

Лекция 4

Синтез белков у эукариот

Эндоплазматический ретикулум

Мембранный транспорт:

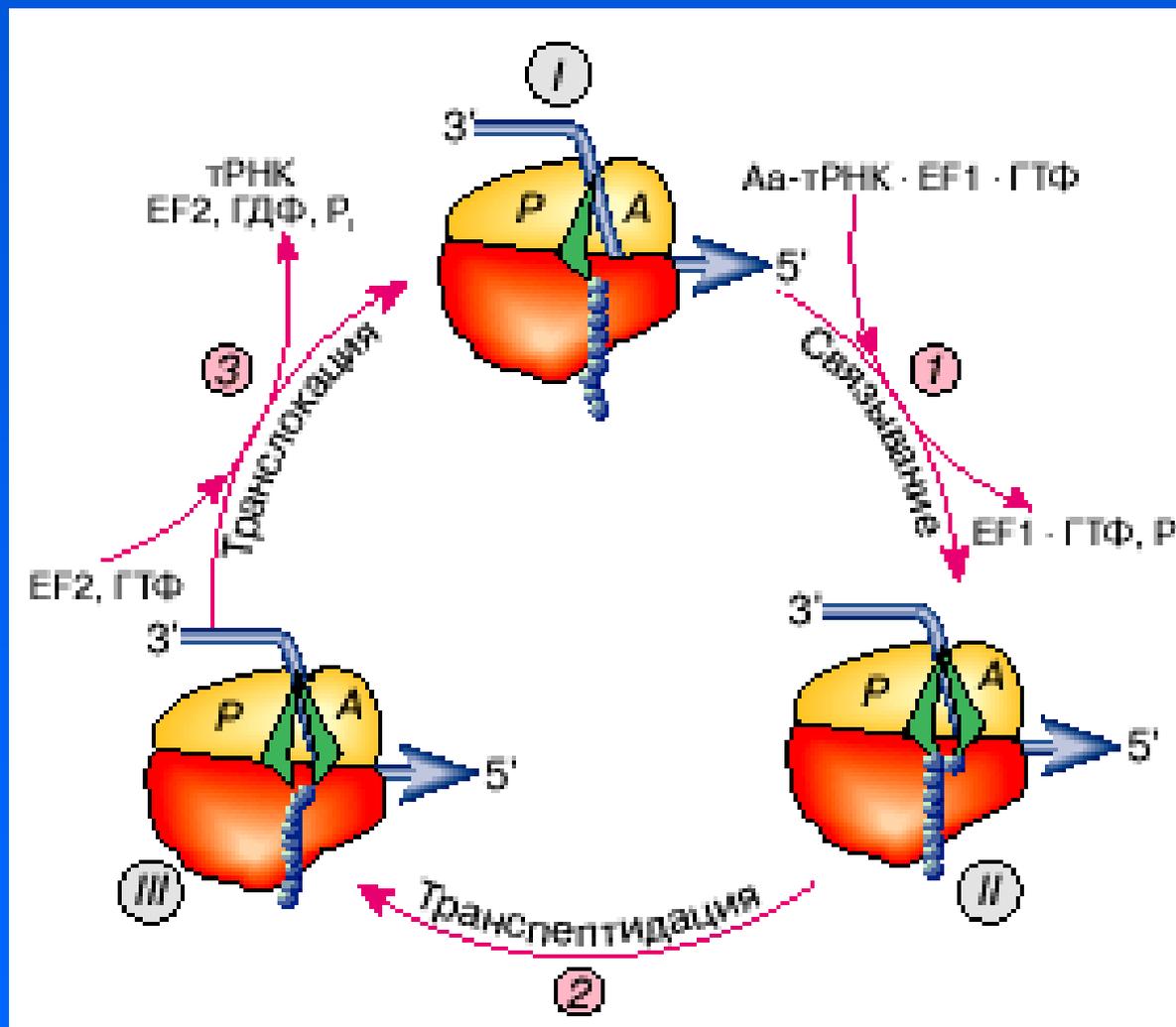
экзоцитоз

Аппарат Гольджи

Окаймленные пузырьки

Лизосомы

Цикл работы рибосомы



Пространственная организация биосинтеза белка у эукариот

Свободные полирибосомы – цитоплазматические белки, ядерные белки и белки некоторых органелл.

Рибосомы на мембране (ЭПР) – большинство мембранных и секретируемых белков.

Биосинтез секретлируемых и мембранных белков

Биосинтез секретлируемых белков начинается также, как остальных – на рибосоме в цитозоле.

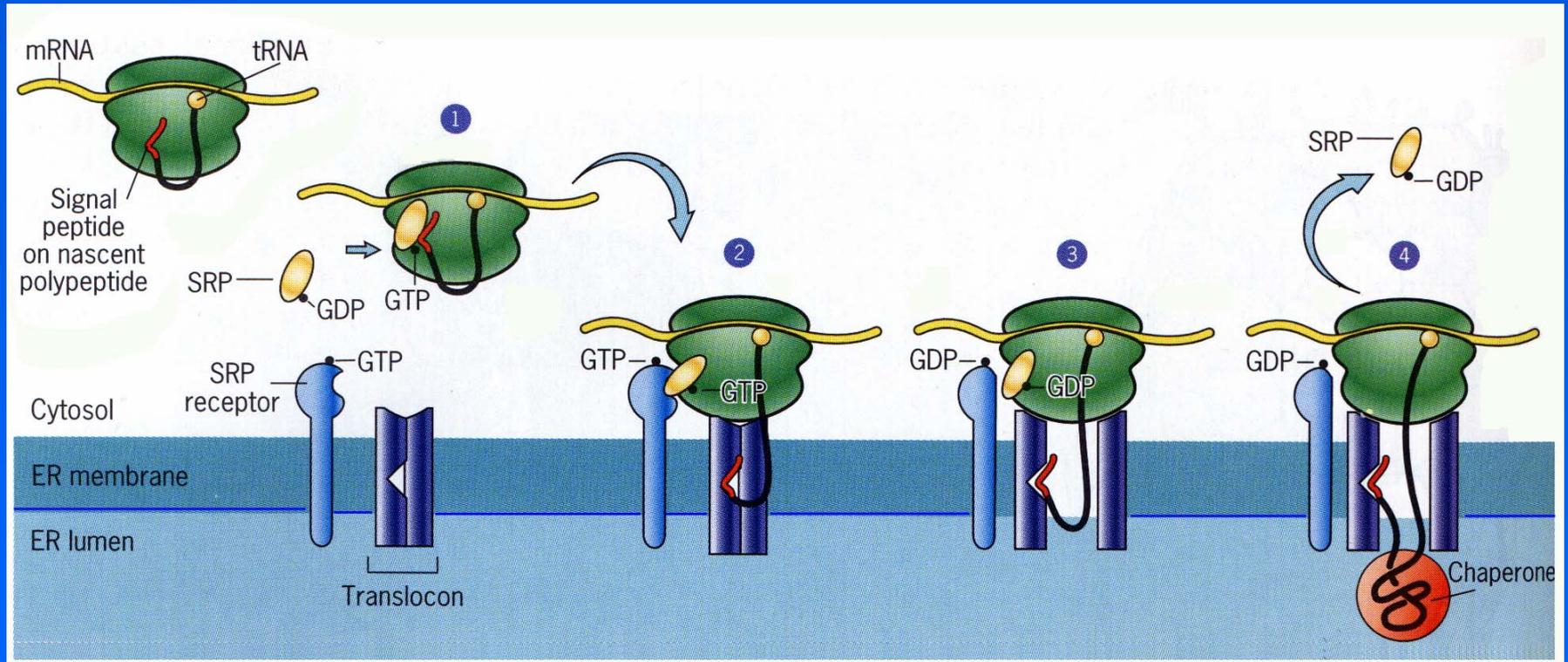
Начальный пептид блокирует дальнейшую трансляцию.

Элонгация полипептида возобновляется только после связывания рибосомы с мембраной ЭПР.

Синтезированный белок укладывается в мембране или попадает в просвет ЭПР.

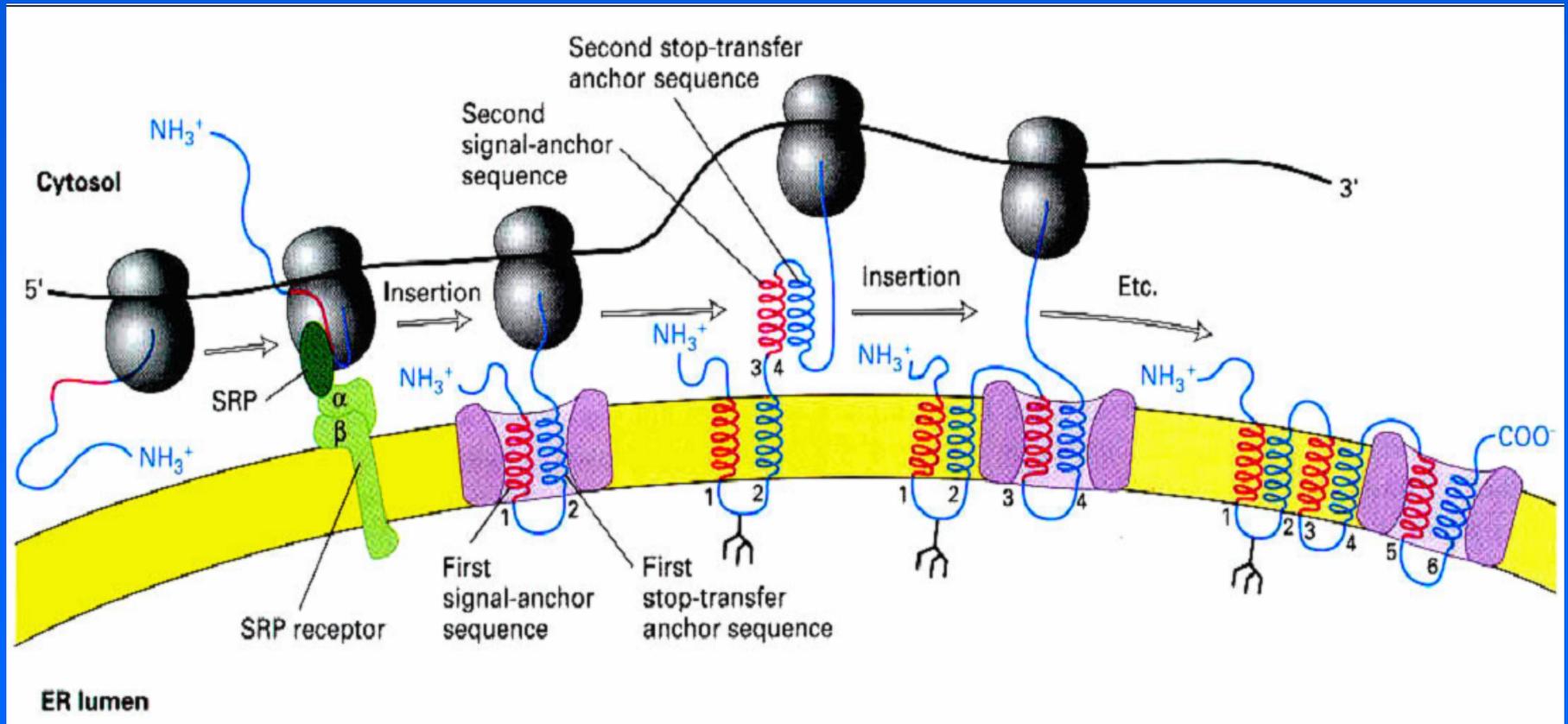
Мембранные и секретлируемые белки часто претерпевают посттрансляционную модификацию (гликозилирование и др.) , которая начинается уже внутри ЭПР.

Биосинтез секретирuемого белка

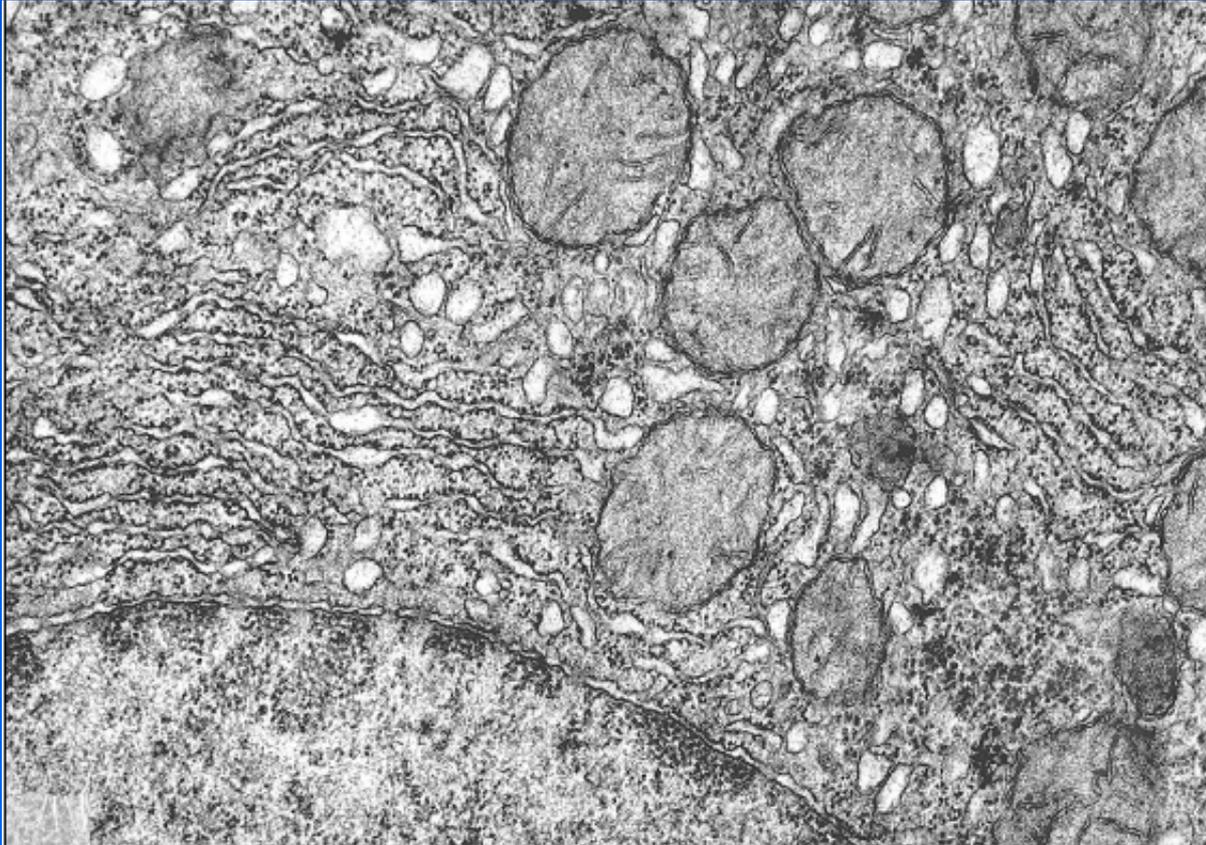


Три стадии – до контакта с мембраной (сигнальный пептид); образование комплекса рибосомы с транслоконом; завершение синтеза после контакта с мембраной

Биосинтез трансмембранного белка

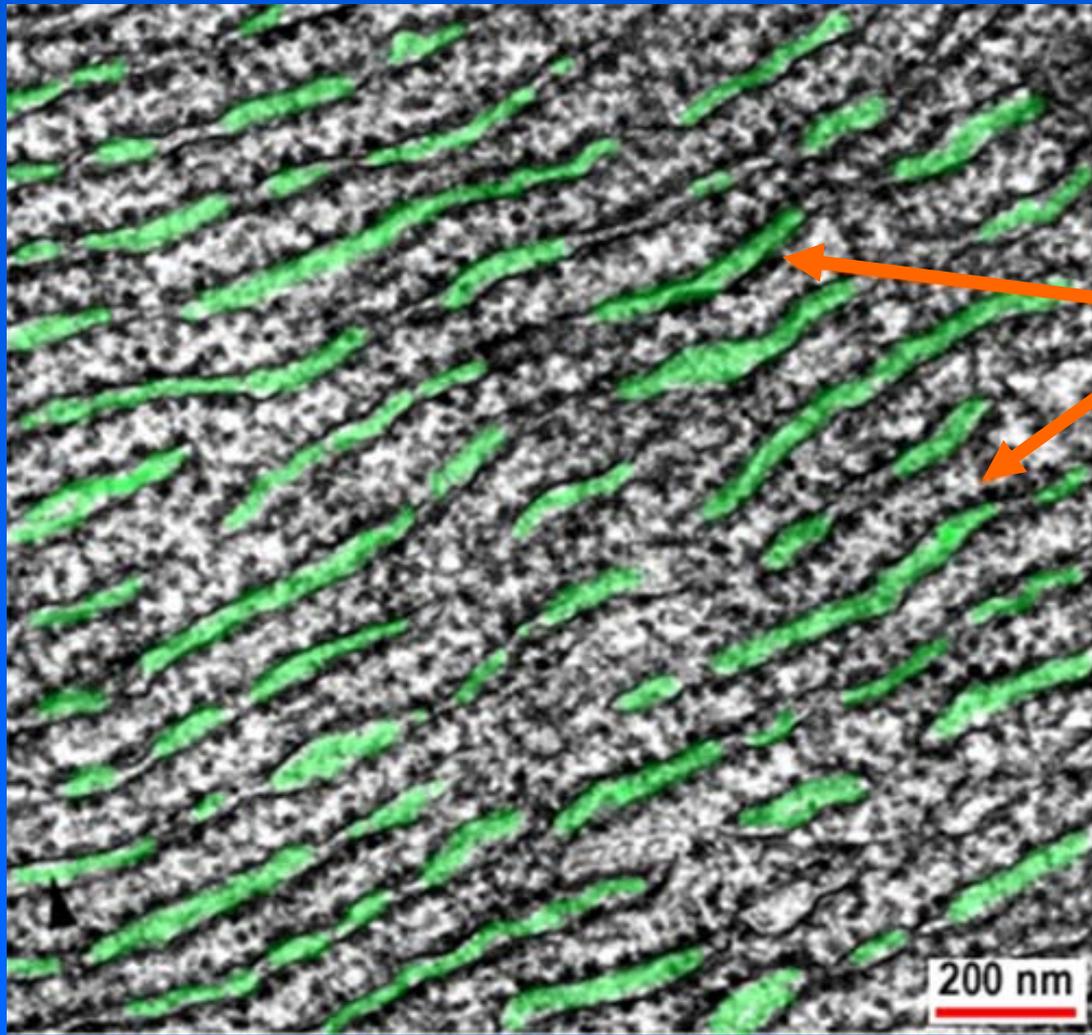


Эндоплазматическая сеть - электронная микроскопия

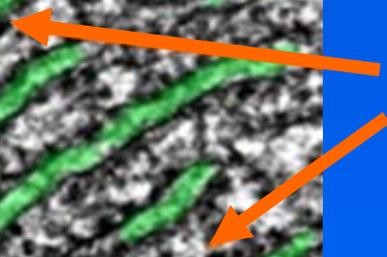


Эндоплазматическая сеть – сложная система связанных друг с другом мембранных мешков.

Гранулярная эндоплазматическая сеть

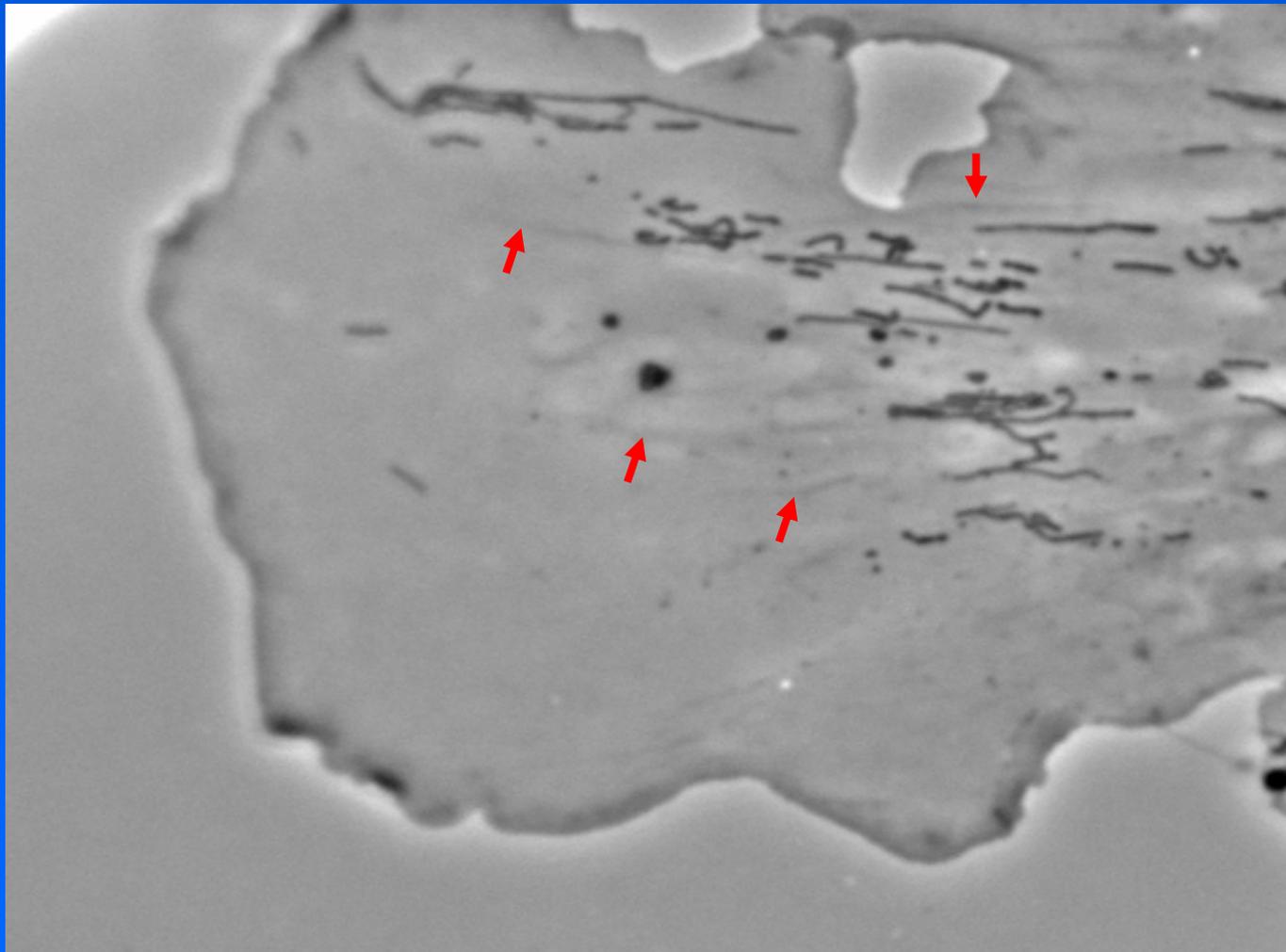


рибосомы

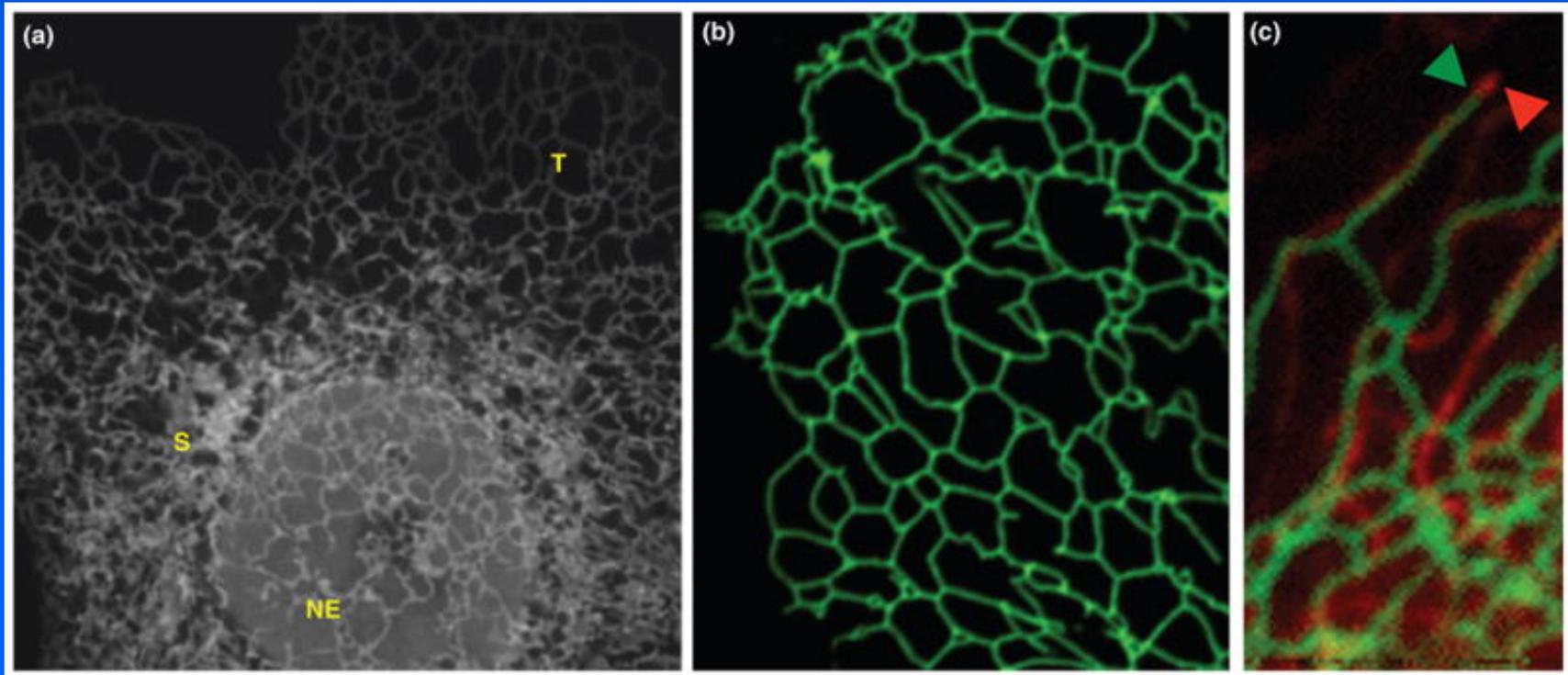


200 nm

Эндоплазматическая сеть в живой клетке

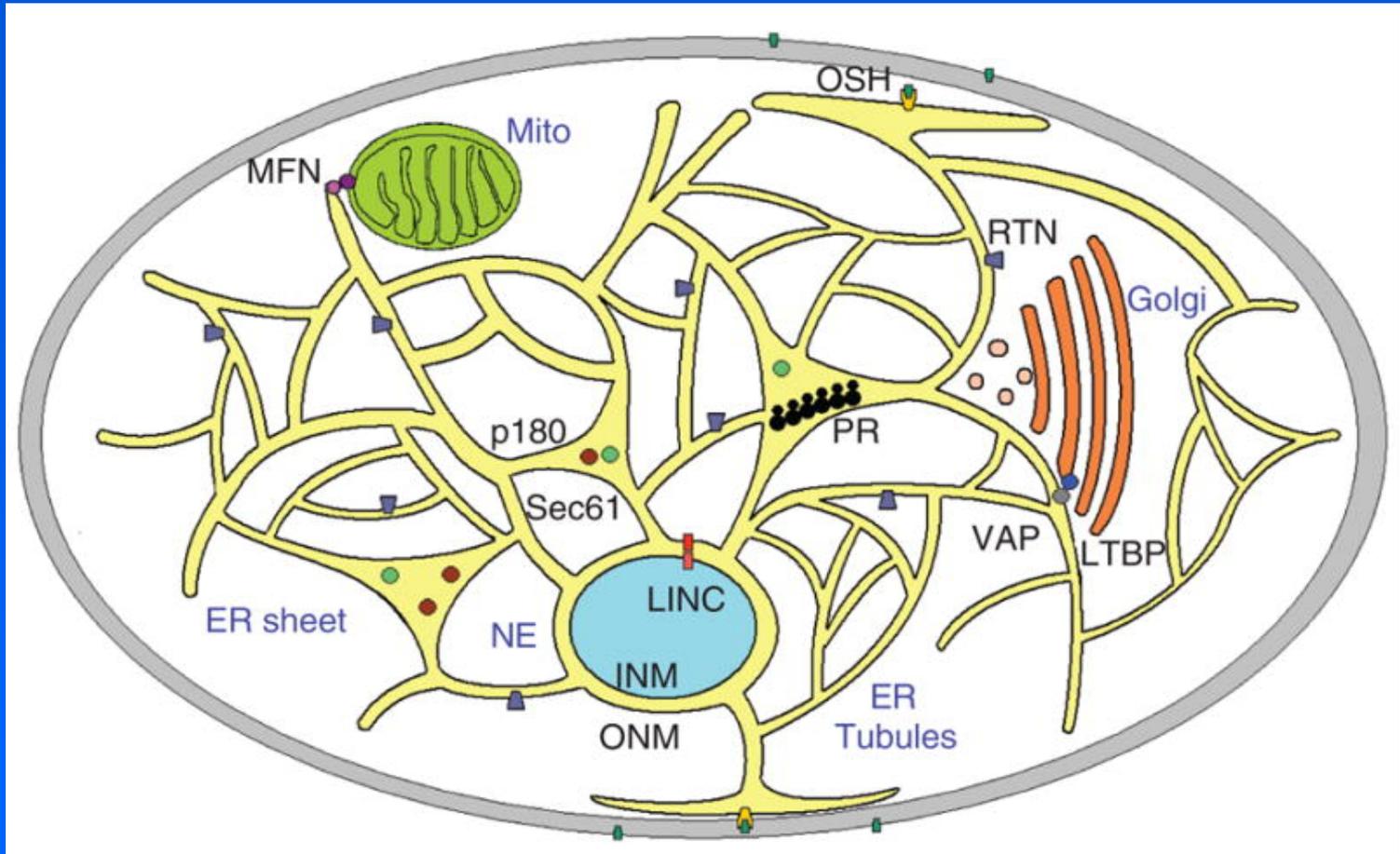


Эндоплазматическая сеть в живой клетке - флюоресценция



Весь ЭПР имеет единое внутреннее пространство (для белков).
Домены в составе ЭПР: ядерная оболочка; гладкий ЭПР;
гранулярный ЭПР; тубулярная система; области контакта с
другими органеллами.

Схема строения ЭПР



Мембраны ЭПР образуют извитую сеть и длинные тонкие (50-100 нм в диаметре) трубки. Через специальные белки ЭПР контактирует с большинством органелл.

Основные функции ЭПР

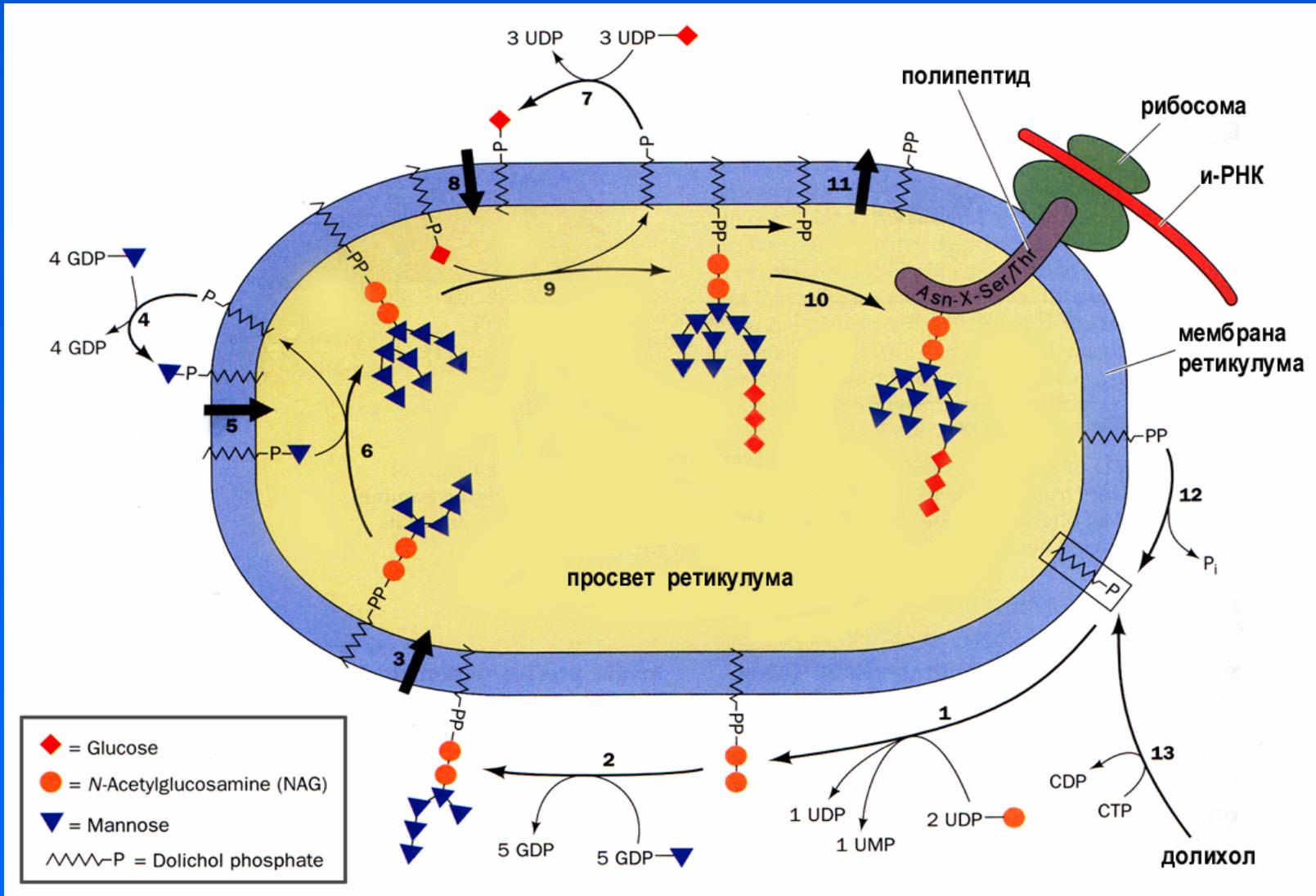
Биосинтез секретируемых и мембранных белков (гранулярный ретикулум).

Биосинтез липидов (гладкий ретикулум).

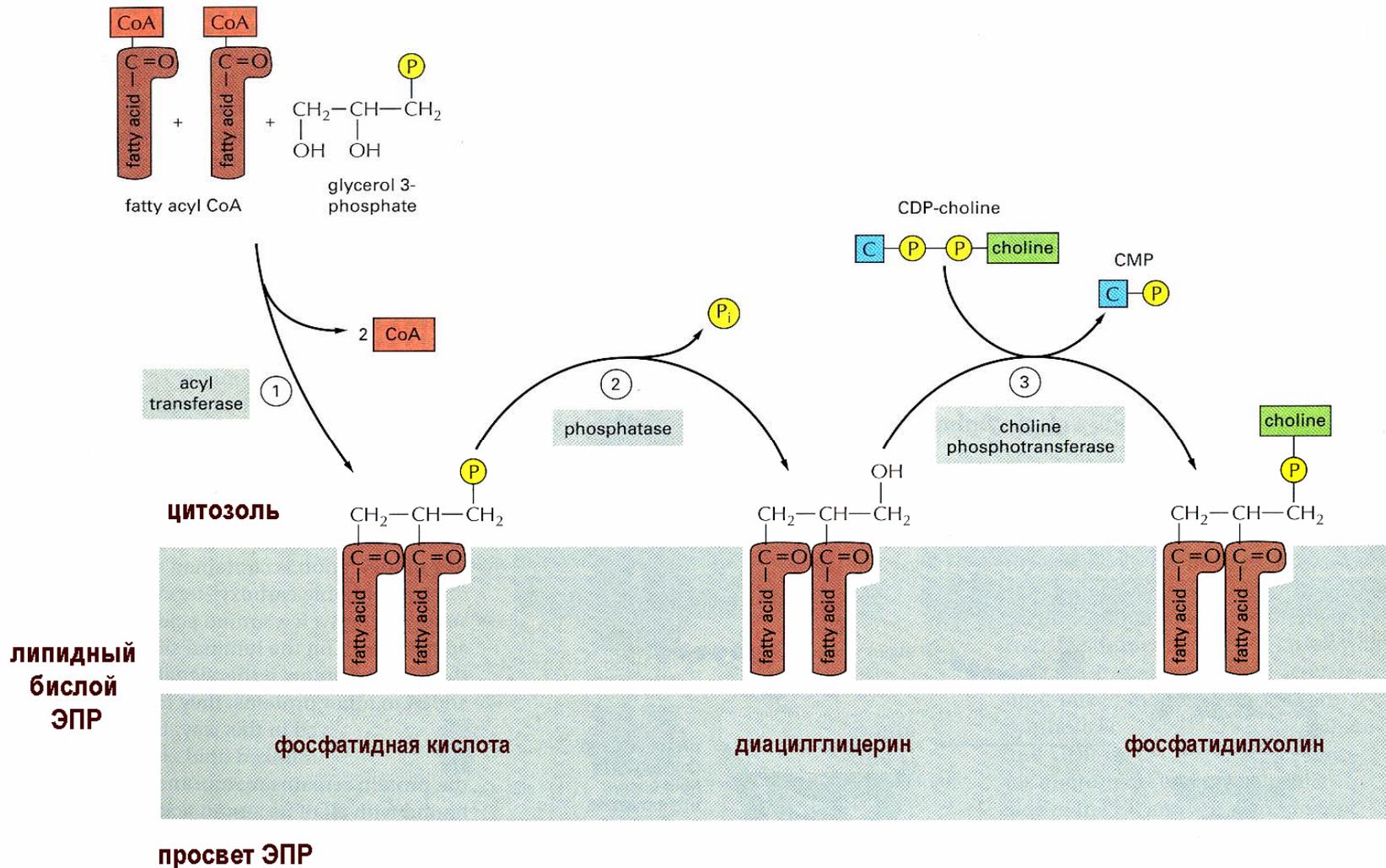
Первичная посттрансляционная модификация белков.

Регуляция кальциевого обмена (депо ионов Ca^{++}) – гранулярный и гладкий ретикулум, специализированный гладкий ретикулум (Т-система) в мышечных клетках.

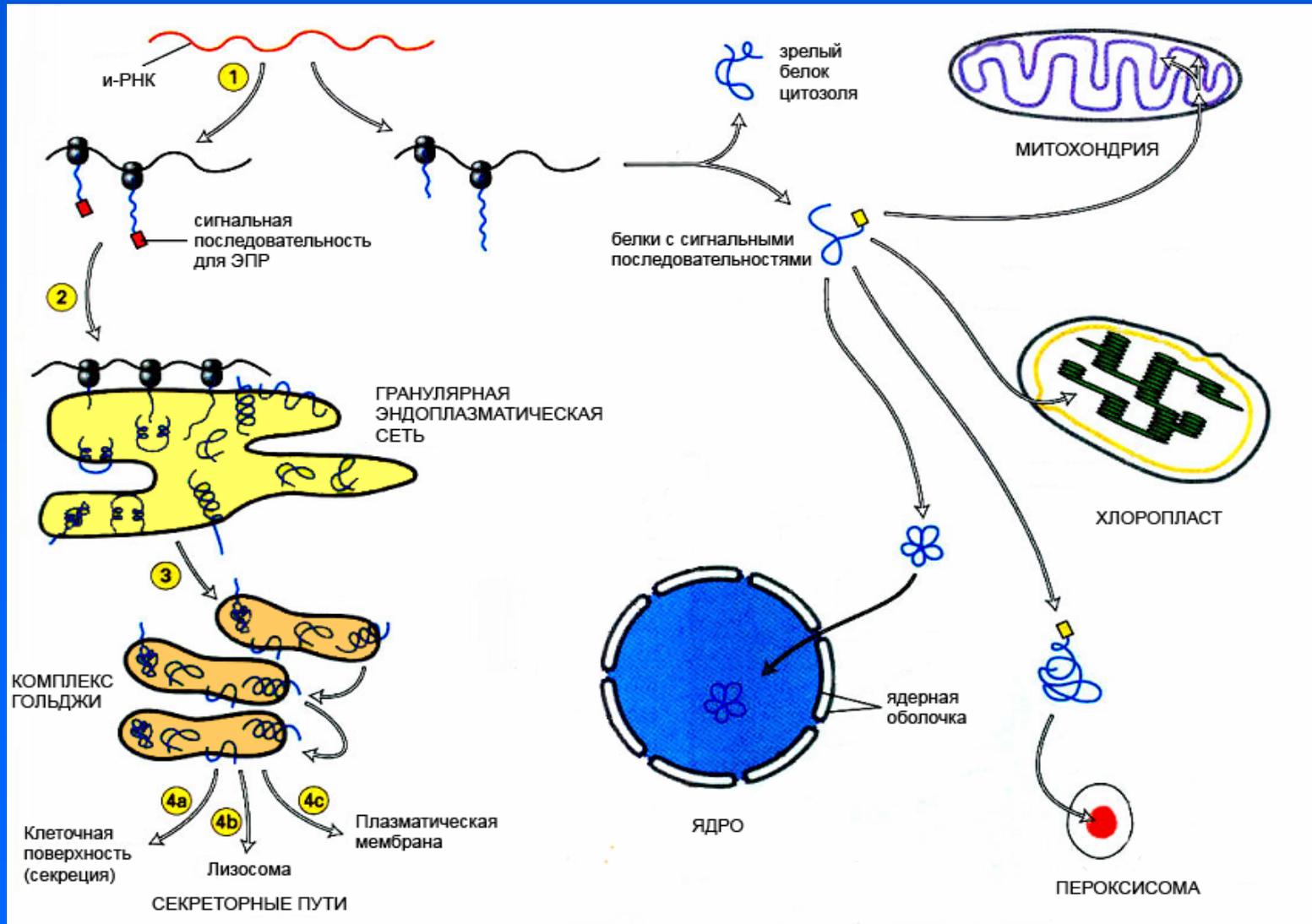
Гликозилирование белка в ЭПР



Биосинтез липидов в ЭПР



Адресация белков в клетке



Адресация белков в клетке

Белки переносятся внутри клетки в составе мембранных пузырьков или отдельными молекулами. В последнем случае им необходимы сигнальные последовательности.

Сигнальная последовательность – как правило, располагается на N-конце, она может отщепляться после прохождения белка через мембрану.

Сигнальные последовательности узнаются специальными рецепторами на поверхности органеллы.

Длина сигнальной последовательности составляет от 5 до 30 аминокислот. Она может быть гидрофильной и гидрофобной (экспорт из ядра, транспорт в ЭПР).

Заряд сигнальной последовательности – положительный (транспорт в ядро и митохондрии) или отрицательный (транспорт в ЭПР).

Перенос белков и мембран

Все транспортируемые белки содержат специальные метки (сигнальные последовательности), указывающие их конечный адрес

Перенос белков: в растворимой фазе и в виде мембранных пузырьков.

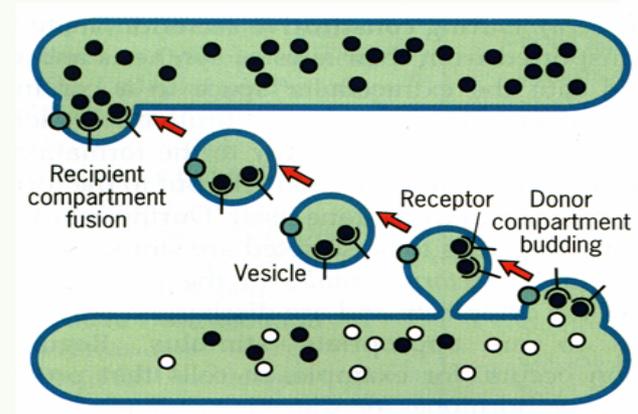
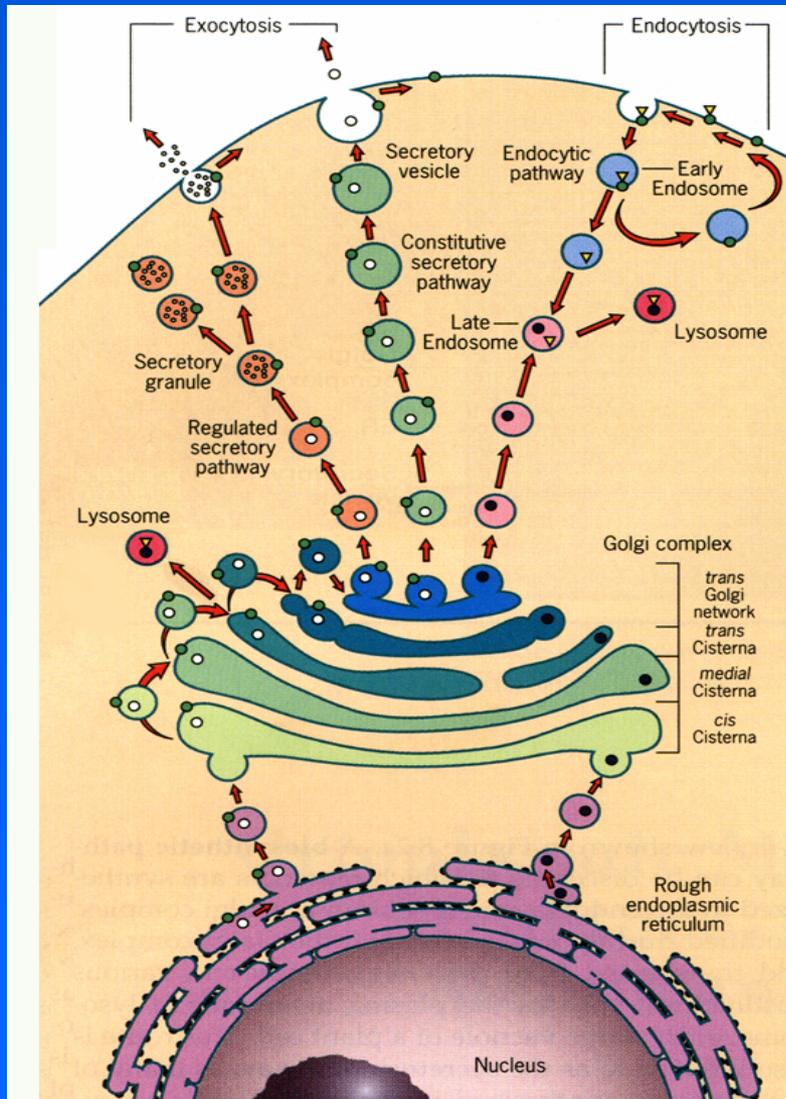
Модели переноса белков:

1. необратимый транспорт
2. обратимый транспорт (челночный)

Перенос белков в виде мембранных пузырьков.

Образование транспортных пузырьков – сортировка – слияние – рециклирование белков

Перенос мембран в клетке



Этапы переноса
содержимого цистерн

ЭНДОЦИТОЗ И ЭКЗОЦИТОЗ

Экзоцитоз – выброс секреторных пузырьков из клетки и выделение их содержимого во внешнюю среду.

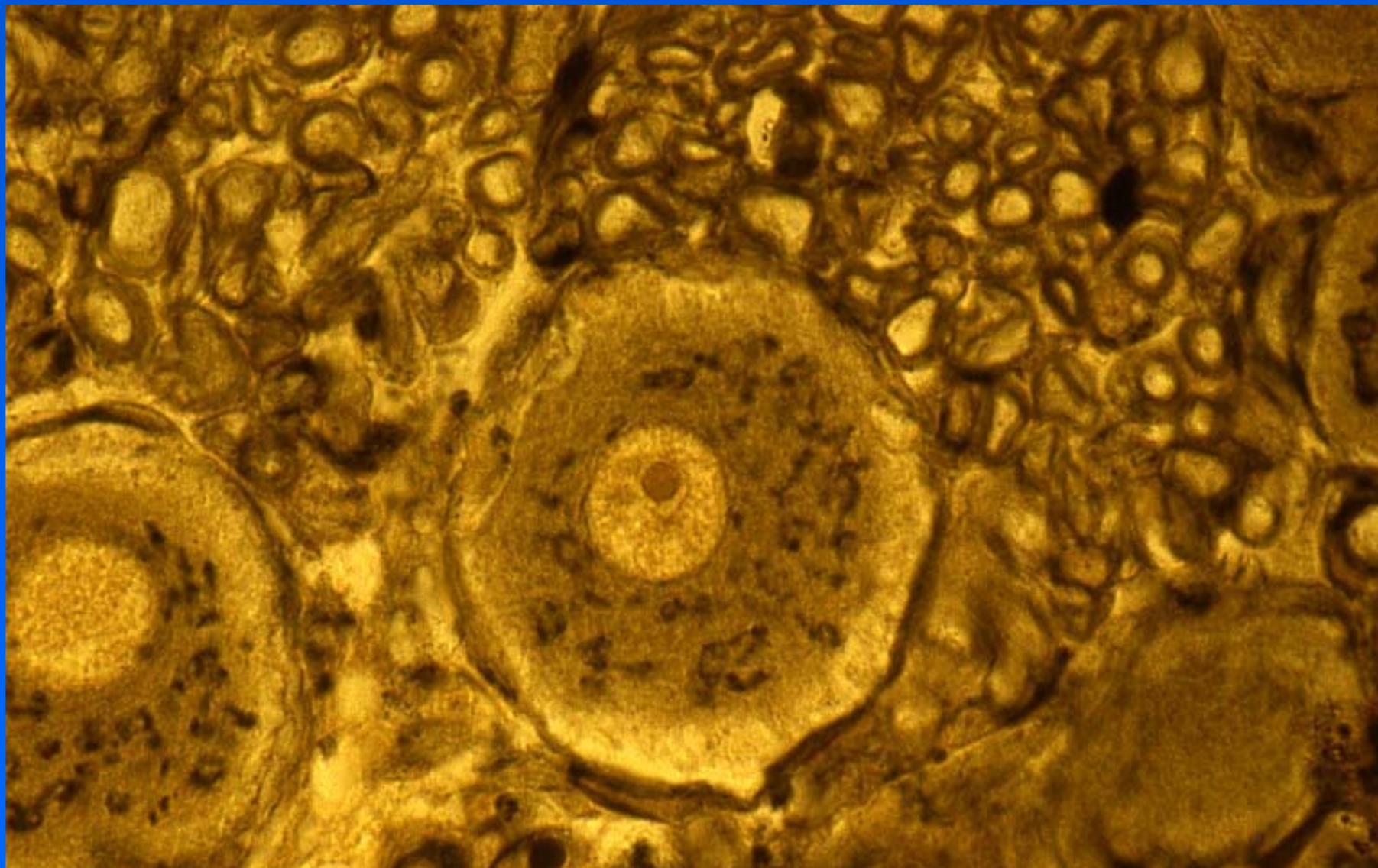
Типы экзоцитоза: конститутивный и регулируемый.

Содержимое экзоцитозных пузырьков, в основном, формируется в аппарате Гольджи.

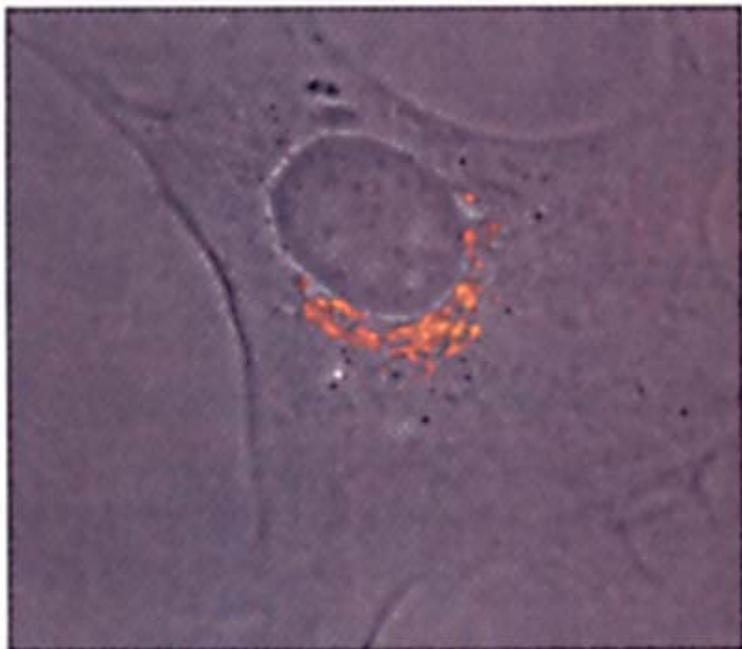
Эндоцитоз – поглощение (абсорбция) белков и макрочастиц плазматической мембраной и их транспорт внутрь клетки.

Эндоцитируемый материал претерпевает различные превращения внутри клетки.

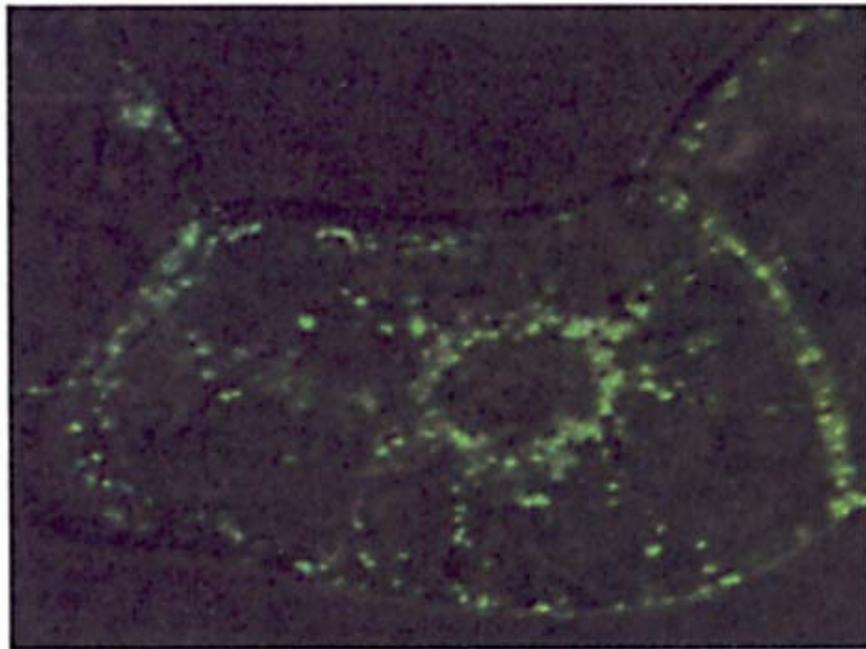
Аппарат Гольджи, серебрение нейронов



Аппарат Гольджи, люминесцентная микроскопия

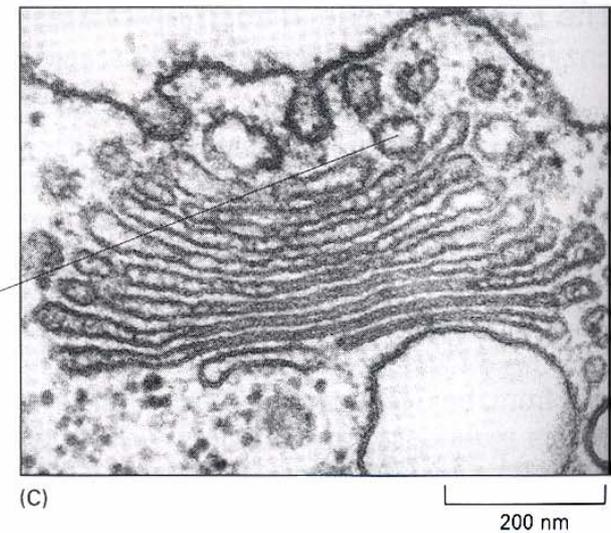
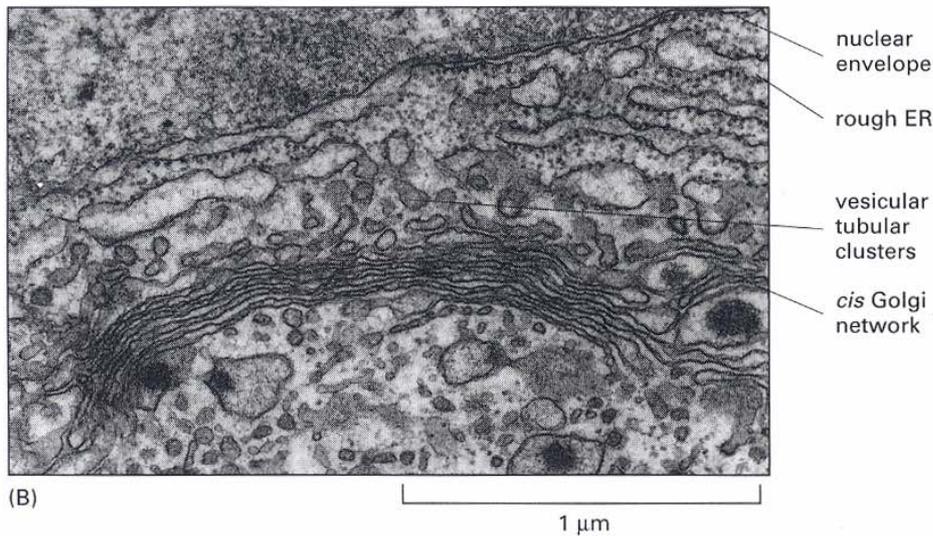
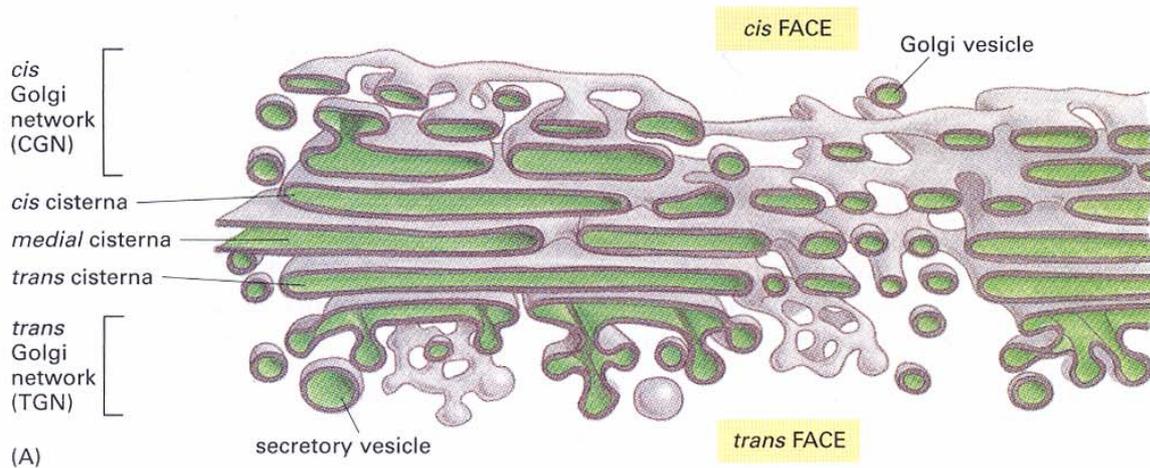


Животные



Растения

Аппарат Гольджи: схема и ЭМ



Структура аппарата Гольджи

Единица комплекса Гольджи – стопка плоских цистерн - диктиосома. К ней примыкают цис-Гольджи и транс-Гольджи сеть.

Цистерны не имеют анастомозов поперек диктиосомы. Химические реакции внутри цистерн различаются.

Средний размер диктиосомы – 5-10 цистерн. Диаметр – около 1-3 мкм.

Цистерны постоянно обновляются – проксимальная формируется за счет слияния пузырьков, приходящих из ЭПР, дистальная распадается за счет отшнуровки пузырьков, уходящих в разные компартменты и наружу клетки.

Дополнительный обмен между цистернами внутри стопки происходит с помощью транспортных пузырьков.

Возможно, что цистерны перемещаются в диктиосоме по мере созревания.

Основные функции аппарата Гольджи

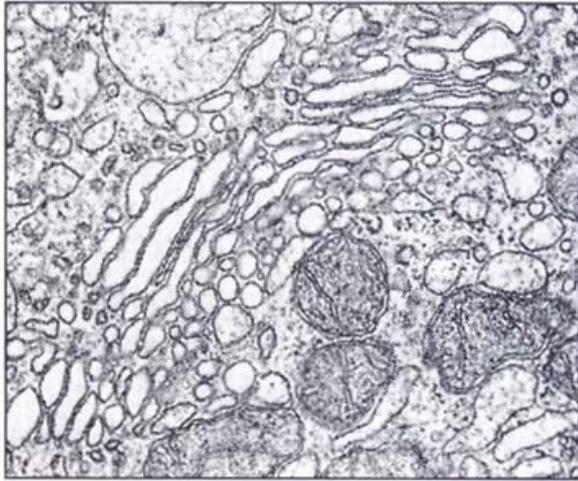
Опыты Ньютра и Леблона (1965): интенсивное включение углеводов в АГ секретирующей клетки поджелудочной железы.

Посттрасляционная модификация белков; синтез, отщепление и модификация углеводов: гликозилирование, фосфорилирование, сульфатирование.

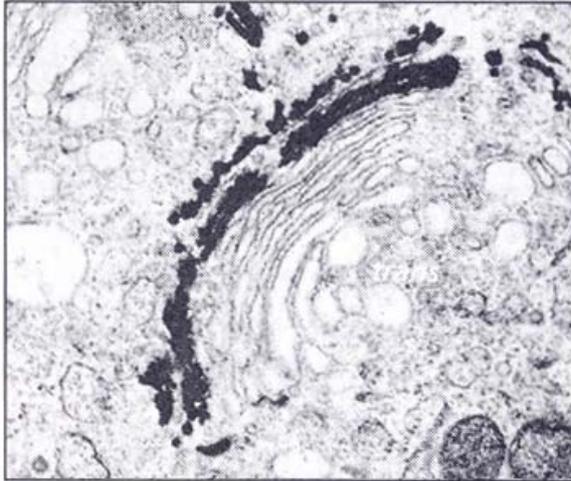
Формирование сигнальной последовательности молекул.

Формирование предшественников плазматической мембраны.

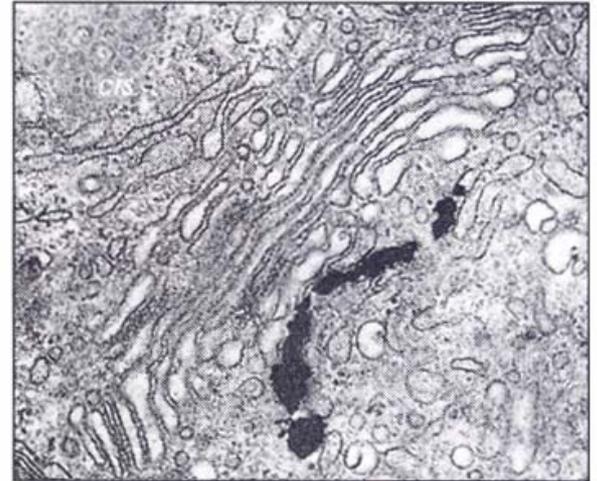
Поляризация внутри диктиосомы



морфология



восстановление осмия –
цис-Гольджи



кислая фосфатаза –
транс-Гольджи

Строение диктиосомы: цис-компаратмент, транс-компаратмент и промежуточный компартмент отличаются спектрами основных реакций.

Последовательность реакций в аппарате Гольджи

Фосфорилирование олигосахаридов на лизосомных белках.

Синтез глюкозаминогликанов – длинные неветвящиеся полисахариды.

Присоединение маннозы (маннозо-6-фосфат – адресация в лизосомы).

Присоединение галактозы и глюкозаминогликанов к белкам – формирование протеогликанов.

Сульфатирование протеогликанов.

Формирование активных лизосомных ферментов (кислая фосфатаза).

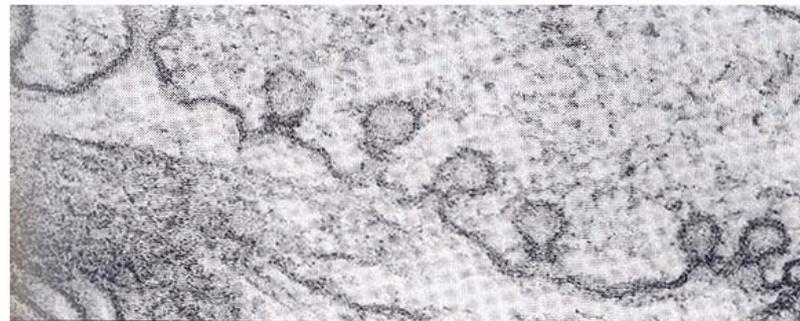
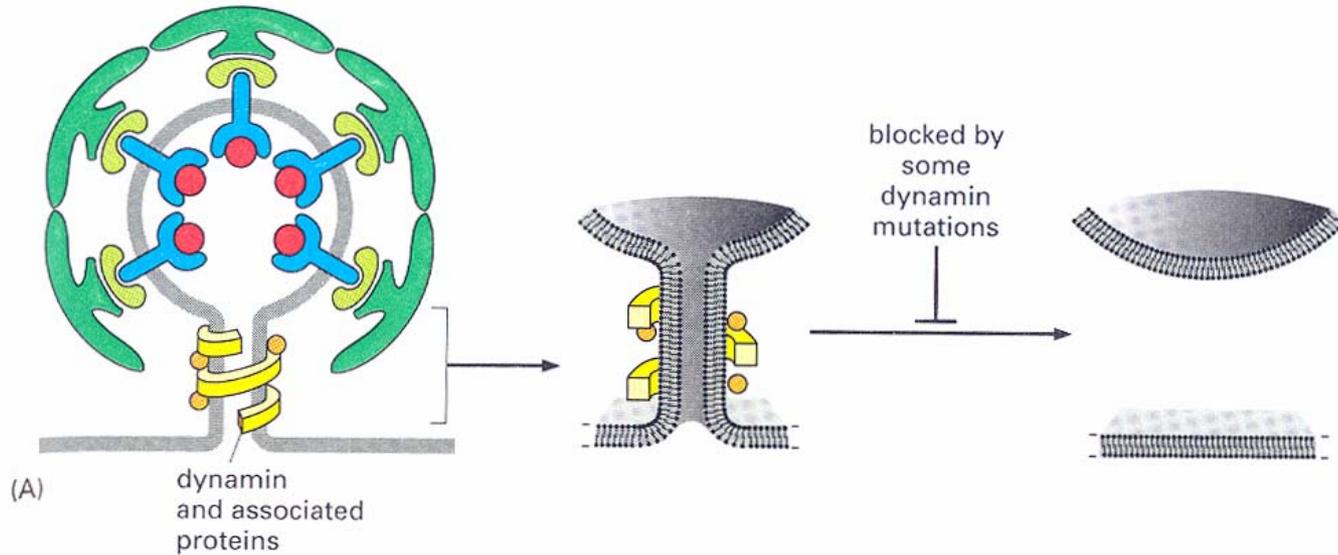
Производные АГ – три типа транспортных пузырьков

Экзоцитозные пузырьки – транспортируются от АГ к мембране и сливаются с ней, выделяя содержимое во внеклеточную среду (конститутивный экзоцитоз).

Секреторные пузырьки – накапливаются в цитоплазме; их слияние с плазматической мембраной начинается при появлении в цитоплазме специального сигнала (регулируемый экзоцитоз).

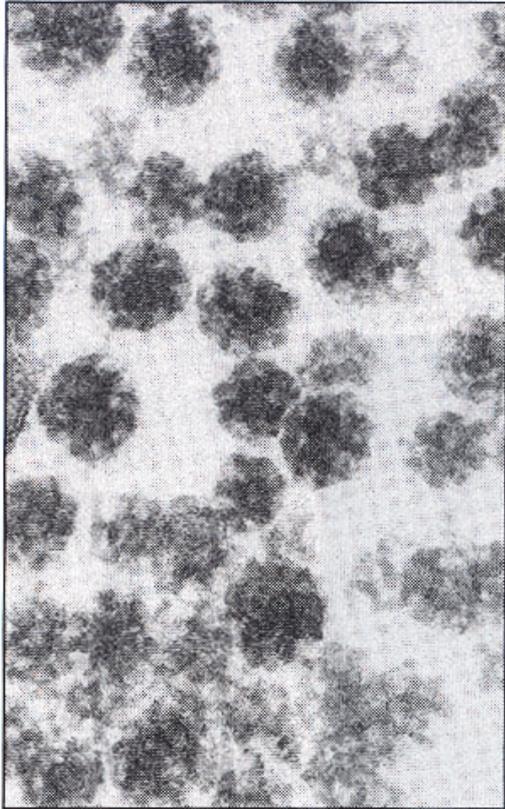
Первичные лизосомы (лизосомные пузырьки) – содержат ферменты лизосом в неактивном виде и сливаются с поздними эндосомами. Содержимое лизосом может выделяться во внешнюю среду только при гибели клетки.

Почкование пузырьков

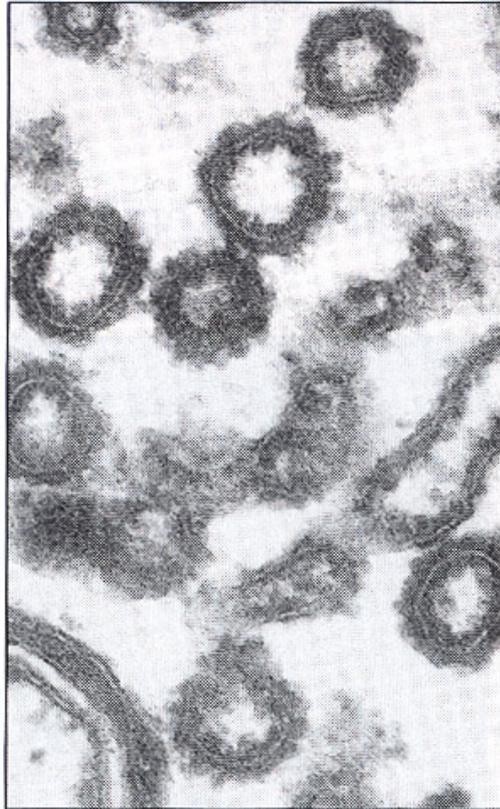


200 nm

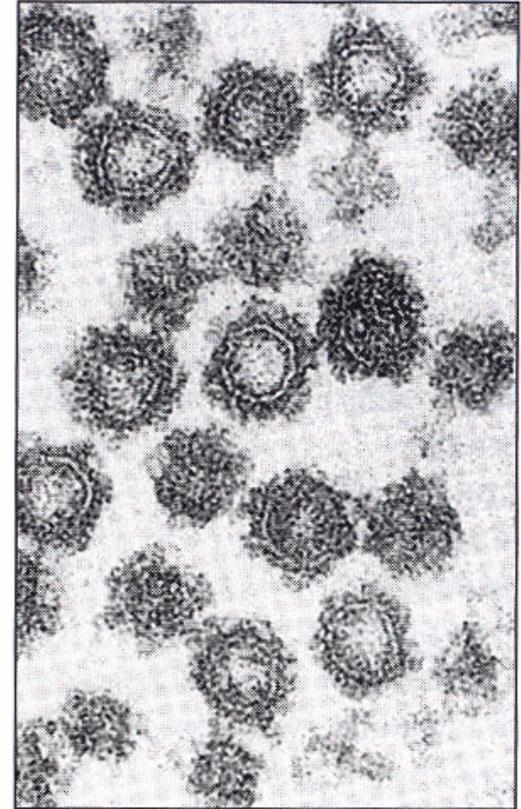
Три основных типа окаймленных пузырьков



clathrin



COPI

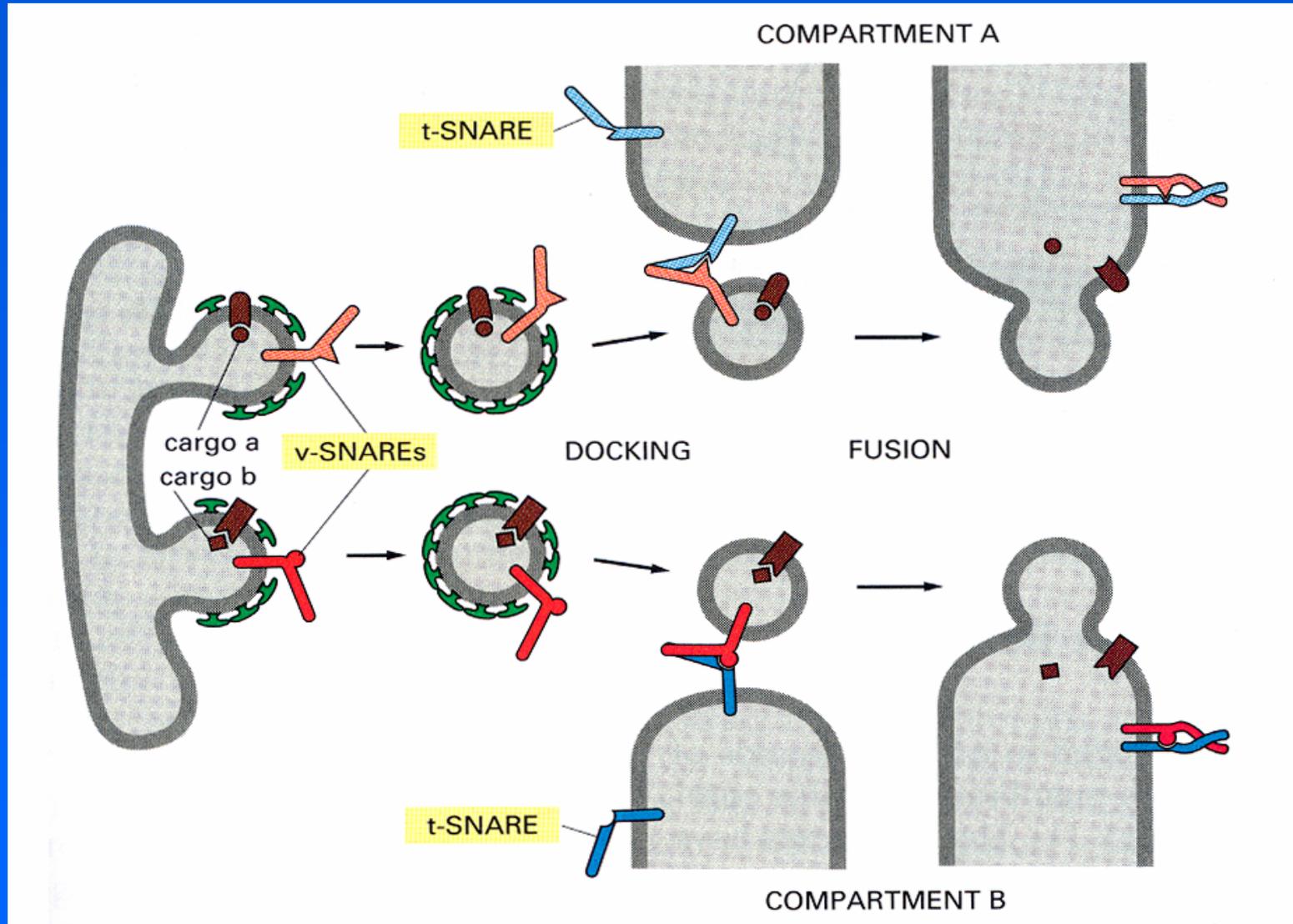


COPII

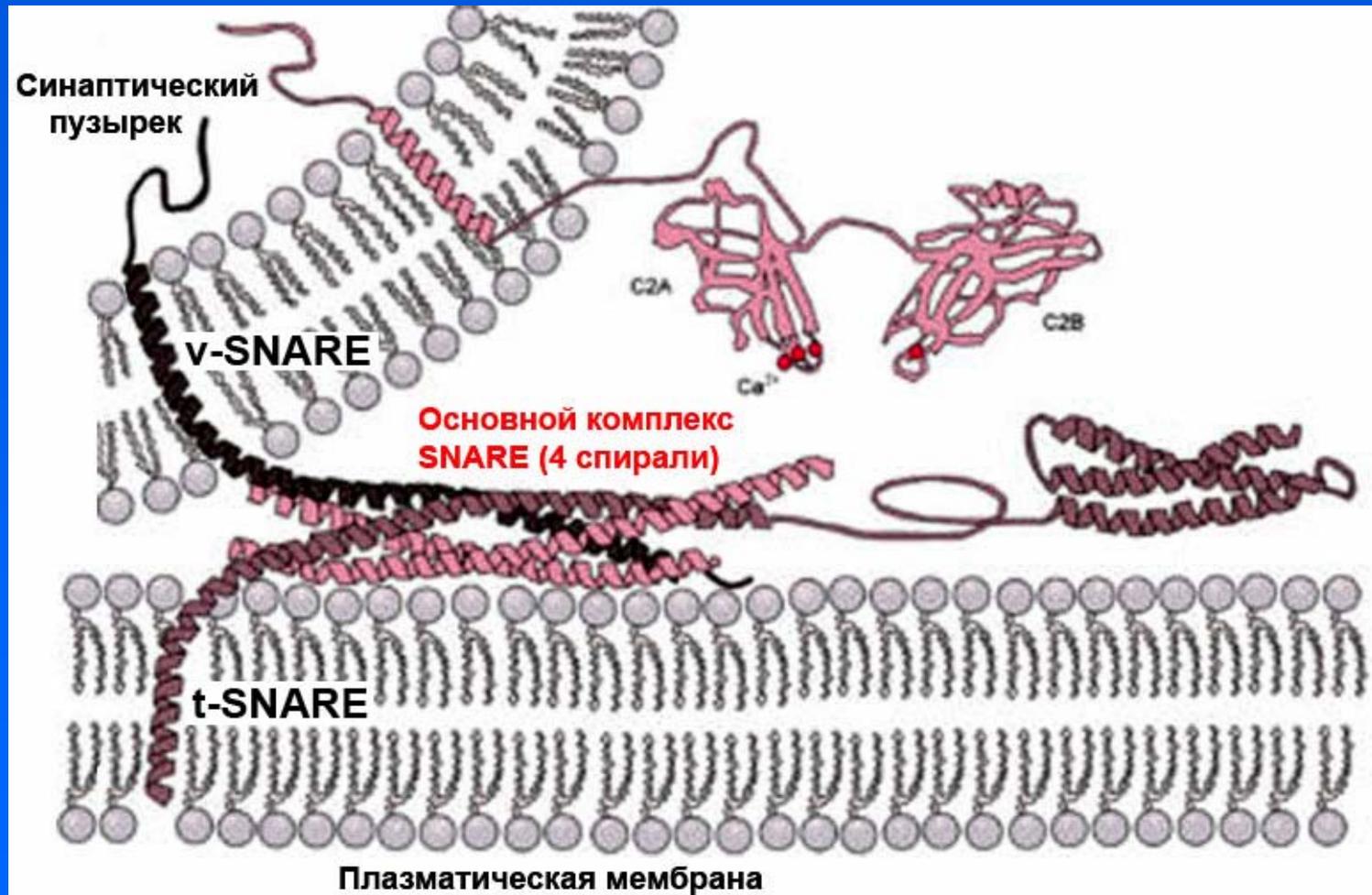
100 nm

Для формирования мембранных пузырьков малого диаметра необходимы специальные белки.

Докование пузырьков



Слияние мембран с помощью SNARE-комплекса



Транспорт пузырьков

5 этапов переноса – почкование, транспорт пузырька в другой отсек, причаливание, докование, слияние с акцепторной мембраной

Транспорт начинается в эндоплазматической сети (почкование – COPII) или от плазматической мембраны (впячивание – клатрин)

Переход из ЭР в АГ (цис-компаратмент) – тубуло-везикулярный комплекс.

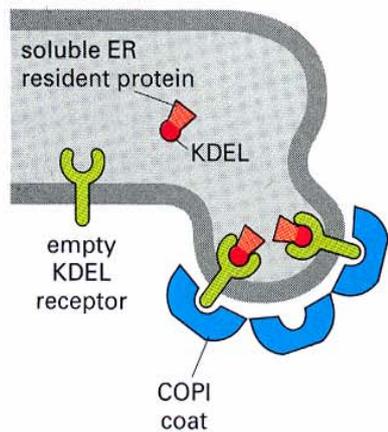
Перенос пузырьков между цистернами АГ происходит с помощью COPI.

Сортировка модифицированных белков происходит в транс-компаратменте АГ.

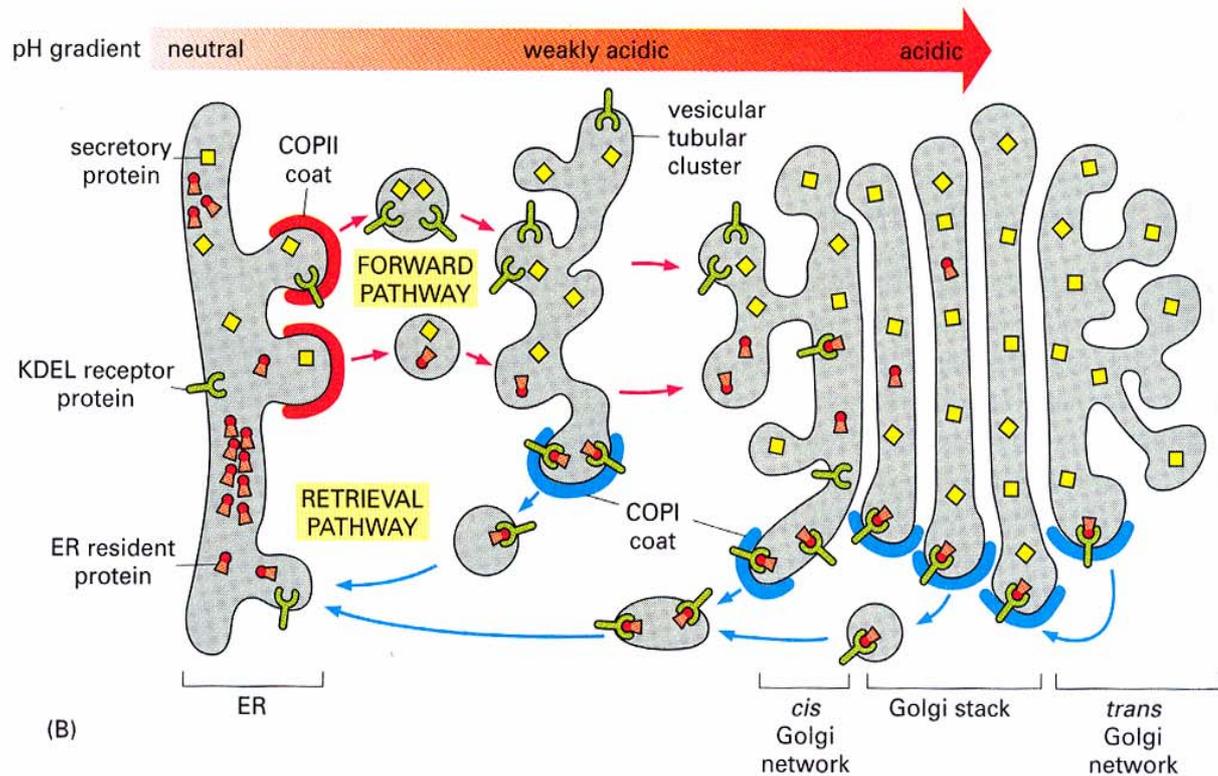
Отщепление пузырьков от транс-компаратмента АГ – участвуют COPI и клатрин

Секреция и формирование эндосом – клатрин.

Обмен белков между ЭПР и АГ



(A)



(B)

Перенос материала между ЭПР и АГ

Перенос между ЭПР и АГ осуществляется в виде замкнутых пузырьков (животные) или через тубулярные выросты мембран (растения).

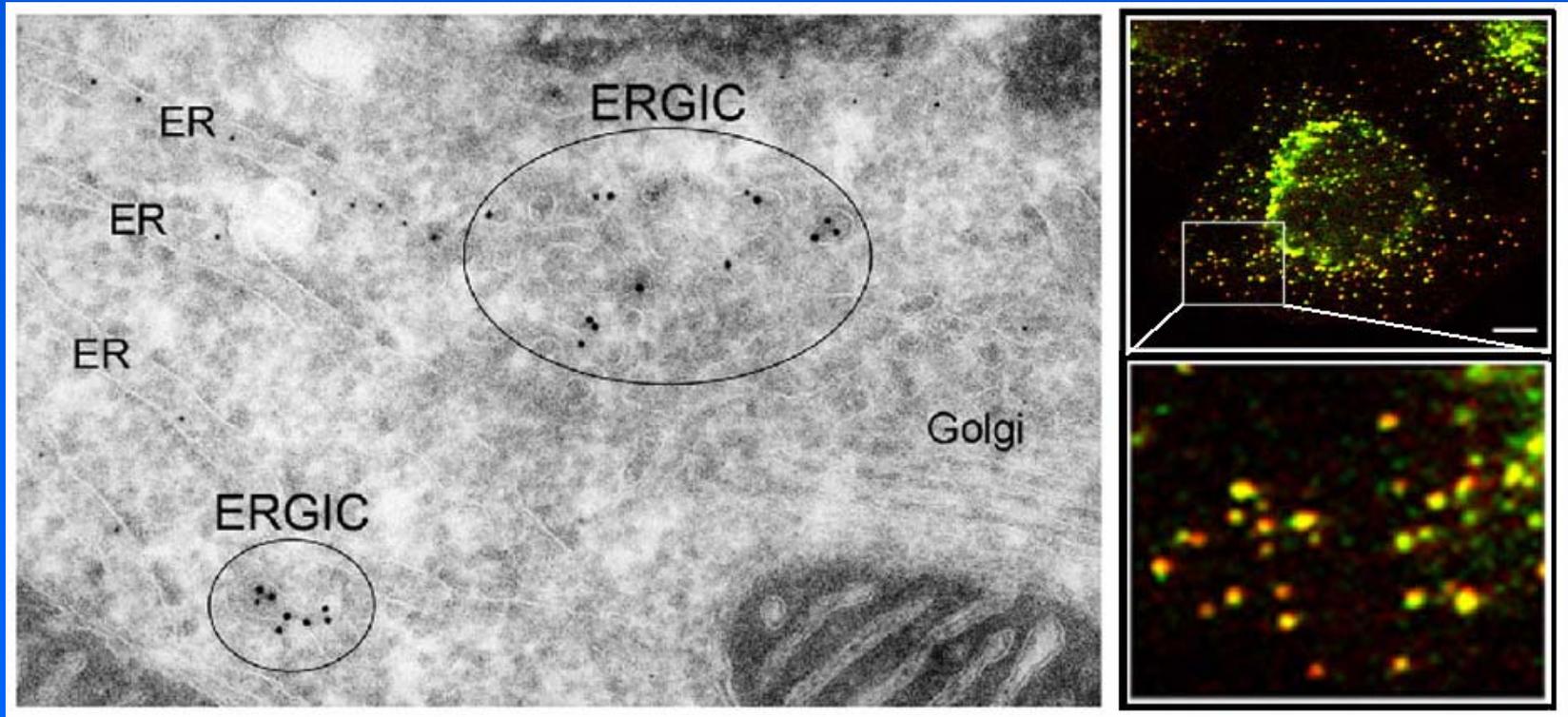
Этапы переноса – почкование, антероградный транспорт пузырька в другой отсек, причаливание, слияние с акцепторной мембраной, разделение содержимого, ретроградный транспорт переносчиков.

Участники процесса: coat protein complexes (COPI, COPII), SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment recceptor proteins).

Транспорт начинается в эндоплазматической сети в специальных местах – областях выхода (ERES), где на мембране собирается комплекс COPII.

По-видимому, существует промежуточная система перестройки пузырьков между ЭПР и АГ.

Промежуточный комплекс между ЭПР и АГ



Кластеры ERGIC и места выхода из ЭПР расположены вблизи друг друга (наложение сигналов в световом микроскопе)

ЭКЗОЦИТОЗ

Секреция (каноническая) – выделение веществ из клетки с помощью мембранных пузырьков.

Секреция – конститутивная (постоянная) и кальций зависимая (регулируемая).

Механизм экзоцитоза: высокоспецифическое взаимодействие адапторных молекул, встроенных в мембраны (с расходом энергии АТФ).

Стадии экзоцитоза: транспорт пузырьков; начальное прикрепление; прочное прикрепление (докование); слияние мембран.

При регулируемой секреции вход кальция (через кальциевые каналы) стимулирует прочное прикрепление и модификацию мембран пузырьков.

Лизосомы

Открытие – де Дюв, 1950-е г.г.

Размер – 200-1500 нм. Окружены одинарной мембраной.

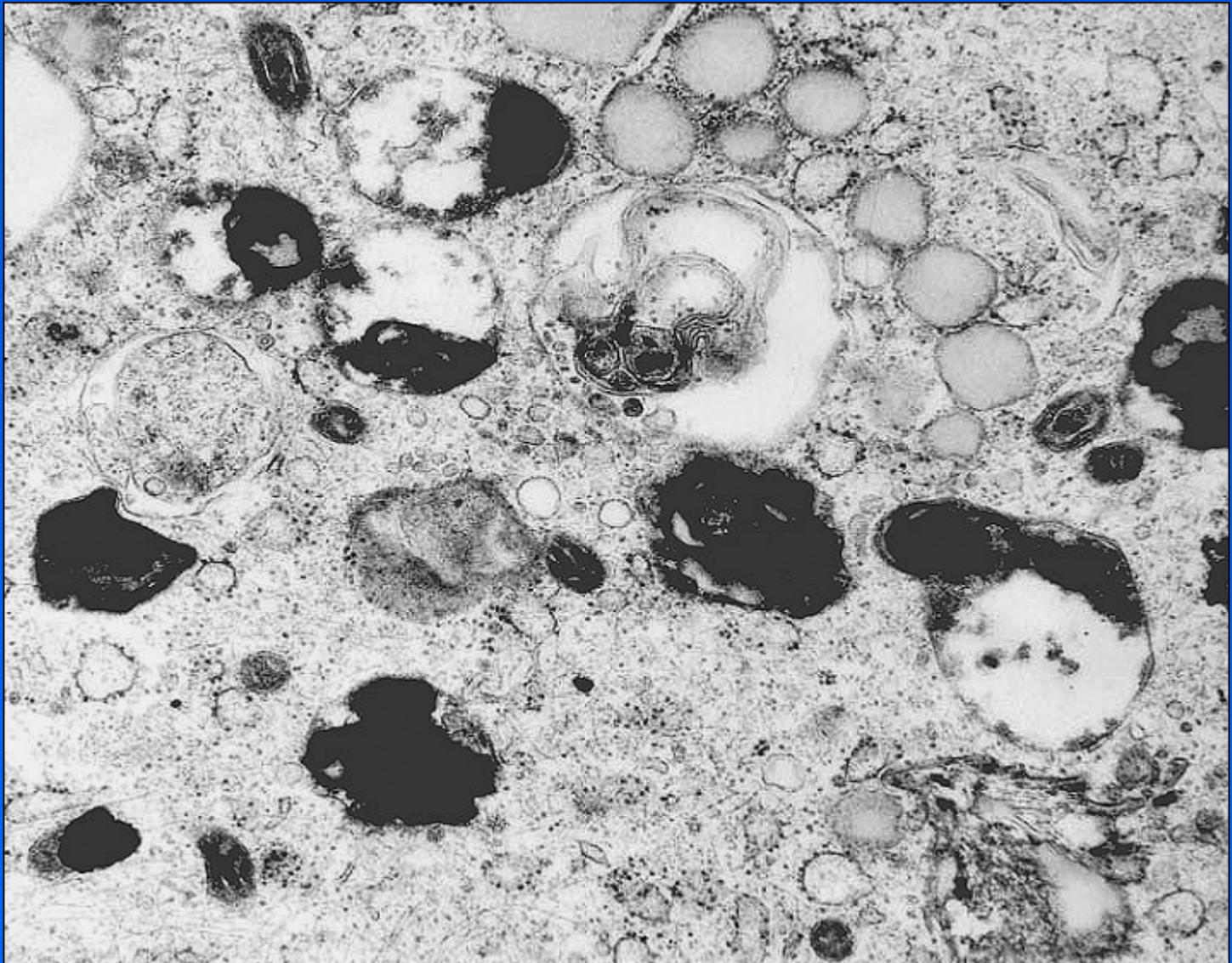
Ферменты: свыше 30 гидролаз (кислых) – протеазы, липазы, нуклеотидазы, полисахаридазы.

Функции: фагоцитоз; аутофагоцитоз; эндоцитоз, опосредованный рецепторами

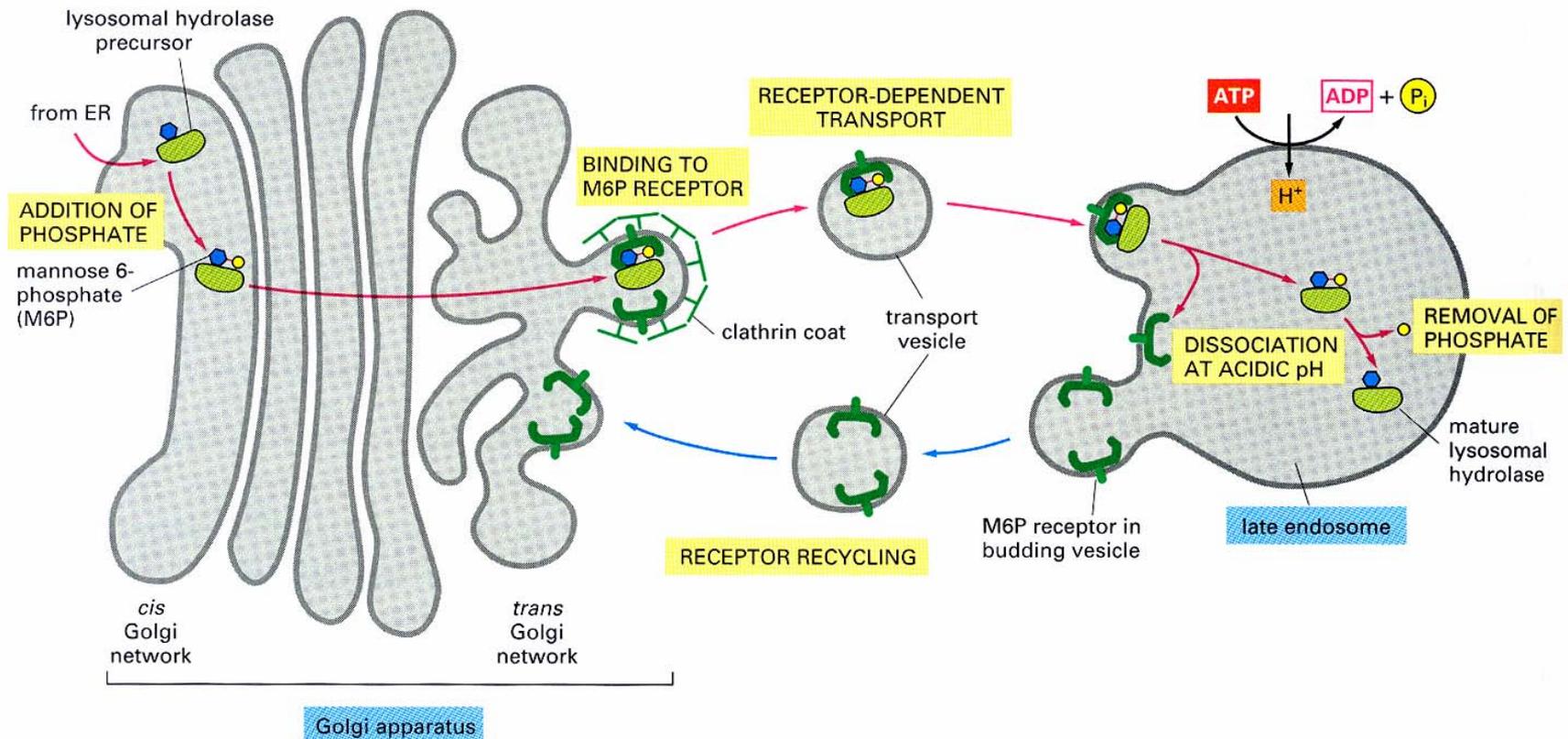
Цикл: поздняя эндосома + первичная лизосома – вторичная лизосома – остаточное тельце

Патология: дефекты лизосомных ферментов – болезни накопления (болезнь Гоше); асбестоз и силикоз – накопление нерастворимых волокон и утечка ферментов

Лизосомы, ЭМ



Формирование первичной лизосомы (поздней эндосомы)



Формирование вторичных ЛИЗОСОМ

Начальные этапы формирования вторичных лизосом изучены слабо. Известно несколько путей:

- слияние поздних эндосом, возникших в результате эндоцитоза
- формирование аутофагосом
- результат фагоцитоза (специализированные клетки).

Ферменты (кислые гидролазы) всегда доставляются во вторичную лизосому из ЭПР через аппарат Гольджи.

Формирование вторичной лизосомы происходит при понижении pH (pH~5).

Непереваренные вещества в составе вторичных лизосом иногда могут выделяться в результате экзоцитоза.

Внутриклеточное «пищеварение»

