

SEJTBIOLÓGIA

biomérnök hallgatók számára

**Hetedik rész:
Intracelluláris kompartmentek:
a fehérjék elosztása**

Novák Béla
docens

Proofreading:
Sveiczter Ákos
öszöndíjas kutató

1994. november 30.

Copyright © 1994

BME, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

Az eukarióta sejtek kompartmentalizációja

A baktériumokkal ellentétben, amikben csak egyetlen intracelluláris kompartment van, az eukariótákban funkcionálisan különböző és membránnal körülhatárolt kompartmentek sokasága van: az **organellumok** saját enzimmézzel rendelkeznek. A kompartment belsejét **lumennek** nevezzük.

Kérdések, amiket tárgyalunk:

1. Mi történik az organellumokban?
2. Hogyan mozognak a molekulák közöttük?
3. Hogyan keletkeznek és maradnak fenn?

Az organellumokban a proteinek:

1. jellegzetes reakciókat katalizálnak,
2. molekulákat visznek ki és be,
3. és az organellumok felületi markerei is.

Minden fehérjének a szintézise azonban a citoszolban kezdődik, mielőtt a specifikus kompartmentbe kerül (kivétel: a szemiautonóm organellumok néhány fehérjéje).

A membránokon alapvető fontosságú biokémiai folyamatok játszódnak le: lipid bioszintézis, oxidatív foszforiláció, fotoszintézis, stb. Az intracelluláris membránok **funkcionálisan specializált részeket** hoznak létre a sejt számára. Mivel az így létrejött organellumok membrán határoltak, ezért specifikus transzport kell mindegyiknek. Az organellumra jellemző (specifikus) fehérjéknek is oda kell jutniuk valahogya megfelelő organellumhoz, és bejutni a belsejébe.

Az eukarióta sejt fő intracelluláris kompartmentjei

Sejtmag (nukleusz): DNS és RNS szintézis folyik benne. A sejtmagot a **citoplazma** veszi körül, ami citoszolra és az organellumokra oszlik. A **citoszol** a sejttérfogat kb. felét teszi ki.

Endoplazmás retikulum (ER): labirintus; a membrán felület fele itt van. Sok riboszóma van rajta. Ezek a riboszómák készítik:

1. az **integráns membránfehérjéket**,
2. és azokat az oldható fehérjéket, amik más organellumba mennek.

Alapvető különbség van abban, hogy hogyan megy egy fehérje az ER-be vagy más citoplazmás organellumba:

1. más organellumba a kész fehérje megy,
2. az ER-be viszont a szintézis alatt transzlokálódik a fehérje.

Az ER készíti a lipideket is a sejt többi része számára, és emellett Ca^{2+} raktár is.

Golgi apparátus = lapos Golgi ciszternák összessége: lipideket és fehérjéket kap az ER-től, és általában kovalens módosítás után szétosztja azokat.

Mitokondrium és kloroplaszt: funkciójuk az ATP termelés.

Lizoszómák: emésztő enzimek vannak bennük:

1. makromolekulákat,
2. intracelluláris organellumokat,
3. **endocitózissal** bekebelezett dolgokat (ezeknek előbb az **endoszóma**-nak nevezett kompartmenten kell átmenniük) esznek meg.

A peroxiszómák (mikrobodies) oxidatív folyamatokat végeznek.

Az organellumok minden sejtben ugyanazt a funkciót töltik be, de az egyes organellumok mennyisége sejttípusonként változó. Az intracelluláris kompartmentek a sejttérfogat felét adják, és az ER membrán pedig 12-25- szöröse a plazmamembránnak.

Az intracelluláris kompartmentek topológiája evolúciós szempontból
(ezt a bekeretezett részt már az év elején az evolúciónál említettem)

Lineáris dimenzióban az eukarióta sejt 10-30-szor nagyobb, mint a prokarióta. Térfogat alapján viszont 1000-10.000-szer nagyobb. Az intracelluláris membránok az F/V arány romlását hivatottak helyre állítani (emlékezzünk az alapvető membrán folyamatokra).

A baktérium citoplazmamembránja **multifunkcionális**, míg az eukariótáknál a különböző membránfunkciók különböző membránokba kerültek. Tehát a belső membránok kialakulása együtt ment a membrán funkciók specializálásával.

Az invagináció után leszakadt kompartment belseje (lumen) a sejt külsejével azonos: ez igaz az ER, Golgi, endoszóma, lizoszóma esetében.

Ezek egy családot alkotnak, és a belsejük kommunikál egymással és a sejt külsejével.

A baktériumokban a plazmamembránon riboszómák vannak, és talán azért van az ER-en is, mert az abból ered (származik).

A baktériumokban a kromoszóma a citoplazmamembránhoz kötődik. **Az eukarióta kettős magmembrán a plazmamembrán invaginációjával jöhetett létre. A nukleáris kompartment ekvivalens a citoszollal,** és ezért mitózis alatt, amikor a magmembrán lebomlik, tartalma a citoplazmával keveredhet (ez más organelumnál soha sincs így). A 2 membrán közti rész pedig a sejt külsejével azonos és folytonos az ER-rel.

A mitokondriumok és kloroplasztok: saját genomjuk van; belső membránjuk a bekebelezett baktérium membránja, és a lumenjük annak citoszolja. Ez magyarázza, miért nem vesznek ezek részt az intenzív vezikuláris forgalomban, ami a protoeukarióta citoplazmamembránjából származó membránnal borított organelumokat (ER, stb.) jellemzi.

Mindezek alapján 5 csoportba soroljuk az intracelluláris kompartmenteket:

1. nukleusz és citoszol: nukleáris pórusokon keresztül kommunikálnak;
2. szekréciós folyamatban résztvevők: ER, Golgi, endoszóma, lizoszóma, és transzport vezikulumok;
3. mitokondriumuk;
4. plasztidok;
5. peroxiszómák.

A proteinek különböző módon mozoghatnak a kompartmentek között

A citoszolban szintetizált proteinek sorsa attól függ, hogy a szekvenciájuk tartalmaz-e, és ha igen, akkor milyen **szortírozó szignált**, ami kijuttatja őket a citoszolból.

A legtöbb fehérjének nincs ilyen szignál szekvenciája, ezért a citoszolban marad. A proteinek alapvetően 3 különböző módon mehetnek egyik kompartmentből a másikba:

1. **Kapu transzport:** a topológiailag ekvivalens kompartmentek (pl. nukleusz és citoszol) között: **nukleáris pórus komplex.**

Nukleáris pórus komplex = egy szelektív kapu, ami specifikus makromolekulákat beenged, vagy kis molekulákat.

2. **Transzmembrán transzport:** topológiailag különböző részek között membrán kötött **protein transzlokátor** katalizálja. A molekulának **kitekeredettnek kell lennie**, hogy ebben részt vehessen. Pl. ER-be és mitokondriumba történő transzport a citoszolból.

3. **Vezikuláris transzport: transzport vezikulum** szállít. Cargo-val feltöltődik az egyik kompartmentben, és egy másikba ürül. Pl. oldható proteinek szállítása az ER-ből a Golgiba. A protein nem megy membránon át, tehát csak topológiailag ekvivalens kompartmentek között.

Mind a 3 protein transzfer szortírozó szignállal irányított folyamat. Ez a molekulán van, és kell egy receptor, ami ezt felismeri.

Szignál peptidek és szignál foltok

Kétféle szortírozó szignál van.

1. **Szignál peptid:** folyamatos aminosav szekvencia, 15-60 tagból áll. Ez gyakran levágódik a transzport folyamat végén egy **szignál peptidáz** által, de nem mindig. Használata: citoszolból az ER-be, mitokondriumba, kloroplastba, peroxiszómába, nukleuszba, protein visszatartás az ER-ben.

2. **Szignál-folt:** 3 dimenziós struktúra a feltekeredett protein felületén. Nem szomszédos oldalláncoktól való. A Golgi-ból a lizoszómába történő transzportnál használt mechanizmus.

Különböző célállomásokhoz különböző szignál peptid tartozik.

1. Transzport az ER-be: N-terminálison 5-10 hidrofób aminosav. Ezek legtöbbje a Golgi apparátusba megy majd.
2. Visszatartás az ER-ben: speciális 4 aminosav a C-terminálison.
3. Mitokondrium: pozitív töltésű és hidrofób aminosavak váltakozása.
4. Peroxiszóma: C-terminálison 3 aminosav.
5. Nukleusz: a fehérje közepén pozitív töltésű aminosavak.

A szignál peptidek jelentőségének felismerése: ha az ER szignál peptid kódját egy citoszolus protein génjének elejére tették, akkor a fehérje bement az ER-be.

A sejtek nem tudják az organelumokat *de novo* szintetizálni.

Molekulák transzportja a nukleuszba és onnan kifelé

Sejtmag membrán (nuclear envelope): 2 koncentrikus membrán, folyamatos az ER-rel. A 2 membrán protein összetétele eltérő, jóllehet folyamatosak. A belső membránhoz köt a lamin. A külső membrán az ER membránhoz hasonlít (riboszómák is kötnek hozzá): az itt szintetizált fehérjék a **perinukleáris térbe** kerülnek (ER-rel folytonos).

Kétirányú (bidirekcionális) forgalom van a nukleáris membránon át:
1. hisztonok, DNS- és RNS polimeráz, gén szabályozó fehérjék, stb. befelé;
2. tRNS-ek és mRNS-ek kifelé mennek.

Az import és az export is szelektív: mRNS-ek csak modifikáció után jönnek ki.

Gyakran a transzport komplex: riboszóma fehérjék bemennek, összeállnak riboszóma részecskévé, így jönnek ki.

Nukleáris pórusok perforálják a nukleáris membránt

A nukleáris pórusok: nukleáris pórus komplex (molekulatömege = 125 millió; 100 fehérjéből áll); oktagonális szimmetria. **Molekuláris szita:** minden pórusnak 1 vagy több nyitott vizes csatornája van. Vízoldható kis molekulák szabadon diffundálhatnak be rajta.

A nukleáris transzport mérése: az afrikai karmosbéka (*Xenopus*) oocitájának citoszoljába injektálják a molekulát, és mérik, mikor jelenik meg a nukleuszban. A kis molekulák és az ionok szabadon vándorolnak be, sőt még nem nukleáris, globuláris fehérjék is. Az adatok alapján a szabad diffúzió csatornája 9 nm átmérőjű (ami 60.000 molekulatömegű anyagot enged maximum át), és a hossza 15 nm. Az ennél nagyobb molekulák nem mehetnek diffúzióval át; a riboszóma mérete 30 nm, tehát minden riboszóma a citoszolban marad. De hogy jön akkor ki a sejtmagból? És hogy mennek be a 100.000-nél nagyobb tömegű nukleáris fehérjék?

3000-4000 pórus van a magmembránon. A DNS szintézis alatt 100 hiszton molekula megy be pórusunként és percenként.

Nukleáris lokalizációs szignál (NLS) jellemzői:

1. csak a nukleáris proteineken van;
2. bárhol a szekvenciájukban;
3. rövid szekvencia (4-8 aminosav);
4. változó, de sok pozitív töltésű (lizin és arginin) aminosav, gyakran prolin is;
5. gyakran 2 darab 2-4 aminosavból álló részre oszlik, és ezeket 10 aminosav választja el;
6. ha egy citoplazmás fehérje N-terminálisára teszik, akkor az a nukleuszba megy.

A transzporthoz ATP szükséges; ATP hiányában nukleáris molekulák megrekednek a pórusoknál, és nem jutnak be. A nukleáris transzport során a fehérjék feltekeredve mennek át a póruson, ami különbözik a többi kompartmentbe történő transzporttól.

A nukleáris membrán szétesik a mitózis alatt

A nukleáris lamina a lamin fehérjék kétdimenziós hálózata. A laminok intermedier filamentumok, és alapvető szerepük van a nukleáris membrán alakjának és stabilitásának meghatározásában. A nukleáris membrán belső felületén 30-100 nm vastag réteget hoznak létre: nukleáris lamina köti össze a membránt a kromatinnal.

A nukleáris membrán a profázisban eltűnik (kis vezikulumok lesznek), és ekkor a laminok depolimerizálódnak. Ezt alapvetően foszforileződésük okozza. A lamin depolimerizáció feltehetően szükséges a sejtmagmembrán széteséséhez. A nukleáris membrán pórusainak komplexei komponenseikre esnek szét. A magmembrán pedig vezikulumokra esik szét, a mag tartalma pedig a citoplazmába ürül.

Telofázis alatt a kromoszómák dekonzenzálódnak, és a nukleáris összeszerelés megindul. Kis nukleáris membrán vezikulumok fúzionálnak a szétszórt kromatin körül. A laminok repolimerizálódnak, amit defoszforileződésük okoz. A nukleáris membrán újra összeszerelése kétlépéses folyamat:

1. először az egyedi kromoszómák körül áll össze a membrán,
2. ezek fúziója révén egy interfázisú nukleusz alakul.

A dekonzenzált kromatin indítja meg a nukleáris membrán összeállítását.

A nukleáris lokalizációs szignál a transzport után **nem vágódik** le, feltehetően azért, mert a fehérjéknek újra kell importálódniuk minden mitózis végén. Ez jellegzetes sajátosság, mert a többi organelumba, ha egyszer bement egy fehérje, akkor ott is marad.

Az NLS inaktíválható foszforilezéssel, amit az MPF is okozhat.

Protein transzport a mitokondriumba és kloroplasztba

Kettős membránnal rendelkező organelumok, amiknek saját DNS-ük és riboszómáik vannak, de ennek ellenére a proteinek többsége a citoplazmából jön.

Szubkompartmentjeik (ismétlés):

Mitokondrium:

- 1. mátrix,**
- 2. intermembrán tér.**

Kloroplaszt:

- 1. mátrix,**
- 2. intermembrán tér,**
- 3. thylakoid tér (thylakoid membrán zárja körül).**

Az organelumban kódolt fehérjék többsége a belső membránban (mitokondrium) vagy a thylakoid membránban (kloroplaszt) van.

Transzport a mitokondrium mátrixba

A citoszolban való szintézis után 1-2 perc múlva megy be a fehérje ebbe az organelumba.

Mitokondriális prekursor fehérjék: N-terminálisukon 20-80 aminosavból álló **szignál peptid** van. Van eset, hogy ez 12 aminosavra rövidíthető. A szignál peptid a bemenet után gyorsan levágódik.

Sejtmentes rekonstituált transzport rendszer: nemcsak ATP kell a transzporthoz, hanem elektrokémiai gradiens is (ionofórok ugyanis leállítják az importot).

Az import kétlépéses folyamat:

- 1. A receptorhoz való kötődés és az N-terminálisú szignál peptid bejuttatása:** alacsony hőmérséklet nem állítja le, és membrán potenciált igényel.

2. **A protein maradék részének bejuttatása:** ATP igényes és alacsony hőmérséklet gátolja.

Elektronmikroszkópos felvételeken **kapcsolódási helyek** láthatók, ahol a 2 membrán összetapad: prekursor proteinek itt mehetnek át, mert **egyszerre átlépik a 2 membránt**. A 2 membránnak **külön transzlokátora** lehet, de **kapcsoltan** működnek.

A mitokondriumba csak fel nem tekeredett fehérje mehet be

“Chaperone” fehérjék: a citoplazmások neve = **chaperonin** (hsp70). Hozzákötnek a készülő proteinhez, és nem engedik feltekeredni, mielőtt a transzlokátorhoz ér. A disszociációjuk a proteinről pedig ATP igényes folyamat. Élesztő hsp70 mutánsában a proteinek nem mennek a mitokondriumba.

A mitokondriumban is “chaperone” fehérjék fogadják a proteint. A nem feltekeredett proteinekhez kötnek ezek is, és csak ATP hatására engedik el. Ez húzhatja be a fehérjét a mitokondriumba.

A mitokondriális belső membránba és intermembrán térbe kerülő proteineken 2 szignál van

Valami meg kell akadályozza, hogy ezek a fehérjék a mátrixban kössenek ki.

Belső membrán proteinek:

1. eset: egy hidrofób szignál szekvencia van az N-terminálison az első szignál szekvencia után. Amikor a protein bement a mátrixba, és az első szignál szekvencia levágódik, akkor ez a második hidrofób szekvencia a membránba viszi vagy azon át (ld. lentebb).

2. eset (stop - transzfer útvonal): be se megy a fehérje a mátrixba. A 2 transzlokátor szétkapcsolódik. A hidrofób szekvencia eléri a belső membrán transzlokátorát, és azon keresztül a transzport leáll. Ezért a fehérje csak a külső membránon húzódik át.

Intermembrán tér proteinjai: a fenti 2 eset egyikével jönnek, és csak az a különbség a belső membrán fehérjékkel szemben, hogy a 2. szignál szekvencia levágódik róluk.

Transzport a kloroplasztba

Az alábbiakban hasonlít a mitokondriális fehérje transzportra:

1. transláció után következik be (poszt-transzlációs),
2. energia igényes,
3. amfipatikus szignál az amino-terminálison,
4. a szignál levágódik a bejutott fehérjéről.

Alapvető különbség, hogy nem használ elektrokémiai potenciált, csak ATP-t.

A szignálok hasonlóak ugyan, de pl. növényi sejtben, ahol mitokondrium és kloroplaszt is van, a szignál szekvenciák mégis megkülönböztetődnek.

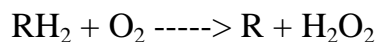
Transzport a thylakoid-membránba vagy -térbe: a protein belép a sztrómába, ahol a **sztróma szignál peptidáz** levágja az amino-terminálist. Ezután egy másik ún. **thylakoid szignál peptid** (hidrofób) szekvencia van, ami bejuttatja a fehérjét a thylakoidba vagy annak membránjába.

Peroxiszómák

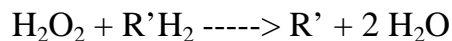
Szimpla membránjuk van, és nincs sem DNS-ük, sem riboszómájuk. Ezért minden proteinjük kintről jön **szelektív importtal**. **Minden eukarióta sejtben** megtalálhatók. **Oxidatív enzimeket** tartalmaznak nagy koncentrációban: kataláz, urát oxidáz.

Alapvető szerepök van az O₂-fogyasztásban. Elképzelés az evolúciós eredetükről: ősi organellum abból az időből, amikor az O₂ megjelent. Védte az első eukariótákat az oxigén káros hatásától. A mitokondrium megjelenése ATP termeléses O₂-fogyasztást eredményezett, ami sokkal hatékonyabb, mint a peroxiszómás. Csak olyan funkciójuk maradt, ami nincs a mitokondriumban meg.

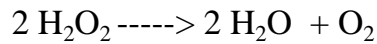
Tipikus peroxiszómás reakció:



A kataláz a képződött peroxidot más szubsztrátok (fenol, hangyasav, formaldehid, alkohol) oxidálására használja:



Ez a májban és vesében igen fontos. Az alkohol 1/4-e (annál, aki piál) így oxidálódik acetaldehiddé. Ha a H₂O₂ feleslegben keletkezik, akkor a kataláz azt így is el tudja bontani:

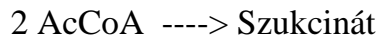


A peroxiszómák fő funkciója a zsírsavak β-oxidációja. Állati sejtekben ez a mitokondriumban és a peroxiszómában megy, de élesztőben csak a peroxiszómában.

A peroxiszómák a sejt változó környezeti feltételeihez alkalmazkodnak: például az élesztő glükózos tápoldatban kis peroxiszómákat hoz létre, míg metanolon vagy zsírsavakon nagy peroxiszómák képződnek (a metanol vagy zsírsavak oxidációjára).

Növényekben is fontosak és 2 típusuk van:

1. levelekben: fotorespirációt végeznek;
2. **glioxiszóma**: csirázó magvakban a tartalék lipidből cukorszintézis (glioxalát ciklus):



A szukcinát kimegy a glioxiszómából, és glükózzá alakul.
Állati sejtekben nincs glioxalát ciklus !!!

A peroxiszómába kerülő fehérjék szignál szekvenciája a C-terminálison 3 aminosav.

Endoplazmás retikulum

Minden eukarióta sejtben megtalálható, és membránja a össz membrán felület több mint felét teszi ki. Elágazó tubulusokból és lapos zsákokból áll, melyek mindannyian össze vannak kötve egymással, és így folyamatos belső térük van, aminek **ER lumen (ER ciszternális tér)** a neve. A sejtterefogat 10%-át teszi ki.

Központi szerepe van a protein és lipid szintézisben

Az ER membránján szintetizálódik az ER, Golgi, lizoszómák, endoszómák, szekréciós vezikulumok és a plazmamembrán minden **transzmembrán fehérjéje**, valamint a szekréciós proteinek, és a mitokondriális, peroxiszómás **lipidek**.

Az ER **szintézis közben** kétféle proteint importál a citoplazmából:

1. transzmembrán proteineket, amik az ER membránjába épülnek be,
2. vízoldható proteineket, amik pedig a lumenjébe kerülnek.

Szignál peptid irányítja a proteineket az ER-hez. A kétféle protein további sorsa azonban eltérő (ld. később).

A protein import az ER-be **ko-transzlációs mechanizmussal** megy: együtt megy a szintézissel. Már transzlokálódik, amikor még szintetizálódik. Ezért a fehérje nincs a feltekeredés veszélyének kitéve, és "chaperone"-okra sincs szükség. Más organelumokba (sejtmag, mitokondrium stb.) a protein transzport **poszt-transzlációs mechanizmussal** kerül.

A fehérjét szintetizáló riboszóma az ER membránhoz köt, és így keletkezik a **durva felszínû (rough) ER (RER)**.

A riboszómák két csoportja

1. Membrán kötött riboszómák: a szekréciós, az integráns ER, a Golgi, a plazmamembrán és a lizoszómás fehérjéket szintetizálják. Ezek a fehérjék az N-terminálisukon olyan szekvenciákat tartalmaznak, ami a riboszómát az ER-hez irányítja, és annak membránjához köt. A szintetizálódó fehérje megy át a membránon a szintézis alatt.

2. Nem kötött riboszómák: egyrészt a citoszol fehérjéit (pl. glikolitikus enzimek), és a legkülső membránfehérjéket (pl. spektrin) szintetizálják.

Ezek a fehérjék a citoszolba kerülnek, és ott más fehérjékkel (pl. aktin és tubulin egymással) vagy membrán proteinekkel kapcsolódnak (pl. spektrin).

Ezek szintetizálják a nukleáris DNS által kódolt mitokondriális és kloroplaszt fehérjéket, valamint a sejtmag és peroxiszóma (glioxiszóma) lumen fehérjéit is. A szintézis a citoszolban játszódik le, az organellumok specifikus felvevő rendszere felismeri őket a szignál szekvenciájukon keresztül, amik az organellumba történő bekerülés után levágnak.

A kötött és a szabad riboszómák strukturálisan és funkcionálisan azonosak, és csak a szintetizált protein tekintetében különböznek

Ha egy riboszóma egy **ER szignállal** rendelkező proteint kezd csinálni, akkor az ER-hez köt, sőt az egész poliriboszóma odaköt. A riboszóma csak akkor szabadulhat ki, ha a 3' végénél végzett az mRNS-sel, de az mRNS a többi riboszómával továbbra is kötve marad.

Az ER-nek azonban van riboszóma mentes része is = **sima felszínû (smooth) ER = SER**. A SER igen kifejezett néhány sejt típusban, főleg azokban, melyekben intenzív lipid metabolizmus folyik.

Pl. máj hepatocytá sejtjei: egyrészt lipoproteinek lipid részét készítik, másrészt lipid oldékony drogokat detoxikálnak. Ez utóbbi folyamat a citokróm P-450 enzimeivel megy: vízoldhatatlan anyagokat vízoldhatóvá tesz, hogy ki tudjanak ürülni. Ha pl. valaki ilyen tulajdonságú gyógyszert szed, akkor a SER néhány nap alatt megduplázódik a máj sejtjeiben.

Az ER további funkciója a Ca^{2+} raktározás: pl. az izomsejtekben óriási SER van, aminek neve: **szarkoplazmás retikulum**. Ca-ATP-ázzal koncentrálna a Ca^{2+} -t és a Ca^{2+} kiszabadulása az ER-ből a kontrakció szignálja.

A RER és SER centrifugálással szeparálható

Szövet és sejt homogenizálás során az ER szétesik és kis (~ 100 nm átmérőjű) zárt vezikulumokká áll össze: **mikroszómák**.

A RER-ből a **durva (rough) mikroszóma** lesz: riboszómák a külső felszínen; protein és lipid szintézisre és protein glikozilálásra képesek.

A riboszóma nélküli mikroszóma frakció = **simá mikroszóma**: eredhet SER-ből, Golgi-ből, endoszómából, mitokondriumból.

Tehát a sima mikroszóma nemcsak a SER-ből eredhet. Ez alól a szabály alól a májsejtek a kivételek, mert azokban olyan sok a SER.

A durva mikroszómának nagyobb a sűrűsége, és egyensúlyi centrifugálással szeparálható a simától. A durva és sima mikroszómák fehérje összetétele azonban hasonló a májsejtekben, de nem azonos (máshol nem szabad összehasonlítani, ld. fent).

Szignál hipotézis

(ezt a bekeretezett részt már a Mikrobiális Fiziológián tárgyaltuk a baktérium sejtfelszíni fehérjéinek szintézisének)

1970-ben az ER-be transzportálódó proteineknel fedezték fel. A "kulcs kísérlet" egy *in vitro* fehérje szintézis volt:

1. Mikroszóma nélkül nagyobb (hosszabb) fehérje keletkezik, mint a sejtek által szekretált fehérje. A különbség a két fehérje hosszában a **vezető (leader) peptid** annak az N-terminálisán.
2. Mikroszóma jelenlétében is a rövidebb fehérje keletkezik, és a szekréciós proteinek proteáz rezisztensek lettek (mert bementek a mikroszómába).

Konklúzió (**szignál hipotézis**): a szignál peptid vagy **vezető szekvencia** levágódik a szignál peptidáz által az ER-ben.

SRP & SRP receptor

Két komponens felelős az **ER szignál peptiddel** rendelkező fehérjék ER membránhoz való vezetéséért:

1. **Szignál-felismerő részecske (SRP)**: ciklizál az ER membrán és a citoszol között. Felfedezése: durva felszínû mikroszóma frakció felületéről (sóval) lemosott fehérjék között azonosították: 6 fehérjéből és egy 300 nukleotidból álló RNS-ből áll. Kötőhelyei: szignálpeptid kötőhely, SRP receptor kötőhely, transzlációs szünet domén.

Funkciói:

1. **Az SRP közvetíti a szignálszekvencia és az ER membrán kapcsolódását;**
2. Sejtmentes rendszerben kb. 70 aminosav után leállítja a fehérje szintézisét (nincs jelen ER membrán). Ezt a P9/P14 alegységei okozzák. A nagyobb alegységei a szignál szekvenciát ismerik fel.

2. SRP receptor (dokkoló fehérje): az ER membránban van.

A proteinek bejutása az ER-be

Megkezdődik a fehérje szintézise, amikor a polipeptid 70 aminosav hosszú, és a **szignál szekvencia** megjelenik (30 aminosavat a riboszóma ugyanis elfed). A szignál szekvencia 16-30 aminosav: 1-2 pozitív töltésű aminosav az N-terminális közelében, amit 6-12 db hidrofób követ. A **szignál felismerő fehérje (SRP)** hozzáköt a szignál szekvenciához. Az ER membránban elhelyezkedő **SRP receptorhoz** kötnek mindannyian. A szignál szekvencia belemerül a membránba, és köt a **szignál szekvencia receptorral**. Az SRP és az SRP receptor disszociálnak. A **szignál peptidáz** (az ER lumenben) levágja a szignál peptidet, és a szignál szekvencia receptorral együtt disszociál. Az elongáció folytatódik. A szignál szekvencia nem lesz tehát rajta a kész fehérjén.

A fehérje nem tekeredik fel, amíg el nem éri az ER lument. **Ma már tudjuk, hogy néhány fehérje a szintézise után (poszt-transzlációban) is be tud menni az ER-be.**

Hogyan megy át a fehérje a membránon ?

Sokáig igen vitás volt, hogy protein csatornán (**protein transzlokátor**) keresztül vagy közvetlenül merül bele a lipid kettős rétegbe.

Evidencia a transzlokátorra: normálisan a pórusok tele vannak naszcens fehérje láncokkal. A puromycin nevű antibiotikum azonban leállítja a protein szintézist, és a fehérje ledisszociál a riboszómáról. Ilyenkor ionáram detektálható a pórusokon át. Ha nagy koncentrációjú sóval lemoszák a riboszómát, akkor a pórus becsukódik. Tehát a pórus dinamikus, és a riboszóma jelenléte nyitja.

Az N-terminálisú ER szignál **kettős funkciójú**:

1. Az ER-hez irányítja a proteint;
2. **Start transzfer szignált képez:** a transzlokációs apparátushoz marad kötve a transzfer alatt, miközben a protein bújik át. Ha a fehérje C-terminálisa is bement, akkor levágódik.

Nem minden ER szignál N-terminálisú (ld. később a transzmembrán proteineknél). **Nem a szignál peptidet** ismeri fel a **szignál peptidáz**, hanem egy amellel lévő hasító helyet. Ha az ER szignál nem az N-

terminálison van, hanem beljebb (**internális**), akkor nincs a szignál peptidáznak felismerési helye, és ezért a szignál peptid nem vágódik le.

Transzmembrán proteinek szintézise

A membrán proteinek szintézise komplikáltabb, mint azoké, amik az ER lumenjébe kerülnek.

Az egyszeres transzmembrán szegmenst tartalmazó proteinek szintézise

3 eset lehetséges:

1. eset: a C-terminálishoz közelebb eső szakasz szintéziséig ez a modell ua. mint az oldható (szekréción) fehérjéké. De amikor egy kb. 22 aminosavból álló hidrofób **stop-transzfer szekvencia** kerül a membránba, akkor az megakadályozza, hogy a fehérje tovább menjen. A riboszóma ledisszociál a membránról, és a citoszolban folytatja a C-terminális szintézisét. Ha a stop transzfer szekvenciát eltávolítják, akkor a fehérje szekréción lesz.

A másik két esetben: az ER szignál peptid most **internális**. Köt az SRP-hez és **start transzfer szignálként** működik. A transzlokáció befejeztével a szignál a membránban marad mint α -hélix, mert nem vágódik le. Kétféle orientációban is köthetnek a transzlokációs apparátushoz, és ez határozza meg, hogy az N- vagy a C-terminális kerül-e a lumenbe (ezért 2 eset).

A membránt többszörösen átszelő transzmembrán fehérjék

Ezek többször átszelik a membránt, és egy **belső szignál szekvencia** a start-transzfer szignál, ami inicializálja a transzlokációt, amíg egy stop-transzfer szignál meg nem jelenik.

A legegyszerűbb esetben, amikor a fehérje kétszer szeli át a membránt, akkor az első szekvencia bemelegíti a membránba, a második pedig nem engedi tovább átbújni, és kész.

A membránt többszörösen átszelőknél a stop transzfer által leállított átbújtást a membránon egy újabb belső start-transzfer szekvencia újra inicializálja.

Hogy egy **hidrofób szekvencia** start vagy stop transzfer-e, azt a lokalizációja dönti el a fehérjén. Az SRP az N-terminálisról kezdve kezdi figyelni a fehérjét. Az első hidrofób szekvencia a "reading frame" kezdete.

Mivel a fehérje mindig a citoplazmából megy az ER-be, ezért egy adott polipeptid mindig egyformán épül be, és az ER asszimmetrikus lesz.

Proteinek feltekeredése az ER lumenben

A legtöbb protein csak **átmenetileg** tartózkodik az ER-ben, és mennek tovább. Vannak azonban **ER rezidens proteinek**. Ezeknek **ER retenciós szignáljuk** van (4 aminosav a C-terminálison). Ha ezt eltávolítják, akkor a fehérje szekretálódik a sejtől (ez ugyanis az ER-be került fehérjék alapesete és ehhez nem kell szignál). Ha pedig egy szekréciósba teszik ezt az ER visszatartási szekvenciát, akkor az az ER-ben marad.

Az ER-ben tartozkodó fehérjék legtöbbször más fehérjék feltekeredését katalizálják:

1. **Protein diszulfid izomeráz (PDI)**: szabad -SH-k oxidációját katalizálja diszulfiddá. A diszulfid hidak a fehérjék harmadlagos és negyedleges struktúrájának, stabilizálásának legfontosabb eszközei. Ha több -SH van a fehérjében, akkor a megfelelőeknek kell kapcsolódniuk. Citoplazmás proteinek nem csinálnak S-S hidat, mert a redukáló erő túl nagy a citoszolban.

Eukariótákban az összes S-S híd az ER-ben képződik, gyakran a szintézis alatt már. Szekvenciálisan alakulnak: az első a másodikkal, a harmadik a negyedikkel, és így tovább. Gyakran azonban nem szekvenciális S-S hidak vannak a kész fehérjében: ilyenkor először a szekvenciális S-S hidak alakulnak ki, de felszakadnak, és a stabilabb megfelelők alakulnak ki. Az ER-ben ezt a tekeredési folyamatot gyorsítja a **protein diszulfid izomeráz (PDI)**. A megfelelő S-S hidak kialakulása gondot jelent pl. a humán rekombináns fehérjék baktériumokban való előállításánál. A baktériumokban ugyanis ezek a citoplazmában képződnek, és gyakran kicsapódnak, mert nincsenek jó S-S hidaik. Állati sejtekkel kell az ilyen fehérjéket szintetizálni.

2. **Binding protein (BiP)**: “chaperone” típusú fehérje, ami a hsp70-hez hasonló, és a nem jól feltekeredett fehérjékhez köt, és megakadályozza őket abban, hogy az ER-t elhagyják.

Fehérjék glikozilációja az ER-ben

Szénhidrátok kovalens kapcsolása a fehérjékhez az ER egyik fő funkciója. A citoplazmában ez nem történik meg. A legtöbb membrán protein glikozilált (**glikoproteinek**).

Összesen 14 szénhidrát molekulából álló előre elkészített oligoszaharid (N-acetil-glükózamin + mannóz + glükóz) adódik a fehérjében lévő aszparagin-NH₂ csoportjához. **N-kapcsolt vagy aszparagin kapcsolt proteineknek** hívjuk ezeket.

Az oligoszaharil-transzferáz enzim katalizálja ezt a folyamatot, ami egy membrán enzim, aminek aktív centruma az ER lumenje felé néz.

Az oligoszaharid a kapcsolódás előtt a **dolicol** nevű membránlipidhez van kötve, és azonnal megy az aszparaginra, ha az bejött a lumenbe. Az oligoszaharid nagy energiájú foszfáttal van a dolicolhoz kötve, és az adja a glikozilezéshez az energiát.

Vannak **O-kapcsolt oligoszaharidok** is a fehérjéken, de ezek a Golgi-ban képződnek.

Glikozil-foszfatidil-inozit kapcsolás

Bizonyos membrán fehérjék C-terminálisához egy glikolipid szénhidrát része kapcsolódik az ER lumenjében. Egy glikozil-foszfatidil csoport adódik így a fehérjéhez, ami 2 zsírsavat tartalmaz, és ezek kötik a fehérjét a membránhoz. Az így membránkapcsolt fehérjék a sejt külső felszínére fognak kerülni. Mi a jelentősége? Szignál hatására specifikus foszfolipáz lecsípheti ezeket a fehérjéket.

A foszfolipid szintézis is az ER-ben folyik

A foszfolipidek amfipatikusak és energetikailag nehéz vízben összeszerelni őket (ezért membránon kell). Baktériumokban a plazmamembránon folyik a lipid szintézis, állati és növényi sejtekben viszont az ER-ben (inkább a SER-ben). Az ER membrán csinálja az összes lipidet egy eukarióta sejtben, melyek közül a legfontosabb a **foszfatidil-kolin = lecitin**.

A lipid szintézis az ER citoplazmás oldalán folyik

Az újonnan szintetizált foszfolipid molekula az ER citoplazmás oldalán épül be az ER membránba. A lipidek spontán flip-flop-ja lassú folyamat szintetikus membránokban, az ER-ben viszont percek alatt ekvilibrál egy foszfolipid molekula.

Az ER membrán (és a baktériumok citoplazma membránja is) egy **flippázt (foszfolipid transzlokátor)** tartalmaz.

A transzlokátor “fej” csoport specifikus: a kolin fejű lipidet viszi, az etanolaminost stb. viszont nem. Ez a magyarázata annak, hogy a membrán két rétegének lipid összetétele nem azonos.

Membránlipidek mozgása az ER-től más membránba

A plazmamembrán, a Golgi, a lizoszóma és az endoszóma membránok egy egységes **membránrendszert** alkotnak, amik az ER-rel **transzport vezikulumokkal** kommunikálnak. Az ER membránról sarjként leválik egy vezikulum, és fúzionál a Golgival, és így tovább. A mitokondrium, a kloroplaszt és a peroxiszóma **nem tartozik bele** ebbe a rendszerbe, és a mitokondriumok nem is szintetizálnak lipideket. Akkor hogyan kapnak lipidet? A válasz: **foszfolipid csere proteinek** (vagy **foszfolipid transzfer proteinek**) működnek, amik vízoldható fehérjék a citoplazmában, és az egyik membránból a másikba szállítanak foszfolipidet. Identifikáltak ilyen és specifikus a foszfolipidre. Extrahálja a lipidet az egyik membránból, és átviszi a másikba.