

Membránreceptorok szerkezete és funkciója

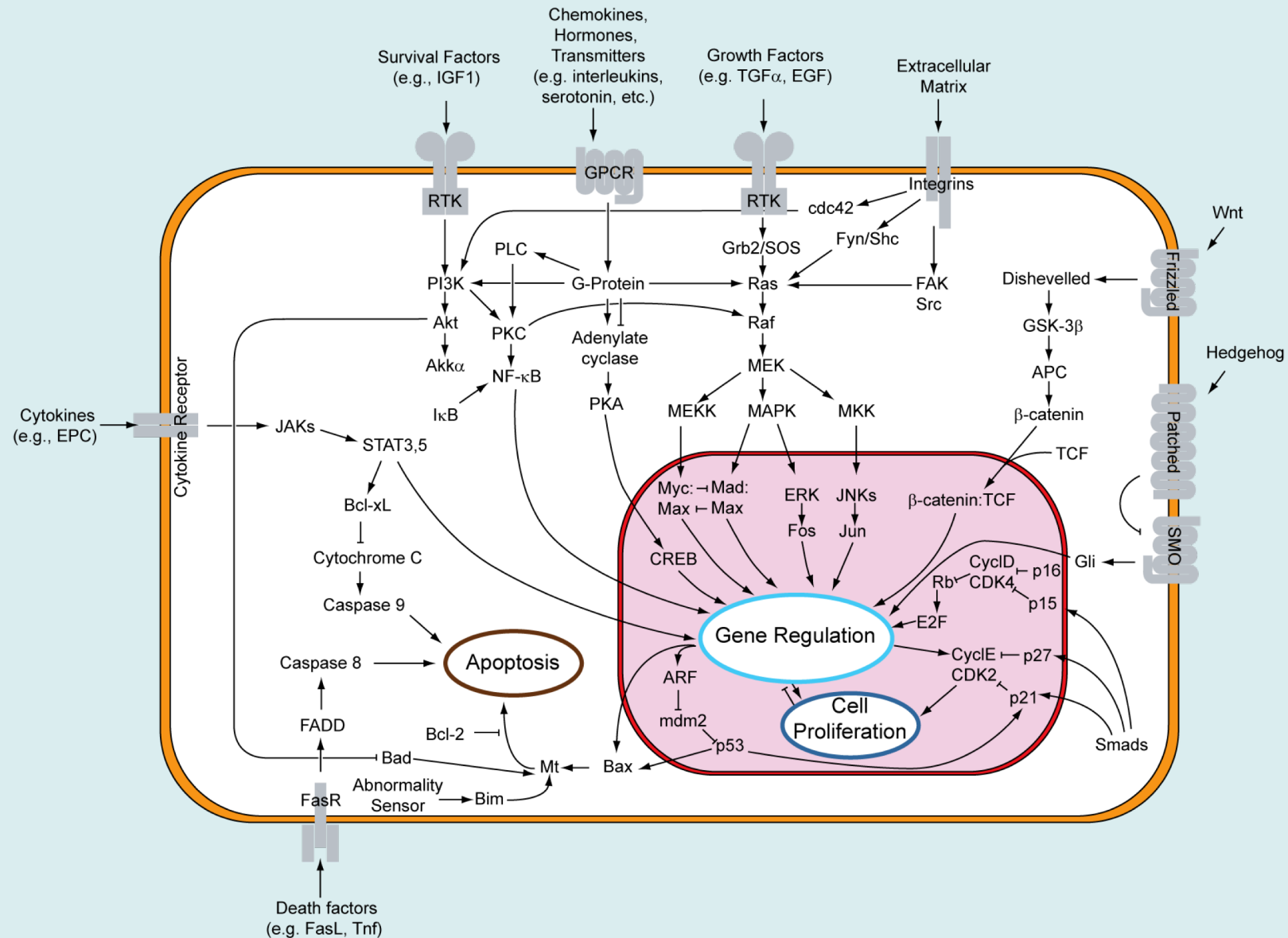
“Modellmembránok”

Liliom Károly

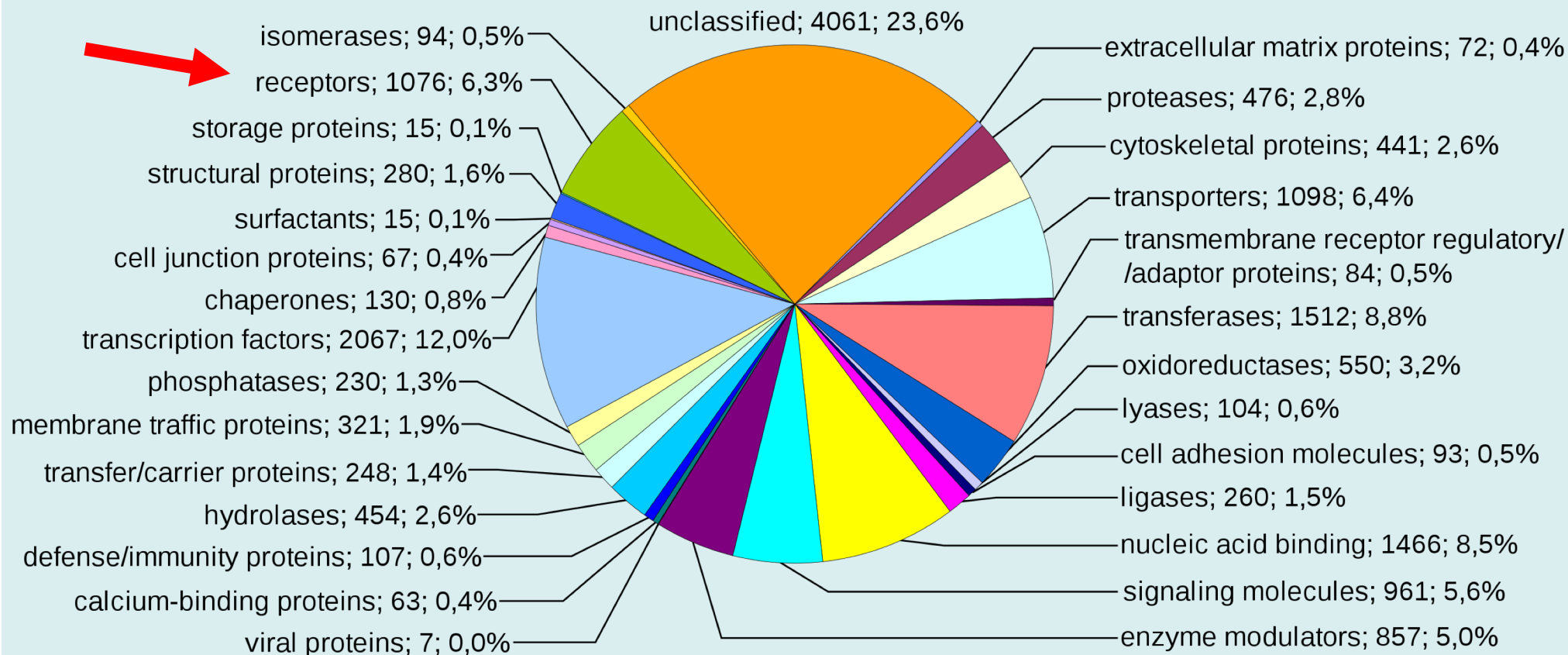
SE ÁOK Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

2020. április 7.

Receptorok a plazma membránban – a sejt környezetéből érkező ingerek érzékelői

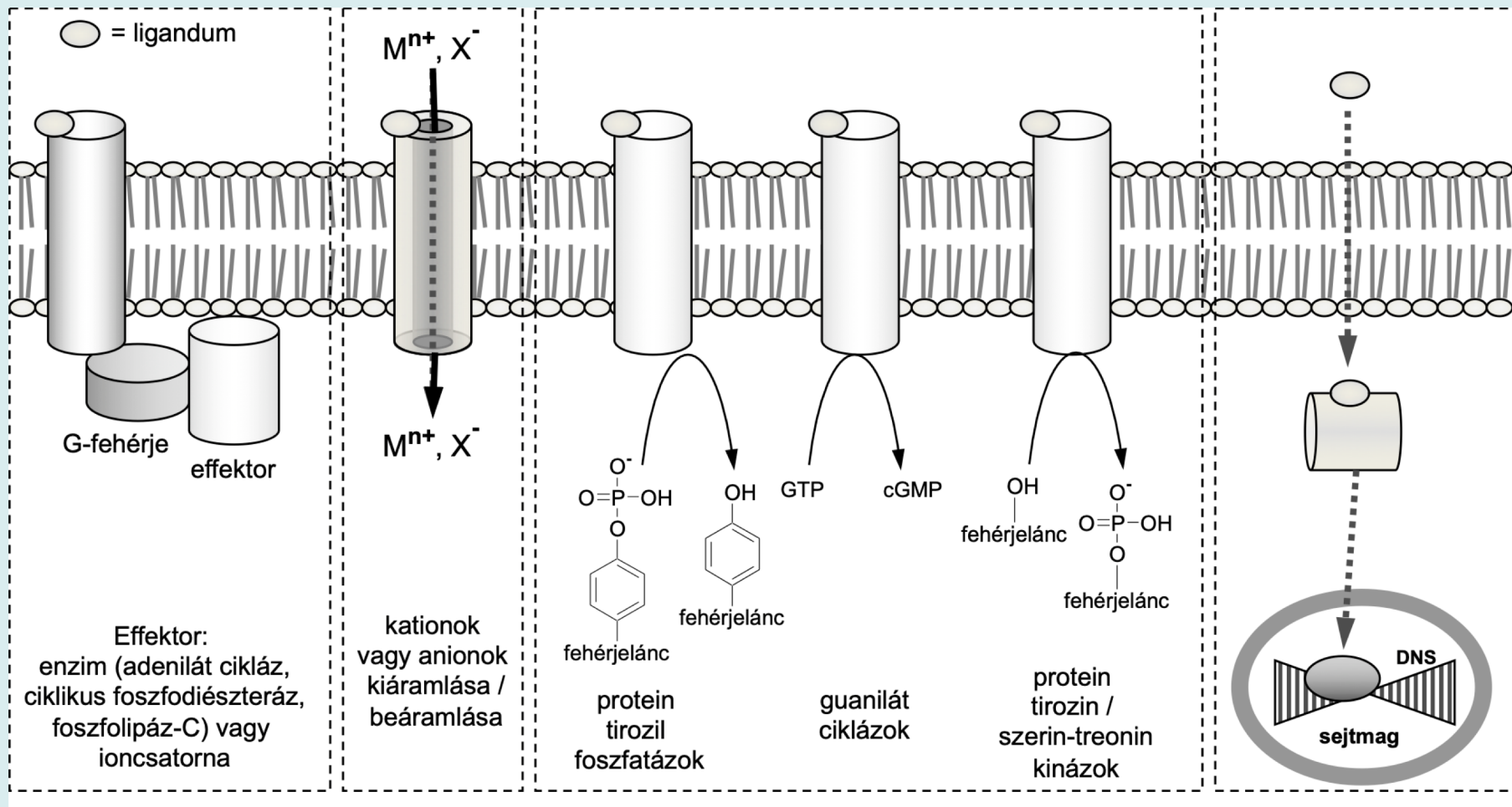


Receptorfehérjék az emberi genomban



A receptorok a humán genom egyik legnépesebb fehérjecsaládját alkotják (~6%). Megtalálhatók a plazmamembránban, a citoplazmában és a sejtmagban. Általában molekuláris kapcsolóként működnek, aktív konformációjukat specifikus ligandumuk kötődése hozza létre vagy stabilizálja.

Receptor-típusok



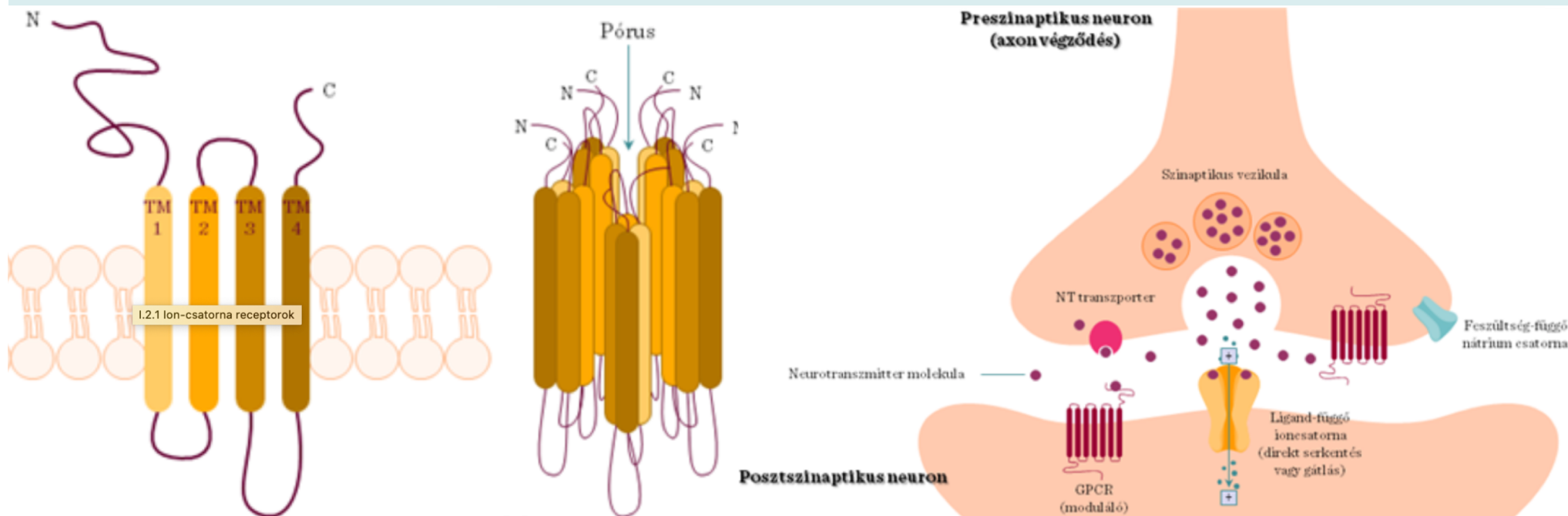
G-fehérjékkel
kapcsolódó
receptorok
(GPCR)

ioncsatornák
(ligandumfüggő,
feszültségfüggő)

enzimaktivitással
rendelkező
receptorok

magi receptorok
(ligandum-aktivált
transzkripciós
faktorok)

Ligandumfüggő ioncsatornák

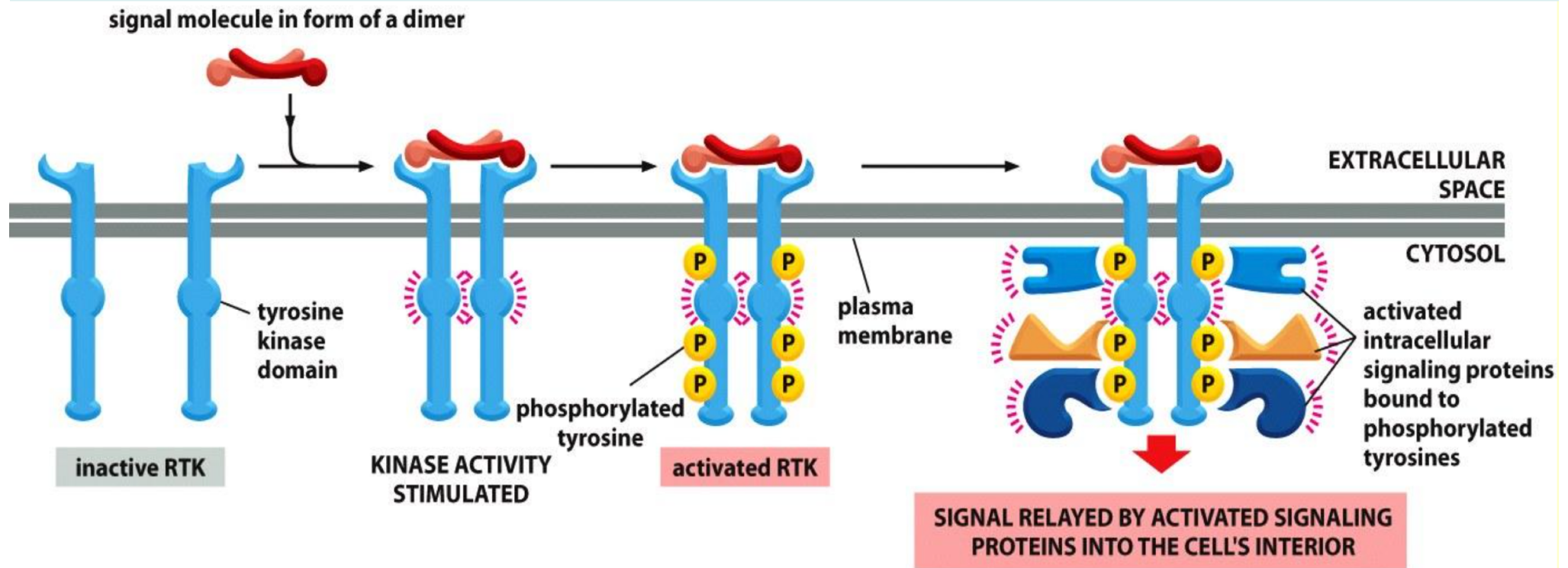


A plazmamembrán ligandum-vezérelt ioncsatornái gyakran fordulnak elő az excitábilis sejtekben. A ligandum kötődésekor a csatorna kinyílik és az ionok a koncentrációgrádiens mentén átáramlanak.

Az ioncsatorna receptorokat 3 csoportba osztjuk:

- (1) Cys-hurok receptorok: pentamer szerkezetűek, minden alegységük 4 transzmembrán régiót tartalmaz (pl. acetilkolin nikotinos receptora – Na^+ csatorna; GABA-A, GABA-C, Glicin- Cl^- csatornák).
- (2) Glutamát-aktivált kation-csatornák: tetramerek, mindegyik alegység 3 transzmembrán régiót tartalmaz.
- (3) ATP-függő csatornák: három homológ alegységből állnak, minden alegység két transzmembrán régiót tartalmaz (pl. P2X purinerg receptor).

Enzimaktivitással rendelkező receptorok



A saját enzimaktivitással rendelkező receptorok lehetnek 1) receptor tirozin-kinázok (PDGF, inzulin, EGF, VEGF, FGF receptorok), 2) receptor tirozin-foszfatazok (CD45), 3) receptor guanilát-ciklázok (nátriuretikus peptid receptorok), 4) receptor szerin/treonin kinázok (TGF- β receptorok), és 5) tirozin-kináz asszociált receptorok (citokin receptorok, Fc receptorok). A receptor tirozin-kinázok extracelluláris ligandumkötő, transzmembrán és intracelluláris kináz-doménekből állnak, működésük fő lépései: ligandum kötése, dimerizáció, autofoszforyláció, majd a foszfotirozin csoportokhoz adapter- vagy effektor-fehérjék kötődése.

G-fehérjékkel kapcsolódó receptorok

A G-fehérjékkel kapcsolódó receptorok (GPCR) az elsődleges jelátviteli molekulák, amelyekkel a sejtek érzékelik a környezetükben bekövetkező változásokat (fény, szag, íz, pH, Ca^{2+} -ionok, hormonok, lipidek, neurotranszmitterek, stb). Szerkezetük alapján heptahelikális vagy hét transzmembrán-hélixet tartalmazó (7TM) receptorokként is hivatkoznak rájuk.

Az emberi genom (~20000-25000 gén) ~1500 nem-redundáns szekvenciát tartalmaz, amely receptorokat kódol, ezek mintegy mint fele 7TM receptor (791). 391 7TM receptor a szaglásban vesz részt és 271 gén kódol endogén ligandummal rendelkező 7TM receptort. Ha figyelembe vesszük a poszt-transzlációs módosításokat, splice-variánsokat és az átlagos expressziós profiljukat, akkor a 7TM receptorok egy átlagos sejt felszínén mintegy ~30000-40000 különböző ligandum-kombinációira tudnak reagálni.

A sejtéletben minden lényeges folyamatát szabályozni képesek: proliferáció, differenciáció, apoptózis, migráció, mozgékonyág, sejthalak, Ca^{2+} -homeosztázis, sejtek közötti kommunikáció, ...

7TM receptorok orvosi jelentősége

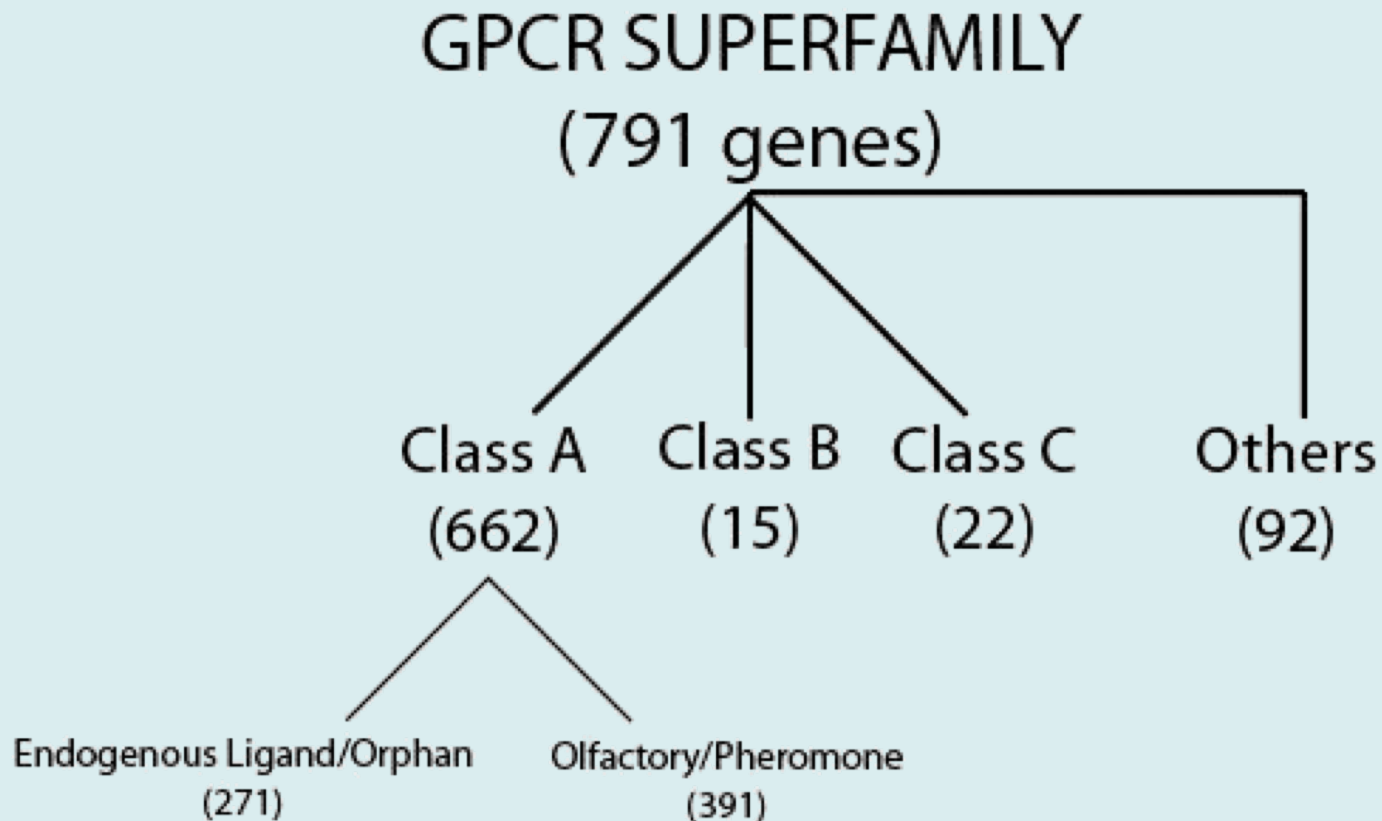
A 7TM receptorokon hat a ma kapható gyógyszerek mintegy fele és az új hatóanyagfejlesztések mintegy 60% is ezt a fehérjecsaládot célozza meg. Ennek ellenére még mindig több, mint 100 7TM receptor endogén liganduma ismeretlen (árva-receptorok). A nagy gyógyszergyárak komoly erőfeszítéseket tesznek az árvareceptorok endogén ligandumainak azonosítására.

A legkomolyabb kihívás a racionális hatóanyagtervezés számára, hogy alig van ismert térszerkezet, miután a 7TM - és általában a membránreceptorok kristályosítása komoly technikai kihívást jelent. Az elmúlt években ötletes új technikákkal sikerült tucatnyi 7TM receptor szerkezetét meghatározni, de még mindig döntő szerepe van a homológia modellek kidolgozásának és kísérleti ellenőrzésének, finomításának, amely modelleket azután in silico ligandumdokkolással alkalmaznak a potenciálisan kötődő vegyületek azonosítására.

További komplikáció, hogy a 7TM receptorok működése lényegesen összetettebb, mint azt eleinte gondolták...

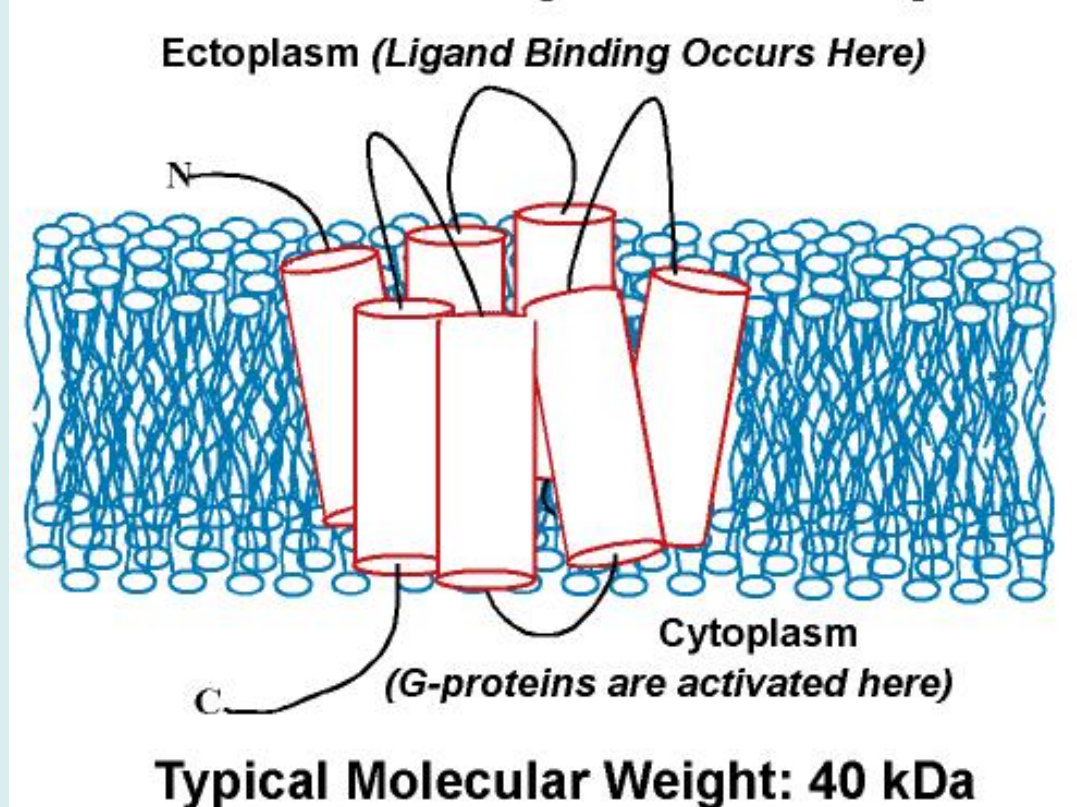
7TM receptorok osztályozása

A-család -	Rodopszin-szerű 7TM receptorok (legnépesebb és legdiverzebb)
B-család -	Szekretin receptorcsalád (glukagon, GnRH, PTH, CRH receptorok)
C-család -	Metabotróp (glutamát, GABA) receptorok
D-család -	Gomba feromon receptorok
E-család -	Frizzled/Smoothened, Wnt, Hedgehog



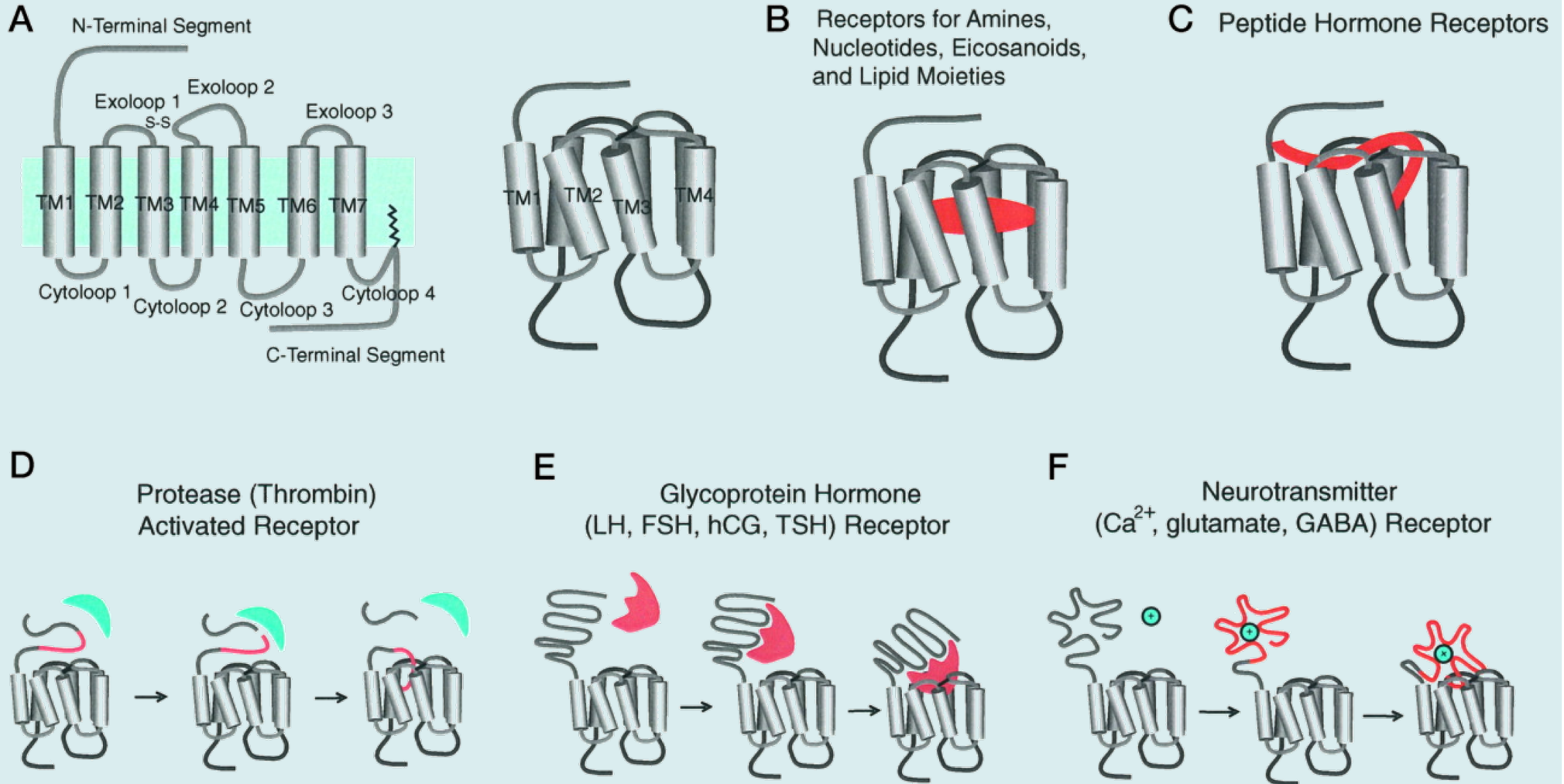
7TM receptorok szerkezeti jellemzése

G Protein-Coupled Receptors

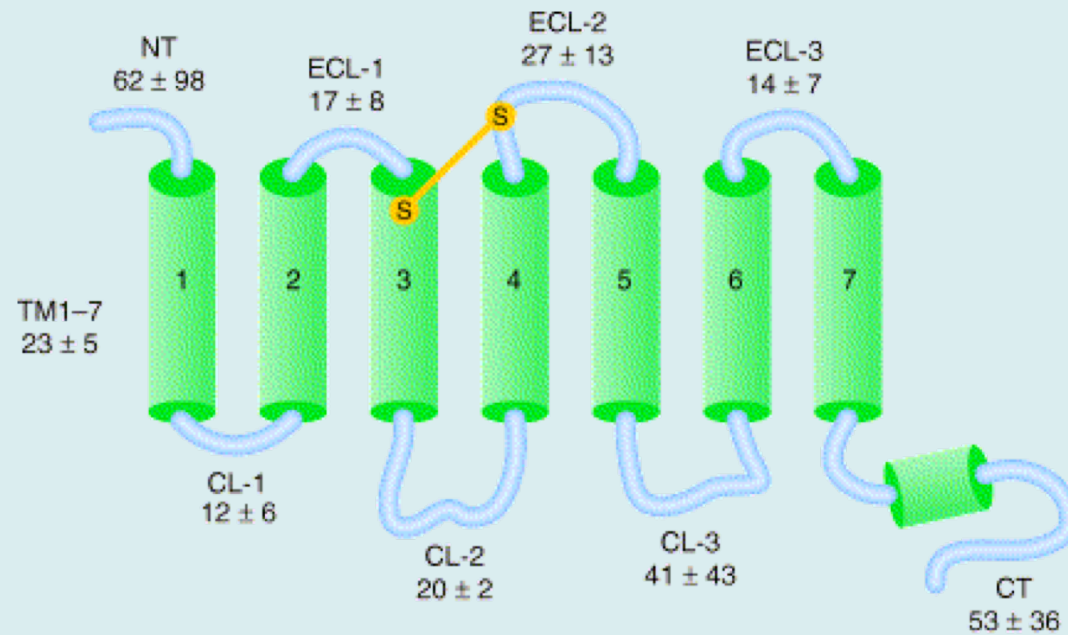


A plazmamembránt hétszer átszelő α -helikális köteg, valamint ebből következően három extracelluláris és három intracelluláris hurok-régió. Az N-terminális mindig extracellulárisan, a C-terminális mindig intracellulárisan helyezkedik el. Sok 7TM receptorban megtalálható egy rövid nyolcadik hélix a C-terminális közelében, intracellulárisan, általában a membránszínnel párhuzamos orientációban.

7TM receptorok ligandum-kötése

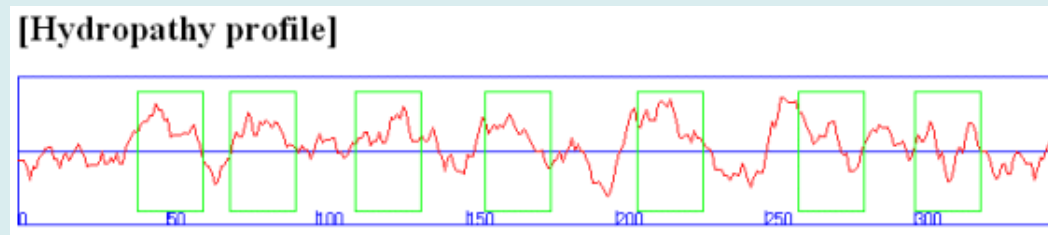


A 7TM receptorok szerkezeti jellemzői



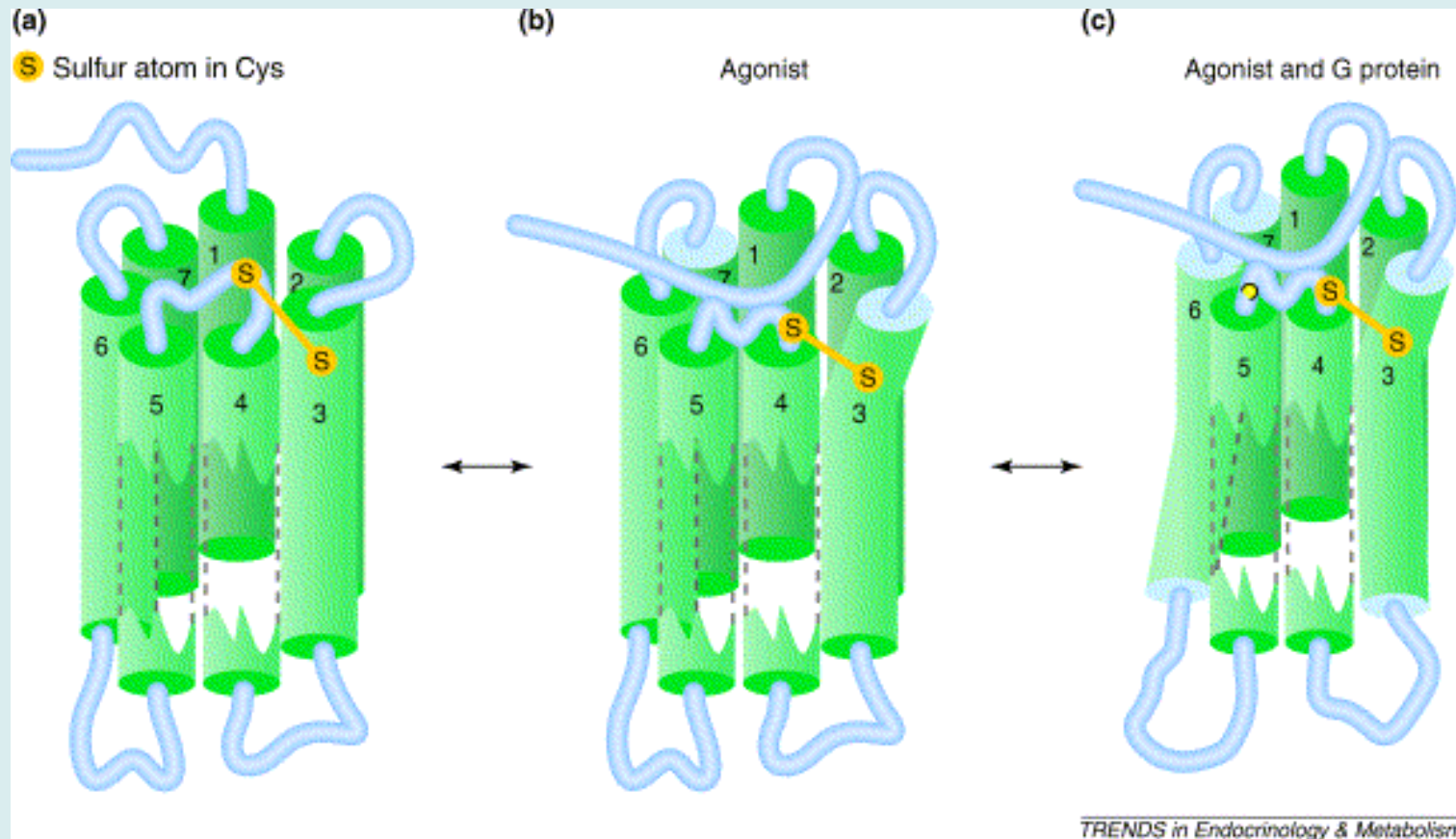
TRENDS in Endocrinology & Metabolism

7TM hélix, ~25 hidrofób AA – szekvenciából hatékonyan jósolható (pl. HMMTOP)



Konzervált szerkezeti elemek: diszulfid-híd (92%), DRY-motívum TM3-ban, NPxxY motívum TM7-ben.

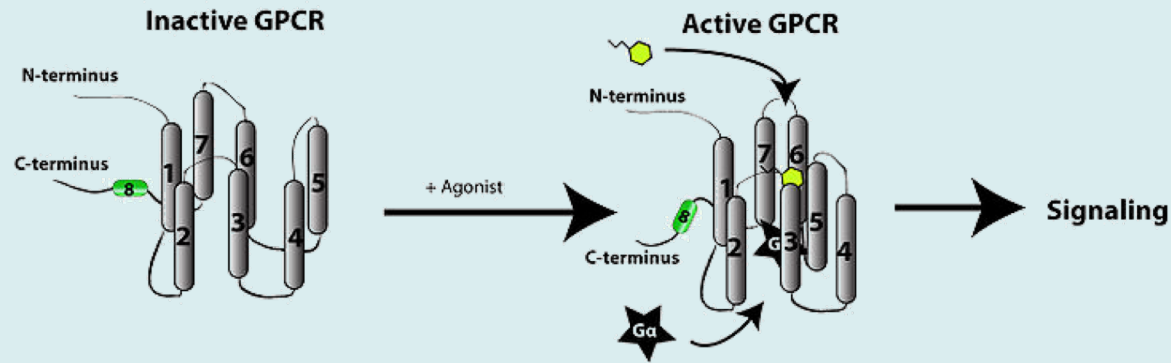
A 7TM receptorok aktivációs mechanizmusa



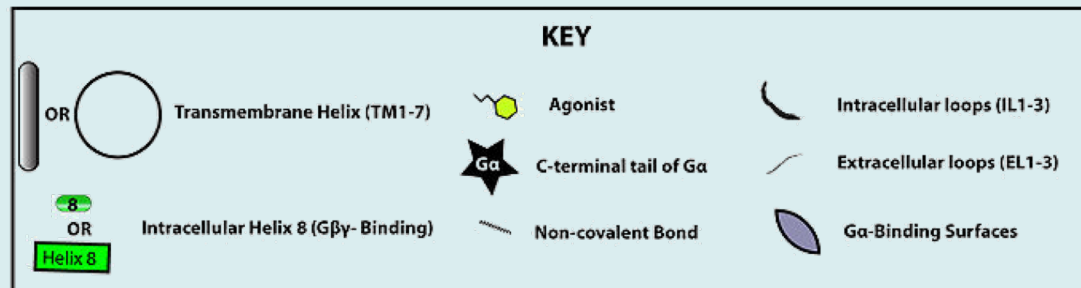
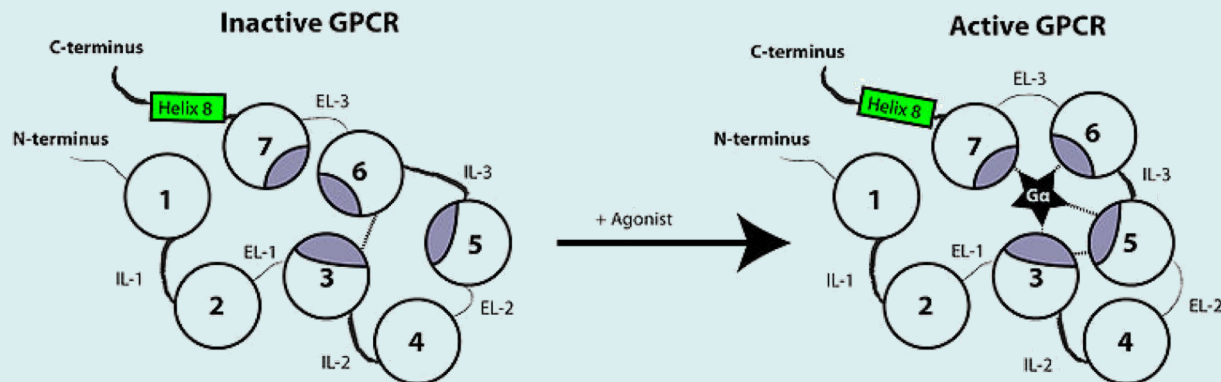
TM3 és TM7 közötti sókötés felszakad, a TM6 és az intracelluláris hurkok nagymértékű elmozdulása következtében TM2, TM6 és TM7 citoplazmatikus felszínei hozzáférhetőbbé, a TM3 és TM4 felszínei pedig kevésbé hozzáférhetővé válnak.

7TM receptorok aktivációs mechanizmusa

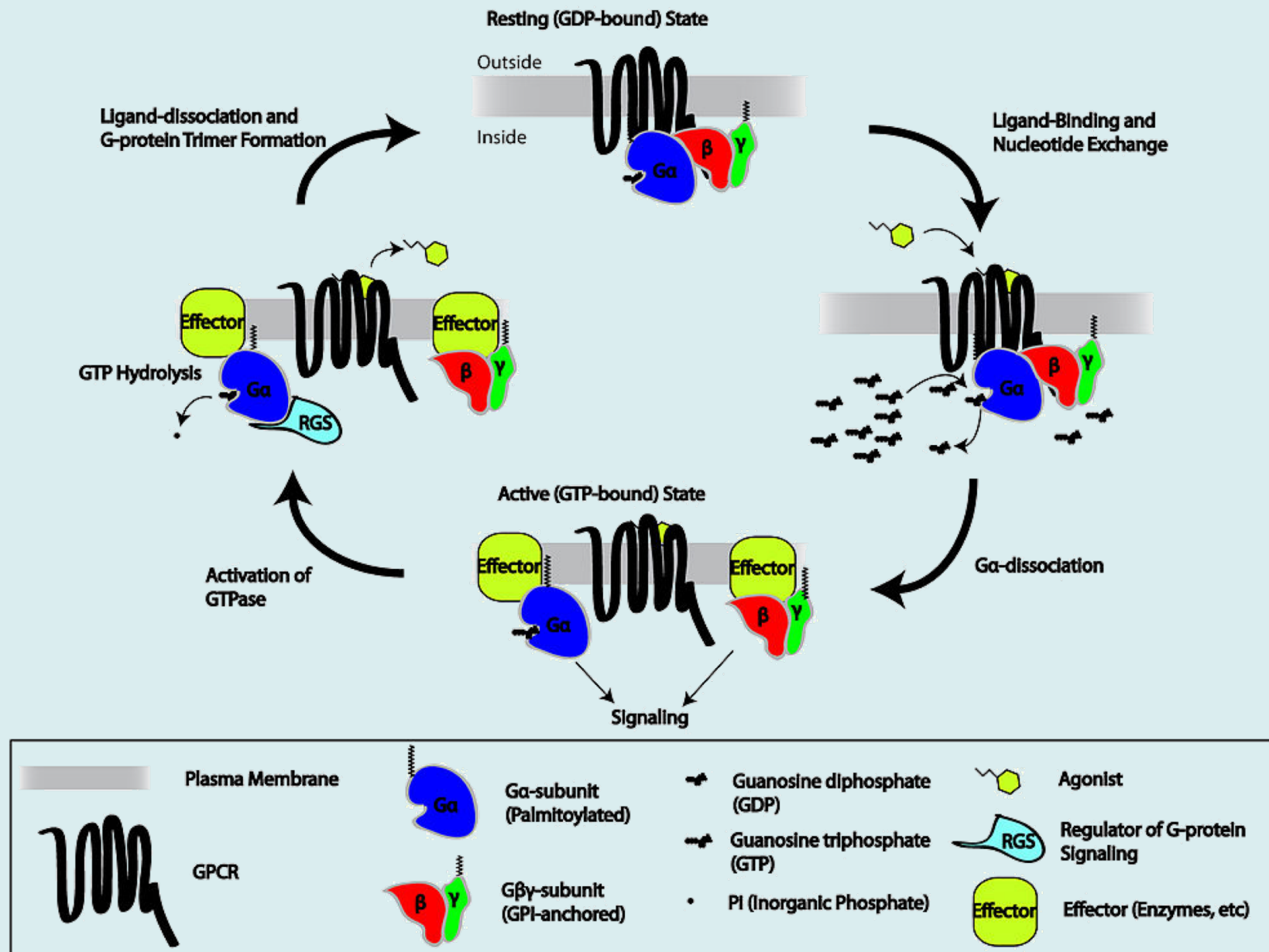
Side Perspective



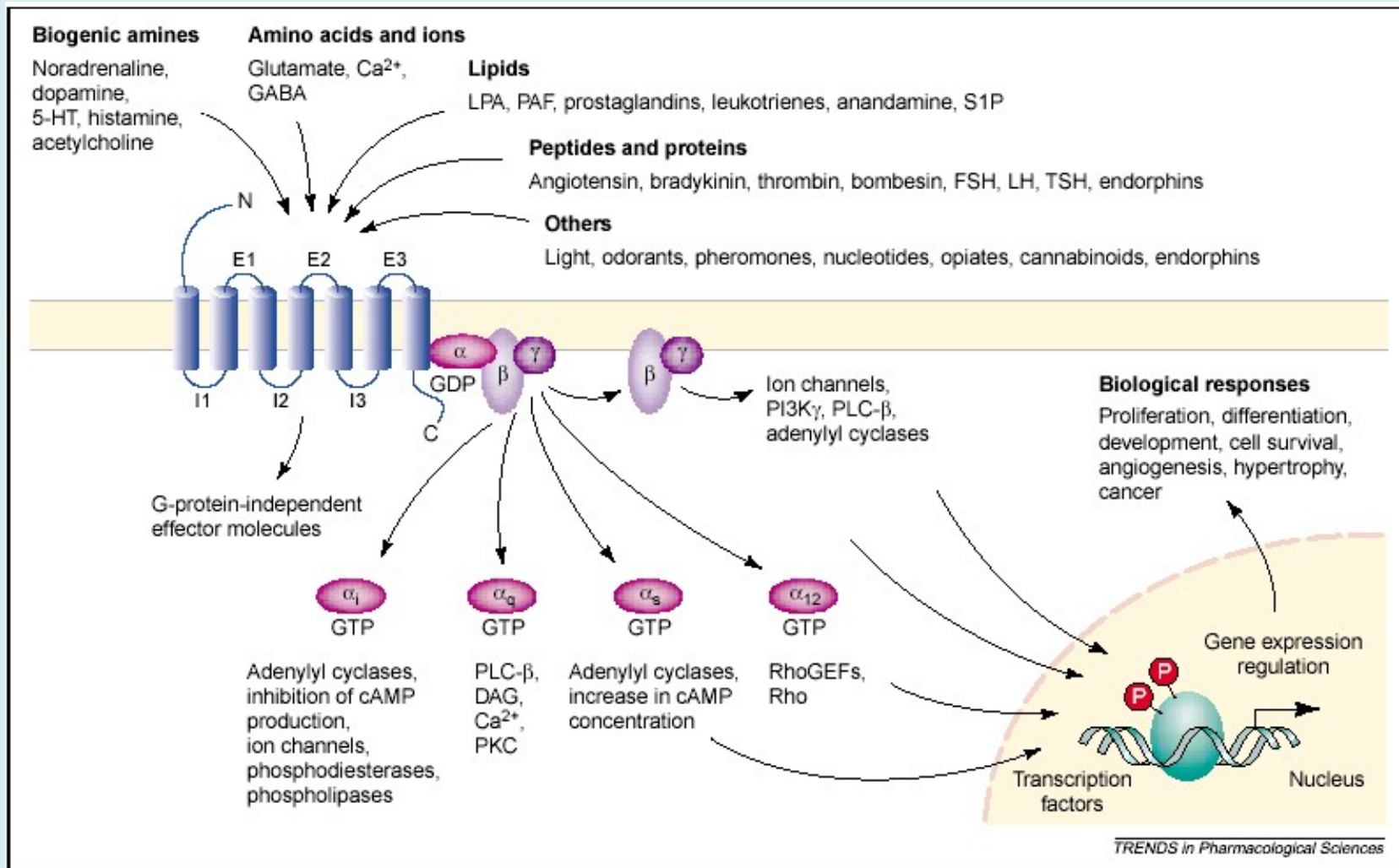
Intracellular Perspective



A 7TM receptorok működése (GPCR-ciklus)

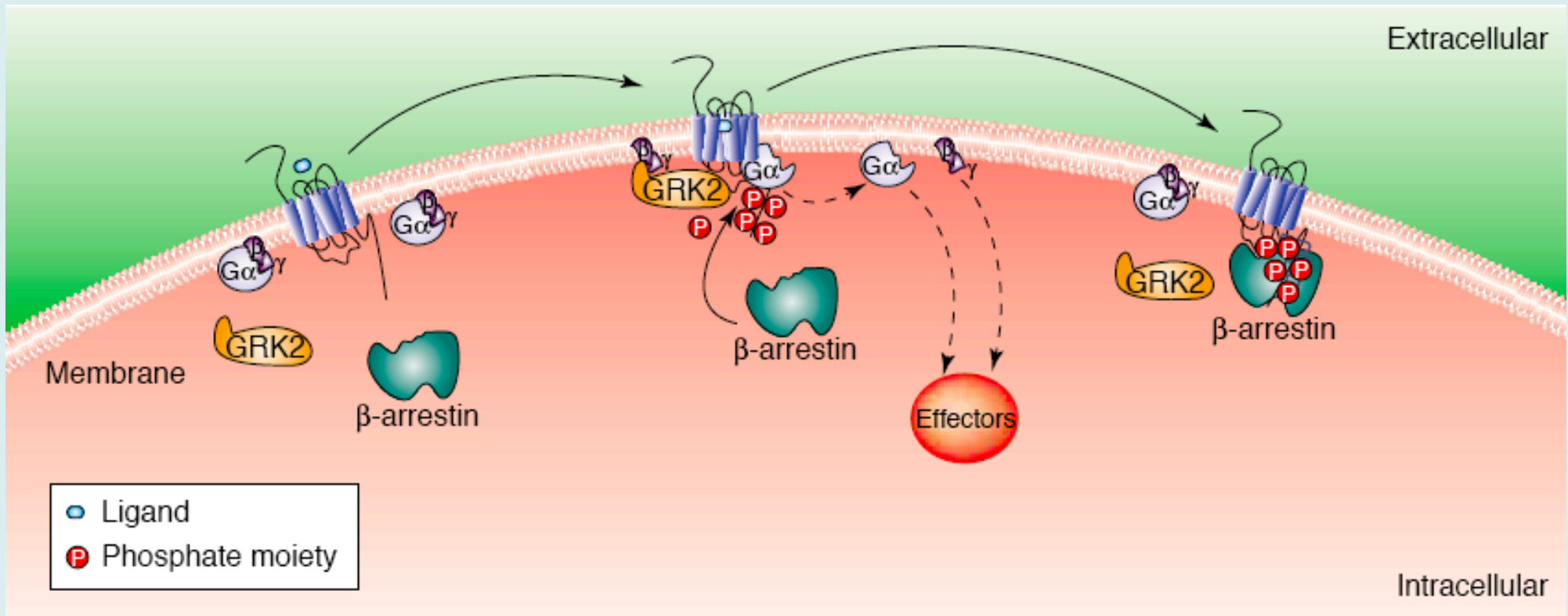


7TM receptorok főbb jelátviteli lehetőségei



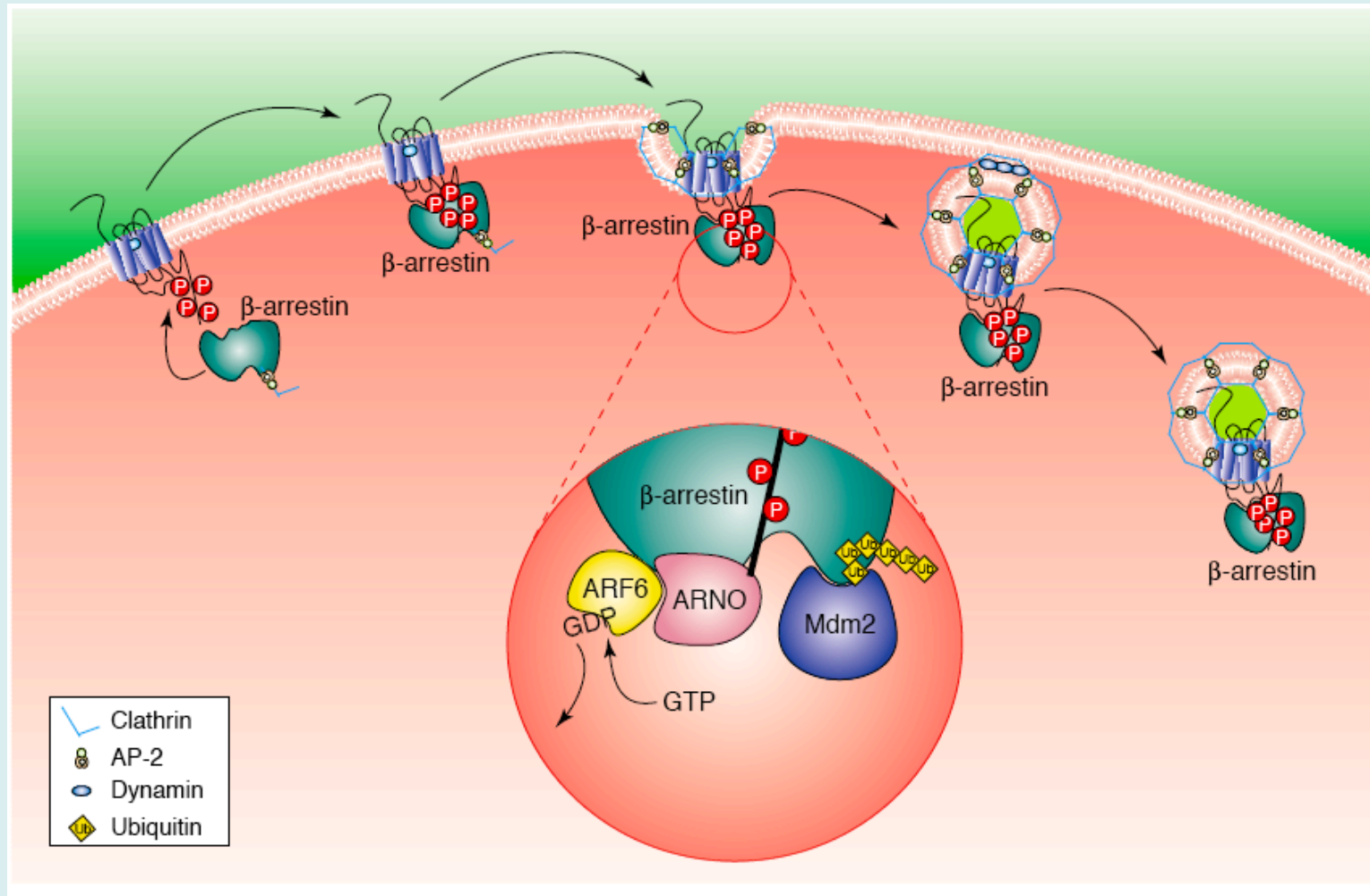
A klasszikus $G\alpha$ -mediált jelátvitelben négyféle $G\alpha$ -alegység kapcsolódhat a receptorokhoz: α_i – inhibitorikus, gátolja az adenilát-cikláz enzimet, α_q – aktiválja az intracelluláris Ca^{2+} -mobilizációt, α_s – stimulálja az adenilát-cikláz, és $\alpha_{12/13}$ – aktiválja az aktin-citoszkeletont. Ezen kívül a receptoraktivációt követően disszociálódó $\beta\gamma$ -alegység (mindig heterodimer) szintén aktiválhat célenzimeket és ioncsatornákat, illetve a receptor-arresztin komplex is képes a heterotrimer α - illetve $\beta\gamma$ -alegységeitől függetlenül jelátviteli folyamatok módosítására.

7TM receptorok aktivációs és inaktivációs mechanizmusai



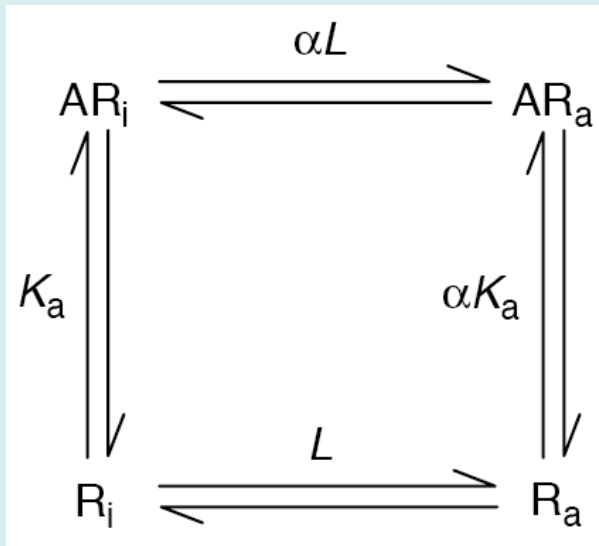
Az aktiváló ligandum (agonista) kötődése után a heterotrimer G-fehérje kapcsolódik a receptorhoz, aminek következtében az alfa-alegységen a GDP-GTP csere lezajlik és az aktiváció továbbadódik az effektor fehérjékre. Közben először GPCR-függő receptor-kinázok (GRK) a receptor C-terminálisa közelében foszforilálva inaktiválják a receptort, amely inaktív állapotot arresztin kötődése stabilizál.

7TM receptorok aktivációs és inaktivációs mechanizmusai



A C-terminálisán foszforilált receptor - β -arrestin-komplex klattrin-függő endocitózis során internalizálódik. A lefűződött, deszenzitizált receptort tartalmazó vezikulák visszekerülhetnek a plazmamembránba (recirkuláció), vagy késői endoszómákká alakulva, majd a lizoszómákkal fuzionálva degradációra kerülhetnek.

7TM receptorok – kétállapotú kapcsolók

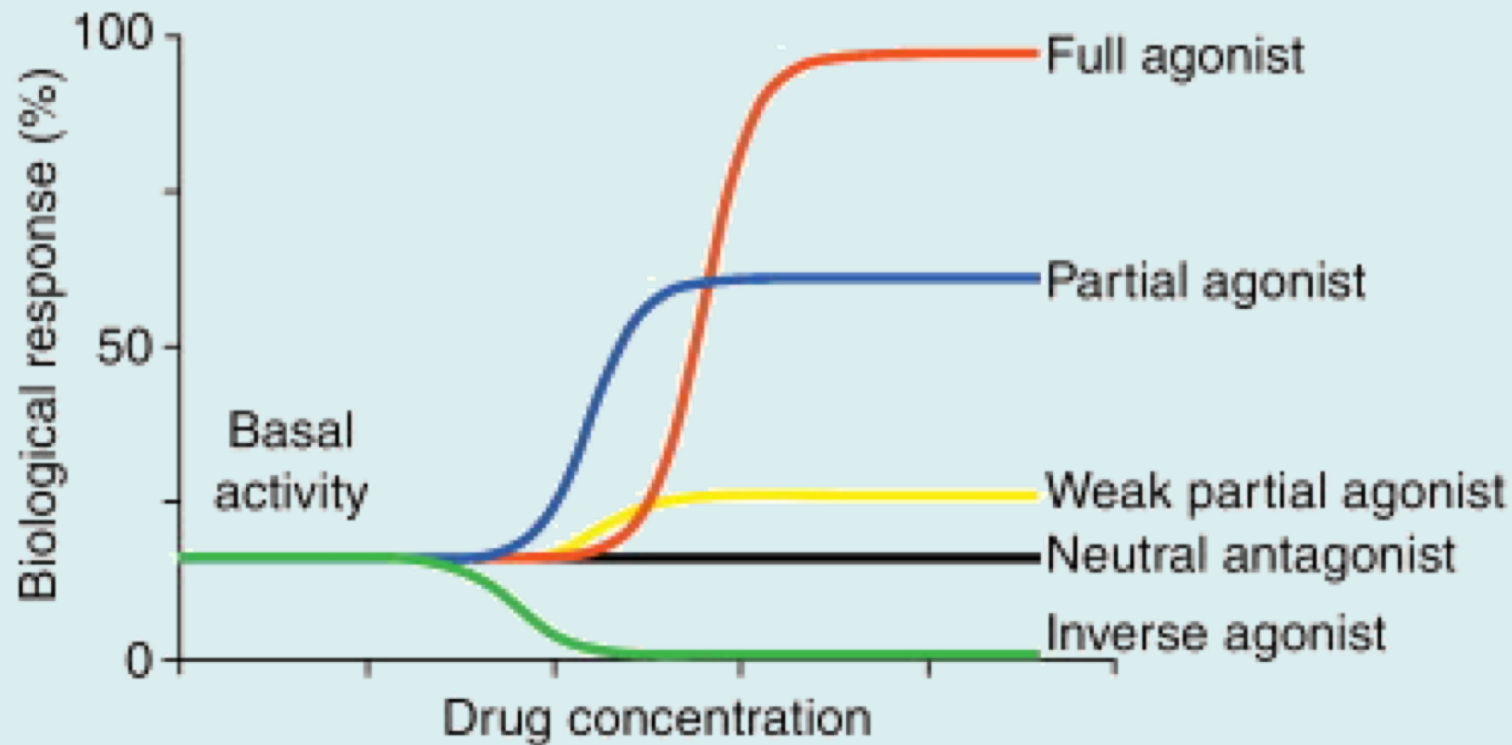


$$\rho = \frac{L(1 + \alpha[A]/K_A)}{[A]/K_A(1 + \alpha L) + L + 1}$$

Ha $[A] = 0$ akkor $\rho_0 = L/(1 + L)$, illetve ha $[A] \sim \infty$ akkor $\rho_\infty = (\alpha L)/(1 + \alpha L)$. Tehát a $\rho_\infty/\rho_0 = \alpha(1 + L)/(1 + \alpha L)$ arány szerint változik az aktív receptorok aránya, ezáltal a receptor aktivációs szintje. Például ha $L=0.1$, akkor a receptorok 9%-a lesz aktív ligandum nélkül is (alapaktivitás). Egy ligandum $\alpha=5$ értékkel az aktív receptorok arányát 33%-ra növeli telítési koncentrációnál.

- Az aktív (R_a) és inaktív (R_i) konformerek egyaránt kötik a ligandumot (A), de eltérő affinitással, ezáltal a köztük kialakult koformációs egyensúly eltolódik:
- $\alpha > 1$ – agonista, kedvez R_a felszaporodásának
- $\alpha < 1$ – inverz agonista, az egyensúlyt R_i -felé tolja el
- $\alpha = 1$ – kompetitív antagonist, az egyensúly változatlanul hagyása mellett csökkenti a jelátvitelre rendelkezésre álló receptorok számát

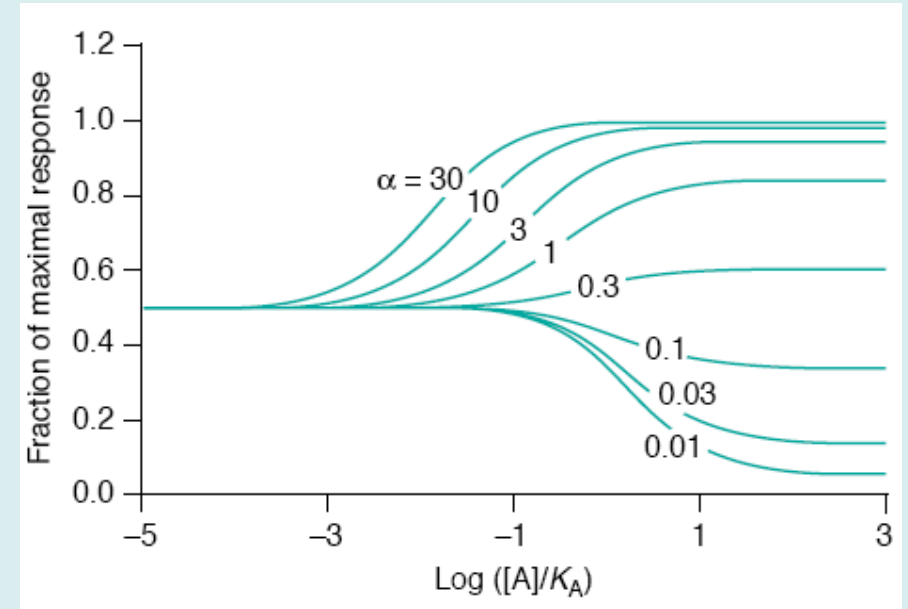
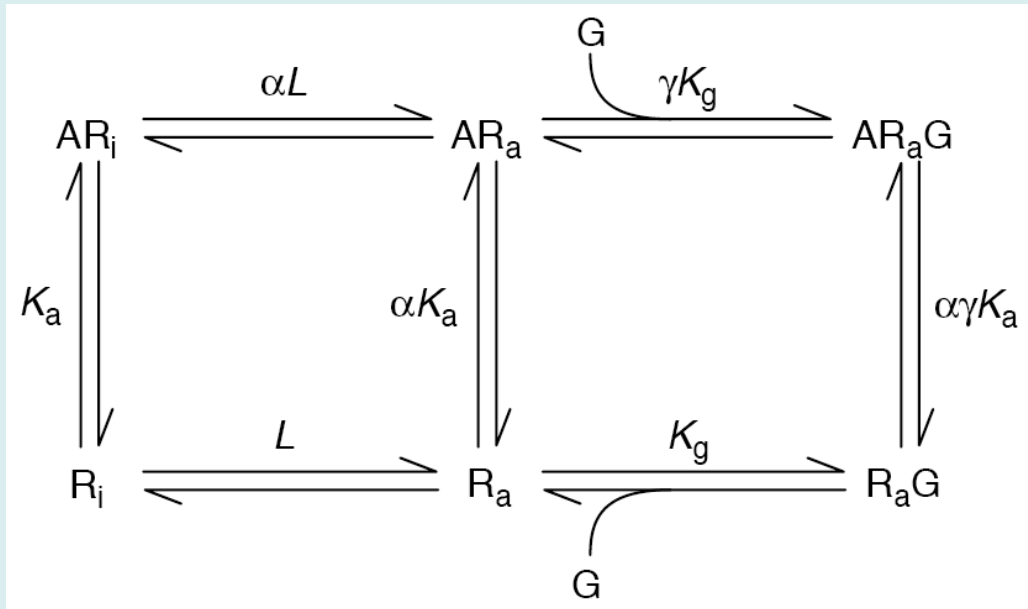
7TM receptorok – kétállapotú kapcsolók



T/BS

- Az aktív (R_a) és inaktív (R_i) konformerek egyaránt kötik a ligandumot (A), de eltérő affinitással, ezáltal a köztük kialakult koformációs egyensúly eltolódik:
- $\alpha > 1$ – agonista, kedvez R_a felszaporodásának
- $\alpha < 1$ – inverz agonista, az egyensúlyt R_i -felé tolja el
- $\alpha = 1$ – kompetitív antagonist, az egyensúly változatlanul hagyása mellett csökkenti a jelátvitelre rendelkezésre álló receptorok számát

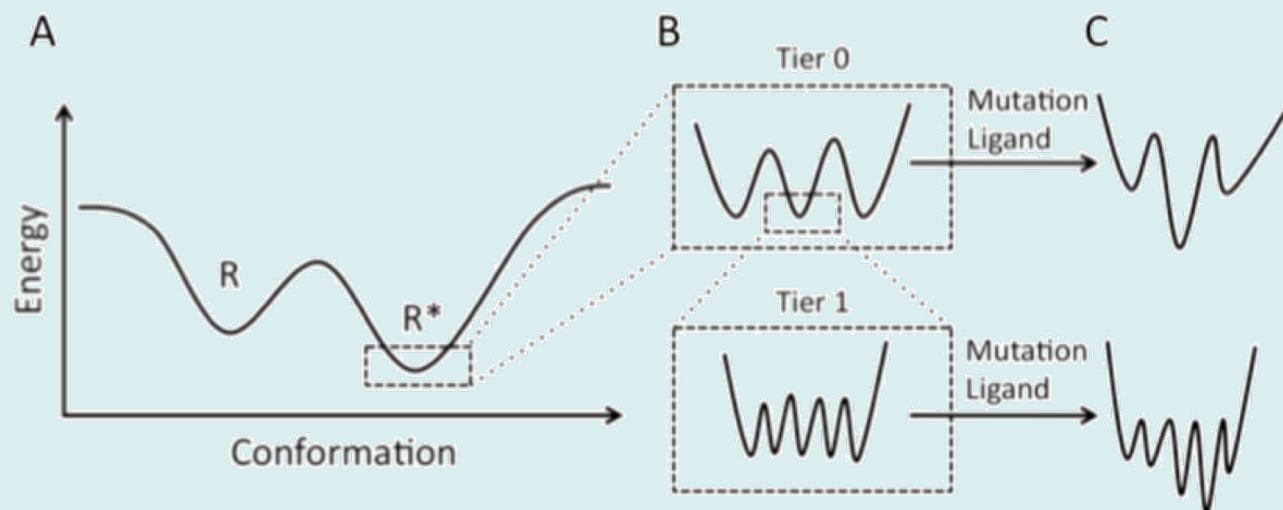
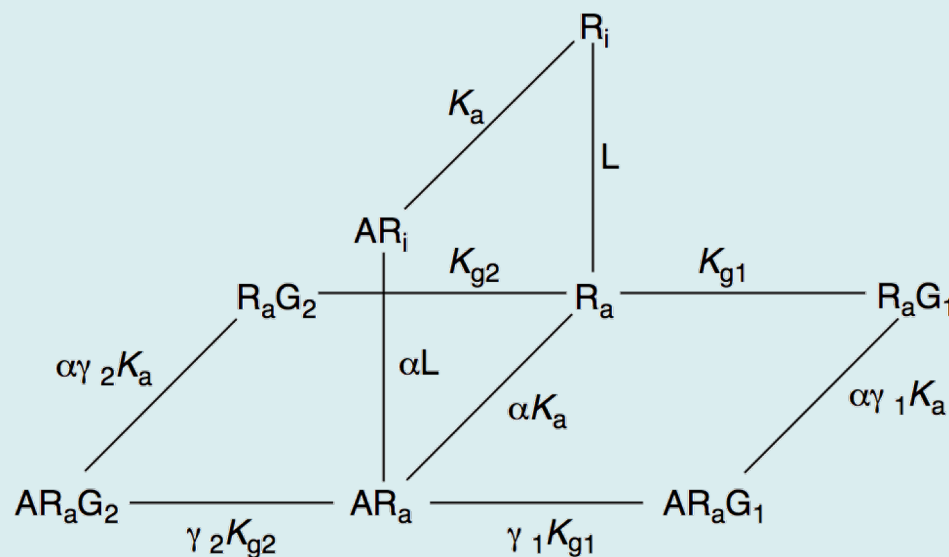
A 7TM recetor aktiváció terner modellje



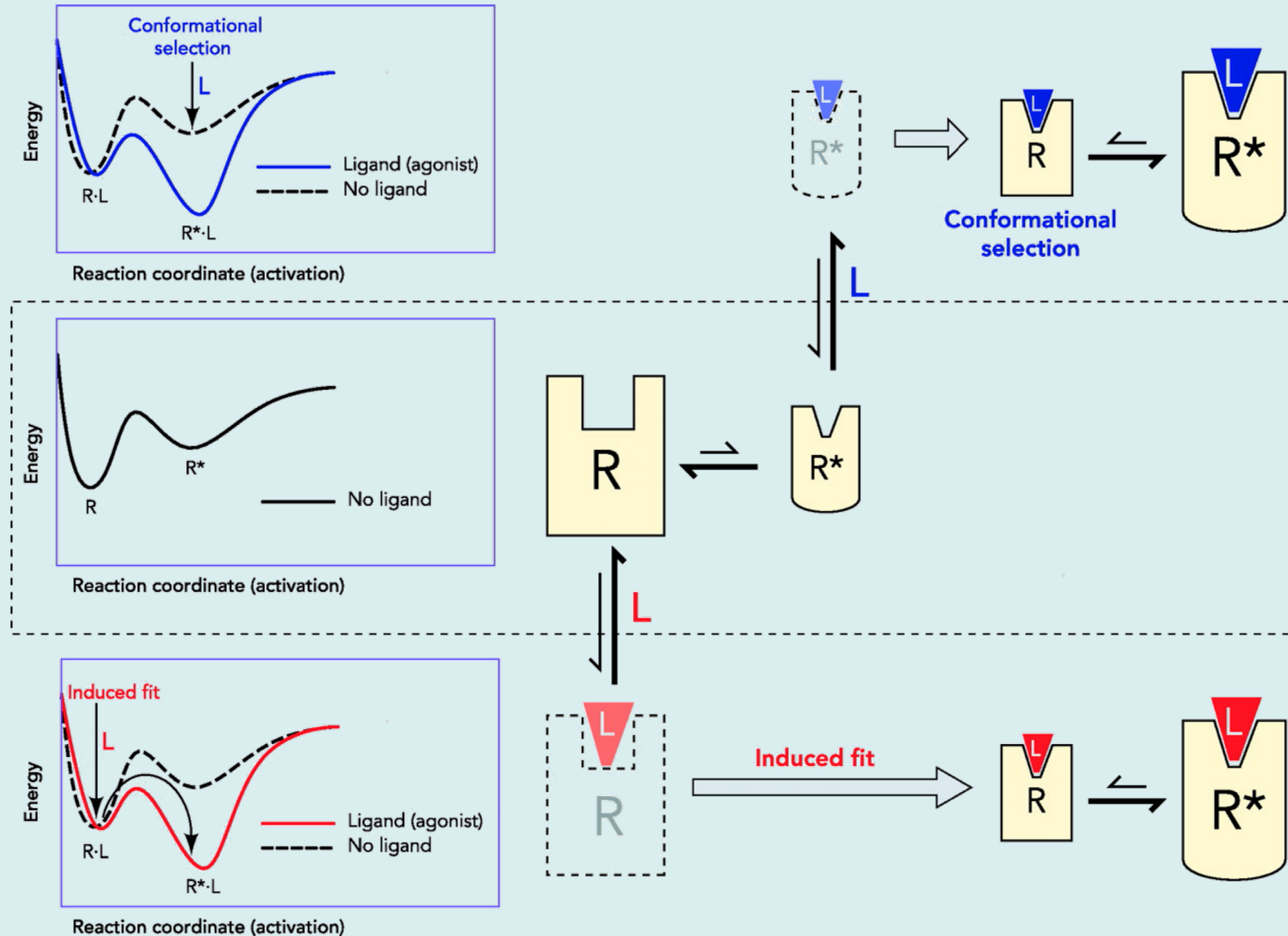
A receptor két konformere mellett a G-fehérje is részt vesz az aktív komplexben! Az összes konformert figyelembe kell venni, amelyekben a receptor aktív állapotban van! A ligandum természete α és γ arányától függ, akár $\alpha = 1$ mellett is létrejöhet agonista hatás. Nyilvánvaló, hogy a receptorok különböző ligandumokkal és G-fehérjékkel eltérő affinitású komplexeket hozhatnak létre, tehát akár ugyanaz a ligandum lehet az egyik esetben agonista, míg a másokban nem, illetve a receptor ligandum-függően eltérő hatékonysággal aktiválhatja a G-fehérjét, komplex farmakológiai viselkedést eredményezve!

GPCR - Konformációs állapotok sokasága?

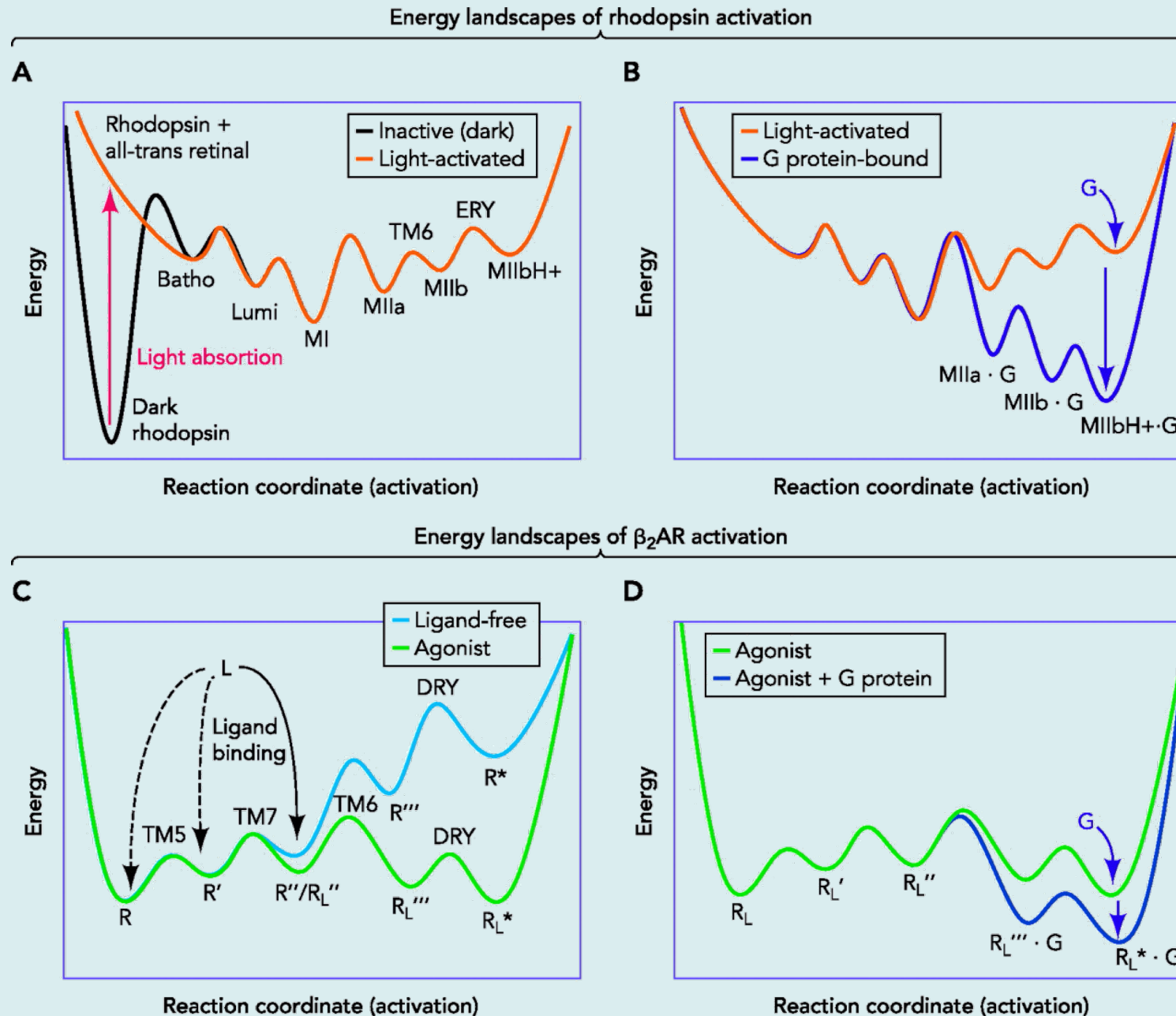
A különböző állapotok száma, a modell komplexitása bővíthető, de vannak olyan receptor-aktivációs kísérletek, amelyeket nem lehet csak diszkrét állapotok feltételezésével megmagyarázni. Ma úgy gondoljuk, hogy a receptor aktív konformere a ligandum kötődésének hatására is kialakulhat kölcsönhatásuk során.



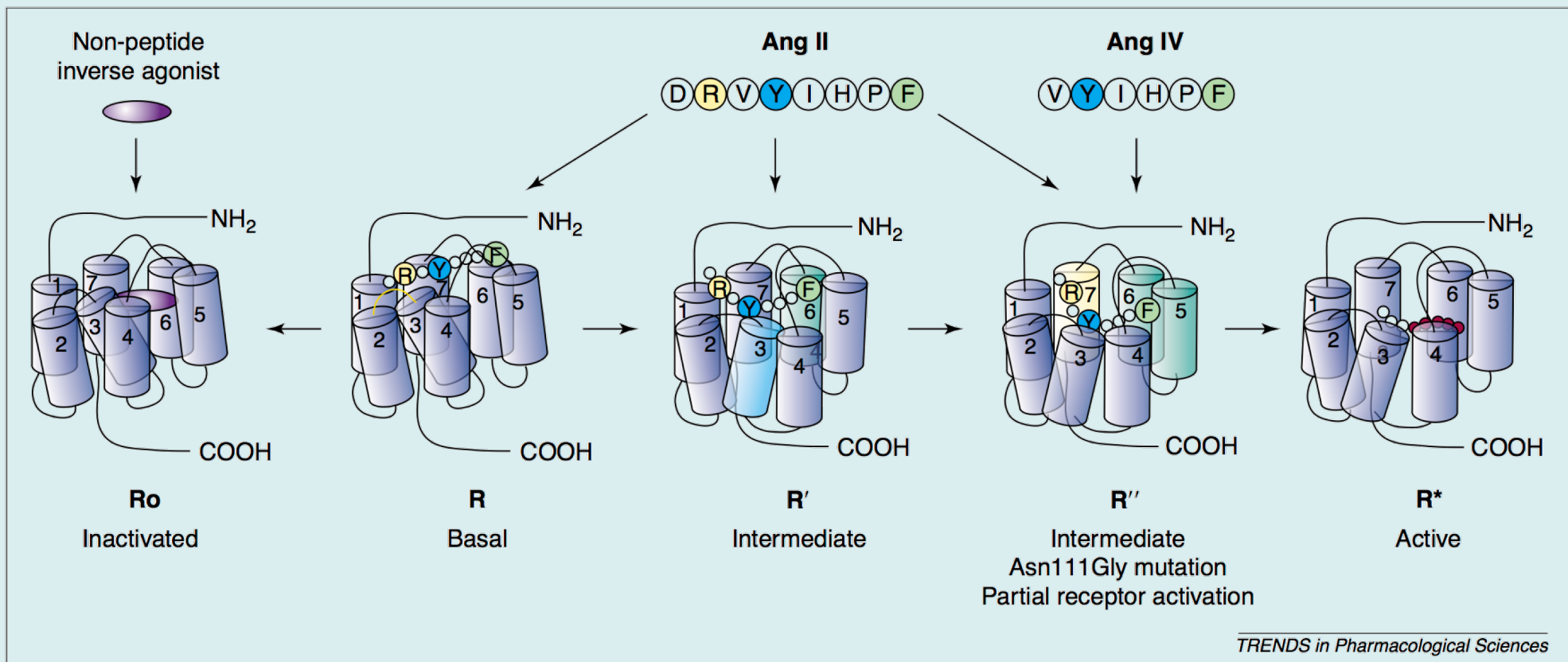
Konformációs szelekció vagy indukált illeszkedés?



Konformációs szelekció vagy indukált illeszkedés?



Konformációs állapotok sokasága – angiotenzin receptor



Mind a konformációs szelekcióra, mind az indukált-illeszkedésre találunk példákat (lásd előző ábra). Például az angiotenzin receptor esetén a különböző ligandumok más-más receptor-konformereket kötnek/stabilizálnak.

7TM receptorok homodimerizációja

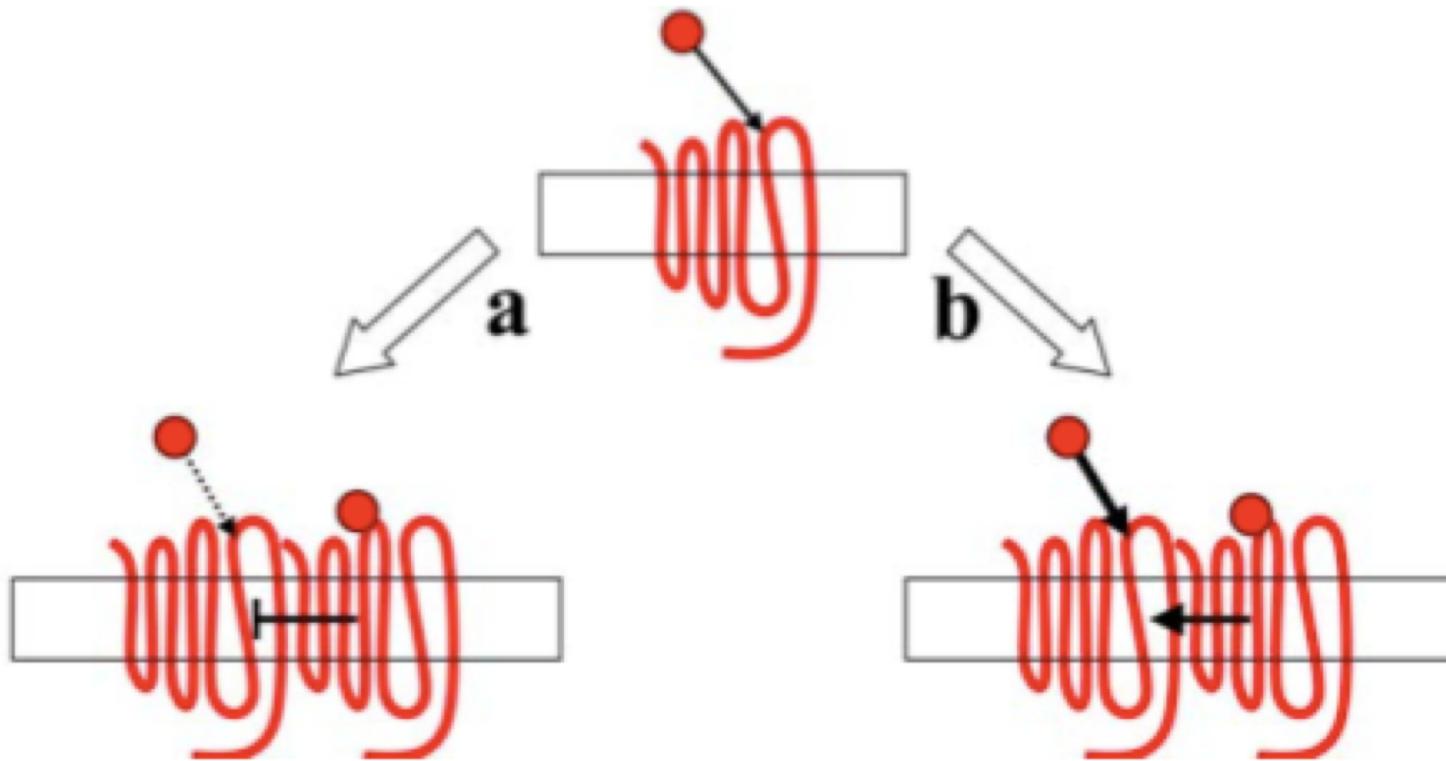


FIGURE 2. Intermolecular interactions in the receptor homodimer. The affinity of a given ligand for its receptor (central drawing) may be decreased (a) or increased (b) when the ligand already occupies the receptor partner (in the homodimer).

7-TM receptorok heterodimerizációja

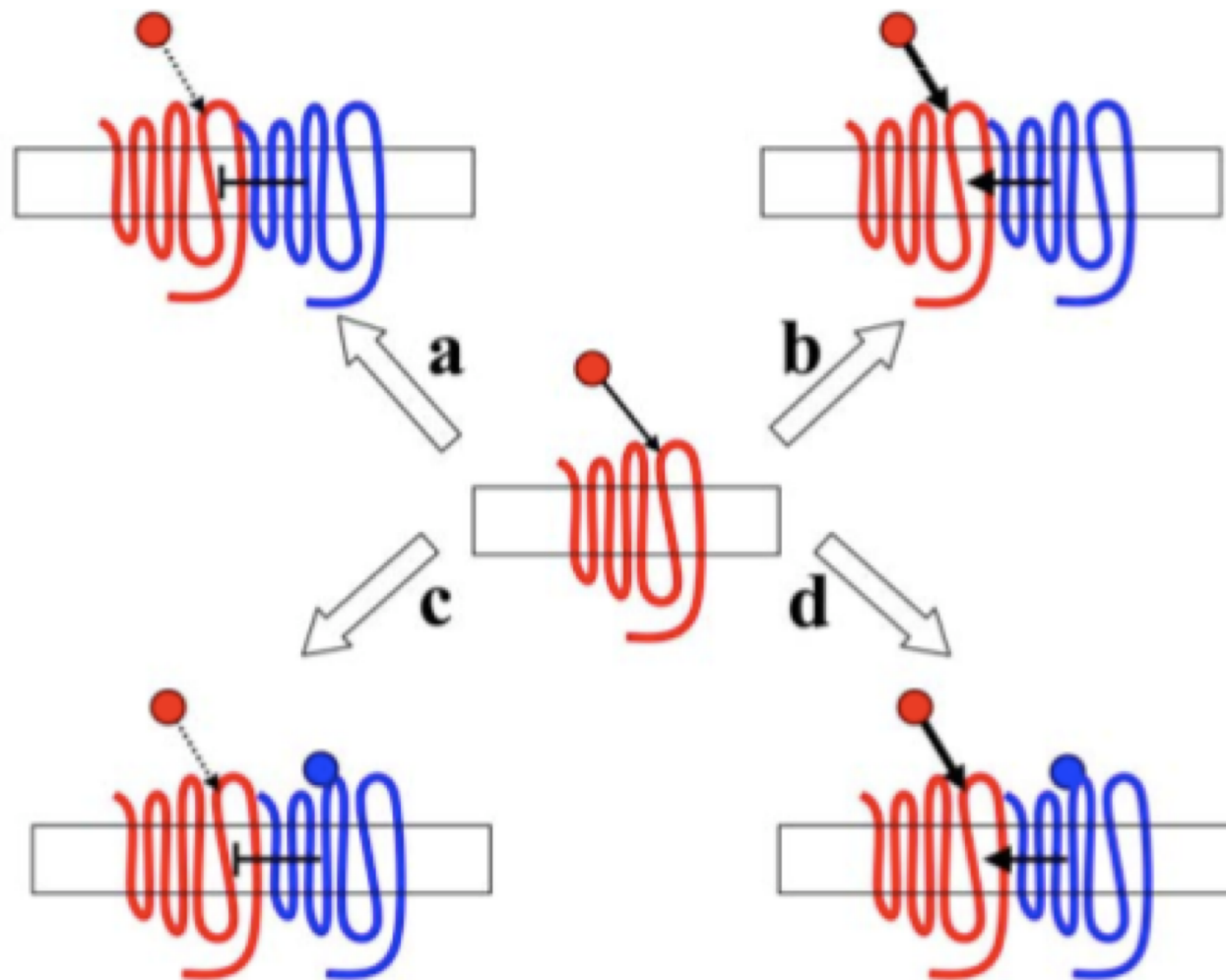
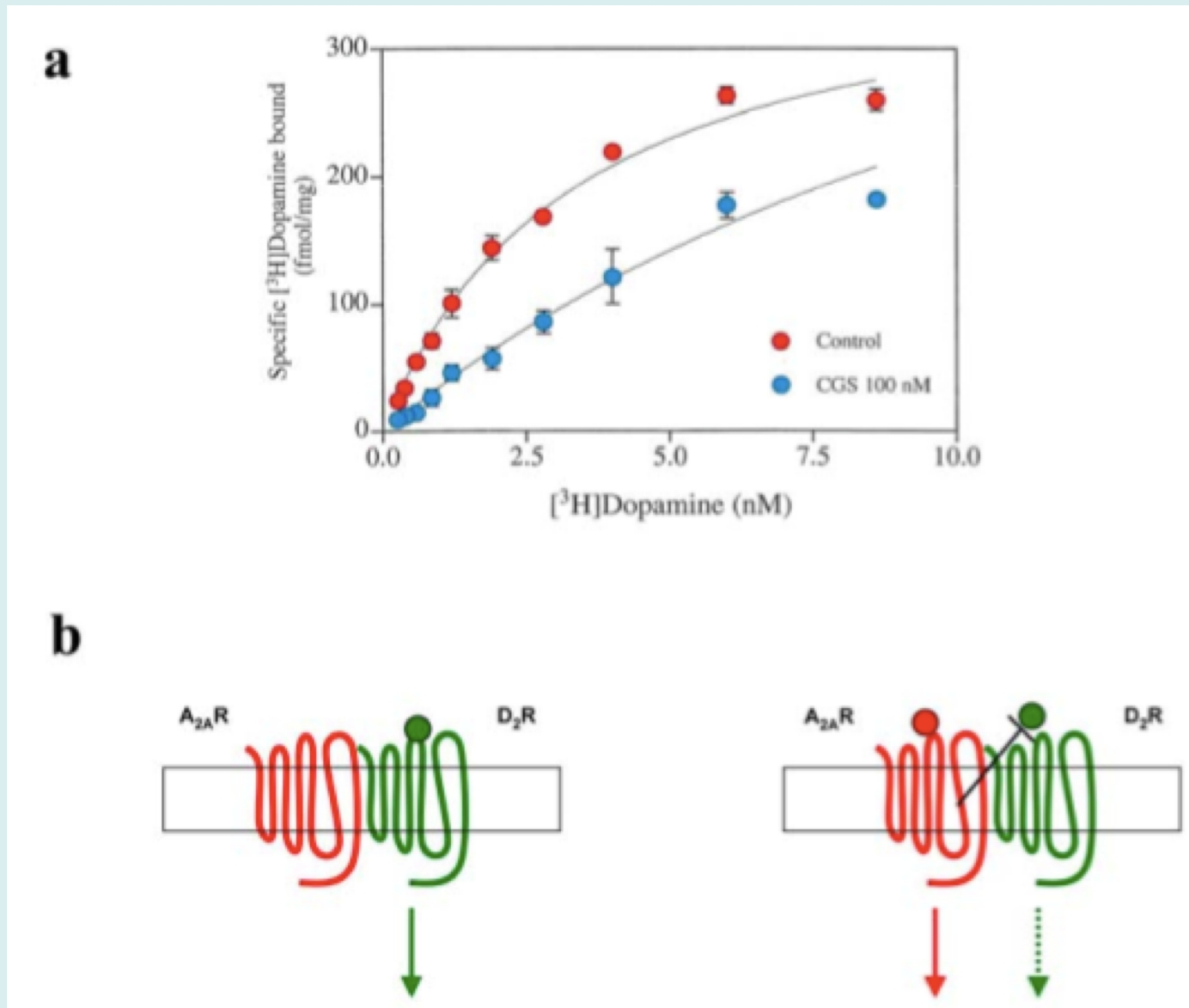
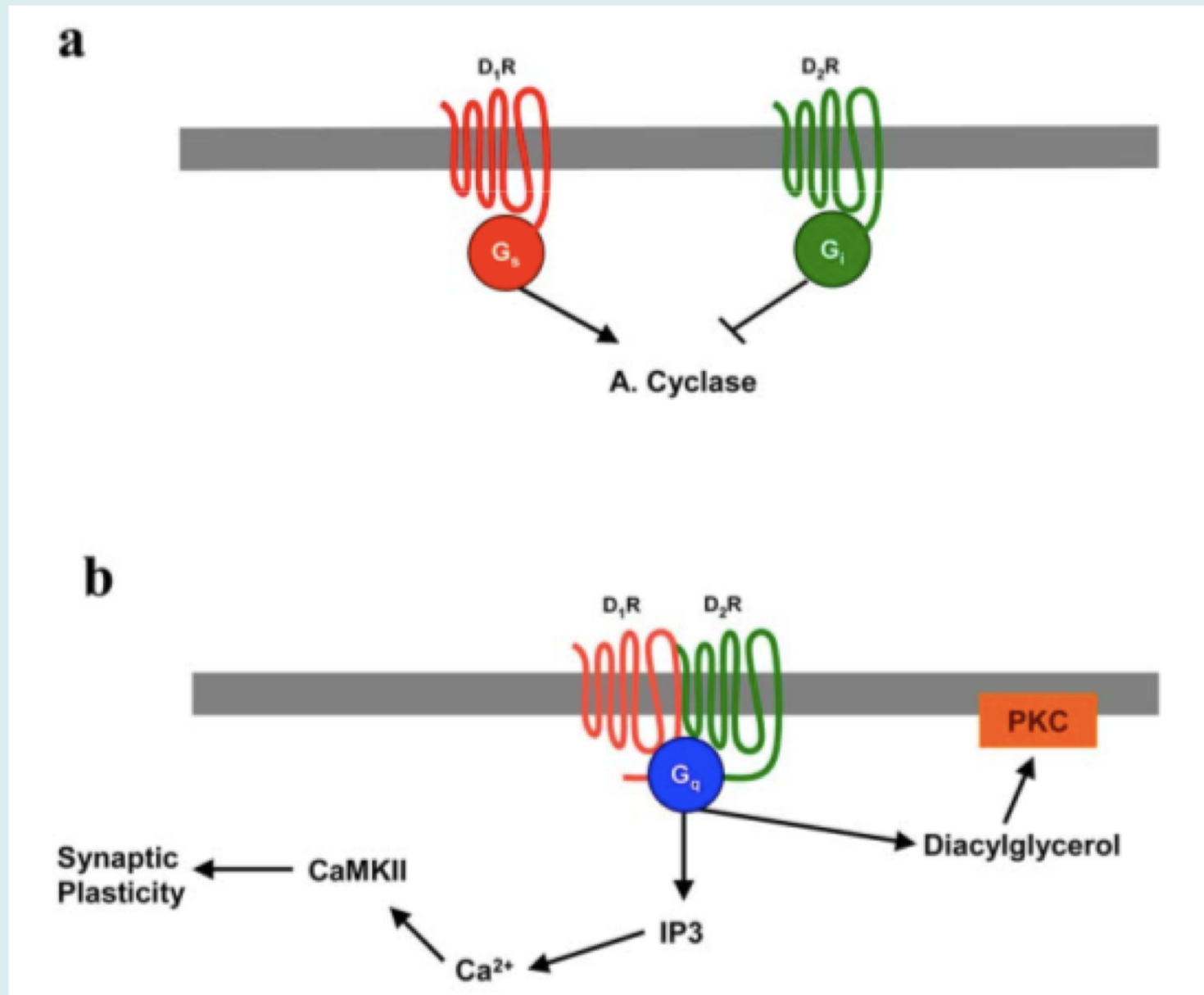


FIGURE 3. Intramolecular interactions in the receptor heterodimer. The affinity of a given ligand for its receptor (central drawing) may decrease (a) or increase (b) when the receptor forms heterodimers and also may be decreased (c) or increased (d) when the receptor partner (in the heterodimer) is occupied by the same (for isoreceptors) or another ligand.

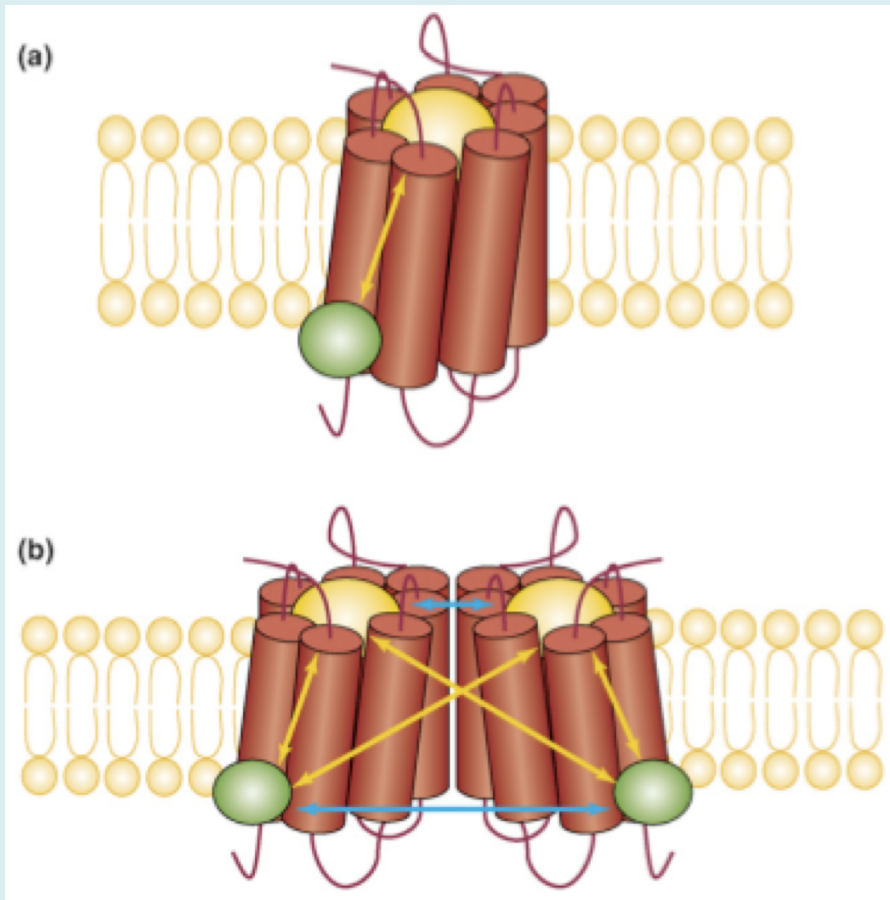
Heterodimerizáció következtében megváltozhat a receptor ligandumkötő képessége



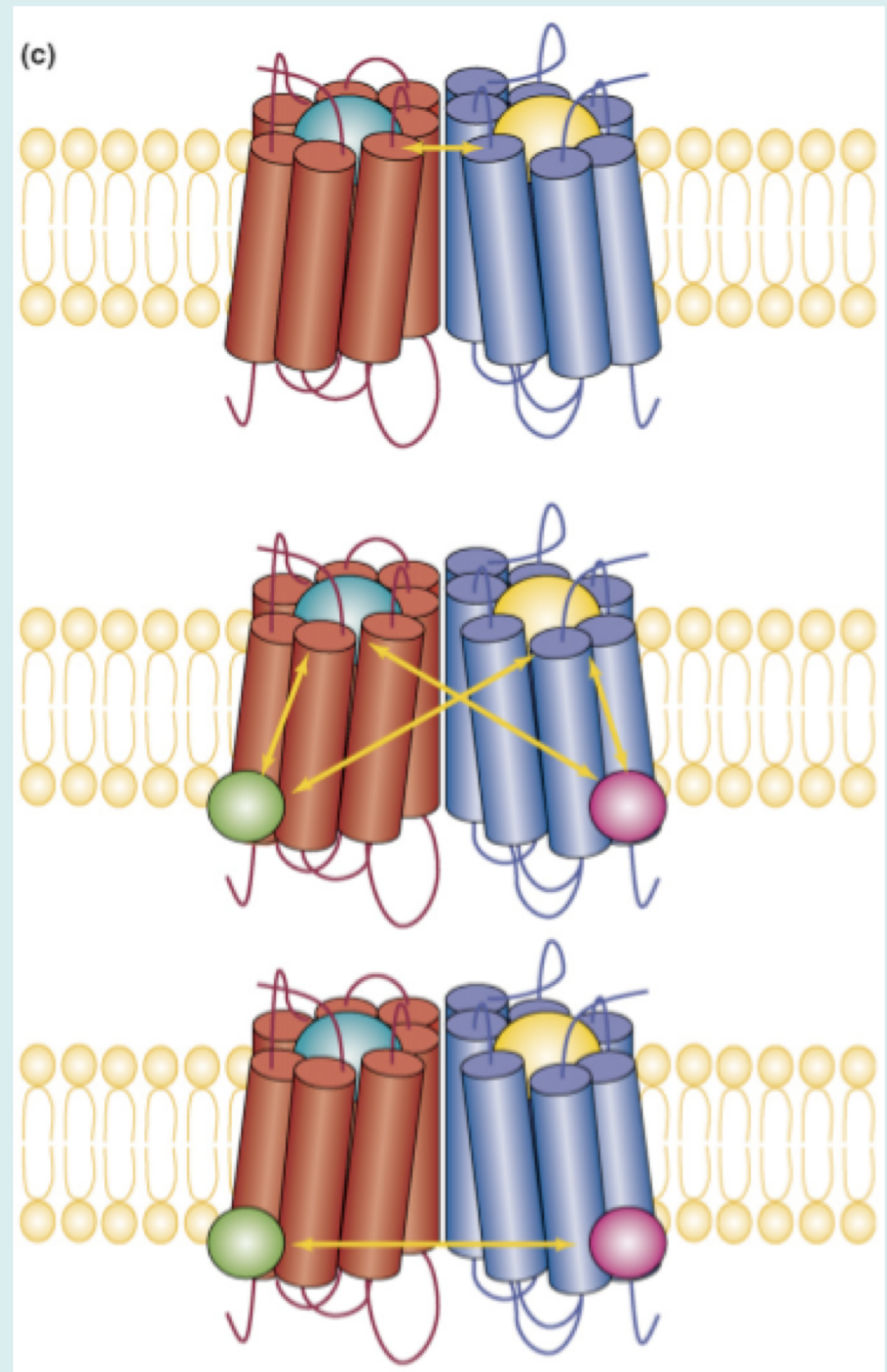
Heterodimerizáció következtében megváltozhat a receptor $G\alpha$ alegység-szelektivitása



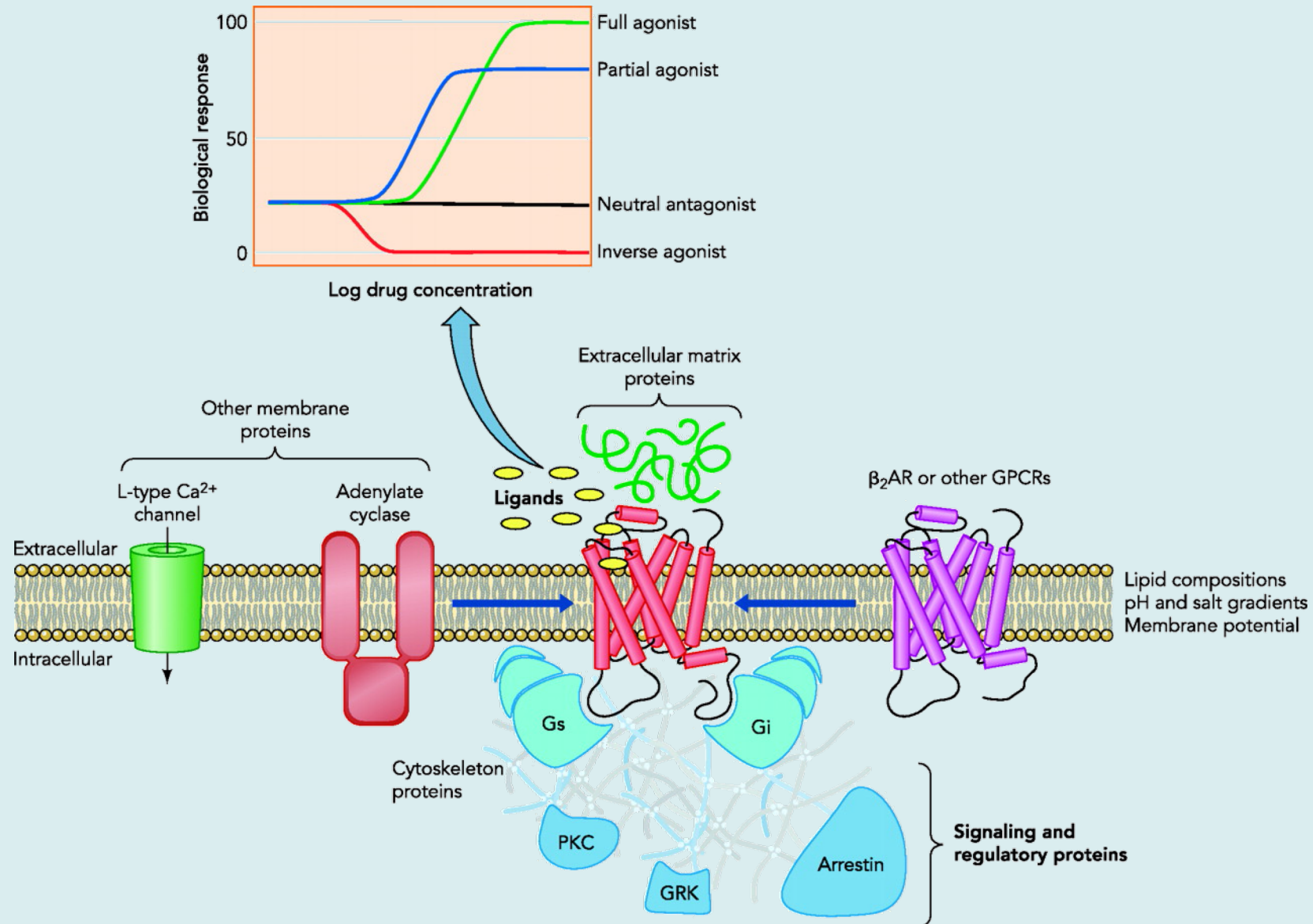
7TM receptorok allosztérikusan is szabályozódnak



PAM – pozitív allosztérikus modulátor
NAM – negatív allosztérikus modulátor

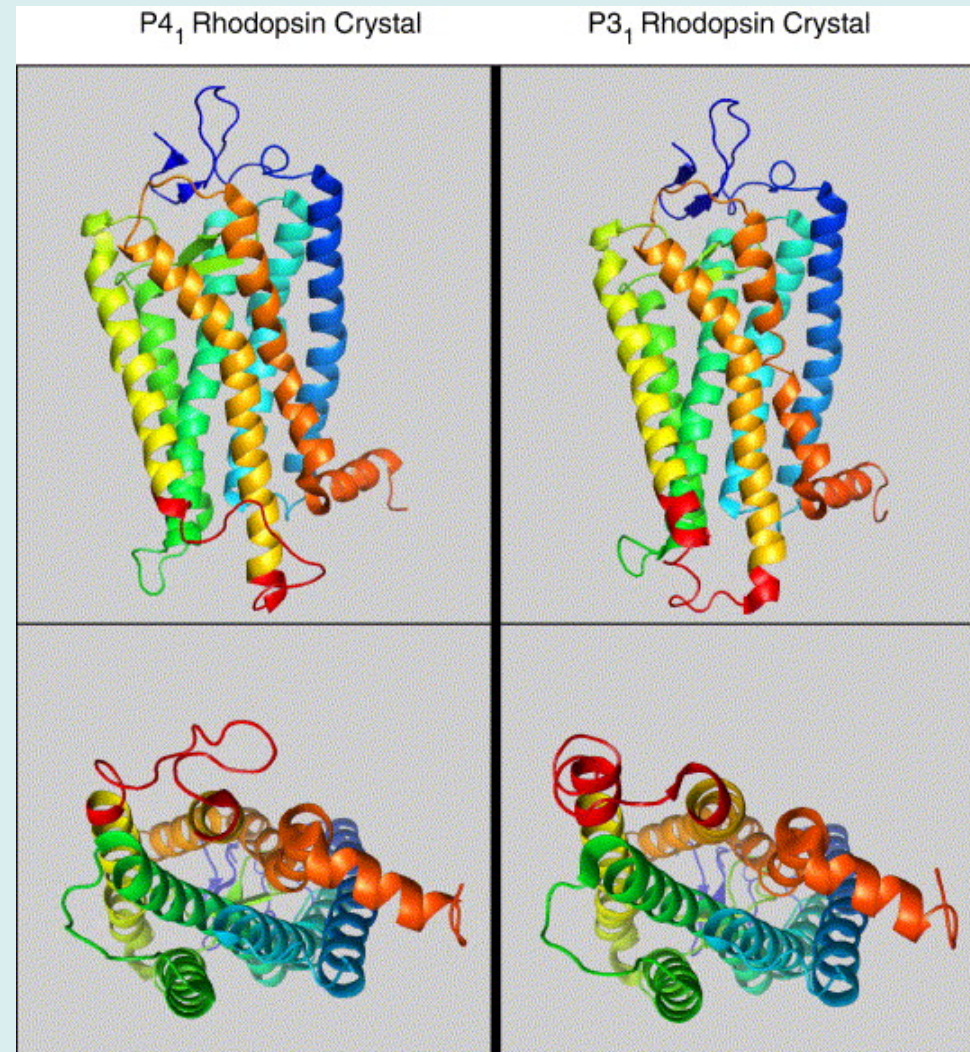
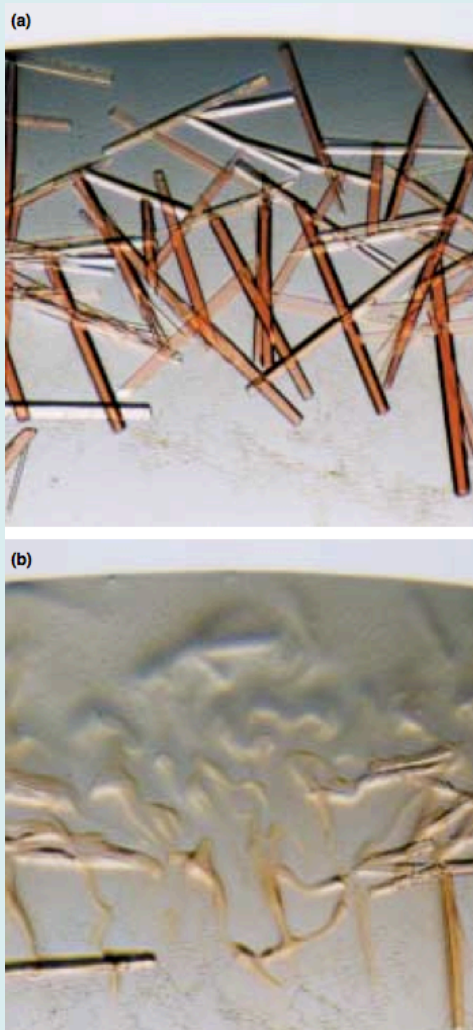


A 7TM receptorok farmakológiai jellemzőit komplex kölcsönhatás-rendszerük határozza meg



Az első 7TM kristályszerkezet: sötét-adaptált, inaktív rodopszin

sötétben tartva



a kristályokat megvilágítva szétesnek!

Sok inaktív 7TM szerkezet ismert már, de az aktív konformer kristályosítása a nagy szerkezeti dinamika miatt problémás...

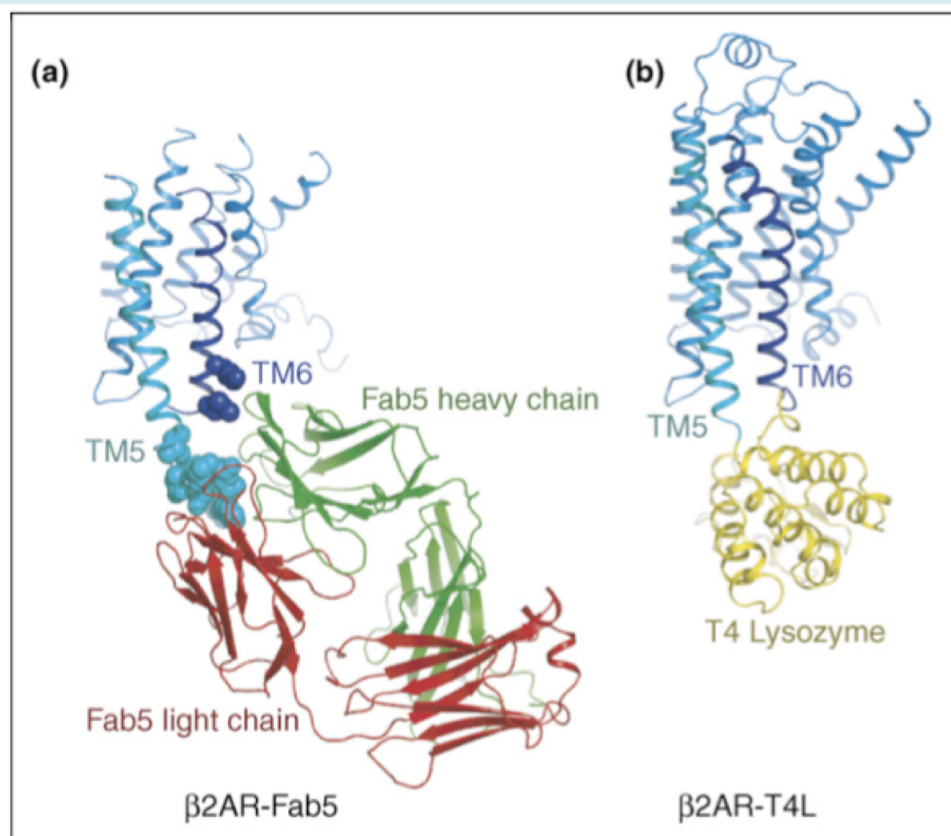
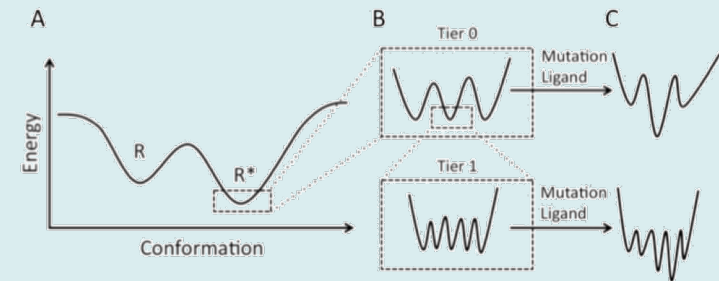
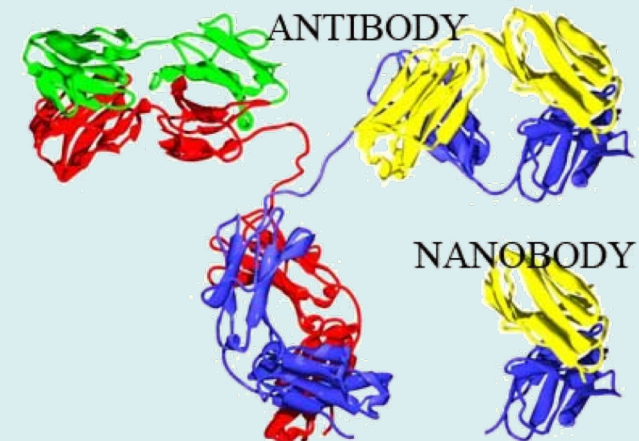


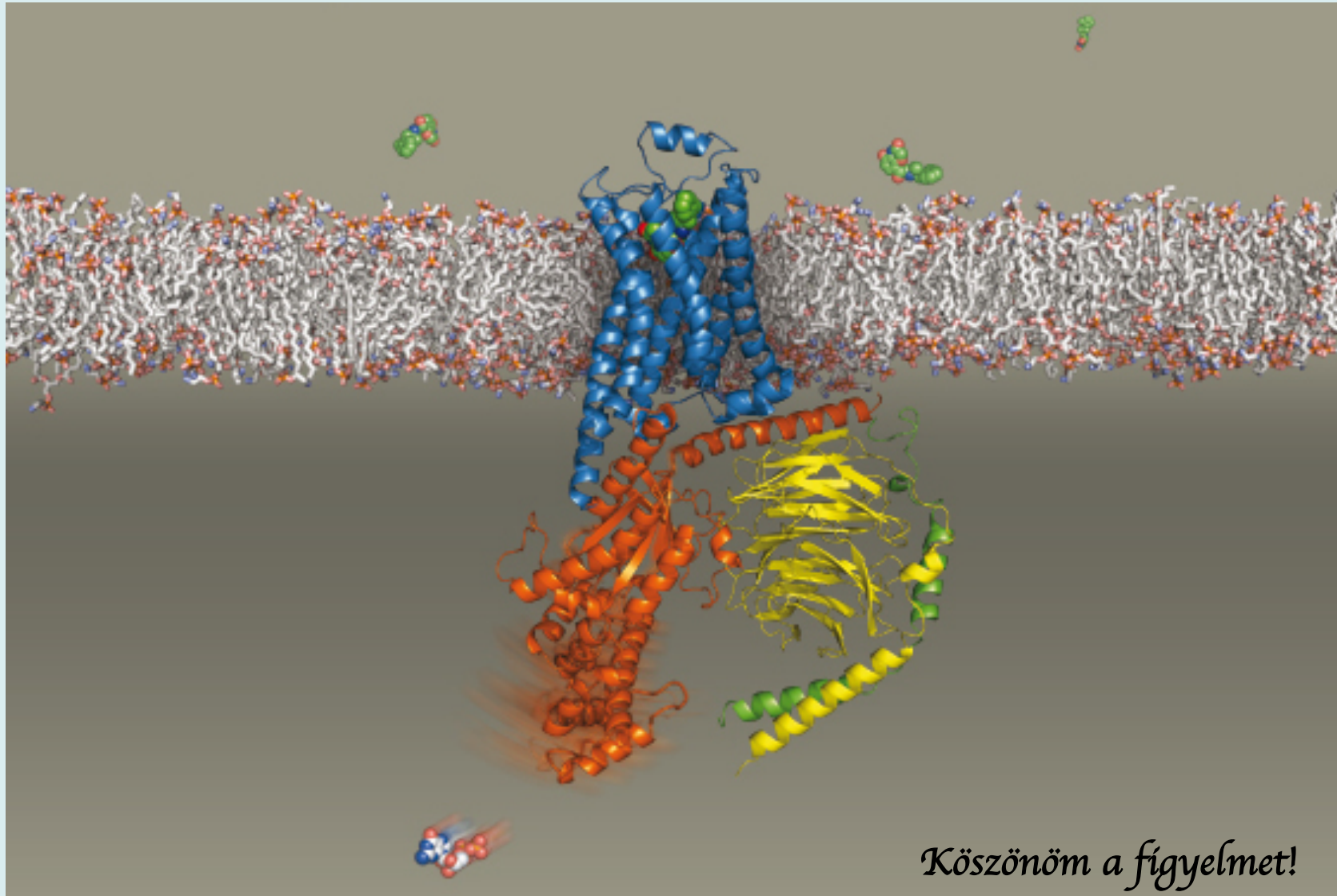
Figure 1. Structures of the β_2 AR. (a) Wild-type β_2 AR in complex with Fab5. (b) Engineered β_2 AR-T4-lysozyme fusion protein. TM, transmembrane segment; ICL2, second intracellular loop. Fab5 and T4 lysozyme serve similar functions in these two crystal structures. They both stabilize interactions between TM5 and TM6, and provide additional polar surface area for crystal lattice contacts.



instabil állapotok sokasága – törékeny kristályok – stabilizálni kell egy natív állapotot – fúziós fehérjék, nanobody-k



β 2AR és G_s komplex szerkezeti modellje



Köszönöm a figyelmet!