**8. VEZIKULÁRIS TRANSZPORT**

**Írták: Matejka Judit, Merczel Kinga és Marton Zoltán biomérnök hallgatók,**

**Dr. Sveiczer Ákos egyetemi docens előadásai alapján**

**A vezikuláris transzport fő útvonalai**

A sejt a vezikuláris transzport segítségével egyrészt kapcsolatot tart a külvilággal. A folyamat során hormonok, neurotranszmitterek és olyan nagy molekulák (pl. fehérjék) jutnak át a membránon, amelyek a transzportereken vagy nem férnek át, vagy nincsenek rájuk transzporterek. Másrészt az endomembrán hálózat tagjai is kommunikálnak egymással ily módon, és elosztják pl. a fehérjéket a rendeltetési helyükre. A folyamat lényege minden esetben az, hogy egy membránról lehasad kis vezikulum, amely a lumenjében tartalmazza a szállítandó anyagokat, a membránján pedig ott az „irányítószám”, ami a célt jelzi. A célhoz érve a transzport vezikulum membránja fúzionál a megfelelő organellum membránjával, és ennek következtében lumenjeik is összekeverednek, így a szállított anyagok célba érnek. Két fő útvonala van a vezikuláris transzportnak: a **szekréciós** és az **endocitózisos útvonal**. A szekréciós, vagy más néven exocitózisos útvonal a sejtből kifelé szállítja az anyagokat. Kiindulópontja az ER, az innen lefűződött „hólyagok” a Golgi-készülékbe vándorolnak, amelynek osztályozó szerepe van. Végül a vezikulumok jelentős része kiürül a sejtből, kisebb hányaduk pedig az endoszómákba kerül. Az endocitózisos útvonal a plazmamembrán lefűződésével veszi kezdetét. Ezek a transzport vezikulumok a korai endoszómával fúzionálnak, amely pedig késői endoszómává, majd lizoszómává alakul. A lizoszómában levő emésztő enzimekkel a sejt képes lebontani a bekebelezett anyagokat, így jutva táplálékhoz. A két útvonal a korai endoszómáknál találkozik, mert a lizoszómákba így jutnak el a hirolítikus enzimek az ER és a Golgi-készülék irányából.

**A transzport vezikulumok típusai, képződése, célba juttatása**

Megkülönböztethetünk **csupasz** és **burkolt vezikulomokat**. A vezikuláris transzport során tipikusan burkolt vezikulumok képződnek először. Pl. endocitózis esetén a plazmamembránban lévő megfelelő receptorok megkötik a külvilágből a szállítandó molekulákat. A receptor citoszol felőli oldalára adaptin kapcsolódik, erre pedig klatrin fehérjék. Az egyre növekedő burkolt hólyagocska leszakadását a dinamin nevű fonalas szerkezetű fehérje végzi el GTP hidrolízis terhére. A burkolt vezikulum szállítódni kezd a sejtváz mentén motor proteinek segítségével, de a klatrin fehérjék leárnyékolják a célt jelző szignált. A burok elvesztésével képződő csupasz vezikulumok felszínén a szignál láthatóvá válik, míg a leváló adaptin és klatrin újra felhasználódik. Bizonyos sejtalkotóknál képződő vezikulumok esetében klatrin helyett ún. COP-fehérje burkolja be a felszínt.

A csupasz vezikulumok felszínén perifériásan elhelyezkedő specifikus Rab fehérjék egyfajta felismerő szignálként szolgálnak a megkötődéskor. A célmembránon lévő fonalas szerkezetű pányvázó fehérjékkel specifikus kapcsolatot alakíthatnak ki. A megfogott vezikulumon lévő fonalas v-SNARE fehérje és a célmembránon lévő t-SNARE fehérje egymás köré csavarodva fokozatosan csökkentik a távolságot, és kellő közelségbe kerülve végül megtörténik a két membrán összeolvadása.

**A szekréciós útvonal állomásai (ER, Golgi) és folyamatai**

A szekréciós útvonal az ER-ből indul és a Golgi-készüléken keresztül a sejtfelszín irányába halad, amihez nincs szükség a szállított fehérjén semmilyen specifikus szignálra, ez az alap útvonal. A „sarjak” leválása az ER ún. átmeneti elemein nem szelektív módon történik, szinte bármelyik megfelelően feltekeredett protein bekerülhet egy ilyen transzport vezikulumba, és azt követően a Golgi-készülékbe (kivételt képeznek részben az ER rezidens proteinek). A BiP (binding protein) nevű dajkafehérje katalizálja a képződött fehérje feltekeredését: addig nem engedi a proteint tovább haladni, amíg az rendesen fel nem tekeredett, így az ER elhagyására minőségellenőrzési pontként is tekinthetünk. A tartósan nem jól feltekeredett fehérje pedig kikerül az ER-ből, és lebontásra kerül a citoplazmában.

Ha a sejtnek nincs elég kapacitása a megszintetizált fehérjék feltekeredéséhez, mert például kevés a dajkafehérje (ER stressz), akkor az ún. UPR (Unfolded Protein Response) válaszreakció indul be. Ennek mechanizmusa az alábbi: az ER membránjában lévő szenzorok (receptorok) megkötik a rosszul feltekeredett fehérjéket, ezáltal a citoszol felőli oldalon aktiválódnak. Ezek aktiválnak bizonyos transzkripciós regulátorokat, ezáltal megváltozik ezen regulátorok térszerkezete, és így az importin már transzportálja őket a sejtmagba. A chaperone génekhez kötődve indukálják azok átírását, majd a már korábban tárgyalt módon a képződő új BiP fehérjék bekerülnek az ER lumenbe. A növekvő számú dajkafehérjék működése miatt fokozatosan csökkenni kezd a rosszul feltekeredett fehérjék száma, és így végül az UPR program befejeződik.

A szekréciós útvonal első állomásán, az endoplazmás retikulumban zajlik le a fehérjék **glikozilációja** (részben!) és **oxidatív módosítása** is. A glikoziláció során a membránon előre elkészített cukorláncok az oligoszacharil transzferázok által lehasításra kerülnek a dolichol nevű lipidről, és átkapcsolódnak a szintetizálódó fehérjék megfelelő környezetű aszparagin oldalláncaira, annak aminocsoportjaira. Ezeket a fehérjéket ezért N‑kapcsolt glikoproteineknek nevezzük. Az oligoszacharidok összesen 14 tagból és 3-féle cukorból (glükóz, mannóz, N-acetil-glükózamin) állnak. Ha egy integráns sejtmembránfehérje glikozilálódik az ER lumenjében, akkor ez a cukorrész végül majd a plazmamembrán külső felszínére kerül, ahol pl. immunológiai szerepet tölthet be. Oxidatív módosításnál a protein diszulfid izomeráz (PDI) nevű vízoldható enzim a fehérjék cisztein aminosavai között diszulfid hidakat képez, ami egy stabil kovalens kapcsolatot eredményez, és a fehérjék végső térszerkezetét stabilizálja. Ez a módosítás csak az ER-ben képződő fehérjéknél történik meg.

Az ER retenciós szignállal nem rendelkező fehérje mindig eljut a Golgi-készülékbe, azonban ennek a transzportnak jelentős a hibarátája, így olyan fehérje is átjuthat, amelynek van ER retenciós szignálja (ER rezidens fehérje). Ezért mindkét sejtorganellum (ER, Golgi) tartalmaz retenciós szignál receptorokat, ami visszairányítja a Golgi-ból az ER-be azokat a fehérjéket, amelyeknek rendelkeznek ezzel a szignállal.

A Golgi-készülék egy orientált organellum: a cisz-oldala az ER-rel, a transz-oldala pedig a külvilággal kommunikál. Nagy, egymással nem összekapcsolódó egységekből áll: hálózatos és ciszternás részekből, mind a cisz- mind a transz-oldala. A ciszternás részeket tovább tagolhatjuk cisz-ciszterná(k)ra (a cisz-hálózathoz legközelebb eső ciszterna/ák), középső ciszterná(k)ra és transz-ciszterná(k)ra. A ciszternák száma változó: 3 és 20 közötti lehet, és szintén változó lehet ezen „Golgi-halmok”, az ún. diktioszómák száma is. A diktioszómán belül az egyes részek egymás között vezikuláris transzporttal kommunikálnak.

A Golgi-készülék feladatai:

* Lumenjében a szénhidrátok bioszintézise folyik.
* O-kapcsolt glikoproteinek alakulnak ki a szállított fehérje megfelelő környezetű szerin és treonin oldalláncai –OH csoportjainak glikozilálódásával.
* A fehérjék, pontosabban a cukorrészeik további kovalens átalakítása is történik itt. Módosul az N- és az O-kapcsolt oligoszacharidok szerkezete is, és ezáltal a fehérjék térszerkezete is változik.
* Egyes fehérjéken olyan specifikus oligoszacharid mintázatok alakulnak itt ki, amelyek faji, szöveti, egyedi megkülönböztető jelzések lehetnek (immunológiai jelentőség).
* Az oligoszacharid mintázatok segítségével szignálfoltok (pl. M6P) képződnek, ami alapján a Golgi osztályozza és továbbítja a fehérjéket az endoszóma-lizoszóma rendszer irányába (vagy az ilyen szignál hiányában a sejtfelszín felé).

**Az exocitózis típusai (konstitutív, regulált)**

Az exocitózis kétféle típusa a **konstitutív** és a **regulált** szekréció. A regulált szekréció során a vezikulumban szállított anyagok (pl. hormonok, neurotranszmitterek) csak a felszín közelébe kerülnek, ott tárolódnak, ún. szekréciós vezikulumokat létrehozva. Ezek csak megfelelő kémiai jelre (inger) ürülnek ki. Ezzel szemben a konstitutív szekréció esetében a vezikulum nem halmozódik fel, hanem a felszínhez történt szállítás után rögtön fuzionál a sejtmembránnal. A konstitutív folyamat révén a sejt pl. folyamatosan kijuttatja a külvilágba az extracelluláris mátrix fehérjéit, illetve megújítja/növeli a sejtmembrán felületét.

**A sejten belüli fehérje transzport vizsgálati módszerei**

A sejten belüli fehérje transzport vizsgálatának egyik lehetséges módja a sejten kívüli (**in vitro**) megfigyelés. Ennek menete a következő: az élő sejtet elroncsolják, majd frakcionálással elkülönítik a sejtorganellumokat. Az in vitro transzlációs rendszerekben gyártott vizsgálandó fehérjéket radioaktív izotópokkal jelölik meg, majd kémcsőben összehozzák őket valamilyen sejtalkotóval. Ha van az adott organellumra specifikus szignál peptid a fehérjében, akkor in vitro is be tud oda jutni, ha nincs, akkor viszont nem. Ezután centrifugálással a szabad fehérjéket elválasztják a sejtorganellumba bejutottaktól. Sugárzás alapján vizsgálható, hogy melyik fehérje jutott be az adott sejtszervecskébe, és melyik nem.

In vivo (sejten belüli) vizsgálat történhet **élesztőgombák szekréciós mutánsai**nak alkalmazásával. Az élesztőgombák számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: egyrészt gyorsan szaporodó egysejtűek, ami rövid kísérleti időt tesz lehetővé, másrészt eukarióták, azaz a humán sejtekhez hasonló sejtalkotókat tartalmaznak, harmadrészt genetikailag könnyen manipulálhatóak. A „vad típusú” élesztőknél hibátlanul lejátszódik az exocitózis, míg a szekréciós mutánsoknál „valahol” megakad a folyamat. Mesterségesen létrehozva a mutációkat indirekt módon vizsgálható, hogy mely gének és gének által kódolt fehérjék hiánya felelős a szekréció egyes lépéseinek elmaradásáért, azaz hol halmozódnak abnormálisan fel a szekréciós fehérjék a mutáns sejtben.

**Fluoreszcens fehérjejelölés**sel szintén in vivo vizsgálatot végezhetünk. A vizsgálni kívánt fehérje génjéhez GFP-t (az ún. zöld fluoreszkáló protein génjét) kapcsolnak. Együtt történik meg a „két gén” átírása, majd a fehérjeszintézis is, így képződik egy fluoreszkáló fehérje, amely eredeti funkcióját is betöltheti. A fehérje mozgása és lokalizációja a sejtben láthatóvá válik: fluoreszcens mikroszkópban zöld színű lesz.

**Az endocitózis típusai**

Az endocitózis típusait a plazmamembránról lefűződő transzport vezikulumok mérete szerint kicsi (100-150 nm) és nagy(>250 nm) csoportra oszthatjuk. A kis vezikulumok képzését **pinocitózis**nak nevezzük, ekkor a sejt folyadékot (és abban oldott/diszpergált anyagokat) vesz fel („iszik”). A pinocitózis azért is nagyon lényeges folyamat, mivel ezáltal képes ellensúlyozni a sejt a plazmamembrán folyamatos megújulásából (exocitózis) eredő felületnövelést, ugyanis az endocitózis csökkenti a plazmamembrán felületét. A pinocitózis tehát mind „konstitutív”, mind regulált (receptor‑mediált) módon lejátszódhat. A nagy vezikulumok endocitózisát pedig **fagocitózis**nak nevezzük. Ekkor regulált (receptor‑mediált) módon szerves törmelékek, akár kisebb sejtek felvétele történik meg. Ez a vízben élő protozoonokra jellemző táplálkozási forma, pl. az amőbák nyúlványaikkal (álláb) körbeölelve veszik fel és kebelezik be a táplálékot. Magasabb rendű élőlényekben a fagocitózis az immunrendszerben jellemző folyamat: az ún. makrofág fehérvérsejtek a saját elöregedett vagy hibás sejteket, valamint az idegen anyagokat, pl. betolakodó kórokozó baktériumokat bekebelezik és megemésztik.

**A receptor-mediált endocitózis folyamata**

A receptor-mediált endocitózis olyan anyagok felvételét teszi lehetővé, amelyekhez a sejtekben nem alakult ki külön transzporter. A koleszterin sejtekbe történő felvétele is regulált módon történik meg. A hidrofób koleszterin vízoldható lipoproteinekben, az ún. LDL (low density lipoprotein) belsejében szállítódik a vérben. A sejtek plazmamembránjában LDL receptorok helyezkednek el, melyekhez hozzákötődik az LDL-koleszterin komplex, ezáltal megkezdődik a koleszterin felvétele. Az endocitózis során klatrinnal burkolt vezikulum jön létre, majd később a sejten belül ez csupasszá válik. Ezután a vezikulum beleolvad az endoszómába: a receptor a pH változás miatt leválik az LDL komplexről és vezikuláris transzporttal visszajut a plazmamembránba, míg az LDL-komplex a lizoszómába kerül. Ott az LDL degradálódik, így a felszabaduló koleszterin pedig kidiffundál a citoszolba, és a SER-nél beépülhet a membránba. Ezen kívül pl. a már említett makrofágok fagocitózisa, vagy a bélhámsejtek vasion felvétele is hasonlóképpen működő receptor-mediált endocitózis.

**Az endoszómák és a lizoszómák fejlődése, működése, biokémiai folyamatai**

A Golgi-készülék transz oldaláról lefűződött bizonyos vezikulumok fuzionálnak, ugyanis fehérjéik mannóz‑6‑foszfát (M6P) szignálfoltja megakadályozza, hogy a sejtfelszínre kerüljenek; így képződnek a **korai endoszómák**. Ezek az endoszómák emésztő enzimeket már tartalmaznak ugyan, amik az enyhén savas közeg (pH ≈ 6) miatt ekkor még inaktív formában vannak jelen. Az érésük során a membránon lévő protonpumpák H+-t pumpálnak be a citoszolból, így az endocitózisos transzport vezikulumokból a fúziót követően a receptor fehérjék a savas pH miatt képesek lehetnek leválni a hordozott anyagról. Az endoszóma itt osztályozza a felvett anyagokat: (I) reciklizálással az üres receptorokat a plazmamembránhoz küldi vissza; (II) a degradációra szánt anyag a lizoszómába kerül (receptorral együtt vagy anélkül); míg (III) a transzcitózis során a felvett anyagot a membrán másik oldalára szállítja vezikuláris transzporttal (receptorral együtt). A transzcitózis főként a polarizált sejteknél jelentős: a bélhámsejtek esetében a bélből a vasionok így kerülnek végül a vérbe. 10-15 perces protonpumpa működés után a korai endoszóma **késői endoszómá**vá érik, ahol az osztályozás már leáll, a pH további csökkenése miatt az emésztő enzimek aktiválódni kezdenek. További érés után, pH ≈ 5-nélmár **lizoszómá**ról beszélünk. A benne lévő hidrolázok csak ennyire savas környezetben aktívak, így a lizoszóma esetleges sérülése esetén a kiszabaduló enzimek (nukleázok, proteázok, lipázok, foszfatázok, glikozidázok, stb.) nem károsítják a sejtet, mivel a citoszol 7,2-es pH-ján inaktiválódnak.

A lizoszóma fő feladata a receptor-mediált endocitózissal (főleg pinocitózis) felvett anyagok emésztése. A fagocitózissal táplálkozó sejtek esetében a bekebelezett nagyméretű vezikulumot fagoszómának nevezzük. Amíg a lizoszóma nem fuzionált fagoszómával, addig primer lizoszómának, a fúzió után pedig szekunder lizoszómának (más néven fagolizoszómának) nevezzük. A fagolizoszómákban bekövetkezik a táplálék emésztése, és az ilyen sejtekben ez a lizoszómák másik feladata. Az elöregedett saját sejtalkotók lebontása szintén a lizoszómák funkciója; ez a folyamat az ún. autofágia. Ennek során az ER‑ről leváló ún. izoláló membrán veszi körbe az elöregedett organellumot, és ún. autofagoszóma képződik. Ez a struktúra a fagoszómához hasonló módon a lizoszómával fuzionál. Ha a lizoszómában emésztési folyamatok zajlanak, a felszabaduló építőkövek (pl. aminosavak) a lizoszóma membránjában elhelyezkedő transzportereken keresztül, passzív transzporttal jutnak vissza a citoszolba, ahol hasznosulnak. A nem hasznosítható törmelék a lizoszómában gyűlik össze, az elöregedett lizoszóma később ún. reziduális testté alakul át, az pedig exocitózissal kerül végül ki a sejtből.