

Transzporterek vizsgálata membránokban

2024. április 16.

Sarkadi Balázs
HUN-REN 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

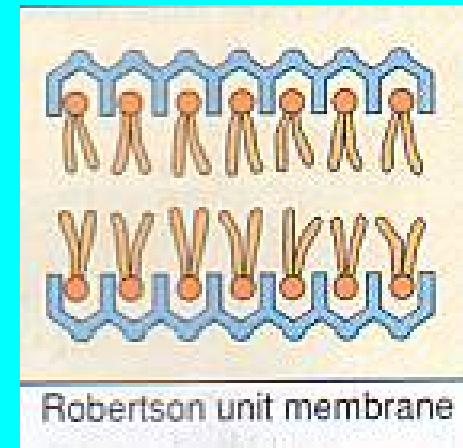
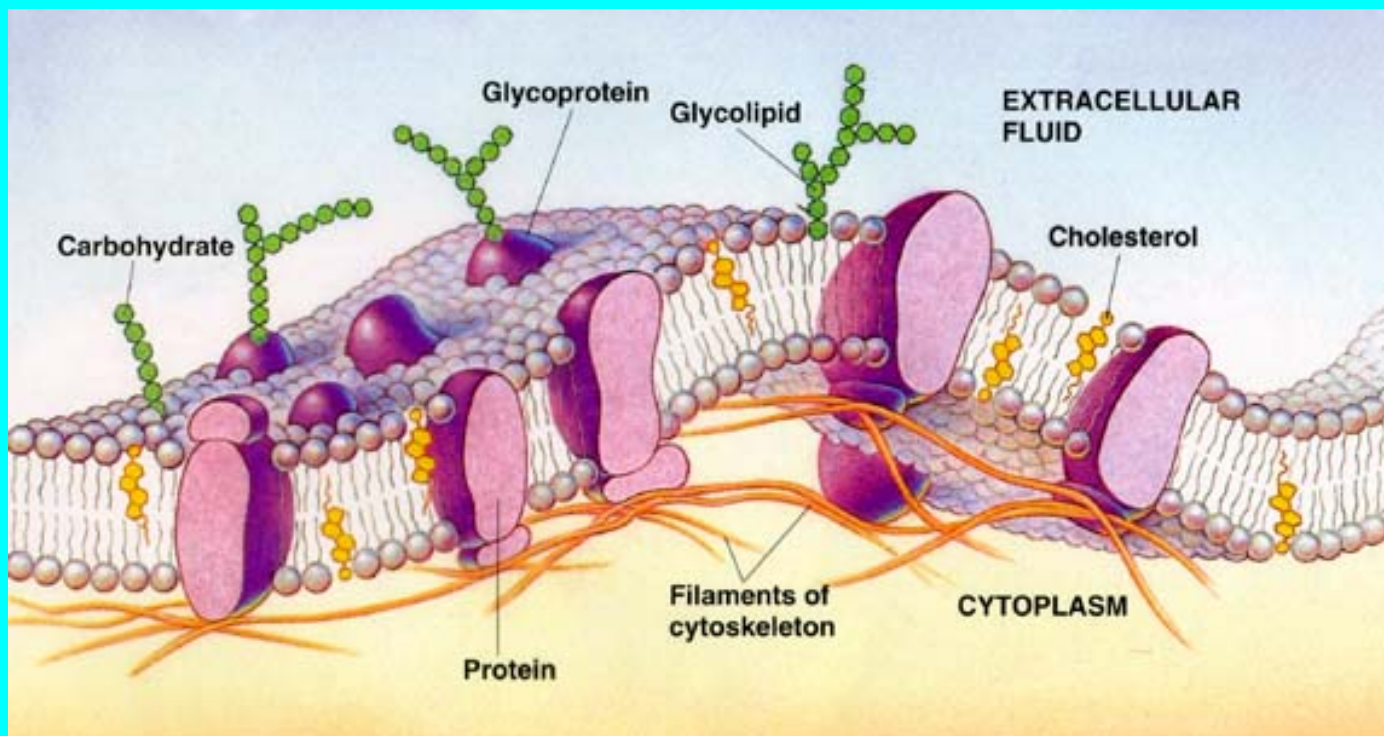
1935: J.R. Danielli and H. Davson – fehérjék is részei!

Sandwich Model

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

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

Singer – Nicolson, 1972



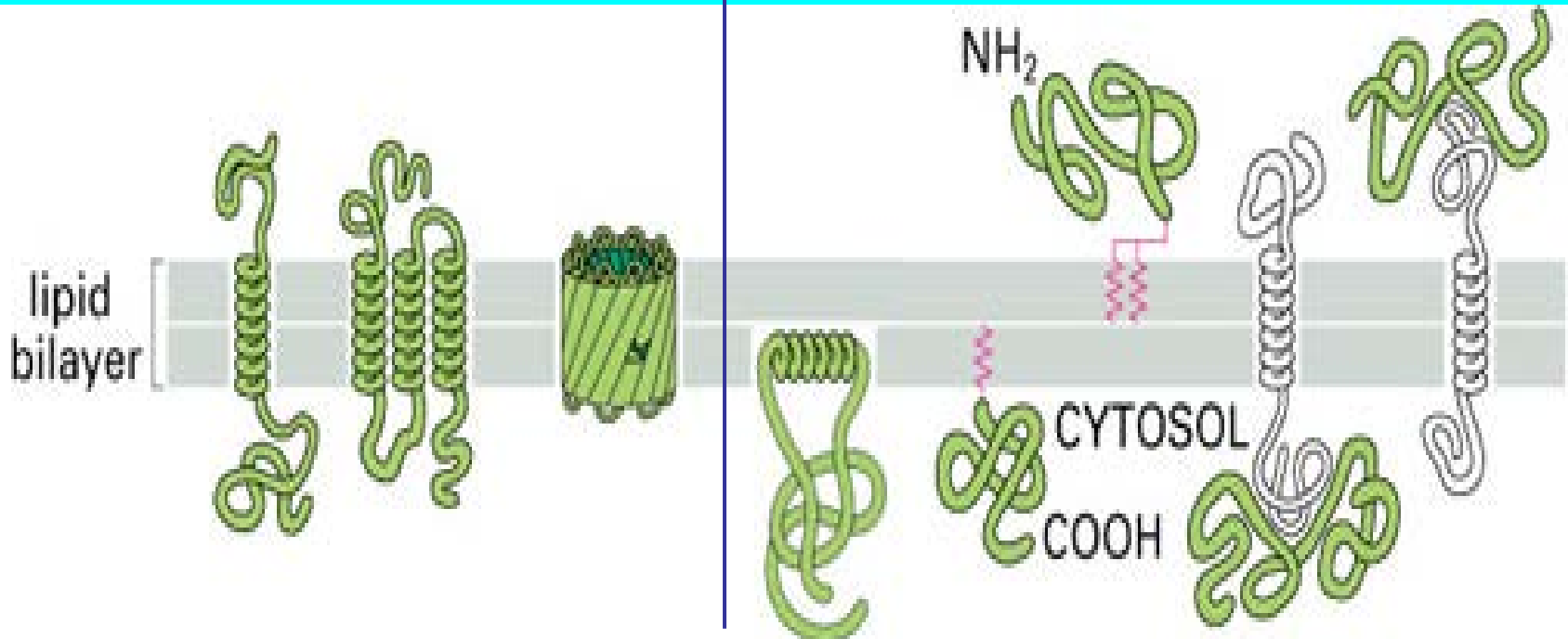
A folyékony mozaik
sejtmembrán sémás
ábrája

A membránfehérjék fő típusai

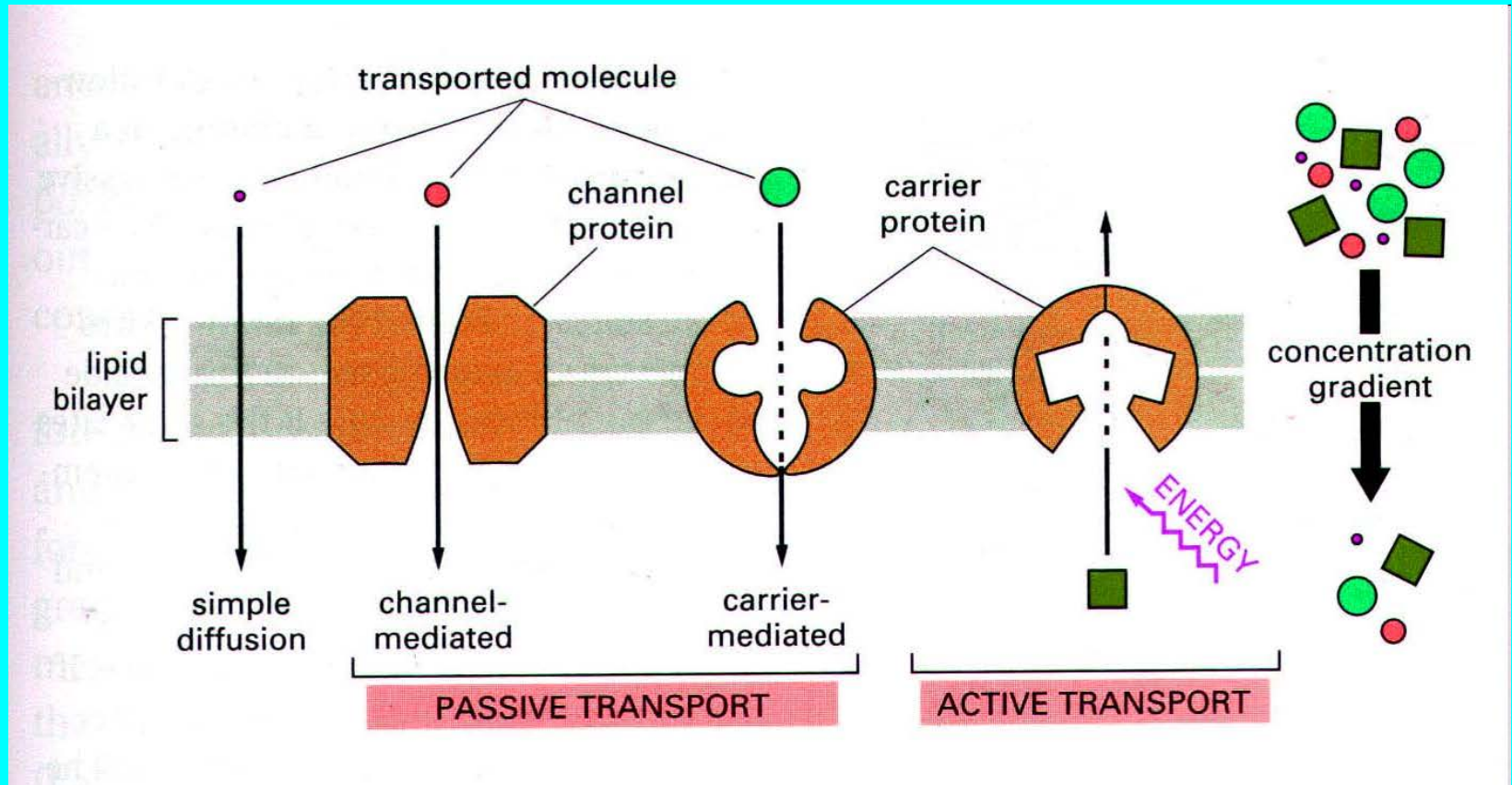
Transzmembrán (intergráns)

Single-pass Multi-pass
membránfehérjék

Membrán-asszociált (perifériás) membránfehérjék



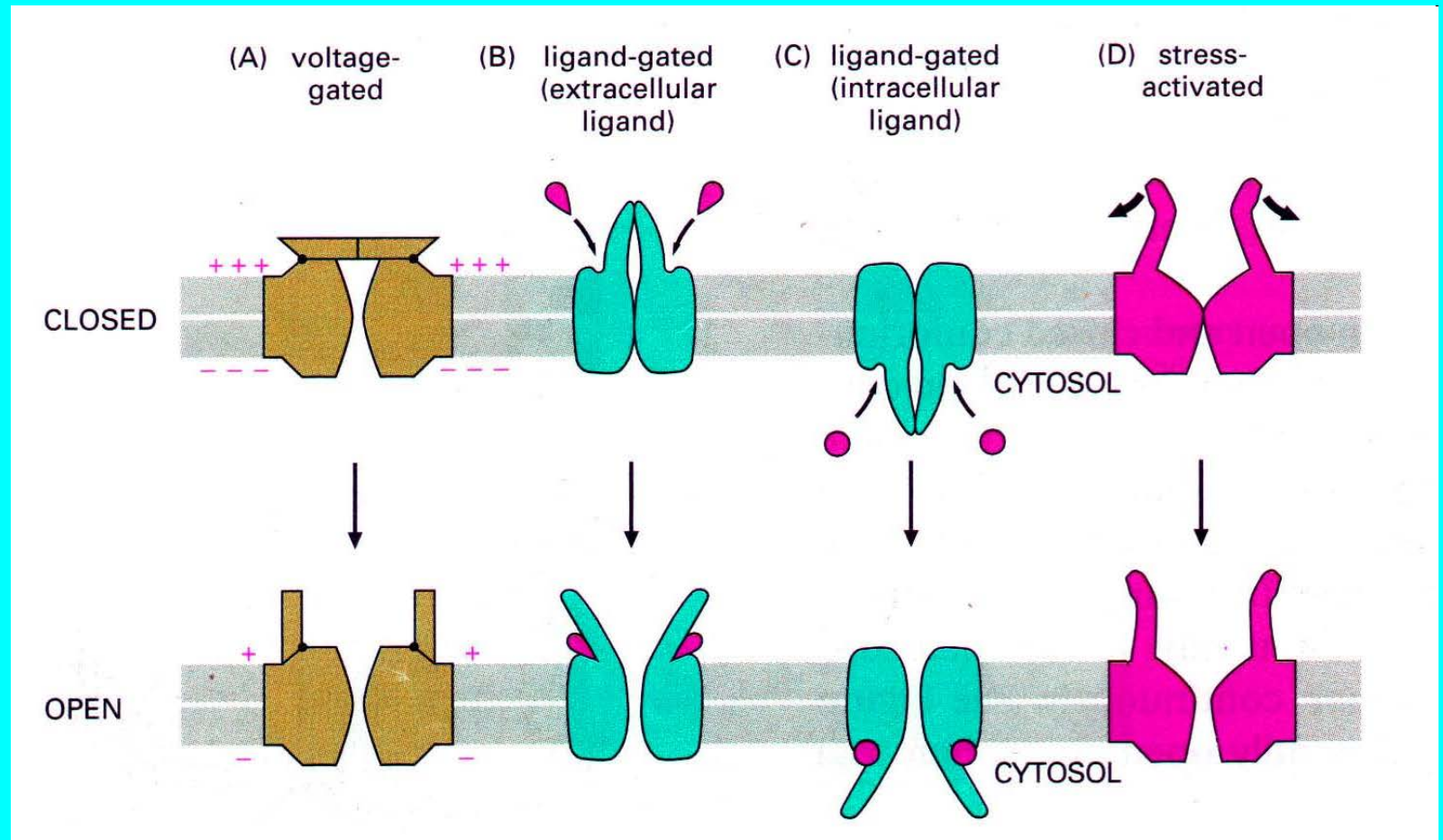
A membrántranszporterek főbb típusai



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.

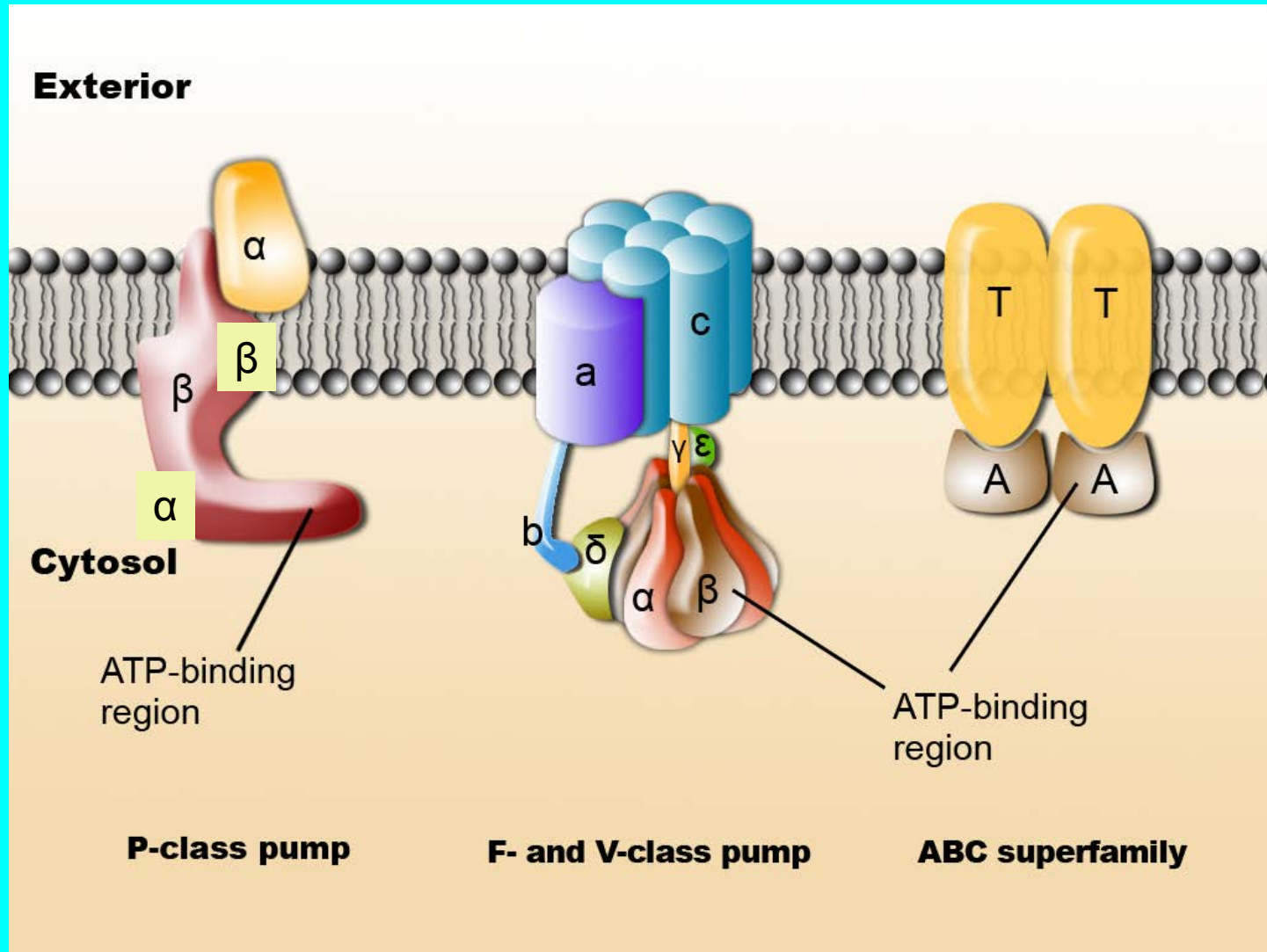
Aktív transzport esetében, a sejt energiabefektetése révén fordított irányú transzport is lehetséges.

Az ioncsatornák főbb típusai



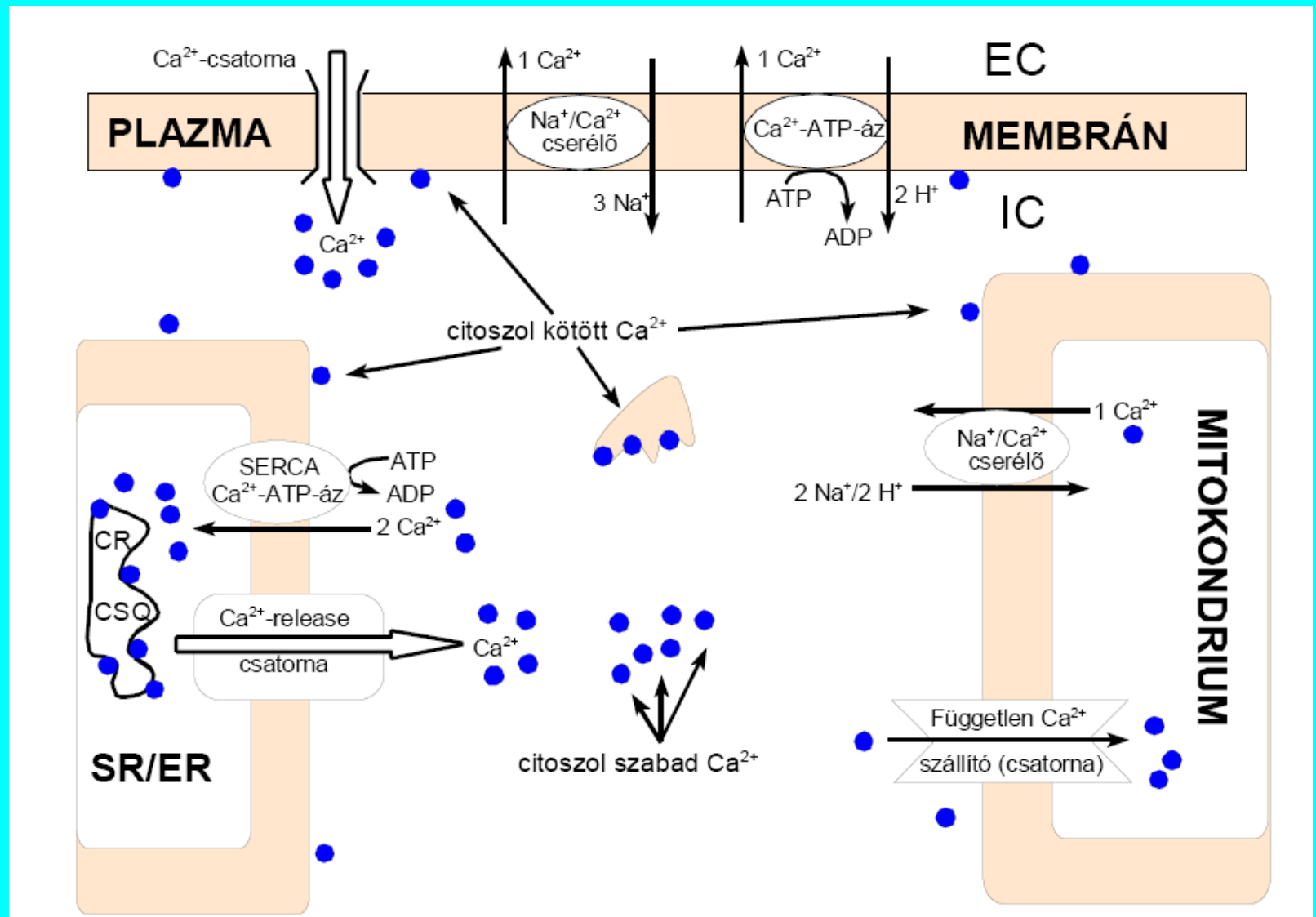
Az **ioncsatornáknak** számos formája, működési mechanizmusa ismert. A **feszültségfüggő** csatornákat a membránpotenciál változása nyitja vagy zárja. Számos ioncsatorna extracelluláris (pl. hormonok) vagy intracelluláris (pl. cAMP vagy kalcium ionok) **ligandok** hatására aktiválódik. Ismertek közvetlenül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

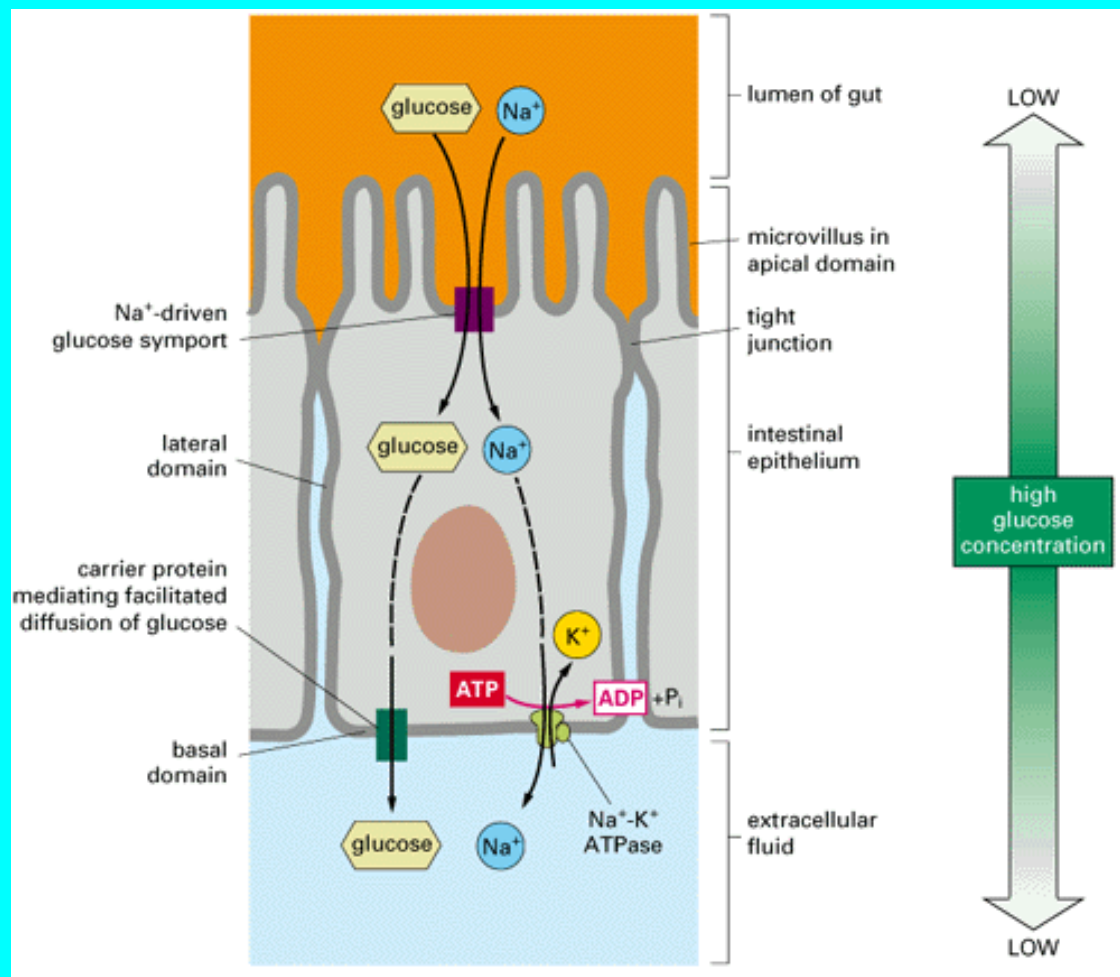
Kalcium transzporterek a sejtben



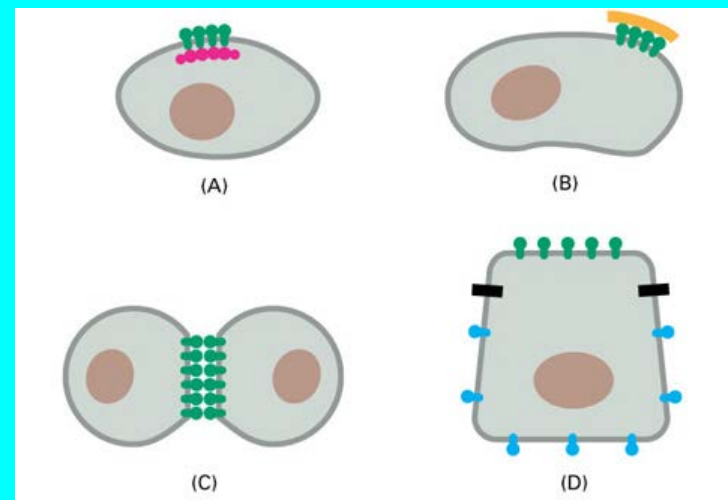
A sejtben belüli igen alacsony kalciumion koncentráció számos transzportfolyamattal szabályozott.

A membrán-transzporterek elhelyezkedése a sejtekben

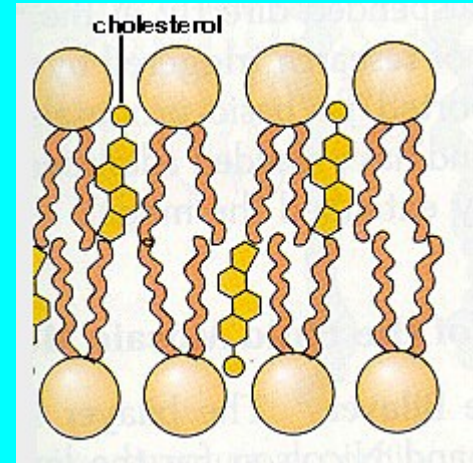
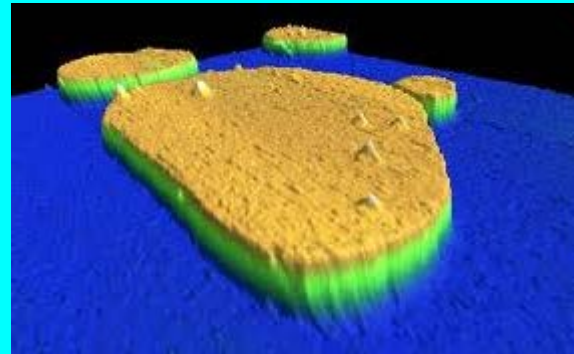
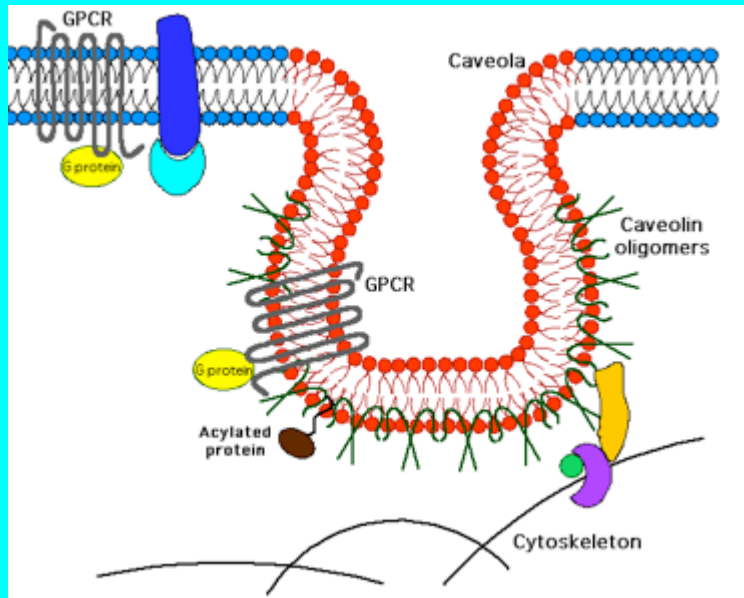
Polarizált sejtekben az egyes transzporterek speciális lokalizációban találhatók!



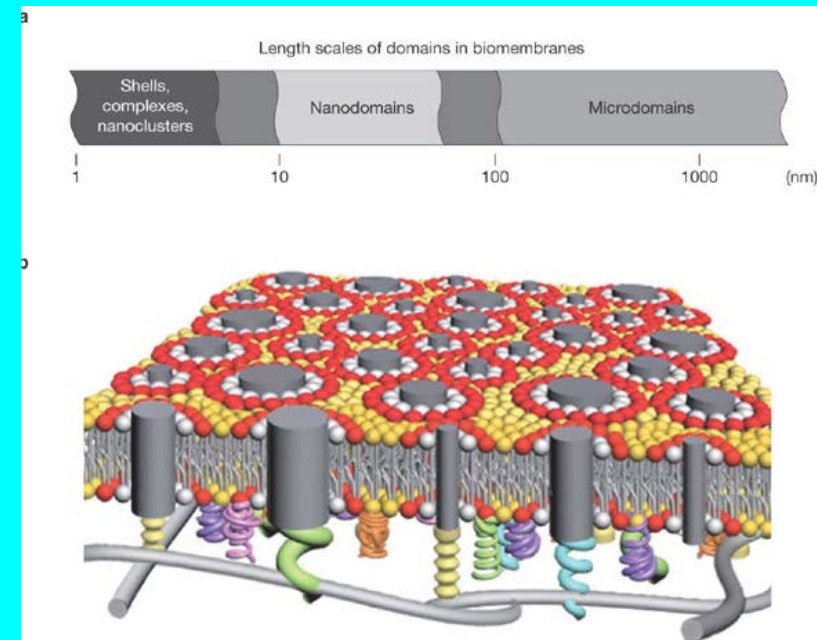
Fehérjék együttes elhelyezkedésben, pl. lipid-tutajokban



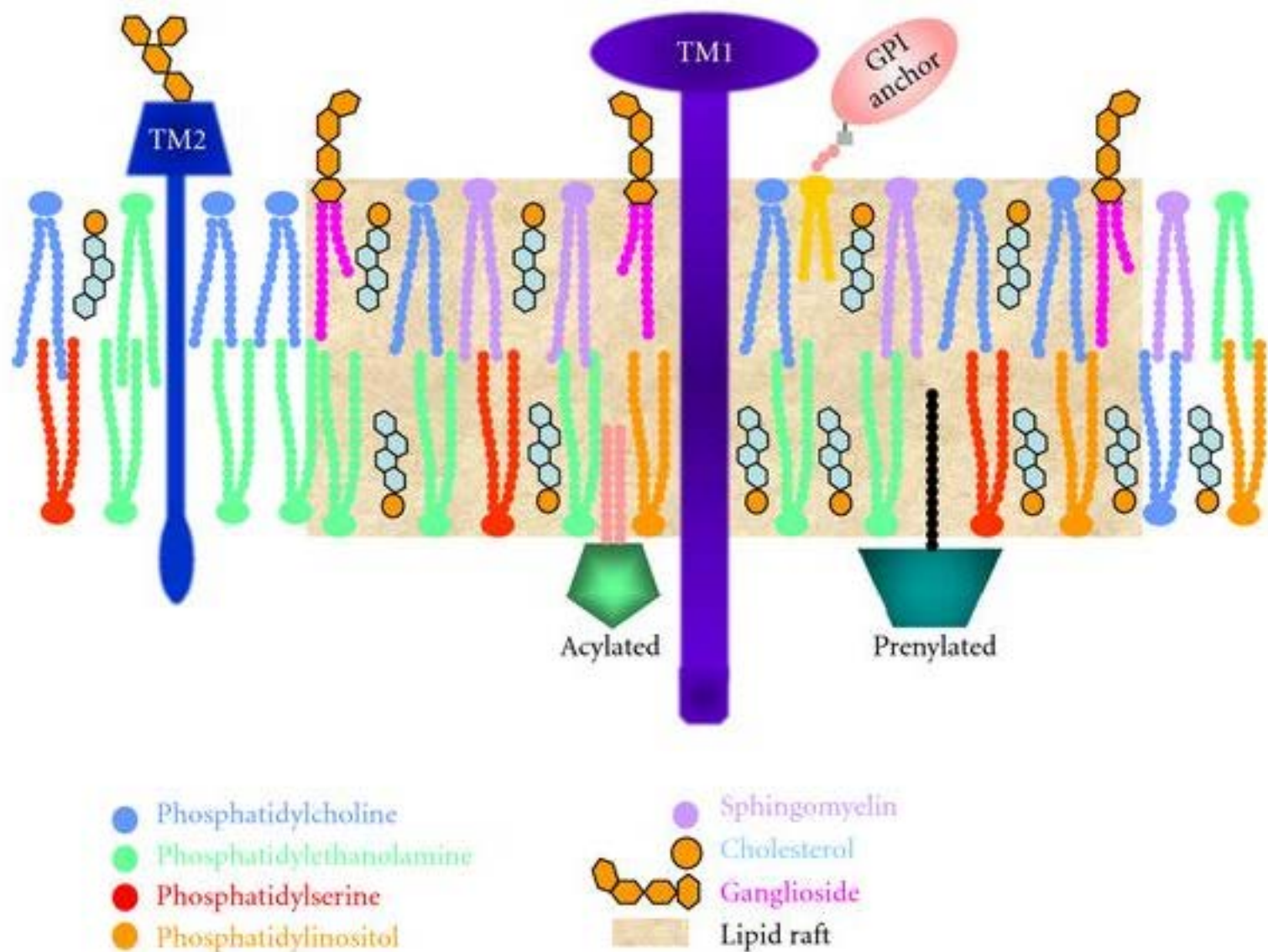
Lipid tutajok („rafts”) a membránokban



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

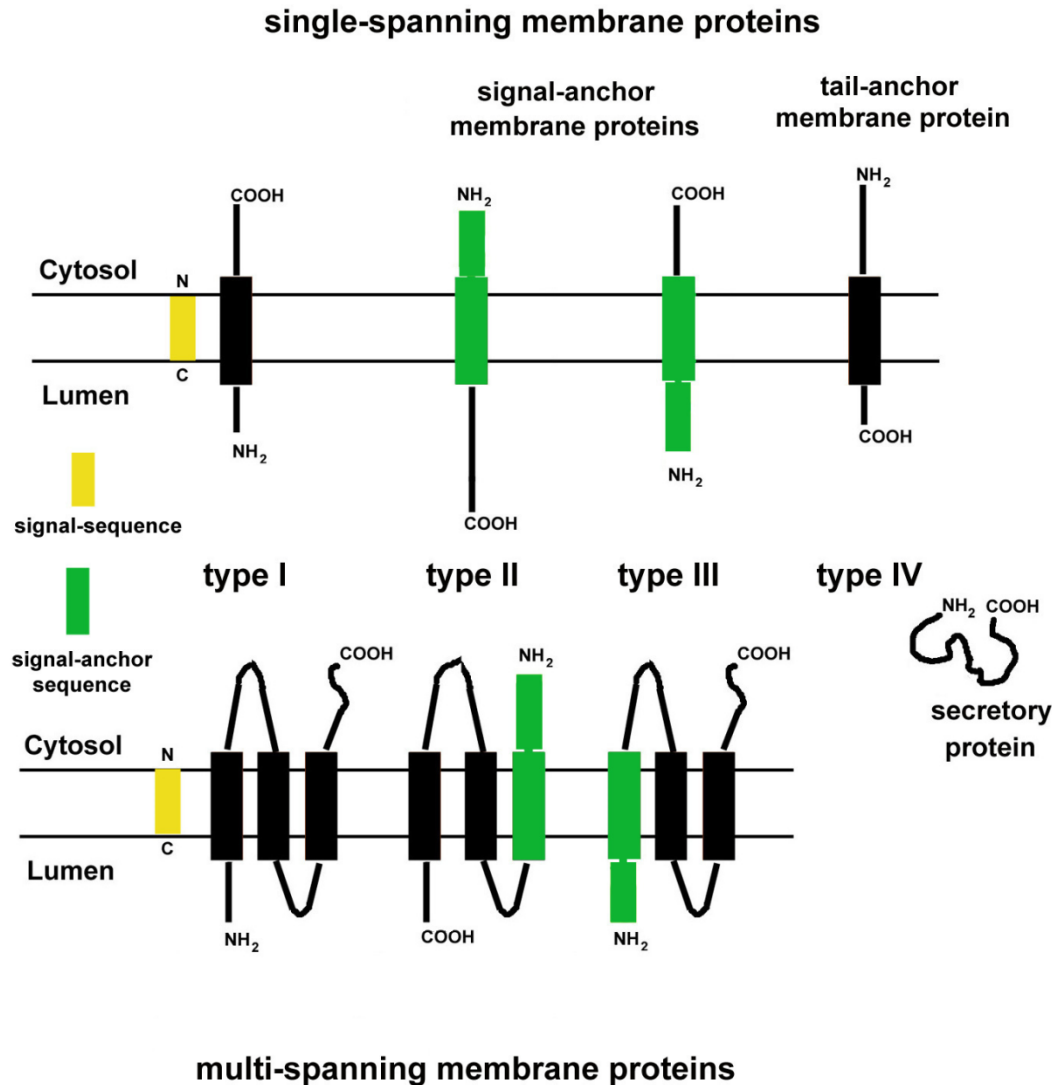


Lipid tutajok („rafts”) a membránokban



Membránfehérjék szintézise

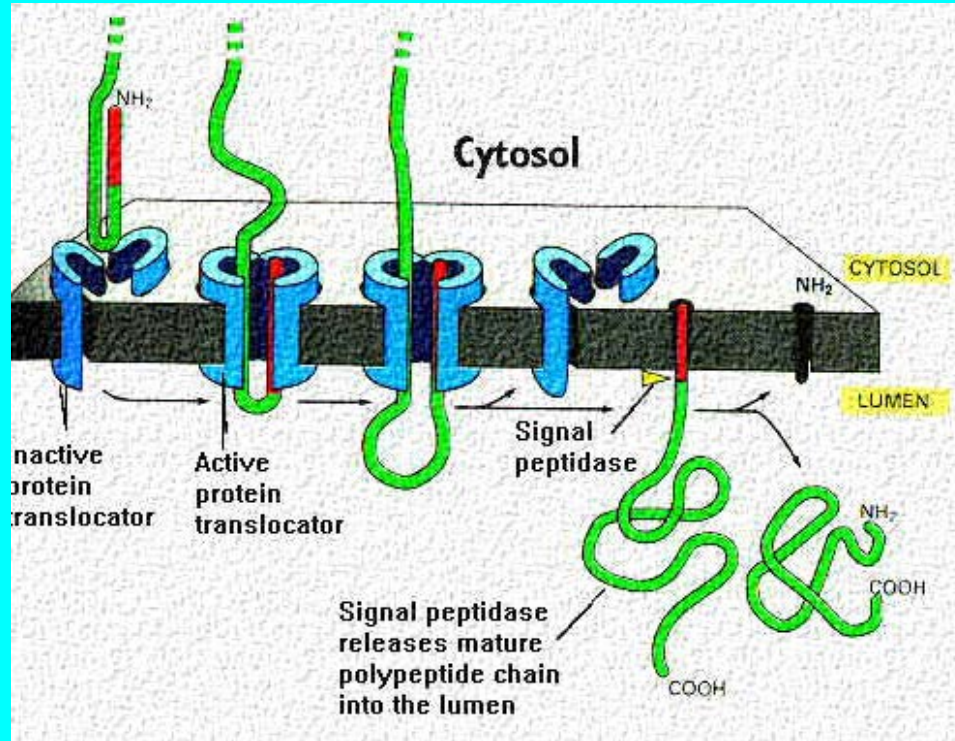
– mindig lipidmembránokban készülnek!



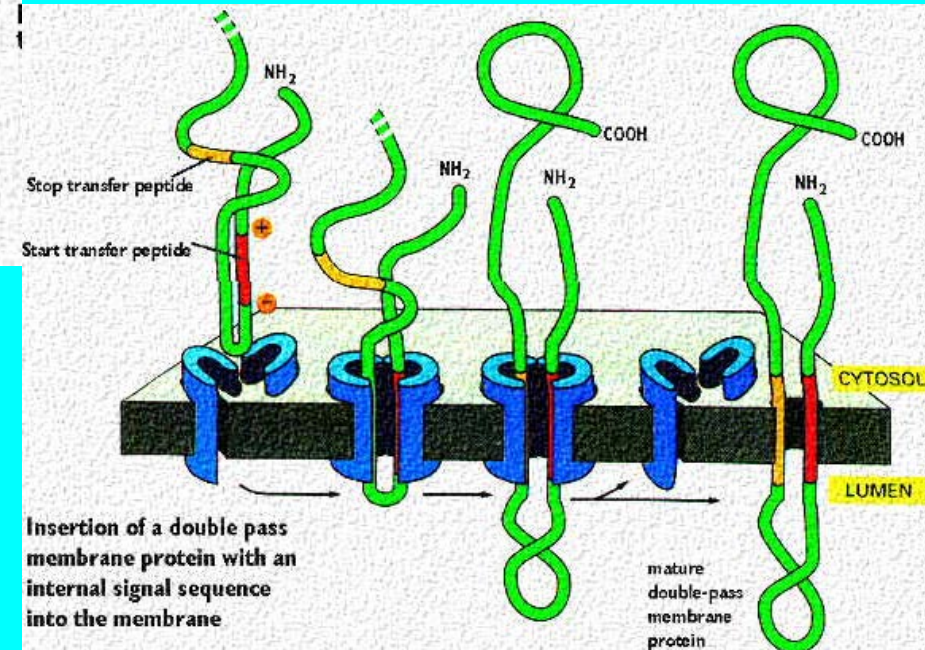
A membránfehérjék már szintézisük során lipid-rétegekbe illeszkednek, folyamatosan membránokban készülnek és utaznak a sejt különböző, membránokkal elhatárolt területeire.

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

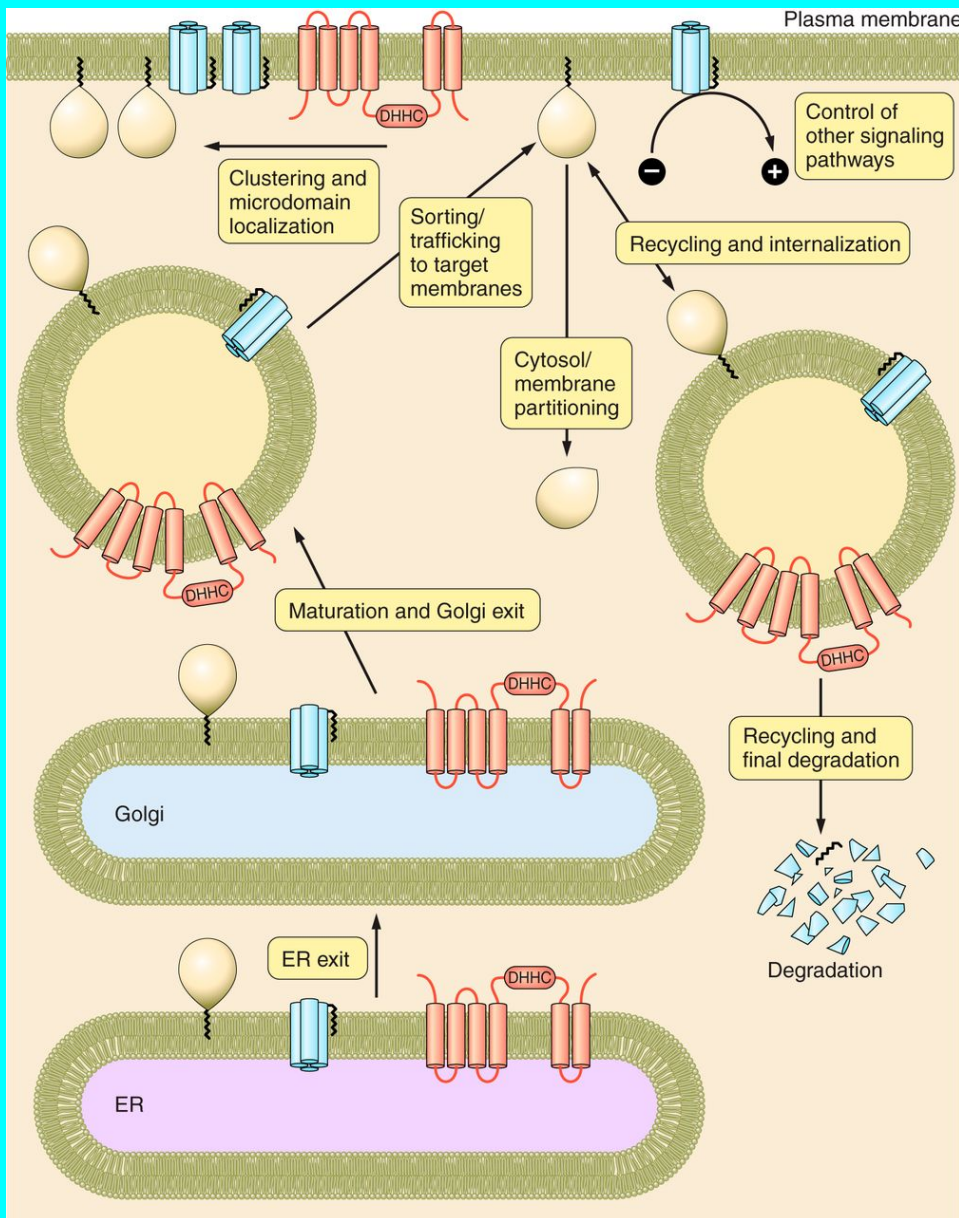


A membránfehérjék szintézisének és lipid-rétegekbe illeszkedésének folyamata - szignál szekvenciák és horgony szekvenciák szerepe.

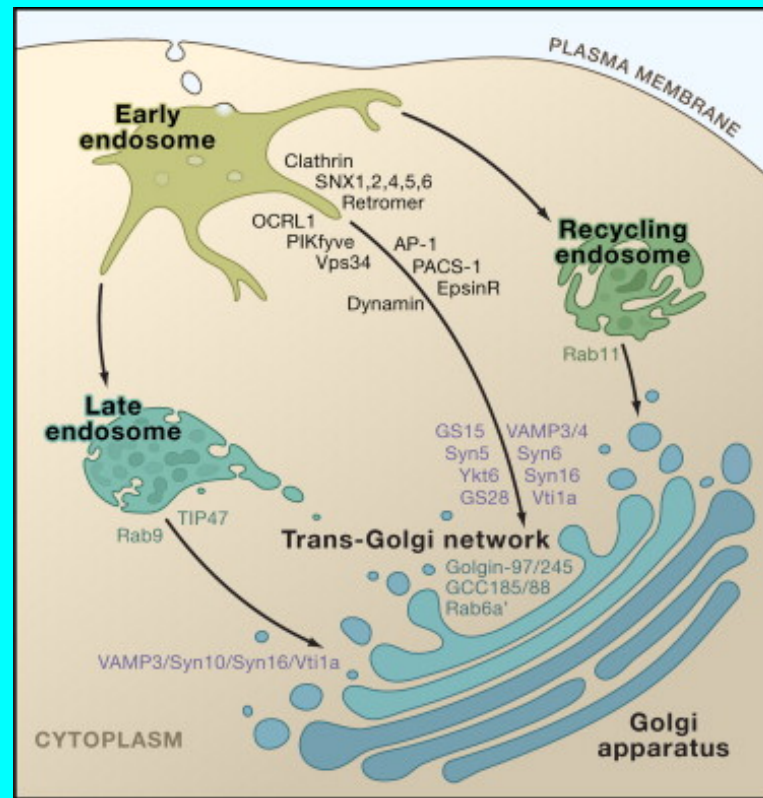


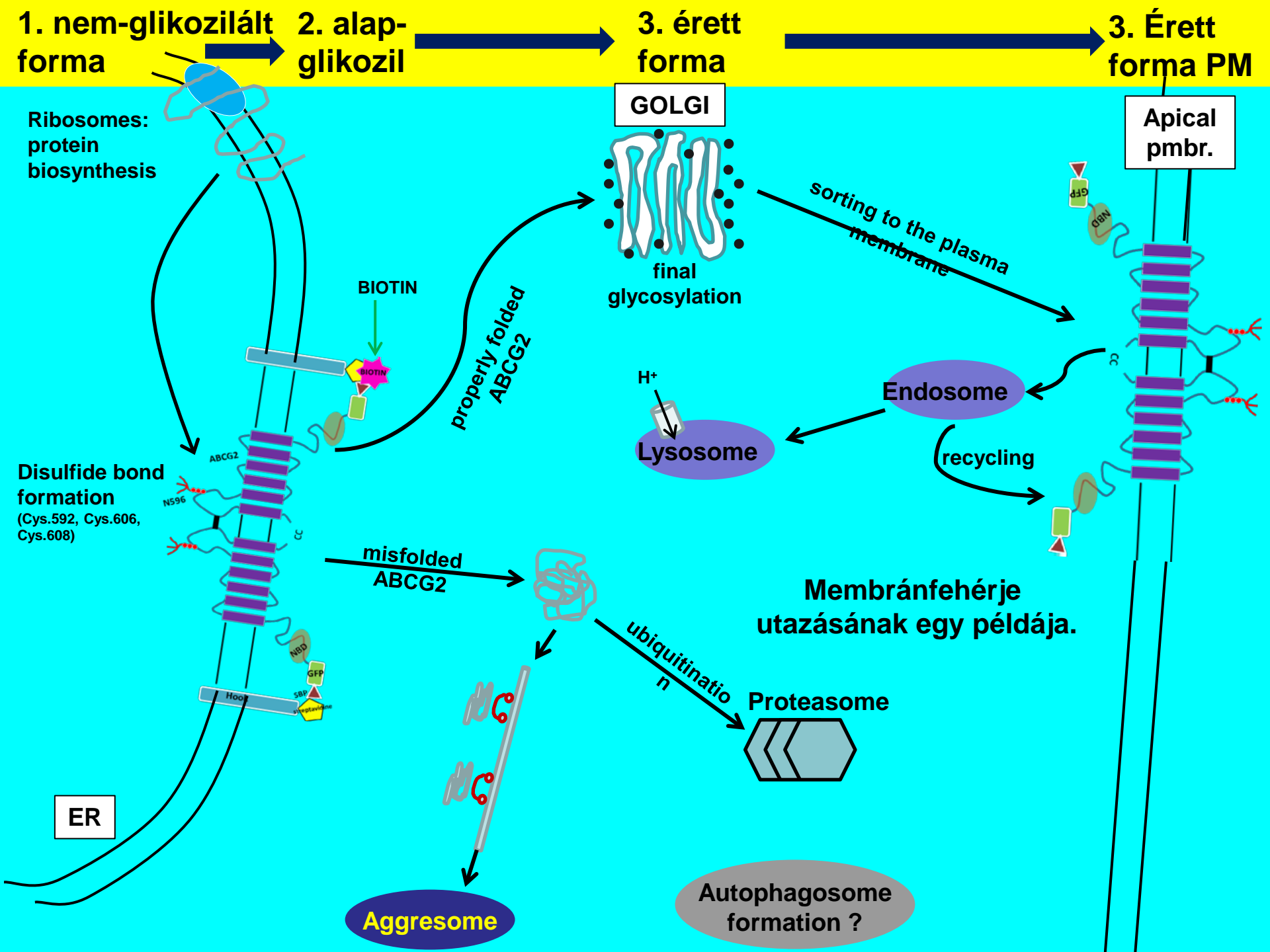
A membránfehérjék utazása (trafficking) a sejtekben

A folyamat membránvezikulák mozgásán, utazásán alapul



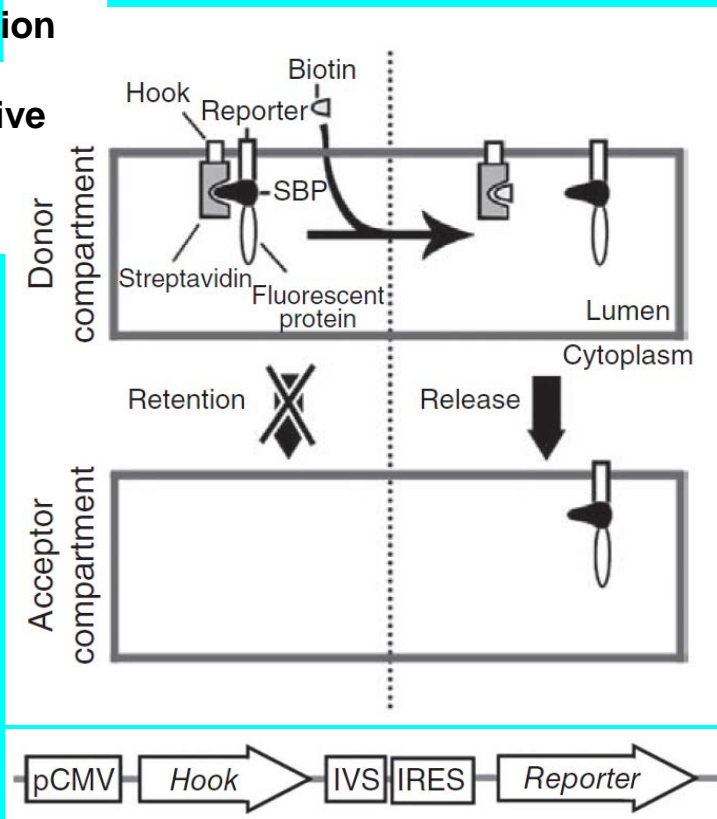
Az endoplazmás retikulumban képződő membránfehérjék a Golgi apparátusba kerülnek, ahol a cukor-komponensek épülnek be, majd a vezikulák vándorlásával további sejtalkotókba és a sejtmembránba utaznak, folyamatos reciklizációban vesznek részt.



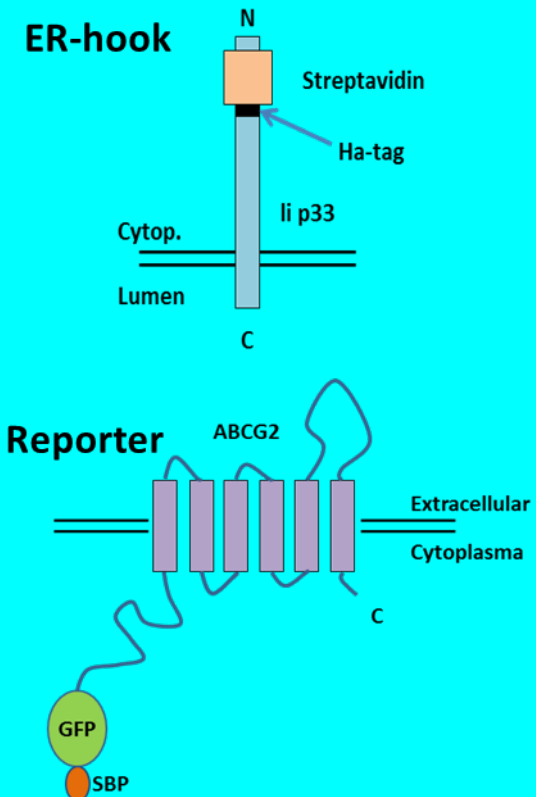


RUSH: dinamikus módszer membránfehérje utazás követésére

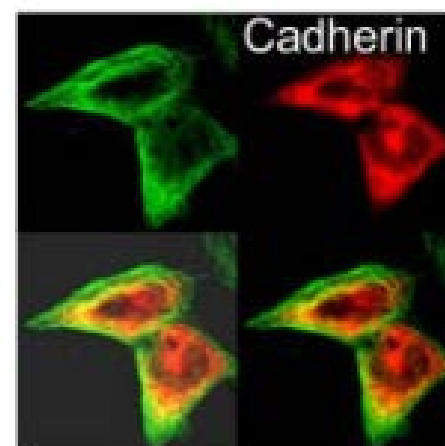
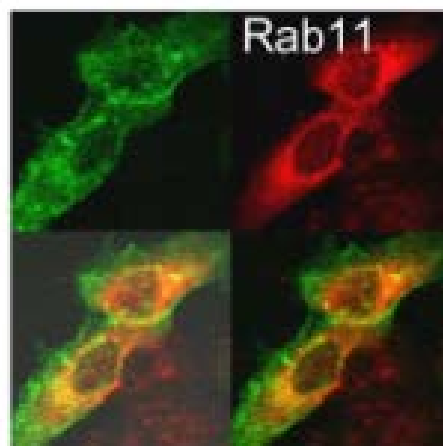
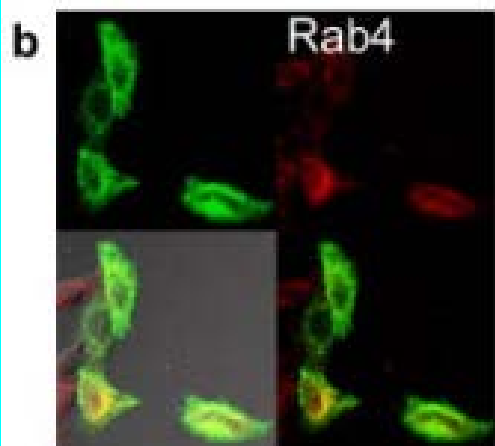
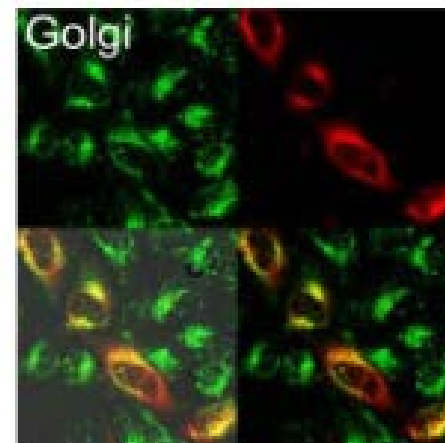
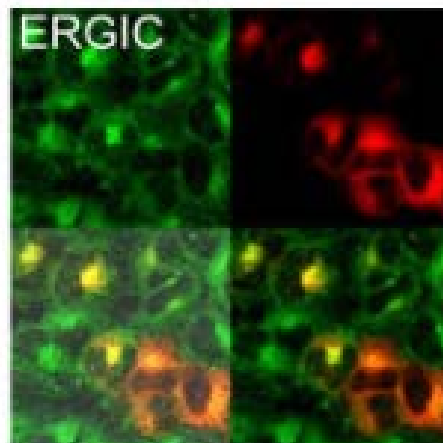
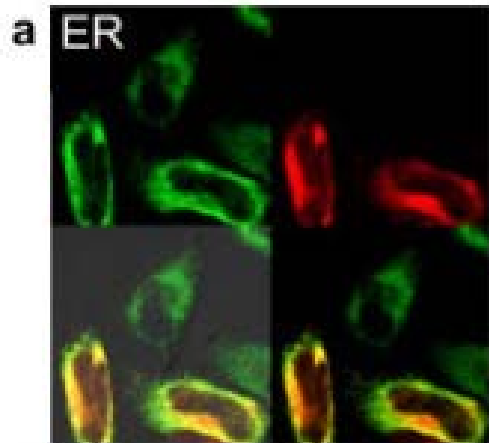
Retention Using Selective Hooks



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

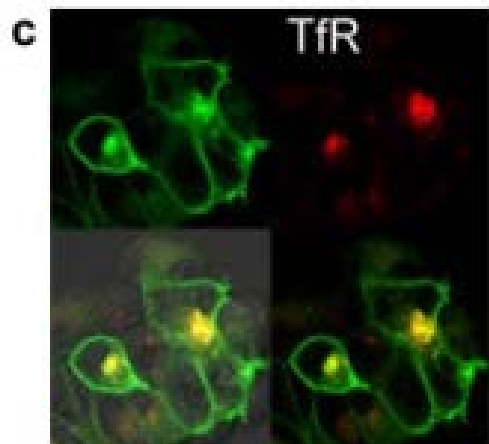


Egy érdekes kísérleti módszer: az ER-ban elkészült, jelölt membránfehérjék oda rögzített állapotúak, majd egy adott vegyület hatására szinkronizálva elindulhatnak a sejten belüli utazásra, amely így jól követhető



Korai endoszóma

Késői endoszóma

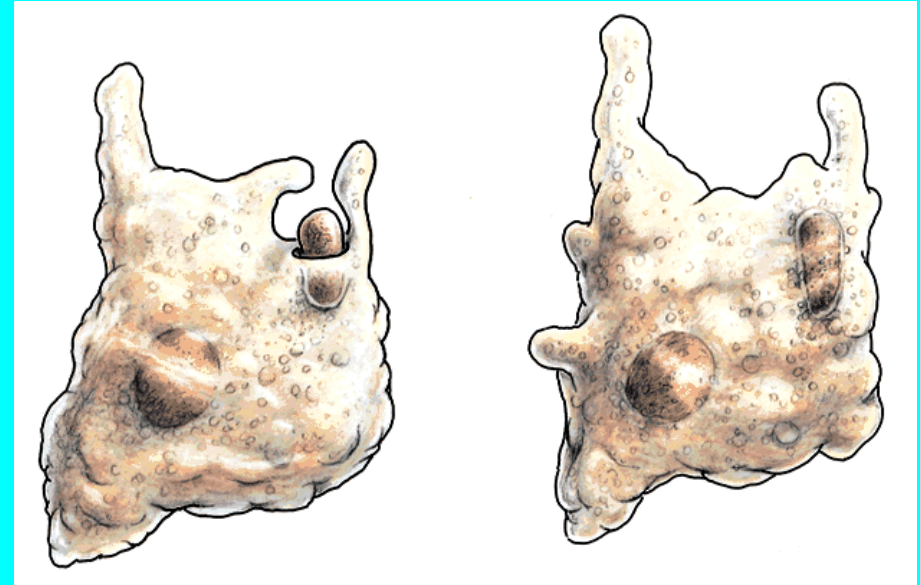
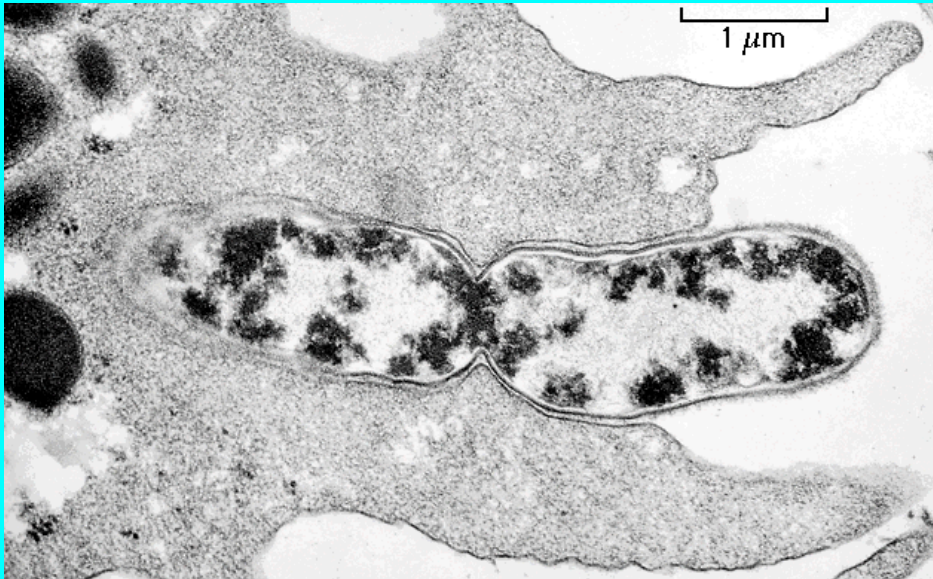


**Specifikus membránfehérje
jelölések az egyes sejt-komponensek
követésére**

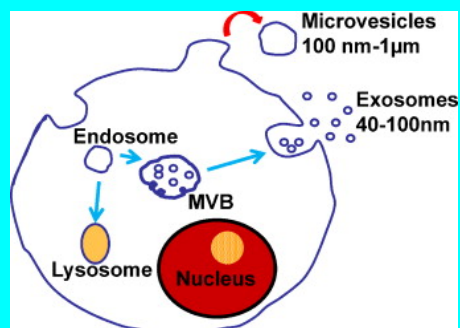
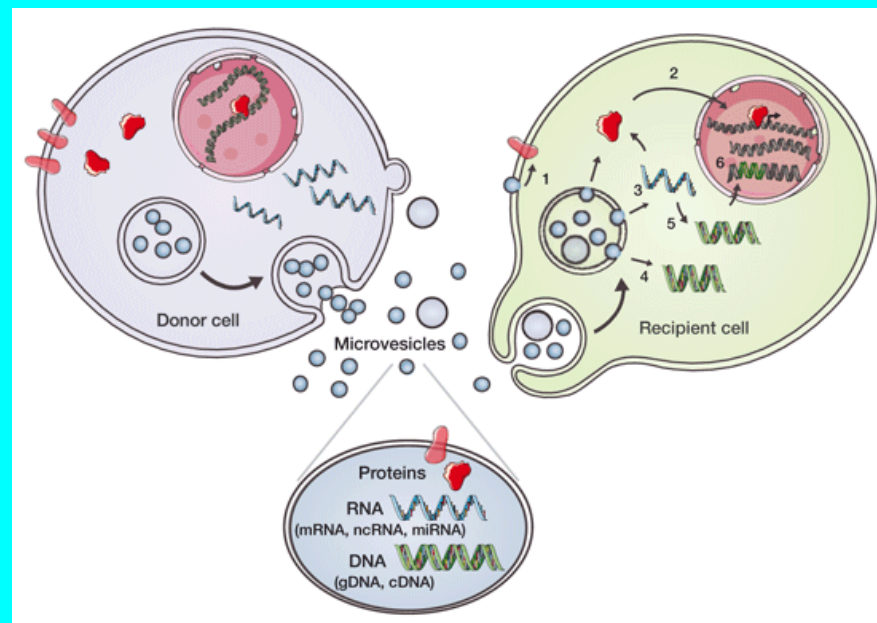
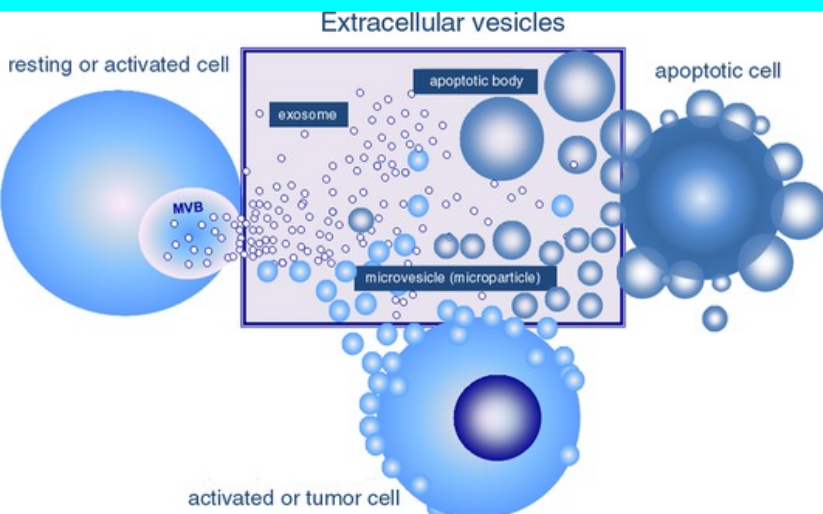
Transzferrin receptor endocitózis

Endocitózis – exocitózis - transzcitózis

Makrofágok – fagocitózis (endocitózis)

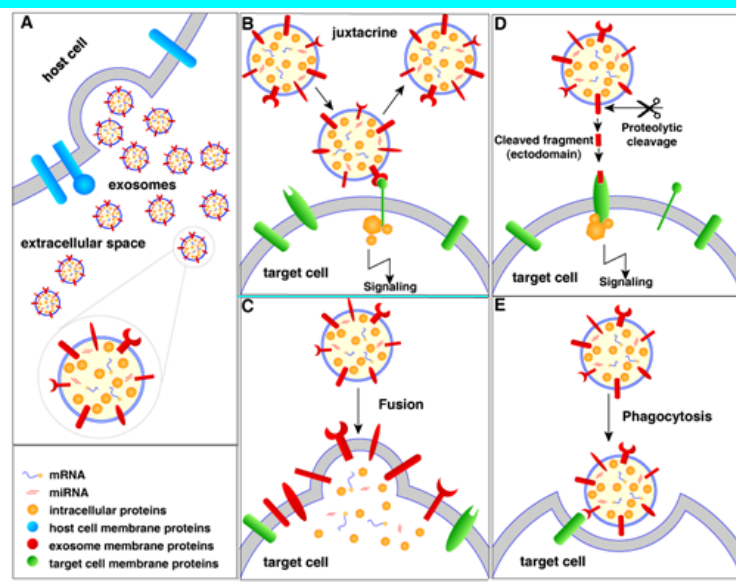


Mikrovezikulák képződése a sejtekből - exoszómák

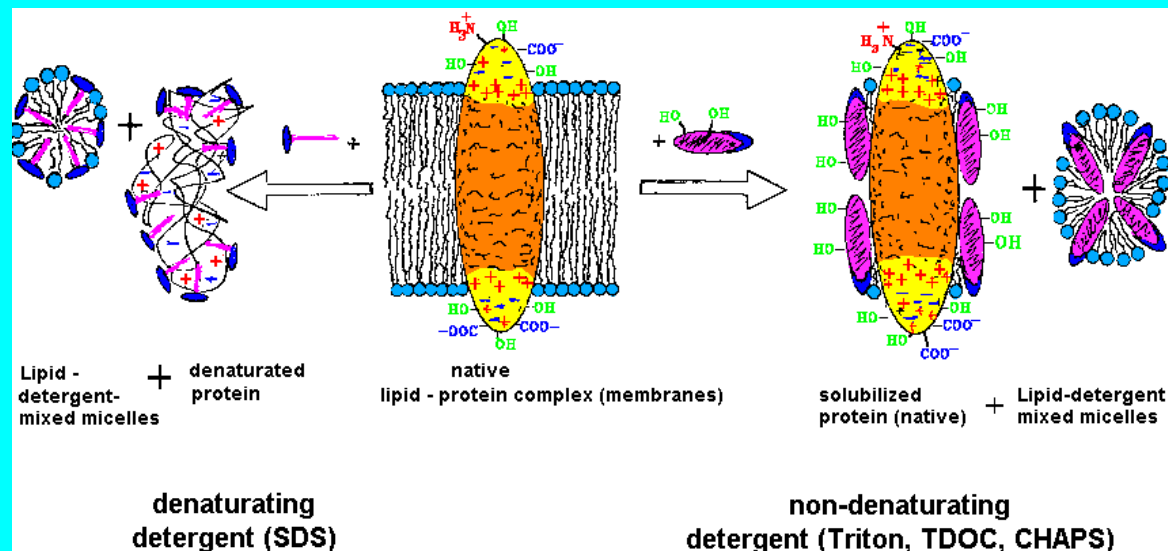


Normál és aktivált (immun)sejtek,
apoptotikus sejtek,
daganatsejtek...

Fontos fiziológiás szabályozó
szerep!

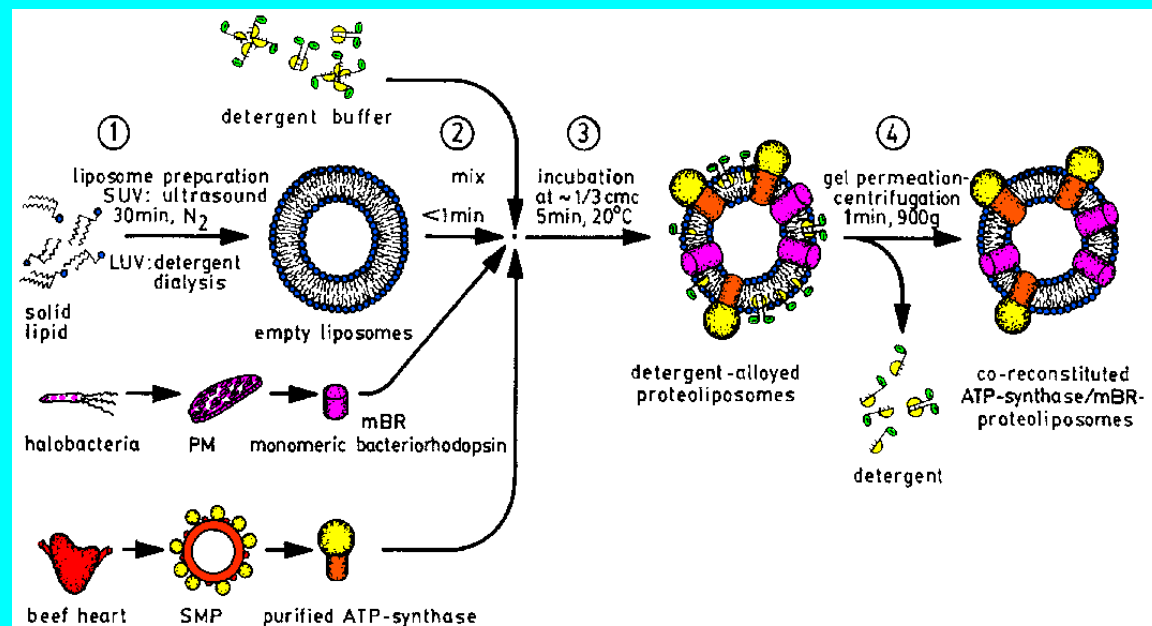


Membránfehérjék szerkezetvizsgálata és beépítése lipidekbe



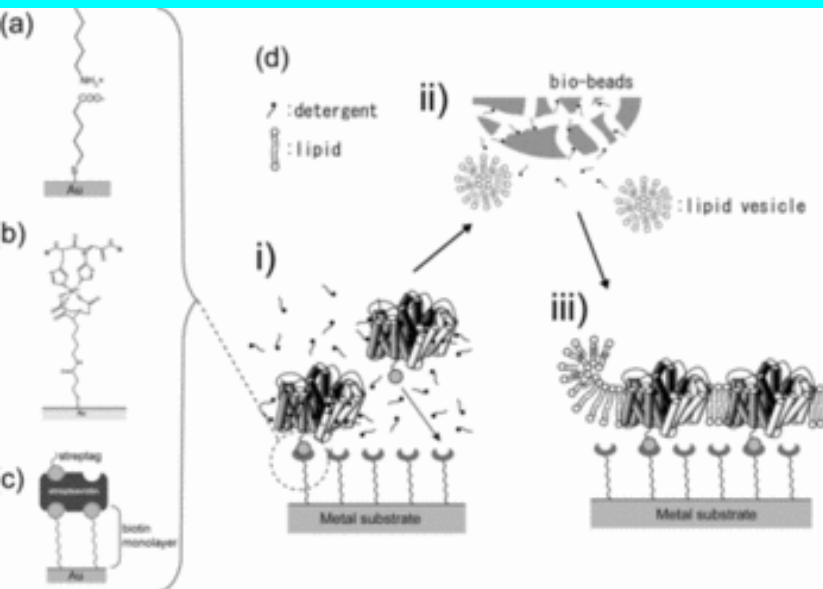
Membránfehérjék izolálása

Membránfehérjék rekonstitúciója



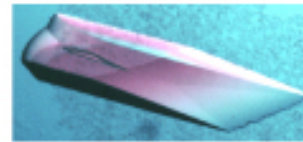
Membránfehérjék rekonstitúciója – atomi szintű szerkezet meghatározása

Membránfehérjék
kristályosítása –
lipid rétegben

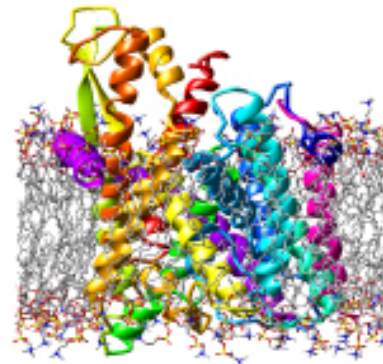


Membránfehérjék
kristályosítása –
háromdimenziós szerkezet!

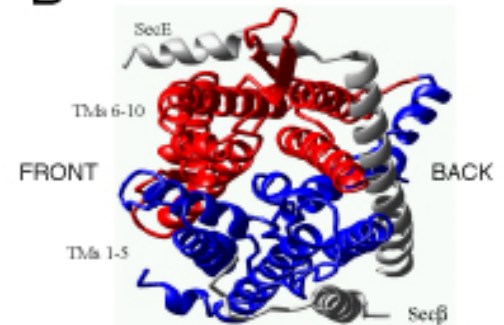
A



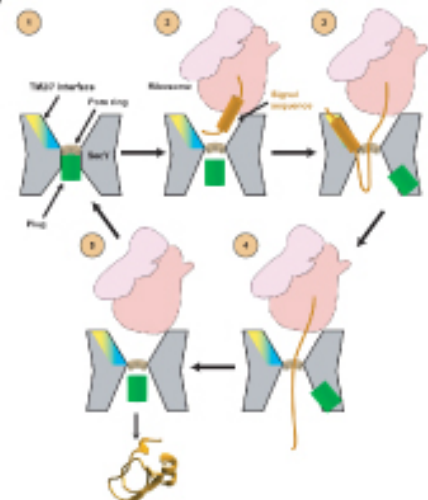
C

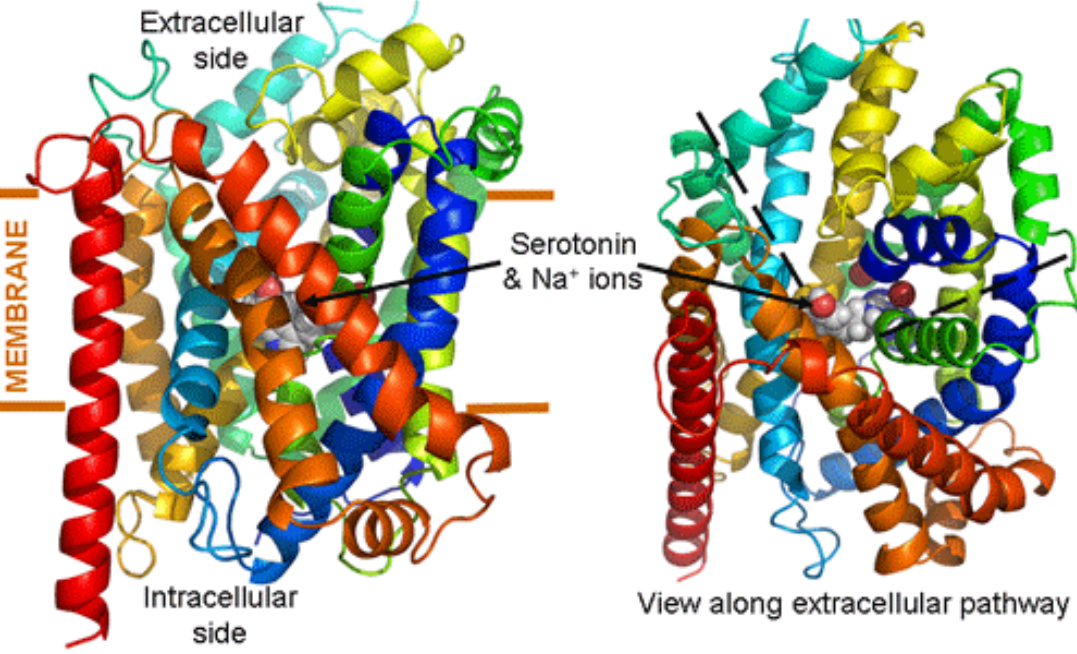


B



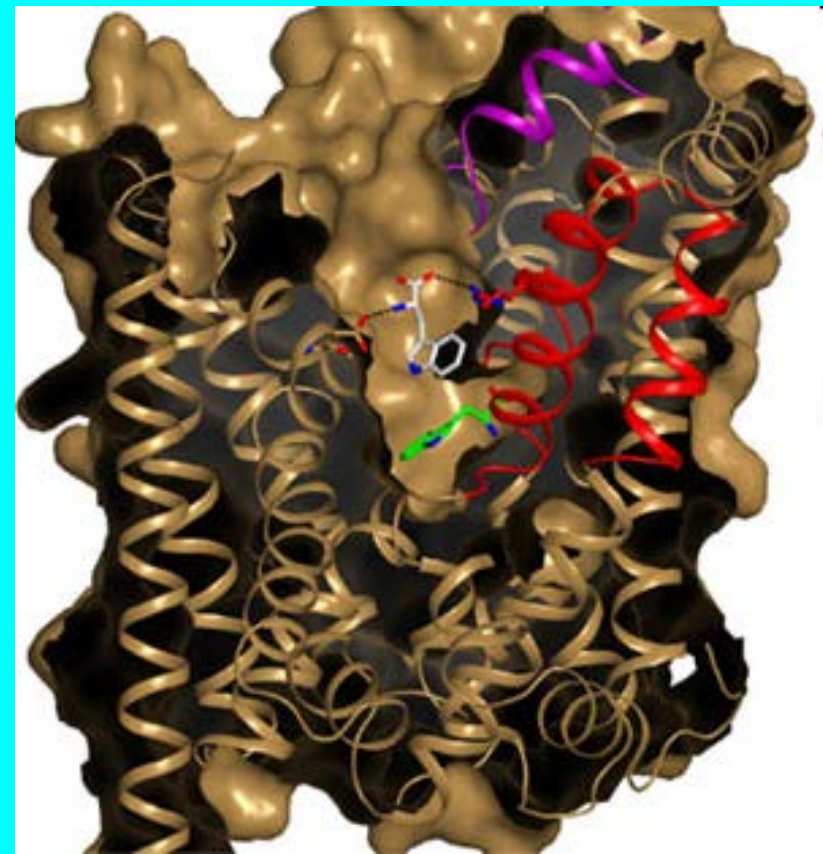
D





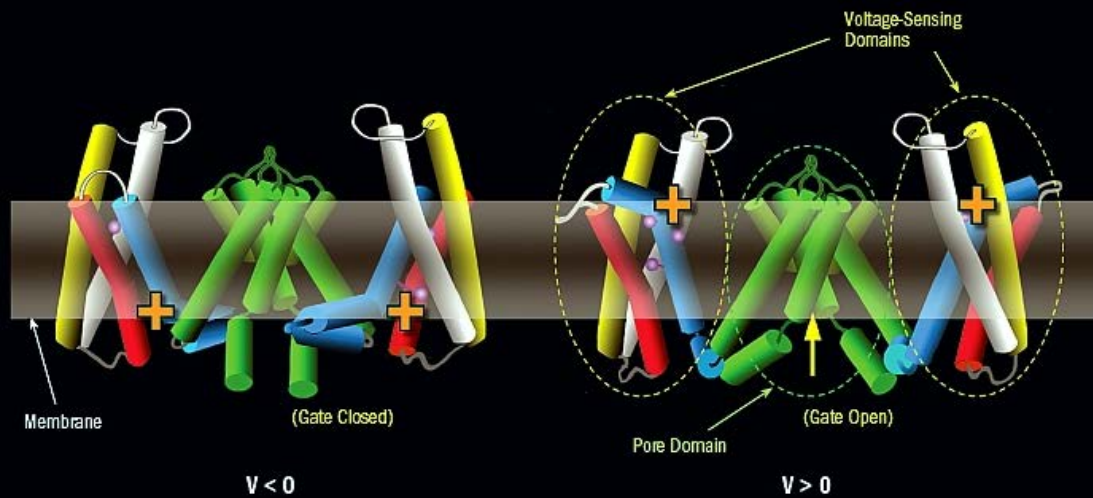
Szerotonin transzporter
Na-függő transzport

Leucin transzporter (Science, 2008)



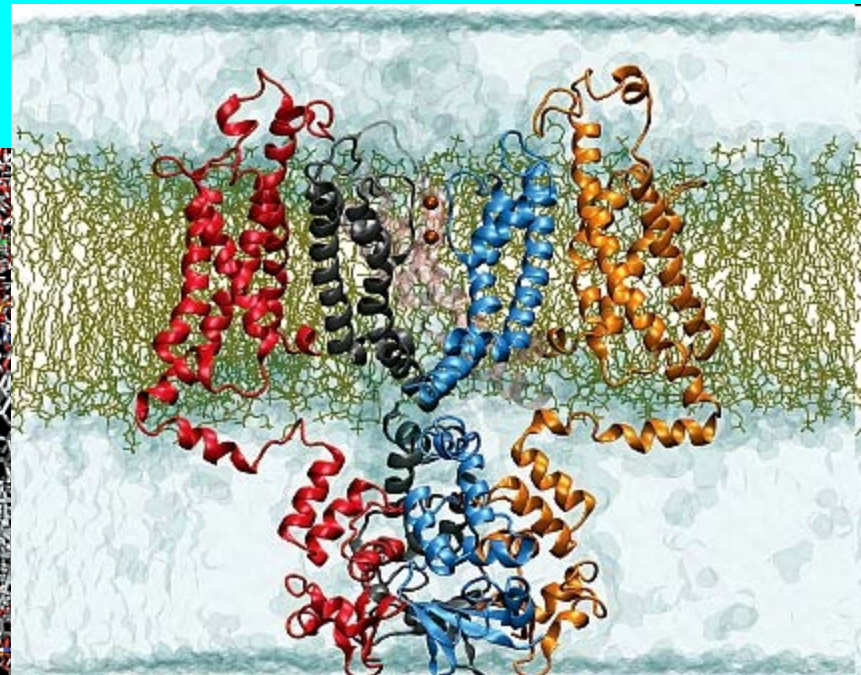
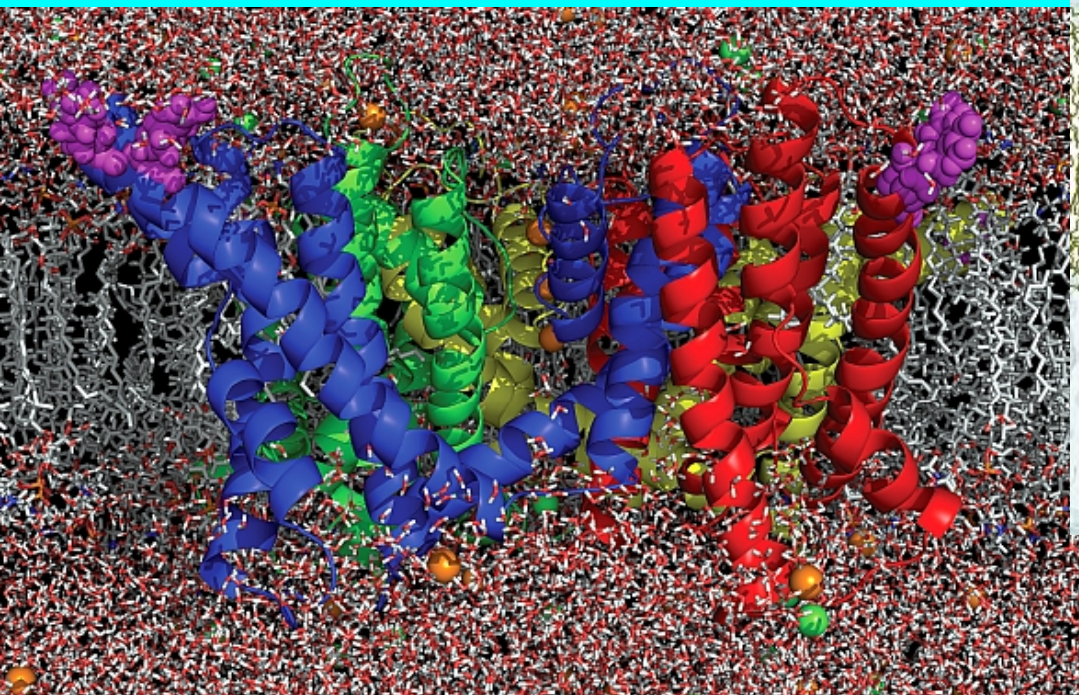
Closed State

Open State

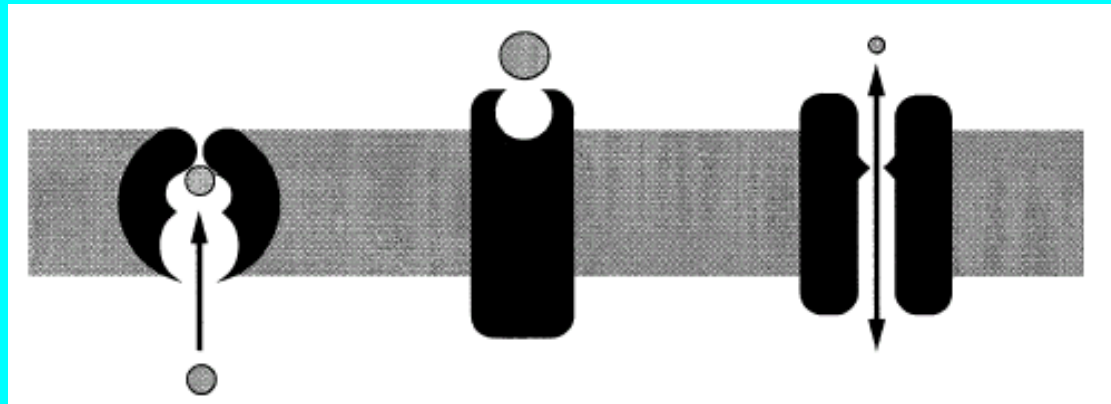


Feszültségfüggő
K⁺ ion csatorna (Kv1.2)

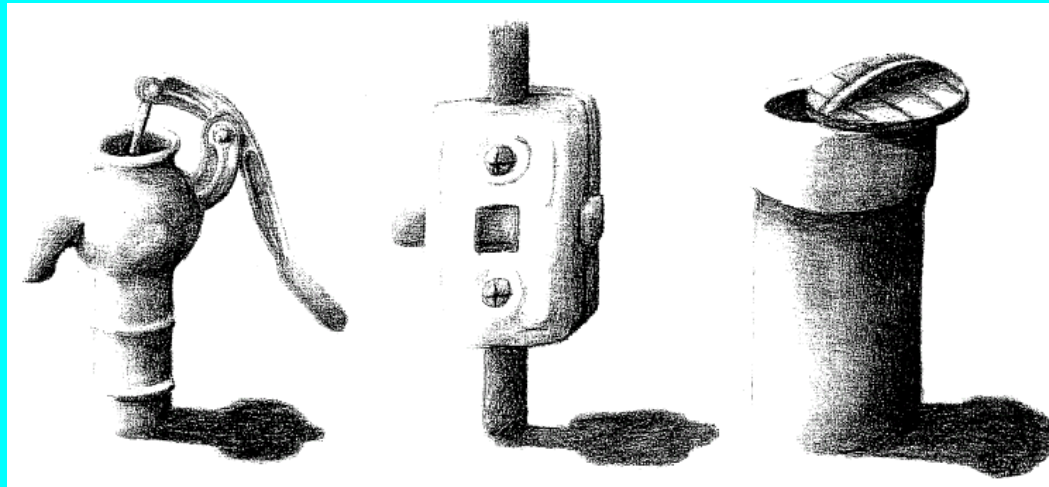
Molekuláris szerkezet
és modellek



Az ABC (ATP-binding Cassette) transzporterek

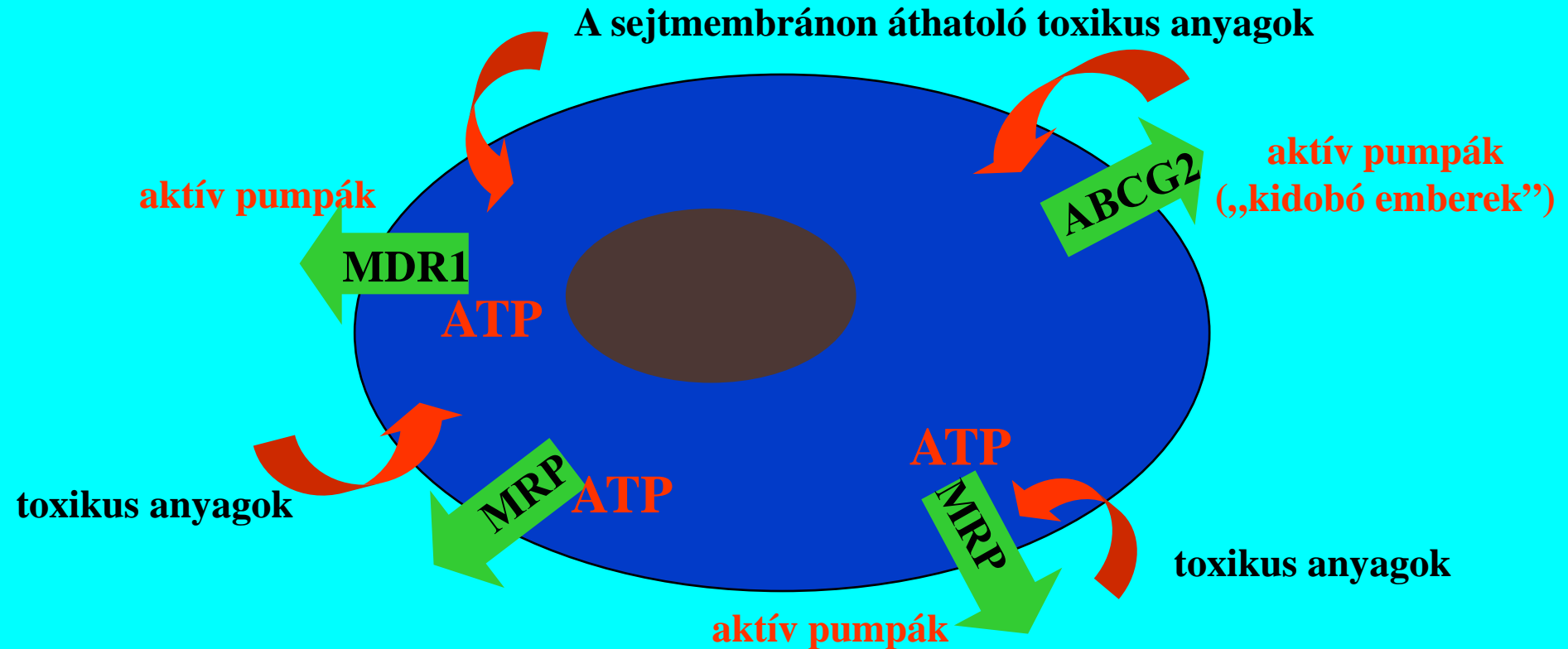


pumpák receptorok csatornák



Az ABC transzporterek: mindezen feladatokra képesek?

A gyógyszer (multidrog)-rezisztencia pumpák – ABC transzporterek

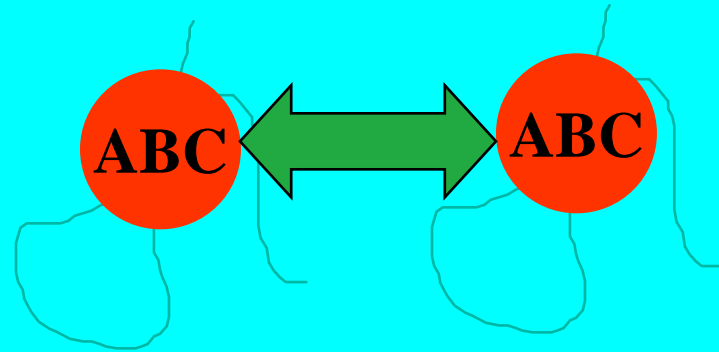
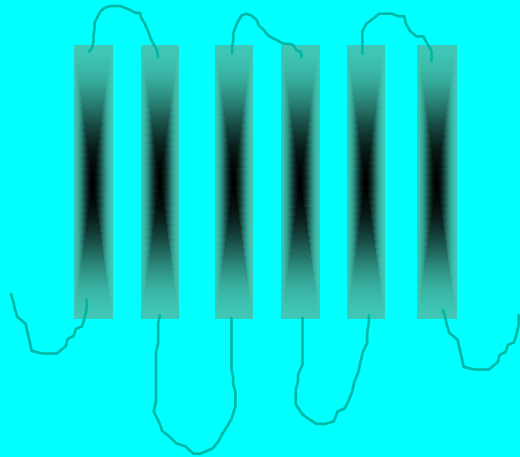


A sejtek és a szervezet védelméért felelős aktív pumpák az ATP energiájával működnek –

a rákos sejtek az ABC fehérjéket a saját védelmükre használják fel

Az ABC transzporterek alap-motívumai:

**6 TMH membrán
domén (TMD)**



Kooperáló ABC domének

Az ABC doménekben:

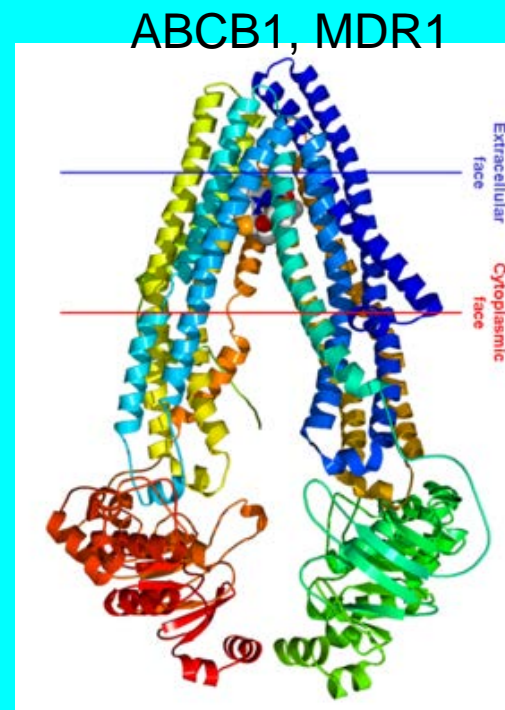
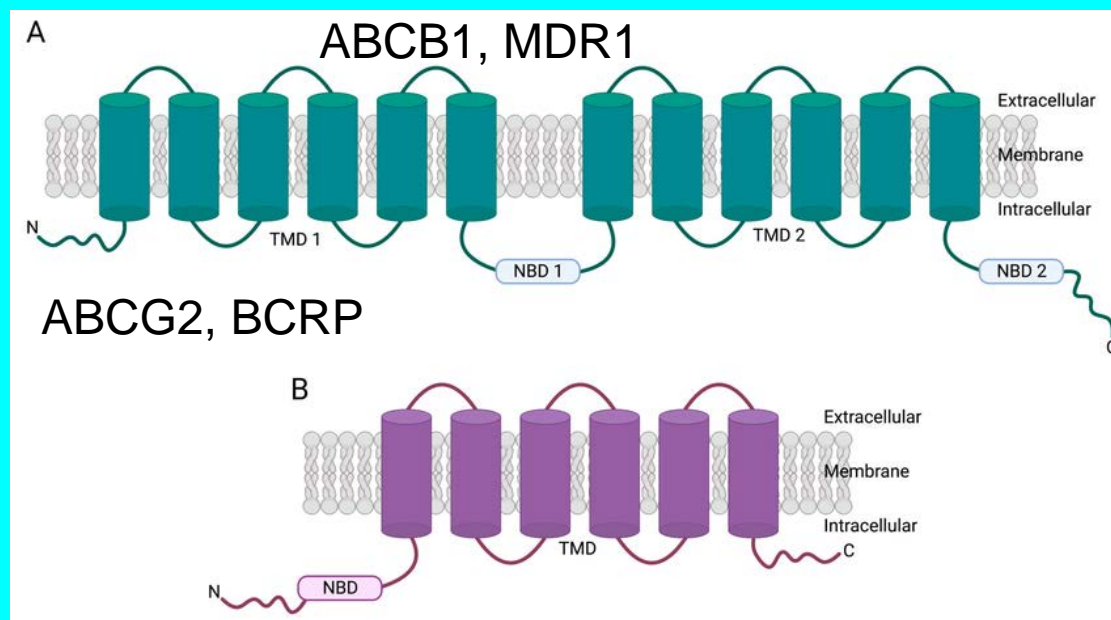
Walker A

Signature (C)

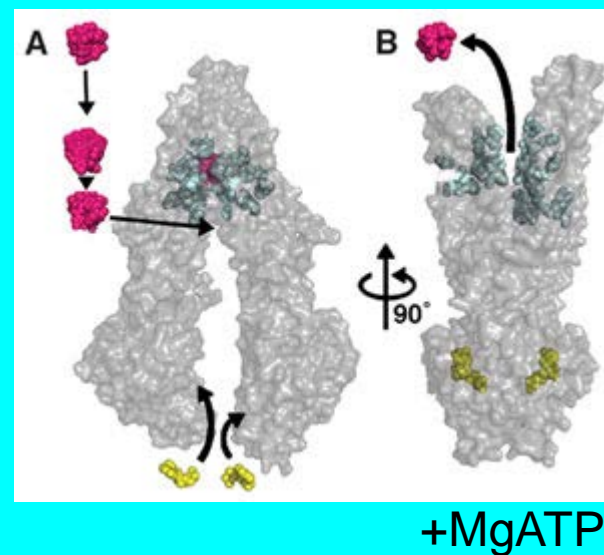
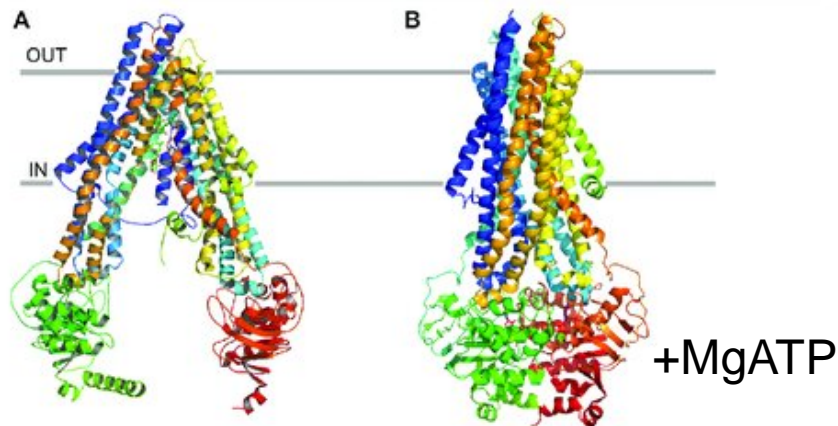
Walker B

**(egyedi az ABC
transzportereknél!)**

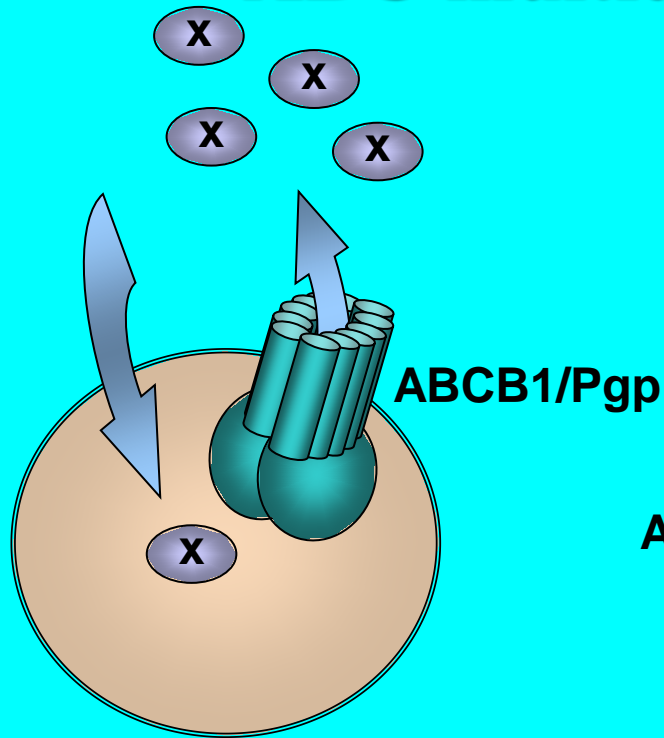
Az ABC drog transzporterek topológiája, atomi szerkezete és az ATP szerepe



ABCB1,
MDR1



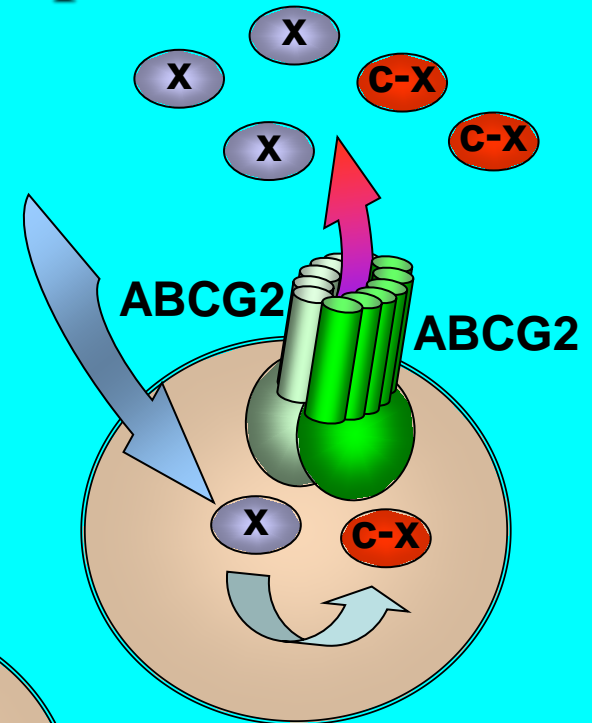
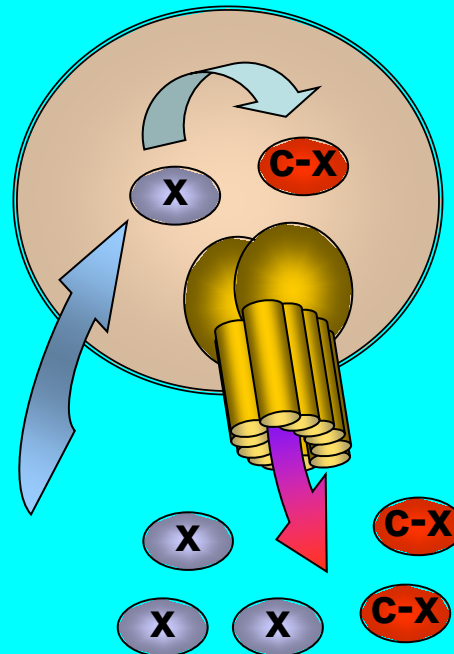
ABC multidrog transzporterek



Szubsztrátok:
hidrofób drogok (X)

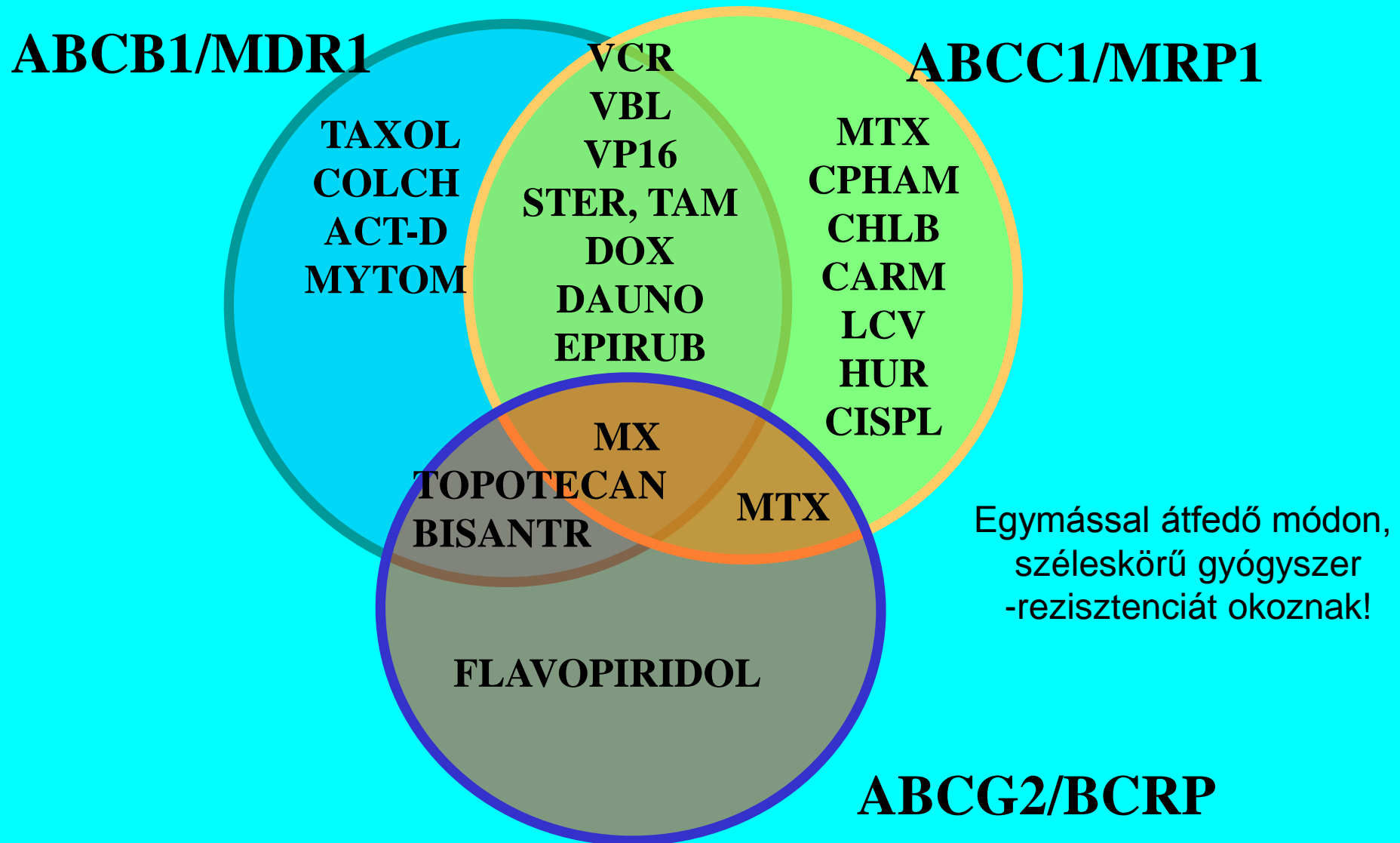
Három fő multidrog
transzporter!

ABCC1/MRP1

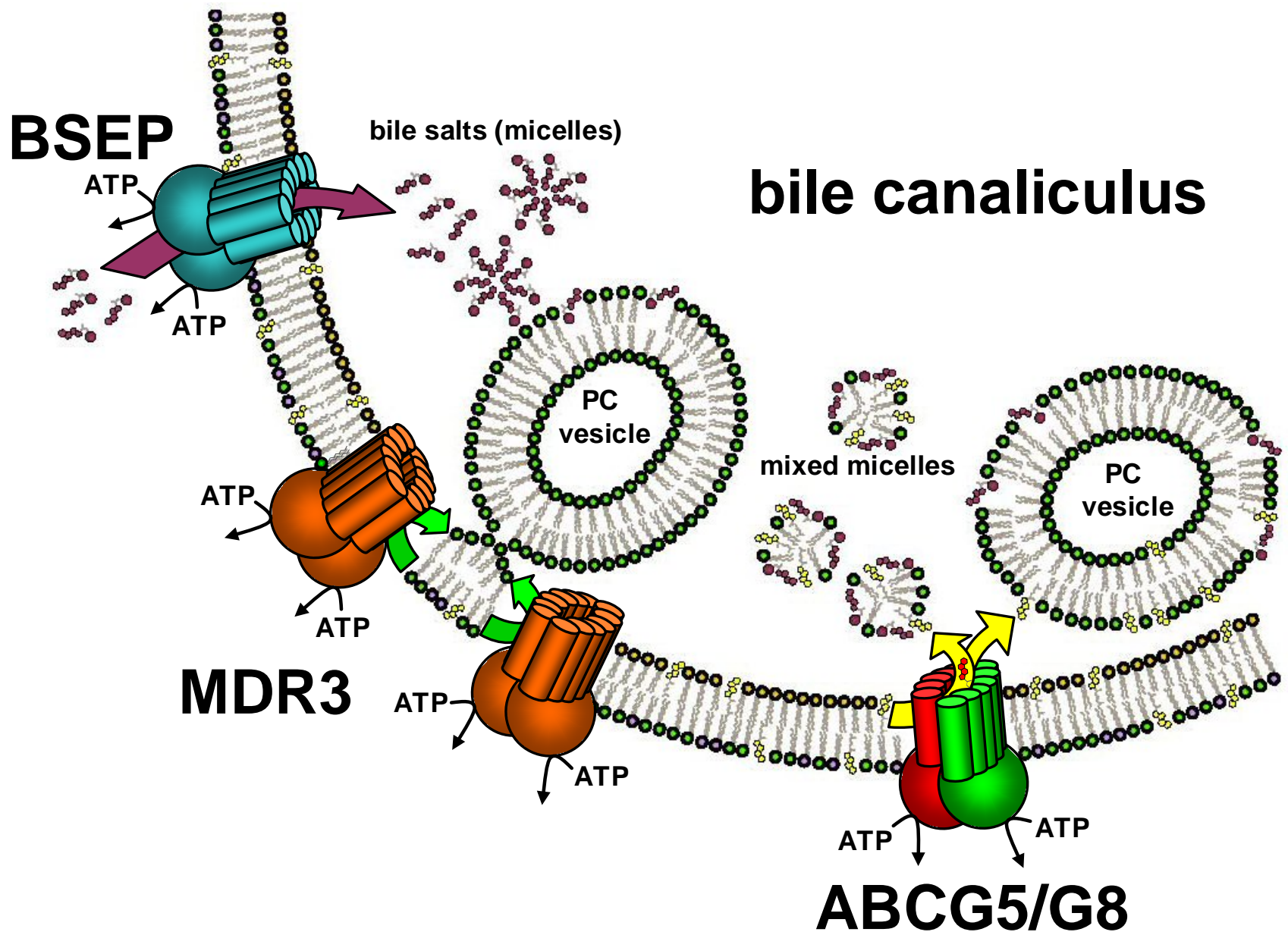


Szubsztrátok:
hidrofób drogok (X),
de már
részlegesen
méregtelenített
metabolitok (C-X) is!

A multidrog rezisztencia fehérjék szerepe rák-ellenes gyógyszereknél



Az ABC transzporterek élettani szerepe: lipidek transzportja a májban



Az ABC transzporterek élettani szerepe: méregtelenítés a placentában

Anyai
vér-
keringés

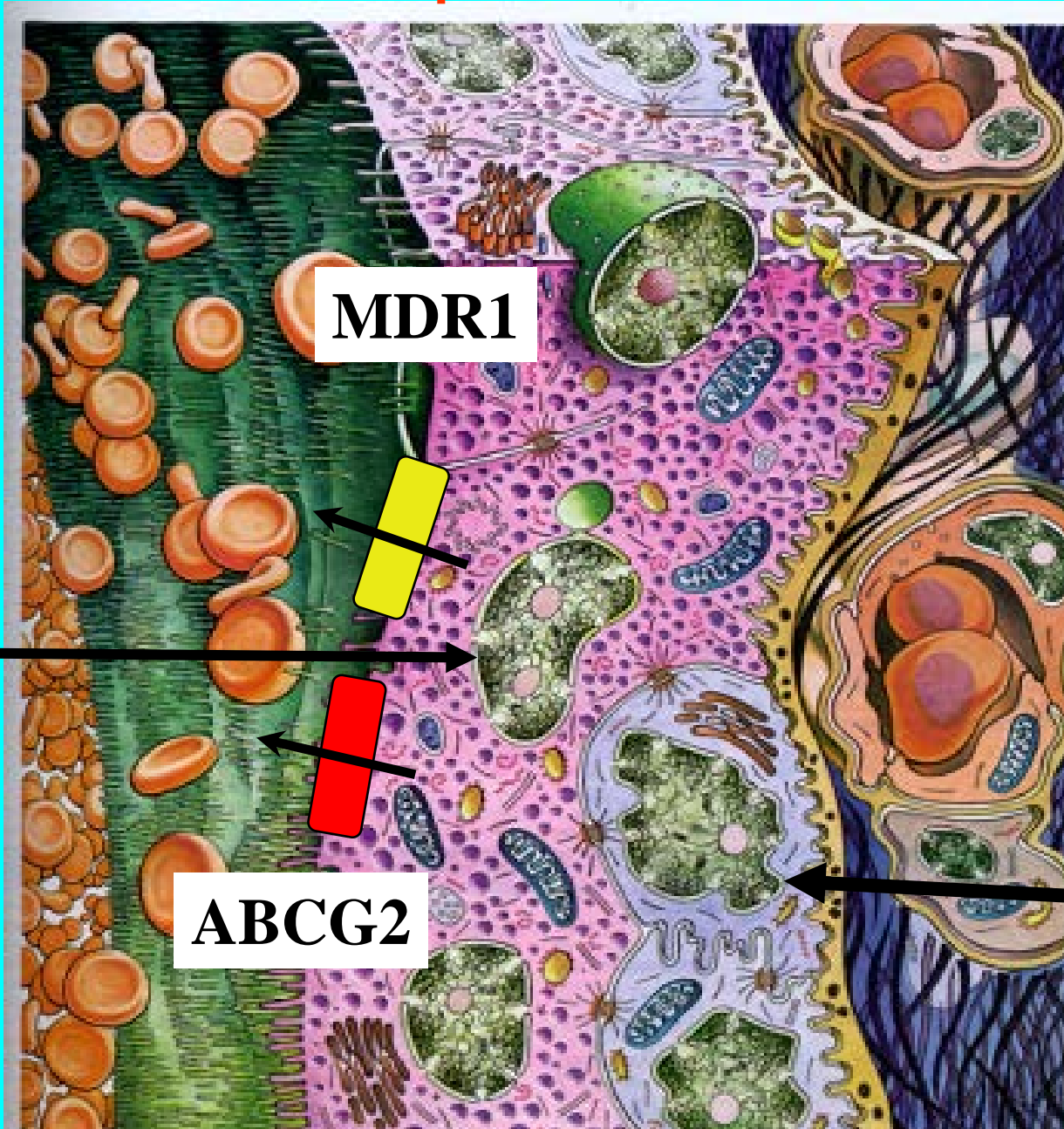
Magzati
vér-
keringés

MDR1

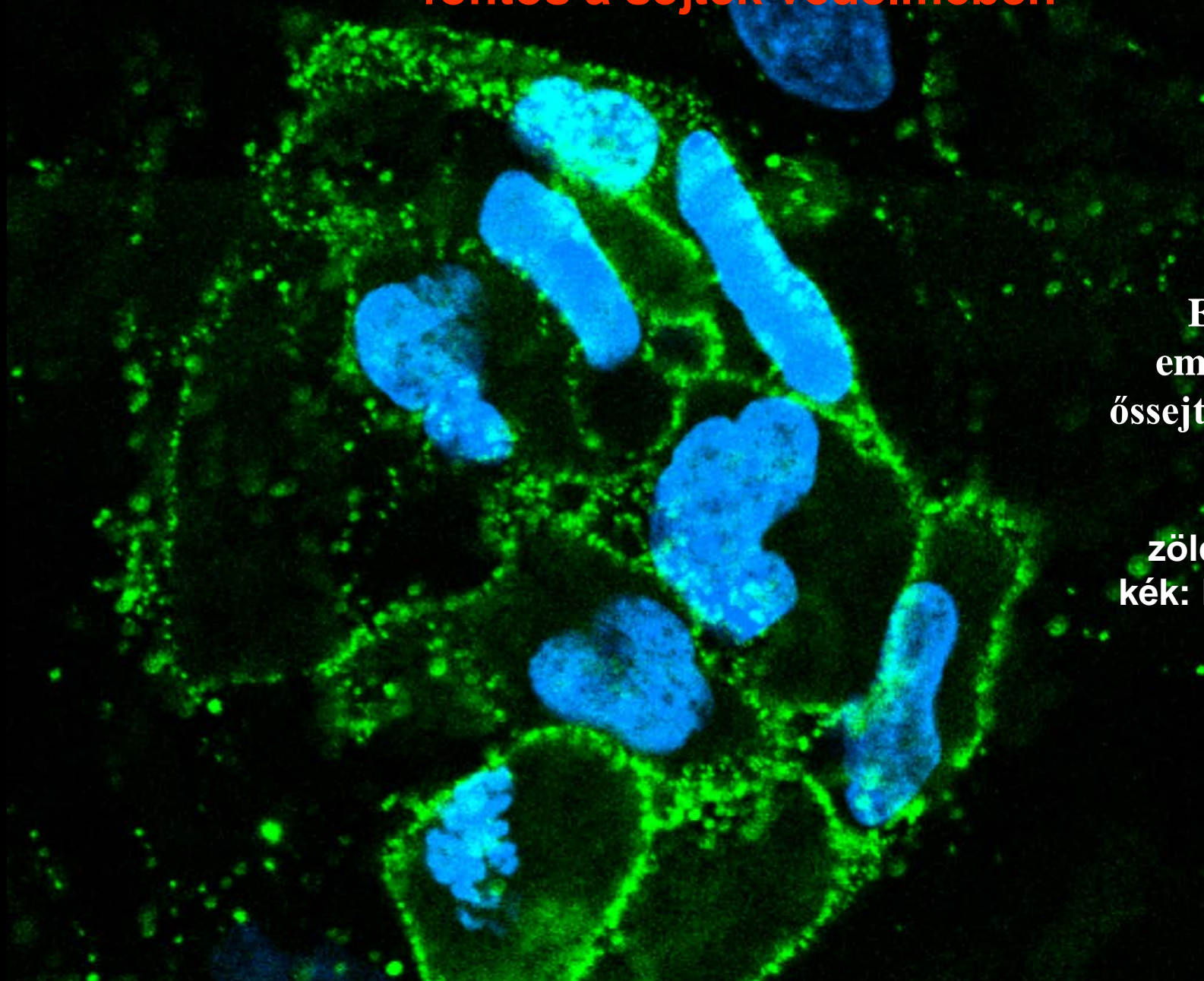
Syncytio-
trophoblast

Cyto-
trophoblast

ABCG2



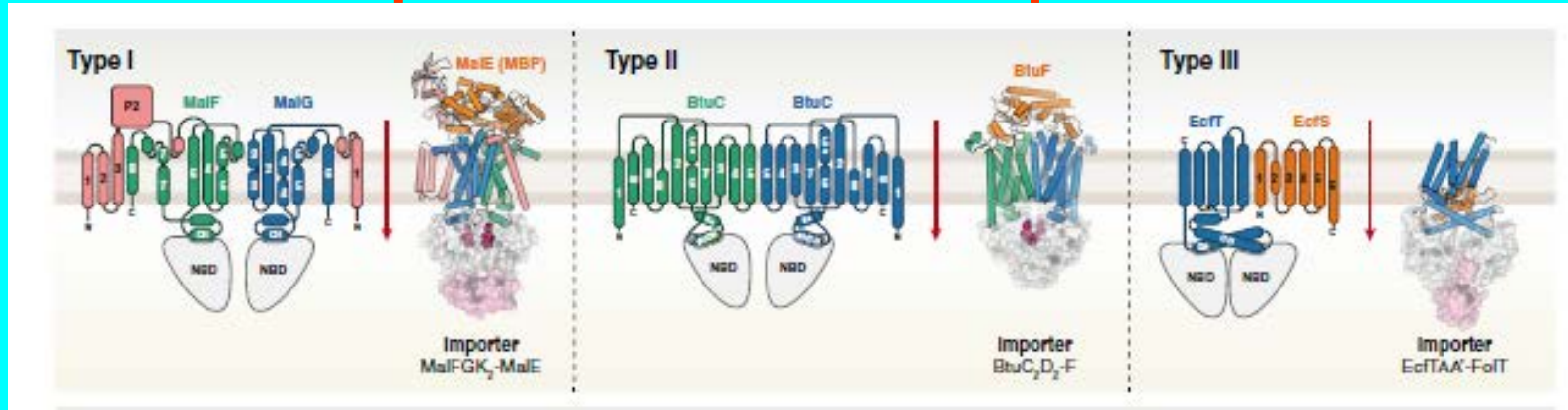
Emberi pluripotens őssejtekben az ABCG2 kifejeződés fontos a sejtek védelmében



Emberi
embrionális
őssejtek (HuES9)
sejtek

zöld: ABCG2
kék: DAPI (mag)

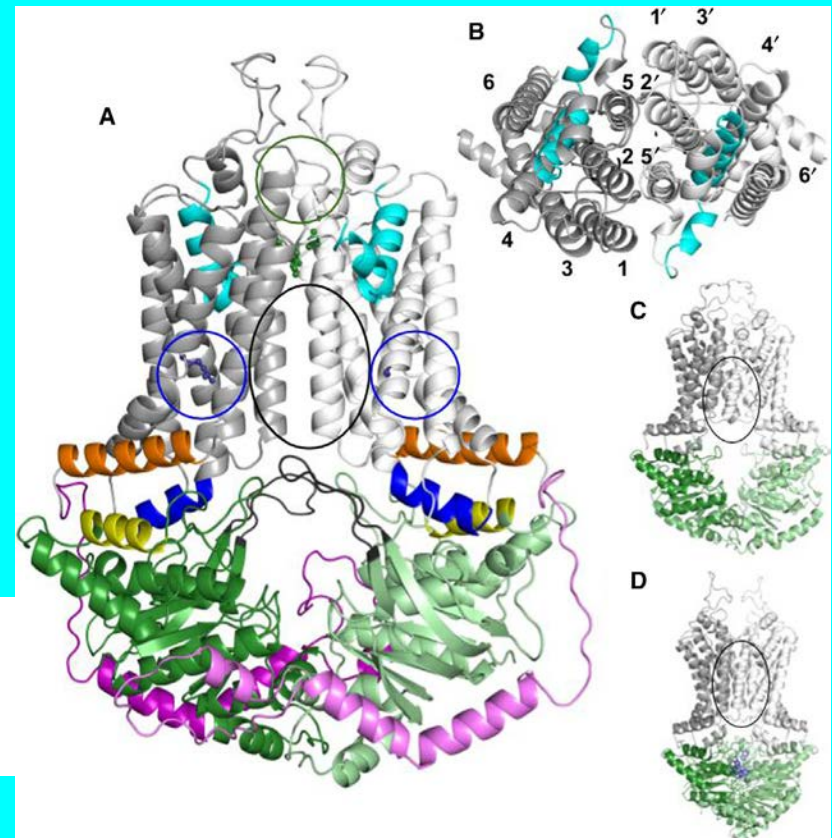
Az ABC transzporterek változatos típusai a szerkezet alapján






Type V



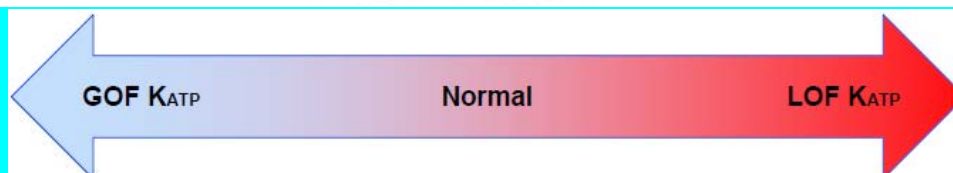
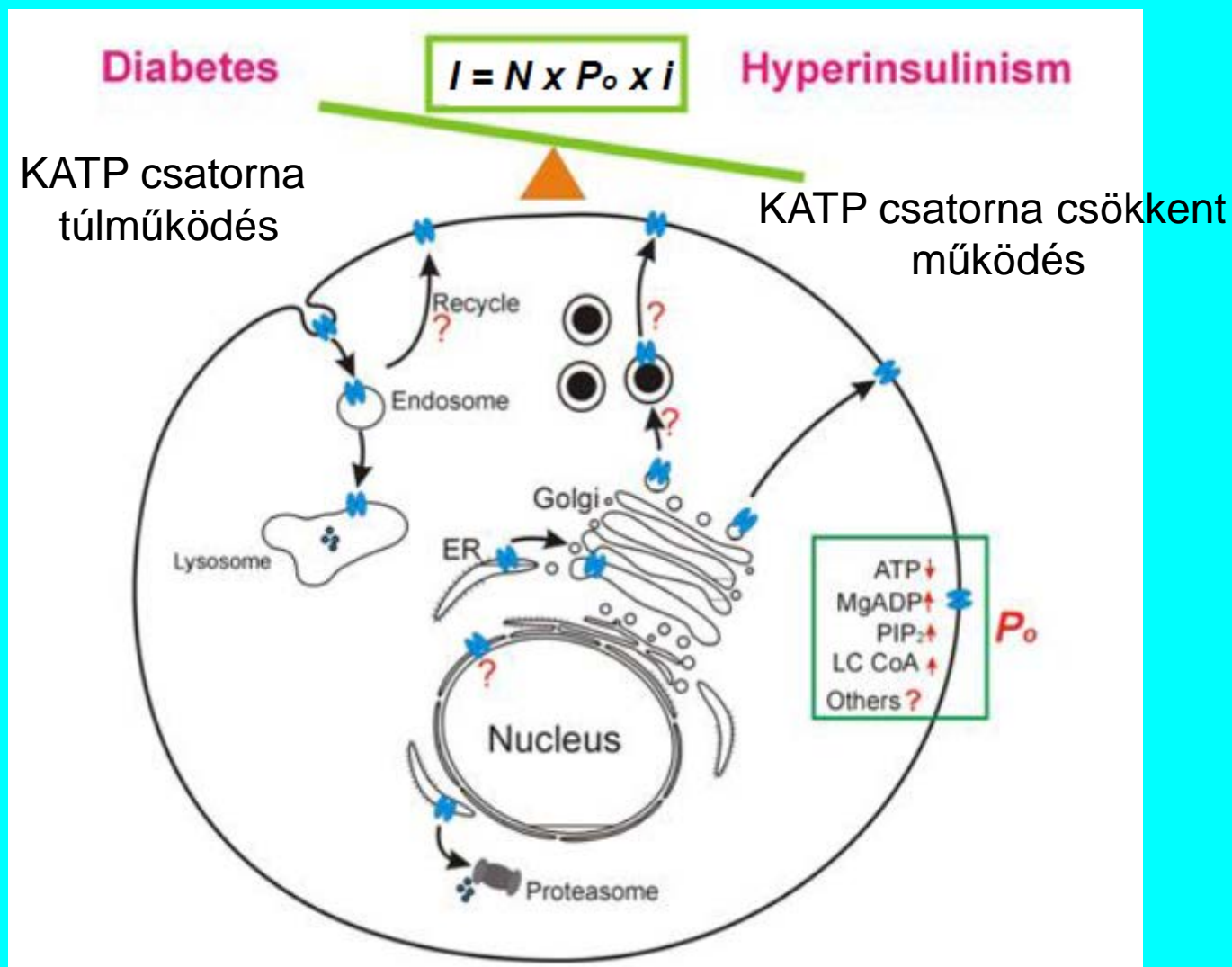
ABCG2
(2020)



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

Balázs Sarkadi^{1,2} , László Homolya¹  and Tamás Hegedűs² 

Egy ABC transzporter és az inzulin szekréció betegségei



Az inzulin szekréció betegségeinek gyógyszeres kezelése

Diabetesz

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

Close
ATP

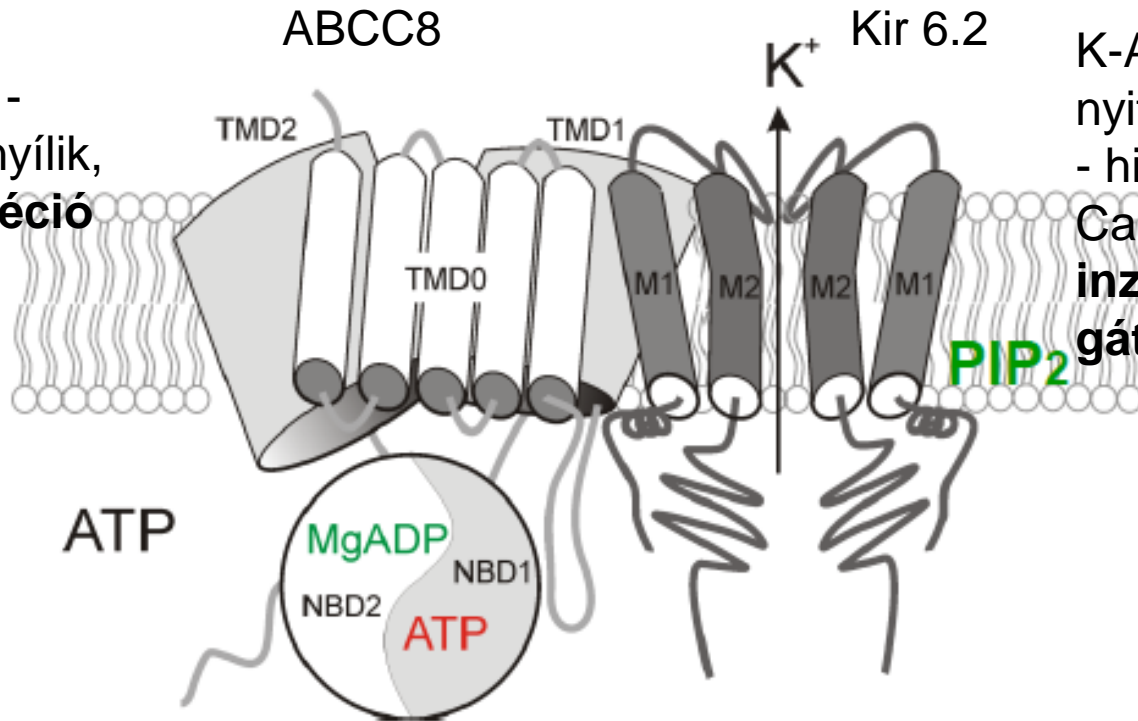
Hiperinzulinemia

MgADP

Diazoxide

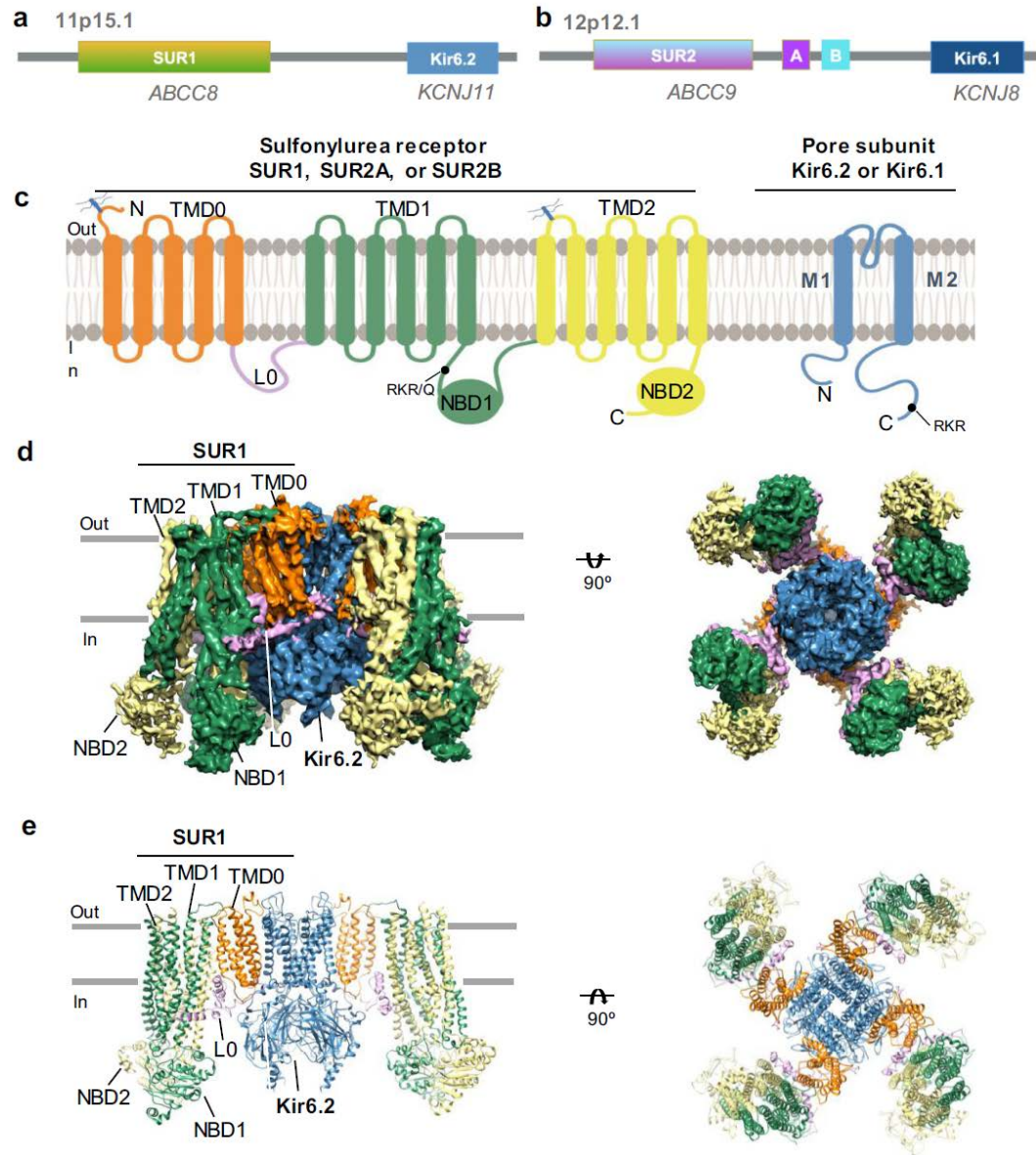
Open

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



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

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

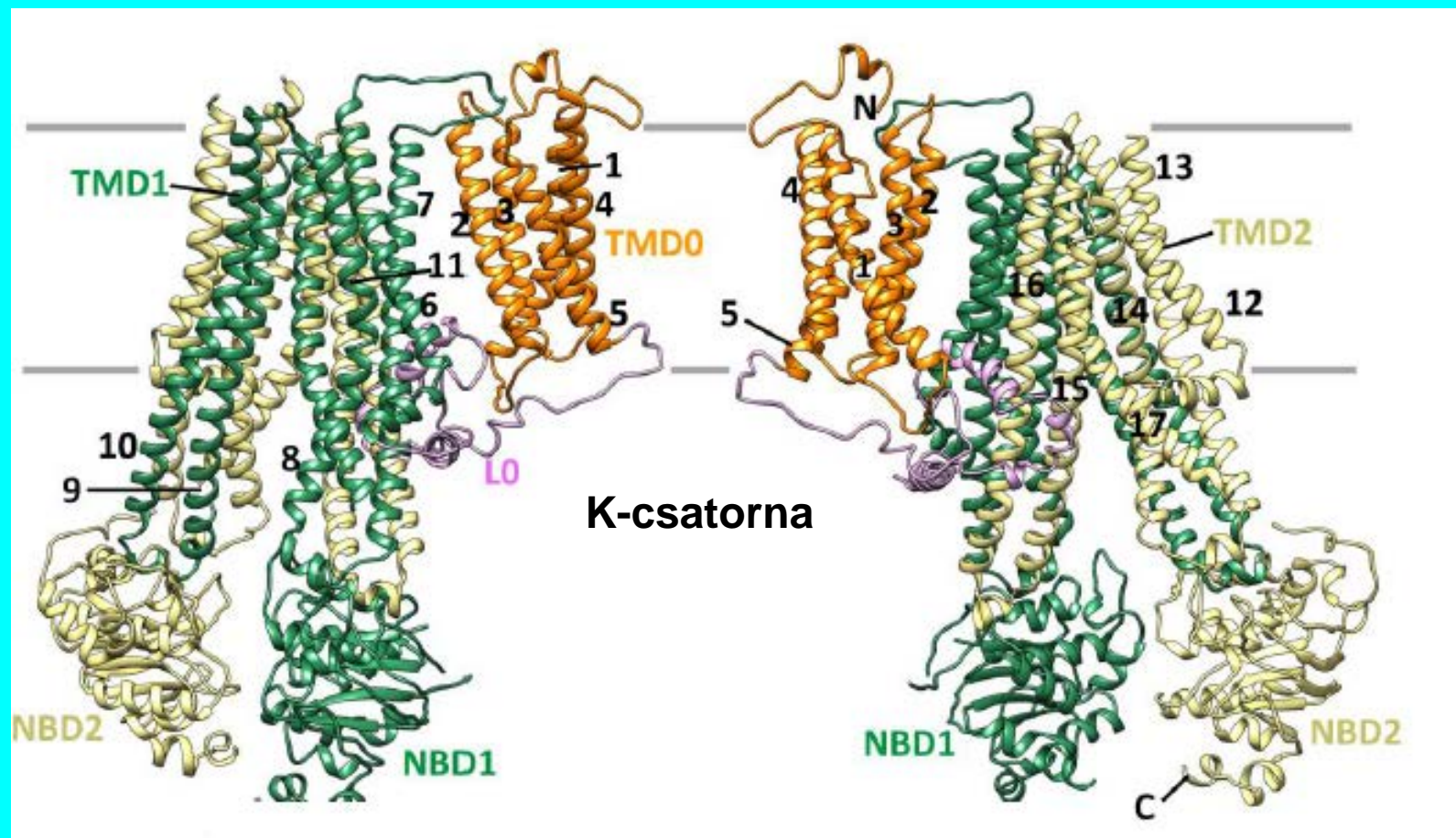


Dinamikus kettős: Kir6 és SUR (ABCC8-9) a KATP csatorna szerkezetében és működésében

Bruce L. Pattona, Phillip Zhua, Assmaa ElSheikha,b, Camden M. Driggersa, and Show-Ling Shynga **Channels, 2024**

A KATP csatorna molekuláris szerkezete. (a) a SUR1 és Kir6.2 fehérjét kódoló gének, (b) a SUR2 (A/B) és a Kir6.1 fehérjét kódoló gének, (c) a SUR és Kir6 fehérjék membrán topológiája, (d-e) a KATP csatorna szerkezete

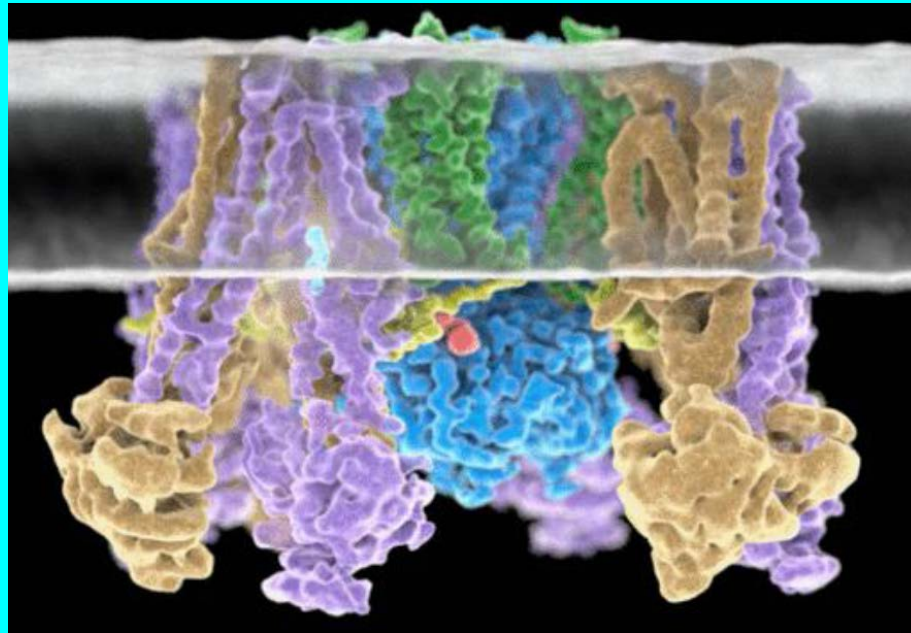
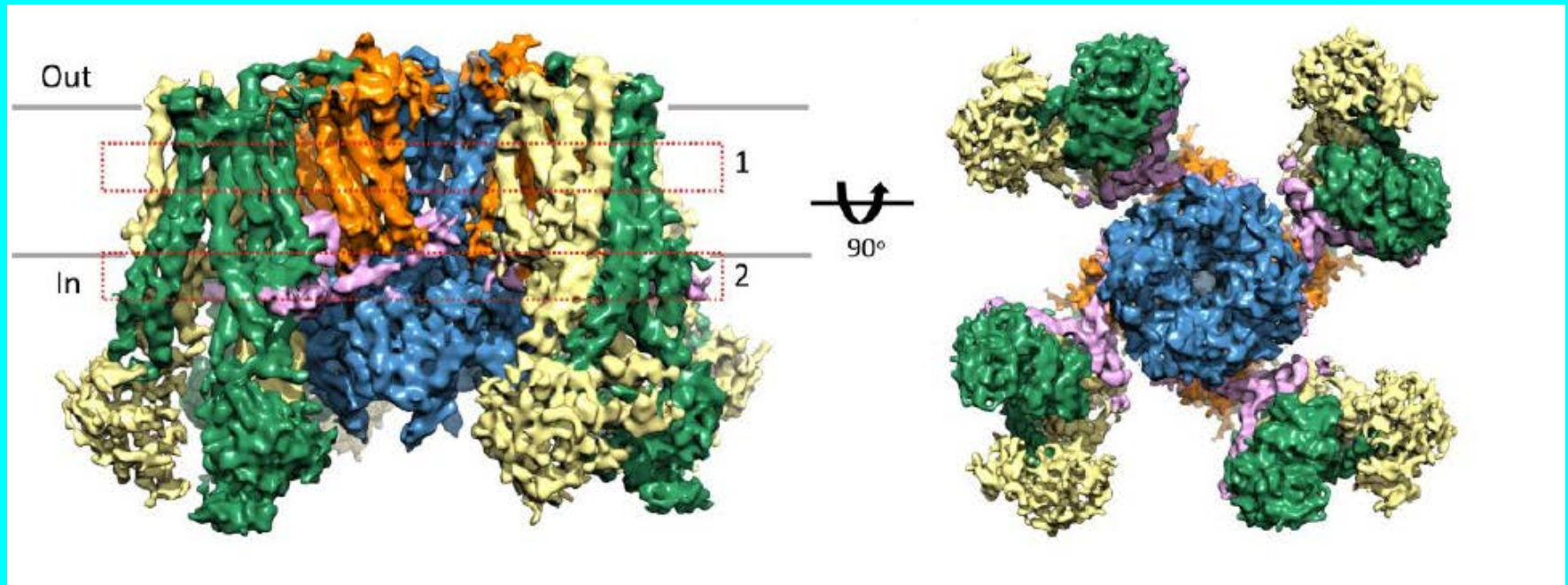
Az ABCC8 és a Kir6.2. csatorna komplexének atomi szintű szerkezete



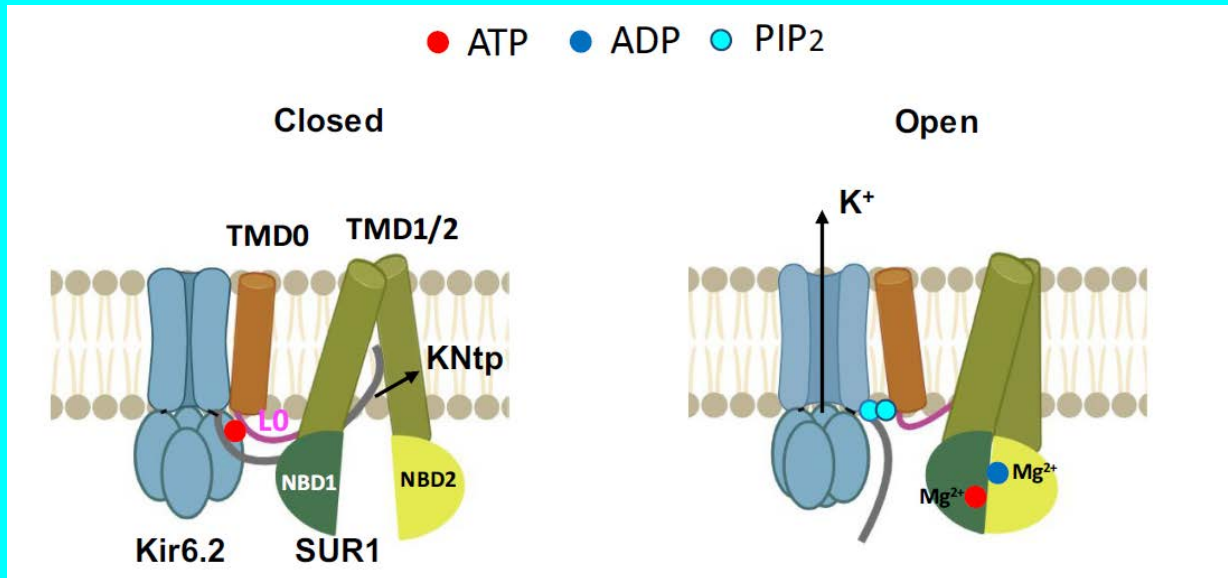
ABCC8 fehérje

ABCC8 fehérje

Az ABCC8 és a Kir 6.2. csatorna komplexének szerkezete



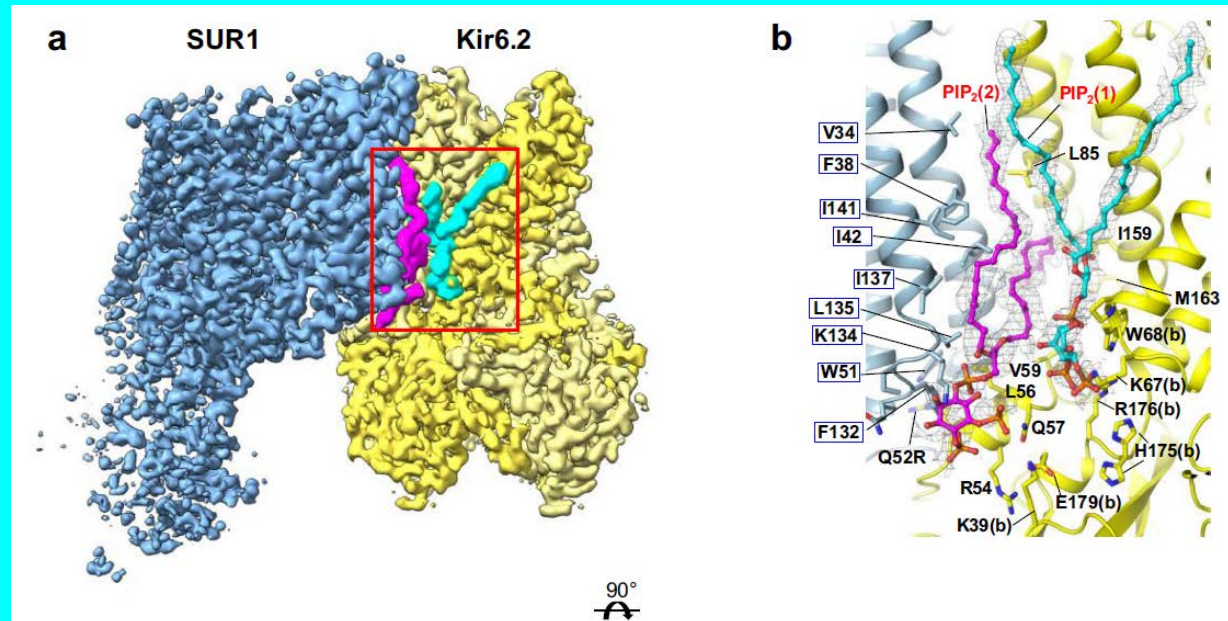
A KATP csatorna nukleotid és lipid szabályozása



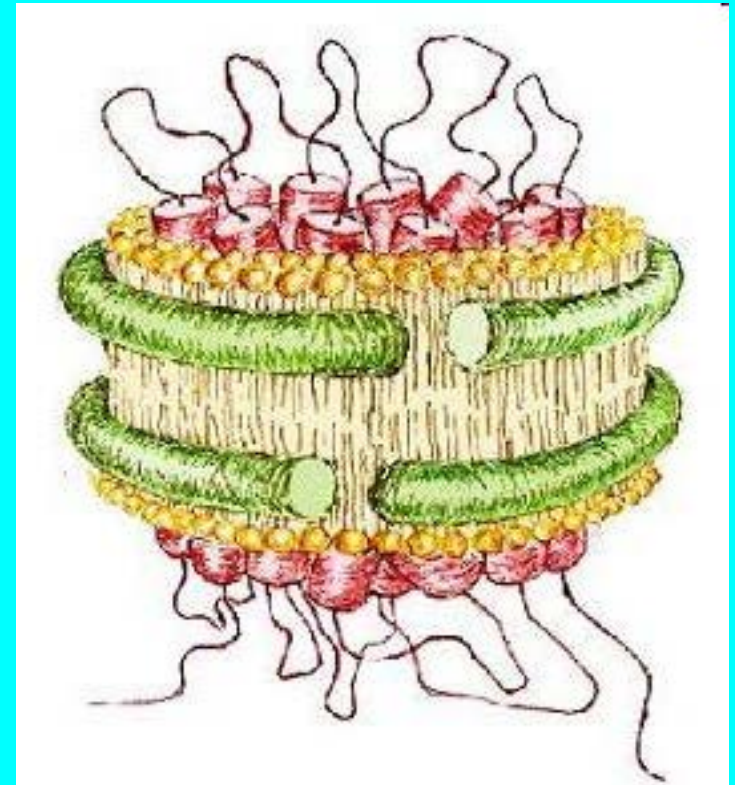
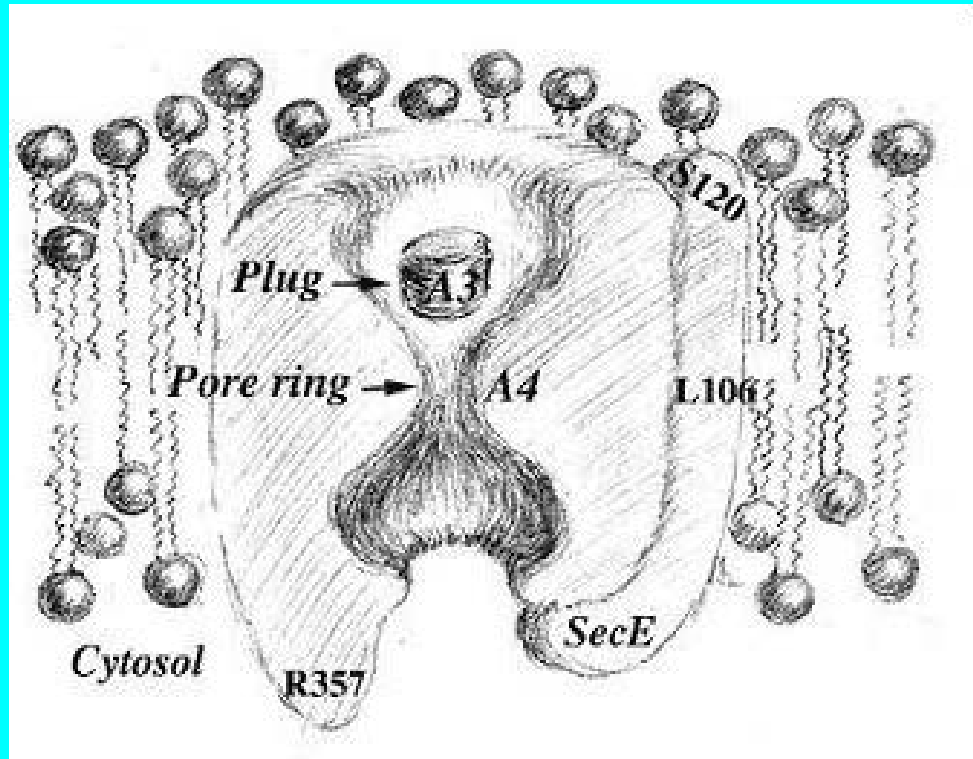
Ha KATP csatornában a Kir6.2-höz gátló MgATP kötődik, a csatorna zárt konformációba kerül.

A KATP csatorna **nyílik**, ha a SUR1 NBD1/2 -hez MgATP/MgADP kötődik, és az NBD dimerizálódik

A lipid (PIP₂) kötőhely a SUR1 NBD dimerizált, a csatorna **nyitott** konformációjában jelenik meg, és két PIP₂ molekula kötődik a SUR1-Kir6.2 interfész-hez, ezzel stabilizálva a nyitott állapotot

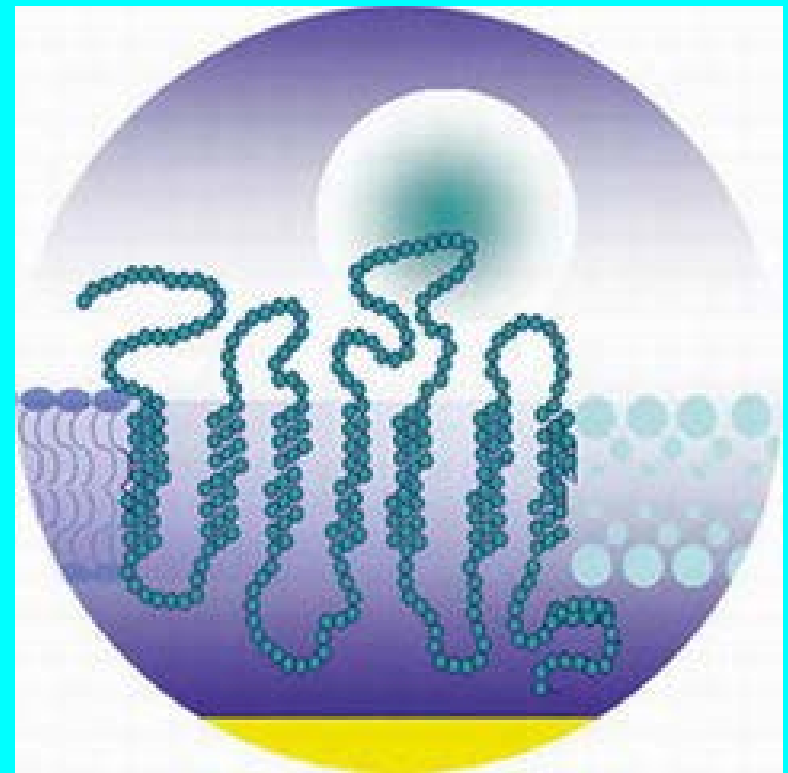
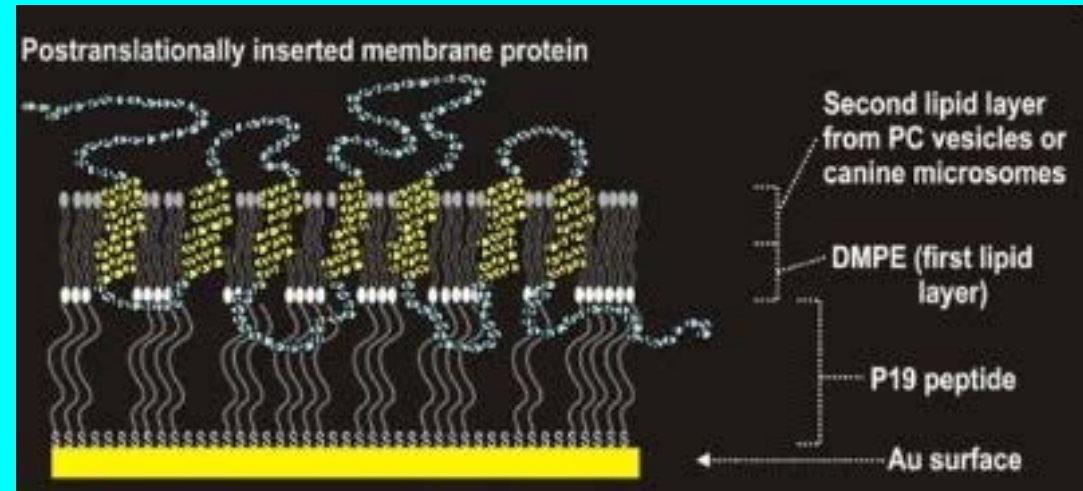
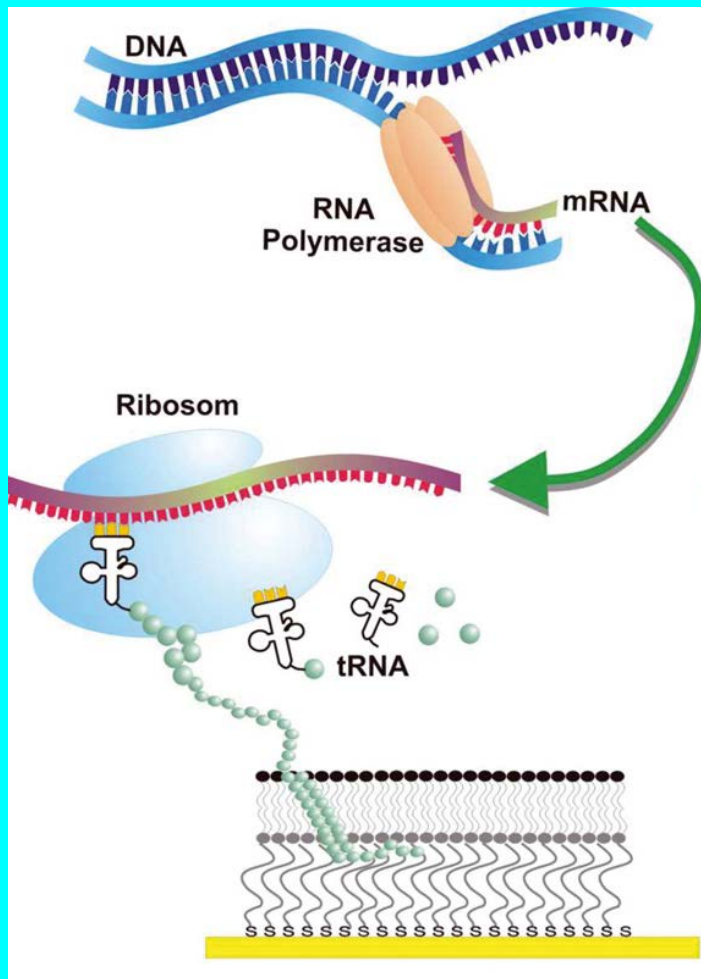


Mesterséges fehérje-membrán komplexek – új biotechnológiai lehetőségek



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:

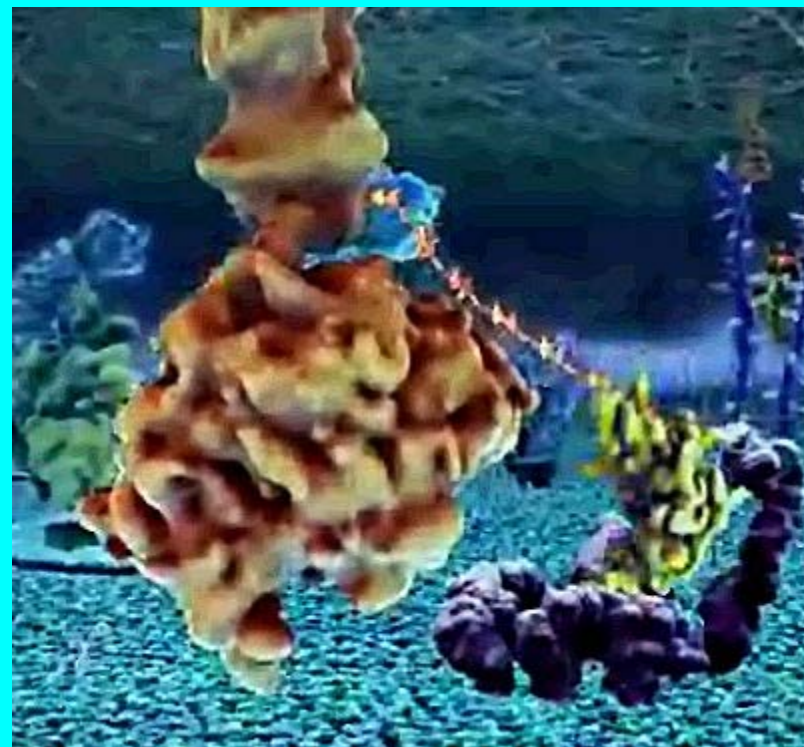
In vitro szenzor készítése!

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