

# Transzporterek vizsgálata membránokban

2021. április 27.

Sarkadi Balázs

ELKH-TTK, SE Biofizika, Budapest



A sejtekben: Mindenütt membránok!

Az előadás tartalma:

- Membrántranszport fehérjék – típusok, lipid-kapcsolatok
- Membrán-utazás (trafficking) a sejtekben
- Transzporter fehérjék beépülése membránokba
- Membránfehérjék szerkezete és rekonstitúciója lipid környezetbe
- ABC membrán transzporterek
- Membrán toxinok - mesterséges membrán komplexek

# Membrántranszport fehérjék – típusok, lipid-kapcsolatok

## A membránok szerkezete – membrán modellek

1925: E. Gorter and G. Grendel - phospholipid bilayer

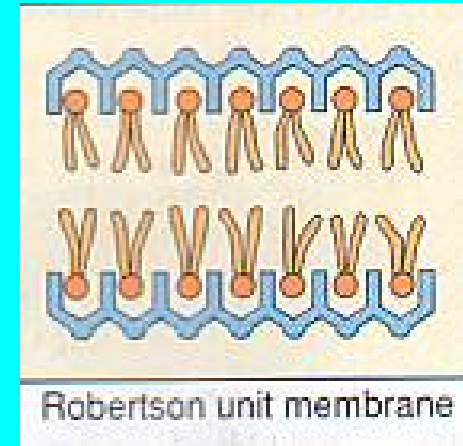
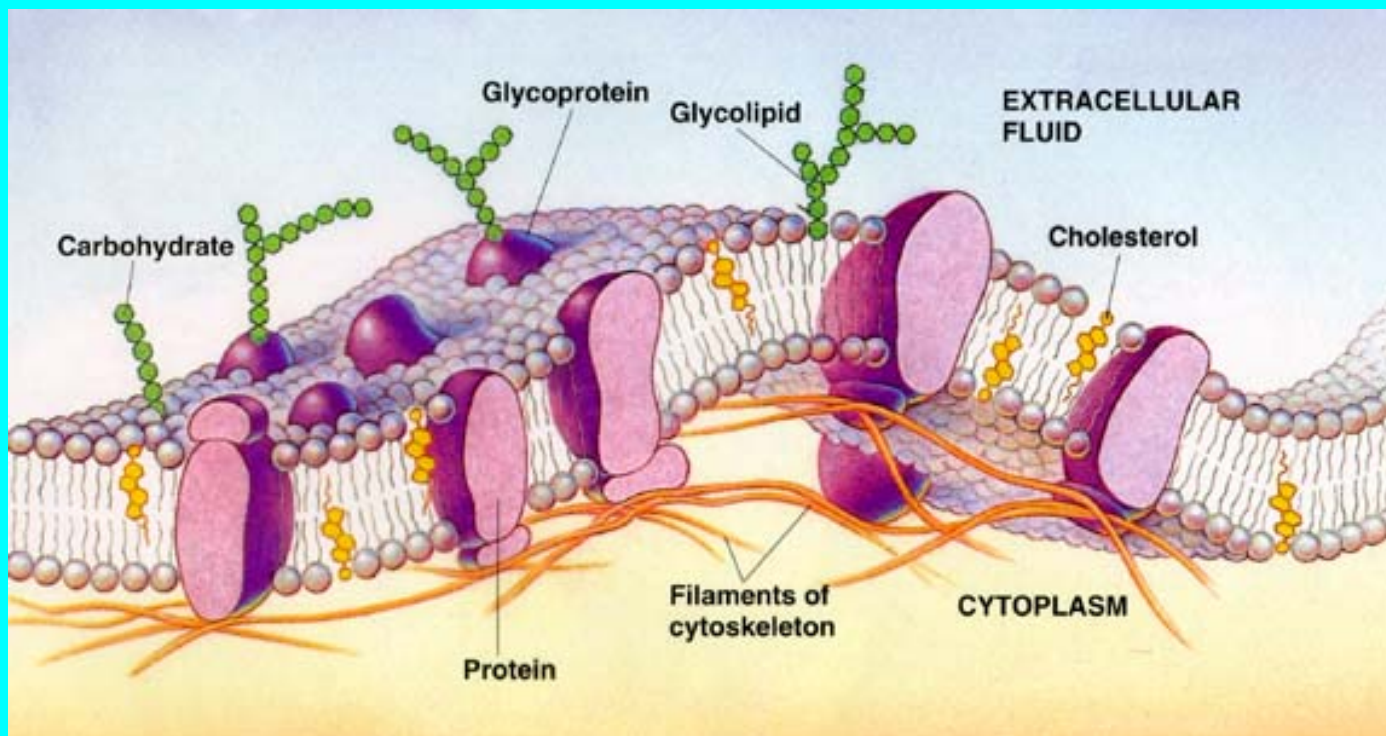
1935: J.R. Danielli and H. Davson – fehérjék is részei!

### **Sandwich Model**

1950's: J.D. Robertson – **Unit Membrane Model**

1972: S.J. Singer and G.L. Nicolson – **Fluid Mosaic Model**

Singer – Nicolson, 1972



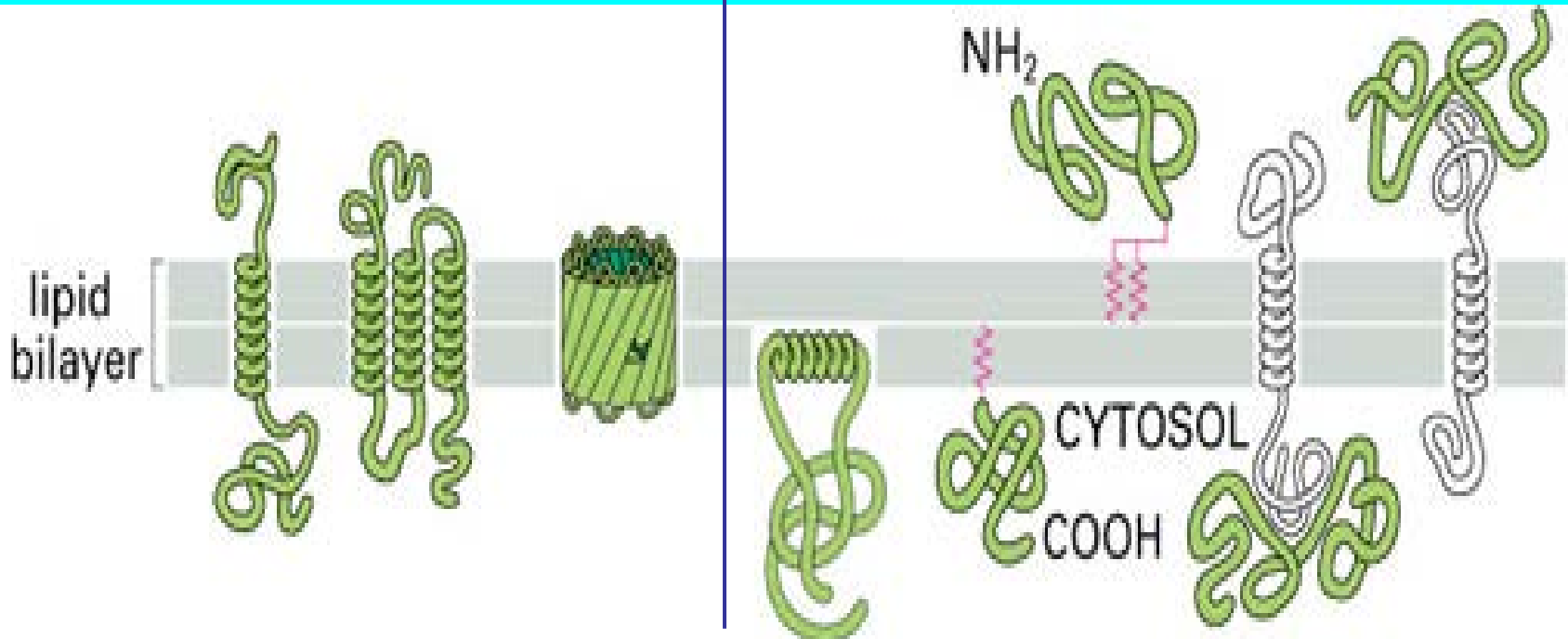
A folyékony mozaik  
sejtmembrán sémás  
ábrája

# A membránfehérjék fő típusai

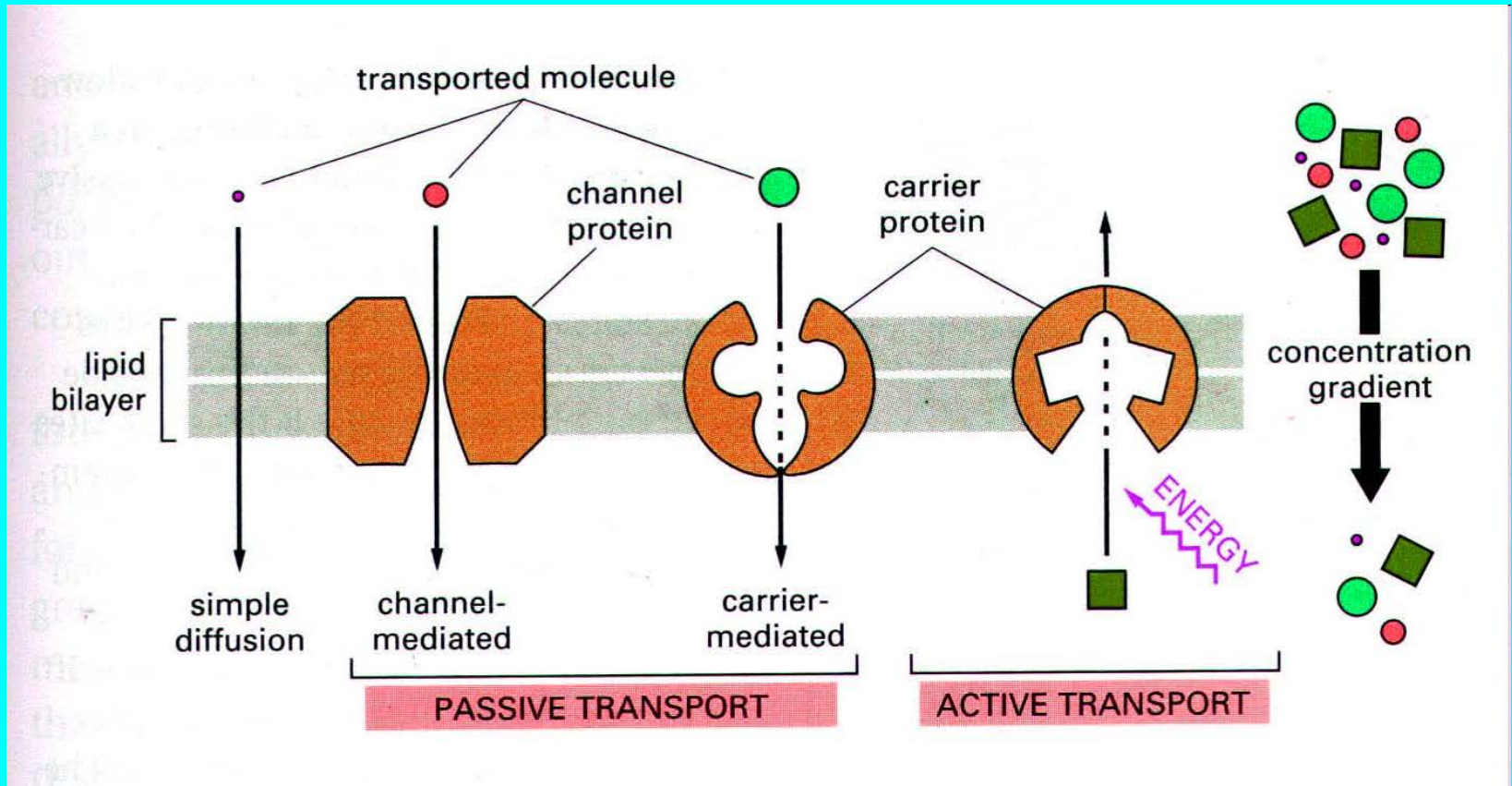
## Transzmembrán (intergráns)

Single-pass    Multi-pass  
membránfehérjék

## Membrán-asszociált (perifériás) membránfehérjék



# A membrántranszporterek főbb típusai

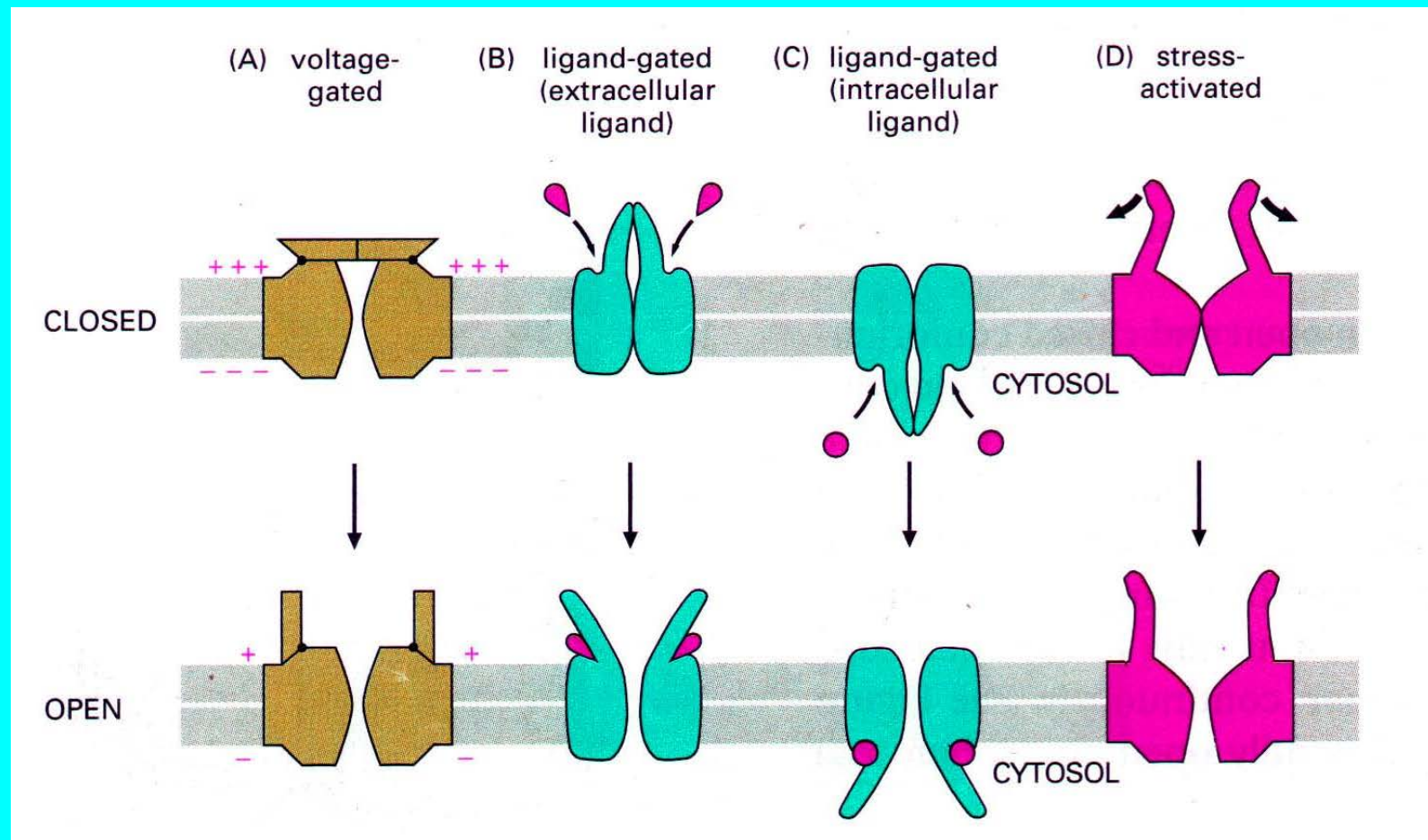


A **passzív transzportfolyamatok** között szokás említeni a diffúziót, a membrán-csatornákon át történő, és az ún. carrier-mediált, azaz a membránfehérjék részvételével történő anyagáramlást. Ezek a transzportok a magasabb anyagkoncentrációtól az alacsonyabb koncentráció irányában történnek.

**Aktív transzport esetében**, a sejt energiabefektetése révén fordított irányú transzport is lehetséges.

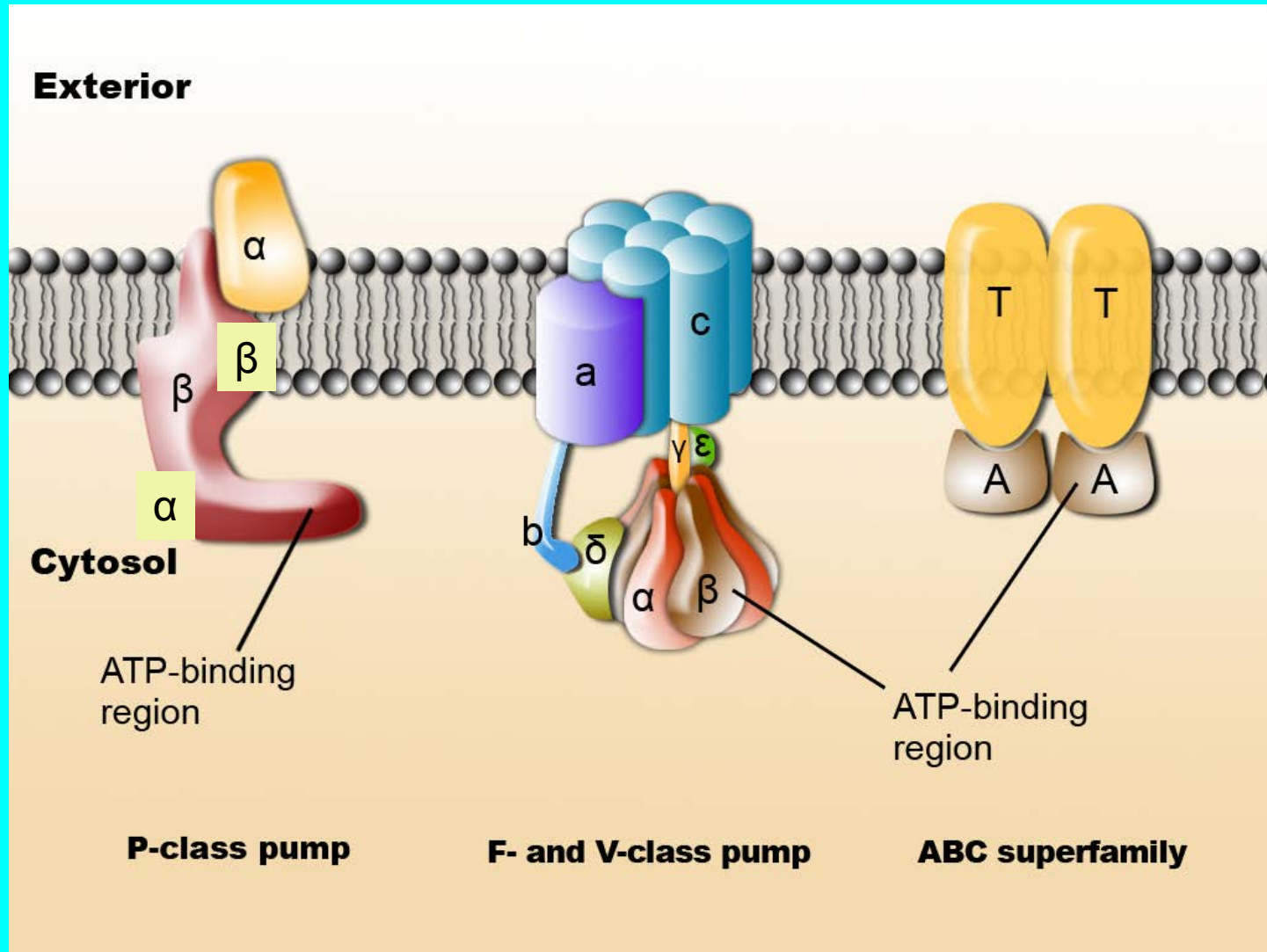


# Az ioncsatornák főbb típusai



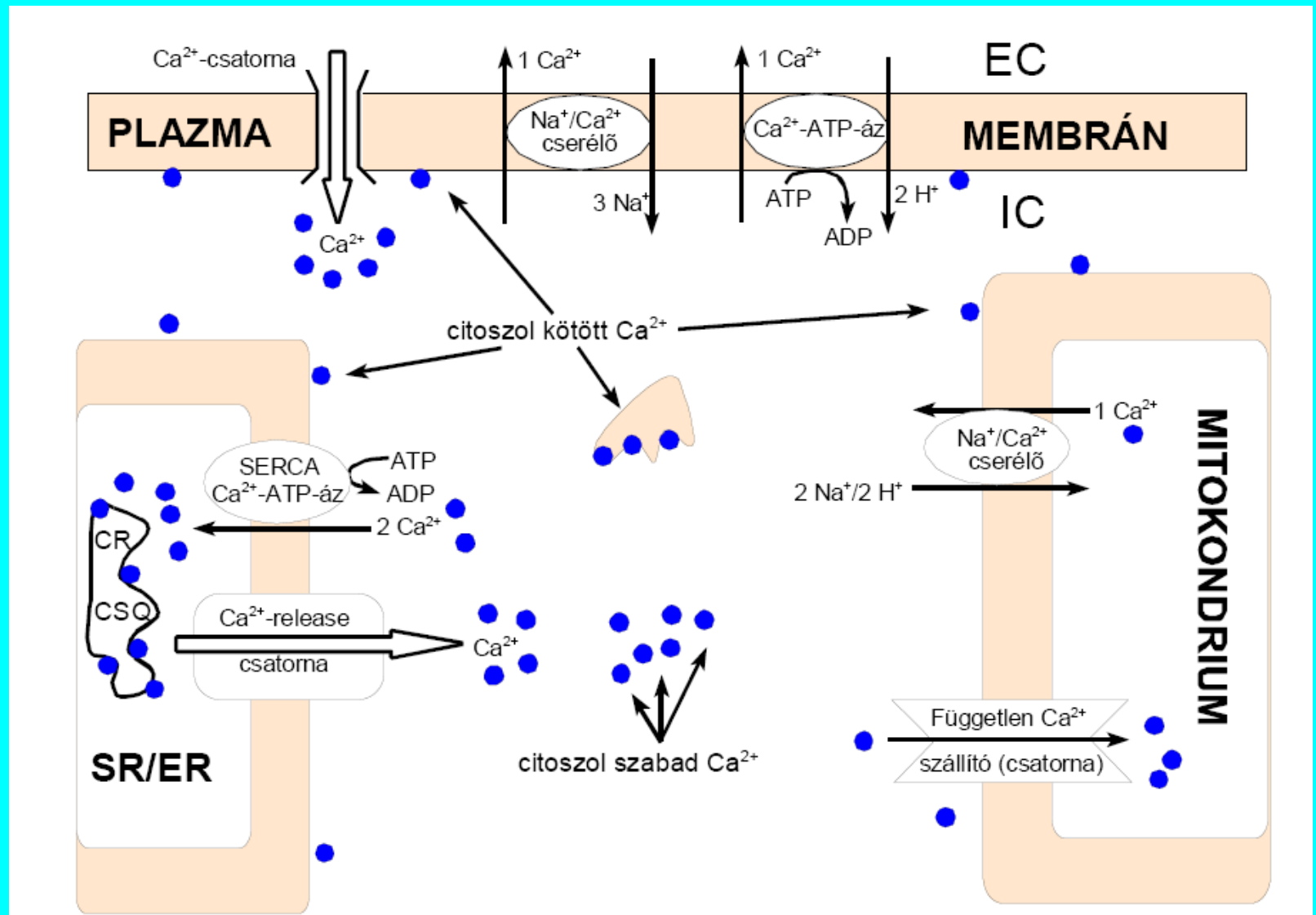
Az **ioncsatornáknak** számos formája, működési mechanizmusa ismert. A **feszültségfüggő** csatornákat a membránpotenciál változása nyitja vagy zárja. Számos ioncsatorna extracelluláris (pl. hormonok) vagy intracelluláris (pl. cAMP vagy kalcium ionok) **ligandok** hatására aktiválódik. Ismertek közvetlenül **mechanikus** hatásokra aktiválódó ioncsatornák is.

# A transzport ATPázok alaptípusai



A P-típusú ATPázok az ATP-vel időlegesen foszforilálódnak. A V (vezikuláris) ATPázok több alegységből felépülve ATP hidrolízisre, de szintézisre is képesek. Az ABC transzporterek két nagy transzmembrán domént és két ATP-kötő domént tartalmaznak.

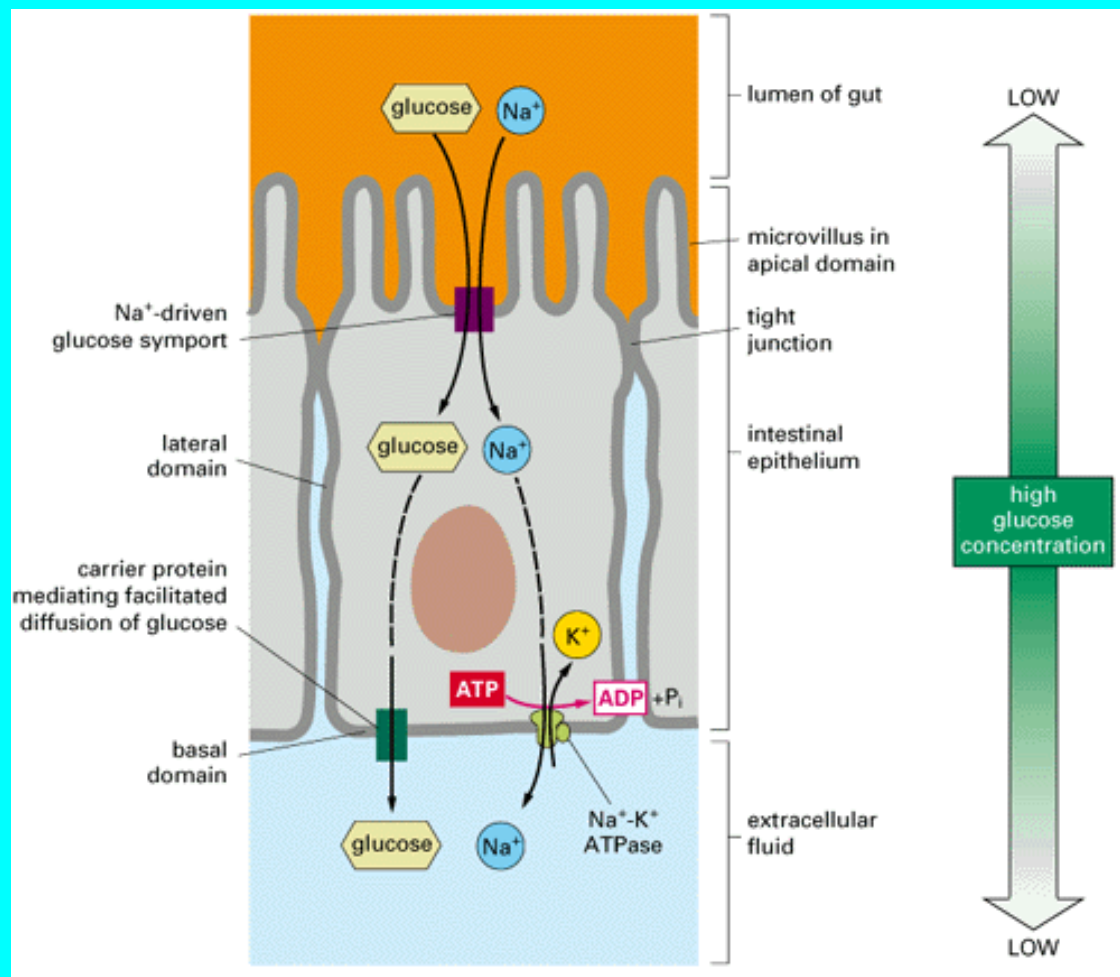
# Kalcium transzporterek a sejtben



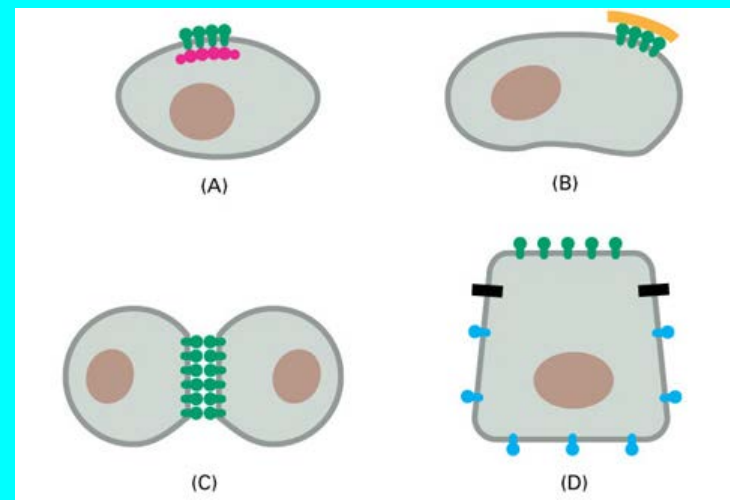
A sejtben belüli igen alacsony kalciumion koncentráció számos transzportfolyamattal szabályozott.

# A membrán-transzporterek elhelyezkedése a sejtekben

Polarizált sejtekben az egyes transzporterek speciális lokalizációban találhatók!

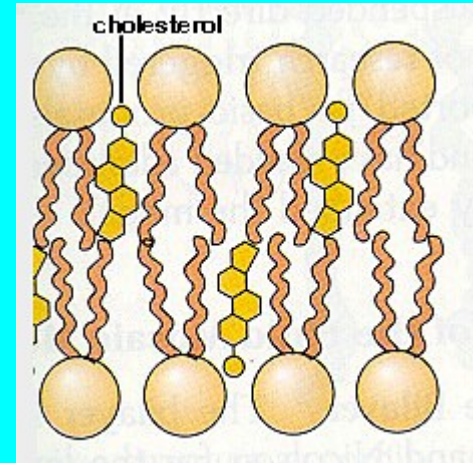
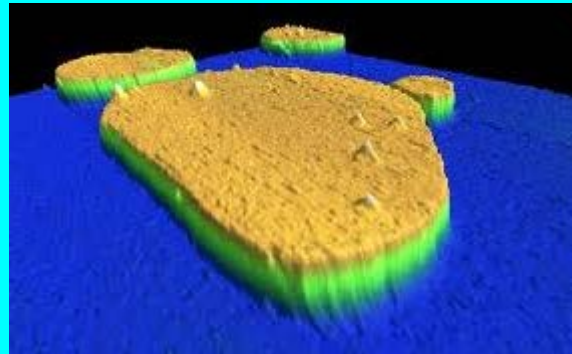
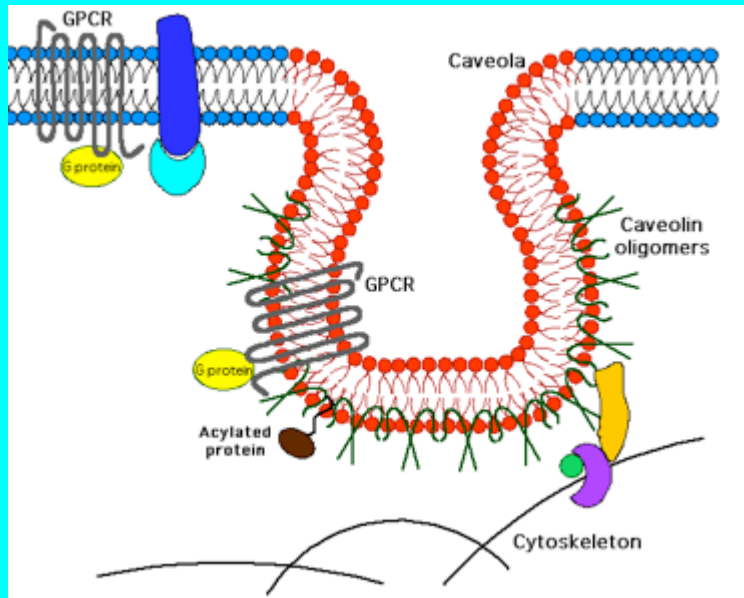


Fehérjék együttes elhelyezkedésben, pl. lipid-tutajokban

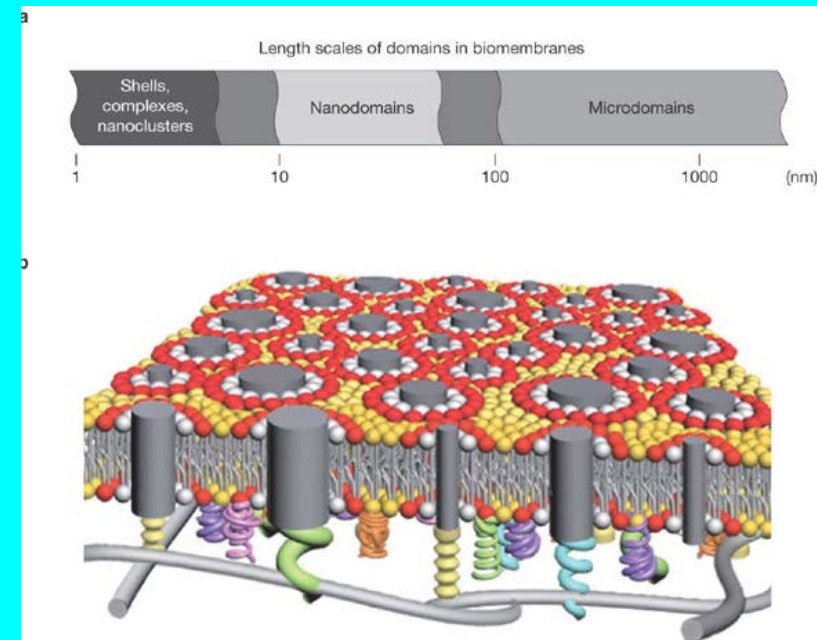




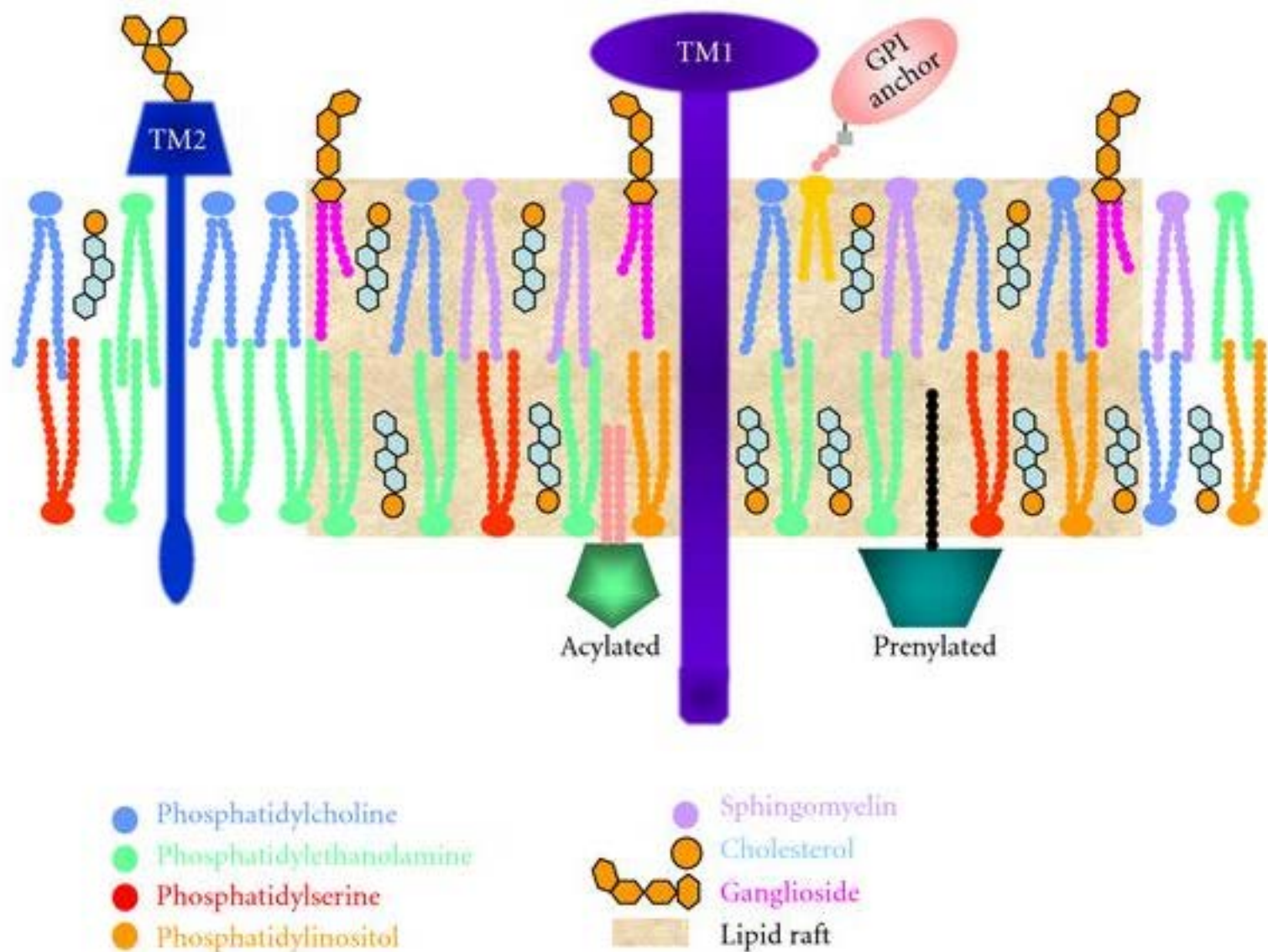
# Lipid tutajok („rafts”) a membránokban



A lipid-tutajok (raftok) a plazmamembrán speciális régiói, amelyeket magas koleszterin tartalom és speciális lipidek és fehérjék összeállása jellemez.

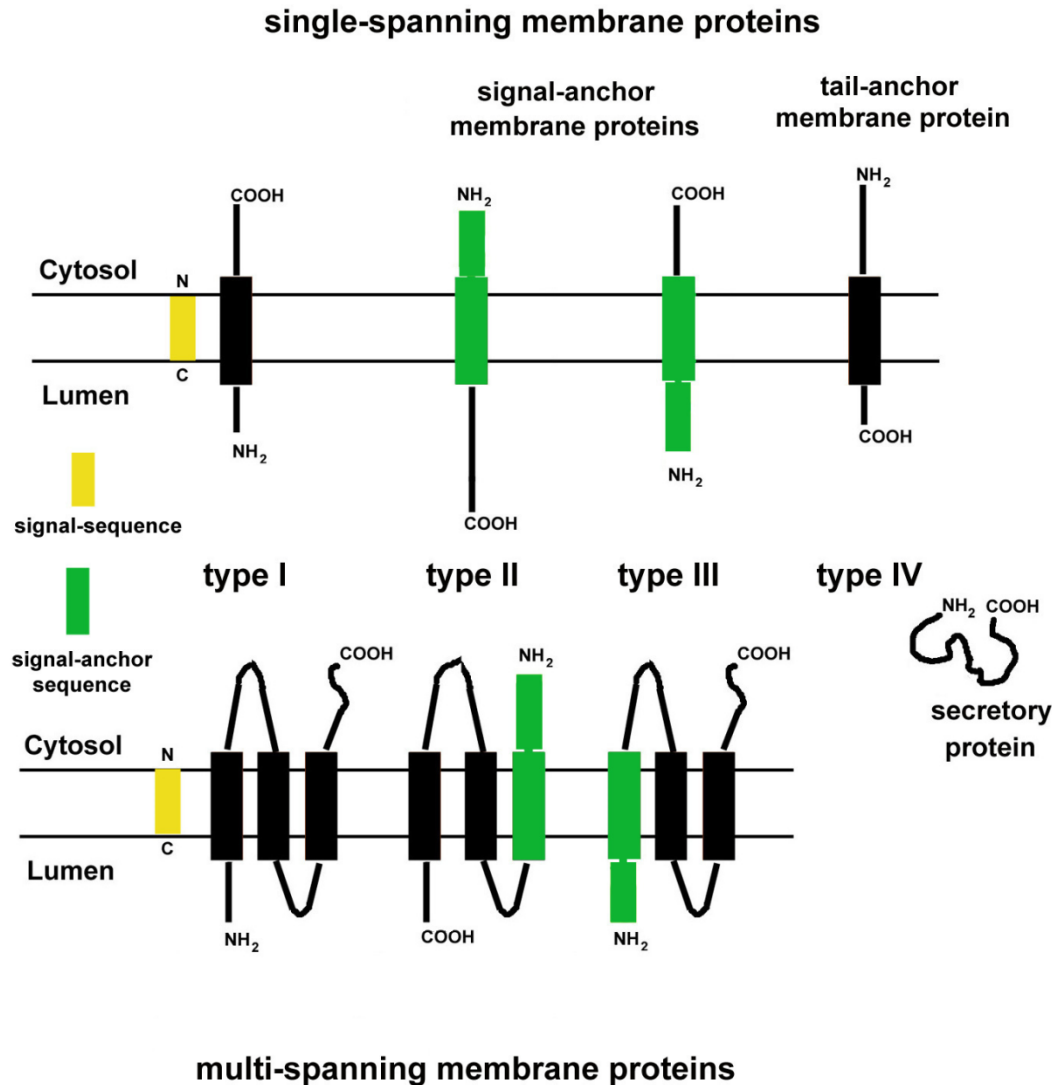


# Lipid tutajok („rafts”) a membránokban



# Membránfehérjék szintézise

## – mindig lipidmembránokban készülnek!

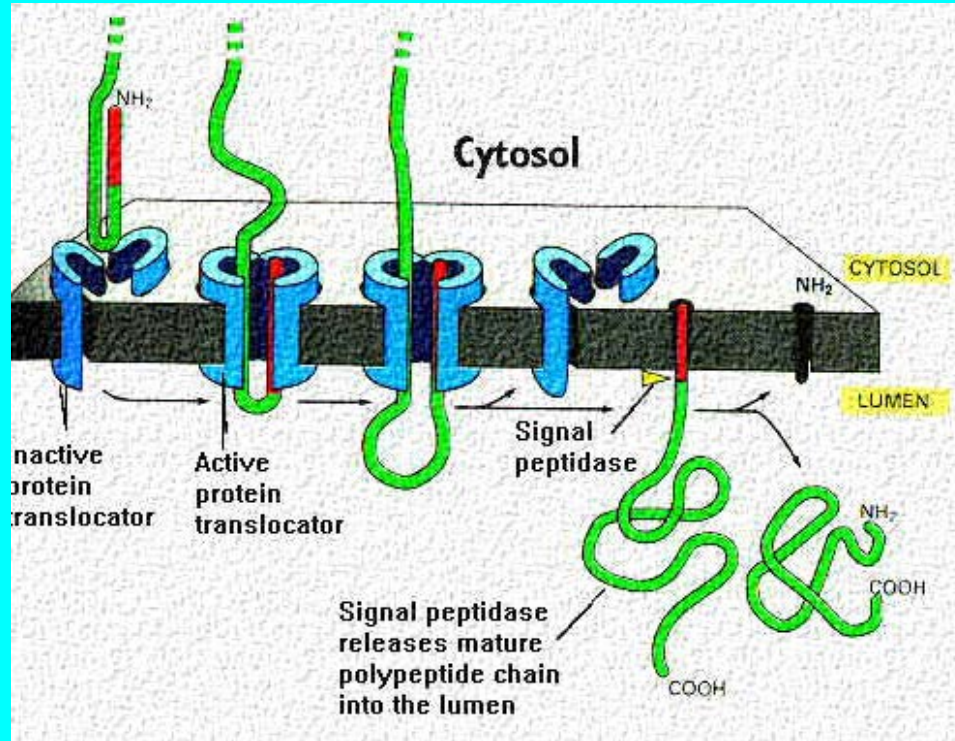


A membránfehérjék már szintézisük során lipid-rétegekbe illeszkednek, folyamatosan membránokban készülnek és utaznak a sejt különböző, membránokkal elhatárolt területeire.

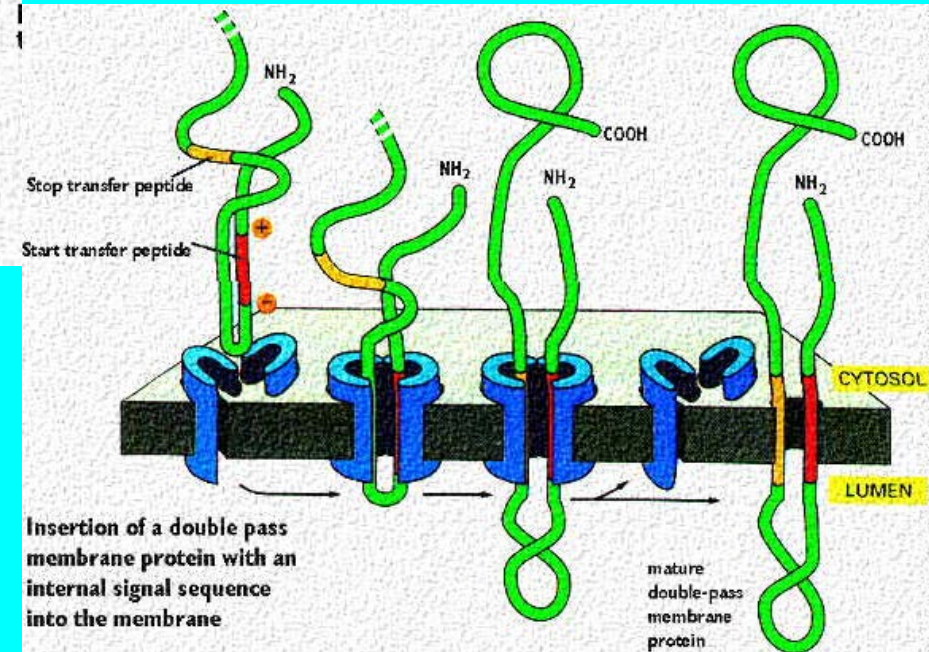
A képződés és beilleszkedés részletei ma sem pontosan és minden részletükben ismertek, a folyamatot ún. szignál szekvenciák és horgony szekvenciák irányítják.



# Transzporter fehérjék beépülése membránokba

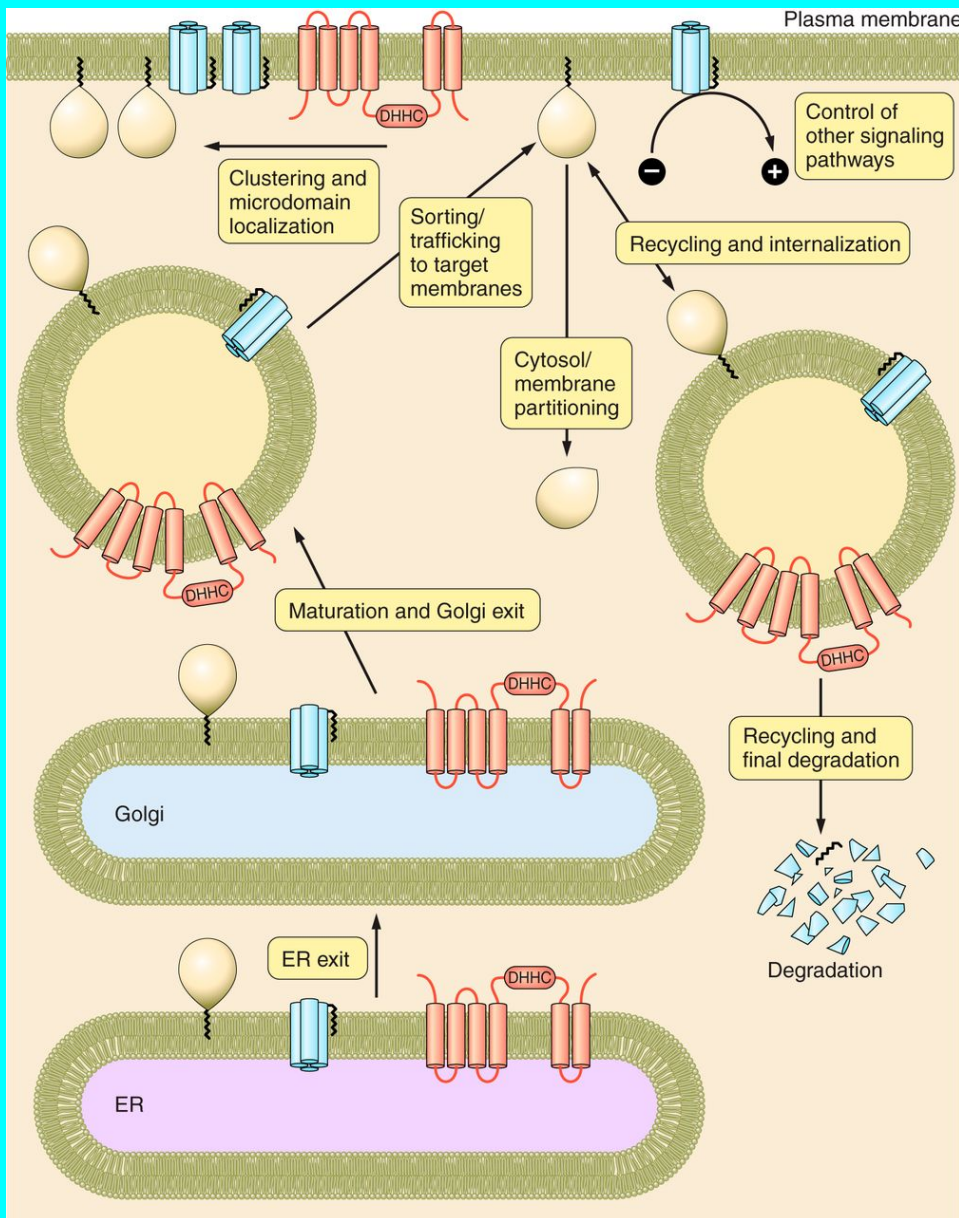


A membránfehérjék szintézisének és lipid-rétegekbe illeszkedésének folyamata - szignál szekvenciák és horgony szekvenciák szerepe.

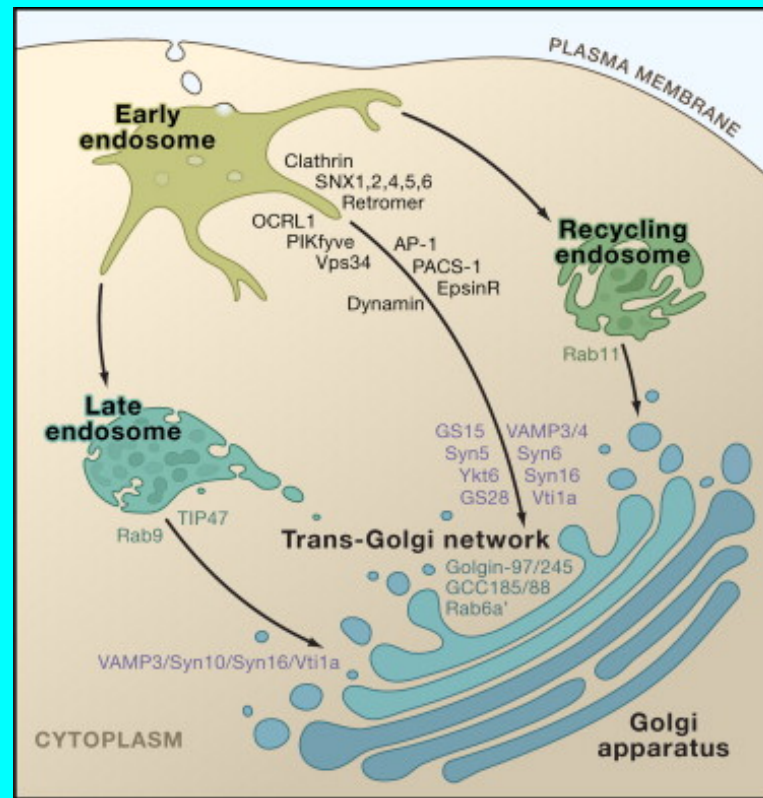


# A membránfehérjék utazása (trafficking) a sejtekben

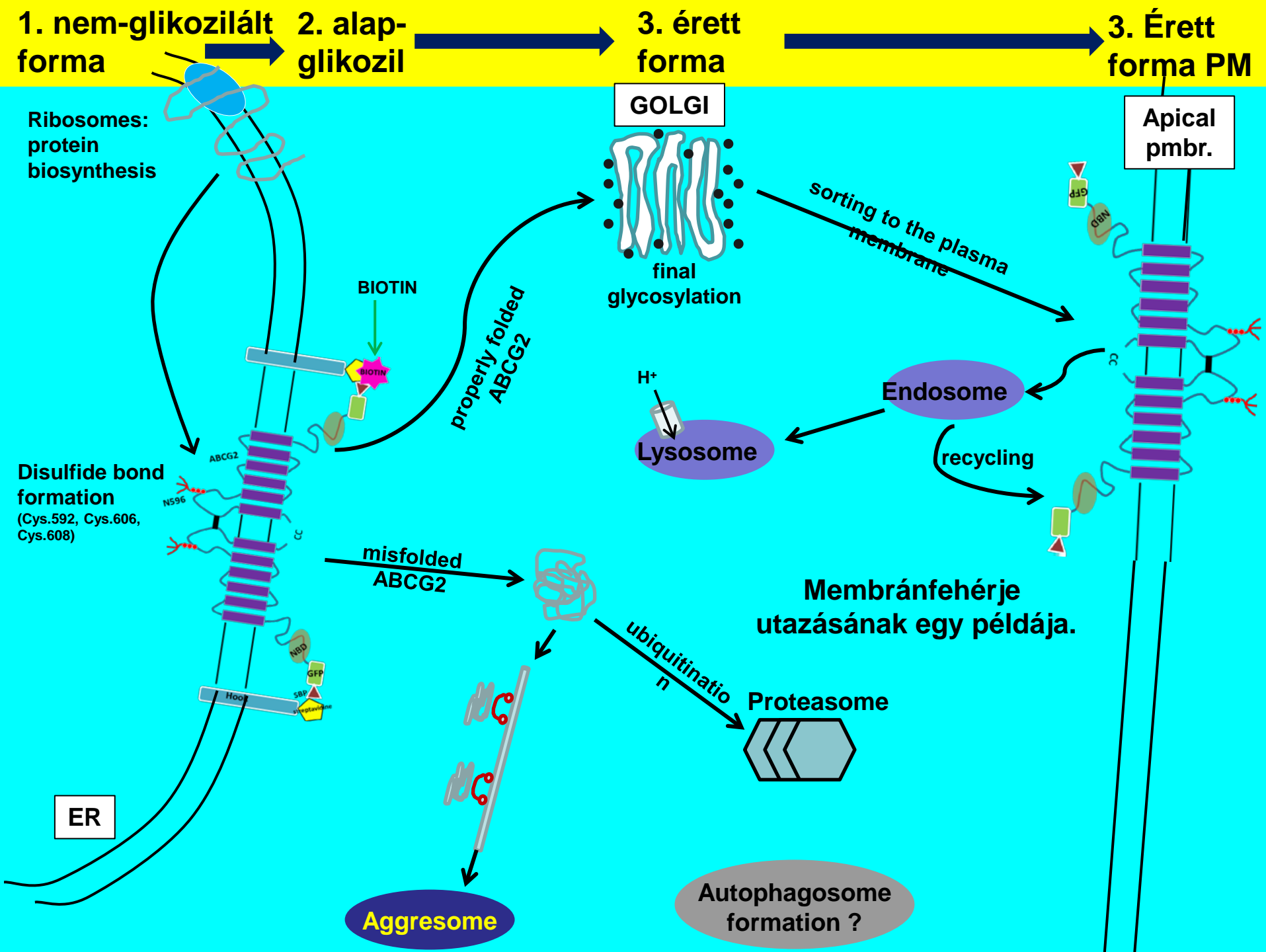
A folyamat membránvezikulák mozgásán, utazásán alapul



Az endoplazmás retikulumban képződő membránfehérjék a Golgi apparátusba kerülnek, ahol a cukor-komponensek épülnek be, majd a vezikulák vándorlásával további sejtalkotókba és a sejtmembránba utaznak, folyamatos reciklizációban vesznek részt.

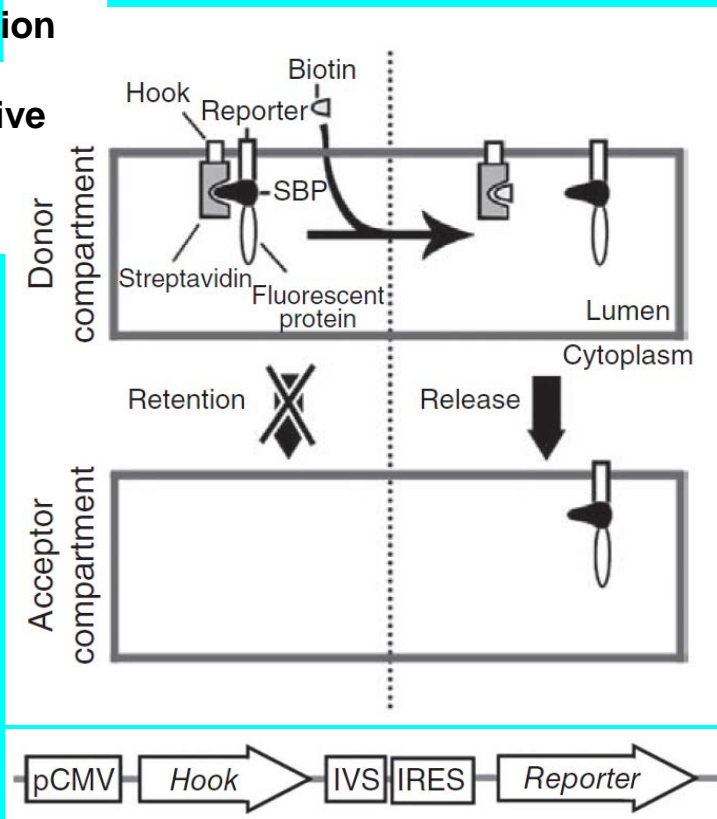




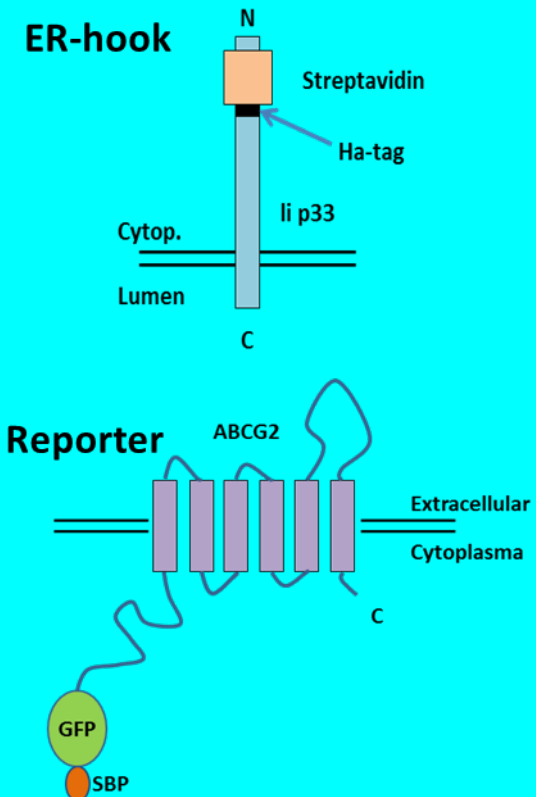


# RUSH: dinamikus módszer membránfehérje utazás követésére

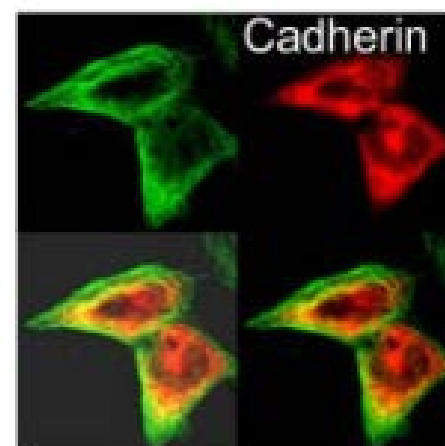
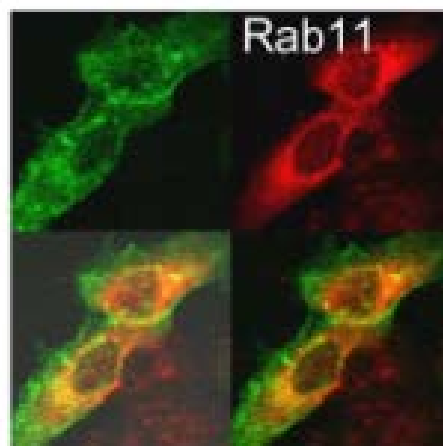
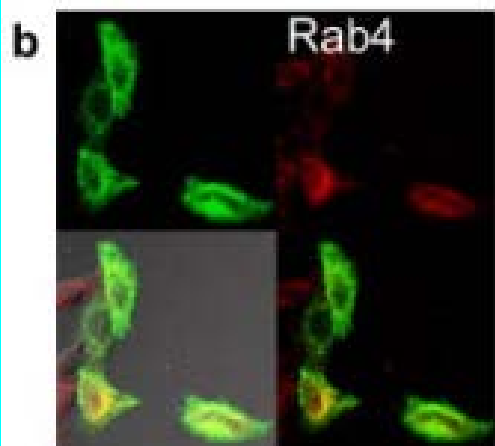
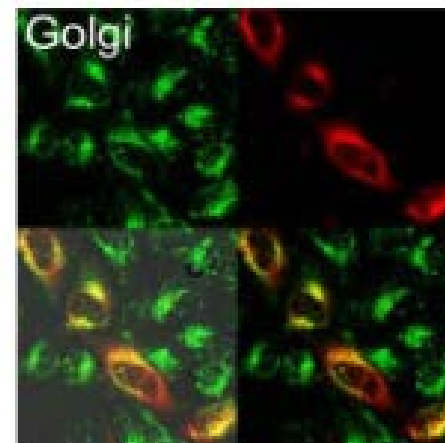
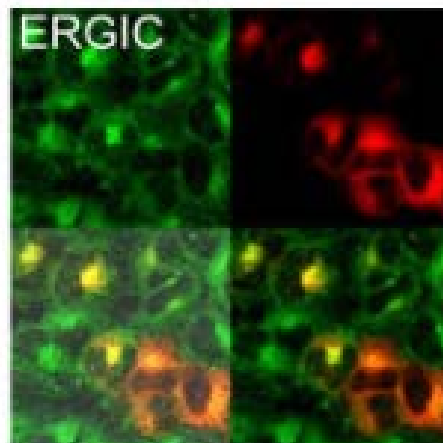
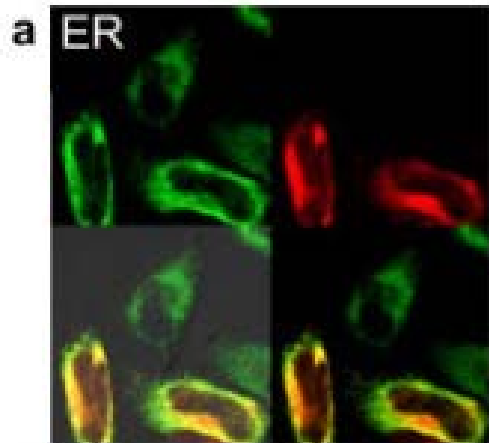
## Retention Using Selective Hooks



Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells  
F. Perez, *Nature Methods*, 2012

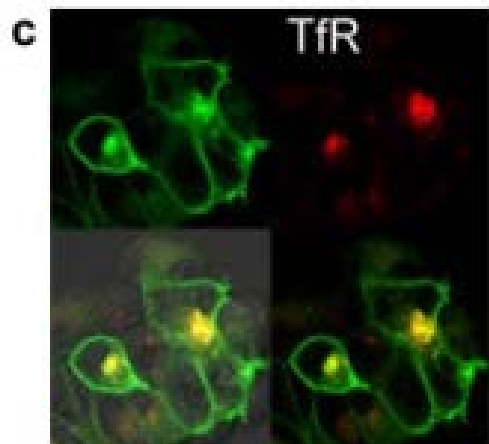


Egy érdekes kísérleti módszer: az ER-ban elkészült, jelölt membránfehérjék oda rögzített állapotúak, majd egy adott vegyület hatására szinkronizálva elindulhatnak a sejten belüli utazásra, amely így jól követhető



Korai endoszóma

Késői endoszóma

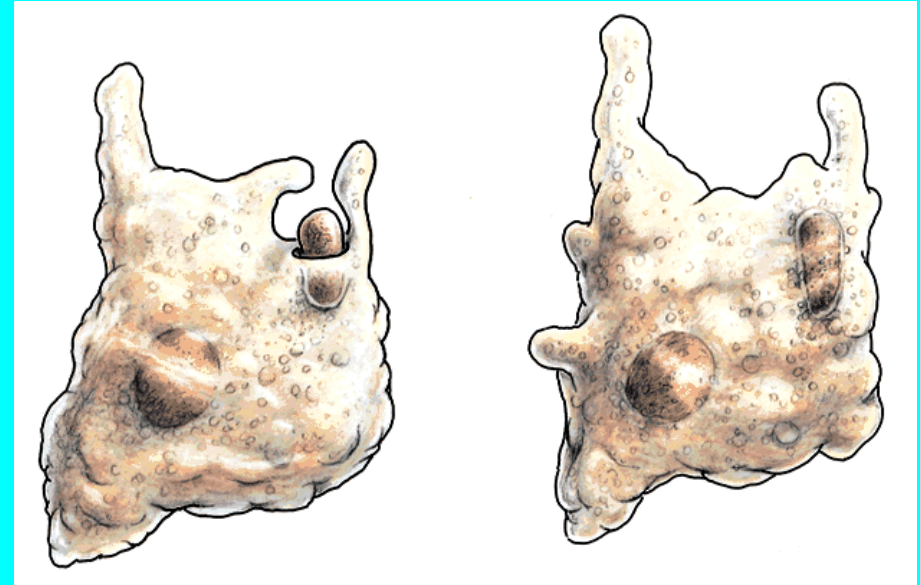
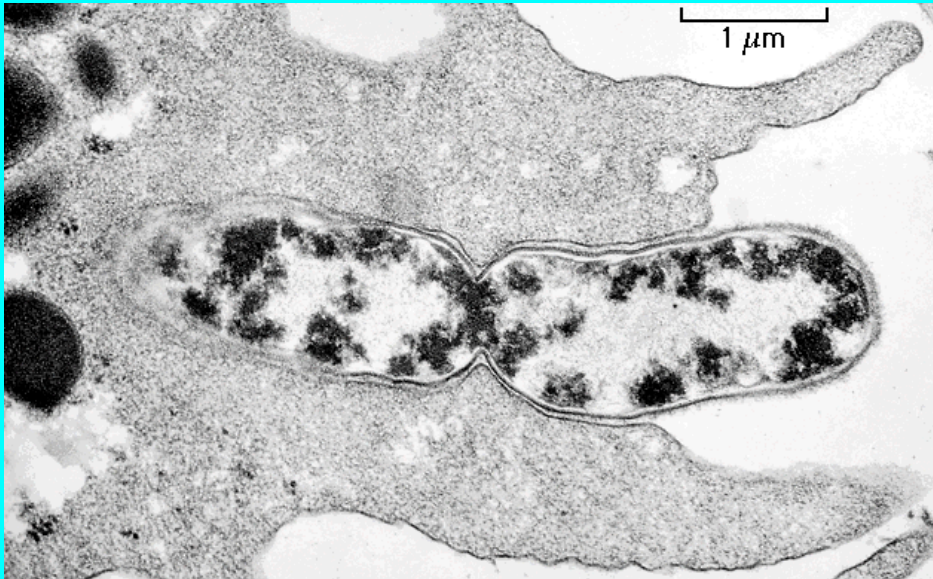


**Specifikus membránfehérje  
jelölések az egyes sejt-komponensek  
követésére**

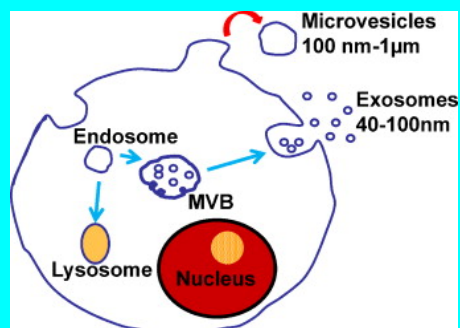
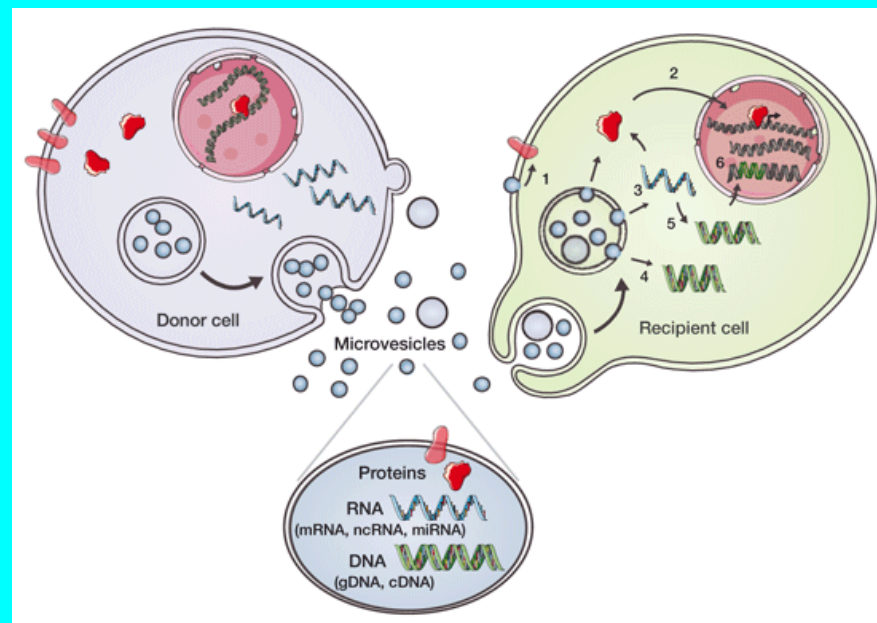
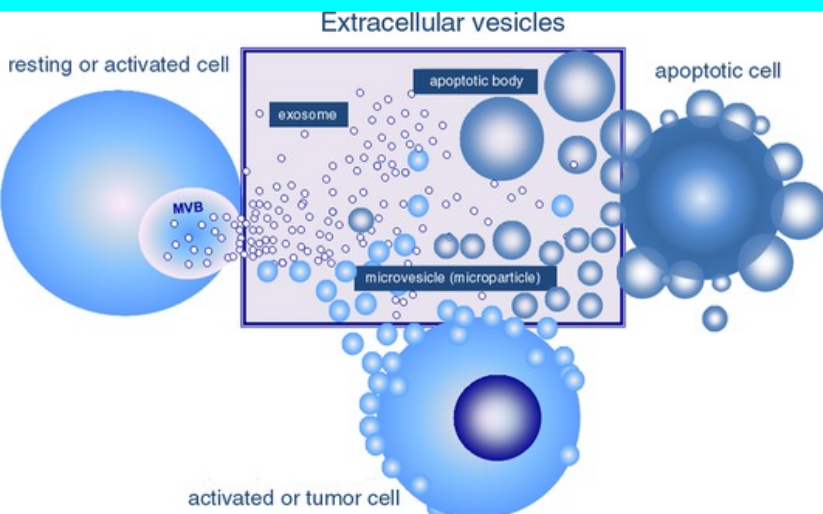
Transzferrin receptor endocitózis

# Endocitózis – exocitózis - transzcitózis

Makrofágok – fagocitózis (endocitózis)

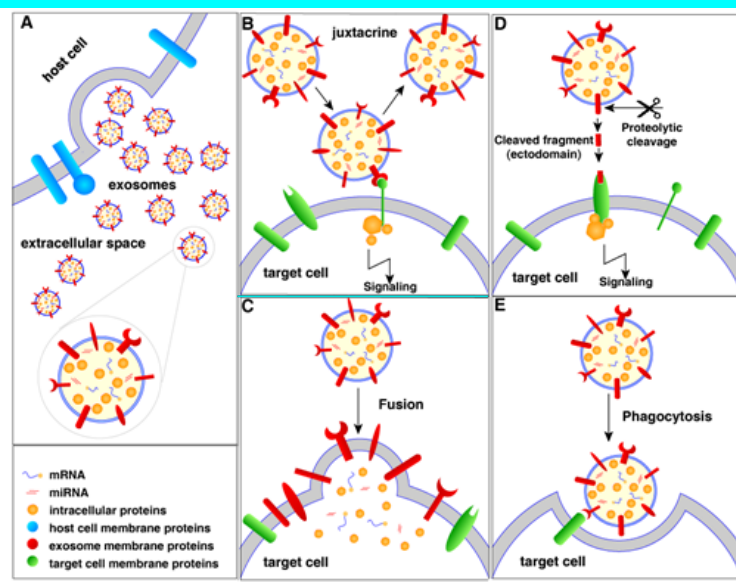


# Mikrovezikulák képződése a sejtekből - exoszómák



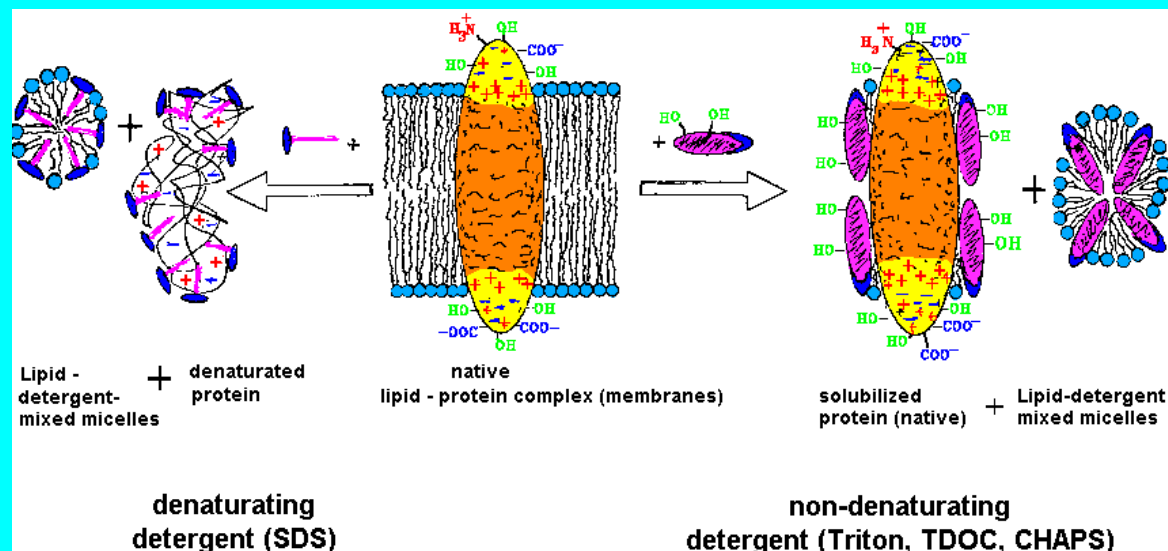
Normál és aktivált (immun)sejtek,  
apoptotikus sejtek,  
daganatsejtek...

Fontos fiziológiás szabályozó  
szerep!



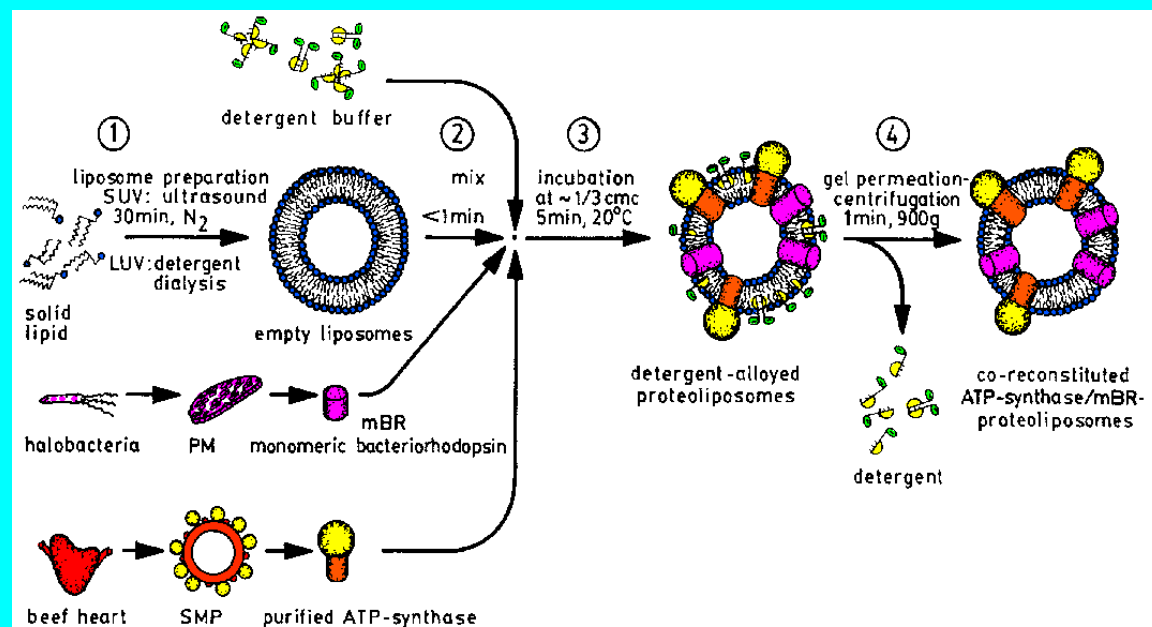


# Membránfehérjék szerkezetvizsgálata és beépítése lipidekbe



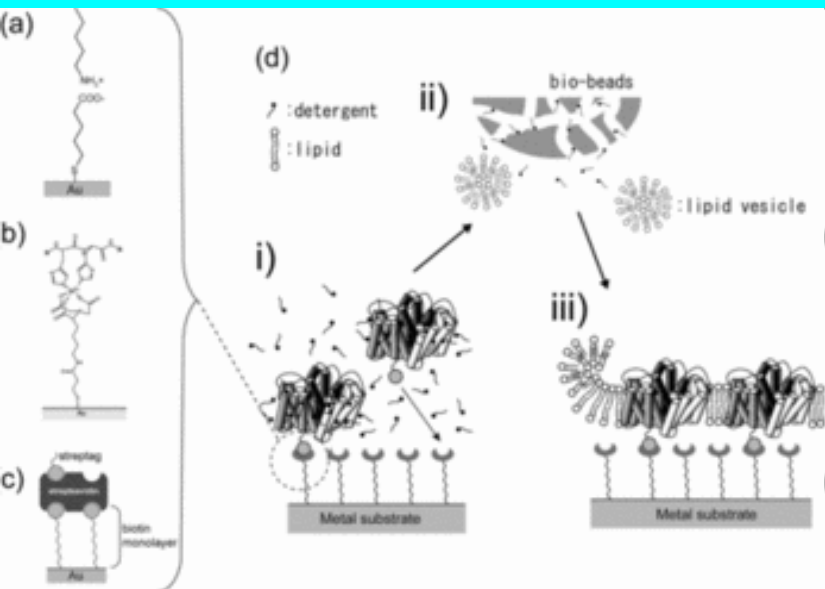
## Membránfehérjék izolálása

## Membránfehérjék rekonstitúciója



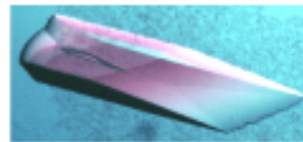
# Membránfehérjék rekonstitúciója – atomi szintű szerkezet meghatározása

Membránfehérjék  
kristályosítása –  
lipid rétegben

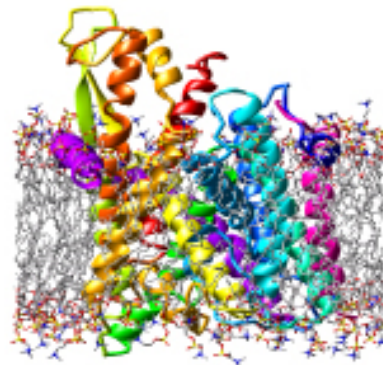


Membránfehérjék  
kristályosítása –  
háromdimenziós szerkezet!

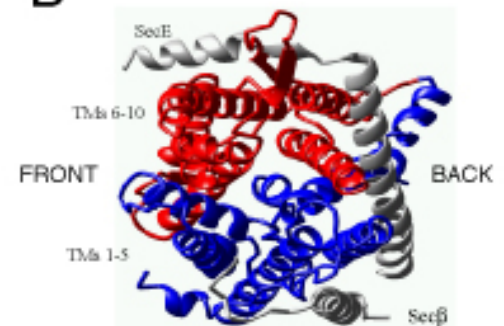
A



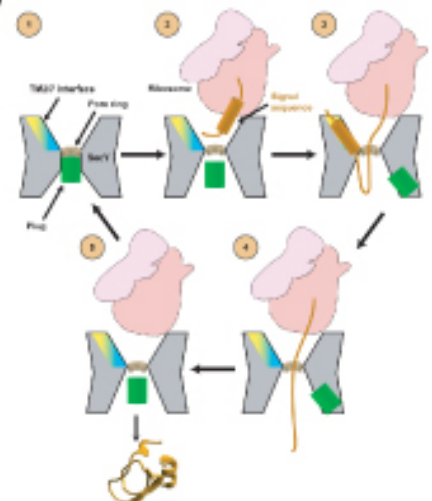
C

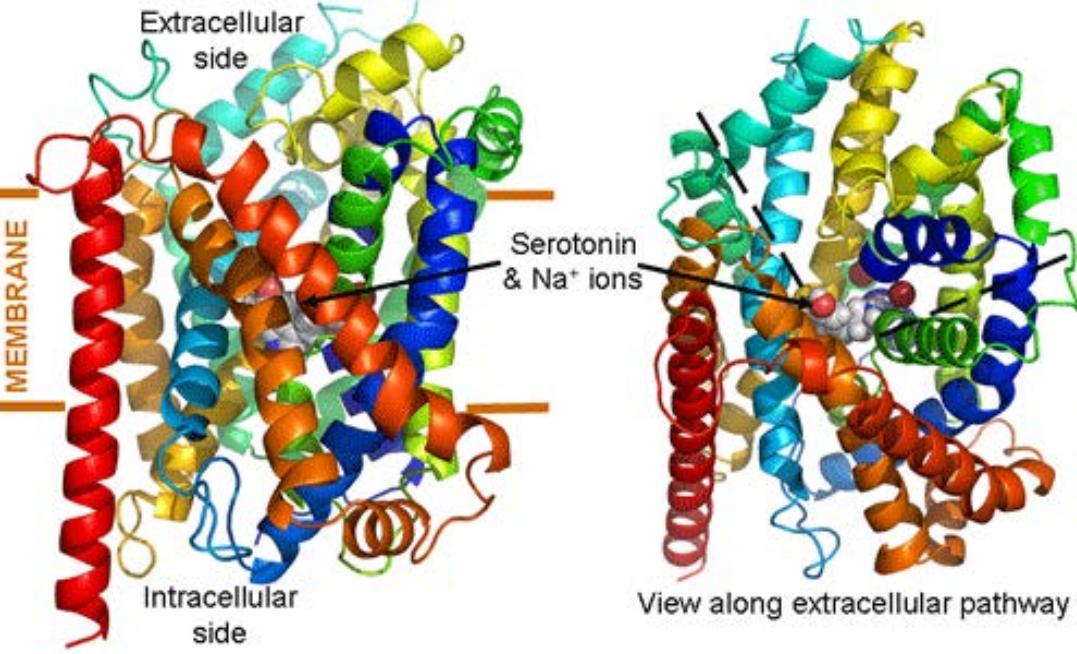


B



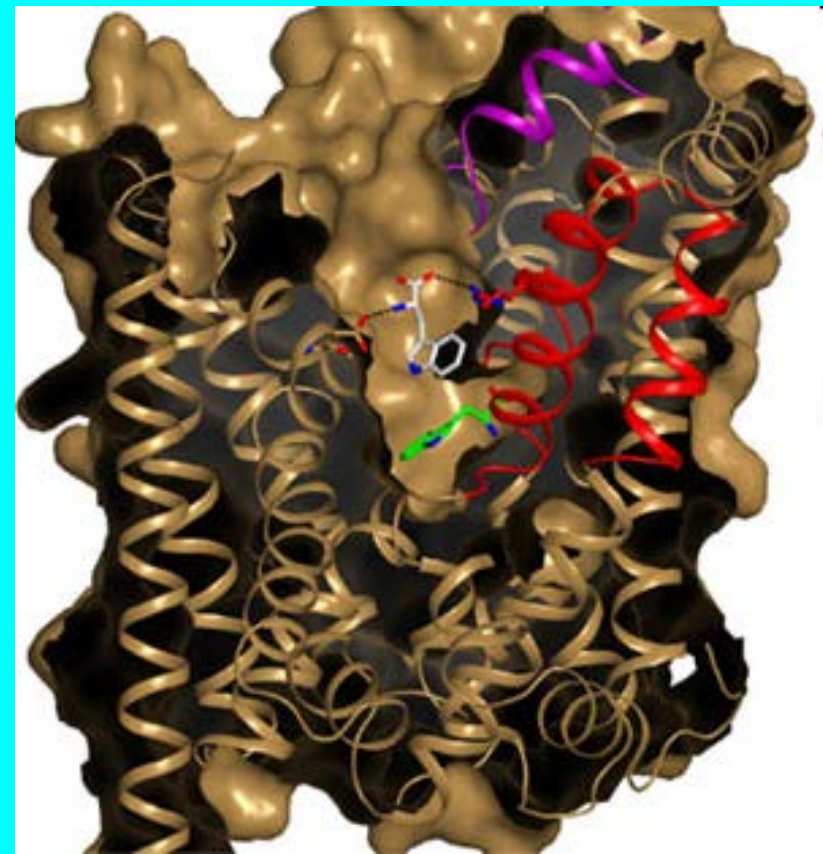
D





Szerotonin transzporter  
Na-függő transzport

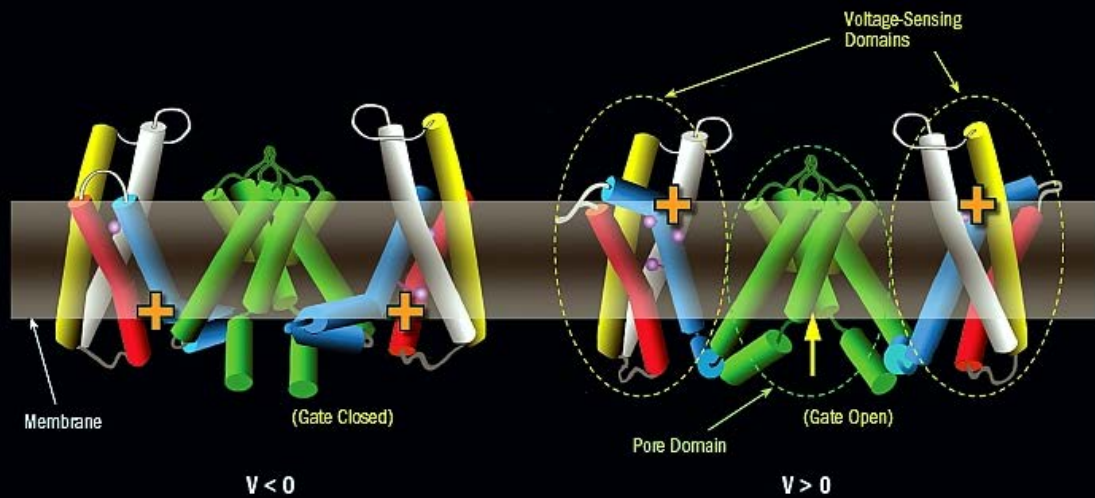
Leucin transzporter (Science, 2008)





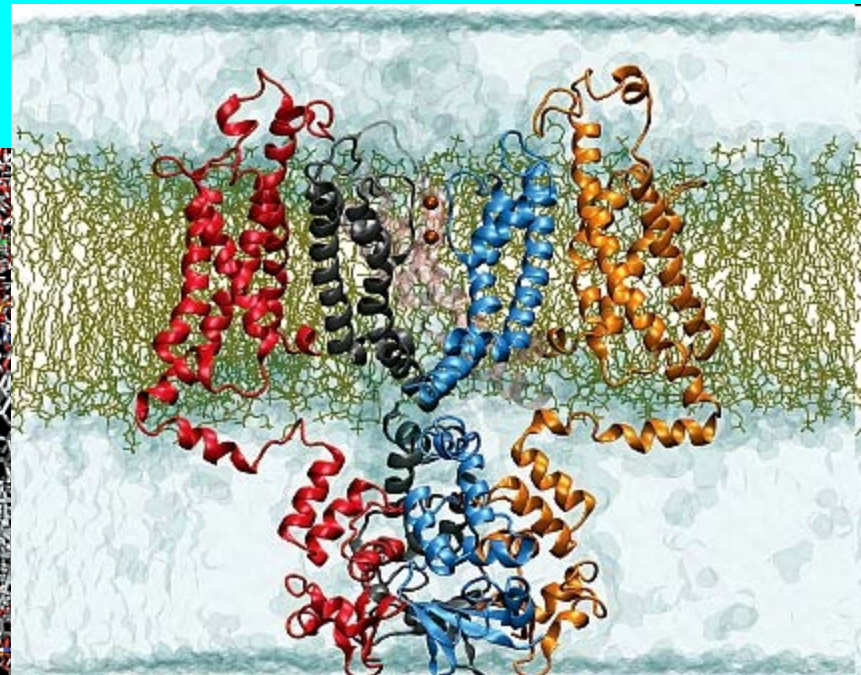
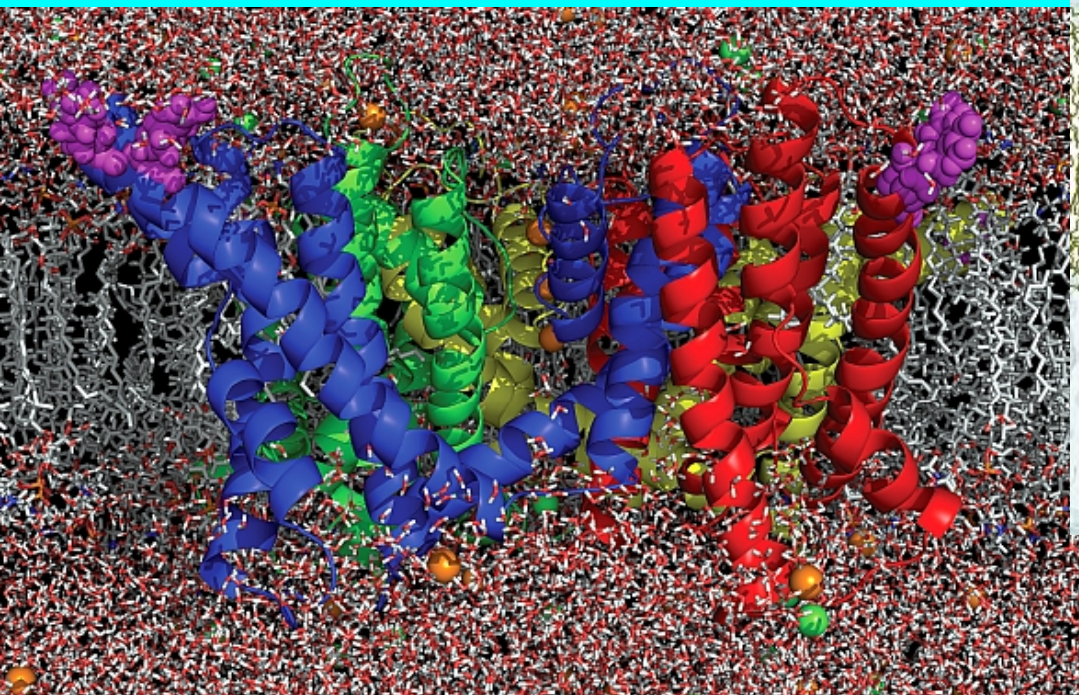
Closed State

Open State

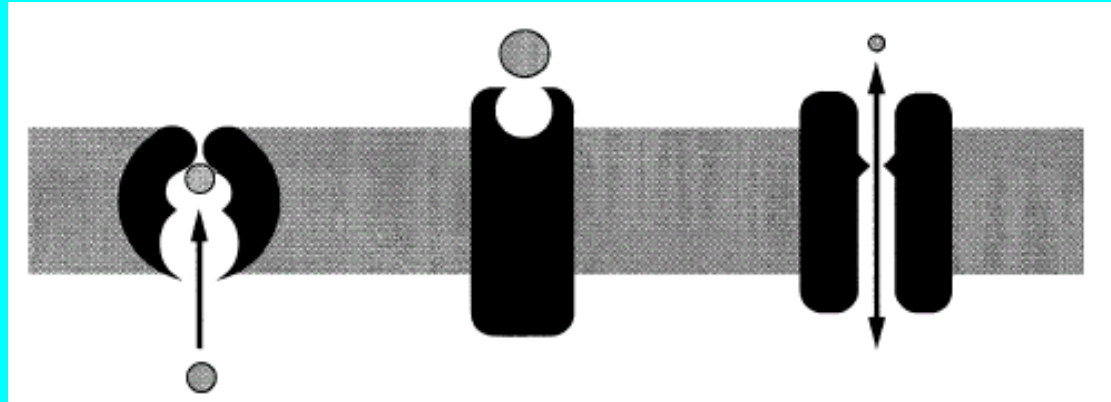


Feszültségfüggő  
K<sup>+</sup> ion csatorna (Kv1.2)

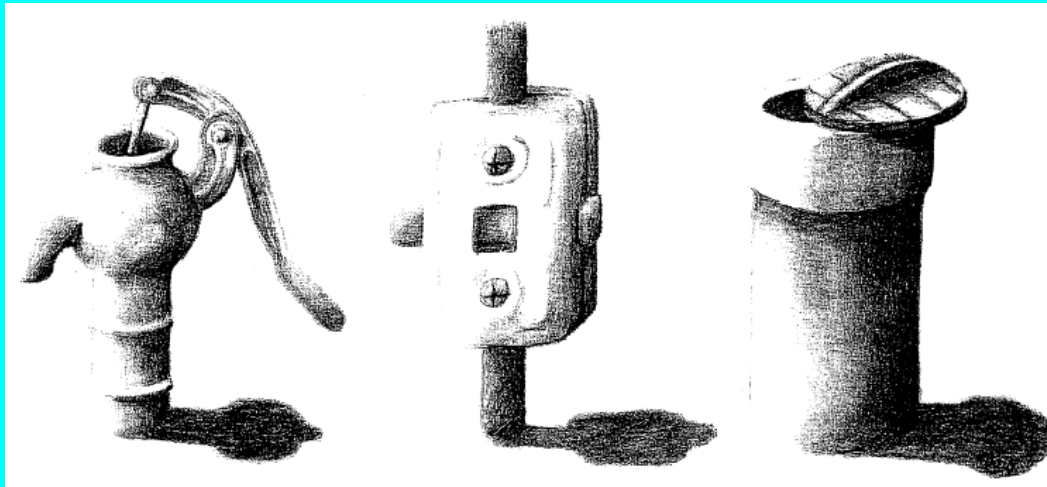
Molekuláris szerkezet  
és modellek



## Az ABC (ATP-binding Cassette) transzporterek



pumpák      receptorok      csatornák

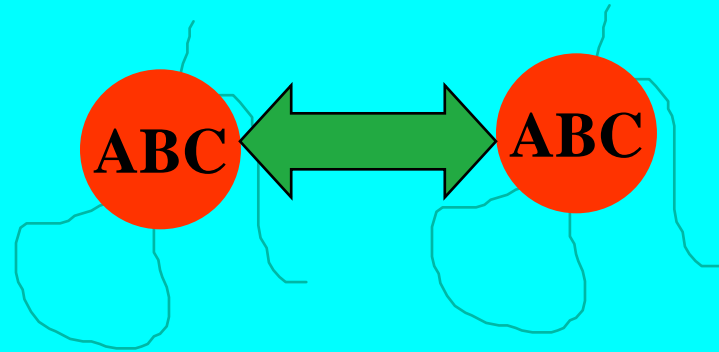
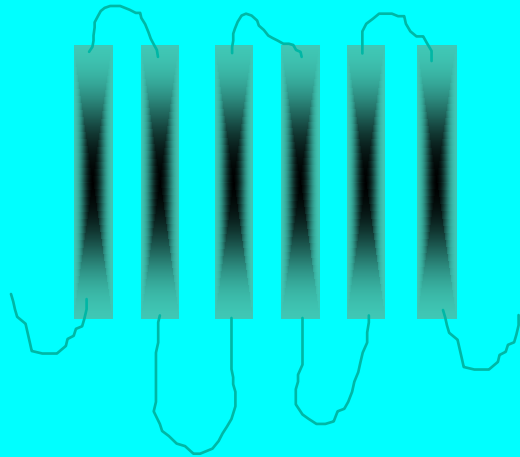


**Az ABC transzporterek: mindezen feladatokra képesek?**



# Az ABC transzporterek alap-motívumai:

**6 TMH membrán  
domén (TMD)**



**Kooperáló ABC domének**

**Az ABC doménekben:**

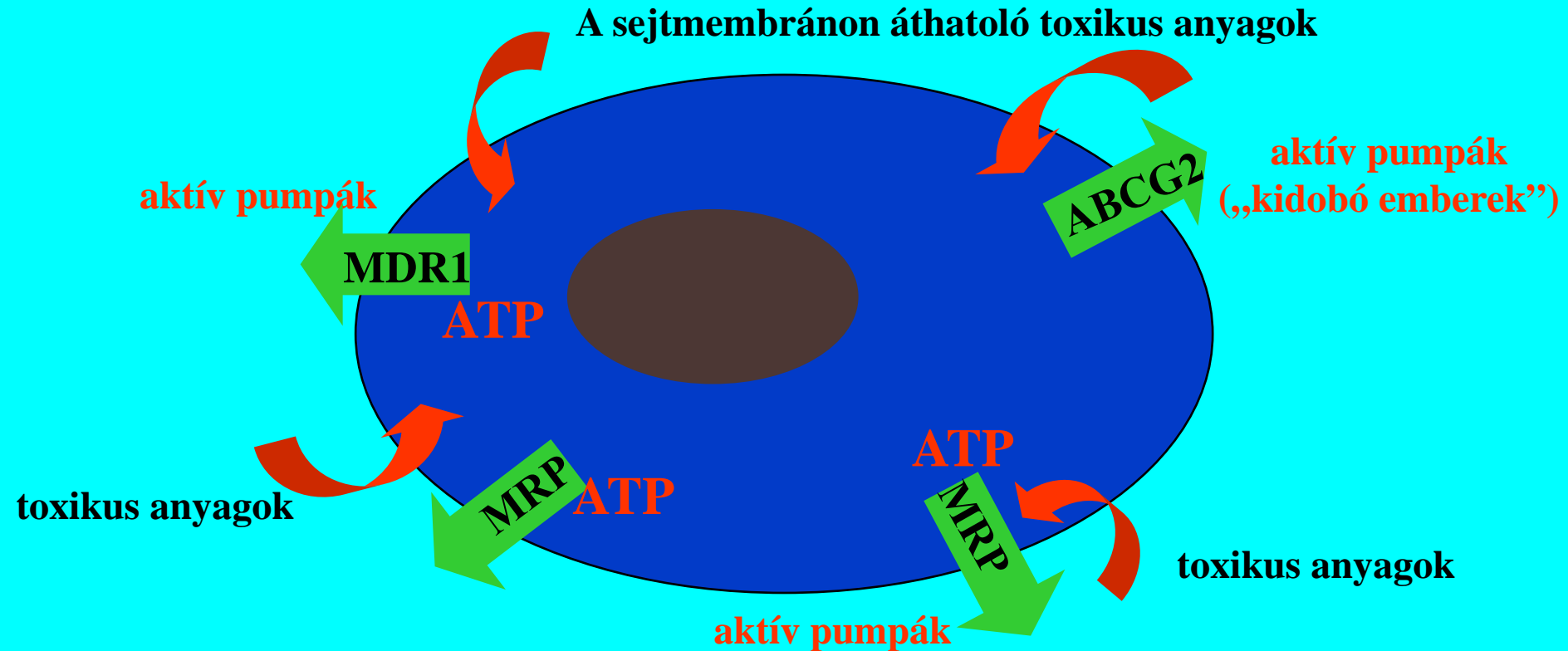
**Walker A**

**Signature (C)**

**Walker B**

**(egyedi az ABC  
transzportereknél!)**

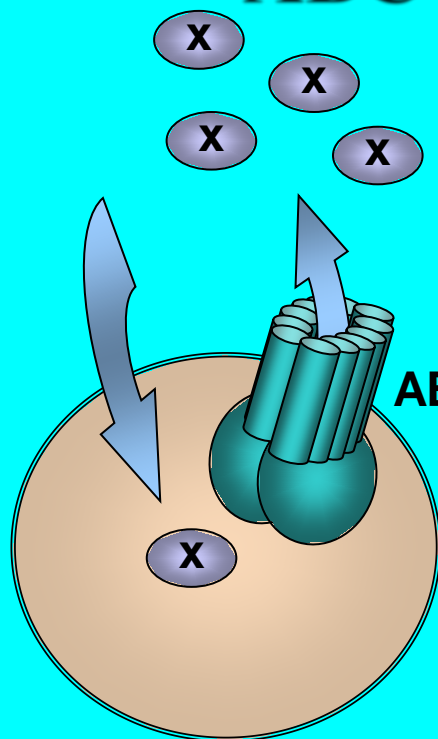
# A gyógyszer (multidrog)-rezisztencia pumpák – ABC transzporterek



A sejtek és a szervezet védelméért felelős aktív pumpák az ATP energiájával működnek –

a **rákos sejtek** az ABC fehérjéket a **saját védelmükre** használják fel

# ABC multidrog transzporterek

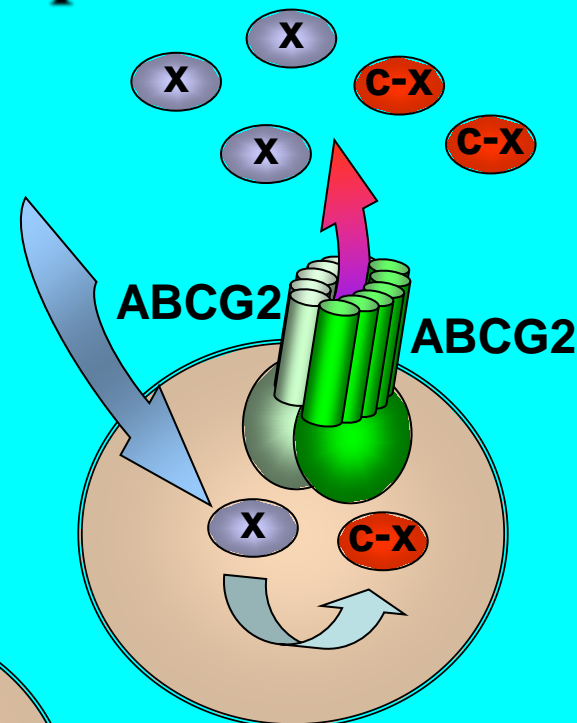
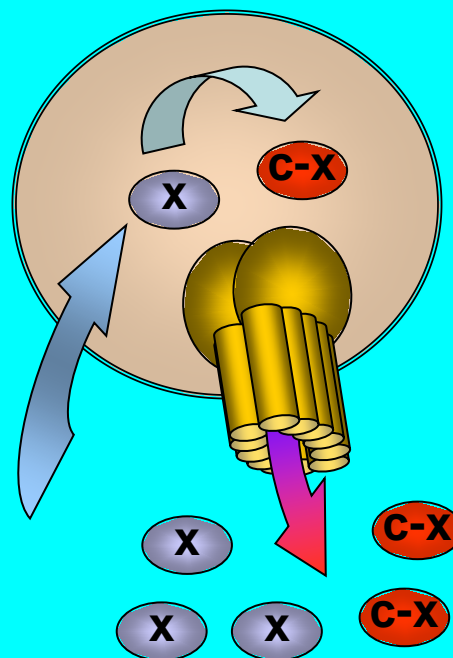


ABCB1/Pgp

Szubsztrátok:  
hidrofób drogok (X)

Három fő multidrog  
transzporter!

ABCC1/MRP1

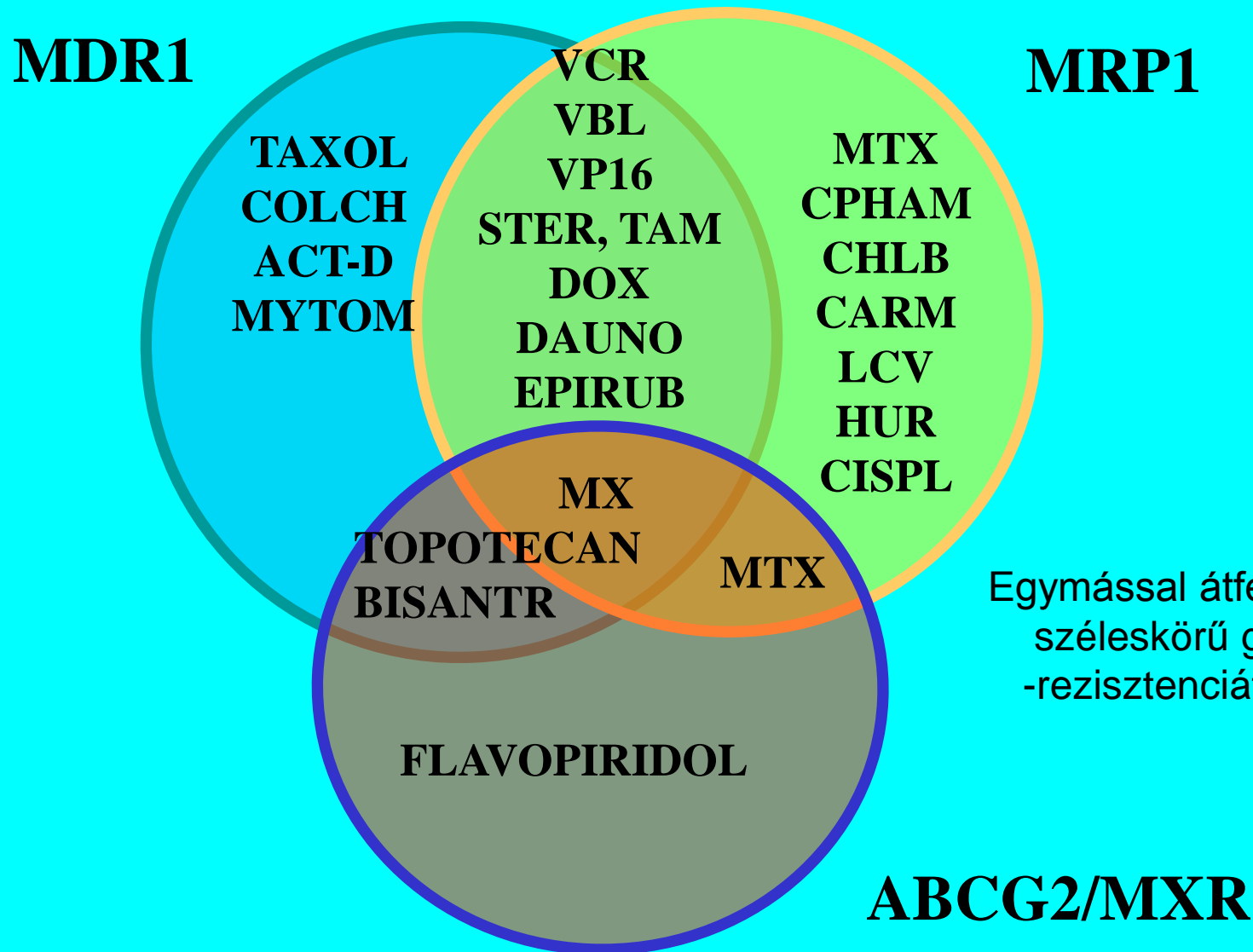


ABCG2

ABCG2

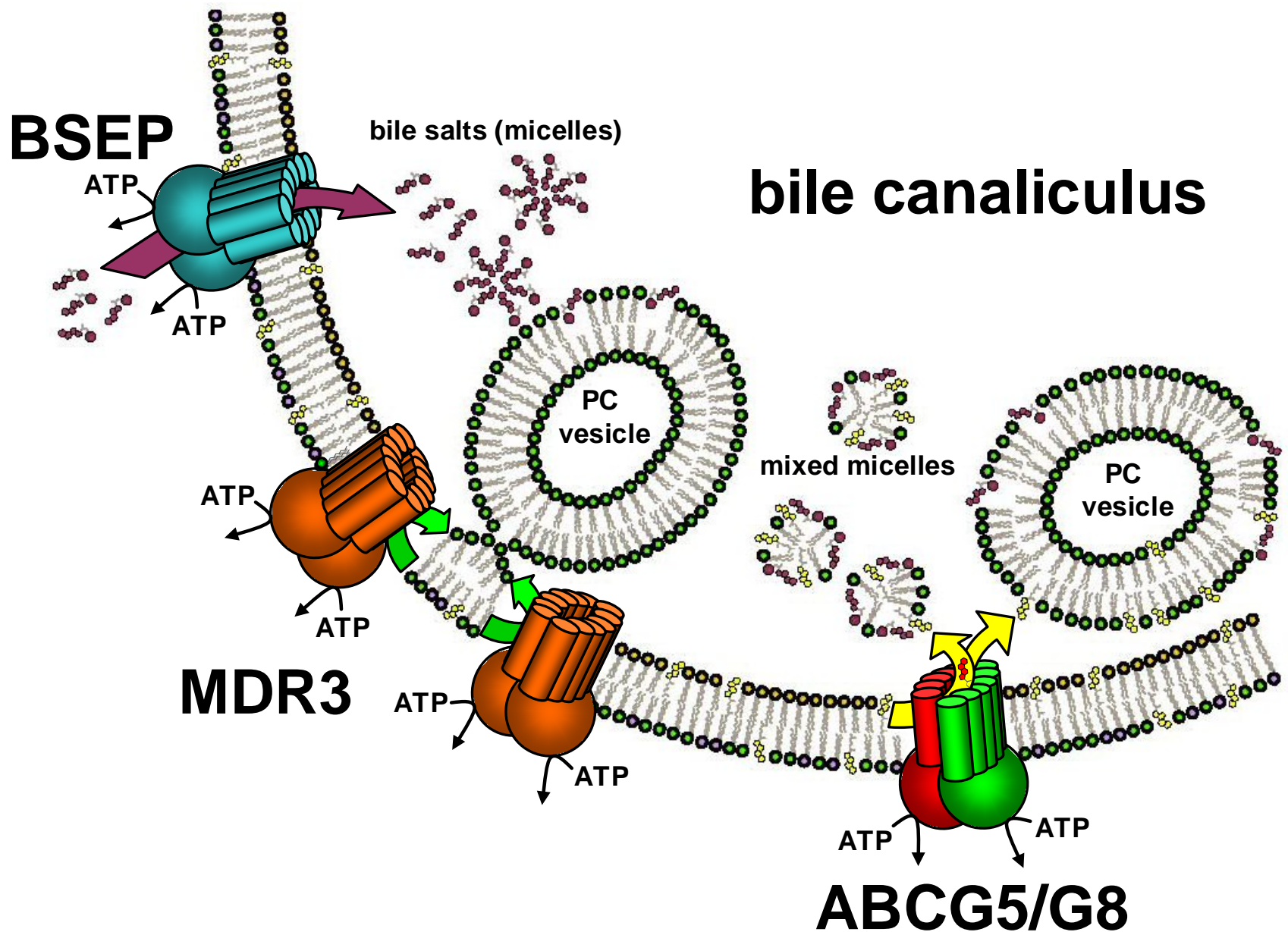
Szubsztrátok:  
hidrofób drogok (X),  
de már  
részlegesen  
méregtelenített  
metabolitok (C-X) is!

# A multidrog rezisztencia fehérjék szerepe rák-ellenes gyógyszereknél



Egymással átfedő módon,  
széleskörű gyógyszer  
-rezisztenciát okoznak!

# Az ABC transzporterek élettani szerepe: lipidek transzportja a májban





# Az ABC transzporterek élettani szerepe: méregtelenítés a placentában

Anyai  
vér-  
keringés

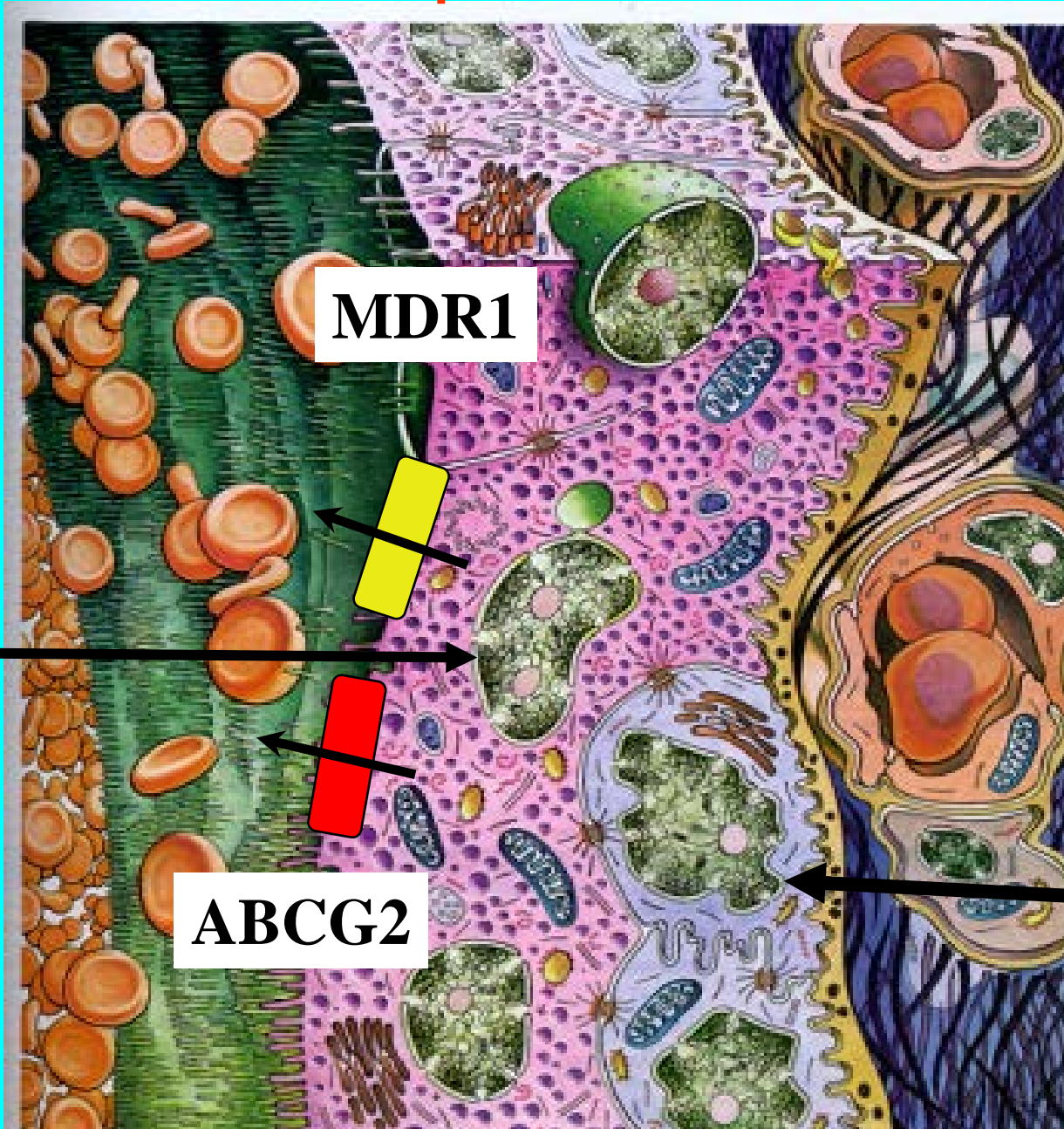
Magzati  
vér-  
keringés

**MDR1**

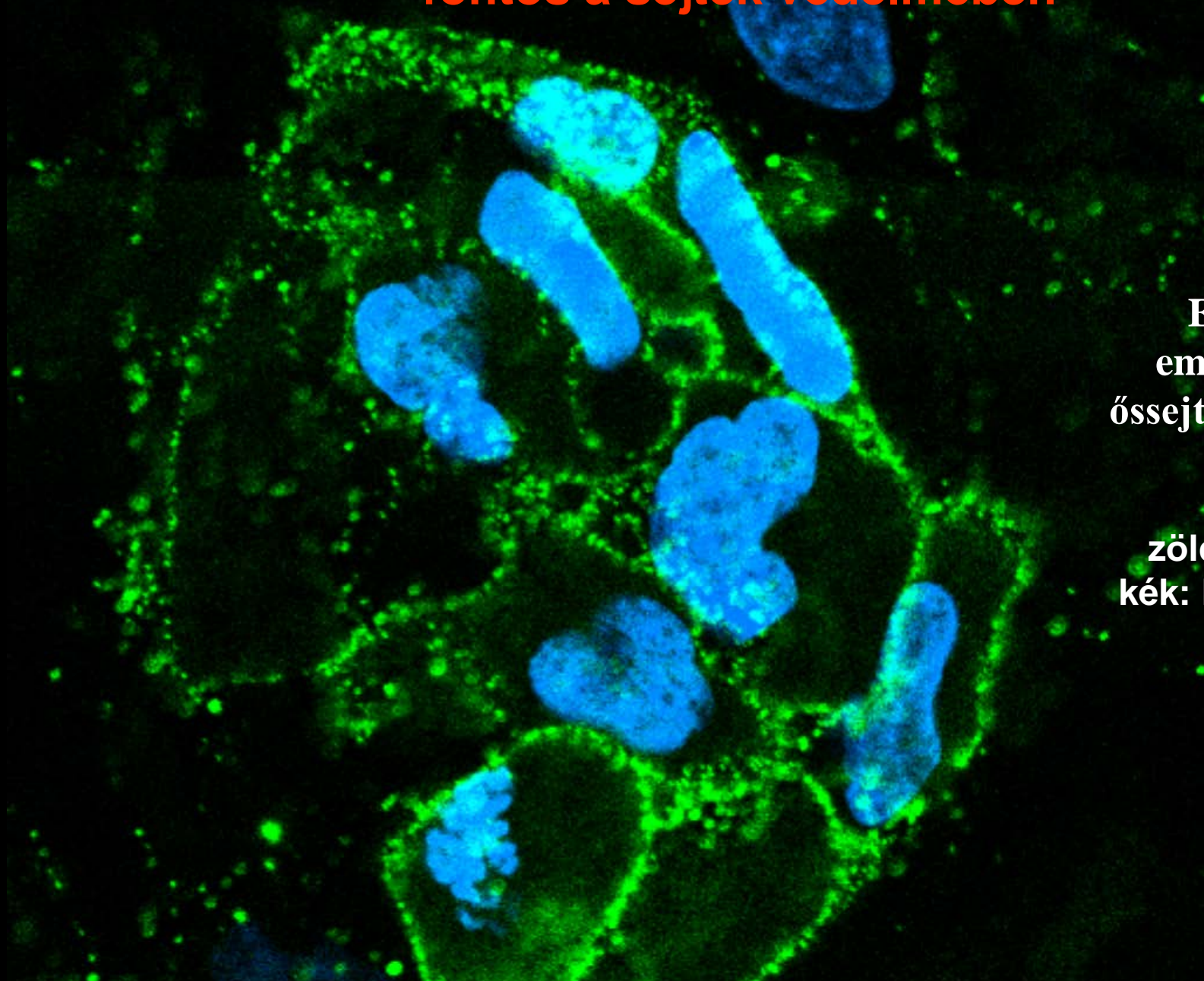
Syncytio-  
trophoblast

Cyto-  
trophoblast

**ABCG2**



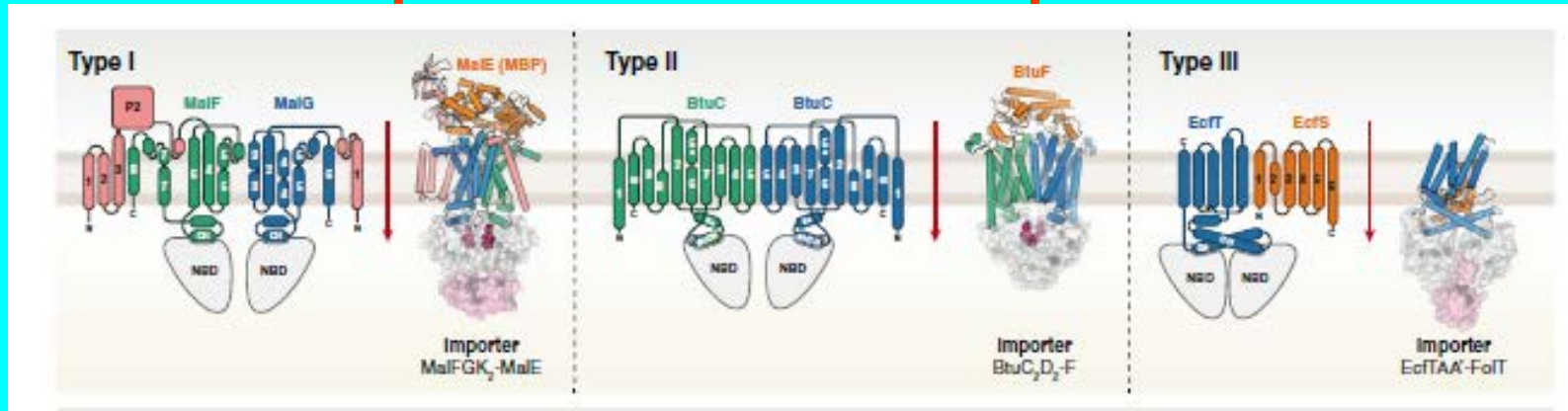
# Emberi pluripotens őssejtekben az ABCG2 kifejeződés fontos a sejtek védelmében



Emberi  
embrionális  
őssejtek (HuES9)  
sejtek

zöld: ABCG2  
kék: DAPI (mag)

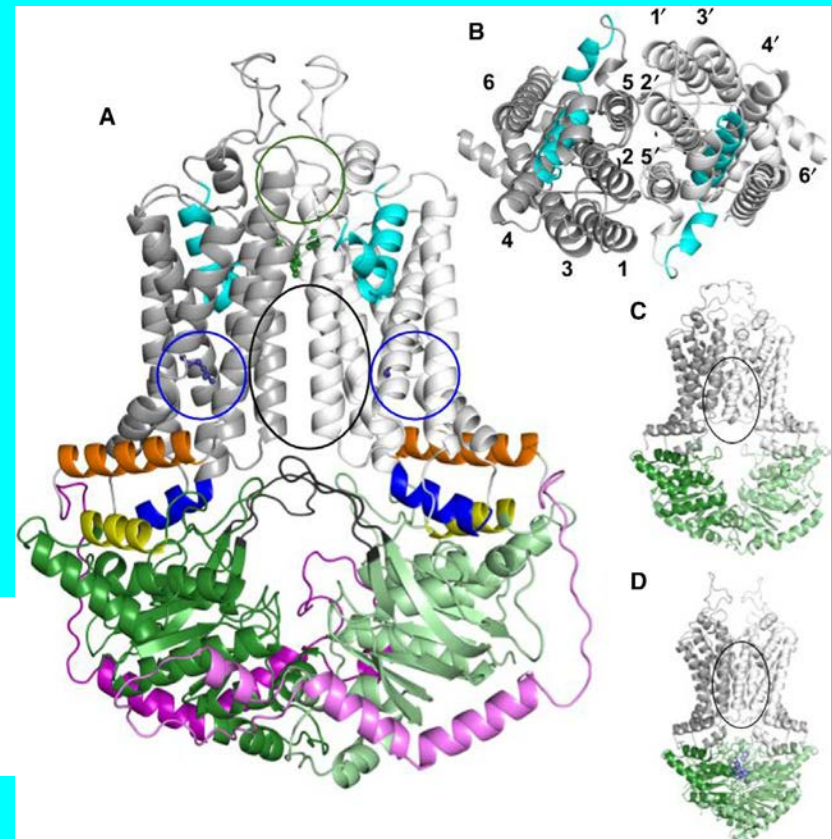
# Az ABC transzporterek változatos típusai a szerkezet alapján






## Type V



## ABCG2 (2020)

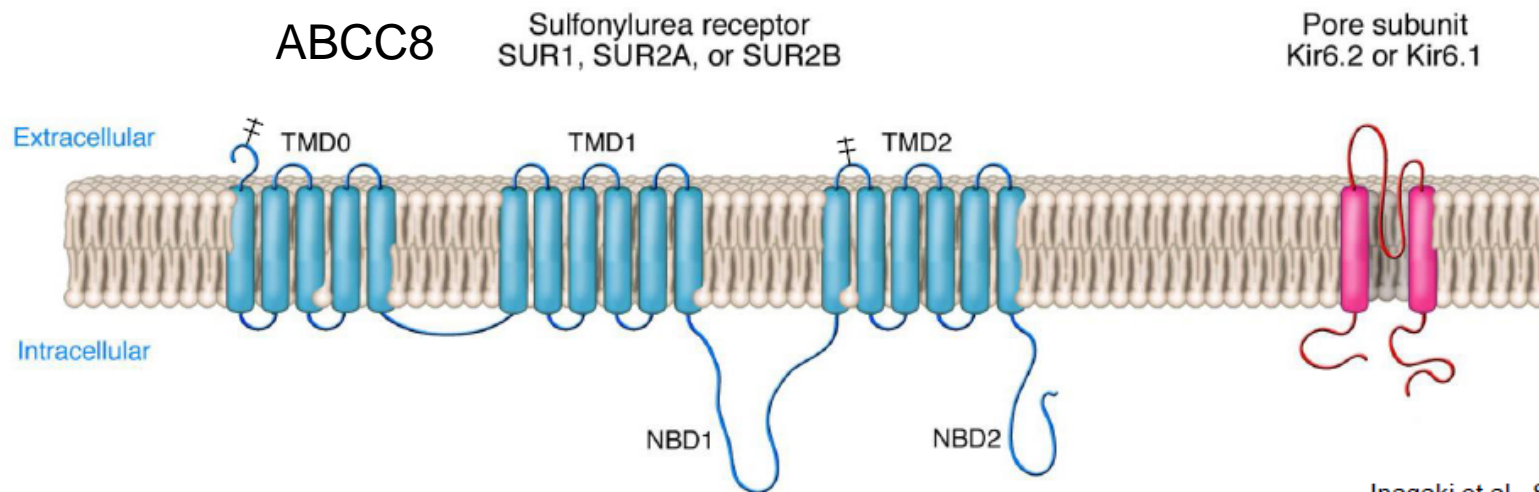


## The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology

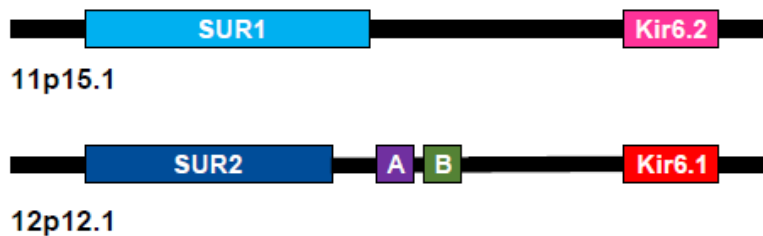
Balázs Sarkadi<sup>1,2</sup> , László Homolya<sup>1</sup>  and Tamás Hegedűs<sup>2</sup> 



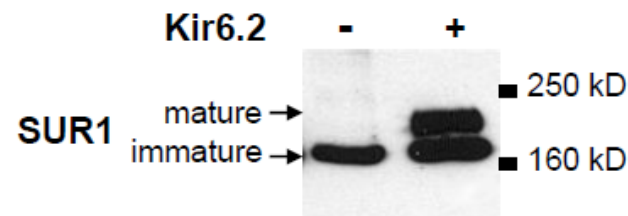
# KATP csatorna a szigetsejtekben – az ABCC8 és egy Kir csatorna komplexe



Inagaki et al., Science, 1995  
Cartoon from Ashcroft, JCI, 2005



SUR1/Kir6.2: pancreas, brain  
SUR2A/Kir6.2: heart, skeletal muscle  
SUR2B/Kir6.2: non vascular smooth muscle  
SUR2B/Kir6.1: vascular smooth muscle



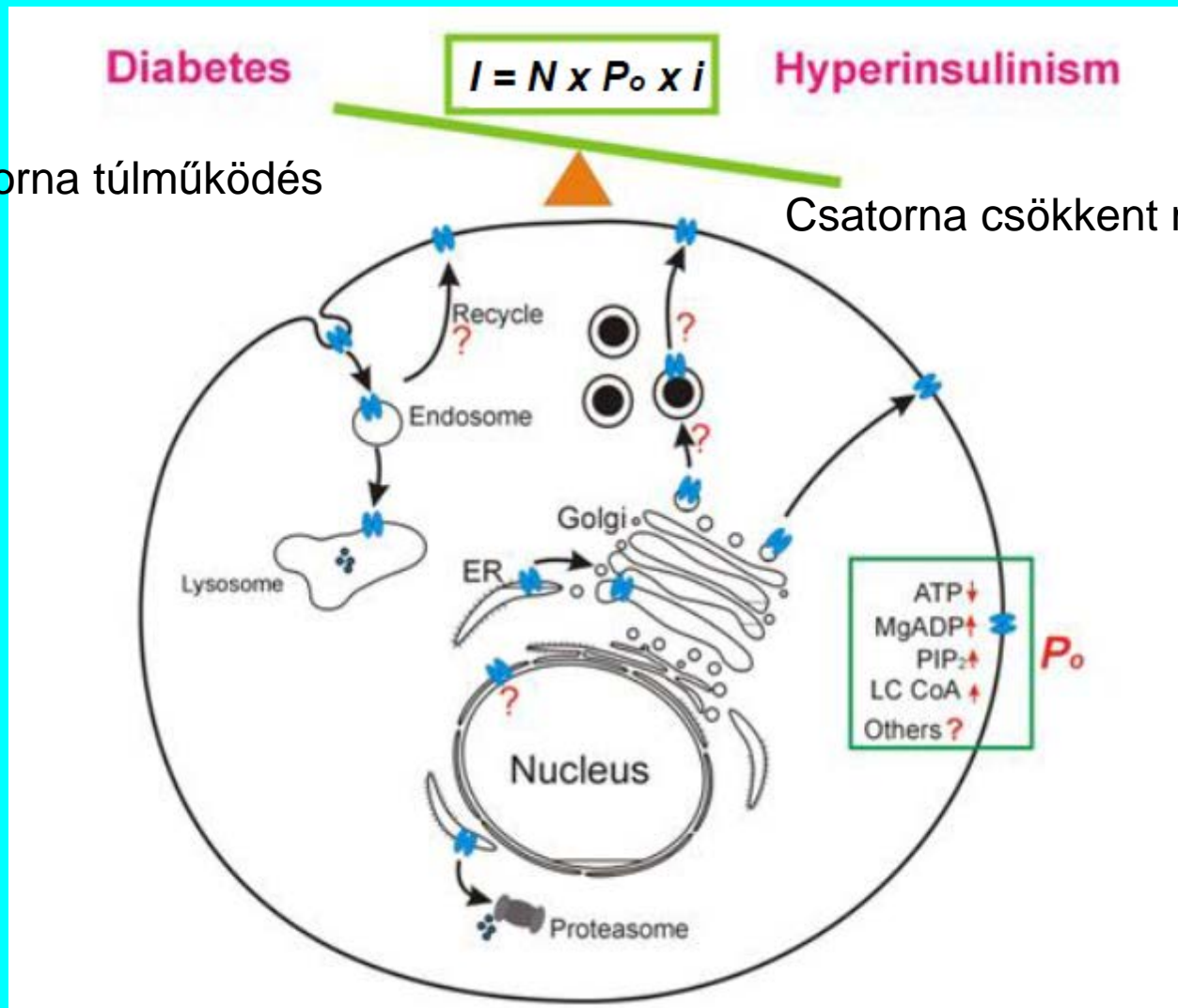
Tucker et al., Nature, 1997  
Zerangue et al., Neuron 1999



# Az inzulin szekréció betegségei

Csatorna túlműködés

Csatorna csökkent működés



# Az inzulin szekréció betegségeinek gyógyszeres kezelése

**Diabetesz**

**Sulfonylureas  
(e.g. glibenclamide)**

Close  
ATP

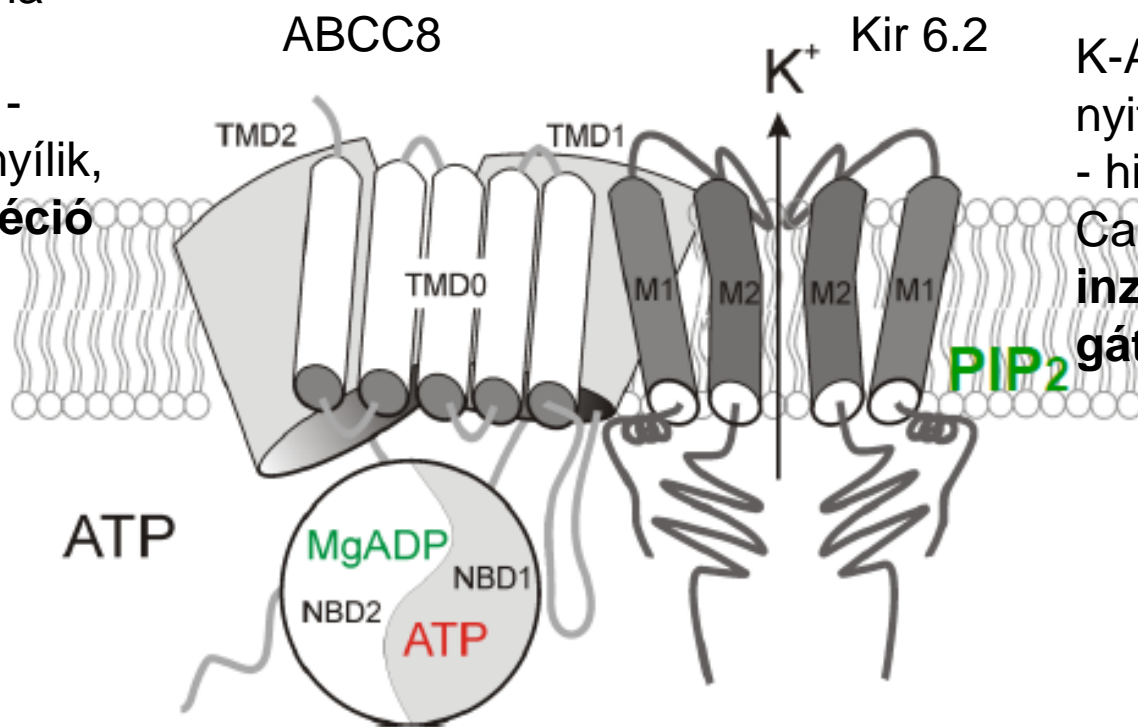
**Hiperinzulinemia**

MgADP

**Diazoxide**

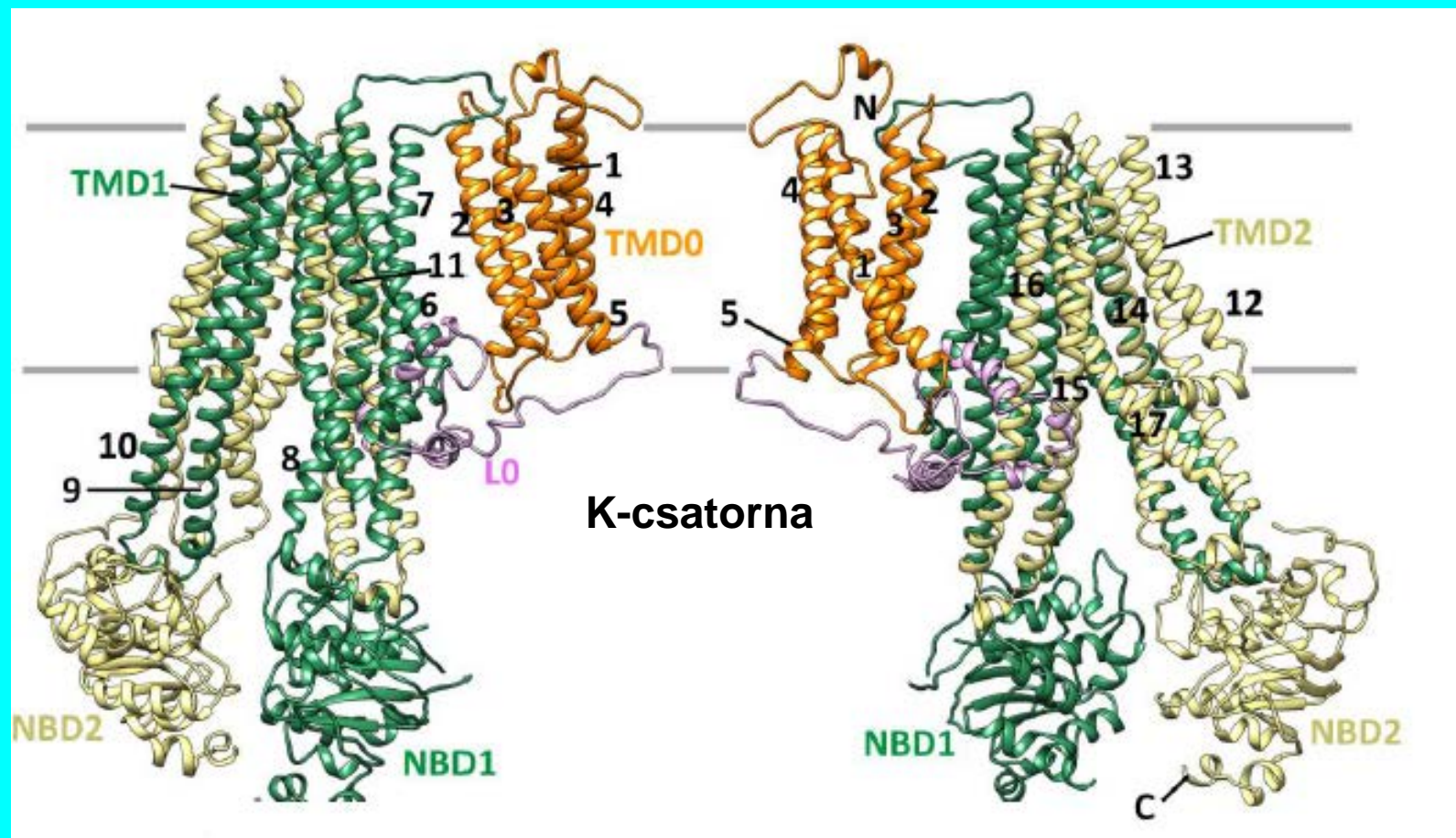
Open

K-ATP csatorna  
gátlószer -  
depolarizáció -  
Ca csatorna nyílik,  
**inzulin szekréció  
növekszik**



K-ATP csatorna  
nyitó vegyület  
- hiperpolarizáció -  
Ca csatorna záródik,  
**inzulin szekréció  
gátlódik**

# Az ABCC8 és a Kir6.2. csatorna komplexének atomi szintű szerkezete

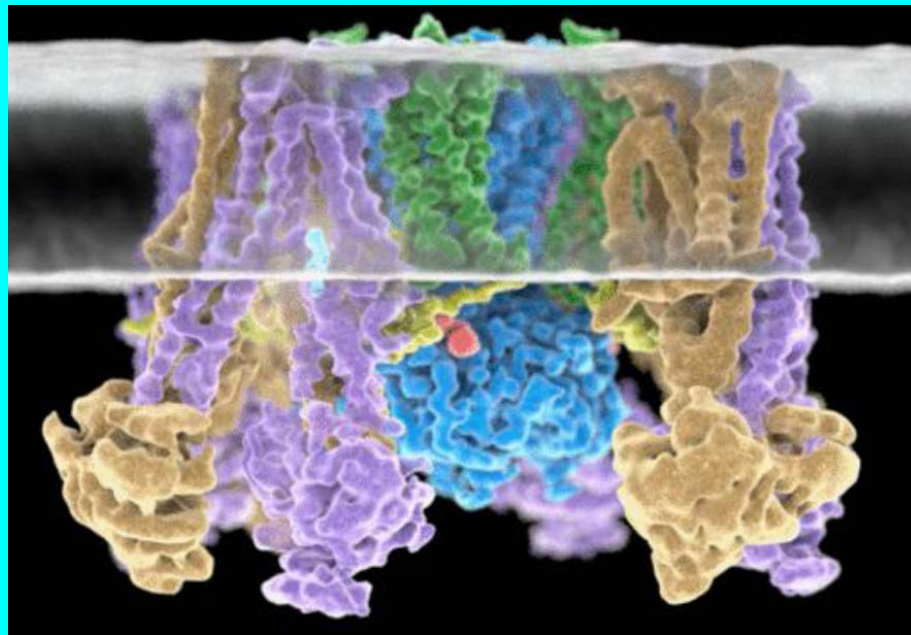
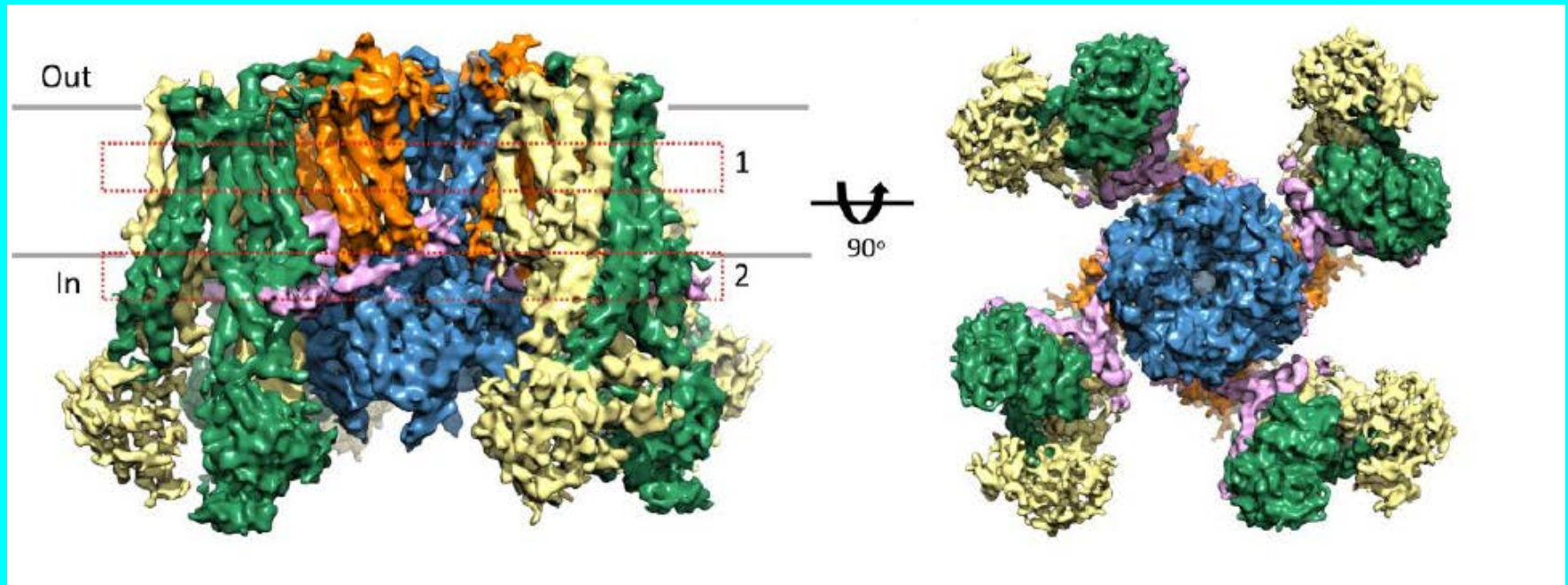


ABCC8 fehérje

ABCC8 fehérje

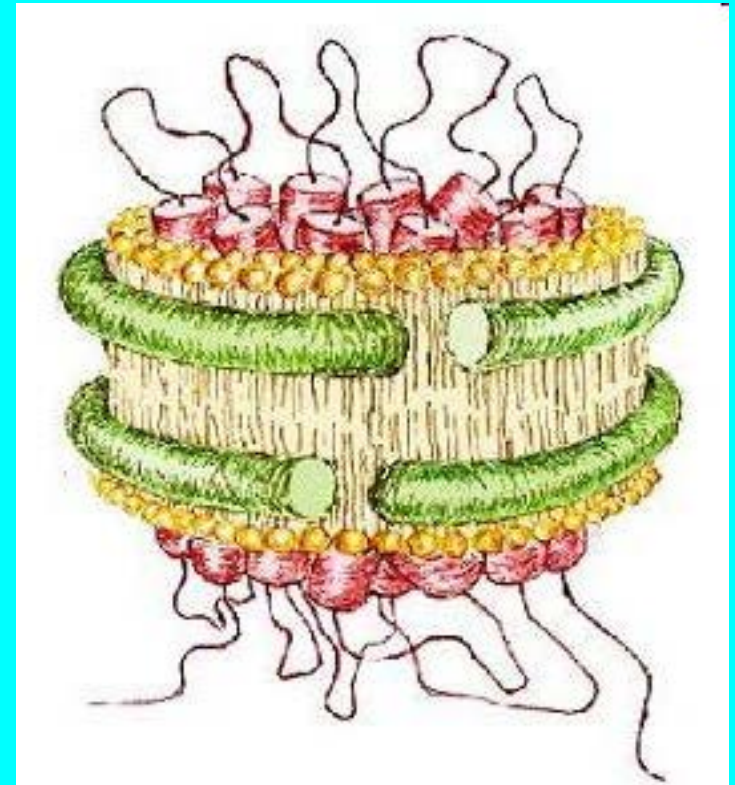
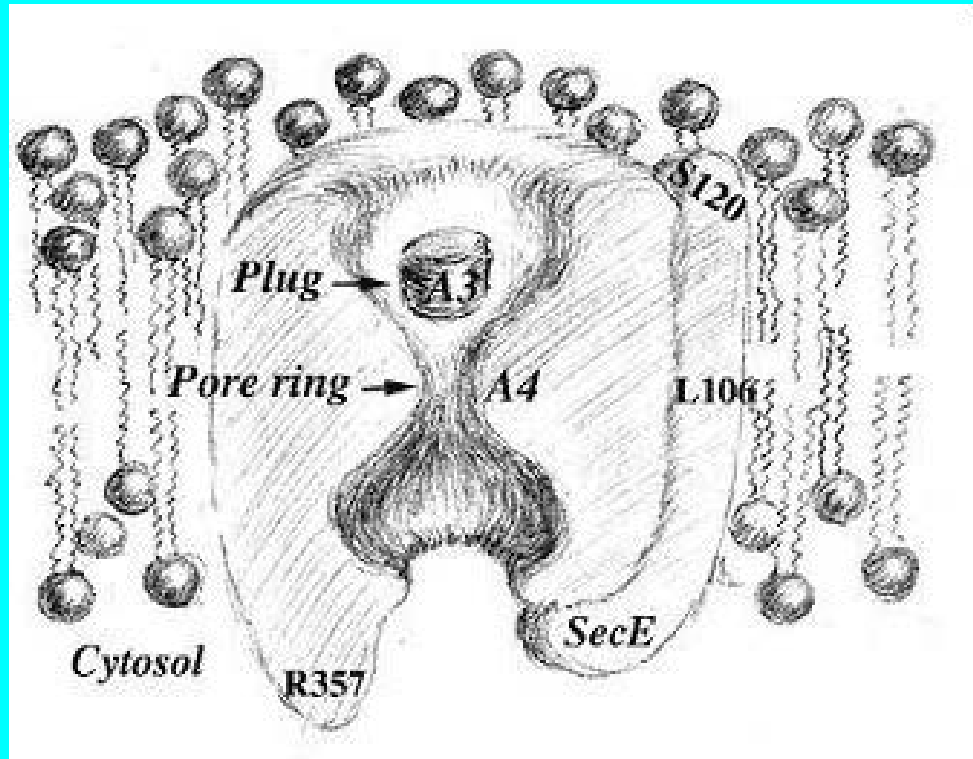


# Az ABCC8 és a Kir 6.2. csatorna komplexének szerkezete



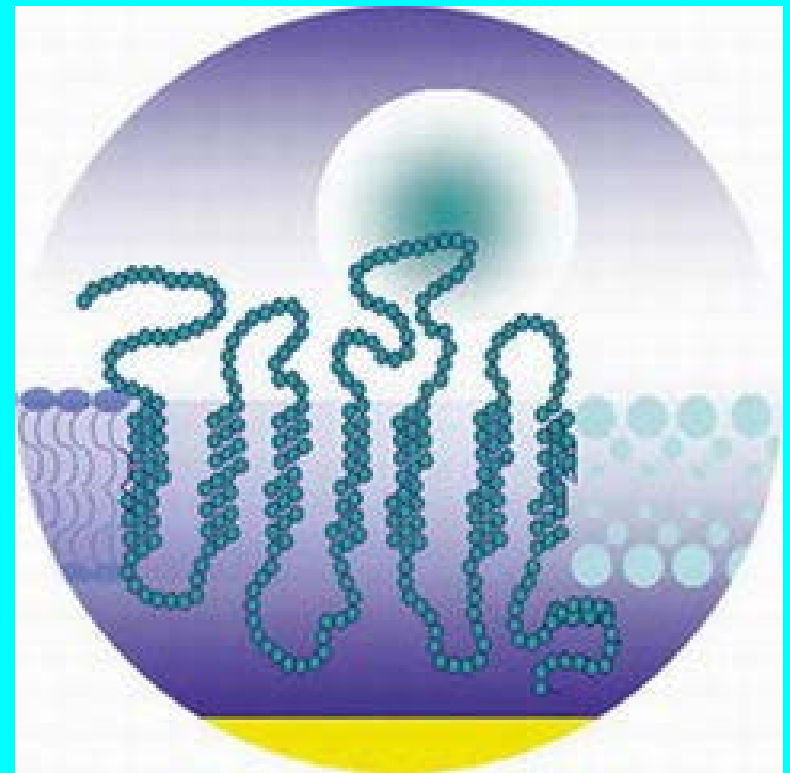
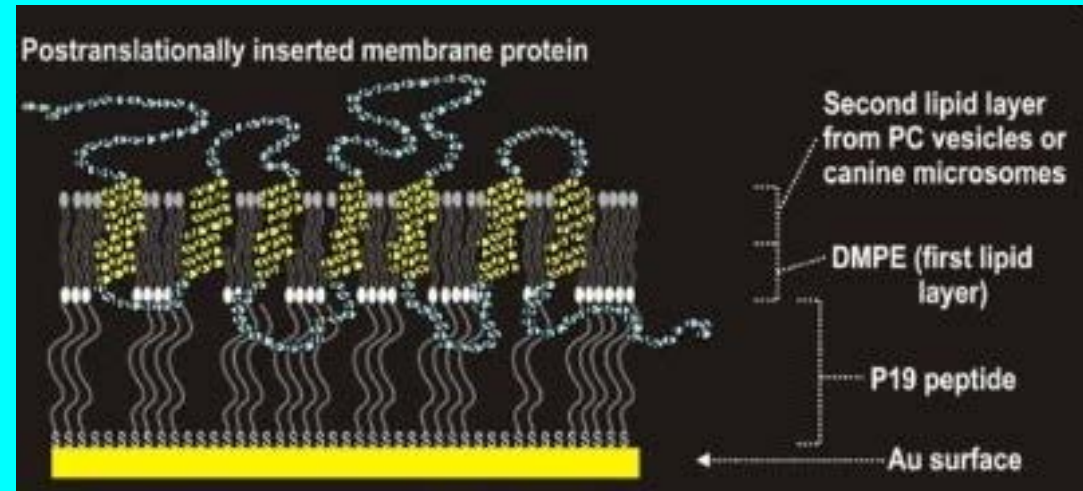
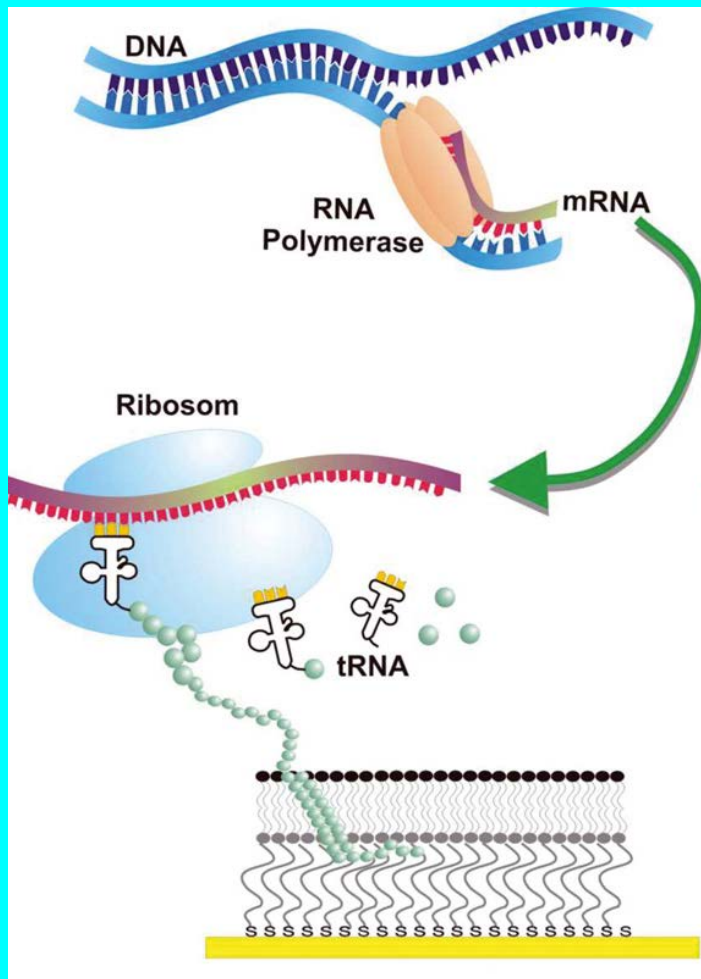


# Mesterséges fehérje-membrán komplexek – új biotechnológiai lehetőségek



Fehérje-beépítés mesterséges membránokba:  
Egy példa a „Nanodisc” technológia:  
Transzlokon beépítése lipid membránba - "sushi-szerű"  
részecskék, nanoméretű fehérjekorongok!

# Mesterséges membrán komplexek



Mesterséges szagérzékelő receptor:  
Szintetikus lipid membrán szenzor-  
alapon

– in vitro szintetizált szag-receptor  
fehérje beillesztése:

In vitro szenzor készítése!

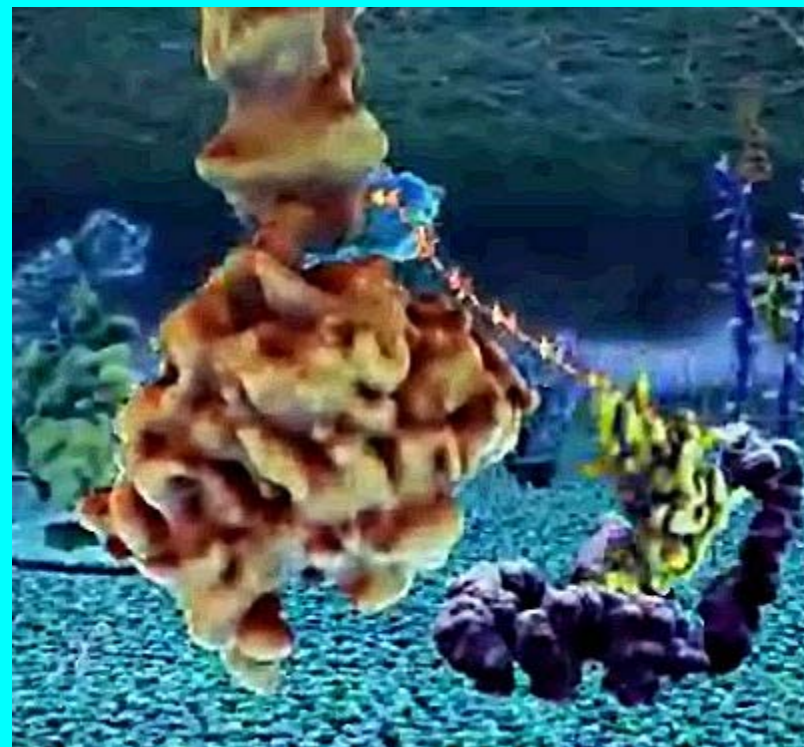
# Művészet vagy tudomány – művészet a tudományért

BioVisions

at Harvard University



Membránfehérjék utazása lipid  
tutajokban a foszfolipid-tengerben



Membránreceptorok  
találkozás a lipid-  
medencében

[https://www.youtube.com/watch?feature=player\\_detailpage&v=Pfu1DE9PK2w](https://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=Pfu1DE9PK2w)