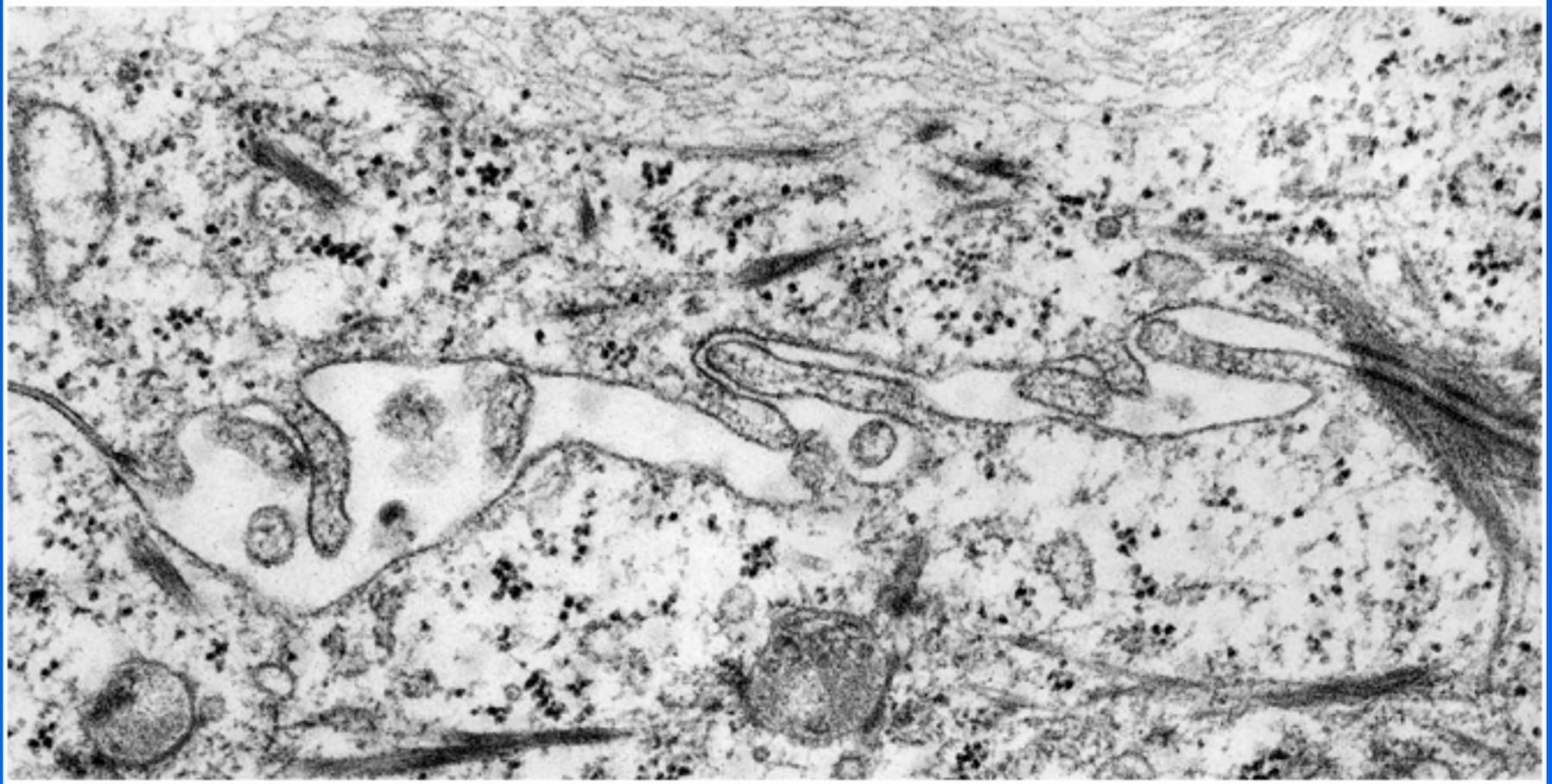


Лекция 6.

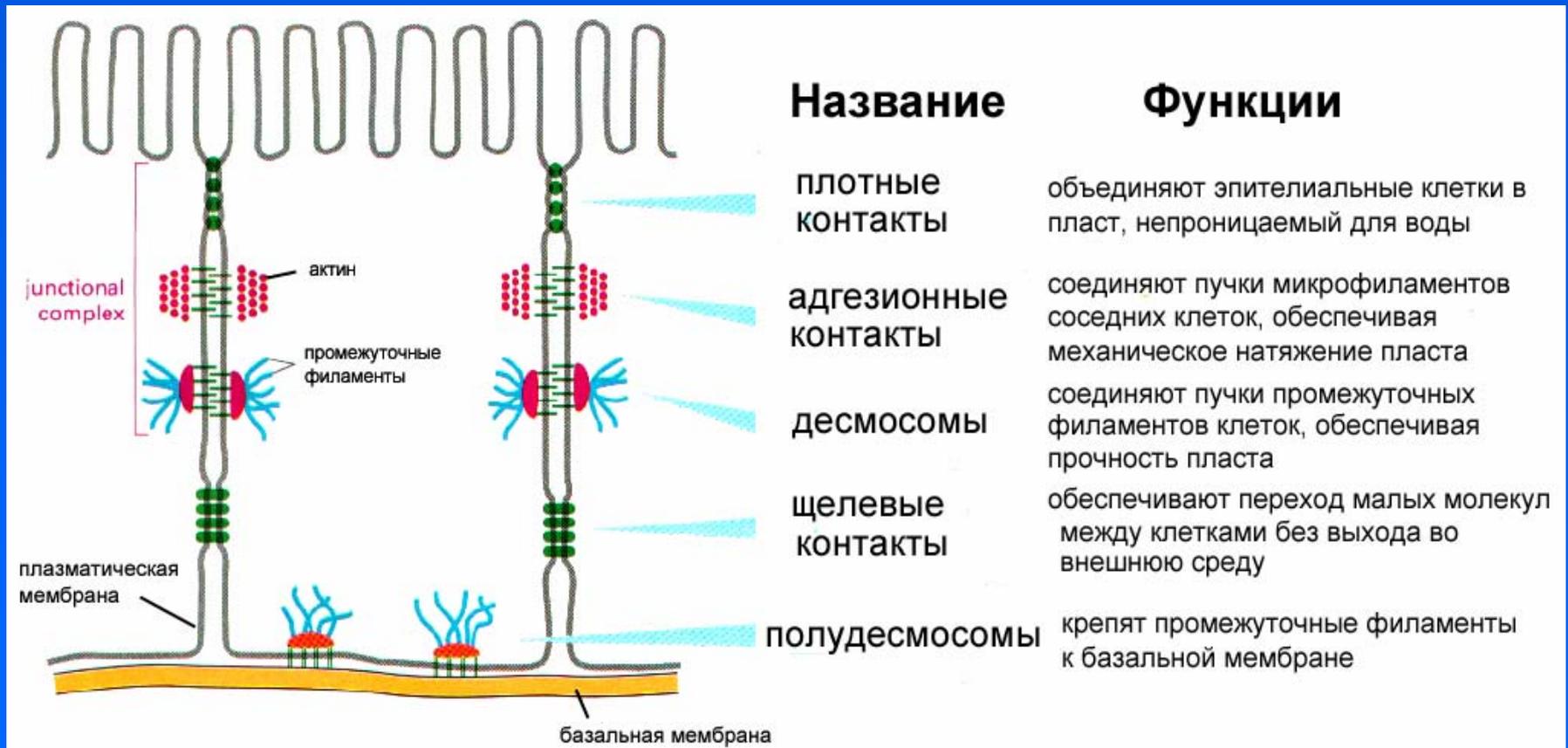
**Межклеточные контакты
(окончание)**

Митохондрии

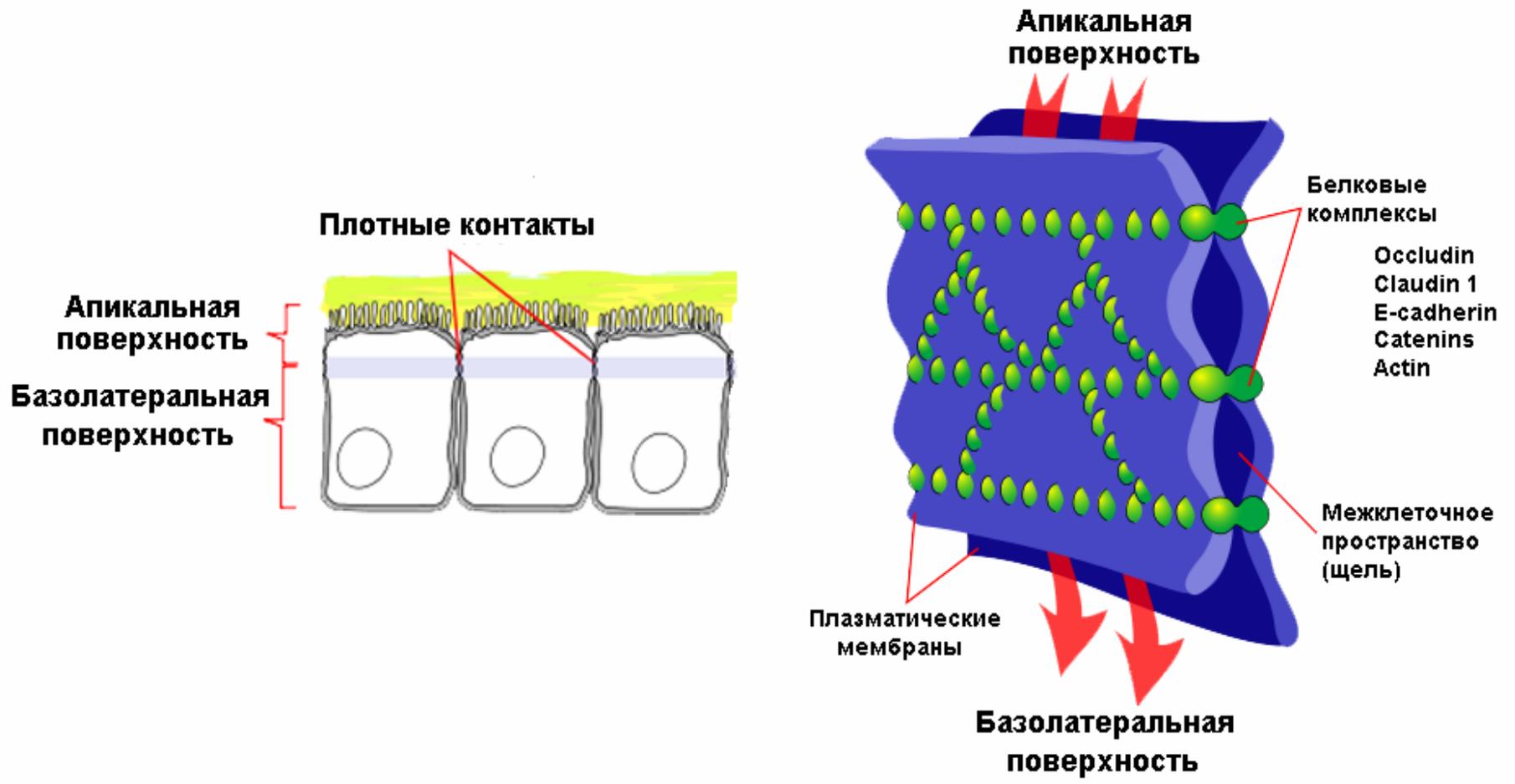
Межклеточные контакты. Эпителий, ЭМ



Межклеточные контакты, резюме



Плотный контакт (схема)



Плотные контакты (zonula occludens)

Компоненты – тяжи белков.

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).

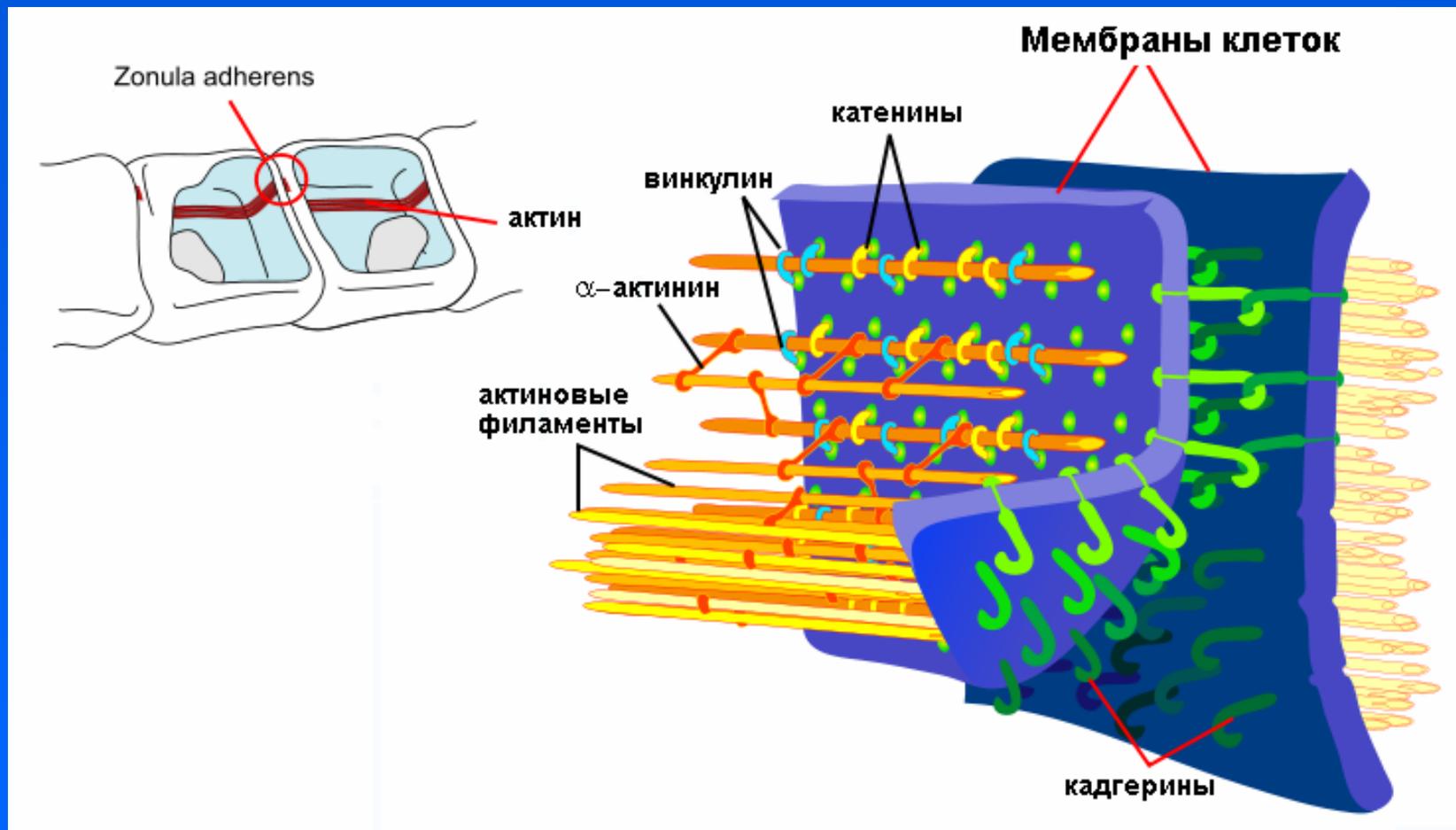
Формирование клеточного пласта, непроницаемого для воды и ионов.

Септированный контакт



Плотные контакты клеток у беспозвоночных имеют ту же функцию, но другую структуру.

Адгезионные контакты (zonula adherens) – схема



Адгезионные контакты (zonula adherens)

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

α -катенин связывается с β -катенином.

β -катенин непосредственно взаимодействует с кадгеринами.

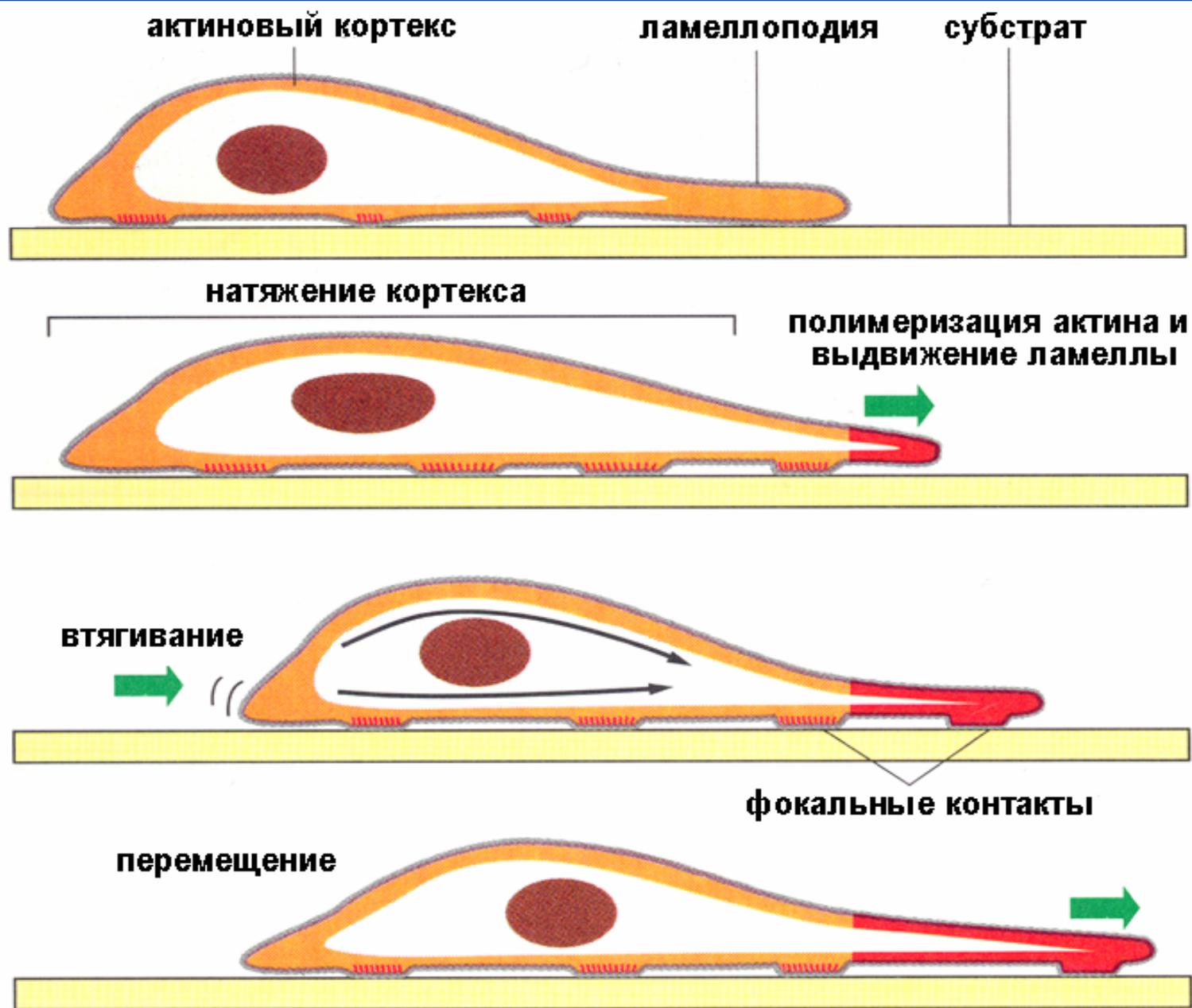
Адгезионные контакты связаны с актином.

Адгезионные контакты разрушаются при удалении ионов кальция из среды.

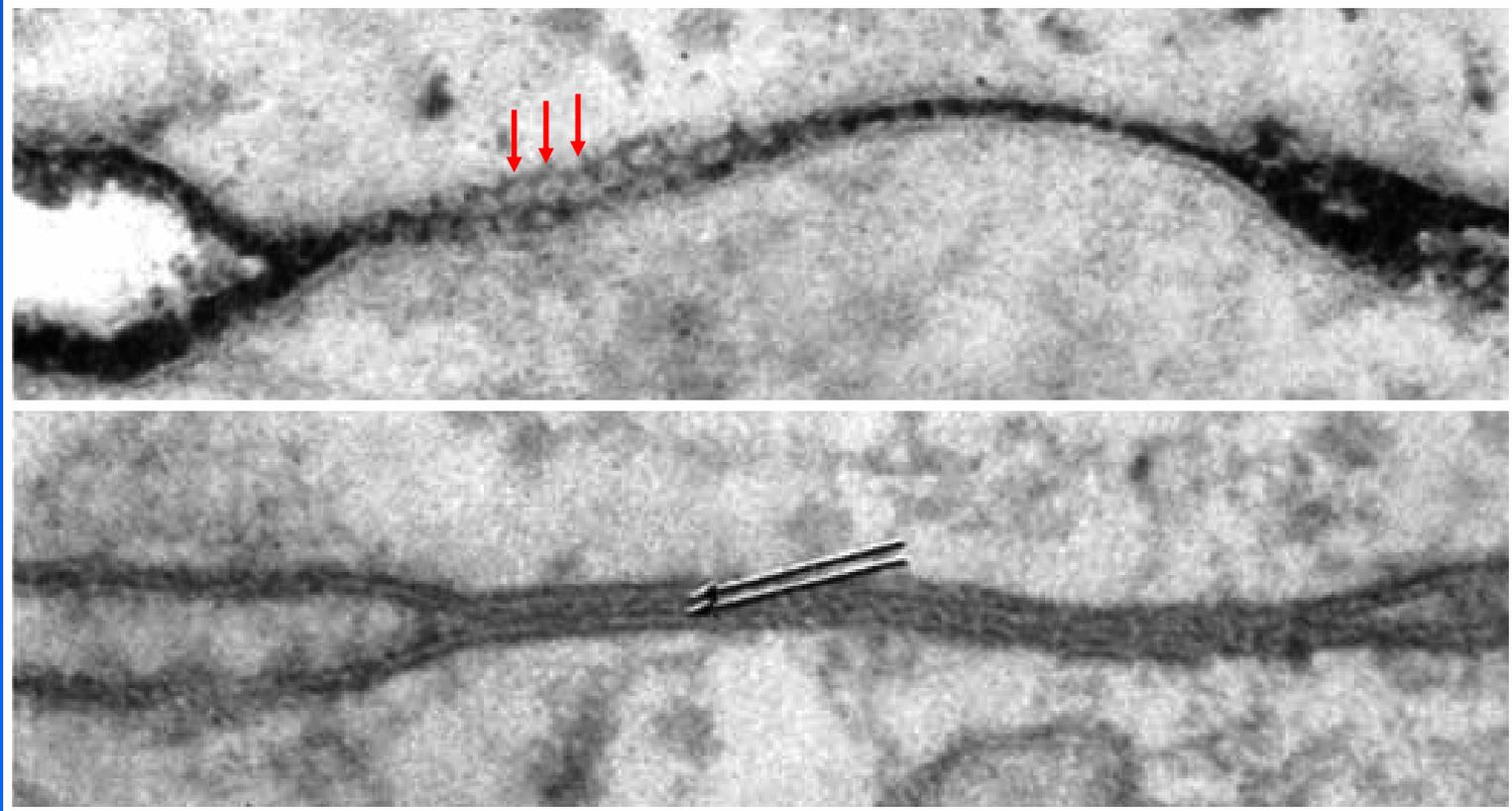
Функции:

Обеспечивают механическую связь клеток (например, в мышце).

Регулируют (подавляют) полимеризацию актиновых филаментов.

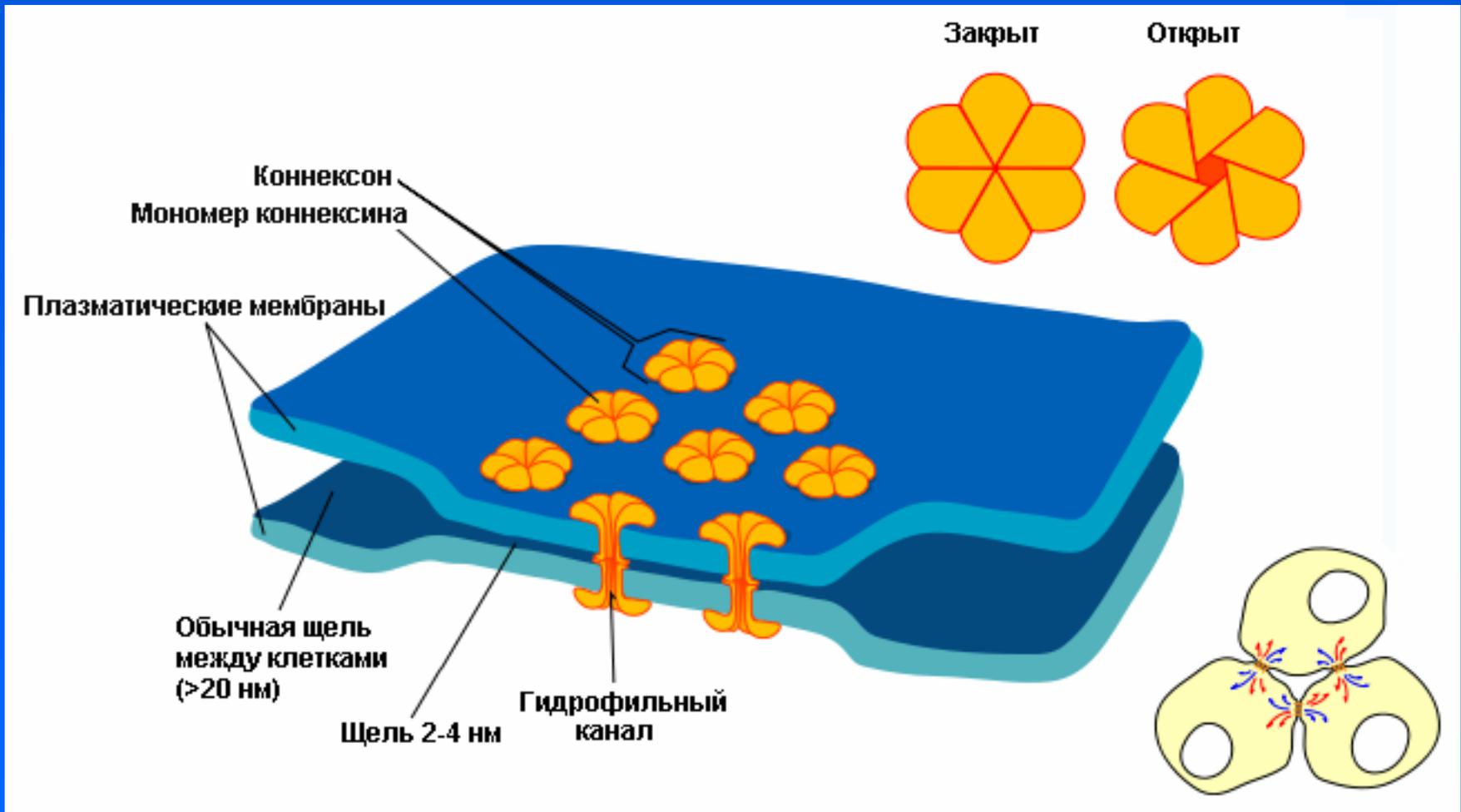


Высокопроницаемый контакт, ЭМ



На тангенциальном срезе видно упорядоченное расположение коннексонов. Между мембранами соседних клеток (поперечный срез) щель составляет 3,5 нм.

Высокопроницаемый контакт, схема



Функции высокопроницаемого контакта

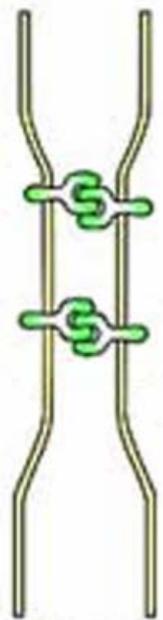
Метаболическая кооперация – передача нуклеотидов и др. веществ через мембраны контактирующих клеток с образованием коннексонов. Коннексон – гексамер, состоящий из коннексинов. Полный канал – два коннексона (полуканала), совмещенных на соседних клетках.

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

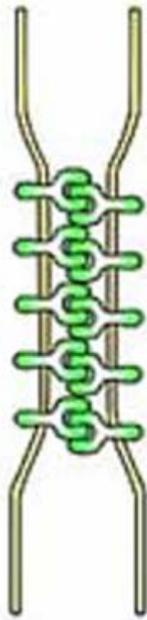
Открытый канал (высокопроницаемый контакт – ВПК) образуется, если коннексоны контактирующих клеток комплементарны.

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

Возможная эволюция МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ



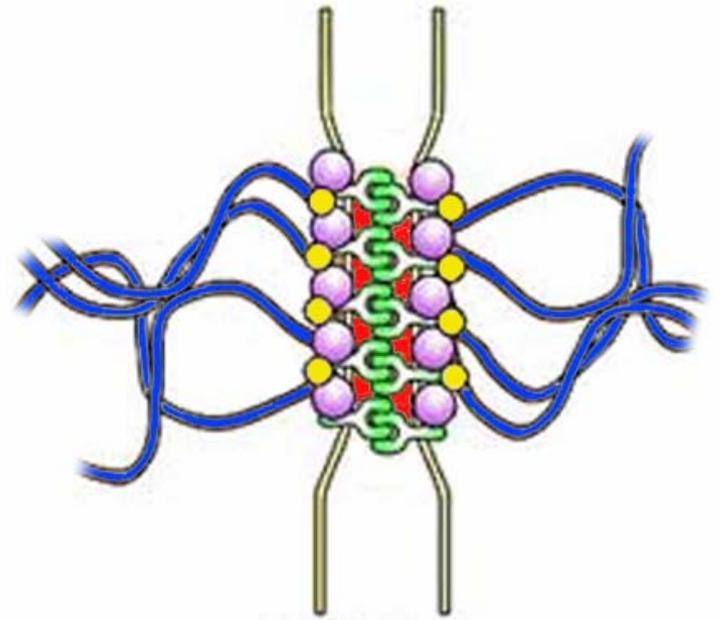
Адгезия
с помощью
отдельных
молекул



Молекулы адгезии
собираются
в бляшки



Присоединение
цитоплазматических
белков и образование
мактрикса



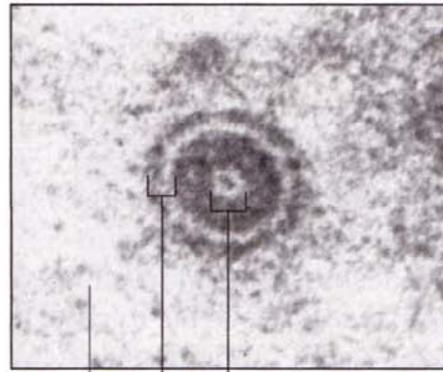
Адаптерные белки
связываются с
цитоскелетными
филаментами

Плазмодесмы растительных клеток

плазматическая мембрана эндоплазматический ретикулум



0.1 μm



клеточная стенка десмотрубочка
плазматическая мембрана

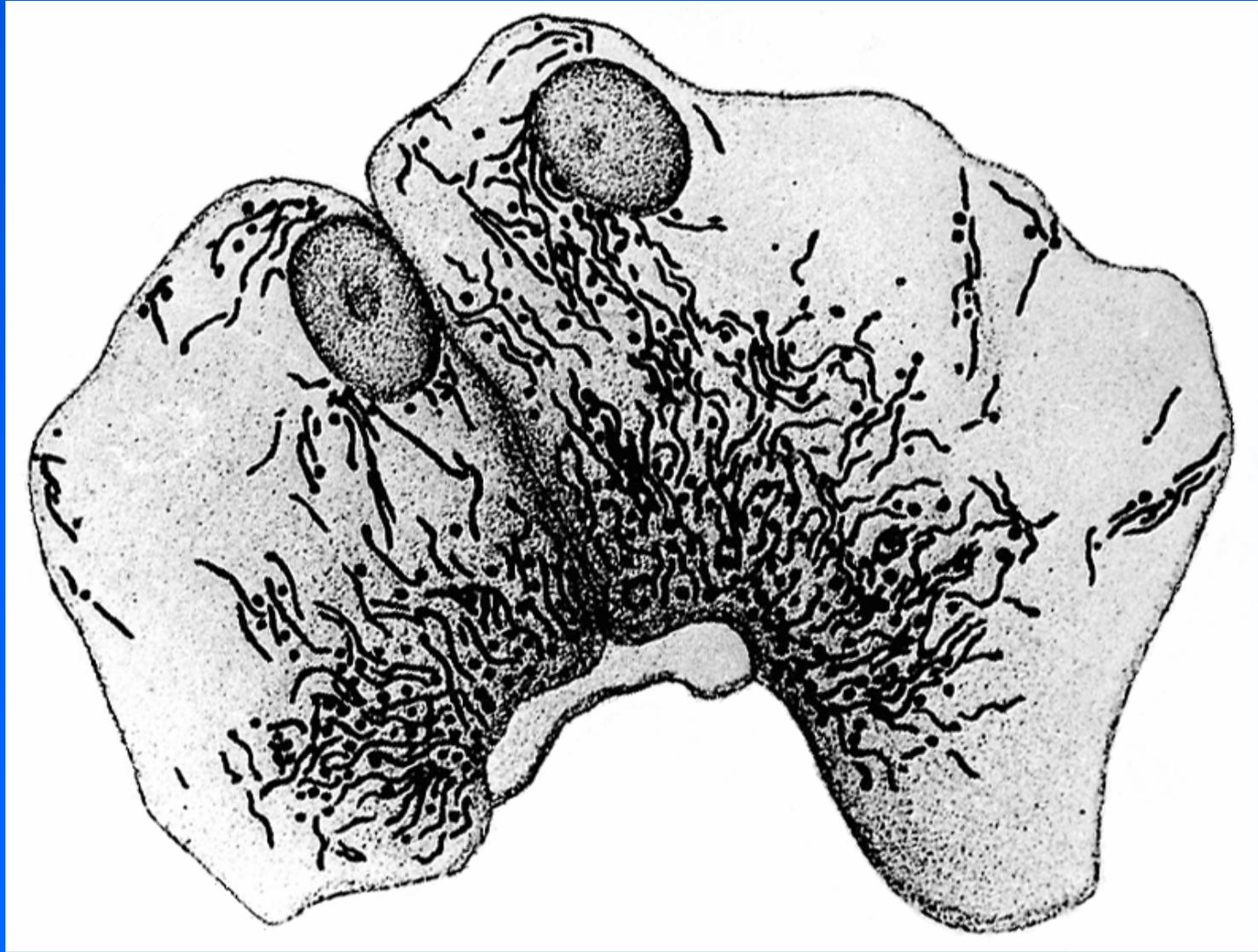
25 nm

клеточная стенка десмотрубочка



0.5 μm

Митохондрии – окраска по Альтману



Методы исследования МИТОХОНДРИЙ

Исследование фиксированных клеток – световая и электронная микроскопия.

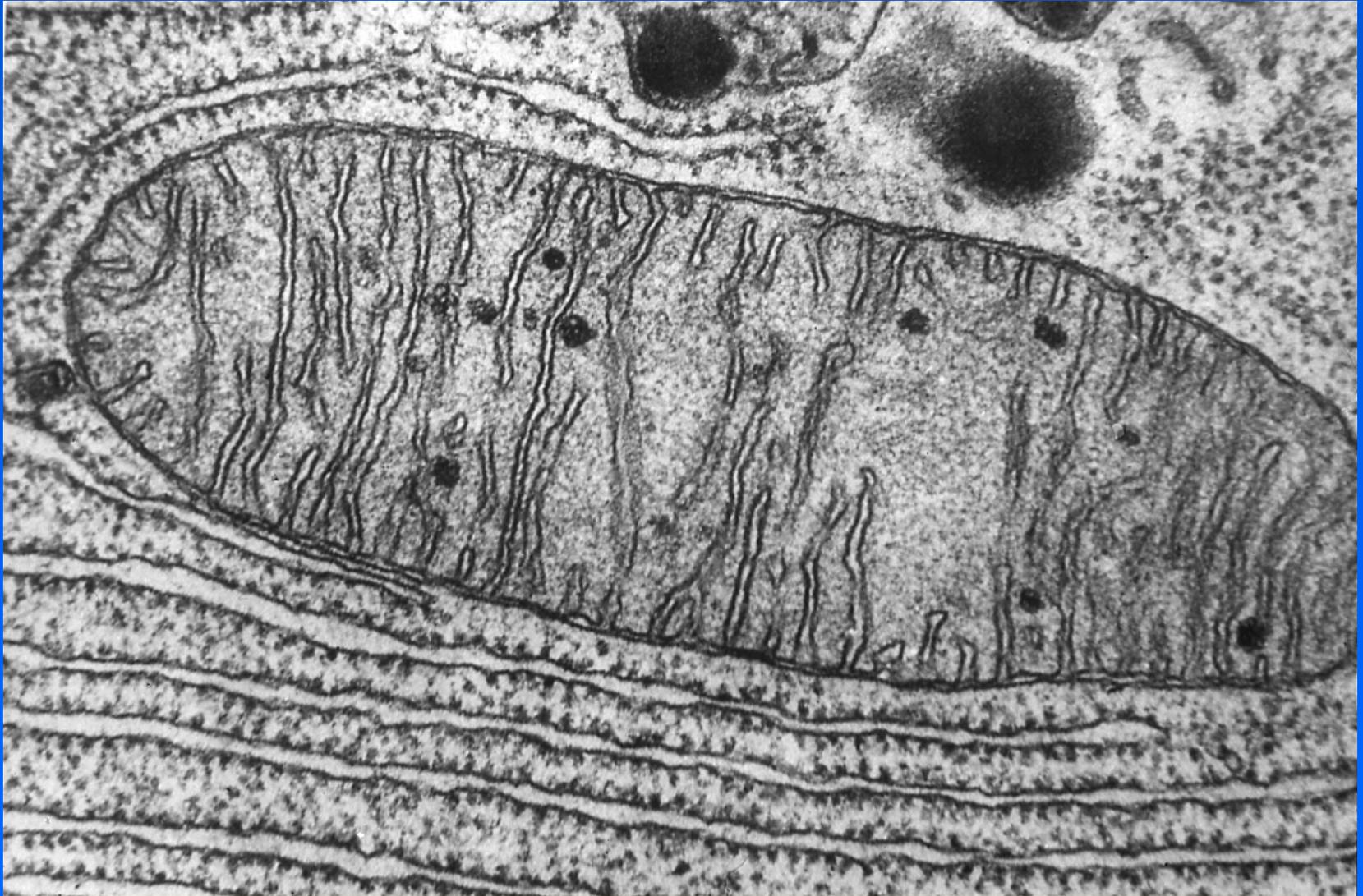
Исследование в живых клетках – фазовый контраст; прижизненное окрашивание катионами; полярография.

Определение митохондриального потенциала – потенциал-зависимые флюоресцентные красители.

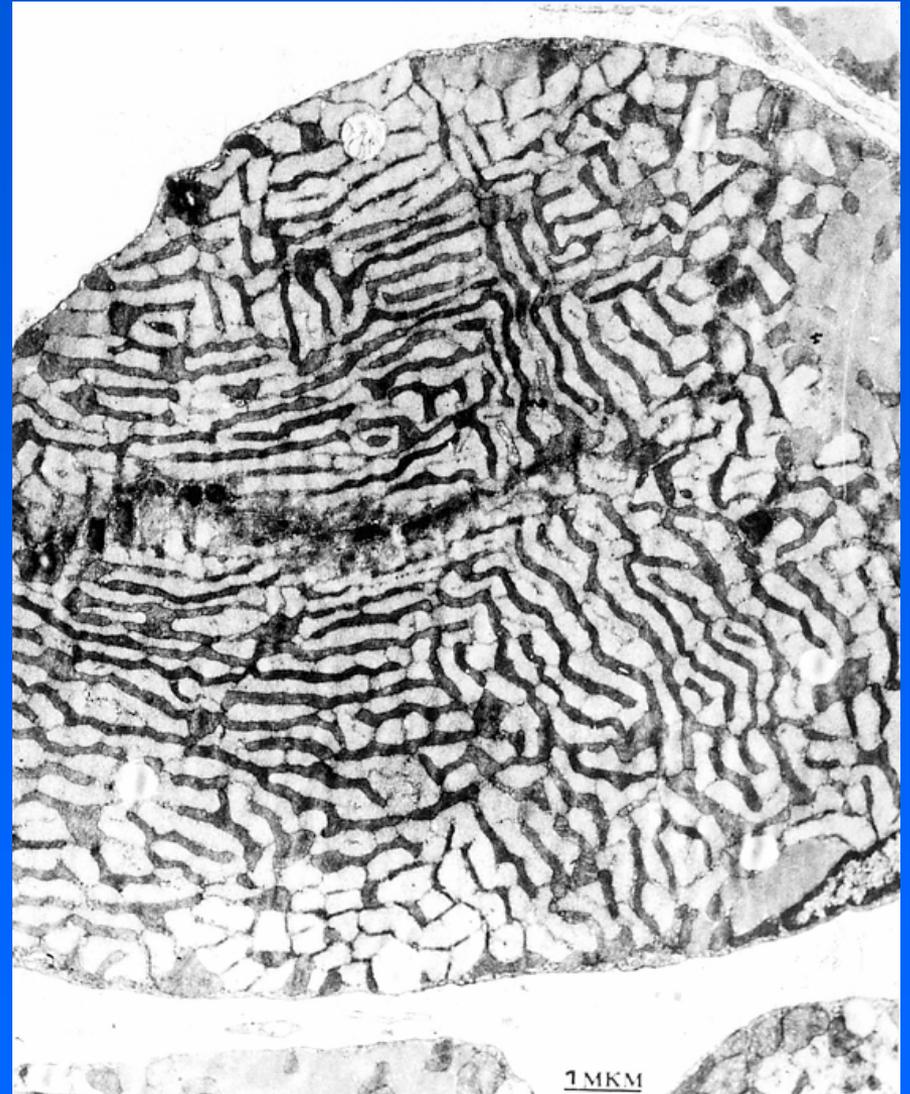
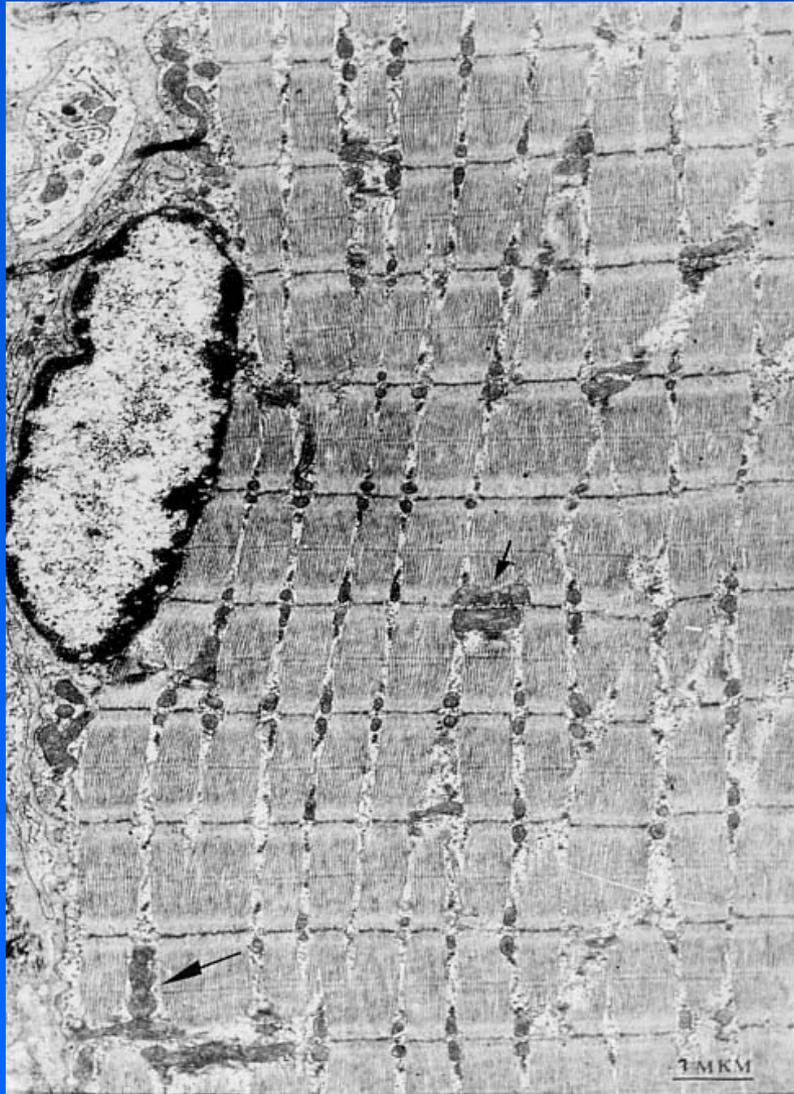
Исследование выделенных митохондрий – фракционирование клеток, получение митохондрий и субмитохондриальных частиц (СМЧ). Недостатки – фрагментация митохондрий, разрывы наружной мембраны.

Выделение митохондриальных ферментов.

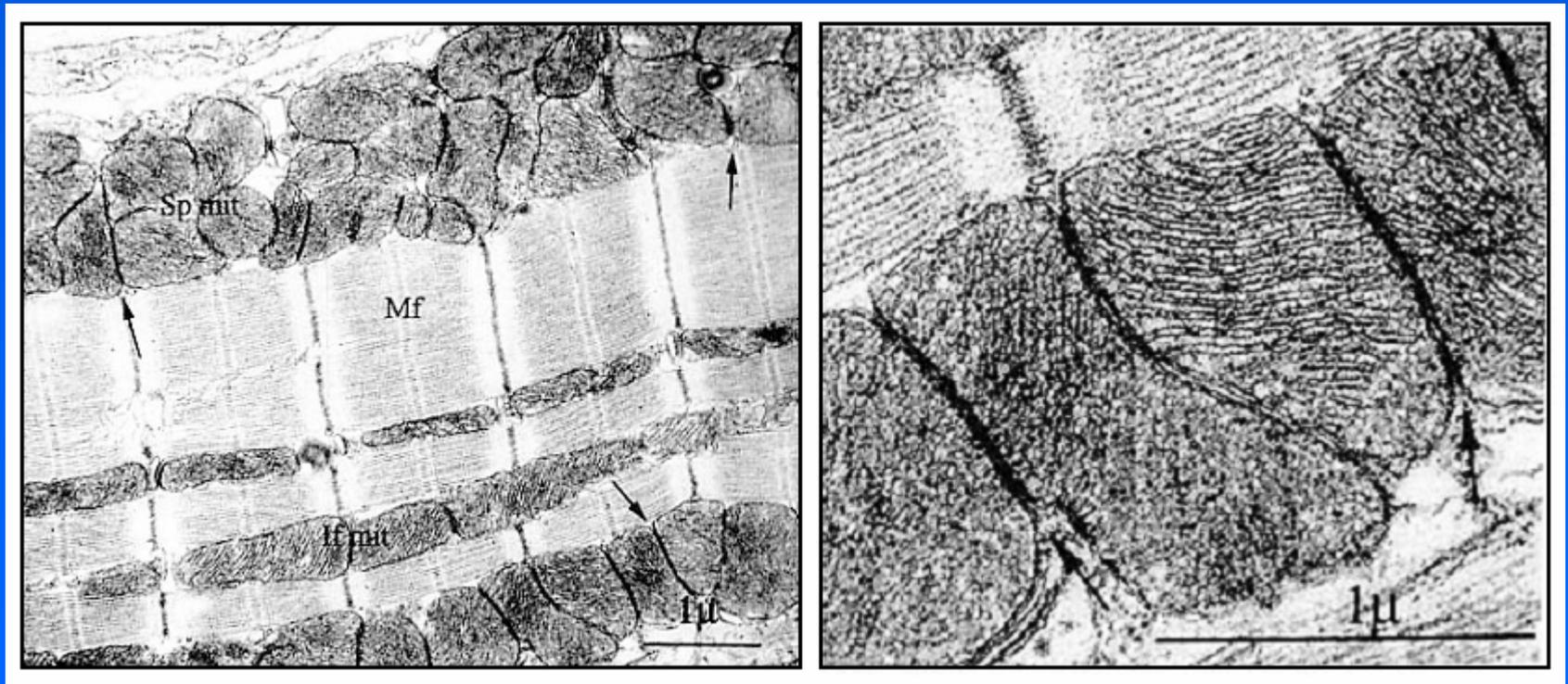
Митохондрия – срез (ЭМ)



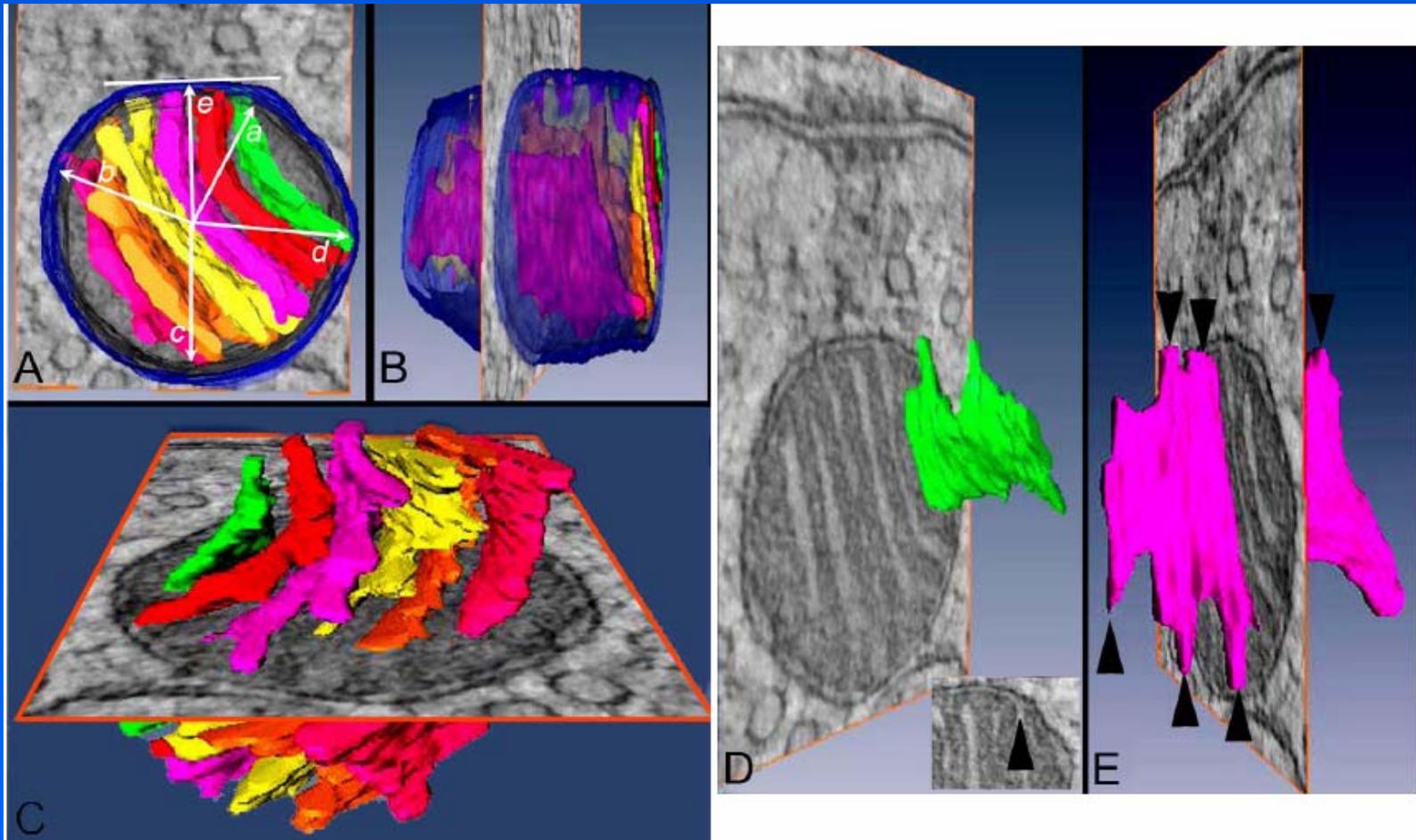
Митохондрии в мышце - хондриом



Межмитохондриальные контакты

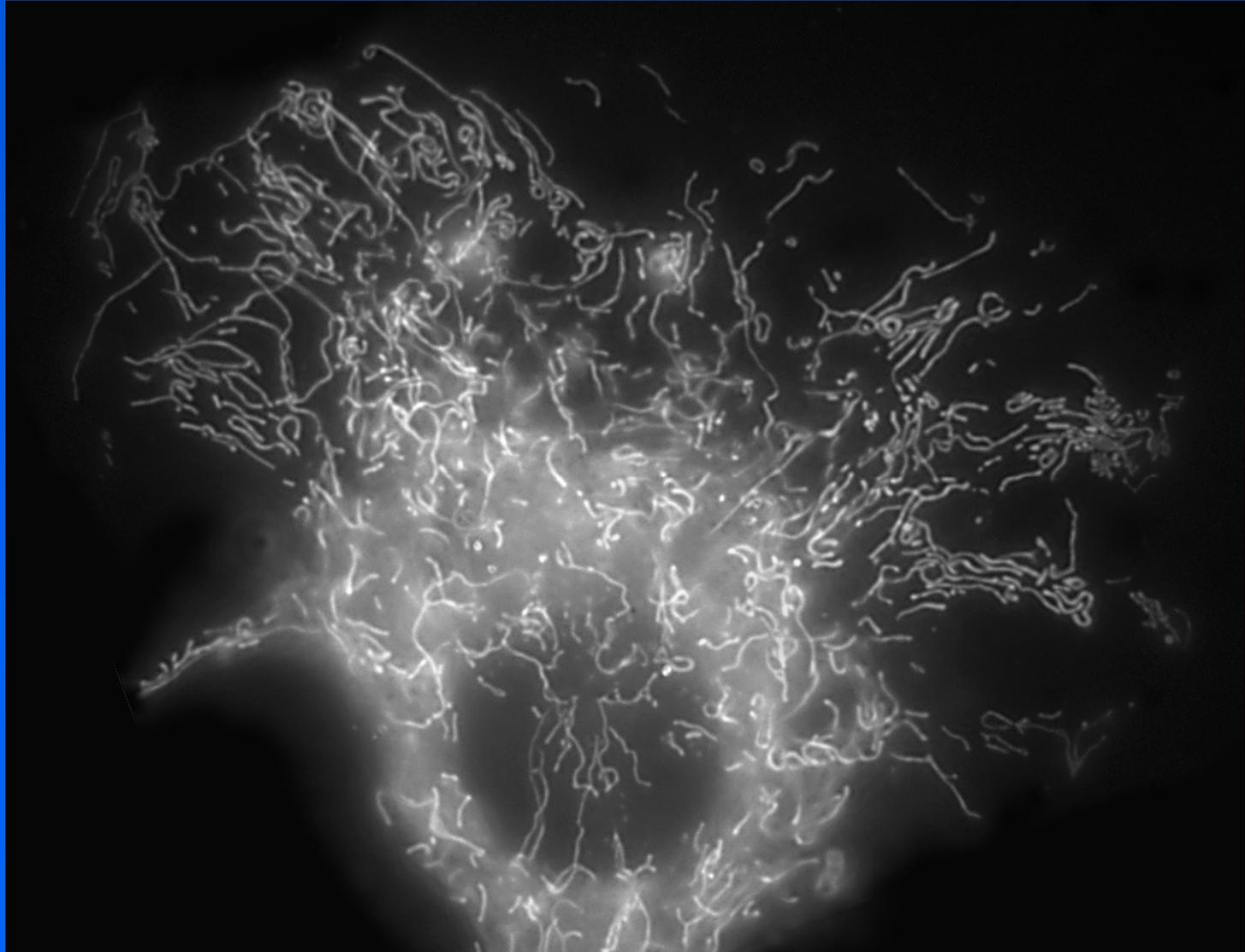


Митохондрия – ЭМ томография

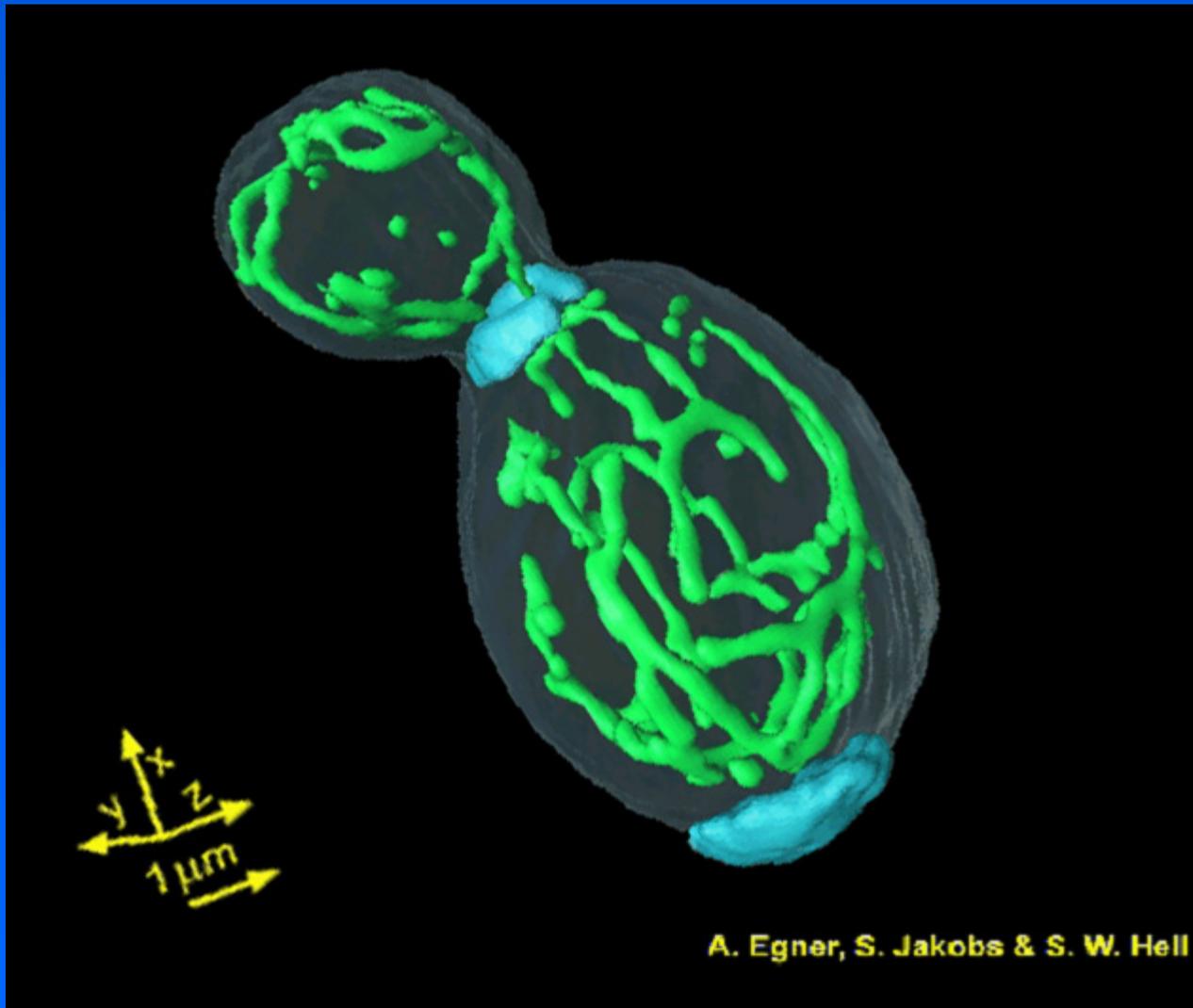


Стрелками указаны анастомозы между кристами и внутренней мембраной

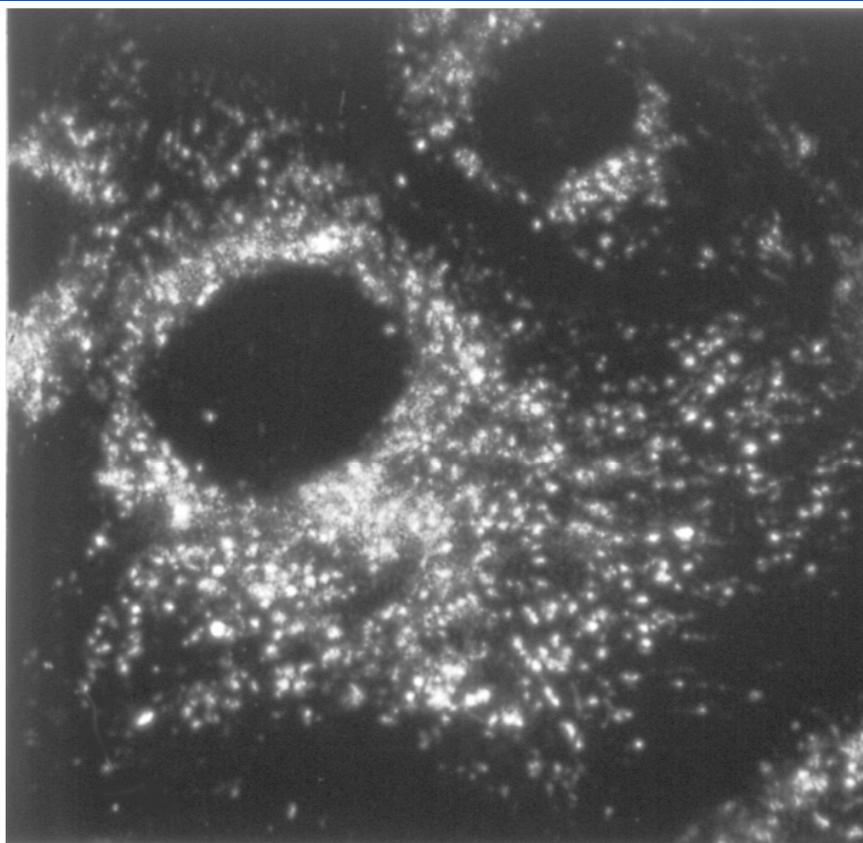
Митохондрии в живой клетке – окраска родамином 123



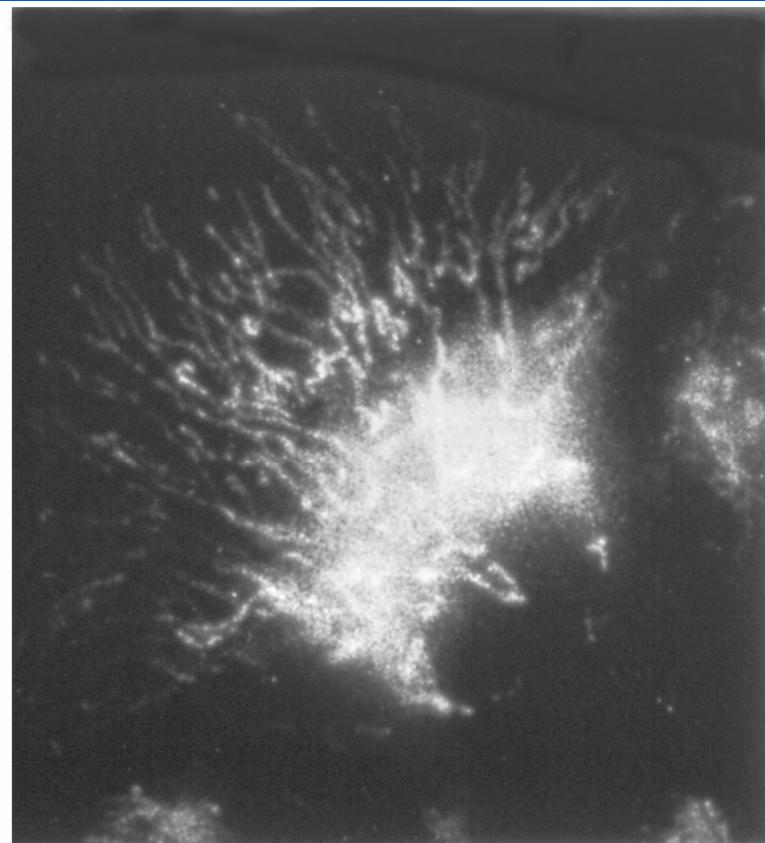
Сложный хондриом в дрожжевой клетке



Фрагментация митохондрий

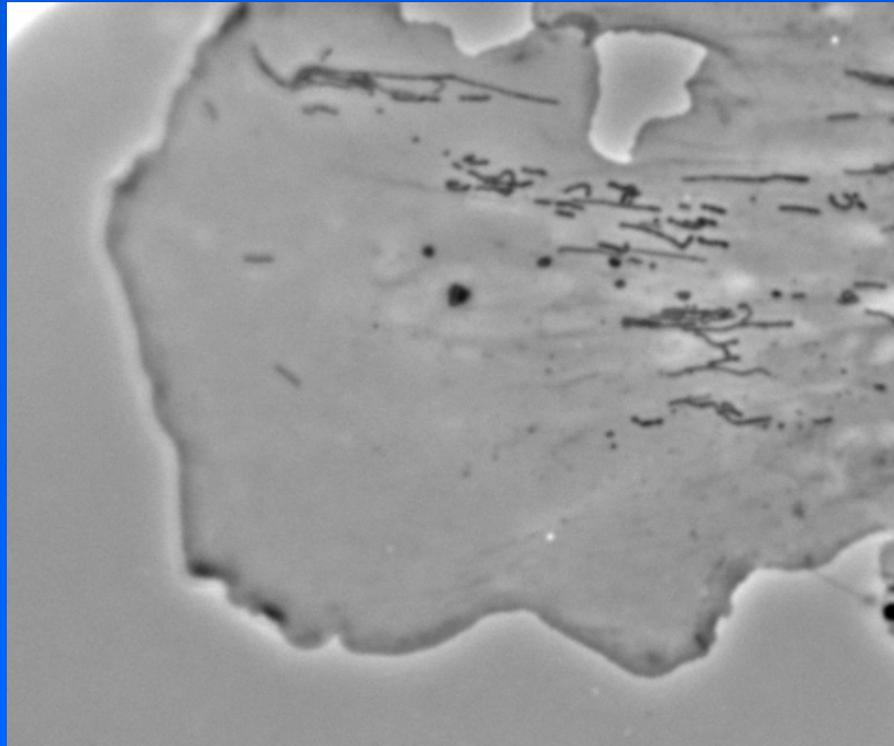


ДИАЗЕПАМ



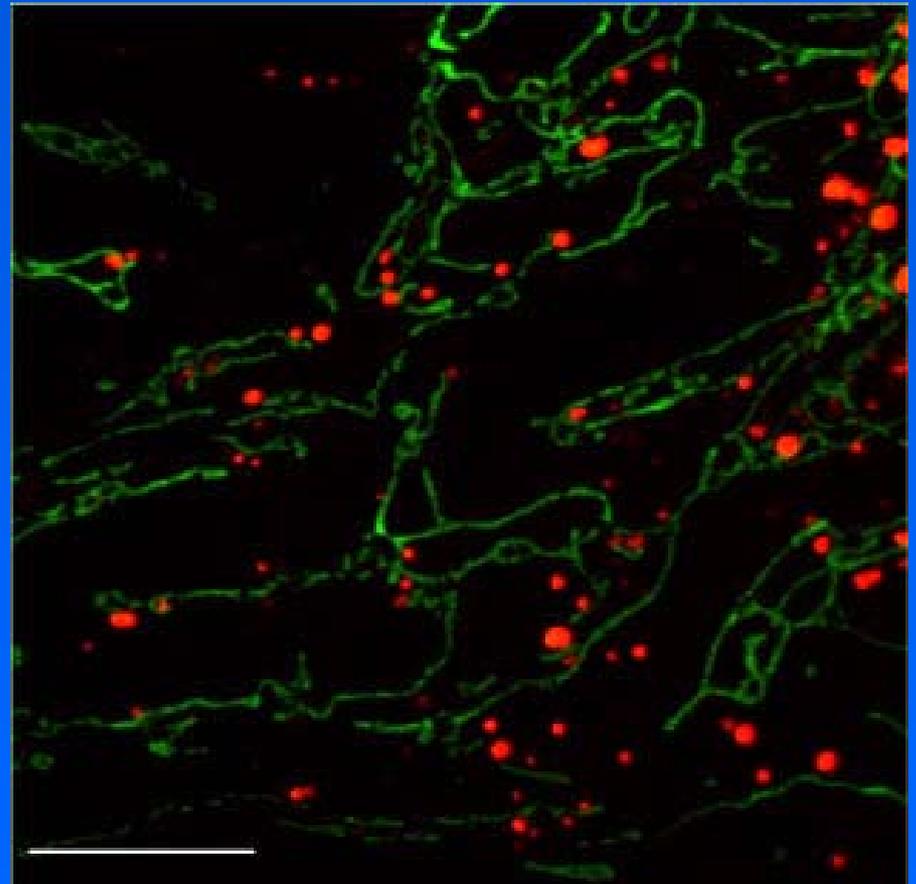
КОНТРОЛЬ

Деление и слияние МИТОХОНДРИЙ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

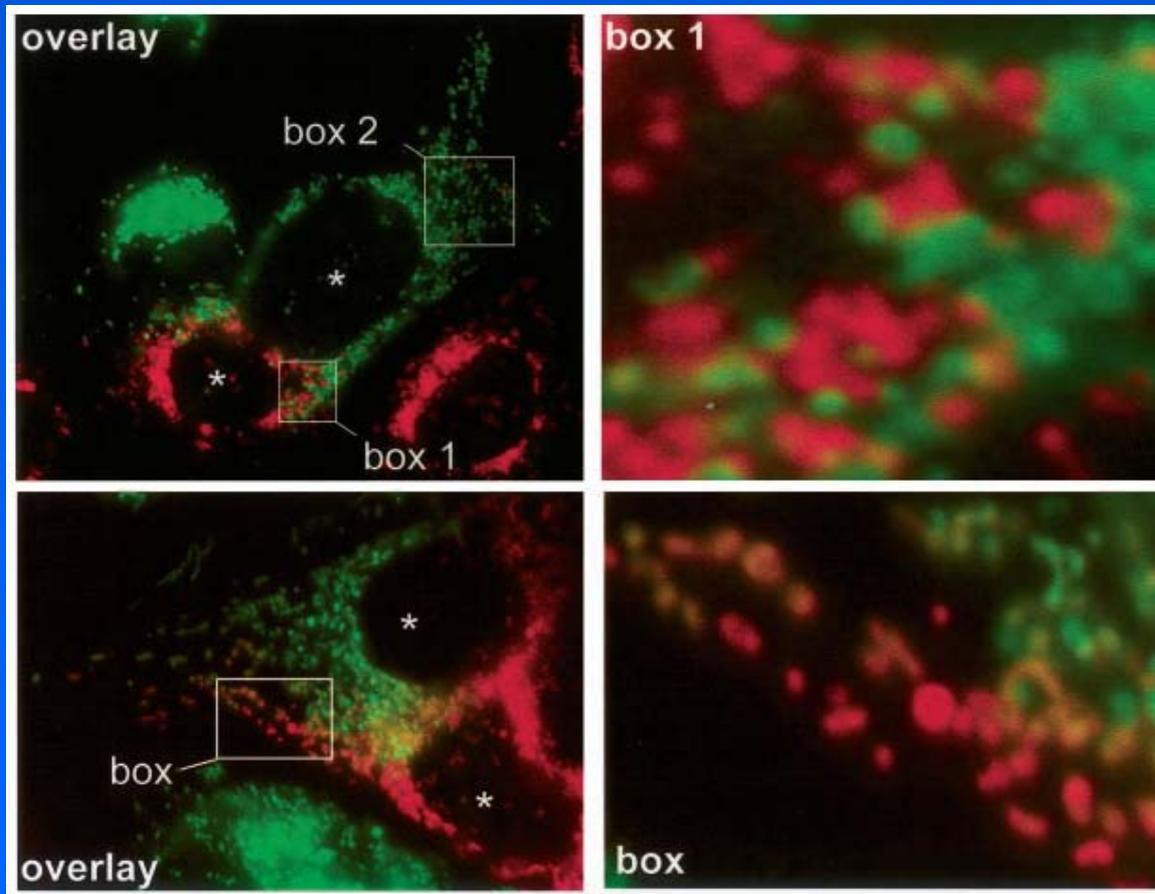


Регуляция слияния МИТОХОНДРИЙ

За слияние митохондрий
отвечают митофузины
(mitofusins)



Слияние митохондрий



**При разобщении (вверху) слияние не происходит.
Митохондрии с нормальным потенциалом
сливаются эффективно (внизу).**

Слияние и деление МИТОХОНДРИЙ

Слияние митохондрий – митофузины 1 и 2 и их гомологи (слияние внешних мембран) + специальные белки для слияния внутренних мембран.

Деление митохондрий – динамин-подобные белки (Dcp1).

Для клетки важен баланс активностей – ингибирование слияния может быть компенсировано подавлением деления.

Компоненты митохондрий

Наружная мембрана: гладкая; содержит мало белков (отношение липид/белок ~1:1); проницаема для веществ с молекулярным весом менее 5 кД. За проницаемость отвечает белок – порин.

Внутренняя мембрана: связана с кристами; содержит много белков (отношение липид/белок ~1:3); практически непроницаема для любых веществ (имеет специальные белки-переносчики); в норме заряжена (- 200 мВ).

Мембрана крист: заряжена; содержит цепь переноса электронов и АТФ-азу; соединяется с внутренней мембраной.

Межмембранные контакты (митохондриальные поры) – обеспечивают избирательный перенос белков из матрикса в цитозоль и обратно.

Матрикс – имеет слабощелочной рН (рН=8); содержит белки цикла Кребса, нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) и рибосомы митохондрий; аккумулирует ионы кальция.

Транспорт белков в МИТОХОНДРИИ

Сигнальная последовательность митохондриальных белков – как правило, на N-конце, она отщепляется после прохождения мембраны.

Белки переносятся в неупакованном (unfolded) состоянии.

Перенос через мембраны – с помощью специальных комплексов переносчиков.

Перенос в матрикс – через зоны контакта наружной и внутренней мембран, однако комплексы на каждой мембране могут работать независимо.

Встраивание белка во внутреннюю мембрану требует двух сигнальных последовательностей и происходит через матрикс.

Основные функции митохондрий

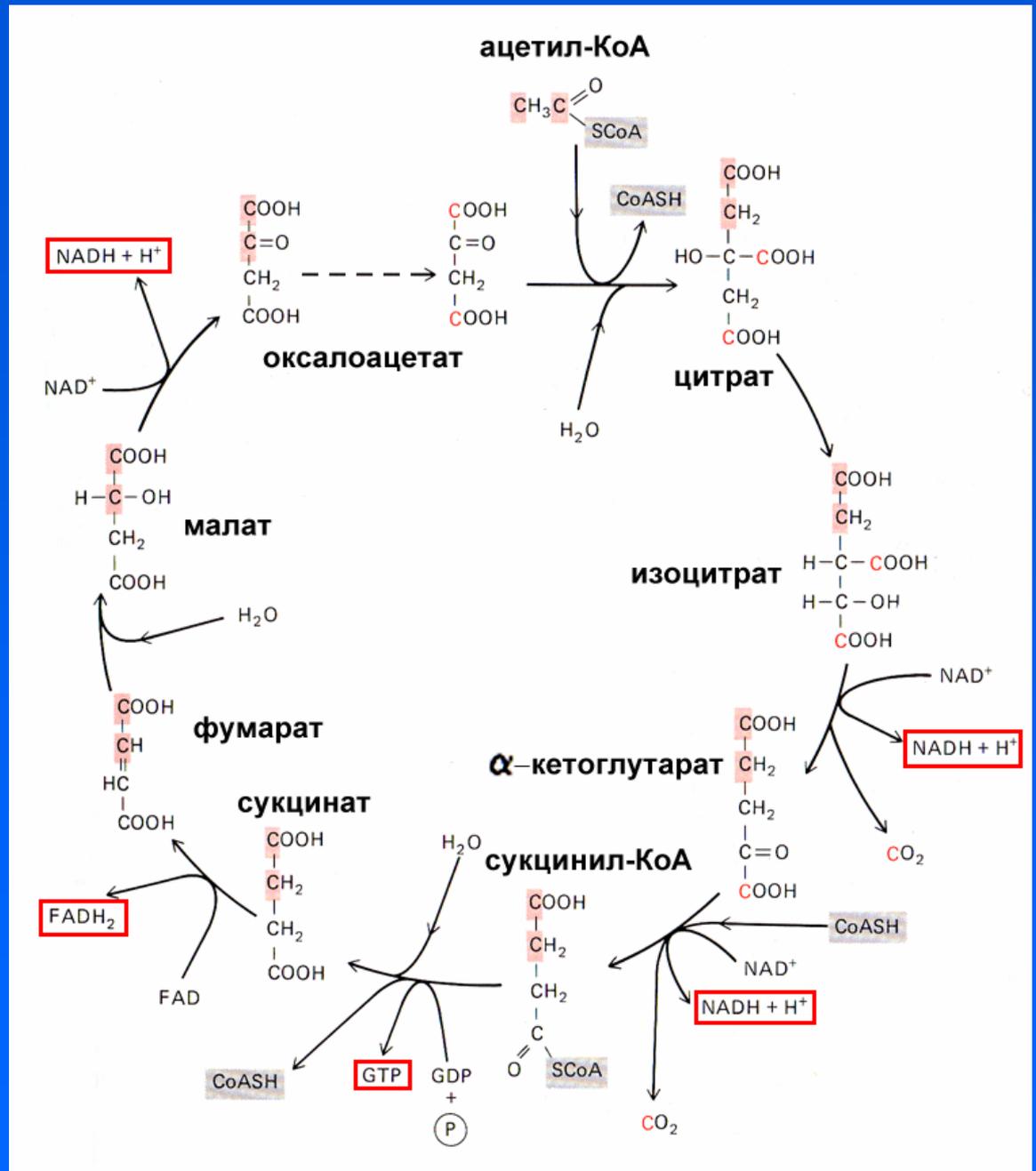
Окислительное фосфорилирование: генерация разности потенциалов в результате окисления органических субстратов; синтез АТФ в матриксе и его экспорт в цитозоль; поддержание низкого уровня АДФ в клетке.

Регуляция уровня внутриклеточного кальция; депонирование кальция.

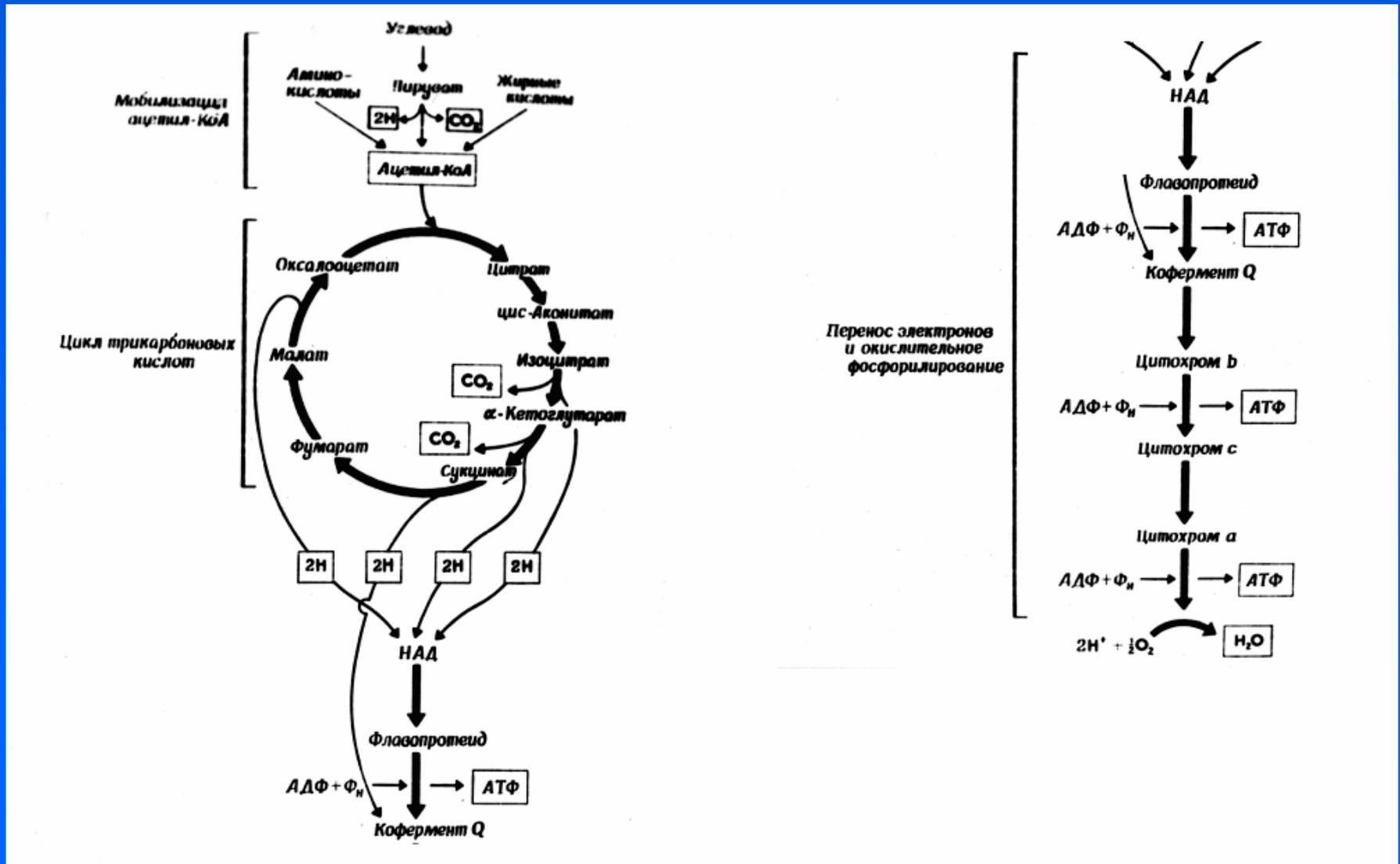
Регуляция апоптоза – зависимый от митохондрий путь активации каспаз.

Синтез некоторых митохондриальных белков и цитоплазматическая наследственность.

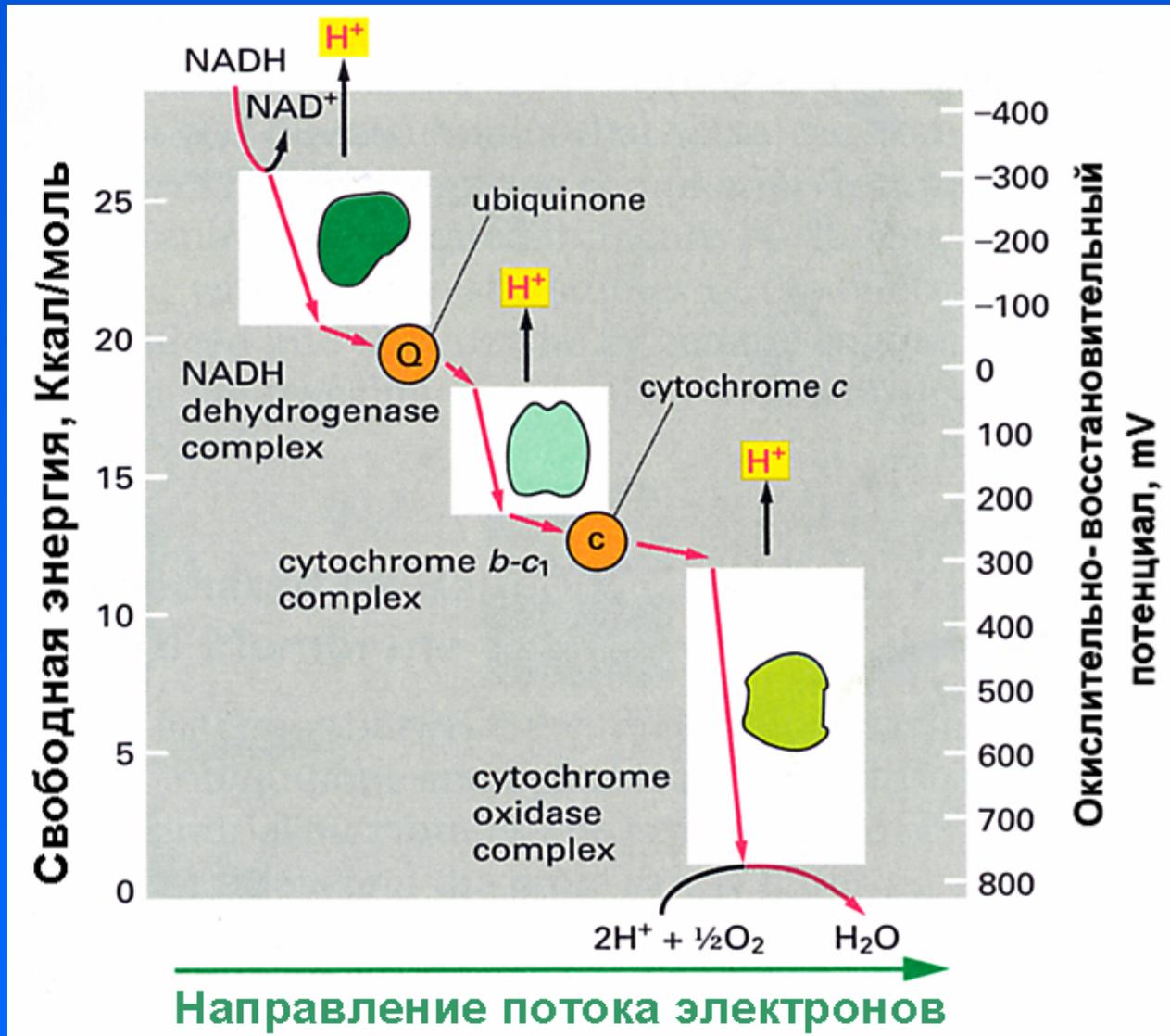
Цикл Кребса - в матриксе МИТОХОНДРИЙ



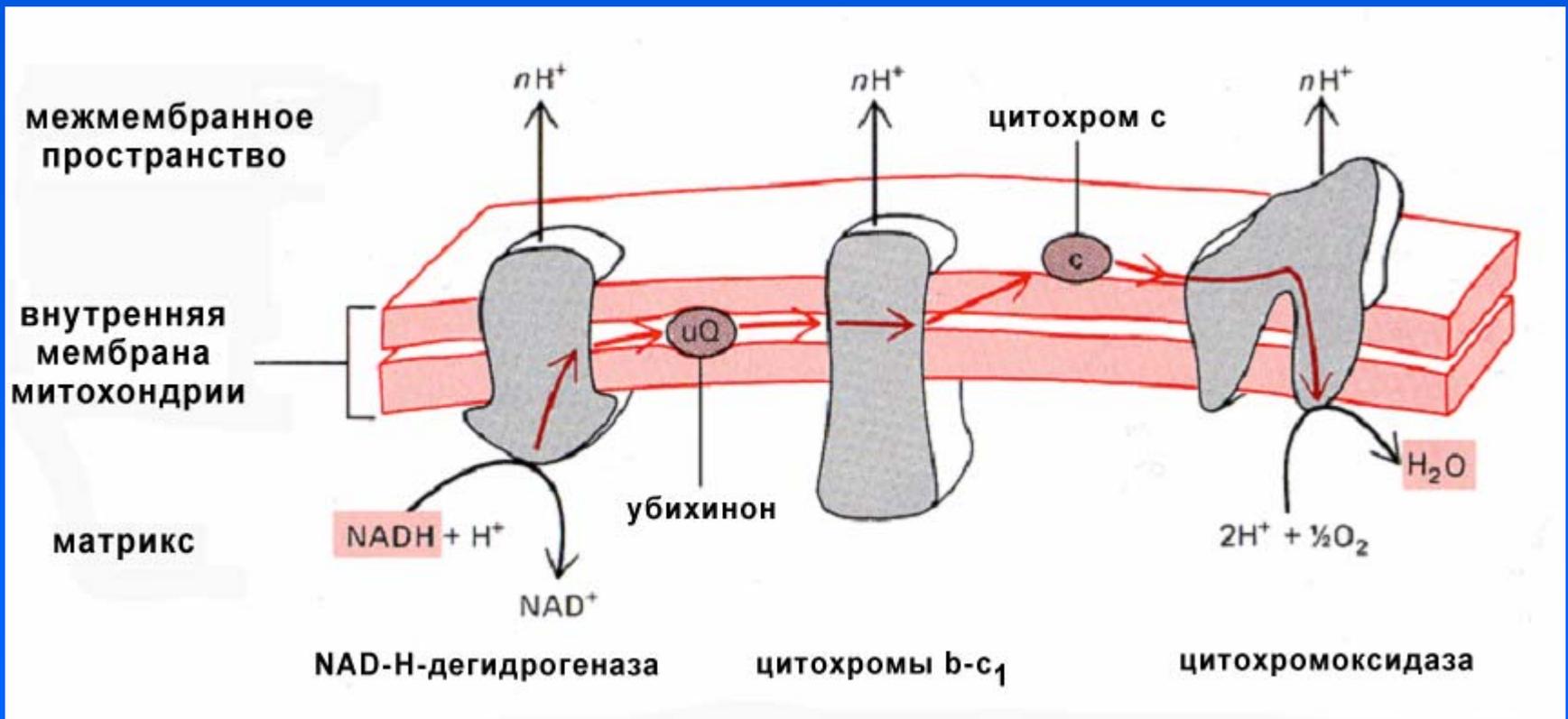
Цепь переноса электронов и цикл трикарбоновых кислот



Цель переноса электронов



Перенос электронов в мембране митохондрии



Уравнение Нернста (электрохимический потенциал)

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\psi - 2.3RT/F * \Delta\text{pH},$$

где $\Delta\psi$ – разность потенциалов (в мВ);

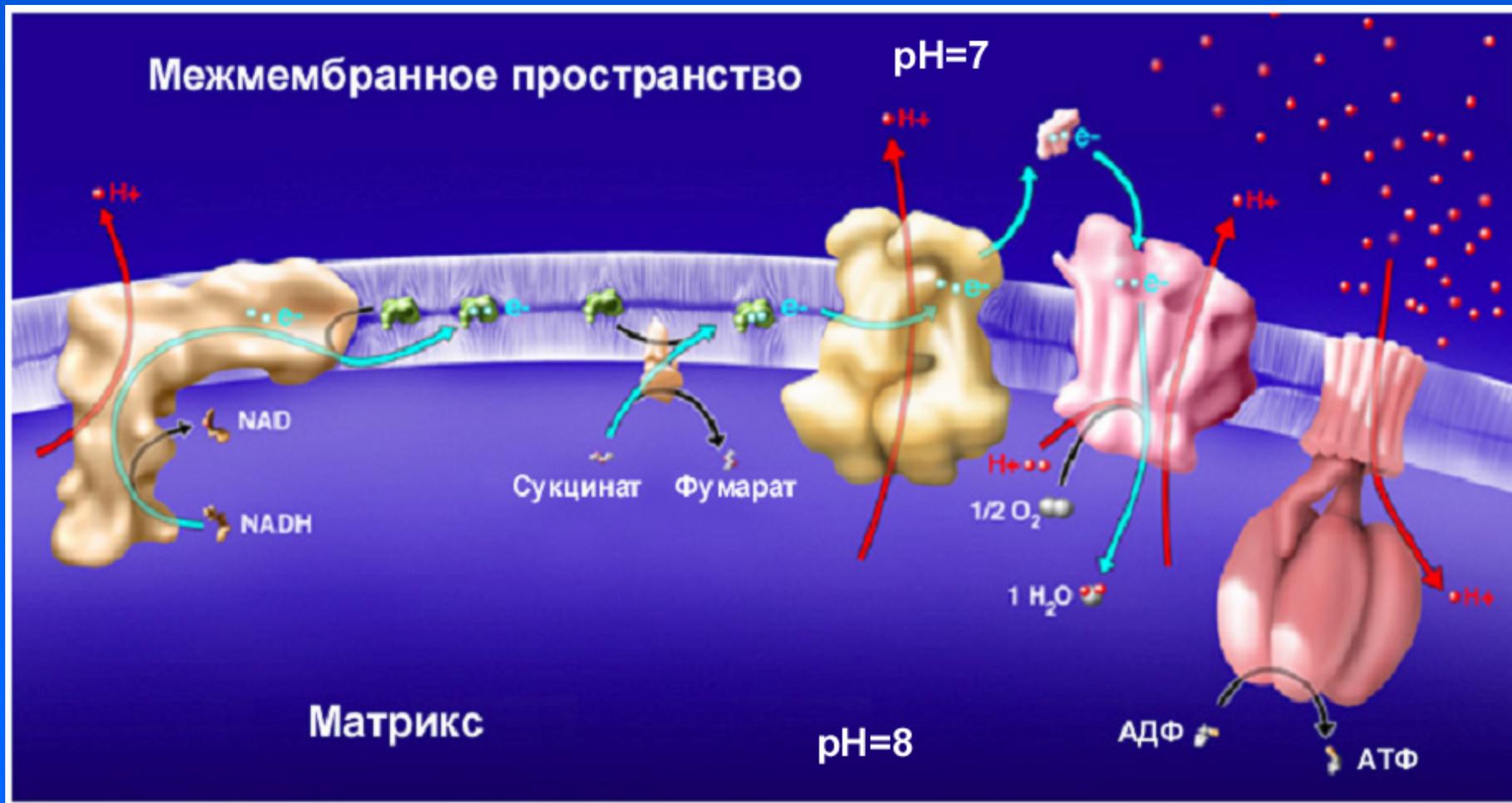
ΔpH – разность показателей pH,

R – газовая постоянная (8,31 Дж/град/моль)

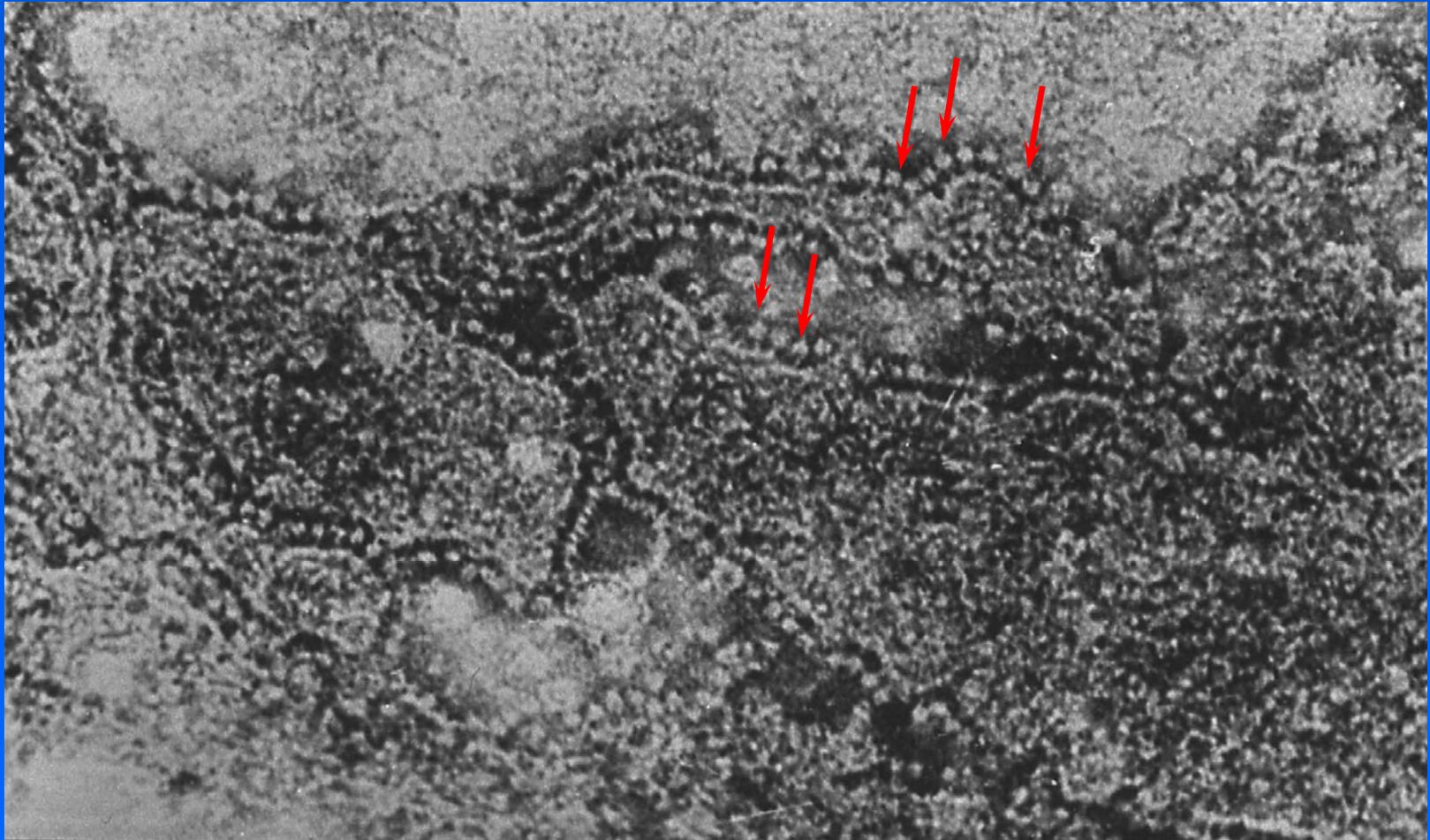
F – число Фарадея (96485 Кулон/моль).

$2.3RT/F$ равно 60 мВ при температуре 37°C

Работа внутренней митохондриальной мембраны



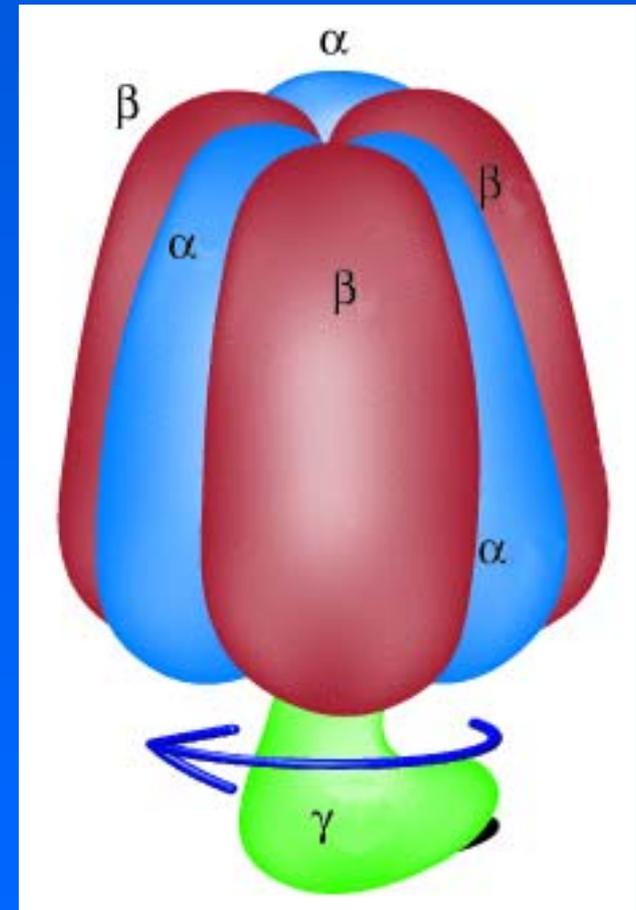
Субмитохондриальные частицы – АТФ-аза (негативный контраст)



АТФ-аза митохондрий и прокариот

АТФ-аза – миниатюрный электромотор. Ротор – гамма-субъединица; статор – три альфа- и три бета-субъединицы.

Вращение ротора в одну сторону приводит к гидролизу АТФ, а в противоположную – к синтезу АТФ (возможен только при наличии большого электрохимического потенциала).



Хемиосмотическая гипотеза

Цель переноса электронов переносит протоны из матрикса митохондрии в цитозоль в процессе снижения уровня свободной энергии.

Митохондриальная АТФ-синтетаза переносит протон через внутреннюю мембрану и синтезирует или расщепляет АТФ. Ее работа обратима и направление переноса зависит от величины электрохимического потенциала.

Внутренняя мембрана в остальном непроницаема для ионов H^+ , OH^- и большинства других.

Внутренняя мембрана имеет специальный переносчик для противоположного переноса АДФ (внутри) и АТФ (наружу).

Генерация энергии МИТОХОНДРИЯМИ

Универсальная форма энергии – электрохимический потенциал (H^+ у эукариот, H^+ или Na^+ у прокариот).

Заряд на внутренней мембране – около 170 мВ; разность рН матрикса и цитозоля – около 1.

Синтез АТФ происходит в матриксе за счет рассеивания электрохимического потенциала.

Максимальный к.п.д. синтеза АТФ (3 пункта сопряжения: НАДН⁺-дегидрогеназа; цитохромы b-c₁, цитохромоксидаза) – около 50%.

Для поддержания баланса через мембрану происходит:

- совместный перенос в матрикс ионов фосфата и водорода.
- противоположный перенос АДФ (внутри) и АТФ (наружу).

Регуляция окислительного фосфорилирования через систему обратных связей

При нормальном окислении соотношение $P/O = 3$. Шунтовое окисление ($P/O < 3$) – перенос электронов начинается со второго или третьего пунктов сопряжения (флавины, ТМПД-аскорбат)

Дыхательный контроль – потребление кислорода ограничивается концентрацией АДФ в цитоплазме и потенциалом на митохондриальной мембране.

Разобщители (ускорители дыхания) – жирные кислоты. Синтетические – ионофоры для H^+ (2,4-динитрофенол, FCCP и др.) Максимальная скорость окисления при разобщении ~ в 3 раза превышает нормальную.

Ингибиторы дыхания – яды, которые подавляют перенос электронов по цепи (азид, цианид, антимицин А, ротенон).

Ингибитор АТФ-азы – олигомицин.

Митохондрия как осмометр

Набухание митохондрий – пассивное (в условиях гипотонии) и активное (в условиях недостатка кислорода).

Набухание митохондрий может приводить к исчезновению крист и разрыву наружной мембраны.

Сжатие митохондрий (выход воды) – результат воздействия разобщителей.

Митохондрия как терморегулятор

Жирные кислоты – природный разобщитель, который регулирует соотношение окисления и синтеза АТФ.

Митохондрии в клетках бурого жира – обеспечивают терморегуляцию и быстрый разогрев организма. В них содержится специальный белок – термогенин, который активируется за счет работы нервной системы (симпатических нервов).