

Лекция 5

Эндоцитоз

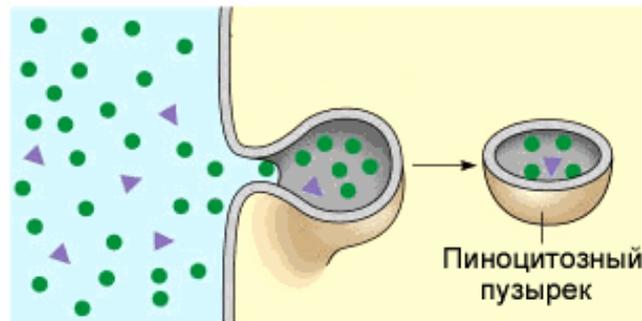
Рецепторы

Межклеточные контакты

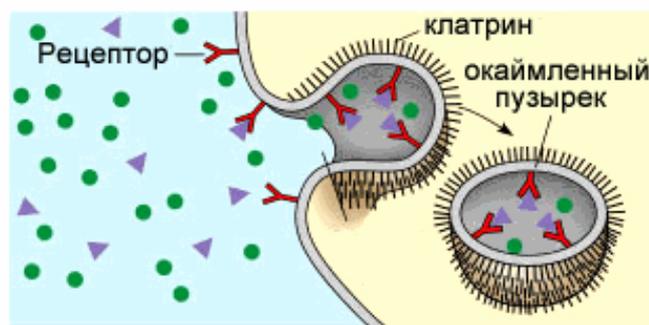
ЭНДОЦИТОЗ – ОСНОВНЫЕ ТИПЫ



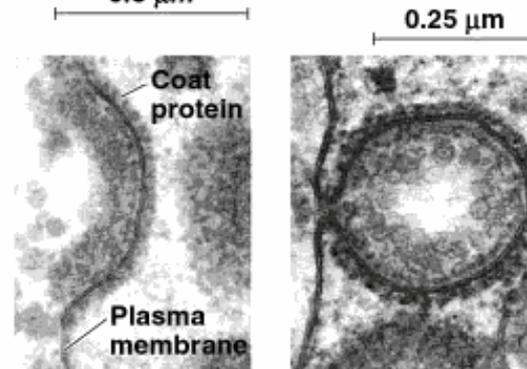
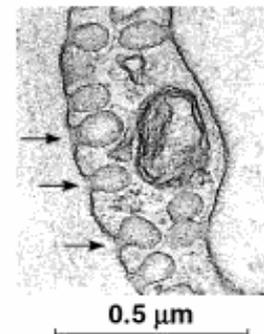
Фагоцитоз



Пиноцитоз



Рецептор-опосредованный эндоцитоз



ЭНДОЦИТОЗ

Макропиноцитоз – захват больших объемов ($\sim 1 \text{ мкм}^3$) за счет слияния мембранных выростов (раффлов).

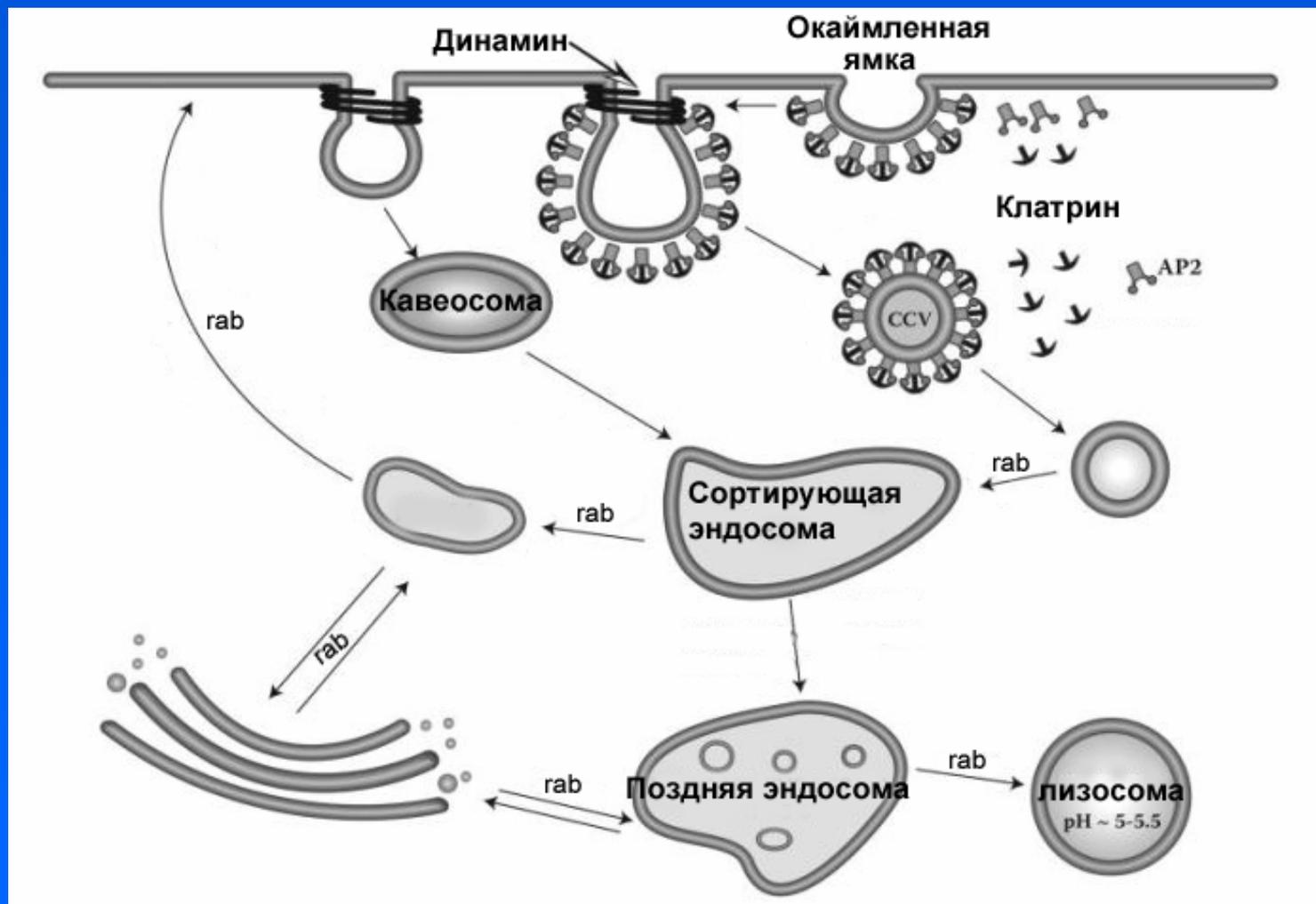
Фагоцитоз – захват твердых частиц размером более 0,5 мкм.

Микроэндоцитоз (объем $\sim 0,001 \text{ мкм}^3$):

Клатрин-зависимый путь – интернализация белков, связавшихся с рецепторами мембраны. Предшественники – окаймленные ямки. Диаметр пузырьков – около 100 нм.

Кавеолы – независимый от клатрина путь интернализации (Основной белок - кавеолин). Предшественники – вогнутые участки мембраны, обогащенные холестерином. Диаметр впячиваний – 50 нм.

Микроэндоцитоз и эндосомы



Клатрин-зависимый ЭНДОЦИТОЗ

Окаймленные ямки все время находятся на плазматической мембране. Они содержат мало холестерина.

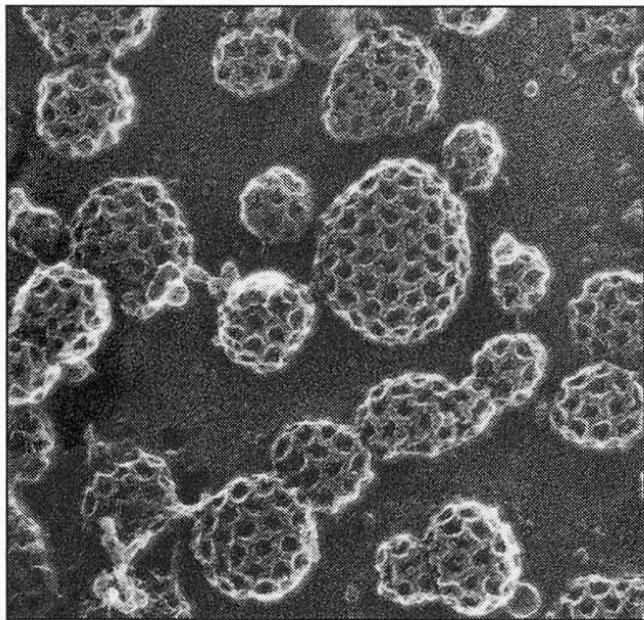
Время формирования окаймленного пузырька составляет около 30-60 с. Диаметр – около 100 нм.

Клатрин – белок, который декорирует окаймленные пузырьки. Клатрин связывается с мембраной через адапторный белок, формируя жесткий гексагональный каркас и обеспечивая ее скручивание в колбовидную структуру диаметром около 100 нм.

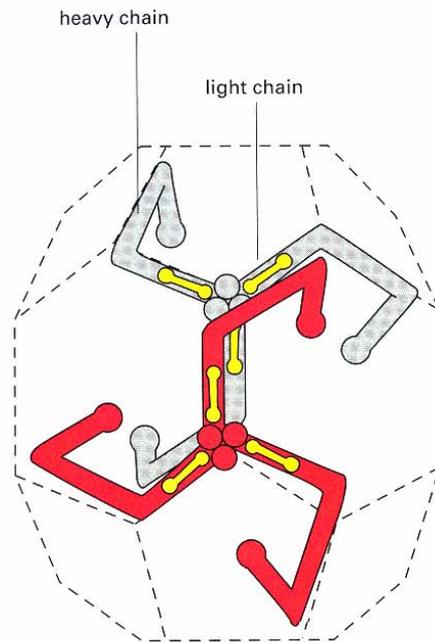
Колба отшнуровывается с помощью динамина от плазматической мембраны и замыкается в окаймленный пузырек.

После формирования пузырька клатрин быстро его покидает, убираемый шаперонами.

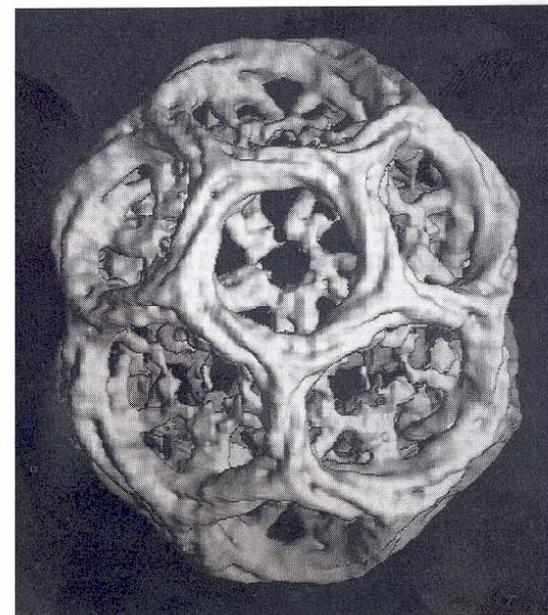
Клатрин в окаймленных пузырьках



0.2 μm



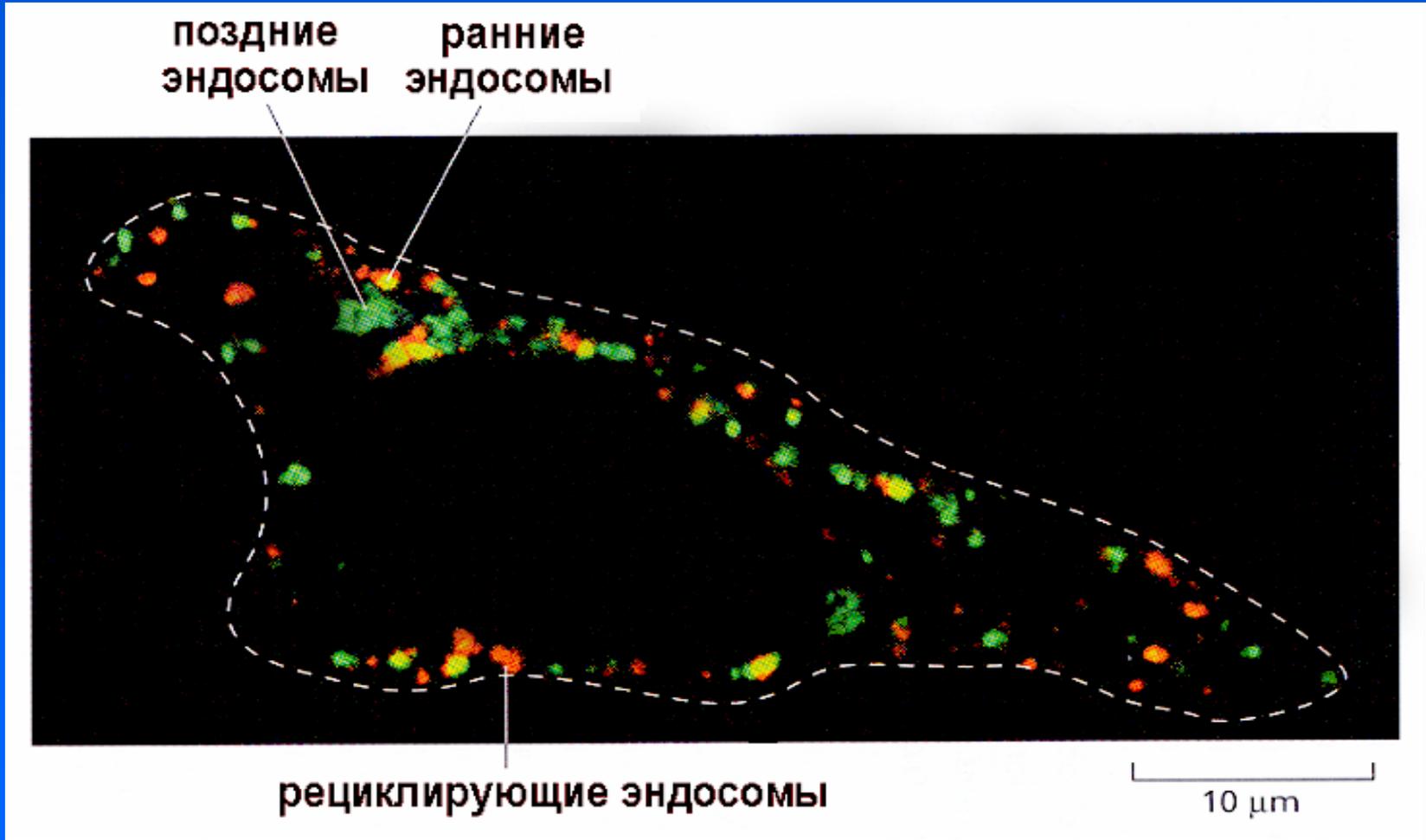
(B)



(C)

50 nm

Цикл эндосом в живой клетке

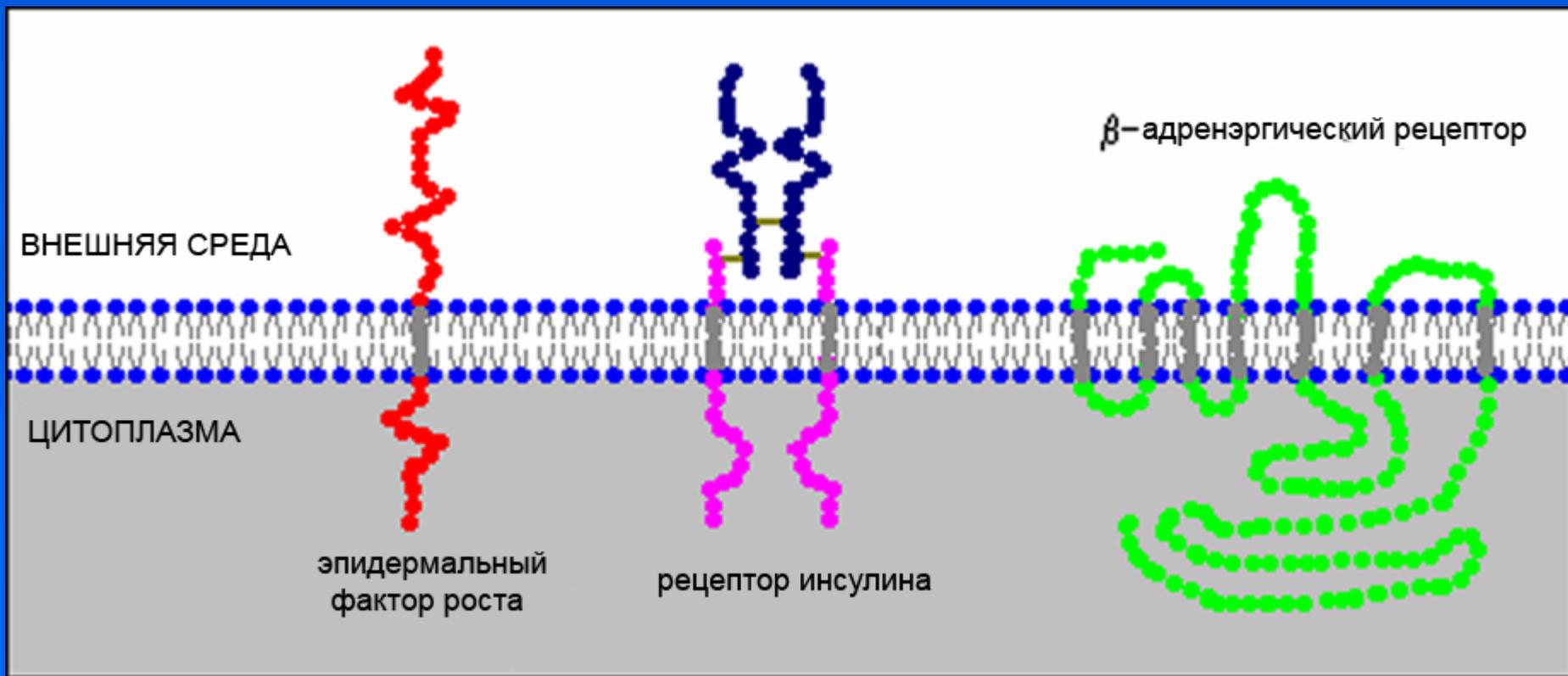


pH эндосом меняется в зависимости от фазы их цикла

Цикл эндосом

1. Окаймленные пузырьки освобождаются от клатрина и сливаются в ранние эндосомы.
2. Ранние эндосомы – располагаются вблизи поверхности, имеют слегка кислый рН (около 6,5). В них расщепляется большинство комплексов лиганд-рецептор.
3. Поздние эндосомы – могут уходить от поверхности. Они имеют более кислый рН (5,5), за счет чего в них активируются кислые гидролазы. Представляют собой промежуточное звено на пути к лизосомам.
4. Лизосомы (вторичные) – конечная стадия внутриклеточного транспорта, связанного с расщеплением поглощенного клеткой содержимого. Имеют сильно кислый рН и активные гидролазы.

Структура поверхностных рецепторов



Внеклеточный домен – связывание лиганда;
Трансмембранный домен – гидрофобный участок молекулы;
Внутренний (цитоплазматический) домен – передача сигнала (эффектор)

Поверхностные рецепторы

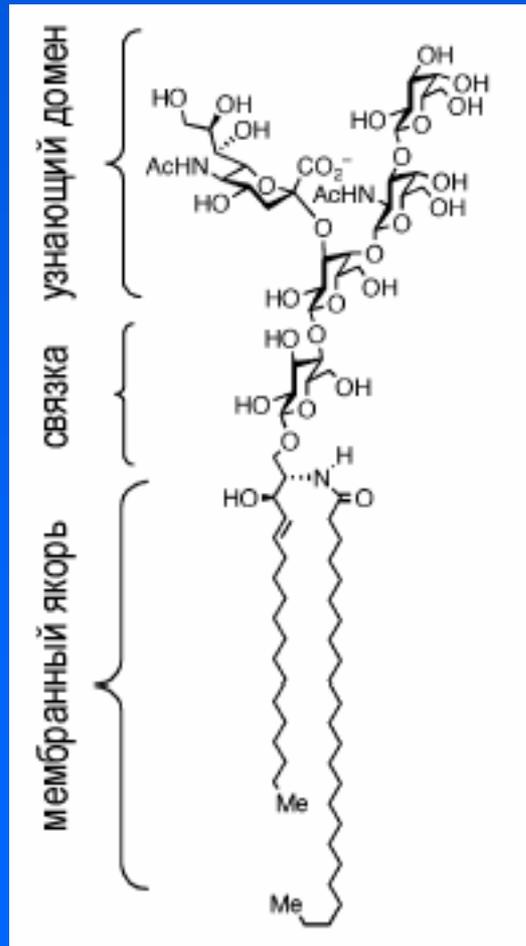
Расположение – трансмембранные (интегральные) белки. На внешней стороне мембраны часто представлены сложными гликопротеинами; на внутренней стороне мембраны нередко связаны с другими белками.

Распределение в мембране – олигомеры (гомо, гетеро), как правило, способны перемещаться.

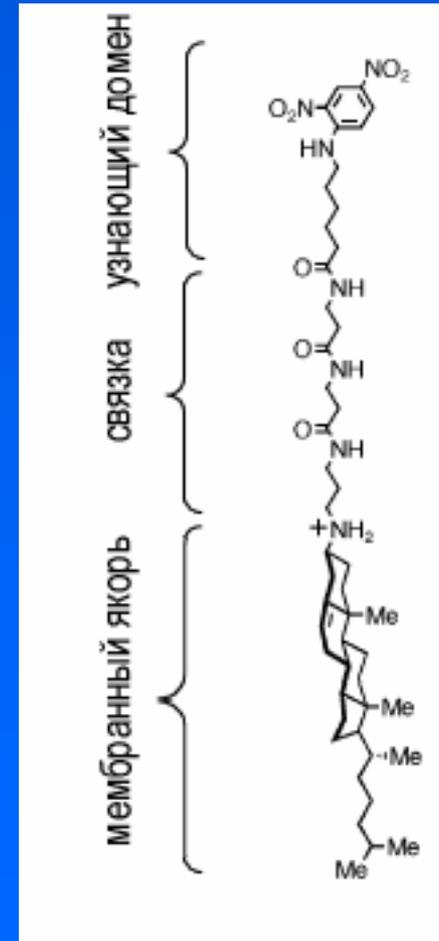
Принцип работы – за счет изменения собственной конформации запускают внутриклеточные каскады реакций (фосфорилирование и проч.) или увеличивают проницаемость мембраны для ионов (Ca^{++} , Na^+).

Строение минимального рецептора

Рецептор холерного токсина



Синтетический рецептор антител к 2,4-ДНФ



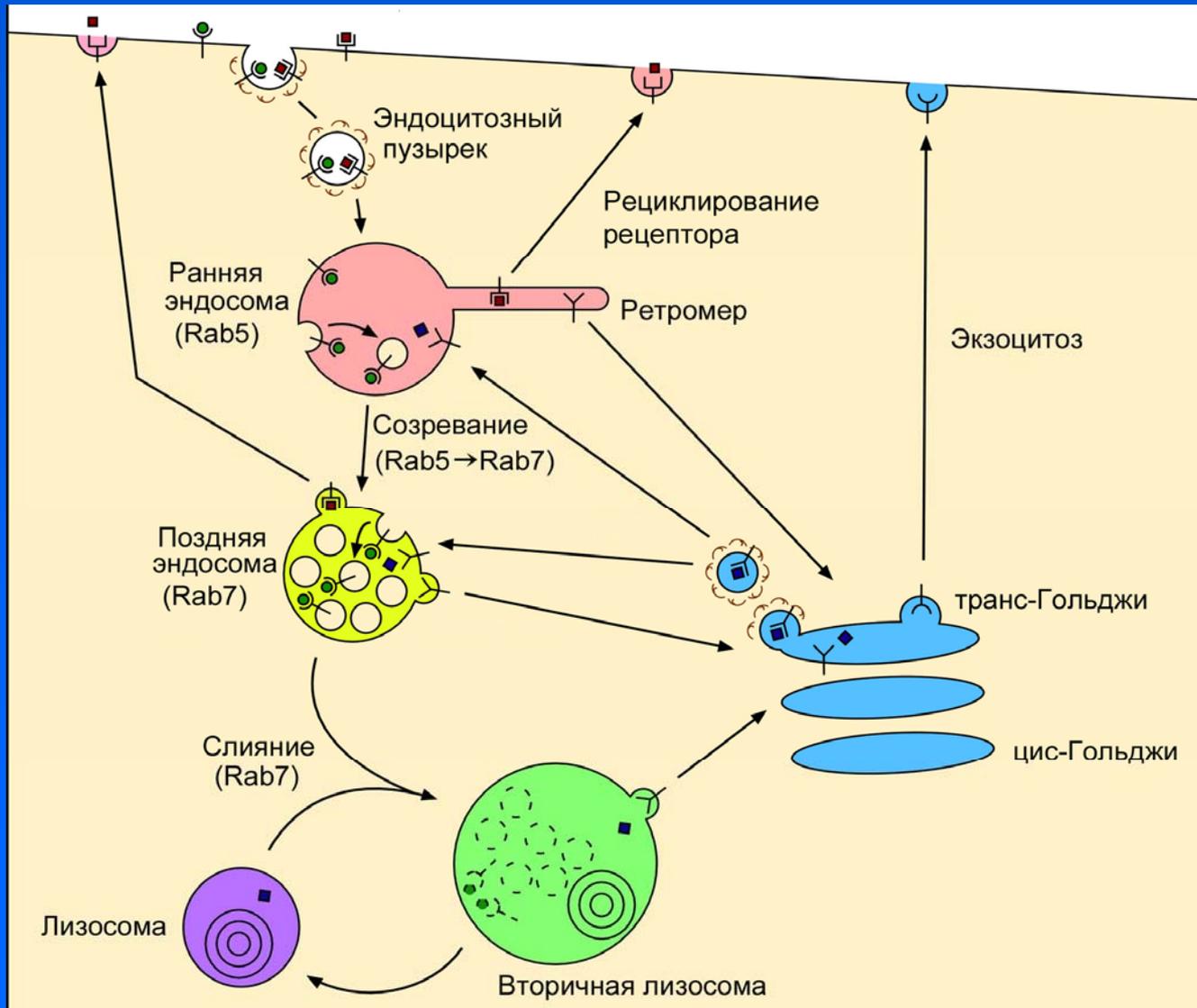
Этапы работы рецептора

1. Изменение конформации рецепторного комплекса при связывании с лигандом.
2. Кластеризация (агрегация) комплексов в липидных доменах мембраны (рафтах).
3. Передача сигнала сквозь мембрану и перестройка цитоплазматического домена: активация протеинкиназ или конформационное изменение, которое обеспечивает связывание цитоплазматического лиганда с рецептором (внутри клетки).
4. Активация вторичных переносчиков на внутренней поверхности плазматической мембраны или вблизи нее.
5. Высвобождение лиганда на поверхности клетки или интернализация комплекса рецептора с внешним лигандом в эндосому.

Круговорот рецепторов

- 1 стадия. Образование комплекса лиганд-рецептор и кластера рецепторов.
- 2 стадия. Интернализация комплексов и образование эндосомного пузырька.
- 3 стадия. Слияние первичных эндосом, активация протонной помпы в мембране, закисление содержимого ($\text{pH}=6$) и диссоциация комплексов лиганд-рецептор.
- 4 стадия. Возврат рецепторов в плазматическую мембрану путем экзоцитоза (отщепление пузырьков от поздней эндосомы). Свободный лиганд частично или полностью расщепляется в лизосомах при $\text{pH}=5$, или выходит в цитоплазму.

Рециркуляция рецепторов



Передача сигналов – общие замечания

Общая оценка для бактерий – до 90% генов отвечают за передачу сигналов. У эукариот – похожий порядок.

Принципы передачи сигнала: отрицательная обратная связь и положительный контроль (каскад усиления).

Устойчивость сигнальных путей достигается за счет избыточности белков, вовлеченных к ним.

Цепь передачи сигнала строится модульно – одни элементы уникальны для каждого пути, другие элементы общие.

Система передачи сигнала должна быть устойчива к обычным колебаниям внешней среды.

Белки, участвующие в передаче сигнала в цитоплазме, собираются в микродомены - трансдуконы.

Общие принципы межклеточной сигнализации

Внешние сигналы распознаются клеткой с помощью рецепторов

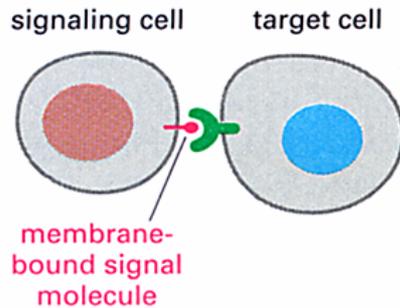
Каждая клетка имеет запрограммированные ответы

Рецепторы: наружные, цитоплазматические, ядерные.

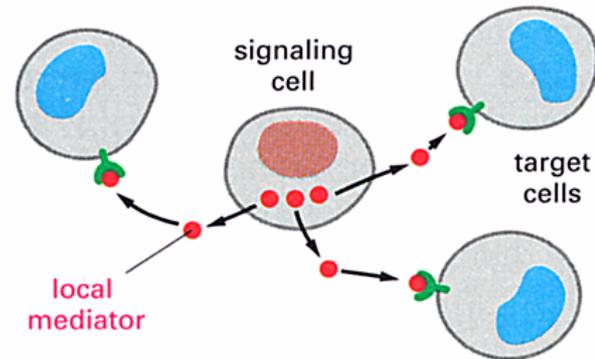
Четыре типа сигналов:
контактные взаимодействия,
паракриновые, синаптические,
эндокринные

Четыре типа межклеточных сигналов

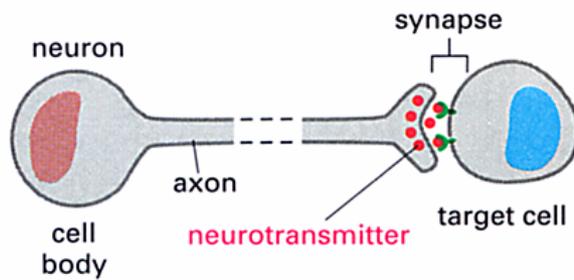
контактный



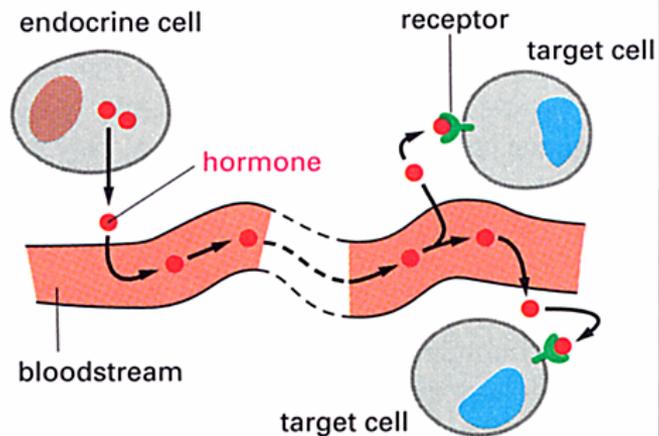
паракриновый



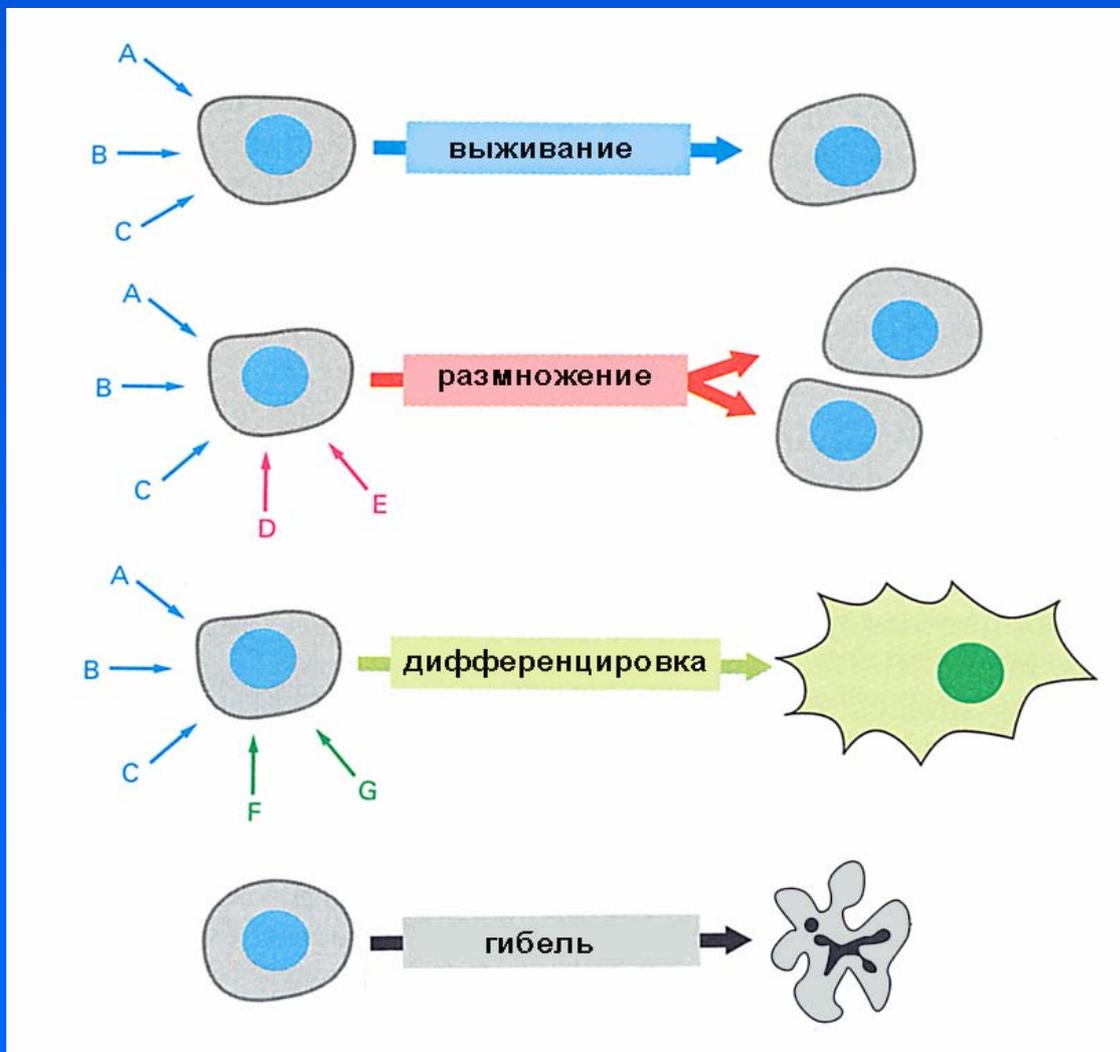
синаптический



эндокринный



Четыре типа клеточных ответов



Интегрины

Гетеродимерные белки, каждый имеет один трансмембранный домен. Располагаются в мембране постоянно (не рециклируют) и имеют низкую константу связывания с лигандами.

Внешние домены сильно гликозилированы.

Не имеют собственной киназной активности, но взаимодействуют с протеинкиназами в процессе передачи сигналов.

Взаимодействуют с внеклеточным матриксом и цитоскелетом.

Осуществляют механо-химическое сопряжение.

Кластеризуются при передаче сигнала.

Являются активируемыми (лейкоциты, тромбоциты) или конститутивно активными (эпителий).

Передают сигналы для всех типов клеточных ответов.

Toll-подобные рецепторы (TLR)

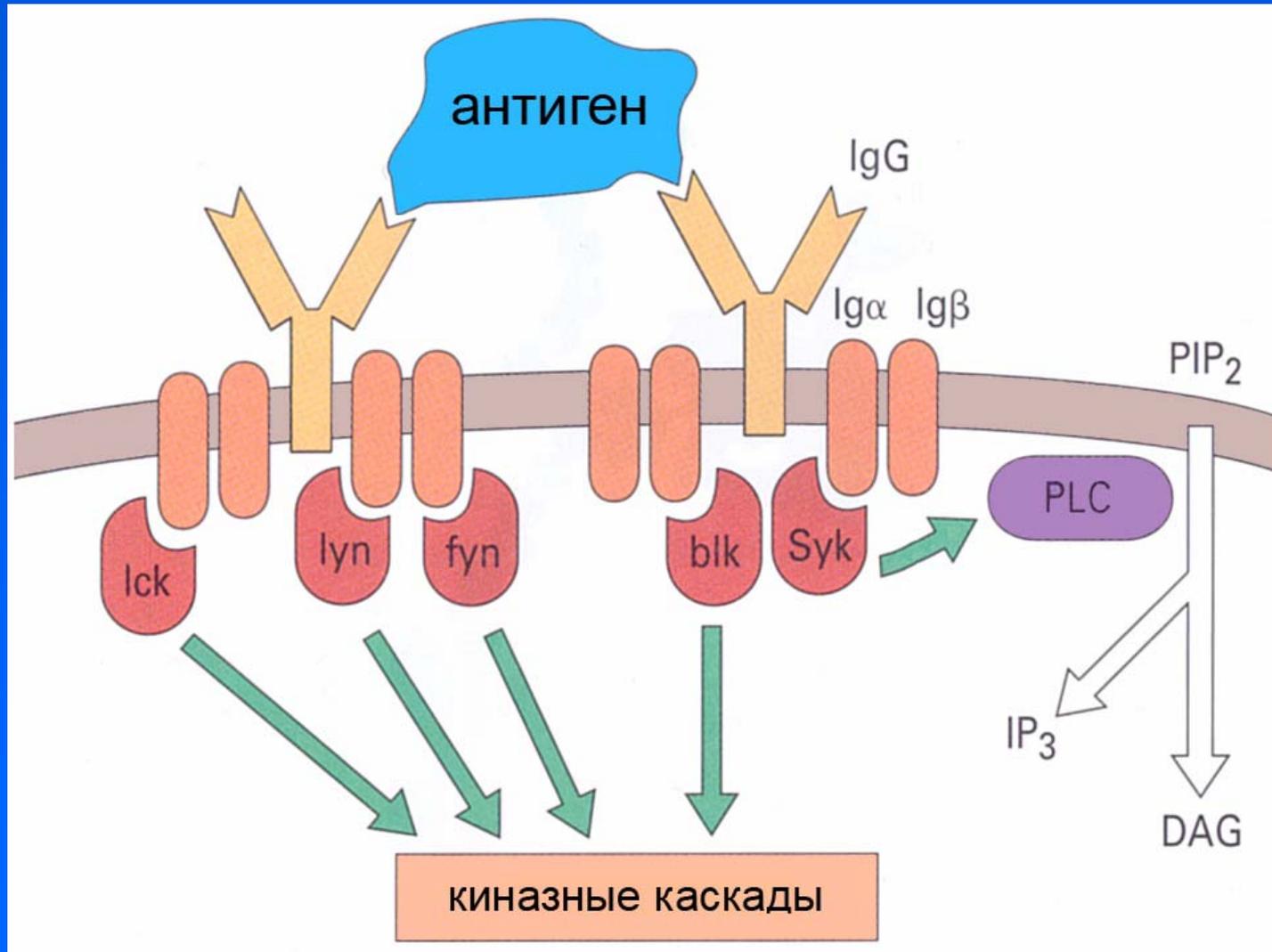
Трансмембранные белки. Имеют один трансмембранный домен. Функционируют в виде димеров (гомо- или гетеродимеров).

Не имеют собственной киназной активности. При взаимодействии с лигандом связываются с адаптерными белками, которые запускают протеинкиназы.

Запускают воспалительные реакции и иммунный ответ (млекопитающие), апоптоз (растения).

Эволюционно консервативны и узнают незаменимые последовательности у прокариотических белков (флагеллин, липополисахариды бактерий), некоторые вирусные факторы (двуспиральную РНК и т.п.).

Рецептор В-лимфоцитов (BCR)

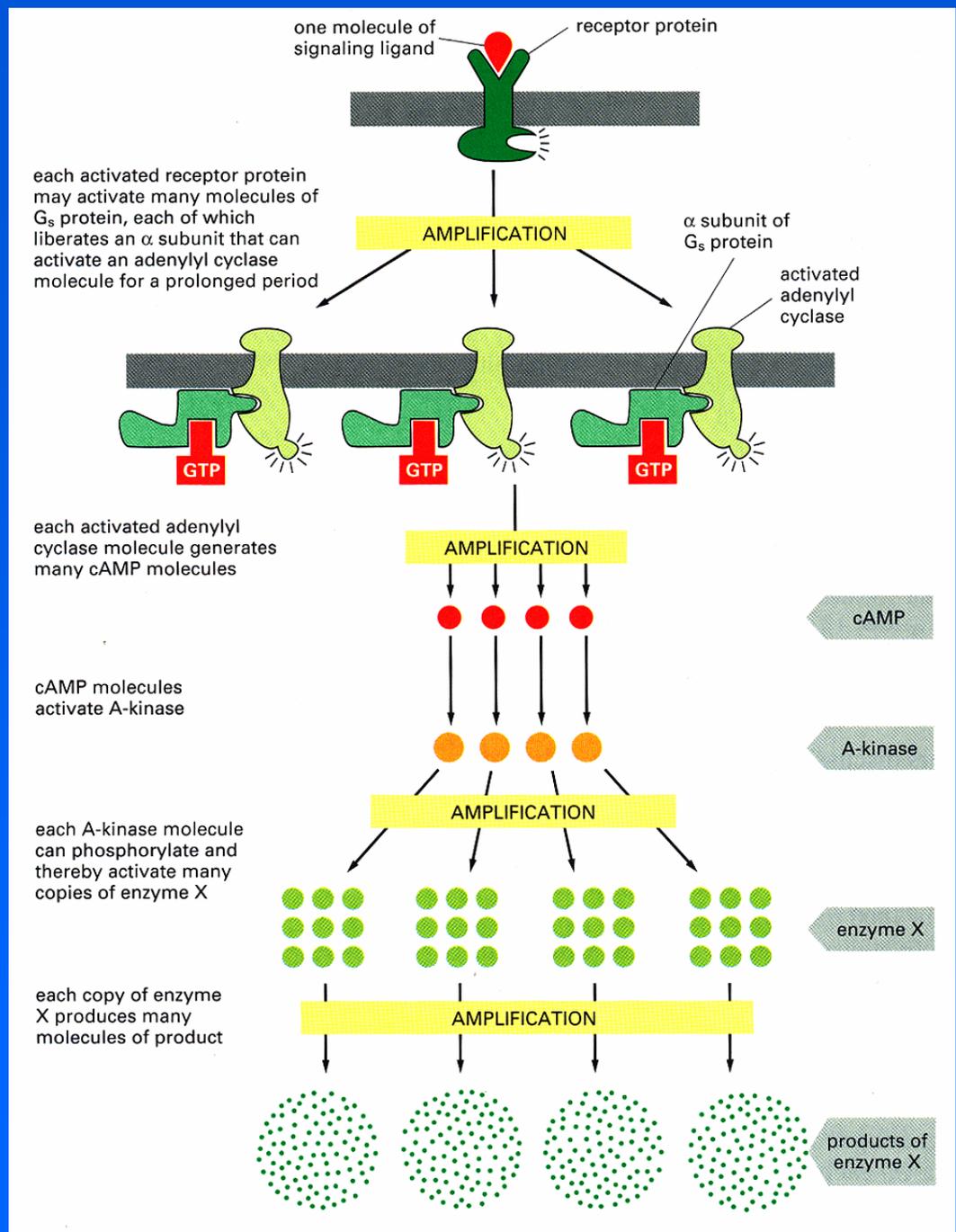


Рецепторные каскады

1. Рецептор – активируемый фермент – вторичный переносчик (цАМФ, цГМФ, инозитол-3-фосфат, фосфатидилинозитол-3-фосфат, диацилглицерин).
2. Рецептор – адапторные белки – формирование сигнальных комплексов.

Многие ферменты активируются в процессе передачи сигнала и многие адапторные белки имеют домены связывания со вторичными переносчиками.

Внутри клетки сигнал множественно усиливается (до 10^7 раз)



Вторичные переносчики

цАМФ и цГМФ

Тирозин-киназные системы

Протеин киназа А

Инозитол-3-фосфат

*Ионы кальция

*Окись азота (NO)

Ферменты, активируемые поверхностными рецепторами

Тирозин киназы (tyrosine kinases)

Гетеротримерные G-белки (heterotrimeric G proteins)

Малые ГТФ-азы (small GTPases)

Серин-треониновые киназы (serine/threonine protein
kinases)

Фосфатазы

Киназы липидов

Гидролазы

Ядерные рецепторы

Присутствуют у многоклеточных животных, начиная с губок.
Отсутствуют в простейших, растениях и грибах.

Строение - димеры (гомодимеры, гетеродимеры).

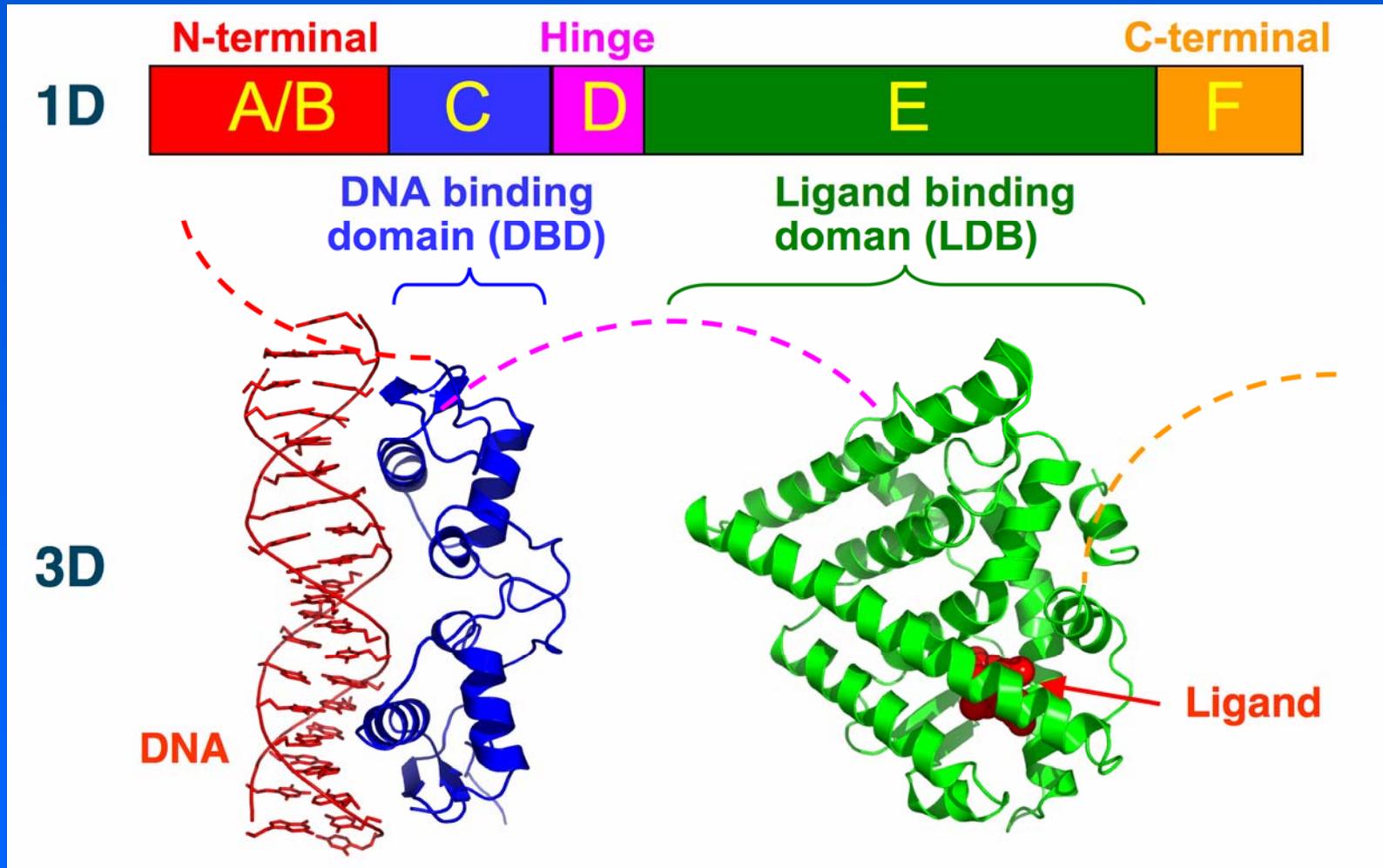
Лиганды к ядерным рецепторам – гормоны водорастворимые и водонерастворимые.

Рецепторы для неизвестных факторов роста.

Принцип работы: после взаимодействия с лигандом рецептор меняет свою структуру и связывается со специфическим участком ДНК, выполняя роль транскрипционного фактора.

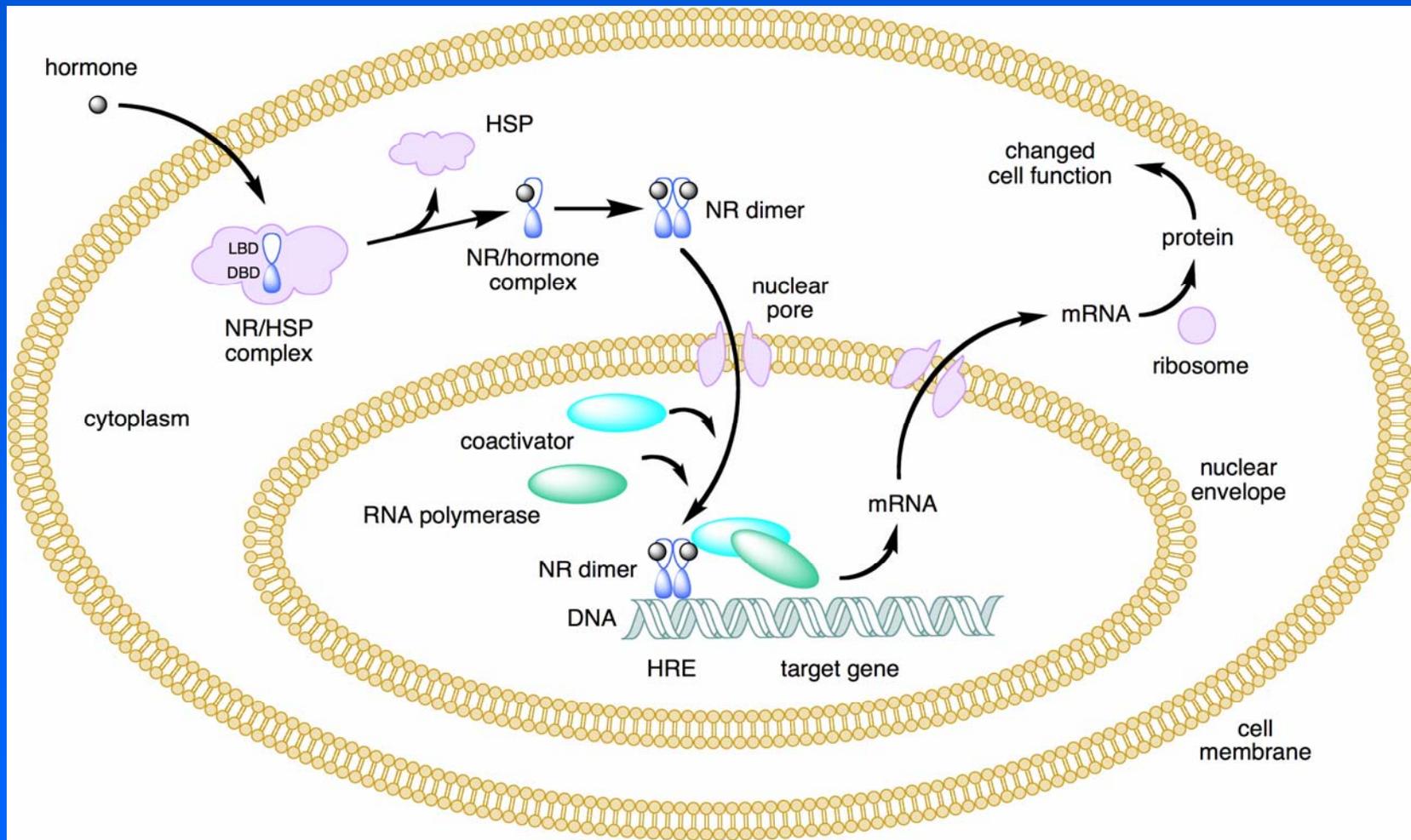
Каскад усиления: первичный ответ (транскрипция нескольких генов), затем вторичный ответ.

Структура ядерного рецептора



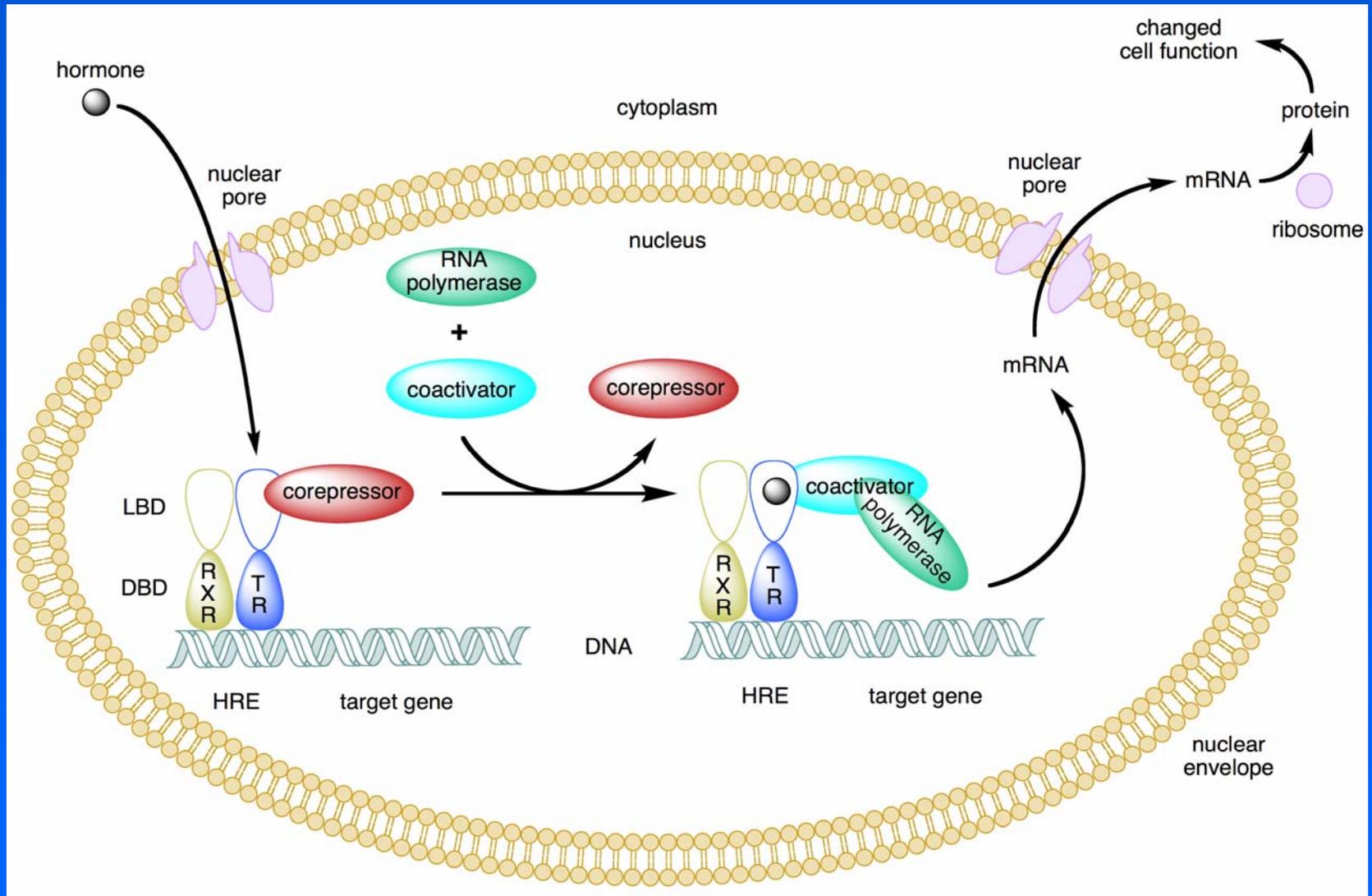
Домены: N-концевой; ДНК-связывающий; шарнир; лиганд-связывающий; С-концевой.

Ядерные рецепторы, I типа



Входят в ядро только после взаимодействия с лигандом

Ядерные рецепторы II типа



Постоянно находятся в ядре. Активируются гормоном.

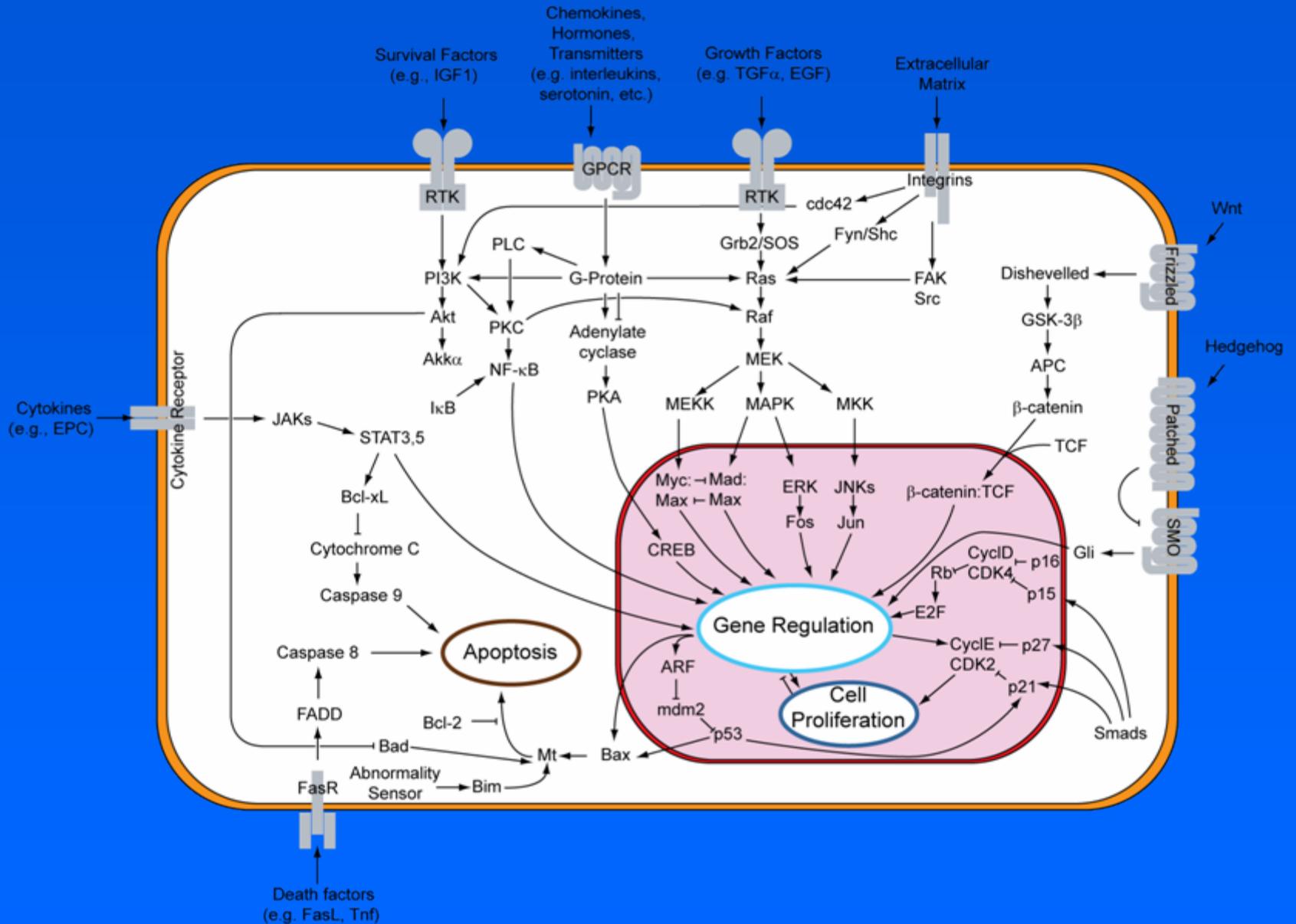
Концепция сигнальных путей

Рецепторы запускают цепочки реакций, которые специфичны вначале и перекрываются (имеют общие промежуточные реакции) только после нескольких стадий – это дает возможность выделить сигнальные пути.

Основные сигнальные пути эволюционно консервативны и инвариантны по отношению к тканевой дифференцировке – каждый путь использует собственные переносчики.

Ответ клетки на активацию сигнального пути запрограммирован. Основной вариант ответа – «все или ничего».

Сигнальные пути (упрощенная схема)



G-белки

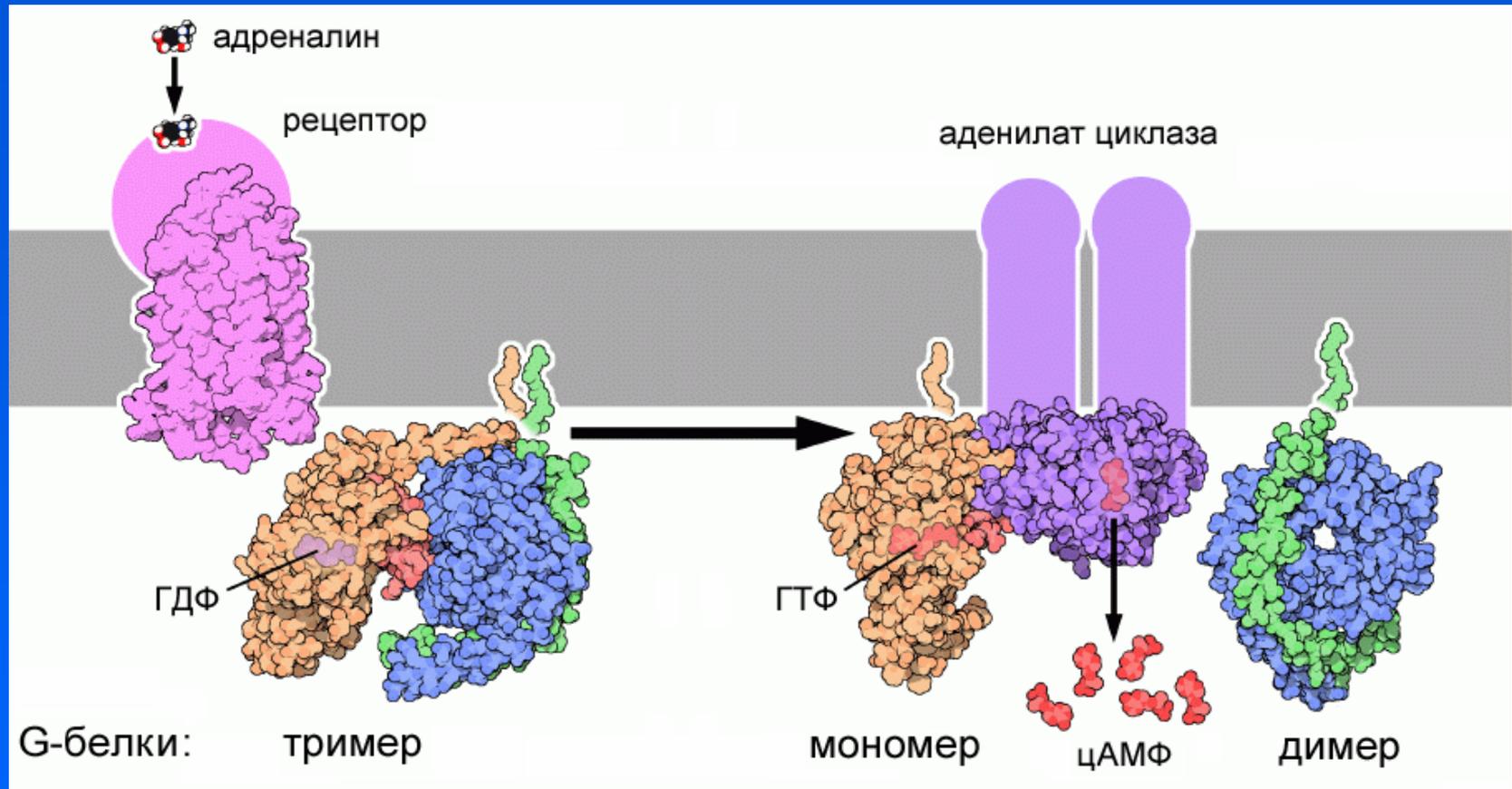
G-белки: связывают ГДФ(неактивные)/ГТФ(активные)

Строение: тримеры в комплексе с ГДФ, м.в. мономера – 17 кД

Принцип работы: в комплексе с ГТФ запускают внутриклеточные сигнальные каскады

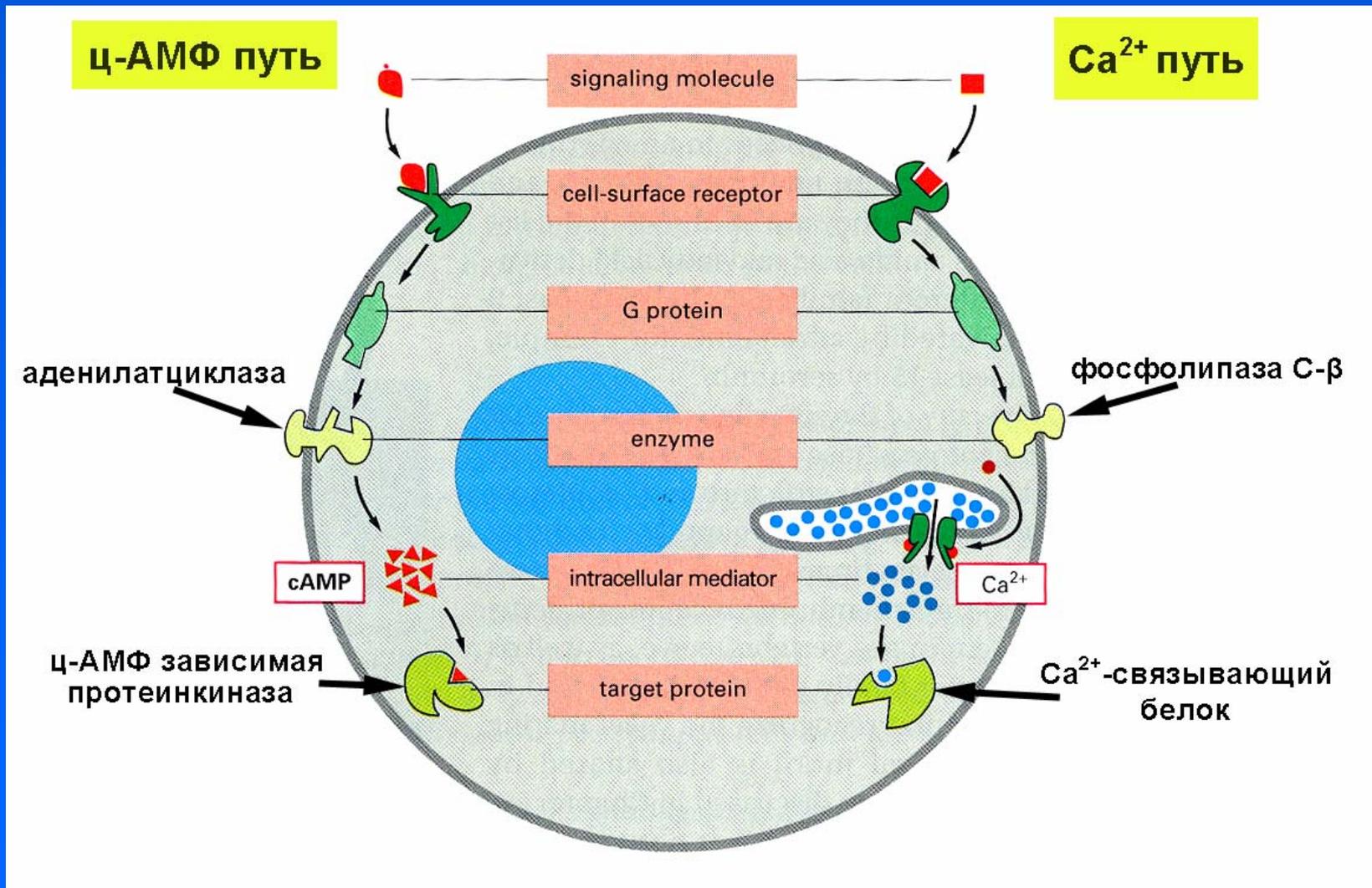
Каскады: аденилатциклаза – цАМФ-зависимая протеинкиназа; инозитол-3-фосфатный путь; серин-треониновая фосфатаза; тирозин-киназа

Работа G-белков



Активированный гормоном рецептор активирует тримерный G-белок – замена ГДФ на ГТФ приводит к диссоциации тримера и ГТФ-мономер G-белка активирует аденилатциклазу, что приводит к синтезу ц-АМФ. Инактивация G-белка происходит за счет гидролиза ГТФ.

Сигнальные пути G-белков



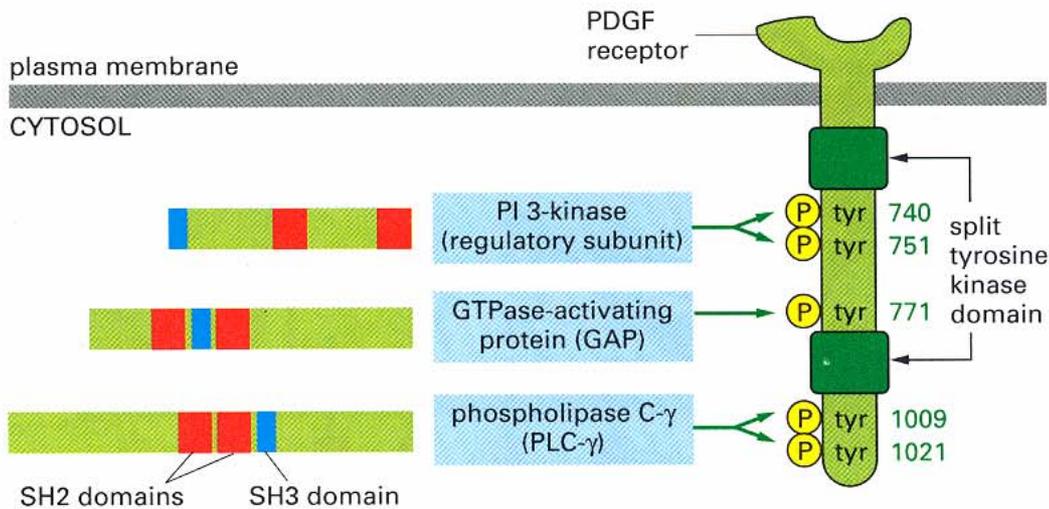
Тирозин-киназы

6 семейств (генетически). У человека известно ~90 тирозин-киназ (58 мембранных и 32 цитоплазматических).

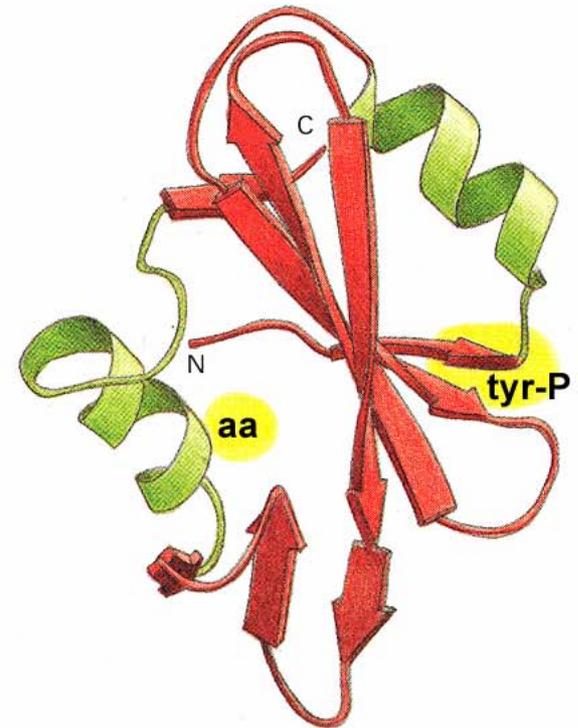
Принцип работы тирозин-киназ – автофосфорилирование цитоплазматического домена, который содержит несколько фосфорилируемых сайтов (остатков тирозина), затем – фосфорилирование других белков.

Строение тирозин-киназного рецептора к фактору роста

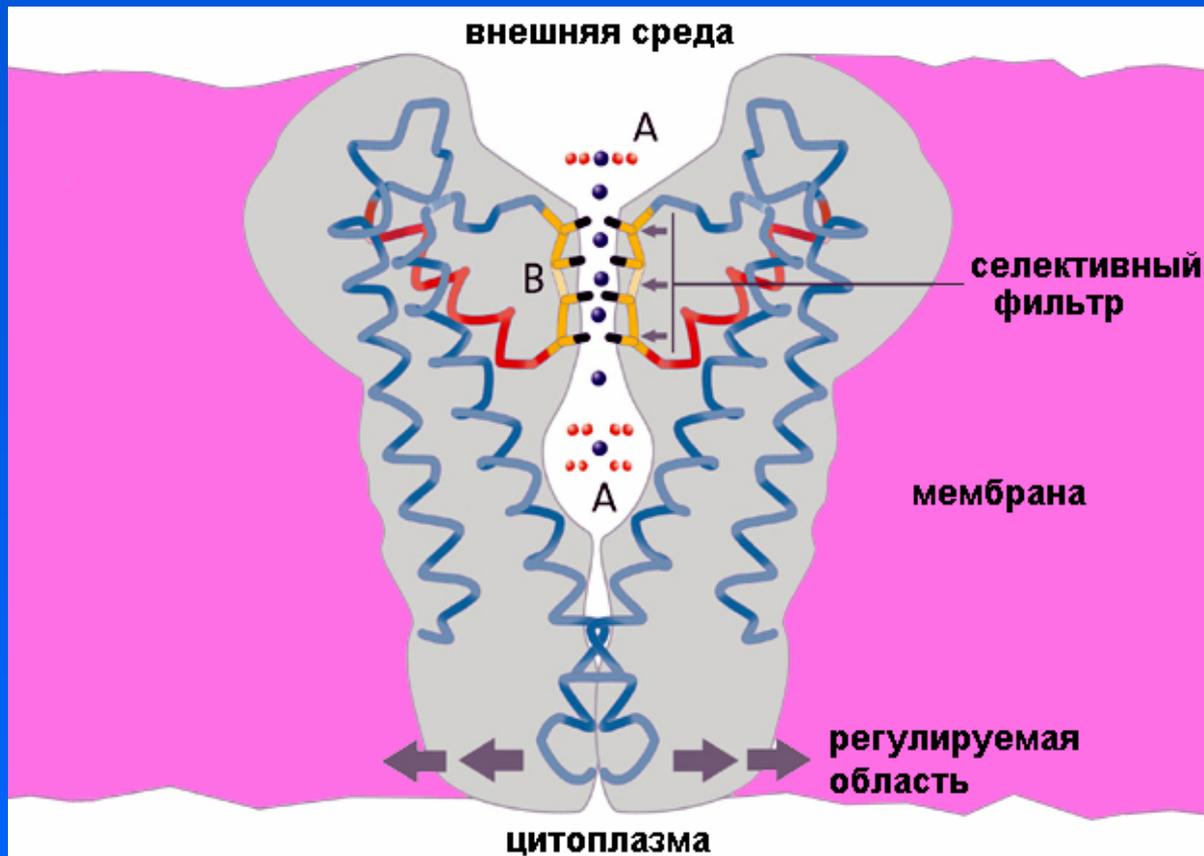
PDGF- рецептор



SH2-домен

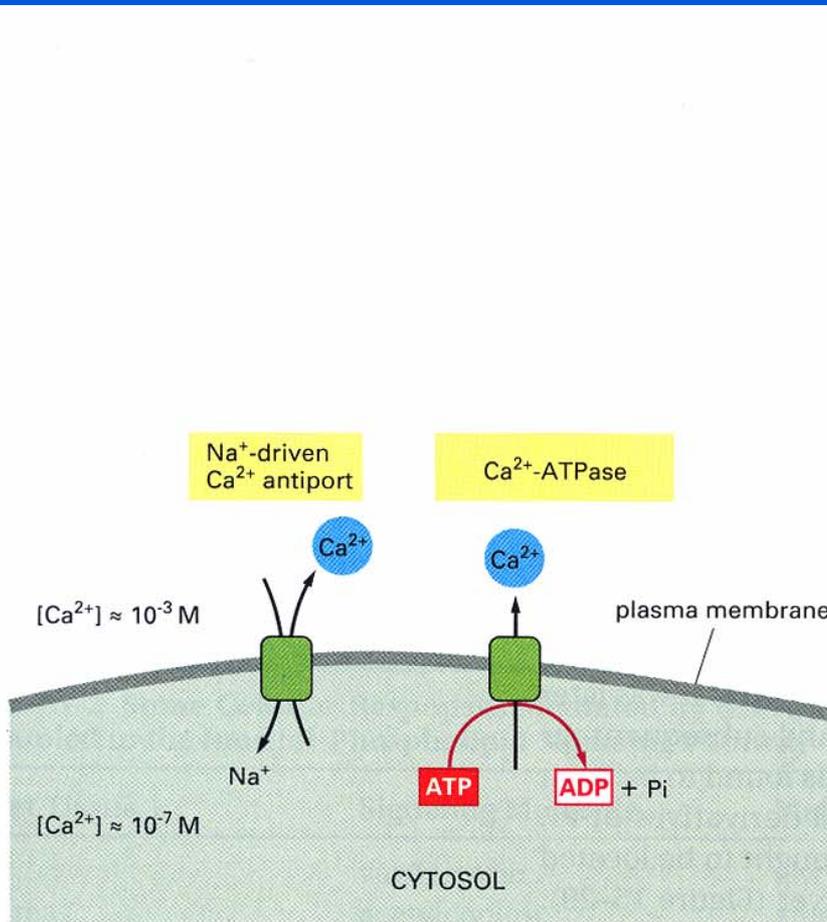


Ионный канал

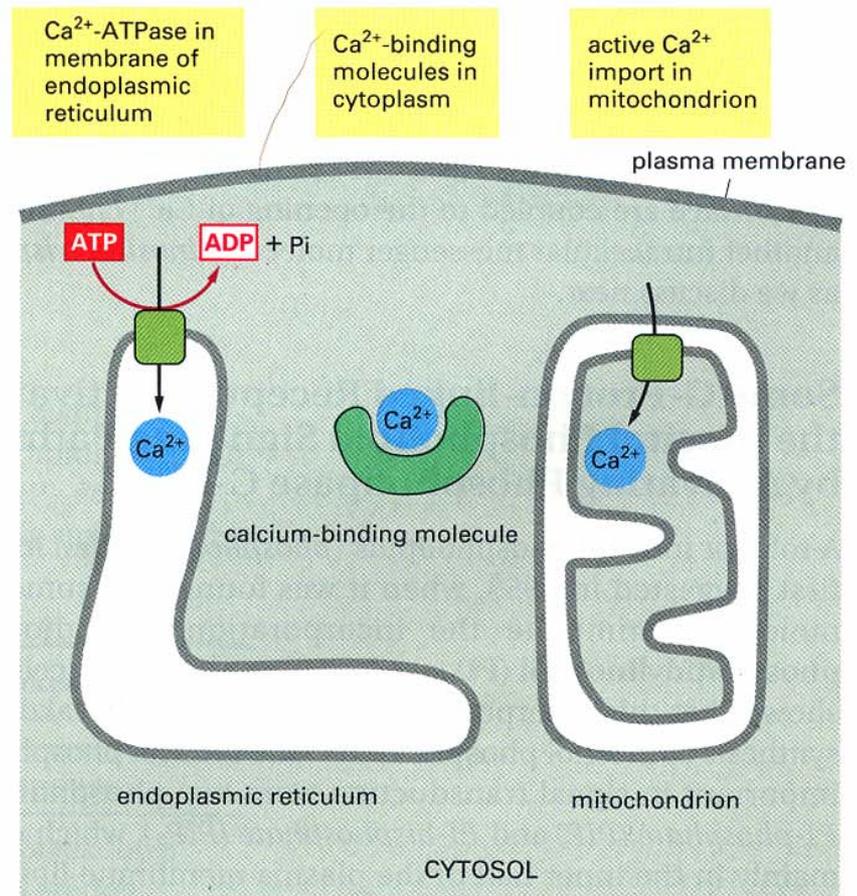


Канал представляет собой рецептор (область связывания лиганда не показана на схеме), состоящий, как правило, из нескольких субъединиц. Транспорт ионов (строение внутреннего просвета ионного канала) регулируется (вкл/выкл) за счет взаимодействия рецептора с лигандом.

Клетка поддерживает низкую концентрацию ионов кальция

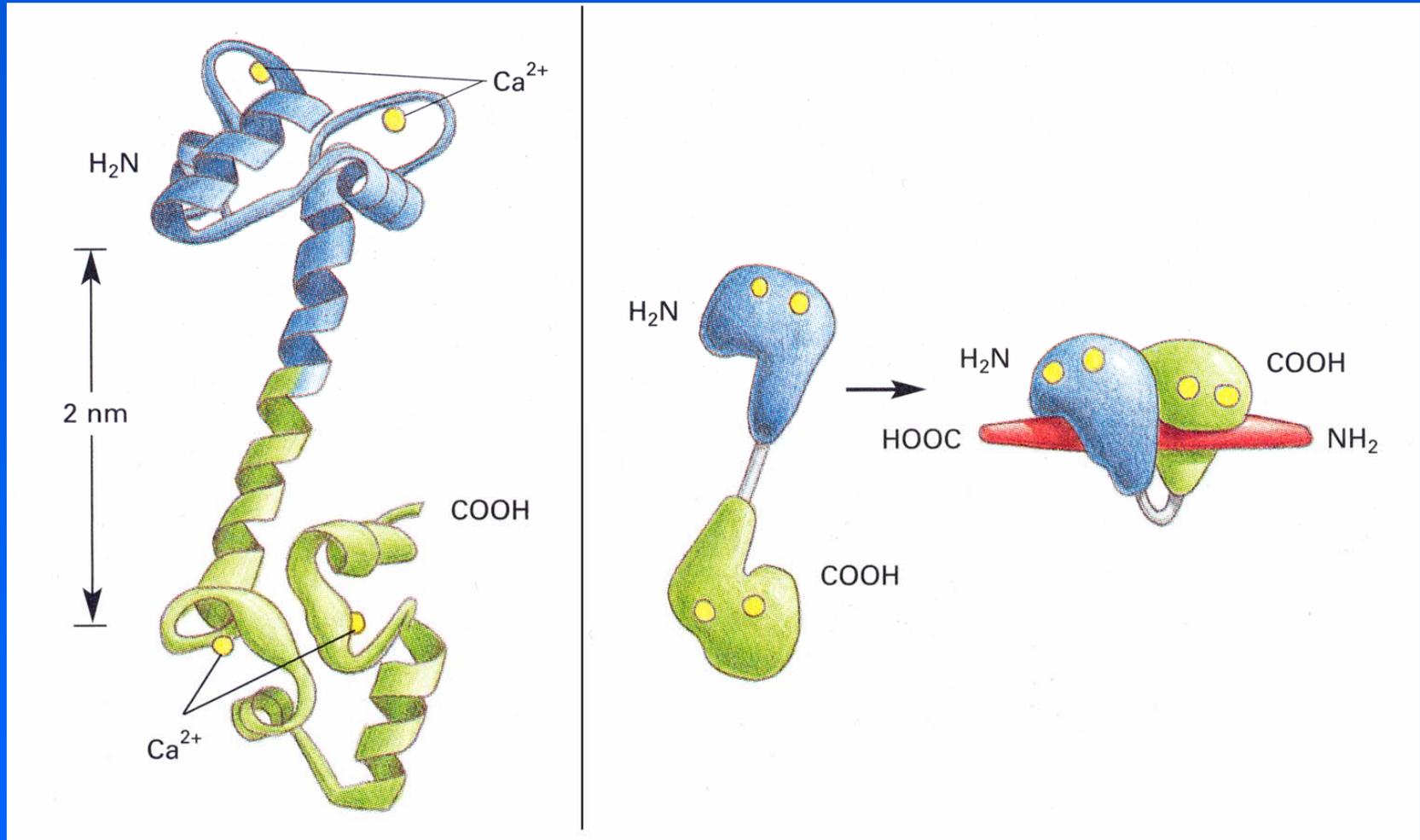


(A)



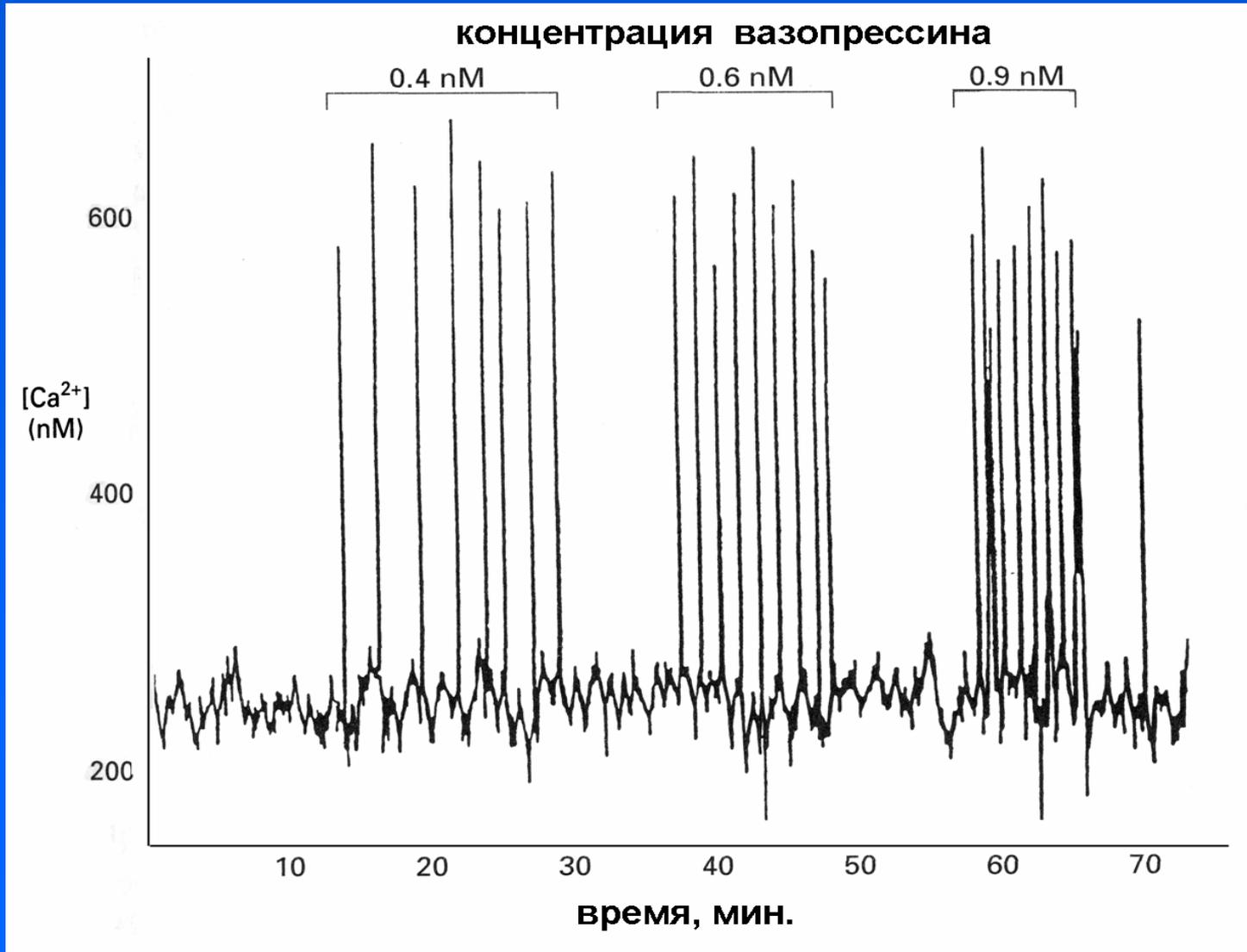
(B)

Кальций и кальмодулин



Кальмодулин – 148 а-к (17 кД). Имеет 2 кальций-связывающих домена. Связывается с различными белками и участвует во множестве клеточных реакций.

Колебания концентрации кальция во времени



Контактные межклеточные взаимодействия

Узнавание клетками друг друга происходит с помощью специальных молекул гликопротеидов, расположенных на плазматической мембране.

Все молекулы адгезии построены по принципу рецепторов. Они имеют наружный, трансмембранный и цитоплазматический домены. Цитоплазматический домен взаимодействует с цитоскелетом.

Взаимодействие молекул адгезии друг с другом слабое, оно может быть гомофильным и гетерофильным.

Основные классы молекул адгезии у эукариот:

селектины; кадгерины (Ca^{++} -зависимые);
интегрины; иммуноглобулин-подобные белки.

Межклеточные контакты

Классификация:

Простые контакты

Высокопроницаемые (щелевидные) контакты (gap junctions)

Адгезионные контакты (zonula adherens в эпителии)

Плотные контакты (tight junctions) – замыкательные пластинки (zonula occludens)

Десмосомы

Синаптические контакты (синапсы)

Белки клеточных контактов

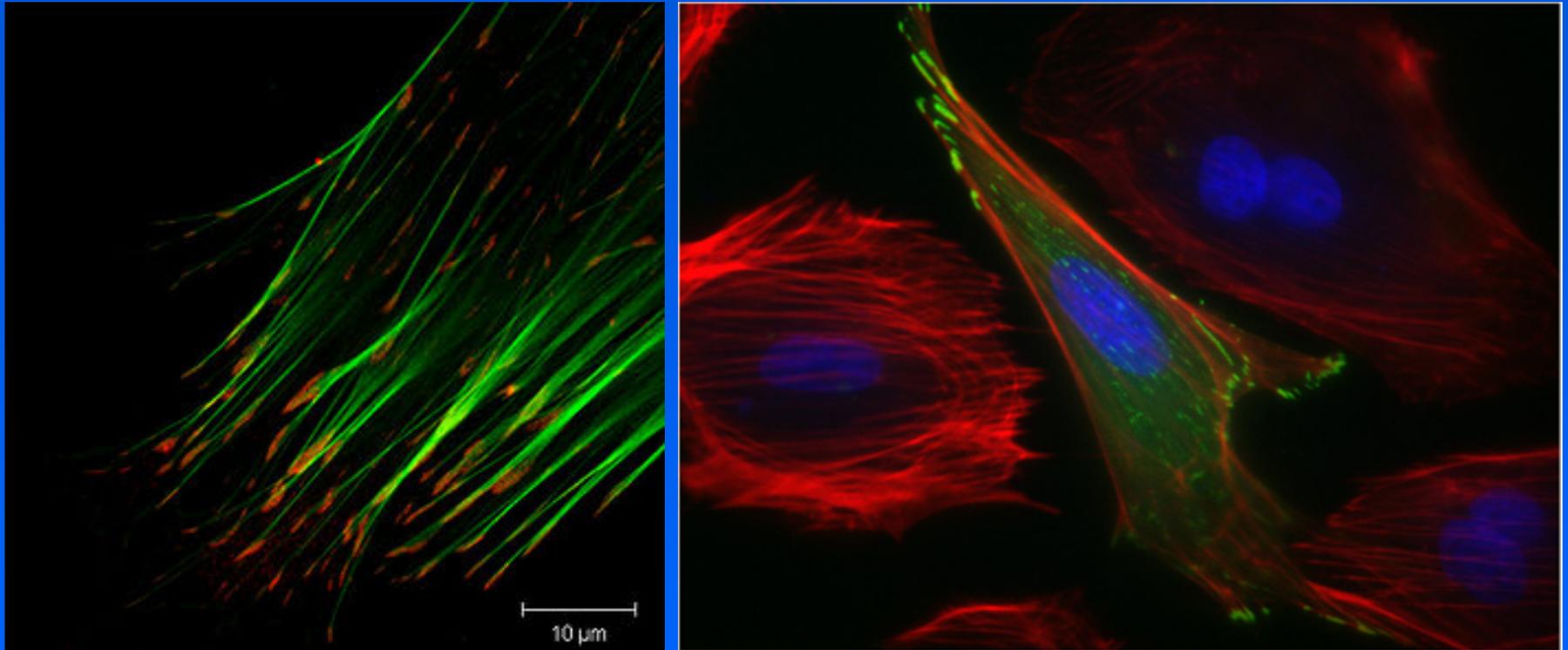
Селектины: обеспечивают слабое связывание клеток. Взаимодействуют с муцинами – гетерофильное взаимодействие.

Кадгерины (Ca^{++} - зависимые) – образуют комплекс с катенинами, расположенными под мембраной. В большинстве клеток образуют лабильные комплексы. Обеспечивают гомофильное взаимодействие (эпителий).

Интегрины – гетерофильное взаимодействие, как между клетками, так и с матриксом.

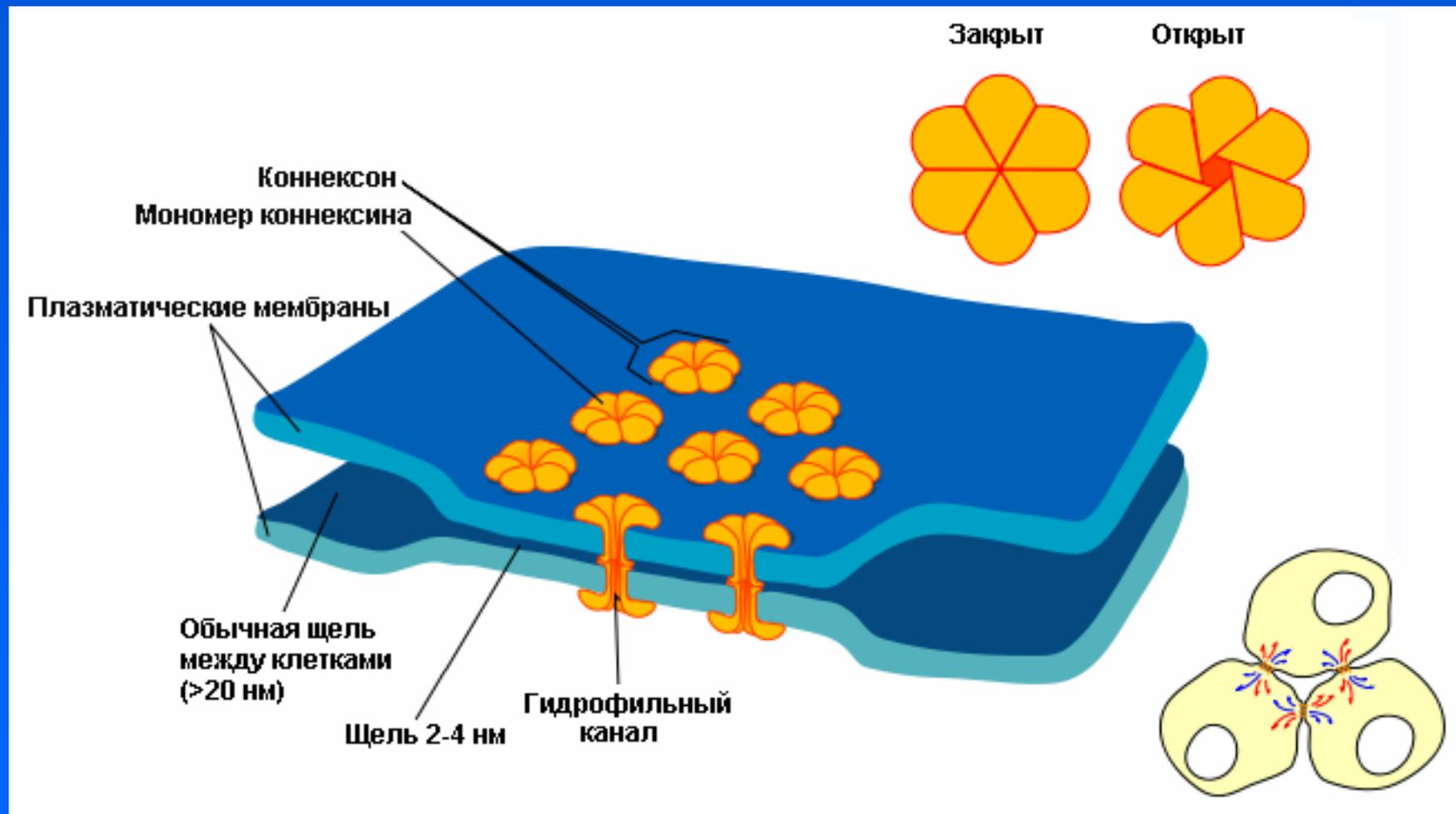
Иммуноглобулин-подобные белки – гомофильное взаимодействие; специфичны для нервных клеток.

Фокальные контакты



Культивируемые клетки при распластывании образуют фокальные контакты с субстратом

Высокопроницаемый контакт



Функции высокопроницаемого контакта

Метаболическая кооперация – передача нуклеотидов и др. веществ через мембраны контактирующих клеток с образованием коннексонов. Коннексон – гексамер, состоящий из коннексинов. Полный канал – два коннексона (полуканала), совмещенных на соседних клетках.

Коннексины – трансмембранные белки (3 основных типа), образующие гидрофильный канал. Каждый коннексин имеет 4 трансмембранных домена. Если клетка не контактирует с соседями, полуканал закрыт.

Открытый канал (высокопроницаемый контакт – ВПК) образуется, если коннексоны контактирующих клеток комплементарны.

ВПК обеспечивают свободную передачу ионов, вторичных переносчиков и др. веществ с м.в. менее 3000 между клетками без выхода их во внешнюю среду.

Структура межклеточного контакта

Мембранный домен (трансмембранные белки – кадгерины, белки десмосом)

Цитоплазматическая бляшка

Цитоскелетная часть (актиновый пучок или промежуточные филаменты)

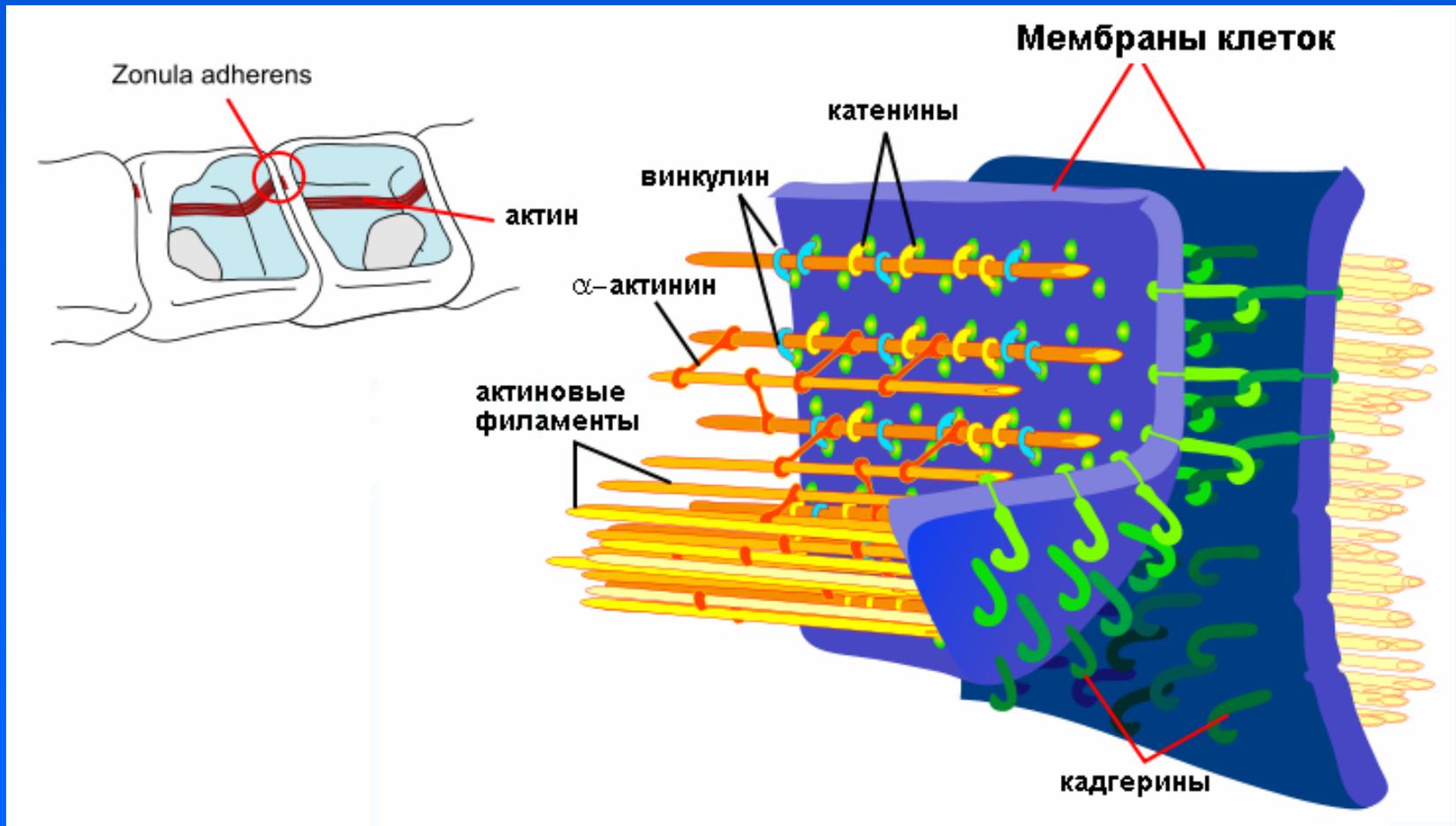
Форма и размер контакта:

Одиночные контакты – диаметром 0,3-0,5 мкм.

Пояса контактов могут окружать всю клетку.

In vitro – протяженные контакты с субстратом.

Адгезионные контакты (zonula adherens) – схема



Адгезионные контакты (zonula adherens)

Содержат кадгерины, соединяющие клетки друг с другом через кальциевые мостики и катенины, соединяющие кадгерины с цитоскелетом.

α -катенин связывается с β -катенином.

β -катенин непосредственно взаимодействует с кадгеринами.

Адгезионные контакты связаны с актином.

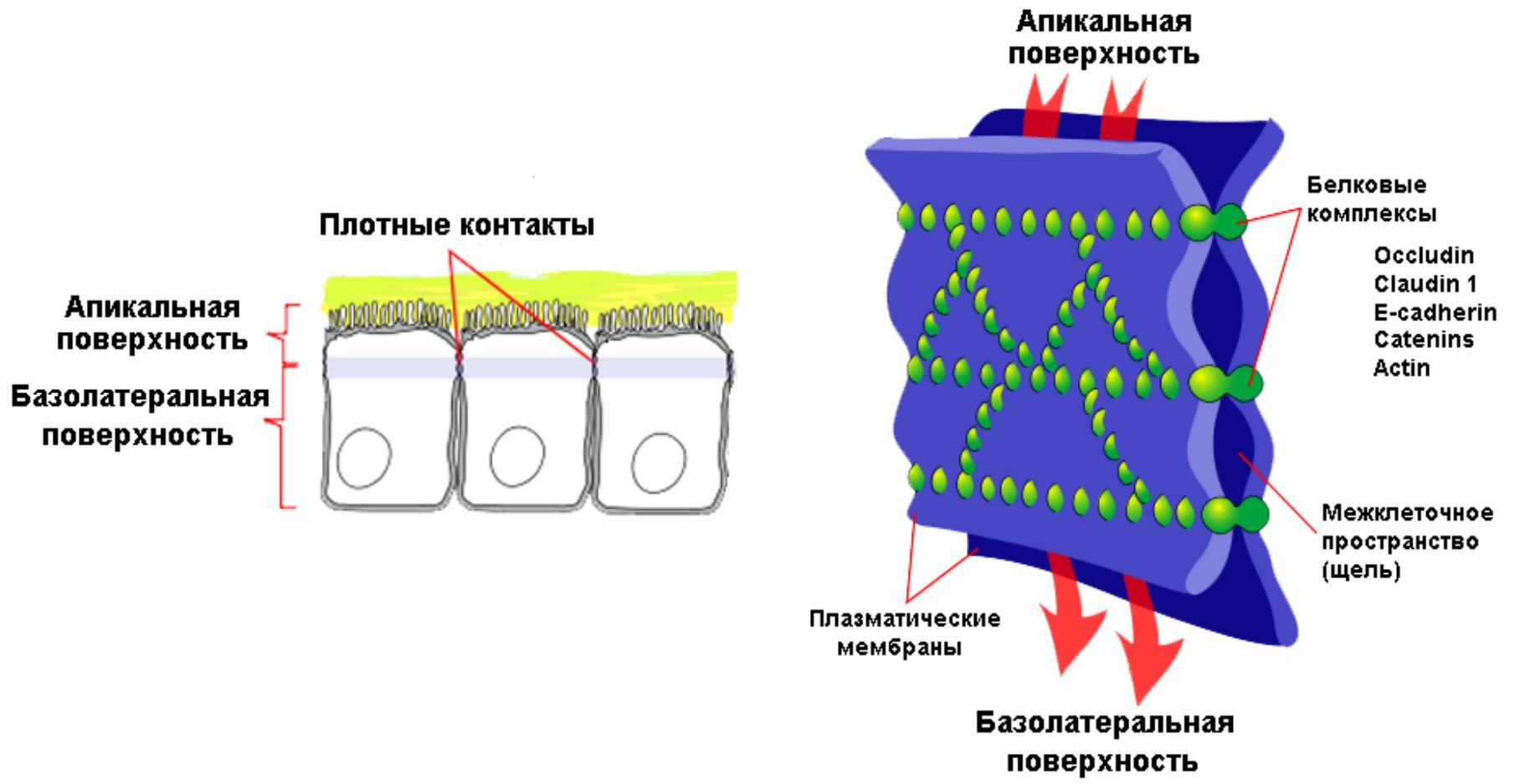
Адгезионные контакты разрушаются при удалении ионов кальция из среды.

Функции:

Обеспечивают механическую связь клеток (например, в мышце).

Регулируют (подавляют) полимеризацию актиновых филаментов.

Плотный контакт (схема)



Плотные контакты (zonula occludens)

Компоненты – тяжи белков.

Специфические белки: окклюдины и клаудины.

Эффективность контактов зависит от количества тяжей. На внутренней стороне мембраны плотные контакты связаны с актиновым цитоскелетом.

Функции:

Подавление латеральной диффузии интегральных мембранных белков (разделение доменов, формирование полярного транспорта).

Формирование клеточного пласта, непроницаемого для воды и ионов.

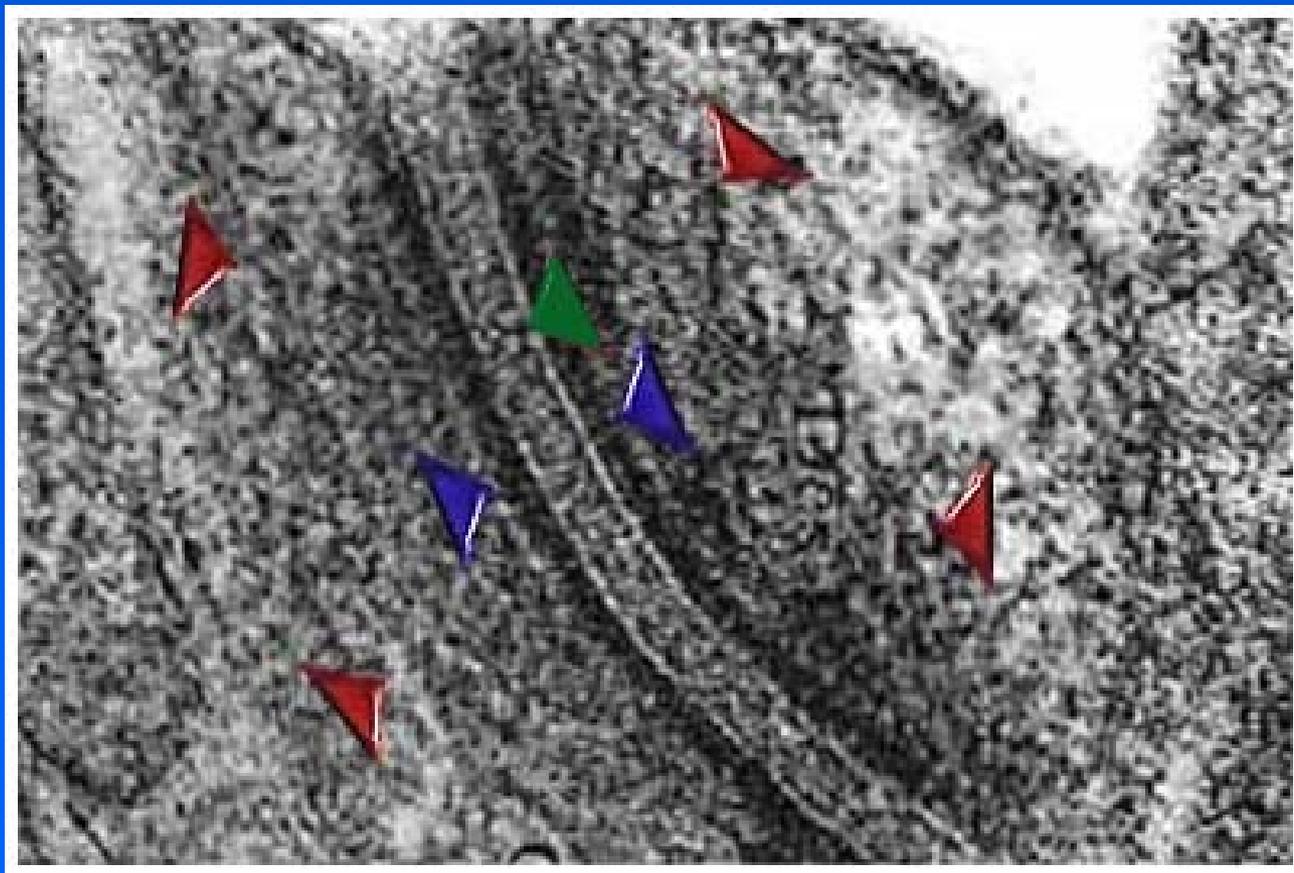
Функции плотного контакта

Прочное механическое взаимодействие клеток.

Подавление латеральной диффузии интегральных мембранных белков (разделение доменов, формирование полярного транспорта).

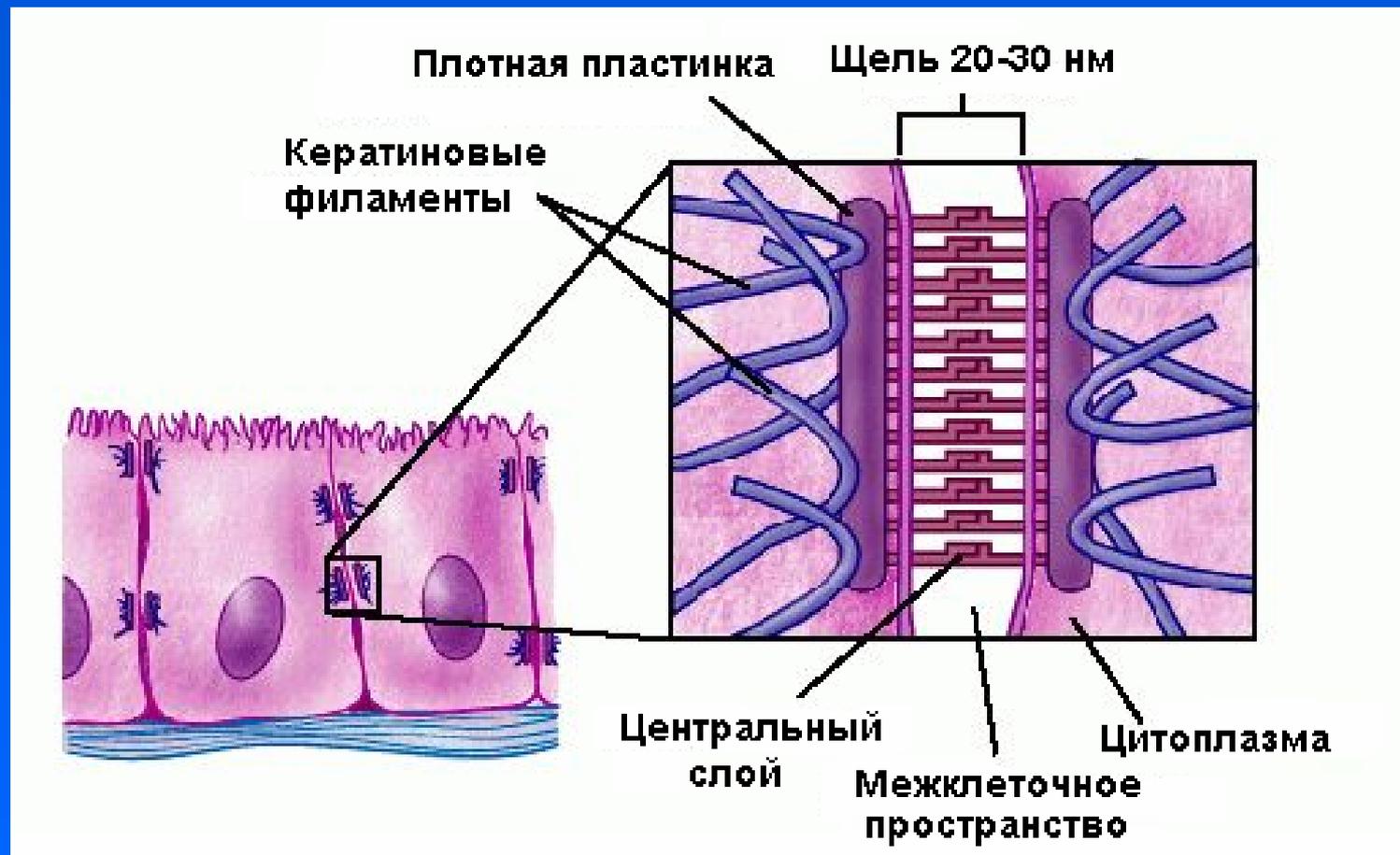
Формирование клеточного пласта, непроницаемого для воды и ионов.

Десмосома (фото, ЭМ)



Стрелками обозначены: красные – кератиновые филаменты;
синие – цитоплазматические плотные пластинки (десмоплакин);
зеленая – промежуточное вещество (замки)

Десмосома (схема)



Десмосома – специализированный контакт между эпителиальными клетками.

Функции десмосом

Обеспечивают механическую прочность клеточного пласта.

Полные десмосомы – скрепление эпителиальных клеток в пласт.

Полудесмосомы (гемидесмосомы) – обеспечивают прикрепление эпителиальных клеток к базальной мембране и к соединительнотканым клеткам.

Мембранные домены в клетке

