

# **SEJTBIOLÓGIA**

biomérnök hallgatók számára

**Nyolcadik rész:  
Vezikuláris forgalom a szekréción  
és endocitózis útviagonalakon**

**Novák Béla**

docens

**Proofreading:**

Sveiczter Ákos

ösztöndíjas kutató

1994. december 1.

Copyright © 1994

BME, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

Minden sejtnak kapcsolatot kell tartania a környezetével. A **prokarióta** sejteknél mindez a plazmamembránon következik be. A baktérium emésztő enzimeket küld a környezetébe, és a lebontási termékek mint szubsztrátok jönnek be. Ezzel szemben az **eukarióta** sejt belsőmembrán struktúrákat fejlesztett ki, amivel

1. makromolekulákat fel tud venni (**endocitózis**), és összehozni az emésztő enzimekkel, amik a lizoszómában vannak (**endocitózisos útvonal**);
2. az újonnan szintetizált molekulákat pedig **exocitózissal** kijuttatni: **bioszintetikus-szekréción útvonal**.

A bioszintetikus-szekréción és az endocitózisos útvonalak lumenje a sejt külsejével ekvivalens. Egymással állandó kommunikációban vannak **transzport vezikulumokon** keresztül (lesarjadzik az egyikről, és egyesül egy másikkal).

A forgalom iránya:

1. a bioszintetikus-szekréción útvonalon: ER -> Golgi -> sejt felszín (oldalút a lizoszómákhoz);
2. az endocitózisos útvonalon: sejt felszín -> endoszóma -> lizoszóma.

**Transzport vezikula:** csak a megfelelő proteineket kell “cargo” -ként felvegye, és csak a megfelelő célállomással szabad összeolvadnia.

### **Transzport az ER-ből a Golgiba**

A transzport az ER-ből a Golgi-ba és tovább **transzport vezikulumokkal** megy. Az **alap útvonal** az **ER -> Golgi -> sejt felszín** irány, mert nem kell hozzá semmi specifikus szignál. Minden protein, ami belép az ER-be, a sejt felszínre kerül, ha nincs külön szignálja.

### **Golgi apparátus**

A **Golgi apparátus** vagy **Golgi komplex** a **szénhidrát szintézis központja** (növényekben pektin és hemicellulóz a sejt falhoz), és az ER termékeinek **elosztója** eukarióta sejtekben.

Általában a sejtnukleusz közelében helyezkedik el, és állati sejtekben a **centroszóma** mellett van. Lapos membránhatárolt **ciszternákból** áll és hasonlít egy halom tányérra. Minden Golgi “halomnak” 4-6 ciszternája van, és a Golgi “halmok” száma sejtenként változó.

A Golgi környezetében kis vezikulumok találhatóak, amik szállítanak:

1. a Golgi-ba vagy a Golgi-ból, ill.
2. a Golgi ciszternák között.

A Golginak 2 oldala van: **cisz** és **transz**, és ezek alapján megkülönböztetünk **cisz Golgi hálózatot** (vagy **intermedier vagy mentő (salvage) kompartment**) és **trans Golgi hálózatot**. Az ER-ből a cisz oldalon lépnek be a transzport vezikulumok, és a sejtfelszín felé a transz oldalon hagyják el a Golgi-t. A Golgi igen kifejezett szekrécióna specializált sejtekben.

Az ER **átmeneti elemein (transitional elements)**, amiken nincsenek riboszómák, történik a sarjak leválása **nem szelektív módon** (bármelyik protein mehet a Golgiba).

Fontos követelmény az ER -> Golgi átmenetnél, hogy a fehérje korrekten legyen feltekeredve és összeszerelve. Az ER elhagyását, tehát mint egy **minőségi ellenőrzési pontot** tekinthetjük. A nem jól feltekeredett fehérjék a BiP-hez kötve maradnak az ER-ben (ld. korábban), és végül degradálódnak.

**Az ER rezidens proteinek** (ld. már korábban is), mint pl. a BiP, egy KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) **ER retenciós szignál szekvenciát** tartalmaznak. Ha ezt a szekvenciát a BiP-ről leveszik, akkor kiürül a sejtől. Ez a szignál tulajdonképpen nem az ER-ben tartja az ER rezidens fehérjéket, hanem a cisz-Golgiból küldi vissza őket. **Az ER tehát egy olyan nyitott börtön, ahonnan el lehet ugyan menni, csak a Golgiból visszaviszik a rabokat.**

A transzport a két organelum között ugyanis egy kétirányú folyamat: A **brefeldin A** nevű szer leállítja a protein szekrécióna, és hatására a Golgi is eltűnik. A **Golgi proteinek pedig az ER-be kerülnek**. A szer eltávolítása után minden helyre áll.

A szer hatásának magyarázata: a brefeldin az ER -> Golgi transzportot gátolja, anélkül hogy a vissza transzportot (Golgi -> ER) befolyásolná.

## **Oligoszaharid kapcsolások a Golgiban**

A Golgiban tovább folytatódik az N-kapcsolt oligoszaharidok módosítása, és 2 nagy csoport jön létre:

- 1. Komplex oligoszaharidok:** újabb N-acetil-glükózaminok, galaktóz és szialinsav (negatív töltésű) adódik a szénhidrátlánchoz.
- 2. Nagy mannóz tartalmú oligoszaharidok:** 2 db N-acetil-glükózaminhoz mannózok adódnak hozzá.

Az oligoszaharid érési útvonal a **Golgi zsákokban** szekvenciálisan következik be: minden ciszternában jellegzetes enzimek vannak. Alapvetően 3 ciszternát különböztethetünk meg: **cisz, medial és transz**. Ezek megkülönböztetése éppen az enzimek elektronmikroszkópos kimutatásán alapul (hisztokémia).

Nemcsak a fehérjék N-kapcsolt oligoszaharid származékai alakulnak ki a Golgiban, hanem O-kapcsolt glikozilezés is van. Glikozil transzferáz enzimek végzik.

Mivel az oligoszaharidok az ER és a Golgi lumenjének oldalán adódnak a membrán összetevőhöz, ezért ha ezek a glikolipidek vagy glikoproteinek a sejtfelületre kerülnek, akkor a sejtről kifelé lógnak.

### **Mi a glikozilezések funkciója ?**

A glikozilezések nem templát irányított folyamatok, és nem nagyon ismerjük a funkciójukat. Talán a felszínre került fehérjét az oligoszaharid megvédi a proteázok hatásától.

### **Transzport a transz-Golgi-tól a lizoszómáig**

Minden olyan fehérje, amelyik a Golgi-n átmegy (kiv. ami ott marad), a transz oldalon szortírozódik a végső rendeltetési helye szerint. Legjobban azt a mechanizmust ismerjük, ami a lizoszómába irányítja a fehérjéket.

### **A lizoszómák végzik a sejten belüli emésztéseket**

A **lizoszóma** olyan membránnal határolt organellum, ami hidrolitikus enzimek zsákja, és makromolekulákat degradál. Kb. 40-féle enzim található

benne: proteázok, nukleázok, glikozidázok, lipázok, foszfolipázok, foszfatázok, szulfatázok. Mindegyikük **savas hidroláz, mert** pH optimumuk savas (közel pH=5). Ez kétszeres védelmet jelent a sejt számára, mert:

1. a veszélyes enzimek a citoszoltól elzárva találhatóak, és
2. ha kiszabadulnak, se tudnak a citoszol semleges pH-ján működni.

A lizoszóma membránjának jellegzetessége a transzport fehérjék sokasága. Ezek funkciója:

1. a makromolekulák bomlástermékeinek (aminosavak, cukrok, nukleotidok stb.) transzportja a citoszolba, és
2.  $H^+$  pumpálás, ami ATP hidrolízissel pumpál protont a lumenbe (pH=5 beállítása).

Az endocitózissal bekebelezett anyag először az **endoszómába** kerül, és aztán a lizoszómába. Az endoszóma belseje is savas, de nem annyira, mint a lizoszómáé.

### A lizoszómák heterogének

A lizoszómák **mérete és alakja** egy sejtben is **nagyon változó**, és ez alapvetően eltér a többi organellumétól. Általános hisztokémiai jellemzőjük azonban a savas foszfatáz jelenléte.

A növényi és gomba sejtek egy vagy több óriási folyadékkal töltött **vakuólumot** tartalmaznak, amik az állati sejtek lizoszómáival homológ sejtstruktúrák, mert hidrolitikus enzimek vannak bennük. Funkcióik:

1. tápanyagok és végtermékek raktárai,
2. turgor nyomás szabályozói.

### A lizoszómákba többféleképpen kerülhet anyag

A lizoszómák az intracelluláris anyagáramok találkozó helyei:

1. Az emésztő enzimek az ER-ből a Golgin keresztül kerülnek ide.
2. A bontásra kerülő anyagok pedig 3 különböző úton érkehetnek:

a.) A környezetből endocitózissal felvett makromolekulák először ún. **korai endoszómákba** kerülnek, amikből később **késői endoszóma** lesz. Ebbe a Golgiból érkező hidrolázok lépnek be, és megkezdődik a felvett

makromolekula degradációja. **Az érett lizoszómák a késői endoszómákból lesznek.**

b.) **Autofágia:** minden sejtben az elöregedett sejtalkotókat el kell tüntetni. Az ER membrán átöleli az organelumot és **autofagoszóma** keletkezik, ami lizoszómával (vagy késői endoszómával) fúzionál (**autofagolizoszóma**).

c.) **Fagocitózisra** (nagy részecskék pl. mikroorganizmusok) specializált sejtekben (pl. makrofágok és neutrofil sejtek) **fagoszóma** keletkezik, ami lizoszómával fúzionál (**fagolizoszóma**).

Van tulajdonképpen egy negyedik útvonal is: KFERQ (lizin-fenilalanin-glutamát-arginin-glutamin) szekvenciával rendelkező fehérjék szelektíven bejutnak a lizoszómába degradációs célból.

### **Lizoszómális enzimek szortírozása a transz-Golgiban**

Nézzük először azt a folyamatot, ahogy emésztő enzimek kerülnek a lizoszómába. Ezek az ER-ben szintetizálódnak, és a Golgin keresztül haladnak tovább. **Transzport vezikulum** sarjadzik le a transz Golgi-ról, amiben lizoszómás enzimek vannak. A lizoszómás hidrolázok mindegyike egy **mannóz-6-foszfát (M6P)** markert hordoz az N-kapcsolt oligoszaharidjában (ez a cisz Golgiban adódik hozzá). A transz Golgi M6P receptorai, amik transzmembrán fehérjék, felismerik és kötik a M6P-t, és segítik a transzport vezikulák kialakulását a következőképpen. A transzmembrán receptor citoplazmás oldalához “clatrin” fehérjék kapcsolódnak, és hoznak létre egy fehérje burkot.

Az M6P receptor pH=7-en (transz Golgi) köti és pH=6-on (endoszóma) disszociálja a hidrolázokat. Ily módon a felszabadult hidroláz megkezdheti működését a késői endoszómában, ami lizoszómává alakul. Az M6P receptor pedig visszamegy a transz Golgiba, hogy újra hasznosulhasson (reciklizál).

Fentiek alapján a transzport vezikulumok által végzett szortírozás mechanizmusa a következő. A **cargo-t** a **cargo receptor** ismeri fel és köti meg. Az így képződött lesarjadzó vezikulum pedig csak specifikus membránnal olvad össze.

A specifikus folyamat ellenére néhány hidrolitikus enzim mégis a sejt felszínre kerül és exocitózissal kiürül. Mivel valamennyi M6P receptor is kijut a plazmamembránba. ezért azok a lizoszómás enzimeket **receptor**

**mediált endocitózissal** (ld. később) visszahozzák. Ezt a mentő útvonalat a következőképpen fedezték fel. Ha egy lizoszómás hidrolázban hibás sejtet szövettanilag egy normális sejttel tenyésztünk együtt, akkor a mutáns sejt helyreáll, mert a környezetből a normális által kiválasztott hidrolázból tud magának összeszedni a fenti módon.

### **A lizoszómás enzimeken egy szignál folt van és ezért köt rájuk a mannóz-6-foszfát**

A lizoszómás hidrolázok kiválogatódásának specifikusságát az adja, hogy a M6P csak a megfelelő glikoproteinekhez adódik hozzá. Két enzim működik szekvenciálisan:

1. Foszfotranszferáz: egy **szignál foltot** ismer fel a hidrolázban, és N-acetil-glükóz-amin-foszfátot kapcsol mannóz oldalláncokhoz.
2. Foszfoglükozidáz: lehasítja az N-acetil-glükóz-amint, és így mannóz-foszfát marad.

### **A hibás N-acetil-glükóz-amin-foszfotranszferáz következménye**

Ha ez az enzim hibás, akkor majdnem minden hidrolitikus enzim hiányzik a lizoszómából. Ilyen betegben a hidrolázok a vérben vannak, mert a szekréciós útvonalon haladnak végig, ami az alapállapot (nem kell hozzá szignál).

### **Transzport a plazmamembrántól az endoszómákon keresztül: endocitózis**

A sejt felszíntől a lizoszómáig vezető útvonal az **endocitózissal** indul, ami makromolekulák és részecskék felvételének folyamata a környezetből. Az emésztendő anyagot a plazmamembrán egy kis darabja körülveszi, aztán a membrán invaginál, leszakad és egy intracelluláris vezikulum keletkezik.

A bekebelezett részecske mérete alapján az endocitózis 2 fajtáját különböztethetjük meg:

1. **pinocitózis** (“**sejtek ivása**”): folyadékok (oldatok) felvétele kis vezikulumokkal (< 150 nm),
2. **fagocitózis** (“**sejtek evése**”): nagy részecskék pl. mikroorganizmusok (> 250 nm) bekebelezése fagoszómákkal.

A pinocitózis szinte minden eukarióta sejtre jellemző, a fagocitózis pedig az erre specializált sejtekre. A **pinocitózis** egy **konstitutív** folyamat, a **fagocitózis** pedig **receptor aktivált** folyamat.

### Specializált fagocitáló sejtek

A fagocitáló sejtek specializált endocitózisos vezikulumait **fagoszómának** nevezzük. A fagoszóma mérete akár akkora is lehet, mint maga a fagocitáló sejt. A protozoák fagocitózissal táplálkoznak, és a megevett anyag a lizoszómában degradálódik. Szóval a fagoszóma a lizoszómával fúzionál, és az anyag degradálódik.

Többsejtűekben a bélben a táplálék extracellulárisan lebomlik, és a fagocitózis a táplálkozáshoz nem fontos. A professzionális fagocitáló sejtek a többsejtűekben más funkciót látnak el. A fehérvérsejtek 2 csoportja fagocitál:

1. **makrofágok:** vérben és szövetekben,
2. **neutrofil leukociták:**

Közös ősből erednek, és a fertőző mikrobáktól védenek minket, valamint az előregedett sejteket eszik meg. A fagocitáló sejtek receptorait legjobban az antitestek aktiválják, amik a fertőző mikroba felületére kötnek. Az antitest Fc régiója néz kifelé, és ezt ismerik fel a fagocitáló sejtek. Erre az ingerre a fagocitáló sejtek kiterjesztik a membránjukat, és bekebelezik a mikrobát.

### A pinocitózis

Kis pinocitózisos (endocitózisos) vezikulum keletkezik, ami később visszatér a felületre. A pinocitózis mértéke sejtípustól függ. Makrofágoknál gyors. Mivel a pinocitózis nem változtatja a sejt felület/térfogat arányát, ezért az eltávolított membránnal azonos mennyiség visszaadódik (exocitózis). Tehát van egy **exocitózisos-endocitózisos ciklus**.

Az endocitózis a plazmamembrán invaginációjával indul, és **clathrin** fehérje fedi a citoplazmamembránt itt belülről. Egy clathrin fedett vezikulum keletkezik. Az endoszómák később levetik a "clathrin" burkukat és endoszómával fúzionálnak. Ez a **fluid fázisos endocitózis**.

### Receptor mediált endocitózis



Specifikus makromolekulákat is felvehet a sejt “clathrin” fedett vezikulumokba. Ekkor a molekula egy receptorhoz köt, és mint receptor-makromolekula komplex kerül a vezikulumba. Vegyük észre, hogy a folyamat nagyon hasonló a lizoszómás enzimek pakolásához a Golgi-ban. Ott is a transzportált molekula egy membrán receptorhoz köt, “clathrin” burok keletkezik, és a vezikulum lesarjadzik a membránról, stb.

Kis koncentrációban a környezetben lévő anyagok ezzel a folyamattal **koncentráltan** kerülnek felvételre.

### **A koleszterin felvétele receptor mediált endocitózissal**

Az állati sejtek a vérből is fel tudnak venni koleszterint, hogy a plazmamembránjukba beépítsék. A vérben a koleszterin **LDL**-hez (**low density lipoprotein**) kötve cirkulál. Az a sejt, amelyik fel akar venni a vérből, termel egy **LDL receptor** transzmembrán fehérjét. Ez beépül a membránba, és köti az LDL-hez kötött koleszterint, és clathrin fedett vezikulumba felveszi. Szabad koleszterin keletkezik a lizoszómában. Azok az egyének, akiknek genetikai hibájuk van az LDL receptorban, vagy azt egyáltalán nem tudják termelni, azok nem tudják a koleszterint felvenni, és az az érfalban lerakódik (atherosclerosis).

### **Az endocitózissal felvett anyag a lizoszómákban köt ki**

Az **endoszómás kompartment** megfigyelése: peroxidáz enzimet adnak a sejt extracelluláris környezetébe, és az azt endocitózissal felveszi. Az enzim elektronmikroszkópos felvételeken könnyen kimutatható. Heterogén kompartmenteket lehet detektálni a sejtfelszíntől szinte a sejtmagig:

1. **korai endoszómák:** percek alatt keletkezik a plazmamembrán alatt,
2. **késői endoszómák:** 5-15 perc múlva keletkezik.

Az endoszómák savasabbak (pH=6) a citoszolnál, mert **vakuális H<sup>+</sup>-ATPáz** van a membránjukban. A késői endoszóma savasabb a korainál.

A korai endoszóma ugyanolyan **elosztó hely** az endocitózisos útvonalon, mint a transz-Golgi a bioszintetikus-szekréción úton. A korai endoszómában a receptor elengedi a ligandját, ugyanúgy mint az M6P receptor elengedi a lizoszómás hidrolázokat a késői endoszómában. Az elengedett ligand a

lizoszómába kerül, és ott degradálódik. A receptor sorsa 3-féleképpen alakulhat:

1. visszatér a plazmamembránba,
2. lizoszómába kerül és degradálódik,
3. a citoplazmamembrán egy másik részébe jut (**transzcitózis**).

### **Hogyan lesz a korai endoszómából késői endoszóma?**

Feltehetően úgy, hogy folyamatosan fúzionál a transz Golgi-ból érkező hidrolázokat hordozó vezikulumokkal. Végül így lesz belőle lizoszóma. De ez nem teljesen biztos, hogy így megy.

### **Transzport a transz-Golgi-tól a sejtfelszínig: exocitózis**

Most azokról a vezikulumokról lesz szó, amik a transz Golgitól a sejtfelszínig mennek. Ezek membránjában lévő lipidek és fehérjék a citoplazmamebránt fogják növelni, míg a benne lévő fehérjék kiválasztódnak a sejt által. Az **exocitózis** a vezikulum fúziója a sejtfelszínnel.

Kétféle szekréciónál van:

1. **konstitutív**: ez minden sejtben megfigyelhető, és folyamatosan választ ki a sejtől fehérjéket;
2. **regulált**: ez a szekréciónál specializált sejtekre jellemző, amik hormonokat, neurotranszmittereket vagy emésztő enzimeket választanak ki. A corgot a sejt **szekréciónál vezikulumban** tárolja, amíg inger nem kap.

Ha egy sejtben van regulált szekréciónál, akkor 3-féle proteint kell a transz Golgiban osztályoznia:

1. lizoszómába kerülők (késői endoszómán keresztül),
2. konstitutív kiválasztásra kerülők,
3. szekréciónál vezikulumba kerülők.

A lizoszómába a M6P irányítja a fehérjét, és a szekréciónál vezikulumok irányában is feltételeznek egy egyelőre ismeretlen szignált (szignál foltot). Az a fehérje, amelyiknek egyik szignálja sincs, a sejtfelszínre kerül, és kiválasztódik, mert ez az alapútvonal.

### **A szekréciónál vezikulum képződése**

A transz Golgi-ról válik le, és először “clatrin” köpenyt visel, amit később elveszít. A tartalma sokat töményedik a transz Golgi-hoz képest. Ezenkívül még sok protein részleges proteolízist szenved, és ezáltal aktíválódik. Ez leginkább a kiválasztott hidrolitikus enzimekre igaz.

Nagyon gyakran a szekréciós vezikulum a transz Golgitól nagyon messzire kerül. Ez az idegsejtekben a legkifejezettebb, ahol az axon végére vándorol a szekréciós vezikulum. A citoszkeleton mikrotubulusait és motor fehérjét használ a vándorútján az axon végéhez. Amikor megérkezett a rendeltetési helyére, már csak egy szignálra vár, ami rendszerint egy hormonális inger. Ha a hormon köt receptorához, akkor intracelluláris szignál keletkezik, ami rendszerint  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedés a citoszolban, és a vezikulum kiüríti a tartalmát.

A szekréciós vezikulum azért nem növeli a plazmamembrán felületét, mert a felülethez adott membrán komponensek endocitózissal reciklizálódnak.