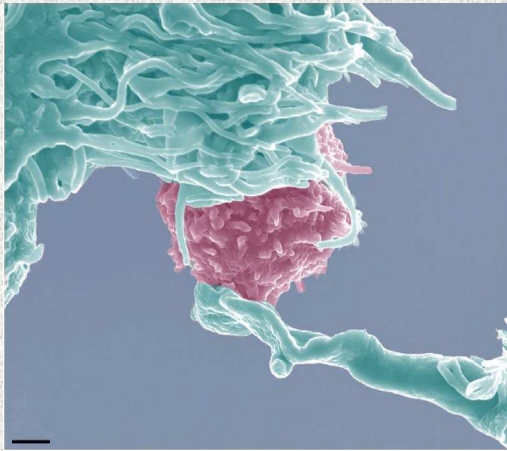


Membrán mikrodomének, nanocsövek és extracelluláris vezikulák: szerepük a sejtfunkciókban.

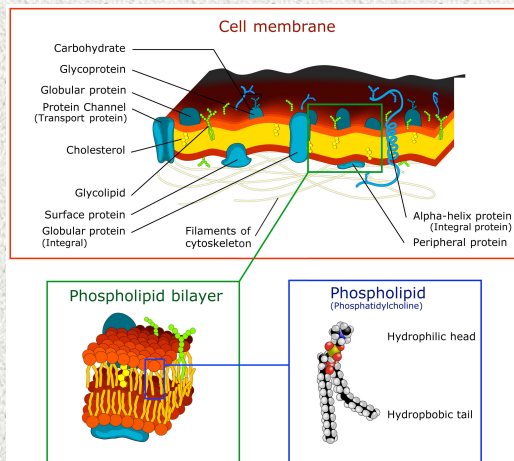
Példák az immunrendszer működéséből



SE Biofizika - Matkó János, ELTE, Immunológia
2019-04-03 – Liliom Károly SE Biofizika

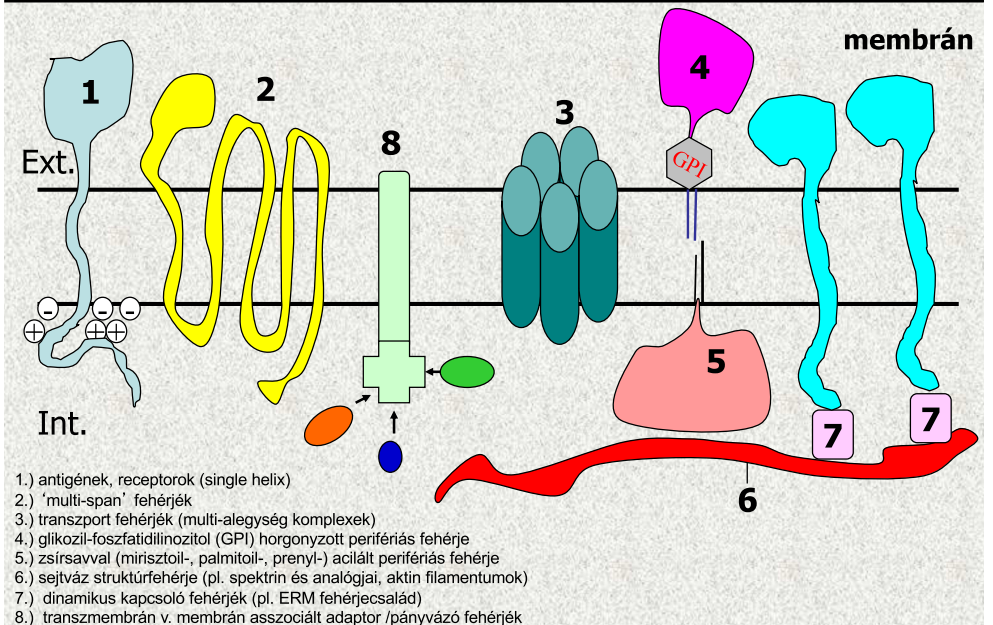
- **A sejtmembrán ultrastruktúrája**
- **A membrán mikrodomének (lipid tutajok, caveolák), avagy a „lipidek és fehérjék társasége”**
- **Egyéb membránstruktúrák (mikrovezikulák és membrán nanocsövek) és szerepük a sejt-kommunikációban: példák az immunrendszer működéséből**

A membrán globális szerkezete

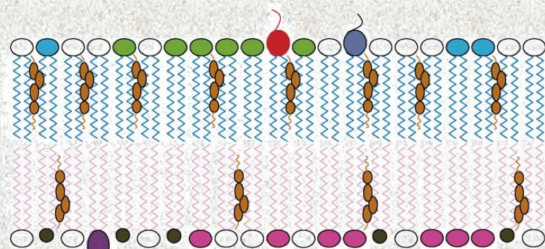


A „folyékony mozaik modell” több mint 40 éves...

A membránfehérjék globális szerkezete és kapcsolódása a lipid kettősréteghez:

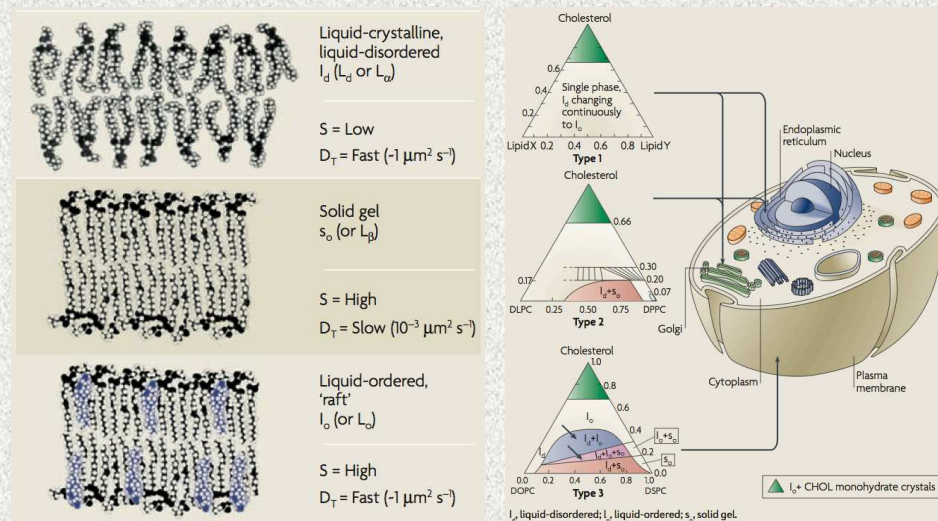


Homogén-e a membrán lipid kettősréteg?

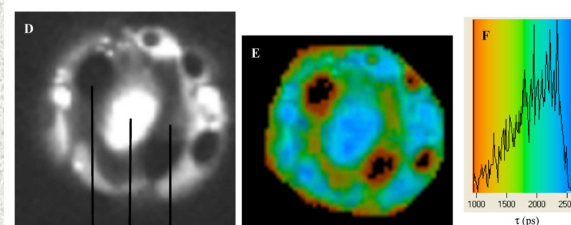
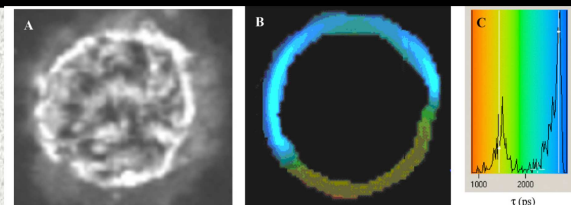


Outer leaflet	Inner leaflet
Cholesterol	Cholesterol
Phosphatidylcholine	Phosphatidylethanolamine
Sphingomyelin	Phosphatidylserine
Glycolipids	Phosphoinositides (PI, PIP, PIP2, PIP3)

Homogén-e a membrán lipid kettősréteg?



Homogén-e a membrán lipid kettősréteg?

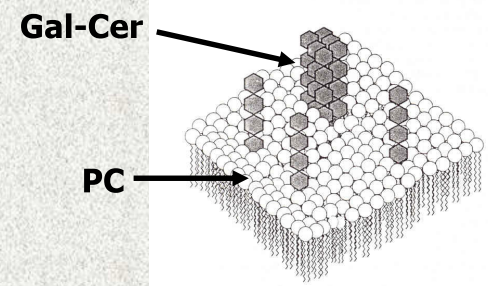


Spontán
fázis-
szeparáció
két illetve
három
komponensű
rendszerben

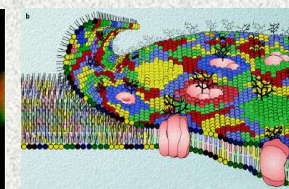
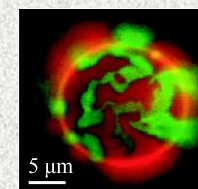
(A) **DOPC:DPPC 1:1** (mol:mol) GUV showing gel (dark)/fluid (bright) phase separation. (B) fluorescence lifetime (FLIM) image and (C) its lifetime distribution histogram of the equatorial section of GUV. Fluorescence intensity image (D), FLIM image (E), and its lifetime distribution histogram (F) of **DOPC, DPPC, and Chol of 0.44:0.44:0.12**.

Homogén-e a membrán lipid kettősréteg?

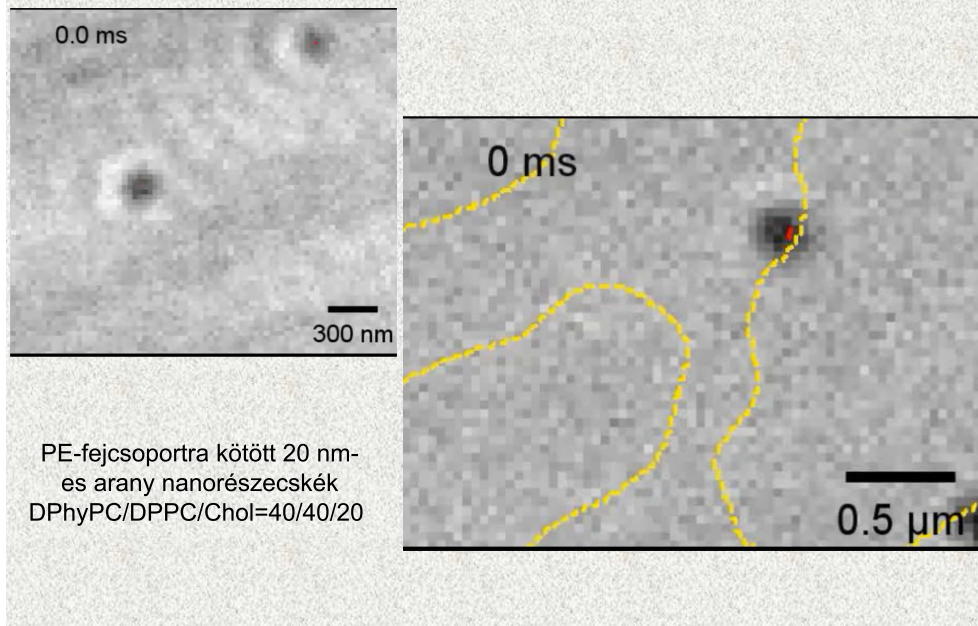
- Lipid mikroheterogenitás többkomponensű mono- és bilayerekben, liposzómákban (LUV): mikrokolorimetria, FRAP, ESR
- Spontán **GSL, SM szegregáció** két/háromkomponensű PC lipid kettősrétegekben
- A **koleszterin** egy kritikus stabilizáló faktor



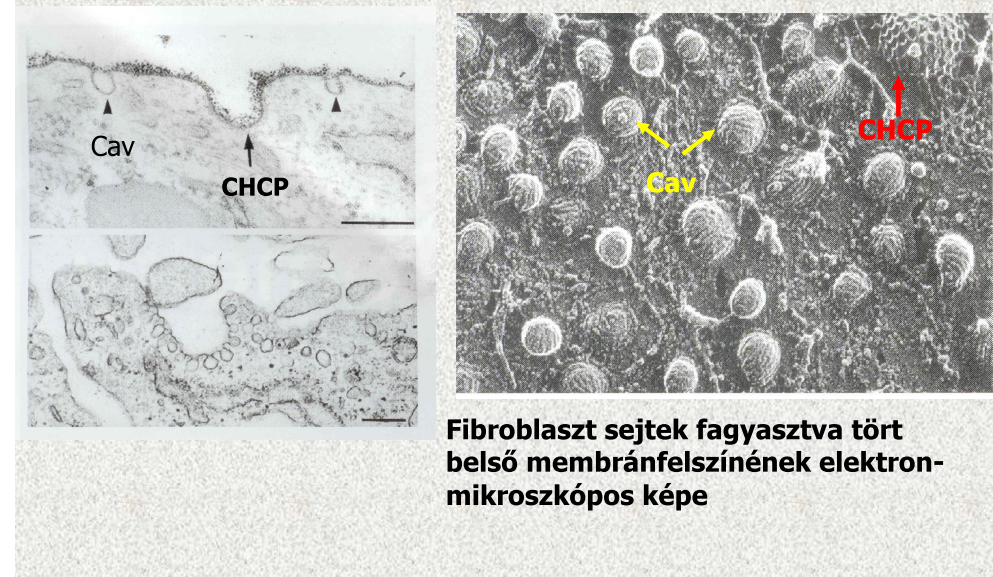
Fluid (zöld) és gél fázisú (piros) lipid domének kétkomponensű liposzóma modellmembránban (SNOM, Kinnunen, 2002)



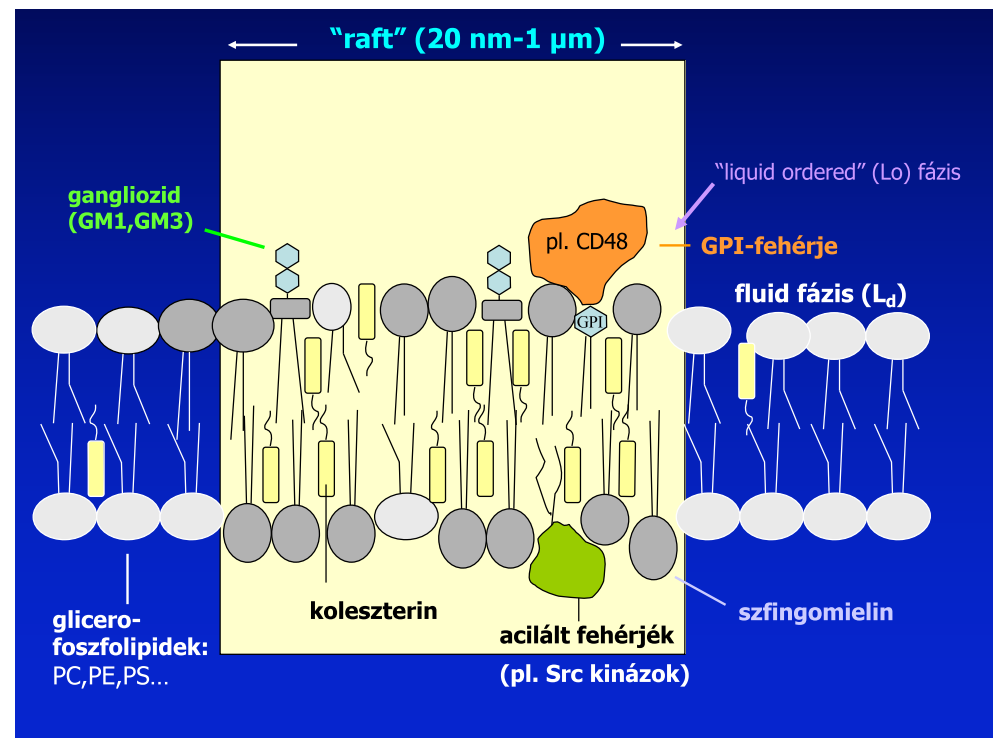
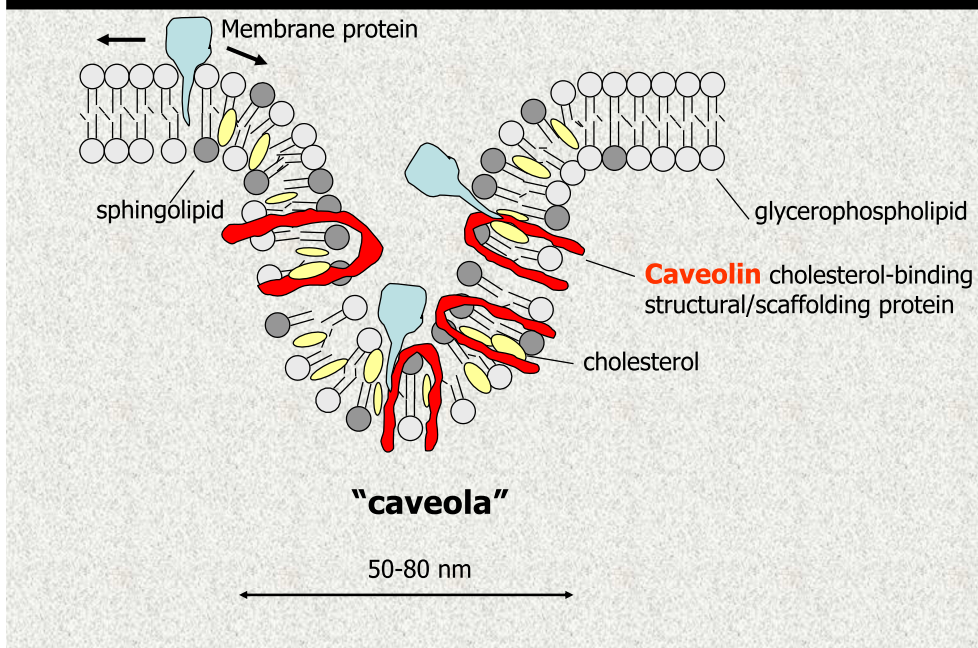
Homogén-e a membrán lipid kettősréteg?



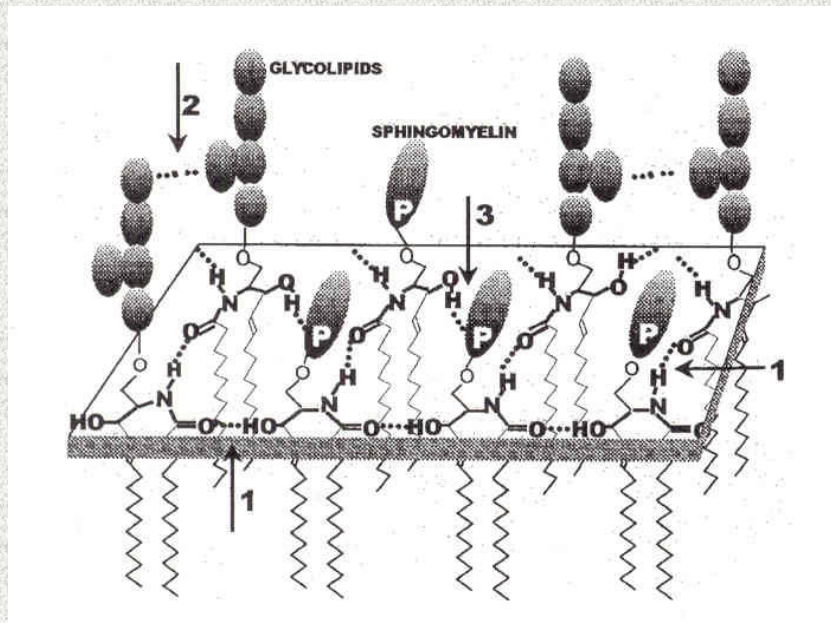
A „Caveola mikrodomének” elektronmikroszkópiás képe



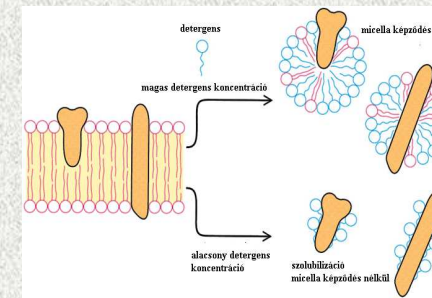
A „caveola” membrán mikrodomének szerkezete



A 'GSL domének' stabilitása membránokban: kiterjedt H-híd hálózat



A membrán mikrodomének „detergens-rezisztensek”

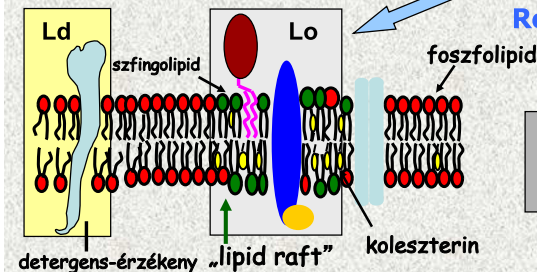


„erős”/ ionos detergens: pl. oktil-glikozid, SDS

kioldás /szolubilizáció/

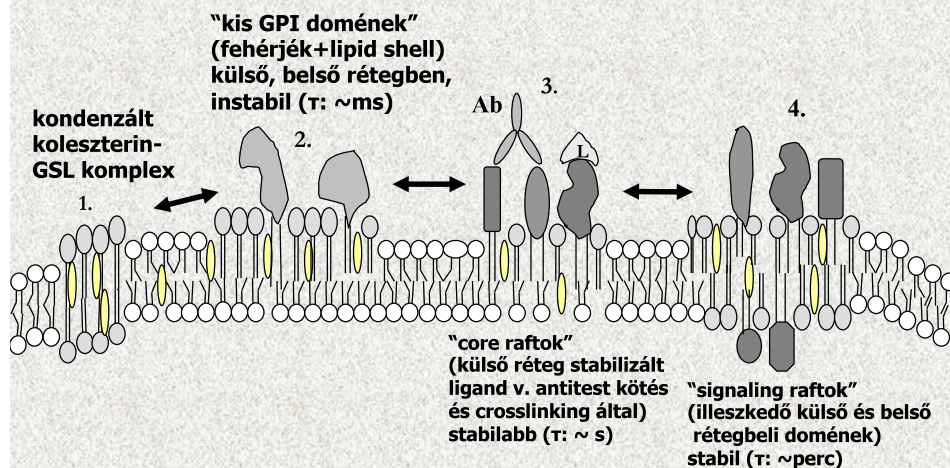
„gyenge”/nem ionos detergens: pl. Triton X-100, CHAPS, NP-40, Brij 97, Lubrol

Részleges vagy teljes rezisztencia



A lipid „tutajok” (raftok) kémiai definíciója

A sejtmembrán lipid raft dinamikájának modellje



„tutajozó fehérjék”:

- GPI-horgonyzott (EC oldal)
- acilált (dupla palmitoilált, mirisztoilált, prenilált stb.) (IC oldal)
- transzmembrán fehérjék (ED, TRMD, CPD)

A „tetraspan web”: TM4-SF fehérjék hálózata a membránban

- 34 tetraspan fehérje ismert emlősökben, ebből 33 humán is
- Képesek „konformációs pányvázóként” (scaffolding) többféle fehérje szelektív horgonyzására a membrán egy területén. A kapcsolódó fehérjékkel nagyobb, több száz fehérjéből álló „hálózatot” is tudnak képezni a membránban



„TEM domének”

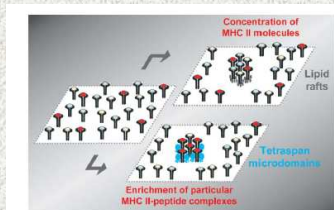


Fig. 11. Tetraspan microdomains and lipid rafts differ in their class II-peptide content. Schematic representation of which class II-peptide subsets segregate into tetraspan or lipid raft microdomains.

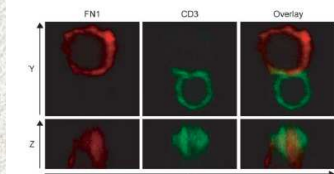
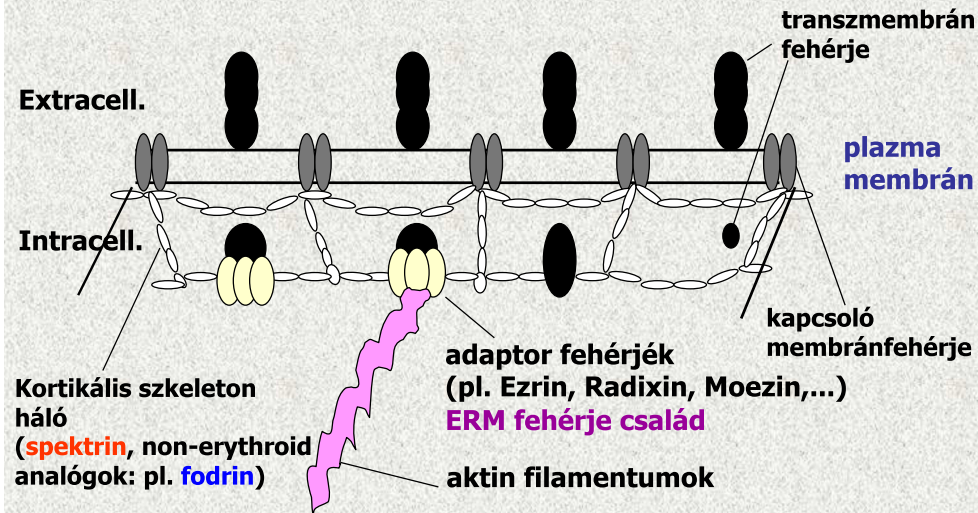
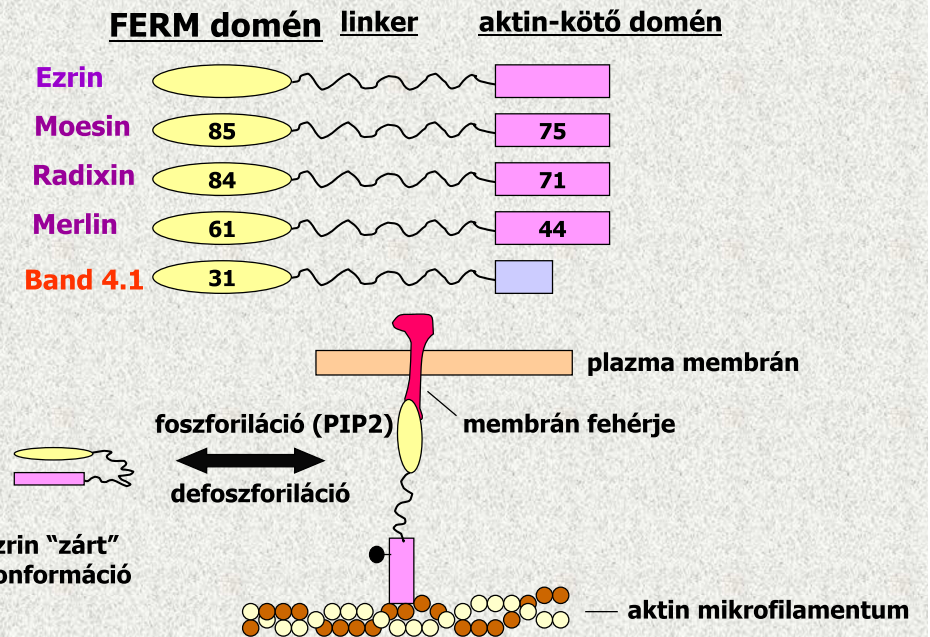


Fig. 12. CD4 and CD8 are involved in synapse formation between DCs and T-helper cells. Monoclonal-derived DCs were pulsed with the influenza vaccine Influvac, fused, and activated by LPS treatment. They were mixed with anti-CD4 or anti-CD8 (ratio 4:1) and incubated for 30 min at 37°C. After fixation in 1% paraformaldehyde, cells were stained for CD4 or CD8 with the anti-CD4 (red) and for CD8 with the anti-CD8 (green), as shown in the upper panel (DCs alone). The lower panel of images shows the molecules accumulating in the DC-T cell synapse (DC plane).

A kortikális szkeleton és a membránfehérjék kapcsolatrendszere a sejtmembránban: a "kerítés" modell



Az ERM fehérjecsalád és a citoszkeletális kapcsolatok



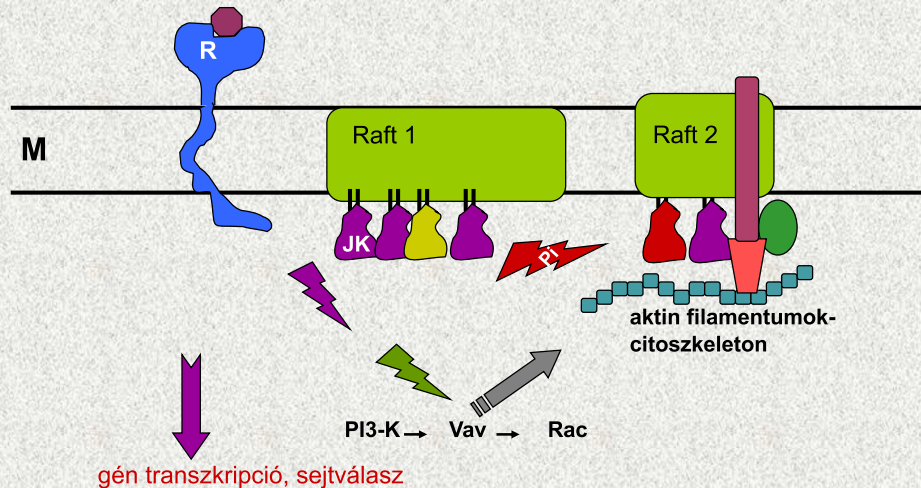
A plazmamembrán jelentős laterális és vertikális heterogenitást, „mikrodomén szerkezetet” mutat eukaryóta sejtekben

A membrán mikrodomének funkcionális jelentősége:

- Jelátvitel, sejt-kommunikáció „térbeli és időbeli” kontrollja (immunrendszer, idegrendszer)
- Különböző mikróbák (vírusok, prionok, baktériumok, protozoák) transzportja sejtekbe/sejtek között

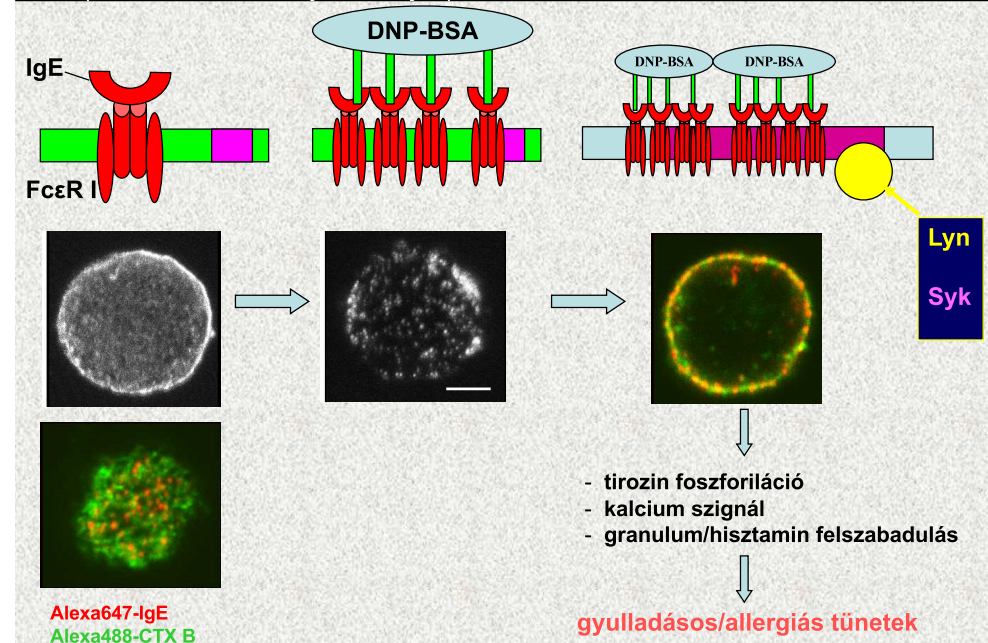
Lipid raftok és a limfocita jelátvitel

- kompartmentalizáció: „toborzás/kapcsolás”
- izolálás, kinetikai szabályozás
- szignál integrálás (PI3-K/Vav/Rac; raft-aggregáció, receptor clustering)

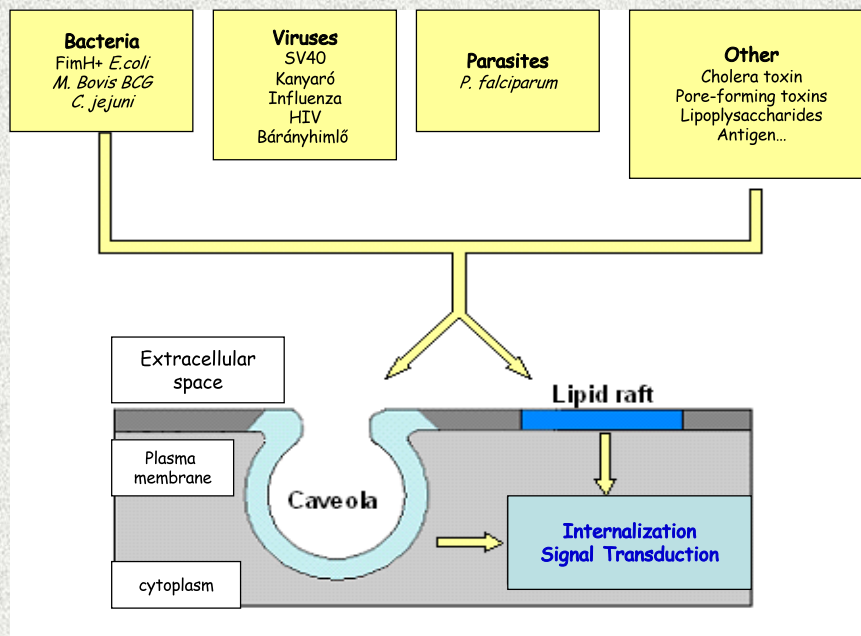


A raftok szerepe az allergén-válasz kialakulásában

(RBL-2H3 mucosa hízósejtek/leukocyták)



A membrán mikrodomének különféle mikróbak célpontjai

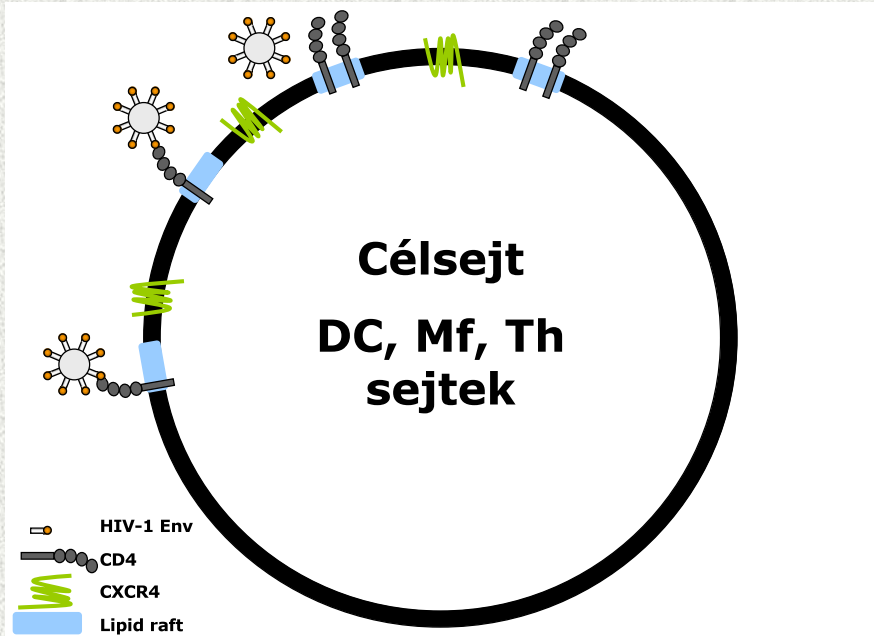


A HIV és egyéb vírusok (pl. kanyaró, influenza és hímővírusok) célsejtbe jutása: „raft-függő” folyamat

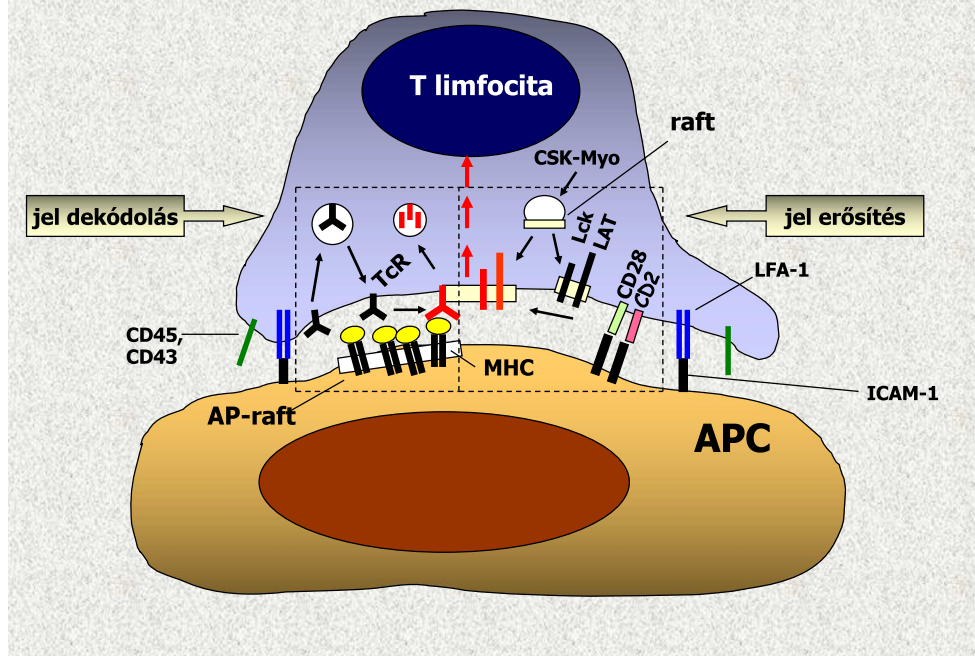
➤ A vírus sejt felszínhez történő kapcsolódása, rögzülése, a membránfúzió és internalizáció:

- függ a vírusreceptor(ok) raft-lokalizációjától
- függ a membrán koleszterin szintjétől
- függ a kortikális citoszkeleton és a raftok integritásától

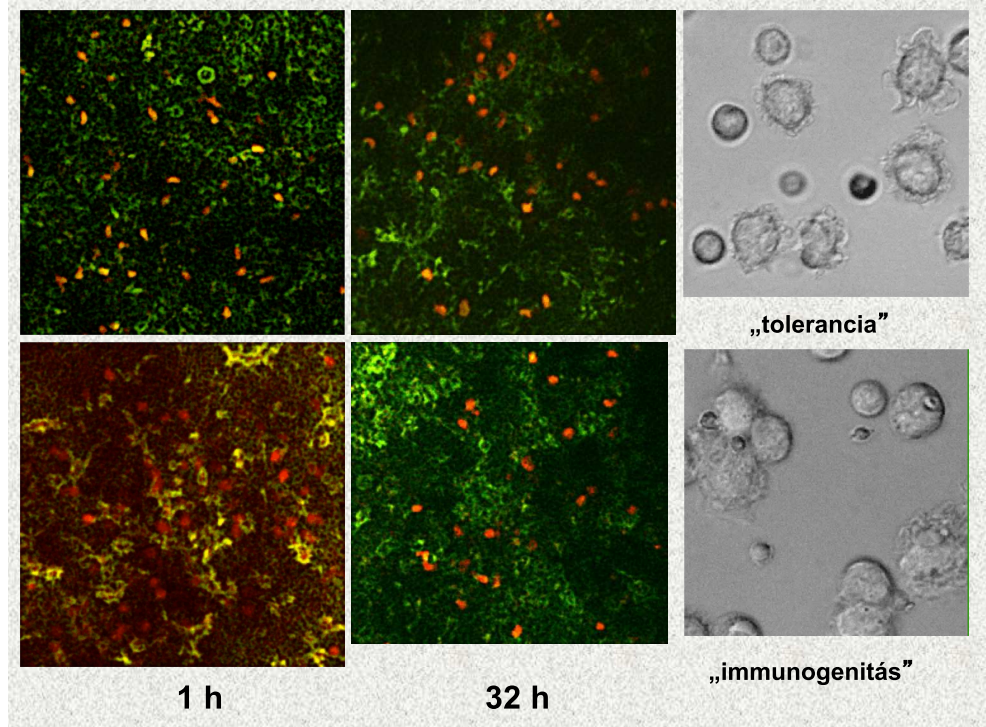
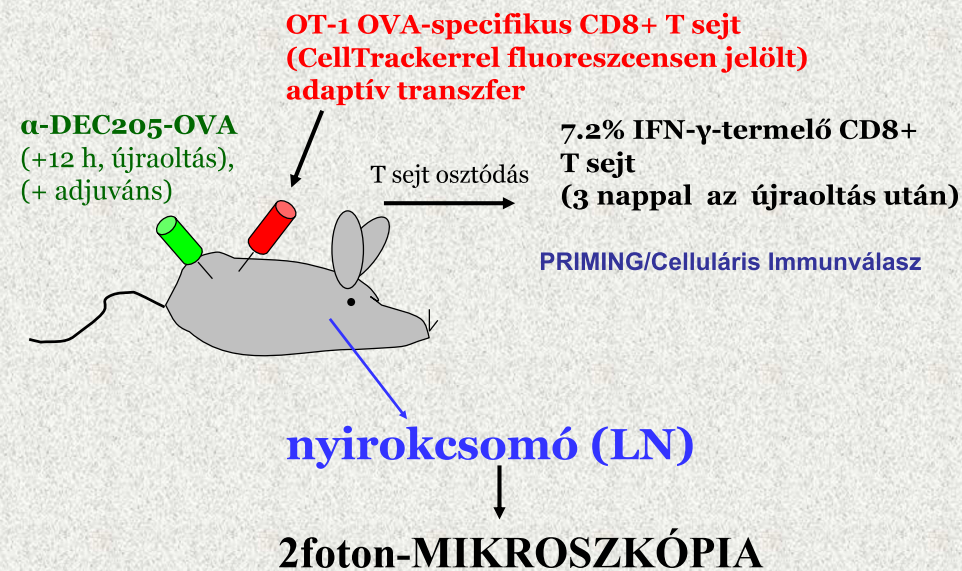
A HIV-1 fertőzés molekuláris modellje



A T-sejt - APC immunszinapszis: funkcionális modell



Tolerancia ill. immunválasz egerben (antigén-célzás) – a nyirokcsomó 2PM „in vivo dinamikus képalkotása”



A membrán nanocsövek kialakulása, típusai

- a.) F-aktin/tubulin tartalmú „protrúzió” képződése és növekedése révén
b.) Két előzőleg kontaktusban levő sejt eltávolodásakor (pl. osztódás után)

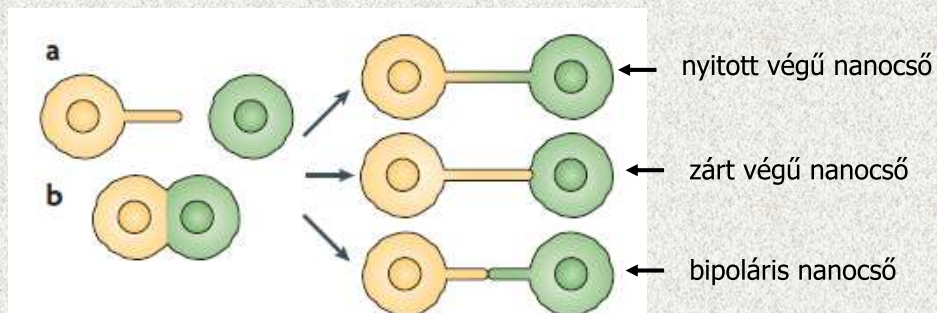
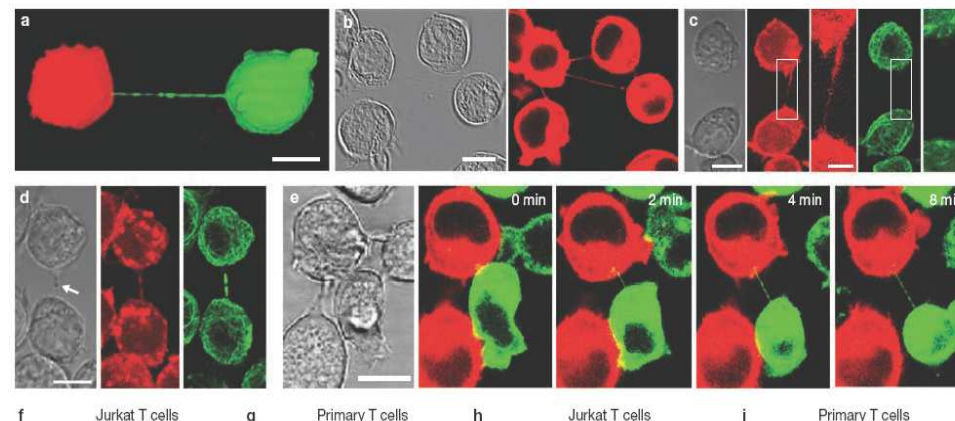


Figure 2 | Two distinct processes can lead to membrane nanotube formation. Schematic

D.M Davis, S. Sowinski: *Nature Rev Mol Cell Biol* 9:431, 2008.

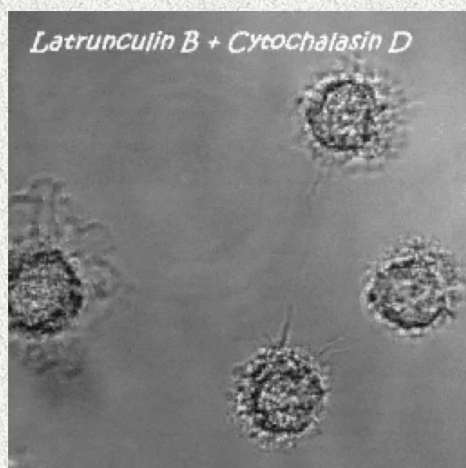
A T-sejtek közötti „nanocsövek hálózata”

Sowinski et al, 2008, *Nature Cell Biol*

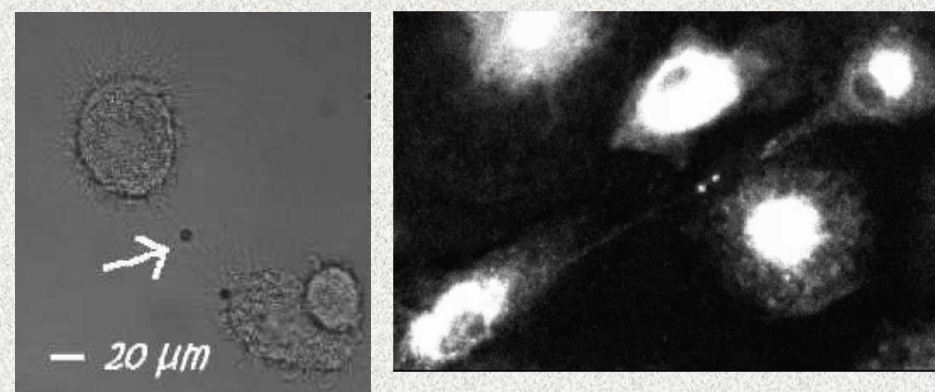


- A nanocsövek kontaktusba lépő (in vitro: 12-15 óra) fertőzött és nem fertőzött T sejtek kapcsolatának megszűnése után alakulnak ki
- A T sejt nanocsövek, szemben mieloid nanocsövekkel, nem mikrotubulus hanem F-aktin-tartalmú membránnyúlványok
- A T-sejt nanocsövek nem „nyitott végű csatornák”, anyagtranszport nincs

A T-sejtek közötti „nanocsövek hálózata”



„Baktérium szörfőzés” a makrofágok között

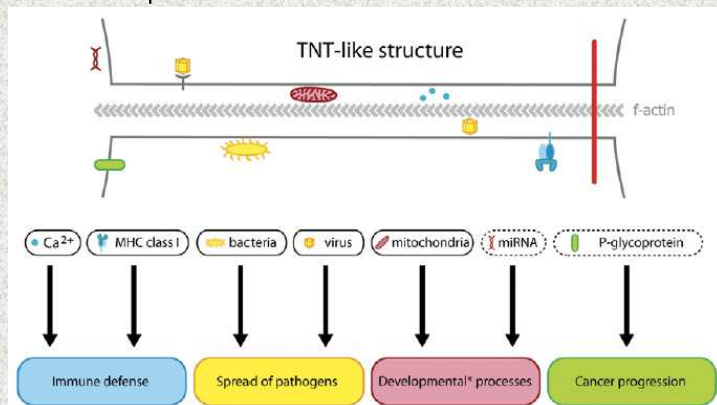


Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)⁺ expressing GFP.

Önfelt et al, *J Immunol* 2006. 177: 8476-83

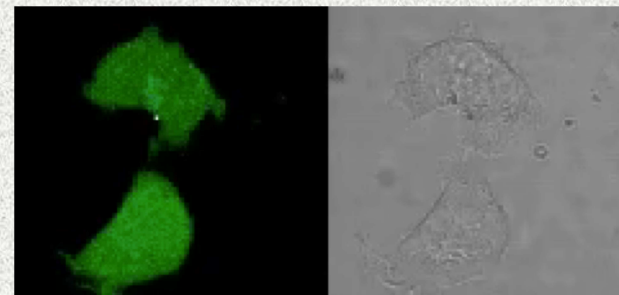
Intercelluláris transzport a „tunneling nanocsöveken” át:

- lipid vezikulák
- membrán részek
- endoszóma, lizoszóma
- mitokondrium, miRNA
- aktív kaspáz-3, endogén membrán kötött FasL
- receptorok (CD59, CD81, MHC-I)
- prionok



Szekretált membrán mikrovezikulák: a sejtek „távkommunikációs eszközei”

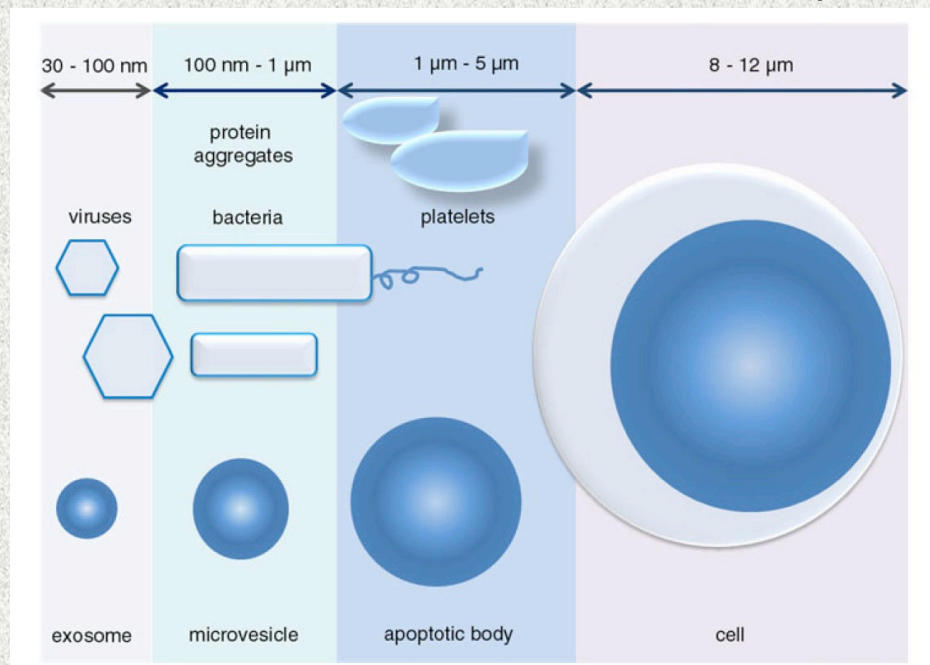
PI: A kalcium stressz mikrovezikula felszabadulást vált ki B limfocitákban



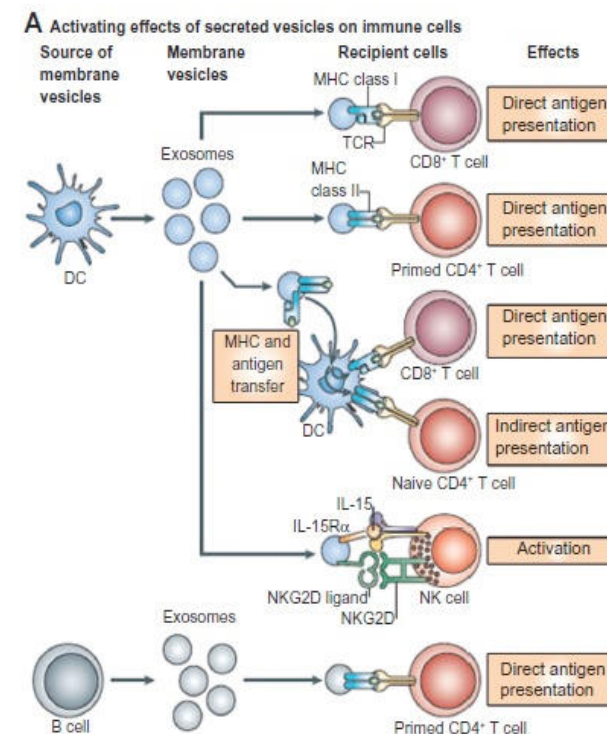
Színkód: $\text{Ca}^{2+}_{\text{ic}}$ szint –zöld: alacsony; vörös: magas; indikátor: Fluo-4

Kezelés: 4 $\mu\text{g/ml}$ IONOMYCIN

Az extracelluláris membrán mikrovezikulák főbb típusai



Az exoszómák/
extracelluláris vezikulák
pozitív/aktiváló
immunregulációs
hatásai



Az exoszóma mikroRNS profil mint diagnosztikus biomarker (?)

Table 1 | miRNAs present in exosomes isolated from the sera of patients with specific cancers or following immunization are being used as diagnostic biomarkers.

miRNA identified in exosomes	Cells origin	Reference
miR-150	CD4 ⁺ T cells	(70)
miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, and miR-214	Ovarian cancer	(71)
miR-205, miR-19a, miR-19b, miR-30b, and miR-20a	Lung squamous cell carcinoma	(72)
let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, and miR-23a	Colon cancer	(73)
hsa-miR-31, miR-185, and miR-34b	Melanoma	(44)

Exoszómák a tumor-immunterápiában...

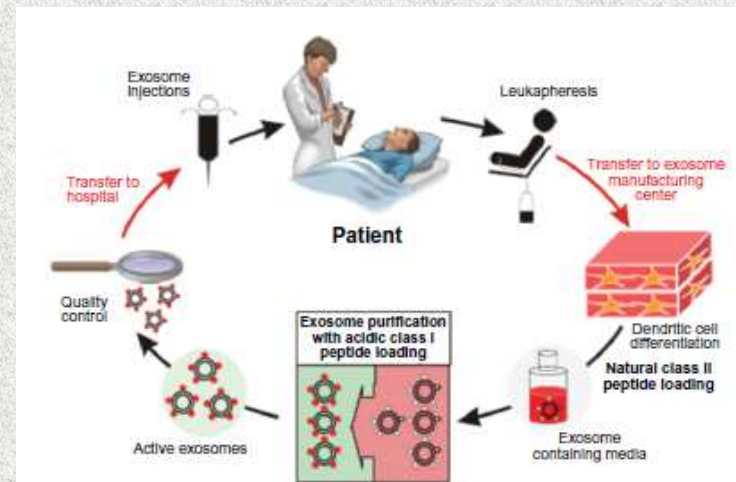


Figure 6 Clinical grade exosomes in immunotherapy. The process of how DEX can be derived, purified, and utilized in cancer treatment. Creative Commons. Reproduced with permission from Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 2005;3(1):10.

A sejtmembrán-felszín dinamikája

