

# INTEGRÁNS MEMBRÁNFEHÉRJÉK 3-DIMENZIÓS KRISTÁLYOSÍTÁSA és SZUBMOLEKULÁRIS SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA ELEKTRONKRISZTALLOGRÁFIÁS MÓDSZERREL

Dr. Varga Sándor

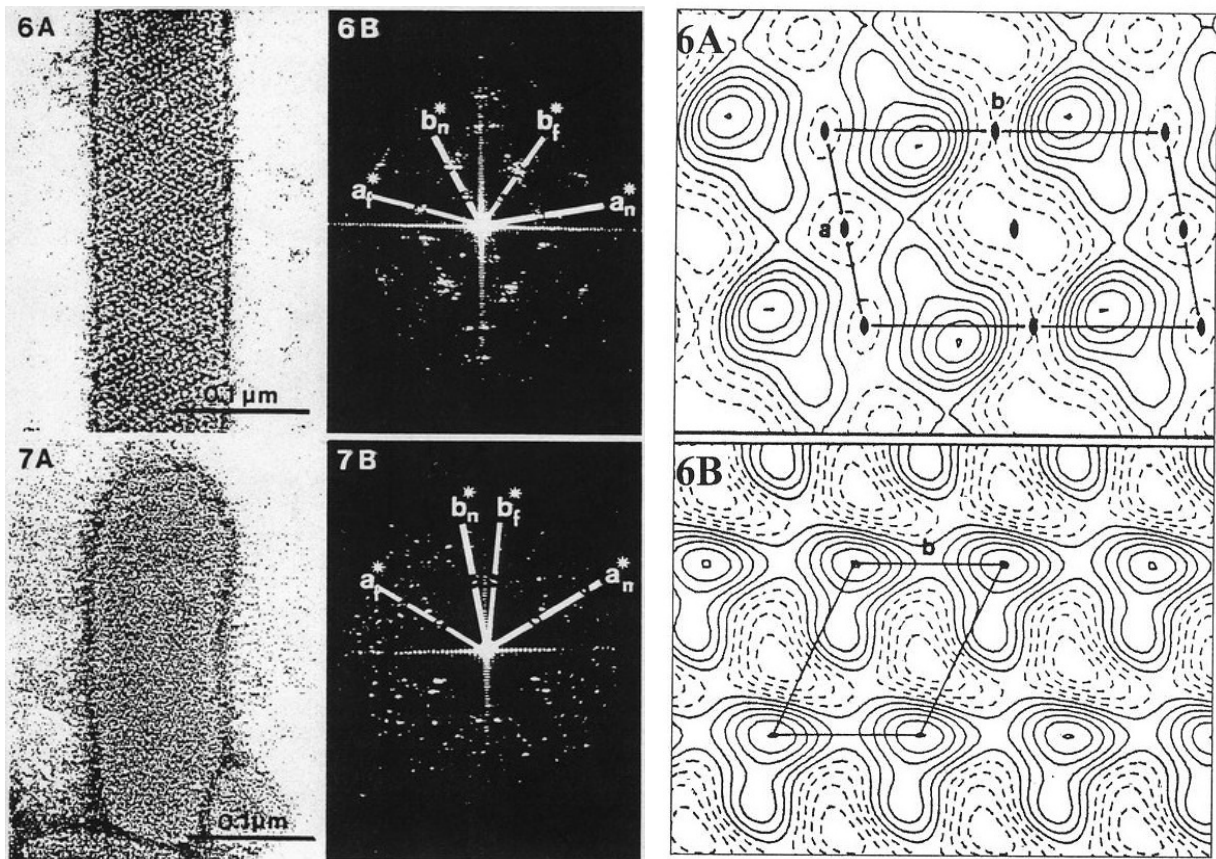
Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Klinikai Biokémia és Molekuláris Patológiai Intézet, Elektronmikroszkópos Laboratórium

Három ionpumpáló (integráns) membránfehérje: a vázizom SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz (Taylor 1988), a vese ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPáz (Varga 1993), és a gyomor ( $\text{H}^+, \text{K}^+$ )-ATPáz (Varga 1994) enzim(fehérje)molekulák atomi feloldású térbeli szerkezetét vizsgáltuk elektronkrisztallográfiás módszerrel. Célunk a biokémiai-, fizikai-, s más módszerekkel korábban igazolt „ioncsatornák” molekulán belüli jelenlétének, azok pontos térbeli elhelyezkedésének, szerkezetének ill., működésének megismerése, s ezek ismeretében a membránon keresztül történő iontranszport molekuláris mechanizmusának teljes (lépésenkénti) leírása.

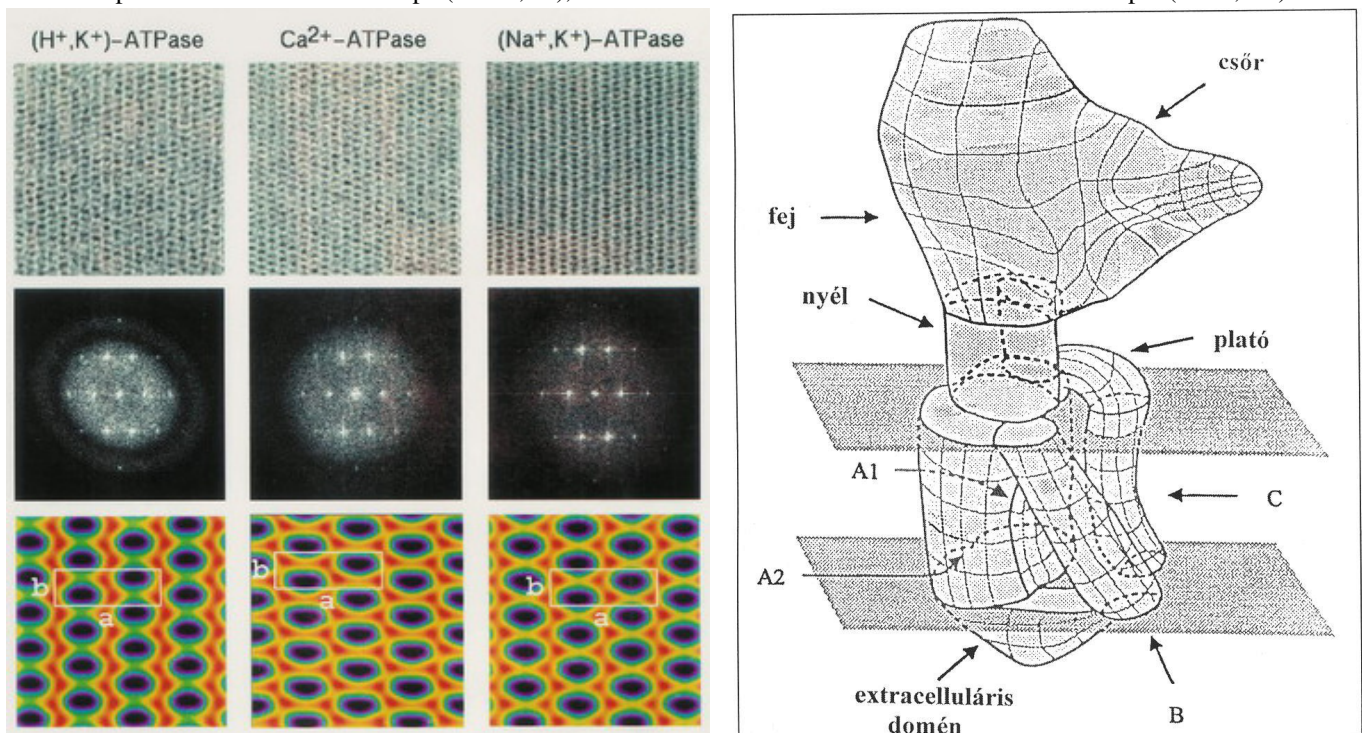
Az elektronkrisztallográfiás módszer kizárólag elektronmikroszkóppal készült transzmissziós felvételeket (fázis-adatok), ill. elektron-diffrakciós szórási képeket (amplitúdó adatok) használ adatforrásként a számítógépes feldolgozáshoz, ill. térbeli rekonstrukcióhoz. Az atomi feloldást speciális körülmények között növesztett 3-dimenziós fehérjekristályokból gyors-fagyasztással holy-gridre preparált frozen hydrated (mono-layer) mintákról (-180 °C-os cryo-stage-en) alacsony elektron-dózisú üzemmódban készített felvételeken, ill. diffrakciós szórási képeken értük el (5-7 Å diffrakciós feloldás).

A vizsgálatokhoz szükséges néhány  $\mu\text{m}^2$  méretű és nagy-rendezettségű 3-dimenziós kristályok előállítása a lipid-membránba ágyazott (integráns) fehérje-molekulákból rendkívül nehéz. Ehhez ugyanis a membrán detergenssel történő teljes szolubilizálását, a célfehérje más membrán-fehérjéktől való elkülönítését (tisztítás), és a molekulák 3-dimenziós kristályos rendbe történő szerveződését kell biztosítani. [A 2000-ig megismert 3547 makromolekula-fehérje szerkezeti képből még ma is csak 3 olyan van, amely integráns membránfehérje (teljes szerkezetét írja le). A detergenssel szolubilizált, összetett lipid-detergens-fehérje-adalékok kristályosítási rendszerben (néha hónapokig) növekedő u.n. I-es típusú 3-dimenziós kristályok valójában egymáshoz tapadó 2-dimenziós (sík)-kristálylapokból épülnek fel, ahol a lapok közötti összetartó erőt a kevert lipid-detergens rétegbe (az ideális kristályszimmetriát rontva) mindkét oldalról (fej-láb pozícióba) beépülő fehérjemolekulák hidrofil, feji részei között ható poláros kölcsönhatások biztosítják.

Az első számítógépes kiértékelés/rekonstrukció egy C2-es tércsoportú egységcellán belül (a tércsoport szabályai szerint lehetséges/szükséges) 4 darab ATPáz molekula szoros pakolású, de ésszerű elrendeződését adta az egyetlen katalitikus  $\alpha$ -alegységből álló  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz enzimre (55 x 165 Å-ös egységcella adatokkal). A későbbi (15 évet átölelő) analízisek ezeket az adatokat megerősítették, s **a** = 166,2 ± 3,8 Å, **b** = 54,3 ± 0,5 Å, (**c** = 157 Å) cella-adatokat adva a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázra; **a** = 166,8 ± 4,5 Å, **b** = 57,7 ± 4,4 Å, (**c** = 161 Å) adatokat a ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPáz kristályaira, s **a** = 166,4 ± 2,8 Å, **b** = 55,3 ± 3,2 Å, (**c** = 154 Å) adatokat a ( $\text{H}^+, \text{K}^+$ )-ATP-ázra. Az egységcella adatok hibahatáron belüli egyezése, az  $\alpha$ -alegységek primér szekvenciái nagyfokú homológiájára alapozott elméleti-tentatív ATPáz molekula-szerkezeti kép, s a valóságos, rekonstruált vetületi képek nagyfokú azonossága alapozták meg azt a megállapításunkat, hogy a natív membránban eredetileg ( $\alpha\beta$ )-heterodimérekben álló ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )- és ( $\text{H}^+, \text{K}^+$ )-ATPáz fehérje-molekulák I-es típusú 3-dimenziós kristályai is csak a katalitikus  $\alpha$ -alegységekből épülnek fel ugyanúgy, mint a (csak) egyetlen polipeptid láncból álló  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz enzim kristályai. Vizsgálatainkkal jelentősen hozzájárultunk az ATPáz molekulákról mára elfogadott, s egyre részletesebb szerkezeti kép kialakításához, s a membránt áthidaló 6/8/ darab  $\alpha$ -helix által kialakított ioncsatorna lehetséges szerkezetére vonatkozó adatok összegyűjtéséhez.



A vázizom SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz  $\text{E}_2$  és  $\text{E}_1$  típusú -a membrán síkjában szerveződő- fehérjekristályai (B: 6A, 7A), azok optikai-diffrakciós szórás képe (K: 6B,7B), ill. rekonstruált -felülnézeti- elektron-denzitás térképei (J: 6A, 6B)



Az „azonos” transzmissziós-, elektron-diffrakciós- és rekonstruált felülnézeti vetületi képek (Bal) a rokon ATPáz molekulák  $\alpha$ -alegységeiből növesztett I-es típusú 3-dimenziós kristályok egységcelláinak (számítással igazolt) hibahatáron belüli egyezését sugallják. (Jobb) Az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz fehérje-molekula mára elfogadott, s egyre részletesebb szerkezeti képe a molekula tömegének 2/3-át kitevő, extracelluláris térbe kiemelkedő (felülnézetben körte-alakú) feji részének, ill. a membránt áthidaló 6/+2/ darab  $\alpha$ -helixből „álló” ioncsatorna lehetséges szerkezetére vonatkozó eddigi ismereteinket összegezi.