

18. TRANSPORTFOLYAMATOK I.

Transzport a sejtmaghártyán keresztül. Fehérjeszállítás a mitokondriumba és az endoplazmatikus retikulumba. Folyamatok az endoplazmatikus retikulumban.

Lippai Mónika

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejt belsejében, a prokariótákkal szemben, sokféle, különböző funkciójú membránhatárolt teret –kompartimentumot– találunk. Kompartimentumokként jelenik meg a sejtszervecskék többsége (sejtmag, mitokondrium, stb.) Ezeknek a belső tereknek a kialakulása tette lehetővé, hogy az eukarióta sejtekben többféle, eltérő környezetet igénylő, sokszor egymást kizáró metabolikus folyamat tud egy időben működni. Mindezek mellett az organellek megjelenése a sejt belső felszínének radikális növekedésével hozzájárult az alapvető membránhoz kötött biokémiai folyamatok hatékonyságának fokozódásához.

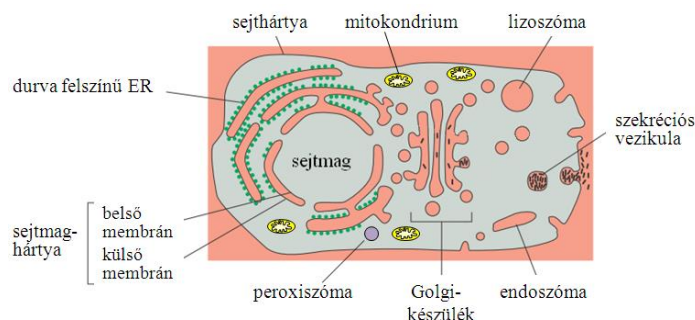
A kompartimentumok megjelenése a vitathatatlan előnyök mellett azonban nagy kihívást is jelent a sejt számára. Ismert, hogy valamennyi fehérje a citoplazmában található riboszómákon szintetizálódik. A sejtek tehát gondoskodnia kell valahogyan arról, hogy azok, de csakis azok a fehérjék, amelyek egy adott térrészben működnek, el is jussanak rendeltetési helyükre. Emellett minden sejt folyamatosan juttat a sejten kívüli *extracelluláris* térbe (vagy a plazmamembránba) olyan fehérjéket, amelyek például a szomszédos sejtekkel vagy a sejten kívüli állománnyal való összeköttetést és a kommunikációt biztosítják. Ez különösen igaz az úgynevezett szekréciós sejtekre, amelyek a soksejtű szervezet váladéktermelésre szakosodott sejtjei.

Hogyan oldható meg ez a bonyolult feladat? Milyen természetű az a jel, amely „megmondja”, hogy melyik fehérje hová kerüljön a sejtben? Milyen mechanizmus valósítja meg az „utazást” a célállomásra? A kérdéseket megválaszoló munkáért Günter Blobel német származású amerikai kutató 1999-ben Nobel-díjat kapott. Szignál-elmélete szerint: 1) a fehérje integráns részét képező **szignálpeptidek** biztosítják a megfelelő sejtszervecskébe jutást; 2) létezik olyan **szállítóapparat**, amely felismeri ezt a jelet, és biztosítja a célba érést. Ha egy fehérjén semmiféle válogatási jel nincs, a citoszolba kerül és ott is marad (pl. vázfehérjék, glikolitikus enzimek).

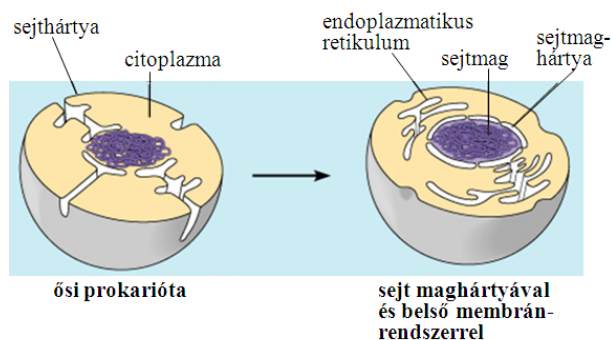
Azt, hogy egy fehérje milyen módon kerülhet rendeltetési helyére, az határozza meg, hogy a szintézis helyének tere (a citoszol) egyenértékű-e, *ekvivalens-e* a célszervecske terével. Ebből a szempontból meg lehet különböztetni topológiailag ekvivalens tereket (például citoszol – sejtmag, endoplazmás retikulum belső tere – Golgi-készülék belső tere), illetve nem-ekvivalens tereket (citoszol – endoplazmás retikulum tere, citoszol – mitokondrium) (18.1. ábra).

Az egymással egyenértékű közegek közös evolúciós eredetűek (18.2. ábra), közöttük szabadabb az átjárás. Ezt jelzi a nagyméretű vizes pórus a sejtmag esetében,

illetve a vezikuláris transzport a szekréciós és endocitotikus útvonalon belül. Nem-ekvivalens terek között csak szigorúan szabályozott, zárható csatornákon, transzlokátorokon keresztül történhet a fehérje átjutása, hiszen egyébként sérülne az eltérő terek integritása.



18.1. ábra Különböző belső terek az állati sejtben. Az ekvivalens terek azonos színnel vannak jelölve.



18.2. ábra A sejt belső membránrendszerének evolúciós eredete

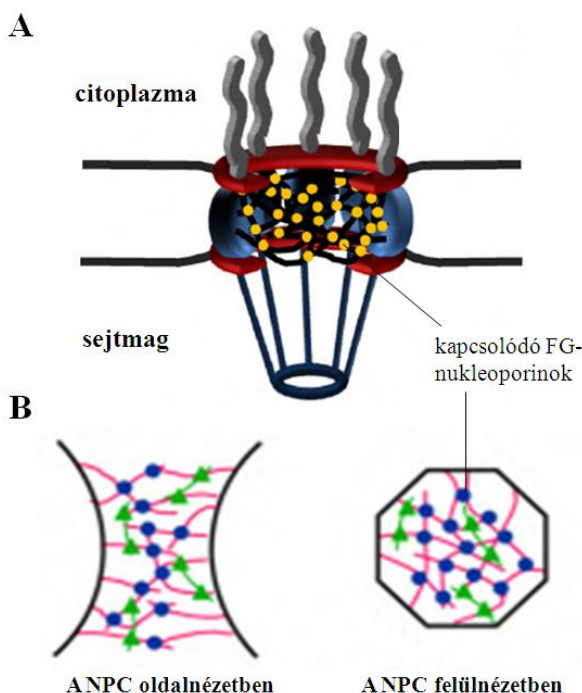
A SEJTMAGI TRANSPORTFOLYAMATOK

Közlekedés a sejtmag és a citoplasma között

A sejtmagon belüli nukleoplazma és a citoplasma tere egyenértékű, amit az is alátámaszt, hogy mitózis során valamennyi magasabbrendű eukarióta sejtben a sejtmaghártya lebomlik, és a két tér egyesül. Interfázisos sejtben azonban, bár az ionok és a kisméretű molekulák szabadon közlekedhetnek a sejtmag és a citoplasma között, a fehérjék többsége diffúzióval nem juthat át a sejtmaghártya pórusain. A sejtmaghártyát átívelő, sokszáz fehérjéből felépülő **póruskomplex** (NPC, nuclear pore complex) ugyanis körülbelül 0,9 nm átmérőjű csatornaként viselkedik, amely a ~100-200 kDa-nál nagyobb tömegű citoplazmatikus fehérjéket nem engedi át. Hogyan juthatnak akkor be a sejtmagba az ott működő nagyméretű fehérjék (például polimerázok, transzkripciós faktorok), és hogyan lépnek ki onnan az érett mRNS-ek, ingázó fehérjék, és az óriási méretű riboszóma-alegységek?

Az egyik megválaszolható kérdés az, hogy mi biztosítja a póruskomplex szelektivitását. Mi teszi lehetővé, hogy ugyanaz a csatorna egyszerre képes megakadályozni a mérethatár feletti molekulák szabad diffúzióját, és mégis biztosítani egyes „kiválasztottak” transzportját?

Erre a választ az NPC-t alkotó nukleoporinok egy speciális csoportja, az úgynevezett *FG-nukleoporinok* adják. Ezek a csatorna belső felszínén, de a komplex citoplazma felőli és a sejtmagi nyúlványain is előforduló fehérjék. Jellemzőjük, hogy sok, egymás után elhelyezkedő fenilalanin-glicin (FG-) ismétlődés van aminosav-szekvenciájukban. Ezek az FG-ismétlődések kis hidrofób régiókat alkotnak a pórus belső csatornájának üregébe benyúló, egyébként hidrofíli fehérjeláncokban. A jelenlegi elképzelések szerint ezek a hidrofób régiók egymással interakcióba lépve csomópontokat képeznek, összekapcsolják az egyes FG-nukleoporinok rendezetlen szerkezetű láncait, és térhálós, gélyszerű struktúrát hoznak létre (18.3A. ábra). Ezen háló jelenléte zárja ki a nagyobb molekulák szabad diffúzióját az NPC-n keresztül, míg az engedélyezett transzport során az FG-nukleoporinok pórusba nyúló láncainak elrendeződése úgy módosul, hogy egyes molekulák átbújhatnak közöttük (18.3B ábra).



18.3. ábra. **A:** A póruskomplex sematikus ábrája, sárga pöttyök jelzik az FG-nukleoporinok oldalláncai között létrejövő hidrofób kölcsönhatásokat. **B:** Az FG-nukleoporinok oldalláncai által kialakuló gélyszerű, térhálós szerkezet. Kékkel az FG-szigetek közötti hidrofób kapcsolatok, zölddel a háló átrendezése, ezáltal a póruson való átjutásra képes nagyobb molekulák vannak jelölve.

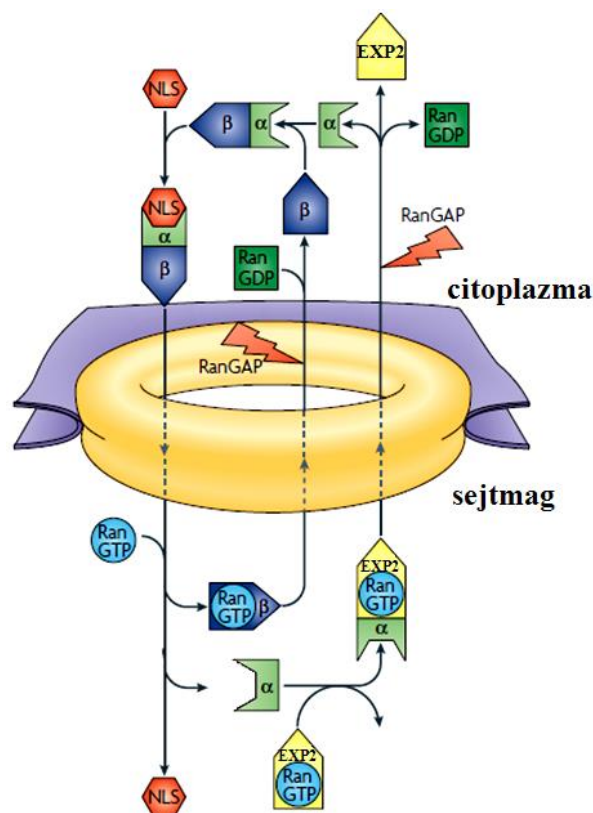
A másik kérdés pedig az, hogy mi lehet a jel, amelynek hatására a sejtmagi fehérjék rendeltetési helyükre jutnak, és mi az a mechanizmus, ami ezt lehetővé teszi számukra?

Import a sejtmagba

Biokémiai és géntechnológiai módszerek segítségével sikerült az első, azóta klasszikusként

emlegetett sejtmagi lokalizációs jelet (NLS, nuclear localization signal) felderíteni. A klasszikus NLS kétféle lehet, aszerint, hogy egy (monopartit NLS) vagy két (bipartit NLS), néhány bázikus aminosavat tartalmazó szekvenciából áll-e. Az NLS jelenléte szükséges és elegendő a sejtmagba jutáshoz. A monopartit NLS-t éppen úgy fedezték fel, hogy az SV40 vírus úgynevezett nagy T antigénje, amely normálisan a sejtmagba kerül a fertőzés során, az NLS-ében bekövetkezett egyetlen aminosavcsere miatt a citoplazmában maradt. Ugyanakkor, ha egy egyébként citoszolikus fehérje szekvenciájába mesterségesen NLS-t építenek be (vagy akár egy mikroszkopikus arany szemcsére NLS-peptidet csapnak ki), az NLS-tartalmú molekula a sejtmagba jut. A sejtmagba juttató jelnek nincs meghatározott helye a fehérje aminosav-szekvenciájában, sőt, az is elegendő, ha egy komplex egyik alegysége tartalmazza az NLS-t.

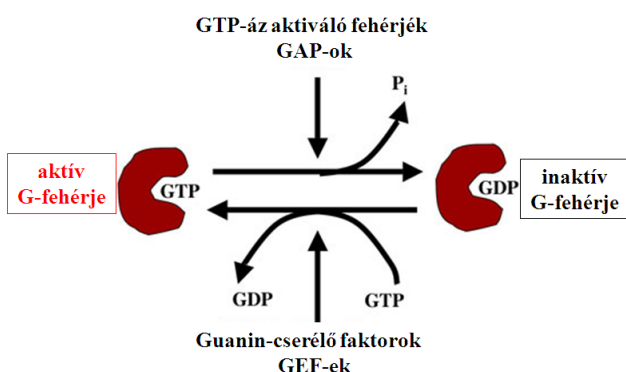
Az NLS-t tartalmazó fehérjét receptor szállítja a citoplazmából a sejtmagba, amely legtöbbször az *importin β* (*karyopherin β*) fehérjék családjába tartozik. A legelőször felderített és legtöbbet tanulmányozott klasszikus importfolyamat során egy közvetítő, adapter fehérje is szerepet játszik: ez az *importin α* . Az importin β -val létesített kapcsolat hatására szabaddá válik az importin α NLS-kötő doménje, aminek segítségével „kihorgássza” a citoszolból a sejtmagba szállítandó fehérjét (18.4. ábra). Ma azonban már ismert, hogy sok esetben maga az importin β , adapter nélkül is felismerheti az NLS-t.



18.4. ábra. A klasszikus sejtmagi import folyamata és a benne szerepet játszó faktorok körforgalma. Részleteket lásd a szövegben.

Az importin β és rokonai tartalmaznak az FG-nukleoporinok hidrofób régióival gyenge kapcsolatot létesítő domént is. Ennek segítségével bejuthatnak a póruskomplex csatornájába és sejtmagi oldalára is, az FG-nukleoporinok oldalláncaival új és új kötések létrehozva majd megszüntetve, mintegy folyamatosan „lépegetve” az NPC belső felszínén. Az importin β mozgásának nincs kitüntetett iránya, véletlenszerűen mozog ide-oda a pórus sejtmagi és citoplazma felőli nyílása között. Akkor vajon mitől lesz irányított az NLS-tartalmú fehérje mozgása? Miért akkumulálódik a sejtmagban, ha az őt szállító receptor mozgása ezt nem indokolja?

A sejtmagi importban szerepet játszó tényezőket azonosító kezdeti kísérletekben izoláltak egy, az úgynevezett kis G-fehérjék családjába tartozó GTP-kötő fehérjét, amelyet *Ran*-nak (Ras-related nuclear protein) neveztek el. A kis G-fehérjék képesek kötött GTP-jüket GDP-vé hidrolizálni, és ezen GTP-áz aktivitásukat specifikus GAP-ok (GTP-áz aktiváló proteinek) serkenthetik. A GDP-kötött állapotú G-fehérjére specifikus GEF (guanin-cserélő faktor, guanine exchange factor) hathat, ennek következtében a G-fehérje elengedi GDP-jét, és a sejtben mindig jóval nagyobb koncentrációban jelen lévő GTP-vel lép interakcióba (18.5. ábra). A kis G-fehérjék a korábban már megismert heterotrimer G-fehérjékkel szemben (a Ras-hoz hasonlóan) monomer formában működnek, innen a „kis” jelző.

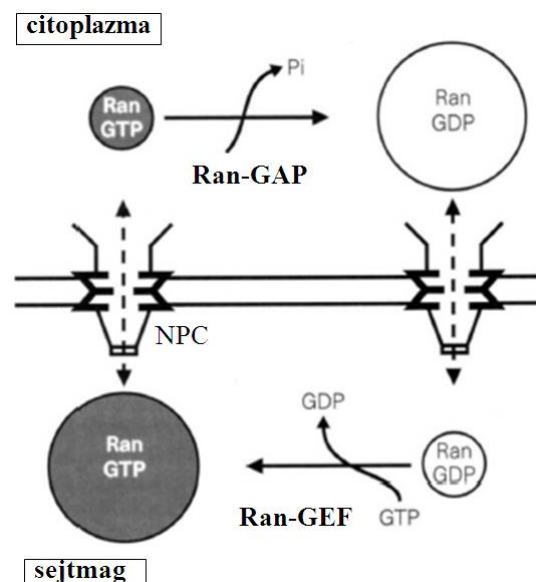


18.5. ábra. A G-fehérjék GTP-kötött állapotban aktívak, amit GAP-ok és GEF-ek befolyásolnak.

A Ran GTP-kötött formában kizárólag a sejtmagban, GDP-kötött formájában pedig csak a citoplazmában található meg. Ennek az oka, hogy a Ran-GAP a citoszolban (pontosabban az NPC citoplazmába nyúló fehérjéin) lokalizálódik, így módon a sejtmagból kijutó Ran-kötött GTP hidrolízise azonnal bekövetkezik. Ugyanakkor a Ran GEF-je a kromatinállományhoz kötődik, és valamennyi sejtmagi RanGDP-n indukálja a GDP-GTP cserét (18.6. ábra).

Az importin β , azon kívül, hogy képes (önmagában, vagy adaptermolekulán keresztül) interakcióba lépni a sejtmagba szállítandó fehérjével és az FG-nukleoporinokkal, tartalmaz egy RanGTP-t felismerő domént is (18.4. ábra). RanGTP-kötés hatására azonban olyan konformációs változás következik be szerkezetében, aminek hatására elengedi a citoszolban

hozzá kapcsolódott fehérjé(ke)t. Miután az importin β RanGTP-vel csakis a sejtmagban találkozhat, a receptor-komplexről a szállított fehérje nem válhat le az NPC citoszolikus oldalán, csakis a sejtmagban. Az importin β a magban szorosan köti a RanGTP-t, ezért nem tudja újra „felvenni csomagját”. Ahhoz pedig, hogy az import során bejutott molekula kijusson újra a citoszolba (ahogy ezt sok, úgynevezett ingázó fehérje teszi), egy újabb jelre van szükség (lásd később).



18.6. ábra. A sejtmaghártya két oldalán RanGTP-RanGDP gradiens jön létre a lokalizált RanGAP-nak és RanGEF-nek köszönhetően.

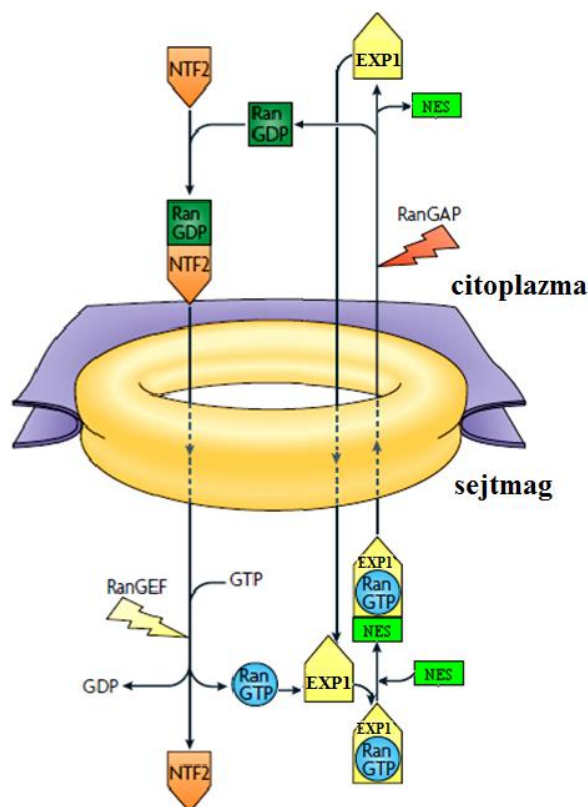
Az importmechanizmus folytonossága érdekében alapvető, hogy a szállítást lebonyolító fehérje visszakerülhessen a citoplazmába. Az importin β RanGTP-kötött állapotában is ugyanúgy, minden irányítottság nélkül mozog az NPC környékén az FG-nukleoporinokhoz kapcsolódva. Azonban a citoszolikus oldalon kölcsönhatásba lép a Ran-GAP-pal, ennek következtében a Ran fehérje GTP-jét GDP-vé hidrolizálja. A RanGDP viszont már nem tud hatékonyan kötődni az importin β -hoz, ez utóbbi felszabadul. Miután mindez csak az NPC citoszolikus oldalán következhet be, szabad importin β csak itt fordulhat elő, biztosítva az NLS-tartalmú fehérje egyirányú szállítását (18.4. ábra).

A fentiekből az is következik, hogy a Ran - az importin β közreműködésével – folyamatosan „szökik” a sejtmagból, tehát nyilvánvaló, hogy valahogyan vissza kell juttatni. Az importin β nem képes RanGDP-t kötni, más szállítóra van szükség. Valóban, már a korai kísérletekben izoláltak egy *NTF2* (nuclear transport factor 2) nevű fehérjét, amely dimert képezve erősen köti a RanGDP-t, és az importin β -hoz hasonlóan az FG-nukleoporinokon, gyenge kölcsönhatások révén közlekedik az NPC két oldala között. A sejtmagban a Ran-GEF révén RanGTP-vé alakuló partneréhez viszont már nem kapcsolódik szorosan, így a Ran importin β -val ellentétes irányú szállítását valósítja meg (18.7. ábra).

Mint minden olyan folyamat, amely rendezetlen állapotból egyfajta rendezettséget hoz létre, a sejtmagi import is energiát igényel. Az importin β NPC-n keresztül történő helyváltoztatásához nincs szükség energia-befektetésre, az importfolyamatot a sejtmaghártya két oldalán kialakult RanGDP-RanGTP grádiens hajtja, azaz a grádiens létrejöttéhez elengedhetetlen GTP-hidrolízis.

Export a sejtmagból

Már a klasszikus importfolyamatban adapter szerepet játszó importin α esetében is felmerül a kérdés, hogyan jut vissza egy-egy ciklus végén újra a citoplazmába. A fehérjék exportja az importhoz nagyon hasonló mechanizmus szerint történik. Az exportinok egy, a kijuttatandó fehérjék szekvenciájában található NES-t (nuclear export signal) ismernek fel (18.7. ábra) – ezek közül egy speciális exportin (exportin2) az, amely az importin α -t szállítja vissza a citoplazmába (18.4. ábra). Az exportinok a NES-hez éppen akkor tudnak kapcsolódni, ha RanGTP-vel komplexet tudnak képezni, azaz a sejtmagban. A póruskomplexen ájtutva a citoplazmában, a GTP hidrolízise után a RanGDP-ről disszociál az exportin, majd a NES-tartalmú fehérjéhez való affinitása is lecsökken - a szállított fehérje a citoplazmába kerül.



18.7. ábra. A klasszikus sejtmagi export folyamata.

Talán nem meglepő, hogy az importin β és az exportinok szerkezete nagyon hasonló, valamennyien az importin β (vagy karyopherin β) fehérjék közös családjába tartoznak. Rugószerű, flexibilis struktúrájuk van, gyenge interakcióba lépnek az FG-

nukleoporinokkal, és erősen kötődnek a RanGTP-hez, míg a RanGDP-hez már nem. A RanGTP-kapcsolódás azonban az importinra és az exportinokra ellentétesen hat: a szállítandó fehérjét felismerő domén kötőképessége az importin esetben lecsökken, míg az exportinok esetében megnövekszik.

A sejtmagból kijutó, a citoplazmában működő vagy ott ribonukleoproteinné összeszerelődő RNS-féleségek többségét (a tRNS-eket, snRNS-eket, miRNS-eket, sőt a vírus RNS-eket is) - az mRNS kivételével - szintén speciális exportinok szállítják. A mRNS-ek azonban külön, erősen konzervált mechanizmus révén exportálódnak, Ran-független módon. A két alegységből álló NXF1/Nxt1 fehérjekomplex (NXF1: nuclear export factor1, Nxt1: nuclear export transporter1) akár több helyen is kötődik az mRNS-hez, közvetlenül és adapterfehérjéken keresztül is.

A speciális fehérjék által kísért mRNS-t mRNP-nek, azaz messenger-ribonukleoproteinnek is nevezik. Mindkét mRNP-exporter alegység - az importinokhoz hasonlóan - interakcióba lép FG-nukleoporinokkal, és diffúzióval átkerülhet az NPC citoplazmatikus oldalára. Ott azonban az mRNP átrendeződik és exportere disszociálódik, néhány, az mRNP-t csak a pórusig kísérő fehérjével egyetemben. Az mRNP-t exportáló NXF1/Nxt1 heterodimer az importinokhoz hasonlóan diffúzióval visszajut a magba, ahol újabb mRNP exportjában vehet részt. Sok eredmény utal arra, hogy az mRNP-k transzlokációja a sejtmagi oldalon a transzkripció és érési folyamatokhoz, a citoszol felől pedig a transzlációhoz is kapcsolódik.

A sejtmagi transzport szabályozása

Míg néhány, NLS-t és NES-t is tartalmazó fehérje folyamatosan ingázik a sejtmag és a citoszol között (például az mRNS-t a riboszómaig kísérő, az mRNS érésében és a transzportjában szerepet játszó faktorok), más fehérjék mozgása szigorú kontroll alatt áll. Ez különösen igaz a transzkripció faktorokra, amelyeknek folyamatos magi jelenléte káros lenne a sejt működésére nézve. Változatos módokon szabályozható a fehérjék közlekedése a két tér között. Akár az NLS, akár a NES - vagy a környezetükben lévő aminosavak - poszttranszlációs módosítása (főként foszforilálása) megváltoztathatja e jelek affinitását receptorukhoz. Gátló faktorok kapcsolódása közvetlenül is eltakarhatja transzportjelet, vagy olyan konformációs változásra készítheti a jelet hordozó fehérjét, amely megakadályozza a receptor kötődését. Sok esetben valamilyen citoplazmatikus komponenshez (membránhoz, sejtvázhoz) való rögzülés akadályozza az NLS érvényesülését, amely csak megfelelő stimulus hatására szűnik meg.

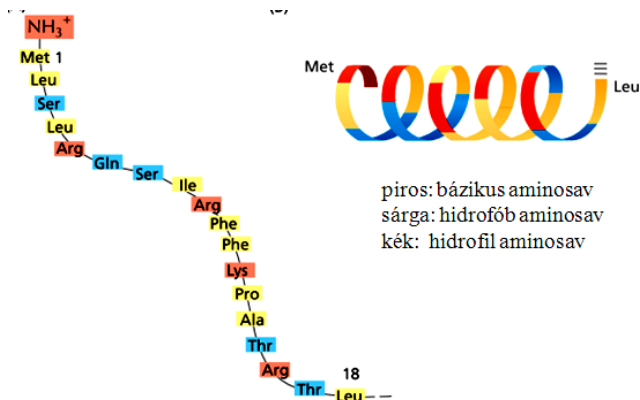
FEHÉRJESZÁLLÍTÁS A MITOKONDRIMUMBA

A mitokondrium és a kloroplasztisz prokarióta eredetű organelum, membránjainak összetétele eltér az eukarióta membránokra jellemzőtől. Könnyen belátható, hogy az a speciális milió, amely az elektron-

transzportlánc működéséhez és az ATP-termeléshez szükséges, nem lehet kompatibilis a citoszollal. Ezért a mitokondrium és a kloroplasztisz bármely részébe (mátrix/sztróma, külső és belső membrán, intermembrán tér, illetve tilakoid-membrán és a tilakoidok tere) csak szigorúan szabályozott, zárható csatornákon, *transzlokátorokon* keresztül juthat be fehérje. A fehérjék importjára pedig szükség van, hiszen bármennyire is van saját genomja és translációs rendszere ezeknek az organelumoknak, az evolúció során lezajlott, a sejtmag felé irányult géntranszfer következtében a saját genetikai állomány alapján kódolt fehérjék száma kevés, az emberi mitokondrium esetében például csak 13.

A legrégebben ismert fehérjeszállító mechanizmus a mitokondriális mátrix fehérjéinek importja - a továbbiakban csak ez kerül ismertetésre.

Sejtmentes kísérleti rendszerben folytatott vizsgálatok során derült ki, hogy az import ATP-igényes, és függ egy, a fehérje N-terminálisának közelében található 20-50 aminosavnyi amfipatikus –egyik oldalán pozitív töltésű, a másikon hidrofób - α -hélix jelenlététől (18.8. ábra). A jel hatásosságát nem annyira a pontos szekvencia, mint inkább az amfipatikus karakter biztosítja. A fehérjék a mátrixba olyan, elektronmikroszkópos felvételeken jól látható pontokon jutnak be, ahol a mitokondrium külső és belső membránja érintkezik.

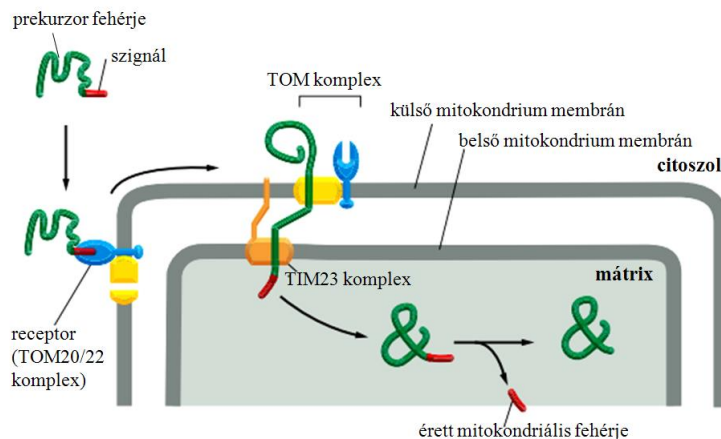


18.8. ábra. A mitokondrium mátrixába irányító N-terminális szignál szerkezete (A citokrom c oxidáz IV alegységének szignál-szekvenciája).

A mitokondrium mátrixába induló fehérje, bár teljes szintézise lezajlik a citoplazmában, nem veszi fel a rá jellemző térszerkezetet, mert az N-terminális szignált érzékelő citoszolikus Hsp70 dajkafehérjék (chaperonok) kitekert állapotban tartják (18.10. ábra). Ez az ATP-igényes folyamat nagyon fontos a fehérje membránon való átjutásához, mert a szűk csatornán másképp nem férne át. Genetikai és biokémiai módszerekkel azonosították a felismerésben és a szállításban szerepet játszó faktorokat. A mitokondrium külső membránjában található, az importban szerepet játszó fehérjéket TOM-ként (translocon of the outer membrane), míg a belső membrán hasonló funkciójú fehérjéit TIM-ként

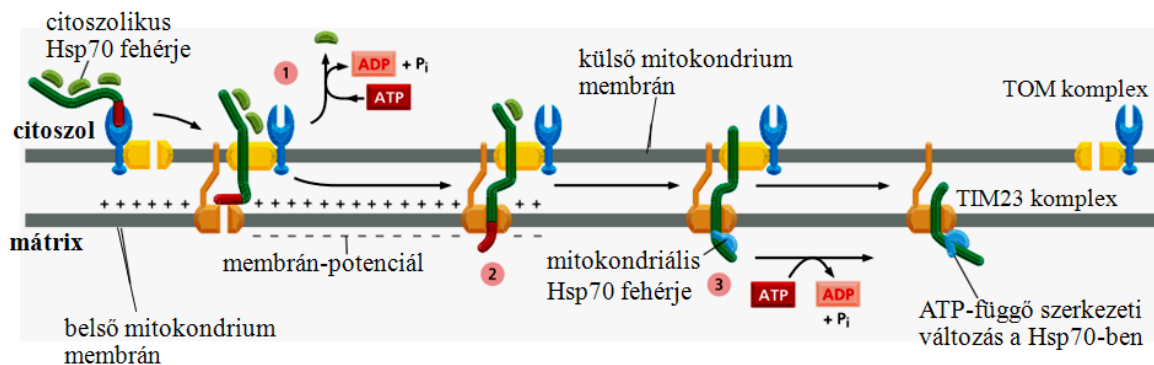
(translocon of the inner membrane) rövidítik. Az N-terminális mátrix-jel a külső membránban elhelyezkedő receptorkomplex (TOM20/22) érzékeli, és az ily módon „megfogott” fehérjét átjuttatja a szomszédos TOM40 transzlokátorhoz, amely a külső membránt átívelő csatorna-komplex (18.9. ábra). Bebizonyosodott később, hogy nemcsak a mátrixba, hanem az egyéb mitokondriális „helyszínekre” tartó fehérjék is valamennyien a TOM40 transzlokátoron haladnak át először.

A mátrixfehérjék a TOM40-en áthaladva rögtön a belső membránban elhelyezkedő TIM23 transzlokátorba jutnak, amit egyik alegysége mindaddig zárva tart, amíg a TOM40 intermembrán tér felé néző oldalán meg nem jelenik az N-terminális szignál. Ezután a szignál és a TIM és TOM komplexek között lezajló, egymást követő interakciók eredményeképpen a mátrixfehérje becsúszik a kinyíló TIM23 transzlokátorba, és megkezdí útját a mátrixba.



18.9. ábra. A mitokondrium mátrixába történő szállítás mechanizmusa (TOM: a külső membrán transzlokója; TIM: a belső membrán transzlokója)

A mitokondriális fehérjéknek nemcsak a citoszolban van szükségük energiára a kitekert állapot fenntartásához. Átjutásuk az átmenetileg összekapcsolódott két csatornán természetesen szintén energiát igényel. Az egyik energiaforrás a működő mitokondrium sajátossága: a H^+ -ionok elektrokémiai grádiense miatt kialakuló, a belső membrán két felszíne közötti feszültségkülönbség fontos szerepet játszik a transzlokációban. A mátrix felőli oldal negativitása szükséges az N-terminális szignálban található pozitív töltésű aminosavak „behúzásához”: az elektrokémiai gradiens kialakulását gátló szerek megakadályozzák a mátrixfehérjék transzportját. Ezen kívül a transzlokáció ATP-t is igényel. A TIM23 komplex belső felszínéhez egy több alegységből álló molekuláris motor csatlakozik, melynek fő komponense egy mitokondriális Hsp70 dajkafehérje (Hsp70: 70 kDa-os hőszok-fehérje). Ez utóbbi - a citoszolban található rokonához hasonlóan - kötődik a kitekert állapotban éppen becsúszó fehérjeszakaszhoz, majd egy idő múlva, ATP-hidrolízis után elengedi azt, mindeközben a motorkomplex húzóerőt fejt ki a fehérjén (18.10. ábra).



18.10. ábra. A mitokondrium mátrixába történő szállítás energiaigénye. ①: A citoszolikus Hsp70 fehérjék ATP felhasználásával tudják elhagyni a kötött, kitékert állapotban tartott fehérjét. ②: A mitokondrium belső membránja mentén kialakult membrán-potenciál is szükséges a fehérje transzlokációjához. ③: A mitokondriális Hsp70 fehérjék szintén ATP felhasználásával húzzák a mátrixba a fehérjét.

A mátrixfehérjék transzlokációja során az N-terminális szignálszekvenciát egy proteáz levágja (18.9. és 18.10. ábra), majd a teljes átjutás után a transzportált fehérje – általában mitokondriális dajkafhérjék segítségével – felveszi normális térszerkezetét.

TRANSPORT AZ ENDOPLAZMATIKUS RETIKULUMBA

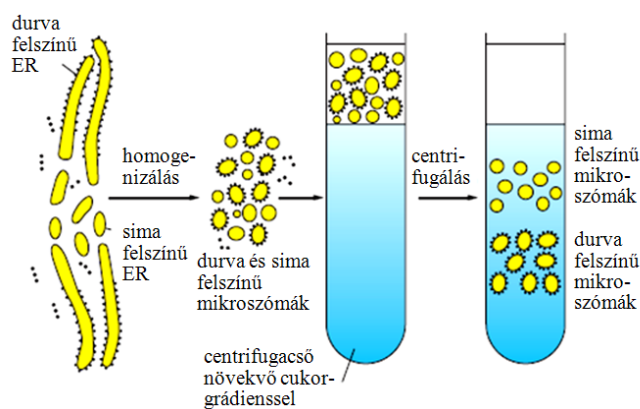
Valamennyi sejt juttat fehérjéket a környezetébe, soksejtű szervezetekben pedig találhatóak olyan sejtípusok, amelyeknek ez a fő feladata. Ezek az úgynevezett kiválasztó vagy szekréciós sejtek kiválóan alkalmasak voltak a fehérjéket a sejten kívülre szállító apparátus megismerésére és vizsgálatára, miután az általuk termelt fehérjék többsége a szekréciós utat járta végig. Az első kísérleteket a hasnyálmirigy emésztőenzimeket termelő sejtjeivel végezték, radioaktívan jelölt aminosavak felhasználásával, ami lehetővé tette a sejtek által nagy tömegben termelt szekréciós fehérjék útjának követését.

Gyorsan fény derült arra, hogy valamennyi kiválasztandó fehérjét az endoplazmatikus retikulum (ER) felszínén lokalizálódó riboszómák szintetizálják, így az út első állomása mindig az ER. Onnan továbbhaladva a fehérje membrán-határolt hólyagocskáiban, úgynevezett vezikuláris transzport segítségével járja végig a Golgi-készülék ciszternáit, ahonnan szintén lefűződő vezikulákban jut el végül a plazmamembránig, hogy exocitózissal kiürüljön az extracelluláris térbe. Ez a fejezet azt ismerteti, hogyan kerülhet egy fehérje a citoplazmából az ER lumenébe. Ez azért is fontos, mert ugyanezzel a lépéssel kezdődik a Golgi-készülékben és a lizoszómákban működő, állandóan ott tartózkodó *rezidens* fehérjék vándorlása is - nem is beszélve az ER lumenének saját fehérjeiről.

Ezen kívül nemcsak a vízdékony, de a membránokban lokalizálódó fehérjék is ezt az utat követik. Először az ER membránjába integrálódnak, majd innen szállítódnak tovább végső rendeltetési helyükre, az endomembrán rendszer többi tagjához, vagy a plazmamembránba.

Ahogy erről már korábban szó esett, a citoszol és az ER tere nem ekvivalens – már csak evolúciós szempontból sem: az ER lumene a külső környezet befűződésével alakult ki. Ha arra gondolunk, hogy az ER kalcium-raktárként is szolgál, rögtön nyilvánvaló: a sejt számára végzetes lenne, ha tere szabadon közlekedne a citoplazmával. Így ebben az esetben is szigorúan szabályozott csatornán keresztül zajló transzlokációról beszélhetünk.

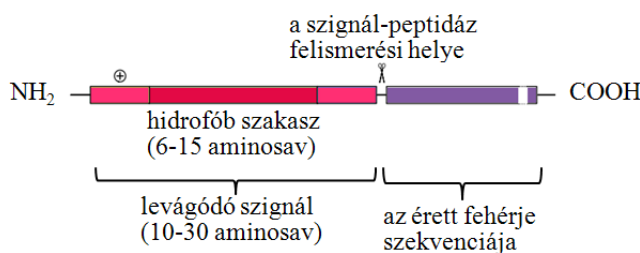
Az ER-be történő fehérjetranszport vizsgálatát nagyon megkönnyítette, hogy ez a sejtalkotó - annak ellenére, hogy teljesen behálózza a citoplazmát - egyszerűen izolálható. A sejtek homogenizálása során ugyanis kicsi, nagyjából egyforma méretű vezikulákba, az úgynevezett *mikroszómák*ba oszlik szét, amelyeket centrifugálással könnyen el lehet különíteni a többi sejtalkotótól (18.11. ábra). A mikroszómák topológiailag megegyeznek az ER-rel, és a lumenükben lejátszódó biokémiai reakciók is ekvivalensek azokkal, amelyek az ER-ben zajlanak le.



18.11. ábra. A sejtek megfelelő módon történő feltárással és homogenizálásával az ER kis, egyforma méretű hólyagocskáira oszlik, amelyek sűrűséggradiens centrifugálással szeparálhatóak. Így el lehet különíteni a durva és a sima felszínű ER-nek megfelelő mikroszómákat is.

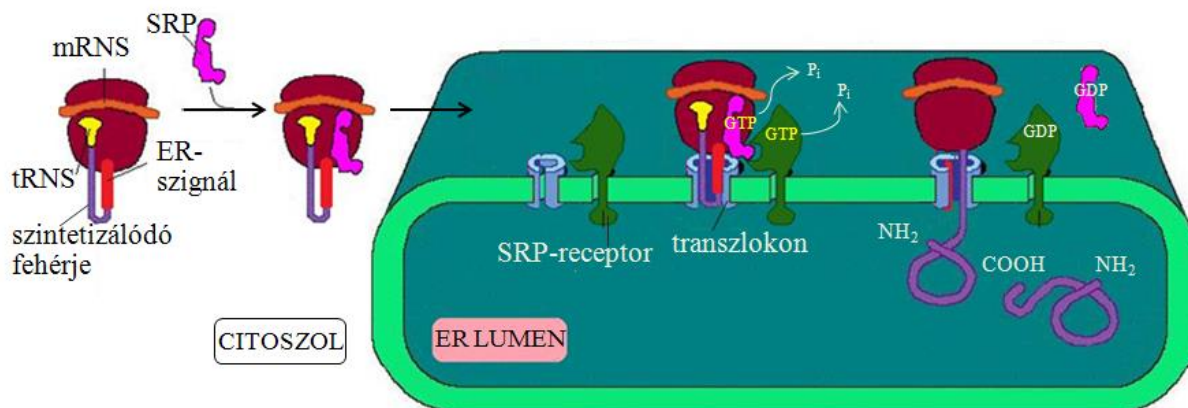
A fehérjék útja az endoplazmatikus retikulumig

Az izolált mikroszómákkal végzett vizsgálatoknak köszönhetően az első, még a 70-es évek elején felfedezett, fehérje-lokalizációt meghatározó szignál éppen az ER-be irányító szekvencia volt. Az ER-jel a fehérjék N-terminálisán található 16-30 aminosavból álló szakasz. A pontos összetétel változó, inkább az aminosavak tulajdonsága és helyzete meghatározó: 1-2 pozitív töltésűt közvetlenül 6-15 hidrofób aminosav követ, és ez a hidrofób „mag” elengedhetetlen a jel felismeréséhez (18.12. ábra). Az ER-szignál szükséges és elégséges a fehérje transzportjához: hiányában egy szekréciós fehérje a citoszolban marad, ha pedig mesterségesen egy normálisan máshol működő fehérje N-terminálisába építik, elérhető, hogy az az ER lumenébe kerüljön.



18.12. ábra. Az ER-lokalizációs szignál a fehérje N-terminálisán található, 1-2 pozitív töltésű aminosavat követő hidrofób szakaszból áll. A rajzon az ER membránjában lokalizálódó peptidáz (lásd 18.15. ábra) hasítási helye is látható.

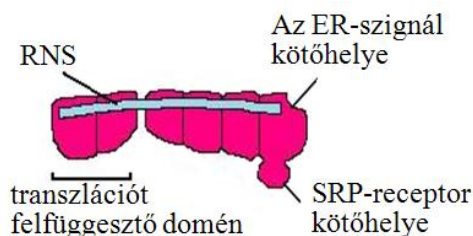
A kísérletek során az is kiderült, hogy a fehérjék teljes szintéziséhez szükséges a mikroszómák jelenléte; sőt, a transzláció az első kb. 70 aminosavnyi fehérjérszlet szintézise után a mikroszómák felszínén folytatódik, egyenesen a belső térbe (valójában ekkor még csak körülbelül az első 30-40 aminosav érhető el a készülő fehérjéből a citoszol felől, a többi a nagy alegység csatornájában van). Mikroszómák nélkül, szabad riboszómákon ugyan elkészül a fehérje, de utólag már sohasem juthat be a lumenbe. Ezért ezt a



18.14. ábra Egy fehérje útja az ER lumenébe. Az SRP a citoszolban kötődik az általa felismert hidrofób szekvenciához, megállítja a transzlációt és az ER citoszolikus felszínén található receptorhoz kötődik. Mind a receptor, mind az SRP hidrolizálja GTP-jét és elválnak egymástól; eközben a riboszóma illeszkedik a csatornára (transzlokon). A szintézis folytatódik, az N-terminális szignál (piros) levágódik, végül a fehérje a lumenbe kerül.

folyamatot *kotranszlációs transzlokációnak* nevezték el. A vizsgálatok során az is kiderült, hogy a szabad riboszómákon kialakult, a mikroszómákon kívül rekedt fehérjével szemben a lumenbe jutottak rövidebbek, éppen az N-terminális szignál hasítódik le róluk (18.12. és 18.15. ábra).

A fentebb bemutatott sejtmentes transzport-rendszer segítségével az ER-be vezető útvonal többi komponensét is sikerült izolálni. Bár a transzláció, mint minden esetben, szabad riboszómán kezdődik, az N-terminális szignált az élő sejtben még a fehérje szintézisének legelején (amint a szignál kijutott a riboszóma felszínére) felismeri specifikus receptora. Ez a vízdékony receptor az *SRP (signal recognition particle)* ribonukleoprotein, amely egy 300 nukleotidnyi RNS „vázra” kötődött hat fehérjéből áll (18.13. ábra). Az ER-szignál egy hidrofób zsebbe illeszkedik, az SRP egy másik doménje pedig akadályozza a további transzlációt, mert az elongációs faktor helyére köt be (18.13. és 18.14 ábra).



18.13. ábra. Az SRP (signal recognition particle) sematikus szerkezete és doménjei: halványkékkel az RNS, pinkkel a fehérjealkotók vannak feltüntetve.

Így a további fehérjeszintézis mindaddig igen lassú, míg az SRP nem kötődik az ER membránjában található SRP-receptorhoz (18.14. ábra). Ez nagyon „praktikus” lépés, mert dajkafehérjék nélkül is megakadályozza, hogy a fehérje frissen szintetizálódó N-terminális a transzlokációt gátló kompaktabb térszerkezetet vegyen fel (emlékeztetőül: a mitokondriumba jutó fehérjék csak dajkafehérjék segítségével tudják megőrizni „kitekeredett” szerkezetüket).

A riboszómához csatlakozott SRP és receptoranak kölcsönhatása akkor igazán tartós, ha mind az SRP (egyik fehérjekomponense révén), mind az SRP-receptor GTP-kötött állapotban van.

Az SRP és az SRP-receptor interakciója egyrészt pozicionálja a riboszómát az ER felszínére, másrészt lehetővé teszi a transzláció folytatását. Ugyanakkor kötődésük hatására hatékonyan hidrolizálják GTP-jüket, és ez az a lépés, amely lehetővé teszi az SRP leválását a riboszómáról és a receptorról (18.14. ábra). A szabadra vált partnerek ezután elengedik a GDP-t, és a citoplazmában jóval nagyobb koncentrációban lévő GTP-t kötve alkalmassá válnak egy újabb ciklusra. A transzlokációt biztosító energiaforrás egyik eleme tehát a GTP-hidrolízis.

Egyelőre még nem tisztázott módon, de az SRP leválása hozzájárul ahhoz is, hogy a riboszóma nagy alegységének megfelelő illeszkedésével a születő fehérje N-terminálisa a közeli transzlokomba hatoljon, amelyet a transzlokon és a riboszóma kapcsolódásának stabilizálódása követ. A folytatódó transzláció során születő új peptidlánc ezek után már a csatorna belsejében, N-terminálisával az ER lumene felé halad tovább.

Az N-terminális jel, az SRP és az SRP receptora olyannyira konzervált, hogy a prokariótákban is működik: ott a sejthártyába irányított membránfehérjék kotranszlációs transzportját biztosítja. Kölcsönhatásaik részleteit elsősorban a bakteriális homológok tanulmányozásával ismerték meg.

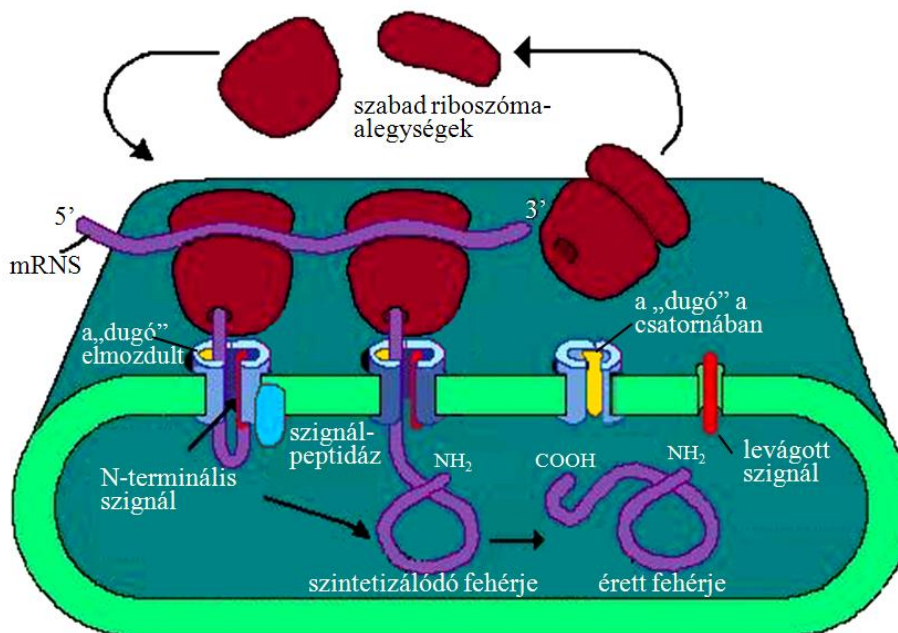
Ahogy a citoszolban zajló transzlációs folyamat, úgy az ER-kötött fehérjeszintézis is történhet poliriboszómákon. Az átíródo mRNS végig az ER felszínén lokalizálódik, de pozíciója folyamatosan változik. Az egymás közelében lévő transzlokonokon elhelyezkedő riboszómák között adódik „kézről kézre”, mint egy futószalag. Amint az egyik riboszóma elkészítette a fehérjét, alegységeire szerelődik szét, és a citoszolba visszajut. Az mRNS leolvasott 5' végét viszont újabb szabad riboszómák foglalják el, az átírt szignál hatására az ER-re kerülnek. Természetesen a többi, ugyanazon mRNS-en dolgozó riboszóma közelébe, hiszen az mRNS, mint egy kötel, fogva tartja őket (18.15. ábra).

A csatorna szerkezete és a kotranszlációs transzlókáció mechanizmusa

Az ER-be irányuló fehérjetranszportot biztosító csatorna szerkezetét sok évig tartó vizsgálat tárta fel. Az első eredmények olyan élesztőmutánsokkal folytatott kísérletek során születtek, amelyekben a szekréciós fehérjéket szintetizáló riboszómák az ER felszínéig még eljutottak, ám ott elakadt a további transzláció. Az így azonosított, az evolúció során erősen konzervált csatornafehérjét a szekrécióban gátolt (*Sec*-nek elnevezett) élesztőmutánsok után a szakirodalomban azóta is *Sec61 α* -nak, a három tagból (*Sec61 α* , *Sec61 β* és *Sec61 γ*) álló teljes komplexet, a transzlokont pedig *Sec61 komplexnek* nevezik. A csatorna belsejében lévő vizes pórust a *Sec61 α* alakítja ki membránon átvelő doménjei által.

Csakúgy, mint a szignál felismerésére és ER-hez szállításához szükséges apparátus, a csatornát képező fehérjék is erősen konzerváltak. Prokariótákban a sejten kívülre irányuló fehérjeexportban és a membránfehérjék integrálásában játszanak szerepet. Sok strukturális modell készült a *Sec61* transzlokonról, de a csatorna molekuláris szerkezetét legpontosabban feltáró röntgenkristallográfiás vizsgálat ezideig csak egy archeobaktériumból izolált homológ esetében sikerült. A kapott adatok alapján maga a pórus körülbelül 1 nm átmérőjű, ezért csak teljesen kitekeredett fehérjelánc képes áthaladni rajta. Ugyanakkor kis molekulák bőven átjuthatnának, ami persze sértené az ER belső terének integritását. A csatorna

zártágát egy rövid, helikális szerkezetű peptid, „dugó” biztosítja, amely az N-terminális szignál-szekvenciát érzékelve konformációs változáson esik át, és átengedi a növekvő polipeptidláncot. Amint a transzláció befejeződött, a fehérjedugó visszaveszi eredeti pozícióját, és teljesen elzárja a pórus belsejét (18.15. ábra).



18.15. ábra A kotranszlációs transzlókáció lépései. Az ER-fehérjék szintézise poliriboszómákon is történhet (az ábrán az SRP és receptora már nincs feltüntetve). A hidrofób N-terminális szignál jelenléte szükséges a csatornát elzáró peptidrészlet, a „dugó” felre-csúszásához. A csatorna-komplexhez csatlakozó a szignál-peptidáz, lehasítja az N-terminális jelet, amely a membránban degradálódik.

Ahogy az már a korai kísérletekből is kiderült, az ER-be irányító jel nincs rajta a transzlokonon átjutott érett fehérjén. Eltávolításáról az úgynevezett *szignál-peptidáz* gondoskodik, amely a transzlokonhoz asszociálódó transzmembrán fehérje. A Sec61 komplex finomszerkezete azt mutatja, hogy a csatorna képes oldalirányban, a lipidmembrán felé is megnyílni. Ezt a lépést minden bizonnyal az ER-szignál hidrofób jellege váltja ki. Így a szintetizálódó fehérje eredeti N-terminálisa kicsusszan a lipidrétegbe, ahol a szignál-peptidáz levágja, majd egyéb proteázok által degradálódik. A transzláció zajlik tovább, és az ily módon felszabadult új N-terminális vég folytathatja útját az ER ürege felé (18.15. ábra).

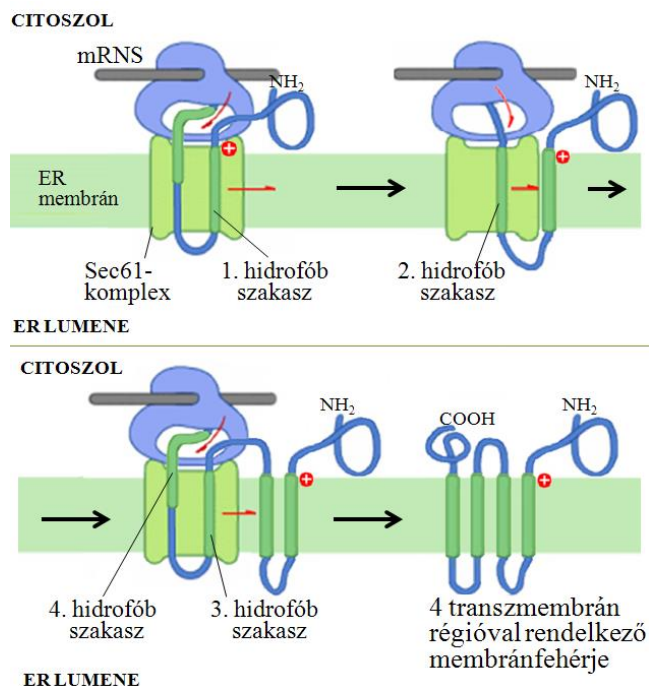
A mikroszómákkal végzett *in vitro* kísérletek alapján magához a póruson való átjutáshoz elegendő a fehérje szintéziséhez felhasznált energia. A riboszóma felől folyamatosan növekvő peptidlánc így magától „beletolódik” a csatornába.

Transzport az ER membránjába

A sejtben a teljes endomembrán rendszer (ER, Golgi-készülék, lizoszómák, endoszómák) és a sejthártya valamennyi membránfehérjéje az ER felszínén szintetizálódik. A membránfehérje irányultsága – azaz melyik része néz a citoszol felé, és melyik a membrán másik felszínének irányába – a szintézis után már sohasem változhat meg. Bármilyen sok vezikula-lefűződés és -fúzió után is jut el például a plazmamembránig, az eredetileg citoszol felé néző része mindig ebbe a térbe lóg majd, és az ER felé néző darabja pedig mindig a membrán túlsó oldalán található közegbe, plazmamembrán-fehérje esetében az extracelluláris térbe.

A membránfehérjék szintézise az előzőleg ismertetett lépésekkel kezdődik, ugyanazon SRP és SRP-receptor segítségével kerül a riboszóma az ER felszínére, a transzlokáció ugyanazon Sec61 transzlokonon keresztül zajlik. Sőt, van olyan membránfehérje, amelyet a szolubilis fehérjékkel kapcsolatban megismert N-terminális szignál irányít az ER-hez. Többségük esetében azonban az SRP számára jelként egy a belső, 20-25 aminosavból álló hidrofób szekvencia szolgál, ami nem más, mint maga az (N-terminálisról számított) első leendő transzmembrán domén. Ezek a domének α -helikális szerkezetűek, és a foszfolipid kettős réteg hidrofób belső részét ívelik át. A membránfehérjék topológiáját, membránban elfoglalt helyzetét az határozza meg, hogy hány transzmembrán doménből állnak, és azok hogyan orientálódnak a két felszín között.

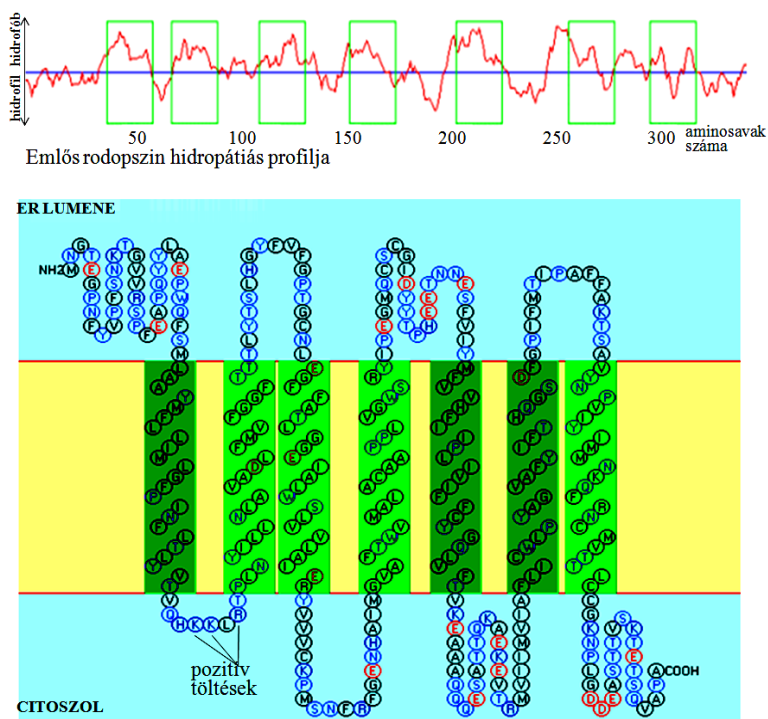
Amint a fehérje belsejében lévő hidrofób szekvencia áthalad a Sec61 komplex pórusán, a transzlokon oldalsó, a lipidrétegbe vezető „kapuja” kinyílik, ugyanúgy, ahogyan a vízdékonny fehérjék levágódó N-terminális szignáljának hatására (18.15. ábra). A transzmembrán domén azonban nem vágódik le, rögzíti a fehérjét, a transzlokáció itt megakad. A citoszol felől a riboszóma ugyanakkor tovább folytatja a szintézist, mindaddig, amíg egy újabb hidrofób régió nem következik (18.16. ábra).



18.16. ábra A transzmembrán fehérjék szintézise és integrálódása a membránba. A legtöbb transzmembrán doménnel rendelkező fehérje orientációját meghatározza az, hogy az első szintetizálódott domén milyen helyzetben stabilizálódik a csatorna belsejében – ami attól függ, hogy melyik oldalán található pozitív töltéstitélet. Az első transzmembrán domén után váltakozó helyzetben épülnek a membránba a soron következő hidrofób szakaszok.

Vajon mi határozza meg, hogy hogyan helyezkedik el a membránban a fehérje? Bár orientációja első transzmembrán doménjének irányultságától függ, magában a döntésben ezen hidrofób szakasz *szekvenciája* nem játszik szerepet. Felfedezték, hogy a hidrofób szakaszt valamelyik végén mindig bázikus aminosavak csoportja határolja, erős pozitív töltést biztosítva. Amikor a riboszóma dokkol a transzlokonon, a jelként szolgáló, majd a csatornába ékelődő első hidrofób szakasz mindig úgy helyezkedik el, hogy a pozitív töltésű rész a citoszol felé irányul. Ezt sokáig nem tudták megmagyarázni, de a legújabb eredmények szerint ennek az az oka, hogy maga a Sec61 komplex (citoszolikus felén csoportosuló negatív töltésű aminosavjai révén) irányítja a hidrofób szakasz orientációját.

Könnyen felismerhető az a törvényszerűség, hogy minden második hidrofób szekvencia ugyanúgy viselkedik, az öt megelőzővel ellentétesen helyezkedik el (18.16. ábra). Tehát az első kivételével az egymás után következő transzmembrán domének orientációját alapvetően a sorrendben elfoglalt pozíciójuk határozza meg. Ez legtöbbször valóban így is van, például ha mesterségesen eltávolítják egy fehérje egyik hidrofób szakaszát, az utána következők orientációja megfordul az eredetihez képest. Ezek a szabályok lehetővé teszik, hogy a fehérje aminosavsorrendjének ismeretében meg lehessen próbálkozni a képződő fehérje topológiájának jóslásával (18.17. ábra).



18.17. ábra A rodopszin hidropátias profilja (fent), és transzmembrán doménjeinek pontos elhelyezkedése a membránban (lent). Az A ábrán az x tengelyen az aminosavak pozíciója, az y tengelyen az adott aminosav hidrofób (pozitív értékkel) illetve hidrofíli jellege (negatív értékkel) van feltüntetve. A bekeretezett részek a szekvenciának azon, körülbelül 20 egymás utáni, többségében hidrofób aminosavból álló szakaszai, amelyek feltehetően a membránban helyezkednek el. Az alsó ábra a rodopszin fehérjeláncának a membránba illeszkedő, illetve a citoszolba vagy az ER lumenébe nyúló aminosavjait mutatja. Az első N-terminális transzmembrán domén orientációját a citoszol felé néző pozitív töltések határozzák meg. (Figyelem, az eddigiekhez képest ezen az ábrán a citoszol van „lenn”, míg az ER lumene „felül”!)

Az ER-ben zajló módosító folyamatok

Az ER-be transzlokálódó fehérjéhez már a transzport folyamán is enzimek kapcsolódnak, és különböző módokon alakítják szerkezetét. Ezek a módosítások elsősorban arra szolgálnak, hogy elősegítsék a stabil harmadlagos, negyedleges struktúra kialakítását, illetve biztosítsák a sejtfelszínre jutó fehérjék egyedi karakterét specifikus cukoroldallancok rákapcsolásával.

A legtöbb - nem túl nagyméretű - fehérje magától is képes kialakítani helyes szerkezetét, ez sokkal gyorsabban végbemegy, ha *dajkafehérjék* is segítenek. Ezek működéséhez, ahogy erről már korábban is szó esett, ATP-hidrolízisre van szükség.

A szekretált fehérjékben és a membránfehérjék extracelluláris részében gyakran találhatunk diszulfidkötést. A citoplazma redukáló közege inkább a tiolforma fennmaradásának kedvez, ezért az ezen fehérjék

térszerkezetét alapvetően meghatározó intra- vagy intermolekuláris *diszulfid-hidak* csak az ER lumenében jöhetnek létre.

.... A membrán integráns fehérjéi sokszor nem képesek a lipidmembránban laterálisan elmozdulni, mert citoplazma felőli részüket „fogva tartja”, immobilizálja például a sejtváz valamelyik komponense. A sejthártya extracelluláris oldalán egyes fehérjék szabadabb mozgását teszi lehetővé az, hogy nem hidrofób α -hélix révén, hanem egy amfipatikus glikolipid, a glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) által horgonyzódnak a membránba. A GPI-horgony az ER-ben kerül a fehérjére.

Az ER-be érkezett legtöbb fehérjén bekövetkező módosulás az *N-glikoziláció*. Ennek során egyes aszparaginok oldalláncának NH_2 -csoportjához egy oligoszacharid „fácska” kapcsolódik. Az adott helyen bekövetkezett N-glikozilálódás a legtöbb fehérje végleges konformációjának kialakításában mindenképpen szerepet kap, de bizonyos esetekben elengedhetetlen is a helyes térszerkezet létrejöttéhez. Az elkészült és szekretált fehérjék stabilitását is megnövelheti, és további módosulások révén a sejtfelszíni fehérjék és az általuk létesített kapcsolatok specificitására döntő mértékben hathat.

Mindemellett a szekréciós- és membránfehérjék utazása során ez az utolsó állomás, ahol egy igen szigorú minőségellenőrzés is zajlik: ha bármilyen jel arra utal, hogy nem jött létre a megfelelő térszerkezet, a fehérje degradációra ítéltetik.

Ma már tudott, hogy a pusztulásra ítélt fehérjék nem az ER lumenében bomlanak le, hanem a citoszolban - a folyamat neve: ER-asszociált degradáció (ERAD). Szintézisükhöz hasonlóan a degradáció útjára is dajkafehérjék kísérik a fehérjéket, valószínűleg egy ugyanolyan Sec61 komplexhez, amely ER-be érkezésüket biztosította. Diszulfid-kötéseik felbomlanak, cukor-oldalláncaikat elvesztik, és a Sec61 komplex és más, a csatornához asszociálódott fehérjék segítségével a citoszolba kerülnek (retrotranszlokáció). Azt feltételezik, hogy a transzlokon citoszol felőli oldalán várakozó ATP-ázok „húzzák ki” a fehérjéket az ER lumenéből és továbbítják őket a proteasómához.

A síma felszínű ER a fehérjeszintézisben nem vesz részt, membránjából hiányoznak az ehhez szükséges fehérjék. Mind a RER, mind a SER közös funkciója viszont a *membránlipidek szintézise*. Ezen kívül a SER feltűnően fejlett szteroidhormonokat szintetizáló (pl. mellékvesekéreg), illetve biológiailag aktív idegen anyagok, például gyógyszerek feldolgozását (méregtelenítést) végző sejtekben (májsejtek).

Az ER mindkét részének feladata a citoszol Ca^{2+} -koncentrációjának szabályozása is. Ez azért lehetséges, mert üregrendszerükben Ca^{2+} -kötő fehérjék lokalizálódnak, membránjaik pedig Ca^{2+} -pumpát (Ca^{2+} -ATP-áz) és Ca^{2+} -csatornákat tartalmaznak. A Ca^{2+} -ionok másodlagos hírvivőként fontos szerepet játszanak számos jelátviteli folyamatban.