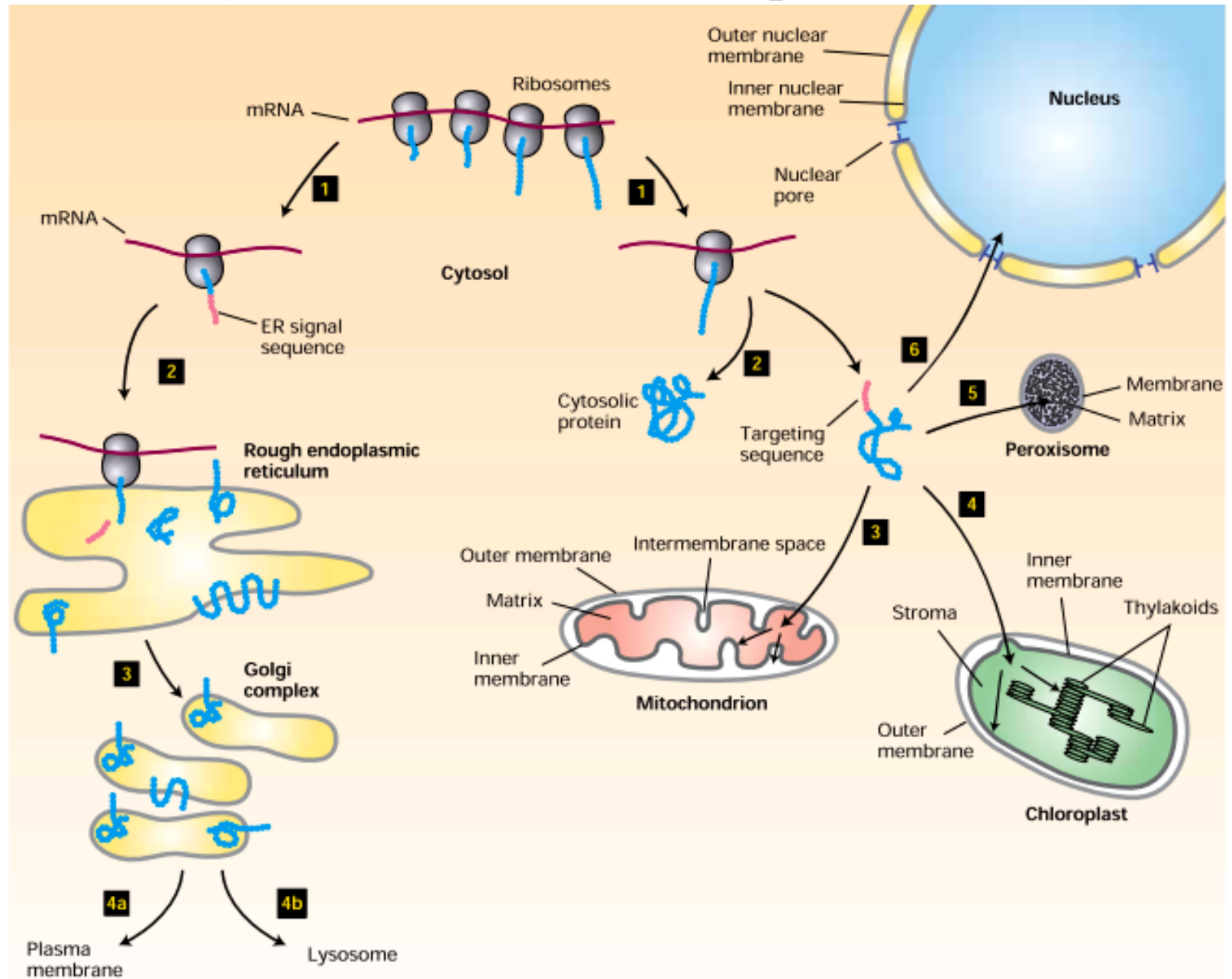


# Transzportfolyamatok a sejtben I.

2016. március 10.

Lippai Mónika

# Az eukarióta sejt belső terei... és a kompartmentalizáció ára



SECRETORY PATHWAY

# A riboszómán szintetizálódó fehérje sorsa:

- Marad a citoplazmában
- A sejtmagba importálódik
- Sejtszervecskébe szállítódik
  - mitokondriumokba
  - kloroplasztokba
  - peroxiszómákba
- Az endoplazmatikus retikulumba jut (szekréciós út)

# Topológiaiailag ekvivalens és nem-ekvivalens terek a sejtben

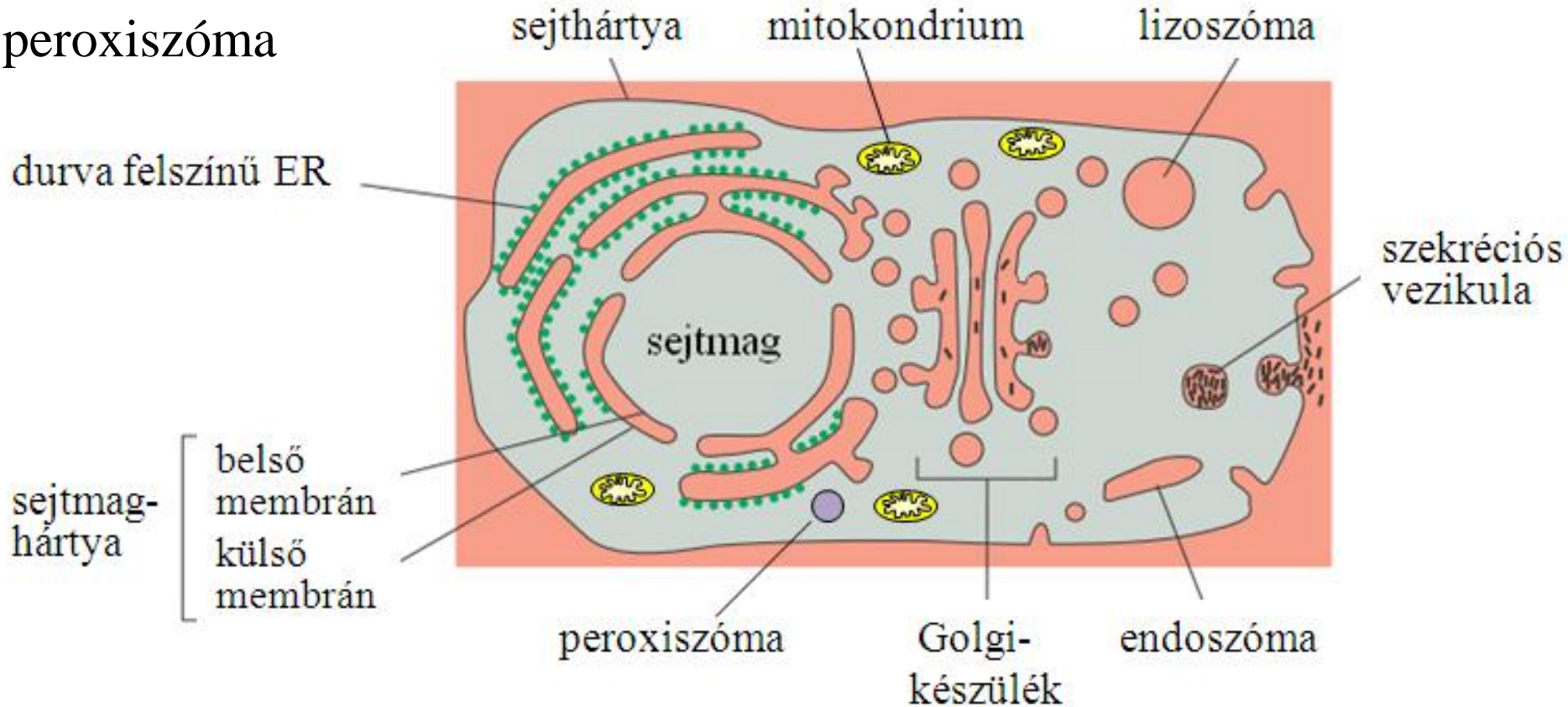
sejtmag – citoplazma

szekréciós-endocitotikus folyamatokban résztvevő terek

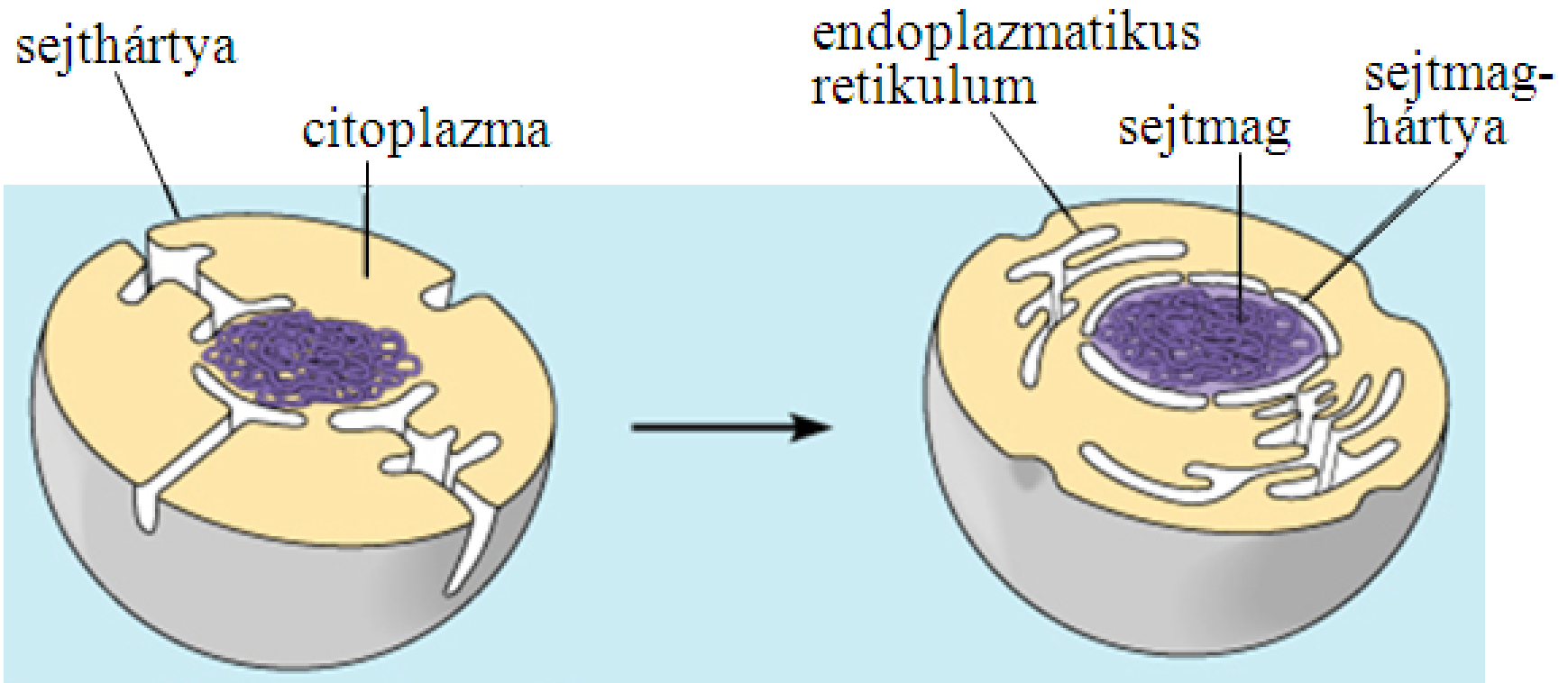
mitokondriumok

kloroplasztiszok

peroxiszóma



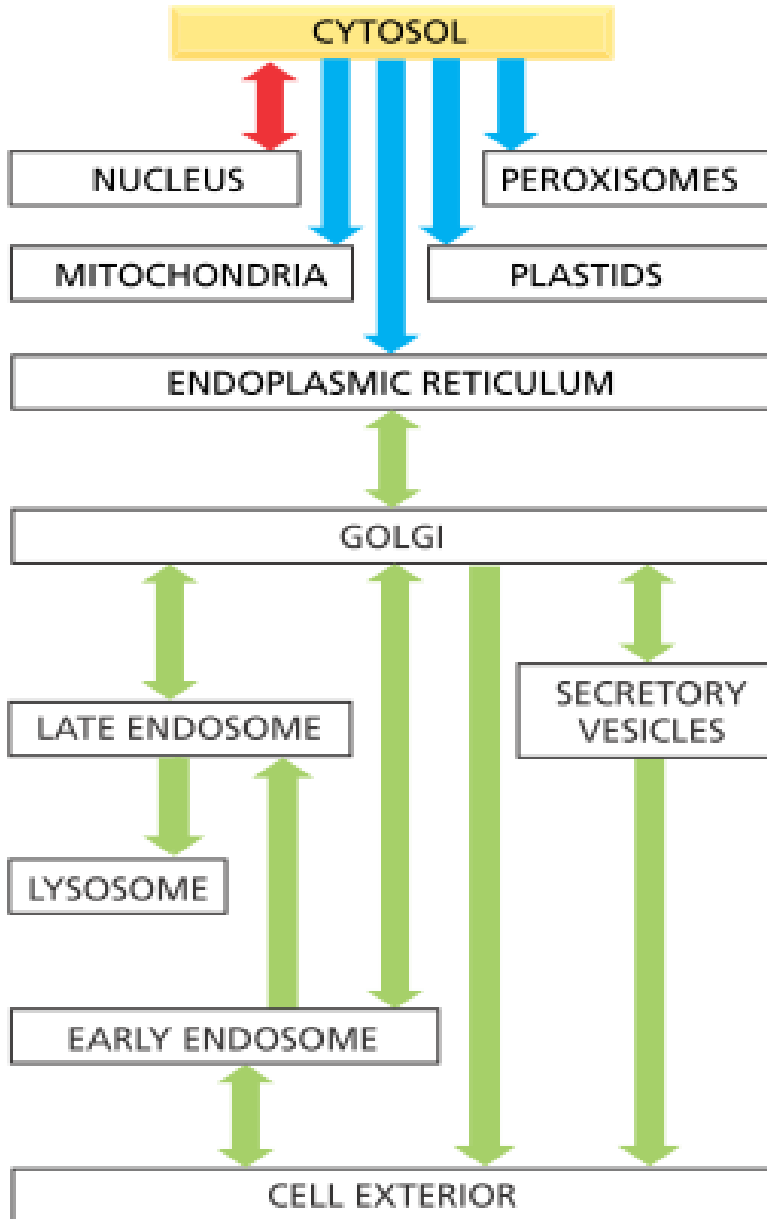
# Evolúciós magyarázat: az endomembrán rendszer eredete



**ősi prokarióta**

**sejt maghártyával  
és belső membrán-  
rendszerrel**

# A fehérjeforgalom áttekintő térképe

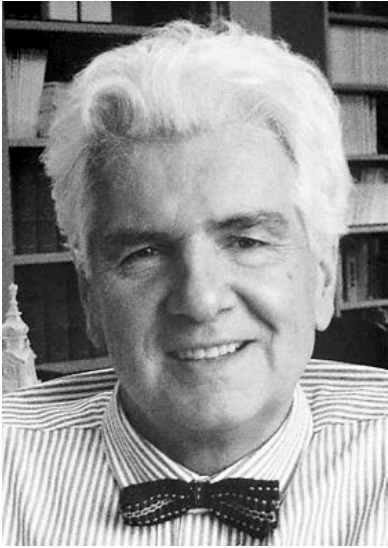


**„gated” (kapuzó) transzport:**  
vizes póruson keresztül –  
ekvivalens terek között!

**Transzmembrán transzport:**  
integráns fehérje-transzlokátor  
által alkotott csatornán  
keresztül

**Vezikuláris transzport:**  
membrán-határolt vezikulákba  
csomagolva – ekvivalens terek  
között!

# A protein-szortírozás (sorting) felfedezője



**Élettani és orvosi Nobel-díj, 1999**

*"for the discovery that proteins have intrinsic signals that govern their transport and localization in the cell".*

A molekuláris sejtbiológia módszereinek egyik kidolgozója, a **szignálemélet** megalapozója

Günter Blobel

- A fehérje integráns részét képező **szignálpeptidek** biztosítják a megfelelő sejtszervecskébe jutást
- Létezik olyan **szállítóapparátus**, amely felismeri ezt a jelet, és biztosítja a célbaérést.

# A sejtmagi transzportfolyamatok



# Sejtmagi transzport

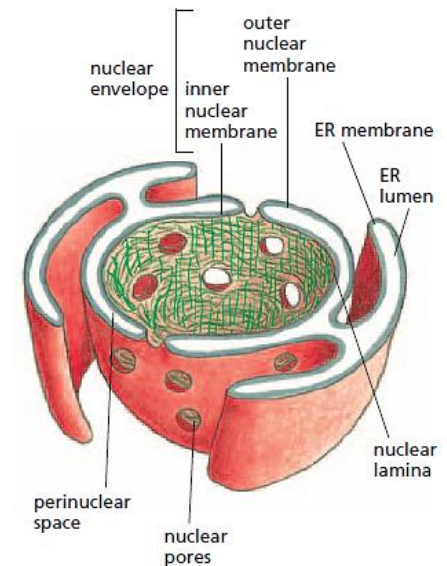
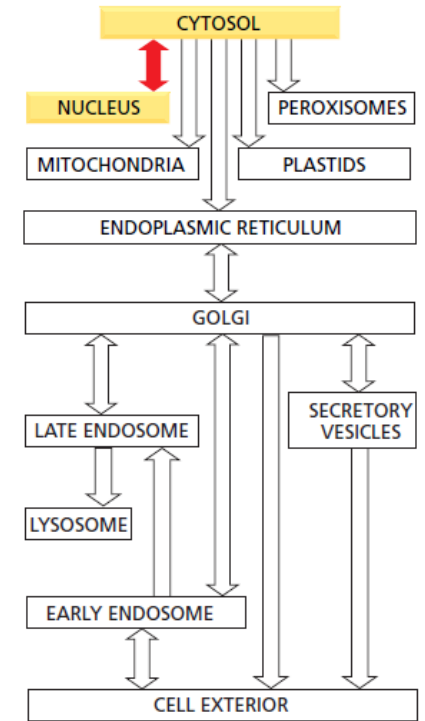
-Mely molekulák közlekednek a sejtmag és a citoplazma között?

-Milyen struktúrán keresztül?

-Mi biztosítja a szelektivitást (szignál, receptor)?

-Mi biztosítja a transzport irányát?

Mi szolgáltatja az energiát?



Mely molekulák közlekednek a sejtmag és a citoplazma között?

### **citoplazma → sejtmag:**

**fehérjék:**

hisztonok

DNS/RNS polimerázok

génszabályozó fehérjék

RNS-processzáló fehérjék

riboszómafehérjék

**nukleinsavak:**

snRNS-ek (snRNP-kben),

vírusgenom

### **sejtmag → citoplazma :**

**fehérjék:**

riboszóma-alegységek

ingázó fehérjék

**nukleinsavak:**

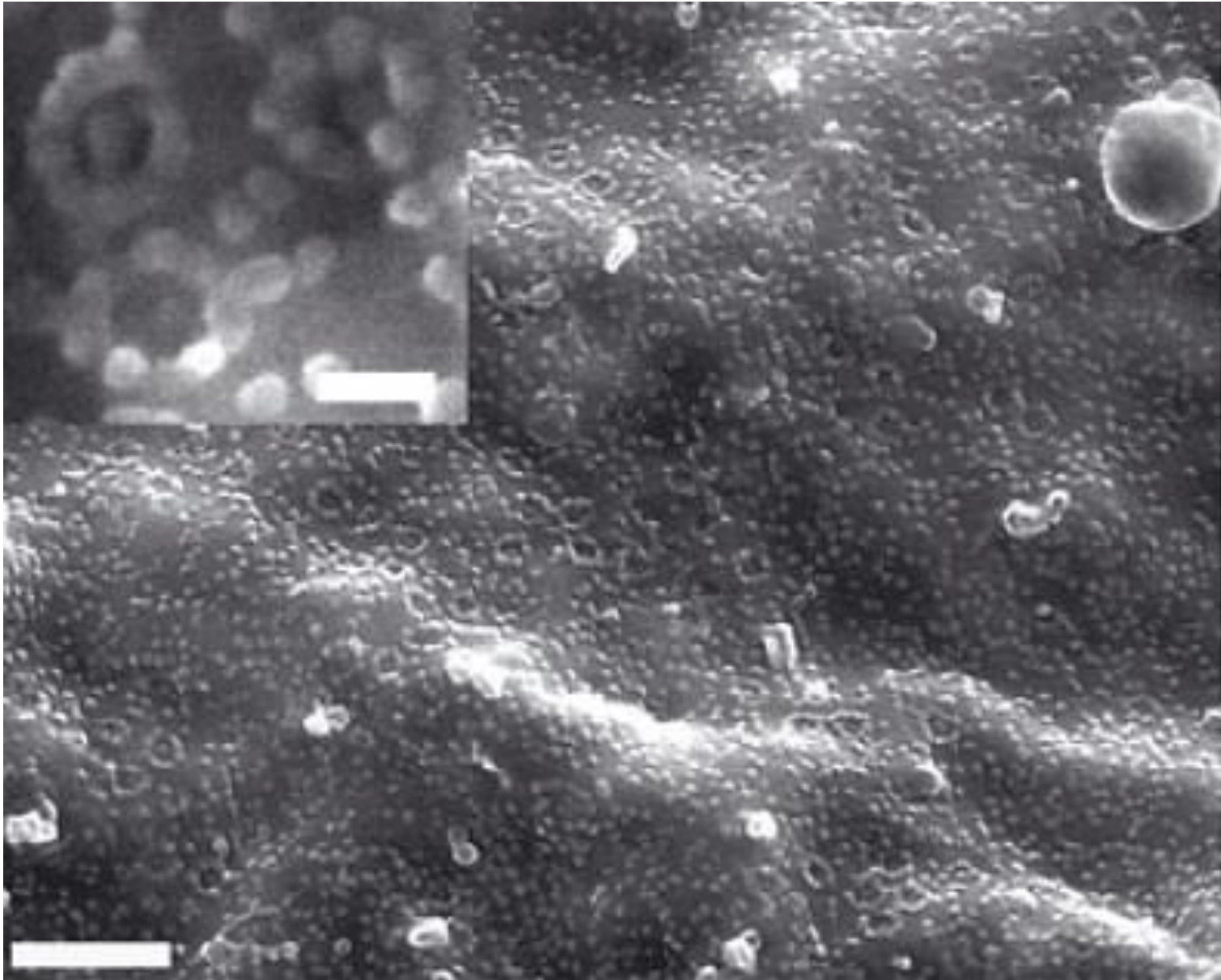
mRNS,

tRNS,(rRNS)

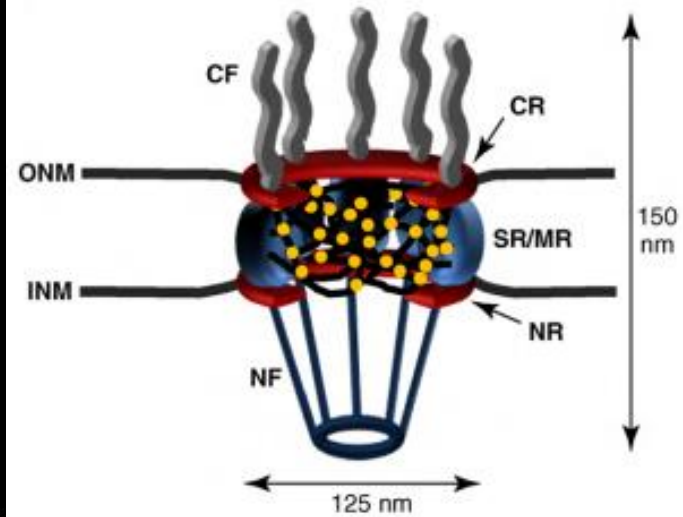
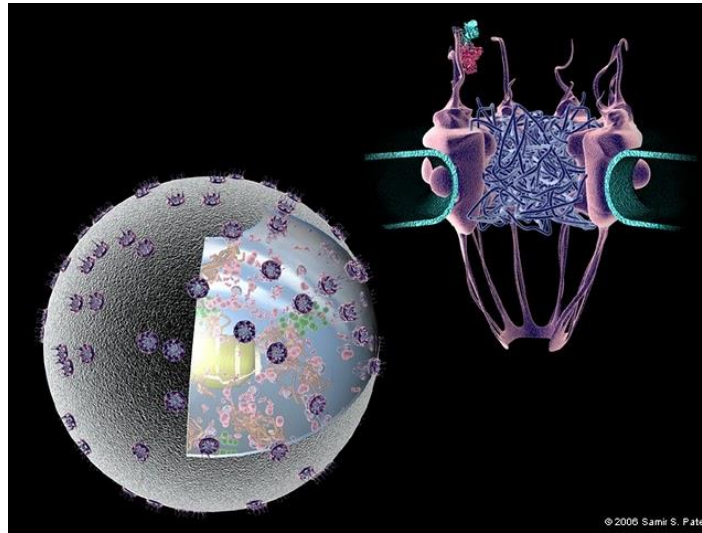
snRNS, miRNS

vírusgenom

# Milyen struktúrán keresztül zajlik a sejtmagi transzport?



## Néhány adat:



- 125000 kDa = ~ 30 x riboszóma mérete
- ~30 különböző alegység - nucleoporinok, de többszörös kópiában
- átlagosan 3000-4000 db egy emlős sejt maghártyájában
- 500 makromolekula/sec egy NPC-n keresztül
- Egyszerre mindkét irányban folyhat transzport
- Dinamikusan változó pórusméret: ~9-30 nm

# A nukleáris pórus komplex (NPC) szerkezete I

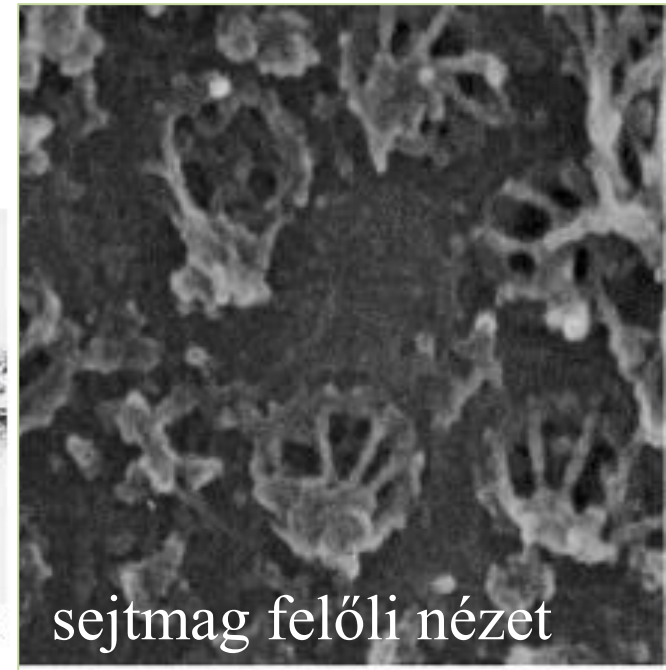
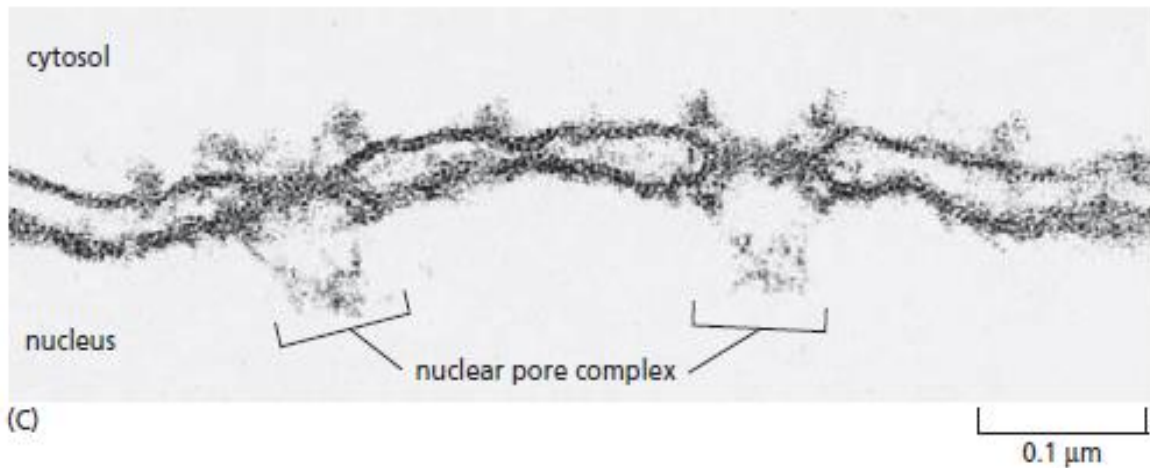
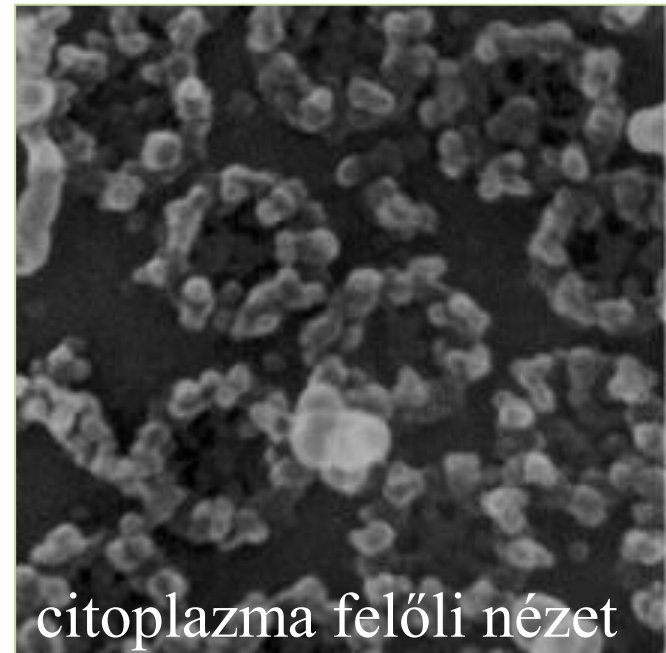
- oktagonális szimmetria

- felépítés:

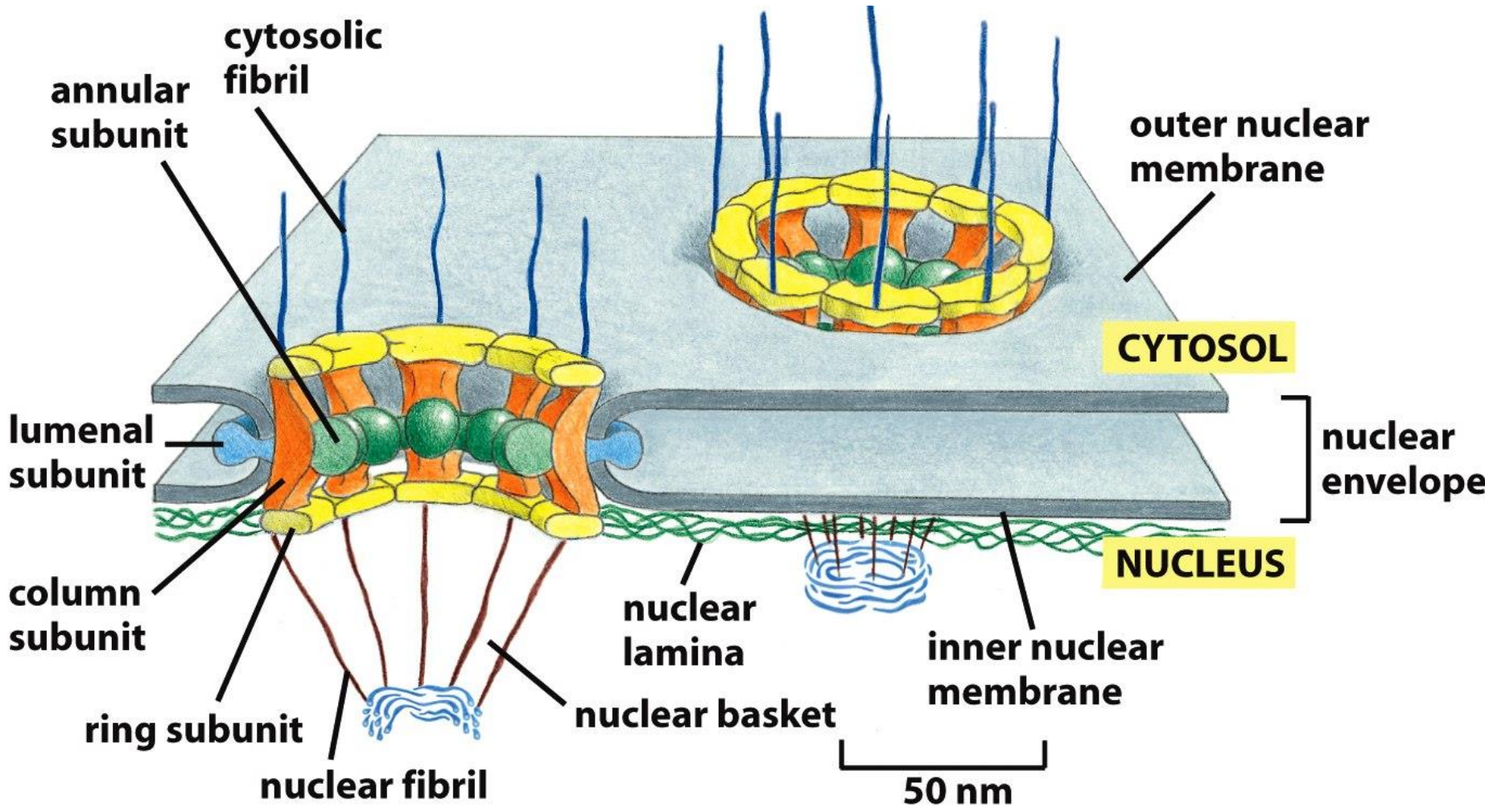
gyűrűk és küllők

citoplazmatikus fibrillumok

sejtmagi oldal: kosárszerű háló



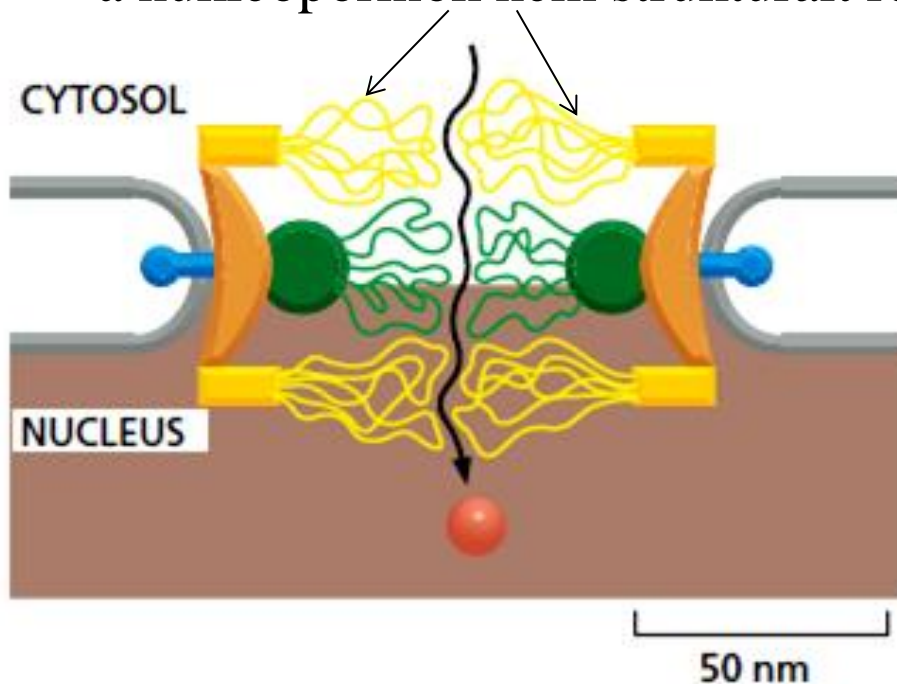
# A nukleáris pórus komplex (NPC) szerkezete II



# Hogyan juthatnak át a makromolekulák az NPC-n?

- kisméretű molekulák passzív diffúzióval
  - < 5 kDa: szabadon átjárható az NPC
  - 5 kDa < 60 kDa: mérettől függően egyre lassabban
- nagyméretű molekulák (100-200 kDa) aktív transzporttal, receptorok segítségével

Fenilalaninban és glicinben gazdag (FG-) régiók a nukleoporinok nem strukturált részein



size of molecules that enter nucleus by free diffusion



size of macromolecules that enter nucleus by active transport

Milyen szignál, receptor biztosítja a szelektivitást? Mi biztosítja a transzport irányát?  
Mi szolgáltatja az energiát?



# A sejtmagba irányított fehérjék nukleáris lokalizációs szignált (NLS) tartalmaznak

Az NLS bárhol lehet a fehérjén belül. Jelenléte szükséges...

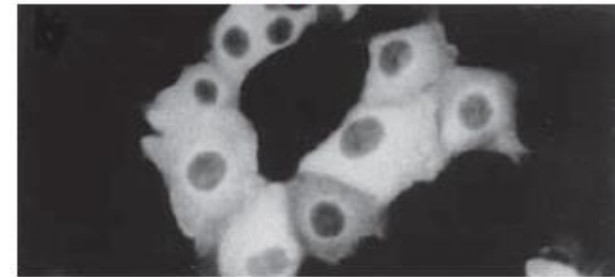
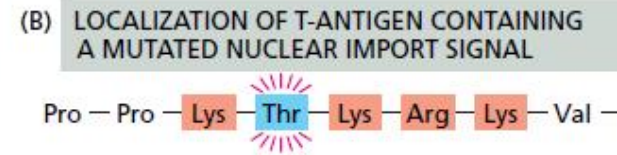
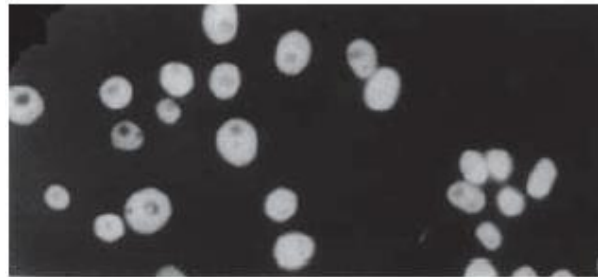
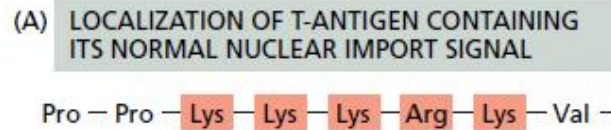
## Typical NLSs

Monopartite NLS (SV40 large-T antigen)

**PKKKRKV**

Bipartite NLS (nucleoplasmin)

**KRPAATKKAGQAKKKL**



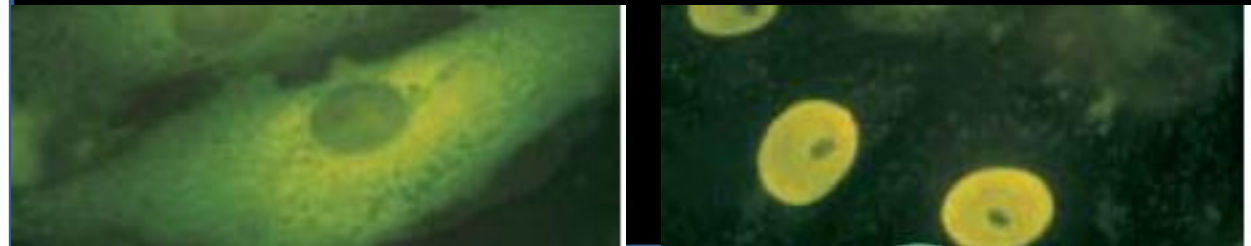
Alberts: Molecular Biology of the Cell, 2008

Az első NLS felfedezése:

az SV40 vírus mutáns “large T antigén”-je nem került be a sejtmagba

és elégséges a sejtmagba jutáshoz.

Fusion of a nuclear localization signal (NLS) to a cytoplasmic protein causes the protein to enter the cell nucleus.



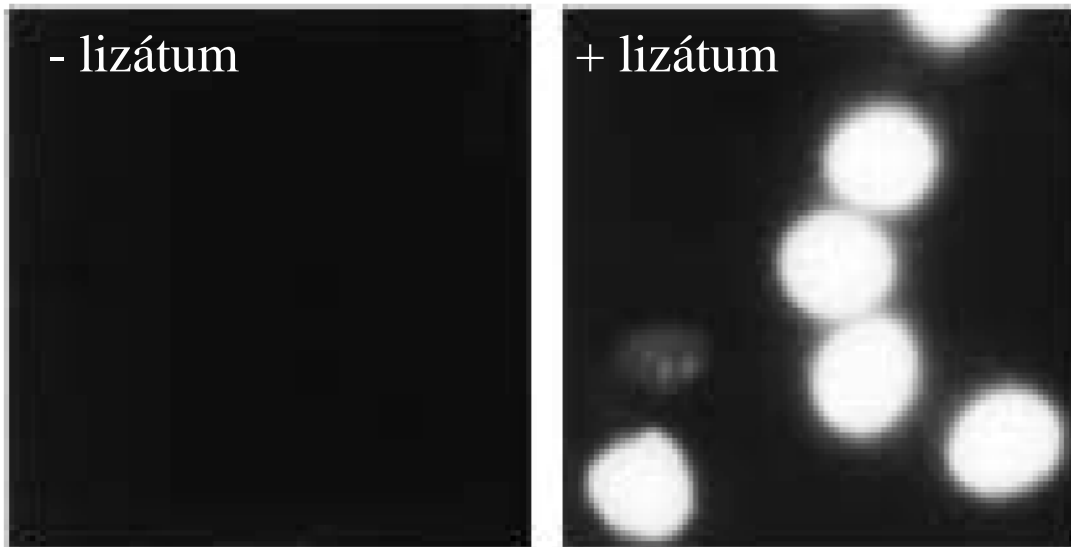
Lodish: Molecular Cell Biology, 2003

# Milyen citoplazma-komponensek szükségesek az NLS-tartalmú fehérjék sejtmagi importjához?

-HeLa sejteket digitoninnal permeabilizáltak, így a plazmamembrán átjárható lesz, míg a sejtmaghártya és az NPC intakt marad.

-SV40 “large T antigén”-ből származó NLS-peptidet fluoreszcens festékkel jelöltek, és a permeabilizált sejteket ezzel és különböző összetételű citoszol-lizátummal inkubálták (1993).

Ha a lizátumban jelen voltak az importhoz szükséges komponensek:



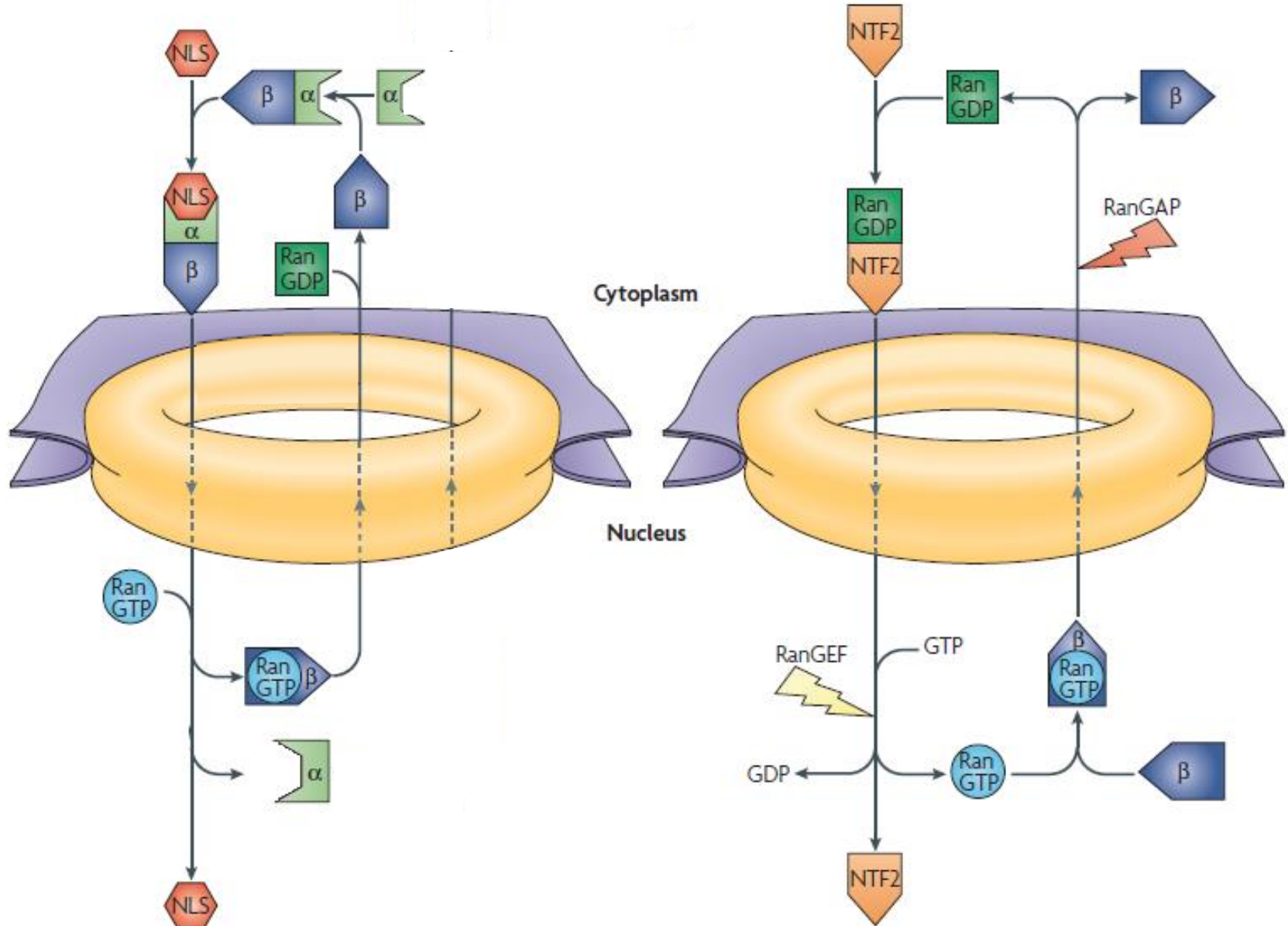
Négy fehérjét izoláltak:

- importin  $\alpha$
- importin  $\beta$
- Ran
- NTF2

# Az azonosított komponensek jellemzői

- **importin  $\alpha$** : ez a molekula képes kötni a klasszikus NLS-t hordozó fehérjét - adaptor funkció. Importin  $\beta$  hiányában csökken az affinitása a cargóhoz.
- **importin  $\beta$** : köti az importin  $\alpha$ -t, és felismeri az FG-nukleoporinokat (és egyes struktúr nukleoporinokat is). Ha RanGTP kapcsolódik hozzá, elengedi az importin  $\alpha$ -cargó komplexet.
- **Ran**: monomer GTP-áz (kis G-fehérje). A RanGAP (GTPase activating protein) hatására a kötött GTP-t GDP-vé hidrolizálja. A RanGEF (guanine exchange factor) hatására pedig elengedi a kötött GDP-t és GTP-t köt helyette.
- **NTF2**: Specifikusan a RanGDP-t kötő transzport fehérje, szintén FG-nukleoporinok segítségével közlekedik.

# A klasszikus sejtmagi import folyamata



# Sejtmagi transzport folyamatok: A RanGTP/RanGDP grádiens szerepe

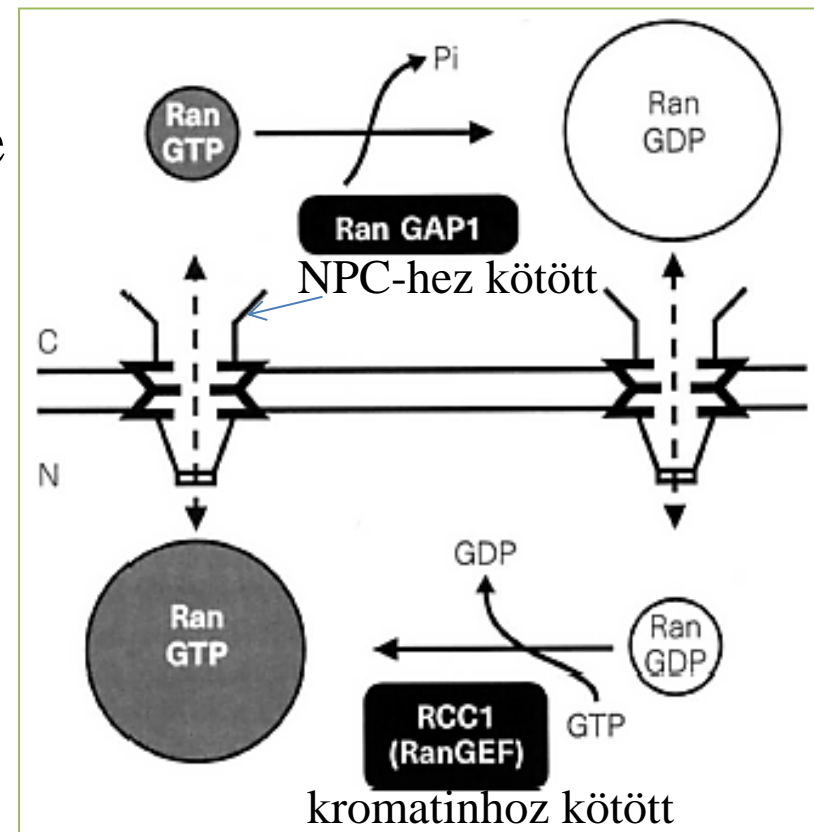
- Az importin komplex az FG-régiókhöz kapcsolódva közlekedik a pórus belsejében. A mozgásnak nincs irányultsága, és nem energiafüggő.

- A cargo transzportjának iránya attól függ, hogy a komplex hol találkozik RanGDP-vel illetve RanGTP-vel.

- Az NPC sejtmagi oldalán a RanGTP, a citoplazma felé néző oldalán a RanGDP koncentrációja magas.

- A RanGDP/RanGTP grádiens a sejtmagi lokalizációjú RanGEF és a citoplazmatikus RanGAP hozza létre.

- A sejtmagi transzportnak ez a fázisa (a GDP-GTP-csere) energiafüggő!



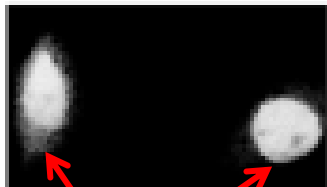
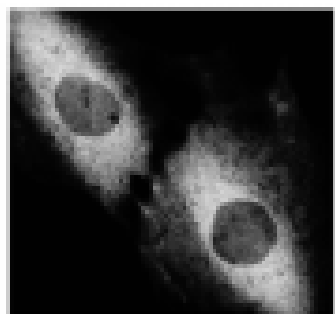
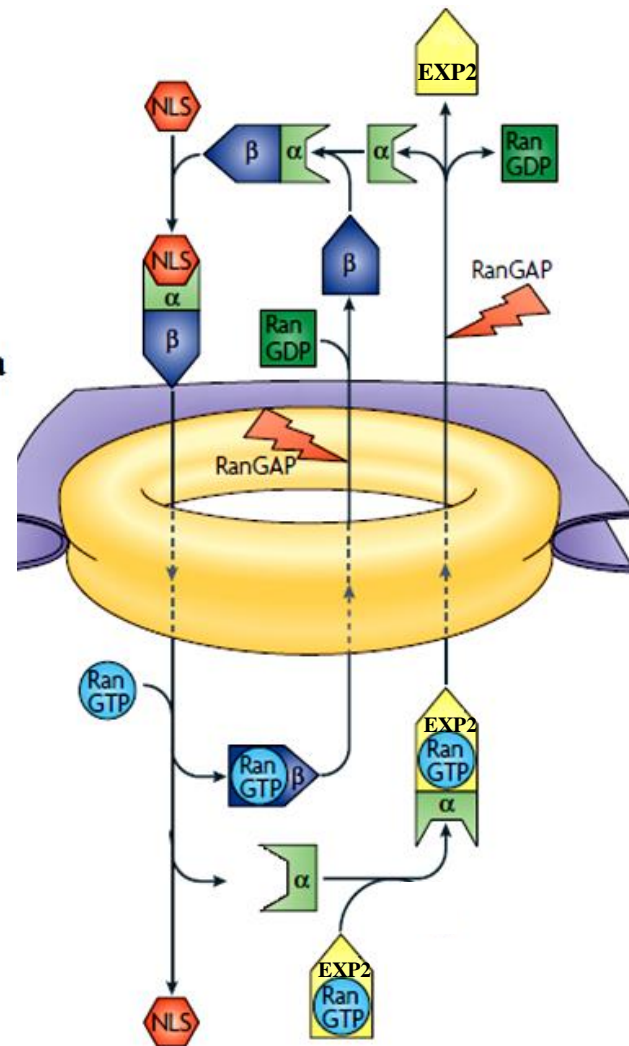
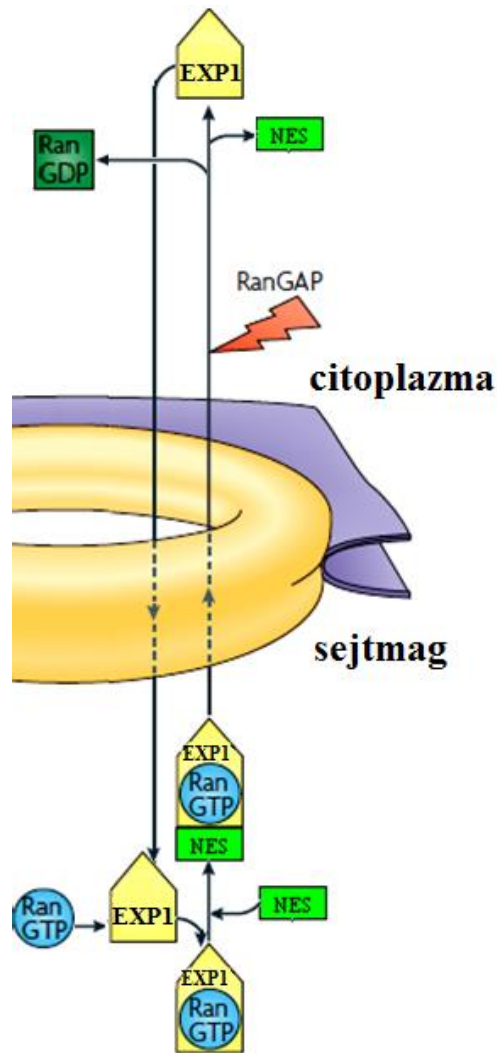
# A klasszikus sejmagi export folyamata

Később kiderült, hogy a magból újra kijutó fehérjék egy része konzervált, leucinban gazdag nukleáris export szignált (NES) tartalmaz.

Dsk-1 (308-320)	SL EGAV SEI SL RD
MAPKK (32-44)	AL QKKL EEL EL DE
PKI $\alpha$ (37-46)	L ALKL AGL DI
Rev (73-83)	L QL PPL ERL TL

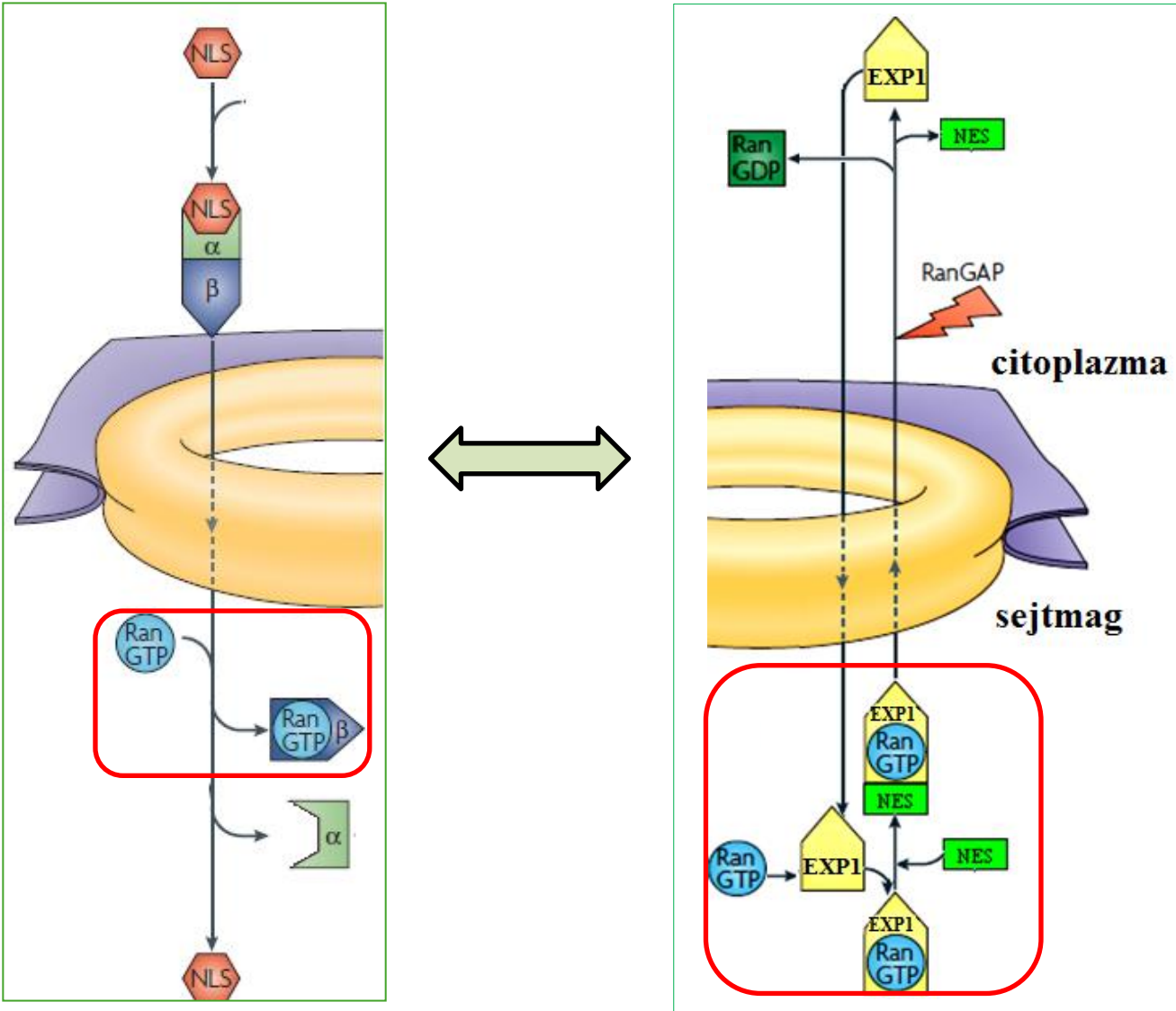
Míg az exportin1 a klasszikus leucin-gazdag NES-t tartalmazó fehérjéket szállítja ki,

addig az exportin2 specifikusan az importin $\alpha$  „exportőre”



NES nélkül nem jut ki a fehérje a magból.

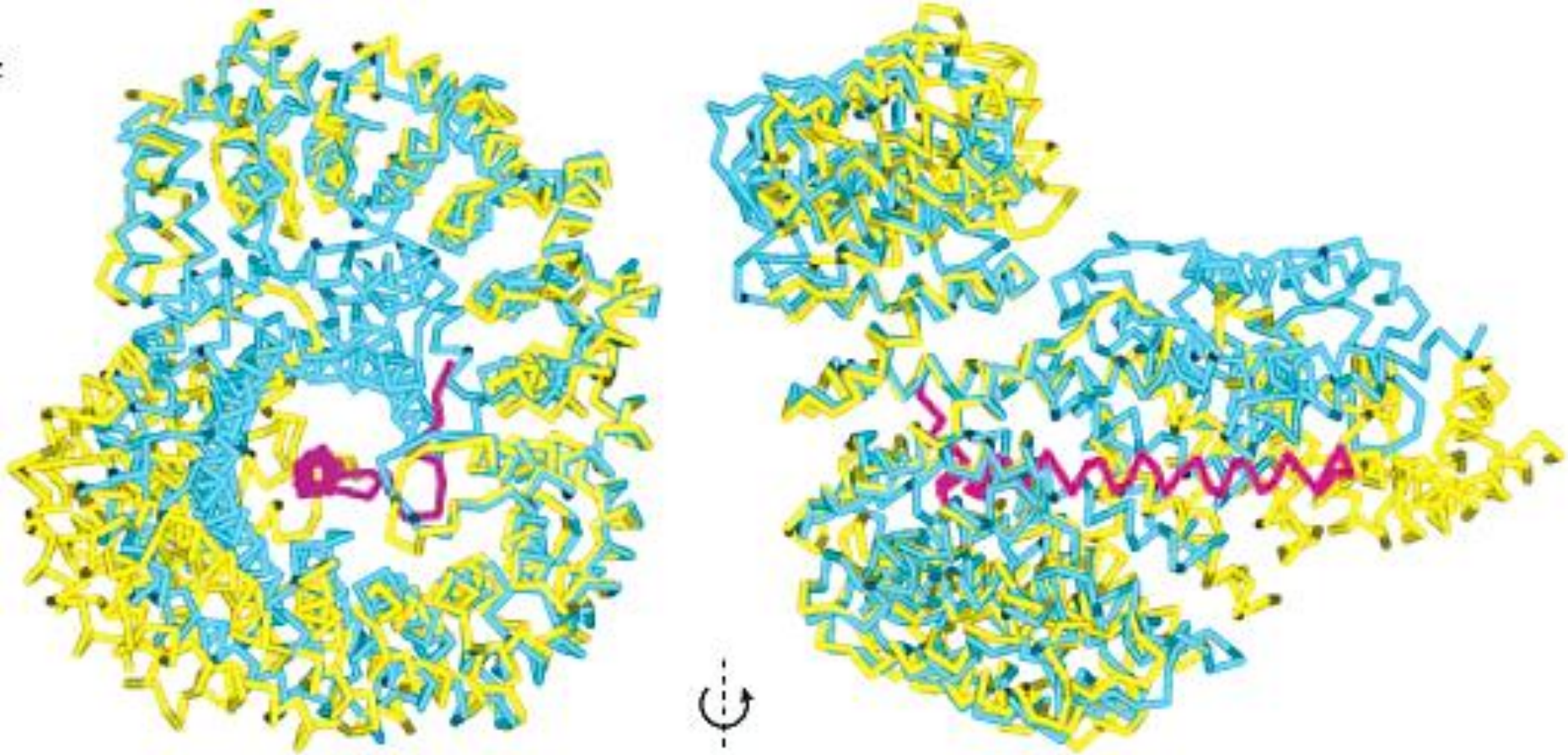
Hogyan lehetséges, hogy az exportáló receptorok a RanGTP hatására nem elengedik, hanem megfogják a cargót?



# A RanGTP kötés hatása az importin $\beta$ szerkezetére

**kék:** az importin  $\beta$  konformációja RanGTP-kötés nélkül

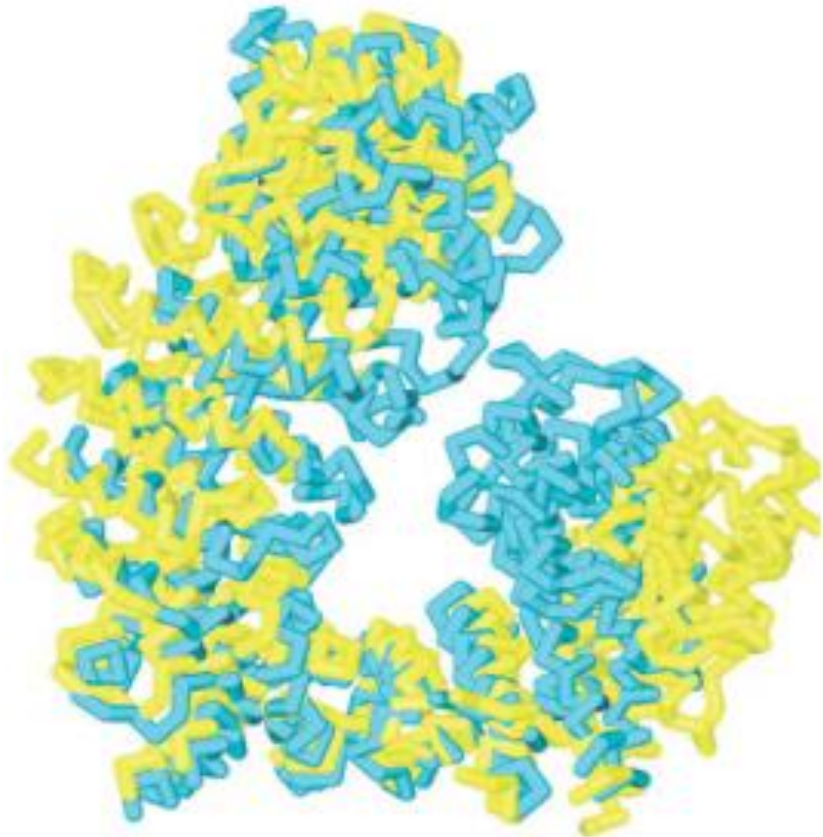
**sárga:** az importin  $\beta$  konformációja RanGTP-kötés esetében





# A RanGTP kötés hatása az exportinok szerkezetére

Az exportin1 és exportin2 szerkezete hasonló az importin  $\beta$ -éhoz, de vele ellentétben a RanGTP hatására bekövetkező konformációváltás hatására *éppen alkalmasak* lesznek a cargo kötésére.



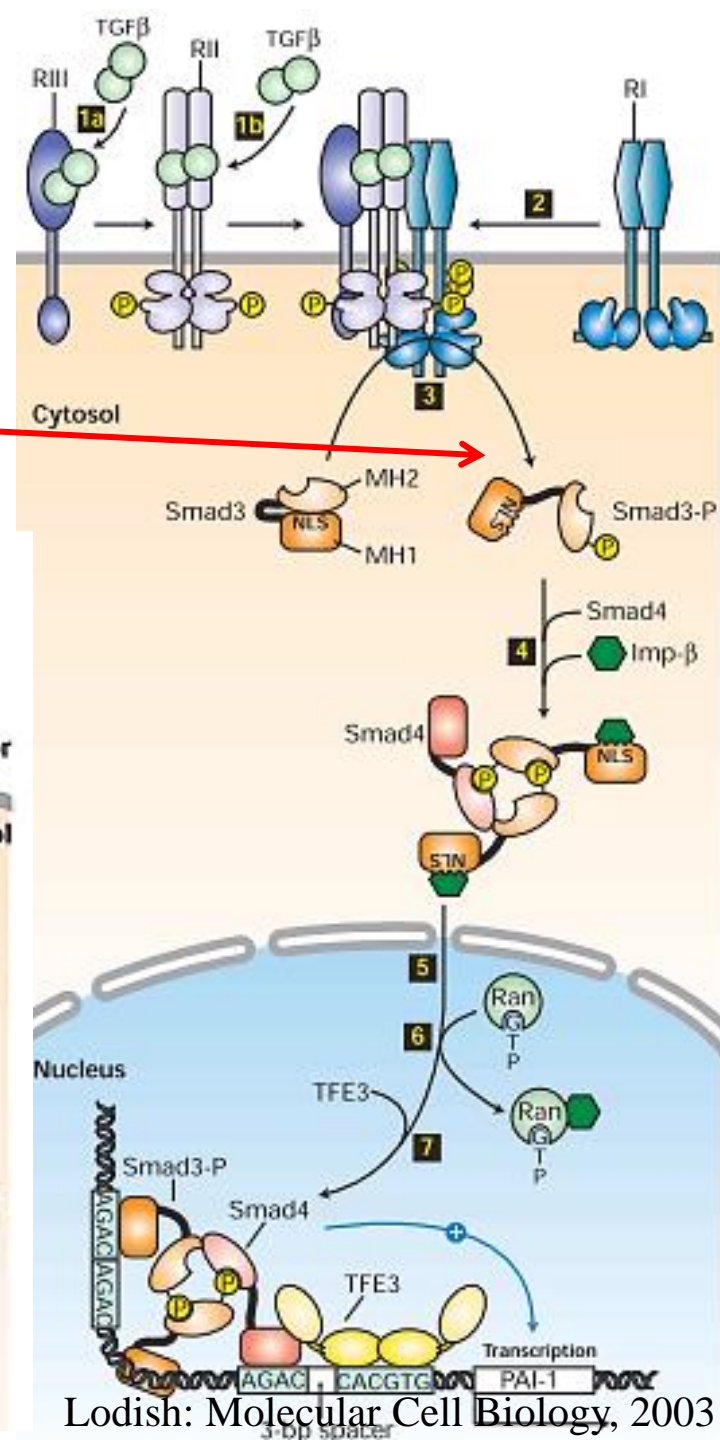
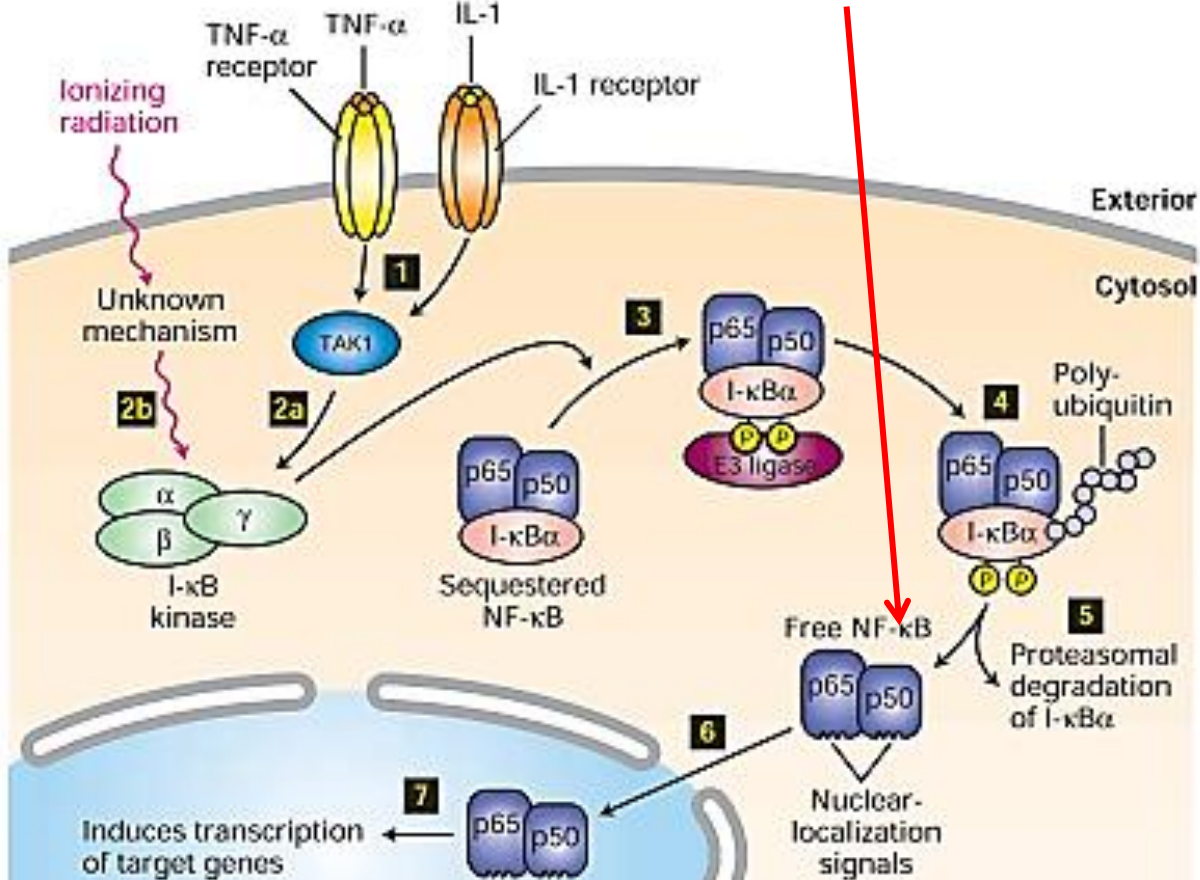
**kék:** az exportin2 konformációja  
RanGTP-kötés nélkül

**sárga:** az exportin2 konformációja  
RanGTP-kötés esetén

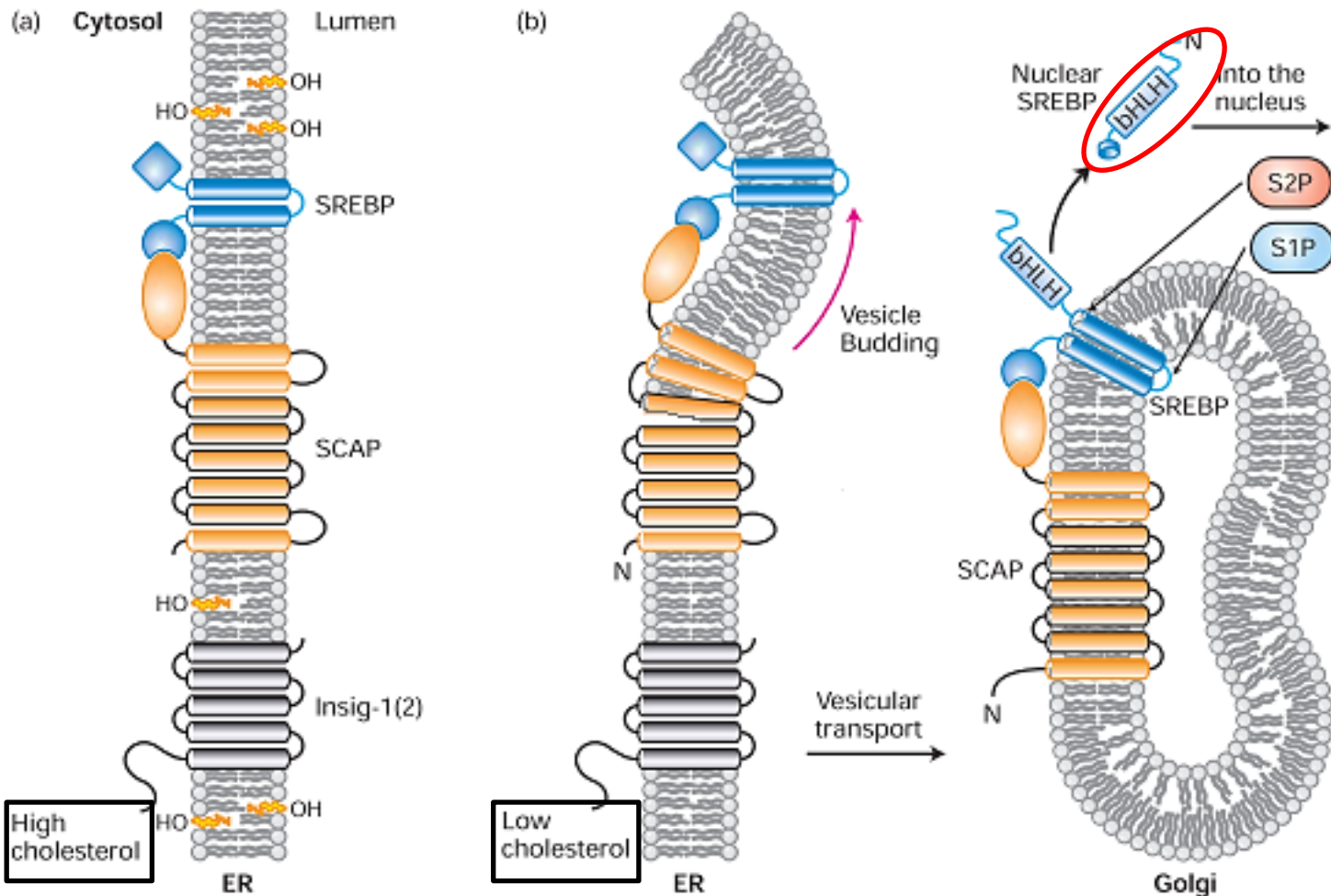
# Példák transzkripciós regulátorok lokalizációjának szabályozására I: a szignálhoz férés gátolt

Az NLS akkor kerül a felszínre, ha:

- konformációváltozás következik be
- gátló faktorok kapcsolódnak le



# Példák transzkripciós regulátorok lokalizációjának szabályozására II: immobilizálás



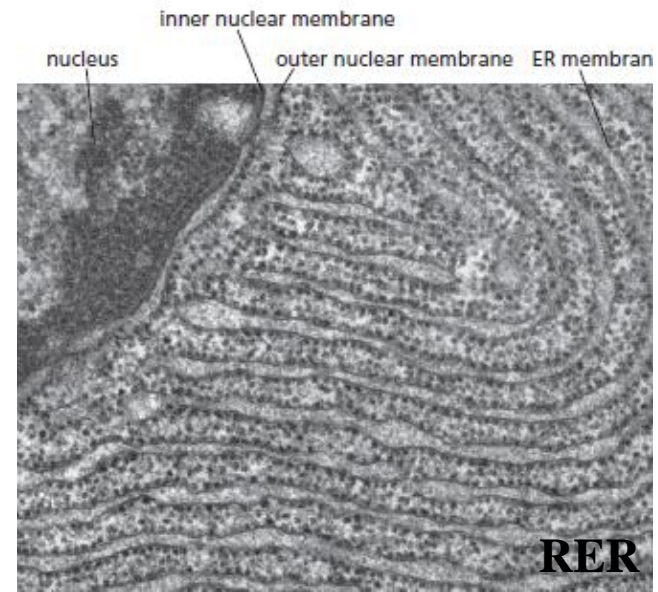
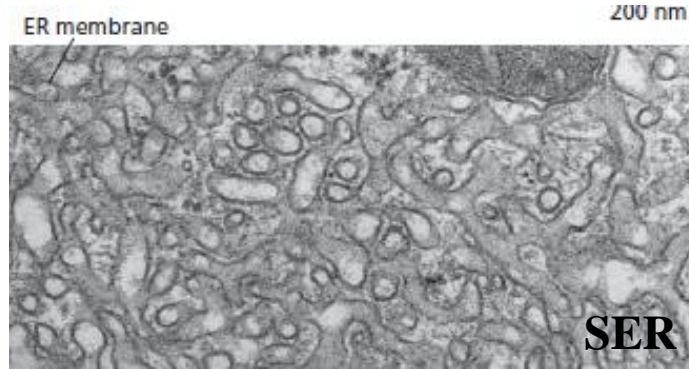
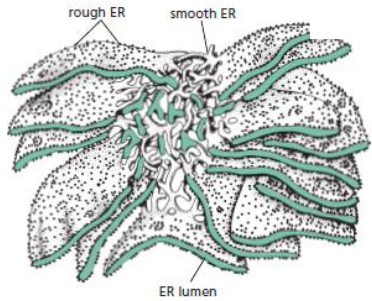
Az ER-ben lokalizálódó SREBP (steroid responsible element binding protein) transzmembrán doménjei “kikötik” a fehérjét. Koleszterin-hiány esetében a SREBP vezikuláris transzporttal a Golgi-készülékbe kerül, ahol Golgi-specifikus enzimek levágják az NLS-t is tartalmazó citoszolikus domént → a magba jut

film

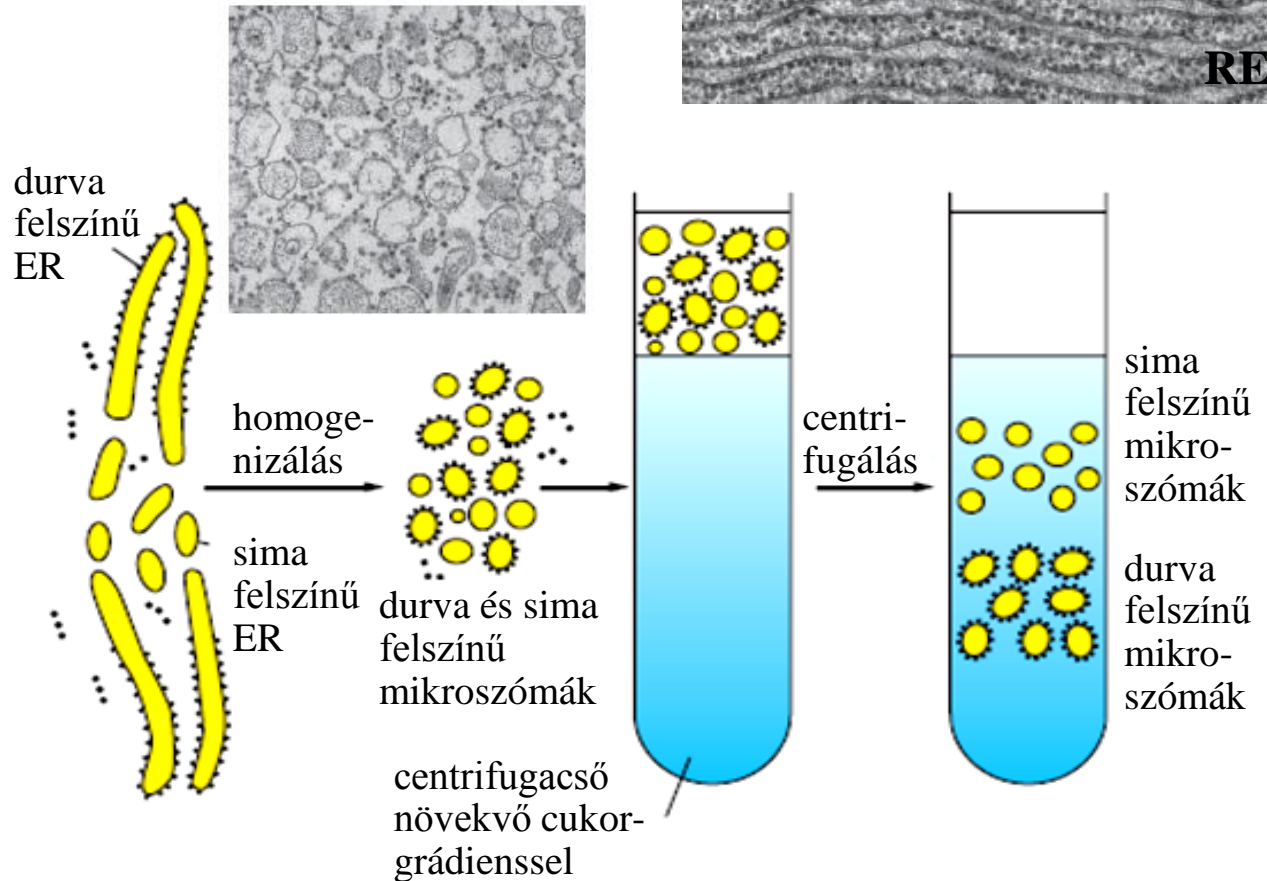
<https://sites.google.com/site/sspatel/nuclearporecomplex>

# Transzport az endoplazmatikus retikulumba

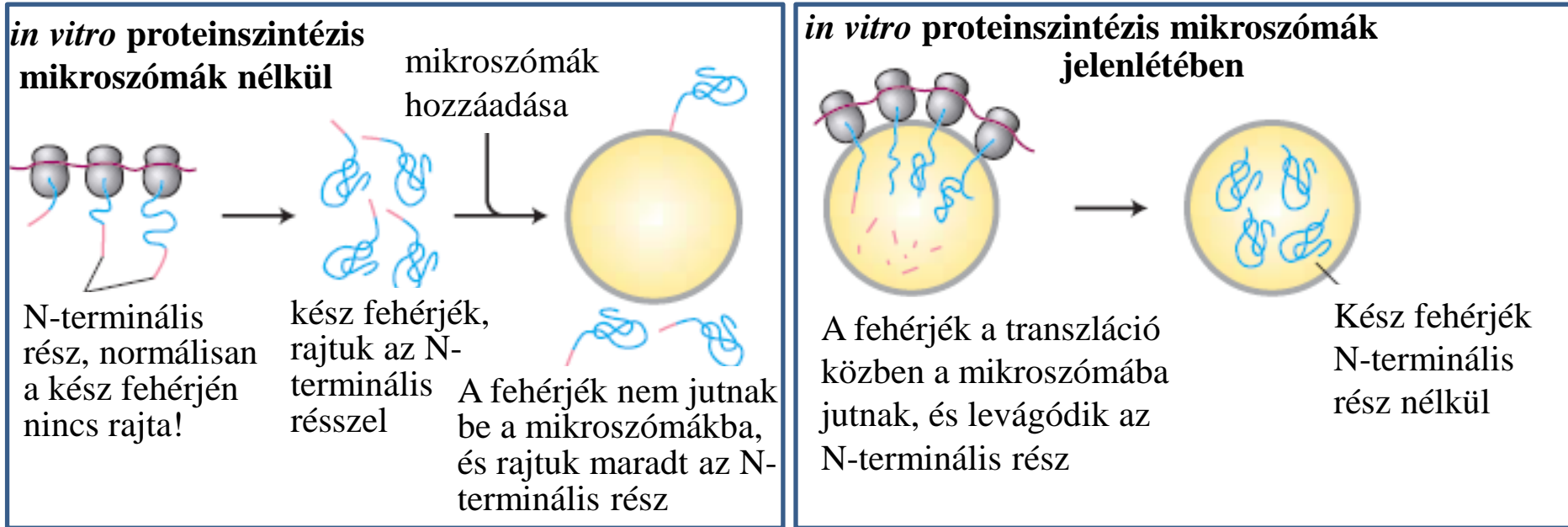
# Az ER működésének vizsgálata: mikroszómák



**George Palade, 1912-2008**  
Nobel-díj: 1974 (A.Claude, de Duve)



# Fehérjeimport az ER lumenébe



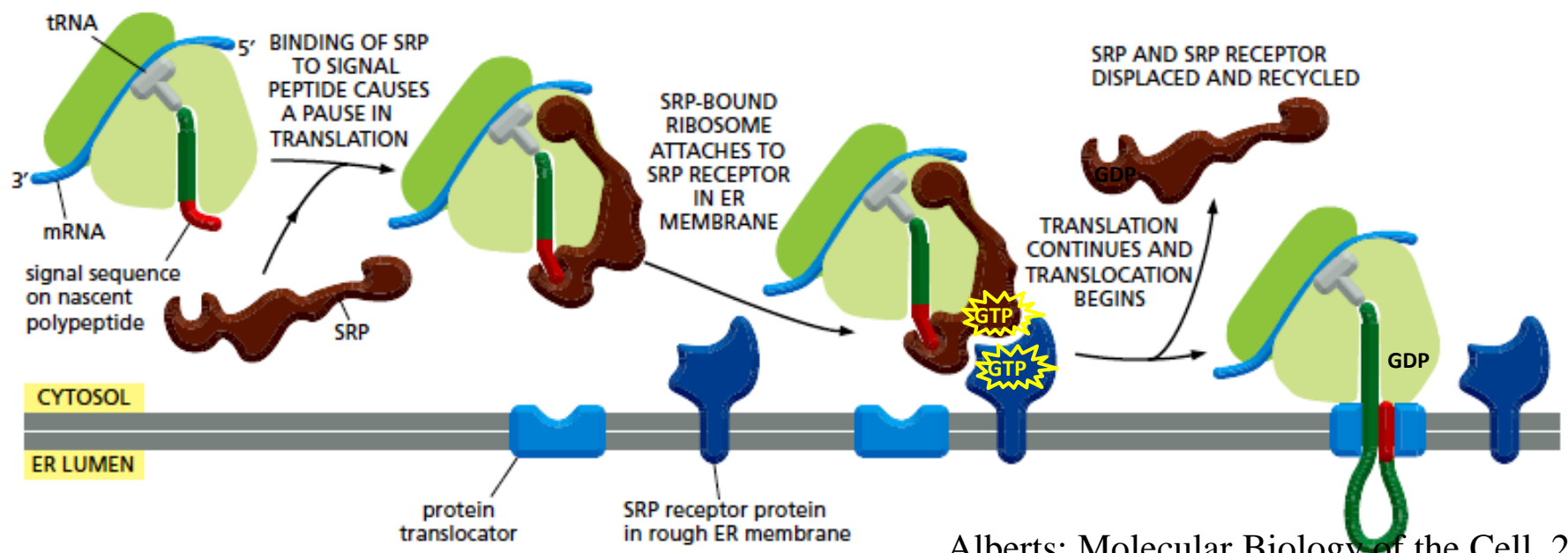
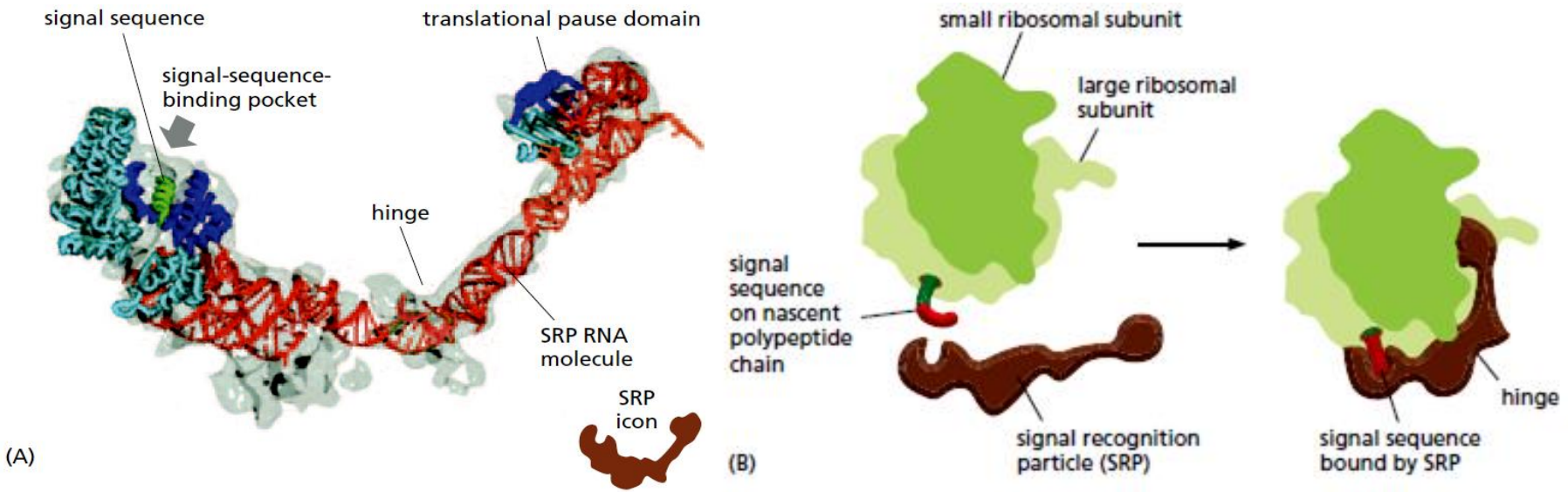
- Maximum kb. 70 aminosav szintetizálódhat meg szabad riboszómán, hogy az ER lumenébe kerülhessen a fehérje - ebből ~ 30 a „csatornában”, a többi ~ 40 hozzáférhető → ez tartalmazza a szignált



## kotranszlációs transzlokáció

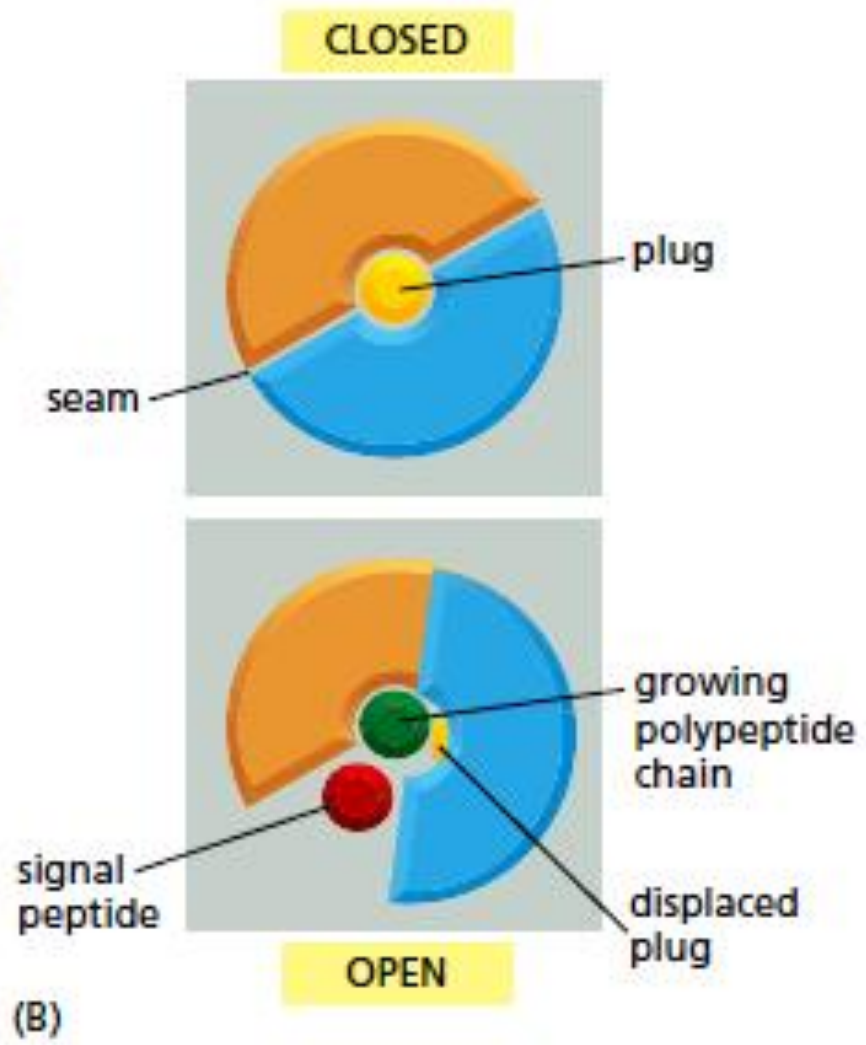
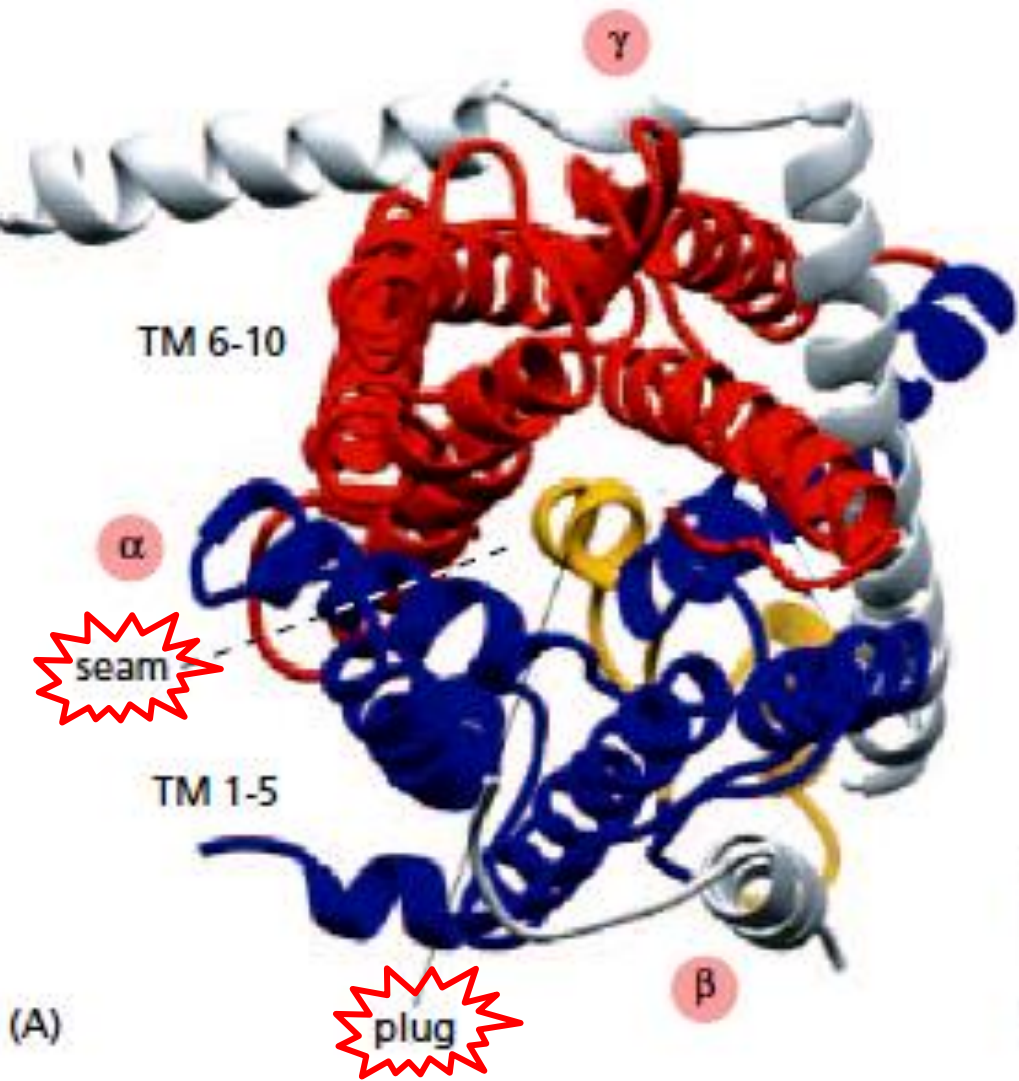
Maga a szignál: 8< hidrofób aminosav. Levágódik!

# Az ER-szignált az SRP komplex ismeri fel, majd membrán-receptorához szállítja

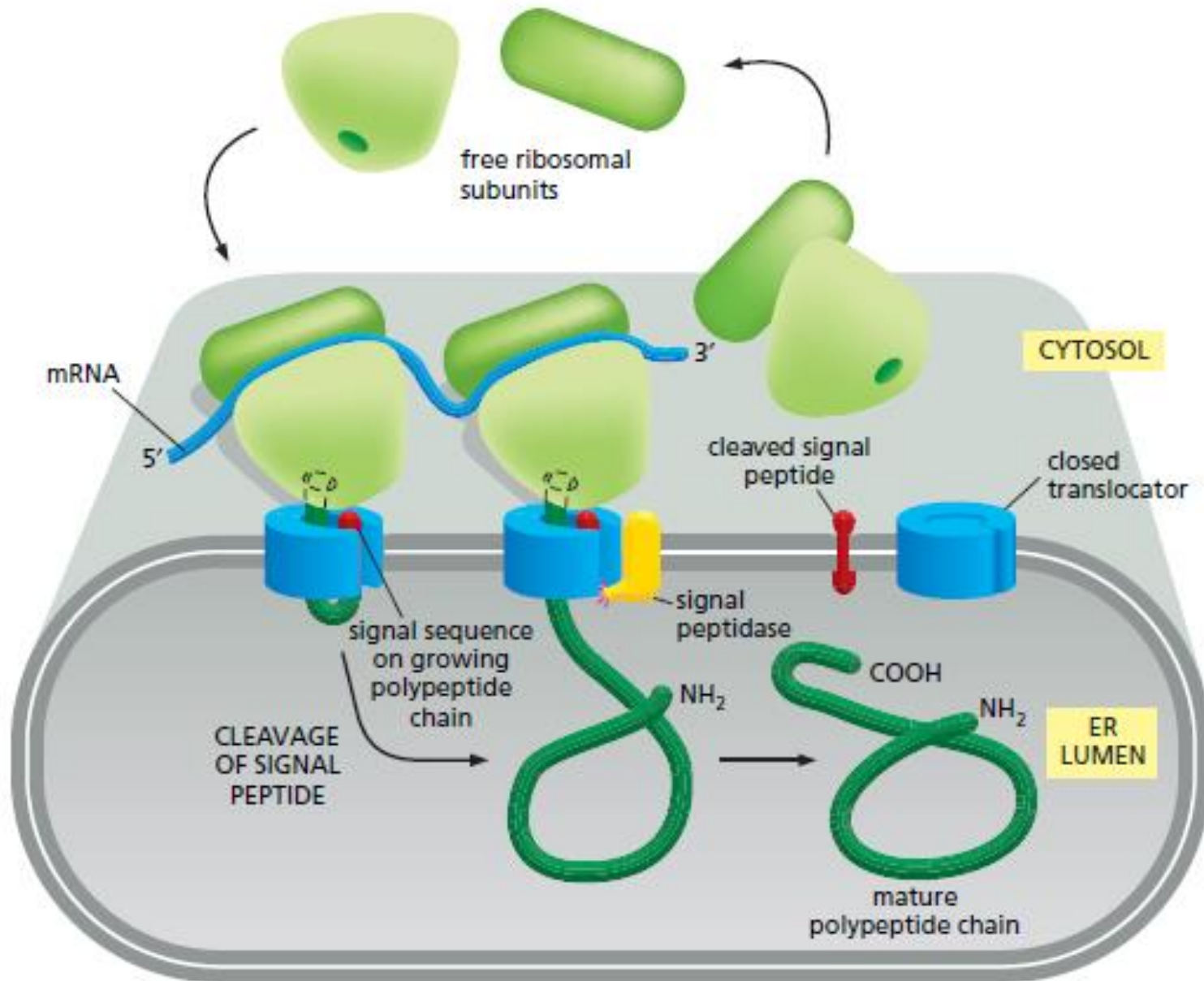




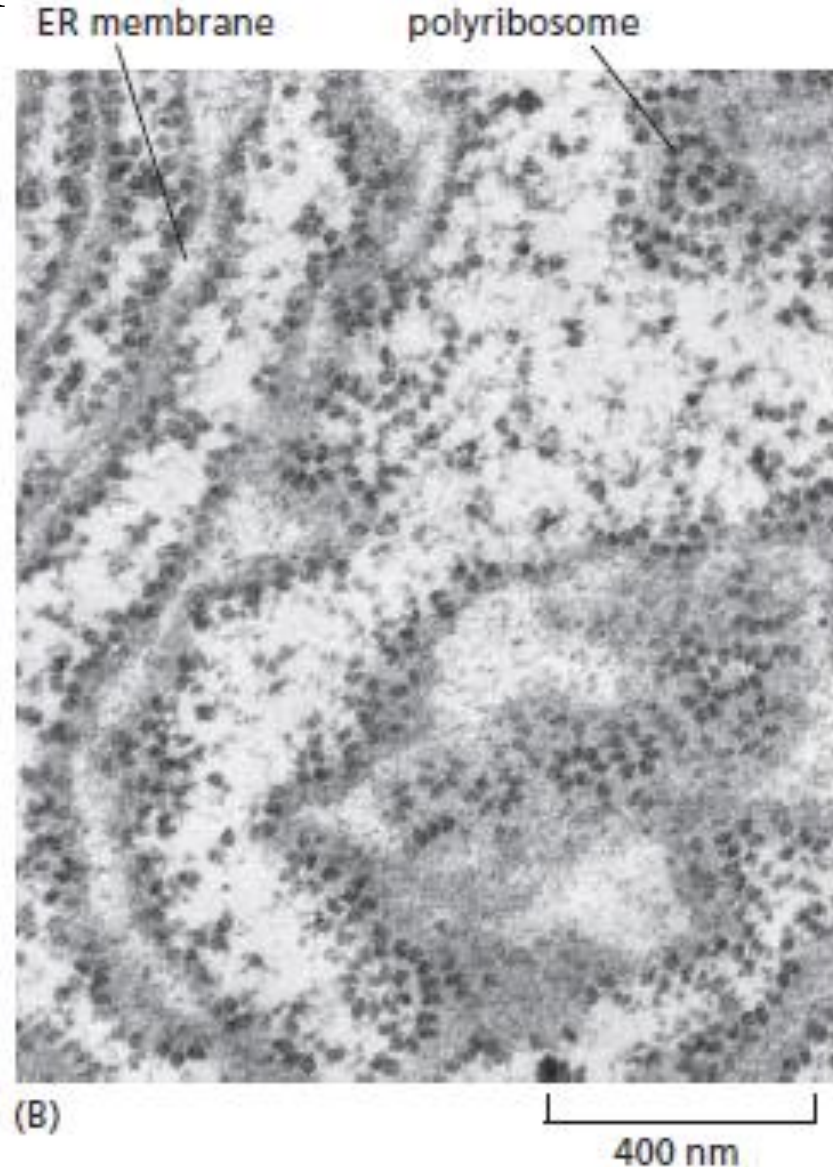
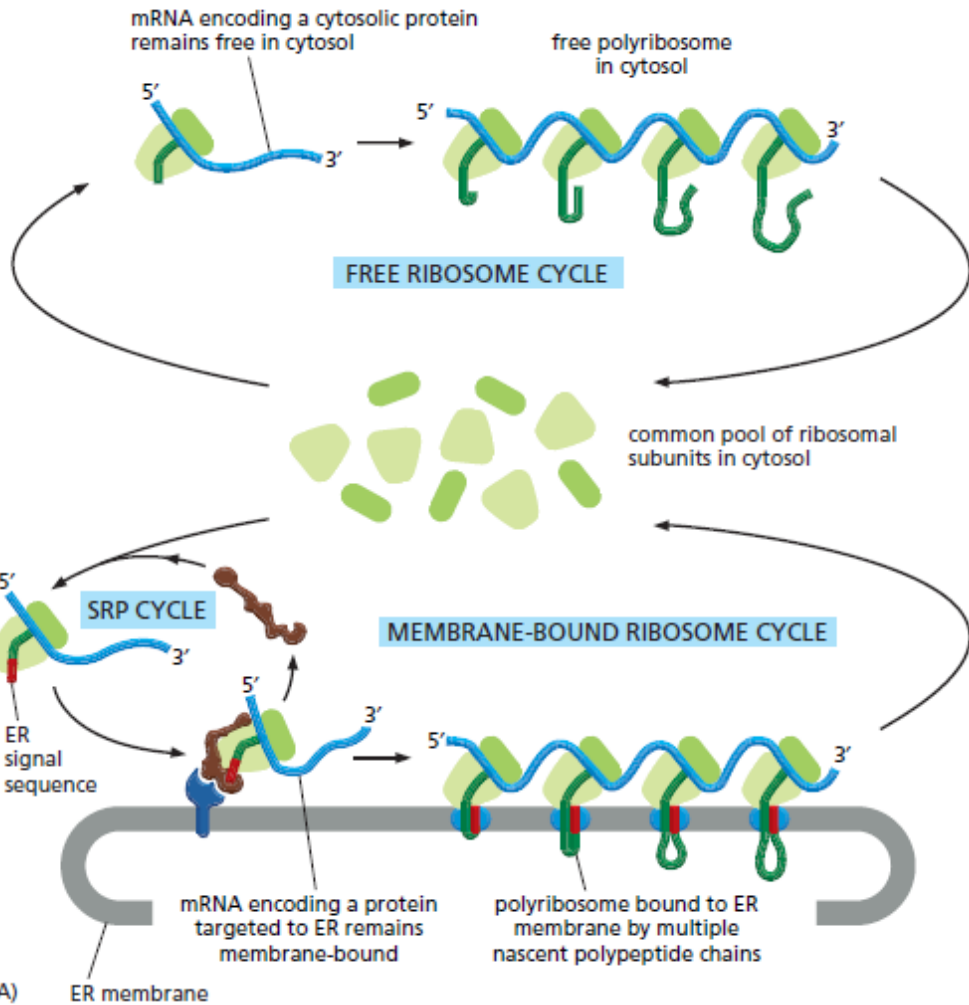
# A transzlokátor csatorna (Sec61 komplex) szerkezete (felülnézet)



# Az ER lumenébe történő fehérjeimport vázlatja



# Az mRNS akár folyamatosan az ER membránhoz kötve maradhat egy poliriboszóma komplex részeként



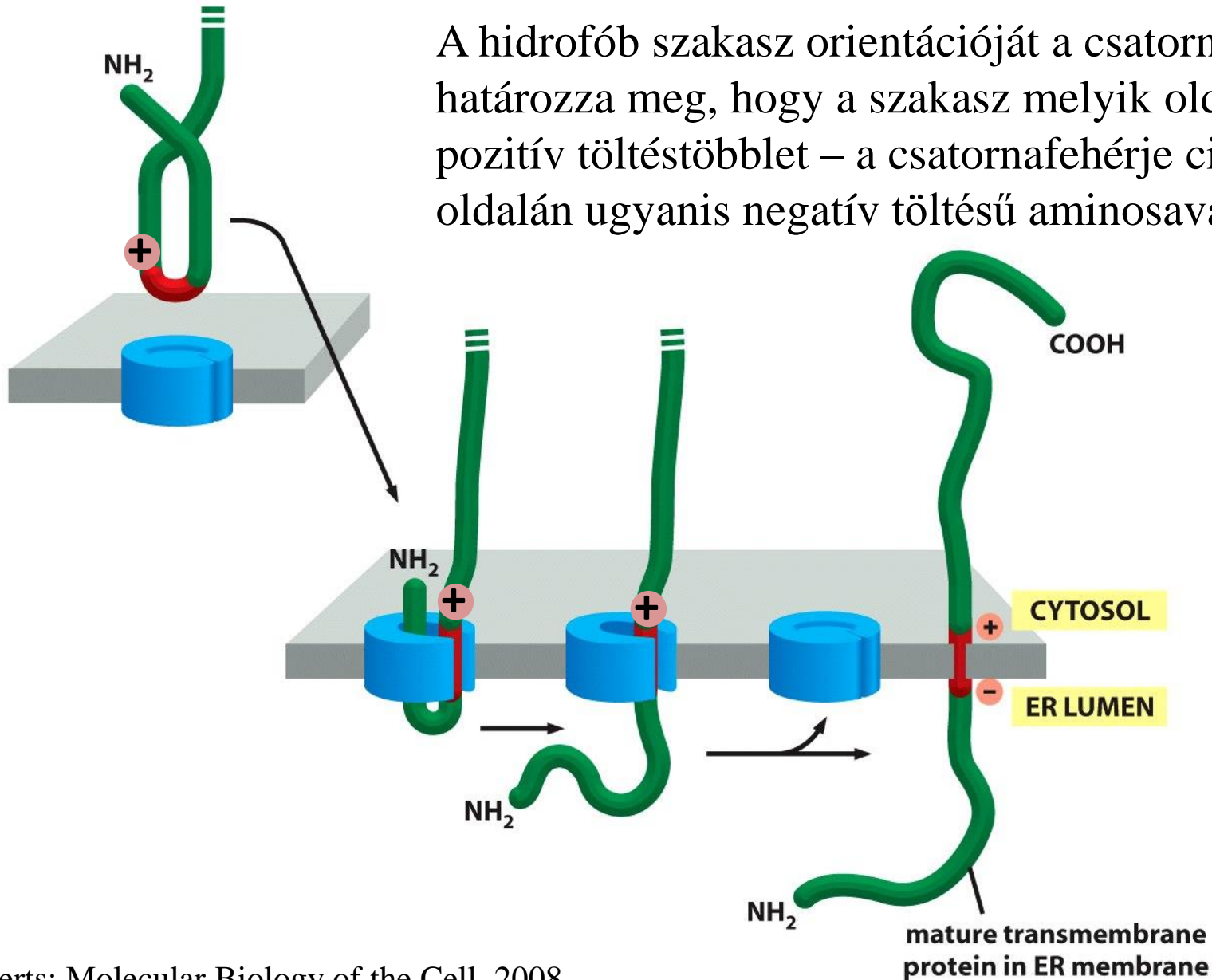
Csak a riboszómák reciklizálódnak

## Membránfehérjék importja az ER-be

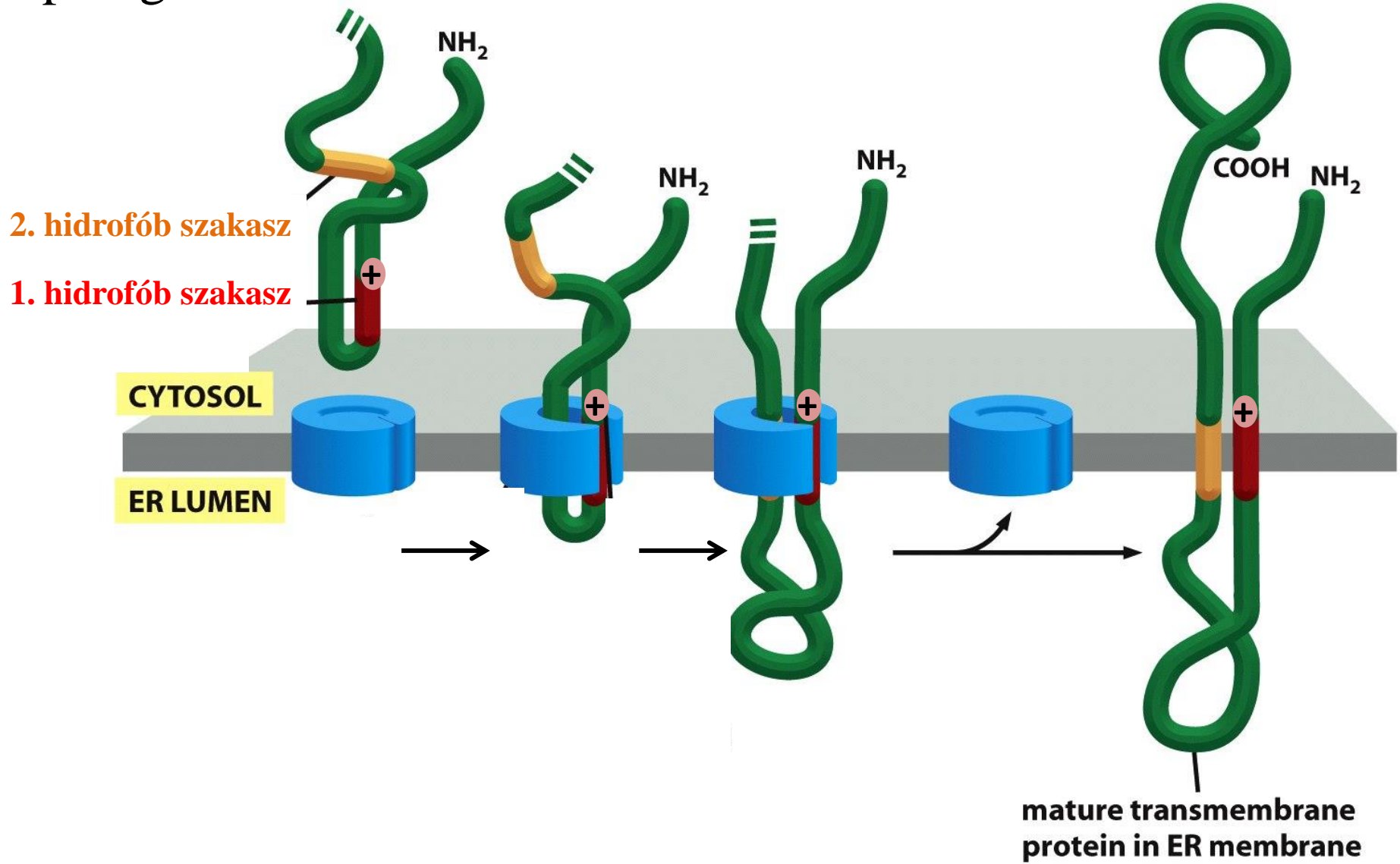
- Az ER-membránba épült fehérjék orientációja megmarad a vezikuláris transzport során is. (ER lumen → extracelluláris tér; citoszol → citoszol)
- A membránba épülés orientációja nincs kódolva a fehérjében, csak az határozza meg, hogy a citoszol felől kerül a membránba.
- Szignáljukat – amely a legtöbb esetben **nem** a lumenbe kerülő fehérjék N-terminális szignálja - ugyanúgy az SRP ismeri fel és szállítja receptorához

# A transzmembrán fehérjéket egy (vagy több) hidrofób jel megakasztja az ER membránjában

A hidrofób szakasz orientációját a csatornában az határozza meg, hogy a szakasz melyik oldalán van pozitív töltéstöbblet – a csatornafehérje citoszolikus oldalán ugyanis negatív töltésű aminosavak vannak.

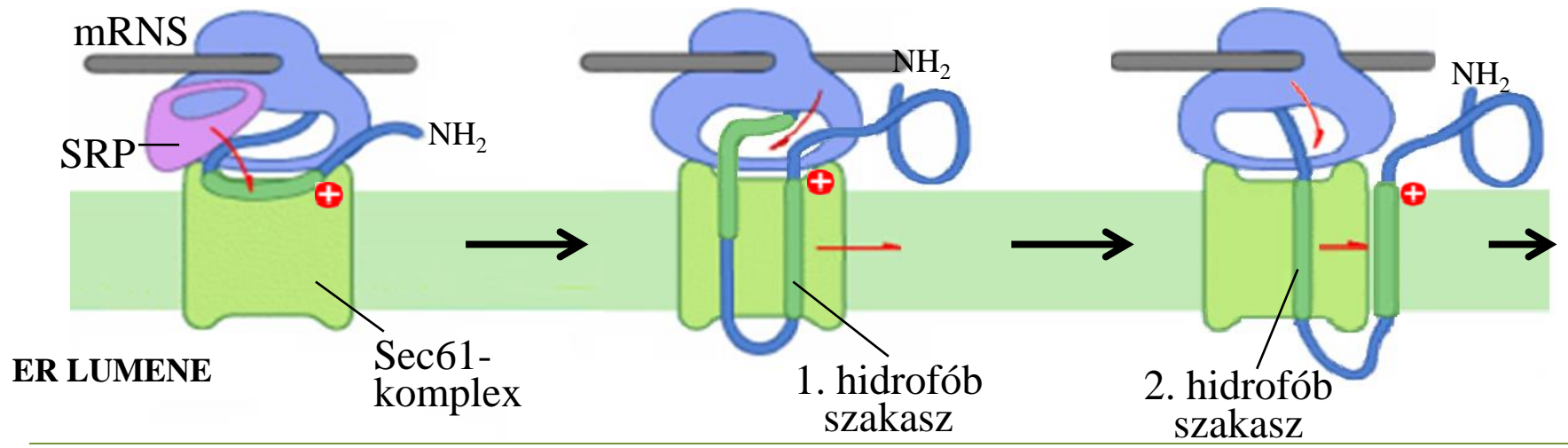


A membránt többször átérő fehérjékben elsősorban az első hidrofób szakasz (szignál) körüli töltések határozzák meg a topológiát

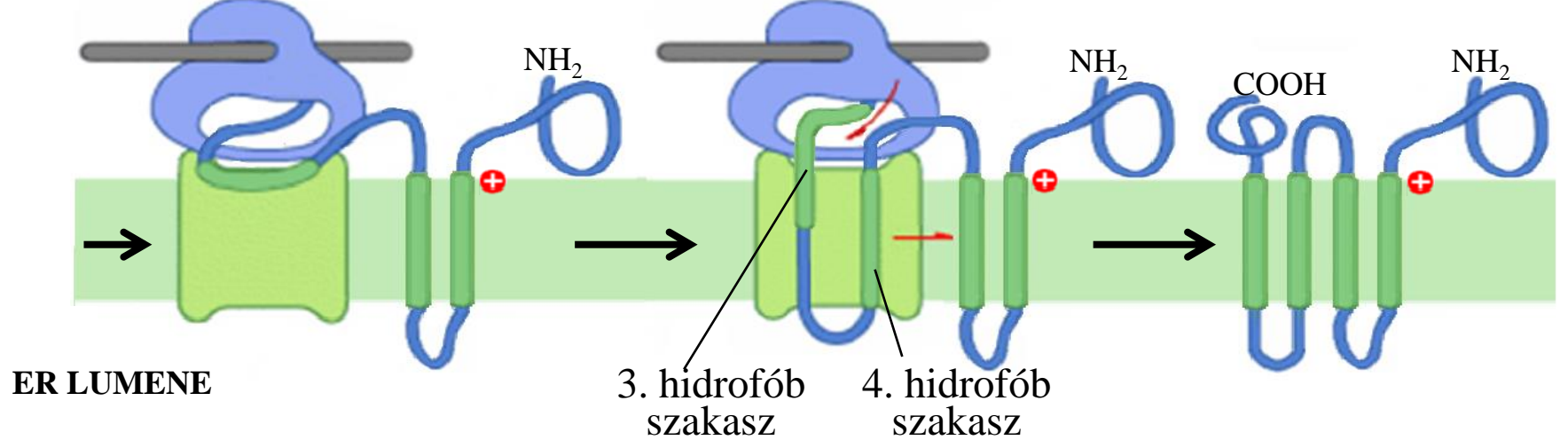


A membránt többször átérő fehérjékben elsősorban az első hidrofób szakasz körüli töltések határozzák meg a topológiát

CITOSZOL

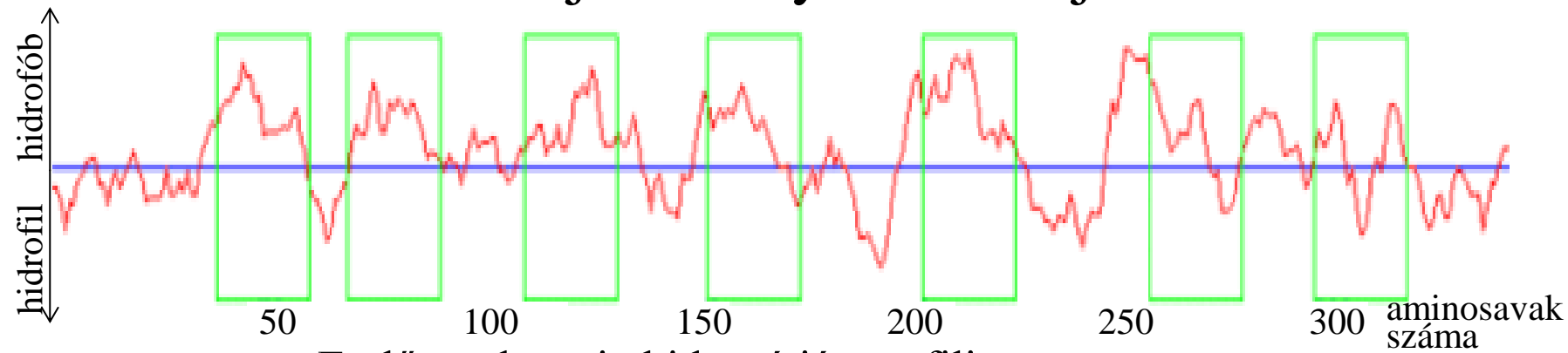


CITOSZOL

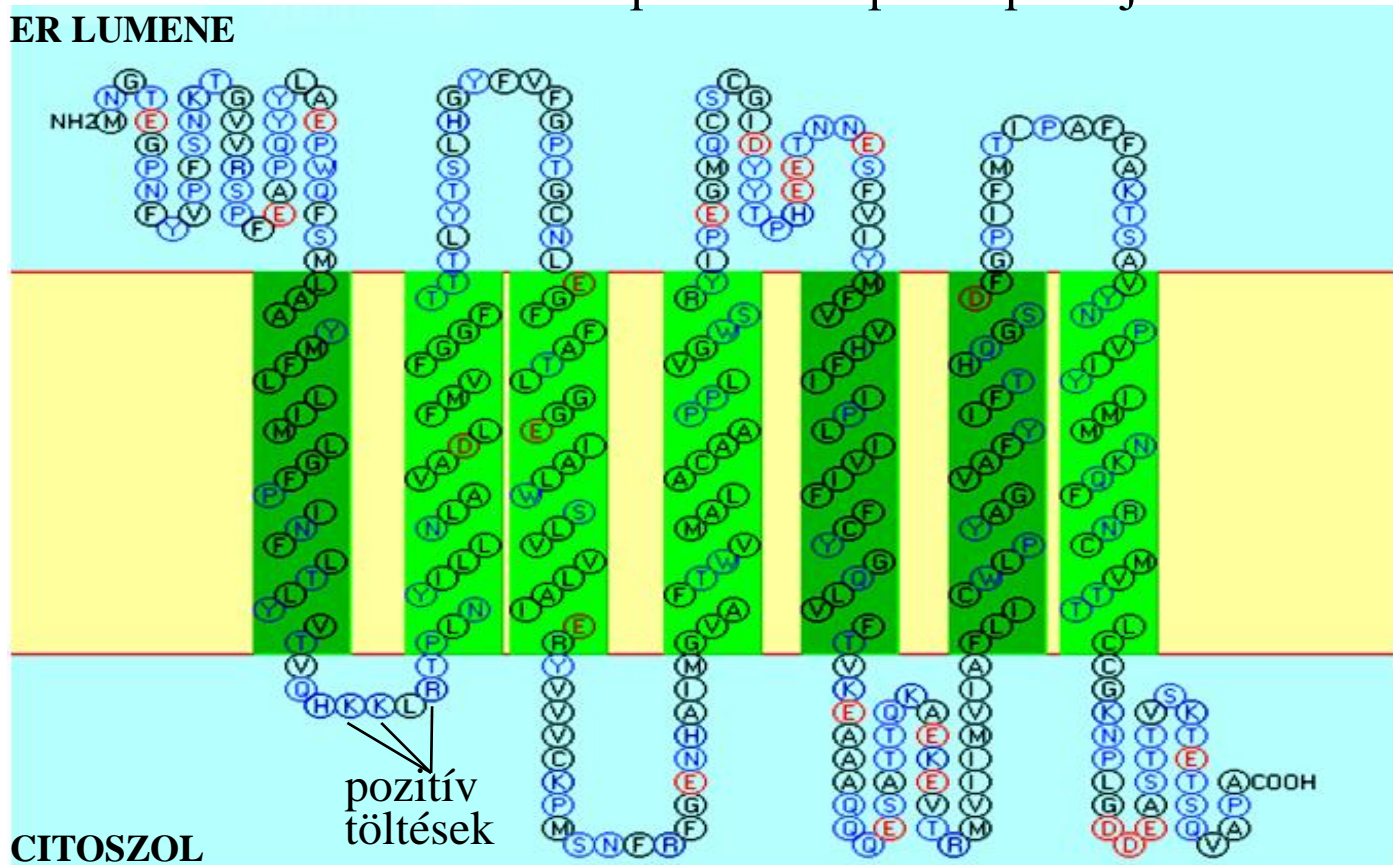


Az első kivételével az egymás után következő transzmembrán domének orientációját alapvetően a sorrendben elfoglalt pozíciójuk határozza meg.

# A transzmembrán fehérjék elhelyezkedése jósolható



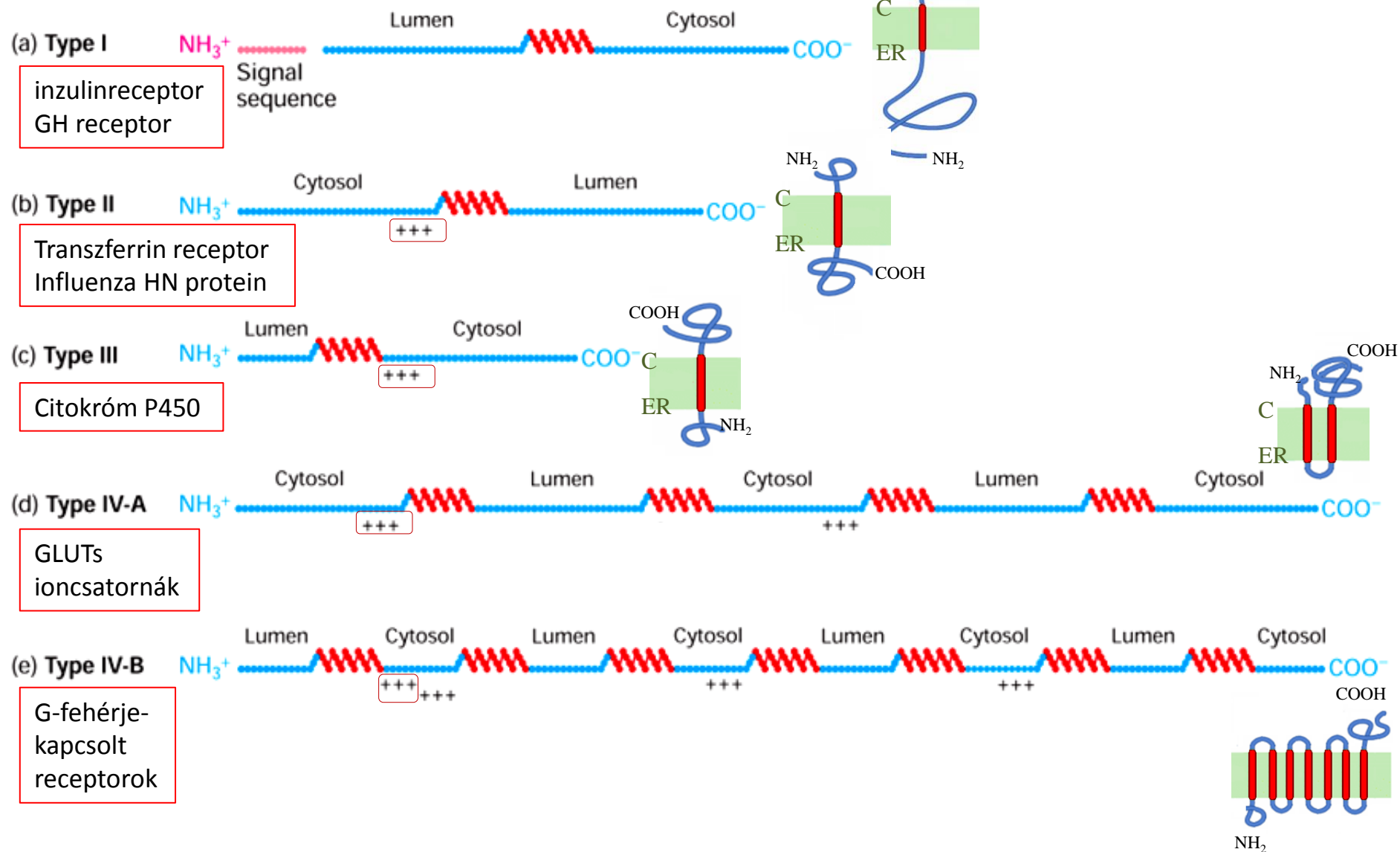
Emlős rodopszin hidropátiás profilja



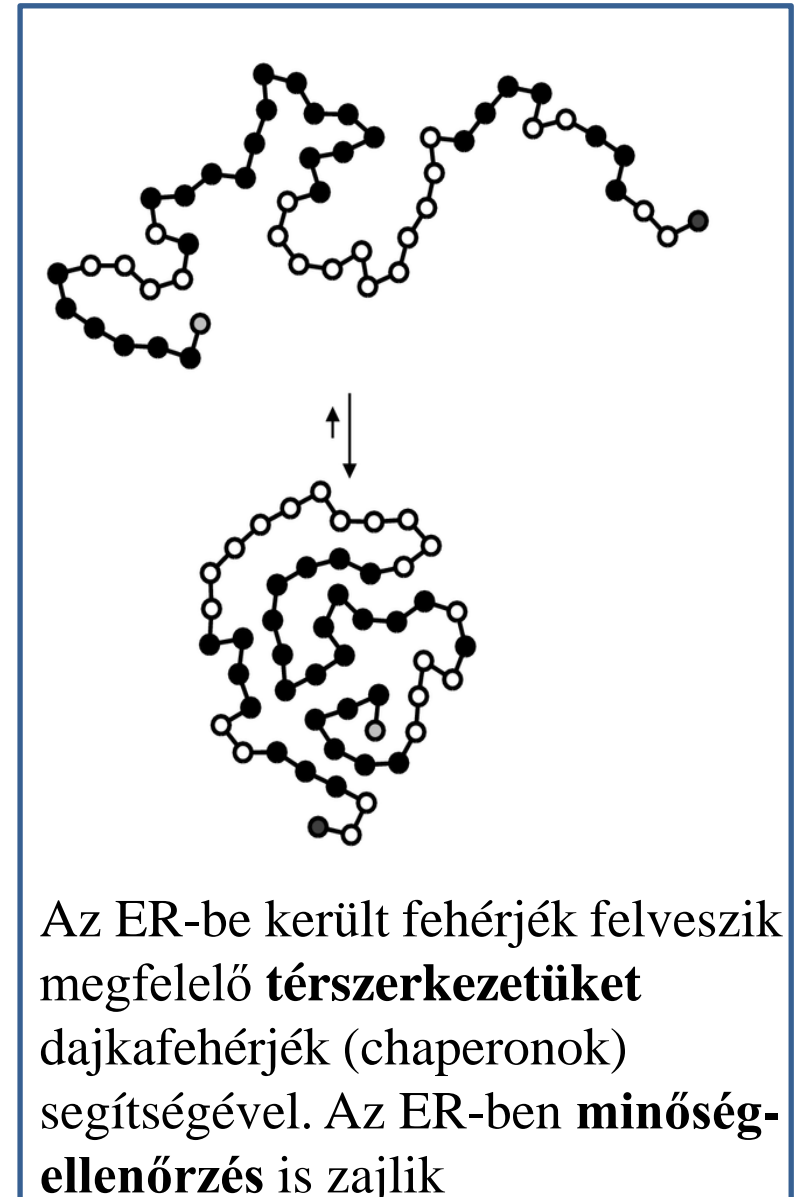
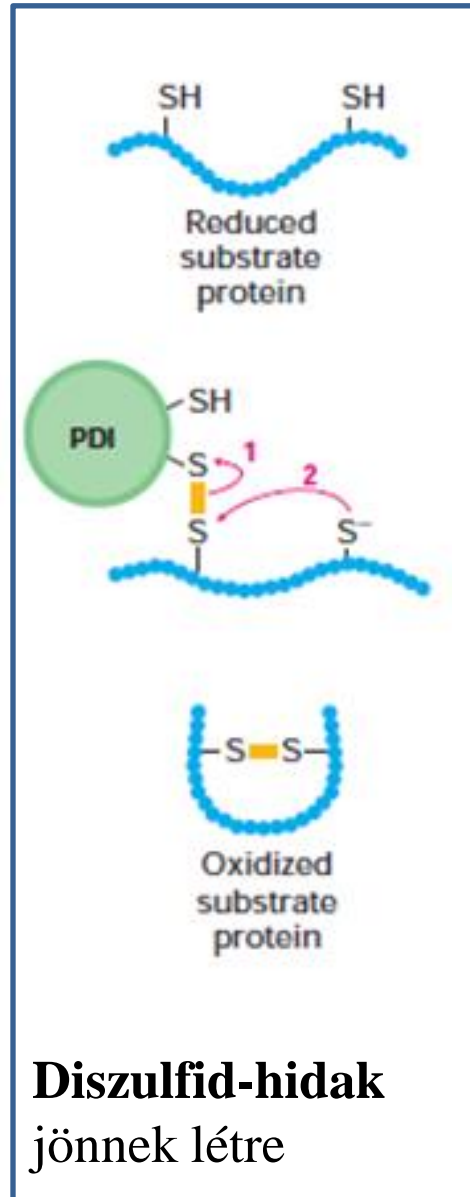
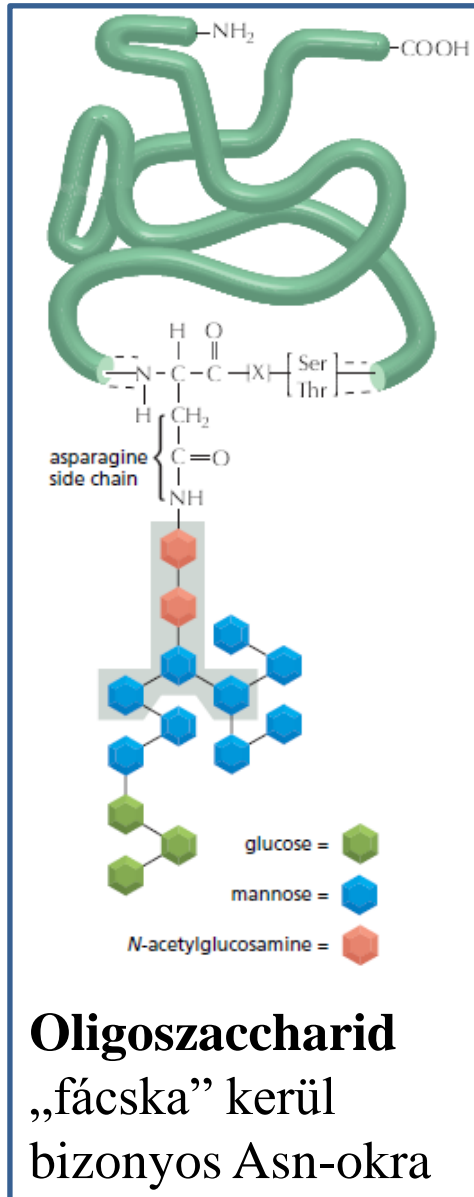
Emlős rodopszin elhelyezkedése a membránban ( a citoszol van “alul”!)



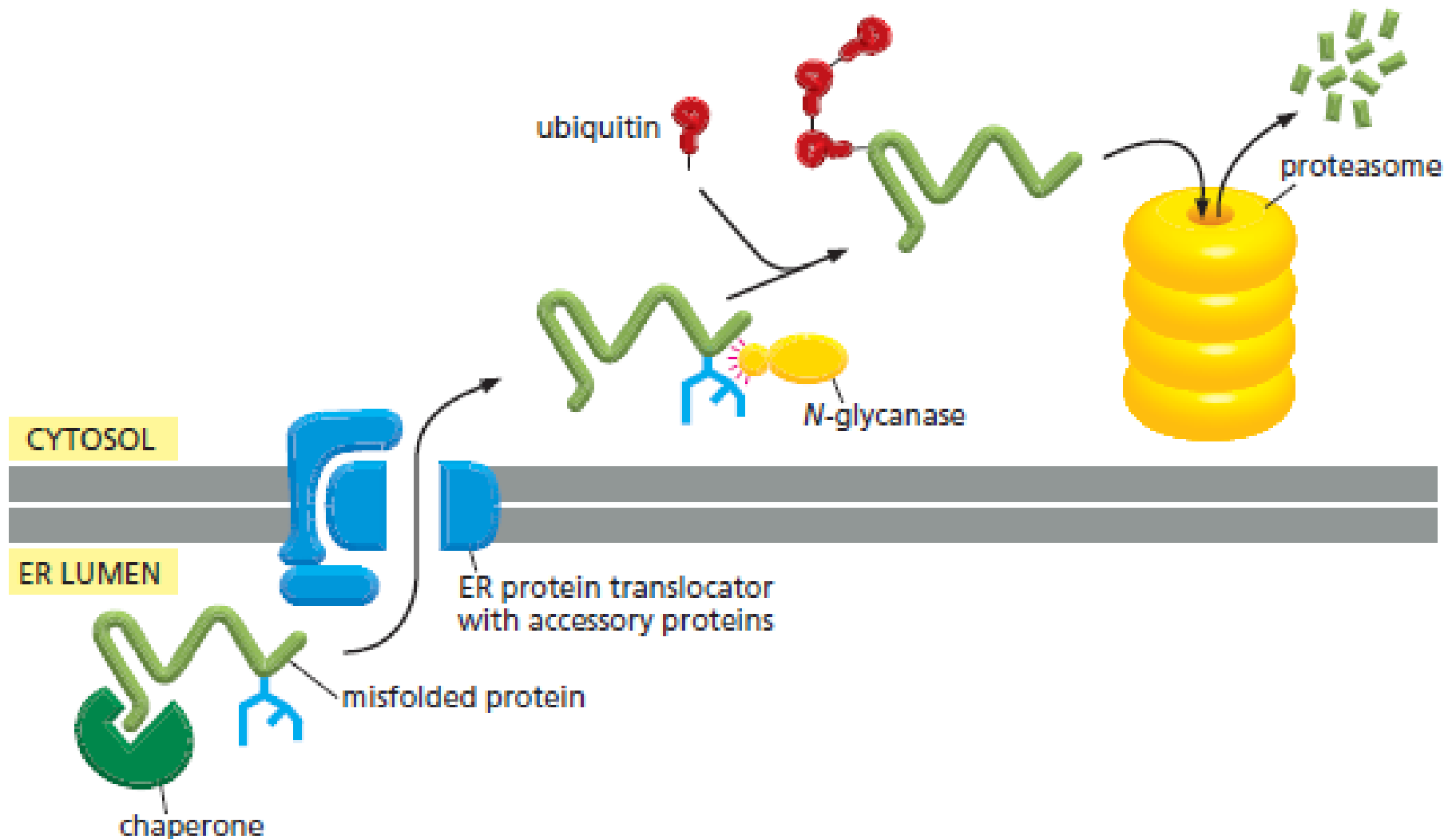
# A membránt többször átérő fehérjékben elsősorban az első hidrofób szakasz (szignál) körüli töltések határozzák meg a topológiát



# Az ER lumenében speciális folyamatok zajlanak



# Minőség-ellenőrzés: a nem megfelelő szerkezetű fehérjék visszakerülnek a citoszolba, és lebomlanak

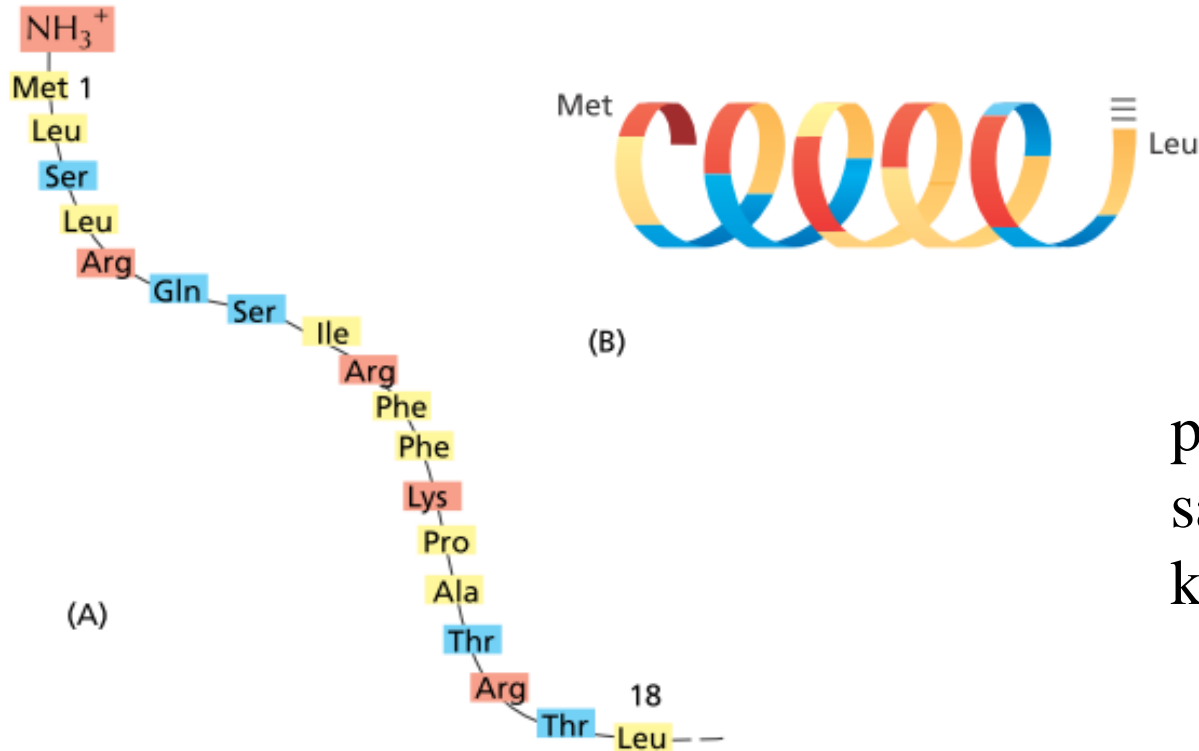


film

<http://biochem.web.utah.edu/iwasa/projects/translocation.html>

# A fehérjék útja a mitokondrium mátrixába

# A mitokondrium mátrixába irányító jel



piros: pozitív oldallánc  
sárga: apoláros  
kék: poláros

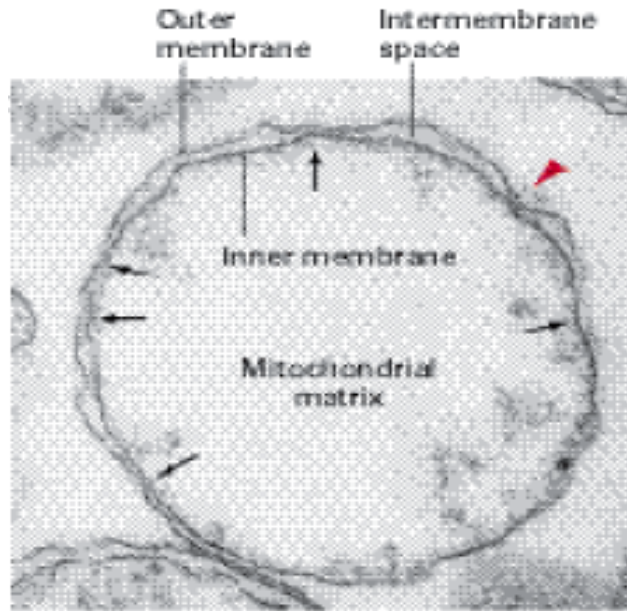
- A szignál („presequence”) egy N-terminális amfipatikus (pozitív/hidrofób) hélix. Nem annyira a pontos aminosav-összetétel, hanem az elrendezés fontos.

-Szükséges és elégséges a mitokondrium mátrixába juttatáshoz

-Hidrofób oldala illeszkedik a receptor megfelelő árkába

# „Klasszikus” mitokondriális transzport: a mátrixba

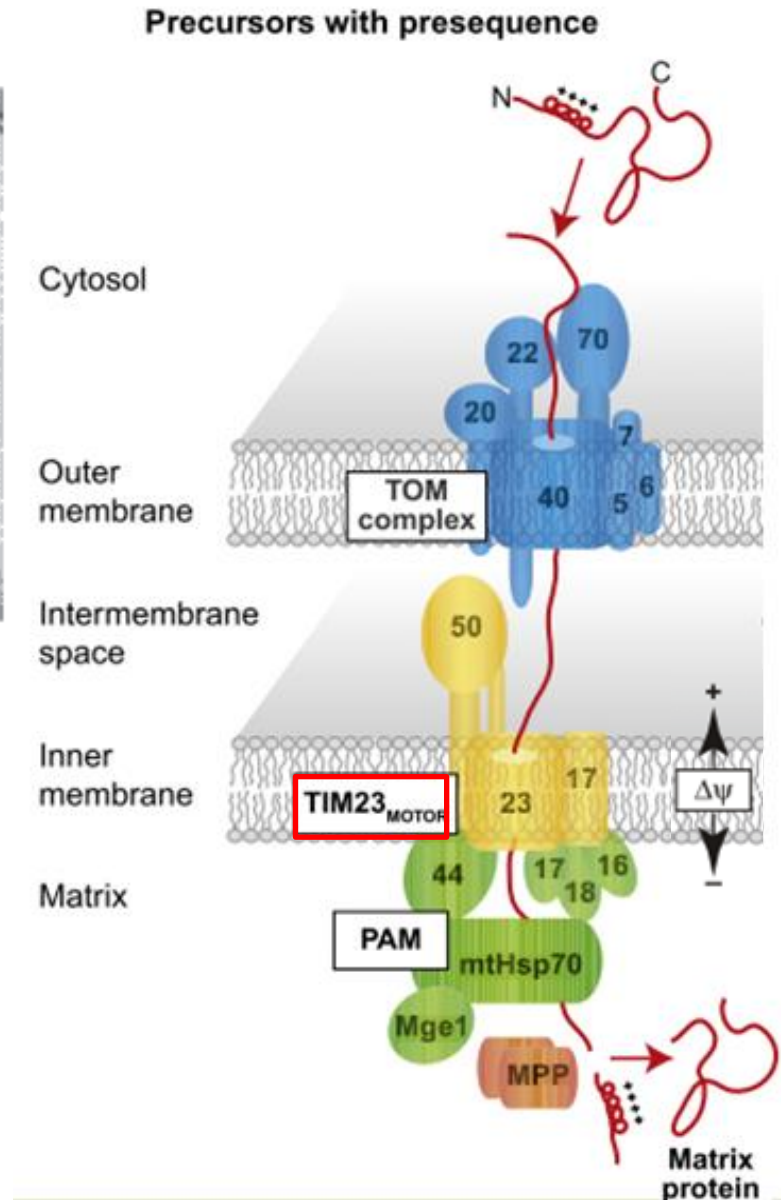
- Két csatornán át jut be, a két membrán kontakthelyénél



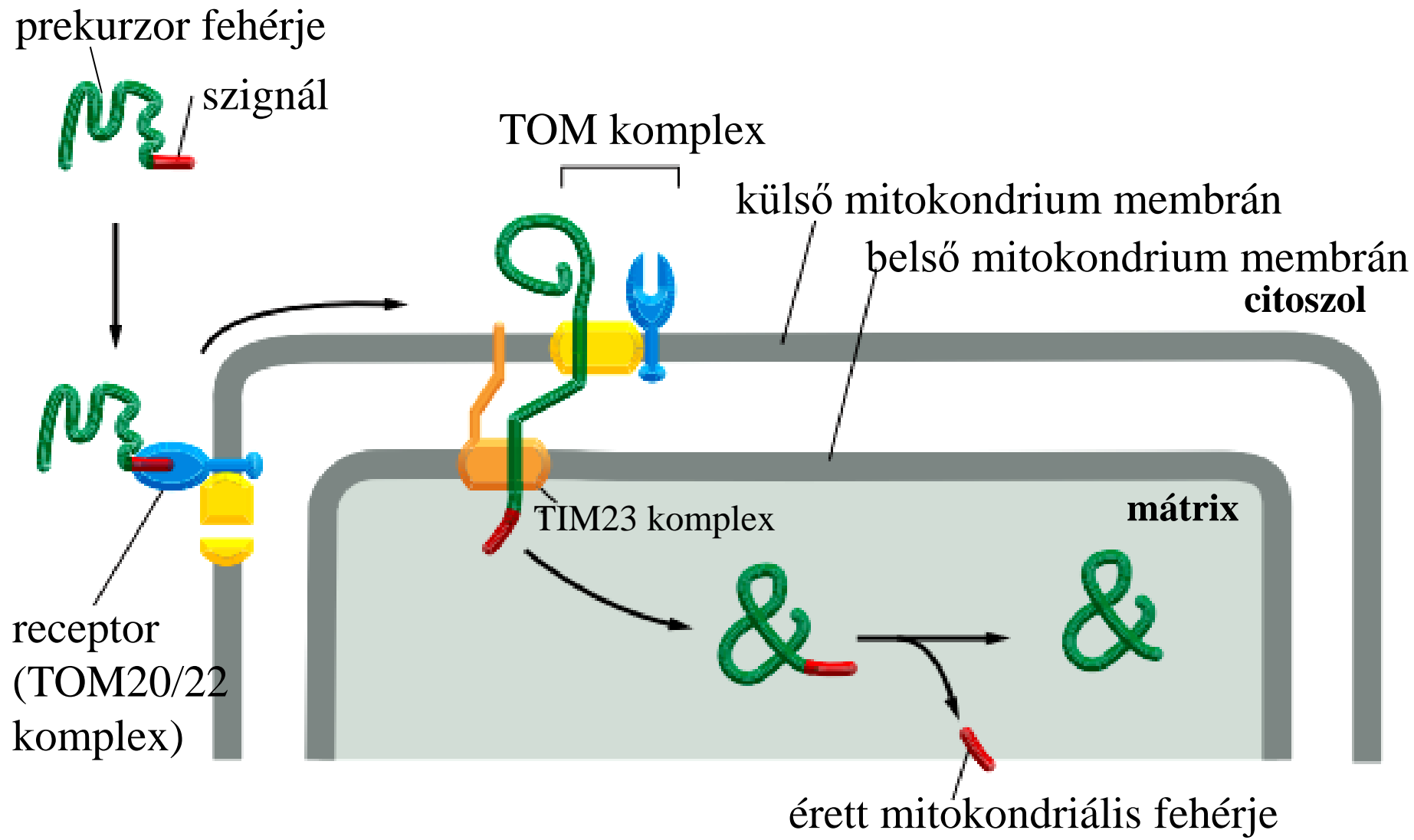
-Az mtHsp70 dajkafehérjék ATP felhasználásával „húzzák be” (motor? „racsn”?) (PAM)

-A mátrixba érve a szignált levágja egy peptidáz (MPP)

-A transzporthoz szükséges az elektrokémiai gradiens épsége



# A mitokondriumba irányító szignált tartalmazó fehérjét membrán-receptor köti meg és irányítja a csatornába





# A mitokondriális transzport energiaigénye

