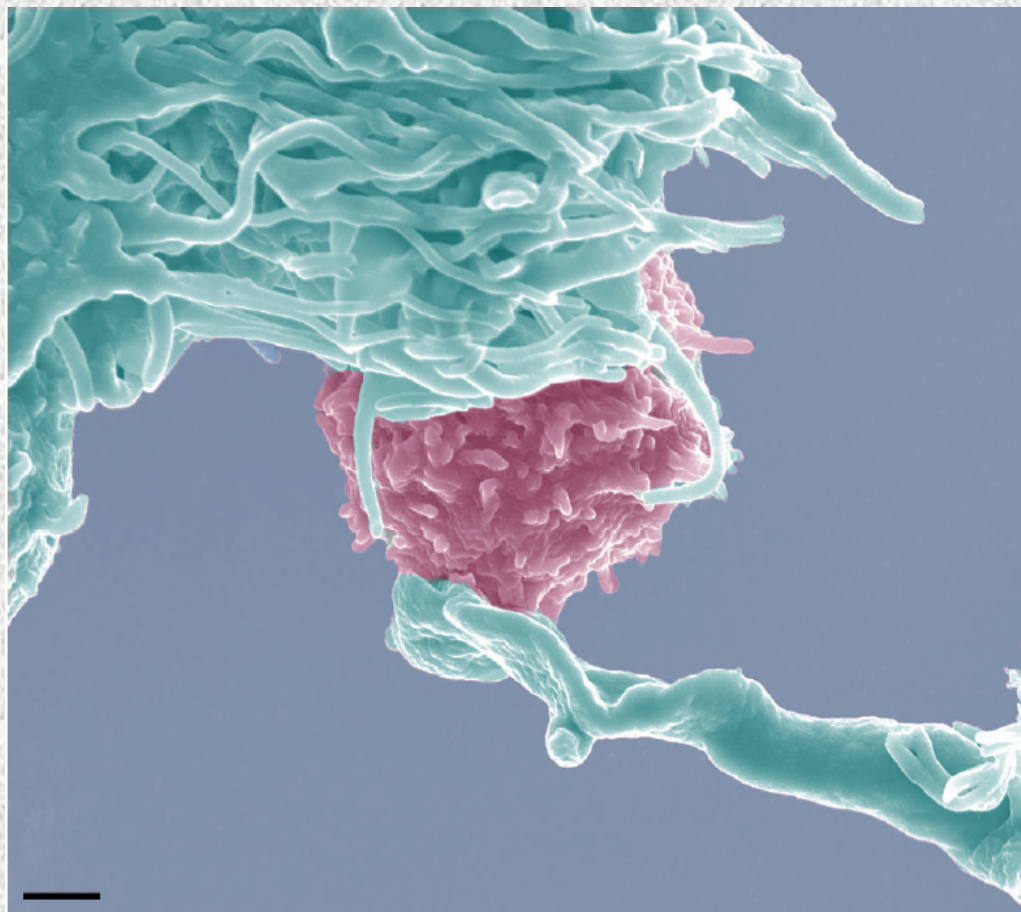
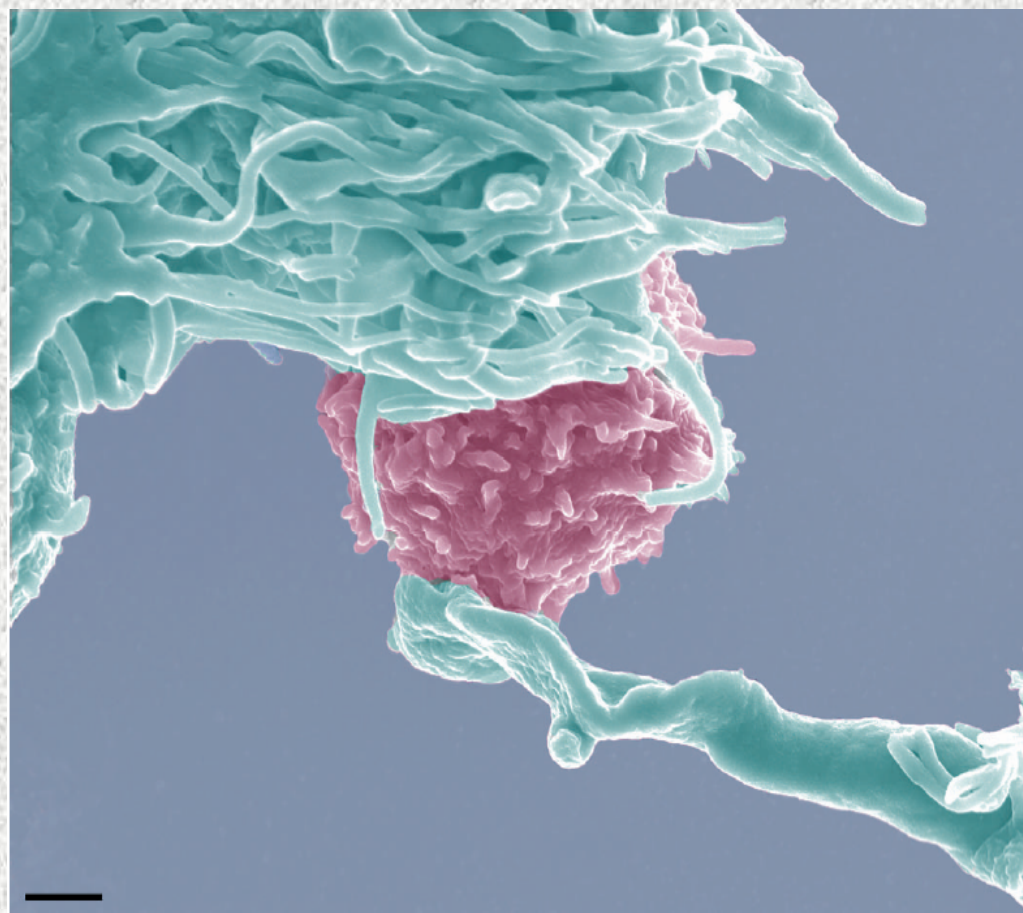


Mikrodomének szerepe a membránfunkcióban



SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet -
2023-04-04 – Liliom Károly

Az előadás eredeti címe:
Membrán mikrodomének, nanocsövek és
extracelluláris vezikulák: szerepük a sejtfunkciókban.
Példák az immunrendszer működéséből

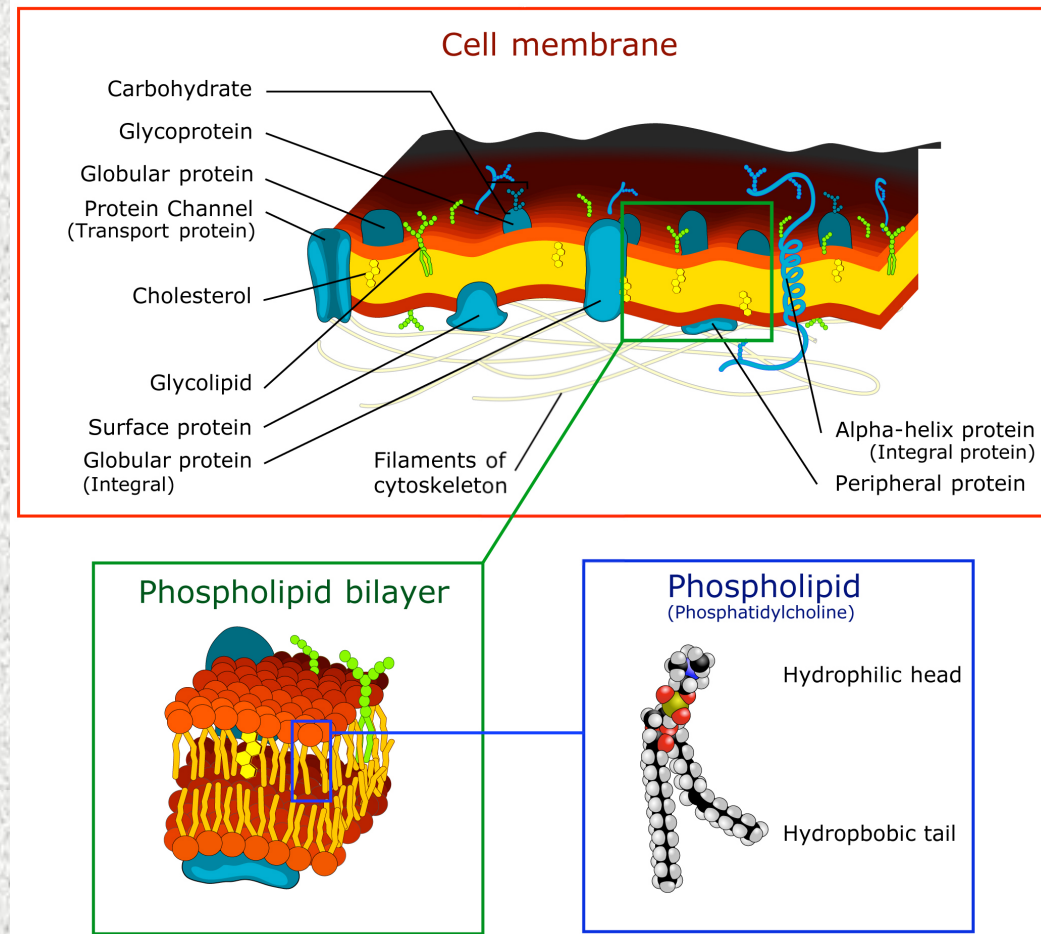


Matkó János, ELTE, Immunológia Tanszék

Témakörök:

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

A membrán globális szerkezete

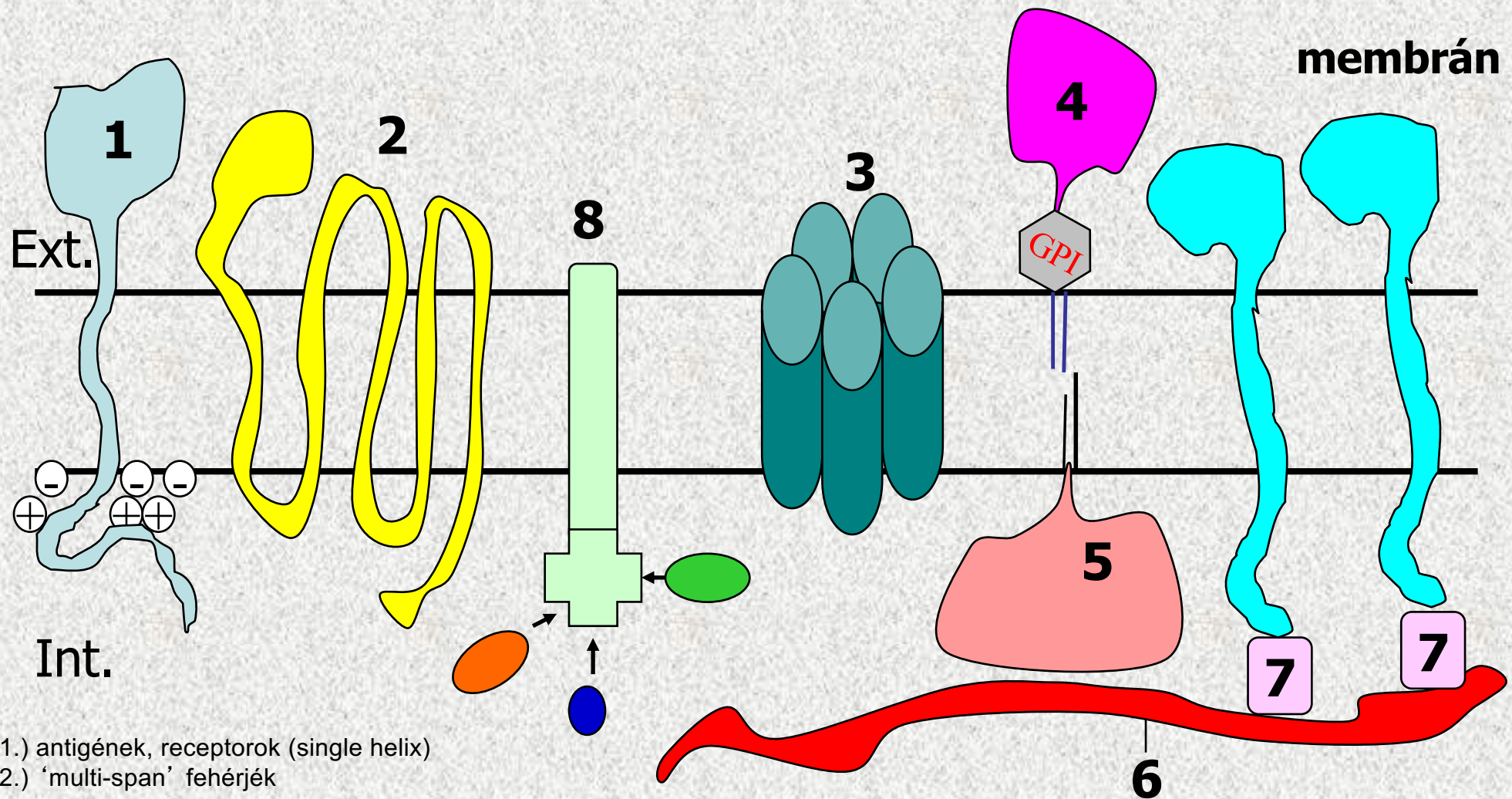


A „folyékony mozaik modell” több mint 40 éves, de mai ismereteink szerint is helyesen írja le a membrán mint foszfolipid kettősréteg alapszerkezetét...

Nicolson GL. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years.

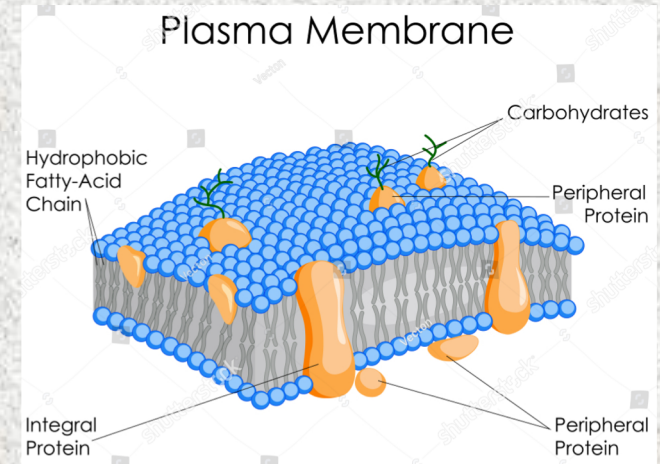
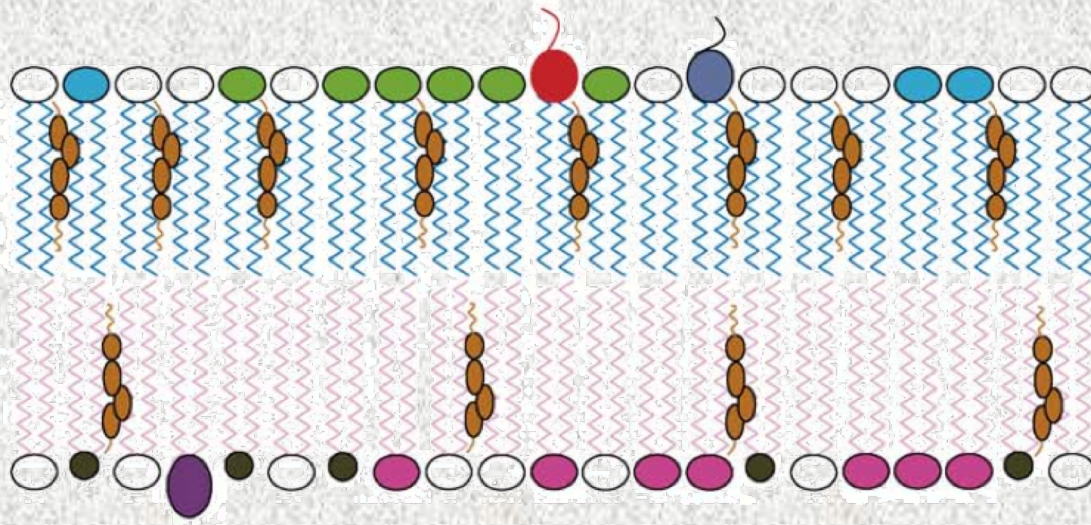
Biochim Biophys Acta Biomemb. 2014; 1838:1451–1466.

A membránfehérjék globális szerkezete és kapcsolódása a lipid kettősréteghez:



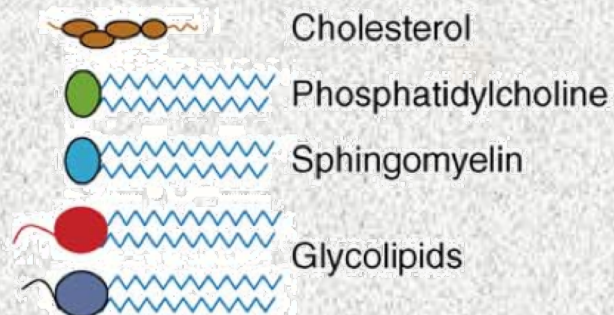
- 1.) antigének, receptorok (single helix)
- 2.) 'multi-span' fehérjék
- 3.) transzport fehérjék (multi-alegység komplexek)
- 4.) glikozil-foszfatidilinozitol (GPI) horgonyzott perifériás fehérje
- 5.) zsírsavval (mirisztoil-, palmitoil-, prenyl-) acilált perifériás fehérje
- 6.) sejtvázs struktúrfehérje (pl. spektrin és analógjai, aktin filamentumok)
- 7.) dinamikus kapcsoló fehérjék (pl. ERM fehérjecsalád)
- 8.) transzmembrán v. membrán asszociált adaptor /pányvázó fehérjék

Homogén-e a lipidek eloszlása a kettősrétegben?

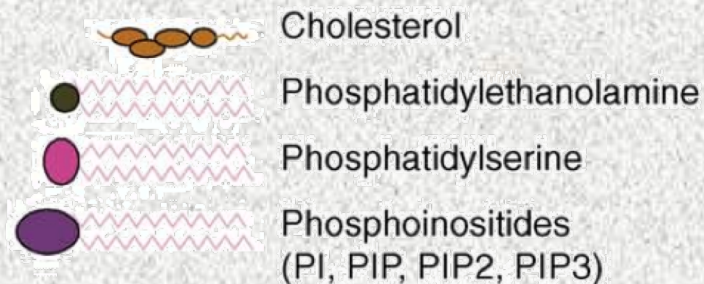


!?

Outer leaflet

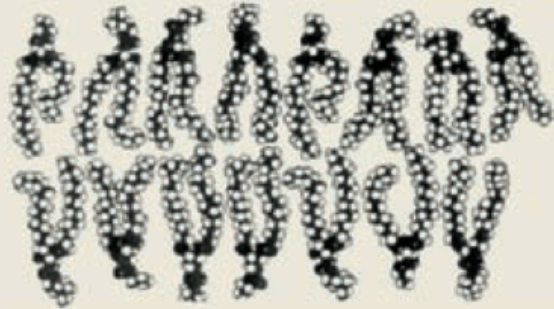


Inner leaflet



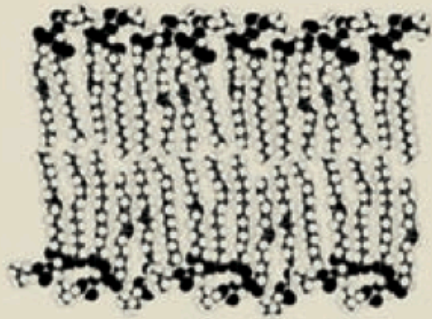
A plazmamembrán külső fele szfingolipidekben, belső fele glicerín-foszfolipidekben gazdagabb, de a belső és külső félmembrán a glicerín-foszfolipid-összetételben is markánsan különbözik. A foszfatidil-szerin elsősorban a belső membránban található, has mégis megjelenik (kifordul) a külső membránban, az biológiai jel-értékű...

Homogén-e a lipidek eloszlása a kettősrétegben?



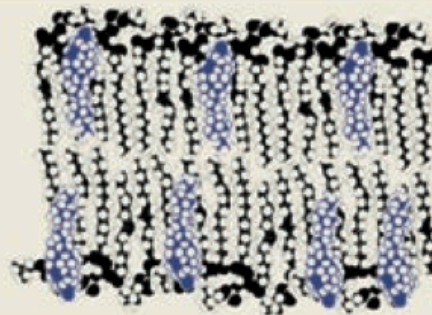
Liquid-crystalline,
liquid-disordered
 L_d (L_d or L_α)

S = Low
 D_T = Fast ($\sim 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)



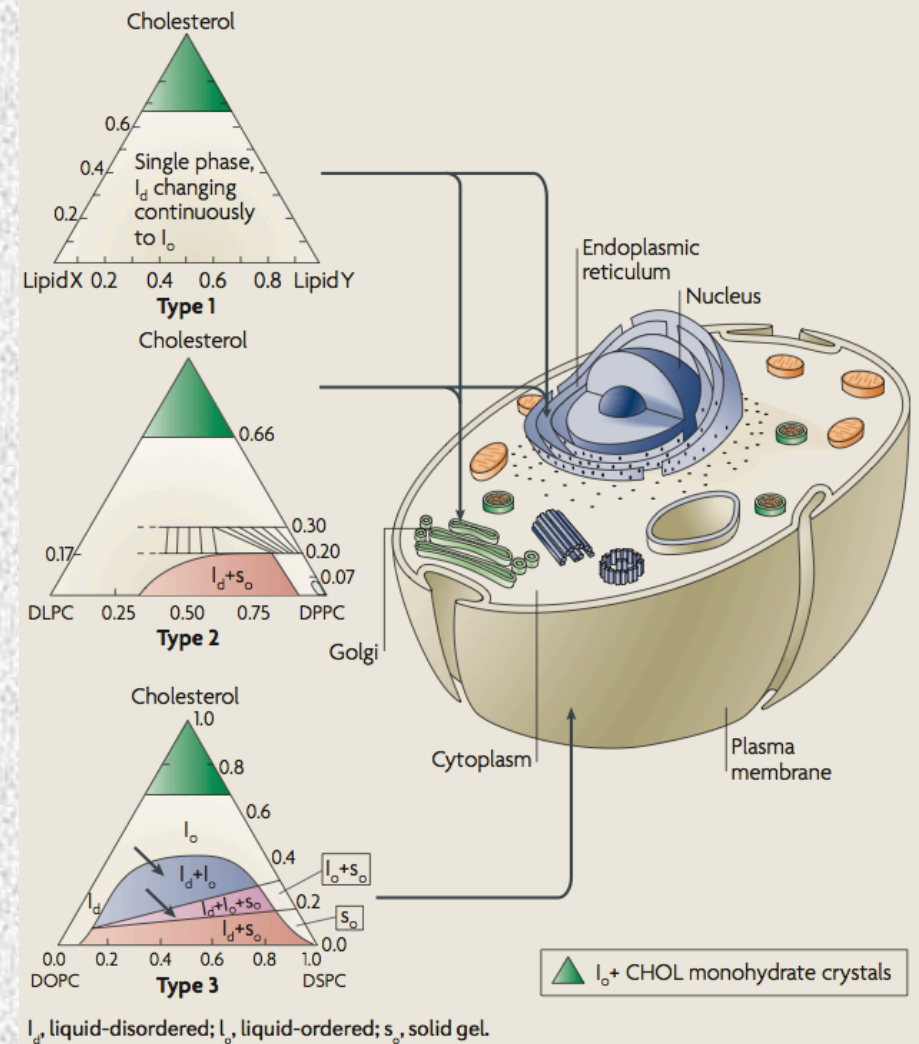
Solid gel
 s_o (or L_β)

S = High
 D_T = Slow ($10^{-3} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)



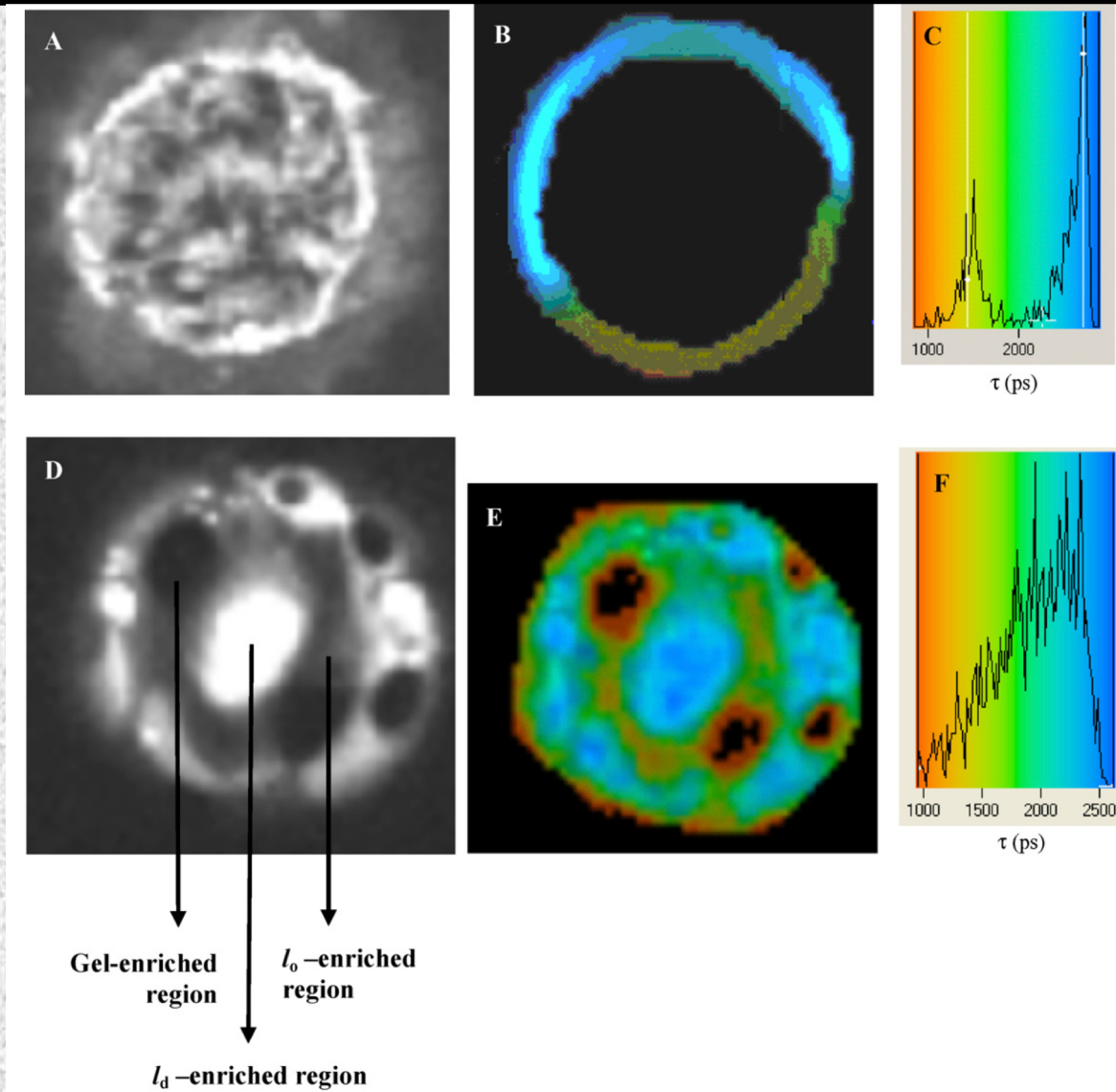
Liquid-ordered,
'raft'
 l_o (or L_o)

S = High
 D_T = Fast ($\sim 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)



A plazmamembrán és a belső kompartmentumok membránjai más-más, az adott membránra tipikus lipid-összetétellel jellemezhetők (jobb oldal). A zsírsav-láncok telített / telítetlen jellege és a fejcsoportok különböző fizikai-kémiai tulajdonságai rendezettebb / rendezetlenebb kettősréteg-struktúrát eredményeznek (bal oldal).

Homogén-e a lipidek eloszlása a kettősrétegben?

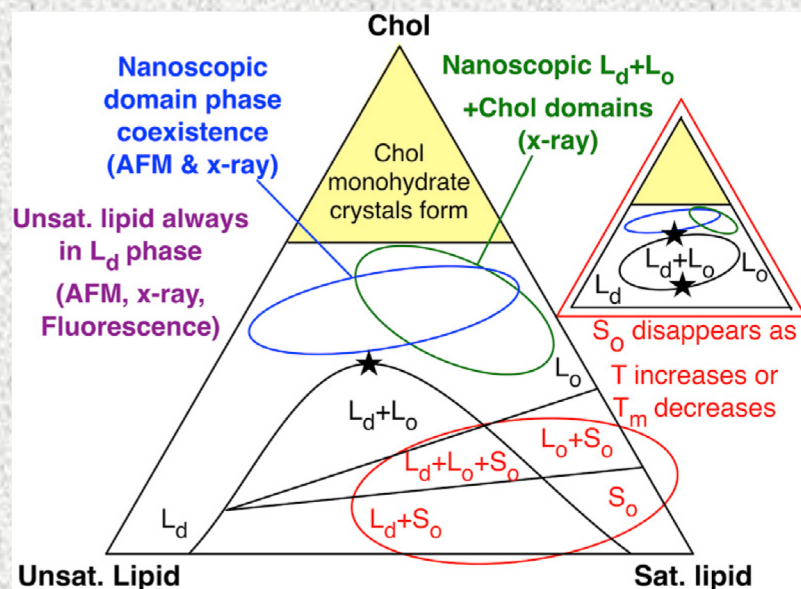


Spontán fázis-
szeparáció már
egyszerű, két
illetve három
komponensű
membránokban
is megfigyelhető
(*biológiai
membránokban
több-száz lipid
speciesz is
előfordulhat!*)

(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 lipidek eloszlása a kettősrétegben?

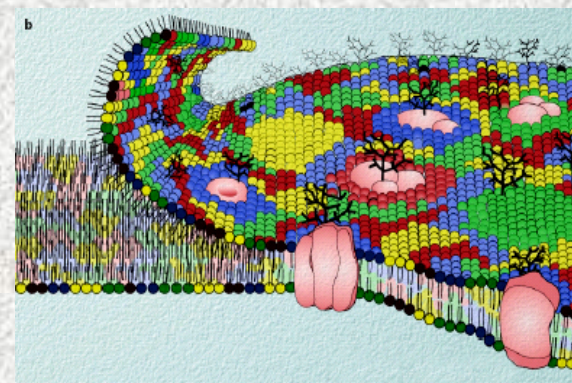
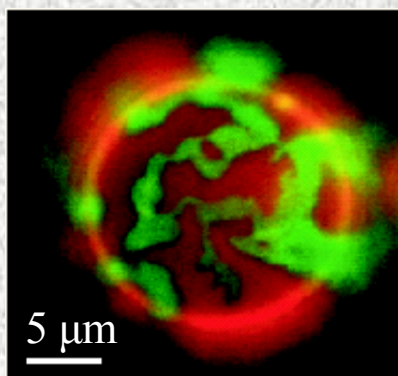
- Lipid mikroheterogenitás többkomponensű mono- és bilayerekben, liposzómákban (LUV): fluoreszcencia-életidő, mikrokalorimetria, FRAP, ESR
- Spontán **GSL**, **SM szegregáció** két/háromkomponensű PC lipid kettősrétegekben
- A **koleszterin** egy kritikus stabilizáló faktor



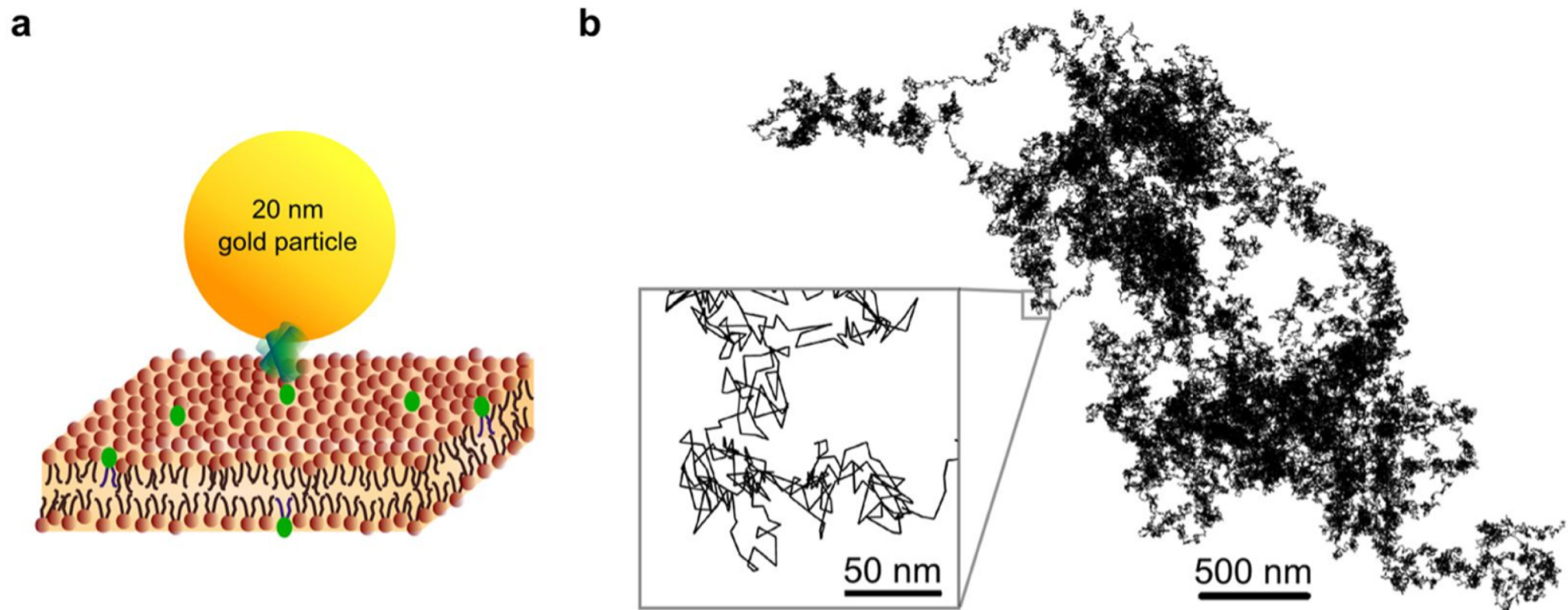
Általános fázisdiagram háromkomponensű (telítetlen és telített lipidek, koleszterin) kettősrétegekben.

L_d : rendezetlen (liquid-disordered),
 L_o : rendezett (liquid-ordered),
 S_o : gél (gel),
 Chol: tiszta koleszterin domének.

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



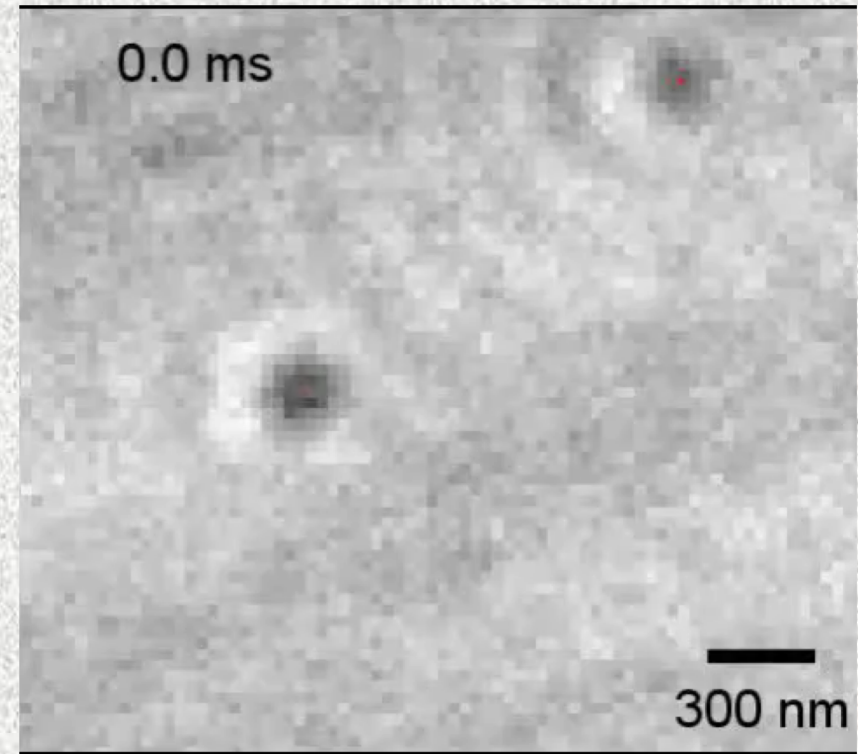
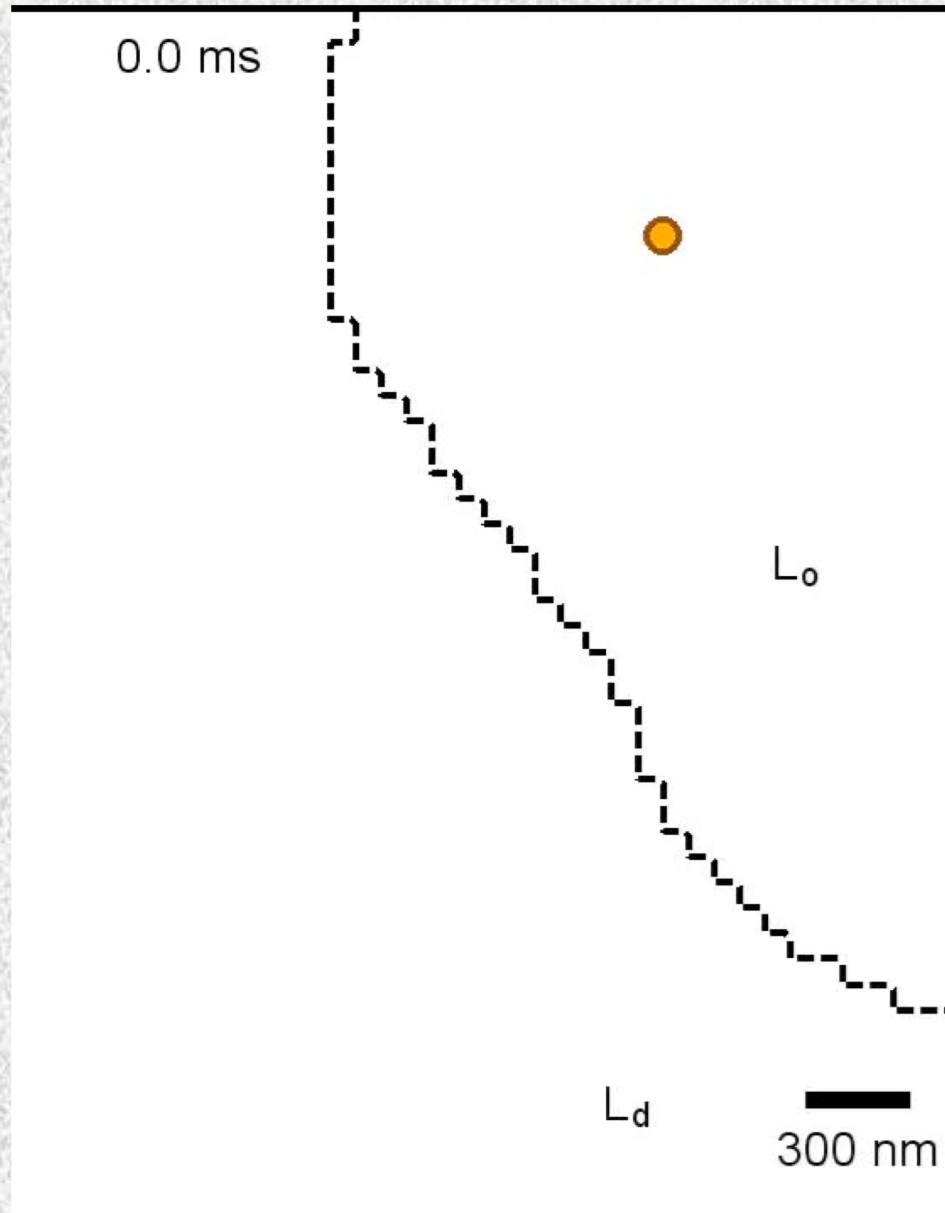
Homogén-e a lipidek eloszlása a kettősrétegben?



Wu HM, Lin YH, Yen TC, Hsieh CL. Nanoscopic substructures of raft-mimetic liquid-ordered membrane domains revealed by high-speed single-particle tracking. *Sci Rep.* 2016; 6:20542.

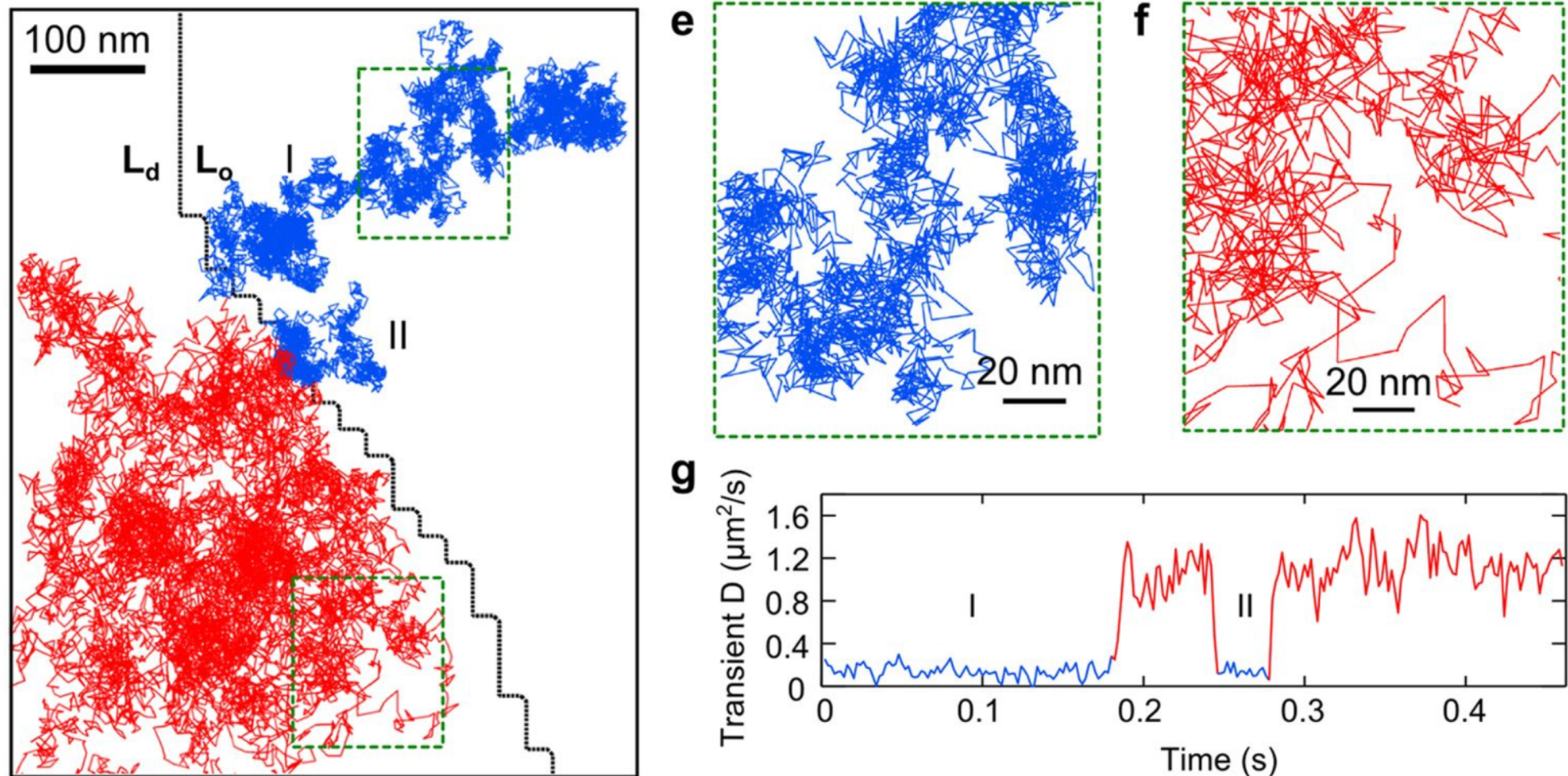
DPhyPC homogén kettősréteg szilárd tartón, 1 mol% DPPE-N-biotin-arany 20 nm-es nanogömb (a). Az egyedi arany nanogömbök mozgásának követése 50000 kép/mp lépésekben ~3 nm laterális felbontással ~3 mp-en keresztül (b). Jól megfigyelhető a DPPE-lipid laterális diffúziós mozgása a kettősrétegben.

Homogén-e a lipidek eloszlása a kettősrétegben?



Wu HM, Lin YH, Yen TC, Hsieh CL. Nanoscopic substructures of raft-mimetic liquid-ordered membrane domains revealed by high-speed single-particle tracking. *Sci Rep.* 2016; 6:20542.

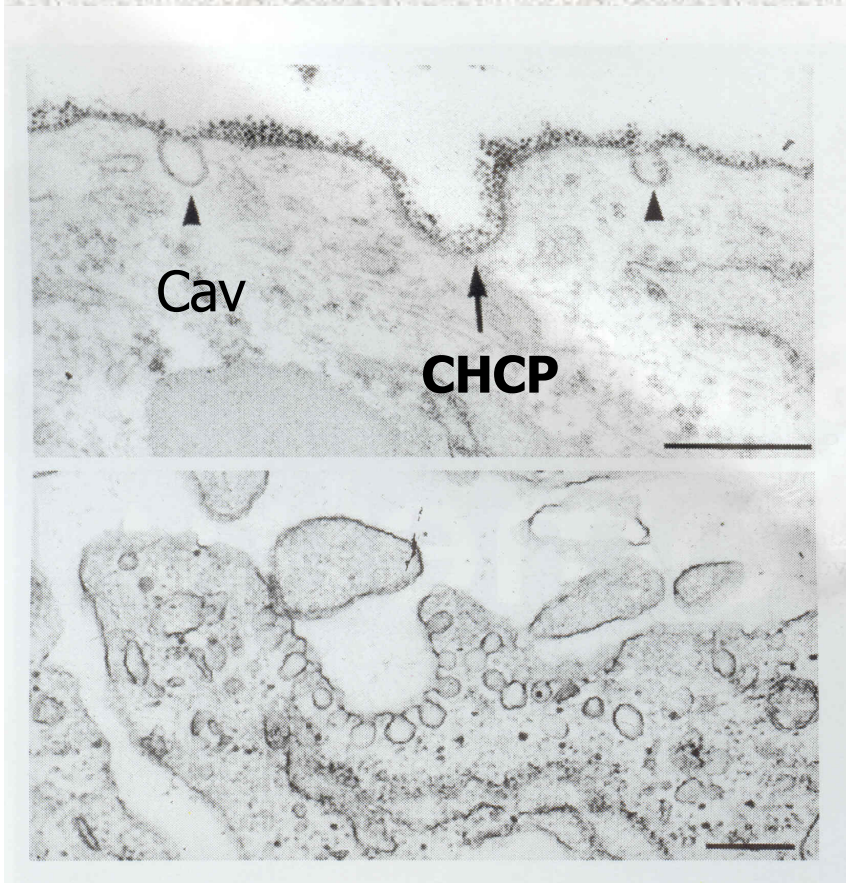
Homogén-e a lipidek eloszlása a kettősrétegben?



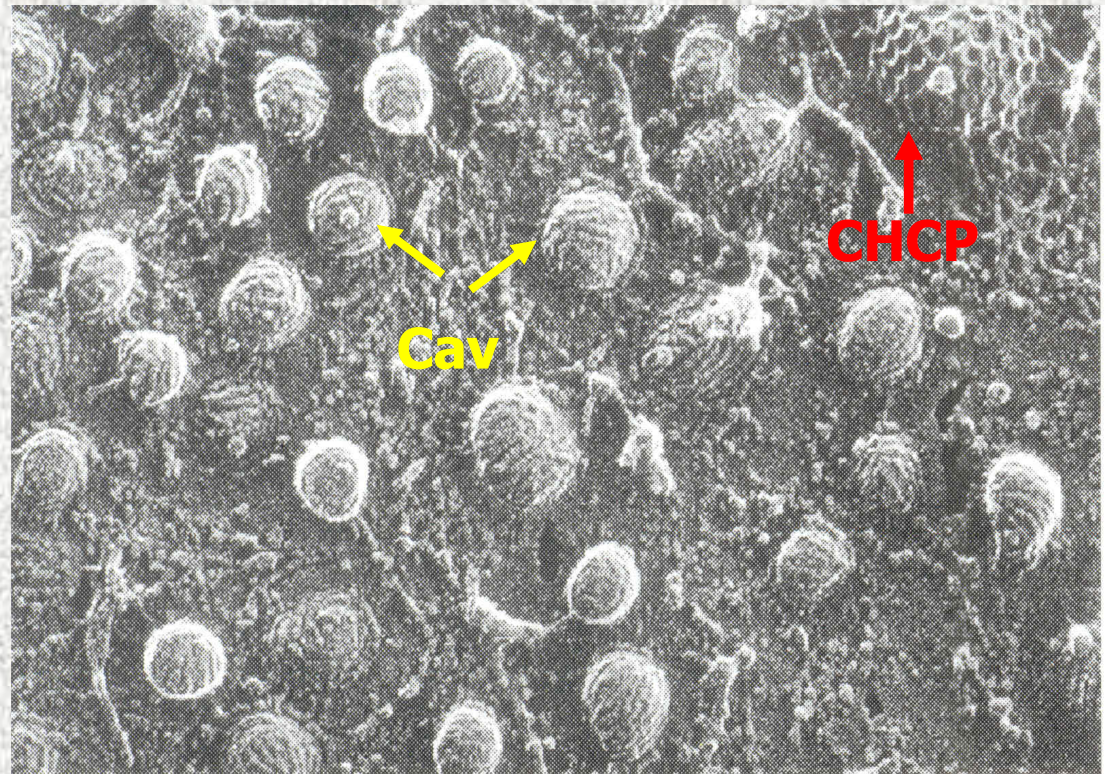
Wu HM, Lin YH, Yen TC, Hsieh CL. Nanoscopic substructures of raft-mimetic liquid-ordered membrane domains revealed by high-speed single-particle tracking. *Sci Rep.* 2016; 6:20542.

DPhyPC/DPPC/Chol = 40/40/20 kettősréteg, amely spontán fázis-szeparációt mutat (kék: L_o gél-fázis, **e**, piros: L_d fluid-fázis, **f**). Egy részecske trajektóriája a diffúziós együtthatóban nagyságrendi különbséget mutat, amint spontán bolyongás során átkerül a gél-fázisból a fluid-fázisba (**g**).

A „Caveola mikrodomének” elektronmikroszkópiás képe

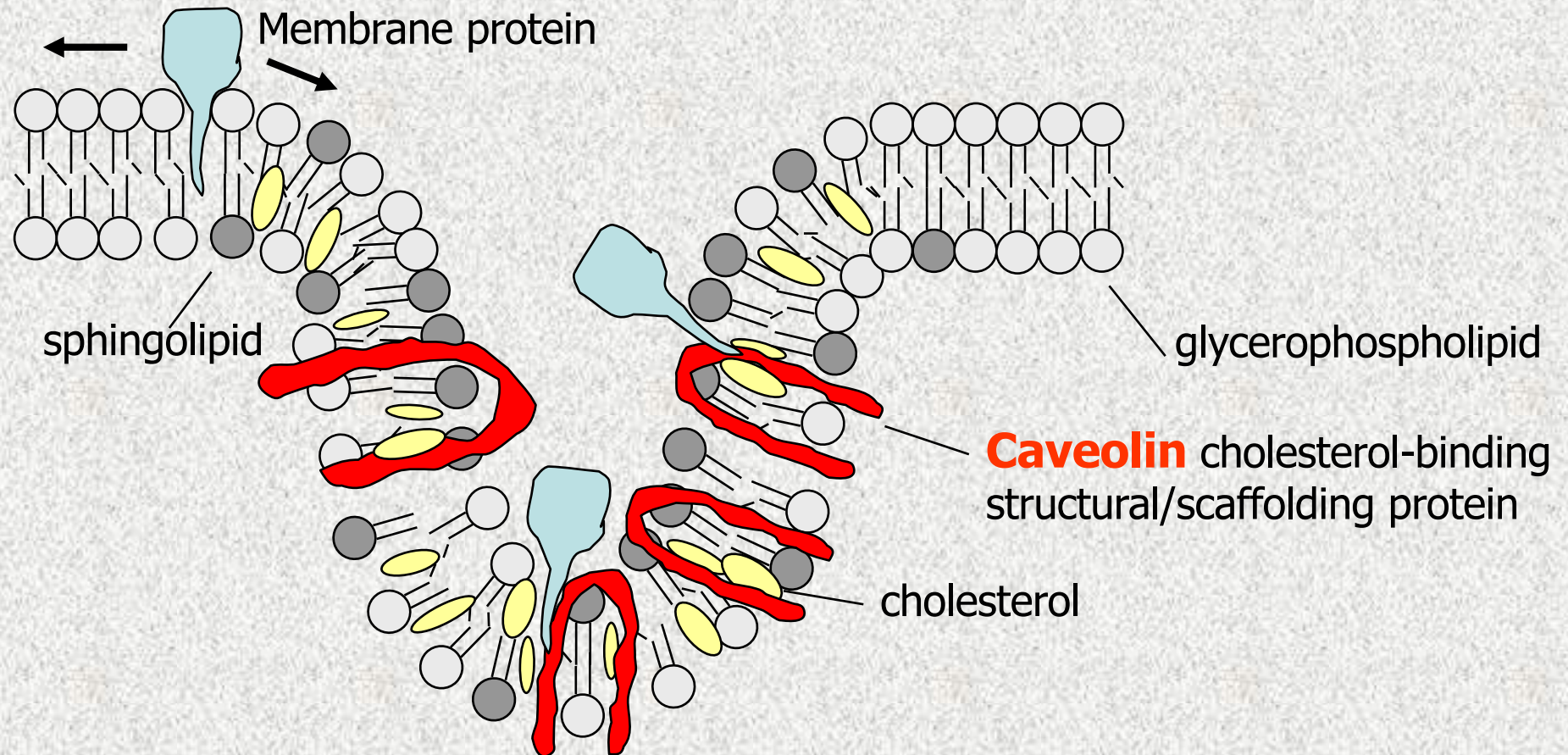


Cav: kaveola
CHCP: klatrin-burkos gödör



**Fibroblaszt sejtek fagyasztva tört
belső membránfelszínének elektron-
mikroszkópos képe**

A „caveola” membrán mikrodomének szerkezete



“caveola”

50-80 nm



← "raft" (20 nm-1 μm) →

ganglio-
zid
(GM1,GM3)

pl. CD48

"liquid ordered" (Lo) fázis

GPI-fehérje

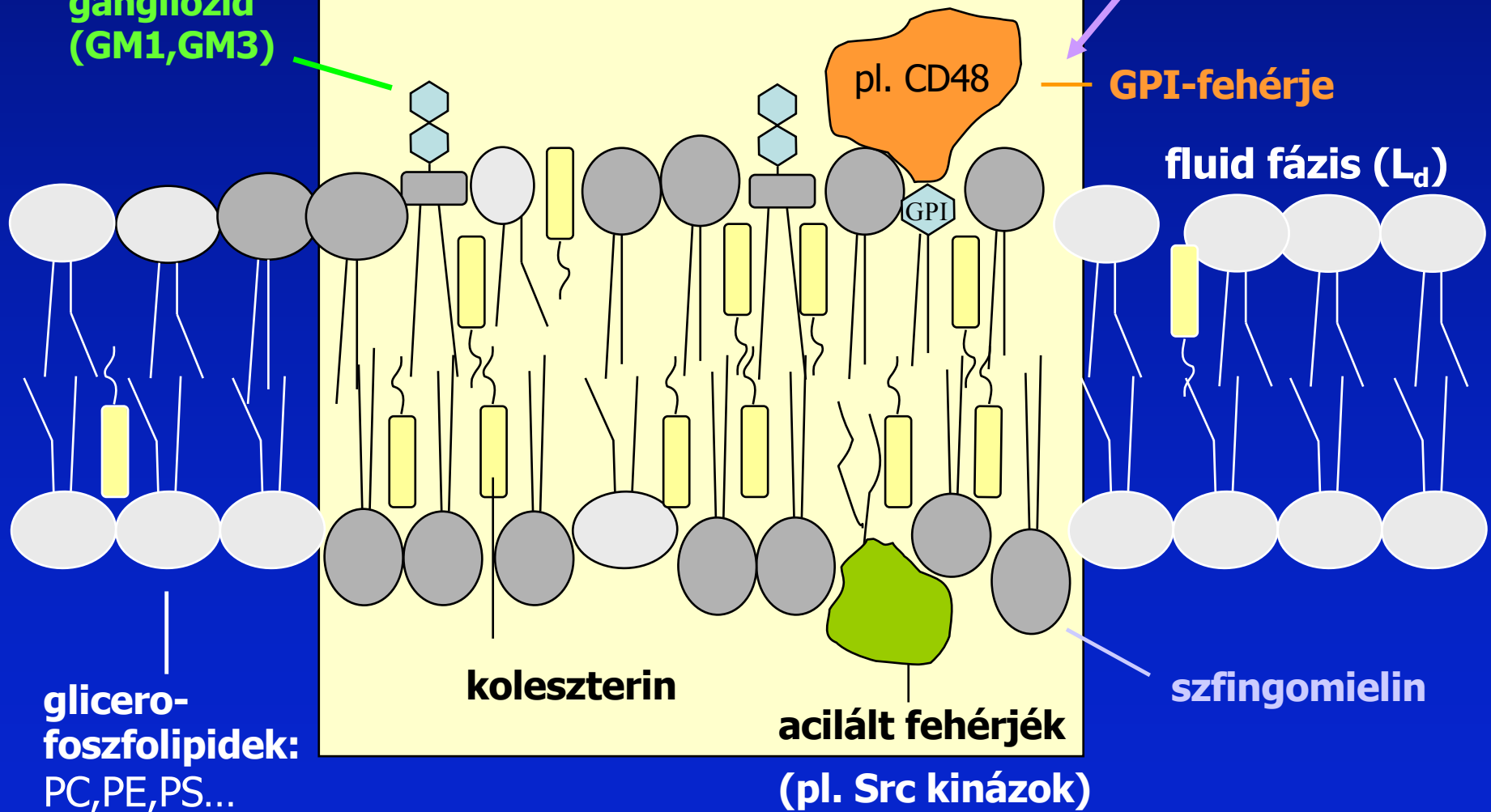
fluid fázis (L_d)

glicero-
foszfolipidek:
PC,PE,PS...

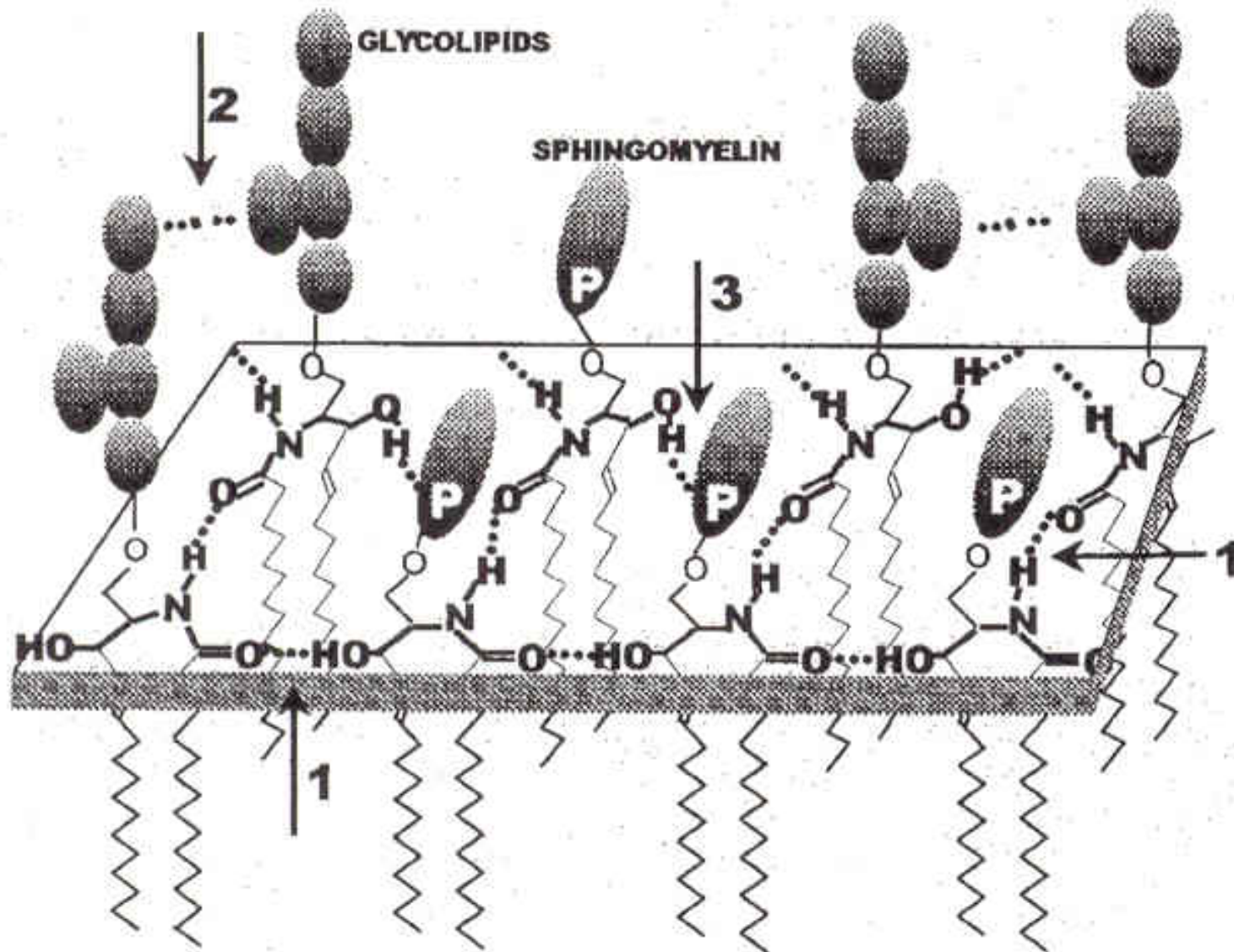
koleszterin

acilált fehérjék
(pl. Src kinázok)

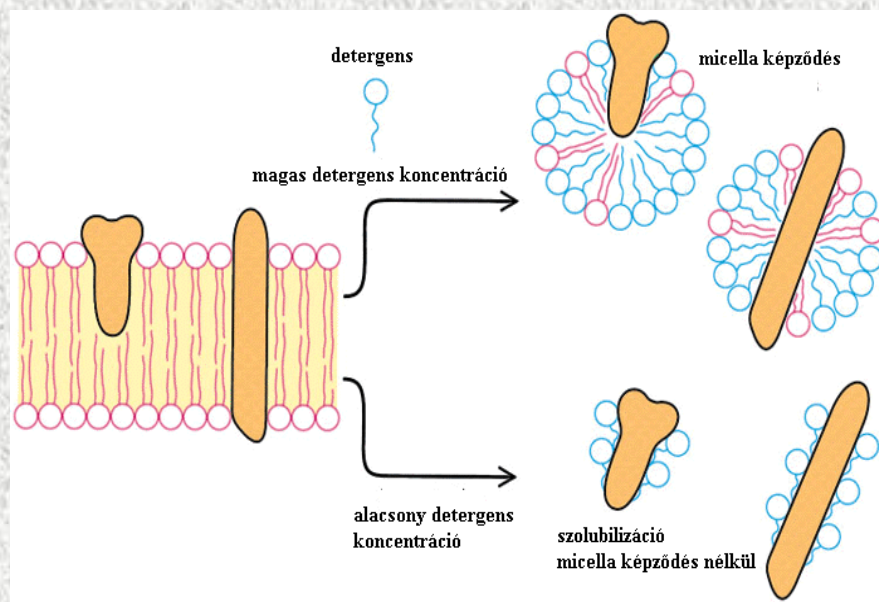
szfingomielin



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



A membrán mikrodomének „detergens-rezisztensek”

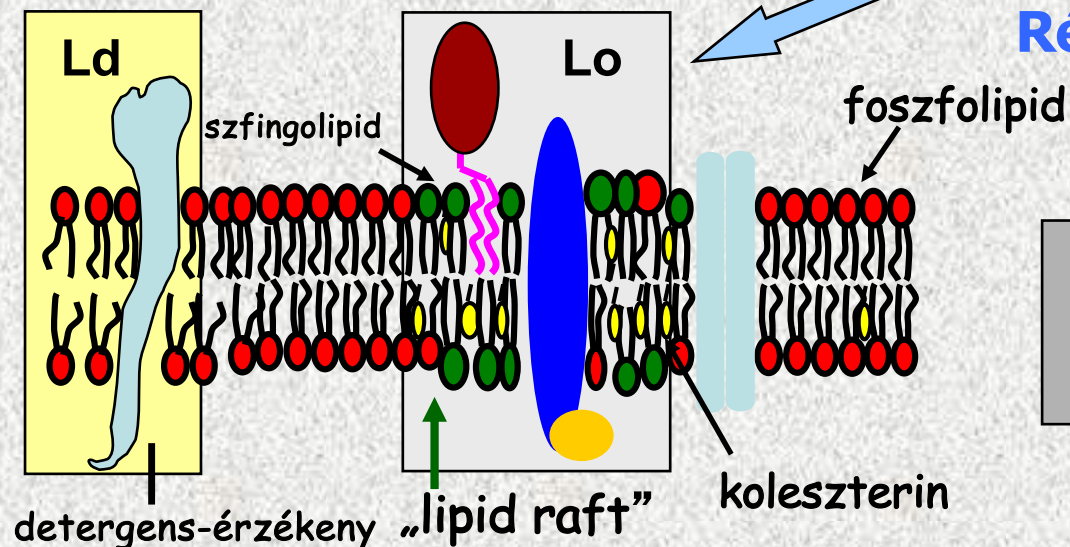


-“erős”/ ionos detergenssek: pl. oktil-glikozid, SDS

↓
kioldás /szolubilizáció/

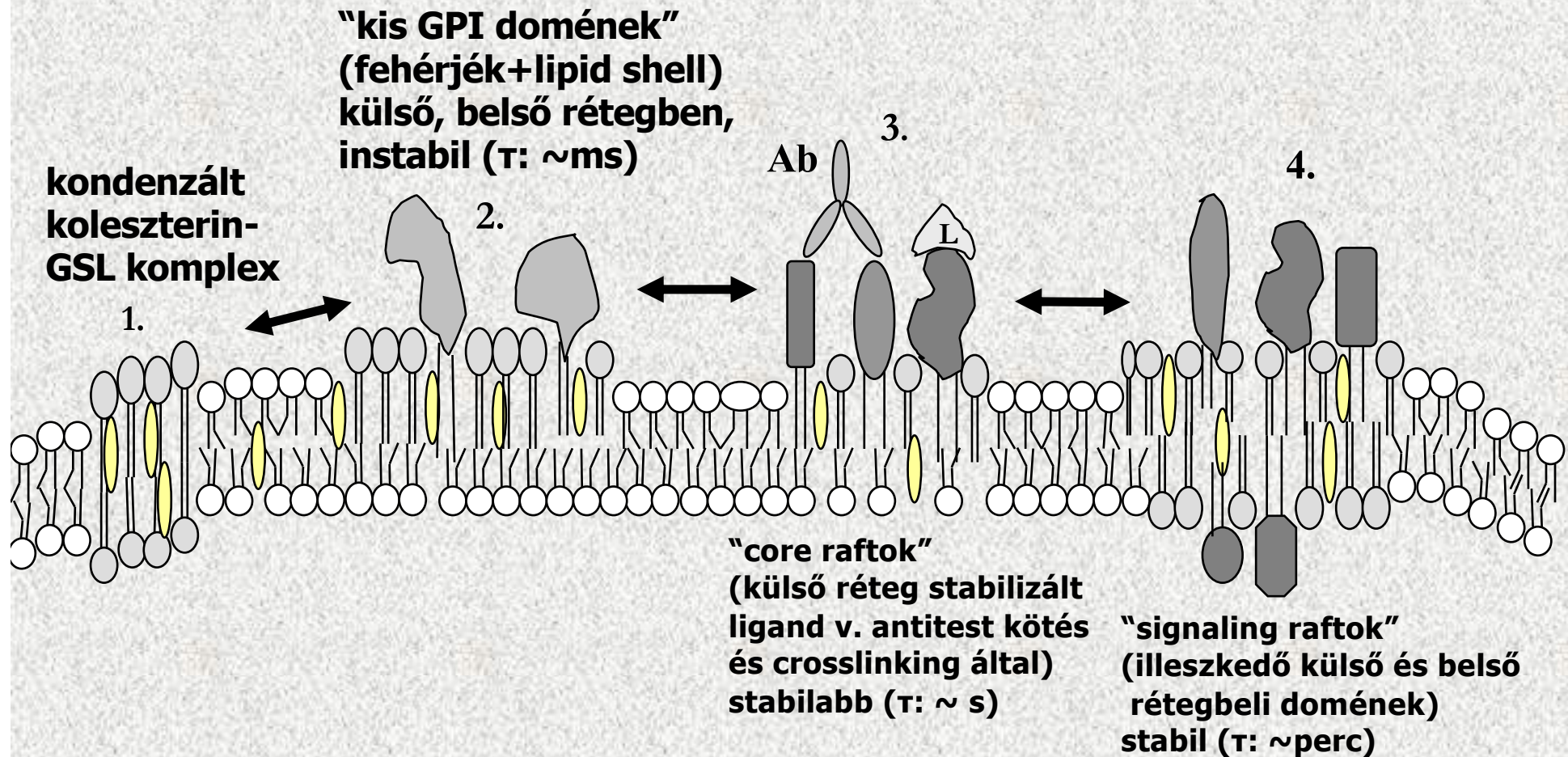
-“gyenge”/nem ionos detergenssek:
pl. Triton X-100, CHAPS, NP-40,
Brij 97, Lubrol

Részleges vagy teljes rezisztencia



A lipid „tutajok” (raftok)
kémiai definíciója

A sejtmembrán lipid raft dinamikájának modellje



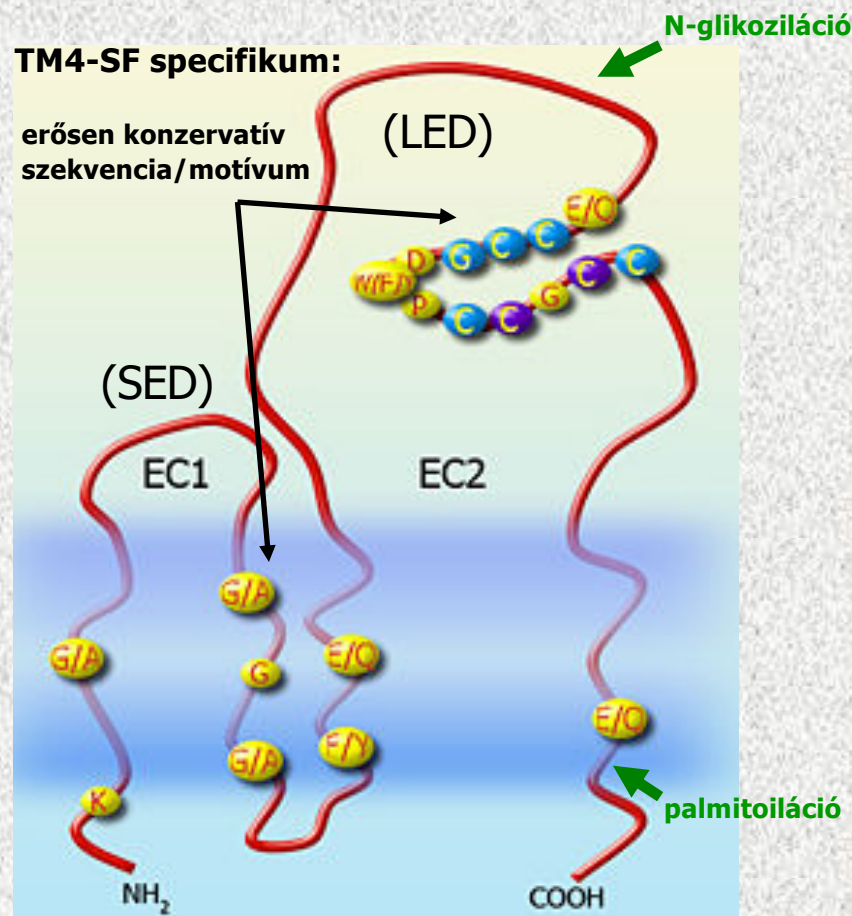
"tutajozó fehérjék":



- 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 emlőssökben, 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”

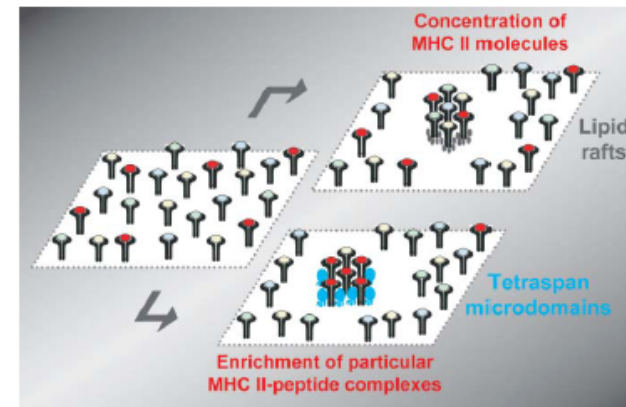


Fig. 11. Tetraspan microdomains and lipid rafts differ in their class II-peptide content. Schematic representation of which class II-peptide subsets segregate into tetraspan or lipid raft microdomains.

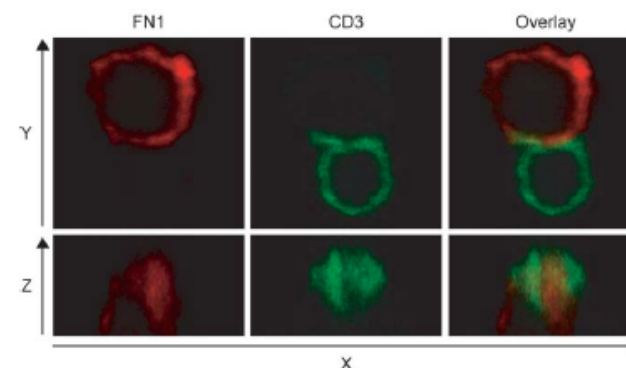
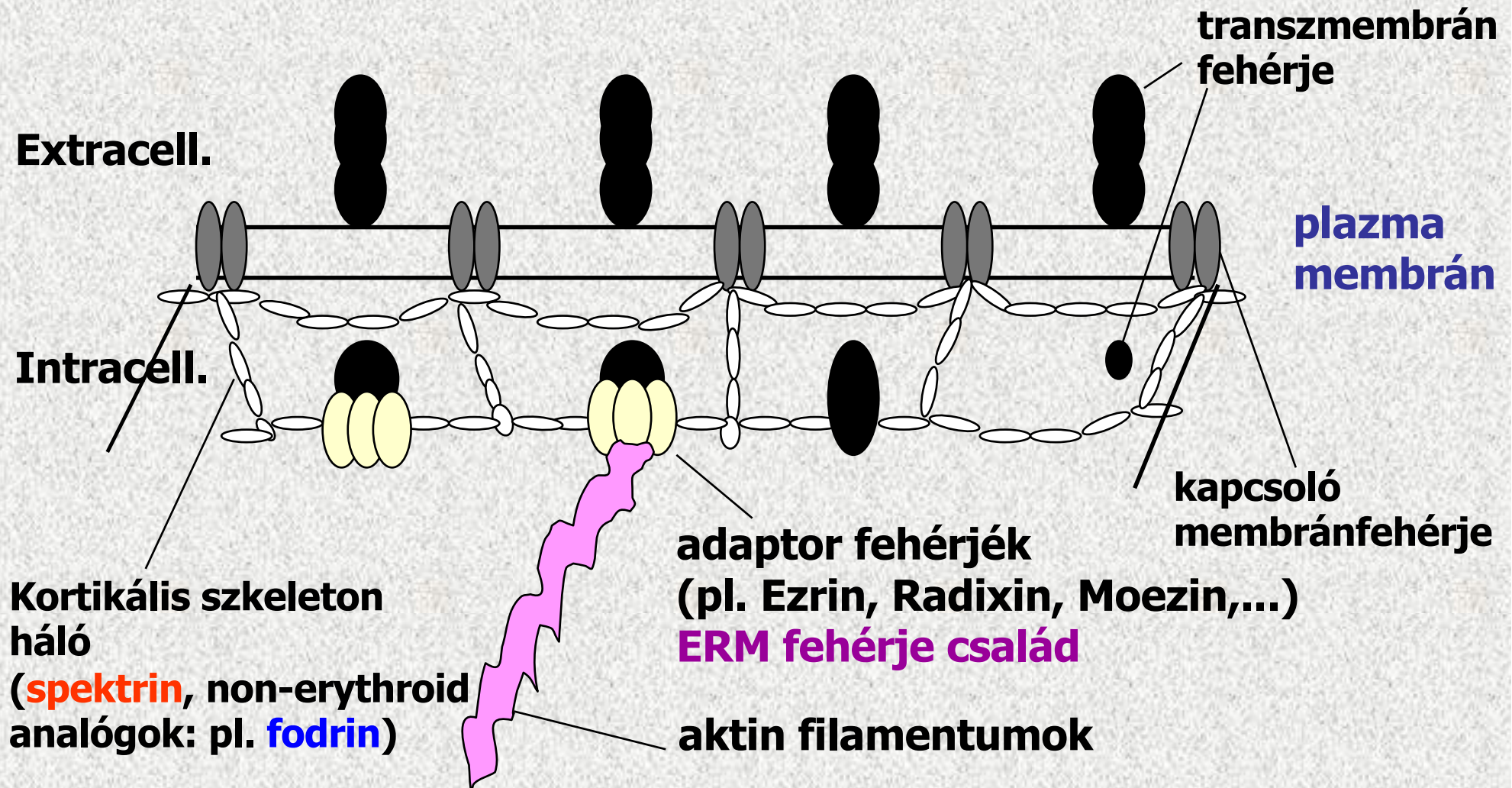


Fig. 12. CDw78 microdomains are involved in synapse formation between DCs and Thelper cells. Monocyte-derived DCs were pulsed with the influenza vaccine Infalzel, Berna, and activated by LPS treatment. They were mixed with autologous CD4⁺ T cells (ratio 4:1) and incubated for 30 min at 37°C. After fixation in 1% paraformaldehyde, cells were stained for CDw78 domains with the mAb FN1 (red) and for CD3 with the mAb Okt3 (green), as shown in the upper panel (XY-plane). The lower panel of images shows the molecules accumulating in the DC-T-cell synapse (XZ-plane).

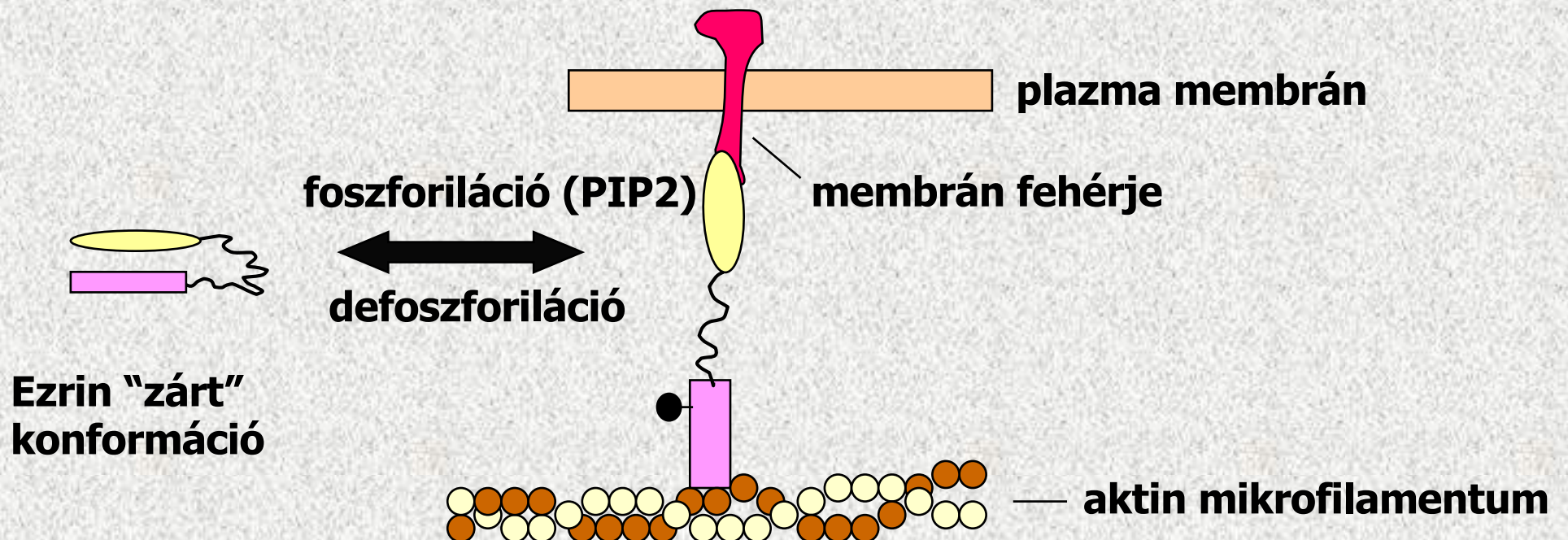
A kortikális szkeleton és a membránfehérjék kapcsolatrendszere a sejtmembránban: a "kerítés" modell



Kusumi A(1), Suzuki KG, Kasai RS, Ritchie K, Fujiwara TK. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36(11):604-15.

Az ERM fehérjecsalád és a citoskeletális kapcsolatok

	<u>FERM domén</u>	<u>linker</u>	<u>aktin-kötő domén</u>
Ezrin			
Moesin	85		75
Radixin	84		71
Merlin	61		44
Band 4.1	31		



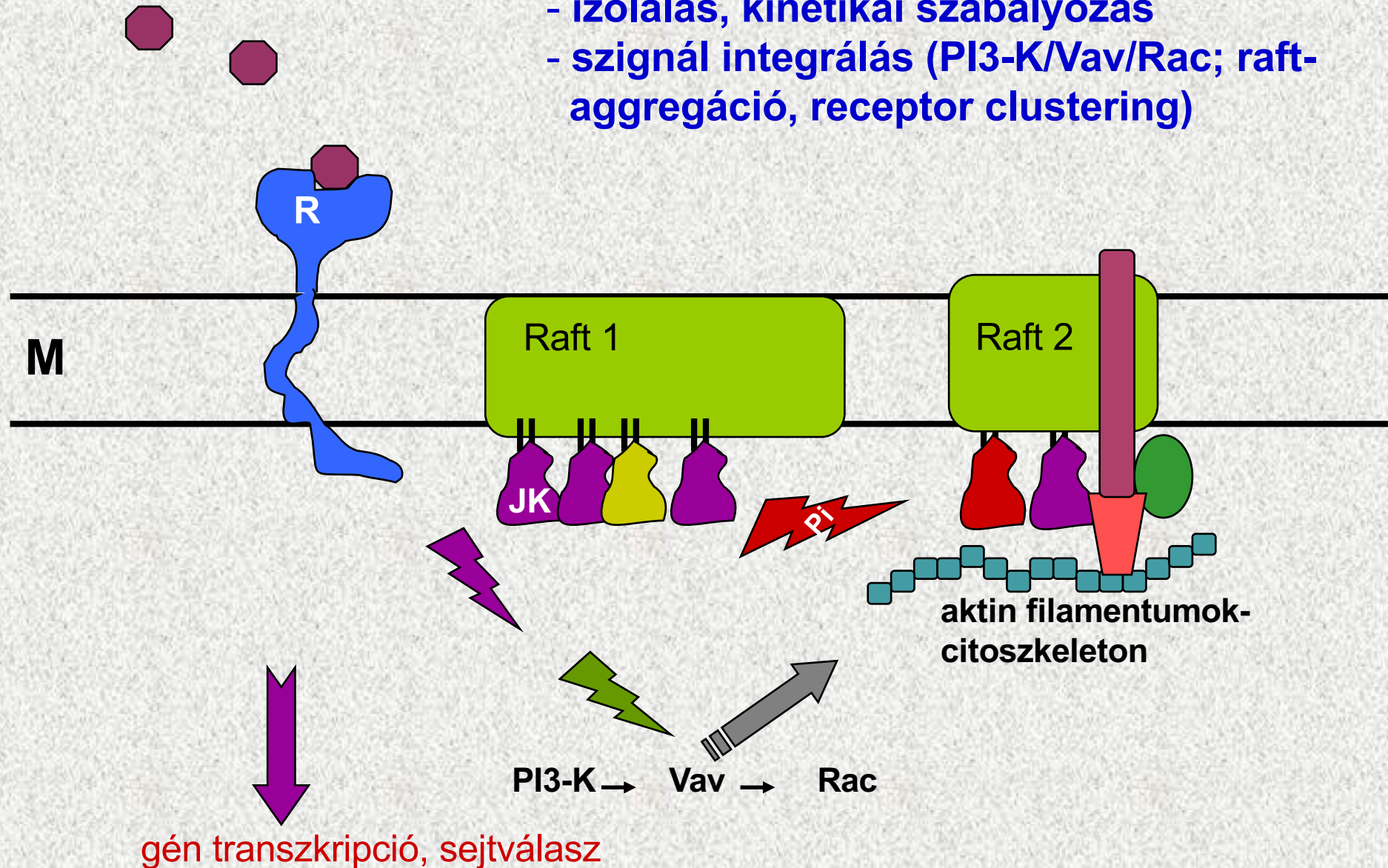
**A plazmamembrán jelentős laterális
és vertikális heterogenitást,
„mikrodomén szerkezetet” mutat
eukarióta sejtekben**

A membrán mikrodomének funkcionális jelentősége:

- **Jelátvitel, sejtkommunikáció „térbeli és időbeli” kontrollja (immunrendszer, idegrendszer)**
- **Különféle mikróbák (vírusok, prionok, baktériumok, protozoák) transzportja sejtekbe/sejtek között**

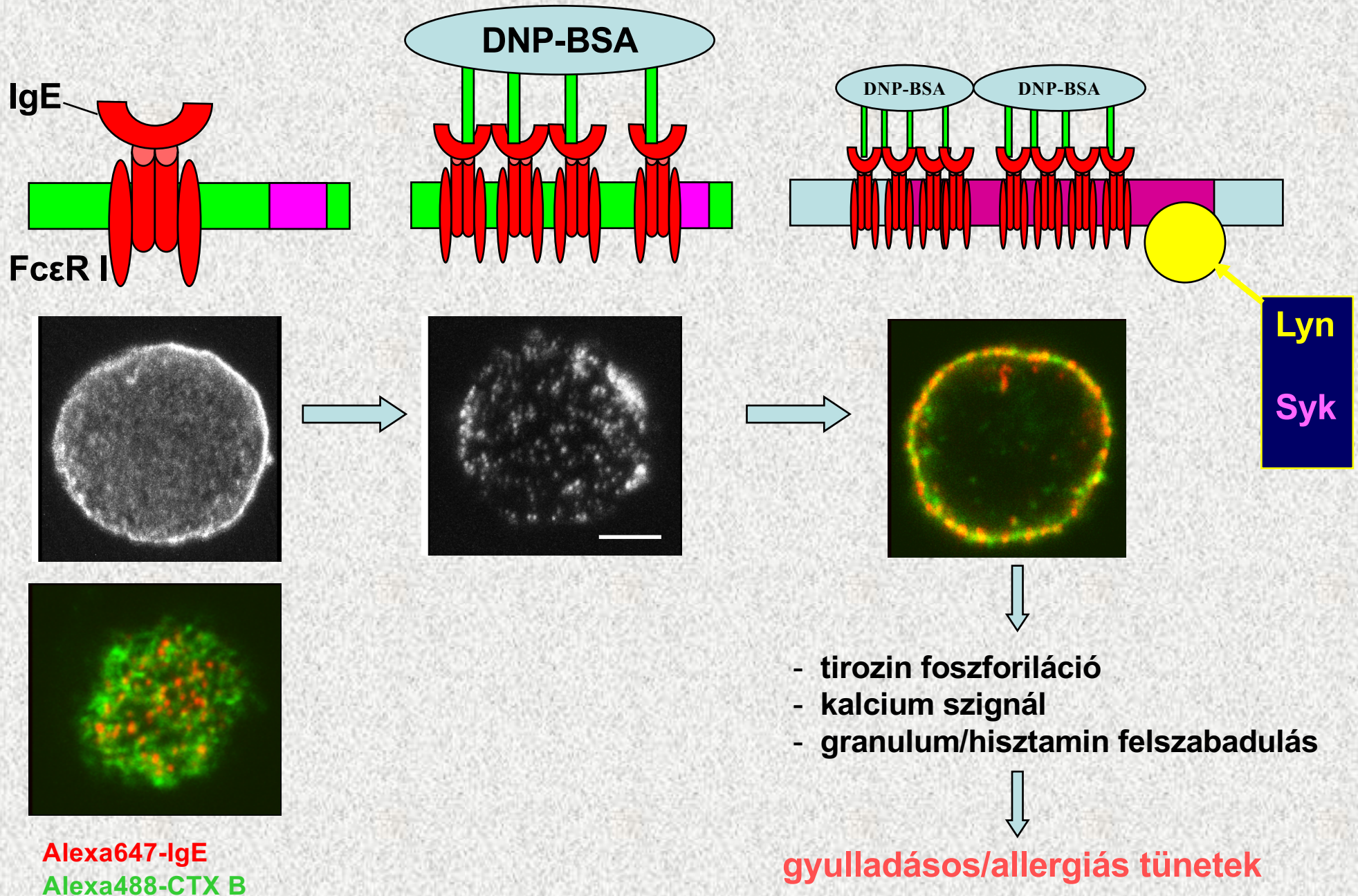
Lipid raftok és a limfocita jelátvitel

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

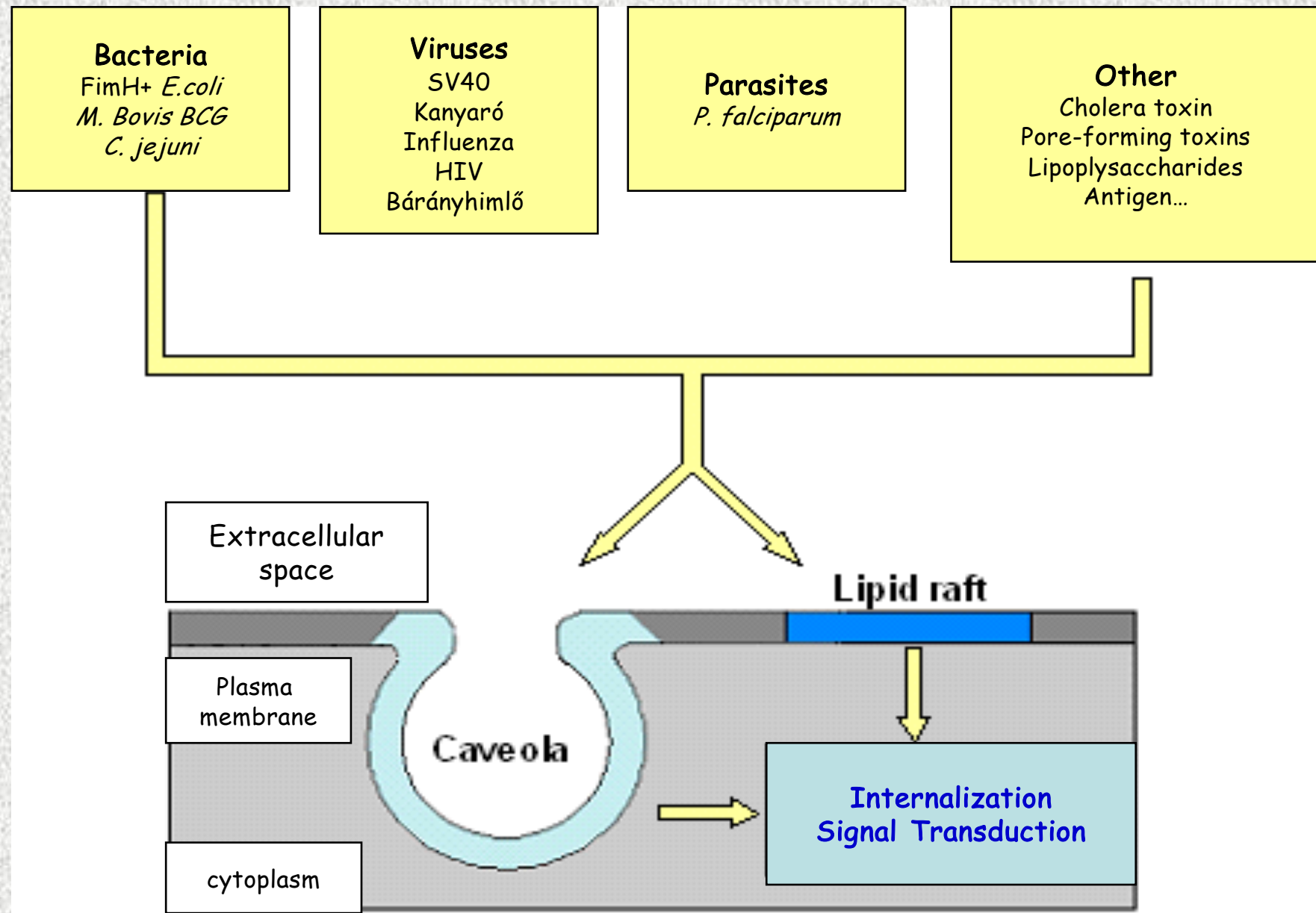


A raftok szerepe az allergén-válasz kialakulásában

(RBL-2H3 mucosa hízósejtek/leukocyták)



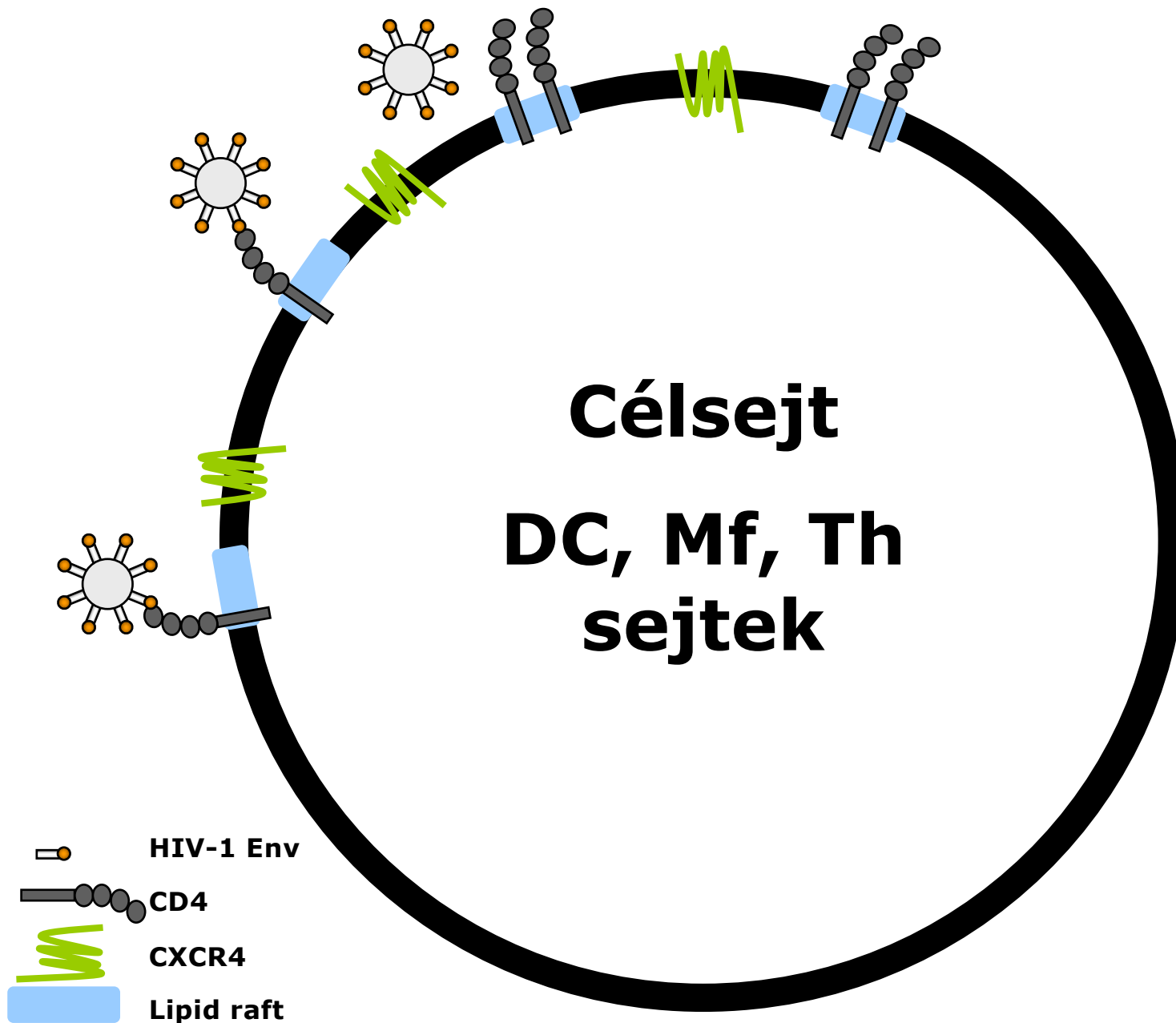
A membrán mikrodomének különféle mikróbák célpontjai



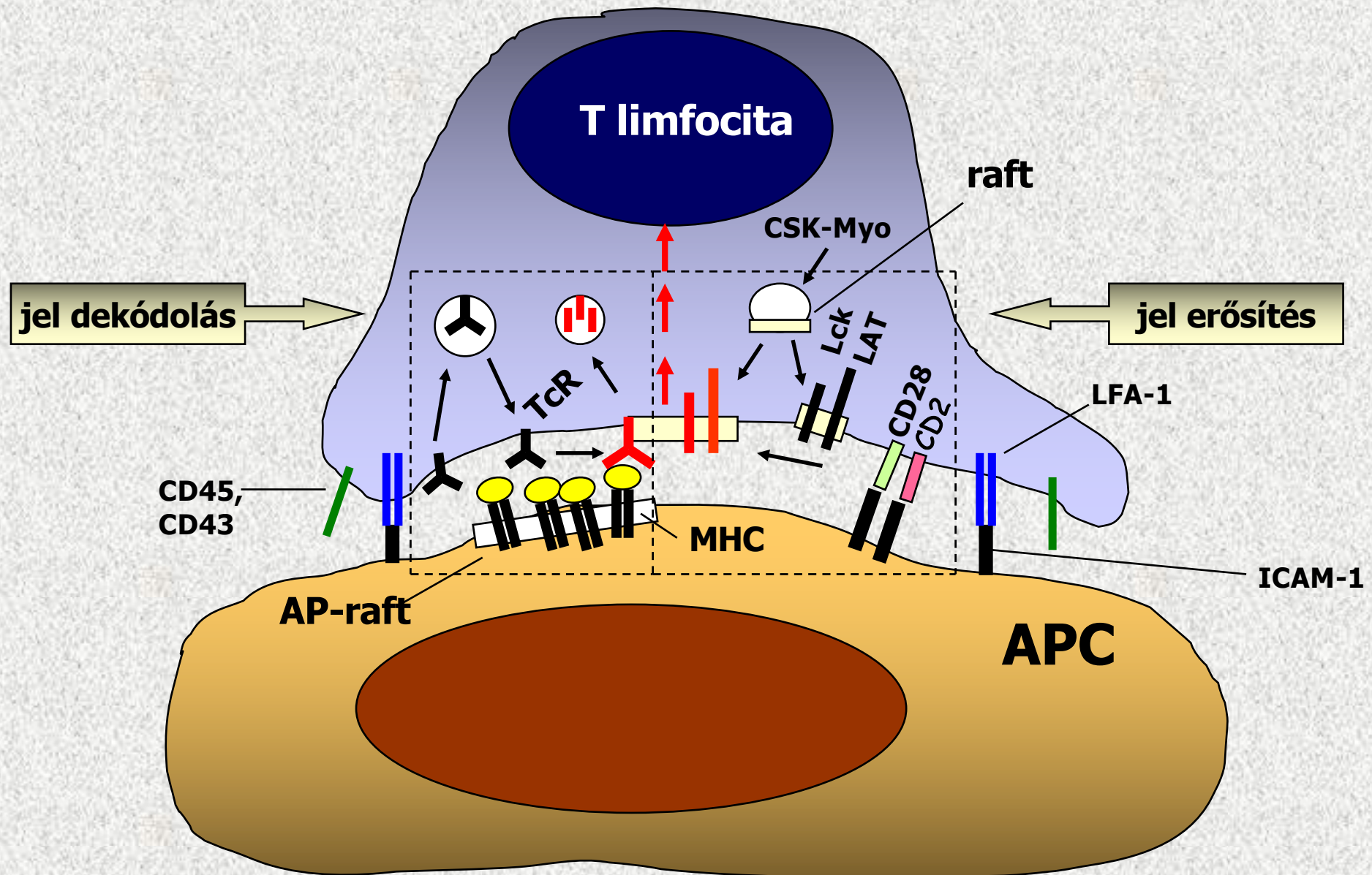
A HIV és egyéb vírusok (pl. kanyaró, influenza és himlővírusok) célsejtbe jutása: „raft-függő” folyamat

- **A vírus sejtfelszínhez 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

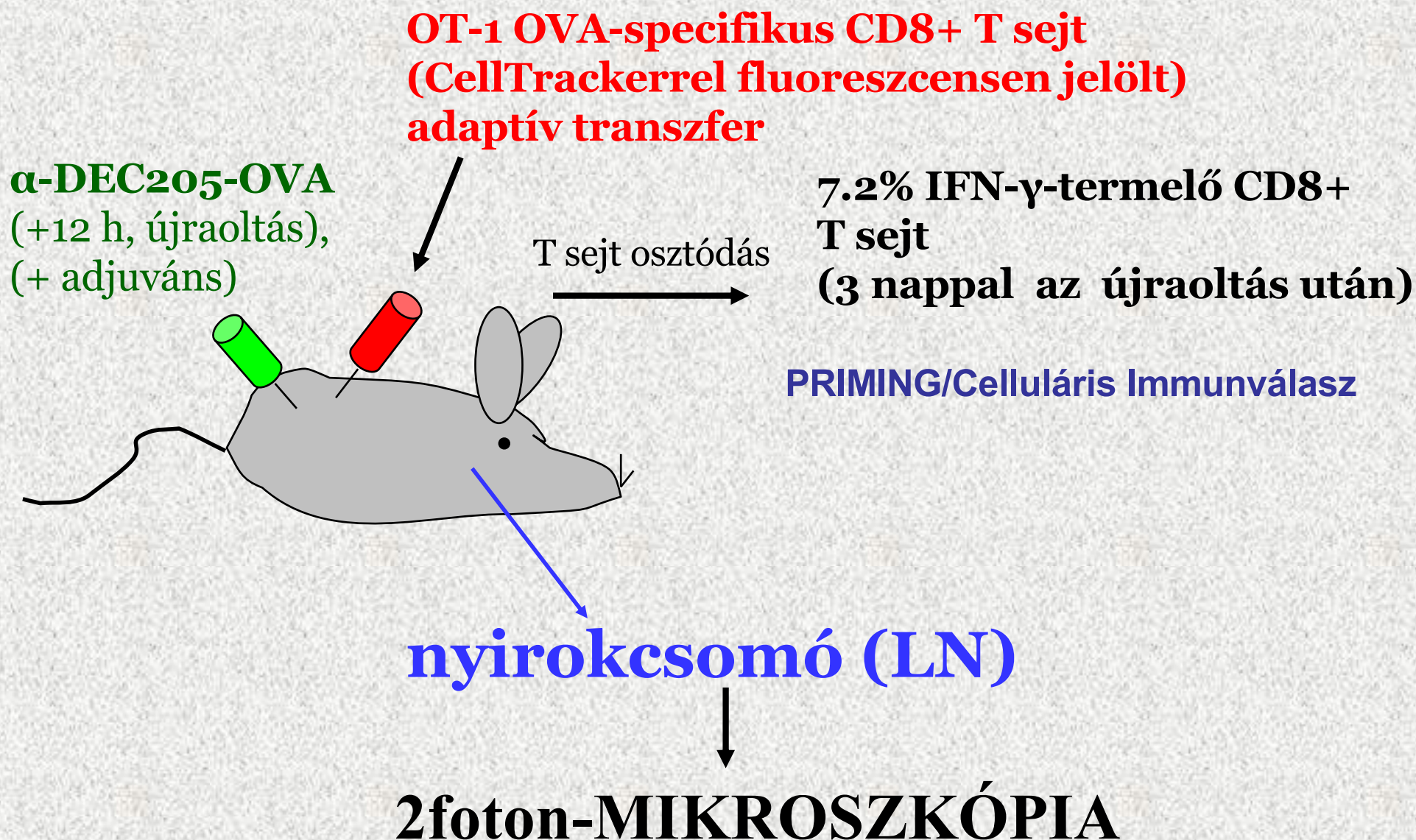
A HIV-1 fertőzés molekuláris modellje

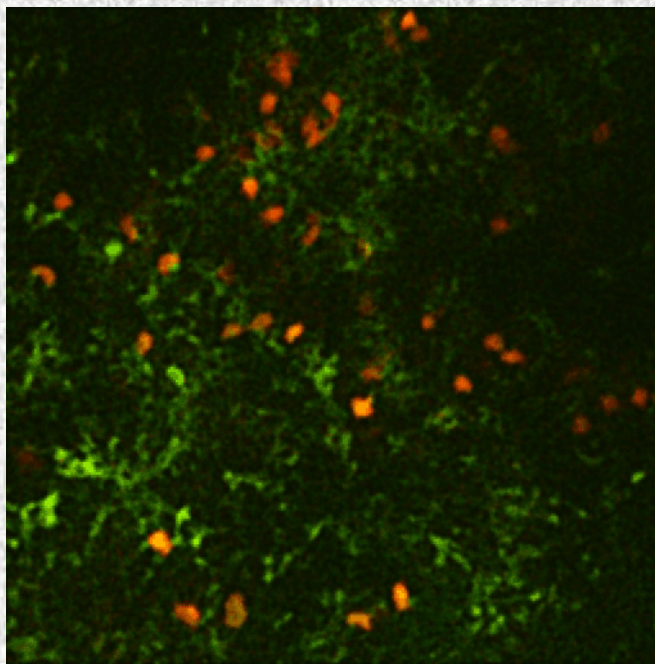
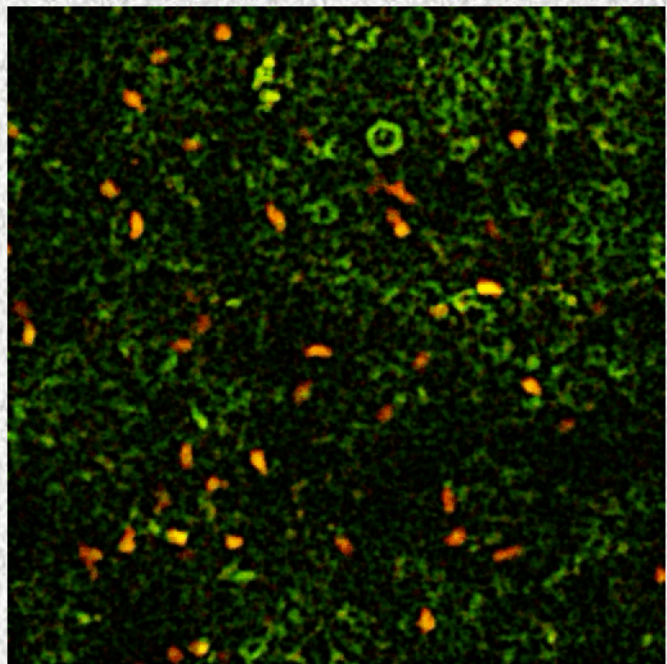


A T-sejt - APC immunszinapszis: funkcionális modell

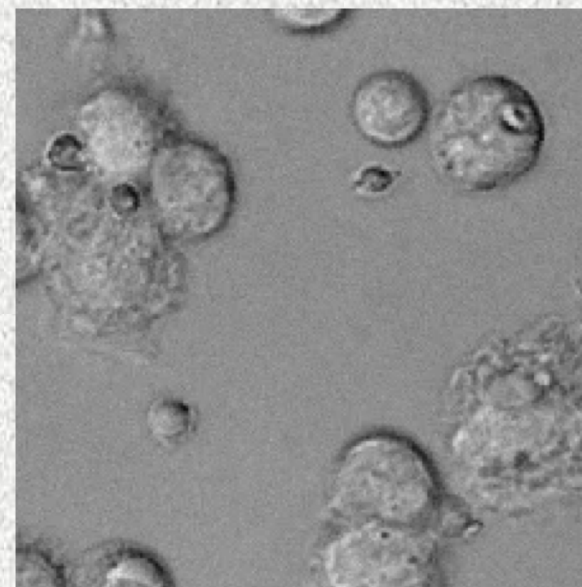
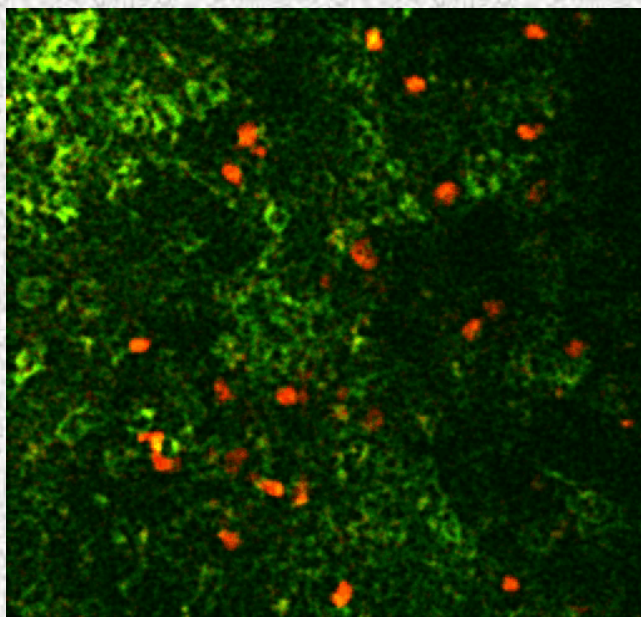
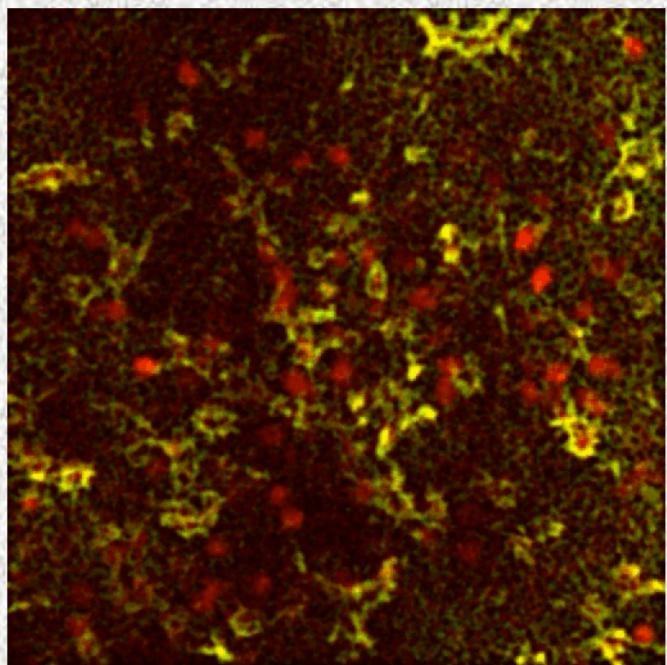


Tolerancia ill. immunválasz egérben (antigén-célzás) – a nyirokcsomó 2PM „*in vivo* dinamikus képalkotása”





„tolerancia”



„immunogenitás”

1 h

32 h

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)

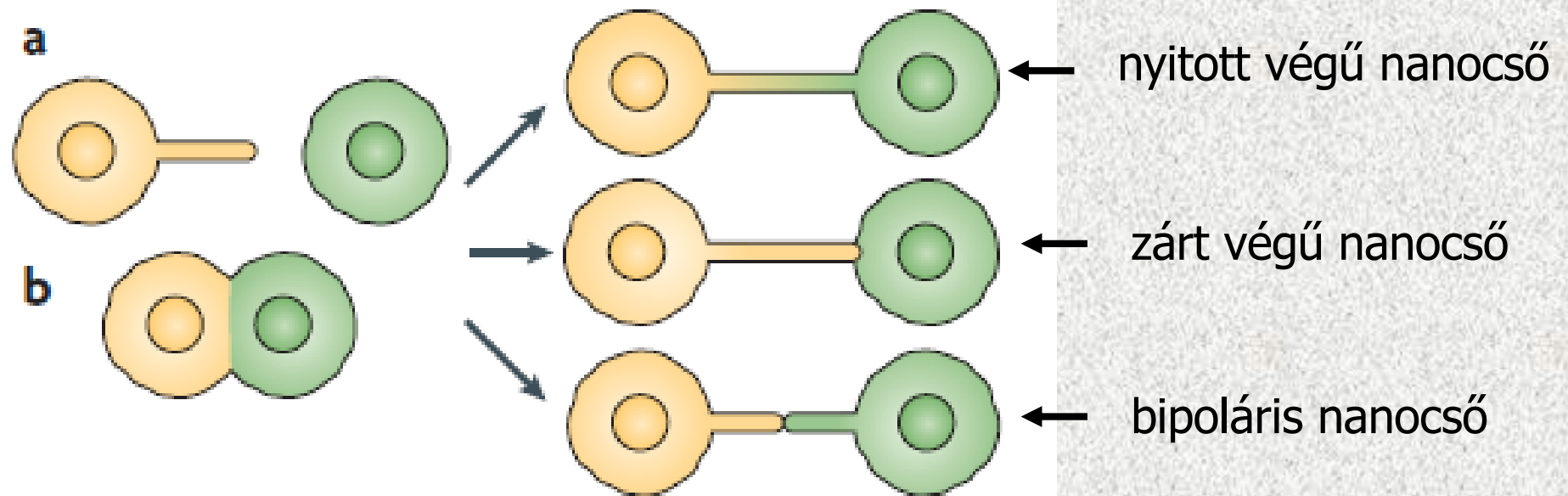
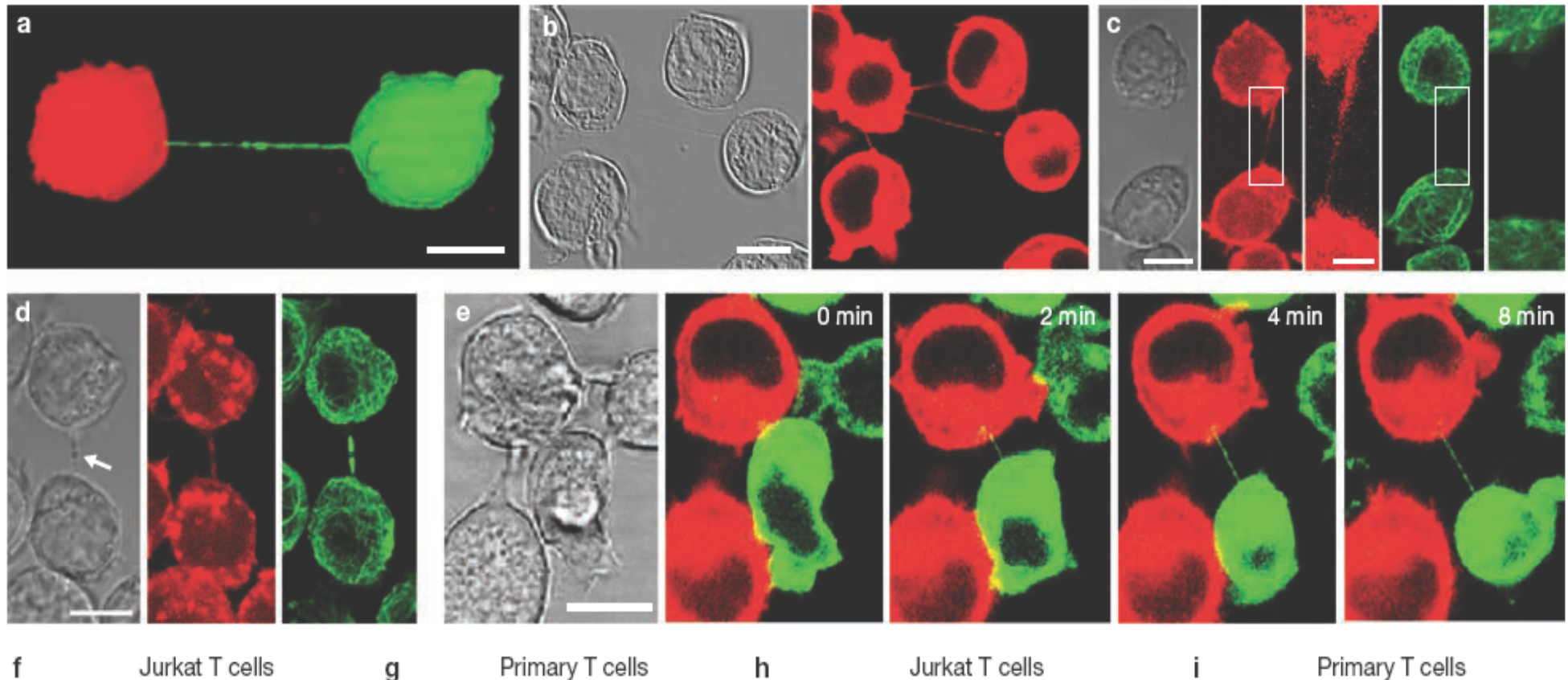


Figure 2 | Two distinct processes can lead to membrane nanotube formation. Schematic

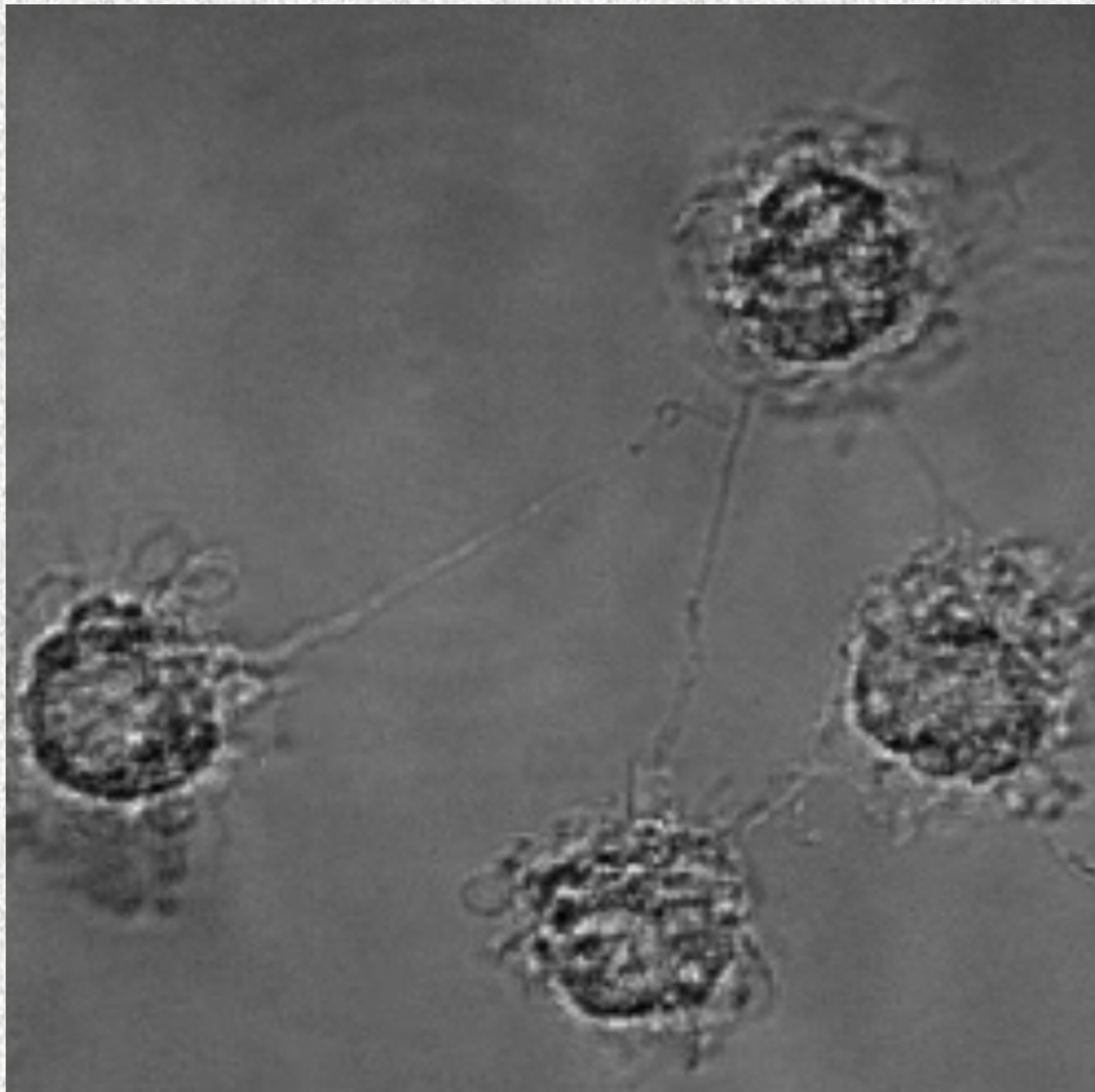
A T-sejtek közötti „nanocsövek hálózata”

Sowinski et al, 2008, Nature Cell Biol

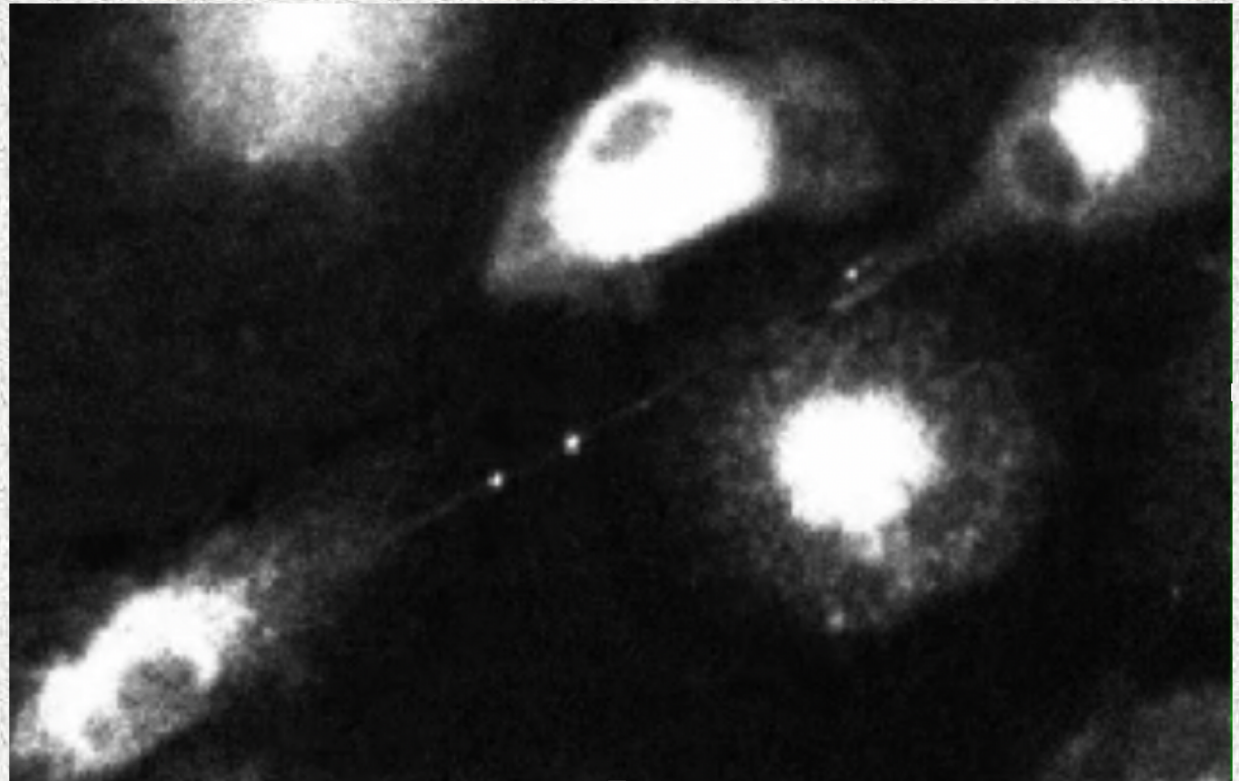
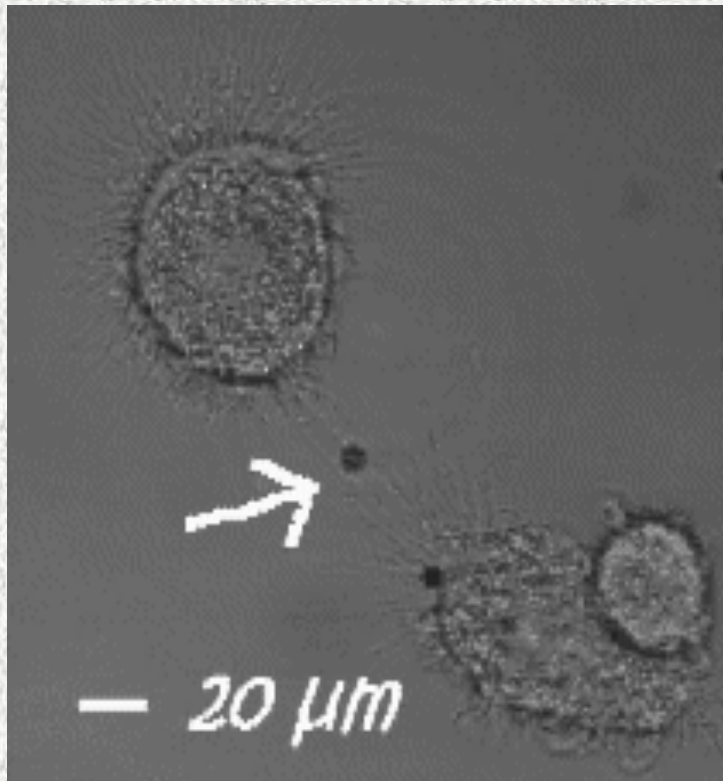


- A nanocsövek kontaktusba lépő (in vitro: 12-15 óra) fertőzött és nem fertőzött T sejtek kapcsolatának megszűnése után alakulnak ki
- A T sejt nanocsövek, szemben mieloid nanocsövekkel, nem mikrotubulus hanem F-aktin-tartalmú membránnyúlványok
- A T-sejt nanocsövek nem „nyitott végű csatornák”, anyagtranszport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

A T-sejtek közötti „nanocsövek hálózata”



„Baktérium szörfözés” a makrofágok között

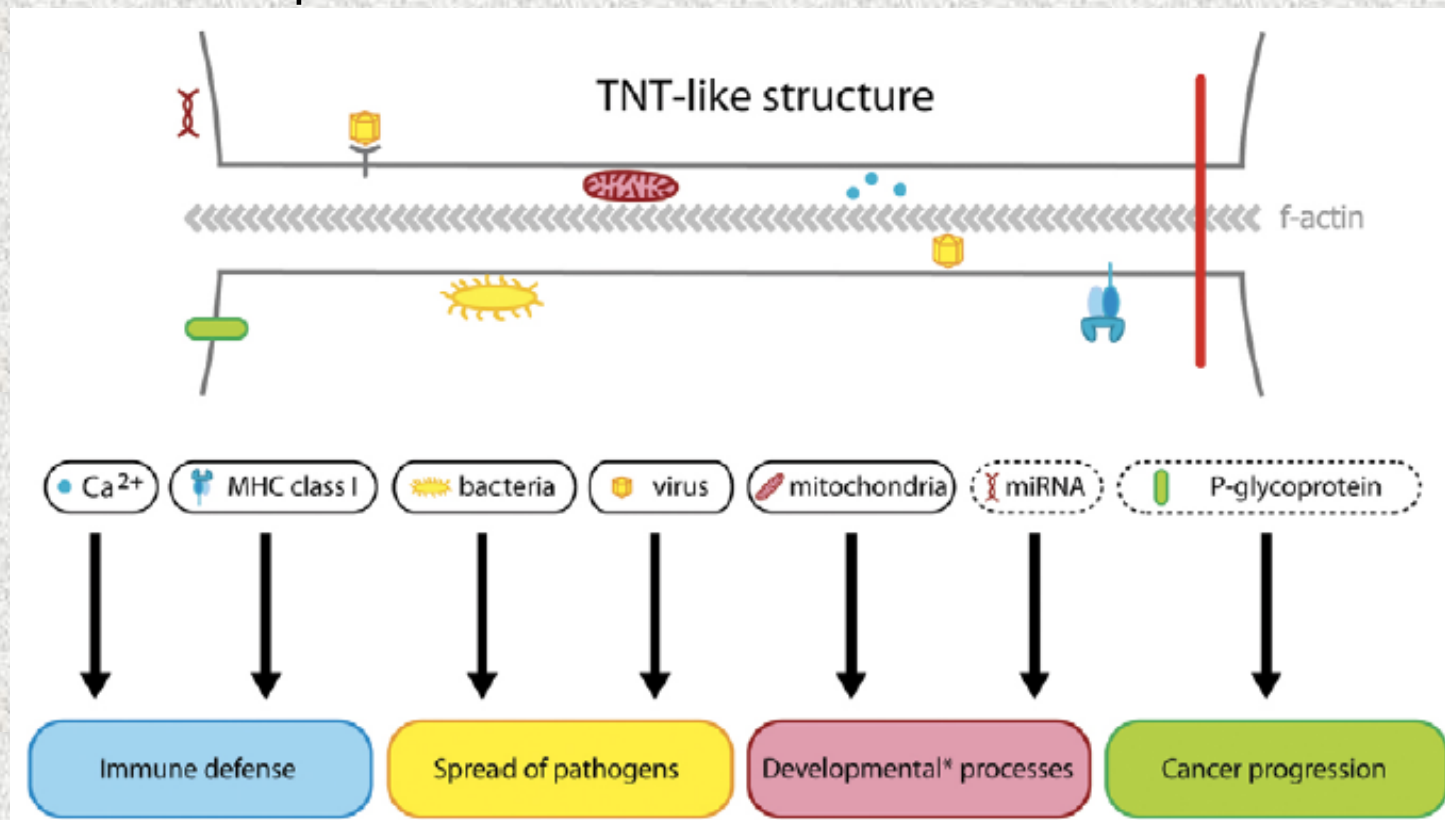


Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)⁴ expressing GFP.

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

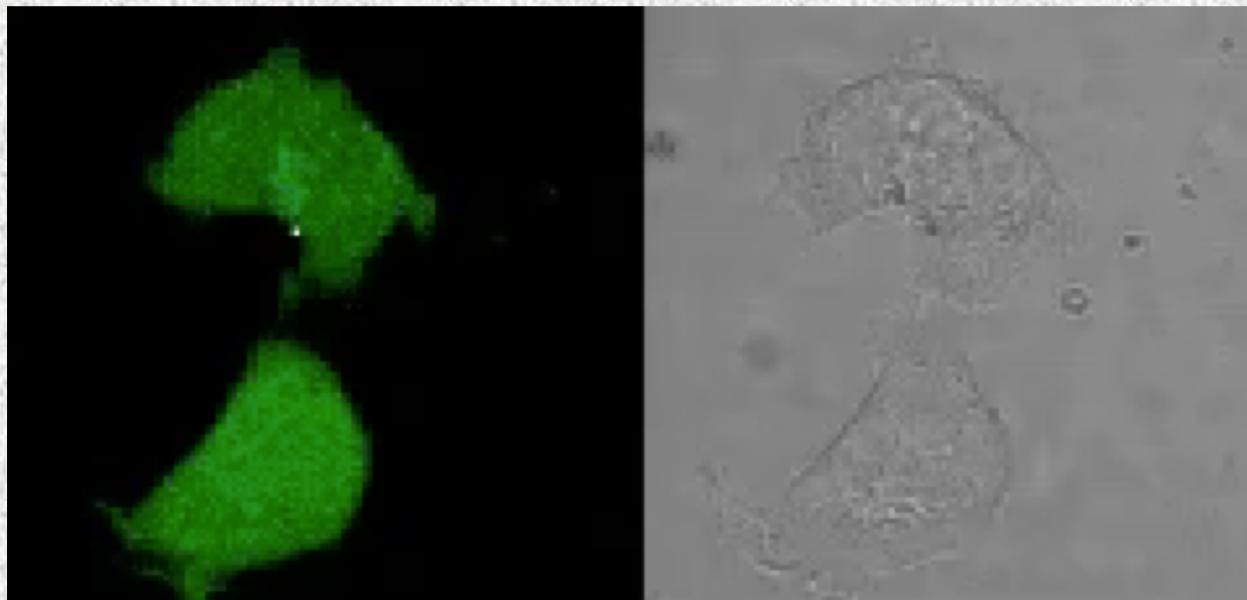
Intercelluláris transzport a „tunneling nanocsöveken” keresztül:

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



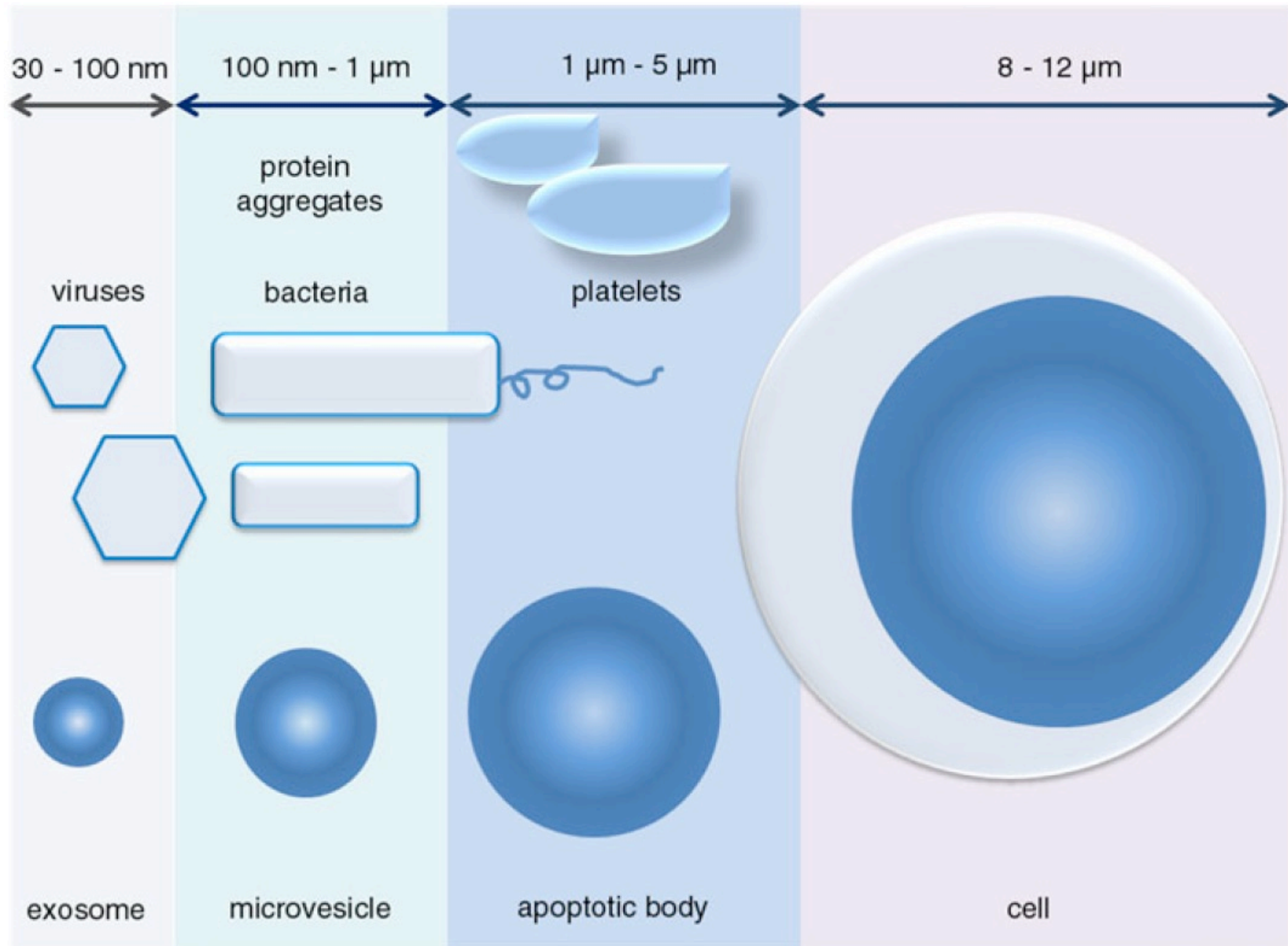
Szekretált membrán mikrovezikulák: a sejtek „távkommunikációs eszközei”

**Pl: A kalcium stressz mikrovezikula felszabadulást
vált ki B limfocitákban**

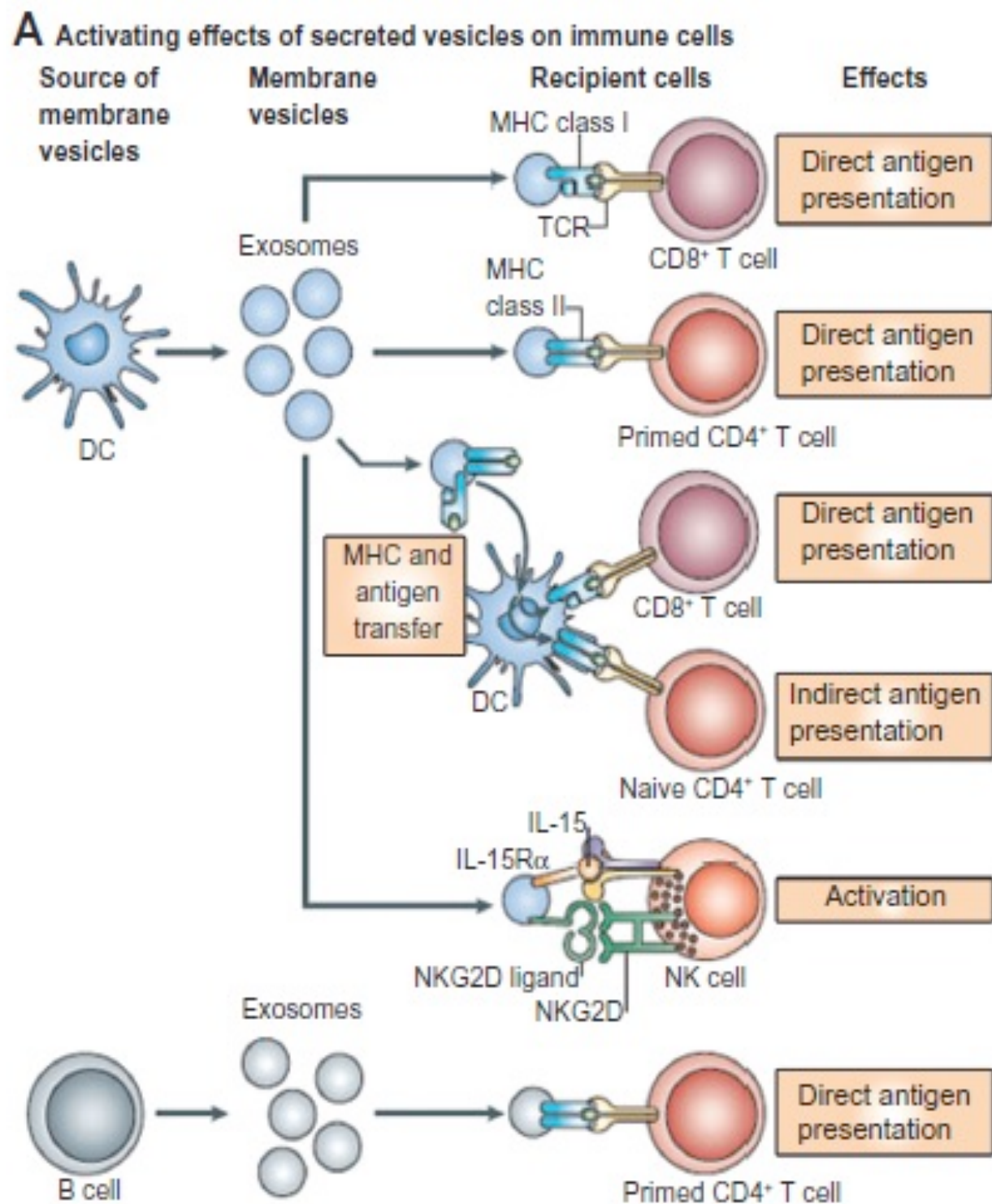


Színkód: $\text{Ca}^{2+}_{\text{ic}}$ szint – zöld: alacsony, vörös: magas;
indikátor: Fluo-4, Kezelés: 4 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin

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...

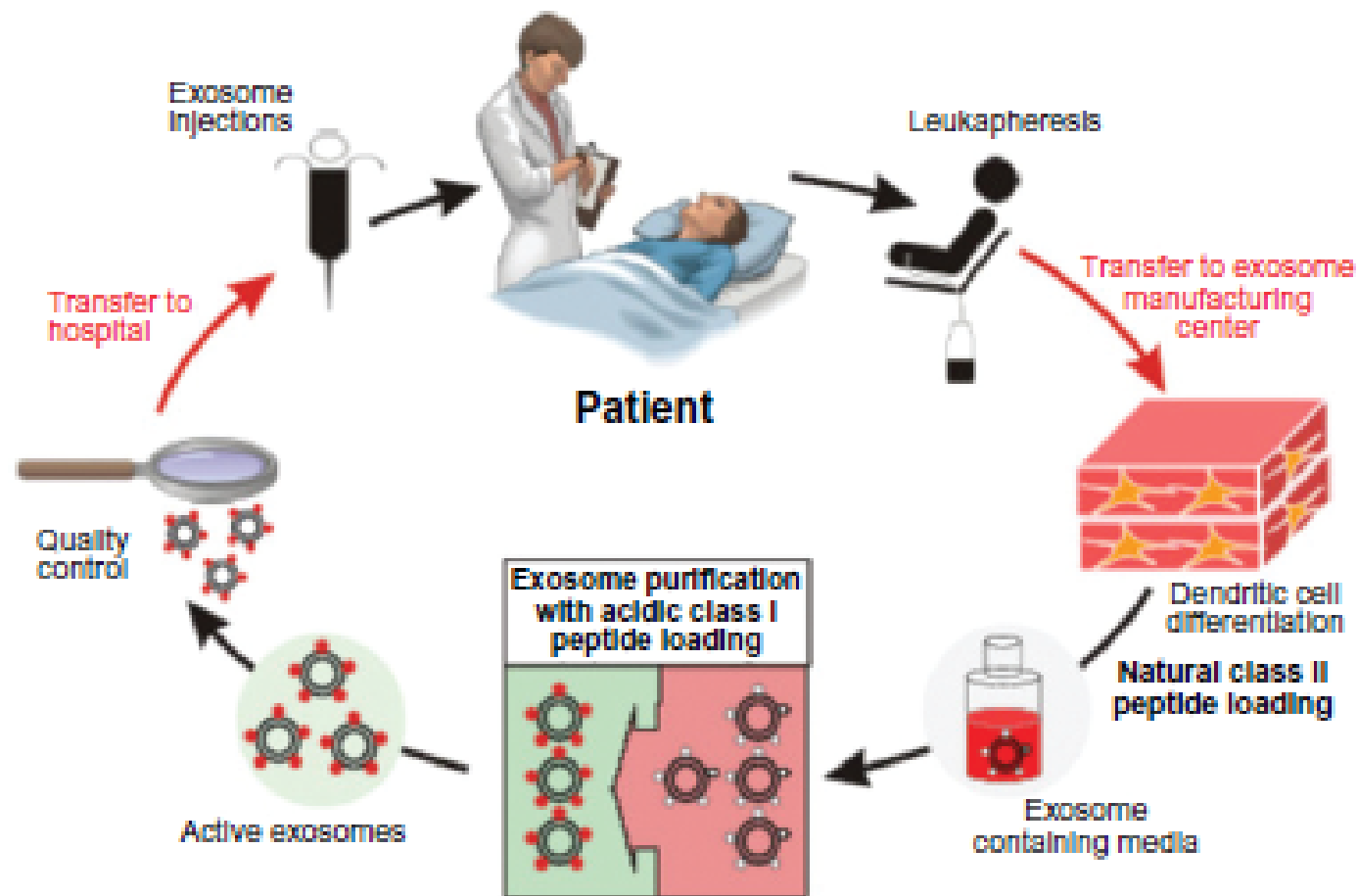
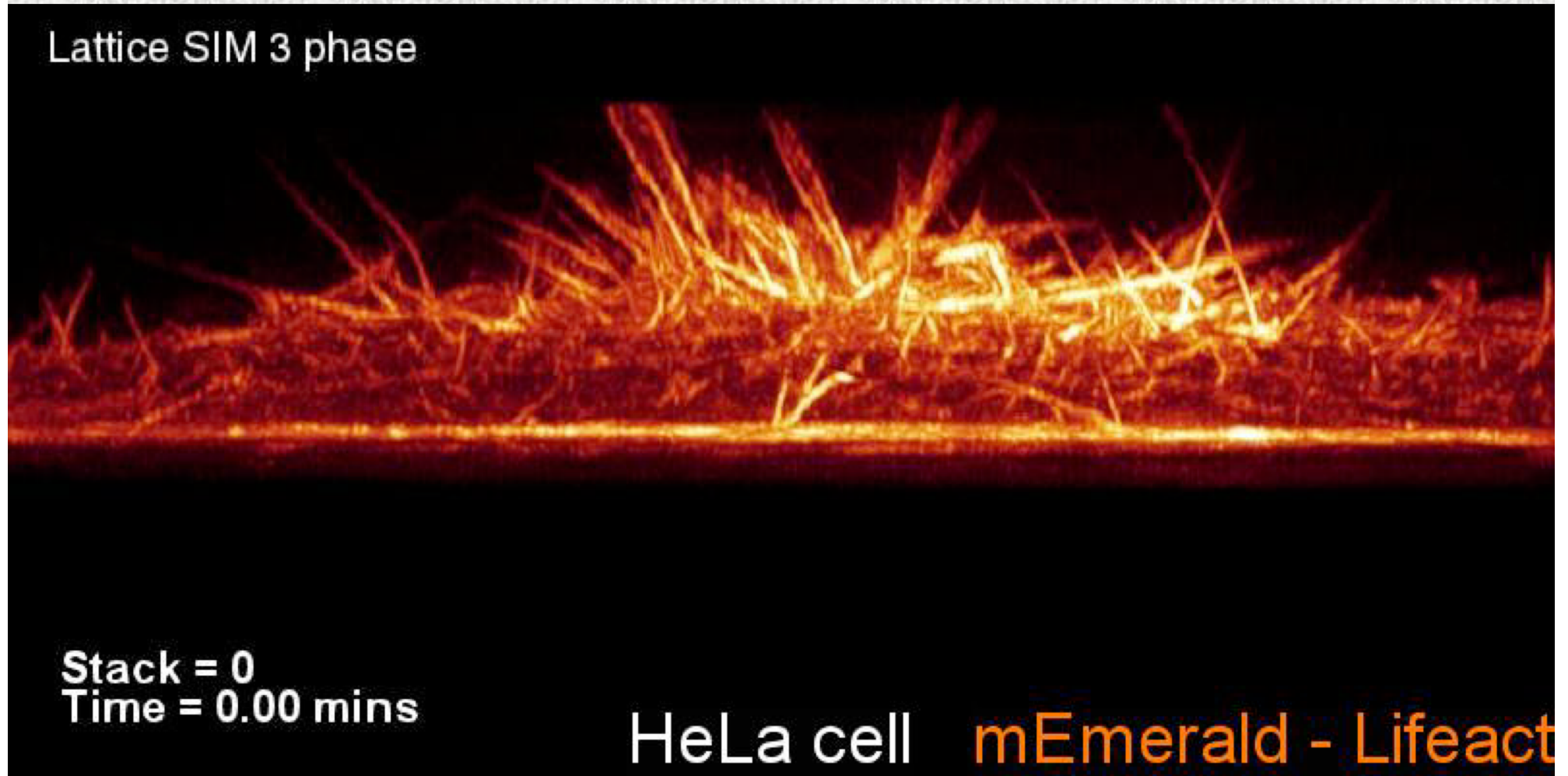


Figure 6 Clinical grade exosomes in immunotherapy. The process of how DEX can be derived, purified, and utilized in cancer treatment. Creative Commons. Reproduced with permission from Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC)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

A sejtmembrán-felszín dinamikája



Chen BC, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. Science. 2014 Oct 24;346(6208):1257998.