**SEJTBIOLÓGIA**

biomérnök hallgatók számára

**Hatodik rész:**

**Jelátvitel az eukarióta szervezetben**

**Sveiczer Ákos**

ösztöndíjas kutató

**Reviczky Zsolt**

doktoráns

**Proofreading**:

Self-splicing and self-correcting

Egy frászt, én javitottam:

Novák Béla

1994. november 22.

Copyright © 1994

BME, Mezõgazdasági Kémiai Technológia Tanszék**Szignálképzés**

A sejtek információt juttatnak el a más sejtekhez. A sejt-sejt kommunikáció fõleg a többsejtû teremtmények esetében létfontosságú, bár egysejtûek is képeznek szignálokat: pl. a *Saccharomyces cerevisiae* párosodási faktora, vagy a nyálkagomba sejtjeinek aggregációja spóraképzés elõtt. (Nyílvánvaló, hogy egy adott egysejtû faj egyedei kénytelenek egymással kommunikálni, ha keverni szeretnék genetikai állományukat, vagyis ha szexuális ciklusba lépnek.) A jelrendszer kialakulása hosszú evolúció eredménye: az elsõ prokarióták 3.5 milliárd éve jelentek meg a Földön, míg az elsõ tõbbsejtû eukarióta szervezetek csak 1 milliárd éve.

**A sejtek kommunikációs rendszereinek alapvetõ elemei és 3 általános jellemzõje**

Az alapvetõ komponensek: **szignálképzõ (regulátor) sejt**, **hírvivõ (messenger) molekulák (szignálok)** és **célsejtek**. A célsejtek a felületükön lévõ receptorok segítségével értelmezik a beérkezõ jeleket - tehát a receptorok jelenléte tesz egy sejtet célsejtté. Ilymódon egy sejt az egyik jelátviteli folyamatban mint célsejt, míg egy másik kommunikációs eseményben mint szignálképzõ sejt is szerepelhet.

A sejt-sejt kommunikáció 3 általános jellemzõje:

1. Minden molekuláris messenger hasonló módon hat: vagy a célsejt felszínén, vagy annak belsejében **speciális receptor fehérjékhez kötõdnek**, és ezeken keresztûl megváltoztatják a célsejt mûködését.

2. A hormonok és hírvivõ molekulák kettõs feladatot teljesítenek:

a.) Vagy a **szervezet belsõ környezetének állandóságát** (annak **homeosztázisát**) **biztosítják** - pl. az emberi szervezet esetében állandó testhõmérséklet, nem túlságosan fluktuáló vércukorszint, nagyon pontos kalcium szint a vérben, stb. A szervezet csak állandó belsõ környezetben képes funkcionálni - pl. a vér kalcium koncentrációjának egész kismérvû csökkenése is görcsöket, majd halált okozhat.

b.) Bizonyos **irreverzibilis és ciklikus változásokat** is iniciálnak, ill. szabályoznak. Pl. az embrionális fejlõdés “levezénylése”, a rovarok metamorfózisa, vagy az évszaktól (nappalok hosszúságától) függõ változások (a növényi vegetáció adaptációja).

3. Nagyon **hasonló hírvivõ molekulák mûködnek nagyon különbözõ fejlettségi szintû szervezetekben** (pl. a hernyó - lepke metamorfózist és a humán serdülõkori változásokat nagyon hasonló, ún. szteroid hormonok iniciálják, ill. irányítják). Nyílvánvaló, hogy a természet megbecsüli egy 2,5 milliárd éves, hosszú "evolúciós projekt" csúcstermékeit.

**Az extracelluláris szignál molekulákat a célsejtek**

**specifikus receptorai ismerik fel**

A szignálképzõ sejtek által kibocsájtott szignálok kémiai szempontból lehetnek: **fehérjék** (pl. a vércukor szintet szabályozó **inzulin** - hatására a sejtek felveszik a vérben levõ glükóz molekulákat - és a **glukagon** - a glikogén depókból glükózt szabadít fel az "éhes" sejtek igényei szerint); **kis peptidek** (pl. az agyban termelõdõ, és más hormonok (hormon: görög eredetû szó, jelentése: ösztönöz, serkent, sarkall) útnak indításáért felelõs, ún. **elengedõ (releasing) faktorok**); **aminosav származékok** (pl. a stresszhelyzetekben kialakuló ún. vészreakciót okozó epinefrin és norepinefrin - régebbi nevükön **adrenalin**, ill. **noradrenalin** -, amelyek tirozin származékok); **nukleotidok**ból képzett szignálmolekulák (pl. **cAMP**, **cGMP**); **szteroidok** (pl. a **nemi hormonok**, vagy a hernyó-lepke metamorfózist iniciáló és szabályzó **ekdizon**); a gerincesek egyedfejlõdésekor kulcsszerepet játszó lokális mediátorok: **retinoidok;** **zsírsavszármazékok** (pl. a többek között simaizom összehúzódást kiváltó **prosztaglandinok** - ezek arachidonsav-származékok) és **oldott gázok** (pl. a növényi termések érését serkentõ **etilén**, vagy az értágító **NO**).

Exocitózissal vagy diffúzióval jutnak ki a **szignálképzõ sejt**bõl az intracelluláris térbe, ahol a célsejt receptora felismeri õket. Egyes **szignál molekulák** nem jutnak ki a jelképzõ sejtbõl, hanem rögzülnek a felületén, itt “tapogathatja le” a jelet a **célsejt** is (nagyon fontos mechanizmus az immun-rendszerekben).

A szignál molekulák nagyon kis koncentrációban vannak jelen a szervezetben, ill. nagyon kis koncentrációban hatnak (10-8 M), a receptoroknak ezért nagyon nagy affinitásuk kell legyen a receptorokhoz. A receptorok lehetnek transzmembrán fehérjék (sejtfelszíni receptorok), melyeket a hidrofil ligand (a szignál molekula) kötése aktívál: hatására elindul egy intracelluláris szignálkaszkád, aminek hatására a sejt megváltoztatja mûködését. Az eredeti szignál tehát ebben az esetben nem jut be a sejtbe (hidrofil molekula nem tud átmenni a membránon), hatását a receptor átteszi intracelluláris szignálokra (**másodlagos messengerekre**), amelyek aztán újabb sejtalkotókat aktíválnak. A szignálok másik csoportjának tagjai, melyek kicsik és hidrofóbok, át tudnak diffundálni a plazmamembránon, és intracelluláris receptorok ismerik fel õket. Ezenkívül újabban felfedeztek olyan kivételes szignál molekulákat is, melyek receptort sem igényelnek: kis gázmolekulák (NO, CO) képesek bediffundálni a citoplazmába, s ott közvetlenül hatnak bizonyos enzimek mûködésére (ílymódon az enzim úgy is felfogható, mint a NO különleges intracelluláris receptora).

**A jelátvitel 4 módja: parakrin, szinaptikus, endokrin**

**és réskapcsolat (gap junction)**

**Parakrin** jelközvetítés: csak közeli célsejtekre hat. A szignálokat **lokális mediátoroknak** (rövidtávú közvetítõk) hívjuk. A parakrin szignalizáció speciális esetét **autokrin** jeltovábbításnak hívjuk: a sejtek felszínén a saját maguk által kibocsájtott jeleik befogására alkalmas receptorokat is reprezentálnak, így saját aktivitásukat is serkenthetik. Ez a mechanizmus különösen alkalmas arra, hogy az azonos típusú szomszédos sejtek egy adott típusú szövetben nagyobb lokális jelkoncentrációt hozzanak létre (mindegyikük gyártja a jelet), így a sejtek nagyobb csoportja idõben majdnem teljesen egyszerre válhat elkötelezetté valamely funkcionális változásra.

Természetes, hogy a rövid hatótávolságú parakrin jelátvitel mellett nagyobb hatótávolságú jelátviteli mechanizmusok is ki kellett hogy fejlõdjenek a fejlettebb élõ rendszerekben. Ilyen típusú kommunikációt tesz lehetõvé a **szinaptikus** jelközvetítés: idegsejtek hosszú axonjaikkal távoli sejtekre hatnak. Az axonon elektromos impulzus (akciós potenciál) halad végig, s ennek hatására az axon végén molekuláris messengerek (**neurotransz-mitterek**) szabadulnak fel, amelyek a célsejt felé közvetítik az elektromos impulzus által hordozott információt. Az idegsejt fizikailag kapcsolt célsejtjével **kémiai szinapszis**on (*görög* synapsis = kapcsolat) keresztül, a jel specifikusan és gyorsan csak erre a sejtre hat. Ezen jelátvitel igen gyors és pontos (az elektromos ingerület max. terjedési sebessége az axonban akár 100 m/s is lehet, majd a kb. 100 nm széles szinapszisokon a neurotranszmitter molekulák kevesebb mint egy milliszekundum alatt kelnek át, hogy aztán a célsejt receptoraihoz kötõdjenek).

**Endokrin** jelközvetítés: az endokrin sejtek **hormon**okat küldenek a testfolyadékba (pl. véráram), ami továbbítja õket a test legkülönbözõbb részein levõ célsejtekhez. Lassú jeltovábbítási folyamat, de távolra hat.

**Réskapcsolatok (gap junctions)**: szomszédos sejtek membránjait csatornák köthetik össze, melyek közvetlen kapcsolatot létesítenek a két citoplazma között. Ezeken a réseken csak kis intracelluláris szignálok mehetnek át, nagy molekulák nem. A réskapcsolatokon keresztül zajló információcserének fõleg az embrionális fejlõdésben vagy nagy szerepe. Kimutatták, hogy az embriók sejtjei speciális “gap junction” mintázatokat váltogatnak fejlõdésük során, elõre meghatározott program szerint nyitják-zárják "ablakaikat" szomszédjaik felé.

**A messenger molekulák osztályozása a jelátvitel módja szerint**

- **Parakrin messengerek (lokál mediátorok):** rövid hatótávolság (lokális jelközvetítés).

- **Neurotranszmitterek:** az idegsejtek axon-végzõdésibõl szabadulnak ki exocitózissal, majd átdiffundálva a szinapszison a célsejt receptoraihoz kapcsolódnak. Nagyon gyors a degradáció, így gyors a jeltermináció, a célsejt nagyon hamar újabb szignált képes fogadni - ez alapvetõ követelmény pl. az izommozgások esetén.

- **Neurohormonok:** a hormon az idegsejt (neuron) axon-végzõdésébõl szabadul fel, és kerül a testfolyadékba (véráramba). A jelátvitel módja kevert: részben szinaptikus, részben endokrin.

- **Igazi hormonok:** a hormont endokrin (belsõ elválasztású) sejtek termelik és ürítik az intercelluláris térbe, majd innen diffundál a testfolyadék szállító rendszerébe.

- **Feromonok** (régebben: ektohormonok): az élõ szervezet az õt körülvevõ közegbe (levegõ, tápoldat, stb.) juttatja hírvivõ molekuláit, amelyek a közegen át jutnak el a célszervezet receptoraihoz (rovarok, gombák, algák, stb.).

**A sejtek program szerint válaszolnak jelmolekulák kombinációira**

A sejteket szignálok százai érik a környezetbõl, melyekre szelektíven kell válaszolniuk. A sejtek inkább jelcsoportokra válaszolnak, s nem egyes szignálokra. Az egyik jelcsoport pl. osztódásra késztetheti a sejtet, egy másik differenciálódásra, stb. Jellemzö, hogy egy bizonyos jelkombináció egyszerûen ahhoz kell, hogy a sejt életben maradjon. Ennek hiányában a sejt az ún. **programozott sejthalál** folyamata révén elpusztítja önmagát. Például az idegsejtek kontakt-dependensek, azaz csak akkor maradnak életben, ha axon-végzõdésük kapcsolódik valamiféle célsejthez. Annak elvesztése után - pl. foghúzás - az idegsejt elhal. Különbözõ sejtek túlélési szignál kombinációi eltérõek lehetnek, mint ahogy egy adott jelcsoport különbözõ sejtekbõl más-más választ válthat ki. Pl. az acetilkolin nevû neurotranszmitter a vázizom sejtjeit összehúzódásra készteti, ezzel szemben a szívizmot lassítja - a pulzus leesik - és az összehúzódások ereje is csökken. De az acetilkolin képes kiváltani szekréciós sejtek szekréciós aktivitását is. Mindennek két oka lehet:

1. ugyanazt a szignált különbözõ típusú sejtek eltérõ receptorokkal érzékelik;

2. a receptorok azonosak, de az intracelluláris jeltovábbítás más.

Összefoglalva: az egyszerûbb válaszreakciók mellett az alábbi esetek is lehetségesek:

1. Különbözõ szignálok, ill. szignálkombinációk - azonos típusú sejtek: különféle (többféle) válasz a sejtek részérõl.

2. Azonos szignál, ill. kombináció - különbözõ típusú sejtek: különbözõ sejt aktivitás változások.

**A belsõ szignál molekuláknak bomlékonyaknak kell lenniük**

A sejteknek nemcsak a jelekre kell gyorsan válaszolniuk, hanem jelek hiányában a választ éppoly gyorsan le is kell állítaniuk. Ennek feltétele, hogy az intracelluláris szignálokat azonnal degradálja a sejt, ha a külsõ szignál megszûnik. A szignálok **turnovere** (“forgalma”) tehát nagy kell legyen: gyorsan képzõdnek és gyorsan bomlanak. Más esetekben (pl. differenciálódás) a sejtek hosszan tartó válaszokat kell adjanak rövid szignálokra, amit speciális **sejtmemória** mechanizmusok biztosítanak, de ez a ritkább eset.

Ha a degradáció - jeltermináció - blokkolódik, a szervezet mûködésképte-lenné válhat. Pl. a szerves foszfát vegyületek egyik képviselõje, a diizopropil-fluoro-foszfát (inszekticid és harci ideggáz) blokkolja egy neurotranszmitter, az acetilkolin hidrolízisét - lebontását. Az állandó jeladás izomgörcsöket, görcsös állapotot, majd a légzõizmok funkcióképtelenné válásán keresztûl halált okozhat már mikrogrammos mennyiségben is.

**Az intracelluláris receptor szupercsalád**

Mint arról már volt szó, vannak olyan kis hidrofób szignál molekulák, melyek átjuthatnak a célsejt plazmamembránján. Néhány példa: szteroid hormonok (tesztoszteron, ösztradiol, kortizol), tiroid hormonok (tiroxin), retinoidok, vitamin D. Ezeket a molekulákat intracelluláris receptorok ismerik fel, melyek szerkezetileg hasonlóak, ún. szupercsaládot alkotnak. Valamennyiükre jellemzõ, hogy a citoplazmában várakoznak, aztán a megfelelõ jel hatására bemennek a magba, s ott közvetlenül aktiválják egyes specifikus gének transzkripcióját. Öt fontos régiójuk van:

1. a hormonkötõ régió;

2. egy régió, ahová egy inhibítor fehérje kötõdik;

3. a DNS-kötõ régió;

4. egy régió specifikus szekvenciával (**n**ukleáris **l**okalizációs **s**zignál: **NLS**), ami lehetõvé teszi, hogy a receptor bemenjen a magba;

5. egy transzkripciót aktíváló régió.

**Szignalizáció intracelluláris receptorokkal**

Alapesetben a receptor a citoplazmában úszik, és az inhibítor fehérjével komplexet alkot. Az inhibítor fehérje **lefedi az NLS-szekvenciát**, ezért a receptor **nem tud bemenni a magba**. Ha jel (hormon) érkezik a citoplazmába, a receptor megköti azt. A hormon-receptor komplex kialakulásának hatására az inhibítor fehérje leválik a receptorról, az **NLS-szekvencia szabaddá válik**, s lehetõvé válik, hogy a receptor **bemenjen a magba**. Ott DNS-kötõ régiójával hozzáköt egy olyan génhez, mely a promotere elõtt egy specifikus szekvenciával rendelkezik (képes kötni a receptort); és aktíválja a gén transzkripcióját. A receptor általában dimerként köt a DNS-hez. Van olyan receptor is (a retinoid), amelyik kicsit másképp mûködik: ligand hiányában is bemegy a magba, és a DNS-hez köt: de a gén transzkripcióját csak akkor tudja aktíválni, ha a ligand (hormon) is hozzá kötõdött.

Ezek a szignálok hosszú élettartamúak: órákig sõt napokig keringhetnek a testfolyadékban, szemben a hidrofil hormonokkal, melyek néhány perc alatt degradálódnak. Ennek oka, hogy éppen hidrofób voltuk miatt a testfolyadékban nem úszhatnak szabadon, csak egy karrier protein védõ hatása mellett, ami viszont meggátolja lebontásukat.

A hatást még tovább nyújtja, hogy az eddig tárgyalt ún. **korai (elsõdleges) válasz** után **késleltetett (másodlagos) válasz** is kialakul. Az elõször aktívált gének termékei között vannak ugyanis olyan fehérjék, melyek szintén képesek bemenni a magba, majd ott más gének transzkripcióját aktíválják.

**Sejtfelszíni receptorok**

A hidrofil szignál molekulák (neurotranszmitterek, növekedési faktorok, protein hormonok) nem juthatnak át a sejtmembránon, ezért sejtfelszíni receptorok kötik meg õket. A ligand hatására a receptor a külsõ (extracelluláris) jelet valamilyen belsõ (intracelluláris) jellé konvertálja, ezt a folyamatot **szignál transzdukció**nak (jelátvitelnek) hívjuk.

A sejtfelszíni receptoroknak 3 típusuk ismert:

1. ion-csatornához kapcsolt receptorok,

2. G-proteinhez kapcsolt receptorok,

3. enzim-kapcsolt receptorok.

**Ion-csatornához kapcsolt receptorok** mûködnek a szinaptikus kapcsolatoknál: a célsejt receptora egy ion-csatorna, ami kinyílik a neurotranszmitter kötésének hatására, ez pedig a membrán depolarizálódását okozza. Homológ receptorok: a membránt sokszor átszelõ transzmembrán proteinek.

A **G-proteinhez kapcsolt receptorok** közvetve szabályozzák egy másik membránfehérje (enzim vagy ion-csatorna) aktivitását. A közvetítõ molekula egy harmadik fehérje, a **trimer GTP-kötõ protein (G-protein).** Ezek a receptorok hétszer szelik át a membránt, homológok.

Az **enzim-kapcsolt receptorok** vagy maguk rendelkeznek enzimaktivitással vagy enzimek asszociálódnak hozzájuk. Bármelyik esetrõl van is szó, az enzim csak akkor lesz aktív, ha a receptorhoz ligand (jel) érkezik. Ezek a receptorok heterogének, bár nagy többségük protein-kináz vagy azzal asszociált receptor. Sok közülük egyszer szeli át a membránt, a ligand-kötõ része a sejt külsõ felszínén található, a katalitikus aktivitású része pedig a membrán belsõ oldalán.

**Az aktívált sejtfelszíni proteinek fehérjék foszforilációját**

**indítják el a citoplazmában**

A szignalizációs utak zöménél a receptor által transzdukált **jel végsõ célpontja a sejtmag**, ahol bizonyos gének transzkripcióját kell szabályoznia (erre már láttunk példát az intracelluláris receptoroknál). A másik lehetõség, hogy egyszerûen egy **enzim aktiválása a végcél**. A jel intracelluláris fehérjék hálózatán keresztül juthat el a célba. Ezek olyan enzimfehérjék, amelyek protein kinázok hatására foszforilezõdnek, ha jel érkezik a sejtbe, és foszfatázok hatására defoszforilezõdnek, ha a jel lecseng. A foszforiláció aktíválja az enzimet, ami továbbadja a jelet. Jellemzõen maga a foszforilált enzim is egy **protein kináz**, ami most aktív állapotban foszforilál egy másik protein kinázt, és így tovább. A jel tehát egy **foszforilációs kaszkádon** áramlik végig. A kaszkádban lehetnek GTP-kötõ fehérjék is, nemcsak protein kinázok. Ezek akkor inaktívak, ha GDP-t kötnek, s úgy aktíválódnak, hogy a GDP-t GTP-re cserélik. Végsõ soron ez is egy foszforilációs lépés.

A protein kinázoknak két típusa ismert: a szerin/treonin kinázok és a tirozin kinázok, aszerint hogy a fehérjék melyik aminosav oldalláncait képesek foszforilezni.

A sejtet számos szignál éri, és mindegyik elindít egy foszforilációs kaszkádot. A sejtnek integrálnia kell ezeket a jeleket, és eldöntenie, hogy milyen választ adjon. Ennek módja, hogy **a kaszkádok különbözõ pontokon összefutnak**. Pl. tegyük fel, hogy van egy olyan enzim, ami csak akkor lesz aktív, ha két helyen is foszforilezõdik, és ezt a két lépést csak két külön kaszkád képes elvégezni. A jel csak akkor megy innen tovább downstream irányba, ha mindkét kaszkád aktív, tehát kétféle külsõ inger érte a sejtet.

**A G-proteinhez kapcsolt receptorok jellemzése**

A G-proteinek és receptoraik óriási jelentõségét bizonyítja, hogy felfedezõik, Martin Rodbell és Alfred Gilman 1994-ben orvosi Nobel-díjat kaptak munkájuk elismeréseként.

A G-proteinhez kapcsolt receptorok nagyon sokféle jelmolekulát felfoghatnak: hormonokat, neurotranszmittereket és lokál mediátorokat egyaránt, melyek kémiailag is nagyon változatosak lehetnek: fehérjék, kis peptidek, aminosavak és zsírsavszármazékok. Egy jelmolekula is többféle receptort aktíválhat, pl. az adrenalinnak legalább 9 különbözõ receptora van. A receptorok ennek ellenére homológok: a membránt hétszer átszelõ fehérjék. Az extracelluláris térben található a ligandkötõ régiójuk, a citoplazmába nyúló rész pedig a G-protein kötéséért felelõs.

**A G-protein receptoroktól a jelet a G-proteinek viszik tovább**

A G-proteinek **trimer szerkezetû GTP-kötõ proteinek**. Szerepük a szignál átvitele a receptorról valamilyen membránasszociált enzimre, ami másodlagos messengereket gyárt. A G-proteinek GDP-t vagy GTP-t köthetnek, akkor aktívak, ha GTP-t kötnek. Aktív állapotban képesek a szignál továbbítására, ilyenkor eldiffundálhatnak a receptortól. Azonban GTP-áz aktivitással is rendelkeznek, azaz képesek aktív állapotban elhidrolizálni saját kötött GTP-jüket, s ezzel inaktíválják magukat. Így ha megszûnik a külsõ jel, belül is gyorsan leáll annak továbbítása.

A G-proteinek 3 alegysége közül kettõ, **a  és a , erõs komplexet képeznek**, és a plazmamembrán belsõ oldalához **rögzülnek**. A harmadik alegység (****) rendelkezik a **GTP-kötõ és hidrolizáló aktivitás**sal, és képes **disszociál**ni a másik két alegység komplexérõl.

Alapállapotban a trimer együtt van és GDP-t köt. Ha a membránban diffundálva találkozik egy liganddal aktívált receptorral, akkor hozzáköt. A receptort a ligand allosztérikusan szabályozza, ezért a G-protein szabad receptorhoz nem kötõdhet, csak liganddal aktíválthoz. **Ha a G-protein a ligand-kötött receptorhoz kapcsolódik**, lecsökken affinitása a GDP-hez, és megnõ affinitása a GTP-hez, ami azt eredményezi, hogy elengedi a GDP-t, és helyette GTP-t vesz fel. Ekkor **szabaddá válik az  alegység a GTP-vel**, és képessé válik **célenzimének aktíválás**ára egészen addig, amíg el nem hidrolizálja saját GTP-jét. Akkor inaktívvá válik az  alegység (mivel most már GDP-t köt), és visszamegy a  komplexhez: újra összeáll az inaktív trimer.

**Egyes G-protein receptorok az adenilát-ciklázt aktíválják**

A G-proteinek egyik csoportja az **adenilát-cikláz** nevû enzimet stimulálja, ezek a Gs-proteinek. Az **adenilát-cikláz** pirofoszfát kihasadása mellett elhidrolizálja az ATP-t, de közben egy új észterkötést alakít ki: nem "közönséges" AMP, hanem **ciklikus AMP (cAMP)** lesz a termék. Ezen jelszignalizációs úton a cAMP másodlagos messengerként funkcionál: aktíválja a “downstream” enzimeket. A cAMP normális szintje nagyon alacsony (10-7 M), és hormonális hatásra másodpercek alatt ötszörösére növekedhet. Gyors turnoveréhez a degradációt a **cAMP-foszfodiészteráz** katalizálja, ez az enzim a cAMP-t AMP-vé alakítja.

A specifitás a receptoron múlik: milyen ligandot és G-proteint köt. Tipikus példa a fenti rendszerre a -adrenerg receptor, ami **adrenalin**t köt az extracelluláris térbõl, és Gs-proteint a membrán belsõ oldalán.

Ezen a szinten fejti ki hatását a **kolera toxin**. Ez egy enzim, ami NAD-ról ADP-ribózt szállít a Gs-protein  alegységére (s). Ennek hatására az s alegység elveszti GTP hidrolizáló aktivitását, és irreverzibilisen aktív marad a külsõ jel megszûnése után is. A cAMP szintje tartósan magas lesz, s ez a bélhámsejteket állandó víz- és Na+-ürítésre készteti, ami súlyos hasmenéshez vezet, a beteg szinte kiszárad.

 **Egyes G-protein receptorok az adenilát-ciklázt inaktíválják**

A G-proteinek egy másik csoportja az adenilát-ciklázt inaktíválja, ezek a Gi-proteinek. Ezek  alegysége (i) nem stimulálja, hanem ellenkezõleg, inaktívvá teszi az adenilát-ciklázt. Másik hatása: a plazmamembrán K+- csatornáit kinyitja.

Az elõzõekben volt szó az adrenalinról. Ez a hormon éppúgy kiválthatja a cAMP szint csökkenését, mint növekedését. Ha ugyanis a - helyett az 2- adrenerg receptorhoz köt, utóbbi a Gi-proteinen keresztül csökkenteni fogja a cAMP szintet.

Szemben a kolera toxinnal a **pertussis toxin** nem az s, hanem az i alegységet ADP-ribozilálja. Az ilyen Gi-fehérje nem tud kapcsolódni receptorával, és nem tudja továbbítani a jelet. Ezt a betegséget szamárköhögésnek (pertussis) hívjuk.

**A cAMP aktíválja a cAMP-dependens protein kinázt**

Hogyan hat a cAMP, mint másodlagos messenger? Legfontosabb szerepe a **cAMP-dependens protein kináz (A-kináz)** aktíválása. Ez egy szerin/treonin kináz, négy alegységbõl áll inaktív alakban. Ebbõl két alegység katalitikus (de most inaktív), a másik kettõ pedig regulációs. A regulációs alegységek õsszesen 4 molekula cAMP-t tudnak megkötni, s ekkor a katalitikus alegységek allosztérikusan aktíválódnak, és ledisszociálnak a tetramerrõl. Az aktív A-kináz pedig foszforilációs kaszkádokat indít el.

Egy példa: adrenalin hatására izomsejtekben miért nõ meg a metabolikus aktivitás? A glükóz polimerként (glikogén) raktározódik. A **glikogén foszforiláz** foszforilálja a glikogén terminális monomerjét, s glükóz-1-foszfát egységek lehasadása mellett a glikogén degradálódik. A glükóz-1-foszfát ismert úton belép a glikolízisbe. Hogyan hat erre az adrenalin? Azt már tudjuk, hogy ha -adrenerg receptorhoz köt, akkor megnöveli a cAMP szintet. A magas cAMP szint aktíválja az A-kinázt, ami kétlépéses kaszkáddal aktíválja a glikogén foszforilázt: közvetlenül a foszforiláz kinázt aktíválja foszforilezéssel, az pedig a glikogén foszforilázt. Az A-kináz ugyanakkor közvetlenül foszforilezi a glikogén szintázt, amit ezzel inaktívál. A glikolízist tehát két oldalról serkenti az A-kináz: elõsegíti a glikogén lebomlását, s ugyanakkor gátolja szintézisét.

**A szerin/treonin foszfatázok jelentõsége**

Ahhoz hogy a sejtek gyorsan reagáljanak a környezet változó hatásaira (jeleire), fontos, hogy a cAMP szint csökkenése esetén gyorsan defoszforilálják a korábban az A-kináz által foszforilált proteineket. Ezt a feladatot a protein foszfatáz I látja el, egy szerin/treonin foszfatáz. Az aktivitása egy tetszõleges foszforilációval szabályozott fehérjének mindig kinázok és foszfatázok aktivitásának pillanatnyi egyensúlyától függ. A foszfatázok aktivitása éppúgy lehet regulált, mint a kinázoké. Az aktív A-kináz úgy teszi még drámaibbá adrenalin hatására a glükóz metabolizmusra kifejtett hatását, hogy foszforilációval aktívál egy inhibítor proteint, ami éppen a foszfatáz I-et inaktíválja úgy, hogy hozzáköt. A kináz tehát közvetve gátolja saját antagonistáját, a foszfatázt.

**Az extracelluláris szignálokat sokszorosukra erõsítik az intracelluláris mediátorok és az enzimatikus kaszkádok**

Említettük, hogy az extracelluláris szignálok nagyon alacsony koncentrációban hatnak, a sejtnek tehát a jelet fel kell erõsítenie. Nézzük meg a Gs-protein receptor példáján, hogy ez miként is történik. Egy szignál molekula (pl. adrenalin) csak egy receptort aktíválhat egyszerre. Ha a ligand elég hosszú ideig kötve marad a receptoron, az képes számos Gs-proteint aktíválni: ez az elsõ erõsítõ lépés. Egy Gs-protein csak egy adenilát-ciklázt aktívál, de az aktív cikláz sok cAMP-t tud készíteni: második erõsítés. Két cAMP molekula egy A-kinázt tud aktíválni (kis mérvû gyengítés), de az aktív A-kináz számos célenzimet tud foszforilezni: ez az erõsítés harmadik szintje. A célenzim pedig a negyedik erõsítést végzi, hiszen amíg aktív, számos molekula végterméket állíthat elõ.

A nagyfokú erõsítést és gyors válaszadást gyakran **pozitív visszacsatolás**os mechanizmusok biztosítják.

**A Ca2+, mint intracelluláris szignál**

Ahhoz, hogy a sejt a Ca2+-t másodlagos messengerként hasznosíthassa, alapvetõen alacsonyan kell tartsa koncentrációját. Ez meg is valósul: az intracelluláris koncentráció 10-7 M, míg az extracelluláris 10-3 M. Ehhez a sejt olyan mechanizmusokkal rendelkezik, melyek segítségével vagy a plazmamembránon át az extracelluláris térbe pumpálja a Ca2+-t, vagy pedig a sejten belül bizonyos organellumok vagy molekulák megkötik azt. Az alábbiakban felsoroljuk a sejtek által használt mechanizmusokat:

1. A plazmamembránban **Ca2+-ATP-áz**ok mûködnek: ATP hidrolízisének terhére kihajtják a Ca2+-t a sejtbõl.

2. Egyes sejtek **Na+-Ca2+-antiport** fehérjékkel is rendelkeznek membránjukban: a Na+ beáramlik a sejtbe, a Ca2+ pedig ki.

3. Az endoplazmás retikulum membránjában is mûködnek Ca2+-ATP-ázok: a sejt az **ER-ben raktározza** a Ca2+-t.

4. Ha a sejt megsérül, és extrém mértékben megemelkedik a Ca2+ szint, akkor a **mitokondrium** is felveszi aktív transzporttal a Ca2+-t.

5. Ca2+-kötõ molekulák is vannak a citoplazmában, melyek csökkentik a szabad Ca2+ szintet, legismertebb példájuk a **kalmodulin**.

Hogyan nõ meg a sejtek Ca2+ szintje szignál hatására? Ennek két útja van:

1. Idegsejtek végén feszültség függõ Ca2+-csatornák vannak, melyek kinyílnak, ha a membrán depolarizálódik akciós potenciál hatására.

2. Az ER-bõl extracelluláris szignál hatására a Ca2+ kiáramlik a citoplazmába. Ennek mechanizmusát a következõkben tárgyaljuk.

**Egyes G-protein receptorok a foszfolipáz C-t aktíválják**

A G-proteinek egy családja, a **Gq-proteinek** nem az adenilát-ciklázra hatnak, hanem egy másik membránkötött enzimet aktíválnak, a **foszfolipáz C-**t. A specifitásért itt is a receptor felel: pl. az izomsejtek acetilkolin receptorai Gq-proteineket kötnek. A foszfolipáz C katalizálja egy minor membránlipid, a **foszfatidilinozitol-difoszfát (PIP2)** hidrolízisét, ami a membrán belsõ rétegében fordul elõ. A hidrolízis eredménye két intracelluláris mediátor: az **inozitol-trifoszfát (IP3)** és a **diacilglicerol (DAG).**

Az IP3 vízoldható molekula, ledisszociál a membránról, és az ER membránján specifikus receptorhoz köt, ami egy **IP3-függõ Ca2+-csatorna**. A ligand kötésére a csatorna kinyit, és a Ca2+ a citoszolba áramlik. A kiáramló Ca2+ pozitív visszacsatolással növeli saját transzportját. Az IP3 gyors turnoverét foszfatázok és kinázok együtt biztosítják, mûködésük eredményeként IP, IP2 és IP4 is keletkezik, melyek mind inaktívak.

Az IP3-mal szemben a DAG a membránban marad, és a **szerin/treonin protein kináz C-t (C-kináz)** aktíválja. Ez az enzim Ca2+-függõ, az IP3 hatására emelkedõ Ca2+ szint hatására megy inaktív formában a membránhoz, ahol a DAG hatására aktíválódik. A C-kináz elindít egy foszforilációs kaszkádot, amely végül a **MAP-kináz**t aktíválja, s így a szignál a génexpresszióra hat. A MAP kinázra késõbb még visszatérünk.

**A Ca2+ szignál további útja**

A megemelkedett Ca2+ szintet a fentebb említett **kalmodulin** nyeli el. Ez egy roppant konzervatív fehérje, tk. intracelluláris Ca2+-receptor, ami allosztérikusan aktíválódik, ha Ca2+ köt hozzá. A **Ca2+/kalmodulin komplex**nek nincs enzimaktivitása, de más fehérjékhez képes kötõdni, s további konformáció változások révén azokat regulálni. A komplex aktíválja pl. a Ca2+-ATP-ázt, s ezzel lecsökkenti saját koncentrációját (turnover).
Másik fontos szerepe a **Ca2+/kalmodulin függõ szerin/treonin protein kinázok (CaM-kinázok)** aktíválása. A CaM-kinázok számos fehérjét foszforileznek, és ún. **molekuláris memória**ként funkcionálnak: aktívak maradhatnak tovább is, mint ameddig a Ca2+ szint magas. Erre az ad lehetõséget, hogy a Ca2+/kalmodulinnal aktívált kináz saját magát foszforilezi (**autofoszforiláció**), s ezáltal még aktívabbá válik. Ha lecsökken a Ca2+ szint a citoplazmában, akkor a Ca2+ és a kalmodulin leválnak ugyan a komplexrõl, de a kináz továbbra is aktív marad az autofoszforiláció révén, bár gyengébb aktivitással. A CaM-kinázt megfelelõ foszfatázok tehetik csak teljesen inaktívvá.

**Kölcsönhatások a cAMP és a Ca2+ szignálok között**

A két út számos ponton hat egymásra, pl. az A-kináz aktívál Ca2+-csatornákat, a cAMP-foszfodiészterázt pedig a Ca2+/kalmodulin komplex regulálja. Egy szép példa a kölcsönhatásra a glikogén metabolizmusnál említett **foszforiláz kináz**. Az enzimnek négy alegysége van: ebbõl kettõt az A-kináz aktívál, a harmadik felel a kináz aktivitásért, a negyedik pedig kalmodulin (!). Ily módon nemcsak az adrenalin hatására nõ az izomsejtben a glikolitikus fluxus, hanem Ca2+ hatására is. Ez azért fontos, mert a Ca2+ szignál váltja ki az izom kontrakcióját, ami energiaigényes folyamat. A sejt mozgósítja metabolizmusát, hogy energiát termeljen az izommûködéshez.

**Enzim-kapcsolt sejtfelszíni receptorok**

Ezek olyan sejtfelszíni receptorok, melyek a plazmamembránt egyszer szelik csak át. A membrán külsõ oldalán megkötik a ligandot (akár a G-protein receptorok), de a membrán belsõ oldalán található egy katalitikus aktivitású régiójuk is (tehát a receptor egyben enzim is), vagy pedig asszociálnak egy enzimmel.

Az enzim kapcsolt receptoroknak 5 típusuk ismert:

1. **Guanilát-cikláz receptorok.** Közvetlen enzimaktivitásuk van, az adenilát-ciklázhoz hasonlóan mûködnek: GTP-bõl cGMP-t állítanak elõ, ami másodlagos messengerként funkcionál.

2. **Tirozin kináz receptorok**. Egyes intracelluláris fehérjéket specifikus Tyr oldalláncaikon közvetlenül foszforileznek.

3. **Tirozin kináz asszociált receptorok**. Az elõzõtõl abban különböznek, hogy a receptoroknak nincs közvetlen aktivitásuk, hanem a tirozin kináz asszociál velük.

4. **Tirozin foszfatáz receptorok**. Egyes intracelluláris fehérjék specifikus Tyr oldalláncairól közvetlenül lehidrolizálják a foszfát csoportot.

5. **Szerin/treonin kináz receptorok**. Egyes intracelluláris fehérjéket specifikus Ser/Thr oldalláncaikon közvetlenül foszforileznek.

**A tirozin kináz receptorok**

Ide tartozik a legtöbb **növekedési faktor** (pl. epidermális növekedési faktor: **EGF**) receptora, de az **inzulin** receptor is. Hat alcsaládba sorolják ezen receptorokat. Érdekes kérdés, hogy ha a ligand a receptor extracelluláris régiójához köt, hogyan aktíválódik az intracelluláris régióban a kináz? A ligand dimerizálja a receptort (gyakran úgy, hogy maga a ligand dimer szerkezetû); és amint a két receptor dimerré összeáll, a két intracelluláris régió egymást képes foszforilezni (**autofoszforiláció**). Az autofoszforilált kináz pedig nagy affinitással megköt bizonyos intracelluláris proteineket, melyeket foszforilezéssel aktívál. A különbözõ receptorok különbözõ fehérjéket képesek megkötni, ezáltal különbözõ kaszkádokat indítanak el, s így a különbözõ külsõ jelek eltérõ választ indukálnak a sejtben. A foszfotirozin régióit a receptornak csak speciális intracelluláris proteinek (pl. a továbbiakban tárgyalandó GAP) ismerik fel, melyek specifikus régiókat tartalmaznak (ún. SH2-doméneket).

**A tirozin kináz receptorok a Ras proteineket aktíválják**

A **Ras proteinek** egy nagy szupercsaládot alkotnak, és valamennyien **monomer GTP-kötõ proteinek** (v. ö.: a G-proteinek trimer GTP-kötõ proteinek). Akár a G-proteinek, ezek is megkötik a GTP-t (ekkor aktívak), vagy a GDP-t (ekkor inaktívak). Aktív állapotban képesek GTP-áz aktivitásuk révén saját kötött GTP-jüket elhidrolizálni, s így önmagukat inaktíválják. Hasonlóságuk miatt **kis G-proteinek**nek is nevezik õket. A Ras proteint inaktíválja a **GTP-áz aktíváló protein (GAP),** mert elhidrolizálja GTP-jét, és aktíválja a **guanin nukleozid elengedõ (releasing) protein (GNRP),** mert GDP-jét GTP-re cseréli. Mind a GAP, mind a GNRP a tirozin kináz receptor szabályozása alatt áll: ha a receptort a megfelelõ növekedési faktor aktíválja, akkor válik a Ras is aktívvá, egyébként a Ras inaktív.

A Ras proteinek jelentõsége óriási: aktív állapotban egy olyan **foszforilációs kaszkád**ot indítanak el, ami végül a sejtmagban olyan választ indukál, hogy **a sejt elosztódik vagy differenciálódik.** Ha a Ras protein génjében (*ras*) egy olyan mutáció történik, hogy a Ras hiperaktívvá válik, a sejt olyankor is el fog osztódni, amikor erre külsõ jelet nem kap. Ilyen mutációt könnyû elképzelni, hiszen elég, ha a Ras protein elveszti GTP-áz aktivitását, s máris nem tudja kikapcsolni önmagát. A *ras* gén tehát ún. **proto-onkogén**, mutációja **onkogén**t eredményezhet. A humán rákot mintegy 30%-ban ilyen mutáció eredményezi. Természetesen nemcsak a Ras, hanem a szignalizációs utak más fehérjéi is okozhatnak rákot, ha mutáció során hiperaktívvá válnak.

**A Ras proteinek a MAP-kinázon keresztül hatnak bizonyos gének expressziójára**

A tirozin kináz receptor által aktívált Ras protein nagyon rövid ideig marad csak aktív. A receptort a tirozin foszfatázok, a Rast saját GTP-áz aktivitása gyorsan inaktíválja. A Ras azonban elindít egy szerin/treonin foszforilációs kaszkádot, ami tovább aktív marad. Ahhoz ugyanis, hogy a sejt elosztódjon vagy differenciálódjon, mindenképp tartós jelre van szükség. A kaszkád egyik tagjának kiemelt szerepe van: ez a **mitogén aktívált protein (MAP) kináz**. Teljes aktíválásához egy treonin és egy tirozin oldalláncának is foszforilezõdnie kell. A kaszkádban elõtte lévõ **MAP-kináz-kináz** képes mindkét foszforilációt katalizálni. Az õt aktíváló kinázt pedig a Ras aktíválja vagy pedig a C-kináz: így találkozik a G-protein kapcsolt és az enzim kapcsolt szignalizáció.

Milyen hatása van a sejtben az aktív MAP-kináznak? Azon túl, hogy számos proteint (köztük újabb kinázokat) foszforilál, be tud menni a sejtmagba, és ott génregulációs proteineket foszforilál (génexpressziót szabályoz). Olyan géneket aktívál, melyek termékei a sejtet osztódásra vagy differenciálódásra késztetik. A MAP-kináz hatására nyugalmi (ún. G0-fázisú) sejtek bekerülnek a sejtosztódási ciklusba: a G0/S átmenet szabályozása eltér a sejtciklus G1/S átmenetének szabályozásától.