön negatív töltésű aminosav-oldalláncok jelennek meg, amelyek kapcsolatba kerülnek a gén promoter régiójának fehérjekomplexeivel *(5-44b ábra)*. Ennek eredményeként *transzaktiváció* történik, vagyis az RNS-polimeráz a promoter komplex aktiválásának eredményeként elindítja a transzkripciót, a kortizol által szabályozott gének (ilyen egy adott sejtben akár több tucat is lehet) mRNS-ének átírását.

A legfrissebb eredmények szerint a szteroid hormonok nemcsak DNS-hez kötődve szabályozhatják a génkifejeződést. Hatásuk másik bizonyított módja a transzkripciós interferencia. Ennek lényege, hogy a ligand bekötődése után az aktív konformációs állapotban lévő receptor más transzkripciós faktorok hatását befolyásolja. Bizonyítottnak tekinthető, hogy az igen sokrétű kortizolhatás (pl. szénhidrát-anyagcsere befolyásolása, fehérje- és DNS-szintézis fokozása a májban, egy sor egyedfejlődési lépés gyorsítása, kalciumfelszívódás befolyásolása, az immun- és gyulladásos válasz gátlása, citokinek termelődésének gátlása, extracelluláris matrix képződés gátlása) egy része, elsősorban a gátlási folyamatok, nem igénylik a receptor DNS-kötődését. Valószínűsíthető, hogy a kortizolt kötött receptor interferál más transzkripciós faktorok (így AP-1 vagy NF-κB válaszadó elemhez kötődők) funkciójával, és így éri el élettani hatását.

A hormonfüggő magreceptorcsalád komplexitása

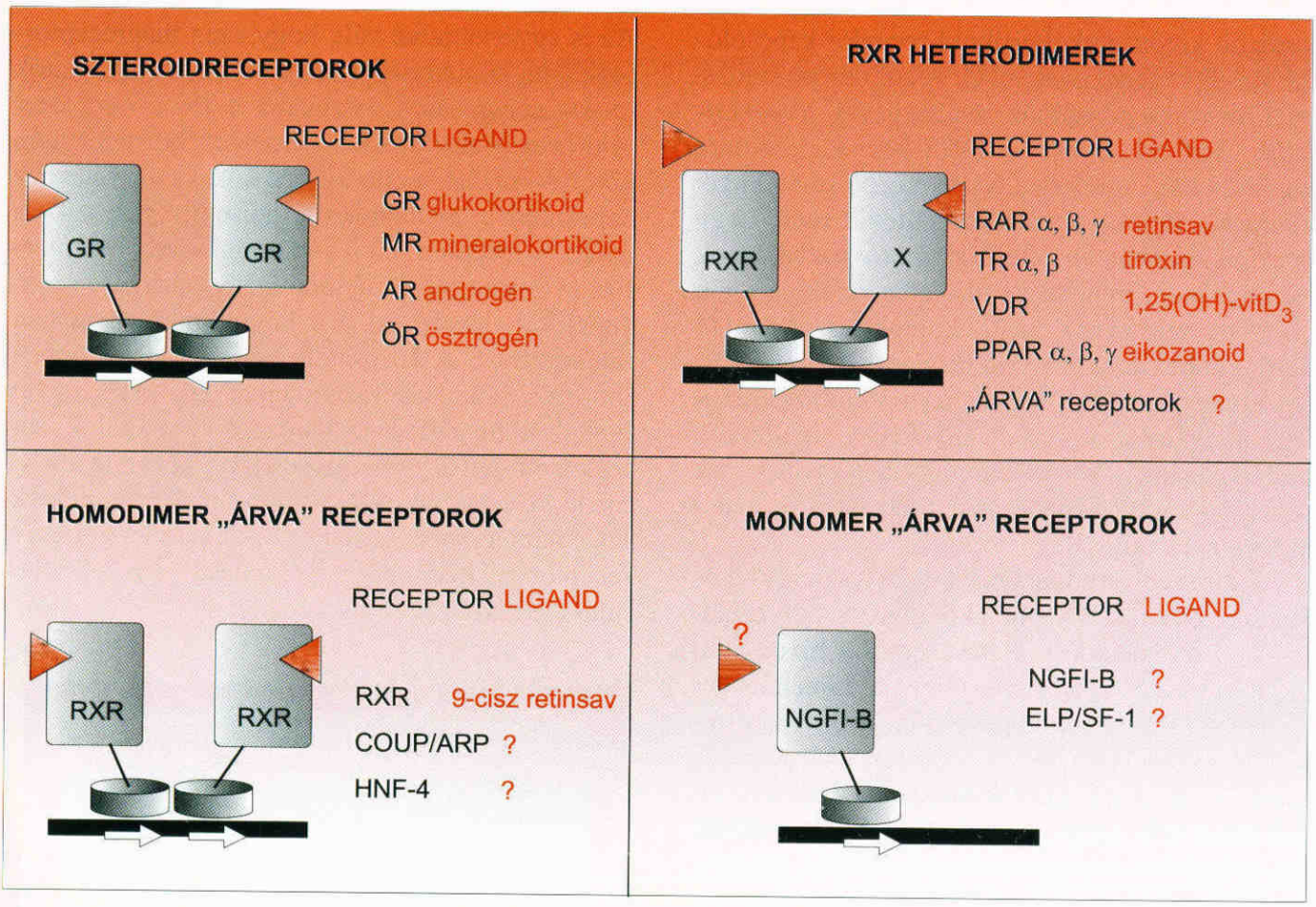
A szteroid–tiroid–D-vitamin–retinoid hormon magreceptorcsalád 15 tagját azonosították 1990-re. Köztük találhatók külön gének által kódolt izotípusok is, így pl. a retinoid receptorok α, β és γ típusa. A 90-es évek közepére a család tagjainak száma több mint 150-re bővült, beleértve a különböző speciesekből izolált formákat és azokat, amelyeknek még nem találták meg a ligandját és ezért „árva" receptoroknak nevezik őket (lásd később).

Az is egyértelművé vált, hogy ezen magreceptorcsalád tagjai nagyjából négy osztályba sorolhatók *(5-45. ábra)*. Az I. osztályba a jól ismert szteroidreceptorok tartoznak, amelyek hormont nem kötött formában a citoszólban hősokk-fehérjékhez kapcsolódva találhatók; a hormon „betereli" a magba a receptort, ahol a hormont kötött receptorforma fordítottan ismétlődő DNS válaszadó szekvenciákat ismer fel és homodimer formában transzaktivál. A II. osztály tagjai alaphelyzetben (hormon nélkül) is a sejtmagban találhatók és ott ligand nélkül gátló hatást fejtenek ki az általuk szabályozott gének transzkripciójára, közvetlenül ismétlődő válaszadó DNS-szekvenciákat ismernek fel, valamennyien RXR-ral (RXR a 9-cisz-retinsav receptora) heterodimerizálódnak. Az A-vitamin-származék retinsav képlete:



A III. osztály tagjai az „árva" homodimer receptorok, amelyek közvetlenül ismétlődő válaszadó DNS-elemekhez kötődnek. („Árva" receptoroknak nevezzük azokat a fehérjéket, amelyek szerkezetük alapján receptornak tekinthetők, de ligandjuk még ismeretlen). A IV. osztályba tartozó monomer „árva" receptorok nem ismétlődő, általában hosszabb DNS válaszadó elemhez kötődnek.

Újabb eredmények szerint további, a magreceptorokhoz kötődő fehérjék is szerepet játszanak e receptorok működésében. A koaktivátorok a receptorhoz bekötődő ligand hatására kapcsolódnak a receptorokhoz, azok transzaktiváló régióihoz. Önmaguk is bírnak transzaktiváló doménnal, jelenlétükben a transzkripciós hatás fokozódik. Egyrészt hídképző molekulák a receptor dimerek és a TATA-boxhoz kötődő obligát transzkripciós faktor komplex között, másrészt különböző aktív funkciókat jelenítenek meg a transzkripció szabályozásában. így pl. a koaktivátor komplexek hisztón-acetiláztranszferáz aktivitással bírva fellazítják az átírandó gén nukleoszómáit, génspecifikus

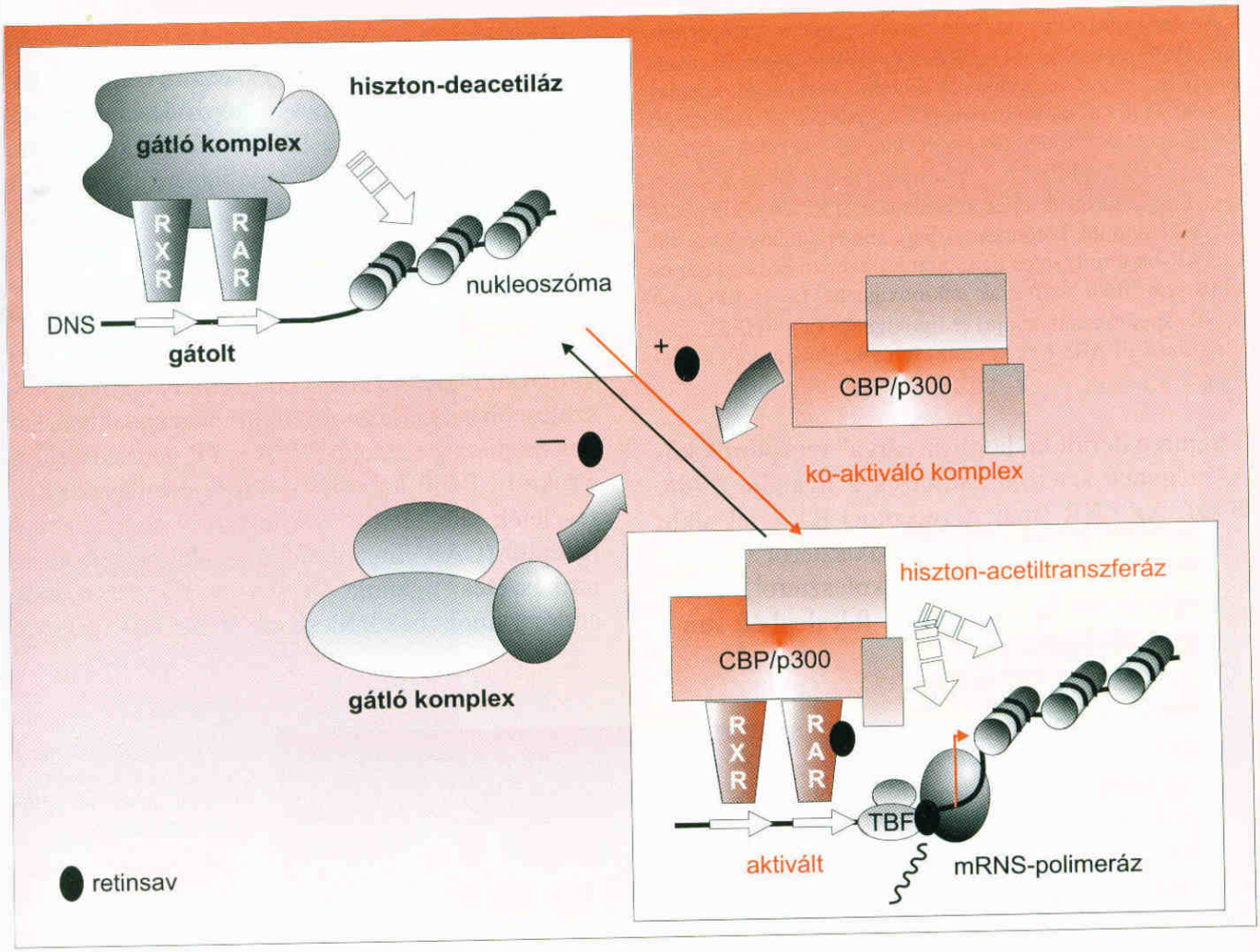


5-45. ábra. A magreceptorok osztályai

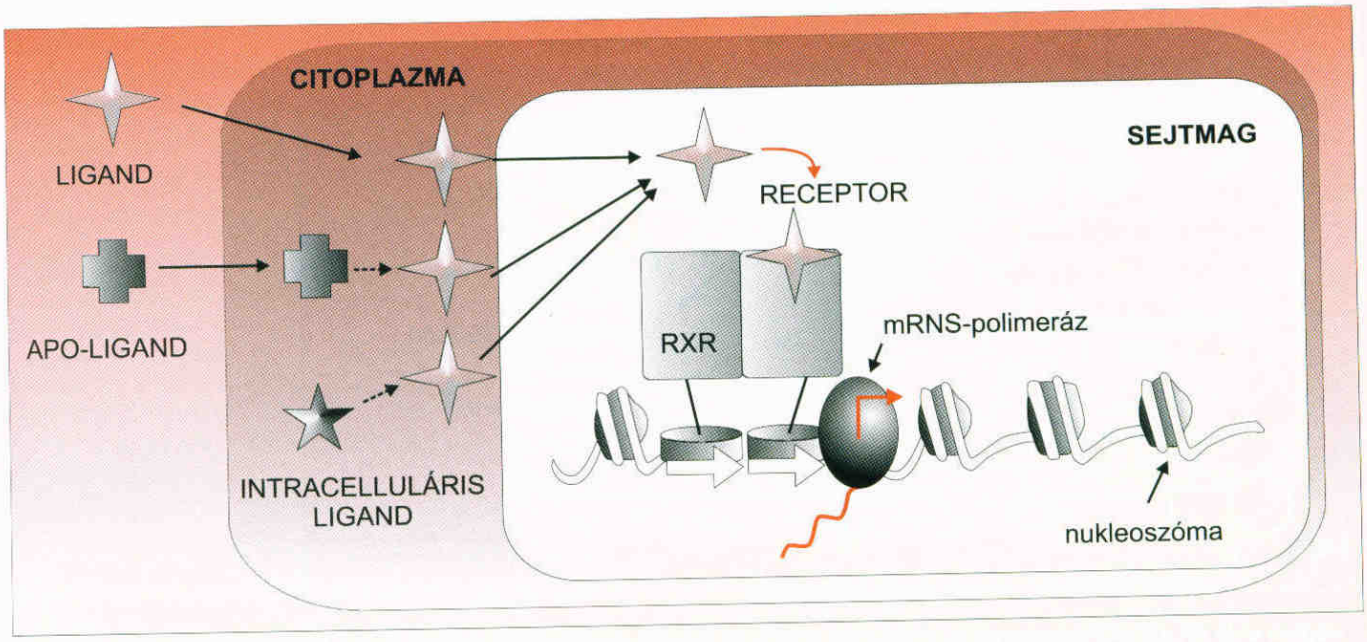
módon lehetővé téve az aktív kromatin kialakulását, az RNS- polimeráz hatékony működését *(5-46. ábra)*. A korepresszorok gátolják a ligand nélküli magreceptorok aktivitását; a gátló komplex adaptereket és hiszton deacetiláz aktivitással bíró fehérjét tartalmaz, amelyek ligand hiányában inaktív állapotba viszik az adott génszakaszt (5-46. ábra). A ligand megjelenésekor leválnak a magreceptorról, lehetővé téve a koaktivátor komplexek bekötődését.

Az „árva" magreceptorok és a reverz endokrinológia kibontakozó világa

A magreceptorok jelentős száma nyilvánvalóvá tette, hogy a hagyományos zsíroldékony hormonok mellett léteznie kell más ligandoknak is. Általában elmondható, hogy magreceptorra hatni tudó ligand háromféle módon jelenhet meg. Képződhet más szervekben (pl. a tiroid hormon) klasszikus endokrin hormon módjára, keletkezhet a célsejtben apohormon előalakból (ilyen pl. a *mind-tansz* retinsavból létrejövő *9-cisz-retinsav*, amely az RXR-receptor ligandja), végül a ligand (pl. prosztaglandinszármazék) abban a sejtben is képződhet, amelyben a hatását kiváltja *(5-47. ábra)*. Különleges érdeklődés kíséri az „árva" receptorok ismeretlen ligandjainak felkutatását. Sokan ezt a munkát fordított endokrinológiának is hívják, hiszen szemben a klasszikus endokrinológiával, itt előbb lettek meg a receptorok és ezt követően keressük a hozzájuk tartozó hormont, ligandot, majd annak segítségével derítjük fel az élettani funkciót. Csak az emberi szervezetben 40 körüli az ilyen „árva" receptorok száma. A fordított endokrinológia első sikere éppen a 9-cisz-retinsavnak a felfedezése volt, specifikus receptorának, az RXR-receptornak (amelynek 3 izotípusa van) az ismeretében. A közelmúltban 5 további „árva" receptor találta meg ligandját.



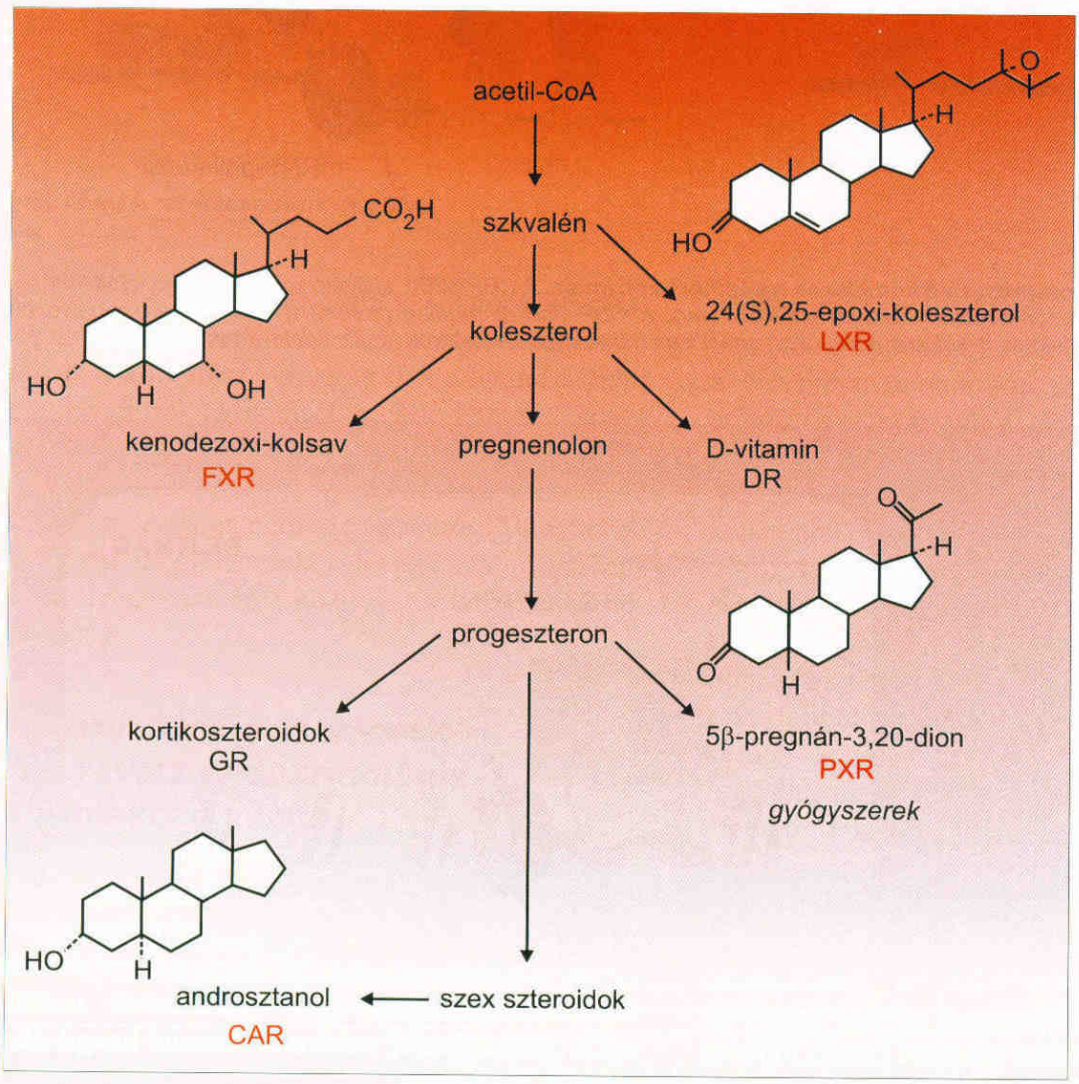
5-46. ábra. Koaktiváló és korepresszáló komplexek hatásmechanizmusa. *A CBP/p300, aktiváló komplexekben talált fehérje. Az aktiváló komplexnek hiszton-acetiltranszferáz aktivitása van. A CBP (CREB binding protein) a cAMP által szabályozott CREB-hez és az AP-1 fehérjékhez is kötődik; különböző specifikus transzkripciós faktorok közös koaktivátor fehérjéje*



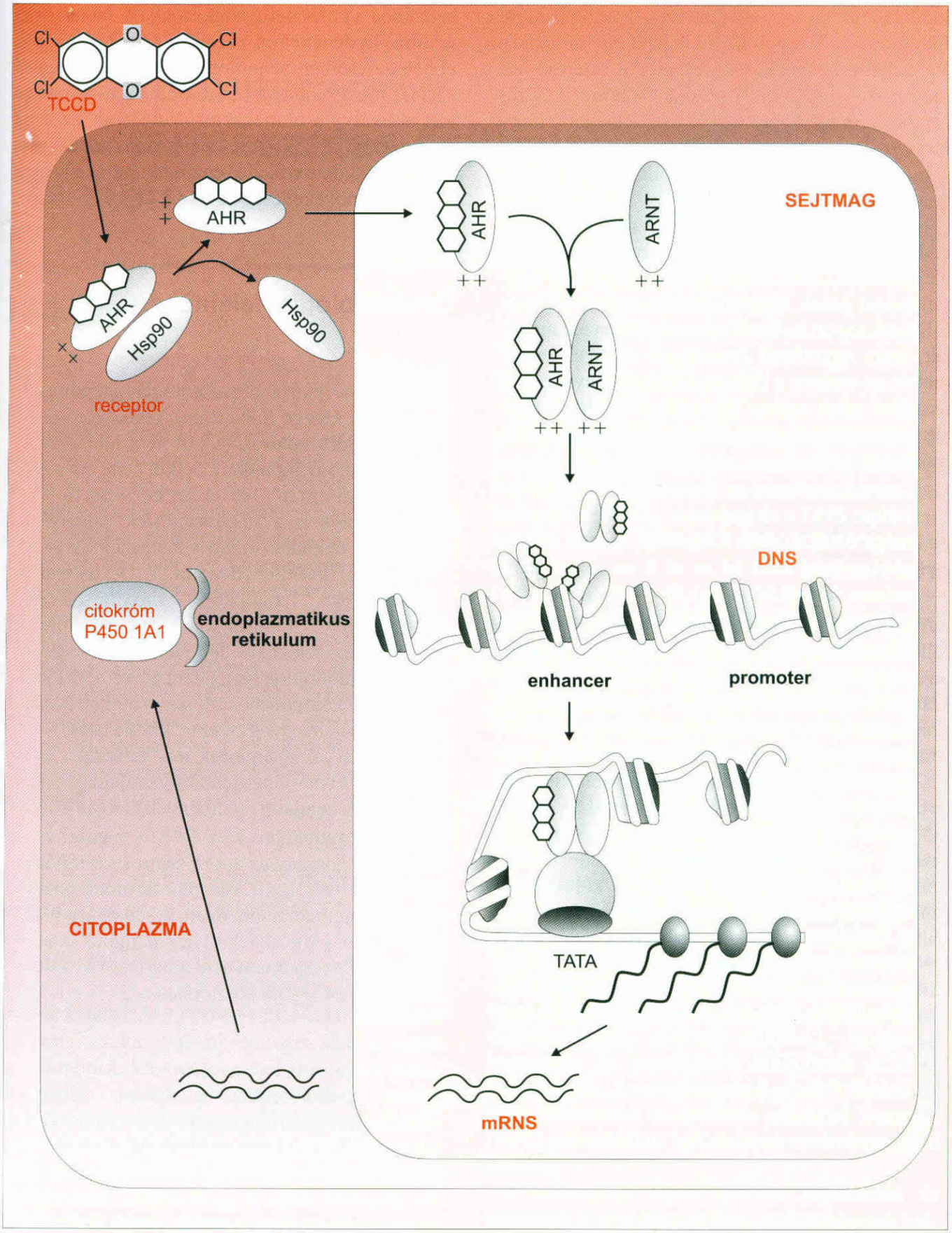
5-47. ábra. A magreceptorokat aktiválni képes ligandok megjelenésének lehetőségei

Az energiaháztartás szabályozásában fontos szerepet játszó PPAR-receptorokról (α, β és γ típusokat ismerünk, nevüket peroxiszóma proliferációt kiváltó hatásukról kapták) először az derült ki, hogy ismert gyógyszerek aktiválják; pl. azok, amelyek a triacilglicerol-szintet és a coronariasclerosist csökkentik a PPARα-t aktiválják és lipoproteinek génjének szabályozásával fejtik ki hatásukat; a PPARγ-hoz pedig antidiabetikumok kötődnek. A legújabb eredmények szerint a PPAR-ok természetes ligandjait különböző hosszúságú és telítettségi fokú zsírsavak ciklooxigenáz (a 15d-PGJ_2 a PPARγ specifikus ligandja) és lipoxigenáz (a 8S-HETE specifikusan a PPARa-hoz kötődik) termékei között kell keresnünk.

Nemrég derült ki, hogy az „árva" receptorok közül négynek szteroidszármazék a ligandja *(5-48. ábra)*. Az LXR (máj X receptor) RXR-ral alkot heterodimert. Ligandja olyan oxiszterol (a koleszterolszármazék 24S,25-epoxikoleszterol), amely akkor keletkezik, ha a májban feleslegben van a koleszterin. Az oxiszterol hatására aktiválódott LXR transzaktiválja a CYP7 enzim (amely a koleszterinből történő epesav képződéshez szükséges) génjét. Ha nincs LXR-hatás, akkor extrém mértékben felszaporodik a májban a koleszterin. A pregnánreceptor (PXR) szintén az RXR-ral alkot heterodimert, természetes ligandján (pregnánszármazék) kívül aktiválni képes az összes humán terápiában használatos gyógyszer közel fele. Transzaktiváló hatásának célgénje (CYP3A4 gén) citokróm P450 enzimet kódol, amely egyike a legszélesebb hatású, xenobiotikumokat átalakítani képes monooxigenázoknak. (A CYP géncsaládról, a citokrom P450 kapcsán a 2.6 fejezetben további részletek találhatók). A konstitutív androszteronreceptor (CAR) ligand nélkül is aktív a sejtekben; természetes ligandja, a tesztoszteronszármazék androsztanol bekötődésének hatására inaktivá-



5-48. ábra. Néhány szteroidszármazék, amely „árva" receptorok ligandja



5-49. ábra. A dioxinszármazék TCDD (tetraklórdibenzo-p-dioxin) hatására aktiválódó AH-receptor (AHR). Az ábra megértéséhez lásd még a 2.6 fejezetben leírtakat

lódik, az általa szabályozott gének kifejeződése felfüggesztődik (egyikük a CYP2B enzim génje). Valószínűsíthető, hogy a receptor a szteroid-homeosztázis egyik szabályozója. A farnezil X receptorról eredetileg azt tételezték fel, hogy farnezol lesz a természetes ligandja. Ezt később nem sikerült bizonyítani. Kiderült, hogy a természetes ligandok epesavak (így pl. a kenodezoxikólsav), vagyis az FXR (amely azokban a szövetekben fejeződik ki leginkább, ahol az epesavak megjelennek), ezek magreceptora eddig nem teljesen ismert gének kifejeződésének szabályozására. E ligandcsoport hatásai összességükben azt mutatják, hogy egymással összefüggő anyagcsereutak (ebben az esetben a komplex szteroid-anyagcsere) termékei adott sejtben közvetlenül szabályozhatják kulcsenzimeik génjeit (metabolikus génszabályozás).

A magreceptorok tágabb értelmezése

A fentiekben bemutatott magreceptor család kifejlődése azt mutatja, hogy az evolúció során kifejezetten előnyös volt a cinkujjat tartalmazó DNS-kötő és a ligandkötő domének fúziójával létrejött szerkezet, amely biztosítani tudta diverz élettani funkciók specifikus szabályozásának megjelenését. Ez azonban nem jelenti azt, hogy csak cinkujjat tartalmazó magreceptorok jelentek meg az evolúció során. Jó példa az ettől eltérő megoldásra a **szterol szabályozó elemhez** kötődő fehérje (amely az LDL-receptor, továbbá a koleszterolszintézis kulcsenzime, a HGM-CoA reduktáz génjeihez közeli és azokat szabályozó válaszadó DNS-szakaszhoz kötődik): ez akkor válik az endoplazmatikus retikulum membránban található inaktív előalakból proteázok hatására aktívvá, ha a sejtekben a koleszterolszint csökken. Jól ismert az **aromás hydrocarbon-receptor** (AHR) példája is; ebben az esetben xenobiotikus (tehát nem természetes) anyag a ligand (pl. a dioxin), amely a receptort aktiválva a biotranszformáció első fázisának enzimei (pl. a CYP1A1) génjét transzaktiválja és vezet ezen detoxifikáló enzimek intracellulárisa szintjének növekedéséhez *(5-49. ábra)*.

Orvosbiológiai jelentőség

A magreceptorok orvosbiológiai jelentőségét nem lehet eléggé túlbecsülni. Glukokortikoid- vagy tiroidreceptorok nélkül nem lehet élni – éppúgy, ahogy ligandjaik nélkül sem. Az utóbbi években egyre több olyan kórképet is leírnak, amelyben a magreceptorok mutációja, részleges deléciója miatt a betegség az adott hormonnal kezelhetetlen; pl. a D-vitaminnal kezelhetetlen angolkór, tiroxinrezisztens tiroidhiányos szindróma, androgénnel nem korrigálható szexuális fejletlenség. A szteroidok és a retinoidok igen jelentős szerepet töltenek be a különböző terápiás protokollokban. újabb és újabb gyógyszerek kifejlesztése várható az „árva" receptorok már felderített és a közeli jövőben felderítendő ligandjainak ismeretében. A legújabb eredmények alapján közeli kapcsolat mutatható ki a PPARγ hatásai és a diabetes, valamint az arteriosclerosis kifejlődése között. Az RAR receptor kromoszómális transzlokáció miatt bekövetkező fúziója a PML génnel a mieloid sejtek olyan malignus transzformációját eredményezi, amelynek kezelése magreceptor ligandokkal lehetséges.

A sejtproliferáció és a természetes sejthalál biokémiája

5.3.

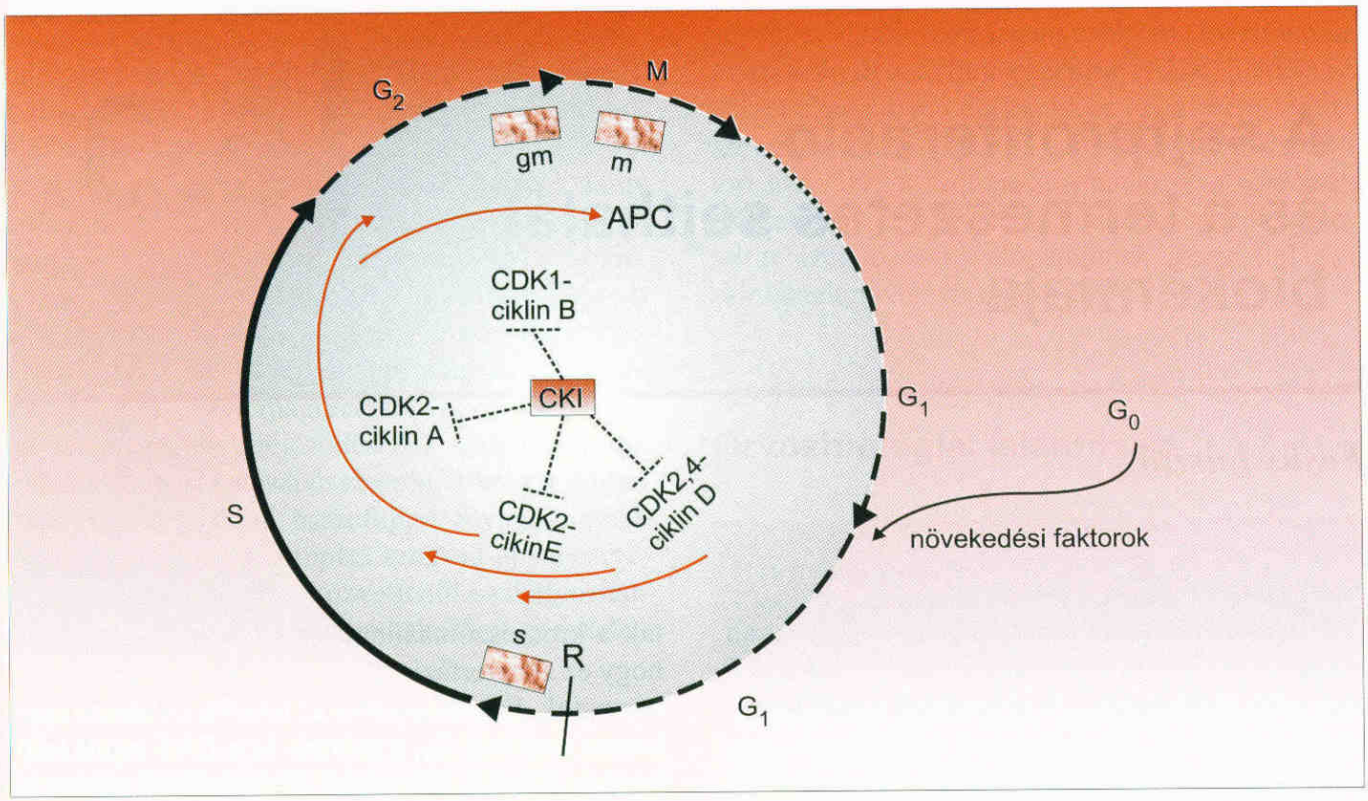
Fésüs László

Az emberi szervezet fiziológiás működése során a sejtproliferáció és a sejthalál egymást kiegészítő egyensúlyi folyamatok. Szervezetünk legtöbb sejtje meghatározott élettartammal rendelkezik, naponta sejtjeink milliárdjai halnak el, helyettük ugyanilyen számban kell új sejteknek keletkezni. A sejtproliferáció különösen jelentős az embriogenezis során, a növekvő szervezetben, a csontvelőben, a bőr bazális rétegében, a bélhámsejtek napi pótlásában, de elengedhetetlen feltétele a sebgyógyulásnak vagy más megnövekedett igény kielégítésének. Ma már részletesen ismerjük azokat a biokémiai folyamatokat, amelyek a sejtproliferáció és a természetes sejthalál folyamatokat meghatározzák.

A sejtosztódási ciklus biokémiai sajátságai és szabályozása

A korai fénymikroszkópos vizsgálatok során ismerték fel, hogy a mitózis (M fázis) vagyis a sejtek kettéosztódásának periódusa több, a kettéosztódást előkészítő szakaszból áll. Mitózis alatt a sejtek összetömörítik kromoszómáikat (profázis), felsorakoztatják azokat a mikrotubuláris orsóra (metafázis) és a testvérkromatidokat a sejt ellentétes pólusára csoportosítják (anafázis). Keveset lehetett látni a mitózisok közötti időszak (interfázis) történéseiből, kivéve, hogy a sejtek térfogata nő. Az interfázis fekete doboz maradt addig, amíg fel nem fedezték, hogy a DNS hordozza a kromoszómákban tárolt információt. Ezt követően kimutatták a kromoszómaállomány megduplázódását, és hogy ez az interfázis idején, annak rövid időszakában zajlik. Ez a felismerés az interfázist három szakaszra osztotta: G_1, a mitózis és a DNS replikáció kezdete közötti időszak; S fázis, a DNS szintézis ideje; és G_2, az S és az M fázis közötti időszak *(5-50. ábra)*. A G1, S, G2, és M fázisok mint meghatározó sejtciklus-szakaszok jelentősége fokozatosan vált egyértelművé és a sejtosztódási ciklus kutatás legfontosabb célja olyan biokémiai események azonosítása lett, amelyek kiváltják az egyik fázisból a másikba való átmenetet. Az egyes fázisokon belül is kiemelkedő jelentősége van az ún. stabil pontoknak, nevezetesen a start (S fázis kezdete) előtti (s), a G_2/M átmenet (gm) és a metafázis (m) pontoknak, amelyek a sejtosztódási ciklus ellenőrző pontjai; csak akkor halad tovább a ciklus, ha megfelelő információk érkeznek a következő lépéshez szükséges összes biokémiai esemény bekövetkeztéről. A három ellenőrző pont közül kettő esetében (s, gm) az áthaladás biokémiai meghatározói döntően a ciklus adott pontján újonnan szintetizálódott ciklinek és az azok által aktivált ciklindependens kinázok (CDK-k), amelyeket konstitutív és indukálható inhibitorok (CKI-k) kontollálnak. A metafázis stabil pontból történő kilépés elsősorban az anafázist elősegítő komplex (APC) proteolitikus hatásának az eredménye (lásd később).

A szomatikus sejtek, például hepatociták és neuronok in vivo hosszú ideig funkcióképesek tudnak maradni akkor is, ha nem proliferálnak; ezt, a sejtproliferáció szempontjából nyugalmi állapotot



5-50. ábra. A sejtosztódási ciklus sémás ábrázolása. A G_1 fázis eseményei közül azok, amelyek az S fázis előkészítői már az előző ciklus alatt a G_2 és a mitózis eseményei idején indulhatnak. Ugyanígy, a mitózisra való, döntően G_2 előkészületek már az S fázisban megkezdődnek. A G_0-ból a G_1-be való belépés növekedési faktorok hatására lehetséges (folyamatosan proliferáló sejtek nem lépnek ki a G_0-ba). A kritikus szabályozási pontok az R (restrikciós pont, a progresszió vége), az s a start előtt, a gm az M fázisba lépés előtt és az m, a metafázisban. A belső nyilak a ciklindependens kinázok (CDK) és a megfelelő ciklinek komplexeinek kialakulását jelzik. A ciklindependens kináz–ciklin komplexekhez átmenetileg inhibitorok (CKI) kötődhetnek.

gyakran nevezzük G_0 helyzetnek. Az ilyen G_0 állapotban tartott sejtek nem rendelkeznek megkettőzött DNS-tartalommal. A G_0 és G_1 sejtek azon túlmenően hogy részt vesznek vagy sem a sejtciklusban, nagyon sok minden másban is különböznek egymástól. A G_0 és G_1 sejtek megkülönböztetése központi kérdés, mert hogy egy adott sejtpopuláción belül milyen ütemben nő a sejtszám, az elsősorban attól függ, hogy a sejtek mekkora hányada proliferál a G_0 fázisban lévő sejtek számához viszonyítva. A G_0 állapotban lévő sejtek visszatérhetnek a sejtciklusba, amennyiben átesnek az ún. mitogén kaszkád biokémiai eseményein.

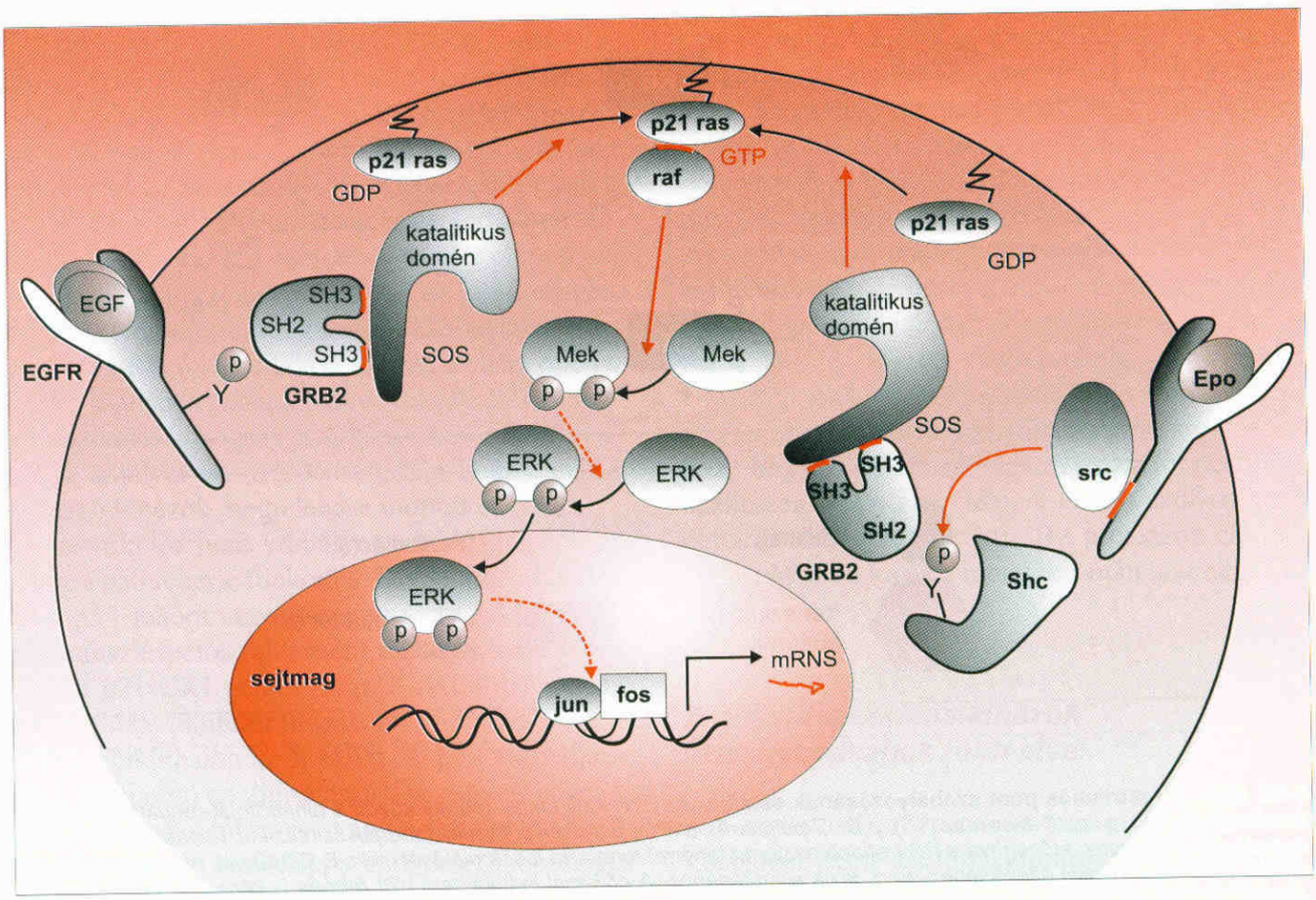
Proliferációs szignál útvonalak, a mitogén kaszkád

A G_0-ban lévő sejtek proliferációs szignálok hatására jutnak el a sejtosztódási ciklus G_1 szakaszába, és onnan a restrikciós ponton át az S fázisba. A proliferációs szignálútvonalat, más nevén a mitogén biokémiai kaszkád útvonalat növekedési faktorok indítják el, amelyeket három fő csoportba lehet osztani:

1. Tirozin-kináz-receptorokra hatók, így a PDGF, EGF, fibroblaszt növekedési faktor (FGF), hepatocitanövekedési faktor (HGF) és mások.
2. Egy transzmembrán domént tartalmazó, de saját tirozin-kináz-aktivitással nem rendelkező receptorokra hatók, így az eritropoetin (Epo), a kolóniastimuláló faktor (CSF), az interleukin-1, interleukin-2 és mások.
3. Hét transzmembrán doménnal rendelkező receptorokra ható bizonyos sejtekben mitogén kaszkádot is indítani tudó bombezin, noradrenalin, szerotonin és mások.

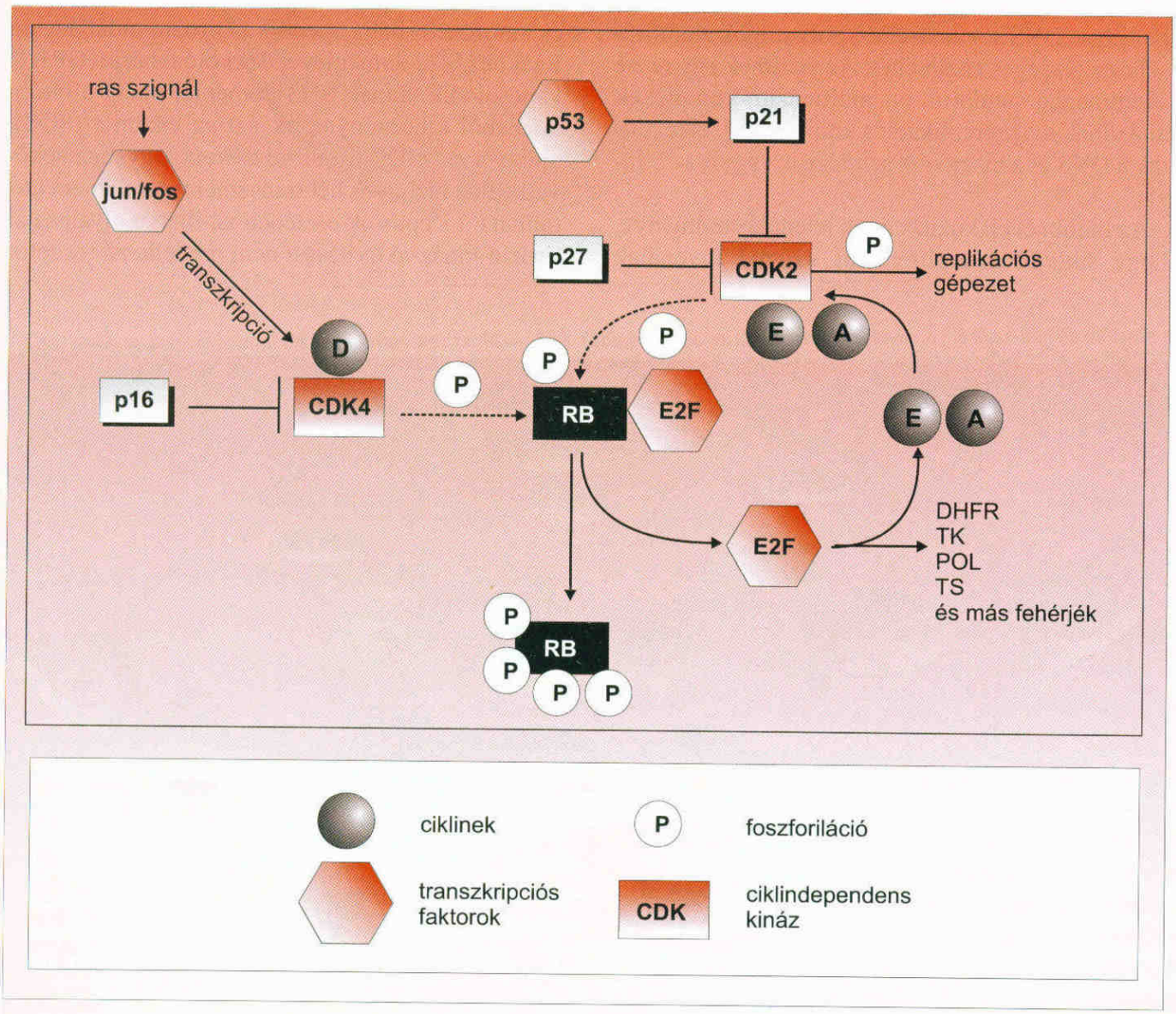
A receptorokhoz kötődő növekedési faktorok másodlagos hírvivők képződéséhez vezetnek; sejtkultúrákban végzett kísérletek során intenzív fehérjefoszforilációt, diacilglicerol- és inozitol-P-képződést, nátrium-, kalcium- és protonbeáramlást figyeltek meg. Már néhány órán belül megfigyelhetők a korai, azonnali válaszadó gének (jun, fos, myc transzkripciós faktorok) transzkripciójának fokozódása, majd ezen, főleg transzkripciós fehérjék szintézisét követi a sejtmag szerkezetének átrendeződése, újabb gének indukciója, újabb és újabb fehérjék megjelenése (ciklinek, proteázok), beleértve DNS szintéziséhez, poliaminok előállításához szükséges enzimeket. Az enzimek egy része a sejtmagba vándorol, ott multienzim-komplexek alakulnak ki (prereplikációs komplexek), elkezdődik a DNS és a hisztonok szintézise, vagyis az S fázis.

Az utóbbi évek kutatásainak jelentős eredménye, hogy sikerült a proliferációs szignál útvonalak egyikének, a ras mitogén kaszkád útvonalnak minden lépését felderíteni. A tirozin-kináz-receptorokkal működő jelpályák leírásakor ez az útvonal már részletes ismertetésre került, itt röviden ismét összefoglaljuk *(5-51. ábra)*. A 21 kD méretű ras fehérje a hozzá kovalensen kötődő palmitát- és farnezilcsoportok segítségével sejtmembránhoz van kihorgonyozva és GDP-t kötött formában inaktív. Aktív, GTP-t kötő állapotba annak hatására kerül, hogy a növekedési faktor (pl. EGF) a tirozin-kináz aktivitású receptorához kötődik (EGFR), a receptor ennek hatására dimerizálódik és autofoszforilálja specifikus tirozin oldalláncait. Ezekhez SH2 doménjével dokkoló fehérje (GRB2) kapcsolódik, annak SH3 doménjei pedig a citoplazmából kihorgonyozzák azt az enzimet (SOS), amely a ras-GDP-t GTP-re cseréli. Ugyanez bekövetkezhet bizonyos hét transzmembrándomént tartalmazó receptorok esetében is, illetve olyan saját tirozin-kináz-aktivitással nem rendelkező receptor



5-51. ábra. A ras proliferációs szignál útvonal. Az ábra megértéséhez lásd a szöveges leírást és az 5.1. fejezetben leírtakat

esetében, mint pl. az eritropoetin (Epo) receptora. Ilyenkor a receptoraktiválás az src tirozin-kináz-családba tartozó enzimet aktiválja, ez az Shc fehérjét foszforilálja, amihez a GRB2 és azon keresztül az SOS kötődni képes. Az igen rövid ideig aktív ras aktív állapotba hozza a raf fehérjét (és más ras effektor célfehérjéket), majd endogén GTPáz aktivitása révén a kötött GTP-t GDP-vé alakítva inaktív állapotba kerül. A raf fehérje kináz, foszforilációval aktivál más kinázokat, így a sejtek egy részében a MEK fehérjét is, amely az ERK fehérjét foszforilálja. Az ERK fehérjéket foszforilál a citoszólban, majd bevándorol a sejtmagba, ahol szintén foszforilációval aktivál transzkripciós faktorokat, amelyek újabb, ugyancsak foszforilálódó transzkripciós faktorok szintézisét teszik lehetővé. Az utóbbiak hatására egy sor kritikus szabályozó fehérje, így pl. a ciklin D, E és A génjei indukálódnak.



5-52. ábra. A restrikciós pont szabályozásának sémája. *Az E2F-k elindítják többek között a dihidrofolát-reduktáz (DHFR), a timidin-kináz (TK), a timidilát-szintáz (TS), a DNS-polimeráz-a (POL), a ciklin E és más fehérjék szintézisét. Mindez pozitív visszacsatolást eredményez, elősegítve a RB (retinoblasztoma fehérje) fenntartó foszforilálását ciklin E-CDK2-vel, hozzájárulva a restrikciós pont irreverzibilis átlépéséhez, az S fázis elindításához. A p53-mal indukálható p21 fehérje is képes G_1-blokkot csinálni azzal, hogy gátolja a CDK2-t; a p27 a ciklin E(A)-CDK2 komplex alapállapotú gátló fehérjéje. (Az ábra megértéséhez lásd még a szövegben található leírást.) Az inhibitor fehérjék családokat alkotnak. A p16 családba tartozik a p15, p18, p19. A p21 családnak ugyancsak több tagja van*

A restrikciós pont szabályozása

A restrikciós pont a G_1 fázis azon pontja, ahonnan a sejtek további mitogén stimulus nélkül is továbbhaladnak a sejtciklus lépésein. Feltehetően egybeesik a ciklin E szintézis megtörténtével. A restrikciós ponton való áthaladást és az S fázisba való belépést CDK-ok szabályozzák, amelyeket a ciklin D és E egymást követően kapcsol be. A D típusú ciklinek mintegy növekedési faktor érzékelőként hatnak, mivel expressziójuk inkább függ az extracelluláris környezetből érkező információktól (növekedési faktorok, ras mitogén kaszkád), mint az adott sejt sejtciklusban fennálló pozíciójától. Amint a sejt belép a sejtciklusba (a G_0-ból vagy újabb sejtciklus indul a G_1-ből), D típusú ciklinek indukálódnak a növekedési faktorok hatására bekövetkező elnyújtott korai válasz részeként; mind a D ciklinek szintézise, mind katalitikus partnereikkel (döntően CDK4) való összeállásuk a mitogén stimuláció függvénye *(5-52. ábra)*. Egyidejűleg a CDK-ciklin D komplexet gátló CKI (ciklin-dependens kináz inhibitor p16 fehérje) proteolízissel degradálódik. A ciklin D-függő kinázok hiperfoszforilálják a retinoblasztoma (RB) fehérjét. A RB és más RB-hez hasonló fehérjék közvetve génexpressziót szabályoznak, mert inaktív komplexben tartják az E2F transzkripciós faktorcsalád tagjait. Ez utóbbiak aktiválják azon géneket, amelyek termékei fontosak az S fázisba történő belépéshez. Alulfoszforilált állapotban az RB az E2F komplexekhez kötődik és ezzel gátolja a E2F célgének átírását. Az RB foszforilálása az E2F transzkripciós faktort szabaddá teszi, lehetővé téve az E2F célgének aktiválását, vagyis az S fázist bevezető folyamatot, amelyet eredendően a ciklin D és a ciklin D-függő kinázok megjelenése indított el.

A restrikciós pont szabályozásának igen fontos eleme a p53 fehérje funkciója. DNS károsodás esetén a p53 fehérje mennyisége megnövekszik és a p53 transzkripciós faktorként többek között indukálja a p21 CKI génjét. A p21 ciklin-dependens kináz fehérje inhibítor megakadályozza azt, hogy a CDK2 elindíthassa az S fázist. A p53 aktiválja a DNS hibajavító enzimrendszert is. Amennyiben a DNS károsodás túl nagy, vagy a hibajavítás nem elégséges, a p53 indukálja a sejthalált (apoptózist) kiváltó géneket és elindítja a károsodott sejt eliminálását.

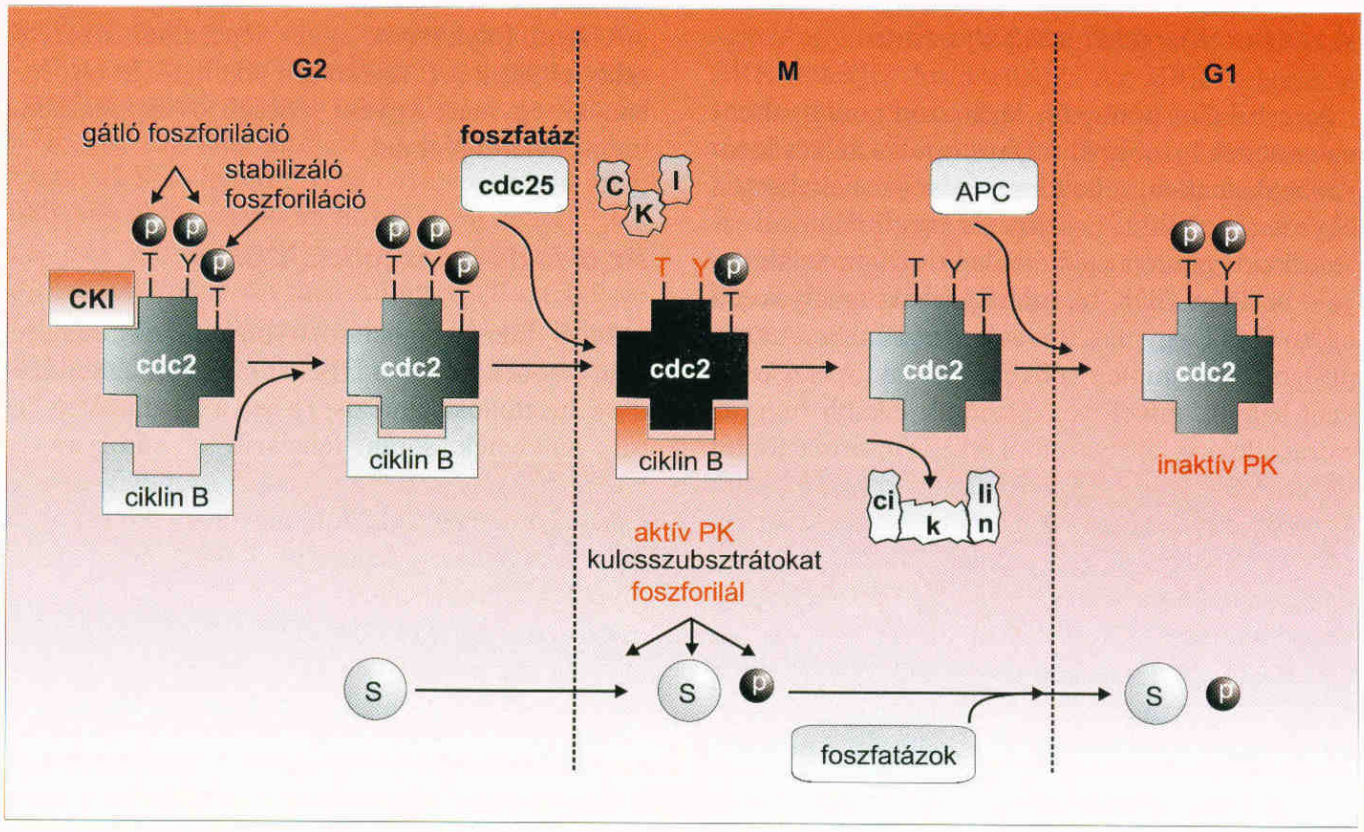
A fenti folyamatok egyes lépéseinek részletesebb leírása a 3.1. fejezetben található, itt elsősorban az egymást követő lépések összefüggéseire hívjuk fel a figyelmet.

Az M fázis kináz (cdc2, CDK1)

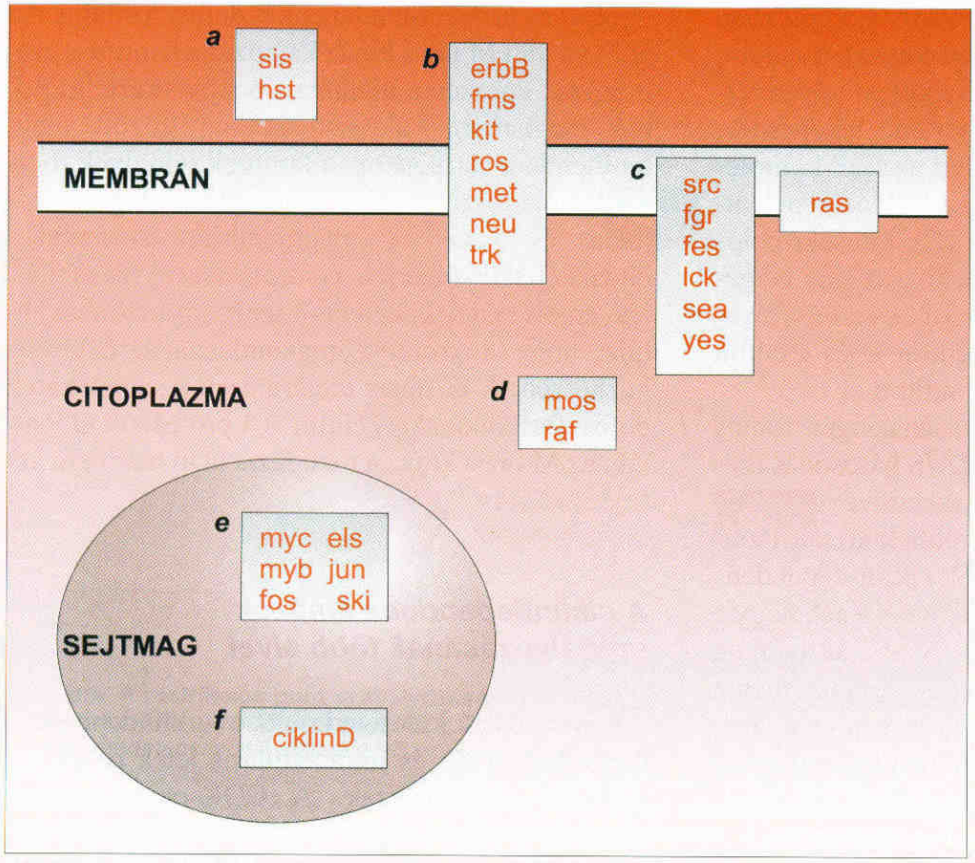
Az S fázis maghatározó biokémiai történései után (többek között a DNS állomány megkettőződése, hisztonok szintézise) a sejt a G_2 állapotba kerül, amelynek során felkészül a mitózisra és ellenőrzi, hogy az S fázis eseményei rendben lezajlottak. Ez az ellenőrző funkció adja a gm stabil állapot elsődleges jelentőségét; addig nem megy tovább a sejtciklus, amíg minden fontos biokémiai eseményről be nem fut a „megnyugtató" információ. Az ellenőrzések visszajelzései az ún. M fázis kináz, a cdc2, más néven ciklindependens kináz 1 (CDK1) szabályozásában jelentkeznek (lásd még a 3.1 fejezetben). A CDK 1 a ciklin B-vel komplexet alkot. A komplex azonban inaktív a G_2 fázisban, mert az az ATP kötőhelyén foszforilált. A folyamat sémáját az *5-53. ábra* mutatja. A cdc25 foszfatáz (amelyet a visszajelző szignálok aktiválnak) az aktív centrum közelében foszforilált treonin és tirozin oldalláncokat defoszforilálja. Az aktívvá vált M fázis kináz katalizálja a mitózis eseményeit, egészen a metafázis bekövetkeztéig. Eddig megismert kulcsszubsztrátjai között megemlítendő a H1 hiszton, a laminok (amelyek foszforilációja teszi lehetővé proteolitikus degradációjukat és ezzel a magmembrán szétesését), citoszkeletális fehérjék, centroszóma és más fehérjék, amelyeknek ki kell kerüljeni a kromatinból ahhoz, hogy a kromoszómakondenzáció bekövetkezhessen. A G_1 fázis idejére ezek a szubsztrátok defoszforilálódnak, a ciklin B-t proteázok elbontják, az M fázis kináz a metafázis után már nem aktív.

A ciklindependens kinázok szabályozásának főbb elvei

A sejtciklus kulcsenzimeit, a ciklindependens kinázokat extra- és intracelluláris jelek rendkívül precízen szabályozzák. A CDK-ok aktivitását több, az evolúció során megőrzött biokémiai me-



5-53. ábra. Az M fázis kináz szabályozó mechanizmusai és működése. *Az aktivitást a cdc 25 foszfatáz kapcsolja be*



5-54. ábra. Sémás ábrázolás sejtkompartmentek bemutatására, ahol onkogén vagy protoonkogén termékek lokalizálódnak. (a) *Növekedési faktorok;* **(b)** *transzmembrán tirozinkináz növekedési faktor receptorok;* **(c)** *az src és ras géncsalád membránhoz kapcsolódó tagjai;* **(d)** *citoplazma jelátvivő molekulák;* **(e)** *a magban található transzkripciós faktorok; (f) sejtciklus regulátorok*

chanizmus szabályozza, amelyek összességében a szabályozó útvonalak szinte utolérhetetlen eleganciájú és bonyolultságú hálóját alkotják.

1. *CDK-aktiválás ciklinkötődéssel.* Mindegyik CDK a ciklinek specifikus alcsoportjával tud komplexet alkotni. Emellett egy adott ciklin több CDK-zal is képes kölcsönhatásba lépni. A szabályozás transzkripciós szinten a megfelelő ciklinek adott időpontban indukált szintézisével történik.
2. *CDK-gátlás foszforilációval.* A CDK-ciklin komplexek aktivitását gátolja két, az N- terminális vég közelében elhelyezkedő oldallánc foszforilációja (Tr 14 és Tyr 15 mind a cdc2, mind a CDK2 esetében). A defoszforilációt a cdc25 foszfatáz katalizálja.
3. *CDK-aktiválás foszforilációval* (komplex stabilizáló foszforiláció). A teljes CDK aktiválás foszforilációt igényel konzervatív treonin oldalláncokon (Tr 161 a cdc2, Tr 160 a CDK2 esetében).
4. *CDK-gátlás inhibitor alegységekkel.* A négy fontosabb emlős CKI két csoportba tartozik: a p21 és p27 egymáshoz hasonló fehérjék, amelyek a CDK2- és a CDK4-ciklin komplexeket preferálják. A p16 és p15 egymáshoz szintén hasonló CKI-ok, amelyek CDK4- és CDK6-ciklin komplexeket gátolják.
5. *Ciklinek és ciklin inhibitorok proteolízise,* ahol a target-fehérjék foszforilálása ubiquitinálási szignálként szolgál.

A proteolízis jelentősége a sejtciklusban

A proteolízis a CDK aktivitást a CDK aktivátorok (ciklinek) vagy inhibitorok lebontásával szabályozza, illetve közvetlenül elindíthatja a metafázisból az anafázisba történő átmenetet. A proteolízis kémiai irreverzibilitását kihasználva a sejtek a sejtciklus kritikus pontjain adnak döntő irányultságot a biokémiai folyamatoknak. Az APC (anafázist elősegítő fehérjekomplex) proteolitikus aktivitása a kromoszómaszegregációt és a mitózisból történő kilépést segíti elő az anafázis inhibitorok és mitótikus ciklinek lebontásával. Amíg a G_1-S és a G_2-M átmeneteket (s és gm) döntően CDK-ok határozzák meg, addig a metafázisból a G_1-be jutást az APC proteolitikus hatása katalizálja.

A sejtosztódási ciklus szabályozásának kapcsolata a tumoros sejtproliferációval

Protoonkogének és onkogének

Az onkogének fogalma a tumorvirológiából származik: olyan virális (elsősorban retrovirális) génekről van szó, amelyek az adott vírus tumorkeltő hatásáért felelősek (lásd 3.3. fejezet illetve 5.1. fejezet). A 70-es években derült ki, hogy ezeket a géneket a vírusok gazdaszervezeteikből vették át; azok ott normál körülmények között a sejtproliferáció szabályozásában vesznek részt, de megváltozásuk tumorok kialakulásához vezethet (lásd 5.1. fejezet). Kiderült, hogy a mitótikus kaszkád szignáltranszdukciós biokémiai útvonala ilyen protoonkogénekkel van „kikövezve" *(5-54. ábra).*

A protoonkogének onkogénné aktiválódásának lehetséges biokémiai mechanizmusai a következők: promoter beilleszkedés, enhancer beilleszkedés, kromoszomális transzlokáció, génamplifikáció, pontmutáció vagy deléció. Az öt mechanizmus közül az első négy onkogének termékének a megnövekedését jelenti transzkripció fokozódása miatt, a fehérje szerkezetében nincs semmiféle változás. Ez azt jelenti, hogy egy onkogén termékének mennyiségi fokozódása elégséges lehet egy sejt malignussá tételéhez. Az ötödik mechanizmus, a pontmutáció vagy deléció, a fehérje szerkezetének megváltozását jelenti, miközben annak mennyisége nem nő. Ebből az következik, hogy a malignitás felé billentheti a sejtproliferáció kényes szabályozási folyamatait a kulcshelyzetben működő regulációs fehérje szerkezeti abnormalitása.

Az onkogén hatás kialakulását az alábbi példák illusztrálják.

- Növekedési faktorok túltermelése, amelyek magára a növekedési faktort termelő sejtre hatnak (autokrin mechanizmus). Az onkogén közvetve stimulálhatja a növekedési faktor génjét, vagy az onkogén maga kódol növekedési faktort (pl. a

sis onkogén megfelel a trombocita eredetű növekedési faktor, a PDGF egyik polipeptidláncának).

- Az onkogén hibás receptort kódol, amely stimulációs jeleket továbbít a sejteknek akkor is, amikor nincs jelen az extracelluláris térben növekedési faktor. Klasszikus példa erre a transzmembrán tirozin-kináz aktivitású receptorok, amelyek onkogénné válva növekedési faktor nélkül is autofoszforilálják tirozin oldalláncaikat és ezzel folyamatosan aktiválják pl. a ras útvonalat. Ilyenek a PDGF receptorból kialakuló kit, az epidermális növekedési receptorból kialakuló erb, a hepatocitanövekedési receptorból kialakuló met és több más onkogén.
- A növekedési receptortól eredetileg normál stimulációs szignált vivő útvonal kóros megváltozása. A normál gén terméke jelet továbbít receptorstimuláció után a sejt belsejébe; onkogén formája olyan fehérjét eredményez, amely a receptor felől érkező jel hiányában is stimulációs szignált küld a sejtmagba. A malignus tumorok 30–40%-ában megtalálható kóros ras fehérje endogén GTPáz aktivitása adott pontmutációk következtében akár ezredrészére csökkenhet, ezzel a ras aktív jeltovábbító GTP-t kötő formája túl gyakran küld sejtosztódásra vezető szignált.
- A citoszól szignáltovábbító fehérjéinek onkogénné alakulása elsősorban fokozott vagy tartós fehérjefoszforilációs képességükben nyilvánulhat meg, pl. a kóros raf esetében.
- Elváltozások azokban a fehérjékben, amelyek a sejtmagban fogadják a mitogén stimulációs jeleket. A humán myc gén a sejtekben heterodimer formában található a max fehérjével kapcsolódva; ez a kölcsönhatás elősegíti szekvenciaspecifikus kötődését DNS-hez és ezzel olyan célgének indukcióját, amelyek meghatározóak a restrikciós ponton való áthaladásban, az S fázis elindításában. A myc gén expressziója több, a transzkripciótól a poszt-transzlációig terjedő szinteken szabályozódik. Genetikai változások (génamplifikáció, kromoszómatranszlokáció, inzerciós mutagenezis, pontmutáció következtében megváltozott transzkripciós elongációs sebesség, a mRNS szerkezetének olyan megváltozása, amely megnyújtja annak felezési idejét) képesek a c-myc fehérje emelkedett intracelluláris koncentrációját kiváltani, ami tumorképzéshez vezethet.
- A sejtciklus ellenőrző pontok deregulációja a ciklin-CDK komplexekben létrejött elváltozások miatt. Az onkogenezis során több ellenőrzési pont szabályozása borulhat fel és ez gyakran annak a következménye, hogy a ciklin-CDK komplexekben szerkezeti változások lépnek fel. A start deregulációja ahhoz vezethet, hogy a sejtszaporodás érzéketlenné válik az extracelluláris jelekre. Mindez kialakulhat a pozitív regulátorok túlzott expressziójának következtében. Gyakran figyelték meg malignus tumorokban a ciklin D (ritkábban a ciklin A és E) kórosan magas szintjét, vagyis a ciklin D protoonkogén, potenciális onkogén.

Tumorszuppresszor gének

Már az onkogén kutatások kezdetén felmerült, hogy léteznie kell olyan biokémiai mechanizmusoknak, amelyek ellensúlyozzák a protoonkogének/onkogének sejtekre kifejtett hatását; pl. megfigyelték, hogy malignusan proliferáló és normál sejt fúziója után általában megszünt a kontroll nélküli proliferáció. Az első tumorgátló gén felfedezésére a retinoblasztóma tumoros kórkép tanulmányozása során került sor. A retinoblastoma tumornak örökletes és sporadikus formái ismertek; ezt csak annak feltételezésével lehetett magyarázni, hogy két genetikai esemény szükséges a kialakulásához, a gén mindkét alléljében kell valaminek történni. A retinoblastoma sejtekben megfigyelhető kromoszómaelváltozások tanulmányozásával (törések, deléciók) sikerült a genetikai eseményeket a 13. kromoszómához kapcsolni, majd a molekuláris biológia módszereivel a gént klónozni, és a retinoblasztóma fehérjét azonosítani. Kiderült, hogy retinoblastoma-sejtekben ez a fehérje vagy funkcionális formája mindig hiányzik a gén mindkét alléljének károsodása miatt, valamint, hogy az ép gén visszajuttatása a sejtekbe megállítja a malignus proliferációt. Több éves munkával sikerült tisztázni a retinoblasztóma fehérje funkcióját is; foszforilálatlan formája gátolja az S fázishoz szükséges fehérjék/enzimek génjeinek indukcióját (5-52. ábra). Ha a fehérje hiányzik, ezen gének indukciója szabályozatlanul állandóan bekövetkezik.

5-9. táblázat. Néhány tumorszuppresszor gén és termékei biokémiai funkciója

Név	Kromoszómális lokalizáció	A hiányzó fehérje biokémiai funkciója
Rb retinoblasztóma	13	sejtciklus restrikciós pont szabályozása
p53	17	a CDK inhibitor p21 indukciója, Gadd45 segítségével DNS hibajavítás, apoptózist indukál
NF-1 neurofibromatosis 1. típus	17	neurofibromin (ras GTPáz aktiválás)
NF-2 neurofibromatosis 2. típus	22	a sejtmembrán citoszkeletonhoz kapcsolása (schwannomin)
WT-1 transzkripciós Wilms tumor	11	négy Zn-ujjat tartalmazó gátló hatású faktor
DCC „deleted in colon cancer"	18	netrin-1 receptor a receptor szabaddá válása apoptózist vált ki
von Hippel–Lindau	3	a CKI p27 fehérje stabilizálása
P16 melanoma	9	a cdk4 inhibitora
PTCH basal sejtes karcinóma	9	transzkripció represszálása specifikus sejtekben (TGF-β család tagjainak génjét); a TGF-β több fajta sejt proliferációját befolyásolja
DPC4 deletált pancreas tumorokban, locus 4	18	TGF-β szignálútvonalon hat
BRCA1 emlőkarcinóma	17	DNS hibajavítás
BRCA2 emlőkarcinóma	13	DNS hibajavítás
PTEN deletált prostatarákban	10	PI3 foszfatáz

A retinoblastoma gén felfedezése után az 1990-es években újabb és újabb tumorszuppresszor gének felfedezésére került sor. Kiderült, hogy a proliferációs szignál útvonal negatív szabályozóit kódoló gének (beleértve a sejtciklus start szakaszát ellenőrzőket) potenciális antionkogének (tumorszuppresszor gén) abban az értelemben, hogy mindkét allél károsodása tumor kialakulásához vezethet. Az *5-9. táblázat* a 90-es évek végére megismert néhány antionkogént mutatja be. Megfigyelhető, hogy a gének/fehérjék neve a klinikai kórképhez kapcsolódik, vagyis legtöbbször a klinikum adta a kiindulópontot az adott tumorban hiányzó gén felfedezéséhez. A fehérje funkciójának megismerése általában ezután következett és sok esetben ma sem tisztázott egyértelműen.

Kiemelkedő jelentősége van a p53 fehérjének, amelynek hiányát a malignus tumorok közel 50%-ában megfigyelték. Ez mutatja, hogy mennyire fontos az a normál esetben fennálló kontrollmechanizmus, amely megakadályozza, hogy a károsodott DNS-t tartalmazó sejtek belépjenek az S fázisba, hogy bekövetkezzen a ki nem javított mutációkat tartalmazó DNS replikációja.

Amint azt e fejezet korábbi részében láttuk, a sejtproliferációs útvonal során jelentős szerepe van a fehérje foszforilációs folyamatoknak. Gyanítható volt, hogy léteznie kell olyan tumorgátló génnek, amely foszfatázt kódol. Csak a közelmúltban fedezték fel az első ilyen foszfatáz gént. Erről azonban kiderült, hogy nem fehérje foszfatáz. Olyan inozitol-P származék a szubsztrátja, amely az intracelluláris kalciumszint szabályozása révén biztosítja a proliferációs szignálútvonal hatékonyságát *(5-9. táblázat)*.

Nem kétséges, hogy a modern, molekuláris célpontú, hatékony tumorterápia az onkogén hatások biokémiai mechanizmusainak befolyásolásával (elsősorban gátlásával), illetve a kieső tumorgátló molekulák hatásának pótlásával (többek között majd génterápiával) lehetséges. Az onkogének és a tumorgátló gének közötti legfontosabb különbségeket az *5-10. táblázat* mutatja.

5-10. táblázat. Néhány jellegzetes különbség az onkogének és a tumorgátló gének között a malignus sejtproliferáció kialakulása szempontjából

Onkogének	Tumorszuppresszor gének
Mutáció a két allél egyikében elégséges a hatáshoz	Mutáció mindkét allélben vagy a mutációt az egyik allélben követi a másik által kódolt fehérje inaktiválódása
A fehérjetermék megnövekedett funkciója	Fehérjefunkció elvesztése
Mutáció szomatikus szövetekben keletkezik, nem öröklődik	A mutáció jelen lehet a germinális sejtekben (örökölhető) és/vagy a szomatikus sejtekben
Kismértékű szöveti preferencia	Sok esetben nagymértékű szöveti preferencia
A géntermék pozitív jelet továbbít	A géntermék negatív vagy differenciálódási jelet továbbít

A természetes sejthalál molekuláris háttere

A természetes sejthalál az élő szövetekben állandóan előforduló fiziológiás folyamat az olyan sejtek zökkenőmentes eltávolítására, amelyeknek nincs funkciója (pl. morfogenezis, duplikálódó struktúrák, szexuális dimorfizmus), amelyek fiziológiás körülmények között felesleges számban képződnek (pl. csontvelőben), amelyek nem megfelelően fejlődnek (pl. limfociták egy része), amelyek már teljesítették funkciójukat (pl. endometrium, szöveti „turnover"), vagy amelyek potenciálisan kárt okozó sejtek (pl. autoreaktív T sejtek, neutrofil granulociták).

A természetes sejthalál formái

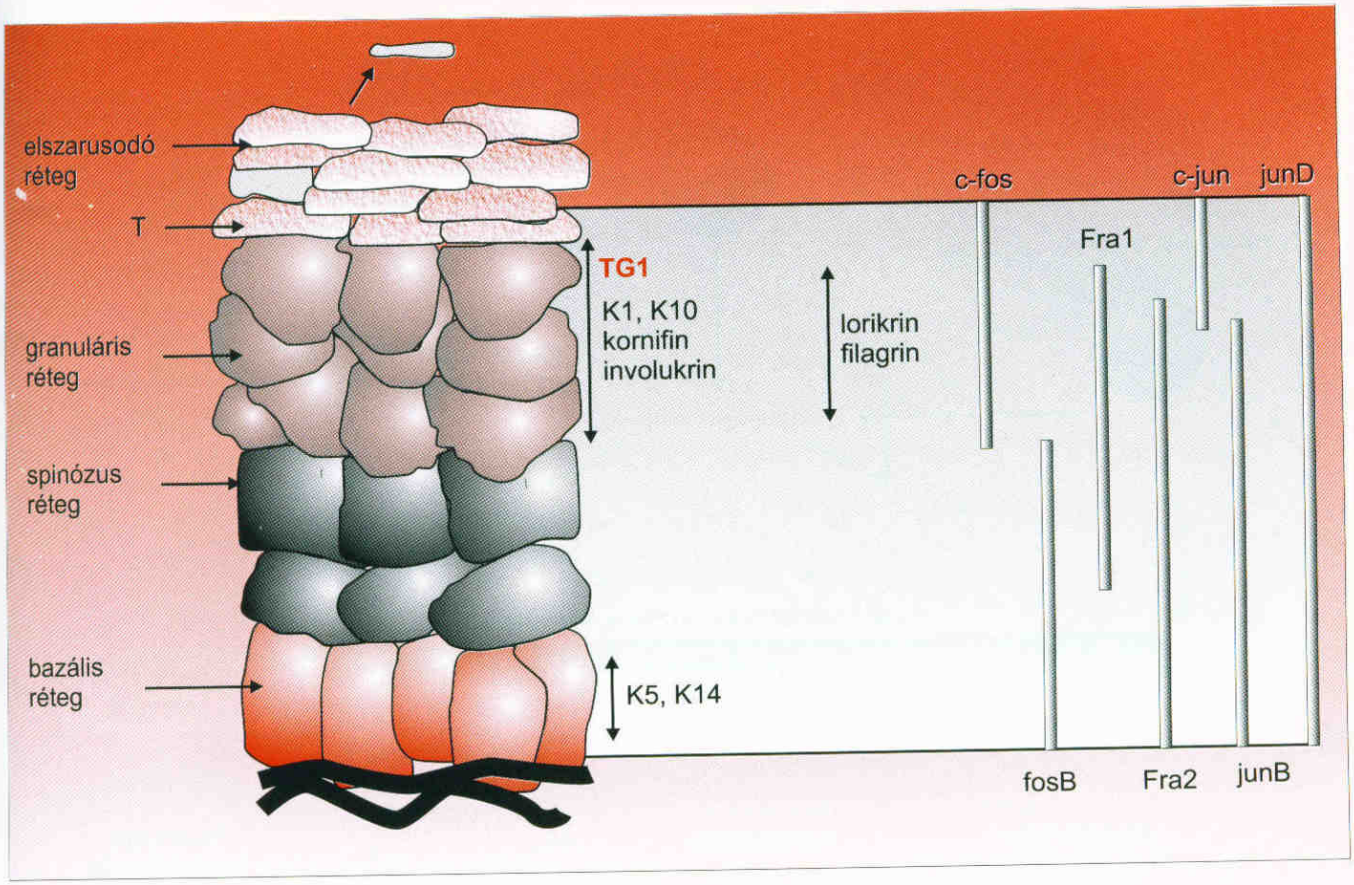
❶ *Programozott sejthalál.* Az embriogenezis során gyakori jelenség; funkcionális, fejlődéstani definíció olyan sejthalálra, amely időben és térben megjósolható, valamint aktív fehérjeszintézist és új gének expresszióját igényli.

❷ *Specializált sejthalál.* Szövetspecifikus terminális differenciálódás; a sejthalál programja egy adott ponton felfüggesztődik, a részleges sejthalál specifikus szöveti funkciót szolgál (pl. elszarusodás, kornifikáció). Aktív fehérjeszintézist, új gének expresszióját igényli.

A kornifikáció az élő keratinociták elhalása, miközben 1 hónapnyi idő alatt a stratum basaléból a stratum corneumba jutnak *(5-55. ábra)*. A stratum spinotosumban elveszítik szaporodási készségüket, a méretük növekszik, ellapulnak és vizet vesztenek. Specifikus keratinok (K1, K10) expresszálódnak és filamenteket alkotnak; ezek a filamentumok a stratum granulosumban filagrin segítségével tovább pakolódnak (makrofibrillumok). Más fehérjék, lipidek és szénhidrátok szintetizálódnak, a DNS, a sejtmag, a mitokondrium eliminálódik. Új organellumszerű struktúrák, lamelláris testek jelennek meg, stabil fehérjeburok képződik. Az utóbbi a széteső plazmamembrán alatt keletkezik specifikus szubsztrátfehérjék (lorikrin, involukrin, kornifin) glutaminjai és lizinjei között, kovalens keresztkötéseket létrehozó transzglutamináz (Tg1) segítségével. A korneocita nem más, mint keratinkötegekkel kitöltött keresztkötött fehérjeburok. A fehérjeburokra kívülről a lamelláris testekből származó ceramidok és zsírsavak kovalensen kötődnek.

❸ *Apoptózis.* Elsősorban morfológiai, az 1970-es évek elején született definíció: típusos esetben a sejtmag állománya kondenzálódik, majd fragmentálódik, a citoplazma zsugorodik, az elhaló sejt legtöbbször fragmentálódik, az organellumok többsége épen marad, az apoptótikus testek fagocitózissal gyorsan eliminálódik. A sejtekből nincs makromolekula kiáramlás, nem követi gyulladás és hegképződés. Nem fiziológiás ágensek is kiválthatják, nem mindig igényel aktív fehérje szintézist, új gének expresszióját.

A három sejthalálforma között a nyilvánvaló különbségek mellett sok a hasonlóság, a közös biokémiai elem. A következőkben a leggyakrabban megfigyelhető apoptózis molekuláris mechanizmusának részleteit tekintjük át, hangsúlyozva, hogy annak számos biokémiai eleme a másik két sejthalál formában is szerepet játszik.

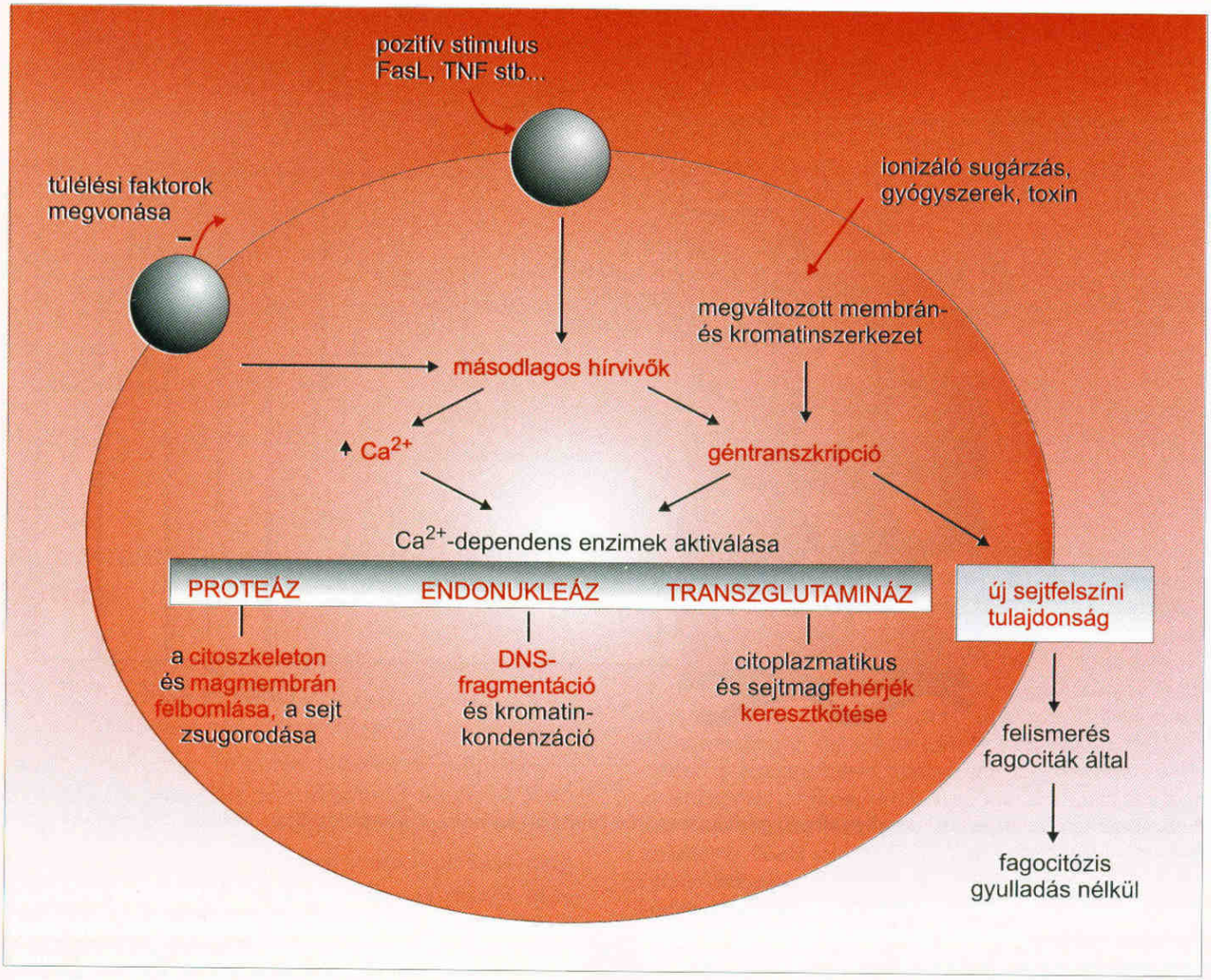


5-55. ábra. Az epidermisben megfigyelhető génexpressziós mintázat sémája. *T: tranzíciós réteg. Fra, jun, fos: transzkripciós faktorok*

A sejthalál (apoptózis) elindítása

Az apoptózist elindító, ún. apoptótikus faktorok, tényezők lehetnek sejtfelszíni receptorok ligandjai (pl. a tumornekrózis faktor – TNF, Fas ligand, antigén a T sejt negatív szelekciója esetén) vagy olyanok, amelyek magreceptorokon át hatnak (glukokortikoidok, retinsav, p53). Az apoptózis kiváltásának másik módja a túlélési faktorok hiánya, koncentrációjuk csökkenése. A túlélési faktorok is lehetnek sejtfelszíni receptorokon át hatók (pl. eritropoetin a normoblasztok esetében, antigén a pozitív szelekció során, IL1 a monociták számára, idegi növekedési faktor – NGF a fejlődő idegrendszerben, CSF a mieloid prekurzorok számára), vagy magreceptorokra hatók (pl. tesztoszteron a prostataepitheliumban), illetve sejt–sejt kölcsönhatáson alapulók (pl. idegrendszer fejlődése, sejtérés a tímuszban). Ismerünk nem fizológiás hatásokat (UV vagy röntgensugárzás, toxikus anyagok, hypoxia, gyógyszerek), amelyek szintén apoptózishoz vezetnek *(5-56. ábra)*.

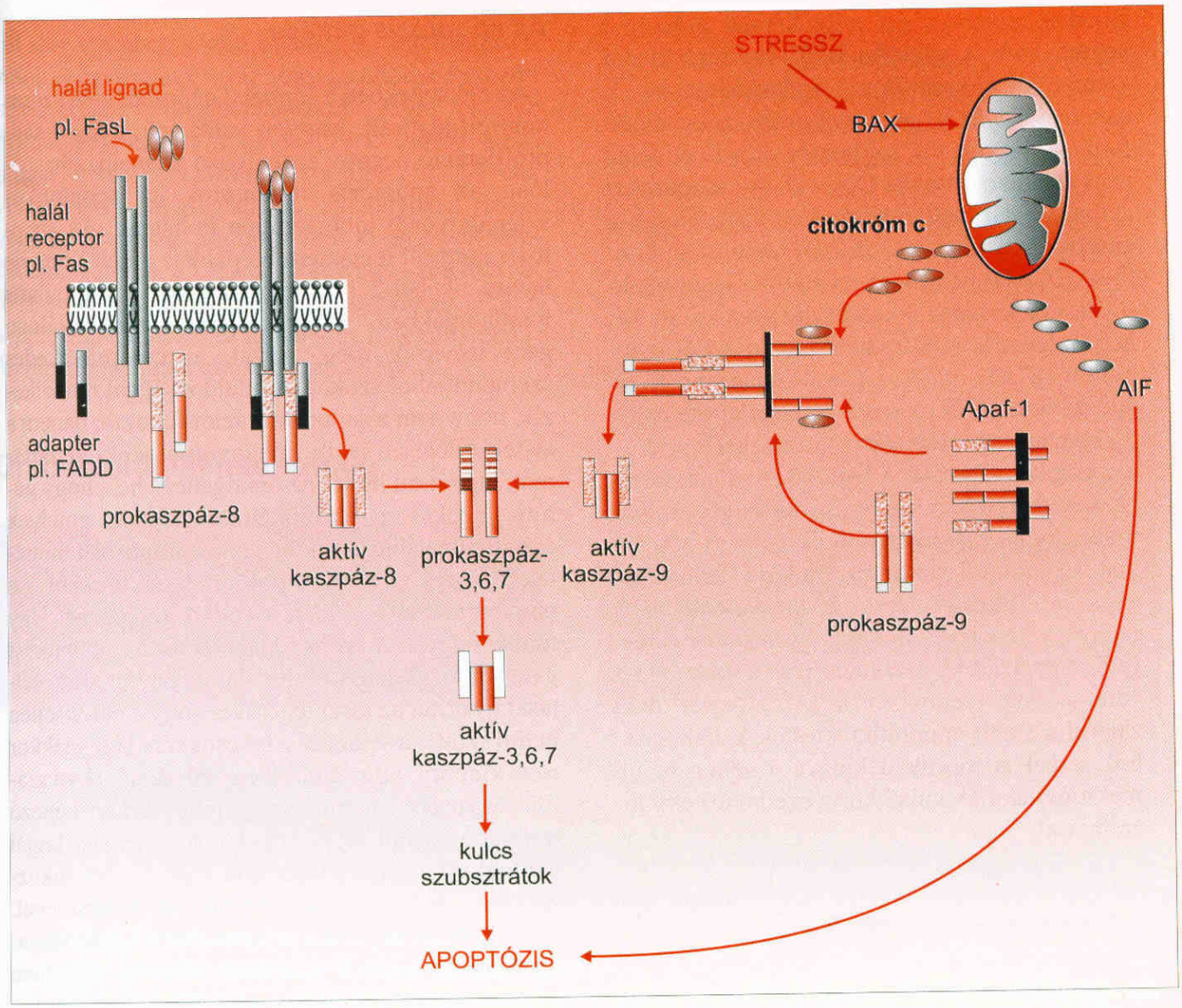
Többféle jelátviteli útvonal vezethet apoptózisra jellemző molekuláris mechanizmusok beindításához, akár egy adott sejt esetében is. Ezek közül a kaszpáz nevezetű proteázok részvételével zajló biokémiai folyamatok részletei a legismertebbek. A kaszpázok aktív centrumukban cisztein-hisztidin-diádot tartalmazó, aszpartát mellett hasító proteázok. Aktiválódásuk során (amely auto vagy transzkatalízissel történhet) a proformából kihasított kis és nagy alegységekből épül fel az aktív enzim, amely homo-heterodimer. A prokaszpáz aggregációt adapter molekulák kaszpáz prodoménekhez való kötődése indítja el, kialakítva a kaszpázok aktivációhoz szükséges „apoptoszóma" szerkezetet, amelyek két egymástól eltérő folyamat eredményeként alakulhatnak ki *(5-57. ábra)*. A Fas, TNF és az e családba tartozó más halálreceptorok ligandjaik bekötődése után adapter fe-



5-56. Az apoptózis domináns molekuláris eseményeinek egyszerűsített sémája (Nem minden proteáz és DNáz Ca^{2+}-függő, pl. kaszpázok, CAD)

hérjét (FADD, Fas associated death domain) és prokaszpázokat (a Fas receptor esetében prokaszpáz 8-at) kötnek, oligomerizálnak és a prokaszpáz autokatalízissel aktiválódik. Az aktív kaszpáz további kaszpázokat aktivál, elindítva egy aktivációs kaszkád folyamatot. A másik adapter molekula az Apaf1 (apoptosis activating factor-1), amely a prokaszpáz 9-et köti és egyben két Apaf1-prokaszpáz 9 dimerizálódik. Ez a komplex önmagában még nem aktív, ahhoz (és ezzel a kaszpáz aktivációs kaszkád elindításához) az Apaf1-hez dATP vagy ATP és citokróm c szükséges. A citokróm c a mitokondriumból kerül ki olyan apoptózist kiváltó stimulusok következtében, amelyek nem sejtfelszíni receptorokon keresztül, hanem a mitokondriumra hatnak, ott átmeneti permeábilitási pórusokat nyitva.

A mitokondriumból bizonyos sejthalál stimulusok hatására flavoprotein szabadul ki (AIF, apoptosis inducing factor), amely a sejtmagba jutva kaszpázok nélkül is elindítja az apoptózis molekuláris eseményeit. Ez is jelzi az apoptózis jelátviteli útvonalak sokféleségét; valószínűsíthető, hogy további mechanizmusokra derül majd fény, hiszen nem ismerjük pl. a túlélési faktorok megvonása vagy a p53 által kiváltott apoptózis kialakulásának molekuláris részleteit, illetve a sejtek sok esetben akkor is elhalnak, ha a kaszpázok gátoltak (kaszpáz-független apoptózis)



5-57. Az apoptózis sejtfelszíni jellel és mitokondriumból indítható kaszpáz kaszkádjai, illetve a mitokondrium eredetű, kaszpáz hatástól független sejthalál. Apaf 1; apoptosis activating factor-1; AIF; apoptosis inducing factor

Effektor mechanizmusok

Az apoptózis effektor mechanizmusai felelősek a sejt elhalását eredményező irreverzibilis történésekért, a morfológiai kép kialakulásáért. Az ezekben a biokémiai lépésekben részt vevő enzimek irreverzibilis reakciókat katalizálnak (5-56. ábra).

❶ *Proteázok.* A kétféle módon elinduló kaszpáz kaszkád végeredményeként az ölő kaszpáznak is elnevezett kaszpáz 3 aktiválódik; ennek gátlószerei sokféle módon kiváltott apoptózis esetében megakadályozzák a sejt elhalását. Igen nagy számú kaszpáz szubsztrátot írtak le (pl. citoszkeletális fehérjék, nukleáris lamina, sejtmag enzimek, apoptózist gátló fehérjék), de nem ismert, hogy ezek közül melyik (melyek) proteolitikus hasítása a sejthalál meghatározó, visszafordíthatatlan lépése. Bizonyos sejthalál rendszerekben a kaszpázok mellett jelentős szerepet tulajdonítanak a granzimeknek (a citotoxikus T sejtekből kiszabaduló szerin-proteázok, amelyek a célsejtekben elindítják az apoptózis folyamatát és kaszpázokat is aktiválnak), illetve a kalpainoknak is.

❷ *DNázok.* Bár a nukleoszómák közötti DNS-hasítás az apoptózis egyik legjellegzetesebb jele, a mai napig nem ismerjük pontosan azokat az en-

zimeket, amelyek ezt a biokémiai eseményt végrehajtják. A gyanúba került enzimek között szerepelnek specifikus endonukleázok, a pancreas DNáz I (amelynek nem szekretálódó formája nagyon sok sejtben és szövetben jelen van) és a lizoszomális DNáz II. A kaszpázokat aktiváló jelátviteli rendszerhez kapcsolódik a kaszpáz aktivált DNáz (CAD), amely inhibitorával (ICAD) heterodimert alkotva inaktív, aktiválását a kaszpáz 3 katalizálja azzal, hogy két helyen hasítja, és ezzel hatástalanná teszi az inhibitor ICAD-ot. Az is valószínű, hogy az apoptótikus DNS degradáció első lépése nagy, 50 kb nagyságú darabokra történő hasítás.

❸ *Transzglutaminázok.* A legtöbb apoptózissal elhaló sejtben a szöveti típusú transzglutamináz indukálódik, majd aktiválódik és nagy tömegben keresztköti az intracelluláris fehérjéket, azok specifikus glutamin és lizin oldalláncaik igénybevételével. Vannak olyan sejtek, amelyekben maga a keresztkötés lehet a sejthalál kiváltója. Más sejtekben a keresztkötés hozzájárul a stabil apoptótikus testek kialakulásához, ezzel is megakadályozva a sejten belüli makromolekulák külső környezetbe történő kiáramlását.

Az elhalt sejtek fagocitózisa

Az apoptózissal elhalt sejtek hatékony, gyors fagocitózisa majd teljes lizoszómális degradációja makrofágokban és nem fagocita sejtekben a sejthalál e formáját szinte észrevétlenné teszi az élő szervezet számára. Az elhaló sejtek felszínén foszfatidil-szerin molekulák jelennek meg, fehérje glikoziláció következik be. A bekebelező sejtek többfajta, kooperatív mechanizmus segítségével ismerik fel az elhaló sejteket; adhéziós molekulák, több receptor és dokkoló fehérjék vesznek részt a folyamatban. Molekulák aktív transzportja egy ABC transzporter segítségével bizonyítottan szerepet játszik. A sejtek bekebelezése együtt jár a citoszkeleton átrendeződésével adapter/szignálközvetítő molekulák segítségével. A bekebelezett sejt valamennyi biokémiai komponensét, makromolekuláját a lizoszómák enzimei alapösszetevőikre bontják.

Az apoptózis gátlása

Az élő sejtekben a sejthalál gépezete igen szoros kontroll alatt áll. Nagyon valószínű, hogy a sejtproliferáció negatív szabályozó elemeihez hasonlóan az apoptózis inhibitorok az apoptotikus szignálútvonal több szintjén is hatnak. Az apoptózis kontroll legismertebb példája a bcl-2 fehérje hatása. A bcl-2 gént először mint a follicularis lymphomákban leggyakrabban transzlokálódó gént ismerték meg. Azzal, a tumornövekedés szempontjából szokatlan tulajdonsággal rendelkezik, hogy nem a sejtproliferációt fokozza, hanem a sejtek túlélését segíti, megnyújtja azok élettartamát. Úgy járul hozzá az onkogenezishez, hogy gátolja azokat a sejtbiokémiai jeleket, amelyek apoptózist váltanak ki; egy sor sejttípusban mutatták ki, hogy növeli a sejtek túlélését, blokkolva a nagyon sokfajta módon kiváltott apoptózist. Úgy tűnik, hogy a bcl-2 a legáltalánosabb apoptózist gátló intracelluláris molekula; az apoptózis kiváltását gyakran az teszi lehetővé, hogy a bcl-2 sejten belüli szintje a sejthalál jelre csökken. Ugyanakkor az is kiderült, hogy a bcl-2 egy egyre növekvő számú, egymással homo- vagy heterodimert képező multigén család tagja, amelynek bizonyos tagjai gátolják (bcl-XL, bcl-w), más tagjai pedig fokozzák (bax, bak, bik, bad) az apoptózis készséget. Ezen molekulák pontos sejtbiokémiai hatásmechanizmusa az intenzív kutatások ellenére még nem teljesen ismert. Az eddigi adatok ismeretében valószínűsíthető, hogy míg a sejthalállal szemben védő fehérjék a sejthalál adapterekhez (pl. Apaf) kötődve gátolják azok kaszpáz aktiválóképességét, addig a pro-apoptózis családtagok ezt a kölcsönhatást megszüntetik. Alternatív mechanizmusként a bax úgy is elősegítheti a sejthalált, hogy közvetlenül sejtorganellum károsodást okoz (pl. mitokondrium károsítást és onnan citokróm c felszabadulást); ezeket a hatásokat a bcl-2 és a többi védő fehérje sejtorganellumokhoz kötődve, azok integritását védve ellensúlyozza. A növekedési faktorok által, vagy a sejt–extracelluláris matrix közti kapcsolatok által aktivált foszfatidilinozitol 3-kináz és protein kináz B szerepét a bcl-2 működés szabályozásában az 5.1. fejezet ismerteti (túlélési jel).

A bcl-2 sejthalálgátló fehérjéken túlmenően újabb és újabb apoptózis inhibitorok létezésére de-

rül fény – többek között olyanokra, amelyeket vírusok is használnak arra, hogy az általuk fertőzött sejtek elhalását megakadályozzák. Ezen fehérjék humán megfelelőire jó példa a FLIP (amely a Fas intracelluláris szakaszának és a prokaszpáz-8-nak véletlenszerű aggregációját akadályozza meg) vagy az apoptózis inhibitor IAP-k, amelyek közvetlenül gátolják a kaszpázokat, vagy azok aktiválódását. A sejthalál biokémiai folyamatait tehát a sejtproliferációhoz hasonlóan igen hatékony ellenőrző/gátló mechanizmusok szabályozzák.

Orvosbiológiai jelentőség

A természetes sejthalál folyamata alapvető fontosságú az élő szervezet működésében. Enélkül nem lehetséges embriogenezis, nem alakul ki az ideg- és az immunrendszer optimális funkciója, nem biztosítható a szövetekben a sejtpopulációk folyamatos megújulása. Molekuláris mechanizmusainak defektusa, a szükséges apoptózis elmaradása autoimmun kórképekhez, tumorokhoz vezethet. Bizonyított, hogy az apoptózist gátló fehérjék potenciális onkogének, az apoptózist kiváltó szignál útvonalak tagjai (beleértve a p53 transzkripciós faktort vagy a bax-ot) tumorgátló hatásúak. A nem megfelelő időben, helyen és mennyiségben jelentkező apoptózis funkcióvesztést, degenerációt eredményez, az ischaemiás szövetpusztulások progressziójának lényeges komponense az apoptózis típusú sejthalál. A neurodegeneratív Alzheimer-kór vagy a Parkinson-betegség egyaránt kapcsolatba hozható fokozott apopózissal. A megismert molekuláris elemek új, hatékony terápiás stratégiák célpontjai lehetnek egyre több betegségben.

Az egyes szervek és szervrendszerek működésének biokémiai alapjai

6.
FEJEZET

6.1. A kémiai idegingerület átvitel (neurotranszmisszió) molekuláris alapjai *(Ádám Veronika)*

Az akciós potenciál és a feszültségfüggő Na^+-csatorna
A kémiai ingerületátvitel jellemzői
Aminosav neurotranszmitterek
  Glutamát
    A glutamát neurotranszmisszió szerepe a fiziológiás és patológiás folyamatokban
  GABA és glicin
Acetilkolin
  Az acetilkolin szintézise, raktározása és felszabadulása a kolinerg neuronokban
  Kolinerg receptorok
  Az acetilkolin inaktiválása
Katecholamin neurotranszmitterek. Noradrenalin, dopamin és adrenalin
  A katecholaminok bioszintézise és raktározása
  A katecholaminok metabolizmusa és inaktiválása
  A noradrenalin és az adrenalin receptorai
  Dopaminreceptorok
Szerotonin
  Szerotoninreceptorok
Neuropeptidek
  Opioid peptidek

6.2. Kontraktilis rendszer *(Dux László)*

Az izomszövet kontraktilis rendszere
  A vastag filamentum rendszer, a miozin fehérje szerkezete
  A vékony filamentum rendszer
A kontrakció mechanizmusa
  Az érett harántcsíkolt izom felépítés. Szupramolekuláris struktúra
  A vázizom hossz–feszülés összefüggése, a csúszó filamentum (sliding filament) modell
A kalcium szignál keletkezése és eliminációja izomban
  A kalciumszignál és az izom szarkotubuláris rendszere
  A kalciumfelszabadulás mechanizmusa
  A kalciumvisszavétel mechanizmusa
Az izomkontrakció energiaszükségletének biztosítása
Az izomszövet alkalmazkodási reakciói
  Az izomfáradás, izomláz
  Az izom adaptációja, plaszticitása
Az izomszövet citoszkeletális vázrendszere

Egyes fontosabb izombetegségek biokémiai alapjai
Az izomszövet fontosabb anyagcsere-betegségei
A citoszkeleton, membrán–citoszkeleton rendszer betegségei izomban
Ioncsatorna-betegségek az izomszövetben

6.3. A kötőszövet és a hám struktúrfehérjéi *(Machovich Raymund)*
Kollagének
A kollagén bioszintézise és degradációja
Elasztin
Egyéb fehérjék
Keratinok
Fibronektin és laminin
Proteoglikánok

6.4. Lokális hormonok egyes szervek működését befolyásoló hatása. Az eikozanoidok *(Mandl József)*
Prosztanoidok
Az arachidonsav metabolizmusa. Arachidonsavellátás. Foszfolipáz A_2
A „ciklooxigenáz"-út. Prosztanoid- és tromboxánszintézis
A prosztanoid és a tromboxán katabolizmusa
Leukotriének
A lipoxigenáz-út. Leukotriének szintézise és lebontása
Eikozanoidok biológiai hatásai
Eikozanoidreceptorok. Eikozanoidok és szignál transzdukciós rendszerek

6.5. Hemosztázis *(Machovich Raymund)*
A véralvadék képződése és feloldódása
A véralvadás molekuláris és celluláris mechanizmusai
A fibrinogén és a fibrin
A trombin szabályozása
A protrombin aktiválása
Az aktivált X-faktor keletkezése
A véralvadás beindítása és a véralvadási kaszkád
A trombinképződés szabályozása; a protein C
A véralvadás inhibitorrendszere
A szöveti faktor reakcióút inhibitora
A vérlemezkék (trombociták)
A fibrinolízis
A fibrin feloldódása
A plazmin keletkezése
A plazminogén konformációváltozásai
A plazminogénaktivátorok
A plazminogénaktivátorok inhibitorrendszere
A plazmin inhibitorrendszere
A fibrinolízis szabályozása
A máj szerepe a hemosztázisban
Az endothelium szerepe a hemosztázisban

6.6. Mitokondriális betegségek *(Sümeghy Balázs)*

A mitokondriális genom károsodása
A mitokondriális genom mutációi és az ehhez kapcsolódó betegségek
A mitokondrium oxidatív károsodása, öregedés
Terápiás lehetőségek

6.7. A klinikai laboratóriumi diagnosztika biokémiai háttere *(Dux László)*

A klinikai laboratóriumi diagnosztika célja, feladata
A laboratóriumi diagnosztika, mint az élő szervezetek áramlási egyensúlyának nyomon követése
Normál-, referenciatartomány fogalma meghatározása
Kóros laboratóriumi eredmények típusai
Laboratóriumi diagnosztikai eredmények hibái, értékelése
Az eredmények valódisága, pontossága, véletlen és szisztémás hibák
Laboratóriumi diagnosztikai mérések kalibrálása, standardok típusai
Külső minőségellenőrzés a laboratóriumi diagnosztikában
A laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok fő fázisai
A preanalitikai fázis
Az analitikai fázis
A posztanalitikai fázis
Szűrővizsgálatok

A kémiai idegingerület átvitel (neurotranszmisszió) molekuláris alapjai

6.1.

Ádám Veronika

Az idegrendszer alapvető jellegzetessége, hogy működése során elektromos jelek képzése és vezetése történik. Egyetlen neuronon belül az információt elektromos jelek továbbítják, amelyek egy másik neuronra vagy a beidegzett sejtre kémiai anyagok, neurotranszmitterek segítségével kerülnek át. A neuron tehát azzal a képességgel is rendelkezik, hogy az elektromos jeleket kémiai jellé, majd azt ismét elektromos jellé alakítja át. Jelen fejezetben vázlatosan e két sajátosság molekuláris alapjait tekintjük át.

Az akciós potenciál és a feszültségfüggő Na^+-csatorna

Minden sejt, így a neuron működésének is egyik meghatározó feltétele, hogy intracellulárisan, a sejt citoplazmájában az ionok koncentrációja eltérő legyen – esetleg több nagyságrenddel is – az extracelluláris ionkoncentrációktól. A K^+ a sejten belül koncentrálódik, a Na^+, Cl^- és a Ca^{2+} koncentrációja viszont alacsonyabb, mint az extracelluláris térben. Az egyenlőtlen ioneloszlás elektromos potenciál különbséget eredményez a plazmamembrán mentén, amely nyugalmi állapotban a neuronokban –60 és –80 mV közötti érték (belül negatív). A nyugalmi potenciált, amelyhez permeabilitásukkal arányosan a K^+, a Na^+ és a Cl^- járul hozzá, a Goldman–Hodgkin–Katz-egyenlet írja le:

$$V_m = 2{,}3 \cdot \frac{RT}{F} \cdot \lg \left(\frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e} \right)$$

ahol R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, F a Faraday-állandó, P a permeabilitási együttható, [ ] az ionok extracelluláris (e) és intracelluláris (i) koncentrációi.

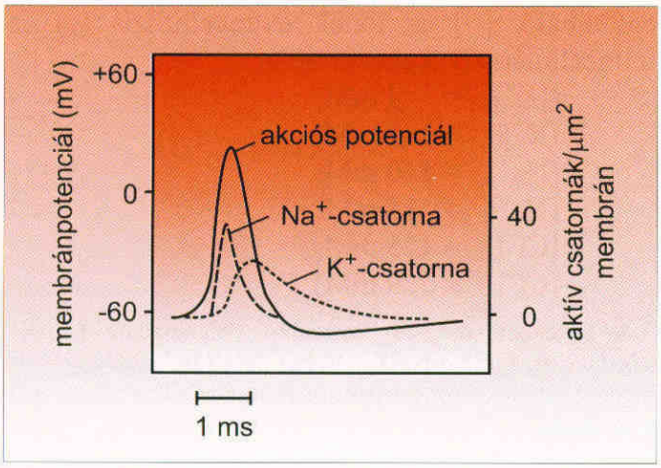
($[K^+]_e$ = 4 mM;
$[K^+]_i$ = 145 mM;
$[Na^+]_e$ = 140 mM;
$[Na^+]_i$ = 15 mM;
$[Cl^-]_e$ = 125 mM;
$[Cl^-]_i$ = 9 mM)

A sejtekben mérhető nyugalmi potenciálhoz néhány mV-tal hozzájárul a Na^+K^+-ATPáz $3Na^+/2K^+$ sztöichiometriájából adódó extra pozitív töltés kipumpálása (lásd még 432. oldal).

Mivel nyugalomban a plazmamembrán K^+ iránti permeabilitása nagyobb, a nyugalmi potenciál nagyon közel van a K^+ egyensúlyi potenciálhoz, azaz a K^+ elektrokémiai gradiense közel 0. Ezzel szemben jelentős Na^+ elektrokémiai grádiens van a plazmamembrán mentén, ami szabad Na^+-áramlás esetén +60 mV-ra vinné el a membránpotenciált (a Na^+ egyensúlyi potenciálja +60 mV).

Külön említést érdemel a Cl^-, amelynek nyugalmi eloszlása közel van az elektrokémiai egyensúlyhoz, nem lévén olyan Cl^--pumpa a membránban, ami grádienst tartana fenn. A gátló neurotranszmitter glicin és GABA receptorai (GABA-A) Cl^--ioncsatornák, aktiválásuk a Cl^- szabad áramlását teszi lehetővé, ami megakadályozza, hogy a Na^+-permeabilitás-növekedés ellenére depolarizáció jöjjön létre. A GABA és a glicin gátló hatásának ez a mechanizmusa.

A neuron elemi működése az ingerület vezetése az **akciós potenciál** segítségével, amelynek során a nyugalmi potenciál hirtelen, nagymértékben és átmenetileg csökken. Kialakulását és terjedését az teszi lehetővé, hogy a plazmamembránban feszültségfüggő Na^+- és K^+-csatornák vannak. A Na^+-csatornák már kismértékű depolarizáció hatására aktiválódnak, 1–2 ms időtartamig Na^+-beáramlást engednek meg az elektrokémiai grádiens irányában, aminek következtében a membránpotenciál lecsökken és megközelíti a pozitív Na^+ egyensúlyi potenciált. 1–2 ms után a Na^+-csatornák spontán inaktiválódnak, megszűnik a Na^+-beáramlás. A nyugalmi potenciált a K^+-kiáramlás állítja vissza, amely a késve aktiválódó feszültségfüggő K^+-csatornákon keresztül jön létre. Az akciós potenciál jellegzetes görbéje tehát két ion áramlásából adódik *(6-1. ábra)*, s létrejöttét feszültségfüggő ioncsatornák jelenléte és működése teszi lehetővé.



6-1. ábra. Az akciós potenciál görbéje (bal oldali skála) és a Na^+-, illetve K^+-csatornák aktiválása (jobb oldali skála)

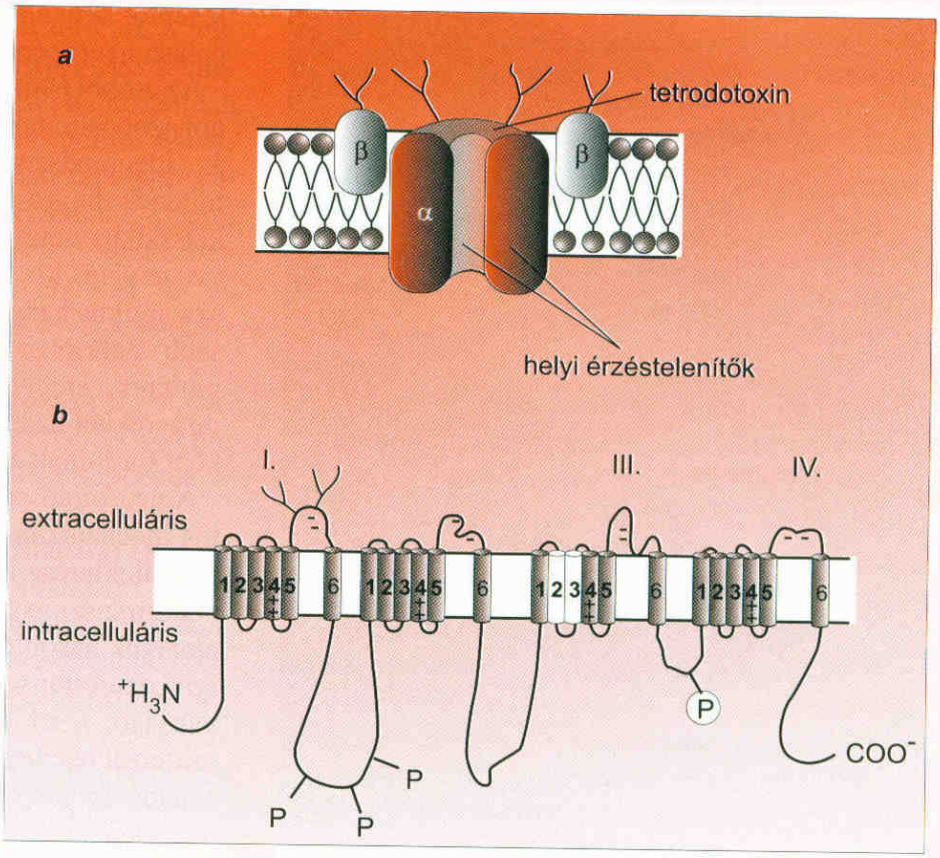
A feszültségfüggő csatornák közül legjobban a **Na^+-csatorna** ismert, amelynek szerkezete alapvetően jellemző a többi csatornára is. A csatornát emlős agyban egy 260 kDa molekulatömegű glikoprotein alkotja (α-alegység), amelyhez két kisebb alegység (β_1, β_2) kapcsolódik, amelyek úgyszintén glikoproteinek és a csatorna megfelelő orientációját biztosítják a plazmamembránban *(6-2. ábra)*. Az α-alegység négy azonos doménből áll, amelyek mindegyike hat transzmembránszegmentet tartalmaz. Ezek a membránban úgy helyezkednek el, hogy – elsősorban az S_4-szegmenttel – egy csatornát alkotnak. A feszültség érzékelését az S_4-szakaszban elhelyezkedő pozitív töltésű aminosavoldalláncok teszik lehetővé, amelyek a nyugalmi membránpotenciálnál a szomszédos transzmembránszegmentekben található negatív töltésű oldalláncokkal kölcsönhatásba lépve rögzítik a fehérje szerkezetét, s ilyenkor a csatorna nem átjárható. Kismértékű töltéseloszlás-változás (depolarizáció) a pozitív töltésű oldalláncok elmozdulását teszi lehetővé, s ez olyan konformációváltozást jelent, amelyben a csatorna átjárhatóvá válik (0,3–0,5 nm átmérő). A permeabilitáshoz hozzájárulnak az S_5–S_6 szakaszokat összekötő szegmentek, amelyekben sok a glutamát és az aszpartát. A csatornán való áthaladás esetén a Na^+ részlegesen elveszti a hidrátburkát. A csatorna Na^+ iránti szelektivitása nem kizárólagos, egyéb ionok (pl. Li^+) számára is átjárható.

A csatorna megismerésében fontos szerepet játszottak toxinok, amelyek az állat- és növényvilágban, valamint az emlős szervezetekben a Na^+-csatornához szelektíven kötődve s azt gátolva méregként működnek. Legismertebb közülük a tetrodotoxin és a saxitoxin (halakban található toxinok), amelyeket kísérleti körülmények között a csatornák jelölésére használtak, s ez a tisztítás során lehetővé tette a csatornát alkotó fehérje nyomonkövetését. Jelzett toxinok segítségével tudták meghatározni az egyes szövetekben a Na^+-csatornák sűrűségét is.

A Na^+-csatornát intracellulárisan a cAMP-függő protein-kináz foszforilálja, ami feltehetően az inaktiválást segíti elő. A csatornát foszforilálja a protein-kináz C is.

A feszültségfüggő Na^+-csatornákat gátolják a klinikumban használatos helyi érzéstelenítők (lidokain, prokain), amelyek lipidoldékony molekulák, és a csatorna intramembrán hidrofób részéhez kötődnek. Klinikai hatásukat – az axonális vezetés átmeneti felfüggesztését – tökéletesen megmagyarázza a Na^+-csatornák gátlása.

Az axonmembránban jelen lévő Na^+-csatornák az axon hillockban keletkező akciós potenciál tovavezetését teszik lehetővé. Ennek megfelelően a Ranvier-befűződések területén a Na^+-csatornák sű-



6-2. ábra. A feszültségfüggő Na^+-csatorna modellje (a) és az α-alegység transzmembránszakaszai (b).
P, a cAMP-függő protein kináz, ill. Ⓟ, a protein-kináz C által történő foszforiláció helyei. +, az S_4 szegmentben található lizin és arginin; –, az S_5–S_6 szakaszon levő glutamát és aszpartát aminosav oldalláncokat jelzi

rűsége tízszerese annak, mint ami a Ranvier-befűződések közötti axonszakaszon található. A Na^+-csatornák itt egységesek és funkciójuk az, hogy a rövid ideig tartó akciós potenciálokat továbbítsák. Ezzel szemben a különböző izmokban és szekréciós sejtekben többféle csatorna található, amelyek inkább a kontrakciók, illetve a szekréciós válaszok intenzitásának és időtartamának szabályozásában játszanak szerepet, ezért változatosabbak és általában hosszabban tartó depolarizációt tesznek lehetővé.

A feszültségfüggő K^+-csatornákról molekuláris szinten lényegesen kevesebbet tudunk, mint a Na^+-csatornákról. Elektrofiziológiai paraméterek, endogén regulátorok (pl. a citoplazmában jelen lévő Ca^{2+} vagy ATP) és farmakológiai érzékenység alapján számos K^+-csatorna különíthető el, de molekuláris biológiai módszerrel ezidáig csak két csatornát azonosítottak. Ezek szerkezete hasonló, de nem azonos a Na^+-csatornával. A K^+-csatornát hat transzmembránszakasszal rendelkező fehérjék alkotják, valószínű tetramer struktúrában (az összesen 24 transzmembránszakaszt, tehát nem egy nagy polipeptid tartalmazza, mint a Na^+-csatornánál). Immuncitokémiai módszerrel az egyik fajta K^+-csatornát inkább preszinaptikusan, a másikat inkább a dentriteken azonosították.

A kémiai ingerületátvitel jellemzői

A neurotranszmisszió – azaz az ingerület terjedése egyik neuronról a másikra vagy egy neuronról a beidegzett sejtre – kémiai anyagok, a **neurotranszmitterek** segítségével történik. Definíció szerint a neurotranszmitterek olyan anyagok, amelyek az idegsejtben termelődnek, az axonterminálisból depolarizáció hatására szabadulnak fel és receptoraikon hatva a posztszinaptikus sejt aktiválását, illetve gátlását okozzák. A neurotranszmisszió a legtöbb esetben morfológiailag és funkcionálisan egyaránt jól definiálható helyen, az ún. szinapszisban történik. A szinapszisban az „üzenetet" küldő neuron axonterminálisa alkotja a preszinaptikus terminálist, amit a szinaptikus rés választ el a posztszinaptikus neuron (vagy beidegzett sejt) membránjától. A preszinaptikus neuronból az akciós potenciál hatására felszabaduló neurotranszmitter a szinaptikus résen átdiffundálva éri el receptorát a posztszinaptikus membránban. A neurotranszmisszió általában nagyon gyors és rövid ideig tartó folyamat (0,5–3,5 ms a preszinaptikus akciós potenciáltól a posztszinaptikus

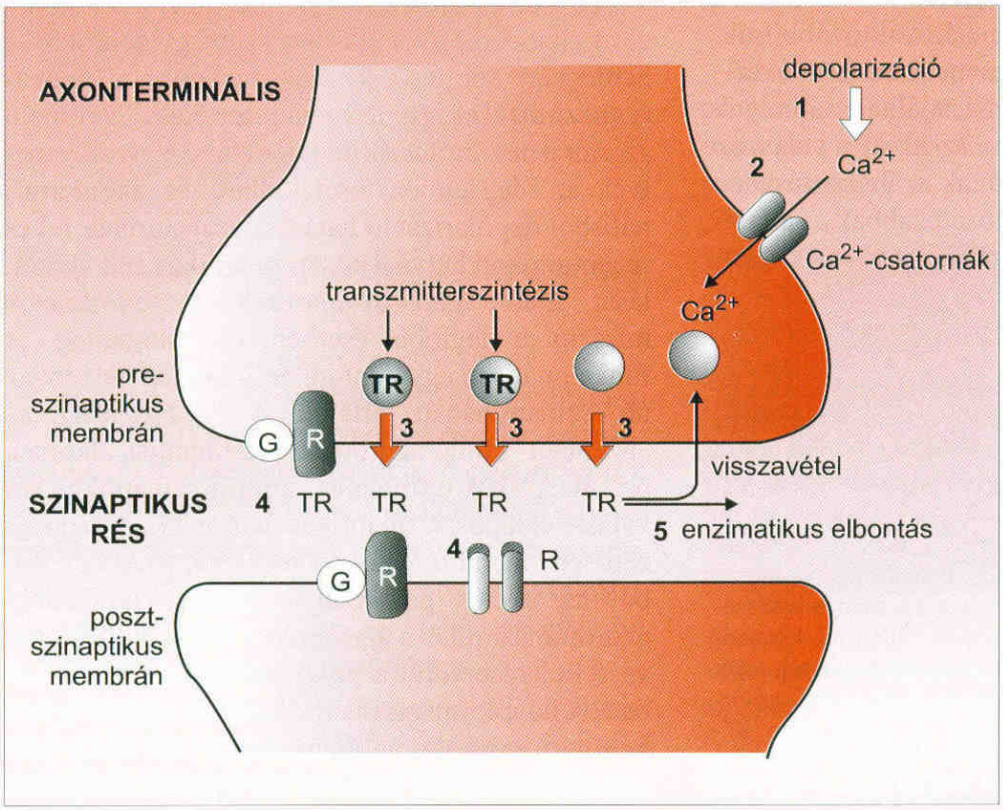
6-1. táblázat. A legfontosabb neurotranszmitterek

Klasszikus neurotranszmitterek:
acetilkolin
noradrenalin
dopamin
szerotonin
adrenalin
hisztamin
adenozin
ATP
Aminosavak:
glutamát
γ-aminovajsav (GABA)
glicin
Peptidek:
Met-encefalin
P-anyag
kolecisztokinin
szomatosztatin
vazoaktív intestinalis peptid (VIP)
vazopresszin
Gáz-halmazállapotú:
NO

receptor aktiválásig), kivételt a lényegesen lassúbb hatású neuropeptidek jelentenek.

Az utóbbi évtizedekben nagyszámú kémiai anyagot azonosítottak, amelyek a központi és a perifériás idegrendszerben neurotranszmitter funkciót töltenek be *(6-1. táblázat)*. Ezek közül az ún. klasszikus neurotranszmitterek és az aminosavak viszonylag kis molekulák, és általában gyors szinaptikus hatásokért felelősek. Lassúbb és tartósabb hatásokat hoznak létre a peptid transzmitterek, amelyek gyakran a klasszikus transzmitterekkel azonos terminálisban, kotranszmitterként fordulnak elő.

A neurotranszmitterek nagy száma és a változatos mechanizmusok miatt a szinaptikus működések áttekintése nem egyszerű. Vannak azonban a neurotranszmisszionak olyan jellegzetességei, amelyek hasonlóak tekintet nélkül arra, hogy melyik neurotranszmitterről és milyen szinapszisról van szó. Mielőtt néhány fontosabb neurotranszmitterről részletesen szólnánk, azokat az általános sajátosságokat tekintjük át, amelyek a szinapszisban mennek végbe. Ezek vázlata a *6-3. ábrán* látható.

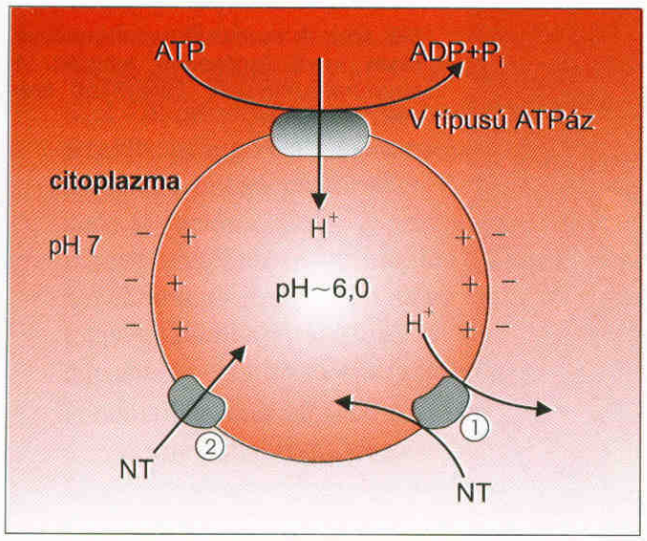


6-3. ábra. A neurotranszmisszió egyes elemei a szinapszisban. A depolarizáció (1) hatására megnyílnak a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák (2), a Ca^{2+}-beáramlás kiváltja a végkészülékben szintetizálódott és a vezikulákban raktározott transzmitter (TR) felszabadulását (3), a TR kötődik a posztszinaptikus membránban található receptorokhoz (4), amelyek vagy ioncsatornák, vagy G-fehérjéhez kapcsolódó receptorok (preszinaptikusan is találhatók), végezetül a transzmitter inaktiválódik (5) (vagy enzimatikusan elbomlik, vagy a preszinaptikus membránon keresztül visszakerül a végkészülékbe)

❶ A preszinaptikus terminálisban történik a legtöbb neurotranszmitter **szintézise**. A bioszintézishez szükséges enzimek jórészt a citoszolban találhatók, de egy-egy neurotranszmitter szintézisében valamely partikulumban található enzim is részt vesz. Ez alól kivételt a peptid transzmitterek jelentik, amelyek a sejttestben szintetizálódnak, vezikulákba épülnek be és axonális transzporttal jutnak el a végkészülékhez.

❷ A neurotranszmitterek **raktározása** a szinaptikus vezikulákban történik, amelyek 20–60 nm átmérőjűek és az axon terminális citoplazmájában helyezkednek el.

A vezikulák membránjában V típusú ATPáz található, amely protontranszlokáló enzim, és pH grádienst hoz létre a vezikulamembrán mentén, az intravezikuláris közeg relatív savanyodását okozva. A létrejövő proton elektrokémiai potenciál (belül pozitív) neurotranszmitterek felvételét teszi lehetővé. Az egyes neurotranszmitterekre specifikus transzporterek vagy a pH-grádiens (pl. acetilkolin, katecholaminok) vagy a membránpotenciál-komponens (pl. glutamát) vagy mindkettő (pl. GABA) terhére transzportálják a citoplazmában szintetizálódott transzmittereket a vezikulába *(6-4. ábra)*.



6-4. ábra. V típusú ATPáz a szinaptikus vezikulák membránjában. A neurotranszmitter transzportja vagy a pH-grádiens (1), vagy az elektrokémiai potenciálkülönbség (2), vagy mindkettő (nem jelezzük) terhére történik. *NT, neurotranszmitter*

❸ A preszinaptikus neuron depolarizációja a vezikulák és a plazmamembrán fúzióját váltják ki és megtörténik a **neurotranszmitterek felszabadulása**. E téren is lényeges a különbség a klasszikus neurotranszmittereket tartalmazó kis méretű, elektronmikroszkóp alatt áttetszőnek látszó vezikulák (a továbbiakban csak kis vezikulák) és a peptideket tartalmazó nagy, a középen sűrűbbnek imponáló (dense core) vezikulák között.

A kis vezikulák a citoplazmában nem random módon helyezkednek el, hanem az axon terminális szinaptikus rés felőli membránja közelében, az ún. aktív zónában találhatók, ahol a plazmamembránban nagy a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák sűrűsége. Innen történik a depolarizációt kísérő Ca^{2+}-belépés közvetlen hatására a vezikulák kiürülése a szinaptikus résbe. Maga a fúzió olyan rövid ideig tartó folyamat, hogy nem jöhet létre a vezikulák és a plazmamembrán teljes egybeolvadása, hanem a vezikulák újra azonnal visszafűződnek, megőrizve integritásukat.

A plazmamembrán és a vezikulamembrán lipid- és különösen fehérje-összetétele teljesen eltérő (pl. a Na^+K^+-ATPáz, amely esszenciális fehérje a plazmamembránban, nincs jelen a vezikulákban, de a V típusú ATPáz, amely fontos fehérje a vezikulamembránban, nincs a plazmamembránban). Ha a szinaptikus vezikulák egyszerűen endocitózissal fűződnének le a plazmamembránból a két membrán összetételének többékevésbé azonosnak kellene lenni.

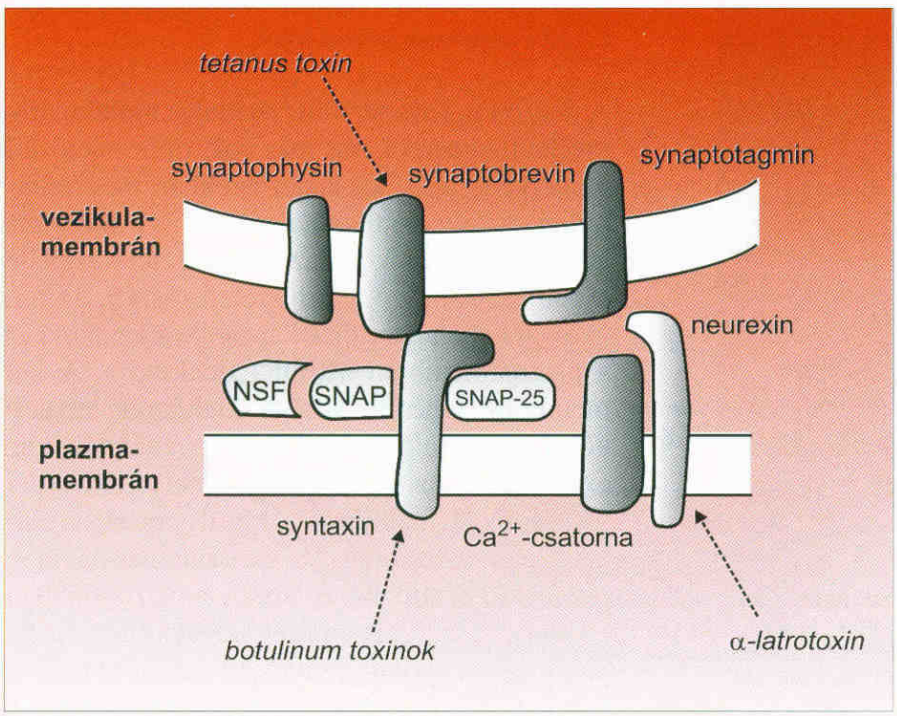
A neurotranszmitter-felszabadulás molekuláris mechanizmusáról ma már sok információ áll rendelkezésre, sok részlet azonban még feltáratlan. A folyamatban a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák a plazmamembrán közelébe kerülnek, annak egy kitüntetett részén, az ún, aktív zónában létrejön a kapcsolat a vezikula és a plazmamembrán között („docking"). A két membrán fehérjéi között kialakuló kezdeti kötés, amely alkalmassá teszi a vezikulákat az exocitózisra az ún. priming, amely feltétele a membránok fúziójának. Az ily módon előkészített membránok Ca^{2+} hatására fúzionálnak (exocitózis), amelynek során a vezikulákban található neurotranszmitter a szinaptikus résbe kerül. A vezikulák ezután lefűződnek a plazmamembránról (endocitózis) és endoszómák-

kal fuzionálnak, ahonnan újra lefűződve ismét szinaptikus vezikulák keletkeznek. A proton elektrokémiai grádiens terhére történő neurotranszmitter-felvétel után a vezikulák visszakerülnek az aktív zónába (transzlokáció) és alkalmassá válnak az exocitózisra. Az egész folyamat körülbelül 1 perc alatt lezajlik, amiből az exocitózis maga kevesebb mint 1 ms-ot vesz igénybe. A szinaptikus vezikuláknak ez a ciklusa sok szempontból hasonló más vezikuláris transzporthoz, azonban egyedülálló a szigorú reguláció és a rendkívül gyors lefolyás szempontjából.

A vezikula membránjában és a plazmamembránban számos olyan fehérje található, amelyek részt vesznek az exocitózis előkészítésében, iniciálásában és az azt követő folyamatokban. Ezek közül a teljesség igénye nélkül csak a fontosabbakat és azokat említjük, amelyek funkcióját ismerjük. Elnevezésük, amely nem követ semmilyen törvényszerűséget egy sajátos nómenklatúrát mutat, és sok esetben az adott fehérje oldékonysági vagy kötési viszonyaira utaló rövidítéseket takar *(6-2. táblázat)*. Az egész folyamatot is csak vázlatosan ismertetjük *(6-5. ábra)*. A vezikula és a plazmamembrán közötti az exocitózishoz elengedhetetlen kap-

6-2. táblázat. Néhány, a neurotranszmitterek felszabadulásában szerepet játszó fehérje

Szinaptikus vezikulák membránjában	
rab-fehérjék	Ras-hoz hasonló GTPáz aktivitással rendelkező fehérjék
synaptobrevin	V-SNARE; vezikuláris SNAP-receptor
synaptophysin	több fehérjét jelöl, amelyek pórus alkotására képesek, kötik a synaptobrevint
synaptotagmin	Ca^{2+}-ot és foszfolipideket köt
Plazmamembránban	
SNAP-25	(szolubilis NSF-attachment faktor)
NSF	(N-ethylmaleimid sensitive factor) ATPáz aktivitással rendelkezik
syntaxin	Kötni tudja a SNAP-25-öt, synaptotagmint, synaptobrevint, N típusú Ca^{2+}-csatornákat és a SNAP fehérjéket
neurexin	α-latrotoxin receptora
feszültség-függő Ca^{2+}-csatornák	



6-5. ábra. A vezikulák exocitózisában részt vevő fontosabb fehérjék. *A neurotranszmissziót befolyásoló toxinok hatáshelyei*

csolat (synaptic core complex) kialakításában három fehérje vesz részt; a plazmamembránban található **syntaxin** és **SNAP-25** (amelyek a t-SNARE-t alkotják; t = target) és a vezikula membránjában elhelyezkedő **synaptobrevin** vagy **v-SNARE** (v = vezikuláris). A v-SNARE és t-SNARE fehérjék a citoplazmatikus részen található α-helixeken keresztül kapcsolódnak össze hidrofób és ionos kölcsönhatások révén. Ez a komplex nem jön létre az aktív zónától távol eső membránrészen, ahol a syntaxin a plazmamembránban nem a SNAP-25-hez, hanem egyéb fehérjékhez, a vezikulamembránban pedig a synaptobrevin a synaptophysinhez kötődik, megakadályozva a core komplex létrejöttét. A három fehérje által alkotott komplex (synaptobrevin–syntaxin–SNAP-25) receptorként szolgál a SNAP és az NSF számára (innen ered a SNARE elnevezés). Több fehérje tartozik a SNAP családba (α, β, γ), de az elnevezés ellenére, a SNAP-25 nem. Az **NSF** ATPáz aktivitással rendelkező fehérje, amelynek meghatározó szerepe van a membránfúzióval járó folyamatokban. ATP hidrolízis közben az NSF hatására a komplex szétesik, de eközben valószínűleg megtörténik a két membrán részleges fúziója. A komplex keletkezése és szétesése alkotja az ún. priming folyamatát, ami után a Ca^{2+} hatására megtörténhet a két membrán teljes fúziója

A szinaptikus vezikulák és a plazmamembrán összekapcsolódása az aktív zónában jön létre, ahol különösen nagy a plazmamembránban a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák sűrűsége (elsősorban N típusú csatornák). A Ca^{2+}-csatornákon át belépő Ca^{2+} a membrán közvetlen környe- zetében (mikrodomén) jelentős Ca^{2+}-koncentráció-emelkedést okoz, ami az exocitózis közvetlen kiváltója. A Ca^{2+}-koncentráció a Ca^{2+}-csatornák intracelluláris oldalánál átmenetileg akár 10–100 μM is lehet, ahonnan a csatornák inaktiválódása után a Ca^{2+} eldiffundál az axon terminális távolabbi részébe. A Ca^{2+} érzékelője valószínűleg a **synaptotagmin**, amely a vezikulák membránjában található Ca^{2+}-kötő fehérje és Ca^{2+} hatására foszfolipidekhez, illetve a syntaxinhoz kapcsolódik. Maga a fúzió valószínűleg egy nagyon komplex folyamat, amelyben szerepe van a synaptotagmin–syntaxin kölcsönhatásnak, a foszfolipidekhez való kapcsolódásnak (ami a membránokat átstrukturálhatja) és egyéb fehérjékkel, így például a plazmamembránban elhelyezkedő neurexinnel létrejövő kölcsönhatásnak.

Meg kell említeni, hogy a rab fehérje család számos tagjának fontos szerepe van abban, hogy vezikulák álljanak a transzmitter-felszabadulás rendelkezésére. Ezek viszonylag kis molekulatömegű GTP-kötő és hidrolizáló fehérjék, amelyek GTP-kötött formában a vezikulák membránjához kapcsolódnak A membránfúzióban közvetlenül nem vesznek részt, de hiányukban a szinaptikus transzmisszió csökken.

Szintén nem a membránfúziót befolyásolják, de a neurotranszmisszióban mégis fontos szerepet játszanak a **szinapszinok**, azok a vezikulamembránban helyet foglaló fehérjék, amelyeknek több tagját ismerjük, s amelyek foszforilációval regulálódnak. A szinapszinokat foszforilálja a cAMP-függő protein-kináz és a Ca^{2+}–kalmodulin függő protein-kináz I, és csak a szinapszin I-et a CaMK II is. A szinapszin I citoszkeletális fehérjékhez, így aktinhoz is kapcsolódik, aminek következtében a vezikulákat rögzíti az idegvégződésen belül. Amikor ismételt stimulációk következtében a Ca^{2+}-koncentráció a végkészülékben megemelkedik; a CaMK II aktiválódik és foszforilálja a szinapszin I-et. Ennek következtében megszűnik az aktinhoz történő kötődés, ezáltal a vezikulák kirögzítettsége, és így a vezikulák az aktív zóna közelébe kerülhetnek. A szinapszin I-nek tehát az a szerepe, hogy segítségével a tartós stimuláció során a végkészülékben vezikulák álljanak a neurotranszmitter-felszabadulás rendelkezésére. Ennek jelentőséget tulajdonítanak a memória rögzülése szempontjából.

Az exocitózis egyes komponenseivel történő kölcsönhatás miatt számos toxin gátolja vagy éppen kontrollálatlanul stimulálja a neurotranszmitterek felszabadulását. A proteáz aktivitással rendelkező tetanus toxin és botulinum toxinok a v-SNARE–t-SNARE komplex kialakulását gátolják, mert hasítják a synaptobrevint (tetanus), a SNAP25-t vagy a syntaxint (botulinum toxinok), ezáltal a transzmitter-felszabadulást tartósan gátolják. Az α-latrotoxin (a Fekete Özvegy pók

toxinja) a neurexint köti és transzmitter-felszabadulást okoz Ca^{2+}-stimulus nélkül is.
Más a helyzet a nagy (>70 nm), peptidtartalmú, ún. dense core vezikulák esetében. Ezek az aktív zónáktól távol helyezkednek el, mobilizálásuk nem a hirtelen és lokális [Ca^{2+}]-emelkedés hatására történik, hanem a végkészülékben diffúzan megemelkedő [Ca^{2+}]-koncentrációra reagálnak. A peptiderg axonterminálisokban L- és N-csatornákat találtak. A plazmamembránnal történő fúzió általában a szinaptikus réstől távolabb jön létre, s a felszabadult peptid diffúzióval éri el a környező neuronokon található receptorait. A vezikula és a plazmamembrán között az exocitózist követően a fúzió tökéletes, hiszen hiába is fűződne le ismét a vezikula, a végkészülékben, ahol nincs fehérjeszintézis, nem tudna újratöltődni.

❹ A felszabadult transzmitter diffúzióval éri el a posztszinaptikus membránt, ahol **receptorához** kötődik, s ez kiváltja a posztszinaptikus neuron vagy sejt (simaizom, harántcsíkolt izom, mirigy) válaszát. A receptorokról már részletesen szóltunk (lásd 5.1 fejezet). Jelen fejezetben az egyes neurotranszmitterek specifikus receptorairól lesz szó. A gyors neurotranszmitterek legtöbbje receptor ioncsatornához kötődik, s attól függően, hogy a receptor milyen ionra permeábilis, posztszinaptikus aktiválás vagy gátlás jön létre. A posztszinaptikus membrán metabotrop, G-fehérjével működő receptorokat is tartalmaz, amelyekről szintén szóltunk már. Meg kell jegyezni, hogy a legtöbb végkészülékben a preszinaptikus membrán is tartalmaz receptorokat, amelyek vagy autoreceptorok, vagy más transzmitterek receptorai, és aktiválásuk a transzmitterfelszabadulás gátlását vagy serkentését eredményezi.

❺ Nagyon fontos feladata a szinapszisnak a felszabadult **transzmitter inaktiválása**, azaz a receptor környezetéből történő eltávolítása, amely két módon mehet végbe. A transzmitter vagy enzim hatására elbomlik és inaktiválódik, vagy a preszinaptikus membránban található, specifikus transzporterén keresztül visszakerül a preszinaptikus citoplazmába. A transzport a Na^+ elektrokémiai grádiens terhére történik ún. másodlagos, Na^+-függő kotranszporttal (lásd 436. oldal).

A továbbiakban a teljesség igénye nélkül áttekintjük néhány neurotranszmitter speciális sajátosságait, funkcióját és jelentőségét.

Aminosav neurotranszmitterek

Az aminosavak közül a glutamát, a glutamátszármazék GABA és a glicin az általános metabolikus szerepen kívül transzmitter funkciót is ellátnak a központi idegrendszerben. A két eltérő funkciót eltérő intracelluláris kompartmentekben található aminosavkészlet látja el.

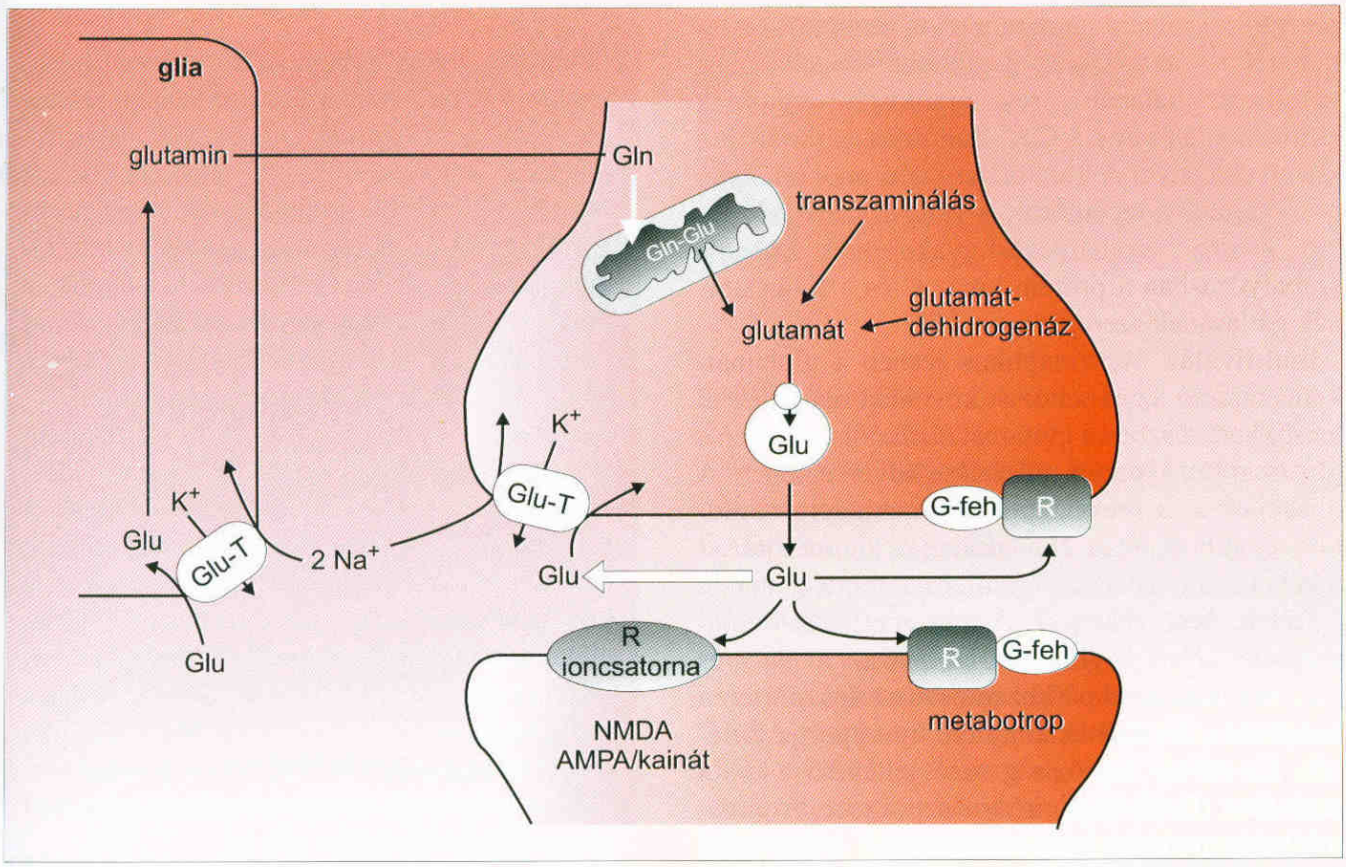
Glutamát

Részleteit illetően leginkább a glutamát neurotranszmisszió ismert. A glutamát a legfontosabb excitátoros transzmitter a központi idegrendszerben. Immunhisztokémiai vizsgálattal, különö- sen a cortex, a hippocampus, a striatum és a cerebellum területén lehet glutamaterg neuronokat kimutatni.

A neurotranszmisszióról szóló általános részben összefoglalt sajátosságok a glutamát transzmisszió esetében az alábbiak (a vázlatos összefoglalás az *6-6. ábrán* látható):

A glutamát a vér-agy gáton (agyi kapillárisok endothelsejtrétege) nem tud áthatolni, **szintézise** az agyban történik. A glutamát keletkezésének legfőbb útjai a transzaminálás, az α-ketoglutarátból történő glutamát-dehidrogenáz reakció és a glutamin dezamidálása. Ezek a reakciók részleteiben a 2.4. fejezetben olvashatók. A glutamin az astrocitákban szintetizálódik a glutamin-szintetáz hatására. A glutamin → glutamát átalakulás a neuronokban a mitokondrium belső membrán belső felszínén lokalizálódó glutamináz hatására megy végbe.

A neurotranszmisszióban szerepet játszó glutamát nem a citoplazmában lokalizálódik, hanem a metabolikus folyamatokban részt vevő glutamáttól elkülönítve, a szinaptikus vezikulákban **raktározódik**. Specifikus glutamát transzporter található a vezikulák membránjában, amely a citoplazmából – ahol a glutamát koncentrációja mM-os nagyságrendben van – glutamátot transzportál a vezikula belsejébe, a kb. 50–100 mM koncentráció ellenében. A transzporter K_t-értéke (analóg az enzimológiában használatos K_M-értékkel) 1–5 mM. A glutamát mint anion transzportálódik az elektrokémiai potenciál terhére, amit a vezikula membránjában található protonpumpáló ATPáz tart fenn. A glutamát transzporter specifikus, aszpartátot nem



6-6. ábra. A glutamáttal működő szinapszis vázlata. *Glu, glutamát; Gln, glutamin; Glu-T, glutamát transzporter; R, receptor; NMDA, N-metil-D-aszpartát; AMPA, α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav*

transzportál, szelektív gátlója ezidáig nem ismert. A fiziológiás stimulusra, a Ca^{2+} közvetlen hatására a vezikulák exocitózisa következik be és a glutamát a szinaptikus résbe ürül.

Glutamátreceptorok. Két receptor típus ismert, amelyhez a glutamát szelektíven kötődhet: az ún. ionotrop receptorok, amelyek ioncsatornák és a glutamátreceptorok nagy többségét alkotják, valamint az ún. metabotrop, G-fehérjéhez kapcsolódó receptorok. Az ionotrop receptorokon belül az eltérő farmakológiai érzékenység alapján NMDA- (N-metil-D-aszpartát), AMPA- (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav) és kainátreceptor különíthető el, az utóbbi kettőt gyakran egynek tekintik és AMPA/kainát vagy egyszerűen nem NMDA-receptornak nevezik. Az NMDA-receptorokról, amelyek Na^+-ra, K^+-ra és Ca^{2+}-ra permeábilis csatornák, már részletesen szóltunk (458. oldal), jelen fejezetben csak speciális jelentőségüket tárgyaljuk.

Az AMPA-receptorok a központi idegrendszer legkülönbözőbb részén megtalálhatók. A receptor ioncsatorna aktív állapotban elsősorban monovalens kationokra (Na^+, K^+) permeábilis, tehát posztszinaptikus depolarizációt okoz, de bizonyos helyeken Ca^{2+}-ra permeábilis AMPA-receptort is leírtak. A receptor klónozásával több AMPA-szelektív csatornát azonosítottak, amelyekben az alegységek – az acetilkolin nikotinreceptorhoz hasonlóan – pentamer komplexet képeznek.

A metabotrop glutamátreceptorok (mGluR) a hét transzmembránszegmenttel rendelkező, G-fehérjékhez kapcsolódó receptorok családjába tartoznak. Ezen belül legalább hét receptort klónoztak és azonosítottak, amelyek között vannak olyanok, amelyek az inozitol-foszfolipidek hidrolízisét aktiválják és olyanok, amelyek az adenilát-cikláz, illetve a Ca^{2+}-csatornák gátlását okozzák. Pre- és posztszinaptikusan egyaránt megtalálhatók, és hatásuk az egyes agyterületeken más és más lehet. A preszinaptikus receptorok egy része gátló auto-

receptor, tehát a glutamaterg axon terminálison találhatók és aktiválásuk a glutamátfelszabadulást gátolja. Ez általában a preszinaptikus K^+-csatornák aktiválásának vagy a Ca^{2+}-csatornák gátlásának a következménye. A glutamaterg neuronokon olyan preszinaptikus receptorok is vannak, amelyek pozitív feedback szabályozást gyakorolnak. Ebben a szabályozásban a protein-kináz C és a K^+-csatornák gátlásának szerepét igazolták.

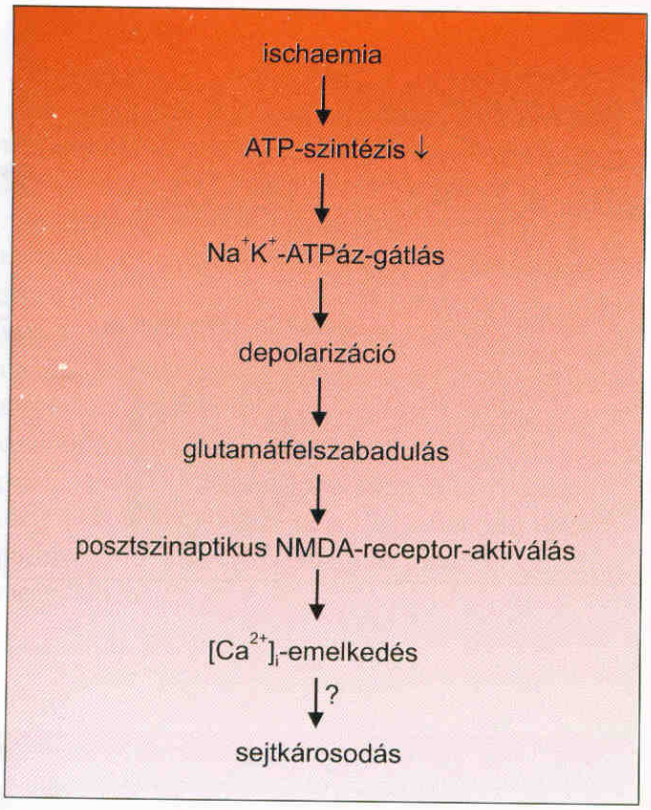
Inaktiválás. A szinaptikus résben a glutamátkoncentráció az exocitózist követően ms-on belül lecsökken, részben a glutamát diffúziója, részben a glutamát transzporter működése következtében. A gliasejtek és a preszinaptikus glutamaterg neuronok membránjában Na^+-glutamát kotranszporter található, amely a Na^+-gradiens terhére glutamát felvételét teszi lehetővé. A transzporter sztöchiometriája $2Na^+$ + glutamát/$1K^+$, azaz a Na^+- és glutamátfelvétellel párhuzamosan a transzporteren keresztül a K^+ ellenkező irányú transzportja történik. Ez utóbbi sajátosság nem jellemző a többi aminosav (GABA, glicin) transzporterre. A glutamát transzporteren keresztül aszpartát is felvételre kerül. Minthogy azonban a vezikulák aszpartátot nem vesznek fel, a fiziológiás stimulus asztpartátot nem, csak glutamátot szabadít fel a végkészülékből.

A glutamát neurotranszmisszió szerepe speciális fiziológiás és patológiás folyamatokban

A glutamát fiziológiás körülmények között a központi idegrendszer legfontosabb excitátoros neurotranszmittere. Jelenlegi ismereteink szerint a hippocampus glutamaterg neurotranszmissziójának kitüntetett szerepe lehet a **tanulás és az emlékezés** folyamatában. Az információk kezdeti rögzítésében – mielőtt az még a cortexben tárolódna – a hippocampusnak tulajdonítanak szerepet. Az egyik lehetséges modell ennek vizsgálatára az ún. long term potentiation (LTP), amelynek az a lényege, hogy a hippocampus adott szinapszisaiban a preszinaptikus glutamaterg neuronok rövid ideig tartó nagy frekvenciájú („tetanikus") ingerlése után hosszú ideig, akár hetekig megnő az adott, egységnyi preszinaptikus ingerléssel kiváltható posztszinaptikus válasz (epsp; excitátoros posztszinaptikus potenciál) erőssége, azaz a szinapszis „emlékszik" az előző tetanikus ingerlésre. Ennek kialakulásában az NMDA-receptorok szerepe egyértelműnek látszik: NMDA-receptor-antagonisták az LTP kialakulását gátolják. Az NMDA-receptorok az AMPA-receptorokkal együtt fordulnak elő, az utóbbiak aktiválása a tetanikus ingerlés következtében olyan mértékű posztszinaptikus depolarizációt hoz létre, ami az NMDA-receptorokon a Mg^{2+}-gátló hatását felfüggeszti (458. oldal), az NMDA-receptorok aktiválódnak és Ca^{2+}-belépés jön létre. A Ca^{2+} számos fehérjét, enzimet aktiválhat, de nem világos, hogy ezek közül melyik és mi módon vesz részt az LTP kialakulásában. Az LTP kialakulásában szerepet játszhat egy retrográd messenger is (esetleg a nitrogén-monoxid), amely az NMDA-receptorok aktiválásának következtében posztszinaptikusan keletkezik és preszinaptikusan fokozott glutamátfelszabadulást vált ki.

A glutamát neurotranszmisszió és az NMDA-receptorok a **hypoxiás agyi károsodás** kialakulásában is döntő szerepet játszanak. Elhúzódó anoxia (pl. szívmegállás vagy trombotikus érelzáródás következtében) sejtkárosító és neurotoxikus hatású. Az energiatermelés károsodása miatt a sejtek tartósan depolarizálódnak, a glutamaterg neuronokból glutamátfelszabadulás történik, ami az NMDA-receptorok tartós aktiválása következtében a posztszinaptikus neuronban nagymértékű $[Ca^{2+}]_i$-emelkedést okoz, ami pl. az intracelluláris Ca^{2+}-függő proteázok aktiválása következtében sejtkárosító tényező. A helyzetet rontja, hogy a pozitív feedback szabályozás további glutamát felszabadításával erősíti fel a folyamatot. NMDA-receptor-gátlókkal, egyelőre csak kísérleti körülmények között, az ischaemiás sejtkárosodás lényegesen csökkenthető a hippocampusban és a striatumban, amelyek egyébként a hypoxiára a legérzékenyebb területek. A hypoxia során bekövetkező egyes események lehetséges összefüggését az *6-7. ábra* mutatja.

Döntő szerepet tulajdonítanak a glutamát neurotranszmissziónak az **epilepsia** és néhány



6-7. ábra. Az ischaemiás neuronális károsodás kialakulásának lehetséges tényezői

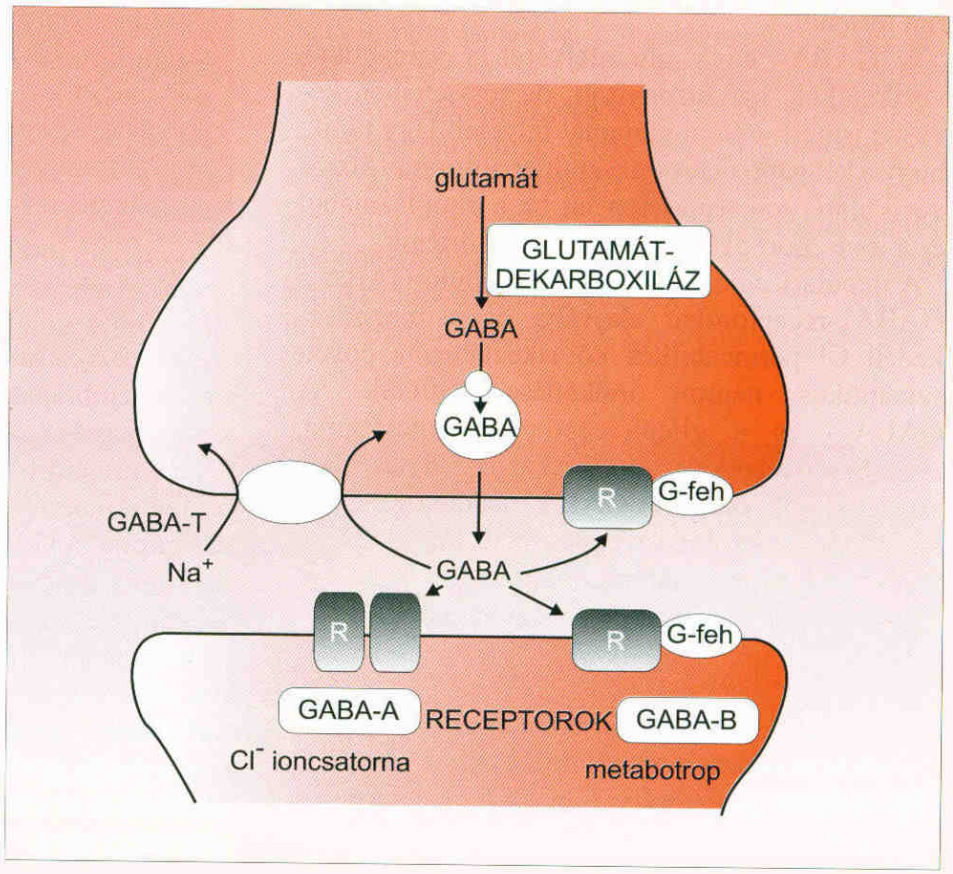
neurodegeneratív betegség kialakulásában. Kísérleti körülmények között epilepsia váltható ki a glutamát neurotranszmisszió túlzott stimulálásával, s ebben mind az AMPA-, mind az NMDA-receptorok aktiválása szerepet játszik.

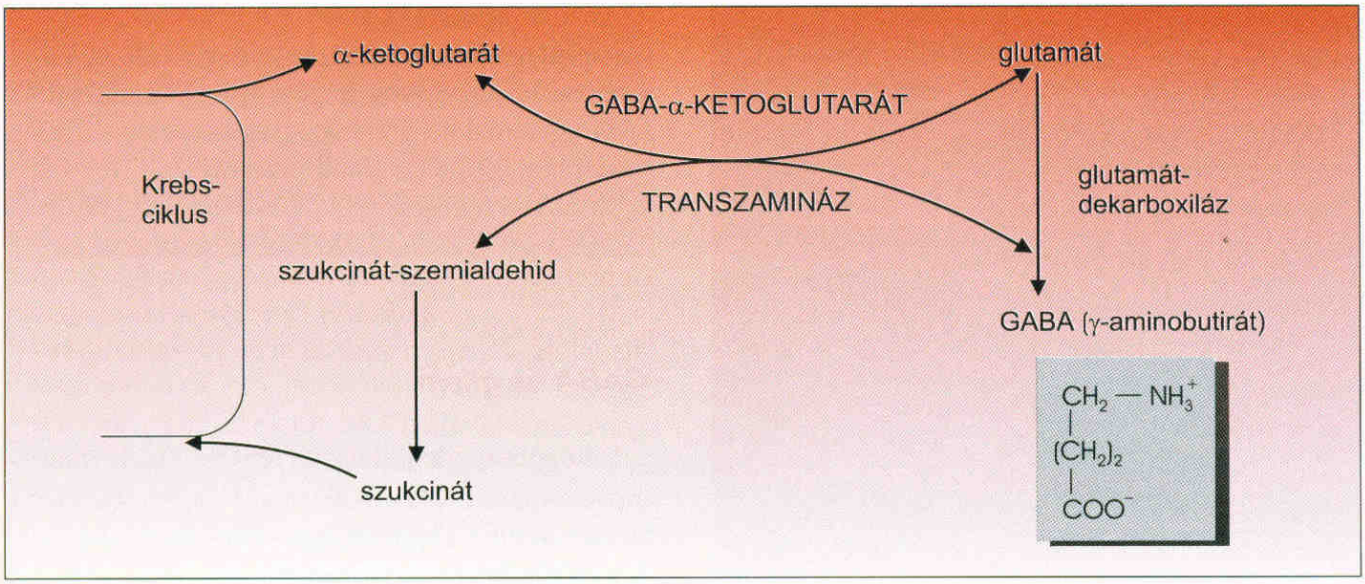
GABA és glicin

A központi idegrendszer legfőbb gátló neurotranszmittere a γ-aminovajsav, (γ-aminobutirát) a GABA, amely a legtöbb agyi régióban megtalálható és a glicin, amely az agytörzsben és a gerincvelőben játszik szerepet. A GABA-val működő szinapszis vázlatát az *6-8. ábra* mutatja.

A GABA-**szintézis** és -lebontás az ún. GABA-shunt útján történik *(6-9. ábra)*, amelyhez a legfontosabb prekurzor a glukóz, amelynek metabolizmusa a Krebs-ciklust működteti. A GABA keletkezése közvetlenül glutamátból történik a glutamát-dekarboxiláz (GAD) hatására, amely piridoxál-foszfát kofaktorral működik. Az enzim

6-8. ábra. A GABAerg axon terminális sémája. *Az ábrához a részletes ismertetés a szövegben olvasható. GABA-T, GABA-transzporter*





6-9. ábra. A GABA-shunt

specifikusan, csak a GABA transzmitterrel működő neuronokban expresszálódik. Így a központi idegrend- szerben a GAD kimutatása (antitesttel, mRNS-hibridizációval) a GABAerg neuronok azonosítására alkalmas.

A glicinnek az agyban nincs speciális metabolikus útja, szintézise a 2.4. fejezetben leírtak szerint történik.

A GABA- és a glicin**felvétel** a szinaptikus vezikulákba, bár bizonyított, de részleteiben kevésbé ismert, mint a glutamát felvétel. Úgy tűnik, hogy a két gátló neurotranszmitter aminosav közös vezikuláris transzporteren jut be a citoplazmából és a transzport pH-grádiens terhére történik.

A depolarizáció hatására felszabaduló GABA a $GABA_A$-receptorokat aktiválja és a megnövekedett Cl^--permeabilitás következtében a posztszinaptikus neuron működése gátlódik. A $GABA_A$- és a glicinreceptor Cl^--ioncsatorna, amelynek tulajdonságairól már részletesebben szóltunk (458. oldal). A GABA metabotrop, G-fehérjékhez kapcsolódó receptorokat, ún. $GABA_B$-receptorokat is aktivál, amelyek pre- és posztszinaptikusan egyaránt megtalálhatók.

A $GABA_A$-receptor farmakológiailag szelektíven aktiválható és gátolható, de ennek egyelőre terápiás jelentősége nincs. A receptoron alloszterikus kötőhelyek vannak, ahol endogén anyagok, illetve az orvosi gyakorlatban használt gyógyszerek kötődnek. A szorongás tüneteinek oldására használt benzodiazepinek kötődése például a csatornák nyílásának valószínűségét növeli, míg a barbiturátok és egyes szteroidok jelenlétében a csatornák GABA hatására tartósan nyitva maradnak. A barbiturátok aktiválják a csatornát GABA részvétele nélkül is, s valószínű ez magyarázza nagyobb koncentrációban megnyilvánuló általános anaestheticus hatásukat.

A $GABA_A$-csatornán intracellulárisan (a 3. és 4. transzmembránszakaszt összekötő hurkon) olyan konszenzushelyek vannak, ahol a protein-kináz A, C és protein-tirozin-kinázok foszforilálnak. A protein-kináz A-val történő foszforiláció a csatornát gátolja. A $GABA_A$-receptort az etanol stimulálja, ami magyarázhatja az alkohol általános szedatív hatását. A glicinreceptornak ezidáig specifikus agonistája és antagonistája nem ismert. A sztrichnin, egy növényi alkaloid azonban a receptort gátolja, bár nagy affinitású kötőhelye nem azonos a glicin kötőhellyel. A gátló glicinreceptorok blokkolása következtében a strichnin generalizált görcsöket okoz.

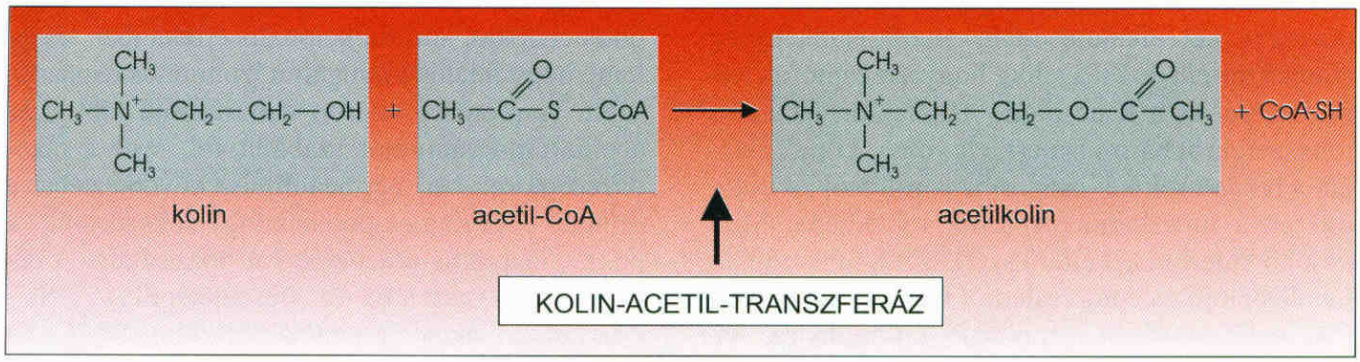
Acetilkolin

Az acetilkolin volt az első kémiai anyag, amelynek neurotranszmitter szerepét igazolták. Megtalálható mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben. Acetilkolin a transzmitter a neuromuszkuláris szinapszisban, ahol a harántcsíkolt izom tónusát és kontrakcióját szabályozza. Jelen van a vegetatív ganglionokban és acetilkolin a transzmitter a paraszimpatikus posztganglionáris rostokban, ahol a szív, a gyomor–bél traktus, az emésztőrendszer mirigyeinek, a pupillának stb. a paraszimpatikus beidegzését közvetíti. A központi idegrendszerben elszórtan a cortexben, hippocampusban és az alacsonyabb agyrégiókban egyaránt megtalálható.

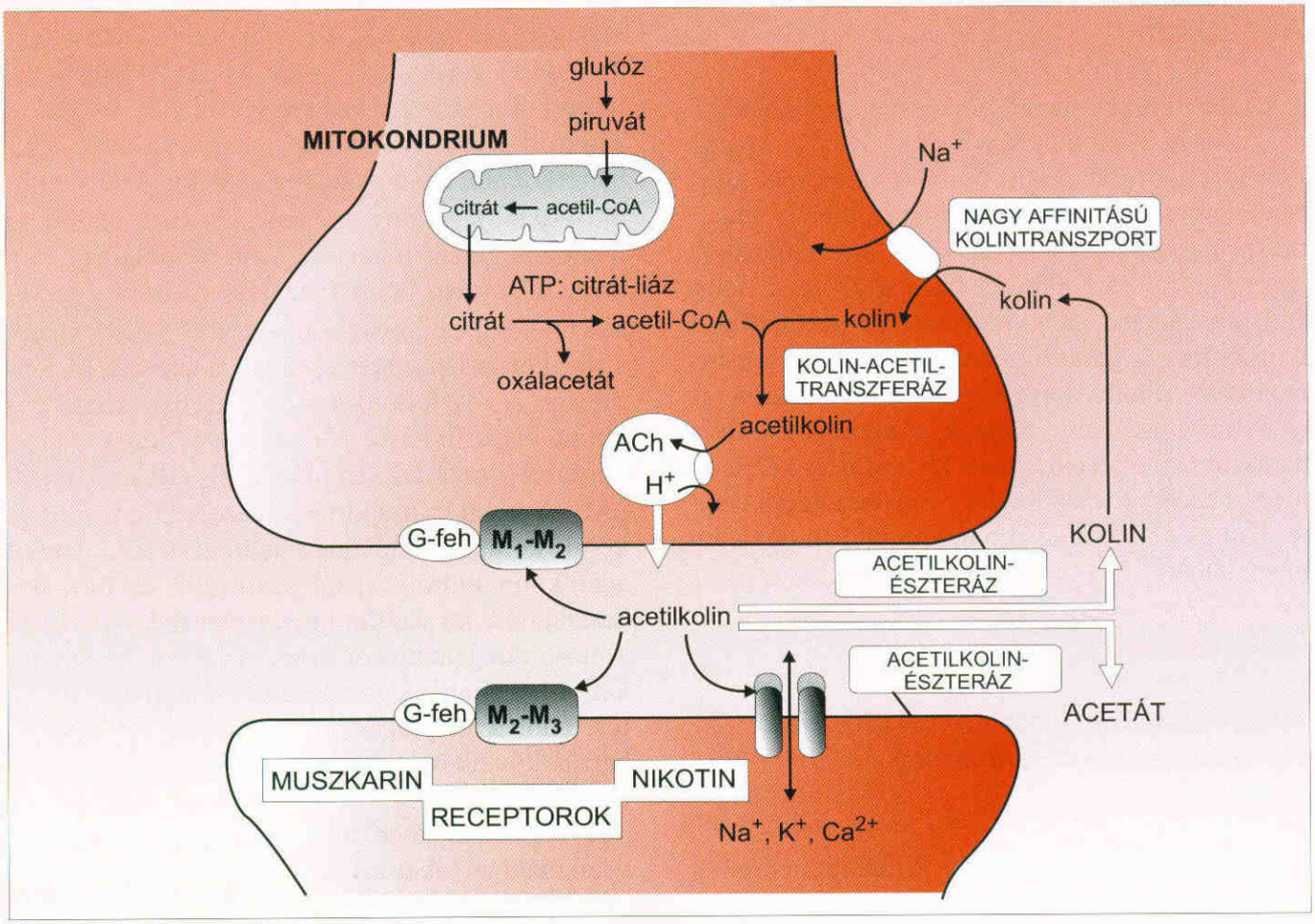
Az acetilkolin szintézise, raktározása és felszabadulása a kolinerg neuronokban

Az acetilkolin szintézise a kolinerg neuronok axon terminálisában történik kolinból és acetil-CoA-ból a **kolin-acetil-transzferáz** (CAT) hatására *(6-10. ábra)*. Mivel az enzim csak az acetilkolint szintetizáló neuronokban van jelen, immunhisztokémiai kimutatása a központi idegrendszeri kolinerg pályák feltérképezését tette lehetővé. Az axon terminálisban az enzim a citoszolban lokalizálódik. A szintézishez az acetil-CoA a mitokondriumban piruvátból keletkezik, citrátként transzportálódik a citoplazmába és ott az ATP:citrát-liáz hatására keletkezik. Az acetilkolin szintézisben nem a CAT működése a sebességmeghatározó (K_M kolin iránt ~1 mM), hanem az, hogy kolin a szükséges mennyiségben rendelkezésre áll-e. A neuronokban *de novo* kolinszintézis nem történik, a vérplazmában a kolin koncentrációja ~10 mM. A kolin egy speciális, csak a kolinerg neuronok plazmamembránjában megtalálható, ún. **nagy affinitású kolin-transzportrendszeren** keresztül kerül a citoplazmába (K_t = 1–5 μM), amely a Na^+-kotranszporterek családjába tartozik. (A többi sejt a foszfolipidek szintéziséhez szükséges kolint kis affinitású, Na^+-tól nem függő transzporterrel veszi fel, amelynek K_t-értéke 10–100 μM). A kolin transzporteren keresztül a neuronba kerülő kolin legalább fele a neuronból felszabadult acetilkolin hidrolíziséből származik és újra felhasználódik az acetilkolin szintézisére. Alternatív kolinforrást jelenthet a foszfatidilkolin lebomlása, ami a központi idegrendszerben különösen jelentős, ahol a vérplazmából kolin – a vér-agy gát barrier következtében – csak korlátozottan áll rendelkezésre.

A végkészülékben található acetilkolin 80%-a vezikulákban lokalizálódik, ahova a citoplazmából a vezikula acetilkolin/H^+ cseretranszportere szállítja. A kolinerg vezikulákban ATP is jelen van, de ezidáig nem ismert az a mechanizmus, ahogy az ATP a vezikulákba kerül. Egy vezikula az emlős központi idegrendszerben kb. 2000 acetilkolinmolekulát tartalmaz, s bár metodikai nehézségek miatt a neuromuszkuláris junkcióban ez az adat nem áll rendelkezésre, az elektrofiziológiai analízis alapján itt is hasonló nagyságrend tételezhető fel. Az izom nyugalmi működését jellemző miniatűr véglemez-potenciálok a vezikulákból felszaba-



6-10. ábra. Az acetilkolin szintézise



6-11. ábra. Az acetilkolin (ACh) szintézise, receptorai és inaktiválása a kolinerg axon terminálisban

duló acetilkolin-„kvantumoknak" felelnek meg. A kolinerg szinapszisban zajló folyamatok vázlata a *6-11. ábrán* látható.

Kolinerg receptorok

A kolinerg receptorok megkülönböztetése és elnevezése két alkaloid iránti eltérő érzékenység alapján történt, jóval azelőtt, hogy a receptorok természetéről és a kapcsolódó szignáltranszdukciós rendszerekről bármi ismert lett volna. Ennek alapján a receptorok két csoportba sorolhatók, a nikotin- és a muszkarinreceptorok családjába. Mint később kiderült, két eltérő szerkezetű, funkciójú és lokalizációjú receptorcsaládról van szó, s mindkettőn belül további altípusok különíthetők el. Néhány altípus fontosabb tulajdonságainak összefoglalása az *6-3. táblázatban* látható.

A **nikotinreceptor** a receptor ioncsatornákhoz tartozik, amelyről részletesen szóltunk a 457. oldalon, itt csak funkcionális jelentőségüket foglaljuk össze. A receptor a harántcsíkolt izomban található és elsősorban Na^+ és K^+-ra permeábilis. A kolinerg neuronból a spontán, kvantális acetilkolin-felszabadulás a nikotinreceptorokon keresztül hozza létre a harántcsíkolt izomban a miniatűr véglemez-potenciálokat, ami funkcionális értelemben azt jelenti, hogy felelős a nyugalmi izomtónus fenntartásáért. A motoros neuron stimulációja több száz acetilkolin-kvantumot szabadít fel, s ez a nikotinreceptorok Na^+-permeabilitása következtében a miniatűr véglemez-potenciálok sokszorosát, a posztszinaptikus potenciálokat hozza létre. A depolarizáció aktiválja a feszültségfüggő Na^+-csatornákat, akciós potenciál jön létre, ami Ca^{2+}-t mobilizál a szarkoplazmás retikulumból és kiváltja az izomkontrakciót. A nikotinreceptoron kompeti-

tív gátló, a klinikumban izomrelaxánsként használt d-tubokurarin. Eltérő alegység-szerkezetű és Ca^{2+} iránt permeábilisabb nikotinreceptor található a központi idegrendszerben, ahol szerepe egyelőre nem ismert.

A nikotinreceptort érintő súlyos autoimmun betegség a **myasthenia gravis**, amelyben ellenanyagok termelődnek a harántcsíkolt izom nikotinreceptora ellen. Az állapotot, a nikotinreceptorok számának nagymértékű csökkenése következtében, egyre súlyosbodó izomgyengeség, fáradékonyság, végül az izomtónus elvesztése jellemzi. A betegség a légzésbénulás következtében halálos kimenetelű.

A **muszkarinreceptorok** a hét transzmembránszegmenttel rendelkező és G-fehérjékhez kapcsolódó receptorok családjába tartoznak, és megtalálhatók a központi idegrendszerben és a paraszimpatikus beidegzésű belső szervekben. Molekuláris biológiai módszerekkel öt altípusa különböztethető meg (M_1–M_5), amelyek közül három funkcionálisan és farmakológiailag, valamint lokalizáció szempontjából is jól elkülöníthető. Az M_1-receptorok neuronális (jórészt preszinaptikus) lokalizációjúak, a G_q-fehérjén keresztül a foszfatidilinozitol jelpályát aktiválják és a transzmitterfelszabadulás pozitív regulációjában játszanak szerepet. Az M_2-receptorok a szívben találhatók és a kapcsolódó G-fehérjéken keresztül közvetlenül aktiválják a K^+-csatornát, hiperpolarizációt és bradycardiát okoznak. Az M_2-receptorok a G_i-fehérjén keresztül adenilát-cikláz-gátlást is okoznak. M_2-receptorok vannak a kolinerg axonterminális membránjában is, ahol az acetilkolin-felszabadulás negatív feedback gátlását közvetítik. Az M_3-receptorok a gyomor-bél rendszerben a simaizmokon és a nyálmirigyekben találhatók, a G_q-fehérjét és a foszfatidilinozitol jelpályát aktiválják, intracelluláris [Ca^{2+}]-emelkedést okoznak, s ez felelős a paraszimpatikus izgalom simaizom-kontrakciót és szekréciót okozó hatásáért. A muszkarinreceptorok specifikus, de nem szelektív – mert mindhárom receptoron hatékony – gátlója a terápiában is használatos **atropin.** A muszkarinreceptor-aktiválás fontosabb fiziológiás hatásainak és a jelátviteli mechanizmusoknak az összefoglalását az *6-3. táblázat* mutatja.

Az acetilkolin inaktiválása

A receptorokról disszociáló acetilkolint a szinapszisban az **acetilkolin-észteráz** bontja kolinra és acetátra. Az enzim a kolinerg szinapszisban található és specifikus az acetilkolinra.

Az acetilkolin-észteráz megkülönböztetendő az ún. pszeudo-kolinészterázoktól (más néven butiril-kolin-észteráz), ami a májban keletkezik, a plazmában található, s valószínűleg az a funkciója, hogy a szervezetbe került, potenciálisan toxikus, idegen észtereket hidrolizálja.

Az acetilkolin-észteráz több izoformában és változatos alegység-összetételben fordul elő, azonban

6-3. táblázat. A kolinerg receptorok néhány jellemző tulajdonsága

Receptor		Lokalizáció	Jelátvitel		Hatás	Terápiás antagonista
Muszkarin	M_1	neuron	G_q	PLC-aktiválás	transzmitterfelszabadítás (preszinaptikusan)	atropin
	M_2	szívizom	G_k G_i	K^+-csatorna aktiválás Adenilát-cikláz-gátlás	negatív inotrop és kronotrop	
		kolinerg végkészülék	G_k	K^+-csatorna aktiválás	transzmitterfelszabadulás-gátlás	
	M_3	gyomor-bél simaizom	G_q	PLC-aktiválás	kontrakció	
		mirigyek (nyál-, gyomor-, hasnyál)	G_q	PLC-aktiválás	szekréció	
		pupillasphincter izom	G_q	PLC-aktiválás	pupillaszűkület	
Nikotin		harántcsíkolt izom	Na^+-, K^+-, Ca^{2+}-ioncsatorna		kontrakció	d-tubokurarin

minden formában extracellulárisan, a plazmamembránhoz kötődik. A katalitikus alegységeket a C-terminálison egy lipidhorgony vagy a katalitikus alegységekhez disszulfidkötéssel kapcsolódó filamentózus, kollagéntartalmú struktúr alegység köti a plazmamembránhoz. Az enzim a szerinproteázoknál leírtak szerint működik (lásd 1.2 fejezet), de érdekes módon nem mutat szekvenciahomológiát a szerin-proteázokkal. Működése közben az aktív centrumban lévő szerin acetilálódik, de az effektív katalitikus aktivitásnak megfelelően az acetil-enzim rövid életű.

Az acetilkolin-észteráz reverzibilis gátlói – neosztigmin, fizosztigmin – az aktív helyen lévő szerinnel reagálnak és karbamoil enzim jön létre, amely az acetil-enzimnél stabilabb és gátolja az acetilkolin hidrolízisét. A reverzibilis gátlók szemcseppként pupillaszűkítést okoznak. Az enzim irreverzibilis gátlói, az alkil-foszfátok súlyos mérgek, amelyek a szerin OH-csoporttal rendkívül stabil kötést hoznak létre, amely gyakorlatilag nem hidrolizál.

A katecholamin neurotranszmitterek. Noradrenalin, dopamin és adrenalin

Az idegrendszerben neurotranszmitter szerepet betöltő katecholaminok a noradrenalin és a dopamin. A hasonló struktúrájú adrenalin elenyészően kevés neuronban található, viszont a mellékvesevelő legfontosabb szimpatikus hatású hormonja.

A katecholaminok bioszintézise és raktározása

A dopamin, a noradrenalin és az adrenalin szintézise egyaránt tirozinból történik *(6-12. ábra)*. A **tirozin-hidroxiláz**, egy kevert funkciójú oxigenáz, amely molekuláris oxigén felhasználásával, biopterin kofaktor közreműködésével, meta-pozícióban egy hidroxilcsoportot épít a tirozinba és 3,4-dihidroxi-L-fenilalanin (L-DOPA) keletkezik.

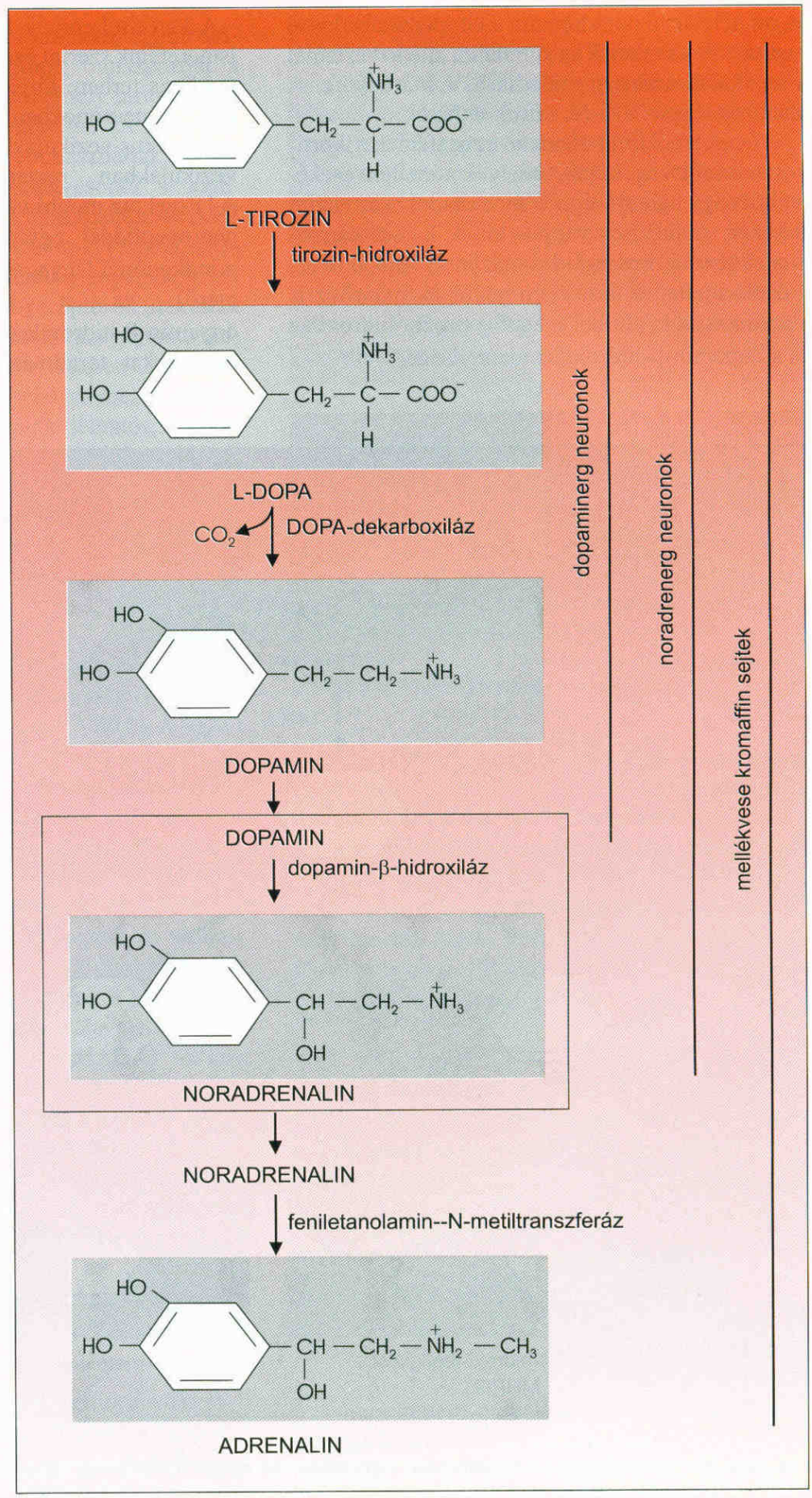
A tirozin-hidroxiláz a fenilalanin → tirozin átalakulást is katalizálni tudja, aminek phenylketonuriás egyénekben van jelentősége. Mivel a tirozin-hidroxiláz csak a katecholaminokat szintetizáló sejtekben található, ez a reakció a katecholaminok szintézise szempontjából fontos, de nem jelent érdemleges alternatívát a fenilalanin metabolizmusában.

A tirozin-hidroxiláz a katecholaminszintézis sebességmeghatározó enzimje, ahol a katecholamin-bioszintézis szabályozása történik. Fokozott idegi ingerlés során az intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedik, ami aktiválja a Ca^{2+}–kalmodulin függő protein-kinázt (CAMK II), ez foszforilálja és aktiválja a tirozin-hidroxilázt, ami a katecholaminszintézis fokozásával lehetővé teszi a neuron alkalmazkodását a megnövekedett igénybevételhez.

Az L-DOPA-t a **DOPA-dekarboxiláz** alakítja tovább, és dopamin keletkezik. A DOPA-dekarboxiláz nagyon hatékony (alacsony K_M, nagy V_{max}) és széles szubsztrátspecificitású enzim, amely más aromás aminosavakat is dekarboxilál (így az 5-hidroxi-triptofánt a szerotoninbioszintézis során), ezért aromás-aminosav-dekarboxilázoknak is nevezik. Nemcsak neuronokban, hanem más sejtekben (pl. vese, endothel) is megtalálható.

A tirozin-hidroxiláz és a DOPA-dekarboxiláz egyaránt a citoszolban található szolubilis enzim, s itt keletkezik a dopaminerg neuronokban a szintézis végtermékét jelentő dopamin. A további események a vezikulában dőlnek el, ahova a dopamin transzportálódik. A dopaminerg neuronok nem, de a noradrenerg neuronok és a mellékvesében a kromaffin sejtek vezikulái tartalmaznak egy enzimet, a **dopamin-β-hidroxilázt**, ami a dopamint noradrenalinná alakítja. Az enzim Cu-t tartalmazó, szintén kevert funkciójú oxigenáz. A reakcióhoz az elektronokat az aszkorbát szolgáltatja, ami a vezikulákban dehidro-aszkorbáttá alakul. A noradrenalin tehát mind a neuronokban, mind a mellékvesevelőben a vezikulákban keletkezik.

A mellékvesevelő és néhány agytörzsi neuron tartalmazza a **feniletanolamin-N-metiltranszferáz** enzimet, ami az S-adenozil-metioninról metilcsoportot transzferál a noradrenalinra és kialakul az adrenalin. Az enzim a citoszolban található, azaz az intermedierek ismét a citoszolba kerülnek. A szintézis során tehát a citoplazmában keletkezett dopamin a vezikulába transzportálódik,

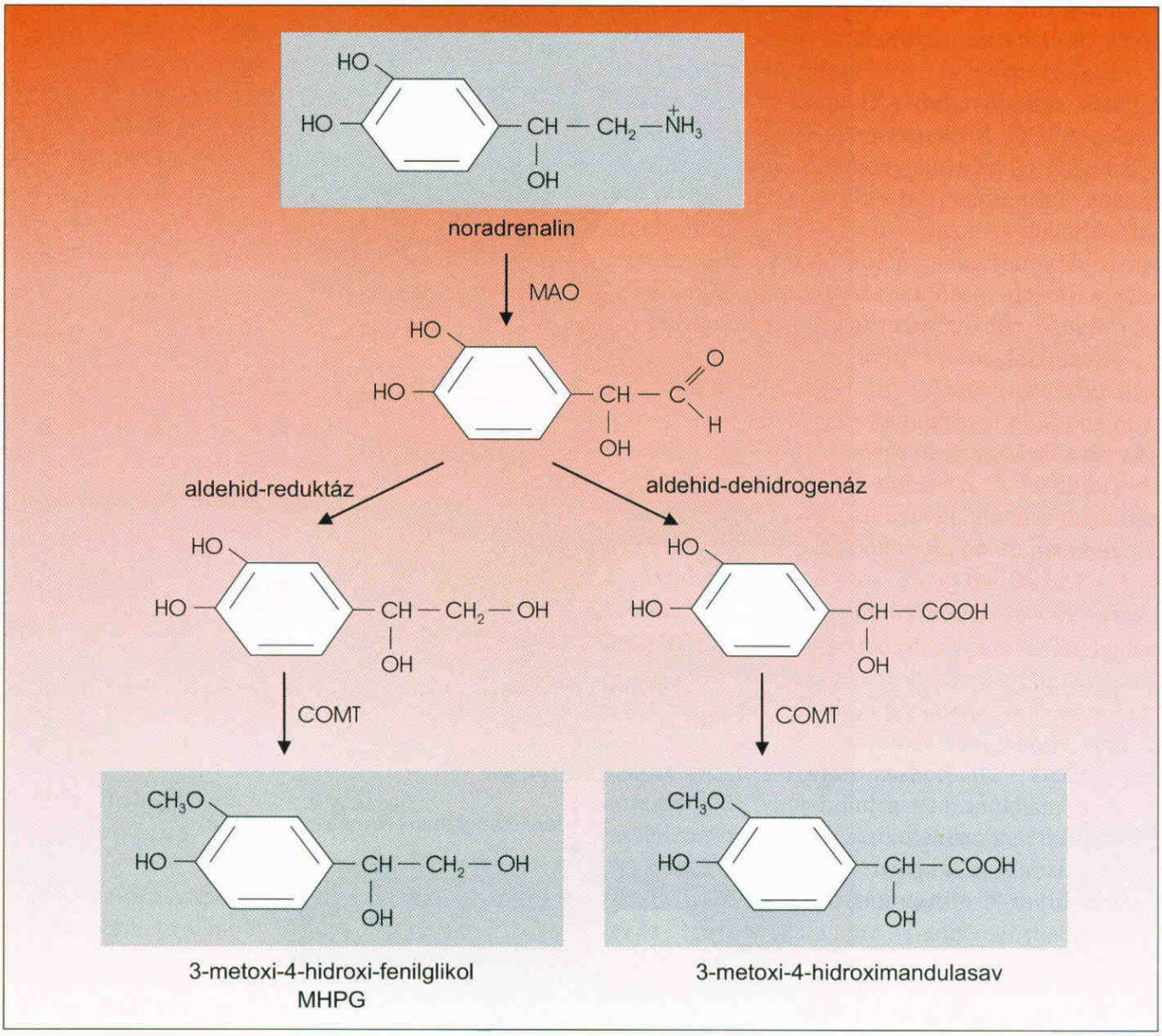


6-12. ábra. A katecholaminok bioszintézise. *A bekeretezett rész a vezikulát jelzi, a többi reakció a citoszolban történik*

az ott keletkező noradrenalin a citoplazmába kerül vissza, s itt keletkezik az adrenalin, ami aztán ismét a vezikulába transzportálódik és raktározódik. A szintézis lépései a *6-12. ábrán* láthatók.

A feniletanolamin-N-metil-transzferázt a kortikoszteroidok regulálják, amelyek a mellékvesekéregből nagy mennyiségben felszabadulva az enzim fokozott szintézisét váltják ki. A katecholamin-bioszintézis a tirozin-hidroxilázon történő akut reguláció mellett a tartós neuronális aktivitáshoz is alkalmazkodik, amikor megnő a tirozin-hidroxiláz és a dopamin-β-hidroxiláz mennyisége.

A katecholaminok felvétele a vezikulába, jelen ismereteink szerint azonos transzporteren, a proton grádiens terhére történik, azaz ATP-függő folyamat. A neuronokban a noradrenalin vagy a kis szinaptikus vezikulákban, vagy a nagy dense core vezikulákban raktározódik, mindkét helyen ATP-vel, az utóbbi vezikulákban még valamilyen neuropeptiddel együtt. A kromaffin vezikulák mindkettőnél lényegesen nagyobbak (~280 nm átmérő) és a katecholamin, ATP és dopamin-β-hidroxiláz mellett további fehérjéket és ionokat tartalmaznak, amelyek a vezikulák



6-13. ábra. MHPG keletkezése a noradrenalin metabolizmusa során. *Az ábrán nem jeleztük, de a reakciók más sorrendben (COMT-MAO-aldehid-reduktáz vagy -dehidrogenáz) is ezeket a metabolitokat eredményezik*

exocitózisa során a katecholaminokkal együtt felszabadulnak. A katecholaminok transzportját a vezikulákba a rezerpin gátolja, amely tartós alkalmazásakor a vezikulákat depletálja. (A rezerpint régen vérnyomáscsökkentőként használták.)

A neuronokból és a mellékveséből a katecholaminokkal együtt ATP is felszabadul. Az ATP és belőle az extracelluláris ún. ekto-ATPázok hatására keletkező adenozin modulátor anyagok, amelyek felismerésére specifikus receptorok alakultak ki az idegrendszerben és számos más sejtben. Receptoraik részben ioncsatornák, részben G-fehérjéhez kapcsolódnak. Az ATP tehát nemcsak mint a metabolizmus központi anyaga jelentős, hanem mint extracelluláris szignál is egyre fontosabbnak látszik.

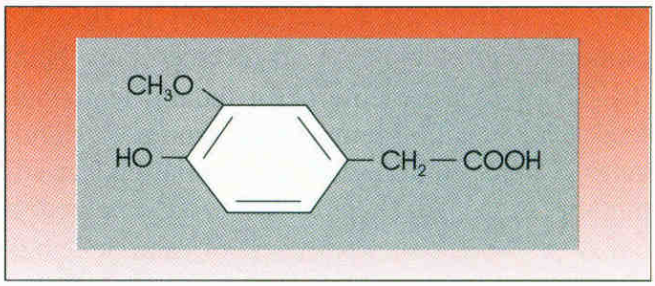
A katecholaminok metabolizmusa és inaktiválása

A katecholaminok katabolizmusában két enzim játszik szerepet: a **monoamino-oxidáz** (MAO) és a **katechol-O-metiltranszferáz** (COMT). A MAO a mitokondriumok külső membránjában található flavintartalmú enzim, ami általában az aromás aminokat oxidálja. A citoplazmába kikerülő – a vezikula által nem védett – katecholaminokat oxidatív dezaminálással a megfelelő aldehiddé alakítja. Két MAO izoenzim létezik, a MAO-A és a MAO-B, amelyek cDNS-ét klónozták és aminosavszekvenciáját ismerik. Megkülönböztetésük funkcionális alapja az, hogy eltérő a szubsztrátspecificitásuk: a MAO-A szubsztrátja elsősorban a noradrenalin és a szerotonin, a MAO-B sokféle feniletil-amint átalakít, beleértve a táplálékban jelenlévőket. Mindkét izoenzimnek szelektív gátlói vannak, amelyek terápiás jelentőségűek.

A COMT, ami nemcsak az idegrendszerben található, S-adenozil-metioninról metilcsoportot transzferál a katecholgyűrű 3-OH-csoportjára. Széles a szubsztrátspecificitása, az oldalláncról függetlenül gyakorlatilag minden katechol gyűrűn metilál.

A két enzim plusz az aldehid-dehidrogenáz és az aldehid-reduktáz hatására többféle metabolit keletkezhet *(6-13. ábra)*. Az agyban keletkező legfontosabb metabolit a 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglikol (MHPG), amelynek mennyisége jelentősen csökken a likvorban és a vizeletben depressziók egyes formáiban.

A dopaminból a MAO, az aldehid-dehidrogenáz és a COMT hatására keletkező metabolit a homovanillinsav (HVA; *6-14. ábra*), amelynek mennyisége szintén meghatározható. A dopaminerg pályák károsodása esetén, pl. Parkinson-kórban a HVA mennyisége lecsökken.



6-14. ábra. A homovanillinsav képlete

A katecholamint tartalmazó neuronokból felszabadult neurotranszmittert az axon terminális membránjában található transzportrendszer veszi fel a preszinaptikus terminálisba, s ezáltal inaktiválja. Szelektív transzporter található a megfelelő neuronokban a noradrenalinra, a dopaminra és a szerotoninra. Ezek, felépítésüket és általános mechanizmusukat illetően a Na^+-kotranszporterek családjába tartoznak.

A transzportereknek specifikus gátlói vannak, amelyeket a depressziók kezelésében alkalmaznak (lásd még alább). A katecholamin transzportert gátolja a coca cserjében található, élvezeti szerként fogyasztott kokain is.

A noradrenalin és az adrenalin receptorai

A noradrenerg pályák a központi idegrendszerben, a locus coeruleusból indulnak, és adrenerg receptorok vannak számos agyrégióban. Az axonból

felszabaduló noradrenalin, a többi biogén aminnal együtt nem kizárólag szinaptikus kapcsolatban, hanem esetleg nagyobb távolságon diffundálva éri el a receptorait. A periférián a szimpatikus innervációnak megfelelően noradrenalinreceptorok vannak a szimpatikus ganglionban és a szimpatikus beidegzésű belső szervekben (pl. érfal, bronchus, gyomor-bél simaizom). Olyan szervek is tartalmaznak adrenerg receptort, amelyeknek nincs szimpatikus beidegzése (pl. uterus, harántcsíkolt izom), ahol endogén agonistájuk a hormon adrenalin.

A noradrenalin és adrenalin receptorai funkcionális és farmakológiai szempontból β, α_1-, α_2-csoportba sorolhatók. A β-receptorokon belül (β_1–β_4) β_1 és β_2-receptorokról tudunk legtöbbet. Ezek funkcionális szempontból azonosak, mindkettő G-fehérjén keresztül az adenilát-ciklázt stimulálja és a sejtekben cAMP-szint emelkedést okoz. A β-receptor szerkezetéről, ami jellemző példája a hét transzmembránszegmenttel rendelkező, G-fehérjéhez kapcsolódó receptoroknak már részletesen szóltunk (453-454. oldal). A β_1 és β_2 elkülönítés farmakológiai szempontból jelentős. Noha a két receptor általában együtt fordul elő, az egyes szervekben a fiziológiai hatás valamelyik receptor dominanciájának az eredménye, és a megfelelő agonistákkal viszonylag szelektíven lehet egyes hatásokat befolyásolni. β_1- és β_2-receptorok jelen vannak a központi idegrendszerben és a perifériás szervekben. A szimpatikus hatásokat és azok molekuláris mechanizmusát az *6-4. táblázat* foglalja össze.

Az α_1- (α_{1A}, α_{1B}, α_{1C}) és az α_2-receptorok (α_{2A}, α_{2B}, α_{2C}) eltérő celluláris hatásúak. Az α_1-receptorok a G_q-fehérjén keresztül a foszfatidilinozitol jelpályát aktiválják és [Ca^{2+}]-emelkedést okoznak. α_1-receptorok vannak az érfal-simaizmok membránjában, s aktiválásuk simaizom-kontrakciót okoz, mert a Ca^{2+}–kalmodulin komplex aktiválja a miozin-könnyűlánc-kinázt (lásd még 6.2 fejezet). Ezen receptorok gátlói hatékony szerek a hypertonia (magas vérnyomás) egyes formáiban. Az α_2-receptorok a G_i-fehérje közvetítésével az adenilát-ciklázt gátolják. Az α-receptorok a központi idegrendszerben és a perifériában egyaránt megtalálhatók. A noradrenerg neuronon a preszinaptikus gátló autoreceptor az α_2, de α_2-receptor más transzmitterrel működő axon terminálison (pl. kolinerg) is jelen van, s ezen keresztül érvényesül a noradrenalin transzmitter felszabadulást gátló hatása.

Dopaminreceptorok

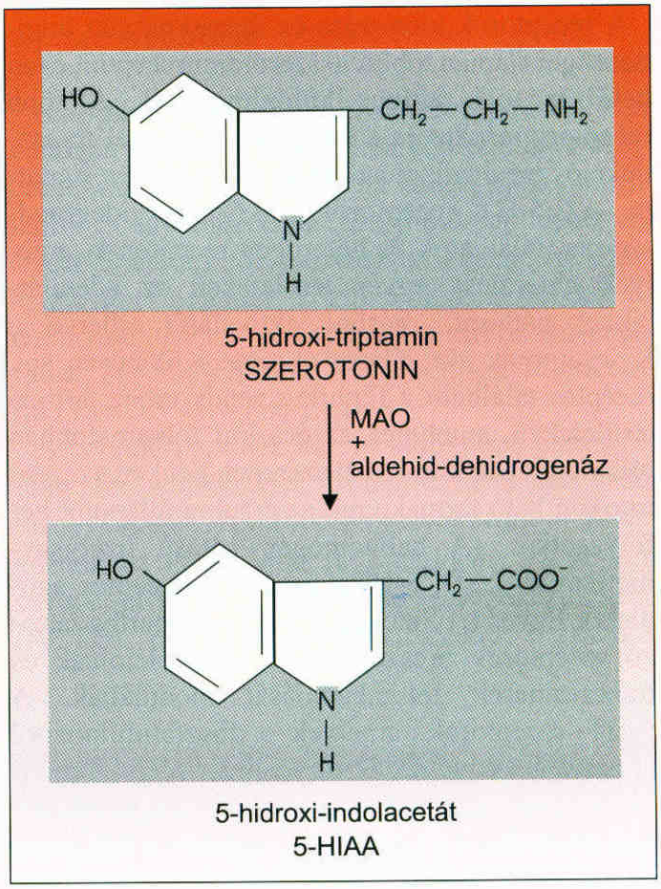
A dopaminreceptorok (D_1–D_5) G-fehérjéken keresztül az adenilát-ciklázt aktiválják (D_1, D_5) vagy gátolják (D_2, D_3, D_4). A központi idegrendszerben

6-4. táblázat. Adrenerg receptorok és hatásaik az egyes szervekben

Receptor	Lokalizáció	G-fehérje	Másodlagos messenger	Celluláris effektor	Fiziológiás válasz
β_1	szívizom harántcsíkolt izom	G_s	cAMP (+)	Ca^{2+}-csatorna (+) glikogén-foszforiláz-kináz (+)	kontrakció glikogénmobilizálás
β_2	bronchus gyomor-bél simaizom uterus zsírszövet	↓	↓	miozin-könnyűlánc-kináz (–) ↓ hormonszenzitív lipáz (+)	relaxáció ↓ zsírsavmobilizálás
α_1	érfal-simaizom lép máj	G_q ↓	Ca^{2+} ↓	miozin-könnyű lánc-kináz (+) glikogén-foszforiláz-kináz (+)	kontrakció vércukorszint-emelkedés
α_2	érfal-simaizom	?	Ca^{2+} (L-csatorna)	miozin-könnyű lánc-kináz (+)	kontrakció

a legtöbb dopaminerg pálya a substantria nigrából indul és a striatumba fut. Jelentős dopaminerg innervációja van a limbikus rendszernek és szerepet játszanak dopaminerg neuronok a hypophysishormonok, elsősorban a prolaktin szekréciójának szabályozásában. Psychosisok kezelésében használnak olyan gyógyszereket (neuroleptikumok), amelyek D_2-receptor-antagonisták, s hatékonyságuk alapján feltételezhető, hogy a psychosisok kialakulásában a dopaminerg neurotranszmisszió kóros működése szerepet játszik.

A nigrostriatalis dopaminerg pályák károsodásának a következménye a **Parkinson-kór**, amelyben drasztikusan csökken a striatum dopamintartalma. A betegség 50 év felett gyakori és egyre súlyosbodó végtagremegéssel, beszéd- és mozgászavarokkal, valamint a kognitív funkciók romlásával jár. A kezelés egyik lehetősége L-DOPA adása, amely a szintézisben a dopamin prekurzora (6-12. ábra).



6-15. ábra. 5-hidroxi-indolacetát keletkezése szerotoninból

Szerotonin

A szerotonin (5-hidroxi-triptamin, 5-HT) mint neurotranszmitter azért érdemel külön említést, mert jelentősnek látszik szerepe a normális magatartási folyamatok, az alvás–ébrenlét vagy az étvágy szabályozásában. A szerotonin fontosságát jelzi, hogy számos pszichoterápiás gyógyszer a szerotonin-neurotranszmissziót befolyásolja.

A szerotonin nemcsak az idegrendszerben keletkezik. Szintézise triptofánból a megfelelő neuronokban az Aminosavak anyagcseréje című fejezetben leírtak szerint történik. A szintézisben ugyanaz az aromás-aminosav-dekarboxiláz vesz részt, amely a dopa → dopamin átalakulást is katalizálja. A szintézis sebességmeghatározó enzime a triptofán-hidroxiláz, amely a tirozin-hidroxilázhoz hasonlóan, Ca^{2+}-függő módon foszforilálódik és aktivitása alkalmazkodik a fokozott neuronális aktivitás igényeihez.

A szerotoninerg axon terminális membránjában szerotoninra specifikus, Na^{+}-függő transzportrendszer található, ami a felszabadult és a receptorról disszociált szerotonint az axon terminálisba transzportálja és így inaktiválja. A transzport szelektív, kompetitív gátlói hatékony antidepresszív gyógyszerek.

A szerotonin metabolizmusa során 5-hidroxi-indolecetsav keletkezik *(6-15. ábra)*, amelynek szintje a szerotoninerg neuronok aktivitását jelzi. A metabolizmusban a monoamino-oxidáz A izoenzim és a NAD-dal működő aldehid-dehidrogenáz vesz részt.

Szerotoninreceptorok

A szerotoninerg neuronok az agytörzs körülhatárolt területeiről (raphe nuclei) indulnak és a központi idegrendszer csaknem minden részéhez eljutnak, de különösen jelentős a limbikus rendszer szerotoninerg beidegzése. Szerotonint tartalmazó neuronok találhatók a periférián is, amelyek szerepet játszanak pl. a gyomor–bél motilitás szabályozásában.

A receptorok klónozása és farmakológiai tulajdonságai alapján többféle szerotoninreceptor, ezen belül is több altípus különíthető el. A főbb receptortípusokat és a kapcsolódó szignál transzdukciós mechanizmusokat az *6-5. táblázat* mutatja. Az 5-HT_1-receptorok a központi idegrendszerben találhatók és heterogén receptorok, amelyek aktiválása egyes területeken az adenilátcikláz gátlását, máshol aktiválását, illetve a K^+-csatornák aktiválását okozza. Különösen sok receptor található a limbikus rendszerhez tartozó területeken, amelynek az érzelmi folyamatokban tulajdonítanak kitüntetett szerepet. Ezeken a receptorokon ható farmakonok az érzelmi állapotot befolyásolják. (A hallucinogén hatású lizergsavdietilamid, LSD, 5-HT_1- és 5-HT_2-receptor agonista). Egyes területeken a 5-HT_1-csoportba tartozó receptorok preszinaptikus lokalizációjúak és transzmitterek felszabadulását modulálják. A 5-HT_2-receptorok, amelyek a foszfatidilinozitol jelpályáját aktiválják és intracelluláris [Ca^{2+}] emelkedést okoznak részben a központi idegrendszerben (különösen a cortexben), részben a bél simaizmokon találhatók, ahol hatásukra simaizomkontrakció jön létre. A 5-HT_3 (és 5-HT_4) receptorok a perifériás (gyomor-bél traktust beidegző) és a központi idegrendszeri neuronokban egyaránt megtalálhatók. Az 5-HT_3-receptorok mint kation-ioncsatornák membrándepolarizációt, s így gyors excitátoros válaszokat okoznak. A receptor antagonistái hatékonyak a kemoterápiás kezelés mellékhatásaként jelentkező hányinger és hányás csökkentésében.

A szerotonin számos központi idegrendszeri funkcióban szerepet játszik. Résztvesz a hypophysis hormonszekréciójának hypothalamicus szabályozásában (prolaktin, ACTH, növekedési hormon szekréciót okoz), az alvás–ébrenlét és az étvágy szabályozásában.

6-5. táblázat. Fontosabb szerotoninreceptor típusok

Receptor	Effektor mechanizmus	Lokalizáció
5-HT_1	adenilát-cikláz (+,–) K^+-csatorna (+)	központi idegrendszer (különösen a limbikus rendszer)
5-HT_2	PLC (+) K^+-csatorna (+)	vékonybél-simaizom központi idegrendszer
5-HT_3	kationcsatorna	perifériás és központi idegrendszeri neuronok
5-HT_4	adenilát-cikláz (+)	perifériás és központi idegrendszeri neuronok

A **depressziók** és a **szorongás** modern terápiájában egyre nagyobb szerepet kapnak azok a vegyületek, amelyek a szerotoninerg neurotranszmissziót befolyásolják. A szerotonin metabolizmusának, inaktiválásának és receptorainak ismeretében ilyen hatás várható a monoamino-oxidáz gátlás, a szerotonin preszinaptikus transzporterének gátlása és a szerotoninreceptorok aktiválásának eredményeképpen. Ma már számos ilyen hatásokkal rendelkező szer áll a terápia rendelkezésére.

Neuropeptidek

Az opioid peptidek kivételével a peptid neurotranszmitterekről – terjedelmi okokból – csak az általános sajátosságok vázlatos ismertetésére szorítkozunk.

A neuropeptidek széleskörű funkciókkal rendelkeznek a központi idegrendszerben és azon kívül egyaránt. Vagy a neuronokból felszabadulva diffúzióval érik el a közelben található receptoraikat, vagy a hypophysisből a neuroszekretoros neuronokból a vérpályába szekretálódnak.

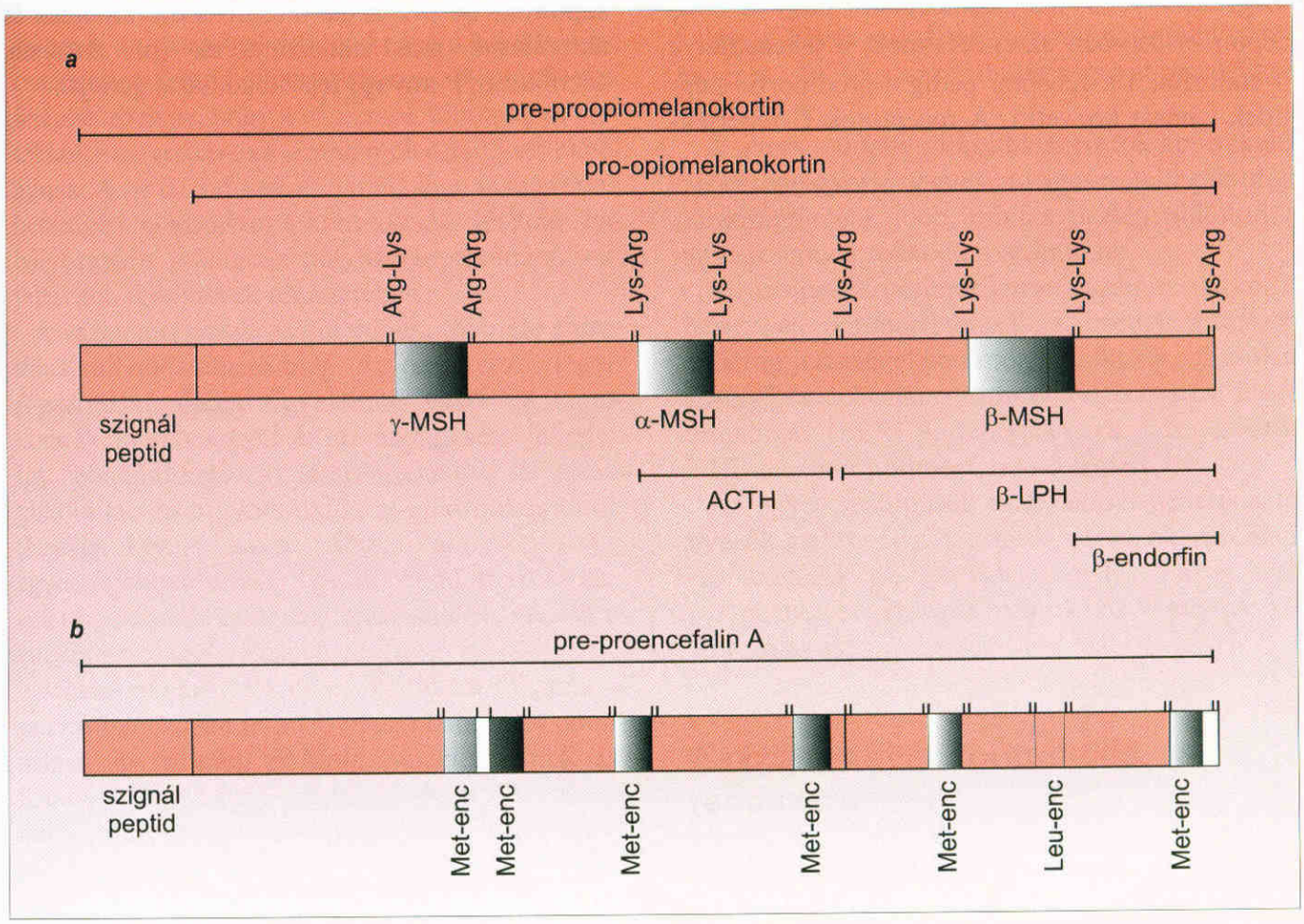
A neuronokban a peptid transzmitterek szintézise az összes eddig tárgyalt transzmittertől eltérően a sejttestben történik a 3.4. fejezetben tárgyalt törvényszerűségeknek megfelelően. A megszintetizált neuropeptidek, a nagy „dense core" vezikulákba kerülnek, és az axonban transzportálódva érik el a szinaptikus végződést. Gyakran a sejttestben a propeptidek kerülnek a vezikulákba és proteázok hatására itt alakulnak ki a transzmitter peptidek.

A neuropeptidek legtöbbször az aminosav vagy a klasszikus neurotranszmitterekkel azonos terminálisban, kotranszmitterként fordulnak elő. A kolinerg terminálisban gyakran VIP (vazoaktív intestinalis peptid), a noradrenalinnal az opioid peptidek vagy a neuropeptid Y, a szerotoninnal a P-anyag fordul elő azonos terminálisban. A peptidek felszabadulása a klasszikus neurotranszmitterektől eltérő mechanizmussal történik. A neuropeptidek felszabadulását az axonok nagyobb frekvenciával történő stimulációja váltja ki, s a vezikulák, a depolarizáció hatására létrejövő Ca^{2+}-szignálra reagálnak, de ez nem az aktív zónák területén, hanem diffúzan, a végkészülék egész területén érvényesül. A peptiderg vezikulákból a transzmitterfelszabadulás exocitózissal megy végbe és a peptidek pótlása a sejttestből történik.

Opioid peptidek

Az opioid peptidek azoknak a receptoroknak az endogén agonistái, amelyeken keresztül a növényi eredetű morfin fejti ki régóta ismert fájdalomcsillapító és egyéb hatásait. Az opioid peptideket endogén fájdalomcsillapítóknak is nevezik. Az eddig azonosított peptidek közül a legismertebbek az endorfinok és két peptapeptid, a **metionin-encefalin** (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) és a **leucin-encefalin** (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu).

Az opioid peptidek három különböző prekurzor fehérjéből keletkeznek proteolitikus hasítás eredményeképpen. A proopiomelanokortinból keletkeznek az endorfinok (a β-endorfin 31 aminosavból áll), de emellett az adrenokortikotrop (ACTH) és a melanocitastimuláló hormonok



6-16. ábra. (a) A pre-proopiomelanokortinból keletkezik az adrenokorikotrop hormon (ACTH), a melanocitastimuláló hormonok (MSH), a β-lipotropin (β-LPH) és a β-endorfin. *A bázikus aminosavpárok a proteolitikus hasítás helyei.* **(b) A pre-proencefalin A, amelyből a Met-encefalin és a Leu-encefalin keletkezik.** *A kettős vonalak a bázikus aminosavpárokat jelzik*

(MSH) is. A proteolitikus hasítás bázikus aminosavpároknál történik, amelyek mintegy keretbe foglalják a kihasítandó peptideket. Ugyanígy keletkeznek a proencefalinból az **encefalinok** *(6-16. ábra)*. A harmadik prekurzor a prodinorfin, amely további opioid peptidszekvenciákat tartalmaz.

Az opioid peptidek a központi idegrendszer sok régiójában megtalálhatók. Hogy melyik agyrégióban milyen peptid található, az attól függ, hogy az adott neuronokban milyen prekurzor expresszálódik és milyen proteolitikus enzimek vannak jelen. Az opioid peptidek nagy affinitású, specifikus opioid receptorokhoz kötődnek, amelyek a központi idegrendszerben és a perifériás szervekben találhatók. Szintetikus ligandok iránti eltérő szelektivitás alapján többféle opioid receptor különíthető el (μ, δ, κ). A különböző receptorok eltérő affinitást mutatnak az endogén ligandok iránt is és általában különbözik lokalizációjuk a központi idegrendszerben. Valószínűsíthető, hogy a δ-receptor elsősorban az encefalinok, a μ-receptor a β-endorfin, a κ-receptor pedig a prodinorfin peptidek hatását közvetíti. A receptorok G-fehérjékhez kapcsolódnak és hatásukban szerepet játszik az adenilát-cikláz gátlása, a K^+-csatorna aktiválása és a Ca^{2+}-csatornák gátlása. Orvosi szempontból a legfontosabb kérdés az, hogy az opiátok sokféle, eltérő hatásai közül (fájdalomérzés csökkentése, vazopresszinszekréció-csökkentés, hypotensio, gyomorszekréció gátlása, légzésdepresszió, hányinger, kedélyállapot változása stb.) melyik receptorhoz melyik hatás rendelhető, mert ez ad lehetőséget az egyes funkciók szelektív befolyásolására és a nem kívánt hatások csökkentésére. Bár e téren távolról sem letisztultak az ismeretek, úgy tűnik, hogy a fájdalomcsökkentő hatás létrejöttében mindhárom receptor szerepet játszik, a cardiovascularis hatások inkább a δ, míg a só- és vízháztartás szabályozása a κ-receptor feladata.

Az exogén fájdalomcsillapító morfin a legnagyobb affinitást a μ-receptor iránt mutatja. Az opioid receptorok általában posztszinaptikus receptorok, de preszinaptikusan is előfordulnak és aktiválásuk más transzmitterek (pl. dopamin, acetilkolin, P-anyag) felszabadulását gátolják.

Ajánlott irodalom

Basic Neurochemistry (Fifth Ed.) eds. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, P. B. Molinoff, 1994, Raven Press, New York

6.2. Kontraktilis rendszer

Dux László

A kontraktilis szövetek három fő típusa a vázizom, a szívizom és a simaizom. Szívizomban és vázizomban jól felismerhető a kontraktilis rendszer rendezettségéből eredő harántcsíkolat, simaizmokban az ultrastrukturális kép sokkal kevésbé rendezett. Jelentős eltérést okoz az izomszövetek felépítésében az, hogy a vázizmok többmagvú rostokból, a szívizom és a simaizmok önálló sejtekből állnak. A simaizomszövet önmagában is rendkívül heterogén, elsősorban a kontrakció-relaxáció szabályozásáért felelős szabályozó mechanizmusok, jelátviteli rendszerek tekintetében.

A vázizomrendszer is heterogén, többféle izomtípus különböztethető meg. Az osztályozás legelfogadottabb alapja figyelembe veszi az izomkontrakció sebességét és az anyagcsere jellegét. Így elkülöníthető a lassú oxidatív, a gyors glikolitikus és a gyors oxidatív-glikolitikus típus. (Ezeken kívül számos altípus, átmeneti típus, egyes fajokban erősen specializálódott izomtípusok írhatók le, de ezek részletes taglalása inkább az áttekinthetőséget veszélyezteti.)

A lassú oxidatív rostok elsősorban a folyamatosan kis intenzitású munkát végző izmokban dominálnak, így például az antigravitációs izmokban. Kitartó, fáradástűrő rostok, színük a magas mioglobin és mitokondrium tartalom miatt vörös, jól kapillarizáltak. Energiaigényüket elsősorban zsírsavak és ketontestek oxidációjával fedezik, glikogént nem tartalmaznak. A szívizomsejtek számos biokémiai tulajdonságukban erősen hasonlítanak a lassú oxidatív vázizomrostok sajátságaira.

A gyors glikolitikus rostok rövid ideig tartó igen intenzív erőkifejtésre képesek, hamar elfáradnak. Energiaigényüket elsősorban glikogénraktáraik anaerob glikolitikus lebontásával fedezik. Színük világos, kevés mitokondriumot, mioglobint tartalmaznak. Belső szarkotubuláris membránrendszerük igen fejlett.

A gyors oxidatív glikolitikus rostok kontrakciós sebessége gyors, vegyes anyagcserejellegük miatt fáradságtűrésük jobb, mint a tisztán glikolitikus anyagcserével működő rosttípusnak.

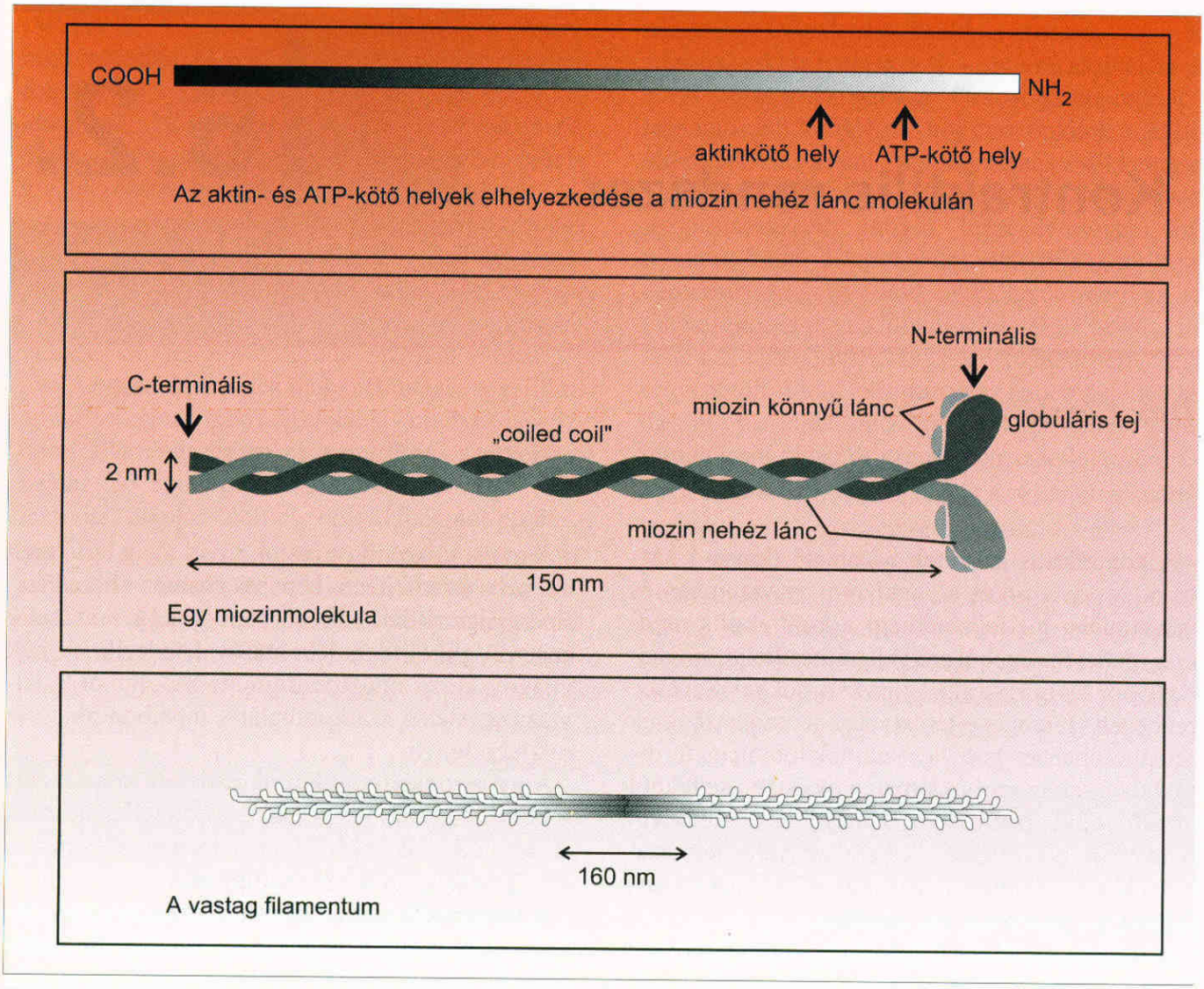
A rosttípusok polimorfizmusa számos alkotó fehérje gén polimorfizmusában, esetleg alternatív splicing jelenségekben megmutatkozik, pl miozin könnyű és nehézláncok, troponin komplex, kalciumpumpa (SERCA fehérjék), rianodinreceptor, DHP-receptor polimorfizmusa ismert.

Az egyes rosttípusok kialakulását genetikai tényezők, neuronális, hormonális hatások, mechanikai tényezők pl. feszülés, terhelés, edzés határozzák meg és bizonyos határok között egymás között átalakulásra képesek (lásd alább).

Az izomszövet kontraktilis rendszere

A vastag filamentum rendszer, a miozin fehérje szerkezete

A **miozin**molekulák tömege 540 kD és 6 polipeptidláncból állnak *(6-17. ábra)*. Ezek közül 2 ún. nehéz lánc 230 kD tömegű, részben



6-17. ábra. A miozinmolekula szerkezete

alfa-helikális elrendeződésben egymásra tekeredve (szuperhelix) a miozin farki részét alkotják, részben a globuláris szerkezetű feji részekbe is belenyúlnak. A farki rész átmérője 2 nm, hossza 150 nm. A globuláris feji részek egyenként 2, összesen 4 könnyű láncot is tartalmaznak, amelyek molekulatömege kb. 20 kD. A feji rész mérete 4x11 nm, itt lokalizálódik a miozinmolekula ATP-bontó aktív centruma. Mind a nehéz, mind a könnyű láncok polimorf fehérjék. Izoforma összetételük döntő az izomkontrakció-sebesség sajátságainak meghatározásában.

A harántcsíkolt izomban az ún. **vastag filamentumok** a miozin fehérje polimérjeinek tekinthetők. A polimerizálódott molekulákat elektrosztatikus kölcsönhatások tartják együtt. (Emiatt a miozinmolekulák kioldása, tisztítása magas ionerősségű pufferekkel volt sikeres.)

A miozinmolekulák összekapcsolódása, a vastag filamentum képzés, a feji részek ellentétes irányú polarizációját eredményezi. Középen a két oldalról beépülő farki részek találkozása egy kb. 300 nm hosszúságú csupasz szakaszt eredményez. A vastag filamentum két vége irányába az ún. tüskés zónák mutatnak, ahol az előemelkedő nyaki és feji részek a vastag filamentum közepe irányába csuklószerű elmozdulásra képesek, két hajlékony ún. kapocs (hinge) régió segítségével. A feji részek elrendeződése a vastag filamentum keresztmetszete felől nézve, a körfogaton hat sávot alkot. Ezek a sá-

vok a vastag filamentumot körülvevő hat vékony filamentum felé tekintenek. Az azonos sávokon belül a feji részek ismétlődésének távolsága kb. 58 nm.

A vékony filamentum rendszer

A vékony filamentumok alapvázát az aktin fehérje két gyöngysorszerűen összekapcsolódó polimerje, az ún. F (fibrilláris) aktin alkotja. Az aktin monomer, a G (globuláris) aktin molekulatömege 42 kD. Az élővilágban egyik legáltalánosabban előforduló fehérje. Alfa típusú aktin alkotja a szív, a váz és a simaizmok kontraktilis rendszerének vékony filamentumrendszerét, a béta és gamma típusú aktin a citoszkeletális rendszer része és gyakorlatilag minden sejtben megtalálható.

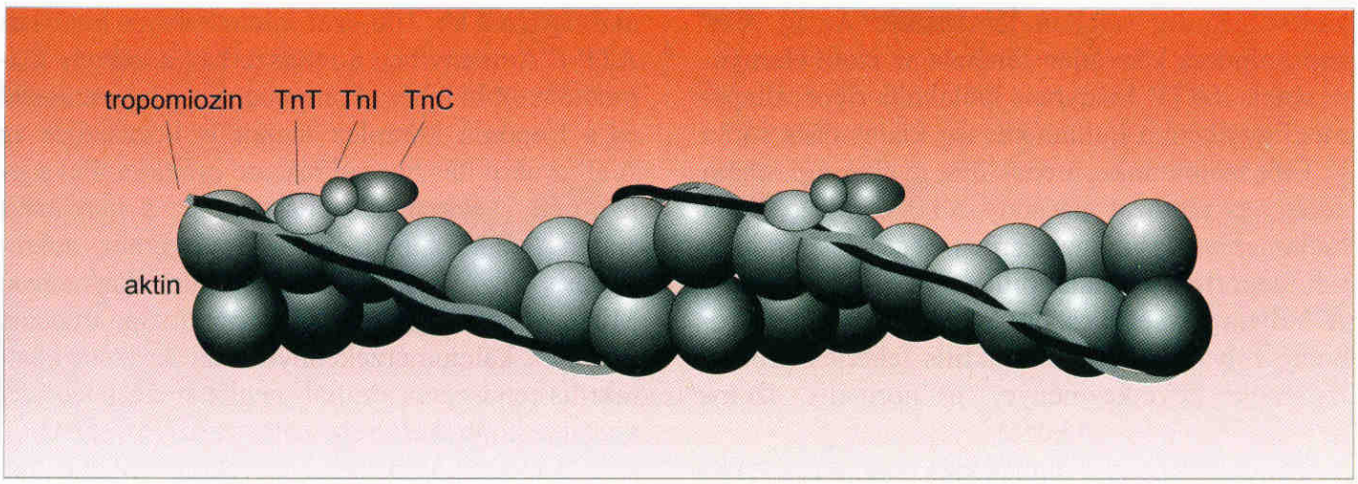
Az aktin polimerizáció, a miozin vastag filamentum képzéséhez hasonlóan, alacsony ionerősségen végbemenő spontán, exergonikus folyamat. Eredménye a több millió dalton molekula- tömegű F aktin, amelynek vége a Z vonal (lásd alább) struktúrájába ágyazódva a kontraktilis rendszer mechanikai erőátvitelének legfontosabb lehorgonyzási pontját alkotja *(6-18. ábra)*.

Az aktin polimer kettős gyöngysorszerű elrendeződése két tekeredő árkot hagy szabadon, melyben egy másik fibrilláris fehérje, a tropomiozin kábelszerű kettős helixei fekszenek bele. A tropomiozin monomer molekulatömege 70 kD. A tropomiozin kapcsolódása elfedi az aktin monomérek felszínén azt a régiót, mely alkalmas lehet a miozin fejjel kereszthidak kialakítására. 38 nm távolságra ismétlődve a tropomiozin-molekulához kapcsolódva helyezkedik el a troponinkomplex, mely három alegységből épül fel. Ezek a tropomiozinhoz kapcsolódó troponin T, a kalcium kötő doméneket tartalmazó troponin C, valamint az aktin kereszthídkötésével interakcióba lépni képes troponin I (inhibitoros) alegység. Ezek molekulatömege 37 kD (TnT), 18 kD (TnC), illetve 24 kD (TnI).

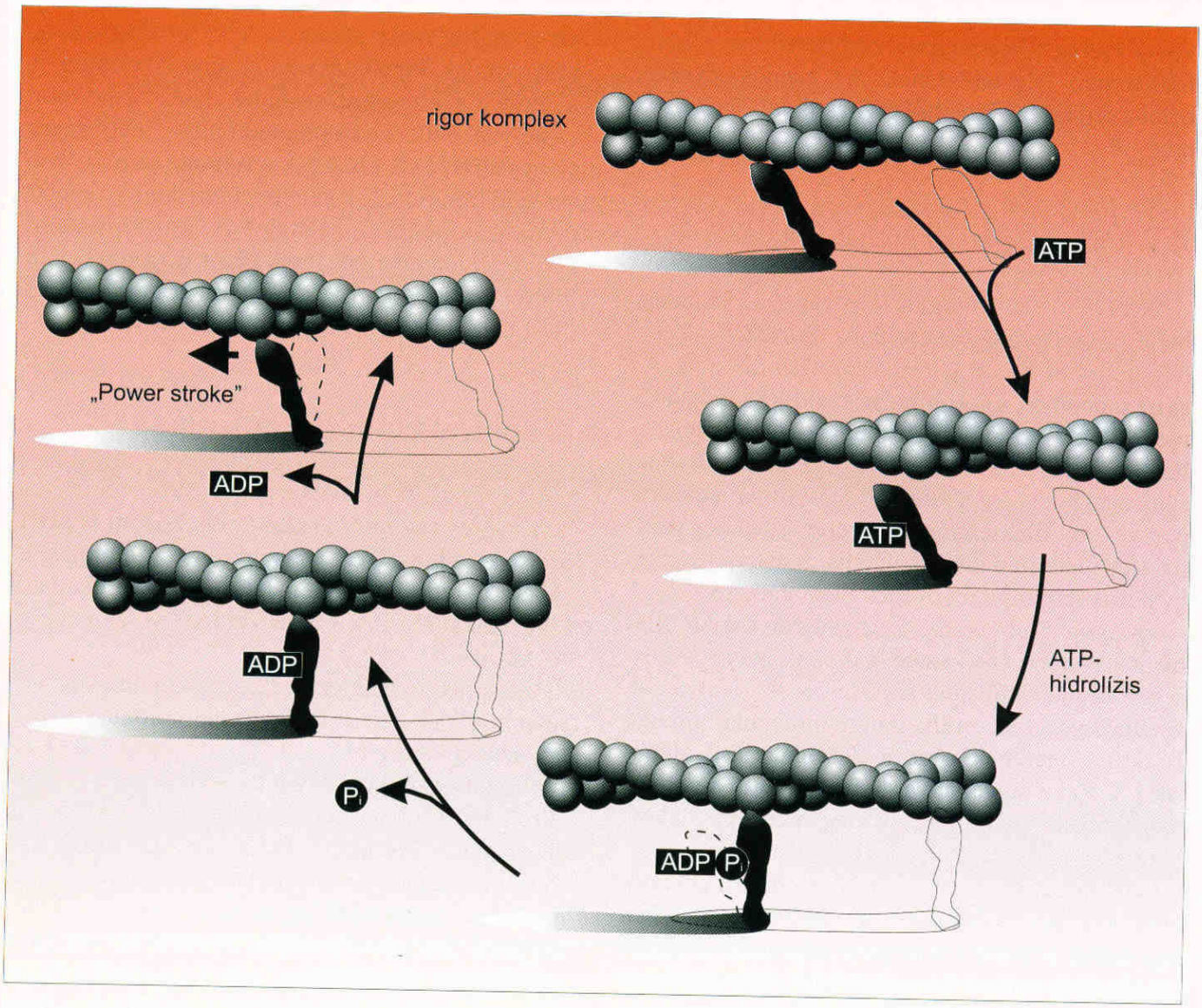
A kontrakció mechanizmusa

A kereszthídciklus. Az izomrostok erőkifejtése a vastag és vékony filamentumok közötti kereszthidak kialakulásának és szinkronizált elmozdulásának következtében jön létre. Ezt a folyamatot kereszthídciklusnak (cross bridge cycle) nevezik *(6-19. ábra)*.

A kontrakció befejeztével, a miozinmolekula feji részéhez ATP kapcsolódik, az aktomiozin kapcsolat, azaz a kereszthíd szétválik, az izom elernyed. Az újabb kontrakció kezdetén a miozin fej ATPáz aktivitásának hatására a kötött ATP ADP-re és anorganikus foszfátra bomlik. Az ADP kötve marad a miozinfejen és kialakul a kereszthídkapcsolat a vékony filamentum egyik aktin monomér kötőhelyével. Ezt követi a miozin feji és nyaki részének csuklószerű elmozdulása, ami a kapcsolt vékony filamentumot a szarkomer közepe (H zóna, lásd alább) felé mozdítja el. Ezalatt az ADP leválik az



6-18. ábra. A vékony filamentumok felépítése *(TnT, TnI és TnC; troponin T, I és C)*



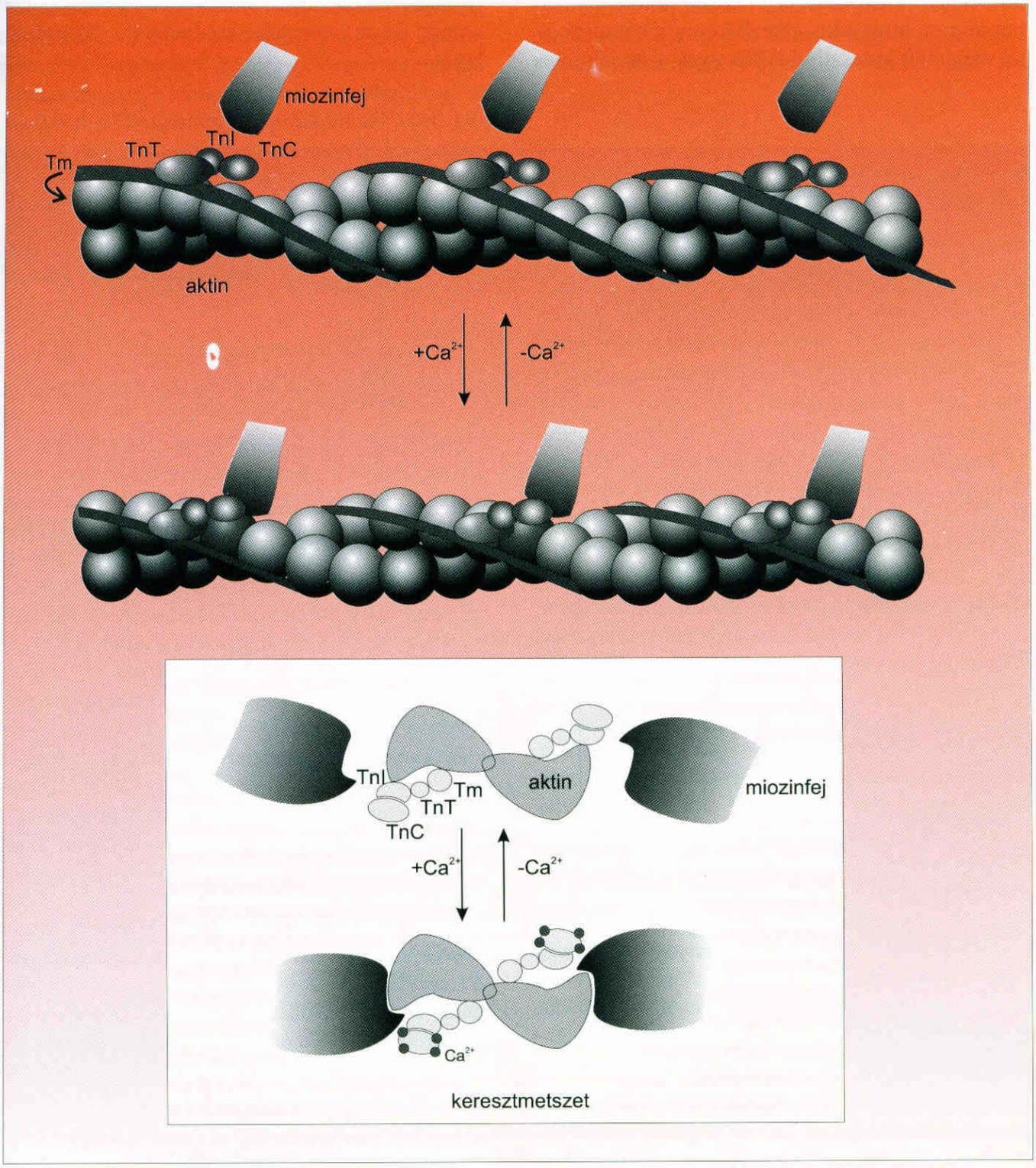
6-19. ábra. A kereszthídciklus (cross bridge cycle) folyamata

aktomiozin komplexről, mely a következő ATP kapcsolódásáig stabilan fennmarad. Az új ATP kapcsolódása közvetlen feltétele az izom elernyedésének. (ATP hiányban kialakuló rigor állapot megfigyelhető a hullamerevség kialakulása során is. Erős izommunka, menekülés, gyalogsági roham során az izomzat alacsony ATP-szintje révén a hullamerevség pillanatszerűen beállhat és pontosan megőrizheti a halál pillanatának testhelyzetét. A hullamerevség későbbi oldódása már fehérjebontó folyamatok, a kontraktilis fehérjék proteolízisének következménye, a normális izomrelaxációhoz nincsen köze).

A miozinmolekula önmagában minimális ATP-bontó aktivitással rendelkezik. Az aktinnak nincsen ATPáz aktivitása. A két fehérje együttesen, magnéziumion jelenlétében a miozin saját ATPáz aktivitásánál kb. 100-szor intenzívebben bontja az ATP-t. Amennyiben a rendszerhez a vékony filamentum többi fehérjekomponensét, a tropomiozint és a troponin komplex tagjait is hozzáadjuk az ATPáz aktivitás huszad részére csökken. Ezt a jelentősen csökkent aktivitást ismét a maximális szintre lehet emelni, ha a rendszerhez mikromoláris koncentrációban kalciumionokat adunk. Mindez arra utal, hogy a tropomiozin, troponin komplex kalciumérzékennyé teszi az izom kontraktilis rendszerét, ezáltal meghatározó jelentősége van a kontrakció/relaxáció szabályozásában.

A troponinkomplexek, a vékony filamentum hosszában kb. 38 nm távolságra követik egymást, kijelölve a kereszthidak kialakulásának lehetséges

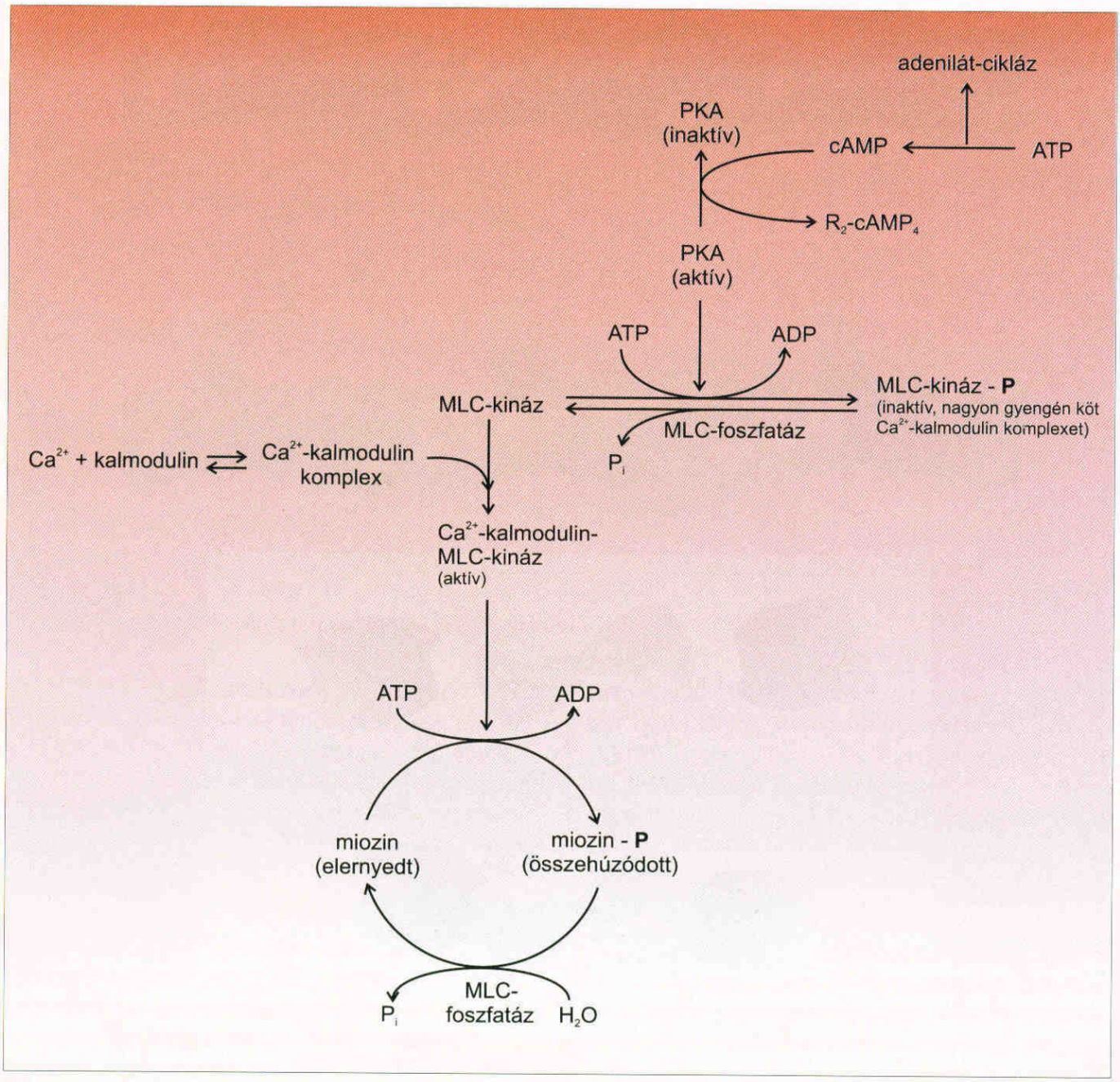
helyeit. Kalciummentes közegben, kisebb mint 10^{-6} M Ca^{2+} jelenlétében, amikor a troponin C nem köt kalciumot, a tropomiozin és a troponin T alegység közelében elhelyezkedő, és ezáltal inhibitoros troponin I alegység ráfekszik az aktin-miozin kötésre alkalmas régiójára, az izom relaxált állapotban van *(6-20. ábra)*. Ha az ionizált kalciumszintje eléri a 10^{-6} M értéket, a troponin C



6-20. ábra. Az aktin-miozin kapcsolódás kalcium szabályozása. *Tm, tropomiozin; a többi rövidítéshez lásd a 6-18. ábrát*

kalciumionokat köt, eltávolodik a vékony filamentumtól és elhúzza magával az inhibitoros toponin I alegységet is. Az aktin-miozin kölcsönhatás, a kereszthíd kialakul.

Izotóniás kontrakcióban a kereszthídciklus erőcsapás lépése során a vékony filamentumok olyan mértékben mozdulnak el a vastag filamentumokhoz képest, hogy a következő troponinkomplex által megjelölt kereszthíd kötőhelyek a miozinfejek számára elérhető távolságra kerülnek és a következő kereszthídciklus ott fog lezajlani, az izom rövidül. Amennyiben az izomra háruló terhelés nagyobb a miozin feji, nyaki részek erőcsapása során kifejthető erőnél, a filamentumok egymáshoz képest nem mozdulnak el, az újabb kereszthidak ugyanott alakulnak ki ahol az előző kontrakcióban voltak. Ez az izometriás kontrakcióra jellemző állapot.



6-21. ábra. A simaizom-kontrakció szabályozási mechanizmusa. *PKA, protein-kináz A; MLC, miozin könnyű lánc (myosine light chain)*

A troponin–tropomiozin komplex szerepe a kalcium érzékenység közvetítésében csak a váz és szívizomzatban érvényesül. Simaizmokban ezt a szabályozó szerepet a miozinfej egyik könnyű lánca, a foszforilálható ún. P könnyű lánc veszi át. A simaizomban a miozin P könnyű láncok foszforilációjáért, defoszforilációjáért felelős kinázok, foszfatázok számos jelátviteli rendszer hatását közvetíteni képesek *(6-21. ábra)*. Végső soron ezek határozzák meg a simaizmok szervrendszerenként rendkívül heterogén és nagy alkalmazkodási képességet mutató kontrakciós relaxációs állapotát.

Az izomfehérjék és az izomműködés megismerésében korszakos jelentőségű volt *Szent-Györgyi Albert* és munkatársai, *Banga Ilona* és *Straub F. Brúnó* a harmincas évek végén, Szegeden folytatott munkássága.

Az érett harántcsíkolt izom felépítés. Szupramolekuláris struktúra.

A harántcsíkolt izmok kifejlett állapotukban köteges képződményeket alkotnak. Felépítő egységük az izomrostok, melyek lefutása, elrendeződése nagyrészt az anatómiai helyzettel, erőkifejtéssel, rövidülési képességgel függ össze.

A rostok tömegét nagyrészt a kontraktilis apparátust tartalmazó miofibrillumok képezik. Ezen kívül felismerhetők a szarkolemma alá szorult sejtmagok, a szarkotubuláris rendszer elemei, a mitokondriumok, glikogénszemcsék. Ezek mennyisége, eloszlása jól tükrözi az izomrost kontrakció sebességét, anyagcserejellegét és az aktuális tápláltsági állapotot is.

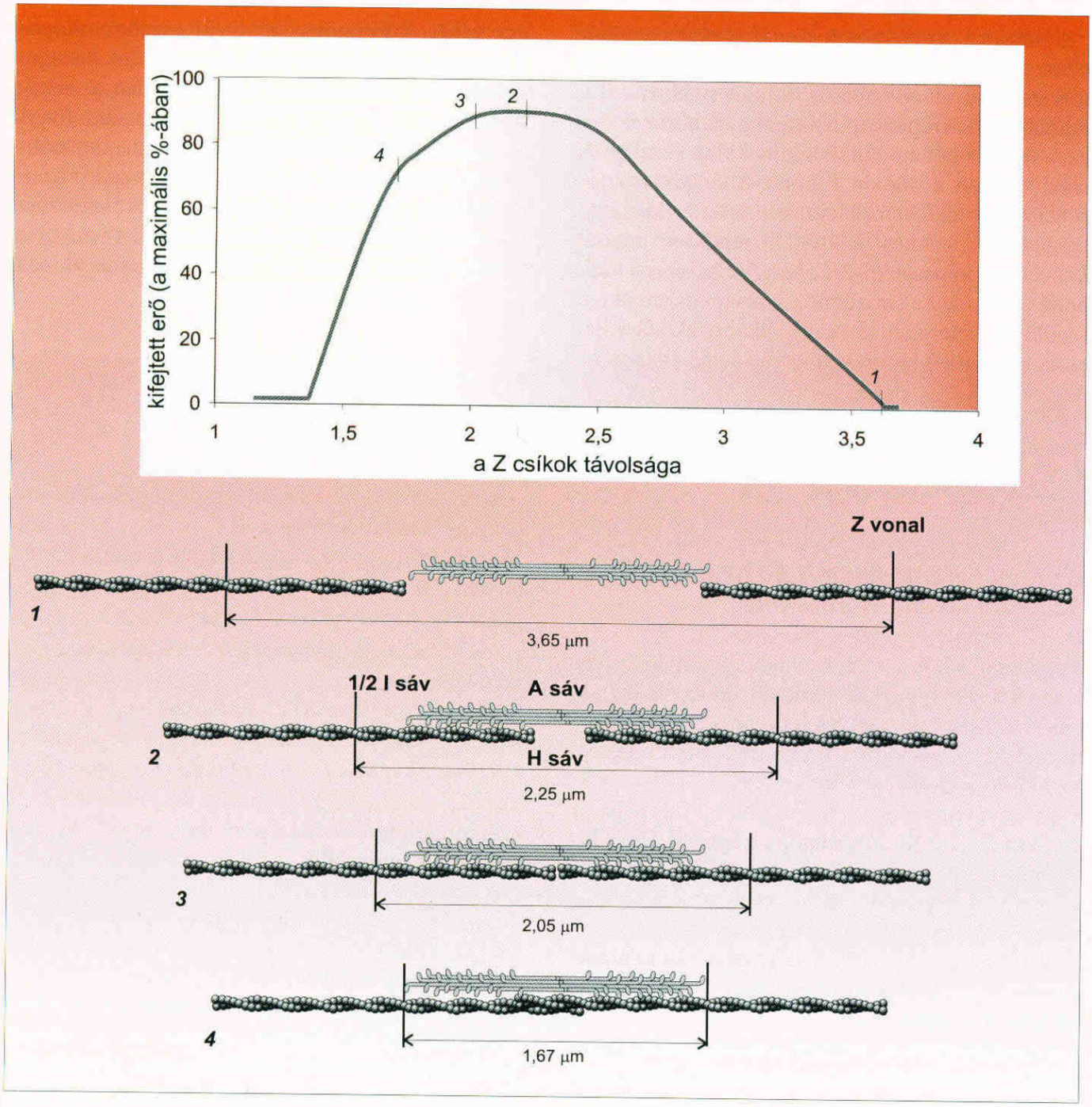
A miofibrillumok képezik a szinkronizált kontrakció megvalósulásának szupramolekuláris rendszerét. Világosan mutatják a harántcsíkolatot, amely a két keskeny elektrondenz Z vonal között, szarkomerenként az alábbi részleteket mutatja: csekély elektrondenzitású 1/2 izotrop I sáv, az erősebben elektrondenz anizotrop A sáv, melynek közepén a világosabban festődő H sáv található *(6-22. ábra)*. Nagy felbontású elektronmikroszkópos képeken felismerhető, hogy az A sávban az ún. vastag filamentumok helyezkednek el. Az I sáv két fele, a Z membránhoz kapcsolódó, két szomszédos szarkomerbe nyúló vékony filamentumrendszert tartalmazza. A vékony filamentumok benyúlnak a vastag filmentumok közé, és a H zóna határán érnek véget. Keresztmetszeti elektronmikroszkópos képen az I sávban a vékony filamentumok hexagonális szabályos rendszere, a H zónában a vastag filamentumok trigonális rendszere látszik. Az A sáv legsötétebb festődésű szakaszán a hexagonális és a trigonális rácspontok szabályos szuperpozíciója látható. Az ultrastruktúra tökéletes megőrzése mellett ebben a sávban felismerhetőek a vastag és vékony filamentumok között húzódó kereszthidak is.

A vázizom hossz–feszülés összefüggése, a csúszó filamentum (sliding filament) modell

A vázizomrostok feszülési, erőkifejtési képessége nagymértékben függ a szarkomerek hosszától. Maximális feszülés észlelhető ha a szarkomerek hossza 2,0–2,25 μm *(6-22. ábra)*. Ezt meghaladó szarkomerhossz mellett a feszülés képessége fokozatosan csökken, 3,5 μm felett aktív feszülésre már nem képes az izom (a kötőszöveti, támasztó struktúrák passzív feszülése természetesen ilyenkor jobban érvényesül). A szarkomerhosszat rövidítve, a feszülés képesség előbb enyhébb ütemben, majd kb. 1,6 μm alatt rohamosan csökken. 1,2 μm szarkomerhossz alatt az izom erőkifejtésre ugyancsak képtelenné válik.

A fenti megfigyelések arra utalnak, hogy az izom erőkifejtési, aktív feszülési képessége a vastag és vékony filamentumok között kialakuló kereszthidak számával arányos. A kereszthídalkotás képessége legnagyobb a vastag filamentum két vége felé elhelyezkedő ún. tüskés szakasz és a vékony filamentum maximális átfedése esetén. Nyújtás során ezen átfedő szakasz hossza csökken, majd 3,65 μm szarkomerhossz mellett a kétféle filamentumrendszer szétcsúszása következik, kereszthíd képzésre nem marad lehetőség. Ilyenkor elektronmikroszkóppal a H zóna kiterjedése látszik, az A sáv teljes hosszára.

Rövidített izomban a feszülésképességet fokozatosan csökkenti a két vékony filamentum összeütközése a szarkomer közepén (a H sáv eltűnése az elektronmikroszkópos képen). Tovább rövidítve az izmot a vékony filamentumok torlódása és a vastag filamentumok ütközése a Z struktúrákhoz meredekebben tovább rontja az erőkifejtés lehető-



6-22. ábra. Az izomhossz és feszülés összefüggése

ségeit. Ilyenkor az I sávok eltűnése lesz jellemző az elektronmikroszkópos képen. Végül a vékony filamentum végek ellenkező oldali Z vonalba ütközése az aktív feszülés lehetőségét végleg megszünteti.

Mindezen összefüggések gondos tanulmányozása alapján született meg az izomkontrakció máig legelfogadottabb és kísérletesen legjobban alátámasztott modellje, az ún csúszó filamentum (sliding filament) modell. Ennek lényege, hogy az izom rövidülése a vastag és a vékony filamentum rendszer egymáshoz viszonyított elcsúszásának következménye. A Z lemez, mint a citoszkeletális hálózat része lehorgonyozza a vékony filamentumokat. Kontrakciókor a vastag filamentumokkal kialakított kereszthidak, illetve ezek elmozdulása behúzza a vékony filamentum rendszert a vastag filamentumok közötti térbe, ami a citoszkeletális,

ín, kötőszöveti rostok révén makroszkóposan is észlelhető elmozdulást és/vagy erőkifejtést eredményez. Relaxációban a kereszthidak felszakadnak és a passzívan megfeszített váz struktúrák rugalmassága következtében a vastag és vékony filamentumok szétcsúsznak, az izom makroszkóposan is észlelhető mértékben megnyúlik.

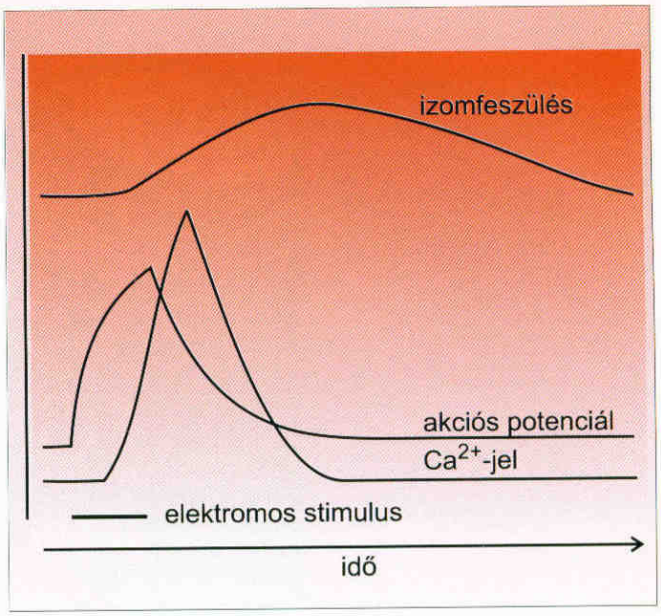
- A vázizmok maximális rövidülési képessége a sliding filament modellnek megfelelően kb. a nyugalmi hossz 1/3-a. A párhuzamos, hosszanti rostlefutású izmokban ez megegyezik az izom anatómiai hosszának 1/3-val. Olyan izmokban, ahol a rostok lefutása valamilyen szögben eltér az izom tengelyétől, a rövidülés mértéke a rostlefutással párhuzamos síkban 1/3, a teljes izomra nézve ez kisebb (a lefutási szög koszinusával megszorzott érték lehet). Ezen izmokban viszont az erőkifejtés mértéke nagyobb, mivel a ferde rostlefutás miatt, azonos izomtérfogatban sokkal több kereszthíd kialakulására nyílik lehetőség. A maximális erőkifejtés mértéke az izom funkcionális keresztmetszetével arányos, amely a rostlefutásra merőleges síkban mérhető keresztmetszetnek felel meg.

A kalciumszignál keletkezése és eliminációja izomban

A kalciumszignál és az izom szarkotubuláris rendszere

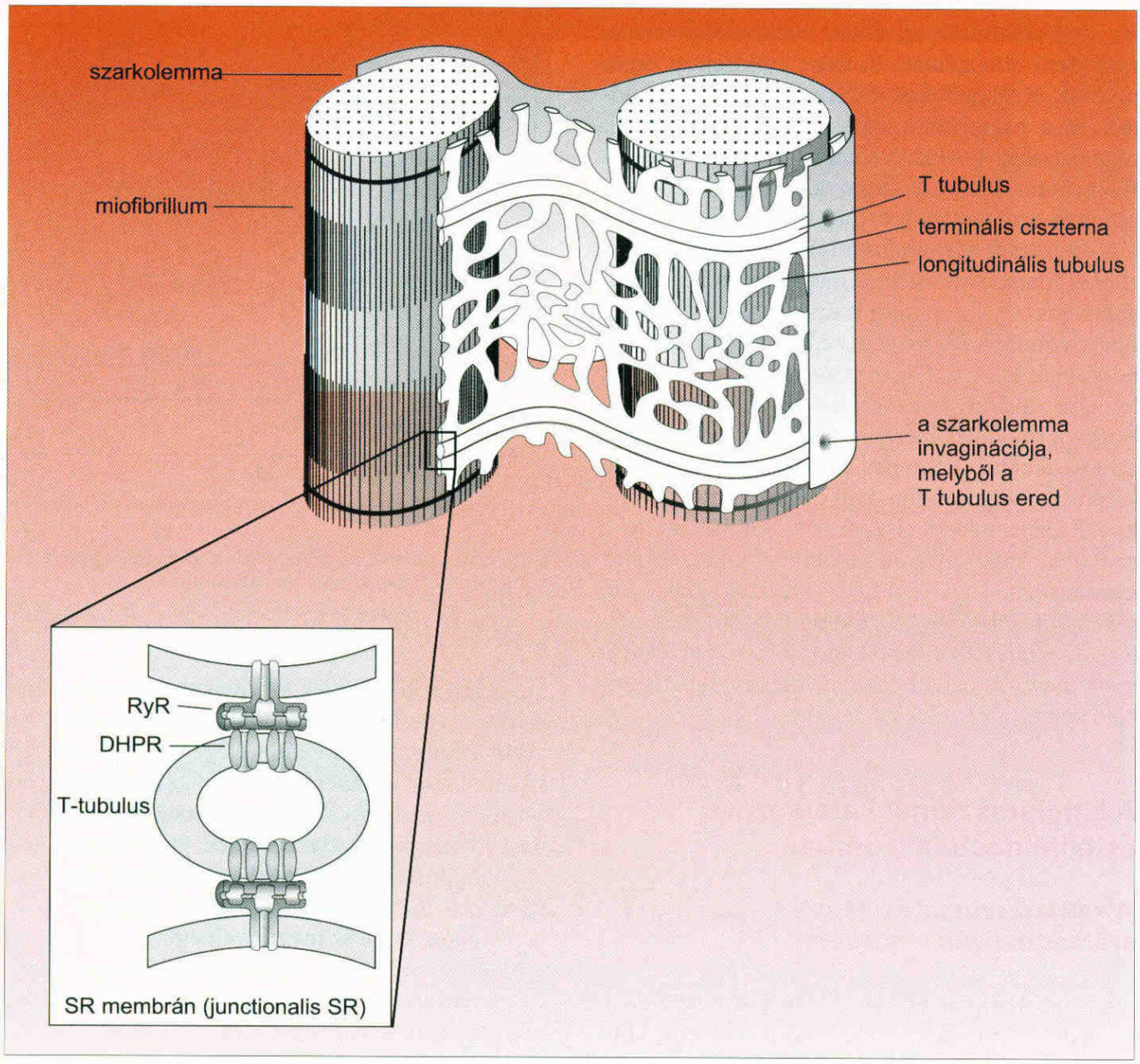
Az izomkontrakció és -relaxáció szabályozó szignálja a citoplazmatikus szabad kalcium koncentráció változása. Ha a küszöbingert meghaladó stimulus ér egy izmot, a tovahaladó akciós potenciál kialakulását 10–15 ms késéssel követi az intracelluláris kalcium szint emelkedése. A kalciumszignál időbeli dinamikája nagyban függ az izom kontrakciós sajátságaitól. Gyors kontrakciójú izomrostban rövid ideig tartó, nagyobb amplitúdójú szignál, lassú izomban kisebb amplitúdójú, lassúbb lefutású kalciumjel észlelhető. A kalciumszignál leszálló szárának kezdetén, a stimulus idejétől számítva kb. 50 ms elteltével kezdődik meg az izom feszülése. A feszülés növekedése folyamatosan tart a kalciumszignál leszálló szára ideje alatt *(6-23. ábra)*.

Fenti megfigyelések arra utalnak, hogy az akciós potenciált követően megemelkedett szabad kalcium szint, a kötőhelyek affinitási konstans szintjét elérve kapcsolódik a troponin C kötőhelyeihez. Ez vezet a kontrakció elindításához, egyúttal a szabad kalcium szint csökkenéséhez. Relaxálódó izomban a troponin C-ről leváló kalciumionok vagy azonnal más kompartmentekbe kerülnek, vagy átmenetileg kalcium pufferoló fehérjékhez kötődnek, így relaxációban újabb átmeneti szabad kalcium szint emelkedés nem lesz megfigyelhető.



6-23. ábra. Az akciós potenciál, a kalciumszignál és a kontrakció időbeli lefutása a vázizomban

A vázizomrostok és a szívizomsejtek igen fejlett és rendezett belső membrán hálózattal az ún. szarkotubuláris rendszerrel rendelkeznek. Ennek részei a felszíni membrán, a szarkolemma betüremkedésével kialakult transzverzális, T tubulus rendszer. Ennek lumene folyamatos teret képez az extracelluláris térrel, bár a diffúzió korlátozott volta miatt a T tubulusok lumenében átmenetileg az extracellulárisétól eltérő ionkoncentrációk is kialakulnak *(6-24. ábra)*. Az izomrostok endoplazmatikus retikulum hálózata szinte teljes egészében a kalciumraktározásra és -felszabadításra specializálódott szaroplazmatikus retikulummá (SR) alakult. Ennek morfológiai részei, a kontraktilis apparátussal párhuzamos csatornákat képező longitudinális tubulus rendszer, és a szarkomerek két szélén tágulatot alkotó terminális ciszternák. Működésbeli különbség a terminális ciszternák T tubulus felőli ún. junkcionális felszíne, valamint a szarkoplazma-



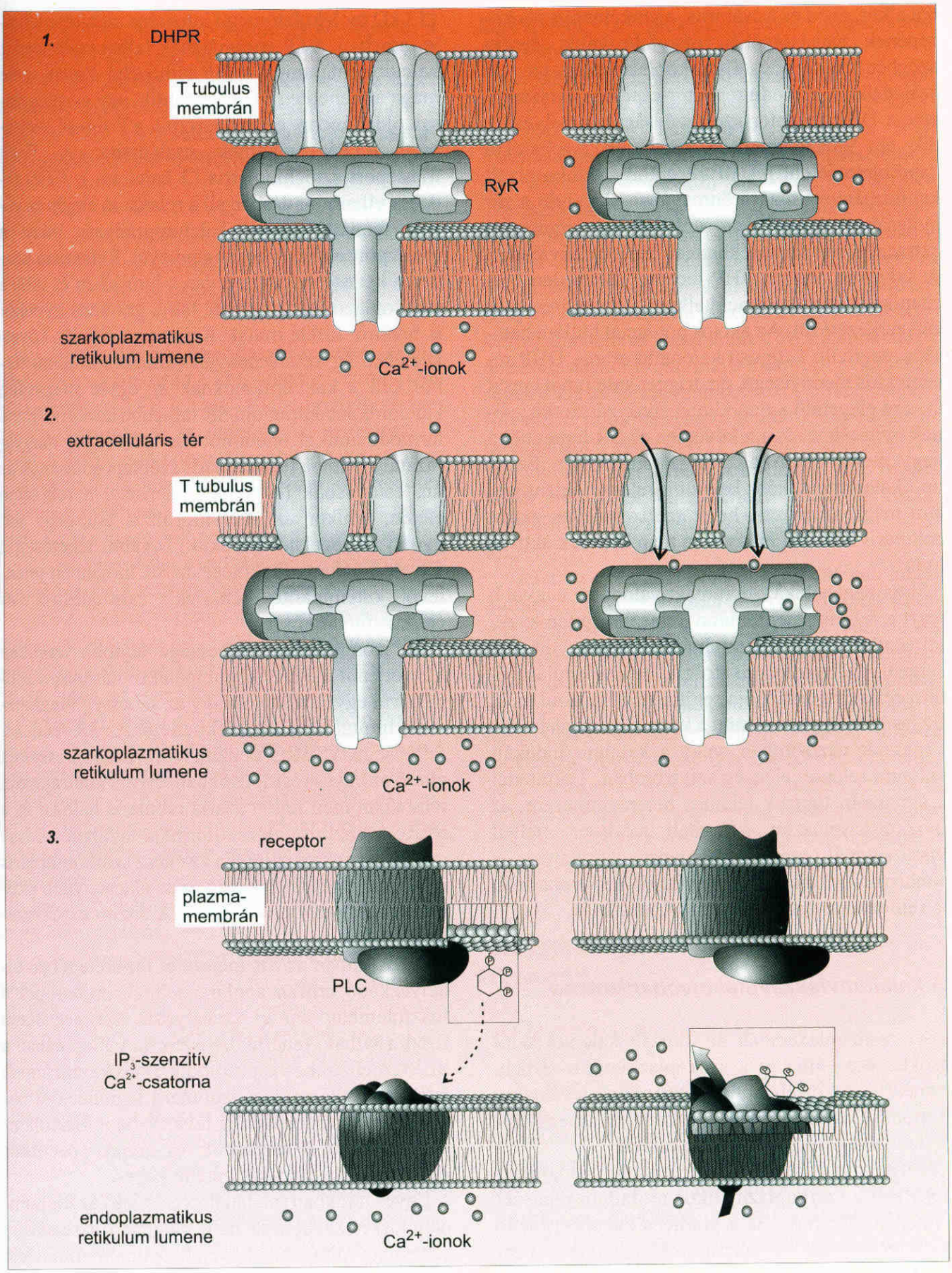
6-24. ábra. A szarkotubuláris rendszer felépítése vázizomban. *SR; szarkoplazmatikus retikulum; RyR, rianodinreceptor; DHPR, dihidropiridin-receptor*

tikus retikulum rendszer többi membrán területe között mutatható ki. Az előbbi a kalcium felszabadításért, az utóbbi a kalcium visszvételért felelős.

A kalciumfelszabadulás mechanizmusa

A kalciumfelszabadítás, a felszíni membránról a T tubuluson beterjedő akciós potenciál hatására indul. A T tubulus membránban tetrádokat alkotó L típusú kalciumcsatornák, más néven dihidropiridin- (DHP) receptorok szinkronizált elmozdulása, konformáció változása az SR membrán junkcionális felszínéből előemelkedő kalciumfelszabadító csatorna fehérjék, a rianodinreceptorok zárszerkezetét megnyitja és az SR lumenből a kalcium elektrokémiai gradiensének irányába a szarkoplazmatikus térbe, a kontraktilis fehérjékkel azonos kompartmentbe áramlik *(6-25. ábra)*.

A rianodinreceptor négy azonos, 450 kD molekulatömegű alegységből felépülő tetramer. Az SR lumen irányába a négy alegység egy közös csator-



6-25. ábra. Az excitációs-kontrakciós kapcsolás mechanizmusa a váz- (1), a szív- (2) és a simaizomban (3)

nát alkot, majd ez a csatorna, a junkcionális rés közepének magasságában négyfelé válik, derékszögben megtörik és a szarkoplazmatikus tér felé szájadzik. A rianodinreceptor-csatorna zárszerkezete a DHP-receptor szomszédságában helyezkedik el. Vázizomban ez közvetlen mechanikai kapcsolatot jelent, a DHP-receptorok szinkronizált konformációváltozása önmagában elegendő a zár nyitásához. A vázizomrostok így kalciummentes extracelluláris folyadékban is képesek aktiválódni. A szívizom típusú DHP-receptor közvetlen mechanikai kapcsolatot nem alkot a rianodinreceptor zárszerkezetével. Az akciós potenciál hullám hatására megnyíló L típusú kalciumcsatorna DHP receptor kis mennyiségű, ún. trigger kalciumot ereszt át, ami elegendő a rianodinreceptor zárszerkezetének nyitásához, és ezt követően az SR lumenből a nagy mennyiségű kalcium kiáramlásához. Ez az ún. kalciumindukált kalcium release jelensége, ami megmagyarázza, hogy szívizomsejtek extracelluláris kalcium hiányában nem képesek aktiválódni.

Simaizomsejtek kalciumaktiválódása nagyobb részt a felszíni membránon keresztül történik. Az intracelluláris kalciumraktárak elérése kémiai szignál, az inozitol-triszfoszfát felszabadulása és intracelluláris diffúziója segítségével valósul meg. Ez lassúbb folyamat, mint a közvetlen mechanikus kapcsolat vázizomban, vagy a kalcium indukált kalcium release jelenség szívizomban. Tekintettel a simaizom típusok jelentős heterogenitására, az inozitol-triszfoszfát jelátviteli rendszer mellett más szignál utak is szerepet játszhatnak a símaizmok excitációs kontrakciós kapcsolásának létrejöttében (lásd még az 5.1 fejezetben).

A kalciumvisszavétel mechanizmusa

Az izom relaxációját az ionizált kalcium szint csökkenése váltja ki a szakoplazmatikus térben. Ennek következtében a kalcium ionok leválnak a troponin C kötőhelyeiről, és a troponin I meggátolja az újabb kereszthidak kialakulását.

A troponin C-ről levált kalcium eliminációja elsősorban a szarkoplazmatikus retikulum rendszer lumenébe történik. Ez a gradiens ellenében zajló iontranszport az SR kalcium ATPáz (SERCA) enzim működésének eredménye. A SERCA enzim, 113 kD molekulatömegű integráns membránfehérje, amely 1 ATP energiájának felhasználásával 2 kalciumiont pumpál az SR lumenébe. Ennek során maga átmenetileg foszforilálódik, egy aszparaginsav oldalláncon, emiatt soroljuk a P-típusú transzport ATPáz enzimek családjába. A fixált transzport sztöchiometria (2 kalcium–1 ATP) érdekes ellentmondásban áll a relaxáció elején és végén fennálló eltérő kalciumgradiens miatt a transzport eltérő energiaigényével. Relaxáció kezdetén kevesebb kalcium van a lumenben és több a szarkoplazmatikus térben, bár a grádiens ilyenkor is belülről kifelé mutat. A pumpaműködés következtében egyre alacsonyabb kalciumtartalmú térből kell a kalciumionoknak az egyre magasabb kalciumkoncentrációjú SR lumenbe kerülnie. Ezen termodinamikai ellentmondás lehetséges magyarázatai a pumpa funkcionális szétkapcsolásának az ún. csúszásnak (slippage) jelensége a relaxáció elején, amikor az ATP-hidrolízis energiája nagyobb részben hővé alakul. További lehetőség a felvett kalcium megkötése az SR lumenben jelenlévő kalciumkötő fehérjék, calsequestrin és calreticulin által.

Az izomrelaxáció sebessége legtöbb izomban közvetlenül a SERCA pumpa aktivitásának változásaival együtt változik, így az sebesség meghatározó, limitáló lépésnek tekinthető. Az SR rendszer fejlettsége, a SERCA enzim izoforma expressziója eltérő az egyes rosttípusokban. Gyors kontrakciójú izmokban igen fejlett szarkotubuláris hálózat és a SERCA enzim gyors izoformája található. Lassú izmokban és szívizomban az egész szarkotubuláris rendszer kevésbé kiterjedt, és az alacsonyabb aktivitású lassú/szív típusú SERCA enzim expresszálódik.

Szívizomban az SR membrán lipidrétegében elhelyezkedő erősen apoláris jellegű proteolipid a foszfolamban fejt ki szabályozó szerepet. Ezen foszforilálható fehérje defoszforilált állapotában a SERCA enzimhez kapcsolódik és csökkenti annak pumpaaktivitását. Béta-adrenerg stimulációra bekövetkező foszforilációja leválasztja a foszfolambánt a SERCA enzimről, és annak specifikus aktivitását kb. 50%-kal emelni képes.

Egyes fajokban (pl. halak, kétéltűek) az SR pumparendszer-kapacitása nem elegendő a relaxáció sebessége által megkövetelt kalciumelimináció végrehajátáshoz. Ezen fajok izmában egy nagyobb

mennyiségben jelen lévő kalciumkötő fehérje, a parvalbumin köti meg az átmenetileg a troponin C-ről leváló kalciumionokat, lehetővé téve ezzel az izom relaxációját, majd a kalciumionok a SERCA enzim kapacitásának megfelelő sebességgel kerülnek tovább az SR lumenébe.

Az izomkontrakció energiaszükségletének biztosítása

Az izomműködés energiaszükségletét döntő mértékben a kereszthíd ciklus során az aktomiozin által elbontott ATP jelenti. ATP-t igénylő endergonikus folyamatok az ionpumpák, elsősorban a SERCA enzim működése. Kisebb mértékben energiafelhasználást jelentenek az izom intermedier anyagcsereútjainak aktivációs lépései, valamint az anabolikus folyamatok endoterm szakaszai is.

Az ATP-szükséglet biztosításának mechanizmusa nagyban függ az izom anyagcseretípusától. Szív és oxidatív típusú vázizomban a zsírsav- és ketontest-oxidáció, valamint kisebb mértékben az aerob glikolízis játszik szerepet. Ez utóbbi a vérpályából felvett glukózt hasznosítja, mivel az oxidatív anyagcseréjű izmok glikogénraktárral nem rendelkeznek. Az oxidatív anyagcsereutak fontosságára utal ezen izmokban a mitokondriumok nagy száma és térfogata. Az oxidatív energiatermelés oxigénszükségletét a gazdag kapillarizáció mellett a magas mioglobintartalom biztosítja, ami egyúttal az izom vörös színéért is felelős. Kiemelkedően magas a merülő életmódot folytató emlősök izmainak mioglobin tartalma.

A glikolitikus anyagcseréjű izmok energiaforrása az anaerob glikolízis. Ezt nagyrészt a rostok saját glikogénraktára látja el szubsztráttal. Ennek kimerülése után a glukózfelvétel sebessége közvetlenül a vérből nem elegendő a gyors kontrakciótípus energia szükségletének maradéktalan biztosítására. Ez magyarázza ezen izomrostok fáradékonyságát. A glukózfelvételt az inzulindependens GLUT 4 transzporter katalizálja. Az anaerob glikolízis végterméke a tejsav, ami felhalmozódás esetén lokálisan illetve az izomból kikerülve generalizáltan metabolikus acidosist okoz, és hozzájárul az izomfáradás kialakulásához. Az izomból kikerülő tejsav a májban piruváton keresztül bekapcsolódik a glukoneogenezis folyamatába (Cori-kör).

Az izom energiaraktározó kapacitását jelentősen növelni képes a kreatin-foszfát képzése. A kreatin-kináz enzim hatására a felesleges ATP foszfátcsoportját kreatinmolekulára transzferálja, így ADP és foszfokreatin keletkezik, ami szintén makroerg kötést tartalmaz. Izommunka végzésekor, amint az ATP-szint lecsökken, a kreatin-foszfát leadja a foszfátcsoportot az ADP-nek, és visszaalakul kreatinná. A folyamatot katalizáló enzim, szív és vázizomra specifikus izoformái értékes diagnosztikus paraméterek izomkárosodások detektálásában (miokardiális infarktus, izombetegségek). Hasonló energiaraktározó, újrahasznosító folyamat a miokináz vagy adenilát-kináz enzim által katalizát 2 ADP = ATP + AMP reakció, ami a kontrakció során nem hasznosítható ADP-molekulák felét ismét felhasználható állapotba hozza. Ezen folyamatok részletei a 2. fejezetben olvashatók.

Az izomszövet anyagcsere-folyamatainak intenzitása munkavégzés során eltérő mértékben változik. 12 másodpercig tartó, maximális izommunka nyomán az oxigénfogyasztás 4,2-szeres emelkedést mutat. A zsírsavfelhasználás aránya a munkavégzés előtti 69%-ról 18 %-ra csökken, míg a szénhidrát-felhasználás aránya 31%-ról 82%-ra emelkedik. A glikogenolízis és glikolízis intenzitása 35-szörös, a citrát-ciklus intenzitása 3,2-szeres emelkedést mutat. Ezzel összhangban a tejsavképzés intenzitása a nyugalmi állapotban megfigyelhető szint 14-szeresére emelkedik.

Az izomszövet alkalmazkodási reakciói

Az izomfáradás, izomláz

Az izomfáradás komplex folyamat eredménye. Fáradásnak nevezzük azt az állapotot amikor az izomkontrakció ereje és/vagy sebessége nem tud megfelelni a vele szemben támasztott elvárásoknak. Elméletileg a fáradás létrejöhet az excitációs kontrakciós kapcsolat, a kontraktilis rendszer, a metabolikus energiabiztosítás, illetve a kalciumvisszavétel szintjén. A fáradó izomban megfigyelhető a glikogénraktárak kiürülése, a lokális pro-

ton-, tejsav- és anorganikus foszfát koncentráció emelkedése, káliumionok kiáramlása, a metabolikus bomlástermékek felhalmozódása okozta hiperozmózis miatti vízbeáramlás. A kreatin-foszfát szintje lecsökken, gyakorlatilag eltűnik a fáradt izomból, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az ATP-szint jelentős fáradásban sem számottevően alacsonyabb.

Egészséges izomban a motoros véglemezben a transzmitter- (acetilkolin) felszabadulás csökkenése nem játszik szerepet a fáradás kialakulásában. A metabolikus duzzadás az excitációs kontrakciós kapcsolat elemeinek összerendezett működését zavarja meg. A káliumvesztés, acidosis, anorganikus foszfát felhalmozódás együttesen eredményezik a kereszthídműködés, illetve a SERCA enzim működésének csökkenését. Szívelégtelenségben először a relaxáció sebessége csökken, jelezve a kalcium-visszavételi folyamatok nagyobb érzékenységét és korai érintettségét a fáradási folyamatban.

Az izomláz nem azonos az izom fáradásával. Hátterében durva morfológiai károsodások, filamentumok, membránelemek disztorziója, szétesése, esetleg teljes rostok pusztulása áll. Izomláz kialakulását elsősorban ún. excentrikus izommunkában figyelhetjük meg, amikor túlnyújtott izom végez erőkifejtést. Hegyről lefelé jövet a quadriceps izomban sokkal erősebb izomláz alakul ki, mint felfelé mászás során. Egyik lábunkkal ismételten fel, másikkal lefelé lépve egy emelvényről, a pozitív munkát (felfelé lépést) végző láb izmaiban a fáradás biokémiai paraméterei sokkal kifejezettebben mérhetőek, míg a negatív munkát (lefelé lépést) végző láb izmaiban sokkal súlyosabb izomlázat kapunk, amely a fáradás biokémiai változásainak megszünte után is, akár napokig fennmarad.

Az izom adaptációja, plaszticitása

Az izom sajátságai számos tényező hatására módosulhatnak, átalakulhatnak. Fokozott terhelés, rendszeres edzés hatására elsősorban az anyagcserejelleg megváltozása figyelhető meg. A gyors glikolitikus rostok nagyobb fáradástűréssel rendelkező gyors oxidatív-glikolitikus rostokká alakulnak. Lassú oxidatív rostok megfelelő stratégiájú edzése az oxidatív anyagcsere kapacitás, mioglobin-tartalom növekedését eredményezi, ezáltal az oxigénadósság tűrőképesség is javul.

A kontrakciós jelleg megváltozása normál, természetes edzési protokollok hatására nemigen következik be. Az izom beidegzési típusától eltérő frekvenciával az izmokat tartósan ingerelve, kereszt innerváció vagy elektromos impulzusok segítségével, a lassú fehérje izoformák (miozin, troponin komplex, SERCA stb.) gyors típusúra cserélhetők, illetve fordítva a gyors izoformák lassú típusra válthatók. Ezek az átalakulások, hosszú, akár több hetes ingerlést igényelnek. Génexpresszió-változások, miogenikus faktorok, idegi és mechanikus tényezők együttesen játszanak szerepet létrejöttében. Pajzsmirigyhormok hatására szintén a gyors izoformák expressziója válik erőteljesebbé.

Az izomplaszticitás, illetve -transzformáció gyakorlati orvosi felhasználása a kardiomioplasztika műtét, amikor a szívizom elégtelenségének korrigálására a mellüregbe behúzott m. latissimus dorsiból készítenek egy második izomburkot a szív körül. Ez megfelelő frekvenciával ingerelve a pumpafunkciót javítja. A latissimus dorsi rostjainak folyamatos szívfrekvenciájú működtetése a fáradságtűrés fokozása nélkül nem lehetséges. Ezért a kardiomioplasztika műtéte előtt hetekig tartó krónikus alacsony frekvenciájú ingerléssel az izmot lassú oxidatív típusúvá kell transzformálni. Hasonló előkezelés után a m. gracilis incontinens betegek állapotának javítására a sphincter ani megerősítésére használható.

Az izomszövet citoszkeletális vázrendszere

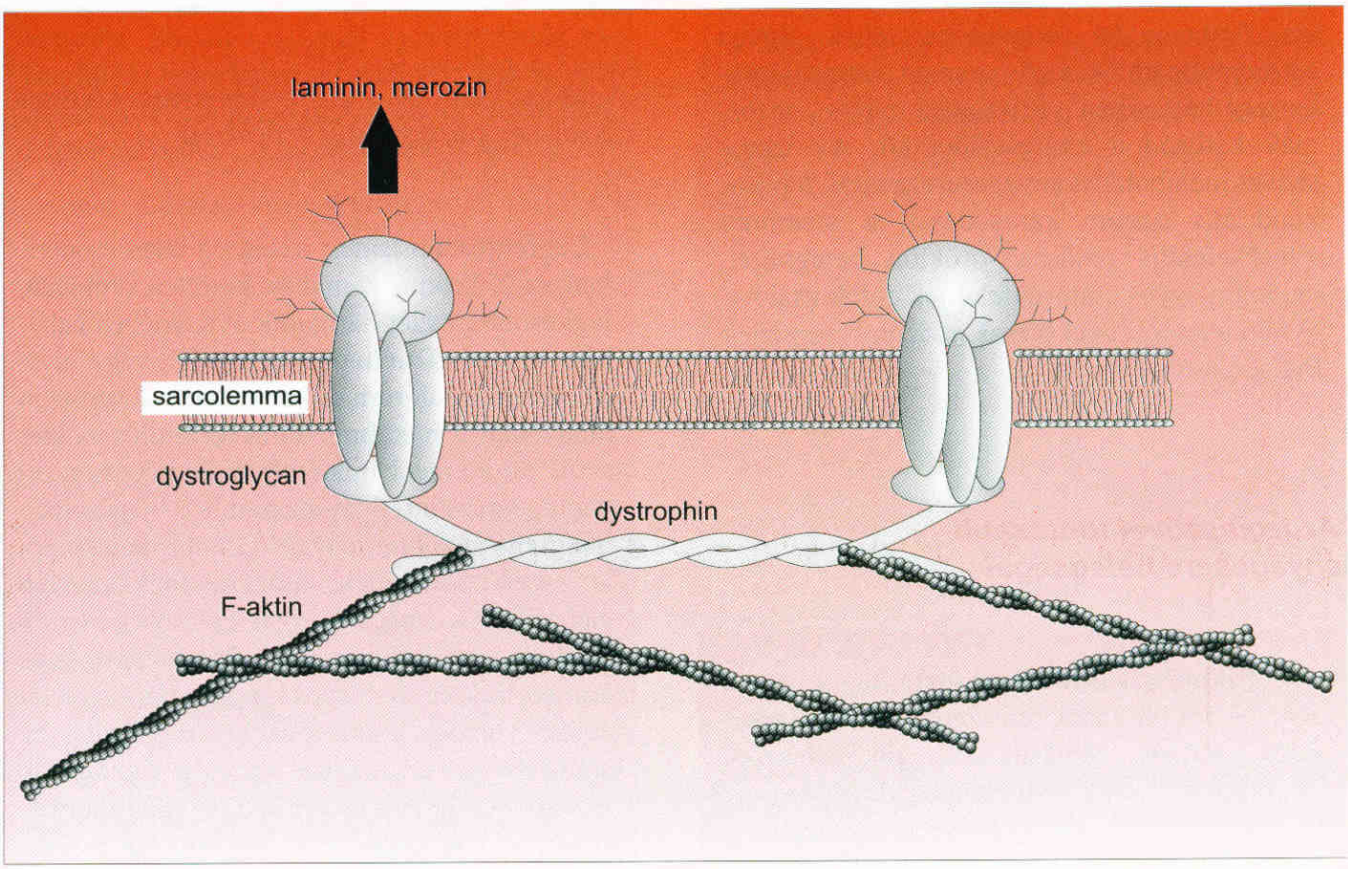
Az aktív kontrakció erőátvitelét, valamint a jelentős mértékű mechanikai terheléssel szembeni ellenálló képességet, a rendezett miofibrilláris és szarkotubuláris struktúrák integritásának megőrzését fejlett citoszkeletális rendszer biztosítja az izomrostokban. Ennek részei a Z vonal és a

miofilamentumok vázrendszere, illetve a membrán citoszkeletális rendszer elemei.

A Z vonal alapvázát a 100 kD tömegű monomerekből felépülő alfa-aktinin-hálózat alkotja. Ebben az alapvázban rögzülnek a vékony filamentumok, részben az F aktin részben az ehhez kapcsolódó citoszkeletális fehérje, a nebulin révén. A filamentum rendszer másik fontos citoszkeletális eleme a titin. A jelenleg ismert legnagyobb molekulatömegű fehérje (2,5 megaD) a Z vonal és a vastag filemtumok között helyezkedik el. Merev része hozzáilleszkedik a vastag filamentumokhoz, és a szarkomer közepéig kíséri azokat. A molekula másik része szabadon húzódik a vastag filamentum folytatásaként a vékony filamentumok közötti térben, és a Z vonal állományában rögzül. Periodikusan ismétlődő, rugószerűen megnyúlásra, illetve összetekeredésre képes domének követik ebben a szakaszban egymást. A titin funkciója az izom túlnyújtása után a vastag és vékony filamentumok eredeti pozíciójának helyreállítása, illetve végső állapotban a nyújtás korlátozása.

Az intermedier filamentumok közül a dezmin szív- és vázizmokban, a vimentin simaizmokban fordul elő. Simaizmok a vimentin mellett dezmint is tartalmaznak. A dezmin filamentumok annyira specifikusak a váz- és szívizomsejtekre, hogy expressziójuk megjelenése a mezenchimális ősejtek izom irányú elkötelezetté válásának korai markerének tekinthető. A titin, nebulin, illetve az intermedier filamentumok hálózata fontos irányító, szabályozó szerepet játszik az izom morfogenezise, a szarkomerek, filementumok, fibrillumok strukturális rendeződése során.

A membrán citoszkeletális rendszer feladata az egyes integráns membránfehérjék, -receptorok, -csatornák laterális diffúziójának szabályozása, a belső citoszkeletonnal, illetve az extracelluláris mátrix komponenseivel való mechanikai kapcsolattartás, a jelátviteli rendszerek működésének támogatása. A szarkolemma citoszkeletális kapcsolatai biztosítják, hogy kontrakció, rövidülés során az izomrostok felszínéről nem válik le a membrán. Kiemelten fontos terület a motoros véglemez,



6-26. ábra. A disztrofin és a hozzá kapcsolódó glikoprotein-komplex elhelyezkedése az izomban

junkcionális SR struktúrák védelme az aktív izommunka, illetve passzív terhelések során bekövetkező extrém mértékű mechanikai behatásoktól. Ezen rendszer kiemelkedően fontos tagja a szarkolemma alatt hálózatot alkotó disztrofin, amely a citoszkeletális aktin hálózat és egy a felszíni membránba épülő glikoprotein-komplex között létesít kapcsolatot *(6-26. ábra)*. Hasonló szerkezetű és funkciójú fehérje az utrophin, amely elsősorban a T tubulus SR junkció, valamint a mioneurális junkció területére lokalizálódik. Szerkezetük erősen hasonlít a más sejttípusokban előforduló membrán citoszkeletális fehérje, a spektrin szerkezetéhez.

Egyes fontosabb izombetegségek biokémiai alapjai

A miozin, aktin, tropomiozin, troponin komplex fehérjéinek defektusa ritkán fordul elő. Ennek magyarázata elsősorban ezen fehérjék igen elterjedt előfordulása és nélkülözhetetlen funkcionális jelentősége lehet. Egyes cardiomyopathiák, a szívizomzat pumpaelégtelensége hátterében a szívtípusú miozin izoformák károsodott expressziója áll. Az izomszövet metabolikus anyagcserezavarai, a mitokondriális genom károsodásai, a membrán citoszkeletális rendszer öröklött betegségei, valamint egyes csatornafehérjék defektusai nagyobb jelentőséggel bírnak az izombetegségek kialakulásában.

Az izomszövet fontosabb anyagcsere-betegségei

A **glikogén raktározási betegségek** közül számos érintheti az izom szénhidrát-anyagcseréjét. Közös vonásuk a glikogenolízis, glikolízis valamelyik lépésének defektusa, az ezzel járó fáradékonyság, terhelésre bekövetkező görcsök és a glikogén raktárak feltöltött állapota. Egyes típusokban a szívizom is érintett. Tekintve, hogy a miokardium energiaszükségletének biztosítása döntően lipidekből és ketontestekből történik a szívizom károsodása másodlagos metabolikus vagy jelátviteli hatások következménye lehet glycogenosisokban.

A mitokondriális genom károsodásából eredő betegségek jelentős és gyakori manifesztációs helye az izomszövet. Ezeket mitokondriális myopathiáknak is nevezik. A mitokondriális genom sérülékenységét a jelentős oxidáló szabadgyök-képzés magyarázza, a kialakuló defektusok fennmaradását a repair mechanizmusok hiánya okozza.

Minden formában általában az izom energetikai egyensúlyának különböző mértékű zavara jellemző, amit morfológiai károsodások kísérnek. A súlyosság mértékét befolyásolja, hogy a nukleáris genom érintettsége azonos vagy hasonló fehérjék, enzimek kompenzáló expresszióját megengedi-e.

A citoszkeleton, membrán–citoszkeleton rendszer betegségei izomban

Legfontosabb ismert betegség ezen csoportban az X kromoszómához kötötten öröklődő, legkésőbb az élet harmadik évtizedében halálhoz vezető **Duchenne-betegség** vagy dystrophia musculorum progressiva. A dystrophin hiányában a membrán–citoszkeleton rendszer sérül, ami a mechanikai ellenálló képesség zavarán, valamint a dystrophinhoz kapcsolódó integráns membránfehérje–glikoprotein komplex szerveződésének, működésének zavarán alapszik. Az ismétlődő rostelhalások kimerítik a satellitasejtek regenerációs kapacitását, és az érintett fiúk kb. 6–8 éves korukra járásképtelenekké válnak, majd további tíz-tizenkét év után, elsősorban a szívizom és a légzőizmok károsodása miatt halnak meg. Enyhébb formája a dystrophinopathiáknak a Becker-dystrophia, ahol a leolvasási keret megőrzöttsége

miatt rövidebb, de még bizonyos mértékben funkcióképes distrophinmolekulák szintetizálódnak az izomban. Egyes dystrophiák hátterében nem a dystrophin, hanem a dystrophin asszociált glikoprotein komplex defektusa áll.

Ioncsatorna-betegségek az izomszövetben

Ezen betegségcsoport legfontosabb, gyakori előfordulású képviselője a **malignus hyperthermia**, ami az SR kalciumrelease csatorna, a rianodinreceptor fehérje pontmutációjára vezethető vissza. Emberben és sertésekben is megfigyelték. Előbbiben inhalációs anesztetikumok hatására, utóbbiakban a szállítás, vágás előtti stresszhatásokra váltódik ki a roham. Ennek lényege hogy a mutáns rianodinreceptor-csatorna nyitott állapotának esélye jelentősen nagyobb, mint a normál fehérje esetében. Emiatt malignus hyperthermiás rohamban az izom kalciummal árasztódik el, ami hiperkontrakcióhoz, a metabolikus folyamatok felgyorsulásához, a tartalék tápanyagok gyors felégetéséhez, a hőmérséklet általános emelkedéséhez vezet. Ez súlyos életveszélyes komplikációként jelentkezhet műtéti altatás során, illetve sertésekben a hús minőségét károsítva, jelentős gazdasági veszteségeket okoz.

Az izommembránok érdekes tárházát képezik más ioncsatornák genetikai defektusainak is. Ezek gyakran a nyugalmi potenciál csökkenését fokozott ingerlékenységet, más esetekben a relaxáció elhúzódását eredményezik.

A myotoniával járó állapotok elhúzódó izomrelaxációt okoznak. Hátterükben a kloridvagy a nátriumcsatornák defektusa áll. A hyper-, illetve hypokalaemiás periodikus paralysises állapotok oka a nátriumcsatornák defektusa. Ezen betegségek feltűnően gyakran figyelhetőek meg teljesítménysportokra tenyésztett állatokon (versenylovak, harci kutyák stb). Ennek oka az, hogy a megbomlott ionegyensúly miatt az izom folyamatos kismértékű ingerlésnek van kitéve nyugalomban is, és erre munka hipertrofiával válaszol.

A dihidropiridin-receptor veleszületett hiánya a muscularis disgenesis. Ilyenkor az izomdifferenciálódás az embrionális fejlődés során a korai miotubulus állapotban elakad. Az élettel összeegyeztethetetlen állapotot eredményez.

Az ábrák elkészítésében nyújtott segítségért a szerző köszönetet mond Dr. Rácz Gábornak.

A kötőszövet és a hám struktúrfehérjéi

6.3.

Machovich Raymund

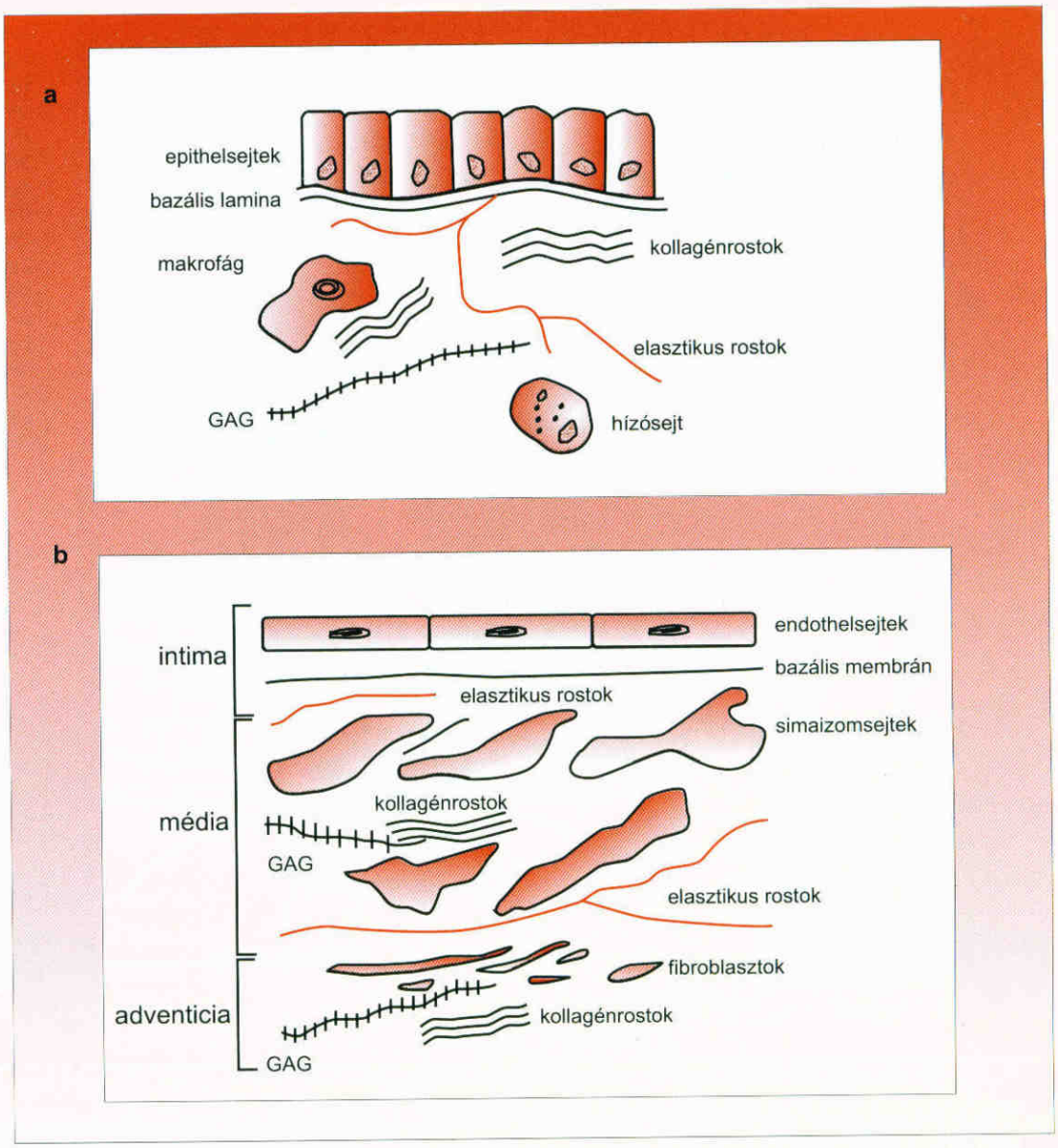
A kötőszövet olyan molekuláris és celluláris elemekből felépülő szerkezet, amely biztosítja a különböző sejtféleségek szöveti struktúrákhoz történő kapcsolódását, illetve a sejtek migrációját és azok egymással történő kölcsönhatásainak kialakítását. A sejtek között makromolekulákból felépülő hálózatos szerkezet található, amelyet **extracelluláris mátrixnak** nevezünk. Az utóbbi legfőbb alkotói a különböző típusú **kollagének**, amelyek kollagénrostokat hoznak létre, az **elasztin**, amely rugalmas rostokat képez és a **proteoglikánok**, illetve a glukózaminoglikánok (GAG), melyek a mátrix „alapanyagát" alkotják. Az extracelluláris mátrix illusztrálására két példát mutatunk be *(6-27. ábra)*.

Emlősökben a kötőszövet elemeit alkotó fehérjék a szervezet összfehérje-tartalmának több mint 25%-át teszik ki. Ezek elsősorban **fibrózus fehérjék**, vizes közegben nem vagy csak rosszul oldódnak. Feladatuk különböző, többek között a mechanikai funkciókat ellátó szerkezetek kialakítása. Legfőbb előfordulási helyük a bőr, csont, fogak, ízületi porcok és szalagok, érfalak és általában a sejtek közötti szövetek. A kollagének, az elasztin és a proteoglikánok mellett az extracelluláris mátrix legjellemzőbb képviselői még a **keratinok** és kisebb mennyiségben a **fibronektin** és **a laminin**.

Ezeken kívül még számos kötőszöveti fehérjefélеség fordul elő különböző specializálódott funkcióval, de ezek tárgyalása meghaladja kereteinket. Ugyancsak nem kerülnek megbeszélésre egyéb, bár biokémiai szempontból érdekes, de az emberi szervezet kialakításában szerepet nem játszó molekulák (pl. a selymet alkotó fibrózus fehérje, a fibroin).

Kollagének

A kollagének **tropokollagén alegységekből** épülnek fel, amelyekben három, egyenként kb. 1000 aminosavat tartalmazó lánc található. A három, egyenként balmenetes helikális polipeptidlánc együttesen egy jobbmenetes szuperhélixet alkot *(6-28. ábra)*. A **helikális szerkezet** nem α-hélix. A tropokollagén rúd alakú szerkezetének hossza kb. 300 nm, átmérője pedig 1,5 nm. A hélix egy menete 3 aminosavat tartalmaz. A három lánc hidrogénhidakkal kapcsolódik egymáshoz: a H-donor a peptidkötést alkotó Gly –NH csoportja, az akceptor pedig egy másik peptidkötés, gyakran a Pro –C=O csoportja. A láncokat alkotó aminosavak összetételétől függően közel 14 féle kollagént lehet megkülönböztetni. Általánosságban jellemző a nagy **Gly-** (39%) és **Pro-** (25%) tartalmuk. A fehérjeszintézishez felhasznált aminosavakon kívül **4-hidroxiprolin** és **5-hidroxilizin** fordul elő bennük. Jellemző még, hogy a tropokollagénláncokon belül és a láncok között is kovalens **keresztkötések** jöhetnek létre, bár a kollagének ciszteint nem tartalmaznak. Szénhidráttartalmuk (glukóz–galaktóz diszacharidegységek) változatos; a fibrilláris szerkezetekben (pl. ízületi szalagok) általában kevés, míg a lapszerű kollagénszerkezetekben (pl. cornea) bőséges.



6-27. ábra. Az epithelsejtek (a) és az endothelsejtek (b) környezetét képező kötőszövet sematikus képe. *Az „alapanyagot" a GAG (glukózaminoglikánok és proteoglikánok), a kollagének és az elasztikus rostok képezik*

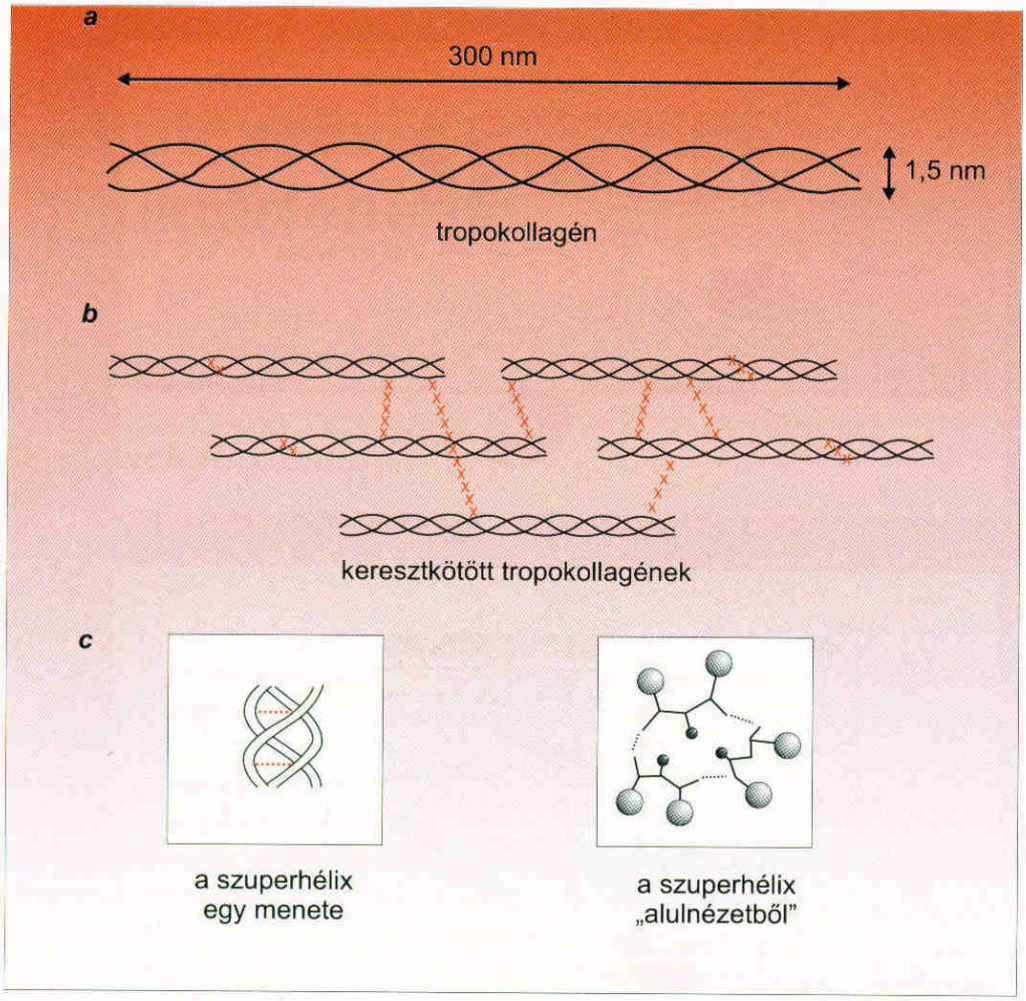
A kollagének nagyfokú **szakítószilárdságot** mutatnak: az 1 mm átmérőjű kollagénszál elszakításához több, mint 10 kg-os terhelés szükséges.

A kollagének fehérjeszerkezete több szempontból is szokatlan.

❶ A kollagénben szabályosan ismétlődő struktúrák jönnek létre, mert majdnem minden harmadik pozícióban **Gly** található (a globuláris fehérjékben ilyen jellegű szabályosság nincs). Mivel a glicin oldallánca kis helyet foglal el a térben, így elfér a szuperhélixen belül, ezáltal nagyobb lehetőséget teremt a különböző polipeptidláncok egymáshoz közeledéséhez (6-28c ábra).

A Gly jelentőségére utal, hogy pl. egy glicin hiánya (pontmutáció során a DNS-ben egy G → T csere történik és így a Gly^{988} helyett Cys keletkezik) már elégséges a hélix részleges felbomlásához, ami súlyos kórképben (osteogenesis imperfecta) nyilvánul meg.

❷ A kollagénben kétféle módosult aminosav is található: a **hidroxilizin** (Hyl) és a **hidroxiprolin** (Hyp). Míg a hidroxilizin elsősorban szénhidrát oldalláncok kialakításában, a hidroxiprolin a molekula stabilitásában, illetve a hármas hélix kialakításában játszik szerepet (ez utóbbi hiá-



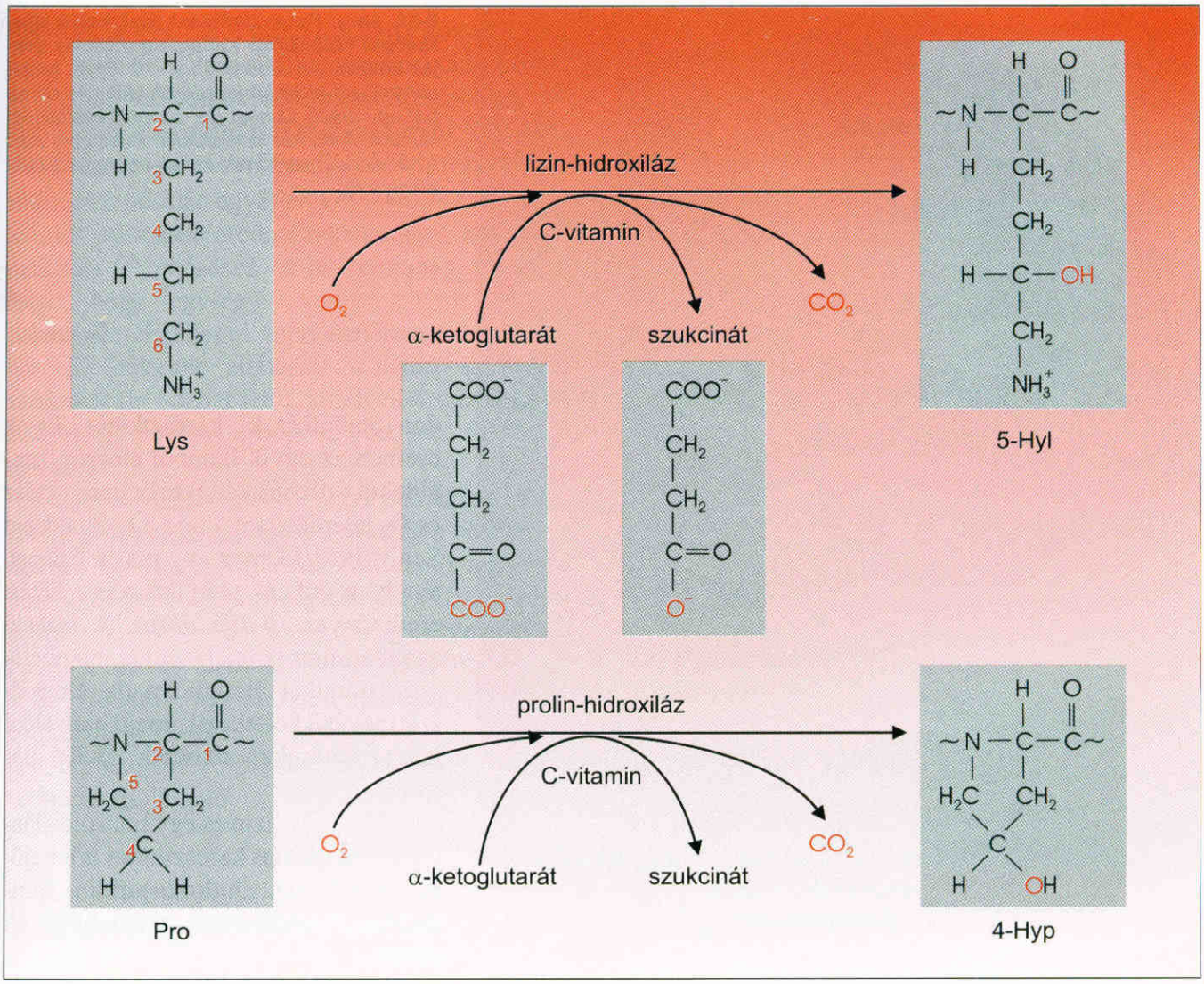
6-28. ábra. A tropokollagén sematikus szerkezete. *A három polipeptidláncból kialakított szuperhélix (a). Több szuperhélix között keresztkötések jöhetnek létre (b). A tropokollagénmolekulák összekapcsolódása mikrofibrillumokat hoz létre. A szuperhélix egy menete alulnézetből (c): a vonalak peptidláncot, a pontozott vonalak hidrogénhidakat, az üres karikák Ala-t és Pro-t, a kitöltött karikák pedig Gly-t jelképeznek*

nya gyengébbé és „törékenyebbé" teszi a kollagén szerkezetét; lásd később). A hidroxilizin és a hidroxiprolin nem módosított aminosavakként épülnek be a polipeptidláncba, hanem a kész fehérjeláncban lévő Lys és Pro hidroxilálásával jönnek létre *(6-29. ábra)*. A hidroxiláz enzimek rendkívül specifikusak: csak lizinnel és α-ketoglutaráttal, illetve prolinnal és α-ketoglutaráttal reagálnak. A molekuláris oxigén egyik atomja az aminosavra, a másik a ketosavra kerül, ami jelzi, hogy ezen enzimek dioxigenázok. Az enzim aktív centrumában vasion (Fe^{2+}) foglal helyet, amelynek visszaredukálásához aszkorbát (C-vitamin) szükséges. **C-vitamin** hiányában nem történik hidroxilálás.

❸ A kollagénmolekulán belül lizinek között **keresztkötések** találhatók, amelyek a kollagének további stabilizációját eredményezik.

Az ilyen jellegű stabilizáció bizonyos ponton túl azonban már előnytelenné is válhat: az öregedés során a keresztkötések száma növekszik, ami a kollagén rugalmasságának csökkenését eredményezi. Ezek szembetűnő jelei a bőr rugalmasságának elvesztése, továbbá a csontok és ízületek fokozott sérülékenysége.

A prolin hidroxilálása jelentősen hozzájárul a kollagének stabilitásához: egy tropokollagénben a hélix stabilitása annál nagyobb, minél több benne a Hyp. A stabilitás egyik jellemzője az olvadáspont. A kollagének olvadáspontja (T_m) az a hőmérséklet, amelynél a molekula hélix szerkezetének az 50%-a megszűnik és rendezetlen struktúrává (random coillá) alakul át. A hidroxi-prolin szerepének illusztrálására egy jellemző példa, hogy a tőkehal-

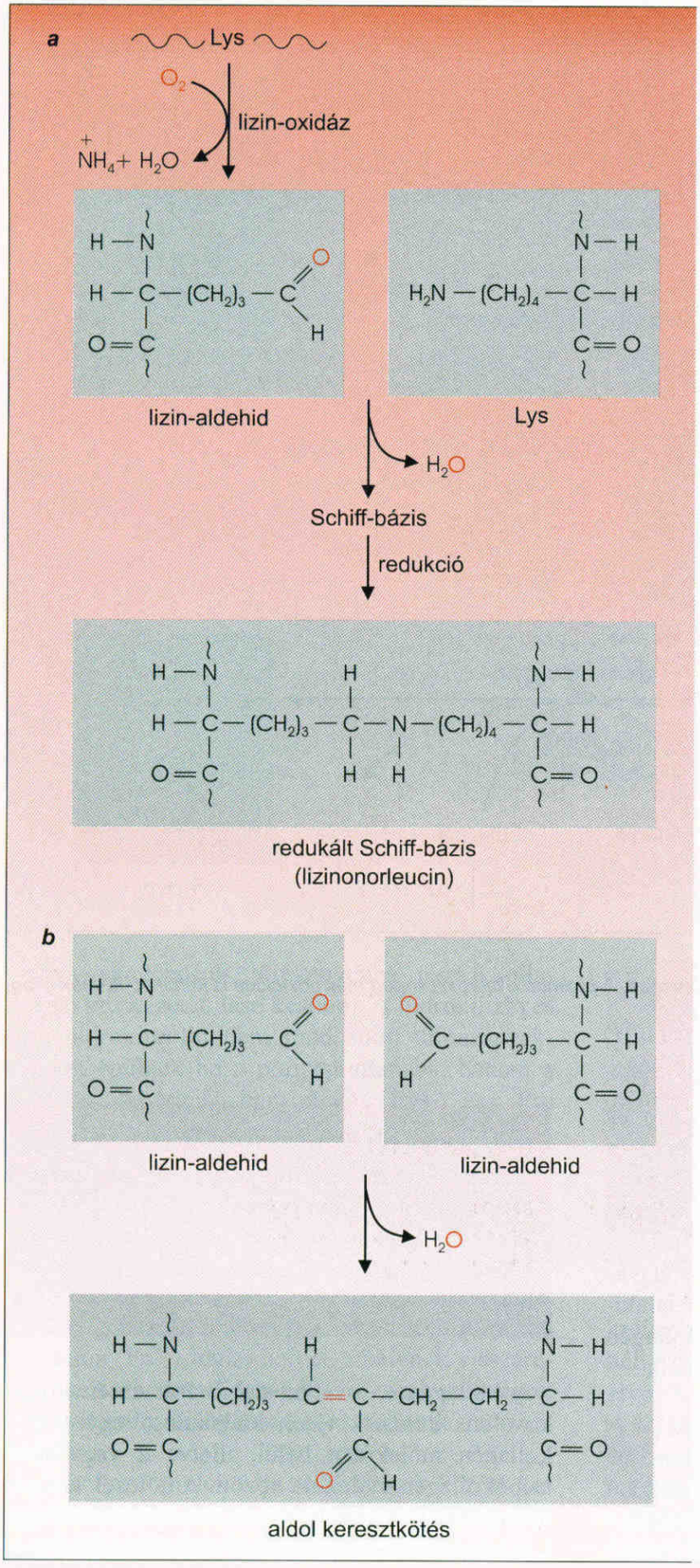


6-29. ábra. A hidroxi-lizin és hidroxi-prolin keletkezése. *A prolinon a hidroxilcsoport más pozícióba is kerülhet; itt csak a leggyakoribb szerkezetet mutatjuk be*

bőr-kollagénben 1000 aminosavban 155 Pro és Hyp fordul elő, amelyhez T_m=16 °C érték társul (a tőkehal testhőmérséklete 10 °C–14 °C), míg a marhabőr-kollagénben 232 Pro és Hyp, amelyhez T_m=39 °C társul (a testhőmérséklet 37 °C). Ha a molekula teljesen elveszti helikális szerkezetét, vagyis ha a hőmérséklet emelésével a hélixet kialakító összes kölcsönhatás megszűnik, a kollagén viszkozitása lecsökken, ún. zselatin keletkezik.

A Pro hidroxilálás hiánya emberben a kollagénstabilitás csökkenését eredményezi, amely bőrléziókban és vérzésekben nyilvánul meg, mert az érfalak károsodása azok fokozott „törékenységét" eredményezi. Ez történik scorbutban, C-vitamin-hiányos állapotokban (az ember, bizonyos emberszabású majmok és a tengerimalac nem tud aszkorbátot szintetizálni).

A kollagének további stabilitását eredményezi kovalens keresztkötések kialakulása egy tropokollagén molekulán belül, illetve 2 vagy több tropokollagén molekula között. A kötések létrejöhetnek két Lys között, de két hidroxi-lizin és egy Lys között is. Két Lys között is két különböző mó-



6-30. ábra. Keresztkötések kialakulási lehetőségei különböző kollagénmolekulák lizinjei között. *Az első esetben az egyik lizinből allizin (lizin-aldehid) keletkezik előbb és az reagál egy másik lizinnel (a), a másik esetben két lizinből előbb két lizin-aldehid keletkezik, majd azok kondenzálódnak kovalens keresztkötést alkotva (b)*

don alakulhat ki keresztkötés. Egyik esetben az egyik lizinből először lizin-aldehid (allizin) keletkezik lizin-oxidáz és O_2 jelenlétében, majd a lizin-aldehid Schiff-bázist képez egy másik lizinnel, amely redukció után kovalens kötést eredményez *(6-30a ábra)*. A reakció azonban úgy is lejátszódhat, hogy először mindkét lizinmolekula aldehid-származéka keletkezik, majd ezek aldol keresztkötéseket alkotnak *(6-30b ábra)*.

Két hidroxi-lizin és egy lizin oldallánca között hármas keresztkötés is létrejöhet, amely ún. „hidroxi-piridin- (piridinolin-)" szerkezetet alakít ki *(6-31. ábra)*.

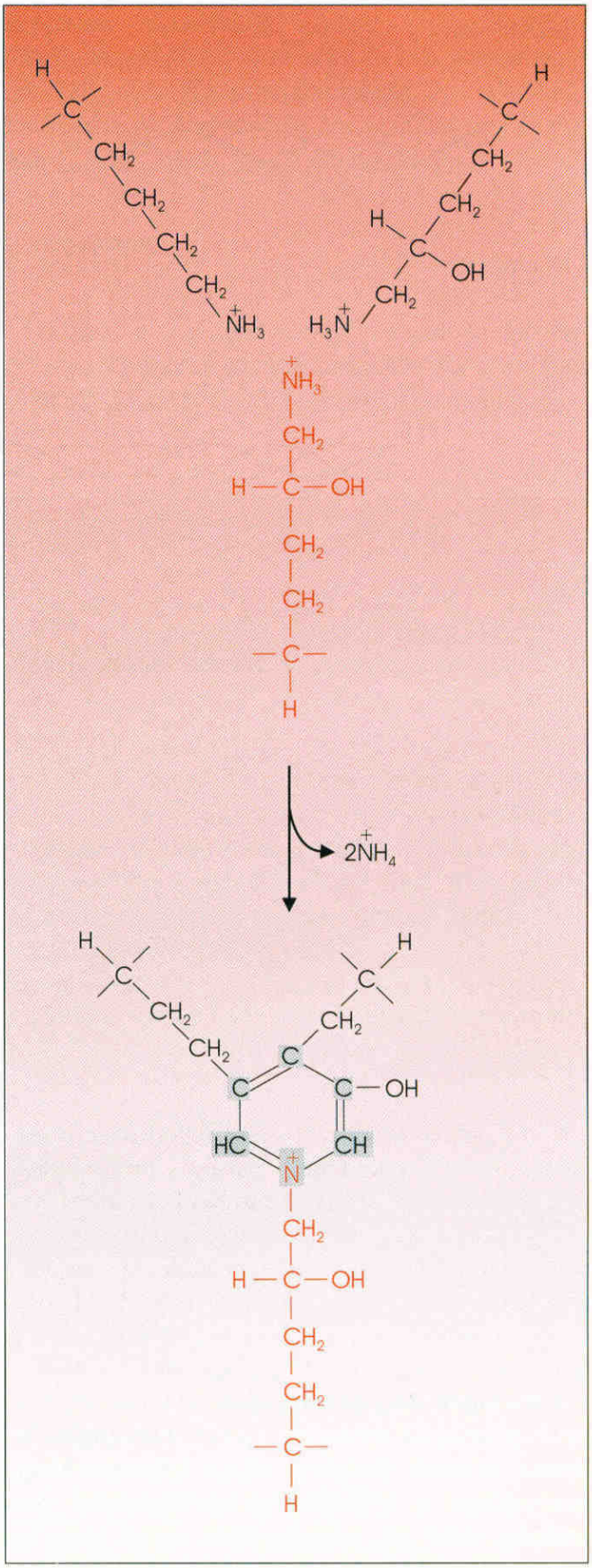
Több tropokollagén egység egymás mellett kb. 1/4-rész eltolódással nagyobb szerkezeti egységeket, ún. mikrofibrillumokat képez (6-28. ábra). A tropokollagének egymás mellett, illetve egymás után kapcsolódnak, de egy sorban elhelyezkedő tropokollagének között kb. 40 nm méretű hiány („üreg") található. Az „üreg" jelentős szerepet játszhat bizonyos funkciók betöltésében; pl. a csontszövet esetében az üreget kalcium-foszfát- (hidroxilapatit-) ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) kristályok töltik ki. A tropokollagének egymással képzett aggregátumai, a mikrofibrillumok, különben nagyon emlékeztetnek a fibrin monomerek polimerizációjára (lásd a 6.5 fejezetet). Mint ott, itt is további módosulások történnek; keresztkötések jöhetnek létre egy

tropokollagénen belül mind a 3 hélix között, mind pedig különböző tropokollagén molekulák között is. A mikrofibrillumokban előforduló szabályos ismétlődések elektromikroszkópos képen jól láthatók; pl. harántcsíkozás formájában. Mint korábban említettük, pusztán egyetlen Gly → Cys csere igen jelentős változást eredményezhet egy kollagénmolekula felépítésében és funkciójában, így nem csoda, hogy egy-egy aminosaveltérés a tropokollagén elsődleges szerkezetében a legkülönbözőbb funkciók ellátását szolgáló kollagénszerkezeteket hozhat létre, amelyek a szemlencse, az inak, az érfalak, a bőr, az erek stb. feladatait szolgálják.

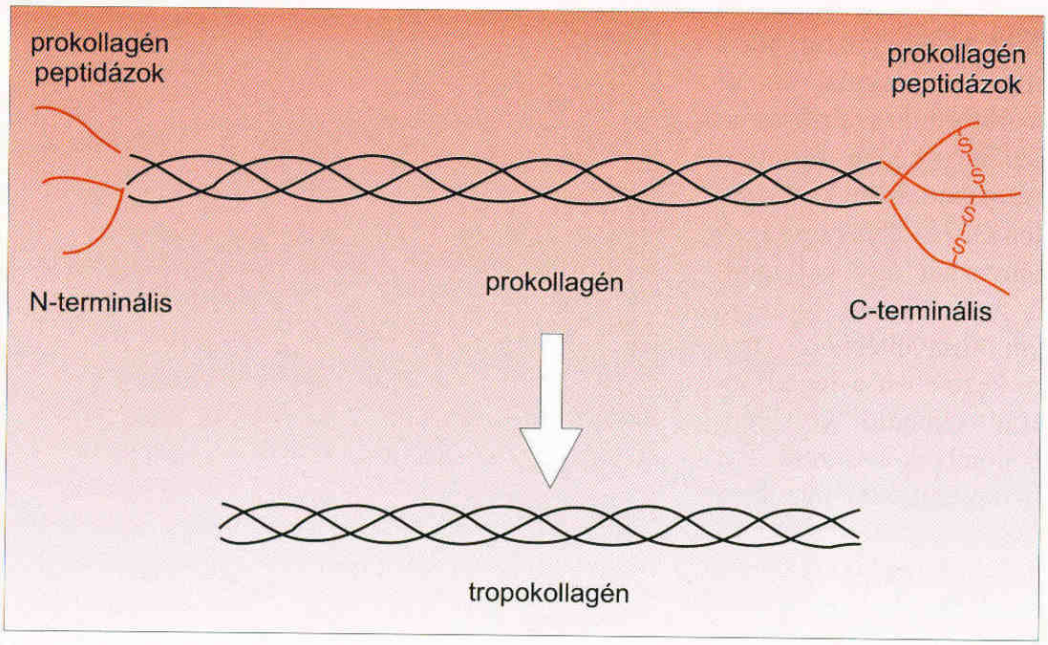
A teljesség igénye nélkül, csak példaként említjük meg, hogy az I-es típusú kollagén a bőrben, az inakban, csontban, corneában fordul elő, a II-es típusú az ízületekben, az üvegtestben, a III-as típusú az érfalban, bőrben, a limfoid mirigyekben, a IV-es típusú a bazális membránokban, placentában, az V-ös típusú ugyancsak bőrben, inakban, corneában, a VI-os típus az aortában, izomszövetben, bőrben, illetve majdnem az összes kötőszövetben megtalálható.

A kollagén bioszintézise és degradációja

A kollagének a **fibroblasztokban** szintetizálódnak, de prekurzor formában, mint **prokollagének**. A prokollagének abban különböznek a tropokollagéntől, hogy nagyobbak; mind a három lánc N-terminális és C-terminális végén is ún. **extenziós peptidek** találhatók. A C-terminális peptidek között S-S hidak alakulnak ki *(6-32. ábra)*. Ezek az extenziós peptidek nagymértékben eltérnek a tropokollagéntől; egyrészt kevés bennük a Gly, Pro, másrészt ciszteinek találhatók bennük. Ez teszi lehetővé azt, hogy a tropokollagénmolekulák nem képeznek a sejten belül rosszul oldódó aggregátumokat, és azt is, hogy szintézisük helyéről, a fibroblaszt sejtekből kikerülhetnek az extracelluláris környezetbe. Az extracelluláris mátrixban ezután **prokollagén-peptidázok** lehasítják az N-terminális (kb. 15 kDa) és C-terminális (kb. 30 kDa) peptideket. Az extenziós peptidek eltávolítása után a tropokollagének oldékonysága lecsökken, a már korábban elmondottak szerint mikro-



6-31. ábra. A hidroxi-piridin keresztkötés kialakulása két Hyl és egy Lys között



6-32. ábra. A prokollagén átalakulása tropokollagénné. Az itt feltüntetett átalakulás az extracelluláris mátrixban játszódik le

fibrillumokat képeznek, és keresztkötések alakulnak ki.

Ha az extenziós peptidek eltávolításában defektus lép fel (pl. csökkent prokollagén-peptidáz aktivitás miatt), az klinikai tünetekben is megnyilvánul; az ilyen betegek bőrében és ízületeiben megnövekedett mennyiségben található prokollagén, aminek eredményeként az ízületek rendkívül flexibilisek és a bőr nagymértékben nyújtható (Ehlers–Danlos-szindróma).

A kollagének rendkívül stabil fehérjék nemcsak mechanikai értelemben, hanem proteolitikus emésztéssel szemben is. Neutrális pH-tartományban gyakorlatilag csak a **kollagenázok** képesek degradációjukra. A kollagenázok a szöveti proteázok csoportjába tartoznak, működésük szoros kapcsolatot alkot az elasztázzal és a fibrinolitikus rendszerrel (lásd később).

A **kollagén degradációjának** azonban fiziológai és patológiai jelentősége is van. Fiziológiás lebontás történik általában olyan folyamatokban, amelyekben a kötőszövetek újraépítésére van szükség, mint pl. sebgyógyulás során vagy az uterus ciklusaiban. A kollagén degradációja fontos szerepet játszik olyan általános biológiai jelenségekben is, mint pl. az állatok metamorfózisa.

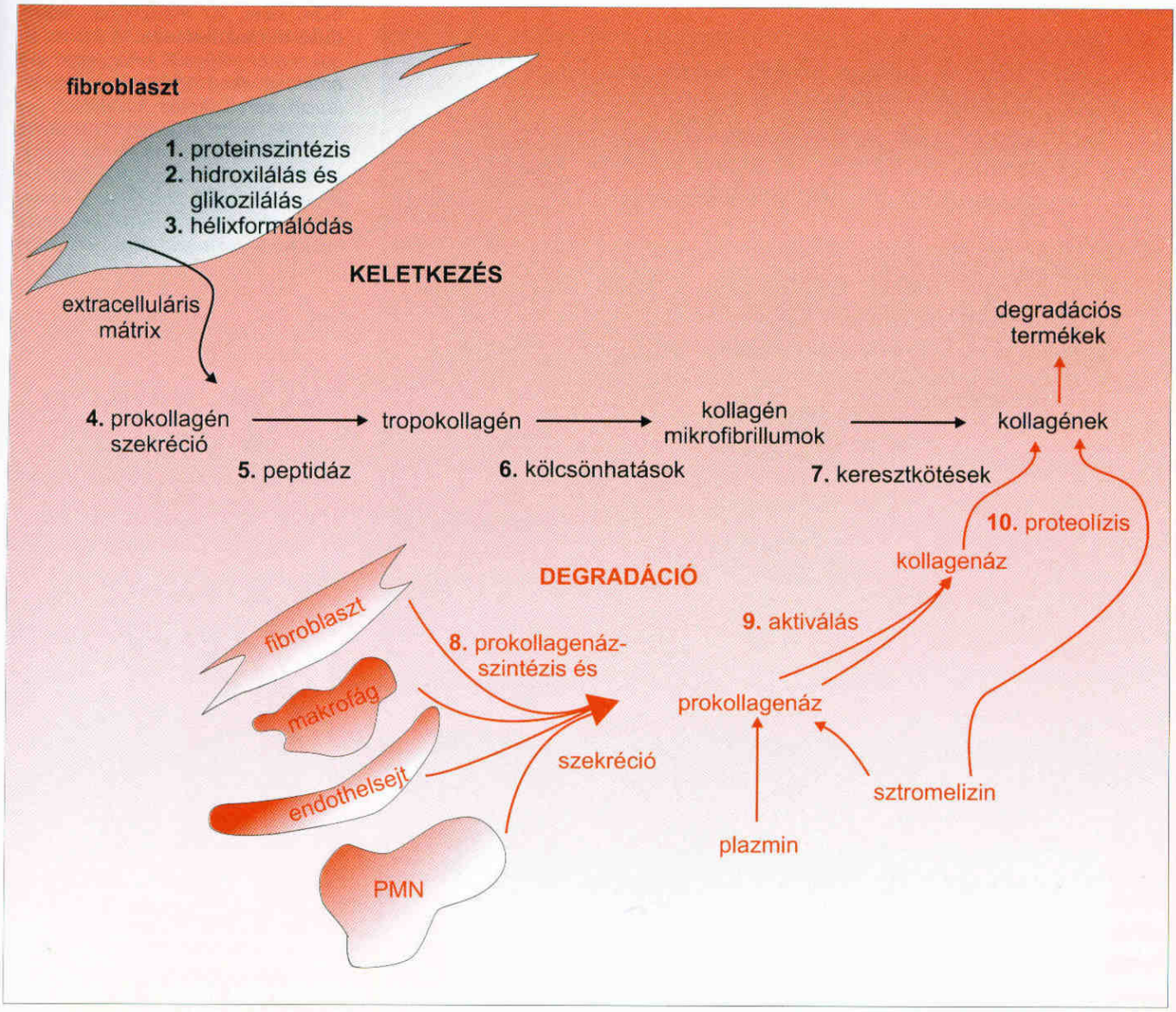
Más oldalról viszont a kollagének emésztése kulcsszerepet játszik olyan patológiás folyamatokban, mint pl. a Clostridium histolyticum által kiváltott gázgangraena (amelyben a baktérium egy rendkívül hatékony kollagenáz enzim szekréciójával teszi lehetővé invázióját; a gazdaszervezet kötőszöveti barrierjében a kollagén minden egyes polipeptidláncát több, mint 200 részre „darabolja"). Szöveti kollagenázok működnek közre a legtöbb gyulladásos folyamatban is, mint pl. a rheumatoid arthritis vagy a rosszindulatú tumorok növekedése és metasztázisképzése.

A **szöveti kollagenáz** neutrális metalloproteáz, aktív centruma integráns részét Zn^{2+} képezi, és aktivitásához Ca^{2+} jelenléte is szükséges. A legújabb nómenklatúra szerint mátrix metallo-proteáz-1-nek (MMP-1) nevezik. Az MMP-1 inaktív prekurzor formában, mint prokollagenáz szintetizálódik fibro- blasztokban, makrofágokban, endothelsejtekben és granulocitákban, de amíg az utóbbi sejtféleségben granulumban tárolódik és csak a megfelelő ingerre szekretálódik, a többi sejtféleségben szin- tézise után azonnal kiválasztásra kerül. A **prokollagenáz** aktiválódása, a zimogén enzimmé történő átalakulása specifikus proteolízis eredménye, amelyért elsősorban a **plazmin** a felelős, bár a **kallikrein**, a **tripszin** vagy

a **sztromelizin** is képes aktiválására. (A plazmin és kallikrein funkcióit lásd még a 6.5. fejezetben, a tripszinét pedig a 2.4. fejezetben.) A **sztromelizin** szintén fém-proteáz (MMP-3), de amellett, hogy a prokollagenázt aktiválja, a kollagenázzal „szinkronban" működik az extracelluláris mátrix degradálásában; emészteni képes a IV-es típusú kollagént és degradálja a proteoglikánokat, a laminint és a fibronektint. A prokollagenáz szintézise komplikált szabályozás alatt áll, amelyben a környező mononukleáris sejtek citokintermelése fontos szerepet játszik. A citokinek a megfelelő receptorhoz kötődésük után a sejtmagban onkoproteineken keresztül aktiválják a prokollagenáz gén transzkripcióját. A kollagének szintézisét és degradációját a *6-33. ábra* foglalja össze.

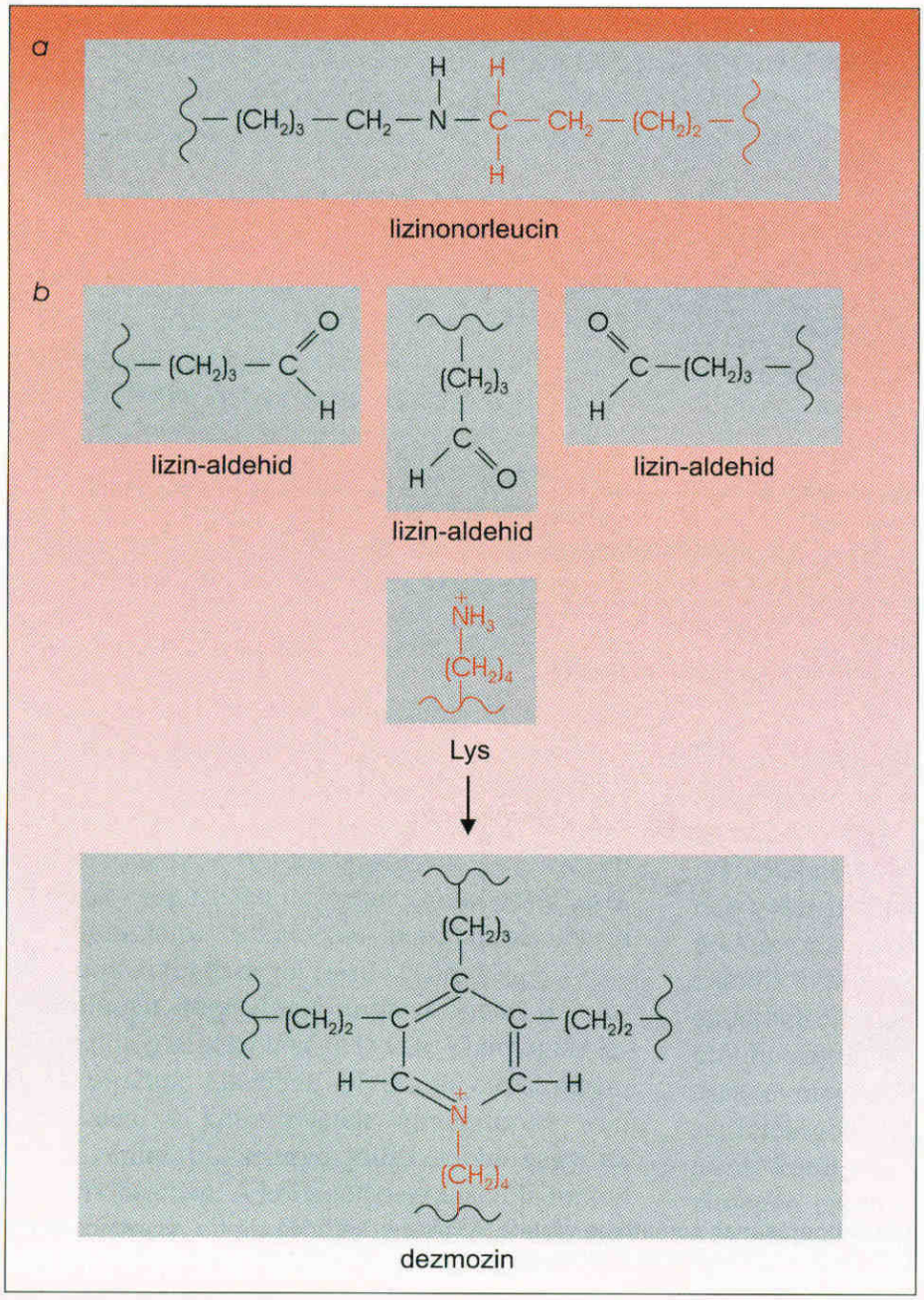
Elasztin

Az elasztinra jellemző, hogy hasonlóan a kollagénhez rendkívül gazdag glicinben és prolinban (~30 %). Ezenkívül a fehérjében nagy mennyiségű



6-33. ábra. A kollagének keletkezésének és lebontásának sematikus vázlata. A kollagén képződése intra- és extracelluláris folyamatok összehangolt működésén alapszik. A folyamatok sorrendjét számozással jelöljük. A PMN polimorfonukleáris sejtet jelent

alanin fordul elő, de a kollagénhez képest kevés a hidroxiprolin és nincs benne hidroxilizin. Az elasztinrostok **tropoelasztin** polipeptidből épülnek fel. A tropoelasztinban helikális struktúra található, amely azonban sem az α-helixre, sem a kollagén hélixre nem hasonlít. A fehérje szerkezetében Val-Pro-Gly-Val szekvenciák gyakran fordulnak elő, amelyek β-fordulatok kialakítását teszik lehetővé. A helikális szakaszokat Lys-ben és Ala-ban gazdag rövidebb, nem helikális szekvenciák kapcsolják össze. Az elasztinban is találhatók **keresztkötések**, amelyek más jellegűek ugyan, mint a kollagénben lévők, de ezekben is a lizinek játszanak fontos szerepet *(6-34. ábra)*. A keresztkötések jellege és a tropoelasztin helikális szerkezete együttesen hozza létre az elasztin legfontosabb mechanikai tulajdonságát, nevezetesen, hogy az elasztin rendkívüli mértékben nyújtható, tágítható, de az erő megszűnése után gyorsan visszatér eredeti állapotába. Ez a flexibilitás teszi lehetővé az érfalak, elsősorban az aorta és artériák tágulékonyságát és a ligamentumok nyújthatóságát. Aránylag kevés elasztin található a bőrben és a laza kötőszövetekben. Az elasztin legtöbbször kolla-



6-34. ábra. Az elasztinban előforduló keresztkötések. *A módosulások a már elkészült fehérjékben lévő aminosavakon történnek. A lizinonorleucin keresztkötés kialakítása úgy történik, mint a kollagén esetében (a). A dezmozin kialakulása során először 3 Lys-ből 3 lizin-aldehid keletkezik, majd 3 lizin-aldehid és egy negyedik nem módosult Lys között kialakul a dezmozin keresztkötés (b)*

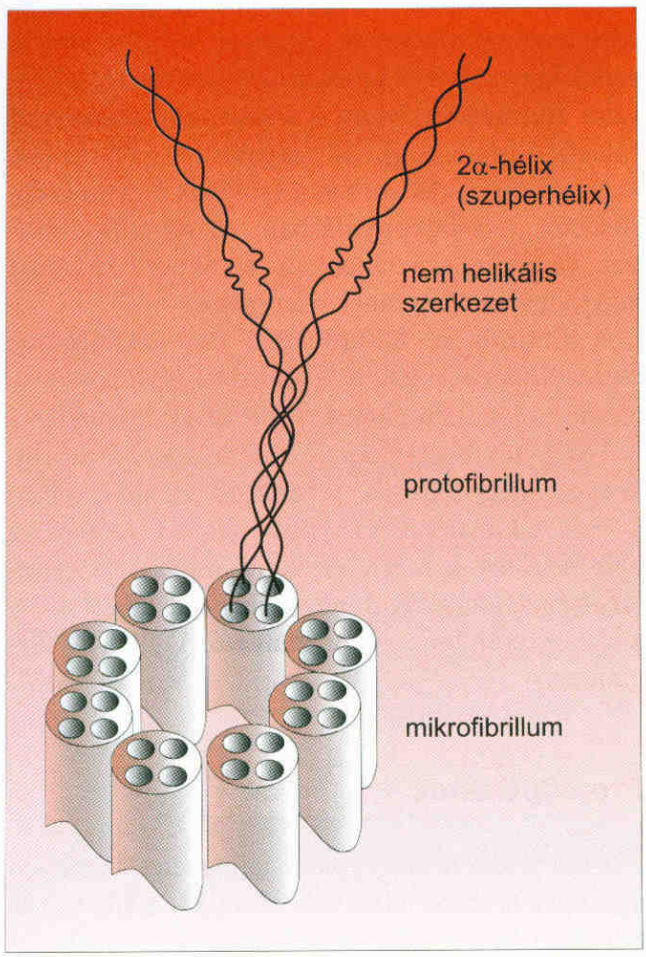
génnel és poliszacharidokkal kapcsolatban fordul elő a különböző kötőszövetekben. A kollagénhez hasonlóan, az elasztin is oldhatatlan a szervezet vizes közegében, de prekurzora, a proelasztin, amely nem tartalmaz még keresztkötéseket, oldható. A proelasztin molekulatömege kb. 70 kDa, és szintézise után réztartalmú **lizin-oxidázok** hozzák létre azokat a lizin-aldehid-származékokat, amelyek végül a **lizinonorleucin** és a **dezmozin** keresztkötéseket kialakítják (6-34. ábra).

Az elasztin degradációjáért az **elasztázok** a felelősek. Az elasztázok nem specifikus szerin-proteázok; nemcsak az elasztint, hanem számos más fehérjét is hatásosan emésztenek (pl. a véralvadási-fibrinolitikus rendszer majdnem összes faktorát, enzimét és inhibitorai nagy részét). Két fajta elasztáz ismert; az egyik a pancreasban szintetizálódik, s a táplálék fehérjeemésztésében játszik szerepet, a másik a granulocitákban.

A pancreas-elasztáz a hasnyálmirigyen és a bélen kívül csak patológiás körülmények között fordul elő (pl. akut pancreatitisben kerül a vérkeringésbe vagy a környező szövetekbe). Alapvető feladata a táplálék emésztése (lásd még a 2.4. fejezetet).

A kötőszöveti anyagcsere, a gyulladásos folyamatok és a hemosztázis szempontjából a pancreas-elasztáznál sokkal jelentősebb a leukocitákban szintetizálódó elasztáz (25 kDa), amelyet a granulociták a granulumjaikban tárolnak és „szükség esetén" vagy patológiás körülmények között kiválasztanak. Ilyenkor a sejtek **mieloperoxidázt** is szekretálnak, ami az elasztáz legfőbb inhibitorának, az α_1-proteáz inhibitornak hatékony gátlója (lásd a 2.4 fejezetet is). Az inhibitor magas vérplazma-koncentrációja miatt az elasztáz csak olyan körülmények között funkcionálhat, ahol a granulociták lokális koncentrációja magas.

Az elasztáz inhibitorának deficienciája esetén az elasztáz szabályozás nélkül emésztheti a kötőszöveti elemeket, s az egyik jellemző elváltozást, a tüdő fiatalkorban kifejlődő emphysemáját eredményezi.



6-35. ábra. A keratin mikrofibrillum elrendeződése. A protofibrillumok *többféle módon is elrendeződhetnek, amelyeket S-S hidak tartanak össze. Az így kialakult mikrofibrillumok tovább rendeződhetnek makrofibrillumokat alkotva (nem látszik az ábrán) és ezek sejtekkel történő társulás után létrehozhatnak pl. egy szál hajat*

Egyéb fehérjék

Keratinok

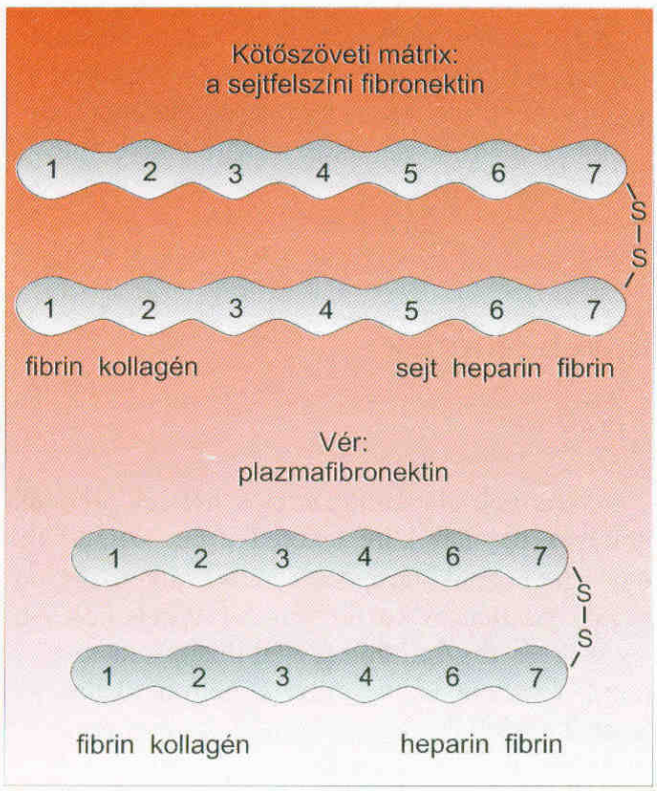
A keratinok alapszerkezetét α-hélixek alkotják, amelyek egymás köré tekeredve ún. szuperhélix egységet hoznak létre. Az α-hélixet alkotó aminosavak oldalláncai között van der Waals-kölcsönhatások és diszulfidhidak stabilizálják a szuperhélixet. A helikális szerkezetet nem helikális szakaszok szakítják meg. A keratin további rendeződését és stabilitását eredményezi, hogy rostjában két szuperhélix tekeredik egymás köré, amelyet S-S hidak rögzítenek, ún. protofibrillumot alkotva. Majd 8 protofibrillum ugyancsak S-S keresztkötések révén egy mikrofibrillumot hoz létre *(6-35. ábra)*. A kialakult szerkezet a bőr, haj, szőr, prém, gyapjú és a köröm, illetve a madarak csőrének fő

alkotóeleme. Ha az S-S hidak mennyisége relatíve kevés, akkor a keratint nagyfokú nyújthatóság, illetve flexibilitás jellemzi (pl. haj, gyapjú), ha bőséges, akkor merev, kemény szerkezet jön létre (pl. karom, csőr).

Fibronektin és laminin

A **fibronektin** molekula 2 polipeptidláncból épül fel, amelyek egyenként 250 kDa nagyságúak és C-terminális végüknél S-S hiddal kapcsolódnak össze *(6-36. ábra)*.

A molekula nagymértékben elnyújtott (60 nm hosszú és 2,5 nm széles) és számos olyan eltérő szerkezeti elemet tartalmaz, amely különböző funkciókért felelős. A hét szerkezeti egységből az N-terminális végén található első és a C-terminálison lévő utolsó felelős a fibrinhez kötődésért, míg a második és hatodik a kollagénnel, illetve heparinnal kialakított kölcsönhatásért, és az ötödik a sejtekkel, illetve a kötőszöveti mátrixszal való kapcsolódásáért (6-36. ábra). Érdekes, hogy az oldható kollagén és fibronektin heparin jelenlétében vizes fázisban oldhatatlan hármas komplexet hoz létre, amelyben a kollagén és a heparin komponens a fibronektinen keresztül kapcsolódik, az extracelluláris mátrix jellegzetes szerkezetét illusztrálva.



6-36. ábra. A fibronektin sematikus szerkezete. *A különböző funkciókért felelős doméneket számok jelzik (1–7). Amíg a sejtfelszíni fibronektin hét doménből épül fel, a plazmafibronektin csak hatból (az 5-ös domén hiányzik). (A doméneknél jelöltük, hogy mely fehérjékkel vagy struktúrákkal történő kölcsönhatásért felelősek)*

A fibronektinnek két fő formája ismert, az egyik a sejtfelszíni fibronektin (az előbbiekben tárgyalt szerkezet) és a vérplazmában található plazmafibronektin, amelyben az ötödik szerkezeti egység, a sejthez nagy affinitást mutató rész hiányzik. A plazmafibronektinben hiányzó részre jellemző egy Arg-Gly-Asp-Ser szekvencia, amely valószínűleg felelős a sejtekkel történő kölcsönhatásért (6-36. ábra).

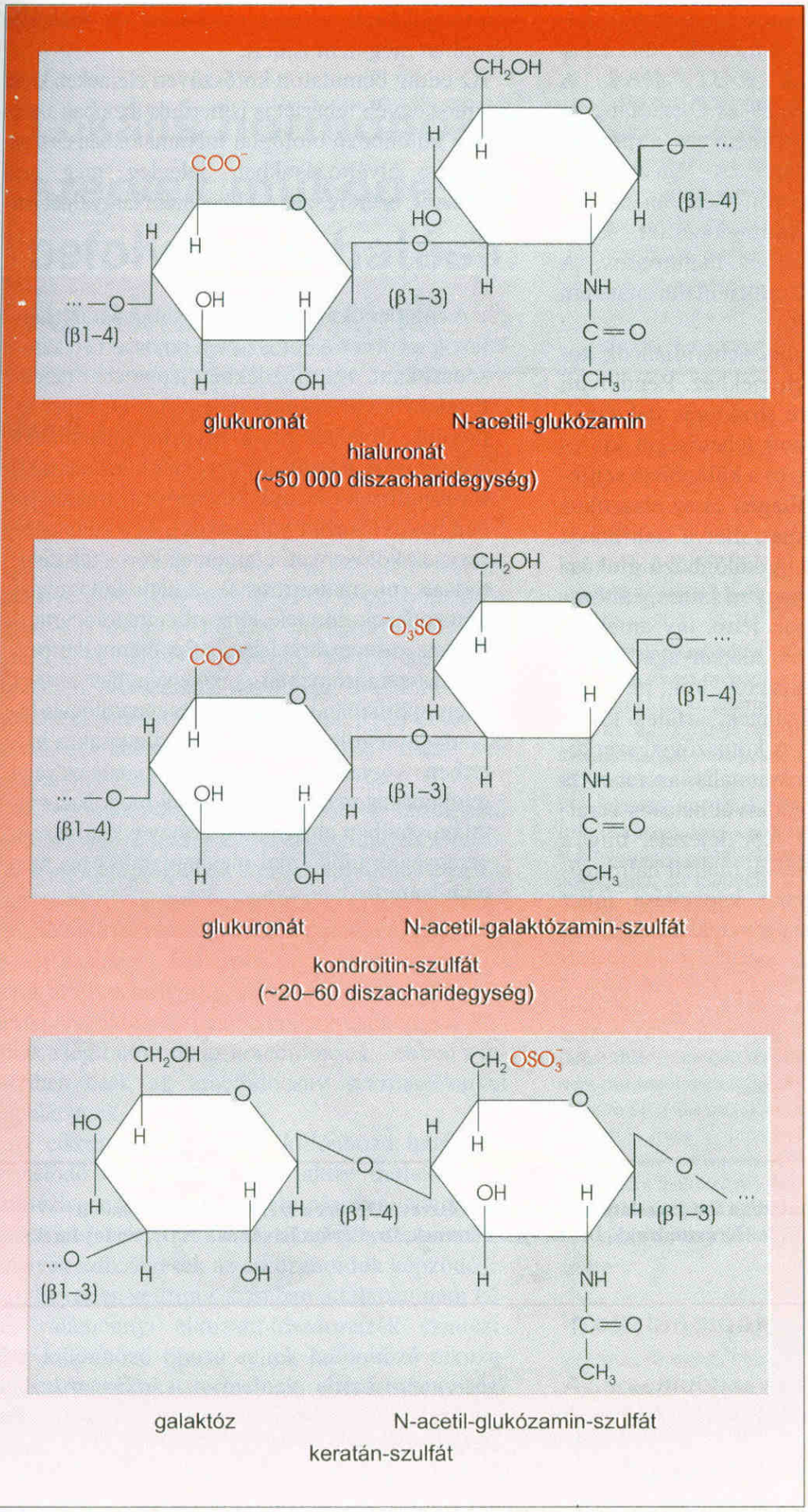
A fibronektinek a legkülönbözőbb biológiai folyamatokban játszanak szerepet, mint például a sejtek kapcsolatai a kötőszöveti mátrixszal (sejtfelszíni fibronektin) vagy a véralvadási rendszerrel (plazmafibronektin). A sejtfelszíni fibronektin kapcsolódásai elsősorban a szövetek újra modellezésében, a sebgyógyulásban, az embriogenezisben, a sejtmigrációban és a tumormetasztázis képződésében játszanak szerepet.

A **laminin** is, hasonlóan a fibronektinhez az extracelluláris mátrix adhezív glikoproteinje. Nagy molekulatömegű (~1000 kDa), három láncból felépülő fehérje, amely kereszt alakú formát alkot. Szintén több és különböző funkciót ellátó domén található benne. Egyik fontos szerepe az epithelialis sejtek kötőszövettel történő kapcsolatának biztosítása. Különösen nagy affinitást mutat a bazális membránokban található IV-típusú kollagénhez.

Proteoglikánok

A kötőszövetek egy másik jellegzetes szerkezeti egységét a proteoglikánok alkotják. Lényegében polianionok (95% a poliszacharid- és 5% a fehérjetartalmuk), amelyek nagy mennyiségű vizet és kationt képesek megkötni.

A poliszacharidláncot, főleg glukózamin, galaktózamin, valamint ezek N-acetil és szulfát származékai, illetve iduronsav és glukuronsav al-



6-37. ábra. A glukózaminoglikánokban előforduló néhány jellegzetes diszacharidegység, amelyek ismétlődve építik fel a lineáris polimert. *Az anion karakterű csoportokat piros színnel tüntettük fel*

kotják. A glukózaminoglikánok szerkezetére jellemző, hogy szabályosan ismétlődő diszacharidegységeket tartalmaznak *(6-37. ábra)*. A karboxilcsoportok mellett az N- és O-szulfát-csoportok negatív töltésse eredményezi a proteoglikánok polianion karakterét. A legismertebb glukózaminoglikánok: heparin, heparán-szulfát, kondroitin-6-szulfát, kondroitin-4-szulfát, keratán-szulfát, dermatán-szulfát és hialuronsav. A glukózaminoglikánok közül csak a hialuronát nem tartalmaz szulfátcsoportokat.

A proteoglikánokban a poliszacharidláncok kovalensen kapcsolódnak a fehérjékhez. Rendkívüli mértékben hidratált gélszerű struktúrát alakítanak ki. Ez az „alapanyag" teremt lehetőséget kis és nagy molekulák diffúziójára és a különböző sejtféleségek vándorlására. A kollagén és az elasztikus rostok a mátrix organizációját, illetve stabilitását és flexibilitását biztosítják. A különböző glukózaminoglikánok és fehérjék nagyon színes, változatos kombinációkat hozhatnak létre, így amellett, hogy az extracelluláris mátrix „alapanyagát" képezik, a legkülönbözőbb szerkezetek, mint pl. a csigolyák közötti discusok, ízületek, érfalak kialakulásához is hozzájárulnak. A kötőszöveti szerkezet kialakítása mellett funkcionális szerepet is játszhatnak. Pl. a heparin rendkívül hatásos véralvadásgátló molekula (lásd 6.5. fejezet), míg a hialuronátról ismert, hogy sebek mellett halmozódik fel és ott nagy vízkötő kapacitása miatt oedemát okoz. A különböző szövetekben található proteoglikánok pontos szerkezete és funkciója azonban még nem ismert.

Az eddig bemutatott kötőszöveti elemeken kívül számos egyéb fehérjét is ismerünk, azonban szerepük a különböző biológiai folyamatokban és a patológiás elváltozásokban jelenleg még nem tisztázott, ezért részletesebben nem tárgyaljuk ezeket.

A mindennapi életben nagyon gyakran találkozik az orvos a kötőszöveti rendszert ért károsodásokkal. Az előzőekben ismertetett defektusokon kívül számos jellegzetes kórképet ismerünk. Ilyenek pl. a myositis interstitialis (izomrostok közötti kötőszöveti károsodások), a vasculitisek (az erek kötőszöveti struktúrájában bekövetkezett változások), és a különböző szervek kötőszöveti elemeinek kóros felszaporodása (pl. májcirrhosis). Ízületi kötőszöveti károsodások jönnek létre rheumatoid arthritisben, osteoarthrosisban, Bechterew-kórban, ischias-szindrómában, köszvényben vagy haemophiliában is. A kötőszövet patológiás folyamatai legtöbb esetben másodlagosak, a háttérben gyakran immunológiai és/vagy gyulladásos reakciók húzódnak meg. Nagy általánosságban elmondható, hogy a kötőszöveti betegségek biokémiai mechanizmusa ma még nem ismert.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerző köszönetet mond Dr. Csermely Péternek, Dr. Kolev Kraszimirnak, Dr. Krajcsi Péternek, Dr. Léránt Istvánnak és Dr. Vodnyánszky Lajosnak.

Ajánlott irodalom

Molecular Cell Biology, Eds., J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimora, W. H. Freeman and Company, New York, 1990

Molecular Biology of the Cell, Eds., B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, Garland Publishing, Inc., New York–London, 1994

6.4. Lokális hormonok egyes szervek működését befolyásoló hatása. Az eikozanoidok

Mandl József

Az egyes szervek működésének kialakításában, szabályozásában a sejt közötti kapcsolatokban rendkívül fontos a **lokális** mediátorok szerepe. Számos, különböző molekula, biogén amin (pl. hisztamin, szerotonin), peptid (pl. bradikinin), fehérjék (pl. citokinek) rendelkezik ilyen hatással. Közülük ebben a fejezetben csak az eikozanoidokkal foglalkozunk.

Az **eikozanoidok** 20 szénatomot tartalmazó többszörösen telítetlen zsírsavak oxidált származékai; magukban foglalják a prosztanoidokat és azok származékait (prosztaglandinok, tromboxánok, prosztaciklin) és a leukotriéneknek nevezett vegyület családot. A három leggyakoribb prekurzoruk az eikozatriénsav, eikozatetraénsav (triviális nevén arachidonsav) és az eikozapentaénsav. Közülük a legfontosabb az arachidonsav – ebben a fejezetben csak az arachidonsav származékaival foglalkozunk.

Az eikozanoidok – mint különböző hatásokra termelődő biológiailag igen aktív molekulák – **szintézise univerzális mechanizmus**. Szinte az összes emlős sejt tartalmazza azokat az enzimeket, amelyek szükségesek az eikozanoidok képződéséhez. Egyetlen sejttípus azonban általában nem képes valamennyi eikozanoidszármazék szintézisére: különböző típusú sejtek különböző eikozanoidszármazékokat termelnek, eltérő mennyiségben. Minden sejttípus eikozanoid-„profilja" jellemző a sejt biológiai funkciójára. Prosztanoidszintézisre szinte valamennyi emlős sejt képes, a leukotriének szintézisére képes sejtek száma jóval kevesebb. Számos sejt tud azonban mind prosztanoidokat, mind leukotriéneket termelni.

A prosztaglandinokat 1930-ban fedezték fel ondóváladékban. Simaizom-preparátumok összehúzódását okozták és csökkentették az artériás vérnyomást. Az 1950-es évek végén és az 1960-as években különböző prosztaglandinszármazékokat azonosítottak, illetve kimutatták, hogy többszörösen telítetlen zsírsavakból származnak. A rendkívül intenzív kutatások az 1970-es években vezettek el a tromboxánok, majd a prosztaciklin felfedezéséhez. A kutatások nyomán a prosztanoidok hatásaival kapcsolatos ismeretanyag annyira kibővült, hogy nehéz olyan szervet, illetve funkciót találni, amelyet prosztanoidszármazékok közvetlenül vagy közvetve ne befolyásolnának. 1977-ben ismerték fel, hogy az arachidonsav szerepet játszhat az SRS (slow reacting substance) bioszintézisében is. SRS-nek egy simaizom-preparátumok jellegzetesen lassú kontrakcióját okozó anyagot neveztek el még 1938-ban. Hasonló hatású anyag termelődését antigén stimulussal is ki lehetett váltani s ezt a nem immunológiai ingerre keletkező SRS-től megkülönböztetendő SRS-A-nak (slow reacting substance of anaphylaxis) nevezték. Intenzív kutatások után 1979-ben egy új, oxidált arachidonsavszármazékot sikerült azonosítani. Az új vegyületcsaládot leukotriéneknek nevezték el; szerkezete különbözött a korábban megismertektől. Az SRS-A leukotriének keverékének bizonyult.

Prosztanoidok

Az arachidonsav metabolizmusa. Arachidonsavellátás. Foszfolipáz A_2

Az **arachidonsav** a szervezetben linolsavból és linolénsavból szintetizálódik. Emlős sejtekben az

arachidonsav – a többi, többszörösen telítetlen zsírsavhoz hasonlóan – szinte kizárólag a glicerofoszfolipidek 2-acil pozíciójában észterifikálva fordul elő. A spontán felszabaduló arachidonsav szinte azonnal reészterifikálódik. Az arachidonsav szabaddá válását az eikozanoidszintézis sebességmeghatározó lépésének tekintik. A szabad-arachidonsav-koncentráció a citoszolban rendkívül alacsony.

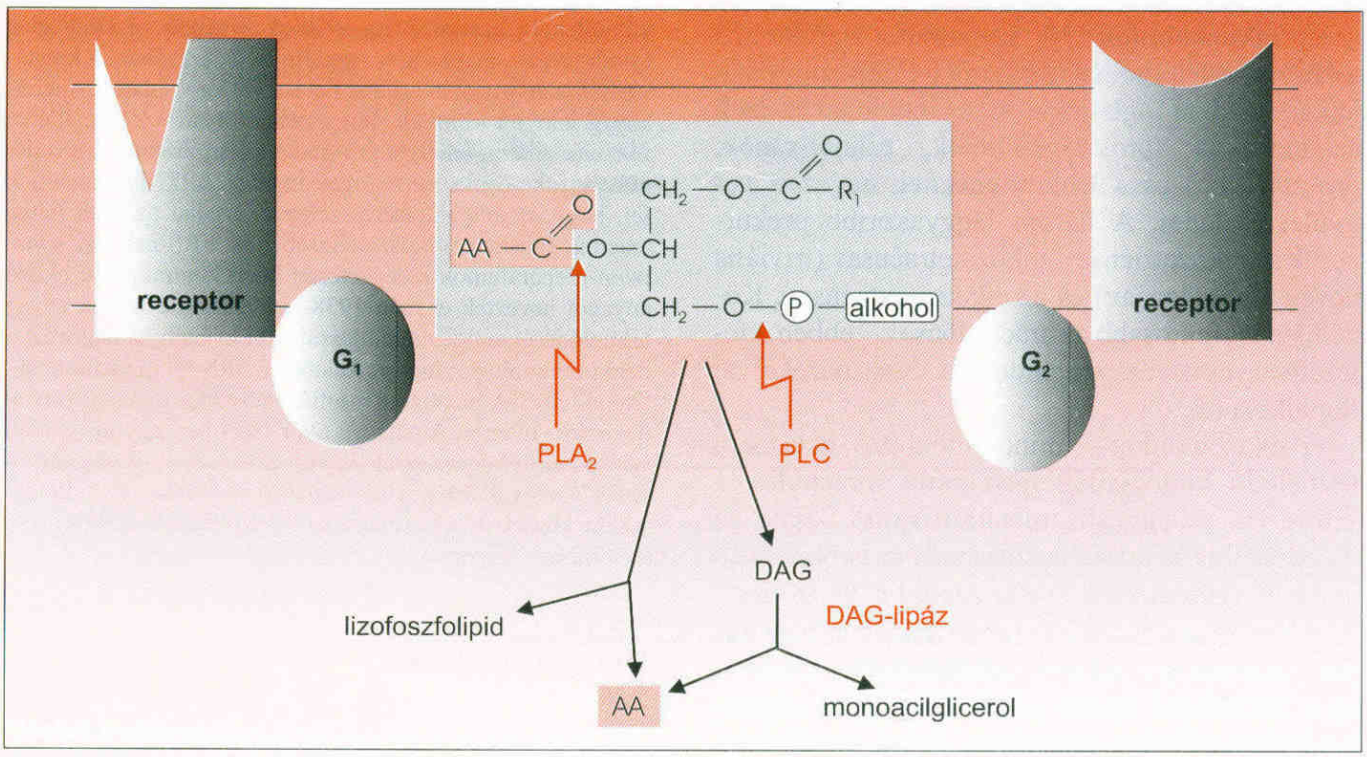
Stimulált sejtekben az arachidonsav két úton válik a foszfolipidekből szabaddá *(6-38. ábra)*. A legfontosabb út az, amikor a **foszfolipáz A_2** (PLA_2) izoenzimek hatására hidrolízissel szabadul fel foszfolipidekből. A nagy molekulatömegű PLA_2 izoenzim specifikus, csak az arachidonsavat tartalmazó foszfolipidek hidrolízisét katalizálja. Emelkedett intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció esetén arachidonsavat szabadít fel a 2-acil pozícióból. A Ca^{2+}-koncentráció-emelkedés a PLA_2 plazmamembránhoz történő transzlokációjához szükséges, hasonlóan a protein-kináz C transzlokációjához.

Az újabb ismeretek szerint a specifikus PLA_2 izoenzim receptorfüggő aktiválása G-fehérjén keresztül történik. Ezt a PLA_2 izoenzimet a MAP-kináz (lásd 407. oldal) foszforilálja. Ennek révén ez az aktiválási út összefügg több más jelátviteli folyamattal.

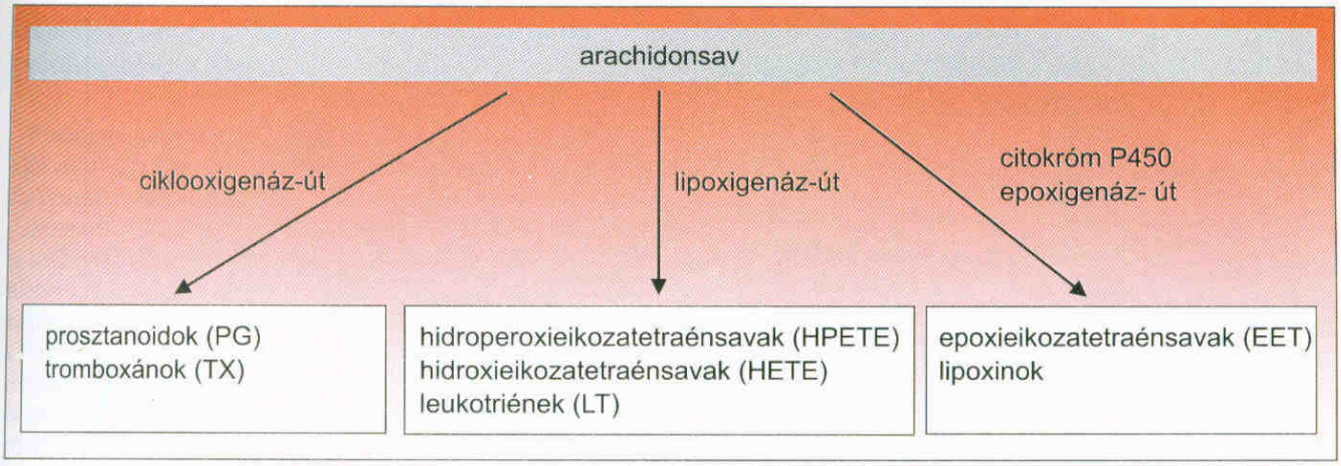
Az arachidonsav szabaddá válását más kis molekulatömegű PLA_2 izoenzimek is katalizálják, amelyek azonban nem specifikusak az arachidonsavra. A gyulladásokban szerepet játszó mediátorok például ezeknek az izoenzimeknek az expresszióját serkentik, illetve a gyulladásgátló glukokortikoidok ezt gátolják.

Az arachidonsavfelszabadulás másik útjához két enzim, a foszfolipáz C (PLC) és a diacil-glicerol-(DAG-) lipáz aktivitása szükséges. A PLC hatására keletkezett diacil-glicerol lehet a DAG-lipáz szubsztrátja és belőle szabadul fel arachidonsav. Ez az út kevésbé általános mechanizmus, elsősorban trombocitákban fontos.

A keletkezett arachidonsav (i) kikerülhet a sejtből, (ii) észterifikálódhat CoA-val és a keletkezett arachidonoil-CoA beépül a foszfolipidekbe, (iii)



6-38. ábra. Az arachidonsav felszabadulása foszfolipidekből. *Rövidítések: R, zsírsav szénhirogénlánca; G_1, G_2, G-fehérjék;* PLC, foszfolipáz C; PLA_2, foszfolipáz A_2; DAG, diacil-glicerol; AA—C—, arachidonsav



6-39. ábra. Az arachidonsav oxidációja a sejtekben

oxidálódhat. **Az arachidonsav háromféle úton oxidálódik** a sejtekben *(6-39. ábra)*.

1. A **ciklooxigenáz** által katalizált reakciót követő folyamatokban prosztaglandinok és tromboxánok képződnek
2. A **lipoxigenázok** katalizálják a leukotriének, hidroperoxi- és hidroxieikozatetraénsavak (HETE) képződését.
3. Citokróm-P450 izoenzimek az epoxieikozatetraénsavak (EET) képződését segítik elő **(epoxigenáz-út)**. Ezzel az úttal részletesen nem foglalkozunk.

A fentiekben felsoroltakon kívül az arachidonsav nem enzimatikus úton is oxidálódhat; különböző hidroperoxiszármazékok keletkezhetnek autooxidációval.

A „ciklooxigenáz"-út. Prosztanoid- és tromboxánszintézis

A prosztanoid- és tromboxánszintézisben membránkötött enzimek vesznek részt. A szintézis elsősorban az endoplazmás retikulumban folyik, de a plazma membrán és a magmembrán is tartalmazza a szükséges enzimeket. A szintézis első lépésében dioxigenálással az arachidonsavba két molekula oxigén épül be *(6-40. ábra)*. A reakciót a **ciklooxigenáz** enzim katalizálja: kialakul a ciklopentán gyűrű és prosztaglandin endoperoxid, $\mathbf{PGG_2}$ keletkezik. A PGG_2 15-hidroperoxi-csoportja redukálódik 15-hidroxil-csoporttá a prosztaglandin-hidro- peroxidáz hatására és egy másik prosztaglandin-endoperoxid, a $\mathbf{PGH_2}$ keletkezik. A két egymáshoz szorosan asszociált enzimet együttesen **prosztaglandin-endoperoxid-szintetáznak** nevezik.

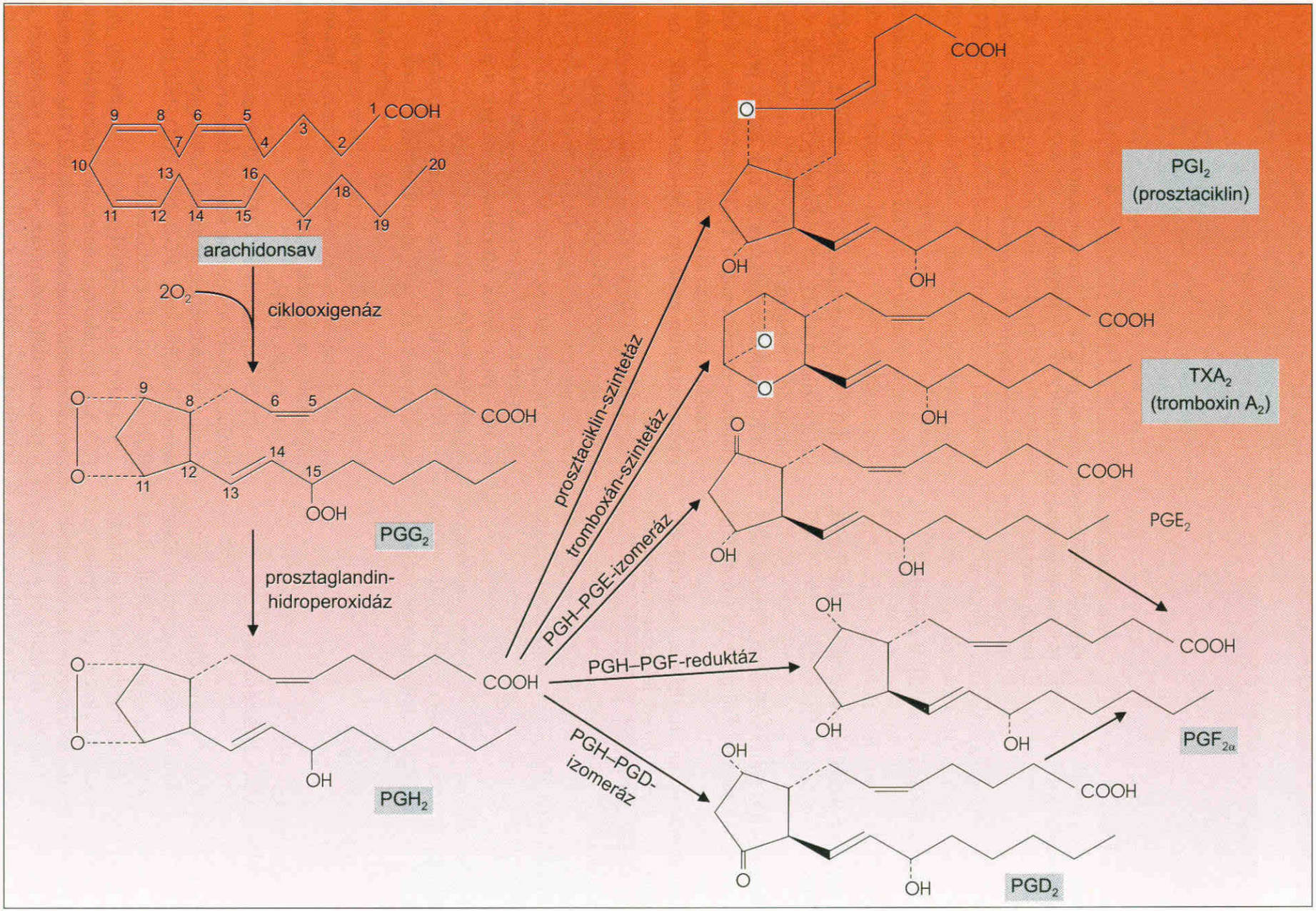
A ciklooxigenáz aktivitását számos nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő gyógyszer (indometacin, szalicilátok stb.) gátolja. Az acetil-szalicilsav (aszpirin) például az enzim kovalens modifikációját (Ser-acetiláció) okozza. Ezért a **gyulladáscsökkentő gyógyszerek általában gátolják a prosztaglandin- és tromboxánszintézist**.

PGH_2-ből különböző reakcióutakon prosztaglandinok, prosztaciklin és tromboxán keletkezik.

PGH_2-ből a 9–11-endoperoxi-híd hidrolitikus hasítása illetve oxidoredukció eredményeképpen a következő három, természetben előforduló **prosztaglandinszármazék** keletkezhet (6-40. ábra): $\mathbf{PGD_2}$, $\mathbf{PGE_2}$, $\mathbf{PGF_{2\alpha}}$

A PGD_2 szintézisét a PGH–PGD-izomeráz katalizálja. A PGE_2 szintézise szintén izomerizáció, az enzim működéséhez glutation szükséges. $PGF_{2\alpha}$ szintézise több úton: PGE_2-ből, PGD_2-ből, illetve PGH_2-ből történhet redukcióval.

A prosztaciklin $\mathbf{(PGI_2)}$ és a tromboxán A_2 $\mathbf{(TXA_2)}$ biciklusos molekula; intramolekuláris oxidoredukció útján képződnek. A $\mathbf{PGI_2}$-szintézist a **prosztaciklin-szintetáz**, a $\mathbf{TXA_2}$ szintézisét a **tromboxán-szintetáz** katalizálja, mindkettő cito-



6-40. ábra. Prosztaglandinok és tromboxán A_2 szintézise

króm P450 típusú enzim; heteroatomot tartalmazó gyűrűs szerkezet alakul ki.

Prosztaglandinok (PG) és tromboxánok nómenklatúrája azon alapul, hogy valamennyi származék prosztánsav – ciklopentángyűrűt tartalmazó 20 C-atomos monokarbonsav – származéknak (prosztanoid) tekinthető. A PG rövidítés utáni betű (PGE, PGF stb.) azt jelzi, hogy a ciklopentángyűrű 9, illetve 11C-atomján milyen oxigéntartalmú funkciós csoport helyezkedik el. A különböző tromboxánokat (TX) szintén különböző betűkkel jelzik (TXA, TXB). A prosztanoidok az oxigén tartalmú funkciós csoportokon kívül kettős kötéseket is tartalmaznak. A kettős kötések száma a prekurzor többszörösen telítetlen zsírsavtól függ. Az arachidonsav-származékok két kettős kötést tartalmaznak – amit alsó indexbe tett számmal jelölnek (PGE_2, PGI_2, TXA_2) – a 13 és az 5C-atomnál. Az eikozatriénsavból származó prosztanoidok egy kettős kötést tartalmaznak (PGE_1) a 13, az eikozapentaénsavból származók három kettős kötést tartalmaznak a 13,5,17C-atomnál. A 13C-atomnál a kettős kötés jelenléte, valamint egy hidroxilcsoport a 15C-atomon karakterisztikus valamennyi prosztanoidra függetlenül attól, hogy melyik zsírsavból származik. A 9C-atomon hidroxilcsoportot tartalmazó származékok esetében a csoportnak a karboxil oldallánchoz viszonyított helyzetét az indexben feltüntetett görög betűvel jelzik ($PGF_{2\alpha}$).

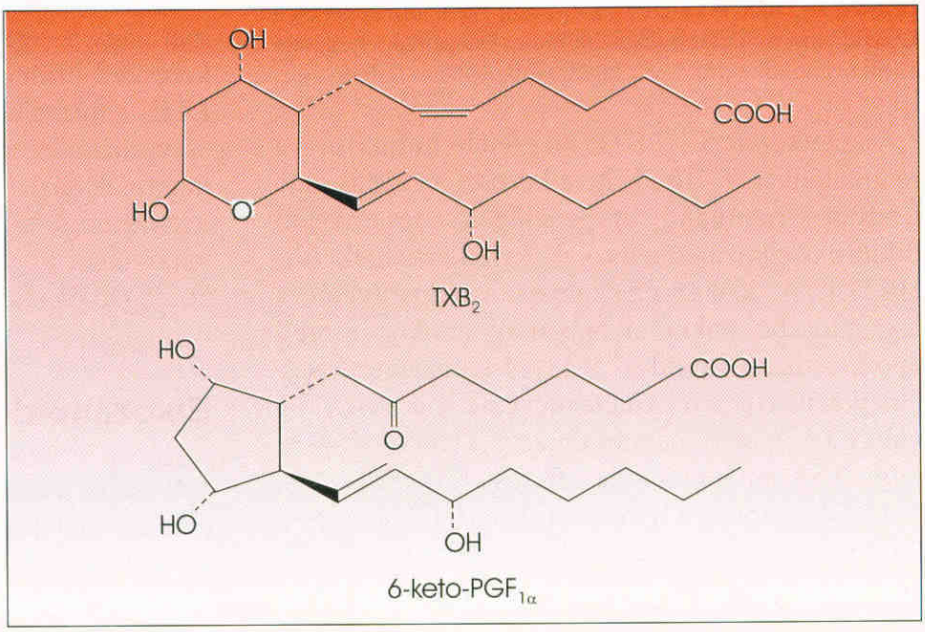
A prosztanoid és a tromboxán katabolizmusa

A különböző oxidált arachidonsavszármazékok általában igen rövid időn belül inaktiválódnak. Termelődésük után rendszerint szecernálódnak. Katabolizmusuk a vérben, illetve szövetekben történhet, a lebontás kitüntetetten fontos helyei a tüdő, vese és a máj. A különböző típusú sejtek a szecernált prosztaglandinokat felveszik és két lépésben inaktiválják. Először a valamennyi PG-származék aktivitásához nélkülözhetetlen 15C-atomon elhelyezkedő OH-csoport oxidálódik ketocsoporttá a **15-hidroxi-prosztaglandin-dehidrogenáz** (PGDH) hatására. A PGDH a citoszolban található, mind NAD^+, mind $NADP^+$ koenzimmel működő formái ismeretesek. A második lépésben a 13 és 14C-atom közötti kettős kötés redukálódik, s ezzel a biológiai aktivitás elvész.

A prosztaciklin hidrolízissel 6-keto-$PGF_{1\alpha}$-vá alakul, a TXA_2 szintén spontán TXB_2-vé *(6-41. ábra)*.

Leukotriének

A leukotriéneket először leukocitákban mutatták ki: elnevezésük is innen származik, valamint onnan, hogy minden leukotriénben van konjugált trién struktúra, ami karakterisztikus UV-abszorpciós spektrumot ad. Szemben a prosztanoidokkal és tromboxánokkal, a **leukotriének** nem ciklusos 20 szénatomos monokarbonsavak; a három konjugált kettős kötésen kívül egy vagy két oxigént tartalmazó szubsztituenst is tartalmaznak. Különböző típusú sejtek, különösen az immunrendszer sejtjei,



6-41. ábra. A 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ és a TXB_2 képlete

különböző mennyiségben képesek különböző leukotriének termelésére. Elsősorban makrofágokban, monocitákban, neutrofil és eozinofil sejtekben, valamint hízósejtekben szintetizálódnak, de termelésükre képesek más sejtek is.

A különböző leukotriénszármazékokat az **LT** rövidítés utáni betűvel jelzik (pl. LTA), a molekulában található kettős kötések számát az alsó indexbe tett szám mutatja (pl. LTB_4).

A lipoxigenáz-út. Leukotriének szintézise és lebontása

A leukotriének szintéziséhez is a foszfolipáz A_2 aktiválása szükséges. Ez a lépés megegyezik a prosztanoidok szintézisének első lépésével. Különbség a prosztanoidszintézissel szemben, hogy a leukotriénszintézist kiváltó stimulus mindjárt a reakciósorozat második lépését katalizáló **lipoxigenáz** aktiválását is jelenti. A lipoxigenázok vastartalmú fehérjék, amelyek azonban nem tartalmaznak hemet. Egy oxigénmolekula beépülését katalizálják az arachidonsav meghatározott szénatomján (5, 12 vagy 15C-atomon).

A leukotriének szintézise szempontjából az 5-lipoxigenálás az alapvetően jelentős út *(6-42. ábra)*. Az **5-lipoxigenáz** kalciumdependens enzim. Az 5-lipoxigenáz hatására 5-hidroperoxi-6,8,11,14-eikozatetraénsav (5-HPETE) keletkezik.

A 12-lipoxigenáz és a 15-lipoxigenáz hatására keletkező 12-HPETE, illetve 15-HPETE további metabolizmusa és a képződő hidroxilált termékek biológiai hatásainak vizsgálata az eikozanoidkutatás egyik legdinamikusabban fejlődő ága.

A keletkezett 5-HPETE megfelelő hidroxisavvá redukálódhat, 5-HETE keletkezhet: az alifás lánc további pontjain oxigenálódhat és végül dihidroxi-eikozatetraénsavak keletkezhetnek (di-HETE). A leukotriénszintézis szempontjából a legfontosabb reakció azonban az, amikor instabil epoxi-zsírsav, 5-oxido-7,9,11,14-eikozatetraénsav keletkezik. Ezt a vegyületet nevezik leukotrién A_4-nak (LTA_4), mert már tartalmazza a leukotriénekre jellemző konjugált kettős kötéses szerkezetet.

Az LTA_4 mind a leukotrién B_4- (LTB_4), mind a leukotrién C_4- (LTC_4) szintézis közös intermedierje. Az $LTA_4 \rightarrow LTB_4$, illetve az $LTA_4 \rightarrow LTC_4$ átalakulás sebessége meghatározó a leukotriének bioszintézisében, szemben a prosztanoidszintézissel, ahol az arachidonsavat oxidáló ciklooxigenáz a sebességmeghatározó lépés.

LTA_4-ből (i) víz belépésével egy epoxid-hidroláz segítségével LTB_4 keletkezik, ami kalciumdependens folyamat.

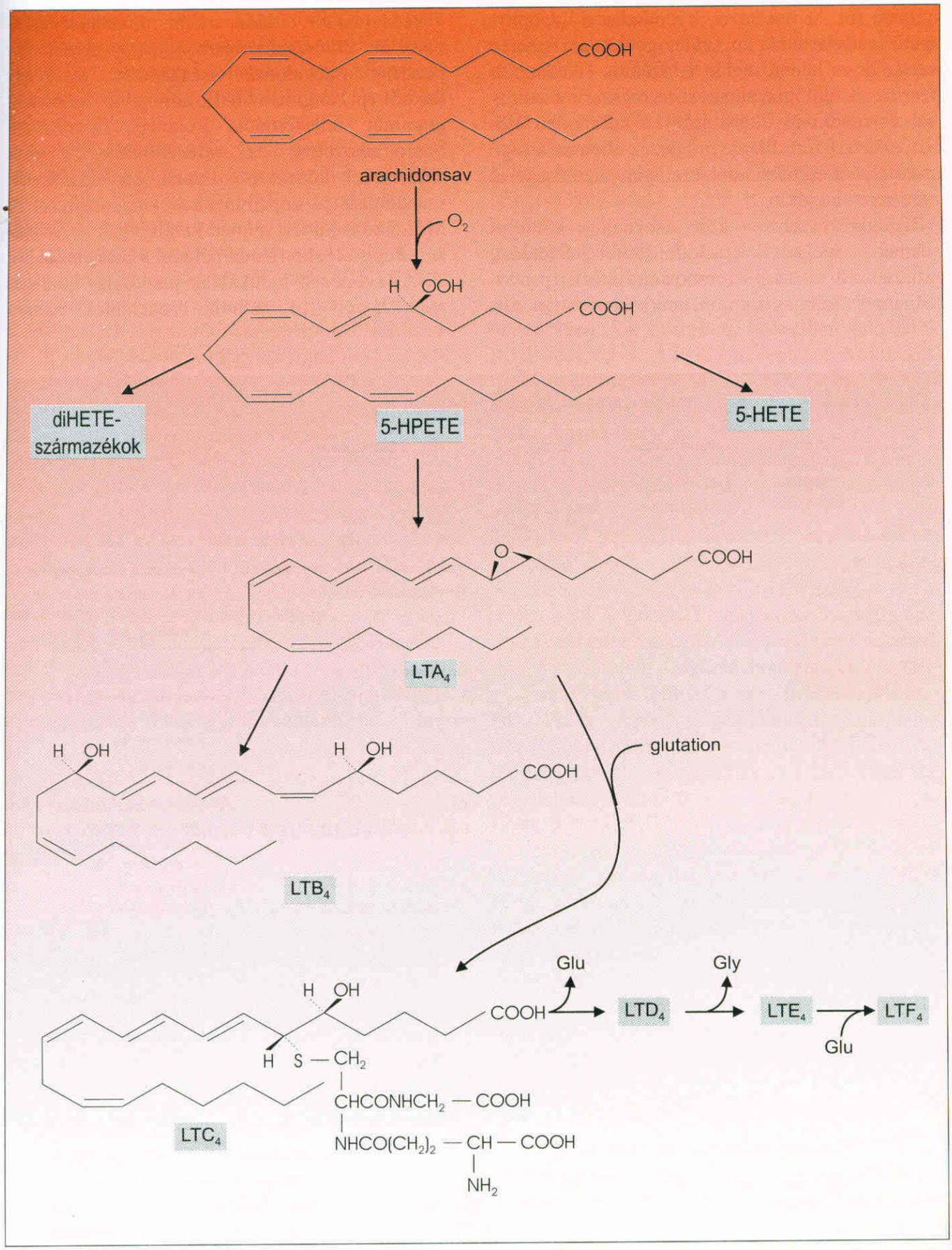
A glutationnal történő kapcsolódás (ii) – amelyet a biotranszformációban is jelentős szerepet játszó glutation-S-transzferáz katalizál – útján peptidil-lipid konjugátum az LTC_4 jön létre. LTC_4-ből a glutaminsav (γ-glutamil-transzpeptidáz), illetve a glicin (dipeptidáz) lehasadásával, a glutaminsav visszalépésével további leukotriénszármazékok (LTD_4, LTE_4, LTF_4) képződhetnek. A peptid-leukotrién-származék biológiai aktivitása szempontjából alapvető, hogy a peptid az arachidonsavszármazék 6C-atomján helyezkedjen el, illetve, hogy a konjugált trién szerkezet megmaradjon.

A leukotrién-bioszintézis fontos sajátossága, hogy enzimei a prosztanoidszintézis enzimeitől eltérően csak részben membránhoz kötött, vagy az aktiválódás során membránhoz transzlokálódó fehérjék. Az 5-lipoxigenáz az aktiválódás során transzlokálódik a membránhoz, a glutation-S-transzferáz, a γ-glutamil-transzpeptidáz és a dipeptidáz membránkötött enzimek. A sejtek a különböző leukotriénszármazékokat szecernálják.

A leukotriének katabolizmusa igen gyors folyamat. Lebontásuk intracellulárisan történik. Az LTB_4 sejttípusonként változó módon oxidálódik. A peptidolipid-származékok gyorsan eliminálódnak a vérből, speciesenként változó mértékben a máj vagy a vese veszi fel őket. A májból az epén keresztül ürülnek. Az epébe elsősorban N-acetil-LTE_4 formájában, de átalakulás nélkül is szecernálódhatnak. Az N-acetilálódás jelentős inaktiválódást eredményez. A vesébe kerülő leukotriének főleg LTE_4 formájában kerülnek kiválasztásra a vizelettel. A katabolizmusban más konjugációs utak is lehetségesek.

Eikozanoidok biológiai hatásai

Az eikozanoidokkal kapcsolatos kutatások az elmúlt évtizedekben óriási lépésekkel haladtak előre, az ezzel összefüggő ismeretanyag rohamosan gyarapodott, számos fiziológiai és patológiai folya-



6-42. ábra. Leukotriének szintézise

matban (pl. hemosztázis, hypothalamo-hypophysealis rendszer funkciói, szülés, gyulladás) ismert a szerepük és jelentőségük. A számos eikozanoid-származék biológiai hatása szervről szervre változhat és rendkívül eltérő lehet a különböző élőlényekben. Ezért, illetve mindezek ellenére átfogó szemlélet az eikozanoidok biológiai jelentőségéről még nem alakult ki.

Rendkívül széles a köre azoknak a stimulusoknak, melyek arachidonsavfelszabadulást, prosztanoid- és/vagy tromboxánszintézist provokálhatnak. Számos hormon, neurotranszmitter, növekedési faktor, citokin, enzim, immunkomplexek váltanak ki meghatározott sejteken receptordependens arachidonsavfelszabadulást foszfolipidekből (pl. angiotenzin II, adrenalin, szerotonin, glutamát, interferonok, trombin), illetve több neurotranszmitter az intracelluláris Ca^{2+}-szint emelésével közvetve stimulál arachidonsavfelszabadulást (pl. dopamin, adenozin, noradrenalin). Más eikozanoidok szintén kiválthatják termelésüket. Peptid-leukotriének például a bronchusokban TXA_2 szintézist indukálnak patológiás körülmények között (pl. asthma bronchiale). Számos

6-6. táblázat. Az eikozanoidok jelentősebb biológiai hatása

	Szignál transzdukciós rendszer	Trombocita		Érfal		Simaizom		Egyéb
		pro-aggregáns	anti-aggregáns	vazokonstrikció	vazodilatáció	kontrakció	relaxáció	
PGE_2	$G_s \rightarrow$ cAMP ↑ $G_i \rightarrow$ cAMP ↓ Ca^{2+} ↑+	+			+	- uterus corpus - GI longitudinális	- uterus cervix - GI cirkuláris - bronchus	- gyomorsav-szekréciógátlás - idegrendszeri hatások: láz, katecholamin-felszabadulás szabályozása, „ébrenlét"
$PGF_{2\alpha}$	$G_q \rightarrow$ PI ↑			+		uterus cervix GI bronchus		- luteolitikus hatás - központi idegrendszeri hatások - veseműködés - gyulladás
PGD_2	$G_s \rightarrow$ cAMP ↑					- GI - bronchus		- idegrendszeri hatások: hőcsökkentés, alvás, neurondifferenciálódás, szinaptogenezis - veseműködés - tumornövekedés
PGI_2	$G_s \rightarrow$ cAMP ↑							- gyomorsavszekréció-gátlás - „citoprotektív" hatások - központi idegrendszeri hatások - veseműködés
TXA_2	$G_q \rightarrow$ PI ↑					- bronchus		- májregeneráció
LTB_4								- gyulladás
peptid -LT	$G_q \rightarrow$ PI ↑					- bronchus		- immunválasz - negatív inotrop hatás, pitvari K^+-csatorna-nyitás - gyulladás

Rövidítések: GI, gastrointestinalis traktus; G_s, G_i, G_q, G-fehérjék; PI, foszfatidilinozitol-metabolizmus

membránkárosító hatás vagy ischaemia több szervben és szövetben eikozanoidszintézist indukál. Így a vérkeringési zavarokkal járó állapotokban közvetve az eikozanoidok képződése fontos tényezője lehet kóros folyamatoknak.

Leukotriénszintézist leggyakrabban az alábbi anyagok indukálhatnak: kemotaktikus peptidek, így az f-Met-Leu-Phe, PAF, IgE választ kiváltó antigének, az egyik komplement komponens (C5a), bakteriális endotoxinok, fagocitozist kiváltó anyagok, más eikozanoidszármazékok (pl. 12 HPETE).

Az eikozanoidok stimulus nélkül igen kis mennyiségben termelődnek. Stimulus hatására 10–30 s belül hirtelen, akár a nyugalmi szint 50-szeresére is fokozódik a szintézisük. Képződésük után nem raktározódnak, hanem intracelluláris mediátorként, illetve szecernálódva a sejtekből receptorokon keresztül lokális mediátorokként hatnak. Van autokrin funkciójuk, de hatásukat más sejteken is kifejthetik. Lebontásuk, illetve inaktiválódásuk azonban igen gyors folyamat (a tromboxán A_2 féléletideje például vizes oldatban 37 °C-on mindössze 30 s), tehát az eikozanoidoknak inkább lokális, mintsem általános, az egész szervezetre kiterjedő hatásaik vannak. Hatásaik rendkívül különbözőek és sokszor egymással ellentétesek *(6-6. táblázat)*, a különböző eikozanoidszármazékok gyakran egymás antagonistái.

Eikozanoidreceptorok. Eikozanoidok és szignál transzdukciós rendszerek

Az eikozanoidok plazmafelületi receptorokhoz kötődve fejtik ki hatásaikat. A különböző természetes prosztanoidszármazékoknak igen specifikus receptoraik (sőt receptor altípusaik) vannak. A receptorok különböző G-fehérjékkel, illetve szignál transzdukciós rendszerekkel kapcsolódnak (6-6. táblázat). G_s-, G_i-, G_q-n keresztül a receptor–PG kapcsolatok cAMP-szint-emelkedést vagy -csökkenést, intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedést idéznek elő a receptorok (illetve ligandjaik) típusától függően. Mind az arachidonsav, mind az oxigenált származékok ioncsatornák és enzimek aktivitását befolyásolhatják. A különböző receptorokon, illetve az ezekhez csatlakozó szignál transzdukciós utakon keresztül kiváltott biológiai hatások igen eltérőek lehetnek az élővilágban. A PGD_2-receptorok trombocitákon és simaizomban, idegszövetben, a méh, a légutak, valamint a gastrointestinalis traktus izomzatában találhatók. A PGE_2 igen sokféle biológiai hatást válthat ki; simaizom-kontrakciót vagy relaxációt (gastrointestinalis, urogenitalis traktus, érfal), neurotranszmitter-felszabadulás gátlását vagy serkentését, lipolízis gátlását, gyomorsavszekréció-gátlást, gyulladás gátlását, immunglobulin-expreszió gátlását, a vízreabszorpció gátlását, a trombocita-aggregáció serkentését okozhatja. Ennek megfelelően igen sok szervben, szövetben találhatók PGE_2-receptorok. A $PGF_{2\alpha}$-receptorok is több sejttípusban előfordulnak. A sejtproliferáció szabályozásában például az EGF hatásra termelődő PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ hatását ismerték fel.

A PGI_2 elsősorban az érendotheliumban termelődik és receptorai a trombocitákban és az érfal simaizomsejtjeiben expresszálódnak (lásd 6.5. fejezet). PGI_2-receptorok azonban más szövetekben is előfordulnak, így például idegszövetben, thymusban. A TXA_2-receptorok részben a PGI_2-receptorokkal ellentétes hatásokat közvetítenek, így trombocitákban és az érfal simaizomsejtjeiben. Fontos a szerepük a légutak simaizmaiban is.

LT-receptorok több szervben, illetve sejtben találhatók, így lépben, a gastrointestinalis traktusban, tüdőben, agyban, neutrofil granulocitában. Az LTB_4-receptorok a leukociták és a limfociták felszínén találhatók, G-proteineken keresztül számos sejtfunkciót befolyásoló hatásuk van: kemotaxis, kemokinézis, aggregáció serkentése. Mindez az LTB_4 gyulladásokban betöltött szerepével függ össze. Lipoxigenáz metabolitok például (szerotoninszenzitív) K^+-csatornák működését szabályozzák neuronokban, valamint protein-kinázok aktivitására hatnak, pl. a neuroszekrécióban jelentős Ca^{2+}–kalmodulin dependens protein-kináz II-t lipoxigenáz metabolitok gátolják.

Az epoxigenáz-út egyes termékeinek a Na^+,K^+-ATPáz gátló hatását ismerik vesében és a corneában.

Az eikozanoidok hatásaik jelentős részét sejtek, illetve sejtorganellumok kontrakciójának befolyásolásán keresztül fejtik ki. A különböző eikozanoidszármazékok függően a származéktól, illetve a „célsejttől", egyaránt előidéznek kontrakciót és relaxációt. PGE_2 például a gastrointestinalis

traktus longitudinális simaizmainak kontrakcióját, de a cirkuláris simaizmok relaxációját váltja ki. Ugyanaz a származék kiválthat sejt- és sejt-organellum-kontrakciót (pl. TXA_2 bronchus simaizom kontrakcióját, illetve a trombocita tubuláris rendszerének kontrakcióját okozza). Peptid-leukotriének (LTC_4, LTD_4, LTE_4) például, szemben az LTB_4-el elsősorban – G-fehérjékhez kötött receptoraikon keresztül – simaizom-kontrakciót kiváltva hatnak (pl. asthma bronchialéban légutak összehúzódását okozzák).

A veseműködés, a reprodukciós ciklus szabályozásában az eikozanoidok hatásainak kutatása viszonylag hosszú múltra tekinthet vissza. Az elmúlt évtizedben az eikozanoidok szerepe az idegrendszer működésében került az érdeklődés egyik középpontjába. A PGD_2, PGE_2, LTC_4, LTB_4, valamint az epoxigenáz metabolit EET-k szerepét és hatásait a már előbb is említett hypothalamo-hypophysealis rendszer működésében, a PGE_2, 12-HPETE, LTC_4 funkcióit a szinaptikus transzmisszióban ismerték fel.

Az eikozanoidok intercelluláris mediátor funkciót töltenek be. A hidroxi-leukotrién LTB_4 különböző prosztaglandinszármazékokkal együtt a gyulladásos folyamatok fontos mediátora. A különböző szervek fiziológiai működésében (és az egyedfejlődésben) oly jelentős sejt-sejt közötti kölcsönhatásokban az eikozanoid mediátor funkció igen lényeges. Ez például a májműködés szabályozásában (Kupffer-sejtek, sinus endothelsejtek és hepatociták közti kapcsolatok) az érfalműködés, -tónus fenntartásában (endothel–simaizomsejt kapcsolat), a korábban említett idegrendszeri hatásokban jelentős. A sejt-sejt kölcsönhatások igen sajátos módja, amit PGH_2, illetve LTA_4 ,mint szintézis intermedierek esetében figyeltek meg. A stimulált neutrofil granulociták által termelt LTA_4-t például különböző sejtek felvehetik és különböző módokon alakíthatják tovább. Trombocitákban, endothelsejtekben LTC_4, vörösvértestekben LTB_4 képződik belőle, amelyek különböző hatásúak és a funkciójuk is eltérő a változó patológiás állapotokban.

Az eikozanoidreceptorokkal, illetve az egyes származékok hatásainak szignál transzdukciós mechanizmusaival kapcsolatos kutatások jelenleg rendkívül intenzívek. A molekuláris biológiai módszerekkel nyert újabb ismeretanyag (receptor cDNS-ek klónozása) – összhangban a korábban kapott eredményekkel – igen fontos terápiás lehetőséget jelent a közeljövőben.

Számos betegség patogenezisében ismerték fel az eikozanoidok szerepét, ezért képződésük és lebontásuk, valamint hatásmechanizmusuk ismerete változatlanul az érdeklődés középpontjában áll.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerző köszönetet mond Garzó Tamásnak és Dr. Kardon Tamásnak.

6.5.

Hemosztázis

Machovich Raymund

Hemosztázis fogalma alatt az érpályának azt a képességét értjük, amely lehetővé teszi, hogy a vér az érpályán belül megtartsa folyékony állapotát és abból kikerülve elveszítse azt, ún. véralvadékot hozva létre. A vér ezen tulajdonsága biokémiai reakciók egyensúlyi állapotának függvénye.

Ezen egyensúlyi állapotnak bármilyen irányú eltolódása patológiás elváltozáshoz vezethet:

1. a véralvadás hiányossága vagy az alvadék fokozott oldódása vérzékenységgel járó betegségeket (haemorrhagiás kórképeket),
2. míg a fokozott alvadékképződés vagy gátolt alvadékoldódás thrombosisos betegségeket (thromboemboliás kórképeket) eredményezhet.

A hemosztázis zavara képezi a cardiovascularis kórképek egyik alapját, amely napjainkban, a „jóléti társadalmakban" a haláloki statisztikák első helyén áll, de szorosan kapcsolódik olyan egyéb és súlyos betegségekhez, mint például az atherosclerosis, általában a gyulladással járó kórképek, a tumormetasztázisok kialakulása. A rosszindulatú daganatos megbetegedések több mint 90%-ában mutatható ki a hemosztázis zavara.

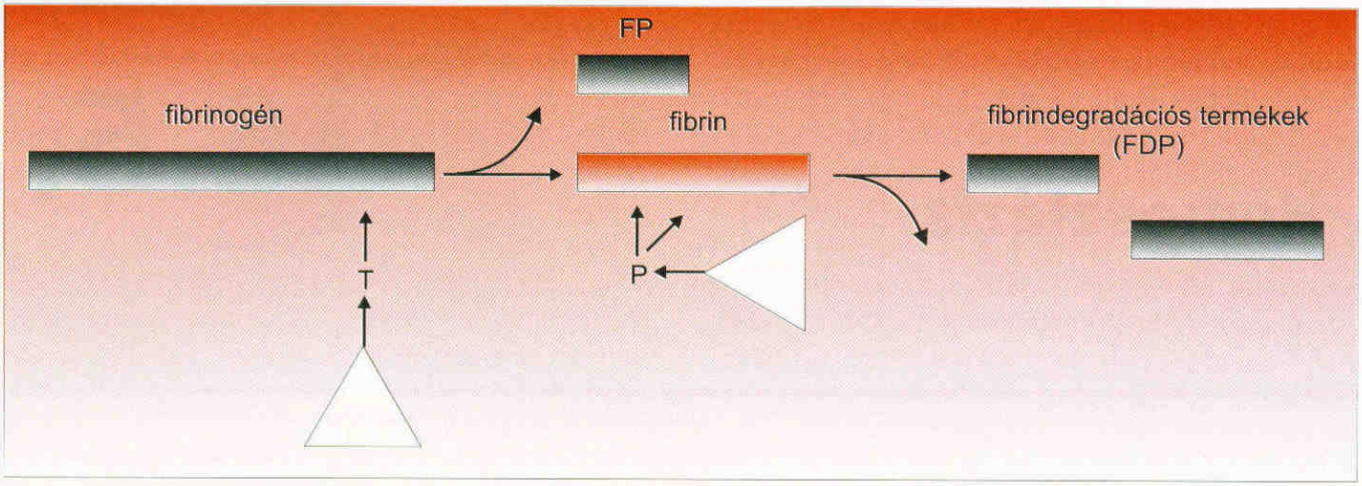
A hemosztázis fenntartásához mind molekuláris, mind pedig celluláris komponensek szükségesek; ezek legfőbb képviselői a véralvadási-fibrinolitikus rendszer, a vérlemezkék (trombociták), a hepatociták, a granulocita–monocita–makrofág rendszer, valamint az endothelium.

A véralvadék képződése és feloldódása

Molekuláris szinten a véralvadék létrejöttének és megszűnésének lényege, hogy a vérplazma egy bizonyos fehérjemolekulája, a **fibrinogén** oldékonysága vizes fázisban proteolízis következtében megszűnik és ún. fibrinaggregátum jön létre. További degradációk eredményeképpen viszont ezen gél állapot szűnik meg, mert a keletkezett fehérjerészek vízoldékonyak *(6-43. ábra)*. A folyamat első fázisához, amelyet véralvadásnak nevezünk, egy celluláris esemény társul, a **vérlemezkék aggregációja**. Ez a komplex folyamat teszi lehetővé, hogy a sérülés következményeként ne vérezzen el az ember, ill. ez az oka annak, hogy ha az érpályán belül történik a károsodás, thrombosis jöhet létre.

A folyamat második fázisához is, amelyet fibrinolízisnek nevezünk, társulhatnak celluláris események; ezekben elsősorban a granulocita–makrofág rendszer sejtjei vesznek részt. Normális körülmények között a folyamatok egymással egyensúlyban vannak (mindig keletkezik és mindig fel is oldódik valamennyi fibrin). Mindkét folyamat molekuláris komponenseinek szintéziséért és lebontásáért elsősorban a máj felelős, míg a folyamatok beindításában az endothelium játssza a döntő szerepet.

A fibrinogén meglehetősen nagy koncentrációban fordul elő a vérkeringésben. A hemosztázis kulcsenzimei (a trombin, a plazmin) zimogén (proenzim, inaktív prekurzor) formában szintetizálódnak a májban, ahonnan a vérkeringésbe kerülnek.



6-43. ábra. A véralvadási–fibrinolitikus rendszer legalapvetőbb reakciói. *A fibrinogén → fibrin átalakulást a trombin (T) katalizálja; a lehasadt fibrinopeptid (FP) oldatban marad, míg a fibrin egy másik, majd további fibrinmolekulákhoz kötődve vizes fázisban nem oldódó aggregátumot hoz létre. A fibrin degradációját a plazmin (P) katalizálja; a proteolitikus reakciók olyan termékeket (FDP) eredményeznek, amelyek vizes fázisban oldódnak. Mind a trombin, mind a plazmin keletkezése rendkívül komplikált és több szinten szabályozott reakciók eredménye, amelyeket általános konvenciók szerint véralvadásnak, illetve fibrinolízisnek neveznek, amit ezen az ábrán két háromszög jelképez. A két enzim keletkezése a véralvadás és a fibrinolízis szabályozását jelenti*

A véralvadás molekuláris és celluláris mechanizmusai

A fibrinogén és a fibrin

A fibrin keletkezése. Ha valahol **trombin** keletkezik, akkor lehetőség nyílik arra, hogy a fibrinogénből 4 peptid lehasadjon; 2 fibrinopeptid A és 2 fibrinopeptid B *(6-44. ábra)*.

A **fibrinogén proteolízise** során már az első fibrinopeptid A hidrolízise olyan fibrinmolekulát eredményez, amelynek megváltoznak fizikokémiai tulajdonságai, és így alkalmassá válik arra, hogy egy másik hasonló molekulával aggregátumot hozzon létre. Bizonyos kígyómérgek hatására csak egyfajta fibrinopeptid eltávolítására kerül sor. A trombin, bár különböző reakciósebességekkel, mindkét fajta fibrinopeptidet lehasítja. Azokat a fibrinogénmolekulákat, amelyek elvesztették összes **fibrinopeptid A** és **B** részüket, **fibrin monomereknek** is nevezzük. Az ilyen monomerek szabályos szerkezetet alkotva kötődnek egymáshoz úgy, hogy mind oldalaik, mind végük között kölcsönhatások alakulnak ki; magát a folyamatot fibrinpolimerizációnak is szokták nevezni (ez a reakciósor nem igényel enzimes katalízist). A vízben oldhatatlan fibrin lényegében ilyen monomerek halmazát jelenti *(6-45. ábra)*.

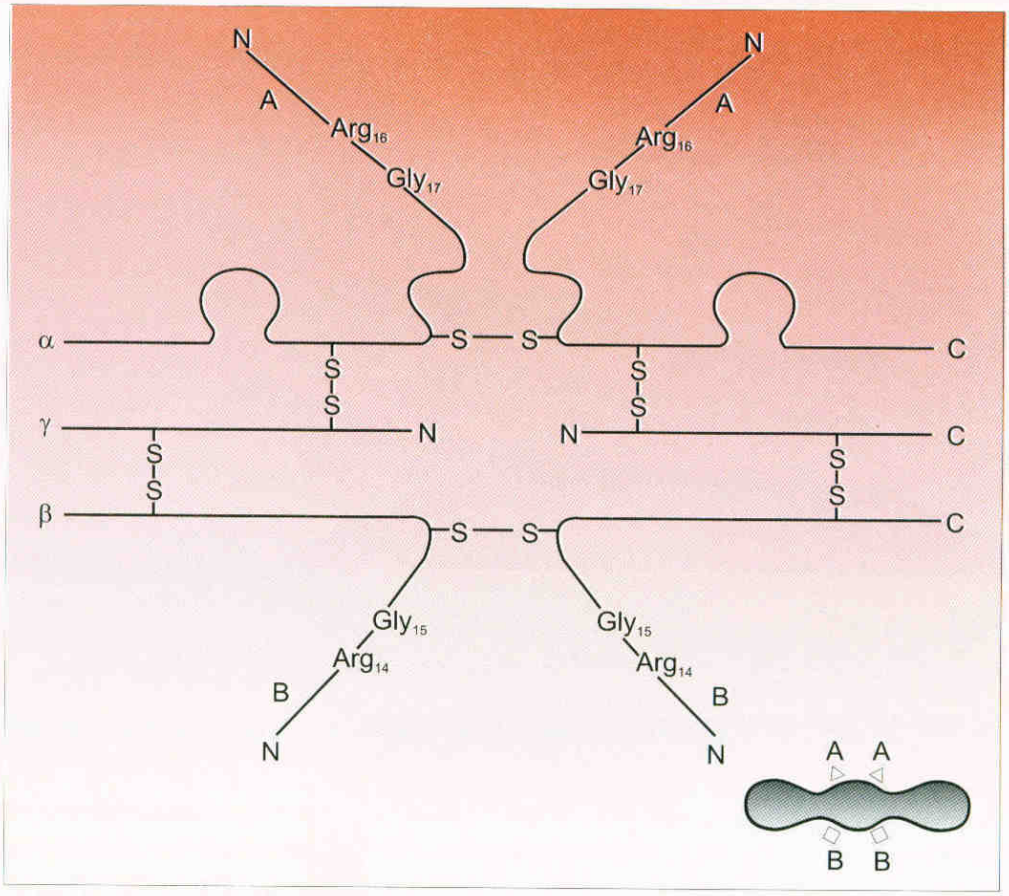
A fibrin további módosulásokon mehet át, ha **aktivált XIII-faktor** (F-XIIIa) van jelen. Az F-XIIIa szulfhidril-ligáz enzim (aktív centrumát -SH csoport képezi) és az ún. transzglutaminázok enzimcsaládjába tartozik, amelyek egyik funkciója az, hogy a fibrin szerkezetében kovalens keresztkötéseket hoz létre a gamma-láncok, illetve kisebb reakciósebességgel az α-láncok között *(6-46. ábra)*; ezt a fázit **fibrinstabilizációnak** szokták nevezni.

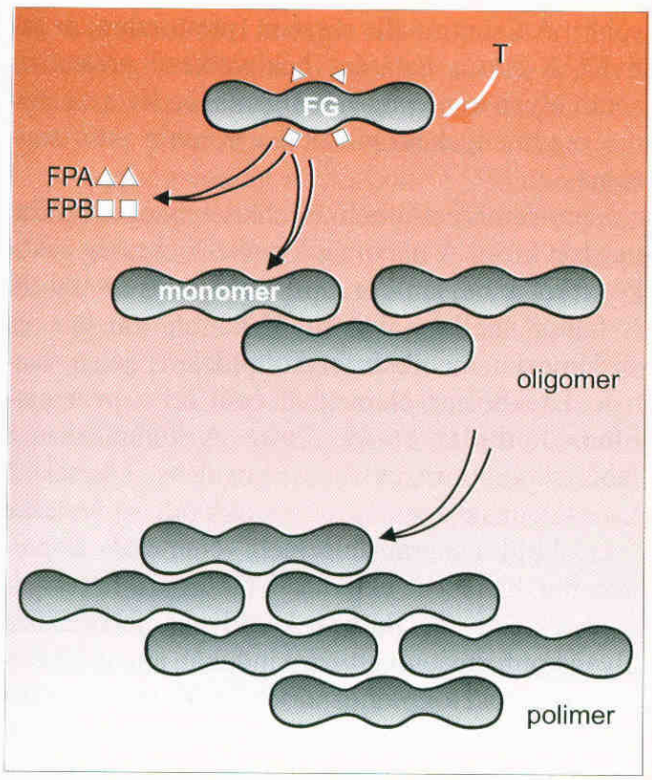
Az F-XIIIa klinikai jelentőségét elsősorban az adja, hogy a thrombosis késői fázisában, amikor már a fibrinben a keresztkötések kialakultak, a terápiás beavatkozások sokszor eredménytelenek (lásd a Fibrinolízis c. Fejezetet is). Az F-XIIIa hiánya viszont vérzékenységi problémákat okozhat, mert a sérülés helyén a fibrinháló „laza" marad.

A vérplazmában a XIII-faktor elsősorban a fibrinogénhez kötött formában található. Aktiválásáért a trombin felelős; vagyis ahol trombin keletkezik, a fibrinogén átalakulhat fibrinné és a XIII-faktor is aktiválódhat.

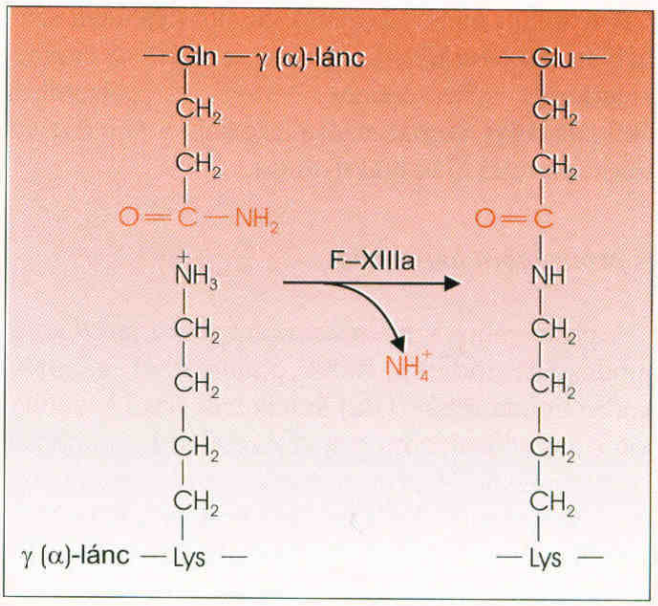
Mint az eddigiekből kitűnik, a trombin felelős a fibrin keletkezéséért és indirekt módon annak további módosulásáért. A trombin, hasonlóan a tripszinhez, a szerin-proteázok csoportjába tartozó enzim, a peptidkötések hidrolízisét tekintve azon-

6-44. ábra. A fibrinogén szerkezete. *A fibrinogén elnyújtott alakú glikoprotein, amely 3 láncból épül fel (Aα-lánc Bβ-lánc, γ-lánc). A fibrinogén szimmetrikus szerkezetű, mert két ilyen három láncú szerkezet kapcsolódik össze és végső fokon úgy írható le, mint: $(A\alpha, B\beta,\gamma)_2$. A láncokat S-S hidak tartják együtt. A trombinra és néhány kígyóméregre specifikus peptidkötés (Arg-Gly) az Aα- és Bβ-láncok N-terminális végén található. A fibrinogénmolekulát egyszerűsített ábrázolási formában is bemutatjuk az ábra jobb alsó sarkában*

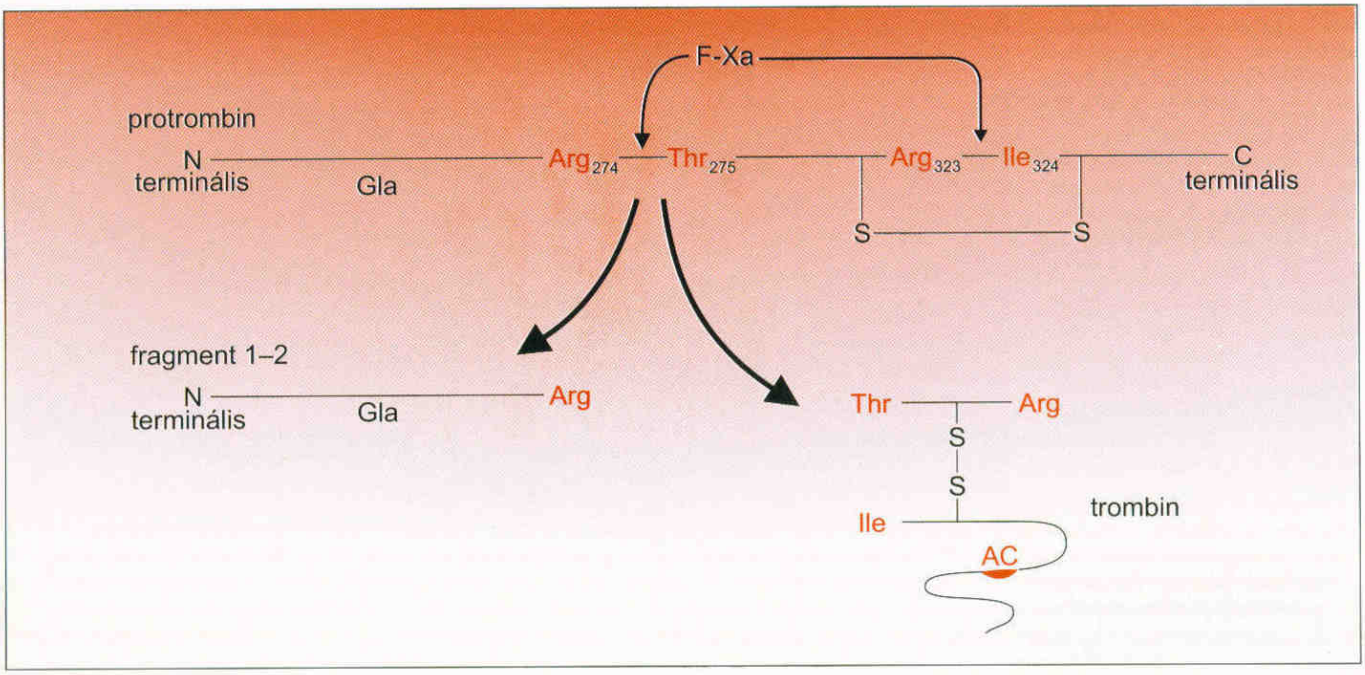




6-45. ábra. Fibrinpolimerizáció. *Rövidítések: fibrinogén (Fg), trombin (T) és fibrinopeptid A és B (FPA és FPB)*



6-46. ábra. Keresztkötések kialakulása a fibrinláncok között. *Az aktivált XIII-faktor (F-XIIIa) egy glutamin és egy lizin oldallánc közötti savamid („izopeptid") kötés kialakulását katalizálja*



6-47. ábra. A trombin keletkezése protrombinból. *Rövidítések: aktivált X-faktor (F-Xa), aktív centrum (AC), γ-karboxiglutamát (Gla)*

ban nagyfokú specificitással rendelkezik; egy fehérjében egy vagy két kötésnél nem hidrolizál többet. A trombin (36 kDa) két láncból épül fel, amelyeket S-S híd tart össze *(6-47. ábra)*.

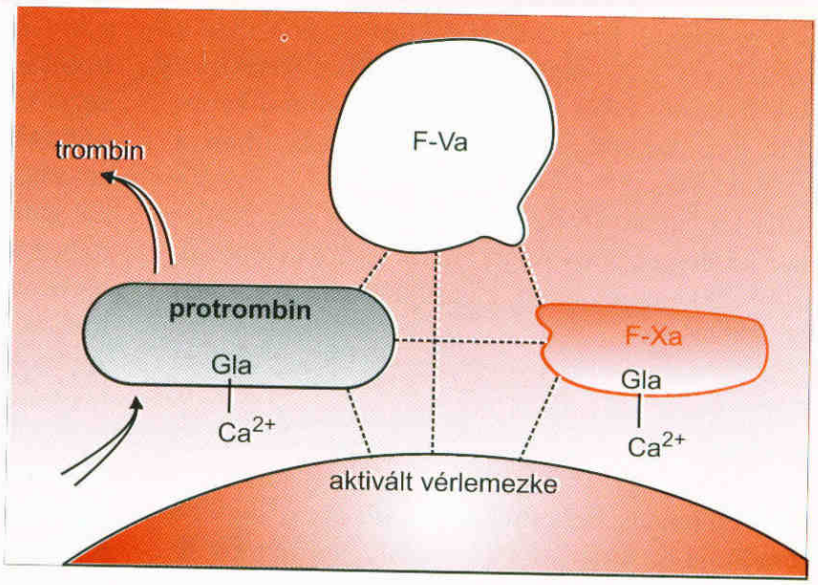
A trombin szabályozása

A trombin mennyiségének és aktivitásának szabályozására két lehetőség van: az egyik az enzimkeletkezés sebességének, vagyis a protrombin aktiválásának szabályozása, a másik a keletkezett trombinmolekulák inaktiválása.

A protrombin aktiválása

A protrombin szintézise során poszttranszlációs módosulás történik; több glutamátból gamma-karboxiglutaminát (Gla) keletkezik (lásd később), majd a módosult zimogén szekretálódik a májból a vérkeringésbe. A protrombin enzimatikusan inaktív glikoprotein, ha azonban a molekulában két meghatározott peptidkötés hidrolitikusan bomlik, **trombin** keletkezik (6-47. ábra). A két kötés hidrolízisét az **aktivált X-faktor** mellett egyes exogén enzimek (pl. kígyómérgek) is katalizálják. Az egyik proteolitikus lépés során a protrombin két részre hasad; az N-terminális rész tartalmazza a Gla-aminosav oldalláncokat (fragment 1-2). A protrombinban ez a szekvencia felelős a különböző lipid–fehérje–Ca^{2+} kölcsönhatásokért (lásd később). A C-terminális részben (pretrombin) az aktivált X-faktor hatására bekövetkező proteolízis során olyan konformációváltozás jön létre, amelynek eredményeként kialakul a trombin aktív centruma.

A protrombin proteolízisének sebessége azonban nagyon kicsi. A maximális reakciósebesség akkor következik be, amikor a protrombin és az aktivált X-faktor mellett aktivált V-faktor, kalcium és vérlemezke membránfoszfolipidek is jelen vannak. Ezekből az elemekből épül fel a **protrombináz komplex** *(6-48. ábra)*. A komplexben a fehérjekomponensek nem kovalens kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz az aktivált vérlemezke foszfolipidmembrán-felszínén. Nemcsak a protrombin, hanem az aktivált X-faktor is Gla-t tartalmaz. A Ca^{2+} a Gla-hoz kötődve a fehérjékben olyan konformációváltozást indukál, amely lehetővé teszi a foszfolipidhez történő kötődést. Az **aktivált V-faktor** olyan proteo- litikusan módosult vérplazmafehérje (nem proteáz), amely kofaktor szerepet tölt be a reakcióban. A komplexben a molekulák konformációváltozása és orientációja következtében a protrombinaktiváció sebessége 300 000-szeresére fokozódhat.



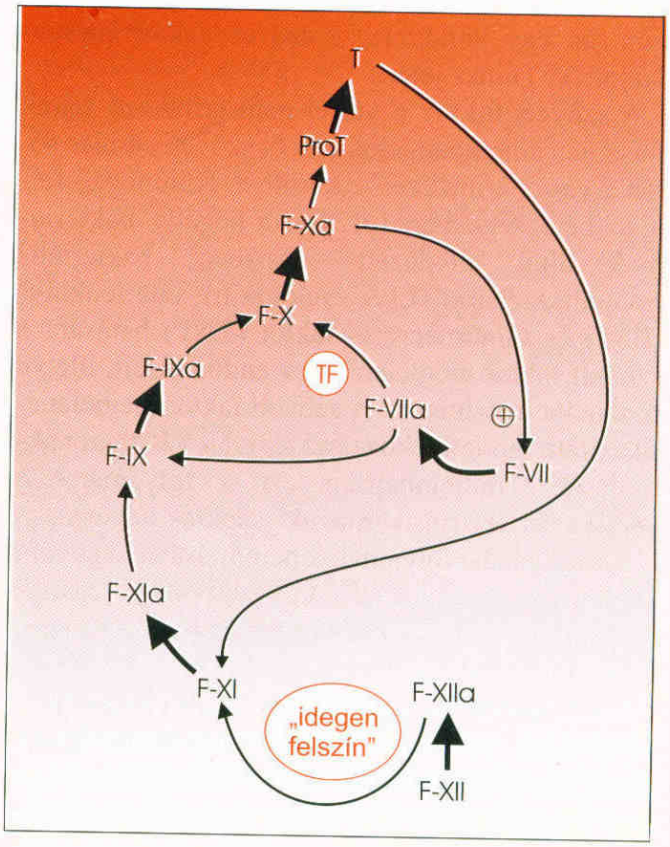
6-48. ábra. A protrombináz komplex. *Rövidítések: aktivált X-faktor (F-Xa), aktivált V-faktor (F-Va)*

Az aktivált X-faktor keletkezése

A X-faktor két láncból felépülő, Gla-t tartalmazó glikoprotein, amelynek aktiválása limitált proteolízissel történik. Az aktiválás során egyéb kofaktorok, foszfolipidfelszínek és Ca^{2+} jelenlétében **aktiválódási komplexek** alakulnak ki. Ezek a komplexek felfoghatók úgy is, mint az érpályában ideiglenesen képződött kompartmentek, amelyekben a proenzimek aktiválásának a sebessége több nagyságrenddel növekszik. A X-faktor aktiválódása során keletkező komplexeket az egyszerűbb áttekinthetőség céljából nem ábrázoljuk, de hangsúlyozzuk, hogy nélkülük a véralvadási folyamat (a trombin képződése) nem hatékony. A komplexek rendkívül hasonlóak a protrombináz komplexhez (funkcióikat azonos mechanizmusok szerint fejtik ki), csak a protrombint a X-faktor helyettesíti, az V-faktort a VIII-faktor vagy szöveti faktor (tissue-faktor), az enzimet (aktivált X-faktor) pedig az aktivált IX-faktor vagy az aktivált VII-faktor.

A X-faktor aktiválódását több enzim is képes katalizálni; az endogén szerin-proteázokat képviselő **aktivált VII-faktor** és az **aktivált IX-faktor** mellett **kígyómérgek** (pl. Russel vipera mérge, amely szintén szerin-proteáz) és egy cisztein-proteáz is, amelyet kizárólag tumorsejtek termelnek (ezért **cancer procoagulansnak** is nevezik).

A X-faktor endogén aktiválásának két útja lehet *(6-49. ábra)*, a F-VIIa nemcsak a X-faktort aktivál-



6-49. ábra. A véralvadási zimogének aktiválódása. *A faktor nomenklatúra a szerin-proteázokat, illetve az azoknak megfelelő zimogéneket jelenti. A vastag nyíl az átalakulást, a vékony nyíl az enzimhatás célpontját jelzi. Rövidítések: T, trombin; ProT, protrombin; F-Xa, aktivált X-faktor; F-X, X-faktor; F-VIIa, aktivált VII-faktor; F-VII, VII-faktor; TF, szöveti faktor; F-IXa, aktivált IX-faktor; F-IX, IX-faktor; F-XIa, aktivált XI-faktor; F-XI, XI-faktor; F-XIIa, aktivált XII-faktor; F-XII, XII-faktor (a szöveti faktor és „idegen felszín" szerepét lásd később)*

ja közvetlenül, hanem a IX-faktort is, és ezután a képződött F-IXa hatékonyan aktiválja a X-faktort. A keletkezett F-Xa nemcsak a protrombint képes aktiválni, hanem pozitív visszacsatolás útján a VII-faktort is.

Bármilyen úton történik is a X-faktor aktiválódása, a kérdés az, hogy miért, mikor és hol keletkezik az az első enzim, amely elindítja a reakciósorozatot.

A véralvadás beindítása és a véralvadási kaszkád

A véralvadási folyamatok (6-49. ábra) legfőbb beindítója az **aktivált VII-faktor.** Normál körülmények között az enzim rendkívül kis mennyiségben képződik, s az is gyorsan inaktiválódik endogén inhibitora jelenlétében (lásd később). Ezenkívül az aktivált VII-faktor nem hatékony enzim, ha egy kofaktora, a szöveti faktor (tissue-factor, TF) nincs jelen.

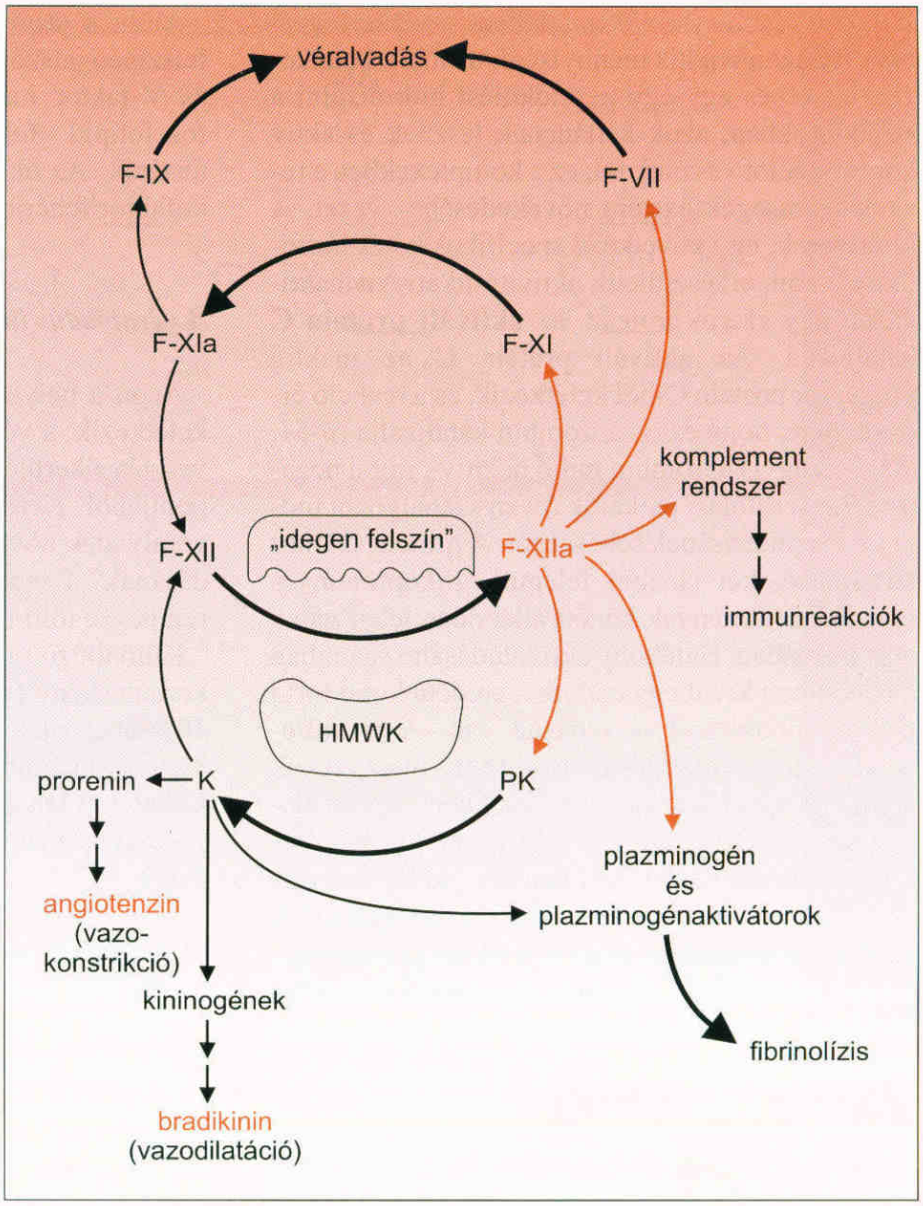
A **szöveti faktor** a vérrel nem érintkező sejtek felszínén állandóan jelen van és szöveti sérülés során a vérrel érintkezésbe kerülhet. Különböző fertőző betegségekben (pl. Gram-negatív baktériumok által előidézett sepsisben) bakteriális lipopoliszacharid (LPS, endotoxin), interleukin-1 (IL-1) és tumornecrosis faktor (TNF) hatására a szöveti faktor megjelenhet az endothelsejt, illetve monocita felszínén is. A szöveti faktor megjelenése extrém módon fokozza az aktivált VII-faktor aktivitását. Tradicionálisan ezt a folyamatot a véralvadás „extrinsic útjának" szokták nevezni.

A véralvadási folyamatok beindításának egy másik lehetséges útja a XI-faktor aktiválása, aminek eredményeképpen a keletkezett aktivált XI-faktor a IX-faktort aktiválja.

Ezen reakciósorozat, amelyet tradicionálisan a véralvadás „intrinsic útjának" neveznek (6-49. ábra), kapcsolódhat a XII faktor funkcióihoz. Az a tény azonban, hogy a XI faktor aktivációjának leghatékonyabb katalizátora a trombin, azt jelzi, hogy az intrinsic út inkább a véralvadási kaszkád felerősítését, mint az iniciálását szolgálja (6-49. ábra).

Bárhogyan történik is a véralvadás beindítása, a következmények egy bizonyos szempontból hasonlóak; nevezetesen az első enzimreakció egy másik enzimféleség képződéséhez vezet, amely ezután egy harmadik enzim keletkezését eredményezi, és így tovább, addig amíg nagy mennyiségű trombin nem keletkezik. A rendszer erősítő berendezésként működik, amelyet **véralvadási "kaszkádnak"** neveznek. Minthogy a véralvadási enzimek (szerin-proteázok) proteolítikus reakciókat katalizálnak (amelyek irreverzibilisek), szigorúan meghatározott a reakció iránya. A rendszer hatékonyságát fokozza, hogy: (i) pozitív visszacsatolások tovább növelhetik egyes enzimek keletkezésének sebességét, és (ii) a reakciók komplexekben (elsősorban vérlemezke foszfolipid membránja által kialakított kompartmentekben) játszódnak le, ahol a reakciók 10^5-szeres sebességnövekedést is elérhetnek az oldatban mérhető értékekhez képest. Így nem meglepő, hogy rendkívül rövid idő alatt nagyságrendekkel megnő az enzimmolekulák száma, aminek eredményeként a trombin elérheti azt a helyi koncentrációt, amely elégséges a fibrinogén megalvasztásához és a vérlemezkék aggregációjának kiváltásához (lásd később).

A **XII-faktor** nagy affinitással kötődik a vér számára „idegen", elsősorban negatív töltésekkel rendelkező felszínekhez; ahol azután egy peptidkötés hidrolízise révén aktiválódik. Az aktiválási folyamat azonban sokkal bonyolultabb, mert egyéb komponensek is hozzájárulhatnak és regulálhatják a reakciót *(6-50. ábra)*. A XII-faktor aktiválódhat aktivált XI-faktor vagy kallikrein hatására. Ha keletkezett **aktivált XII-faktor**, az képes a véralvadás beindítására; a XI-faktort és a VII-faktort is aktiválhatja. Mindezek mellett az aktivált XII-faktor fibrinolízist is indukálhat, a komplement rendszeren keresztül interferálhat az immunrendszerrel, illetve a prekallikrein aktiválásával kallikreint produkál, ami aztán szubsztráttól függően vazokonstrikciót vagy vazodilatációt válthat ki. Jelenlegi ismereteink szerint úgy tűnik, hogy a XII faktor aktiválódása a kallikreinrendszerrel indul be. A prekallikrein – nagy molekulatömegű kininogén komplex – az endothel felszínén lévő receptorhoz kötődve aktivál egy membránkötött proteázt, amely a prekallikreint kallikreinné alakítja. A kallikrein ezután direkt aktiválja a XII faktort, a kininogénből bradikinint szabadít fel (amely az endothelből plazminogén aktivátor szekréciót vált ki) és aktiválja a prourokinázt is. Az utóbbi két reakció fibrinolízist indukál (lásd később).



6-50. ábra. A XII-faktor multifunkcionális szerepe. *Rövidítések: XII-faktor (F-XII), aktivált XII-faktor (F-XIIa), XI-faktor (F-XI), aktivált XI-faktor (F-XIa), IX-faktor (F-IX), prekallikrein (PK), kallikrein (K), nagy molekulatömegű kininogén (HMWK), VII-faktor (F-VII)*

A XII-faktor úgy látszik központi szerepet játszik a véralvadási-fibrinolitikus rendszer egyéb biológiai folyamatokkal történő összekapcsolásában. Pontos funkciójáról azonban keveset tudni. A többi véralvadási faktorral ellentétben, hiánya nem kapcsolódik vérzéses rendellenességekhez.

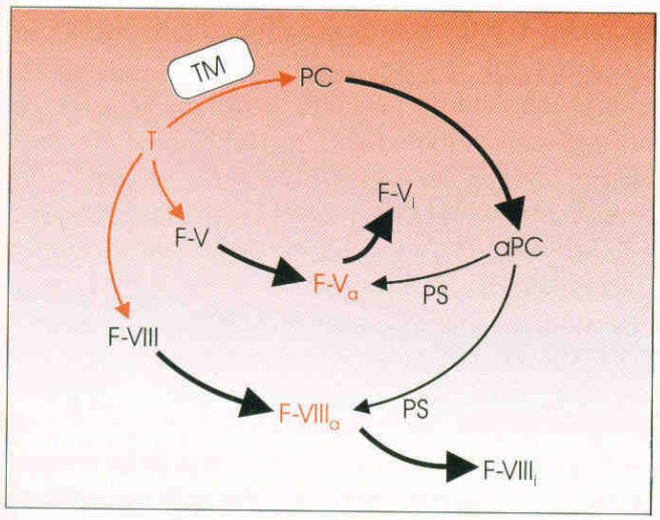
A véralvadási faktorok hiánya vagy defektusa súlyos vérzékenységi zavarokhoz vezethet. A VIII-faktor hiányán alapszik a haemophilia A, a IX-faktor deficiencia okozza a haemophilia B-t; mindkét betegség intraarticularis, intramuscularis és intracerebralis vérzésekre, illetve azok súlyos szövődményeire hajlamosít.

A XI-faktor hiánya hozza létre a haemophilia C klinikai tüneteit. A többi faktor hiányossága, mint pl. a fibrinogéné, a protrombiné, az V-faktoré (parahaemophilia) és a X-faktoré, bár életveszélyes vérzéseket okozhat, különösen trauma vagy műtét során, aránylag ritka.

A trombinképződés szabályozása; a protein C

A véralvadási kaszkád kofaktorai, az V-faktor és a VIII-faktor fontos szerepet játszanak a véralvadás sebességének meghatározásában. Mindkét

kofaktor inaktív formában található a vérkeringésben. Ha azonban kis mennyiségű trombin keletkezik, az képes egy-egy peptidkötést hidrolizálni a kofaktorokban, azok kétláncúak lesznek és aktív konformációt vesznek fel; ez a komplexekben a reakciósebességek extrém növekedéséhez vezet. A kofaktorok, egy következő specifikus kötés hidrolízise során, elveszíthetik aktivitásukat. Az inaktiválást egy szerin-proteáz, az **aktivált protein C** katalizálja. Az aktivált protein C az inaktív prekurzor protein C-ből keletkezik, és a reakció érdekessége, hogy ezt is a trombin katalizálja *(6-51. ábra)*. Vagyis a trombin mind pozitív-, mind negatív visszacsatolási reakciók révén szabályozni tudja saját szintézisének sebességét. A protein C Gla-t tartalmazó, két láncból felépülő glikoprotein és normál körülmények között állandóan jelen van a vérplazmában. Hatékony aktiválódásához azonban a trombinon kívül egy endothel eredetű kofaktorra (trombomodulinra) is szükség van. A **trombomodulinhoz** kötődött **trombinnak** megváltozik szubsztrátspecificitása; így csökken a fibrinogénnel, a XIII-, az V-, a VIII-faktorokkal és vérlemezkékkel szembeni hatékonysága, de ezerszeresére nő a protein C-t aktiváló potenciálja. A rendszer érdekessége, hogy egy enzim (a trombin), a konformációjától függően, egymással ellentétes biológiai funkciókat katalizál; lehet trombotikus vagy antitrombotikus is.



6-51. ábra. Az V-faktor és a VIII-faktor aktiválódása és inaktiválódása. *Rövidítések: trombin (T), V-faktor (F-V), VIII-faktor (F-VIII), protein C (PC), aktivált protein C (aPC), aktivált V-faktor (F-Va), aktivált VIII-faktor (F-VIIIa), inaktív kofaktorok (F-Vi és F-VIIIi), trombomodulin (TM), protein S (PS)*

Amíg a protein C aktiválása az endothelsejtek felszínén játszódik le, addig az aktivált VIII-faktor és V-faktor inaktiválása az aktivált vérlemezke foszfolipid felszínén kialakult komplexekben történik. Az aktivált protein C működéséhez egy kofaktor fehérje, a **protein S** szükséges.

A véralvadás inhibitorrendszere

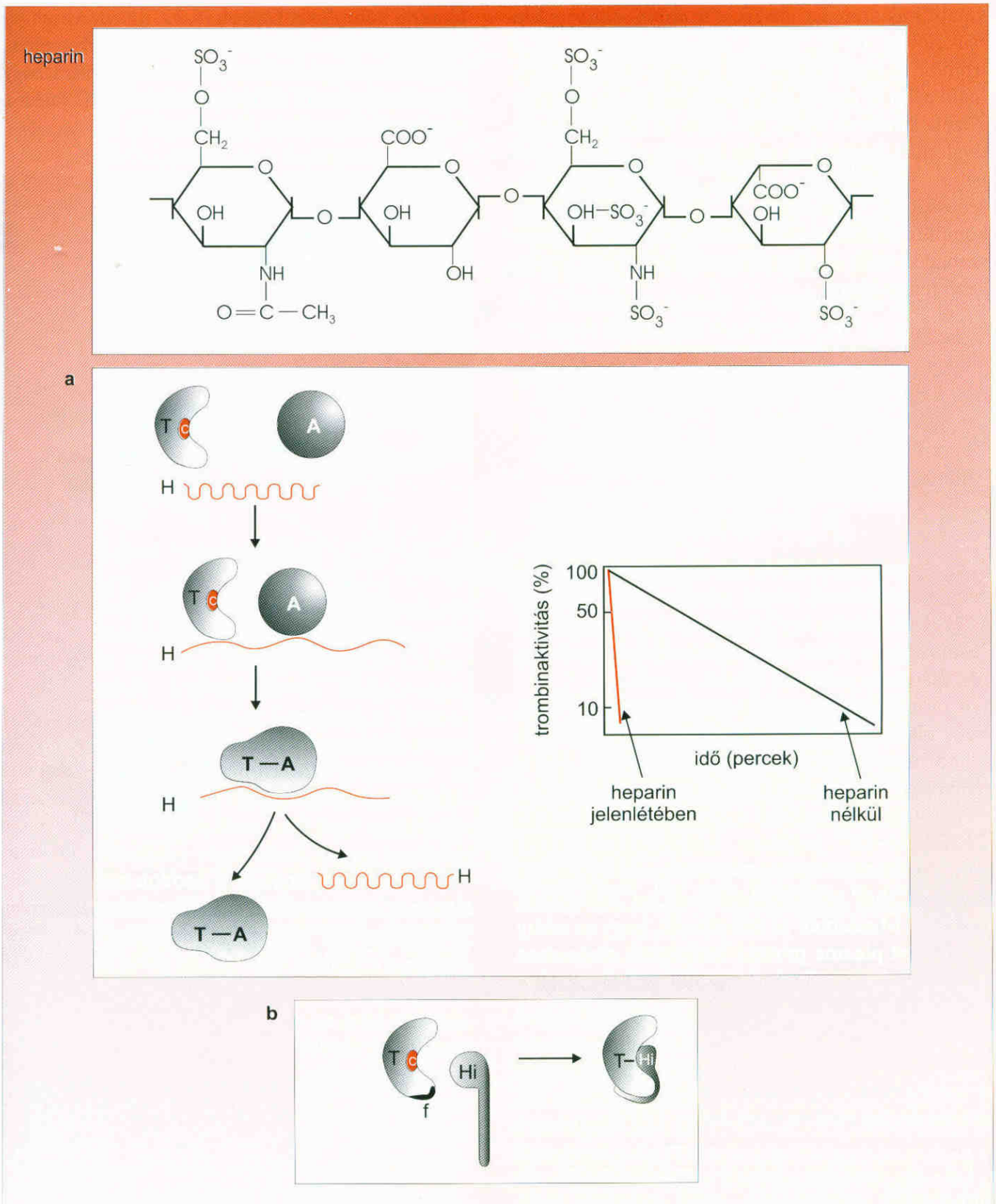
Azon a helyen, ahol nagy mennyiségű trombin keletkezik, a vér megalvad, ami "hasznos" a vérvesztés elkerülése, a vérkeringés fenntartása szempontjából. Kérdés azonban, hogy mi vet véget a véralvadék növekedésének és az ér lumen elzáródásának? Ezt a szerepet a véralvadás inhibitorrendszere tölti be.

Különböző proteáz inhibitorok találhatók a vérkeringésben (a vérplazmafehérjék több mint 10%-át teszik ki). Ezek általában nem specifikusak egy-egy enzimre, bár szerepük egyes reakciókban kitüntetett lehet.

Hatásmechanizmusuk szerint két csoportra oszthatók.

1. Az egyik mechanizmus során kovalens kötés jön létre az enzim aktív centruma és az inhibitor között. Így működik az **antitrombin** (a trombin legfőbb inhibitora), az **α_1-proteáz inhibitor** (α_1-antitripszin néven is ismert; lásd 2.4. fejezetet) és a **heparin kofaktor II** (szintén elsősorban a trombin inhibitora). Mindhárom inhibitor a véralvadási szerin-proteázok szubsztrátjaként fogható fel. Az enzim „szuicid", ekvimoláris komplexet hoz létre az inhibitorral és elveszti aktivitását.
2. A másik mechanizmus során az enzim kötődik az inhibitorhoz de az enzim aktív centruma működőképes marad. A térszerkezet-változás miatt azonban a nagy molekulatömegű szubsztrátok (pl. fibrinogén) nem férnek hozzá. Így működik az **α_2-makroglobulin**.

A proteáz inhibitorok közül az antitrombin és a heparin kofaktor II nem hatékony inhibitorok. Heparin *(6-52. ábra)* vagy heparinszerű molekulák (pl. heparán-szulfát) jelenlétében azonban a trombin inaktiválás sebessége nagyságrendekkel fokozódhat. A reakció érdekessége, hogy a **heparin**



6-52. ábra. A heparin képlete, valamint a: hatásmechanizmusa a trombin–antitrombin reakcióban. *Rövidítések: trombin (T), antitrombin (A), heparin (H), trombin–antitrombin komplex (T-A). A reakciókinetikai ábrán a trombin antitrombin által történő inaktiválását tüntettük fel az idő függvényében. A heparin D-glukuronsav, L-iduronsav és O-szulfatált, illetve N-szulfatált D-glukózamin egységekből épül fel. Egy molekula átlagosan 11 kDa molekulatömeget ér el*
b: A hirudin reakciója trombinnal. *A hirudin (Hi) feji része a trombin aktív centrumához (C), míg farki része (negatív töltésű) a trombin fibrinogént kötő oldalához (f) illeszkedik; az így kialakult komplexben (T-Hi) a trombin aktivitása megszűnik*

katalitikus szerepet játszik a trombin–antitrombin reakcióban (6-52. ábra). Az antitrombin és a trombin is nagy affinitással kötődik a heparinhoz, majd azon az enzim aktív centruma és az inhibitor között kovalens kötés jön létre (a trombin inaktiválódik), hasonlóan, mint heparin nélkül, de heparin jelenlétében sokkal nagyobb reakciósebességgel. Minthogy a trombin–antitrombin komplex affinitása a heparinhoz kicsiny, a heparin szabaddá válik és újra felhasználódhat egy következő reakcióban.

A trombin inaktiválását gyorsító tulajdonsága miatt a heparin már több évtizede az egyik leggyakrabban használt gyógyszer a thromboemboliás betegségek megelőzésében, illetve kezelésében.

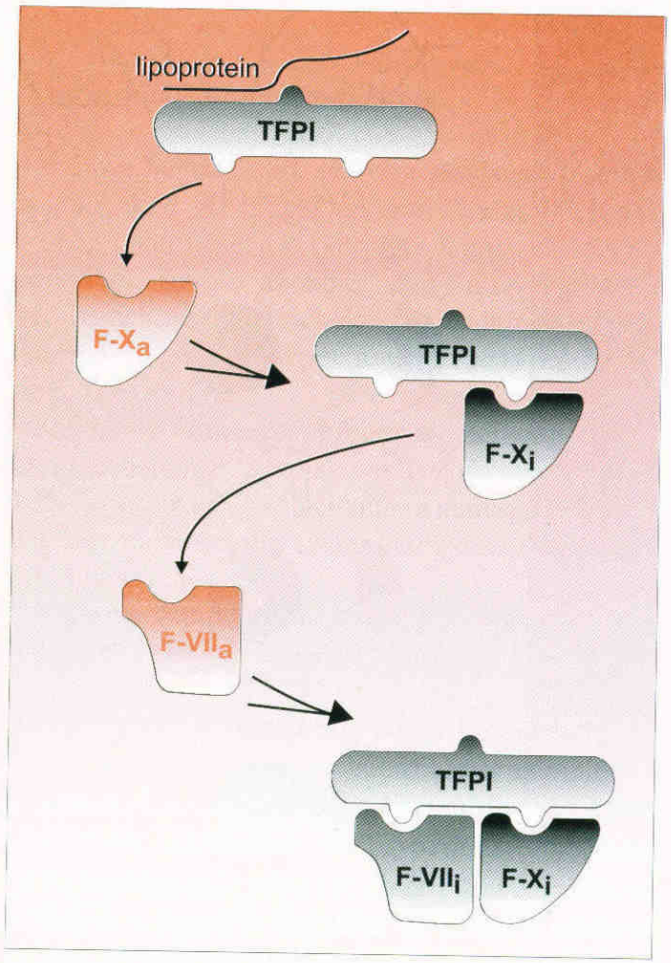
Az α_2-makroglobulin a szervezet egyik legáltalánosabb inhibitora, szinte minden szerin-proteáz aktivitását gátolja, így a trombint és a plazmint is. Jelentősége a véralvadási-fibrinolitikus rendszerben még nem pontosan ismert.

A proteáz inhibitorokra, mint általános elv igaz, hogy elsősorban „szabad enzimeket" (szubsztrátjukhoz nem kötötteket) képesek inaktiválni. Mit is jelent ez a véralvadási kaszkád szempontjából?

A trombin kivételével a véralvadási proteázok foszfolipid–Ca^{2+}–kofaktor komplexekben vagy „idegen felszín"–kofaktor komplexekben fordulnak elő, ahol hozzáférhetetlenek az inhibitorok számára. Mindebből az következik, hogy az eddig ismertetett plazma proteáz inhibitorok elsősorban a trombin inaktiválásán keresztül szabályozzák a véralvadási rendszert.

A szöveti faktor reakcióút inhibitora (tissue-factor pathway inhibitor; TFPI)

Ezt az inhibitor fehérjét endothelsejtek és tumorsejtek szintetizálják, majd szekréció útján kerül a vérkeringésbe, ahol lipoproteinekhez kötődve rendkívül alacsony koncentrációban található. A TFPI az aktivált VII-faktor legfontosabb inhibitora. Érdekessége, hogy csak akkor képes azt inaktiválni, ha már találkozott aktivált X-faktorral és azzal komplexet képzett *(6-53. ábra)*. Az inhibitor biológiai jelentősége valószínűleg abban rejlik, hogy a szervezet ezzel tud védekezni az ellen, hogy a „szükségtelenül" keletkező aktivált VII-faktor a véralvadási kaszkádot beindítsa.



6-53. ábra. A szöveti faktor reakcióút inhibitorának (TFPI) működése. *Rövidítések: aktivált X-faktor (F-Xa), aktivált VII-faktor (F-VIIa), inaktivált F-Xa (F-Xi), inaktivált F-VIIa (F-VIIi)*

Mint az előzőekből kitűnik, a trombin inaktiválása kulcsszerepet játszik a véralvadás szabályozásában. Nem csoda, hogy az orvostársadalom nagy érdeklődést tanúsít exogén eredetű egyéb természetes és mesterséges trombin inhibitorok iránt. Több vérszívó rovar és egyéb állat termel trombin inhibitorokat. Ezek fehérjetermészetű molekulák, amelyek az emlős szervezetekben keletkező trombint inaktiválni ké-

pesek. Ezek közül orvosi szempontból a piócák által termelt **hirudin** látszik a legjelentősebbnek. A hirudin viszonylag kis molekulatömegű fehérje (~7 kDa), amely „feji" és „farki" részből épül fel. Az utóbbi nagy mennyiségű Glu-t és Asp-ot tartalmaz *(6-52b ábra)*. A hirudin nagy affinitással ($Kd=7x10^{-11}$ M) és extrém nagy reakciósebességgel kötődik a trombinhoz és azt inaktiválja. Rendkívül nagy a hirudin specificitása is; a trombinon kívül még egyetlen egy enzimet sem találtak, amelyet a hirudin gátolna.

A természetes inhibitorok mellett nagyszámú (eddig több, mint százféle) szintetikus trombin inhibitort is előállítottak.

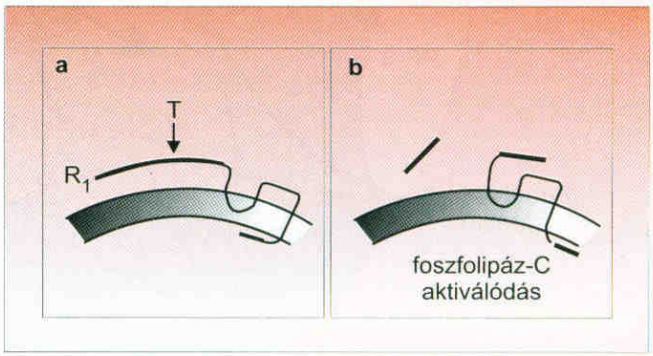
A vérlemezkék (trombociták)

A vérlemezkék az emlősök legkisebb méretű sejtes elemei, amelyek DNS-szintézisre nem képesek. Féléletidejük az emberi vérkeringésben 9–12 nap. A vérlemezkék leglényegesebb tulajdonságai, hogy: (i) **aktiválási felszínt** formálnak a véralvadási kaszkád számára, (ii) mint **kontraktilis rendszer**, különböző alakváltozásaik (adhéziós és aggregációs képességük) révén direkt hozzájárulnak a vérrög kialakításához, (iii) mint **szekréciós rendszer**, nemcsak a véralvadási, hanem egyéb biológiai folyamatokban is szerepet játszanak.

A vérlemezkék nélkül a véralvadási folyamatok nem működnek hatékonyan; ha a vérlemezkék funkciójában zavar áll elő, vagy számuk a normális 300 000 trombocita/µl-ről 50 000 alá csökken, vérzések következhetnek be. Ha az érfal sérülése helyén, a vér számára „idegen" felszín keletkezik (pl. kollagén válik szabaddá), a vérlemezkék **von Willebrand-faktor** (lásd később) jelenlétében hozzákötődnek **(adhézió)**. Nagyobb sérülés esetén vagy egyéb, aktiválást beindító komponensek megjelenésekor a vérlemezkék egymáshoz is kapcsolódhatnak **(aggregáció)**; az utóbbi Ca^{2+}-t és fibrinogént igényel. Mindkét folyamat során a vérlemezkék aktiválódhatnak, ami a már említett véralvadási kaszkádot felgyorsító foszfolipidfelszín kialakításához vezet, illetve szekréciós folyamatok beindulását eredményezi. A vérlemezkékben bekövetkező morfológiai változások pedig nagymértékben hozzájárulnak ahhoz, hogy a vérlemezkék aggregátuma maga is mechanikusan megakadályozza vagy csillapítsa a vérzést a sérülés helyén.

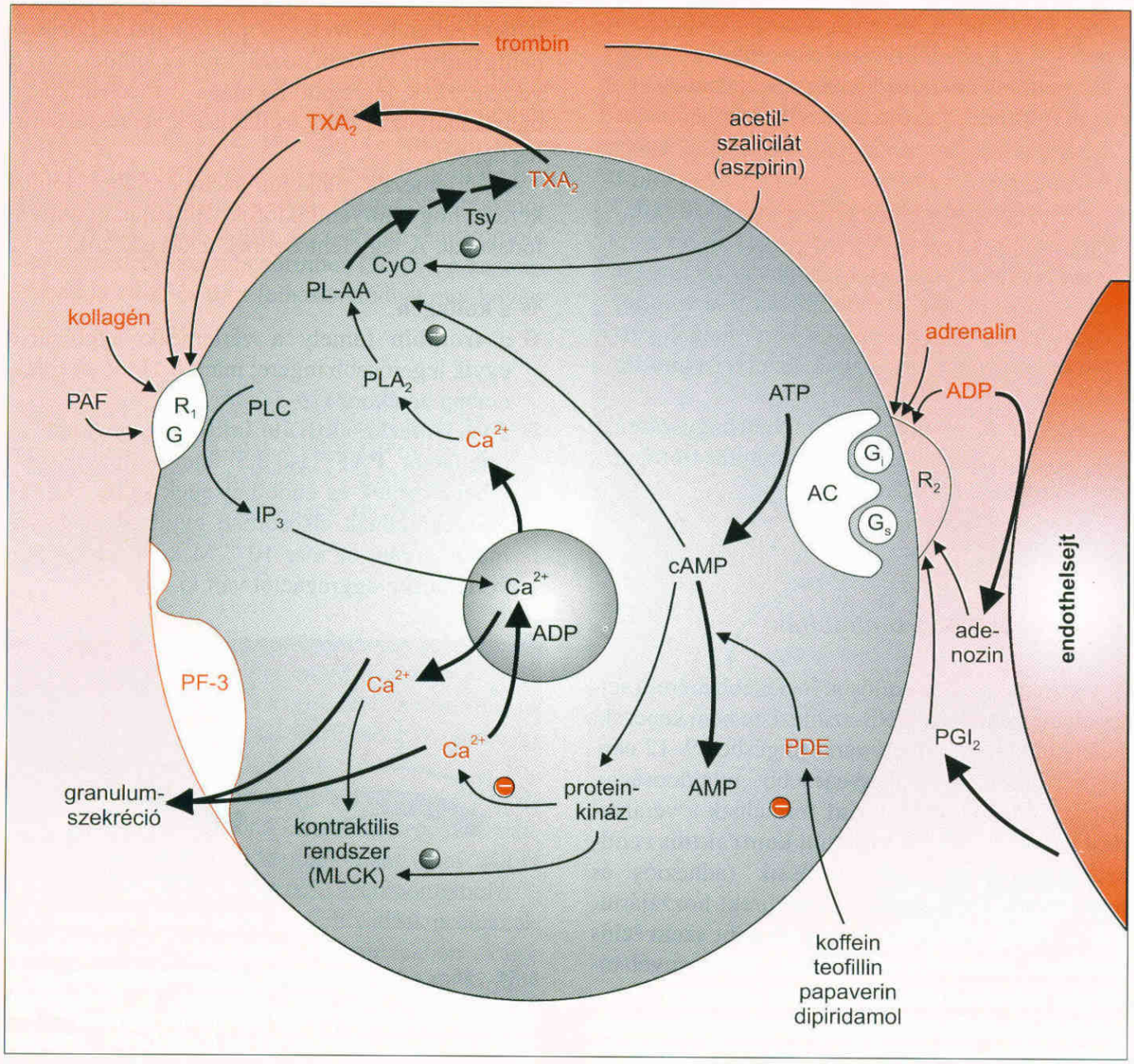
A vérlemezke funkciói szempontjából fontos kérdés, hogy milyen faktorok válthatják ki aktiválódásukat. A legjelentősebbek a következők:

1. a **kollagén**,
2. a **trombin** (amely a vérlemezke-aggregáció egyik legerősebb ingere; már 10^{-8} M koncentrációban hatékony) *(6-54. ábra)*,
3. a **vérlemezke-aktiváló faktor** (platelet activating factor, **PAF**; lásd 2.3. fejezetet), amelyet a fehérvérsejtek és endothelsejtek szintetizálnak és szekretálnak elsősorban gyulladásos folyamatok során, és már 10^{-10} M koncentrációban vérlemezke-aggregációt vált ki.



6-54. ábra. A vérlemezke trombinreceptora. a: *A trombinreceptor (R_1) natív állapotban.* **b:** *Konformációváltozás, ha a trombin (T) egy peptidkötést hidrolizál*

A **vérlemezke-aktiválás** beindításának a foszfolipáz C aktiválódása a kulcslépése. Az inozitol-foszfát rendszer közvetítésével a citoplazmában megemelkedik a szabad Ca^{2+}-szint, amely ezután aktiválhatja a kontraktilis rendszert, illetve a foszfolipáz A_2-t *(6-55. ábra)*. Az utóbbi reakció **tromboxán A_2 (TXA_2)**szintéziséhez vezet (lásd a 6.4. fejezetet), amely a vérlemezkéből kikerülve a saját vagy egy másik trombocita receptorán keresztül felerősítheti, illetve kiválthatja a szignált. A kontrakció eredményeként a vérlemezke membránja foszfolipidstruktúrát szolgáltat a véralvadási kaszkád számára (régebben vérlemezke 3-faktornak nevezték), illetve **ADP-szekréció** következik



6-55. ábra. A vérlemezke aktiválása. *Az aktiválási folyamatokat és az összes lehetséges eseményt egy vérlemezkén mutatjuk be (a valóságban természetesen több trombocita működik közre, amelyekben nem egy időben játszódik le az összes reakció). Rövidítések: foszfolipáz C (PLC), inozitol 1,4,5-triszfoszfát (IP_3), vérlemezke membránfoszfolipid (PF-3), foszfolipáz A_2 (PLA_2), arachidonát (PL-AA), foszfolipid (PL), ciklooxigenáz (CyO), tromboxán-szintetáz (TSy), adenilát-cikláz (AC), foszfodiészteráz (PDE), vérlemezke aktiválásához szükséges receptorok (R_1 és R_2). Az átalakulásokat vastag nyilak, a hatásokat vékony nyilak, a gátlásokat (-) jelek szimbolizálják. A véralvadás fokozódásának irányába ható komponenseket piros színnel jelezzük*

be. Az ADP az aktiválódott vérlemezke denz granulumából kikerülve a tromboxán A_2 receptorától eltérő receptorhoz kötődve G_i-proteinen keresztül gátolja az **adenilát-cikláz** működését, ami csökkent cAMP-szintet eredményez. Ezáltal fokozódik a TXA_2 szintézise és a vérlemezkék aggregációja, mert a cAMP gátolja a TXA_2 szintézisét, aktiválja a cAMP-függő protein-kinázt, amely gátolja a miozinfoszforilációt [a miozin-könnyűlánc-kináz (MLCK) foszforilálódik és inaktiválódik], ezáltal csökkentve a kontraktilis rendszer működését. Az elmondottakkal ellentétes folyamatok játszódnak le, ha az endothelsejtekben **prosztaciklin (PGI_2)** szintetizálódik és szekretálódik. Amíg az ADP (és az adrenalin is) a G_i-proteint aktiválja, a **PGI_2** (hasonlóan az

adenozinhoz) a G_s-proteint aktiválja, amelynek eredményeképpen a fokozott adenilát-cikláz aktivitás **cAMP**-szint-emelkedést eredményez (6-55. ábra).

Említést érdemelnek azok a vegyületek is, amelyek valamilyen módon a fent említett folyamatokkal interferálnak és ezért a medicinában alkalmazást nyertek. Ilyenek az **aszpirin** (acetil-szalicilsav), amely a **ciklooxigenázt** gátolja, ezáltal a TXA_2-szintézist csökkenti; a dipiridamol, illetve a koffein, teofillin és papaverin, amelyek a vérlemezke foszfodiészteráz aktivitását gátolják, gátolva a cAMP hidrolízisét, vagyis növelik a cAMP-szintet, aminek eredménye csökkent aggregációs készség.

A **vérlemezke-adhézió** és **vérlemezke-aggregáció** – a véralvadás molekuláris reakcióihoz hasonlóan – kofaktorokat igényel. Amíg az aggregáció Ca^{2+}- és fibrinogénfüggő, az adhézió nem jön létre **von Willebrand-faktor** nélkül. A von Willebrand-faktor 2050 aminosavból épül fel, amely multimer komplexet képez azáltal, hogy egy ilyen lánc N- és C-terminális végével is kapcsolódhat egy másikhoz. A szerkezeten kötőhelyek találhatók a vérlemezke membránja, a VIII faktor, a heparin és a kollagének számára. A von Willebrand-faktort az endothelsejtek szintetizálják és szecernálják; a vérlemezke adhéziójában játszott szerepén túl további feladata, hogy a VIII-faktort szállítja a vérkeringésben. Sérülések során kollagén, heparin, vérlemezkemembrán-glikoprotein (GPIb vagy GPIIb/IIIa) kötődhet a von Willebrand-faktor megfelelő funkcionális doménjeihez.

A **von Willebrand-faktor hiánya vagy defektusa** (von Willebrand-kór) esetén nem jön létre adhézió és a betegek vérzékenységben szenvedhetnek. Általában a vérlemezke-rendellenességek haemorrhagiás tünetekkel járnak; a betegségek örökletes és szerzett formái is előfordulnak.

Orvosi szempontból figyelemreméltó, hogy a véralvadási rendszerbe több szinten is be lehet avatkozni:

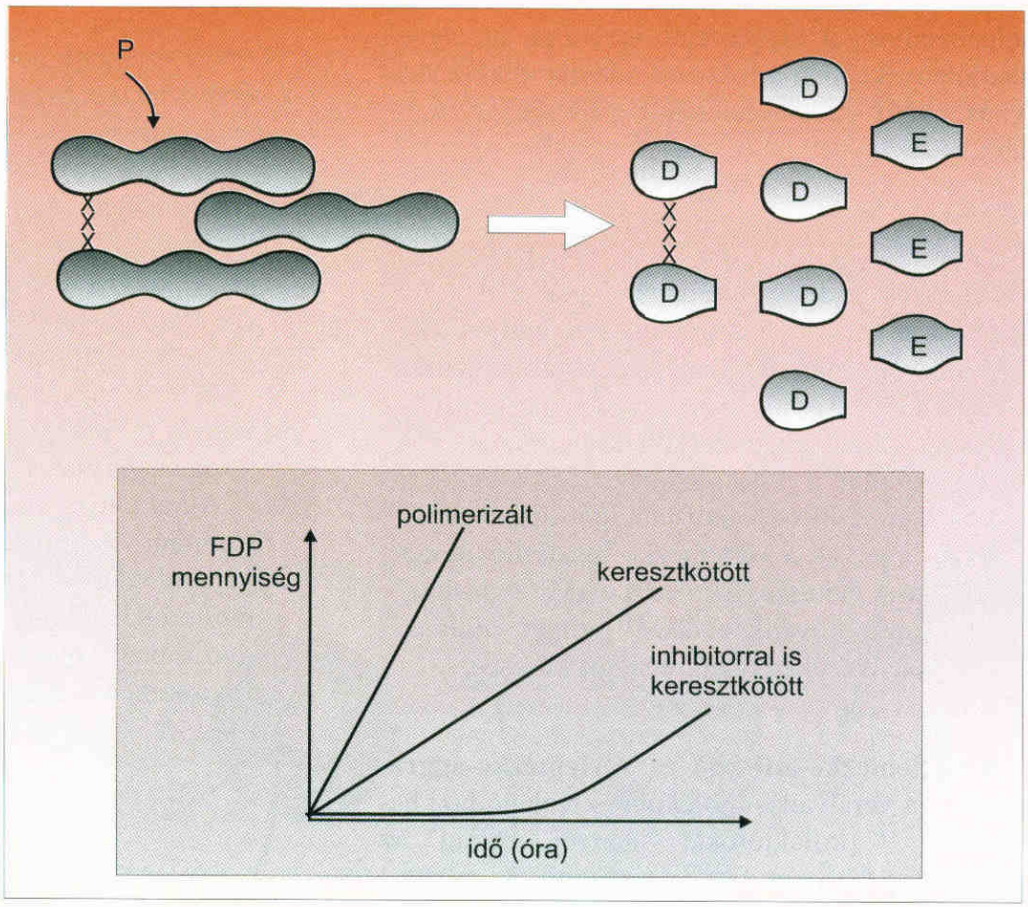
1. A különböző véralvadási faktorokat elő lehet állítani (ma már géntechnológiai módszerekkel) és terápiásan alkalmazhatók.
2. A kompartmentek (alvadási komplexek) kialakulása gátolható (a májban a Gla-képződés megakadályozása pl. Syncumarral vagy a vérlemezkék aktiválódásának gátlása pl. aszpirinnel).
3. A véralvadási proteázokat, elsősorban a trombint in vivo inaktiválni lehet (pl. heparin adásával fokozható az endogén inhibitorok hatékonysága, vagy hirudin alkalmazásával a trombin közvetlenül és specifikusan inaktiválható).

Fibrinolízis

Bár több proteáz képes a fibrint emészteni (pl. tripszin, elasztáz, katepszin G), nagy általánosságban elfogadott, hogy a fibrinolízis a plazmin aktivitását jelenti. A plazmin azonban csak proenzim plazminogén formában található a vérkeringésben; így működésének előfeltétele a plazminogén aktiválódása.

A fibrin feloldása

A **plazmin** (83 kDa) a szerin-proteázok csoportjába tartozik; két láncból épül fel, amelyeket S-S hidak tartanak össze (6-57. ábra). Bár különböző fehérjéket bonthat (főleg a lizin melletti kötéseket), a plazmin egyik legjelentősebb funkciója a fibrin emésztése. A proteolízis sebessége megváltozik, ha a fibrin vagy a fibrinogén szerkezetében módosulások következnek be; így pl. az aktivált XIII-faktorral keresztbe kötött fibrin szolubilizálása lassúbb reakció, mint a natív fibriné. A **keresztkötött fibrinben** emésztés után ún. **D-dimérek** jelennek meg, amelyek a vérben kimutathatók *(6-56. ábra)*.



6-56. ábra. A polimerizált fibrin és a keresztkötött fibrin monomer egységeinek degradációja. *A plazmin (P) a fibrin emésztésekor egy fibrin monomerből két D degradációs terméket és egy E degradácós terméket hoz létre. A keresztkötött fibrin monomerekből D-dimérek keletkeznek. A keresztkötéseket a xxx jelzések szimbolizálják. A reakciókinetikai ábrán a polimerizált fibrin, a keresztkötött fibrin és a plazmin inhibitorral is keresztkötött fibrin degradációjának relatív sebességét mutatja. A fibrin degradációs terméket az FDP rövidítés jelzi*

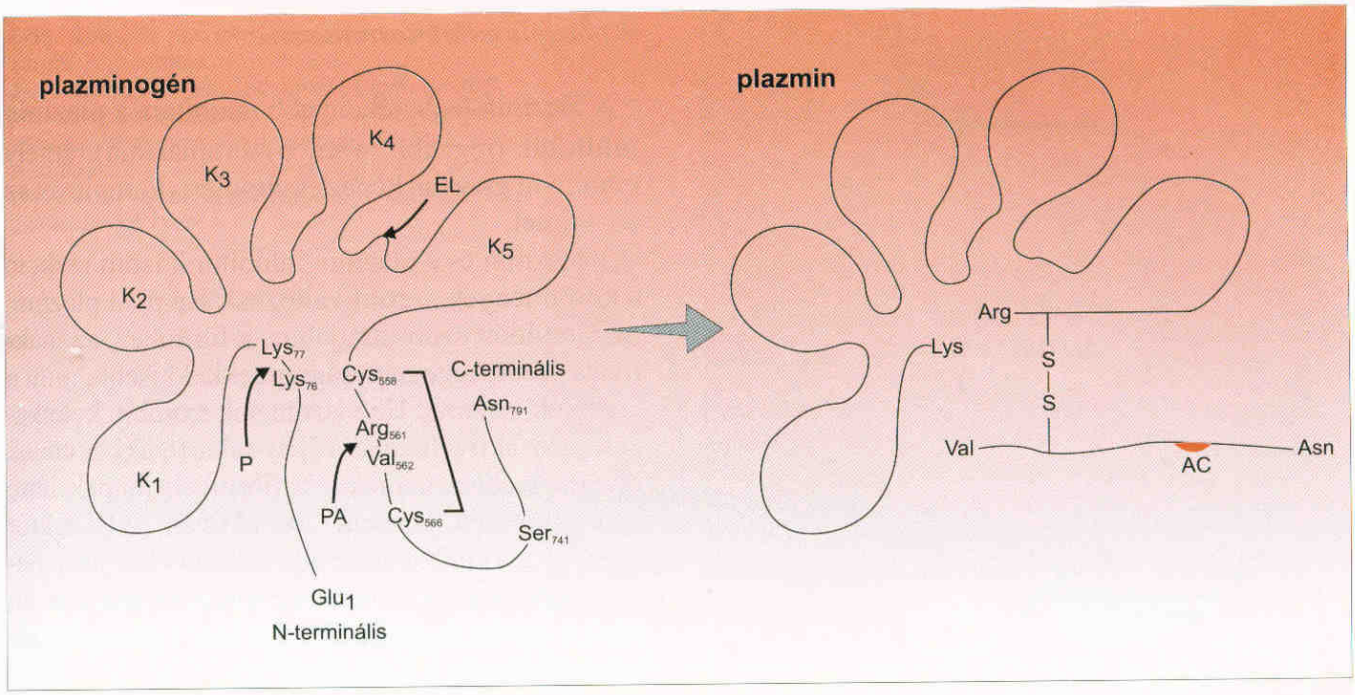
E változásoknak orvosi szempontból kettős jelentősége van: (i) ha az orvos későn találkozik a thrombosisos beteggel, kisebb a remény a vérrög gyors feloldására, (ii) a dimerek kimutathatók a vérplazmában, így diagnosztikai–prognosztikai jelként használhatók.

A plazmin keletkezése

A plazminogén → plazmin átalakulás folyamatát **plazminogénaktiválásnak** nevezik. Funkcionális szempontból a plazminogénnek három régióját lehet megkülönböztetni: az N-terminális, ún. aktivációs peptidszakaszt, az öt ún. kringle-struktúrát tartalmazó régiót és a C-terminális oldalon az aktív centrum (ser_{741}) kialakításához szükséges szekvenciát *(6-57. ábra)*. A plazmin keletkezése rendkívül kifinomult módon több szinten szabályozott rendszer: (i) a plazminogén, mint szubsztrát, a körülményektől függően nehezen vagy könnyen aktiválódhat, (ii) a plazminogénaktivátorok nincsenek állandóan jelen a vérplazmában, (iii) hatásos inhibitorrendszer szabályozza a plazminogénaktivátorok aktivitását, (iv) egy másik inhibitorrendszer rendkívül gyorsan inaktiválhatja a kész plazminmolekulákat.

A plazminogén konformáció változásai

Normális körülmények között a vérplazma ionmiliőjében a plazminogén alig hozzáférhető a plazminogénaktivátorok számára; ugyanis az N-terminális aktivációs peptid rész „lefedi" az Arg_{561}-Val_{562} (lásd a 6-57. ábrát) peptidkötést az aktivátorok elől. Ha azonban az aktivációs peptid „eltávolodik" akár konformációváltozás következtében, akár proteolízissel (pl. plazmin vagy elasztáz hatására), a módosult zimogén az aktivátorok számára jó szubsztráttá válik. A plazmin által végrehajtott plazminogén módosulás azt jelzi, hogy a plazmin pozitív visszacsatolási mechanizmussal szabályozhatja saját keletkezését.



6-57. ábra. A plazminogén és plazmin szerkezete. *Rövidítések: plazminogénaktivátorok (PA), plazmin (P), elasztáz (El), kringle-szerkezetek (K). A kringle-szerkezetet S-S hidak tartják össze és részletes ábrázolásban perecre emlékeztet (norvég felfedezőktől származó elnevezés; kringle = perec). Az egyláncú plazminogén aktiválódása során kétláncú szerkezet jön létre és annak rövidebb láncán alakul ki az aktív centrum (AC).*

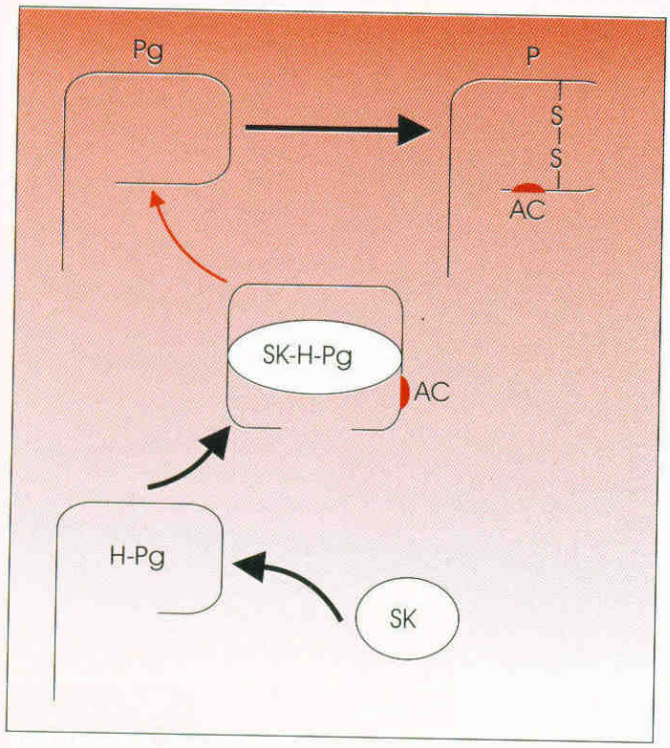
A plazminogénaktivátorok

Endogén (emlősök által termelt) és exogén (bakteriumok által termelt) plazminogénaktivátorok ismertek. A két legjellegzetesebb endogén aktivátor az **urokináz** (helyesen: urokináz típusú plazminogénaktivátor; uPA) és a szöveti típusú plazminogénaktivátor (tissue-type plasminogen activator; **tPA**). Mindkét aktivátor fő forrása az endothelsejt, bár tumorsejtek is nagy mennyiségben szintetizálják. A tPA-szekréció egyik legfőbb ingere a bradikinin, amely kallikrein hatására a kininogénekből szabadul fel. Plazminogénaktivátorként működhet még az **aktivált XII-faktor**, hatékonysága az uPA-nál és a tPA-nál sokkal csekélyebb. Ennek biológiai vagy fiziológiai jelentősége nem ismert; az a tény azonban, hogy XII-faktor-deficiens betegek nem szenvednek vérzékenységben, sőt hiánya gyakran társul thromboemboliás kórképekkel, amellett szól, hogy a fibrinolízis beindításában fontos szerepet játszhat az aktivált XII-faktor.

Az **urokináz** típusú plazminogénaktivátor inaktív formában szintetizálódik és szekréciója után az urokináz legspecifikusabb aktivátora a kallikrein és a plazmin. Az egyláncú zimogénből (scuPA) kétláncú aktív enzim keletkezik (tcuPA). A **kallikrein** szerepe azt jelzi, hogy a XII-faktor és a kinin–kallikrein rendszer szoros kapcsolatban lehet fibrinolítikus folyamatokkal, míg a **plazmin** szerepe azt mutatja, hogy a plazminogénaktiválást a plazmin pozitív visszacsatolás útján, mind a zimogén, mind az aktivátorok módosításán keresztül felerősítheti.

Regulációs szempontból még egy fontos effektust kell tekintetbe venni, nevezetesen azt, hogy a **tPA**, amely aktív formában szekretálódik, csak akkor válik hatékony enzimmé, ha ún. kofaktorok is jelen vannak. Ilyen **tPA-kofaktor** szerepet játszhat az endothelsejt felszíne, bizonyos denaturált fehérjék, a miozin és a fibrinolítikus rendszer végső szubsztrátja, a fibrin. Az utóbbi azért érdekes, mert jelzi, hogy a **fibrin** egyidőben lehet a plazmin szubsztrátja és a szöveti típusú plazminogénaktivátor kofaktora. Ha elfogy a szubsztrát, elfogy a kofaktor is, „nincs szükség" enzimre, nem is aktiválódik a plazminogén.

Az exogén plazminogénaktivátorok legjellemzőbb, s orvosi szempontból legfontosabb képviselője a **sztreptokináz**, amely nem proteolitikus enzim, hanem a β-hemolitikus Streptococcus által



6-58. ábra. A humán plazminogén sztreptokinázzal alkotott komplexe plazminogénaktivátorként működik. *Rövidítések: sztreptokináz (SK), humán plazminogén (H-Pg), aktív centrum (AC), sztreptokináz–humán plazminogén komplex (SK-H-Pg), plazmin (P)*

termelt fehérje. Humán szervezetbe kerülve nagy affinitással kötődik a plazminogénhez és abban olyan konformációváltozást indukál, hogy a zimogénben kifejlődik egy aktív centrum anélkül, hogy kétláncú plazmin(ogén) keletkezne. A **sztreptokináz–plazminogén komplex** mint plazminogénaktivátor működik, hasonlóan az uPA-hoz vagy a tPA-hoz *(6-58. ábra)*. A sztreptokináz–plazminogén komplex féléletideje igen rövid; szubsztrát (plazminogén) hiányában néhány percen belül degradálódik.

A sztreptokinázt már régóta használják thromboemboliás betegségek kezelésére. Bár újabban az orvosi gyakorlatban előnyben részesítik az urokinázt és a géntechnológiával gyártott tPA-t.

A plazminogénaktivátorok inhibitorrendszere

A plazminogénaktivátor inhibitorai közül (eddig négyféle ismert) a legfontosabb a **plazminogénaktivátor inhibitor-1** (PAI-1), amely ekvimoláris komplexet képez a plazminogénaktivátorokkal és mind a tPA-t, mind az uPA-t gyorsan inaktiválja.

A plazmin inhibitorrendszere

A plazmin leghatékonyabb inhibitora a **plazmin inhibitor** (régebbi nevén α_2-antiplazmin), amely rendkívül gyorsan képez ekvimoláris komplexet az enzimmel.

A plazmin és a plazmin inhibitor közötti reakció a körülmények szerint változhat. Ha pl. a plazmin már kötődött szubsztrátjához, a fibrinhez, az inaktiválás sebessége nagyságrendekkel kisebb, mint a „szabad" enzimé. Ha viszont sok trombin keletkezett és az aktiválta már a XIII-faktort, akkor ennek eredményeként nemcsak a fibrinben jönnek létre keresztkötések, hanem az aktivált XIII-faktor mintegy „rákötí" a plazmin inhibitort is a fibrinhálóra, úgy hogy az megtartja inhibitor aktivitását; tehát a vérrög hozzáférhetetlen lesz a plazmin számára (lásd még a 6-56. ábrát is)

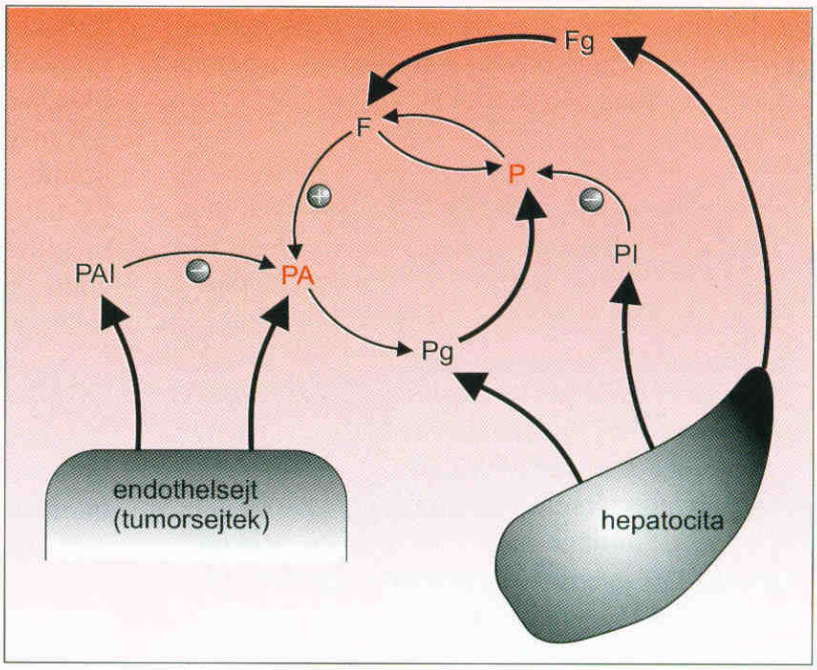
Mindkét mechanizmus jelzi a klinikus számára, hogy milyen fontos a thromboemboliás kórképek gyors diagnózisa és az azonnali terápiás eljárás megkezdése a hatékony kezelés céljából.

A fibrinolízis szabályozása

A fibrinolízisben részt vevő molekulák szintézisének *(6-59. ábra)* és szekréciójának sebességétől függően vagy az enzimek, vagy az inhibitorok koncentrációja lehet magasabb, ami alapvetően meghatározza a fibrinolízist. A szabályozás miként je még nem ismert, bár több információ is található az irodalomban.

A klinikus szempontjából hasznos, hogy az inhibitorok és az inhibitor–enzim komplexek mennyisége a vérben meghatározható, ami tájékoztatást jelenthet terápiás szempontból.

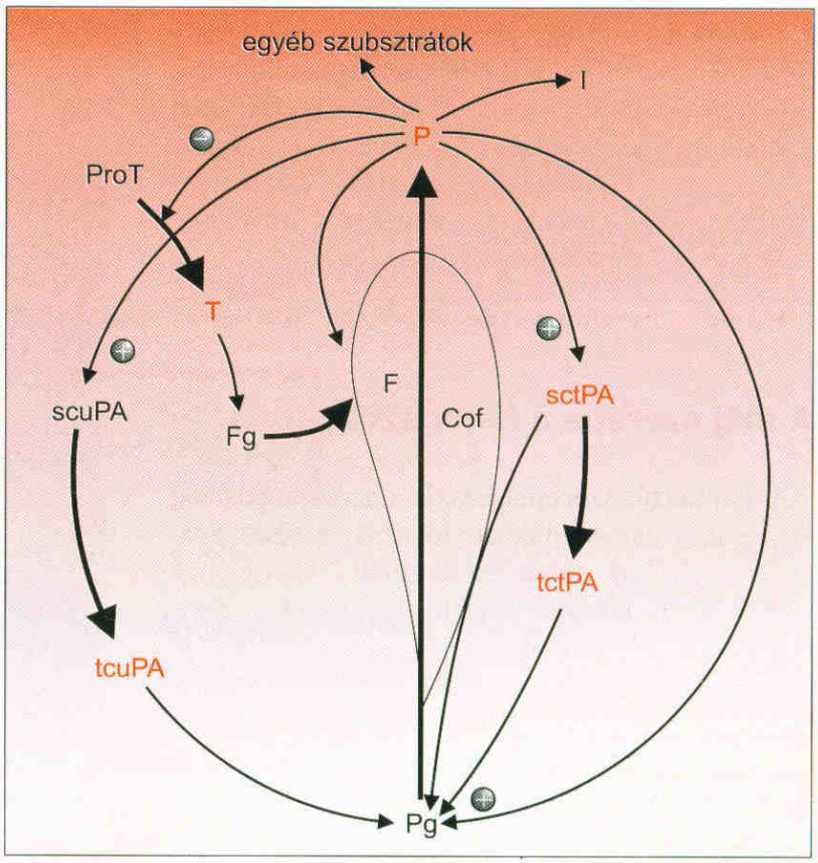
Molekuláris szinten játszódnak le a **pozitív** és a **negatív visszacsatolásos reakciók**, illetve az **inhibitorokkal** történő gátlási reakciók nagy része *(6-60. ábra)*. A plazminogénből plazmin keletkez-



6-59. ábra. A plazmin keletkezés celluláris szintű regulációja. *Rövidítések: plazminogén (Pg), fibrinogén (Fg), plazmin inhibitorok (PI), plazminogénaktivátorok (PA), plazminogén-aktivátor inhibitorok (PAI), plazmin (P), fibrin (F). A szekréciót és átalakulást vastag nyilak, a hatást vékony nyilak, a gátlást (–), a fokozást (+) szimbólumok jelzik*

het, ha plazminogénaktivátor szabadul fel a sejtekből. A plazmin pozitív feedback szabályozás útján fokozza további plazminmolekulák keletkezését. A szöveti típusú plazminogénaktivátorok hatékonyabban működnek, ha **kofaktorok** vannak jelen. Amíg a plazmin a fibrint meg nem emésztette, az megtartja kofaktor aktivitását.

Mind a celluláris, mind a molekuláris komponensek olyan **kompartmenteket** hozhatnak létre, amelyek elkülönülnek a környezetüktől és azok-



6-60. ábra. A plazminogénaktiválás molekuláris szintű szabályozása. *Rövidítések: plazminogén (Pg), plazmin (P), fibrinogén (Fg), fibrin (F), egyláncú és kétláncú szöveti típusú plazminogénaktivátorok (sctPA, tctPA), aktivátorok kofaktorai (Cof), egy- és kétláncú urokináz típusú plazminogénaktivátorok (scuPA, tcuPA), protrombin (ProT), trombin (T), inhibitorok (I). A vastag nyilak átalakulásokat vagy kötődést, a vékony nyilak hatásokat, a (+) jelek pozitív, a (-) jel negatív visszacsatolást jeleznek. Mint mindkét tPa, az egyláncú uPA (scuPA) csak bizonyos körülmények között rendelkezik csekély aktivitással. Mindez azt jelzi, hogy a tPA a plazminogénaktiváció beindítását, az uPA pedig a felerősítését szolgálják. A fibrinolízis hatékonyságához a plazmin hozzájárul azzal is, hogy gátolni képes a véralvadás egyes kofaktorait, így gátolja további fibrin keletkezését.*

ban lokálisan nagy koncentrációeltérések alakulhatnak ki. Ilyen kompartment maga a trombus vagy egy gyulladásos terület is.

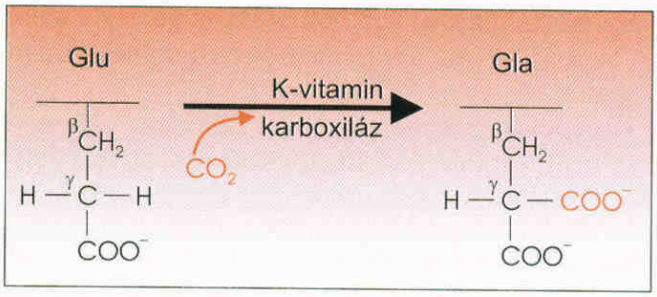
A **fibrinolízis patológiás változásaival** kapcsolatban általánosságként elmondhatjuk, hogy fokozott működése (pl. az aktiválódási folyamatok felgyorsulása vagy az inhibitorok defektusa) vérzékenységet eredményez, míg a fibrinolízis csökkent működése (pl. plazminogén hiánya vagy elégtelen aktiválódása) thromboemboliás kórképekhez vezet. A fibrinolízis és véralvadás társult, rendkívül súlyos kórképe jöhet létre, amikor nagy mennyiségű **szöveti faktor** (TF) jelenik meg a vérkeringésben (pl. terhesség során elhalt magzatból vagy sepsises állapotban az endothelsejtek és monociták felszínén). Ilyenkor generalizáltan fokozódik a véralvadási kaszkád, elfogynak a zimogének, a sok proteáz „elfogyasztja" az inhibitor rendszert, miközben a fibrinolízis is beindul. Parallel alakulnak ki thrombosisok és vérzések. A kórképet **disszeminált intravascularis coagulopathiának** (DIC), illetve újabban intravascularis coagulatiós fibrinolízisnek (ICF) nevezik. Az intravascularis folyamatok mellett a fibrinolízis szerepet játszhat extravaszkuláris eseményekben is, mint pl. az extracelluláris szövetek degradációjában (lásd 6.3. fejezet), a sebgyógyulásban, az ovulációban és terhességben, a legkülönbözőbb gyulladásos folyamatokban, angiogenezisben, a tumorok növekedésében és metasztázisképződésében.

A máj szerepe a hemosztázisban

A máj **kettős szerepet** játszik a hemosztázisban; egyrészt a hepatocitákban történik a véralvadási–fibrinolitikus rendszer legtöbb fehérjéjének szintézise és poszttranszlációs módosítása, másrészt a májmakrofágok (Kupffer-sejtek) és részben a hepatociták veszik fel a vérkeringésből az inaktív proteázokat, illetve a proteázok inhibitorokkal alkotott komplexeit és degradálják azokat.

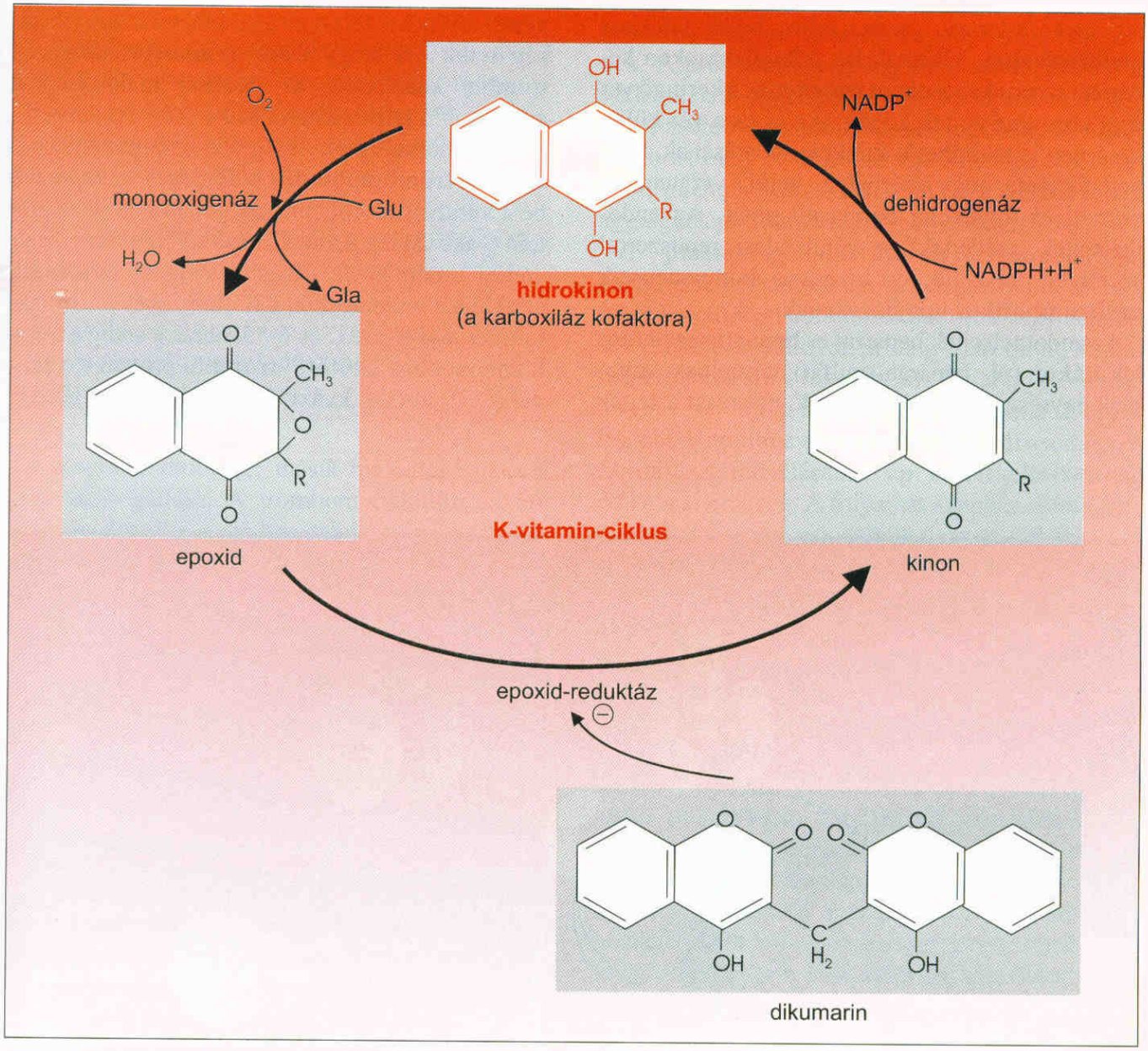
A máj gyakorlati jelentőségét az jelzi a legjobban, hogy parenchymás károsodásakor (pl. cirrhosis) zavart lesz a véralvadási zimogén rendszer szintézise, ami súlyos vérzékenységi problémákat okozhat.

A máj kitüntetett szerepe a **Gla szintézise**. A Gla számos alvadási faktorban (protrombin, X-faktor, IX-faktor, VII faktor, protein C és protein S) már meglévő glutaminsav módosulásán keresztül képződik: a glutamát gamma-C-atomjához széndioxid felhasználásával egy további karboxilcsoport kapcsolódik. A reakciót egy **karboxiláz** enzim katalizálja *(6-61. ábra)*. A reakció nem történik meg K-vitamin hiányában. A **K-vitamin** a karboxiláz működködése közben oxidálódik, illetve két további enzim hatására redukálódik *(6-62. ábra)*.



6-61. ábra. A gamma-karboxil-glutaminsav (Gla) szintézise. *A karboxiláz által katalizált reakció kofaktora a K-vitamin redukált formája (lásd még a 6-62. ábrát is)*

K-vitamin-hiány vagy a K-vitamin-ciklus gátlása vérzékenységi zavarokat eredményez. Az utóbbit használják fel az orvosi gyakorlatban thrombosisos betegségek kezelésére. Egy lóhere féleségben talált vegyület, a dikumarol az epoxid-reduktázt gátolja (6-62. ábra), ezáltal a K-vitamin-ciklus nem működik és nem történik Gla-szintézis. (A dikumarol felfedezéséhez az vezetett, hogy helytelen tárolás következtében a rothadó szénában keletkezett ez a vegyület és a tehenek elvéreztek. Később a vegyületet patkányirtásra használták. Ma gyógyszer.) A dikumarinszármazékok alkalmazásának veszélye, hogy hatásuk a fehérjeszintézis sebességéhez kapcsolt. Ha a poszttranszlációs Gla-hiány kialakult és vérzés következik be, meg kell várni, amíg a Gla-tartalmú fehérjék újra szintetizá-



6-62. ábra. A K-vitamin-ciklus. *A K-vitaminban (kinon) az R-gyök változó lehet, és szintetikusan is változtatható, ami a hatékonyságot befolyásolja. Leggyakrabban:*

$$-(CH_2-CH=\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{C}}-CH_2)_n-H$$

egységeket tartalmaz (ha pl. n = 6, K_2-vitaminról beszélünk). Az oxidált forma (epoxid) redukcióját az epoxid-reduktáz katalizálja. A reduktáz enzim gátolható dikumarinszármazékokkal (Dicumarol, Warfarin, Syncumar)

lódnak. Ez azt jelenti, hogy a gyógyszerhatás csak a hiányzó fehérjék pótlásával függeszthető fel. Ezért az ilyen jellegű kezelés – bár könnyű, mert orálisan alkalmazható – szoros laboratóriumi ellenőrzést igényel.

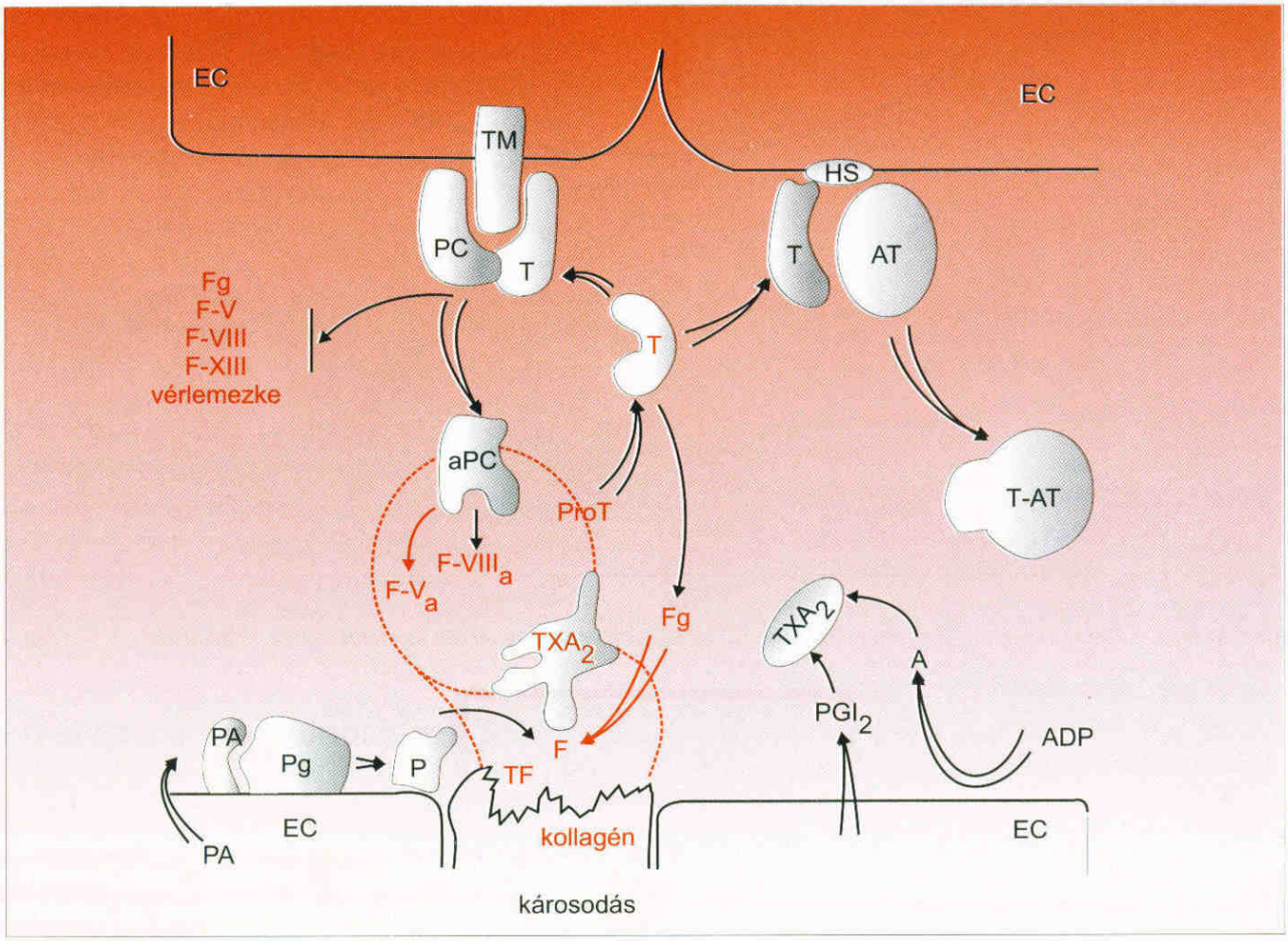
Az endothelium szerepe a hemosztázisban

Az eukarióta sejtek elvesztették közvetlen kapcsolatukat környezetükkel; számukra az anyagcsere-folyamatok végbemeneteléhez és feladataik ellátásához a vérkeringés biztosítja a feltételeket.

Az erek (artériák, vénák) teljes belső felszínét **endothelsejtek** hálózzák be; a kapillárisokon keresztül szoros kapcsolatot teremtenek a keringő vér és a környező sejtek között. Az ér és a vér külön szervnek is tekinthető. Funkciói ellátásának alapvető feltétele, hogy az érpályán belül a vér nem veszítheti el folyékony halmazállapotát. Az endothelsejtek „védettek" a véralvadási rendszerrel szemben; felszínük és bizonyos komponenseik **antitrombotikus** tulajdonságúak.

Az endothelsejtek heparint és **heparinszerű molekulákat** (pl. heparán-szulfát) termelnek, amelyek egyrészt szekretálódhatnak, másrészt a sejtek vérrel érintkező felszínére kerülhetnek. Így lehetőség nyílik arra, hogy bizonyos érszakaszokban, ha trombin keletkezik, az gyorsan inaktiválódjon antitrombin jelenlétében (lásd a 6-52. ábrát is).

Az endothelsejtek integráns membránkomponense a **trombomodulin** különleges szerepet tölt be a véralvadási folyamatok gátlásában (lásd protein C aktiválás). Amíg a **„szabad" trombin** véralvadást eredményez (megalvasztja a fibrinogént, aktiválja a vérlemezkét, a XIII, az V és a VIII faktorokat; 6-44., 6-51. és 6-55. ábrák), addig a trombomodulinhoz **„kötött" trombin** protein C-t aktivál (6-51. ábra), „kvázi" haemophiliát hoz létre.



6-63. ábra. Az endothelium antitrombotikus tulajdonságának főbb elemei. *Rövidítések: endothelsejt (EC), szöveti faktor (TF), trombin (T), protrombin (ProT), aktivált V- és VIII-faktor (F-Va és F-VIIIa), vérlemezke és tromboxán A_2 (TXA_2), fibrinogén (Fg), fibrin (F), XIII-faktor (F-XIII), protein C (PC), aktivált protein C (aPC), trombomodulin (TM), antitrombin (AT), heparán-szulfát (HS), adenozin (A), prosztaciklin (PGI_2), plazminogén (Pg), plazminogénaktivátor (PA), plazmin (P). A vastag nyilak átalakulást vagy kötődést, a vékony nyilak hatást jelentenek. A nyílhegy előtt levő függőleges vonal azt jelzi, hogy az enzim kötött formájában nem hatékony a felsorolt szubsztrátjain. A szaggatott vonal a véralvadási komplexeket jelzi. A piros szín a trombus képződésnek kedvező tendenciákat szimbolizálja*

Ennek a negatív feedback szabályozásnak gyakorlati jelentőségét az bizonyítja, hogy a protein C-hiányos betegek, valamint azok, akiknél az V-faktor mutációja miatt az nem inaktiválható aktivált protein C-vel (APC-rezisztencia), thrombosisban szenvednek. Figyelemre méltó az is, hogy a trombomodulin in vivo funkciójának gátlása trombin jelenlétében (olyan koncentrációban, amely különben nem jár semmiféle károsodással) pár percen belüli súlyos thrombosis kifejlődéséhez és halálhoz vezet.

A trombomodulin egy másik biológiai hatása a fibrinolízis gátlása. A trombomodulinhoz kötött trombin aktiválja a vérben található prokarboxipeptidáz B-t, majd a karboxipeptidáz B eltávolítja a fibrin C-terminális Lys-jeit, amelyek a plazminogén–fibrin kölcsönhatásáért felelősek. Így csökken a plazminogénaktiváció sebessége, a fibrinolízis „gátolt" lesz. Az időközben fokozódott protein C aktiválódás miatt viszont csökken a trombin mennyisége, és ezáltal a prokarboxipeptidáz B aktiválódása. A fibrinolízis felszabadul a gátolt állapotából. A rendszer működésének in vivo jelentősége még nem ismert.

Az endothelsejtek nemcsak plazmamembránjuk útján képesek a véralvadási folyamatokat gátolni, hanem egyéb sejtbiológiai folyamatok révén is. Amíg a vérlemezkék az arachidonsavból **TXA_2**-t szintetizálnak, az endothelsejtek **PGI_2**-t termelnek. A prosztaciklin pedig, mint láttuk, gátolja a vérlemezkék aggregációját (6-55. ábra). A PGI_2-hez hasonló mechanizmussal működik az **adenozin** is, mely az endothelsejt felszínén elhelyezkedő adenozin-difoszfatáz révén a vérlemezkék aggregációját fokozó ADP-ből keletkezhet.

A **plazminogénaktivátorok** elsősorban az endothelsejtekben szintetizálódnak. Szintézisüket és szekréciójukat különböző faktorok vagy behatások (bradikinin, aktivált protein C, trombin, fizikai megerőltetés stb.) fokozhatják. Ez alapvető jelentőségű, mert amíg a véralvadási folyamatok egyik legfőbb beindítója az **endothelium károsodása**, a fibrinolízis iniciálásához **ép endothelsejt-funkcióra** van szükség. A folyamat azonban sokkal bonyolultabb, mert az endothelsejtek felelősek a **plazminogénaktivátor inhibitorok** (pl. PAI-1) egy részének szintéziséért és szekréciójáért is. A két rendszer egyensúlyi állapota nagymértékben befolyásolja, hogy a fibrinolitikus folyamatok beindulhatnak-e vagy sem (6-59. ábra).

Mindezekhez társul, hogy az endothelsejtek felszíne a fibrinolízis szempontjából is kitüntetett szerepet játszhat, nevezetesen az ép endothelsejt külső membránján a plazminogén aktiváláshoz szükséges komponensek találkoznak és az aktiválás reakciósebessége nagymértékben megnő. Azokat a legfontosabb mechanizmusokat, amelyek hozzájárulnak az endothelium tromborezisztens tulajdonságaihoz a *6-63. ábra* foglalja össze.

A fejezet megírásával kapcsolatban tett javaslatokért és kritikai észrevételekért a szerző köszönetet mond Dr. Bartha Katalinnak, Dr. Blaskó Györgynek, Dr. Kolev Kraszimirnak, Dr. Komorowicz Erzsébetnek, Dr. Kőnig Tamásnak, Dr. Krajcsi Péternek, Dr. Mészáros Károlynak és Dr. Vodnyánszky Lajosnak.

Ajánlott irodalom

Blood Vessel Wall and Thrombosis, ed. R. Machovich, CRC Press, Florida USA, Vol. I-II., 1988

Hemostasis and Thrombosis, Eds. R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, E. W. Salzman, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994

6.6. Mitokondriális betegségek

Sümegi Balázs

A mitokondrium a sejtek legfontosabb oxidatív energiatermelő objektuma, amely felhasználja a citoplazmában glukózból képződő piruvátot, a zsírsavakat és aminosavakat. Ezen anyagok mitokondriális átalakulásai során termelődött redukált koenzimeket (NADH és $FADH_2$) a respirációs komplexek oxidálják és az oxidáció során felszabadult energia egy jelentős részét ATP szintézisre fordítják. Az itt képződő ATP-t egy transzport rendszer juttatja a citoplazmába, ahol eljut a sejt ATP-t használó enzimjeihez (fehérjéihez). A fenti folyamatok sérülése legtöbb szövetben nagyfokú ATP-hiányt okozhat, amely a sejt pusztulásához, illetve súlyos betegségekhez vezethet.

A mitokondriális betegségek két nagy csoportba oszthatók:

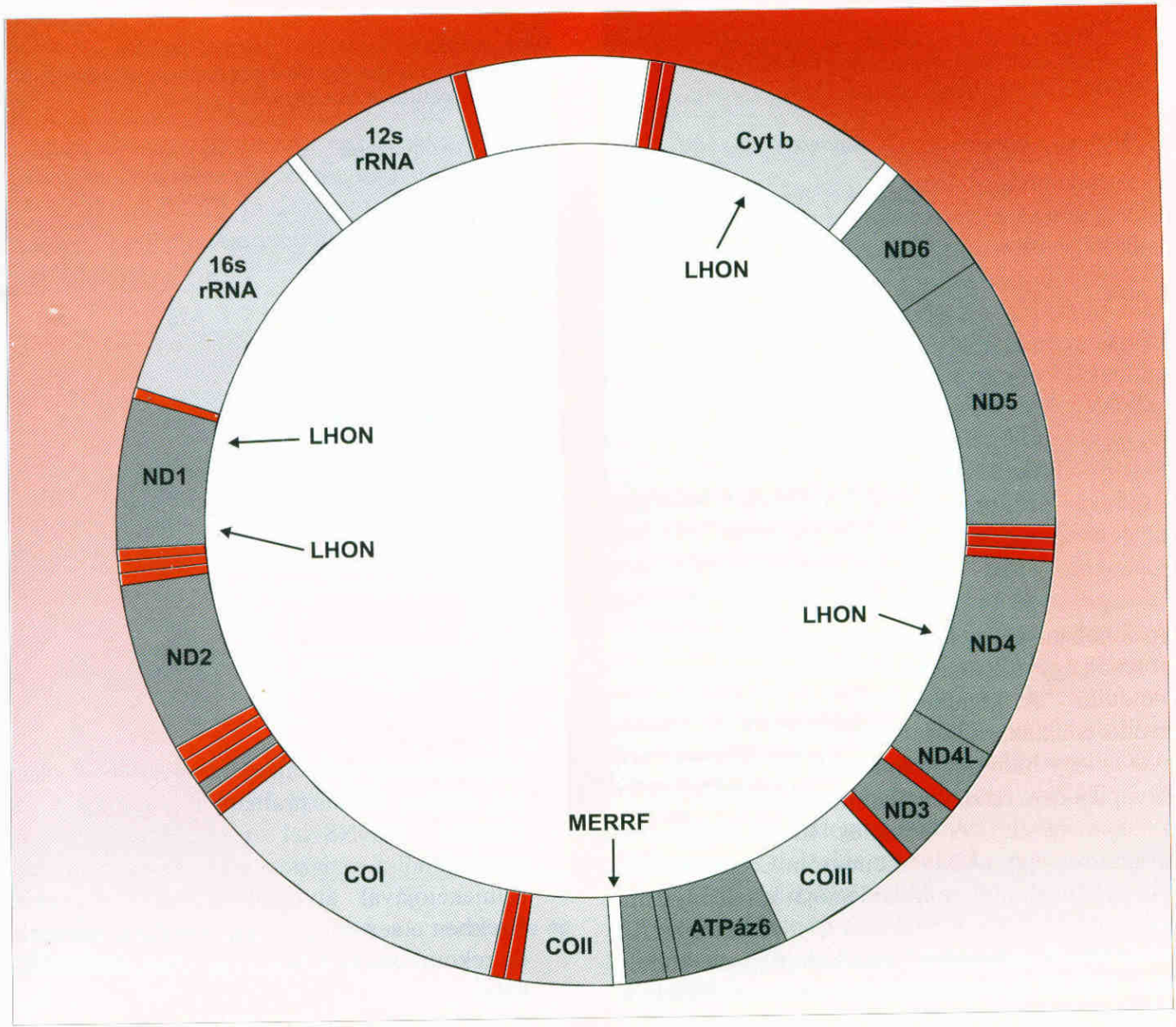
1. az egyik csoportba azon betegségek tartoznak, melyek oka a nukleárisan kódolt és a mitokondriumba transzport útján bejutó enzimek-fehérjék génjeinek a károsodása,
2. a másik csoportba tartozók esetében a mitokondriális genom károsodása következtében a mitokondriális genomban kódolt fehérjék defektusa hozza létre a betegséget. A mitokondriális genom károsodásának okai lehetnek örökletes tényezők, stressz hatások, illetve a kor előrehaladtával bekövetkezett DNS károsodások akkumulációja.

A nukleárisan kódolt mitokondriális enzimek génjeinek mutációja által előidézett mitokondriális betegségek eléggé ritkák, így ezekkel részleteiben nem foglalkozunk.

A mitokondriális genom károsodása

Az emberi sejtekben lévő gének több mint 99,9 %-a a nukleáris genomban található, de egy kis számú gén a nukleáris genomtól függetlenül előforduló mitokondriális genomban van. A mitokondriális genom 16 569 nukleotidpárból álló cirkulális DNS-molekula, amelynek komplementer láncai összetételükben jelentősen különböznek *(6-64. ábra)*. Az ún. nehéz lánc igen sok guanint tartalmaz, míg a komplementer könnyű lánc citozinban dúsult. A nehéz lánc a templátja a két rRNS-nek, 12 mitokondriálisan kódolt fehérjének és 14 tRNS-nek. A könnyű lánc egy fehérjeláncot kódol és 8 tRNS-t. A mitokondriális DNS nem tartalmaz intronokat. Ellentétben a nukleáris genommal, a mitokondriális DNS (mtDNS) molekulák száma egy sejtben több száz is lehet, sőt a petesejtekben a mtDNS-molekulák száma a 10 000-t is elérheti. A mtDNS replikációja két helyről indul. Az RNS szintéze mindkét láncról megtörténik és tartalmazza az egész genomot. Az elsődleges transzkriptumból egy mitokondriális ribonukleáz enzim vágja ki a tRNS-eket. Mivel a mtDNS rendkívül kompakt és a riboszomális RNS-ek, valamint a mRNS-eknek 5` és 3` végeinél nincsenek nem kódoló szekvenciák, ezért poli-A végek poszttranszkripciós hozzáadásával fejeződik be a mitokondriális mRNS képződése.

Hasonlóan a baktériumokhoz, a fehérjeszintézis itt is formil-metioninnal kezdődik és a mitokondriális fehérjeszintézis is gátolható a bakteriá-



6-64. ábra. A humán mitokondriális DNS szerkezete. A humán mitokondriális DNS 16 569 bázispárból áll. ND, NADH dehidrogenáz alegységei; CO, citrokróm-oxidáz alegységei; ATPáz, ATP-szintáz fehérjeláncai. Az ND6 alegységet és 8 tRNS-t a belső lánc kódol, a többit külső. A piros szakaszok a tRNS-eket kódoló régiókat jelzik. LHON, Leber örökletes látóideg neuropathia; MEERRF, myoclonusos epilepsia töredezett egyes rostokkal.

lis riboszóma inhibitor klóramfenikollal. További érdekessége a mitokondriális fehérjeszintézisnek, hogy a genetikai kód különbözik a megszokottól *(6-6. táblázat)*, így a normál stop kodon (UGA) triptofánt kódol a mitokondriumban. Az (AUA) izoleucin kód metionint kódol a mitokondriumban, és az (AGA, valamint AGG) arginin kódok stop kodonként szolgálnak az emberi mitokondriumban. Ezek a genetikai kód változások biztosítják, hogy mtDNS-ben kódolt gének csak a mitokondriumban tudjanak expresszálódni.

Az összes mitokondriumban kódolt polipeptid a mitokondriális belső membránban elhelyezkedő respirációs komplexek alkotórésze *(6-7. táblázat)*. A respirációs komplexek a mitokondriális oxidáció és ATP-szintézis következő reakcióit katalizálják. A komplex I, NADH dehidrogenáz vagy NADH:ubikinon oxidoreduktáz katalizálja a hidrogéntranszfert a NADH-ról az ubikinonra. Az enzim aktív centrumában flavin mononukleotid (FMN) és számos vas-kén centrum található. A mitokondriálisan kódolt fehérjék részt vesznek a

6-6. táblázat. Különbségek az univerzális kód és a mitokondriális genetikai kód között különböző fajokban

Kodon	Univerzális kód	Mitokondriális kód		
		Emlősök	Drozofila	Élesztő
UGA	Stop	Trp	Trp	Trp
AUA	Ile	Met	Met	Met
CUA	Leu	Leu	Leu	Thr
AGA	Arg	Stop	Ser	Arg
AGG				

6-7. táblázat. Az emberi mitokondriális genomban kódolt polipeptidek és a légzési lánc komplexeinek a kapcsolata

Komplexek		Az alegységek teljes száma	A mitokondriális DNS által kódolt alegységek száma
I.	NADH-dehidrogenáz	>25	7
II.	Szukcinát-dehidrogenáz	4	0
III.	Ubikinon-citokróm c oxidoreduktáz	9	1
IV.	Citokróm-oxidáz	13	3
V.	ATP-szintáz	12	2

reakcióban és a komplexet specifikusan gátló rotenon egy mitokondriálisan kódolt polipeptidhez kötődik. A komplex II – szukcinát:ubikinon oxidoreduktáz, valójában a szukcinát-dehidrogenáz és egy hidrogén-transzferáz együttese, amely komplex nem rendelkezik mitokondriálisan kódolt komponenssel. A komplex III (citokróm bc_1 komplex) vagy ubikinon:citokróm C oxidoreduktáz a redukált ubikinon oxidációját katalizálja, miközben redukálja a citokróm C-t. A komplex III citokróm b komponese mitokondriálisan kódolt. Az oxidáció befejező lépése a citokróm-oxidázon (komplex IV) történik, ahol az elektronok átkerülnek az oxigénre, amely proton felvételével vízzé alakul. A komplex három legnagyobb polipeptidje mitokondriálisan kódolt. Az F_1F_0-ATPáz vagy (komplex V) a protongrádiens energiáját felhasználva ATP-t szintetizál ADP-ből és foszfátból. Az F_0-résznek két komponense mitokondriálisan kódolt. Ezért bármely mitokondriálisan kódolt gén károsodása maga után vonja valamelyik respirációs komplex károsodását és így defektív mitokondriális oxidatív foszforilációt eredményez.

A mtDNS genetikája jelentősen különbözik a nukleáris genométól, a legjellegzetesebb különbségeket az alábbi öt pontban foglaljuk össze:

❶ Az mtDNS autonóm módon viselkedik, pl. egyik humán sejtvonalból átvihető egy másik humán sejtvonalba citoplazmafúzióval vagy mitokondrium mikroinjektálásával. Ez a jelenség szépen demonstrálható klóramfenikol rezisztens mtDNS-sel rendelkező sejteken, amelyekből a rezisztencia mitokondrium mikroinjekciójával átvihető másik sejtvonalba. Ezekben a sejtekben a mtDNS-ek keverednek, de rekombináció nincs, vagy elenyészően csekély.

❷ A mtDNS anyai ágon öröklődik.

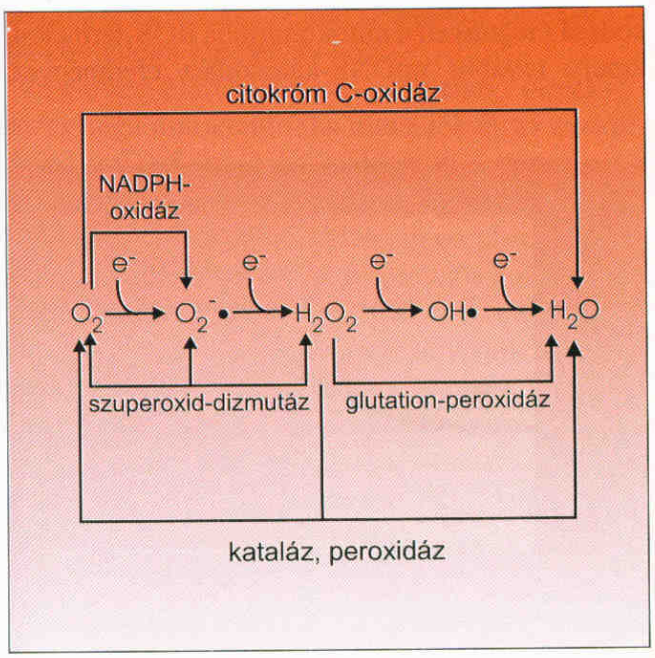
❸ A mtDNS replikatíven szegregálódik mitózis és meiózis során. Ez azt jelenti, hogy egy heteroplazmikus (amelyben van mutáns és normál mtDNS) sejt többszöri mitotikus és meiotikus lépések után olyan sejtekké alakul, amelyekben vagy a mutáns mtDNS vagy a normál mtDNS kerül többségbe. Azaz a sejtek egy része megszabadul a genetikai károsodástól, míg más részükben a genetikai károsodás dominánsan felszaporodik.

❹ Különböző szöveti érzékenység a mutációkra. Erre példa, hogy az idegsejtek jóval kisebb DNS-változást jelentő mutációknál sérülnek, mint mondjuk a hepatociták.

❺ A mitokondriális genom evolúciójának sebessége kb. 10–20-szor nagyobb, mint a nukleáris genom evolúciós sebessége.

Mitokondriális genom mutációi és az ehhez kapcsolódó betegségek

A mitokondriumban történő terminális oxidáció enzimjein képződhetnek részlegesen redukált oxigén intermedierek *(6-65. ábra)*, amelyek rendkívül reaktívak, és képesek a sejtalkotórészek oxidatív károsítására.



6-65. ábra. Reaktív oxigén intermedierek képződése és átalakításai

A fent jelzett reaktív oxigén intermedierek és egyéb anyagok DNS-károsodást idézhetnek elő, amelyek következményeként mutáció történhet a mitokondriális DNS-ben. A mitokondriális DNS mutációi négy kategóriába sorolhatók:

❶ **Misszensz mutáció** (a kodonok változása miatt egy fehérje szerkezete változik). Misszensz mutáció alatt azt érjük, amikor a mutáció miatt a képződő polipeptidben egy adott aminosav helyett egy új aminosav jelenik meg. Ez a típusú mutáció gyakori a Leber örökletes *optikai-látóidegi* neuropathiában (LHON). A mtDNS mutációja következtében (6-64. ábra) sérül a látóideg és a központi idegrendszer egy része, és korai vakság jön létre. A betegség anyai ágon öröklődik. Például a Komplex I 4. komponensében egy arginin–hisztidin csere történik (6-64. ábra), aminek következtében részlegesen inaktiválódik a Komplex I. Ennek következtében csökken a NADH-ból történő ATP-termelés és a sejtben energiaellátási zavarok lépnek fel. Hasonló mutációk történhetnek a Komplex I első komponensében és a citokróm b-ben (6-64. ábra), amely szintén energiatermelési problémákat okoz a mitokondriumban.

❷ **Proteinszintézis mutáció** (a mutáció több mitokondriálisan szintetizálódó fehérje szintézisét károsítja, mert a szintézis mechanizmusa károsodik). Amennyiben a mutáció valamely tRNS-en történik, akkor gyakorlatilag az egész mitokondriális proteinszintézis sérül. Általában ezek a mutációk csak az mtDNS egy részét érintik, azaz a mitokondriális fehérjeszintézis csak részlegesen károsodik. Ilyen mutációkat vettek észre a MERRF szindrómában (myoclonus epilepsy with ragged red fibers; myoclonus epilepsia töredezett egyes rostokkal) szindrómában, MELAS, amely nevét a jellegzetes tünetekről kapta; **m**iopatia, **e**ncephalopathia, tejsavas (**l**actic) **a**cidosis és **s**troke-szerű tünetek. Ezek a betegségek a myopathián kívül súlyos központi idegrendszeri zavarokat okoznak.

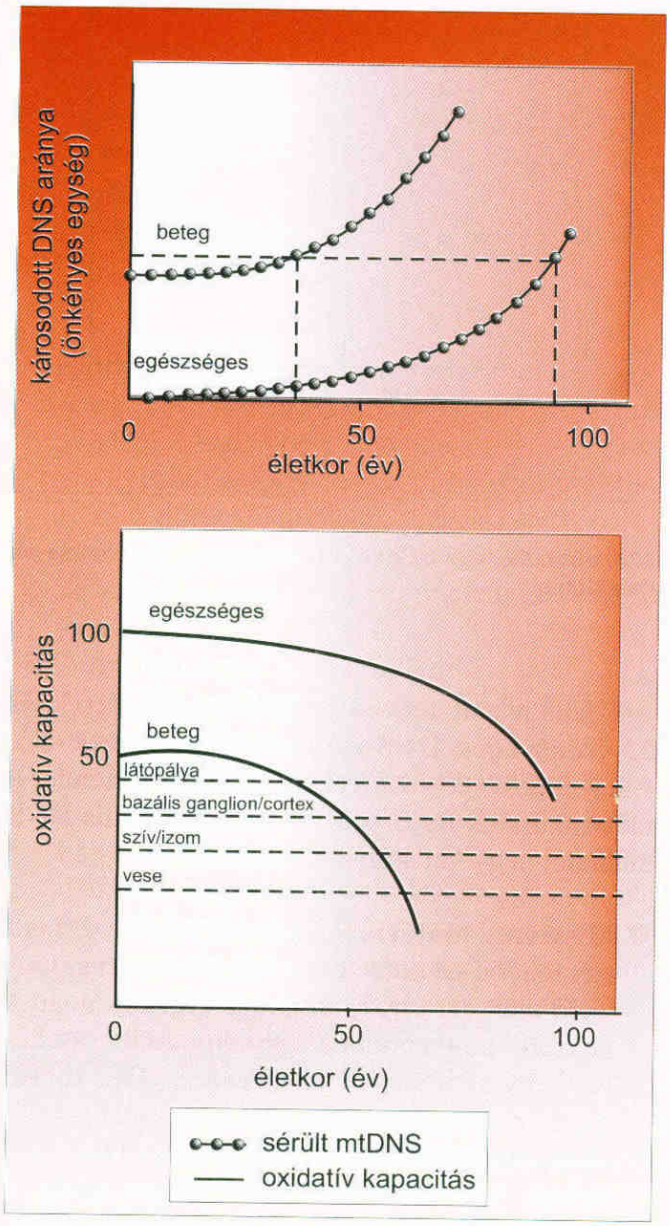
❸ **Inzerciós-delécios mutációk.** A mitokondriális DNS delécióját vették észre a szemmozgató izom károsodásával járó Kearns–Sayre-szindrómában. A deléciók esetenként csak az összmtDNS mennyiség néhány százalékában vannak jelen és régiótól függően változnak. Általában a deléció mennyisége növekszik az életkor előrehaladtával. Az is előfordulhat, hogy valamely, a mitokondriális genom stabilitásában fontos nukleárisan kódolt gén károsodása destabilizálja a mitokondriális genomot, amiből számos deléció alakulhat ki. Ugyanakkor a betegség a nukleáris genomra jellemző módon öröklődik.

❹ **A mtDNS mennyiségének változását okozó mutációk.** A mtDNS kópia számának változása is okozhat súlyos károsodást. Ezt figyelték meg halálos újszülötti respirációs szindrómában. Előfordult olyan eset is, amikor a betegben az mtDNS mennyisége a normálérték 2%-át éri csak el. Ilyen jellegű mtDNS-csökkenést figyeltek meg olyan AZT-kezelt betegekben is, akiknél myopathia alakult ki.

A mitokondrium oxidatív károsodása, öregedés

A sejtekben normális működés közepette is megjelennek reaktív oxigénszármazékok (ROS) (6-65. ábra) és nitrogén intermedierek (NO és peroxinitrit, amely a NO és a szuperoxid kölcsönhatása során alakul ki), amelyek nagyobb mennyiségben (oxidatív stressz) oxidálják a sejtalkotórészeket, beleértve a DNS molekulákat is. A nukleáris genom igen jó DNS kijavító rendszere nagymértékben képes csökkenteni a DNS-károsodást, de a lényegesen kevésbé aktív mitokondriális DNS kijavító rendszer nem képes teljesen korrigálni az mtDNS-ben bekövetkezett oxidatív károsodásokat. Ezért az mtDNS-ben sokkal nagyobb a mutációk előfordulása, mint a nukleáris genomban. Azonban a mitokondriális mutációk számának megnövekedése maga után vonja a genomban történő deléciók kialakulását. Ennek megfelelően ismert, hogy 35 éves kor után gyakran mérhető mennyiségben megjelennek az ún. közönséges 3,6-kb és 5-kb deléciók, melyek mennyisége az életkor előrehaladtával növekszik. Ebből következően a kor előrehaladtával a mtDNS által érintett respirációs komplexek aktivitása csökken. Ugyanilyen logika szerint azon személyeknél, akiknek már örökölt mtDNS-károsodása van (tehát alacsonyabb, de még nem kórosan alacsony a respirációs komplexek aktivitása), a koruk előrehaladtával súlyosbodik a helyzet, és a nagy energiaigényű szövetekben a kóros folyamatok indulnak el *(6-66. ábra)*. Hasonlóképpen különböző okok által kiváltott oxidatív stressz elindíthat – különösen a nagy energiaigényű szövetekben (idegsejtek, szívizom) – mtDNS-károsodást, amely kóros funkciókat eredményezhet.

A neuronokban az oxidatív stressz mellett a nagyfokú glutamátfelszabadulás által okozott tartósan magas kalciumkoncentráció is a mtDNS károsodásához vezethet, és így a mitokondriális energiatermelés részleges károsodását okozhatja. Ezen részleges energiadeficit vezethet bizonyos neuronok kipusztulásához, különösen olyan esetekben, amikor egyes sejtek egyéb károsodásnak is ki vannak téve. Az ilyen jellegű járulékos mtDNS-károsodás jellemző a Pakinson-kórra, amyotropicus lateralsclerosisra (ALS), a Huntington-kórra és Alzheimer-kórra. Ezen betegségekre jellemző, hogy az elsődleges probléma nem mitokondriális, ugyanakkor mindegyik esetben fokozott ROS-termelés történik különböző típusú neuronokban és a fokozott ROS termelés az érintett idegsejtekben a mtDNA károsodását indukálja, amely később energiadefektust és sejtpusztulást okoz. Így végül is a kiindulási októl függetlenül az érintett sejtcsoportok pusztulását a mitokondriális genom nagyfokú károsodása okozza. Ehhez tartozik még az a megfigyelés is, hogy a mtDNS részleges károsodása megnöveli a mitokondriális ROS-termelést, amely további mtDNS-károsodást eredményez.



6-66. ábra. Az öregedés hatása a mitokondriális genom állapotára és a mitokondriális energiatermelésre

Ezért egy kezdeti károsodás, egy fokozott ROS-termelés → mtDNS károsodás → további ROS- termelés → további károsodás pusztító ciklusába hajthatja a mitokondriumot, amely folyamat végülis sejthalálhoz vezet. Az, hogy a fenti elképzelés tényleg igaz, szépen igazolható egy Komplex I inhibitorral (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinnel), amely megnöveli a mitokondriális ROS termelést, és állatmodellekben elpusztítja a substantia nigra neuronjait és Parkinson-kór jellegű tüneteket okoz.

Az életkor előrehaladtával megjelenő növekvő mennyiségű mitokondriális mutációk és az ezeket követő mtDNS-deléciók csökkentik a mitokondrium oxidatív energiatermelését, de ugyanakkor a romló minőségű mitokondriális genomban képződő polipeptidek – melyek a respirációs komplexek komponensei – megnövelik a ROS-termelést. A ROS-t az antioxidáns enzimek és anyagok nem képesek a normális szinten tartani, így ezek mennyisége megnő, és káros lipidperoxidációt, valamint fehérjék oxidációját okozhatja, ami az apolipoprotein B oxidációján keresztül hozzájárulhat az időskori arteriosclerosis kialakulásához is.

Hasonlóképpen az mtDNS fokozott oxidatív károsodása cardiomyopathia kialakulásához vezethet és szerepet játszhat a nem inzulinfüggő diabetes mellitus tüneteinek súlyosbodásában és a velejáró vaszkuláris komplikációk kialakulásában.

Terápiás lehetőségek

Az egyik felmerült terápiás lehetőség a respirációs lánc aktivitásának a növelése, így az ATP-produkció növelése. Számos anyag került kipróbálásra, így pl. ubikinon, filokinon, menadion, szukcinát, aszkorbát és riboflavin, melyek részt vehetnek az elektronszállításban vagy stabilizálhatják a respirációs komplexeket, estleg antioxidáns hatásúak. Voltak ugyan kedvező eredmények, de igazi áttörést a fenti anyagokkal kapcsolatos vizsgálatok nem igazán eredményeztek. További próbálkozás volt acetil-karnitin adása, mely állatkísérletekben mérsékelte a korfüggő kardiolipinszint-csökkenést és javította a mitokondriális energiatermelést. Hasonlóképpen egyéb antioxidánok (E-vitamin, C-vitamin stb.) adásával is voltak probálkozások, melyekben több kísérleti rendszerben bizonyultak előnyösnek, de igazán meggyőző humán terápiára még várni kell. Ugyanakkor az eddigi vizsgálatok messzemenően jelzik a mitokondriális genom károsodásának jelentőségét nagyszámú betegség kialakulásában és a nem mitokondriális betegségek korfüggő súlyosbodásában. Jelzik továbbá azt is, hogy a mitokondriális respirációs rendszerből felszabaduló reaktív oxigén specieszek átalakítása – semlegesítése, a reaktív oxigén specieszek – antioxidáns anyagok egyensúlyának fenntartása a különböző szövetek hosszú távú fenntartásához elengedhetetlenül szükséges.

Ajánlott irodalom

Principles of Biochemistry, Leninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. Worth Publisher, Inc. New York. 1993.
Wallace, D.C. Diseases of the mitochondrial DNA. Annu. Rev. Biochem. 61, 1175-1212 (1992)
Luft, R. The development of mitochondrial medicine. Biochem. Biphys. Acta 1271, 1-6 (1995).

A klinikai laboratóriumi diagnosztika biokémiai háttere

6.7.

Dux László

A klinikai laboratóriumi diagnosztika célja, feladata

A klinikai laboratóriumi diagnosztika az in vitro diagnosztika ágait foglalja magába. Ezek a klinikai kémia/klinikai biokémia, hematológia/hemosztazeológia, mikrobiológia. Ezen területeken a vizsgálatok elvégzése nem igényli a vizsgált személy fizikai jelenlétét, csak valamilyen testfolyadék vagy excretum minta biztosítását.

A klinikai laboratóriumi vizsgálatok célja betegség gyanúja esetén a diagnózis felállítása, pontosítása, már diagnosztizált betegen a folyamat progressziójának, prognózisának követése, az alkalmazott terápia hatékonyságának és/vagy mellékhatásainak ellenőrzése. Külön csoportot képeznek az egészséges egyéneken elvégzett vizsgálatok, melyek célja normál- (referencia-) érték megállapítása vagy szűrés lehet.

A laboratóriumi diagnosztika, mint az élő szervezetek áramlási egyensúlyának nyomon követése

Az élő szervezet áramlási egyensúlyban lévő, nyitott termodinamikai rendszer, melynek rendezettsége nagyobb a környezet rendezettségénél, így annak fenntartása állandó energiabefektetést igényel. Kémiai összetételét és felépítését viszonylag szűk koncentrációtartományon belül képes állandó szinten tartani, szabályozó rendszereinek működése következtében. Ez a szabályozás az áramlási egyensúly állapotát a környezeti paraméterek változásai ellenében is biztosítani tudja, amennyiben a szabályozó mechanizmusok nem sérültek vagy a (külső, belső) környezet változásainak mértéke nem halad meg egy kritikus szintet.

A szabályozás lényege, hogy az adott kémiai paraméter szintjének változása kapcsolja ki vagy be az adott korrekciós mechanizmust, így a kémiai összetevők koncentrációjának ingadozása elkerülhetetlen eleme a szabályozott rendszereknek. Emiatt egészséges egyénekben, a kémiai összetevők mennyiségét nem egyetlen értékkel, hanem egy koncentrációtartománnyal adhatjuk meg, amelyen belül az ingadozások normálisnak tekinthetők. Ezt a sávot nevezzük referencia- vagy normáltartománynak, szélessége nagyban függ a vizsgálati minta eredetétől (pl. vizeletben általában sokkal szélesebb, mint vérplazmában), illetve a kémiai paraméter életműködések szempontjából tekintett fontosságától.

Egy kémiai paraméter normáltartományon belül eső vizsgálati értéke arra nem ad információt, hogy a szabályozási rendszer kapacitásának, tartalékainak milyen mértékű felhasználásával tudta a szervezet a normális sávba eső értéket biztosítani. Ennek eldöntésére alkalmasak az ún. terheléses vagy provokációs próbák, tesztek, melynek során az egyensúlyából kimozdított rendszer homeosztázisának visszaállását vizsgáljuk. Fontos tudni, hogy a terheléses próbák csökkent szabályozóképesség esetén egészségkárosodást, akár életveszélyt okozhatnak, így azok végzése csak arra teljesen felkészült helyen és kellő körültekintéssel megengedhető.

A kémiai paraméterek áramlási egyensúlyának elvesztése, a referenciatartományon kívül eső értékek biokémiai értelemben betegségnek vagy annak tünetének tekinthetők. Egyes paraméterek jelentős mértékű referenciatartományon kívül kerülése pl. kálium, oxigén, ionizált kalcium, glukóz perceken belül az egész élő szervezet áramlási egyensúlyának végleges felborulásához, halálhoz vezetnek. Más paraméterek esetében ez az időtartam órákban mérhető. Vannak olyan paraméterek, pl. plazmafehérjék, lipidek melyek referenciatartományon kívüli értékei közvetlenül nem fenyegetik a szervezet áramlási egyensúlyát, de folyamatos működési, strukturális zavarokat okozva rontják az egyén életminőségét és várható élettartamát is (vö. krónikus betegségek).

A referenciatartományon kívül eső kémiai paraméterek mesterséges korrekciója az orvoslás célja és feladata. Ezen mesterséges beavatkozások többsége ma nem szabályozás, hanem vezérlés alapján lehetségesek (pl. inzulin időközönkénti adagolása diabetes mellitusban). Ennek sikeréhez az ingadozások időbeli üteme, iránya és mértéke előre tervezhető kell, hogy legyen. Ennek bizonytalansága veszélyezteti a terápia sikerét. Hatékonyságát javíthatja az adott paraméter (diabetes mellitusban szérumglukóz) vagy valamely patobiokémiai jellegzetesség (diabetes mellitusban a fehérjeglikoziláció) mértékének folyamatos laboratóriumi kontrollja. Bioszenzorok fejlesztése és alkalmazása nagy segítséget jelenthet a terápiás beavatkozások vezérlés helyett valódi szabályozási alapokra helyezésében. Ez jelenleg a biotechnológiai kutatások egyik izgalmas és ígéretes területe.

Normál-, referenciatartomány fogalma meghatározása

A normál- vagy referenciatartomány egy paraméter egészséges egyénekben megengedhető ingadozásait foglalja magában. Az ingadozások hátterében az egyén biológiai ingadozásai, valamint a méréshez használt technikából eredő pontatlanságok egyaránt megtalálhatóak. Normális eloszlás esetén az egyes mérési eredmények az átlag körüli haranggörbét adnak. Konvencionálisan az átlaggal azonosnak, normálértéknek tekintjük a ±2SD közötti sávba eső eredményeket. Fontos tudni, hogy a Gauss-eloszlás függvénye alapján ez az összes mért érték 95%-a, így teljesen egészséges egyéneken is az esetek 2,5%-ában ennél magasabb, 2,5%-ban ennél alacsonyabb értéket kapunk. Ez minden egyes vizsgált paraméterre külön-külön igaz, így az alábbi képlet alapján:

$$1 - (0,95)^n$$

Egy paraméter esetében 5%, két paraméter esetében 10%, négy paraméter esetében 19%, tíz paraméter esetében 40%, húsz paraméter esetében 64% az esélye annak, hogy legalább egy, a referenciatartományon kívül eső eredményt kapunk teljesen egészséges egyénen is. Ha kellő körültekintés nélkül ezt a „kóros" laboreredményt kezelni kezdik, a referenciatartományon kívül eső paraméterek száma várhatóan emelkedni fog.

Referenciaérték meghatározásánál fontos figyelembe venni, hogy a biokémiai paraméterek áramlási egyensúly szintje életkor, nem, genetikai háttér, táplálkozási, életmódbeli szokások, környezeti tényezők által is befolyásolt. A referencia- (normál-) tartományok gyakran nagy számban elérhető, korlátozott önállóságú egyéneken kerültek meghatározásra, pl. katonák, rabok, orvostanhallgatók, így kiterjesztésük a teljes populációra óvatosságot igényel.

Kóros laboratóriumi eredmények típusai

A referenciatartományon kívül eső értékek megítélése különböző. A ±2SD tartományon kismértékben kívül eső értékeket figyelemfelkeltő vagy korai, enyhe tüneteknek tekinthetjük. Ilyenek észlelése esetén célszerű a mérés megismétlése a mintavételi, preanalitikai előírások pontos betartására fokozott figyelmet fordítva.

A jelentősebb mértékben eltérő mérési eredményeket az adott paraméter áramlási egyensúlyi helyzetének zavaraként értékelhetjük. Az analitikai szempontból kimutatható mennyiségi különbségek orvosi megítélése eltérő lehet, így célszerű a mérőrendszer, műszer megválasztása során az orvosi döntéshozatal szempontjából értékelhető eltérések kimutathatósági szintjét megcélozni. (Pl. ésszerűtlen és gazdaságtalan század vagy ezred

millimólos eltérések kimutatását végezni olyan paraméterek esetén, amelyeknél a klinikai döntésbeli különbség egész millimólokban megmutatkozó eltérések esetén áll csak fenn).

Külön kategóriaként kezelendőek az azonnali riasztást igénylő, életveszélyes állapotot jelentő eltérések. Ilyen eltérések észlelése esetén, az esetleges mintavételi, analitikai stb. hiba lehetőségének kizárása előtt, soron kívül értesítendő a beteget kezelő orvos vagy a mintaküldő személy. Azonnali riasztást igénylő értékeket mutat a *6-8. táblázat.*

6-8. táblázat. Azonnali riasztást igénylő paraméterek

Na^+	<115 mmol/l	>160 mmol/l
K^+	<2,5 mmol/l	>6,5 mmol/l
Ca^{2+}	<1,5 mmol/l	>3,5 mmol/l
P	<0,3 mmol/l	
Mg^{2+}	<0,4 mmol/l	>1,5 mmol/l
Cl^-	<80 mmol/l	>120 mmol/l
HCO_3^-	<10 mmol/l	>40 mmol/l
Glukóz	<2,5 mmol/l	>35 mmol/l

Az ún. abszurd értékek az élettel semmiképpen nem összeegyeztethető, akár nagyságrendekkel eltérő eredmény észlelése súlyos preanalitikai vagy posztanalitikai hiba bekövetkeztére utal, a teljes mintavételi mérési és adatközlési rendszer alapos ellenőrzését igényli.

Laboratóriumi diagnosztikai eredmények hibái, értékelése

Az eredmények valódisága, pontossága, véletlen és szisztémás hibák

A klinikai laboratóriumi diagnosztikai mérések többsége kvantitatív vagy legalábbis szemikvantitatív alfa-numerikus eredményt szolgáltat. A mérési eredmény összetevői a konvencionális valódi érték, amire rárakódnak a szisztémás és a véletlen hibák. Szisztémás hibák közé soroljuk a rossz kalibráció, pontatlan adagoló, rosszul beállított hullámhossz stb. következtében, az összes elvégzett mérést egyformán érintő eltéréseket. Ennek mértéke lehet állandó vagy függhet a mért paraméter koncentrációjától A random deviáció a véletlenszerűen bekövetkező hibákat jelenti, amely nem minden mérést és nem azonos mértékben érintenek.

A mérési eredményeket valódiságuk (accuracy) és pontosságuk (precision) alapján jellemezzük. A valódiság az elméleti, konvencionális valódi értékkel való megegyezés mértéke, a pontosság az egyes mérések eredményének reprodukálhatósága, valójában a Gauss-görbe szélességének megfelelő fogalom. Az ideális mérési eredmény valódi és pontos. A valódiság eltérését szisztémás hibaforrások, a pontosság romlását véletlen hibaforrások adják.

A pontatlanságra, annak mértékére azonos minta ismételt mérésével, a kapott eredmények szórásának összehasonlításával kaphatunk információt. Jellemzésére alkalmas a variációs koefficiens (CV) mértéke, ami a standard deviáció és a mérési átlag hányadosa, százalékban kifejezve.

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

A variációs koefficiens elfogadható értéke laboratóriumi diagnosztikában ionmérések esetében 1–2%, kis molekulatömegű metabolitok meghatározásánál maximum 5%, enzimek, fehérjék mérésénél 10–15% lehet.

A mérés valódiságának eltéréseit a mérés megismétlésével nem lehet felismerni. A mérési eredmények valódiságának problémái (inaccuracy) súlyosan veszélyeztetik a laboratóriumi eredmények transzferábilitását, egyes mérőrendszerek, metodikák, laboratóriumok között egy-egy országon belül és nemzetközi összehasonlításban egyaránt. Ez jelentős többletköltségeket, a vizsgálatok ismételgetését, korábbi leletek értelmezési problémáit, multicenter tanulmányok értékelhetőségének zavarait okozza.

Laboratóriumi diagnosztikai mérések kalibrálása, standardok típusai

A mérési eredmények valódisági kérdésének megoldása megegyezik a relatív skálán kapott mérési jelek, eredmények, abszolút skálára való

transzferálásának megoldásával. Köznapi nyelven, ezt a folyamatot kalibrálásnak nevezzük. A kalibrálás lényege, hogy kémiailag egyértelműen definiált, ismert koncentrációjú, nagy tisztaságú oldatokon elvégezve a mérést, a mérési jel változásait detektáljuk. A mérendő mintán kapott jelet ezen kalibrációs egyenesről/görbéről leolvasva abszolút skálán kapjuk meg a mérni kívánt paraméter mennyiségét.

A kalibrálásra használható elsőfokú, primer standard anyagokat köznapi gyakorlatban nem használják, azokat nemzeti, nemzetközi standardizálási központok állítják elő és tárolják. Ezek segítségével transzferálják a mért érték valódiságát az ún. másodfokú, szekunder standardokra, amit reagens-, mérőműszergyártók, fejlesztők használnak munkájuk során.

A desztillált vizes alapanyagú primer és szekunder standard oldatok a mért érték valódiságának beállítása szempontjából kiválóak, ugyanakkor a klinikai laboratóriumi diagnosztikai minták egy alapvető sajátságát nem tudják reprodukálni. Ez az ún. mátrixhatás. A biológiai minták, testfolyadékok, nem tisztán vizes oldatok, hanem nagyszámú fehérje, lipid, kismolekulájú metabolit, ion komplex rendszere. Ezen mátrix hatás jelenlétében számos mérési módszer, kémiai detektálási reakció a vizes oldatban megfigyelhetőtől jelentős mértékben eltérően viselkedik. Kóros minták esetében ezen mátrixhatás jellege, mértéke önmagában is sokféleképpen változhat, pl. dializált beteg plazmájában egészen más mátrixhatást kapunk dialíziskezelés előtt, alatt és után. Fényelnyelésen, fényszóráson alapuló méréseket a minta lipid-, lipoprotein-tartalmának változásai, színreakción alapuló méréseket icterus, hemolízis okozta színváltozások zavarhatják.

A mátrixhatás kiiktatásának egyszerű, ugyanakkor nem teljesen biztonságos módja a mérési rendszer érzékenységi szintjének változtatása, köznapi nyelven lenullázása, a reakcióterméket nem, csak a mátrixhatásokat hordozó, ún. vak próba segítségével. Ennek automatikus elvégzése a jel/zaj arány megengedhetetlen szintre való eltolódását elfedheti.

Az ún. tercier, harmadlagos standardok vagy kalibrátorok a mátrixhatást is tartalmazzák, valódi biológiai mintákból vagy ahhoz hasonló összetételben mesterségesen állítják elő. A kémiai paraméterek valódi értékét elsődleges standardokból eredeztetett, másodlagos standardok segítségével határozza meg és garantálja gyártójuk, forgalmazójuk. Ezen kalibrátorok segítségével történik a labordiagnosztikai módszerek kalibrálása. Fontos, hogy a legszélesebb méréstartományú metodikák esetében is a mért jel és a mérendő anyag koncentráció közötti összefüggés csak egy adott tartományon belül lineáris. Efölött vagy ezalatt deviációval számolhatunk. Emiatt nem szabad a kalibrációs görbe/egyenes mért pontjain kívüli szakaszról extrapolációval értéket leolvasni. Célszerű a kalibrációt kórosan magas és kórosan alacsony koncentrációjú, ún. patológiás kalibrátorral is elvégezni. Ennek hiányában a túl magas koncentrációjú analitet tartalmazó mintát kell hígítani, a kalibrációs görbéről leolvasható értéket adó koncentrációtartományba, és a végső eredményközléskor a hígítás fokával megszorozni.

A primer, kémiailag tökéletesen definiált standard anyagok előállítása anorganikus ionok, kis molekulatömegű metabolitok esetében megoldott. Nehezebb a helyzet a makromolekulák, fehérjék, lipoproteinek, nukleinsavak standardizációjával és így laboratóriumi diagnosztikai meghatározásaival kapcsolatban, ahol a molekulák genetikai polimorfizmusa, a térszerkezetbeli, konformációs izomérek előfordulása egészséges egyénekben is megnehezítik az eredmények valódiságának megítélését. Tovább nehezíti a helyzetet patológiás minták esetében a betegséggel oki összefüggésben vagy másodlagosan kialakuló poszttranszlációs jelenségek nagy száma és véletlenszerűen bekövetkező eloszlása. Pl. oxidáló szabad gyökök, nitrogén-monoxid hatására bekövetkező módosulások, fehérjeglikáció stb. Patológiásan módosított primer makromolekula standardok előállítása és elterjesztése a patobiokémia, laboratóriumi diagnosztika igen kurrens kutatás/fejlesztési területe.

Külső minőségellenőrzés a laboratóriumi diagnosztikában

A laboratóriumi diagnosztikai eredmények valódiságának, az eredmények transzferábilitásának biztosítására kiterjedt külső minőségellenőrzési rendszerek alakultak, többnyire non profit alapú, nemzeti vagy nemzetközi szakmai szervezetek ke-

retében. A külső minőségellenőrzés során a laboratóriumok meghatározott időközökben ismeretlen mintákat kapnak, az analitikai mérések elvégzésére. A kapott eredményeket kétféle elven értékelik. Konszenzus értéken alapuló ellenőrzés esetében a vizsgálatban résztvevők eredményeit átlagolják és ehhez viszonyítják az egyes résztvevők teljesítményét. Hátránya hogy kevés résztvevő és a rosszul mérők magas aránya esetén gyakran a legjobb laboratóriumok érik el a legrosszabb minősítést. Emiatt, ahol erre mód van, ezt felváltotta a célértéken alapuló értékelési rendszer. Ennek lényege, hogy a minta összetételét a rutin diagnosztikában használatos módszereknél és eszközöknél nagyságrendekkel érzékenyebb, pontosabb és valódibb eredményt szolgáltató, ún. referens laboratóriumban meghatározzák, ez lesz az ún. célérték. A körvizsgálati teljesítményeket az egyes laboratóriumokban ehhez hasonlítják.

A referens módszerek, technikák köre a technikai fejlődéssel folyamatosan fejlődik, jelenleg referens módszernek számít a laboratóriumi diagnosztikában az atomabszorpciós spektrometria, a HPLC, a gázkromatográfiával összekötött tömegspektrometria, a kapilláris elektroforézis.

A laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok fő fázisai

A preanalítikai fázis

A laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatokat három fázisra osztjuk. Ezek a preanalitikai, az analitikai és a posztanalitikai fázis. Nem laboratóriumban dolgozó orvos, egészségügyi szakember számára legfontosabb a preanalitikai fázis szempontjainak, követelményeinek ismerete és maradéktalan betartása vagy betartatása, tekintve hogy az ebben a fázisban elkövetett hiba a laboratóriumi személyzet által csak nehezen vagy utólag felismerhető, és a mintát még a laboratóriumba érkezés előtt a vizsgálat elvégzésére teljesen alkalmatlanná teheti.

A minta, leggyakrabban a vérplazma vagy szérum nyerése megköveteli a vizsgált személy pontos előkészítését (éhgyomorra, élvezeti szerek, gyógyszerek fogyasztását mellőzve). A vérvételi hely nyomkodása, préselése, a vér erőteljes szívása hemolízist okozhat, és/vagy a mintát szövetnedvekkel keveri. A testhelyzet standardizálása a mintavételek során fontos. Álló testhelyzetben az alsó testfélben a hidrosztatikai nyomás emelkedett volta miatt több folyadék lép ki a vérpályából és emiatt a legtöbb analit plazma/szérum koncentrációja 5–10%-kal magasabb értéket adhat, mint a fekvő egyénben levett mintában.

Gyakori preanalitikai hiba, hogy laboratóriumi vizsgálatra a vért olyan érszakaszról nyerik, melynek közelébe infúziót folyatnak be és annak elkeveredése előtt a kémiai paramétereket akár abszurd tartományba tolhatja el. Még súlyosabb hibaforrás magából az infúziós kanülből nyerni laborvizsgálathoz vérmintát.

Az alakos elemek és a plazma vagy szérum gyors szakszerű szétválasztása elengedhetetlen a pontos labordiagnosztikai eredmények érdekében. Az alakos elemek és a plazma együttes állása során kálium áramlik ki a sejtekből, így annak értéke tévesen magasabb lehet. Fontos figyelembe venni, hogy a vörösvértestek glukózt fogyasztanak, és ez a glukózfelvétel óránként 10%-os szérumglukózszint-csökkenést eredményez. Egészséges egyénben preanalitikai hibából eredő látszólagos hypoglykaemia könnyen azonosítható, viszont enyhén emelkedett vércukorszintet a vörösvértestek glukóz fogyasztása ismételten a normáltartományba csökkentheti, ami a kezdődő diabetes felismerését és időbeli kezelését veszélyezteti.

A glukózszint-csökkenés kivédésére nem javallt a vérminta hűtése, még kevésbé annak fagyasztása. Hűtés során csökkenő anyagcsere-folyamatok, csökkenő ATP-szint a Na^+K^+-pumpa csökkent működése miatt tévesen magas K^+-szintet kapunk. A vvt-ek gondatlan megfagyasztása generalizált hemolízis révén jelentős K^+-kiáramlás mellett, az anaerob anyagcsere miatt nagy mennyiségben jelen lévő LDH enzim kiáramlását is eredményezi.

Egyértelműen javasolható a glikolízist gátló szert, általában fluoridot tartalmazó vérvételi csövek használata vércukorszint-meghatározáshoz. Igen jól alkalmazhatók a szeparáló gélt tartalmazó primer vérvételi csövek, melyekben centrifugálás során egy gélszerű anyag az alakos elemek és a plazma/szérum határfelületei közé flotál és az analitek diffúziójának gátlására órákig képes dugót alkotni.

Fontos figyelembe venni egyes analitek, elsősorban a bilirubin fényérzékenységét, így a kémiai vizsgálatra levett mintákat fénytől védve kell szállítani, tárolni.

Az analitikai fázis

Ionmeghatározások. Az analitikai fázis biokémiai héttere eltérő az egyes vizsgálati tipusok, csoportok között.

Ionmérések esetében fontosabb a preanalítikai fázisban már említett hibaforrások kizárása. Az elérhető elektrokémiai, lángfotometriás, enzimatikus, illetve atomabszorpciós ion meghatározások elfogadható valódiságú és pontosságú eredményeket szolgáltatnak.

Kis molekulatömegű metabolitok meghatározása. A kis molekulatömegű metabolitok, glukóz-, karbamid-, kreatinin-, bilirubinmeghatározások klasszikus kémiai színreakciókon alapuló módszereit egyre több területen kezdik felváltani a drágább, de specifikusabb enzimatikus módszerek. Ezek alkalmazása során alapkövetelmény, hogy az enzimatikus reakció elsőrendű kinetikát kövessen, vagyis a reakció sebessége arányos legyen a szubsztrát (a meghatározandó analit) koncentrációjának első hatványával, azaz magával a koncentrációval, így megfelelő kalibrálás mellett az analit koncentrációja az enzimreakció sebessége alapján megadható.

Diagnosztikai enzimmérések. A diagnosztikus célú enzimaktivitás-mérések során csekély kivételtől eltekintve (pl. szérum-kolinészteráz) valójában nem a vizsgált enzim funkciójára vagyunk kíváncsiak. Az enzimeket csak egyes szervekre, szövetekre többé vagy kevésbé specifikus makromolekuláris indikátoroknak tekintjük. Megjelenésük, illetve megnövekedett aktivitásuk a testfolyadékokban az enzimet eredetileg tartalmazó szerv szövetkárosodására hívja fel a figyelmet. A károsodott sejtekből kiáramló számos anyag közül az enzimek diagnosztikus előnyét az adta, hogy jelenlétük, mennyiségük változása a testfolyadékokban viszonylag olcsó, egyszerű aktivitásméréssel detektálható.

A diagnosztikus célú enzimaktivitás-mérések esetében a mintában mérhető maximális sebességre vagyunk kíváncsiak, így a reakció nullad rendű kinetikája feltétlen követelmény. Az ehhez szükséges szubsztrátfeleslegről nemcsak a mérés elején, hanem annak végén is gondoskodni kell. Ez utóbbi gyakran gondot okoz jelentősen emelkedett aktivitású minták esetében, pl. akut pancreatitisben az alfa-amiláz-aktivitás mérésekor. Nagy mennyiségű szubsztrát hozzáadása egyrészt jelentősen emeli a mérés költségeit, másrészt gyakran méréstechnikai zavarokat is okozhat főleg optikai rendszerekben. Célszerűbb a mérés időtartamát rövidíteni, ami elsősorban gyorsabb, érzékenyebb detektálási rendszert igényel, vagy az általánosan használt módszer a biológiai minta hígítása révén a relatív szubsztrátfelesleg biztosítása.

Az egyes enzimek diagnosztikus információértéke függ szerv-, szövetspecifitásuk mértékétől. Ezen specifitást jelentősen javítja, ha nem az enzim összaktivitását, hanem egyes izoformáinak elkülönített aktivitását határozzuk meg. Ennek módszerei kihasználják az eltérő szubsztrátaffinitás, specifitás, gátlószer, hőmérséklet vagy antitest-érzékenységet az egyes izoformák között. Az enzimmolekula mérete, alakja, sejten belüli kompartmentalizációja, struktúrához kötöttsége szintén befolyásolhatja a kiáramlás sorrendjét és mértékét. A mennyiségi változások interpretálása, a károsodás súlyosságával, kiterjedésével összefüggésben azonban jelentős óvatosságot igényel. Figyelembe kell venni, hogy a károsodás körüli, ún. széli izgalmi zónában kompenzáló fokozott enzimfehérje-expresszió indul meg, ami a kiáramlásra képes enzimmennyiséget megnöveli. Igen súlyos kiterjedt károsodásban ez a fokozott szintézis elmaradhat, ami enyhébb enzimaktivitás-emelkedést okoz. Egyes szervek megbetegedéseiben, pl. vázizmok, máj a korábban emelkedett enzimaktivitás visszatérése a normáltartományba nem szükségszerűen a gyógyulás jele. Okozhatja az ún. kiégett végstádium elérése, amikor a károsodott szervben már nem szintetizálódik elegendő enzim a kiáramlás fenntartására. Szívizomban ezen stádium elérése előtt, a funkciócsökkenés eredményeként bekövetkezik a halál.

A testnedvekben mérhető enzimaktivitást a kiáramlás mértéke mellett az enzim aktív konformációs állapotának elvesztése, fragmentálódása, lebomlása, kiürülése is befolyásolja. Emiatt egyre jobban elterjed az enzimmolekulák katalitikus aktivitásának meghatározása helyett, azok immunké-

miai mennyiségi meghatározása, ami az inaktív, limitált proteolízisen átesett, aktivitással már nem rendelkező molekulákat is detektálni tudja. Ezen immunkémiai eljárások költségesebbek, technikailag nehezebbek, de megbízhatóbb eredményt adnak és enzimaktivitással nem rendelkező molekulákat is diagnosztikus célra felhasználhatóvá tesznek (pl. Troponin I, Troponin C, myoglobin).

Toxikológiai, gyógyszerszint-ellenőrzés céljából végzett vizsgálatok. A toxikológiai, gyógyszerszint-monitorozás céljait szolgáló laboratóriumi vizsgálatok nagyrészt kis, közepes molekulatömegű molekulák minőségi és mennyiségi kimutatására irányulnak. Klinikai diagnosztikai szempontból két eltérő felhasználási területüket különböztetjük meg. Az egyik a beteg, mérgezett személy ellátását, életmentését segítő, gyors, egyszerűen, kis technikai és elméleti felkészültséggel, a nap 24 órájában bármikor elvégezhető tájékozódó mérések. Ezek többnyire csak hatóanyag szerinti nagyobb csoportokat tudnak megkülönböztetni vagy jelenlétüket kizárni a mintában. Elsősorban betegellátási célzatúak, jogi procedúrákban az ilyen módszerekkel, ilyen körülmények között nyert eredmények bizonyítékként nem használhatóak fel. Többnyire a gyógyszer-, méregmolekulák immunkémiai kimutatásán alapulnak.

Más szempontok alapján történnek az igazságügyi orvostani célzatú toxikológiai laboratóriumi vizsgálatok. Ilyenkor az eredmény analitikai pontossága, megbízhatósága fontosabb a sürgős leletközlésnél, illetve a 24 órás hozzáférhetőségnél. Ilyen vizsgálatokat arra felkészült speciális laboratóriumok végeznek. Az alkalmazott technikák elsősorban HPLC és gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria. Az igazságügyi orvostani célú laboratóriumi vizsgálatok esetén fokozott figyelmet kell fordítani a mintavételre, a személy és minta azonosítására, az esetleges szándékos vagy véletlen kontaminációk kiküszöbölésére, az ún. „chain of custody" felügyeleti láncolat maradéktalan biztosítására. Enélkül jogi szempontból érvénytelen eredmények születhetnek mérgezés-, dopping-, kábítószer- stb. vizsgálatok során, ami a felesleges költségek mellett még kártérítési eljárásoknak is kiteheti a laboratóriumot.

Nukleinsav-diagnosztika. A nukleinsav alapú laboratóriumi diagnosztika sokak véleménye szerint a jövő diagnosztikája, ami fokozatosan kiszorítja a hagyományos biokémiai diagnosztikai eljárásokat. A fejlődés üteme ezen a területen valóban figyelemre méltó. Az emberi genom project befejezése, valamint a DNS chip technológia kifejlesztése lehetőséget ad egy egy mikrokártyán 30–40 000 különböző cDNS primer rögzítésére és a vizsgált személyből nyert mRNS-mintával való hibridizáltatásra. Az alkalmazott fluoreszcens detektálási rendszer percek alatt azonosítani tudja a keresett mutáns vagy betegség kialakulására hajlamosító genetikai konstellációt. Így a nukleinsav alapú diagnosztika mára technikailag csaknem korlátlannak tekinthető.

Minden más diagnosztikus eljárást kiszorító képességének megítélése mégis óvatosságot igényel. Tekintettel arra, hogy a genetikailag kódolt, betegségre hajlamosító konstellációk manifesztációja, különösen poligénes öröklődés esetén számos egyéb tényező, életmód, környezeti hatások függvénye. Az ismert betegségek hátterében álló pathobiokémiai történések gyakran poszttranszlációs módosítások eredményei, lásd fehérjeglikáció, nitroxiláció, oxidáló szabad gyökök hatása, folding, unfolding megváltozása, melyek genetikailag nem vagy csak közvetve kódolt folyamatoknak tekinthetőek. Ezért a nukleinsav alapú diagnosztika aligha szorítja ki teljesen a funkciók végrehajtásáért és a struktúra fenntartásáért felelős egyéb makromolekulák, fehérjék, glikoproteinek, lipoproteinek diagnosztikus célú vizsgálatait.

A nukleinsav alapú diagnosztika lehetőségeinek robbanás szerű növekedése ugyanakkor felszínre hozta számos jogi, etikai korlát kérdését is. A néhány mikrogramm mRNS-ből, akár az egyén intrauterin életében leolvasott előre kódolt élettörténet olyan adathalmazt jelent, melynek felelősségteljes őrzése, felhasználása, interpretálása jelenleg meghaladja az egyének, a családok, a társadalom (betegbiztosítási, oktatási, munkáltatói stb. rendszerek) felkészültségét.

A posztanalitikai fázis

A klinikai laboratóriumi vizsgálatok harmadik, posztanalitikai fázisa során az analitikai fázisban kapott nyers mérési eredmények technikai, szakmai validálása, majd leletté szerkesztése és ahol

csak mód van rá interpretálása történik. A technikai validálás során a mérőrendszer működőképességének, megbízhatóságának ellenőrzése, a kontrollminták eredményeinek, a kalibráció, hígítás stb. helyességének ellenőrzése, megfelelő mértékegységek hozzárendelése történik. Ezt követi a szakmai validálás, az azonos személyből származó különböző vizsgálati eredmények összevetése esetleg a rendelkezésre álló egyéb adatokkal, korábbi vizsgálatok eredményeivel, az alapvető biokémiai, patobiokémiai törvényszerűségekkel. Ezt a fázist plauzibilitási próbának is nevezik. A végleges, ellenőrzött, megfelelő informatikai keretekbe rendezett laboratóriumi eredmény a lelet, melyhez szükség esetén biokémiai, patobiokémiai interpretáció is kapcsolódik. A lelet célszerű hasznosítása a diagnózis felállítása, pontosítása terápia ellenőrzése során, az újabb laboratóriumi vizsgálatok rendelése folyamatos elemző, értékelő munka eredménye kell, hogy legyen. *R. Asher* által, 1954-ben a British Medical Bulletin-ben megfogalmazott öt kérdés, amelyet egy laboratóriumi vizsgálat kérése előtt fel kell tenni:

1. Miért kérem ezt a vizsgálatot?
2. Milyen eredményre számítok?
3. Ha a várt eredményt kapom, befolyásolja-e a diagnózist?
4. Hogyan befolyásolja a kért vizsgálat a beteg kezelését?
5. Előnyére válik-e a vizsgálat elvégzése a betegemnek?

Ha az öt kérdés közül legalább egyre nem tudunk egyértelmű határozott pozitív választ adni, a vizsgálat kérésétől nyugodtan eltekinthetünk.

Szűrővizsgálatok

Fontos és felelősségteljes területe a laboratóriumi diagnosztikának a szűrővizsgálatok kérdése, ahol egészséges vagy annak tartott egyedeken végzünk méréseket, betegségek korai felismerése, hajlam, veszélyeztetettség megállapítására. Ilyenkor figyelembe kell venni a hatékony szűrővizsgálatok, Egészségügyi Világszervezet által felállított követelményrendszerét.

1. A szűrővizsgálat legyen hatással a beteg életének minőségére és/vagy időtartamára.
2. A kiszűrt személyek számára álljon rendelkezésre megfelelő kezelés.
3. A szűrés olyan személyekre irányuljon akiken a betegség tünetei még nem figyelhetőek meg (aszimptomás állapot).
4. Az elérhető kezelés legyen hatékonyabb az aszimptomás állapotban, mint a tünetek kialakulása után.
5. A szűrővizsgálati eljárás megfelelően standardizált legyen.
6. A szűrés költségei legyenek arányban annak hatékonyságával, a kérdéses betegség gyakoriságával.

A fentiekből kitűnik, hogy az elterjedten végzett, népszerű szűrőprogramok közül igen kevés felel meg ezen előírásoknak, azok gyakran divat, publicitás, üzleti egyéb szempontokkal kontaminálódnak.

A szűrővizsgálatok értékelés során fontos a szűrési határérték (cutoff limit) helyes megválasztása. A cutoff-érték emelése növeli az álnegatív (valójában pozitív, de negatív eredményt adó) egyének számát. (Feltéve, ha a paraméter emelkedése jelenti a kóros elváltozást.) A cutoff-érték csökkentése viszont az álpozitív (valójában egészséges, de a vizsgálaton pozitív eredményt adó) esetek számát emeli. Fontos tudni, hogy szűrővizsgálatokban az álnegatív eredmények nagyobb gondot jelentenek mint az álpozitív eredmények. Előbbiek valójában a szűrés értelmét kérdőjelezik meg, az utóbbiak esetében a kiszűrt személyeket ismételt, nagyobb specifitású és érzékenységű vizsgálatnak vetik alá, pl. phenylketonuria gyanúja esetén a Guthrie-féle gyors teszttel kiszűrt újszülötteken aminosav-analizátorral választják szét a valódi és álpozitív eseteket. Az álpozitivitás lehetőségének figyelembevételével a szűrővizsgálati eredmények interpretálásakor kellő óvatossággal, körültekintéssel kell eljárni az érintett személy vagy családtagjai felé.

Tárgymutató

A
ABC fehérjék 437
abetalipoproteinaemia 189
abzim 22
ACAT 173
ACE 214
acetecetsav 165
acetil-CoA
  hiányos képződése 91
  képződése piruvátból 81
  mint elágazási pont 318
  szerepe a glikolízisben 118
  transzportja 146
acetil-CoA-karboxiláz 147
acetil-enzim 540
acetilkolin 537
  inaktiválása 539
  nikotinreceptora 456, 457
  szintézise 537
acetilkolin-észteráz 539
acetil-neuraminsav 141
acetil-transzferáz 148
acidosis, tejsavas 116
acil carrier protein (ACP) 148
acil-CoA:koleszterin-aciltranszferáz (ACAT) 173
acil-CoA-dehidrogenáz 160
  elégtelen működése 162
acil-CoA-szintetáz 154
acil-gliceridek 145
aciltranszfer 82
ACP 148
ACTH 211, 216
adaptív enzimrendszerek 3632
adduktok 299
adenilát 275
adenilát-cikláz 453, 460, 471
adenilát-kináz 118, 561
adeniloszukcinát-liáz 275
adeniloszukcinát-szintetáz 275
adenin 269
adenin-foszforibozil-transzferáz 276
adenozil-metionin 232, 540
adenozin 609
adenozin-3'-foszfát-5'-foszfoszulfát 296
adenozin-dezamináz 285
  hiánya 288
adenozin-difoszfát (ADP) 76
adenozin-difoszfatáz 609
adenozin-foszfátok 59
adenozin-kináz 277
adenozin -trifoszfát (ATP) 106, 118
adipociták 325
adipocita 146
ADP foszforilációja 76
ADP/ATP ciklus 59, 60
adreanlin 132
adrenális androgének 211
adrenalin 131, 258, 540
  receptorai 543
adrenerg receptor 453, 455
adrenogenitalis szindróma 216
adrenokortikotrop hormon (ACTH) 211, 547
aerob glikolízis 104
affinitás kromatográfia a fehérjék elválasztására 20
agy
  anyagcseréje 324
  szerepe az intermedier anyagcsere integrációjában 324
AIDS vírus 382
akceptor kontroll 77
akciós potenciál 525, 526
akonitáz 85
aktin 7
aktinomicin D 367
aktív hely 2
aktív szulfát 248
aktív kromatin 371
aktív transzport 431
  másodlagos 431, 436
aktivált metilciklus 232
akut fázis fehérjék 225

akut intermittens porphyrinuria 262
akut pancreatitis 224
akut transzformáció 383
alanin 3, 115, 246
alanin-aminotranszferáz 43
alaninciklus 115
ALAT 39
albumin 6
alcaptonuria 258
aldózok 92
aldóz-reduktáz 124
aldoláz 106
aldoláz B 122
aldoszteron 211
  szintézise 214
alfa$_1$-antitripszin 594
alfa$_2$-antiplazmin 604
alfa$_2$-makroglobulin 596
alfa-adrenerg receptorok 544
alfa-aminosav 3
alfa-bungarotoxin 457
5- alfa-dihidrotesztoszteron 216
1-alfa-dihidroxi-kolekalciferol 219
alfa-hélix 9
alfa-ketobutirát 239
alfa-ketoglutarát 86, 240
alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz 86
  enzimkomplex 86
  szabályozása 90
alfa-krisztallin 136
alfa-laktalbumin 126
alfa-limit-dextrin 100
alfa-oxidáció 164
alkalikus foszfatáz 43
alkil-foszfátok 540
alkohol
  hatása a GABA-receptorra 536
  mint energiabevitel 327
alkohol-dehidrogenáz 108
alkoholizmus okozta májkárosodás 327
alkoholos erjedés 108
allantoin 285
allizin 570
allopurinol 288
allosztérikus konformációváltozás 37
allosztérikus aktivátor 37
allosztérikus enzimek 35, 36
allosztérikus inhibitor 37
allosztérikus kölcsönhatások 315
allosztérikus kötőhely 37
alloxantin 288
almasav enzim 151
alternatív splicing 370
Alzheimer-kór 614
Ames-próba 352
amiláz 43, 100
amilóz 98
amilopektin 99
amilo-transzglikoziláz 126
aminoacil-tRNS-szintetáz 387, 388
aminocukrok 140
aminodikarbonsav 6
amino-hidrolázok 285
amino-levulinát 261
amino-levulinát-szintáz 261
aminopterin 283, 284
aminosav(ak) 3, 285
  apoláros 3
  aromás 3
  átalakulásai 240
  bázisos 6
  esszenciális 220
  glukoplasztikus 246
  katabolizmusa 240
  ketoplasztikus 246
  metabolizmus zavara 326
  nem esszenciális 232
  neurotranszmitter 528, 532
  oldallánc szerinti csoportosítása 3
  poláros 6
  savas karakterű 6
  szemiesszenciális 220, 243
  szerkezeti tulajdonságok 3
  táplálékból származó 221
  transzportja 226
aminosav-anyagcsere 291
aminosav-oxidázok 240
aminosavsorrend 7
aminotranszferázok 231
ammónia 240, 326
  eliminációja 241
AMP 275
AMPA- (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionsav) receptor 458, 533
AMPA/kainát receptot 533
AMPA-receptorok 533
AMPA-szelektív ioncsatorna 533
AMP-dezaminász 290
amplifikáció 462
amyotropicus lateralsclerosis 614
anaplerotikus reakciók 90
anabolikus folyamatok 321
anabolizmus 56
anaerob metabolizmus 104
anaemia
  B_{12}-vitamin-hiány okozta 296
  hemolitikus 140
anaerob glikolízis 108
anaplerotikus reakció 151
Andersen-betegség 133
androgének 211
androszténdion 211, 216, 218
ANF 215
ANF-receptor 483
angiotenzin I 214
angiotenzin II 132, 214
angiotenzin III 214
angiotenzinkonvertáló enzim (ACE) 214

angiotenzinogén 214
annexinek 481
anomerek 94
anorganikus szulfát 248
antibiotikumok 394
antikodon 387
antimetabolitok 35
antionkogén 513
antiplazmin 604
antiport 431
antiproliferatív hatás 490
antiszenz nukleinsav 413
antitripszin 596
antitrombin 596
antivirális szerek 285
anyagcsere
  integrációja patológiás állapotokban 325
  intermedier 56
  szabályozása 315, 320
anyagcserezavar 325
APC-(aktivált protein C-)rezisztencia 609
AP-endonukleáz 350
apoenzim 27
apoprotein 184
apoprotein A-I 187
apoprotein B-100 184, 185
apoprotein C-II 184
apoprotein transzfer reakciók 184
apoproteinek 182
apoptosis inducing factor 516
apoptótikus faktorok 515
apoptózis 348, 374, 514
apoptózis inhibitorok 518
apotranszferrin 264
arachidonsav 203, 422, 469, 579
  felszabadulása 580
  ioncsatorna 587
argináz 243, 251
arginin 6, 243, 244, 251
argininoszukcinát-liáz 241
argininoszukcinát-szintetáz 241
aromás-aminosav-dekarboxiláz 540
aromás aminosav 3
arteriosclerosis 188
árva receptorok 499
arzenát glikolízis gátlása 106
ASAT 39
asziálglikoprotein 228
aszkorbát 540
aszkorbinsav (C-vitamin) 68, 312
aszparagin 6, 235, 260
aszparagináz 260
aszparaginsav 6
aszpartát 235, 260, 279
  transzporter 112
aszpartát-transzkarbamiláz 279
aszpartát-aminotranszferáz 43
asszociáció 449
asszociációs egyensúlyi konstans 450
ATP
  keletkezése 106
  szerepe a glikolízisben 118
ATP:citrát-liáz 147, 537
ATPáz
  F típusú 435
  P típusú 435
  V típusú 435
ATP-szintetáz 72
ATP-ADP transzlokáz 77
ATP-hidrolízis 77
ATP-szintáz 71, 76
atraktilozid 77
atrial natriuretic factor (ANF) 483
atropin 539
attenuátor 365
AUG kodon 386
avidin 113
azaszerin 274

B

B_1-vitamin 91
B_{12}-vitamin 91, 232, 254, 291
baktérium, lizogén 378
bakteriofágok 376
  replikációja litikus úton 377
  replikációja lizogén úton 377
bakteriolízis 377
bakteriosztatikus hatás 394
barbiturátok hatása GABA jelenlétében 536
barna zsírszövet 77
Basedow-kór 260
bázissorrend 331
bcl-2 518
benzodiazepinek hatása GABA jelenlétében 536
beriberi kór 91
béta-adrenerg receptor 453, 544
béta-galaktozidáz 100
béta-hidroxivajsav 165
béta-ketoacil-ACP-szintáz 148
béta-ketoacil-szintáz 148
béta-oxidáció 160
  csökkenése 321
béta-pleated sheet 9, 11
béta-redőzött lemez 9, 11
béta-turn 11
bilirubin 265, 268
  glukuronsavas konjugációja 302
  konjugációzavara 326
  konjugált 265
bilirubin-diglukuronid 265
biliverdin 265
biliverdin-reduktáz 265
bioenergetika 55
biológiai oxidáció 68
biotin 90, 113, 147, 232
biotranszformáció 297
  biológiai jelentősége 307
  előkészítő szakasza 299

biotranszformáció (folyt.)
konjugációs szakasza 302
oxidációs folyamatai 299
szabályozása 305
biotranszformációs betegség 308
biotranszformációs enzimek 307
aktivitása 308
2,3-biszfoszfoglicerát 109
bronz-diabetes 268
bungarotoxin 457
butiril-kolin-észteráz 539
butiril-S-ACP 149

C, CS
Ca^{2+} 431, 435, 440, 441, 444, 445, 446, 467, 469, 470, 477, 480, 481, 540, 580, 587
intracelluláris 476, 477
Ca^{2+}/foszfolipid dependens protein-kináz 469
Ca^{2+}-ioncsatornák 441
Ca^{2+}-jelpálya 469, 473
Ca^{2+}–kalmodulin dependens protein -kináz 467, 481
CAAT-box 367
CAD 279
cAMP 471
hatása simaizomsejtekre 474
hatása szívizomsejtekre 474
cAMP/Ca_{2+} 474
cAMP–CAP komplex 365
cAMP-akceptor fehérje 365
cAMP-dependens protein-kináz 118, 466, 467, 472
cAMP-függő protein-kináz 158, 526
cAMP-mediátorrendszer 471
cAMP-reszponzív elem 474
cancer procoagulans 593
Cap-képződés 367, 368
caspase 491
CAT 537
CBG 215
cDNS 410
cDNS-könyvtár 410
CDP-kolin 197
ceramid 207
cerebrozid 207
CFTR fehérje 438
cGMP 482
cGMP-dependens protein-kináz 467
cGMP-foszfodiészteráz 453, 484
cGMP-függő protein-kináz 483
cGMP-szint 484
chaperonok 16
cholelithiasis 180
choleratoxin 207, 437, 461
ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát lásd cAMP
ciklikus guanozin-monofoszfát lásd cGMP
ciklikus nukleotid-foszfodiészterázok 471
ciklindependens kináz 509
ciklindependens protein-kinázok 347, 469
ciklinek 347
cikloheximid 394
ciklooxigenáz 581
ciklooxigenáz-út 581
ciklosporin 471
cink-proteázok 221, 223
cinkujj fehérjék 372
cirrhosis 326
cisz-elemek 367, 371
cisz-Golgi-kompartment 398
cisz-regulációs elemek 362
cisztation 239
cisztationin-liáz 239
cisztationin-szintáz 239
cisztein 6, 239, 248, 319
cisztein-aszpartát-proteáz 491
cisztein-proteáz 593
cisztin 6
cisztronok 359
citidil-transzferáz 198
citidin lebontása 288
citokinek 486, 573
jelpályarendszere 486
citokróm b_5 153 , 299
citokróm c 76
citokróm P450 299, 301
citokróm P450-indukció 306
citokrómok 73
citokróm-oxidáz 76
citokró3m-reduktáz 75
citokróm-oxidáz 68, 69
citoszkeletális rendszer 562
citozin-arabinozid 284
citrát 147
szerepe a glikolízisben 118
citrátciklus 79, 232
anaplerotikus reakciói 89
reakciói 85
szabályozása 89
tápanyag-katabolizmusban 88
citrát-szintáz 85, 89
allosztérikus szabályozói 89
allosztérikus szabályozói 89
citrullin 241, 245, 484
Cl^- 525, 536
COMT 543
congenitalis adrenalis hyperplasia 216
consensus szekvencia 359, 367
core enzim 358
core-glikolizáció 397
core-hisztonok 343
Cori-ciklus 115, 323
cosmid 407
cöruloplazmin 6
CRE 474
CREB 374, 474
Crigler–Najjar-szindróma 268, 308
cro fehérje 379
cross-talk 465, 490
CTP 279
CTP keletkezése 282

CTP:foszfokolin-citidilil-transzferáz 197
CTP-szintetáz 279
cukoralkohol 96
Cushing-kór 325
cutoff-érték 623
C-vitamin (lásd még aszkorbinsav) 68, 312
  mint elektronátvivő rendszer 68
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator 438
csatornaképző ionofórok 439
csontszövet 570
csoportátvitel 56
csoportátviteli potenciál 56

D
D_3-vitamin 219
dehalogenáz 260
dehidrogenázok 69
deléció 351, 352
denaturáló vegyületek 15
dense core vezikulák 532
depurinizáció 349, 352
dermatán-szulfát 142, 578
  lebontását katalizáló hidrolázok hiánya 142
deszaturáció 152, 153
deszaturáz 153
deszenzitizáció 455
  heterológ 455
  homológ 455
dezaminálódás 349
dezaminázok 285
dezmin 563
dezoxikólsav 178
dezoxi-monoszacharidok 97
dezoxi-nukleotidok lebontása 285
dezoxi-nukleozid-difoszfát 284
dezoxi-pirimidin-fotoliáz 349
dezoxi-ribonukleotidok 331
  bioszintézisének szabályozása 284
  keletkezése 281
dezoxi-ribonukleozid-5'-trifoszfát 336
dezoxi-timidilát 282
  szintézise 283
DHP-receptor 443
diabetes mellitus 135
  bronz 268
  inzulinfüggő 325
diabeteses ketoacidosis 165, 168
diacil-gliceridek 145
diacil-glicerol 468, 475, 482
diacil-glicerol-lipáz 580
dialízis fehérjék elválasztására 18
diallil-szulfid 301
diarrhoea 436, 483
DIC 606
didezoxi-módszer 403
diffúzió 428
  egyszerű 429
  facilitált 429
  laterális 425
digliceridek 145, 146, 468
dihidrolipoil-reduktáz 87
dihidrofolát 232
dihidrofolát-reduktáz 232
dihidrolipoil-dehidrogenáz 82
dihidrolipoil-transzacetiláz 81
dihidrolipoil-transzszukciniláz 86
dihidroorotát-dehidrogenáz 279
dihidroorotáz 279
dihidroorotsav 279
dihidropiridin 565
dihidropirimidináz
  defektusa 290
dihidropiriminidáz 288
dihidropteridin-reduktáz 237
dihidrouracil 288
dihidroxi-aceton 92
dihidroxi-aceton-foszfát 155
3,4-dihidroxi-fenilalanin (DOPA) 258
dikumarol 606
dimerizáció 349
dimetil-adenin 269
dimetil-allilpirofoszfát 169
2,4-dinitrofenol 77
dioxigenázok 70
dioxin 306
dipalmitoil-lecitin 196
dipeptid 7
diphtheria exotoxin 394
direkt bilirubin 265
diszacharidázok 100
diszacharidok 92, 97
disszeminált intravascularis coagulopathia 606
disszociáció 449
disszociációs konstans 450
disztrofin 564
dnaB-fehérje 339
dnaC fehérje 339
DNázok 517
DNS 17, 355, 400, 401
  A-formája 335
  bázisszekvenciájának vizsgálata 402, 403
  B-formája 331
  C-formája 335
  eukarióta sejtekben 343
  extranukleáris 347
  károsodásainak javítása 348
  késlekedő 339
  mitokondriális 348, 613
  olvadáspontja 335
  rekombináns 405
  relaxált 335
  replikációja eukariótákban 344
  replikációja prokariótákban 336
  specifikus kémiai hasítása 403
  szerkezete 331
  topológiai izomér 336
  vektor 405
  Z-formája 335

DNS-chip 415
DNS-dependens DNS-polimerázok 336
DNS-dependens RNS-polimerázok 358, 366
DNS-genommal rendelkező vírusok 379
DNS-giráz 336, 339
DNS-hez kötődő fehérjék 372
DNS-károsodások 348
DNS-ligáz 338, 341, 349, 401, 350
  eukarióta 344
DNS-polimeráz 336, 349, 350, 403
  eukarióta 344
DNS-szintézis 271
DNS-topoizomerázok 336
DNS-vírusok, transzformáló 379
dokkoló fehérje 396
dolikol-foszfát 397
dolikol-pirofoszfát 397
L-DOPA 258, 540
DOPA-dekarboxiláz 540
dopamin 258, 540
dopamin-béta-hidroxiláz 540
dopaminreceptorok 544
down-reguláció 455, 469
dTMP 282
Dubin–Johnson-szindróma 268, 308
Duchenne-betegség 564
durva endoplazmás retikulum 395
dystrophia musculorum progressiva 564
dystrophin 564
dystrophin asszociált glikoprotein komplex 565

E
EF-G elongációs faktor 392
EF-Ts elongációs faktor 392
EGF 486
EGF-receptor 482, 486
egyszerű diffúzió 429
Ehlers–Danlos-szindróma 572
éhezés 320, 321
éhezési hypoglykaemia 327
eIF2 393
eikozanoidok 145, 579
  biológiai hatásai 584
  receptorai 587
eikozapentaénsav 579
eikozatetraénsav 579
eikozatriénsav 579
ekto-ATPáz 543
elágazási pontok intermedier anyagcserében 316
elasztáz 223, 227
  pancreas 575
elasztin 6, 566, 573
  degradációja 575
  flexibilitása 574
elektrokémiai potenciál 431
elektrontranszfer 63, 68
  katalizáló enzimei 69
elhízás 325
elongáció 152, 360, 390
elongációs faktorok 390, 392
  eukarióta 393
elsődleges transzkriptum 366
emésztés 100
emlékezés, glutamát szerepe 534
emphysema 225
emzymopathia 42
encefalinok 548
endergonikus reakció 56
endonukleáz 349, 401
endonukleáz-metiláz 400
endoplazmás retikulum 395, 444
endorfinok 547, 548
endothel-derived relaxing factor 486
endothelium
  szerepe a véralvadási folyamatokban 607
  tromborezisztens tulajdonságai 609
endotoxin shock 486
energiaraktárak 320
energiatöltés 61
energiatranszdukció 77
energiatranszformáció 55
enhancer 371
enhancer DNS-szakasz 367
enoil-CoA-hidratáz 164
enoláz 107
enterális proteázok 223
enteropeptidáz 223
entrópia effektus 26
enzimaktivitás
  gátlása 34
  szabályozása 35
enzimatikus katalízis 6
enzimek 6, 21
  aktivitása 33
  allosztérikus 35, 36
  emésztésben részt vevők 101
  fajlagos aktivitása 33
  immobilizált 43
  karbamoil 540
  koncentációemelkedése a vérplazmában 43
  mennyiségének szabályozása 315
  osztályai 26
  specificitása 23
enzimindukció 306
enzimgátlás, kompetitív 35
enzim–szubsztrát komplex 22, 30
enzyme-linked immunosorbent assay 43
epe 178
epesavak 172, 175, 190
  enterohepatikus körforgása 178
  másodlagos 178
epeszekréció 321
epidermális növekedési faktor (EGF) 486
epilepsia, glutamát szerepe 535
epimeráz 163
epimerek 93
epithelsejtek transzporterei 102
epoxigenáz-út 581, 587

eritróz-4-foszfát 137
eritromicin 394
esszenciális aminosavak 220
esszenciális fructosuria 124
esszenciális zsíravak 145
etanol metabolizmusa 327
eukarióta gén 366
eukarióta kromoszóma 343
eukarióta mRNS 389
eukarióta riboszóma 389
E-vitamin 312
exchange fehérjék 392
excitátoros posztszinaptikus potenciál 534
exergonikus reakció 56
exocitózis 481
exon 366
exonukleáz 336
exotoxin 394
expressziós rendszerek 411
expressziós vektorok 410
extenziós peptidek 571
extracelluláris jelek 449
extracelluláris jelre regulálódó protein-kináz (ERK) 489
extracelluláris matrix 566, 578
extracelluláris receptor 449
extranukleáris DNS 347

F
F plazmid 341
F típusú ATPáz 435
facilitált diffúzió 429, 436
FAD 64, 82
fajlagos aktivitás 33
familiaris hypercholesterinaemiák 187
fázisátalakulási hőmérséklet 425
feedback enzimgátlás 39
fehérjeszintézis mitokondriumokban 399
fehérjék 6, 566
  biológiai funkciók 6
  Ca^{2+} 481
  cserélő 489
  denaturációja 12, 14
  DNS-hez kötődő 372
  dokkoló 396
  elsődleges szerkezete 7
  emésztése 221
  emésztése bélben 223
  emésztése gyomorban 223
  endogén, lebontása 227
  feltekeredése 15
  fúziós 411
  foszforilálódása 397
  G 444
  harmadlagos szerkezet 12
  heterotrimer GTP-kötő 459
  hőshock 397
  integráns 425
  ionos karakter 13
  izoelektromos pont 13
fehérjék (folyt.)
  izolálás 17
  kapcsoló 488
  ligand affinitás alapjántörténő elválasztás 17
  másodlagos szerkezet 9
  mérete szerinti elválasztás 17
  molekuláris chaperonok 397
  multienzim komplex 14
  natív állapot 14
  natív állapot kialakulása 15
  negyedleges szerkezet 14
  oldékonyság 17
  perifériás 425
  raktárak 320
  rep 340
  riboszóma 366
  sejtorganellumokba irányítása 394
  szerkezete 7
  szerkezetét megismerő metodikák 17
  szupramolekulásris struktúra 14
  töltéstől függő szeparálás 17
  zsírsavas acileződése 397
fehérjeemésztő enzimek aktivitásának szabályozása 223
fehérjefoszforiláció
  közvetlen 464
  reverzibilis 464
felszívódás 101
fém-proteáz 573
fenilalanin 235, 254
  anyagcserezavarok 258
fenil-alanin 3
fenilalanin-hidroxiláz 235, 258
feniletanolamin-N-metil-transzferáz 540
fenilketontestek 258
fény érzékelése a retinapálcikákban 484
ferritin 6
ferrokelatáz 261
feszültségfüggő ioncsatornák 526
feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák 441
feszültségfüggő ioncsatornák 439
feszültségfüggő Na^{+}-csatornák 525
FFA 321
FGF 486
fibrilláris aktin 551
fibrin 603
  keletkezése 590
fibrin monomerek 590
fibrinaggregátum 589
fibrinogén 589, 590
fibrinolízis 589
fibrinolitikus rendszer aktiválódása 609
fibrinolízis 601
fibrinopeptid 590
fibrinpolimerizáció 590
fibrinstabilizáció 590
fibroblaszt növekedési faktor (FGF) 486
fibroblasztok 571
fibroin 566
fibronektin 566, 576

fitánsav 164
fiziológiás icterus 268
fiziológiás ketosis 168
fizosztigmin 540
flavin-adenin-dinukleotid (FAD) 64, 82
flavin-mononukleotid (FMN) 64, 240
flavin-oxidázok 311
flavoprotein dehidrogenázok 69
flavoproteinek 73
flexibilitás 574
flip-flop mozgás 425
fluiditás 425
fluid-mosaic membránmodell 425
5-fluorouracil 282, 285
  timidilát-szintáz gátlása 283
FMN 64, 240
folátcsapda 291
follikulusstimuláló hormon (FSH) 211
folsav 232, 284
  hiánya 232
forbol-észterek 469, 494
formilkinurenin 248
formil-metionin 396
forward funkció 490
fos 493
fos fehérje 374
foszfatidiletanolamin 194, 422
  szintézise 201
foszfatidiletanolamin-N-metil-transzferáz 198
foszfatidilglicerol 194
foszfatidilinozitol 194, 422, 426
  szintézise 201
foszfatidilinozitol jelpálya 539, 544, 546
foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 201, 475
foszfatidilinozitolokra specifikus enzim 475
foszfatidilkolin 194, 422, 482
  szintézise 196
foszfatidilszerin 194, 422
  szintézise 201
foszfatidsav 157, 193
foszfatidsav-foszfatáz 157, 200
3-foszfo-adenozin-5-foszfoszulfát (PAPS) 303
foszfolipidek 423
foszfoenolpiruvát 114
foszfoenolpiruvát-karboxikináz 91, 113, 114
foszfofruktokináz 324, 474
foszfofruktokináz I 106, 112, 117
foszfofruktokináz II 106, 119
foszfoglicerát-kináz 106
foszfoglicerát-mutáz 106
foszfogliceridek 422
foszfoglukóz-izomeráz 106
foszfoglukomutáz 126
6-foszfoglukonát-dehidrogenáz 137
6-foszfoglukono-delta-lakton 136
foszfohexóz-izomeráz 106
foszfokreatin 324
foszfolambán 472, 474
foszfolamban 443
foszfolipáz A2 580
foszfolipáz C 453, 475, 580
foszfolipáz C (PLC) 475
foszfolipid kettős réteg 424
foszfolipidek 193, 422
  mozgásai a membránokban 424
4-foszfopantetein 148
foszfopentóz-epimeráz 137
foszfopentóz-izomeráz 137
foszfoprotein-foszfatázok 41, 129, 130, 133, 464, 470
  csoportosítása 470
  szerin/treonin 470
  tirozin 471
5-foszforibozil-1-amin 272
5-foszforibozil-1-pirofoszfát (PRPP) 272
5'-foszforibozil-aminoimidazol-szintetáz 275
5'-foszforibozil-aminoimidazol-szukcinokarboxamid-szintetáz 275
foszforiláció 129, 397
  szubsztrátszintű 61, 87, 106
foszforiláció-defoszforiláció 40
foszforilációs kaszkádok 41, 466
foszforilációs potenciál 60
foszforiláz-a-foszfatáz 130
foszforiláz b-kináz 130
foszforiláz-kináz 130
foszforiltranszfer 59, 76, 87
foszforolízis 128
foszfotranszferázok 27
frameshift mutáció 351
free fatty acid 158, 189
fructosuria, esszenciális 124
D-fruktóz 93, 122
  metabolizmusa 122
  transzportja 101
fruktóz-1,6-biszfoszfatáz 114
fruktóz-1-foszfát-aldoláz 122
fruktóz-2,6-biszfoszfát 119
fruktóz-2,6-biszfoszfát 120
fruktóz-6-foszfát 137
fruktózintolerancia 122
fruktokináz 122
FSH 211
fumaráz 87
furanóz 93
fúziós fehérjék 411

G, GY

G fehérjék 444
gátlás 456
gén, riporter 412
génamplifikáció 374
gének kiütése 348
génkönyvtár 406
génsebészet 401
G2-fázis 345, 460
GABA 250, 525, 535, 536
  szintézise 535
GABA A-receptor 458

GABAerg neuronok 536
GABA-shunt 535
galactosaemia 124
galactosuria 124
galaktózamin 141
galaktóz 124
  metabolizmusa 124
galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz 124
galaktózamin 142
galaktitol 124
galaktocerebrozid 207
galaktokináz 124
galaktozidáz 100
galaktozil-transzferáz 126
gamma-aminobutirát
gamma-aminobutirát (GABA) 250, 525, 535, 536
gamma-aminovajsav 535
  receptora 456
gamma-glutamil-ciklus 227
gamma-karboxiglutaminát 592
gamma-karboxil-glutaminsav szintézise 606
gangliozidok 207
gap 349
GAP-fehérje 487
gasztrin 223
Gaucher-kór 210
GC-box 367
gélelektroforézis 17
gélszűrés 18
gentamicin 394
geranil-pirofoszfát 169
G-fehérjéhez kapcsolódó receptor-kinázok 455
G-fehérjéhez kapcsolódó receptorok 532, 533
G-fehérjék 452, 459, 460, 587
  csoportosítása 460
G-fehérjékhez kapcsolódó receptorok 536
Gilbert-kór 308
Gilbert-szindróma 268
glicerin 322
glicerin-3-foszfát 155
glicerinaldehid 92
glicerin-foszfát-dehidrogenáz 109
glicerin-kináz 155, 325
glicerofoszfatidok 422
glicerol-foszfát-dehidrogenáz 75
glicin 3, 237, 246, 456, 525, 535, 567
glicinreceptor 458
glicin-szintáz 239, 246
glicin-transzaminász 239
glikán 426
glikoforin 425
glikogén 98, 99, 126
  anyagcsere-szabályozása 129
  izomban 323
  lebontása 128
  máj 320
  metabolizmusa izomban 129
  metabolizmusa májban 131
glikogén-foszforiláz 128, 129, 130, 133
glikogén-foszforiláz-kináz 469
glikogénmobilizálás 481
glikogén-szintáz 126, 129, 133
glikogénszintézis 126, 317
glikogéntárolási betegségek 133
glikogenezis 92, 321
glikogenin 126
glikogenolízis 92, 322, 323
glikolízis 61, 91, 92, 103, 157, 232, 317, 323
  ATP szerepe 118
  arzenát, gátlása 106
  energiamérlege 108
  hormonális szabályozása 118
  reakciói 104
  sebessége 109
  szabályozása 116
glikolitikus kapacitás 109
glikolizáció, core- 397
glikoprotein 427
glikoproteinek 397
  szénhidrátláncának szintézise 141
glikoszfingolipidek 207
glikozidázok 141
  repair mechanizmusban 350
glikozidok 96
glikozidos OH-csoport 94
glikozilált hemoglobin 136
glikozil-foszfatidilinozitol
  kötődése fehérjéhez 399
glikozil-foszfatidilinozitol horgony 426
glikozil-transzferázok 141
globuláris aktin 551
glutamát-dehidrogenáz 532
glukagon 117, 118, 120, 132, 133, 201, 322
  szerepe a glikolízisben 118
  szerepe a zsírsavszintézisben 147
glukocerebrozid 207
glukokináz 106, 121, 321
glukokortikoidok 210
glukoneogenezis 92, 112, 157, 322
  hormonális szabályozása 118
  szabályozása 116
glukonsav 96
glukoplasztikus aminosavak 246, 322
glukóz 93, 103, 321
  agyi szükséglet 324
  aktivált 126
  direkt oxidációja 92, 136, 137
  foszforilációja 61, 106
  koncentrációja a plazmában 133
  oxidációzavara 91
  raktárak 320
  szintézise de novo 113
  szintézise lipidekből 115
  transzportja 101, 102, 429
glukóz-6-foszfát
  dehidrogenálása 139
  mint elágazási pont 316
glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz 136

glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz-hiány 140
glukóz-6-foszfatáz 114, 317, 323
glukóz-6-foszfatáz-deficiencia 286
glukózamin 141,142
glukózaminoglikánok (GAG) 141, 566
glukózszenzor molekula 133
glukóztranszporter 102, 429, 436
glukuronidáció 302
glukuronidképződés 302
L-glukuronsav 142
glukuronsavas konjugáció 302
  bilirubin 302
GLUT-2 transzporter 135
glutamát 228, 229, 232, 241, 251
  neurotranszmisszió 532
  raktározása 532
  receptorok 533
  szerepe a tanulás és emlékezés folyamatában 534
  szintézise 532
glutamát-dehidrogenáz 91, 240, 241
glutamát-dekarboxiláz 250, 535
glutamát-dehidrogenáz 229
glutamaterg neuronok 532, 534
glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) 43
glutamát-piruvát-transzamináz (GPT) 43
glutamil-ciszteinil-glicin (GSH) 227
glutamin 6, 240, 241, 250, 324, 532
glutaminláz 240, 244, 251, 532
glutaminsav 6
  receptorai 458
glutaminsav NMDA 456
glutamin-szintetáz 235, 241
glutation 68, 304, 312
  oxidált 248
  redukált 248
  szintézis 227
  szintézise 248
glutationkonjugáció 304
glutation-peroxidáz 248, 319
glutation-reduktáz 248, 319
glutation-S-transzferáz 304
glutation-szintetáz 248
glycogenosisok 133
GMP 275
GMP-reduktáz 290
Goldman–Hodgkin–Katz-egyenlet 525
Golgi-komplex 398
  kompartmentjei 398
golyva 260
GOT 43
GPT 43
granulocita–monocita–makrofág rendszer 589
granzimek 517
Graves-kór 260
growth factor 486
GSH 227
GTP-kötő fehérjék 392, 459
guanidinoacetát-metil-transzferáz 252
guanilát 275
guanilát-cikláz 482
  szolubilis 483
guanin 271
guanin-dezaminláz 286
guanozin lebontása 286
guanozin-3',5'-tetrafoszfát 366
gyulladáscsökkentő gyógyszer 581

H
hélix destabilizáló (HD-) fehérjék 340
hőshock 397
hőshockfehérjék 397
húgysav 271, 285, 286
heptózok 92
haemochromatosis 268
haemoglobinopathia 48
haemorrhagiás kórkép 589
haemosiderosis 268
harántcsíkolt izmok 555
  kontrakció 443
HDL 175, 182, 187
helix-kanyar-hélix fehérjék 372
hem 261
  prosztetikus csoport 483, 486
  szintézise 261
hemoglobin 6, 48, 49
  aminosav-összetétele 48
  glikozilált 136
  szintézisének öröklődő zavarai 49
hemolitikus anaemia 140, 268
hemosztázis 589
  endothelium szerepe 607
  máj szerepe 606
  zavara 589
hem-oxigenáz rendszer 265
hemszintézis 306
hem-vas 44
heparán-szulfát 142, 578, 608
  lebontását katalizáló hidrolázok hiánya 142
heparin 142, 578, 598, 608
heparin kofaktor II 596
hepatikus lipáz 184
hepatociták 589
heterológ deszenzitizáció 455
heteronukleáris RNS 355, 367
heteropoliszacharidok 92
heterotrimer G-fehérjék 484
heterotrimer GTP-kötő fehérjék 452, 459, 471
heterotrimer guaninnukleotid-kötő fehérjék 452
heterotrop hatás 37
hexózok 92
hexózaminok 140
hexokináz 62, 106, 112
hexokináz izoenzimek szerepe a glikolízisben 121
Hfr baktérium 341
hialuronsav 142, 578
hibridizáció 335, 407, 408
  in situ 408
hidrátburok 13

hidrogénion-koncentráció szerepe a glikolízisben 118
hidrolázok 27, 41
hidroperoxidázok 70
hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) 165
hidroxiláz 568
  11β 210
  17α 216
21-hidroxiláz-elégtelenség 216
hidroxi-lizin 567
hidroxi-metil-citozin 269
hidroxi-metil-transzferáz 237
hidroxi-piridin-szerkezet 570
hidroxi-prolin 567
15-hidroxi-prosztaglandin-dehidrogenáz (PGDH) 583
17β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz 216
5-hidroxi-triptamin 248
high density lipiprotein (HDL) 175, 182, 187
hipoxantin 275, 285, 349
hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz 276, 288
hirudin 599
histidinaemia 253
hisztamin 253
hisztidáz 253
hisztidin 6, 240, 253
hisztidin-dekarboxiláz 253
hisztidin-liáz 253
hisztonok 343, 345
  core- 343
HMG-CoA 165
HMG-CoA-reduktáz 169, 172, 186
HMG-CoA-reduktáz gátlók 187
HMG-CoA-szintáz 165
homotrop hatás 38
holoenzim 27, 358, 467
homocisztein szintézise 232
homocisztein-metil-transzferáz 254, 291
  elégtelensége 296
homocisztin 240
homogentizát-oxidáz 258
homogentizinsav 258
homológ deszenzitizáció 455
homopoliszacharidok 92, 98
homotrop kooperatív hatás 38
homovanillinsav (HVA) 543
hormonok, lokális 579
hormonreceptorok, sejten belül 372
hormonszenzitív lipáz 158, 474
humán choriogonadotrop hormon 211
humán immundefficiencia vírus 382
Huntington-kór 614
HVA 543
hyperglykaemiás, hyperosmolaris coma 325
hyperammonaemia 326
hyperbilirubinaemia 326
  újszülöttkori 308
hyperchylomicronaemia 325
hyperglykaemia 321
hyperlipidaemiák 189
hyperlysinaemia 261
hyperoxaluria 239
hyperphenylalaninaemia 258
hyperthyreosis 260
hypoglykaemiás coma 325
hypoglykaemia 321
  laktózintoleranciában 122
hypothyreosis 260
hypoxiás agyi károsodás 534
hypoxia 534

I
icterus 268, 302
idegrendszer működése 525
IDL 182, 184
L-iduronsav 142
ikerion 3
immobilizált enzimek 43
Imuran 284
in situ hibridizáció 408
inaktív kromatin 371
indító lánc 339
indirekt bilirubin 265
indol-3-karbinol 301
indukciós hatás 308
indukció 363
induktív enzimrendszerek 363
ingerület vezetése 526
inhibitorok, kompetetív, valódi 35
iniciáció 360, 390, 393
iniciációs buborék 339
iniciációs faktorok 390
  eukarióta 393
iniciációs komplex 390
iniciátor kodon 389
inozin 285
inozinsav 275
inozitol-1,4,5-triszfoszfát 475
inozitol-foszfátok, metabolizmusa 480
inozitol-foszfolipid jelpálya 475
inozitol-lipid jelpálya 481
integráns membránfehérjék 425
interfázis 345
interferonok 381, 486
interkaláció 352
interleukinok 486
intermediate density lipoprotein 182, 184
intermedier anyagcsere 56
  elágazási pontjai 316
  integrációja 315
intracelluláris Ca^{2+} 476, 477
intracelluláris mediátorok 464
intracelluláris pH 436
intrinsic faktor 291
  hiánya 291
intron 366
inzerció 351, 352
inzerciós szekvencia 343
inzerciós-deléciós mutációk 613

inzulin 89, 121, 133, 321
hiánya 135
mint növekedési faktor 486
szerepe a glikolízisben 118
szerepe a zsírsavszintézisben 147
inzulin/glukagon arány 325
inzulinfüggő diabetes mellitus 325
inzulinreceptor 455, 490
ioncsatornák 439, 482
Ca^{2+} 441
feszültségfüggő 439
receptor 439
ioncserélő kromatográfia fehérjeszétválasztásra 20
ionofórok 439
ionok transzportja 431
ionotrop receptorok 533
IP_3 478
irreverzíbilis enzimgátlás 35
itom nikotinreceptor 458
izocitrát-dehidrogenáz 86, 319
allosztérikus szabályozói 89
gátlása 147
szabályozása 90
izoelektromos fókuszálás 18
izoelektromos pont 18
fehérjéké 13
izoenzimek 27
izoleucin 3, 254
izom
metabolizmusa 324
szerepe az intermedier anyagcsere integrációjában 323
izomerázok 27, 164
izomfáradás 561
izomkontrakció 538
izomkontrakcióhoz szükséges energia 323
izomláz 561
izomműködés energiaszükséglete 561
izopentenil-pirofoszfát 169

J
JAK (Janus arcú) protein-tirozin-kinázok 470, 486
jávorfaszörp betegség 260
jelátvitel 449
jelpályák 465
Ca^{2+} 469, 473
cAMP mediátorrendszer 472
citokinek 486
foszfatidilinozitol 539, 544, 546
inozitol-foszfolipid 475
inozitol-lipid 481
közötti kölcsönhatás 490
növekedési faktorok 486
protein-kináz C 469
tirozin-kináz-receptorral működő 486
jelpályarendszerek 465
jód hiánya 260
jun 493
junfehérje 374

K
K^+ 435, 525, 526, 527
kainátreceptor 458, 533
kalcineurin 470
kalcium 130
kalciumindukált kalcium release 560
kalciumszignál 557
kallikrein 572, 594, 603
kalmodulin 130, 444, 469, 481
kalmodulinantagonisták 485
kalorikus homeosztázis 325
kalpainok 481
kalretikulin 477
kalszekvesztrin 477
kapcsoló fehérje (adapter) 488
kapcsolt reakciók elve 56
karbamid 286
karbamil-foszfát 241, 277
karbamil-foszfát-szintetáz 241, 243, 244, 279
karbamoil enzim 540
karboxil-proteázok 221, 223
karboxipeptidáz 223
karcinogének 348
kardiolipin 194, 422, 423
karnitin 159, 261
karnitin-aciltranszferáz 159
hiánya 160
karnitinszint-csökkenéssel járó állapotok 321
karnitinvesztés 321
karnitin-zsíracil-transzferáz 322
kaszpáz 515
katabolitrepresszió 365
katabolizmus 56, 79
katalázok 286
kataláz 312
katalitikus képesség 33
katalízis 23
katecholaminok 254, 540
bioszintézése 540
metabolizmusa 543
katechol-O-metil-transzferáz (COMT) 543
katepszinek 227
kazein 6
kefalin 194
keményítő 98
kémiai ingerületátvitel 527
kemiozmotikus elmélet 77
kemoterápia 284
kenodezoxikólsav 178
keratán-szulfát 142, 578
keratinok 6, 566, 575
kereszthíd ciklus 551
kereteltolódással járó (frameshift) mutáció 351
késlekedő DNS-lánc 339
ketózok 92
kétdimenziós elektroforézis 18
ketoacidosis 325
ketobutirát 239
ketoglutarát 240

ketoizokaproát 260
ketoizokaproát-dehidrogenáz 260
ketonaemia 168
ketontestek 165, 318, 246, 320, 324
  koncentrációja 325
  túltermelése 325
ketonuria 168
ketoplasztikus aminosavak 246
kilomikron 182, 193
  maradvány 184
kimotripszin 26, 223
kimotripszinogén 224
kinázok 27, 277
kinurenin 248
kinurenináz 248
kisméretű citoplazmai RNS 355
kisméretű nukleáris RNS 355, 370
klónozás 405
kloramfenikol-acetil-transzferáz 343
klasszikus neurotranszmitterek 528
klasszikus PKU 258
Klenow-fragmentum 336, 403
klinikai laboratóriumi diagnosztika 616
klorid–bikarbonát cseretranszport 430
klorofill 261
knock-out állatok 415
kobalamin 254
kodon 386
kodon–antikodon lötyögés 387
kódszótár 386
koenzim Q 74
koenzimek 27
kofaktor defektusos PKU 258
koffein 271
kolecisztokinin 190, 223
kolekalciferol 219
koleszterin 168, 210, 423
  szállítása 184
  szintézis regulációja 172
  szintézise 168
koleszterin-észteráz 175
koleszterin-észterek 168, 173
koleszterinkövek 178
kolicin 341
kolicinogén faktor 341
kolin 196
  szintézise 246
kolin-acetil-transzferáz (CAT) 537
kolinerg receptorok 538
kolinerg szinapszis 538
kolin-transzportrendszer, nagy affinitású 537
kolipáz 192
kollagenáz, szöveti 572
kollagének 6, 566, 599
  degradációja 572
  fehérjeszerkezete 567
  olvadáspontja 568
  stabilitása 568
kollagenázok 227, 572
kólsav 175
kompartmentalizáció 36
  sejten belüli 316
kompetíció 308
kompetetív enzimgátlás 35
kompetetív inhibitorok, valódi 35
komplementaritás 335
komplementer bázispárok 333
kondroitin-6-szulfát 142, 578
konjugációk 298
  glukuronidáció 302
  glutation- 304
  metilezés 304
  paracetamol- 306
  szalicilsav- 302
  szulfatálás 302
konjugált bilirubin 265
konstitutív mRNS-szintézis 359, 362
kontrakció mechanizmusa 551
kontraktilis szövetek 549
kontrollálatlan sejtszaporodás 348
korepresszor 365
kortikoszteroidkötő fehérje (CBG) 215
kortizol 210
  szintézise 214
kotranszmitter 528
kotranszport 431
kovalens katalízis 26
köszvény 286
kötőszövet 566
közvetlen fehérjefoszforiláció 464
kreatin 252
kreatin-foszfát 62, 252, 561
kreatinin 241, 252
kreatininclearence 252
kreatinin-kináz 43
kreatin-kináz 252, 561
krisztallin 136
kromatin, aktív 371
kromoszóma, eukarióta 343
kromoszómaséta 409
K-vitamin 606
kwashiorkor 221

L

L (long-lasting) ioncsatornák 442
laboratóriumi géntechnika 400
lac-operon 363
lagging strand 339
laktalbumin 126
laktát 322, 323
  szérumszintje 108
laktát-dehidrogenáz 43, 108
  aktivitásának mérése 109
laktátacidosis 91
laktáz 100
laktonáz 136
laktonszerkezet 96
laktóz 97

laktóz szintézise 126
laktózintolerancia 102
laktóz-szintáz 126
laminin 566, 576
lanoszterin 172
laterális diffúzió 425
LCAT 175, 187
LDL 182, 184
LDL-receptorok 186
leading strand 339
lecitin 178, 194
lecitin:koleszterin-aciltranszferáz 187
lecitin:koleszterin-aciltranszferáz (LCAT) 175
légzési (respirációs) kontroll 77
légzési lánc gátlószerei 76
Lesch–Nyhan-szindróma 288
leucin 3, 260
leucincippzár 372
leucin-encefalin 547
leukaemia 286
leukocita-elasztáz 575
leukotriének 579, 583, 584
  szintézise 584
  katabolizmusa 584
LH 211, 217
liázok 27
ligandok 30, 449
limitált proteolízis 41
limit-dextrin 100
linolénsav 145
linolsav 145, 164, 422
lipázok 157, 190
  hormonszenzitív 158
lipid kettős réteg 423
lipid transzfer fehérjék 187
lipidek 143
  funkció szerinti felosztása 143
  szállítása 180
lipid-peroxidáció 300
lipidszállítási rendellenességek 180
liponsav 82
lipoproteinek 157, 181
lipoprotein-lipáz 157, 184
liposzómák 424
lipoxigenáz-út 584
lipoxigenázok 581, 584
litokólsav 178
lizin 6, 260, 261
lizin-oxidáz 570, 575
lizogén baktérium 378
lizolecitin:lecitin-aciltranszferáz (LLAT) 203
lizozim 377
LLAT 203
lokális hormonok 579
long term potentiation (LTP) 534
low density lipoprotein 172, 182, 184
LTP 534
luteinizáló hormon (LH) 211, 217

M
M fázis kináz 509
májglikogén 320
máj
  szerepe a hemosztázisban 606
  szerepe az intermedier anyagcsere integrációjában 320
májban folyó glukoneogenezis 115
májbetegség okozta anyagcserezavar 326
májcoma 320
májelégtelenség 321
máj-lipáz 187
malát 87, 91, 319
malát transzporter 112
malát-dehidrogenáz 87, 109, 151
malignus hyperthermia 565
malonil-CoA 147, 162
malonil-CoA–ACP-transzaciláz 148
malonil-transzferáz 148
maltáz 100
maltóz 97, 100
maltotrióz 100
mannóz-6-foszfát 398
mannózamin 141
MAO 448, 543
MAO-inhibitorok 248
MAP-kináz 489
MAP-kináz kaszkád 489
MAP-kináz-kináz 489
Maple Syrup (jávorfaszörp) betegség 260
marasmus 221
másodlagos aktív transzport 431, 436
mátrixhatás 619
Maxam–Gilbert-módszer 403
McArdle-szindróma 133
mebránfehérjék
  integráns 425
  perifériás 425
mediátorok, intracelluláris 464
megszakított enzimatikus szintézis 403
melanin 258
melanocitastimuláló hormonok (MSH) 548
membránfehérjék 425, 429
membránlipidek 421
membránmodell 425
membránok 421
  aszimmetriája 424
  barrier tulajdonsága 428
  fluiditása 425
  kémiai összetétele 421
  szénhidrát alkotórésze 427
membrántranszport-folyamatok 428
mentő mechanizmusok 276
  timidilátszintézis 283
  citidin nukleotidok 280
  purin nukleotidok 276
  uridin nukleotidok 280
mentő utak 280, 283
MEOS 327
méregtelenítés 297

6-merkaptopurin 284
messenger RNS 355
  eukarióta 389
  prokarióta 389
metabolikus acidosis 168
metabolikus utak
  éhezéskor 322
  táplálékfelvételkor 321
metabolizmus 56
metabotrop glutamátreceptorok 533
metabotrop receptor 455, 532, 533, 536
metalloenzimek 26
metalloflavoprotein 69
metalloproteázok 227
methaemoglobinaemia 49
metil-citozin 269
metil-malonát-acidosis 291
metil-malonil-CoA 254
metil-malonil-CoA-mutáz 162, 254, 291
metilezés 304
metilmalonsavas acidaemia 162
metilmalonsavas acuduria 162
metionin 6, 254
metionin-encefalin 547
metotrexat 283
3-metoxi-4-hidroxi-fenilglikol (MHPG) 543
micella 423
Michaelis–Menten-modell 30
mieloperoxidáz 575
mikrofibrillum 575
mikroszómális etanol oxidáló rendszer (MEOS) 327
mikroszómális légzési lánc 299
mineralkortikoidok 210
mineralokortikoidok 214
miofibrillumok 555
mioglobin 6
miokináz 118, 561
miozin 7, 549
miozin-könnyűlánc-kináz 469, 474, 472
mismatch repair 351
misszensz mutáció 613
mitogén aktivált protein-kináz 489
mitogén kaszkád 506
mitokondriális belépő szekvencia 399
mitokondriális betegségek szintézisének zavarai 78
mitokondriális DNS 348 , 613
  mutációi 613
mitokondriális fehérjék 78, 399
mitokondriális genom károsodása 610
mitokondriális genom mutációi 613
mitokondriális légzési lánc 72
mitokondriumok 70, 399, 610
  membránja 423
  oxidatív károsodása 614
mitózis 505
mobil carrierek 439
molekuláris chaperonok 397
monoacil-gliceridek 145, 146
monoamino-oxidáz (MAO) 248, 543
monoamino-oxidáz-inhibitor 248
monogiceridek 145
monomer 14
mononukleotidok 271
monooxigenázok 70, 298
monoszacharidok 92, 97
  sztereoizomérek 93
morfin 548
mucolipidosisok 142
mucopolysaccharidosisok 142
mukopoliszacharidok 142
mukoproteinek 6
multidrog transzporter 437
multidrug-rezisztencia fehérje 438
multienzim kompex 26, 82
muszkarinreceptorok 539
mutáció 348, 351, 613
  irányított 412
mutagének 348
mutagenezis, in vitro irányított 412
myasthenia gravis 539
myelinmembrán 421
myositis interstitialis 578

N, NY

N (neither T nor L) ioncsatornák 442
N-acetil-glutamát 244
N-acetil-glutamát-szintetáz 244
N-acetil-neuraminsav 97
nádcukor 97
növekedési faktorok 345, 383, 486
  jelpályarendszere 486
  receptorai 455, 469
Na^+ 101, 102, 431, 432, 436, 444, 525, 526
Na^+-csatornához kötődő toxinok 526
Na^+-csatornák 525
NADH 73
NADH-dehidrogenáz 74
NADH-UQ-oxidoreduktáz 74
NADPH 73, 318
  forrása 151
  termelése 139
NADPH-citokróm P450-reduktáz 299
NADPH-oxidáz 311
nagy nukleáris ribonukleoprotein-részecskék 375
nagy T antigén 379
nascens kilomikron 183
natív konformáció 12, 16
nebulin 563
negatív szupertekercs 336
nem esszenciális aminosavak 220
  bioszintézise 232
nem hiszton fehérjék 343
nem kompetetív enzimgátlás 35
nem permisszív gazdasejtek 379
nem receptor protein-tirozin-kinázok 470
nemi hormonok 210
  szintézise 216
neomicin 394

neosztigmin 540
neuropeptidek 546
neurofibromatosis 494
neurofibromin 487, 494
neuronális nikotinreceptor 458
neuropeptidek 528
neurotranszmisszió 527
  elemei a szinapszisokban 528
neurotranszmitterek 525, 527
  aminosav 532
  aminosavak 528
  felszabadulása 529
  inaktiválása 532
  katecholaminok 540
  klasszikus 528
  peptidek 528
  raktározása 529
  receptorhoz kötődése 532
  szerotonin 545
  szintézise 529
neurotrof hormonok receptorai 455
neurotrofinok (NGF) 486
neutrális zsírok 145
NGF 486
nick 338
Niemann–Pick-betegség 208
nikotinreceptor 457, 538
nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát ($NADP^+$) 66
nitrózaminszármazékok 307
nitrogén-monoxid 252, 483, 484, 534
nitrogén-oxid vaszkuláris hatása 486
nitrogén-oxid-szintáz 484
  indukálható 484
  konstitutív 484
NMDA (N-metil-D-aszpartát) 458, 533
NMDA-receptorok 534
nonsense kodon 386
noradrenalin 258, 540
  receptorai 543
Northern-blot eljárás 408, 411
NO-szintáz 311
növekedési faktorok 6
NSF 531
nukleáris lokalizáció jele 399
nukleázok 271
nukleotid 269
nukleinsav antiszenz 413
nukleinsavak 331
  bázissorrendjének meghatározása 408
nukleolusz 374
nukleoszóma 343
nukleotidázok 285
nukleotid-anyagcsere 291
nukleotidcukrok 140
nukleotidok 269, 296, 331
  bioszintézisét befolyásoló vegyületek 284
  egymásba történő átalakulásai 290
nukleozid 269
nukleozid-difoszfát 282
nukleozid-difoszfát-kináz 87, 283
nyugalmi potenciál 432

O
obesitas 157, 325
okadánsav 471, 494
Okazaki-fragmentum 340
oligo-adenilát-dependens endonukleáz 381
2',5'-oligo-adenilát-szintetáz 381
oligo-glukán-transzferáz 128
oligopeptid 7
oligoszacharidázok 100
oligoszacharidok 92
olvasási keret 386
omega-oxidáció 165
onkogének 383, 493, 511
opioid peptidek 546, 547
ornitin 251
ornitinciklus 241, 286
ornitin-transzkarbamiláz 241
orotát-foszforibozil-transzferáz 279
orotsav 279
osteogenesis imperfecta 567
ouabain 433
ovalbumin 6
oxálacetát 147
oxidáció
  alfa 164
  omega 165
oxidatív dezaminálás 240
oxidatív foszforiláció 56, 61, 70, 76
oxidatív stressz 75, 310
oxidázok 69
oxidoredukció 63
oxidoreduktázok 27, 69, 318
oxigenáció 299
oxigenázok 70
oxigéntoxicitás 309
oxitocin 132
ölő kaszpáz 517
öregedés 614
önemésztődés 223
ösztradiol 217
ösztrogének 217
ösztron 218

P
P típusú ATPázok 435
P:O hányados 76
p16 fehérje 347
p21 fehérje 347, 374
p53 fehérje 347, 348, 374, 379, 509, 513
P450 izoenzim 300
PAF 196
Pakinson-kór 614
palindrom 365
  szekvencia 361, 400
palmitinsav 151, 422
  szintézise 148

palmitoil-CoA 147
palmitoil-S-CoA 149
pancreas-elasztáz 575
pancreas-lipáz 178, 191
pancreas-proteázok 224
pancreas-tripszin inhibitor 224
pancreatitis, akut 224
pankreozimin 223
PAPS 303
Parkinson-kór 543, 545
partikuláris enzim 483
partikuláris guanilát-cikláz 483
parvalbumin 561
Pasteur-effektus 109
passzív transzport 429, 431
PCR 413
PDGF 486
pentóz-foszfát keletkezése glikolízis intermedierekből 137
pentóz-foszfát-út 136, 318
  szabályozása 139
pentóz-foszfát-ciklus 139
  működésének megváltozásával összefüggő kórképek 140
pentózok 92
pepszin 223
pepszinogén 223
peptid
  extenziós 571
  neurotranszmitter 528, 546
  opioid 547
  transzmitterek 546
peptid-leukotriének receptorai 588
peptid-leukotrién-származék 584
peptidil-transzferáz 392
peptidkötés 7, 8
perifériás 425
permisszív gazdasejt 379
peroxid shunt 300
peroxidáz 312
pertussistoxin 460
phenylketonuria 237, 258
piranóz 93
piridinnukleotid-transzhidrogenáz 73
piridinolinszerkezet 570
piridoxál-foszfát 229, 535
piridoxamin-foszfát 231
pirimidin 269
pirimidin nukleotidok 271
  bioszintézise 277
  lebontása 285
pirimidinantagonisták 284
pirimidinbázisok lebontása 288
pirimidin-dehidrogenáz 288
pirimidinvázat alkotó atomok eredete 276
piruvát mint elágazási pont 317
piruvát/laktát redoxrendszer 64
piruvát-dehidrogenáz 81, 321
  csökkent működése 91
piruvát-dehidrogenáz-foszfatáz 89
piruvát-dehidrogenáz komplex 81
  aktivitásának szabályozása 88
  szabályozása 90
piruvát-dehidrogenáz-kináz 89
piruvát-dekarboxiláz 108
piruvát-karboxiláz 90, 113
piruvát-kináz 107, 112, 120, 474
pitvari nátriumürítő faktor (ANF) 215, 483
PKU 258
  klasszikus 258
  kofaktor defektusos 258
platelet activating factor (PAF) 196, 599
plazmafibronektin 576
plazmalogén 194
  szintézise 203
plazmamembrán 423
plazmamembrán-receptorok 451
plazmidok 341, 405
plazmin 572, 589, 601, 603
  inhibitorrendszere 604
  keletkezése 602
plazminogénaktivátor inhibitor-1 604
plazminogénaktiválás 602
plazminogénaktivátor 603
  inhibitorai 604
PLC 475
PLC izoformák 476
poli-A-farok 368
poli-A-polimeráz 369
poliaminok 252
policisztronos mRNS 359
polimeráz láncreakció 413
polipeptid 7
polipeptidlánc szintézise 390
polipeptidláncot kódoló gének transzkripciója 366
poliszóma 392
poliszacharidok 92, 98
pontmutáció 351
porfirinek 261
  anyagcsere-változásai 265
  anyagcserezavarai 268
  lebomlása 265
  szintézise 87, 261
porfobilinogén 261, 262
porin 71
porphyriák 265
porphyria cutanea tarda 262, 268
posztszinaptikus aktiválás 532
posztszinaptikus gátlás 532
posztszinaptikus neuron 527
poszttranszlációs kovalens módosítások 315
pozitív homotrop hatás 38
pozitív inotrop hatás 474
pozitív kronotrop hatás 474
pozitív reguláció 365
pozitív szupertekercs 335
prefehérje 395
pregnenolon 211, 216
prekallikrein 594

prekurzor aktiválás 39
pre-profehérje 395
preszinaptikus neuron 527
primáz 339, 340
primoszóma 340
prodinorfin 548
proelasztáz 224
proelasztin 575
proenzimek 41, 223, 395
profág 378
profehérje 395
progeszteron 218
programozott sejthalál 514
proinzulin 134
prokarboxipeptidáz A 224
prokarióta mRNS 389
prokarióta gén 366
prokarióta riboszóma 389
prokollagének 571
prokollagén-peptidázok 571
prokollagenáz 572, 573
proliferációs szignál útvonalak 506
prolin 3, 251
promoterek 358, 359
propionil-CoA 162
prosztaciklin 579, 581, 609
prosztaciklin-szintetáz 581
prosztaglandin-endoperoxid 581
prosztaglandin-endoperoxid-szintetáz 581
prosztaglandin-hidroperoxidáz 581
prosztaglandinok 579, 581, 587
  nómenklatúrája 583
  receptorai 587
prosztanoidok 579, 583
  katabolizmusa 583
prosztetikus csoportok 23, 27
proteáz inhibitorok 598
  alfa$_1$-proteáz 224, 225
proteázok 41, 221
  enterális 223
  szöveti 227
proteázaktivált receptorok 453
proteázok 26, 43, 517
protein C, aktivált 596
protein folding 15
protein S 596
protein-diszulfid-izomeráz 397
protein-kinázok 40, 41, 129, 455, 464
  A 467, 472
  cGMP-dependens 467
  ciklindependens 469
  C 467, 526, 534
  Ca^{2+}/foszfolipid dependens 469
  Ca^{2+}–kalmodulin dependens 467, 481
  cAMP-dependens 119, 467
  cGMP-függő 483
  csoportosítása 465
  extracelluláris jelre regulálódó protein-kináz 489
  G 467, 483
protein-kinázok (folyt.)
  kettős szálú RNS-dependens 469
  mitogén aktivált 489
  széles szubsztrátspecifitású 469
  szűk szubsztrátspecifitású 469
  szerkezete 466
protein-szerin/treonin-kinázok 465
proteinszintézis mutáció 613
protein-tirozin-kinázok 465, 469
  JAK 470
  nem receptor 470
  sejtmagban elhelyezkedők 470
  src 470
proteoglikánok 576
  szénhidrátláncának szintézise 141
proteolízis 324
  intracelluláris 227
protofibrillum 575
proton motoros erő 77
protoncsatorna 76, 77
protonofor 77
protoonkogének 347, 383, 493
protoporfirin IX 261
protrombin aktiválása 592
protrombináz komplex 592
provírus 379
PRPP 272, 276
PRPP-amidotranszferáz 275, 288
PRPP-glutamin-amidotranszferáz 272
PRPP-szintáz 288
PRPP-szintetáz 272, 275, 276
psoralen 301
pszeudo-kolinészteráz 539
purin 269
  antagonisták 284
purin nukleotid 271
  bioszintézise 271, 275
  ciklus 291
  lebontása 285
purin-nukleozid-foszforiláz 285
  hiánya 288
purinbázisok 271
  anyagcserezavarai 288
  lebontása 285
  újra hasznosítása 276
puromicin 394
putreszcin 252

R

R faktor 342
raf 489, 493
ragadós DNS-végek 401
random coil 11
ras 489
ras gének 385, 487
ras GTP-kötő fehérje 487
Rb-fehérje 374, 379
RDS 196
reakciósebesség 30

reaktív oxigén intermedier 310
reaktív oxigén species 310
receptor 449
  adrenalin 543
  deszenzitizációja 455
  dopamin 544
  extracelluláris 449
  glutamát 533
  receptor ioncsatornák 439, 452, 455, 532
  ionotrop 533
  kolinerg 538
  muszkarin 539
  nikotin 538
  noradrenalin 543
  prosztaglandin 587
  rianodin 478, 558
  szerotonin 545
  szteroid–tiroid–D-vitamin–retinoid hormon 499
receptor–ligand komplex 449
receptor-kinázok 455
receptormediált endocitózis 264
redox homeosztázis 318
reductive power 66
redukáló ekvivalensek transzportja 109
redukált glutation 319
redukciós potenciál 63
referenciatartomány 617
Refsum-kór 165
reguláció, pozitív 365
regulátor gén 363
rekombináció 353
rekombináns DNS-molekulák 401, 405
rekombináns DNS-technológia 17, 400
relaxált DNS 335
release faktorok 392
  eukarióta 393
renin 214
rep fehérjék 340
repair mechanizmusok 348
replikáció 336
replikációs villa 338
replikáz 376, 380
repliszóma 339, 340
represszív szabályozás 365
represszor fehérje 363
represszor–korepresszor komplex 365
respiratory distress syndroma (RDS) 196
restrikció 400
restrikciós endonukleáz-metiláz párok 400
restrikciós endonukleázok 400
restrikciós enzimek 401
restrikciós térképek 400, 401
reszponzív elem 371
retinális ABC transzporter 438
retinoblastoma gén 513
retrovírus 383
retrovírusok 380, 381
reverz transzkriptáz 376, 382
reverzíbilis enzimgátlás 35
Reye-szindróma 326
rezerpin 543
rezisztenciafaktor 341, 342
rezisztenciatranszfer faktor 342
RFLP-térkép 402
rho-fehérje 360
rianodin 443, 565
  receptor 478, 558
D-ribóz 93
D-ribóz-5-foszfát 137, 272
ribóz-foszfát-pirofoszfokináz 272
riboforin 396
ribonukleáz 26
ribonukleáz P 21
ribonukleinsav mint enzimek 21
ribonukleotidok 331, 355
ribonukleotid-reduktáz 281, 284
riboszóma
  eukarióta 389
  prokarióta 389
riboszómaciklus
  ismétlődő 389
riboszómafehérjék 366
riboszóma-RNS 355, 361, 366
  transzkripciója eukariótákban 374
ribozim 21, 370, 375
ribozimek 362
D-ribulóz-5-foszfát 137
rifamicin 367
rifampicin 367
riporter gének 412
RNS-polimeráz 366
RNS
  analízise 408
  heteronukleáris 367
  kettős szálú 381
  kisméretű nukleáris 370
  riboszóma 366
  típusai 355
  transzfer 387
  U- 370
RNS-dependens DNS-polimeráz 376, 381
RNS-dependens protein-kináz 381
RNS-dependens RNS-polimeráz 376, 380
RNS-polimeráz 339
RNS-vírusok 376, 380
rodopszin 461, 484
rosszindulatú daganat kialakulása 493
rotáció 425
Rotor-szindróma 308
Rous-sarcoma vírus 383

S, SZ

S-adenozil-metionin 232, 540
S-adenozil-metionin (SAM) 304
S-adenozil-metionin-ciklus 254
salvage mechanizmus 276
SAM 304
Sanger-módszer 403

sarlósejtes anaemia 48
savanyú proteázok 221
savanyú foszfatáz 43
sav-bázis katalízis 26
saxitoxin 526
Scatchard-analízis 450
Scatchard-görbe 451
scorbut 569
sejtek intermedier anyagcseréje 315
sejtek redox homeosztázisa 318
sejten belüli kompartmentalizáció 316
sejtfelszíni fibronektin 576
sejthalál 505, 514
sejtlégzés 79
sejtmagreceptor 495
sejtosztódási ciklus ellenőrző pontjai 505
sejtproliferáció 505
SGOT 232
SGPT 232
SH2/SH3 doménekkel rendelkező fehérjék 470
SHBG 217
sima endoplazmás retikulum 395
simaizmok kontrakciója 481
simaizom 555
simaizom-kontrakció 481
simaizom-relaxáció érfalban 483
slow reacting substance (SRS) 579
slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) 579
SNAP-25 531
snRNS 370
SOS cserélő fehérje 488
Southern-blot módszer 408
specializált sejthalál 514
specifikus cGMP-foszfodiészteráz 484
specifikus ligandkötés 450
specifikus transzkripciós faktorok 367
specifitásdeterminánsok 466
spektrin 564
spermidin 252
spermin 252
splicing 367, 370
  alternatív 370
  mechanizmusának károsodása 371
src-gén 383
src-kináz 470
SSB-fehérjék 340
stacionárius állapot 32
standard anyagok 619
standard redoxpotenciál 63
steatorrhoea 193
stimuláció 456
stopkodon 386, 389
struktúr gének 358
struma 260
surfactant 196
synaptobrevin 531
synaptotagmin 531
syntaxin 531
széles szubsztrátspecifitású protein-kinázok 469
széndioxid-transzport 430
szénhidrát-anyagcsere 140
szénhidrátok 92
  osztályozása 92
szénsavanhidráz 430
szérum-glutaminsav-oxálecetsav-transzaminász 232
szérum-glutaminsav-piroszőlősav-transzaminász 232
szívglikozidok 433
szívizom anyagcseréje 324
szívizom-infarctus hypoxia következtében 109
szívizom-kontrakció 443
szöveti faktor 593, 594
szöveti faktor reakcióút inhibitora 598
szöveti kollagenáz 572
szöveti proteázok 227
szöveti típusú plazminogénaktivátorok 603
szétkapcsoló szerek 77
szabad gyökök 299
szabad zsírsav 158
szabadenergia-változás 22, 55
szacharóz 97
szalicilsav konjugációja 302
szarkoplazmás retikulum 444
szarkotubuláris rendszer 557
szedoheptulóz-7-foszfát 137
szekréciós vezikulák 435
szekretin 191, 223
szekvenciális modell 38
szekvenciális reakciók 34
szemiesszenciális aminosavak 220, 243
szemikinon 75
szerin 6, 237, 239, 240, 246
szerin/treonin foszfoprotein-foszfatázok 470
szerin-proteázok 26, 41, 221, 223, 540
szerotonin 545
  receptorok 545
  szintézise 248
szexdukció 342
szexfaktor 341
szexuálhormonokat kötő globulin (SHBG) 217
szfingolipidek 193, 203
  szintése 207
szfingomielin 196, 207, 422, 423
szfingozin 203
sziálsav 97, 141, 207
szigma-alegység 358
szignál peptidszekvencia 395
szignál transzdukció 449
szignál transzdukciós rendszerek 345, 587
szignálfelismerő részecske 395
szimmetria modell 38
szimport 431
szinapszinok 531
szinapszis 527
  kolinerg 538
szinaptikus plaszticitás 469
szinaptikus rés 527
szinaptikus vezikulák 435, 529
szisztémás lupus erythematosus 371

szkvalén 171
szkvalen-szintáz 169
szolubilis enzim 483
szolubilis guanilát-cikláz 483
szorbitol 96
sztearil-CoA 153
szterkobilin 265
szteroidhormonok 210
  inaktiválása 215
  szintézisének szabályozása 211
  szintézise 216
  szintézise mellékvesekéregben 210
szteroid–tiroid–D-vitamin–retinoid hormon magreceptorcsalád 499
sztreptokináz 603
sztreptokináz–plazminogén komplex 604
sztreptomicin 394
sztreptomicinrezisztencia 394
sztrichnin 458, 536
sztringens kontroll 366
sztrofantin G 433
sztromelizin 573
szubsztitució 351
szubsztrátszintű foszforiláció 61, 87, 106
szubsztrátkötő hely 22
szuicid enzim 283, 288
szukcinát 250
szukcinát-dehidrogenáz 75, 87
szukcinát-szemialdehid-dehidrogenáz 250
szukcinát-UQ-oxidoreduktáz 75
szukcinil-CoA 89, 254
szukcinil-CoA-szintetáz 87
szukráz 100
szulfát
  aktív 248
  anorganikus 248
szulfatálás 302
szulfhidril puffer 248
szulfhidril-ligáz 590
szulfonamidok 284
szulfotranszferázok 302
szuperhélix egység 575
szuperoxid-dizmutáz 312
szuppresszor mutáció 352
szűrővizsgálatok 623

T
T (transient) ioncsatornák 441
tanulás, glutamát szerepe 534
táplálékbevitel 320
targettáló szerep 467
TATA-box 367
Tay–Sachs-kór 208
TBG 259
tejcukor 97
tejsav 116
tejsavas acidosis 116
tejsav-dehidrogenáz 43
tekeráz 397
telítetlen zsírsavak 422
telített zsírsav 144
telítetlen zsírsav 144
telítési koncentráció 30
telomér szekvencia 345
telomérek 345
telomeráz 345
temperált fágok 377
template 358
teobromin 271
teofillin 271
természetes sejthalál 514
terminációs faktorok 392
terminális glikoziláció 398
terminális oxidáció 56, 70, 74, 76
termogenin 77
testvérkromatid csere 354
tesztoszteron 216
tesztoszteron-ösztrogén-kötő globulin (TEBG) 217
tetrózok 92
tetraciklinek 394
tetrahidrobiopterin 235
tetrahidro-dihidrofolát ciklus 282
tetrahidrofolát 232, 275, 282
tetrahidrofolát-analógok 283
tetrajód-tironin 258, 259
tetrodotoxin 526
thalassaemia 49, 371
thalassaemia-szindróma 49
thromboembolia 606
thrombosis 240, 589
thyreoid stimuláló hormon (TSH) 260
thyreotropin releasing hormon (TRH) 260
tiamin-pirofoszfát 82, 137
timidilát-kináz 283
timidilát-szintáz 282, 285
timidin-kináz 283, 285
timidin-trifoszfát 282
timinbázisok UV-fény hatására történő dimerizációja 349
tioészteráz 149
tioinozinsav 284
tiokináz 154
tiolízis 160
tireoglobulin 258
tiroid-peroxidáz 258
tirosinaemia 258
tiroxin 79, 258, 259, 260
tiroxinkötő globulin (TBG) 259
tirozin 3, 235, 254, 258, 540
tirozin-hidroxiláz 540
tirozin-foszfoprotein-foszfatázok 471
tirozin-hidroxiláz 258, 474
tirozin-kináz receptorok 476
tirozin-kináz-aktivitás 486
tirozin-kináz-receptorokkal működő jelpályák 486
tissue-factor 593, 594
tissue-factor pathway inhibitor 598
tissue-type plasminogen activators 603

titin 563
topoizimerázok 336
topológiai izomér DNS-molekulák 336
topológiai izomérek 335
toxinok, Na^+-csatornához kötődő 526
transfer RNS 355
transzaldoláz 137
transzaminálás 231, 240
transzaminázok 229
transzducin 484
transz-elem 362
transzfekció 411
transzfer RNS 387
  transzkripciója eukariótákban 374
transzferázok 27, 40
transzferrin 6, 264
transzformáció 405
  akut 383
transzformáló DNS-vírusok 379
transzformált baktériumok 405
transzgénikus állatok 415
transzglutaminázok 397, 590
transz-Golgi-kompartment 398
transzketoláz 137
transzketolázhiány 140
transzkortin 215
transzkripció 358
  polipeptidláncokat kódoló gének 366
  szabályozása prokariótákban 362
transzkripciós faktor 474
transzkripciós buborék 360
transzkripciós egység 358
transzkripciós faktorok 367, 374
  eukarióta 371
transzkriptum 366
transzláció
  eukariótákban 393
  gátlása 394
  gátlása prokariótákban 394
  utáni módosulások 394, 396
transzlációs apparátus 387
transzlációs faktorok 389
transzlokáció 392
transzport 429
  ATPázok 435
  aktív 431
  másodlagos aktív 431
  passzív 431
transzporterek 71, 429
  glukóz 436
transzportfolyamatok energetikája 431
transzpozáz enzim 343
transzpozíció 353
transzpozonok 342, 353
transz-regulációs elem 362
transzverzió 351
tranzíció 351
tranzíciós analógok 35
tranzíciós állapot 21
treonin 6, 240, 254
treonin-dehidratáz 254
TRH 260
triózfoszfát-izomeráz 106
triózok 92
triacil-gliceridek 145
trifluoperazin 485
trigliceridek 145, 146, 324
  hidrolízise 157
  raktára 320
  raktározása 157
  szállítása 182
  szintázise 154
trijód-tironin 259
tripeptid 7
tripla-hélix génterápia 415
tripszin 223, 224, 572
tripszin inhibitor 41, 224
tripszinogén 224
triptofán 3
  katabolizmusa 248
triptofán-dioxigenáz 70
triptofán-hidroxiláz 545
triptofán-pirroláz 248
trombin 589, 590, 599
trombocitákból származó növekedési faktor (PDGF) 486
trombociták 589, 599
trombocitaaktiváló faktor 196
trombomodulin 240, 596, 608
tromboxánok 579 , 581
  katabolizmusa 583
  nomenklatúrája 583
tromboxán-szintetáz 581
trombus 606
tropoelasztin 574
tropokollagén 566
troponin C 481, 551
troponin I 551
troponin T 551
troponin–tropomiopzin komplex 555
TSH 260
d-tubokurarin 458, 539
túlélési jel 491
tumorpromoter hatás 494
tumorszuppresszor gének 347, 374, 379, 384, 493, 513
tüdőemphysema 575
tyrosinaemia 258

U

ubikinol 75
ubikinon 74
ubikvitin 228, 344
UDP 279
UDP-glukuronil-transzferáz (UDPGT) 302
UDP-galaktóz 124, 140
UDP-galaktóz-4-epimeráz 126
UDP-glukóz 126, 140
UDP-glukóz-pirofoszforiláz 126
UDP-glukuronil-transzferáz 265

UDP-glukuronsav 140
UDPGT 302
UDP-xilóz 140
ugráló gének jelensége 342
ukleotidszármazékok 296
UMP 279
UMP szintézise 279
uniport 431
unkompetetív enzimgátlás 35
UQH2-citokróm c-reduktáz 75
urát 285
urát 271, 285
urátkristályok 286
uracil 288
ureáz 241
urea 241, 260, 326
ureaciklus 241
ureaszintézis szabályozása 243
uridin lebontása 288
urikáz 285
U-RNS 370
urobilin 265
urobilinogén 265
urokináz 253, 603
uronsav 96
uroporfirinogén
uroporfirinogének 261, 268
uroporfirinogén-koszintáz 261
uroporfirinogén-szintáz 261
UTP 279
utrophin 564

V, W
V típusú ATPázok 435, 529
vakuola 435
valódi kompetitív inhibitorok 35
valin 3, 254
valinomicin 439
vanadát 435
vasanyagcsere 262
vasanyagcsere-zavarok 268
vasculitisek 578
vashiányos anaemia 268
vas-kén komplex prosztetikus csoport 74
vastag filamentumok 550
vasvesztés 265
vazoaktív intestinalis peptid (VIP) 547
vazopresszin 132
vékony filamentum rendszer 551
vektor
  DNS 405
  eukarióta 411
  expressziós 410
verdoglobin 265
vérlemezke-adhézió 601
vér 589
véralvadás 589
  extrinsic útja 594
  inhibitorrendszere 596
véralvadás (folyt.)
  intrinsic útja 594
  szabályozása 592
véralvadási enzimek 594
véralvadási faktor
  VII 593, 594
  VIII 593
  IX 593
  X 593
  XI 594
  XII 594, 595, 603
  XIII 590
  hiánya 595
véralvadási folyamatok 594
véralvadék 589
véralvadsái kaszkád 594
vércukorszint
  acetil-CoA-karboxiláz működését befolyásoló 147
  ingadozása 325
  szabályozása 133
vérlemezkék 589, 599
  aggregációja 589, 599, 601
vérlemezke-aktiváló faktor 599
vérukorszint 321
vérzékenység 606
vérzékenységi zavarok 595
very low density lipoprotein (VLDL) 157, 182, 184
vesekő 286
vezető DNS-lánc 339
vezikulák 435
V-faktor 592
vimentin 563
virionok 376
vírusgenom 376
vírusok 376
  DNS-, transzformáló 379
  DNS-genommal rendelkező 379
  replikációja 379
vitaminok
  B_1 91
  B_{12} 91, 232, 254, 291, 296
  C 312
  D_3 219, 499
  E 312
  K 606
  vízben oldódó csoportátvitelben szerepet játszó 57
VLDL 157, 182, 184
von Gierke-kór 133
von Willebrand-faktor 599, 601
v-onc gén 383
von-Gierke-kór 286
v-SNARE 531
Wernicke–Korsakoff-szindróma 140

X
xantin 271, 275, 285, 349
xantin-oxidáz 69, 285, 288
xeroderma pigmentosum 349
xilulóz-5-foszfát 137, 139

Z, ZS

zimogének 223
Zovirax 285
zsíracil-CoA 89
zsíracil–CoA-dehidrogenáz 75
zsírmáj 200, 327
zsírok
  emésztése 190
  keménysége 146
  neutrális 145
  olvadáspontja 146
zsírsavak 144, 325
  béta-oxidációjának regulációja 162
  de novo bioszintézise 146
  elágazó szénláncú 153
  esszenciális 145
  jelölése 144
  koncentrációja 325
  oxidációja 159
zsírsavak (folyt.)
  páratlan szénatomszámú, oxidációja 162
  páros szénatomszámú, oxidációja 160
  rövid szénláncú 153
  speciális 153
  szabad 158, 189
  szintézis elkötelező lépése 147
  szintézis regulációja 147
  telített 144
  telítetlen 144, 422
  telítetlen, oxidációja 162
zsírsavlánc elongációja 152
zsírsav-szintáz 148, 153
  modellje 149
zsírsavszintézis 321
zsírszövet
  fehér 157
  szerepe az intermedier anyagcsere integrációjában 324
zselatin 569

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM Országos Műszaki Információs Központi Könyvtár 2001