

# AZ ENDOPLAZMATIKUS RETIKULUM FEHÉRJETRANSZPORTJA

VÉGH MIKLÓS

Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. sz. Kémiai—Biokémiai Intézet, Budapest

## *I. Az endoplazmatikus retikulum felépítése, izolálása, fő funkciói*

A sejt ultrastruktúrájának korai elektronmikroszkópos vizsgálatakor feltűnt egy igen kiterjedt citoplazmatikus hálózat, amelyet endoplazmatikus retikulumnak neveztek el (PORTER 1953) (51). A technikai módszerek fejlődésével kiderült, hogy olyan membránhálózatról van szó, amely folyadékkal töltött üregeket vesz körül a citoplazmában. A retikulum egyes szakaszai felületükön szemcsézettek, — riboszómákat kötnek (48), ez a „durva felszínű”, vagy „granuláris” retikulum —, más szakaszai sima felszínűek, és a Golgi-komplextől különböző „átmeneti hólyagocskák” választják el. (Bár a Golgi-komplex rendezettebb felépítésű, mint az igen polimorf retikulum, a „sima felszínű retikulum” kifejezésbe gyakran a Golgi-komplext is beleértik.)

A retikulum általános, fő szerepe foszfolipidek, trigliceridek szintézise, zsírsavak meghosszabbítása és deszaturációja stb. A membránhálózat állandó mozgásban van, mintegy „végigsepri” a citoplazmát és tartalmát folyamatosan újraelosztja. Egyes szövetekben speciális funkciót végez. Így pl. az izomszövetben a  $Ca^{2+}$ -függő kontrakció szabályozásában („szarkoplazmatikus retikulum”) a here intersticiális sejtjeiben és a mellékvesében a szteroidok bioszintézisében vesz részt. A máj méregtelenítő funkciójában fő szerep jut a retikulum elektrontranszport rendszereinek és az ezekhez kapcsolt járulékos enzimeknek. Ezek jelentős része xenobiotikumokkal indukálható (47). Egyes szövetekben jelentős az exportfehérjék szintézise és szekréciója (pl. máj, hasnyálmirigy stb.). A retikulum *ép formában történő izolálása* nem megoldott. A jelenlegi feltérési módszerek szétzúrodják hálózatát. A képződött fragmentumok spontán záródnak és tartalmuk a citoplazmával keveredik. Idegen organelumok darabjaival fuzionálhatnak, így „hibrid vezikulumok” képződhetnek. Az eredmény tehát, kisebb-nagyobb, membránnal határolt hólyagocskák, amelyek részben citoplazmát tartalmaznak. (Golgiból ideális esetben preparálni lehet viszont ép sacculus halmazokat, ha a homogenizálás nagyon óvatosan, standard körülmények között történik, l. 19.) Ez a „mikroszóma” emellett — szövettől függetlenül — más organelumokból származó membrándarabokat is tartalmaz. Különböző sűrűséggradiens centrifugálásokkal az ilyen szennyezéseket nagyrészt el lehet távolítani, sőt, a granuláris retikulum, a sima felszínű retikulum és a Golgi-komplex elemei egymástól szétválaszthatók (2, 14, 15, 20, 22, 29,

30). Az így kapott tisztított mikroszóma preparátumok enzim-orientáció és lokalizáció szempontjából jól jellemzettek (17), és az endoplazmatikus retikulum egyes szakaszaival összehasonlíthatók (2, 14, 20, 22, 24).

Az *endoplazmatikus retikulum membránja* vékonyabbnak látszik az elektronmikroszkópos képeken (kb. 50 Å), mint a plazmamembrán (80–100 Å). A membrán anyagának 60–70%-át fehérjék, 30–40%-át lipidek (főként foszfolipidek) teszik ki. Mind a foszfolipidek, mind a fehérjék eloszlása igen aszimmetrikus, ezt részletesen tárgyalja DEPIERRE és ERNSTER (17). Fagyasztva — tört preparátumok elektronmikroszkópos kiértékelése, valamint  $^{31}\text{P}$  — NMR spektrumok alapján, a máj-retikulum membránja fiziológias körülmények között, egymással egyensúlyban levő, folyamatosan átalakuló kettősrétegű és hexagonális felépítésű lipidszerkezetekből áll. Egy ilyen struktúra  $^{31}\text{P}$  — NMR-rel szimmetrikus csúcsú spektrumot ad, jelezve az alkotó foszfolipidek izotróp mozgási lehetőségét. Mind a kettősrétegre, mind a hexagonális fázisra jellemző spektrum aszimmetrikus, vállal rendelkezik. Kettősrétegre jellemző spektrumot mutat pl. a vörösvértest plazmamembránja, az extrahált mikroszomális lipidek vizes szuszpenzióban, de a 4 °C-on tartott mikroszóma is (39, 61, 67). Az utóbbi két adat azt jelentheti, hogy a mikroszóma membrán fehérjéinek komoly szerepe van a membrán átmeneti formájának fenntartásában. Egy ilyen változatos felépítésű membrán környezetével szorosabb kapcsolatban lehet, mint akár a teljesen kettősrétegű, vagy a csak hexagonális fázisú. Amellett, hogy könnyen vehet részt fúziós- és transzportfolyamatokban, képezhet elágazásokat és permeábilis, mindezen tulajdonságai a környezet összetételének (pl. kétértékű kationok koncentrációváltozása) megfelelően módosulhatnak. Nem ismerjük pontosan, milyen szerepe van a retikulum membránjának (és csőhálózatának) a sejt anyagainak újraelosztásában. Valószínű, az anyagoknak a felhasználás, vagy eliminálás helyére továbbításában jelentősen lerövidíti az utat. Különösen fontos lehet a lipidoldékony vegyületek továbbításában (lipidek, hidrofób xenobiotikumok, transzmembrán enzimek, fehérjék stb.). Egy ilyen rendszer akkor működhet igazán hatékonyan, ha a membránban „oldott” anyagok laterális diffúziója gyors (33, 54, 65). Gyors laterális diffúzióra képes az oxigén (21), vagy pl. a citokróm  $b_5$  (53). Ezért valószínű, hogy a retikulumban, a mitokondrium külső membránjában és a plazmamembránban egyaránt megtalálható NADH: citokróm  $b_5$  redukáz (redoxpotenciálja  $\approx -0,2$  V) és citokróm  $b_5$  (redoxpotenciálja  $\approx 0$  V) részt vesz a sejt redox állapotának szabályozásában (3, 4, 59), és ezen keresztül a hormonális szabályozás mértékét is befolyásolhatja (12, 25, 43). A jelenség további érdekessége, hogy a retikulumban ez az elektrontranszport rendszer a sejt membránjainak zsírsavösszetételén keresztül, azok fluiditását is változtathatja, mivel a redukált citokróm  $b_5$  a zsírsavelongáció és -deszaturáció elektrondonorja (34, 64).

## II. Fehérjetranszport a retikulum membránján keresztül

### 1. A szignál hipotézis

A fehérjeszintézis részfolyamatainak megismerése megteremtette a lehetőséget, hogy elgondolkodjunk azon, hogyan történik a szekrécóra szánt fehérjék sejten kívülre kerülése, és milyen mechanizmussal folyik az intracelluláris organelumok fehérjéinek utánpótlása. A kiindulási lépések a fehérjeszekrécio mechanizmusának felderítésében nagyrészt PALADE munkacsoportjának köszönhetőek. A máj- és hasnyálmirigysejtek fehérjetranszportját vizsgálva, a hatvanas években kimutatták, hogy a szekrécios fehérjék szintézise az endoplazmatikus retikulumhoz kötött poliszómákon történik, e fehérjék nem jelennek meg a citoplazmában, hanem az endoplazmatikus retikulum lumenében figyelhetőek meg, mint befejezett polipeptid-láncok. Ugyanakkor a citoplazmatikus fehérjék szabad poliszómákon szintetizálódnak. Még élesebb különbség tehető a kétféle fehérjeszintézis között puromicinnel. Az antibiotikum jelenlétében végzett transzlációs kísérletek kiderítették, hogy a polipeptid lánc első szakasza még a szintézis befejeződése előtt transzlokálódik a retikulum belsejébe (52). Ez a transzport nem igényel külön energiát, viszont a szekrécios fehérje további útja valószínűleg több lépésnél is energiát igényel.

Sokáig kérdéses volt, milyen mechanizmussal jut be a szekrécios fehérje a retikulumba. Ehhez a szekrécios fehérjének először a retikulummal kell kölcsönhatásba lépnie. Lényegében az alábbi három lehetőség tételezhető fel:

- a) az exportfehérjék szintézisére olyan *specifikus riboszóma populáció* szolgál, amely az endoplazmatikus retikulumhoz kötődik;
- b) *specifikus jel az mRNS-en*, amely az mRNS-t a retikulummembránhoz köti;
- c) maga a *szintetizálódó polipeptid kötődik* a membránhoz, N-terminális szakaszával.

Az első két pontra vonatkozó kísérletek összességükben kevés eredménnyel zárultak. Világossá vált viszont, hogy a szekrécios fehérjék szerkezetükben hordozzák azt az információt, ami lehetővé teszi membránkötött transzlációjukat és transzlokációjukat a retikulummembránba (10). Mivel a transzlokáció már a fehérje szintézise közben megindul (52), a membrán iránti affinitásnak a transzláció korai szakaszában jelentkeznie kell. MILSTEIN és mtsai (45) összehasonlítva a sejtmentes rendszerben, mikroszóma távollétében *in vitro* szintetizálódó immunglobulin könnyű lánc méretét a mikroszóma jelenlétében kapott transzlációs termékkel megállapította, hogy a membrán távollétében szintetizálódott polipeptid-lánc nagyobb, mint az érett fehérje, mégpedig az N-terminális szakaszon van egy extra szekvencia. Ezeknek a vizsgálatoknak a kiterjesztése más exportfehérjékre igazolta, hogy egy additív N-terminális peptid darab — mint „szignál” — felelős az exportfehérjék transzmembrán mozgásáért.

A szignál peptidek összehasonlító szekvenciavizsgálatából kitűnik azonban, hogy bár közös sajátosságuk az erősen hidrofób oldalláncok csoportosulása a peptid egy szakaszán, a szekvenciában csak részleges hasonlóságok vannak (1. ábra), ezek:

1. az N-terminális után legalább egy erősen töltött oldallánc, leggyakrabban lys, vagy arg található;
2. a peptid központi régiójában hidrofób oldalláncok csoportosulnak, és ez legalább 9 aminosav hosszúságú szekvencia. Ennek hidrofobicitását csak egy oldalláncon csökkentve (pl. leucint  $\beta$ -hidroxil leucinra cserélve (28), a szintetizálódó peptid transzlokációra képtelen lesz;
3. a hidrofób csoportot hidrofil oldalláncok követik;
4. a peptid C-terminális környékén az oldalláncok mérete jelentősen csökken (gly, ala, ser, thr a leggyakoribb aminosavak).

Végül az is feltűnő, hogy ezek az N-terminális szekvenciák igen különböző (15–30 aminosav) hosszúságúak. Ezért feltehető, hogy a „szignált” nem egy aminosavszekvencia, hanem egy háromdimenziós peptidszerkezet jelenti.

A szignál peptidek felfedezése nyomán alakult ki a „szignál hipotézis” — egy elképzelés a szekréciós fehérjék retikulumba történő transzportjára, az ún. „vektoriális transzlációra” vonatkozóan (BLOBEL és DOBBERSTEIN) (8).  
Lényege:

*Pre-proinzulin* (patkány) (66):

X—Leu-Lys-Met—X—Phe-Leu-Phe-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Val-Leu-Trp-Glu-  
-Pro-Lys--Pro-Ala-Gln-Ala Phe...  
↑

*Pre-proalbumin* (patkány) (67):

Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Phe-Ser Arg...  
↑

*Növekedési pre-hormon* (patkány) (68):

Met-Ala-Ala-Asp-Ser-Gln-Thr-Pro-Trp-Leu-Leu-Thr-Phe-Ser-Leu-Leu-Cys-Leu-Leu-Trp-Pro-  
-Gln-Glu-Ala-Gly-Ala Leu...  
↑

*Pre-protripszinogén* (69):

X—Ala-Lys-Leu-Phe-Leu-Phe-Leu-Ala-Leu-Leu-Leu-Ala-Tyr-Val-Ala-Phe Pro...  
↑

*Pre-lizozim* (70):

Met-Arg-Ser-Leu-Leu-Ile-Leu-Val-Leu-Cys-Phe-Leu-Pro-Leu-Ala-Ala-Leu-Gly Lys...  
↑

*Pre-placentális laktogén hormon* (humán) (71):

Met-Pro-Gly-Ser-Arg-Thr-Ser-Leu-Leu-Ala-Phe-Ala-Leu-Leu-Cys-Leu-Pro-Trp-Leu-  
-Gln-Glu-Ala-Gly-Ala Val...  
↑

*Citokróm P450* (72):

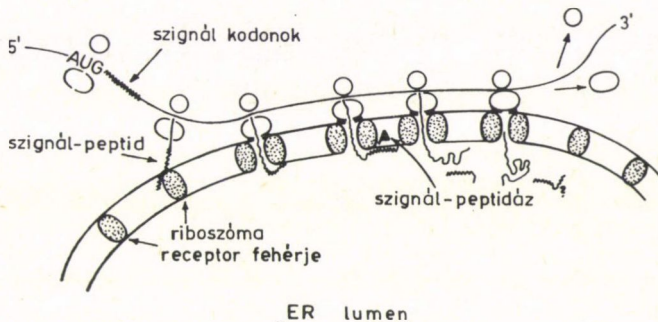
Met-Glu-Phe-Ser-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Phe-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe...

1. ábra. Néhány pre-fehérje szignál régiójának aminosavszekvenciája. A citokróm P450 szignál régiója kivételével a fenti szignálrégiókat a szignál peptidáz a nyíljal jelölt helynél hasítva, eltávolítja az érési folyamat során

1. az endoplazmatikus retikulumba transzlokálódó fehérjék mRNS-e az 5' végén az iniciálási kodon után a szignál szekvencia kódsorozatát tartalmazza, ezt követi az érett fehérjére jellemző információ;
2. minden fehérje szintézise közös, citoplazmatikus riboszómán kezdődik;
3. amint a növekvő peptidlánc N-terminális darabja kiemelkedik a nagy riboszóma alegység felületéről, kölcsönhatásba lép specifikus integrális membránfehérjékkel, és egy működő riboszóma-membrán asszociátum létrejöttét katalizálja, amelyben egy de novo kialakult fehérjecsatorna fúrja át a membránt;
4. a membrán-kötött 60 S alegységben és a membránban létrejött csatornán át a polipeptid a retikulum ciszternájába jut;
5. az endoplazmatikus retikulum belső falán levő szignál peptidáz lehasítja a szignál peptidet a növekvő polipeptid lánc elejéről;
6. a fehérje elkészülte után a riboszóma alegységek disszociálnak és a citoplazmába kerülnek. A csatorna megszűnik, a kész peptidlánc teljesen a lumenbe kerül (2. ábra).

A szignál hipotézist sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszer segítségével igazolták (40, 68): mRNS-t húzacsíra, vagy retikulocita citoplazma extraktummal (amely a riboszómákat és a fehérjefaktorokat, valamint az energiaellátást is tartalmazta) hoztak össze, az aminosavak közül a metionin volt jelzett ( $^{35}\text{S}$ ). A radioaktív fehérjéket SDS-gélelektroforézissel és autoradiográfiásan detektálták, az érett termékeket immunprecipitációval és N-terminális rádiószekvencia-analízissel azonosították (3. ábra). A hipotézis bizonyítása azon alapszik, hogy

1. Endoplazmatikus retikulum távollétében az érett polipeptid láncnál hosszabb prekursor képződik;
2. A transzláció után hozzáadott proteáz ezt elemésztí;
3. A retikulum (kutya-hasnyálmirigy mikroszóma) jelenlétében történő transzláció során az érett, rövidebb polipeptidlánc képződik;



2. ábra. Szekréciós fehérjék vektoriális transzlációja a szignál hipotézis alapján (BLOBEL és DOBBERSTEIN (8) nyomán)



3. ábra. Bovine prolaktin és növekedési hormon vektoriális szegregációja mikroszóma membránba — SDS poliakrilamid gélelektroforézist követő autoradiográfiás (1–5.), ill. fehérjére megfestett (6–7.) gélek kiértékelése. Az érett prolaktint és növekedési hormont a 6., a prehormonokat az 1. gél mutatja. A hipofízis elülső lebenyéből származó RNS-frakció búzacseriből izolált sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszerben transzlálódott. 1. gél: poszttranszlációs inkubálás 90 percig kutya-hasnyálmirigyből preparált mikroszóma membránal. 2. gél: a mikroszómaival történt poszttranszlációs inkubálást követően, tripszin + kimotripszin proteázokkal kezelés (200–200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). 3. gél: a mikroszóma már a transzláció alatt jelen van. 4. gél: kotranszlációsán jelen van a mikroszóma, és a transzláció befejezte után proteázzal utóinkubáltak. 5. gél: ugyanaz, mint a 4. gél, de a proteázzal való utóinkubálás 0,5% Na-dezoxikolat (DOC) jelenlétében történt. 6. gél: hipofíziskivonat (szövethomogenátum 100 000 $\times$ g felülúszója). 7. gél: hipofíziskivonat proteázzal inkubálva. Jelölések: GH: növekedési hormon, LTH: prolaktin (laktotrop hormon). Az ábra LINGAPPA és mti (40) nyomán készült

4. Ezt proteázzal tovább inkubálva a peptidlánc változatlan marad, mivel már a mikroszómába transzlokálódott;
5. Ha ez a proteázos utóinkubálás detergens jelenlétében történik, a szintetizált fehérje megemésztődik;
6. Ha a mikroszómát csak a transzláció cikloheximides leállítását után adják a rendszerhez, a kész polipeptidlánc (a prekursor) nem transzlokálódik a mikroszómába, és a hozzáadott proteázzal megemészthető.

A fentiek alapján a hipotézis további igazolása során meg kell találni és izolálni a

- a) szignál peptidát,
- b) az endoplazmatikus retikulumban levő riboszóma-kötő fehérjét,

- c) az alagútképző komponenseket, és
- d) a szignál peptid kötő receptort.

Ezenkívül ellenőrizni kell még, létezik-e más transzlokációs lehetőség az exportfehérjék számára, és hogy a sejt saját organellumait is ez a mechanizmus látja-e el újonnan szintetizált fehérjékkel.

#### a) szignál peptidáz

Elég sok tulajdonságát ismerjük anélkül, hogy tisztán sikerült volna izolálni. Az enzim a riboszómán elongálódó fehérjék szignál szekvenciáját távoztatja el. A szignál szekvenciákban a C-terminális szekvenciareészlet elég különböző, ezért az enzim valószínűleg a peptidnek az apoláros környezetben felvett *harmadlagos szerkezetét* ismeri fel (40).

Sajnos, nagyon kevés ismeretünk van arról, hogy a szignál szekvenciák a hidrofób környezetben milyen szekunder és terciér szerkezetűek. Ezért a retikulum-membrán szignál peptidáz aktivitását csak kotranszlációban tudjuk mérni, olyan természetes szubsztrátokkal, amelyeket a hozzáadott fehérjeszintetizáló rendszer *in situ* készít. A szignál peptidáz ezeket pontosan, fajtól és szövettípustól csaknem függetlenül alakítja át az érett polipeptiddé. Nagyon ritka kivételtől eltekintve, *csak a granuláris retikulum membránban* van (pl. 30, 31), *sima retikulumban nincs*, és a granuláris retikulumból szolubilizett aktivitás csak a granuláris retikulummal asszociál rekonstitúciós kísérletekben, a *sima felszínűvel* nem.

*Integráns membránfehérje*, valószínűleg a lúmináris felülethez közelebb, amit az bizonyít, hogy egyrészt, az ép retikulumot proteázzal emésztve, aktivitását megtartja, másrészt, szolubilizése és aktív alakja detergenst igényel (0,5% DOC). Szolubilizett formája igen hőérzékeny (feltehetően a DOC hőmérsékletfüggő detergens hatása miatt). Részleges tisztítását—szolubilizést követő—Sephadex G-100 kromatográfiával (63, 70), DEAE-cellulóz ioncserével (31), vagy differenciál szolubilizéssel (38) végezték.

Gátolhatóságáról igen ellentmondók az adatok: a DOC-szolubilizátum katalizálja természetes szubsztrátok korrekt poszttranszlációs átalakítását is érett formáikká, de sem SH-reagensek (20 mM-ig), EDTA (10 mM), sem különböző természetes eredetű proteáz-inhibitorok nem csökkentik aktivitását (31). Szintetikus szubsztrátok használatát nehezíti, hogy a retikulummembránban és a szolubilizett kivonatban legalább háromféle proteáz-aktivitás mutatható ki (kutya-hasnyálmirigy granuláris retikulum): *aminopeptidáz* (bestatinnal, 1,10-fenantrolinnal teljesen gátolható, szerinproteázgátlókra érzéketlen), *endopeptidáz* (termolizin-szerű aktivitás, pl. foszforamidonnal gátolható), és *kimotripszin-szerű* (klorometilketonok és PMSF gátolja). Nagy koncentrációban használt chymostatin (3–600 µg/ml) a természetes szubsztrát hasítását is gátolja, de kérdés, hogy ez az enzim és az inhibitor közvetlen kölcsönhatásának eredménye-e (63, 70).

### b) Riboszóma-kötő fehérjék

A durva felszínű retikulum membránja riboszómát köt, annak nagyobbik alegységén keresztül (52), és a szintetizált fehérje a 60 S alegység „védelmében” éri el a retikulummembránt (44).

A granuláris retikulum háromdimenziós elektronmikroszkópos képe azt mutatja, hogy a riboszóma, nagyobb alegységéből kiemelkedő dudor révén kapcsolódik a membrán felületén levő kiterjedt fehérjehálózat egy régiójához (36, 66). Ez a kapcsolat ionerősség- és puromicinérzékeny: az előbbi a riboszóma és a membrán fehérjei közötti kölcsönhatásra, az utóbbi a szintetizálódó polipeptid (szignálszekvenciájának) membránkomponensekkel történő kapcsolódására utal (1).

SDS-gélelektroforézissel a durva felszínű retikulumból három olyan fehérje mutatható ki, amelyek a sima felszínű retikulumban nem találhatók meg. Ezek integráns membránfehérjék, 63, 65 és 87 000 dalton alegységmolekulasúllyal (35, 36, 56). Kis koncentrációjú keresztkötő ágenssel a 63 és 65 ezres fehérje riboszómához köthető, és azzal együtt szolubilizálható. E tulajdonságaik alapján várható, hogy szerepük a riboszómáknak a membrán specifikus helyéhez kötése, nevük: „riboforin” (37).

### c) Az „alagútképző” és a d) „szignálpeptid-kötő” komponens

Egyelőre még felderítetlen, mindkettőről csupán feltételezéseink vannak. A kompetíció jelensége viszont kimutatható két prepeptid között ko-transzlációs transzportjuk folyamán, így valamilyen kötő-komponensnek léteznie kell. Az ilyen kísérleteknél a kétféle mRNS-t különböző arányban tartalmazza a sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszer, amelyhez limitáló mennyiségű mikroszómát adnak. A kiértékeléshez vagy a mikroszóma külső proteázról védő sajátságát használják fel, vagy a szignál peptidáz által kialakított „érett” alakok arányát határozzák meg.

### Egyéb, ismeretlen transzlokációs faktorok

Riboszóma mentesített granuláris retikulum transzlokációs aktivitása tripszinnel, tömény KCl oldattal (0,5 M, 69), N-etil maleimiddel (1 mM) történő kezelés következtében megszűnik. A tripszines és a KCl-os extraktumnak a membránnal való egyesítése többé-kevésbé helyreállítja a transzlokáló képességet, míg az extraktum maleimid-kezelését követő rekonstitúció sikertelen. A maleimidre érzékeny komponens az extraktumban van, amit az bizonyít, hogy ha a sóoldatos kivonást követően a membrán maradékot kezelik maleimiddel, és a sóextraktummal egyesítik, transzlokáló képességét a membrán visszanyeri. (Sima felszínű retikulum a sóextraktum hozzáadása után is kép-



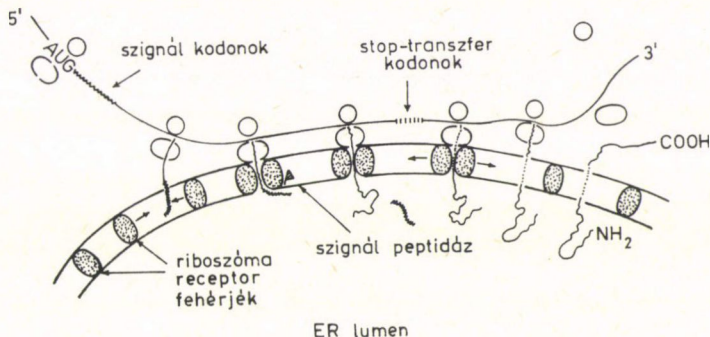
telen transzlokációra; feltehetően olyan komponensek is szerepet játszanak a folyamatban, melyek a sima felszínű retikulumból hiányzanak.) Valószínű, hogy mindhárom kezelés ugyanazt a citoplazmatikus felszín közelében lokalizáló faktort vagy faktorokat érinti (32).

## 2. A szignál-hipotézis kiterjesztése: stop-transzfer és inzerciós szekvenciák

### a) A szignál-hipotézis módosítása membránfehérjék szintézisére

A membrán biogenezis lényeges eleme a komponensek megfelelő struktúrává rendeződése. Ez a folyamat a membránfehérjék de novo szintézisét, és a struktúrába történő beilleszkedését igényli. A szignál hipotézis a membránfehérjék szintézisekor is feltételezi az N-terminális szignál szekvencia jelenlétét, amely transzláció közben a még „szabad” riboszómáról kiemelkedve, egy riboszóma-membrán kötést katalizál (4. ábra). Az eredeti elképzelés szerint (9), a prepeptid a membrán-komponens szignálpeptid-receptorhoz kapcsolódik. A naszcens peptidlánc a membránon átjut, egészen addig, amíg a peptidláncban levő ún. „stop-transzfer szekvencia” kapcsolatba nem lép a membránnal; ekkor a polipeptid transzlokációja befejeződik. A szignál peptidáz működése folytán a folyamat irreverzibilis lesz. Ennek eredményeképpen a polipeptid lánc a membránban aszimmetrikus, részlegesen transzlokált formában marad. A fehérje „stop-transzfer szekvenciája”, amely szintén az mRNS-ben van leírva, a feltételezések szerint

1. szétszórja a feltételezett „alagútképző” fehérjéket,
2. megszünteti a riboszóma-membrán kötést,
3. specifikusan megszabja a fehérje topológiai viszonyait, ezáltal a fehérje strukturális információja egyben a fehérje lokalizációjáért is felelős. (Részben az orientációért és aszimmetrikus elhelyezkedésért, részben — a további intracelluláris transzportot is figyelembe véve — a „végállomásért”. A membránból kiálló hidrophil régiók a retikulum és a



4. ábra. Transzmembrán fehérjék vektorialis transzlációja a szignál hipotézis alapján (BLOBEL (7) nyomán)

Golgi különböző régióiban poszttranszlációs módosításokon mennek át, amelyek a fehérje további útját is meghatározzák.)

Kompetíciós kísérletekkel igazolható, hogy a lumenbe kerülő exportfehérjék és a membránba transzlokálódó fehérjék szignálpeptid receptora azonos. A vesicularis stomatitis vírus G-fehérjéje mint transzmembrán fehérje kompetál sejtmentes rendszerben, mikroszóma jelenlétében az exportfehérje-prekurzor pre-prolaktinnal, de egyikkel sem kompetál a globin, amely szignálpeptid nélkül szintetizálódó citoszól fehérje (42). — Több szekvencia is lehet egy membránfehérjében, amely a retikulum membránba való beillesztődést idézi elő. Vajon, a nem N-terminális „szignál-szekvenciák” (ezeket újabban „inzerációs szekvenciának” nevezik) szintén ugyanahhoz a receptorhoz kötődnek-e, és miért nem hasítja le ezeket a szignál peptidáz?

Erre vonatkozó adatok részben az endoplazmatikus retikulum elektrontranszportjában szereplő enzimek, részben az ovalbumin szintézisének tanulmányozásából erednek.

#### b) Az endoplazmatikus retikulum fehérjéinek szintézise és transzportja

Ismert, hogy az endoplazmatikus retikulum saját fehérjéi közül a citokróm P450, a NADPH: citokróm P450 reduktáz és az epoxid hidratáz membrán-kötött riboszómákon, a citokróm  $b_5$  és a NADH: citokróm  $b_5$  reduktáz pedig szabad riboszómákon szintetizálódik (46). Mind az öt fehérje esetében az érett alak mérete a naszcens polipeptid méretével egyezik. Az első három fehérje, amely membrán-kötött riboszómán szintetizálódik, az *N-terminálison* tartalmaz egy szignál peptidáz inszenzitív szignál régiót, amely a polipeptidnek a membránba süllyedését irányítja. A „szignál-régió” C-terminális részén ugyanis hiányzik a kisméretű aminosavak alkotta szignál-peptidáz szenzitív szakasz, így a szignál régió nem hasad le.

E három fehérje inzerációja *kotranszlációs*. Ugyanakkor a citokróm  $b_5$  és a NADH: citokróm  $b_5$  reduktáz *poszttranszlációs*an süllyed a membránba, annak megfelelően, hogy

1. szabad riboszómán szintetizálódik
2. nem tartalmaz az N-terminálisán semmilyen szignál-ekvivalens régiót, ellenkezőleg,
3. egy hidrofób régió, amely az inzerációért felelős, a C-terminális félen van.

Mindkét utóbbi fehérje katalitikus centrumát a retikulum citoplazmatikus felszínén, a hidrofil szekvenciárészlet tartalmazza. A citokróm  $b_5$  C-terminális a citoplazmatikus felszínen van, de az ezt megelőző szakasz hurokszerűen a membránba süllyed (13). Az N-terminális fél tartalmazza a hem-csoportot, a retikulum citoplazmatikus felszínén. Amint ezt pre-proinzulinnal elvégzett elegáns kompetíciós kísérletek igazolják, a citokróm  $b_5$  nem igényel szignál peptid receptort és inzerációja poszttranszlációs (5).

### c) Az ovalbumin transzlokációja

Az ovalbumin esetében egy *intramolekuláris szignál* létezésére derült fény.

A csirke petevezeték szekretálta ovalbumin ugyanis szintén nem tartalmaz N-terminális szignál szekvenciát, és a fehérjéből nem hasad ki transzlokációkor peptid (49).

Kiderült azonban, hogy

1. az ovalbumin transzlokálódik a retikulum-membránba,
2. a transzlokáció csak a szintézissel egyidőben történik,
3. az ovalbumin limitált proteolízisével a molekula közepéből egy „szignál-ekvivalens szekvencia” nyerhető,
4. pre-prolaktin transzlokációjával a naszcens ovalbumin, a denaturált ovalbumin és az ovalbumin szignál-ekvivalens peptidje egyaránt kompetál, ugyanakkor a transzlációját befejezett ovalbumin inaktív. Szintén nem kompetál a pre-prolaktinnal az érett bovine szérum albumin (ebben már nincs meg a szignál szekvencia).

Az ovalbumin esete lehetőség arra, hogy könnyen és olcsón lehessen előállítani „szignál peptidet”, ami affinitási módszerek és kompetitív gátlási kinetika révén a szignál-peptid receptor és esetleg a peptidáz izolálására is alkalmas.

### 3. A transzlokáció mechanizmusára vonatkozó egyéb hipotézisek

A szignál hipotézis mellett már más elképzelések is vannak a transzlokáció mechanizmusára. A „ $\beta$ -transzorpciós hipotézis” (STEINER (60)) szerint a szignál peptid darab belépve a hidrofób membránrégióba,  $\beta$ -szerkezetet vesz fel, intramolekuláris kötések hozva létre egy vagy két integráns membránfehérje polipeptid láncával. A prepeptid növekedésével hurokszerű alakot öltve, átéri a membránt, a szignál peptidáz pedig elbontja a megfelelő kötést.

Prokarióták ektoprotein szintézisére INOUE (18) állított fel tetszetős elképzelést, a „*hurok-modell*”. Mivel a prokariótáknak nincs retikulumuk, a riboszómák közvetlenül a sejtmembrán citoplazmatikus felszínén kötődve szintetizálják az exportfehérjéket.

A szignál-szekvencia N-terminális néhány bázikus aminosavja a membrán negatív töltésű citoplazmatikus felületéhez kötődik, a növekvő hidrofób peptid darab egyszerűen benyomul a membránrétegbe. A membrán külső oldalára érve prolin, vagy glicin következik a transzlokálódó peptid láncban, majd újra hidrofób aminosavak — a lánc megtörik, és hurokszerűen visszahajlik a membránba. Itt vágja el a láncot a szignál peptidáz. A peptid lánc a membrán citoplazmatikus oldaláról most már a külső membrán felé nyomul. Ebben a hipotézisben nem szerepel tehát „szignálpeptid-receptor”, a prepeptid közvetlenül a membrán lipidfázisával lép kapcsolatba. Ez a felfogás tükröződik von

HEIJNE (27) „*direkt transzfer modell*”-jében, amely a fehérje transzlokációt fiziko-kémiai jelenségek alapján, a szignál-szekvencia és a membrán lipofil vázának közvetlen kölcsönhatásával magyarázza. Feltételezi, hogy a hidrofób környezetben a prepeptid  $\alpha$ -helix konformációt vesz fel, ami energetikailag kedvezőbbé teszi a kevésbé hidrofób oldalláncok penetrációját is. Ezek transzlokációs igényét a riboszóma megkötésekor felszabaduló energia fedezné, de erősen töltött láncok a membránon rögzült riboszóma leválását is okozhatják. Ez esetben a transzlokáció is befejeződik. Termodinamikai számításai szerint, ilyen módon nem túlságosan hidrofil peptidláncok átjuthatnak a membránon, a töltéssel rendelkezők esetleg a riboforinokkal történő H-hídkötés, vagy egyéb kölcsönhatások révén (rokonság a  $\beta$ -transzorpciós modellel). A modell megkönnyíti elképzelnünk az alacsonyabb evolúciós fokon levő élőlények fehérjetranszportját, ahol specializált struktúrák még nem alakultak ki. A modell hibája, hogy bár a membránba transzlokált peptidlánc  $\alpha$ -helix vagy  $\beta$ -lemez szerkezetének energiaviszonyaira vonatkozóan nincsenek közvetlen mérési adatok az irodalomban, valószínűbb, hogy a  $\beta$ -szerkezet hidrofób környezetben több kölcsönhatást képes kialakítani, tehát stabilabb. Másrészt, egy ilyen transzlokáció elvileg csak riboszóma-kötő fehérjéket igényel, amelyek kevésbé maleimid érzékenyek, és a transzlokáció SH reagens-érzékenységét a direkt transzfer modell nem magyarázza.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a szekrécióna kerülő fehérjék és a membrán-asszociált fehérjék transzportjának jellegzetességei az illető fehérje struktúrgénjében egyértelműen meghatározottak. A szignál-hipotézis megfelelő rugalmassággal kezelve alkalmas azon folyamatok részletes magyarázatára, hogyan kerül a szintetizált polipeptid az endoplazmatikus retikulum lumenébe, ill. megfelelő pozícióban és orientációval membránjába. Egyelőre nincs azonban konkrét elképzelésünk arra, hogy milyen folyamat során jutnak a retikulumba transzlokálódott polipeptid-láncok a transzlokáció helyétől a Golgi-komplexbé kerüléshez kedvező membránszegmensekhez. Egyszerű diffúzió valószínűleg nem elegendő erre, mivel a retikulumból a Golgi-komplexbé irányuló fehérjetranszport akkor is fennmarad, ha cikloheximiddel a fehérjeszintézist gátoljuk és ezáltal a „koncentrációgradiens” csökken. A további transzportlépések között több energiaigényes lehet: a Golgi-készülékbe, majd ennek különböző származékain keresztül a sejtmembránhoz, ill. az extracelluláris térbe. Ezeknek a folyamatoknak a részleteit azonban egységes elképzelésbe egyelőre nem lehet foglalni.

#### IRODALOM

1. ADELMAN, M. R., SABATINI, D. D., BLOBEL, G.: J. Cell Biol. **56**, 206–29 (1973).
2. ADELMAN, M. R., BLOBEL, G., SABATINI, D. D.: Meth. Enzymol. vol. **31**, (A) 201–215 (1974).
3. ARCHAKOV, A. I., KARYAKIN, A. V., SKULACHEV, V. P.: Febs. L. **39**, 239–242 (1974).
4. ARCHAKOV, A. I., KARYAKIN, A. V., SKULACHEV, V. P.: Biochim. Biophys. Acta **408**, 93–100 (1975).

5. BENDZKO, P., PREHN, S., PFEIL, W., RAPOPORT, T. A.: *Eur. J. Biochem.* **123**, 121–26 (1982).
6. BLOBEL, G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **68**, 1–7 (1976).
7. BLOBEL, G.: in „International Cell Biology 1976–77” (eds.: Brinkley, B. R., Porter, K. R.) pp 318–25. The Rockefeller Univ. Press N. Y.
8. BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B.: *J. Cell Biol.* **67**, 835–51 (1975).
9. BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B.: *J. Cell Biol.* **67**, 851–62 (1975).
10. BLOBEL, G., SABATINI, D. D.: in *Biomembranes* (Manson L. A. ed.) vol. **2**, 193–195 (1971) Plenum Press, New York
11. CHAN, S. J., KEIM, P., STEINER, D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1964–68 (1976).
12. CRANE, F. L., LÖW, H.: *Febs. L.* **68**, 153–156 (1976).
13. DAILEY, H. A., STRITTMATTER, P.: *J. Biol. Chem.* **256**, 3951–55 (1981).
14. DALLNER, G.: *Meth. Enzymol.* vol. **31**, (A) 191–201 (1974).
15. DEPIERRE, J. W., DALLNER, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 411–472 (1976).
16. DEVILLERS-THIERY, A., KINDT, T., SCHEELE, G., BLOBEL, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 5016–20 (1975).
17. DE PIERRE, J. W., ERNSTER, L.: *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 201–62 (1977).
18. DI RIENZO, J. M., NAKAMURA, K., INOUE, M.: *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 481–932 (1978).
19. FAVARD, P.: in „Mammalian Cell Membranes” vol. **2**, (eds. Jamieson, G. A. Robinson, D. M.) 108–140 Butterworths, London, Boston (1977).
20. FELDMAN, R. A., GAETANI, S., MORIMOTO, T.: in „Cancer Cell Organelles” (eds.; Reid, E., Cook, G. M. W., Morrè, D. J.) pp 262–92. Halsted Press, N. Y. (1982).
21. FISHKOFF, S., VANDERKOOI, J. M.: *J. Gen. Physiol.* **65**, 663–76 (1975).
22. FLEISCHER, B.: *Meth. Enzymol.* vol. **31**, (A), 180–191 (1974).
23. GEUZE, J. J., KRAMER, M. F., DE MAN, J. C. H.: *l. Ref.* (3) 55–107.
24. GLAUMANN, H., DALLNER, G.: *J. Cell Biol.* **47**, 24–49 (1970).
25. GOLDENBERG, H., CRANE, F. L., MORRÈ, D. J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **83**, 234–240 (1978).
26. HAUGEN, D. A., ARNES, L. G., YASUNOBU, K. T., COON, M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **77**, 967–73 (1977).
27. VON HEIJNE, G., BLOMBERG, C.: *Eur. J. Biochem.* **97**, 175–181 (1979).
28. HORTIN, G., BOIME, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1356–60 (1980).
29. IMAI, Y.: *Biochem. J. (Tokyo)* **80**, 267–76 (1976).
30. JACKSON, R. C., BLOBEL, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5598–5602 (1977).
31. JACKSON, R. C., BLOBEL, G.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **343**, 391–404 (1980).
32. JACKSON, R. C., WALTER, P., BLOBEL, G.: *Nature* **286**, 174–76 (1980).
33. KEITH, A. D., SNIPES, W.: *Science* **183**, 666–668 (1974).
34. KEYES, S. R., CINTI, D. L.: *J. Biol. Chem.* **255**, 11357–64 (1980).
35. KREIBICH, G., CZAKO-GRAHAM, R. C., SABATINI, D. D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **343**, 17–33 (1980).
36. KREIBICH, G., GRENBENAU, R., MOK, W., PEREYRA, B., RODRIGUEZ-BOULAN, E., ULRICH, B., SABATINI, D. D.: *Fed. Proc.* **36**, 656 (1977).
37. KREIBICH, G., ULRICH, B. L., SABATINI, D. D.: *J. Cell Biol.* **77**, 464–487 (1978).
38. KREIL, G., MOLLAY, G., KRASHNITZ, R., HAIML, L., VILAS, U.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **343**, 338–46 (1980).
39. DE KRUIJFF, B., VAN DEN BESSELAAR, A. M. H. P., CULLIS, P. R., VAN DEN BOSCH, H., VAN DEENEN, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **514**, 1–8 (1978).
40. LINGAPPA, V. R., DEVILLIERS-THIERY, A., BLOBEL, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2432–36 (1977).
41. LINGAPPA, V. R., LINGAPPA, J. R., BLOBEL, G.: *Nature* **281**, 117–121 (1979).
42. LINGAPPA, V. R., SHIELDS, D., WOO, S. L. C., BLOBEL, G.: *J. Cell Biol.* **79**, 567–572 (1978).
43. LÖW, H., CRANE, F. L.: *Febs. L.* **68**, 157–159 (1976).
44. MALHIN, L. I., RICH, A.: *J. Mol. Biol.* **26**, 329–346 (1967).
45. MILSTEIN, C., BROWNLEE, G. G., HARRISON, T. M., MATTHEWS, M. B.: *Nature New Biol.* **239**, 117–20 (1972).
46. OKADA, Y., FREY, A. B., GUENTHER, T. M., OESCH, F., SABATINI, D. D., KREIBICH, G.: *Eur. J. Biochem.* **122**, 393–402 (1982).
47. ORRENIUS, S., ERICSSON, J. L. E., ERNSTER, L.: *J. Cell Biol.* **215**, 627 (1965).
48. PALADE, G. E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 567–578 (1955).
49. PALMITER, R. D., GAGNON, J., WALSH, K. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 94–98 (1978).
50. PODMITER, R. D., GAGNON, J., ERICKSON, L. H., WALSH, K. A.: *J. Biol. Chem.* **252**, 6836–93 (1977).
51. PORTER, K. R.: *J. Exp. Med.* **97**, 727 (1953).

52. REDMAN, C. M., SABATINI, D. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 608—15 (1966).
53. ROSEMAN, M. A., HOLLOWAY, P. W., CALABRO, M. A., THOMPSON, T. E.: *J. Biol. Chem.* **252**, 4842—49 (1977).
54. SACKMANN, E., TRÄUBLE, H.: *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4492—4498 (1972).
55. SEEBURG, P. H., SHINE, J., MARTIOL, J. A., BAXTER, J. D., GOODMAN, H. M.: *Nature* **270**, 486—94 (1977).
56. SHARMA, R. N., BEHAR-BANNELIER, M., ROLLESTON, F. S., MURRAY, R. K.: *J. Biol. Chem.* **253**, 2035—43 (1978).
57. SHERWOOD, L. M., BURSTEIN, Y., SCHECHTER, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3819—23 (1979).
58. SIEKEVITZ, P., PALADE, G. E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 619 (1960).
59. SKULACHEV, V. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **604**, 297—320 (1980).
60. STEINIR, D. F., QUINN, P. S., CHAN, S. J., MARSH, J., TAGER, H. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **343**, 1—16 (1980).
61. STIER, A., FINCH, S. A. E., BÖSTERLING, B.: *Febs. Lett.* **91**, 109—112 (1978).
62. STRAUSS, A. W., BENNETT, C. D., DONOKUE, A. M., RODKEY, J. A., ALBERTS, A. W.: *J. Biol. Chem.* **252**, 6846—55 (1977).
63. STRAUS, A. W., ZIMMERMANN, M., BOIME, I., ASHE, B., MUMFORD, R. A., ALBERTS, A. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4225—29 (1979).
64. STRITTMATTER, P., SPATZ, L., CORCORAN, D., ROGERS, M. J., SETLOW, B., REDLINE, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4565—69 (1974).
65. SUMPER, M., TRÄUBLE, H.: *Febs. Lett.* **30**, 29—34 (1973).
66. UNWIN, P. N. T.: *Nature* **269**, 118—22. (1977).
67. VERKLEIJ, A. J. VERVERGAERT, P. H. J. Th.: *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 303—327 (1978).
68. WALTER, P., JACKSON, R. C., MARCUS, M. M., LINGAPPA, V. R., BLOBEL, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1975—99 (1979).
69. WARREN, G., DOBBERSTEIN, B.: *Nature* **273**, 569—71 (1978).
70. ZIMMERMANN, M., ASKE, B. M., ALBERTS, A. W., PIERCHALA, P. A., POWERS, J. C., NISHINO, N., STRAUSS, A. W., MUMFORD, R. A.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **343**, 405—413 (1980).