

1. AZ ÉLET KELETKEZÉSE, A SEJTEK SZERVEZŐDÉSE

A Föld kialakulása és a prebiotikus környezet. A fossziliák jelentősége. A szerves molekulák eredete és szerveződése. A progenóta kialakulása. Az életfeltételek változása. A sejtalkotó makromolekulák.

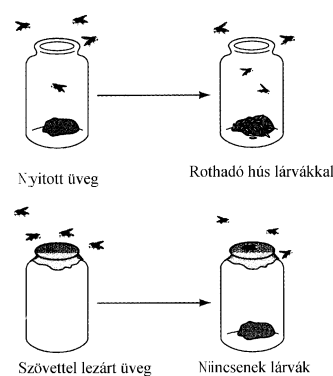
A sejt, mint az élet alapegysége. A pro- és az eukarióták általános jellemzői. Sejtszervecskék és funkcióik.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár jegyzete alapján módosította és összeállította Lippai Mónika.

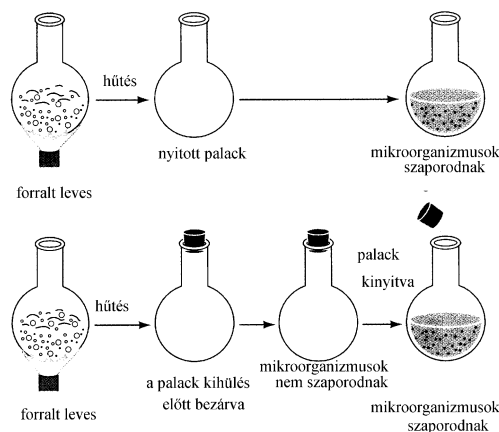
Bevezetés

Mindenkinek természetes, hogy élőlények születnek, élnek és meghalnak. Hogyan kezdődhetett az élet

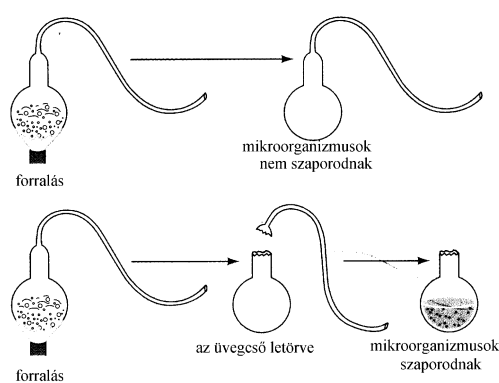
(a) Redi kísérlete



(b) Spallanzani kísérlete



(c) Pasteur kísérlete



körforgása?

1.1. ábra. Az élet spontán eredetéről szóló elképzeléseket cáfoló klasszikus kísérletek.

Az első élet kialakulása szervetlen anyagokból szerves molekulák, majd sejtyszerű struktúrák szerveződésével következhetett be (*abiogenezis*). Hol, hogyan, mikor történhetett ez meg? A kutatások fejlődése lehetővé tette, hogy ezekre a kérdésekre válaszul ma már tudományosan elfogadható hipotézis(ek)e)t lehessen felállítani.

A sejt fontosságát mi sem bizonyítja jobban, mint hogy minden életjelenség sejttel kapcsolatos és (legalábbis mindeztáig) minden sejt csak egy korábban létező sejtől származhat - azaz a sejt az élet alapvető szerveződési és funkcionális egysége. Milyen szerveződési és funkcionális jellegzetességeik vannak a sejteknek? Az alábbi fejezet a fenti kérdésekre adható válaszokat tekinti át röviden.

Korai kutatások az élet mibenlétével kapcsolatban

Az élet *ősnevezés*-eredetét, melyet Arisztotelesz (i.e. 384 – i.e. 322) is vallott, a XVII. század második felétől kezdve kezdték tudományos alapon megcáfolni. Izolált rothadó húsból nem képződnek légylárvák (Redi 1668). A sterilizált, lezárt tápoldatban nem keletkeznek mikroorganizmusok (Spallanzani, 1770 körül). Louis Pasteur híres kísérletei (1862) alapján mondta: *omne vivum e vivo* (minden élet életből származik; (1.1. ábra).

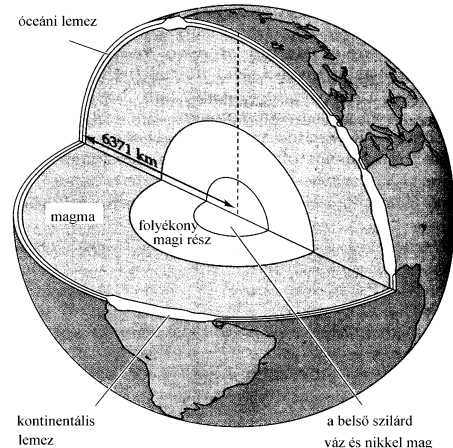
Az első mikroszkópot Robert Hook készítette 1665-ben. Leeuwenhoek 1676-ban látott először mikroszkópban élő sejteket, mikroorganizmusokat.

Ma már tudjuk, hogy minden élőlény sejt(ek)ből áll. Miből képződtek az első sejtek, és miből a sejteket alkotó szerves anyagok?

A Föld rövid története.

Az univerzum anyaga sok milliárd évvel ezelőtt kis térfogatban volt összehúzóulva. Anyaga a „Nagy Bumm” (~13,7 milliárd éve) után szétszóródott, belőle galaxisok képződtek. A bolygók a gravitáció, valamint a szétszóródott részecskék aggregációja révén alakultak ki. A Föld mintegy 4,5 milliárd éves. Belső magja 3700 km sugarú, folyékony vas és nikkel alkotja. A magma 3000 km vastag, sűrű, olvadt szilikátokból áll. A magmán úszik a földkéreg, amely 5-40 km vastag (1.2. ábra). A külső rétegek nyomása, meteoritok becsapódása és a radioaktív bomlás hevítette fel.

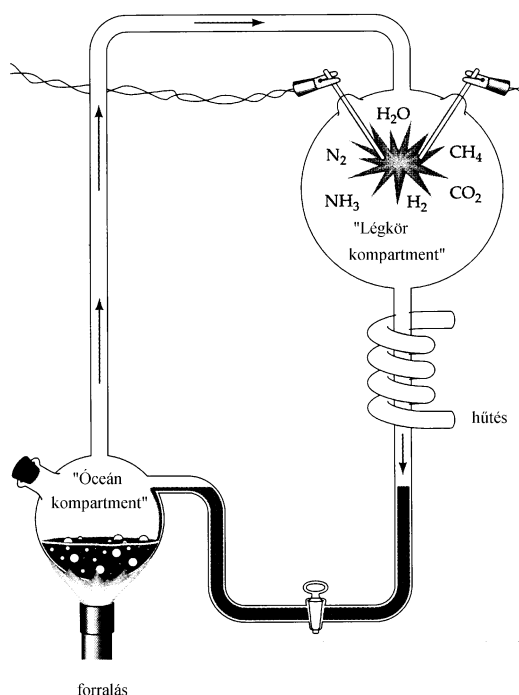
A legöregebb fossziliák, az élőlények geológiai korból megőrzött struktúrái 3,8 milliárd évesek. Az élet 4 milliárd éve keletkezhetett itt, a Földön. Hogyan?



1.2. ábra A Föld szerkezete.

Az első szerves molekulák eredete

Az ősi föld légköre redukáló jellegű volt (bár a redukáló hatás korábban feltételezett erősségét ma már vitatják), oxigént nem tartalmazott: a magmából és a földkéregből kiszabadult N_2 , CO_2 , H_2O , H_2 , NH_3 , H_2S , CO és CH_4 alkotta (O_2 csak nyomokban: más elemekkel alkotott vegyületeket). A légkör hűlésével víz csapódott ki. A villámlás, az ultraibolya sugárzás és a magas hőmérséklet a légköri gázokat egyszerű szerves vegyületekké alakította. Harold Urey és Stanley Miller (az 1950-es években) lombikban korai földi körülményeket teremtve elektromos kisülésekkel, viszonylag magas hőmérsékleten valósította meg szerves molekulák szintézisét (1.3. ábra). Berendezésükben a vízben („ősleves-hipotézis”) már rövid idő alatt is olyan vegyületek képződtek, mint pl. HCN , formaldehid, acetaldehid, ecetsav, hangyasav, urea, sőt aminosavak is (glicin, alanin, glutaminsav, aszparaginsav).



1.3. ábra Az Urey és Miller-féle berendezés működésének elvi alapjai.

Bár a mai elképzelések szerint az őslégkör összetétele különbözött az Urey és Miller által feltételezettől (kevésbé redukáló volt), a gázkomponensek módosításával szintén előállítható - akár még többféle - szerves vegyület. A reaktív vegyületekből, különösen a HCN -ből és a formaldehidből, könnyen képződnek olyan bonyolultabb molekulák, mint az adenin vagy cukrok.

A szerves molekulák szerveződése

Az évmilliók folyamán az ősóceánban felhalmozódhattak a szerves molekulák. A prebiotikus körülmények között képződő sokféle vegyület monomerjei könnyen polimerizálódhattak. A polimer molekulák sok fontos tulajdonsággal bírhatnak: reakciókat katalizálhatnak, replikálódhatnak,

információt tárolhatnak, aggregálódhatnak, emellett stabilak. Valószínű, hogy az első biológiai aktivitású polimerek RNS-szerű molekulák voltak, olyanok, mint a ma ismert *ribozimok*.

A ribozimok enzimatiszus aktivitású RNS-ek, az 1980-as évek elején fedezték fel őket – addig csak fehérjetermészetű enzimeket ismertek. Az *enzimek* olyan katalitikus aktivitású szerves molekulák, amelyek az életfeltételeknek megfelelő hőmérsékleten gyorsítják fel a kémiai reakciókat. Az enzimek szelektívek: a sok lehetséges kémiai reakció közül csak néhányat katalizálnak.

A különféle ribozimok eltérő folyamatokban vesznek részt, de sokféle ribozimmal nagyon sokféle enzimatiszus reakció katalizálható. Valaha ribozimok katalizálhatták az aminosavak polimerizációját is peptidekké, fehérjékké. A fehérjék sokfélesége teremthette meg az alapot további enzimatiszus folyamatokhoz, valamint a "sejtszerű" szerkezetek kialakulásához.

Alexander Oparin mutatta meg először (1924, 1936), hogy a különféle polimerekből ma is készíthetők olyan szerveződéses, úgynevezett koacervátumok, amelyek mutatnak bizonyos, a sejtekre jellemző tulajdonságokat. Például: szelektíven vesznek fel anyagokat környezetükből és alakítják át azokat, képesek anyagokat koncentrálni belsejükben, és arra is, hogy megszabaduljanak a felesleges anyagcseretermékektől. Mesterséges körülmények között, fehérjeszerű oldatok hűtésekor olyan, kb. $2\ \mu m$ átmérőjű cseppecskék formálódnak, amelyeknek kettős külső rétegük van, fehérjeszerű molekulákat abszorbeálnak, bimbóznak, osztódnak és önszervező képességűek. (a legidősebb, 3,8 milliárd éves fossziliák mérete is $2\ \mu m$!).

Az őstengerben a kis agyagszemcsék felszíne katalizátorként segíthette a cseppecskék szerveződését. A poláros és apoláros csoportokat egyaránt tartalmazó molekulákból spontán képződhetnek határoló rétegek: a hidrofób természetű lipidek és/vagy fehérjék "membránokkal" burkolhatták be a koacervátum-cseppecskéket. Ezek alkalmassá válhattak a szelektív anyagfelvételre és -leadásra: a membránokon protonok pumpálódhatnak át, lehetőséget teremtve az energiatermelésre. A kettős láncú nukleinsavak (szintén polimerek) lehettek képesek a replikálódásra, olyan információk tárolására, amelyek a tulajdonságok átörökítéséhez szükségesek. Azok a koacervátumok szaporodhattak, amelyek át tudták örökíteni tulajdonságaikat "utódaikra".

A progenóta (proto-sejt) kialakulása

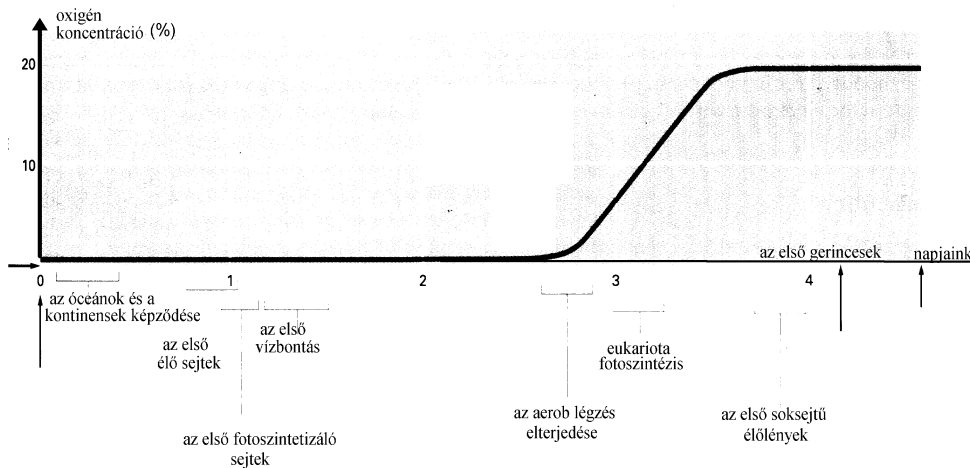
A DNS, valamennyi mai élőlény örökítő anyaga, membránnal körbezárt sejtyszerű struktúrában alakulhatott ki, RNS minta alapján. A progenóta (a proto-sejt) az első olyan élőnek tekinthető élőlény, amelyet membrán határolt, DNS-t (vagy az újabb elképzelések szerint előbb csak RNS-t) tartalmazott és tulajdonságait átörökítette utódaira. Az első progenóta kb. 4 milliárd éve képződhetett. A tudomány mai álláspontja szerint egyetlen egy progenóta az őse minden, a Földön valaha élt élőlénynek. Az örökítő anyag változásai, a mutációk biztosították a progenóta leszármazottainak azt a változatosságát, amelyek közül

természetes szelekció révén válogatódott ki az élet- és szaporodásképesebbek.

A Föld képződésétől a progenóta kialakulásáig kb. 500 millió év telhetett el: volt esély a szerves vegyületek képződésére, a polimerek kialakulására, koncentrállódására, a különféle szerves anyagok kombinálódására: sok, egyenként kis, de nem nulla valószínűségű esemény bekövetkeztére. A közös eredetet egyebek mellett olyan tények bizonyítják, mint hogy minden élőlény sejt(ek)ből áll, minden élőlény örökítő anyaga DNS és sejtjeiket hasonló jellegű szerves vegyületek alkotják. Az élőlények eredetére vonatkozó, az utóbbi két évtized során felhalmozódott molekuláris biológiai/genetikai bizonyítékokról a kurzus utolsó előadásán lesz majd szó.

A korai életfeltételek

Ózonréteg hiányában a földfelszín erős ultraibolya sugárzás érte, amelynek roncsoló hatása miatt élet csak árnyékban, iszapban vagy 5 méternél mélyebb vízben keletkezhetett. Az első élőlények oxigénmentes körülmények között éltek, *anaerobok* voltak. Anyag- és energiaforrásaik az óceán szerves molekulái voltak.



1.4. ábra. A légköri O₂-koncentráció változása a Föld története során, néhány fontosabb esemény feltüntetésével.

A szerves anyagok lassú fogytával elszaporodhattak azok az élőlények, amelyek az energiát (ATP-t) szerves anyagok (elsősorban a vulkanikus tevékenység miatt bőségesen rendelkezésre álló H₂S) oxidálásával, és/vagy a fényből nyerték. A már említett 3,8 milliárd éves maradványok is *anaerob fotoszintetizáló baktériumok* voltak. Az elektronakceptor azonban nem víz volt - ne felejtjük el, hogy a víz bontása során felszabaduló O₂ toxikus az anaerob élőlényekre! Ehhez más szerves molekulákat (pl. H₂S) használtak fel. Ezek az élőlények tehát képesek voltak szénforrásként CO₂-t használva, csak szerves anyagokból kiindulva szerveset készíteni. (Részletesebben lásd a 2. előadás anyagát.)

Elektronakceptorként (és hidrogénforrásként) a vizet először az O₂ jelenlétét már eltűrő *cianobaktériumok* kezdték használni, kb. 3,2 milliárd éve (1.4. ábra). A cianobaktériumok által a vízből felszabadított O₂ csaknem 2 milliárd éven át nem halmozódhatott fel jelentősen a légkörben, mert az óceánok vizében oldott

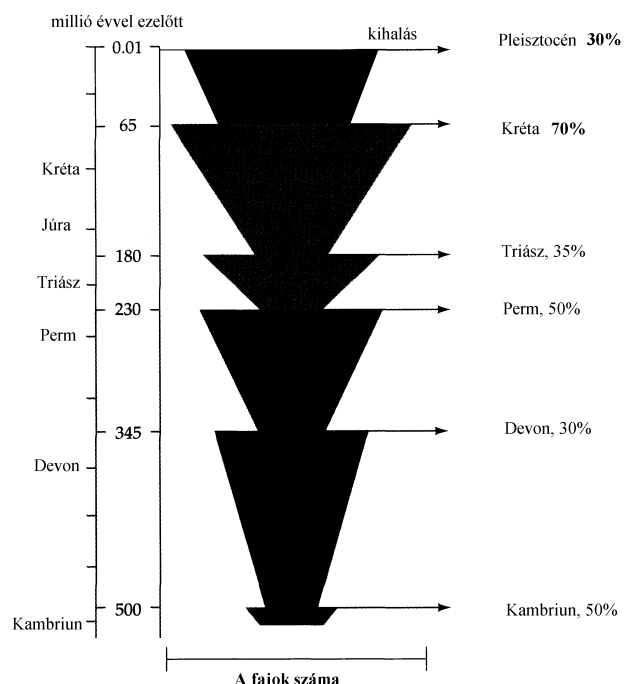
nagy mennyiségű Fe²⁺-t oxidálta Fe³⁺-á. A légkör O₂-koncentrációja csak kb. 1,5 milliárd éve kezdett nőni. Az O₂-koncentráció növekedtével nyílt lehetőség arra, hogy az O₂ is elektronakceptorként működhessen (mint az eukarióta élőlények mitokondriumában), és kialakulhasson az energiát hatékonyan termelő *aerob légzés*.

Ráadásul a légköri O₂ egy része az ultraibolya sugárzás hatására ózonná (O₃) alakult. Az ózon hatékonyan abszorbeálja az ultraibolya sugárzást, 500-600 millió éve lehetőséget teremtve az élőlények megtelepedésére a tengerek és a föld felszínén.

A Földet kb. 1,6-2 milliárd évvel ezelőttig csak prokarióta (sejtmag nélküli) élőlények népesítették be. Az *eukarióta* (valódi sejtmagvas) élőlények fejlődése valószínűleg csak ezután kezdődött. A sejtszervecskék, köztük az endoszimbionta eredetű kloroplasztok és a mitokondriumok kialakulása fontos esemény az evolúció folyamán. A soksejtű élőlények (~5-600 millió évvel ezelőtt) kialakulása után jött létre az élőlények mindannyiunk által jól ismert sokfélesége.

A „közel múlt” életfeltételei

Az életfeltételek bár lassan, de folyamatosan változnak a Földön. Mintegy 550 millió éve a szárazföld hat, az egyenlítő körül elhelyezkedő kontinensre tagolódott. Kb. 200 millió éve ezek egyetlen kontinenssé (Pangea) egyesültek. A Pangea később újra kontinensekre hasadt, amelyek az idők során elkülönültek, és lassan, de ma is sodródnak, torlódnak.



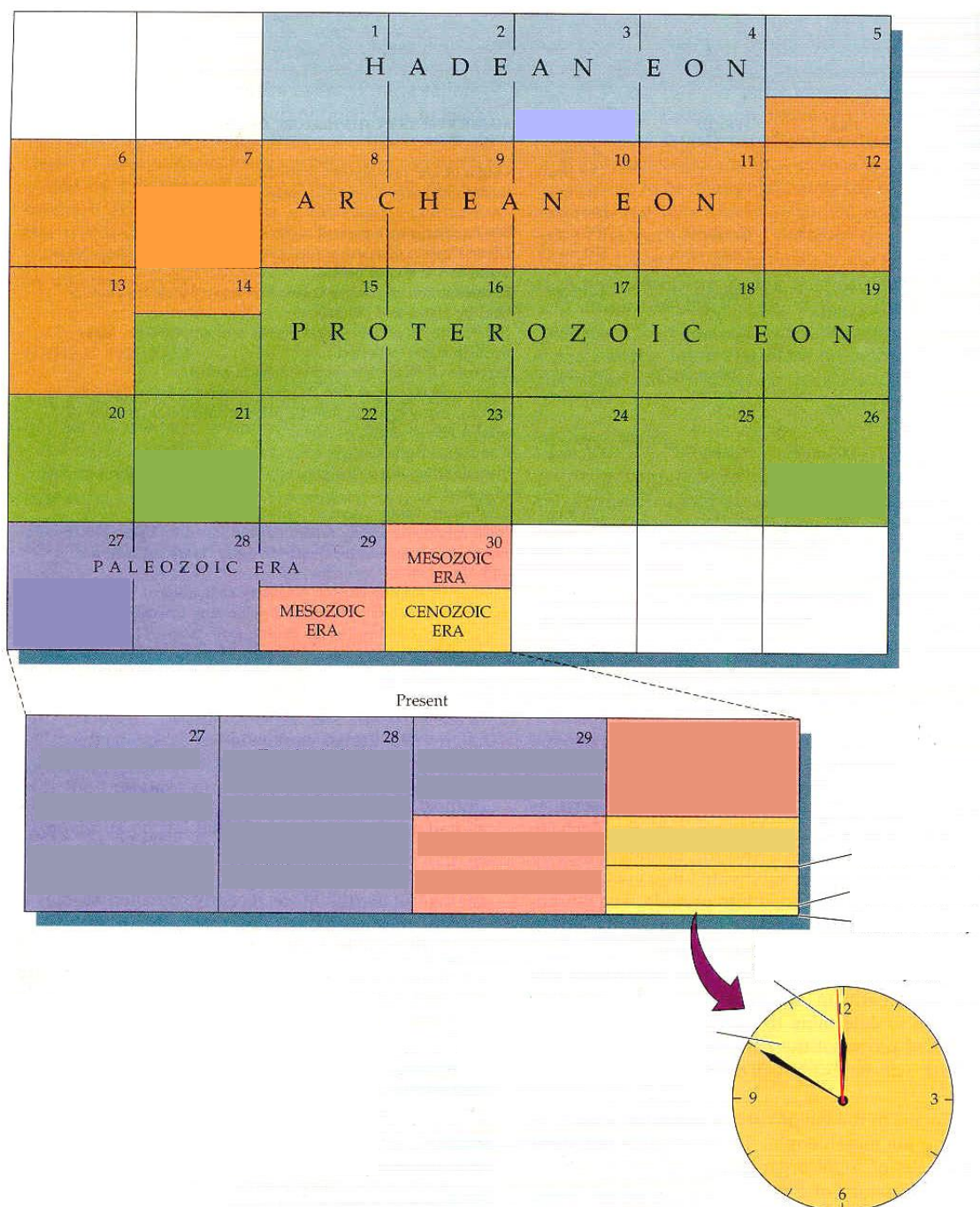
1.5. ábra. Az elmúlt 500 millió év során hatszor haltak ki tömegesen fajok - ezek a tömeges kihalások jelzik a földtörténeti korok határait.

Az évmilliók során változott (és változik ma is) a Föld klímája is. A Földnek a világűrben történő mozgása felmelegedésekhez, és olyan lehűlésekhez vezet, mint pl. a jégkorszakok. (Ma is az átlagosnál hidegebb korszakban élünk.)

Jelentős (és gyors!) lehűléshez vezettek a vulkánkitörések, és meteor-óriásokkal történt ütközések. A fossziliák tanulsága alapján a Föld története során a ezek a hirtelen bekövetkezett lehűlések fajok tömeges kihalásához vezettek (1.5. ábra). Mára a Föld története során valaha élt fajok több mint 99%-a kihalt. A környezeti feltételekhez alkalmazkodó, szaporodni képes élőlények élhettek tovább és származhattak tőlük utódok.

Evolúció egyhónapos skálán

Ha a Föld történetét egyetlen hónapba sűrítve szemléltetjük, egy nap kb. 150 millió évnek felel meg (1.6. ábra). A Föld képződését követően a szerves anyagok kialakulása és szerveződése után a progenóta, az első élőlény az 5. nap környékén alakulhatott ki. A legidősebb prokarióta fossziliák a 7., az eukarióták csak a 19-20. (fossziliák csak a 21.), a soksejtűek a 26. napról származnak. Az első szárazföldi növények és az állatok csak a 28. napon bukkantak fel. A dinoszauruszok a 29. nap délutánján élték fénykorukat, amikor az első emlősök is megjelentek. Az utolsó nap delére fejlődtek ki a madarak és a virágos növények, késő délutánján az emberszabású majmok. Az értelmes ember (*Homo sapiens*) a 30. nap utolsó tíz percének terméke. Írásos történelme pedig mindössze 30 másodpercnyi.



1. 6. ábra Az „élet kalendáriuma” harminc napba sűrítve.

A SEJTALKOTÓ MAKROMOLEKULÁK

1. Lipidek. Apoláros oldószerekben (pl. benzolban) oldódó, polárosokban (pl. vízben) nem oldódó, meglehetősen különböző kémiai szerkezetű molekulák. Funkcióikat illetően is szerteágazó természetű vegyületek. Különböző típusaik energiát tárolnak, membránok alkotói, hormonok, stb. A zsírok (egyszerű lipidek vagy trigliceridek) glicerín és zsírsavak (palmitin-, sztearin-, olaj- és linolsav) észterei, hatékony energiatárolók.

A foszfolipidekben a glicerín molekula két zsírsavval kapcsolódik, a harmadik zsírsav helyett vagy egy foszforsav-maradék (a foszfátidokban), vagy egy foszforsav-maradékon át egy töltött molekula kapcsolódik (a foszfátidil-kolinban például kolin, a foszfátidil-etanolaminban etanolamin). A foszfolipidek élettani szempontból rendkívül fontos tulajdonsága, hogy vannak hidofil és hidrofób részeik is. A biológiai membránok alapvető szerkezete két foszfolipid rétegből áll: a belső, hidrofób részét a hidrofób zsírsavláncok, két felszínét pedig a hidofil részek alkotják.

Az egyéb lipidek közül megemlítiük a karotenoidokat, a fényelnyelő pigmentek egyik családját. A β -karotin növényekben az egyik fényenergia-elnyelő pigment, egyben az A vitamin előanyaga. Az A vitamin egyik származéka (retinál) pedig az állatvilágban a fényérzékelésre általánosan használt pigment, a rodopszin egyik komponense.

A szteroidok némelyike membránalkotó, mások hormonok. A koleszterin, a membránok egy fontos összetevője, részben a májban képződik, részben a táplálékból (tejből, vajból és állati eredetű zsírokból) szívódik fel. A koleszterin-tartalom növekedése általában csökkenti a membránok fluiditását. A koleszterin az epesavak előanyaga is. A szív ereiben történő lerakódása ateroszklerózishoz, érelmeszesedéshez vezethet. Koleszterinből képződnek a szteroid hormonok (tesztoszteron, ösztrogének, kortizon, ekdizon). A D vitamin is egyfajta szteroid, a kalcium-felszívódás és lerakódás fontos szabályozója.

2. Szénhidrátok. Az energiatárolásban és vázanyagként is fontos szerepet betöltő, szén, hidrogén és oxigéntartalmú, heterogén méretű molekulák. A legismertebb monoszacharidok a hat szénatomos glükóz (a fotoszintézis legfontosabb terméke), a fruktóz, a mannóz és a galaktóz, az ötszénatomos ribóz és dezoxiribóz (a nukleinsavak egyik alkotója). A diszacharidok közül a tejcukor (laktóz) és a háztartásokban használt répacukor (szacharóz), a poliszacharidok közül az állati sejtekben energiát raktározó glükogén, valamint a növényi sejtekre jellemző keményítő és cellulóz a legismertebb.

3. Fehérjék. Aminosavakból peptid-kötésekkel képződő polimerek. Az aminosavak oldalláncaik alapján lehetnek hidrofób természetűek (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, metionin és prolin), hidrofilok (aszparaginsav, glutaminsav, lizin, arginin, hisztidin) vagy semlegesek (glicin, alanin, szerin, cisztein, triptofán, tirozin, treonin, aszparagin, glutamin). A fehérjék fontosabb funkciói a következők: lehetnek enzimek, szerkezeti elemek, hírvivő, jeltovábbító

molekulák, immunglobulinok és motorfehérjék. A fehérjék elsődleges szerkezetét az őket alkotó aminosavak sorrendje határozza meg. Másodlagos szerkezetüket olyan jellegzetes struktúrák adják (mint például az α -hélix, a β -lemez), amelyek alapjai az aminosav-oldalláncok közötti kölcsönhatások. A harmadlagos szerkezetet a fehérje-molekula térbeli rendeződése jelenti. A negyedleges szerkezet alapja a különböző fehérjék asszociációja funkcionális komplexekké.

4. Nukleinsavak. Kétféle típusát ismerjük: a DNS-t, és az RNS-t. Későbbi előadásokban szerkezetükről, funkciójukról még sok szó esik majd.

A sejtalkotó makromolekulák természetével részletesebben a biokémia tantárgy foglalkozik.

A SEJTEK KÖZÖS TULAJDONSÁGAI

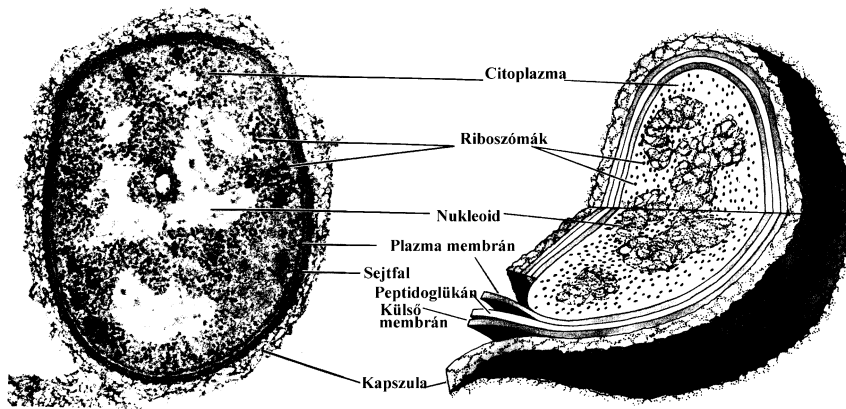
A sejt az élőlények szerveződési és funkcionális egysége. Minden élőlény sejt(ek)ből áll, és a ma ismert körülmények között sejt csak sejtől származik. Általában kicsik (térfogatuk $1-1000 \mu\text{m}^3$) – de vannak igen nagyok is, mint például a madarak tojásának „sárgája”, vagy az idegsejtek. Energiát vagy energiahordozó anyagokat használnak fel, és szelektíven vesznek fel és adnak le anyagot környezetükből és környezetükbe. A sejtek a genetikai információ kifejeződésének helyei.

A PROKARIÓTÁK

Egysejtű élőlények, a baktériumok alkotják ezt a csoportot. Nincs jól meghatározott, membránnal határolt sejtmagjuk (nevük is ezt jelenti), de egyéb, membránnal határolt sejt szervecskéik sem. Legtöbbjük szabadon él, de vannak kolóniaképzők is közöttük. Az átmérőjük kb. $2 \mu\text{m}$, tömegük 10^{-12} gramm, egy átlagos állati sejt ezrednyi része. Generációs idejük rövid: a közönséges bélbaktérium (*Escherichia coli*) 37°C -on kb. 20 percenként osztódik. Alakjuk szerint legtöbbször gömbszerűek (kokkusok), bacilusok (pálcika), spirálisan tekeredők (spirocheták) vagy görbültek (vibrió). Belső váz híján plazmamembránjukon kívül védő és egyfajta külső vázat biztosító sejtfaluk van. Minthogy a baktériumokra jellemző összetételű sejtfalnak nincs eukarióta megfelelője, a baktériumokat sejtfaluk képződésének bizonyos antibiotikumokkal történő megakadályozásával is el lehet pusztítani.

A baktériumoknak két nagy csoportja ismert: az arche- (ős-), valamint az eu- („valódi”) baktériumok (ma már tudjuk, hogy ez az elnevezés hibás: valójában az archebaktériumok nem „ősibbek”). Sőt, az archebaktériumokat az utóbbi évtizedekben az eubaktériumoktól való különbözőségük miatt teljesen külön leszármazási csoportba sorolják.

Az *eubaktériumok* (általában ezeket nevezik egyszerűen „baktérium”-nak) sejtfalát murein (peptidoglükán) alkotja, ami egyetlen, keresztbe kötött



1.7. ábra. Egy baktériumsejt szerkezete.

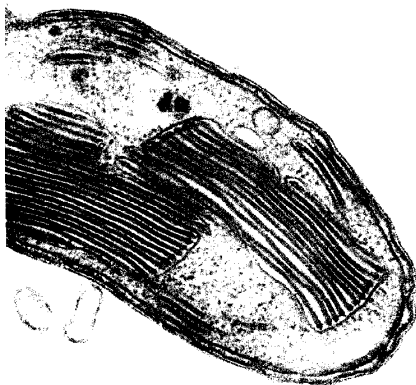
aminocukrokból képződött óriásmolekula, képződését például a penicillin gátolja. Vannak eubaktériumok, amelyek falát még védelmet biztosító nyálkás poliszacharidból álló kapszula is borítja (1.7. ábra).

Plazmamembránjuk, mint minden sejtben, elválasztja a környezettől, szabályozza az anyagáramlást. A fotoszintetizáló baktériumokban a plazmamembrán betüremkedik, réteges szerkezetet alkot, benne fotoszintetikus pigmentekkel (legtöbbször bakterio-klorofillal, a klorofill egy típusával; 1.8. ábra).

Vannak olyan baktériumfajok, amelyek ostorokkal, flagellumokkal változtatják helyüket. A flagellumok egy flagellin nevű fehérjéből állnak, mozgató szerkezetük turbinára emlékeztet (1.9. ábra) – teljesen különbözik az eukarióta csilló és ostor szerkezetétől!

A pílusok a flagellumoknál hosszabb, üreges nyúlványok, némelyik baktériumfajban a sejtek tapadását segítik egy másik baktériumhoz, például a baktériumok párosodása, a konjugáció során (vagy akár az eukarióta sejtekhez, például fertőzéskor).

A nukleoid a citoszol nukleinsavakban és fehérjékben gazdag része, a baktérium kör alakú kromoszómáját tartalmazza (az *Escherichia coli* bélbaktérium egyetlen sejtje 2 µm "hosszú" és 0,8 µm "vastag" – míg kromoszómája 0,9 mm (!) hosszú).



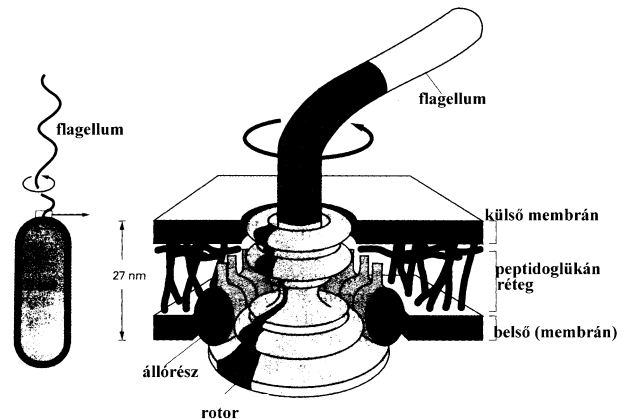
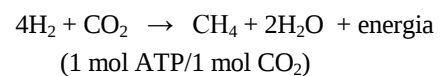
1.8. ábra. Sejthártya-betüremkedések egy cianobaktériumban.

Az archebaktériumok sejtfala nem mureinből áll, ezért penicillinre érzéketlenek. A plazmamembránjukat alkotó lipidek szerkezete teljesen eltérő, és fehérjészintézisük is különleges (emiat például

sztreptomycinre is érzéketlenek). Mindig anaerob körülmények között, nagy sótartalmú (halofilek), a szokásosnál magasabb hőmérsékletű (termofilek), vagy extrém savas közegben (acidofilek) élnek, és vannak metánképző fajaik is. A metánképző baktériumokból különösen sok él a fűevő emlősök emésztőrendszerében. Becslések szerint a szarvasmarhák emésztőrendszerében élő metánképző baktériumok évente 2 milliárd tonna metánt termelnek (a metán a CO₂

mellett az üvegház hatás fő okozója).

A metánképző archebaktériumok a következő reakció alapján termelnek energiát anaerob környezetben:



1.9. ábra. A baktérium flagellumot forgató „turbina”.

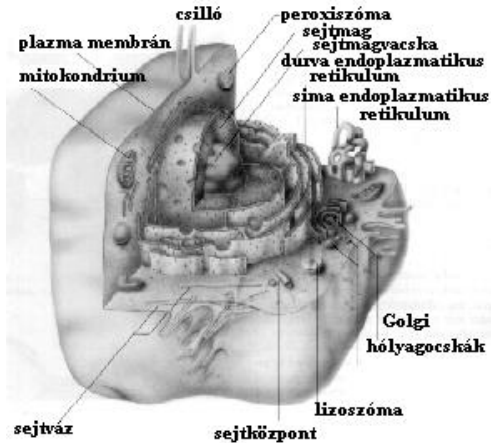
AZ EUKARIÓTÁK

Az eukarióták sejtjeiben jól elkülönülő sejtmag(vak) van(nak), és erősen jellemző a kompartmentalizáció: bennük a különféle biokémiai folyamatok térben elkülönülten zajlanak (1.10. és 1.11. ábrák). A citoplazma a sejtmag és a plazmamembrán (sejthártya) közötti állomány, részei a citoszol, amely a citoplazma folyékony komponense, és az organelumok (sejtszervecskék), melyek jellegzetes feladat elvégzésére specializálódott képződmények. A legtöbb organelumot membrán is burkolja, ezek szabályozzák a molekulák be-éskiáramlását, enzimeket tartalmaznak, védett közeget biztosítanak az adott sejtszervecskében zajló folyamatoknak.

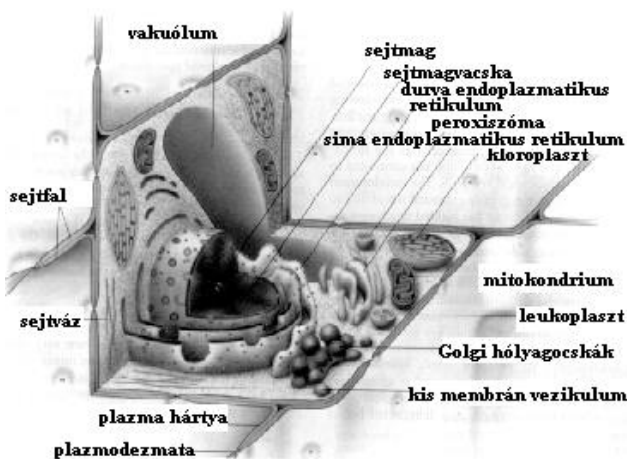
A sejtmag. Átmérője változó lehet, kb. 5-10 µm. Az örökítő anyag tárolásának, valamint az RNS-szintézisnek a legfőbb helye. A sejtmagot sejtmaghártya választja el a citoplazmától, amely kettős membrán, rajta sejtmagpórus-komplexekkel (1.12. ábra). A pórusokon át történik a sejtmag és a citoplazma közötti anyagáramlás. A pórusok átmérője „csukott” állapotban kb. 9 nm, de például a riboszóma-alegységek

kijutásakor 26 nm-esre nyílnak. A maghártya külső rétege az endoplazmatikus retikulummal folyamatos.

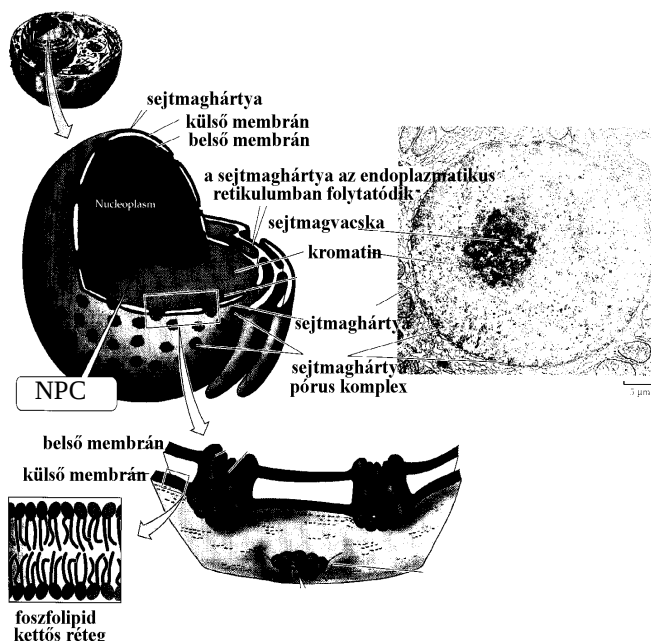
A *kromatin*, a kromoszómák anyaga a nyugalomban lévő sejtben a sejtmagot kitölti (1.12. ábra), de a sejtosztódások előtt mikroszkóppal jól látható képződményekké (úgynevezett metafázisos kromoszómákká, lásd később) szerveződik.



1.10. ábra. Egy állati sejt sematikusan.



1.11. ábra. Egy növényi sejt sematikusan.

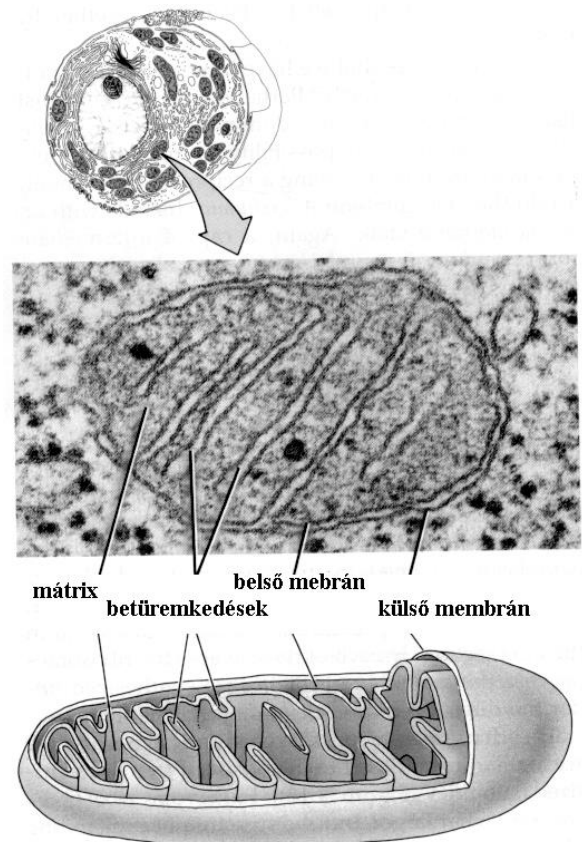


1.12. ábra. A sejtmag. NPC = sejtmagpórus- komplex.

A *sejtmagvacskák* (nukleólusz) a sejtmagon belül jól látható képződmény, száma fajonként állandó. A sejtmagvacskák a riboszómák összeszerelésének helye, a DNS rRNS-t kódoló szakaszai, rRNS (riboszomális-RNS), valamint a riboszomális fehérjék találhatóak itt.

Mitokondrium

Az energiatermelő sejt szervecskék egyike (1.13. ábra). Mérete 2-8 μm , mint sok baktériumé. Két membrán burkolja: a külső sima, a belső betüremkedik a mitokondrium belsejébe. A mitokondriumok O_2 felhasználásával a sejt lélegzés során energiát termelnek, amely ATP-ben raktározódik. A mitokondriumok száma sejtenként egy és néhány százezer között változhat. Saját DNS-ük van, egy vagy néhány kópiában. A mitokondriális DNS (mtDNA) gyűrű alakú, és sokban hasonlít a baktériumok DNS-ére. A mtDNA a mitokondriális rRNS-eket, tRNS-eket és néhány mitokondriális fehérje szintéziséhez szükséges mRNS-t kódol. Az általánosan elfogadott elmélet szerint a mitokondriumok bakteriális eredetűek, endoszimbiózis eredményeként maradtak fenn az eukarióta sejtben (az endoszimbiózis egy élőlény létezése egy másik élőlényen belül, mindkét fél hasznára.) A mitokondriumok ősei valószínűleg bíbor fotoszintetizáló baktériumok voltak (lásd 2. fejezet).



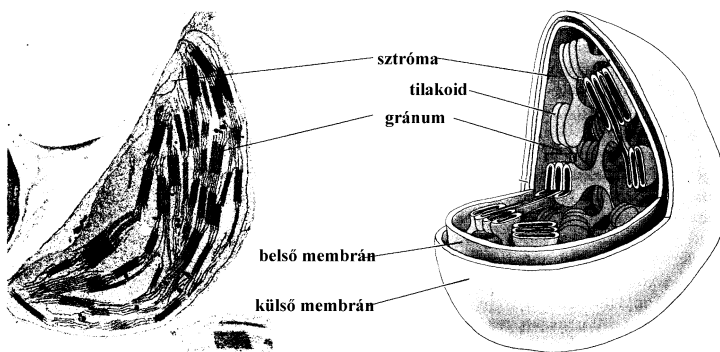
1.13. ábra. Egy mitokondrium felépítése.

Plasztiszok

A másik energiatermelő sejt szervecske, amely növényekben található (1.14. ábra). Méretük, 3-5 μm . A plasztiszok közül a zöld *kloroplasztok* a legismertebbek.

A kloroplasztokban történik a fotoszintézis. Egy sima külső membrán burkolja őket, belső membránjukról pedig pénztekerccsszerűen elrendezett zsákokcák (*tilakoidok*) fűződnek le, hasonlóképpen, mint a cianobaktériumokban (1.8. ábra). A tilakoidok tartalmazzák a fotoszintetikus pigmenteket. A kloroplasztoknak a mitokondriumokhoz hasonlóan saját DNS-ük van, szintén gyűrű alakú. A plasztisz-DNS is rRNS-ek, tRNS-ek és néhány kloroplaszt fehérjéhez szükséges mRNS szintézisét kódolja.

A kromoplasztok színesek (vörösek, narancsszínűek és sárgák). A leukoplasztok színtelenek, keményítőt vagy növényi zsírokat tárolnak. A plasztiszok, mint a mitokondriumok is, endoszimbiózis eredményeként kerültek az eukarióta sejtbe, és a cianobaktériumokból származtatják őket.



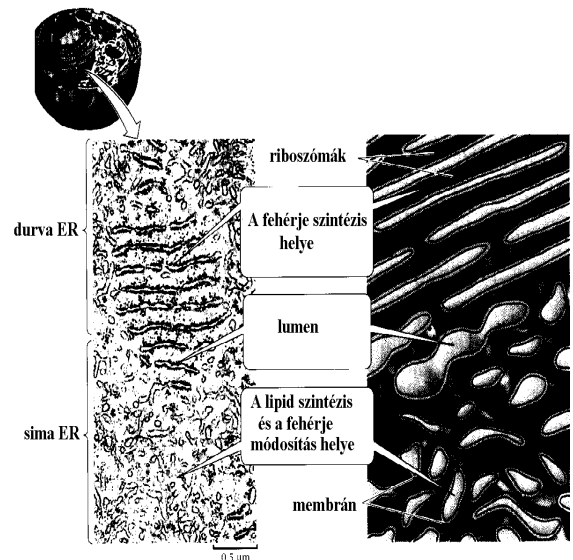
1.14. ábra. Egy kloroplaszt felépítése.

Endoplazmatikus retikulum (ER)

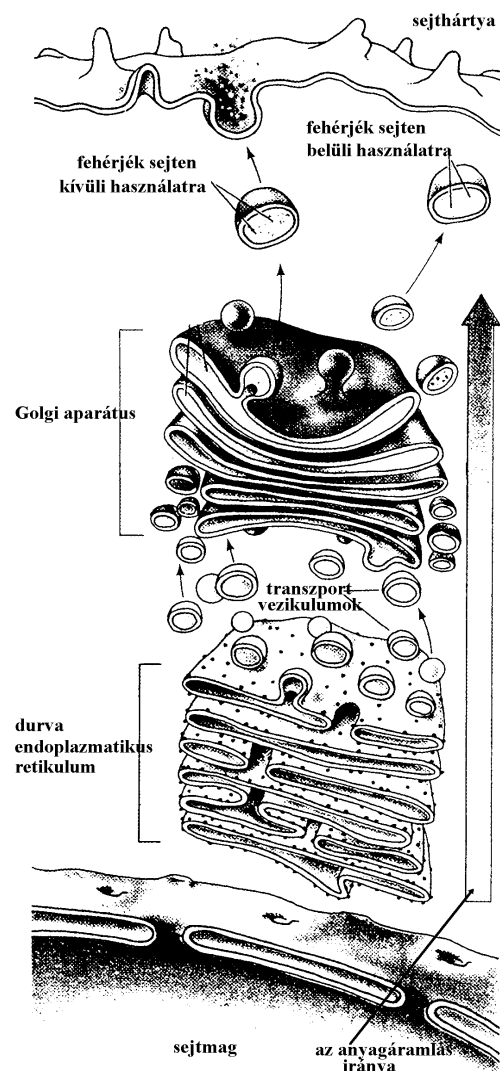
Csővek és ellaposodott zsákok összefüggő hálózata (1.15. ábra), határoló membránja a külső maghártyával folyamatos. Az úgynevezett *durva ER* (rough ER, RER) külső felszínén riboszómák ülnek (innen kapta a nevét). Olyan fehérjék szintézise történik itt, amelyek az úgynevezett szekréciós utat követik: a sejtben kívülre jutnak, vagy például beépülnek a plazma membránba (a citoszolban levő „szabad” riboszómákon olyan fehérjék szintetizálódnak, amelyek vagy a citoszolban maradnak, vagy más sejtsejtszervecskébe, például a sejtmagba vagy a mitokondriumba importálódnak). A RER-rel folyamatos, de riboszómáktól „mentes” *sima ER* (smooth ER, SER) fontos események helye: itt módosulhat sok, a RER-en képződött fehérje, itt történik a lipidek és a szteroid hormonok szintézise, és számos méregfajta itt bomlik le.

Golgi-készülék

Nevét felfedezője, Camillo Golgi nyomán kapta 1898-ban. A Golgi-készülék ER-hez közelebbi „cisz-felszíne” olyan hólyagocskákból, *vezikulákból* áll össze, amelyek az ER-ről fűződnek le. A túlsó „transz-felszín” elosztóállomás, az innen leváló vezikulák a fehérjéket a megfelelő rendeltetési helyükre – *exocitózissal* a sejtben kívülre, a plazmamembránba vagy a liszoszómákba (lásd később) szállítják. A két felszín között néhány lapos zsák, *ciszterna* található, bennük a cisz-transz irányban keresztülhaladó, a szekréciós utat követő fehérjék és lipidek intenzív módosítása zajlik (1.16. ábra).



1.15. ábra. Az endoplazmatikus retikulum.



1.16. ábra. Az endoplazmatikus retikulum, a Golgi-készülék és az exocitózis kapcsolata (az ábrán nem látszik, de az ER és a sejtmaghártya külső membránja egymással folyamatos).

Az *exocitózis* és az *endocitózis* anyagok kiválasztását illetve felvételét jelenti a környezetbe, illetve a környezetből, membrán-határolt hólyagok, vezikulák segítségével (1.16. ábra). A pinocitózis folyadék, a fagocitózis szilárd anyagok felvételét jelenti. A fagocitózis sok egysejtű lény táplálkozási módja, és soksejtűekben az immunrendszer egyes sejtjeinek fontos képessége.

Lizoszómák

A Golgi-készülékből származó, 1-3 μm átmérőjű, erősen savas (pH 4,5) beltartalmú sejt szervecskék. A lizoszómákat egyrétegű membrán burkolja. Legalább negyven különféle, savas közegben hatékony emésztőenzim van bennük. A fehérjék, nukleinsavak, lipidek és poliszacharidok bontását végzik.

A növényi sejtek általában egyetlen, óriási *vakuóluma* a lizoszóma megfelelője. Különféle anyagok vizes oldataival töltöttek, egyrétegű membránnal burkoltak. Gyakran tartalmaznak toxikus vagy kellemetlen ízű anyagokat. Növényi eredetű gyógyszereink nagy hányada a vakuólumokban raktározott anyagokból származik. Vannak tartalék-tápanyagokat raktározó vakuólumok is, és vakuólumok tartalmazzák például a szíromlevelek színanyagát.

Peroxiszómák

A peroxiszómák 0,2-1,7 μm átmérőjű, szintén egyetlen membránnal burkolt organellek. A kémiai reakciókban elkerülhetetlenül képződő toxikus peroxidokat, leggyakrabban a H_2O_2 -t bontják, és zsírbontás is zajlik bennük. A glyoxiszómák speciális peroxiszómák, a csíranövények sejt szervecskéi. Bennük alakulnak át a magban elraktározott lipidek szénhidrátokká.

Sejtváz

Olyan fehérjék együttese, amelyek (i) biztosítják a sejt alakját, (ii) a sejten belüli elmozdulásokban és (iii) magának a sejtnak a mozgásában játszanak szerepet. Alkotó molekuláik típusai, méretük és funkciójuk alapján három sejtvázalkotó ismeretes: a *mikrotubulusok*, a *mikrofilamentumok* (az aktinváz) és az *intermedier filamentumok*.

A *mikrotubulusok* 24 nm átmérőjű, hosszú, lyukas, el nem ágazó csövecskék. Egy-egy α - és β -tubulinból álló tubulin dimerekből képződnek polimerizációval. Szerepük alapvető a sejtosztódás során az úgynevezett orsófonalak kialakulásában, az idegsejtek axonjának és dendritjeinek képződésében és a bennük zajló transzportban, a csillók és az ostorok felépítésében, valamint a sejten belüli anyagtranszportban. A sejten belüli mikrotubulus-hálózat legtöbbször a *sejtközpontból*, a centroszómából indul ki.

A *mikrofilamentumok* vagy aktin filamentumok 7-8 nm átmérőjű, aktin monomerekből felépülő citoplazma-alkotók. A sejt mozgásának, alakváltozásainak fontos résztvevői. Olyan folyamatokban vesznek részt, mint az izomösszehúzódság, a citoplazma-áramlás, vagy a sejtek szétválása a sejtosztódások végén. A mikrofilamentumok nemcsak a mozgások, hanem a sejthalak stabilizálásának is fontos elemei.

Az *intermedier filamentumok* 8-12 nm átmérőjű, fehérjék polimerizációjával felépülő rostos, kötelszerű képződmények. Stabilizálják a sejt struktúráit, rugalmasságot biztosítanak, de ellenállnak a külső erőknél, elsősorban nagy szakítószilárdságuk révén. Legismertebbek a *keratinból* felépülő intermedier filamentumok. Belőlük jönnek létre például a haj, a pata vagy a bőr külső rétegének alkotói. A *laminok* a sejtmaghártyához belülről kapcsolódva rögzítik a sejtmagot. Vannak olyan intermedier filamentumok, amelyek a jellegzetes harántcsíkolt izomszerkezetet stabilizálják.

Sejtfal

Az eukariótákban is a plazmamembrán külső felszínén képződik bizonyos egysejtűekben, gombákban és növényekben. De figyelj, az állati sejteknek nincsen sejtfala! Korlátozza a víz be- és kiáramlását plazmamembránon keresztül. Növényekben elsősorban cellulóz, lignin és szuberin alkotja. A növényi sejtek között a sejtfalon átvivő plazmahidacsok, úgynevezett plazmodezmaták teremtenek kapcsolatot (1.11. ábra). A gombák sejtfalát kitin alkotja.

A többsejtű élőlények kialakulása

A valódi soksejtűek kialakulása kb. 5-600 millió éve kezdődött, a légkör oxigéntartalmának növekedését követően (1.4. ábra). A többsejtű élőlények az eukarióta egysejtűekből fejlődtek, a legvalószínűbb, ma elfogadott mechanizmus szerint egyetlen sejt utódsejtjei együtt maradtak, kolóniát képeztek, majd differenciálódtak. A sejtek közötti munkamegosztás biztosította a kolónia jó alkalmazkodó képességét. A mai is élő *Volvox* zöldalga sejtjei hasonló társulásban élnek. A soksejtűség olyan, korábban ismeretlen génfunkciók kialakulását feltételezi, mint amilyenek például a sejtek együtttartásához, kommunikációjához vagy a sejt differenciációhoz szükségesek.

ÖSSZEFOGLALÁS

A korai földi körülmények alkalmasak voltak arra, hogy szerves anyagok képződjének, szerveződjenek. Nagyon valószínű, hogy a Földön valaha élt minden élőlény egyetlen élőnek tekinthető organizmus, a progenóta leszármazottja. Az élőlények sokféleségének az örökítő anyag, a DNS változékonysága és a változó életfeltételeket képviselő természetes szelekció az alapja.

A sejt minden élőlény létezésének elemi alapegysége. A sejtek közös tulajdonsága, hogy bennük jellegzetes felépítésű makromolekulák látnak el szerkezeti, enzimatis és információt tároló feladatokat. A prokarióta sejtek egyszerűbb (de nem kevésbé hatékony!) élőlények, az eukarióták a kompartmentalizáció következtében bonyolultabb szervezethez jutottak. Mindkét sejtípus az evolúció győztese: olyan funkciók ellátására alkalmasak, amelyek kb. 4 milliárd éve biztosítják az élet folyamatosságát a változó életfeltételek közepette.

KEMOSZINTÉZIS, FOTOSZINTÉZIS, LÉGZÉS

Az élőlények létezéséhez elengedhetetlen (i) a testüket felépítő anyagok, valamint (ii) az életfolyamataikhoz szükséges energia megléte. Aszerint, hogy erre a két különböző célra milyen forrásból származik az energia, az alábbi csoportokat állíthatjuk fel. Az *autotróf* élőlények energiájukat vagy a természetben rendelkezésre álló kémiai energiából (kemoautotrófok), vagy a fényenergiából nyerik (fotoautotrófok), a testüket felépítő szerves molekulákat pedig szerves anyagokból állítják elő: a CO₂ redukciójával szénhidrátokká. A *heterotróf* élőlények az autotrófok által készített szerves anyagokat használják fel testépítő anyagnaként, energiaforrásként pedig általában szervesen vagy szerves vegyületeket (kemoheterotrófok), egyes baktériumok pedig fényenergiát (fotoheterotrófok) (2.1. táblázat).

2.1. táblázat. Az élőlények osztályozása anyag- és energiaforrásuk szerint.

Az élőlény típusa	Testépítő anyagok	Energia-forrás	Élőlény
Autotróf	CO ₂ + H	Kémiai	Baktériumok
		Fény	Baktériumok Algák Növények
Heterotróf	Szerves	Kémiai	Baktériumok Gombák Állatok
		Fény	Baktériumok

Anyagcsere a korai földi körülmények között

Az első élőlények az ósóceán szerves anyagát használták anyag- és energiaforrásként is, tehát kemoheterotrófok voltak. Mivel a Föld légkörében nem volt oxigén, az első élőlények bizonyosan anaerobok voltak. Energiájukat olyan mechanizmusokkal állíthatták elő, mint pl. a glükolízis vagy a fermentáció. A prebiotikus eredetű szerves anyagok fogytán az élőlényeknek új energia-, valamint építőanyag-forrásokat kellett találniuk.

Az aktív vulkáni tevékenység bőségesen ellátta az ősi Föld légkört CO₂-al, H₂-vel, CH₄-el és H₂S-el. Az ósóceán vizében bőven volt NH₃, CO₂, nitrátok, szulfátok és foszfátok. Kezdetben a légkör és a vizek CO₂-koncentrációja a mainak többszöröse volt. (Anaerob körülmények között a hidrogéntartalmú vegyületekből is sokkalta több volt, mint napjainkban. Ma, amikor a levegő O₂-koncentrációja 21%, az O₂-gazdag feltételek kedveznek a hidrogéntartalmú vegyületek oxidációjának). Az ósóceán szerves anyagainak fogytával azok a kemoszintetizáló élőlények élhettek tovább, amelyek szervesen forrás alapján, CO₂-ból és hidrogéntartalmú vegyületekből is képesek voltak szerves anyagokat előállítani a következő általános séma szerint:



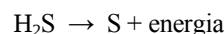
ahol H₂X a hidrogéndonor, X a hidrogént vesztett (oxidálódott) donor, CH₂O a képződő szerves vegyület jele. Ezek az autotróf élőlények kemoszintetizáltak, azaz a fenti folyamathoz szükséges **energiát** még nem fényből, hanem szintén szervesen vegyületek

oxidálásából nyerték, ahogyan erre a ma élő baktériumok között is találhatunk példákat. Ma már természetesen olyan fajok is vannak, amelyek aerob környezetben élnek.

ENERGIANYERÉS: A KEMOSZINTÉZIS

Energianyerés szervesen anyagokból, anaerob körülmények között

A mai anaerob kénbaktériumok energiatermelő folyamata olyan, mint őseiké lehetett kb. 3-4 milliárd éve, és a következő reakció szerint történik:



Az energianyerés folyamatában valószínűleg a mai baktériumok (és pl. a mitokondrium és a kloroplaszt) által is „használt” elektrontranszportlánc (lásd később) nagyon hasonló komponensek vettek részt, a sejthártya két oldalán létrejött H⁺-grádiens kiaknázásával pedig a ma ismert ATP-szintázal rokon enzim(komplex) állíthatott elő ATP-t (részletesebben lásd a mitokondrium működésének ismertetésénél). Az elektron-transzportlánc „végigvándorló” elektront itt a H₂S vette fel, protonok leadásával.

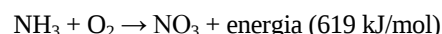
Energianyerés szervesen anyagokból, aerob körülmények között

Az aerob kemoszintetizáló baktériumfajok a légköri O₂-t használják elektronakceptorként szervesen anyagok oxidálására és így módon energia-termelésre. A legfontosabb példák a következők.

- Az aerob kénbaktérium fajok az elemi ként oxidálják:

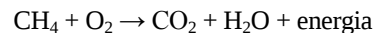


- A nitrifikáló baktériumok ammóniát oxidálnak nitrátokká:

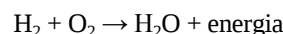


A nitrifikáló baktériumok mezőgazdasági szerepe kiemelkedő, mert hektáronként évente kb. 200 kg nitrátot készítenek. A nitrátok a növények egyedüli nitrogén forrásai.

- A metánbaktériumok metánt égetnek el, csökkentve a metán szerepét az üvegház hatásban:



- A durranógáz-baktériumok hidrogént égetve termelnek energiát:



- A működésükhöz szintén oxigént igénylő vasbaktériumok az Fe²⁺ → Fe³⁺ oxidáció során felszabaduló energiát hasznosítják. Leggyakrabban vízvezeték rendszerekből kikerülő barna lepedékként láthatjuk őket.

A kemoszintézis folyamán megtermelt energia mennyisége, bár csekély, a kemoszintetizáló baktériumoknak elegendő. A kemoszintetizáló élőlények benépesítik az olyan sötét, vagy fényesegény élettereket, amelyekben oxidálható szervesen molekulák állnak rendelkezésükre (a CO₂ mennyisége szinte sohasem korlátozza a kemoszintetizáló életét). Ismerünk olyan élőlényeket, mint pl. a *Scenedesmus* zöldalga, amely

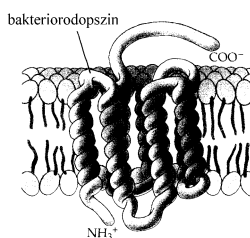
fényben fotoszintetizál, sötétben pedig úgy termeli az energiát, mint a durranógáz-baktériumok. Létezése arra utal, hogy a fotoszintetizáló élőlények a kemoszintetizálókból fejlődtek.

ENERGIANYERÉS: A FOTOSZINTÉZIS

A fotoszintézis az a biológiai folyamat, amely során az élőlények a fényből származó energiát használják fel energiaforrásként a szervesen CO_2 redukciójára (fixálására) szerves anyagokká. A fotoszintézis az evolúció óriási "találmánya": megoldás a Napból fény formájában érkező, jószerivel korlátlanul rendelkezésre álló energia hasznosítására. Közvetve a fotoszintézis teszi lehetővé az állatok létezését is: hiszen heterotrófok lévén a testüket felépítő anyagokhoz szükséges szerves táplálék a Nap energiáját használó növényekből eredeztethető. Ahogy a kemoszintézisnek, úgy a fotoszintézisnek is van egy anaerob körülmények között működő "egyszerűbb", és egy aerob körülmények között működő bonyolultabb formája.

A fotoszintézis legegyszerűbb típusa

A fotoszintézis "legegyszerűbb" típusa azokban az archeobaktériumokban folyik, amelyek magas sótartalmú helyeken élnek (halobaktériumok), és amelyek a fényenergiát az ún. bakteriorodopszinnal hasznosítják. A bakteriorodopszin egy membránba épült fehérje (2.14. ábra), nagyon hasonló az állatvilágban a fény érzékelésére használt rodopszinra. Az egyébként heterotróf (tehát CO_2 -t redukálni, fixálni nem képes) halobaktériumok a bakteriorodopszint használva állítanak elő ATP-t: a fény energiája szerkezetváltozást idéz elő a bakteriorodopszinban: protonokat pumpál ki a sejtéből, majd a sejtbe visszaáramló protonok energiája épül be ATP-be – szintén a magasabbrendűek ATP-szintázával (lásd később) rokon fehérje segítségével.



2.14. ábra. A bakteriorodopszin a halobaktériumok membránjába épült fehérje.

Anaerob fotoszintézis bakterioklorofillal

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok oxigénmentes környezetben élnek. Ma az anaerob fotoszintézis három fő típusát a zöld kénbaktériumok, a bíbor kénbaktériumok és a bíbor nemkén-baktériumok képviselik. A fotoszintetikus rendszer szerveződése nagyon hasonló a növények kloroplasztjában működő rendszerhez (lásd később). Legfontosabb fotoszintetikus pigmentjük a bakterioklorofill, amely mellett vörös és sárga karotenoidokat, ún. járulékos pigmenteket is tartalmaznak. A járulékos pigmentek olyan hullámhossz-tartományban abszorbeálnak fényenergiát, ahol a bakterioklorofill nem. Gerjesztési energiájukat átadják a bakterioklorofillnak, javítva a fényenergia-hasznosítás hatékonyságát. A pigmenteket a sejt-

hártyáról a citoszolba betüremkedő „tilakoidok” tartalmazzák (1.8. ábra).

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumoknak csak egyfajta pigmentrendszerük van – a pigmentrendszer olyan pigmentmolekulák együttese, amelyek a reakciócentrumhoz továbbítják gerjesztési energiájukat. A reakciócentrumban a bakterioklorofill található, amelyen ha a gerjesztési energiák összegződnek, egyik elektronja képes kilépni és egy speciális fehérjemolekulára kerülni át, majd továbbhalad. A tilakoidok tartalmazzák ugyanis egy fehérjéből álló elektrontranszportláncot, amely az elektron továbbítása során felszabaduló energia segítségével protonokat pumpál ki a sejtekből. A sejtbe a bakteriális ATP-szintáz csatornáján keresztül visszaáramló protonok energiája raktározódik ATP-ben.

Ezek a baktériumok nem képesek még a vízbontásra. Ezért a zöld és bíbor kénbaktériumok H_2S -ből nyerik azt az elektront, amivel pótolják a gerjesztés után a bakterioklorofillról távozó elektront. Melléktermékként elemi ként választanak ki. A bíbor nemkén-baktériumok vagy H_2 -t használnak, vagy szerves vegyületekből (pl. etanol, tejsav) nyerik az elektront és a hidrogént.

A H_2S , a H_2 vagy a szerves vegyületek bontásakor keletkező elektron pedig az elektron-transzportlánc végén NADPH-ba épül be (2.19. ábra) és a CO_2 redukciójánál hasznosul – hasonlóan a kloroplasztokban zajló fotoszintézishez (lásd alább). Ezek a baktériumok tehát már képesek a CO_2 megkötésére –nincs feltétlenül szükségük tehát szerves vegyületekre, azaz autotrófok.

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok 3,4 milliárd éve annyian éltek, hogy részlegesen lebomlott, elszennesedett maradványaikból akkora széntelepek képződtek, mint a fásszerű növényekből 3 milliárd évvel később.

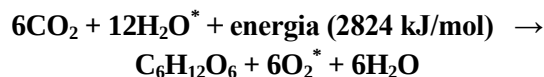
Fotoszintézis aerob körülmények között

Az aerob fotoszintézis elektronforrásként a vizet használja. A víz bontása során „melléktermékként” O_2 szabadul fel. A vízbontás képességére először a mai cianobaktériumok rokonai tettek szert 3-3,3 milliárd éve, amelyek bár anaerobok voltak és nem hasznosították a keletkező oxigént, de el tudták viselni jelenlétét.

Az O_2 megváltoztatta a Föld légkörét, klímáját. Az O_2 teremtetett lehetőséget az ózonpajzs kialakulására, így arra, hogy az élőlények a földfelszínt élettérként elfoglalják. Ma a légkör 78%-a N_2 , 21%-a O_2 , és csak 0.03%-a CO_2 (és csak nyomokban tartalmaz más alkotókat). Megnyílt az út az O_2 használatán alapuló, az eukariótákban a mitokondriumban zajló hatékony energia-termelés előtt is (lásd később)!

Elsősorban az aerob fotoszintézisre képes autotróf fajok rendkívüli elterjedése vontat ki a CO_2 döntő többségét is a légkörből. A kivont és az élőlényekbe beépült szén szerves anyagok és üledékek alkotója lett.

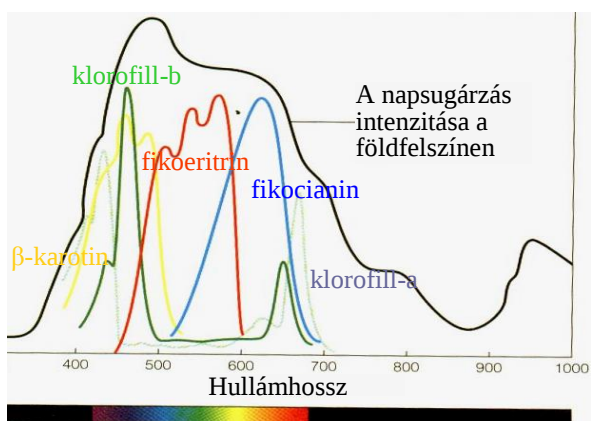
Az aerob fotoszintetizáló élőlények (a fenti anaerob fotoszintetizáló baktériumokhoz hasonlóan) a fény energiáját nemcsak ATP előállítására, hanem a CO_2 redukálására (fixálására) is felhasználják, a következő reakció szerint:



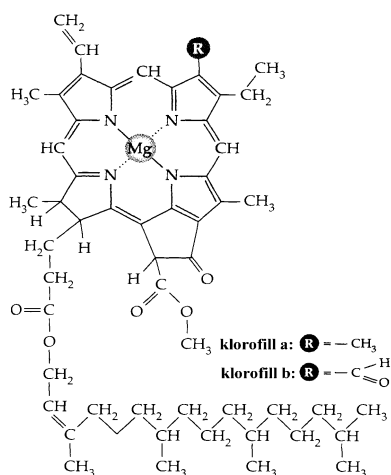
(A *-gal jelölt O_2 a víz oxigénatomjából képződik a víz fotolízise során.)

A fotoszintézis mechanizmusa a kloroplasztokban

A fotoszintézis a tilakoidokban történik (1.14. ábra), amelyek a növényekben a kloroplasztok részei. A fényt a tilakoid membránjába ágyazott fotoszintetikus pigmentek abszorbeálják (2.15. és 2.16. ábra). A klorofilok mellett ún. járulékos pigmentek, karotinok és fikobillinek is segítik a fény hasznosításának hatékonyságát (a cianobaktériumokban fikocianin, a vörös moszatokban fikoeitritin). A különböző pigmentek abszorpciós spektruma éppen lefedi a Föld felszínét elérő fény hullámhossz-tartományát. A pigmentek pigmentrendszereket alkotnak, bennük egy-egy reakciócentrummal. A reakciócentrumban lévő klorofil-a molekula egy speciális membránfehérjéhez kapcsolódik. Ez a membránfehérje veszi át a reakciócentrumból a gerjesztés hatására kilépő magasabb energiájú elektront, és biokémiai folyamatok sorozatát indítja el. A pigment-rendszereknek - összetételüknek és funkcióiknak megfelelően - két típusa van (lásd később).



2.15. ábra. A fotoszintetikus pigmentek abszorpciós spektruma.

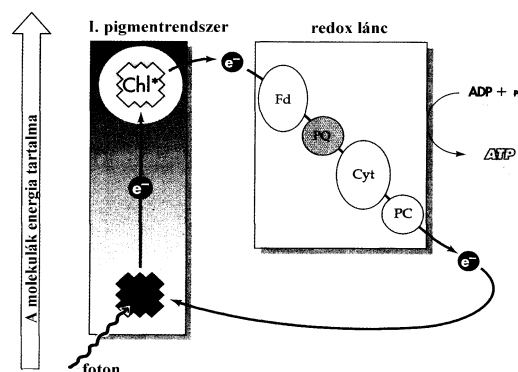


2.16. ábra. A klorofil szerkezete. A klorofilok hosszú szénhidrogén láncukkal illeszkednek a foszfolipid membrán hidrofób részébe. A klorofil gyűrűje hasonló a hemoglobin és a citokrómok hem csoportjához.

A ciklikus fotofoszforiláció

A ciklikus fotofoszforilációban csak egyetlen, az ún. I. típusú pigmentrendszer vesz részt (2.17. ábra). Ez jellemző egyes baktériumokra és bizonyos körülmények között a két pigmentrendszerrel rendelkező

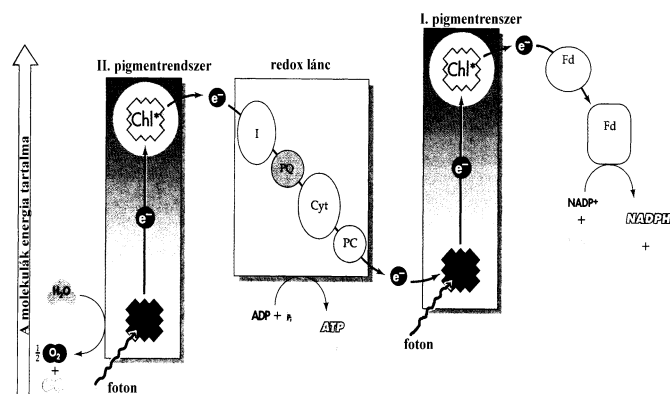
cianobaktériumokra és növényekre is. A ciklikus fotofoszforiláció során a fényenergia felhasználásával csak ATP képződik, vízbontás és NADPH-termelés nem történik. A gerjesztett klorofil elektrona (az energia hordozója) ekkor is a tilakoid-membránba ágyazott fehérjékre jut. A fehérjék egy olyan oxidációs-redukciós láncot alkotnak, ahol vándorlása közben az elektron elveszti energiáját, de végül visszajut a reakciócentrumba. Az elektron energiája protonpompákat működtet, amelyek tevékenysége nyomán a tilakoidok belsejében nő a H^+ -ion koncentrációja. A tilakoidok belsejéből a sztrómába visszaáramló protonok energiáját az ATP szintetáz alakítja át ATP-vé az $ADP + P_i + \text{energia} = \text{ATP}$ reakció folyamán (ahol P_i a szervesetlen foszfát jele).



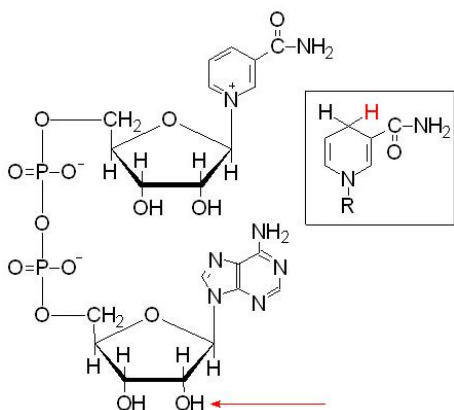
2.17. ábra. A ciklikus fotofoszforiláció során a fény energiája csak ATP-ben raktározódik (az ábrán a protonpompák és a protongrádiens nincs feltüntetve).

A nemciklikus fotofoszforiláció

A nemciklikus fotofoszforilációban két pigmentrendszer vesz részt, és nem csak ATP képződik, hanem NADPH is (2.18. ábra). Az I. pigmentrendszer elektrona nem kerül vissza a pigmentrendszerre, hanem a $NADP^+$ -t redukálja NADPH-vá (2.18. és 2.19. ábra). Az "elvesztett" elektront a II. pigmentrendszerből származó elektron pótolja, amely a vízbontás során képződő hidrogénből származik (2.18. ábra), az O_2 pedig - mint melléktermék - kiválik. Az újabb elektron kiválásához és vándorlásához szükséges energiát mindig a pigmentek által elnyelt fényenergia biztosítja. Végeredményben tehát a II. pigmentrendszer kialakulása és a nemciklikus fotofoszforilációval járó vízbontás és O_2 -képződés miatt változott meg a Föld arculata.



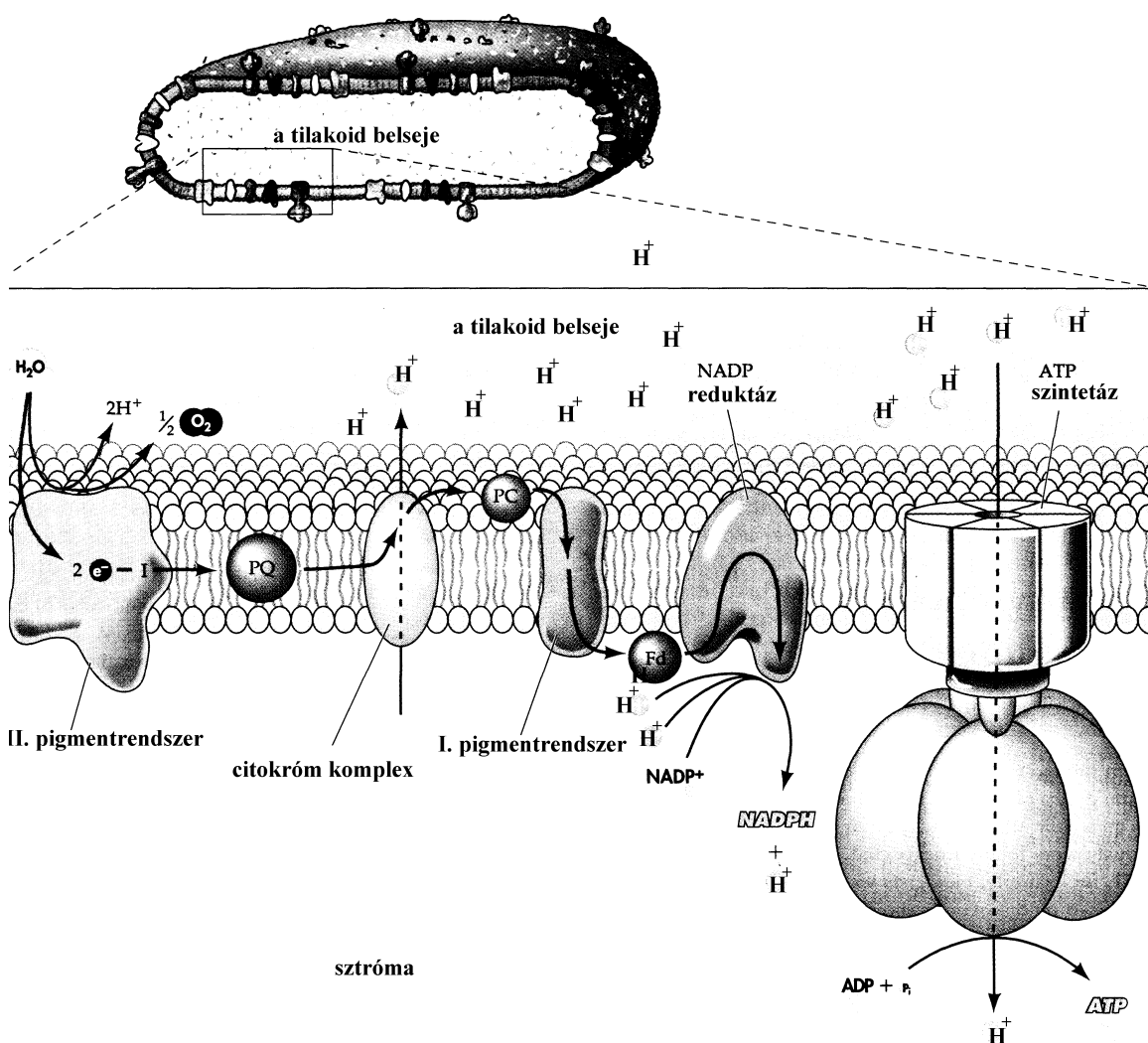
2.18. ábra. A nemciklikus fotofoszforiláció eredményeként a fény energiája ATP-ben és NADPH-ban raktározódik, melléktermékként pedig O_2 képződik (a kialakult protongrádiens itt nincs feltüntetve).



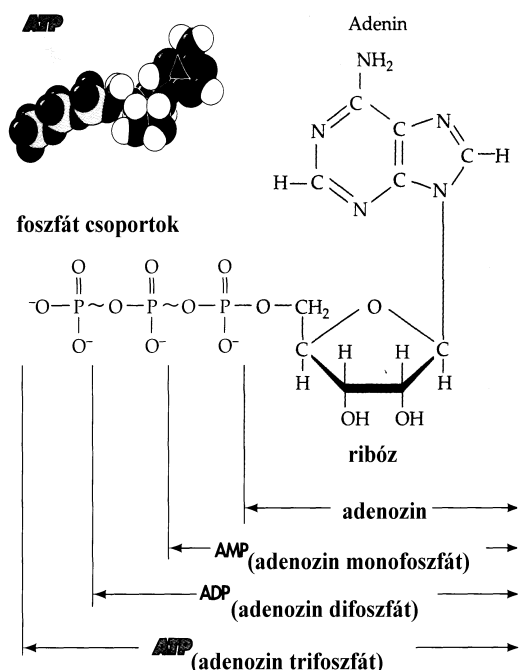
2.19. ábra. A NAD^+ (nikotinamid dinukleotid) szerkezete. A bekeretezett rész a redukált (NADH) formát ábrázolja. A NAD^+ -ban a $\leftarrow$ nyíllal jelölt helyen foszfátcsoport van. Az elektronfelvétel során keletkező NADH és a NADPH a legfontosabb és leghatékonyabb elektrondonorok a biokémiai reakciókban. A NADH többnyire a bontó, a NADPH az építő reakciók résztvevője.

Az ATP-képződés strukturális alapjai

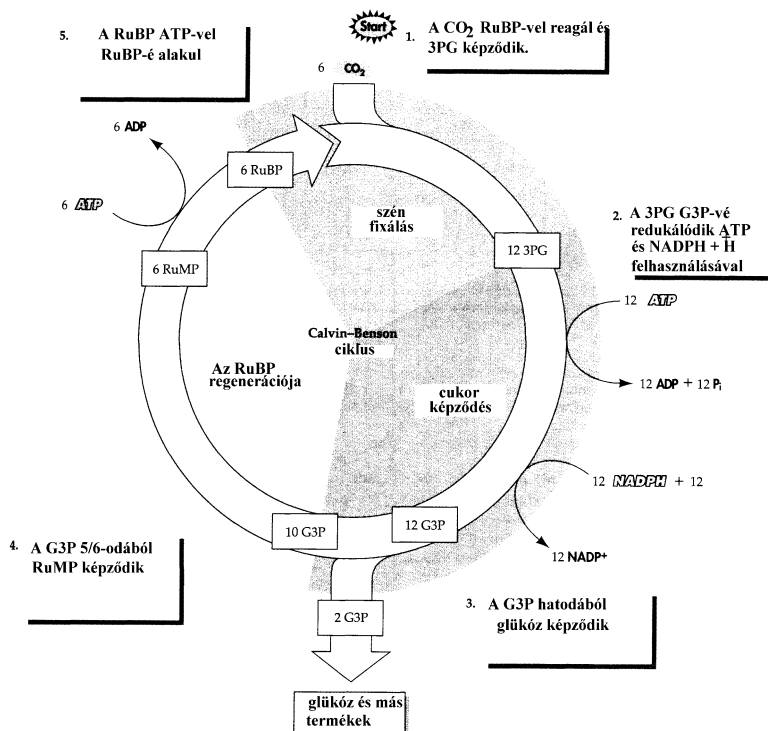
A víz bontása a tilakoid belsejében történik (2.20. ábra). Az elektron a II. pigmentrendszert elhagyva a membránba épült elektrontranszportláncon át az I. pigmentrendszerre jut. Mindeközben a citokróm-komplex - az elektron által leadott energia „költségén” - protonokat pumpál a sztrómából a tilakoid belsejébe. Az elektron az I. pigmentrendszer által hasznosított fényből nyert energia segítségével ismét magasabb energiaállapotba kerül, így képessé válik arra, hogy végül a nehezen redukálható NADP^+ -re jutva azt NADPH -vá redukálja. A fotoszintézis fényreakciói során a tilakoid belsejében tehát protonok halmozódnak fel (csökken a pH). A protonok, koncentrációjukat kiegyenlítő, a tilakoid belsejéből a sztrómába igyekeznek. Útjuk csak a tilakoidmembránba épült csatornán át vezethet. A csatorna az ATP-szintetáz része - egy olyan enzimkomplexé, amely a protonok áramlásából származó energiát ATP-be építi (2.20. és 2.21. ábra).



2.20. ábra. A kloroplasztokban (a mitokondriumhoz hasonlóan –lásd később) az ATP az ún. kemiozmotikus mechanizmus szerint képződik: a protonok koncentráció-grádiensében rejlő energia révén.



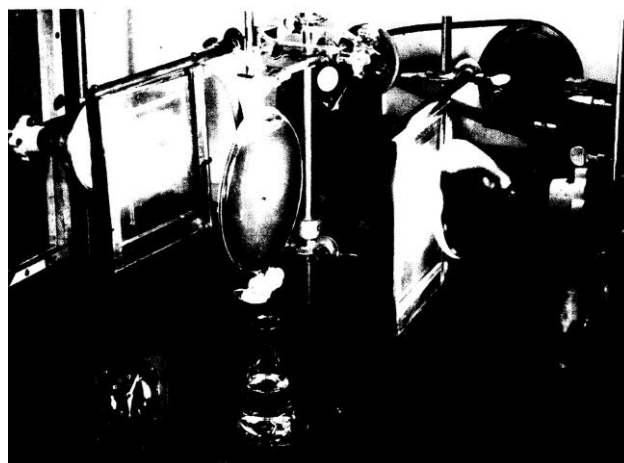
2.21. ábra. ATP.



2.22. ábra. A Calvin-Benson ciklus sematikus ábrázolása.

A fotoszintézis biokémiája: A Calvin-Benson ciklus

A nemciklikus fotofoszforiláció során a kloroplasztok sztrómájában tehát ATP és NADPH halmozódik fel, olyan molekulák, amelyek energiatartalma magas - és amelyek szükségesek a CO_2 redukciójához. A CO_2 redukciója és a szerves anyagok szintézise a fotoszintézis „sötét”, fényt nem igénylő reakciója, az ún. Calvin-Benson ciklus során történik (2.22. ábra). A folyamat részleteit kiderítendő, Melvin Calvin, Andrew Benson és munkatársaik egy vékony üvegpalackba fotoszintetizáló algákat tettek. A palackba a szén sugárzó izotópját tartalmazó $^{14}\text{CO}_2$ -t vezettek (2.23. ábra). A palackot erős fénnel világították meg, hogy elkezdődjön a fotoszintézis. A palackból mintát engedtek forró alkoholba, hogy leállítsák a fotoszintézist és hogy kioldják a fotoszintézis termékeit. A minta komponenseit papírkromatográfiával elválasztották és autoradiográfiával tették láthatóvá. Amint azt a 2.24. ábra mutatja, a ^{14}C már 30 másodperc múltán sokféle szerves anyagnak volt alkotója. Az első radioaktívan jelölt anyag a 3-foszfoglicerinaldehid (PGA). A Calvin-Benson ciklus részleteivel a biokémia tantárgy foglalkozik. Itt csupán azt hangsúlyozzuk, hogy a Calvin-Benson ciklusban a fotoszintézis fényreakcióiban megtermelt ATP és NADPH felhasználásával PGA keletkezik, amelyből glükóz és más olyan szerves anyagok képződnek, amelyekből (i) a fotoszintetizáló élőlények felépítik testüket és (ii) fotoszintetizárra nem képes sejtjeik is (mitokondriumukban) energiát nyerhetnek. Lényegében a fotoszintetizáló (fotoautotróf) élőlények által előállított szerves anyagok adják minden heterotróf élőlény életének az alapját.



2.23. ábra. Berendezés a fotoszintézis sötét reakcióinak tanulmányozásához.



2.24. ábra. A fotoszintézis termékeinek azonosítása papírkromatográfiával és autoradiográfiával.

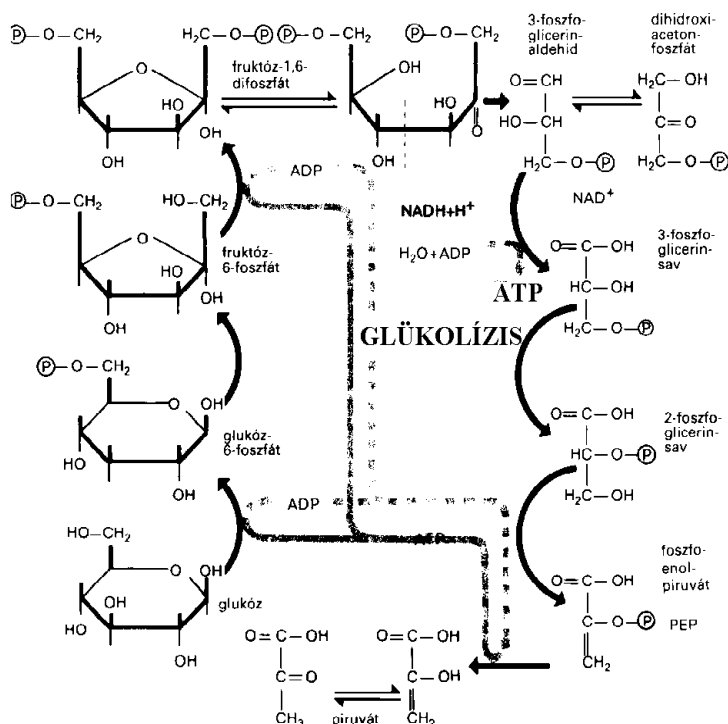
ENERGIATERMELÉS SZERVES ANYAGOK BONTÁSÁVAL

A sejtek a glükózban (vagy más szerves anyagban) raktározott energiát a körülményektől függően vagy (1) a glükolízis és a fermentáció, vagy (2) a glükolízis és a sejtlegzés folyamán szabadítják fel.

Ezekben az energiatermelő folyamatokban lényegében a szerves anyagok oxidációja következik be. Az energiatermelés apró, egymáshoz kapcsolódó enzimatis lépésekből áll. A szerves anyagok oxidációja nyomán felszabaduló energia végül ATP-ben raktározódik - ugyanis az ATP-ben raktározott energia az egyik legkönnyebben hozzáférhető az éppen zajló életfolyamatok számára. Hosszabb távra az élőlények makromolekulákban tárolnak energiát. A fontosabb szerves vegyületek energiatartalma a következő: a szénhidrátoké 17,2, a fehérjéké 17,2, a zsíroké 39,9 kJ/g (vagy 4,1, 4,1 és 9,3 kcal/g). Természetesen a hosszútávú energiaraktározók energiatartalma visszaalakítható ATP-be.

Glükolízis

A glükolízis (a glükóz bontása) a szerves vegyületekből történő energia-felszabadító mechanizmusok legősibbiké, a citoszolban történik. A glükolízis során a glükóz csak részlegesen bomlik le: egy glükóz molekulából két piruvát (piruvát) molekula képződik, valamint NADH és két ATP (2.25. ábra). A glükolízis lényegében előkészítő lépés vagy a fermentációra, vagy a sejtlegzésre. Energiahozama csekély, mindössze 586 kJ/mol. (A glükolízis részleteivel a biokémia tantárgy foglalkozik.)



2.25. ábra. A glükolízis lépései.

Fermentáció

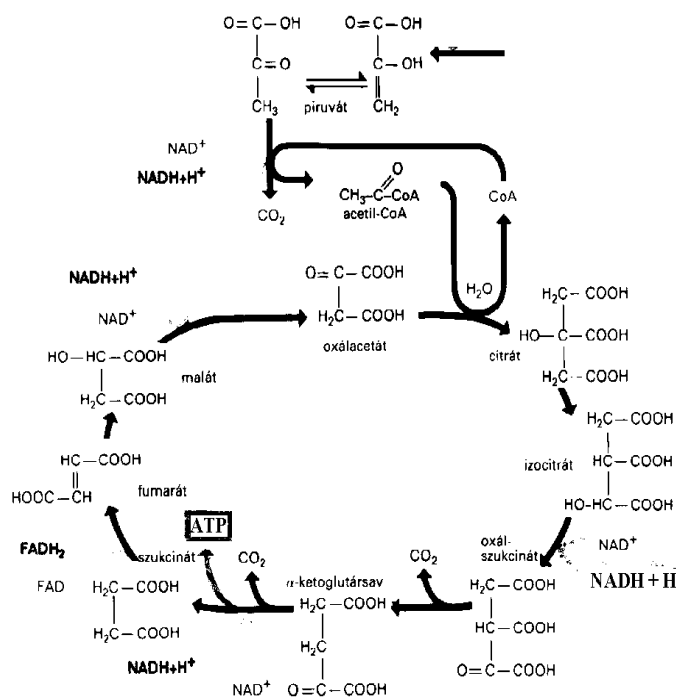
Anaerob, vagy csak kevés oxigént tartalmazó környezetben (munkavégzés során a vázizmokban is) a glükolízis a legfontosabb energiatermelő folyamat. Az élesztőkben a glükolízis folyamán képződő piruvát a citoszolban etanollá fermentálódik, erjed. A piruvátból CO_2 hasad ki és acetaldehid képződik, az acetaldehid NADH felhasználásával etilalkohollá redukálódik, miközben NAD^+ képződik. A vázizmokban az erjedés végterméke a tejsav és a NAD^+ (a tejsavtól érzünk izomlázatot).

A piruvát átalakulása alkohollá vagy tejsavvá az erjedés során nem jár további energia felszabadulásával, csupán úgy hangolja át a sejtanyagcserét, hogy a glükolízis intenzitása az aerob körülmények közöttinek tízszeresére fokozódik. Végeredményben tehát a glükolízis a fermentációval kiegészítve mégis jelentős mennyiségű energia felszabadulásával járhat. Ám a glükolízis és a fermentáció végtermékei még mindig energiában gazdag vegyületek.

A vázizomsejtekkel szemben a legtöbb sejtfeleségből hiányzik az az enzimszisztéma, amely a fermentációhoz szükséges. Következésképpen sejtjeink nagyon érzékenyek az oxigén hiányára - oxigén hiányában elsőként éppen az idegsejtek halnak el.

Sejtlegzés

A sejtlegzés során összességében energia szabadul fel, miközben a szerves anyagokból származó hidrogén a légköri oxigénnel egyesül, valamint CO_2 és H_2O képződik. A reakció ilyen tekintetben a fordítottja annak, amellyel a fotoszintézis tanulmányozása során megismerkedtünk. A sejtlegzés során felszabaduló energia ATP-ben raktározódik. Hogyan képződik ATP a sejtlegzés folyamán?

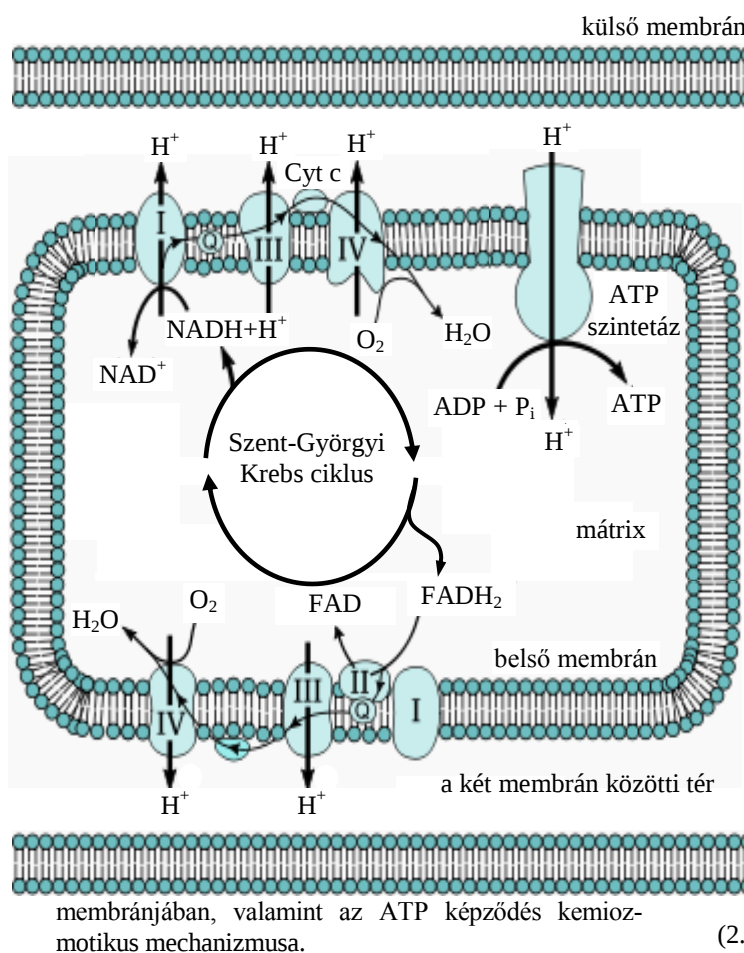


2.26. ábra. A Szent-Györgyi-Krebs ciklus lépései.

A glükolízis eredményeként képződő piruvát a mitokondriumokba jut, ahol az ún. Szent-Györgyi-Krebs (citromsav, trikarbonsav) ciklusban, egymást követő enzimatis lépések során fokozatosan bomlik le, miközben CO_2 hasad ki és NADH képződik (2.26. ábra.) (A Szent-Györgyi-Krebs ciklussal részletesen a biokémia foglalkozik.)

A Szent-Györgyi-Krebs ciklus a mitokondriumok belsejében (a mátrixban) zajlik. A ciklusban résztvevő csaknem minden enzim a mátrix része. A képződő NADH az elektronját a mitokondrium belső membránjába beágyazott elektrontranszportlánc, az ún. légzési lánc első tagjának, a NADH-Q reduktnak adja át (2.27. ábra). Az elektron tovább „csorog” az oxidációs-redukciós elemekből álló légzési láncban, egészen az O_2 -ig, a rendszer legerősebb oxidáló eleméig (2.27. ábra). Az O_2 átveszi az elektronokat, majd protonokat vesz fel a mátrixból, és közben vízzé alakul. Megjegyzendő, hogy az O_2 általában bőségesen rendelkezésre áll. A végtermék víz nem toxikus, könnyen eltávolítható, mint ahogy a CO_2 is.

2.27. ábra. A légzési lánc a mitokondrium belső



Az ATP-képződés strukturális alapjai

A légzési lánc elemei, miközben elektronokat továbbítanak, a kis „csomagokban” felszabaduló energia révén protont pumpálnak a mitokondrium belső membránján át a mitokondrium belsejéből a két membrán közötti térbe (2.27. ábra). A légzési lánc működésének eredményeként csökken a mitokondrium

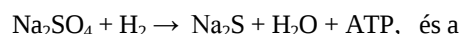
két membránja közötti tér pH-ja. Az ún. kemiozmotikus modell értelmében (Peter Mitchell, 1961) a protonok a mitokondrium belsejébe igyekeznek visszadiffundálni. A protonok diffúziója egy olyan csatornán keresztül valósul meg, amely a belső mitokondriális membránba ágyazott ATP-szintetáz enzimkomplex része. Az ATP-szintetáz a protonáramlás energiájával az $\text{ADP} + \text{P}_i = \text{ATP}$ reakcióban ATP-t szintetizál. A folyamatot oxidatív foszforilációnak is nevezik, hiszen oxigén jelenlétében foszforilálódik az ADP.

A mitokondriumok belső membránjában vannak olyan hőmérsékletre érzékeny, nyitható/zárható csatornácskák is, amelyeken a protonok az ATP-szintetáz csatornájának megkerülésével juthatnak be a mitokondriumok belsejébe. Az ilyen „menedékcsoportok” átáramló protonok energiája hővé alakul. A termogénin nevű fehérje által alkotott „menedékcsoportok” állapotokban elsősorban az ún. barna zsírszövet sejtjeiben gyakoriak, és a hőgazdálkodás fontos tényezői. Bizonyos esetekben a kóros elhízás kapcsolatban van a „menedékcsoportok” genetikailag hibás funkciójával.]

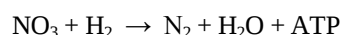
A Szent-Györgyi-Krebs ciklus és az aerob légzés sok baktériumfaj sejtjeiben is zajlik, és ATP is képződik, annak ellenére, hogy a baktériumokban természetesen nincsenek mitokondriumok. Az aerob légzéssel energiát termelő baktériumok sejthártyája nagyon hasonlít, és úgy is működik, mint a mitokondriumok belső membránja.

Vannak anaerob körülmények között élő, és mégis oxigént redukáló baktériumok is. Ők nem az O_2 -re, hanem kémiai kötött oxigénre továbbítják elektronjaikat. Példaként említjük

- a szulfátredukáló baktériumokat



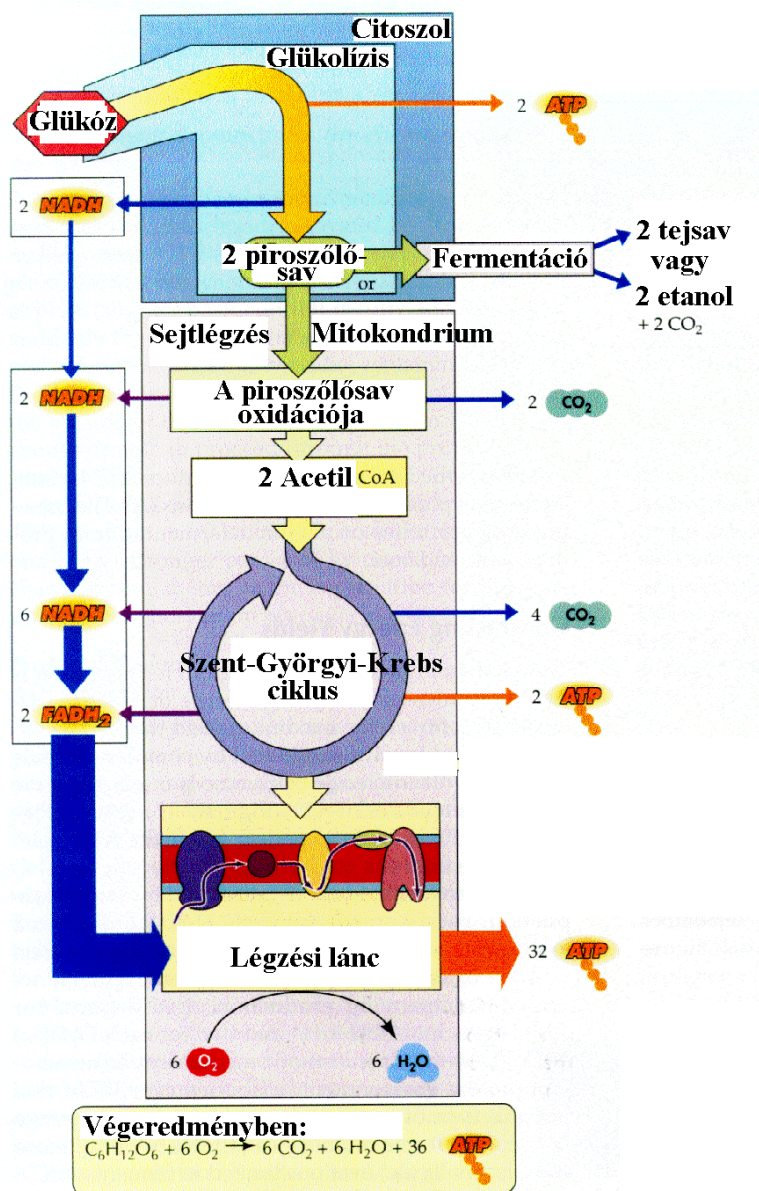
- a denitrifikáló baktériumokat



A denitrifikáló baktériumok a termőtalaj nitráttartalmát használják el, amely a növények egyetlen nitrogénforrása, komoly károkat okozva a mezőgazdaságnak. Az anaerob denitrifikáló baktériumok legnagyobb ellensége a szántás...

A sejtek energiagazdálkodásának hatékonysága

Egy mól glükóz elégetése során (O_2 -ben) 2880 kJ energia képződik. A glükóznak a sejtjeinkben történő elégetése folyamán az általános elképzelések szerint elméletileg 38 ATP molekula képződhet: 2 a glükolízis, 2 a Szent-Györgyi-Krebs ciklus és 34 az oxidatív foszforiláció során (2.28. ábra). A valóságban ez soha nem teljesül a folyamat „költségei” (pl. a piruvátot be kell juttatni a mitokondrium mátrixába), a belső membrán igen alacsony, de létező proton-áteresztőképessége és az egyes részfolyamatok nem 100%-os hatékonysága miatt. A valóságban maximum ~30 ATP keletkezhet egy glükózból a glükolízis és a sejtlégzés során.



2.28. ábra. A glükózbontás lépéseinek sematikus ábrázolása, különös tekintettel az ATP képződésére.

anyagok bontásával és oxidatív foszforilációjával nyerik. Ily módon a heterotróf élőlények közvetve szintén a Nap energiáját hasznosítják életjelenségeikhez.

Akár közvetlenül fényenergiát (fotoszintézis), akár szerves anyagokban lévő kémiai kötések bomlását (oxidatív foszforiláció) használítja a sejt, az energia ATP-be történő építése leghatékonyabban protongrádiens kialakításával és a protonok membránba ágyazott ATP-szintetázon történő átáramlásával kapcsolatos. A sejtek számára elegendő mértékű energiatermelés tehát nem létezik erre specializálódott membránok nélkül!!

ÖSSZEFOGLALÁS

Az autotróf élőlények energiájukat szerves anyagok oxidációja során vagy fényenergiából nyerik, amely magasabb energiaállapotú elektront, és annak „átadogatásával” protongrádiens eredményez. Az autotróf élőlények az életfolyamataikhoz szükséges alapanyagokat is képesek szerves anyagokból előállítani. Azért nincs szükségük szerves anyagokra, mert az általuk előállított energia egy részét képesek a CO₂ megkötésére, szerves anyagokká történő redukálására is felhasználni.

A cianobaktériumok és a növények a víz fotolíziséből pótolják a fotoszintézisük során elvesztett elektront. A fotolízis „mellékterméke” az O₂, amely egyben a fotoszintézisre nem képes aerob állati és növényi sejtekben a sejtlégzés, az oxidatív foszforiláció alapja.

A heterotróf élőlények testük anyagaihoz az autotrófok (döntő többségükben a fotoszintetizáló növények) által előállított szerves anyagokat használják fel. Energiájukat pedig - egyes fotoszintetizáló heterotróf baktériumok kivételével - szintén az autotrófok által termelt szerves

3. DNS, GÉN, GENOM, KROMOSZÓMÁK.

Minden élőlény örökítő anyaga DNS. A DNS és a genom szerkezete, a DNS szekvenálása. Kromatin, a kromoszómák szerveződése. Kariotípus.

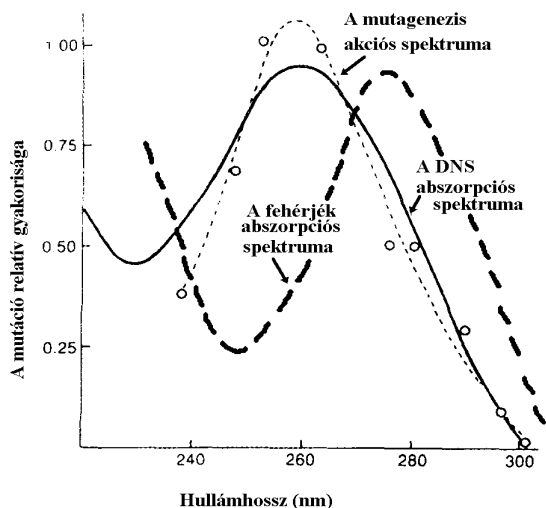
A fejezetet Szabad János egyetemi tanár írta, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

Az örökítő anyag jelentőségén, kimutatásán csak a 19. század végén kezdtek gondolni a kutatók. Az örökítő anyagnak négy fontos ismérve van: (1) a **replikáció** (másolódás) képessége, (2) a **funkció**, amellyel meghatározza az élőlények öröklődő tulajdonságait, szabályozza a sejtek működését, (3) a **mutáció** (változás) képessége, valamint (4) biztosítania kell az élővilág **komplexitását**, sokféleségét is. A 20. század első felében vált nyilvánvalóvá, hogy az örökítő anyag része az addigra már ismert sejtmagi szerkezeteknek, a kromoszómáknak - azaz a kromatinnak, ami DNS és fehérjék együttese. Vajon a DNS vagy a fehérje az örökítő anyag? Az 1930-as években, amikor már ismert volt a fehérjék sokfélesége, a DNS szerkezetét viszont nem ismerték, a DNS túl egyszerűnek tűnt. P. A. Levene szerint a DNS-ben az A:T:C:G bázisok aránya 1:1:1:1, és a DNS valójában négy egységből álló tetranukleotid. Levene szerint ezért csak $4^4 = 256$ féle DNS létezhet. Nem meglepő, hogy az 1940-es évekig általános volt a tévhit: a fehérje az örökítő anyag.

A DNS az örökítő anyag

A következőkben négy kísérlettel ismerkedünk meg, amelyek az örökítő anyag különböző ismérvei alapján bizonyítják, hogy a DNS az örökítő anyag.

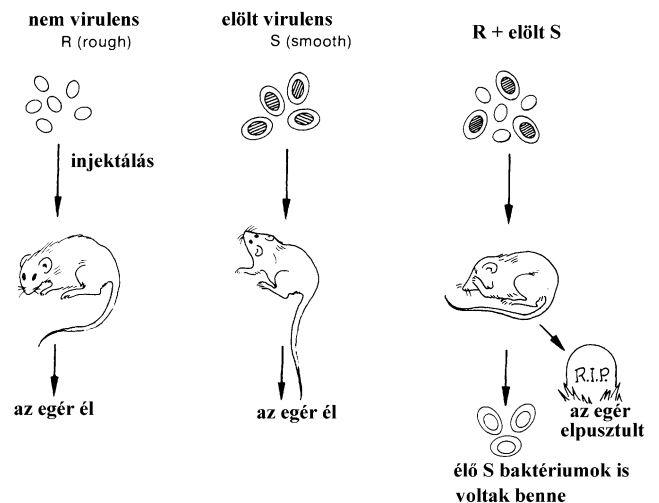


3.1. ábra. A mutációk indukciójának akció spektruma a DNS abszorpció spektrumára hasonlít.

1. Lewis J. Stadler és Fred M. Uber (1942) kukorica virágporaszemeket sugárzott be különböző hullámhosszúságú ultraibolya (UV) sugárzással. Az UV a mutációk indukciójára képes *mutagének* egyike. Stadler és Uber a besugárzott polleneket kukoricák bibéjére

kente, majd a mutáns kukoricaszemek gyakoriságát vizsgálta. Azt tapasztalták, hogy az indukált mutációk akció spektruma nagyon hasonlított a DNS abszorpció spektrumára: a két spektrum maximuma 260 nm-nél egybeesett (3.1. ábra). Minthogy a fehérjék abszorpció spektruma 280 nm-nél van, Stadler és Uber arra következtetett, hogy a DNS az örökítő anyag, és nem a fehérje. Kritikusai szerint valójában a DNS elnyeli az energiát, átadja a fehérje-molekuláknak, amelyek megváltoznak. A megváltozott (mutáns) jelleg szerintük ezért valójában a fehérjék megváltozásával kapcsolatos.

2. A következő híres kísérlet-sorozat azzal kezdődött, mikor Frederick Griffith 1928-ban figyelmes lett egy érdekes jelenségre. Amikor a *Streptococcus pneumoniae* baktériumok R (Rough) típusú (mutáns) sejtjeit egerekbe fecskendezte, az egerek egészségesek maradtak (4.2. ábra). Az S (Smooth) variánsból az egerek megbetegedtek, majd elpusztultak. Az R és az S variáns baktériumok Petri-csészében, alkalmas táptalajon tenyésztethetők, telepeket képeznek. Amint várható, az elölt S baktériumoktól nem betegedtek meg az egerek. Griffith meglepetésére azonban az egerek elpusztultak, miután egyszerre injektált beléjük élő R és elölt S baktériumokat. Az elpusztult egerekből izolált élő baktériumok között az R variánsok mellett S-ek is voltak (3.2. ábra). Vagyis az elölt S baktériumok anyagai között volt olyan, amely az R baktériumokat S-é alakította át, **transzformálta**. Vajon mi volt a transzformáló tényező?

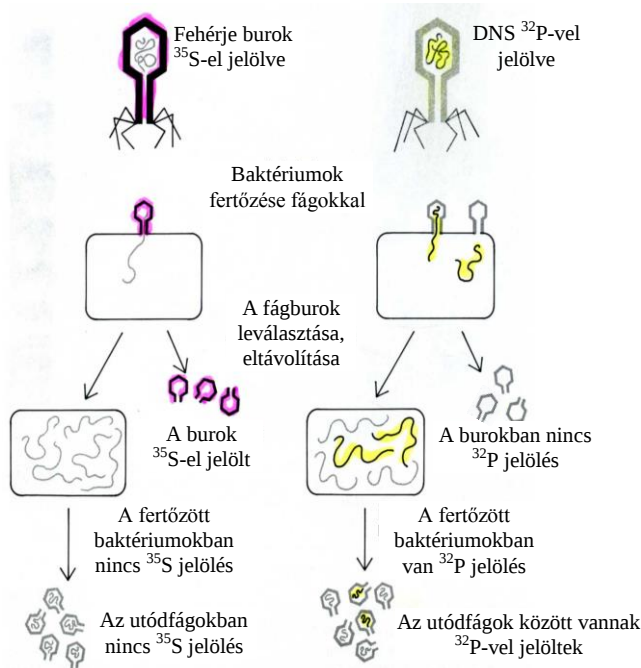


3.2. ábra. Griffith transzformációs kísérletei.

Griffith rendszere ideális: a baktériumok R vagy S jellege táptalajon növesztés után, mikroszkópban vizsgálva eldönthető, a transzformáció pedig kémcsőben is elvégezhető. A transzformáló anyag természetére vonatkozó kísérleteket később mások folytatták: Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod és Maclyn McCarty közölte 1944-ben, hogy az S variáns különféle alkotói közül (fehérje, lipid, szénhidrát, RNS és DNS) csak a DNS okozott transzformációt. A DNS-t bontó enzimmel folytatott emésztés után megszűnt a DNS transzformáló képessége. Tehát a DNS az S tulajdonság meghatározója, az örökítő anyag.

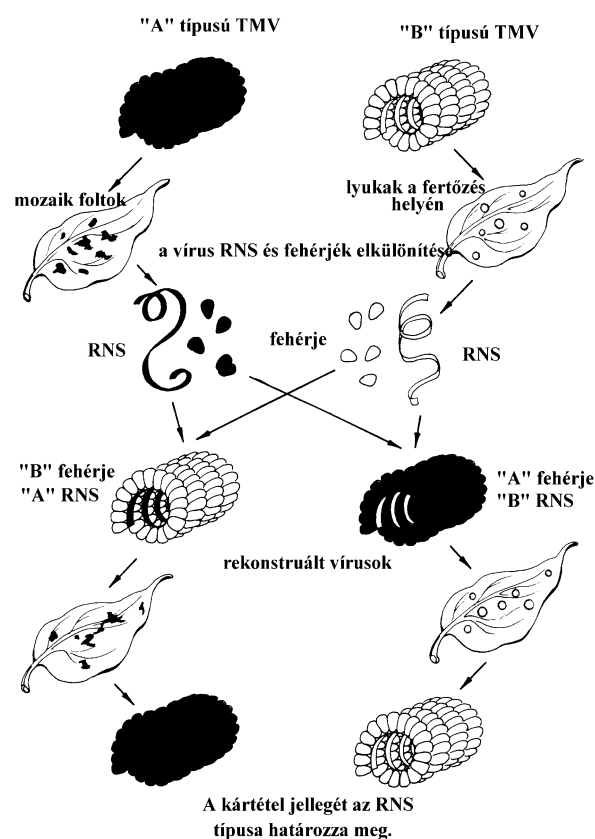
Avery és munkatársai azt is megmutatták, hogy az általuk izolált DNS-molekula súlya akár 500.000 Dalton (Da) is lehet. (1Da = egy hidrogén atom tömege.) Kiszámítható, hogy ilyen súlyú DNS-t kb. 1600 nukleotid alkot. Az 1600 nukleotidból álló DNS-molekula elvileg $4^{1600} = 10^{960}$ -féle lehet, így nagyon sokféle fehérje képződését kódolhatja (ma már tudjuk: ráadásul amellet, hogy a 10^{960} nagyon nagy szám, az 1600 bázispár alig több mint egy átlagos baktériumgén hossza...). Végeredményben tehát a DNS *elég komplex* lehet ahhoz, hogy bármely élőlény genetikai információját kódolja. Kritikusai szerint Averyék DNS-preparátumai nem voltak elég tiszták...

3. Alfred D. Hershey és Martha Chase (1952) az örökítő anyag *replikációja* alapján bizonyította, hogy a DNS az örökítő anyag. Olyan T2 fággal (bakteriális vírussal) fertőztek *E. coli* sejteket, amelyeknek vagy a fehérjeburka (^{35}S tartalmú aminosavakkal) vagy a DNS-e (^{32}P -vel) volt megjelölve (3.3. ábra). Külön-külön kísérletben követték a radioaktív jelölés sorsát. A baktériumokat összekeverték a jelzett fágokkal. Vártak néhány percet, majd erős keveréssel leválasztották a fágokat a baktériumokról. Centrifugálással leüleptették a baktériumokat. A fágok burkai a felülészóban maradtak. Amíg a ^{35}S a felülészóban maradt (a fágburokban), a ^{32}P -jelölés az üledékben (azaz a baktériumokban) volt jelen. Hershey és Chase a fertőzött baktériumokból kiszabaduló fágokat is megvizsgálta. A fágok nem tartalmaztak ^{35}S jelölést, ellenben a ^{32}P jelölés csaknem teljes egészében jelen volt az utód-fágokban (3.3. ábra). Hershey és Chase kísérleti eredményei alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a fág-DNS az, ami bejutott a baktériumokba, ott replikálódott és bekerült az utódokba is - vagyis a DNS az örökítő anyag.



3.3. ábra. A Hershey és Chase kísérlet sematikus ábrázolása.

4. Heinz Fraenkel-Conrat és Bea Singer (az 1950-es években) az örökítő anyag *funkciójának* vizsgálata alapján bizonyította, hogy nukleinsav természetű molekula lehet örökítő anyag. A dohány mozaikvírus (TMV) A variánsának fertőzése miatt a leveleken kis foltokban elhalnak a sejtek és barna foltok képződnek (3.4. ábra). A B variáns fertőzése miatt a leveleken kis lyukak képződnek. A TMV RNS-e (örökítő anyaga) és a burkoló fehérjék kényelmesen elválaszthatóak. Összekeverve az RNS a fehérjékkel fertőzőképes vírusokká áll össze. Az A RNS-t B fehérjékkel kombinálva olyan vírusok képződtek, amelyek a leveleken barna foltokat alakítottak ki. A B RNS-ből és az A fehérjékből álló vírusok fertőzése nyomán lyukak képződtek (3.4. ábra). Eredményeik alapján Fraenkel-Conrat és Singer arra következtetett, hogy a vírusok funkcióját nem a fehérjék, hanem (ebben az esetben) az RNS-ek határozzák meg. Tehát a nukleinsav az örökítő anyag.

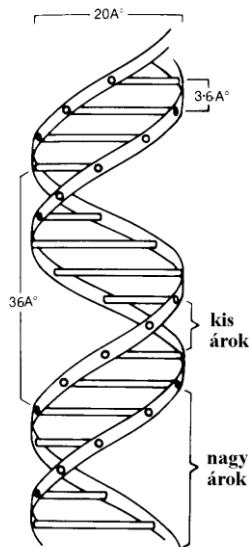


3.4. ábra. A Fraenkel-Conrat és Singer kísérlet sematikus ábrázolása.

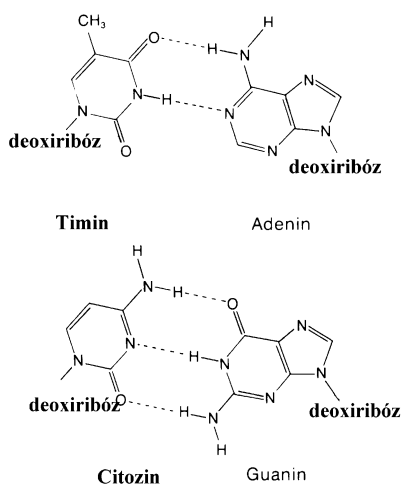
A DNS szerkezete

A nukleinsav-kémia fejlődésével Ervin Chargaff és munkatársai munkája nyomán vált nyilvánvalóvá, hogy a DNS-ben az $A/T = 1$ és a $C/G = 1$. Az $A+T/G+C$ arány, bár fajonként állandó, a különféle fajokban nagyon különböző lehet. Rosalind Franklin és Maurice Wilkins röntgen-kristallográfiai eredményei, valamint Linus Pauling modellépítő módszere alapján James Watson és Francis H. C. Crick írta le a DNS szerkezetét. (Crick és Watson Nature-cikkének megjelenésétől, 1953-tól számítjuk a molekuláris biológia kezdetét.) A DNS-molekula egy jobbmenetű, 2 nm "széles" kettős spirál, nukleotidok óriáspolimerje (3.5. ábra). A

polinukleotid fonal alapja a -cukor-foszforsav-cukor-foszforsav-cukor- lánc. A cukorhoz (a dezoxiribózhhoz) kapcsolódnak a bázisok. A foszforsav-maradékok a szomszédos cukormolekulák 5' és 3' szénatomjai között teremtenek kapcsolatot. Lényegében tehát a DNS fonalnak van egy 5' → 3' irányú polaritása (egyben ez az az irány is, amelyben a nukleinsavak szintézise folyik lásd később). A DNS két szála ellenkező lefutású - antiparallel állásúak. A kettős spirál alapját az A=T és a G≡C bázispárok között képződő H-híd kötések adják (3.6. ábra). A szemközti szálak közötti bázisok komplementerek. A szomszédos bázispárok 3,6 Å-nyire ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$) vannak egymástól, és 36° -ot zárnak be egymással. A DNS-fonal mentén egy nagy és egy kis árok vonul végig (3.5. ábra). A DNS genetikai információ-tartalmát a bázisok sorrendje jelenti.



3.5. ábra. A DNS kettős spirál szerkezete.



3.6. ábra. Az A=T és a G≡C komplementer bázispárok.

Gén és genom

A **genom** az egyszeres kromoszóma-készletben levő DNS összessége. Másként megfogalmazva: a kromoszómák egyszeres készlete. A klasszikus definíció szerint a **gén** az öröklődés, a genetikai funkció olyan egysége, amely egy vagy több, de közös RNS-ről képződő, nagyon hasonló polipeptidet vagy egy funkcionális

RNS-t kódol. A genom mérete a különböző fajokban meglehetősen változó (3.1. táblázat).

3.1. táblázat. Néhány faj genomjának mérete

Faj	Bázispárok száma	Hossza (méter)
FÁGOK, VÍRUSOK		
SV40	5226	$1,7 \times 10^{-6}$
φX 174	5375	$1,8 \times 10^{-6}$
λ	$4,65 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{-5}$
BAKTÉRIUMOK		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$1,75 \times 10^6$	$6,0 \times 10^{-4}$
<i>Escherichia coli</i>	$4,60 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-3}$
EUKARIÓTÁK		
Élesztő	$1,75 \times 10^7$	$6,0 \times 10^{-3}$
Muslica	$1,75 \times 10^8$	$3,0 \times 10^{-2}$
Ember	$3,00 \times 10^9$	$9,0 \times 10^{-1}$
Kukorica	$6,60 \times 10^9$	2,2
Szalamandra	$1,50 \times 10^{11}$	50
Liliom	$2,00 \times 10^{11}$	110

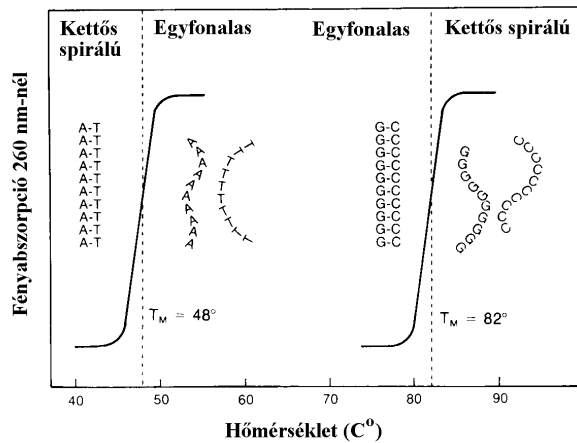
Az ember genomjának nukleotid-szekvenciája 1000 olyan könyvet töltene meg, amelyek mindegyike 1000 lapból állna, laponként kb. 3000 betűvel. A φX 174 fág genomja 10, az *E. coli* bélbaktériumé 4381, az élesztőé 5770, a muslicáé 13379, az emberé kb. 23000 gént tartalmaz. Amíg prokariótákban a genom java részét, sok eukariótában a teljes genomnak mindössze néhány százalékát teszik ki a gének.

A genom szerveződése

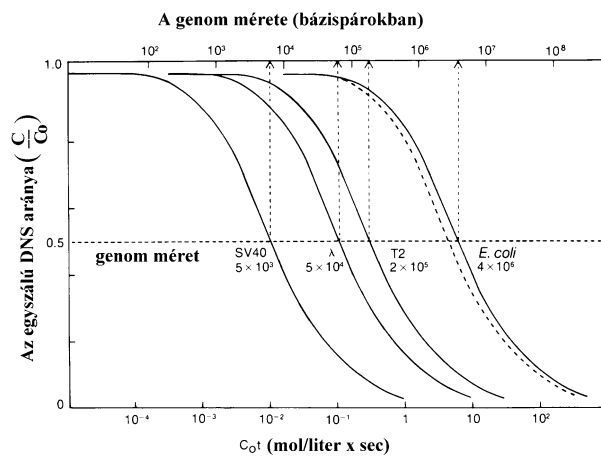
A hőmérséklet növekedésével a DNS két szálát összetartó A=T és G≡C bázispárok közötti H-hidak felbomlanak, a DNS "megolvad", denaturálódik, egyszálúvá válik, miközben a 260 nm-en mért fényelnyelése növekszik. A H-hidak által biztosított kötések különböző erőssége miatt a csupa A=T bázispárból álló DNS olvadáspontja 48°C , a csupa G≡C-ből állóé 82°C (3.7. ábra).

Prokarióta DNS-t kb. 400 bázispárból álló darabokra aprítva (pl. egy turmixgépben) és felmelegítve, hogy csupa egyszálú DNS legyen az oldatban, majd engedve, hogy az oldat lehűljön, a komplementer szálak egymásra találhatnak, párosodnak (hibridizálnak) - helyreáll a kétszálú állapot (renaturáció). Hűlés közben fokozatosan csökken az oldat fényelnyelése, végül visszaáll a kiindulási értékre. Az oldat fényelnyelés-változásának dinamikája mutatja a benne lévő egy- illetve kétszálú DNS mennyiségét.

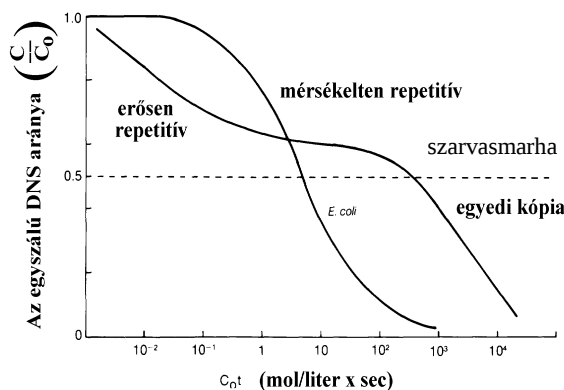
Ha a C/C_0 arányt (ahol C az egyszálú DNS koncentrációja, C_0 pedig az eredeti DNS koncentráció) a $C_0 t$ (t = idő másodpercekben) függvényében ábrázoljuk, a görbék jellegzetes lefutásúak (3.8. ábra) - ez az ún. *denaturációs-renaturációs kinetika*. Természetesen minél kisebb a genom (mint pl. az SV40 vírus esetében), annál nagyobb az esélye annak, hogy a komplementer DNS szálak egymásra találhatnak és egyesülnek. Minél nagyobb a genom, a renaturáció annál tovább tart. A denaturáció-renaturációs kinetika alapján meghatározható a genom mérete (3.8. ábra).



3.7. ábra. A csak A=T illetve a csak G=C bázispárból álló DNS fényelnyelésének változása a hőmérséklet függvényében.



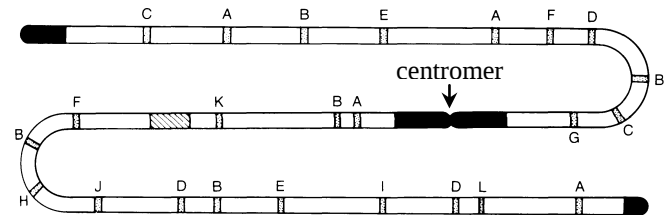
3.8. ábra. A DNS renaturációs kinetika vírusok és baktériumok esetében.



3.9. ábra. Az *E. coli* és a szarvasmarha DNS renaturációs kinetikája.

A denaturációs-renaturációs kinetika eukarióták esetében a prokariótákétól eltérő lefutású (3.9. ábra): van egy gyors renaturációt mutató, egy lassabb, de még viszonylag gyors, és egy lassú, hosszan elnyúló része. A gyorsan renaturálódó rész az eukariótákra jellemző ún. *erősen repetitív* szekvenciáknak felel meg. Az erősen

repetitív szekvenciák genomként $10^5 - 10^7$ kópiában vannak jelen, viszonylag rövid, 1-13 bázispárból állnak, tandem elrendeződésűek, és a genomnak akár 5-30%-át is kitehetik (pl. a tengerimalacban a CCTA szekvencia ismétlődik nagyon sokszor). Nyilvánvaló, hogy az erősen repetitív egyszálú szekvenciák gyorsan rátalálnak valamelyik komplementerükre, renaturálódnak. Erősen repetitív szekvenciák találhatók például a kromoszómák centromerének és a végeinek (telomerjeinek) környékét alkotó *heterokromatinban* (3.10. ábra).



- Heterokromatin. Rövid, erősen ismétlődő szekvenciák.
- Egyedi, egy kópiában levő szekvenciák.
- ▨ Tandem ismétlődő szekvenciák.
- ▤ Különböző mérsékleten repetitív szekvenciák.

3.10. ábra. A különféle szekvencia típusok eloszlása egy eukarióta kromoszómában.

A denaturációs-renaturációs kinetika második szakaszának a *mérsékleten repetitív* szekvenciák felelnek meg. A mérsékleten repetitív szekvenciák genomként 30-10000 kópiában vannak jelen. Hosszuk többnyire 10-100 bázispár közötti, sokszor tandem elrendeződésűek, szekvencia-családokat alkotnak és az eukromatinban, kis „szigetecskékben” vannak elszórva (3.10. ábra). A mérsékleten repetitív szekvenciák egy csoportját képezik azok, amelyeket *változó számú tandem ismétlődő* (angolul *variable number of tandem repeats*, VNTR) szekvenciáknak neveznek. Az ismétlődések száma kromoszómánként változhat, és a VNTR-ek hossza személyek azonosítására alkalmas (lásd a 13. előadás anyagát).

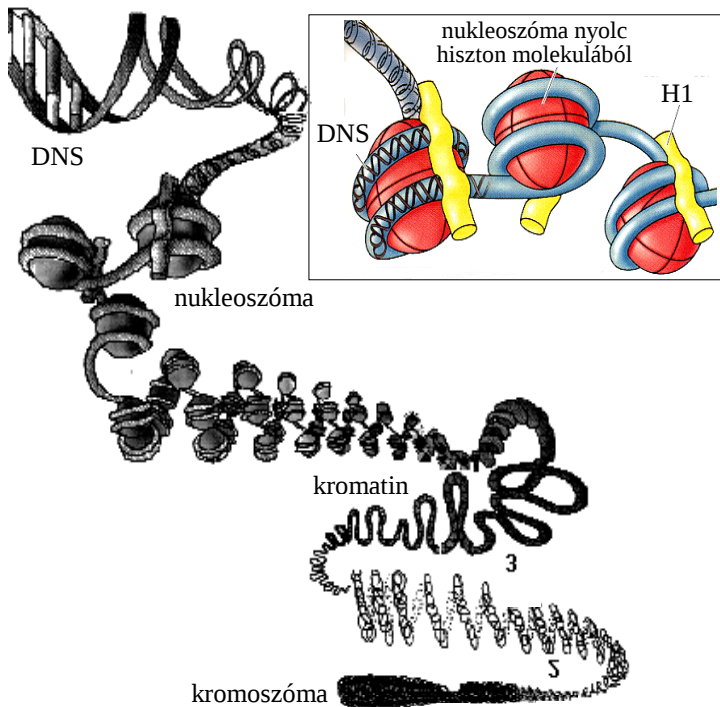
Miután genom-izolálás, aprítás és ultracentrifugálás után az erősen és a mérsékleten ismétlődő szekvenciák a fő DNS-sáv mellett kis különálló (szatellit) sávot alkotnak, előbbieket hagyományosan mikroszatellit, utóbbiakat miniszatellit DNS-nek is szokás nevezni. (A jelenség oka az, hogy az ismétlődő szekvenciáknak általában az átlagostól eltérő a nukleinsav-összetétele, így az ülepedési sebessége is).

Az eukarióta DNS harmadik típusát azok az ún. *egyedi kópia* DNS-szekvenciák alkotják, amelyek genomként csak egyetlen vagy néhány kópiában vannak jelen. Az egyedi szekvenciák adják az eukromatin fő tömegét, és ide tartoznak a gének is (3.10. ábra).

A kromoszómák szerveződése

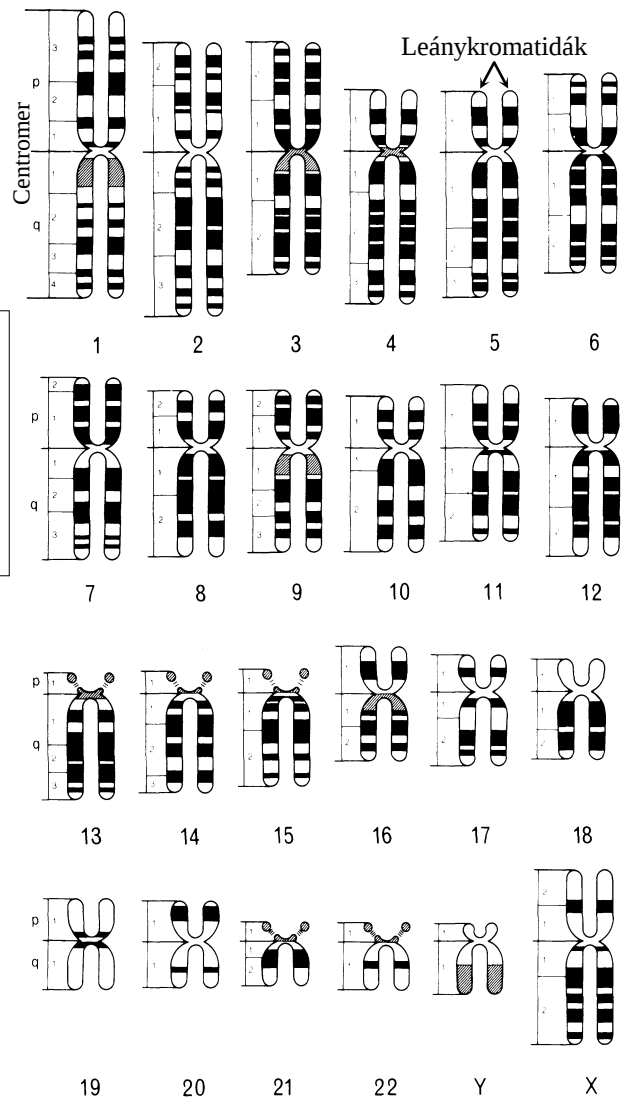
A baktérium-kromoszóma egyetlen körbezáródó, gyakran gyűrű alakúnak nevezett DNS molekula, amely egy ponton a sejthártyához rögzül. Sok baktérium a kromoszóma mellett kis kör alakú DNS molekulá(ka)t, plazmido(ka)t is tartalmaz. A *plazmidok* önállóan replikálódó, kromoszómán kívüli DNS-ek. A baktérium-kromoszóma és a plazmidok - bár sok, a génműködést szabályozó fehérjével kapcsolódnak – nem szerveződnek bonyolultabb struktúrákba.

Az eukarióták DNS-e bázikus molekulákból, ún. hisztonokból képződött „gyöngyöcskékre” tekeredik. A „gyöngyöcskéket” a rájuk tekeredett DNS-el együtt *nukleosómáknak* nevezik (3.13. ábra). A nukleosómákra tekeredett DNS más, ún. nem-hiszton fehérjékkel is kapcsolódva tekercseket, majd szupertekercseket, azokból pedig hurkokat képez. A tömörödés mértéke az osztódásban levő sejtekben a legnagyobb, amikor bizonyos festések hatására a nyugalomban lévő sejtekben egyébként laza szerkezetű, a sejtmagot kitöltő kromoszómák mikroszkópban is jól láthatókká válnak. A *kromatint*, a kromoszómák anyagát tehát DNS, hiszton és nem-hiszton fehérje-molekulák alkotják.



3.13. ábra. Az eukarióta kromoszóma szerveződése. A DNS hiszton fehérjékből képződő „gyöngyöcskékre” tekeredik, és nukleosómákat alkot. Egy nukleosómában nyolc hiszton molekula található, két-két H2A, H2B, H3 és H4 típusú. A nukleosómákat a H1 típusú hisztonok stabilizálják, fűzik össze. A nukleosóma-fűzér további fehérjékkel kapcsolódva kromatint képez, feltekeredik, hurkot képez és legtömörebb formájában, osztódáskor fénymikroszkópban is azonosítható.

Egy, a mitózis metafázisában (a sejtosztódás részleteit lásd a következő előadás anyagában) levő ún. *metafázisos kromoszóma* már replikálódott, tehát kétszeres mennyiségű DNS-t tartalmaz, és két leánykromatidává (ikerkromatidákká) szerveződött (3.14. ábra). Egy kromatidát egyetlen DNS kettős spirál és nagyon sok fehérje-molekula alkot. A leánykromatidák, egyetlen DNS kettős spirál két kópiája, a centromerjükönél tapadnak össze. A *centromer* jellegzetes, erősen repetitív DNS-szekvenciából és a hozzájuk kapcsolódó ún. centromer fehérjékből áll. A centromer a kromoszómák különböző helyein lehet. A *telomereket*, a kromoszómák végeit is jellegzetes DNS-szekvenciák és a hozzájuk kapcsolódó specifikus fehérjék alkotják.



3.14. ábra. A humán haploid (egyszeres) kariotípus. Metafázisú kromoszómák. A 13., a 14., a 15., valamint a 21. és a 22. kromoszómák rövid (p) karjainak végén levő részt szatellitnek nevezik. Az alattuk levő, nyélszerű szakaszokban vannak azok a gének, amelyek a riboszomális RNS molekulák képződését kódolják. Az 1-22. kromoszómákat autoszómáknak, az X és az Y kromoszómákat nemi (ivari) kromoszómáknak nevezik.

Kariotípus

A haploid kromoszómaszám fajonként jellemző és állandó. Az ember diploid testi sejtjeiben 23 pár kromoszóma van. Az egyik garnitúra anyai, a másik apai eredetű. Bármely pár két tagja, az ún. **homológ kromoszómák**, azonos méretű, alakú, azonos szerveződésű, és ugyanazon a pontján ugyanarra a tulajdonságra (pl. szemszín) vonatkozó információt hordoz. Az információ tartalma a két homológ kromoszómában lehet azonos (legyen a szemszín kék) vagy különböző (kék illetve barna). A metafázisos kromoszómák méretük, a centromer helye és a festődési mintázat alapján könnyen azonosíthatóak (3.14. ábra). Az egy sejtben jelenlevő metafázisos kromoszómák alkotják a kariotípust.

Az ivarsejtek haploidok, csak egyetlen kromoszómaszerelvényt tartalmaznak: emberben 22 autoszómát és egy ún. nemi (ivari) kromoszómát. Az autoszómák (látszólag) nem tartalmaznak a nemre vonatkozó információt. A nemi kromoszómáknak (X és Y, ám pl. a madarakban Z és W) szerepük van a nem (ivar) meghatározásában.

A 13., a 14., a 15., a 24. és a 22. kromoszómák rövid karjainak jellegzetes dobverő alakú (szatellit) részei vannak. Azok tartalmazzák a riboszomális RNS-eket (rRNS) kódoló gének zömét (vannak olyan rRNS gének is, amelyek az X kromoszómán vannak). A riboszomális RNS-gének a sejtmagvacska egyik alkotói az interfázisú sejtben.

A kariotipizálás, vagyis valamely sejt kromoszóma-készletének megállapítása diagnosztikai jelentőségű: a normálistól eltérő számban kromoszómát hordozó, vagy a rendellenesen szerveződött kromoszómá(ka)t hordozó sejtek funkciója gyakran sérül, többnyire a megbomlott géndózis és géntermék-koncentráció arányok miatt.

A gének az öröklődés egységei, a genetikailag kódolt tulajdonságok meghatározói, és egy adott kromoszóma DNS-ének jól meghatározott szakaszán találhatóak. Amint az elkövetkező fejezetekből kiderül, a genetikai térképezés során nem csak azt lehetett/lehet meghatározni, hogy valamely gén melyik kromoszóma része, hanem azt is, hogy ezen belül kromoszóma mely helyén van. A molekuláris genetika egyik feladata a gének helyének pontos meghatározása a DNS-en belül, ezt követheti a gén felépítésének és működésének vizsgálata.

ÖSSZEFOGLALÁS

Minden élőlény örökítő anyaga a DNS. A DNS a nukleotid-szekvenciák sokfélesége alapján elég komplex ahhoz, hogy szinte végtelenül sokféle fehérje szintézisét kódolja, biztosítsa az élőlények sokféleségét. A DNS-ben kódolt genetikai információt az építő nukleotidok sorrendje jelenti.

A prokarióta genomot csaknem teljes egészében egyedi szekvenciák alkotják és gyűrű alakú kromoszómává szerveződik. Az eukarióta genom és a kromoszómák is bonyolultabb szervezettségűek. Bár az eukarióta genom nagyon nagy, vannak olyan módszerek, amelyekkel el lehet benne igazodni, géneket tudunk azonosítani. Egy adott gént első lépésben kromoszómákhoz lehet kapcsolni, majd meg lehet helyét állapítani a kromoszómán belül, és végül klónozni lehet a gént: molekuláris szinten lehet megállapítani szerkezetét és funkcióját.

4. REPLIKÁCIÓ ÉS SEJTOSZTÓDÁS.

A replikáció mechanizmusa. A vírusgenom replikációja. A megkettőződött genetikai anyag szétesése az utódsejtekbe: teltfej- és helyspecifikus pakolás; mitózis; meiózis. Nondisjunkció. Aneuploidia és következményei.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár jegyzete alapján módosította Lippai Mónika.

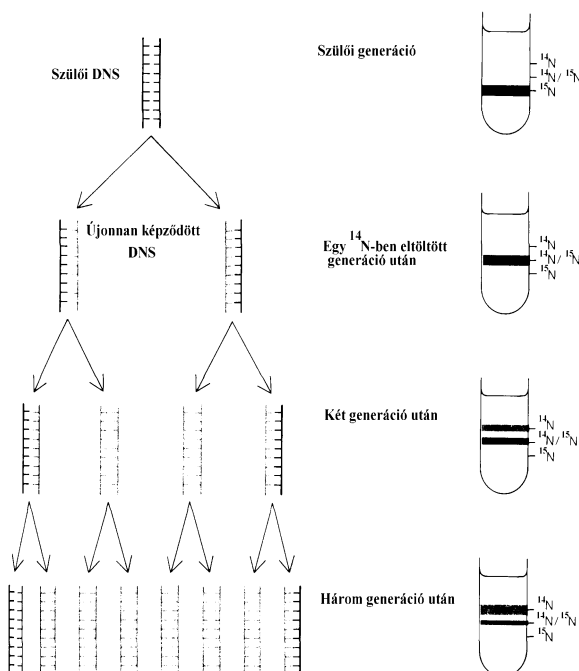
BEVEZETÉS

Az utódok hasonlósága az egymást követő nemzedékekben azt jelzi, hogy az örökítő anyag átjut sejtről sejtre, generációról generációra. Ezt azonban meg kell előznie a megkettőződésnek, azaz a replikációnak. Vajon hogyan történik ez? Milyen mechanizmusok szerint oszlik meg pontosan a DNS az utódsejtek között? Milyen következményei vannak a DNS (vagyis a kromoszómák) tökéletlen megoszlásának? A következő fejezet a fenti kérdéseket válaszolja meg.

REPLIKÁCIÓ

A replikáció szemikonzervatív természete

Egy DNS kettős spirál megkettőződésére elvileg három lehetőség kínálkozik. (1) A **konzervatív** mechanizmus, amely szerint az eredeti DNS kettős spirál mintájára úgy képződik egy új kettős spirál, hogy az eredeti kettős spirál is megőrződik. (2) A **szemi-konzervatív** modell szerint a DNS kettős spirál száalai elválnak egymástól, és mindkét szál templátként szolgál a komplementer szál szintéziséhez. (3) A **diszperzív** modell szerint az új DNS kettős spirálokban az eredeti DNS szálak anyaga véletlenszerű elrendezésben őrződik meg az utódszálakban. A replikáció három lehetséges módja közül a szemikonzervatív bizonyult igaznak, amint azt M. Meselson és F. Stahl 1958-ban bebizonyította.

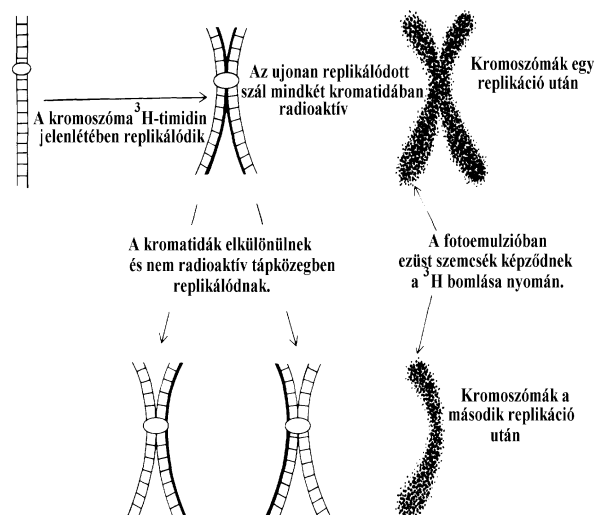


4.1. ábra. A replikáció szemikonzervatív mechanizmusának sematikus ábrázolása.

Meselson és Stahl olyan közegben szaporított sok generáción át baktériumokat, amely ^{15}N -t, a nitrogén nehéz izotópját tartalmazta. A ^{15}N a DNS alkotójává vált, „nehézzé” téve a DNS-t. A nehéz DNS cézium-kloridos sűrűséggradiens centrifugálás során a centrifugacső alsó részébe ülepszik, oda, ahol a sűrűsége megegyezik a közeg sűrűségével. A könnyű, ^{14}N -et tartalmazó DNS-ből a centrifugacső felső részében képződött sáv (4.1. ábra). A „nehéz” DNS-t tartalmazó baktériumokat egyetlen generációra olyan közegbe tették, amely a nitrogén könnyű, ^{14}N változatát tartalmazta. Egy generáció (kb. 20 perc) múltán DNS-t izoláltak a baktériumokból, és megvizsgálták az ülepedését. A DNS egyetlen sávban helyezkedett el a centrifugacsőben, egy köztes pozícióban (4.1. ábra). Tehát a ^{14}N -es közegben replikálódott DNS egyik szála nehéz, a másik könnyű volt, bizonyítva a replikáció szemikonzervatív természetét: ha ugyanis a replikáció konzervatív volna, egy nehéz (az eredeti) és egy könnyű (az új) DNS-nek megfelelő sáv képződött volna a centrifugacsőben. Diszperzív replikáció esetén ugyan csak egy, de elmosódott sáv lenne várható a centrifugacső közepe táján.

A kutatók a nehéz DNS-t tartalmazó baktériumok egy másik mintáját két generáción át szaporították ^{14}N könnyű nitrogént tartalmazó közegben, majd a DNS-t izolálták és vizsgálták sűrűséggradiens centrifugálással. A centrifugacsőben két egyforma vastagságú sáv alakult ki: egy a közepes, egy pedig a könnyű „helyen”, megerősítve a replikáció szemikonzervatív természetét (4.1. ábra). (Ha a replikáció konzervatív lenne, egy nehéz és egy könnyű sáv képződött volna, és a könnyű háromszor több DNS-t tartalmazott volna, mint a nehéz. Diszperzív replikáció esetén egy elmosódott sáv alakult volna ki, valahol a közepes és a könnyű sávok között...)

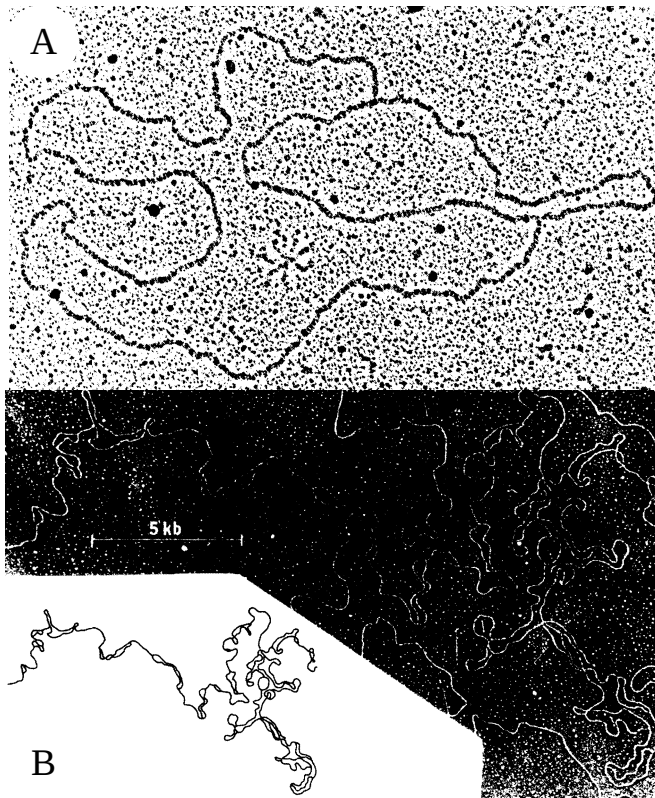
Herbert Taylor azt bizonyította 1958-ban, hogy a replikáció mechanizmusa eukariótákban is szemikonzervatív (4.2. ábra). Taylor egy sejtciklusra olyan közegbe tett emlős sejteket, amely ^3H -al jelzett timint tartalmazott (mivel a timin csak a DNS-be épül be, ^3H -timinnel a DNS specifikusan jelölhető). Egy sejtciklus (kb. egy nap) múltán az osztódó sejtekből metafázisos kromoszómákat preparált.



4.2. ábra. Az eukarióta kromoszómák replikációja is szemikonzervatív módon történik.

A preparátumot vékony fotoemulzió-réteggel borította, és autoradiográfiával detektálta a ^3H -al jezett kromatidákat (a ^3H bomlása során képződő β -sugárzás nyomot hagy az emulzióban, ami előhívás után fekete jelként ismerhető fel; 4.2. ábra). Azt tapasztalta, hogy mindkét leánykromatida felett elsötétedett a fotoemulzió, vagyis mindkét kromatida tartalmazott egy-egy új, ^3H -al jezett DNS-fonalat. (Ha a replikáció konzervatív volna, csak a leánykromatidák egyike tartalmazott volna ^3H timint, a másika nem. Diszperzív replikáció esetén a leánykromatidák "foltosan" kiegészítették volna egymást, és a foltosság mértéke is változó lett volna.)

Taylor a ^3H -al jezett sejtek egy mintáját egy további sejtciklusra olyan közegbe tette, amely nem tartalmazott ^3H -t, majd ismét kromoszóma-preparátumokat készített és vizsgált. A második replikáció után csak a leánykromatidák egyike tartalmazott ^3H jelölést, a másika nem, bizonyítva, hogy a replikáció eukariótákban is szemikonzervatív (4.2. ábra).



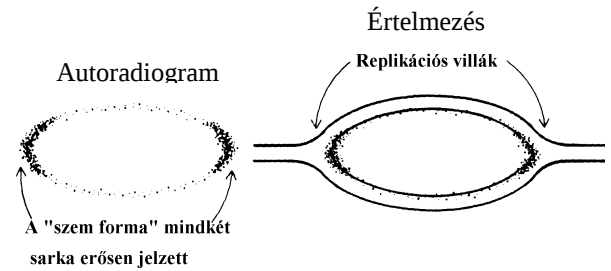
4.3. ábra. A replikáció prokariótákban egy (A), eukariótákban sok helyen kezdődik (B).

A replikáció kétirányú

John Cairns és munkatársai elektronmikroszkópos felvételeken tanulmányozták a DNS replikációját (4.3 ábra). Láthatóvá vált, hogy a replikáció a prokarióta kromoszóma (és plazmid) egyetlen pontján kezdődik, eukariótákban pedig egyszerre sok helyen (4.3. ábra).

D. Prescott és R. G. Wake ^3H -timint tartalmazó közegbe tett rövid időre baktériumokat (mások pedig eukarióta sejteket). A baktériumokból DNS-t izoláltak elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. A kromoszómákat vékony fotoemulzió réteggel borították, hogy láthatóvá tegyék azokat a helyeket, ahová ^3H épült be,

bomlott el és hagyott jelölést a fotoemulzión (4.4. ábra). A jelek vizsgálata alapján vált világossá, hogy a replikáció a DNS kettős spirálon mindkét irányban folyik, pro- és eukariótákban egyformán.



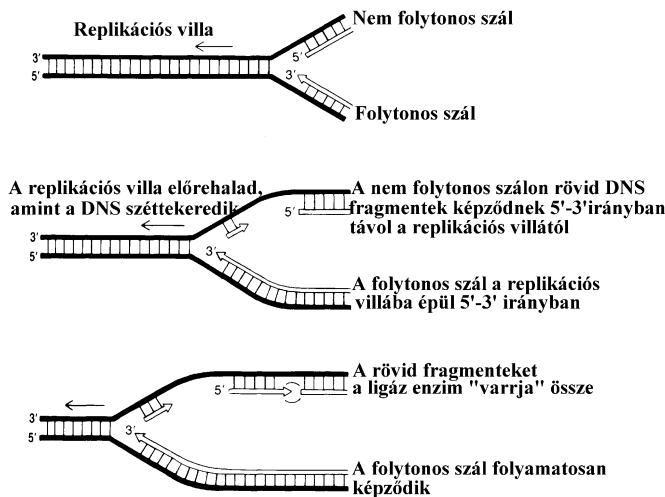
4.4. ábra. A replikáció két irányban folyik.

A replikáció molekuláris mechanizmusa

A DNS replikációjában enzimek sokasága vesz részt. A replikáció az ún. *replikációs origókban* kezdődik. A replikációhoz a DNS kettős spirált szét kell tekerni (a széttekeredés sebessége kb. 10^4 fordulat/perc). A széttekeredés után a DNS mindkét szála templátként (mintaként) szolgál az új, komplementer DNS szálak szintéziséhez (4.5. ábra). Az új DNS-szálak szintézisének sebessége lenyűgöző: prokariótákban 5×10^4 , eukariótákban 5×10^3 nukleotiddal hosszabbodnak percenként! Az új DNS-szálat a DNS templát szál alapján a DNS-polimeráz enzimkomplex végzi. A DNS-polimeráz csak a 3' véghez képes újabb nukleotidot építeni, tehát a DNS (ugyanúgy, mint minden más nukleinsav) szintézise $5' \rightarrow 3'$ irányban folyik. Ahhoz, hogy a DNS-polimeráz elkezdhesse a DNS szintézisét, egy indító molekulára, ún. primerre van szükség. A primer *E. coli*-ban egy kb. 30 nukleotidból, eukariótákban 10 nukleotidból álló RNS, amit egy primáz nevű RNS-polimeráz enzim szintetizál a DNS-templát alapján (az RNS-polimeráz maga ugyanis nem igényel primert!).

A primert az $5'$ irányból érkező DNS-polimeráz bontja el és épít helyére DNS-t. A DNS-polimeráz a négyféle dezoxi-nukleotidból a DNS-templát alapján szintetizálja az új DNS-fonalat. Amíg az ún. vezető szál szintézise folyamatosan haladhat az $5' \rightarrow 3'$ irányban, addig az ellentétes polaritású késlekedő szál rövid részletekben (ún. Okazaki fragmentekben) szintetizálódik. Az Okazaki fragmenteket a ligáz enzim kapcsolja egységes fonallá (4.5. ábra). A folyamat gördülékeny lezajlásában még számos más fehérje játszik szerepet.

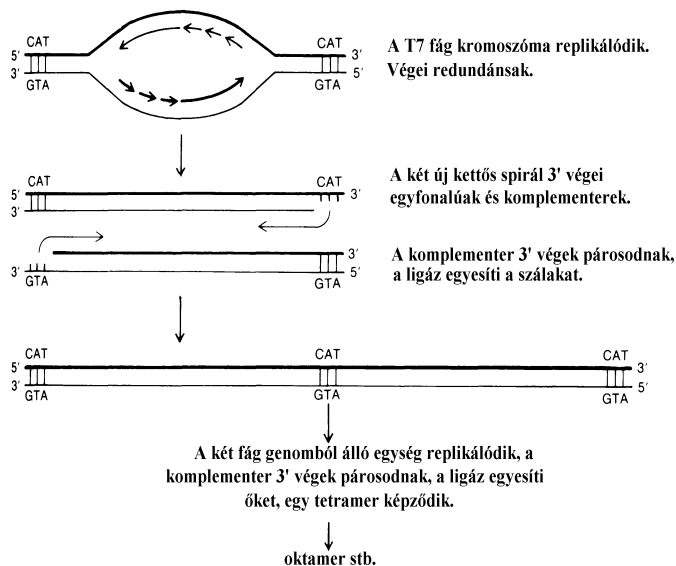
Mivel (i) minden DNS szál szintézise csak RNS-primerral kezdődhet és (ii) minden DNS-szintézis templát alapján történik, az új szálak $5'$ végének szintézise (ahol az RNS-primert nem lehet lecserélni DNS-re) külön problémát jelent. A problémára különféle megoldások léteznek. A baktériumok kromoszómái és a plazmidok gyűrűbe zárultak. A konkatemerek (egyes vírusok DNS-ének replikációja során képződő képlet – lásd alább) esetében a lineáris DNS-szakaszok összekapcsolódnak. Eukariótákban pedig az ún. telomeráz enzim akadályozza meg a kromoszómák rövidülését, erről a folyamatról a második félév anyagában lesz részletesebben szó.



4.5. ábra. A DNS két szálán a replikáció ellentétes irányban zajlik.

A konkatemer

Sok vírus, mint pl. a T7 bakteriofág (baktérium-vírus) DNS-e lineáris, és különös módon replikálódik (4.6. ábra). Egy-egy replikációs ciklus végén olyan szabad 3' végek képződnek, amelyek komplementerei egymásnak. A komplementer végek párosodnak, és a ligáz enzim összeköti őket. Végeredményben olyan DNS képződik, egy ún. *konkatemer* (concatemer), amely ekkor még csak két kópia vírusgenomból áll. A konkatemert alkotó vírusgenomok száma mértani haladvány szerint halad a replikációk során, és így módon nagyon hosszú konkatemerek képződhetnek.

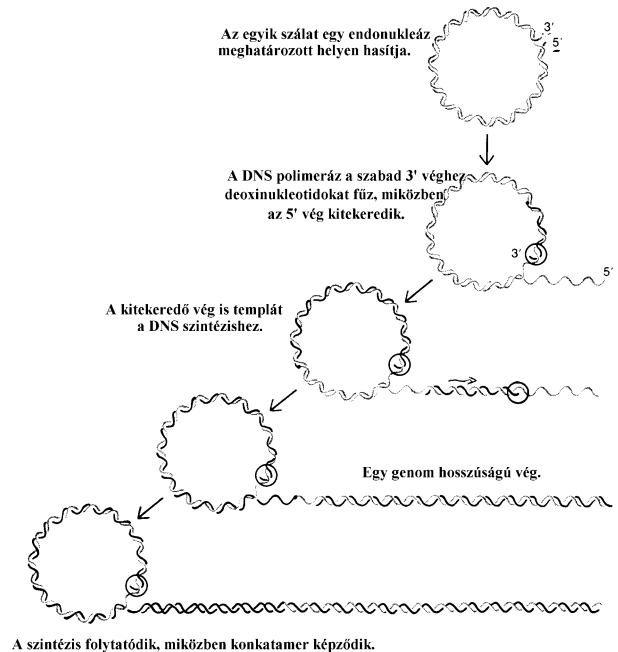


4.6. ábra. A konkatemer-képződés modellje.

A forgó gyűrű

A forgó gyűrű-módszer sok vírus és plazmid esetében is hatékony megoldás a DNS replikációjára (4.7. ábra). Első lépésben egy endonukleáz enzim elhasítja a gyűrű alakú DNS kettős spirál egyik szálát. Amíg az 5' vég szabaddá válik, a szabad 3'-hez kapcsolódva a DNS-polimeráz DNS-t szintetizál a

gyűrű alakú templát alapján. Miközben a templát DNS körbeforog, az újonnan szintetizálódott DNS egyre hosszabb lesz, és templátként szolgál a másik DNS-szál szintéziséhez. Végeredményben egy hosszú DNS kettős spirál, szintén egy konkatemer képződik, amely annyi vírusgenomot tartalmaz, ahányat gördült a gyűrű (4.7. ábra).



4.7. ábra. A „forgó gyűrű” replikáció eredménye hosszú, lineáris, a genomot több kópiában tartalmazó DNS-szál, azaz konkatemer.

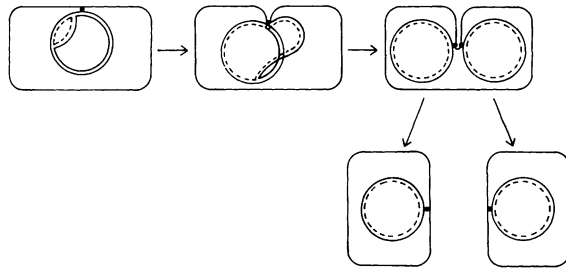
A KROMOSZÓMÁK ÁTJUTÁSA SEJTRŐL SEJTRE, GENERÁCIÓRÓL GENERÁCIÓRA

Vírusok: "helyspecifikus" és "teltfej" pakolódás

Konkatemerből kétféle módon képződhetnek genom-méretű fragmentek. A *helyspecifikus* változatban a konkatemert endonukleázok jól definiált helyeken hasítják, úgy, hogy egy fragment éppen egy vírusgenomnyi DNS-t tartalmaz. A genomnyi DNS épül be a már elkészült vírusburokba, így végül fertőzőképes vírusok képződnek. A *teltfej* pakolódás esetében a konkatemer egyik vége betüremkedik a burokba, majd egy endonukleáz enzim akkor vágja el a konkatemert, amikor az éppen kitölti a burkot. Ennek belső térfogata akkora, hogy pontosan egy vírusgenomnyi DNS fér bele. A konkatemer bármely pontján is kezdődjön el a "teltfej" pakolódás, a vírusburok mindig egy genomnyi DNS-t tartalmaz.

A baktériumsejtek osztódása

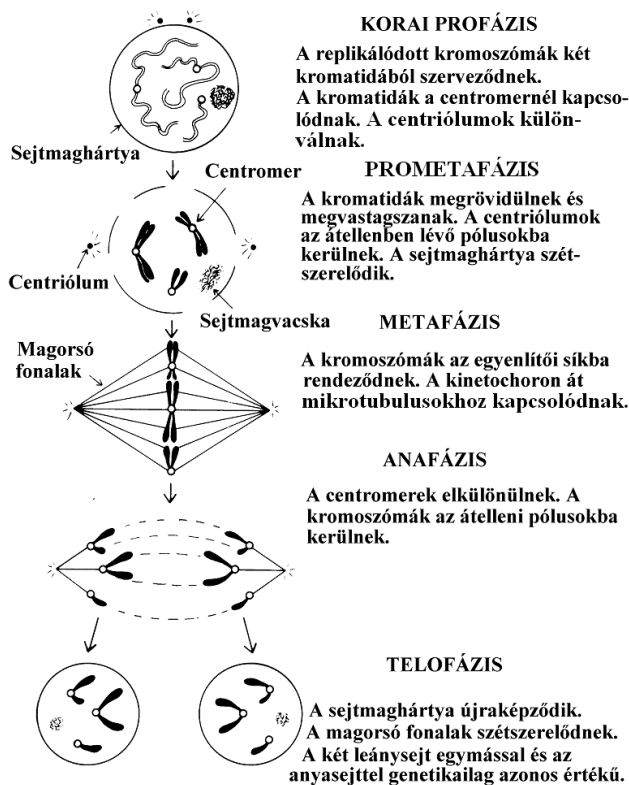
A baktérium-kromoszómák egy ponton a sejthártyához kapcsolódnak - ez a kapcsolódási pont nem azonos azzal a ponttal, ahol a replikáció kezdődik, bár a két pont nincs nagyon távol egymástól. A replikációt követően a baktériumsejtek osztódása viszont éppen azon a ponton kezdődik el, ahol a kromoszóma a sejthártyához kapcsolódik. A sejthártya lefűződése, a tapadási pontok elkülönülése azt eredményezi, hogy a kromoszómák is elkülönülnek egymástól, és végeredményben más-más sejtbe jutnak (4.8. ábra).



4.8. ábra. A baktérium-kromoszómák megoszlása az utódsejtek között a sejtosztódás folyamán.

AZ EUKARIÓTA SEJTEK OSZTÓDÁSA: MITÓZIS

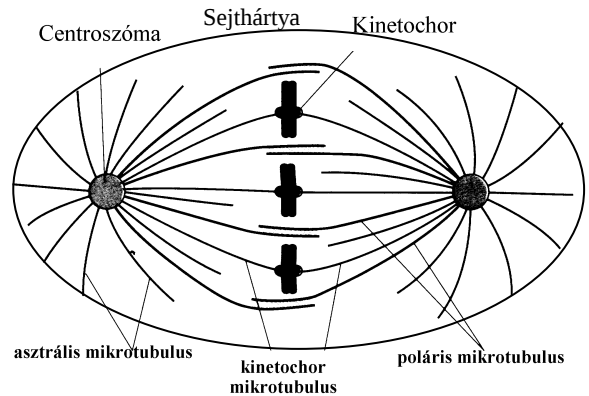
Az eukarióta sejtek életében a növekedés és az osztódás ciklusokban követi egymást. Két osztódás között, az interfázisban, van egy olyan szakasz, az ún. S (szintézis) fázis, amikor a sejt örökítő állománya (a sejtmagi DNS) replikálódik, megkettőződik. Az osztódásra felkészült sejtéből ezután a sejt a *mitózis* során osztja ketté az örökítő anyagát, és végül két leánysejt keletkezik. A mitózist számtartó sejtosztódásnak is nevezik, mert a genetikai állomány mennyisége, a kromoszómák száma az utódsejtekben változatlan marad. A két leánysejt genetikai értelemben tehát azonos értékű egymással, valamint az anyasejttel is.



4.9. ábra. A mitózis sematikus ábrázolása.

A mitózist mikroszkópban jól látható események alapján öt fontosabb szakaszra osztják (4.9. ábra).

1. Profázis. A replikáció után minden kromoszóma két teljesen egyforma leánykromatidából áll. A leánykromatidák a centromerjeiknél kapcsolódnak, és a profázis során tömörödni kezdenek, ezért megrövidülnek. Az interfázisban osztódott *centroszómák* szétválnak és vándorolni kezdenek: a még meglévő sejtmembránja felszínén ellentétes irányba mozognak.



4.10. ábra. A háromféle mikrotubulus egy metafázisos sejtben: a mitotikus orsó.

2. Prometáfázis. A kromatidák tovább tömörödnek, rövidülnek. A centroszómák elérnek a sejt két szemközti szélére (a pólusokra). A sejtmembránja és a sejtmembránja felbomlik.

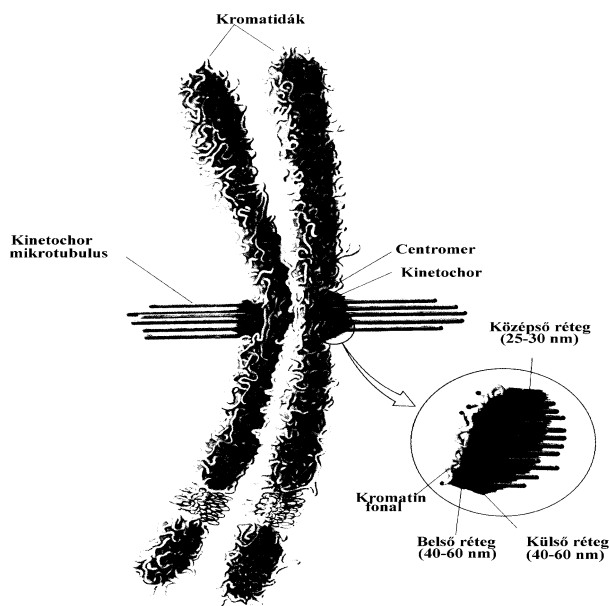
3. Metafázis. A centroszómákból kiindulva háromféle funkciójú mikrotubulus szerveződik. (4.10. ábra).

(1) Az ún. *poláris mikrotubulusok* a sejt egyenlítői síkjában átfednek a szemközti pólusról indulókkal. A poláris mikrotubulusokhoz az átfedő részekben olyan mechanoenzimek (motorfehérjék) kapcsolódnak, amelyek, miközben összekapcsolják a szemközti mikrotubulusokat, az ellenkező irányba tolják őket. A poláris mikrotubulusok szerepet játszanak a két centroszóma távolításában.

(2) A *kinetochor mikrotubulusok* a centromerhez kapcsolódó ún. kinetochorhoz tapadnak. A kinetochort szendvicsszerűen elrendezett kinetochor fehérjék alkotják. Egyetlen kinetochorhoz több mikrotubulus is rögzül, és kapcsolatot teremt a centroszómák és a kromoszómák között (4.11. ábra). A leánykromatidák egyike az egyik, másika a másik centroszómához tartozó kinetochor mikrotubulussal kapcsolódik. Az ősi kikerics alkaloidja, a kolhicin a mikrotubulusok alapegységéhez, a tubulin dimerhez kapcsolódva megakadályozza a mikrotubulusok képződését. A metafázisban képes felüggeszteni a mitózist, lehetővé téve például a metafázisos kromoszómák izolálását és vizsgálatát, azaz a kariotipizálást.

(3) Az *asztrális mikrotubulusok* a centroszómából sugárzanak ki és a sejtmembránhoz rögzítik, így tartják a centroszómákat a sejt megfelelő térrészében.

A mitotikus orsó és a motorfehérjék működéséről részletesebben a második félév során lesz szó.



4.11. ábra. A centromer, a kinetochor, és a kinetochor mikrotubulus kapcsolata.

4. **Anafázis.** A centromerek, és így a leánykromatidák elválnak egymástól. Az immár egykromatidás kromoszómák az ellentétes oldalakon levő pólusok felé haladnak. A kromoszómák vándorlásában a mitotikus orsót alkotó mindhárom fajta mikrotubulus részt vesz. Mérések szerint egy kromoszóma "elszállításához" kb. 20 ATP molekulát használ fel a sejt.

5. **Telofázis.** Befejeződik a mitózis. Újraalakul a sejtmaghártya, a sejtmagvacská, szétszerelődik a mitotikus mikrotubulus-apparátus, azaz a mitotikus orsó. Végeredményben két, az anyasejttel genetikai értelemben teljesen azonos értékű leánysejt képződik.

A *citokinézis* folyamán különülnek el egymástól a leánysejtek, miközben az anyasejt citoplazmája a két leánysejt között megoszlik. Állati sejtekben a leánysejtek elkülönülését aktin mikrofilamentumok és a hozzájuk kapcsolódó speciális miozin motorfehérjék biztosítják. Magasabbrendű növényekben az egyenlítői sík környékén, az osztódási orsóra merőlegesen egy ún. sejtlemez (fragmoblaszt) alakul ki, amely a mikrotubulusok származéka. Anyagai a Golgi-készülékből érkeznek az új sejthártya és a sejtfal építőelemeit tartalmazó vezikulákban.

Mitotikus nondiszjunkció

A mitózis nagy pontossággal biztosítja, hogy a metafázisos kromoszómák egyik leánykromatidája az egyik, másika a másik leánysejtbe kerüljön, így azt is, hogy a kromoszómák száma sejtenként nem változik, a sejtek diploidok ($2n$) maradnak. A leánysejtek kromoszómaszáma csak nagyon ritkán különbözik az anyasejtétől. Ez azért van, mert időnként mégis elveszik egy-egy kromoszóma: ritkán előfordulhat, hogy a kromoszómák rendellenesen oszlanak meg az utódsejtek között, ún. kromoszóma szét-nem-válás, szakszóval **nondiszjunkció** következik be. A **mitotikus nondiszjunkció** következményeként az egyik

leánysejtbe a szokásosnál általában egy kromoszómával több ($2n+1$ állapot, ún. triszómia alakul ki), a másikba eggyel kevesebb kerül ($2n-1$ állapot, ún. monoszómia alakul ki). A szokásostól eltérő számú kromoszómát hordozó sejteket **aneuploid** sejteknek nevezzük. A sejtek ugyanis akkor **euploidok**, ha a haploid kromoszómaszám (n) egész számú többszörösét hordozzák. Diploidon kívül lehetnek **triploidok** ($3n$): minden kromoszómából három van, **tetraploidok** ($4n$): minden kromoszómából négy van, stb.

Az aneuploid sejtek életképessége a diploidhoz képest általában csökkent, a megbomlott géndózis és géntermék-koncentráció viszonyok miatt. Már viszonylag kis kromoszómák hiánya, vagy a közepes méretű kromoszómák feleslege a sejt pusztulásához vezet. Minél kisebb a számfeletti vagy a hiányzó kromoszóma, azaz minél kevesebb gént kódol, annál kevésbé csökken a sejtek életképessége. A triszómiás sejtek életképessége mindenesetre általában jobb, mint a monoszómiásoké.

A túlélő aneuploid sejtek osztódhatnak, együtt maradhatnak, és egy ún. *klónt* alkothatnak. Az aneuploid sejtek bizonyos esetekben - megváltozott működésük miatt - rákos daganatok kiindulási gócai is lehetnek. Ismertek olyan környezetszennyező tényezők, amelyek fokozzák a mitotikus nondiszjunkció gyakoriságát.

A mitotikus nondiszjunkció egy-egy testi sejtben következik be, de nondiszjunkció természetesen nemcsak a mitózis, hanem a meiózis folyamán is megtörténhet.

A MEIÓZIS

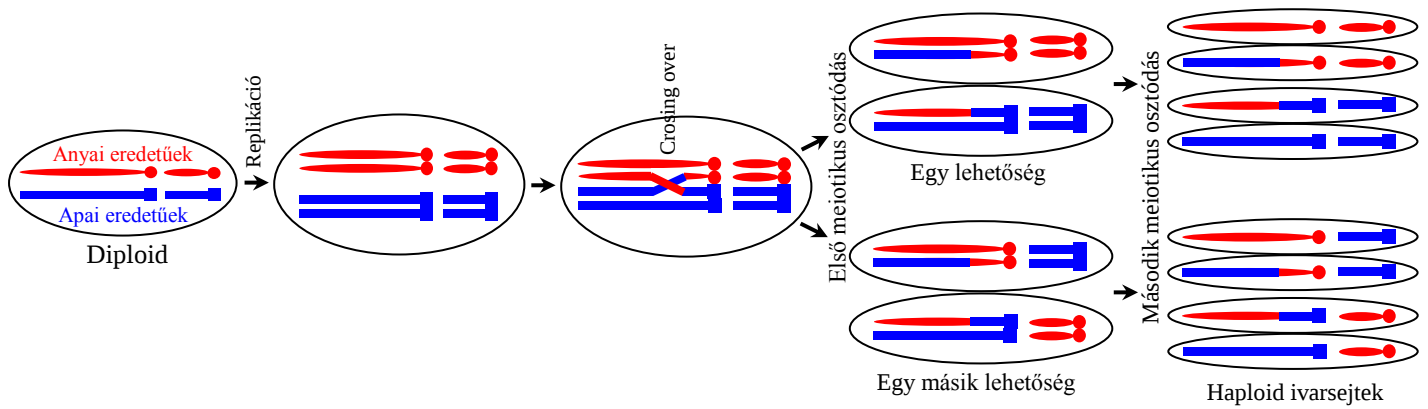
A meiózis vagy számfelező sejtosztódás lényegében két sejtosztódás, amelyek végén a diploid sejtekre jellemző kromoszómaszám megfelelődik. A meiózis termékeként képződő ivarsejtekbe minden homológ kromoszómából csak egyetlen egy kerül (4.12. ábra).

Az ivarmirigyekben (petefészek, illetve here) található ősvarsejtek diploidok, és érésük során először mitotikusan osztódnak, míg eléri a megfelelő sejtszámot. A nő- illetve a hímnemű egyedekben oo- illetve spermatogoniális sejteknek nevezik őket.

Az oo- és a spermatogoniális sejtek kezdik el az első meiotikus osztódást. Az első meiotikus osztódásban levő sejtek az *elsődleges oociták*, illetve *spermatociták*.

Az első meiotikus osztódás után a sejtek rögtön elkezdik a második meiotikus osztódást. A második meiotikus osztódást elkezdett sejteket nevezik *másodlagos oo- illetve spermatocitáknak*. A második meiotikus osztódás végén képződnek az ivarsejtek.

Az elsődleges oociták az emberi magzatok petefészekében a 3-8. hónapban jönnek létre, és az első meiotikus osztódás profázisában "vesztegelnek" a nemi érés kezdetéig (ez a többi gerincesre is jellemző folyamat). A nemi érés kezdetétől hormonális hatásra folytatódik a meiózis az elsődleges oociták némiyikében. Az oogenezis ezek után ismét leáll, a legtöbb gerinces fajban a második meiotikus osztódás metafázisában. Ezt a második meiotikus blokkot a spermiummal való találkozás oldja fel, így a meiózis csak a megtermékenyülés után fejeződik be.



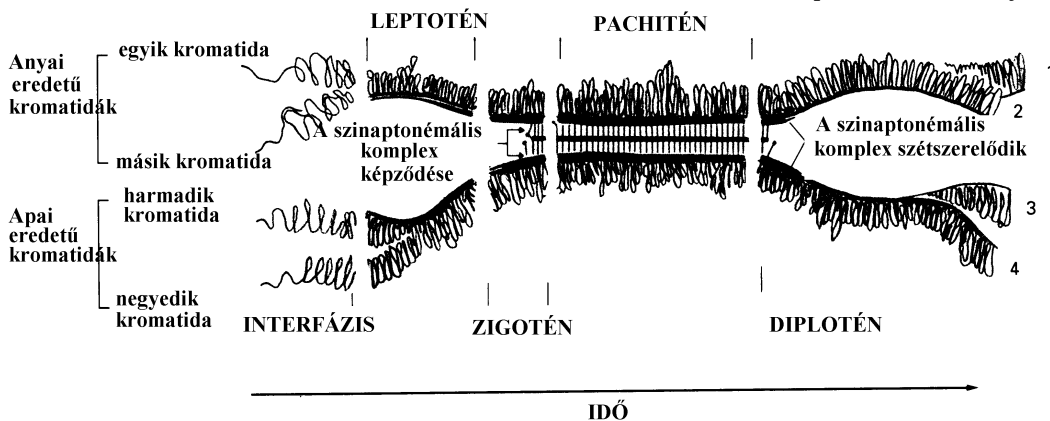
4.12. ábra. A meiózis sematikus és egyszerűsített ábrázolása csak két pár homológ kromoszómával. Crossing over csak a hosszabbik kromoszómapár között van feltüntetve, de valójában minden kromoszómapár esetében előfordul legalább egyszer. A hosszabbik kromoszómapár szegregálódásának lehetőségei közül is csak az egyik van ábrázolva.

kromoszóma összetapadt ikerkromatidait diádnak nevezik, két homológ kromoszóma összetapadt négy kromatidája egy ún. **tetrádot** alkot. Tehát egy emberi ivarsejtben a meiózis során 23 tetrád alakul ki, míg a mitotikus sejt metafázisában 26 diád emeződik a középsíkba.

3. A **pachitén** stádiumban cserélődnek ki a kromatidák komplementer részei, játszódik le a crossing over – bár ebből a mikroszkópban még semmi sem látszik.

A crossing over *mindig* a nem-leány kromatidák között történik, és legtöbbször pontos. A crossing over alapja a DNS-fonalak törése és újraegyesülése. A crossing over a **rekombináció**, a genetikai sokféleség

egyik pillére: a szülői eredetű kromoszómáreszek cseréjével az utódokban a tulajdonságok új kombinációi jöhetnek létre (molekuláris mechanizmusával a genetika és biokémia tankönyvek foglalkoznak). A **rekombináció** az anyai és az apai eredetű kromoszómák, vagy kromoszómáreszek (azaz a genetikailag meghatározott szülői tulajdonságok) újfajta kombinációinak kialakulását jelenti az ivarsejtek képződése során.



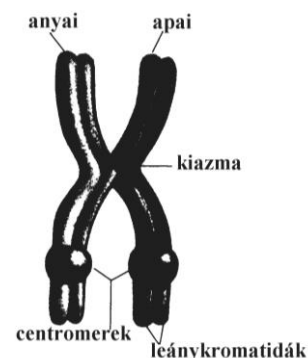
4.13. ábra. Az első meiotikus osztódás profázisát alkotó első négy stádium időbeli ábrázolása. Magyarázat a szövegben.

Az első meiotikus vagy redukciós osztódás

Az első meiotikus osztódás során a homológ kromoszómák részei kicserélődnek, rekombinálódnak, köztük ún. **crossing over** játszódik le. Az első meiotikus osztódás, hasonlóan a mitózishoz, stádiumokra osztható.

Profázis I. Az első meiotikus osztódás legfontosabb szakasza a profázis, öt alstádiumra szokás elkülöníteni (4.13. ábra).

1. A **leptotén** stádiumban a korábban már replikálódott kromoszómák tömörödnek, mikroszkópban felismerhetővé válnak. A leánykromatidák szorosan összetapadnak.
2. A **zigotén** stádiumban viszont – a mitózissal szemben! – nem az egyes kétkromatidás kromoszómák, hanem a **homológ kromoszómapárok** (természetesen egyenként két-két leánykromatidával) párosodnak és egy ún. szinaptonemális komplexet képeznek. Míg egy



4.14. ábra. A homológ kromoszómák kromatidáinak cseréje helyén kiazma képződik.

4. A *diplotén* stádiumban a párba állt homológ kromoszómák (összesen tehát négy) kromatidái között kezd lazulni a kapcsolat. A crossing over helyén a kromatidák X alakban rendeződnek el, és egy ún. kiazmat képeznek (4.15. ábra). A kiazma tehát a crossing over mikroszkópban látható megjelenési formája.

5. A *diakinézis* során a kromatidák teljesen kondenzálódnak és egyenként láthatóvá válnak. A profázis végén kezdődik a sejtmaghártya felbomlása.

Metafázis I. Szétszerelődik a maghártya és a sejtmagvacskák is. Mikrotubulusok képződnek és kapcsolódnak a kinetochorhoz. A homológ kromoszómák (még mindig tetrádot képezve) az egyenlítői síkban helyezkednek el.

Anafázis I. A homológ kromoszómák egyike (a maga két kromatidájával, a melyeket a centromer még összetart) az egyik, másika a másik a pólushoz kerül. Az anyai és az apai eredetű kromoszómák véletlenszerű kombinációkban jutnak valamelyik pólushoz: ez a meiózis másik "értelme", a rekombinációs események másik komponense (a crossing over mellett) azaz szintén hozzájárul az élőlények sokféleségének, a környezethez való alkalmazkodó-képességének kialakulásához.

A kromoszómáknak az első meiotikus osztódás anafázisában bekövetkező véletlenszerű szegregációja miatt tehát egy ember $2^{23} = 8,4 \times 10^6$ különböző kromoszóma-kombinációjú ivarsejtet képezhet. A $8,4 \times 10^6$ értékből eredő változatosságot tovább fokozza a kromoszómánkénti 2-3 crossing over, valamint a ritkán bekövetkező mutációk is. A leendő utódsejt ekkor már *haploidnak* számít, hiszen egyfajta kromoszómából csak egyet tartalmaz.

Telofázis I. Csak nagyon rövid ideig tart, ezalatt új sejtmaghártya képződik. Az első telofázist citokinézis is követi, de az új sejtekben replikáció már nem zajlik le, hanem gyorsan beindul a második osztódás.

Második meiotikus (számartató) osztódás

A második meiotikus osztódás lényegében egy mitózis (4. 12. ábra).

Profázis II. Csak pár percig tart, miközben újra lebomlik a sejtmaghártya.

Metafázis II. A kromoszómák (a homológoknak már csak egyike a maga két kromatidájával) az egyenlítői síkban helyezkednek el, és szorosan kapcsolódnak a kinetochor mikrotubulusokkal.

Anafázis II. A leánykromatidák elkülönülnek egymástól, és már mint önálló egykromatidas kromoszómák az ellentétes oldali pólusokba vándorolnak.

Telofázis II.

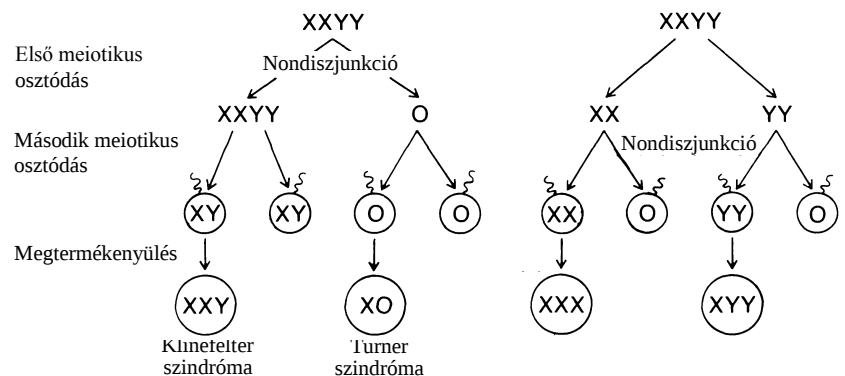
Újra képződik a sejtmaghártya. A citokinézis után, a

két egymás utáni meiotikus osztódás eredményeképpen összesen négy haploid utódsejt képződik, a DNS mennyisége egy-egy utódsejtben a meiózis megkezdő ősvarsejtékének negyede. Nőstényekben a haploid sejtek egy petesejtté és sarki testekké, hímekben spermiumokká differenciálódnak.

Meiotikus nondisjunkció

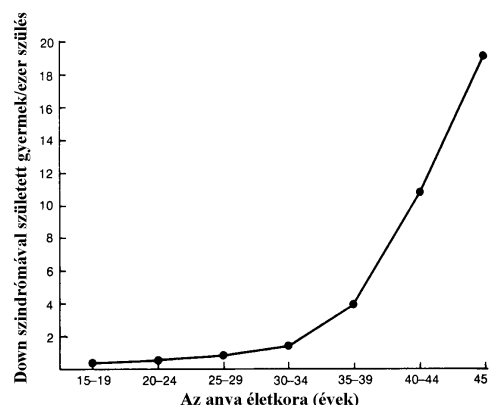
Nondisjunkció, azaz a kromoszómák rendellenes megoszlása az utódsejtek között, természetesen az első és a második meiotikus osztódás során is bekövetkezik. A nondisjunkció érintheti az autoszómákat és a nemi kromoszómákat is (4.15. ábra).

Ha egy aneuploid petesejtet normális számú kromoszómát hordozó spermium termékenyít meg (vagy fordítva), olyan zigóta képződik, amelynek később minden utódsejtje aneuploid lesz. Az aneuploid sejtek életképessége korlátozott (lásd fentebb). A minden sejtükben aneuploid élőlények, ha életképesek, általában szembetűnőbbek, mint azok, amelyekben „csak” mitotikus rekombináció zajlott le, és testi sejtjeinek csupán egy kis csoportja aneuploid.



4.15. ábra. A meiózis folyamán bekövetkező nondisjunkció eredményeként aneuploid ivarsejtek képződhetnek. Ez a példa az egyszerűség kedvéért a nemi kromoszómák nondisjunkciójára vonatkozik.

Az autoszómák aneuploidijára legismertebb példa a Down-szindróma, amely a 21. kromoszóma triszómiája. Ismert, hogy az anyai kor előrehaladtával exponenciálisan növekszik a Down-szindrómával született gyermekek gyakorisága (4.16. ábra).



4.16. ábra. Összefüggés a szülő nő életkora és annak valószínűsége között, hogy gyermeke Down szindrómás lesz.

Nondiszjunkció következtében nemcsak az autoszómák, hanem a nemi kromoszómák száma is lehet rendellenes (4.15. ábra). A nemi kromoszómákra aneuploid élőlények életképessége általában csak csekély mértékben csökkent. Ha rendellenes számban nemi kromoszómákat hordozó ivarsejtek vesznek részt a megtermékenyülésben, olyan emberek születnek, akik például a Turner- (X0), vagy a Klinefelter- (XXY) szindrómára jellemző tünetegyüttest mutatják (4.1. táblázat.)

4.1. táblázat. Rendellenes nemi kromoszóma-garnitúrák jellemzői emberben.

Kromo- szóma	Születési gyako- riság	Nem	Jellemzői
X0 Turner	0,04	Nő	Sterilitás, rövid törzs, széles nyak. Sokszor csökkent értelmi képesség.
XXY	0,125%	Férfi	Semmi különös
XXY Kline- felter	0,14%	Férfi	Sterilitás, magas, kis emlők fejlődnek. Sokszor csökkent értelmi képesség.
XXX	1,10%	Nő	Csökkent fertilitás és időnként enyhén csökkent értelmi képesség
XXXX	<0,03%	Nő	Csaknem sterilek, értelmi képesség csökkent.

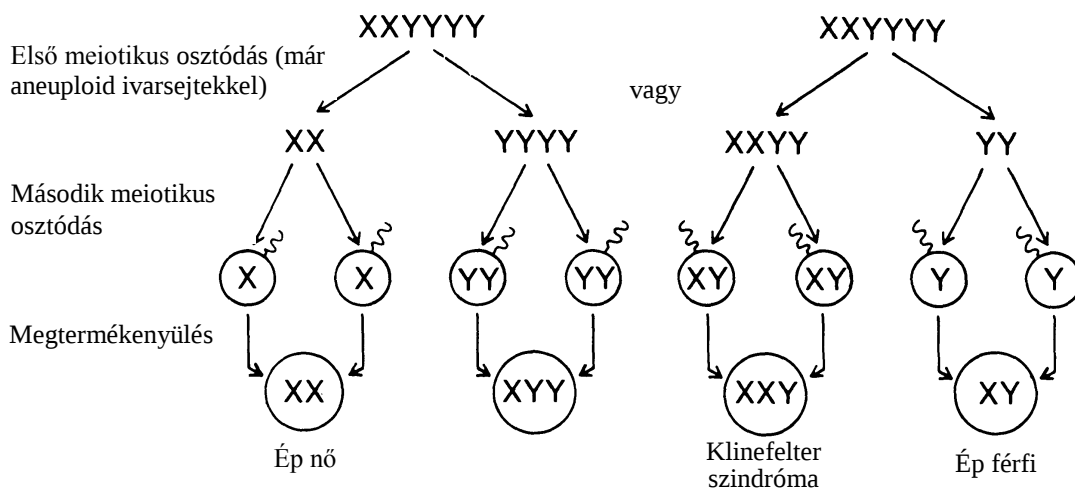
A meiózis során bekövetkező nondiszjunkciót nevezik *elsődleges nondiszjunkciónak*. A *másodlagos nondiszjunkció* során az ősvarsejtek már eleve aneuploidok, és emiatt jönnek létre végül aneuploid ivarsejtek. Az aneuploid ősvarsejtekben ugyanis megmarad a számfeletti kromoszóma a meiózis során, és valamelyik ivarsejt alkotójává válik (4.17. ábra). Végeredményben tehát az aneuploid élőlényektől anélkül származnak nagy gyakorisággal aneuploid ivarsejtek, hogy bennük a meiózis során elsődleges nondiszjunkciónak kellene bekövetkeznie.

Prenatális diagnosztika

A prenatális diagnosztikai módszereket elterjedten alkalmazzák elsősorban olyan esetekben, amikor viszonylag nagy az esély rá, hogy a magzat kromoszóma-garnitúrája rendellenes (mint pl. a 40 évesnél idősebb várandós asszonyok esetében). A vizsgálat során magzati sejteket kariotipizálnak. A magzataból sejteket négyféle módszerrel lehet gyűjteni: (i) a magzatvízből, (ii) a korionboholyból, (iii) a köldökvénából, vagy (iv) az anya vérkeringéséből.

BEFEJEZÉS

Az örökítő anyag szemikonzervatív módon replikálódik, hogy szabályozza a következő generációk életét, biztosítsa a fajok létét. Az örökítő anyag átadására ugyan többféle mechanizmus alakult ki az evolúció folyamán, közös jellemzőjük, hogy az átadott "egység" genomnyi. Az örökítő anyag fontos jellemzője, hogy különféle mechanizmusok révén biztosítja az élőlények sokféleségét, esélyét a túlélésre a változó életfeltételek közepette. Az örökítő anyag mennyiségének részleges változása (az aneuploidia) a sejtek és/vagy az utódok teljes vagy csökkent életképtelenségét eredményezi.



4.17. ábra. Ha az ősvarsejtek eleve aneuploidok, a meiózis során nem kell elsődleges nondiszjunkciónak bekövetkeznie, hogy aneuploid ivarsejtek képződjenek. Ez a másodlagos nondiszjunkció jelensége.

5. MENDELI GENETIKA. KAPCSOLT-SÁG ÉS GÉNTÉRKÉPEK.

Mendel szabályai. Az öröklődés típusai. Független kombinálódás. Kapcsoltság, crossing over és géntérképek.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

A tulajdonságok öröklődése régóta foglalkoztatja az emberiséget. Az öröklődés törvényszerűségeit először egy Ágoston-rendi szerzetes, Gregor Johann Mendel tette közkincsé 1865-ben. Thomas Hunt Morgan és munkatársai (1913) mutatták meg, hogy a tulajdonságok úgynevezett kapcsoltági csoportokban öröklődnek, és hogy egy kapcsoltági csoport egy kromoszómának felel meg. Ők gondolták először úgy, hogy a gének, mint gyöngyök, egy füzéren sorakoznak a kromoszómákban. Sorrendjük és távolságuk alapján szerkesztik a genetikai térképeket. Ez a fejezet az öröklődés törvényszerűségeivel foglalkozik és leírja a géntérképek szerkesztésének elvi alapjait.

Néhány fontosabb genetikai fogalom

Gén: az öröklődés és a genetikai funkció egysége, a DNS jól definiálható szakasza.

Allél: a gén olyan változata, amely a gén többi változatától megkülönböztethető.

Vadtípus: egy adott génnek a természetben leggyakrabban előforduló változata.

Lokusz: a gén helye a kromoszómában.

Genotípus: egy élőlény genetikai tartalma, egy vagy több gént, tulajdonságot illetően.

Fenotípus: mindazon látható jellegzetességek összessége, amelyek a genetikai tartalom és a környezeti tényezők együttes hatására fejlődnek ki.

Heterozigóta: olyan élőlény, amely két homológ kromoszómáján egy adott gén két különböző allélját hordozza.

Homozigóta: olyan élőlény, amely két homológ kromoszómáján egy adott gén ugyanazon allélját hordozza.

Hemizigóta: a diploid élőlényekben egyetlen kópiában jelenlevő génekre vonatkozó állapot (mint pl. az X kromoszómához kapcsolt tulajdonságok többsége az XY egyedekben.)

Recesszív: olyan allél, amely fenotípusa csak homo-, vagy hemizigóta állapotban nyilvánul meg.

Domináns: valamely allél azon képessége, hogy heterozigóta állapotban is meghatározza a fenotípust.

Expresszivitás: egy tulajdonság kifejeződésének mértéke a fenotípusban, az egyedek szintjén.

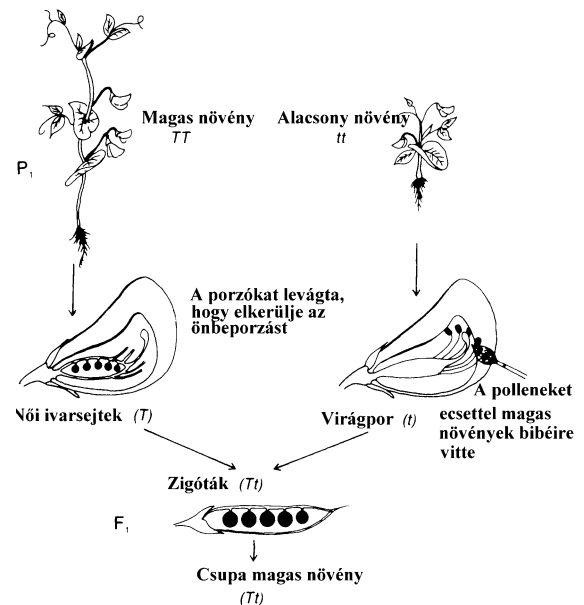
Penetrancia: a fenotípust mutató hordozók aránya a populáció szintjén.

A Mendel-szabályok

1. Az uniformitás szabálya

Mendel kísérleteiben a borsónövény ún. *tiszta vonalait* használta, amelyekben a kétféle „szülő”-növény

önmegtermékenyítéssel, sok generáción keresztül egyfajta tulajdonságot mutatott (pl. az egyik mindig magas, a másik mindig alacsony). Ma úgy fogalmaznánk, ezek *tiszta genetikai vonalak*, azaz homozigóták egy (vagy több) tulajdonságra. Első kísérleteinek egyikében Mendel magas növényeket keresztezett alacsonyakkal (5.1. ábra). Tapasztalatai szerint az első, úgynevezett F₁ generáció minden tagja egyformán (uniformisan) magas volt. Mendel első, az *uniformitás szabálya* értelmében az F₁ generáció tagjai egyformák (természetesen akkor, ha tiszta vonalakat keresztezett egymással). Az „alacsonyság” tulajdonsága látszólag eltűnt. A magas tulajdonság tehát *domináns*, az alacsony pedig *recesszív*.



5.1. ábra. A Mendel-kísérletek kivitelezésének sémája.

2. A hasadás szabálya

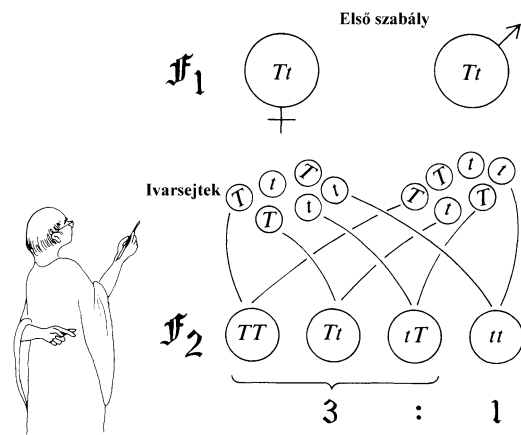
Mendel a fenit módon létrehozott F₁ generáció tagjait egymás között keresztezte (a borsó esetében ilyenkor az önmegtermékenyítés is elég), és létrehozta a második, ún. F₂ generációt. Megfigyelte, hogy az F₂ generációban 3:1 arányban voltak a magas és az alacsony növények. Mendel második, a *hasadás szabálya* értelmében az eredeti szülői (P nemzedékbeli) tulajdonságok a második generációban 3:1 arányban hasadnak. Mendel hét különböző tulajdonságpár öröklődését is tanulmányozta (5.1. táblázat).

5.1. táblázat. Mendel F₂ eredményei egy-egy allélpárra.

Tulajdonság	Domináns		Recesszív		Összesen
	darab	%	darab	%	
A mag alakja	5474	74,7	1850	25,3	7324
A sziklevél alakja	6022	75,1	2001	24,9	8023
A mag színe	705	75,9	224	24,1	929
A hüvely alakja	882	74,7	299	25,3	1181
A hüvely színe	428	73,8	152	26,2	580
A virágok helyzete	651	75,9	207	24,1	858
A szár hossza	787	74,0	277	26	1064

Mendel a 3:1-es hasadási arány alapján arra következtetett, hogy a növények magasságát két faktor határozza meg (ezeket a faktorokat nevezzük ma

géneknek!). Felismerte, hogy (i) az ivarsejtek a faktoroknak csak az egyikét hordozzák (a fenti példában vagy a T = magas, vagy a t = alacsony faktort), és hogy (ii) a női és a hím ivarsejtek véletlenszerűen kombinálódnak (5.2. ábra). Ma már tudjuk, hogy az allélok öröklődése egy olyan általános sémát követ, amelynek az alapja a homológ kromoszómák szegregációja a meiózis folyamán. A T allél a homológ kromoszómák egyikének, a t a másiknak a része (5.2. ábra). Az ivarsejtek véletlenszerű kombinálódása eredményezi a domináns allélra homozigóták (TT), a heterozigóták (T/t és t/T), valamint a recesszív allélra homozigóták (tt) képződését. Az első három típus hordozza a T domináns allélt és magas, a negyedik tt homozigóta és alacsony. A genotípusok szegregációjának, hasadásának aránya 1 TT , 2 T/t és 1 tt .



5.2. ábra. Az ivarsejtek a két faktornak csak az egyikét hordozzák, és a megtermékenyülés folyamán véletlenszerűen kombinálódnak.

A lehetséges geno- és fenotípusok számbavételére R. Punnett egy olyan eljárást dolgozott ki, amelyben egy táblázat első sorában és első oszlopában a szülők ivarsejtjeinek lehetséges genotípusai, a Punnett táblázat további helyeiben pedig az utódok lehetséges genotípusai vannak feltüntetve.

Az ivarsejtek genotípusa. Egyik szülő	Az ivarsejtek genotípusa. Másik szülő	
	T	t
T	TT	Tt
t	tT	tt

Példák a domináns-recesszív öröklődésre emberben: autoszómákhoz kapcsoltan öröklődő tulajdonságok, betegségek

Az embereknek számos olyan tulajdonságuk van, amelyek a fentebb ismertetett T és t allélpár esetéhez hasonlóan domináns-recesszív módon öröklődnek: például a barna szem domináns a kékkel, a gyapjas haj a simával szemben (csirkékben a kopasz nyak domináns a tollással szemben). Számos örökletes betegség öröklődés-mintázata is domináns-recesszív mintát követ.

Például a rövidujjúságot (brachydactylia) és a sokujjúságot (polydactylia) az autoszómákhoz kapcsolt Bd és Pd domináns mutációk okozzák.

Talán meglepő, de a sokujjúság nem alakul ki minden, a $Pd/+$ mutációt hordozó emberben: a Pd mutáció *penetranciája* nem 100%-os. A sokujjúság mértéke, a Pd mutáció *expresszivitása* is változó: $Pd/+$ emberek között vannak olyanok, akiknek mind a négy végtagján hat ujj képződik, másoknak csak az egyikén, esetleg egyiken sem.

Az öröklődő betegségek többségében a mutációra homozigóta emberek (a t/t -hez hasonló) betegek. A sok közül csak néhányat említünk érintőlegesen. A *cisztás fibrózis* (cf) Európában a leggyakoribb öröklődő halálos betegség: 2000 újszülött között egy cf/cf (a heterozigóták aránya a populációban $1/22$!) A cf/cf gyermekek tüdejében sűrű váladék képződik és pang, de hasnyálmirigy- és emésztőrendszeri tünetek is kifejlődnek. A halál általában 20-30 éves korban bekövetkezik. A CF gén a 2. kromoszóma része, egy 1480 aminosavból álló fehérjét kódol, amely a sejtmembránhoz kapcsolódva egy bizonyos klorid-ioncsatorna működését szabályozza. A mutáns fehérjék hibás vagy hiányzó kloridcsatorna-funkciót, betegséget és halált eredményeznek.

A *Tay-Sachs* betegséget a hexóaminidáz-A enzim hiánya okozza. Az enzim hiányában az idegrendszer fokozatos degenerációja majd halál következik be, általában még ötéves kor előtt. A betegséget okozó egyik allél gyakorisága $1/3600$ az askenázi zsidók között, a hexóaminidáz-A egy másik mutációja pedig ugyanilyen gyakorisággal okoz betegséget a francia-kanadaiak között.

A *fenilketonúria* a hibás fenilalanin-metabolizmus következménye. A hibás génre homozigóták szellemi fogyatékoságtól szenvednek, és általában 30 éves koruk előtt meghalnak. A *sarlósejtes vérszegénység* leggyakrabban a β -hemoglobin egyetlen aminosavának cseréje miatt következik be. Az *albinizmus* olyan mutációk következménye, amelyek a hámsejtek színanyagainak szintézisét szüntetik meg.

Az inkomplett domináns (intermedier vagy szemidomináns), és a kodomináns öröklődésmenet

Az *inkomplett domináns* (más néven intermedier vagy szemidomináns) öröklődés esetében a heterozigóták fenotípusa különbözik mind a domináns homozigóták, mind a recesszív homozigóták fenotípusától. A domináns allél által meghatározott tulajdonság kifejeződése nem teljes (inkomplett), szemidomináns vagy intermedier.

A *kodomináns* öröklődés esetében a két allél a fenotípushoz azonos mértékben járul hozzá. A legismertebb példa az A és B vércsoportok öröklődése, ahol a két allél együttes jelenléte egy új, mind az A-tól, mind a B-től különböző fenotípust, az AB vércsoportot hozza létre. (Ezzel szemben az AA emberek vércsoportja éppúgy A típusú, mint az AO embereké – azaz az A domináns a 0-val szemben, és ugyanez igaz a B és a 0 allél viszonyára is).

Nemhez kapcsolt öröklődés

Mendel kísérleteiben, vagy például a barna és a kék szemszín öröklődése során az utódok tulajdonságai nem függenek sem a szülők, sem pedig az utódok nemétől. Azokban a kísérletekben viszont, amelyekben Thomas Hunt Morgan és munkatársai a vad típusú, vörös szemű és mutáns, fehér szemű muslicákkal (*Drosophila melanogaster*) végeztek, valami más derült ki. Ha a vörös szemű nőtényeket fehérszemű hímekkel keresztezték, minden utód szeme uniform módon vörös volt – Mendel I törvényének eleget téve. Meglepetésükre viszont a *reciprok keresztezés* során, amikor is fehérszemű nőtényeket keresztezték vörös szemű hímekkel, minden hím utód szeme fehér volt és minden nőtény szeme vörös. A Morgan-csoport arra következtetett, hogy a hím utódok a fehér szemszín okozó mutációt tartalmazó allélt megkapták a nőtényektől, ugyanakkor nem kapták meg az apától az vad típusú gént hordozó homológ kromoszómát. Azt a kromoszómát, amelynek része a vörös szemszín kódoló gén is, nemi, ivari vagy X kromoszómának nevezték el.

Morgan és társai arra következtettek, hogy az X kromoszómából a nőtények testi sejteikben (így a szemükben is) kettőt, a hímek pedig csak egyet hordoznak. A reciprok keresztezésből származó nőtények tehát két X kromoszómát hordoztak, amelyek egyike anyjuktól származik és a „fehér” (mutáns), másika apjuktól, ez a „vörös” (vad típusú) allélt tartalmazta (5.2. táblázat). Miután a vörös domináns a fehérrel szemben, a nőtény utódok szeme vörös lett. Morganék elméletét igazolta, hogy ha ezeket a fehér és vörös allélt hordozó heterozigóta nőtényeket bármilyen szemű hímekkel keresztezték, fele-fele arányban születtek vörös, illetve fehérszemű hímek.

A muslica X kromoszómáján kb. 2200 gén van - a vad típusú, vörös szemszín kódoló gén csak egy közülük. A hímekre jellemző nemi kromoszómát, akárcsak az emlősökben, Y-nak nevezzük. (Érdeklőség, hogy madarakban a hímek nemi kromoszóma összetétele ZZ, a nőtényeké ZW – ők a heterozigóták.)

5.2. táblázat. A reciprok keresztezések eredménye vörös és fehérszemű muslicákkal.

A nőtény ivarsejtje	A hím ivarsejtjei	
	X	Y
X	XX vörös	XY vörös
X	XX vörös	XY vörös

reciprok keresztezés

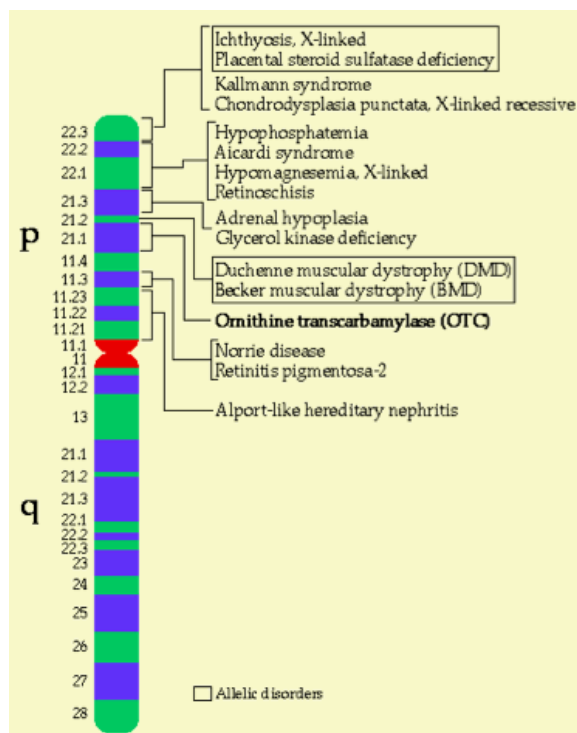
A nőtény ivarsejtje	A hím ivarsejtjei	
	X	Y
X	XX vörös	XY fehér
X	XX vörös	XY fehér

X = X kromoszóma, amely a vad típusú, vörös szemszín kódoló allélt hordozza.

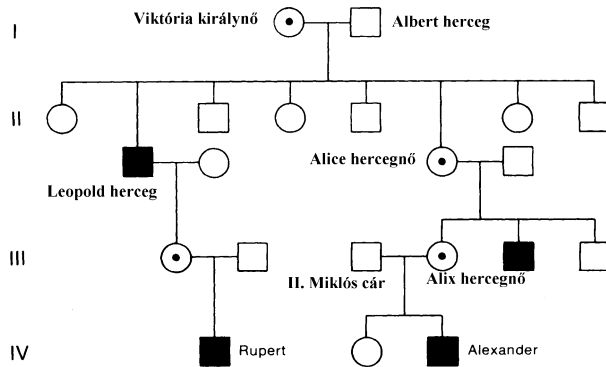
X = X kromoszóma, amely a mutáns, fehér szemszín kódoló allélt hordozza.

Az ember X kromoszómája (5.3. ábra), a muslicához hasonlóan, sok gént tartalmaz. Férfiakban az X kromoszómán található gének döntő többsége hemizigóta állapotban van, vagyis sejtenként csak egy kópiában, mert az Y kromoszóma csak nagyon kevés olyan gént tartalmaz, amely az X kromoszómának is része (ezek az úgynevezett pseudo-autoszomális gének). Az X kromoszómához kapcsolt mutációk hatása általában a férfiakban jelentkezik és jellegzetes öröklődés-mintázatot mutat: a mutáns tulajdonság (olykor betegség) ugyanazon leszármazási ágon minden második generációban a férfiakban nyilvánul meg, és a tulajdonságokat a heterozigóta hordozó lányok örökítik fiaikra (5.4. ábra).

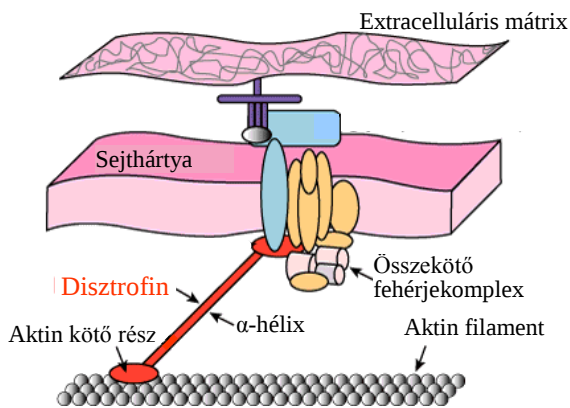
Emberben csak kevés X-hez kötött domináns mutációt ismerünk. Az X-hez kötött recesszív mutációk által okozott tulajdonságok sokkal ismertebbek (5.3. ábra). Itt csak néhányat említünk. A *Lesch-Nyhan* szindróma a hipoxanthin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) enzim hiánya miatt alakul ki. A HPRT a purin- és az ATP-bioszintézis fontos eleme. A HPRT enzim hiánya abnormális szellemi tevékenységhez, paralízishez vezet. A *vérzékenység* leggyakoribb formáját is egy X-hez kapcsolt mutáció okozza. A mutáció eredményeként véralvadási zavarok fejlődnek ki a fiúkban (5.4. ábra). Az *izomsorvadás* egyik fajtáját a disztrofin gén mutációi okozzák. A disztrofin gén a legnagyobb ismert emberi gén: 2,4 millió bázispárból áll. Az ép gén terméke, a disztrofin fehérje, a sejt váz és a külső sejt közötti állomány között teremt kapcsolatot egy transzmembrán komplexen keresztül (5.5. ábra). A disztrofin gén mutációi az izmok fokozatos sorvadását eredményezik a harmadik életévtől kezdődően. A *színvakság* vagy *Daltonizmus* és az *ichthyosis* (pikkelybőrűség) egy fajtáját is X kromoszómához kapcsoltan öröklődő mutációk okozzák.



5.3. ábra. Az ember X kromoszóma egy részének genetikai térképe.



5.4. ábra. A vérzékenység nemhez kötött öröklődése családfa bemutatásával.



5.5. ábra. A disztrofin fehérje a sejtváz és az extracelluláris állomány között létesít kapcsolatot.

A fülkagyló külső peremének szőrösödését – ritka példaként - az Y kromoszómához kapcsolt mutáns allélok okozza.

A *nemre szorító* (angolul sex-limited) öröklődés kifejezés olyan génekre vonatkozik, amelyek csak az egyik nemben fejeződnek ki. Az elsődleges és a másodlagos nemi tulajdonságok változatai nyilvánvaló példák (nehéz volna az emlő vagy a tőgyalak genetikáját a hímeken tanulmányozni, bár az emlő és a tőgy alakjára vonatkozó géneket a hímek is öröklítik utódaikra). A mindkét nemben, ám a különböző nemekben különböző mértékben/módon kifejeződő tulajdonságok *nem által befolyásolt öröklődést* (angolul sex-influenced) mutatnak (például a kopaszság bizonyos típusai öröklődnek a nem által befolyásolt módon).

Keresztezések két génnel: A 3. Mendel-szabály: a független kombinálódás

Mendel olyan kísérleteket is folytatott, amelyekben két allélpár öröklődését követte, pl. az Y/y és az R/r allélpárokét (Y = sárga, y = zöld színű borsó magvak, R = gömbölyű és r = szögletes magvak; Y és R a domináns, y és r a recesszív allélok). Mendel $YY; RR$ borsókat keresztezett $yy; rr$ borsókkal. Az F_1 generációban a magvak uniform módon sárgák és

gömbölyűek voltak, genotípusuk pedig $Y/y; R/r$. Mendel egymás között keresztezte az $F_1 Y/y; R/r$ borsókat (vagy önmegtermékenyítést alkalmazott), és létrehozta az F_2 generációt (5.3. táblázat).

5.3. táblázat. Az $Y/y; R/r \times Y/y; R/r$ keresztezésből származó F_2 utódok geno- és fenotípusa Pannett-táblázatban.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímivarsejtek genotípusa			
	$Y; R$	$Y; r$	$y; R$	$y; r$
$Y; R$	$YY; RR \bigcirc$	$YY; Rr \bigcirc$	$Yy; RR \bigcirc$	$Yy; Rr \bigcirc$
$Y; r$	$YY; Rr \bigcirc$	$YY; rr \square$	$Yy; Rr \bigcirc$	$Yy; rr \square$
$y; R$	$Yy; RR \bigcirc$	$Yy; Rr \bigcirc$	$yy; RR \bullet$	$yy; Rr \bullet$
$y; r$	$Yy; Rr \bigcirc$	$Yy; rr \square$	$yy; Rr \bullet$	$yy; rr \blacksquare$

A fenotípusok: $\bigcirc$ = sárga és gömbölyű; $\square$ = sárga és szögletes; $\bullet$ = zöld és gömbölyű; $\blacksquare$ = zöld és szögletes.

Az F_2 generációban az arányok a következők voltak: sárga+gömbölyű : zöld+gömbölyű : sárga+szögletes : zöld+szögletes = $9:3:3:1$. A $9:3:3:1$ hasadási arány alapján Mendel arra következtetett, hogy a sárga/zöld és a gömbölyű/szögletes faktorok (ma: gének) függetlenül kombinálódva öröklődnek. [Vegyük észre, hogy a $9:3:3:1$ hasadási arány a (sárga : zöld = $3:1$) $\times$ (gömbölyű : szögletes = $3:1$) - azaz két mendeli tulajdonság szegregációs arányának szorzata.] A fentiek alapján Mendel harmadik szabálya azt mondja ki, hogy a különféle tulajdonságokat kódoló faktorok függetlenül kombinálódva öröklődnek. Ma tudjuk, hogy a független kombinálódás természetes, ha a két allélpár *különböző* autoszómákhoz kapcsoltan öröklődik a meiózis során.

A 5.3. táblázat komplikáltnak tűnhet. Az ilyen, ún. kétfaktoros keresztezések áttekinthetőbbé tételéért a genetikusok *tesztelő keresztezéseket* (angolul test cross) alkalmaznak. Ez különösen akkor hasznos, ha meg szeretnénk ismerni egy adott egyed genotípusát a vizsgált génekre. A tesztelő keresztezésekben a partnerek egyike homozigóta a recesszív allélokra, amint azt a 5.4. táblázat mutatja. A tesztelő keresztezés eredményének értelmezése egyszerűbb, mert ebben az esetben csak négyféle utód jöhet létre. Figyeljük meg, hogy a tesztelő keresztezés során az utódok fenotípusában tükröződik az ismeretlen genotípusú szülő genetikai összetétele!

A *rekombinánsok* – vagyis a két szülő bármelyikétől eltérő genetikai kombinációt hordozó egyedek - aránya az utódok között független öröklődés esetében 50%.

5.4. táblázat. Az $Y/y; R/r \times y/y; r/r$ tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az Y/y és az R/r allélok különböző kromoszómák részei.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímivarsejtek genotípusa $y; r$	Az utódok típusa	Az utód típusok aránya
$Y; R$	$Yy; Rr \bigcirc$	szülői	25%
$Y; r$	$Yy; rr \square$	rekombináns	25%
$y; R$	$yy; Rr \bullet$	rekombináns	25%
$y; r$	$yy; rr \blacksquare$	szülői	25%

A fenotípusok: $\bigcirc$ = sárga és gömbölyű; $\square$ = sárga és szögletes; $\bullet$ = zöld és gömbölyű; $\blacksquare$ = zöld és szögletes.

Kapcsoltság, kapcsoltági csoportok

A fenti tesztelő keresztezés utódaiban az egyes geno-, illetve fenotípusok aránya 1:1:1:1 (5.4.-es táblázat). Elsőként Thomas H. Morgan csoportja figyelte fel arra, hogy miközben kettős heterozigótákkal (azaz két különböző génre egyaránt heterozigóta egyedekkel) tesztelő keresztezéseket végeztek, az utódgenerációkban a fenotípusok aránya nem volt mindig 1:1:1:1. Az 1:1:1:1-től eltérő hasadási arány azt mutatja, hogy a két különböző gén (illetve alléljaik) nem függetlenül kombinálódnak, hanem *kapcsoltan öröklődnek*. Kapcsoltan, mert – ahogy már Morganék is feltételezték – nem különböző kromoszómák részei, hanem ugyanahhoz a kromoszómához kapcsoltan öröklődnek, és egymás közelében vannak. Így érthető, hogy a szülői kategóriák (mint az $A B$ és $a b$; 5.5. táblázat) gyakoribbak, mint a rekombinánsok ($A b$ és $a B$), hiszen a meiózis során nagy eséllyel ugyanazon a kromoszómán maradnak. Ugyanakkor a két szülői, valamint a két rekombináns „osztály” aránya 1:1 ($A B : a b = 1:1$, és $A b : a B = 1:1$). A két rekombináns osztály azonos gyakorisága azt jelzi, hogy a rekombinánsok egyetlen esemény két, egymást kiegészítő „termékei”.

Az esemény a meiózis mikroszkópos megfigyelése során már kiazmaként megismert átkeresztződéssel kapcsolatos mechanizmus, a *crossing over*.

5.5. táblázat. Egy növényi példa: az $A/a; B/b \times a/a; b/b$ tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az A/a és az B/b allélok ugyanannak a kromoszómának a részei, kapcsoltan öröklődnek.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímivar-sejtek genotípusa $a b$	Az utódok típusa	Az utód típusok aránya ¹
$A B$	$A B/a b$ 	szülői	45%
$A b$	$A b/a b$ 	rekombináns	5%
$a B$	$a B/a b$ 	rekombináns	5%
$a b$	$a b/a b$ 	szülői	45%

A fenotípusok:  = sötét, karéjos szíromlevelek;  = fehér, csipkés szíromlevelek;  = fekete, csipkés szíromlevelek;  = fehér, karéjos szíromlevelek.

¹ = egy példa.

A kapcsoltan öröklődő gének közötti távolságot a rekombinánsok gyakoriságával (%-ban) fejezik ki a következő összefüggés alapján:

$$\frac{\text{rekombináns utódok száma}}{\text{összes utód száma}} \times 100.$$

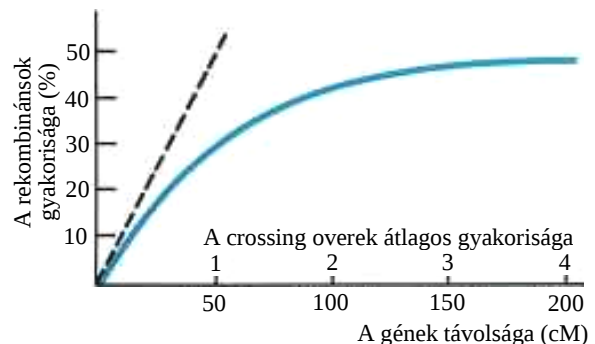
és Thomas H. Morgan tiszteletére *centiMorgan* (cM) egységben mérik. Az a két gén van 1 cM-ra egymástól, amelyek között 1%-os gyakorisággal képződnek rekombinánsok. A fenti példában az A és a B gének közötti távolság $= (5+5 / 45+5+45) \times 100 = 10$ cM.

A legnagyobb mérhető távolság 50 cM. Ha ugyanis két gén ≥ 50 cM-ra van egymástól, a rekombinánsok gyakorisága 50%. Éppen annyi, mint a rekombináns kategóriáké a különböző kromoszómákon levő allélpárok esetében (lásd 5.4. táblázat), vagyis mintha a

két vizsgált gén különböző kromoszómához kapcsoltan öröklődne. Mendel 3. szabálya tehát módosul: a különböző kromoszómákon, valamint az ugyanazon a kromoszómán, de egymástól ≥ 50 cM-ra levő gének függetlenül kombinálódva öröklődnek.

Mivel a rekombináns kromoszómák (utódok) arányát valamely két pont között esetleg bekövetkező második crossing over csökkenti, torzul a gének közötti mért és valós genetikai távolság. A gének között mért és valódi genetikai távolságok viszonyát JBS Haldane (1919) térképfüggvénye írja le (5.6. ábra):

$r = \frac{1}{2} (1 - e^{-2m})$, ahol r a rekombináns kromoszómák aránya, m pedig a crossing overek átlagos száma a két gén között.



5.6. ábra. Haldane térképfüggvénye a rekombinánsok gyakorisága (kék) és a gének valódi távolsága (szaggatott vonal) közötti összefüggést írja le.

A fentiek miatt a térképtávolságokat rövid, rendszerezint kisebb, mint 10 cM egységekben mérik, majd a kis távolságokat összeadják. A nagy kromoszómák térképei jóval több, mint 100 cM hosszúak, a kisebbeké akár csak néhány cM-nyiak is lehetnek.

A genetikai térképek

A rekombinánsok típusa és gyakorisága alapján A. H. Sturtevant már az 1910-es évek elején olyan módszert dolgozott ki, amellyel genetikai térképek szerkeszthetők, vagyis meghatározható a kapcsoltan öröklődő gének (i) sorrendje, valamint (ii) a köztük levő távolságok is. A genetikai térképek egysége a cM.

Morgan és Sturtevant azt is megmutatta, hogy a gének, mint gyöngyök a füzéren, lineárisan követik egymást és ún. *kapcsoltági csoportokat* alkotnak. A kapcsoltági csoportok száma azonos a haploid kromoszómaszámmal. A 20. század elején az ő munkájuk hatására vált nyilvánvalóvá, hogy a kromoszómák valóban az öröklődő tulajdonságok anyagi hordozói. Morgan és sokan mások bizonyították, hogy az öröklődés törvényszerűségei általános érvényűek az élővilágban.

Részletes genetikai térképek később nemcsak a muslica, hanem más fajok esetében is készültek. Folyamatosan bővítették az élesztő, a kukorica, az egér, az ember és néhány más faj géntérképét is – jóval azelőtt, hogy nemhogy a DNS-szekvenálás technikáját, de az örökítő anyag szerkezetét is ismerték volna! A kutatók ehhez úgynevezett *markermutációkat* használtak fel. Ezek olyan génváltozatok, amelyek fenotípusa a kísérletező számára jól látható, a keresztezések során

generációról generációra követhető az őket hordozó kromoszómák öröklődése, ugyanakkor nem befolyásolják a kísérleti alany életképességét. Ilyen például a muslicák esetében a szemszín vagy a szárnyalak, egéknél a szőrszín, stb.

A genetikai térképek – ma már a fizikai, azaz szekvencián alapuló térképekkel együtt - teszik lehetővé az öröklődő tulajdonságok molekuláris szintű vizsgálatát, a gének molekuláris klónozását, módosítását és akár a génterápiát is.

A családfák

A tulajdonságok generációkon át történő öröklődését a családfákkal szokás szemléltetni (5.4. ábra). A családfák egy, esetleg néhány tulajdonság öröklődését szemléltetik. A családfák tanulmányozása alapján megállapítható, hogy milyen öröklődésmenetet követ az illető tulajdonság (vagy öröklődő betegség), amely ismeret segít a lehetséges utódok esetében egy adott fenotípus gyakoriságának megállapításában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az öröklődés először Mendel által leírt törvényszerűségei általános érvényűek az eukariótákban, és összhangban vannak a kromoszómák "viselkedésével" a meiózis folyamán. Bizonyos jelenségekkel azonban Mendel nem szembesült.

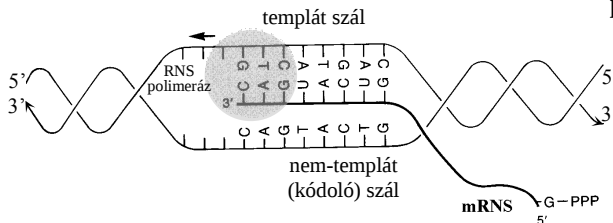
Az ivari kromoszómákon található gének esetében nem mindegy, hogy adott fenotípusú szülő milyen nemű volt – vagy másképp: az utódok fenotípusa függ attól, hogy az adott allélt milyen nemű utód örökölte.

A kromoszómákon egymás közelében található gének öröklődése eltér attól, amelyet Mendel 3. szabálya rögzít – ez utóbbi csak különböző kromoszómákon kódolt, illetve egyazon kromoszómán található, de igen távol elhelyezkedő génpárok esetében igaz. Ekkor ugyanis biztosan bekövetkezik közöttük rekombináció, és úgy viselkednek az utódok genotípusa szempontjából, mintha külön kromoszómákon lennének.

A markermutációk (látható fenotípust eredményező allélok) tették lehetővé a géntérképezést, a kapcsoltsági csoportok felállítását, az eligazodást a gének között – már az 1920-as - 30-as években is. A genetikai és fizikai géntérképek a molekuláris genetika alapjai.

hogyan vannak ritka kivételek...). Ezt a szálakat magyarul *templát* (vagy *értelmes*, de: angolul: antisense) szálaknak nevezik (9.2. ábra).

Ugyanakkor – prokariótákban és eukariótákban is – a teljes kromoszómán belül a DNS kettős spirálnak *mindkét szálán* vannak *templátként szolgáló szakaszok* (ezek természetesen legtöbbször különböző génekhez tartoznak).

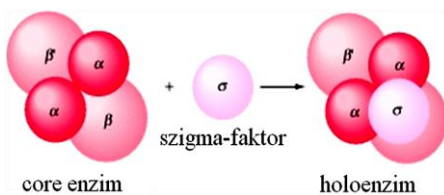


9.2. ábra. Az mRNS szintézisekor mintaként szolgáló DNS-szálat templátnak nevezik – ez komplementer a képződő mRNS-sel, míg a nem-templát DNS-szál szekvenciája *megegyezik* vele (ezért ez utóbbit gyakran kódoló szálnak hívják). A templát szál az RNS-polimeráz 3'→5' irányban olvassa, mert az mRNS csak 5'→3' irányban történhet.

TRANSZKRIPCIO PROKARIOTÁKBAN

Az RNS-polimeráz

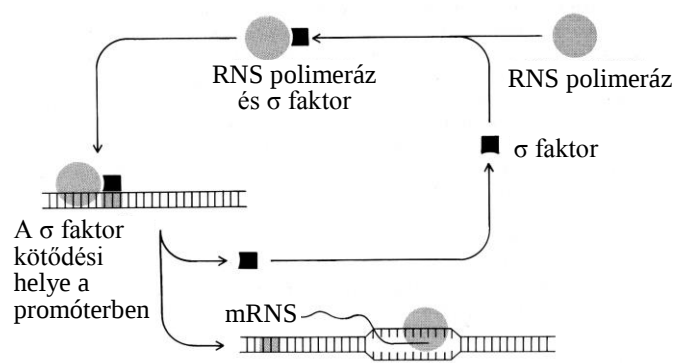
Az mRNS molekulákat óriás méretű fehérjekomplex szintetizálja, a DNS-függő RNS polimeráz, röviden *RNS-polimeráz*. *E. coli*-ban az RNS-polimeráz tömege kb. 490 kDa. Az enzim magját (core enzim) két α , egy β , egy β' és egy ω egység alkotja (9.3. ábra). Az RNS polimeráz magja a DNS bármely részéhez kapcsolódhat és elkezdheti az mRNS szintézisét. Az úgynevezett holoenzim, azaz a teljes enzimkomplex akkor alakul ki, amikor az enzim magja egy további fehérjével egészül ki, a σ (szigma) faktorral (9.3. ábra).



9.3. ábra. A bakteriális RNS-polimeráz enzim magja + σ faktor = holoenzim

A σ faktor az a komponens, amely az RNS-polimeráz a DNS jellegzetes helyeihez, a promóterekhez irányítja. A promóterhez történt kapcsolódás és az első nukleotidok szintézise után a σ faktor kiválik a komplexből, hogy egy további RNS-polimeráz irányítson egy másik promóterhez (9.4. ábra).

Eukariótákban egy RNS-polimeráz komplexet 10-15 fehérje alkot. Az RNS-polimeráz tömege 500 kDa. Mégis, a pro- és eukarióta polimerázok minden bizonnyal közös eredetűek, mert az *E. coli* RNS-polimeráz minden alegysége homológ az eukarióta RNS-polimeráz valamelyik komponensével. Az eukarióta RNS-polimerázoknak funkcióik és α -amanitin



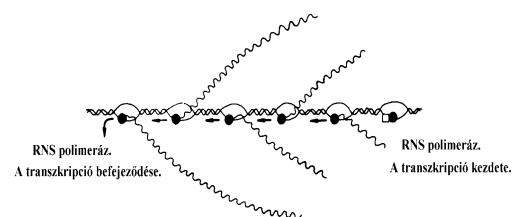
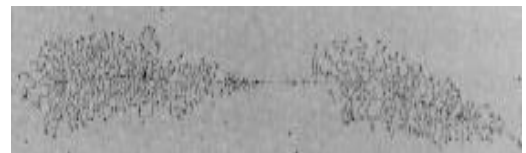
9.4. ábra. A σ faktor az RNS polimeráz holoenzimet a promóterhez irányítja.

érzékenységek alapján három típusuk van (9.1. táblázat).

Az mRNS-nek, mint minden más nukleinsavnak a szintézise 5'→3' irányban történik (9.2. ábra). Miután az mRNS komplementere a DNS templát szálának, és miután a komplementer szálak antiparalel állásúak, az RNS-polimeráz a templát szálát 3' → 5' irányban olvassa. A transzkripció sebessége 15-20 nukleotid/sec. (Az összehasonlítás kedvéért: a replikáció sebessége eukariótákban 170 nukleotid/sec, a transzlációé 2 aminosav/sec.) A különböző génekről különböző gyakorisággal képződnek mRNS-ek: némelyik gén esetében 1-2 mRNS/sec, mások esetében óránként mindössze egy.

Eukariótákban speciális fehérjék, úgynevezett *transzkripciós faktorok* is szükségesek a transzkripcióhoz. A transzkripciós faktorok valamennyien a DNS-hez kötődni képesek fehérjék, a DNS nagy árkának „letapogatásával” specifikus szekvenciákat ismernek fel.

A transzkripció elektronmikroszkópban láthatóvá is tehető (Oscar Miller). Egy intenzíven átírt gén esetében a képződő mRNS-ek úgy néznek ki, mint karácsonyfán az ágak (9.5. ábra). Az mRNS-ek elhelyezkedése és mérete világosan kijelöli a gén határait, azt a két pontot, ahol elkezdődik, és ahol befejeződik az mRNS szintézise.



9.5. ábra. A transzkripció során az egy génről képződő mRNS-ek karácsonyfaszerű képet mutatnak.

9.1. táblázat. Az RNS polimerázok jellemzői

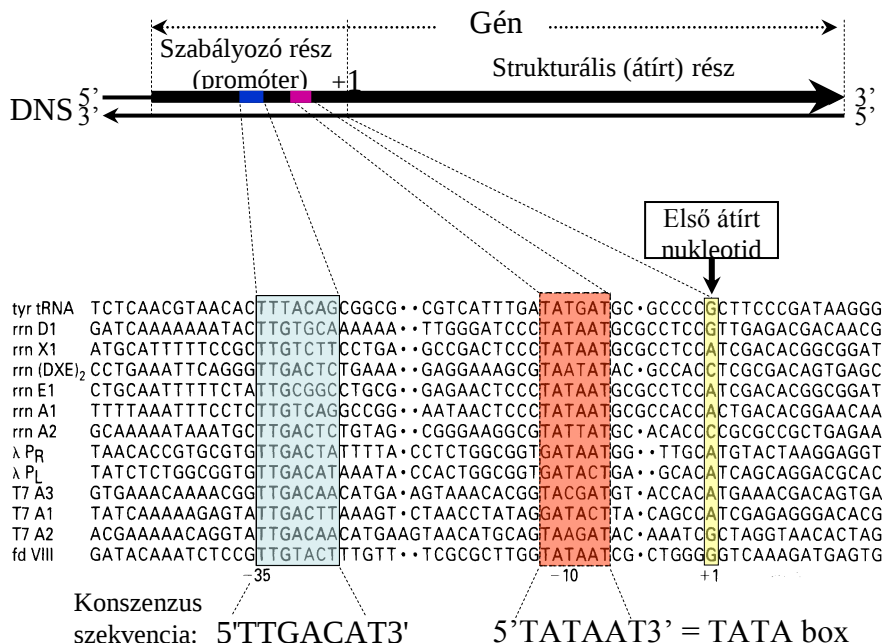
RNS polimeráz	A szintetizált RNS típusa	α -amanitin* érzékenység	Számuk sejtenként
I.	Riboszomális RNS	Nem érzékeny	Negyvenezer
II.	mRNS	Nagyon érzékeny	Negyvenezer
III.	transzfer RNS és 5S rRNS	Mérsékelt érzékeny	Húszezer

* a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) alkaloidja.

A promóter

Korábban szó volt róla, hogy az RNS-polimeráz a DNS promóter régiójához kötődik. Az RNS-polimeráz a promóterhez kötődve marad, ha hiányoznak az elindulásához, az mRNS szintéziséhez szükséges építőelemek. Ekkor a DNS a hozzá kapcsolódó RNS-polimerázzal együtt izolálható. A DNS-nek az RNS-polimerázzal nem lefedett részeit a DNS-t hasító endonukleázzal el lehet bontani, így a DNS-nek csak az RNS-polimeráz által védett promóter-részei maradnak épek, amelyeket izolálni, vizsgálni, szekvenálni lehet.

A polimeráz egy kb. 50 bázispárból álló DNS szakaszt véd meg a DN-áztól. A különféle gének promóter-szekvenciáinak összehasonlítása alapján arra derült fény, hogy a promóterekben két erősen konzervált szakasz, úgynevezett box van (boxnak a DNS evolúciósan erősen konzervált szakaszát nevezzük). A leggyakoribb nukleotidokból álló, az összeshez legjobban illeszkedő szekvenciát *konszenzus szekvenciának* nevezik.



9.6. ábra. A prokarióták promótereiben (itt az *E. coli* 13 génjének promóterében) két erősen konzervált szekvencia ismerhető fel. Mindkettőhöz az RNS-polimeráz kötődik. A -35. hely környékén levőt kék, az ún. TATA-boxot narancssárga téglalap jelzi. A transzkripció a +1-el jelölt helyen kezdődik (sárga). Az első átírt nukleotid az esetek többségében A vagy G.

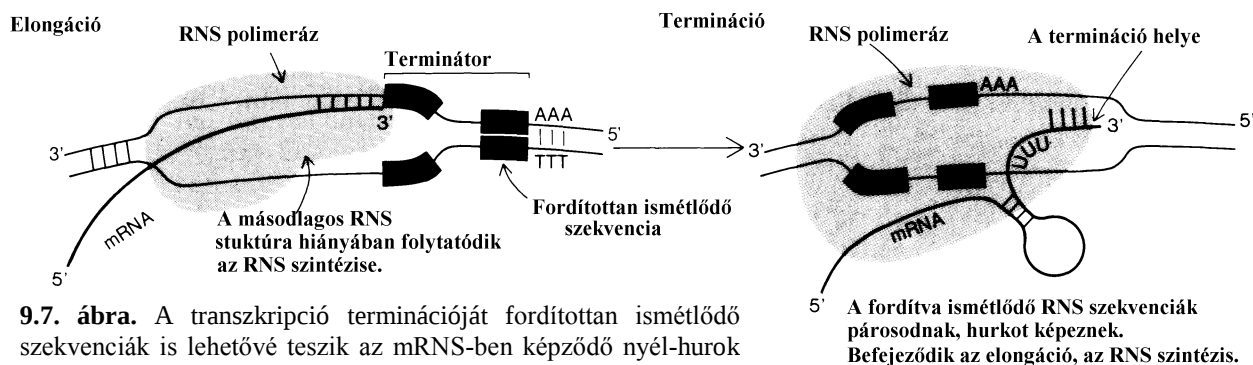
Az egyik szakasz a -35. hely körül helyezkedik el, és leggyakrabban az 5'TTGACAT3' sorrendű nukleotidok alkotják (9.7. ábra). Az 5'TTGACAT3' szekvencia ahhoz szükséges, hogy az RNS-polimeráz σ faktora a DNS-hez kötődhessen.

Az úgynevezett TATA-boxot többnyire 5'TATAAT3' sorrendben alkotják a nukleotidok (9.6. ábra). (A TATA-boxot prokariótákban felfedezője, David Pribnow tiszteletére Pribnow-boxnak is nevezik.) A TATA-box A=T bázispárokból gazdag. Ez az a hely a promóteren belül, ahol az RNS-polimeráz kötődése után a DNS két szála könnyen elválasztható, lehetőséget teremtve a templát DNS-szál átírására. A transzkripció a TATA-boxtól 5-9 bázispárral „lentebb”, a 3' irányban kezdődik. A templát az a szál lesz, amely komplementer a TATA-boxot tartalmazó (kódoló) szállal. Az első átírt nukleotid többnyire purin bázis (9.6. ábra).

Bár a két erősen konzervált szekvencia közötti rész nem konzervált, hossza mindig 15-17 bázispár. A két box közötti szakasz egy részének, vagy akár egyetlen bázispárjának deléciója csökkenti, vagy megszünteti az adott promóter aktivitását, a gén kifejeződését.

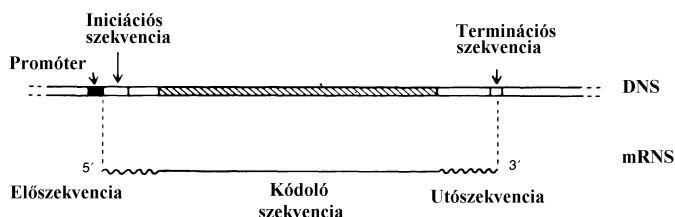
A transzkripció terminációja

E. coli-ban a transzkripció terminációjának két típusa van. (i) Sok gén esetében egy fehérje, az ún. *rho* faktor, biztosítja a transzkripció befejeződését. (ii) A második megoldás alapjai fordítva ismétlődő (inverted repeat) szekvenciák. A fordítva ismétlődő szekvenciák transzkripciója után az mRNS olyan komplementer szekvenciákat tartalmaz, amelyek egymással párosodnak és nyél-hurok (hajtű) szerkezetet képeznek (9.7. ábra). A nyél-hurok szerkezet kialakulása után nem sokkal az mRNS leválik az RNS-polimerázról, befejeződik a transzkripció.



Az mRNS szakaszai

Minden prokarióta mRNS-t három szakasz alkot (9.8. ábra). (1) Az ún. *előszekvencia* (angolul leader sequence) az mRNS 5' végétől az AUG (start) kodonig tart. Szerepe az mRNS-riboszóma kapcsolat megteremtése a fehérjeszintézis elkezdődéséhez. (2) A *kódoló szekvencia* vagy nyitott leolvasási keret (angolul open reading frame, ORF) az AUG kodontól az első stop kodonig tart. (3) Az *utószekvencia* (angolul trailer sequence) az első stop kodontól az mRNS 3' végéig tart. A elő-, illetve az utószekvenciát szokás 5', illetve 3' nem-transzlálódó régióknak is nevezni. (Angolul untranslated region, 5'UTR, illetve 3'UTR.)



9.8. ábra. A DNS és a kódolt mRNS szerkezete közötti kapcsolat prokariótákban.

TRANSZKRIPCIÓ EUKARIÓTÁKBAN

Az eukarióta promóter

A legtöbb eukarióta gén promóterében is gyakran felismerhető két erősen konzervált szakasz. Az itt is megtalálható TATA-box konszenzus szekvenciája 5TATA^A/T^AA^A/3', és felfedezője tiszteletére Hogness-boxnak nevezik (9.9. ábra). Eukariótákban további, a TATA-boxhoz közeli DNS-szekvenciák, és távolabb található enhanszerek, valamint silencerek is szabá-

5'-----+1 3'  mRNS →

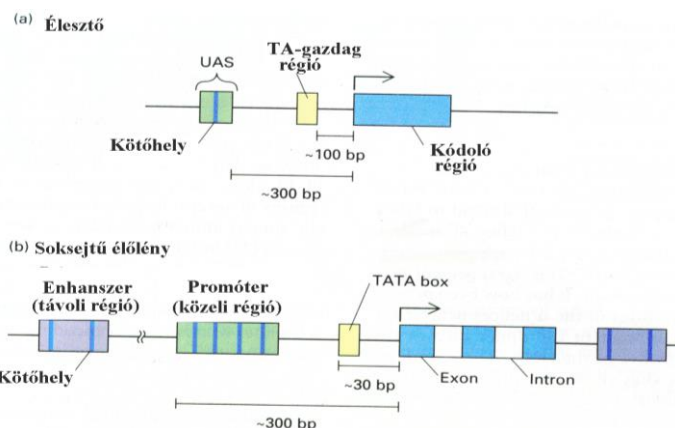
A bázisok gyakorisága	A	17	22	13	7	97	7	85	63	89	50	33	18
T	17	27	11	82	2	93	10	37	10		33	12	16
C	50	38	53	1	1	0	0	0	0		13	38	48
G	16	13	23	10	0	0	5	0	1		4	17	18

Konszenzus szekvencia: **T A T A A/T A**

9.9. ábra. TATA-box az eukarióta gének promóterében. A felső vonal a DNS 5'→3' szálát mutatja, és azt, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő az adott helyen a különféle bázisok nagyon sok eukarióta gén promóterében. A színes téglalappal jelzett helyen a TATAA/TA szekvencia fordul elő a leggyakrabban.

lyozzák a transzkripciót, a gének kifejeződését, erről egy későbbi előadás során lesz részletesen szó (9.10. ábra).

A transzkripció kezdetén az RNS-polimeráz a TATA-boxnál tekeri szét a DNS két szálát, majd a 3' irányba 18-26 nukleotidnyit gördülve, a +1. helyen elkezd a transzkripciót, azaz az mRNS szintézisét. A templát szál itt is az lesz, amely komplementer a TATA-boxot tartalmazó (kódoló) szállal.



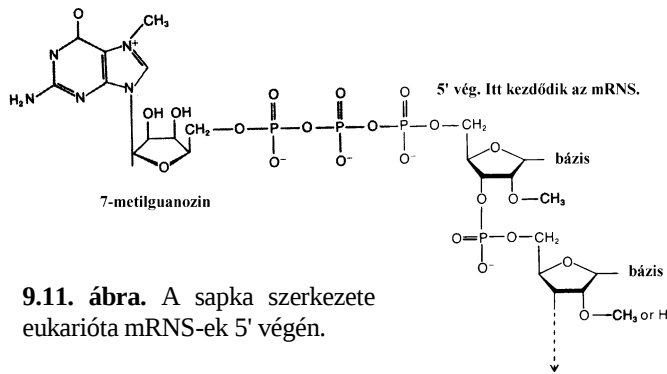
9.10. ábra. Szabályozó szekvenciák az élesztő és egy soksejtű élőlény DNS-ében. A kötőhelyek azokat a DNS-szakaszokat jelölik, amelyekhez transzkripciósfaktorok kapcsolódhatnak. (UAS= upstream activating sequence)

A pre-mRNS érése

A legtöbb eukarióta mRNS egy *érés*i folyamat eredménye, amelyet angolul processing-nek neveznek. A transzkripció első lépésében úgynevezett *pre-mRNS* molekulák képződnek. A pre-mRNS-ek összessége alkotja a heterogén sejtmagi RNS-ek populációját (hnRNS). (Ez az elnevezés még abból az időből származik, amikor még nem ismerték a magban nagy tömegben található, sokféle méretű RNS természetét). A pre-mRNS-ek érésük során három lépésben módosulnak.

1. A „cap” képződése

Első lépésben egy ún. „sapka” (cap) képződik a még teljesen át sem íródott pre-mRNS 5' végére. A „sapka” egy 7-metil-guanozinból és 1-2 további metil-csoportból áll (9.11. ábra), egy enzimkomplex építi az 5' végére. A „sapka” a pre-mRNS-t, és a később belőle képződő mRNS-t védi a degradációtól. Szükséges továbbá az mRNS sejtmagból való kijutásához, valamint az mRNS-riboszóma kapcsolat megteremtéséhez.

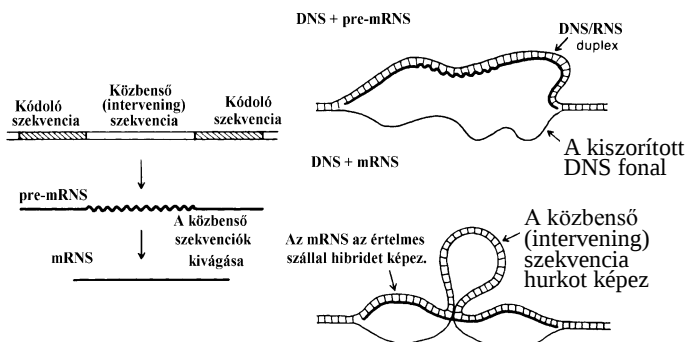


9.11. ábra. A sapka szerkezete eukarióta mRNS-ek 5' végén.

2. A splicing

A hnRNS-állományt alkotó pre-mRNS-ek mérete néhány száz és több mint egy millió nukleotid között változik. Ugyanakkor, míg például a β -globin pre-mRNS kb. 1500 nukleotid hosszú, az érett, már a citoplazmában levő β -globin mRNS csak kb. 700 nukleotidból áll. Amikor a β -globint nagyon nagy mennyiségben szintetizáló madár vörösvérsejtekből sejtmagi hnRNS-t (ma már tudjuk: pre-mRNS-t) izoláltak, majd a kódoló (denaturált) DNS-el hibridizálták és az RNS/DNS hibridet elektronmikroszkópban vizsgálták, két egymáshoz tapadó vastagabb, kettős szál (az RNS-DNS-hibrid) és egy vékony, egyszálú DNS-szakasz látszott (9.12. ábra).

A citosolból izolált érett mRNS is hibridizált a kódoló DNS-el. Azonban az előzőtől különböző szerkezetet láttak: a DNS-szakasz egy része hurkot képezett (9.12. ábra) – mert a neki megfelelő szekvencia hiányzott az mRNS-ből. Tehát a pre-mRNS-ből bizonyos szakaszok kivágtak még a sejttagon belül. A kivágott szakaszt *intronnak* (angolul intervening sequence, intron) nevezik. Az a folyamat, amely során az intronok kivágódnak a pre-mRNS-ekből, a *splicing* (szplájszing). A megmaradó RNS szakaszok (*exonok*) képezik az érett mRNS-t. Az intron/exon fogalma nemcsak pre-mRNS-re, hanem a gén megfelelő DNS-szakaszaira is alkalmazható: a kódoló régió belül intronok, amelyek az érett mRNS-ben nincsenek benne, illetve exonok, amelyek az érett mRNS-ben is jelenlévő szakaszt kódolnak.



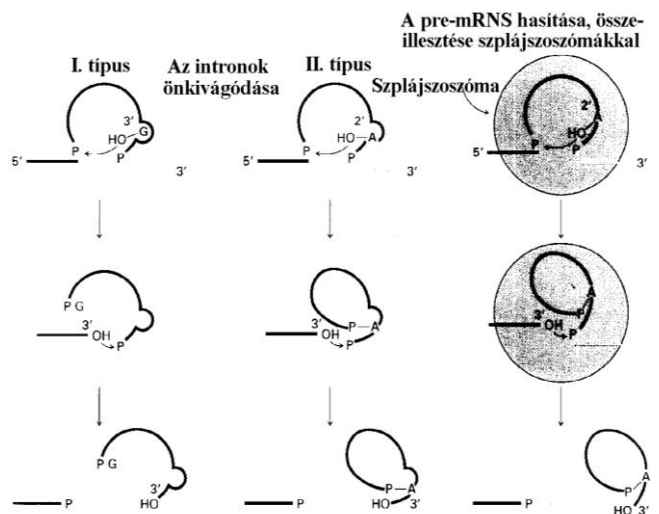
9.12. ábra. Az intronnak megfelelő szekvenciák kihurkolódnak az RNS/DNS hibridekből.

Ugyanabból a pre-mRNS-ből különféle mRNS-ek képződhetnek a különféle sejt típusokban vagy az egyedfejlődés különböző szakaszaiban (*alternatív splicing*). Vannak olyan DNS-szekvenciák, amelyek bizonyos

esetekben intronok, máskor exonok. Az intronok/exonok változó kombinációja a kódoló DNS gazdaságos felhasználását biztosítja: egyetlen génnel többféle, többé-kevésbé eltérő funkciójú fehérje is kódolható. Az intronoknak másfajta, evolúciós jelentősége is van: az intronok területén „szabadabb” a rekombináció lehetősége (mert nem érintik a képződő fehérje szerkezetét), exonok kerülhetnek egyik génből a másikba, és maguk is exonokká válhatnak az evolúció során. Sőt, vannak olyan gének, amelyek egy másik gén intronjában vannak.

A pre-mRNS-ek splicingja többféle módon történhet.

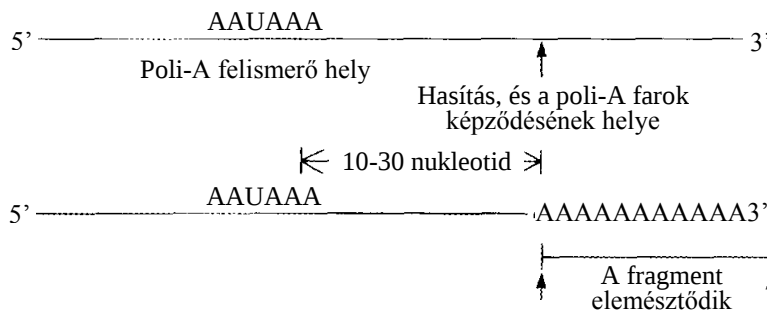
(1) A legtöbb pre-mRNS érése a *spliceosomák* közreműködésével történik. A spliceosomákat kis sejtmagi, ún. snRNS molekulák, valamint a hozzájuk kapcsolódó speciális fehérjék alkotják. Az snRNS-ekből többet ismerünk (U1 – U12), de a leggyakoribbak az együttműködő U1, U2, U4, U5 és U6 snRNS-ek. A spliceosomák snRNS-ei katalitikus aktivitással bírnak. Felismerik a pre-mRNS-ekben az intron/exon-határt (jellegzetes szekvenciákat), elhasítják a pre-mRNS-eket, két átészterezéssel lasszó alakban kivágják az intron-szekvenciákat, majd ligálják az exonoknak megfelelő részeket (9.13. ábra). Az intronok ezek után gyorsan lebomlanak a sejtmagban található RNS-bontó komplex, az *exoszóma* segítségével. A kivágódás helyének pontossága nagyon fontos, hiszen a fehérjét kódoló, az összekapcsolt exonok által meghatározott szekvencia megváltozása mutációval járhat. Ezért az exon/intron határon levő nukleotidok igen erősen konzerváltak.



9.13. ábra. Az intron-szekvenciák kivágása pre-mRNS-ből ön-splicing-gal (I. és II. típus) és a spliceosomával.

(Érdekesség, hogy a spliceosomák megismerésében a *Lupus erythematosus* - farkasfoltosság – nevű autoimmun betegség volt a kutatók segítségére: néhány farkasfoltos beteg vére olyan ellenanyagot tartalmazott, amely a spliceosomák valamelyik komponense ellen képződött. Az így rendelkezésre álló ellenanyagok tették lehetővé a spliceosomák izolálását, tanulmányozását.)

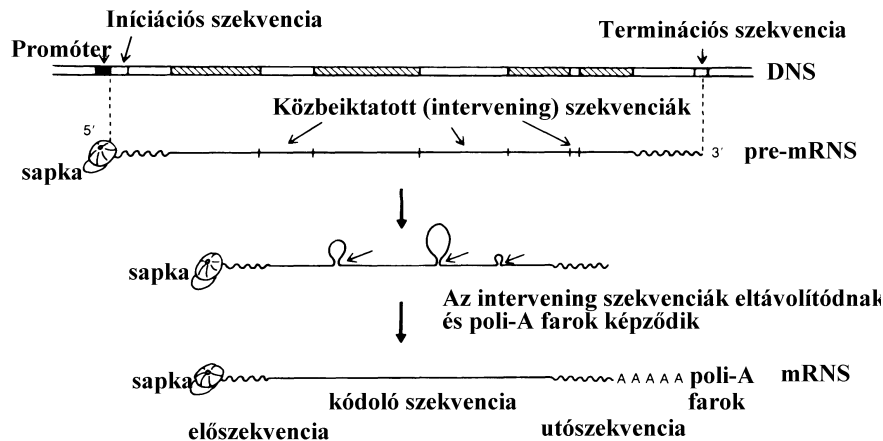
(2) Vannak olyan pre-mRNS-ek (és pre-rRNS-ek, pre-tRNS-ek is!), amelyek ön-splicinggal, kétféle módon távolíthatják el magukból az intronokat (9.13. ábra). Ezekben a pre-RNS-ekben található intronoknak maguknak van olyan katalitikus aktivitása, amely éppen saját kivágódásukat és az exonok ligálását katalizálja.



9.14. ábra. A poli-A farok képződésének mechanizmusa eukarióta mRNS-ek 3' végén.

be és exportálódik a citoplazmába, vesz részt a transzlációban. Az intronokat alkotó szekvenciák sohasem hagyják el a sejtmagot, hanem az exoszómák révén elemésződnek. Az érett mRNS-ek pedig exportálódnak a citoplazmába.

A prokariótákhoz hasonlóan az érett eukarióta mRNS-nek is három fontos része van: az előszekvencia, a nyitott leolvasási keret és az utószekvencia (9.15. ábra). Az érett mRNS-ek alapján szintetizálódnak a fehérjék a transzláció során a citoplazmában.



9.15. ábra. Egy tipikus eukarióta mRNS képződése és szerkezete.

Közülük a II. típusú önkivágódó intronok mechanizmusukban és szerkezetükben nagyon hasonlítanak a spliceosomákban található U1-U6 snRNS-ekre. Ez utóbbiak valószínűleg ilyen önkivágódó intronoknak az evolúció során bekövetkezett „önállósodásából” származnak. A spliceosomák fehérjekomponensei főleg a katalitikus aktivitású snRNS-ek szerkezetének stabilitását biztosítják.

A katalitikus aktivitású RNS-eket *ribozimoknak* nevezzük, a spliceosomákon kívül jellegzetesen ilyenek például a riboszómában található rRNS-ek is.

3. A poly-A farok

Az eukariótákban a legtöbb mRNS-nek *poli-A farka* van az mRNS 3' végén. A poli-A farok 100-250 adenin nukleotidból áll, és *nincs* poli-T DNS-templátja a génben. A poli-A farok képződésének mechanizmusa a következő (9.14. ábra). Egy enzimkomplex egyik tagja az AAUAAA (poli-A felismerési helynek nevezett) szekvenciától 10-30 nukleotiddal lentebb, azaz a 3' irányban elvágja a pre-mRNS-t, egy másik alegység, a poli-A polimeráz pedig poli-A farkat készít. A poli-A farok az mRNS élettartalmát szabályozza: minél többször gördülnek végig a riboszómák egy mRNS-en, annál rövidebb lesz a poli-A farok.

A pre-mRNS érése kb. 30 percet vesz igénybe, természetesen a sejtmagon belül. Talán meglepő, de a pre-mRNS-eket alkotó nukleotidoknak csak kis hányada, átlagosan kb. 5%-a kerül bele az érett mRNS-

És ez egy fontos különbség a prokarióták és eukarióták között: az eukariótákkal ellentétben a prokariótákban (miután nincs sejtmagjuk) az mRNS-ek transzlációja már akkor elkezdődik, amikor szintézisük, azaz a transzkripció még be sem fejeződött. Ez előnyös számukra, mert nagyon meggyorsítja a fehérjeszintézis folyamatát, ugyanakkor prokariótákban nincs lehetőség arra, hogy egy elkülönült térben, még a fehérjeszintézis előtt módosítani lehessen az mRNS-t. Így nem működhet az eukarióta fehérjék sokféleségét biztosító splicing, és nincs meg egy másik fontos transzkripciós szabályozási pont sem: az eukariótákban adott esetben még az érett mRNS is visszatérhet a sejtmagban, ha a helyzet úgy kívánja.

ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS-ben kódolt genetikai információ a fehérjék szintjén nyilvánul meg. A fehérjék szintézise kétlépcsős „erősítési” folyamatban történik. Először a transzkripció során a génről sok mRNS, majd minden egyes mRNS alapján nagyon sok fehérje képződhet. Az mRNS szintézisét speciális fehérjekomplex, az RNS-polimeráz végzi. Az mRNS-ek szintéziséhez specifikus DNS-szekvenciákra, promóterekre van szükség. A promóterek nem csak a transzkripció kezdetét jelölik, hanem szabályozzák a transzkripció, így a génkifejeződés mértékét is. A DNS tehát nemcsak azt kódolja, hogy milyen fehérjék képződjenek, hanem azt is, hogy belőlük milyen sejttípusban, az egyedfejlődés melyik szakaszában, és mennyi szintetizálódjon. Az eukarióta mRNS-ek érési folyamaton mennek keresztül, amelynek talán legfontosabb lépése „átszabásuk”, a splicing.

10. GENETIKAI KÓD ÉS TRANSZ-LÁCIÓ. FEHÉRJEBONTÁS.

A riboszómák szerkezete. A genetikai kód természete. A tRNS szerkezete és funkciója. A transláció jellemzői és lépései. A fehérjék bontása.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

Bár az élőlények öröklődő jellegzetességeinek alapja a DNS-ben kódolt genetikai információ, a fehérjék azok a molekulák, amelyek ellátják a legtöbb biológiai funkciót: enzimek, szerkezeti elemek, jeltovábbítók, stb. A fehérjék szintézisének a transzkripció folyamán létrejövő mRNS az irányítója. Mi a fehérjeszintézis mechanizmusa? Hogyan határozzák meg az mRNS-ek nukleotidjai, hogy mely aminosavak, és milyen sorrendben épüljenek be a képződő fehérjékbe? Melyek a genetikai kód jellemzői?

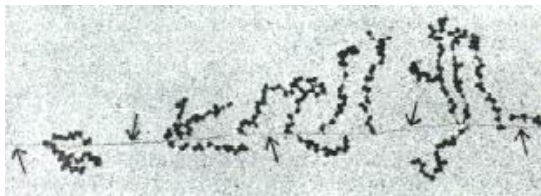
A sejtek normális működéséhez hozzátartozik nemcsak a fehérjék szintézise, hanem a nem megfelelő szerkezetű, működésképtelen vagy már szükségtelen funkciójú fehérjék lebontása is. Hogyan lehet a sok közül csak bizonyos, kiválasztott fehérjéket lebontani? Lehetséges-e – például tápanyaghiány esetében – a sejt saját fehérjeinek és akár sejtalkotóinak degradálása, átmeneti energianyerés céljából?

A 10. fejezet a fenti kérdésekre ad választ.

Transzláció: az a folyamat, amely során az mRNS-ben kódolt genetikai információ alapján fehérje képződik.

Amint azt elektronmikroszkópos felvételek mutatják, a baktériumsejtekben a transzkripció során képződő mRNS-ek már akkor kapcsolatba kerülnek a riboszómákkal, amikor az mRNS-ek szintézise még folyamatban van (10.1. ábra). Ez azért lehetséges, mert az mRNS szintéziséhez hasonlóan az mRNS translációjának iránya is $5' \rightarrow 3'$.

Egy mRNS-re egymás után több riboszóma is kapcsolódhat. Ugyanazon mRNS translációját egyidőben végző riboszómák együttesét *poliszómának* nevezik.



10.1. ábra. Prokariótákban a riboszómák (a kis, gyöngyszerű képletek) már akkor elkezdik az mRNS translációját, amikor annak szintézise még folyamatban van. A nyilak a DNS-t jelölik.

Eukariótákban az érett mRNS-ek a sejtmagból a citoplazmába exportálódnak, ahol a citoplazmában található riboszómákkal kapcsolatot teremtve kezdődhet el a transláció. Ezután azok a

riboszómák, amelyeken membránfehérjék, illetve az ER-ben, a Golgi készülékben vagy a lizoszómákban funkcionáló, valamint a sejten kívülre kerülő fehérjék szintézise indult el, a durva felszíni endoplazmatikus retikulum külső felszínéhez kapcsolódnak, és ott folytatják a translációt (erről a 2. félévben lesz részletesen szó).

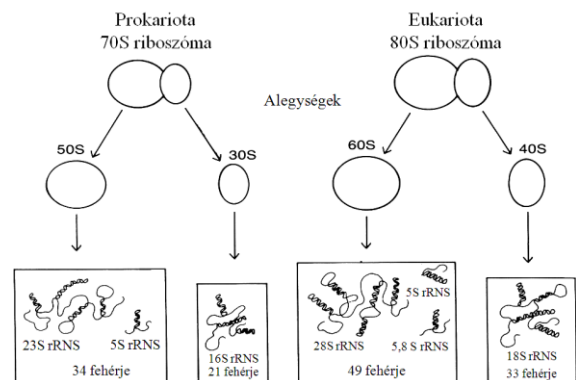
A citoplazmában képződő fehérjék egy része a citoplazmában marad és pl. a sejtvázat alkotja, mások a sejtmagba importálódnak; ismét mások a mitokondriumokba vagy a peroxiszómákba jutnak.

A riboszómák

A riboszómák riboszomális RNS (rRNS) molekulából és riboszomális fehérjékből állnak. Egy nagy és egy kis alegység alkotja őket. Prokariótákban a kis alegység egy 16S (eukariótákban 18S) rRNS-t valamint 21 (eukariótákban 33) különféle fehérjemolekulát tartalmaz. A nagy alegység egy-egy 5S és egy 23S rRNS-t (eukariótákban egy-egy 5S, 5,8S és 28S) valamint 31 (eukariótákban 49) különféle fehérjét tartalmaz (10.2. ábra). A riboszóma-alegységek és a bennük található rRNS-ek méretét Svedbergben (S) mért ülepedési sebességükkel jellemzik. A 23S rRNS például kb. 3000, míg a 28S rRNS kb. 5000 nukleotidból áll.

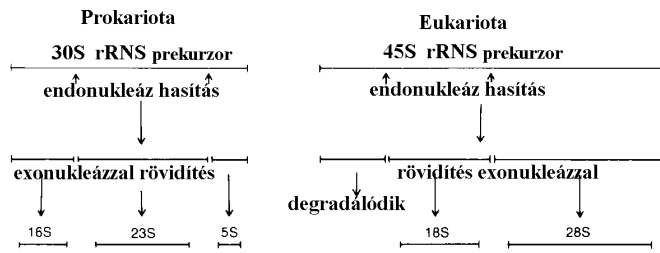
Emberben az rRNS-eket kódoló gének a 13., 14., 15., 21. és a 22. kromoszómák szatellit részében, valamint az X-kromoszómán vannak, tandem elrendezésben. Ezekről az ún. riboszomális génekről (mind a pro-, mind az eukariótákban) első lépésben prekursor (elő-) rRNS íródik át (10.3. ábra). A prekursor rRNS-ek érése során képződnek a különféle rRNS-ek, amelyek aztán „helyben”, a sejtmagvacská(k)ban kapcsolódnak a citoszolból érkezett riboszomális fehérjékkel, és együtt kialakítják az egyes alegységeket.

A riboszóma alegységei a sejtmagban inaktívak. Aktivitásukat aztán nyerik el, hogy a sejtmagpórus-komplexeken keresztül a citoplazmába exportálódnak, ahol néhány további riboszomális fehérjével egészülnek ki.

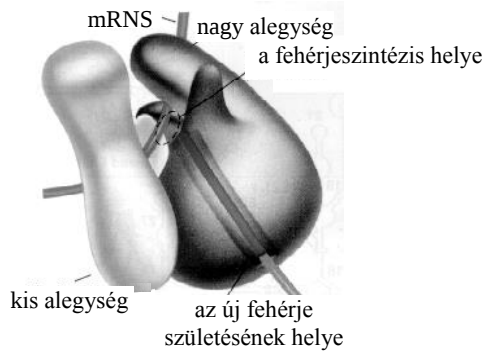


10.2. ábra. A riboszóma alegységeit rRNS(-ek) és riboszomális fehérjék alkotják.

A riboszóma-alegységek a transláció során kapcsolódnak az mRNS-el (10.4. és 10.9. ábra). Az újonnan képződő fehérje a nagy alegység belsejében levő csövön bújik keresztül, majd jut ki a citoszolba.



10.3. ábra. Az érett rRNS-ek képződése.



10.4. ábra. A két alegységből álló riboszóma végzi az mRNS-ben kódolt genetikai információ lefordítását, azaz translációját.

A genetikai kód me

A genetikai kód természetét az alábbi kérdések megválaszolása révén ismerték meg.

1. Valóban az 5' vég közelében kezdődik az mRNS-ek translációja?

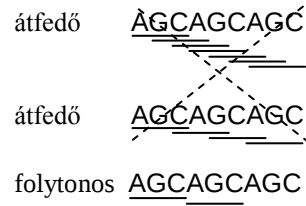
Az *in vitro* translációs rendszerek minden olyan komponenst tartalmaznak, amelyek az (akár mesterségesen szintetizált) mRNS-ek translációjához szükségesek. Ha egy *in vitro* translációs rendszerbe olyan RNS-t tettek, amely csupa A-ból állt és csak az 5' vég közelében volt egy C nukleotid (5'AAAAACAAAAAAAAAAAAA~~~~~AA3'), az mRNS-ről olyan polipeptid képződött, amely egy kivételével lizin aminosavakból állt. Az egyetlen kivétel egy aszparagin volt a polipeptid N-terminálisa közelében (N-Lys-Asn-Lys-Lys~~~~~Lys-C), jelezve, hogy az mRNS translációja valóban annak 5' vége közelében, a fehérjék szintézise pedig az N-terminálisuknál kezdődik. Ha a C az RNS 3' végénél volt (5'AA~~~~~AAAAAAAAAACAAAAA3'), az aszparagin a polipeptid C terminálisa közelébe épült be.

2. Hány betűből áll a genetikai kód?

Miután a fehérjék kialakításában húsz különféle aminosav vesz részt, és az mRNS-t csak négyféle nukleotid alkotja, nyilvánvaló volt, hogy a genetikai kód nem lehet egybetűs. Kétbetűs sem, mert a négy nukleotidból kettőt-kettőt választva a lehetőségek száma $4^2 = 16$, ami kevesebb, mint 20. Ha három betű alkotná a genetikai kódot, úgy $64 (= 4^3)$ lehetőség adódna, a 64 pedig bőven elég. Lehet, hogy a genetikai kód hárombetűs?

Abban a kísérletben, amelyben H. G. Khorana és munkatársai egy *in vitro* translációs rendszerbe 5'AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC 3'

szekvenciájú, kémcsőben szintetizált RNS-t tettek, az RNS alapján háromféle oligopeptid képződött. Az egyiket csupa szerin, a másikat csupa alanin, a harmadikat csupa glutamin aminosavak alkották. A háromféle oligopeptid képződése azt mutatja, hogy (i) a mesterséges RNS translációja bármely ponton elkezdődhet. (ii) A polipeptid szintézise a kiindulás helyétől kezdődően folyamatosan halad, nem hagy ki nukleotidokat. (iii) A genetikai kód nem átfedő. Az RNS-ben kódolt AGCAGCAGC információt a riboszómák nem AGC GCA CAG, és nem is AGC CAG GCA sorrendben olvassák (10.5. ábra). (iv) Egy mRNS *kodon* tehát három betűből, vagy esetleg a három többszöröséből áll.



10.5. ábra. A genetikai kód olvasása nem átfedően, hanem folytonosan és szünetmentesen történik. Egy vízszintes vonal három olyan nukleotidot jelöl, amelyek információ-tartalmát a riboszóma egy lépésben leolvassa.

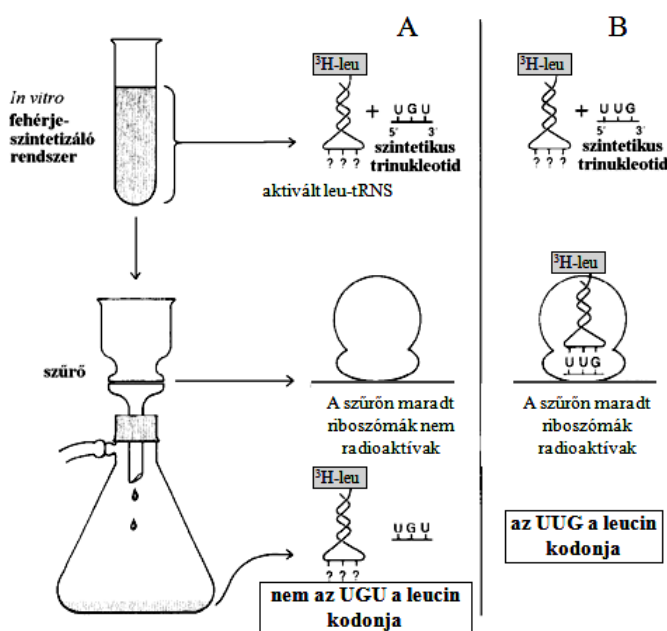
Az, hogy egy kodon három betűből áll, a következőkből derült ki. Az először megismert α -hemoglobin mRNS-ét 650 nukleotid alkotja, az α -hemoglobin fehérjét pedig 141 aminosav. Ha a genetikai kód három betűből állna, a 141 aminosav kódolásához 423 nukleotidra lenne szükség, és még maradna 227. Ha a genetikai kód hat vagy kilenc betűs lenne, a 650 nukleotidból álló α -hemoglobin mRNS-ben nem lenne annyi nukleotid, amely a 141 aminosav kódolásához szükséges. A genetikai kód tehát hárombetűs, és az mRNS tartalmaz még olyan részeket (elő- és utószekvenciát), ami nem kódol fehérjét.

3. Mi a hárombetűs kodonok jelentése?

Az előző kísérlet alapján nem lehet eldönteni, hogy a szerin kódja AGC, GCA vagy CAG. Azokban a kísérletekben, amelyekben a szintetizált mRNS csupa A-ból állt, olyan polipeptid képződött, amelyben csak lizinek voltak, jelezve, hogy a lizin (legalábbis egyik) kodonja AAA. (Figyelem, az mRNS bázishármasait nevezik kodonoknak, a DNS nem-templát, kódoló szálának bázishármasait pedig *kódnak*.) Az UUU a fenilalanint, a CCC a prolint kódolja (a poli-G RNS bonyolult struktúrába rendeződik, a benne levő információt a riboszómák nem tudják elolvasni).

A genetikai kód megfejtésére Akai Kaji és Hideko Kaji (1963) dolgozott ki módszert, amely alapján Marshall Nirenberg és Philip Leder fejtette meg a genetikai kódot 1964-ben. A módszer lényege a következő (10.6. ábra). Összeállítottak egy *in vitro* fehérje-szintetizáló rendszert, amely tartalmazta az összes olyan komponenst, amely a fehérjék szintéziséhez szükséges. A leucin (leu) aminosavat

radioaktív ^3H -mal jelölték, így ezután a leucint hordozó ^3H -leu-tRNS is jelet bocsájtott ki. A rendszerhez különböző, például UGU szintetikus trinukleotidokat adtak (10.6. ábra). (Bár kis hatékonysággal és speciális körülmények között, de a riboszóma képes megkötni az ilyen rövid RNS-t és a hozzá kapcsolódni képes tRNS-t is.) Ha az UGU nem a leucin kodonja, nem alakulhatnak ki olyan komplexek, amelyeket az UGU szintetikus trinukleotid, a riboszóma két alegysége és a ^3H -leu-tRNS alkotnak együttesen. Vagyis a szabadon maradt ^3H -leu-tRNS-eket egy kislyukú szűrőn át lehet szűrni, el lehet választani a nagyméretű riboszómáktól. Ha viszont a rendszerbe olyan mesterséges trinukleotidot tettek, amely a leucin egyik lehetséges kodonja (a 10.6. ábrán UUG-t), kialakulhattak olyan komplexek, amelyek az UUG tripletból, a riboszóma két alegységéből és a ^3H -leu-tRNS-ből álltak. A komplexbe került ^3H -leu-tRNS nem választható el a riboszómáktól, és a szűrőn marad. A ^3H -leu-tRNS szűrőhöz kötődése azt jelzi, hogy az UUG a leucin (egyik) kodonja. Ez a módszer volt alkalmas a genetikai kód megfejtésére.



10.6. ábra. A genetikai kód jelentésének megfejtésére kidolgozott módszer.

A genetikai kódszótár és jellemzői

Az mRNS kodonjainak jelentését a 10.1. táblázat összegzi. A kódszótár tanulmányozása alapján a következő fontosabb megállapításokat tehetjük.

1. Egy aminosavat több kodon is kódolhat. Szakszerű kifejezéssel: a genetikai kód degenerált. Ugyanakkor egy kodon csak egyfajta aminosavat kódol.
2. A transláció elkezdődését (START) az AUG iniciációs kodon jelzi. Az AUG kodon egyben a metionin kodonja is. A fehérjék szintézise tehát metioninnal kezdődik (a metionin aztán legtöbbször lehasítódik a kész fehérjék N-terminális végéről).

3. A 64 mRNS kodon közül az UAG, az UAA és az UGA kodonok jelentése STOP, és transláció befejeződését jelzik. A STOP kodonokat terminációs vagy értelmetlen (nonsense) kodonoknak is nevezik.

4. A genetikai kód „löttyögős”: gyakori, hogy a kodonok három betűje közül csak az első kettő fontos, a harmadik lényegtelen. Például a valin aminosav négy kodonja a következő: GUU, GUC, GUA és GUG (10.1. táblázat). A négy kodon első két (GU) betűje azonos, a harmadik pedig bármelyik lehet a négy közül.

10.1. táblázat. A genetikai kódszótár: az mRNS kodonok és jelentésük. Az aminosavak három, illetve egybetűs jelei.

Első nukleotid	Második nukleotid				Harmadik nukleotid
	U	C	A	G	
U	Phe F	Ser S	Tyr Y	Cys C	U
	Phe F	Ser S	Tyr Y	Cys C	C
	Leu L	Ser S	STOP	STOP	A
	Leu L	Ser S	STOP	Trp W	G
C	Leu L	Pro P	His H	Arg R	U
	Leu L	Pro P	His H	Arg R	C
	Leu L	Pro P	Gln Q	Arg R	A
	Leu L	Pro P	Gln Q	Arg R	G
A	Ile I	Thr T	Asn N	Ser S	U
	Ile I	Thr T	Asn N	Ser S	C
	Ile I	Thr T	Lys K	Arg R	A
	Met ¹ M	Thr T	Lys K	Arg R	G
G	Val V	Ala A	Asp D	Gly G	U
	Val V	Ala A	Asp D	Gly G	C
	Val V	Ala A	Glu E	Gly G	A
	Val V	Ala A	Glu E	Gly G	G

Met¹ = iniciációs kodon; STOP = a transláció terminációja. A színek: erősen hidrofób, gyengén hidrofób, erősen hidrophil, gyengén hidrophil.

Vajon mi határozza meg, hogy melyik aminosav épül be a képződő fehérjébe? Az, hogy milyen aminosavat hordoz a tRNS, vagy magának a hordozó tRNS-nek a szekvenciája? Egy kísérletben G. von Ehrenstein, B. Weisblum és S. Benzer ^{14}C -el jelzett aktivált cisztein-tRNS ciszteinjét katalizátor és H_2 jelenlétében alaninná alakította. Ezután *in vitro* fehérje-szintetizáló rendszerben azt vizsgálták, hogy vajon az alanint hordozó cisztein-tRNS az α -hemoglobin cisztein vagy alanin helyeire épült be. Azt tapasztalták, hogy az α -hemoglobinban cisztein helyett alaninok voltak, vagyis nem a tRNS-hez kapcsolódó aminosav határozza meg, hogy melyik aminosav épül be a fehérjébe, hanem a tRNS egy speciális részlete. Ez az *antikodon*.

Az aminosavak aktiválása

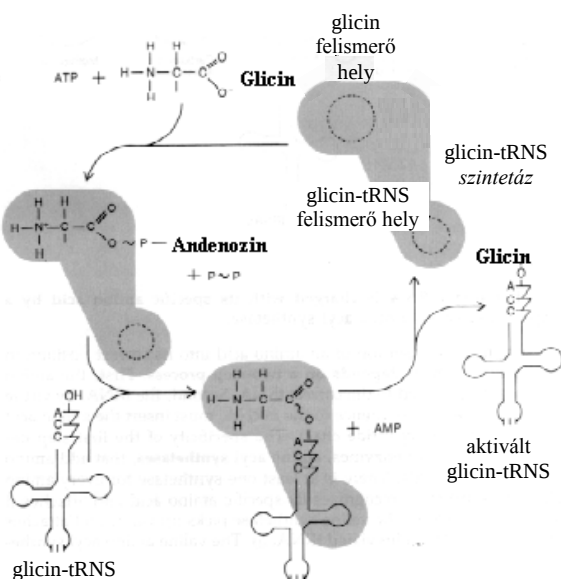
A riboszómák a fehérje szintéziséhez *aktivált* (a tRNS-sel nagy energiájú kötéssel kapcsolódó) aminosavakat használnak. Az aminosavak a megfelelő tRNS-hez az úgynevezett aminosav-

aktiválás során kötődnek - ezt szokás a tRNS feltöltésének is nevezni (10.7. ábra). Az aminosav-aktiválás fontosabb lépései:

Az első lépésben az aminosav-specifikus *amino-acil-tRNS-szintetáz* enzim az általa felismert aminosavhoz AMP-t köt kovalensen, így a nagy energiájú foszfát-kötés révén energiával tölti fel azt (az AMP ATP-ből származik).

A következő lépésben az enzim az AMP-kapcsolt aminosavat köti a megfelelő tRNS 3' végéhez (a kötés az aminosav -COOH és a tRNS 3' végén lévő ribóz 3', vagy néha a 2' -OH csoportja között jön létre).

Az aktivált aminosav-tRNS komplex végül leválik az amino-acil-szintetáz enzimről, hogy részt vegyen a fehérjeszintézisben.



10.7. ábra. Az aminosav-aktiválás lépései.

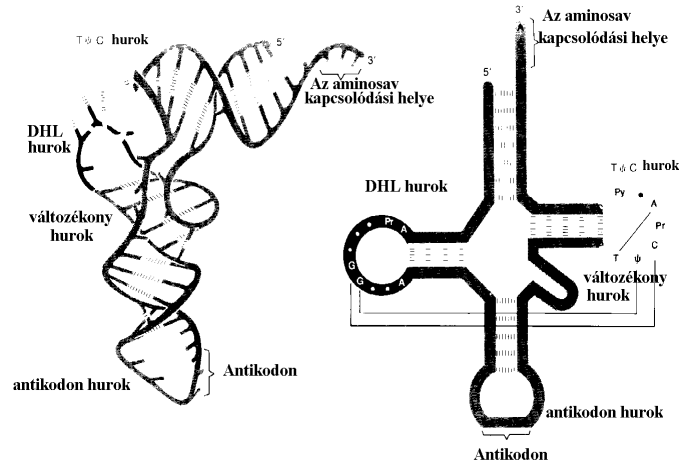
A tRNS-ek

A tRNS-ek olyan kis, kb. 70-80 nukleotidból álló adapter funkciójú RNS-ek, amelyek aktivált aminosavakat szállítanak a fehérjeszintézishez. Szerkezetük 1965 óta ismert (10.8. ábra). A tRNS-ek képződését az ún. tRNS-gének kódolják. Az rRNS-génekhez hasonlóan a tRNS-gének is tandem elrendeződésűek, és róluk is egy prekursor (elő-) tRNS íródik át, amelyről több lépéses érési folyamat során készülnek el a funkcionális tRNS-ek.

A tRNS-ek 3' végén mindig 5'CCA 3' nukleotidok találhatók, amelyek (az eukarióta mRNS poli-A farkához hasonlóan) nincsenek kódolva a DNS-ben, egy enzim kapcsolja őket a 3' végre. A tRNS-ek némelyik specifikus bázisa kémiai módosul. A tRNS-ek egyes komplementer részei párosodnak, és kettősszalú részeket képeznek. Azok az egyszálú tRNS szakaszok, amelyeknek nincs komplementere, hurkokat alkotnak (10.8. ábra).

A tRNS-ben kialakult három huroknak kitüntetett szerepe van. (1) Az *antikodon hurok*ban található a tRNS *antikodon*, amely az mRNS megfelelő

kodonjával párosodik a fehérjeszintézis során (természetesen az antiparalel illeszkedési elv szerint). (2) A *DHU* (*dihidroxi-uridin*) hurok az amino-acil-szintetáz enzimmel teremt kapcsolatot az aminosav-aktiválás során. (3) A *TΨC* hurok kapcsolódik a riboszómához. (Az aminosavak a tRNS-ek 3' végéhez kötődnek, lásd fentebb).



10.8. ábra. A tRNS szerkezete.

A genetikai kód degeneráltsága miatt nem meglepő, hogy az élőlényekben 61 helyett csak kb. 30-50-féle tRNS van, a különféle fajokban változó számban.

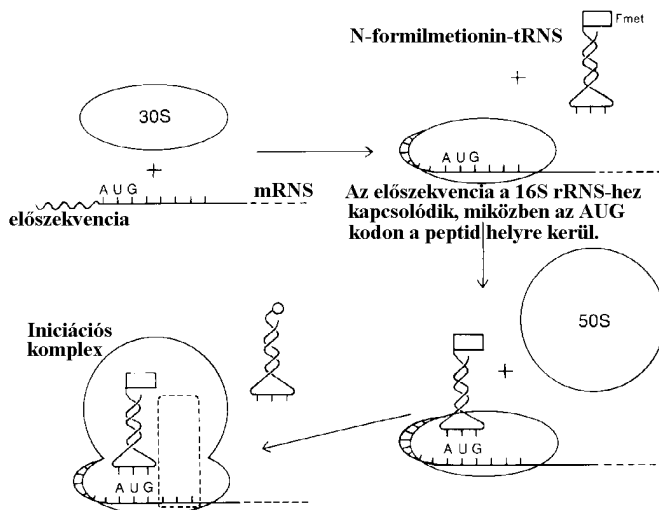
A fehérjeszintézis lépései

1. Iniciáció

A prokariótákban az mRNS előszekvenciájának egy konzervált szakasza párosodik a kisebb alegység 16S rRNS-ével. A kétféle RNS párosodása során az AUG (START, metionin) kodon a riboszóma ún. peptid (P) helyére illeszkedik (10.9. ábra). Az iniciációban szerepet játszó speciális *formil-metionin-tRNS* antikodonja antiparalel módon illeszkedik az mRNS kodonjához.

Eukariótákban a "sapkának"-nak és a poli-A faroknak is alapvető szerepe van az mRNS 5' vége és a kisebb riboszóma alegység kapcsolódásában, amelyet *segédfehérjék*, *iniciációs faktorok* közvetítenek. A kapcsolódás után egy *iniciátor metionin-tRNS* köt a kis alegységre, és más iniciációs faktorok segítségével a komplex mozogni kezd 3' irányban az mRNS-en. Ahol az első AUG-kodonnal találkozik az iniciátor-tRNS CAU antikodonja, a kis alegység megáll, a komplex stabilizálódik és képessé válik a nagy alegységgel való asszociálódásra. (Az első metionint szállító tRNS szerkezetében különbözik a „közönséges” metionin-tRNS-től, bár ugyanaz az metionin-tRNS szintetáz tölti fel.)

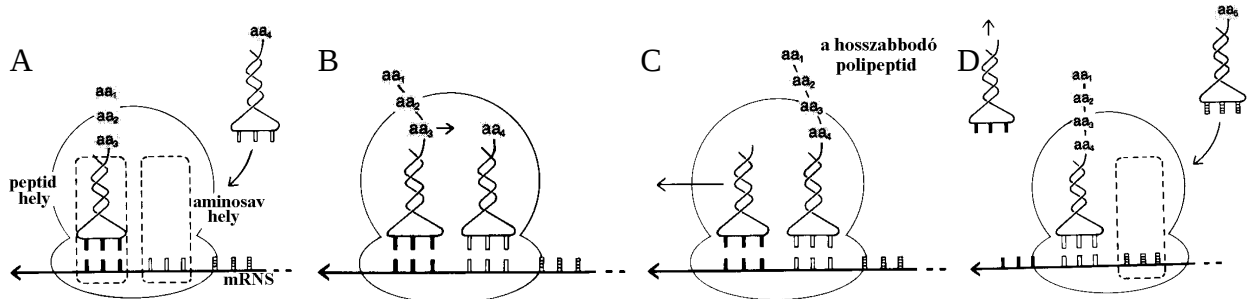
A következő lépésben az mRNS + Met-tRNS + kis alegység komplexhez csatlakozik a nagy riboszóma alegység is, és kialakul az *iniciációs komplex*.



10.9. ábra. A fehérjeszintézis elkezdődése prokariótákban.

2. Elongáció

A fehérjeszintézis elongációs szakaszában az aminosavak egymás után épülnek be a fehérjeláncba peptidkötések képződése közben. A riboszóma + mRNS komplexben három hely van: (1) Az aminosav (A) helyre az a tRNS illeszkedik, amely a következő beépülő aminosavat hordozza. (2) a peptid (P) hely, ahova az előzőleg érkezett tRNS kapcsolódik, végén a növekvő polipeptiddel. (3) Az exit (E) hely, ahová a távozó, „üres” tRNS köt átmenetileg.



10.10. ábra. A fehérjeszintézis lépései. Ezen és a 10.11 ábrán az E (exit) hely nem szerepel. (aa = aminosav)

Az elongáció lépései a következők (10.10. ábra).

- A szabad A helyre az mRNS következő kodonjának megfelelő antikodonnal rendelkező tRNS köt be. Az érkező tRNS-ek beilleszkedéséhez elongációs faktorokra és GTP-re van szükség (10.10 A ábra).
- A nagy riboszóma alegységben található, peptidil-transzferáz aktivitású nagyobbik (23S ill. 28S) rRNS peptidkötést alakít ki a szomszédos tRNS-eken lévő aminosavak között, melynek során a polipeptid a P helyen lévő tRNS-ről az A helyen levőre kerül (10.10 B ábra).
- Az A helyen levő, most már aminosav helyett

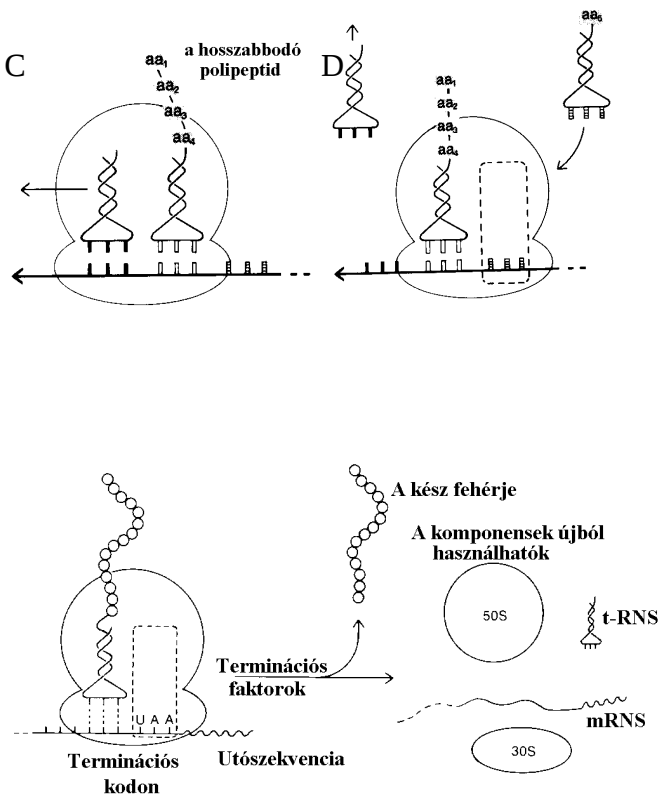
polipeptidet hordozó tRNS akkor jut a P helyre, amikor a riboszóma nagy, majd kis alegysége is egy lépéssel (három nukleotiddal) elmozdul az mRNS mentén 3' irányba (10.10. C és D ábra) - az „üres” tRNS pedig elmozdul a P helyről az E helyre. A folyamat az mRNS első STOP kodonjának eléréséig ismétlődik, néha sok ezerszer. A fehérjeszintézis sebessége ~2 aminosav/másodperc.

Tehát azt, hogy egy fehérjében milyen aminosavak követik egymást (azaz, hogy milyen a fehérje elsődleges szerkezete), az mRNS kodonok sorrendje, lényegében pedig az határozza meg, hogy a DNS-ben mi a bázispárok sorrendje.

3. A transláció terminációja

A fehérjeszintézis akkor fejeződik be, amikor a riboszóma A helyére valamelyik STOP mRNS kodon kerül. Minthogy nincsenek a STOP kodonoknak megfelelő antikodonnal rendelkező tRNS-ek, megáll az elongáció. A transláció terminációjához ugyanakkor speciális fehérje, ún. terminációs faktor is szükséges, amely bekötődik az A helyre, de nem járul hozzá újabb peptidkötéshez. Ehelyett vízmolekula épül be, a P helyen maradt tRNS-hez kapcsolódó fehérje szintézise így befejeződik, leválik a tRNS-ről, majd a riboszómáról is (10.11. ábra). A riboszóma alegységei és az utolsó tRNS is szétválnak. A kész fehérje lehet azonnal funkcióképese, de sokszor csak bizonyos módosító lépések után nyeri el funkcióját.

A genetikai kód (egy-két különleges kivételtől eltekintve), és a fehérjeszintézis mechanizmusa is univerzális, jelezve, hogy a transláció evolúciósan nagyon ősi, erősen konzervált folyamat.



10.11. ábra. A transláció befejeződése.

A fehérjék lebomlása

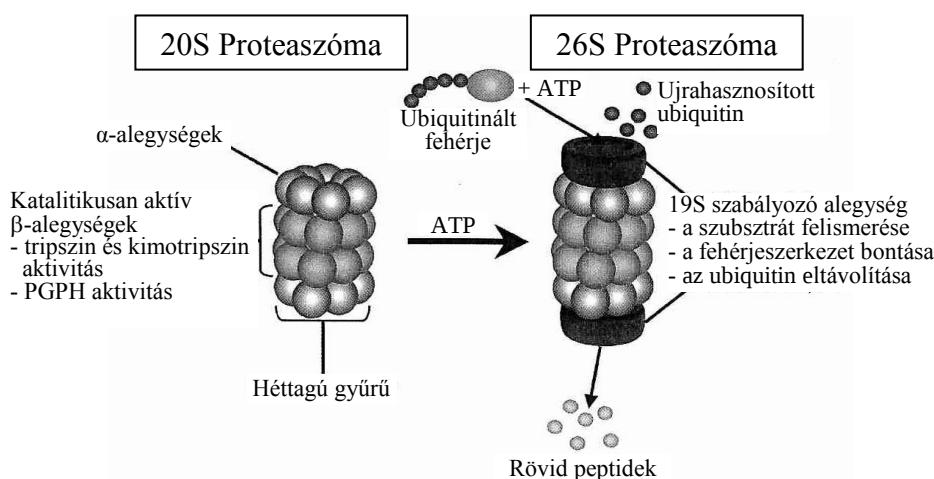
A fehérjék folyamatosan képződnek, és bomlanak le. Lebomlásuk két fő utat követ: vagy (1) ubiquitinálódás után az úgynevezett *proteaszómákban* bomlanak le (10.12. ábra), vagy (2) az *autofágia* valamelyik fajtájával (10.13. ábra).

Az ubiquitin-proteaszóma útvonala

Az ubiquitin olyan, mindössze 76 aminosavból álló, evolúciósan erősen konzervált kis fehérje, amely minden eukarióta sejtben megtalálható (az ember és az élesztő ubiquitinjeiben az aminosavak sorrendje 96%-ban azonos!). Más fehérjékhez lizin oldalláncukon keresztül képes kapcsolódni, ezáltal megjelölve azokat. Ha az első ubiquitinhez további ubiquitinek kapcsolódnak (szintén lizinen keresztül), akkor a fehérje poliubiquitinálódik, ez a jel a proteaszóma felé „irányítja”, hogy aztán ott lebomoljon, majd alkotói újrahasznosuljanak.

(Jegyezzük meg, hogy ha a fehérjékre egyetlen [monoubiquitiniláció] vagy több ubiquitin, de egyesével, több lizinre [multiubiquitiniláció] pakolódik, az is jelként szolgál. Nem a proteaszómához irányít, de más módokon meghatározza a megjelölt fehérje sorsát – erre a második félév során látunk példákat.)

A fehérjék ubiquitinizációjának folyamata a következő fontosabb lépésekből áll. Az ubiquitin - egy ún. *ubiquitin-aktiváló enzim* - aktiválódik: képessé válik arra, hogy *ubiquitin-konjugáló* és *ubiquitin-ligáz* enzim közvetítésével a célfehérjékhez kapcsolódjon. Ha már legalább négy ubiquitinből áll a fehérjéhez kapcsolódó lánc, azt felismeri a 26S proteaszóma, a citoplazmában található (de újabban a sejtmagban is kimutatott), fehérjelebontó sejtorganelum (10.12. ábra).



10.12. ábra. A proteaszóma szerkezete.

A proteaszómák nagyméretű (~2000 kDa), hordószerű szerkezetek. Három részből tevődnek össze: egy 20S méretű katalitikus és két 19S szabályozó alkomplexből. A 20S proteaszómát 4, egyenként hét fehérjéből álló gyűrű alkotja, amelyek

a zárható belső üreget határolják. A két külső gyűrű tagjait α -alegységeknek, a két belső gyűrű tagjait β -alegységeknek nevezik. A külső gyűrűk biztosítják a kamra zárhatóságát, valamint lehetővé teszik a 19S szabályozó alkomplexek kötődését. A belső gyűrűk által határolt térben zajlik a fehérjék degradációja. A β -alegységek egyes tagjai különböző proteolitikus enzimek: tripszin-, kimotripszin- vagy peptidil-glutamil-peptid hidrolizáló (PGPH) aktivitással bírnak.

A 19S alkomplex felelős a poliubiquitinilált lebontandó fehérjék felismeréséért, kitekeréséért (unfolding), az ubiquitin eltávolításáért. A megfelelő szubsztrát kötődése és kibontása után biztosítja az addig zárt 20S alkomplex kinyílását és a fehérje bejuttatását a kamra belsejébe. Mindehhez ATP-ben tárolt energiát használ fel.

A fehérjék 4-25 aminosavból álló kis peptidekre bontása tehát a 20S alkomplex belsejében, zárt környezetben történik. A peptidek aztán tovább bomlanak a citoszolban, hogy a belőlük képződő aminosavak ismét fehérjékbe épülhessenek. (10.12. ábra).

Az ubiquitin-proteaszóma lebontó út célja nemcsak a sérült fehérjék eltávolítása. Olyan folyamatoknak is elengedhetetlen része, mint a génexpresszió vagy a sejtciklus szabályozása, vagy az oxidatív stressz elleni védekezés.

Az autofágia

Az autofágia (görög eredetű szó: „önévés”) a sejt saját anyagának lebontását lizoszómák közreműködésével végzi. A proteaszómákkal szemben általában nem válogat a fehérjék között, és nagyobb sejtalkotók, citoplazmarészletek degradációját is biztosítja. Fenntartja az egyensúlyt a szintézis és a lebontás között, miközben biztosítja a sejt anyagainak újrahasznosítását. A sejtekben alapszinten mindig működik – feladata a citoplazma folyamatos „takarítása”. Ugyanis más mód nincsen például a sérült, „megöregedett” mitokondriumok eltávolítására. Nem véletlen, hogy az alapszintű autofágia nem megfelelő működése többek között az idő előtti öregedéshez is hozzájárul.

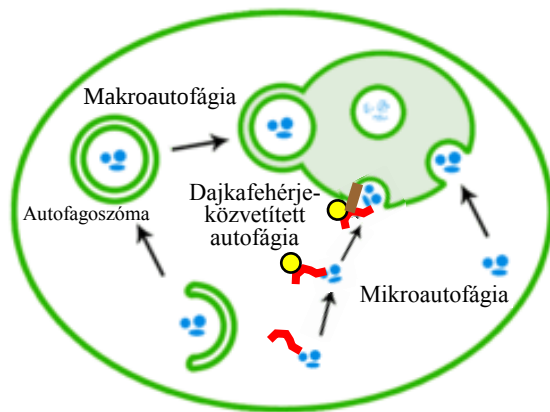
Az autofágia aktivitása egyes helyzetekben fokozódhat, ami pontos szabályozás alatt áll. A sejtek növekedésében, az egyedfejlődésben, a programozott sejthalálban is szerepet játszik. Tápanyag-ellátottság szűkében az autofágia képes biztosítani a sejt anyagainak mozgósítását, újraelosztását. Ezen kívül a neurodegeneráció, a daganatképződés és sejten belüli fertőzések elleni védelem fontos eszköze is.

Bár az autofágiának különféle típusai vannak, közös bennük, hogy végül a lizoszómákba kerül a lebontandó anyag. A legismertebb és legáltalánosabb mechanizmus a *makroautofágia*, amely során a citoplazma egy részlete körül kettős

membrán képződik, elkülönítve azt a citoplazma többi részétől. Az így kialakult ún. autofagoszóma végül egyesül a lizoszómával: külső membránja fuzionál vele, tartalma (és a belső membrán), lebomlik (10.13. ábra).

Az ún. *mikroautofágia* során a lizoszómák membránja közvetlenül fűződik be és veszi fel a citoplazma kis részeit.

A *dajkafehérje-közvetített (chaperon-mediált) autofágia* során azok a fehérjék bontódnak el, amelyek szekvenciájukban hordoznak egy olyan öt aminosavból álló szignált, amelyet egy 70 kDa-os dajkafehérje ismer fel. (A dajkafehérjét, más néven chaperonokat azért hívják így, mert segítik a fehérjék térszerkezetének kialakítását a szintézis után, illetve a szerkezetet károsító körülmények, leggyakrabban hősokk esetében. Legnagyobb csoportjuk is erről kapta nevét: hősokkfehérjék, Hsp). A fehérje/dajkafehérje komplex a lizoszóma membránjához jutva ott egy receptorral kapcsolódik. A lebontandó fehérje elveszti szerkezetét, a receptor által képzett csatornán keresztül átjut a membránon, és a lizoszóma belsejében lebomlik.



10.13. ábra. Az autofágia típusai.

BEFEJEZÉS

A sejtekben jelenlevő néhány DNS-molekula funkciója a transzkripció és a transzláció révén olyan fehérjék tömeges képződését eredményezi, amelyek ellátják a rájuk jellemző funkciókat, lehetővé téve az élőlények életét, alkalmazkodását a gyakran változó környezeti feltételekhez. A fehérjék természetét az őket alkotó aminosavak sorrendje, és végeredményben az határozza meg, hogy milyen sorrendben követik egymást a bázispárok a DNS-ben.

A fehérje molekulák nem örökéletűek: jól ismert mechanizmusok bontják le őket, hogy alkotóik hasznosuljanak.

11. MUTÁCIÓK, MUTAGÉNEK. REVERZIÓ ÉS REPARÁCIÓ.

Spontán és indukált mutációk. A mutációk típusai és következményei. Reparáció. Reverzió és szuppresszió. Kromoszóma-mutációk és következményeik. Mutagének/karcinogének. Ames teszt.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

A változás képessége az örökítő anyag fontos jellemzője. A mutációk - az örökítő anyag hirtelen bekövetkező és sejtről sejtre öröklődő változásai - képezik az élőlények változatosságának és az evolúciónak az alapját. Mutációk spontán is bekövetkeznek, ám a környezeti tényezők is indukálnak mutációkat. Minthogy a mutációk hozzájárulhatnak a daganatok kialakulásához is, azaz minden mutagén karcinogén, a környezetszennyező mutagének súlyos egészségügyi problémát jelenthetnek. A mutagéneket/karcinogéneket mutagén tesztekkel mutatják ki.

A mutációk során nemcsak az örökítő anyag *minősége*, hanem a *mennyisége* is változhat kromozómatörések következményeként, valamint kromozómavesztés és/vagy nondiszjunkció nyomán. A mutációk következményei legtöbbször hátrányosan befolyásolják a sejtek, élőlények életét.

A sejt reparációs rendszerei ugyan a DNS sok változását kijavítják, de nem mindegyiket. A 11. fejezet a mutációk típusait és következményeit, és a sejt saját javító mechanizmusait tekinti át.

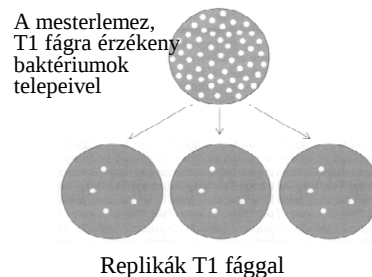
A SPONTÁN MUTÁCIÓK

Vajon a sztreptomycin jelenléte indukálja a sztreptomycin-rezisztenciát, vagy talán a rezisztencia spontán eredetű? A baktériumok fágokkal szembeni rezisztenciája a fágfertőzés hatására alakul ki, vagy spontán eredetű?

Joshua és Esther Lederberg (1952) Petri-csészékben kb. 10^8 *E. coli* telepet növesztett olyan sejtekből, amelyek korábban sohasem találkoztak T1 fágokkal. A *replikalemez módszerével* a kolónia-készlet másolatait olyan Petri-csészékre vitték, amelyek T1 fágokat tartalmaztak (11.1. ábra). A T1 fágok jelenlétében csak a fágra rezisztens baktériumok szaporodhattak, képezhettek telepeket. Mivel a T1 rezisztens telepek minden replikalemezen ugyanazon a helyen képződtek, Joshua és Esther Lederberg arra következtetett, hogy a mutációk már korábban, *spontán, véletlenszerűen képződnek*, és nem a T1 fágok indukálták a T1-rezisztenciát. Ez a megállapítás a biológia fontos elve: a mutációk spontán bekövetkezése a DNS, az örökítő anyag egyik fontos belső tulajdonsága. A mutációk nem a célszerűség elve alapján következnek be, hanem „vakon”, véletlenszerűen. A mutánsok (a mutáció fenotípusát mutató élőlények) némelyike túlélheti a változó környezeti feltételeket és biztosíthatja a faj fennmaradását. A megváltozott életfeltételekhez alkalmazkodni nem tudó egyedeket a természetes (vagy a mesterséges, ember által megvalósított) szelekció kirostálja, kiválogatja. Végeredményben a mutációk

biztosítják az élőlények változékonyságát, az evolúció alapját.

A spontán mutációk gyakorisága alacsony, és különböző az élőlények különféle csoportjaiban: a baktériumokban 10^{-10} és 10^{-6} /gén/generáció között változik. Az eukarióták diploid állapota nagyobb mutációs gyakoriságot tesz lehetővé, ami pedig nagyobb genetikai változékonyságot, alkalmazkodóképességet, evolúciós előnyt biztosít. A spontán mutációs gyakoriság a *Neurospora* gombákban kb. 10^{-8} , *Drosophilában* 10^{-4} - 10^{-5} , kukoricában kb. 10^{-6} , egérben kb. 10^{-5} , emberben 4×10^{-6} - 10^{-4} /gén/generáció között változik. A diploid élőlények genomjában lassacskán halmozódnak a recesszív mutációk, és el is veszhetnek. A mutációk jelentős hányada *letális*: homozigóta állapotban nem teszi lehetővé az élőlény életét. Becslések szerint egy ember 3-5 recesszív letális mutációra heterozigóta.



11.1. ábra. A T1 rezisztens baktériumok telepei a replikák azonos helyein képződnek, jelezve, hogy a mutációk már a mesterlemezen jelen voltak - véletlenszerűen, "vakon" következtek be.

A spontán mutációk eredete

1. Tautomer átrendeződések

Szabály szerint az egyik DNS-fonal A bázisai a komplementer szál T bázisaival, a G-k a C-kkel párosodnak. Ritkán, és csak rövid időre a bázisok tautomer átrendeződésen mennek át, azaz az adenin és a citozin imino, a guanin és a timin enol formává alakul (11.2. ábra). A szokatlan formában az A* C-vel, a T* G-vel, a G* T-vel, a C* A-val párosodik (11.3. ábra). Ha a tautomer átrendeződés a replikáció pillanatában történik, szokatlan bázispárok (ún. mismatch-ek) alakulnak ki a DNS-ben. A szokatlan bázispárok zömét a reparációs rendszerek kijavítják. Ha azonban a szokatlan bázispár megmarad, egy újabb replikáció után egy ún. bázispár-csere (szubsztitúció) következik be. A bázispár-csere a két replikáció során keletkező négy új DNS-szálnak csak az egyikét érinti (11.4. ábra).

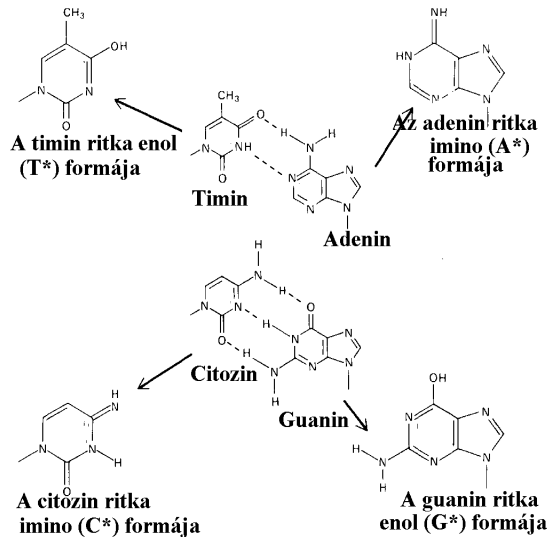
A példában az eredeti A=T bázispár helyét egy G≡C veszi át. Az olyan báziscsere-mutációkat, amelyekben egy purin bázis helyét egy másik purin bázis veszi át (vagy az egyik pirimidinét a másik) *tranzíciónak* nevezik ($A=T \rightarrow G=C$ vagy $G=C \rightarrow A=T$). Az olyan báziscsere-mutációkat, amelyekben egy purin bázis helyére pirimidin bázis kerül (vagy egy pirimidin bázis helyére egy purin bázis) *tranzverzióknak* nevezik (pl. $A=T \rightarrow T=A$ vagy $C=G$).

2. Depurináció, deamináció

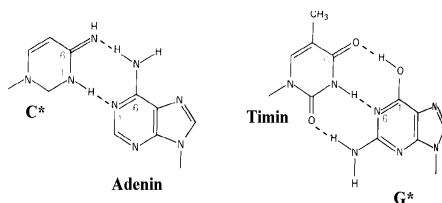
A spontán mutációk közül a leggyakoribb a *depurináció*, a dezoxi-ribóz és a purinbázisok közötti N-

glikozidos kötés hidrolízise (egy emberi sejt átlagosan naponta ~5000 adenint vagy guanint veszít el).

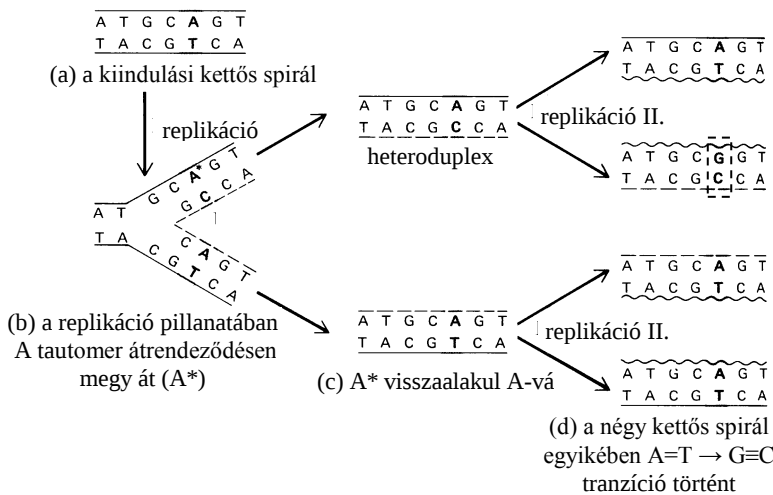
Szintén nem ritka jelenség a *deamináció*, amelynek következményeként a DNS-ben egyébként elő nem forduló bázisok keletkeznek. (Kivételt képez a gerinces gének kifejeződésének szabályozásában fontos szerepet játszó metilált citozin deaminációja: ekkor ugyanis timin, egy „normális” DNS-bázis keletkezik, ami gondot is jelent a mutációkat észlelő és javító rendszer számára!).



11.2. ábra. A tautomer átrendeződések hatására szokatlan szerkezetű bázisok képződnek.



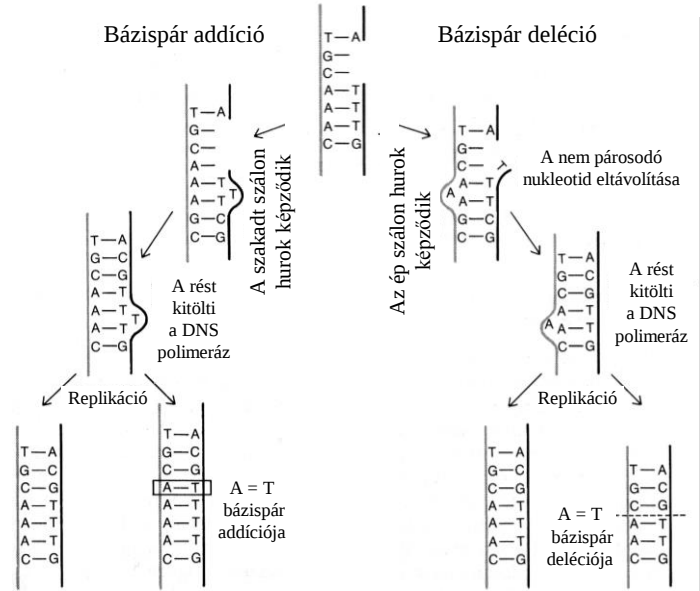
11.3. ábra. A tautomer átrendeződések szokatlan bázispárok kialakulásához vezetnek.



11.4. ábra. Bázispár csere típusú mutáció kialakulása tautomer átrendeződés és két replikáció után.

3. Bázispárok deléciója, addíciója

A komplementer DNS fonalak téves párosodása ún. extrahelikális hurkok képződéséhez vezethet: a DNS rövid szakaszán az egyik fonál kitérnekedik (11.5. ábra). Az extrahelikális hurkok többnyire az egyik DNS-szál szakadása után képződnek. Ez többféle esemény során is kialakulhat: ionizáló sugárzás, replikáció, rekombináció, reparáció, vagy a DNS szerkezetének egyéb változásai hatására is.



11.5. ábra. A szálszakadás után a komplementer DNS-szálak téves párosodása az egyik kettős spirálban bázispár(ok) deléciójához, a másikban addíciójához vezet.

Ha a DNS-szálak téves párosodása a replikációig fennmarad, a másolás után olyan kettős spirálok képződhetnek, amelyek egyikéből néhány bázispár hiányzik, *deléció* alakul ki; vagy éppen a szokásosnál több bázispár képződik, *addíció* következik be (11.5. ábra). A bázispár(ok) deléciójának és addíciójának eredményeként a genetikai információ sorrendje eltolódik. Ha mindez ráadásul egy gén kódoló régiójában, egy exonban történik, a képződő mRNS-en megváltozhat az aminosavak leolvasási kerete - ezeket a delécióval és addícióval létrejött mutációkat *kereteltolódásos (frame shift) mutációknak* nevezik.

Mint ahogy a bázispárok típusának, illetve számának fenti változásai a DNS-nek csak igen kis részét érintik, az ilyen típusú mutációkat *pontmutációknak* nevezik. A mutációk osztályozását a 11.1. táblázat mutatja be.

AZ INDUKÁLT MUTÁCIÓK

Az ún. interkalálódó (a DNS kettős szála közé bekelődni képes) vegyületek stabilizálják a 11.5. ábrán bemutatott extrahelikális hurkokat, így növelik az addíció/deléció, azaz a kereteltolódásos típusú mutációk bekövetkeztének esélyét. Az interkalálódó vegyületek közül az akridinek, és közülük is a proflavin, a legismertebb (11.6. ábra). A proflavin az ún. **mutagének** jellegzetes példája: olyan hatás, amely képes a mutációk indukciójára.

Mutációk tehát nem csak spontán történnek, hanem indukálhatóak is, fizikai (ionizáló sugárzások, UV), kémiai (különböző vegyületek), vagy biológiai (transzpozonok, retrotranszpozonok) tényezőkkel.

Számos mutagén a természet része. A legismertebbek közülük az ionizáló és az UV-sugárzás, valamint néhány gomba és növényi anyagcsere-melléktermék, mint például az aflatoxin (12.7. ábra). Sok mutagén azonban mesterséges, az emberi civilizáció "terméke".

A *direkt mutagének* közvetlenül a DNS-re hatva fejtik ki hatásukat. Az *indirekt mutagének* (mint pl. a benzpirén a cigarettafüstben) a szervezetben úgy alakulnak át, hogy a belőlük képződő származékok lesznek mutagének (12.8. ábra).

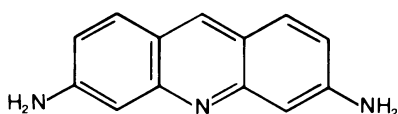
11.1. táblázat. A mutációk osztályozása.

Eredetük szerint

Spontán	Tautomer átrendeződés Depurináció, deamináció Téves bázispárosodás	
Indukált	Természetes mutagének	
	Kémiai	Direkt mutagén
	Fizikai	
	Biológiai	Indirekt mutagén
	Mesterséges mutagének	
	Kémiai	Direkt mutagén
	Fizikai	
Biológiai	Indirekt mutagén	

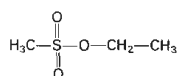
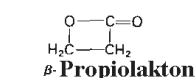
Típusaik szerint

Minőségi (kvalitatív) mutációk	pontmutációk	Bázispár szubsztitúció	Tranzíció
			Tranzverzió
		Kereteltolódásos (frame shift) mutáció	Deléció
			Addíció
kromoszóma-mutációk	Szerkezeti változások (átrendeződések)	Inverzió	
		Transzlokáció/inszerció	
		Transzpozíció	
Mennyiségi (kvantitatív) mutációk	kromoszóma-mutációk	Szerkezeti változások	Deficiencia
			Duplikáció
		Számbeli változások (kromoszómavesztés, és/vagy nondiszjunkció következtében)	Euploidia (pl. triploidia)
			Aneuploidia (pl. monoszómia)

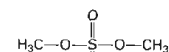


11.6. ábra. Egy interkaláló vegyület, a proflavin molekula szerkezeti képlete.

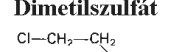
Közvetlenül a DNS-re ható, direkt mutagén



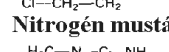
Etil-metánsulfát



Dimetilsulfát

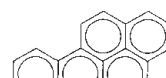


Nitrogén mustár

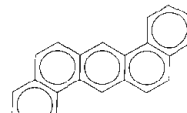


Metilnitrozourea

A DNS-re átalakulása után ható, indirekt mutagén



Benzpirén



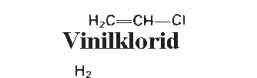
Dibenzantracén



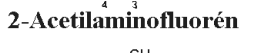
2-Naftilamin



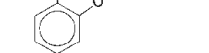
Dimetilnitrozamin



Vinilklorid



2-Acetaminofluorén



Szafról



Aflatoxin-B

11.7. ábra. Néhány ismert mutagén szerkezeti képlete.

A következőkben négy ismert direkt mutagén hatásmechanizmusát mutatjuk be röviden.

Salétromossav (HNO_2)

A HNO_2 a bázisok aminos-csoportjait keto-csoportokká alakítja: a citozint uracillá, az adenint hipoxantinná (11.9a ábra). Két replikáció után az A=T bázispár helyén $\text{G} \equiv \text{C}$ képződik, a bázispár csere tranzíció típusa játszódik le.

Etil-metánszulfonát (EMS)

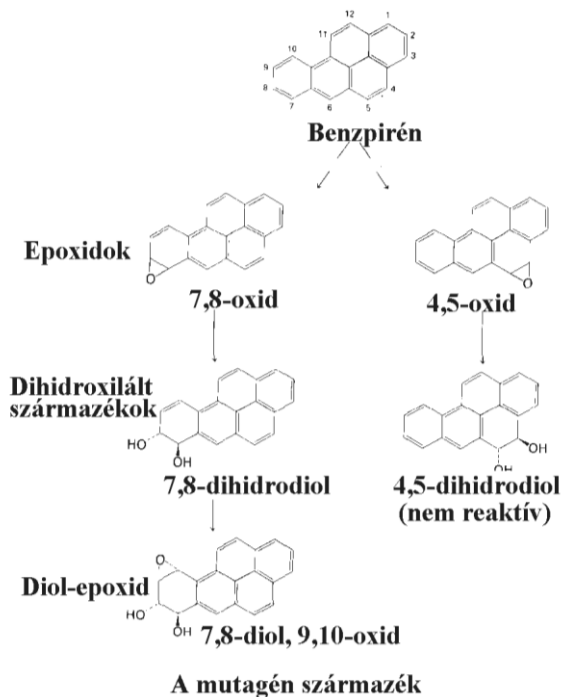
Az egyik legismertebb alkiláló vegyület. Az EMS a guanint etilguaninná (EG) alakítja. Az EG timinnel párosodik. Két replikációt követően egy $\text{G} \equiv \text{C} \rightarrow \text{A}=\text{T}$ tranzíció következik be (11.9b ábra). Az EMS hatására képződött etiltimin guaninnal párosodik, és végeredményben $\text{T}=\text{A} \rightarrow \text{C} \equiv \text{G}$ tranzíciót eredményez.

Bróm-dezoxiuridin (BrDU)

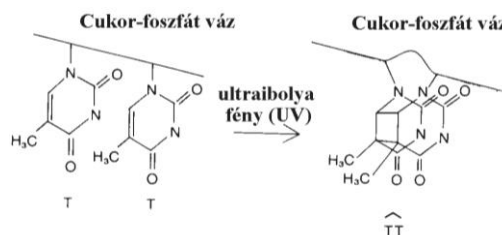
A BrDU egy timin-analóg (11.9c ábra). Úgy okoz tranzíciókat, hogy fokozza a tautomer átalakulások gyakoriságát.

Ultraibolya- (UV-) sugárzás

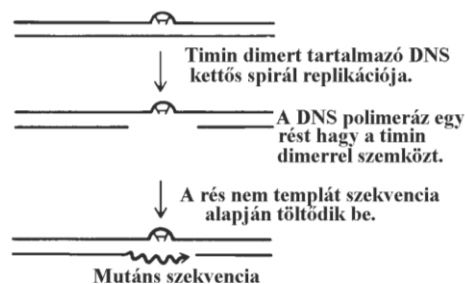
Az UV közvetve okoz bázispár-cseréket. UV hatására az egyik DNS-szálnak két szomszédos pirimidin bázis (többnyire timinek) között kovalens kötések képződhetnek (11.10. ábra). A timin dimerek nem értelmezhetőek a DNS-polimeráz számára: nem szolgálnak templátként a replikáció folyamán, velük szemben véletlenszerűen épülnek be nukleotidok, végeredményben bázispár szubsztitúciók következnek be (11.11. ábra).



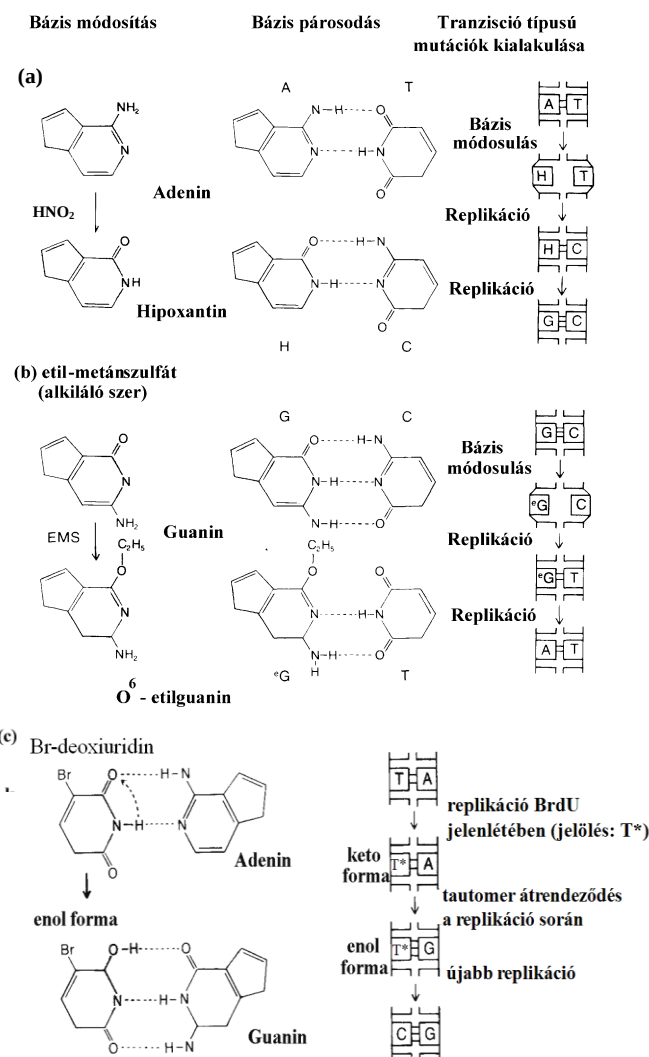
11.8. ábra. Az indirekt mutagén benzpirénből a szervezetben képződik mutagén származék.



11.10. ábra. Az ultraibolya sugárzás pirimidin (többnyire timin) dimerek képződéséhez vezet.



11.11. ábra. Mutáns szekvencia képződése timin dimerral „szemközt”.



11.9. ábra. A salétromossav, az EMS, valamint a BrDU direkt mutagének hatásmechanizmusa.

A MUTÁCIÓK KÖVETKEZMÉNYEI

Ha a pontmutációk a gének kódoló részében történnek, és az általuk okozott változás az érett mRNS-ben is megjelenik, az legtöbbször befolyásolja a gén által kódolt fehérje aminosav-sorrendjét, szerkezetét. A különböző típusú mutációk hatása ebből a szempontból nem egyforma.

A bázispár-cserék következményei

1. A néma mutációknak nincsenek következményei, mert ugyanaz az aminosav szintetizálódik az érintett kodon alapján - például mert a kodon „löttyögös” harmadik tagja cserélődik ki a mutáció következtében (lásd a genetikai kódszótárt).

2. A halk mutációk esetében a bázispár-csere eredményeként az eredeti aminosav helyére egy azonos jellegű épül be a fehérjébe (pl. egy glutaminsav helyére egy aszparaginsav). A halk mutációk általában nem befolyásolják jelentősen a fehérjék funkcióját. A hasonló jellegű aminosavaknak valamennyire hasonlóak a genetikai kódjaik, egyfajta védelmet biztosítva a túlzottan gyakori mutációk ellen (11.12. ábra). A kódszótár megmutatja, hogy a bázishármasok második helyét érintő mutációk következménye a legsúlyosabb.

3. A téves (missense) mutációk esetében a bázispár-csere olyan aminosav-csere a következménye, amely jelentősen megváltoztatja a kódolt fehérje funkcióját. Például a sarlósejtes vérszegénységet okozó autoszomalisan öröklődő recesszív mutáció, az 5'GAA3' → 5'GTA3' bázispár-csere Glu → Val aminosav-cserét eredményez a β-hemoglobin 6. aminosavában. A Glu→Val csere sarló alakú vörösvérsejtek képződését okozza (oxigénszegény környezetben a heterozigótákban is). A gyorsan pusztuló vörösvérsejtek vérszegénységhez és számos további rendellenességhez vezetnek (11.13. ábra).

Egyetlen mutáció szerteágazó következményeinek összességét pleiotrópiának nevezik.

Máso-dik		Harmadik bázis			
Első bázis	U	phe	phe	leu	leu
	C	leu	leu	leu	leu
	A	ilu	ilu	ilu	met
	G	val	val	val	val

Máso-dik		Harmadik bázis			
Első bázis	U	ser	ser	ser	ser
	C	pro	pro	pro	pro
	A	thr	thr	thr	thr
	G	ala	ala	ala	ala

Máso-dik		Harmadik bázis			
Első bázis	U	tyr	tyr	term	term
	C	his	his	gln	gln
	A	asn	asn	lys	lys
	G	asp	asp	glu	glu

Máso-dik		Harmadik bázis			
Első bázis	U	cys	cys	term	trp
	C	arg	arg	arg	arg
	A	ser	ser	arg	arg
	G	gly	gly	gly	gly

☐ Hidrofób

☒ Semleges

☒ Hidrofil

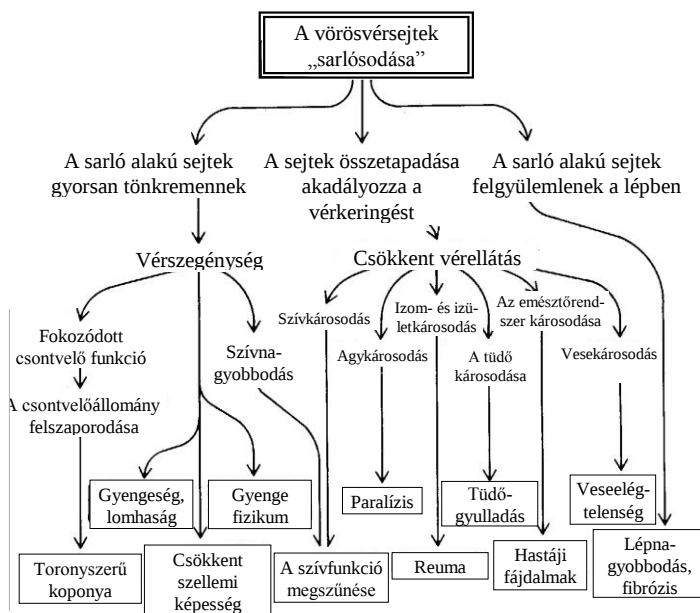
11.12. ábra. A hasonló jellegű (hidrofób, hidrofil vagy semleges) aminosavak kodonjai hasonlóak.



11.13. ábra. A sarlósejtes vérszegénységet egyetlen bázispár csere okozza a β -hemoglobint kódoló génben.

4. Az értelmetlen (nonsense) mutációk egy aminosav kodonját a három STOP kodon valamelyikére változtatják. Az értelmetlen mutációk a fehérjeszintézis idő előtti befejeződését, így a szokásosnál rövidebb fehérjék képződését eredményezik. A szokásosnál rövidebb fehérjék általában funkcióképtelenek és gyorsan degradálódnak.

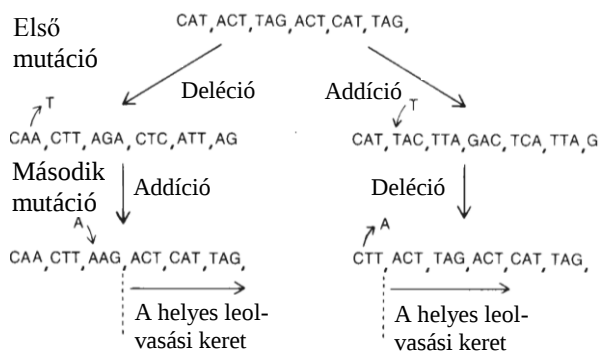
5. A lánchosszabbító mutációk valamelyik stop kódot értelmes, aminosavat kódoló kóddá alakítják, pl. UAG (STOP) $\rightarrow$ UAC (Tyr). A lánchosszabbító mutációk esetében a fehérjeszintézis az mRNS következő STOP kodonjáig folytatódik, így a szokásosnál hosszabb fehérje képződik. A szokásosnál hosszabb fehérje sok esetben nem, vagy csak csökkent mértékben működőképes. A vérszegénység sok típusát lánchosszabbító típusú mutációk okozzák.



11.14. ábra. Egyetlen mutáció szerteágazó következményei (pleiotróp hatás).

A kereteltolódásos mutációk következményei

Egy fehérjekódoló gén exonjában bekövetkező kereteltolódásos mutáció helyétől kezdődően az információ-tartalom az eredetihez képest teljesen más lesz (11.15. ábra). Ezért a kódolt fehérjék szerkezetét érintő pontmutációk közül általában a kereteltolódásosak következményei a legsúlyosabbak. Ráadásul a kereteltolódásos mutációk hatására gyakran a szokásosnál rövidebb vagy hosszabb fehérjék képződnek, mert véletlenszerű lesz a stopkodonok megjelenése is az új leolvasási keretben. (Ugyanakkor egy második mutáció nagyobb eséllyel állítja helyre a fehérje szerkezetét, működését, mint a bázis-cserés mutációk esetében – lásd később; 11.15. ábra.)



11.15. ábra. A kereteltolódásos mutációk következményei (és szuppressziója – lásd később). Az aktuális leolvasási keretet a nukleotidok hármastagolása jelzi.

A pontmutációk esetében az örökítő anyag *minősége* változott, mennyisége nem, vagy csak elhanyagolható mértékben. Az ún. kromoszóma-mutációk esetében azonban változhat az örökítő anyag mennyisége is (11.1. táblázat).

KROMOSZÓMAMUTÁCIÓK

Mutációk a kromoszómák szerkezeti változásai miatt

Elsősorban az ionizáló sugárzások, de sok kémiai és biológiai mutagén is eltörheti a DNS-t. A DNS-töréseknek szerteágazó következményei lehetnek. Az *inverziók* esetében a DNS egy hosszabb darabja megfordul. A *transzlokációk* esetében valamely kromoszóma nagyobb szegmense egy másik kromoszóma részévé válik (a *reciprok transzlokációk* esetében kromoszómakészletek kölcsönösen cserélődnek ki). A *transzpozíció* transzpozon (ugráló gén) áthelyeződését jelenti a genomban. Megjegyzendő, hogy az inverziók, a transzlokációk, és a transzpozíciók esetében a mutációt elszenvedett sejtben nem feltétlenül változik az örökítő anyag mennyisége (11.1. táblázat).

A kromoszóma-átrendeződéseknek, bár az adott sejtben mennyiségi változás nem történik, gyakran súlyosak a következményei. Egy jellegzetes példa az ún. Cri-du-chat (macskanyávogás) szindróma, amelyet az esetek 10-15%-ában az 5. kromoszóma egy darabjának egy másik kromoszómára történő transzlokációja okoz. Míg abban a (testi vagy ősvivar-) sejtben, amelyben az átrendeződés létrejött, a transzlokáció nem okoz problémát (*kiegyensúlyozott vagy balanszírozott transzlokáció*), addig az érintett ősvivar-sejt haploid utódsejtjeinek felében már genetikai kiegyensúlyozatlanság jön létre (11.16. ábra). (A Cri-du chat szindrómát az esetek 85-90%-ban azonban az 5. kromoszóma „egyszerű” deficienciája – lásd alább – okozza).

Az átrendeződések egyes esetekben gének szerkezetét változtathatják meg. Ha ennek eredménye valamilyen, a sejtosztódásban szerepet játszó gén túlzott aktivitása, az hozzájárulhat daganatok kialakulásához – erre egy későbbi, a daganat kialakulásáról szóló előadásban látunk példákat.

A *deficienciák* esetében nagy DNS-szakaszok vesznek el a kromoszómákból (a már tárgyalt deléciók csak egy, esetleg néhány bázispár elvesztését jelentik). A *duplikációk* esetében már meglevő hosszabb szekvenciákkal bővül a genetikai állomány.

Bármilyen sok káros következménye is legyen a kromoszóma-átrendeződéseknek, jelentőségük kiemelkedő nem csak az evolúcióban, hanem a gének azonosításában, molekuláris szintű vizsgálatában is. A töréspontok ugyanis néha génekben történnek, így fenotípusban is észlelhető mutációkat okoznak. A kromoszómák töréspontjait pedig citológiai és molekulárisan is viszonylag egyszerűen lehet azonosítani.

Mutációk a kromoszómák számbeli változása miatt

A DNS mennyisége a sejtekben/élőlényekben nemcsak deficienciák, duplikációk és transzlokációk miatt változhat, hanem teljes kromoszómák vesztese vagy nyerése következtében is. A kromoszómaszám kromoszómavesztés és/vagy nondiszjunkció következtében változhat, amint azt egy korábbi fejezet áttekintette.

A MUTÁCIÓK HATÁSA A FEHÉRJE SEJTEN BELÜLI FUNKCIÓJÁRA

A fehérjekódoló gének mutációit nemcsak a kódolt fehérje szerkezetében, hosszában bekövetkezett változások alapján lehet osztályozni, hanem aszerint is, hogy hogyan változott meg az eredeti funkció. Az ilyen mutációk nemcsak exonban, hanem a gén szabályozó régiójában is bekövetkezhetnek, kromoszóma-átrendeződés, sőt, a gén sokszorozódása is hatással van egy adott fehérje sejtben betöltött szerepére. A funkció megváltozásán alapul a Hermann J. Müller genetikus által még 1946-ban bevezetett, de máig használatos osztályozás.

Amorf mutációról beszélünk, ha a gén nem funkcionál, azaz egyáltalán nem képződik róla fehérje, vagy ha képződik is, de teljesen működésképtelen. Ezt okozhatja a szabályozó régió hibája, a gén részleges vagy teljes deléciója, vagy például egy korai STOP-kodon kialakulása a leolvasási keretben. Az amorf mutáció a leggyakoribb, nullmutációnak is nevezik.

A szintén gyakori hipomorf mutáció esetében fehérje ugyan képződik, de vagy kisebb mennyiségben (a szabályozó régió hibája miatt), vagy szerkezeti hibája miatt, nem tud elég hatékonyan működni.

Az amorf és hipomorf mutációkat hordozó allélokat *funkcióvesztéses* (angolul *loss-of-function*) alléloknak is nevezik, és legtöbbször recesszívek.

Ezzel szemben a mutáció hipermorf, ha túl sok vagy túl aktív fehérje termelődik a normálhoz képest. A mennyiségi növekedést akár a géndózis növekedése (például génduplikáció), akár fokozott transzkripció is okozhatja.

A neomorf mutációk következtében a fehérje olyan sejtekben is kifejeződik, ahol normálisan nincs jelen (a szabályozó régióban kialakult hiba miatt), vagy valamilyen szerkezeti változás miatt a szokásostól eltérő, új funkciót lesz képes ellátni – például a normálissal szemben képes lesz egy teljesen új fehérjével kölcsönhatásba lépni.

A hipermorf és neomorf mutációkat *funkciónyeréses* (*gain-of-function*) mutációknak is nevezik, és a hordozó allél domináns lesz.

A ritka antimorf mutációk olyan változást okoznak a fehérje szerkezetében, aminek következtében a hibás fehérje képes megakadályozni a sejtben az ép géntermék működését is (mint például a dimer formában működő fehérjék esetében). Ezért az ilyen mutációt hordozó allél *domináns negatív* allélnak nevezik. Az antimorf mutációt hordozó allélok heterozigóta formában gyakran hasonló fenotípust okoznak, mint ugyanazon gén funkcióvesztéses (amorf vagy hipomorf) alléljai homozigóta formában.

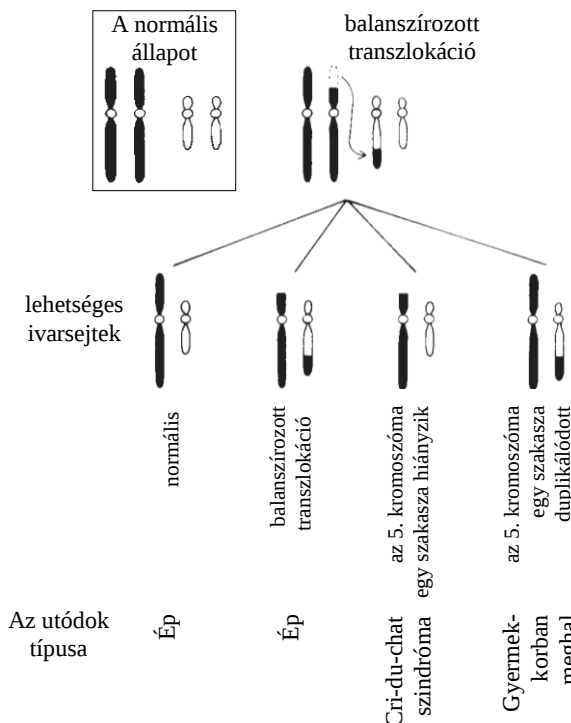
MUTÁCIÓK ÁTÖRÖKÍTÉSE AZ UTÓDRA

Mutációk természetesen az ősvivar-, vagy a testi sejtekben egyaránt bekövetkezhetnek. A testi sejtekben ezek csak a testi sejtek funkcióját érintik (bár ez súlyosan kihat az egyedre, pl. daganatképződés során), de az utódokra nem öröklődhetnek. Az ősvivarsejtekben kialakult mutációk átöröklődhetnek az utódokra, növelve a faj genetikai változékonyságát.

REVERZIÓ ÉS SZUPPRESSZIÓ

Ritkán, de megtörténhet, hogy **reverzió** következtében visszaáll a normális fenotípus. A reverzió minden esetben egy második mutáció következménye. A nagyon ritka *valódi revertánsok* esetében a bázisok eredeti sorrendje áll helyre. A *szuppresszor mutációk* is második mutációk, amelyek vagy helyreállítják az eredeti fenotípust, vagy csökkentik a mutáns fenotípus erősségét - de mellettük megmarad az első mutáció is.

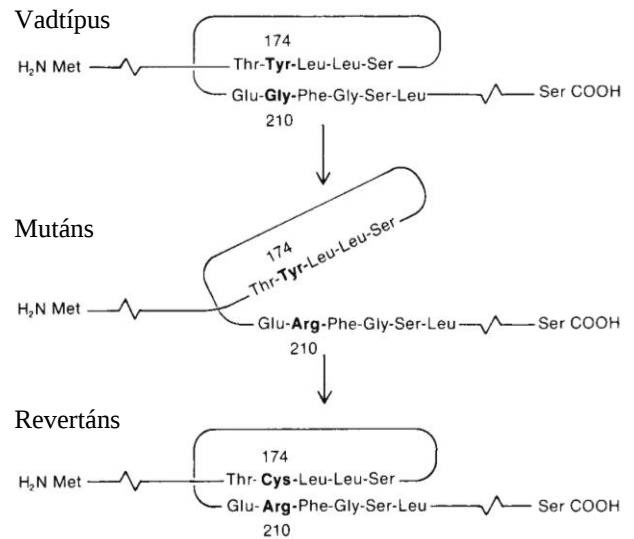
A szuppresszor mutációk sokféle módon kifejthetik hatásukat. Itt egy-egy példát említünk az *intra-* és az *extragénikus szuppresszióra*. A triptofán szintetáz enzimet kódoló génben a 212. aminosavat kódoló helyen történt GGA→AGA mutáció következtében Gly→Arg aminosavcsere történt, ezért megváltozott a fehérje szerkezete, elveszett funkciója. A 174. helyen bekövetkezett második mutáció (TAT→TGT) egy Tyr→Cys aminosavcsere eredményezett, helyreállítva a fehérje eredeti szerkezetét és funkcióját is (11.17. ábra). A triptofán szintetáz mutációinak esete az *intragénikus szuppresszió* klasszikus példája.



11.16. ábra. A Cri-du-chat szindróma alapja sokszor egy transzlokáció: az 5. kromoszóma egy darabkája egy másik kromoszómára helyeződött át.

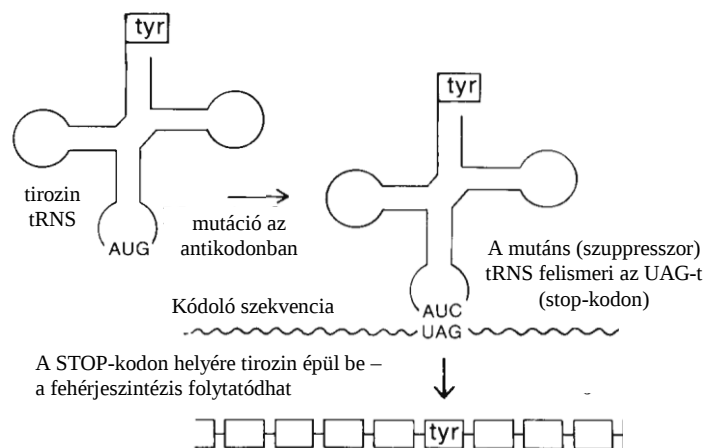
Az *extragénikus szuppressziók* esetében a második (a szuppresszor hatású) mutáció nem ugyanabban a génben következik be, mint az első mutáció. Klasszikus, különleges példa a következő, baktériumokban leírt jelenség. Az első mutáció miatt hibás, a fehérjeszintézis túl korai befejezését előidéző STOP kodon képződött a nyitott leolvasási kereten belül. Azonban egy második, valamely tRNA génjében bekövetkezett szuppresszor mutáció hatására a mutáns tRNA-en a STOP kodonnak megfelelő, azzal komplementer párt képző antikodon jött létre. Ez az első mutáció miatt hibás mRNS-ről képződő fehérje esetében is lehetővé tette aminosav beépülését és a transláció folytatását (11.18. ábra).

Tehát a tRNA génjében bekövetkező szuppresszor mutáció következtében nem képződött a szokásosnál rövidebb fehérje, hanem a fehérjeszintézis a következő STOP kodonig folytatódhatott. Miután (az rRNA-ekhez hasonlóan) a tRNA-gének is több kópiában vannak jelen a genomban, egyetlen tRNA-génben bekövetkező antikodon-változás mellett a többi, ugyanazon aminosavat szállító tRNA még felismeri a megfelelő eredeti kodont is. Ugyanakkor, bár ezek az extragénikus tRNA szuppresszor mutációk „kisegítik” a baktériumot, de az ép mRNS-ek esetében az adott STOP helyére beköthetnek és aminosavat szállíthatnak, így a szokásosnál hosszabb fehérjék képződéséhez is vezetnek - és általában csökkentik az életképességet.



11.17. ábra. Az intragénikus szuppresszor mutációk úgy revertálják (állítják helyre) az enzimaktivitást, hogy egy, ugyanabban a génben bekövetkező második mutációval visszaállítják a fehérje eredeti szerkezetét.

A kereteltolódásos mutációk reverziója legtöbbször intragénikus, és további bázispárok deléciójával vagy beékelődésével valósulhat meg (11.15. ábra). Ekkor minél közelebb történnek a szuppresszor mutációk az eredetihez, annál hatékonyabb a szuppresszió, és áll helyre az eredeti fenotípus.



11.18. ábra. A tirozin tRNA génjében az antikodonban történő mutáció extragénikusan szuppresszálhat egy értelmetlen mutációt.

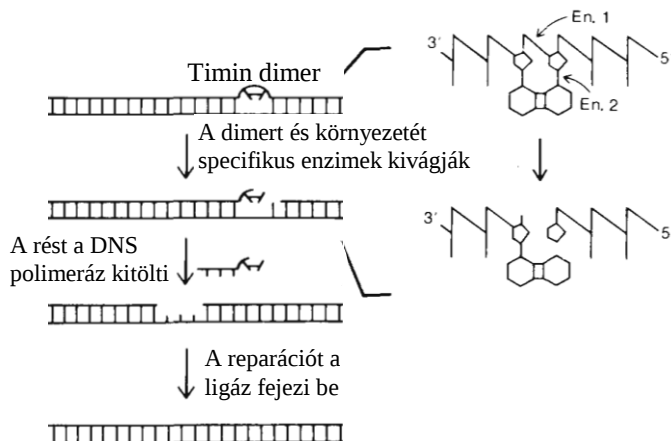
REPARÁCIÓ

A **reparáció** a DNS-hibák enzimatiskus javítását jelenti. Pro- és eukariótákban egyaránt vannak olyan enzimrendszerek, amelyek folyamatosan felügyelik a DNS épségét, és kijavítják hibáikat. A reparációs mechanizmusoknak négy fő típusa ismert.

1. A fotoreaktivációs reparációs rendszer kifejezetten az UV-sugárzás hatására kialakult timin-dimerek közötti kovalens kötéseket hasítva állítja vissza az eredeti állapotot. A fotoreaktivációs reparációs rendszer látható fénnel aktiválható. Ez a mechanizmus méhlepényes emlősökben nem működik.

2. A kivágásos (excíziós) reparációs rendszer kétféle. A **bázis-kivágás** során specifikus glikozidázok ismerik fel a szokatlan (pl. deamináció vagy bázis-csere miatt megjelent) bázisokat, levágják őket a dezoxiribózárról, majd a „lyukat” észlelő ún. AP (apurimidin/apurin) endonukleázok vágják ki a hibás szál egy rövid szakaszon. A hiányt DNS-polimeráz, majd ligáz enzim állítja helyre.

A struktúra nagyobb torzulását okozó timin-dimereket, kémiaiilag módosított bázisokat vagy az interkalálódó molekulák okozta abnormális szerkezetet a sejt **nukleotid-kivágással** javítja (11.19. ábra). Ez a reparációs rendszer először kivágja az egyik DNS-szálból a teljes meghibásodott szakaszt – a kivágott szakasz hossza meghatározott, konzervált – majd az ép szál alapján helyreállítja a nukleotidok eredeti sorrendjét.

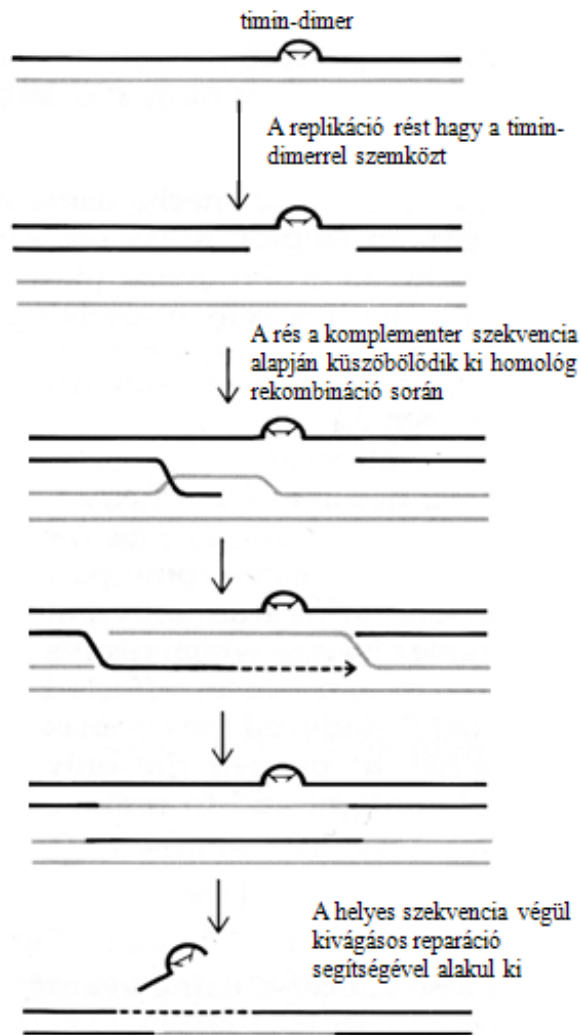


11.19. ábra. A timin dimerek excíziós reparációja.

3. A reparáció rekombinációval egybekötve is megtörténhet (11.20. ábra). A **rekombinációs reparáció** homológ rekombináción alapul. Ha egy hiba a replikáció kezdetéig bennmarad a szekvenciában, vagy a replikáció közben vagy után száltörés következik be, akkor a frissen szintetizálódott, ugyanolyan szekvenciájú, közeli leánykromatidán található komplementer DNS-szál szolgálhat mintául az eredeti DNS szekvencia helyreállításában.

4. A nem-homológ vég-összekapcsolás a kétszálú töréseket javítja, az előbbinél jóval egyszerűbb és gyorsabb folyamat. Ekkor ugyanis a törött DNS kettős spirál végek egymás közelébe kerülnek és köztük új kovalens kötésekkel helyreáll a cukor-foszfát lánc épsége. Ez a mechanizmus óhatatlanul mutációt generál, ugyanis néhány nukleotid ilyenkor elveszik. Mégis, az emlősök testi sejtjeiben általánosan jellemző ez

hatékony, de hibázó javítás. Ez azért van, mert genomjuk méretéhez képest igen kis arányban vannak kódoló szekvenciák. Így a nem-homológ vég-összekapcsolás gyorsasága, amely súlyos genom-sérüléseket előz meg, még mindig előnyösebb az így kialakuló kis pontmutációk ellenére is.



11.20. ábra. A DNS-hibák javítása rekombinációs reparációval.

A reparációs rendszerek a DNS legtöbb hibáját kijavítják. A *Xeroderma pigmentosum* betegség esetében az UV-okozta DNS-hibákat is kijavító nukleotid-kivágásos reparációs rendszerek valamelyik eleme hiányzik. Bármelyik ilyen enzimet kódoló gén mutációja homozigóta állapotban *Xeroderma pigmentosum*-hoz vezethet. A mutációra homozigóta emberek sejtjeiben, leggyakrabban az UV sugárzásnak kitett bőrsejtjeiben, halmozódnak a mutációk. A mutációk előbb-utóbb megváltoztatják, vagy megszüntetik a sejtosztódást szabályozó gének némelyikének funkcióját is, gyakran melanómát, a legveszélyesebb típusú bőrrákot okozva, de egyéb rákfajták kialakulásának valószínűsége is nagy.

KARCINOGENÉK; A MUTAGÉN HATÁS TESZTELÉSE

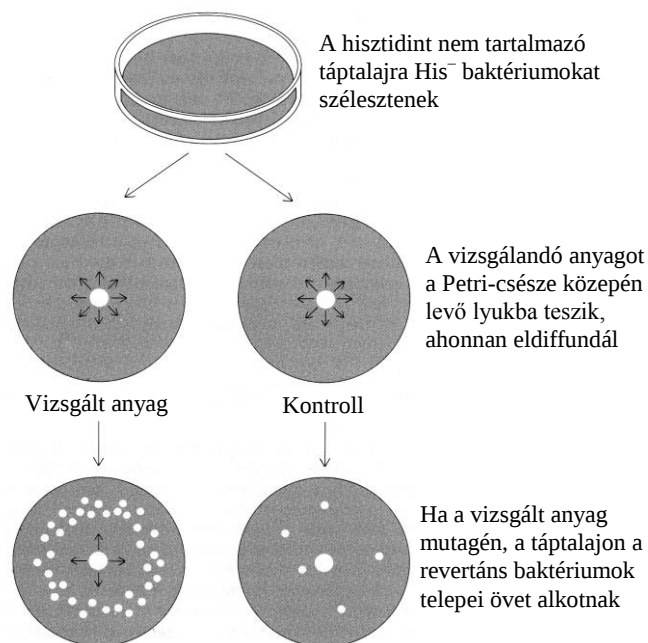
A daganatok képződésének legfontosabb okai a DNS-ben, a mutációkban rejlenek. Mivel a napjainkig megvizsgált mutagének mindegyike képes daganatok képződését indukálni, kijelenthetjük, hogy minden mutagén egyben rákkeltő is (a rákkeltők vagy *karcinogének* olyan fizikai, kémiai és biológiai hatások, amelyek daganatok képződését indukálhatják).

Évente sok ezer olyan vegyületet állítanak elő, amelyek korábban nem léteztek a Földön. Az új vegyszerek némelyikéből gyógyszer lesz, másokból rovarölő, gyomirtó, gombaölő szer, vagy ételadalék, kozmetikum stb. Az élőlényeknek nem volt sem szükségük, sem lehetőségük, hogy alkalmazkodjanak az új vegyszerekhez. Az élőlényekben nem alakult ki olyan vészjelző rendszer sem, amely felhívhatná a figyelmet a mutagénekre.

A mutagén és a rákkeltő hatások közötti szoros kapcsolat lehetőséget biztosít a környezetben levő, mutációt okozó karcinogének kimutatására – hiszen ha egy anyagnak mutagén hatása van, biztos, hogy karcinogén is. Számos. mutagén hatást vizsgáló eljárást dolgoztak ki. A legismertebb, és a leggyakrabban alkalmazott az ún. Ames-teszt, amelyet Bruce Ames fejlesztett ki.

Az Ames-teszt a *Salmonella typhimurium* baktérium olyan mutáns törzseinek használatán alapul, amelyek hisztidinre auxotrófok (van olyan törzsük, ahol a hisztidin szintéziséhez szükséges egyik génjükben kereteltolódásos mutáció van, más törzsükben bázispár-cserén alapul a hisztidin-auxotrófia). Egy további mutáció miatt a baktériumokban nem működik a kivágásos reparációs rendszer, egy másik hatására pedig sejthártyájuk fokozottan permeábilis. A hisztidin-auxotróf baktériumok nem szaporodnak olyan táptalajon, amely nem tartalmaz hisztidint. Ha azonban a vizsgált hatás mutagén, egy általa okozott másodlagos mutáció akár reverteálhatja a hisztidin-auxotrófiát is. Ekkor minimál (hisztidin-mentes) táptalajon is szaporodásnak indulhatnak, telepeket képezhetnek azok a baktériumsejtek, amelyekben megtörtént a reverzió (11.21. ábra).

Az Ames-teszt kivitelezése során Petri-csészébe nagyon kevés (csak néhány kezdeti osztódást lehetővé tevő) hisztidint tartalmazó táptalajt öntenek, amely felszínére szélesztik a baktériumokat (11.21. ábra). A Petri-csésze közepébe lyukat fúrnak, és belehelyezik a vizsgálandó anyagot. A vizsgált anyag diffundál a táptalajban, és különböző koncentrációban érintkezik a baktériumokkal. Ha a vizsgált szer mutagén, mutációkat indukál, néha a hisztidin-auxotrófia reverzióját is, amelynek hatására baktériumtelepek fejlődhetnek. Vagyis a telepek képződése mutagén hatásra utal. Minél több telep képződik, annál erősebb a vizsgált szer mutagén, azaz karcinogén hatása.



11.21. ábra. Az Ames-teszt elvi alapja sematikusan.

A megvizsgált tényezők sokasága bizonyult mutagének: a dohányosok vizelete, sok hajfesték, a DDT... A mutagén-tesztek eredményeként születtek meg azok a törvények, amelyek kötelezővé teszik az új termékek mutagén (tehát rákkeltő) hatásának vizsgálatát.

ÖSSZEFOGLALÁS

Mutációk a kezdetektől fogva folyamatosan történnek, spontán, és a természetes mutagének által indukálva is. Az újonnan képződő mutációk óriási többsége előnytelen hatású. A replikáció során a DNS-polimeráz biztosította ellenőrzés és a különböző reparációs mechanizmusok nagyon alacsony szinten tartják a mutációk bekövetkeztének valószínűségét.

Ugyanakkor, mint tudjuk, a mutációk adják a genetikai variabilitás alapját. Az evolúció során kialakult kényes egyensúly biztosítja azt az éppen elegendő mutációs gyakoriságot, amely lehetővé teszi az élőlények alkalmazkodását a folyamatosan változó környezeti feltételekhez.

A vegyszerek és egyéb mutagének újabb keletű használata fokozhatja a mutációk számát, amire az élőlények szervezete nincs felkészülve. A sejtekben a mutációk kivédését szolgáló mechanizmusok kevésbé tudnak megbirkózni a megemelkedett hibaszámmal, ami jelentősen növelheti a rákos megbetegedések kialakulásának valószínűségét.

14. A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA PROKARIÓTÁKBAN

Enzimindukció, indukálható operon. Policisztronos mRNS. Katabolit represszió, represszáható operon. Attenuáció.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

Az örökítőanyag egyik fontos tulajdonsága, hogy képes szabályozni az élőlények élettevékenységeit. Hogyan tudják az élőlények génjeiket az igényeknek megfelelően be- vagy kikapcsolni? A probléma megértéséhez ma is a legegyszerűbb felépítésű élőlények, a prokarióták szabályozási mechanizmusainak megismerésén keresztül vezet az út. Hogyan használják a prokarióta élőlények génjeiket a környezetükben levő tápanyagforrások hasznosítására? Hogyan veszik fel azokat a szénforrásokat, amelyekből életfolyamataik energiaigényét fedezik és azokat a tápanyagokat, amelyekből testüket építik? A következő fejezet azokat a mechanizmusokat tekinti át, amelyek a prokarióta gének expresszióját szabályozzák. Ezen folyamatok megismerése azért is nagyon fontos, mert a modern molekuláris biológiai laboratórium „háziállata”, az *Escherichia coli* baktérium munkára fogásához ismerni kell az erre alkalmas megközelítéseket...

Génexpresszió: funkcióképes RNS képződése génben kódolt genetikai információ alapján.

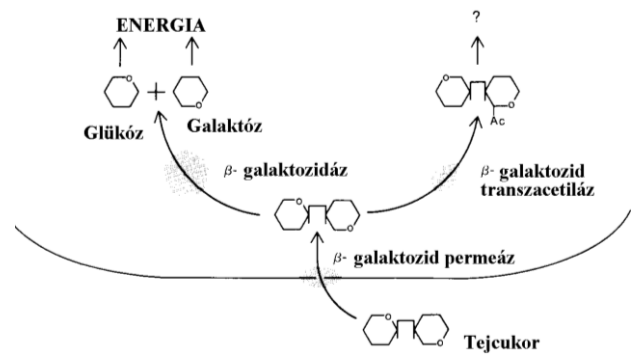
Enzimindukció

A β -galaktozidáz azon enzimek egyike, amelyek ahhoz szükségesek, hogy a baktériumok a laktózt szénforrásként hasznosíthassák (14.1. ábra). Biokémiai módszerekkel már hamar kimutatták, hogy azokban a baktérium-sejtekben, amelyek olyan közegben élnek, amely nem tartalmaz laktózt (tejcukrot), csupán néhány molekulányi β -galaktozidáz enzim van. Ha a tápoldatba azonban glükóz helyett laktózt tesznek, a baktériumsejtek β -galaktozidáz tartalma hamarosan növekedni kezd. A jelenség az úgynevezett *enzimindukció* jellegzetes példája, és ebben az esetben azt jelenti, hogy a laktóz, az *induktor* molekula, indukálja a β -galaktozidáz enzim szintézisét (más esetben az induktor már jelenlevő, de még inaktív enzimeket is aktiválhat). Miután elfogy a tápoldatból a laktóz, a sejtek β -galaktozidáz tartalma hamarosan csökkenni kezd, majd visszaáll az eredeti állapot (14.2. ábra). Mi történik az enzimindukció során? Hogyan állítanak elő a sejtek éppen akkor (és csak akkor) elegendő β -galaktozidázt, amikor környezetükben a hasznosítható energiaforrás a laktóz?

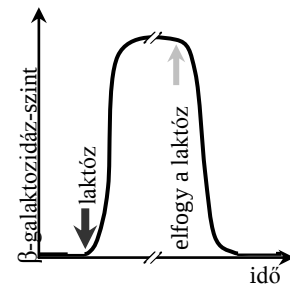
AZ INDUKÁLHATÓ OPERON

A lac operon szerkezete

A β -galaktozidáz enzim szintézisét a baktérium-kromoszóma egy olyan működési (operációs) egysége kódolja, amelyet *laktóz* (*lac*) operonnak neveznek



14.1. ábra. A laktóz-hasznosítás enzimeit.



14.2. ábra. A laktóz, mint induktor, indukálja a β -galaktozidáz enzim szintézisét.

(14.3. ábra). A *lac* operon három enzim szintézisét kódolja, mindhárom enzim a tejcukor hasznosításában vesz részt. (1) A β -galaktozid permeáz (*lacY*) juttatja be a β -galaktozid típusú vegyületeket (köztük a laktózt) a sejtekbe. (2) A β -galaktozid transzacetiláz (*lacA*) pontos funkciója a laktóz-hasznosítás szempontjából nem ismert. (3) A β -galaktozidáz (*lacZ*) hasítja a laktóz molekulákat glükózra és galaktózra, hogy a cukrok energiátartalma további enzimatis lépések során hasznosulhasson.

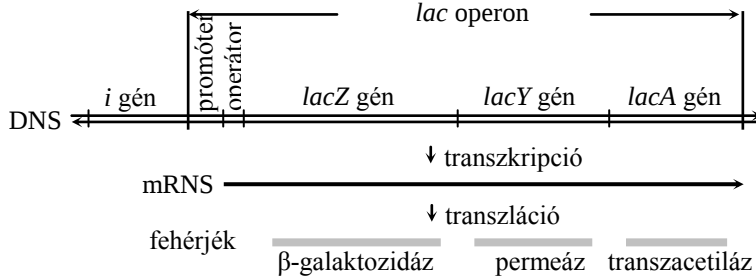
A három enzim egyetlen, úgynevezett *policisztronos* mRNS alapján képződik (14.3. ábra). Az mRNS-t akkor nevezik *policisztronos*nak, ha több (itt három) teljesen különböző fehérjét kódoló gén együttes transzkripciója során képződik, így több gén információtartalmát hordozza. A *lac* operonról átíródó *policisztronos* mRNS-ben tehát három nyitott leolvasási keret van (14.3. ábra).

Az operon „értelme” az, hogy az ugyanabban a folyamatban szereplő fehérjék (általában enzimek) expressziója közösen van szabályozva – ez a genoméret és energiagazdálkodás szempontjából igen „takarékos” baktériumok számára nagyon hasznos. A két szabályozó elem a *promóter* és az *operátor*, amely a *lac* operon esetében két jól definiált szakasz (14.3. ábra).

A lac operon expressziójának szabályozása

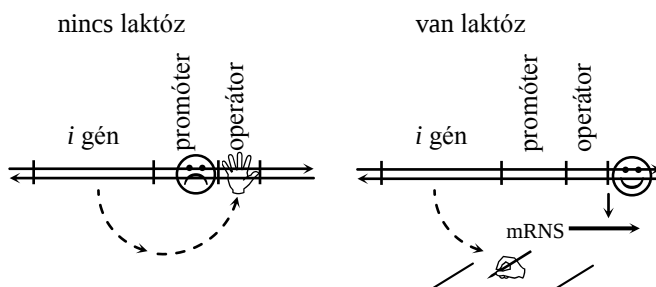
Ha nincs a baktériumok környezetében laktóz, a *lac* operon „csukva”, *represszált* állapotban van (14.4. ábra). A „csukott” állapotot az biztosítja, hogy az operátor régióhoz az úgynevezett *represszor* fehérje kötődik, megakadályozva az RNS-polimeráz kapcsolódását és a *lac* operon Z, Y és A génjeinek átíródását.

A represszor fehérje az *i* gén a terméke. Az *i* gén nem része a *lac* operonnak, de – ritka kivételként, és a hajdani kutatók szerencséjére – közeli szomszédja (más esetekben a represszor génje messze van az általa szabályozott operontól). Az *i* gén, bár igen kis mértékben, de *konstitutívan* (folyamatosan) expresszálódik, biztosítva, hogy a baktériumsejtekben mindig legyen néhány represszor fehérje.



14.3. ábra. A *lac* operon szerkezete.

Ha laktóz (induktor) kerül a baktériumsejtek környezetébe, a sejtbe bekerülő valamelyik laktózmolekula kapcsolódik az operátorhoz kötődött represszor fehérjéhez. Miután laktózzal kapcsolódott, megváltozik a represszor térbeli szerkezete, olyan *allosterikus* változás történik, aminek hatására az induktor-represszor komplex leválik az operátorról, az operon mintegy "kinyílik", *derepresszált* állapotba kerül. Derepresszált állapotban kezdődhet el a *lac* operon Z, Y és A génjeinek aktív transzkripciója, a policisztronos mRNA képződése és transzlációja – azon három enzim szintézise, amelyek a laktóz hasznosításához szükségesek. (Ugyanakkor represszor-kötés mellett is van – bár nagyon gyenge – transzkripció, így a sejtekben van néhány molekula az enzimekből. Erre azért van szükség, hogy a tápközegbe került laktóz egyáltalán bejusson a sejtekbe, a laktóz jelenlétét "észlelhessék" a baktériumok.) Ha elfogyott a közegből a laktóz (az induktor), a represszor fehérje ismét kötődik az operátorhoz, "becsukja", és represszálni tartja a *lac* operont (14.4. ábra). A szintetizálódott β -galaktozidáz fehérje rövid életű, többsége nagyon gyorsan lebomlik (14.2. ábra).



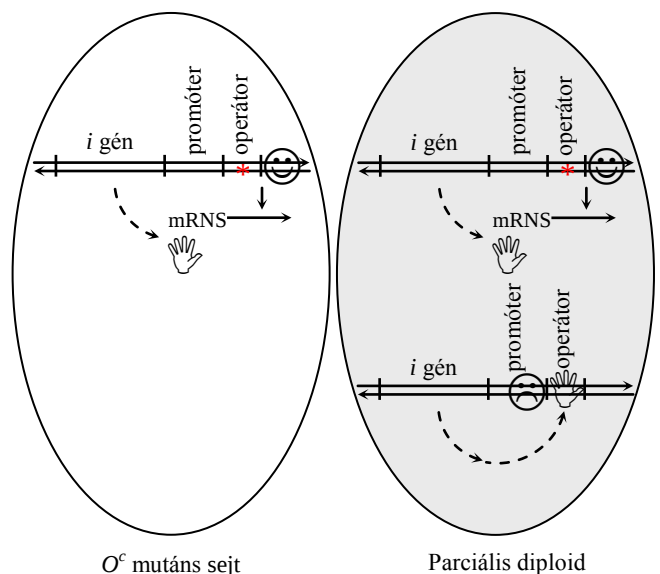
14.4. ábra. A *lac* operon expressziójának szabályozása. A jelölések a következők: ⊕ akadályba ütközött RNS-polimeráz; ⊙ transzkripciót végző RNS-polimeráz; ✎ az operátorhoz kötődött represszor fehérje; / induktor (itt: laktóz); ✎ az induktorttal kapcsolódott represszor fehérje.

A *lac* operon funkciója – a mutációk szerepe

A fent leírt mechanizmusra Francois Jacob, Jacques Monod és munkatársaik (1960) olyan mutánsok vizsgálata révén derítették fényt, amelyek megváltoztatták a laktóz által generált enzim-indukció folyamatát, azaz a *lac* operon szabályozhatóságát. Első eredményeik alapján hipotézist állítottak fel az enzim-indukció szabályozásáért felelős génszakasz szerkezetével és a mechanizmussal kapcsolatban, majd további kísérleteket végeztek, hogy alátámasszák elképzelésüket. A baktériumgenom szekvenciájának megismerése – néhány évtizeddel később – tökéletesen igazolta őket. A következőkben azt tekintjük át, hogy melyek voltak a legfontosabb mutációk és jellemzőik – hogyan derült fény azokra a mechanizmusokra, amelyek a *lac* operon expresszióját szabályozzák.

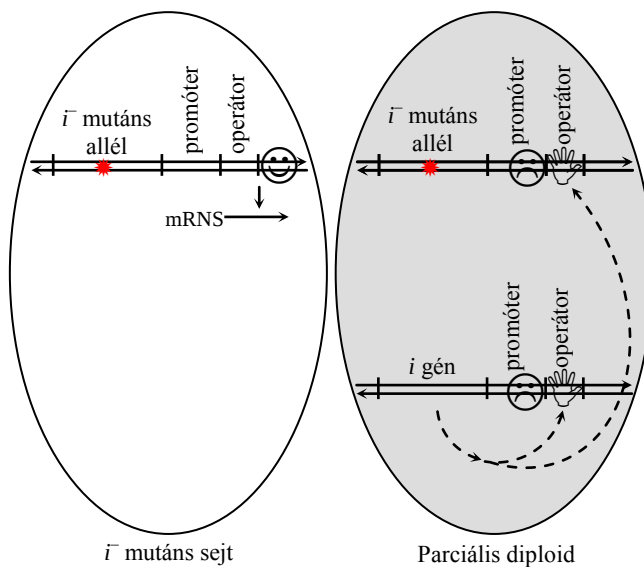
1. O^c , az „operátor konstitutív” mutáció. A vizsgált mutáns baktériumtenyészetek között volt olyan, amelyben a sejtek a laktóz jelenlététől *függetlenül* nagy mennyiségben tartalmazzák mindhárom enzimet. (Egyébként éppen abból következtettek arra, hogy a három gén szabályozása együttesen történik, azaz operonról van szó, hogy egyetlen mutáció egyszerre három gén expresszióját változtatta meg.) Amikor a baktérium saját kromoszómája mellé (egy plazmid részeként) bevitték az ép *lac* operont és környezetét az *i* génnel együtt, ezek a *parciális diploid* baktériumok továbbra is termelték mindhárom enzimet (Parciális diploid: csak néhány gén szempontjából diploid).

Ekkor gondoltak arra, hogy létezhet egy gátlásért felelős génszakasz, amelyet *operátornak* neveztek el. A mutáció úgy változtatta meg ezt, hogy a represszor nem tudott hozzá kapcsolódni, ezért a *lac* operon konstitutívan expresszálódott. Parciális diploidokban ugyan ép operont és ép *i* gént vittek be, de a baktérium saját *lac* operonja szabályozhatatlan maradt (14.5. ábra). Vagyis a mutáció domináns, „éli saját életét”. Ezért a mutáció neve ez lett: *operátor konstitutív*, O^c .



14.5. ábra. Az O^c mutáció (*) domináns, mert a parciális diploidokban is folyamatosan képződik mindhárom *lac* operon által kódolt enzim. A jelek jelentését a 14.4. ábra szövege összegzi.

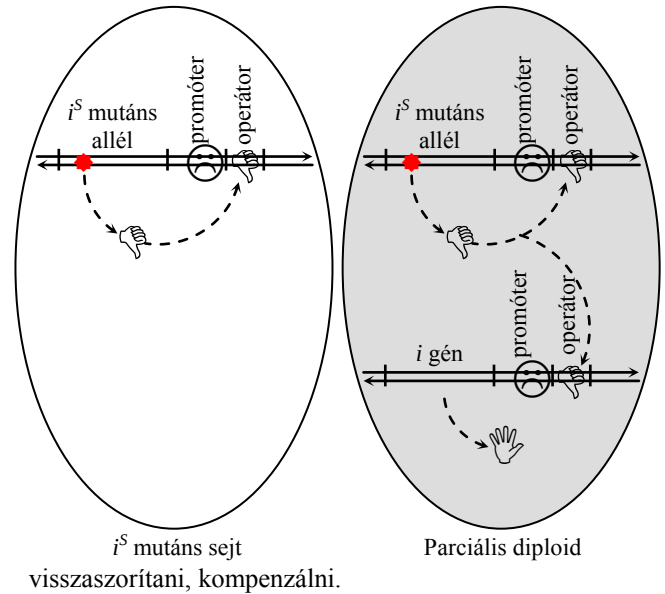
2. Az i^- mutáció. Jacob és Monod mutagenézises kísérleteiből olyan mutánsok is származtak, amelyek szintén a laktóz tápközegeben való jelenlététől függetlenül termelték a három enzimet. Ha ellenben a sejtek saját kromoszómája mellé egy ép *lac* operont és egy ép *i* gént vittek be, a parciális diploid sejtek viselkedése normalizálódott: laktóz hiányában nem termelték az enzimeket, ám laktóz jelenlétében indukálni lehetett bennük a három enzim képződését (14.6. ábra). Jacob és Monod arra következtetett, hogy a mutáns sejtekből hiányzik az a hipotetikus represszor fehérje, amely az operátorhoz kötődve szabályozhatná a *lac* operon működését (innen a mutáció i^- jele). Represszor hiányában ezért folyamatosan kifejeződhet az operon. A parciális diploidokban azonban képződik ép represszor, ami szabályozni tudja mindkét *lac* operon funkcióját. Az i^- mutáció tehát „recesszív”.



14.6. ábra. Az i^- mutáció (★) recesszív, mert a parciális diploidokban szabályozottá válik mindhárom *lac* operon-kódolt enzim képződése. A jelek jelentését a 14.4. ábra szövege összegzi.

3. Az i^s mutáció esete. A mutagenézis-kísérletekből olyan mutáns sejtek is származtak, amelyek következményeként akkor sem indukálódott a *lac* operon, ha volt a táptalajban laktóz. Bizonyos esetekben az operon „örökre” bezárult: még a parciális diploidokban sem képződtek indukció után *lac* operon-kódolt enzimek. Az ilyen mutáció hatása túlzott (szuper), innen kapta a nevét: i^s . Az i^s mutáció az *i* gén azon pontját változtatta meg, amely a represszornak a laktóz (induktor)-kötő részét kódolja. A mutáns represszor ugyan képes az operátorhoz kapcsolódni, de onnan laktózzal nem távolítható el, örökre „bezárja” az operont. Ha a mutáns sejtekbe ép *lac* operonokat és ép *i* géneket viszünk (plazmidok részeként), az i^s -kódolt mutáns represszormolekulák előbb-utóbb akkori is bezárják az összes *lac* operont (14.7. ábra). Nyilvánvaló, hogy az i^s mutáció domináns. Valójában az i^s mutáció a *funkciónyerés* típusú mutációk jellegzetes példája: a domináns

mutáns fenotípus alapja nem valamilyen funkció hiánya, hanem a mutáns fehérje megváltozott működése, új funkciója. Az i^s mutáció egyben példa a *domináns negatív mutációkra*: a mutáns allél génterméke vetélkedik az ép allél termékével, és akadályozza annak funkcióját. A mutáns géntermék hatását ilyenkor sok ép géntermékkel lehet



14.7. ábra. Mivel az i^s mutáns allél (★) által kódolt represszorhoz (✋) nem tud laktóz (induktor) kötődni, a mutáns géntermék örökre „bezárja” a *lac* operonokat. A jelek jelentését a 14.4. ábra szövege összegzi.

Katabolit-represszió

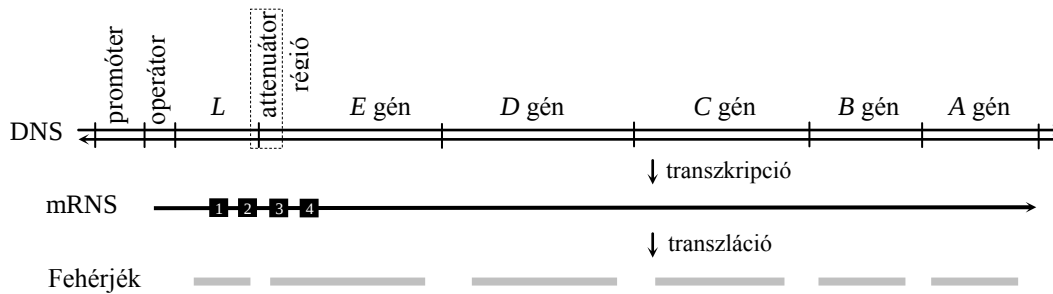
A baktériumsejtek nem csupán arra képesek, hogy valamilyen szénforrás (katabolit) jelenlétében a szénforrás hasznosításához szükséges enzimeket szintetizálják, hanem képesek „válogatni” a szénforrások között. Érthetően azt választják, amelynek energiataralma gyorsan és „olcsón” hozzáférhető.

Ha például az *E. coli* sejtek glükóz és laktóz között választhatnak, először a glükózt „fogyasztják el”, és csak azután „fanyalodnak” a laktózra, miután a glükóz már elfogyott. A szénforrások közül való választás képessége az úgynevezett *katabolit-represszió* mechanizmusának köszönhető.

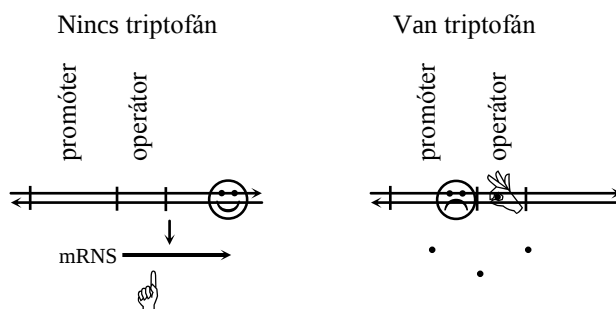
A *lac* operon promóter-régiójában nem csak olyan hely van, ahová az RNS polimeráz kötődik, hanem egy másik, úgynevezett CAP hely is. A CAP helyre a katabolit aktivátor protein (CAP) kapcsolódik (14.8. ábra), azonban csak azután képes erre, ha előzőleg ciklikus AMP-t (cAMP)-t kötött. A cAMP a nagy biológiai hatású szabályozó molekulák egyike, az adenilát-cikláz enzim állítja elő ATP-ből (14.9. ábra).

Az RNS polimeráz csak akkor tud hatékonyan a TATA-boxhoz kapcsolódni és elkezdni a *lac* operon géneinek transzkripcióját, ha a CAP helyre a cAMP-CAP komplex bekötődött (14.8. ábra). Minthogy a glükóz gátolja az adenilát-cikláz enzim aktivitását, glükóz jelenlétében nem képződik cAMP. Ha nincs

az után képes az operátorhoz kapcsolódni, miután előbb triptofánt kötött. Ha a triptofán-represszor komplex az operátorhoz kötődik, meg tudja akadályozni, hogy az RNS polimeráz átírja a triptofán operon génjeit, végeredményben tehát represszálja a triptofán operont (14.12. ábra). A represszorral együttműködő, a triptofán operon repressziójában résztvevő triptofán *ko-represszornak* tekinthető.



14.11. ábra. A triptofán operon sematikus ábrázolása. Az operon alapján egy olyan policisztronos mRNS képződik, amely ötféle fehérje (A-E) képződését kódolja. Valamennyinek a triptofán bioszintézisében van szerepe. Az L (leader) szekvencia által kódolt, az mRNS-en vastagon jelölt négy szakasz szerepe a szabályozásban (attenuáció) a 14.13 ábrán látható részletesebben.



14.12. ábra. A triptofán operon ki-, illetve bekapcsolásának mechanizmusa. Ha nincs triptofán a baktériumok környezetében, a triptofán operon nyitva van, mert a szabályozó represszor fehérje (•) nem tud az operátorhoz kapcsolódni. Az RNS polimeráz ekkor átírja az operont (☉), mRNS és róla olyan fehérjék képződnek, amelyek segítségével a baktérium triptofánt készíthet. Triptofán (•) jelenlétében viszont úgy változik meg a represszor szerkezete (☹), hogy kötődni tud az operátorhoz, és bezárja az operont (☉).

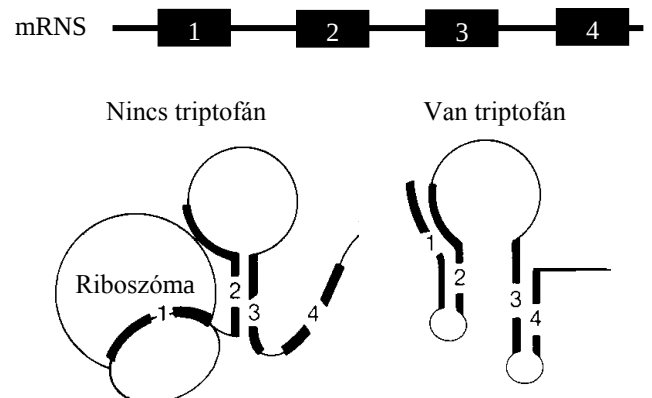
Ha tehát nincs a tápközegben triptofán, a triptofán operon génjei expresszáldhatnak: képződnek a triptofán szintéziséhez szükséges enzimek, a baktérium saját maga készíti el a létéhez szükséges triptofánt. Ellenben, ha a tápközegben sok triptofán van, a sejtbe bejutó triptofán kapcsolódik a represszor fehérjével. A triptofán-represszor komplex az operátorhoz kötődve represszálja (kikapcsolja) a triptofán operont, amelynek funkciójára pillanatnyilag nincs szükség: a

baktérium a környezetéből szerzi be az „olcsó” triptofánt.

Attenuáció és az attenuátor

A represszálnak operonoknak része az *attenuátor* régió, az a DNS szakasz, amely segítségével a

baktérium a represszor fehérje által generált egyszerű igen/nem válasz mellett finoman tudja hangolni az operon funkcióját. Az attenuátor nem a promóterhez tartozik, hanem az operonnak azon a részén van, amely a transzkripció során már átíródik (14.13. ábra).



14.13. ábra. Az attenuáció mechanizmusa, részletes magyarázat a szövegben.

A triptofán operonról átíródó policisztronos mRNS első szakaszán, az attenuátornak megfelelő részen 4 rövid szekvencia található, amelyek közül a szomszédosak (az 1. és 2., a 2. és 3. illetve a 3. és a 4.) komplementerek és képesek egymással részlegesen hibridizálni, hajtű-formát képezni. A 3. és 4. szekvencia párosodása terminációs jelként szolgál az RNS polimeráz számára, és a transzkripció befejeződik, mielőtt az RNS polimeráz átírhatná a triptofán operon génjeit.

Az attenuáció mechanizmusának megértéséhez emlékezzünk arra, hogy prokariótákban az mRNS molekulák transzlációja már akkor elkezdődik, amikor az mRNS-nek még csak az 5' végi része íródott át. Az

mRNS elejét már olvassák le a riboszómák, és aminosavakat építenek be a képződő fehérjébe. Az attenuátor 1. jelű szakaszán két egymás utáni triptofán-kodon van. Ha a baktérium citoplazmájában valóban csak igen kevés triptofán van (és így nyilván a tápközegben sincs), amit beépíthetne a képződő fehérjébe, a riboszóma „megakad”, és csak lassan tud továbbjutni az mRNS 1. szakaszán – csak akkor, ha egymás után két triptofánt szállító tRNS is be tudott kötni a riboszómára. Ebben az esetben az mRNS 3. jelű szakaszának van ideje arra, hogy a riboszóma által még el nem foglalt 2.-sel párosodjon. Ily módon azonban nem jöhet létre a transzkripció terminátorként működő 3.-4. hajtú-szerkezet. Ezért a még közelben „dolgozó” RNS polimeráz folytathatja az operon átírását. Így teljes mRNS, és róla olyan fehérjék képződhetnek, amelyek triptofánt szintetizálnak - a baktérium élheti életét és szaporodhat.

Ha a tápközegben és ezáltal a citoplazmában is több triptofán van (de azért nem olyan sok, hogy a represszor végleg leállítsa az operon működését!), a riboszómák gyorsan áthaladhatnak az mRNS 1. részén. Így gyorsan eléri a 2. szakaszt is, átjutnak rajta, és nincs idő arra, hogy az mRNS-en a 2.-3. hajtú létrejöjjön. Ebben az esetben az mRNS 3. jelű szakasza a frissen átíródott 4.-sel párosodik (14.13. ábra). Most létrejön a 3.-4.-es RNS-hurok, amelynek jelenlétében az RNS polimeráz leválik a DNS-ről, még az enzimeket kódoló szakasz átírása előtt befejeződik a transzkripció. Így az mRNS-ről csak egy rövid peptid képződött (a DNS L, leader szekvenciájának megfelelő első aminosavak). Ha nincs teljes hosszúságú mRNS, nem képződnek a triptofán szintéziséhez szükséges enzimek sem, a baktérium nem pocsékolja feleslegesen energiáját a triptofán szintézisére, hiszen a citoplazmájából kész triptofánt vehet fel.

ÖSSZEFOGLALÁS

A baktériumok génjei a körülményeknek és az igényeknek megfelelően expresszálnak: képződnek a bennük kódolt genetikai információ alapján funkcionális fehérjék, vagy éppenséggel „zárva” maradnak. Az operonok és a policisztronos mRNS-ek a genetikai információ kibontakozásának hatékony megoldásai, eszközei. A gének expresszióját olyan jellegzetes DNS-szakaszok szabályozzák, amelyekhez speciális fehérjék kapcsolódhatnak. Ebben a fejezetben példát láttunk mind pozitív, mind negatív szabályozási típusokra.

Láthatjuk: már a „primitív” baktériumok is rendelkeznek azzal az eszköztárral (szabályozási elemekkel), amelyekkel hatékonyan hasznosíthatják környezetük forrásait. A bakteriális génexpresszió szabályozásának ismerete segít az összehasonlíthatatlanul bonyolultabb eukarióta szabályozás alapelveinek megértésében - azon túl, hogy alapvetően fontos mind az ember által munkába fogott baktériumok, mind a patogén fajok működésének felderítéséhez.

15. A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA EUKARIÓTÁKBAN.

A differenciális génexpresszió. Sejtdifferenciáció és a sejtek DNS-tartalma. Az eukarióta gének expresszióját szabályozó DNS-szakaszok. Transzkripciósfaktorok. DNS-kötő fehérjemotívumok. Riporter gének. A génexpresszió szabályozásának szintjei. Kromatin és génexpresszió. Mikro-RNS-ek és RNS-interferencia.

A fejezetet szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika

BEVEZETÉS

A prokarióta élőlények életében a génexpresszió szabályozásának célja elsősorban az, hogy a baktérium a leghatékonyabban alkalmazkodjon környezetéhez. Mivel a soksejtű eukarióta élőlények sejtjei viszonylag állandó környezetben élnek életüket, bennük a génexpresszió szabályozásának elsődleges célja nem a környezethez való alkalmazkodás, hanem a sejtdifferenciáció kiteljesedése az egyedfejlődés folyamán, és a kifejlett élőlény sejtfunkcióinak összehangolása. Milyen mechanizmusok biztosítják a soksejtű élőlényekben, hogy a gének a megfelelő sejtekben, a megfelelő időben és mértékben fejeződjenek ki (azaz expresszálódnak)? Melyek azok a DNS-szakaszok, amelyek a gének kifejeződésében szerepet játszanak? Milyen fehérjék és hogyan szabályozzák a gének expresszióját? Milyen szintjei vannak a génexpresszió szabályozásának? A jelen fejezet célja a fenti kérdések megválaszolása.

A differenciális génexpresszió

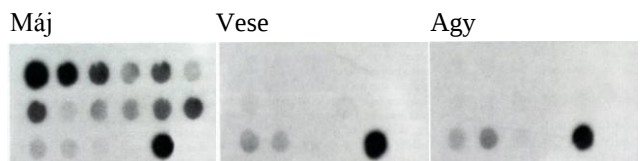
A soksejtű eukarióta élőlények testét kétféle sejt alkotja: (i) az ivarsejt-vonal sejtjei, amelyekből a kifejlett élőlény ivarsejtjei származnak, valamint (ii) a testi sejtek, amelyekből a legtöbb élőlényben nem származnak utódok (a kivételek zömét az ivartalan szaporodás különféle típusai jelentik). Vajon a testi sejtek mindegyikében minden gén expresszálódik? A kérdés például a következő kísérlet alapján eldönthető.

Egy adott sejttypusból (pl. máj) származó különböző cDNS-eket rögzítenek egy nitrocellulóz filterhez (15.1. ábra). Miután a cDNS-eket mRNS-ek alapján lehet reverz transzkriptáz enzim segítségével szintetizálni, mRNS-ek pedig csak akkor keletkeznek, ha egy gén kifejeződik, egy adott cDNS jelenléte az jelenti, hogy a neki megfelelő gén kifejeződik a vizsgált sejtfeleségben. Ugyanakkor csak az RNS-ekbe beépülő ^{32}P -UTP-t adnak máj-, valamint vese-, és idegsejtekhez - ha egy gén átíródik ezekben a sejtekben, a róla képződő mRNS-ekbe is ^{32}P -UTP épül be. Össz-mRNS mintákat izolálnak ezekből a máj-, vese- és agysejtekből, hibridizálják a ^{32}P -UTP-vel megjelölt mRNS-ek-et a nitrocellulóz filterhez kötött, májsejtekből származó cDNS-ekhez. Az autoradiográfia módszerével el lehet dönteni, hogy képződött-e az adott sejttypusban olyan mRNS, ami a

májsejtekben is jelen van. Ha expresszálódott a gén, képződött ^{32}P -jelzett mRNS, amely hibridizál a májból származó cDNS komplementer szálával, és az autoradiogramon sötét folt képződik (15.1. ábra).

Nyilvánvaló, hogy ha nincs jel az autoradiogramon, nincs olyan ^{32}P -el megjelölt mRNS, ami a cDNS-el hibridizálhatna, vagyis az adott szövetben nem expresszálódik az a gén, amelyet a májból származó cDNS reprezentál. Ugyanakkor a 15.1. ábrán láthatjuk, hogy (i) van olyan gén, amely alapján a máj-, a vese- és idegsejtekben is képződik mRNS. Ebben az esetben a 3. sor 1., 2. és 5. helyén levő cDNS-ek aktin, tubulin, és riboszomális fehérje géneknek felelnek meg, amelyek az ún. *háztartási* gének jellegzetes példái. A háztartási gének termékére minden sejtnek szüksége van. (ii) Vannak olyan gének, amelyek csak az egyik sejttypusban expresszálódnak (itt: csak a májsejtekben), más sejttypusokban nem. A jelenség neve *differenciális génexpresszió*. (iii) Egy sejttypuson belül is a különféle gének expressziójának mértéke erősen változó – lásd a 15.1. ábra első képét. Kell tehát, hogy legyenek olyan mechanizmusok, amelyek szabályozzák, hogy egyrészt mely sejttypusban mely gének expresszálódnak, másrészt szabályozni tudják a gének expressziójának mértékét is.

Az mRNS-ek forrása



15.1. ábra. A differenciális génexpresszió bemutatása. A képen olyan nitrocellulóz filterekről készült autoradiogramok vannak, amelyekhez májsejtekből izolált különböző mRNS-ek alapján készült cDNS-eket kötöttek foltokban. A szűrőpapírokhoz ^{32}P -vel jelzett máj-, vese-, valamint idegsejtekből izolált mRNS-eket hibridizáltak. Látható, hogy kis számban ugyan, de vese- és agymintában is találhatóak olyan mRNS-ek, amelyek a májsejtekben is jelen vannak – ezek lehetnek például a minden sejtben működő háztartási gének termékei.

A sejtek DNS-tartalma a differenciáció folyamán

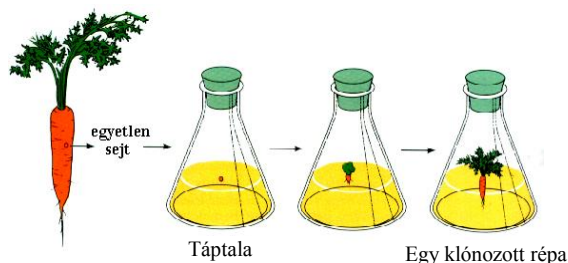
Lehetséges ugyanakkor olyan magyarázat is, amely szerint azért nem expresszálódik valamely gén valamely sejttypusban, mert a sejt nem tartalmazza az illető gént. Elképzelhető, hogy az egyedfejlődés során, miközben egy testi sejttypus valamely speciális feladat elvégzésére differenciálódik, elveszti azokat a géneket, amelyekre nem lesz szüksége hátralevő élete során. A feltételezés nem alaptalan. Vannak olyan fereg- és rovarfajok, amelyek testi sejtjeinek differenciálódása során kromoszómák vagy kromoszóma-részek vesznek el. (A jelenség neve a kromoszóma-diminúció, mechanizmusa pedig a következő: kromoszómák vagy kromoszóma részek erősen kondenzálódnak (úgy, mint a heterokromatin), majd a sejtosztódások során elvesznek a sejtekből.)

Itt említjük meg a kromoszóma(rész) eliminációjával ellentétes folyamatot, a *génamplifikációt*, amely folyamat során a DNS olykor meglehetősen nagy szakaszai replikálódnak (és néha a kromoszómából kivágódva független életet élnek). A DNS-kópiák tovább replikálódnak, miáltal néhány (vagy csak egyetlen) gén kópiaszáma megsokszorozódik. Ismert példa a selyemhernyó nyálmirigy-sejtjeiben, a gubó képződése során az úgynevezett selyem-gének amplifikációja, valamint az multidrog-rezisztencia gén amplifikációja a daganatsejtek bizonyos típusaiban (a multidrog-rezisztenciáért felelős fehérje egy pumpa: a sejthártyába épül, és miután eltávolítja a sejtekből a káros anyagokat, lecsökkenti a kemoterápia hatékonyságát).

Vajon a magasabbrendű élőlények differenciálódott sejtjei tartalmaznak minden gént? A kérdésre a következő két kísérlet is adhat választ.

1. A sárgarépa-klónozás tanulsága

Egy kísérletsorozatban sárgarépa gyökeréből származó sejteket különítettek el és tették egyenként steril táptalajra (15.2. ábra). A répansejt osztódni kezdett, az utódsejtek úgynevezett kalluszt képeztek. Megfelelő hormontartalmú táptalajra téve a kalluszból répa keletkezett. Az a tény, hogy egyetlen, már differenciálódott sejtből növényt lehetett regenerálni, azt jelenti, hogy a kiindulási sejt tartalmazta mindazt a genetikai információt, amely a sejtek osztódáshoz, és a differenciálódásához szükséges, vagyis a répagyökér-sejtől nem vett el gén.



15.2. ábra. A sárgarépa klónozása. A répa terminálisan differenciálódott testi sejtjeinek mindegyikéből egy-egy répa regenerálható, jelezve, hogy a differenciálódott testi sejtek DNS-tartalma nem változott a sárgarépa élete során.

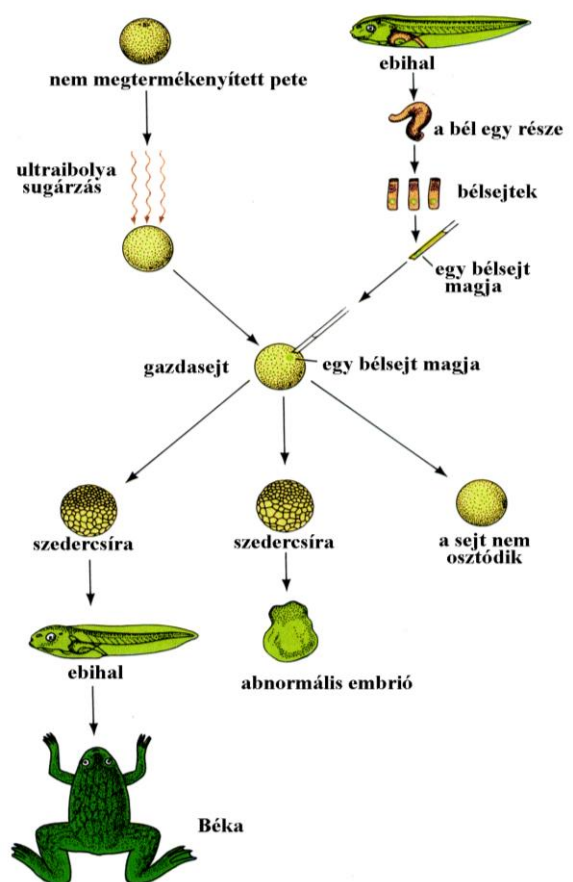
Az a technika, amellyel egy növény testi sejtjeiből nagyon sok utódnövényt lehet előállítani, példa a klónozás egyik típusára, és mindennapos eljárás a növény-nemesítésben. (Klón: egyetlen sejt vagy élőlény ivartalan szaporodással/szaporítással létrejött, azonos genotípusú leszármazottai.)

2. A béka-klónozás tanulsága

Vajon az előző kísérlet működik az állatvilágban is? Igen, amint azt először J. Gurdon az 1960-as évek közepén megmutatta. Gurdon az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) ebihal bélhámsejtjeiből, a terminálisan differenciálódott sejtek egyik típusából izolált sejtmagokat (15.3. ábra). A sejtmagokat

egyenként olyan meg nem termékenyített petesejtbe ültette, amelyek sejtmagját előzőleg vagy eltávolította, vagy ultraibolya sugárzással tönkretette. A testi sejtek magját tartalmazó peték némelyikéből olyan békák fejlődtek, amelyek utódai ma is élnek (15.3. ábra). Gurdon 2012-ben Nobel-díjat kapott munkásságáért.

A Gurdon-kísérlet elegánsan bizonyítja, hogy a béka bélhámsejtek örökítőanyagának anyaga sem csökken a sejt-differenciáció során - és azt is, hogy akár egy terminálisan differenciálódott sejt génexpressziós mintázata is áthangolható. Ezzel a módszerrel „készítették” többek között a világhírű Dolly birkát is 1996-ban.



15.3. ábra. A béka klónozása. Béka fejlődhet abból a „zigótából”, amelyet úgy hoztak létre, hogy a sejtmagtól megfosztott petesejtbe ebihal bélhámsejtjének magját ültették.

A génexpressziót szabályozó DNS-szakaszok típusai

Nyilvánvaló, hogy a génexpresszió szabályozásához szükség van (i) olyan DNS-szakaszokra, amelyek befolyással vannak a gének kifejeződésére és (ii) olyan fehérjemolekulákra is, amelyek szabályozzák a gének transzkripcióját. A génexpressziót szabályozó DNS-szakaszoknak eukariótákban három fő típusa van.

(1) Promóter

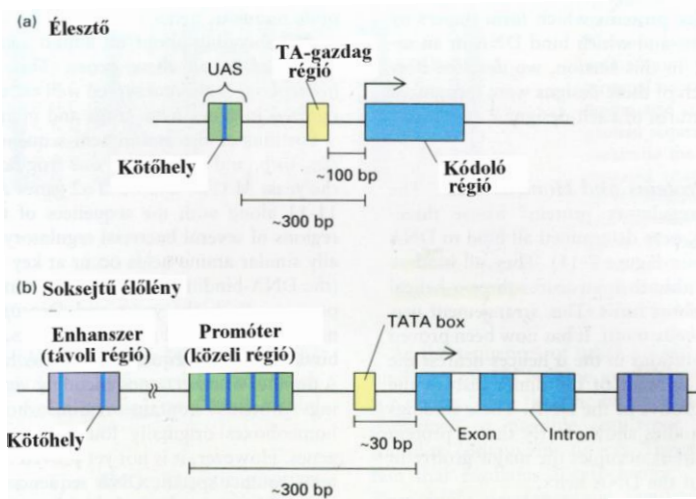
Amint azt a 9. fejezet áttekinti, a gén átíródo részének 5' vége közelében van a promóter, az a DNS-

szakasz, amelyhez - egyebek mellett - az RNS polimeráz enzim kapcsolódik. Az RNS polimeráz végzi a transzkripciót, a génexpresszió első lépését. Eukariótákban, hasonlóan a prokariótákhoz, a promóter része az A=T bázispárokban gazdag TATA- (Hogness-) box, az evolúció folyamán erősen konzerválódott szekvenciák egyike (15.4. ábra).

5'																									
----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

15.4. ábra. A TATA-box 60 eukarióta gén promótere alapján.

A TATA-box a gén 5' vége közelében levő kb. 300 bp-nyi DNS-szakasz része (15.5. ábra). A promóterben olyan további DNS-szakaszok vannak, amelyekhez a transzkripciót szabályozó fehérjemolekulák, ún. *transzkripciós faktorok* kapcsolódhatnak. Minthogy ezek a szekvenciák a gén 5' vége közelében, "felfelé" vannak, élesztőkben UAS-nek (Upstream Activating Sequences) nevezik őket. A soksejtű eukarióta promóterekben sok esetben nagyon nagyszámú olyan DNS-szakasz van, amelyekhez különféle transzkripciós faktorok kapcsolódhatnak. A kötődő transzkripciós faktorok típusa, száma, kombinációja, a kapcsolódás helye és erőssége határozza meg, hogy mely sejttypusban és milyen mértékben expresszálódik az általuk szabályozott gén.



15.5. ábra. A génexpressziót szabályozó DNS-szakaszok szerveződése egysejtű (élesztő) és soksejtű eukarióta élőlényekben.

(2) Enhanszer

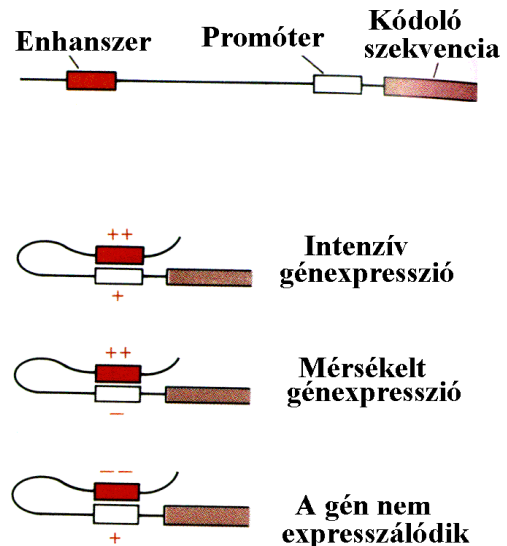
Az enhanszerek olyan DNS szakaszok, amelyekhez (i) transzkripciós faktorok kapcsolódhatnak, szabályozva gének expresszióját, (ii) amelyek a szabályozott gén(ek)től akár nagyon messze is lehetnek (akár 100

kb-nyira), és (iii) a gén strukturális részéhez viszonyítva 5' és 3' irányban, sőt, az intronokban is lehetnek.

(3) Szilenszer

A szilenszerek olyan DNS-szakaszok, amelyek csökkentik egy gén kifejeződésének mértékét. A szilenszerek is lehetnek az 5' vagy 3' irányban, vagy akár az intronokban is.

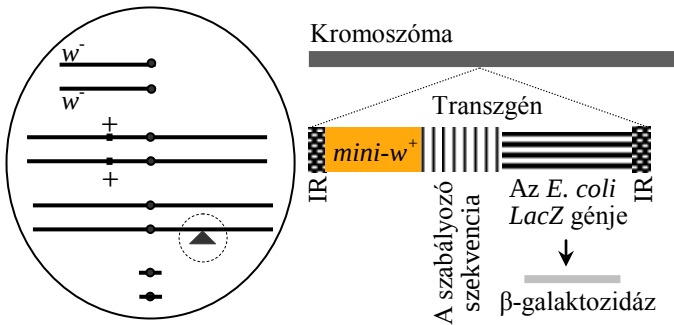
Hogyan szabályozhatják a génexpressziót az enhanszerek és a szilenszerek? Ne feledjük, hogy a gén a strukturált kromatin része, vagyis például egy gén promótere és egy adott enhanszer a DNS-szekvenciában távol, de térben egymás közelében is lehet. Vannak olyan fehérjék is, amelyeknek feladata éppen az, hogy egymás közelébe hozzák az enhanszert és a promótert. Tehát a génexpresszió szempontjából nagyon fontos, hogy milyen fehérjék kapcsolódnak a génexpressziót szabályozó DNS szakaszokhoz, és fontos a DNS-fehérje komplex térbeli szerkezete is (15.6. ábra). Például egyetlen foszfátcsoport jelenléte a DNS-hez kapcsolódott fehérjén már drámai módon megváltoztathatja a génexpresszió jellegét és mértékét.



15.6. ábra. Egy példa: a promóter és az enhanszer, illetve a hozzájuk kapcsolódó (+) illetve nem kapcsolódó (-) fehérjék kombinációinak hatása a szabályozott gén expressziójára és az expresszió mértékére.

A riportergének és a transzgénikus élőlények szerepe a génexpresszió tanulmányozásában

A génexpresszió megfelelő szabályozása olyan mechanizmusokat feltételez, amelyek funkcióképes fehérjék képződését jelentik (i) az egyedfejlődés megfelelő szakaszában, (ii) a megfelelő sejtekben és (iii) a megfelelő mértékben. Hogyan lehetne azonosítani azokat a DNS szakaszokat, amelyek egy adott gén kifejeződését szabályozzák? Hogyan lehetne kideríteni az egyes szakaszok szerepét a gén kifejeződésében? A *riportergének* elegáns megoldást adnak a fenti kérdések megválaszolására (15.7. ábra).



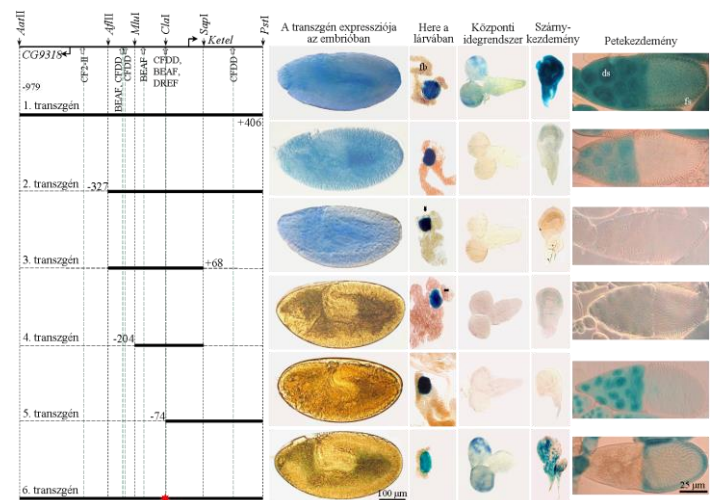
15.7. ábra. Egy *Drosophila*-ban alkalmazott riporter-konstrukció szerkezete. Egy transzpozon kétoldali fordítva ismétlődő szekvenciái (IR) a következő DNS-szakaszokat fogják közre: (i) azt, amely a riporter gén expresszióját szabályozza. (Ugyanez a szekvencia szabályozza a $+$ -szal jelölt tanulmányozni kívánt gént) expresszióját! (ii) a riporter gént (itt az *E. coli lacZ* génjét), valamint (iii) egy úgynevezett markergént (a markergén itt *mini-w*⁺, ami a *w*⁻/*w*⁻ – fehér szemű – háttérén narancssárga szemszín eredményez). A fenti elemeket hordozó DNS-szerkezet a kromoszómák egyikébe inszertálódott (▲). A kromoszómák annak a génnek a két ép kópiáját (+) is hordozzák, amelynek az expresszióját szabályozó elemeket és szerepüket kívánjuk megismerni.

Vegyük azt a DNS-szakaszt, amely tartalmazza azokat a szekvenciákat, amelyek a vizsgált gén kifejeződését szabályozzák (15.7. ábra). Készítsünk egy olyan *rekombináns konstrukciót*, amely különböző eredetű DNS-darabokból áll: ligáljuk a vizsgálandó szabályozó DNS-szakaszt például az *E. coli lac* operonjának *lacZ* génjével (a *lacZ* gén a β -galaktózidáz enzimet kódolja). A konstrukcióban a *lacZ* gén expresszióját tehát a mesterségesen hozzá kapcsolt szakaszok szabályozzák. Ennek megfelelően a *lacZ* gén expressziója (azaz a β -galaktózidáz enzim képződése) pontosan úgy alakul, amint a tanulmányozandó gén expressziója: a *lacZ* gén, mint egy riporter, tudósít a vizsgálandó (+) gén expressziójáról. Érthető, hogy a *lacZ* gént *riporter génnek* nevezik. A β -galaktózidáz aktivitásának kimutatásához egy olyan szintelen X-gal nevű (β -galaktózid típusú laktóz-analóg) vegyületet használnak, amelyből a β -galaktózidáz enzim hatására kékszínű vegyület képződik (15.8. ábra). Néhány más riporter gén is “forgalomban van”, mint például a *luciferáz* enzim, amelynek működése miatt világítanak a szentjánosbogarak, a CAT (kloramfenikol-acetil-transzferáz) vagy a ma már leggyakrabban alkalmazott riporter, egy medúzafaj *zölden fluoreszkáló proteinje*, a GFP, illetve sokféle színben világító „rokonai” (YFP, CFP, RFP..).

A riporter gén kifejeződésének időtartama függ a sejten belüli sorsától. (i) A riporter gént is tartalmazó konstrukciót például plazmidban eukarióta sejtekbe juttatják (transzfektálják), és úgynevezett tranzien্স génexpresszió során követik a riporter gén expresszióját. A sejtekbe juttatott DNS-szakaszok egy ideig jelen vannak, és működnek a *transzformált* sejtekben, majd degradálódnak. (ii) A rekombináns

konstrukciót beleültetik a genomba. Erre alkalmasak például a transzpozonok: a mesterséges DNS „széleire” egy transzpozon fordítva ismétlődő szekvenciáit ligálják, és vektorban ivarsejt-vonal sejtekbe juttatják. Természetesen transzpozáz enzim jelenlétében, hogy a “szerkezet” eredeti helyéről kivágódhasson és a kromoszomális DNS-be inszertálódhasson. Így olyan transzformánsok képződnek, amelyek stabilak, és genomjuk átadásával utódokra is öröklítik a *transzgént*. Az ivarsejt-transzformáció során létrejövő élőlények *transzgénikusak*: saját DNS-ük mellett idegen fajból származó (vagy akár mesterségesen előállított) DNS-t is hordoznak. A megfelelően megtervezett transzgén nem befolyásolja a sejtek normális funkcióját.

A szabályozó elemeket tartalmazó DNS-szakaszok egyes részeit, különböző kombinációit a riporter génnel kombinálva specifikus génexpressziót szabályozó szakaszokat lehet azonosítani, és szerepüket vizsgálni a génműködés szabályozásában (15.8. ábra).



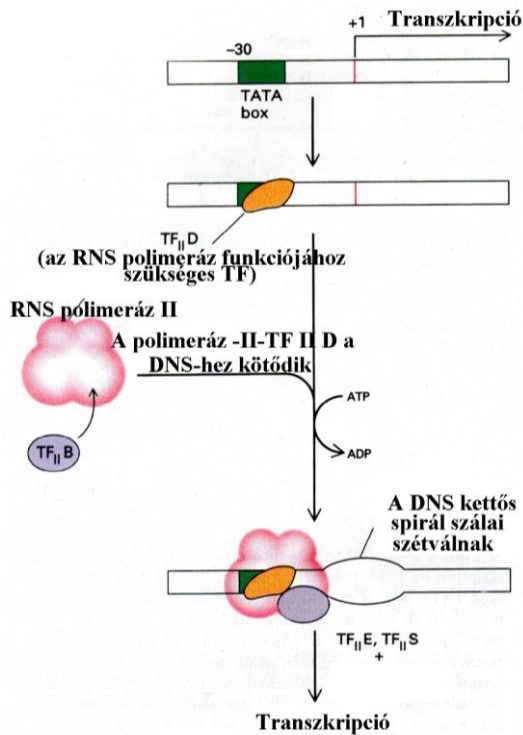
15.8. ábra. Riporter gén felhasználása annak vizsgálatára, hogy milyen DNS-szakaszok biztosítják a *Drosophila Ketel* génjének expresszióját a különféle sejt típusokban. A transzgénekhez tartozó vastagított szakaszok azt mutatják, hogy a promóter mely szakaszai voltak a *lacZ* génnel kombinálva. A kéken festődő szövetekben a β -galaktózidáz riporter gén expresszálódik. A * jel egy olyan *in vitro* indukált mutáció helyét mutatja, amely megszüntette egy transzkripciós faktor kötőhelyét. (Részletesen lásd: Villányi et al. Mech. Dev. 125, 822–831, 2006, 2008.)

A DNS-kötő fehérjék jellemzői

A génexpresszió szabályozásának további fontos tényezői a fehérjék. Közülük a transzkripciót „végző” RNS polimerázok szerepe kézenfekvő, de az eukarióta gének transzkripciójához nem elegendőek az RNS polimerázok. A transzkripció iniciációjához szükség van arra, hogy a promóter megfelelő szakaszához *transzkripciós faktorok* (TF-ek) kötődjenek (15.9. ábra).

Az *általános transzkripciós faktorok* olyan fehérjék, amelyek közvetlen szerepet játszanak a transzkripció

szabályozásában. Például a TFIID a TATA-boxhoz kapcsolódik, és kötődése úgy változtatja meg a fehérje és a DNS térbeli szerkezetét, hogy további TF-ek, valamint az RNS polimeráz II is csatlakozhat a komplexhez, és végül elkezdődhet a transzkripció. TF-ek azonban nemcsak a promóterhez, hanem az enhanszerekhez és a szilenszerekhez is kapcsolódhatnak. A minden sejtben jelen lévő általános TF-eken kívül a *specifikus TF-ek* csak bizonyos típusú sejtekben, az egyedfejlődés bizonyos stádiumaiban fejtik ki hatásukat, biztosítva a differenciális génexpressziót.



15.9. ábra. Az eukarióta gének transzkripciójához nem csak az RNS polimerázra, hanem általános (és specifikus) transzkripciós faktorokra is szükség van.

DNS-kötő fehérjemotívumok

Azok a fehérjék, amelyek a DNS-hez kapcsolódhatnak, tartalmaznak olyan funkcionális egységeket (doméneket), amelyek ehhez a kapcsolódáshoz szükségesek. A legfontosabb DNS-kötő motívumok a következők (15.10. ábra):

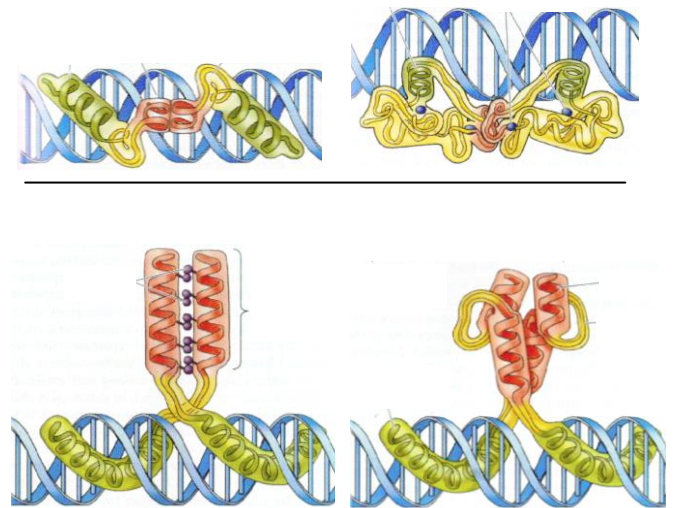
(1) A *hélix-turn-hélix* motívumot tartalmazó fehérjék dimert képezve kapcsolódnak a DNS-hez, úgy, hogy a hélixek egyike a DNS nagy árkába illeszkedik, és felismeri a bázispárok megfelelő szekvenciáit. Hélix-turn-hélix motívumot tartalmaz egyebek között a triptofán-operon expresszióját szabályozó represszor fehérje, vagy a testszélvények kialakulásában fontos szerepet játszó, később bemutatásra kerülő úgynevezett homeodómén.

(2) A *cink-ujj* motívumokban egy Zn^{2+} -ion úgy létesít kapcsolatot négy ciszteinnel, hogy a közbelső aminosavak kétdimenziós ábrázolásokon ujszerű kitérkedést képeznek. Ezek a fehérjerészek szintén a DNS nagy árkába illeszkednek, és a

megfelelő bázispár-sorrendet felismerve a DNS-hez kapcsolják a fehérjét. A Zn-ujjakat tartalmazó fehérjék jellegzetes példái a szteroid hormon receptorok (lásd 16. fejezet).

(3) A *leucin-cipzárok* szintén dimert képeznek, a hidrofób leucin oldalláncok cipzárszerűen illeszkednek egymáshoz, miközben DNS-kötő fehérjemotívum alakul ki (15.10. ábra). Leucin-cipzárt tartalmaz néhány, a sejtosztódásban szerepet játszó transzkripciós faktor (funkcióyeréses mutációjuk sok esetben rákos daganat forrása).

(4) A *hélix-hurok-hélix* (angolul helix-loop-helix) motívum például az immunoglobulinok és bizonyos izomfehérjék szintézisét kódoló gének expresszióját szabályozó fehérjékben található meg.



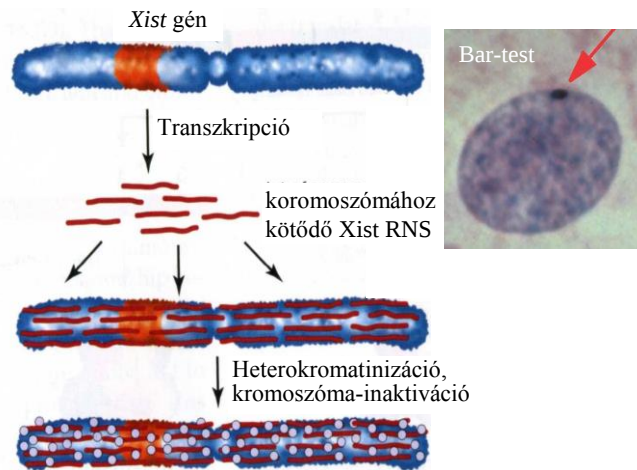
15.10. ábra. A DNS-kötő fehérjemotívumok típusai.

A kromatin és génexpresszió

Az eukarióta génműködés szabályozásában a kromatinnak is óriási szerepe van. Az eukarióta genom nagy (emberben $\sim 3 \times 10^9$ bp). Nem kis feladat a genomként kb. 10-30 ezer gén között a megfelelő megtalálni, be- vagy kikapcsolni. Annál kevésbé, mert a DNS nukleosómákba van tekeredve, a nukleosómák pedig szupertekercseket képeznek. Ismertek olyan kromatin-fehérjék, amelyek "nyitva tartanak" bizonyos kromatin-szakaszokat, mások más kromatin-szakaszokat "örökre bezárnak". Vannak olyan fehérjék, amelyek a kromatinhoz kapcsolódva a transzkripcióra alkalmas, nyitottabb területekre irányítják a transzkripciós faktorokat.

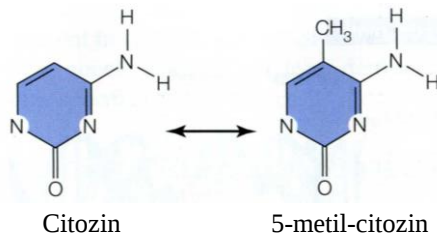
Az X-kromoszóma inaktiváció a génexpresszió szabályozásának olyan típusa, amely nőnemű emlősök sejtjeiben az egyik X-kromoszóma nagy részét, és ezzel együtt persze a benne levő géneket inaktíválja. Az inaktiváció alapja a kromatin erős feltekeredése (Barr-test képződése; 15.11. ábra). „Értelme” pedig az, hogy a nő- (XX) és a hímneműek (XY) sejtjeiben a X kromoszómához kapcsolt gének termékeinek dózisa

azonos legyen a sejtekben. Az X-kromoszóma inaktiváció mechanizmusa a dóziskompensáció egy fajtája.



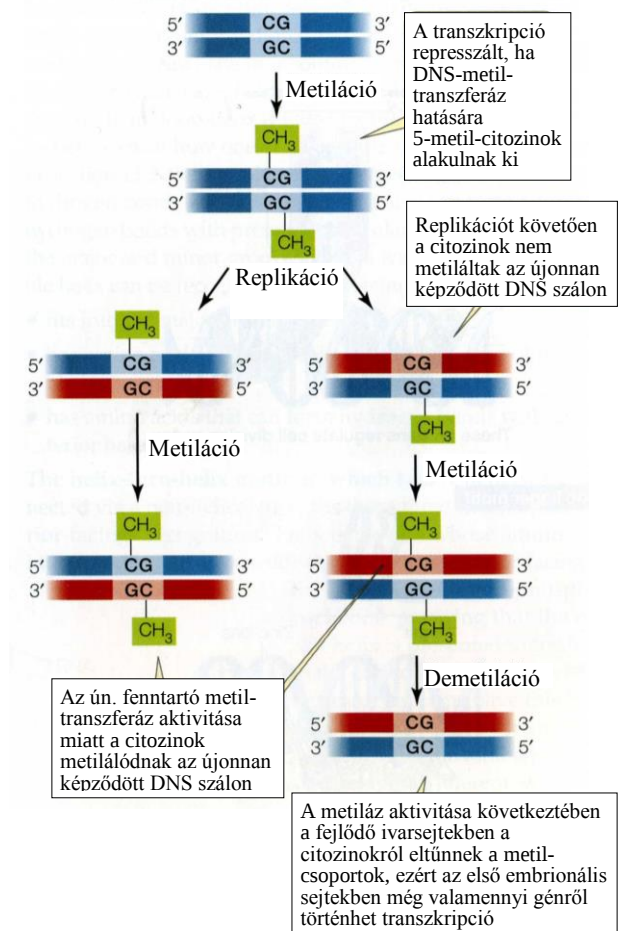
15.11. ábra. Az X-kromoszóma inaktiváció mechanizmusának modellje. Az inaktiváció első lépésében az X-kromoszómához kapcsoltan öröklődő *Xist* gén transzkripciója nyomán úgynevezett interferáló RNS molekulák képződnek. Az interferáló RNS molekulák ahhoz az X kromoszómához kötődnek, amelyen levő *Xist* gén alapján képződtek. A kötődés hatására hiszton metilációk és deacetilációk játszódnak le (lásd később), heterokromatin képződik, miközben az X kromoszóma inaktíválódik. Az ábra jobb oldala egy Barr-testet mutat, amely az egyik heterokromatinizálódott X kromoszóma.

A kromatinszerkezet szabályozására többféle lehetőség is van. Az emlősök promótereiben található, guanin előtt lévő citozinok metilációja (15.12., 15.13. ábra) azt eredményezi, hogy a metilált DNS-hez olyan fehérjék csatlakoznak, amelyek a kromatin tömörítésével megakadályozzák a transzkripciót. A metilált citozinok mintázata a replikáció során is fennmarad, és az utódsejtekbe átöröklhető, de a metiláció meg is szüntethető (15.13. ábra).



15.12. ábra. A citozin metilációja.

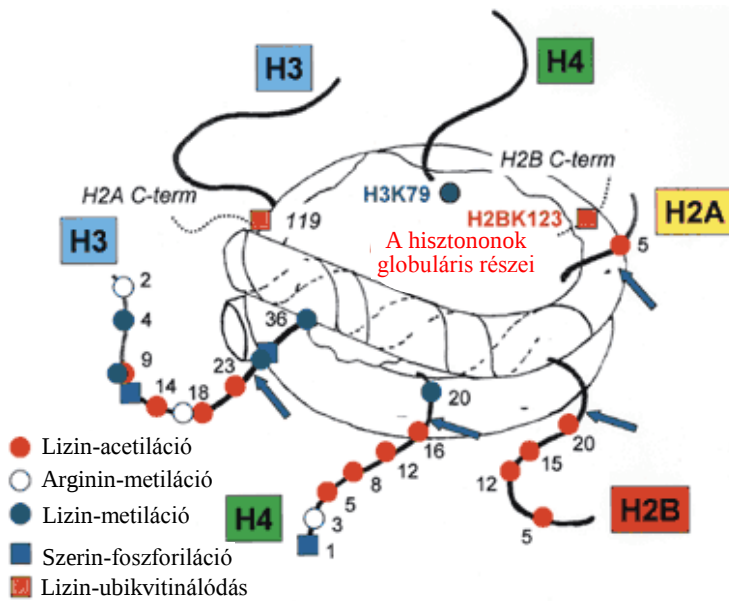
A DNS metilációjának szerepe különösen fontos az egyedfejlődés folyamán. Az érő spermiumban illetve petesejtben szinte valamennyi gén demetilálódik, azaz aktiválható állapotba kerül. A megtermékenyítés után, ahogy az embrió fejlődik, szövetei differenciálódnak, azok a géneik, amelyekre az adott sejt típusban immáron nincs szükség, metilálódnak, inaktíválódnak, „elhalkítódnak” (angolul: silenced). A metiláltság



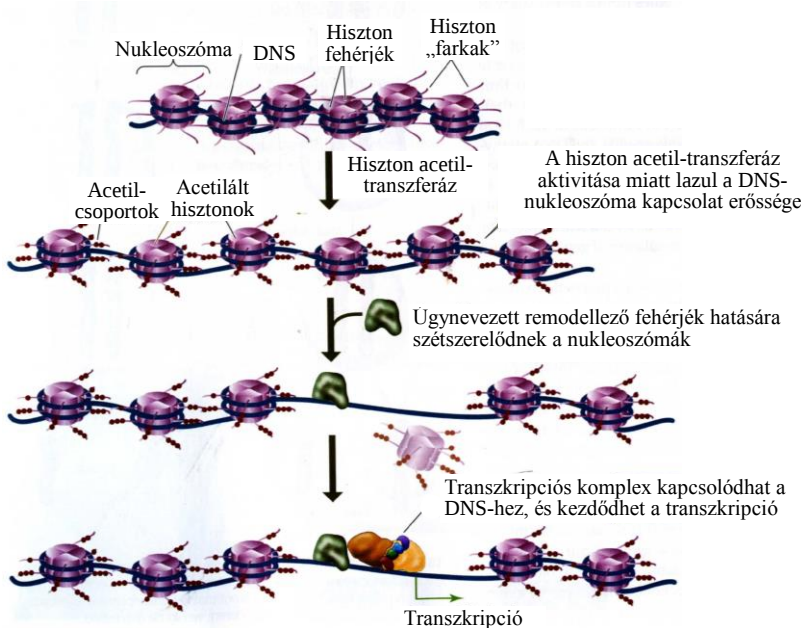
15.13. ábra. A metilált citozin mintázata megőrződik a replikáció során, így öröklődhet az utódsejtbe. Az ivarsejtekben törölődik a mintázat, hogy a megtermékenyítés után az embrióban még minden gén működhesen

normális állapotának megváltozása, amint azt egy későbbi fejezetben látni fogjuk, gyakran vezet rákos daganatok kialakulásához.

Az eukarióták sejtjeiben a DNS nukleoszómákra van feltekerve (lásd a 3.13. ábrát). Ebben az állapotában a DNS-hez nem tud hozzáférni a transzkripció apparátus. Amint azt a 15.14. ábra mutatja, a nukleoszómákat alkotó hisztonfehérjéknek van egy kb. 20 aminosav hosszúságú „farka” az N terminálisuknál, amely kilóg a nukleoszómából. A „farkak” lizinjei, argininjei és szerinjei módosulhatnak. A hiszton acetyl-transzferázok, amelyek acetyl csoportokat kapcsolnak ezen aminosavak némelyikéhez, mintegy kinyitják a kromatint, lehetővé téve a transzkripciót (15.15. ábra). Ezzel szemben a hiszton deacetylázok, amelyek eltávolítják az acetyl-csoportokat, tömörítik a kromatint, megnehezítve a transzkripciót. A hisztonok metilációja szintén ilyen hatást gyakorol, így a gének inaktíválódásához vezet. A szerinek foszforilációja pedig attól függően vezet gének aktiválódásához vagy éppen inaktíválódásához, hogy melyik hiszton melyik szerinjét érinti. A fent említett módosulások reverzibilisek, különféle kombinációkban következhetnek be, és a gének aktivitását rendkívül komplex módon szabályozhatják – a mára elterjedt „hiszton-kód” kifejezés ezt tükrözi.



15.14. ábra. A hisztonok „farkában” levő aminosav-oldalláncok módosításainak leggyakoribb példái.



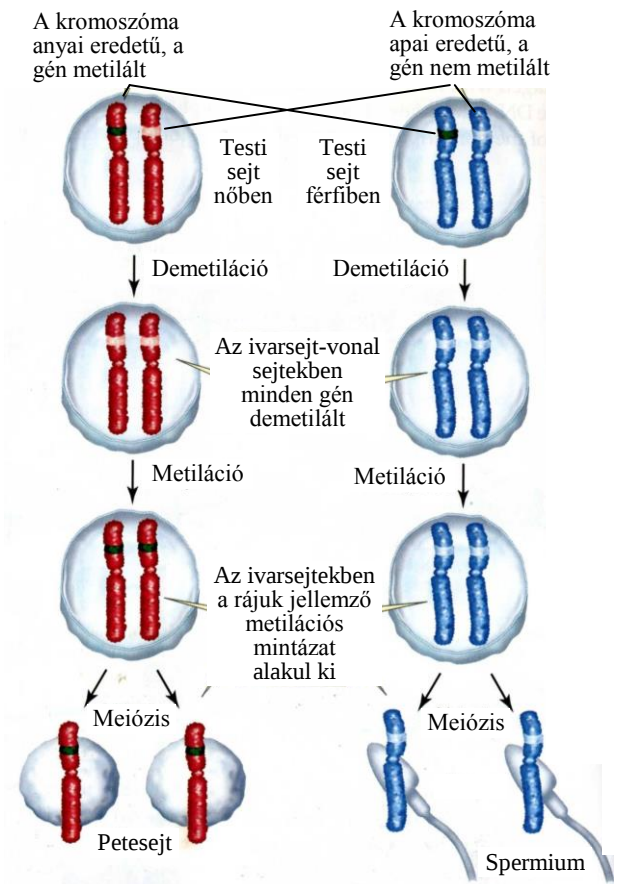
15.15. ábra. A hisztonok acetilációja a kromatin lazítása révén teszi lehetővé a gének expresszióját. A hisztonok deacetilációja a kromatin tömörödésével jár, hatására az expresszió gátlódik.

A DNS egyes citozinjainak metilációja és a hisztonok fent említett módosulásai olyan, a kromoszómák állapotával kapcsolatos jellemzők, melyek anélkül öröklődnek sejtről sejtre, olykor generációról generációra, hogy magának a DNS-nek a genetikai információ-tartalma megváltozna. A fenti jelenséget *epigenetikus öröklődésnek* nevezik.

Emlősökben az ivarsejtek képződése folyamán – bár a legtöbb gén metiláltsága megszűnik, ahogy erről már volt szó – egyes gének esetében a DNS mégis metilálódik, mégpedig a nemekre jellemzően. A

folyamat két lépésben történik. Először az 5-metilcitozinokról a metiláz eltávolítja az összes metilcsoportot, majd közvetlenül a meiózis előtt egy metiltranszferáz néhány génben a megfelelő citozinokat – nemtől függően – metilálja. A DNS metilációs mintázata mintegy 200 génben különbözik a spermiumban és a petesejtben: egy részük csak az anyában (a petesejtben), másik részük csak az apában metilálódik. A megtermékenyítés után a metiláció új mintázata, mint egyfajta epigenetikus információ megőrződik (15.16. ábra). Az ivarsejtekben bekövetkező, nemtől függő metiláció mintegy előre programozza némely gén inaktivitását az utódban. A jelenség neve: *genom-imprintálódás*, bevésődés.

A jelenség következményei nyilvánvalók: ha például egy utód az anyától egy ép, ám metilált (inaktív) gént örököl, az apától pedig annak egy mutáns, funkcióképtelen változatát, kifejeződik benne a mutáns fenotípus, bár heterozigóta a recesszív mutáns allélra...

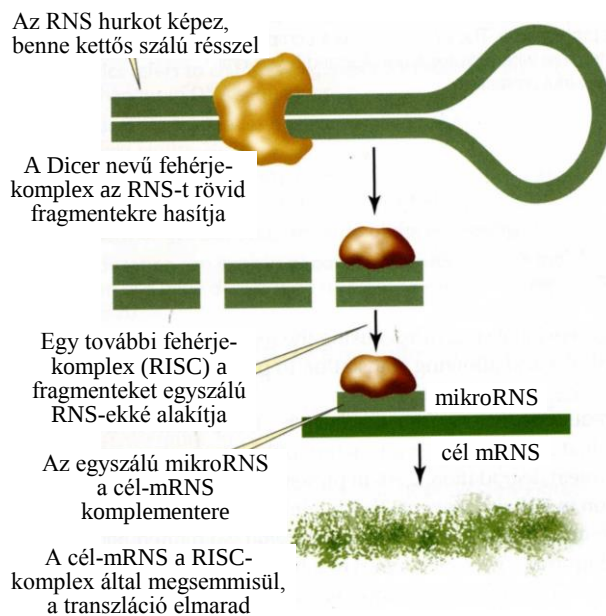


15.16. ábra. Egy csak az anyában imprintálódó gén metilációs mintázatának öröklődése. A genom imprintálódása az epigenetikus öröklődés egyik típusa.

MikroRNS-ek

A gének az eukarióta fajok többségében a genom kis hányadát teszik ki. A nem kódoló részt a legutóbbi időkig feleslegesnek, „hulladéknak” (angolul: junk) vélték a szakemberek. A közelmúltban arra derült fény, hogy az eddig nem kódolónak hitt DNS egyes szakaszairól is íródhatnak át RNS-molekulák. Miután ezek az RNS molekulák rövidek, mikroRNS-eknek

(miRNS) nevezték el őket. A 2000-es évek elején vált nyilvánvalóvá, hogy a miRNS-ek fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének expressziójának szabályozásában, elsősorban csökkentésében, azaz a gének „csendesítésében” (angolul: gene silencing) (15.17. ábra). És miután a miRNS-ek nagyon ősi eukarióta fajokban is jelen vannak, a gének csendesítése miRNS-ekkel a génexpresszió szabályozásának minden bizonnyal ősi, konzervált mechanizmusa. A miRNS-ekkel és legismertebb hatásmechanizmusukkal, az úgynevezett RNS-interferenciával kapcsolatos kutatások elismeréseként Andrew Z. Fire és Craig C. Mello 2006-ban Nobel-díjat kapott.



15.17. ábra. A génfunkció „csendesítése” mikroRNS-ekkel, RNS-interferenciával. Az RNS egy úgynevezett RISC-komplex segítségével (angolul: RNA-induced silencing complex) semmisül meg.

Az első miRNS-t Victor Ambros és munkatársai fedezték fel 1993-ban a *Caenorhabditis elegans* fonalféregben. Először arra derítettek fényt, hogy a *lin-14⁺* gén terméke egy olyan transzkripciósfaktor, amely a féregben az első fejlődési stádium bekövetkeztét teszi lehetővé. Azok a férgek, amelyekben a *lin-14* nevű gén elvesztette funkcióját, a fejlődés első stádiumát kihagyva a második stádiumba lépnek. Ugyanakkor a *lin-4* nevű mutánsokban a sejtek némelyike az első stádium eseményeit ismételte. Kiderült, hogy az ép *lin-4⁺* gén terméke gátolja a *lin-14⁺* gén működését: így teszi lehetővé, hogy a normális fejlődés során a férgek az első stádium után a második stádiumba jussanak. Arra számítottak, hogy a *lin-4⁺* gén terméke egy olyan fehérje, amely a *lin-14⁺* gén funkcióját gátolja. Ehelyett azt találták, hogy a *lin-4⁺* gén terméke nem fehérje, hanem egy olyan, mindössze 22 nukleotidból álló kis (mikro-)RNS amely megsemmisíti a *lin-14⁺*-kódolt mRNS-t, csendesítve a *lin-14* gén funkcióját (15.17. ábra).

Időközben sok száz miRNS-féleséget írtak le. Mindegyik kb. 22 nukleotidból áll, és egyetlen miRNS általában különböző mRNS-ek tucatjait ismeri fel és járul hozzá megsemmisítéséhez. A humán genom többezerféle miRNS-t kódol, amelyeknek célpontjai a géneknek mintegy 60%-át teszik ki.

RNS interferencia (RNSi, angolul RNAi)

Az RNS-interferencia szerepe nagyon fontos a sejtek a vírusokkal szembeni védekezésében és a génexpresszió szabályozásában, különösen az egyedfejlődés során. A kis RNS molekulának két típusa van: az előbb bemutatott miRNS-ek, valamint az úgynevezett kis interferáló RNS-ek (angolul: small interfering RNA, siRNA), amelyek az RNS-interferencia „kívülről történő” indukálásának kulcsfontosságú tényezői. Míg a miRNS-ek a saját genom által kódolt, eredetileg egyszálú RNS alapján képződnek, a siRNS-ek kívülről (vírusok által, vagy mesterségesen) bejutó rövid kettős szálú RNS-ek, és legtöbbször szintén a sejt saját mRNS-eihez kapcsolódva, RNS-interferencia révén fejtik ki hatásukat.

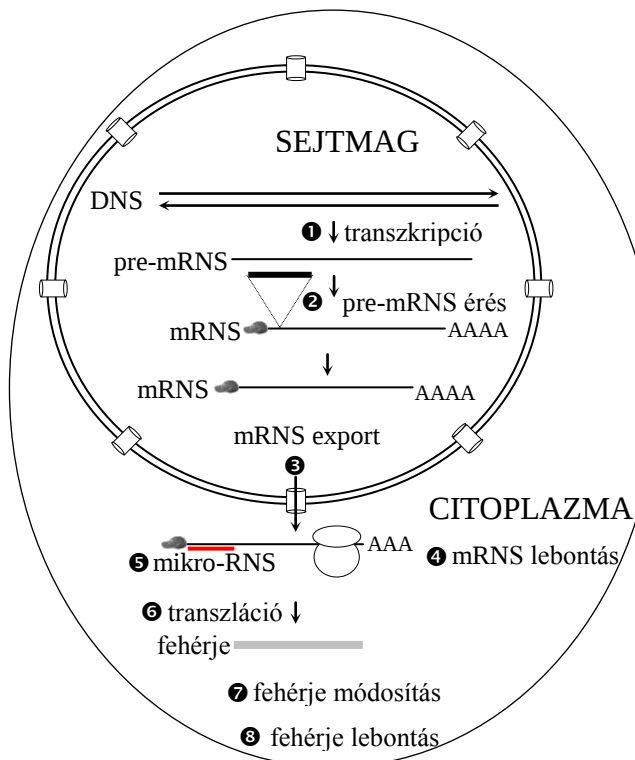
Akár miRNS, akár siRNS váltja ki, a mechanizmus fontos szereplője a Dicer fehérjekomplex, amely a hosszú, kétszálú RNS molekulákat kb. 20-22 nukleotidból álló, szintén kétszálú fragmentekre aprítja (15.17. ábra). A képződő kis kettősszálú RNS molekulákat a RISC (RNA-induced silencing complex) két egyszálúvá tekeri szét. Közülük az egyik degradálódik, a másik pedig a RISC-komplex részévé válik, és hibridizál a citoszolban található azon mRNS-ekkel, amelyek komplementer szakaszt tartalmaznak. A párosodás hatására a RISC-komplex egyik alkotója, az Argonaute fehérje teljes egészében elemeszi a felismert mRNS-t.

Az RNSi annyira hatékony technika, hogy vele egyes kiválasztott gének funkcióját lehet mesterségesen eliminálni, a génfunkció hiányában pedig az ép gén funkciójára következtetni. Az RNSi technikát egyre szélesebb körben igyekszik felhasználni a modern orvostudomány is, olyan esetekben, amikor hibásan túlműködő gének gátlására lenne szükség.

A génexpresszió szabályozásának szintjei

A normális génexpresszió nemcsak funkcióképes fehérjék képződését jelenti, hanem azt is, hogy a sejtekben éppen megfelelő mennyiségű fehérje van a funkció ellátásához (bizonyos fehérjékből sejtenként csak néhány, másokból milliónyi molekula van). A fehérjék számának és aktivitásának szabályozására a transzkripción túl további lehetőségek is vannak (15.18. ábra). A génexpresszió szabályozásának leglényegesebb szintjei a következők. (1) A transzkripció, amely mind közül a legfontosabb. (2) A képződött pre-mRNS molekulák érése: milyen kombinációban vágódnak ki az intronok, azaz milyen érett mRNS keletkezik. (3) Az mRNS-ek kijutása, azaz exportja a sejtmagból szintén befolyásolható lépés. (4) Szabályozható a citoplazmába jutott mRNS molekulák élettartama, vagyis hogy mennyi ideig „élnek”, hány fehérje képződhet egy-egy mRNS alapján. (5) A

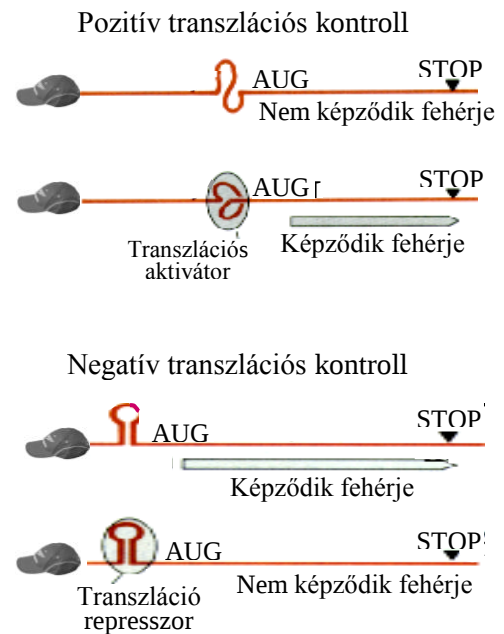
miRNS-ek tevékenysége is meghatározhatja az egyes mRNS-ek koncentrációját a citoplazmában. (6) A transzlációs kontroll azt jelenti, hogy a citoplazmába jutott mRNS-ek transzlációjának hatékonysága is szabályozható (15.19. ábra). Vannak olyan mRNS-ek, amelyek transzlációját adott fehérjék kapcsolódása serkentheti vagy éppen gátolhatja; szabályozható, hogy hozzáférhet-e hozzájuk a transzlációs apparátus. (7) A fehérjék aktivitását kémiai módosításukkal is lehet szabályozni. Akár egyetlen foszfátcsoport kapcsolása (például egy tirozin oldallánchoz) döntően megváltoztathatja a fehérje aktivitását. Ezeket a szerkezeti változásokat poszttranszlációs módosításnak nevezik gyűjtőnéven. (8) A fehérjék sem örökéletűek, egy idő múltán mindenképpen degradálódnak, de élettartamuk (amit félféltidejük jellemez) szintén szabályozható.



15.18. ábra. A génexpresszió szabályozásának lehetséges szintjei.

ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtek jellegzetességeit döntően az határozza meg, hogy bennük mely gének, mikor és milyen mértékben expresszálódnak. A génexpresszió szabályozása soktényezős folyamat. Az alapot a DNS biztosítja, nemcsak azzal, hogy fehérjék szintézisét kódolja, hanem azzal is, hogy benne olyan szakaszok vannak, amelyekhez különféle fehérjemolekulák kapcsolódhatnak. A DNS-hez kapcsolódó fehérjék nemcsak azt határozzák meg, hogy kifejeződjenek a gének vagy sem, hanem azt is, hogy a gének melyik sejtben, az egyedfejlődés mely stádiumában, és milyen mértékben expresszálódnak. A génexpresszió szabályozásának fontosságát az is jelzi, hogy a folyamat több szinten valósul meg.



15.19. ábra. A transzlációs kontroll.

Ugyanakkor a sejtek nem csupán saját belső harmóniájukat valósítják meg a génexpresszió szabályozása révén, de arra is képesek, hogy a szomszédságból, vagy akár a távolról érkező üzeneteket is észleljék, és egyes génjeik kifejeződésének megváltoztatásával az üzeneteknek megfelelően módosítsák funkciójukat. A sejtek működése közötti összhang biztosítja az élőlény életét, alkalmazkodását a változó környezeti feltételekhez. A sejtek közötti kommunikációt lehetővé tevő jelátviteli folyamatokat a következő fejezet mutatja majd be.

21. SEJTVÁZ ÉS SEJTMOZGÁSOK.

Mikrotubulusok. Molekuláris motorok és az intracelluláris transzport. A csillók és a flagellumok mozgása. Aktin mikrofilamentumok és szerepeik. Intermediér filamentumok.

A fejezetet Lippai Mónika állította össze, Kovács János Sejtan című könyve és Szabad János jegyzete alapján.

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek sokkal nagyobbak, mint prokarióta társaik, szerkezetüket elsősorban a sejtváz biztosítja. A belső váz megjelenése az evolúció egyik fontos lépése volt, mely megnyitotta az utat a bonyolult felépítésű eukarióta sejtek kifejlődése és végső soron a soksejtűség kialakulása előtt.

A sejtváz fehérjék polimerjeiből álló szerkezet. Három komponense van:

1. A mikrotubulusok 24 nm átmérőjű csövecskék, tubulin molekulák polimerjei alkotják.
2. A mikrofilamentumok kb. 7 nm átmérőűek, és globuláris aktin molekulák polimerjeiből állnak.
3. Az intermediér filamentumok átmérője kb. 10 nm. Többféle fehérje polimerje alkothatja, és a fenti két sejtalkotóval szemben nincs jelen minden eukariótában. Néhány citoszolikus típusa csak a gerincesekre jellemző.

A háromféle váz funkciója részben átfedő, de emellett jellegzetes eltéréseket is mutat. Az *intermediér filamentumok* mechanikai szilárdságot kölcsönöznek a sejtnak. Az *aktinváz* fő funkciója az alak fenntartása, ill. a letapadást, az alak- és helyváltoztatást eredményező mozgásjelenségek generálása. A *mikrotubulusok* tartják fenn a sejt belső rendezettségét, a sejtmag és az organellek jellegzetes elhelyezkedését. Elsősorban ők teszik lehetővé – a hozzájuk kapcsolódó motorfehérjék közreműködésével – az egyes kompartmentumok közötti transzportot, a kromoszómák szegregációját a sejtosztódás során, általában a belső átrendeződést eredményező mozgásokat. A mikrotubulusok alkotják a sejt mozgásszerveinek, a csillóknak, illetve az ostoroknak a vázát.

Végül, de nem utolsósorban, a vázelemek összességükben az intracelluláris membránokéval összemérhető, hatalmas hordozófelületet alkotnak, melyhez számos makromolekula (enzimek, nukleinsavak) képes hozzákötődni, és így lokálisan az általuk katalizált reakciók számára optimális mikrokörnyezet alakul ki.

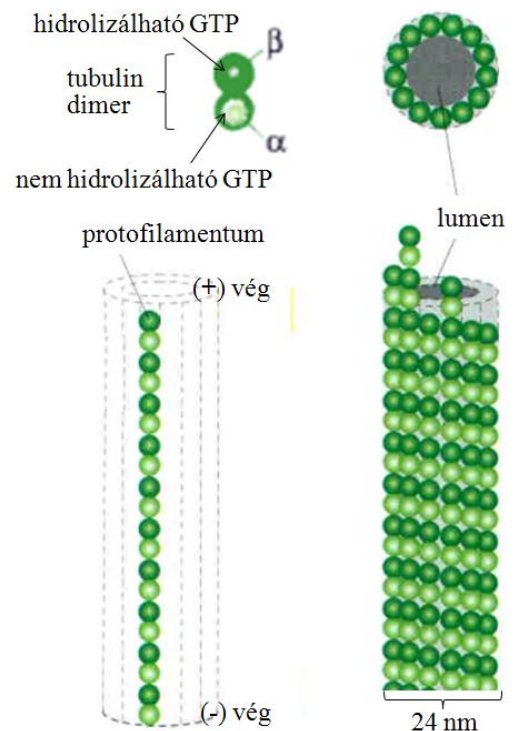
Bár a váz elnevezés statikus szerkezetre utal, valójában mind az aktin, mind a mikrotubuláris váz dinamikusan változó, állandóan átépülő hálózat. Könnyen képződnek polimerizációval, és könnyen lebomolhatnak depolimerizációval.

MIKROTUBULUSOK

A mikrotubulusok szerkezete

A mikrotubulusok azonos módon épülnek fel és működnek az egysejtű és a magasabb rendű eukariótákban. Alapegységük, a tubulin két, egymáshoz hasonló polipeptidből, az α - és β -tubulinból álló heterodimer. A sejtekben kimutatható egy harmadik tubulintípus, a γ -tubulin is, mely a centroszómákban lokalizálódik. A tubulinokat kódoló gének evolúciósan erősen konzerváltak (az ember genomjában hat α - és hat β -tubulin gén van).

Egy-egy dimer „fej-farok” orientációban egymás után kapcsolódva képez egy úgynevezett *protofilamentumot*, és az élő sejtben 13 ilyen protofilamentum kapcsolódik össze csövecskévé (21.1. ábra). Miután minden protofilamentum ugyanúgy orientálódik (a mikrotubulus egyik végén csak α -, a másik végén csak β -tubulin található), a mikrotubulusok polarizáltak. A mikrotubulus növekedése vagy rövidülése újabb és újabb heterodimereknek a cső végeire történő asszociációjával, illetve onnan való disszociációjával valósul meg.

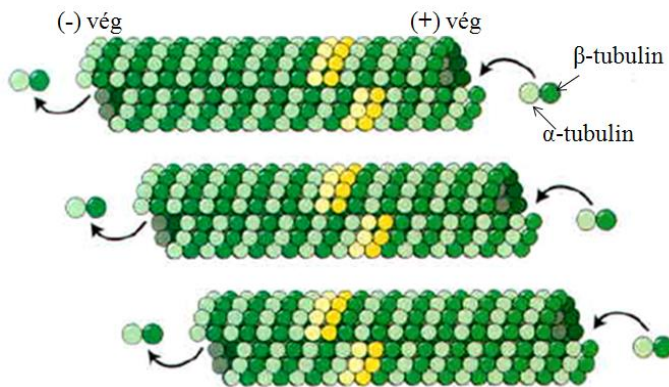


21.1. ábra. A mikrotubulusok α - és β -tubulin alegységek dimerjeinek polimerizációja során képződnek.

A mikrotubulus-váz dinamikus instabilitása

A mikrotubulusok két végén az új tubulin-dimerek beépülésének sebessége nem ugyanolyan azonos szabad dimer-koncentráció mellett. A β -tubulint tartalmazó végén alacsonyabb a *kritikus koncentráció*, vagyis az a szabad dimer-koncentráció, melynél az időegység alatt történő ráépülés és leválás éppen kiegyenlíti egymást. A β -tubulint tartalmazó vég

sokkal dinamikusabban változhat, ezért a mikrotubulusoknak ez a gyors vagy plusz (+) vége, míg az α -tubulint tartalmazó vég a lassú vagy mínusz (-) vég (21.1. és 21.2. ábra).



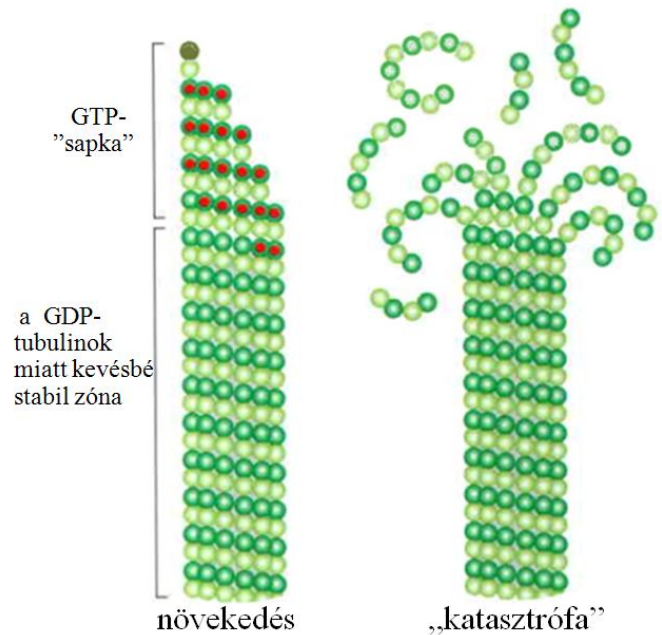
21.2. ábra. Van olyan szabad tubulin koncentráció-tartomány, ahol a mikrotubulusok β -tubulint tartalmazó végén (+ vég) a beépülés, míg az α -tubulint tartalmazó végén (- vég) a disszociáció dominál. Sárga szín jelöli egy kitüntetett „sáv” helyzetét az idő elteltével.

A polimerizációt jelentősen befolyásolja a β -tubulin GTP-áz aktivitása (bár az α -tubulin is köt GTP-t, de nem képes a hidrolízisre). A csővégekre beépülő GTP-tartalmú dimerek β -alegységén a GTP a polimerizációt követően hamarosan elhidrolizál, ezért a csővek falában már GDP-tartalmú β -tubulin van. A hidrolízis csökkenti a dimerek közötti kötés erősségét: a GDP-tartalmú tubulin disszociációra hajlamos. Mivel szabadon kilógó β -alegység csak a „+” végén van, ez a vég reagál érzékenyen a szabad tubulin-koncentráció változására. A mikrotubulus növekedése akkor figyelhető meg, ha a GTP-tartalmú dimerek asszociációja gyorsabb, mint az ezt követő GTP-hidrolízis. Ilyenkor a (+) csővégeken GTP-tartalmú dimerekből álló „sapka” alakul ki, mely nem hajlamos disszociációra. Ha a ráépülés lelassul, ez a sapka eltűnhet, a csővégeken a hidrolízis következtében GDP-tartalmú β -tubulinok jelennek meg, és ez azonnali gyors depolimerizációt, úgynevezett „katasztrófát” eredményez (21.3. ábra).

Ez vezet a mikrotubulusok *dinamikus instabilitásához*, ahhoz az élő sejtekben jól megfigyelhető folyamathoz, melynek során az az összes mikrotubulus mennyisége a sejten belül időben ugyan jelentősen nem változik, de az egyedi mikrotubulusok végei hol növekedési fázisban, hol rövidülésben vannak. A dinamikus instabilitás következményeként a sejt mikrotubuláris apparátusa folyamatosan átépül: a sejt energiát (GTP-t) használ fel arra, hogy a rendszert állandóan átalakulásra kész állapotban tartsa. Különösen gyors a mikrotubuláris apparátus átrendeződése az osztódó sejtekben, melyekben a kromoszómák szállítását a mikrotubulusokból álló magorsó (osztódási orsó) végzi (lásd 21.5. ábra).

Az osztódás gátlására széleskörűen alkalmazott *citosztatikumok* jelentős része tulajdonképpen a dinamikus instabilitás megzavarásán keresztül fejt ki hatá-

sát. Az őszi kikerics hatóanyaga, a kolchicin, vagy a meténg-fajokból kinyerhető alkaloidák és származékai (vinblastin, vincristin) kis koncentrációban gátolják a csővégeken a kicserélődési folyamatokat és befagyasztyják a mikrotubuláris rendszert, míg nagyobb koncentrációban teljes depolimerizációt okoznak. A tisztafelekéből kinyerhető taxol és származékai ellentétes hatásúak, túlzott polimerizációt okoznak és stabilizálják a mikrotubulusokat.



21.3. ábra. Ha a plusz végén elég gyorsan érkezik új tubulin dimer, az épülő végén mindig GTP-kötött β -tubulin van – stabilizálja a növekvő mikrotubulust. Ha a beépülés lelassul, a végén bekövetkezik a hidrolízis – szétnyílik a mikrotubulus protofilamentumokra.

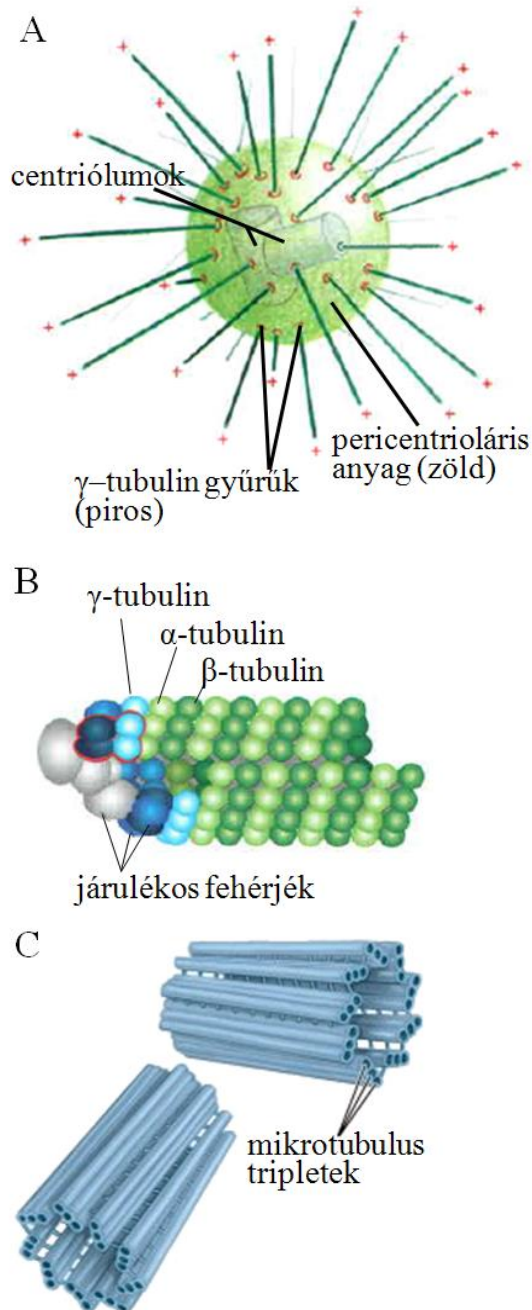
A mikrotubulusok helyzete a sejtben

A mikrotubulusok térbeli elrendeződését a sejtben elsősorban a MTOC-k, mikrotubulus organizáló centrumok szervezik. Az állati sejtekben a fő MTOC a sejtközpont, azaz a *centroszóma*.

A sejtközpont tipikusan a sejtmag közelében elhelyezkedő viszonylag kicsi (~1-2 μ m átmérőjű) test, melyet membrán nem határol, ezért anyaga élesen nem különül el a környező citoplazmától. Állati sejtekben két részre különíthető el: a *centriólumokra* és az őket felhőszerűen körülvevő *pericentrioláris anyagra* (21.4. A ábra). A magasabbrendű növényi sejtekből a centriólumok hiányoznak.

A centriólumok henger alakú testek, de szerepük a centroszómaiban nem teljesen tisztázott. Falukat 9 tubuluscsoport alkotja. Egy-egy csoport három mikrotubuláris tagból (triplet) áll (21.4. C ábra). A centriólumok száma a sejtciklus során változik. A nem osztódó sejtekben általában egy pár figyelhető meg.

A pericentrioláris anyag néhány jellegzetes fehérjét tartalmaz, közöttük a már említett γ -tubulinból álló gyűrűket. A mikrotubulusok mínusz végei tulajdonképpen ezekhez a gyűrűkhöz kapcsolódnak hozzá. Egy-egy ilyen gyűrű 13 alegységből áll és polimerizációs magként működik, melyre az α - és β -tubulinból álló heterodimerek fokozatosan ráépülnek (21.4. B ábra).



21.4. ábra. A centroszóma felépítése. **A:** A centroszómában található γ -tubulin gyűrűkből indulnak ki a mikrotubulusok, úgy hogy (-) végük ágyazódik a gyűrűbe. **B:** A 13 γ -tubulint tartalmazó gyűrűből indul ki a mikrotubulus polimerizációja. A gyűrűt egyéb fehérjék stabilizálják. **C:** a centriólumok szerkezete: egyenként 9x3, azaz 27 mikrotubulusból álló hengerek.

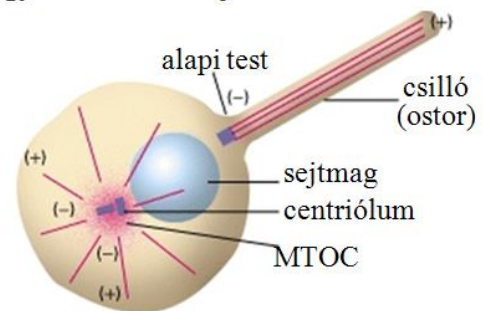
Ennek a ténynek két fontos következménye van a térbeli rendezettség kialakításával kapcsolatban. Egy-

részt az egész mikrotubuláris apparátus irányultságra, polarításra tesz szert, mivel a csövek gyors plusz végei egyöntetűen kifelé néznek (21.5. ábra), másrészt a centroszóma anyagába beágyazott mínusz végek stabilizálódnak, mivel az asszociáció/disszociáció itt gátlódik.

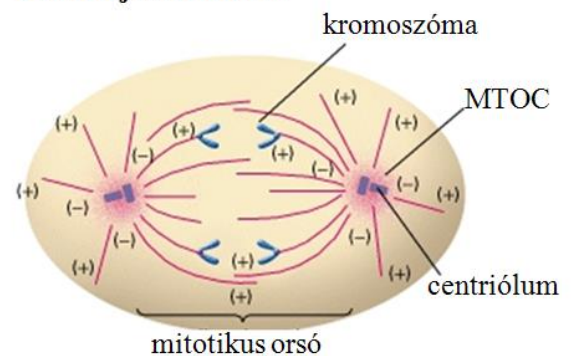
MTOC aktivitással bír a *csillók/ostorok alapi teste* is, amelynek szerkezete megegyezik a MTOC-ban található centriólummal (21.5. ábra). A zigóták centroszómája a megtermékenyülés során a spermium ostorának alapi teste körül képződik. A spermiummal érkező alapi test a petesejt citoplazmájából toborozza azokat az anyagokat, amelyekkel kiegészülve a centroszómát alkotja.

Ugyanakkor a neuronok nyúlványaiban a mikrotubulusok jelentős része nincs kapcsolatban a sejtközponttal, mégis stabil. Az axonokban a mikrotubulusok irányultsága egyforma: mindegyik cső plusz vége kifelé (a szinapszisok felé) néz, míg a dendritekben kevert elrendeződésük, egyesek plusz végei kifelé, míg másoké a sejttest felé néznek (21.5. ábra).

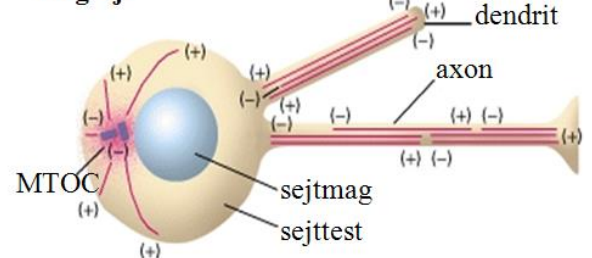
Egy csillós állati sejt interfázisban



Állati sejt mitózisban



Idegsejt

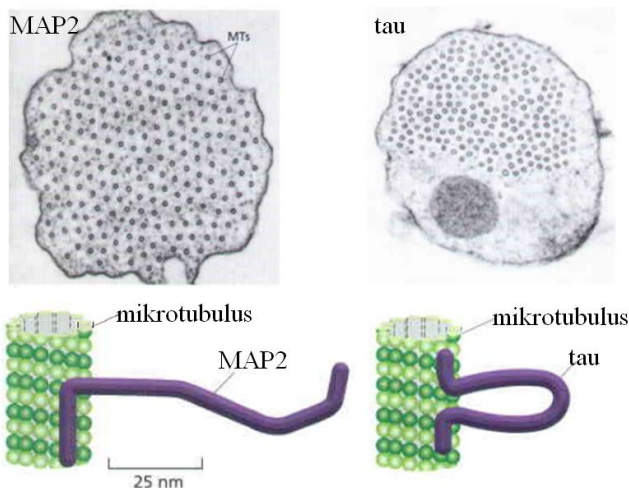


21.5. ábra. A mikrotubulusok elrendeződése különböző sejtekben. A centroszóma és az alapi test képes a mikrotubulusok kialakítására és irányítására: mindig a mínusz vég indul ki belőlük.

A mikrotubulus-asszociált fehérjék (MAP-ok)

- A szerkezeti MAP-ok

A felsorolt tényezőkön kívül a mikrotubulusok viselkedését jelentősen befolyásolják a mikrotubulusokhoz asszociált fehérjék (MAP) is. A MAP-ok egyik csoportját az úgynevezett *struktúrafenntartó (szerkezeti) fehérjék* alkotják. Ezek hosszú, szálszerű molekulák, melyek a mikrotubulusokhoz asszociálva kilógnak azok felületéről. Különösen nagy mennyiségben fordulnak elő idegszövetben. A MAP-ok szerepe sokrétű: elősegítik a tubulin-polimerizációt, stabilizálják és kötegekbe rendezik a mikrotubulusokat. A csoporton belül az egyes mikro-tubulusok közötti távolságot a felszínükről kilógó MAP-ok hossza határozza meg (21.6. ábra). A MAP-ok egy további fontos funkciója a „horgonyzás”: képesek megkötni, és ezáltal a mikrotubulus közelében rögzíteni más fehérjéket, így különböző enzimeket is. Ezáltal az egyes mikrotubulusok körül sajátos mikrokörnyezet alakul ki.



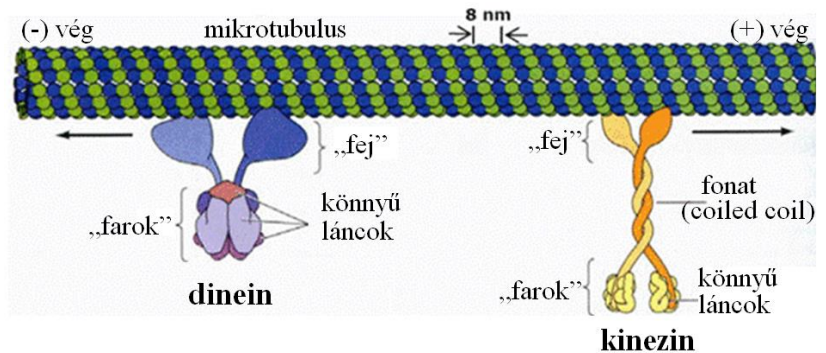
21.6. ábra. Két különböző MAP-fehérje hatása a mikrotubulusok elrendeződésére. A felső elektronmikroszkópos képeken a MAP2-t illetve a tau fehérjét mesterségesen túltermelő sejtek és bennük a mikrotubulusok keresztmetszete látható. Alul a kétféle fehérje és a mikrotubulus kapcsolata látható.

- A motorfehérjék

A MAP-ok egy másik nagy csoportját az úgynevezett *motorfehérjék* (mechanokémiai MAP-ok) alkotják. A motorfehérjék mechanokémiai enzimek, képesek ATP-t hidrolizálni, és a felszabaduló energiát mechanikai munka – elmozdulás – végzésére felhasználni. A mikrotubulusokkal kapcsolatban két nagy családjuk ismert: a **kinezin** és a **dineinek**.

Minden változatosságuk mellett van néhány közös tulajdonságuk. Minden motorfehérje több alegységből áll, van rajta katalitikus centrum, ahol az ATP elbontása végbemegy, reverzibilisen kötődni tud a mikrotubulushoz és a molekula C-terminális, farki

régiójához más fehérjék, membránok, vezikulák asszociálódnak. A motorfehérjék fontos tulajdonsága, hogy felismerik a mikrotubulus polaritását és az egyik meghatározott vég felé haladnak: a legtöbb kinezin plusz-vég motor, míg a jelenleg ismert dineinek mínusz-vég motorok. A motorfehérjék ATP felhasználásával végig tudnak lépegetni a mikrotubulus felszínén, miközben vonszolják magukkal a hozzájuk asszociálódott anyagokat (21.7. ábra).



21.7. ábra. A kinezin és a dinein szerkezete. A kinezin a plusz vég felé halad, a dinein a mínusz vég felé halad. A kinezin a plusz vég felé halad, a dinein a mínusz vég felé halad. A kinezin a plusz vég felé halad, a dinein a mínusz vég felé halad.

A sejten belüli irányított anyagmozgatás (például vezikuláris transzport, kromoszómák szállítása a mitózisban) a mikrotubulusokhoz kapcsolt motorfehérjék közreműködésével valósul meg.

A motorfehérjék nehéz és könnyű láncoknak nevezett alegységekből épülnek fel (21.7. ábra). Egy nehéz láncnak globuláris feji, valamint α -hélixből álló farki része van, ez utóbbihoz kapcsolódnak a könnyű láncok. A motorfehérjék a globuláris feji részen keresztül kapcsolódnak a mikrotubulusokkal. A motorok globuláris része felelős az ATP-hidrolíziséért. A nehéz láncok α -hélixből álló farki részei kettős fonattá rendeződnek, így alakul ki a dimer szerkezet. A fonatoknak egyrészt nagy a szakítószilárdságuk, másrészt rugalmasak: ideális szerkezetek erő kifejtésére, terhek „cipelésére”.

A mikrotubulusok szerepe a sejt életében

1. Anyagszállítás

A mikrotubulusokhoz kapcsolódó motorfehérjék szállítják többek között az endomembrán rendszerben (például az endoplazmatikus retikulum és a Golgi készülék között) haladó vezikulákat, és fontos szerepük van a szekrécióban.

A színüket gyorsan változtatni tudó élőlények speciális sejtjeiben, a melanocitákban a lizoszómákkal rokon vezikulákban pigmentszemcséket szállítanak a mikrotubulusok mentén a dineinek és a kinezin.

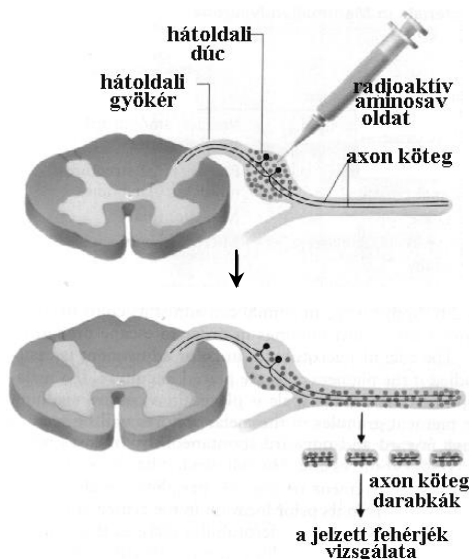
Mélyül a sejtek színe, ha a granulumok a sejt felszín közelébe szállítódnak, és halványul, ha a granulumok

a sejtek belsejében koncentrálnak. A melanocitákban levő mikrotubulusok és motorfehérjék működése idegi és hormonális szabályozás alatt áll. A halak pikkelyeiben és a kételtűek bőrében levő melanociták működése a legismertebb.

2. Az axonális transzport

Az axonális transzport során plusz-vég motorok, azaz kinezinok szállítanak anyagot az axonok mentén az idegsejtek sejttestjéből a szinapszisokhoz (21.5. ábra). A fordított irányú anyagszállítást a mínusz vég felé dineinek végzik. Ha egy gerincvelői dűcba radioaktívan jelzett aminosav-oldatot injektálnak, az idegsejtek a jelölt aminosavakat beépítik az újonnan képződő fehérjékbe (21.8. ábra). A radioaktívan jelzett fehérjék különféle típusai az axon mentén továbbítódnak. Ha valamennyi idő elteltével megvizsgáljuk az axon különféle darabjait, bennük különböző jelzett fehérjék jelenlétére derül fény.

A jelzett fehérje-mintázat alapján meghatározható az axonális transzport sebessége. A vizsgálatok eredményeit a 21.1. táblázat foglalja össze: régóta nyilvánvaló, hogy a különféle komponensek szállításának sebessége nagyon eltérő. Az olyan komponensek szállítása gyors, amelyekből sokra van szükség, vagy amelyek gyorsan lebomlanak. A hosszabb élettartamú molekulákat csak lassan szállítják a kinezinok.



21.8. ábra. Az axonális transzport sebességének meghatározása.

Az anyagszállítás sebessége	Szállított anyag
Gyors 250-400 mm/nap	Glükoproteinek, glükolipidek, acetilkolin-észterázzal töltött vezikulák, granulomok
Közepes; 50 mm/nap	ATP-áz, mitokondriumok
Lassú 0,2-1,0 mm/nap	Neuronspecifikus vázfehérjék, mikrotubulus és intermedier filamentum komponensek

21.1. táblázat. Az axonális transzport hatékonysága.

3. A mitotikus orsó szerepe a sejtsztódásban

A mikrotubulusokból álló orsófonalak a sejtsztódások kezdetén képződnek. A mikrotubulusokhoz motorfehérjék, valamint különféle egyéb fehérjék is kapcsolódnak. A kromoszómák szegregációja a mikrotubulusok, a motorfehérjék és a MAP-fehérjék összehangolt működésének az eredménye.

A *profázis* során a sejtközpon mikrotubulus-szervező aktivitása lényegesen megnő. Az interfázisos mikrotubulus-váz depolimerizálódik, ugyanakkor a korábban már megkettőződött sejtközpon - mindkét utód egy-egy pár centriólummal - kettéválik. Körülöttük gyors ütemben új mikrotubulusok kezdenek képződni, miközben a két sejtközpon eltávolodik egymástól. Miután a mikrotubulusok plusz végei mindig kifelé néznek, míg mínusz végeik a sejtközpon anyagába ágyazódnak, két ellentétes orientáltságú, tükröszimmetrikus mikrotubulus-apparátus alakul ki. (21.9. ábra.)

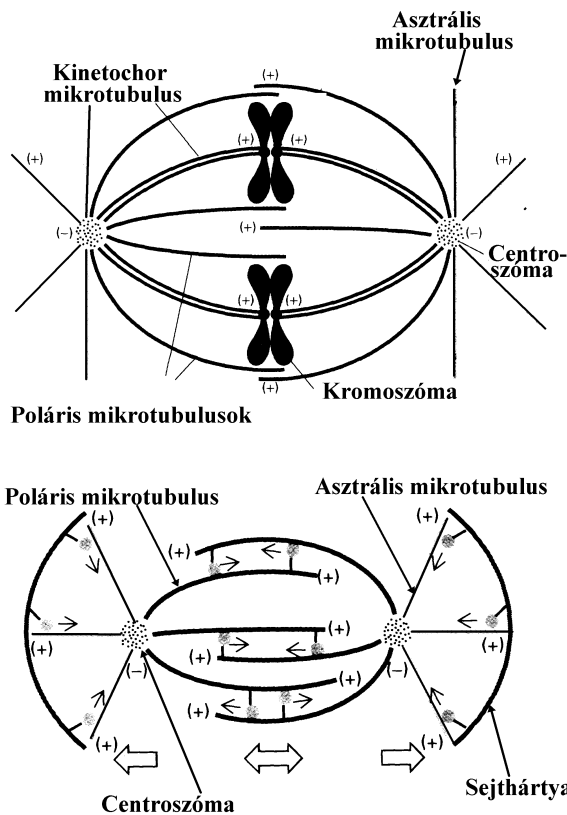
A *prometáfázis* fő eseménye a szállítandó kromoszómák és a szállítókészülék, a magorsó összekapcsolása. Ebben a szakaszban a pólusokon a két sejtközpon körül véglegesen kialakul a magorsó mikrotubuláris rendszere, mely az **asztrális**, a **poláris** és a **kinetochor** mikrotubulusokból áll. Az előbbieket csillagszerűen ágaznak szét a pólusból a sejt felszín felé, a kinetochor mikrotubulusok a kromoszómákat kapcsolják a pólusokhoz. A poláris mikrotubulusok az ellentétes pólus felé irányulnak, kromoszómákhoz nem kötődnek és a magorsó felezősíkjában végeikkel egymás közé csúsznak. Mindhárom csoportnak szerepe van a kromoszómák szétválasztásában (21.9. ábra).

A prometáfázis során a kromoszómák a két pólus között véletlenszerűen ide-oda mozognak. Ez a rendezetlen mozgás addig tart, amíg minden kinetochorhoz hozzá nem kötődik néhány mikrotubulus. Ha az egyik leánykromatidán levő kinetochor kapcsolatot létesített valamelyik pólussal, akkor a másik leánykromatida kinetochorja már csak az ellentétes pólushoz tud stabilan kötődni. A prometáfázis próbálkozásai sorozata, melyben végül is csak a helyes kapcsolat, vagyis a két kromatida ellentétes pólushoz való kötődése marad fenn.

A mikrotubulusok dinamikus instabilitásának különösen nagy jelentősége van a prometáfázisban. Ebben a fázisban a centroszómákból sugárirányban folyamatosan nagyszámú mikrotubulus nő ki, közülük azok, melyek véletlenszerűen beletalálnak egy kinetochorba, stabilizálódnak, a szabad végük gyorsan lebomlanak. Minél gyorsabban képződnek újabb és újabb mikrotubulusok, nyilván annál nagyobb lesz a találati valószínűség és annál hamarabb alakul ki a kapcsolat a kromoszómák és a kinetochor mikrotubulusok között.

A kinetochorba befogott mikrotubulusok képesek maradnak polimerizációra vagy depolimerizációra, de úgy, hogy közben kapcsolatuk a kinetochorral nem szakad meg. Ha a polimerizáció kerül túlsúlyba, a kromoszóma távolodni fog pólusától, depolimerizáció esetében pedig közelít hozzá. A prometáfázisos kromoszóma-mozgásoknak ez az egyik oka. Emellett a kromoszómakarokon lokalizálódó motorok ellentétes

hatásúak, a mikrotubulusokhoz kötődve azok plusz végei felé, vagyis az ekvatoriális sík irányába mozgatják a kromoszómákat.



21.9. ábra. A kromoszómák vándorlása az anafázis során. A mikrotubulusok képződését a centroszóma szervezi. A centroszómákat az anafázis során a farki végükkel a sejthártyához kapcsolódó, és az asztrális mikrotubulusokon a mínusz vég, azaz a centroszóma felé lépegetni próbáló dineinek húzzák a sejthártya felé. A „farkukkal” poláris mikrotubulusokhoz rögzülő és az ellenoldali poláris mikrotubulusok plusz vége felé lépegető kinezinok pedig széttolják az orsót és vele a centroszómákat. Mindez hozzájárul a kromoszómák szétválásához.

A *metafázisban* a kromoszómák elfoglalják a „start-vonalat”: a két pólus közötti felezővonal síkjában (az ekvatoriális síkban) rendeződnek el. Erre az készleti őket, hogy a két kromatidára a pólusok felől ható ellentétes irányú húzó- és taszítóerők a felezővonalban egyenlítik ki egymást.

Az *anafázis* a testvérkromatidák gyors szétválásával kezdődik, majd a szétvált kromatidák (most már mint utódkromoszómák) elkezdnek (kb. 1 μm /perc sebességgel) az ellentétes pólusok felé vándorolni. A kromoszómák szétválása kétféle mozgás eredője.

Egyrészt az utódkromoszómák közelednek a pólusok felé, mivel kinetochor mikrotubulusaik fokozatosan depolimerizálódnak (rövidülnek), de közben kapcsolatuk sem a pólussal, sem az utódkromoszómával nem szakad meg. Emellett dineineket, azaz mínusz-vég motorokat is kimutattak a kinetochorokban, amelyek szintén a pólus felé közelítik a kromoszómákat.

Másrészt a két pólus is távolodik egymástól, aminek elsődleges oka az, hogy az ellentétes irányultságú poláris mikrotubulusok, melyek az egyenlítői síkban átfedik egymást, az anafázisban szétszúsznak és széttolják a pólusokat is a hozzájuk kötött kromoszómákkal együtt. A szétszúszást a poláris mikrotubulusokhoz asszociált, plusz irányba elmozduló kinezinok okozzák. Ráadásul az asztrális mikrotubulusok plusz vége dineineken keresztül kapcsolódik a sejthártyához. Így az asztrális mikrotubulusokat és közvetve a centroszómát a mínusz irányba „igyekekvő”, de a sejthártyához kötött dineinek húzzák a sejthártya felé. Ezek a folyamatok egyben a sejt megnyúlását is eredményezik (21.9. ábra).

A *citokinézis* során is van szerepe a mikrotubulusoknak: a befűződés síkját a magorsó helyzete szabja meg, mivel mindig a két pólust összekötő tengelyre merőleges síkban, annak felezővonalában (a poláris mikrotubulusok átlapolódásának helyén) alakul ki.

Mindezek alapján érthető, hogy minden olyan anyag, amely a mikrotubulusok dinamikus instabilitását gátolja vagy depolimerizációjukat okozza, egyben a mitózist is megakadályozza. A mindennapi gyakorlatban a rákos sejtek burjánzásának megakadályozására alkalmazott citosztatikumok (pl. a már említett alkaloidák – vinblastin, vincristin) sejtosztódást gátló hatása ezen alapul.

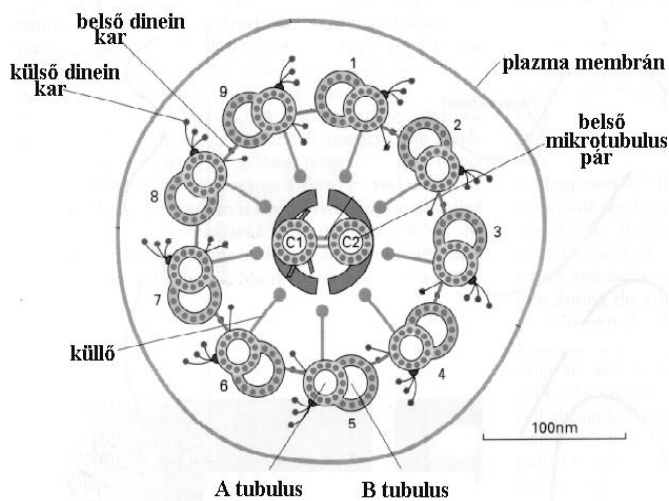
4. A csillók és a flagellumok mozgása

A csillók és az ostorok 0,25 μm átmérőjű, mikrotubulusokból felépülő sejtnyúlványok. Szerkezetük hasonló, a különbség számukban, hosszukban, a mozgás módjában és szabályozásában van. A csillók száma több száz is lehet egy sejtben, míg ostorból általában egy van. A csillók jóval rövidebbek (5–10 μm), mint az ostorok (150–200 μm), csapásuk gyorsabb és összehangolt.

Lehetővé teszik egyes eukarióta egysejtűek és a csak néhány sejtből álló élőlények helyzetváltoztatását. A magasabbrendű élőlényekben, ahol a csillókat tartalmazó sejtek rögzítettek, a csillók folyadékot vagy szilárd részecskéket mozgatnak: például a légutakban váladékot, a petevezetékben a petesejtet vagy a zigótát. Módosult csillók a fényérzékeny sejtek csapjai és pálcikái. Tipikus ostoros sejtek a hímivarsejtek.

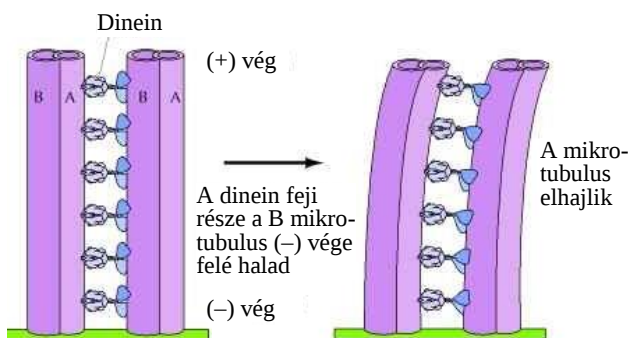
A csillók és ostorok a centriólumok származékainak tekinthetők, jellegzetes szerkezetük is eredetükből következik (ezt a tényt a XIX. század végén Lenhossék Mihály ismerte fel). Kialakulásuk első lépése az, hogy a sejt központ pericentrioláris anyagában bazális testek képződnek. Ezek a centriólumoktól alakra nem különböző, apró, henger alakú testek, melyek fala 9 darab hármastagolású csőcsoporthoz (tripletekből) áll (lásd 21.4. C ábra). Később ezek a bazális testek a sejthártya alá kerülnek és ott sorokba rendeződnek úgy, hogy hossz tengelyük a membránra merőlegesen áll. Ezután minden triplet első két tagján polimerizáció indul meg: a bazális test MTOC-ként viselkedik. A növekvő mikrotubuluspárok (dupletek)

maguk előtt tolják kifelé a plazmamembránt, így alakul ki a csilló. Keresztmetszetben vizsgálva a csillóakra az úgynevezett 9+2-es szerkezet jellemző (21.10. ábra). Ez azt jelenti, hogy a plazmamembrán alatt, a csilló „palástjában” az említett 9 mikrotubuluspár fut végig (plusz végeik kifelé néznek, mínusz végeik a bazális testbe ágyazódnak – lásd 21.5. ábra), míg középen, a csilló tengelyében 2 különálló mikrotubulus helyezkedik el. Minden perifériás csőpár egyik („A”) tagján egymástól szabályos távolságban két kar helyezkedik el, mely képes a következő csőpár „B” tagjához kötődni (21.11. ábra). Az „A” tubulus teljesen zárt cső, míg a „B” tubulus részleges. A karokat speciális, úgynevezett csilló-dinein motorfehérje alkotja.



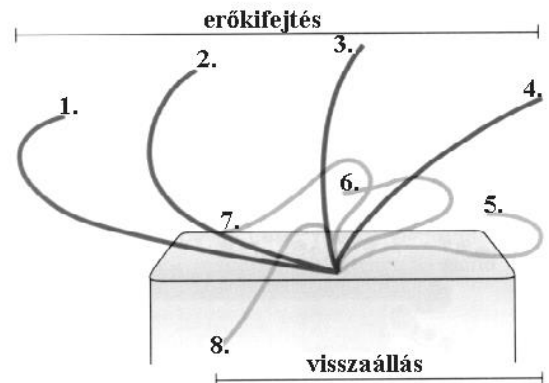
21.10. ábra. A csillók szerkezete egy keresztmetszeti képen.

A csillók és ostorok működésük közben változatos mozgást végeznek. A mozgás molekuláris alapja az, hogy megfelelő jel (a Ca^{2+} -szint emelkedése) hatására a dineinek a a szomszédos mikrotubuluspár „B” tubulusával teremtenek kapcsolatot, és miközben a mínusz vég, azaz az alapi test irányába „araszolnak” rajtuk, a szomszédos csőpárokat egymáshoz képest kissé elcsúsztatják. Ez eredményezi a csilló meghajlását (21.11. ábra).



21.11. ábra. Az „A” mikrotubulushoz rögzített dineinek „araszolása” a szomszédos csőpár „B” tubulusa mentén a csilló elhajlását eredményezi.

A csillók működése összehangolt: a lecsapások egyirányúak (21.12. ábra), és a sejtet borító csillósorok nem egyszerre, hanem egymás után csapnak le: a sejtek felszínén csillóhullámok futnak végig, melyek egy irányba hajtják a sejtek felszínére tapadt anyagokat (például a légutakból a garatba sodorják a porszenyeződést). Egy csillót kb. 200 különféle típusú fehérje alkot, amelyek közül csak néhány funkcióját ismerjük.



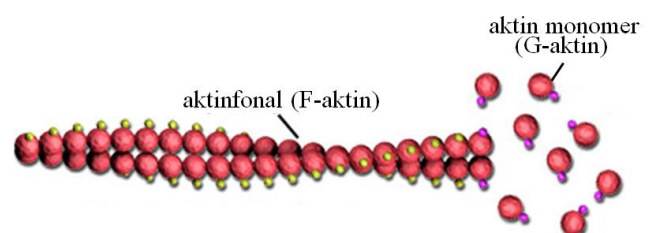
21.12. ábra. Egy csilló működésének munka- (1-4) és visszaálló (5-8) szakaszai.

AZ AKTINVÁZ (A MIKROFILAMENUMOK)

Az aktin az állati sejtek egyik leggyakoribb fehérjéje, a szervezet összfehérje-tartalmának kb. 1-5%-át (izmokban kb. 20%-át) alkotja. 374 aminosavból áll, szabad monomer (globuláris aktin, *G-aktin*) vagy polimer (filamentáris aktin, *F-aktin*, aktinfonal) formájában fordul elő (21.23. ábra). Felfedezése Szent-Györgyi Albert és munkatársa, Straub F. Brúnó kutatásainak köszönhető.

Az aktin különféle típusainak szintézisének evolúciósan erősen konzervált gének kódolják, magasabbrendű élőlényekben több is, emberben hat. Emlősökben háromféle, szerkezetében nagyon hasonló, de eltérő funkciójú aktin fehérje működik, α -aktin jellemző az izomsejtekre, β - és γ -aktin található egyéb sejtekben.

Minden aktin monomer egy molekula ATP megkötésére képes. A globuláris aktin monomerekből kialakuló aktinfonalak hossza több μm is lehet, átmérője viszont kb. 6-8 nm, a legkisebb a sejtváz másik két alkotójához képest, ezért *mikrofilamentumoknak* is nevezik őket. Az *aktinváz* az aktinfonalak és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék összessége.

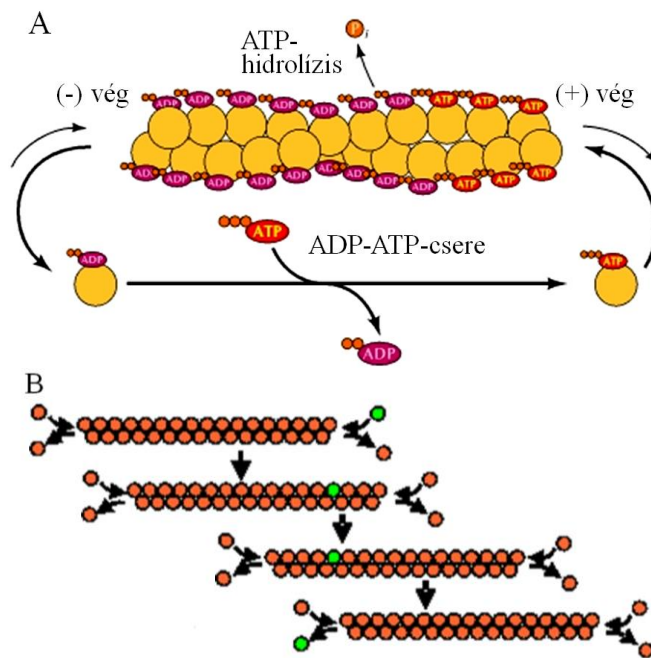


21.13. ábra. Egy aktin mikrofilamentum szerkezete.

Az aktin polimerizációja

A polimerizációs folyamat mechanizmusa és a polimer viselkedése sok tekintetben hasonló ahhoz, ami a tubulin-mikrotubulus rendszerben megfigyelhető. A polimerizáció néhány monomerből álló mag kialakulásával kezdődik. Ezt követi a szálnövekedés, melynek során a mag két végéhez újabb és újabb monomerek asszociálódnak, és kialakul a több μm hosszúságú fonalas szerkezetű aktinpolimer.

A növekedés sebessége a hozzáférhető szabad monomer koncentrációjától függ. A *kritikus koncentráció* elérésekor a végek növekedése leáll: az időegység alatt történő monomer-ráépülés és -leválás ilyenkor kiegyenlíti egymást. Azonban, a mikrotubulusokhoz hasonlóan, az aktinfonal két végére jellemző kritikus monomerkoncentráció eltérő, az ún. gyors („+”) végre nézve alacsonyabb, mint a lassú („-”) végén (21.14. A ábra), ami az aktin monomer aszimmetrikus felépítésének köszönhető. A kettő közötti koncentrációtartományban az aktinfonal állandó átépülésben van. Ilyenkor a gyorsan növvő véghez időegység alatt annyi monomer asszociálódik, amennyi a lassan növvő végén leválik, ezért a polimer össztömege (hossza) nem változik, de anyaga folyamatosan kicserélődik - ez az úgynevezett *taposómalom-állapot* (21.14. B ábra).



21.14. ábra. A: a szabad monomerek egy adott koncentráció-tartományán belül az aktinfonal plusz-végén beépülés, a mínusz-végén leválás történik. Ha az asszociáció elég gyors, a frissen beépült G-aktin nem hidrolizálja ATP-jét, és a stabilitást növelő ATP-sapka képződik. **B:** Az aktin filamentum taposómalom-állapota.

A monomerekhez kötött ATP a beépülést követően gyorsan hidrolizál, ezért a fonalak belső tömegét ADP-tartalmú aktin alkotja, ATP-tartalmú aktin csak a végeken, taposómalom-állapotban gyakorlatilag csak a

gyors végén figyelhető meg (21.14. A ábra). Az ATP-hidrolízis szerepe itt is ugyanaz, mint a GTP-hidrolízis a mikrotubulusok esetében: labilissá teszi a polimert, mivel az ADP-tartalmú aktinmolekulák között a kötés gyengébb, mint az ATP-tartalmú molekulák között. Ezért a plusz végén levő ATP-tartalmú aktinmonomerek sapkaként védik a polimert a gyors széteséstől. Ha ez a sapka eltűnik és ADP-tartalmú aktin jelenik meg a polimer plusz végén is, a fonal gyorsan szétesik.

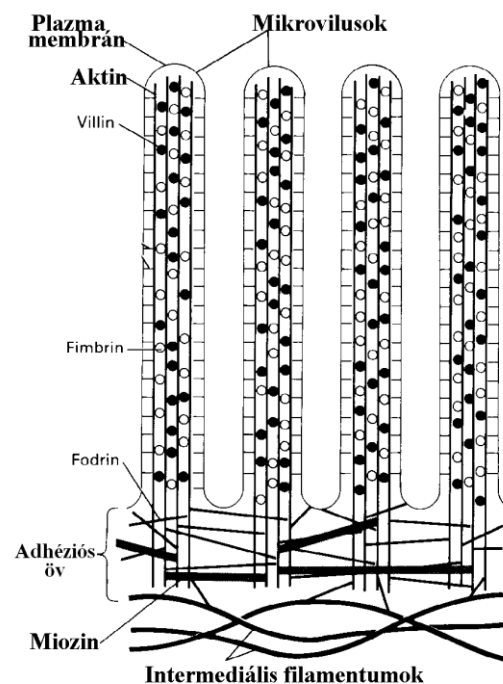
Az aktin mikrofilamentumok kettős szerepet töltenek be a sejtek életében: (i) szerkezeti elemek és/vagy (ii) a sejtek vagy egyes részleteik mozgásában játszanak szerepet.

Az aktinváz és az aktinhoz asszociált fehérjék szerepe: polimerizáció és a szerkezet fenntartása

A mikrotubuláris apparátustól eltérően, aktinhálózatot szervező központ a sejtekben nincs. Helyette az aktinhálózat szerveződését tucatnyi, *aktinhoz asszociált fehérje* irányítja. Ezek egy része a polimerizáció lépéseit szabályozza. Ide tartoznak a G-aktinkötő fehérjék, melyek a monomerekhez kötődve gátolják azok beépülését a polimerekbe, továbbá a *fragmentáló- és sapkaképző fehérjék*, melyek rövid darabokra törik a polimereket és a végeikhez kötődve leállítják a monomerek kicserélődését.

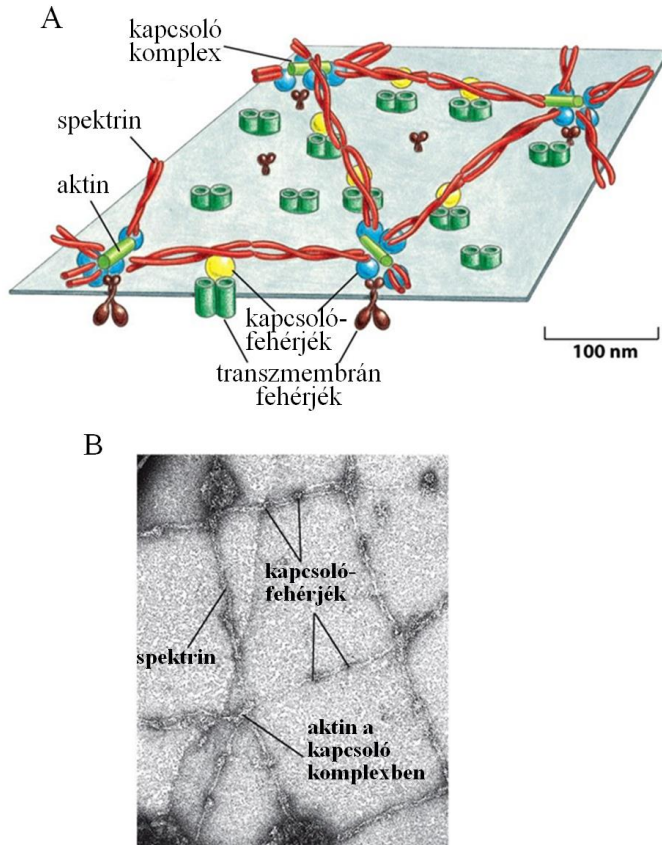
Másik csoportjuk, a *hálózatba rendező fehérjék*, az aktinfonalakat párhuzamos kötegekbe vagy laza hálózatba szervezik.

A bélhámsejtekben az aktinfonalak ilyen típusú fehérjékkel (villin, fimbrin, fodrin) kapcsolódva biztosítják a sejtek jellegzetes nyúlványai, a mikrobolyhok (villusok) stabilitását (21.15. ábra).



21.15. ábra. Az aktinfonal szerkezeti, hálózatba rendező asszociálódó fehérjékkel együtt stabilizálja a bélhámsejtek nyúlványait.

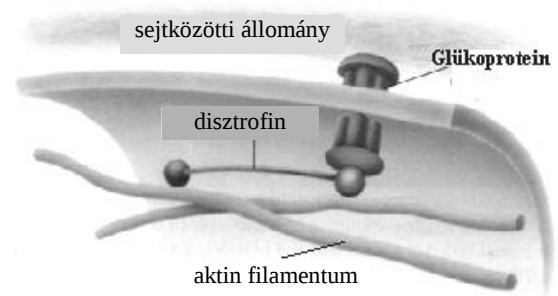
Aktinhálózat alakul ki a plazmamembrán alatt (úgynevezett kortikális aktinváz), melynek jelentős szerepe van az alak fenntartásában. Ismertek olyan fehérjék is, melyek a kortikális vázat a plazmamembránhoz rögzítik. Jellemző képviselőjük a vörösvértestekben nagy mennyiségben előforduló spektrin (21.16. ábra).



21.16. ábra. A: A kortikális aktinváz szerveződése a vörösvértest membránjában. A rajz a sejthártya citoplazma felé néző oldalát mutatja. **B:** A spektrin és az aktin filamentumok alkotta hálózat elektronmikroszkópos képe.

Aktinfonalak kötődnek a sejtkapcsoló struktúrák egy részéhez (lásd 20. fejezet), valamint az intermedier filamentumokkal is kapcsolatban vannak, amelyek a sejtek stabilitását és mechanikai hatásokkal szembeni ellenállóképességét biztosítják (lásd később). Ezen kapcsolatok lényege a szilárdság és a rugalmasság, azaz a sejtek azon képességének kialakítása, hogy az alakváltozások során ne sérüljön meg a sejthártya, és épen maradjon a kapcsolat a sejt belseje és a sejt külső struktúrák között.

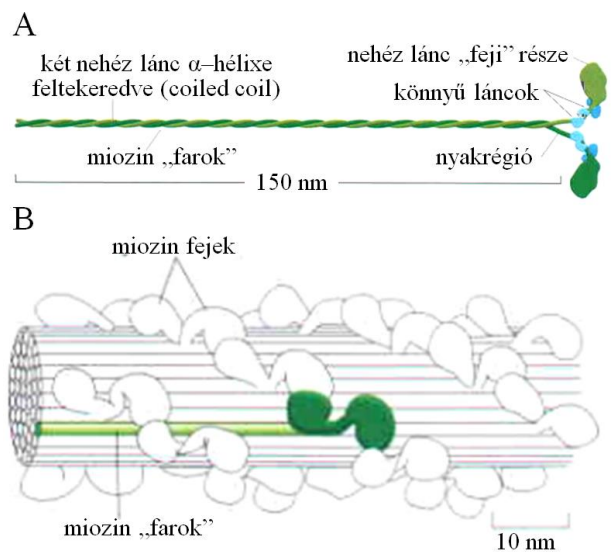
Az izomsejtekben különösen fontos a disztrofin jelenléte. Hiányában elpusztulnak az izomsejtek, elsorvadnak az izmok, és végül meghal az élőlény (21.17. ábra). (Az ismert emberi gének közül a disztrofint kódoló a legnagyobb: kb. 2,3 millió bázispárból áll.)



21.17. ábra. A disztrofin alapvető szerepet játszik az izomsejt kortikális aktinváza és a sejtközi állomány kapcsolatának biztosításában.

Az aktinváz és az aktinhoz asszociált motorfehérjék szerepe: alakváltozás, mozgás

Az aktinváz motorfehérjéi a miozinok. A miozinok döntő többsége úgynevezett plusz-vég motor: ATP elbontása közben az aktinszálon a plusz vég irányában csúsznak el. Jellemző képviselőjük a II. típusú (hagyományos) miozin, mely nagy mennyiségben fordul elő izmokban, de más sejtekben is. A molekula egy-egy nehéz láncból és két-két könnyű láncból álló komplex. A két nehéz lánc globuláris feji régiói és a hozzájuk asszociálódott könnyű láncok kötődnek az aktinpolimerhez, hosszú farki végeik egymás köré tekerednek, és más miozinmolekulák farki végeihez kapcsolódnak (21.18. ábra). A nem izom típusú sejtekben gyakori a miozin I. is, mely nem képez dimereket. Feji része ennek is az aktinszálnak kötődik, míg rövid farki része membránokhoz, vezikulákhoz kötődve azok szállítását végzi. A mikrotubulusokhoz hasonlóan az aktinvázhoz is kapcsolódhat mínusz-vég irányú motorfehérje, ilyen a miozin VI.

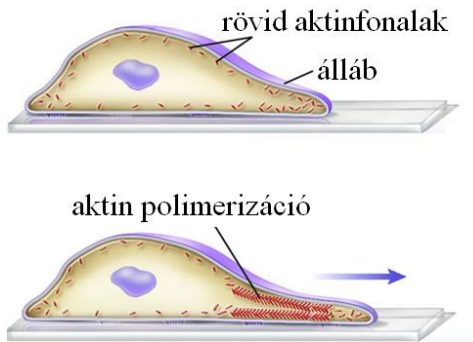


21.18. ábra. A: A miozin II szerkezete. Két miozin nehéz lánc (zöld) hosszú α -helikális C-terminálisa egymásra tekeredik, ez képezi a fark-régiót. A nehéz láncok globuláris N-terminális vége két-két könnyű lánc (kék) együtt alkotja a feji régiót, amely képes az aktin-kötésre és ATP-hidrolízisre is. **B:** A miozin II kötegekbe rendeződve, egy miozin zölddel kiemelve.

Az aktinváz közreműködésével történő alak- és helyváltoztatás kétféle mechanizmusra vezethető vissza: az állábak, nyúlványok segítségével történő amőboid mozgásra és az erre specializálódott izomsejtek által közvetített mozgásra.

Az amőboid mozgás

Az állábak képződését helyi, gyors aktin-polimerizáció okozza. Ezt tipikusan valamilyen inger, például kémiai anyag jelenléte váltja ki, melyet sejtfelszíni receptorok, például integrinek érzékelnek. A jel speciális kis G fehérjék közvetítésével nukleáló és polimerizációt gyorsító fehérjéket aktivál. A gyorsan növekvő aktinszálok tolják kifelé a plazmamembránt, a miozin ebben a folyamatban nem játszik szerepet (21.19. ábra). Ha a kitüremkedésbe mikrotubulusok is beépülnek, akkor a nyúlvány stabilizálódik. Így alakulnak ki például a neuronok hosszú nyúlványai.



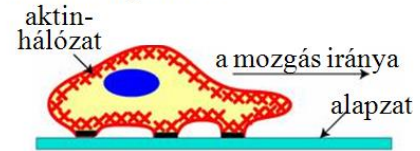
21.19. ábra. Az álláb kinyúlása az aktin polimerizációjának következménye.

A helyváltoztatáshoz már miozin közreműködése is szükséges. A mozgás során az álláb egyes pontjai letapadnak az aljzatra, és a tapadási pontok (*fokális adhézió*, lásd sejtkapcsoló struktúrák, 20. fejezet) között miozint is tartalmazó aktinkötegek képződnek. Ezek, a miozin jelenlétének köszönhetően kontrakcióra képesek és előrehúzzák a sejtet (21.20. ábra). Az aktin-miozin komplex kontrakciójának alapja hasonló az izomműködés során ismertetett mechanizmushoz, a miozinok elmozdítják egymáshoz képest a párhuzamosan rendeződött aktin filamentumokat (lásd később).

Kitapadás hiányában a kortikális váz egyenletes összehúzódása gömb alak felvételére készíti a sejtet. Ez figyelhető meg a keringésben levő fehérvérsejteken vagy az oldatban tartott szövettenyésztési sejteken.

Mind a sejtvándorlásnak, mind a nyúlványképződésnek fontos szerepe van az egyedfejlődés során a szöveti struktúrák kialakításában és az egyes szervek közötti kapcsolat létrehozásában is.

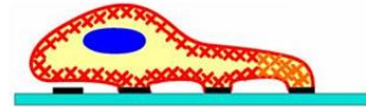
1. álláb-képződés



2. letapadás a mozgás irányában



3. elválás a „hátsó” élen



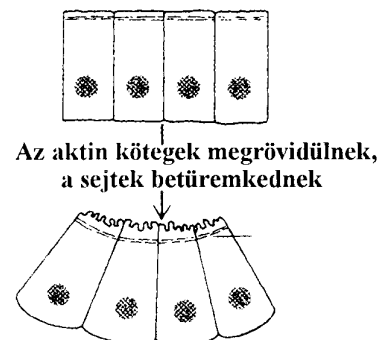
4. a sejttest mozgása



21.20. ábra. Az amőboid mozgás lépéseinek sematikus ábrázolása. Az álláb előrenyújtása után új tapadási pontok alakulnak ki (2.), míg a mozgás irányával ellentétes oldalon megszűnnek (3.). A sejttest előrehúzásához a sejtthártya alatti miozin-aktin együttes összehúzódik (4.)

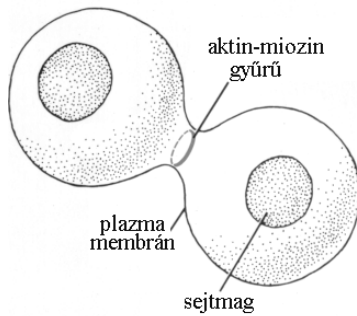
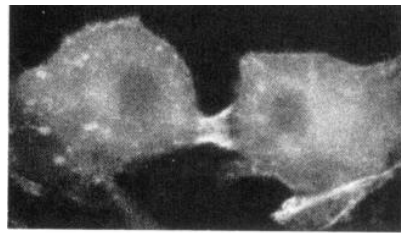
A sejtek alakváltozása

A mikrofilamentumok fontos szerepet játszanak a gasztruláció (bélcsírképződés) során is, amikor a hólyagcsíra sejteinek egy részében a felszín alatt körben, az adhéziós öv mentén elhelyezkedő mikrofilamentumok miozinok segítségével megrövidülnek, és ezek a sejtek a hólyagcsíra belsejébe türemkednek. Hasonló folyamat zajlik le később, a velőcső kialakulásakor is (21.21. ábra; lásd még 20.4. ábra).



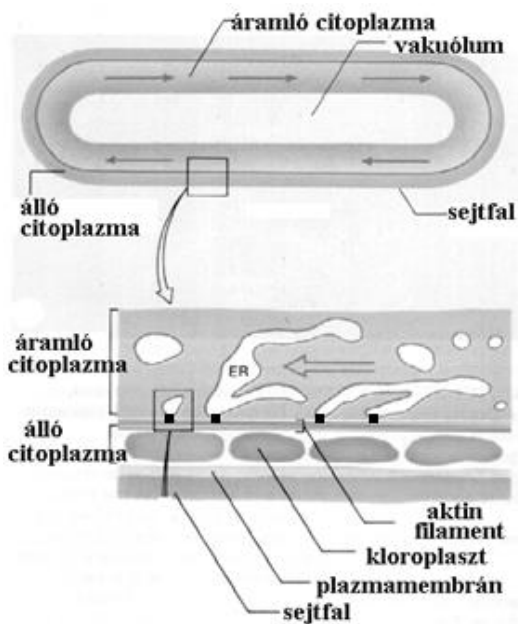
21.21. ábra. A gasztruláció alapja a felszín alatti, a sejtet gyűrűként belülről övező mikrofilamentumok megrövidülése a hólyagcsíra egyes sejteiben.

A leánysejtek elkülönülése a mitózis utolsó fázisában a sejthártya alatt gyűrűben elhelyezkedő aktin és miozin molekulák kölcsönhatása miatt bekövetkező befűződés eredménye (21.22. ábra).



21.22. ábra. A citokinézis egy aktinfonalakból és miozinokból álló gyűrű összehúzódásának segítségével következik be.

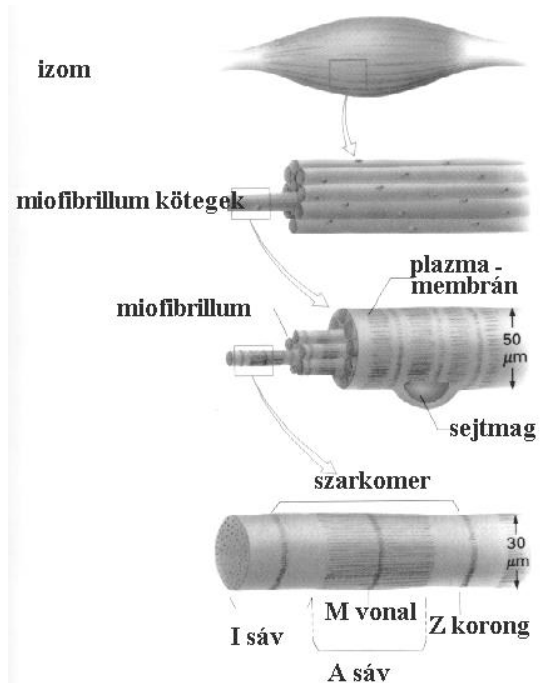
A citoplazma áramlását néhány növényfaj esetében mikrofilamentumok és az endoplazmatikus retikulum membránjába ágyazott miozinok kölcsönhatása biztosítja. Az áramlás a kloroplasztokban képződött szerves anyagok eljuttatását segíti a sejt minden részébe (21.23. ábra).



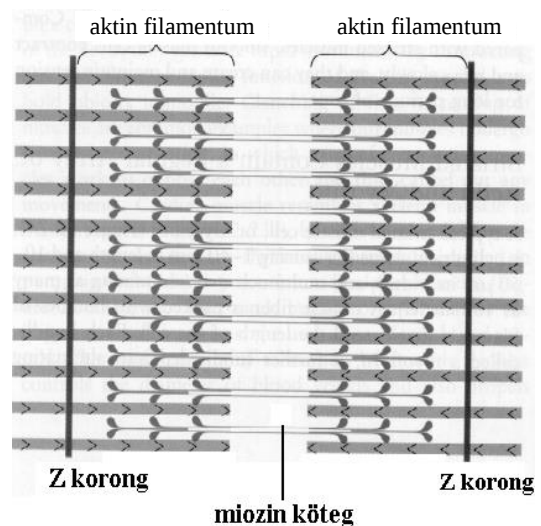
21.23. ábra. A citoplazma-áramlás alapja is a mikrofilamentumok és a miozin közötti kölcsönhatás. A fekete pöttyök a miozinokat jelölik, amelyek az endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolódnak, és a sejthártya alatti, stabil helyzetű aktin filamentumokon mozogva a membránrendszer mozgásával áramoltatják a citoplazma egyéb komponenseit is.

A harántcsíkolt izom működésének alapjai

Egy izom izomsejtekből, az izomsejt pedig izomrostocskák, miofibrillumok sokaságából áll (21.24. ábra). A miofibrillum (és az izom) alapvető szerkezeti és funkcionális egysége a szarkomer. A szarkomer két szomszédos Z-lemez közötti szakasz (a Z-lemezeket speciálisan szerveződött, aktinhoz asszociálódó fehérjék alkotják.) A Z-lemezhez csatlakoznak a Z-lemezre merőlegesen rendeződött aktinfonalak. Az aktin mikrofilamentumok közé illeszkednek a II. típusú miozinok kötegei (21. 18. és 21.25. ábra), úgy, hogy egy miozinköteg hat mikrofilamentummal tud kapcsolatot teremteni. Az izom összehúzódásának alapja a miozinkötegek araszoló elmozdulása a mikrofilamentumok mentén. Az araszoló mozgás során a miozin-nyalábok közelebb húzzák egymáshoz a Z lemezeket, ezáltal megrövidül a szarkomer, és sok szarkomer megrövidülésével összehúzódik a teljes izom.



21.24. ábra. Egy izom felépítése vázlatosan.



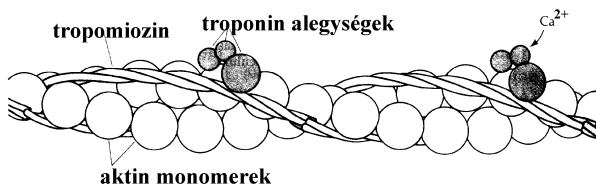
21.25. ábra. A mikrofilamentumok és a miozin nyálábok helyzete.

Az aktin filamentumok árkaiba fonalas szerkezetű, tropomiozin fehérjéből álló fonatok illeszkednek, nagy szakítószilárdságot biztosítva az aktin polimernek (21.26. ábra). Nyugalmi helyzetben a tropomiozin elfedi azokat a helyeket, amelyekhez a miozinok feji részei kapcsolódhatnak. Az együtteshez három alegységből álló troponin komplex is kapcsolódik.

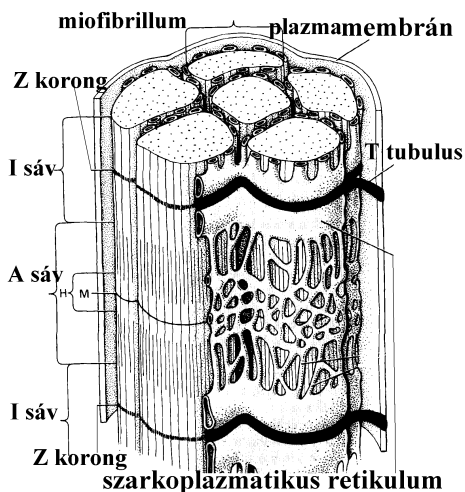
A miozin-kapcsoló helyek azután válnak szabaddá, miután a troponin szerkezete Ca^{2+} -kötés hatására megváltozik, és elmozdítja a tropomiozint a miozin kötőhelyéről. A Ca^{2+} -ionok a szarkoplazmatikus retikulumból (amely az izomsejt jellemző felépítésű endoplazmatikus retikuluma) szabadulnak ki, miután egy, az idegrendszerből eredő jel hatására az izomsejt membrán-potenciálja lecsökken. A jelet motoros idegsejtek „hozzák”, acetilkolint ürítenek a szinapszisba, és az izomsejt membránjában található, ioncsatornaként működő acetilkolin receptorok továbbítják (lásd 17. fejezet).

A membránpotenciál csökkenése a sejthártya betüremkedésein, az úgynevezett T csatornákon át továbbítódik a sejtek belsejébe (21.27. ábra). A membránpotenciál-csökkenés egy nem teljesen ismert mechanizmussal áttevéődik a szarkoplazmatikus retikulum membránjára, ahol hatására kinyílnak az ott található feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák.

A kiáramló Ca^{2+} -ionok hatására tehát elmozdul a tropomiozin. A miozinok fejrésze most kapcsolódhat a mikrofilamentumokkal, és ATP jelenlétében elkezdődhet az izom összehúzódása. Az izom összehúzódása akkor fejeződik be, amikor a Ca^{2+} -ionok pumpák működésének hatására visszakerülnek a szarkoplazmatikus retikulumba (21.28. ábra).



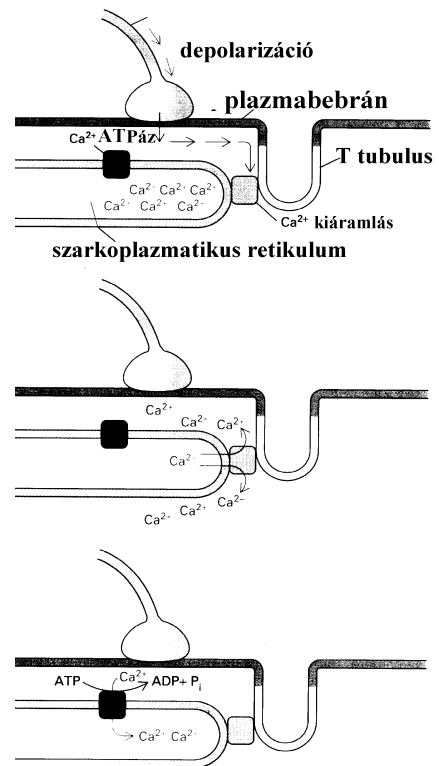
21.26. ábra. Az aktin, a tropomiozin és a troponin kapcsolata.



21.27. ábra. Egy izomsejt szerkezete sematikusan.

Az izom összehúzódásának fontosabb lépései a következők (21.29. ábra). Miután a Ca^{2+} -ionok felszabadítják az aktin filamentumok miozin-kötő helyeit, az ADP-vel kapcsolódó miozinok feji része kötődhet azokhoz. A kötődés után a miozin fejről leválik az ADP, és ennek hatására megváltozik a miozin konformációja, a miozin maga felé húzza az aktinfonalt. A következő lépésben a miozin ATP-vel kapcsolódik, ezután leválik az aktin filamentumról, és konformációja visszatér az kiindulási állapotba. A miozin az ATP-t gyorsan hidrolizálja, de az ADP a fejhez kötődve marad. Ekkor a rendszer készen áll egy újabb ciklusra (21.30. ábra).

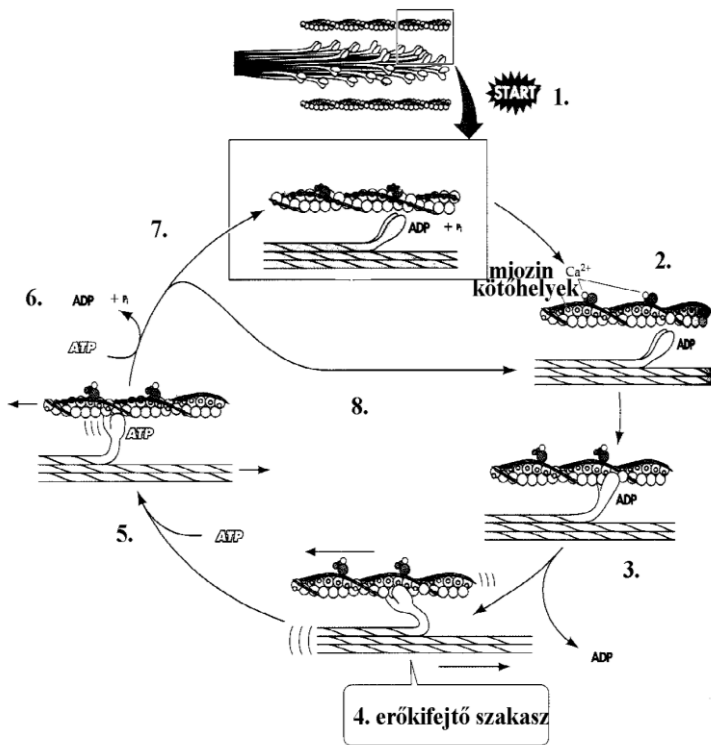
Az izom-összehúzódás alapja tehát nem más, mint Ca^{2+} -ionok jelenlétében a miozin-kötő „araszolása” a mikrofilamentumok mentén, ATP-ben tárolt energia rovására.



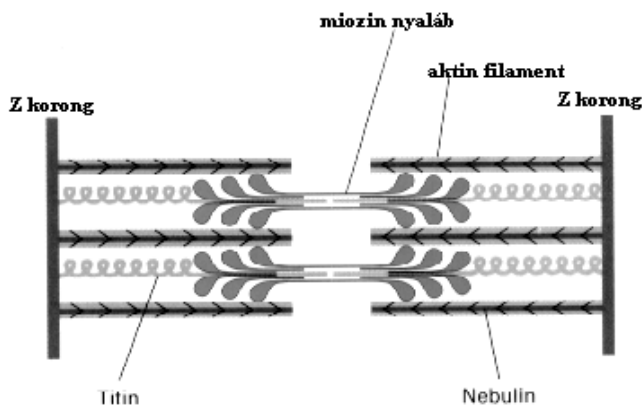
21.28. ábra. Az axonon érkező ingerület hatására a szarkoplazmatikus retikulumból Ca^{2+} -ionok ürülnek, majd pumpálódnak vissza a szarkoplazmatikus retikulumba.

Az ATP tehát az összehúzódot állapot megszüntetéséhez, a kiindulási állapotba való visszatéréshez szükséges. ATP hiányában az izmok összehúzódva maradnak. A jelenséget hullamerevségnek nevezik. A ciklusok addig ismétlődnek, ameddig Ca^{2+} -ionok vannak az izomsejt citoplazmájában.

A szarkomerek stabilitását és rugalmasságát olyan fehérjék is segítik, mint a titin és a nebulin (21.30. ábra). A titin az ismert legnagyobb fehérjék egyike: a molekula tömege 3×10^6 Da.



21.29. ábra. Az izom-összehúzódnás lépései. Magyarázat a szövegben.



21.30. ábra. A titin és a nebulin egy szarkomerén belül.

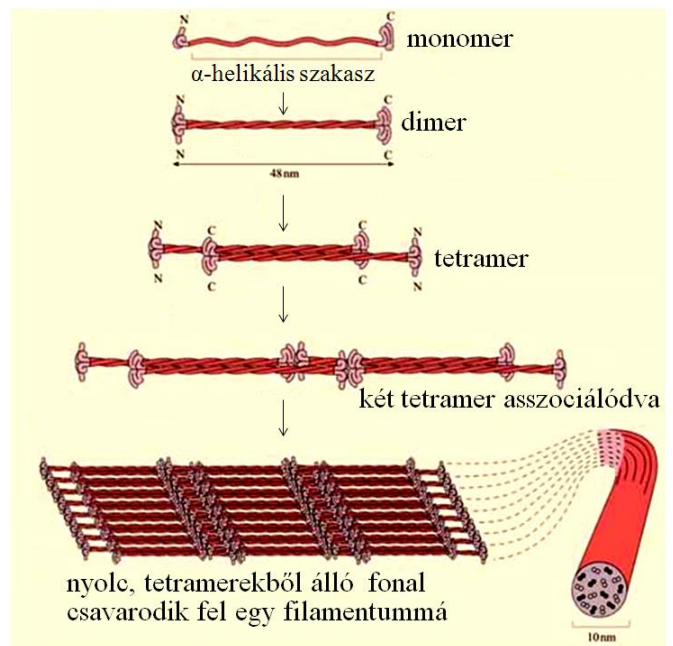
AZ INTERMEDIER FILAMENTUMOK

A sejtek belső vázának harmadik komponensét az intermedier fonalak (filamentumok) alkotják. A fonalak átmérője kb. 10 nm (vastagabbak, mint az aktin-fonalak, viszont vékonyabbak, mint a mikrotubulusok – innen ered az intermedier, vagyis „köztes” elnevezés), hosszuk több μm . Általában rendezetlen, az egész sejtet behálózó fonadékot alkotnak, melynek egyes részei különböző sejtkapcsoló struktúrákhoz rögzülnek (lásd 20. fejezet). Az intermedier fonalak nehezen átépülő, stabil vázszerkezetet hoznak létre, melyhez motorfehérjék nem kapcsolódnak.

Az intermedier filamentumok egyik csoportja, a sejtmag vázát alkotó *lamin* hálózat minden eukarióta sejt magjában megtalálható, de az aktin- és mikrotubuláris váztól eltérően, citoplazmatikus intermedier filamentumok nem minden sejtben fordulnak elő (hiányoznak például az izeltlábuak sejtjeinek citoplazmájából). A legváltozatosabb citoplazmatikus formák a gerincesekben találhatóak, itt az intermedier filamentumokat szövettípusonként eltérő fehérjék alkotják.

Bár a fonalakat alkotó fehérjék molekulatömegben, aminosav-szekvenciákban eltérnek egymástól, szerkezetük közös vonásokat mutat, ezért polimerjeik is hasonlóak. Minden molekulára jellemző, hogy középső része mintegy 310–350 aminosavnyi hosszú, pálcika formájú, α -helikális szerkezetű szakaszt tartalmaz. A polimerizáció során először dimerek, majd ezekből antiparallel orientációjú tetramerek, ezek további asszociációjából pedig a kb. 10 nm vastagságú fonalak alakulnak ki (21.31. ábra).

A polimerizációhoz nukleotidok nem szükségesek. Bár az intermedier fonalak általában stabilak, bizonyos körülmények között, például az osztódó sejtekben, mégis depolimerizálódnak. Ez kinázok hatására történik, melyek foszforilálják a fonalak fehérjéit, és ez vezet a polimer széteséséhez.



21.31. ábra. Az intermedier filamentumok polimerizációja. A tetramerek antiparallel elrendeződése miatt az intermedier filamentumoknak nincs belső irányultsága (a két vég egyenrangú).

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.

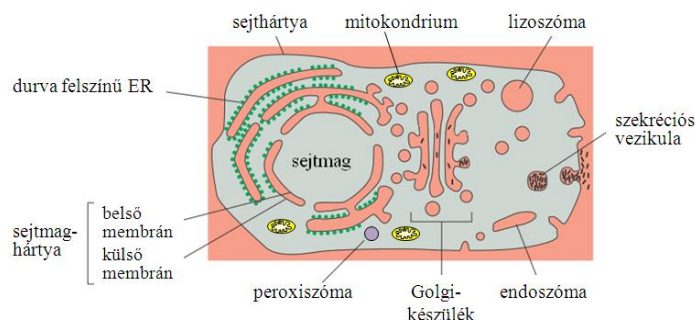
A kompartimentumok megjelenése a vitathatatlan előnyök mellett azonban nagy kihívást is jelent a sejt számára. Ismert, hogy valamennyi fehérje a citoplazmában található riboszómákon szintetizálódik. A sejtek tehát gondoskodnia kell valahogyan arról, hogy azok, de csakis azok a fehérjék, amelyek egy adott 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).

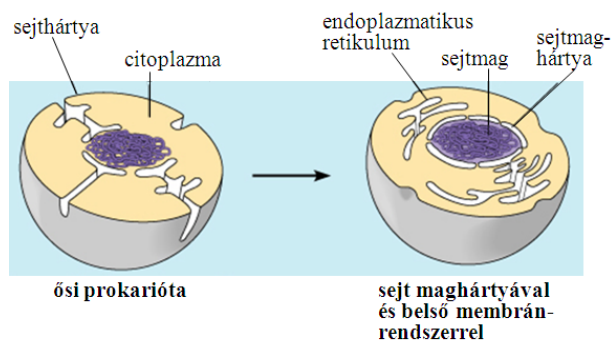
Azt, hogy egy fehérje milyen módon kerülhet rendeltetési helyére, az határozza meg, hogy a szintézis helyének tere (a citoszol) egyenértékű-e, *ekvivalens-e* a célszervecske terével. Ebből a szempontból meg lehet különböztetni topológiailag ekvivalens tereket (például citoszol – sejtmag, endoplazmás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

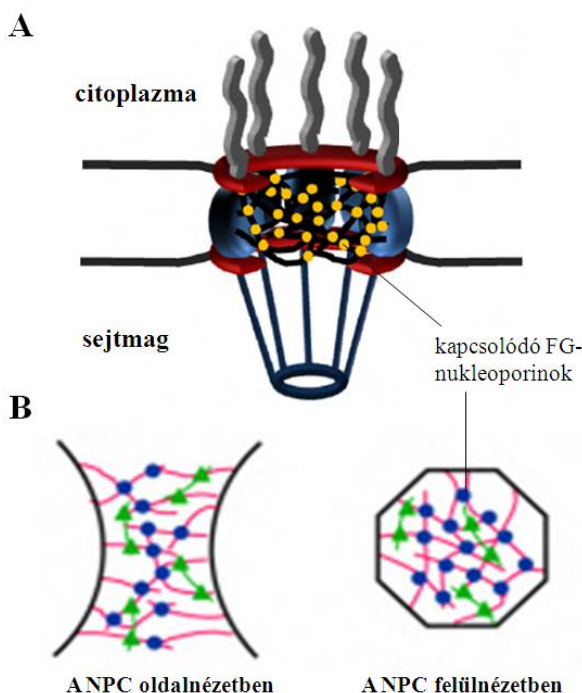
A SEJTMAGI TRANSPORTFOLYAMATOK

Közeledés 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, gélszerű 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 gélszerű, térhálós szerkezet. Kékkel az FG-szigetek közötti hidrofób kapcsolatok, zölddel a háló átrendezése, ezáltal a póruson való átjutásra képes nagyobb molekulák vannak jelölve.

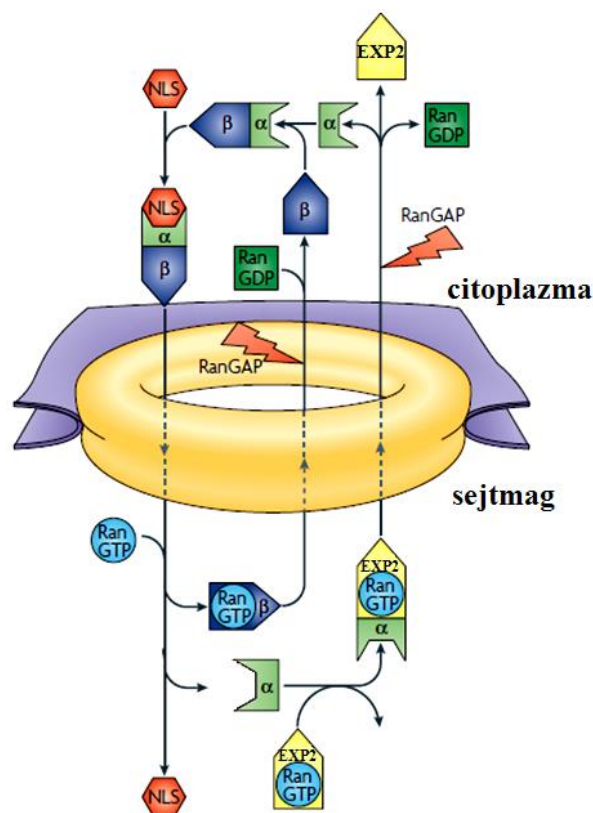
A másik kérdés pedig az, hogy mi lehet a jel, amelynek hatására a sejtmagi fehérjék rendeltetési helyükre jutnak, és mi az a mechanizmus, ami ezt lehetővé teszi számukra?

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 aranyszemcsére 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.

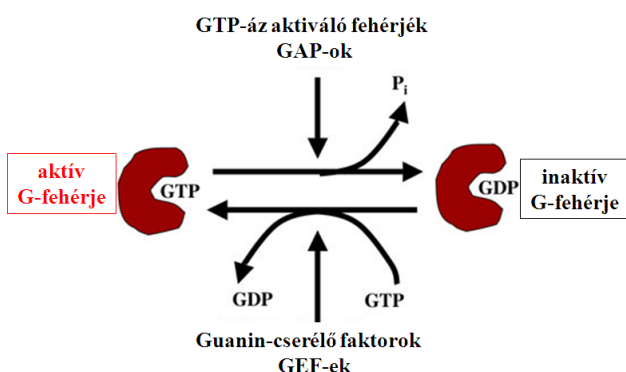
Az NLS-t tartalmazó fehérjét receptor szállítja a citoplazmából a sejtmagba, amely legtöbbször az *importin β* (*karyopherin β*) fehérjék családjába tartozik. A legelőször felderített és legtöbbet tanulmányozott klasszikus importfolyamat során egy közvetítő, adapter fehérje is szerepet játszik: ez az *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) serkentetik. 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 sejtből 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.

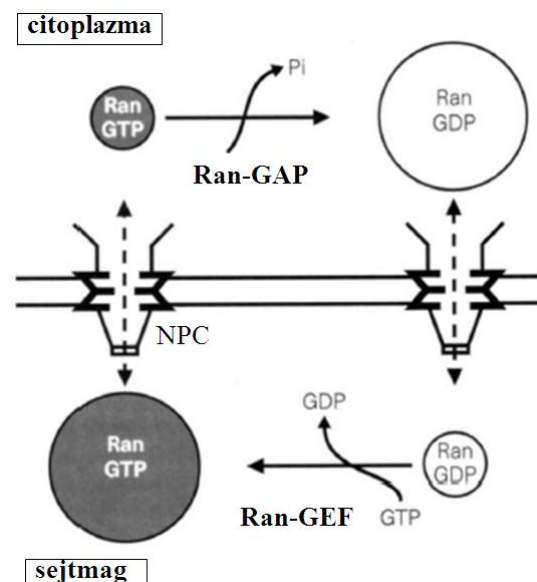


18.5. ábra. A G-fehérjék GTP-kötött állapotban aktívak, amit GAP-ok és GEF-ek befolyásolnak.

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.

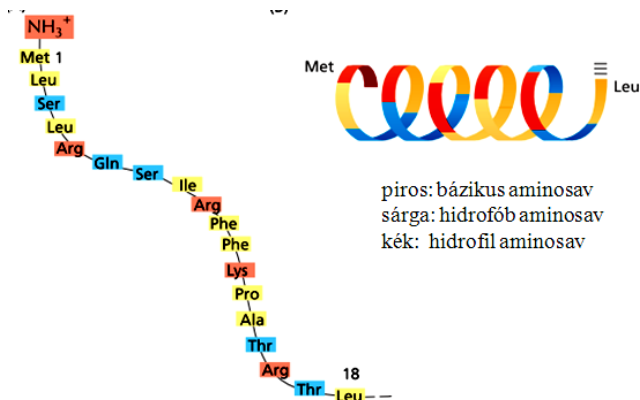
Az importmechanizmus folytonossága érdekében alapvető, hogy a szállítást lebonyolító fehérje visszakerülhessen a citoplazmába. Az importin β RanGTP-kötött állapotában is ugyanúgy, minden irányítottság nélkül mozog az NPC környékén az FG-nukleoporinokhoz kapcsolódva. Azonban a citoszolikus oldalon kölcsönhatásba 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 szállító 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).

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 organelleknek, 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 fehérjeinek 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.

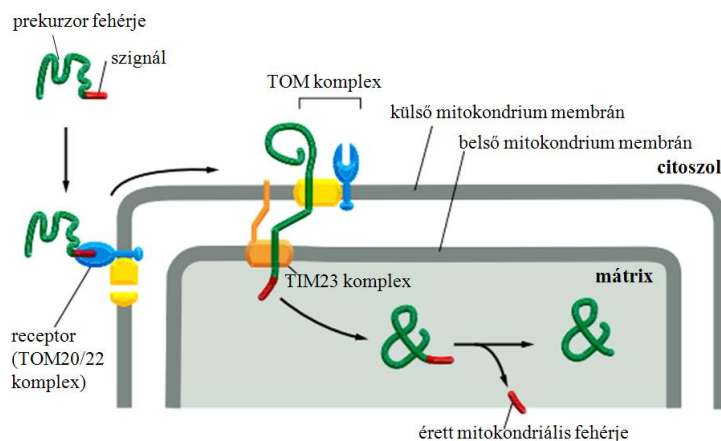


18.8. ábra. A mitokondrium mátrixába irányító N-terminális szignál szerkezete (A citokróom c oxidáz IV alegységének szignál-szekvenciája).

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

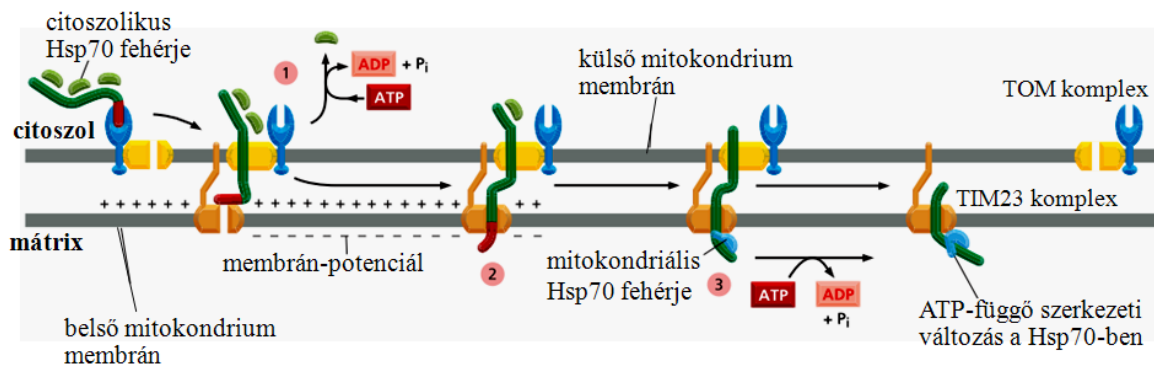
(translocon of the inner membrane) rövidítik. Az N-terminális mátrix-jel a külső membránban elhelyezkedő receptorkomplex (TOM20/22) érzékeli, és az ily módon „megfogott” fehérjét átjuttatja a szomszédos TOM40 transzlokátorhoz, amely a külső membránt átívelő csatorna-komplex (18.9. ábra). Bebizonyosodott 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 hő sokk-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, kitekert 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 dajkafehérjék segítségével – felveszi normális térszerkezetét.

TRANSPORT AZ ENDOPLAZMATIKUS RETIKULUMBA

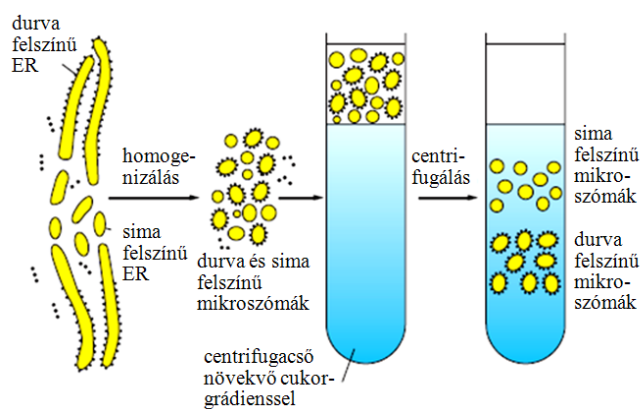
Valamennyi sejt juttat fehérjéket a környezetébe, soksejtű szervezetekben pedig találhatóak olyan sejtípusok, amelyeknek ez a fő feladata. Ezek az úgynevezett kiválasztó vagy szekréciós sejtek kiválóan alkalmasak voltak a fehérjéket a sejten kívülre szállító apparátus megismerésére és vizsgálatára, miután 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.

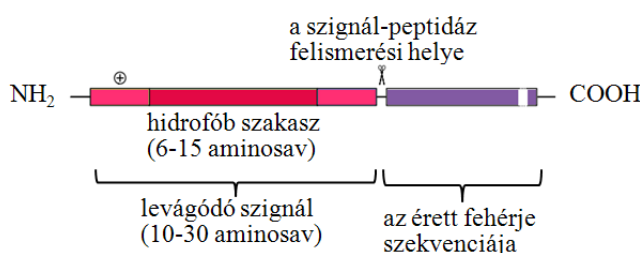
Az ER-be történő fehérjetranszport vizsgálatát nagyon megkönnyítette, hogy ez a sejtalkotó - annak ellenére, hogy teljesen behálózza a citoplazmát - egyszerűen izolálható. A sejtek homogenizálása során ugyanis kicsi, nagyjából egyforma méretű vezikulákba, az úgynevezett *mikroszómák*ba oszlik szét, amelyeket 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.

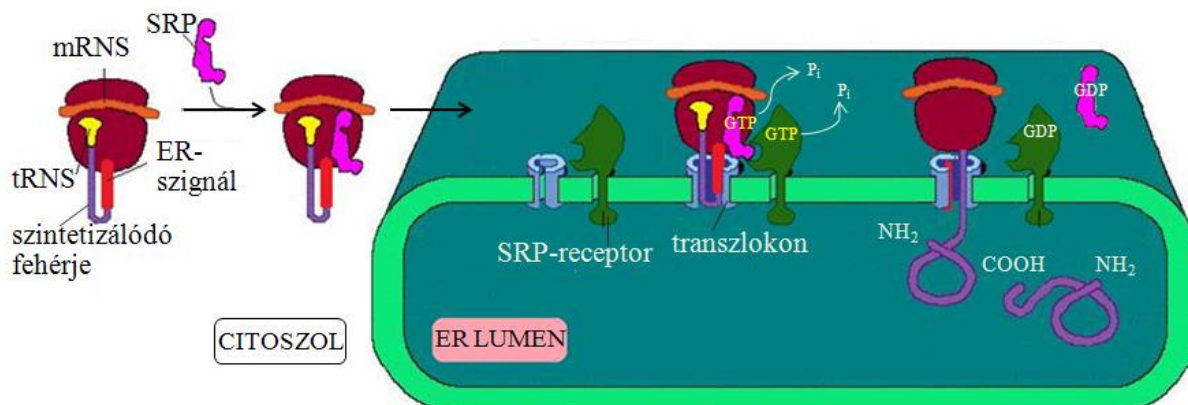
A fehérjék útja az endoplazmatikus retikulumig

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.

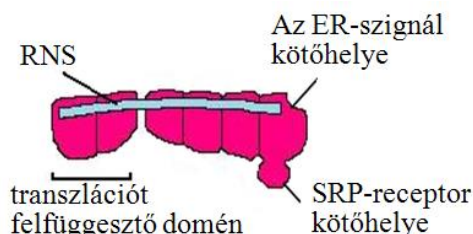
A kísérletek során az is kiderült, hogy a fehérjék teljes szintéziséhez szükséges a mikroszómák jelenléte; sőt, a transzláció az első kb. 70 aminosavnyi fehérjérszlet szintézise után a mikroszómák felszínén folytatódik, egyenesen a belső térbe (valójában ekkor még csak körülbelül az első 30-40 aminosav 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.

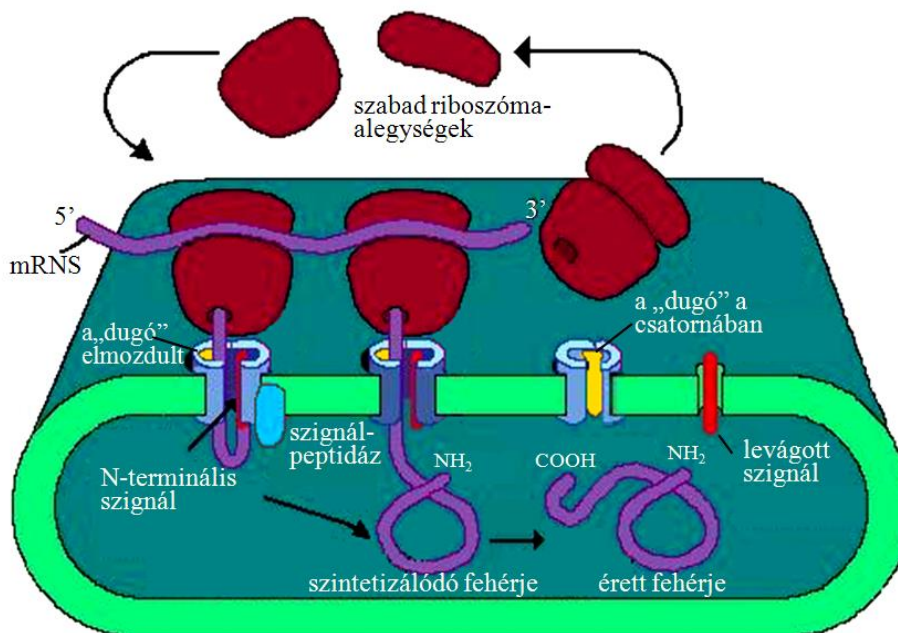
Ahogy a citoszolban zajló transzlációs folyamat, úgy az ER-kötött fehérjeszintézis is történhet poliriboszómákon. Az átíródo mRNS végig az ER felszínén lokalizálódik, de pozíciója folyamatosan változik. Az egymás közelében lévő transzlokonokon elhelyezkedő riboszómák között adódik „kézről kézre”, mint 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” felrecsúszásához. 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).

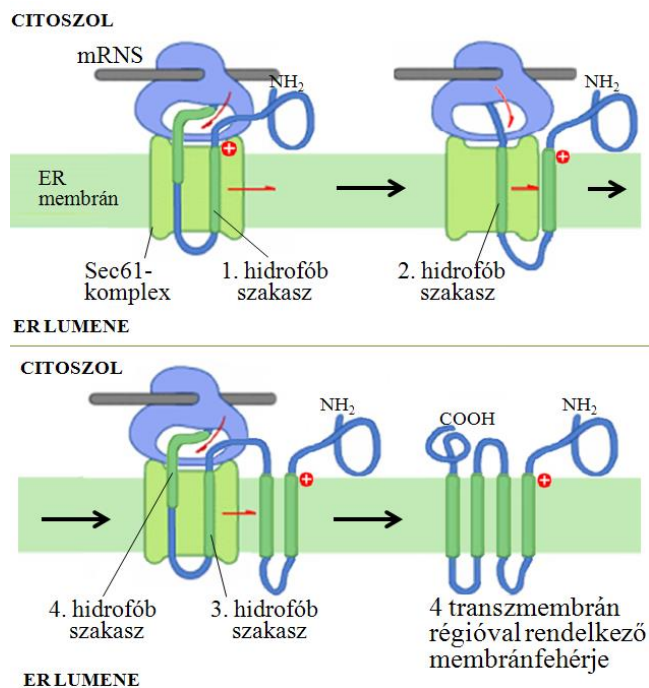
A mikroszómákkal végzett *in vitro* kísérletek alapján magához a póruson való átjutáshoz elegendő a fehérje szintéziséhez felhasznált energia. A riboszóma felől folyamatosan növekvő peptidlánc így magától „beletolódik” a csatornába.

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.

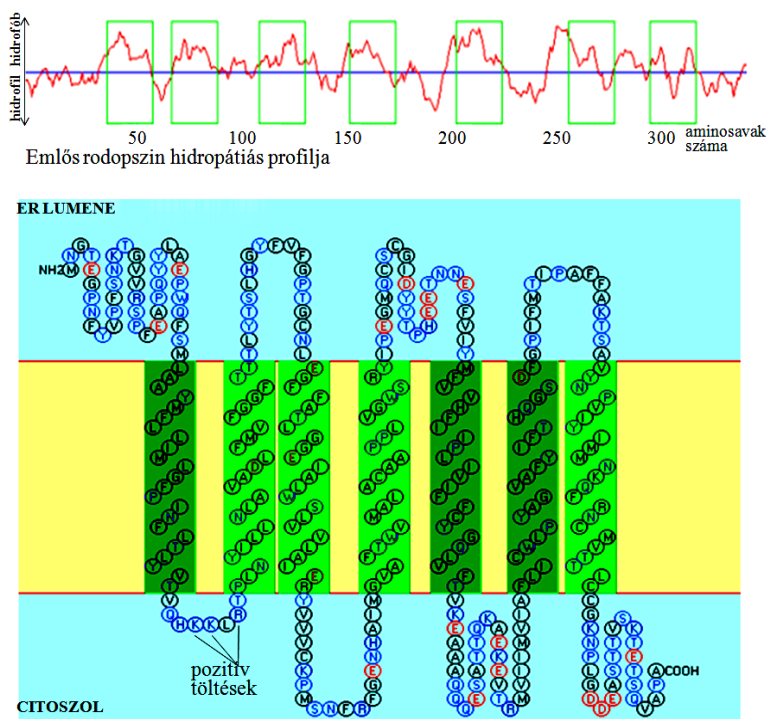
Amint a fehérje belsejében lévő hidrofób szekvencia áthalad a Sec61 komplex pórusán, a transzlokon oldalsó, a lipidrétegbe vezető „kapuja” kinyílik, ugyanúgy, ahogyan a vízdékonny fehérjék levágódó N-terminális szignáljának hatására (18.15. ábra). A transzmembrán domén azonban nem vágódik le, rögzíti 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 töltéstöbblet. 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 hidrofíl 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 üreghrendszerükben 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.

19. TRANSPORTFOLYAMATOK II. VEZIKULÁRIS TRANSZPORT

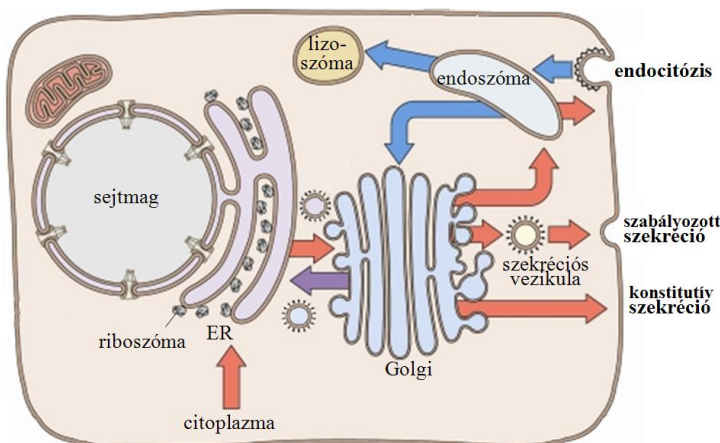
A vezikuláris transzport alaplépései: lefűződés, vándorlás, fúzió; a folyamatokban szerepet játszó fehérjecsaldók. A szekréciós út: az endoplazmatikus retikulumtól a sejtthártyáig. Lizoszomális fehérjék transzportja. Endocitózis: a folyamat állomásai.

Készítette: Lippai Mónika

BEVEZETÉS

A sejtben belüli transzportfolyamatok egy meghatározó hányada membrán-határolt hólyagocskák, vezikulák közvetítésével zajlik. Az endoplazmatikus retikulum (ER), a Golgi-készülék, az endoszómák és a lizoszómák - az úgynevezett endomembrán rendszer tagjai - egymás és a plazmamembrán közötti anyagforgalma valósul meg így. A vezikuláris transzporttal összekapcsolt, membránnal határolt terek szigorúan elkülönülnek a citoszoltól, egymással azonban topológiai szempontból egyenértékűek (lásd 18.1. ábra). Ez nem is lehet másképp, hiszen a vezikulák lefűződése és fúziója sokkal szabadabb vízzoldékony és membrán-kötött anyagáramlást tesz lehetővé, mint a nem-ekvivalens terek közötti forgalmat biztosító, jól zárható csatornák (például az ER-be vezető transzlokon). Ugyanakkor az endomembrán rendszer különböző kompartmentjei funkció szempontjából világosan elkülönülnek, mert membránjuk összetétele és beltartalmuk is különbözik.

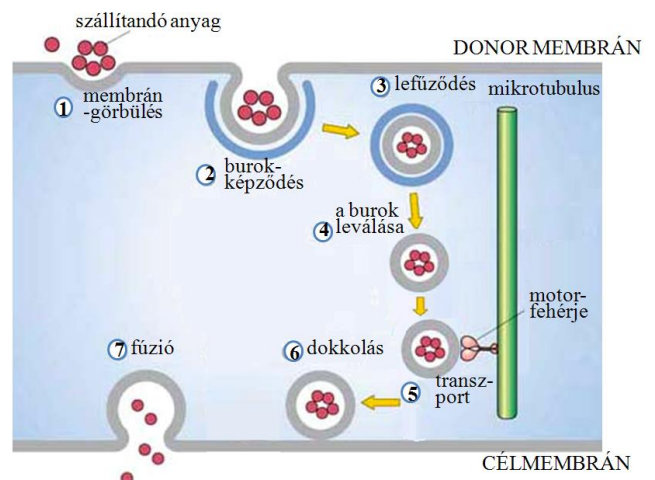
Az ER-től kiinduló és a Golgi-készüléken keresztülhaladó vezikuláris transzportot *szekréciós útnak* nevezik, a sejtben kívülre juttatott fehérjéket pedig *szekréciós fehérjéknek*. Ugyanakkor a szekréciós útvonalat „használgják” a sejtet el nem hagyó, a Golgi-készülék különböző tereibe, a lizoszómákba vagy az endoszómákba irányított, ott működő fehérjék is. A plazmamembrán felől lefűződő vezikulák pedig az *endocitotikus útvonalon* haladnak végig, és szállítanak molekulákat a lizoszómába, vagy reciklizáció révén vissza a plazmamembránba (1. ábra).



19.1. ábra A sejtben működő fő vezikuláris útvonalak. Piros nyíl: anyagforgalom a plazmamembrán irányába (szekréciós út); kék nyíl: endocitotikus útvonal; lila nyíl: Golgi-ER retrográd transzport

A vezikuláris anyagtranszport irányait, állomásait és a benne résztvevő molekulákat az 1960-as évek óta kutatják. A kutatások egy része az úgynevezett pulse-chase módszeren alapult, amelynek során rövid ideig (régábban radioaktívan) jelölt aminosavakat juttattak szekréciós sejtekbe, és követték a szintetizálódott – elsősorban kiválasztásra kerülő – fehérjék sorsát. Ezt az utóbbi húsz évben kiegészítette a GFP riporterfehérjével fuzionált fehérjék lokalizációjának vizsgálata.

A vezikulák lefűződése a donor membránról, vándorlása a sejtben és fúziója a következő állomás membránjával természetesen szigorúan szabályozott. Bár az endomembrán rendszer elemei között óriási számban találhatunk méretre teljesen egyformának tetsző hólyagocskákat, ezek molekuláris összetétel szempontjából különböző identitással bírnak, amit a membránjukban található jelölő, úgynevezett markermolekulák különböző kombinációi biztosítanak. Hiszen minden egyes vezikulának pontosan „tudnia kell”, már születése, azaz a lefűződés során, hogy hová tart; ugyanúgy, ahogy egy kompartmentnek is tudnia kell, mely vezikulákkal lehet fuzionálnia, és melyekkel nem. Ugyanakkor a lefűződés, a felismerés és a fúzió mechanizmusa ugyanarra a sémára íródott (19.2. ábra), az egyes folyamatokban résztvevő molekulák egy családba tartoznak, vagy funkciójukban igen hasonlóak.



19.2. ábra Két membránfelszín közötti vezikuláris transzport általános lépései

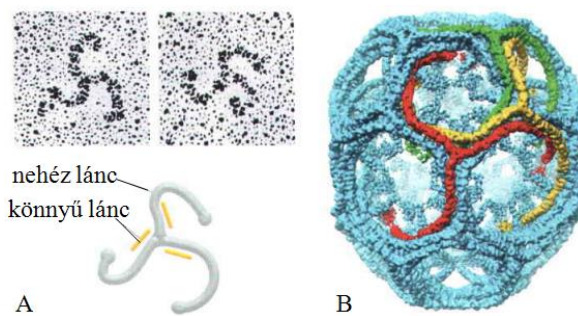
Ez a fejezet összefoglalja mindazokat az ismereteket, amelyek a vezikuláris transzport lépéseit, a szekréciós és az endocitotikus útvonalat általánosan jellemzik.

A VEZIKULÁRIS TRANSZPORT

A vezikulák lefűződése

Hogyan jöhet létre egy lefűződő hólyagocskák? Hiszen ennek során a donor membrán – bármi is legyen az – egy kis területe másképp kezd el viselkedni, új sorsot kezd követni, nyilvánvalóan valaminek meg kell változnia az eredeti összetételhez képest.

Ennek látványos, akár fénymikroszkópban is jól látható eleme a membrán citoszolikus oldalán kezdődő burokképződés, amelyben speciális, a membrán görbülését elősegítő burokfehérjék vesznek részt (lásd 19.20. ábra). Ezek különböznek az eltérő irányokba közlekedő vezikulákon. *COP-II* típusú burok (*COP*: coat protein) alakul ki az ER-től a Golgi-készülék felé irányuló anterográd (előre haladó) transzportban. *COP-I* típusú jön létre a Golgi-készülék felől az ER felé és a Golgi-készülék egyes ciszternáiból visszafelé haladó, úgynevezett retrográd transzport során. *Klatrin* veszi körbe a többi irányban haladó vezikulák többségét – ezek a leggyakoribb és legismertebb burokfehérjék. Ezek a burkok alapegységeik szabályos összeilleszkedésével egységes kosárszerű képet mutatnak (19.3. ábra).

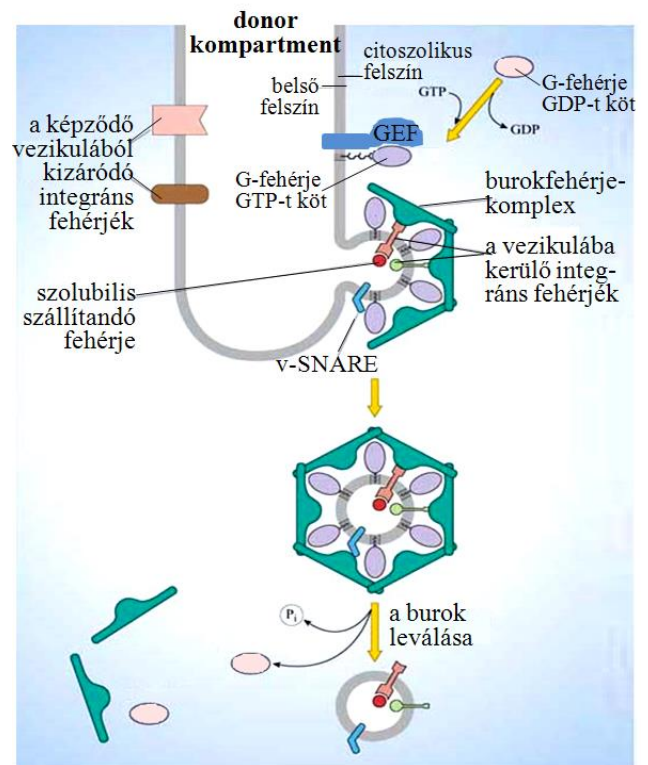


19.3. ábra. **A:** A klatrinburok alapegysége 3-3 könnyű és nehéz láncból áll, elektronmikroszkópban is láthatóan háromágú szerkezet. **B:** Az összeszerelődött klatrin-burok képe, három alapegység ki van emelve.

Ugyanakkor a lefűződést kiváltó folyamat a burok kialakulásánál korábban kezdődik, és a főszerepet GTP-kötő kis G-fehérjék (az előző fejezetekben már megismert Ras-hoz és Ran-hoz hasonló, kapcsolóként működő GTP-ázok) játsszák benne. Emlékeztetőül: a kis G-fehérjék a sejt számos életfolyamatában központi szerepet játszó molekulák. Aktivitásuk a GTP jelenlétéhez kötött, amelynek GDP-vé hidrolízisét GAP-ok (GTP-ase activating protein), a GDP GTP-vé cserélését a GEF-ek (guanine exchange factor) serkentik. Ily módon a GAP-ok a kis G-fehérjék aktivitásának kikapcsolásában, a GEF-ek pedig bekapcsolásában vesznek részt. A különböző burkok kialakulásában különböző kis G-fehérjék játszanak szerepet. Közülük több tucatnyit azonosítottak eddig emlősökben.

A vezikula-képződés kezdetén a donormembrán egy kis területén aktiválódnak a megfelelő GEF-ek, melyek integráns membránfehérjék. Aktiválódásukhoz valószínűleg a kompartmentből elszállítandó „rakomány”, „cargó”-molekulák jelenléte és membránreceptorhoz kötődése vezet, amely változást idéz elő a receptor szerkezetében és hozzájárul a GEF-ekkel történő interakcióhoz. Az aktív GEF odavonzza a GDP-kötött, inaktív formájában szolubilis kis G-fehérjét, és elősegíti a GDP-GTP cserét. Ennek hatására a G-fehérje konformáció-változáson esik át, felszínére kerül hidrofób N-terminálisa, ezáltal a

donormembrán citoszolikus felszínére horgonyzódik (19.4. ábra).



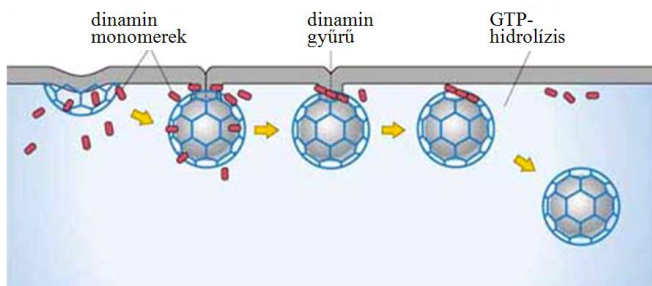
19.4. ábra. Kis G-fehérjék szerepe a burok képződésében és leválásában. GEF: guanine exchange factor. A v-SNARE a célmembránnal történő fúzióban szerepet játszó fehérje (lásd később).

A donormembránba lokalizálódott aktív kis G-fehérje kezdi aztán kölcsönhatásai révén maga köré gyűjteni mindazokat a fehérjéket, amelyek 1) szükségesek a membrán görbítéséhez, 2) további oldott és membránfehérje „cargó”-t kötnek meg, és 3) hozzájárulnak a vezikula identitásához, azzal, hogy meghatározzák a leendő célállomást is (19.4. ábra). A fogadó kompartment membránjával történő fúzióhoz nélkülözhetetlen az úgynevezett SNARE (SNAP receptor) fehérjecsalád, közülük a v-SNARE-k a vezikulák, a t-SNARE-k a cél- (target) membrán felszínén vannak, szerepüket részletesebben később tárgyaljuk. Ugyanígy, már ekkor beépülnek egy másik kis GTP-áz családba, a *Rab*-ok GEF-jei, szintén a fúzió bemutatása során lesz róluk szó.

A burokfehérjék membránhoz vonzásában nemcsak a kis G-fehérjék, hanem lipidkomponensek is szerepet játszanak. A membránban található foszfatidil-inozitrolra kerülő foszfátcsoportok különböző kombinációi az endomembrán rendszer más-más tagján jönnek létre, így a fehérje-összetevők mellett lipidek is részt vesznek a membránok identitásának kialakításában. Például a plazmamembrán jellegzetes alkotója a foszfatidil-inozitol 4,5 bifoszfát ($PI(4,5)P_2$), amelynek jelenléte szükséges a klatrinburok kötődéséhez, így az endocitózis első lépéseire.

A membránhoz kötődött burokkfehérjék között egyfajta polimerizáció következik be. Ahogyan számuk növekszik a donormembrán egy területén, szerkezetükből adódóan fokozzák a membrán görbülését, végül kialakul a buroktípusra jellemző méretű hólyagocska.

A vezikula leválását a *dinamin* nevű motorfehérje teszi lehetővé. Sok dinamin spirálszerűen körbeveszi a nyakrégiót, GTP-hidrolízis hatására megnyújtva, majd elszakítva a nyakat a donormembrántól. Először a legintenzívebben kutatott klatrin-burkos vezikulák lefűződésével kapcsolatban azonosították, ma már úgy gondolják, hogy a dinamin, vagy dinamin-szerű fehérjék minden vezikula leválásánál jelen vannak (19.5. ábra).



19.5. ábra. A dinamin szerepe a vezikula leválásában. A dinamin monomerek oligomerizálódnak a formálódó vezikula „nyaka” körül. GTP-hidrolízis hatására szerkezetük megváltozik, összehúzzák a nyakat és kiváltják a rendkívül közel kerülő lipidrétegek fúzióját.

A burok elvesztése és a vezikulák transzportja

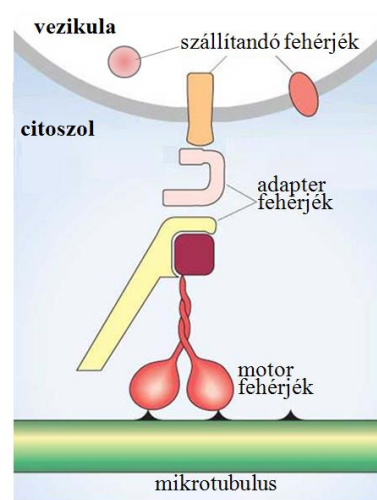
Lefűződés után a vezikula gyorsan elveszti burkát. Ez igen fontos lépés, hiszen így kerülhetnek felszínre azok a - még a képződés során a membránba integrálódott - komponensek, amelyek a sejt váz mentén történő vándorlást és a fúziót is lehetővé teszik.

A kis G-fehérjék saját belső GTP-áz-aktivitással bírnak, ezért egyfajta időzítőként működhetnek. Ha hidrolizálják GTP-jüket, membránnal való kapcsolatuk meggyengül, ismét a citoszolba kerülnek. A burokkfehérjék a kis G-fehérjék hiányában szintén elvesztik affinitásukat a membránfelszínhez és a citoszolba távoznak (19.4. ábra).

A lefűződött vezikulák vándorlása a sejt váz mentén történik, motorfehérjék vesznek részt benne (19.6. ábra). A megfelelő motor kiválasztása a vezikula membránösszetételében van kódolva. Tehát a vezikulák membránjának egyedi fehérje- és lipidmintázata nemcsak a fúziót, hanem már a sejten belüli mozgás irányát is meghatározza.

A vezikulák fúziója

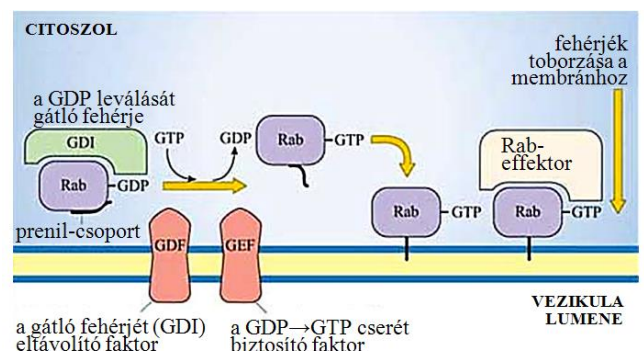
Egy küldemény szállításának lebonyolítása sem végződhet sikeresen a pontos cím ismerete vagy a kézbesítéshez szükséges apparátus nélkül. Ahogy a Bevezetés is említi, a vezikulák membránja olyan



19.6. ábra. A különböző motorfehérjék a szállítandó vezikula felszínének egyes fehérjeihez - sokszor adapterek közvetítésével - kötődnek. A vezikula membránösszetétele határozza meg a kapcsolódó motorfehérje minőségét, és így a szállítás irányát is.

molekulákat tartalmaz, amelyek együttes kombinációja szükséges és elegendő mind a célfelszín felismeréséhez, mind a folyamat „technikai” részéhez, a két membrán egyesüléséhez. A lefűződés után a burokkfehérjék leválása azt a célt is szolgálja, hogy a vezikula ezen membránfehérjei is a felszínre jussanak, és elvégezhessék feladatukat.

A vezikulákkal zsúfolt citoszolban a fúzióra alkalmas felszínnek nagy specificitással kell egymást felismerniük. Ebben ismét kis G-fehérjék egy csoportja, az úgynevezett *Rab*-ok (szintén Ras-rokon fehérjék) játszanak döntő szerepet, amelyek GDP-kötött formájukban a citoszolban vannak, fogva tartják őket specifikus inhibitoraik. A burokkfehérjék távozása után előtérbe kerülő faktorok segítségével a GTP-kötött *Rab* szintén a membrán citoszolikus felszínéhez rögzül. Ugyanis - a lefűződést segítő kis G-fehérjékhez hasonlóan - egy lipidhorgony, a *Rab*-ok esetében egy C-terminálshoz kapcsolódó prenil-csoport kerül olyan helyzetbe, hogy alkalmassá válik a membránba ékelődésre (19.7. ábra).



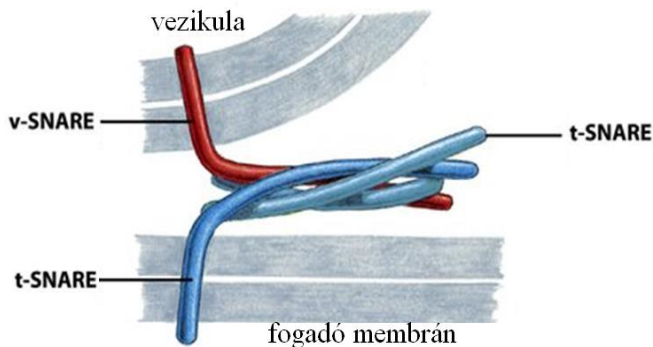
19.7. ábra. A *Rab*-ok aktiválódása. GTP-kötött aktív formájukban sokféle fehérjét (specifikus *Rab*-effektorokat) toborozhatnak a felszínre. GDI: GDP dissociation inhibitor; GDF: GDI-displacement factor; GEF: guanine exchange factor.

Az aktív Rab-ok sokféle folyamatban szerepet játszó fehérjével léphetnek kölcsönhatásba, ezeket gyűjtőnéven *Rab-effektoroknak* nevezik (19.7. ábra). Emberben eddig körülbelül hetven különböző Rab-fehérjét azonosítottak, ők alkotják a legnépesebb kis G-fehérje alcsaládot. Rab-ok szükségesek a fúziót lebonyolító SNARE-k működéséhez is.

A sikeres fúzió után, „dolguk végeztével” a Rab-ok hidrolizálják GTP-jüket, kiszabadulnak a membránból és újra a citoszolba kerülnek.

A membránfúziót a már említett SNARE-k bonyolítják le, amelyek mechanikai szerepükön kívül részt vesznek a megfelelő donor-és célmembrán azonosításában is. Ezzel összefüggésben szintén népes fehérjecsalsádról van szó: több mint hatvan tagját izolálták eddig. A vezikula membránjában a v-SNARE-k, a célmembránban pedig komplementer partnereik, a t-SNARE-k lokalizálódnak. Ha a komplementer v- és t-SNARE-k egymás fizikai közelségébe kerülnek, α -héliceik egy stabil közös köteget, a transz-SNARE komplexet hozzák létre (19.8. ábra).

Az α -hélixek feltekeredése olyan közelségbe hozza a két membránfelszínt, hogy még a vízmolekulák is kiszorulnak a két lipidréteg közül. Ekkor egyes lipidmolekulák átvándorolhatnak egyik citoszolikus lipidrétegből a másikba, és még részleteiben nem teljesen tisztázott módon a két membrán egyesül. A transz-SNARE komplex létrejötte energetikai szempontból rendkívül kedvező, olyannyira, hogy önmagában biztosítja azt a nem kevés energiát, amely a membránok fúziójához szükséges.

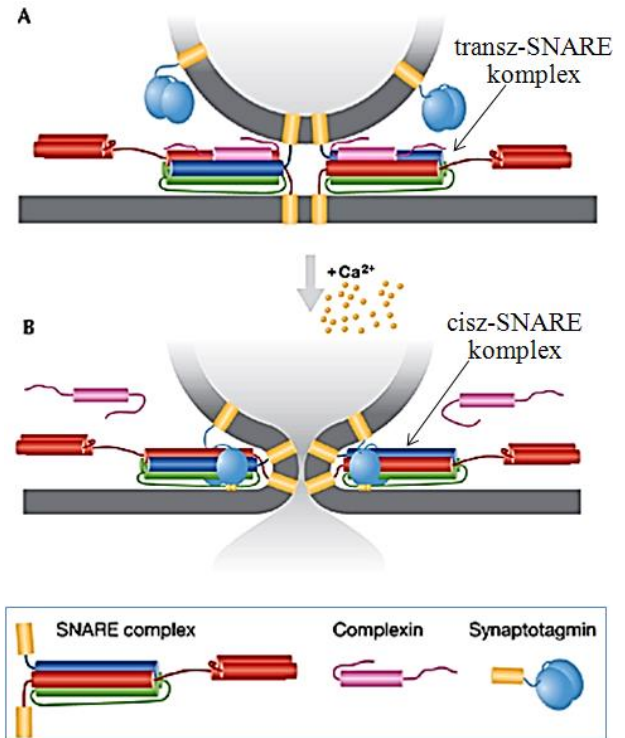


19.8. ábra. A v-SNARE és a t-SNARE-k stabil komplexet alakítanak ki, megfelelő közelségbe hozva így a vezikula és a célmembrán lipidrétegeit.

A fúzió azonos identitású membránok között is bekövetkezhet. Ekkor azonos v-, illetve a nekik megfelelő t-SNARE-komplexek találhatók mindkét membránfelszínen, szimmetrikusan. Ez a folyamat a *homotipikus fúzió*, míg az eltérő kompartmentek között *heterotipikus fúzió* jön létre.

A fúzió nem mindig következik be a komplementer SNARE-k interakciója után. A szabályozott szekréció esetében a befejezéshez egy külső jel is szükséges. A legtöbbet tanulmányozott membránfúziós esemény, a

szinaptikus vezikulák exocitózisa során egy részlegesen összeszerelődött transz-SNARE komplex jön létre, a fúzió befejeződéséhez pedig a külső jel az axon-terminálison bekövetkező Ca^{2+} -beáramlás biztosítja, amely az exocitózishoz szükséges Ca^{2+} -függő fehérjéket aktiválja (19.9. ábra).



19.9. ábra. Az idegsejtek axonvégződéseiben összeszerelődik a transz-SNARE komplex, de csak Ca^{2+} -ion jelenlétében következik be a fúzió. Ekkor a Ca^{2+} -ot kötő synaptotagmin szintén kapcsolódik a membránhoz, és eltávolítja a fúziót akadályozó komplexint.

A célmembrán regenerálódása

A folyamat kezdetén két külön kompartmenthez tartozó membrán között létrejött transz-SNARE komplex a membránok egyesülése után, mint cisz-SNARE komplex marad fenn (19.9. ábra). Ennek szét kell bomlania, hogy a benne résztvevő t-SNARE-k újabb fúzióban játszhasanak szerepet. Ha a négyes α -hélix olyan stabil állapotot eredményez, hogy létrejötte képes a fúzióhoz szükséges energiát biztosítani, akkor szétválásához viszont nyilvánvalóan külső energiaforrás, ATP felhasználása szükséges. Egy ATP-áz aktivitású fehérje bontja szét a feltekeredett héliceket, és választja szét a komplexet alkotó SNARE-kat.

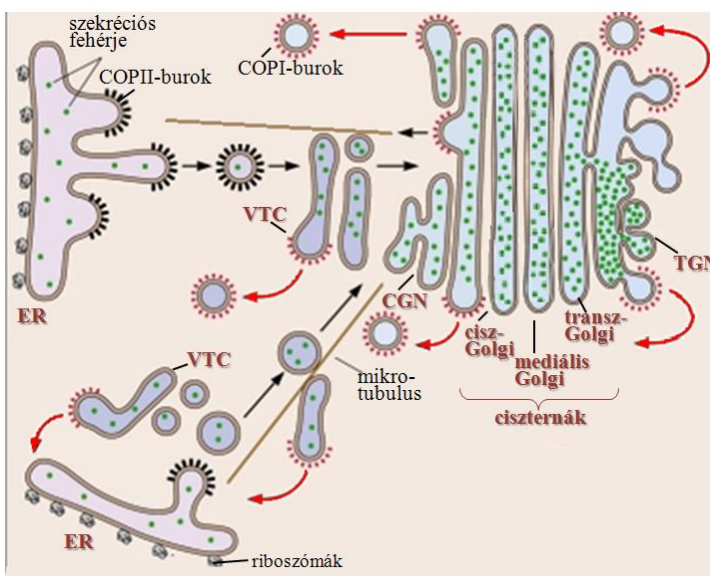
A célmembrán területén felhalmozódó lipid- és fehérjetöbblet (például a transzportált fehérjét szállító receptorok, különböző GEF-ek, v-SNARE-k) retrográd transzporttal, a vezikuláris transzport ismertett lépéseivel jutnak vissza a kiindulási kompartmentbe.

A SZEKRÉCIÓS ÚT

Az ER és a Golgi-készülék közötti anyagforgalom

Az ER-ből a minőség-ellenőrzésen átesett oldott és membránfehérjék COP-II-burkos vezikulákban indulnak tovább a Golgi-készülék cisz oldala felé. Ezt a haladási irányt, mivel a szekréciós út a sejt belsejéből a sejten kívüli tér felé halad, *anterográd*, azaz előírányuló transzportnak nevezik. A vezikulák általában az ER Golgi-készülék felé néző, kötött riboszómáktól mentes felszínén, az ER kilépési helyein (ER exit site) alakulnak ki.

Néhány membránfehérjénél sikerült egy olyan jelet kimutatni, amely a citoszol felőli oldalon a COP-II burok egyik elemével interakcióba lép és lehetővé teszi szelektív transzportjukat. Vannak olyan vízdékony szekretáló fehérjék is, amelyek ilyen szignállal rendelkező membránfehérjék lumen felőli részéhez – mint egy receptorhoz – kapcsolódva gyűlnek össze a lefűződés helyén. Ugyanakkor feltehető, hogy a nagy mennyiségben képződő szekréciós fehérjék többségének nincs szüksége külön transzport-jelre, hiszen nagy koncentrációban vannak jelen az ER-ben, emiatt aztán a képződő vezikulákba is elsősorban ők kerülnek bele. Kísérletek sora igazolta, hogy egyéb jelre a szekréciós fehérjéknek nincs is szükségük: az anterográd útvonal egyenesen a sejten kívüli térbe szállítja őket, csak a szekréciós út egyéb célállomásai (például a lizoszóma) igényelnek külön szignált.



19.10. ábra. A Golgi-készülék kompartmentjei és a közöttük közlekedő vezikulák típusai. Rövidítések: ER: endoplazmatikus retikulum; VTC: vezikuláris-tubuláris klaszter; CGN: cisz-Golgi hálózat (network); TGN: transz-Golgi hálózat (network). Az anterográd irányú transzportot fekete, a retrográd transzportot piros nyilak jelzik.

A legtöbb esetben a burok elvesztése után a vezikulák egymással fuzionálnak (homotipikus fúzió); hosszú, csőszerű szerkezetet képezve, amelyet

vezikuláris-tubuláris klaszternek is neveznek. Ezek végül a Golgi-készülék cisz oldalához érkeznak és fuzionálnak vele, a cisz-Golgi hálózatot (CGN, cis-Golgi network) alkotva (19.10. ábra).

Az ER-ben feladatot ellátó, úgynevezett ER-rezidens fehérjék természetesen nem tartalmaznak semmiféle olyan jelet, amely őket a Golgi-készülék felé irányítaná. Ugyanakkor a vezikuláris transzport mechanizmusa, amely csak „pozitív szelekcióra” képes, nem tudja kizárni őket a képződő vezikula üregéből, az ER-rezidens fehérjék egy része időről-időre megszökik egy-egy lefűződött COP-II-burkos vezikulában. Miután egyéb jel hiányában a szekréciós út „alapértelmezett” végállomása az extracelluláris tér, az ER enzimeit egy idő után kiürülhetnek a sejtől. Emellett a vezikuláris transzport során a donormembrán felszíne állandóan csökken, és ez természetesen az ER-re is vonatkozik. Tehát a távozott membránt, és vele az anterográd transzportot biztosító membránfehérjéket is vissza kell juttatni az ER-hez.

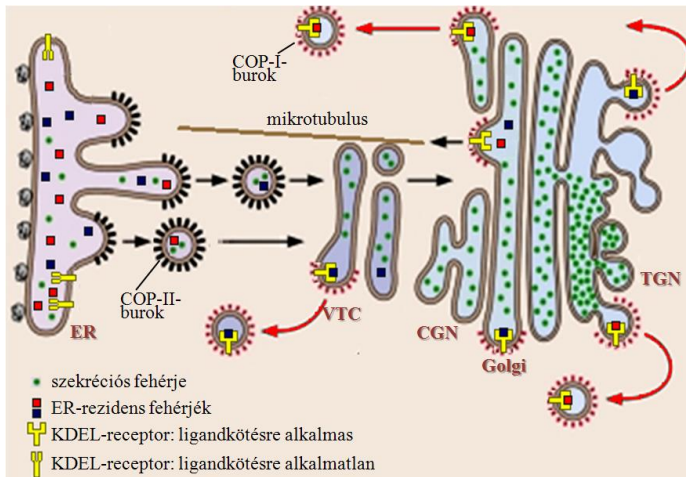
Ez is vezikuláris transzporttal történik: most a vezikulák a Golgi-készülekről fűződnek le és haladnak „hátrafelé”, az ER irányába: ez a *retrográd transzport* (19.10. ábra). Ezen kívül valamennyi, a szekréciós út későbbi állomásai között lejátszódó, pótlás céljából visszafelé irányuló szállítást is így nevezik.

Az is érthető, hogy az ellentétes irányba haladó vezikulákat más típusú fehérjéknek kell burkolnia. A retrográd transzport vezikuláit COP-I-es fehérjék burkolják (ezeket azonosították először, ezért kapták az I sorszámot). Lefűződésük és a burok elvesztése más kis G-fehérjék interakciója során következik be, de a mechanizmus megegyezik a vezikuláris transzport alaplépéseivel.

Az igazán hatékony visszaszállításhoz a szolubilis ER-rezidens fehérjék külön jelet, úgynevezett *retenciós jelet* hordoznak. Ez a C-terminálisukon található KDEL szignál (Lys-Asp-Glu-Leu vagy nagyon hasonló aminosavakból álló szekvencia). A KDEL szignált a KDEL membránreceptorok ismerik fel, és megkötik az ER-ből kiszökött fehérjét. A KDEL-receptorok a szerveződő COP-I-es vezikulák területére koncentrálnak. Hasonló módon jut vissza kiindulási helyére, az ER-be valamennyi, a burokképződésben és szállításban szerepet játszó faktor (19.11. ábra).

Az ER és a Golgi-készülék közötti forgalom egyes membránkomponensei, például a szekréciós fehérjéket a Golgi-készülék felé szállító receptorok egyrészt beépülnek a COP-II-es vezikulába, de „üresen” a COP-I-es típusú vezikulák szállítják vissza őket az ER felszínére. Vajon mi biztosíthatja azt, hogy az általuk szállított fehérje lehetőleg csak az egyik irányba haladjon, és ne kerüljön vissza a receptorával együtt a kiindulási helyre? Például a KDEL-receptorok esetében fontos, hogy az ER lumenének elszökött enzimeit csak a Golgi-készülék területén kapcsolódjanak nagy affinitással hozzájuk, az ER-be visszatérve váljanak le. Különböző hasonlóan receptorukhoz, ők is ide-oda mozognának a kompart-

mentek között, ahelyett, hogy az ER-ben koncentrálnának. A KDEL-receptor esetében már ismert, hogy az ER és a Golgi-készülék belső tere közötti kis pH-különbség okoz olyan változást a receptor szerkezetében, amely lehetővé teszi, hogy az ER-ben elengedje a későbbi állomásokon „felszedett” fehérjét (19.11. ábra). Ezek a mechanizmusok a szekréciónál más szakaszain is hasonlóképpen működnek. Az egyes kompartmentek közötti eltérő pH-t és ion-összetételt a szelektív transzportot különböző ioncsatornák és pumpák biztosítják.



19.11. ábra. Az ER fehérjéinek retrográd transzportja. A szolubilis fehérjéket specifikus KDEL-jelüket felismerő és kötő KDEL-receptorok szállítják vissza az ER-be. A KDEL-receptor csak az ER lumenénél savasabb terekben képes megkötni szubsztárait, ezért csak retrográd irányba, vissza az ER-be szállítja a „megszökött” ER-rezidens fehérjét. Jelölések és rövidítések: lásd 19.10. ábra.

A Golgi-készülék működése

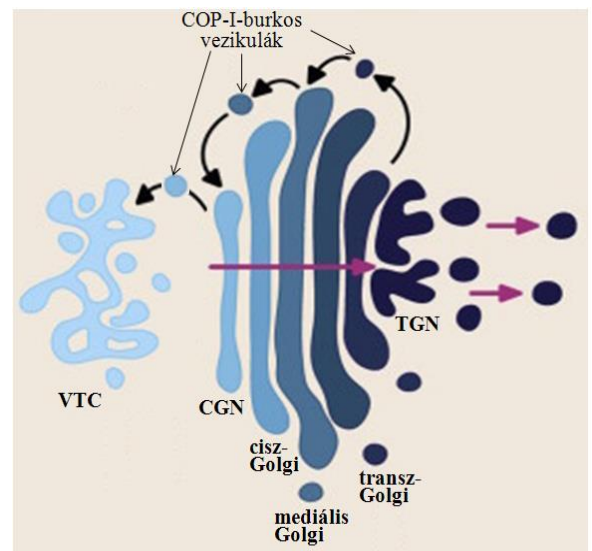
Az összetett szerkezetű Golgi-készülék fő feladata az ER-ből érkező fehérjék fogadása, szerkezetük módosítása (elsősorban a cukor-oldalláncoké), és továbbítása a különböző célállomások felé. Felépítés és funkció szempontjából is kisebb egységekre tagolható (19.10. ábra).

Az ER felőli, „belépő” felszíne a cisz-Golgi hálózat (CGN), amelyet a fuzionáló ER-ből érkező vezikulák hoznak létre. Innen is folyamatosan történik retrográd transzport az ER irányába. A CGN üregének fehérje-összetétele az ER-étől már jelentősen különbözik.

A szekréciónál fehérjék ezután a Golgi-készülék ciszternaiba jutnak. Ezek, lapos, kiterjedt felszínű zsákok, a legtöbb eukariótában négy-hat cisztterna található szoros közelségben. Közöttük gyakran csőszerű összeköttetések figyelhetők meg. A lefűződő vezikulák leginkább az egyes ciszternák szélén láthatóak, ennek oka valószínűleg az, hogy a membrán ott eleve erősen görbült. A rendezetten elhelyezkedő ciszternák között is megkülönböztethetünk belépési (cisz-Golgi), középső (mediális Golgi) és kilépési (transz-Golgi) ciszternát (19.10. ábra).

A teljes Golgi-készülék kilépő felszínén a CGN-hez hasonló, folyamatosan formálódó, zsák- és csőszerű elemekből álló transz-Golgi hálózat jön létre (TGN: trans Golgi network). A készüléken belül ez az utolsó állomás működik elosztó-központként: ennek megfelelően a TGN-ről is folyamatosan vezikulák képződnek, a sejtfelszín irányába, az endomembrán rendszer más részei felé, vagy vissza, a retrográd transzportot biztosítva.

A mai felfogás szerint a Golgi-készülék belüli anyagáramlást az úgynevezett *cisztterna-érési modell* magyarázza. Eszerint nem a szekréciónál és membránfehérjék mozognak külön-külön, vezikulákba csomagolva (ez a hagyományos vezikuláris transzport modell), hanem maguk a ciszternák „vonulnak” előre, és a róluk lefűződő, visszafelé mozgó hólyagocskák révén folyamatosan változik enzim- és lipid-összetételük. Ezek szerint úgy kell elképzelnünk a szekréciónál fehérjék érését, hogy valójában nem mozdulnak ki az első állomáshelyről, ahová az ER-ből érkeztek: csak a környezetük, az őket módosító enzimek változnak folyamatosan, és a cisztterna, amelyben vannak, folyamatosan mozog a mikrotubulus-hálózat mentén a plazmamembrán felé. A ciszternák körüli COP-I-es vezikulák pedig valamennyien retrográd transzportot bonyolítanak, a soron következő érő ciszternába viszik vissza a módosító fehérjéket (19.12. ábra). Emellett lehetséges, hogy mindkét folyamat jelen van a szekréciónál fehérjék szállítása során: egyes fehérjék gyorsabban érnek és anterográd irányban, vezikulákban jutnak a következő ciszternába, míg a nagy többség helyben marad, és megvárja, míg az enzimek cserélődnek ki körülötte.



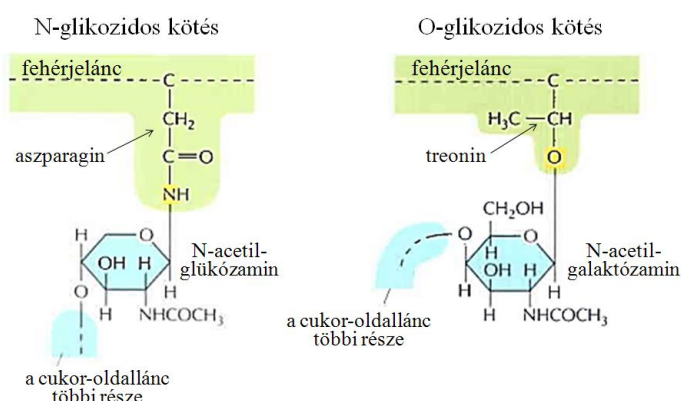
19.12. ábra. A Golgi-készülék belüli anyagáramlás cisztterna-érési modellje. A változó színárnyalat a beltartalom és a membrán eltérő enzim-összetételét jelzi.

A Golgi-készülékben zajló módosító folyamatok

A plazmamembránba és a sejten kívüli térbe kerülő fehérjék többsége tartalmaz kovalens kötéssel kapcsolódó cukor-oldalláncot. A Golgi-készülék egyik

fő feladata a *glikoproteinek és glikolipidek cukortartalmának formálása* - ennek megfelelően a sok glikoproteint szekretáló nyálkatermelő sejtekben igen fejlett Golgi-készülék található.

A glikoproteinek és glikolipidek nagy aránya és cukor-oldalláncaik sokfélesége jelzi a glikoziláció fontosságát. A cukor-oldallancok sokkal kevésbé flexibilisek, mint a peptidek, a sejt felszínén ezért védőburkot (glikokalix) képesek alkotni: nem engedik a fehérjelánc közelébe az extracelluláris tér bontóenzimeit. A nagy cukortartalmú nyálkaréteg a patogénekkal szembeni ellenállást is növeli. Ez lehetett a glikoziláció ősi feladata: az eukarióta sejt megszabadulhatott a prokariótákra jellemző rigid sejtfaltól, ugyanakkor a plazmamembrán nem maradt védelem nélkül. A sejtfelszíni cukor-oldallancok sejtípusra jellemző összetétele és az őket felismerő fehérjék fontos szerepet játszanak számos élettani folyamatban, például a sejtek vándorlásában és kapcsolódásában, és közismert a cukorlancok szerepe a fehérjék antigén tulajdonságainak kialakításában. A glikoproteinek kétféleképpen kaphatják meg cukorrészüket: *N-glikozidos kötés* révén, amely az ER-ben jöhet létre aszparaginon, vagy *O-glikozidos kötéssel*, amely elsősorban a Golgi-cisztérnában (és kis arányban a citoszolban) alakulhat ki, leggyakrabban szerinen, treoninon vagy tirozinon (19.13. ábra).



19.13. ábra. A fehérjeláncokon kialakuló kétféle glikozidos kötés szerkezete.

Valamennyi Golgi-rezidens cukor-módosító enzim transzmembrán fehérje. Minden cisztérnára más glikozidázokból és glikozil-transzferázokból álló enzimmészlet jellemző. Az egyes enzimek által katalizált reakciók egymásra épülnek: például a középső Golgi-cisztérná enzimeinek csak az a fehérje lehet szubsztátja, amely már átesett a cisz-Golgi-specifikus folyamatokon.

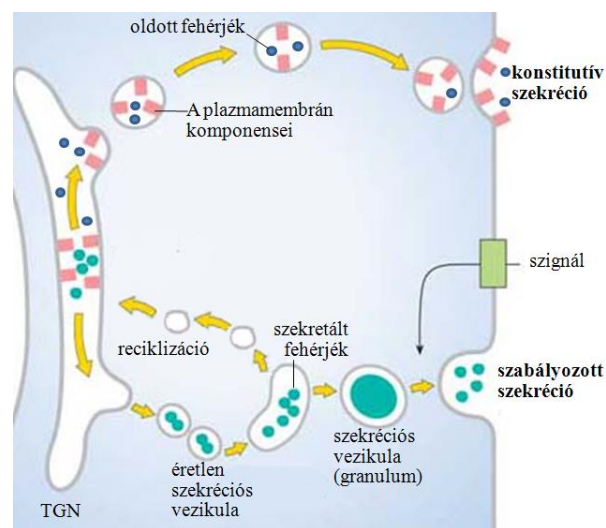
A Golgi-cisztérnában szintetizálódó, O-glikozidos kötést tartalmazó fehérjék közül a legfontosabbak a mucinok és a proteoglikánok. A *mucinok* nagy molekulású glikoproteinek, a nyálka fő komponensei, a testben található csatornák (légutak, emésztőtraktus, urogenitális rendszer) háma termeli elsősorban védelem céljából. A *proteoglikánok* fehérje-részének („core” protein) egyes szerinjere

egyesével kerülnek rá a hosszú, el nem ágazó glükózaminoglikán polimert képező diszacharidok. A proteoglikánok általában erősen negatív töltéssel rendelkeznek, köszönhetően cukor-oldalláncaik uronsav-tartalmának és annak, hogy a TGN területén nagy arányban szulfát-csoportok kerülnek rájuk. A mucinokhoz hasonlóan nagy a vízmegtartó képességük és a hosszú, rigid poliszacharid oldallancoknak köszönhetően nagy az ellenállásuk az nyomóerővel szemben. Nagy a térkitöltésük, gélszerű állományt képeznek, amely lehetővé teszi az anyagok (ionok, kis molekulák, metabolitok, például tápanyagok, hormonok) áramlását. Az extracelluláris mátrix fő komponensei, de sok proteoglikán integráns membránfehérje. A kötőszövetek alapvető alkotóelemei (minderről a 20. fejezet részletesebben ír majd).

A plazmamembrán külső felszínét borító cukorlancokból álló réteg, a glikokalix kialakításában nemcsak membrán-kötött glikoproteinek, hanem glikolipidek is részt vesznek. Ezek túlnyomó része a szfingolipidek közé tartozó *glikoszfingolipid*. A Golgi-készülék területén jönnek létre, és a sejt felszínének védelme mellett szerepet játszanak a sejtek felismerési és jelátviteli folyamataiban is. Gyakran koncentrálnak a lipidtutajok területén. A szfingolipidek másik csoportját alkotó *sfingomielin*ek – mint nevük is jelzi – nagy mennyiségben vannak jelen az idegsejtek axonjait körülvevő mielinhévely membránjában, de valamennyi sejt plazmamembránjának alapvető alkotóelemei. Szintén szerepet játszhatnak a jelátvitelben is.

A Golgi-készülékből a plazmamembrán felé

A szekréciós út utolsó állomásáig valamennyi molekula együtt szállítódik, a TGN feladata, hogy megkülönböztesse és a megfelelő végállomás – a plazmamembrán vagy a lizoszóma - felé indítsa el őket. A plazmamembrán irányába is kétféle módon juthatnak: *konstitutív* (folyamatos) vagy *szabályozott* szekrécióval (19.1. és 19.14. ábra).

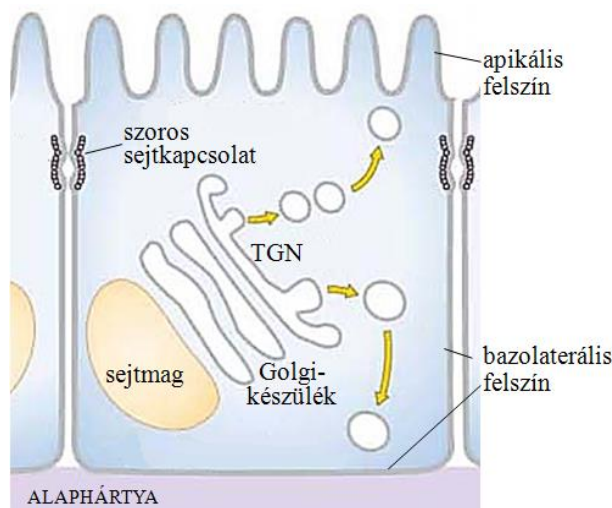


19.14. ábra. Az állandóan működő konstitutív és a speciális sejtekre jellemző szabályozott szekréció.

A plazmamembrán felé irányított molekulákat tartalmazó vezikulák a valamennyi sejtben állandóan működő *konstitutív szekréció* során folyamatosan fűződnek le a TGN területéről és a dokkolás után fúzióval, exocitózissal juttatják tartalmukat az extracelluláris térbe vagy a membránba. Ilyen módon történik a sejtközi állomány komponenseinek, valamint a membrán fehérjeinek és lipidtartalmának utánpótlása.

A soksejtű szervezetekre jellemző munkamegosztás fejlődése során igen korán elkülönültek azok a sejt, amelyek valamilyen váladék termelésére szakosodtak. Ezek az úgynevezett *szekréciós sejt*ek a folyamatos, valamennyi sejtfeleségre jellemző *szekréció* mellett *szabályozott* ürítésre is képesek – speciális, általában nagy mennyiségben szintetizált termékük *szekréciós* vezikulákba csomagolva várakozik, majd aztán valamilyen jel hatására ezek egyszerre fuzionálnak a plazmamembránnal. A jelet általában a sejt felszínén bekövetkező ligand-receptor kölcsönhatás váltja ki, vagy - ahogyan az idegsejtek esetében – membrán-depolarizáció. Az idegsejtek szabályozott *szekréció*ja messze a legismertebb valamennyi közül.

A szabályozott *szekréció*t végző sejt sok esetben polarizáltak, bennük a nagy mennyiségben termelt *szekretált* fehérje ürítése általában az egyik kitüntetett, úgynevezett *apikális* felszín irányába történik. Ugyanakkor természetesen a sejt más területeire is történik *konstitutív szekréció*. Polarizáltak az idegsejtek is, ahol az axon és végződéseinek membránja számít *apikális* felszínnek. Legtöbbször a TGN területén eldől, hogy a lefűződő vezikula melyik felszín felé indul el (19.15. ábra).



19.15. ábra. Kétféle irányba zajló szekréció egy tipikus polarizált sejt, a bélhámsejt belsejében.

Sok *szekretált* hidrolitikus enzim, hormon és neurotransmitter, valamint a membránfehérjék egy része a TGN elhagyása után proteázok révén módosulhat. A specifikus helyeken bekövetkező proteolízis „*időzítésében*” segít a vezikulák fokozatos, savasodása, amely a proteázok aktivitásához szükséges. A proteolízis következménye lehet

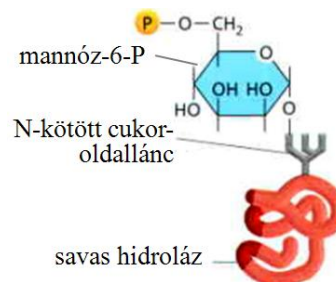
aktiválódás. A *szekretált* bontóenzimek esetében ennek a lépésnek a késleltetése azt a célt szolgálja, hogy a sejt elkerülje saját alkotóelemeinek hidrolízisét. Más esetekben a „*vágtatlan*” protein sokkal stabilabb szerkezetű, ezért történik csak közvetlenül az exocitózis előtt az aktiválás.

A Golgi-készülékből a lizoszómák felé

A TGN-ben zajló osztályozás legkorábban megismert eleme a lizoszómába kerülő, ott működő *vízoldékony* és membránfehérjék szelektív kiválogatása volt. Ehhez a ritka lizoszomális betegségek tanulmányozása vezetett. Ezek a genetikai rendellenességek azzal járnak, hogy valamilyen – vagy súlyos esetben mindegyik - bontóenzim hiányzik „*munkahelyéről*”, a lizoszómából, ezért a sejt nem képesek megemészteni az oda bejutott anyagokat. Néhány esetben az enzimek ugyan rendben szintetizálódtak és kotranszlációs transzlokációval bejutottak az ER-be, de megfelelő jel hiányában *konstitutív szekréció*val kiürültek a sejtől. Genetikai és biokémiai módszerekkel sikerült azonosítani az ilyen páciensekből mutáció következtében hiányzó fehérjéket, és így fény derült azokra a folyamatokra, amelyek a bontóenzimek lizoszómába vezető útját biztosítják.

A lizoszómában működő bontóenzimek *vízoldékony* *savas hidrolázok*, amelyek csak a lizoszómában uralkodó igen alacsony, 4-4,5-ös pH-n működőképesek, mert odavezető útjuk során inaktív proenzim formában vannak. Csak a lizoszóma erősen savas, elzárt közegében következik be az aktiválódást biztosító specifikus proteolízisük. A *lizoszóma-specifikus membránfehérjék* közé tartoznak – többek között - a különféle transzporterek, amelyek az elbontott makromolekulák építőköveit juttatják vissza újrahasznosítás céljából a citoszolba, a savasságot biztosító protonpumpák, illetve a dokkoláshoz, fúzióhoz és a lefűződéshez szükséges komponensek. Ezek a membránfehérjék általában erősen glikoziláltak, ami védelmet biztosít a lizoszóma-membrán belső felszínének a savas hidrolázok emésztésével szemben.

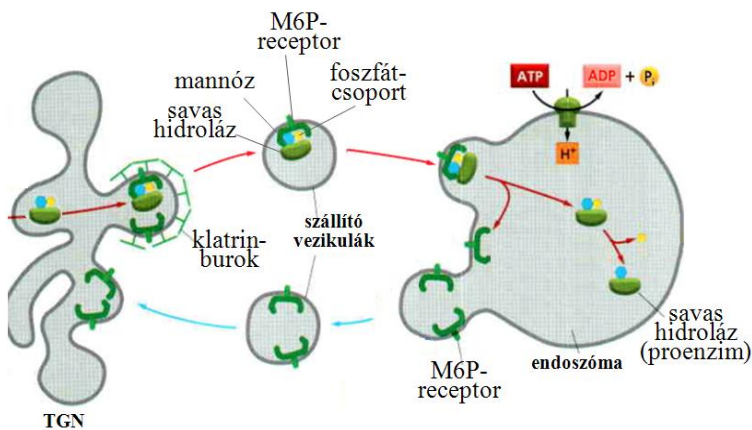
A savas hidrolázok (az aminosav-szekvencián alapuló ER-jel mellett) valamennyien módosulnak N-glikozidos cukor-oldalláncukon is. Egy mannóz-6-foszfát (M6P) jelet kapnak még a cisz-Golgi cisztterna területén, azaz a cukorlánc egyes mannózainak 6. szénatomjára foszfát-csoport kerül (19.16. ábra). Ezt a TGN membránjában lokalizált M6P-receptor ismeri fel.



19.16. ábra. A mannóz-6-foszfát (M6P) jel

A TGN-ről lefüződő vezikulák közül a lizoszóma felé indulók szerkezete a legismertebb, legtöbbször klatrinból álló burok veszi körbe őket. A burok összeszerelésében itt is G-fehérjék játszanak szerepet. A TGN membránjában speciális összetételű folt jön létre, benne a lizoszómára jellemző membránfehérjékkel és az M6P-receptorokkal.

A megfelelő görbületet elért vezikula dinamin segítségével lefüződik, majd a burok leválása után egy úgynevezett endoszómával fuzionál (lásd később). A pH 6-nál savasabb, az endoszómákra jellemző környezetben az M6P-receptor elengedi a szállított savas hidrolázt, majd a foszfátcsoport is leválik. Az M6P-receptor reciklizálódik: visszaszállítódik a Golgi-készülék transz oldalához (19.17. ábra).



19.17. ábra. Az M6P-jelet tartalmazó lizoszomális enzimek sorsa. Piros nyíl jelzi az enzimek szállítási útját (az endoszóma később egyesül egy lizoszómával). Kék nyíl jelzi a receptor reciklizációját.

Az endoszóma membránja és lumene tehát már tartalmazza a lizoszómára jellemző fehérjekészletet, majd fúzió után maga is részévé válik egy meglévő lizoszómának (19.23. ábra).

A lizoszómák

A lizoszómák belsejében sokféle bontóenzim (savas hidroláz) található, melyek a lizoszómák terébe bekerült szerves anyagokat alapegységeikre bontják. A degradáció zárt térben történik, ez megakadályozza, hogy a citoplazmát a lizoszomális enzimek károsítsák. A lizoszómák membránjában transzporterek vannak, ezért a bontófolyamatok végtermékei a citoplazmába könnyen átjutnak, de a különböző emésztendő makromolekulák nem. A bontási folyamat nem mindig eredményez kismolekulájú végterméket, ilyenkor az emésztetlen anyagok felhalmozódnak a lizoszómákban, úgynevezett maradványtestek jönnek létre a sejtekben. Ezek különösen gyakoriak már osztódásra képtelen, hosszú életű sejtekben, és a kor előrehaladtával egyre több található belőlük az idegsejtekben vagy a szívizom sejteiben.

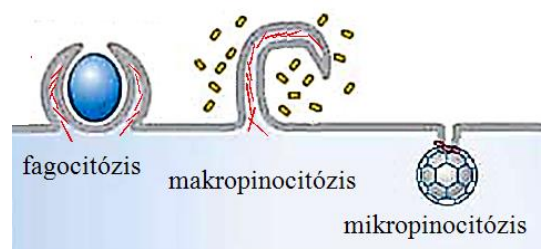
AZ ENDOCITÓZIS

Az *endocitózis* a külvilág felől a sejt belsejébe vezető, membránbefűződéssel és –leválással járó, vezikulák által közvetített anyagfelvételi utak összességét jelöli. A lipid kettősrétegen keresztül, csatornák, transzporterek és pumpák biztosította *transzmembrán transzporttal* a sejt számára szükséges anyagok csak kis hányada, az igen kisméretű molekulák képesek átjutni. Valamennyi egyéb tápanyag *vezikuláris transzporttal* jut el a lizoszómaig, ahol lebontásra kerül, és komponensei a citoszolba jutnak hasznosítás céljából.

Az endocitózis során azonban korántsem jut valamennyi felvett anyag a lizoszómába; az endocitózis funkciója egyáltalán nem korlátozódik a tápanyagfelvételre. A sejt életének más területein is fontos szerepet játszik: részt vesz a védekezésben, a jelátviteli folyamatok szabályozásában. A szekréció utolsó lépésekor, az exocitózis során jelentős membrántöbblet keletkezhet a sejt felszínén, amelyet vissza kell juttatni a donor sejtsejtszervecskéhez – ezt szintén endocitózis biztosítja. A vírusok és más intracelluláris patogének többsége is az endocitózis folyamatában szerepet játszó apparátust használja ki a fertőzés során.

Az endocitózis tanulmányozását segíti, hogy a transzport kiinduló állomása a kísérletesen könnyedén manipulálható extracelluláris tér. Fluoreszcensen vagy egyéb módon jelölt oldott molekulák, különböző méretű részecskék, receptorok, ligandok, membránalkotók alkalmazásával követhető a sejtbe jutott anyag további sorsa. A folyamat élesztősejtekben az állati sejtekhez nagyon hasonlóan játszódik le. Hosszú ideig az emlős szövetenyészeteken kívül ebben a modellrendszerben végezték a legtöbb kísérletet. Újabban más, erős genetikai háttérrel rendelkező modellszervezetben – fonalféreg, muslica – is intenzíven kutatják.

Az endocitózis tehát minden sejt életében alapvető, az exocitózissal szorosan kapcsolt folyamat. Valamennyi sejt folyamatosan vesz fel a környezetéből vezikulákba zárva folyadékot és benne többek között oldott tápanyagokat, az extracelluláris mátrix komponenseit; valamint membránösszetevőket: lipideket és membránfehérjéket. Ezt a jelenséget *pinocitózisnak*, „folyadékivásnak” nevezik (19.18. ábra).



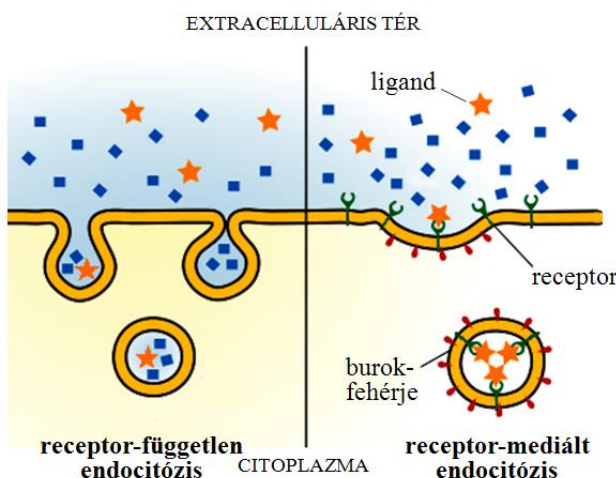
19.18. ábra. Az endocitózissal történő felvétel típusai.

Mikropinocitózis során kis, nagyjából egyforma méretű (~100nm-es) vezikulák fűződnek le, legtöbbször klatrin-burok kialakulásával. A makropinocitózis jóval nagyobb, akár 0,5-5µm átmérőjű vezikulák keletkezésével jár, amelyekben a folyadék aránya sokkal nagyobb.

A *fagocitózis* során nagyobb szilárd szemcsék, sejtörmelék, mikroorganizmusok bekebelezése történik, a keletkező fagoszómák mérete jóval nagyobb és változó, a felvett részecske mérete határozza meg. Egysejtűekben ez a táplálékszerzés egyik módja, soksejtűekben célja elsősorban a környezetben elpusztult sejtek „eltakarítása” és a védekezés. A hatékonyság érdekében ezt a feladatot az immunrendszer erre szakosodott sejtjei végzik. A fagocitózis nem is zajlik állandóan: speciális sejtfelszíni receptorok ismerik fel a bekebelezendő anyagot, és indukálják a folyamatot. Kezdetben állászerű nyúlványokkal veszi körbe a fagocitáló sejt a részecskét, amely végül körbezárul, és a fagoszóma lefűződik - mindez az aktinváz intenzív átrendeződésével jár együtt (19.18. ábra).

A legrégebben és legintenzívebben kutatott terület a klatrin-burkos vezikulák lefűződésével járó endocitózis, ugyanakkor egyre több eredmény születik más, klatrin-független endocitózissal kapcsolatban is.

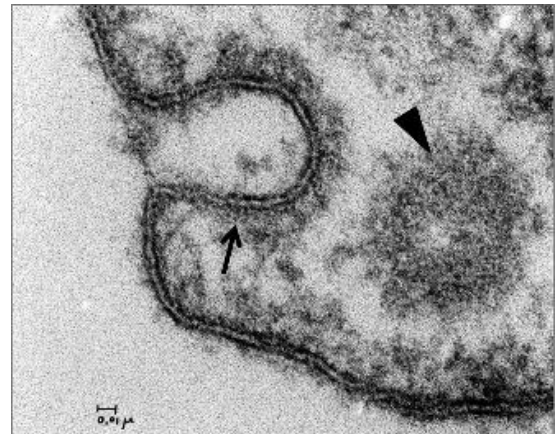
A *receptor-mediált endocitózis* célja nem aspecifikus folyadék- és membránfelvétel, hanem bizonyos plazmamembrán-receptorok és/vagy ligandjaik kiválogatása (19.19. ábra). A receptor-mediált endocitózissal tehát kis térfogatban, de nagy hatékonysággal lehet az extracelluláris térben vagy a membránban akár igen alacsony koncentrációban jelen lévő makromolekulákat a sejtbe juttatni - például a membránalkotó koleszterin felvétele is így zajlik. De az életműködéshez szükséges, kis koncentrációjú molekulák bejuttatásán kívül a receptor-mediált endocitózissal óriási szerepe van a transzmembrán receptorokon keresztül történő jelátvitel szabályozásában is.



19.19. ábra. Receptorok közvetítésével hatékonyan lehet a környezetben kis koncentrációban lévő anyagokat felvenni.

Az endocitózis első szakasza

A legtöbb endocitotikus vezikula lefűződése klatrin alegységek polimerizációjával kezdődik a membrán citoszolikus felszínén, ami a membrán görbülésével jár (lásd 19.3. ábra). A plazmamembrán egyes területein mikroszkópon jól látható bemélyedések, „burkos gödrök” alakulnak ki (19.20. ábra). Egyes sejtfeleségeken a teljes membránfelület 2%-át is boríthatja klatrin. A burok képzéséhez a kis mennyiségben, de specifikusan a plazmamembránban lokalizálódó PI(4,5)P₂ is hozzájárul.



19.20. ábra. Klatrin-burkos vezikula elektronmikroszkópos képe lefűződés közben (→), és lefűződés után (tangenciális metszetben, ►)

A „burkos gödrök” membránjában egyes transzmembrán receptorok koncentrációja is megfigyelhető. Legtöbbször a ligand kötése okoz olyan konformáció-változást a receptor citoszolikus részén, hogy az addig a membrán síkjában viszonylag szabadon diffundáló receptor a formálódó klatrin-burok területén megreked.

A klatrin-burkos vezikula kialakulása gyors, a megfelelő görbület elérése 1-2 percen belül bekövetkezik. Újabban kimutatták, hogy a sejtthártya alatti aktinváz átrendeződése is hozzájárul a folyamathoz. Ezután dinamin közreműködésével, GTP-hidrolízis során fűződik le a megformálódott vezikula.

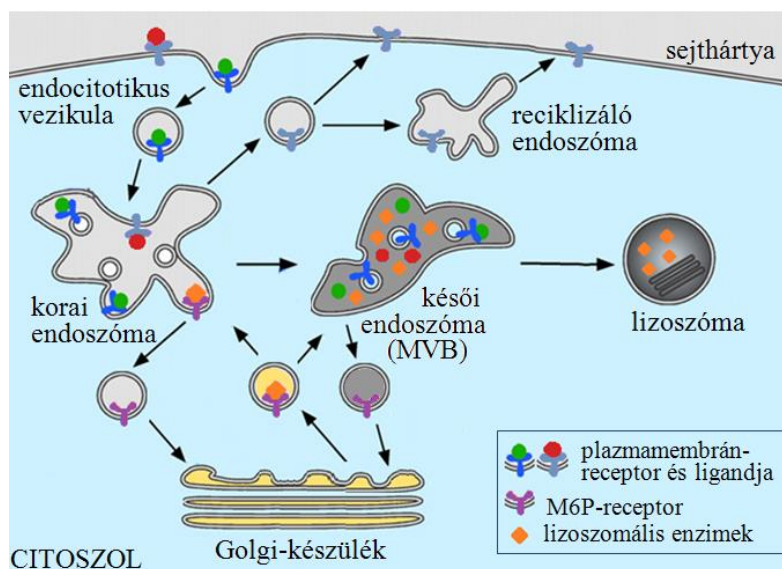
A sejt belsejébe került vezikuláról másodperceken belül leválik a klatrin-burok. Ennek oka ugyanaz, mint általában a vezikuláris transzport során: egy addig a membrán felszínén rögzülő kis G-fehérje hidrolizálja kötött GTP-jét, és GDP-kötött állapotban a citoszolba vándorol. Az endocitotikus vezikula membránjában a többi komponenssel együtt „utazik” egy lipid foszfátáz is, amely szintén aktiválódik, és leszedi a foszfátcsoportokat a PI(4,5)P₂-ről – így a membrán identitása máris megváltozott. A klatrinburok esetében egyéb, ATP-igényes lépés is szükséges a burok széteséséhez.

A buroktól megszabadult vezikula felszínén most már működésbe léphetnek a célmembrán felismeréséhez és a fúzióhoz szükséges fehérjék – elsősorban a v-SNARE-k, Rab-ok és effektorai.

Első lépésben valamennyi lefűződő vezikula egy *korai endoszómával* fuzionál, amely a TGN-hez hasonlóan elosztóállomásként működő, rendkívül dinamikus, folyamatosan változó organellum. Nemcsak az extracelluláris térből fogad anyagokat, hanem a TGN felől is érkeznek lizoszomális enzimeket és membránfehérjéket szállító vezikulák (19.21. ábra). Egy darabig (tipikusan körülbelül tíz percig) folyamatosan áramlanak felé és fuzionálnak vele a különböző irányból érkező vezikulák, de ezzel párhuzamosan igen aktív lefűződés is folyik.

A korai endoszóma komponenseinek egy része ugyanis vezikuláris transzporttal - közvetlenül vagy *reciklizáló endoszómák* közbeiktatásával – exocitózis révén visszakerül a plazmamembránba vagy az extracelluláris térbe, más részük pedig *késői endoszómába* jut, amely a lizoszómába vezető út közbülső állomása. Létezik ugyanakkor a Golgi-készülék irányába tartó, retrográdnak tekinthető irány is. (19.21. ábra).

Általában a plazmamembránba visszajuttatott membránmennyiség jóval nagyobb, mint a visszatartott, végül lebontásra kerülő „maradék”: sok membránfehérjét a sejt szeretne újrahasznosítani. Ezek egy része transzmembrán receptor, receptor-mediált endocitózissal érkezett a korai endoszómába; más részük „véletlenül” került az endocitotikus vezikulába. Ugyanakkor, ha a sejt pillanatnyi helyzete úgy kívánja, a lizoszomális transzport aránya szabályozható: előfordul, hogy egyszerre nagyobb mennyiségű membránfehérje lebontására van szükség.



19.21. ábra. Az endocitotikus útvonal állomásai. A különböző pH-jú tereket eltérő színek jelölik. Két, különböző sorsú plazmamembrán-receptor és az M6P-receptor útját is mutatja az ábra. Egyes receptorok (szürke) ligandjukat elengedve a korai endoszómából visszatérhetnek a sejthártyába. Mások (kék) ligandjukkal együtt a késői endoszómába, majd onnan a lizoszómába kerülnek, ahol lebomlanak. MVB: multivesicular body (lásd később).

A sejthártyába visszairányított membránalkotók egy része először egy külön kompartmentbe, a *reciklizáló endoszómába* kerül. A reciklizáló endoszómáról lefűződő vezikulák szintén a plazmamembrán felé szállítanak, így felvetődik a kérdés: mi értelme egy külön teret fenntartani a visszajuttatandó anyagoknak?

A reciklizáló endoszómákból (az itt is működő retrográd transzport kivételével) ugyan csak a sejthártya irányába történik anyagáramlás, de szabályozható módon. A sejt eldöntheti, mikor, milyen körülmények között engedi vissza az adott plazmamembrán-fehérjét működési helyére. Ez a szabályozás nemcsak a sejtfelszíni receptorok, hanem például transzporterek vagy sejtkapcsoló molekulák funkcióját is befolyásolhatja. A reciklizáló endoszóma membrán-alapanyag raktározására is szolgálhat: a citokinézis során egyszerre nagy mennyiségben van szükség új membránra, amely adott jelre fuzionálhat a meglevő plazmamembránnal; fagocitáló sejtekben a nagyméretű bekebelezett anyag körbevételéhez is szükség van ilyen membránraktárra.

Az endocitózis második szakasza

A korai endoszóma a folyamatos lefűzések után módosulva egy idő múlva a külső térből származó anyagok közül már csak azokat tartalmazza, amelyek sorsa a degradáció. Közöttük van az összes sérült, kicserélendő transzmembrán fehérje és lipid, valamint számos olyan sejtfelszíni receptor, amelynek lebontása létfontosságú a jelátviteli folyamatok megfelelő szabályozása érdekében. Ekkorra a korai endoszóma átalakult úgynevezett *késői endoszómává*.

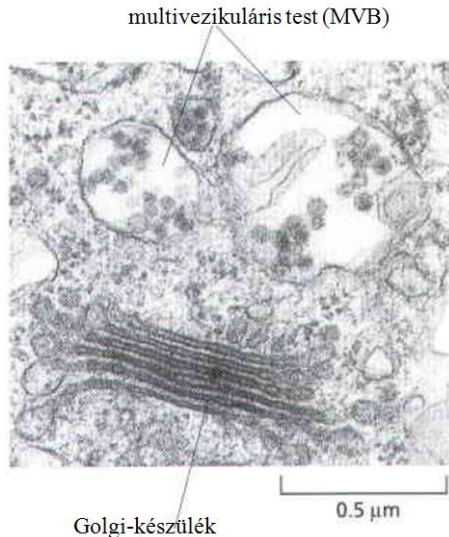
Az érett késői endoszóma végleg elköteleződött a lebontó folyamatok felé. A korai endoszómától „örökölt” lizoszomális fehérjékhez csatlakoznak újabbak: a késői endoszóma irányába is zajlik transzportjuk a TGN felől. A protonpumpáknak köszönhetően a pH egyre savasabb, és a savas hidrolázok némelyike ebben a közegben már képes aktiválódni – a lebontás már a késői endoszómákban is intenzíven folyik. Párhuzamosan növekszik a határoló membrán ellenállóképessége, a TGN-ből érkező erősen glikozilált membránfehérjék által.

Vajon hogyan juthatnak a lebontandó membránfehérjék és lipidek végül a késői endoszóma védett felszínéről a lumenbe, ahol a bontóenzimek hozzájuk férhetnek? A késői endoszóma érésének talán leglátványosabb eleme a belső vezikulák lefűződése.

Már az 1950-es években, mikor a lizoszomális rendszert felfedezték, leírtak úgynevezett multivezikuláris testeket is (továbbiakban MVB: multivesicular body). Olyan membrán-határolt organellumok ezek, amelyekben belül több kisebb vezikula található (19.22. ábra). Később bebizonyosodott, hogy a MVB-k tulajdonképpen a késői endoszómáknak felelnek meg, sőt, kismértékben, de már a korai endoszómára is jellemző a lumenben

lokalizálódó belső (úgynevezett intraluminális) vezikulák jelenléte (lásd 19.21. ábra).

A belső vezikulák membránja tartalmazza azokat a membrán-komponenseket, amelyek később teljesen lebomlanak. Tehát valamilyen módon a késői endoszóma membránjáról befelé, a lumen irányába - azaz a citoplazmából nézve kifelé - történik lefűződés.



19.22. ábra. MVB-k elektronmikroszkópos képe.

2001-ben élesztőben azonosították az első komplexet, amely szerepet játszik az ilyen belső vezikulák képződésében. Röviddel ezután a folyamat többi elemét is izolálták, és megtalálták az emlősök hasonló fehérjeit is, ESCRT-oknak (endosomal sorting complex required for transport) nevezik őket. Tulajdonképpen öt, egymással szoros kölcsönhatásban és munkamegosztásban működő egységről van szó.

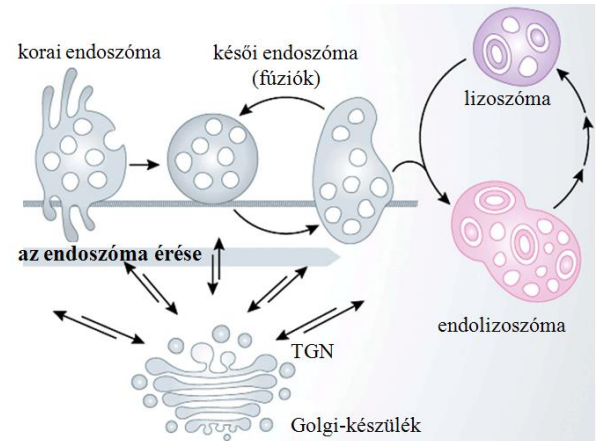
Az ESCRT-komplexek felfedezése óta arra is fény derült, hogy – bár az egyes komplexek nem egyenlő mértékben – szerepet játszanak más folyamatokban is. Például néhány vírusfajta (köztük a HIV-vírus) a sejt saját ESCRT-alegységeit használja fel a sejtől való kijutásra. Ekkor a belső vezikulák formálódásával topológiailag azonos esemény történik: a citoplazmából kifelé, csak hogy ebben az esetben a plazmamembrán területéről fűződik le a vírustartalmú vezikula.

A késői endoszómák a TGN felől folyamatosan érkező újabb lizoszóma-specifikus enzimek és membránkomponensek révén funkciójukban egyre inkább hasonlítanak a lizoszómákhoz. Ráadásul képessé válnak a velük való fúzióra is, így valóban egy hibrid, az *endolizoszóma* jön létre, amely molekuláris és funkcionális szempontból is mindkét organelum tulajdonságait képviseli. Állati sejtekben a késői endoszóma – endolizoszóma - lizoszóma tulajdonképpen ugyanazon organelum különböző érési stádiumaként is felfogható (19.23. ábra).

Az endocitózis és a jelátvitel

Az endocitózis szerepét először a jelátvitel leállításában ismerték fel. A sejt normális működésében éppolyan fontos szerepe van a szignalizációs folyamatok hatékony és gyors leállításának, mint a jel

generálásának. Erre sokféle módszer fejlődött ki az evolúció során, többek között az aktivált receptor eltávolítása a sejt felszínéről. Ha a ligand-receptor kapcsolat megszűnik a korai endoszóma savas környezetében, a receptor inaktíválódik. Ezzel együtt a felszínen hozzáférhető receptorok számának szabályozására is lehetőség van: a szabad receptor rögtön a plazmamembránba kerülhet vissza és új ligandot fogadhat, vagy egy ideig reciklizáló endoszómában várakozhat (19.21. ábra).



19.23. ábra. A késői endoszóma lizoszómává érési átalakulások és fúziók révén.

A jelátvitel tartós felfüggesztését, a sejt hosszabb távú érzéketlenítését (deszenzitizációját) teszi lehetővé, ha a liganddal együtt a receptor is lebomlik (19.21. ábra). Egyes növekedési jeleket kötő receptorok sorsa ennek klasszikus példája. Fontos azonban megjegyezni, hogy sok esetben a receptor mindaddig, míg ligandjához kapcsolódik - az endoszomális útvonal állomásain is – aktív marad, és folytatja a jel generálását. Egyes tumoros megbetegedéseknél azt találták, hogy az ESCRT-komplexek valamely tagjának génjében bekövetkezett mutáció szerepet játszott a tumor kifejlődésében. Az ESCRT-ok funkciójának meghibásodása azt okozta, hogy az adott-receptor nem került belső vezikulákba, hanem a MVB felszínén maradvia folyamatos osztódásra serkentette a sejtet.

Az utóbbi évtized alaposan megváltoztatta az endocitózisnak a jelátvitelben betöltött szerepéről kialakult képet. Kiderült, hogy sok esetben éppen a receptornak a sejt belsejébe kerülése szükséges a megfelelő hatás eléréséhez. Bizonyos esetekben pedig a reciklizáló endoszómán alakul ki az a speciális környezet, amely alkalmas az adott jel átadására.

Érdekes a G-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR) endocitózisával kapcsolatban leírt jelenség is. Miután a sejt felszínén teljesítették feladatukat, azaz aktiválták a megfelelő heterotrimer G-fehérje-komplexet, a GPCR-ek klatrin-burkos vezikulákban a sejt belsejébe kerülnek. Egyes receptorok ekkor válnak képessé arra, hogy az endoszóma felszínén egyéb (például MAPK vagy PI3K) jelátviteli útvonalakat is indukáljanak

A jelátvitel finomra hangolásában tehát egyre nyilvánvalóbban jelentős részt vállal az endocitotikus útvonal, nem véletlen, hogy az endoszomális rendszer kutatása igen intenzíven zajlik.

2. A BIOLÓGIAI MEMBRÁN, KEMO- ÉS FOTOSZINTÉZIS, SEJTLÉGZÉS

A sejthártya szerkezete. A sejthártya funkciói. Anyagáramlás a sejthártyán keresztül.

A sejtek anyag- és energiaellátása, az energiatermelés strukturális alapjai. Kemo- és fotoszintézis, fény- és sötétreakciók. Glükolízis, fermentáció és sejtlégzés (oxidatív foszforiláció).

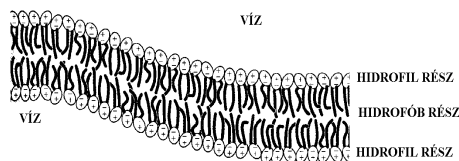
A fejezetet Szabad János egyetemi tanár jegyzete alapján módosította és összeállította Lippai Mónika.

A BIOLÓGIAI MEMBRÁN

A biológiai membránok képződése az élet kialakulásának egyik alapvető feltétele volt. A sejthártya sok, a sejtek szintjén megvalósuló alapvető életfolyamathoz szükséges. A membránok egyrészt elkülönítik a sejt belsejét a külvilágtól, másrészt szelektív kapcsolatot biztosítanak a sejt belseje és a környezete között. A sejthártyákban lokalizálódó szerkezetek biztosítják a sejtek közötti kapcsolatot is.

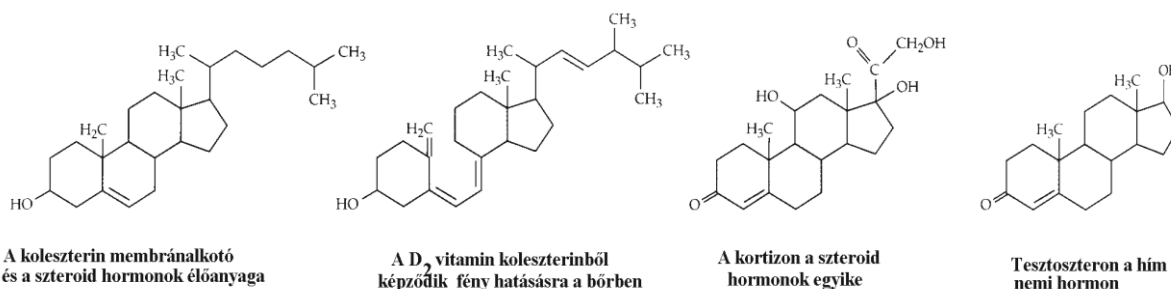
A sejthártya (plazmamembrán) szerkezete

A sejthártya alapja egy kb. 8-10 nm „vastag” kettős foszfolipid réteg (2.1. ábra). A membrán belsejét a foszfolipidek hidrofób zsírsav-oldalláncjai alkotják. A membrán külső részein a foszfolipidek hidrophil részei helyezkednek el.



2.1. ábra. A sejthártya alapja foszfolipid kettősréteg.

A foszfolipidekben a glicerinnel két zsírsav kapcsolódik (észter kötéssel), és vagy egy foszforsav-maradék (a foszfatidokban), vagy a foszforsav-maradékhoz még egy poláros csoport (leggyakrabban kolin, etanolamin vagy szerin, 2.2. ábra). Minél rövidebbek a zsírsav-oldalláncok, és minél több bennük a telítetlen kettős kötés, annál folyékonyabb (fluidabb) maga a membrán. A membránok koleszterint is tartalmaznak (2.3. ábra). A koleszterin a membránok fluiditását élettani körülmények között csökkenti. A membránfluiditás-változásnak fontos szerepe van a hőmérsékletre való alkalmazkodásban.

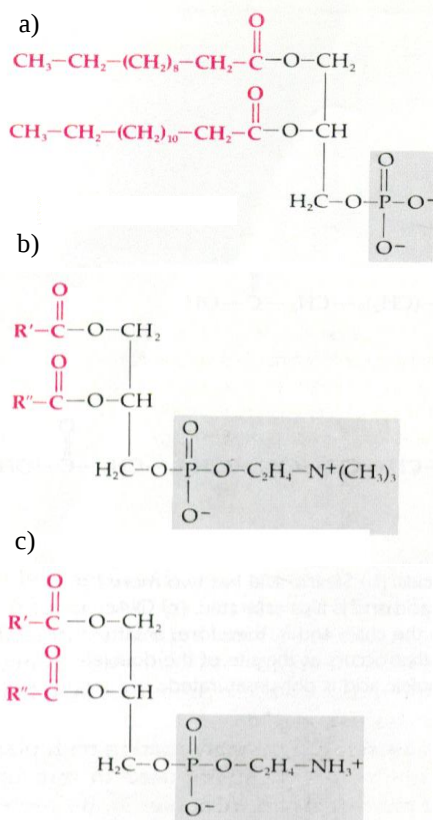


2.3. ábra. A koleszterin és néhány származéka.

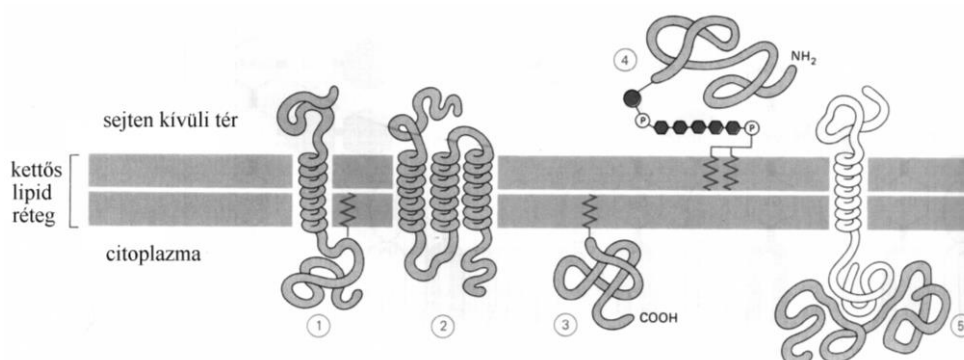
A plazmamembrán biológiai funkciójában a tömegének általában kb. 50%-át kitevő fehérjéknek elengedhetetlen szerepe van (2.4. és 2.5. ábra). A membránfehérjéknek lokalizáció szempontjából a következő fontosabb típusai vannak.

A *transzmembrán fehérjék*re az jellemző, hogy egy vagy több olyan doménjük (funkcionális egységük) van, amelyek átvívnak a sejthártyán (2.6. ábra). A transzmembrán domén legtöbbször egy olyan α -hélix, amely kb. húsz hidrofób vagy semleges jellegű aminosavból áll. A fehérje azon részeiben, amelyek a transzmembrán doménnel szomszédosak, gyakoriak a pozitív töltésű lizin és arginin aminosavak. A pozitív töltésű oldalláncok a foszfolipidek poláros feji részéhez kötődve stabilizálják a fehérjét. Gyakoriak az olyan fehérjék, amelyeknek több transzmembrán doménje van.

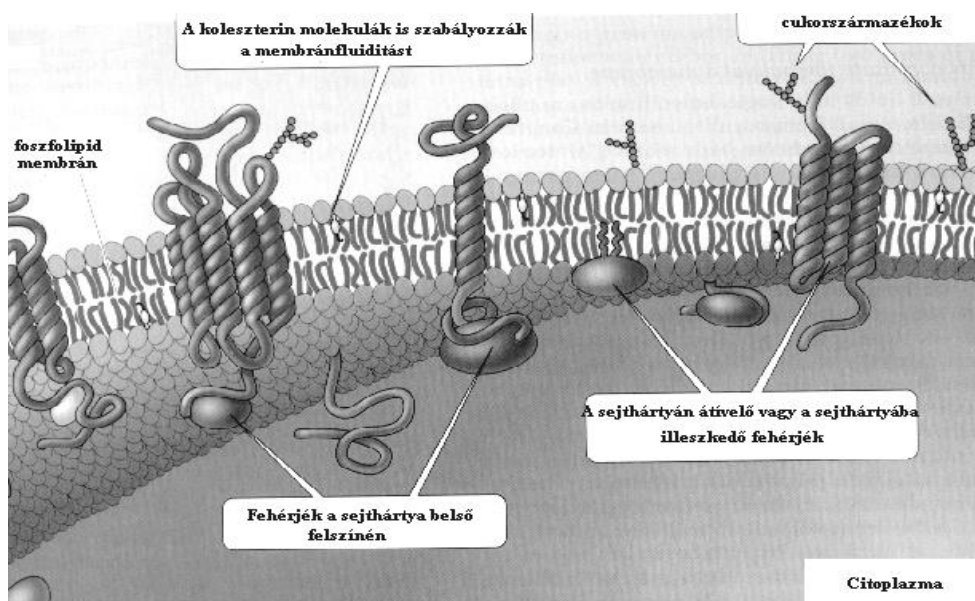
Transzmembrán fehérjék biztosítják kis molekulák, ionok membránon keresztül történő *transzportját*.



2.2. ábra. Háromféle foszfolipid: a) foszfatidsav; b) foszfatidil-kolin; c) foszfatidil-etanolamin.



2.4. ábra. A membránfehérjék különféle típusai. 1. és 2.: *transzmembrán* fehérjék; 3. és 4.: *lipidhorgonnyal kapcsolódó* fehérjék; 5. *transzmembrán* fehérjéhez asszociálódó *perifériás* fehérjék.

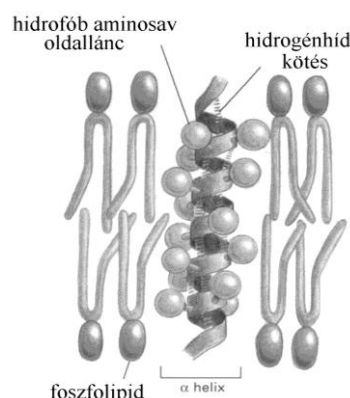


2.5. ábra. A sejthártya felépítése sematikusan.

A transzmembrán fehérjék *teremtenek kapcsolatot* a sejten belüli szerkezetek, a sejtváza elemei és a sejten kívüli állomány (extracelluláris mátrix) között is. A membránon átívelő kapcsolat erős és rugalmas: biztosítja a sejthártya integritását, és a kapcsolatot a sejten kívüli molekulákkal. A transzmembrán fehérjék egy része *receptorként* működik: külső „antenna” része gyűjti össze a sejthez érkező információkat, és juttatja a sejten belülről a jelátvitel során, citoplazmatikus részének enzimatis aktivitása révén.

Sok fehérje nem íveli át, hanem belülről vagy kívülről kapcsolódik a sejthártyához (2.4. és 2.5. ábra). Ez lehetséges úgy, hogy hidrofób horgonnyal (amely általában lipid-oldallánc) rendelkeznek, vagy úgy, hogy transzmembrán fehérjékkel létesítenek kapcsolatot.

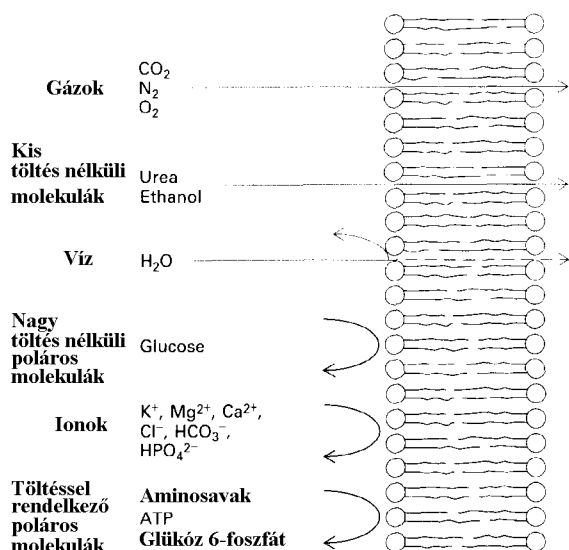
A sejthártya külső felületén található fehérje-oldalláncokhoz (és egyes lipidkomponensekhez is) gyakran kapcsolódnak különféle cukor-származékok (2.4. és 2.5. ábra). A sejt védelmének kívül egyéb fontos szerepük is van. Némelyikük a sejtek azonosításához, identitásához járul hozzá, mások a sejtekhez érkező jelek felfogásában és továbbításában játszanak



2.6. ábra. Egy transzmembrán motívum szerkezete.

szerepet, ismét mások a sejtek között, vagy az extracelluláris mátrixszal teremtenek kapcsolatot.

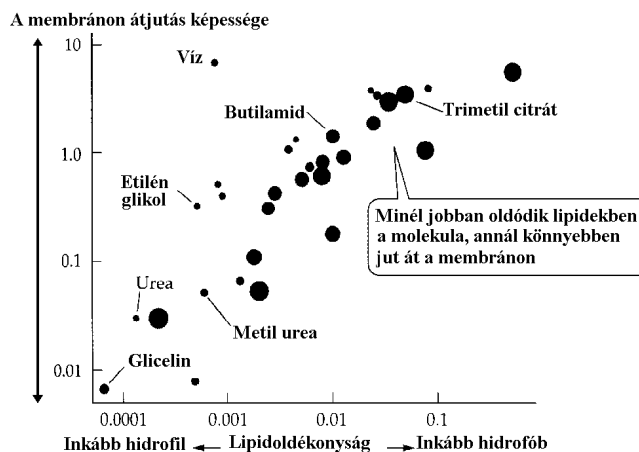
A biológiai membrán „folyékony”, azaz alkotóelemei oldalirányban, a membrán síkjában könnyedén mozognak. Egyes, általában ugyanazon folyamatban résztvevő membránfehérjék azonban az őket közrefogó lipidekkel úgynevezett *lipidutaj*t (raftot) képeznek, és együtt „úszkálnak” a membránban.



2.7. ábra. Különbféle anyagok átjutási képessége mesterséges lipidmembránon.

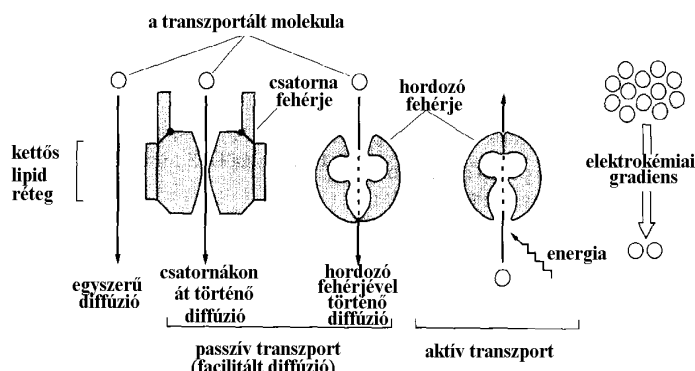
Anyagszállítás membránokon keresztül

A csak foszfolipid molekulákból álló mesterséges membránon a gázok, a hidrofób molekulák, a töltés nélküli kis molekulák, valamint a kis poláros természetű molekulák könnyen átjutnak (2.7. ábra). Minél jobban oldódik valamely molekula lipidekben, annál könnyebben jut át egy lipidmembránon (2.8. ábra), a nagyobb poláros molekulák és az ionok azonban nem képesek erre.



2.8. ábra. A lipidoldékonyság és a lipidmembránon való átjutás közötti kapcsolat.

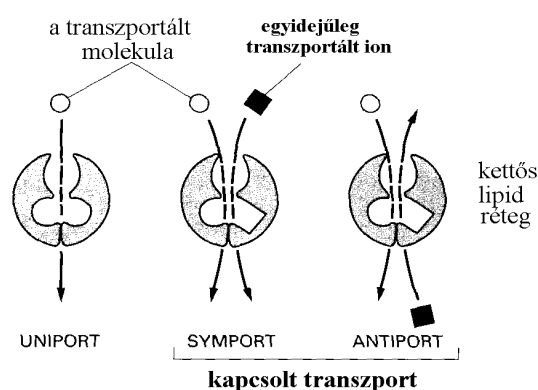
A tapasztalat viszont az, hogy a biológiai membránokon a nagyobb poláros természetű molekulák és az ionok is átjutnak, ebben a membránok fehérjéi játszanak szerepet (2.9. ábra). A biológiai membránokon keresztül, fehérjék segítségével történő anyagtranszportnak energiafelhasználás szempontjából két formáját lehet elkülöníteni.



2.9. ábra. A fehérjék a membránokon át történő anyagszállítás fontos szereplői.

A **passzív transzport**hoz nincs szükség energiára. A passzív transzport során koncentrációgradiensüknek megfelelő irányban áramlanak be anyagok a sejtekbe, membránba épült fehérjék közvetítésével (2.9. ábra). A transzportot biztosító fehérjék lehetnek *csatornák*, rajtuk keresztül ionok áramlanak át. Vannak állandóan nyitott, és szabályozott, csak adott jelre megnyíló ioncsatornák.

A *transzporter* (más néven hordozó fehérje vagy carrier) egy olyan transzmembrán fehérje (vagy fehérjekomplex), amely mintegy „bezsilipeli” a molekulákat a sejtbe. A transzporterek három típusát különböztetik meg, a szállított molekulafajták számától és a transzport irányától függően (2.10. ábra). Egyfajta anyagot (uniport) az *uniporter* szállít. Kétféle anyag kapcsolt transzportja esetén (*szimporter*: egy irányba; *antiporter*: ellentétes irányba) az egyik anyag mindig a koncentrációgradiensének megfelelő, a másik azzal ellentétes irányban jut át a membránon.

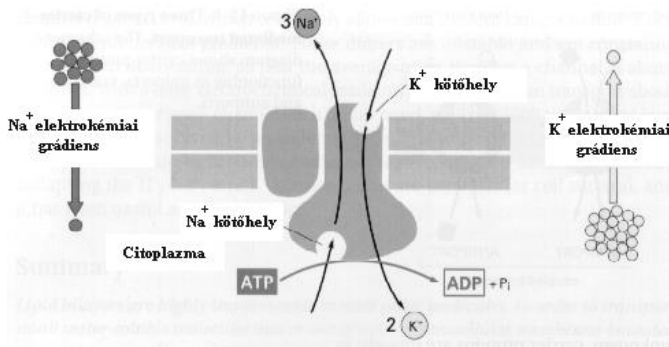


2.10. ábra. A transzporter biztosította diffúzió típusai.

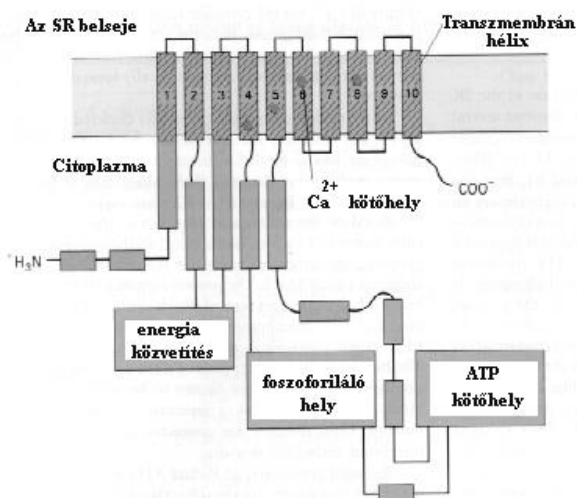
Az **aktív transzport** során a *pumpafehérjék* vagy *ATPázok* ATP-ben raktározott energia felhasználásával juttatnak át molekulákat a membránon (2.9. ábra). Ekkor az anyagszállítás mindig koncentrációgradienssel szemben valósul meg.

Az aktív transzport jól ismert példája a Na^+/K^+ pumpa, amely ATP segítségével három Na^+ iont

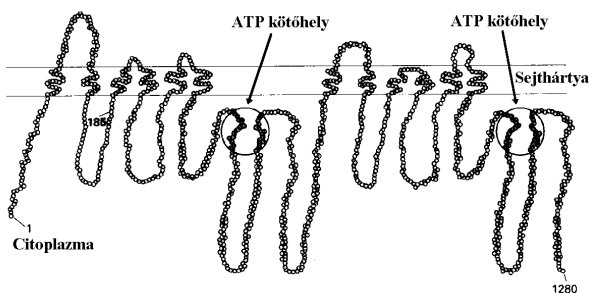
pumpál ki a sejtől, miközben két K^+ iont juttat be a (2.11. ábra). Az izomsejtek speciális endoplazmatikus retikulumából, a szarkoplazmatikus retikulumból a citoplazmába jutó, az összehúzóódáshoz szükséges Ca^{2+} -ionokat Ca^{2+} pumpa szivattyúzza vissza a szarkoplazmatikus retikulumba. A szarkoplazmatikus retikulum membránjába épült Ca^{2+} pumpa tíz transzmembrán domént, ATP-kötő, energiageneráló és további funkcionális egységeket tartalmaz (2.12. ábra). Az MDR (multidrug resistance) fehérje is egy pumpa: a sejt számára káros különféle hatóanyagokat pumpálja ki a sejtekből (2.13. ábra).



2.11. ábra. A Na^+-K^+ pumpa működésének sematikus ábrázolása.



2.12. ábra. A Ca^{2+} pumpa moduláris felépítése (SR: szarkoplazmatikus retikulum)



2.13. ábra. Az MDR fehérje szerkezete.

A membránok szerepe az energiatermelésben

A plazmamembrán külső és belső oldala között -60-90 mV a nyugalmi membrán-potenciál értéke. A membrán szigetelőképessége kiváló: ez az érték $2,4 \times 10^5$ V/cm-nek felel meg. A kiváló szigetelőképességben rejlő potenciális lehetőség az evolúció során az energianyerésre is alkalmassá vált. Ha a membrán két oldalán töltéskülönbség halmozódik fel, azt apránként le lehet vezetni, és például ATP-ben lehet raktározni, így meg lehet oldani a sejtek energia-ellátását.

Az eltérő H^+ -ion koncentráció kialakítására három „megoldás” terjedt el az élővilágban.

1. Egyes archebaktérium fajok sejtthártyájába *bakteriorodopszin* molekulák épülnek. A fotopigmentet tartalmazó bakteriorodopszin lényegében egyfajta protonpumpa: az elnyelt fényenergiát arra használja, hogy protont szivattyúzzon a sejt belsejéből a sejten kívülre.

2. A *fotoszintetizáló élőlényekben* a fényenergia hatására bekövetkező elektronmozgás olyan protonpompákat „működtet”, amelyek protont juttatnak a kloroplasztok tilakoidjainak belsejébe a fotoszintézis folyamán.

3. A *mitokondriumokban* a szerves anyagok oxidációjából származik az az elektron, amelynek nagy energiáját kihasználva protonpompák H^+ ionokat juttatnak a mitokondrium belsejéből a mitokondrium külső és belső membránja közötti térbe.

Az eltérő H^+ -ion koncentrációban rejlő energia hasznosulásának is három módja ismert.

1. A membránba épült *ATP-szintáz* tevékenysége révén ATP-be épül be, hogy kielégítse a sejtek szerteágazó energiaigényét. Az ATP-szintáz enzim azt az energiát építi be ATP-be, amelyet a membrán két oldalán eltérő H^+ ion-koncentráció miatt rajta áramló H^+ ionokból nyer. (Lásd a 2.20 és a 2.27. ábrát.)

2. A protonáramlás „meghajtja” a baktériumok membránjába épült rotorszerű szerkezetet, amely a flagellinből álló *bakteriális ostort* forgatja (lásd az 1.9. ábrát).

3. A mitokondrium úgynevezett *menedékcsonat*on át hővé disszipálódik, biztosítva az állandó hőmérsékletű élőlények hőenergia-igényét.

Minden biológiai energiatermelő rendszer funkciója tehát membránokkal kapcsolatos, és a membránok kiváló töltésszigetelő képességén alapul.

ÖSSZEFOGLALÁS

A biológiai membránok a sejtek kulcsfontosságú alkotói. Az életfolyamatokhoz szüksége funkciók nagy részét fehérjekomponensei biztosítják. Szelektív áteresztő-képességük teszi lehetővé a sejtek belsejének viszonylagos állandóságát, szabályozhatóságát. A membránok teszik lehetővé az eukarióta sejteken belül a különféle kompartmentek elkülönülését, hogy az egyes kompartmentekben a kémiai reakciók hatékonyan menjenek végbe. A membránoknak alapvető szerepe van az energiatermelő folyamatokban is.

17. AZ IDEGSEJTEK ÉS AZ ÉRZÉKELÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA.

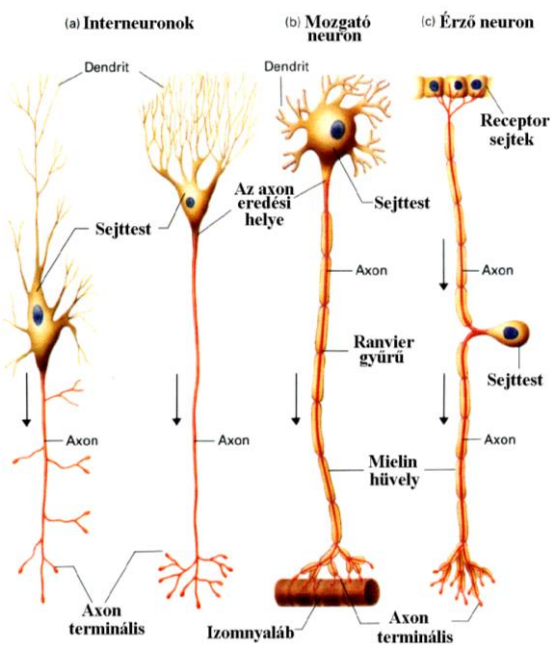
Neuronok és szinapszisok. Membrán és akciós potenciál. Ioncsatornák. Neurotranszmitterek és receptorok. A mechanikai, kémiai és fényingerek érzékelése. Az érzékszervek molekuláris biológiája

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika

BEVEZETÉS

Az élőlényeket folyamatosan éri a külső és a belső környezetből érkező jelek, ingerek. Az élőlények a jeleket felfogják, feldolgozzák, majd olyan válaszokat szerveznek, amelyek alapján tovább élhetik életüket. A hormonális és az immunrendszer viszonylag lassan reagál a változó környezeti feltételekre, a gyors reakciókat az idegrendszer szervezi. Az idegrendszer az állatvilágra jellemző szervrendszer, alapvető funkcionális egysége a neuron. Az idegsejtek szinapszisokkal érintkeznek más sejtekkel, így adják át az információt. Melyek az idegsejtek jellemzői? Hogyan továbbítanak jeleket? Mi a jelek természete? Milyen események játszódnak le egy idegsejt működésekor?

A soksejtű élőlények többségében olyan érzékszervek vannak, amelyekkel érzékelik mindazokat a környezeti jeleket, ingereket, amelyeknek életük szempontjából jelentősége van. Az ingereket ingerületté alakítják, amelyeket az idegrendszer fel tud dolgozni. Hogyan érzékelik az élőlények a környezeti hatásokat? Hogyan alakítják át a mechanikai, kémiai és fény formájában érkező jeleket akciós potenciállá? A jelen fejezet célja az idegsejtek és az érzékelés molekuláris működésének megismerése.



17.1. ábra. Az ember idegsejtjeinek jellegzetes típusai. A nyilak az ingerület vezetésének irányát mutatják.

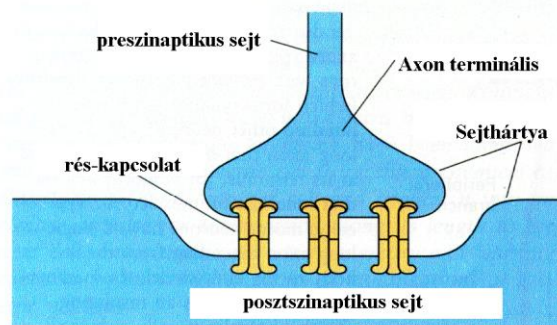
Az idegsejt

Az idegsejt az idegrendszer funkcionális egysége (17.1. ábra). Az ember idegrendszerét kb. 10^{11} neuron alkotja, legtöbbjük interneuron. Bár alakjukat illetően nagyon különbözőek, közös jellemzőjük, hogy valamennyiüknek van (i) sejtteste, (ii) nyúlványai: axonok és dendritok, és (iii) szinapszisokkal kapcsolódnak más sejtekhez. Ezek funkciói a következők:

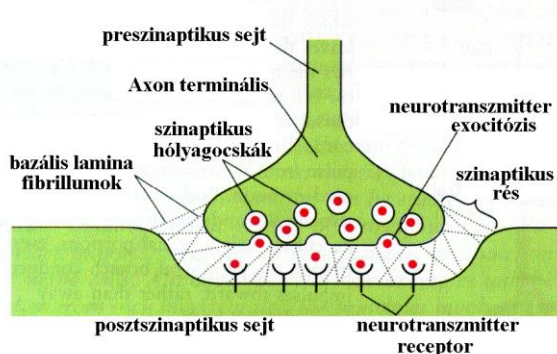
A **sejttest** egy kis „számítógép”: a beérkező jeleket analizálja, átalakítja, és szükség szerint akciós potenciált generál. Az akciós potenciál képződésében különleges szerepe van az axon eredési helyén levő kiemelkedésnek, az **axondombnak**. Ezen kívül a sejttestben szintetizálódik a legtöbb sejtalkotó, bármilyen messze is legyen később a működési helye. A sejttestben szintetizálódott molekulák ún. axonális transzport során kerülnek pl. az axonterminálisba, illetve az axonterminálisból vissza a sejttestbe. Az axonális transzport folyamán kinezin motormolekulák szállítják a különféle anyagokat a sejttestből az axonok végeibe, illetve dineinek vissza a sejttestbe.

Az **axonok** és a **dendritok** a bennük végignyúló mikrotubulusok képződésével együtt kialakuló olyan (néha igen hosszú) nyúlványok, amelyekkel a neuron más sejtekhez kapcsolódik. A dendritok jeleket gyűjtenek és továbbítanak a sejttesthez. Az axonok jeleket továbbítanak a sejttesttől a szinapszisokig. A központi idegrendszerből kilépő hosszú axonokat az idegsejteket védő/tápláló gliasejtek egy típusa, a Schwann-sejtek nyúlványai borítják.

(a) Elektromos szinapszis



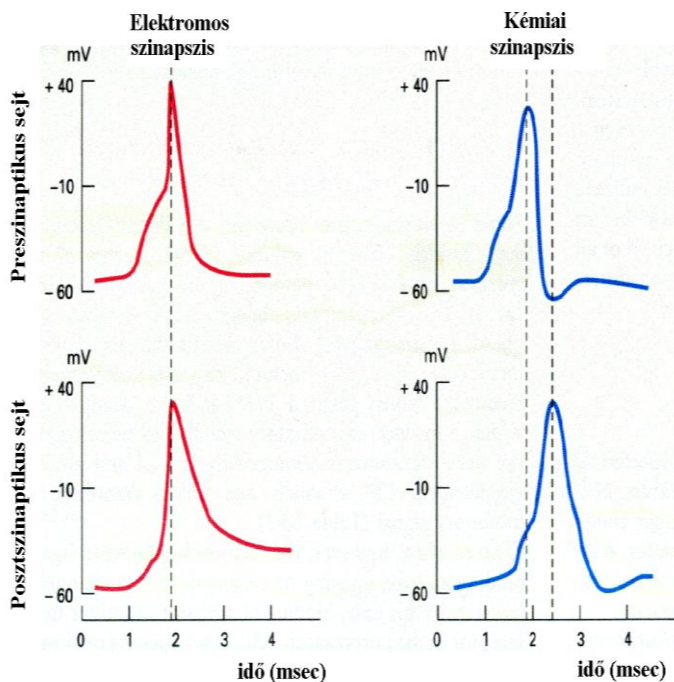
(b) Kémiai szinapszis



17.2. ábra. Egy elektromos és egy kémiai szinapszis szerkezete vázlatosan.

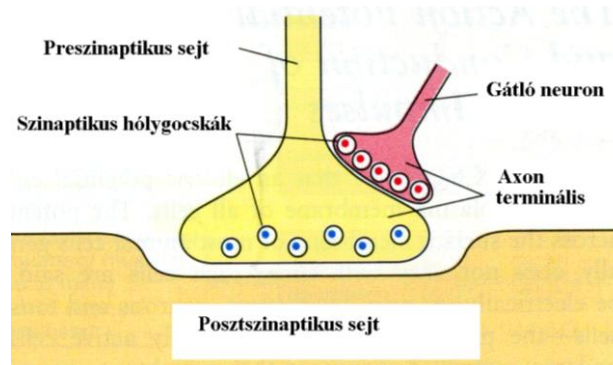
A **szinapszisok** révén az idegsejtek egymással, izom- vagy mirigysejtekkel teremtenek kapcsolatot. A szinapszisoknak jelátviteli szempontjából két típusa van. (1) Az **elektromos szinapszisokat** az úgynevezett réskapcsolatok (angolul gap junctions) alkotják, közvetlen összeköttetést biztosítanak a sejtek között (17.2. ábra; lásd még: 20. előadás anyaga). Az elektromos szinapszisokon a jel szinte késedelem nélkül, de ugyanakkor változatlan formában jut egyik sejtből a másikba (17.3. ábra). Az elektromos szinapszisok különösen a hidegvérű állatokban gyakoriak, de a magasabbrendű gerincesekben is megtalálhatóak.

(2) A **kémiai szinapszisokon** kis molekulák - **neurotranszmitterek** - közvetítésével, a sejten kívüli térben keresztül jut át az információ egyik sejttől a másikhoz (a kémiai szinapszisban tulajdonképpen egyfajta parakrin jelátvitel zajlik). A kémiai szinapszis preszinaptikus részében (az axonterminálisban) apró szinaptikus hólyagocskákból, vezikulákból vannak töltve a neurotranszmitterek (17.2. ábra). Az akciós potenciál megérkezése után az axonvégződésben megnő a Ca^{2+} -koncentráció, és hatására a szinaptikus vezikulák tartalma exocitózissal a szinaptikus résbe ürül. A neurotranszmitterek az őket specifikusan kötő receptorral kapcsolódnak a rés másik oldalán, a jelet fogadó posztzinaptikus idegsejt membránján, hogy aztán a jel ezen a sejten haladjon tovább. A vezikulák ürítése, a neurotranszmitterek kapcsolódása a receptorral és a jelátvitel természetesen időbe telik. A jel a kémiai szinapszisokban kb. 0,5-1 msec alatt jut át egyik sejtről a másikra (17.3. ábra). A kémiai szinapszisok ugyanakkor lehetőséget biztosítanak a jel módosítására. Míg az úgynevezett serkentő szinapszisok a posztzinaptikus sejt membránjának depolarizációját okozzák (lásd később), a gátló szinapszisok hiperpolarizációt okoznak, gátolják az akciós potenciálok generálását (17.4. ábra).



17.3. ábra. Akciós potenciál átvitele elektromos és kémiai szinapszisokon át egyik sejtből a másikra.

A kémiai szinapszisok további jellemzője, hogy egy axonvégben többféle neurotranszmitter is lehet, bár egy szinaptikus vezikulában mindig csak egyféle van. A szinapszisokban olyan mechanizmusok is működnek, amelyek a neurotranszmitterek gyors visszavételéről vagy lebontásukról gondoskodnak, így ismét „üzemképes” állapotba hozzák a szinapszist. A neurotranszmittereket bontó enzimek közül az acetilkolin-észteráz enzim a legismertebb, amely nagy hatékonysággal bontja az acetilkolint. A szinapszisban lebomló molekulák is visszavevődnek a preszinaptikus sejtbe, ahol aztán vagy rögtön az axonvégben, vagy a sejttestbe szállítás után válnak használhatóvá.



17.4. ábra. A szinapszisok kapcsolata módosíthatja a szinapszisok funkcióját.

A neurotranszmitterek

Kémiai természetüket illetően a neurotranszmitterek sokfélék lehetnek (17.1. és 17.2. táblázat). Vannak közöttük viszonylag egyszerű szerves molekulák, mint pl. az acetilkolin, a glicin, az ATP és más purin- valamint aminosav-származékok. Más neurotranszmitterek peptidek, és egyben neurohormonként is funkcionálhatnak. A neurohormonok a vérkeringésen keresztül szállítódó jelmolekulák és módosíthatják az idegsejtek válaszoló képességét a neurotranszmitterekre. Például az adrenalin és a noradrenalin nemcsak hormon, hanem neurotranszmitter is. Nagyon sokféle ligand-receptor rendszer alkalmas szinapszis-funkció betöltésére, ha a szinapszis rendelkezik a ligandot (a neurotranszmittert) bontó képességgel is.

Mi történik a szinapszisokban? Hogyan alakul át a kémiai, neurotranszmitterek formájában jelenlevő jel olyan akciós potenciállá, amely a posztzinaptikus sejtben tovaterjed? A szinapszisokban olyan **ligand-függő csatornák** vannak, amelyek segítségével a kémiai jelek a membrán áteresztő-képességének megváltozásához vezetnek. Ennek két fő mechanizmusát a nikotin és muszkarin típusú acetilkolin-receptor példáján keresztül az előző, 16. fejezet ismertette.

17.1. táblázat. Néhány aminosav-származék neurotranszmitter

Neurotranszmitter	Kémiai szerkezet	A neurotranszmitter jellege
Acetilkin	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	
Glicin	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Aminosav
Glutaminsav	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{C}(=\text{O})\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Aminosav
Dopamin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Tirozin származék
Noradrenalin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Tirozin származék
Adrenalin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_2^+-\text{CH}_3$	Tirozin származék
Oktopamin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Tirozin származék
Szerotonin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Triptofán származék
β -alanin	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Aszparaginsav származék
Hisztamin	$\text{HC}=\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Hisztidin származék
γ -amino-vajsav (GABA)	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Glutaminsav származék
Taurin	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$	Glicin származék

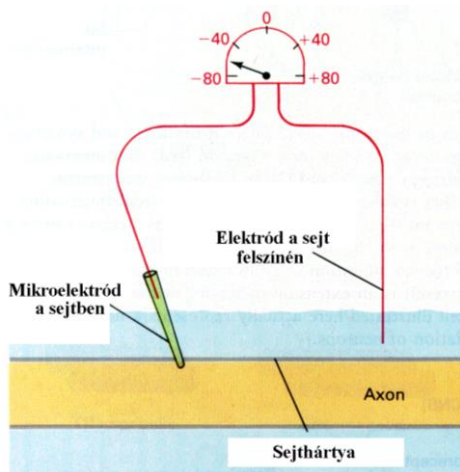
17.2. táblázat. A peptidtermészetű neurotranszmitterek egy csoportja neurohormonként is funkcionál.

Neurotranszmitter	Felépítés*
β -endorfin	YGGFMTSEKSQTPLVTLLFKNAIILNAYKKGE
Met-enkefalin	YGGFM
Leu-enkefalin	YGGFL
Szomatosztatin	AGCKNFFWLFTSC
Luteinizáló hormon kiválasztását serkentő hormon	pEHWSYGLRPG-NH ₂
Tirotropin kiválasztását serkentő hormon	pGUP-NH ₂
Neurotenzin	PGLYENLPRRPYIL
Angiotenzin I	DRVYIHPFHL
Angiotenzin II	DRVYIHPF
Vazoaktív intesztinális peptid	HSDAVFTDNYTRLRLEMAVLLTLNSILN-NH ₂

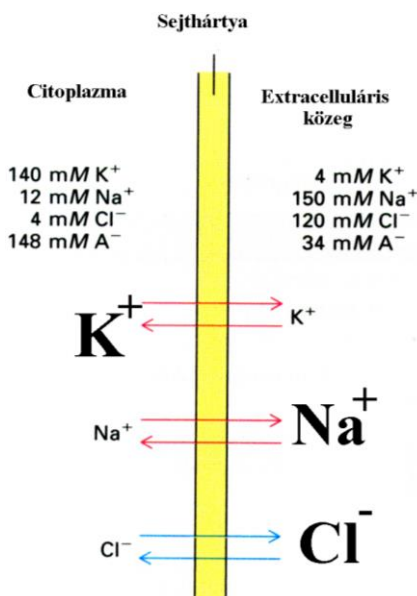
* Egybetűs aminosav kódok. A C-terminálshoz néhol -NH₂ csoport kapcsolódik, az N-terminális pedig néha pirrol-(p) gyűrűs szerkezetű. Az enkefalinok a β -endorfinnal egyetemben az úgynevezett természetes opiátok. Az idegrendszerben termelődnek és a fájdalomimpulzusokat továbbító neuronok funkcióját gátolják. Az ópium és származékai, mint például a morfium, a természetes opiátok hatását mutatják. Rendszeres használatuk során szenvedélybetegség alakul ki.

A membrán- vagy nyugalmi potenciál

Valamennyi sejt (és így a nyugalmi állapotú neuronok) plazmamembránjának citoplasma felőli oldala negatív töltésű a sejt külsejéhez képest: a membrán belső és külső felszíne közötti elektromos feszültség általában -40 – -100 mV, idegsejtekben -70 – -80 mV (17.5. ábra). A nyugalmi vagy membrán-potenciál oka a kationok és az anionok egyenlőtlen megoszlása a sejthártya két oldalán (17.6. ábra). A Na^+ és a K^+ ionok egyenlőtlen eloszlásáért a sejthártyában található Na^+ - K^+ -pumpák, valamint az állandóan nyitott állapotban lévő, „leaky” K^+ -csatornák felelősek. Az ionkoncentrációk és a Nernst-egyenlet alapján számított ún. elektrokémiai potenciál (E) értéke egy „átlagos idegsejt” esetében -91 mV, ami jó egyezést mutat a mért membrán-potenciál értékekkel (a Nernst-egyenlet: $E = \frac{RT}{ZF} \times \ln \frac{K_k}{K_b}$, ahol K_k és K_b az adott ion külső illetve belső koncentrációját jelöli, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, F a Faraday állandó, Z pedig a vegyérték).



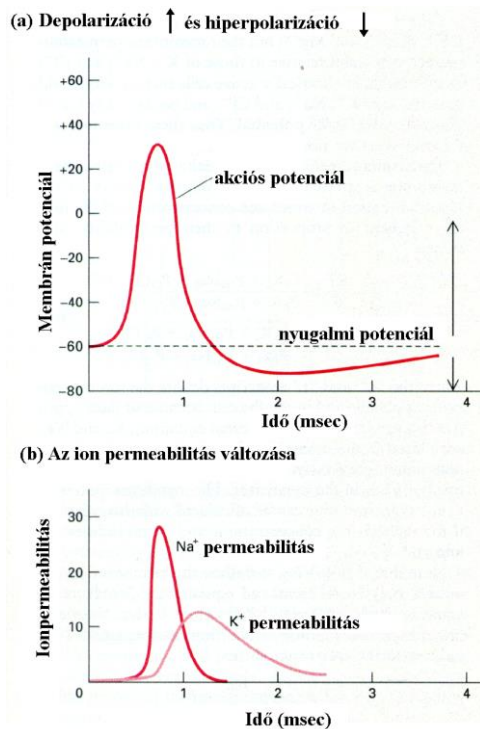
17.5. ábra. A membrán (nyugalmi) potenciál mérése.



17.6. ábra. Az anionok és a kationok koncentrációja különböző a sejthártya két oldalán. Az A^- jel elsősorban a fehérjék negatív töltéseit jelöli.

Az akciós potenciál

Az ideg- és izomsejtek sajátja, hogy membránpotenciáljuk hirtelen lecsökkenhet, a membrán depolarizálódhat. Sőt, ilyenkor a membrán belseje rövid időre pozitív töltésűvé válik a sejt külsejéhez képest (17.7. ábra). A depolarizáció oka az, hogy az ionkoncentráció kiegyenlítődhet a membrán két oldala között. A kérdés az, hogy vajon milyen esemény nyomán válik a membrán permeábilissá az ionokra?



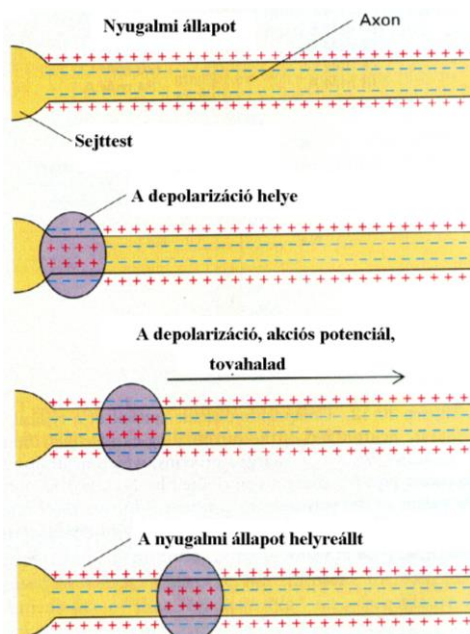
17.7. ábra. A membránpotenciál (a) valamint a membránon átváramló Na^+ és K^+ ionok mennyiségének (b) változása a membrán egy adott pontján az idő függvényében.

A magyarázat a **ligand- és feszültségfüggő ioncsatornáknak** rejlik. A membrán kezdeti depolarizációja után (amely a ligand-függő ioncsatornák működésének hatására következik be, lásd 16. fejezet) további ioncsatornák nyílnak ki. Na^+ -csatornákon Na^+ ionok ömlenek be passzív diffúzióval a sejtbe, K^+ -csatornákon át pedig K^+ ionok szöknek ki a citoplazmából. Mivel ezek a Na^+ - és a K^+ -csatornák a membránfeszültség csökkenésének hatására nyílnak, *feszültségfüggő (ion)csatornáknak* nevezik őket. A csatornák mindössze 0,5-1,5 msec-ig vannak nyitva, majd zárulnak (17.7. ábra). Nyitott állapotban egy Na^+ -csatornán kb. hater ezer Na^+ ion halad át. Miután zárultak a csatornák, néhány msec-ig hiperpolarizálódik ott a membrán, mielőtt helyreáll a nyugalmi potenciál (17.7. ábra). A hiperpolarizáció oka a K^+ -csatornák késleltetett záródásában rejlik. A membránpotenciált Na^+ - K^+ -pumpák állítják helyre.

A membránpotenciál csökkenése miatt a szomszédos feszültségfüggő Na^+ és K^+ csatornák is nyílnak, ezért rövid idő múlva ott is lecsökken a membránpotenciál. Miközben a csatornák becsukódnak, a szomszédos

csatornák nyílnak, csukódnak és így tovább (17.8. ábra).

Végeredményben tehát ez a nagymértékű depolarizáció hullámként végigterjed az axon mentén: ezt nevezik **akciós potenciálnak**. Ez az a jel, amely az axonterminálshoz érve neurotranszmitterek felszabadulását váltja ki, tehát az idegsejtek kommunikációjához elengedhetetlen. De hogyan keletkezik az akciós potenciál?



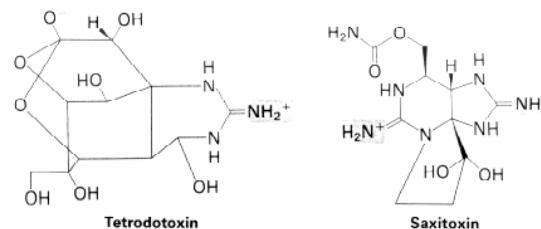
17.8. ábra. Az akciós potenciál az axondomb tövében keletkezik, és lényegében nem más, mint a depolarizációs hullám tovaterjedése az axon mentén.

Az axonok eredési helyén – az axondombon – olyan speciális csatornák vannak, amelyek a sejtestben hozott döntések hatására nyílnak, és megfelelő mértékben depolarizálják a membránt. A membrán depolarizációja vezet azon Na^+ - és K^+ -csatornák nyílásához, amelyek az akciós potenciál tovahaladását biztosítják (17.8. ábra).

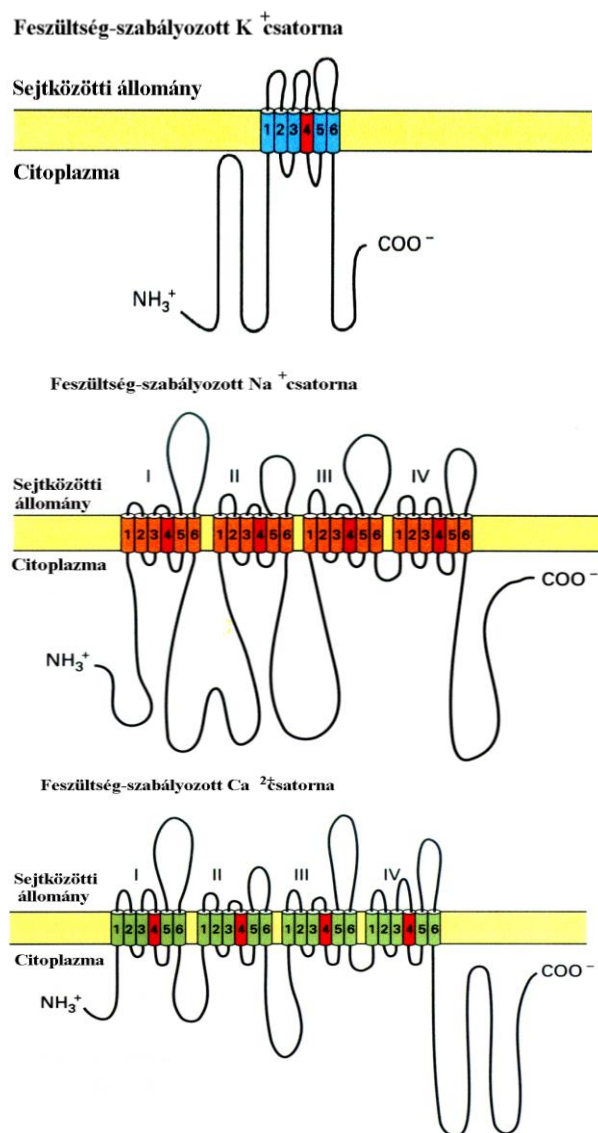
Az akciós potenciál terjedése annál gyorsabb, minél vastagabb axon mentén halad. A tintahal 600 μm vastag óriás axonjának minden μm^2 -én kb. 500 feszültségfüggő Na^+ -csatorna van, itt 12 m/sec (43,2 km/óra) sebességgel halad az akciós potenciál. A magasabbrendűek jóval fejlettebb idegrendszerében nem lenne helye ilyen vastagságú axonoknak. A megoldás a *szigetelés*: a mielinben gazdag membránnal burkolt (mielinhüvelyes) axonokon a burkmentes helyeken, az ún. Ranvier-befűződésekben 10^4 Na^+ -csatorna van μm^2 -enként. A mielinhüvelyes axon mentén mintegy szökellve, gyorsan halad az akciós potenciál: a mindössze 12 μm átmérőjű axon mentén is képes 12 m/sec sebességgel terjedni.

A feszültségfüggő ioncsatornák szerkezete

A Na^+ -csatorna szerkezetére a csatorna affinitás-kromatográfiás tisztítása után derült fény. Két neurotoxin, a fugu tengeri hal tetrodotoxinja, valamint egy vörös ostoros moszat saxitoxinja specifikusan kötődik a Na^+ -csatornához (17.9. ábra). A Na^+ -csa-



17.9. ábra. A Na^+ -csatornához specifikusan kötődő két neurotoxin szerkezeti képlete.

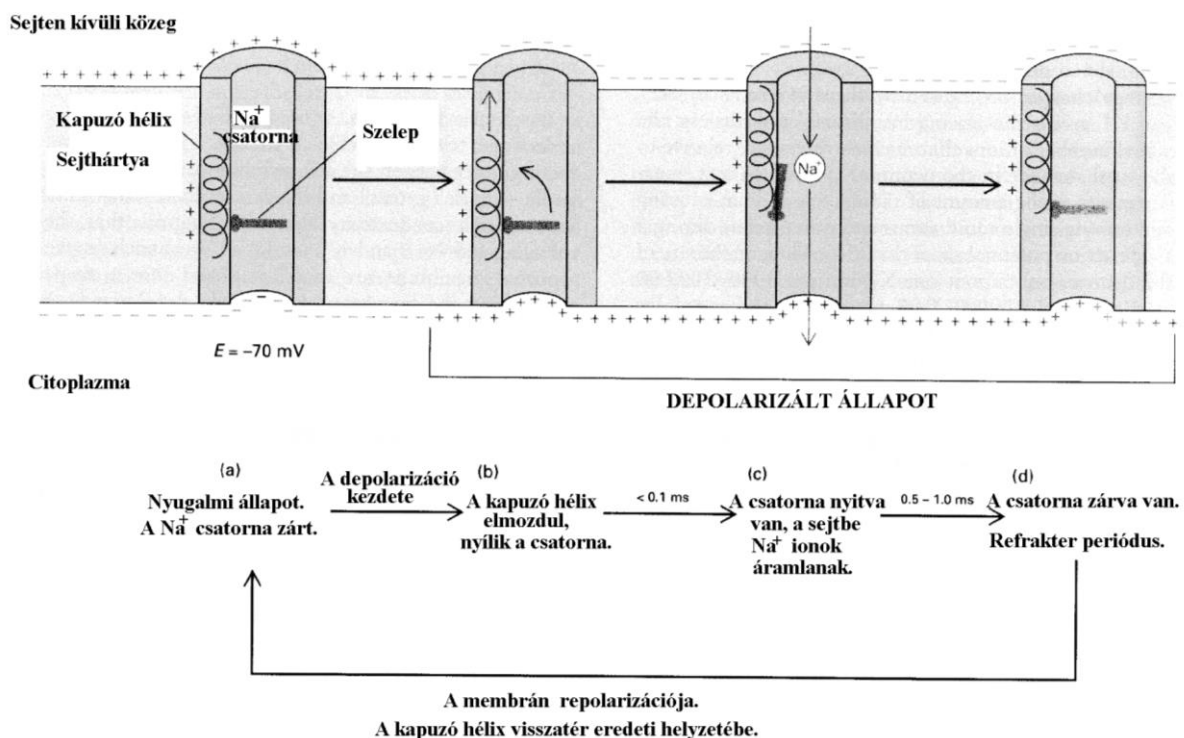


17.10. ábra. A feszültségfüggő ioncsatornák szerkezete. Pirossal a kapuzó hélixek vannak kiemelve.

tornát a neurotoxinnal való kapcsolódása miatt izolálhatták, tanulmányozhatták. A Na^+ -csatorna egy kb. 250 kDa tömegű fehérje, 4x6 transzmembrán doménnel, jellemző sejten belüli és sejten kívüli szakaszokkal. Az egyes transzmembrán domének közül kitüntetett minden 4., az ún. *kapuzó hélix* szerepe (17.10. ábra). A kapuzó hélix nyugalmi állapotban a membrán citoplazma felőli részében van. A depolarizáció hatására a kapuzó hélix a membrán sejten kívüli térrel határos részébe mozdul el. Hely-

változtatása közben a Na^+ -csatorna kinyílik, rajta Na^+ -ionok áramolhatnak át. Mintegy 0,5 msec múlva a kapuzó hélix eredeti helyére kerül, ennek hatására a csatorna zárul (17.11. ábra).

A csatornának van egy ún. *refrakter periódusa*: nyílása-csukódása után néhány msec-ig nem reagál az újabb membránpotenciál-csökkenésre. Ez annak köszönhető, hogy a pórust a depolarizáció hatására „bedugaszolja” egy, a csatornafehérje citoszolikus oldalán található globuláris domén, amely csak késleltetve válik le újra és teszi lehetővé – újabb depolarizáció esetében – a csatorna átjárhatóságát. A refrakter szakasz azért fontos, mert emiatt a depolarizáció (az akciós potenciál) nem haladhat visszafelé az axonon a sejttest felé: természetes körülmények között az akciós potenciál mindig az axondombtól az axonvég felé halad.



17.11. ábra. A kapuzó hélix szerepe a feszültségfüggő Na^+ -csatorna működésében.

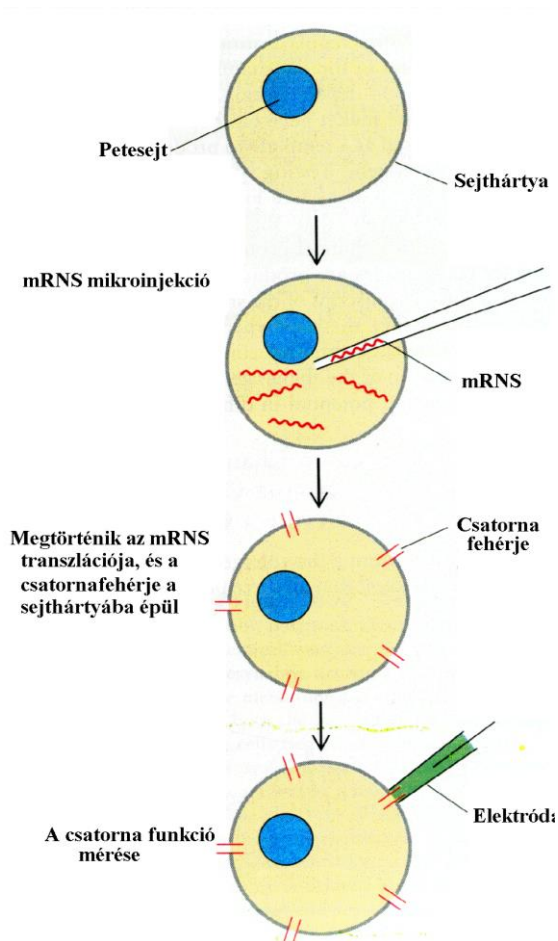
A kapuzó hélixek molekuláris analízise mutatta meg, hogy az α -hélix minden harmadik aminosava lizin (K) vagy arginin (R) - tehát olyan aminosav, amelynek pozitív töltése van (17.12. ábra). A pozitív töltések szerepére olyan kísérletekben derült fény, amelyekben a Na^+ -csatorna gén megfelelő szakaszának lizin és arginin kódjait úgy változtatták meg, hogy töltés nélküli aminosavat kódoljon. A mutáns génről mRNS-t állítottak elő, majd a mutáns mRNS-t afrikai karmosbeka (*Xenopus laevis*) petéibe injektálták, amely egyébként nem expresszál Na^+ -csatornát (17.13. ábra). A mutáns mRNS transzlációja során képződő fehérjék a petesejt plazmamembránjába épülnek, ahol funkciójukat az úgynevezett patch-clamp technikával lehet tanulmányozni. (A patch-clamp technikával

mindössze egyetlen csatornát tartalmazó kis folt területén is lehet mérni az átfolyó áram erősségét.)

A módosított fehérjék vizsgálata megmutatta, hogy minél több lizint és arginint helyettesít neutrális aminosav a 4. transzmembrán hélixek területén, annál kevésbé funkcionál a Na^+ -csatorna, bizonyítva a pozitív töltésű aminosavak szerepét nemcsak a kapuzó hélix, hanem a Na^+ -csatornák működésében is.

Feszültség-szabályozott K^+ csatorna	
Hélix 4	R V I R L V R V F R I F K L S R H S K G L O
Feszültség-szabályozott Na^+ csatorna	
Hélix 4: domén I	S A L R T F R V L R A L K T I S V I P G L K
domén II	G L S V L R S F R L L R V F K L A K S W P
domén III	G A I K S L R T L R A L R P L R A L S R F E
domén IV	R V I R L A R I G R I L R L I K G A K G I R
Feszültség-szabályozott Ca^{2+} csatorna	
Hélix 4: domén I	K A L R T F R V L R P L R V L S G V P S L O
domén II	L G I S V L R C I R L L R L F K I T K Y W T
domén III	S V V K I L R V L R A L R P L R A I N R A K
domén IV	I S S A F F R L F R V M R L I K L L S R A E

17.12. ábra. A kapuzó hélixek (minden hat transzmembrán domén közül a negyedik) minden harmadik aminosava lizin (K), vagy arginin (R). A csatorna belsejébe tehát olyan aminosav-oldalláncok nyúlnak, amelyeknek pozitív töltése van.



17.13. ábra. Módszer mesterségesen előállított feszültségfüggő Na^+ -csatorna funkciójának tesztelésére.

AZ ÉRZÉKSZERVEK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

1. Mechanoreceptorok

A mechanoreceptor sejtek mechanikai hatásokat alakítanak át akciós potenciállá és továbbítanak a központi idegrendszerbe "feldolgozásra". A mechanoreceptorok a már megismert ligand-függő és a feszültségfüggő ioncsatornák mellett harmadik típusú, ún. *feszültség-érzékeny ioncsatornákat* tartalmaznak: ezek a sejthártyába illeszkedő olyan fehérjék, amelyek a membránt ért mechanikai hatásokra kinyílnak, rajtuk ionok áramolnak át, és lecsökkentik a membránpotenciált. A membránpotenciál csökkenése miatt kinyílnak a szomszédos feszültségfüggő ioncsatornák, hogy az érzékejtől akciós potenciál induljon az idegrendszer központja felé.

A mechanoreceptorokra a következő példákat említjük (17.14. ábra). Mechanikai ingerek érzékelésére specializálódott idegsejtek érzékelik az izomsejtek mozgását, és védik az izmokat a túlzott feszüléstől. A *szőrsejtek* szintén a mechanikai ingerek

érzékelésére specializálódott idegsejtek. Nyúlványaik nagyon sok feszülés-érzékeny csatornát tartalmaznak, amelyek révén alkalmasak arra, hogy mechanikai hatásokat érzékeljenek. Ismert példa a rákok sztatolitja, a halak oldalvonaliszerve, valamint az ember félkörös ívjáratának érzékejtői, de talán a legismertebb a hangérzékelés mechanizmusa a belső fülben. Hanghullámok hatására a csigában (Corti-féle szerv) található fedőmembrán megfelelő része rezonál, rezgésbe jön, és hozzáér a közelében levő szőrsejtekhez, nyitja bennük a feszülés-érzékeny csatornákat, akciós potenciált, ingerületet kelt, amely aztán átadódik egy, a központi idegrendszerbe futó másik idegsejtre.

2. Kemoreceptorok

A kemoreceptorok olyan érzékejtők vagy érzékszervek, amelyek (i) specifikusan észlelik a környezet bizonyos molekuláit, és (ii) hatásukra akciós potenciált generálnak. A kemoreceptorok működésének alapja a ligand-receptor kölcsönhatást követő jelátvitel, amelyet ioncsatornák nyitódása, csukódása, membrán depolarizáció és akcióspotenciál-képződés követ (17.15. ábra). A kemoreceptorok olyan sejtek (vagy olyan sejteket tartalmaznak), amelyek plazmamembránjában speciális receptorfehérjék vannak. Ezek a receptorfehérjék képesek kapcsolódni a különféle típusú ligandokkal, és kémiai természetű ingerek hatását közvetítik az agyba. A kemoreceptoroknak két típusa van. (i) A légnemű vegyületek érzékelést a szagló, (ii) a vízben oldottakét az ízérező szervek végzik.

(i) A **szaglószer** működését a hámsejtek közélő idegsejtek biztosítják - egy kutyanak pl. kb. 4×10^7 szaglóneuronja van (17.16. ábra). A szaglósejtek felületnövelő, finom, csillószerű nyúlványai az orrüregbe nyúlnak, ahol vékony nyálkaréteg védi őket.

Hogyan működnek a szagló neuronok? A szaganyag (azaz a ligand) GPCR típusú receptorokkal kapcsolódik, a kölcsönhatás után jelátvitel játszódik le (17.15. ábra). A G-fehérjék aktiválódását követően cAMP (másodlagos hírvivő molekula) képződik, amely Na^+ -csatornát nyit: akciós potenciál képződik. A környező világ gazdag szaganyagokban. A szaglósejtekből annál több akciós potenciál ered, minél erősebb a szaginger.

A legújabb kutatások olyan nagy géncsaládok létre derítették fényt, amelyek szaganyag-receptorok szintézisét kódolják. Az 1990-es években Linda Buck és Richard Axel (Nobel-díjat kaptak 2004-ben) az egér genomjában kb. ezer olyan gént azonosított, amelyek szaglóreceptor-fehérjék képződését kódolják - ezek a gének a genom kb. 3%-át teszik ki. (Az ember genomjában mintegy háromszáz olyan gén van, amely szaglóreceptor-fehérjék képződését kódolja.)

A receptorgének kizárólag a szaglóhámban fejeződnek ki, és egy-egy fajta csak néhány sejtben expresszálódik. Ráadásul a szaglóhám egy sejtjében csak egyetlen szaglóreceptor-fehérje van jelen.