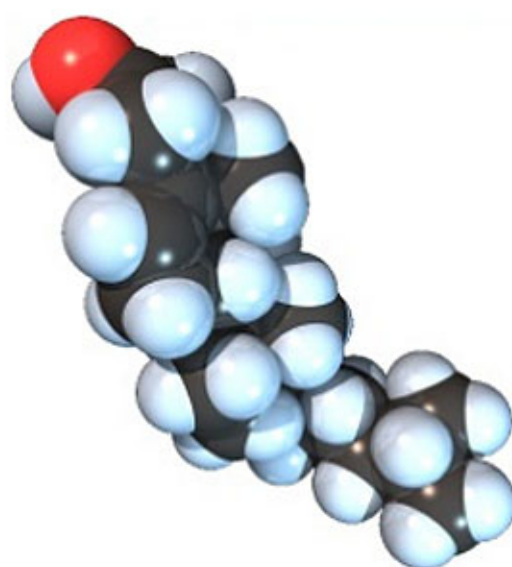




A SEJTBIOLÓGIA ALAPJAI

PÁLFIA ZSOLT
Dr. KRISTÓF ZOLTÁN

A sejtbiológia alapjai

**Pálfia Zsolt
Dr. Kristóf Zoltán**

A sejtbiológia alapjai

írta Pálfia Zsolt és Dr. Kristóf Zoltán

szerkesztette:

Pálfia Zsolt

Szerzői jog © 2013 Eötvös Loránd Tudományegyetem

E könyv kutatási és oktatási célokra szabadon használható. Bármilyen formában való sokszorosítása a jogtulajdonos írásos engedélyéhez kötött.

Készült a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú, „E-learning természettudományos tartalomfejlesztés az ELTE TTK-n” című projekt keretében. Konzorciumvezető: Eötvös Loránd Tudományegyetem, konzorciumi tagok: ELTE TTK Hallgatói Alapítvány, ITStudy Hungary Számítástechnikai Oktató- és Kutatóközpont Kft.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



Tartalom

1. Bevezetés	1
2. A sejtek molekulái	2
Funkciós csoportok	2
A szénhidrátok	4
Monoszacharidok	4
Monoszacharid származékok	6
Oligoszacharidok	7
Poliszacharidok	8
Glikokonjugátumok	9
Lipidek	10
Az összetett, hidrolizálható lipidek	10
Egyszerű, nem hidrolizálható lipidek	14
A fehérjék	16
A nukleinsavak	20
Néhány szervesetlen vegyület szerkezeti és összegképlete	22
3. Az eukarióta sejtek felépítése	25
4. A sejtmembrán szerkezete és működése	28
Membránszerkezet	28
A membrán fluiditása és szerveződése	30
Transzportfolyamatok	31
5. Sejtmag	34
A magvacska	36
A lamina	38
A magpórus komplex	38
Transzport a sejtmag és citoplazma között	39
6. Génkifejeződés; A riboszómák szerkezete és működése	42
Transzkripció – Az átírás	42
Az RNS feldolgozása	43
A transláció, a riboszómák szerkezete, működése	44
7. Az endoplazmatikus retikulum	46
Durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (DER)	46
Simafelszínű endoplazmatikus retikulum (SER)	48
8. A Golgi-készülék	51
A Golgi-készülék felépítése	51
A Golgi-készülék működése	52
A vezikuláris transzport	54
9. A szekréciós apparátus	56
10. Az endoszomális–lizoszomális kompartmentum	59
Az endocitózis	59
A lizoszomális kompartmentum	60
Extralizoszomális proteindegradáció	62
11. A növényi sejtek vakuoláris rendszere	64
A vakuólum feladatai	64
Turgor	64
Térfogatnövelés	64
Homeosztázis	64
Védelem a patogének és növényevők ellen	65
Toxikus anyagok felhalmozása, elkülönítése	65
Színanyagok felhalmozása	65
Raktározó feladat	65
Lítikus feladat	65
A lítikus és a fehérjeraktározó vakuólum	66
Lipidraktározás	68
12. A mikrotestek	70
A peroxiszómák	70

Glioxiszóma	71
Levél peroxiszóma	71
Glikoszóma	71
Hidrogenoszóma	72
13. A mitokondriumok	73
A mitokondrium felépítése	73
A mitokondrium működése	74
A mitokondriumok osztódása	75
Eredete	76
14. A plasztiszok és a fotoszintézis	77
Kloroplasztisz	77
A plasztiszok egyéb típusai	78
Proplasztisz	79
Kromoplasztisz	79
Leukoplasztisz	80
Amiloplasztisz	80
Etioplasztisz	80
Gerontoplasztisz	80
A plasztiszok (és mitokondriumok) eredete, endoszimbióta elmélet	81
Mai endoszimbionta példák	83
Plasztisz–mag géntranszfer	83
Fehérje transzport a plasztiszba (targeting)	84
Fotoszintézis	85
A fotoszintézis fényszakasza	86
Ciklikus fotofoszforiláció	90
Calvin-ciklus	90
C ₄ -es szénasszimilációs út	90
Fotorespirációs komplex	92
15. A sejtvázas	94
A mikrotubuláris váz	94
A mikrotubulusok	94
A sejtközpont	96
A csillók és ostorok	96
Az aktinváz	97
Motorfehérjék	98
Az intermedier filamentumok	98
16. Sejt-sejt, sejt-ECM kapcsolatok, jelátvitel	100
A sejtkapcsoló molekulák és szerkezetek fő típusai	100
Occludin és Claudin	100
Cadherine-k	101
Az integrinek	102
Immunglobulinszerű adhéziós molekulák	102
Szelektinek	103
Jelátvitel receptorokkal	103
Jelátvitel: sejtek közötti kommunikáció réskapcsolatokon keresztül	106
17. A növényi sejtfa	108
A sejtfa képződése	108
A sejtfa felépítő anyagok	109
Cellulóz	109
Kallóz	111
Keresztkötő glikánok vagy hemicellulózok	111
Pektin	113
Fehérjék	114
Inkrusztáló és adkrusztáló anyagok	115
A sejtfa szerkezete	116
A sejtfa megnyúlása	116
A pollenfa szerkezete, kialakulása	116
Apoplasztikus és szimplasztikus szállítás	117

Az endodermisz szerepe a sejt apoplasztikus-szimplasztikus szállításának átváltásában	118
Plazmodezmák	118
Sejtfal-sejtmembrán kapcsolat	120
A sejtfal szerepe a sejt védelmében	120
18. A sejtciklus és a sejtosztódás	122
A sejtciklus	122
Nemzedékváltakozás, növényi és állati életciklus	126
A sejtosztódás	126
Mitózis	126
Meiózis	129
19. A sejtpusztulás	132
A nekrozis	132
A programozott sejthalál	132
20. A sejtek vizsgálatának módszertani alapjai	136
Fénymikroszkópia	136
Fáziskontraszt mikroszkópia	137
Fluoreszcens mikroszkópia	137
Fénymikroszkópos mikrotechnika	138
Elektronmikroszkópia	140
Elektronmikroszkópos mikrotechnika	143
Kriotechnika	146
Az elektronmikroszkópos kép értelmezése – Műtermékek	146
Fagyasztva törés, fagyasztva maratás, replikakészítés	148
A citokémiai módszerek alapjai	150
Enzimcitokémia	151
Immuncitokémia	153
Autoradiográfia	155
A sejtalkotók centrifugális ülepítéssel történő elkülönítése – Sejtfractionálás	157
Homogenizálás	157
Centrifugálás	159
A. Animációk	165
Ajánlott irodalom	166

1. fejezet - Bevezetés

Az ismert életformák sejtes szerveződésűek. Az evolúció során két alapvető sejtstruktúra alakult ki: a prokarióta és az eukarióta sejt. E két sejtípus felépítése és működése sok tekintetben különbözik, de a legalapvetőbb anyagcserefolyamatok nagyfokú, a közös eredetre utaló hasonlóságot mutat. Az eukarióta sejtekből alakultak ki a soksejtű szervezetek melyeknek szerveződési és működési alapegysége a sejt. Egyedfejlődésük során számos különböző sejtípus jön létre, melyek egymással együttműködve és egymásra hatva hozzák létre a szervezetüket felépítő szöveteket, szerveket.

A sejtek felépítésének és működésének megértése, a megszerzett ismeretek alkalmazása a biológia számos területén alapvető fontosságú. A pro- és eukarióta egysejtű vagy soksejtű szervezetek (illetve a belőlük származó sejtek) vizsgálatával több tudományterület is foglalkozik. Ezek egyike a sejtbiológia (citológia) a biológiai tudományok szerteágazó területe, amely a sejtek szerkezetével, működésének jelenségeivel és szabályozásával, fiziológiai tulajdonságaival, a sejtek felépítésében részt vevő sejtstruktúrákkal, a sejt és környezete kölcsönhatásaival, a sejtek interakcióival és kommunikációjával, a sejtciklussal, sejtek osztódásával, differenciálódásával, a sejtpusztulással stb. foglalkozik. Kutatási módszereinek többsége molekuláris biológiai és genetikai vizsgálat. A sejtbiológia számos ponton kapcsolódik a genetikai, a biokémiai, a molekuláris biológiai, az immunológiai, a fejlődéstani tudományterületekhez.

A biológia alapképzésben ezért fontos alapoató tárgy a sejtek legfontosabb tulajdonságait és működését tárgyaló sejtbiológiai kurzus. Ismeretanyagát több felsőbbéves kurzus is felhasználja. E könyv jellemzően a soksejtű eukarióta sejtek felépítésével, szerkezeti elemeivel és azok működési alapjaival foglalkozik. A fejezetek többsége az egyes sejtorgánellumokat tárgyalja.

A sejtalkotókkal és a sejt alapvető működésével foglalkozó anyagrészeket mintegy keretbe foglalja a sejtek makromolekuláival, illetve a legalapvetőbb sejtbiológiai vizsgálati módszerekkel foglalkozó két fejezet.

A biológiai kutatásokban – és ebből fakadóan az oktatásban is – ma már megkerülhetetlen a molekuláris szemlélet alkalmazása, különösen igaz ez a sejtbiológia különböző területeire. Ezért még a sejtbiológia alapszintű tanulmányozásához/tanulásához, az ismeretek eredményes feldolgozásához nélkülözhetetlenek a szervetlen és szerveskémiai alapismeretek. A sejtek makromolekuláival foglalkozó fejezet a teljesség igénye nélkül ad leltárszerű áttekintést a könyv anyagában előforduló makromolekulák és monomerjeik, alkotóelemeik szerkezetéről. Nem helyettesíti a biológusképzésben szükséges és elvárható kémiai műveltséget, de segít felidézni azt.

A módszertani blokk azokat a legfontosabb („klasszikus”) vizsgálati eljárásokat ismerteti röviden, amelyek valamely sejtorgánellum vagy jelenség leírásánál említésre kerülnek és hozzájárulnak az új ismeretek megértéséhez. Fontosnak tartjuk, hogy a sejtek, sejtstruktúrák szerkezetének tanulmányozásában nélkülözhetetlen és a sejtalkotók előforduló elektronmikroszkópos felvételek, fényképek értelmezéséhez, a fotókon.

2. fejezet - A sejtek molekulái

A sejteket felépítő molekulákat szervetlen és szerves vegyületekre oszthatjuk. Közöttük a határvonal nem éles, a velük kapcsolatos természettudományos ismeretek gyarapodása mellett definíciójuk többször is változott.

Szerves vegyületeknek alapvetően a széntartalmú molekulákat tekintjük, melyek a szénen kívül legnagyobb mennyiségben hidrogén-, nitrogén- és oxigénatomokat tartalmazhatnak.

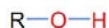
Ebben a fejezetben a teljesség igénye nélkül tekintjük át a sejtek felépítésében és működésében alapvető és ezért a tananyag elsajátításához megismerendő legfontosabb szerves vegyületcsoportokat és azok jellegzetes molekuláit. A felsorolt vegyületek részletes ismertetésével a kémiai és biokémiai kurzusok foglalkoznak.

Funkciós csoportok

A szerves vegyületek jellemző kémiai reakcióit meghatározó, egymáshoz és a molekula egyéb részéhez kovalensen kapcsolódó atomok együttesét funkciós csoportnak nevezzük. Egy molekula két vagy akár többféle funkciós csoportot is tartalmazhat. Az egyes funkciós csoportok kémiai viselkedését a csoportot tartalmazó molekula mérete nem vagy csak kismértékben, de a molekulában lévő további funkciós csoportok akár jelentősen is befolyásolhatják. A funkciós csoportokat atomi összetételük, kémiai tulajdonságaik, a csoportot tartalmazó molekula szénláncának sajátosságai, valamint az azonos funkciós csoportok száma alapján is lehet csoportosítani. A funkciós csoport szénatomjához csatlakozó első szénatomot alfa, a másodikat béta, a harmadikat gamma szénatomnak stb. nevezzük. a lánc utolsó szénatomja kapja az omega jelzést.

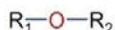
A leggyakrabban előforduló funkciós csoportok között számos oxigéntartalmú található.

Az egy vagy több hidroxilcsoportot tartalmazó szerves vegyületek az alkoholok és a fenolok. Az alkoholokban a hidroxilcsoportok nyílt vagy nem aromás gyűrűt képező telített szénhidrogénláncához csatlakoznak. Ha a hidroxilcsoport közvetlenül aromás gyűrűre kapcsolódik („R” = aromás gyűrű) fenolokról beszélünk.



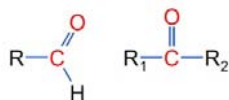
A **hidroxilcsoportot** tartalmazó szerves vegyületek általánosított képlete. Az „R” lehet nyílt vagy nem aromás gyűrűt képező telített szénhidrogénlánc (alkoholok), vagy aromás gyűrű (fenolok).

Az alkoholok származékai a két alkohol kondenzációs (vízkielépéses) reakciójában létrejövő éterek. (A köznyelvben használatos éter szó a dietil-étert jelöli.)



Az **éterkötés** általánosított szerkezeti képlete. R_1 és R_2 lehet azonos vagy különböző szénhidrogénecsoport.

A szerves molekulákban egy szénatom és a hozzá kettős kötéssel kapcsolódó oxigénatom képezi a **karbonilcsoportot**. A karbonilvegyületek közé sorolhatóak (a teljesség igénye nélkül) az aldehidek, a ketonok, a karbonsavak, az észterek, savanhidridek is. A karbonilcsoportot láncközi pozícióban tartalmazzák a ketonok, a szénlánc végén pedig az aldehidek. A karbonilcsoporthoz kapcsolódó szénlánc egyaránt tartalmazhat alifás és/vagy aromás elemeket. A legegyszerűbb, egy szénatomos, karbonilcsoportot tartalmazó vegyület a formaldehid ($H_2C=O$).



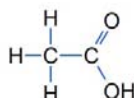
Aldehid (bal oldalt) és **keton** (jobbra) funkciós csoport általánosított szerkezeti képlete.

Ugyanazon (láncvégi) szénatomra kapcsolódó karbonilcsoportból és hidroxilcsoportból áll a **karboxilcsoport**, amely összetett funkciós csoport. A karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek vizes közegben proton leadására képesek, vagyis savas jellegűek. Az egy karboxilcsoportot tartalmazó nyílt láncú, telített karbonsavak

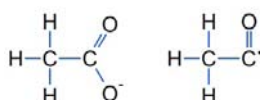
(monokarbonsav) homológ sort alkotnak. Egy szénatomot tartalmaz a hangyasav, az ecetsav két, a propionsav három, a vajsav 4 szénatomos. A telített monokarbonsavak homológ sorának nagyobb szénatomszámú tagjait zsírsavaknak nevezzük.



Karboxilcsoport (pirossal jelölve) a karbonsavak általánosított szerkezeti képletében.

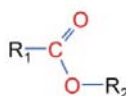


Két szénatomos karbonsav az **ecetsav** szerkezeti képlete.



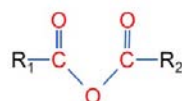
Két szénatomos karbonsav, az **ecetsav** ionja az acetát-ion (balra) és a szintén erősen reakcióképes formája az acetylgyök (jobbra).

Alkoholok (vagy fenolok) és savak kondenzációs reakciójából keletkeznek az észterek. A sav reakciópartner lehet karbonsav vagy ásványi sav, ez alapján a reakciótermék karbonsavészter vagy szervetlen sav (pl. foszforsav, kénsav, salétromsav) észtere. Az észterek általában hajlamosak hidrolízisre.



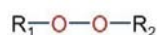
Az **észterkötés** (pirossal jelölve) általánosított szerkezeti képlete.

A karbonsavszármazékok másik nagy csoportját alkotják a két szerves sav kondenzációs reakciójából keletkező savanhidridek.



A **savanhidridek** általánosított szerkezeti képlete. R1 és R2 jelölhet azonos vagy különböző szénláncokat.

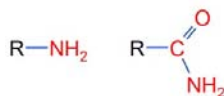
A szerves peroxidokban peroxid funkciós csoport található. Ha a **peroxidcsoport** egyik oldalán hidrogén helyezkedik el, akkor szerves hidroperoxidról (ez nem azonos a hidrogénperoxiddal!) beszélünk. Igen erősen reakcióképes funkciós csoport, mivel az O–O kötés könnyen felszakad, és szabad gyökök keletkeznek.



A **peroxidcsoport** (pirossal jelölve) általánosított szerkezeti képlete. R1 és R2 lehet azonos, vagy R2 lehet hidrogén (hidroperoxid!).

A funkciós csoportok között igen fontos a kén- és a nitrogén- tartalmúak szerepe is. Ilyenek például az aminosavak, a tiolok, a szulfidok és diszulfidok stb.

A bázikus tulajdonságú **aminok** nitrogént tartalmaznak a funkciós csoportjukban. A szénlánc komponens tartalmazhat aromás és nyílt szénláncú elemeket is. A nitrogénhez karbonil funkciós csoporttal (C=O) kapcsolódó szénláncú vegyületek az **amidok**.



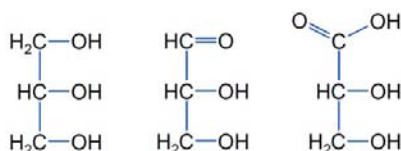
Az **aminok** (balra) és az **amidok** (jobbra) általánosított szerkezeti képlete.

A funkciós csoportjukban kénatomot tartalmazó szerves molekulák a kénorganikus vegyületek. A kén tartalmú funkciós csoportok igen változatosak. Itt az alkoholok, az éterek és a peroxidok analógjait, azaz a tiolokat, a szulfidokat és a diszulfidokat sorakoztatjuk fel.

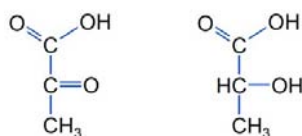


Balról jobbra haladva a **tiol**, a **szulfid** és a **diszulfid** funkciós csoportok (pirossal jelölve).

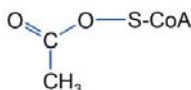
Néhány példa a funkcióscsoportokra:



A **glicerín**, a **glicerinaldehid** és a **glicerinsav** szerkezeti képlete.



A **piroszőlősav** (ionja a piruvát) és a **tejsav** (ionja a laktát) szerkezeti képlete.



Acetil-koenzim-A (az S a koenzim-A láncvégi SH csoportját jelöli, amelyhez tioészter kötést kialakítva kapcsolódik az acetil gyök).

A szénhidrátok

A szénhidrátok vagy szacharidok a természetben legnagyobb mennyiségben előforduló szerves, karbonilcsoportot tartalmazó polihidroxi-oxovegyületek, karbonilcsoportot és hidroxilcsoportokat tartalmaznak.

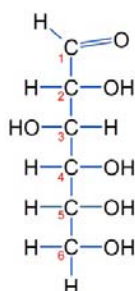
Monoszacharidok

A molekulaszervezet összetettsége alapján a szénhidrátok legegyszerűbb képviselői az egyszerű cukrok vagy monoszacharidok. A karbonilcsoport szénláncon belüli helyzete szerint lehetnek polihidroxi-aldehidek (aldózok) vagy polihidroxi-keetonok (ketózok). Összegképletük $C_nH_{2n}O_n$, ahol n leggyakrabban 3 (triózok), 4 (tetrózok), 5 (pentózok) vagy 6 (hexózok). A triózok (pl. D-glicerinaldehid, dihidroxi-aceton) fontos szerepet játszanak a szénhidrátok lebontásában és szintézisében.

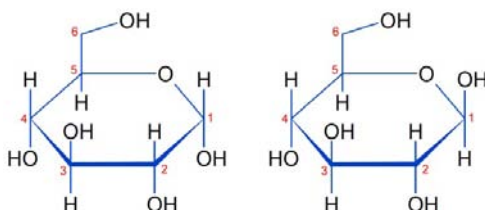
A karbonilsoporton kívül a szénhidrátok szénatomjai egy-egy hidroxilsoportot hordoznak. A nyílt láncú alak több ún. aszimmetriacentrumot tartalmazhat. A hidroxilsoportok térállásának kombinációja különbözteti meg egymástól az azonos szénatomszámú monoszacharidokat (pl. a hexózok között a glükóz, galaktóz, mannóz stb.). Az egymással tükörszimmetrikus molekulák egy adott cukor D és L optikai izomerjei (pl. D- és L-glükóz). A természetben előforduló monoszacharidok többsége D-változat.

A monoszacharidok vizes oldatban gyűrű alakot vesznek fel, intramolekuláris ún. ciklo-félacetál kötés jön létre a karbonilsoport és egy hidroxilsoport között. A hattagú gyűrűt piranóznak, az öttagút furanóznak nevezik (ezek a gyűrűs formák a legstabilabbak). A gyűrű záródásakor az eredetileg a karbonilsoportot hordozó szénatomon kialakuló ún. glikozidos hidroxilsoport térállása kétféle lehet, ezért α - és β - sztereoizomerek jönnek létre.

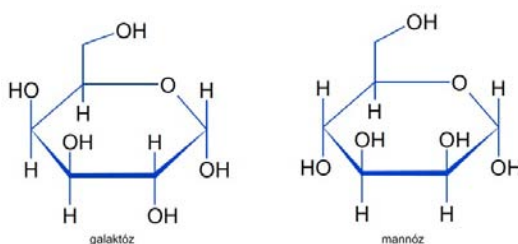
A leggyakoribb hexoaldóz, a glükóz nemcsak monoszacharidként, de diszacharidokban és poliszacharidokban is elterjedt, származékai számos vegyület kialakításában részt vesznek. Központi szerepet játszik a sejtek energiaforgalmában, szerkezeti funkciójú molekulák kialakításában.



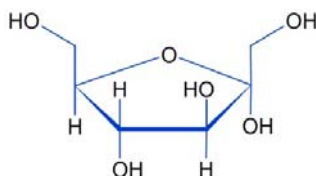
A **D-glükóz** (szőlőcukor) nyílt láncú, valamint α - és β - (gyűrűs) alakja.



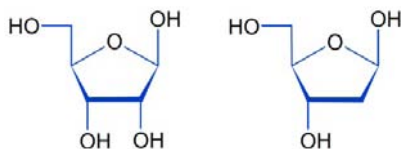
A **D-glükóz** α - és β - (gyűrűs) alakja.



A **D-galaktóz** és **D-mannóz** (szintén hexoaldózok) α -piranózgyűrűs szerkezeti képlete.



Egy hexoetóz, a **D-fruktóz** (gyümölcscukor) furanózgyűrűs alakja.



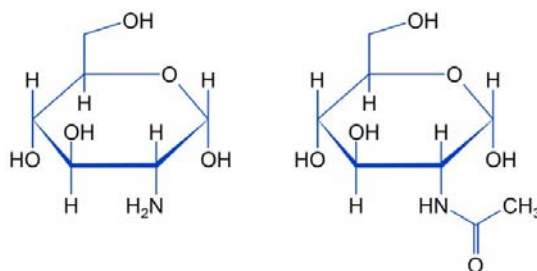
Öt szénatomos furánógyűrűs cukrok a **D-ribóz** (balra) és a **2-dezoxi-D-ribóz** (jobbra). Előbbi a ribonukleotidok és a ribonukleinsavak, utóbbi a DNS (dezoxiribonukleinsav) alkotóeleme. A furánógyűrűk glikozidos hidroxilcsoportja a szerves bázisok nitrogénatomjához kapcsolódik (N-glikozid).

Monoszacharid származékok

A monoszacharidok származékai közül kiemelkedőek a foszfát-észterek, melyek egyaránt fontos szerepet töltenek be a szénhidrátok felépítésében és lebontásában, a fotoszintézis során a CO_2 megkötésében: a szénhidrát anyagszállítási termékei.

A cukrok szulfát-észterei poliszacharidok (pl. kondroitin) felépítésében vesznek részt.

Az aminocukrok esetében a gyűrű alakú molekula egyik alkoholos (nem glikozidos) hidroxilcsoportja van aminocsoportra cserélve. A D-glükózamin proteoglikánok alkotóeleme, az N-acetil-D-glükózamin a kitin monomerje, β -1,4 kötésekkel alkot hosszú láncokat.

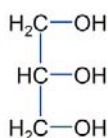


Hexózamin a **D-glükózamin** (balra) és származéka, az **N-acetil-D-glükózamin** szerkezeti képlete.

Ha egy monoszacharid glikozidos hidroxilcsoportja kondenzációs reakció során kapcsolódik egy másik hidroxilcsoportot tartalmazó molekula $-\text{OH}$ csoportjával, ún. O-glikozid keletkezik. Ha a glikozidos hidroxilcsoport a reakciópartner amino- vagy iminocsoportjával alkot vízkilépéssel hoz létre C–N kötést (nukleozid), N-glikozid jön létre.

Redukciós és oxidációs reakcióiban további származékok keletkezhetnek.

Megfelelő körülmények között a nyíltláncú, azaz karbonilcsoportot tartalmazó aldózok és ketózok redukciójuk során alkoholokká alakulnak. A kialakuló **cukoralkoholok** szintén nyíltláncúak (pl. a glicerín).



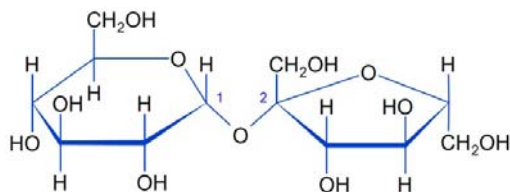
A **glicerín** egy háromértékű alkohol, számos anyagcserefolyamat köztes terméke.

A monoszacharidok különböző mértékű oxidációjával alakulnak ki (többek közt) a uronsavak. A reakció során a láncvégi hidroxilcsoport oxidálódik, a molekula gyűrűs szerkezete megmarad. Az uronsavak például poliszacharidok (pektin) monomerjei lehetnek.

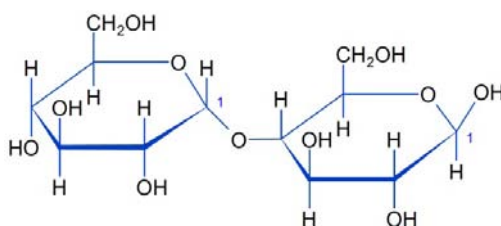
Oligoszacharidok

A szénhidrátok glikozidos hidroxilcsoportja kondenzációs reakcióban, kovalens (éter-) kötéssel kapcsolódhat egy másik szénhidrát molekula glikozidos vagy alkoholos (nem glikozidos) hidroxilcsoportjához. A kialakuló kötés glikozidkötés, a létrejövő új molekulák glikozid típusú vegyületek. Két monoszacharid kapcsolódásával jönnek létre a diszacharidok, hároméval a triszacharidok stb. Nem nagyszámú (néhányszor tíz) egység kapcsolódásával kialakuló vegyületeket soroljuk az oligoszacharidok közé.

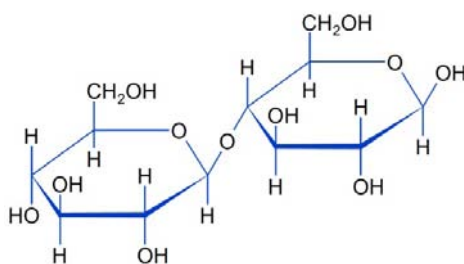
A diszacharidok kialakításában résztvevő monomerek lehetnek egyformák vagy különbözőek. A diszacharidokat alkotó két molekula közötti kötés többféleképpen is megvalósulhat (a kötésben részt vevő szénatomok számozásával jelöljük). Vízben jól oldódnak, számos anyagcserefolyamatban szerepet játszanak.



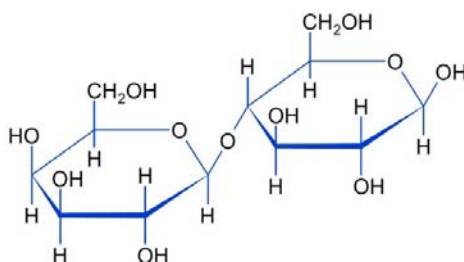
A **szacharóz** vagy répacukor egy α -D-glükopiranoz és egy β -D-fruktofuranóz molekulából épül fel, 1–2 glikozidos kötéssel.



A **maltóz** egy α -D-glükopiranoz és egy β -D-glükopiranoz molekulából áll, α -glikozidos 1–4 kötésben. A keményítő hidrolízisterméke.



A **cellobióz** két β -D-glükózból β -1–4 kötéssel épül fel. Szerkezete a glikozidos hidroxilcsoportok térállásában tér el a maltózétól. A cellulóz részleges hidrolízisével állítható elő.



A **laktóz** 1-4 kötéssel egymáshoz kapcsolódó β -D-glükózból és β -D-galaktózból épül fel. Emlősök anyatejében fordul elő, felszívódásakor hidrolizál, alkotóelemeit a máj veszi fel és glükózzá alakítja.

Az oligoszacharidok szerepe igen változatos. Részt vesznek a sejtek felületi molekuláris „mintázatának” kialakításában, a sejt felismerési és szabályozási folyamatokban. Képviselőit megtaláljuk a sejtközi térben is. Az oligoszacharidok között számos molekula összetett fehérjék (pl. glikoproteinek) és lipidek (glikolipidek) komponensei. Rendkívüli változatosságot mutatnak, melynek alapja a különböző monoszacharidok nagy száma, a monomer egységek számának és kapcsolódási lehetőségeinek bősége.

Poliszacharidok

A poliszacharidok (glikánok) monoszacharidokból és/vagy monoszacharid származékokból vízkilépéses reakcióban (kondenzáció) keletkező glikozidos kötésekkel tartalmazznak. Makromolekulák, molekulatömegük nagy, akár több száz vagy ezer monoszacharidból épülnek fel. Jellemzőik a polimerizációs fok (felépítésükben részt vevő monomer egységek száma), a kémiai összetétel, a polimerben kialakuló kötéstípusok (pl. hidrogénhid) minősége. Osztályozásukra lehetőséget ad összetételük (azonos vagy különböző monomerek alkotják) és architektúrájuk (a polimerlánc szerkezetének) vizsgálata.

Homoglikánok

Az azonos monomerekből felépülő poliszacharidok a homoglikánok.

A **cellulóz** a növényi sejtfal fő alkotóeleme. Lineáris molekula, néhány száztól több ezer D-glükóz β -1,4 glikozidos kötéssel történő összekapcsolódásával szintetizálódik. Ha az egyes cellulóz szálak rendezetten egymás mellett helyezkednek el, közöttük hidrogénhid kötésrendszer alakulhat ki. Bomlásterméke a cellobióz.

A **keményítő** a növényi sejtek tartalék tápanyaga, poliszacharid keverék, kb. 1 rész amilózból és 4 rész amilopektinből áll. Az amilóz átlag 300–1000 D-glükóz monomerből felépülő α -1,4 glikozidos kötéssel el nem ágazó, helikális lefutású láncú kapcsolódó poliszacharid. Az amilopektin több ezer D-glükózból felépülő α -1,4 láncot alkot, amelyen azonban 24–36 monomerenként α -1,6 kötésű elágazások vannak.



Balra az **amilóz** el nem ágazó, helikális lánc, jobbra az **amilopektin** látható.

A **glikogén** az állatok és a gombák tartalék tápanyaga. Az amilopektinhez hasonló elágazó láncból áll, de molekulája több elágazást tartalmaz: az α -1,6 kötésű elágazások között átlag 8–12 D-glükóz monomer található.



A **glikogén** elágazó láncának részlete.

A **kitin** egyenes láncú, N-acetil-D-glükózaminból β -1,4 kötésekkel szerveződő polimer. A rovarok és gombák vázanyaga.

A **pektinek** α -1,4 kötésrendszerű, D-galakturonsavakból álló, egyenes láncú polimerek.

Heteroglikánok

Az eltérő monomerekből felépülő poliszacharidok a heteroglikánok. Jellemző képviselőik a **glükózaminoglikánok** (GAG), melyek ismétlődő diszacharid egységekből épülnek fel, és hosszú, el nem ágazó poliszacharid láncokat képeznek. A diszacharid egységek két különböző monoszacharidból állnak, melyek gyakran módosult aminocukrok.

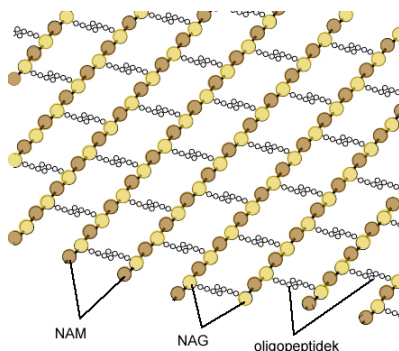
Például a **hialuronát** D-glükuronsav és N-acetil-D-glükózamin diszacharid egységekből létrejövő egyenes lánc. A diszacharidban a D-glükuronsavhoz β -1,3 kötéssel kapcsolódik az N-acetil-D-glükózamin, a diszacharid egységek β -1,4 kötéssel kapcsolódnak. A hialuronsav az állati szervezetek sejtközi állományának fontos összetevője, igen hosszú, akár több tízezer diszacharid egységből álló, a glükuronsav karboxilcsoportja miatt savas jellegű molekula.

A GAG vegyületcsoportba tartozik az állati szervezetekben a hialuronát mellett a heparin, heparán-szulfát, kondroitin-szulfát, keratán-szulfát, dermatán-szulfát. Megtalálhatók az ízületi folyadékban, porc-, ín- és csontszövetben, a száru anyagában, a bazális membránokban stb. Többségükben szulfátcsoport észteresíti az egyik vagy mindkét monoszacharid valamely funkciós csoportját. A növényekben előforduló GAG pl. a xiloglükán vagy a glükuronoarabinoxilán.

Glikokonjugátumok

Az oligoszacharidokhoz, lipidekhez, peptidekhez és proteinekhez kovalensen kötéssel kapcsolódó glikánok a glikokonjugátumok. Számos biológiailag aktív makromolekula tartozik ebbe a csoportba. Részt vesznek a sejt-sejt kapcsolatokban, a sejt felismerésben, a sejt-sejtközi mátrix kölcsönhatásokban, a sejtek differenciálódási folyamataiban stb.

A **peptidoglikán** (más néven **murein**) a bakteriális (a *Bacteria* csoportra jellemző) sejtfa anyaga. Az N-acetil-glükózamin és az N-acetil-muraminsav monoszacharidok β -1,4 glikozidos kötéssel egyenes, el nem ágazó láncokat képeznek. A láncok egymással párhuzamosan futnak, közöttük az N-acetil-muraminsav egységekhöz kapcsolódó rövid, 4–5 aminosavból álló oligopeptid láncok teremtenek lehetőséget az aminocukor láncok közötti keresztkötések kialakítására. Az oligopeptidok összetétele és kapcsolódásuk speciális, fajra jellemző. A cukorláncok lemezekbe rendeződnek és többretegű kristályrácsszerű struktúrába szerveződve alakítják ki a 8–80 nm vastag bakteriális sejtfalet.



A **peptidoglikán** egy rétegének felépítése (*Escherichia coli*). (NAG = N-acetil-glükózamin, NAM = N-acetil-muraminsav)

A **proteoglikánok** erősen glikozilált membrán- vagy mátrixfehérjék, jelentős szerepet játszanak az állati sejtközi mátrix tulajdonságainak kialakításában. A molekula alapját egyes plazmamembrán- vagy extracelluláris fehérjék adják, amelyekhez kovalens kötéssel kapcsolódik számos glükózaminoglikán. Utóbbi komponensek negatív töltésű funkciós csoportjai miatt a proteoglikán is negatív töltésű lesz, ezért jelentős mennyiségű kationt és víz molekulát képes megkötni. A proteoglikánok tulajdonságait alapvetően a GAG komponensek mennyisége és összetétele határozza meg.

A **glikoproteinek** olyan fehérjék, melyekhez glikozidos kötéssel egy vagy több oligoszacharid oldallánc kapcsolódik (glikoziláció). N-kapcsolt az oligoszacharid, ha az aszparaginsav nitrogéntartalmú oldalláncán az NH_2 funkciós csoportra kötődik (N-glikoziláció). Az O-kapcsolt oligoszacharid általában a fehérje szerin vagy treonin aminosav hidroxilcsoportjára kötődik (O-glikoziláció). Fejlett oligoszacharid oldalláncokkal rendelkeznek a sejt felszíni

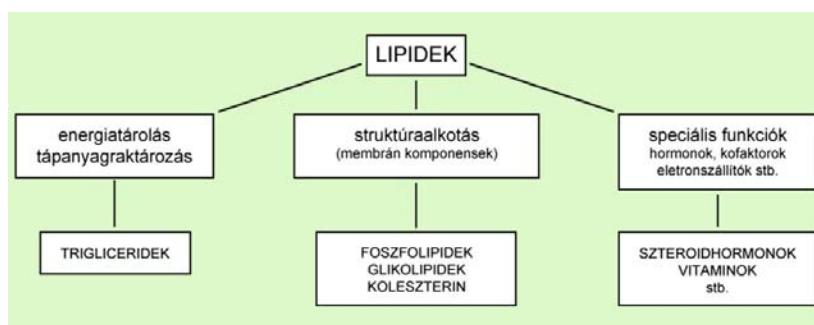
glikoproteinek. Van közöttük enzim, struktúraalkotó, hormon, receptor, transzport stb. molekula. Szerepük szerteágazó.

A **glikolipidekben** az oligoszacharid komponensek lipidmolekulára (pl. ceramidokra) kötődnek fel kovalens kötéssel. Szerepet játszanak többek közt a sejt-sejt kapcsolatokban, receptor funkciókban.

Lipidek

Vízben és poláros oldószerekben gyakorlatilag nem oldódó (hidrofób) vegyületek, amelyek apoláros oldószerekkel oldhatók. Az egyes ide sorolt vegyületcsoportok kémiai szerkezete változatos és egymástól jellegzetes eltéréseket mutat. Egyetlen közös tulajdonságuk az oldhatóságuk.

A lipideket osztályozhatjuk az élő szervezetekben betöltött funkciójuk szerint vagy kémiai szerkezetük szerint. Funkciójuk szerint tápanyag- és energiaraktározó, struktúraalkotó és speciális funkciójú lipideket, kémiai tulajdonságaik alapján a hidrolizálható (összetett) és a nem hidrolizálható (egyszerű) lipideket különböztetjük meg. Az egyszerű lipidek közé sorolhatók pl. a terpének, karotinoidok, szteroidok, egyes vitaminok, az összetett lipidek képviselői a neutrális zsírok, olajok, viaszok, a foszfo- és glikolipidek.

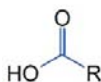


A lipidek osztályozása az élő szervezetekben betöltött funkciójuk szerint.

Az összetett, hidrolizálható lipidek

A zsírsavak

Számos összetett lipid építőelemei, sok anagcsere folyamat köztes termékei. Sok lipidvegyület tartalmaz zsírsav(ak)at, melyek felépítése alapvetően befolyásolja a lipidmolekulák tulajdonságait. A zsírsavak általában hosszabb (4–30 szénatomból álló), telített vagy telítetlen alifás szénláncú, láncvégi karboxilcsoportot tartalmazó monokarbonsavak. A molekula vázát – kevés kivételtől eltekintve – el nem ágazó, nyílt szénlánc képezi. Általánosított képletük: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$. A karboxilcsoportot követő szénatom az α , a lánc utolsó szénatomja az ω jelölést kapja.



A zsírsav általánosított szerkezeti képlete.

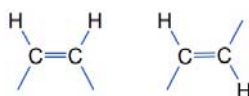
A természetben megtalálható zsírsavak – szintézisük sajátosságai miatt – általában páros számú szénatomból állnak. A **telített zsírsavak** nem tartalmaznak kettős kötést, ezért szénláncuk egyenes. Leggyakoribb képviselőjük a palmitinsav és a sztearinsav.



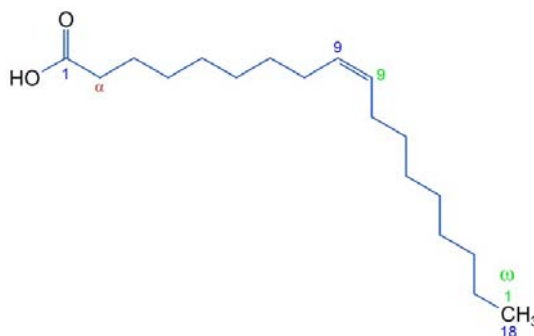
A palmitinsav (C_{16}) szerkezeti képlete.

A sztearinsav (C₁₈) szerkezeti képlete.

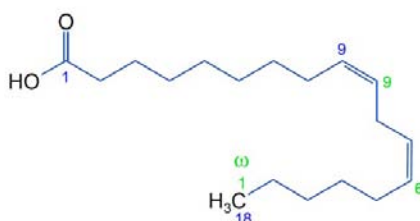
A **telítetlen zsírsavak** egy vagy több szén-szén kettős kötést tartalmaznak. Előbbi esetben a kettős kötés általában a szénlánc 9. és 10. szénatomja között alakul ki, több kettős kötés előfordulásakor azok három szénatomnyi távolságra követik egymást (pl. linolsav). Jellegzetes képviselői az olajsav, linolsav, linolénsav, arachidonsav. A természetben előforduló telítetlen zsírsavakban a kettős kötések jellemzően *cisz*-konfigurációjúak, a természetben előforduló *transz*-konfiguráció ritka. A különböző élelmiszerekben előforduló *transz* kettős kötést tartalmazó, ún. *transz*-zsírsavak többsége mesterséges eredetű, a többszörös telítetlen kötések tartalmazó olajok részleges telítése során jönnek létre. A kettős kötések korlátozzák a lánc szénatomok körüli mozgását, a *cisz*-konfiguráció a lánc erőteljes, míg a *transz*-konfigurációjú kisebb mértékű „megtörését” eredményezi.



Cisz- (bal oldalon) és **transz-konfigurációjú kettős kötés**. A *cisz*-konfigurációjú kettős kötésben a két pillératom hidrogénatomja a szénlánc azonos, a *transz*-konfigurációjában a lánc ellentétes oldalán van.



Az **olajsav** szerkezeti képlete. A kék számok a szénlánc szénatomjainak számozását mutatják. A zöld jelölések a (*cisz*-konfigurációjú) telítetlen kötés helyét jelölik (ezek szerint az olajsav ω-9 zsírsav).

A linolsav szerkezeti képlete (a kettős kötések *cisz*-konfigurációjúak!).

Azokat a többszörösen telítetlen zsírsavakat, amelyek szintézisére az állati szervezetek nem képesek és ezért azokat a táplálékkal kell felvenniük, *esszenciális zsírsavaknak* nevezzük.. (Az emberi szervezet számára pl. a linolsav és a linolénsav *esszenciális zsírsav*.)

A zsírsavak többsége nem fordul elő szabad formában az élő szervezetekben, jellemzően alkoholos hidroxilcsoporttal rendelkező vegyülethez kapcsolódnak, azok hidroxilcsoportját acilezve. Azaz a zsírsavak általában összetett (hidrolízissel részekre bontható) vegyületekben találhatók.

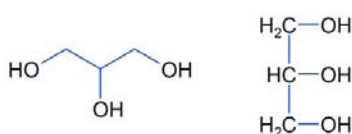
Hosszú láncú zsírsavak (C₁₄-C₃₆) és alkoholok (C₁₆-C₃₀) észterei a **viaszok** (növényi vagy állati és nem ásványi viaszok!). Olvadáspontjuk magasabb a neutrális zsírokénál (45°C feletti), halmazállapotuk szilárd, hidrofób vegyületek. Kémiai szerkezetük és biológiai funkciójuk igen változatos.

A zsírsavak glicerinnel alkotott észterei az acil-gliceridek, melyek az észterező zsírsavak számától függően lehetnek **mono-**, **di-** és **trigliceridek**.

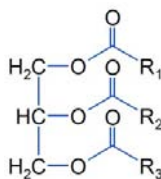
Neutrális zsírok

A triglicerideket nevezzük neutrális zsíroknak, melyek tartalék tápanyagként vagy energiaraktárként funkcionálnak. A zsírsavakban a szénatomok redukált állapotban vannak, így oxidációjukkor a szénhidrátok oxidációjához képest kb. kétszer nagyobb energia nyerhető.

Az állati szervezetben található zsírok általában egyenes láncú telített zsírsavakat, valamint 1–6 kettős kötést tartalmazó telítetlen zsírsavakat tartalmaznak (leggyakrabban a palmitinsav, sztearinsav és olajsav). Az egyenes láncú telített zsírsavak szorosan illeszkedhetnek egymáshoz. A telítetlen zsírsavak és a kettős kötések számarányának növekedése csökkenti a rendezettséget, így a zsír olvadáspontját. A szobahőmérsékleten folyékony neutrális zsírokat olajoknak nevezzük. A növényekben a neutrális zsírok (olajok) összetétele változatosabb, mivel a bennük található zsírsavláncok tartalmazhatnak hármasszén-szén kötést, a karboxilcsoporton kívül más funkcionális csoportokat, és 3 vagy 5 tagú gyűrűket is.



A **glicerín** (glicerol) szerkezeti képletének kétféle ábrázolási módja.



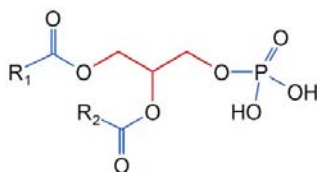
A **neutrális zsír** (triglicerid = triacil-glicerol) általánosított szerkezeti képlete.

Membránalkotó lipidek

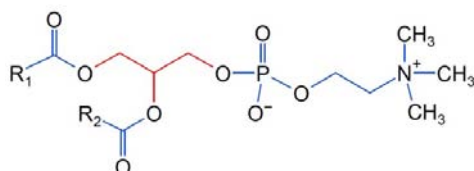
A biológiai membránok fontos alkotóelemei. Poláros molekularészletet tartalmazó, ezért amfipatikus (kettős oldhatósági tulajdonságokat mutató) vegyületek. Kémiai szerkezetüket alapján többféle csoportosításuk is lehetséges, attól függően, hogy az összetett molekulák mely komponensét emeljük ki. Ide sorolhatóak a glicero-fosfolipidek, a szfingolipidek, a glicero-glikolipidek, az éter-lipidek, a koleszterin, stb.

Glicero-fosfolipidek

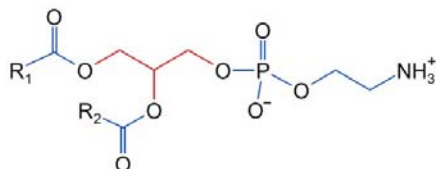
A glicerín két zsírsavval és egy foszforsavval képzett triésztere a foszfatidsav. A foszforsav a glicerín harmadik szénatomján lévő hidroxilcsoportot észteresíti. A **foszfatidok**ban a foszforsavhoz további molekulák kapcsolódhatnak, szintén észterkötéssel. Elnevezésük a foszforsavhoz kapcsolódó molekula alapján történik: foszfatidil-kolin (lecitin), foszfatidil-etanolamin (kefalin), foszfatidil-szerin, foszfatidil-inozitol stb. A különböző foszfatidokban a glicerint észterező két zsírsav (a szénlánc hosszában és a kettős kötések számában megnyilvánuló) kombinációi nagy változatosságot biztosítanak. A különböző szervezetekben, sőt azok különböző szöveteiben a foszfatidok kémiai összetétele eltérő, és fajra, szövetekre jellemző.



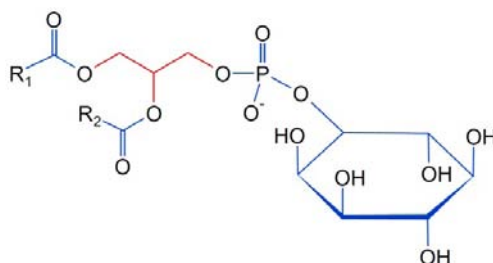
A **foszfatidsav** szerkezeti képlete. A glicerín-váz pirossal jelölve.



A foszfatidil-kolin szerkezeti képlete.



A foszfatidil-etanolamin szerkezeti képlete.



A foszfatidil-inozitol szerkezeti képlete.

Éter-lipidek

A glicero-foszfolipidek sajátos csoportját képezik az ún. **éter lipidek**, amelyekben a glicerinnel nem észter-, hanem éterkötéssel kapcsolódó hosszú szénláncú (alkil vagy enol) komponensek találhatók. A legtöbb élőlényben csak nyomokban találhatók meg, de egyes sőtűrő szervezetekben részarányuk jelentős. Egyes szövetekben, mint a szívizomban és az idegrostok velőhüvelyében jelentős mennyiségben van jelen, és bizonyos daganatos elváltozásokban megemelkedett szintjük mutatható ki. Különleges változatai megtalálhatók az *Archaea* sejthártyájában.

Szfingolipidek

Hosszú szénláncú szfingoid (aminoalkoholok; pl.: szfingozin) vázat és ahhoz amid kötéssel kapcsolódó, hosszú szénláncú zsírsavat tartalmazó vegyületcsoport a ceramidok. Változatosságukat a különböző szfingoid és zsírsavmolekulák kombinációi adják. A zsírsav hosszabb szénláncú, mint a glicerolipidekben (C_{26} -ig, egyes esetekben még ennél is több) általában telített vagy egyszeresen telítetlen.

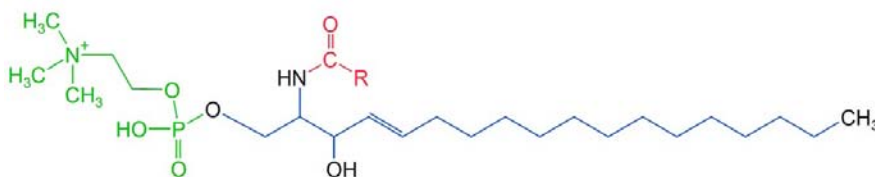


A szfingozin szerkezeti képlete.



A **ceramidok** általánosított szerkezeti képlete. A zsírsav komponens pirossal jelölt.

A szfingoid alkotórész hidroxilcsoportját további molekulák észtereshíthetik, pl. foszfát-észterek, mint (a glicero-fosfolipidekhez hasonlóan) a foszforil-kolin, foszforil-etanolamin, foszforil-inozitol. Ezek alkotják a **szfingo-fosfolipideket**. Jelentősebb koncentrációban a sejthártya külső lemezében és membránok mikrodoménjeiben, számos képviselőjük jelátviteli útvonalakban szerepelnek. Jellegzetes képviselőjük a szfingomielin, amely ceramidból és foszforilkolinból áll, mely állati szervezetekből ismert, egyes szövetekben a lipidek 10–50%-át adja.



A **szfingomielin** szerkezeti képlete. A ceramid zsírsav komponense pirossal, a foszforil rész zölddel jelölt.

A ceramid molekulák a hozzájuk kapcsolódó mono- vagy oligoszacharidokkal alkotják a **glikosszfingo-glikolipideket** (a glikolipidek egyik csoportja). Jellegzetes képviselőik a cerebrozidok, amelyekben a ceramidhoz monoszacharid molekula (galaktóz vagy glükóz) kapcsolódik (β -glikozidos kötéssel). Az idegsejtek membránjának fontos komponensei. A gangliozidokban a ceramidhoz 2–6 cukoregységből álló oligoszacharid lánc kapcsolódik.

Glicero-glikolipidek

Más néven glikosil-diacil-glicerol, melyben a glicerol egyes és kettes pozíciójú hidroxilcsoportját zsírsav molekulák észtereshíthetik, a harmadik hidroxilcsoport β -acetil kötéssel mono- vagy diszacharidhoz (általában galaktózhoz) kapcsolódik. Az állati szervezetekben a glicero-glikolipidekben általában egy telített és egy egyszeresen telítetlen 16, 18 szénatomszámú zsírsav. Növényekben szerepük jelentős, a kloroplasztiszból a fotoszintetizáló membránokban a glicerolipidek $\frac{3}{4}$ -ét teszik ki. Magasabbrendű növényekben a zsírsav rész csaknem kizárólag többszörösen telítetlen zsírsavakból (többnyire linolénsavból) áll. Az eukariótákban jellemzően az egyes pozícióban C_{16} vagy C_{18} zsírsavak, de a kettes pozícióban kizárólag C_{18} zsírsavak találhatók. A prokariótákban az egyes pozícióban általában C_{18} , de a kettes pozícióban csak C_{16} zsírsavak vannak.

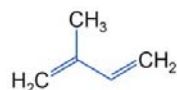
Egyszerű, nem hidrolizálható lipidek

Eikozanoidok

A C_{20} , többszörösen telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) oxidált származékai. Kémiai szerkezetüket tekintve megkülönböztetjük a leukotriéneket és a gyűrűt tartalmazó prosztanoidokat (prostaglandinok, prosztaciklinek, tromboxánok). Biológiai szerepük széleskörű: gyulladásos folyamatok, immunműködés, allergiás reakciók stb.

Terpenoidok

A $(C_5H_8)_n$ összegképletű, izoprén egységekből levezethető vegyületeket a terpének, származékaik a terpenoidok. A két izoprén egységből jönnek létre a mono-, négyből a di-, hatból a triterpenoidok stb. Többségében növényi eredetű vegyületek.

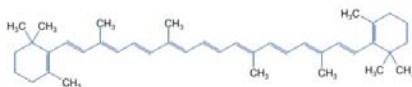
Az **izoprén** szerkezeti képlete.

Az izoprén egységek számának és kapcsolódásuk variációival igen nagyszámú terpenoid vegyület hozható létre. Lehetnek nyílt láncúak és tartalmazhatnak gyűrűket. Sokféleségüknek megfelelően számos anyagcserefolyamatban szerepet játszanak. Terpén származékok a például a gibberelinek, a juvenilis hormon (előbbi növényi, utóbbi ízeltlábúak előforduló hormon), ubiquinon (más néven koenzim-Q; a mitokondriális elektrontranszport rendszer része), K-vitamin, stb.

Nyolc izoprénegységből állnak a C₄₀-es tetraterpének, a **karotinoidok**. Alapvegyületük a cisz-fitoen, melyből dehidrogénezéssel alakul ki a likopin (paradicsomban), a lánc két végének gyűrűvé záródásával a karotinok, oxigénatomok beépülésével pedig a xantofiliek. Több tagjuk színes vegyület, néhányuk a fotoszintetizáló pigmentrendszerekben is megtalálható, antioxidáns hatásúak.

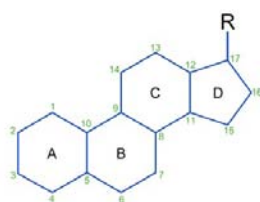
A **cisz-fitoen** szerkezeti képlete.

A β -karotin az A-vitamin prekursora (előanyaga), mely a molekula kettéhasadásával alakul ki. Az A-vitamin a rodopszin felépítésében vesz részt.

A **β -karotin** szerkezeti képlete.

Szteránvázas vegyületek

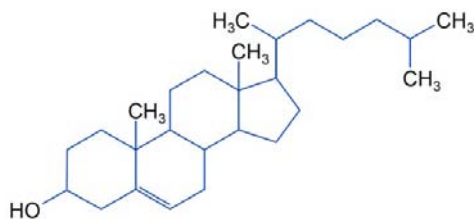
Ugyancsak az izoprén származékok közé sorolható vegyületek. Triterpén ciklizálásával jönnek létre az állatokban és gombákban, valamint a növényekben a szteroidok bioszintézisének kiindulási vegyületei. A lehetséges legegyszerűbb szteránvázis vegyület a gonán, melyben a 17-es szénatomra hidrogénatom kapcsolódik.



A **szteránváz**. A gyűrűket az ABC betűivel, a szénatomokat számokkal jelölik. R a 17 szénatomra kapcsolódó oldallánc.

A legtöbb szteroid molekulában a 10-es és 13-as szénatomon egy-egy metilcsoport található, és a 17-es szénatomhoz alkil lánc kapcsolódik. A szteroidok változatosságát a metilcsoportok száma, az alkil lánc szerkezete és egyéb, a gyűrűkre kapcsolódó funkcionális csoportok adják. A szteroid hormonok fontos szerepet töltenek be a szervezetben lejátszódó folyamatok szabályozásában. Például a rovarokban az ekdiszteron (vedlési hormon), gerincesekben a nemi hormonok, a kortikoszteroidok (mellékvesekéreg által termelt szteroidok), androgének stb., növényekben a fitoszteroidok, gombákban az ergoszteroidok.

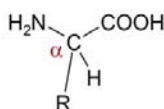
A hármas szénatomon hidroxilcsoportot hordozó szteroidok a szterolok. Utóbbiak képviselője a **koleszterin** (más néven koleszterol) is, amely fontos membrán komponens, a D-vitamin szintézis és az epesavak szintézisének prekursora, számos más szteroid biogenezisének kiindulási molekulája.



A **koleszterin** szerkezeti képlete. A poláros molekularészletet a hidroxilcsoport képviseli.

A fehérjék

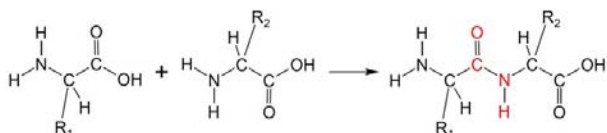
A természetben előforduló fehérjék 20 általánosan előforduló fehérjealkotó aminosavból (mint monomerekből) felépülő lineáris polimerek, makromolekulák. Az aminosavak „központi” α -szénatomjához tetraédres elrendezésben kapcsolódik egy amino- és egy karboxilcsoport, továbbá egy hidrogén atom, valamint különböző tulajdonságokkal rendelkező ún. oldallánc. Vannak apoláros, azaz hidrofób (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp), poláros, de töltést nem hordozó (Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Tyr), bázikus (Lys, Arg, His) és savas (Asp, Glu) oldalláncú aminosavak. Három aminosav aromás oldallánccal rendelkezik (Phe, Trp, Tyr). Az apoláros prolin (Pro) oldallánca saját aminocsoportjával képez gyűrűt (iminosavat). (Az aminosavakat nevük hárombetűs rövidítésével, illetve az ábécé nagybetűivel jelölik.)



Az aminosavak általánosított szerkezeti képlete az alfa helyzetű szénatom megjelölésével.

Az aminosavak α -szénatomja aszimmetriás, optikailag aktív, izomerpárjaik a D- és L-aminosavak. Az élő szervezetekben előforduló fehérjék kevés kivételtől eltekintve α -L-aminosavakból állnak. A glicin, melynek oldallánca csupán egy hidrogénatom, nem mutat optikai izomériát.

Az aminosavak vízkilépéses reakcióban, az amino- és karbonsavcsoportjaik között kialakuló peptidkötést létrehozva kapcsolódnak. A peptidkötés transz-állású, planáris jellegű, a kötéstengely mentén történő rotáció gátolt.



A **peptidkötés** (piros színnel jelölve). Két aminosavból dipeptid, háromból tripeptid, sokból oligo-, illetve polipeptid képződik.

A peptidkötések és az α -szénatomjuk váltakozó sorozata hozza létre a polipeptid „gerincét”. A peptidlánc aminosav sorrendje, az aminosav szekvencia alkotja a fehérjék elsődleges szerkezetét. Az aminosavak oldalláncai a peptidgerinchez viszonyított helyzetük és az egymás közötti kölcsönhatások révén járulnak hozzá a fehérjékre jellemző térszerkezet kialakításához. A változatos oldallánccal a fehérjeszintézis alatt vagy azt követően funkcionális csoportjaikon keresztül számos ko- és poszt-transzlációs módosításon eshetnek át. A fehérjeláncban periodikusan rendezett szerkezetek jönnek létre: α -hélix és a β -redő (β -redőzött lemez), melyeket szabálytalan (random coil) vagy szabályos (β -hurok) szakaszok kötnek össze. Ezek képezik a fehérjék másodlagos szerkezetét. A másodlagos szerkezeti elemek és további kölcsönhatások (hidrogénhid, elektrosztatikus és hidrofób kötőerők, diszulfid-hidak) által a peptidlánc egymástól távol eső elemei egymáshoz közel kerülve globuláris (3D) formát alakítanak ki. Ez a harmadlagos szerkezet vagy a fehérje natív konformációja. Több fehérje összekapcsolódva, alegységszerkezetet (negyedleges szerkezeti szint) képezhet.

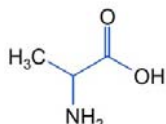
Egy fehérjén belül különböző funkciókat ellátó nagyobb aminosavszekvencia részek, struktúrelemek ún. domének képződhetnek. A különböző szervezetekből származó, azonos funkciót betöltő fehérjékben levő aminosavsorrend

hasonlóságából a rokonság fokára, az evolúciós távolságra is lehet következtetni. A domének aminosavszekvenciáiban mutatkozó aminosaveltérések száma és a vizsgált fajok fejlődéstörténeti távolsága között egyenes arányosság áll fenn.

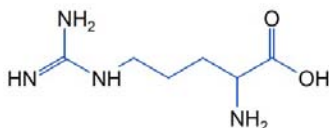
Az összetett (konjugált) fehérjék tartalmaznak nem fehérje alkotóelemeket is, pl. szénhidrát vagy lipid vagy szervetlen (pl. fém-ion) komponenseket (gliko-, lipo-, foszfo-, metallo- stb. proteinek). A fehérjerész az apoprotein, a kapcsolódó nem fehérje rész a proszretikus csoport.

Biológiai aktivitás alapján megkülönböztetünk szerkezeti fehérjéket, tartalékfehérjéket, enzimeket, transzportfehérjéket, kontraktilis fehérjéket, immunfehérjéket, hormonokat, toxinokat stb.

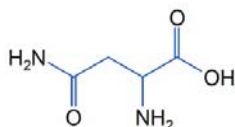
Az aminosavak szerkezeti képletei:



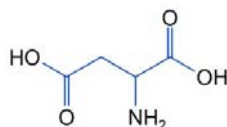
Alanin (Ala; A) oldallánca hidrofób



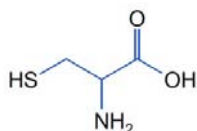
Arginin (Arg; R) oldallánca bázikus



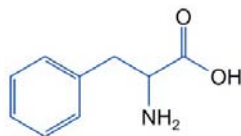
Aszparagin (Asn; N) oldallánca hidrofil



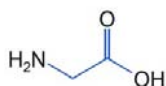
Aszparaginsav (Asp; D) oldallánca savas



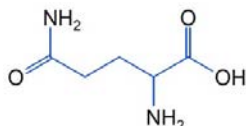
Cisztein (Cys; C) oldallánca hidrofób (–SH csoportja diszulfidhidak kialakítására alkalmas).



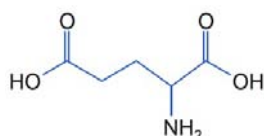
Fenil-alanin (Phe; F) oldallánca hidrofób



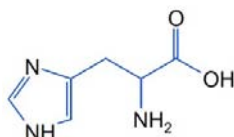
Glicin (Gly, G) hidrofil



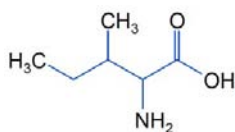
Glutamin (Gln; Q) oldallánca hidrofil



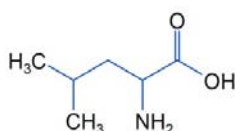
Glutaminsav (Glu; E) oldallánca savas



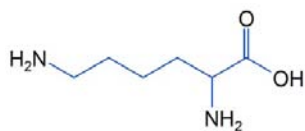
Hisztidin (His, H) oldallánca bázikus



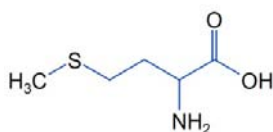
Izoleucin (Ile; I) oldallánca hidrofób



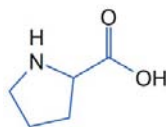
Leucin (Leu; L) oldallánca hidrofób



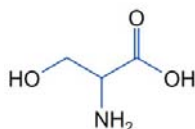
Lizin (Lys; K) oldallánca bázikus



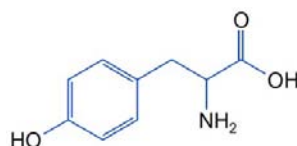
Metionin (Met; M) oldallánca hidrofób



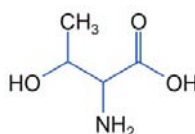
Prolin (Pro; P) oldallánca hidrofób



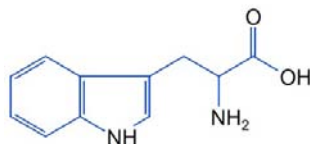
Szerin (Ser; S) oldallánca hidrofil



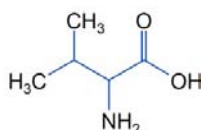
Tirozin (Tyr; Y) oldallánca hidrofób



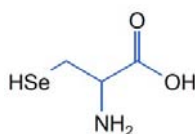
Treonin (Thr; T) oldallánca hidrofil



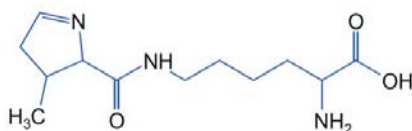
Triptofán (Trp; W) oldallánca hidrofób



Valin (Val; V) oldallánca hidrofób



Az eukariótákban előforduló fehérjeépítő aminosavak 21. tagja a szelén tartalmú **szelenocisztein** (Sec; U), oldallánca hidrofób. Cisztein-analóg, az – SH (tiol) csoport helyett –SeH csoportot (szelenol) tartalmaz. Előfordulása az élő szervezetekben általános, néhány enzim speciális aminosava.

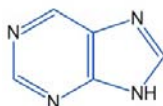


A **pirrolizin** (Pyl; O), melyben lizin oldallánchoz egy pirrolingyűrű kapcsolódik, a 22. fehérjeépítő aminosavként néhány metanogén *Archaea* faj metántermelő enzimjeiben található meg.

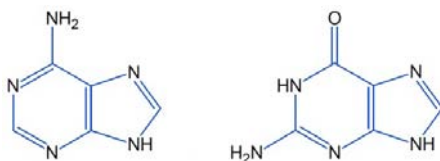
A nukleinsavak

A nukleinsavak nukleotid monomerekből felépülő polimer láncok, makromolekulák, a genetikai információ hordozói és közvetítői. A nukleotidokat egy szerves (purin vagy pirimidin) bázis, egy pentóz cukor és egy foszfáts csoport alkotja, a legjelentősebb természetes szerves vegyületek közé tartoznak.

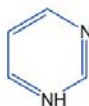
A nukleobázisok nitrogén tartalmú, aromás heterociklusos szerves vegyületek. Közülük az adenin és a guanin purinbázisok, az uracil, a citozin és a timin pirimidinbázisok. A DNS-ben a citozin és a timin fordul elő, az RNS-ben a timint az uracil helyettesíti.



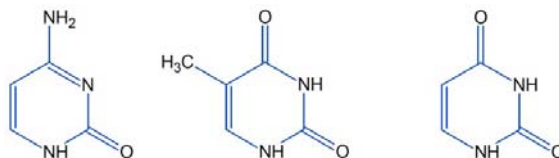
A **purin** szerkezeti képlete.



Purinbázisok: az **adenin** (balra) és a **guanin** (jobbra) szerkezeti képlete.

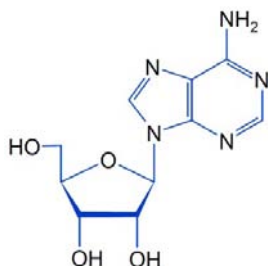


A **pirimidin** szerkezeti képlete.

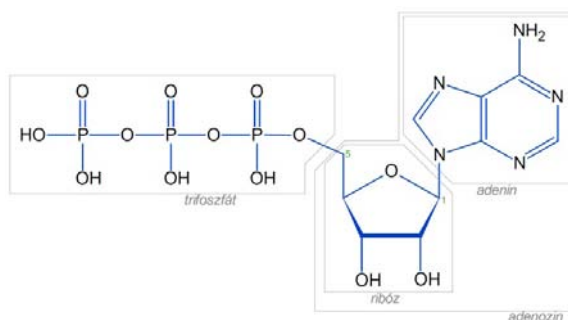
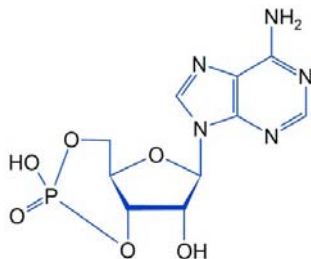


Pirimidin bázisok: citozin, timin és uracil.

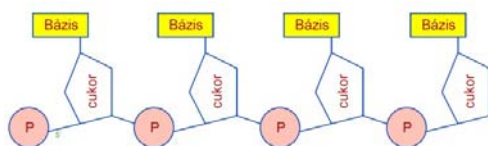
A nukleozidokban egy ribóz- vagy dezoxiribóz-cukorgyűrűhöz β -glikozidos kötéssel kapcsolódik valamelyik nukleobázis. A nukleozidok: citidin, uridin, adenzin, guanozin és timidin.

Az **adenozin** szerkezeti képlete.

A nukleozidokból a cukor rész 5. szénatomját észterestítő foszfátcsoporttal nukleozid-5'-monofoszfátok, a nukleotidok alakulnak ki. A nukleotidok a DNS és RNS monomerjei, ezen kívül számos fontos biomolekula alkotó részei; pl.: koenzim-A, FAD (flavin-adenin-dinukleotid), NAD^+ (nikotinamid-adenin-dinukleotid), ATP (adenozin-trifoszfát). A nukleozid-monofoszfátok (pl. AMP) további foszfátcsoportokkal történő észterestítésével alakulnak ki, a nagyenergiájú (kémiai) kötésekkel tartalmazó nukleozid-difoszfátok (pl. ADP), majd nukleozid-trifoszfátok (pl. ATP). Ezek a molekulák alkalmasak energia raktározására és részleges hidrolízisével az energia szabályozott felszabadítására is.

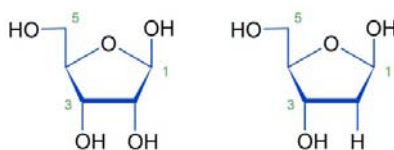
Az **adenozin-trifoszfát (ATP)** szerkezeti képlete az egyes alkotóelemek feltüntetésével.A **ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP)** szerkezeti képlete.

A nukleotidok a foszfátcsoport és a cukormolekula 3. szénatomja között kialakuló észterkötéssel kapcsolódnak egymáshoz, kialakítva a foszfátcsoport – (5'-cukor-3') – foszfátcsoport – (5'-cukor-3') – foszfátcsoport – (5'-cukor-3') láncolatot. A nukleotidok, így a di-, a tri-, ... az oligo- és a polinukleotidok láncok is orientáltak.

A **nukleinsavlánc** szerkezete.

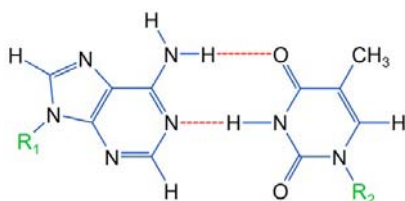
A ribonukleinsav (RNS) nukleotidjaiban ribóz alkotja a cukor részt. Az RNS különböző változatai részt vesznek a genetikai információ kódolásában és dekódolásában, a génexpresszióban és annak szabályozásában, a

fehérjesszintézis kivitelezésében. Az RNS a DNS-nél nagyságrenddel kevesebb nukleotidból áll, egyszeres láncú, de hurkot képezve, önmagával kettős hélix szakaszokat képes kialakítani.

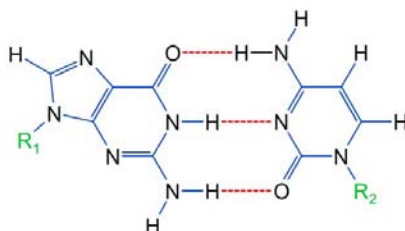


A **ribóz** és a **dezoxiiribóz** szerkezeti képlete.

A dezoxiribonukleinsav (DNS) kettős szálú helikális struktúrát képez. A DNS két szála ellentétesen (antiparallel) orientálódva kapcsolódik egymáshoz. A két szála egymás komplementere, bennük a nukleotidok nukleobázisai párokat alkotnak (adenin–timin, guanin–citozin). A bázispárokat hidrogénhid kötések kapcsolják össze. A bázisok sorrendje (bázisszekvencia) rejtja a genetikai információt.



Az **adenin** (balra) és a **timin** (jobbra) két hidrogénhid-kötéssel kapcsolódva alkotnak **bázispárt**. R_1 és R_2 a DNS lánc kapcsolódási pontját jelölik.



A **guanin** (balra) és a **citozin** (jobbra) három hidrogénhid-kötéssel kapcsolódva alkotnak **bázispárt**. R_1 és R_2 a DNS lánc kapcsolódási pontját jelölik.

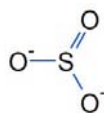
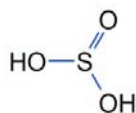
Néhány szervetlen vegyület szerkezeti és összegképlete

Az oxosavak olyan legalább egy oxigént tartalmazó savak, melyekben az oxigénen kívül legalább egy másik kémiai elem is található, legalább egy oxigénatomhoz kapcsolódó hidrogénatomot tartalmaznak, és vizes közegben legalább egy (de lehet több is) proton leadásával iont (savmaradék-ion) képeznek. Többségében vízben oldható anyagok, a vizes oldatok pH-ját csökkentik, a kémhatás csökkentése a protonleadás eredménye.

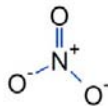
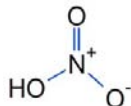
Az oxosavak általában összetett ionok, kötésük erőssége a molekula központi atomjának (pl. kénsavban a kén) elektronegativitásától és a hozzá kapcsolódó oxigénatomok számától függ. Az oxosavak közé tartozik a kénsav, a salétromsav, a foszforsav, továbbá a halogén-oxosavak, mint például a hipoklórossav, a klórossav, a klórsav, a perklórsav, perjódosav stb.



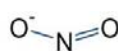
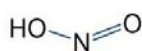
kénsav (H_2SO_4) és kétértékű anionja: a szulfát-ion ($[\text{SO}_4]^{2-}$)



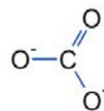
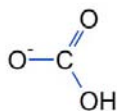
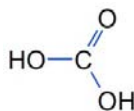
kén-sav (H_2SO_3) és kétértékű anionja, a szulfit-ion ($[\text{SO}_3]^{2-}$)



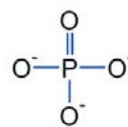
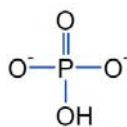
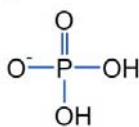
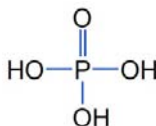
salétromsav (HNO_3) és egyértékű anionja, a nitrát-ion ($[\text{NO}_3]^-$)



salétromos-sav (HNO_2) és anionja, a nitrit-ion ($[\text{HNO}_2]^-$)



szén-sav (H_2CO_3) és anionjai, a hidrogénkarbonát-ion ($[\text{HCO}_3]^-$) és karbonát-ion ($[\text{CO}_3]^{2-}$)



(orto)**foszforsav** (H_3PO_4) és ionjai, a dihidrogén-foszfát ($[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$), a hidrogénfoszfát- ($[\text{HPO}_4]^{2-}$) és a foszfát-ion ($[\text{PO}_4]^{3-}$)

Kérdések:

1. Csoportosítsa előfordulásuk gyakorisága szerint az élő szervezetek felépítésében részt vevő kémiai elemeket!
2. Nevezze meg és jellemezze a makromolekulák főbb csoportjait!
3. Milyen szempontok szerint lehet csoportosítani a szénhidrátokat?
4. Milyen monomerekből áll a cellulóz, a keményítő és a glikogén? Miben különböznek egymástól ezek a poliszacharidok?
5. Rajzolja fel az aminosavak általánosított képletét!
6. Csoportosítsa az aminosavakat oldalláncuk tulajdonságai alapján! Magyarázza meg, hogy az oldalláncok sajátosságai hogyan befolyásolhatják a fehérje szerkezetét!
7. Írja fel két aminosav kondenzációs reakciójának kémiai egyenletét, nevezze meg a kialakuló kötés típusát, majd írja fel hidrolízisét is!
8. Sorolja fel a fehérjék térszerkezeti szintjeit és azok főbb jellegzetességeit!
9. Nevezze meg a nukleotidokat felépítő molekulákat és rajzolja fel az AMP szerkezeti képletét!

10. Milyen közös és milyen eltérő alkotórészek azonosíthatók az RNS és a DNS molekulák szerkezetében?
11. Nevezze meg a nukleinsavak felépítésében részt vevő szerves bázisokat? Csoportosítsa azokat kémiai szerkezetük szerint, és jelölje meg, hogy a nukleinsavakban alkotnak bázispárokat!
12. Milyen szempont szerint, milyen tulajdonságuk alapján sorolunk vegyületeket a lipidek közé?
13. Vázolja fel a foszfolipid molekulák kémiai szerkezetét! Nevezze meg, hogy a sejt mely struktúráinak felépítésében vesznek részt, és indokolja, hogy milyen tulajdonságaik miatt alkalmasak biológiai szerepük betöltésére!
14. Rajzolja fel a szteránváz szerkezeti képletét! Magyarázza meg, miben különböznek a szteránvázas vegyületek egymástól!
15. Definiálja a következő összetett vegyületeket és mondjon példát előfordulásukra: peptidoglikán, proteoglikán, glikoprotein, glikolipid, lipoprotein!

3. fejezet - Az eukarióta sejtek felépítése

Az eukarióta sejtek – szemben a prokariótákkal – legszembeötlőbb és talán legfontosabb tulajdonsága a **kompartimentalizáció**. A prokariótákban nem található a plazmamembrántól független (azzal nem kontinuos) membránrendszer. Az eukarióta sejtekben a plazmamembrán által határolt tér **belső membránrendszerekkel** elválasztott, különböző méretű és funkciójú terekre, sejtszervecskékre (sejtorganelumokra) tagolódik. Az azonos funkciójú terek, az azonos sejtszervecskék összessége kompartmentumot alkot. A sejtorganelumok saját membránjában és belső terében speciális folyamatok zajlanak, melyek számára megfelelő körülmények (pH, koncentrációviszonyok stb.) alakulnak ki, továbbá megfelelő komponensek állnak rendelkezésre: izolált és optimalizált reakcióterek jönnek létre.

A belső membránok megjelenése fontos lépés volt a sejtek evolúciójában. A membránok nemcsak határoló, de nagy hordozó- és reakciófelületet képeznek a fehérjék számára. A több részfolyamatból álló bonyolult anyagcserefolyamatok enzimrendszerei gyakran egymás mellett helyezkednek el, rögzülnek a membránokhoz. A membránok különböző reakciótereket választanak el és kötnek össze. A membránok különböző molekulákra vonatkozó eltérő permeabilitása és számos membránfehérje működésének eredménye, hogy a membránok által elválasztott terek között jelentős koncentráció és potenciálkülönbségek alakulhatnak ki.

Az eukarióta sejt legjellegzetesebb (definíció szerinti) alkotóeleme a **mag** (sejtmag, nukleusz, karion). A plazmamembrán és a sejtmag közötti teret a citoplazma tölti ki. A citoplazma alapállománya a **citoszol**, mely tartalmazza a sejt organelumait és a sejtvázat. Hozzávetőleg a sejt térfogatának felét teszi ki.

Az eukarióta sejtek többsége tartalmaz sejtmagot, amelyet a két membránból álló **maghártya** vesz körül. A maghártyán speciális szerkezetű **pórusok** helyezkednek el. Ez utóbbiakon keresztül zajlik le a mag és a citoszol közötti anyagáramlás. A magban helyezkedik legalább egy **magvacska** (nukleolusz) – a riboszomális RNS (rRNS) szintézisének és a riboszómák összeszerelésének a helye. A mag alapállománya fonalas szerkezetű, DNS-t és fehérjéket tartalmazó **kromatinállomány**. A kromatinban jól megkülönböztethető a világosabb, lazább szerkezetű **eukromatin** és sötétebb, nagyobb sűrűségű **heterokromatin** állomány. A kromatinállományt a **kromoszómák** alkotják, melyek lineáris DNS-t és az ahhoz kötődő jellegzetes fehérjéket, hisztonokat tartalmaznak. A sejtciklus osztódást követő fázisában minden egyes kromoszóma egyetlen, igen hosszú, lineáris DNS-molekulát tartalmaz, melynek szerkezet fellazult, többé-kevésbé letekeredett, így az egyedi kromoszómák nem különíthetők el. A sejtciklus későbbi fázisaiban a DNS megkettőződik (replikálódik), a kromoszóma két részből, két **kromatidából** áll. Mindkét kromatidában egy-egy azonos bázisszekvenciájú DNS-molekula van. Az osztódás során a kromoszómák anyaga erősen kondenzálódik, és ekkor pálcikaszerű testek formájában jól felismerhetők. A két kromatida az mitózis során szétválik és elosztódik a leánysejtek között.

A maghártya és a DNS hisztonokkal képzett állandó kapcsolata védelmet nyújt a DNS-molekulák mechanikai károsodása ellen, biztosítja az egyedi DNS-molekulák kromoszómákba való csomagolását. Ez teszi lehetővé szállításukat, pontos szétosztásukat a sejtosztódás során. A sejtmag ma ismert szerkezete és a DNS hisztonokkal képzett állandó kapcsolata, illetve a mai eukarióta sejtek jelentősen megnövekedett DNS tartalma valószínűleg az evolúciós során párhuzamosan alakult ki.

A **transzkripció** (a DNS bázisszekvenciáinak átírása RNS-bázisszekvenciákba) és a **transzláció** (az RNS irányította fehérjesszintézis) térben szétválik egymástól.

Az organelumokat határoló membránok azonos szerkezeti elv szerint épülnek fel: Alapvetően foszfolipid kettős rétegből és e két rétegbe merülő, vagy annak felszínéhez kapcsolódó fehérjékből állnak. Összetételükben, fehérje- és lipidtartalmukban, valamint az egyes komponensek eloszlásában nagy eltérések alakulhatnak ki, ez is hozzájárul az egyes organelumok és funkcióik különbözőségéhez.

Az **endoplazmatikus retikulum** (ER) a legnagyobb kiterjedésű belső membránrendszer. A citoplazma jelentős részét behálózó lapos zsákokból (ciszternákból) vagy csövekből áll. Ciszternális szerkezetű a **durva felszínű endoplazmatikus retikulum** (DER; angolból átvett rövidítéssel RER – rough endoplasmic reticulum). Felületén riboszómák ülnek, az exportra szánt fehérjék szintézisét végzi. Az elsősorban tubuláris szerkezetű **sima felszínű endoplazmatikus retikulum** (SER – smooth endoplasmic reticulum), a lipid- és szénhidrát-anyagcserében, a

biológiailag aktív idegen szerves vegyületek (xenobiotikumok) feldolgozásában vesz részt. Az endoplazmatikus retikulumban szintetizálódott fehérjék és membránlipidek a **Golgi-készülék** ciszternáiban válogatáson és módosításon esnek át. Az exportra váró fehérjék a Golgi-készülékből képződő **váládékszemcsékben** koncentrálnak, majd exocitózissal ürülnek ki a sejtől. Az **endocitotikus vakuólák** (endoszómák) terében a külvilágból importált anyagok izolálódnak. A bontó enzimeket tartalmazó **lizoszómák** a sejt litikus organelleimrendszerét alkotják: a külvilágból vagy a belső térből felvett makromolekulákat képesek lebontani.

Az egyes kompartmentumok membránjai csak kevés kivétellel tudnak összeolvadni, ezért a sejtorganelleim tartalma nem kerülhet át közvetlenül az egyikből a másikba. Ennek ellenére a kompartmentumok között határozott anyagáramlás figyelhető meg, melynek általános módja a **vezikuláris transzport**. Ennek során általában egyszeres membránnal határolt hólyagokban, vezikulákban, irányított transzporttal és a szállított anyag más kompartmentumok tartalmával való keveredése nélkül valósul meg az anyagszállítás az egyik kompartmentumból a másikba.

Különleges az eredetük, így speciális membránok határolják a **mitokondriumokat**, a **színtesteket**, valamint a **peroxiszómákat**. A mitokondriumok terében szintetizálódik a sejt ATP-tartalmának legnagyobb része, a zöld színtestekben zajlik a fotoszintézis, a peroxiszómákban oxidatív folyamatok bonyolódnak le.

3.1 táblázat Emlős májsejt felépítésében részt vevő membránrendszerek felszíneinek aránya a sejt összmembrán-felületének százalékában. Egy emlős májsejt átlagos térfogata hozzávetőlegesen $5000 \mu\text{m}^3$, a teljes membránfelület kb. $110\,000 \mu\text{m}^2$.

membrántípus	%
sejthártya	2
DER	35
SER	16
Golgi-készülék	7
mitochondrium	39
maghártya	0,2
lizoszomális membrán	0,4
peroxiszomális membrán	0,4
endoszomális membrán	0,4

Az eukarióta sejtekben a sejtalkotók nem véletlenszerűen helyezkednek el, a sejtek többségének meghatározott alakja van. Mindezt az összetett felépítésű **sejtváz** (citoszkeleton) felelős. A citoszkeleton **mikrotubulusokból**, **mikrofilamentumokból** és az ún. **intermedier filamentumokból**, illetve ezek hálózatából áll. A mikrotubulusok és aktinfonalak minden eukarióta sejtben megtalálhatók, az intermedier filamentumok egyes komponensei evolúciósan új szerzemények, szövetspecifikus változataik csak a gerincesekben fordulnak elő.

A mikrotubuláris és aktinvázhoz mozgó molekulák, ún. **motorfehérjék** kapcsolódnak. A vázrendszer meghatározza a sejt alakját, lehetővé teszi a sejt és a sejtalkotók mozgását, rögzíti az egyes organelleim sejtben belüli helyzetét, azaz részt vesz a sejt belső rendezettségének fenntartásában, a sejtben belüli anyagáramlásban. A vázrendszer elemei összességükben nagy hordozó- és reakciófelületet adnak. Számos fehérje kötődik hozzájuk, befolyásolva e fehérjék sejtben belüli elhelyezkedését, eloszlását.

A sejt osztódása során a kromoszómák mozgatását, szétosztását a mikrotubulusokból álló mitotikus készülék (magorsó) irányítja, mikrotubulusok hiányában az eukarióta sejt nem képes osztódni.

A citoplazmát, vagyis a sejt felszínét **plazmamembrán** borítja, amely egyrészt elválasztja (védi és izolálja), a sejtet a környezetétől, másrészt össze is kapcsolja a külvilággal. Külső felszínén glikoproteineket, és speciális poliszacharidokat tartalmazó burok (**sejtköpeny**) képződik. A sejthártya meghatározó komponensei közé tartoznak a membránfehérjék. A sejthártya gazdag **receptorfehérjékben**, melyek nagy affinitással képesek megkötni ligandumaikat, a jelátviteli útvonalak kiinduló pontjai. A membránfehérjék egy heterogén csoportja **sejtdhéziós/sejtkapcsoló** funkciót lát el, alapvető szerepe van a szöveti struktúra kialakításáért és fenntartásáért. Az **ionpumpák**, **ioncsatornák** és **transzporterek** együttesen hozzák létre és tartják fenn a különböző ionok és molekulák egyenlőtlen eloszlását a sejt belseje és a külvilág között, mely a sejt normális működésének alapfeltétele.

3.2 táblázat Prokarióta és eukarióta sejtek néhány alapvető, általánosított tulajdonságának összehasonlítása.

	Prokarióta	Eukarióta
méret	1–10 µm	5–100 µm
sejtmag	nincs	van
DNS mennyisége (bázispárokban) szerveződés	10 ⁶ cirkuláris molekulák	10 ⁷ –10 ⁹ lineáris molekulák, hiszton fehérjékhez asszociáltnak
kromoszómák transzkripció / transzláció	egy térben zajlik	térben elválasztva
belső membránrendszer	nincs	van
váz	külső váz	belső, háromféle komponensből
fázisokra tagolt sejtciklus	nincs	van
sejtkapcsolat	nincs	van
differentiálódás	nincs	van,
szemiautonóm organelum	nincs	van (mitochondrium, szintest)
apoptózis	bizonytalan	van

Kérdések:

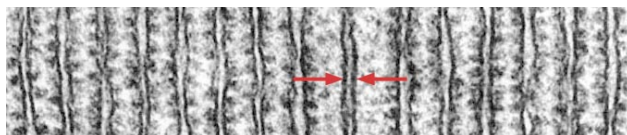
1. Sorolja fel az eukarióta és prokarióta sejt felépítése közötti legalapvetőbb eltéréseket!
2. Mi az előnye a kompartmentalizációnak?
3. Sorolja fel a főbb sejtalkotókat!
4. Nevezzen meg legalább egy nem membrán határolta sejtalkotót!
5. Mi a belső membránrendszerek szerepe?

4. fejezet - A sejtmembrán szerkezete és működése

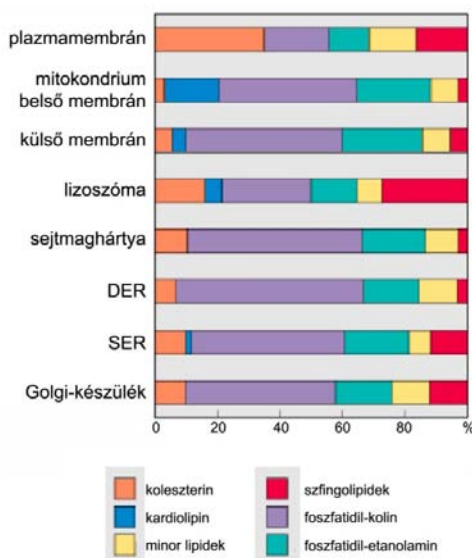
Az eukarióta sejteket borító plazmamembrán és a sejtalkotók belső membránrendszereket alkotó membránjai alapfelépítése azonos. Az egyes kompartmentumok membránjai és a sejthártya eltérő tulajdonságú tereket határolnak, választanak el és egyben kötnek össze. A különböző sejtorganellek membránjait vizsgálva jellegzetes eltérések ismerhetők fel, számos specifikus tulajdonságot mutatnak, melyek a membránok lipid- és fehérjeösszetételének (elsősorban ez utóbbi) különbözőségére vezethetők vissza. Mégis, a membránok működésének, felépítésének alapelvei nagymértékben hasonlóak, ezért legfontosabb tulajdonságaik, legáltalánosabb funkcióik egyezők, ezért a biológiai membránok szerkezetének és alapvető működésének ismertetésére elegendő a plazmamembrán tulajdonságait szemügyre venni.

Membránszerkezet

A biológiai membránok 5–10 nm (az állati sejtek plazmamembránja 10 nm) vastag, kettős rétegű sejtalkotók. Fő alkotóelemeik a lipidek és a fehérjék. Szárazanyagtartalmának 40–75%-a lipid, néhány százalék szénhidrát (glikolipidek és glikoproteinek alkotóelemeiként), a többi fehérje.



Egér májsejtek egy részlete. A piros nyilak mutatják a két szomszédos sejt egymásnak simuló plazmamembránját, jobbra és balra endoplazmatikus retikulum ciszternák láthatók.

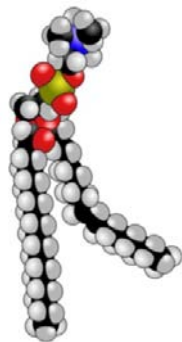


Patkány májsejt különböző membránjainak lipidösszetétele.

A lipidek megközelítőleg fele foszfolipid, nagyjából negyede koleszterin, kisebb része glikolipid és más lipidek. Az egyes lipidek részaránya a sejtorganellek, sejttípusok membránjaiban igen széles skálán változó. A leggyakoribb foszfolipidek, a foszfatidil-kolin, a foszfatidil-etanolamin, a foszfatidil-szerin. A foszfatidil-inozitol ugyan kis mennyiségben szerepel a membránokban, de fontos biológiai funkciók kötődnek hozzá. A foszfolipidek a glikolipidek és a koleszterin is megnyúlt, pálcika alakú, kettős oldthatósági tulajdonságot mutató (amfipatikus) molekulák. Poláros „feji” részből és apoláros, hosszú láncú „farki” részből állnak. ezek az anyagok vizes közegben

hajlamosak micellákat alkotni vagy spontán kettős rétegbe rendeződni; ekkor hidrofíl poláros molekularészekkel a vizes fázissal teremtenek kapcsolatot, hidrofób apoláros részekkel egymás felé fordulnak.

A biológiai membránok vázát foszfolipid kettősréteg képezi. A két rétegben a hidrofíl feji részek a vizes fázisok felé, a hidrofób farki részek pedig a membrán belseje, pontosabban a másik lipidréteg felé tekintenek. A membrán két lipidrétegében a molekulák ellentétesen orientálódnak, így a membrán belsejében kialakul egy hidrofób zóna, amit két oldalról egy-egy (a poláros feji molekularészekből álló) hidrofíl sáv zár le. Ez a hidrofób zóna a vízben oldódó anyagok (cukrok, aminosavak stb.), makromolekulák, ionok számára diffúziós mozgással átjárhatatlan, (impermeábilis), így a membrán válaszfalként viselkedik.



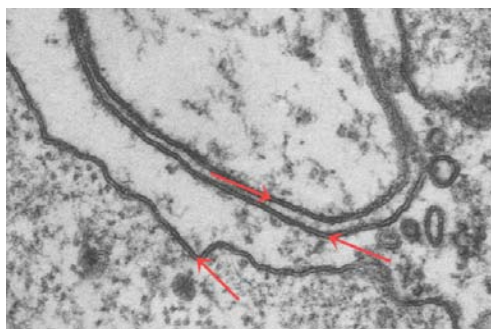
Foszfatidil-kolin molekula modellje.



A koleszterin molekula térbeli modellje.

A tiszta, fehérjementes foszfolipidmembránok áteresztik a kis molekulatömegű (kb. 100 Da-ig) hidrofób vagy poláros molekulákat (pl. O_2 , N_2 , NO, CO, CO_2 , víz, etanol), de átjárhatatlanok nagyobb molekulák és minden elektromosan töltött anyag (ionok) számára.

A plazmamembrán átjárható a sokféle metabolit (aminosavak, cukrok stb.), sőt az ionok számára is. Ennek oka a membrán fehérjéinek működésében keresendő.



A **plazmamembrán** ozmiofil, ozmiofób ozmiofil hármass megjelenése a jó minőségű elektronmikroszkópos képen látható.

A membrán fehérjetartalma széles határok között változik, átlagosan 50% körüli. A velőhüvelyes idegrost mielinhüvelyének plazmamembránjában alig 25%, de a mitokondrium belső membránjában elérheti a 70–80%-ot is. A membrán fehérjéit két nagy csoportba sorolhatjuk a lipid kettősréteg molekuláival létesített kapcsolatuk szerint. A **perifériás fehérjék** a membrán külső vagy belső felszínén lokalizálódnak, felületükön többségében

hidrofil oldalláncok találhatók. A membrán szétbontása nélkül leválaszthatók. Az **integráns membránfehérjék** többé-kevésbé bemennek a membránba, gyakran át is érik azt (**transzmembránfehérjék**), vagy kovalensen kötődnek valamelyik membránkomponenshez (lipidhorgony). Így csak a lipid kettősréteg megbontásával (pl. detergenskezeléssel) távolíthatók el.

A membrán fluiditása és szerveződése

A biológiai membránok élő, dinamikus struktúrák, a membránalkotó molekulák a saját tengelyük körül el tudnak fordulni (rotáció), a membrán síkjában el is tudnak mozogni (laterális diffúzió; lipidek esetében a diffúzió sebessége elérheti az 1–2 $\mu\text{m/s}$ -ot, a fehérjék ennél jóval lassabban mozognak). A lipid molekulák membrán egyik rétegéből a másikba történő átfordulása (flip-flop mechanizmus) gátolt, spontán igen ritkán fordul elő. A zsírsavláncokkal rendelkező lipid komponensek molekulán belüli mozgást végezhetnek: zsírsavláncok elhajolhatnak. A membrán kvázi folyadékként viselkedik, fluiditást mutat.

A membrán fluiditása a membrán belső rendezettségétől, elsősorban lipidösszetételétől, továbbá a környezet hőmérsékletétől függ. A telített zsírsavláncot tartalmazó foszfolipid molekulák között erős kölcsönhatások alakulnak ki, míg a telítetlen zsírsavláncok a kettős kötés helyén kialakuló elhajlás miatt, ezt a szerkezetet fellazítják: a membrán rendezetlenebb, „folyékonyabb” lesz. A merev szteránvázzal rendelkező koleszterin, illetve a membránfehérjék arányának növekedése merevebbé teszi a membránokat.

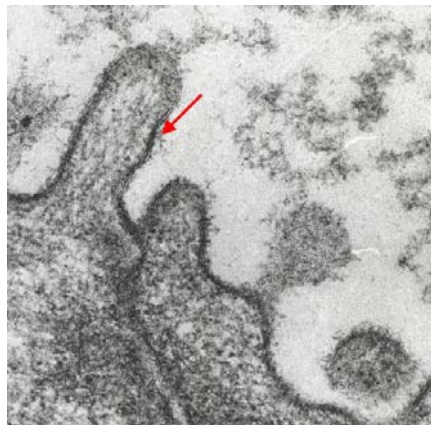
Az élővilágban általános jelenség, hogy a változó hőmérsékletű (poikilotherm) állatok alacsony hőmérsékleten sok telítetlen zsírsavláncot tartalmazó foszfolipidet építenek membránjaikba, ezzel biztosítva a normális működéshez szükséges fluiditást.

A membrán fluiditása számos transzportfolyamat előfeltétele.

A membránalkotók mozgását más tényezők is befolyásolják. A membránba épült molekulák közötti gyenge kölcsönhatások eredményeképpen kb. 10–100 nanométeres körzetben mikroáreák (**mikrodomének**) alakulhatnak ki (mozaikosság), melyekben egyes membrán molekulák feldúsulnak. Jellemző példák a koleszterinben, glikolipidekben és néhány speciális fehérjében gazdag „**lipid tutajok**” (lipid rafts). A lipid tutajokra jellemző, hogy bennük jellemzően hosszabb zsírsavláncú lipidek koncentrálnak, ezért ezen a területen a membrán vastagsága megnő, sőt, ezen a területen a membrán két rétege együtt mozog. A fentiek miatt a lipid tutajokba csak speciális fehérjék képesek beépülni.

Számos membránfehérje kapcsolódva a sejt váz valamely eleméhez, helyhez rögzül. A szomszédos sejteket összekötő kapcsolószerkezetek szintén gátolhatják a membránkomponensek szabad diffúzióját. Polarizált sejt típusokban (pl. bélhámsejt) a fluiditás, ill. a molekulák szabad mozgását korlátozó mechanizmusok, és az irányított vezikuláris transzport együttes hatásaként a plazmamembrán különböző területein a membránkomponensek, elsősorban a fehérjék, eloszlása nem lesz egyenletes. **Funkcionálisan eltérő áreák** (membrandomének) alakulnak ki (pl. a bélhámsejtekben a glükóz felvételét végző fehérje csak az apikális – a bél ürege felé néző – plazmamembrán-régióban mutatható ki, míg számos más fehérje – így a Na^+/K^+ -ATP-áz – csak a bazolaterális membránban). A plazmamembrán ilyen jellegű polarizáltsága a szöveti kötelékben működő sejtek tulajdonsága, egyben normális működésük szükséges feltétele.

A membránkomponensek eloszlása nemcsak a membrán síkjában egyenetlen, ugyanis bizonyos komponensek a membrán két rétegében nem egyenlő arányban oszlanak meg. Általánosan, hogy a kolintartalmú lipidek (foszfatidilkolin, szfingomyelin) és a glikolipidek a membrán külső rétegében, míg az amino-foszfatidok (foszfatidilszerin, foszfatidiletanolamin) a belső, citoszol felőli rétegben helyezkednek el.



A sejtek apikális (lumenális) felszínén a plazmamembrán extracelluláris felszínén található a **glikokálix** (nyíl).

A sejthártya külső, sejten kívüli tér felé néző felszínén szénhidrátban gazdag réteg, a **glikokálix** (angol megnevezése: external coat) található. Összetevői a glikolipidek és glikoproteinek, melyek oligoszacharid oldalláncaik a külvilág felé néznek. Az oligoszacharid komponens általában kevesebb, mint 15 cukormolekulából áll, gyakran elágazó, rendkívül változatos összetételű. A sejt felszínén találhatunk fehérjékhez kovalens kötéssel kapcsolódó poliszacharid láncokat is, ún. proteoglikánokat. Ezek fehérje komponensei vagy a glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) segítségével horgonyzódnak a membránhoz, vagy transzmembrán fehérjék. A glikokálix közvetlenül membránhoz kötött elemeihez lazán kötődő, a sejt által termelt további poliszacharidok, glikoproteinek és proteoglikánok asszociálódnak. A plazmamembrán belső, citoplaszma felé néző oldalán szénhidrátok nincsenek.

Jellegzetesen aszimmetrikus orientációjúak a membránba épült receptorfehérjék, melyek ligandumkötő helyei a külső környezet, míg az intracelluláris folyamatokat beindító molekulaszakaszok a citoplaszma felé néznek.

A (plazma)membrán fenti leírását Singer és Nicolson 1972-ben publikált folyékony mozaik membrán modellje alapozta meg.

Transzportfolyamatok

A plazmamembrán kapcsolatot teremt a sejt környezetével, így a sejt működése szorosan összefügg a membránban zajló folyamatokkal. A plazmamembrán háromféle feladatot lát el: **anyagfelvételt és -leadást**, a sejten kívülről származó **ingerek felfogását**, feldolgozását és továbbítását, valamint **sejt-sejt**, ill. **sejt-sejtközzötti állomány közötti kapcsolatok** létrehozását.

Egyszerű diffúzióval (energiabefektetést nem igényel) csak a már megismert kis molekulájú hidrofób vagy töltés nélküli kis poláros molekulák juthatnak át a membránon. A diffúzió irányát és intenzitását a membrán két oldala közötti koncentrációviszonyok szabják meg.

A biológiai membrán szempereabilitásáért, nagyobb ligandumok transzportjáért többségében igen specifikus integráns membránfehérjék felelősek. Szerkezetük és működésük alapján három csoportba sorolhatók.

A **csatornák** hidrofíl pórusként működnek, melyet a csatornafehérjék transzmembrán α -hélix szakaszai hoznak létre. Nagy sebességgel engednek át vizet és egyes ionokat egyik oldalról a másikra, mivel nem alakul ki kötés a csatornafehérje és az áthaladó molekulák között. A mozgás irányát a membrán két oldalán fellépő koncentráció-, ill. töltéskülönbség (elektrokémiai potenciálkülönbség) szabja meg. Egyes csatornák lehetnek állandóan nyitott állapotban, legtöbbjük azonban csak valamilyen jel (pl. kémiai anyag, mechanikai hatás vagy elektromos feszültségváltozás) hatására nyílik meg időlegesen, ún. kapuzott csatornák. A kémiai szinapszis posztzinaptikus membránjában lévő Na^+ - és K^+ -csatornák neurotranszmitter (pl. acetilkolin) hatására nyílnak ki.

A szállítófehérjék másik nagy csoportját a **transzporterek** (más elnevezéssel: permeázok, karrierek) alkotják. Reverzibilisen kötik a szállítandó (cargo) anyagot, ami konformációváltozást idéz elő a karrier fehérjében, és ez indítja el a transzportot. A transzportereket három csoportba sorolhatjuk. Az **uniporterek** egy molekulát szállítanak egy irányba, mindig a nagyobb koncentrációjú oldalról az alacsonyabb koncentráció felé. Tipikus uniporter a vörösvértest membránjában található glükóz-transzporter. A **szimporterek** (kotranszporterek) egyidejűleg két

anyagot szállítanak azonos irányba. Az egyiket a koncentrációgradiensnek megfelelően (ez hajtja a folyamatot), a másikat a koncentrációgradiens ellenében. Kotranszporttal valósul meg pl. bélhámsejtek apikális membránjában a glükóz felvétele a $\text{Na}^+/\text{glükóz}$ kotranszporter közreműködésével. Az **antiporter**ek (kicserélők) is két anyagot mozgatnak, de ellentétes irányba. Az egyik a koncentrációgradiensnek megfelelően, a másik a sajátjával ellentétesen mozog. Típuspéldája a Na^+/H^+ (nátrium–proton) antiporter, mely Na^+ -t hoz be kívülről (a nagyobb koncentrációjú helyről) a citoplazmába, és egyidejűleg H^+ -t juttat ki a sejtől. Ez az antiporter az intracelluláris pH-t szabályozó kör egyik fontos eleme.

A csatornák és a transzporterek külön energiabefektetés nélküli, ún. facilitált diffúziót (passzív transzportot) valósítanak meg.

A membrán transzportfehérjéinek fehérjék harmadik csoportját a **pumpa-ATP-ázok** képezik. ATP hidrolíziséből nyert energia felhasználásával az alacsony koncentrációjú oldalról a magas koncentrációjú felé történő, energetikailag kedvezőtlen anyagszállítás valósítanak meg. Működésük eredményeként koncentráció-, ill. potenciálkülönbséget alakítanak ki a membrán két oldalán. Legismertebb közülük a Na^+/K^+ -ATP-áz (nátrium-kálium kicserélő ATP-áz), mely egy molekula-ATP lebontásával átlagban 3 Na-iont lök ki a sejtől és két K-iont hoz be. Ionpumpa szabályozza a sejt kalciumtartalmát (Ca^{++} -ATP-áz), protontranszlokáló ATP-áz (H^+ -ATP-áz) teszi lehetővé egyes sejtekben a savszekréciót. Ebbe a csoportba tartoznak az úgynevezett **ABC-transzporterek** (ABC = ATP binding cassette). Nagyméretű, integráns membránfehérjék, ATP felhasználásával számos anyagot (pl. aminosavakat, peptideket, toxikus vegyületeket) képesek a plazmamembránon átjuttatni. Jellemző képviselőjük az MDR (multidrog-rezisztencia) -fehérje, mely gyógyszereket, többek között a sejtburjánzás gátlására használt citosztatikumokat távolíthat el a sejtekből, védve azokat a sejtkárosító hatásoktól.

A pumpák, csatornák, transzporterek működése az ionok és ozmotikusan aktív molekulák mozgatásával lehetővé teszi a sejt térfogatának és pH-jának szabályozását. A sejt felszín meghatározott részein lokalizálódva, működésük irányított anyagáramlást eredményez.

A pumpák által kialakított és fenntartott kényes ionkoncentráció-aszimmetria pillanatszerűen felborul, ha a csatornák áteresztőképessége megváltozik. A rendszer gyenge ingerre is gyors, erős választ képes adni. Ezt használja fel a sejt a külső ingerek felfogására. Ennek közismert példája az idegsejt membránjain inger hatására kialakuló akciós potenciál, mely úgy jön létre, hogy az inger helyén az ionszűrő áteresztőképessége hirtelen megnő, Na-ionok áramlanak be, ill. K-ionok ki, és a membrán depolarizálódik.

Az ionpumpák a membrán két oldala közötti koncentrációkülönbséget ATP felhasználásával állítják elő. Ez a folyamat megfordítható: ha egy membrán két oldalán egy adott anyagra nézve nagy koncentrációkülönbség alakul ki és a membránban kapu van, akkor a visszaáramlás során felszabaduló energia ATP-szintézisre felhasználható. Ezen az elven működik a mitokondriumokban az energia „konzerválása”.

A makromolekulák számára a plazmamembrán nem átjárható, de ezek felvétele is lehetséges egy speciális folyamat, az **endocitózis** útján. Ilyenkor a plazmamembránon kisebb-nagyobb betüremkedések jönnek létre, majd ezek lefűződnek, és így a külvilág egy-egy darabja hólyagba, vakuólába (endoszóma) zárva a sejt belsejébe jut. E folyamat fordítottja az **exocitózis**, melynek során a citoplazma bizonyos membránnal határolt vezikulák vagy granulumok, illetve vakuólák a plazmamembránhoz tapadnak, összeolvadnak, membránjuk ideiglenesen vagy véglegesen beépül a plazmamembránba, eredeti beltartalmuk pedig a külvilágba kerül.

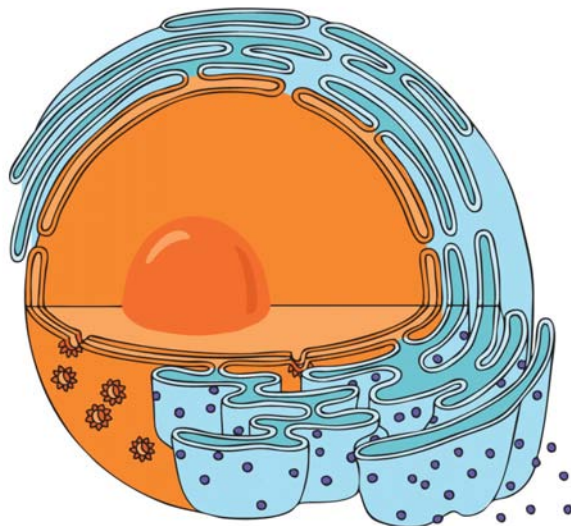
Kérdések:

1. Sorolja fel a biológiai membránok molekuláris komponenseit!
2. Magyarázza el a lipid kettősréteg felépítését és jellemezze tulajdonságait!
3. Milyen anyagok diffundálnak át a lipid rétegen, magyarázza meg, hogy mely tulajdonságuk teszi ezt lehetővé?
4. Mi a biológiai membrán fluiditásának magyarázata! Hogyan mozoghatnak a molekulák a membránban?
5. Mi biztosítja a biológiai membránok szemi-permeabilitását?
6. Csoportosítsa a membránfehérjéket a membránhoz való kapcsolódásuk és funkcióik alapján!
7. Csoportosítsa a membránok transzportfolyamatait energetikai szempontból és működésük szerint!

8. Milyen mechanizmusok, struktúrák játszanak közre a vízmolekulák membránokon történő átjutásában, milyen körülmények befolyásolják a víztranszport irányát és intenzitását?
9. Miben különböznek az eukarióta sejt organelleimait határoló membránok?
10. A sejthártyán milyen membrándoméneket különböztetünk meg, milyen mechanizmus gátolja összetételük kiegyenlítését?
11. Mi a sejtköpeny, milyen molekulák játszanak szerepet kialakításában, mi a funkciója?
12. Sorolja fel a transzmembrán transzport lehetséges változatait, nevezze meg az aktív membrántranszportok alaptípusait!

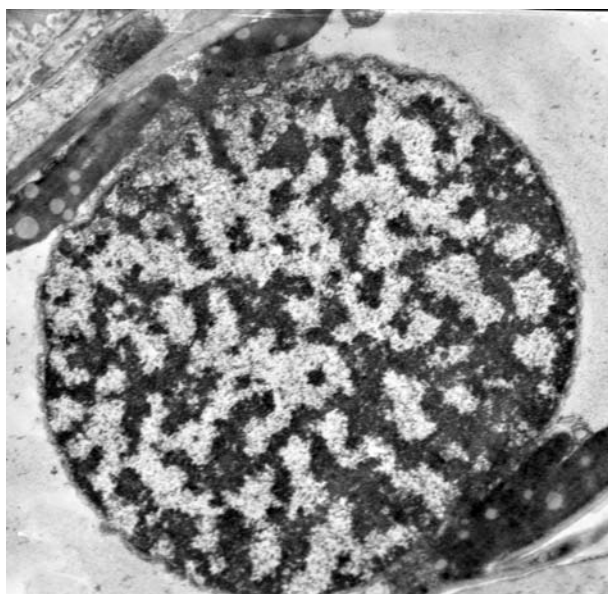
5. fejezet - Sejtmag

A sejtek DNS állománya, a **genom**, a mitokondriumok és plasztiszok saját DNS állományától eltekintve a sejtmagban található.

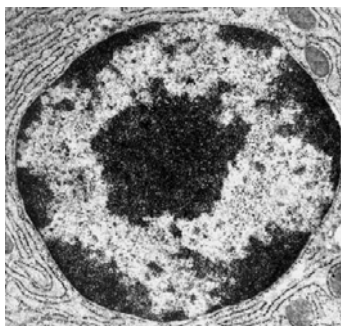


Sejtmag a sejtmagvacskával (sárga), és a maghártyához kapcsolódó ER-mal (kék)

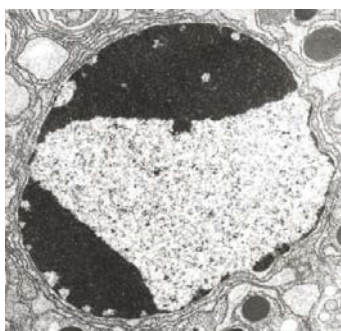
A sejtmagban fénymikroszkópos DNS festéssel is elkülöníthető egy erősebben festődő ún. heterokromatin és egy kevésbé festődő eukromatin. A két szabálytalan eloszlású régió eltérő festődése a DNS eltérő koncentrációjával magyarázható. A világosabb eukromatikus régióban a DNS kevésbé kondenzált állapotban van, ez a rész tehát a működő, despiralizált DNS területe. A heterokromatikus régiók erős festődése pedig a DNS szál erős kondenzációjának következménye. A kondenzált és letekeredett DNS szakaszok a sejt működése során változnak, de legszembetűnőbb a sejtciklusnak megfelelően az osztódásra felkészülő magban a DNS kromoszómákká tömörülése, majd az osztódást követően újbóli dekondenzációja.



Heterokromatikus (sötét) és eukromatikus (világos) részek a sejtmagban

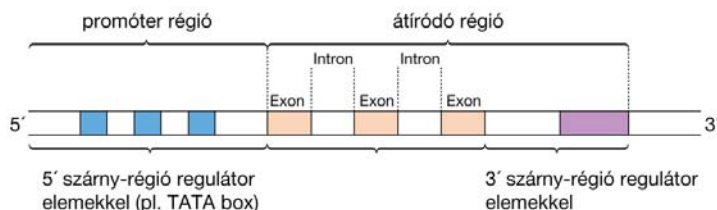


Erősen heterokromatikus sejtmag, jól látható nukleólusszal (TEM).



Apoptotikus sejtmagban a fragmentálódó kromatinállomány kondenzálódik és a maghártya alatt halmozódik fel (TEM).

Az 1850-es években Gregor Mendel által végzett kísérletek mutattak rá először, hogy a tulajdonságok (fenotípus) genetikailag öröklődő formában (genotípus) vannak jelen a sejtekben. 1903-ban Walter Sutton és Theodor Boveri citológiai megfigyelések alapján állította fel az öröklődés kromoszómális elméletét. A genom kromoszómákba szerveződése, és annak működése a kutatások egyik legfontosabb területe, bár még távol állunk a génműködés szerveződésének teljes megértésétől. A genom mérete az élőlények különböző csoportjaiban nagy eltéréseket mutat. Bár van némi korreláció a fejlettség és a genom mérete között, az egyes fajok között igen nagy eltérések tapasztalhatóak. A **haploid** eukarióta sejtek genommérete (C érték) 10^7 – 10^{11} bázispár között változik. Az emberé a középmezőnyben található mintegy 3×10^9 bázispárral. A növényi molekuláris biológia kedvenc kísérleti objektuma az *Arabidopsis* mintegy 7×10^7 bázispárral kicsinek számít. A legnagyobb ismert genommal (10^{11}) a liliumfélék rendelkeznek, de a kétélűek genomja is 50-szer nagyobb, mint az emberé. Ezt a jelenséget hívjuk C-érték paradoxonnak. A gének összehasonlításából kiderült, hogy a különbség alapja nem a működő gének számában, hanem a korábban értelmetlennek tekintett repetitív szekvenciákban keresendő. A működő gének sem tekinthetők folyamatos DNS szekvenciáknak. Bennük közbeékelődött, a géntermékben nem kifejeződő szekvenciák is találhatók. Egy gén átlagos mérete nagyjából 1000 kilobázis, ami az *Arabidopsis* esetén a 15 000 gént tekintve igen kismértékű redundanciát jelent. Hasonló okokból vált a genetikai kutatások fontos alanyává a *Drosophila* és a *Caenorhabditis* is. A nem kódoló közbeékel DNS szakaszai a génnek az ún. intronok, míg a kódoló szakaszok az exonok. A gének 5' irányba eső, nem kódoló DNS szakaszai valószínűleg a transzkripció regulációjában játszanak szerepet, míg a 3' irányú hasonló DNS szakaszok az átíró mRNS módosításában, a transzkripció megállításában vesznek részt, de egyéb szabályozó szerepük is lehet.

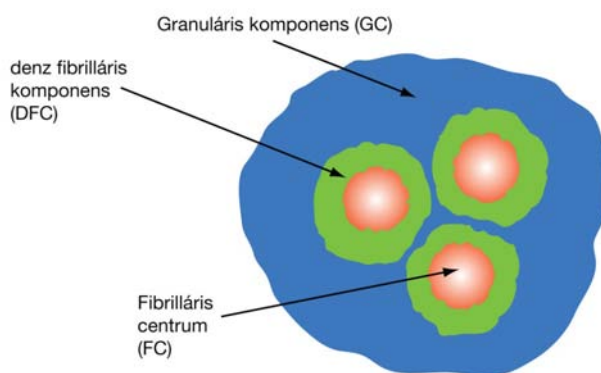


rRNS gén felépítése.

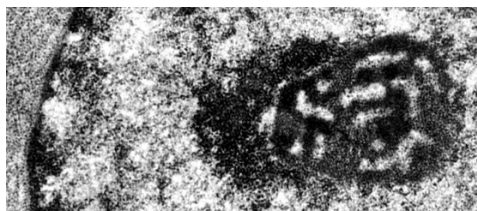
A gének egy része nem csak egy kópiában van jelen, hanem repetitív szekvenciák formájában többszöröződve. A multiplikáció nem mindig jelent teljes azonosságot, az ismétlődő szekvenciák alkotta géncsaládok tagjai között bizonyos fokú eltérés is lehetséges. A tandem ismétlődő szekvenciák alkotta gén klaszterek tagjai akár külön szabályozás alatt is állhatnak. Jellemző, hogy az ilyen ismétlődő gének nagy mennyiségben előállítandó géntermékeket kódolnak, mint például tartalékfehérjéket, vagy a növényi Rubisco enzimet.

A magvacska

A sejtmag fénymikroszkóppal is jól látható része a magvacska, vagy nukleólusz. A nukleólusz elsősorban a riboszómális RNS-ek szintézisének a helye, de a riboszómák részleges összeszerelése is itt történik. Egy magban több nukleólusz is lehet, számuk sejttípusonként is változik. A magvacskának nincs membránja. Az interfázisban figyelhető csak meg, a profázis alatt lebomlik és a telofázisban újrászerveződik. A magvacska a kromoszómák ún. NOR, nukleólusz organizáló régiója köré szerveződik, ugyanis ezek az rRNS tandem ismétlődő szekvenciái.

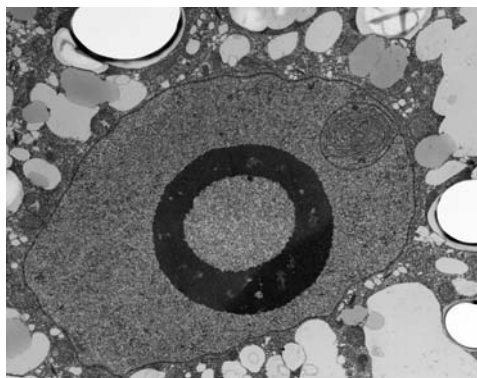


A nukleólusz komponensei



A sejtmagvacska metszete (TEM).

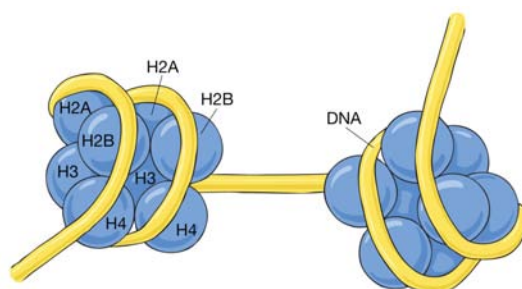
A magvacskának három szerkezeti elemét lehet elkülöníteni. Kívül található granuláris komponens (GC) melybe ágyazódik egy, vagy több kívülről denz fibrilláris komponenssel (DFC) burkolt fibrilláris centrum (FC). A fibrilláris centrumban nincs RNS transzkripció, de inaktív DNS, különböző fehérjék, enzimek kimutathatók. Maga a transzkripció az FC perifériáján, illetve a denz fibrilláris komponens területén történik, és itt indul meg a keletkezett pre-rRNS processzálása. A külső granuláris komponens (GC) területén, mint arra a neve is utal elektronmikroszkópos képen nagyon sok szemcse figyelhető meg. Ezeknek a szemcséknek a mérete megfelel a riboszómák alegységeinek. A citoplazmából a riboszómális fehérjék a transzlációt követően ugyanis visszashállítódnak a sejtmagba, és a GC területén az ott levő rRNS-ekkel kialakítják a riboszómák alegységeit. Mivel a riboszómákat felépítő egyik (5S) rRNS nem a magvacska területén szintetizálódik, annak a nukleoplazmából ide kell szállítódnia. A többi rRNS szintézisét a nukleóluszban az rDNS szakaszokról az RNS-polimeráz I enzim végzi, majd a pre-rRNS feldarabolódásával (splicing) kialakulnak az eukariótákra jellemző 18S, 5,8S, és 28S rRNS-ek. A riboszómák ezekből az rRNS-ekből és mintegy 30 különböző fehérjéből épülnek fel.



A nukleólusz elektronmikroszkópos képe növényi sejtben.

A DNS kettős hélix a sejtmagban meghatározott szerkezetben helyezkedik el, ami biztosítja az aktív szakaszokról történő átíródást és egyben a hosszú (a humán DNS majdnem 2 m) DNS szál becsomagolását az 5–15 μm -es sejtmagba. A sejtosztódás előtt, az S fázisban a DNS szálnak meg is kell duplázódnia, majd a sejtosztódás során szállítható kromoszómákká kell szerveződnie. A DNS szál kromoszómákká alakulásának, kondenzációs szintjeinek egymásra épülését nevezzük a kromoszómák hierarchikus szerveződésének. Kiindulva a DNS kettős hélixből, tekintsük át a csomagolás egyes szintjeit a legkondenzáltabb metafázisos kromoszóma kialakulásáig.

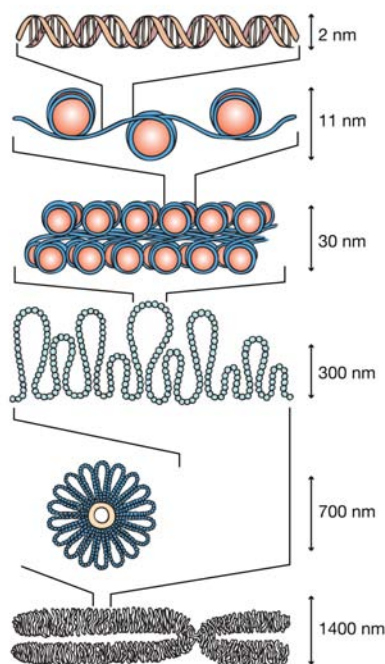
A DNS kettős hélix mintegy 2 nm átmérőjű, és a kromoszómák számának megfelelően több darabban helyezkedik el a sejtmagban. A DNS hisztonfehérjékből álló fehérjekomplexekre, ún. nukleoszómkákra tekeredik fel. Egy nukleoszóma nagyjából két csavarulatot alkot, mintegy 166 bázispárnyi hosszban. Két ilyen nukleoszóma tekeredett szakasz között egy 20–200 bázispárnyi átvezető, linker szakasz található. A nukleoszómkát két tetramer fehérjekomplex alkotja, mindegyikben egy-egy H2A, H2b, H3, és H4 hisztonfehérje található. A DNS szál a nukleoszómaon kívülről a H1 hisztonfehérje stabilizálja. Az így kialakult gyöngyfűzer szerkezet 11 nm átmérőjű.



Nukleoszómkákra feltekert DNS szál

A nukleoszóma fonal tovább hajtogatódik, egy keresztmetszetben hatsugarú ún. szolenoid szerkezetté, melynek átmérője már 30 nm. A hierarchia következő lépcsője a szolenoidok hurokszerű hajtogatódása, amivel kialakul az ún. szupercoil amiben már mintegy 700-szor annyi bázispár található egységnyi hosszban, mint a DNS számban, és átmérője mintegy 300 nm. A szupercoil további hajtogatódásával eljutunk a kromatidák szintjére, melyek kb 700 nm átmérőjűek. Az interfázisos sejtmagban a DNS kondenzációja a szolenoidból álló szupercoil szinten van, de ez teljes mértékben meggátolja a transzkripciót. Az eukromatin aktív működéséhez ezt a struktúrát fel kell lazítani, hogy a DNS az enzimek számára hozzáférhető legyen. A szolenoid fellazítását a hisztonok acetilálásával végzi a sejt, ekkor a szolenoidok fellazulnak, és a DNS gyöngyfűzer szerkezetet mutat. A transzkripciós faktorok hatására a DNS szál letekeredik a nukleoszómaon, és a transzkripció megindulhat. Kísérletileg bizonyítják, hogy a működő gének DN-ázzal könnyen emészthetővé válnak.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatják, hogy a hurokstruktúra egy sokak által feltételezett magvázhoz (nuclear scaffold, nuclear matrix) kapcsolódik a DNS AT gazdag SAR (scaffold associated region) vagy MAR (matrix associated region) régiójának segítségével. Bár molekuláris biológiai és citokémiai adatok is szólnak a magváz létezéséről, szerkezetét nem ismerjük, és egyelőre elég sokféle fehérje került az azt felépítő jelöltek közé (többek között laminok is). Az elektronmikroszkópos eredmények is származhatnak fehérjék precipitációjából.



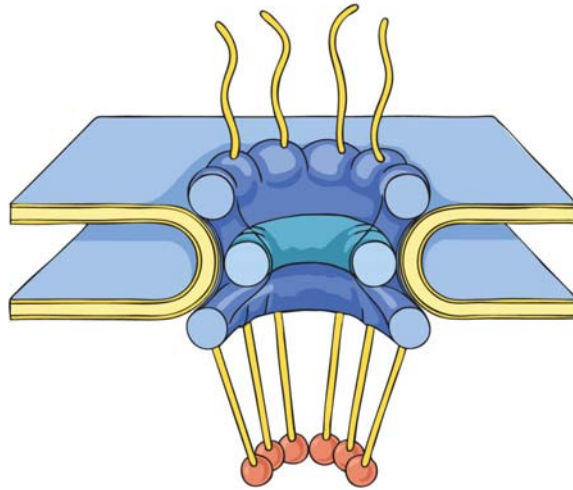
A kromoszóma hierarchikus szerveződése

A lamina

A sejtmag belső felszínén intermedier filamentumokból álló 30–100 nm vastag réteg alakul ki. A lamina a membránhoz és a DNS állományhoz (elsősorban a heterokromatinhoz) is kapcsolódik. A magpórusok területén a lamina megszakad, de kimutatták kapcsolódását a pórus komplexhez is. A laminát különböző típusú lamin fehérjék alkotják, melyek az intermedier filamentumok közé tartoznak. A lamin fehérjék középső régiója helikális szerkezetű, végei pedig globulárisak. A helikális szakaszon a fehérjék egymásra csavarodva dimereket alkotnak, melyek ellentétes polaritással tetramerekké állnak össze. A tetramerek végeikkel összekapcsolódva filamentumokat képeznek. A lamin fehérjéken két foszforilációs hely található, mely fontos szabályozási lehetőséget biztosít. A laminok foszforilálása ugyanis a polimer széteséséhez vezet, defoszforilálása pedig polimerizációhoz. Ez fontos szabályozó folyamat a laminváz és ezzel a maghártya szétszerelésében a mitózis során. A laminváz a növényekben nem található meg, itt más, laminhoz hasonló szerkezetű, de nagyobb méretű fehérjék alkotnak a nukleáris laminához hasonló szerkezetet.

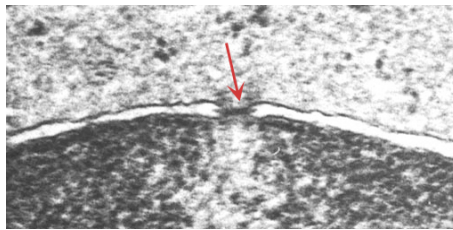
A magpórus komplex

A sejtmaghártyán a két membránt összekapcsoló pórusok alakulnak ki összekapcsolva a mag belső terét a citoplazmával. A magpórusok száma a sejt aktivitásának függvénye. A pórusok nem egyszerű lyukak a kettős membránon, hanem bonyolult szerkezetű pórus komplexek, melyek több mint 50 félé, összefoglaló néven nukleoporinoknak nevezett fehérjéből épülnek fel. A citoplazma és a mag felőli membránrészén a pórust gyűrű alakban elhelyezkedő fehérjék övezik, de a középső részen is kialakul egy hasonló gyűrű. A citoplazmatikus gyűrűből 8 filamentum nyúlik a citoplazmába, míg a másik oldali, nukleáris gyűrűből 8 merev rúd és az őket összekapcsoló fehérjék egy nukleáris kosár elnevezésű képletet alakítanak ki.

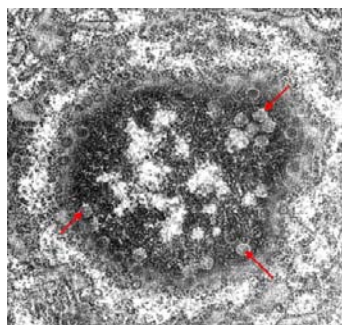


Magpórus komplex hosszszetszeti rajza.

A magpórusokon keresztül történik a nukleocitoplazmatikus transzport, enzimek, transzkripciós faktorok, riboszómális fehérjék importálódnak a citoplazmából a magba, és RNS-ek, riboszóma alegységek stb. exportálódnak a magból a citoplazmába. Ennek a transzportnak a kivitelezését a pórus komplex végzi. A mag membránján található pórusok száma a transzport folyamatok mértékének megfelelően dinamikusan változik. A pórus komplex szoros kapcsolatban áll a membrán alatti laminával. A pórusok az osztódás prometáfázisában szétesnek, és a telofázisban, a magmembrán felépülésével újjászerveződnek.



Magpórus (piros nyíl) keresztmetszeti képe TEM fotón.



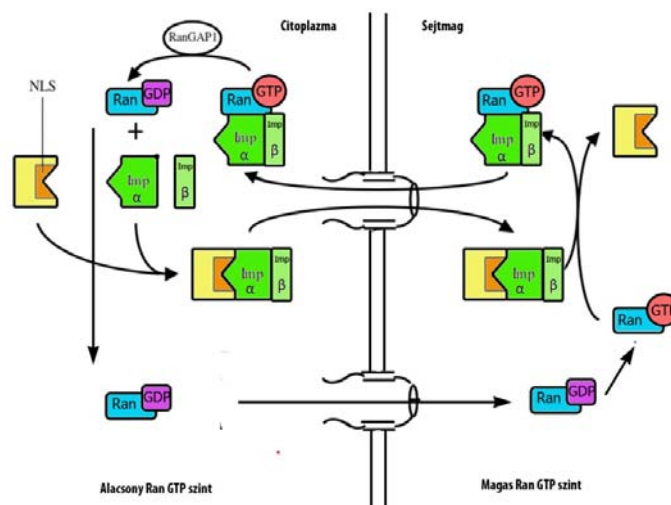
Magpórus (piros nyíl) érintőleges metszetének képe TEM fotón. A piros nyilak mutatják a magpórusok helyét.

Transzport a sejtmag és citoplazma között

A sejtmag membránnal való elkülönülése az eukarióta sejtekben szükségessé tette a két kompartmentum közötti anyagtranszportot. Mivel a maghártyán csak kevés apoláros anyag (pl. szteroidok) képesek átmenni, az anyagok döntő többségének a magmembrán pórusain keresztül kell közlekedni. Ez a transzport zömében aktív transzport, csak az egészen kis (<20–30 kD) fehérjék juthatnak be passzív transzporttal. A magpórusokon igen aktív szállítás folyik, egy-egy pórus komplexen percenként több száz fehérje, RNS halad át, még hozzá mindkét irányban. A

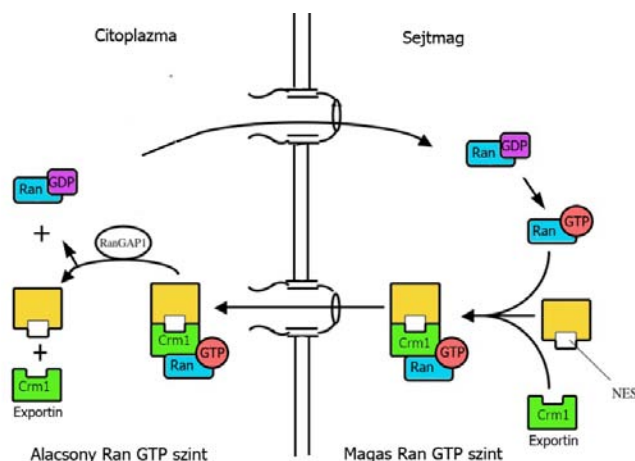
fehérjék sejtmagba történő szállítása egy szignálszakasznak, a nukleáris lokalizációs szignálnak (NLS) a meglétén, vagy pontosabban exponáltságán múlik. Az NLS egy különleges szignál szakasza a fehérjéknek, mivel nem a C, vagy az N terminálison található, hanem a fehérjeszakasz belső részén. Ennek az is a következménye, hogy nem vágható le a fehérjéről, örökre rajta marad, legfeljebb maszkolható, hogy a receptorok ne férjenek hozzá. Az NLS szakasz mindössze 7 aminosavból áll. Ma már többféle import rendszerről tudunk, de a legismertebb az NLS szignálon alapuló.

Az NLS szignált felismeri egy receptor az importin- α , majd ezt a receptor–szubsztrát kapcsolatot az importin- β . Ezen a molekulán keresztül a komplex a magpórus citoplazmába nyúló fibrillumaihoz kapcsolódik, és ezen jut el a tulajdonképpeni pórushoz. A transzlokációhoz azonban szükség van további fehérjékre is. Ezek egyike a Ran-GTP/GDP, mely egy guanizin nukleotid kötő fehérje, amelyik GTP-áz aktivitással rendelkezik. A korábbi elképzeléssel ellentétben azonban nem a GTP hidrolízise az energiaforrása a transzportnak, ehhez ATP szükséges. A Ran-GTP/GDP tulajdonképpen arról ad információt, hogy a transzlokálódó komplex a citoplazmában van-e, vagy már bejutott a magba. Az alacsony Ran-GTP szint a citoplazmai lokalizációt jelzi. A szubsztrát (cargó) – importin komplex átszállítódik a pórus komplexen és bejut a magba. Ugyanez történik a Ran-GDP molekulákkal is.



Fehérjeimport a sejtmagba.

A sejtmagban a Ran-GDP-hez egy ott lokalizálódó enzim csatlakozik, az RCC (RAN nukleotid kicserélő faktor), mely a Ran-GDP-t RAN-GTP-vé alakítja. Ez hozzákapcsolódik az importin-cargó fehérje komplexhez, és ettől a komplex disszociál. Az importin és a Ran-GTP visszajut a pórusokon át a citoplazmába. A citoplazmában a Ran-GTP egy Ran-GAP (Ran-GTP-áz aktiváló protein) hozzákapcsolódásának hatására Ran-GDP-vé alakul a GTP hidrolízise révén. A Ran-GDP leválik az importin molekulákról majd a Ran-GDP visszajut a póruson át a sejtmagba.



Fehérje, illetve RNS export a sejtmagból.

A magból a citoplazmába irányuló exportfolyamatok egy részét az importin receptorhoz nagyon hasonló exportin molekulák végzik. Ők egy másik, az NLS-hez hasonló szignált, a nukleáris export szignált (NES) ismerik fel, és Ran-GTP-hez kapcsolódva exportálják a kötött fehérjét. A Ran tehát GTP vagy GDP kötött állapota szerint vagy a magban, vagy a citoplazmában található, és GTP kötött formában a transzporter molekulával kapcsolatba lépve indukálja a transzlokációt a magpóruson keresztül a citoplazmába.

Egy molekula, ha rajta lokalizációs szignál található mindenképpen átszállítódik a megfelelő kompartmentbe. Vannak olyan szabályozó rendszerek, melyek a lokalizációs szignál elfedésével, vagy szabadon hagyásával szabályozzák egy fehérje (pl. transzkripció faktor) bejutását a sejtmagba. Ez történhet az NLS szakasz tényleges lefedésével, vagy foszforilációjával is, ami az NLS inaktiválódását eredményezi.

Az RNS molekulák fehérjékhez kapcsolódva szállítódnak, ezeken található ugyanis az export szignál.

Kérdések:

1. Mi az eukromatin, és a heterokromatin?
1. Mi a NOR?
2. Milyen funkciója van a magvacskának?
3. Miből áll a nukleoszóma?
4. Mire szolgálnak a hiszton fehérjék?
5. Mi az intron és az exon?
6. Mi a neve a sejtmag membrán alatti vázának?
7. Hogyan jutnak át a sejtmag kettős membránján a nem lipidoldékony molekulák?
8. Hol található az NLS, mit jelent a rövidítés?
9. Milyen módon érzékeli az importin transzport rendszer, hogy a citoplazmában, vagy a sejtmagban van?

6. fejezet - Génkifejeződés; A riboszómák szerkezete és működése

Génkifejeződés az a soklépcsős folyamat, melynek során a génben rejlő információ megjelenik valamilyen fehérjében vagy RNS-ben, és ennek eredményeként a sejt szerkezete/funkciója megváltozik.

A gének egy részét, az ún. **háztartási géneket**, melyek az alapvető anyagcsere-folyamatok enzimjeit, a membránok, a váz fehérjeit, tehát a minden sejtben közösen előforduló fehérjéket kódolják, a sejtek állandóan kifejezik. A **gének egy másik jelentős része** szövetspecifikus fehérjék szintézisét irányítja. Ezek, bár génjeik minden sejtben jelen vannak, csak a rájuk jellemző szövetféleség sejtjeiben fejeződnek ki, működésük differenciált sejtpopulációk kialakulását eredményezik. Változhat a génexpresszió időben is: a szervezet fejlődése során más és más gének kerülhetnek aktív vagy represszált állapotba. A génexpresszió pontosan és bonyolult módon, több szinten szabályozódik.

A génexpresszió kulcslépése az **átírás (transzkripció)**, és ez egyben a legfontosabb szabályozási pont is. Az átírást az elsődleges RNS-átírat feldolgozása, módosítása, majd az érett RNS transzportja követi a maghártya pórusain át a citoplazmába. A génexpresszió több ponton befolyásolható. Nem véletlenszerű, hogy a citoplazmába került sokféle mRNS közül melyikről, mikor és hányszor történik transzláció, eloszlásuk, degradációjuk sebessége szintén befolyásolja a szintetizált fehérjék mennyiségét, lokalizációját.

Transzkripció – Az átírás

Az eukarióta sejtekben az átírást háromféle RNS-polimeráz végzi. Az RNS-Pol.I. a magvacskában lokalizálódik és a riboszómális RNS-molekulákat szintetizálja. Az RNS-Pol.II. és RNS-Pol.III. a nukleoplazmában lokalizálódik, az előbbi a mRNS-ek elsődleges átíratát, az utóbbi a tRNS-eket szintetizálja.

A Pol.II. spontán nem tud a DNS-szállhoz kötődni, ehhez szabályozófehérjék, a **transzkripciós faktorok** szükségesek. Ezek egy része általános jellegű, minden fehérjekódoló gén átírásában közreműködnek (ún. általános transzkripciós faktorok). Másik részük specifikus szabályozófunkciót lát el, egy adott gén vagy géncsoport működését befolyásolja. A transzkripciós faktorok a gén regulációs régiójában levő bázisszekvenciákat ismerik fel, és azokhoz kötődnek. Ilyen szakasz a **promoter**, mely az általános transzkripciós faktorok és a Pol.II. összeszerelődésének a helye. A promoter a starthely (a fehérjét kódoló kezdő szekvencia) előtt található és igen gyakran egy jellegzetes adenin-timin-bázisokból álló sorozat, az ún. TATA-boksz fordul elő benne. Ez utóbbit ismeri fel a TBP (TATA-box binding protein) nevű fehérje, amelyhez ezután több faktor és a Pol.II. is kapcsolódik. Az így kialakult **iniciációs komplex** kb. 50 különböző fehérjekomponensből áll. Azon túl, hogy pontosan a starthely elé helyezi a Pol.II-t, egyes komponensei enzimaktivitással is rendelkeznek. Így pl. ATP-áz-aktivitással, mely elősegíti a DNS két szálának az átírásához szükséges szétválasztását, hiszton-acetiláz-aktivitással, mely a nukleoszómák szerkezet fellazulását eredményezi az aktív génben és kinázaktivitással, mely a Pol.II-t foszforilálja. A Pol.II. foszforilált formájában válik el az iniciációs komplextől és kezdi meg az átírást.

Az iniciációs komplex kialakulása szükséges, de nem elégséges feltétele az átírásnak. Mivel ez mindenütt kialakulhat, ahol a promoter szerkezete lehetővé teszi a bázális transzkripciós faktorok összeszerelését, önmagában nem határozza meg, hogy melyik gén és mikor íródjon át. A transzkripció elindításához specifikus szabályozófaktorok (**specifikus transzkripciós faktorok**) jelenléte is szükséges. Ezek változatos szerkezetű fehérjék, de közös tulajdonságuk, hogy DNS-kötő és átírást aktiváló vagy gátló doménnel rendelkeznek. A DNS-kötő rész ismeri fel a gén specifikus szabályozószakaszait, az úgynevezett **enhancer szekvenciákat**, melyek a promotertől gyakran igen messze – több ezer bázispárnyi távolságban – helyezkednek el. Ezt követően az aktiváló rész kontaktusba kerül más közvetítő fehérjékkel és ezek közvetítésével az iniciációs komplexszel, aminek hatására a Pol.II. megkezdí az átírást. A promotertől messze bekötődő szabályozófaktorok a DNS hurkos szerkezete miatt kerülhetnek fizikai kontaktusba a promoter köré szerveződött faktorokkal. A specifikus szabályozófehérjék között nemcsak aktivátorok, hanem represszorok is találhatók.

A specifikus szabályozófaktorok aktivitását, lokalizációját a sejtet érő külső jelek, hatások szabályozzák. Ilyen lehet pl. valamilyen hormon. Mivel egy-egy gén szabályozórégiójában tucatnyi kötőhely lehet specifikus aktiváló

és gátló faktorok számára, és ezek aktivitását számtalan külső jel befolyásolja, a lehetséges kombinációk száma is igen nagy.

A génkifejeződés szabályozásában jelentős szerepe van a kromatinállomány szerveződésének is. A **mitotikus kromoszómákban** vagy a **heterokromatinban** nincs transzkripció, mert a szorosan feltekeredett DNS-molekulákon a promoter régiók és a specifikus szabályozószekvenciák nem hozzáférhetők a transzkripciós faktorok számára. A nukleoszómák szerkezete maga is nehezíti, ha nem is gátolja meg teljesen az átírást. A transzkripció szabályozásának egy fontos útja a **nukleoszómák hisztonjainak kémiai módosítása**, melyet speciális enzimek, pl. hiszton-acetiltransferázok, metiltransferázok, dezacetilázok végeznek. Aktív kromatinban a hisztonok acetilálódása figyelhető meg, ami csökkenti pozitív töltésüket, és így kapcsolatuk a negatív töltésű DNS-szálakkal fellazul. A **fellazult kromatinszerkezet** nemcsak a hozzáférhetőséget növeli, hanem a hurkok, hajtúszzerű kitüremkedések képződését is lehetővé teszi, ami viszont feltétele annak, hogy a távoli szabályozóregiókon megkötött transzkripciós faktorok érintkezésbe kerüljenek a promoteren összeszerelt iniciációs komplexszel. A hiszton dezacetilálás, metilálás általában ellentétes hatású: kompakt, heterokromatikus, az átírást gátló kromatin szerkezet alakul ki. Az RNS-k egy másik speciális csoportjának, az úgynevezett **kis nemkódoló antiszensz RNS**-nek szintén jelentős szerepe van a génextpresszió szabályozásában.

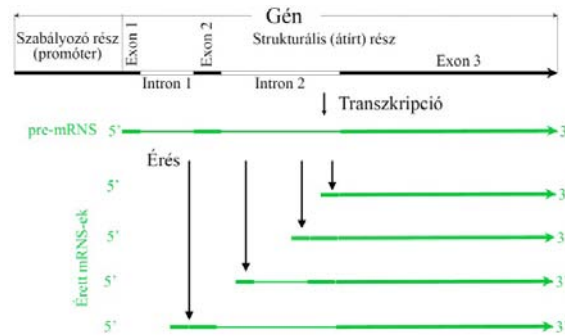
A **DNS kémiai módosítása** is a transzkripció szabályozásának egy fontos lehetősége. A sejtekben kimutatható egy metiláló enzim, amely a DNS-molekulában előforduló citozinokat át tudja alakítani 5-metilcitozinná, ha azok citozin-guanin (CG) szekvenciában fordulnak elő. A DNS-metilálás a gének inaktiválódásával jár együtt.

A génextpresszió specifikus aktiválódása vagy gátlása már az egyedfejlődés korai szakaszaiban megfigyelhető. Ennek egyik oka az, hogy a petesejt citoplazmájában a transzkripciós faktorok mRNS-einek, következésképpen fehérjetermékeiknek eloszlása sem egyenletes, ezért már a barázdálódás során eltérő transzkripciós faktor-készlettel bíró sejtek jönnek létre, melyekben a génkifejeződés is eltérő lesz. A fejlődés későbbi szakaszaiban a génkifejeződés különbségei erősödnek, és kialakulnak a differenciált, valamilyen speciális funkció ellátására szakosodott sejtek. A szomatikus sejtek differenciált állapotukat folyamatosan fenntartják és az osztódásuk során utódsejtjeiknek is átadják (fibroblasztból mindig fibroblaszt keletkezik, májsejtből mindig májsejt stb.). Ezt a jelenséget **sejtemlékezetnek** is nevezik, és lényege az, hogy a szomatikus sejtek utódaikra nemcsak génkészletük (DNS-molekuláik) teljes másolatát, hanem jellemző **génextpressziós mintázatukat** is át tudják örökíteni.

A szülősejt DNS-ének metilációs mintázata (az 5'-metilcitozin bázisok eloszlása) szintén átadódik az utódsejtnak, és ez a gének represszált állapotban tartásának egyik lehetséges mechanizmusa.

Az RNS feldolgozása

A transzkripció terméke hosszú, általában több ezer bázisból álló RNS-molekula, az ún. **elsődleges átirat** formájában jelenik meg a nukleoplazmában, és már rövidebbel a szintézise után megindul feldolgozása. A feldolgozás egyik fontos lépése a **kivágás-összeillesztés** (splicing), melyet speciális RNS-ből és fehérjéből álló részecskék (spliceosoma) katalizálnak. A fehérjekódoló gének mozaikos szerkezetűek: az aminosavak sorrendjét meghatározó bázisszekvenciák (exonok) közé beékelődnek fehérjét nem kódoló szakaszok, az intronok. Az elsődleges átirat tartalmazza mind az exon-, mind az intronszekvenciák teljes komplementer másolatát. A splicing során az intronok kivágódnak, és a szomszédos exonok összekapcsolódnak. Így egy erősen megrövidült átirat jön létre, a kivágott intronok degradálódnak. A feldolgozás során módosul az átirat két vége is, az 5' végre metilált guanin, a 3' végre 200–300 adenilnukleotid (polyA) rakódik rá. A végmódosulások a molekula stabilitását, transzportálhatóságát szabályozzák. E folyamatok végterméke az **érett mRNS**, amely azután a citoplazmába áramlik. A kivágás-összeillesztés következtében egy génről többféle mRNS is keletkezhet (ezek különbözhetnek pl. abban, hogy egyes exonok kimaradhatnak az egyik, vagy másik változatból, vagy a sorrendjük megváltozhat az illesztés során). A jelenséget **alternatív splicing**-nek nevezik és azt eredményezi, hogy egy gén többféle (egyes esetekben több ezer) fehérje változatot is kódolhat. Az alternatív splicing a differenciált állapot kialakításának és fenntartásának fontos mechanizmusa.



Az alternatív splicing.

A transzláció, a riboszómák szerkezete, működése

Transzlációnak azt a folyamatot nevezzük, melynek során a mRNS bázissorrendjében rejlő információ felhasználásával meghatározott aminosav-sorrendű fehérje szintetizálódik. A transzláció a **riboszómák** felszínén megy végbe. A riboszómák kb. 25–30 nm átmérőjű, megközelítőleg gömb alakú részecskék. Egy átlagos sejtben több millió példányban fordulnak elő, részben **szabadon** a citoszolban, részben az endoplazmatikus retikulum membránfehérjéihez **kötődve**. Tömegük több mint felét RNS-ek (riboszomális RNS-ek, rRNS), másik részét fehérjék alkotják. Minden eukarióta riboszóma egy kisebb (40S) és egy nagyobb (60S) alegységből áll (a riboszómák és alegységeik centrifugálással választhatók el a többi sejtorganelumtól, az „S” érték az ülepedés sebességét jellemző mutató, arányban áll a részecske tömegével). A prokarióták riboszómái hasonló szerkezetűek, de kevesebb RNS-t és fehérjét tartalmaznak, ezért össztömegük is kisebb.

A riboszóma képes az mRNS-hez kötődni, és rendelkezik két kötőhellyel a tRNS-ek számára is (ún. „A”-aminoacil-hely az aminosavakat szállító tRNS-ek, és „P”-peptidil-hely a növekvő peptidszálat hordozó tRNS számára). Bizonyos feltételek mellett a riboszóma, nagyobbik alegységén keresztül, az endoplazmatikus retikulum membránjaihoz is hozzákötődhet.

A polipeptid bioszintézis alapfeltétele, hogy a tRNS molekulák feltöltődjenek a nekik megfelelő (specifikus) aminosavakkal, vagyis hogy ATP felhasználása mellett megszintetizálódjanak az aminoacil-tRNS molekulák. A szorosabb értelemben vett transzláció három szakaszra bontható folyamatsor, mely a **lánckezdő (iniciációs) komplex** kialakulásával indul. Ehhez a riboszómának alegységeire kell disszociálnia. A komplex az mRNS 5' végének közelében elhelyezkedő AUG start kodon köré szerveződik és a kis alegységből, az első aminosavat (ez metionin) hordozó tRNS-ből, az mRNS-ből, valamint a citoszolból felvett fehérjékből (iniciációs faktorok) áll. Az iniciáció második lépéseként a nagyobbik alegység rákötődik az iniciációs komplexre: összeáll a működőképes riboszóma. A **lánchosszabbítás (elongáció)** háromlépéses folyamat, melynek során az újabb aminosav az A-helyre belépve kapcsolódik az mRNS-hez, majd létrejön a **peptidkötés** az előző aminosav karboxi csoportjával, és végül a riboszóma egy kodonnal áthelyeződik (tovább lép). A lánchosszabbítás elongációs faktorokat igényel a citoszolból. Újabb és újabb aminosavak épülnek be a peptidláncba, miközben a riboszóma végighalad az mRNS-en 5'→3' irányban. Egy-egy aminosavat az mRNS-en egy-egy **bázishármas (triplet)** kódol, melyet az aminosavat hordozó tRNS-en levő **komplementer bázishármas (antikodon)** ismer fel. A növekvő lánc a nagyobbik alegységben a P-helyről nyíló csatornán (exit tunnel) keresztül tolódik ki a riboszómából. A lánchosszabbítás során a riboszóma eléri az mRNS 3' végének közelében elhelyezkedő **stop kodont** (UAG, UGA vagy UAA bázishármas). Itt leáll a szintézis (**termináció**), a peptidlánc leválik a riboszómáról, mely kis és nagy alegységre disszociál, és maga is leválik a mRNS-ről.

A fehérjeszintézis egyike a legenergiaigényesebb folyamatoknak: minden egyes aminosav beépítése 4 nagy energiájú foszfátkötés (1 ATP, 3 GTP) hasításával jár. Egy átlagos méretű (kb. 200–400 aminosavból álló) fehérje szintézise eukarióta riboszómákon kb. 1 perc alatt megy végbe. A szintézis intenzitását a sejt úgy fokozza, hogy egy-egy mRNS-en egyidejűleg több riboszóma is végez leolvasást, egymás után haladva az 5'→3' irányba. Az egy mRNS-re felfűzött riboszómacsoportot **poliriboszómának** (poliszómának) nevezik. A poliszómák különösen gyakoriak intenzív fehérjeszintézist folytató sejtekben.

A riboszomális RNS-ek szintézise és a riboszóma-alegységek összeszerelése a magvacskában történik, innen vándorolnak azután a citoplazmába. Az rRNS-génekre általában jellemző, hogy nagyszámú kópiában (humán diploid sejtekben pl. 400 példányban) vannak jelen. Számos faj, így pl. kétélűek oocytáiban az rRNS-gének extrém nagy számban, 1–2 millió példányban jelennek meg a sejtmagban. Ez teszi lehetővé, hogy a petesejt citoplazmájában viszonylag rövid idő alatt nagy mennyiségű tartalék fehérje és riboszóma halmozódjon fel.

Számos olyan vegyületet ismerünk, melyek a riboszómaműködés akadályozásán keresztül gátolják a fehérjeszintézist. Így pl. a sztreptomycin és származékai gátolják az iniciációt és hibás leolvasást okoznak, a tetraciklin az aminoacil-tRNS bekötődését akadályozza, a kloramfenikol a peptidkötés kialakulását gátolja. Mivel hatásukkal szemben a prokarióta riboszómák érzékenyebbek, mint az eukarióta riboszómák, alkalmazhatók bakteriális fehérjeszintézis szelektív gátlására és ezen keresztül a fertőzés leküzdésére.

A transzláció szabályozásában nagy szerepe van az RNS- molekulák különleges csoportjainak, a **kis nemkódoló RNS-eknek**. Ezek viszonylag rövid (20–25 nukleotidból álló) láncok. Több változatuk ismert, melyek közös tulajdonsága, hogy bázisszekvenciájuk komplementer valamilyen mRNS bázis-sorozatával, ezért azt fel tudják ismerni és a bázis párosodás szabályai szerint hozzákötődnek. Hosszabb prekurzorok formájában íródnak át a genom különböző helyeiről, majd egy ribonukleáz rövid, 20–25 bázis hosszúságú szakaszokra hasítja őket, melyek azután speciális fehérjékhez kötődve úgynevezett **csendesítő komplexeket** képeznek. Az elnevezés arra utal, hogy ezek hozzákötődnek egyes mRNS-khez és így megakasztják azokról az átírást, vagy kiváltják az adott mRNS degradációját. A hatás specifikus: csak azon mRNS-k transzlációját gátolják, melyekkel szemben a komplementaritás fennáll.

Ahhoz, hogy a fehérjék funkciójukat teljesíteni tudják, a rendeltetési helyükre kell kerülniük. Mivel a sejt riboszóma-populációja egyidejűleg több száz – több ezer különböző fehérjét szintetizál, ez csak akkor lehetséges, ha válogatási, célbajuttatási lépések követik a szintézist. A szintézis során a fehérjékbe rövid aminosav-sorozatokról álló válogatási jelek épülnek be, melyeket jelfogó molekulák – más fehérjék – ismernek fel, és a jel–jelfogó kölcsönhatás határozza meg az adott fehérje lokalizációját. Ha egy fehérjén semmiféle válogatási jel nincs, a citoszolba kerül és ott is marad (pl. vázfehérjék, glikolitikus enzimek). A citoszolba kerülő fehérjék más csoportjai válogatási jeleket hordoznak, és ezek irányításával a magba (NLS segítségével), a mitokondriumokba vagy a peroxiszómákba transzlokálódnak. A külvilág számára készülő váladék- (szekréciós) fehérjék, valamint a vakuoláris apparátus membránfehérjéinek sorsát szintén speciális válogatási jelek determinálják. Ezek a fehérjék nem jutnak a citoszolba, hanem már szintézisük korai szakaszában az endoplazmatikus retikulum üregrendszerébe lépnek, és innen vándorolnak a vakuoláris apparátus különböző tereibe, ill. a külvilágba.

Kérdések:

1. Definiálja a genetikai apparátus fogalmát!
2. Definiálja a „háztartási gén” fogalmát?
3. Milyen fő lépésekből áll a génkifejeződés?
4. A DNS-metiláció milyen hatást gyakorol a gének működésére?
5. Mi a különbség az elsődleges átírat és az érett mRNS között?
6. Válaszolja fel a splicing és alternatív splicing folyamatát!
7. Milyen részfolymatokról áll a transzláció?
8. Milyen komponensek alkotják az iniciációs komplexet?
9. Milyen fő lépésekből áll az elongáció?
10. Mi a termináció?
11. Milyen struktúra a poliriboszóma?
12. Mi a kis nemkódoló RNS molekulák lehetséges szerepe?

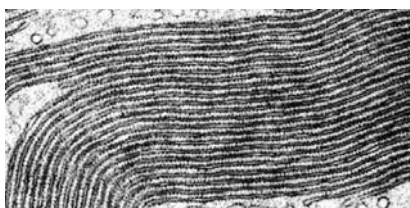
7. fejezet - Az endoplazmatikus retikulum

Az **endoplazmatikus retikulum** (ER) egymással összefüggő lapos zsákokból, ciszternákból, csövekből álló, nagy kiterjedésű üregrendszer, melyet kb. 6 nm vastagságú hártya határol. Fejlettsége, kiterjedése sejtípustól, működési állapottól függően változik. Szerkezet és működés szempontjából két részre választható: a **durva felszínű ER-re** (RER) és a **sima felszínű ER-re** (SER). Az elhatárolódás nem éles, a két rész membránjai átmennek egymásba és üregrendszerük közös. A DER membránjának citoplazmatikus felszínén riboszómák találhatók (erről kapta elnevezését), a SER felszínén nem.

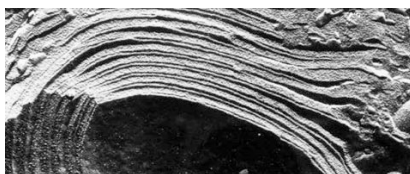
Az endoplazmatikus kompartmentumot ultracentrifugációs módszerekkel **mikroszóma** frakcióként lehet elkülöníteni a sejt egyéb organelumaitól.

Durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (DER)

A DER nevét a membránjainak citoszol felé néző oldalán riboszómák helyezkednek el, emiatt felszíne szemcsés, „érdes”. A DER a nagy mennyiségű váladékfehérjét termelő sejtekben különösen fejlett (pl. hasnyálmirigy, máj, neuronok), ezekben a sejtekben számos, szorosan egymás mellé rendeződött ciszternából áll, gyakran a sejtmag körül helyezkedik el, membránja folytonos a külső maghárttyával, lumene a perinukleáris térrel.



DER ciszternák jellegzetes elrendeződése.



DER ciszternák fagyaszttöréssel preparátumról készül fotón. A ciszternákon keresztbe futott a törés, így keresztmetszetben láthatók.

A DER fő funkciója az integráns membránfehérjék, a lizoszomális és a váladékfehérjék szintézise, módosítása, válogatása és szállítása. E fehérjéket az különbözteti meg a szabad riboszómákon szintetizálódóktól, hogy a mRNS elején, az iniciátor (AUG – metionin) kodon után egy kb. 5–30 aminosavból álló szakasz kódsorozat, az ún. **szignálszekvencia** helyezkedik el.

Az iniciációs komplex kialakulásakor és az elongáció első lépéseinél a riboszóma nincs a DER-hez kötve, azaz a fehérjeszintézis szabad riboszómán indul meg. A leolvasás során a szignálszekvenciának megfelelő **szignálpeptid** szakasz megszintetizálódik és hamarosan megjelenik a riboszóma felszínén.

Szignálpeptid van minden kötött riboszómán szintetizálódó fehérje N-terminálisán. A legtöbb szignálpeptid egy vagy több pozitív töltésű aminosavval (rendszerint lizin) kezdődik, nagyobb részét apoláros aminosavak (leucin, valin, alanin) alkotják. Az apoláros aminosavlánc egyszerű alfa-hélix szerkezet kialakulását teszi lehetővé.



Apoláros aminosavlánc alkotta alfa-hélix térbeli modellje.

A szignálpeptidet egy speciális, hat fehérjéből és egy RNS-ből álló komplex, az SRP (**szignálfelismerő részecske** = **signal recognition particle / SRP**) felismeri, kötődik hozzá és a riboszómához. Az SRP–riboszóma komplex kialakulása hatására a fehérjeszintézis felfüggesztődik. A kötésben lévő SRP kapcsolódni képes a DER membránjaiban található **SRP-receptorhoz** („dokkoló” fehérjéhez). A riboszómát, pontosabban annak nagyobbik alegységét a szintetizálódó fehérje DER membránon való átjutását lehetővé tevő transzlokációs pórust, a **transzlokont** kialakító fehérjék kötik meg. Ezt követően az SRP leválik és újabb szignálpeptid kötésére kész állapotban a citoszolba kerül (SRP-ciklus). Az SRP–riboszóma komplex kialakulása, membránhoz kötődése, majd az SRP disszociációja nem spontán, hanem több molekula GTP lebontásával járó, energiaigényes folyamat (az SRP és receptora is GTP, GDP kötőhelyekkel és GTPáz aktivitással rendelkezik).



Günter Blobel (1936) német-amerikai biológus; 1999-ben fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat kapott a szignálmélet megalkotásáért.

Az SRP leválását követően a fehérje szintézise folytatódik. A szignálpeptid hidrofób szakasza a transzlokációs komplexbe épül, és a hosszabbodó peptidlánc a transzlokonon keresztül becsúszik a DER üregébe vagy beépül annak membránjába.

Az **integráns membránfehérjék** mRNS-ei a szignálszekvencián kívül (membrándoménjaik számától függően) egy vagy több további, ún. „**stop-transzfer**” és „**start-transzfer**” **szekvenciákat** tartalmazhatnak. A stop-transzfer szekvenciának megfelelő peptidszakasz (membrán horgony) szintézis közben elérve a transzlokont, megállítja a peptidlánc átcúszását a RER üregébe, kihorgonyozza a fehérjét a membránba. A start-transzfer hatására a citopazma felőli oldalon növekvő fehérjelánc hurkot képezve újra kapcsolódik a transzlokonhoz, így a start-transzfer szekvenciáról szintetizálódó peptidszakasz ismét kihorgonyozódik a membránba, és a peptidlánc további részei újfent becsúsznak a transzlokonon a DER lumenébe.

A DER-en szintetizálódó fehérjék (pl. váladékfehérjék, lizoszomális fehérjék) válogatása, elkülönítése a citoszol fehérjéitől a szintézis kezdetekor megtörténik, az ehhez szükséges jelet az mRNS (vagyis végső soron az adott fehérje génje) tartalmazza, a jel azonosítását az SRP és a DER membránjaiban levő receptorfehérjék végzik.

Már a szintézis során megindul a DER üregébe becsúszó fehérje további feldolgozása, módosítása (kotranszlációs módosítás). A DER-membrán belső, lumen felőli oldalán lokalizálódó **szignálpeptidáz** eltávolítja a szignálpeptid-szakaszt, mely a citoszolba kerülve proteaszómában degradálódik.

Az **oligoszacharid-transzferáz** meghatározott mintázatot, 2 N-acetil-glükózaminból, 9 mannózból és 3 glükózból álló oligoszacharid oldalláncokat kapcsol a fehérjéhez, az aszparagin aminosav aminocsoportjára kötve (**N-glikoziláció**). Bár az oligoszacharid oldalláncok átalakítása már az DER-ben megkezdődik (néhány monoszacharid egység vágódik le), az eredmény mégis egységes, nem specifikus glikozilációs mintázat kialakulása. Az oligoszacharid mintázat egyedi módosítása a Golgi-készülékben zajlik.

A DER üregében történik a fehérjék korrekt térszerkezetének (a peptidlánc feltekeredése, hajtogatódása) kialakítása is, mely speciális fehérjék (**dajkafehérjék** vagy **chaperonok**, **hőszokkfehérjék**) segítségével történik (a hőszokk elnevezés arra utal, hogy e fehérjék mennyisége a sejtben hőkezelés és általában stresszhatás után megnő). A fehérjék natív szerkezetének kialakításában számos enzim vesz részt. Ilyen pl. a protein diszulfid izomeráz (PDI), mely a szabad –SH csoportokhoz kötődve diszulfidkötéseket alakít ki.

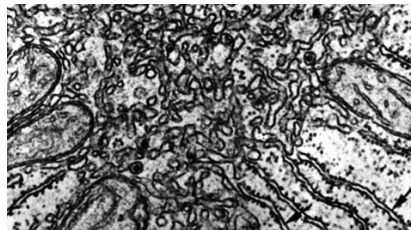
A megfelelő térszerkezettel rendelkező fehérjék vezikuláris transzporttal kerülnek a Golgi készülékbe, ahol további feldolgozásukra és válogatásukra kerül sor. Az ER saját lumenális- és membránfehérjei – általában a peptidlánc C-terminálisán – egy speciális, négy aminosavból álló, ún. **ER retenciós** (visszatartó) **szignált** tartalmaznak, amely hatására e fehérjék el sem hagyják az ER területét vagy a Golgi cisz oldaláról visszaválogatodnak.

A DER-ben működik egy **“minőségellenőrző rendszer”**, az ún. endoplazmatikus retikulum asszociált degradációs útvonal (**ERAD**). A hibás, rosszul hajtogatódott, éretlen oligoszacharid oldalláncú, szabad (diszulfid-híd kialakításában részt nem vevő) ciszteint tartalmazó, nem megfelelő térszerkezetű fehérjék transzlokációs póruson keresztül visszaáramlanak a citoplazmába ahol a proteaszómákban lebomlanak. Az ellenőrző rendszer enzimkészletében vannak dajkafehérjék is, amelyek nemcsak felismerik a fehérjék hibás szerkezeti elemeit, de megpróbálják azokat korrigálni is. A véglegesen javíthatatlan fehérjék egy speciális transzmembrán fehérjekomplex közvetítésével kerülnek ki a citoszolba. Itt egy enzimkomplex poliubikvitin jelöléssel látja el a hibás fehérjéket, melyek végül a proteaszómában bomlanak le.

Simafelszínű endoplazmatikus retikulum (SER)

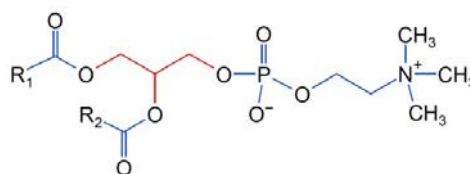
A SER a fehérjeszintézisben nem vesz részt, mivel membránjaiból hiányoznak a riboszómákötő, dokkoló és transzlokon fehérjék. Mind a DER, mind a SER közös funkciója viszont a **membránlipidek** szintézise, továbbá a citoszol **Ca⁺⁺-koncentrációjának** szabályozása. Ez azért lehetséges, mert üregrendszerükben Ca⁺⁺-kötő fehérjék lokalizálódnak, membránjaik pedig Ca⁺⁺-pumpát (Ca⁺⁺-ATP-áz), ill. Ca⁺⁺-csatornákat tartalmaznak. A Ca-ionok ún. másodlagos hírvivőként fontos szerepet játszanak számos jelátviteli folyamatban.

A SER feltagoló lapos zsákokból, de nagyobb részt elágazó és összeolvadó labirintózus csőhálózathoz áll. Nem mutat a DER-hez hasonló rendezettséget. Általában a DER-nél kisebb térfogatú kompartmentum, azonban a SER igen fejlett a szteroidhormonokat szintetizáló (pl. mellékvesekéreg), ill. xenobiotikumok (biológiailag aktív idegen anyagok, pl. gyógyszerek) feldolgozását (ún. méregtelenítését) végző sejtekben (pl. májsejtek).

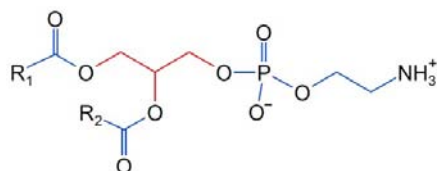


A DER és SER kontinuuus kompartmentumok.

A foszfolipid szintézis enzimeit a SER membránjának citoszol felőli felületén, a prekursorok a citoszolban találhatók. A szintetizálódó foszfolipidek a SER membránjának citoszol felőli lipidrétegébe épülnek be. Ennek következtében a membrán külső rétege folyamatosan nagobbodik. Az ebből fakadó egyenetlenséget a scramblase enzim egyenlíti ki úgy, hogy a lipidek egy részét a SER membránjának citoszol felőli rétegéből átforgatja a lumen felőli rétegbe. A membránok két rétegének foszfolipid összetételében (pl. a foszfatidil-kolinra, foszfatidil-etanolaminra stb.) megmutató asszimmetriát más specifikus flippázok alakítják ki.



Foszfatidil-kolin.



Foszfatidil-etanolamin.

A ceramid és a koleszterin molekulák is a SER-ben szintetizálódnak. A szteroid vegyületek szintézisének meghatározott folyamatai szintén a SER-ben játszódnak le.



Ceramid általánosított képlete.

A SER-ben előállított lipidek vezikuláris transzporttal kerülnek át a Golgi-készülékbe, ahol bizonyos lipidmolekulák (pl. a ceramidok) átalakítódnak, és további vezikuláris transzporttal jutnak el célterületükre (pl. plazmamembrán). A mitokondriumba, a plasztiszba és a peroxiszómákba szállítófehérjék (ún. karrier proteinek) közreműködésével juthatnak el.

A SER fontos funkciója a citoszol kalciumszintjének szabályozása. A Ca^{++} -ionok koncentrációja a citoplazmában jellemzően alacsony, alacsonyabb, mint a sejten kívüli térben. A plazmamembránban és a SER-ben lévő kalcium-pumpák gondoskodnak a citoszol alacsony szabad Ca^{++} -ion koncentrációjáról. A sejten belül a kalcium a SER-ben raktározódik. Megfelelő ingerek hatására a SER-ből a kalcium felszabadul. Ez a mechanizmus igen fontos szerepet játszik az izomsejtek, különösen a harántcsíkolt izomrostok működésében. Utóbbiakban a SER nagy kiterjedésű, speciális változata, a miofibrillumokat hálózatosan körülölelő **szarkoplazmatikus retikulum** alakult ki.

A SER részt vesz a **glükóz anyagcserében** is. A glikogén szintézisének lánckezdő lépése a SER feladata, a folyamat további lépései a citoszolban zajlanak. A kialakuló glikogén szemcsék jellemzően a SER környékén, csoportokba rendeződve találhatók meg. A glikogén lebontásakor keletkező glükóz-6-foszfát a SER membránjában elhelyezkedő transzporter segítségével bejut a SER lumenébe, ahol a glükóz-6-foszfátáz enzim lehasítja a foszfátcsoportot. A glükóz molekula szintén transzporter közvetítésével jut ki a citoszolba, majd a plazmamembránon át végül a vérbe.

A SER speciális enzimrendszerei révén fontos helyszíne a **méregtelenítésnek**. A sejtekbe jutó, a szervezet számára idegen anyagok (xenobiotikumok, mint pl. gyógyszerhatóanyagok, mérgek), vagy éppen a szervezetben keletkező káros anyagok, molekulák átalakításával a SER membránjában elhelyezkedő **kevert funkciójú oxidázrendszer** (mixed function oxidases – MFO) enzimkomplexe foglalkozik. Alkotóelemei pl. a citokróm-P450, citokróm-b5, flaprotein fehérjecsaldók tagjai. Az MFO több tucat reakciót képes katalizálni. Enzimei szubsztrát-specifitása gyenge, egy enzim többféle szubsztrátot is képes átalakítani, ugyanakkor egy adott szubsztrátot több enzim is átalakíthat. A katalizált reakciókhoz NADPH és légzési oxigén szükséges. Az oxigénmolekula egyik atomja az átalakítandó szubsztrátot oxidálja, a másik elektronokat és protonokat felvéve vízzé alakul. A szubsztrátok átalakításának célja oldhatóságuk növelése, a sejtekből, a szervezetből való eltávolításuk megkönnyítésére. (Előfordulhat, hogy éppen a fenti átalakítás során jönnek létre káros hatású molekulák.) Minden eukarióta sejten megtalálható az MFO rendszere. Az állati szervezetben a májsejtek rendelkeznek a legnagyobb méregtelenítési kapacitással, bár a méregtelenítésben jelentős a szerepe a légutaknak, a bőrnek, a bélfalnak.

Kérdések:

1. Milyen térbeli alakzatokból épül fel a DER?
2. Mi a transzlokon?
3. Mi az SRP szerepe a fehérjék irányításában?

4. Mi a dajkafehérjék szerepe a DER.ben?
5. Mi a hatása a stop-transzfer szekvenciának?
6. Mi a SER szerepe a glükóz anyagcserében?
7. Mi a méregtelenítés fő enzimkomplexe?

8. fejezet - A Golgi-készülék

A Golgi-készüléket (más néven Golgi-komplex, Golgi-apparátus) 1898-ban írta le *Camillo Golgi* olasz orvos és citológus. Ez a sejtorganellum Golgi által alkalmazott módszerekkel egy a sejt belsejében elhelyezkedő, membránnal határolt, hálózatos szerkezetként tűnt fel. Tényleges szerkezetét az elektronmikroszkópos vizsgálatok, működését morfológiai és biokémiai, molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével tárták fel. Az eukarióta sejtekben általánosan előforduló, membránnal határolt, eltérő felépítésű alkompartmentumokból álló, heterogén, összetett organellum. Szerkezete a különböző sejttypusoktól és azok különböző fiziológiai állapotaitól függően változatos és változó felépítésű lehet. Különösen fejlett a szekrécióra specializálódott sejtekben. A Golgi-komplex központi szerepet játszik a sejt által előállított lipid- és fehérjeforgalomban, a jelentős transzport útvonalak fontos szereplője.



Camillo Golgi (1843–1926) olasz orvos, citológus; 1906-ban megosztott Nobel-díjat kapott (Santiago Ramón y Cajal-lal) az idegrendszer finomszerkezetének vizsgálatában elért eredményeiért.

A Golgi-készülék felépítése

A Golgi-készülék központi eleme a 4–8 párhuzamos, szorosan egymás felett fekvő ciszterna rendezett csoportjából álló diktioszóma. A ciszternák száma a diktioszómán belül, illetve a diktioszómák száma a sejtben a sejttypustól függ: egyes állati sejtekben egyetlen nagyterjedésű diktioszóma, míg növényi sejtekben akár több száz kisebb méretű található.

A ciszternák nagyjából kör alakú, a szélükön kiszélesedő, kissé hajlított, lapos, zsákszerű struktúrák. A belőlük felépülő diktioszóma polarizált felépítésű, megkülönböztetjük a **bemeneti** (belépési, bemenő), ún. **ciszoldalát (cisz-ciszterna)** és az azzal ellentétes **kimeneti** (kilépési, kimenő), ún. **transz oldalát (transz-ciszterna)**. A cisz-ciszterna membránvastagsága az endoplazmatikus retikuluméval egyezik (kb. 6 nm), a transz-ciszternáé a plazmamembránéhoz hasonló (10–12 nm). A két szélső ciszterna közötti mediális ciszternák vastagsága cisz→transz irányban növekszik. A ciszternák szélein tágulatok és néhol tubulus-szerű képződmények vannak. A cisz és transz felszínen kiterjedt, hálózatosba szerveződő tubulusrendszer alakulhat ki (elsősorban az állati sejtekre jellemző), ezek a cisz- és a transz-Golgi hálózat (cis Golgi network – CGN; trans Golgi network – TGN).



Golgi készülék diktioszómája hidrából (TEM). A cisz oldalhoz közeli SER ciszternát piros nyíl jelöli.

A diktioszómák körül számos 50–80 nm átmérőjű, ún. **Golgi-vezikula** is megfigyelhető. Szerepük a ciszterna közötti anyagtranszportban és a membránok közötti egyensúly fenntartásában jelentős.

A diktioszómák állati sejtekben gyakran a sejtmag közelében, gyakran övszerűen csoportosulnak. A növényi sejtekben elsősorban helyezkednek el, cisz felszínükkel jellemzően DER ciszterna felé fordulnak.

A Golgi-készülék működése

Izotóppal jelölt aminosavak felhasználásával végzett kísérletek alapján bizonyítható (lásd: Palade kísérletei), hogy a Golgi-apparátus funkciója az ER-ben szintetizálódott váladék- és membránfehérjék, illetve -lipidek fogadása, poszttranszlatívus módosítása (feldolgozása), válogatása (szortírozása) és továbbítása rendeltetési helyükre.

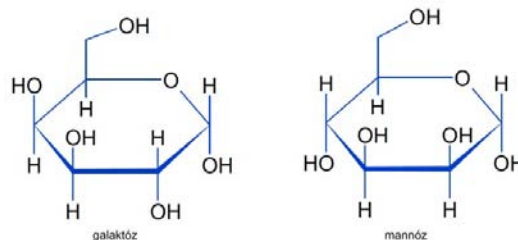
A feldolgozandó anyag felvétele a cisz oldalon történik (CGN), innen a cisz, majd a mediális ciszternákba vándorol a DER-ből szállított anyag, miközben jellemző módosulásokon megy keresztül, majd a tranz oldalon hagyja el a készüléket, rendeltetése szerint szegregálva és szortírozva.

Az endoplazmatikus retikulum és a Golgi-apparátus között nincs közvetlen és folytonos összeköttetés. A DER-ből a Golgi-készülékbe vezikuláris transzporttal történik a szállítás, melynek eredményeképpen csökken a DER és növekszik a Golgi-készülék tömege, membránfelszíne, térfogata. Bár a DER-ben szintetizálódott fehérjék bizonyos mértékig feldúsulva kerülnek a transzportvezikulákba, mégis a DER-ben található anyag gyakorlatilag válogatás nélkül kerül a Golgi-készülék cisz oldalára.

A két kompartmentum egyensúlyban tartását, továbbá az átáramló anyag szétválasztását és irányítását több egymáshoz kapcsolt, térben és időben összehangolt mechanizmus végzi.

A vezikuláris transzport nemcsak a DER – Golgi irányba, de visszafelé is működik. A CGN membránjában lévő receptorok felismerik, kötik azon fehérjéket, amelyeken ER retenciós szignál található. Ezek az ER saját fehérjéi, melyek a cisz oldalon, válogatást követően speciális transzportvezikulákba csomagolódnak és visszajutnak az ER-be. A Golgi-ciszternákból így eltűnnek a DER fehérjéi és koncentrálnak a szekréciós fehérjék: a kimenő oldali ciszternákban a DER saját (ún. rezidens) fehérjéi nem mutathatók ki. A folyamat csökkenti a Golgi, ill. növeli a DER tömegét, hozzájárulva a két sejtkompartiment közötti egyensúly fenntartásához.

A DER-ben a fehérjék egységes, nem specifikus kotranszlációs módosítása az N-glikoziláció. A Golgi-készülékben ez az egységes szerkezet felbomlik: glikozidázok hatására egyes cukormonomerek (főleg mannóz csoportok) lehasítódnak. A mediális ciszternában további mannóz molekulák lehasítása mellett a glikozil transzferázok új monoszacharidokat (pl. fukózt, galaktózt, szialsavat) kapcsolnak a láncokhoz. A folyamat a TGN lumenében fejeződik be, eredménye az N-glikozilációs mintázat átalakulása, egyedivé válása.



Galaktóz és mannóz.

Az előbbiekhöz hasonló folyamatban a Golgi mediális és tranz ciszternáiban a fehérje szerin vagy treonin aminosavainak hidroxil csoportjaihoz is kapcsolódhatnak összetett cukor oldalláncok (ez az ún. **O-glikoziláció**). A végeredmény az adott fehérjére (glikoproteinre) jellemző összetételű oligoszacharid oldalláncok kialakulása, melyek a továbbiakban válogatás alapjául szolgálhatnak.

A lizoszomális enzimek azonosítása már a CGN-ban megtörténik, a felismerés alapja a fehérjék felületén kialakuló speciális aminosav mintázat. Az itt elhelyezkedő oligoszacharid oldalláncok egyes mannóz molekulái a 6. szénatomon foszforilálódnak. A mannóz-6-foszfát (M6P) jel két célt szolgál: egyrészt a megakadályozza a lizoszomális fehérjék további átalakítását, másrészt elősegíti a megfelelő válogatást. A tranz-Golgi hálózat membránjában lokalizálódó receptorfehérjék ismerik fel a M6P jelet és kötik meg a megkötött lizoszomális enzimeket, melyek vezikuláris transzporttal végső rendeltetési helyükre, a lizoszómákba szállítódnak. A receptorok visszajutnak a tranz Golgi-hálózatba (reciklizáció).

A Golgi-készülék fontos funkciója a plazmamembrán (pl. glikokálix) és az extracelluláris mátrix fehérjéinek kialakítása. A proteoglikán molekulák esetében igen nagymértékű a glikoziláció: a fehérjerész szerin oldalláncaira

A **vezikuláris transzport modell**ben a ciszternák állandó képződmények, és a Golgi vezikulák biztosítják az egyes ciszternák közötti anterográd (a cisz ciszterna felől a tranz ciszterna felé haladó, a feldolgozandó fehérjéket és lipideket szállító) anyagtranszportot.

A **ciszternaérési modell**ben az anyagáramlás a ciszternák haladásával magyarázható. A cisz oldalon a CGN elemekből újabb és újabb cisz ciszternák állnak össze, miközben a korábban létrejött ciszternák mediális majd tranz pozícióba kerülnek, ahol vezikulákra, vakuolákra esnek szét. Ebben a modellben a Golgi vezikulák a cisz-, a mediális- és tranz-ciszternákra jellemző enzimek retrográd transzportját bonyolítva biztosítják az egyes ciszternák működését.

A vezikuláris transzport

Az eukarióta sejtek membránnal határolt organelumai, az ER és a Golgi, a Golgi és a plazmamembrán, a plazmamembrán, az endoszomális kompartmentum és a Golgi, a Golgi és a lizoszomális kompartmentum közötti kapcsolat megteremtésében, a membránáramlás fenntartásában, az anyagok szállításában a vezikulák képződésével, lefűződésével, szállításával és fúziójával járó szelektív, szabályozott **vezikuláris transzport** játsza a fő szerepet. A vezikuláris transzport membrán- és szolubilis komponensek szállítását és célba juttatását végzi. Jellemzően célzott vezikuláris transzportfolyamat a neurotranszmitterek szinapszisokba történő szállítása, inger hatására történő kiürülése.

A vezikuláris transzport két fő mozzanata a vezikula képződése és lefűződése, illetve a vezikula célmembránhoz történő kikötődése, és fúziója. Bár az egyes rendszerek molekuláris komponensei eltérőek, közös bennük, hogy a vezikulaképződéshez szabályozó molekulákra, szignálokra és speciális burokképző fehérjékre van szükség. A lefűződésben gyakran mechanoenzimek működnek közre. A megfelelő membránhoz való kötődéshez marker/felismerő molekulák (a vezikula falában, illetve a fogadómembránban levő jel/jelfogó fehérjék), a membránok egybeolvadásához fúziós fehérjék szükségesek. A vezikulaképződésben mindig részt vesz valamilyen burok- és kis G fehérje, a szállítás célzottságát biztosítják.

Az ER Golgi-készülék, valamint a Golgi ciszternák egymás közötti vezikuláris transzportjában kis **G proteinek** mint szabályozó fehérjék, valamint a **COP burokfehérjék** (coatomer protein) vesznek részt.

A G proteinek guanin nukleotidokat, GDP-t vagy GTP-t (guanozin-di-, vagy -trifoszfát), tudnak kötni, GTP-áz aktivitással rendelkeznek. Általában GTP-kötött állapotban aktívak, GDP kötött állapotban inaktívak, molekuláris kapcsolóként működnek. Aktív állapotba kerülésüket a GDP-t GTP-re kicserélő GEF enzimek (guanosine exchange factor) segítik elő. Saját GTP-áz aktivitásuk csekély, gyors inaktiválódásukhoz GAP fehérjék (GTP-ase activating protein) szükségesek.

Két csoportjuk a monomerikus kis G fehérjék, illetve az alfa, béta, és gamma alegységekből álló heterotrimer G fehérjék. Utóbbiak esetében az alfa alegységnek van GDP–GTP kötő tulajdonsága és GTP-áz aktivitása. Az alfa G fehérje inaktív, GDP kötött állapotában a béta és gamma G fehérjékkel heterotrimert alkot, aktív, GTP kötött állapotában disszociál.

Az ER és Golgi közötti ún anterográd transzportban a **COPII** burokfehérje a **Sar1** kis G fehérje, a Golgi és ER közötti retrográd, továbbá a Golgi ciszternák közötti, mindkét irányú transzportban a **COPI** burokfehérje és az **ARP** kis G fehérje közreműködik.

Az **ARP** a donor (a transzport vezikulát képző) membránban lévő GEF enzim hatására GDP helyett GTP-t köt és kapcsolódik a membránhoz. A membránba épülő ARP-GTP molekulák köré szerveződnek (ATP felhasználásával) a **COPI** burokfehérjék, ezzel elindítva a membránkitüremkedést, végül a vezikula lefűződését. A burokfehérjék megakadályozzák a vezikula spontán visszakötődését is. A transzport vezikula burokfehérjeivel együtt szállítódik a cél organelumhoz. A célmembránban elhelyezkedő GAF hatására az ARP molekulák elhidrolizálják a GTP-t. Az ARF molekuláris kapcsolóként működik: GTP-kötött állapotban fenntartja a burokfehérje–membrán asszociációt. A GTP-t GDP-vé hidrolizálva inaktívvá válik: a burokfehérjék leválnak a vezikula faláról, mely így fúzióképessé válik és össze tud olvadni a célmembránnal.

A vezikulák membránja azonosítófehérjét is tartalmaz, mely a célmembránokon lévő jelfogó fehérjéhez nagy affinitással kötődik, ha a vezikula „védőburkát” képező burokfehérjék leválnak. Az azonosítófehérje szintén kis G fehérje, a **Rab** család tagja. A különböző transzportvezikulákra különböző Rab fehérjék jelenléte jellemző. A

jelfogó molekula a célmembrán nagy specifitású Rab receptorfehérjéje. Ez a jel–jelfogó rendszer biztosítja azt, hogy a vezikulák a donor kompartmentumról leválva csak a specifikus fogadó (akceptor) kompartmentum membránjával tudjanak fuzionálni. Ez a mechanizmus határozza meg a transzport irányát. A jel–jelfogó kapcsolat kialakulása hatására a Rab elhidrolizálja GTP-jét, a Rab fehérje a citoszolba kerül, a felszabaduló energia pedig biztosítja a vezikula célmembránhoz való kötődésének, dokkolásának energiaszükségletét. A dokkolásban és a vezikula célmembránnal történő fúziójában a **SNARE** fehérjék szerepe döntő. A vezikula membránjában a v-SNARE, a célmembránban a t-SNARE (t = target) egymást felismerve, a membránok citoszol felőli oldalán kiemelkedő helikális doménjük összekapcsolódásával ún. **transz-SNARE komplexet** hoznak létre. Ez a komplex más fúziós fehérjékkel együttműködve, a vízmolekulákat is kiszorítva, egymáshoz olyan közel húzzák a vezikula és a célmembrán felületét, hogy megindulhat a membránfúzió.

A már fuzionált membránrészeken a transz-SNARE komplex szétválasztását az **NSF** (N-etilmaleimid sensitive factor) végzi. Az NSF citoszol fehérje, amely ATP megkötésével kapcsolódik a **SNAP** (soluble NSF attachment protein) fehérjékhez és a célmembránba beépülve, az ATP-t elhidrolizálva széttekeri az összekapcsolódott SNARE molekulákat (SNARE = **SNAP** receptor). Ezt követően az NSF és SNAP komplex is szétesik.

A vezikuláris transzport további jellegzetes formáit az „Endoszomális lizoszomális kompartmentum” c. fejezetben tárgyaljuk.

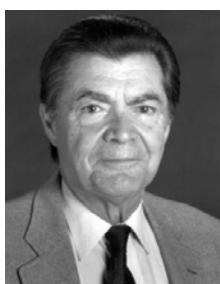
Kérdések:

1. Sorolja fel a Golgi-készülék elemeit!
2. Magyarázza meg a Golgi-készülék polaritását!
3. Mi biztosítja a Golgi ciszternák között a kapcsolatot?
4. Milyen funkciók köthetők a Golgi-készülék ciszternáihoz?
5. Milyen mechanizmus biztosítja a kapcsolatot a DER és a Golgi-készülék között?
6. Milyen szerepet játszik a Golgi-készülék a szekrécióban?

9. fejezet - A szekréciós apparátus

A szekréció (nem tévesztendő össze az exkrécióval, ami a sejtek és a szervezet szempontjából káros vagy felesleges anyagok eltávolítását jelenti) valamilyen, a szervezet számára hasznos anyagot tartalmazó váladékkijuttatása a sejten kívüli vagy sejtek közötti térbe. A különböző sejttípusok által termelt váladék kémiai összetételét (fehérjék, összetett lipidek, szteránvázas vegyületek, elektrolitok stb.) és funkcióját (hormonok, enzimek, szignálok) tekintve igen eltérő lehet, és a váladék sejtől való kijuttatásának mechanizmusa is változatos. E fejezetben a fehérjék szekréciós útvonalát mutatjuk be.

A szekréció a szekrétrum szintéziséből, a nyerstermék feldolgozásából és válogatásából és irányításából, végül a sejtől a sejtközi térbe, esetleg a sejt felszínére irányuló transzportfolyamatból áll. A szekréciós apparátus azokból a sejtorganellumokból áll össze, amelyek a fenti folyamatokban részt vesznek. Tágan értelmezve a szekréciós apparátus elemei a DER és SER, a Golgi, a vezikuláris transzportrendszer elemei, a szekréciós granulumok és a plazmamembrán.



George E. Palade (1912–2008) román születésű, amerikai sejtbiológus; 1974-ben megosztott Nobel-díjban részesült a sejt struktúrájának, kémiai összetételének és működésének feltárásában elért eredményeiért.

A szekréciós apparátus működésének, a szekréciós fehérjék sejtben belüli transzportjának vizsgálatára Palade a sejtfrakcionálás módszere mellett nagy felbontású autoradiográfiás kísérleti módszert vezetett be. Kísérleteiben rövid időre (3 percre) ³H-izotóppal (tríciummal) jelölt aminosavat (leucin) tartalmazó, majd ezt követően nem jelölt táptalajra helyezték a tengeri malac hasnyálmirigy szervszelvényeket. A három perc alatt a sejtek által felvett jelölt aminosavak beépültek a sejtekben szintetizált fehérjékbe, így autoradiográfiás módszerrel elektronmikroszkópos felvételeken is kimutathatók, és lokalizációjuk azonosítható. A rövid idejű jelölés lehetővé teszi a fehérjék transzportjának részletes nyomkövetését (ún. pulse-chase módszer). A három perces impulzusszerű jelölés alatt az izotóp a DER ciszternákban koncentrálódik. A kísérlet kezdetét követő 10. percben a jel nagy mennyiségben megjelenik a Golgi vezikulákban, 40 perc múlva a TGN kondenzáló vakuólumaiban mutatkozik, majd ezt követően az érő szekréciós granulumokban is megjelenik. A jelölést követően kb 120 perc múlva detektálható a jel a sejten kívüli térben. Ez a kísérletsorozat egyértelműen bizonyította, hogy a szekréciós fehérjék irányításában a Golgi-készülék központi szerepet tölt be.

A szekréciós fehérjék többsége az endoplazmatikus retikulumon, kötött riboszómákon szintetizálódik. A DER ciszternák lumenébe jutva glikozilálódnak és chaperonok közreműködésével hajtogatódnak, majd szegregálódva, transzport vezikulák közvetítésével a Golgi-készülékbe kerülnek. A Golgi ciszternákban újabb glikozilációs lépések eredményeként oligoszacharid mintázatuk átalakul, szükség szerint a peptidlánc átalakítására is sor kerülhet (láncrövidítés, nem-fehérje komponensek). A fehérje membránba csomagolva lefűződik a transz-Golgi hálózatról, és a sejt váz komponenseinek közreműködésével a plazmamembránhoz vándorol, ahol a szekrétrum kiürítésére kerül sor. Két fő szekréciós útvonalat különböztetünk meg: konstitutív szekréció és regulált szekréció.

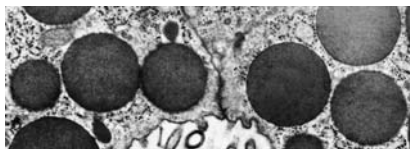
A **konstitutív szekréció** minden eukarióta sejtben megfigyelhető, transzportja a plazmamembránba és annak felszínére irányul. A TGN-ről kisméretű vezikulák fűződnek le, ezek beltartalma az extracelluláris mátrix fehérjei és proteoglikánjai, membránjába pedig a plazmamembrán lipid és fehérje komponensei is beépülnek. A TGN-ről lefűződő vezikula a sejt váz mentén éri el a plazmamembránt, majd azzal fuzionálva tartalmát a sejt felszínére juttatja, membránja a plazmamembránba simul.

A konstitutív szekréció, bár nem igényel szignált, szabályozott folyamat. Egyrészt a szállítás volumene, sebessége befolyásolható, másrészt a polarizált felépítésű sejtekben a szekréciós vezikulák összetétele változó és a szekréció

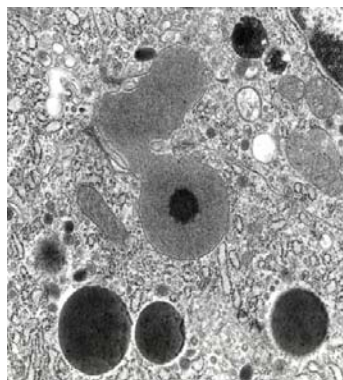
irányított (különböző membrándoménok!). A konstitutív szekréció hozzájárul a plazmamembrán mennyiségének és polarizáltságának fenntartásához, illetve szabályozásához.

A **regulált szekréció** elsősorban a szekréciós tevékenységre specializálódott sejtípusokban jellemző. A szekretálandó termék szintén a TGN-ban válogatódik és csomagolódik. A szekréciós fehérjék válogatását több részfolyamat segíti elő. A szekréciós fehérjék aggregálódásukat elősegítő szekvenciát tartalmazhatnak, amely a TGN tubulusaiban jellemző magasabb Ca^{++} -szint és savas pH hatására szelektív aggregációt eredményez. A folyamatot gyorsíthatják fehérje-fehérje és fehérje-lipid típusú kölcsönhatások is. Előbbire chaperon molekulák közreműködése, utóbbira egyes szekréciós fehérjék lipidutajokhoz (a TGN lumene felőli oldalon) történő kihorgonyzódása példa. A lipidutajokon szerveződő aggregátumok fontos szerepet játszanak a szekréciós vezikulákba történő szelektív becsomagolásában. A lefűződő éretlen szekréciós vezikula hosszabb-rövidebb ideig tárolódik a citoplazmában, ahol egymással fuzionálhatnak, anyagot vehetnek fel a citoszolból és enzimatikusan módosulhat beltartalmuk. Egyes sejtekben (pl. hasnyálmirigy külső elválasztású sejtjeiben) a szekréciós vezikulák vizet veszítenek, tartalmuk koncentráldódik, fuzionálva alakítják ki a szekréciós granulumokat. Más, pl. nyálkában gazdag szekréciót termelő sejtekben (pl. bélhám helysejtjeiben) a szekréciós vezikulák vizet vesznek fel, megduzzadnak. Végül lépésként a plazmamembránhoz történő speciális és specifikus ideiglenes csatlakozás (dokkolás) vezet a beltartalom jelentős részének kiürítéséhez. Ezt követően a vezikula leválk a plazmamembránról és visszatér a TGN-ba. A szekréciós vezikula ideiglenes kapcsolódását és tartalmának kiürítését a poroszóma, egy plazmamembránhoz kapcsolt molekulakomplex irányítja.

A szabályozott szekréció speciális esete figyelhető meg egyes sejtípusoknál (pl. csontfaló sejtek, spermiumok), melyekben fiziológiás körülmények között, funkciójuknak megfelelően lizoszomális fehérjék exportjára kerül sor. Bizonyos körülmények között tumorsejtek is képesek lizoszomális enzimek szekréciójára, mellyel a szöveti kötélkéből való kilépés és a migráció lehetőségét teremtik meg.



Váladékszemcsék a plazmamembrán alatt.



Váladék granulum ürülése. A kép közepén látható váladék szemcsé anyaga fellazulva ürül ki a sejtől

Alternatív szekréciós útvonalon szekretálódnak egyes szabad riboszómák szintetizálódó fehérjék (pl. interleukinok), amelyek ABC transzporterek közvetítésével jutnak ki a sejtől. Ennek az útvonalnak szerepe lehet pl. a citotoxikus fehérjék eltávolításában és a citoszol fehérjetartalmának szabályozásában is.

Kérdések:

1. Milyen kompartmentumok vesznek részt a szekréciós apparátus kialakításában?
2. A sejt melyik kompartmentumában alakul ki a szekréciós granulum?
3. Milyen kapcsolat van a szekréció és a membránáramlás között?

4. Milyen folyamat során ürülnek a váladékszemcsék?
5. Hogyan válogatódnak a TGN-ban a szekréciós fehérjék?

10. fejezet - Az endoszomális–lizoszomális kompartmentum

A szekréciós folyamatokban az anyagáramlás a képződés helyéről (DER vagy SER) a Golgi-készüléken keresztül a plazmamembrán, a külvilág felé irányul. Végso lépése az anyag kijuttatása a sejtől membránba csomagolva exocitózissal vagy alternatív útvonalakon. Az ezzel ellentétes irányú vezikuláris transzportfolyamat a sejt környezetében található makromolekulák, oldott anyagok, szilárd részecskék bekebelezéssel történő felvétele, az endocitózis

Az endoszomális–lizoszomális kompartmentum változatos összetételű, heterogén vezikuláris és tubuláris elemeket is tartalmazó kiterjedt rendszer. Feladata a sejtbe vezikuláris transzporttal bekerülő anyagok fogadása, válogatása és továbbítása a lizoszomális apparátusba.

Az endocitózis

A folyamat során először egy bemélyedés jelenik meg a plazmamembránon, amely aztán lefűződik. Így a külvilág egy-egy darabja a sejtbe jut, de a citoszóllal mégsem keveredik el, mert a vezikula membránja, amely tulajdonképpen a plazmamembrán egy lefűződött darabja, izolálva tartja. A lefűződött vezikula 1–2 percen belül összeolvad egy ún. korai endoszómával. Az endoszóma-kompartimentum a vakuoláris apparátus része, kisebb-nagyobb vakuolák, tubulusok halmazából áll, melyek az endocitózissal felvett anyagok fogadását, válogatását és továbbítását végzik. Az endocitózissal felvett anyagok legnagyobb része az endoszómákból a lizoszómákba kerül, ahol lebomlik. A degradáció termékei (pl. a fehérjékből lebontással származó aminosavak) ezután kiáramlanak a lizoszómákból és szintetikus folyamatokban hasznosulnak.

Az endocitózis két változata fordul elő: a **fagocitózis** (sejtfalás), mely nagyméretű ($>0,2\ \mu\text{m}$) részecskék bekebelezését jelenti és a **pinocitózis** (sejtvívás), mely a környező testfolyadék és az abban oldott anyagok felvétele. Egysejtűekben a fagocitózis a táplálékfelvétel leggyakoribb módja. Többsejtű szervezetekben inkább védekező, a sejtszám állandóságát biztosító szerepe van: fagocitózissal történik a szervezetbe került baktériumok eltávolítása, az előregedett sejtek (pl. eritrociták) kiszűrése, a sejttörmelék lebontása. Ezeket a feladatokat fagocitózissal specializált sejtek végzik. A fagocitózist a bekebelezendő sejtek felületén megjelenő molekulák (pl. antitestek a baktériumok felszínén, módosult oligoszacharidcsoportokat hordozó glikoproteinek öregedő sejteken) váltják ki, amelyeket a fagocita sejtek plazmamembránjában lévő receptorfehérjék képesek megkötni, és ez indítja meg a bekebelezést. A bekebelezett anyag nagyméretű speciális endoszómába, a fagoszómába kerül, amely lizoszómákkal olvad össze, és tartalmát a lizoszomális enzimek megemésztik.

Pinocitózissal gyakorlatilag minden sejt képes, és folyamatosan vesz fel környezetéből anyagokat ezen az úton. Leggyakrabban előforduló változata az ún. **receptormediált endocitózis**. A receptor és **ligandum** (a receptorhoz specifikusan és reverzibilisen kötődő molekula) közötti kapcsolat létrejötte indítja be a felvételt. Ennek során a receptor–ligandum komplexek aggregálódnak, vagyis kisebb-nagyobb foltokban tömörülnek a sejtfelszínen, majd belülről, a receptorok citoplazmába nyúló részéhez burokfehérjék kezdenek asszociálódni. A burok kétféle fehérjéből áll: az adaptin és más fehérjéket tartalmazó adaptorkomplexből, amelyek közvetlenül a receptorokhoz kapcsolódnak és a **klatrin** nevű fehérjéből, mely az adaptorkomplekshoz képes kötődni. A klatrin/adaptor burok – hasonlóan a COP típusú burokhoz – elősegíti a plazmamembrán betüremkedését, majd lefűződését, stabilizálja a vezikula falában a receptor–ligandum komplexeket és megakadályozza a lefűződött vezikula véletlenszerű visszaolvadását a plazmamembránba. A formálódó vezikula plazmamembránról történő lefűződését mechanoenzimek: dinamin és más fehérjéből álló gyűrű alakú komplex segíti elő. A receptormediált endocitózis anyagfelvételt eredményez. A megkötött anyag koncentrációja a betüremkedő membrán felszínén többszöröse az oldatban lévőnek.

A lefűződött vezikula a korai endoszómához sodródik, a klatrin/adaptor burka leválik, összeolvad az endoszómával. A korai endoszóma degradálózimeket nem tartalmaz, funkciója a receptorok és ligandumaik szétválasztása. Az endoszóma membrán egy speciális protontranszlokáló ATP-áz (vakuoláris ATP-áz, protonpumpa, *l. 31. old.*) tartalmaz, amelynek működése savas pH-t ($\sim\text{pH}6$) tart fenn az endoszóma belsejében. Ilyen pH-értéken a

receptor–ligandum komplex disszociálódik, a szabaddá vált receptorok vezikulákba ágyazva lefűződnek az endoszóma faláról és visszavándorolnak a plazmamembránba, ahol ismételt felvételt tudnak elindítani. A korai endoszómában maradt ligandum sorsa többféle lehet. Legtöbbjük vezikuláris transzporttal a késői endoszómákba, majd innen a lizoszómákba jut, ahol degradálódik. Vannak olyan ligandumok is, amelyek elkerülik ezt az utat és vezikuláris transzporttal a sejt másik oldalához vándorolnak, majd kiürülnek. Ezt a folyamatot **transzcitózisnak** nevezik.

Az endocitózissal beáramló anyag mennyisége meglepően nagy. Makrofágok saját térfogatuk 25%-ának megfelelő oldatot képesek óránként felvenni. A vezikulaképzéshez saját plazmamembrán-felületük mintegy 50–200%-át használják fel óránként. Az endocitózis során a sejtek térfogata, felülete nem változik lényegesen, a felvett oldat nagy része (elsősorban a víz) valahogyan visszajut a környezetbe, a plazmamembrán bekebelezésre felhasznált darabjai, így a receptorok is, reciklizálódnak.

Az endocitózis funkcionális jelentősége abban rejlik, hogy segítségével a sejt folyamatosan átszűri környezetét, eközben felvesz és lebont számos makromolekulát, melyek degradációs termékeit új szintézisekben felhasználja, és így az endocitózis a szintetikus-szekrécións folyamatokkal egybekapcsolva lehetővé teszi a környezet makromolekuláinak folyamatos kicserélődését, úgy, hogy azok összetétele, koncentrációja a szervezet számára optimális szinten maradjon.

Endocitózissal vesz fel a sejt néhány számára létfontosságú anyagot, így pl. a membránok szintéziséhez szükséges koleszterint.

Rendkívül intenzív receptormediált endocitózissal történik a szikanyagok felvétele számos faj oocitáiban.

Az endocitózis fontos funkciója a plazmamembrán mennyiségének és összetételének folyamatos szabályozása. Az endocitózis csökkenti, míg a reciklizálás és az exocitózis növeli a plazmamembrán felületét. Együttes hatásuk tartja egyensúlyban a sejtfelszínt. Az endocitózissal felvett plazmamembrándarabok egyes integráns membránfehérjei nem reciklizálódnak, hanem a lizoszómákba kerülve degradálódnak. Így viselkednek pl. a növekedési faktorok vagy az inzulin receptorai. Pótlásuk szintézissel történik, és a két folyamat együttes hatása a membránkomponensek folyamatos kicserélődését, megújulását eredményezi.

Az endocitotikus vezikulák mellett a plazmahártyán gyakran megfigyelhetők apró, mintegy 50–100 nm átmérőjű, palack formájú betüremkedések, **kaveolák** (caveola). Ezeket a **kaveolin** fehérje burkolja. A kaveolák lefűződésében szintén közreműködik a dinamin mecanoenzim. A kaveolák membránjában sok koleszterin, szfingomielin továbbá néhány a jelátviteli folyamatokban szerepet játszó fehérje (pl. kinázok, G-protein, kalciumcsatorna, kalciumpumpa) található. A kaveolák fontos szerepet töltenek be több fontos sejtteni folyamatban. Részt vesznek a transzcitózisban, egyes jelátviteli folyamatokban, és sajátos membránszerkezetüknek köszönhetően egyes anyagok speciális felvételében. Kaveolák útján kerülhetnek a sejtbe egyes baktériumok, vírusok is.

A lizoszomális kompartmentum

A **lizoszómák** a sejt emésztőfunkció ellátására specializálódott organelumai. Alakjuk változatos, általában néhány tized mikrométer átmérőjű vakuolák, tubulusok formájában figyelhetők meg. Terüket a lebontás különböző stádiumaiban lévő auto- vagy heterofág eredetű anyag tölti ki, emiatt az egyes lizoszómák morfológiailag jelentősen különbözhetnek egymástól. Közös tulajdonságuk, hogy belsejükben sokféle lizoszomális bontó enzim (savas hidrolázok) – proteinázok, nukleázok, lipázok, glikozidázok, foszfatázok – található, melyek képesek a lizoszómák terébe bekerült szerves anyagokat építőköveikre lebontani. A lizoszomális enzimek pH-optimuma 5 körül van. Az alacsony pH-t a lizoszomamembránban található protontranszlokáló ATP-áz-molekulák tartják fenn. A lizoszómákat kb. 10–12 nm vastag membrán határolja, mely csak a kis molekulatömegű (kb. 200 Da-ig) anyagok számára átjárható. Ezért a degradáció végtermékei a citoplazmába könnyen átjutnak, de maguk a lizoszomális enzimek és szubsztrátjaik, a különböző makromolekulák nem. A degradáció tehát zárt térben, elkülönítve történik, ami megvédi a környező citoplazmát a lizoszomális enzimek károsító hatásától. A bontási folyamat nem mindig vezet a lizoszómát elhagyni képes kismolekulájú végtermékek kialakulásáig, ilyenkor emésztetlen anyagokkal telített maradványtestek halmozódnak fel a sejtekben.

A lizoszomális enzimek és membránjaik fehérjei idővel maguk is lebomlanak. Pótlásuk folyamatos szintézissel történik. A lizoszomális fehérjék, a váladékfehérjékhez hasonlóan, mind glikoproteinek és a RER-ben szintetizálódnak inaktív formában. Oligoszacharid oldalláncaik sok foszforilált mannózt tartalmaznak, mely

válogatási jelként szolgál. A válogatás a transz Golgi-hálózatban történik, itt különülnek el a lizoszóma enzimeit a többi fehérjétől, és innen klatrinburkos vezikulák szállítják őket a késői endoszómákba, ill. a lizoszómákba. Aktiválódásukat valószínűleg az itteni alacsony pH váltja ki.

A lizoszómák zártsága miatt terükbe a legtöbb makromolekula csak membránba csomagolt formában, vagyis vezikuláris transzporttal képes bekerülni, úgy, hogy a szállító vezikula membránja összeolvad a lizoszóma membránjával. Ilyen anyagfelvételi út az előzőleg már tárgyalt endocitózis, amely a külső környezet anyagait juttatja a lizoszómákba. A külvilágból származó makromolekulák lebontását **heterofágiának** nevezik. Az **autofágia**, a citoplazma saját anyagainak lizoszomális felvételét és lebontását jelenti. Leggyakoribb változata az úgynevezett **makroautofágia**, melynek során először a citoplazma egy-egy darabját speciális izolálómembrán különíti el a környezettől, majd az így kialakuló **autofagoszóma** már képes összeolvadni egy lizoszómával és tartalma megemésztődik. Az izolálómembrán eredetét, kialakulásának mechanizmusát még nem ismerjük pontosan. Az autofágia másik változata a **mikroautofágia**. Ilyenkor nem szükséges izoláló membrán közreműködése: magán a lizoszómán keletkezik bemélyedés, melybe bekerül környezetének egy darabja, majd a lizoszóma záródik és megindul a degradáció. Egy további változat a **chaperon-mediált autofágia**, melynek során hordozófehérjéhez kapcsolva transzportálódik valamilyen citoszolós fehérje a lizoszómák terébe.



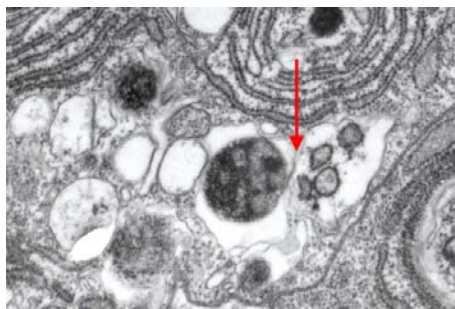
Fiatal autofág vakuóla (nyíl). A beltartalom struktúrái azonosíthatók, és denzitása nem különbözik a környező citoplazmarészekétől.



Az emésztődés jeleit mutató autofág vakuóla (nyíl). A beltartalom struktúrái még azonosíthatók, de sötétebb a környezeténél.



Az emésztés előrehaladtával a beltartalom szétesik, a denzitása nő..



Az **idős autofág vakuólák összeolvadva** (nyíl) komplex képződményeket hoznak létre.

Az autofágia intenzitását elsősorban az intracelluláris aminosavszint szabályozza. Ha ez magas, az autofágia gátlódik, míg aminosavhiányban fokozódik. Egyes hormonoknak is lehet szabályozó hatása, így az inzulin erőteljesen gátolja, míg a glükagon stimulálja az autofág degradációt.

Az autofágia általában kis intenzitású folyamat, de bizonyos körülmények között jelentősen felerősödik. Éhezéskor pl. a májsejtek saját fehérjéik 4–5%-át is képesek óránként autofág úton lebontani, és így átmenetileg fenntartani az életfontosságú, a fehérjeszintézishez, valamint a glükoneogenezishez szükséges szabad aminosavszintet. Intenzív autofágia figyelhető meg szöveti átrendeződéssel/lebontással járó folyamatokban, pl. a lárvális szervek involúciója (visszafejlődése) során.

A lizoszomális rendszer hiányos működése súlyos zavarokat okoz a szervezetben, és ún. tárolási betegségek kialakulásához vezet. Az ok valamilyen lizoszomális enzim hiánya (vagy a gén hibája, vagy a válogatás zavara miatt), aminek következtében szubsztátja nem tud elbomlani és abnormális mennyiségben felhalmozódik a lizoszómák belsejében.

A sejtekben a szintetikus folyamatokkal egyidejűleg **degradáció** is folyik, ezért a sejtet alkotó molekulák, ill. a belőlük felépülő organellek állandó kicserélődésben vannak (ez alól csak a mag és a mitokondriumok DNS-állománya képez kivételt). A legrészletesebben tanulmányozott degradációs folyamat a fehérjék lebontása, a **proteolízis**. Ez legegyszerűbben úgy vizsgálható, hogy a fehérjéket radioaktív aminosavak beépítésével jelöljük. Ezután lebontásuk sebessége radioaktivitásuk csökkenéséből kiszámítható. A folyamat jól jellemezhető a felezési idővel, azzal az időszakkal, mely alatt egy adott mennyiségű fehérje fele elbomlik.

Egyes fehérjék felezési ideje nagyon rövid, mindössze néhány perc. Néhány transzkripciós faktor, a mitózist szabályozó ciklinek, anyagcsere-folyamatokat szabályozó kulcsenzimek tartoznak ebbe a csoportba. Gyors degradációjuk az általuk befolyásolt reakciók érzékeny szabályozását teszi lehetővé. Ugyancsak gyorsan degradálódnak az abnormális – pl. translációs hiba miatt rossz helyre beépült aminosavakat tartalmazó – fehérjék is. A fehérjék döntő többségének felezési ideje néhány órától néhány napig terjedhet.

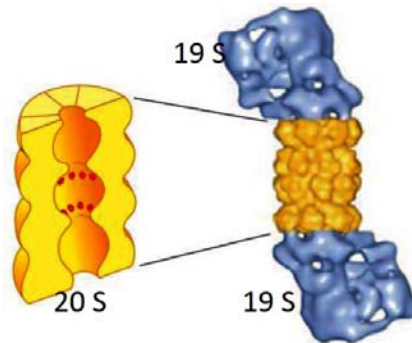
A fehérjedegradáció jelentősége abban rejlik, hogy a szintézissel egybehangolva gyors, finom választ, a körülményekhez történő hatékony alkalmazkodást tesz lehetővé. Segítségével tud megszabadulni a sejt hibás, denaturálódott, működésképtelen fehérjéitől. A proteolízis segít fenntartani a szervezet működéséhez szükséges állandó szabad aminosavszintet.

A fehérjelebontás intenzitása széles határok között ingadozhat. Normális tápanyag-ellátottságnál, egyensúlyi állapotban a sejtek összfehérje-tartalmuk 0,1–1%-át degradálják óránként. Ez az ún. bazális fehérjekicserélődés. Éhezés, a sejtet ért sérülés hatására ez többszörösré növekedhet. Regenerálódó szervezetben vagy újszülött állatokban a gyors növekedést viszont nem annyira a fokozott fehérjeszintézis, mint inkább a visszaszorult degradáció okozza.

Extralizoszomális proteindegradáció

Proteolitikus enzimek a sejt minden organellemben előfordulnak. Hatásuk azonban lokális, és elsősorban a fehérjék módosítását okozzák (pl. a szignálpeptidáz a szignálpeptidet hasítja csak le). A fehérjék tömeges, aminosavakig történő bontása két proteolitikus rendszerben történik. Az egyik a már tárgyalt lizoszomális rendszer, melybe autofágiával kerülnek be a sejt saját fehérjéi. Normális körülmények között autofág-lizoszomális úton csak a fehérjék elenyésző hányada bomlik le, de stressz hatására (pl. tápanyagmegvonás) a rendszer aktiválódik, és a

teljes proteolízis mintegy 60–80% már a lizoszomális útra terelődik. A másik nagy proteolitikus rendszert a **proteaszómák** alkotják. A proteaszóma egy központi részből, magból (az ún. 20S proteaszómából) és a hozzá kapcsolódó regulációs egységekből áll. A mag többtucatnyi alegységből felépülő, henger alakú, mintegy 11x15 nm méretű test, melynek falát gyűrűbe rendezett fehérjealegységek alkotják. 4 gyűrű vesz részt a mag kialakításában, mindegyik gyűrű 7 alegységből áll. A henger belső ürege kb. 5 nm átmérőjű, itt történik a peptidlánc feldarabolása. Ez a tér olyan szűk, hogy normális térszerkezetű, feltekeredett fehérjék nem férnek el benne. A lebontandó fehérjék előzetes kitekerését a henger végeihez sapkaszerűen kapcsolódó ún. 19S regulációs egység végzi. A folyamat energiaigényes, ATP felhasználásával jár.



A proteaszóma szerkezete.

A proteaszóma működésének szabályozása a lizoszómáktól teljesen eltérő. Míg a lizoszomális rendszer enzimjeit membrán izolálja a környezettől és oda lebontandó anyag csak egy fúziós lépésen keresztül juthat, a proteaszómák szabadon helyezkednek el a citoszolban és a magban, tehát kontaktusba kerülhetnek bármely ott található fehérjével. Ennek ellenére sem bontanak le minden, a környezetükben előforduló fehérjét. A specifitást kijelölő és válogató mechanizmusok biztosítják. A jel egy kis molekulatömegű, minden sejtben előforduló fehérje, az ubikvitin, melynek láncait (poliubikvitint) egy több tagból álló enzimrendszer köti a degradálandó fehérjére. A válogatás azon alapul, hogy a poliubikvitint hordozó fehérjéket a 19S regulációs egység felismeri, megköti, majd kitekeri és beereszti a mag katalitikus üregébe, ahol megtörténik a degradáció. A folyamat kezdetén az ubikvitin láncok lehasadnak a hordozó molekuláról, és ismételt ciklusban felhasználódnak újabb szubsztrátok kijelölésére. A központi hengerhez másfajta szabályozóegység is kapcsolódhat. Ez a komplex nem ubikvitinált fehérjéket képes lebontani, működése nem ATP-igényes. A válogatás/felismerés mechanizmusa nem ismeretes. Proteaszómás úton bomlik le számos rövid felezési idejű szabályozófehérje (pl. ciklinek, transzkripció faktorok), ez a rendszer tartja fenn a bazális fehérjekicserélődést és távolítja el a sérült, abnormális fehérjéket.

Kérdések:

1. Milyen folyamat során jön létre endoszóma?
2. Váolja fel az endocitózis fő lépéseit!
3. Hogyan képződik a klatrin-burkos vezikula?
4. Mi a különbség a korai és a késői endoszóma között?
5. Mit jelent a receptor reciklizáció?
6. Mi a transzcitózis?
7. Hogyan keletkezik a primer lizoszóma?
8. Definiálja a hetero- és autofágia fogalmát!
9. Váolja fel a proteaszóma felépítését és működését!
10. Mi az ubikvitin szerepe a fehérjebontásban?

11. fejezet - A növényi sejtek vakuoláris rendszere

A kifejlett növényi sejtek jelentős részét foglalhatják el a vakuólumok, vagy akár egyetlen nagy központi vakuólum. Ez utóbbi esetben a citoplazma vékony réteggént veszi körül a vakuólumot. A vakuólumok membránnal körülvett kompartmentumok, melyeket a vezikuláknál nagyobb méretük miatt különítünk el. Vízet, különböző vízben oldott anyagokat, enzimeket, raktározott fehérjéket, csapadékokat, kristályokat vagy akár membránnal körülvett újabb vakuólumokat tartalmazhatnak, de gyakran találunk bennük lebontásra váró sejtorganellumokat is.

A vakuólumok igen sokrétű szerepet játszanak a növényi sejt életében, ennek megfelelően tartalmuk, számuk, méretük és alakjuk is igen változatos. Az osztódással kialakuló kisméretű, merisztematikus sejtek általában több kisméretű vakuólumot tartalmaznak, majd a sejt térfogatának növekedésével a vakuólumok mérete is növekszik, és sok sejtben csak egy nagy vakuólum marad.

A vakuólum *de novo* többféle módon is kialakulhat. Leggyakrabban a Golgi-készülekről leváló vezikulákból jön létre, vagy a sima illetve durva felszínű endoplazmatikus retikulumból fűződnek le. Megfigyelték azt a jelenséget is, amikor a sima felszínű endoplazmatikus retikulum nyúlványai körbevesznek egy citoplazmarészt, majd e nyúlványok összeolvadásával a citoplazmarészlet bezáródik. A belső membrán illetve a citoplazma később megemésztődik és kialakul a vakuólum.

A vakuólum feladatai

Turgor

A vakuólum a benne található sók és egyéb ozmotikusan aktív molekulák, valamint a féligáteresztő hártya tulajdonságaival rendelkező tonoplaszt révén jelentős ozmotikus szívóerővel rendelkezik, ami a citoplazmából víz beáramlását okozza. A citoplazma a vizet a sejtmembránján keresztül az extracelluláris térből pótolja. Ez a folyamat térfogatnövekedéssel jár, és mindaddig folytatódik, amíg a sejtet körülvevő sejtfa a növekedésnek gátat nem szab. A sejtfalra gyakorolt hidrosztatikai nyomás a turgor. A turgor az intra- és extracelluláris ozmotikus nyomás különbsége. A legtöbb növényi sejt turgora 10^5 - 10^6 Pa közötti érték. A vakuólum és a citoplazma illetve az összes kompartmentum egyensúlyi állapotban ugyanakkora ozmotikus nyomással és vízpotenciállal rendelkezik, így nettó vízáramlás nem történik. Amiért a vakuólumot tesszük felelőssé a turgor létrehozásáért az elsősorban nagyobb mérete, és a benne lezajló ozmotikus változások. A vakuólum legfontosabb ozmotikumai a Na^+ , K^+ és Cl^- de ezenkívül még nagyon sok oldott anyag sorolható az ozmotikumok közé. Az ozmotikumok koncentrációjának fenntartásában illetve változtatásában a membrán transzportfolyamatai és a vakuólumban lezajló polimerizációs-depolimerizációs folyamatok játszanak szerepet.

A turgor igen fontos a növény alakjának megszabásában, mivel a lágy növényi részek alapvetően a turgor révén és tartják meg feszes állapotukat. A vízvesztés az ilyen növényi részek lankadását okozza.

Térfogatnövelés

A növényi létforma megkívánja a nagy felületű test kialakítását. A nagy felület lehetőséget ad a hatékony fotoszintézisre és gázcserére. A felület növelése azonban a térfogat növelésével is együtt jár, amit a leggazdaságosabban a vízzel való feltöltés biztosíthat. Ezért is alakulhatott ki a nagyméretű vakuólum.

Homeosztázis

A vakuólum a legfontosabb víz-, ion-, és aminosavraktár. A vízraktározási szerep különösen nyilvánvaló a szukkulens növények esetén. Az ionok raktározásához sorolhatjuk a H^+ felhalmozást is, bár ennek legtöbbször közvetlen funkcionális szerepe van. A vakuoláris protonpumpa a vakuólumba történő H^+ szállításához egy ATP molekulát használ el. Mivel a tonoplaszt a H^+ áteresztését tekintve jobban szigetel mint a plazmamembrán, a proton nagy valószínűséggel a vakuólumban is marad. A vakuólum pH-ja a vakuólum típusától függően jelentős eltérést mutat,

és dinamikusan változik. Fehérje raktározó vakuólumokban kezdetben 7 körüli, majd a fehérje lebontás során csökken. Emésztő vakuólumokban savas. Nem ritka, hogy a vakuólum pH-ja 2,5 alatti. A protonok citoplazmába juttatásával a vakuólum befolyásolja a citoplazma pH-ját, és ezzel az ottani enzimek aktivitását a citoskeleton szerveződését stb.

Védelem a patogének és növényevők ellen

A vakuólumban sok olyan anyag halmozódhat fel, mely a növény védelmét biztosítja az őt megtámadó élőlényekkel szemben. A növények másodlagos anyagcseréjének számos terméke antimikrobiális, antifungális hatású, de éppúgy találunk köztük a rovarokra, vagy akár az emlősökre hatékony toxinokat. A vakuólumokban felhalmozott anyagok ezért fontos népi gyógyászati és gyógyszeripari alapanyagok. A teljesség igénye nélkül álljon itt néhány példa:

- az alkaloidok közismert toxinok, melyek hatásspektruma igen széles. Kis mennyiségben gyógyszerként, vagy élvezeti szerként is hatásosak. Ismertebb alkaloidok a nikotin (dohány), koffein (kávé), teofillin (tea), morfin (mák), atropin (nadrágulya), akonitin (sisakvirág), koniin (bürök). Gyakori, hogy a növényi vakuólumban inaktív alkaloid a növényevők béltraktusában alakul át toxikus formává.
- a fenoloidok igen hatékony toxinok, antimikrobiális szerek, de a növényevőkre is hatással vannak.
- A cianogén glikozidokból rendkívül mérgező hidrogécianid szabadul fel (amigdalín)
- proteáz inhibitorok, melyek gátolják a növényt elfogyasztó élőlény emésztőenzimeinek működését és az a táplálkozás ellenére gyakorlatilag éhenhal
- sejtfalbontó enzimek, mint kitináz, glukánáz
- tejnedvek, melyek azon kívül, hogy inseticid és fungicid hatásúak biztosítják a sebzett felszín záródását is

Toxikus anyagok felhalmozása, elkülönítése

Mivel a növények nem képesek elhagyni a számukra toxikussá vált környezetet, olyan mechanizmusokat fejlesztettek ki, melyek átalakítják és/vagy a vakuólumba transzportálják a számukra toxikus vegyületeket. Ez az elkülönítés a xenobiotikum hatástalanítás egyik fontos lépése. A xenobiotikumok és egyes lebomlási termékek vakuólumba történő transzportját az ún. ABC transzporter család tagjai végzik. A levelekben felhalmozott mérgező anyagok a lombhullás során el is hagyják a növény szervezetét.

Színanyagok felhalmozása

A vakuólumok gyakran nagy mennyiségű színes vegyületet halmoznak fel, ezáltal virágszirmokat, terméseket és egyéb növényi részeket tesznek színessé. Ez nem öncélú, a növények így fontos jelzéseket küldenek a környezetüknek, mint például a beporzó rovaroknak. A színanyagok leginkább antocianinok, melyekre jellemző, hogy indikátor tulajdonságúak, vagyis színük a pH függvényében változik. Savas közegben vörös, semlegesben bordó, majd lúgos környezetben kék, zöld és sárga. A színváltozás szintén fontos információt jelenthet, a virág érése, vagy megporzatlan és megporzott állapota szerint változhat.

Raktározó feladat

A vakuólumok hasznos, később felhasználandó anyagokat, például fehérjéket raktározhatnak az előzőekben felsorolt anyagokon túl. A fehérjeraktározó vakuólumok különösen a magvakban szemtermésekben fordulnak elő. Feladatuk nem az energiatárolás, hanem, hogy aminosav raktárként szolgáljanak a csíranövény számára. Egyes fehérjeraktározó vakuólumok más anyagokat és enzimeket is tartalmazhatnak.

Lítikus feladat

A növényi sejtekben az állati lizoszómához hasonló feladatokat a vakuólum lát el. A lítikus vakuólumban savas hidroláz enzimek végzik a fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok és lipidek lebontását. Feladatuk igen sokrétű, a sejtalkotók turnoverén túl, a szenescencia (öregedés) és programozott sejtpusztulás folyamataiban is részt vesznek.

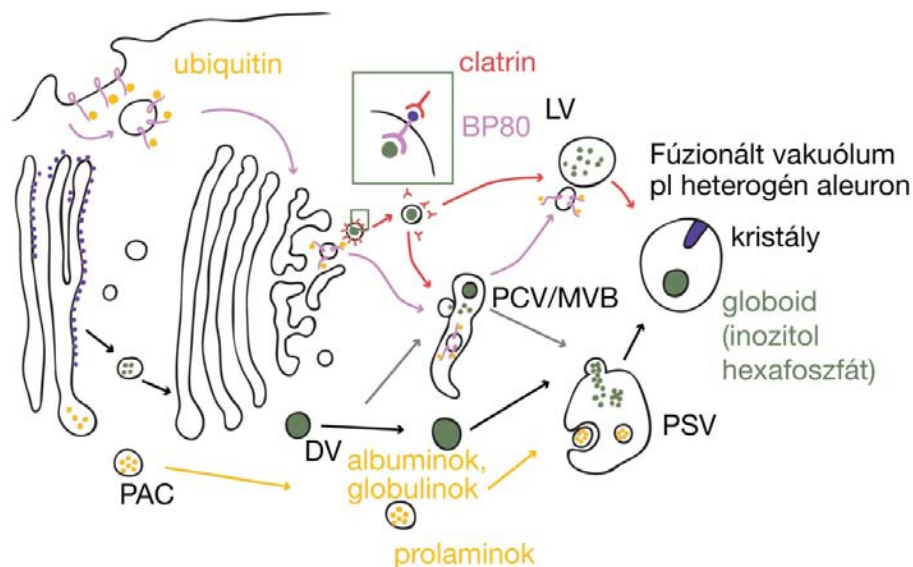
Fontos szerepet játszanak a lombhullás előtti lebontó folyamatokban és így a még felhasználható anyagok lebontása révén azok újrahasznosításában. Az endocitózissal, vagy fertőzéssel sejtbe jutott anyagok lebontásában is részt vesznek.



A növényi vakuólum litékus feladatokat is ellát

A litékus és a fehérjeraktározó vakuólum

A növényi sejtekben gyakran találunk kétféle vakuólumot, legtöbbször litékus és fehérjeraktározó vakuólum, vagy vakuólumok különböztethetők meg. A litékus vakuólumok az állati sejtek lizoszómális feladatait látják el, ennek megfelelően sok hasonlóság mutatható ki közöttük. Ezek a vakuólumok a transz Golgi hálózat (TGN) területéről leváló tüskésburokú, vagy másként klatrinburokos vezikulák (CCV) által szállított emésztő enzimek segítségével végzik a lebontást. Az emésztő enzimek válogatása a Golgi készülékben zömében a fehérjék N terminális végén levő jel alapján történik. Az állati sejtekben a mannóz 6 foszfát a lizoszómális enzimek válogatási jele, a növényekben más szignálok játszik ezt a szerepet. A megvelelő N terminális válogatási jellel rendelkező fehérjék egy membránban található receptormolekulához kapcsolódnak (BP80/AtELP –Arabidopsis thaliana EGF receptor like protein). A receptor egy adaptor fehérjén (AP-1) keresztül klatrint köt meg a külső felületén, és leválik a transz Golgi hálózatról. A vezikula falában található egy olyan fehérje is (v-SNARE), amelyik a célvakuólum falában található komplementer fehérjéhez kapcsolódva biztosítja a vezikulák fúzióját. A citoplazmába kerülő klatrinburokos vezikula falában található protonpumpák működése révén a belső környezet elsavasodik, a klatrinburok leválik, és az eddig inaktív emésztőenzimek aktiválódnak. A vezikulák vagy közvetlenül egy litékus vakuólummal fuzionálnak, vagy a növényi vakuoláris rendszer fő elosztójának tekinthető ún. prevakuoláris kompartmenttel (PVC). Ez az állati sejteknél multivezikulárist testként (MVB) leírt vakuólum, változatos megjelenésű, általában egy tágabb feji vakuólumrésszel, és az ahhoz kapcsolódó vékony csőszerű nyúlvánnyal rendelkezik. A PVC membránjában található dokkoló protein (t-SNARE) kapcsolódik a vezikula SNARE fehérjéje, és végbemegy a fúzió. A BP80/AtELP receptorok lebomlanak, vagy retrográd transzporttal visszajutnak a Golgi készülékbe. A PVC-ből vezikulák tovább szállítják az emésztőenzimeket a litékus vakuólumba. A litékus vezikulák/vakuólumok megkülönböztetése a raktározó vezikuláktól egy másik plazmamembrán fehérjecs család segítségével is történhet. Ezek a funkciójukat tekintve víztranszportot biztosító aquaporinok, a tonoplast intrinsic proteinek (TIP). Ezek egyik típusa a γ TIP jellemző a litékus enzimeket tartalmazó vezikulákra és vakuólumokra. A litékus vakuólumok végzik a sejt lebontó folyamatainak jelentős részét, ide értve az autofágiát, az endocitózissal bejutott anyagok lebontását, az ubiquitinált membránfehérjék lebontását. Éppen ezért bennük gyakran találunk sejtorganelumokat mielinburokszerűen feltekert membránszerkezeteket. A litékus vakuólumok pH-ja savas, ami a savas hidrolázok aktivitásának feltétele.



A növényi vakuoláris rendszer kapcsolatai

A növényi sejtek az állati sejtekhez képest korlátozottabb mértékben képesek endocitózisra. Ennek egyik oka a sejtfa szűrőhatása, vagyis csak azok az anyagok képesek a sejtmembránig eljutni, melyek a sejtfaon átjutnak. A másik tényező a növényi sejtek turgora. Mindezek nem akadályozzák meg az endocitózist, de több energiát igényel a turgornyomás ellenében történő endocitózis, és a sejtfa szűrőhatása miatt a fagocitózis szerepe csökken. Ennek ellenére ezek a folyamatok lejátszódnak a növényekben is, és például a baktériumok fagocitózisa gyakori jelenség éppúgy, mint a receptor mediált endocitózis. Az endocitózisnak szintén jelentős szerepe van a membránfehérjék lebontásában. Az ubiquitinált transzmembrán fehérjék összegyűlnek egy adott membránterületre, majd endocitózissal leválasztódnak a membránról. Az így létrejött vezikula a PVC-be kerül, majd onnan a lítikus vakuólumba, ahol ezek a fehérjék lebomlanak.

Fontos szerepet játszik a növényi vakuoláris rendszer a sejtorganellek, membránok lebontásában is. Az állati autofágiához hasonló folyamatok a növényi vakuólumban játszódnak le. A szenescencia (öregedés) során lebomló anyagok is a vakuólumba kerülnek, majd innen transzportálódnak a lebontott, de még felhasználható anyagok a növény túlélő szövetei felé.

A fehérjeraktározó vakuólumok keletkezése alapvetően kétféle módon történik. Ebben fontos szerepe van magának a raktározott fehérjének. Az Osborne féle fehérjecsoportosítás szerinti könnyen oldható albuminok és globulinok alkotják az egyik típust, míg a nehezen oldható prolaminek és a diszulfidhíd kötésű gluteinek (esetenként albuminok és globulinok is) a másik típust. A két típus természetesen azonos kezdeti lépésekkel rendelkezik, vagyis a fehérjék szintézise mindkét esetben a durva felszíni endoplazmatikus retikulumban megy végbe. Az első típus szerinti útvonal a Golgi készüléken keresztül halad. A DER-ben szintetizált fehérjék vezikuláris transzporttal jutnak a Golgi cisz oldalára. A tranz oldalon a fehérjéket a C terminális végükön található szignál alapján a ciszternák membránjában levő receptorok válogatják ki. A fehérjék ezután vezikulákba csomagoltan válnak le, de ezek körül nem alakul ki clatrin burkok. Membránjukban az α TIP fehérjék mutathatók ki. Ezeket a vezikulákat erős festődésük alapján denz vezikuláknak (DV) is nevezik. A denz vezikulák vagy közvetlenül fuzionálnak a fehérje raktározó vakuólummal (PSV), vagy a PVC/MVB közbeiktatásával jutnak el a vakuólumba. Fúzióval ürítik tartalmukat a fehérje raktározó vakuólum belsejébe. Jellemző példa a raktározott globulinokra a hüvelyesek fazeolinja.

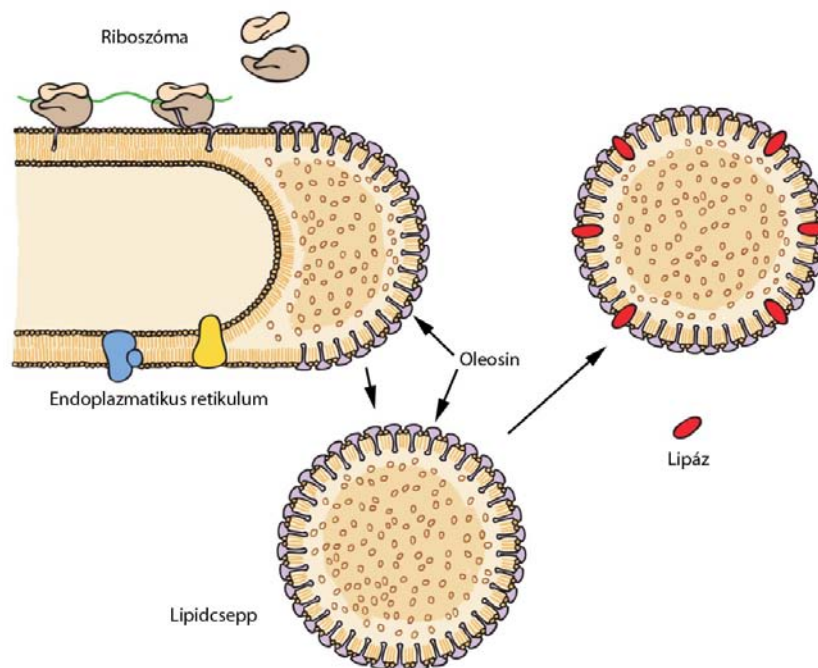
A másik útvonal a Golgi készülék megkerülésével halad. A későn, a differenciáció utolsó szakaszában szintetizálódó albuminok és globulinok, de főként a prolaminek akkumulációjára jellemző szállítási út ez. A DER-ről leváló ún. prekursor akkumuláló vezikulák (PAC) általában közvetlenül a fehérje raktározó vakuólumhoz szállítódnak, és kihagyják a Golgi készüléket. Anyagaikat nem fúzióval juttatják be a vakuólumba, hanem a vakuólum membránja bekebelezi a vezikulákat, így abban a - membránok későbbi lebontásáig - membránba csomagolt fehérjeraktározás folyik. Ilyen raktározott prolaminek a gabonafélék szemtermésében gyakoriak. A kukorica tartalék fehérjéje a zein is ide tartozik.

A kétféle vakuólum illetve a PSV és a lítikus enzimeket tartalmazó vezikulák fuzionálhatnak egymással, ami a raktározott fehérjék felhasználásának előfeltétele. Egyes fehérjeraktározó vakuólumok, mint pl a heterogén aleuronszemcsék biztosan ilyen fúziós termékek anélkül, hogy a lebontás rögtön megindulna. A heterogén aleuronszemcsékben az alapállományt alkotó raktározott fehérje mellett egy kristályos szerkezetű, membránfehérjéket tartalmazó rész és egy globoidnak nevezett inozitol hexafoszfátot, raktározott tápanyagot (fitolsav) tartalmazó képlet is található. Fontos megemlíteni, hogy a fehérjeraktározás nem energiaraktározás, a fehérjékre a növényeknek, elsősorban a fejlődő csiranövénynek, mint fehérje építőelemekre, aminosavakként van szüksége.

A növényi sejtek jelentős részében csak egyféle központi vakuólum található, mely inkább a lítikus vakuólumhoz hasonló, és benne lebontó folyamatok zajlanak. Ennek ellenére ugyanez a vakuólum még számtalan feladatot képes ellátni, mint például színanyagok, ionok raktározása. A különböző feladatok egy vakuólumon belüli ellátásának szabályozásáról egyelőre kevés információval rendelkezünk.

Lipidraktározás

A növényi sejtek gyakran halmoznak fel lipideket a citoplazmában. Ezek a lipidcseppek nem tekinthetők vakuólumoknak, vagy vezikuláknak, mert nem rendelkeznek teljes membránburokkal. A lipideket egy fél membrán burkolja, vagyis kifelé a poláros, befelé az apoláros oldalukkal elhelyezkedő foszfolipidek és egyéb membránépítő lipidek, melyekbe fehérjék is beépülnek. Eredetüket megvizsgálva egyértelművé válik ez a szerkezeti felépítés. A raktározott lipidek szintézise az endoplazmatikus retikulum tubuláris végein, pontosabban annak membránjában történik. Mivel a durva felszínű és a sima felszínű retikulum nem mindig különíthető el határozottan, - hiszen átmennek egymásba, - a tubuláris és ciszternális típusok elkülönítése itt praktikusabbnak tűnik. Az irodalomban ezért néha a DER, néha a SER szerepel a lipidszintézis helyeként.



Lipidcseppek kialakulása az endoplazmatikus retikulumból Az ER felszínéhez kapcsolt riboszómákon oleoszin szintézis folyik. Az oleoszin a két membrán közé benyúlik az apoláros részével, és stabilizálja a lipidcseppeket. Szerpe van a lipáz enzimek (pirossal) megkötésében is.

A raktározott lipidek mint triacil-glicerolok (TAG) halmozódnak fel az ER membránjának kettős foszfolipid rétege között. A lipidek (TAG) szintéziséért felelős enzimek az ER membránjában találhatóak. A lipidcseppek keletkezésében jelentős szerepe van az oleoszin nevű fehérjének, ami a membránba épül be, kifelé hidrofílszínével a citoplazmával érintkezik, hidrofób része pedig a lipidek közé nyúlik. Az oleoszin az ER-hez kötött riboszómákon szintetizálódik, és mint membránfehérje nem kerül be a ciszternába, hanem a membránban marad. A membránban mozogva eljut a tubuláris ER végéhez, ahol a lipidcseppek leválása történik. Ezen a területen – és a lipidcseppeken éppúgy –

nincsenek riboszóma dokkoló fehérjék, mivel azok a fél membránban nem férnek el. A felduzzadt ER membrán, mint lipidcsepp leválik a membránról, gyakorlatilag az ER membránjának külső felével burkolva. A membránba épült oleosin fehérjék megakadályozzák a kisméretű lipidcseppek összeolvadását, stabilizálják azokat, és kötődési helyet biztosítanak a lipidek lebontásában később fontos lipázoknak. Nem minden növényi sejtben található lipidcseppet burkolnak oleosin molekulák. Elsősorban olyan olajos magvakban fordulnak elő, melyek kiszáradnak (repce, napraforgó), de hiányoznak például az olajfa termésének olajcsepjeiből, mivel itt nincs fiziológias kiszáradás. Az ilyen lipidcseppek nagyobb méretűek is a sorozatos összeolvadások eredményeképpen alakulnak ki.

Kérdések:

1. Milyen feladatokat lát el a növények vakuóluma?
2. Hányféle vakuólumot különböztetünk meg a növényi sejtben?
3. Milyen eredetűek a LV-ok?
4. Honnan származnak a raktározott fehérjék?
5. Mi a PVC?
6. Hogyan történik a LV-ok emésztőenzimeinek a vakuólumba történő transzportálása?
7. Hogyan alakul ki a sejt turgora?
8. Miben különböznek a fehérje raktározó és a lítikus vakuólumok?
9. Milyen szerepe van a növényi vakuoláris rendszernek a védekezésben?
10. Hogyan jönnek létre a lipidcseppek?
11. Mi az oleosin szerepe?

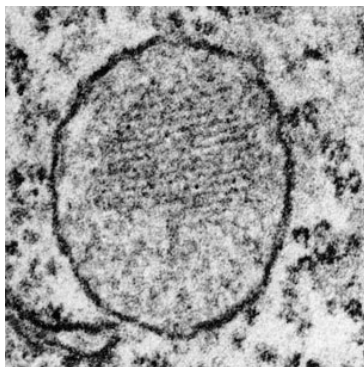
12. fejezet - A mikrotesték

A mikrotesték gyakorlatilag minden eukarióta sejtípusban megtalálható, egyszeres membránnal határolt, közelítőleg gömb alakú, 0,1–1,5 mikrométer átmérőjű sejt szervecskék. A membrán által határolt teret a mátrix tölti ki, amelyben gyakran fehérjekristály (cor vagy kristalloid) helyezkedik el. Számuk a sejt fiziológiai állapotától függően változó lehet, funkciójuk igen sokféle, az adott szervezettől és annak sejtípusától függően változó.

A mikrotestékről feltételezik, hogy a mitokondriumhoz és a színtestekhez hasonlóan, de azokat az evolúciós időskálán megelőzve, endoszimbiontaként váltak az eukarióta sejtek organellumaivá. Evolúciós fejlődésük során elvesztették saját genetikai és fehérjeszintetizáló apparátusukat. Ez a hipotézis nincs kellően bizonyítva.

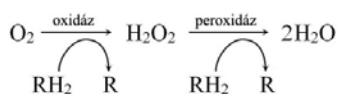
A peroxiszómák

Minden eukarióta sejtben megtalálható sejtalkotók, melyek peroxisomális membránnal határolt, közelítőleg gömb alakú, néhány mikrométer átmérőjű sejt szervecskék. Mindig tartalmaznak hidrogén-peroxidot generáló (innen ered elnevezésük) oxidázokat (pl. húgysav-oxidáz) és a reakció eredményeként keletkező hidrogén-peroxidot bontó kataláz (peroxidáz) enzimet. A kataláz akár a peroxisomális mátrix fehérjekészletének harmadát is kiteheti (gyakran „kikristályosodnak” létrehozva a kristalloidot).



Peroxiszóma TEM fotója. A mátrixban a krisztalloid jól látható.

A légzési oxigén felhasználásával a peroxisomális oxidázok meghatározott szerves molekulákat dehidrogénezik, miközben peroxid keletkezik:



A fenti két reakcióban RH_2 valamilyen szerves szubsztrát, a reakcióban hidrogéndonor. Állati sejtekben a szubsztrátok lehetnek L- és D-aminosavak, húgysav, hosszú C-láncú alkoholok vagy hosszú C-láncú aldehidek stb.. Az alkoholokból aldehidek, az aldehidekből zsírsavak keletkeznek. A hidrogéndonoroknak megfelelően számos peroxisomális oxidázt ismerünk. A második lépésben a kataláz enzim újabb szubsztrátokat (beleértve az 1 szénatomos hangyasavat, formaldehidet, etilalkoholt és egyéb a sejt/szervezet számára mérgező anyagot) dehidrogénez, így eliminálva a rendszerből a toxikus hidrogénperoxidot. Ha valamilyen okból hidrogénperoxid halmozódik fel a sejtben, a kataláz enzim képes azt vízzé alakítani. Az utóbbi reakciók a gerincesek szervezetében a májban (méregtelenítés) és a vesében (mérgező anyagok kiválasztása) különösen fontosak.

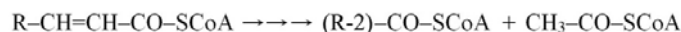


A peroxiszómák fő fiziológiai funkciója azonban hosszú C-láncú zsírsavak oxidációja, a β -zsírsavoxidáció. A reakcióban a zsírsavak a koenzim-A-val kialakított tiol-észter kötésben vesznek részt. A kezdő lépésben az α és β szénatomok között kettős kötés alakul ki és hidrogénperoxid keletkezik:



ahol R hosszúláncú zsírsav, SCoA – koenzim-A (S a molekula SH csoportjának kén)

A β szénatom több lépésben továbboxidálódik, amely végül egy két szénatomos molekularész leválását (acetyl-koenzim-A formájában) és a 2 szénatommal rövidebb zsírsavlánc koenzim-A-ra kötődését eredményezi:



A peroxiszómában nincs elektrontranszportlánc és ATP-szintetáz (más néven ATP-szintáz), ezért az oxidáció során felszabaduló energia hő formájában szabadul fel.

A peroxiszómák zsírsavoxidáló enzimsziszteme a hosszú szénláncú (10–22 szénatomos) molekulák feldolgozására specializálódott a 8 és annál rövidebb szénláncú zsírsavakat a mitokondriális zsírsavoxidáló rendszer oxidálja hatékonyabban. Ez a „munkamegosztás” feltételezi a két organellum együttműködését is, amit a közöttük megvalósuló lipidforgalom is alátámaszt.

A peroxiszómáknak nincs saját fehérjeszintetizáló rendszere, fehérjéik a citoplazmában, szabad riboszómákon szintetizálódnak és utólag transzportálódnak a peroxiszómába. A fehérje importot a peroxiszómális fehérjék C- vagy N-terminálisán lévő szignál biztosítja (PTS1 és PTS2; PTS = peroxisomal targeting signal), amelyet a citoszolban lévő szabad peroxiszómális receptor molekulák ismernek fel. A receptor megkötö a PTS szignált tartalmazó fehérjét, amely ebben a komplexben importálódik a peroxiszóma mátrixába. Itt a receptor felszabadul, és visszajut a citoszolba (receptor reciklizáció). Az importot a membrán receptorai és transzlokációs fehérjéi segítik.

A peroxiszóma lipid importra is rászorul. Az importált fehérjék és lipidek miatt a peroxiszóma térfogata megnő, majd kettéosztódik. A peroxiszómális membrán az endoplazmás retikulumból származik. Az ER-ből kisméretű vezikulák (mikroperoxiszómák) fűződnek le, melyek egymással vagy a már létező peroxiszómákkal fuzionálnak.

A peroxiszóma fehérjekészlete 32 ismert fehérjéből áll, ezek a peroxinok, melyeket a PEX gének kódolnak.

Glioxiszóma

Növények és fonalas gombák speciális sejtszervecskéje. Növényekben az olajos magvak raktározó szövetében található meg. Az oxidációs/peroxidációs és a β -zsírsav-oxidáció enzimsziszteme túl a glioxalát-ciklus enzimeit is tartalmazza. Csírázó magban a lipid depókban a zsírsavbontásból keletkező acetyl gyökökből szénhidrátok előállításához (glükoneogenesis) szükséges köztes reakciótermékek jönnek létre. A szénhidrátok előállítására ezt az anyagcsere-útvonalat a fotoszintézis beindulásáig használják a csíranövények.

Levél peroxiszóma

A levél peroxiszóma a C3-as növények fotorespirációs komplexének egyik tagja. A peroxiszómális enzimsziszteme túl a glikolsav anyagcsere-útvonal enzimeit is tartalmazza. A szintesttel és mitokondriummal képzett fotorespirációs komplex tagjaként fontos szerepet tölt be a növényi sejtek anyagcseréjében. Részletesebben lásd a plasztiszokról szóló fejezetben.

Glikoszóma

Az ostoros egysejtűek között (pl. *Trypanosoma* spp.) előforduló sejtorganelum. A glükogént és a glikolízis enzimsziszteme is tartalmazza. A glükolízis gyors és hatékony elindításáért felelős, a folyamat a glicerinaldehid-foszfát keletkezéséig játszódik le a glikoszómában.

A glükóz raktározásért felelős májsejtekben is megtalálták a glikoszómákat.

Hidrogenoszóma

Az 1970-es években azonosították anaerob parazita egysejtűekben, korábban a peroxiszómából származtatták, ma már általánosan elfogadott, hogy eredete a mitokondriumból vezethető le (redukálódott mitokondrium). Két membrán határolja, molekuláris hidrogént, acetátot, széndioxidot és ATP termel. Kutatásának modellszervezetei Trichomonas fajok.

Kérdések:

1. Mi a peroxiszómák jellemző közös enzimatis reakciófolyamat?
2. Mi a kataláz?
3. Mi a PTS?
4. Mit tartalmaz a kristalloid?
5. Sorolja fel a mikrotestek típusait!

13. fejezet - A mitokondriumok

Az állati sejtek az anyagszállítási folyamatokhoz szükséges energiát a tápanyagok, elsősorban zsírok és szénhidrátok lebontásából nyerik. A tápanyagok aerob, oxigén felhasználásával történő lebontása specializált sejtszervecskékben, a mitokondriumokban játszódik le. A mitokondriális oxidációs energia legnagyobb része ATP-szintézisére fordítódik, vagyis nagyenergiájú foszfátkötések formájában konzerválódik. A légzéshez kapcsolt ATP-szintézis folyamatsort nevezzük oxidatív foszforilációnak. Az oxidatív foszforiláció a mitokondriumok fő funkciója. Emellett jelentős szerepük van egyes ionok, elsősorban a kalcium eloszlásának szabályozásában, a szervezet hőegyensúlyának fenntartásában és szintetikus folyamatokban (pl. a citrátkör köztes termékei zsírsav- és aminosav-szintézis kiinduló anyagai).

A mitokondriumok gyakorlatilag minden eukarióta sejtben található, fénymikroszkóppal is azonosítható, fonál vagy pálcikaszerű, néhány mikrométeres testek. Számuk, eloszlásuk sejt típusonként változó, májsejtekben pl. az össztérfogat kb. ötöd részét teszik ki. Jellemző, hogy a sejt azon területein csoportosulnak, ahol intenzív ATP-fogyasztó folyamat megy végbe (pl. izmokban a miofibrillumokhoz simulva).

A mitokondrium felépítése

A mitokondriumot két membrán határolja. A **külső membrán** sima felületű, a **belső membrán** mély **redőket** képez, melyek beemelkednek a mitokondrium belsejébe. A redők lehetnek a mitokondrium hossz tengelyére merőleges lemezszerű képletek (ún. cristák) vagy rendezetlen lefutású csövek (tubulusok). Mindkét esetben a redők igen nagyra növelik a belső membrán felszínét, számuk és összefelszínük egyenes arányban áll az oxidatív foszforiláció intenzitásával. A két membrán közötti keskeny, kb. 10 nm széles **intermembrán rés** a külső kamra. A redők által határolt keskeny tér közlekedik a külső kamrával. A belső membrán által határolt tér a belső kamra, amit a **mátrix** tölt ki. A mitokondrium membránjai és az általuk határolt terek összetételükben és funkciójukban is jelentősen eltérnek egymástól, de a különböző terekben és felszíneken lejátszódó folyamatok szorosan egymáshoz kapcsolatosan működnek.



Krisztás típusú mitokondrium hosszmetsete (TEM) .



Tubuláris típusú mitokondrium hosszmetsete (TEM)

A külső membrán fehérje lipid aránya a plazmamembránéhoz hasonlóan 1:1 (szárazanyag tartalomra vonatkoztatva). Nagy mennyiségben tartalmaz egy porin nevű fehérjét, ami β -redőket formáló transzmembrán doménjai segítségével igen nagyméretű hidrofíl csatornákat alkot (a legpermeabilisabb membránt létrehozva). Ennek köszönhetően a külső membrán átengedi a citoszol számos molekuláját (kb. 5 kD molekulatömegig), így a külső kamrában az 5 kD-nál kisebb tömegű molekulák (ionok, cukrok) koncentrációja közelíti a citoszoléhoz, bár fehérje összetétele jellegzetesen eltérő.

A belső membrán feltűnően sok fehérjét tartalmaz (szárazanyag tartalmának kb. 75%-a fehérje). Benne lokalizálódnak az **elektrontranszportlánc** (légzési lánc, terminális oxidáció) fehérjekomplexei, az ATP-t szintetizáló

enzimkomplexek és egy sor transzlokálófehérje. A belső membrán erősen szigetelő tulajdonságú, speciális lipid komponense a kardiolipin, amelynek köszönhetően még a kis molekulák, ionok számára sem átjárható.

A külső és belső membrán transzlokálófehérjei között vannak egymáshoz kapcsolódók is, amelyek a citoplazmában szintetizálódott mitokondriális fehérjéket juttatják be a citoszolból a mitokondriumok belsejébe.

A mátrix anyaga tartalmazza a mitokondrium fehérjeinek kb. kétharmadát. Itt található a mitokondrium saját génállománya, gyűrű alakú mitokondriális DNS (mtDNA) több kópiában, saját fehérjeszintetizáló szervecskéi, a mitokondriális (70S) riboszómák, továbbá a citrátkör és a zsírsav- β -oxidáció enzimrendszere.

A mitokondrium működése

A **glikolízis**, a szénhidrátok anaerob lebontása 3 szénatomos termékig (piroszölősavig) a citoszolban történik. A piruvát ezután belép a mitokondrium mátrixába, dekarboxilálódik és acetyl-CoA keletkezik belőle. Ugyanez a termék keletkezik a zsírsavak lebontásából is. Az acetyl-CoA a citrátkörben oxidálódik el, ahol ciklusonként a köztes termékekből 2 molekula széndioxid és 4 pár proton és elektron lép ki. Ez utóbbiakat elektronakceptor koenzim molekulák (NAD^+ , ill. FAD^+) veszik fel:



A redukált akceptorok (NADH és FADH_2) elektronjaikat az elektrontranszportlánc fehérjekomplexeinek adják át. A NADH oxidációja során mérhető standard szabadenergia-változás kb. 52 kcal/mol. Ez közvetetten hasznosulhat ATP-szintézisben és a belső membrán egyes transzportrendszereiben. Egy molekula $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidálása során 2,5–3 ATP-molekula keletkezhet, míg egy molekula FADH_2 oxidálása során felszabaduló energia 1,5–2 molekula ATP szintézisét fedezi. Ez azt jelenti, hogy egy ecetsav molekula mitokondriális metabolizálása kb. 10 molekula ATP szintézisét eredményezi.

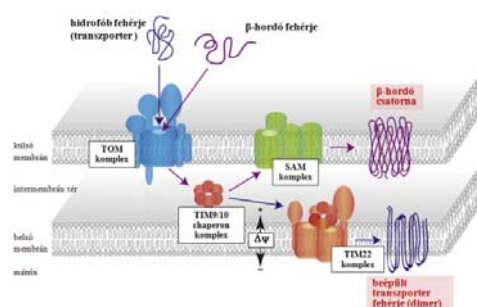
NADH és FADH_2 nagyenergiájú elektronjai egy soklépcsős rendszeren, az elektrontranszportláncon keresztül jutnak el az oxigénig, miközben energiájukat fokozatosan adják le, mely protontranszportra fordítódik. Az elektrontranszportlánc fehérjei nagyobb komplexekbe tömörülve ágyazódnak be a belső membránba. Négy ilyen enzimkomplexet ismerünk, közöttük két elektronhordozó molekula, az ubikinon (koenzim-Q, CoQ) és a citokróm c biztosítja a kapcsolatot.

Az elektrontranszportláncban az egyes komplexek elektronaffinitása (redoxpotenciálja) eltérő, és úgy kapcsolódnak egymáshoz, hogy mindegyik az előtte levőt képes oxidálni. Az áramlás a **I. komplex**től, mely közvetlenül a NADH -tól veszi át az elektronokat, a legnagyobb elektronaffinitással (legpozitívabb redoxpotenciállal) rendelkező végső elektron akceptor, az oxigén felé irányul. Az egyes lépésekben felszabaduló energiát a komplexek arra használják, hogy protonokat pumpáljanak ki a mátrixból a külső kamrába. Így a membrán két oldala között protonkoncentráció- és elektromos potenciálkülönbség (pH-gradiens, értéke kb. 1–1,4 pH-egység) alakul ki. A kettő együttesen (közös néven elektrokémia potenciálkülönbség, **elektrokémiai gradiens**) hajtja vissza a protonokat a belső kamrába. Azonban a belső membrán a protonokat csak protoncsatornákon engedi át.

A fő visszaáramlási (kiegyenlítő) út az ATP-szintetáz (ATP-szintetáz) keresztül vezet. Ez egy több alegységből álló fehérjekomplex, amelynek katalitikus–ATP-szintetizáló–egysége a belső membrán mátrix felőli oldalán van, míg transzmembrán egysége a belső membránba rögzül és protoncsatornaként működik. A csatornán keresztül visszaáramló protonok energiája hajtja az ATP-szintézist. Az ATP-szintetáz akkor állít elő ATP-t, ha az elektrokémiai gradiens elég nagy. Ha a gradiens (vagyis a külső kamrába kerülő protonok koncentrációja) túl kicsi, az ATP-szintetáz ATP-t bont és protont pumpál ki a mátrixból.

A mitokondriumok működése a különböző anyagcseretermékek folyamatos ki- és beáramlása mellett biztosítható. Mivel a belső membrán e molekulák számára nem átjárható, szállításukat a belső membránba épült integráns transzlokálófehérjék végzik. A zsírsavak és a piroszölősav transzportrendszerei a pH gradienst hasznosítják, csakúgy, mint a foszfátkicserélő rendszer, mely szervesen foszfátot hoz be hidroxil-ion egyidejű kiszállításával. Az ADP/ATP-transzlokálófehérje negatív töltést visz ki a mátrixból, vagyis a potenciálkülönbség kihasználásával dolgozik. Szintén a proton gradiens működteti a mitokondriális Ca-ion transzportot, mely normál esetben csak a

saját ionszükséglet fedezésére szolgál, de a sejt sérülése esetén fontos szerepe lehet a citoszol Ca-szintjének szabályozásában.



A mitokondrium-membránok transzportrendszere.

A transzlokálórendszerek tehát valamilyen módon az elektrokémiai potenciálkülönbséget használják fel a transzportra, így versenyeznek az ATP-szintetázszal. Számítások szerint minden 4 kipumpált protonból hozzávetőleg 3 visszaáramlása szükséges 1 molekula ATP szintéziséhez, míg a negyedik proton energiája a transzportrendszereket hajthatja.

A belső membrán integritása alapvető az elektrokémiai gradiens kialakításában és hasznosításában. A membrán működésének sérülése az oxidáció és foszforiláció szétkapcsolásához vezet, Ebben az esetben a protonok az ATP-szintetáz megkerülésével is visszajuthatnak a mátrixba. ATP nem keletkezhet, a légzési energia hő formájában szabadul fel.

A szétkapcsolás fiziológiai szerepére példa az emlősszövetek barna zsírszövetének működése. Mitokondriumaiban egy különleges protoncsatorna, a **termogenin** fehérje lokalizálódik, melyen a protonok szabadon átjuthatnak. Így nem alakulhat ki az ATP-szintézishez szükséges elektrokémiai gradiens viszont, az oxidáció fokozott hőtermeléshez vezet. Ezért a jól kapillarizált barna zsírszövet fontos szerepet játszik, különösen az újszülött és fejletlen szervezetek hőháztartásában.

Különböző szervezetekben, más-más mértékben RNS importra is sor kerülhet. Növényekben, egysejtűekben és élesztősejtben a citoszolból tRNS kerül a mátrixba. Emlőssőkben kis RNS-ek importját figyelték meg.

A mitokondriumok osztódása

A sejtekben lévő mitokondriumok száma és mérete nagy változatosságot mutat, általában igazodik a sejt anyagszere szintjéhez. Új mitokondrium nem keletkezik *de novo*, hanem csak a meglévők növekedésével és befűződéssel történő osztódása útján jöhet létre. Osztódásuk hasonlít a baktériumok hasadással történő osztódására és nagymértékben független a sejt saját osztódási ciklusától. A megtermékenyítés során a spermiumból a mitokondriumok nem jutnak be a petesejtbe, ami azt jelenti, hogy a szervezet sejtjeinek mitokondriuma mind anyai eredetűek. A mitokondriumok növekedéséhez fehérje- és nukleinsav-szintézis szükséges. Ehhez a mitokondrium saját génállománya nem elegendő, hiszen a mtDNS kevés bázispárból állnak (a humán mtDNS kb. 16 000 bázispár hosszúságú), egy-egy gyűrű a riboszomális és transzfer-RNS génjein kívül kevés fehérjekódoló gént (humán mtDNS mindössze 13-at) tartalmaz, így a mitokondrium fehérje-importra szorul. A mitokondriális fehérjék döntő többségének génje a sejtmagban lokalizálódik. A mitokondriumok, a növényi színtestekhez hasonlóan, szemiautonóm organellumok. A mitokondriális fehérjék legnagyobb része a citoplazmában szintetizálódik, onnan jut a mitokondriumba. A transzlokációt bonyolult receptorokból, transzportáló- és feldolgozófehérjékből álló apparátus végzi. A legtöbb ilyen fehérje a citoszolban, szabad riboszómákon szintetizálódik, N-terminálisukon mitokondriális lokalizációs szignál van. Ezt a szignált a külső membránban lévő receptor ismeri fel. A ligandumot kötött receptor a transzlokációs rendszerekhez kapcsolódik és megindul a fehérje transzlokációja. Az importált fehérje a transzport-komplexek közvetítésével általában a mátrixba kerül, ott nyeri el végső formáját (pl. lehasítódik róla a szignál) és jut a rendeltetési helyére, a mátrixba, a külső kamrába vagy a membránokba. A transzport alatt chaperon fehérjék segítik a folyamatot. A transzport energiaigényes folyamat.

Eredete

A mitokondriális DNS és fehérjeszintetizáló apparátus, a DNS működése és molekuláris sajátosságai alapján, a prokarióták genetikai apparátusához hasonlóak. Ezt az endoszimbióta elmélettel lehet magyarázni. Az elfogadott nézet alapján a mitokondriumok őse valamilyen aerob anyagcserére képes prokarióta szervezet lehetett, amely endocitózissal jutott be egy ősi eukariótákba, közöttük tartós együttélés alakult ki.

Kérdések:

1. Mit jelent a szemiautonómia a mitokondrium esetében?
2. Rajzoljon le egy mitokondriumot és sorolja fel a részeit?
3. Melyek a mitokondrium legfontosabb funkciói?
4. Hol lokalizálódnak ezek enzimmészletei?
5. Hogyan kapcsolódnak egymáshoz a részfolyamatok?
6. Mi a kemiozmotikus kapcsolat lényege?
7. Hogyan alakul ki az elektrokémiai gradiens?
8. Mi a különbség a külső és belső membránok felépítésében?
9. Milyen szerepe van a porin fehérjének?
10. Milyen folyamatok versengenek az ATP-szintetázal?

14. fejezet - A plasztiszok és a fotoszintézis

A viszonylag kevés kemoautotróf élőlénytől eltekintve, melyek a szervetlen anyagokból történő szerves anyag szintéziséhez az energiát kémiai kötésekkel nyerik, az élővilág alapvetően a napfény energiájából él. Azok az élőlények melyek ezt közvetlenül képesek felhasználni a fotoautotróf szervezetek, míg a heterotróf szervezetek az autotrófok által felépített anyagokból táplálkoznak.

A fotoautotróf szervezetek a fény energiájával széndioxidból és valamilyen redukáló anyagból képesek szerves vegyületeket, első körben szénhidrátokat felépíteni. A redukatív környezetben élő fotoautotróf szervezetek redukáló, elektrondonorként szolgáló anyagként főként kénhidrogént használnak fel (pl. kénbaktériumok), míg az oxidatív környezetben élők elektrondonorként vizet használnak. Az általános fotoszintetikus folyamat a következő képlettel jellemezhető



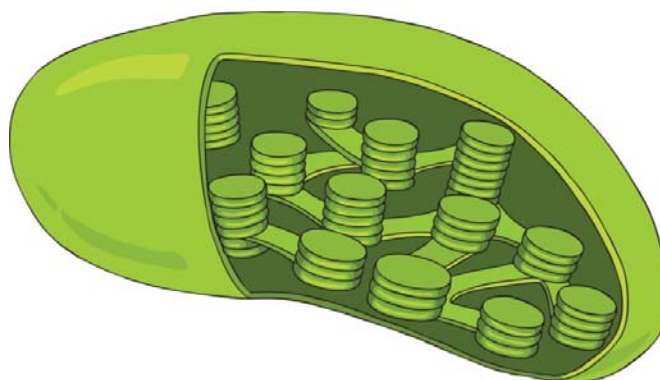
(ahol A = S vagy O)

A fotoszintézis a növényeknél a bakteriális eredetű, endoszimbióta plasztiszban, elsősorban a fotoszintézisre specializálódott kloroplasztiszban játszódik le.

Kloroplasztisz

A kloroplasztisz a növényekben kettős membránnal borított sejttorganellum, mely sok prokarióta jellemvonást mutat, bizonyítékaul a bakteriális, endoszimbionta eredetnek. Ilyen prokarióta jellemvonások:

- cirkuláris DNS több kópiában
- sejtmag, illetve mindenféle, belső membránnal körülvett kompartmentum (organelumok) hiánya
- bakteriális riboszómák, fehérjeszintézis
- baktériumokra jellemző membránalkotók a belső és részben a külső burkolómembránban
- osztódással történő szaporodás (nincs de novo keletkezés)



Kloroplasztisz tilakoid rendszere

A plasztiszok burkolómembránjai a fehérjék transzportja során kialakuló transzlokonoktól eltekintve soha nem kapcsolódnak egymáshoz. A két membrán összetételében jelentősen különbözik egymástól, ami az eltérő eredetnek (a belső membrán bakteriális a külső kevert eredetű) köszönhető.



Levél mezofillum sejtek kloroplasztiszokkal.

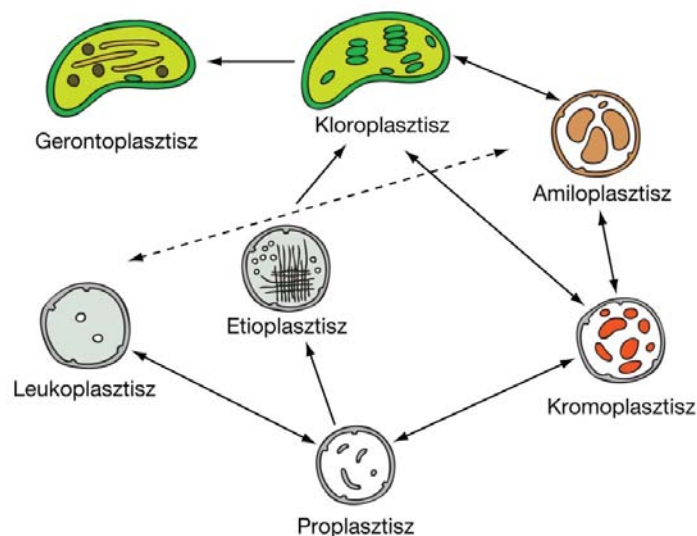
A kloroplasztisz belsejét az alapanyagának, plazmának tekinthető mátrix a sztróma alkotja, melyben a fehérjeszintézis és még sok egyéb folyamat zajlik. Itt található a plasztiszok DNS-e, mely tipikus gyűrű alakú DNS, több kópiában.

A sztrómában helyezkedik el a plasztisz belső membránrendszere, a tilakoidrendszer. A tilakoidok zsákszerű membránszerkezetek, melyek állhatnak szabadon (sztróma tilakoidok), vagy egymásra rétegződve (gránium tilakoidok). A tilakoid membránok által körbezárt tér a tilakoid lumene. A tilakoidok kapcsolatban állhatnak a belső burkolómembránnal, de keletkezésük külön szintézissel történik, és nem egyszerűen a belső burkolómembrán betűrődésével jönnek létre. A tilakoid membránokban folyik a fotoszintézis fényszakasza, míg a sötét szakasz, a Calvin-ciklus a sztrómában zajlik.

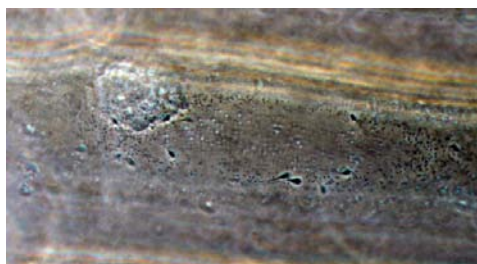
A plasztiszok egyéb típusai

A plasztiszok nagyon sokféle formában jelenhetnek meg a sejtben ezeknek csak egyik, bár leggyakoribb formája a kloroplasztisz. Maga a plasztisz szó a plasztikusságra utal, mivel a plasztiszok formája, szerkezete nagyon változatos lehet, és a különböző típusok egymásba is átalakulhatnak.

A magasabbrendű növények kloroplasztisza általában lencse alakú kb. 5–10 μm hosszú és 3–5 μm széles organelum, de alakja változó, és néha fénymikroszkóppal az élő kloroplasztiszoknak egy hosszú, farokszerű nyúlványa is megfigyelhető, amit sztromulának nevezünk. Számuk egy sejtben a sejt funkciójától függ, mezofill sejtekben 30–150 plasztisz is előfordul. Algákban lehet egy sejtben csak egy plasztisz is. Az algák plasztiszai alakban rendkívül változatosak, lehetnek csavarodott szalag, vagy csillag alakúak, kehelyszerűen beöblösödők stb.



Plasztisz típusok, és egymásba alakulásuk



Stromulák.

Proplasztisz

A különböző plasztisz típusok ebből a kevésbé differenciált proplasztiszból alakulnak ki. Ilyen plasztiszok találhatók a merisztematikus sejtekben, de sok szövetben megmaradnak a proplasztiszok a szöveti differenciáció után is. Így megtalálhatók az epidermisz sejteiben, a rhizodermiszben, és a gyökér más szöveteiben is előfordulhatnak. Méretük általában 0,2–1 μm , belső szerkezetük gyengén fejlett. A tilakoid rendszer csupán néhány lamellára és a belső membrán kevés invaginációjára korlátozódik. A sztrómában kevés riboszóma és egy, vagy néhány kisméretű keményítőszemcse található.

Kromoplasztisz

A színes, általában sárga, narancsszínű vagy vörös plasztiszok. Színüket a bennük felhalmozódó karotinok és xanthofillok adják. A kromoplasztiszok felelősek nagyon sok termés (paradicsom, paprika), virág (körömvirág, bűdöske) és gyökér (sárgarépa) színéért. A kromoplasztiszok kialakulhatnak közvetlenül proplasztiszokból, vagy zöld színű kloroplasztiszokból is. A termések színének megváltozása az érés során a kloroplasztisz kromoplasztisszá alakulásával függ össze. A karotinoidok bioszintézise a membránokban történik, ezért a kromoplasztiszokban itt rengeteg enzim található. A karotinoid bioszintézisét végző sokféle enzim mind a magban kódolt, a citoplazmában szintetizálódik, és ezután transzportálódik a plasztisz sztróma állományába, ahol chaperonok segítenek a fehérjestruktúra kialakításában. Ezek az enzimeknek a sztrómában inaktívak, csak a membránhoz való kapcsolódással aktiválódnak. Itt találhatók a szubsztrátjaik is. A karotinoidok nagyon sokfélék, konjugált kettőskötéseket tartalmazó szénláncok. Bioszintézisük központi típusa a likopin, mely például a bűdöske virágának sárga színét adja. A likopin még egyenes szénláncát különböző enzimek átalakítják és a szénlánc végein gyűrűk jönnek létre. A karotinok színét elsősorban a konjugált kettőskötéseket tartalmazó szénlánc delokalizált elektronjainak a gerjeszthetősége biztosítja. A kromoplasztiszok kialakulása nem keverendő össze a szeneszcens plasztiszok, a gerontoplasztiszok

kialakulásával, bár a kloroplasztisz színe itt is sárgára vált. A kromoplasztiszok működő plasztiszok, és vissza is képesek alakulni kloroplasztisszá, mint ahogy azt a sárgarépa földből kikerülő és megzöldülő részein megfigyelhetjük. A kromoplasztiszok kialakulása során a lipid tartalmú plasztoglobulusok felszaporodnak a sztrómában, majd megnyúlt tubulusokká alakulnak. Ezekben történik meg a karotinoidok felhalmozódása. A karotin kristályok ezekben a lipidcseppekben, vagy a sztrómába kikerülve találhatók. Amennyiben az átalakulás kloroplasztiszból történik, a tilakoid rendszer lebomlik, belőlük egyrétegű membránlipidekkel burkolt plasztoglobulusok alakulnak és a fejlett kromoplasztiszban a tilakoid rendszernek már csak a maradványai találhatók meg. A kromoplasztiszokban új membránok alakulnak ki, melyek zsákokat, vagy csőszerű képleteket alkotnak.

Leukoplasztisz

Szintelen plasztiszok, igen fejletlen tilakoidokkal. Elsőrendű feladatuk a lipid anyagcserében való részvétel, elsősorban a monoterpenoidok bioszintézise. A terpenoidok fontos illóolajok, gyanták, melyek gyógyászati, élelmiszeripari alapanyagok is. Maga a klorofill fitol oldallánca, és a karotinoidok is terpenoidok. A terpenoid bioszintézis a növényekben a plasztiszokban és az endoplazmatikus retikulumban történik, de a kiinduló alapanyag a citoplazmában szintetizálódik acetyl-CoA-ból. Az endoplazmatikus retikulummal való szoros együttműködés utal, hogy a leukoplasztiszok körül gyakran találunk ER tubulusokat. A leukoplasztiszok elsősorban a kiválasztó képletekben, virágokban, epidermiszben találhatók. Nem keverendők össze a keményítőt tartalmazó amiloplasztiszokkal.

Amiloplasztisz

A növényi sejtekben a keményítő raktározása kizárólag plasztiszokban, nagy mennyiségben az erre specializálódott amiloplasztiszokban történik. Az amiloplasztiszok belső membránrendszere gyengén fejlett, gyakran az egész sztrómaállományt keményítőszemcsék töltik ki. A növényi keményítő α -1,4-glükózpólimer, (amilóz) mely időnként 1,6-os elágazásokat is tartalmaz (amilopektin). Az amilóz molekulák egy kristályosodási göcbből indulnak ki sugarasan, és a szerkezet kiritkulásának megakadályozására időnként 1-6-os oldalelágazásokat hoznak létre. Az ilyen, sok elágazást tartalmazó szakaszok eltérő törésmutatójuk miatt fénymikroszkóppal is látható gyűrűket alkotnak a keményítőszemcséken. A keményítő tehát nem kétféle anyagból (amilóz és amilopektin) áll, csupán egyes szakaszokon a glükózpólimer nagyobb gyakorisággal ágazik el. Keményítőszemcsék más plasztiszokban, is előfordulnak, ha nem is nagy mennyiségben. A kloroplasztisz által szintetizált glükóz molekulák ideiglenesen keményítőben raktározódnak mivel egyébként ozmótikus problémát jelentenének. Amiloplasztiszok elsősorban raktározó szervekben, magvakban, termésekben fordulnak elő nagy mennyiségben. Az amiloplasztiszok képesek kloroplasztiszokká alakulni (fényre került burgonya megzöldülése) és fordítva.

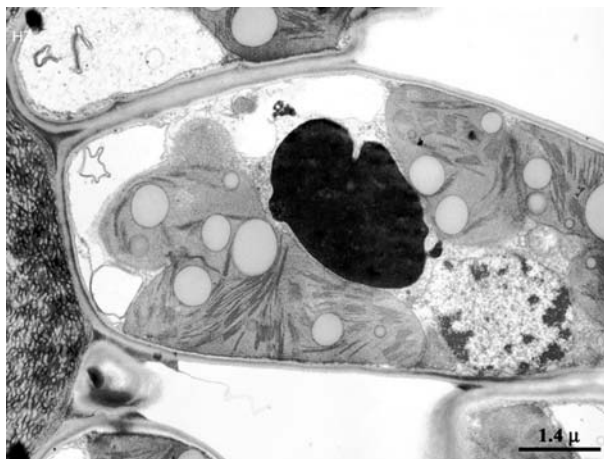
Etioplasztisz

Fény hiányában a proplasztiszból történő kloroplasztisz kialakulás megakad, és egy speciális plasztisz az etioplasztisz alakul ki. Ez a plasztisztípus nem egy átmeneti forma a kloroplasztisz differenciációjában, hanem inkább egy kerülőút állomásának tekinthető. A kloroplasztisz kialakulásához, a belső tilakoidrendszer kifejlődéséhez szükség van a klorofill-fehérje komplexek kialakulására. A klorofill bioszintézisének azonban van egy fényfüggő lépése (a protoklorofillid – klorofillid átalakulás) aminek eredményeként a szintelen protoklorofillid halmozódik fel, de ez nem képes megfelelő fehérjekapcsolatok kialakítására. A tilakoid szerkezet ennek hiányában nem jön létre, de a felhalmozódó membránalkotók egy sajátos kristályszerű, térbeli csőszerkezetté álnak össze. Ez az ún. prolamelláris test (PLB). Fény hatására gyorsan kialakul a klorofill, és a prolamelláris test átrendeződik a kloroplasztiszra jellemző tilakoidrendszerre. Etioplasztiszok normális körülmények között csak ritkán fordulnak elő a növényekben (pl. rügyek belsejében) inkább a fénytől elzárt hajtásokban alakulnak ki kényszerűségből. Kloroplasztiszból visszaalakulás etioplasztisszá nem fordul elő, mert a tilakoid rendszer nem alakul vissza prolamelláris testté.

Gerontoplasztisz

A szenescens plasztiszokat nevezzük gerontoplasztiszoknak is. A plasztiszok lebomlásának jellegzetes lépései vannak melyek a levelek lehullása előtt mennek végbe, amennyiben erre megfelelő idő áll rendelkezésre. Szép megnyilvánulása ennek az őszi lombszíneződés. Ilyenkor a plasztiszok sárga, barna, vörös színűvé alakulnak, de ez a folyamat eltér a kromoplasztiszok kialakulásától. Ilyenkor nem intenzív karotinoid szintézis miatt alakul ki a szín, hanem a jelenlévő karotinoidok válnak láthatóvá, mivel a színüket elfedő klorofill bomlása korábban indul

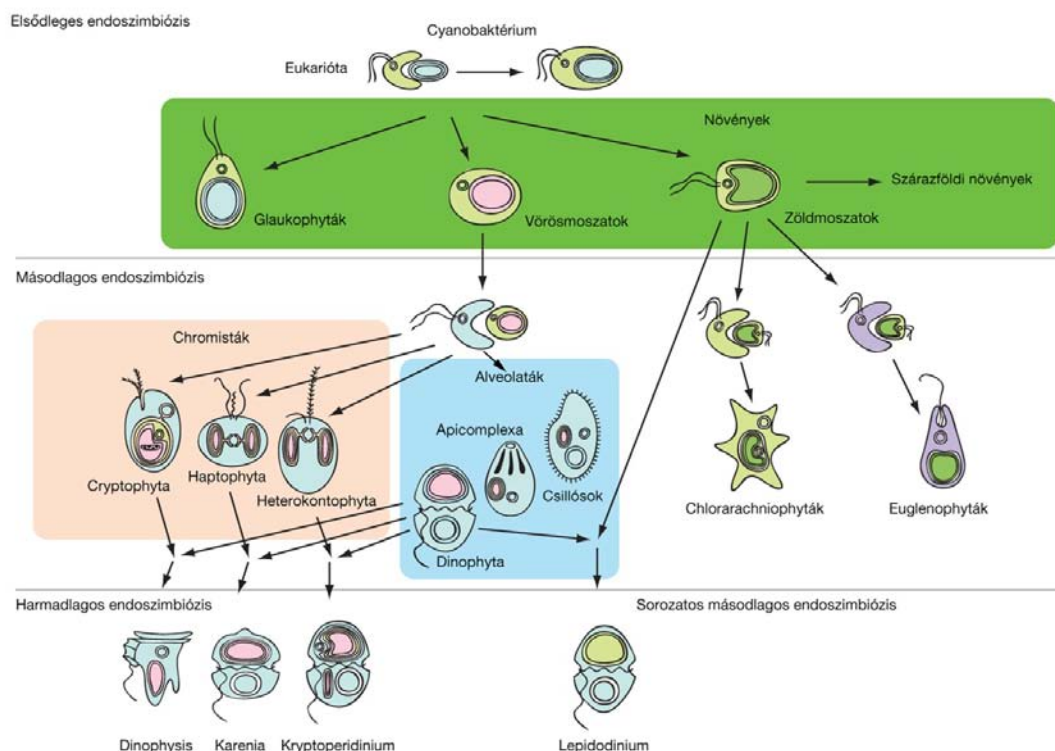
meg. A klorofill bomlásával az elektrontranszportlánc szétesésével, a fény gerjesztésének eredményeképpen reaktív gyökök keletkeznek, ezt gátolja egy bizonyos mértékig a karotinoidok jelenléte. A kloroplasztisz a programozott sejthalál folyamatainak fontos résztvevője, és a növény igyekszik a levélhullás előtt minden fontos anyagot felhasználni, visszaszívni. A szeneszcencia első jeleként a tilakoid rendszer dezorganizálódik, a sztrómaállomány denzitása jelentősen megnő. A membránok lipidtartalma lipidcseppekbe, plasztoglobulusokba kerül át, majd kijut a plasztiszból és a sejt más anyagaival együtt a növény túlélő részeibe transzportálódik. A folyamat végére a plasztisz szinte teljesen kiürül és elpusztul. A folyamat egy ideig reverzibilis, pl. giberellinsav kezeléssel visszafordítható.



Gerontoplasztiszok Az őszi lombszineződés a szeneszcens plasztiszok eredménye. A plasztiszok tilakoidrendszere szétesik, a membránok lipidtartalma lipidcseppekbe (plasztoglobulusok) kerül.

A plasztiszok (és mitokondriumok) eredete, endoszimbióta elmélet

Ma már kétségbevonhatatlan tény, hogy a plasztiszok, és a mitokondriumok valaha élt cianobaktériumok illetve a mitokondrium esetében egy α -proteobaktérium endoszimbióta leszármazottai. Sachs már 1882-ben leírta könyvében, hogy a plasztiszok a sejtben osztódással szaporodnak, számukban alkalmazkodva a sejthez, mintha önálló lények lennének. 1885-ben Schimper leírta a proplasztiszokból történő kloroplasztisz differenciálódást, és az a tény hogy a kloroplasztiszok mindig egy szintelen plasztiszból alakulnak ki, valamint Sachs megfigyelései arra a következtetésre juttatták, hogy a plasztiszok szimbiózisban élnek a növényi sejtrel. Arra is rámutatott, hogy a szimbiózisnak igen nagy jelentősége van a növények evolúciójában. Mintegy öt évvel később Altmann publikálta megfigyeléseit a mitokondriumok festődésével kapcsolatban. Felfigyelt rá, hogy a mitokondriumok ugyanazokkal a festékekkel mutathatók ki eredményesen a növényi és állati sejtekben, mint amik a baktériumok festésére is alkalmasak. Ezek alapján Altmann arra a következtetésre jutott, hogy a mitokondriumok a sejtben élő baktériumok. Mivel cikkében e fontos megfigyelésen túl sok megalapozatlan állítás is szerepelt (például a sejtmagot önálló életre alkalmas bioplazmának tekintette) nem kapott tudományos támogatást. Egy fiatal orosz biológus Mereschowsky 1905-ben publikálta először pontos megfigyelésekkel és érvekkel alátámasztott elképzelését arról, hogy a plasztiszok „idegen mikroorganizmusok”, cianobaktériumok a növényi sejtben, melyek a sejtfejlődés korai stádiumában kerültek be a heterotróf táplálkozású sejt belsejébe, és ott szimbiózisba kerülve együtt evolválódtak a növényi sejtrel. A növényi sejtek szerinte olyan állati sejtek, melyeket megszálltak a cianobaktériumok. Ebből az elképzelésből fejlődött ki az endoszimbióta elmélet.



A plasztiszok, és különböző élőlények endoszimbiozissal történt kialakulása

A plasztiszok tehát valamikor élt cianobaktériumok leszármazottai. Az endoszimbiozis eredményeként a sok millió év alatt az egykori endoszimbionták elvesztették önállóságukat, a sejt felügyelete alá kerültek és sejtorganelumokká váltak. Az endoszimbiozis első lépéseként egy eukarióta sejt bekebelezte a cianobaktériumot és az a sejtben élve szaporodott, fotoszintetizált. Génjeinek nagy része átkerült a sejtmagba. Eredeti, 4–5000Kb méretű DNS-ük kb. 200Kb-ra csökkent, és mintegy 120 gént tartalmaz. A sejtmagba átkerült gének száma mintegy 800. Az elsődleges szimbiozis eredményeként létrejött élőlények három csoportját ismerjük: *Glaukofiták*, vörös moszatok és zöld moszatok. A *Glaukofiták* kis csoportjában található plasztisz hasonlít talán leginkább a cianobaktériumra. A plasztisz két membránja között megtalálható a cianobaktériumokra jellemző sejtfal. A plasztiszban csak klorofill a, és fikobilinok találhatók, a keményítő a plasztiszon kívül raktározódik. A vörös és zöld algák plasztiszai nem rendelkeznek fallal a két membrán között. A két membrán eredetéről nincs egyértelmű tudásunk. Mivel a cianobaktériumnak eleve két membránja és közöttük sejtfala volt, a bekebelező membránnal együtt az elsődleges szimbionta plasztisznak három membránja kellene, hogy legyen. Valószínűleg a bekebelező membrán korán eltűnt, de a plasztisz külső membránjának összetétele alapján az vegyes (prokarióta és eukarióta) eredetűnek tekinthető. Benne eukarióta foszfatidilkolin és prokarióta galaktolipidek is megtalálhatók. A zöldmoszatokból származtathatók a szárazföldi növények, tehát plasztiszuk, bár sokféle megjelenésűek, ennek a valamikori cianobaktériumnak a maradványai.

Az elsődleges szimbionták újabb bekebelezés áldozataivá váltak, így újabb élőlények alakultak ki. Mind a zöldmoszatok, mind a vörösmoszatok ágán találunk másodlagos szimbiozissal kialakult élőlényeket. A zöldmoszat bekebelezésével alakult ki a *Chlorarachniophyta* csoport és az *Euglenák*. A *Chlorarachniophyták* esetében a bekebelező eukariótában élő elsődleges szimbionta megőrizte sejtmagjának maradványait is, ez az ún. nukleomorf. Ezeknek a plasztiszoknak négy membránja van, belülről kifelé haladva kettő az eredeti plasztiszé, egy az elsődleges bekebelező eukariótáé, és egy a másodlagos bekebelező eukarióta bekebelező membránja. Az eredeti sejtmag maradványa tehát a második és harmadik membrán között található. Az eredeti sejtől gyakorlatilag más nem maradt meg. Az *Euglenák* esetében csak 3 membránja van a plasztisznak, mivel a bekebelező membrán és az elsődleges endoszimbionta sejtmembránja valószínűleg egybeolvadt. Nukleomorf sem található a plasztiszban. Az euglén a plasztiszvizsgálatok egyik kedvelt kísérleti alanya, mivel a sejt elviseli a plasztisz elvesztését és képes heterotróf táplálkozásra áttérni. Természetesen az elvesztett, vagy kiírtott plasztiszt sohasem tudja regenerálni.

A vörösmoszatok vonalán a másodlagos endoszimbiózis eredményeként nagyon különböző csoportok jöttek létre. Az egyik csoport a *Chromisták*, ide tartoznak a *Heterokont* ostorosok (*Diatómák*, barnamoszatok, *Oomycoták*), a *Haptophyták*, és a *Cryptomonadok* (*Cryptophyták*). Mindegyikük négy membránnal burkolt plasztisszal rendelkezik, de a nukleomorf csak a *Cryptomonadok*nál maradt meg, amit cryptonucleusznak neveznek. A másik ágon az *Alveolata* csoport tagjai találhatók. A *Dinoflagelláták* három membránnal burkolt plasztisszal rendelkeznek, fotoszintetizálnak és sok közülük egyben heterotróf módon is táplálkozik (mixotrófok). A *Csillósok* csoportja nem rendelkezik plasztisszal ami magyarázható a plasztisz elvesztésével, de a *Chromalveolata* csoport egységes származásának megkérdőjelezésével is. Akik plasztisz tartalmú őseiktől vezetik le a *Ciliata* csoportot, igazolást találtak az újabban megjelent cikkekben, miszerint a plasztisz gének „lábnyomaira” bukkantak a csillósok magjában. Mivel azonban a csillósok között is vannak fotoszintetizáló organizmusokat bekebelező fajok, illetve más források is elképzelhetők, többen felvetik a horizontális géntranszfer lehetőségét. A harmadik *Alveolata* csoport az *Apicomplexa*. Ebben a csoportban kizárólag parazita organizmusok találhatók, mint például a malária, vagy a babesia kórokozója. Jellemzőjük egy apicoplastnak nevezett, nem fotoszintetizáló plasztisz, melyet három, vagy négy membrán burkol. A plasztisz a sejt számára fontos anyagokat állít elő, gyakorlatilag nélkülözhetetlen, és feltételezhetően másodlagos endoszimbiózis eredményeként került a sejtbe. Az endoszimbiózis újabb harmadlagos szintjét is ismerjük, melyben a *Dinoflagelláták* bekebeleznek be elsődleges, vagy másodlagos szimbiontákat. Mind zöldalgákkal, mind a *Chromisták* csoportjaival alkotnak szimbiózist.

Mai endoszimbionta példák

Bár sokáig úgy gondolták, hogy az endoszimbiózis egy egyedi folyamat volt, ami csak igen ritkán történhet meg, egy különleges élőlény a *Paulinella chromatofora* rációfolni látszik erre a paradigmára. A *Paulinella* egy amőba, melyben kloroplasztiszként működő cianobaktériumok élnek szimbiózisban. Ez a szimbiózis jóval fiatalabb mint a már ismert elsődleges szimbiózis. A *Paulinella* sejtmagjában eddig mintegy 30 plasztisz eredetű gént sikerült azonosítani, és a cianobaktérium elvesztette génjeinek mentegy 75%-át. Amiért annyira különleges ez az élőlény az abból ered, hogy az eddigi elképzelések szerint a cianobaktériumból a sejtmagba történő géntanszfer, és az ezzel összefüggő plasztiszba irányuló fehérjetranszport az eddigi elképzelések szerint rendkívül összetett folyamat, és csak lassan, fokozatosan alakulhatott ki. Ez az élőlény esetleg megadhatja a kulcsot ehhez a rejtélyhez. A *Paulinella* esetében a plasztiszba irányuló fehérjetranszport a növényekkel ellentétben a szekréciós mechanizmuson (ER, Golgi) keresztül vezikulárisan történik. Több olyan élőlényt is ismerünk, amelyik valamilyen mértékű szimbiózisban él cianobaktériumokkal, vagy más fotoszintetizáló élőlényekkel, de ezekben a szimbiózis nem jelenti a cianobaktérium állandósulását a sejtben. Ismertek tengeri csigák (pl. *Elysia chlorotica*) melyek algákkal táplálkoznak, de az algák plasztiszait érintetlenül hagyva, azokat speciális sejtekbe szállítják. Itt a plasztiszok hónapokon keresztül is képesek fotoszintetizálni, és energiával ellátni a gazdaszervezetet. Hasonló plasztiszlopást megfigyeltek a *Csillósok* (*Myrionecta rubra*) és az egyébként heterotróf módon élő *Dynoflagelláták* (*Pfisteria piscicida*) esetében is. E két utóbbi csoport esetén ez kevésbé meglepő, hiszen plasztiszt tartalmazó ősekkel rendelkeznek.

Plasztisz–mag géntanszfer

A cianobaktériumok endoszimbiontaként való stabilizálódása a bekebelező és az endoszimbionta közötti információ- és anyagáramlás pontos szabályozását követelte. Valószínűleg ennek a stabilizálásnak fontos lépése volt a cianobaktérium génjeinek átjutása a sejtmagba. A géntanszfer a sejtmagba viszonylag egyszerűen végbemehet, ilyen kísérleteket a maternálisan öröklődő plasztiszgenom alapján a spermasejt degradálódó plasztiszában jelenlévő, és a magba átjutó rezisztenciagének segítségével sikeresen, és viszonylag nagy gyakoriságot kimutatva végeztek. A probléma elsősorban a prokarióta és az eukarióta génszabályozás különbségében rejlik. A prokarióta gén a sejtmag DNS állományába beépülve még nem lesz működőképes. Mindezekon túl, még kódolni kell a géntermékeknek a plasztiszba történő bejutását biztosító szekvenciákat is, hiszen az eredeti géntermék helyben készült, míg a sejtmagba átkerült gén termékét két, három, vagy négy membránon is át kell juttatni. Egyelőre nem tudjuk, hogy ez a szerveződés hogyan alakult ki.

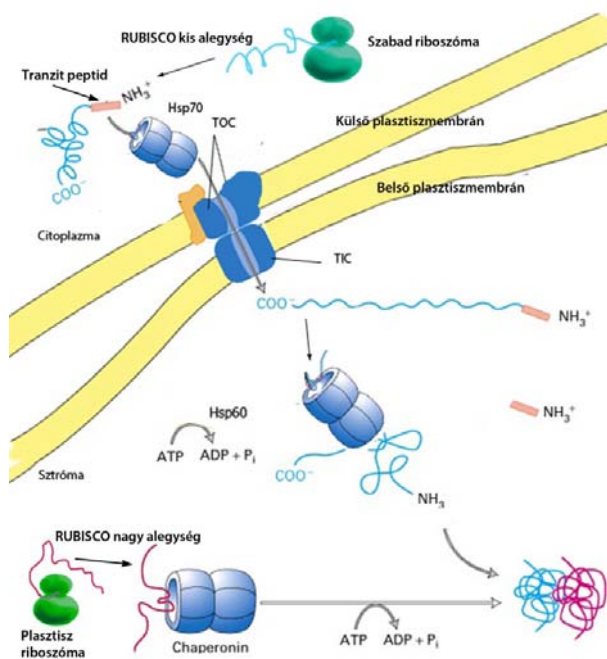
Különösen érdekesek ebből a szempontból a másodlagos szimbiózissal kialakult élőlények. Ezek jelentős részénél az elsődleges bekebelező sejtmagjából a gének teljes mértékben átkerültek a másodlagos bekebelező sejtmagjába, de a Chlorarachniophyták és Cryptomonadok (Cryptophyták) esetében az elsődleges gazdasajt sejtmagja bizonyos mértékben fennmaradt. Ez a nukleomorf a Chryptomonadok esetében még működő géneket tartalmaz, és körülötte megmaradt a citoplazma egy része is, 80 S riboszómákkal, és működő fehérjeszintézissel. Ily módon az eredeti

cianobaktérium genom jelentősen átalakítva három helyen lokalizálódik, melyeknek együtt kell működni, és a géntermékeket célba kell juttatni.

A csillósok esetében annak ellenére, hogy a legtöbben plasztiszt tartalmazó ősökre vezetik vissza őket, a plasztisznak, illetve az elsődleges bekebelezőnek nyoma sem maradt. A legújabb genetikai analízisek azonban több (16) plasztisz specifikus gén nyomát fedezték fel a sejtmagban. Még nem eldöntött kérdés, hogy ezek egy tényleges plasztisz lábnyomai, vagy esetleg horizontális géntranszferrel kerültek be a sejtmagba.

Fehérje transzport a plasztiszba (targeting)

A növényi sejtek esetében a plasztisz számára készülő fehérjék jelentős része a sejtmagban kódolt, és csak egy kisebb része magában a plasztiszban. A legismertebb példa a Rubisco enzim, melynek kisebbik alegységének a génje a magban, a nagyobbiké a plasztiszban található. A sejtmagban kódolt fehérjék szintézise a citoplazmában, szabad riboszómákon történik. A fehérjék célbajuttatása végett, az N-terminális végen tranzit peptid szakasz található. A tranzit peptid biztosítja, hogy a fehérje átjusson a plasztisz két membránján. A fehérjéket chaperonok (Hsp 70) transzportra alkalmas formába hozzák, majd a fehérjék kapcsolódnak a plasztisz külső membránján kialakuló transzlokonhoz. Ez a TOC (translocon of the outer chloroplast membrane), míg a belső membránban egy hasonló transzlokon, a TIC (translocon of the inner chloroplast membrane) szerveződik. A két transzlokon összekapcsolódik, és a fehérje egyszerre jut át a két membránon. A sztrómában levágódik a tranzit peptid szakasz, majd chaperonok segítségével (Hsp 60) helyreáll a fehérje konformációja. Amennyiben a fehérjének még a tilakoid membránon is át kell jutnia, egy másik tranzit peptid szakasszal is rendelkezik az első után. Az ilyen fehérjékről a sztrómába kerülve az első tranzit peptid levágódik és így exponálódik a második tranzit peptid, ami a külső membránokon való átjutáshoz hasonlóan biztosítja a tilakoid membránon történő átjutást. A plasztisz membránjaiban található transzportáló fehérjék részben a cianobaktérium szekréciós rendszerének elemeiből alakultak ki.



A citoplazmában szintetizált fehérjék bejuttatása a plasztiszba.

A magban kódolt fehérjék transzportja a másodlagos szimbionták esetében különösen bonyolult és még eléggé ismeretlen folyamat. Az elsődleges szimbionta eukarióta magból a gének teljes egészében, vagy nagy részben átkerültek a másodlagos bekebelező eukarióta sejtmagjába. Ezzel együtt új transzport feladatokat is meg kellett oldani, hiszen a termelt fehérjének most három, vagy négy membránon keresztül kell eljutni a plasztisz belső sztróma állományáig. A transzportmechanizmusok a membránok száma és azok típusa szerint különböző, bár a pontos részletek még nem tisztázottak.

A komplex plasztisszal rendelkező, másodlagos szimbiozissal létrejött élőlények esetében a sejtmagban kódolt plasztiszfehérjék célba juttatása bonyolult feladat, hiszen három, vagy négy membránon kell a fehérjének átjutnia ahhoz, hogy a plasztisz belsejébe kerüljön. A két belső membránon történő átjutás nagy vonalakban minden másodlagos szimbiontánál megegyezik az elsődleges plasztiszéval, tehát tranzit peptid szekvenciák révén transzlokonokon keresztül történik. A bonyodalmat a további membrán illetve membránok okozzák.

A három membránnal rendelkező euglénák, és a dinoflagelláták esetében, annak ellenére, hogy eltérő származásúak, hiszen az egyik a zöldalga, míg a másik vörösmoszat bekebelezésével alakult ki, viszonylag hasonló a fehérjék célba juttatásának módja. A harmadik membrán tulajdonképpen a másodlagos bekebelező vakuoláris membránjának tekinthető, vagy esetleg kevert származású. Két fő hipotézis létezik a harmadik membrán származását illetően. Az egyik szerint a másodlagos gazdaszervezet olyan táplálkozást folytatott, hogy nem bekebelezte be áldozatát, hanem meglekelve annak membránját csak a benne levő anyagokat szívta ki, és emésztette meg. Ebben az esetben az elsődleges eukarióta gazdasejt membránja nem is került be a sejtbe. A másik elképzelés szerint ugyanúgy, ahogyan az elsődleges szimbiozis esetében is történt, a bekebelező membrán, és a bekebelezett külső membránja egyesült. Mivel itt mindkét membrán eukarióta membrán, az eredet felderítése nem olyan egyszerű, mint az elsődleges endoszimbiozis esetében. A magba átkerült gének egy erősen hidrofób szignál szekvenciát kódolnak, így a fehérjék szintézise a durvafelszínű endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolódó riboszómákon történik. A tranzit peptid szakasz után a fehérjék jelentős részénél még egy stop transfer funkciójú hidrofób szakasz is következik, ami meggátolja a fehérjék transzlokálódását az ER lumenébe. A tranzit peptid tehát belóg a lumenbe, de a tényleges fehérje a citoplazmában helyezkedik el, az ER membránjához kihorgonyozva. A fehérjék vezikuláris transzporttal, a Golgi-készüléken keresztül jutnak el a plasztisz külső membránjához (PPM-periplasztidális membrán). A membránfúzió eredményeként a fehérjék a PPM-be kerülnek, és tranzit peptid részük belóg a periplasztidális térbe. Itt receptor fehérjék felismerik őket, majd transzlokon, és transzportáló fehérjék révén bejutnak a plasztiszba.

A négy membránnal körülvett plasztiszok esetében meg kell különböztetnünk a CER-el (chloroplast endoplasmatic reticulum) rendelkező chromistákat az Apicomplexától, valamint a zöldalga tartalmú Chlorarachnophytától, melyeknél a CER nem alakult ki. A helyzetet a nukleomorf megléte tovább bonyolítja.

A CER-el rendelkező csoportok esetén az endoplazmatikus retikulum a két külső membránnal folytonos, és a plasztiszok legkülső membránján riboszómák találhatók. Itt történik a plasztiszfehérjék transzlációja. A fehérjéken itt is tranzit peptid szakasz található a két belső membránon való átjutáshoz. A Chyriophytáknál fedezték fel azt, hogy a szintetizált fehérjék a két külső membrán közötti térből (CER lumene) hogyan jutnak ki a plasztisz irányába. Annak ellenére, hogy ER a PPC-ben (periplasztidális kompartment), vagyis az eredeti eukarióta maradvány citoplazmájában nem található, a nukleomorf kódol ERAD (endoplazmatikus retikulum asszociált degradáció) fehérjéket, és ezeket meg is szintetizálja az itt levő riboszómákon. Ezek a fehérjék eredetileg arra szolgálnak, hogy a hibás szerkezetű fehérjéket kijuttassák az endoplazmatikus retikulumból a citoplazmába, ahol a proteaszóma rendszer degradálja őket. Ezek a fehérjék most a plasztiszba szánt fehérjék PPC-be juttatását végzik. A PPC-ből a már ismert transzlokon általi transzporttal jutnak be a plasztisz belsejébe. (A nukleomorf nélküli CER-el burkolt csoportoknál a sejtmagba vándoroltak az ERAD gének, ahol így duplikálva találhatók meg.)

Fotoszintézis

A fotoszintézis során a kloroplasztiszok megkötik a fény energiáját. Az energia

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

Egy mólnyi 490 nm-es foton energiája tehát 240 kJ, míg egy mól 700 nm-es fotoné 170 kJ. A fényenergiát végső soron széndioxid fixálására használják fel. Egy mólnyi CO₂ fixálásához 2840 kJ energia kell. A fotoszintézis egy biológiai redox folyamatnak tekinthető, ahol a CO₂ az elektronfelvevő, (vagyis redukálódik) és a H₂O, vagy H₂S az elektrondonor (vagyis oxidálódik). Az eredmény CH₂O szénhidrát.



illetve



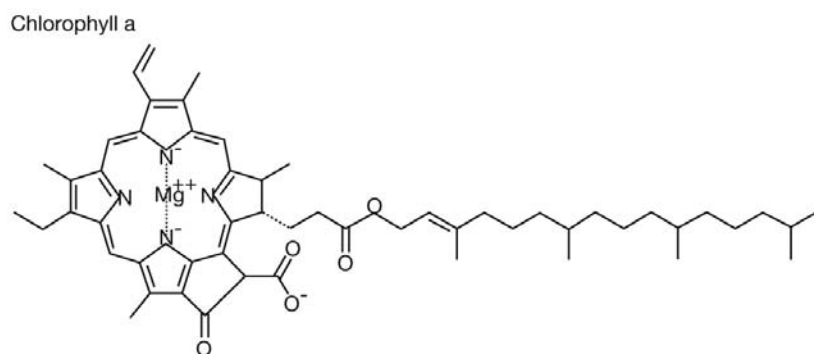
Az első egyenlet az oxigéntermelő fotoszintetizáló élőlényekre (növények, algák, cianobaktériumok), míg a második egyenlet az anoxigenikus fotoszintetizáló baktériumokra (pl. kén-bíbor baktériumok) jellemző. Bár ez utóbbiak mind evolúciós, mind kísérleti szempontból fontos élőlények, mi a továbbiakban a növények fotoszintetikus folyamatait tárgyaljuk.

Bár a fotoszintézis nettó egyenlete egyszerű, a folyamat számos részreakció eredményeképpen alakul ki. A fotoszintézist alapvetően két szakaszra lehet osztani, egy fényfüggő fényszakaszra, és egy fénytől független sötétszakaszra. (Megjegyzendő, hogy a sötétszakasz fényben és sötétben egyaránt végbemehet.) A fényszakaszban a fényenergia felhasználásával a kloroplasztiszok oxidálják a vizet, és így oxigén, valamint NADPH és ATP keletkezik. A sötétszakaszban, vagy Calvin ciklusban a széndioxid redukciója történik szénhidrátokká, és ehhez a fényszakaszban termelődött NADPH és ATP használdik fel. A fényszakasz a kloroplasztiszok tilakoid membránjaihoz kötött folyamat, míg a Calvin ciklus a sztrómában zajlik.

A fotoszintézis fényszakasza

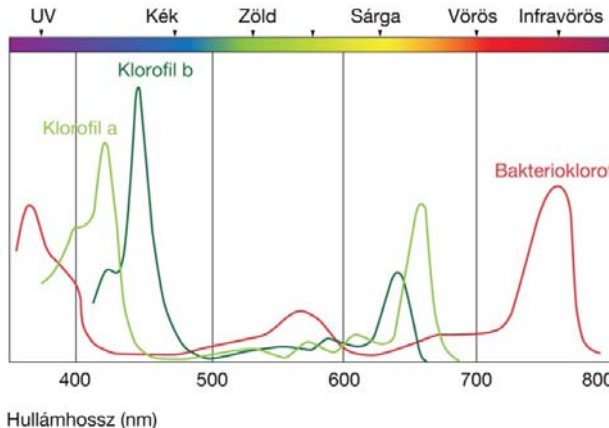
A fényszakasz során a vízből nyert elektron egy membránban elhelyezkedő elektrontranszportláncon szállítódik, majd a szintén vízből származó proton felhasználásával NADP redukálására, vagyis NADPH előállítására használdik fel. A folyamat során protonok koncentrálnak a tilakoidok lumenében, melyek a potenciálgrádiensnek megfelelően a lumenből az ATP-szintetáz enzimen keresztül kijutva $\text{ADP} + \text{P} \rightarrow \text{ATP}$ átalakuláshoz szolgáltatnak energiát. Az egész folyamat energiafedezetét az a fényenergia szolgál, melyet a tilakoid membránokban elhelyezkedő két fotorendszer (PSI és PSII) pigmentjei nyelnek el.

A fényabszorpció során a pigmentek aktiválódnak, elektronjaik magasabb energiaszintre kerülnek. A gerjesztett elektron alapállapotba való visszajutása során kibocsáthat hőt és fényt (fluoreszcencia), de közvetlenül is átadhatja energiáját egy hozzá közel elhelyezkedő másik molekulának. Ennek feltétele az igen szoros kapcsolaton kívül, hogy a kibocsájtott energia a másik molekula gerjesztési energiájának feleljen meg. (Másképp fogalmazva, a molekula által kibocsájtott emissziós (fluoreszcens) fény a másik molekula abszorpciós tartományába essen.) Ilyenkor nincs fluoreszcencia, az energia közvetlenül jut át a másik molekulára. Ez a folyamat a pigmentekből álló antennarendszerben biztosítja a külsőbb pigmentektől a központiak felé történő energiaáramlást. A pigment gerjesztett elektronja fotokémiai reakcióba is léphet egy másik anyaggal, nagy energiájú elektronját annak átadva maga oxidálódik, míg a másik anyag redukálódik. Ez a folyamat játszódik le a pigmentrendszerek központjában.



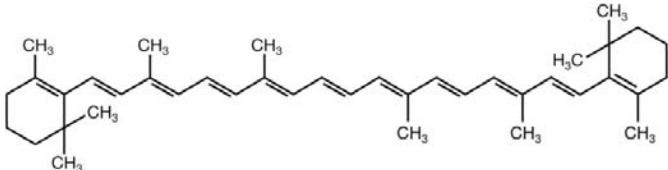
Klorofill a molekula szerkezete

A klorofill az egyik legfontosabb pigment a kloroplasztiszokban. Szinte minden fotoszintetizáló organizmusban megtalálható valamilyen formája. A klorofill egy feji porfirin (tetrapirrol) gyűrűből, és egy ahhoz kapcsolódó hosszú szénláncú (20 C atomos) hidrofób fitol farokrészből áll. A porfirin gyűrű nagyon hasonló a hemoglobin hem részéhez, de belsejében Mg^{++} ion található. A növényekben klorofill a és b található, a fotorendszer központjában a klorofill a helyezkedik el, míg az antennarendszerben mindkettő megtalálható. A klorofill zöld színét az adja, hogy elnyeli a kék és vörös hullámhosszú fényt, de a zöldet nem.

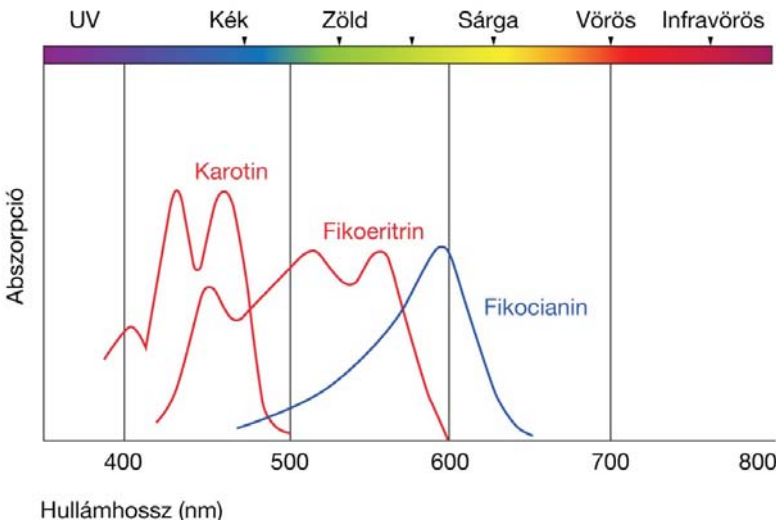


Klorofillok abszorpciós spektrumai

A másik legfontosabb pigmentcsoport a karotinoidok. Tetraterpének, melyek nyolc izoprén egységből épülnek fel. A 40 C atomos lánc konjugált kettőskötéseket tartalmaz. A karotinoidok a klorofill által nem hasznosított 400-500 nm-es hullámhossztartományban nyelnek el, és az energiát a klorofill felé továbbítják. Színük ennek megfelelően sárgától a vörösig terjed. Fontos szerepük van abban is, hogy a klorofillok által felvett, de a fotoszintézisben fel nem használt energiát átveszik, így a reaktív oxigéngyökök képzését megakadályozzák. Ez különösen fontos a gerontoplasztizsá történő átalakulásban, ahol a fotoszintetikus elektrontranszport már szétesésben van, de a klorofill molekulák még jelen vannak, és gerjesztődnek. Ezért a karotinoidok később bomlanak le, mint a klorofillok. Ez az alapja a szép őszi lombszínéződésnek.



A béta-karotin szerkezeti képlete

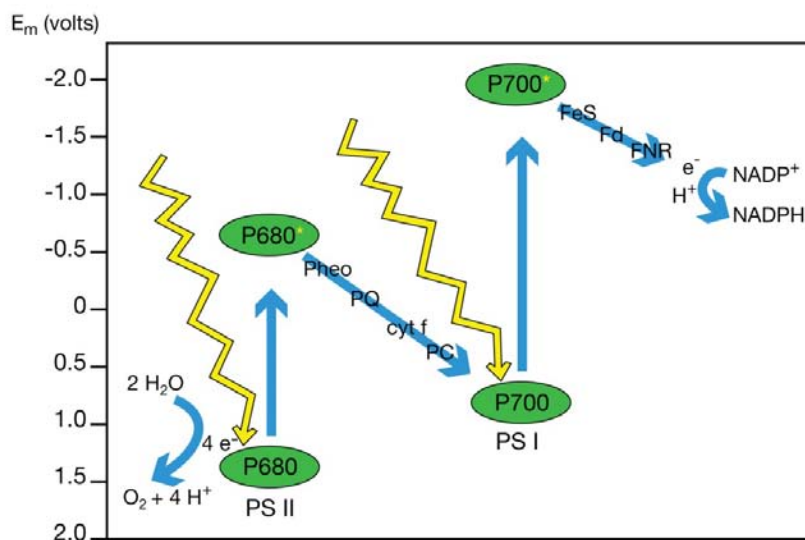


A karotin és fikobilinek abszorpciós spektruma.

A fikobilinek a cyanobaktériumok és vörösmoszatok jellemző pigmentjei, melyek az 500-650 nm-es tartományban nyelnek el. Jellegzetes fehérjékkel asszociálódott komplexeket, ún. fikobiliszómákat alkotnak. Lineáris tetrapirrol felépítésűek, de fém ion nem asszociálódik hozzájuk. A növényekben nincsenek.

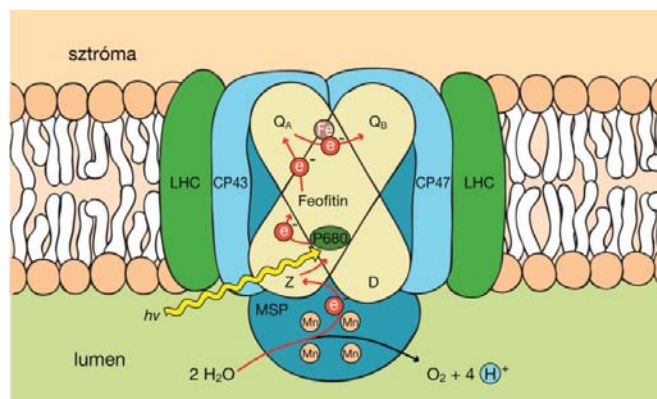
A nem oxigéntermelő fotoszintetikus organizmusokkal ellentétben az oxigént termelők nem egy, hanem két reakciócentrummal, fotorendszerrel rendelkeznek, amelyben a fotokémiai folyamat, azaz a fényenergia segítségével történő elektronleadás végbemegy. Ez a két centrum a folyamat sorrendjében a kettős fotorendszer (PS II) és az egyes fotorendszer (PS I). A fotorendszerekben a központi részhez fénygyűjtő antennarendszerek kapcsolódnak, melyek az abszorbeált energiát közvetlen energiaátadással a központ felé továbbítják. A klorofill a molekulák elektront adnak le az elektron akceptor molekuláknak. A gerjesztési hullámhossz szerint a PS II P680-as klorofill centruma feofitinnel (klorofillhoz hasonló Mg-ot nem tartalmazó pigment), míg a PS I P700-as klorofill reakció centruma egy másik klorofill a molekulának adja át gerjesztett elektronját. A PS II-ben az elektron ezután két plasztokinon molekulára (plasztokinon A, majd plasztokinon B) jut, a PS I-ben pedig először egy plasztokinonra, majd F_x nek jelölt Fe-S centrumra kerül. Mindkét fotorendszerben fehérjék kapcsolódnak mind a központi klorofill molekulákhoz, mind a fénygyűjtő antennapigmentekhez, speciális felépítésű pigment-protein rendszereket alkotva. A tilakoid membránok legnagyobb mennyiségben jelenlevő fehérjei a fénygyűjtő komplexek (LHC – light harvesting complex). Ezek a transzmembrán fehérjék 12 klorofill és 2 karotin molekulát kötnek meg és gyakran trimerizált formában fordulnak elő.

A fotorendszerek elektrontranszporter molekulákkal vannak összekötve egymással, vagyis a PS II-ből származó elektronok pótolják a PS I leadott elektronjait. A PS II a leadott elektronjait a vízbontásból pótolja. A PS I elektronjai pedig végül a NADPH képzésben használandók fel. A fotoszintézis elektrontranszportjának ez az ún. Z sémája, mivel a redox potenciálnak megfelelően felrajzolt elektrontranszfer egy eldöntött Z betűre emlékeztet. A fény hatására a PS II egy erős oxidánsból (elektron elvonóból) egy gyenge redukánssá (elektron leadó) válik, ami, elektronegatívabb révén, elektront ad le az oxidánsként működő egyes fotorendszernek. Fény hatására az egyes fotorendszer válik elektronegatívvá és redukálja (elektront ad át) a $NADP^+$ -t.



A fotoszintézis ún. Z-sémája az elektrokémiai potenciál függvényében.

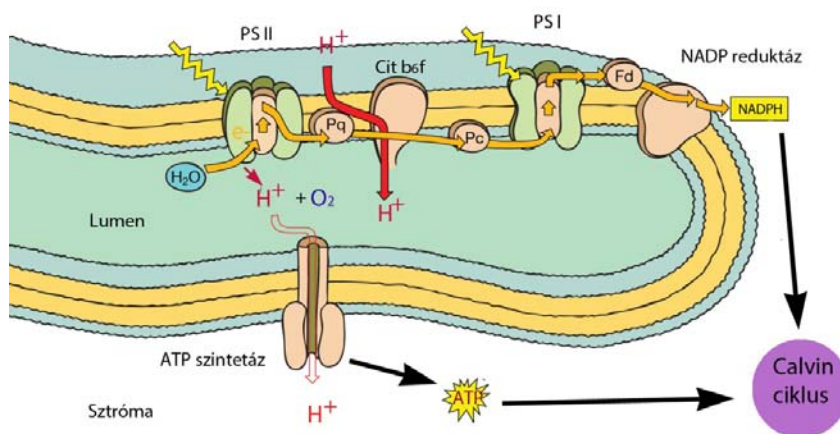
A PS II tehát egy integráns membrán komplex, mely áll egy P680 reakciócentrumból, pigmentekből, pigmentkötő fehérjékből, a víz oxidálásában résztvevő fehérjékből, feofitinnél, plasztokinonból stb. Fény hatására gerjesztődve a reakciócentrum elektront ad át a plasztokinonnak. A hiányzó elektronokat a PS II a víz bontásából származó elektronokkal pótolja. A PS II ennek megfelelően egy víz-plasztokinon oxidoreduktázként működik. A víz bontásából a lumenben oxigén, proton (H^+) és elektron keletkezik, mely utóbbi a reakciócentrum leadott elektronját pótolja. Az oxigén (O_2) átdiffundál a membránon, és végül a légkörbe jut. A protonok a lumen belsejében halmozódnak, míg az ATP szintetáz enzimén keresztül, ATP szintézissel egybekapcsolt transzporttal ki nem jutnak a sztrómába.



A II. fotorendszer felépítése (PS II).

Az elektronok a plasztokinonról (PQ) a citokróm b_6f komplexre kerülnek tovább, miközben természetesen energiaszintjük folyamatosan csökken. A cit b_6f komplex a plasztokinonnal együttműködve egy saját elektronicirkulációt valósít meg, amit Q ciklusnak is neveznek. Ennek során az elektronok részben visszajutnak a plasztokinonra, ami a sztrómából protonokat felvéve PQH₂-vé alakul. A protonokat a sztrómából a tilakoid lumenébe transzportálva ismét leadja két elektronját, és plasztokinonná alakul vissza. A folyamatban fontos szerepet játszik a komplex egyik vas és kén tartalmú fehérjéje a Rieske Fe-S protein. A ciklus hajtóereje az a többlet elektronáramlás ami a PQ és a citokróm b_6f komplex között végbemegy. Az elektronok a citokróm b_6f komplexről a plasztocianinra kerülnek. A plasztocianin a tilakoid lumen felőli oldalán található viszonylag kis méretű (11 kD), réz tartalmú szolubilis fehérje, mely a membrán belső felszínén gyors mozgásra képes. Ez a fehérje az elektront felvéve elmegy a PS I komplexhez és ott az elektront annak átadja. Mivel a PS II elsősorban a gránum tilakoidok területén található, míg a PS I a sztróma tilakoidokban, a plasztocianinnak viszonylag nagy utat kell megtennie. Az elektron leadása után az oxidálódott plasztocianin visszajut a citokróm b_6f komplexhez az újabb elektronszállítmányért.

A PS I hasonló felépítésű komplex, mint a PS II. A PS I a fény abszorpciójának segítségével elektront ad át a sztróma oldalon található szolubilis Fe-S proteinnek, a ferredoxinnak. A PS I tehát egy fényfüggő plasztocianin-ferredoxin oxidoreduktáznak tekinthető. A PS I reakciócentrumából (P700) az elektron több saját transzportertermolekulán át juttatja az elektront a ferredoxinra. A ferredoxin redukált formája a ferredoxin NADP⁺ reduktáz molekulához kapcsolódva biztosítja a redukálóerőt (-420 mV potenciálú elektront) a NADP⁺ + H⁺ → NADPH átalakuláshoz.



A fotoszintetikus elektrontranszport a tilakoid membránban.

A lumenben protonok halmozódnak fel a fényszakasz működése során. Ezek egy része közvetlenül a víz bontásából származik, másik része pedig a plasztokinon-citokróm b_6f komplex együttműködésével a sztrómából a lumenbe transzportált proton. A lumen pH-ja egyre savasabbá válik, a proton koncentráció különbsége a sztróma és a lumen között pedig egyre nő. Ez a koncentrációkülönbség a hajtóereje az ADP + P → ATP reakciónak, melyet az ATP-szintetáz komplex katalizál. Egy molekula ATP szintéziséhez az ATP-szintetáz komplex csatornáján négy protonnak

kell áthaladnia. A folyamat igen hasonló a mitokondriumokban végbemenő ATP szintézishez. Ezt, a proton kémiai potenciálkülönbségéből származó energiát ATP szintézisre felhasználó folyamatot leíró elméletet hívjuk kemiozmotikus hipotézisnek.

Ciklikus fotofoszforiláció

A növények képesek ATP előállítására a PS II működése, azaz vízbontás nélkül is. Ennek az a lényege, hogy a PS I fényelnyelése révén nyert energiával az elektront cirkuláltatják, miközben protont pumpálnak a lumenbe. A ferredoxin redukciója után az elektront (és a protont) nem a NADPH előállítására használják fel, hanem a ferredoxin azt a ferredoxin-plasztokinon oxidoreduktáznak adja át. Innen az elektron a plasztokinonra kerül, és az a sztrómából protonokat pumpál a lumenbe. A folyamat innentől a megismert módon folyik tovább, vagyis a protongrádiens kárára ATP szintetizálódik. Az elektron visszakerül a ferredoxinra, és a folyamat kezdődik előlről. Ez a ciklikus fotofoszforiláció, melynek során természetesen NADPH nem keletkezik.

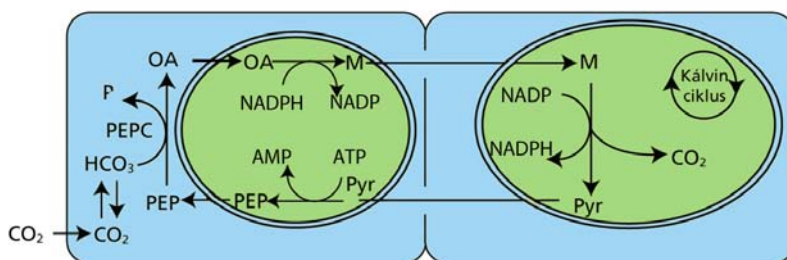
Calvin-ciklus

A fotoszintézis fényszakasza által termelt NADPH és ATP a sötétszakaszban a CO_2 fixálására és ezzel cukrok szintézisére használatos. A folyamathoz már nincs szükség fényenergiára ezért kapta a kissé megtévesztő sötétszakasz elnevezést. A folyamat a plasztisz sztróma állományában megy végbe. Az 1950-es években Melvin Calvin, Andrew Benson, és James A. Bassham fedezte fel, innen kapta a Calvin-ciklus elnevezést. $^{14}\text{CO}_2$ -t juttattak be fotoszintetizáló zöldalgákba, és sűrű mintavétellel vizsgálták a keletkezett radioaktív termékeket. Az első radioaktív termék a 3-foszfoglicerinsav (3-PGA) volt, de nem három, csak egy 14-es C izotópot tartalmazott. A ciklus lépéseit mára már részletesen felderítették. A folyamat kulcsenzime a ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz/oxigenáz, közismertebb nevén a Rubisco. Ez az enzim 8 kis és 8 nagy alegységből épül fel. A kis alegységet a sejtmag kódolja, és a citoplazmában szintetizálódik, míg a nagy alegység a plasztiszban kódolt, és ott szintetizálódik. A Rubisco a föld legnagyobb mennyiségben előállított fehérjéje, a plasztiszok sztrómaállományának mintegy felét teszi ki. Szubsztrátja a ribulóz 1,5 bifoszfát, ami egy öt szénatomos cukor. A Rubisco enzim ezt egy széndioxid felhasználásával karboxilálja, de a keletkező 6 C-atomos cukor szétesik két 3-foszfoglicerinsavra (3-PGA). A folyamat sok lépést követően zárt ciklussá válik, melyben 3 CO_2 fixálása eredményez nettó egy 3 szénatomos cukrot (3-PGA). A ciklusban 13 enzim vesz részt, 3 ATP és 2 NADPH használatos fel, míg a ciklus során a ribulóz-1,5-bifoszfát újratermelődik. Mivel a folyamat első terméke egy 3 C-atomos cukor, a széndioxid fixálás ezen módját C_3 -as útnak, az ezt kivitelező növényeket C_3 -as növényeknek is nevezik. A szénhidrátok szintézise révén trióz foszfátok, abból hexóz foszfátok keletkeznek, végül keményítő formájában raktározódnak a kloroplasztiszban. Innen glükózzá lebontva kerülnek a citoplazmába, majd szacharózként szállítódhatnak el más sejtekhez a floémén keresztül.

C_4 -es szénasszimilációs út

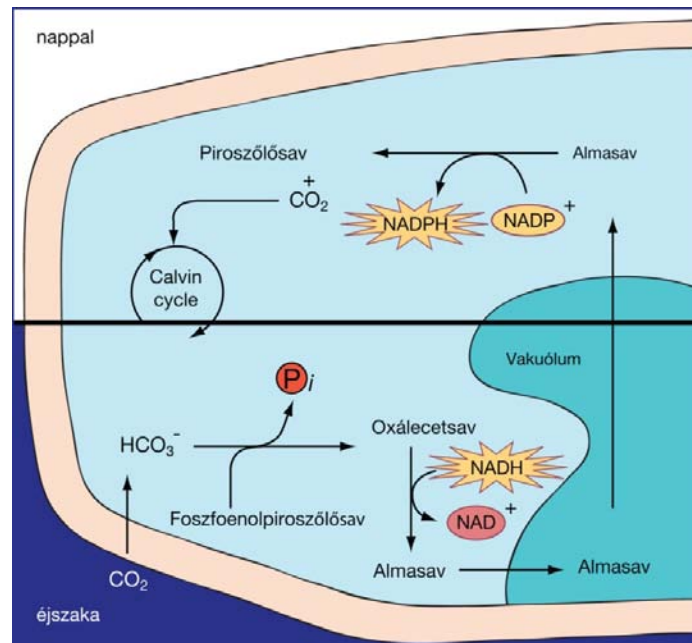
A Rubisco enzim nevében benne van, hogy karboxiláz, és oxigenáz is egyben. A Rubisco a ribulóz 1,5 bifoszfát molekulát oxidálni is tudja oxigén felhasználásával, aminek eredményeképpen egy PGA és egy két szénatomos molekula, a foszfoglikolsav keletkezik. A Rubisco oxigenáz képessége még az obligát anaerob baktériumok esetében is megvan, amiből azt a következtetést vonták le sokan, hogy az enzim még az anaerob légköri viszonyok során alakult ki. Az oxigén és a széndioxid az enzim azonos részéhez kapcsolódik, tehát vetélkedés folyik közöttük. Normál légköri viszonyok mellett a karboxiláció mintegy háromszoros sebességgel folyik az oxigenációhoz képest, ami azt jelenti, hogy a fixált széndioxid egy része mindenképpen elvész az oxigenáz funkció miatt. Ez a veszteség a széndioxid koncentrációjának csökkenésével rohamosan nő. Fontos kiemelni, hogy az enzim működése során a két folyamat egyensúlya az enzim közvetlen környezetében levő széndioxid koncentrációtól függ. Normál körülmények között a levélben működő kloroplasztiszok által elhasznált széndioxid a környező levegőből a gázcsere nyílásokon keresztül viszonylag gyorsan pótlódik. Amennyiben a levelek valamilyen oknál fogva nem nyitják ki a sztomáikat, a levél sejt közötti járataiban, és így a plasztiszokban is csökken a széndioxid koncentráció. A sztomák kinyitása a párologtatás növelésével jár, ezért vízhiány esetén a növény kénytelen gázcsere nyílásait zárva tartani, hogy a kiszáradást elkerülje. Ez viszont az oxigenáz folyamat felé tereli a Rubisco enzim működését, ami végső soron széndioxid keletkezéssel jár a széndioxid fixálás helyett (fotorespiráció). Egyes növények, főként a száraz körülményekhez alkalmazkodottak, kifejlesztettek egy széndioxid koncentrálására alkalmas módszert, melyet az első megkötött széndioxid molekulát tartalmazó négy szénatomos termékről (oxálecetsav) C_4 -es szénasszimilációs útnak neveztek el. A C_4 -es növények gyakran sajátos morfológiai bélyegekkel is rendelkeznek,

ami ennek a sajátos anyagcsere folyamatnak a megnyilvánulása. A legjellemzőbb ezek közül a Kranz (a német koszorú szóból) szindrómát mutató növények levélfelépítése és működése. Ezeknek a leveleiben kétféle fotoszintetizáló alapszövetet különíthetünk el, a nyalábok körül elhelyezkedő nyalábhüvely sejteket, és a körülöttük sugarasan elhelyezkedő mezofillum sejteket. Ilyen növény például a kukorica is. A kétféle sejten a plasztiszok is eltérő felépítésűek. A mezofillum sejtekben a plasztiszok gránumosak, de nem tartalmaznak keményítőt, míg a nyalábhüvely sejteinek plasztiszaiban a gránumok hiányoznak, de sok keményítőt tartalmaznak. Ez látszólag ellentmondás, hiszen a keményítő, illetve cukor szintézishez NADPH is kell, ami csak a vízbontással összekapcsolt fotoszintézis révén keletkezhet. A vízbontás viszont a PS II rendszerhez kötött, ami a gránumtilakoidokban található. Gránumok viszont nincsenek a nyalábhüvely plasztiszaiban. A mezofillum sejtekben vannak gránumos plasztiszok, de azokban nincs keményítő. A kétféle sejt, illetve az azokban található kétféle plasztisz együttműködése a magyarázat a látszólagos ellentmondásra. A mezofill sejtek kötik meg a széndioxidot, a plazmában levő foszfoenol piroszölősav karboxiláz (PEP karboxiláz) segítségével. A keletkezett négy szénatomszámú oxálcetsav a plasztiszokban NADPH felhasználásával almasavvá alakul, majd szimplasztikus úton szállítódva eljut a nyalábhüvely sejtekig. A nyalábhüvely sejtek plasztiszai az almasavat dekarboxilezik, így széndioxid és piroszölősav keletkezik. A dekarboxilezéssel együtt NADPH képződik. A piroszölősav szimplasztikusan visszajut a mezofill sejtek plasztiszaiba, ahol ATP felhasználásával foszfoenol piroszölősavvá alakul és a citoplazmába kerül, készen arra, hogy újabb széndioxidot vegyen fel. A mezofillum plasztiszai gránumosak, tehát mind NADPH-t, mind ATP-t képesek szintetizálni, vagyis az almasav előállításához szükséges redukáló erő, és a PEP előállításához szükséges ATP is megtermelődik bennük. A nyalábhüvely plasztiszaiban az almasav dekarboxilezésével a széndioxid koncentráció megemelkedik, ami a Rubisco enzim karboxiláz hajlamát erősíti. A Calvin ciklushoz szükséges NADPH pedig az almasav dekarboxilezése során termelődik. Az itt lévő plasztiszok PS II nélkül is képesek ATP-t előállítani a ciklikus fotofoszforiláció segítségével, így a Calvin ciklus zavartalanul működhet. A C_4 -es út tehát nem alternatív útvonala a C_3 -as széndioxid asszimilációnak, hanem annak egy kiegészítése. A C_4 -es út révén a levél sejtei képesek széndioxidot transzportálni a nyalábhüvelybe, ahol a C_3 -as széndioxid asszimiláció végbemegy. A széndioxid transzportálás révén a nyalábhüvelyben a széndioxid koncentráció magas lesz, így a Rubisco karboxilázként működik. A C_4 -es növények így nem kényszerülnek olyan gyakran kinyitni a sztómáikat, ezáltal csökkentik a párologtatást, és nem erősödik fel bennük a fotorespiráció sem.



A C_4 -es szénnasszimiláció.

A C_4 -es útnak az előbb leírtaktól némileg eltérő egyéb formái is léteznek. Egyik érdekes megoldása ennek a Crassulaceae típusú széndioxid asszimiláció. Ezekben a növényekben a C_4 -es és C_3 -as út nem térben, hanem időben különül el. Éjszaka, amikor a sztómák nyitása kevésbé jár együtt intenzív párologtatással, ezek a növények fixálják a széndioxidot, és almasav formájában a sejtendv vakuólumban raktározzák. Nappal bezárt gázcsere nyílások mellett az almasavból széndioxidot és piroszölősavat készítenek dekarboxilezéssel, és a széndioxidot a Calvin ciklus révén megkötik.

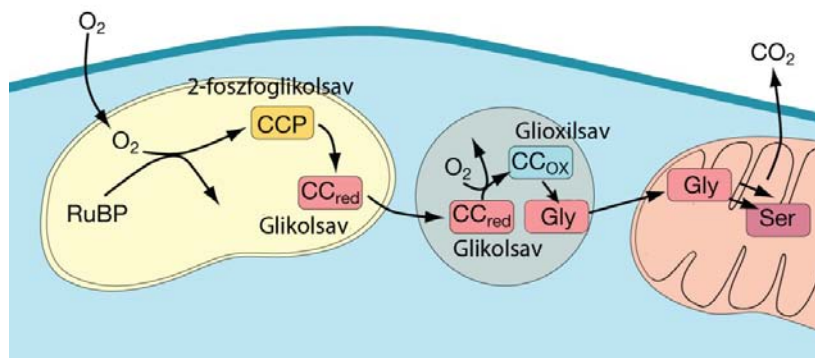


Crassulaceae típusú szénasszimiláció.

Fotorespirációs komplex

A Rubisco enzim oxigenáz aktivitása révén a széndioxid fixálása helyett a ribulóz 1,5-bifoszfátból 3-foszfoglicerinsavat, és két szénatomos 2-foszfoglikolsavat hoz létre. Ez a foszforizált két szénatomos molekula redukálódva glikolsavvá alakul, és átjut a kloroplasztisszal szomszédos peroxiszómába. Itt oxigénnel reakcióba lépve hidrogénperoxiddá és glioxilsavvá alakul. A hidrogénperoxidot a peroxiszóma kataláz enzime bontja, a glioxilsav pedig glicinné alakulva továbbkerül a mitokondriumba. Itt két glicin molekulából széndioxid kilépése mellett egy három szénatomos szerin molekula keletkezik, mely a peroxiszómába visszajutva hidroxipiroszölősavvá, majd glicerinsavvá alakul. A glicerinsav visszajut a kloroplasztisba, foszforilálódik, és 3-foszfoglicerinsavként belép a Calvin-ciklusba.

A fotorespirációban résztvevő három sejtorganelum szoros kapcsolata anatómiailag is megnyilvánul. Elektronmikroszkópos felvételeken gyakran találhatók szorosan egymás mellett. Ezt a képletet nevezzük fotorespirációs komplexnek.



A fotorespiráció vázlatos folyamata.

A Rubisco enzim oxigenáz tulajdonságának háttéréről keveset tudunk, de még az anaerob viszonyok között alakult ki. Mivel a légkör széndioxid koncentrációja a földtörténet során csökkent, oxigén koncentrációja viszont rohamosan emelkedett, a Rubisco enzim széndioxid fixálási hatékonysága fokozatosan romlott. A mai szárazföldi növények Rubisco enzime százszor nagyobb affinitást mutat a széndioxid, mint az oxigén irányába, de az alacsony (0,036%) széndioxid koncentráció miatt a karboxiláz-oxigenáz működés aránya kb. 3:1. Mivel két glicinből származik egy

széndioxid ezért kb. minden 6 megkötött széndioxidból 1 felszabadul a fotorespiráció révén. A baktériumok Robisco enzime még kevésbé hatékony, ezért sokan annak ellenére, hogy képesek lennének az oxigént tolerálni, nem tudnak aerob körülmények között élni, fotoszintetizálni. A hőmérséklet emelkedése a helyzetet tovább rontja, mivel a vízben oldott széndioxiddal és oxigénnel kell kalkulálnunk, és a széndioxid oldékonysága a hőmérséklet növelésével az oxigénnél gyorsabban csökken. A hatékonyság növelésének egyik útja a már bemutatott C₄-es fotoszintézis, vagyis a széndioxid koncentrálása a Calvin ciklusra specializálódott sejtek plasztiszaiba.

Kérdések

1. Mi az elektrondonor a fotoszintézis folyamatában?
2. Milyen sejttani jellegzetességek utalnak a plasztiszok prokarióta eredetére?
3. Milyen plasztisztípusok vannak?
4. Mekkora egy kloroplasztisz?
5. Milyen szerkezetű a kloroplasztisz belső membránrendszere?
6. Milyen élőlényből alakult ki a plasztisz?
7. Az elsődleges szimbiózis eredményeként milyen élőlények keletkeztek?
8. Milyen élőlénycsoportok alakultak ki a másodlagos szimbiózis által?
9. Mely csoportokban maradt meg a nukleomorf?
10. Milyen újabb endoszimbiózist ismerünk?
11. Mi a fotoszintézis nettó egyenlete?
12. Milyen két fő szakaszra osztható a fotoszintézis és ezek hol játszódnak le?
13. Hol történik a vízbontás?
14. A tilakoid melyik oldalán halmozódik a proton?
15. Melyik elektrontranszporter egység működik protonpumpaként is?
16. Mi az elektron végső felvevője a fényszakaszban?
17. Hol használódik fel a fényszakaszban termelt ATP és NADPH?
18. Miért nevezzük C₃-as szénasszimilációs útnak a Calvin-ciklust?
19. Mi a lényege a C₄-es fotoszintézisnek?
20. Mi a fotorespirációs komplex?

15. fejezet - A sejtváz

A mikrotubuláris váz

Az eukarióta sejt egyik jellegzetes szerkezeti eleme az intracelluláris váz, mely molekuláris összetevői alapján három komponensre bontható: a **mikrotubulusokra**, az **aktin hálózatra** és az **intermedier (köztes) fonalak** rendszerére.

A belső váz megjelenése az evolúció egyik fontos lépése volt, megnyitotta az utat a bonyolult felépítésű eukarióta sejtek kifejlődése és végső soron a soksejtűség kialakulása előtt. Korábban úgy vélték, hogy a prokariótáknak nincsen belső vázrendszerük. Azonban az utóbbi időben több baktériumban is találtak tubulin- illetve aktinszerű molekulákat, melyek polimerizációjával egyszerű szerkezetű belső váz alakulhat ki.

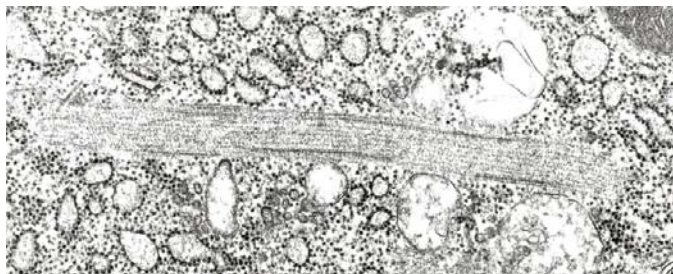
A háromféle váz funkciója részben átfedő, de emellett jellegzetes eltéréseket is mutat. Az intermedier filamentumok mechanikai szilárdságot kölcsönöznek a sejtnek. Az aktinváz fő funkciója az alak fenntartása, ill. a letapadást, az alak- és helyváltoztatást eredményező mozgásjelenségek generálása. A mikrotubulusok tartják fenn a sejt belső rendezettségét, a sejtmag és az organellek jellegzetes elhelyezkedését. 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**, ill. **ostoroknak** a vázát. 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.

Mind az aktin, mind a mikrotubuláris váz dinamikusan változó, állandóan átépülő hálózatot alkot.

A mikrotubulusok

A mikrotubulusok kb. 24 nm átmérőjű, változó – általában néhány mikron – hosszúságú csövek, melyek fala tubulinból áll. A tubulin két, egymáshoz hasonló, kb. 55 kDa tömegű polipeptidből, az α - és a β -tubulinból álló heterodimer. A sejtekben kimutatható egy harmadik tubulintípus, a γ -tubulin is, mely az ún. mikrotubuláris organizáló centrumokban – MTOC – lokalizálódik. Mind az α -, mind a β -tubulin képes egy-egy GTP-molekulát megkötni. A polimerizációs folyamatban a β -tubulinhoz kötött GTP GDP-vé és foszfáttá hidrolizál, az α -tubulinhoz kötött GTP azonban változatlan marad.

A polimerizáció során, mely *in vitro* is jól tanulmányozható, a tubulin-heterodimerek „fej-farok” orientációban (az egyik dimer α -alegysége a következő dimer β -alegységéhez kötődve) összekapcsolódnak és fonalszerű struktúrákba, protofilamentumokba szerveződnek. 13 protofilamentum laterálisan egymáshoz illeszkedve és egymáshoz képest 0,9 nm-rel elcsúszva alakítja ki a mikrotubulus hengeres formáját. A protofilamentum két vége nem egyforma, a belőlük szerveződő mikrotubulus polarizált szerkezetű: egyik, úgynevezett „gyors”, vagy plusz végén szabad β , míg másikon („lassú”, vagy mínusz vég) szabad α alegységeket hordoz.



Mikrotubulus köteg. A taxol hatására a mikrotubulusok stabilizálódnak és kötegelődnek.

A mikrotubulus növekedése vagy rövidülése újabb és újabb heterodimereknek a cső végeire történő asszociációjával, ill. disszociációjával valósul meg. A polimerizáció elsősorban az oldat szabad heterodimer koncentrációjától függ:

ha ez magas, az asszociáció kerül túlsúlyra és a mikrotubulus növekedni fog, alacsony értéknél viszont a tubulin alegységek leválnak, és a cső kezd rövidülni. Azt a szabad dimerkoncentrációt, melynél az időegység alatt történő ráépülés és leválás éppen kiegyenlíti egymást, kritikus koncentrációnak nevezik. Érdekes módon a kritikus koncentráció a cső két végére nézve nem egyenlő: a „gyors” végen alacsonyabb, mint a „lassú” végen. Ezért létezik olyan dimerkoncentráció-tartomány, ahol a mikrotubulus gyors vége még növekszik, miközben a lassú vége már rövidül.

A két vég eltérő viselkedésének oka az, hogy a polimerizációt jelentősen befolyásolja a β -tubulin GTP-áz-aktivitása. 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 „+” végen van, ez a vég reagál érzékenyen a szabad dimer koncentráció változására. 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 (pl. a GTP-tartalmú dimerkoncentráció lokális csökkenése miatt), ez a sapka eltűnhet, a csővégeken a hidrolízis következtében GDP-tartalmú dimerek jelennek meg, és ez azonnali depolimerizációt eredményez. Ez vezet a **mikrotubulusok dinamikus instabilitásához**, ahhoz az élő sejtekben jól megfigyelhető folyamathoz, melynek során az összpóliimer (az összes mikrotubulus) mennyisége a sejten belül időben ugyan jelentősen nem változik, de az egyes 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.

*Az osztódás gátlására széleskörűen alkalmazott **citosztatikumok** jelentős része tulajdonképpen a dinamikus instabilitás megzavarásán keresztül fejt ki hatását. Az őszi kikerics hatóanyaga, a kolchicin, vagy a Vinca-fajokból kinyerhető alkaloidák és származékaik (vinblasztin, vincristin) kis koncentrációban gátolják a csővégeken a kicserélődési folyamatokat és befagyasztják a mikrotubuláris rendszert, míg nagyobb koncentrációban teljes depolimerizációt okoznak. A tisztafejlékből kinyerhető taxol és származékai ellentétes hatásúak, túlzott polimerizációt okoznak és stabilizálják a mikrotubulusokat.*

A mikrotubulusok térbeli elrendeződését a **mikrotubulus-organizáló centrumok** (MTOC) irányítják. Állati sejtekben a domináns MTOC a **sejtközpont** (centroszóma), de MTOC-aktivitással rendelkeznek a csillók bazális teste is. A térbeli rendezettség azáltal jön létre, hogy a mikrotubulusok mínusz végeikkel ágyazódnak a sejtközpont anyagába. Ennek a ténynek két fontos következménye van: egyrészt az egész mikrotubuláris apparátus irányultságra, polarításra tesz szert, mivel a csővek gyors végei egyöntetűen kifelé néznek, másrészt a centroszóma anyagába beágyazott mínusz végek stabilizálódnak, mivel az asszociáció/disszociáció itt gátlódik. A mikrotubulusok végei tulajdonképpen a centroszóma anyagában lokalizálódnak, **gamma-tubulinból** álló gyűrűkhöz erősödnak hozzá. Egy-egy ilyen gyűrű 13 alegységből áll és polimerizációs magként működik, melyre az α - és β -tubulinból álló heterodimerek fokozatosan ráépülnek. A gyűrűk száma egyben a sejtközpontból szétsugárzó mikrotubulusok lehetséges számát is behatárolja.

A felsorolt tényezőkön kívül a mikrotubulusok viselkedését jelentősen befolyásolják a **mikrotubulusokhoz asszociált fehérjék (MAP)** is. A MAP-ok egyik csoportját az ún. **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 mikrotubulusok közötti távolságot a felszínükről kilógó MAP-ok hossza határozza meg. 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.

A MAP-ok egy másik nagy csoportját az ún. **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 **dinein**. Fontos tulajdonságuk, 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 sejten belüli irányított anyagmozgatás (pl. vezikuláris transzport, kromoszómák szállítása a mitózisban) a mikrotubulusokhoz kapcsolt motorfehérjék közreműködésével valósul meg.

A sejt központ

A sejt központ a sejtmag közelében elhelyezkedő viszonylag kicsi (~1–2 µm átmérőjű), bizonytalan kontúrú test, melyet membrán nem határol, ezért anyaga élesen nem különül el a környező citoplazmától. Állati sejtekben morfológiailag két részre különíthető el: a centriólumokra és az őket felhőszerűen körülvevő pericentrioláris anyagra. A magasabbrendű növényi sejtekből a centriólumok hiányoznak.

A **centriólumok** henger alakú, néhány tized mikron hosszúságú testek, melyek falát 9 tubuluscsoport alkotja. Egy-egy csoport három mikrotubuláris tagból (triplet) áll. A centriólumok száma a sejtciklus során változik. Az osztódásból kilépő sejtekben általában egy pár figyelhető meg. Később a pár két tagja eltávolodik egymástól, és mindegyik mellett egy-egy új centriólum képződik. A következő osztódásba lépő sejtben tehát már 2 pár centriólum van, mindegyik párban egy idősebb és egy újonnan képződött centrióllummal. Osztódáskor egy-egy pár jut a keletkező két utódsejtbe, és a ciklus ismétlődik.

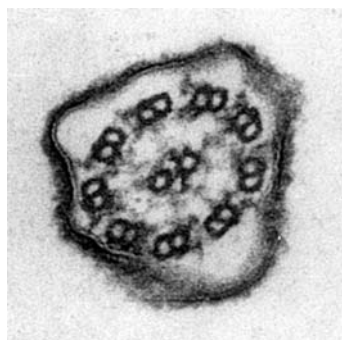
A **pericentrioláris anyag** néhány jellegzetes fehérjét tartalmaz, köztük a már említett gamma-tubulinból álló gyűrűket. A citoplazmatikus mikrotubulusok mínusz végeikkel a pericentrioláris anyagba ágyazódnak.

A sejt központnak három funkciója van: nukleációs helyként szolgál, ahol megindulhat a tubulin polimerizációja, szervezi a mikrotubuláris vázat (kialakítja a mikrotubuláris hálózat térbeli rendezettségét, polaritását) és képes reprodukálni önmagát. A mikrotubulus-szervező és nukleáló aktivitás a pericentrioláris anyag sajátossága, ehhez a centriólumok nem szükségesek. A reprodukció mechanizmusát nem ismerjük, léte a centriólumok számának ciklikus változásából lehet következtetni.

A csillók és ostorok

A csillók és ostorok a sejtek mikrotubulusokból felépülő mozgásszervecskéi, melyek eredetük szerint a centriólumok származékainak tekinthetők. Ezt a tényt a XIX. század végén *Lenhossék Mihály* ismerte fel. 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. Csillók az egysejtűek nagy csoportjában (*Ciliata*) és a soksejtűek különböző üreges szerveit bélelő hámban (légzőszervek, emésztőkészülék, húgy- és ivarvezetékek) fordulnak elő. Módosult csillók a fényérzékelő sejtek csapjai és pálcikái. Tipikus ostoros sejtek a hímivar-sejtek.

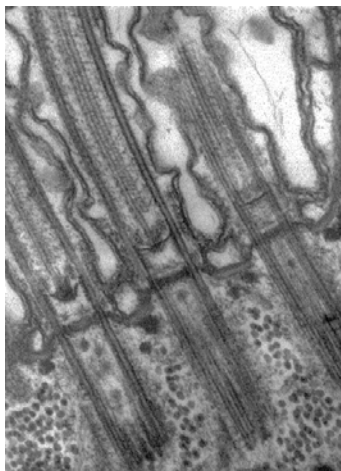
A csillók jellegzetes szerkezete eredetükből következik. Kialakulásuk első lépése az, hogy a sejt központ pericentrioláris anyagában bazális testek képződnek. Ezek a centriólumoktól morfológiailag nem különböző, apró, henger alakú testek, melyek fala 9 darab hármastagolású csőcsoportból (tripletekből) áll. Később a bazális testek a plazmahártya 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.



***Paramecium* faj csillójának keresztmetszet (TEM). Jól azonosítható 9+2-es szerkezet.**

Keresztmetszetben vizsgálva a csillókra az ún. 9+2-es szerkezet jellemző. Ezzel jelzik, hogy a plazmamembrán alatt, a csilló palástjában az említett 9 mikrotubuluspár fut végig (+ végeik kifelé néznek, – végeik a bazális testbe ágyazódnak), míg középen, a csilló tengelyében 2 különálló mikrotubulus helyezkedik el. Minden perifériás csőpár egyik (ún. „A”) tagján egymástól szabályos távolságban két kar helyezkedik el, mely képes a következő csőpár

„B” tagjához kötödni. A karok dineinből állnak. A bazális testből a citoplazma felé gyakran fonalak indulnak ki, ezek a gyökérnyúlványok, melyeknek kihorgonyozó, stabilizáló szerepük van.



Vorticella faj csillósor hosszmetset. Jól láthatók a bazális testek és a belőlük „kinövő” mikrotubulusok. (TEM felvétel)

A csillók és ostorok működésük közben változatos mozgást végeznek. Csillók esetében ez rendszerint gyors lecsapásból áll, melyet egy lassabb visszatérés követ, miközben a csilló erősen behajlik és oldalirányban kitér. Az ostorokon általában szinusz hullámok futnak végig. A csillók működése összehangolt: a lecsapások egyirányúak, 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 (pl. a légutakból a garatba sodorják a porszenyveződést).

Az aktinváz

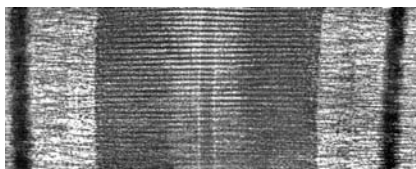
Az aktin az állati sejtek egyik leggyakoribb fehérjéje, összfehérje-tartalmának kb. 5–10%-át (izmokban kb. 20%-át) alkotja. Szabad monomer (globuláris aktin, **G-aktin**) vagy polimer (filamentális aktin, **F-aktin**, aktinfonal) formájában fordul elő. Minden aktin monomer egy molekula ATP megkötésére képes. Az aktinfonalak átmérője kb. 6 nm, hosszuk több μm is lehet. Az aktinváz az aktinfonalak és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék összessége. A polimerizációs folyamat mechanizmusa és a polimer viselkedése sok tekintetben hasonló ahhoz, ami a tubulin-mikrotubulus rendszerben megfigyelhető. A polimerizáció néhány monomerből álló nukleációs hely kialakulásával kezdődik. A szálnövekedés során újabb és újabb monomerek asszociálódnak, és kialakul a 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 („-”) végen. A kettő közötti koncentrációtartományban az aktinfonal állandó átépülésben van. Ilyenkor a gyorsan növekvő véghez időegység alatt annyi monomer asszociálódik, amennyi a lassan növekvő végen leválik, ezért a polimer össztömege (hossza) nem változik, de anyaga folyamatosan kicserélődik (ún. taposómalom-állapot). A monomerekhez kötött ATP a beépülést követően gyorsan hidrolizál, ezért a fonalak belső tömegét ADP-tartalmú aktin alkotja, ATP-tartalmú aktin csak a végeken, az előbb említett taposómalom-állapotban gyakorlatilag csak a gyors végen figyelhető meg. A nukleozid-trifoszfát hidrolízis labilizálja a polimert, mivel az ADP-tartalmú aktinmolekulák között a kötés gyengébb, mint az ATP-tartalmú molekulák között. Ezért a végen levő ATP-tartalmú aktinmonomerek sapkaként védik a polimert a gyors széteséstől. Ha ez a sapka eltűnik és ADP-tartalmú aktin jelenik meg a polimer végén, a fonal gyorsan szétesik.

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 törnek a polimereket és a végeikhez kötődve leállítják a monomerek kicserélődését. Másik csoportjuk, a hálózatba rendező fehérjék, az aktinfonalakat párhuzamos kötegekbe vagy laza hálózatba szervezik. Ilyen hálózat alakul ki a plazmamembrán alatt (ún. kortikális váz), melynek jelentős szerepe van az alak fenntartásában.

Az aktinváz motorfehérjéi a **miozinok**. A miozinok döntő többsége „+” vég motor: ATP elbontása közben az aktinszálon a „+” vég irányában csúsznak el. Jellegzetes képviselőjük a II. típusú (konvencionális) miozin, mely nagy mennyiségben fordul elő izmokban, de más sejtekben is. A molekula egy-egy nehéz láncból és két-két könnyű láncból álló hexamer. 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. Nem izom típusú sejtekben egy másik miozin (miozin I.) is előfordul, 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 „-” vég irányú motorfehérje, ilyen a miozin VI.

Motorfehérjék

Az aktinváz közreműködésével történő alak- és helyváltoztatás kétféle molekuláris mechanizmusra vezethető vissza. Az állábak, nyúlványok képződését lokális, gyors aktinpolimerizáció okozza. Ezt tipikusan valamilyen inger váltja ki, melyet sejtfelszíni receptorok 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. Ha a kitüremkedésbe mikrotubulusok is beépülnek, akkor a nyúlvány stabilizálódik. Így alakulnak ki pl. a neuronok hosszú nyúlványai. Helyváltoztatáshoz már miozin közreműködése is szükséges. A mozgás során az álláb egyes pontjai letapadnak az aljzatra, és a tapadási pontok között miozint is tartalmazó aktinkötegek képződnek. Ezek miozin jelenlétében kontrakcióra képesek és előrehúzzák a sejtet. Kitapadás hiányában a kortikális váz egyenletes összehúzódása gömb alak felvételére készíti a sejtet.



Szarkoméra. A kép két szélén vannak a Z-vonalak az aktin filamentumokkal, középen az M-vonal, hozzá két oldalról kapcsolódnak a miozin molekulák.

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

Az intermedier filamentumok

Az intracelluláris váz 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, „köztes” elnevezés), hosszuk több mikron. Általában rendezetlen, az egész sejtet behálózó fonadékot alkotnak, melynek egyes részei különböző sejtkapcsoló struktúrákhoz erősödnek. Az intermedier fonalak nehezen átépülő, stabilis vázszerkezetet hoznak létre, melyhez motorfehérjék nem kapcsolódnak.

Az intermedier filamentumok egyik csoportja, a sejt mag vázát alkotó lamin fonadék, minden eukarióta sejt magjában megtalálható. Nem minden sejt citoplazmájában fordulnak elő intermedier filamentumok (hiányoznak például az ízeltlábúak sejtjeinek citoplazmájából). A legváltozatosabb citoplazmatikus intermedier váz a gerincesekben található, itt az intermedier filamentumokat szövettípusonként eltérő fehérjék alkotják.

Bár a fonalakat alkotó fehérjék molekulatömegben, aminosav-szekvenciákban eltérnek egymástól, szerkezetük közös vonásokat mutat, polimerjeik hasonlóak: molekuláik 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. Bár az intermedier fonalak általában stabilisak, bizonyos körülmények között, pl. az osztódó sejtekben, mégis depolimerizálódnak. Ez kinázok hatására történik, melyek foszforilálják a fonalak fehérjéit, és ez vezet a polimer széteséséhez.

Kérdések:

1. Milyen evolúciós előnyöket biztosított a sejtvááz kialakulása?
2. Csoportosítsa a sejtvááz alkotóelemeit!
3. Milyen feladatokat lát el, milyen funkciókat biztosít a sejtvááz?
4. A sejtvááz mely komponensei játszanak szerepet a sejtosztódásban? Sorolja fel, hogy az egyes komponensek milyen funkciót töltenek be az osztódás egyes fázisaiban!
5. Mi a jelentősége a kortikális aktinvááznak?
6. Magyarázza meg a dinamikus instabilitás jelenségét! Értelmezze a mikrotubulusok és az aktin filamentumok esetében!
7. Milyen molekulákat sorolunk az intermedier filamentumok közé? Indokolja a csoport elnevezését!
8. Milyen kapcsolat van az aktin globuláris és a filamentális formái között?
9. Milyen fehérjéket sorolunk a motorfehérjék közé? Mi a jellemző funkciójuk?
10. Váázolja fel a váázizom aktomiozin rendszerének felépítését és magyarázza el a „csúszó-filamentum” mechanizmus lényegét!
11. Mi a különbség az anterográád és a retrográád transzport között?
12. Mi a jelentősége a dinein molekuláának a csillók felépítésében?
13. Sorolja fel a tubulin fehérje típusait! Jellemezze szerepüket a sejtvááz kialakításában!
14. A sejt milyen struktúráira jellemző a gamma tubulin előfordulása!
15. Miben különböázik a centriólum és a citocentrum?
16. Rajzolja le egy csillószál keresztmetszetét, és magyarázza el kép alapján a csillószál felépítését!
17. Mit jelöl a GTP-sapka kifejezés? Mi a jelentősége a sejtvááz működésében?
18. A sejt mely funkciói károsodhatnak, ha a mikrotubulusok képződését meggátoljuk?

16. fejezet - Sejt-sejt, sejt-ECM kapcsolatok, jelátvitel

Az állati szervezet nem sejtek véletlenszerű halmaza, hanem specifikusan összekapcsolt – szövetekbe rendeződött – sejtszövetekből épül fel. Kapcsolatok nélkül a sejtek nem életképesek (kísérleti körülmények között kimutatható, hogy tartósan izolált, kapcsolatoktól megfosztott sejtekben önpusztító program aktiválódik). A kapcsolatot a plazmamembrán speciális fehérjéi, a **sejtadhéziós molekulák** alakítják ki. Működésük a jel/receptor rendszer működéséhez hasonló: az adhéziós molekula egyszerre tekinthető ligandumnak, mely stabilan a sejtfelszínhez rögzül, és receptornak, mely megköti a szomszéd sejt felszínén vagy a sejtközi állományban (extracelluláris mátrixban) elhelyezkedő partner adhéziós molekulákat. A hasonlóság abban is megnyilvánul, hogy a kapcsolat létrejötte a sejt belsejében válaszfolyamatokat indít el: legtöbbször a citoskeleton átrendeződését, kinázok aktiválódását eredményezi. A kapcsolat lehet **homofil** vagy **heterofil**, aszerint, hogy azonos típusú vagy eltérő adhéziós molekulák között jön létre. Egy sejt felszínén egyidejűleg többféle adhéziós molekula is kimutatható, de ezek lokalizációja eltérő, és funkcióik is különbözők.

A sejtkapcsoló molekulák és szerkezetek fő típusai

Occludin és Claudin

Az occludinok és claudinok gerinces állatok sejtjeiben előforduló integráns membránfehérjék, melyek a hámsejtek közötti ún. szoros kapcsolat (zárókapcsolat, zonula occludens, tight junction) fő molekuláris komponensei. A szoros kapcsolatok a sejtek oldalfelszínei között alakulnak ki, közvetlenül az apikális régió alatt. Az occludin és claudin molekulák itt fonalakba rendeződnek, melyek körbefogják a sejtet. A szomszédos sejtek fonalkötegei pontosan egymáshoz illeszkednek és lezárják a sejtközi járatokat. A szoros kapcsolatok szerepe kettős: meggátolják az ún. paracelluláris transzportot, vagyis nem engedik anyagok átszivárgását az apikális oldalról (pl. a bél ürege felől) a bazális oldalra a sejtközi járatokban; meggátolják a plazmamembrán molekuláinak oldalirányú (a membrán síkjában történő) elmozdulását, és ezzel stabilizálják a membrán apikális és bazolaterális oldalai közötti molekuláris különbségeket. Gerinctelen állatokban nincs sem claudin, sem occludin, de kimutatható egy speciális, a szoros kapcsolatok funkcióját ellátó struktúra, az úgynevezett szeptális (válaszfal) dezmoszóma. Ez tipikusan ízeltlábúak sejtjei között fordul elő. A kapcsolat helyén a szomszédos sejtek között létrafok-szerűen elhelyezkedő hidak figyelhetők meg, melyek zárják a sejtek közötti járatokat. A szeptumok molekuláris összetétele nem ismert.



Rekeszes dezmoszóma (hidróból, TEM fotó).

Cadherine

A cadherine mintegy 700–750 aminosavból álló transzmembránfehérjék.

Sok változatuk ismert, így az E-cadherin a hámsejtekre jellemző, az N-cadherin neuronokban, izomszövetben fordul elő. Homofil kötést alakítanak ki, vagyis a szomszédos sejtek cadherinmolekuláinak extracelluláris régiói kapcsolódnak össze. A kötés kalciumfüggő (innen az elnevezés – kalcium-dependens-adhézió), kelátorokkal (kalciumelvonó anyagokkal) kezelve a szöveteket, azok szétesnek sejteikre. A molekula citoplazmába nyúló C-terminális szakasza közvetítő fehérjéken (α - és β -catenineken) keresztül az aktinvázhoz kötődik. A cateninek a membrán belső, citoplazmatikus oldalán morfológiailag jól észlelhető megvastagodást, lemezt alkotnak. Ebbe ágyazódnak be az aktinfilamentumok. A β -cateninnek emellett egy másik funkciója is van: szabad (nem cadherinhez kötött) molekulái bejuthatnak a sejtmagba, ahol egyes gének expresszióját szabályozzák. A cadherine tehát áttételesen, a szabad/kötött β -catenin arány befolyásolásán keresztül, ellenőrizni tudják egyes gének működését. A cadherine eloszlása a hámokban nem véletlenszerű: általában a szoros kapcsolatok alatt, azok közelében lokalizálódnak, egy övszerű zónát alkotva a sejt körül. Ezt a zónát és a belülről hozzákapcsolt aktinfilamentumok összességét **adhéziós övnek** (adhéziós szalagnak – zonula adherens) nevezik. Szerepe kettős: mechanikai stabilitást kölcsönöz az összekapcsolt sejtpopulációnak; az aktinváz lokális összehúzódása az összekapcsolt sejtréteg deformálódását, redők, bemélyedések kialakulását okozza.

Az adhéziós öv mellett a stabil összekapcsolódást egy másik sejtkapcsoló szerkezet, a **dezmoszóma** (macula adherens) biztosítja. A dezmoszómák foltoszerű, korong alakú képződmények, az adhéziós öv alatt elszórtan helyezkednek el és sejt-sejt közötti kapcsolatot hoznak létre. Fő molekuláris komponenseik a cadherin családba tartozó **dezmozoglein** és **dezmozokollin** nevű integráns membránfehérjék, melyek a cadherinhez hasonlóan, extracelluláris részekkel homofil kötésben kapcsolják össze a szomszédos sejteket. A molekulák citoplazmatikus régióikhoz cateninszerű kapcsolómolekulák és vázelemek, de nem aktin, hanem intermedier filamentumok kapcsolódnak. A hámok mellett különösen sok dezmoszóma található a szívizomban.

A hámokban gyakori egy további kapcsolószerkezet, a **hemidezmoszóma**, mely alakjában, funkciójában hasonlít a dezmoszómákhoz, de molekuláris összetétele attól eltérő. A hemidezmoszómák foltoszerű képződmények, a sejt bazális oldalán helyezkednek el, és feladatuk a sejt rögzítése az extracelluláris mátrixhoz (a kötőszöveti állomány molekuláihoz). Fő alkotóelemük az **integrin** nevű membránfehérje, mely két alegységből álló dimerek formájában csoportosul a hemidezmoszómákban. Az integrinek extracelluláris régiói a kötőszövet molekuláihoz, elsősorban a fibronektinhez kötődnek, míg citoplazmába nyúló végei a citoszkeleton intermedier fonalaihoz kapcsolódnak.



Két mirigysejt között a piros nyíl mutatja a **dezmoszómát**.

Az integrinek

Az integrinek alkotják a sejtadhéziós molekulák legnagyobb csoportját. Két (alfa és béta) alegységből álló heterodimerek formájában mutathatók ki a legtöbb sejt felszínén. Egy-egy alegység hosszú extracelluláris részből (ez a ligandumkötő régió), egyszeres membránátíelő szakaszból és viszonylag rövid citoplazmába nyúló C-terminális régióból áll. Ez utóbbihoz közvetítő fehérjék, kinázok és citoskeletális elemek (aktin- vagy intermedier filamentumok) kapcsolódnak. A cadherinekhöz hasonlóan, a ligandum kötéséhez kationok, kalcium vagy magnézium jelenléte szükséges.

Az integrinek fő funkciója a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat kialakítása, de egyes sejtípusok között sejt-sejt kapcsolatot is tudnak létesíteni. A tipikus receptorok működéséhez hasonlóan a ligandumok – a mátrix molekuláinak – megkötése jelátviteli folyamatokat indít meg. A ligandumkötött integrinek foltszerű képletekbe tömörödnek, aggregálódnak, és a citoplazmába nyúló C-terminális szakaszaihoz számos más fehérje kezd asszociálódni. Az így kialakuló szerkezet az ún. **fokális adhézios korong**, mely különösen jól megfigyelhető szövettanilag tartott sejteken, ahol az aljzathoz való letapadást biztosítja. A korong anyagában kimutatható egy jellegzetes fehérje, a **fokális adhézios kináz** (FAK), melynek aktivitása számos más fehérje működését szabályozza. A letapadás mint jel a FAK közvetítésével két nagy folyamatsort befolyásol. Egyrészt különböző áttételeken keresztül szabályozza a sejteiklust: normális növekedésre, osztódásra csak a környezetükkel kapcsolatot kialakított, letapadt sejtek képesek. Másrészt, az adhézios korongok szervezik az aktinvázat: miozint is tartalmazó aktinkábelek kötődnek hozzájuk. Ennek a mozgásban van jelentősége. Ugyanis a mozgó sejt kinyúló állábainak közelében folyamatosan fokális adhézios korongok alakulnak ki, és az ezekhez erősödő aktinkábelek segítségével tudja előrehúzni magát a sejt. Ehhez viszont az is szükséges, hogy a hátsó letapadási helyek folyamatosan szétszerelődjenek. A jelenség rávilágít az integrinmediált adhézio egy fontos tulajdonságára: esetenként a kapcsolatok nagyon labilisak, gyorsan kialakulnak, de könnyen meg is szűnnek.

Az integrineket alkotó két alegység mindegyikének több változatát képesek a sejtek előállítani, ezért számos alfa/béta heterodimer-kombináció alakulhat ki. Ezek közül eddig kb. 20-at ismerünk. Az egyes kombinációk más és más ligandumot kötnek meg, pl. az $\alpha 5 \beta 1$ heterodimer specifikus liganduma a fibronectin, az $\alpha 1 \beta 1$ kombináció kollagént köt nagy affinitással, a hemidezmoszómákban $\alpha 6 \beta 4$ összetételű dimer található. Nyilvánvaló, hogy a dimerösszetétel változtatásával a sejt szabályozni tudja, hogy környezetének mely komponensével létesítsen kapcsolatot.

Immunglobulinszerű adhézios molekulák

A csoportba olyan transzmembránfehérjék tartoznak, melyek extracelluláris régiója ún. Ig-szerű (immunglobulinszerű) doméneket (szakaszokat) tartalmaz, melyek szerkezetükben hasonlítanak az ellenanyag-molekulák (immunglobulinok) egyes régióihoz. Mintegy 20-féle változatuk ismert, a legtöbb sejtfeleség felszínén kimutathatók. A csoport legjobban ismert tagja az ún. N-CAM (neuronális sejt(cell)-adhézios molekula), mely a neuronok mellett sok más sejtben is előfordul. Az Ig-szerű adhézios molekulák leggyakrabban homofil kötést létesítenek, de előfordul heterofil kapcsolat is. Így pl. az endotel sejtek Ig-szerű adhézios molekuláikkal kötik meg a leukocita integrineket. A kötés kialakításához kalcium jelenléte nem szükséges. Az Ig-szerű adhézios molekulák intracelluláris régiójához nem, vagy csak kevés citoskeletális elem tapad, ezért az általuk létesített kapcsolat nem

járul különösebben hozzá a szövet mechanikai stabilitásának biztosításához. Jelentősége abban van, hogy az Ig-szerű adhéziós molekulák segítségével az azonos típusba tartozó sejtek felismerik egymást, laza kapcsolatot tudnak létesíteni, melyeket azután a cadherinen alapuló kötések egy következő lépésben stabilizálnak.

Szelektinek

A szelektinek olyan sejtfelszíni adhéziós molekulák, amelyek egy másik sejt felszínén jelenlévő speciális szerkezetű (sziálsavat, galaktózt, fukózt és acetil-glükózamint tartalmazó) oligoszacharid láncokat ismernek fel és kötnek meg. Csak gerincesekben találhatók és a keringésben sodródó sejtek, illetve a kapillárisok falát bélelő endotel sejtek felszínén mutathatók ki. Három változatuk ismert: az L-szelektinek leukociták felszínén, az E- és P-szelektinek az endotel sejtek, illetve vérlemezkék felszínén fordulnak elő. A szelektinek gyenge, átmeneti kapcsolatokat létesítenek az endotel sejtek és a kapillárisokban sodródó leukociták között, ez utóbbiakat lelassítják, és így elősegítik a már említett, integrineken alapuló stabil kitapadást.

Jelátvitel receptorokkal

A sejtek állandó kapcsolatban állnak környezetükkel, amelyből anyagokat vesznek fel, és amelybe saját termékeiket ürítik. Ezek az anyagok információt hordoznak annak a közegnek az állapotáról, amelyben a sejt él és működik. Az evolúció során bonyolult jelfogó rendszer alakult ki ezen információk feldolgozására, mely lehetővé teszi a környezet változásaira adott korrekt válaszreakciót, végső soron a sejt életben maradását.

A jelfogó rendszer egyszerű formában már a prokariótákban és egysejtű eukariótákban (*Protista*) is megtalálható (pl. a kemotaxis kiváltó rendszer), de különös jelentőségre és fejlettségre tett szert az állatokban, ahol a szervezetet alkotó sok sejt működésének összehangolása a fő feladata.

A rendszer elemei a jelhordozó molekulák (ligandumok vagy elsődleges hírvivők), az ezek felfogására – megkötésére – specializálódott receptorok, az intracelluláris közvetítő molekulák, melyek az aktivált receptorról a célmolekulák felé közvetítik a jelet, és a célmolekulák, melyek működésének beindulása (esetleg kikapcsolásuk) jelenti magát a választ. A jelközvetítő rendszerre általában jellemző az érzékenység (a receptorok a sokszor csak nanomólos koncentrációban jelen lévő ligandumaikat is képesek megkötni, a válasz egy koncentrációkülöbség elérésekor indul be). A jelátvitel jelentős erősítéssel történik (pl. egyetlen adrenalin- vagy glükagonmolekula megkötése májsejtekben több millió glükóz-molekula felszabadulását idézheti elő). A sok lépésből álló jelátviteli folyamat számos beavatkozási helyet kínál, ezért finoman szabályozható; az átviteli láncban mindig van negatív visszacsatolás, ezért a rendszer egy bizonyos idő után önmagától leáll.

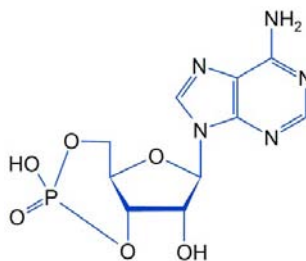
A **ligandumok** kémiai szempontból ugyan változatos molekulák, de a plazmamembránon való áthatolóképességük alapján két nagy csoportra oszthatók. A hidrofób (lipofil) jellegű anyagok könnyen átdiffundálnak a plazmamembránon, receptoraik a citoplazmában és a magban lokalizálódnak. Ebbe a csoportba tartoznak a szteroidok (pl. progeszteron, tesztoszteron, mellékvesekéreg hormonjai, izeltlábuak vedlési hormonja), az A- és D-vitamin-származékok, a tiroxin (lásd a sorozat Endokrin szervek kötetét). A másik csoportba olyan ligandumok tartoznak, melyek számára a plazmamembrán nem átjárható, ezért a citoszolba belépni nem tudnak, receptoraik a sejtfelszínen vannak. Jellegzetes képviselőik a különböző aminosav-származékok (pl. adrenalin, dopamin, hisztamin), peptidhormonok (pl. inzulin), növekedési faktorok (pl. epidermális növekedési faktor). Bár egyes szervek (pl. endokrin mirigyek) kifejezetten jelhordozó molekulák szintézisére specializálódtak, gyakorlatilag minden sejt előállít és kibocsát olyan molekulákat, amelyekkel a környezetében lévő más sejtek működését befolyásolni tudja. A ligandumokat legtöbbször a keringési rendszer szállítja el a célsejtekig. Gyakori azonban, hogy a jelmolekula nem jut a keringésbe, csak lokálisan, a sejt környezetében hat. Ennek extrém példái a szinapszisok, melyekben a ligandum (pl. acetilkolin) a szinaptikus rés szűk terébe ürül, ahol azonnal kapcsolatba kerül az érintkező sejt posztzinaptikus membránjában lévő receptorokkal. Előfordul az a változat is, hogy a ligandum az őt termelő sejt felszínén marad. Ilyenkor a ligandumhordozó és a receptorhordozó sejtek összekapcsolódhatnak. A kapcsolódás lehet átmeneti, de tartós is, ami stabilis sejt-kapcsolatok kialakulását eredményezi.

A **receptorok** fehérjék, amelyekre az jellemző, hogy ligandumaikat reverzibilisen, specifikusan és általában nagy affinitással kötik meg és a receptor–ligandum komplex kialakulása valamilyen jellegzetes válaszreakció beindulását eredményezi. A specifikus azt jelenti, hogy a receptor a környezetében előforduló legkülönbözőbb molekulák közül csak a reál jellemzővel lép kapcsolatba (az inzulinreceptor pl. csak inzulint, és nem más hormont köt meg stb.). A nagy affinitás a receptor azon készségét jelenti, hogy ligandumot még akkor is képes kötni, ha az nagyon kis

koncentrációban van jelen. Az affinitás számszerűen azzal a ligandumkoncentrációval jellemezhető, amelynél a sejtfelszíni receptorok fele foglalt állapotba kerül. Ez általában nagyon alacsony, 10^{-9} – 10^{-7} M körüli érték. A ligandum kötődése aktiválja a receptort, vagyis képessé teszi valamely reá jellemző specifikus válaszreakció beindítására. A válasz lehet pl. anyagcsere-folyamat (pl. glikogénlebontás/glükózfelszabadulás adrenalin hatására májban és izomban), membránpermeabilitás-változás (pl. Na^+ -beáramlás szinapszisokban acetilkolin hatására), sejtnövekedés/sejtosztódás (növekedési faktorok hatására), citoskeleton átrendeződése (sejt-sejt kapcsolatok kialakulásakor). A választ eredményező reakciósort befolyásolja a receptor lokalizációja. A **sejtfelszíni receptorok** integráns membránfehérjék, a membránt elhagyni nem képesek, hatni a citoplazmában vagy magban lejátszódó folyamatokra csak közbeiktatott – közvetítő – molekulák sorozatán keresztül tudnak. A **citoplazmában lokalizálódó receptorok** viszont könnyen kapcsolatba lépnek célmolekuláikkal, a jelátvitel nem, vagy csak kevés közbeiktatott lépést igényel. Ezt a szteroid hormonok hatásmechanizmusával lehet szemléltetni. E hormonok receptorai tulajdonképpen transzkripciós faktorok, és szabad állapotban a citoszolban lokalizálódnak. A receptoroknak három doménje (jellemző szerkezettel és funkcióval rendelkező régiója) van: a hormont köti rész, a transzkripciót aktiváló régió és a DNS-kötő rész. A hormon megkötése után a receptor dimerizálódik (két receptorfehérje összekapcsolódik) és a maghártya pórusain keresztül a magba vándorol. Itt a dimer a DNS-molekulák azon és csakis azon részeivel lép kapcsolatba, melyek jellegzetes inverz bázispársorozatból állnak. Ha egy ilyen szekvencia valamilyen gén szabályozórégiójában előfordul, akkor a receptor oda tud kötődni, és megindítja az adott gén átírását. A válaszreakció specifikitása tehát azon alapul, hogy az aktivált receptor egy jellegzetes bázissorozatot ismer fel a DNS-molekulán. A szteroidok által kiváltott válasz hosszan tartó (órák, napok), miután az átírás, majd az ezt követő fehérjeszintézis hosszabb időt igényel.

A plazmamembránba épült felszíni receptorok jelátviteli mechanizmusaik alapján három nagy csoportba sorolhatók: **ioncsatorna-receptorok**, **G-proteinhez kapcsolt receptorok** és **enzimaktivitással rendelkező receptorok**. Az ioncsatorna-receptorok olyan transzmembránfehérjék, amelyek a ligandum kötődésére kinyílnak és valamilyen ion – pl. Na^+ – számára átmenetileg átjárhatóvá válnak. Ilyen pl. az acetilkolin-receptor, de több más neurotranszmitter receptora is.

A G-proteinhez kapcsolt receptorok családjába több száz különböző receptor tartozik. Közös szerkezeti jellegzetességük, hogy peptidláncaikban mindig 7 transzmembrán- (membránt átvelő) régió fordul elő, extra (aminoterminális) – és intracelluláris (C-terminális) régiók változó hosszúságúak. Enzimatisz aktivitással nem rendelkeznek. G-proteinhez kapcsolt receptorok közvetítik számos hormon (pl. adrenalin, glükagon), illatanyagok, kemotaxiszt kiváltó peptidek, fény (fotonok) hatását a sejtekbe. Nevüket onnan kapták, hogy a jelátvitel egy jellegzetes fehérjecsalád, a **heterotrimer** (három különböző alegységből álló) **G-fehérjék** közreműködésével történik. A G-fehérjék a plazmamembrán belső oldalán, a receptorok környezetében helyezkednek el. Egyik (α) alegységükön kötőhely van **guanozin-di-** vagy **-trifoszfát** számára (innen ered a „G” fehérje név). GDP-kötött állapotban a fehérje inaktív. A jelátvitel azon alapul, hogy a ligandum által aktivált a receptor kicserélőfaktoroként kezd működni: arra készíti a G-fehérje α alegységét, hogy GDP helyett GTP-t kössön meg. GTP-kötött állapotban a G-fehérje aktív válik, disszociál α és $\beta\gamma$ alegységekre, melyek mindegyike hatni kezd valamilyen effektorfehérjére. Az α alegység egyik tipikus effektora az adenilát-cikláz, a $\beta\gamma$ alegység tipikusan ioncsatornákat nyit és foszfolipázokat aktivál. A α -fehérje azonban GTP-áz aktivitással is rendelkezik, ezért rövid idő alatt elbontja a rajta levő GTP-t, ezáltal újra inaktív állapotba kerül és a három alegység ismét összeáll. A G-fehérje tehát kapcsolóként működik: az aktivált receptor bekapcsolja, saját enzimaktivitása viszont egy idő múlva automatikusan kikapcsolja, és így a jelátviteli lánc megszakad. A sejtekben a G-fehérjék sokféle változata fordul elő, és ezek más és más effektorokat aktiválnak. Közülük egyik leggyakoribb az adenilát-cikláz, egy plazmamembránhoz kötött enzim, amely ATP-ből ciklikus adenzin-monofoszfátot (cAMP) szintetizál. A cAMP-t gyakran **másodlagos hírvivőnek** is nevezik a jelátviteli láncban betöltött szerepe miatt. A cAMP hatására egy kináz (proteinkináz-A) aktiválódik, ez további enzimeket foszforilál, és ezen keresztül szabályozza aktivitásukat.



A cAMP szerkezet.

Májban pl. az adrenalin $\rightarrow$ G-fehérje $\rightarrow$ adenilát-cikláz $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ proteinkináz-A kaszkád egyik végső célmolekulája a glikogén-foszforiláz, amely glikogénből glükózt szabadít fel. A cAMP transzkripció faktorok aktivitását is befolyásolja, így hat egyes gének expressziójára is.

Egy másik G-fehérjén keresztül aktiválódó effektor a **foszfolipáz-C β** nevű enzim, mely a plazmamembrán foszfatidil-inozitol molekuláit hasítja. A két keletkező termék (másodlagos hírvívő) közül a **diacil-glicerín** (DAG) egy kinázt (proteinkináz-C – PKC) aktivál. A PKC-hoz a sejtek növekedését, differenciálódását szabályozó jelátviteli utak kapcsolódnak. A másik termék, az **inozitol-trisz-foszfát** (IP₃), kalciummobilizáló hatású. Jelenlétében **kalciumionok** szabadulnak fel az endoplazmatikus retikulum ciszternáiból. A kalciumionok fontos másodlagos hírvívők, mivel a citoplazmában számos olyan fehérje van, melyek aktivitását kalcium szabályozza. A citoplazma szabadkalcium-koncentrációja alapállapotban olyan alacsony (kevesebb, mint 10^{-7} M), hogy a kalciumfüggő szabályozófehérjék nem tudnak telitődni és inaktívak. Ha valamilyen jelátviteli folyamat Ca-szintnövekedést okoz, akkor a kalciumkötő fehérjék telitődnek kalciummal, és ilyen állapotban képesek más fehérjék működését szabályozni. A kalciumkötő fehérjék szabályozzák pl. az aktin-miozin rendszer kontrakcióját izmokban. Az egyik legfontosabb univerzálisan előforduló kalciumfüggő szabályozófehérje, a **kalmódulin**, mely számos enzim, így pl. kinázok, ionpumpa-ATP-ázok regulátora. A kalciumpumpák (Ca-ATP-áz) működése viszont egy idő múlva újra alacsony szintre szorítja az intracelluláris kalciumkoncentrációt, és a nyugalmi állapot helyreáll.

A számos G-fehérjéhez kapcsolt receptor specifikus hatását több tényező együttesen okozza: egyrészt egy adott receptort csak saját liganduma képes aktiválni, másrészt a különböző G-fehérjék eltérő receptorok hatását közvetítik és effektor enzimeik is különbözőek lehetnek. Az egyes jelátviteli utak egymást is szabályozzák. Pl. a kalmódulin, mely foszfolipáz-C-n keresztül aktiválódik, stimulálja az adenilát-ciklázt is, és rajta keresztül a cAMP-függő kinázok működését. Ismerünk gátló hatású heterotrimer G-fehérjéket is. A jelátviteli rendszer fontos tulajdonsága, hogy tartósan magas ligandum koncentráció jelenlétében a válasz intenzitása csökken. Ennek hátterében többféle mechanizmus van. A receptoron keresztül aktivált kinázok sok esetben magát a receptort is foszforilálhatják, és ez általában csökkenti a receptor érzékenységet. Gyakori, hogy a receptorok endocitózissal a lizoszómákba kerülnek, ahol degradálódnak. A sejt így csökkenteni tudja a sejtfelszíni receptorok számát.

A membránreceptorok harmadik nagy csoportját azok a receptorok alkotják, amelyek ligandumkötött állapotban enzimaktivitást mutatnak, vagy azért, mert maga a receptor rendelkezik katalitikus régióval, vagy azért, mert a receptorhoz enzim, általában valamilyen kináz, asszociálódik. Közös strukturális jellemzőjük, hogy három doménből állnak: a molekula extracelluláris régiójában van a ligandumkötő hely, a citoplazmába nyúló részen a katalitikus hely, és a kettőt helikális szerkezetű, a membránt egyszerűen átvivő transzmembrándomén köti össze. Legnagyobb csoportjukat a **receptor protein-tirozin kinázok** alkotják. Tipikus ligandumaik a különböző növekedési faktorok, az inzulin, tehát olyan jelfehérjék, melyek a sejteket növekedésre, osztódásra készítik. A ligandum megkötése után a receptor általában dimerizálódik, majd a peptidlánc citoplazmatikus régiójában levő tirozinok autofoszforilálódnak. A csoport más tagjai szerin/threonin kinázaktivitást mutatnak (vagyis nem tirozinra hanem szerin- vagy threoninmaradékokra visznek rá foszfátcsoporthoz). Ismeretesek olyan receptorok is, amelyek foszfátáz-aktivitásúak vagy proteázokhoz asszociálódnak. A receptoron kialakult foszfortirozin-mintázatot közvetítő – **adaptor** – fehérjék ismerik fel, melyekhez viszont kicserélőfaktorok kötődhetnek. A membrán citoplazmatikus oldalán, a receptor környezetében található egy ún. kis G-típusú fehérje – a **Ras** – mely a jelátvitelben a kapcsoló szerepét tölti be. A Ras alapállapotban guanozindifoszfátot köt meg és inaktív. A kicserélőfaktor hatására a GDP lecserélődik GTP-re és a GTP-kötött Ras képes aktiválni egy kinázt, amely azután további, ún. MAP-kinázokat (mitogénaktivált proteinkinázok) kapcsol be, és a jel lavinaszerűen felerősödik. A végső célmolekulák általában transzkripció faktorok, melyeket a kinázok aktiválnak, és ez beindítja a növekedést szabályozó gének működését. A Ras maga GTP-áz, ezért egy idő múlva GDP-vé bontja a hozzákötődött GTP-t, ezzel inaktiválódik és kikapcsolja az egész jelátviteli láncot (ez a mechanizmus hasonló ahhoz, ahogyan a heterotrimer G-fehérjék működnek a G-proteinekhez kapcsolt receptorok esetében). A Ras egyes mutációi a fehérje GTP-áz aktivitását bénítják, ilyenkor a Ras tartósan GTP-kötött, vagyis aktív állapotban marad, nem tud kikapcsolni, és folyamatosan serkenti a kinázokon keresztül a sejtproliferációt. A daganatos sejtekben gyakran kimutatható a Ras ilyen jellegű hibája. A receptor protein-tirozin kinázok nemcsak a Ras-MAP-kináz rendszeren keresztül fejthetik ki hatásukat. Gyakori, hogy aktiválnak egy másik kináz rendszert is, a **foszfatidil-inozitol kinázokat**, melyek a plazmamembránban elhelyezkedő foszfatidil-inozitol molekulákat foszforilálják. Ilyenkor tehát nemcsak a receptor fehérjén, hanem a membrán egyik lipid komponensén is kialakul foszforilált mintázat, melyhez további jelátvivő molekulák (adaptorok, más kinázok) kapcsolódnak. A foszfatidil-inozitol kinázok aktiválása fokozott fehérje szintézist, növekedést, sejtosztódást, a sejtpusztulás gátlását eredményezi.

A növekedési faktorok gyakran nemcsak az itt leírt kinázaskadokat aktiválják, hanem receptor-mediált endocitózist is indukálnak. Ennek eredményeként a receptorok egy része a lizoszómákba kerül, ahol degradálódik, és ez csökkenti a sejt ligandummal szembeni érzékenységét.

Az enzimaktivitású receptorok további fontos csoportját a **szerin/treonin kináz** aktivitással rendelkező **receptorok** alkotják. Ezek dimerek, a ligandum hatására a dimer egyik tagja foszforilálja a másik tag citoplazmatikus régiójában található szerin/treonin maradékokat és ezáltal azt aktiválja. Az aktivált receptor ezután képes speciális transzkripciósfaktorokat foszforilálni, melyek a magba transzlokálódnak és ott egyes gének átírását szabályozzák. A receptor-szerin/treonin kinázok ligandumai a sejtek sorsát, differenciálódását szabályozó morfogén hatású anyagok (pl. activin, *l.* részletesen a sorozat "Fejlődéstan" kötetében).

Míg az előbbieken tárgyalt receptorok általában a növekedés/szintézis folyamatait szabályozzák, a sejtekben kimutatható a receptorok egy speciális csoportja is, a "**halál-receptorok**", melyek a sejtpusztulás egyik formáját, az apoptózist képesek kiváltani.

Jelátvitel: sejtek közötti kommunikáció réskapcsolatokon keresztül

Az állati szervezet sejtei között működik a jelátvitel egy speciális formája, mely nem igényel receptorokat: a réskapcsolatokon (gap junction) keresztüli kommunikáció. Gerincesekben a réskapcsolatok folt alakú, néhány 100 nm átmérőjű területek a plazmamembránon, melyekben a kapcsolat szerkezeti elemei, a konnexonok helyezkednek el. Egy-egy konnexon 6 alegységből (6 konnexinmolekulából) álló, henger alakú szerkezet, amelynek közepén csatorna húzódik. Az érintkezési helyeken a két sejt közötti rés mintegy 2–2,5 nm-re szűkül (innen a réskapcsolat elnevezés), és a szomszédos sejtek konnexonjai szorosan egymáshoz illeszkednek. Így az érintkező sejtek között a konnexonok csatornái közvetlen kapcsolatot létesítenek, melyeken keresztül különböző ionok, kismolekulájú anyagok (kb. 1 kDa-ig) át tudnak áramlani. Réskapcsolatok találhatók pl. az elektromos szinapszisokban és a szívizom sejtei között, ahol ionáteresztő képességük az ingerület gyors, késedelem nélküli tovaterjedését teszi lehetővé. Más sejtek között a réskapcsolatok az anyagcsere-folyamatok összehangolásában játszanak fontos szerepet azáltal, hogy másodlagos hírvivőket (pl. Ca-ionokat, cAMP-t), ATP-t, aminosavakat stb. eresztenek át. Jelentőségükre utal, hogy a réskapcsolatok már az embrionális fejlődés korai szakaszaiban (pl. egégnél már a 8-sejtes stádiumban) kialakulnak a sejtek között.

Gerinctelenekben nincs konnexin gén ezért a konnexinek is hiányoznak. Helyette egy másik fehérjét, az innexint termelik. Ez aminosav szekvenciájában ugyan a konnexintól eltér, de funkciójában ahhoz hasonlít. Az innexinek a gerincesek konnexonjaihoz hasonló szerkezetű és működésű kommunikációs kapcsolatot képesek létrehozni a szomszédos sejtek között.

Kérdések:

1. Sorolja fel a sejtadhéziós molekulák főbb csoportjait!
2. Csoportosítsa a sejtkapcsoló struktúrákat!
3. Mit takar a FAK rövidítés?
4. Mi a különbség a dezmoszóma és a hemidezmoszóma között?
5. Mi a heterofil és homofil kapcsolat közötti különbség molekuláris háttere?
6. Melyek a jelátviteli rendszer fő elemei?
7. Soroljon fel három receptortípust!
8. Mi a heterotrimer G-fehérje működésének alapja?
9. definiálja a „másodlagos hírvivő” fogalmát?
10. Mi a különbség a konnexin és konnexon között?

17. fejezet - A növényi sejtfal

A növényi sejteket sok más élőlényhez hasonlóan (de az állatoktól eltérően) sejtfal határolja. A sejtfalak lebontásával a növényi sejtek - megfelelő ozmotikus közegben - gömb alakú sejtekre esnek szét, protoplasztokká alakulnak. A növényi sejtfal elhatárolja a sejteket egymástól, de a sejteket összekötő, a sejtfalakon átnyúló citoplazmaszálak, a plazmodezmák révén a sejtek kapcsolatban maradnak egymással. Ez a fajta kapcsolat sokkal gyakoribb a növényi sejtek között, mint az állati sejteket összekapcsoló hasonló struktúrák, és nagyobbak is azoknál. A növények szinte minden sejtje membrán és citoplazmás kapcsolatban áll a szomszédjaival, így a növényi test topológiai értelemben szinte egyetlen - vagy néhány - sejtfalakkal feldarabolt sokmagvú sejtnek tekinthető.

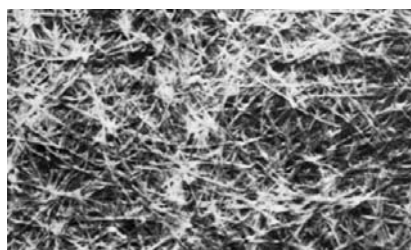
A sejtfal szerepe rendkívül sokrétű, és ennek megfelelően megjelenése, felépítése is sokféle. A sejtfal megszabja a sejt alakját, biztosítja a turgort, védi a sejtet a kártevőktől, fizikai, kémiai behatásoktól, szignálok képződési helye, szállítási pálya, szűrő, vagy éppen szigetelőréteg. A sejtfal dinamikusan változó lebomló és átépülő struktúra, melyet sokféle anyag épít fel. Kialakulása a sejtosztódás végén történik, majd továbbfejlődve kialakul az elsődleges sejtfal. Ez a még a megnyúlásra képes sejtfal további vastagodásokkal, különböző anyagok berakódásával alakul át az állandósult sejtek másodlagos falává. Ez utóbbi már csak rendkívüli esetekben alakul vissza alakváltoztatásra képes sejtállá. Az elpusztult sejtek fala megtartva alakját, részt vesz a növényi test kialakításában, sőt bizonyos sejtek pusztulása révén képesek a sejtfalak feladatukat betölteni. Ilyen élettelen de „működő”, feladatukat beteljesítő sejtek a tracheidák, tracheatagok, rostok.

A sejtfal képződése

A növényi sejtek osztódásakor a sejtek a sejtfalképződés révén válnak külön egymástól. A telofázis végén a magorsó megmaradt mikrotubuláris és mikrofilamentális elemei mentén a Golgi-készülékből származó vezikulák a középsíkba vándorolnak, és összeolvadnak. Ez a vezikulákból, mikrotubulusokból, és mikrofilamentumokból álló képlet a fragmoplaszt. A vezikulák fúziója során a bennük található pektin anyagok egybeömlenek, és ez fogja kialakítani a középlemezt, melyet két oldalról a vezikulák membránjából kialakuló új sejtmembrán borít. A vezikulák fúziójában fontos szerepe van az endoplazmatikus retikulumból kiáramló kalcium ionoknak. A folyamat fokozatosan megy végbe, kezdetben a vezikulák tubulusokat, majd lapos zsákszerű képleteket hoznak létre, melyen itt-ott nyílások találhatók. Ezek a nyílásokon a citoplazma folytonossága megmarad a leendő sejtek között, és rajtuk gyakran az endoplazmatikus retikulum is átnyúlik. Ezekből alakul ki a plazmodezma.

A sejtfal széli részein a vezikulák membránja fuzionál a sejtmembránnal. Itt a már meglevő sejtfal részbeni lebontására is szükség van, hogy a középlemezek találkozzanak egymással.

A középlemez főként cellulózzrétegeknek a középlemezre történő szintézise révén vastagszik, és kialakul az elsődleges sejtfal. Ez a főként pektinből és cellulózból álló fal még rugalmas, és a cellulózzsálak lefutási irányára merőlegesen könnyen nyújtható. További anyagok berakódásával (inkrusztáció), és ráakódásával (adkrusztáció) a fal egyre merevebbé, és vastagabbá válik. Ez az ún. másodlagos sejtfal, ami már megnyúlásra nem képes. A kialakult másodlagos sejtfalban általában három réteget lehet elkülöníteni, melyekben a cellulózzsálak lefutási iránya is különböző.

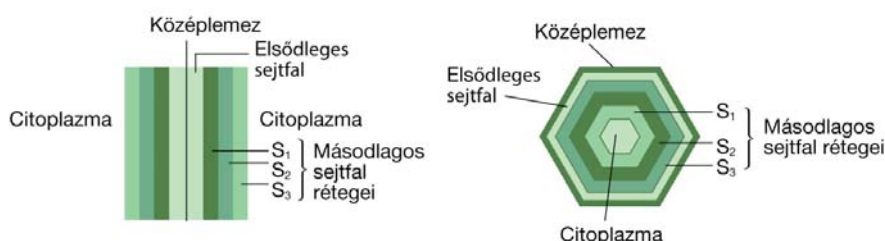


Elsődleges sejtfal felülnézeti képe (SEM fotó).



Másodlagos sejtfal felülnézeti képe (SEM fotó).

A sejtfal vastagodása, elsősorban újabb cellulóz rétegek kialakulásával a membrán felszínénél történik, vagyis a sejtfal a sejtek felé centripetálisan növekszik. Ettől eltérő, ún. centrifugális sejtfalvastagodás figyelhető meg a spórák és pollenszemek esetében, mivel azok a környező sejtektől kapnak sejtfalépítő anyagokat.



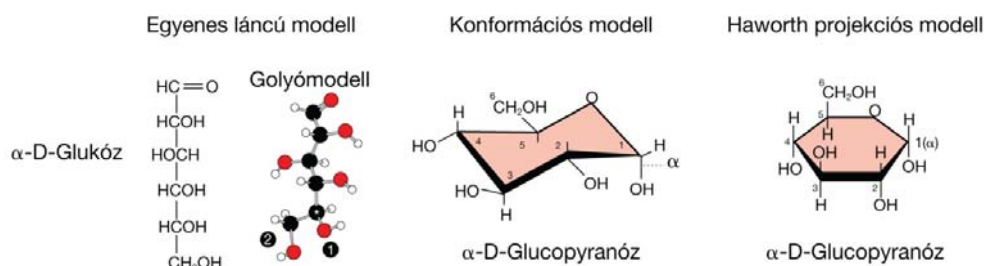
A sejtfal rétegei. A bal oldali ábrán két szomszédos sejt közötti sejtfalegyüttes metszete, a jobb oldalin egy sejtet körülvevő sejtfal metszete látható.

A sejtfalat felépítő anyagok

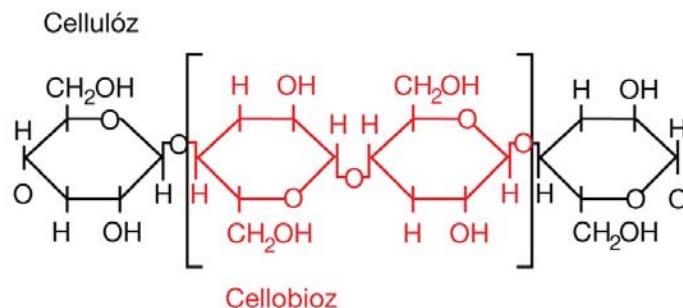
A sejtfal anyagait szerkezeti szerepük, és kémiai természetük, összetételük alapján csoportosíthatjuk. Három fő csoportba rendezhetjük a sejtfal alkotóit:

- Vázanyagok – A sejtfal hosszú, szálas szerkezetű alapanyagai, mint a cellulóz és a kallóz
- Mátrix anyagok – A cellulóz szálak közötti, általában cellulózhoz, vagy közvetlenül egymáshoz kapcsolódó szénhidrátok és fehérjék
- Inkrusztáló és adkrusztáló anyagok – Főként a másodlagos sejtfalra jellemzőek. Ilyen pl. a lignin, a para, a kutin.

Cellulóz

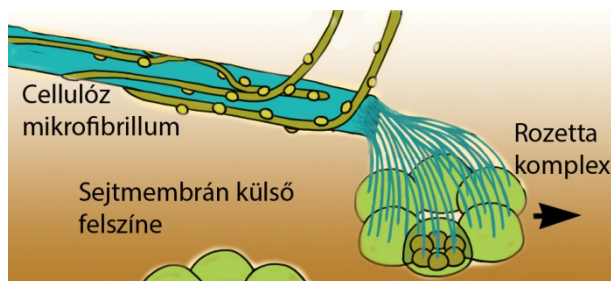


Glükóz szerkezeti képlete különböző ábrázolásokban.

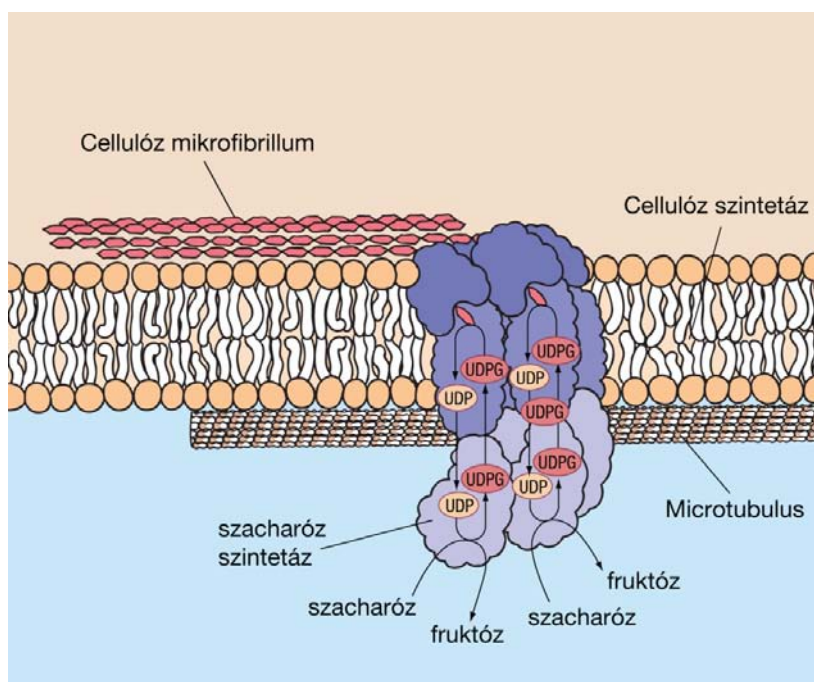


A cellulóz molekula szerkezeti képlete.

A cellulóz a növényi sejtfa legáltalánosabb anyaga. 1-4 kötésű β -D-glükóz polimer. A sejtfaiban a cellulózmolekulák hosszú, párhuzamos szálaból álló kötegeket, mikrofibrillumokat hoznak létre. A mikrofibrillumokban 36 molekula fut együtt, és a közöttük kialakuló H-hidak kristályszerűen rendezett, ún. parakristályos szerkezetet alakítanak ki több ezer glükóz molekulára is kiterjedő hosszban. Ezeket a parakristályos szakaszokat micelláknak is nevezik. A mikrofibrillumok átmérője a rendezettség mértékétől függően 5–12 μm , az elemi cellulóz szálak 2–3 μm hosszúak, míg a mikrofibrillumok több száz μm hosszúak lehetnek. A cellulóz szintézisét a membránban található enzimkomplex, az ún. rozetta enzim végzi. Ez az enzimkomplex β -1,4-glükán-szintetáz, azaz cellulóz szintetáz enzimeket tartalmaz. A rozetta komplexben 6 darab körben elhelyezkedő egység figyelhető meg a fagyasztva tört minták elektronmikroszkópos képén, innen kapták nevüket is. Minden egység hat cellulóz szintetáz enzimet tartalmaz, így együtt $6 \times 6 = 36$ molekulát szintetizálnak egyszerre, ez alkotja a cellulóz mikrofibrillumot. A komplex a membránon átnyúlva, a citoplazmából nyeri a szintézishez az alapanyagot, és a membrán külső felületére bocsátja ki a cellulóz láncokat. A cellulóz szintézis közvetlenül UDP-glükózból történik. Az immuncitokémiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a komplex citoplazma felőli oldalához szorosan asszociálódnak szacharóz szintetáz enzimek, melyek szacharózból UDP felhasználásával UDP-glükózt és -fruktózt hoznak létre. Az előbbi a komplex katalitikus helyén polimerizálódik cellulózzá, és a leváló UDP a szacharóz szintetázhoz visszakerülve a következő UDP-glükóz molekula keletkezésével újra felhasználódik.



Rozetta komplex és a cellulóz mikrofibrillum szintézis.



A cellulóz mikrofibrillumok szintézise

A fruktóz molekulák a citoplazmába kerülnek. A membránba ágyazott rozetta komplexek a cellulóz mikrofibrillumok szintézise során el kell, hogy mozduljanak, mivel a cellulóz szálat nem lehet betolni a sejtfaalba. Csak úgy képződhetnek, hogy a rozetta enzim a szintézissel ellentétes irányban folyamatosan mozog, ennek a mozgásnak az iránya szabja meg a cellulóz mikrofibrillumok lefutási irányát. Amennyiben ez random módon történne, a cellulóz szálat igen merev, szinte megváltoztathatatlan hálózatot alkotnának, pedig az elsődleges sejtfaalnak még megnyúlásra képesnek kell lennie. A rozetta enzimek elmozdulási irányát, és ezzel a cellulózsálat lefutását a sejt kortikális citoskeleton rendszere, a mikrotubulusok és aktin filamentumok elrendeződése szabja meg. A rozetta enzimek citoplazmába benyúló része ugyanis mikrotubulusok határolta sín pályán mozoghat csak el, így a cellulóz mikrofibrillumok kívül mintegy leképezik a membrán alatti mikrotubulusok lefutását.

A genomban a cellulóz szintetáz génje nagyon sok kópiában található meg. Ez a sejtfaépítés szabályozásában fontos szerepet játszik, például más gének működnek az elsődleges és mások a másodlagos sejtfaépítés során.

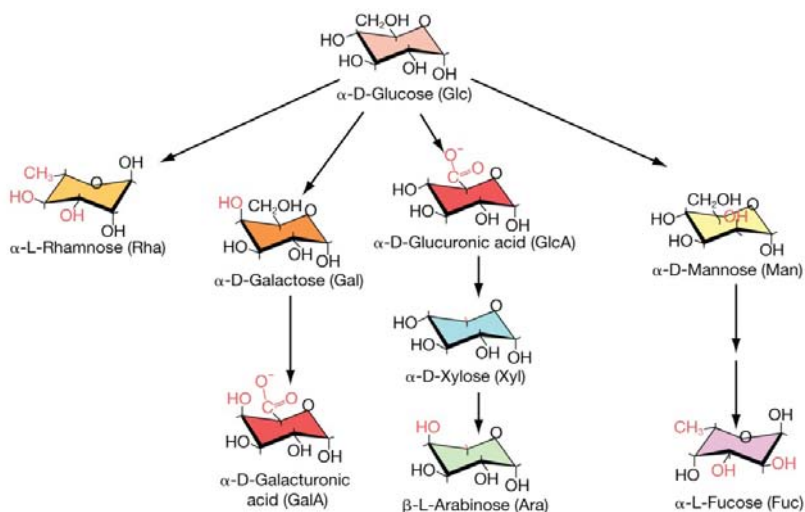
Kallóz

A kallóz a cellulóztól eltérően 1-3 kötésű β -D-glükán láncokat alkot, amelyek kettős, vagy hármas hélixet formálnak. Általában speciális helyeken alkotja a sejtfaat vagy annak egy részét. Jellemző a sérült szövetekben történő megjelenése. Kallóz fala van a pollentömlőnek, a fiatal mikrosporának, de kallóz található a rostasejtek rostamezőiben, vagy az elzáródó plazmodezmák nyaki részén. A kallóz bizonyos mértékben szigetel, a nagy molekulákat nem engedi át. Szintézise a cellulózához hasonlóan a sejtmembránban található enzimek (β -1,3-glükán szintetázok) révén történik.

Keresztkötő glikánok vagy hemicellulózok

A hagyományos hemicellulóz elnevezés mindazokra az anyagokra vonatkozott, melyeket a sejtfaalból 1M-os lúggal ki tudtak vonni. Tudjuk róluk, hogy poliszacharidok, melyek hidrogén hidakkal képesek a cellulóz mikrofibrillumokra tapadni és hálószerűen összekötni azokat. Innen a keresztkötő glikánok elnevezés.

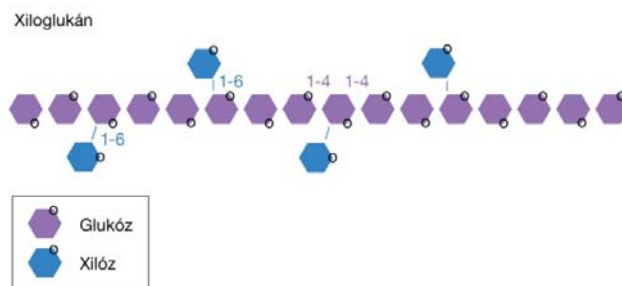
Glikánoknak nevezzük az egyféle cukor alkotta láncokat, homopolimereket (melyek glikozidos kötést tartalmaznak). Elnevezésük a monomer cukor szerint történik, vagyis a nevében levő -óz végződést lecseréljük -án végződésre.



Hexózok képletei

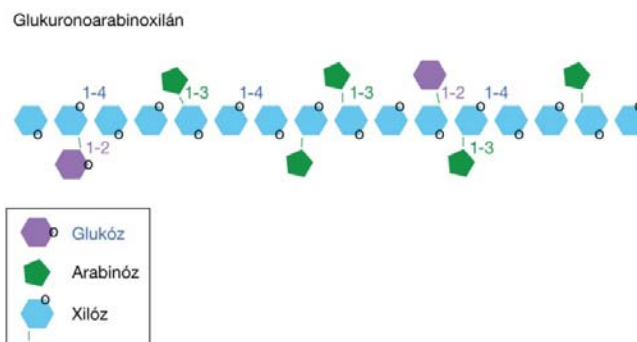
A keresztkötő glikánoknak két fő csoportját szokták elkülöníteni. Az egyik a xiloglükánok (XyG) a másik a glükuronoarabinoxilánok. Míg az első típus a kétszikűek és az egyszikűek körülbelül felének (pl. *Arales*, *Liliales*, *Orchidales*) a sejtfalában megtalálható, az egyszikűek másik része (*Commelina*-félék: *Bromeliales*, *Ciperales*, *Poales*) a glükuronoarabinoxilánokat tartalmazza.

A xiloglükánok a cellulózhoz hasonló glükóz homopolimer gerincéhez (1,4- β -D-glükán), a 6-os szénatomnál bizonyos számban xilóz molekulák kapcsolódnak. A xilóz molekulákhoz más cukrok is kapcsolódhatnak. A glükuronoarabinoxilánok xilóz homopolimer vázához 1-3 kötéssel arabinóz, vagy glükuronsav kapcsolódik, és mint az xiloglükánok esetében, ezekhez esetleg más cukormolekulák is kapcsolódhatnak.



Xiloglükán (XyG) felépítése

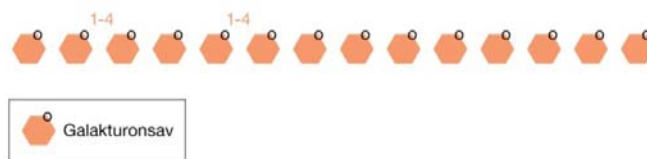
Kisebbségi mennyiségben, de egyes fajokban, speciális sejtek falában esetleg feldúsulva mannánok is előfordulnak. Ilyenek például a datolya magvak falában tartalék tápanyag szerepét betöltő mannánok. A mannóz homopolimeréhez glükóz, vagy galaktóz kapcsolódhat.



Glükuronoarabinoxilán (GAX) szerkezete

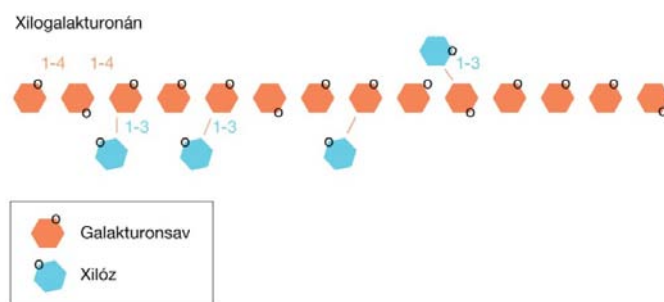
Pektin

A sejtfalból kalcium kelátorokkal (EGTA, EDTA, ammónium oxalát) kivonható anyagokat nevezzük pektinnek. A pektinek szintén poliszacharidok, melyek erősen hidratáltak, és nagy mennyiségben galakturonsavat tartalmaznak. A galakturonsav karboxilcsoportja miatt töltéssel rendelkező molekulák, melyek kalcium pektátként vannak jelen a sejtfalban. Befolyásolják a sejtfa pH értékét töltéssel látják el a falat, befolyásolják áteresztőképességét, a középlemez által biztosítják a szomszédos sejtek összekapcsolását és fontos szignálmolekulák forrásai, amennyiben a sejtfa valamilyen károsodás éri. A sejtfa töltéssel rendelkező hálózatot alakítanak ki, mely a sejtfa cellulóz vázához és a keresztkötő glikánokhoz éppúgy kapcsolódik, mint a sejtfaiban levő fehérjékhez, enzimekhez. A pektinek kémiaiilag két fő csoportja a homopolimerek és a heteropolimerek.



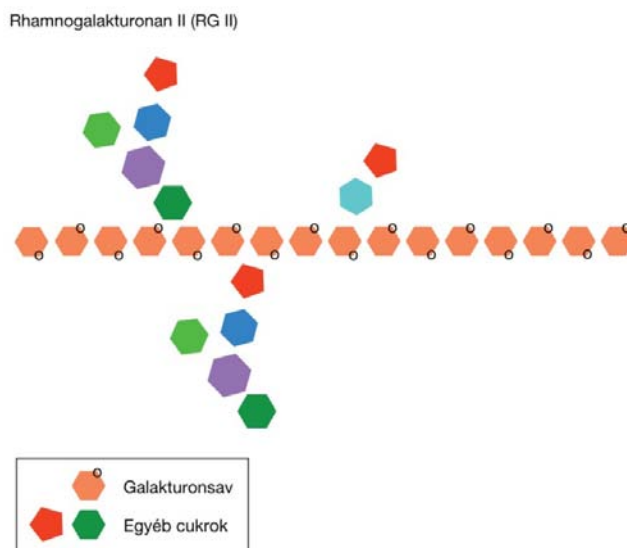
Homogalakturonán

A homopolimer pektinek leggyakoribb képviselői a homogalakturonánok (HGA) melyek 1-4 kötésű galakturonsav polimerek.



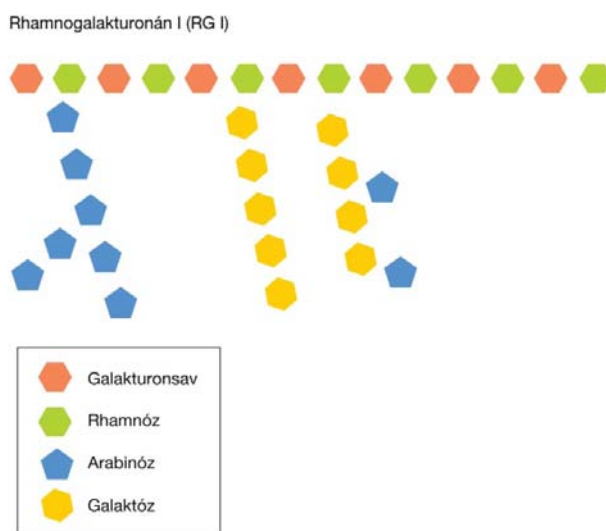
Xilogalakturonán felépítése

Ezekhez a láncokhoz a xilogalakturonánok esetében 1-3-as kötéssel Xilóz molekulák kapcsolódnak. A ramnogalakturonán II (RG II) típusú pektinek igen változatos cukrokat tartalmaznak melyek a galakturonsav homopolimerhez kapcsolódnak (ramnóz, apióz, fukóz stb.) gyakran összetett oldalláncként. Az RGII pektinek apióz molekuláihoz bór kapcsolódik melyen keresztül dimerizálódnak. A viszonylag kis mennyiségben jelenlevő RGII pektinek rendkívüli változatosságú és egyben igen konzervatív molekulák, ami a sejtfaiban betöltött speciális szerepükre utal.



Ramnogalakturonán II felépítése

A heteropolimer pektinek fő képviselője a ramnogalakturonán I (RG I). A molekula gerincét ramnóz és galakturonsav építi fel váltakozva, és ehhez különböző neutrális cukrok alkotta oldalláncok (arabinán, galaktán, arabinogalaktán) csatlakoznak. AZ arabinogalaktánok egyik típusához jellegzetes fehérjék (arabinogalaktán proteinek) kapcsolódnak.



Ramnogalakturonán I felépítése

Fehérjék

A sejtfaiban előforduló strukturális fehérjéket nagy multigén családok kódolják. Szintézisük az endoplazmatikus retikulumban történik, glikozilációjuk pedig a Golgi-készülékben megy végbe. Innen vezikuláris transzporttal a sejtmembránhoz szállítódnak és exocitózissal kerülnek a sejtfaiba. A sejtfaiban a poliszacharidokhoz hasonlóan hálózatot alkotnak. Csoportosításukat a bennük nagy mennyiségben előforduló jellegzetes aminosavak alapján tehetjük meg. Ilyen jellegzetes csoportok a hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek (HRGP), a prolinban gazdag fehérjék (PRP) és a glicinben gazdag fehérjék (GRP). A HRGP csoport legismertebb tagja az extenzin. Ez a hosszúságú glikoprotein a sejtfa megnyúlásakor a vázszerkezet áthidalásával korlátozza a sejtfa szerkezet túlzott fellazulását. Hasonló alakúak a PRP csoport tagjai is, míg a glicinben gazdag fehérjék β -redőzött szerkezetet mutatnak. Ők a sejtmembrán-sejtfa kapcsolat kialakításában játszanak fontos szerepet.

A sejtfal strukturális fehérjéinek negyedik nagy csoportja a már említett arabinogalaktán proteinek vagy helyesebben proteoglikánok, mivel a szénhidrátok aránya a molekulában több mint 95%.

A sejtfalban a strukturális fehérjéken kívül sokféle enzimet találunk melyek főként a sejtfal építésében, megnyúlásában, átszervezésében, lebontásában vesznek részt. Ilyenek a sejtfal H-híd kötéseit fellazító expanszin, a transzglikozilázok, pektinázok, a sejtfal asszociált kinázok (WAK), de találunk a falban más funkciójú fehérjéket is (lektinek, szignálfehérjék).

Inkrusztáló és adkrusztáló anyagok

A másodlagos sejtfalba és a sejtfal felületére különböző anyagok rakódnak be ezek főként szilárdító és védő funkcióval rendelkeznek.

Lignin

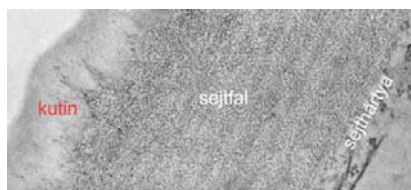
A cellulóz után a legnagyobb mennyiségben termelt szerves anyag. A zárwatermő növények akár 30%-át is kiteheti. A sejtfalak fásodását a lignin okozza. Szintézise a sejtfalban a fenilpropanoid anyagcsere aromás termékeiből (kumaril, koniferil és szinapil alkoholok) történik. A lignin kialakulásainak részleteiről keveset tudunk, de a korábbi elméletekkel szemben, melyek az alkotóelemek autopolimerizációjával történő képződését tételezte fel, ma egyre inkább az enzimek segítségével történő szintézis tűnik valószínűnek. Immunhisztokémiai vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a lignin polimerizációban fontos szerepük van a prolinban gazdag fehérjéknek.

Para vagy szuberin

Szerkezete és képződése színén alig ismert. A szuberin két doménből egy poliaromás részből és az ahhoz utólag hozzákapcsolódó hosszú (>20) szénláncú lipidek alkotta alifás részből áll. Feladata a vízszigetelés és az antimikrobiális hatás. Sérült szövetekben nagy mennyiségben termelődik, de hajtáseredetű földbeni szervek felszínén, a másodlagos és harmadlagos bőrszövet kialakulása során is, és például az endodermiszben az egyik fő komponense a sejtfalnak.

Kutin

Hosszú szénláncú zsírsavak és alkoholok észterei. Az észterképződés a zsírsavláncok karboxilcsoportja és egy másik zsírsav közbenső hidroxilcsoportja között is végbemegy, így egy hálószerű szerkezet alakul ki. A kutin monomerek az endoplazmatikus retikulumban képződnek és innen szállítódnak a sejtmembránhoz. A növények felszínének védőrétegét, a kutikulát alkotja. Hidrofób tulajdonsága miatt véd a kiszáradástól illetve gátolja a víz bejutását is. A növények szárazföldre való kilépésének egyik fontos tényezője volt a kutikula kialakulása, amely már a mohák egy részénél megfigyelhető.



Kutin-kiválás bőrszöveti sejt külső falán (TEM keresztmetszet).

Viasz

Az epidermisz felszínén gyakran viaszréteg alakul ki, melynek alakja szerkezete fajonként eltérő. Bár a viaszok szintézise is az endoplazmatikus retikulumban történik, 16, 18 szénatomszámú zsírsavakból, összetételük bonyolult és alig tudunk valamit szintézisükről és szállításukról. Mivel vízben teljesen oldhatatlanok, feltételezhetően a kutin anyagaival együtt lipidcseppekben, vagy a vezikulák membránjába épülve jutnak el a sejtmembránhoz, ahol azzal összeolvadva juttatják ki a viasz előanyagait. A sejtfalban a feltételezések szerint lipid transzfer proteinek szállítják őket. A viasz szerepet játszik a rovarok távoltartásában, vagy éppen csalogatásában, a párologtatás csökkentésében,

de fényvisszaverő képessége is jelentős. A virágszirmok hamvas, bársonyos felszíne, tompa csillogása is a viaszrétegnek köszönhető.

Sporopollenin

A pollenszemek illetve spórák külső sejtfalrétegének, az exinének az anyaga. A legellenállóbb bioszintetikus anyag, melyet semmiféle organizmus nem képes lebontani. Kémiai ellenálóképessége miatt összetételének kiderítése sem egyszerű feladat. Úgy tűnik, hogy szintézisének oldaláról, vagyis *Arabidopsis* pollenfal mutánsok vizsgálatával a rejtély talán megoldódik. A sporopollenint nem maguk a pollenszemek, hanem az őket körülvevő tapétum sejtek termelik. A kiindulási anyag a közepes és hosszú zsírsavak acetyl-CoA-val észterezett formái. A zsírsavészterek hidroxilezett formái fenilpropanoidokkal alkotott vegyületei választódnak ki ezekből a sejtekből az épülő pollenszemekre, ahol lipid transzfer proteinek és glicin gazdag proteinek segítségével épül fel belőlük a pollenfal exinéje.

A sejtfal szerkezete

A sejtfal hemicellulóz és pektin tartalma alapján kétféle sejtfaltípust szoktak elkülöníteni. Az I. típusú sejtfalban Xiloglükánok alkotják a hemicellulózt és magas pektintartalom jellemzi őket. Ez a kétszikűek és az egyszikűek egy, már említett részére jellemző. A XyG láncok H-híd kötésekkel kapcsolódnak a cellulóz mikrofibrillumokhoz és egymáshoz is, mind parallel, mind antiparallel irányban. Elég hosszúak ahhoz, hogy átvélik a mikrofibrillumok közti teret és keresztössék azokat. A keresztötésben azonban a pektin anyagok éppolyan fontosak. Metilészterek formájában szállítódnak a helyükre, ahol a pektin metilészteráz enzim a metilcsoportot lehasítva biztosítja a kalcium ionok kapcsolódását. A kalcium ionok stabilizálják a szomszédos láncokat. A pektin hálózat megszabja a sejtfal porozitását is. Az I típusú sejtfal struktúrféhéjében is gazdag, melyek szintén hálózatot alkotnak.

A II. típusú sejtfalra a glükuronoarabinoxilánok, és a minimális pektintartalom jellemző. Az egyszikű kormelidafélék jellemző sejtfalösszetétele ez. Mivel a xilóz polimerhez kapcsolódó glükuronsav és arabinóz meggátolja a láncok H-hidakkal történő összekapcsolódását, ahol ilyen oldalcsoportok vannak az összekapcsolódó láncok kinyílnak, szétágaznak. A sejtfal töltését itt nem a pektinekben levő galakturonsav, hanem a GAX glükuronsav tartalma biztosítja. A sejtfal struktúrféhéjje tartalma szintén alacsony, viszont jellemző a fenoloid származékok jelenléte.

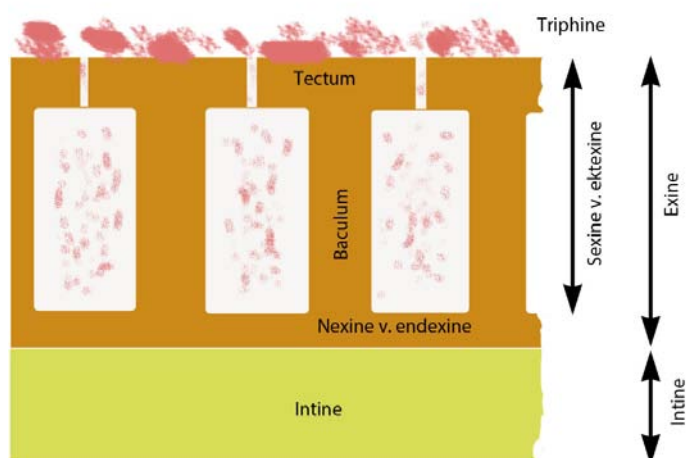
A sejtfal megnyúlása

Az elsődleges sejtfal még megnyúlásra képes. Ehhez a cellulóz mikrofibrillumoknak el kell mozdulni egymáshoz képest. Az elmozdulás csak a szálak távolodásával valósítható meg, vagyis a körkörös, vagy spirálisan elrendezett cellulózzsálakra merőlegesen nyúlhat meg a sejt. A megnyúlás mechanizmusára többféle elképzelés is született. Az egyik klasszikusnak tekinthető elmélet szerint a sejtek a membránban levő protonpumpák révén hidrogén ionokat juttatnak a sejtalba, amely a savas hidroláz enzimek aktiválásával, és a csökkent pH révén fellazítja a sejtfal szerkezetét, megbontva a cellulóz mikrofibrillumok és a keresztötő glikánok, pektinek közötti H-híd kapcsolatokat. Az eredeti elképzelés azonban nem ad magyarázatot arra, hogy hogyan stabilizálódik újra a sejtfal, miért nem feszíti szét a fellazult szerkezetet a sejtek turgornyomása. A savas hidroláz enzimek azonosítása sem sikerült. Az újabb elméletek sokkal specifikusabb enzimműködést tételeznek fel. Az egyik enzim a xiloglükán transzglykoziláz, mint a neve is mutatja képes a XyG láncot elvágni, és egy másik láncsal egyesíteni, így a mikrofibrillumok közötti kipányvázást lazítani. Az expansin a cellulóz és a glikánok közötti H-hidak felbontását végzi. Hogy a fellazított poliszacharid váz ne essen szét, azt a sejtfal vázféhéjjei biztosítják, mint például az extenzin, mely hálózatot alkotva korlátozza a mikrofibrillumok túlzott eltávolodását a turgornyomás feszítő hatására. A PRP-k is részt vesznek a falszerkezet stabilizálásában. A gyümölcsérés során a középlemezek feloldásában, a termés puhításában más enzimek, mint a pektin-metil-észterázok, és a poligalakturonázok játszanak szerepet.

A pollenfal szerkezete, kialakulása

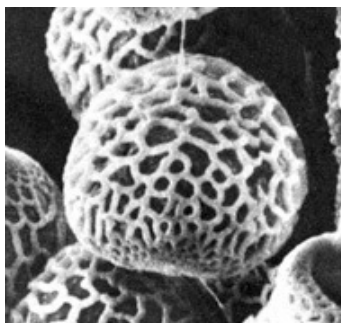
A növények spórái illetve a pollenszemek igen ellenálló sejtfallal rendelkeznek. A zárvatermők pollenszemének sejtfalát példának tekintve vizsgáljuk meg a falszerkezetet illetve annak kialakulását. A kifejlett pollenszem fala két rétegből áll, a külső sporopollenin alapú exinéből, és a pektocellulóz alapú belső intinéből. Az exine réteget tovább oszthatjuk egy alapi nexine (vagy endexine) és egy külső sexine (vagy ectexine) rétegre. A sexine réteg sajátos mintázattal rendelkezik, oszlopok, bakulumok, és esetlegesen azokra rétegződő tető, tectum alkotja. A

legkülső réteg a triphine, mely a környező tapétum sejtek maradványa alkotta bevonat, mely fehérjéket, lipideket is tartalmaz, és fontos szerepe van a pollen bibe kölcsönhatásban.



A pollenfal rétegei.

A pollenszem a mikropórából alakul ki annak osztódásával, de sejtfaik gyakorlatilag folyamatosan alakul át. A meiozissal létrejövő mikropórát egy kallóz sejtfa veszi körül melyen nincsenek plazmodezmák. A kallóz sejtfa alá, a mikropórát egy cellulóz alapú primexine réteget szintetizálnak, majd a mikropórát körülvevő tapétum sejtek megkezdik a kallóz fal lebontását. A megmaradó primexine réteg templátul szolgál a kialakuló exinének. Az exine réteg elsősorban sporopolleninből épül fel, aminek építőköveit a környező tapétum sejtek szintetizálnak, és juttatnak exocitózissal a pollenszem felszínére, ahol egyelőre ismeretlen módon épül fel az exine mintázata. Az intinét a lebomló primexine helyére, az exine alá, maga a pollenszem szintetizálja. A pollenszem tehát centrifugális vastagodással épülő exine, és hagyományos centripetális növekedéssel kialakuló intine rétegekkel rendelkezik.



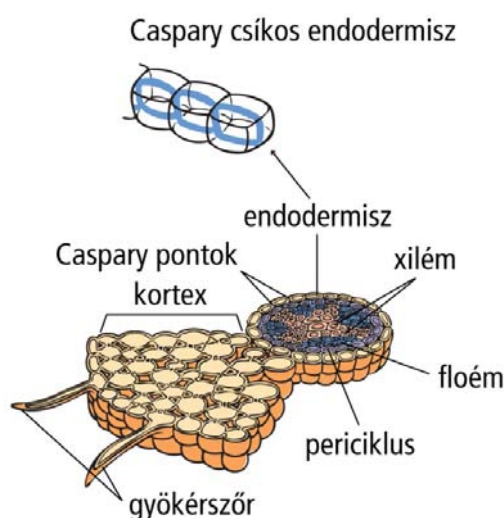
Liliom-faj pollenjének SEM fotója (4000x nagyítás).

Apoplasztikus és szimplasztikus szállítás

A növényekben végbemenő szállítási folyamatok két fő csoportra oszthatók aszerint, hogy a sejtmembrán által határolt téren belül (szimplaszt) vagy azon kívül (apoplaszt) történik-e. A szimplasztikus szállítás a sejteket összekötő plazmodezmákon keresztül valósul meg. Az apoplasztikus szállítás gyakorlatilag passzív anyagmozgás a koncentráció-, és nyomásviszonyoknak megfelelően. Az apoplasztikus tér a sejtmembránon kívüli terület, vagyis a sejtfa és a sejt közötti tér. Apoplasztikus transzporttal mozognak például a gyökér kérgi részében a talajoldatból bejutott anyagok, de apoplasztikus transzport a xilém elemek általi szállítás is. A szimplasztikus transzport mindig rövidtávú, sejtről sejtre történik. A szimplasztikus transzport és az apoplasztikus transzport összekapcsolódik, de ehhez a szállított anyagnak át kell jutni a sejtmembránra. Ez a lépés kontrollált folyamat, a legtöbb anyag esetében a sejtmembrán csatornáin keresztül történik.

Az endodermisz szerepe a sejt apoplasztikus-szimplasztikus szállításának átváltásában

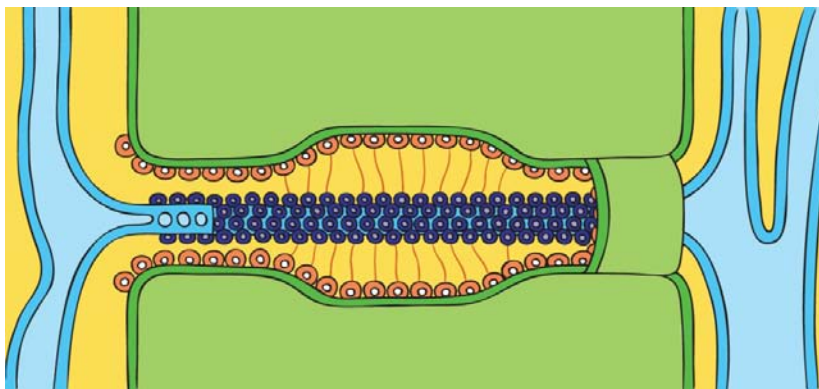
A növények gyökerének felszívási zónájában a kéregrészt és a szállítószöveteket tartalmazó központi henger között egy parásodott sejtfalú sejtréteg az endodermisz található. Ennek a rétegnek a sugárirányú falain egy hidrofób, övszerű parásodás alakul ki, mely meggátolja a szimplasztikus térben áramló anyagok továbbjutását a központi henger irányába és fordítva. A sejtközzötti térben levő ionok, cukrok stb. csak a sejtfal megkerülésével juthatnak át az endodermisz túloldalára. Ehhez a parásodott övi régióhoz a sejtmembrán is erősen ki van horgonyozva, így a sejtfal sejtmembrán között sem történhet anyagáramlás. Az egyetlen út a membránon keresztüli transzport, amit a sejt felügyel. Ezzel a módszerrel az apoplasztikus anyagtranszportot a növény képes szimplasztikus transzportra átváltani.



A központi hengert körbeölelő endodermisz parásodott harántfalai.

Plazmodezmák

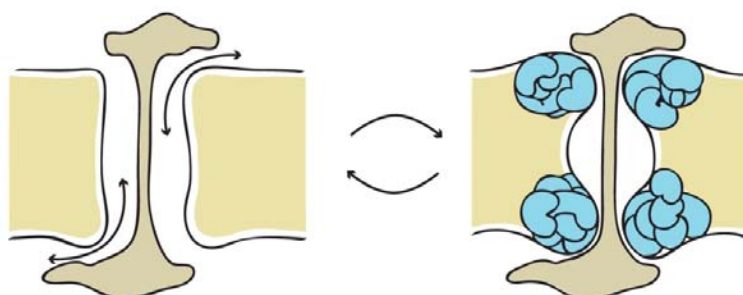
A sejtosztódás citokinézis fázisában, a középlemez kialakulása során a vezikulák fúziója nem teljes. A két utódsejt között citoplazma hidak maradnak, melyeken a sejtmembrán átfordul a szomszédos sejt membránjába, és ezeken a sejtkapcsolatokon keresztül az endoplazmatikus retikulum is átnyúlik. Ezek a citoplazma hidak plazmodezmákká alakulnak. A plazmodezmák belsejében az átnyúló endoplazmatikus retikulum egy szabályos szerkezetű csövet alkot, ez a dezmotubulus. A plazmamebrán alkotta csatorna és a benne középen futó dezmotubulus felszínén is elektrondenz bevonat figyelhető meg, mely fehérjékből áll. A dezmotubulus közepén szintén egy erősebben festődő rúdszerű képlet figyelhető meg az elektronmikroszkópos felvételeken. A plazmodezmák alakja lehet egyenes, megtört, elágazó, és öblös. Ez utóbbi típus esetében a sejtfalon átnyúló plazmodezma középtájon kitágul, kiöblösödik, és a dezmotubulus és a citoplazmamembrán eltávolodik egymástól. A kiöblösödésekben a membrán felszínén levő citoplazmaköpeny (cytoplasmic sleeve) fehérjerészecskéit és a dezmotubulust küllőszerű nyúlványok kötik össze. A tárgulatokban, vagy az elágazó plazmodezmák elágazási pontjain a dezmotubulusok merev szerkezete fellazulhat, és a szokványos endoplazmatikus retikulum képet mutatja.



Plazmodezma szerkezete.

A plazmodezmákon keresztül történő szállítás két útvonalon mehet végbe. A desmotubulus és a citoplazmamembrán közötti vékony citoplazmarészben, vagy a desmotubuluson keresztül. Bár elméletileg a membránáramlás is egy lehetséges anyagtranszport, a plazmamembrán lipidjeinek mozgását a plazmodezmán keresztül nem sikerült kimutatni. A desmotubulus igen szűk ürege elektronmikroszkópban0 ugyan tömörnek látszik, de ez főként a membrán lipidjeinek és fehérjeinek a poláros, membránból kilógó részeit tartalmazza. Endoplazmatikus retikulum lokalizált lipidek áramlását a desmotubuluson keresztül sikerült kimutatni.

A desmotubulus körüli teret a desmotubulushoz és a citoplazmamembránhoz asszociálódott nagyméretű fehérjepartikulumok szűkítik be. A különböző méretű, fluoreszcensen jelölt részecskék vizsgálata igazolta az elektronmikroszkópos méréseket, miszerint a rés körülbelül 2-4 nm nagyságú partikulumok átjutását teszi lehetővé. Ennek megfelelően a plazmodezmák molekulaszűrőként működnek. Bizonyos esetekben a sejtek teljesen elzárják ezt a kis részt is, kallózt szintetizálva a plazmodezmák nyaki részénél a sejtfa alá és beszűkítve ezzel a plazmodezmákat.



A plazmodezmák zárása kallóz szintézissel.

Sérülés hatására, vagy hirtelen turgorváltozásra a plazmodezmák záródnak. Ebben a felszabaduló kalcium ionoknak is szerepe van, mivel a kallóz szintetáz enzim megemelkedett kalciumion koncentrációra aktivizálódik. A turgorállapot helyreállása után a plazmodezmák újra megnyílnak. Mivel aktin polimerizációt gátló szerrel (citokalazin D) a plazmodezmák átjárhatósága jelentősen megnő, feltételezik, hogy plazmodezma-asszociált aktin filamentumok is részt vesznek a plazmodezmális transzport szabályozásában, a plazmodezma nyaki részének szűkítése révén. Különböző vegyszerek vagy vírusfertőzés hatására a plazmodezmák áteresztőképessége nagymértékben megnőhet, de a 2-4 nm-es mérethatár (SEL-size exclusion limit), ami kb. 800 D molekulatömegnek felel meg bizonyos sejtek esetében eleve egy nagyságrenddel is nagyobb lehet.

Megfigyelték bizonyos fehérjék- például a KNOTTED1 transzkripciós faktor-, átjutását a plazmodezmákon annak ellenére, hogy méretük jóval nagyobb volt, mint az adott plazmodezmára jellemző mérethatár. Feltételezhető, hogy bizonyos fehérjék és RNS molekulák képesek megnövelni a plazmodezmák áteresztőképességét akár 40 kD-ra is. Ezt használják ki bizonyos vírusok is, melyek olyan fehérjékkel rendelkeznek (MP, moving protein) amely nagyon hasonlít pl. a fent említett saját fehérjéjére. Hogy a sejtben milyen egyéb molekulák segítik a plazmodezmális transzportfolyamatokat, egyelőre még csak hipotézis szinten van, de a nagyméretű molekulák chaperonokkal, vagy ahhoz hasonló fehérjékkel való kiegyenesítését a legtöbb modell feltételezi.

A plazmodezmákon keresztül történő szállítást leginkább fluoreszcens próbákkal lehet vizsgálni. A fluoreszcensen jelölt különböző méretű dextrán molekulák jól használhatóak a plazmodezma SEL/MEL (mass exclusion limit) értékének mérésére, illetve az egymással aktív plazmodezmális kapcsolatban levő sejtek kimutatására.

Plazmodezmák másodlagos keletkezése.

Plazmodezmák nem csak a sejtosztódáskor alakulhatnak ki, hanem másodlagosan olyan sejtek között is, ahol nem voltak plazmodezmák. Különösen nyilvánvaló ez egymásra oltott növényi szövetek esetébe. Az első jele az új plazmodezmák kialakulásának az az, hogy a sejtfal mindkét oldalán az endoplazmatikus retikulum a sejtmembránhoz kapcsolódik. Ezután mindkét oldalon megkezdődik a sejtfal vékonyítása, végül a membránok, és az endoplazmatikus retikulum is fuzionál. A plazmodezma kialakulását követően a sejtfalak visszaépülnek.

A plazmodezmák meg is szüntethetők a sejtek között. A sztóma komplexek melléksejtjei és a többi epidermiszsejt között az eredeti plazmodezmális kapcsolat megszakad. Hasonló folyamatokat lehet megfigyelni a mikrospóra anyasejtek meiózisa való felkészülése során is. Érdeemes megjegyezni, hogy ezek között a sejtek között a citoplazmális kapcsolat nem a klasszikus plazmodezma struktúrát jelenti, hanem nagy felületű citoplazma kapcsolatokat a sejtek között, mely gyakorlatilag nem képeznek akadályt még a riboszómák számára sem.

Sejtfal-sejtmembrán kapcsolat

A növényekben nem találtak integrinhez, vagy cadherinhez hasonló molekulákat. Az extracelluláris mátrix, a sejtfal és a membránok, vagy az azon belüli citoskeleton kapcsolata más molekulákon alapul. A növényi sejtek nehezen megbontható kapcsolata a sejtfallal nem lenne célszerű, hiszen a növényi sejtek a turgorváltozást, a plazmolízist és deplazmolízist át kell, hogy vészeljék. Ez nyilván rugalmasabb sejtmembrán – sejtfal asszociációkat igényel. A plazmolizált növényi sejtek membránjai egy ideig - mikroszkóppal is jól látható módon - kapcsolatban maradnak a sejtfallal az ún. Hecht-féle fonalakon keresztül. Ezek nem a plazmodezmák okozta kihorgonyzódásai a sejteknek, amit az is egyértelműen bizonyít, hogy olyan sejtfalakon is megjelennek, mint az epidermiszsejtek külső fala, ahol plazmodezmák nem lehetnek. A sejtfal sejtmembrán asszociációkban többféle fehérje, glikoprotein játszik szerepet. Az egyik legfontosabb csoport ezek közül a sejtfal asszociált kinázok (WAK). Ezek transzmembrán fehérjék, melyeknek a sejtmembránból kifelé álló, extracelluláris részük (mely igen hasonló az állati epidermális növekedési faktorhoz) foszforilált állapotban erős pektinkötő tulajdonságot mutat. A citoplazmába belógó részük proteinkináz aktivitással rendelkezik.

Felmerül annak a lehetősége is, hogy ezek a kinázok pektin receptorként is működhetnek. A WAK-ok szintén erős kötődést mutatnak a sejtfal glicinben gazdag glikoproteinjeihez, (GRP) melyek egyébként szintén erősen asszociálódnak a pektinekhez. Egy másik, sejtmembrán–sejtfal kapcsolódásban fontos csoport az AGP proteoglikánok. Ezek nem transzmembrán fehérjék, de glikozil-foszfátidilinozitol (GPI) kihorgonyzásuk révén a membránban, a foszfolipáz C általi hasítás révén szignálvezetési útvonal részei lehetnek. Egy igen fontos sejtmembrán - sejtfal asszociációt jelent a membránban található sejtfal polimereket gyártó enzimek nagy száma. Elsősorban a cellulóz szintézist végző rozetta komplexeket kell megemlíteni, melyek a sejt kortikális mikrotubuláris hálózatával is kapcsolatban vannak, de hasonlóak ehhez a kallóz szintetáz enzimek is. Sok jelölt van még a listán, melyekről a kutatások még nem egyértelműen bizonyították a sejtfal- sejtmembrán asszociációban játszott szerepüket.

A sejtfal szerepe a sejt védelmében

A sejtfal a növényi sejt védelmét többféle módon is ellátja. Mechanikai védelmet nyújt a sejt számára, de e mellett igen fontos szignálok forrása is, amennyiben a sejtet támadás éri. Egy leegyszerűsített példán is jól nyomon követhető a sejtfal, mint első védvonal szerepe a kórokozók elleni küzdelemben. Mivel a növény nem tud elmenekülni a támadó elől, csupán kémiai, biológiai módszerekkel tud védekezni. Amennyiben egy gomba megtámadja a növényi sejtet, megindul a láthatatlan küzdelem a kórokozó, és a növényi sejt között. A gomba a sejtfallal találkozva emésztő enzimeket bocsájt ki, mint például endo-poligalakturonázokat (EPG), melyek a sejtfal pektin állományát kezdik el bontani. A pektinbontás eredményeképpen keletkező oligogalakturonánok fontos információt szolgáltatnak mind a gomba, mind a megtámadott sejt számára. A gomba ebből érzékeli, hogy jó helyen jár, emésztő enzimeit célba találták. A növényi sejt is érzékeli az oligogalakturonánokat, ami riadójelként működve, tudatja a sejtrel, hogy gombatámadás érte. A sejtfelszíni receptorokon keresztül beindul egy szignálvezetési út, ami a növényt új anyagok szintézisére serkenti. A növény egyrészt a gomba galakturonáz enzimét blokkoló

poligalakturonidáz inhibitor fehérjét (PGIP) termel, másrészt válaszcsepásként megtámadja a gombát fitoalexinek, kitinázok és β -1,3-endoglukanázok segítségével. A gomba sejtfalának emésztése révén keletkezett sejtfal oligoglükánok visszajelzést adnak a gombának, hogy ellentámadás történt, ezért glukanáz inhibitor fehérjéket termel, hogy blokkolja a növény ellentámadását. A harc évmilliók óta folyik, az ellenségek újabb és újabb trükköket vetnek be.

Természetesen a mechanikai védelem sem becstülendő le. Nagyon sok sejt, vastagodott falával komoly ellenállást tud kifejteni a legkülönbözőbb behatások ellen. Ez legtöbbször nem is a vastagodott falú sejt védelmét szolgálja, hanem ezek a sejtek óvnak meg más növényi részeket. Ilyenek pl. a körte kősejtjei, melyek a magokat védik, de a csonthéjasok belső termésfala is erős védelme a magoknak.

Kérdések:

1. Milyen feladatokat lát el a növényi sejtfal?
2. Hogyan csoportosíthatjuk a sejtfal alkotóelemeit?
3. Mi a cellulóz kémiai összetétele?
4. Hogyan szintetizálódik a cellulóz?
5. Miből, és hogyan alakul ki a középlemez?
6. Milyen szerepet töltenek be a pektinek és hemicellulózok a sejtfal szerkezetében?
7. Mi az apoplaszt és a szimplaszt?
8. Mi a különbség az elsődleges, és másodlagos sejtfal között?
9. Hogyan alakulnak ki a plazmodezmák?
10. Mire jó az ún. hidrofób sejtfal-sejtmembrán komplex?
11. Milyen fehérjék, glikoproteinek vesznek részt a sejtfal-sejtmembrán kapcsolat kialakításában?
12. Mi a sejtfal szerepe a patogének elleni védekezésben?
13. Mik azok az inkrusztáló anyagok?
14. Hogyan épül fel a pollenszemek fala?

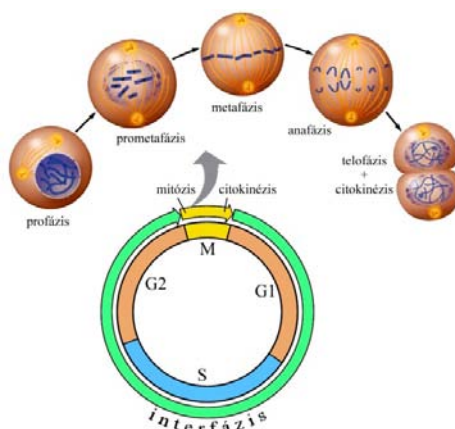
18. fejezet - A sejtciklus és a sejtosztódás

A sejtciklus

A ma ismert életformák legkisebb önálló működési és szerveződési egysége a sejt. Az egysejtűeknél és a soksejtűekben egyaránt érvényes, hogy új sejt(ek) csak korábban létező sejt(ből) jöhet(nek) létre, a sejt osztódása során. Az egysejtűek esetében a sejt osztódása új egyedek létrejöttét eredményezi. A soksejtű szervezetekben az egyedfejlődésük során a megfelelő sejtszám, a szövetek és szervek a megtermékenyített petesejt (zigóta) és utódsejtjei meghatározott számú osztódásával alakulnak ki. A sejtek reprodukciója általában a sejt tömegének, anyagainak megkettőződésével, két genetikailag azonos utódsejt kialakulásával járó, szigorú rendben lezajló események során valósul meg. A sejt anyagainak megkettőződését, majd osztódás következtében két új sejt létrejöttét eredményező folyamat a **sejtciklus**. Hagyományos definíció szerint a sejtciklus a mitózis kezdetétől a következő mitózisig tart.

A sejtciklust, annak meghatározó történései alapján, fázisokra osztjuk. A hagyományos fénymikroszkópos vizsgálatokkal a ciklust két szakaszra lehet osztani, a mag és a sejt kettő osztódására, valamint az osztódások között eltelt időszakra. A sejtmag osztódása (mitózis) és a sejt egészének (citoplazmájának) osztódása (citokinézis) együttesen alkotják az **M fázist**. (Gyakran nevezik ezt a két folyamatot együttesen mitózissnak.) Két egymást követő M fázist elválasztó szakasz az **interfázis**. Korszerű vizsgáló módszerekkel azonosítható, hogy az interfázis is jól elkülöníthető szakaszokból áll: a tipikus sejtciklusban **G₁**, **S** és **G₂** fázisokra tagolható.

Az M fázisban megtörténik a kromoszómák szétválása és a sejt kettő osztódása. Interfázisban a sejt növekszik, tömege megkettőződik, majd a mitózisban feleződik. A fehérjék, ribonukleinsavak szintézise, a sejtorganellek számának növekedése az interfázisban folyamatos, de megkettőződésük, majd feleződésük a mitózis során nem szigorúan pontos, ezért a két utódsejt tömege eltérő. E különbségek általában már az új ciklus elején kiegyenlítődnek: az osztódásból kisebb tömeggel kilépő sejtek hosszabb időt töltenek a G₁ fázisban, mint a nagyobbak, ezáltal tömeghiányukat pótolják. A DNS szintézise az interfázis során nem folyamatos, kizárólag az S fázisban zajlik. A duplikáció pontos, minden DNS-molekuláról egy másolat készül, továbbá a feleződés a mitózis során szigorúan egyenlő, mindkét utódsejt pontosan egyforma kromoszómakészletet örököl. Hasonlóan szigorú szabályozás figyelhető meg a centriólumok számában és szétosztásában. Ezek száma az interfázisban, általában az S fázis során, duplázódik, majd osztódáskor fele-fele arányban kerülnek a két utódsejtbe.



A sejtciklus általánosított sémája.

A G₁ fázisban minden kromoszóma egy DNS-molekulából áll (2C; egy kromatidás állapot), az S fázisból kilépő sejtek kromoszómái már 2-2 DNS-molekulát tartalmaznak (4C; két kromatidás állapot).

Az egyes fázisok hossza a sejtípustól és a külső körülményektől (pl. oxigén- és tápanyagellátottság) függ. Az élesztősejtek kedvező körülmények között 1,5–2 óránként osztódnak. Emlősejtek ciklusideje szövettenyésztetben,

optimális körülmények között kb. 20–24 óra. Az M fázis kb. 1 óra, az S fázis kb. 8 óra, a G₂ kb. 4 óra. A G₁ fázis a leghosszabb és általában a legváltozóbb is.

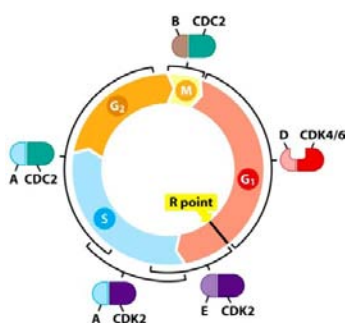
A sejtciklus történései szigorúan meghatározott rendben követik egymást. **Ellenőrző pontok** – molekuláris mechanizmusok – működnek a ciklus meghatározott pontjain, melyek a továbblépést csak akkor engedik, ha a fázisra jellemző részfolyamatokat a sejt végrehajtotta. és nem mutatkozik károsodás a genetikai örökítő készletben. A három fő ellenőrző pont: a G₁/S fázis határán, a G₂ fázis végén és az M fázisban működik.

A sejt akkor tud a G₁-ből az S fázisba lépni, ha a G₁ fázis során ún. **növekedési faktorokhoz** (általánosabban ún. mitogénekhez) jutott és tömege megfelelő méretűre növekedett, DNS-állománya ép, a replikációhoz szükséges apparátus és anyagok (pl. polimerázok, nukleotidok stb.) rendelkezésre állnak. Mindezek ellenőrzésére a G₁ fázis végén kerül sor (G₁ ellenőrzési pont). Jellemző, ha ezen a ponton túllendül a sejt, akkor normális esetben végig is halad a cikluson. (Ezért is nevezik a G₁ ellenőrzési pontot start pontnak vagy restrikciós pontnak.) A G₂ ellenőrzési pont nem engedi mitózisba lépni a sejtet akkor, ha DNS-molekulái károsodottak vagy hiányosan replikálódtak az S fázis során. Az M ellenőrzési pontok a mitózis metafázisában működnek: például a sejt addig nem lép át az anafázisba, amíg az összes kromoszóma rá nem kötődik a szegregációt biztosító magorsóra (mitotikus készülékre) és el nem helyezkedik az ekvatoriális síkban.

A sejtciklus folyamatainak összehangolását molekuláris mechanizmusok biztosítják. Létezésükre a sejthibridizációs és magátültetési kísérletek szolgáltatnak bizonyítékot. A fázisok közötti átmenetet kinázokból és szabályozófehérjékből álló komplexek működése irányítja. Alapvető elemei a **ciklinfüggő protein kinázok** (cyclin dependens kinase – **Cdk**), valamint a **ciklinek**. A sejtben többféle Cdk és ciklin is működik (mai ismereteink szerint több mint tíz Cdk és több mint 30 ciklin), specifikus kombinációik más és más fázisátmeneteket szabályoznak. A G₁ eseményeit a Cdk4/ciklin-D (vagy a Cdk6/ciklin-D) komplex, a G₁/S átmenetet a Cdk2/ciklin-E komplex aktivitása szabályozza. A Cdk2/ciklin-A komplex az S fázisban aktív, a Cdk1/ciklin-A az S-G₂ átmenetet és a G₂ fázis történéseit irányítja. A Cdk1/ciklin-B komplex a G₂-ből a mitózisba lendíti a sejtet.

A magasabbrendű állatok sejtciklus-szabályozásának legfontosabb Cdk/ciklin molekulái		
Cdk/ciklin komplex	Cdk	ciklin
G ₁ -Cdk	Cdk-4, 6	ciklin-D (G ₁ ciklin)
G ₁ /S-Cdk	Cdk-2	ciklin-E (G ₁ /Sciklin)
S-Cdk	Cdk-2	ciklin-A (S ciklin)
M-Cdk	Cdk-1 (emlősökben cdc2)	ciklin-B (M ciklin)

A kapcsolóként funkcionáló, periodikusan változó ciklin/kináz rendszer működését számos belső és külső tényező modulálja. A Cdk-k aktivitását a ciklinek mellett még többféle inhibitor fehérje is befolyásolja, és a Cdk-k maguk is más kinázok és foszfatázok szubsztrátjai: aktivitásuk függ foszforiláltságuk szintjétől is. A Cdk molekulák (apoenzimek) aktivitásukat csak a ciklinekkel (koenzimek) képzett komplexben (holoenzim) képesek kifejteni. A Cdk a komplex kialakulásakor foszforilálódik, egy aktiváló (Cdk aktiváló kinázok hatására) és két gátló (Cdk gátló kinázok hatására) foszforilációs helyen. A komplex létrejöttét követően a gátló foszforilációs helyekről foszfatáz enzimek távolítják el a foszfát csoportokat, így az enzimkomplex aktiválódik. A Cdk molekulák koncentrációja többé-kevésbé állandó a ciklus során. A ciklus egyes szakaszaira jellemző ciklinek koncentrációja ciklusról ciklusra periodikusan változik: újonnan szintetizálódnak, majd ubikvitinálódnak és a proteasóma rendszerben degradálódnak.



A sejtciklus szabályozása.

Megfelelő tápanyag-ellátottság mellett és az ún. növekedési faktorok hatására a G_1 fázisban aktiválódik a sejtekben a receptor tirozin-kináz/Ras/MAP kináz jelátviteli út. (Ma már több mint 50 növekedési faktor ismert. Parakrin módon ható, a célsejt plazmamembránjában található receptorokhoz igen nagy affinitással kötődő jelmolekulák.) A jelátviteli útvonalon aktiválódnak és felszaporodnak azon transzkripciós faktorok, melyek a sejtciklus elindításához szükséges gének expresszióját irányítják. A ciklin-D gén fokozódó aktivitása következtében megnő a ciklin-D koncentrációja a sejtben és aktiválódik a Cdk4/ciklin-D komplex. E komplex egyik szubsztrátja az **Rb-fehérje** (a retinoblasztoma-gén terméke, a gén deléciója retinoblasztomát, egy daganatos elváltozást okozhat). Az Rb számos foszforilációs hellyel rendelkezik, és defoszforilált állapotban az E2F transzkripciós faktort tartja kötött állapotban. A Cdk4 fokozatosan foszforilálja az Rb fehérjét, mely hiperfoszforilált állapotba kerül. Ekkor az E2F faktor felszabadul, és a magban megindítja a G_1/S átmenethez és a DNS replikációjához szükséges gének – többek között a ciklin-E génjének – átírását: a sejt átlép a G_1 -ből az S fázisba. Növekedési faktorok hiányában ez a szabályozás nem működik, a növekedés és a lelassul vagy leáll, a ciklin-D koncentráció csökken, a G_1 fázis elhúzódik, sőt a sejt kiléphet a ciklusból és G_0 fázisba kerülhet.

Megakad a sejt a G_1/S határon akkor is, ha DNS-állományát károsodás (pl. száltörés) érte. A DNS megfelelő szerkezetét, épségét a p53 fehérje ellenőrzi. A p53 folyamatosan termelődik, normális körülmények között gyorsan degradálódik is, koncentrációja ezért alacsony. Hibás DNS szakaszon tetramerizálódik és stabilizálódik, koncentrációja hirtelen emelkedik. A p53 egyben transzkripciós faktor, például a **p21 kinázgátló fehérje** szintézisét indítja be. A p21 a Cdk4/ciklin-D komplexhez kötődve azt inaktív állapotban tartja, a sejt nem lép az S fázisba, ez lehetőséget biztosít a DNS hiba kijavítására. Ha a DNS kijavítása sikertelen, a p53 apoptotikus fehérjék képződését is képes stimulálni, melyek sejtpusztulást (apoptózist) okoznak. Ezért a p53 a genom integritásának egyik fontos "őre", megakadályozza, hogy a sejt károsodott, hibás DNS-molekuláit replikálja és utódaiba örökítse.

A valóságban még számos más tényező befolyásolja a G_1/S fázisátmenetet, de a szabályozás lényegét a fenti két mechanizmus is jól megvilágítja: a külső és belső hatások úgy szabályozzák a fázisátmeneteket, hogy különböző áttételeken keresztül gátló vagy aktiváló jeleket generálnak, melyek célpontja valamelyik Cdk. Ez integrálja a pozitív és negatív jeleket, és attól függően, hogy melyik van túlsúlyban, engedi tovább vagy állítja meg a sejtet a ciklus valamelyik fázisában.

Az S fázisban a sejt egyszer és csakis egy másolatot készít DNS-molekuláiról. A szabályozómechanizmus, mely minden DNS-ről csak egy kópia készítését engedélyezi, egy fehérjekomplex, a **jogosítófaktor** (licensing factor) működésén alapul. Ez a komplex a mitózis végén a DNS-molekulák azon szakaszaira kötődik, ahol majd a következő S fázisban megindul a replikáció. A másolást végző DNS-polimeráz csak a jogosítófaktor által kijelölt helyekről tudja megindítani a replikációt, de ehhez a G_1/S fázis határán aktiválódó Cdk-k (pl. Cdk2-ciklinE) közreműködése is szükséges. Hatásukra a jogosító faktor egyes fehérjei foszforilálódnak, majd leválnak a DNS-ről, utat nyitva a DNS-polimeráznak, mely viszont a jogosító faktor hiányában ismételt nem tud a replikációs eredő pontokhoz kötődni, tehát nem indulhat meg ugyanazon szakasz ismételt lemásolása.

A G_2/M átmenetet kiváltó **MPF** nevű **faktor** (maturation promoting factor, érést/mitózist elősegítő faktor) a Cdk1/ciklin-B komplex, mely számos fehérjét, így a hisztonokat, a magváz, a magvacska, a magorsó fehérjeit képes foszforilálni. A ciklin-B az interfázis elején hiányzik a sejtől, majd fokozatosan felhalmozódik és a G_2/M fázis határán eléri azt a kritikus koncentrációt, mely a Cdk1 aktiválásához szükséges. Ekkor a kináz működni kezd, foszforilálja az M fázis végrehajtásához szükséges fehérjéket, de emellett aktivál egy proteolitikus enzimrendszert is (az APC-t), mely a ciklin-B-t a metafázisban percekben belül elbontja. Ezzel a kináz kikapcsolódik, és újra csak akkor kezd működni, ha a fehérjeszintézis elegendő új ciklin-B-t produkál. A ciklin-B/Cdk1 kináz komplex, tehát egy viszonylag egyszerű önszabályozó rendszer, melyben az egyik komponens (a ciklin) periodikus mennyiségi változásai szabályozzák a másik komponens (a kináz) aktivitását, ami viszont visszahat a szabályozó komponensre.

A sejtciklus tipikus, az eukariótákban általánosan érvényesülő formája négy fázisból áll, ám számos változata is létezik. Az **embrionális sejtciklus** igen rövid ideig tart (8–10 perc), csak az M és S fázisok különíthetők el, a G_1 és G_2 fázisok kimaradnak vagy nagyon rövidek. (A „G” név az angol gap = rés szóból származik, jelezve, hogy az M és S fázisokat időbeli „rés” választja el egymástól.) A G fázisokra jellemző ellenőrzési pontok nem működnek, egyedüli molekuláris szabályzómechanizmusát az M-Cdk (Cdk1-ciklinB) komplex biztosítja. Amikor a ciklinB kapcsolódik a Cdk1-hez, kialakul az aktív kináz komplex, a sejt belép az M fázisba. Az osztódást követően a ciklinB elbomlik, és a sejt az S fázisba lép. Itt a DNS duplikálódik, a ciklinB újra szintetizálódik. A DNS replikáció rövidebb ideig tart, mint a ciklinB szintézise, így a DNS megkettőződése rendben befejeződhet, mielőtt a sejt a következő M fázisba lépne. A sejtszám minden ciklusban duplázódik, míg a sejtek tömege nagyjából feleződik. Ez azért lehetséges, mert a petesejt általában igen nagy, tömege az átlagértéket sokszorosan meghaladja a

felhalmozott tartalék anyagok miatt. A gyors, rövid ciklusok addig zajlanak, amíg a sejtek mérete az átlagos szintre nem csökken, ekkor beiktatódnak a mérettartást biztosító G_1 és G_2 fázisok.

Ha az M fázis végén elmarad a citokinezis, két- és többmagvú sejtek alakulhatnak ki (a májban pl. gyakoriak a kétmagvú sejtek). A meiózisban az első osztódást követően kimarad az S fázis, ezért a második meiotikus osztódás haploid sejteket eredményez. Bizonyos rovarlárvák egyes sejtjeiben éppen ellenkezőleg, a sejtek ismételt S fázisokon mennek keresztül, melyeket nem követ mitózis, és a replikálódott DNS-szálak együtt maradnak, **óriás-** (ún. **politén** – sokfonalas) **kromoszómák** jönnek létre.

A soksejtűek szervezetében gyakran előfordul, hogy egyes sejtek hosszabb-rövidebb időre **megállnak** a ciklus valamelyik fázisában. Az oocitákra pl. jellemző, hogy a meiotikus osztódás hosszú időre (akár évekig is) felfüggesztődik az profázis I-ben. A növekedés ilyenkor sem szünetel, hiszen a fejlődő petesejtben folytatódik a szikanyagok felhalmozása. A petesejtek hormonális (gerincesekben progeszteron-) hatásra fejezik be az osztódást, de a meiózis II. metafázisában általában újra megállnak és a ciklus csak a megtermékenyítés után lesz teljes.

A sejtek külső vagy belső hatásra (vagy inkább annak hiányában) kiléphetnek a sejtciklusból, **G_0 fázisba** kerülnek. Külső hatás lehet pl. a növekedési faktor, vagy a táplálék megvonása stb. A ciklusból való kilépés ebben az esetben ideiglenes, a külső hatás megszűntét követően a sejt visszaléphet a G_1 fázisba. Ám ha a sejtek túl hosszú időt töltenek G_0 fázisban, elveszthetik képességüket a ciklusba történő visszatérésre. Ennek oka lehet a DNS kovalens módosulása pl. metilálás következtében. Ez utóbbi az osztódóképesség teljes elvesztését jelenti, mivel az ilyen sejt nem készíthető DNS-szintézisre.

A kifejezett soksejtű szervezetek fő tömegét valamilyen funkcióra specializálódott, **differenciált sejtek** alkotják, melyek az egyedfejlődés korai szakaszaiban már megjelennek. Jellemző rájuk, hogy az utolsó sejtciklus G_1 fázisából **G_0 fázisba** lépnek. Az utolsó néhány ciklus során olyan gének aktiválódnak e sejtekben, amelyek előkészítik a ciklusból való program szerinti kilépést, majd a differenciálódást. A ciklizáló sejtek szintetikus kapacitásukat saját anyagaik folyamatos megkettőzésére fordítják, a G_0 állapotú differenciálódó/differenciált sejtek elsősorban a funkcióik ellátásához szükséges anyagokat állítanak elő (pl. az izomsejtek nagy mennyiségű aktint és miozint, a mirigysejtek váladékot stb.). A ciklusból való kilépés lehet ideiglenes vagy végleges. A ciklusból véglegesen kilépő sejtek tipikus példái a neuronok és a szívizomsejtek. Osztódóképesség hiányában populációik jellemzően regenerációra képtelenek, a sejtszám stabilizálódik, majd az életkor előrehaladtával a sejtpusztulás miatt fokozatosan csökken. A differenciált sejtek egyes csoportjai a ciklusból csak ideiglenesen lépnek ki. Megfelelő inger hatására a G_0 állapotból újra visszatérnek a G_1 fázisba, majd szabályosan áthaladva az S és G_2 fázisokon, osztódnak. Az ilyen típusú sejtek az elvesztett sejtek pótlására (a szövetek, szervek regenerációjára) képesek (pl. májsejtek). Számos gyorsan kicserélődő, megújuló szövetben együtt fordulnak elő ciklizáló nem véglegesen differenciált ún. **törzssejtek** (stem cells, őssejtek) és az osztódóképességüket elvesztett differenciált sejtek, melyek folyamatosan pusztulnak. Ilyen pl. a bőr hámrétege, melynek felületéről a differenciálódott és elhalt sejtek lekopnak, vagy a bél felszívóhámja, melynek hámsajtjai a bélbolyhok csúcsairól leöklődnek. Az ilyen rendszerekben a törzssejt osztódásából származó két utódsejt egyike megőrzi ciklizálóképességét (törzssejt marad), míg a másik utódsejt G_0 fázisba kerül, differenciálódik, ellátja feladatát, majd elpusztul.

A sejtciklusból való kilépés vagy visszatérés szabályozásának tanulmányozására szövettenyészeteken nyílik lehetőség. A ciklizálásra csak **növekedési faktorok** jelenlétében képesek a sejtek (régibbi kifejezéssel a sejtciklus szérumfüggő), e faktorok hatása a G_1 fázisban érvényesül. Szükséges a ciklizáláshoz, hogy a sejtek **ki tudjanak tapadni** valamilyen hordozófelületre. A sejt-sejt kapcsolatok kialakulása (a sejtek közvetlen fizikai kapcsolatának kialakulása) ugyanakkor a ciklizálást gátló tényező. A **sejtek száma** (a sejtsűrűség) egy szöveti rendszerben szintén ciklusszabályozó tényező. Ezt utóbbi regenerációs kísérletekben igazolható. Például a máj egy részének eltávolítását követően, a megmaradt csonk sejtjei néhány órán belül visszalépnek a sejtciklusba, majd addig osztódnak, míg a szerv normális mérete helyre nem áll. Ekkor a sejtek többsége G_0 fázisba lép, a további proliferáció leáll. (A bőr felhámjának sérülését követő sebgyógyulás is hasonló jelenség.)

Egy sejt osztódási potenciálját jól jellemzi, hogy hány cikluson tudnak keresztül menni élő szervezetben. A lehetséges **ciklusszám fajra jellemző**, genetikailag szabályozott érték. Humán embrióból származó fibroblasztok tenyésztetben kb. 50 sejtciklust képesek végrehajtani, azután G_0 fázisba, majd szenescenciába lépnek, a növekedési faktorokra nem reagálnak (a ciklusba vissza nem léptethetők) és végül elpusztulnak. A jelenség oka a kromoszómák telomerikus szakaszának fokozatos rövidülése. Az S fázisban a DNS-szálak végeinek replikációját, vagyis az eredetivel megegyező hosszúság biztosítását egy speciális enzimkomplex, a **telomeráz** végzi. A telomeráz szomatikus sejtekben nem, vagy csak igen kis aktivitással működik, ezért az egymást követő ciklusokból a sejt egyre rövidebb kromoszómákkal kerül ki, végül életképtelenné válik. A ciklizálóképesség kimerülését/elvesztését **celluláris**

öregedésnek nevezik. A teljes osztódási potenciált a szervezet valószínűleg nem használja ki (50 ciklus elméletileg 2^{50} számú – tonnányi súlyú – sejtömeget eredményezhet).

A sejtciklust szabályozó molekuláris mechanizmusok hibás működése többszörös mutáció következtében, ún. transzformált sejtek, immortális – állandóan kontrollálatlanul osztódó – sejtvonalak alakulnak ki. Ennek számos oka lehet, pl. tartós telomerázenzim-aktivitás, mely kikapcsolja a ciklusszám-korlátot, vagy az Rb-gén hiánya, ami miatt az E2F típusú transzkripciós faktorok állandóan szabad állapotban vannak, és ez felfüggeszti a G_1/S átmenet ellenőrzését. Hasonló hatása van a Cdk inhibitor fehérjék hiányának vagy alulműködésének stb. A sejtosztódást serkentő géneket **protoonkogéneknek** nevezzük. Ezek túlműködést előidéző mutációjával létrejövő transzformáló gének az **onkogének**. Utóbbiak termékei nagyobb mennyiségben termelődhetnek, vagy aktivitásuk nagyobb, esetleg szabályozásuk felfüggesztődése miatt állandóan bekapcsolt állapotban vannak. Hatásuk domináns a protoonkogének termékei felett, fokozott sejtosztódás, sejtburjánzás következhet be. Az osztódást gátló gének a **tumor szupresszor** gének. Normál működésű termékeik hozzájárulnak a sejtciklus szabályozásának egyensúlyához. E gének deléciós vagy alulműködést okozó mutációját a sejtciklus szabályozásának felborulását eredményezheti. Mindkét géncsoport mutációját a ciklus szabályozásának zavarához, szélsőséges esetben annak felfüggesztődéséhez, végül tumorok kialakulásához vezethet.

Nemzedékváltakozás, növényi és állati életciklus

Az ivaros szaporodó élőlények ivarsejtjeinek egyesülését követően kialakul a diploid zigóta, melyben az anyai és apai eredetű kromoszómák egyaránt megtalálhatók. Mivel ezek a kromoszómák azonos géneket hordoznak, de alléljaik különbözőek lehetnek, az utódok bizonyos mértékben heterozigóták, vagyis egy adott gén tekintetében bizonyos valószínűséggel eltérő alléllal, információval rendelkeznek. Ez egyrészt alapja a sokféleségnek, másrészt a különböző allélokkal rendelkező kromoszómapárok az esetleges hibák javítására, vagy legalábbis maszkolására lehetőséget adnak. A hibás gén esetleg haploid állapotban letális lenne, de egy működő allélja ugyanennek a génnek a másik szülőtől származó kromoszómán kompenzálhatja a hibát. Az érem másik oldala, hogy így, a letális recesszív mutációk nem szelektálódnak ki. A diploid állapot mégis előnyösnek tűnik, és az élőlények nagyobb részére jellemző. Azok az élőlények, mint például az állatok, melyek egész életüket diploid fázisban töltik, és csupán az ivarsejtjeik haploidok, a diplonta életciklus képviselői. A meiotikus osztódás az ivarsejtek képzésekor megy végbe. Ennek szinte fordítottja a haplonta életciklus, ami alacsonyabbrendű élőlények, például egyes algák esetében figyelhető meg. Az élőlény haploid, az ivarsejtek képzése mitózissal történik, és az ivaros szaporodás eredményeként kialakuló zigóta azonnal meiotikusan osztódik, vagyis 4 haploid utód keletkezik. A szárazföldi növényekre a haploid, és diploid életszakaszok váltakozása, a haplodiplonta életciklus, vagy kevésbé precíz, de gyakran használt kifejezéssel nemzedékváltakozás jellemző. Az ivarsejtek egyesülésével létrejött zigóta mitotikus osztódásokkal egy diploid életszakaszt képviselő struktúrát, vagy növényt, a sporofitot alakítja ki, mely meiózissal haploid spórákat hoz létre. A spórák mitotikusan osztódva kialakítják a haploid gametofiton életszakaszt, amely az ivarsejtek mitotikus képzésével zárul. Az ivarsejtek fúziójával az életciklus újra indul. A törzsfajlás során megfigyelhető a diploid fázis, vagyis a sporofiton egyre erősebb dominanciája. Míg a mohák esetében a gametofiton a domináns, maga a moha növényke, a harasztok esetében már a sporofiton a fejlettebb szerveződésű és hosszabb életű. A zárvatermők gametofitonja már erősen redukált, csupán a pollenszemre, illetve az embriózsákra korlátozódik.

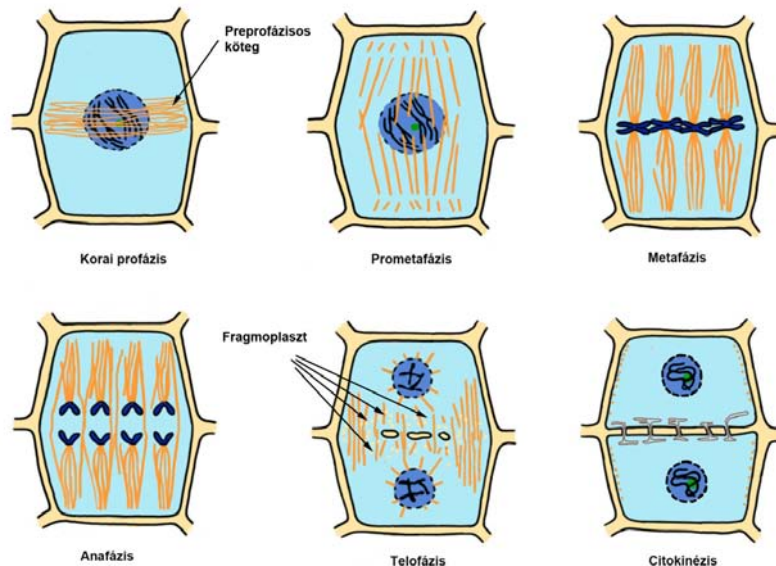
A gombák egy része sajátos, ún. dihaploid életciklussal rendelkezik. A dihaploid állapotot az ivaros folyamatot követő, magfúzió nélküli, a két szülői mag szinkron osztódásával történő kétmagvas állapot jellemzi. Ezeken a főbb életciklusokon túl, az alacsonyabbrendű élőlények között számtalan módosult életciklusformát figyelhetünk meg, különösen a gázdacserés, élősködő életmóddal összefüggésben.

A sejtosztódás

Mitózis

A mitózis, vagy számtartó magosztódás az általános, testi sejtekre jellemző osztódási forma. A növényeknél az ivarsejtek is mitózissal jönnek létre a már haploid gametofiton sejtekből. A sejtosztódás folyamata az élővilágban elég egységes módon megy végbe, de azért találunk számos eltérést a növényi és állati osztódás között. A növények a fenyők és zárvatermők esetében már nem rendelkeznek centriolummal, nincs mozgó alakjuk, ezért a sejtosztódásban

oly fontos citocentrum, vagy sejtközpont is centriólum nélkül alakul ki. Egy másik fontos különbség, hogy az állati sejtek kettéválása a mitózis végén aktin filamentumokból kialakuló gyűrű segítségével történik, míg a növények citokinézise a sejtalképzéssel együtt járó folyamat és a fragmoplaszt végzi. A két sejtosztódás közötti további apróbb különbségekre, a sejtosztódás lépéseinek tárgyalásakor térünk ki.



A növényi mitózis fázisai.

Profázis

A G1 fázis végén a sejtek felkészülnek a mitózisra. Ekkorra az S fázis során kialakult bennük a DNS szál másolata, a testvérkromatida, vagyis 4C DNS mennyiséggel rendelkeznek. Az állati sejtekben megtörtént a citocentrum duplikálódása is, vagyis két pár citocentrummal rendelkeznek. A mitózis profázisában megindul a kromoszómák kondenzációja, ami fénymikroszkóppal is nyomon követhető. Kezdetben csak egy fonálgombolyaghoz hasonló képet látunk, majd a kromoszómák is elkülöníthetők lesznek, ahogy egyre vastagodnak és rövidülnek. Növényeknél a mikrotubulusokból a leendő középsík kerületén kialakul egy ún. preprofázisos köteg, mely a neve ellenére a profázisban jön létre. Ez a gyűrűszerű képlet a profázis vége felé fel is bomlik. Pontos szerepéről nincsenek ismereteink, de kijelöli a leendő osztódási síkot, a későbbi középlemez helyét. A többi mikrotubulus, mely az interfázisban a kortikális mikrotubulusokat alkotta eltűnik és a mag felszínét követve csoportosul, majd egyre inkább a pólusok felé orientálódik. A pólusok a növények és állatok esetében különbözőképpen alakulnak. Az állati sejtekben a pólus egy jól meghatározott része a sejtnek melynek közepében található a centriólumpár. A növényeknél ezzel szemben a pólus egy diffúz, nagyobb méretű terület, mely felé a mikrotubulusok kötegei mutatnak a mínusz végeikkel. A centriólumok az állati sejtekben az S fázisban megkettőződtek, és a profázis elején a sejt két leendő pólusára vándorolnak. Meg kell jegyezni, hogy az állati oociták centriólum nélküli meiotikus osztódása nem hasonlít a növényekéhez, mivel az oocitákban a pólusok csak később alakulnak ki a random mikrotubulus rendszerben, míg a növényekben a pólusok MTOC funkciója kezdetektől megnyilvánul.

Prometafázis

A profázis végén a maghártya felbomlik. Apró vezikulákká alakul, melyek fuzionálnak az endoplazmatikus retikulummal. A membrán szétesése után egészen a telofázis végéig kimutathatók az ER-ben, amikor a sejtmembránja újjászervezéséhez használnak fel. Mielőtt a magmembrán szétesik a mag pórus komplexek disszociálnak, lyukakat hagyva a membránban. A magmembrán szétesésében fontos szerepe van a lamináz foszforilálásának, és ezáltal a laminából álló intermedier filamentumok és a magmembrán kapcsolatának megbontásának. Ezt főként a mitózis promoting faktornak (MPF) nevezett protein kináz végzi. Foszforiláció hatására a magmembrán és a pórusok szétesnek, a defoszforilálás pedig a visszaépülésüket indukálja.

Korábban úgy vélték, hogy a mitózis alatt az endoplazmatikus retikulum dezintegrálódik, vezikulákra esik szét. Valójában az ER a mitózis során végig megmarad, de a ciszternális jellege sejtektől függő mértékben megszűnik, és egy fenesztrált lemez, vagy kifejezetten (bár síkba rendezett) tubuláris formává alakul, de nem esik szét vezikulákra. Az ER felszínén található riboszómák száma jelentősen lecsökken, és a transzláció blokkolódik.

A maghártya felbomlásával a mitotikus orsó teljesen kialakul, a mikrotubulusok behatolnak a mag állományába, és hozzákapcsolódnak a kromoszómákhoz. A mikrotubulusok másik része a kromoszómák között áthaladva a szemből érkező mikrotubulusokkal kapcsolódik össze, kialakítva a pólus-pólus rostokat. A mikrotubulusok a kromoszómákhoz elsősorban a kinetochoron keresztül kapcsolódnak. Ezért ezeket a mikrotubuluskötegeket kinetochor rostoknak nevezzük. Egy-egy ilyen kötegben, rostban több tucat, vagy akár százánál is több mikrotubulus található. A kinetochor a kromatidák kapcsolódási pontjainál kialakuló fehérje komplexek, melyekhez a mikrotubulusok plusz vége kapcsolódik. A mitotikus kromoszómának mindegyik kromatidáján található egy-egy kinetochor. A kapcsolódás mechanizmusáról keveset tudunk, de a kapcsolódásnak flexibilisnek kell lennie, hogy biztosítsa a kromoszómák mozgását. Mikrotubuláris motorfehérjéket (kinezin, dinein) sikerült kimutatni a kinetochorban.

A mikrotubuláris magorsó kiépülésével megindul a kromoszómák vándorlása az equatoriális síkba. A vándorlás pontos mechanizmusa még nem ismert, és biztosan nem teljesen azonos a növények és állatok esetében. A kinetochor mikrotubulusok önmagukban nem elegendőek a kromoszómák középsíkba rendezéséhez. A kromoszómák mozgása nem egyenletes, és főként az állati sejtekben oszcilláló, ide-oda mozgás jellemzi. A középsíkba rendezésre többféle elmélet is ismert. Az állati sejtek esetén működő modell az ún. sarki szél (polar wind). A kromoszómák karjait megfigyelve kiderül, hogy azok a középsík felé néznek. Ha állati sejtekben letörik egy kromoszómadarab, az annak ellenére, hogy nincs kinetochor része, a kromoszómákkal együtt a középsíkba rendeződik. Ez arra utal, hogy a mikrotubulusok a kinetochor nélkül is képesek a kromoszómákat mozgatni ebben a szakaszban. Úgy képzelik, hogy a pólusok felől folyamatosan növekvő mikrotubulusok tényleges kapcsolódás nélkül lökdösik a kromoszómákat, és ezt a kinetochor mikrotubulusok flexibilitásuk révén követik. Amennyiben a kinetochor mikrotubulusok mozgatása a domináns, a kromoszóma karjai lemaradnak, amennyiben a nem specifikusan kapcsolódó mikrotubulusok működése erőteljesebb, a karok a haladási irányba állnak. Mivel a mikrotubulusok felépülése és lebomlása rendkívül gyors- életidejük kevesebb, mint egy perc – a folyamat elég dinamikus lehet a kromoszómák mozgatásához. Mivel állati sejtekben a mikrotubulusok szinte egy pontból indulnak ki, a távolsággal arányosan csökken az egységnyi keresztmetszetben levő mikrotubulusok száma. Minél közelebb van tehát egy kromoszóma az egyik pólushoz, annál nagyobb az onnan eltoló erő. A kétoldali mikrotubulusok sűrűsége a középsíkban egyenlő, itt tehát a kromoszóma stabilizálódik. Növények esetében ez az elmélet nem működőképes, mert a magorsóba bekerülő bármilyen részecskét a magorsó kisöpri a területéről, nem gyűjti össze a középsíkban. A növények esetében hiányzik az állati kromoszómákra jellemző oszcilláló mozgás is, a kromoszómák nagyjából egyenletes sebességgel haladnak, amíg el nem érik a középsíkot. Egy másik elmélet azzal próbálja magyarázni a kromoszómák középsíkba rendezését, hogy feltételezi, a kinetochor rostok húzóereje a hosszukkal arányos. Ennek az elméletnek még nincs kidolgozott molekuláris mechanizmusa.

Metafázis

A kromoszómák a magorsó segítségével a középsíkba rendeződnek. Mindegyik kinetochorhoz számtalan mikrotubulus kapcsolódik. A kapcsolódások folyamatosan újraépülnek, és minél inkább egy adott pólus felé áll egy kinetochor annál valószínűbb, hogy az onnan érkező mikrotubulusokkal kapcsolódik össze. A folyamat addig folytatódik, míg minden kromoszómánál nem teljesül az a feltétel, hogy egyik kinetochorja csak az egyik, a másik kinetochorja csak a másik pólustól kap mikrotubulusokat. Ez a feltétele az osztódás folytatásának, vagyis ez egy ún. ellenőrzési pont.

Anafázis

A sikeres középre rendeződés után megindul a kromatidák szétválása. Ehhez nincs szükség a húzófonalakra, a szétválasztást egy topoizomeráz enzim végzi. Ezután a szétvált kromatidák megindulnak a pólusok felé. A vándorlás gyakran két szakaszra osztható, anafázis A-ra és anafázis B-re. Az első szakaszban a pólusok távolsága nem változik, vagyis a kromatidák mozgása a húzófonalak rövidülésével arányos. A második szakaszban a pólusok távolodnak egymástól, így ez is közrejátszik a kromatidák mozgatásában. A húzófonalak a kromatidák mozgatása során rövidülnek, de nem feltétlenül ez szolgáltatja az erőt a húzáshoz. A mikrotubulusokhoz asszociált fehérjék, a különböző motorfehérjék szintén részt vehetnek a kromatidák mozgatásában. A mikrotubulusok depolimerizációjának mérsékelt indukálásával kísérletileg sikerült a kromatidák mozgását gyorsítani. A pólus-pólus rostok az anafázis

B-ben a plusz vég motorfehérjén, a kinezinen keresztül összekapcsolódva képesek eltolni egymást, és ezzel a pólusokat távolítani egymástól. A növényi és állati sejtek között a kromatidák húzásában az anafázisban nem találtak különbségeket.

Megfigyelték, hogy az endoplazmatikus retikulum szinte rátapadva a kromatidákra, követi azokat a pólusok felé.

Telofázis

A pólusokra érkezett kromatidák körül megindul a maghártya kialakulása. A maghártya felbomlásakor az endoplazmatikus retikulumba szállítódott magmebrán fehérjék a kromatidákat körülvevő ER membránban lokalizálódnak. Az endoplazmatikus retikulum tubulusai körbeölelik a kromatidákat és kialakul az új maghártya. Megjelennek a magpórus komplex disszociált partikulumai, és fokozatosan beépülve kialakítják a magpórusokat. Ezzel együtt jár a laminváz felépülése, ami a lamin fehérjék defoszforilálása következtében indul meg. Nem meglepő ezek után, hogy a maghártya, és az endoplazmatikus retikulum egységet képez, és a maghártya felszínén riboszómák találhatók.

Citokinézis

A sejt kettéválása az állati, és növényi sejtekben teljesen eltérően történik. Az állati sejtekben, a középsíkban, a sejtmembrán alatt, ahhoz kihorgonyozva kialakul egy aktinból, és miozinból álló gyűrű. Az aktinszálak ebben ellentétes polaritással vannak jelen. A miozin motorfehérje az aktinszálakat egymással szembe húzva egyre szűkíti a gyűrűt, és végül kettéfűzi a sejtet.

A növényi sejtek kettéválása a sejtfal kialakulásával együtt történik. A magorsó mikrotubulusainak részbeni újjászervezésével és új mikrotubulusok, valamint aktin filamentumok révén kialakul egy fragmoplasztnak nevezett képlet. Ebben a mikrotubulusok, és aktinfilamentumok a magorsó pólus-pólus rostjainak megfelelően helyezkednek el. Kezdetben a középső régióban futnak a citoskeletális elemek, de a folyamat előrehaladtával, a szélek felé orientálódva egy táguló csőszerű képletet alkotnak. Feladatuk a Golgi készülékekből származó vezikulák középsíkba szállítása. Itt a vezikulák összeolvadnak, és pektin tartalmuk összeomlik. Ez alkotja a sejtlemezt. A fragmoplaszton a kiürült vezikulák egy része visszaáramlik a Golgi-készülékhez. A fúzió a középső részen indul meg, kezdetben egy tubuláris hálózat alakul ki, majd az egyre több vezikula fúziójával egy fenesztrált lemez. A lemez pozícióját a citoskeleton stabilizálja. A lukak számának csökkenésével a fragmoplaszt fokozatosan kifelé halad. A lemez kialakulása sohasem teljes, az itt jelenlevő endoplazmatikus retikulum ugyanis több helyen átnyúlik a képződő sejtfal-sejtmembrán egységen. Feltételezik, hogy az endoplazmatikus retikulumnak, illetve az általa a vezikulák köré kijuttatott kalcium ionoknak fontos szerepe van a vezikulák fúziójában. Ahogy a sejtlemez egyre jobban kiterjed, eléri a sejtmembránt és fuzionál vele. Ezzel megtörténik a sejtek szétválása.

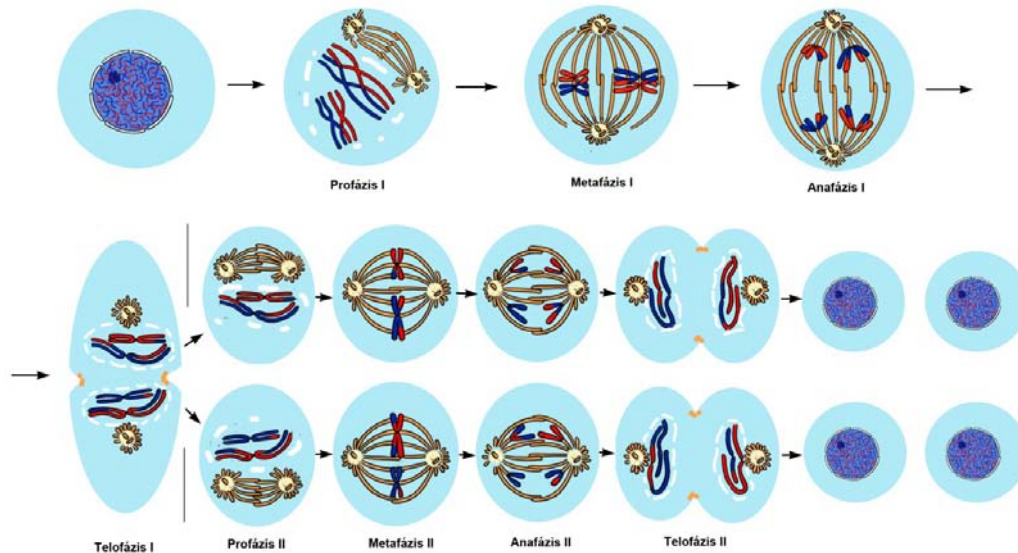
Vakuolizált növényi sejtek esetén a citoplazmának át kell rendeződnie, hogy az osztódáshoz, és a leendő sejtfalképzéshez a citoplazma a középsíkban helyezkedjen el. A „citoplazmalemez”-t, amiben a citoskeleton is koncentráldódik fragmoszómának nevezzük. Meg kell említeni, hogy a fragmoplaszt, és fragmoszóma kifejezéseket néha még a szakirodalomban is hibásan használják, például a fragmoplasztot keverik a középlemezzel, és a fragmoszómát a középlemezt kialakító Golgi vezikulákkal.

Meiózis

Az állati életciklus során az ivarsejtek képzése, a növények haplodiplonta életciklusa során pedig a spórák meiózissal, vagy számfelvező osztódással keletkeznek. Meiózis előtt a DNS az S fázisban ugyanúgy megkettőződik, mint a mitózis előtt, tehát 4C DNS szintről indul az osztódás. A meiózis során két egymást követő sejtosztódás megy végbe, a meiózis I, és a meiózis II. A meiózis I során az apai és anyai eredetű homológ kromoszómák párba állnak, és az adott kromoszómából az egyik sejtbe egy kétkromatidás apai vagy anyai kromoszóma kerül véletlenszerűen. Közben a homológ kromoszómák között génkicserélődés történik a crossing over során. A meiózis I után tehát a sejtekbe, a testi sejtekhez képest csak fele annyi kromoszóma kerül, egy adott kromoszómából csak vagy az apai, vagy az anyai. A sejtek tehát 2C DNS tartalommal rendelkeznek ugyan, de csak 1N kromoszómaszerelvénynek megfelelő DNS-el. A meiózis második szakasza tulajdonképpen egy normál mitózis, amikor a két kromatidás kromoszómák válnak szét. A meiózis végeredménye tehát négy haploid sejt lesz, ami az állatok esetében közvetlenül ivarsejtként funkcionálhat, növények esetében pedig mitózisok után alakul ki az ivarsejt. Az ivarsejtek fúziójával újra diploid sejt jön létre, a zigóta.

A meiózis tehát igen fontos osztódási folyamat, egyrészt biztosítja az ivarsejtek haploid állapotát, másrészt növeli a genetikai variabilitást. Ez utóbbit egyrészt az apai és anyai kromoszómák véletlenszerű szétválása, másrészt a crossing over során történő génkicserélődés révén teszi.

Mivel a meiózis nagyon sok lépése a mitózishoz hasonlóan történik, itt csak az eltéréseket részletezzük, ami főként a meiózis I profázisát érinti. Itt történik ugyanis a homológ kromoszómák párosodása és a crossing over.



Állati sejt meiotikus osztódása

Meiózis I

Profázis

A meiózis leginkább ebben a szakaszban, illetve az itteni történések következményeiben tér el a mitózistól, illetve az annak megfelelő meiózis II-től. A profázis I ennek megfelelően több szakaszra különíthető.

A leptotén szakaszban már kétkromatidás kromoszómák vannak, de még csak vékony fonalaknak látszanak, a két kromatida fénymikroszkóposan nem különíthető el.

A zigotén szakaszban történik meg a homológ kromoszómák párosodása, vagyis az apai és anyai eredetű két-két kromatidával rendelkező kromoszómák párba állnak. Kialakulnak a bivalensek, melyek összesen négy kromatidát tartalmaznak (tetrád). A párosodás folyamán kialakulnak a kromoszómapárok közötti kapcsolódások, a szinapszisek, melyek igen pontos, génszintű egymáshoz rendelését biztosítják a homológ kromoszómák kromatidáinak.

A pachitén szakaszban a kromoszómák megrövidülnek, a homológok kromatidái között kialakul az ún. szinaptonémás komplex, ami egy határozott szerkezetű kapcsolódás. Ebben nagyméretű fehérjekomplexek, az ún. rekombinációs nodulusok figyelhetők meg melyek nevüket a rekombinációban való feltételezett részvételéről kapták.

A diplotén szakaszban megindul a homológok kettéválása, a szinaptonémás komplex szétesik, de bizonyos pontokon a homológ kromatidák közötti kapcsolat fennmarad. Ezeket a kapcsolódási pontokat kiazmáknak nevezzük. Itt feltételezhetően a rekombináció miatti átkereszteződés (crossing over) található.

A profázis végén a diakinézisben a kiazmák elcsúsznak a kromoszómák végei felé, a crossing over befejeződik. A kromoszómapárokon kialakul a két kinetochor régió, az egyik homológon egy és a másikon még egy, vagyis a homológ kromoszómák kromatidái közös kinetochor régiót képeznek. A centromer szakaszon a kromoszómák még erősen összetapadtak.

A további szakaszok sokban hasonlítanak a mitózisra, de a metafázis I-ben a kromoszómapárok rendeződnek a középsíkba, és az anafázisban a homológ kromoszómák válnak el egymástól, és kétkromatidás formában vándorolnak a pólusok felé. A telofázis végén a két mag kialakulása, illetve a citokinézis nem minden esetben fejeződik be, hanem megindul a meiózis II, ami tulajdonképpen egy mitózis. Amennyiben a sejt kettévál, és a sejtmagok kialakulnak, egy rövid interkinézis szakasz után következik a meiózis második szakasza. A végeredmény normál esetben négy haploid sejt, melyek közül kettő-kettő azonos.

Kérdések:

1. Milyen osztódással jönnek létre a magasabbrendű növények illetve az állatok ivarsejtjei.
2. Mi az alapvető különbség a mitózis és a meiózis között?
3. Mik válnak szét a mitózis, illetve a meiózis I anafázisában?
4. Hány kromatidából áll egy meiózis I-es, metafázisos kromoszóma?
5. Mi az a kiazma?
6. Mi a preprofázisos köteg?
7. Mikor bomlik le az osztódás során a maghártya, és mi lesz a sorsa?
8. Hogyan alakul ki a telofázisban a két új maghártya?
9. Mi a különbség a zárvatermő növények és az állatok sejtközpontja között?
10. Mi a különbség a növények és állatok citokonézise között?
11. Hova kötődnek a kromoszómán a húzófonalak?

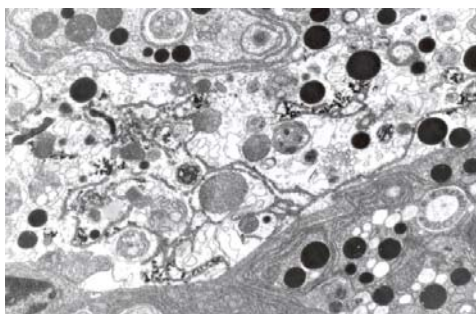
19. fejezet - A sejtpusztulás

Egy szervezet méretét az őt alkotó sejtek száma, nagysága és a sejtközi állomány mennyisége határozza meg. E tényezők közül a sejtszámnak van domináns szerepe. Egyes fajokban a sejtszám egészen pontosan meghatározott érték. Például a *C. elegans* fonálféreg egyedfejlődése során 1090 szomatikus sejt keletkezik, közülük 131 apoptózissal elpusztul, és így áll be a faj egyedeire jellemző 959-es sejtszám. A legtöbb fajban a számszabályozás azonban nem ilyen szigorú, de a testméret átlagértéke fajra jellemző tulajdonság, vagyis a sejtszám korlátok közé szorított. A sejtszámot a sejtosztódás növeli, a sejtpusztulás csökkenti, a ciklusból való kilépés (G_0 állapotba lépés) stabilizálja. Így pl. az embrionális fejlődés legkorábbi szakaszaiban – normál esetben – G_0 fázisú vagy pusztuló sejt nem fordul elő és a ciklus nagyon gyors (csak M és S fázisok váltakozásából áll), a sejtszám robbanásszerűen nő.

A sejtpusztulás többféle formája ismert, melyeket egyrészt a morfológiai bélyegek, másrészt az eltérő molekuláris mechanizmusok szerint lehet megkülönböztetni.

A nekrozis

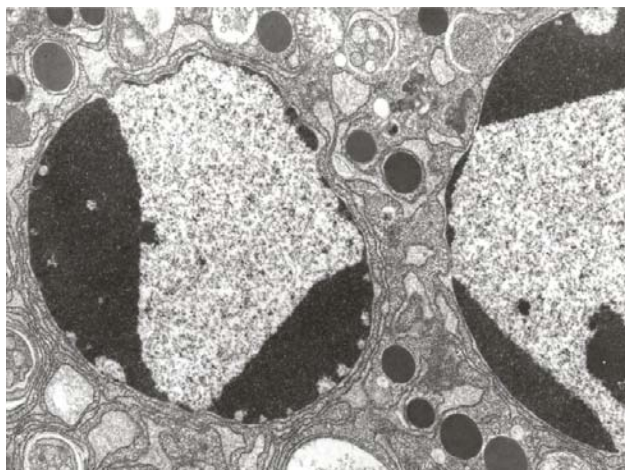
A sejtpusztulás egyik formája a **nekrozis**. Olyan, a sejtet ért külső hatás válthatja ki, mely durva, nem javítható károsodást okoz. A hatás lehet pl. mechanikai roncsolódás, mérgezés, hőhatás, sugárkárosodás, a keringési zavarok miatt kialakuló oxigénhiányos állapot, vírusfertőzés stb. következménye. A károsító hatás általában sejtek kisebb-nagyobb csoportját éri, nekrotikus zóna alakul ki. Jellemző az ionpumpák ATP-hiány miatti leállása, a citoplazma és a sejt környezete közötti jellegzetes ioneloszlás fenntarthatatlansága. A plazmamembrán permeábilissá válik, a sejtbe nagy mennyiségű víz és kalcium-ion áramlik be. A megnövekedett citoplazmatikus Ca^{2+} -ion koncentráció számos enzimet, pl. lipázokat, proteázokat aktivál, melyek károsítják a membránokat. Lavinaszerűen erősödő reakciósorozat indul be. A nekrotikus sejt megduzzad, sejthártyája felszakad, citoplazmájának anyagai a sejtközi térbe kerülnek. A környező kapillárisok permeabilitása is megnő, plazmafehérjék áramlanak a nekrotikus területre, gyulladás alakul ki. Elsősorban a fehérjék bomlástermékei kemotaktikus hatást gyakorolnak a makrofágokra, leukocitákra, melyek kilépve a keringésből a pusztuló sejtek környezetébe vándorolnak és részt vesznek a sejtrombolás eltakarításában. A folyamat lezárásaképpen a hiányzó sejtek helyét kitöltő, az eredeti szöveti struktúrától eltérő szerkezetű és beerezettségű kötőszöveti típus, hegcsövet alakul ki.



Nekrotizáló sejt (a középső világos terület).

A programozott sejthalál

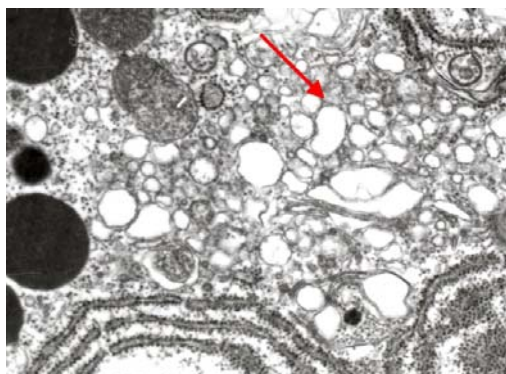
A sejtpusztulás másik formája, a meghatározott program szerint lezajló, szabályozott folyamatok eredőjeként kialakuló **programozott sejthalál** (programmed cell death – PCD). Ennek egyik, jellegzetes morfológiai változásokkal kísért változata az **apoptózis**. Az apoptotikus sejtek zsugorodnak, felszínükről kisebb-nagyobb citoplazmadarabok fűződnek le (bleb képződés), a kromatinállomány erősen kondenzálódik, a DNS fragmentálódik és utóbb a mag is feldarabolódik. Az apoptózis során a plazmamembrán szemipermeabilitása végig megmarad, de a membrán külső rétegében foszfatidilszerin jelenik meg. A szomszédos, ép sejtek ennek alapján ismerik fel az apoptotikus sejtet/blebet és ez váltja ki a fagocitózist. Ilyen körülmények között a sejtek közti térbe bomlástermékek nem jutnak, így a gyulladás és a szöveti átrendeződéssel járó hegképződés nem lép fel. A folyamat igen gyors, néhány óra alatt lezajlik.



A **DNS marginális kondenzációja** figyelhető meg az apoptotikus sejtmagokban (patkány hasnyálmirigy külső elválasztású mirigysejt).

Az apoptózis evolúciósan rendkívül konzervatív folyamat, a soksejtű állatok sejtjeiben azonos lépésekben megy végbe és a kivitelezéséért felelős molekulák is nagyon hasonlóak. Az apoptózist a sejtekben folytonosan jelenlévő speciális enzimrendszer hajtja végre.

Az **endonukleázok** felelősek a DNS fragmentációjáért. A magban DNS molekulákat a nukleosómák között hasítják, különböző méretű fragmentumokat előállítva. A **transzglutaminázok** keresztkötéseket hoznak létre a citoplazma fehérjéi között, ezzel nagyméretű fehérjeaggregátumok képződnek a sejtben.



Az apoptotizáló sejtben a **Golgi készülék** a sejtváz degradálódása miatt „szétúszik”.

A rendszer fő komponensei a fehérjebontó **kaspázok**. Szintézisük és tárolásuk a sejtben igen szigorúan szabályozott: inaktív formában képződnek és tárolódnak, aktiválásukhoz a molekula proteolitikus hasítása szükséges, másrészt a sejtben több kaspáz-gátló és aktiváló fehérje is van. A kaspázok között vannak iniciátorok (kaspáz-2, -8, -9, -10) és effektorok (kaspáz-3, -6, -7). Az effektorok univerzális hatásúak, az iniciátorok viszont speciális kiváltó hatással aktiválhatók. A kaspázok proteolitikus kaszkádsort alkotnak. Szubsztrátjaik közé tartoznak az endonukleázok, a nukleáris laminok, a sejtváz bizonyos fehérjéi stb.

Az apoptózis kiváltásában, illetve szabályozásában külső és belső tényezők egyaránt szerepet játszanak. A külső tényezők között egyaránt találhatók az apoptózist gátló és indukáló hatású jelemolekulák (túlélési és halál szignálok). Gátló hatásúak lehetnek a különböző trofikus faktorok és egyes hormonok. A trofikus faktorok jelenlétét a sejtek receptoraik segítségével érzékelik (túlélési jelek és receptorok). Az apoptózist gátló hatás többek között azon alapul, hogy a jel a sejtben a Bcl-2 család proapoptikus tagjainak működését gátolja.

Az immunrendszer sejtjei számos citokint termelnek (a citokinek kis molekulatömegű fehérjék), melyek többek között az immunválasz szabályozásában játszanak szerepet. Ezek egyik csoportja apoptózisindukáló hatású. A csoport két jellegzetes tagja a tumor nekrosis faktor (TNF) és az ún. Fas/Apo ligandum, melyek megtalálhatók a citotoxikus sejtek felszínén, míg a célsejtek hordozzák ezek receptorait (halál ligandumok és receptorok). A

ligandum–receptor kapcsolódás aktiválja a receptort, mely közvetítő molekulákon keresztül azután beindítja a kaszpázok működését. Mindezen hatások össz eredményeként a célsejt kikényszerített apoptózisba lép és elpusztul, megakadályozva ezzel a vírusfertőzött vagy kóros sejtek szervezetben belüli elszaporodását.

Az apoptózis szabályozásában kulcsszerepe van a mitokondriumoknak, melyekben egy erős kaszpázaktiváló fehérje, a citokróm-c lokalizálódik. A citokróm-c az elektron transzport lánc egyik tagja, normális körülmények között a belső membránon ül, de sejtkárosító hatásokra kidiffundálhat a citoszolba, ahol egyes kaszpázokat aktivál. A kiáramlás a mitokondriumok külső membránján található pórusokon keresztül történik. A pórusok működését egy fehérjecsald (a Bcl-2 típusú fehérjék) ellenőrzi, mely proapoptotikus és antiapoptotikus (a kiáramlást elősegítő, illetve gátló) tagokat egyaránt tartalmaz.

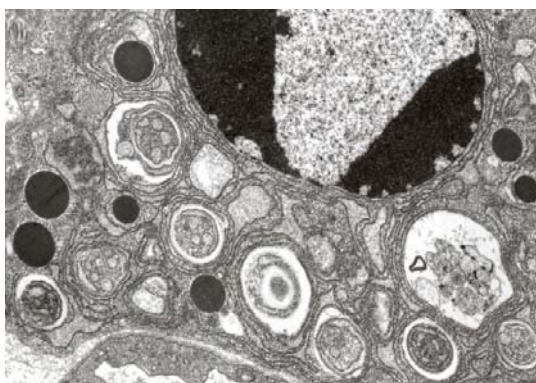
Nem ritka, hogy az apoptózist nem a belső környezet fiziológiás változásai, hanem valamilyen váratlan károsító hatású esemény váltja ki. Az egyik leggyakoribb ilyen esemény a DNS-szálltörés, mely bekövetkezhet különböző vegyületek vagy sugárzások hatására. A ciklizáló sejtek ilyenkor a G₁/S fázis határán megállnak, mert a p53 fehérje közreműködésével egy Cdk-inhibitor kezd termelődni. Ha a hibát sikerül kijavítani, a ciklus folytatódik. Ellenkező esetben a p53 indukálja a Bcl-2 család proapoptotikus tagjait és beindul az apoptózis, a sejt önpusztítással akadályozza meg, hogy hibás DNS-készlettel rendelkező utódsejtek jöjjenek létre.

Az apoptotikus sejtpusztulás immunrendszer által „kikényszerített” változata az erre szakosodott limfociták, a citotoxikus T-sejtek és a természetes öölsejtek közreműködésével valósul meg. Célsejtjeik a szervezet azon sejtjei, melyek felszínén idegenként azonosított fehérjék, fehérjefragmentumok jelennek meg. A kétféle test kontaktusba kerül, majd a citotoxikus sejt kiváltja a célsejt pusztulását. A citotoxikus sejt egyik ürített terméke a perforin nevű fehérje, mely lyukakat képez a célsejt membránján, ezen keresztül víz és ionok áramlanak be citoplazmájába (ez a nekrozisra emlékeztető folyamat). A citotoxikus sejt enzimeket is juttat a célsejtbe (granzimek), melyek a kaszpázokat aktiválják.

Az apoptózis jelentősége, funkciója sokrétű. Így pl. a tiroxin (pajzsmirigyhormon) tömeges apoptózist okoz az ebihalak lárvális szöveteiben, ami a metamorfózis természetes velejárója. Az A-vitamin és származékai a végtagbimbók szövetében a leendő ujjpercek közötti sejtek elhalását indukálják, és ez teszi lehetővé az ujjak formálódását. Ezek a példák mutatják, hogy a sejtpusztulás a normális egyedfejlődés természetes és szükségesszerű velejárója. A normális fejlődési folyamatban a felesleges sejtek eltávolításával segít beállítani az optimális sejtszámot, és apoptózissal történik a funkcióvesztett lárvális szövetek eltávolítása a metamorfózis során. Felnőtt szervezetben kiegyensúlyozza a sejtosztódás sejtszámnövelő hatását és megszabadítja a szervezetet saját meghibásodott sejtjeitől.

Az apoptózist szabályozó mechanizmusok károsodásának súlyos következményei lehetnek. Számos tumor esetében kimutatták, hogy valamelyik apoptózist indukáló gén hibája miatt a transzformálódott sejtek nem hajtják végre az önpusztító programot, és ez vezet – többek között – a hibás sejtek elszaporodásához.

A programozott sejtpusztulás megvalósulhat **autofágiával** is. Az érintett sejtekben az autofág vakuolák tömeges felhalmozódása figyelhető meg. A degradációt a lizoszomális enzimek végzik. Normális körülmények között az autofág aktivitás alacsony, de külső hatásra annyira felerősödhet, hogy ez a citoplazma és az organelumok nagy részének elvesztéséhez és ennek következtében sejtpusztuláshoz vezet. Fokozott autofág aktivitást válthat ki a hypoxia, a nem megfelelő tápanyagellátás, gyulladásos folyamatok stb.



A fokozott autofág aktivitás végletes következménye lehet, hogy a sejt elpusztul, apoptózist szenved.

Intenzív autofágia jellemzi például a teljes átalakulással fejlődő rovarok lárvális szöveteinek sejtjeit a lárva-báb átalakulás során, vagy különböző idegrendszeri megbetegedésekben szenvedők pusztuló neuronjaiban (pl. Parkinson kór).

Kérdések:

1. Sorolja fel a sejtpusztulás jellemző típusait!
2. Vázolja fel a nekrozis és az apoptózis közötti morfológiai különbségeket!
3. Határozza meg, hogy miben különbözik a nekrozis és az apoptózis folyamatának lefolyása!
4. Melyek az apoptózist végrehajtó enzimszisztéma fő komponensei?
5. Milyen szerepe lehet az autofágiának a sejtpusztulásban?

20. fejezet - A sejtek vizsgálatának módszertani alapjai

A sejtteni vizsgálati módszerek felbonthatók képalkotó és nem képalkotó módszerekre. A képalkotó vizsgálati módszerek elsősorban fény- és elektronmikroszkópiát jelentenek, míg a nem képalkotó módszerek közé tartoznak a centrifugálás, elektroforetikus eljárások, molekuláris biológiai módszerek stb. Természetesen a képalkotó módszerek ezekhez is sok ponton kapcsolódhatnak, mikroszkóppal vizsgálhatjuk egy adott frakció összetételét, vagy például egy géntermék megjelenését.

A következőkben – a teljesség igénye nélkül – a sejtek vizsgálatára alkalmas, többségében különböző mikroszkópos módszerekkel foglalkozunk, elsősorban azzal a céllal, hogy megismerjük, milyen kérdésekre kaphatunk választ általuk, illetve, hogy értelmezni tudjuk az általuk alkotott képet.

Fénymikroszkópia

A sejtteni vizsgálatok a sejtek és sejtalkotók kis méretének megfelelően gyakorlatilag a fénymikroszkópok fejlődésével párhuzamosan haladtak. Az első sejtteni vizsgálatok a holland Anton(y) van Leeuwenhoek (1673-ban kezdte publikálni eredményeit) és az angol Robert Hook nevéhez fűződnek. Hook 1665-ben kiadott *Micrographia* című munkájában használja először a sejt (cella, cellula) kifejezést, melyet a parafa sejtfalakkal határolt egységeire vonatkoztatott. Ellentétben Leeuwenhoek „mikroszkópjával” ami tulajdonképpen egy igen jó minőségű, és nagy nagyítású lupe volt, Hook összetett lencserendszert (objektív + okulár) tartalmazó mikroszkóppal dolgozott. Bár ennek képminősége gyengébb volt a Leeuwenhoek által használt szerkezetnél, mégis az optika fejlődésével ebből a típusból alakult ki a mai mikroszkóp. Ahogy az optika fejlődött úgy tárult fel egyre finomabb részleteiben a sejt. Kialakultak azok az eljárások, amivel vizsgálhatóvá tették a sejteket, szöveteket, vagyis kifejlődött egy külön módszertani tudomány, a mikrotechnika.



Fénymikroszkóp.

A fénymikroszkópok összetett nagyítású lencserendszerek, melyek alapvetően objektívből és okulárból állnak. Az objektívek nagyított valódi képét az okulárral tovább nagyítjuk, így a mikroszkóp végleges nagyítása a két lencserendszer nagyításának szorzata. A nagyítást ugyan további lencsékkel még lehetne növelni, de ennek már nincs értelme, mert a mikroszkóp optikai feloldóképessége, vagyis a kép részletgazdagsága nem növekszik. A feloldóképesség ugyanis a mikroszkóp objektívjétől és az alkalmazott fény hullámhosszától függ. Akármilyen jó minőségű is a mikroszkóp, a fény hullámhosszának felénél kisebb részletek már nem vizsgálhatóak vele. Ez a gyakorlatban 0,2 μm -t jelent. A hagyományos átvilágító módban működő mikroszkópok mellett kialakultak speciális fénymikroszkópos vizsgálati eljárások is. Ezek egy része a festetlen minták jobb kontrasztját igyekszik elérni (fáziskontraszt, differenciál interferencia kontraszt, Hoffmann-féle modulációs kontraszt) míg más mikroszkópok az anyag szerkezetének vizsgálatára alkalmasak, mint például a polarizációs mikroszkópia. A fénymikroszkópia legelterjedtebb speciális vizsgálati módszere mindenképpen a fluoreszcens mikroszkópia, és ennek speciális változata a konfokális lézer scanning mikroszkópia. A fluoreszcens mikroszkópia háttérben igen széles spektrumú mikrotechnikai, molekuláris biológiai metodika is áll, mely szinte mindenféle anyag jelölését lehetővé teszi.

Fáziskontraszt mikroszkópia

Az élő festetlen sejtek általában igen kis kontraszttal rendelkeznek. Az ilyen minták vizsgálatára fejlesztette ki Zernike a fáziskontraszt eljárást, amiért 1953-ban Nobel díjat kapott. A hasonlóan átlátszó, de a fényt diffraktáló, a fény fázisát befolyásoló részek az emberi szem számára nem különíthetők el, mivel a képsíkban találkozó hullámok nem okoznak fényintenzitás változással járó interferenciát. Az eljárás lényege, hogy az ilyen mintán szóródott (diffraktált) hullámoknak a fázisát megváltoztatva, már amplitúdó- és így intenzitásváltozást okozó interferenciát lehet a képsíkban létrehozni. Ezáltal a különböző törésmutatójú vagy különböző vastagságú részletek láthatóvá válnak, annak ellenére, hogy fényáteresztésük hasonló. A fáziskontraszt eljárással alkotott képek a sejtalkotókat a szürke árnyalataiban jelenítik meg.

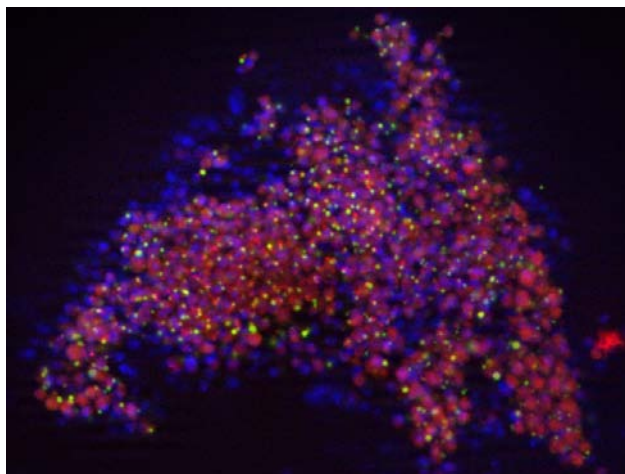


Frits Zernike (1888–1966) holland fizikus; Nobel-díjat kapott 1953-ban az általa alkalmazott fáziskontraszt-eljárások kifejlesztéséért, különösen a fáziskontraszt-mikroszkóp feltalálásáért.

Hasonló kontrasztnövelő eljárás a Nomarsky féle differenciál interferencia kontraszt (DIC) technika, de ennél a módszernél az árnyalatok finomabbak, és domborműszerűen kiemelik a törésmutató, illetve vastagságkülönbségeket. A kép fényereje és feloldása is jobb, ezért általában kedveltebb kontrasztnövelő eljárás.

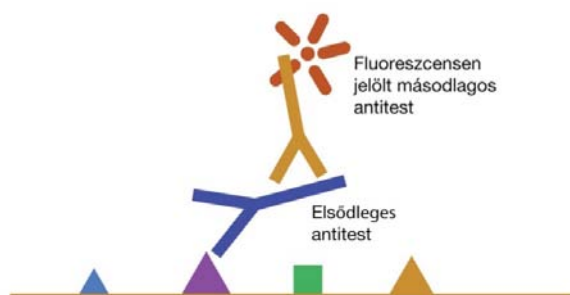
Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcencia jelensége régóta ismert, de mikroszkópos felhasználása csak a fluoreszcens festékek, próbák, az immunfluoreszcens jelölés és a termeltetett fluoreszcens fehérjék széleskörű alkalmazásával vált robbanásszerűvé. A fluoreszcens anyagok a megvilágító fény hatására gerjesztett állapotba kerülnek, majd a gerjesztés a megvilágító fényenél nagyobb hullámhosszú fény kibocsátásával szűnik meg. Ez a kibocsátott fluoreszcens fény, a gerjesztő fénytől szűrők segítségével elkülöníthető, így a fluoreszcens anyagok a mikroszkópban sötét háttér előtt világítanak. A módszer így rendkívül érzékeny és specifikus. A különböző színben fluoreszkáló jelek egy képen is elkülöníthetők egymástól, ami többszörös jelölést is lehetővé tesz. A fluoreszcens mikroszkópok általában nagy teljesítményű, rövid hullámhosszú fényben és UV-ben gazdag fényforrással, és különböző kombinációjú szűrőkészletekkel rendelkeznek. Egyik leghatékonyabb típusuk a konfokális lézer scanning mikroszkóp (CLSM). Ennél a megvilágító fényforrás lézer, mely pontról-pontra végigpásztázza a mintát, és detektálja a kiváltott fluoreszcens fény erősségét. A pontokból számítógép segítségével képet alkot. Mivel a sajátos konfokális optikai elrendezés miatt a detektált pont tulajdonképpen egy kis térfogategység (voxel), optikai szeletelésre, és ezáltal térbeli képalkotásra is alkalmas.



Ecetmuslica agyából készült metszet fluoreszcens festéssel (kék: DNS, piros: FIP200 fehérje, zöld: p62 fehérje jelölése; Nagy Péter felvétele).

A fluoreszcens jelölés rendkívül sokféle lehet. A hagyományos értelemben vett festékek specifikusan kötődő fluoreszkáló anyagok. Ilyen például a DNS-hez kötődő DAPI (diamino-fenilindol), vagy a kallóshoz kapcsolódó anilinkék. A jelöléseket forradalmasította az immunfluoreszcens technika kifejlődése. A jelölni kívánt anyagot, általában fehérjét (például tubulint) kivonják a mintából és azzal valamilyen állatot immunizálnak, vagyis bejuttatják a vérkeringésébe. Az ellene termelt antitesteket kivonják és megtisztítják, majd fluoreszcens jelölőmolekulát kapcsolnak hozzá. Ez az antitest a mintához keverve csak a keresett fehérjéhez kapcsolódik, és fluoreszkálva megjelöli azt. Általában nem készül minden anyaghoz jelölt antitest, hanem az ún. szendvics technikát alkalmazzák. Ekkor a keresett anyag ellen termeltetett antitestet (legyen például egér anti tubulin IgG) egy másodlagos fluoreszcensen jelölt antitesttel (pl. az egér IgG-nek az aspecifikus része ellen termeltetett, fluoreszcensen jelölt nyúl IgG-vel) teszik láthatóvá. Nagyon sok molekulának vannak fluoreszcens analógjai, és egyre inkább leváltják az izotópos jelölést a fluoreszcens módszerek. Igen nagy karriert futott be egy medúzából izolált fehérje a green fluorescent protein (GFP). A GFP génjét megfelelő promóter után beépítve a sejt specifikusan kezdi termelni, és ez fluoreszcens mikroszkóppal jól kimutatható.



Indirekt (kétlépcsős) immunjelölés.

Fénymikroszkópos mikrotechnika

A mikrotechnikai eljárások lényege, hogy a sejtek eredeti állapotát lehetőség szerint megőrizve azt mikroszkópos vizsgálatokhoz előkészítse. Mivel az átvilágításos mikroszkópban csak viszonylag vékony (10 µm nagyságrendű) minták vizsgálhatók az állati és növényi minták általában csak metszetkészítés után vizsgálhatók. Bizonyos szövetekből frissen is lehet kézi, vagy rezgő pengéjű metsző berendezéssel, ún. vibratómmal elfogadható vastagságú metszetet készíteni, az esetek zömében a mintát valamilyen merevítő, a metszést lehetővé tevő anyagba kell beágyazni. Elsősorban ez az anyag, és természetesen a vizsgálat célja határozza meg a mikrotechnikai procedúrát. A leggyakrabban alkalmazott módszerek a fagyasztva metszés, a paraffinba és a műgyantába ágyazott anyagok metszése.



Mikrotóm üvegkessel, műgyantába ágyazott preparátum metszéséhez.

A paraffinos és műgyantás beágyazás viszonylag hosszú (akár több napos), és különböző anyagokkal való átitatást igénylő procedúra, ezért a mintát először fixálni, rögzíteni kell. A fixálás célja, hogy megpróbáljuk az élő sejteket, szöveteket olyan állapotban megtartani, ami a vizsgálat céljait tekintve a lehető legközelebb áll a természetes állapothoz, és lehetővé teszi a kiválasztott festést, jelölést, vagy az egyéb elvégezni kívánt vizsgálatot is. A fixálás során gyorsan megöljük a sejtet, és közben rögzítjük a struktúrát. Elsősorban a fehérjék és lipidek rögzítése, vagyis elmozdulásuk, kioldódásuk, működésük megakadályozása a cél. A fénymikroszkópos vizsgálat finomságától, és a további vizsgálati módszerektől függően többféle fixálószer is használhatunk. Durvább, főként szövettani vizsgálatokhoz jól beváltak a koagulatív fixálók (ecetsav, alkohol, kloroform stb., illetve ezek keverékei) de a finomabb sejtani vizsgálatokhoz inkább a nem koagulatív fixálószerek (paraformaldehid, glutáraldehid) alkalmasak. Ezek hálószerű keresztkötéseket hoznak létre a fehérjemolekulák között. A fixálószerek általában savas, vagy semleges kémhatásúak, de ritkán (pl. mitokondriumok vizsgálatához) lúgos fixálókat is használunk. A fixálás időtartama a minta méretétől függően néhány perctől több óráig tarthat. A fixálószer általában ki kell mosni a mintából, majd a mintát a beágyazáshoz vízteleníteni kell. Ezt felszálló alkohol, vagy aceton sor segítségével végezzük. Egyes műgyanták esetén nem szükséges a teljes víztelenítés, mert néhány százalék víztartalom mellett is polimerizálódnak.

Paraffinos beágyazás előtt a mintákat még át kell itatnunk egy paraffint oldó anyaggal (kloroform, xilol stb.), mivel sem az alkohol, sem az aceton nem elegyedik a paraffinnal. A szerves oldószerben levő mintákhoz fokozatosan adagoljuk a paraffint egészen az oldat telítettségéig, majd a mintát a paraffin olvadáspontját meghaladó hőmérsékletű termosztátba helyezzük. Itt az oldószert elpárologtatjuk, és további paraffint adagolunk hozzá. A teljes átitatás után a mintákat kivesszük a termosztátból. Ekkor a paraffin megdermed, és a minta készen áll a metszésre.

Műgyantás beágyazás esetén köztes oldószerre nincs szükség. A mintát magával a polimerizálatlan műgyantával itatjuk át, majd a polimerizációt hővel, UV fénnel, vagy kémiaiilag beindítjuk. Mivel a műgyanta polimerizáció után már nehezen vágható, a mintákat megfelelő beágyazó formába (pl. zselatin kapszulákba) helyezzük a polimerizáltatás előtt.



Paraffinba ágyazott anyag metszése fém késsel. A műanyag rács hordozófelületen rögzített paraffin-blokkból készített metszetek szalagszerűen egymáshoz tapadva sorakoznak a kés felületén.

A paraffinba ágyazott anyagok metszését mikrotómban fém késsel végezzük. A metszetek hajlamosak egymáshoz tapadni, így hosszú szalag formájában sorozatmetszetek készíthetők. A metszetekből a festés előtt ki kell oldani a paraffint, és a festéknek megfelelő közegbe kell átvinni. Mindezt a tárgylemezre melegített metszeteken szokták elvégezni. A kész metszeteket lefedőanyaggal és fedőlemezzel borítva „állandósíthatjuk”.

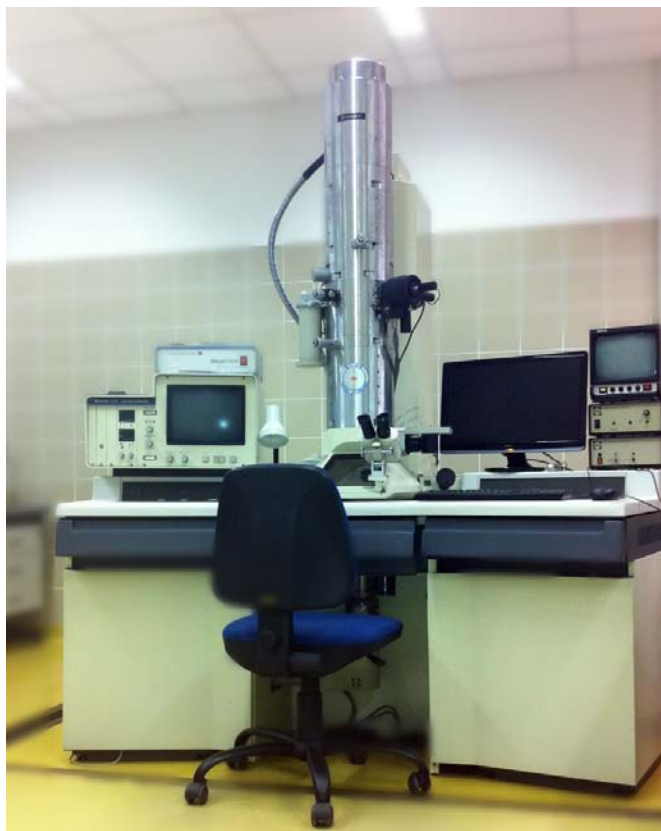
A műgyantába ágyazott minták metszésére üveg vagy gyémánt, ritkábban fém késeket használunk. A paraffinos technikához hasonlóan szárazan végezzük a metszést, mivel a fénymikroszkópos metakrilát gyanták vízben duzzadnak. A metszeteket egyenként kell kezelni, és tárgylemezre rögzíteni. A gyanta kioldására általában nincs szükség, mivel az jól átlátszik. Csak speciális festésekhez, jelölésekhez lehet szükség a gyanta kioldására.

A festést a tárgylemezhez rögzített metszeteken végezzük. A festékek lehetnek hagyományos festékek, melyek viszonylagos specificitással, ionosan, vagy kovalensen kötődnek a minta bizonyos anyagaihoz, de végezhetünk a metszeteken speciális kémiai reakciókat (citokémia), vagy immunológiai jelöléseket (immuncitokémia) is.

A fénymikroszkópos mikrotechnikában is alkalmazzák a fagyasztott állapotban történő metszést, de ez általában csak a metszés megkönnyítését szolgálja, és nem azonos az elektronmikroszkópiában alkalmazott kriotechnikával. Legtöbbször a paraffinos metszésre alkalmas mikrotóm mintatartóját cserélik le egy Peltier-elemmel (félvezető alapú hűtő-fűtő egység) hűtött mintatartóra, de vannak hűtött kamrába szerelt mikrotómok is (kriosztát) melyben a kés is hűtött.

Elektronmikroszkópia

A fénymikroszkópok feloldóképességénél és nagyításánál, mint láttuk, maga a fény hullámhossza a fő korlátozó tényező. A felgyorsított elektronokkal nagyságrendekkel rövidebb hullámhossz és ezáltal sokkal jobb feloldóképesség és nagyítás érhető el. A mai elektronmikroszkópok atomi szintű ($<1 \text{ \AA}$ azaz $0,1 \text{ nm}$) feloldóképességgel rendelkeznek, bár ez a biológiai minták vizsgálatakor a gyakorlatban nem érhető el.



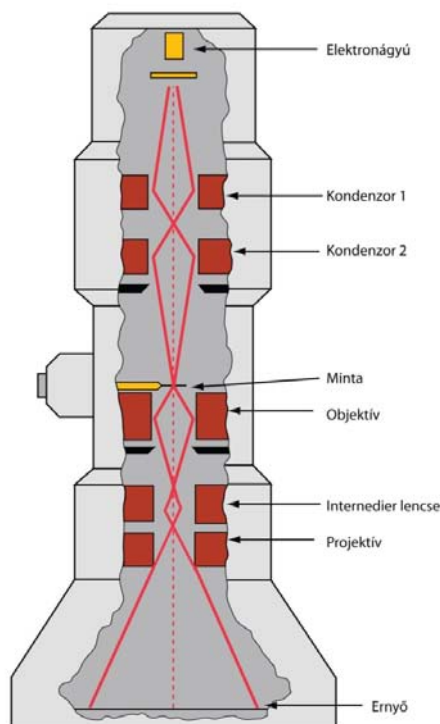
Biológiai transzmissziós elektronmikroszkóp készülék (TEM)

Alapvetően két fő elektronmikroszkópos technikát, és ennek megfelelő készüléket kell elkülönítenünk, a transzmissziós elektronmikroszkópot (TEM) és a scanning elektronmikroszkópot (SEM). A transzmissziós elektronmikroszkóp a minta átvilágításával, a fénymikroszkópokhoz hasonló módon működik, de fény helyett gyorsított elektronokat, az optikai lencsék helyett pedig elektromágneses lencsét használ. A képet az elektronok becsapódásának hatására fluoreszkáló ernyőn látjuk. A TEM-ben csak nagyon vékony (kb. 50–100 nm) mintákat vizsgálhatunk, mivel az elektronok áthatolóképesége igen gyenge. A képet leegyszerűsítve egy árnyképnek kell elképzelni, vagyis ahol a mintában az elektronokat eltérítő nagy rendszámú elemek vannak, onnan kevés elektron jut el az ernyőig és sötét lesz a kép, ahol pedig könnyű elemek vannak, melyek nem tudják olyan mértékben eltéríteni az elektronokat az eredeti irányuktól ott világos lesz a kép. Ezért festjük (kontrasztoszzuk) az elektronmikroszkópos mintákat nehézfémekkel.

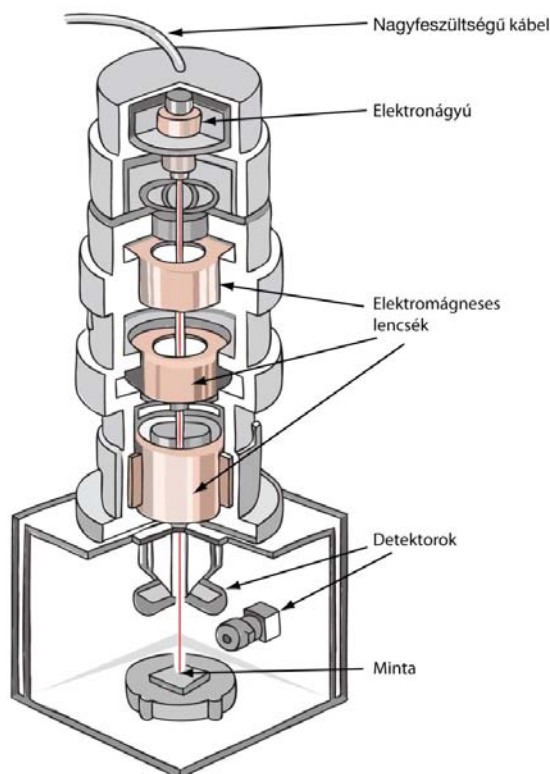


Rutin biológiai scanning elektronmikroszkóp berendezés (SEM)

A scanning vagy pásztázó elektronmikroszkóp egy „fél” transzmissziós elektronmikroszkóp, mivel elektronforrással, megvilágító lencserendszerrel ugyanúgy rendelkezik, mint a TEM, de a mintába becsapódó elektronok nem a hagyományos képalkotási elvek szerint hozzák létre a képet, ezért a képalkotó optika hiányzik. Az elektronsugár a lézer scanning mikroszkópokhoz hasonlóan pontról-pontra pásztázza végig a mintát, és az onnan visszaszóródott, vagy a mintában ionizáció révén keletkezett elektronokat detektáljuk. Ebből a pontonként kiváltott jelből a számítógép hozza létre a képet. A SEM-ben ezért bármilyen vastag mintát vizsgálhatunk, a kép csak a felszíni rétegből származó elektronokból jön létre. Ennek megfelelően a SEM kép térhatású, viszonylag nagy mélységélességű felszíni leképezés.



Transzmissziós elektronmikroszkóp felépítése az elektron-nyaláb sugármenetével.



Scanning elektronmikroszkóp felépítése, elektronoptikai elemei.

Elektronmikroszkópos mikrotechnika

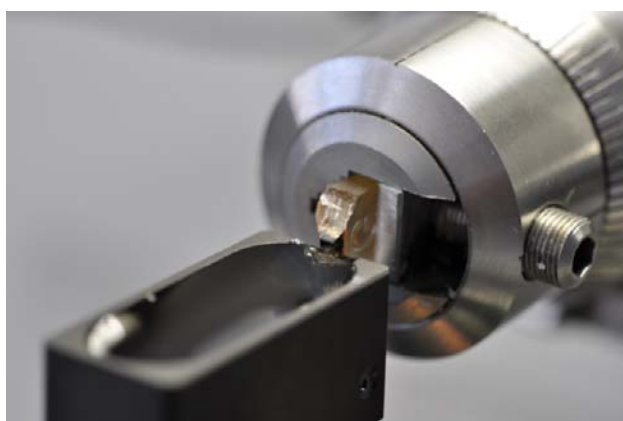
Az elektronmikroszkópos mikrotechnika sok szempontból hasonló a fénymikroszkópos mintaelőkészítéshez, és történelmileg abból is alakult ki. Mivel a nagy feloldóképesség a legfinomabb mintakezelést igényli, szóba sem jöhetnek a koagulatív fixálószerkezetek. Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a rutin fixálószer glutáraldehid a fehérjék térhálósítására, és osmium-tetroxid a lipidek fixálására. Ez utóbbi további előnye, hogy egyben kontrasztanyagként is működik, az osmium erős elektronszóró képessége miatt. A fixálandó anyagnak igen kisméretűnek kell lennie (egyik irányban maximum 2 mm), mivel a fixálószer penetrációja lassú, és ez vastagabb minta esetén rossz fixálást eredményezne. A fixálást mosás, majd víztelenítés követi. Ezután a mintát műgyantával kell átítatni (főként epoxy, speciális esetben metakrilát), kiöntő formába helyezni, és polimerizáltatni. A minta metszését (epoxy gyanta esetén) ún. káddal ellátott üveg, vagy gyémánt késsel végezzük. Ennek lényege, hogy a vágás során a metszet ráúszik a kádban levő víz felszínére, ahonnan könnyen összegyűjthető az elektronmikroszkóp mintatartójául szolgáló apró rácsra (mikrostély vagy grid).



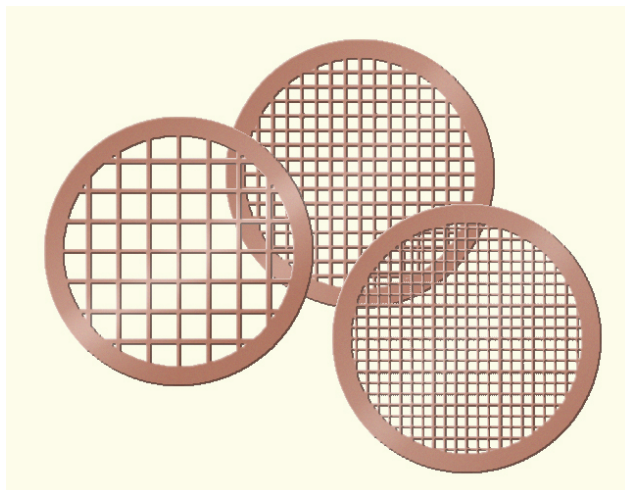
Ultramikrotóm és vezérlő egysége (balra).



Száraz üvegkés, és csónakkal szerelt gyémántkés. A metszést az üvegkés tört élével, illetve a csiszolt és fémházba foglalt gyémánttal (csillogó rész) végezzük.



Metszés ultramikrotómmal, gyémántkéssel.



Az ultramikrotómmal készített metszetek 3 mm átmérőjű mikrorostélyokra (grid) kerülnek. A gridek rácshálózata sűrűségében, azaz lyukméretében is különböző lehet. A különböző méretű beágyazott anyagokból készült és ezért eltérő méretű metszeteket a megfelelő lyukméretű rostélyra kell „felvenni”.



Ultramikrotómmal készített metszet a mikrorostély rácshálózatára kiterítve (kis nagyítású TEM fotó a grid egy részletével).

Az összegyűjtött metszeteket még uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztosítjuk (festjük), hogy a TEM-ben megfelelő kontrasztú képet kapjunk. Minél több nehézfémso kötődik egy adott struktúrához, annál több elektront fog elnyelni, szórni, eltéríteni az eredeti irányából. Ezek a részletek sötéten jelennek meg a képen, vagyis elektrondenzek.

A scanning elektronmikroszkópos mintaelőkészítés csak az első lépésekben hasonlít a TEM-es preparáláshoz. A minta mérete itt nem korlátozó tényező, hiszen csak a felszín jó megőrzése a feladat. A fixálószer kiválasztása sem mindig kritikus. A víztelenítés után a SEM-es vizsgálatokhoz a mintát egy igen vékony vezetőképes réteggel kell bevonni, egyébként a belőtt elektronok nem vezetődnének el, és a minta töltődése nagyon lerontaná a képalkotás lehetőségét. A mintát legtöbbször arannyal, szénnel, vagy palládiummal (esetleg ezek keverékével) vonjuk be, úgy, hogy a fémet nagy vákuumban a mintára gőzöltetjük. A vákuum miatt a mintának teljesen száraznak kell lennie. (Egyébként a hagyományos mikroszkópokban is, akár TEM, akár SEM nagy vákuum van, mivel az elektronok a levegőben szóródnának.) A minták kiszárítását általában a kritikus pont szárító berendezéssel végezzük. A folyamat lényege, hogy minden anyagnak van egy olyan, ún. kritikus pontja a nyomás-hőmérséklet diagramon, amely értékek felett a folyadék és gáz fázis nem különíthető el, vagyis a felületi feszültség megszűnik. Ez lehetővé teszi a mintából az adott anyag elpárologtatását oly módon, hogy közben a felületi feszültség okozta struktúraváltozások elkerülhetők. Mivel a széndioxid kritikus pontja viszonylag könnyen elérhető (7,38 MPa =

73,8 bar és 31,1°C) a víztelenítő anyagot folyékony széndioxidra cseréljük ki, és ezt párologtatjuk el a készülékben. Ezek után a száraz minta már fémgőzölhető és SEM-ben vizsgálható.

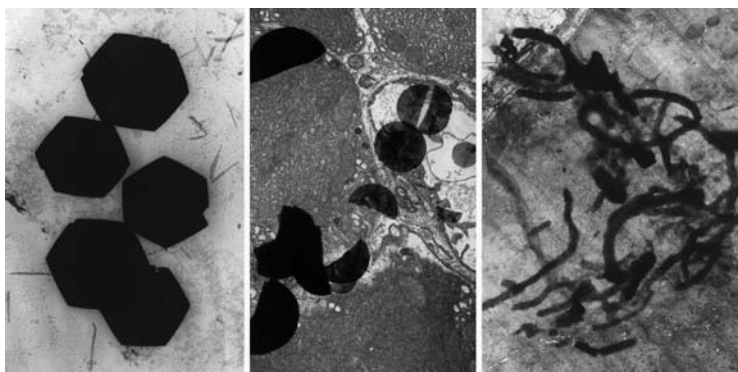
Kriotechnika

Az elektronmikroszkópos mintaelőkészítés egy alternatív lehetősége a minta hirtelen lefagyasztása és bizonyos lépések alacsony hőmérsékleten történő kivitelezése. A kriofixálás során a mintát olyan gyorsan kell lehűteni, hogy a benne levő víz ne tudjon jégkristályokká alakulni, hanem eredeti formájában szilárduljon meg, vitrifikálódjon. A jégkristályok ugyanis nagyobb térfogatúak, mint a víz és a kristályképződés is struktúra-roncsoló hatású. Ehhez a mintát 10^8 fok/s sebességgel kell hűteni, ami csak a felszíni kb. 5–10 µm vastagságú rétegben valósítható meg normál körülmények között. A nagy nyomású kriofixáló berendezésekkel ez a vastagság kb. egy nagyságrenddel növelhető. A kriofixálást általában folyékony nitrogén hőmérsékletére (-196°C) lehűtött propánnal végzik, mivel ez hatékonyabban hűt, mint az állandó forrásban levő, és ezért gőzbuborékokat képző folyékony nitrogén. A folyékony nitrogén hőmérsékletén gyakorlatilag minden reakció leáll, ezért ideális fixálási módszer. A kérdés az, hogyan lehet a kriofixált anyagot vizsgálatra alkalmassá tenni. A legmodernebb és egyben legköltségesebb megoldás, ha a mintát egyáltalán nem engedjük olyan hőmérsékletre felmelegedni (kb. -100°C), hogy a kristályosodás megtörténjen. A mintát ekkor alacsony hőmérsékleten kell metszeni és speciális elektronmikroszkópban vizsgálni. Mivel ilyenkor a mintában nincsenek nehéz atomok, a képalkotás is speciális módon történik. Lehetőség van azonban arra is, hogy a mintából a vitrifikált vizet eltávolítsuk anélkül, hogy az átkristályosodna. Ehhez vagy alacsony hőmérsékleten ki kell oldani (**freeze substitution**) vagy vákuumban el kell szublimáltatni (**freeze drying**). Az így előállított mintákat ezután már a hagyományos mikrotechnikai eljárásokkal lehet beágyazni, és metszeni.

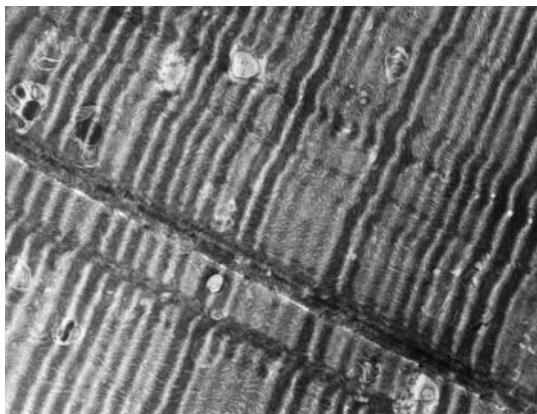
A kriotechnikához tartozik az a gyakorlati szempontból (immuncitokémia) fontos módszer, amikor magát a metszést alacsony hőmérsékleten végezzük, annak ellenére, hogy a fixálás nem alacsony hőmérsékleten történt. A mintákat szacharóz oldattal itatjuk át, ami meggátolja a jégkristályok kialakulását, és egyben könnyen metszhető fagyott állapotban. A kriomikrotómmal így előállított metszetek felolvasztást követően jelölhetők antitestekkel, és kiszáritás után vizsgálhatók az elektronmikroszkópban. Az elektronmikroszkópos immuncitokémiához az antitesteket néhány nm átmérőjű arany szemcsékkel jelölik meg, melyek erősen elektronszórók, és így kontrasztos fekete pöttyökként jelennek meg a mikroszkópi képen. (Metakrilát gyantába ágyazott mintából készült metszetek is alkalmasak immuncitokémiai jelölésre, de eredményességük messze elmarad a kriometszett anyagokétól.)

Az elektronmikroszkópos kép értelmezése – Műtermékek

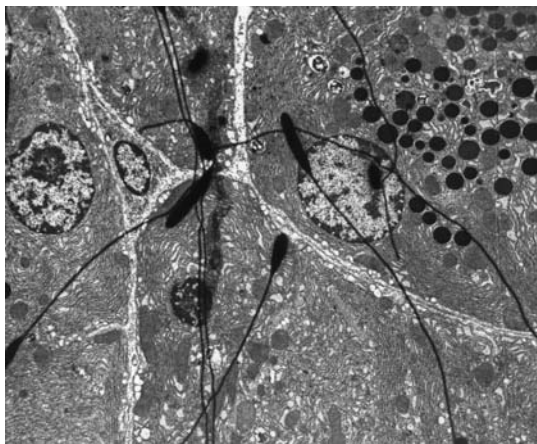
A mikroszkópi kép értékelésekor a mikrotechnikai előkészítés hatását figyelembe kell venni, nem létezik ugyanis olyan módszer, mely ne okozna valamilyen műterméket. Az anyagok egy része kioldódik a mintából, más része reakcióba lép a felhasznált reagensekkel, ozmotikus változások torzíthatják a struktúrát, összecsapzódások, kristályosodási folyamatok befolyásolják az eredeti állapotot. Műtermék keletkezhet az előkészítő eljárások során, a beágyazás alatt, a metszet készítésekor és kontrasztosításakor egyaránt. Alább bemutatunk néhány műtermék típusát, amely megnehezíti, vagy éppen lehetetlenné teszi a mikroszkópi kép értelmezését.



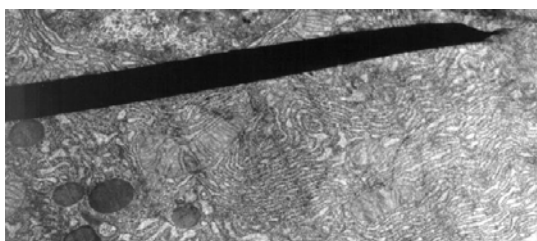
Műtermék I. – A metszet kontrasztosítása során annak felületére került csapadékok zavarják vagy lehetetlenné teszik az érintett terület értékelését. A kialakuló csapadék mérete, alakja, kompakt vagy diffúz volta a kristály anyagi minőségétől és kialakulásának körülményeitől függ. Balra és középen határozott, szabályos alakú, jellemző méretű, a jobb oldali képen szabálytalan alakú, összecsapzódott kristályok láthatók.



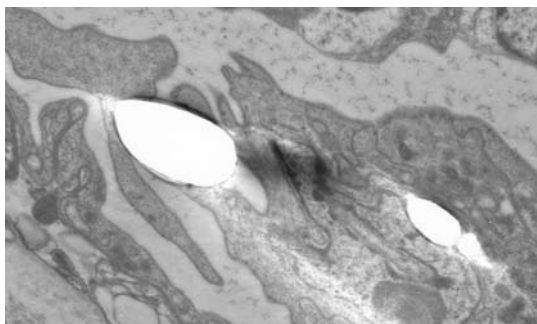
Műtermék II. – A minta ultramikrotómban való elégtelen rögzítéséből vagy a túlságosan lágy műgyanta következtében a metszeten változó vastagságú, ritmikusan ismétlődő, egyenetlen sávok jelennek meg, ún. **chatter** mintázat alakul ki. A kés élének hibája okozza a metszeten egyenes vonalban végighúzódnó sávot, a **késcsíkot**. (TEM felvétel)



Műtermék III. – A kés használatát követően a kés csónakjának nem kellő tisztítása és szárítása miatt baktériumok telepedhetnek meg és kerülhetnek az újabb metszetek felületére (TEM felvétel).



Műtermék IV. – A metszetek mikrorostélyra történő felvételekor előfordul, hogy metszet anyaga „felgyűrődik”, saját magára visszahajlik. A **gyűrődés** területén a metszet háromszorosan rétegződve fekete sávként tűnik fel. A foton a gyűrődés a kép felső részében látható (TEM felvétel).



Műtermék V. – Amennyiben a metszet túl vékony, vagy a műgyanta nem egyenletesen tölti ki a mintát, a metszet készítése során vagy az elektronmikroszkópos vizsgálat hatására a **metszet kilyukadhat**. A lyuk körül a metszet alakváltozása az eredeti struktúra arányainak változását idézi elő. (TEM felvétel)

Ha ismerjük, hogy az adott eljárás milyen műtermék képződését okozhatja, realisabban tudjuk értékelni a kapott képet. Azt is figyelembe kell vennünk, hogy egy metszet – különösen a TEM esetében – a sejtnak csak egy igen kis szelete. Egy 100 μm (100 000 nm) átmérőjű sejtől kivágva egy 50 nm-es szeletet olyan, mintha az egyetem szerkezetét egy véletlenszerűen kivágott 1 cm-es szeleten vizsgálnánk. A vékony szeletek abból a szempontból is megtévesztőek lehetnek, hogy nem tudunk belőlük a térbeli viszonyokra közvetlenül következtetni. Egy vakuólában található membránnal körülvett mitokondrium lehet, hogy csak a vakuólum beöblösödésébe benyúló citoplazma részlet. Ezek a problémák rávilágítanak arra, hogy milyen fontos a korrelatív fény- és elektronmikroszkópia, vagyis az azonos részek fénymikroszkópos, majd elektronmikroszkópos összehasonlító vizsgálata. A térbeli viszonyok megismerésében igen nagy segítséget jelentenek az olyan háromdimenziós rekonstrukciós mikroszkópi technikák, mint például a CLSM (Confocal laser scanning microscopy), vagy az elektrontomográfia.

Kérdések:

1. Mi a fénymikroszkópok feloldóképességének határa?
2. Milyen mikroszkópok alkalmasak az élő sejtek és festetlen minták kontrasztjának növelésére?
3. Milyen alapon csoportosíthatók a fénymikroszkópos fixálószerkezetek?
4. Miért kell a beágyazandó mintát vízteleníteni?
5. Mik a legelterjedtebb beágyazóanyagok a fénymikroszkópos mikrotechnikában?
6. Milyen fő elektronmikroszkóp típusok vannak?
7. Mekkora az elektronmikroszkóp feloldóképessége?
8. Mivel fixálunk a rutin elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatokhoz?
9. Milyen vastag egy elektronmikroszkópos metszet?
10. Milyen késsel készítjük az elektronmikroszkópos metszeteket?
11. Milyen vastagságban tudunk kriofoxálni?

Fagyasztva törés, fagyasztva maratás, replikakészítés

A pillanatszerűen a folyékony nitrogén hőmérsékletére lehűtött (fagyasztott) biológiai mintát megfelelő berendezésben el kell törni, ezt követően a fagyott törési felszínről ún. platina–szén replika (levonat) készíthető. A replika a mintáról leválasztva transzmissziós elektronmikroszkópban vizsgálható. A minta törésekor a fagyott anyagban a törés a strukturális szempontból leggyengébb pontokon, felületeken fut. A megfagyasztott sejtekben a biológiai membránok hidrofób síkjában, a két lipidréteg között a leggyengébb a kötődés, így a membránokra

ráfutó törés „beugorva” a membránok belsejébe, azok felszínével párhuzamosan, a membrán középsíkjában halad. Így a törés által feltárt, mesterségesen előállított felszín a kettős lipidréteg egymás felé tekintő felületének valamelyike lesz.

Ezzel az eljárással a **biológiai membránok belső szerkezetéről, felépítéséről nyerhetünk** olyan **információkat**, amelyeket metszetek vizsgálatával nem vagy csak rendkívüli nehézségek árán lenne lehetséges. Azon túl, hogy a törésfelszínnek térhatású képét láthatjuk, vizsgálható például az integráns membránfehérjék (intramembrán partikulumok) elhelyezkedése. A törésvonal az integráns membránfehérjék nagy részét „megkerüli”.

A minta előkészítési eljárás lépéseinek meghatározásakor figyelembe kell venni a fagyasztás következményeit, illetve az ezek kivédésére alkalmazott anyagok hatásait. A mintát először rögzítik, majd ún. krioprotektív anyaggal itatják át, ezt követi a fagyasztás.

Az élő, nem fixált, nem kezelt mintában a fagyasztás hatására bekövetkező jégkristályképződés és térfogatváltozások károsíthatják a membránokat, roncsolhatják a membránnal határolt struktúrákat. Ennek kivédésére gyors fagyasztást és krioprotektív anyagot kell alkalmazni. Ez utóbbi elősegíti a minta üvegszerű fagyását (vitrifikáció); e célból általában koncentrált (30%-os) glicerint alkalmaznak. A krioprotektív anyagok és az élő állapotú minta sejteinek kölcsönhatása a sejtek eredeti morfológiai jellemzőinek megváltozását okozhatná, ezért a krioprotekció előtt a mintát (az esetek többségében) glutáraldehides rögzítőkeverékben fixálni kell.

A **fagyasztás** két lépcsőben történik, fontos hogy a fagyási folyamat a lehető leggyorsabban végbemenjen. A mintát folyékony nitrogénnel hűtött cseppfolyósított gázba (pl. Freon-22) helyezik. Az előfagyasztott anyag ezt követően folyékony nitrogénbe (-196°C) kerül, amelyben tárolható is. Ha a mintát előfagyasztás nélkül helyeznénk a folyékony nitrogénbe, a minta felszínén a nitrogén azonnal felmelegedne, buborékképződés indulna meg (a folyékony nitrogén forrni kezdene), ami tovább lassítaná a fagyás sebességét.

A fagyott minta **törésére**, az erre a célra kialakított, zárt, folyékony nitrogénnel hűtött, alacsony nyomású térben kerül sor. A fém mintatartón elhelyezett anyagnak egy folyékony nitrogénnel hűtött kést vezetnek. Ennek hatására a rideg minta nem metsződik, hanem a kés élétől kiinduló hasadás mentén törik, így nem sík, hanem jellegzetes domborzatú mesterséges felszín kapunk. A minta letört darabjának eltávolítása után a minta felületén maradó membránrészek a biológiai membrán egyik, a sejt valamely teréhez fagyott lemezéből állnak.

Ha a membrán citoszolhoz (citoplazmához) vagy kariolimfához (nukleoplazmához) fagyott lemeze marad a minta felszínén, akkor a membrán plazmaállomány felőli lemezének (lipidrétegének) a törési (a membrán középsíkja felőli) felületét látjuk. Ezt a felületet **P-felzsinnek** nevezzük (a „P” a plazmára utal). Ha a membrán extracelluláris térhez vagy valamelyik organellum belső teréhez fagyott lemeze marad a minta felszínén, akkor **E-felzsinről** beszélünk. Az „E” az extracelluláris térre (sejthártya esetében), illetve a sejtbe felvett vagy ott előképzett extracelluláris térrel homológna tekinthető terekre (a sejtalkotók esetében) utal. A tört felzsinen mutatkozó szemcsék, vagyis a membrán fehérjéinek lenyomatai jellemzően a P-felzsinen mutatkoznak nagyobb számban.

A tört, fagyasztott preparátumban a membránok belső felzsiné tárul fel a legszebben. Ha a törést követően azonnal elkészítjük a replikát, e felzsin tanulmányozására nyílik lehetőség. A módszer megnevezése **fagyasztva törés (freeze fracture)**. Ha a fagyasztva törést követően kialakult felzsinről a fagyott vizet (néhány percig) hagyjuk szublimálni, akkor a tört felzsin mellett a membránok természetes (citoszol, kariolimfa, extracelluláris tér vagy az organellum belső tere felőli) felzsinéi is láthatóvá válnak. A minta vizes fázisba ágyazódó struktúráinak a tört felzsinrel érintkező részei szabadabbá válnak, kiemelkednek, a felület „bemaródik”. Ezért nevezik ezt a módszert **fagyasztva maratásnak (freeze etching)**.

A törést vagy a törést és maratást követően készül el a **replika**. A kialakult felzsinre 45° -os szögben, platina elpárologtatásával kialakított platina gőzt juttatunk, amely a preparátum hideg, fagyott felzsinén vékony, változó vastagságú bevonatot kialakítva csapódik le. A platinafilm vastagsága a ferdén a mintára érkező platina atomok miatt a felzsin domborzati viszonyaitól függően alakul. A kiemelkedő struktúrák ellentétes oldalán kevesebb platina rakódik le, sőt platinamentes területek is kialakulhatnak.

A platinafilm egyenetlen, egyes helyeken hiányos, ezért a felzsinre merőlegesen szennet (grafitot) gőzölve egyenletes szennetréteget hozunk létre, mely hordozóréteggént tartja meg a platinafilmet. Ezt követően a felzsinnek megfelelő domborzatú platina-szenn-hártyáról a biológiai mintát felolvasztva, lemaratva megkapjuk a replikát. A replika transzmissziós elektronmikroszkópban vizsgálva a platina-árnyékolás miatt térhatású képet ad. A képről

megállapítható a platina gőzölés iránya, ami szükséges a replika fotójának helyes értelmezéséhez: a fotókon a platinaárnyékok fehérek, a platinalerakódások sötétek lesznek!



Patkány bélhámsejt szoros sejtkapcsoló struktúrája részlete. A replika fotójának felső részén a mikrobolyhok sora, alattuk a sejtkapcsoló struktúra hálózatos elemei által képzett kazettái láthatók (fagyasztva tört készítmény, TEM fotó).

Kérdések:

12. Milyen szempontokat kell figyelembe venni a fagyasztási eljárás során?
13. Mi a különbség a fagyasztva tört és maratott felszínek között?
14. A membránokra ráfutó törés a membrán mely felszíneit tárja fel?
15. Indokolja a P- és E-felszín elnevezését!
16. Melyik felszín gazdagabb intramembrán részecskékben?
17. Váolja fel, hogyan készül a replika?
18. Hogyan azonosítható a platina-árnyék a kinyomtatott pozitív képen?
19. Hogyan lehet felismerni és megkülönböztetni a P- és E-felszínt?

A citokémiai módszerek alapjai

A sejtek kémiai komponenseinek kimutatásával a citokémia foglalkozik. A citokémiában alkalmazott módszerek lényege olyan eljárások, protokollok kidolgozása, amelyek alkalmasak a kiválasztott vegyület sejten belüli elhelyezkedésének (lokalizációjának) feltárására, azonosítására. A módszerek alapja olyan (akár több lépésből álló) kémiai vagy biokémiai reakció, amelyben a képződő reakciótermék csapadék (nem oldódik fel és nem diffundál el képződésének helyétől) és mikroszkópban jól látható (színes vagy elektrondenz). A korai módszerek a sejtek makromolekuláinak és szervesetlen alkotóelemeinek közvetlen kimutatására, azonosítására szolgáltak (leíró hisztokémia).



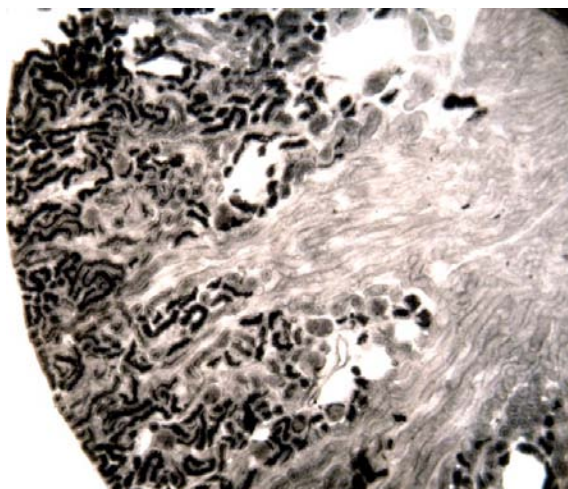
Szénhidrát-kimutatás PAS festéssel (PAS – perjódsvav–Schiff-reagens) egér utóbél metszetén. A püspöklila szín jelzi a magas szénhidráttartalmú váladék elhelyezkedését a metszeten.

A módszertan fejlődésének és a kutatások igényeinek megfelelően a sejtekben végbemenő folyamatok kimutatására, nyomon követésére indirekt eljárások is megjelentek (funkcionális hisztokémia). Ez utóbbi esetben pl. enzimeket ismert reakciómechanizmusuk alapján (enzimcitokémia), egyedi fehérjéket pedig immunológiai módszerrel (immuncitokémia) mutathatunk ki.

Enzimcitokémia

A XX. század első felében a sejtani kutatások eredményeképpen a gyorsan fejlődő biokémiai kutatások során számos enzim, enzimszisztéma azonosítására került sor. Hamar kialakult az a kép, hogy a sejt anyagcserejét a legegyszerűbb folyamattól a legbonyolultabbig az enzimek katalizálják. Az enzimológiai kutatások jelentőségét az anyagcsere-folyamatok feltárásában, és megértésében elért eredmények támasztják alá. Az enzimek sejtekben történő kimutatására kidolgozott ún. enzimcitokémiai módszerek a XX. század második felében, az 1980-as évekig hódítottak, de jelentőségüket a mai napig sem veszítették el.

Az eljárások alapja az, hogy a sejtben vagy sejtközötti állományban elhelyezkedő enzimet olyan szubsztráttal reagáltatjuk, amellyel reakcióba lép, és a képződő reakciótermék a preparátumban azonosítható, megfigyelhető. A preparátum elkészítése (mintavétel, metszetkészítés) során alkalmazott mikrotechnikai lépések hátrányos hatásai ellenére a készítményben található olyan enzimek, melyek működőképességüket megtartották. Ebben az esetben megfelelő körülmények (hőmérséklet, pH, ionkoncentráció, kofaktorok) biztosításával aktiválhatók, és megfelelő szubsztrátjuk (oldhatatlan csapadékot ad, az adott enzimfehérjére nézve specifikus, nem bomlik el spontán) hozzáadásával egy vagy több lépésben színes csapadék képeződhet. A csapadék elhelyezkedése az aktív enzim lokalizációját jelzi.



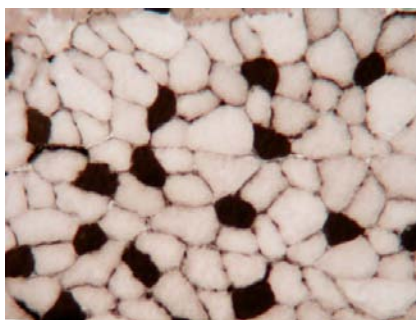
Gömöri lúgos foszfatáz kimutatása a vesetubulusok sejtjeiben egér vese hosszsmetszetén. A sejtek nem ismerhetők fel, mert az alkalmazott nagyítás ehhez túl kicsi.

Az enzimek kimutatására szolgáló eljárások alapvetően négy csoportba sorolhatók:

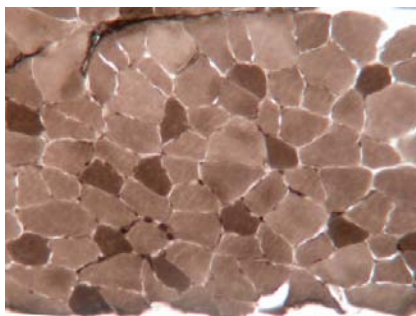
1. A szubsztrát a reakció eredményeképpen szintelen reakciótermékké alakul át. Utóbbi a szubsztráttal együttesen alkalmazott vegyülettel pillanatszerűen lejátszódó reakciója során alakul át színes, oldhatatlan csapadékká.
2. Ha az enzim és szubsztrát kölcsönhatás eredménye egy szintelen, de oldhatatlan vegyület, akkor a színes csapadék kialakítására az enzimreakciót követően is van lehetőség.
3. A szubsztrát oldhatatlan, színes csapadékká alakul az enzimreakció hatására. Az alkalmas szubsztrátok száma igen korlátozott!
4. Az enzimek irreverzibilisen blokkolhatók aktív centrumaikhoz kovalensen kötődő inhibitorokkal. Az inhibitorhoz jelzőmolekulát kötve a gátolt enzim lokalizációja igen pontosan azonosítható. Speciális laborigényei miatt ritkán alkalmazott módszer.

Bár élő állapotú mintán is lehet enzimcitokémiai vizsgálatot végezni, de ilyen mintákon sok a téves reakció, hamis háttérjelölődés. A minta fixálása alapvető fontosságú. Olyan rögzítőszer kell használni, mellyel biztosítható az enzimek azonnali irreverzibilis immobilizációját, de az enzim aktivitásának megőrzésével. Enzimcitokémiai eljárásokban rögzítőszerként legelterjedtebben puffereelt formaldehid- és/vagy glutáraldehidet, alkalmaznak. Lényeges a fixálószer gyors penetrációja.

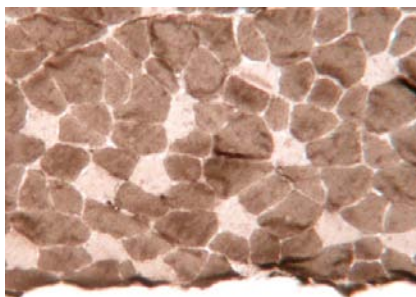
Az alábbi három képből álló sorozaton harántcsikolt izom azonos területéről készült keresztmetszeti készítményeken ATP-áz aktivitásának kimutatása tanulmányozható. Az enzimreakció sötétbarna csapadék képződésével jár. A képek abban különböznek, hogy a szubsztráttal történő inkubálás eltérő pH-n zajlott. Ezért a képeken eltérő pH optimumon működő ÁTP-áz enzimek reakciója, és lokalizációja mutatkozik meg. Így lehetségessé válik pl. az eltérő miozin fehérjék kimutatása.



ÁTP-áz aktivitás kimutatása; pH=4,2.



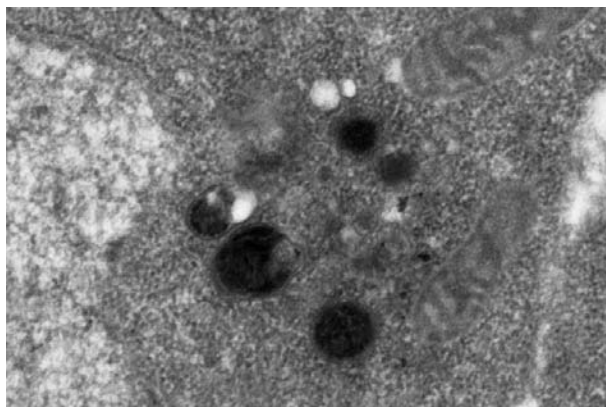
ÁTP-áz aktivitás kimutatása; pH=4,6.



ÁTP-áz aktivitás kimutatása; pH=10,2.

Az enzimidokémiai eljárás műtermék(ek) képződésével járhat (elégtelen vagy hibás fixálás, a keletkező csapadék kioldódik stb.), így a készítmények kiértékelésénél fokozott óvatossággal kell eljárni, és az enzimreakció specifitását kontroll preparátumokkal kell igazolni. A kontroll lehet pozitív, amelyben az alkalmazott enzimreakció biztosan (bizonyítottan) lejátszódik, ezzel lehet igazolni az alkalmazott reakció működését. A negatív kontrollal lehet kizárni a hamis eredményeket: a szubsztrát kihagyásával vagy specifikus gátlók alkalmazásával vagy az enzim hővel történő inaktiválásával elméletileg a csapadékképződés elmarad.

Az enzimidokémia alkalmazható elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz készített metszeteken is. A hiteles eredmények eléréséhez fokozottan kell ügyelni a minta ultrastruktúrájának megőrzésére, a megfelelő elektrondenz csapadék biztosítására (pl. fém sók alkalmazásával), és a csapadék diffúziójának kizárására (pl. alacsony hőmérséklet alkalmazásával).



Elektronmikroszkópos enzimidokémia. Savas foszfatáz kimutatása lizoszomális apparátus elemeiben (elektrondenz struktúrák; Kis Viktor felvétele).

Immuncitokémia

Az utóbbi 25–30 évben egyre szélesebb körben alkalmazott, az immunbiológiai módszerek családjába tartozó eljárás. Alapja az **antigén-antitest reakció**, vagyis az, hogy az antitestek nagy specifitással kötődnek azon molekulákhoz, amelyekkel szemben termelődtek. Az antitest (immunglobulin típusú vérfehérje) e tulajdonságát lehet felhasználni arra, hogy egy sejtben, egy metszeten vagy esetleg sejtenyészetben a megfelelő antigének jelenléte, lokalizációja nagy pontossággal kimutatható legyen.

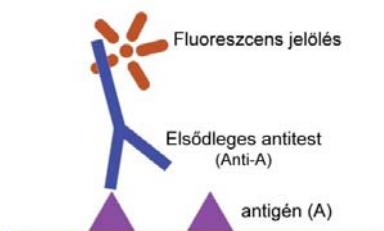
Antigén lehet minden nagy molekulású vegyület (fehérjék, peptidok, egyes lipidek, szénhidrátok), leggyakrabban valamely fehérje. (Antigén céljára kis molekulatömegű anyagok is felhasználhatók: megfelelő hordozómolekulákhoz kötve, az így kialakított molekulával szemben könnyen termeltethető immuncitokémiai célra felhasználható antitest.)

A módszer lényege, hogy a kimutatandó anyagot, pl. fehérjét egy állatból (pl. patkány) izolálják és tisztítják, majd bejuttatják egy másik állatfaj (pl. nyúl) szervezetébe. A patkányból származó fehérjét a nyúl immunrendszere antigénként azonosítja, majd ellenanyagot (**primer antitest**) képez ellene. A termelődő antitestet a nyúl véréből

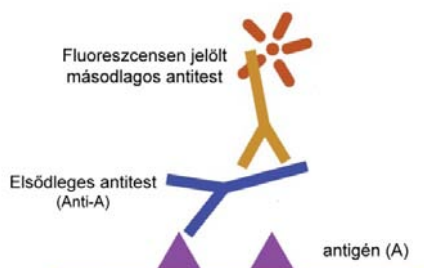
kivonják, tisztítják. Ez az antitest patkányból származó mintán specifikusan kötődhet a megfelelő fehérjéhez (antigénhez). A kötött antitestek nem láthatók, ezért azokat mikroszkóposan is azonosítható jelöléssel kell ellátni.

Ha a jelölést közvetlenül a primer antitesthez kötjük, akkor **direkt immuncitokémiai jelölést** alkalmazunk. A jelölés lehet egy enzim, ekkor az antitestet enzimmikémiai módszerekkel lehet láthatóvá tenni, a minta a kialakuló csapadék tulajdonságaitól függően fény- vagy elektronmikroszkópban vizsgálható. E célra gyakran a peroxidáz-reakciót alkalmazzák, mely már igen kis jelölődés mellett is diaminobenzidin (DAB) és hidrogénperoxid jelenlétében intenzív barna, oldhatatlan reakcióterméket ad. A jelölés lehet egy fluoreszcens festékmolekula (ún. fluofofor, pl. fluorescens izotiocianát – FITC) is, ez esetben a minta fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányozható. A direkt eljárás előnye, hogy egyszerűen és gyorsan kivitelezhető, de relatíve sok antitestet igényel, és magas lehet a téves háttérjelölés.

Az antitest Y alakú molekula, melyek két karja tartalmazza a variábilis antigén kötőhelyeket. A molekula szára több olyan konzervatív, az adott fajra jellemző szekvenciát tartalmaz, melyekkel szemben további antitestek termeltethetők. Ezért az így előállított (másodlagos) antitest a primer antitestet szolgáltató fajtól előállított antitestek jelölésére felhasználható.



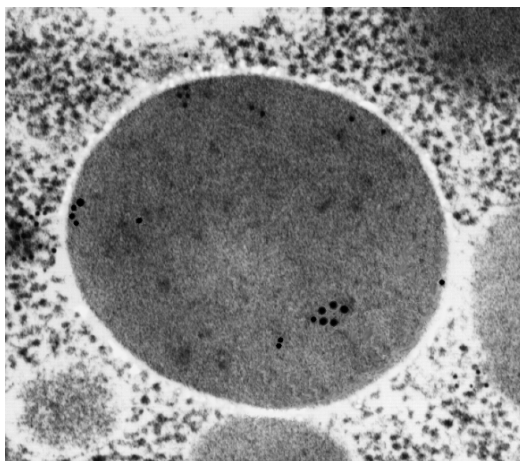
A direkt immuncitokémiai jelölés sémája.



Az indirekt immuncitokémiai jelölés sémája.

Ha a nyúlból származó (primer) antitestet egy harmadik állatfaj egyedébe (pl. kecske) juttatjuk, akkor az ott antigénként jelenik meg és ellenanyag-képződést (**szekunder antitest**) indukál. A szekunder antitest specifikusan fog kötődni a primer antitest megfelelő régiójához. A patkányból származó mintán a nyúl szervezetéből kivont primer antitest specifikusan kötődik az antigénjéhez (a patkány adott fehérjéjéhez), a jelölőmolekulával összekapcsolt szekunder antitest szintén specifikusan kötődik a primer ellenanyaghoz. Ez az **indirekt immuncitokémiai eljárás**. Az eljárás munkaigényes, de egy primer antitesthez több szekunder antitest is kötődhet, így a jelölés erősebb, a módszer érzékenyebb, mint a direkt eljárásnál. Az indirekt eljárások között számos többlépcsős protokollt dolgoztak ki. A többlépcsős immuncitokémiai reakciósor lehetőséget biztosít az antigénkimutatás érzékenységének növelésére.

Az immuncitokémiai vizsgálatokat elektronmikroszkópos mintákon is lehet végezni, ha a jelölésre használt reakciótermék megfelelő elektronelnyelő komponenst is tartalmaz. Ez lehet enzimreakció eredményeképpen létrejövő nehézfémtartalmú (pl. ozmium) csapadék, vagy a szekunder ellenanyaghoz adszorbeáltatott meghatározott mérettartományba eső (1–15 nm átmérőjű) kolloidális arany szemcsé („immunogold” eljárás). Előbbi esetben a nehézfém tartalmú csapadék, az utóbbiban a szabályos és egységes méretű arany szemcsék árnyéka jelöli az antigén helyét a metszeten.



Immunogold eljárással jelölt elektronmikroszkópos immuncitokémiai készítmény. Májsejt váladékszemszején látható kerekded fekete pöttyök az aranyszemcsék képei. A mintán két, eltérő méretű aranykolloiddal jelölt antitest lokalizációja látható (kettős jelölés).

Természetesen az immuncitokémiai eljárások során is keletkezhetnek hamis jelek (pl. az alkalmazott antitestek aspecifikus kötődésével, keresztreakciók kialakulásával), melyeket megfelelő kontroll alkalmazásával lehet az eredmények értékelésénél figyelembe venni.

Kérdések:

20. Csoportosítsa az enzimek kimutatására szolgáló eljárásokat!
21. Mi az antigén–antitest reakció lényege?
22. Milyen molekulák alkalmasak antigénként történő felhasználásra?
23. Mi az eljárásbeli különbség a direkt és indirekt immuncitokémiai eljárások között?
24. Mi a jelentősége az indirekt eljárásban használt szekunder antitestnek alkalmazásának?
25. Mi az előnye az indirekt eljárásnak?
26. Mekkora lehet a jelöléshez felhasznált kolloidális aranyszemcsék mérete?
27. Milyen eszközzel lehet tanulmányozni az immunogold eljárással készített preparátumokat?
28. Miért alkalmas az aranykolloid jelölés elektronmikroszkópos minta kezelésére?

Autoradiográfia

A radioaktivitás jelenségét Henri Becquerel fedezte fel a XIX. század végén (1896) és Marie Curie nevezte el (1898). A XX. század elején Hevesy György dolgozta ki a radioaktív nyomjelzés elvét és erre alapozva a **radioaktív nyomjelzés technikáját** (Hevesy–Paneth, 1913), mely a fizikai, kémiai és biológiai folyamatok/jelenségek tanulmányozásában a más módszerekkel nem követhető folyamatok és azok dinamikájának vizsgálatát tette lehetővé. A mesterséges radioaktivitás felfedezése (1935), majd ezt követően a mesterséges radioaktív izotópok előállítása nagy lökést adott a módszer fejlődésének.



Hevesy György (1885–1966) vegyész; Nobel-díjat kapott 1943-ban az izotópok nyomjelzőként történő alkalmazásáért a kémiai folyamatok vizsgálatához.

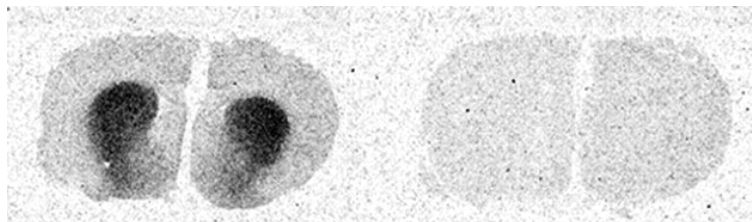
A radioaktív nyomjelzési technikák fejlődése és finomodása lehetővé tette az élő sejtekben vagy a szervezetben lezajló anyagcsere folyamatok, fiziológiai változások időbeni és térbeni alakulásának követését. Orvosi területen történő alkalmazásával kialakult és fejlődésnek indult a nukleáris medicina.

A sejtek anyagcseréjében igen sok kismolekulájú vegyület játszik szerepet, egy részük más, nagyobb molekulákba vagy éppen makromolekulákba épül be. Ha egy beépülő kismolekulájú anyagot radioaktív izotóppal jelölünk, akkor a jelölés később megjelenik a nagymolekulában is, melynek lokalizációja megfelelő módszerrel meghatározható. Az autoradiográfia alkalmas gyógyszerhatástani vizsgálatokra, anyagcsere és élettani folyamatok nyomon követésére, génexpresszió kimutatására stb. Így pl. egy aminosav jelölésével nyomon követhető, hol veszi fel a sejt a jelölt molekulákat, azok hol és milyen sebességgel épülnek be az éppen szintetizálódó fehérjékbe, és mi lesz a jelölt fehérjék sorsa.

Biológiai mintákon a H, C, N, O, P, S és I radioaktív izotópjai alkalmasak a jelölésre. Az élettudományi kutatásokban a β -sugárzó izotópokat (^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S) alkalmazzák a leggyakrabban. Anyagcsere-vizsgálatokban főleg a ^3H , ^{14}C jelzett vegyületeket, fehérjeszintézis kutatásában a ^3H , ^{14}C vagy ^{35}S jelzett aminosavakat, nukleinsavak szintézisének vizsgálatára a ^{32}P jelzett nukleotidok használata terjedt el. A kutatásokban leggyakrabban használt izotóp a trícium (a hidrogén izotópja: ^3H).

Az izotóppal jelölt molekulát (aminosavakat, nukleotidokat, szénhidrát monomereket) injekcióval lehet bejuttatni a kísérleti állatba, vagy a tenyésztő médiummal a sejt-, szövettenyésztetbe, majd – miután a sejtek felvették azokat – beépülnek a szintetizálódó makromolekulákba. Bár a jelölt molekulák tulajdonképpen miniatűr sugárforrások, maga a jelölődés szabad szemmel vagy mikroszkóppal nem detektálható, láthatóvá kell tenni azt. Ebből a célból a kiértékelendő mintát (szöveti metszetet, sejtenyésztetből származó sejteket) vékony fényérzékeny (ezüst-halogenid szemcséket tartalmazó) emulziós réteggel kell lefedni. Az izotópból kilépő sugárzás behatolva az emulzióba, kölcsönhatásba léphet az abban elhelyezkedő ezüst-halogenid szemcsékkel (expozíció), látens képet kialakítva. Az exponált szemcsék hagyományos fényképezési eljárással látható ezüstszemcsékké alakíthatók, a nem exponált szemcsék az emulzióból kimoshatók. Így az eredmény az izotópjelzések közelében (ideális esetben pontosan felette) elhelyezkedő sötét ezüstszemcsék halmaza.

Az így kialakuló **autoradiogram** denzitométerrel kiértékelhető. A „feketedés” a sugárzás intenzitásával széles tartományban arányos ezért közelítő mennyiségi kiértékelésre is alkalmas. A módszer lehetőséget ad nagyobb kiterjedésű akár az egész testet magába foglaló minták vizsgálatára is (makro-, illetve egésztest autoradiográfia). Ha a minta fény- vagy elektronmikroszkópos célra készült metszet, az ezüst fény- és elektronelnyelő tulajdonságai miatt a preparátum (megfelelő előkészítést követően) fény-, illetve elektronmikroszkópban is vizsgálható (**mikro-autoradiográfia**).



Patkány nagyagy keresztmetszet autoradiogram. Baloldalon dopamin transzporter jelölt, jobb oldalon negatív kontrol.

Az autoradiogram minősége függ az alkalmazott izotóp tulajdonságaitól, a sejtek által felvett jelölt molekulák mennyiségétől, a sugárzás mintában, illetve emulzióban megtett útjának hosszától. Ha vastag a minta, nő a sugárzás elnyelődésének és szóródásának valószínűsége. Ha vastagabb az emulzió a benne kialakuló „kép” denzitása nő (nagyobb az esélye a kölcsönhatás bekövetkeztének – több ezüstszemcse keletkezhet), de a sugárzás nagyobb területen is szóródhat, ezért az ezüstszemcsék nem feltétlenül a jelölt anyag felett jelennek meg, kevésbé pontos az autoradiogram.

Kérdések:

29. Mi a radioaktív nyomkövetési eljárás alapja?
30. Melyek a jelöléshez leggyakrabban felhasznált izotópok?
31. Hogyan lehet mikroszkópban láthatóvá/tanulmányozhatóvá tenni a radioaktív jelölést?
32. Mi befolyásolja az autoradiogram minőségét?
33. Kinek a nevéhez kötődik a radioaktív nyomkövetési eljárás elvének és technikájának kidolgozása?

A sejtalkotók centrifugális ülepitéssel történő elkülönítése – Sejtfractionálás

A sejt struktúráját, a sejtorganellek szerkezetét, kiterjedését, alakját, mennyiségét és elhelyezkedését fény- és elektronmikroszkóppal is lehet vizsgálni. Azonban a sejt alkotóelemeinek kémiai összetételéről, az egyes sejtalkotók működéséről részletesebb ismerteket lehet gyűjteni úgy, hogy ha az organelleket izoláljuk a sejt többi alkotóelemétől és előállítjuk tisztított, dúsított frakciókat (sejtfractionálás).

A sejtalkotók és bizonyos makromolekulák frakciókban történő elkülönítésére egyes fizikai tulajdonságaikban (pl. méretükben, alakjukban, sűrűségükben) megmutatkozó különbségeket lehet kiaknázni. Ehhez sejtenyészetből vagy valamely szervből vett minta egyaránt alkalmas lehet. A legmegfelelőbb az olyan szervből származó minta, amelynek sejtállománya túlnyomó többségében azonos sejtípusból áll, és relatíve kevés kötőszöveti rost található benne. Ilyen szerv például a máj vagy az izom.

Az eljárás alapvetően két fő szakasza a homogenizálás, azaz a sejt megbontása, feltárása a sejtalkotók hozzáférhetővé tételére, valamint a „centrifugálás” vagyis a sejtorganellek centrifugális ülepitéssel történő elválasztása a frakciók előállítására.

Homogenizálás

Szervekből, szövetekből származó minták esetében a sejteket szöveti kötődésükből (sejt–sejt, és sejt–ECM kapcsolatok!) fel kell szabadítani. A sejtfelszíni molekuláris kapcsolatokat és a sejtkapcsoló struktúrákat bontani kell. Ez megfelelő ion-összetételű oldatok, enzimek, mechanikai behatás vagy ezek kombinációja alkalmazásával valósítható meg.

A sejtalkotók a sejt "feltárásával" válnak hozzáférhetővé. Ez a sejthártya felszakításával és a sejtváz feldarabolásával érhető el, ennek megvalósítására mechanikai, fizikai, fizikai-kémiai módszerek alkalmazhatók. Az alábbi módszerek többségénél a sejtalkotók egy része sérül, különösen a kiterjedt kompartmentumok (pl. SER, DER) feldarabolódnak, összefüggő membránjaik vezikulákká tagolódnak (vezikularizáció).

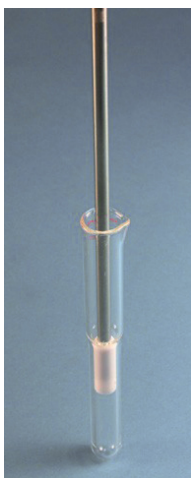
Hipozmotikus oldatba helyezve a sejteket (**ozmotikus sokk**), a membránnal határolt terekbe víz áramlik be, ami a membránnal határolt terek megduzzadásához, végül a membrán felszakadásához vezet.

A konyhai turmixgép működési elvére épülő, de speciális kiképzésű ún. **késes homogenizátor** különösen detergens és/vagy szerves oldószerek alkalmazásával kombinálva makromolekulák (pl. DNS) szeparálására is alkalmas.

Az **ultrahanggal** történő kezelés alkalmas a sejtfal széttörésére is, gyakran sejtkultúrák, sejtszuspenziók sejteinek feldolgozásához használják. Az ultrahangos homogenizátorral jó eredménnyel nyerhető ki egy tisztított sejtfrakció organelumainak beltartalma.

Sejtszuspenzió kisméretű résen, meghatározott nyomással történő átpréselésekor („**french press**”) a sejtekre ható nyírófeszültség és a nyomásváltozások hatására szakad fel a sejthártya.

A sejtekre ható nyírófeszültséget és a kialakuló folyadékelegy belső súrlódását használja fel a sejtek feltárására a **Potter-Elvehjem homogenizátor**. Ez egy üvegcsőből és a csőbe precízen illeszkedő csiszolt üveg vagy teflon dugattyúból áll. A dugattyút kézzel (kis mennyiségek feldolgozásához) vagy motorral (5 ml-es mintatérfogat felett) mozgatva a tengelye körül forgatható. A csőbe helyezve a kisebb szövetdarabokat tartalmazó mintát vagy sejtszuspenziót, a dugattyú forgatása közben az anyagot többször át kell préselni a cső és a dugattyú fala közötti résen. Ennek hatására a szervdarabkák szétesnek, a sejtek felszakadnak, a sejtorganelumok kisodródnak. Sokoldalú, több paraméterében jól szabályozható, ezért széles körben alkalmazott módszer.



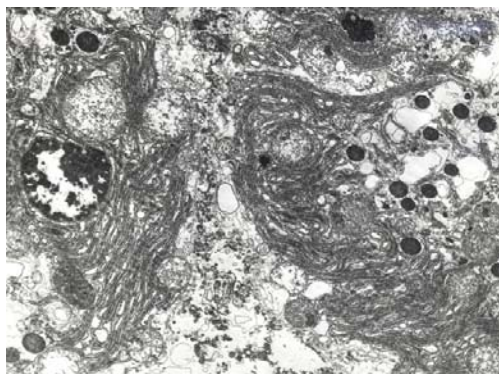
Potter-Elvehjem homogenizáló cső és teflon dugattyúja.



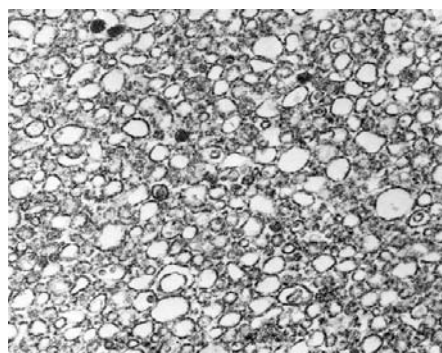
A Potter-féle homogenizáló működési elve.

A kialakuló szuszpenzió, a homogenizátum, diszperz rendszer, melyben sejtödékek, a sejtorganelumok és töredékeik, a sejtközi állomány elemei találhatók meg. A csak sejtekből, szövetekből, szervdarabokból készített homogenizátum túl sűrű (túl nagy belső súrlódású) lenne, ezért a feltárás előtt a feldolgozandó anyaghoz ún. homogenizáló médiumot kell adni (1 g mintához 3–5 ml médium). A homogenizáló médium – rendkívül leegyszerűsítve – modellezi a sejten belüli körülményeket: tartalmaz egy- és kétértékű kationokat, aniont, pufferkomponenst (a pH beállítására) és a megfelelő ozmolalitás beállítására szolgáló vegyszert (általában szacharóz, céziumklorid stb.).

A homogenizálás lehet „enyhe” vagy „durva”. Előbbi esetben a sejteket, sejtalkotókat gyengébb behatásnak tesszük ki, a sérülékenyebb organelumok jól megtarthatók, de a sejtek feltárása nem egyenletes, nagyobb sejtrészletek megbontatlanul maradhatnak. A durva homogenizálás eredménye egy egyenletes feltárás, de ennek ára az érzékenyebb organelumok nagymértékű sérülése. Ez utóbbi esetben a sérült sejtalkotókból kiszabaduló anyagok más frakciókat szennyeznek.



Patkány hasnyálmirigyből enyhe homogenizálással készített preparátum. A DER ciszternái nem váltak el egymástól és a sejtmagtól.



Májból előállított DER frakció jól mutatja az erős homogenizálás hatására lejátszódó vezikularizáció eredményét.

A homogenizátum előállítása során gondoskodni kell a kiszabaduló enzimek aktivitásának gátlásáról alacsony (közel 0°C) hőmérséklet biztosításával, szükség esetén enzimgátlók (pl. hasnyálmirigyből vett minta feldolgozásánál tripszin inhibitor) hozzáadásával.

A homogenizátumból centrifugális ülepítéssel nyerhetők ki a különböző sejtalkotók frakciói.

Centrifugálás

A homogenizátumban a sejtalkotók részecskéinek mozgását alapvetően a nehézségi erőter, illetve az ülepítő közegben fellépő sűrűlási erők határozzák meg. A tényleges mozgást befolyásolja a részecskék mérete (térfogata), alakja (felülete) és sűrűsége, pontosabban az ülepítő közeg és az ülepedő részecske sűrűsége közötti különbség. Az ülepítő közegnél nagyobb sűrűségű részecskék a nehézségi erő irányába haladva ülepednek (**szedimentáció**), a közegnél kisebb sűrűségűek pedig ellentétes irányban elmozdulva fölözödnek (**flotáció**). Az ülepedés (vagy fölözödés) sebessége egyenesen arányos a részecske és a közeg sűrűségkülönbségével, négyzetesen arányos a részecske méretével és fordítottan a közeg belső sűrűlásiával. Mivel a sejtorganelumok és töredékeik a kolloid mérettartományba tartoznak (átmérőjük: 1 nm–0,5 µm), ezért részecskék sebessége még viszonylag nagy sűrűségkülönbség esetén is nagyon csekély. Ezen túlmenően az 1 µm és ennél kisebb átmérőjű részecskék hőmozgása már érzékelhető mértékben a gravitációs mozgás ellen hat. Ezért a gyakorlatban a sejtorganelum frakciók előállítására a normál nehézségi erőter alkalmazása csak igen korlátozottan felel meg.

A megoldás az ülepedési (fölözödési) sebesség megnövelése centrifugális erőter alkalmazásával. Az erre a célra kifejlesztett eszközök a laboratóriumi (és ipari) centrifugák, melyek közül még a legkisebbek is a nehézségi erőternél nagyságrenddel nagyobb centrifugális erőter létrehozására képesek. Sejtfractionálási feladatokhoz az ún. preparatív ultracentrifuga a legalkalmasabb. (Ultracentrifugának nevezik a 20 000/perces fordulatszámnál nagyobb teljesítményű centrifugát.)

Azt, hogy a forgástengelytől mért adott távolságban a centrifugális gyorsulás hány-szorosa a nehézségi gyorsulásnak a relatív centrifugális erőterrel (**RCE**) fejezik ki. A gyakorlatban alkalmazott centrifugális gyorsulás a nehézségi

állandó 10^2 – 10^5 -szeres tartományába esik, ilyen körülmények között a hőmozgás és a gravitációs mozgások ülepítés vagy fölöződés ellen ható komponensei elhanyagolhatóak!

A közegnél nagyobb sűrűségű (ülepedő) részecskék centrifugális, míg a közegnél kisebb sűrűségű (fölöződő) részecskék ezzel ellentétes irányú centripetális mozgást végeznek. A részecskék sebessége egyenes arányban nő a forgási tengelytől mért távolsággal, illetve a fordulatszám négyzetével.

A centrifugálásos elválasztási módszer elméleti alapjait megadó egyenletrendszer a gravitációs mozgást, a súrlódási erőt (Stokes-egyenlet) és a centrifugális gyorsulást leíró egyenleteken alapszik. A felhasznált összefüggéseket ideális rendszerre vonatkoztatjuk: a részecskék 50 nm körüliek, gömbszerűek, a közeg sűrűsége (kb. 1 g/cm³), viszkozitása (kb. 1 centipoise), mely a 20°C-os vízzel egyező. (A valóságban a sejtfractionáláskor az ülepítendő részecskék mérete széles skálán szórhat, alakjuk jelentősen eltérhet a gömbötől.)

A centrifugális erőterben ülepedő (fölöződő) részecske fontos jellemzője egységnyi szöggyorsulására vonatkoztatott ülepedési (vagy fölöződési) sebessége, amit a részecske ülepedési együtthatójának (**szedimentációs koefficiensének**) neveznek. Jele: *s*, dimenziója szekundum, értékének nagyságrendje vizes közegben és makromolekulák esetében 10^{-13} s, amit nagyobb részecskék, pl. sejtoranellumok esetében – kényelmi okokból – 10^{13} -szorosában, ún. Svedbergben (S) fejezünk ki ($S=10^{-13}$ s). Például az eukarióta riboszóma kis alegységének ülepedési együtthatója 40S, azaz $s=4 \times 10^{-12}$.



Theodor Svedberg (1884–1971) svéd fizikokémikus; a diszperz rendszereken végzett kutatásaiért kapott Nobel-díjat 1926-ban. Munkásságával alapvetően hozzájárult a fehérjemolekulák centrifugális ülepedési sebességének és ezáltal molekulatömegének mérésére alkalmas analitikai ultracentrifugálás technikájának kifejlesztéséhez,

A gyakorlatban a percenkénti fordulatszámot (**RPM** – revolutiones pro minutum), a centrifugálás idejét percekben (vagy órákban), és az **RCE** értékét (általában 1000xg-ben kifejezve) adják meg.



Balra fix mintatartó állású szögrotor, jobbra a fordulatszám növelésére az erőhatásoknak megfelelően kilendülő mintatartókkal az ún. kilendülő rotor (a rotortartó talpakon).

A differenciális centrifugálás

E módszerrel a sejt alkotó elemeinek egymástól különböző fizikai tulajdonságú frakcióit állíthatjuk elő. A részecskéket egy adott sűrűségű közegből, vagy esetleg egy adott sűrűségű folyadékrétegen át ülepítjük ki.

Ha az ülepitendő részecskék között nagy a sűrűségkülönbség, akkor az ülepedési együtthatójuk, ebből következően ülepedési sebességeik között érdemi különbség mutatkozik, ami elsősorban a sűrűségkülönbségből származik. Ha nem elegendően nagy a részecskék közötti sűrűségkülönbség, akkor a térfogat-, esetleg alakbeli eltérések jutnak döntő szerephez. Ezért lehetséges, hogy bár a sejtorganellumok többségének sűrűsége az 1,133–1,22 g/cm³-es szűk tartományba esik, ülepedési együtthatójuk mégis öt nagyságrendet is átfogva 10¹–10⁶ S-ig terjed. Ennek az a következménye, hogy a kicsiny sűrűségkülönbség ellenére a különböző méretű részecskék adott közegben, adott centrifugális fordulatszám mellett is igen különböző sebességgel fognak ülepedni.

Az ülepedési sebesség különbségeiért, tehát, döntően a részecskék méretkülönbségei felelősek: a differenciális centrifugálással a részecskéket gyakorlatilag térfogatuk szerint frakcionálhatjuk. A nagyobb térfogatú részecskék ülepednek gyorsabban. Először a nagyobb térfogatú, nagyobb sebességgel ülepedő részecskéket, majd sorban a kisebb sebességgel ülepedőket különítjük el.



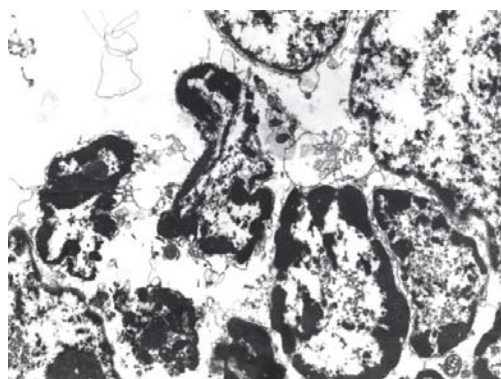
Albert Claude (1898–1983) belga sejtbiológus; Nobel-díj 1974.

Albert Claude belga kutató alkalmazta először (1940) a differenciális centrifugálást, ezzel elindítva a módszer máig tartó sikerét a biokémiai és molekuláris biológiai kutatásokban. Munkásságát 1974-ben az orvostudományi Nobel-díj odaítélésével ismerték el.

Alapos feltárással kapott homogenizátumban nem marad sejttermék, így a sejtmagok a legnagyobb térfogatú részecskék. A centrifugálás paramétereit úgy kell megválasztani, hogy adott centrifugán kiválasztott fordulatszám mellett, a meghatározott centrifugálási idő alatt az elkülönítendő sejtalkotók összes részecskéje lejusson a centrifuga cső aljára. Ezzel két frakciót kapunk: az adott sejtorganellumokat tartalmazó **üledék (szedimentum; csapadékszerű állomány a cső alján)** és az azt már nem tartalmazó **felülúszó (szupernatans)**.

Az üledék nyers frakció, hiszen az adott körülmények között a kisebb sebességgel ülepedő részecskék egy hányada is bejut a szedimentumba. A nyers frakcióból a kisebb részecskéket az üledék többszöri „mosásával”, új médiumban történő reszuszpendálásával és újracentrifugálásával lehet eltávolítani. Az ismételt centrifugálás eredményeképpen a frakció minden részecskéje ismét az üledékbe kerül, a kisebb („szennyező”) részecskékből azonban minden mosással egyre kevesebb. Három–hat mosás után megkapjuk az ún. tisztított frakciót.

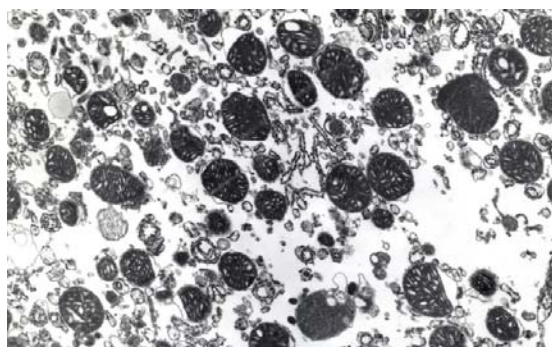
A **magfrakció** – sejttypustól függően – 500–1000 g érték mellett 10–20 percig történő centrifugálással nyerhető ki. A magfrakció feletti felülúszó a sejtmagmentes **poszt nukleáris szupernatans (PNS)**. Rendre növekvő RCE értékek alkalmazásával és megfelelő centrifugálási idő kiválasztásával nyerhetők ki a PNS-ből a méret szerint következő sejtalkotók frakciói.



Patkány májból erőteljes homogenizálással előállított tisztított magfrakció.

A sejtalkotók mérettartománya szerint a növényi sejtekben a **vakuólumok** és/vagy a **plasztiszok**, majd a mitokondriumok, állati sejtekben általában a mitokondriumok, vagy az azoknál nagyobb váladékszemcsék következnek.

Állati sejtek **mitokondrium frakciójának** kinyeréséhez általában 10–20 percig tartó, RCE=3000–10 000 g melletti centrifugálást használnak. A mitokondriumok, a lizoszómák és a peroxisómák egy része sok sejtípusban azonos mérettartományba esik, és ezért differenciális centrifugálással egymástól szét nem választathatók. Ilyen sejtek (pl. májsejtek) esetében gyakran előbb kiülepítik a 3000–4500 g, 10 perc mellett képződő ún. nehéz mitokondrium frakciót. Ez mitokondriumokban dúsabb, míg az azután kb. 7000 g, 20 perc alkalmazásával előállított ún. könnyű mitokondrium frakció a kisebb méretű mitokondriumokat és a lizoszómák, valamint a peroxisómák zömét tartalmazza. Természetesen mindkét nyers mitokondriális szubfrakció szennyezett az említett három organelumnál kisebb részecskékkel is.



Nyers mitokondrium frakció.

A nyers mitokondrium frakció fölött a **posztmitokondriális szupernatans** (PMS) képződik. Ez apró vezikulákat tartalmaz, melyek a homogenizáláskor keletkeztek a DER, a SER, a Golgi-készülék elemeiből, valamint a plazmamembránból. A PMS ultracentrifugálásával (100 000 g, 1 óra, 0,25 M/l szacharóz médiumban) előállítható a szabad riboszómákat is magába foglaló **nyers mikroszóma** frakció. A fennmaradó, ülepíthető részecskéket már nem tartalmazó **posztmikroszomális felülúszó** a homogenizáló közeggel hígított citoplazma alapállomány és a citoszol. A különböző membránorganellumok mikroszomális vezikuláinak térfogata az általában szokásos homogenizálási eljárások (lásd ott) után nem különbözik olyan diszkrét értékben, hogy differenciális centrifugálással kielégítően szétválaszthassuk őket egymástól.

Mivel azonban bizonyos sűrűségkülönbség van a részecskék között, szokás a nyers mikroszómát két szubfrakcióra bontani. Az ún. nehéz mikroszóma frakció (20–30 000 g, 10–20 perc) apró lizoszómákat, a durva felszínű ER-ből származó vezikulákat tartalmaz. A SER, és Golgi-komplex membránjainak és vezikuláinak többsége és a riboszómák a könnyű mikroszóma frakcióban (kb. 100 000 g, 1 óra) nyerhetők ki. A nehéz és könnyű mikroszóma azonban csak nyers frakciónak tekintendő, mert kölcsönösen szennyezik egymást.

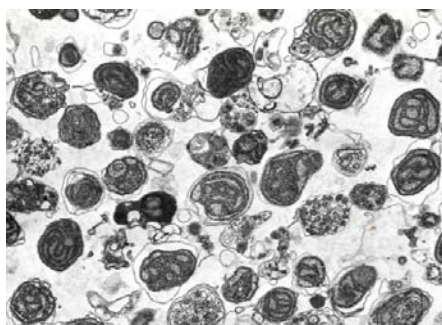
A mikroszóma frakció szubfrakciói kizárólag kismértékű sűrűségkülönbségeiket kihasználva tisztíthatók tovább, erre alkalmas módszer az ún. sűrűség–gradiens centrifugálás.

A differenciális centrifugálással nyert sejtfrakciók anyagi összetétel (lipid–fehérje arányuk, enzimösszetételük, membránjuk és beltartalmuk kémiai összetétele) szempontjából, valamint funkcionális szempontból (*in vitro*) vizsgálhatók.

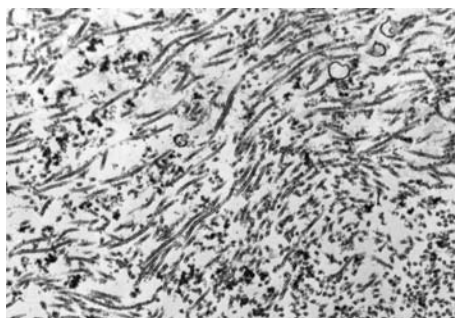
A sűrűség-gradiens centrifugálás

A frakciók további bontása, a részecskék még finomabb elkülönítése már nem a részecskeméretben megmutatkozó különbségeken alapszik.

Ha a centrifugálást egy pontról-pontra növekvő sűrűségű és megfelelő sűrűségtartományt átfogó médiumban végezzük, a részecskék addig ülepednek, amíg el nem érik a nekik megfelelő sűrűségű oldatrészt. Ekkor megszűnik az ülepedő részecske és az ülepítő közeg közötti sűrűség különbség, egyensúlyi helyzet alakul ki, és a részecske lebegni fog. Ha az elválasztandó sejtalkotók sűrűsége bármilyen csekély mértékben is, de különbözik, megfelelő sűrűség-gradiens alkalmazásával elkülöníthetők egymástól.



Autofág vakuólumok frakciója. Az eltérő elektrondenzitás az eltérő emésztettségi fokra utal.



A sejtvez mikrotubuláris elemeit tartalmazó tisztított frakció.

A sűrűség-gradiens kifejezetten preparatív, csekély mennyiségek kifinomult kezelésére használható, ultracentrifugációs módszer.

Kérdések:

34. Soroljon fel néhány, a sejtek feltárására lehetőséget adó módszert!
35. Miért előnyös a Potter-Elvehjem homogenizáló használata?
36. Mi a homogenizálás célja?
37. A sejtalkotók mely tulajdonsága alapján lehet differenciális centrifugálás segítségével frakcióikat elkülöníteni egymástól?
38. Sorolja fel a fő frakciókat előállításuk sorrendjében!
39. Hogyan kaphatunk tiszta frakciókat differenciális centrifugálással?

40. Mi az elvi különbség a differenciális és sűrűség-gradiens centrifugálási módszerek között?
41. Mit jelent a sűrűség-gradiens?

A. függelék - Animációk

1. animáció: A biológiai membrán felépítése
2. animáció: A fagyasztva törés folyamata
3. animáció: Na^+/K^+ ionpumpa komplex molekuláris modellje
4. animáció: Nátrium-ioncsatorna térbeli modellje
5. animáció: A maghártya pórus a póruskomplex nélkül
6. animáció: DNS kettősszál egy darabjának molekuláris modellje
7. animáció: 70s riboszóma térbeli molekuláris modellje
8. animáció: A chaperon-molekula térbeli modellje
9. animáció: A tubuli dimer térbeli modellje
10. animáció: mikrotubulus
11. animáció: Az aktin filamentum és miozin kapcsolódása
12. animáció: A konnexon térbeli modellje
13. animáció: Klatrin triszkelion
14. animáció: Klatrin burok térbeli modellje
15. animáció: Rosetta komplex alfa alegység térbeli modellje

Ajánlott irodalom

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A.D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Essential Cell Biology (Fourth edition), Garland science, Taylor & Francis Group, New York, 2013.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Molecular Biology of the Cell (Fifth edition), Garland science, Taylor & Francis Group, New York, 2008.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Courier Companies Inc., 2000.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M.P.: Molecular Cell Biology (Seventh edition), W.H. Freeman & Co., New York, 2012.

Molnár László, Gábrriel Róbert: Fény- és elektronmikroszkópos mikrotechnika, Dialóg Campus kiadó, Budapest–Pécs, 2001.

Moore, R., Clark, W.D., Vodopich, D.S.: Botany (Second edition), McGraw Hill, 1998.

Röchlisch Pál (szerk.): Szövettan (3. kiadás), Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006.

Ruzin, S.E.: Plant Microtechnique and Microscopy, Oxford University Press, 1999.

Suvarna, K.S., Layton, C., Bancroft, J.D.: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Seventh edition), Churchill Livingstone Elsevier, 2013.

Szabó Gábor (szerk.): Sejtbiológia (2. kiadás), Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009.