# ЛЕКЦИЯ 9

## СЕКРЕТОРНАЯ МЕМБРАННАЯ СИСТЕМА

## АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

# Секреторная мембранная система

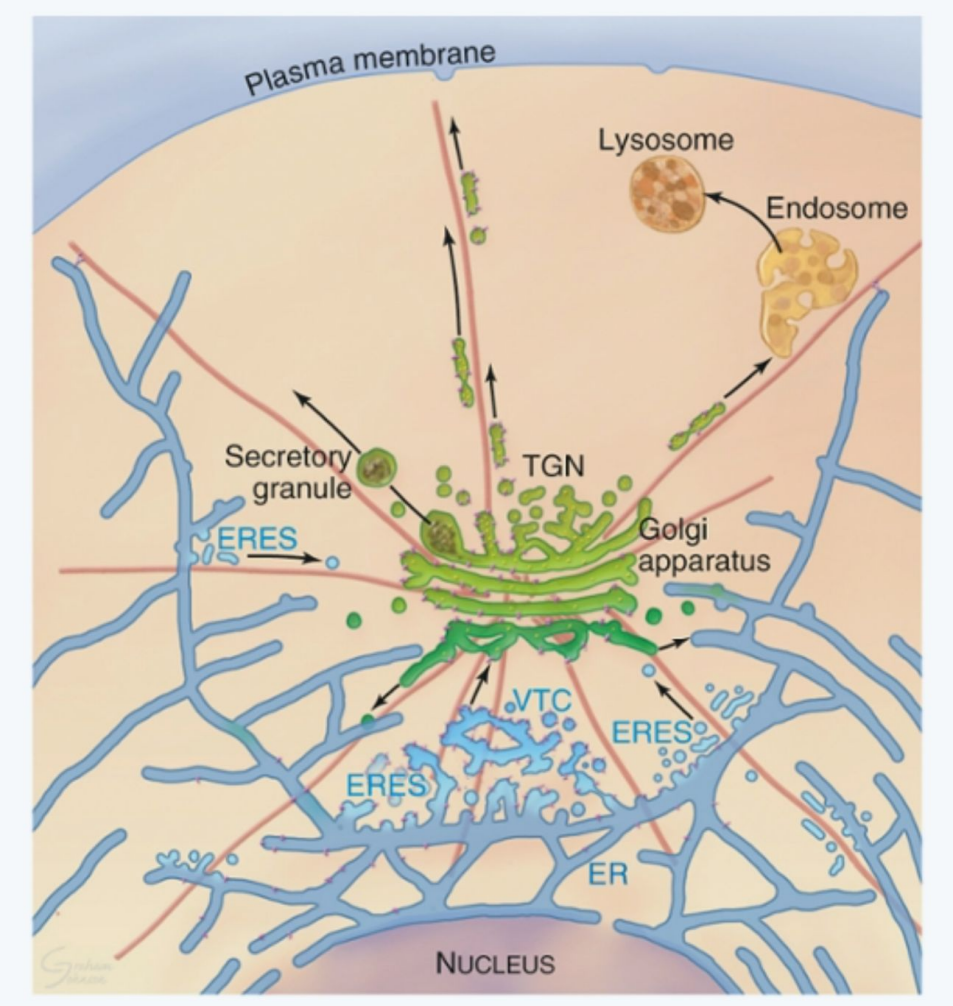
В клетках эукариот белки, предназначенные для выведения из клетки, для внутриклеточного использования (гидролитические ферменты) и мембранные белки, проходят через **секреторную систему.**

**Секреторная система -** серия функционально различающихся мембранных компартментов, куда входят сайты экспорта ЭПР (ERES), аппарат Гольджи, различные везикулярные органеллы.

Функции секреторной системы:

- 1) доставка белков и липидов, синтезированных в ЭПР, к плазматической мембране и клеточным компартментам;
- 2) модификация, сортировка и хранение белков и липидов;
- 3) создание и поддерживание уникальной идентичности и функций ЭПР, аппарата Гольджи и плазматической мембраны.

# Общая схема строения секреторной мембранной системы и направления транспортных потоков в клетке (антероградный и ретроградный транспорт)



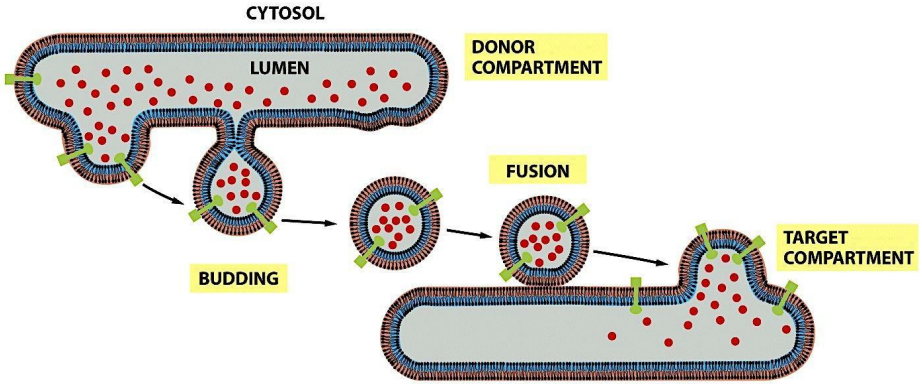

**Антероградный** транспорт - поток везикул-переносчиков по секреторной системе от ЭПР через аппарат Гольджи к плазматической мембране.

**Ретроградный транспорт** - транспорт везикул в сторону ЭПР.

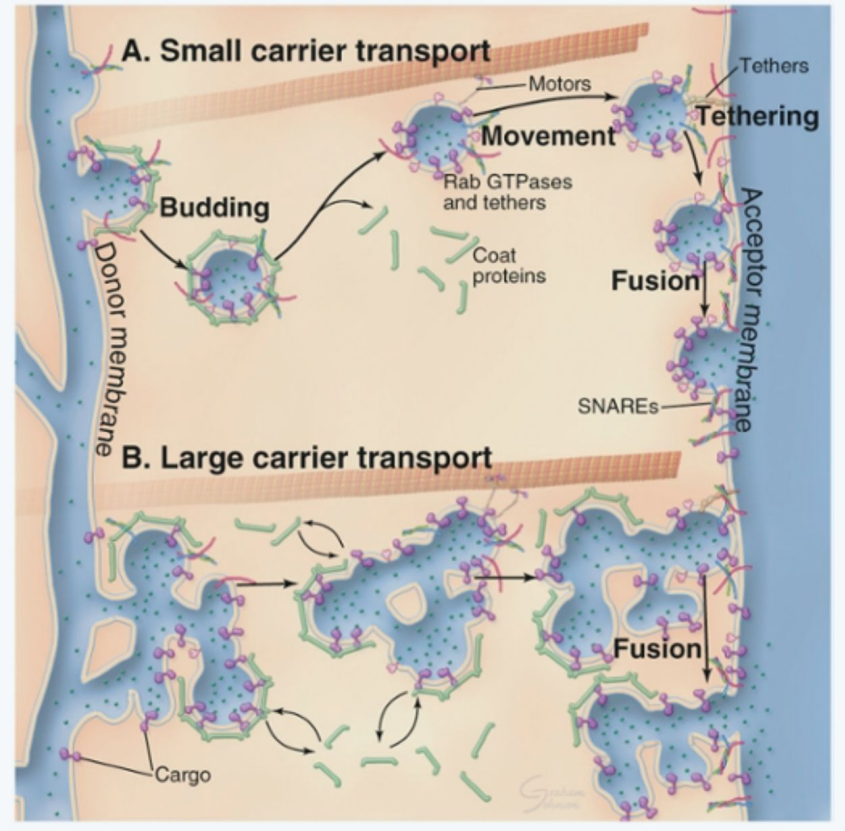
Между всеми компонентами секреторной системы идет постоянный поток мембранных везикул в ту и в другую сторону. Это и есть **везикулярный транспорт**.

Cell Biology, 2016

# Везикулярный транспорт между разными мембранными компартментами




Molecular Cell Biology, 2014



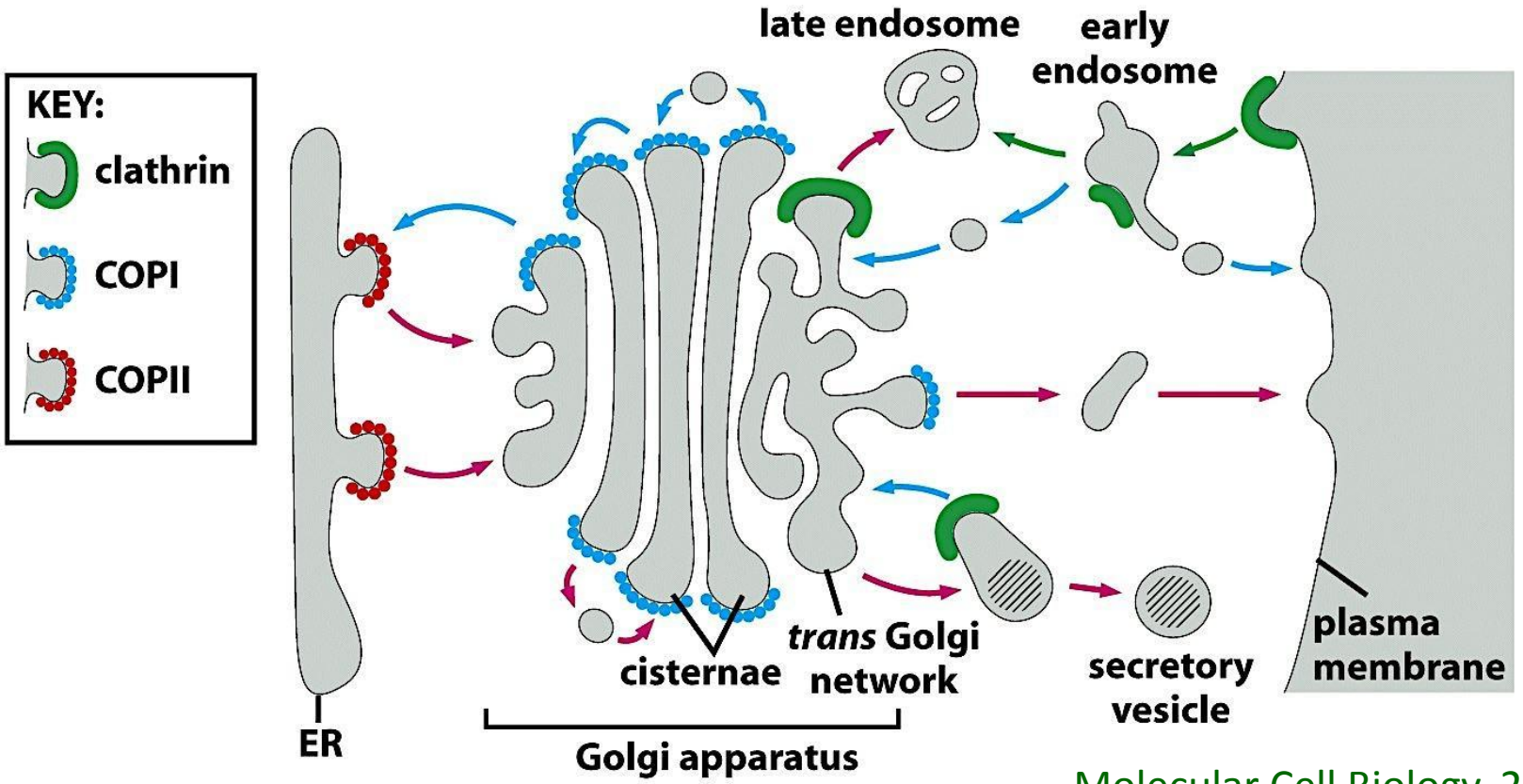

Cell Biology, 2016

В ходе **везикулярного транспорта** происходит постоянный обмен компонентами между закрытыми мембранными компартментами, которые объединяются и составляют биосинтетический, секреторный и эндоцитозный путь. Везикулы (А) и более крупные транспортные переносчики (В) отпочковываются от донорских компартментов и сливаются с таргетными/акцепторными компартментами.

**Нобелевскую премию по медицине в 2013 году присудили за исследования, посвященные механизмам везикулярного транспорта.**

Джеймс Ротман, Ренди Шекман и Томас Зюдов

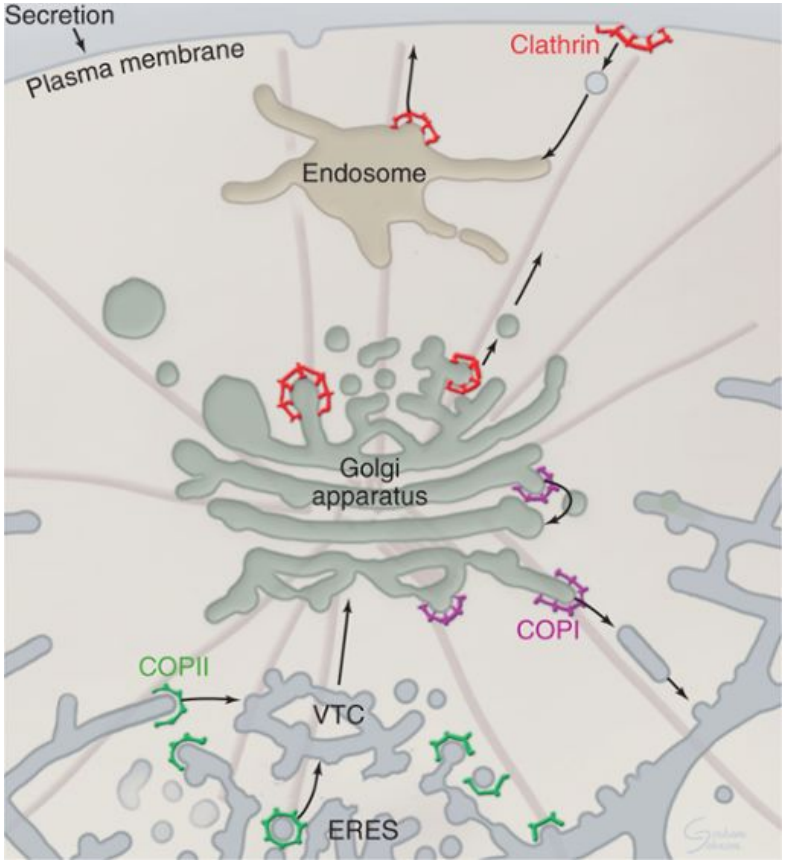
# Использование разных белковых покрытий для везикулярного транспорта



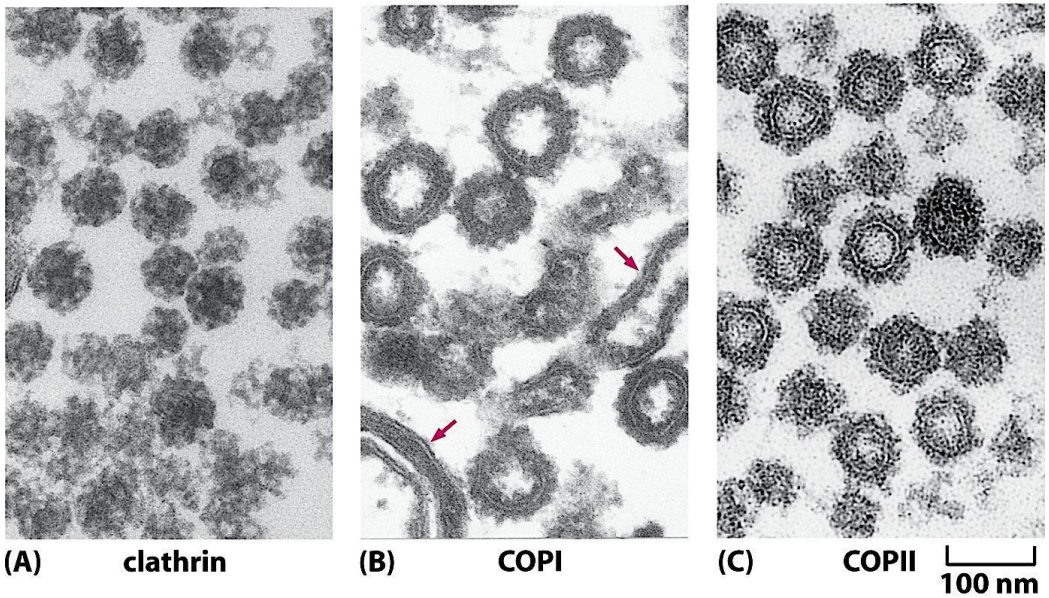

Molecular Cell Biology, 2014

Разные покрывающие белки «выбирают» разные транспортные везикулы/переносчики в биосинтетическом, секреторном и эндоцитозном потоке. **Красные стрелки** – антероградный транспорт, **синие стрелки** – ретроградный транспорт, **зеленые стрелки** – эндоцитоз.

# Как выглядят разные белковые покрытия на транспортных везикулах




Cell Biology, 2016

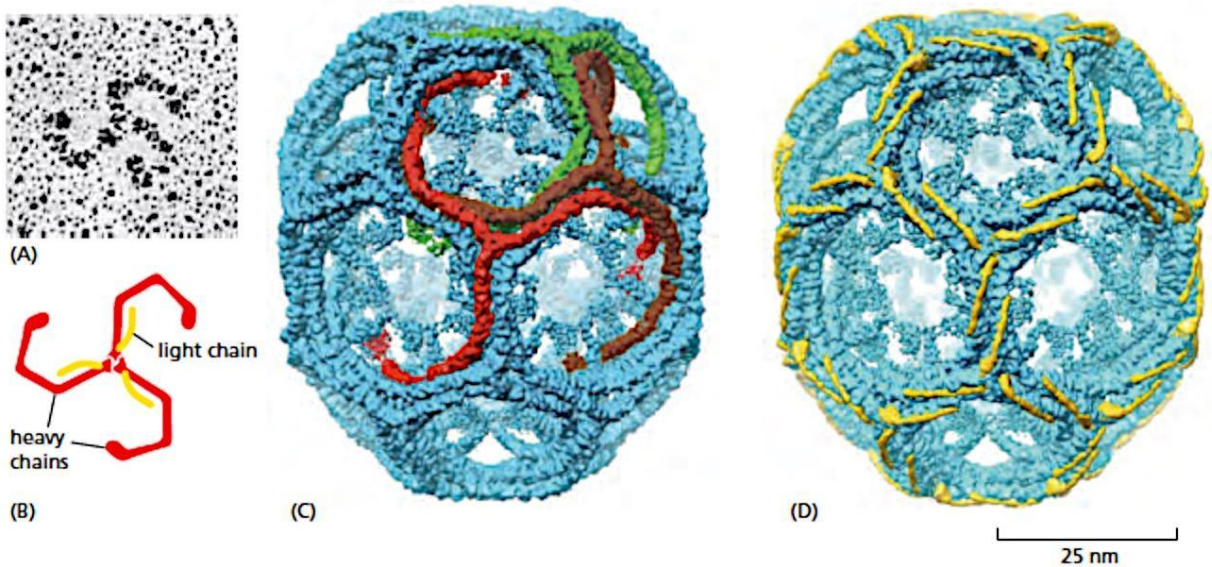


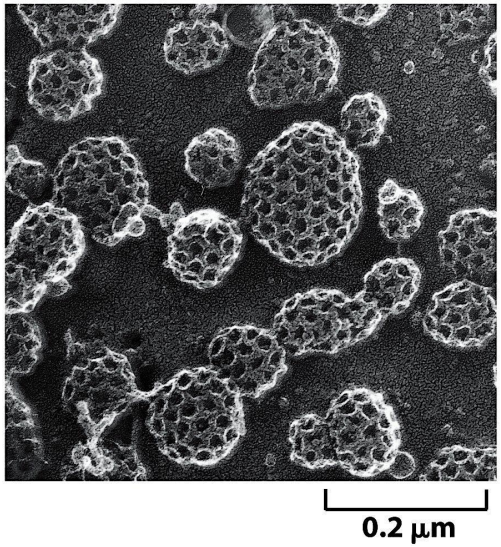

Molecular Cell Biology, 2014

**Клатриновое покрытие** и **COPI покрытие** снимается почти сразу после того, как везикула отделилась от донорского компартмента.
Везикулы с **COPII** покрытием утрачивают его непосредственно перед слиянием с таргетной мембраной.

# Клатриновое покрытие на транспортных везикулах

трискелион

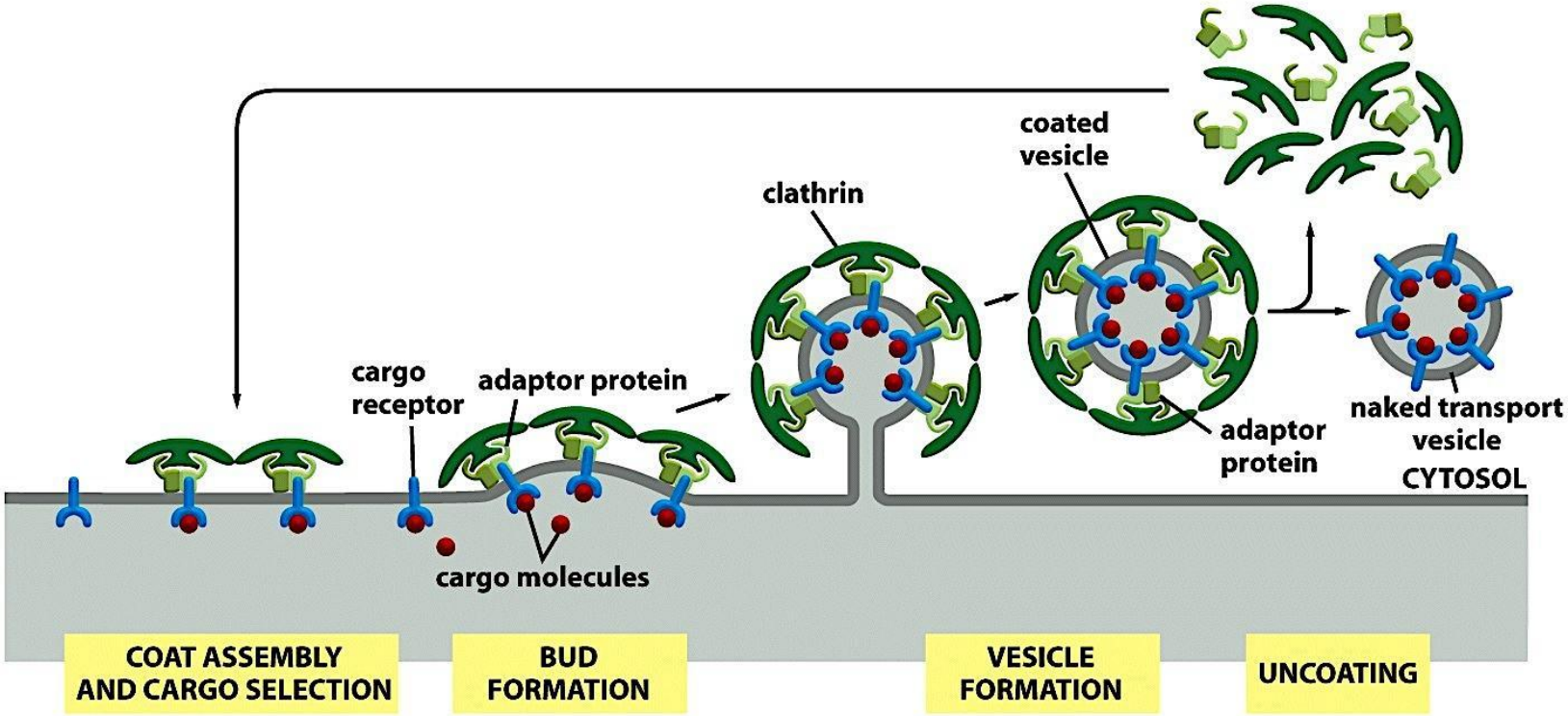



Основной компонент клатринового покрытия - белок **клатрин**. Каждая субъединица клатрина состоит из трех больших и трех малых полипептидных цепей, которые образуют структуру из трех ножек – **трискелион**. Такие трискелионы собираются в корзинки и формируют гексагональные и пентагональные каркасы на цитозольной поверхности мембраны.

Molecular Cell Biology, 2014

# Сборка и разборка клатринового покрытия



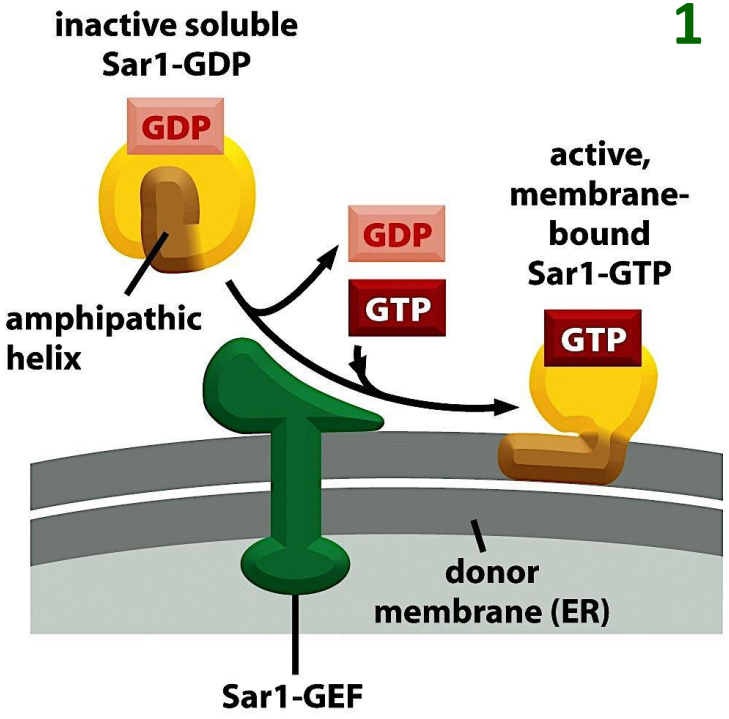

Molecular Cell Biology, 2014

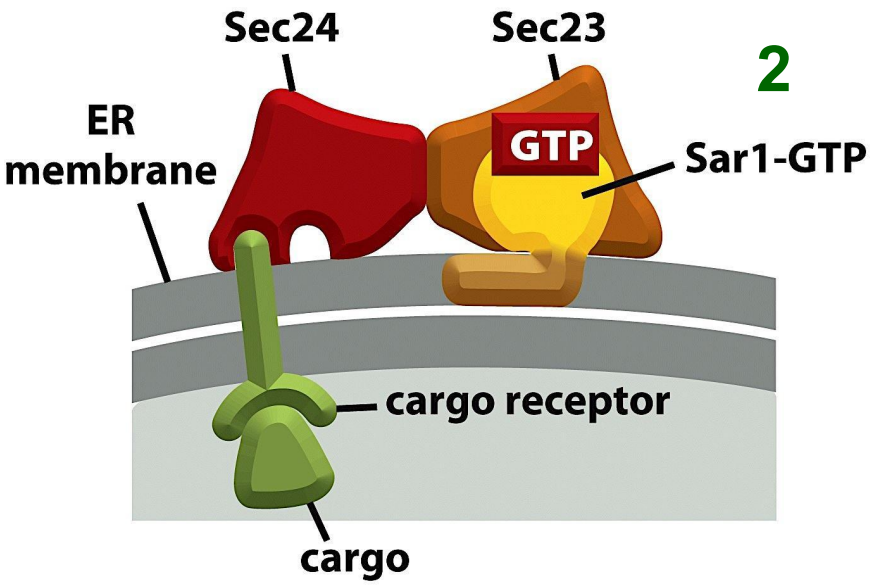
Рецепторы «собирают» молекулы карго (белков) для упаковки в везикулу. Сборка покрытия начинается с прикрепления к рецепторам адаптерных белков (**AP** - **adaptor proteins**), которые затем рекрутируют клатрин. После отпочковывания везикулы, клатриновое покрытие снимается.

Сборка **клатринового, COPI и COPII покрытий** нужна для сортировки рецепторов, связанных с карго, и контролируется белками семейства малых ГТФаз - **coat recrtuitment GTPases**:

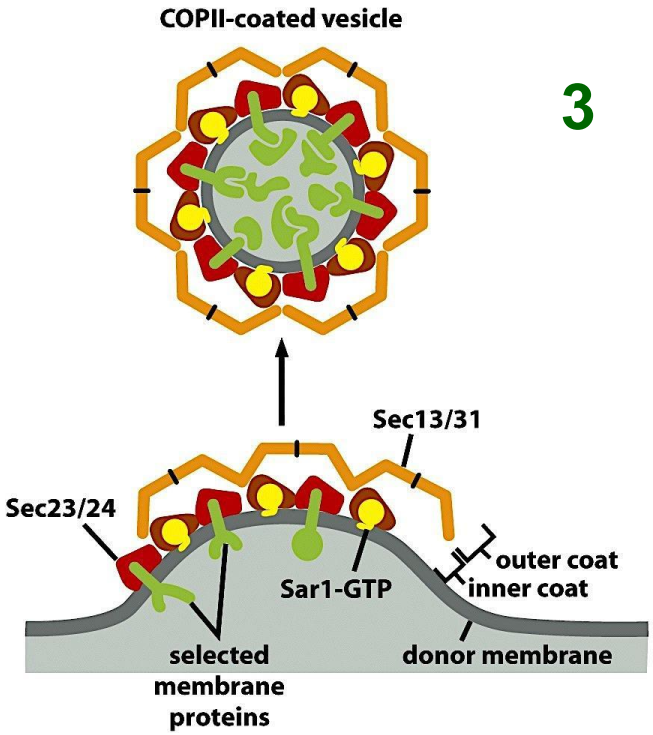
- **Sar1-ГТФаза** отвечает за сборку **COPII** покрытия, который участвует в формировании везикул от сайтов экспорта ЭПР (ERES).
- **Arf1-ГТФаза** отвечает за сборку **COPI** покрытия, который участвует в ретроградном транспорте везикул от аппарата Гольджи, и сборку **клатринового** покрытия.

# Формирование COPII покрытия на везикулах, отщепляющихся от ERES (ER Exit Sites)




COPII покрытие состоит из белков Sec23/24 (внутренняя часть каркаса) и Sec13/31 (внешняя часть каркаса)




Molecular Cell Biology, 2014

При образовании везикул-переносчиков, на донорских мембранах собирается белковое покрытие из клатрина, COPI или COPII, которое сортирует рецепторы и создает изменение упругости мембраны. Это также первый этап сортировки и маркировки «груза» в люмен везикул.

Для того чтобы обеспечить направленный перенос, везикулы должны селективно узнавать только те мембраны, с которыми они должны сливаться. Этот процесс зависит от:

- 1) Rab белков (**Rab GTPases)**, которые направляют везикулы к мембране, с которой должно произойти слияние;
- 2) **эффекторных белков**, которые участвуют в узнавании определенных Rab белков и способствуют взаимодействию транспортных везикул с таргетными компартментами;
- 3) белков **SNARE**, которые обеспечивают слияние билипидных слоев.

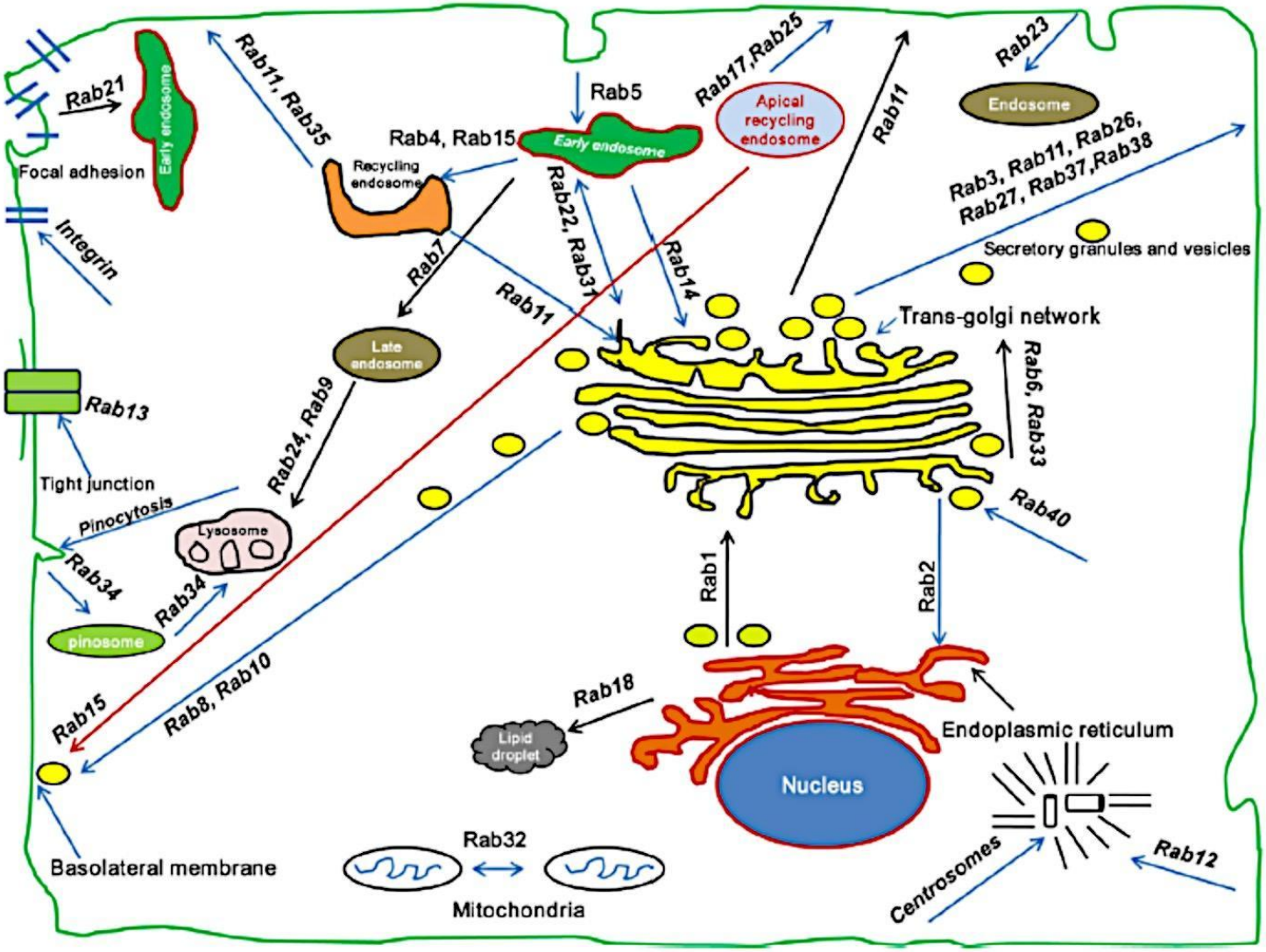
# Rab белки относятся к семейству малых ГТФаз

| TABLE 13–1 Subcellular Locations of Some Rab Proteins | |
|---|---|
| Protein | Organelle |
| Rab1 | ER and Golgi complex |
| Rab2 | *cis* Golgi network |
| Rab3A | Synaptic vesicles, secretory vesicles |
| Rab4/Rab11 | Recycling endosomes |
| Rab5 | Early endosomes, plasma membrane, clathrin-coated vesicles |
| Rab6 | Medial and *trans* Golgi |
| Rab7 | Late endosomes |
| Rab8 | Cilia |
| Rab9 | Late endosomes, *trans* Golgi |

**Rab-ГТФазы** обеспечивают взаимодействие между транспортными везикулами и «docking complexes» (места причаливания) на таргетных/акцепторных мембранах. У млекопитающих есть примерно 70 разных Rab белков, которые обеспечивают специфичность транспортных процессов в секреторной системе разных типов клеток. У каждого Rab белка есть свои GEF и GAP регуляторы.

Molecular Cell Biology, 2014

# Локализация белков семейства Rab на клеточных мембранах (Bhuin and Roy, 2014)

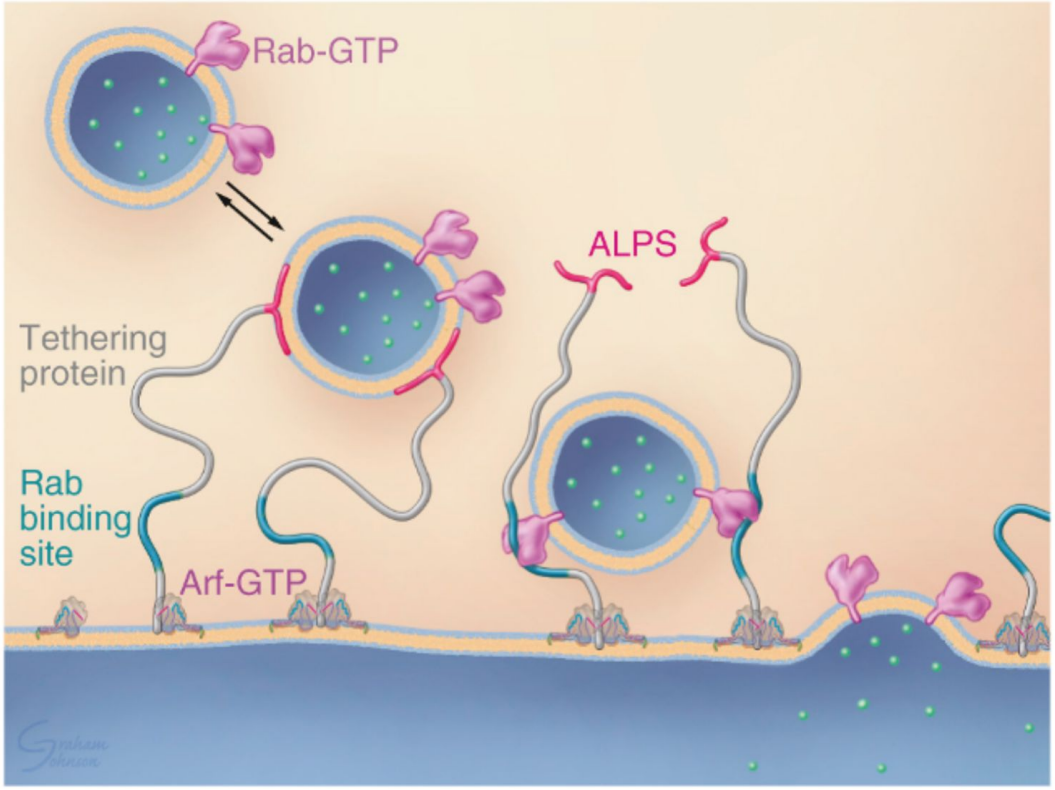


# Эффекторные белки для Rab (Bhuin and Roy, 2014)

**Table 2 – Rab effectors (modified and reviewed by Grosshans et al. [116]).**

| Rab | Effector | Effector function | Effector partners |
|---|---|---|---|
| Rab1 | p115 | Tethering | GM130, Giantin, Golgin-84 |
| Rab3 | Rabphilin-3, Noc2, RIM1, RIM2 | Synaptic vesicle fusion | Rabaptin-5, RIM-BP1 |
| Rab4 | Rabaptin-4, Rabaptin-5, Rabaptin-5β | Protein sorting and recycling | Rabex-5 |
| Rab5 | Rabaptin-5, p150, Rabaptin-5β, Vac1, EEA1 (early endosome antigen 1), Rabenosyn-5, phosphoinositide 3-kinase, Vps (Vps-Vacuole protein sorting) 34,45, CORVET (Class C core vacuole/endosome tethering) | Tethering and fusion | Rabex-5, Rabphilin-3, Syntaxin 13, Syntaxin 16 |
| Rab6 | Rabkinesin6,GAPCenA | Vesicle motility | Microtubules |
| Rab7 | Rabring, HOPS (Homotypic fusion and protein sorting) complex | Vesicle fusion | Not identified (NI) |
| Rab8 | Rab8IP (IP-interacting protein) | Stress-activated protein kinase and transport | NI |
| Rab9 | p40, TIP47 (TIP-Tail interacting protein) | Cargo adaptor, sorting and stimulates fusion | NI |
| Rab11 | Rabphilin11, Rab11BP (BP-Binding protein), FIP2, FIP3, FIP4 (FIFP-Family interacting protein), Sec15, RIP11 (RIP-Rab interacting protein) | Exocytosis, transport and recycling of endosome | Exocyst complex (Sec13) |
| Rab13 | Delta-PDE | Extracts Rab13 from membrane | NI |
| Rab15 | REP15 (REP-Rab escort protein) | Regulate exit from RE | NI |
| Rab27 | Melanophilin, Rabphilin-3, Noc2, Granuphilin (SLP4) | Exocytosis and transport | NI |
| Rab33b | Rab33b-BP | Motility of Rab33 vesicles | NI |
| Rab34 | RILP | Regulate intracellular localization and morphology of lysosomes | NI |
| Sec4p | Sec15p (Sec-Secretory protein) | Acts as tethering complex | Exocyst complex |
| Ypt1p | Uso1p, Sec34/35p | Tethering complex | NI |
| Vps21p/Ypt51 | Vac1p | TGN to Golgi and Late LE to vacuole transport | Vps45p, Pep12p |
| Ypt6p | GARP/VFT (Vps52p) | Tethering complex | NI |
| Ypt7p (Ypt-Yeast protein transcript) | Vamp2 (Vamp-vesicle associated membrane protein), Vamp6, HOPS complex | Tethering and nucleotide exchange | Vamp3p,Hops complex |
| Ypt31/32p | Sec2p, Rcy1p | Vesicle formation and transport | NI |

# Эффекторные белки на примере ”tethering proteins”




Эффекторные белки (гольджины GMAP-120) отходят от таргетной мембраны и захватывают везикулы с помощью ALP домена. Белки Rab на везикуле взаимодействуют с Rab binding sites на эффекторном белке. Это переносит везикулу ближе к поверхности таргетной мембраны и способствует взаимодействию с белками SNARE, которые и осуществляют слияние.

Cell Biology, 2016

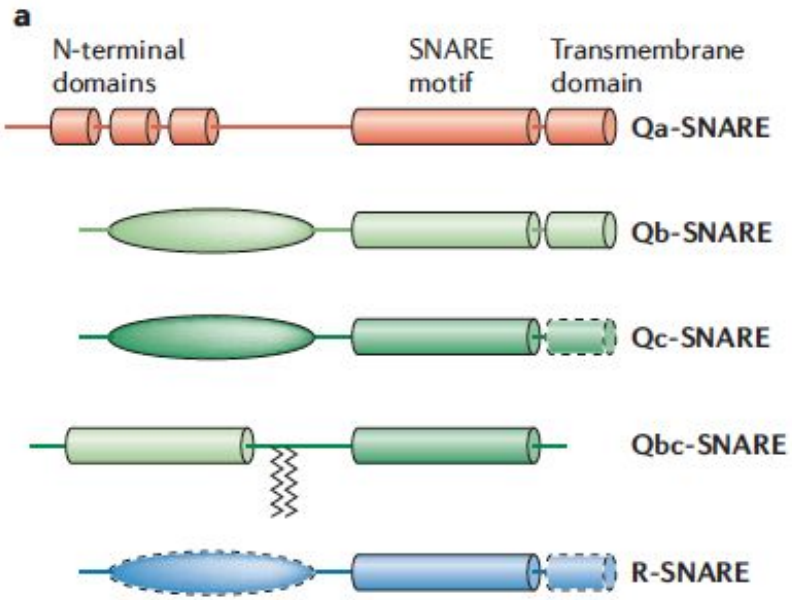
# Непосредственное слияние мембран катализируется белками семейства SNARE

**В функциональном плане** SNARE белки существуют в виде комплементарных наборов – **vSNARE** - (от Vesicles - находятся в везикулах, обычно 1 копия) и **tSNARE** – (от Target - находятся в мембранах органелл, куда идет доставка, обычно 2-3 копии).

Все они имеют характерные спиральные домены; когда vSNARE взаимодействует с tSNARE, спиральные домены взаимодействуют и формируют стабильный четырехспиральный комплекс (stable SNARE complex).

# Белки семейства SNARE - SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor") [NSF -*N*-ethylmaleimide-sensitive factor/*N*-ethylmaleimide sensitive fusion proteins]

- Выделяют два класса белков SNARE - R-SNARE (работают как v-SNARE) и Q-SNARE (работают как t-SNARE).
- Для R-SNARE характерно то, что в формировании корового SNARE комплекса, участвует аргинин (R).
- У Q-SNARE в формирование корового комплекса вносит вклад глутамин (Q).
- Белки Q-SNARE делятся на субклассы Qa, Qb, Qc.
- Функциональный SNARE комплекс сформирован четырьмя спиральными пучками, и для его формирования нужны “one of each of the Qa-, Qb-, Qc- and R-SNAREs”.




SNAREs — engines for membrane fusion

*Reinhard Jahn* and Richard H. Scheller‡*

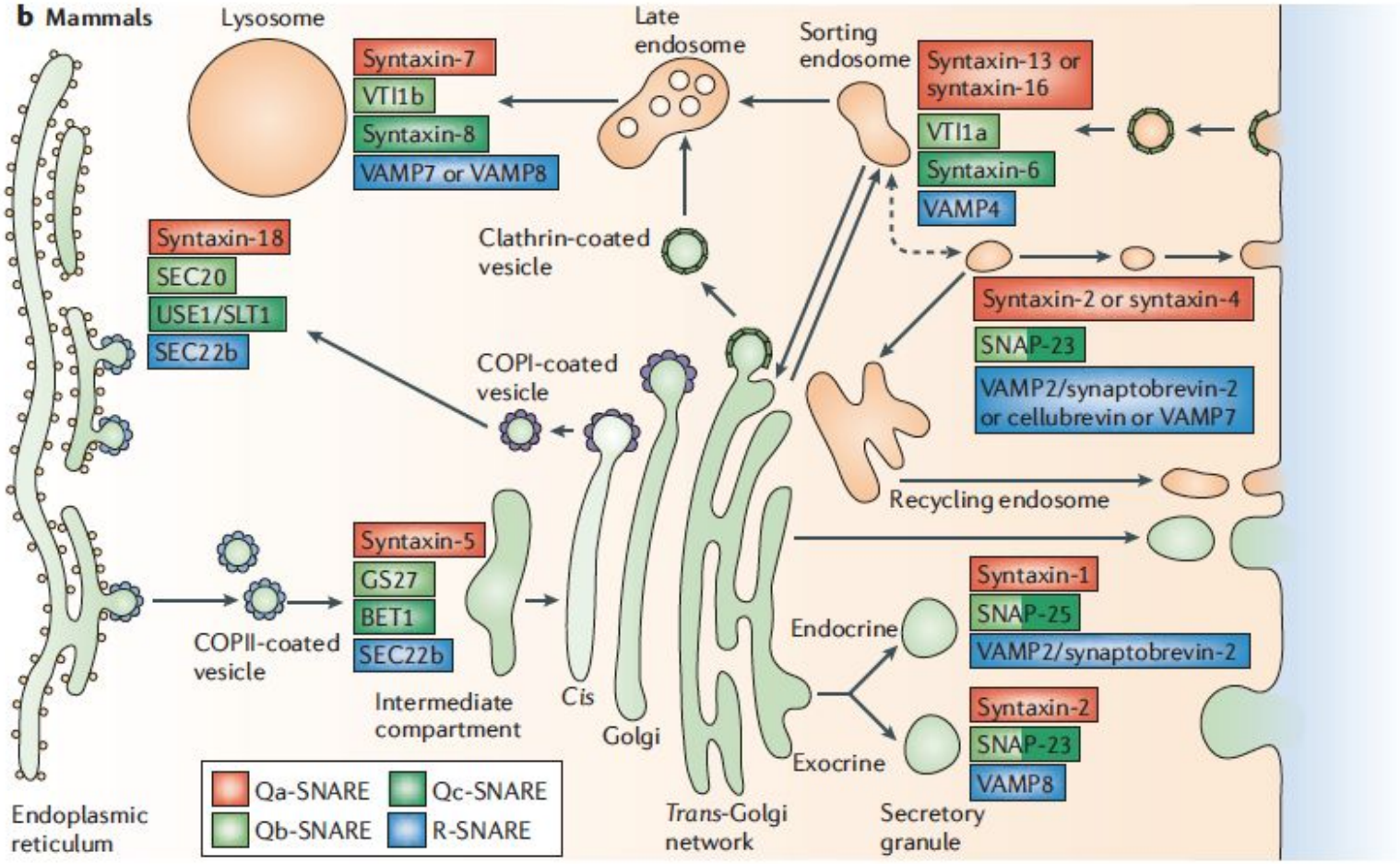
Abstract | Since the discovery of SNARE proteins in the late 1980s, SNAREs have been recognized as key components of protein complexes that drive membrane fusion. Despite considerable sequence divergence among SNARE proteins, their mechanism seems to be conserved and is adaptable for fusion reactions as diverse as those involved in cell growth, membrane repair, cytokinesis and synaptic transmission. A fascinating picture of these robust nanomachines is emerging.

# SNAREs — engines for membrane fusion

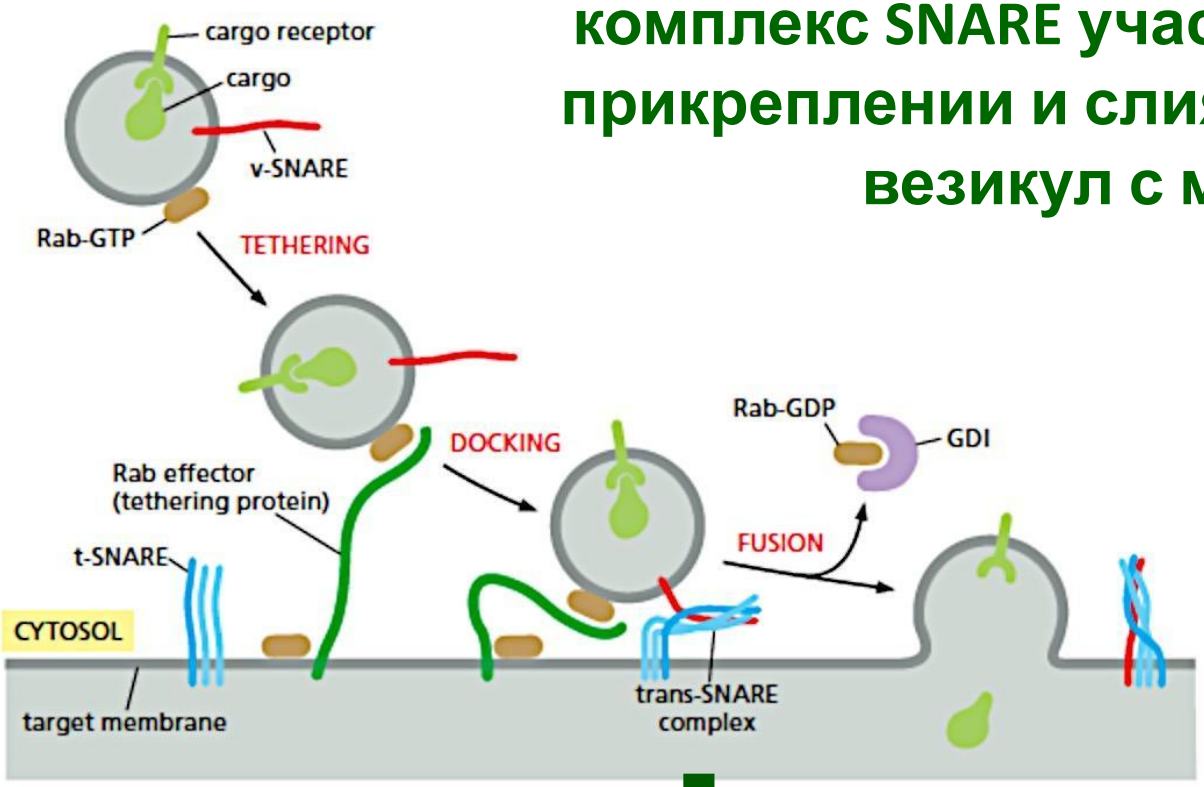
*Reinhard Jahn* and Richard H. Scheller‡*

Abstract | Since the discovery of SNARE proteins in the late 1980s, SNAREs have been recognized as key components of protein complexes that drive membrane fusion. Despite considerable sequence divergence among SNARE proteins, their mechanism seems to be conserved and is adaptable for fusion reactions as diverse as those involved in cell growth, membrane repair, cytokinesis and synaptic transmission. A fascinating picture of these robust nanomachines is emerging.

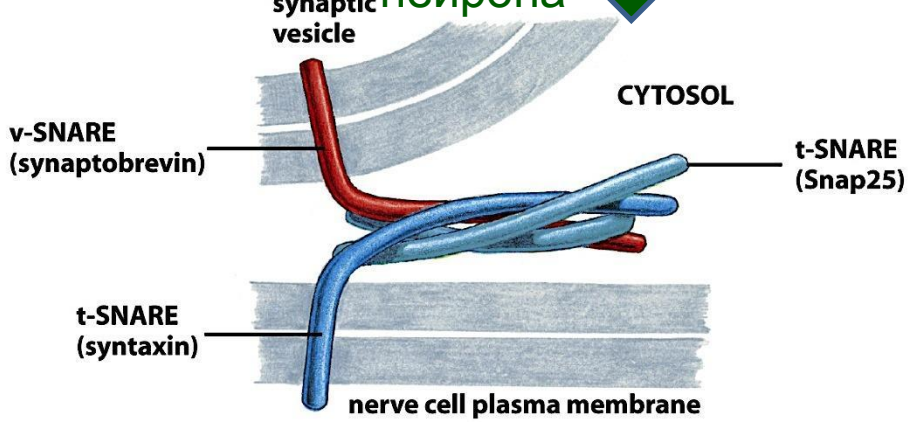
**R-SNARE** работают как v-SNARE и **Q-SNARE** работают как t-SNARE



# Как Rab белки, эффекторные белки и комплекс SNARE участвуют в узнавании, прикреплении и слиянии транспортных везикул с мембраной

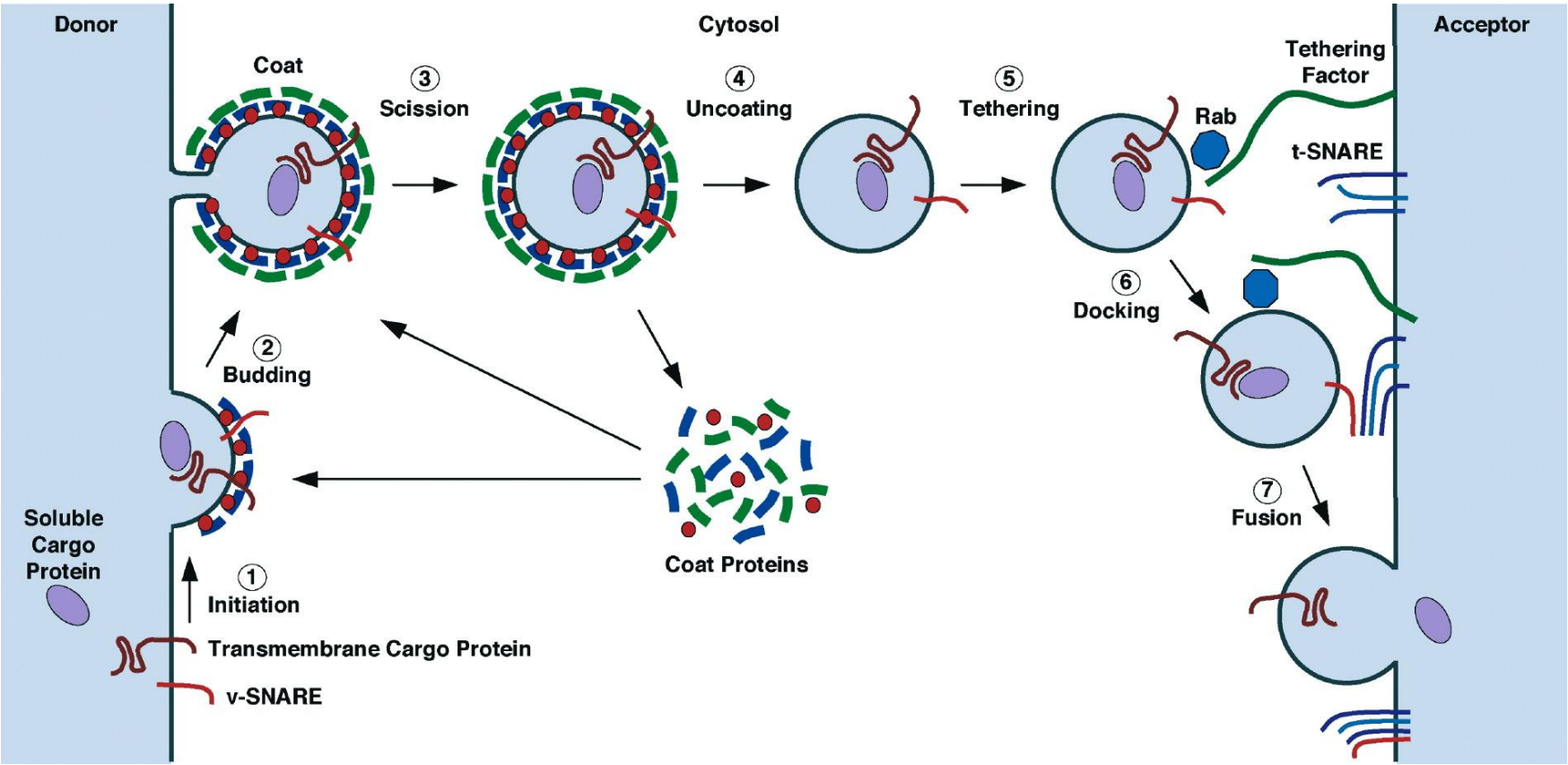



SNARE комплекс при слиянии синаптического пузырька с мембраной нейрона



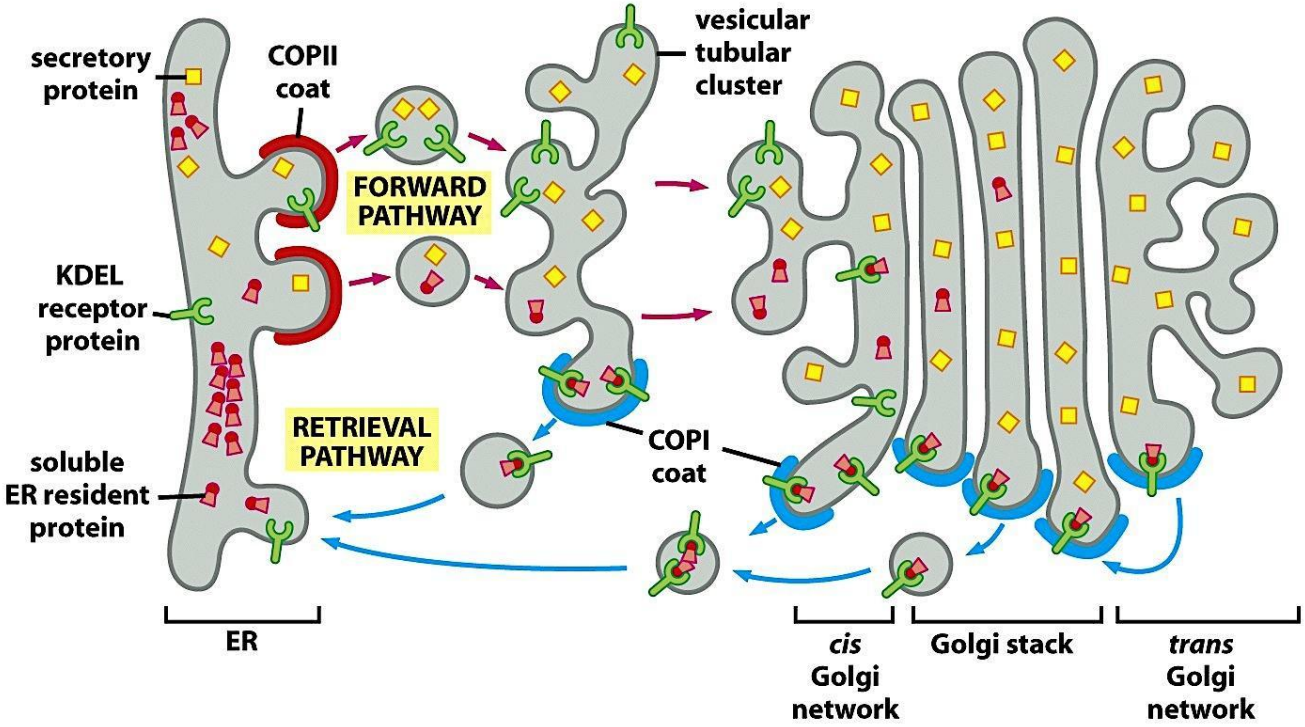

Molecular Cell Biology, 2014

# Mechanisms of vesicle budding and fusion (Bonifacino and Glick, 2004)




После завершения слияния везикул, коровый комплекс SNARE разбирается при участии АТФазы NSF и ее ко-фактора α-SNAP (α-soluble NSF-attachment protein).

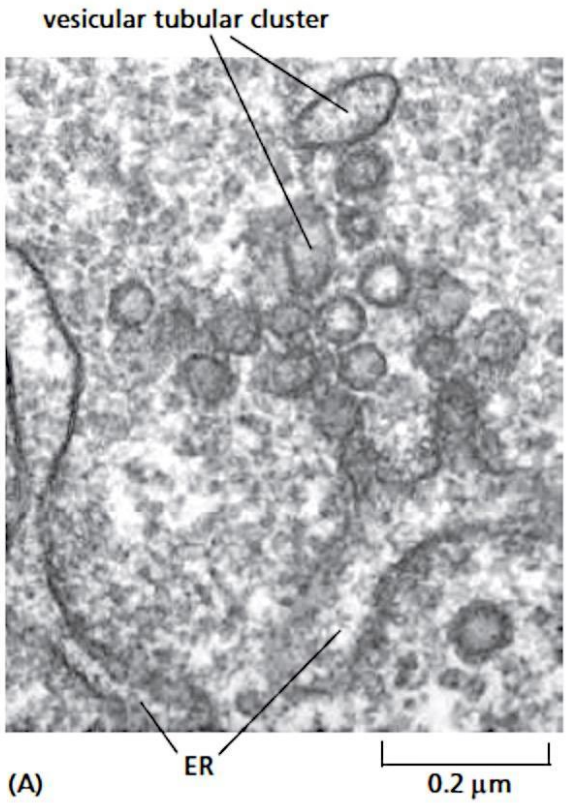
# Антероградный и ретроградный транспорт между ЭПР и аппаратом Гольджи

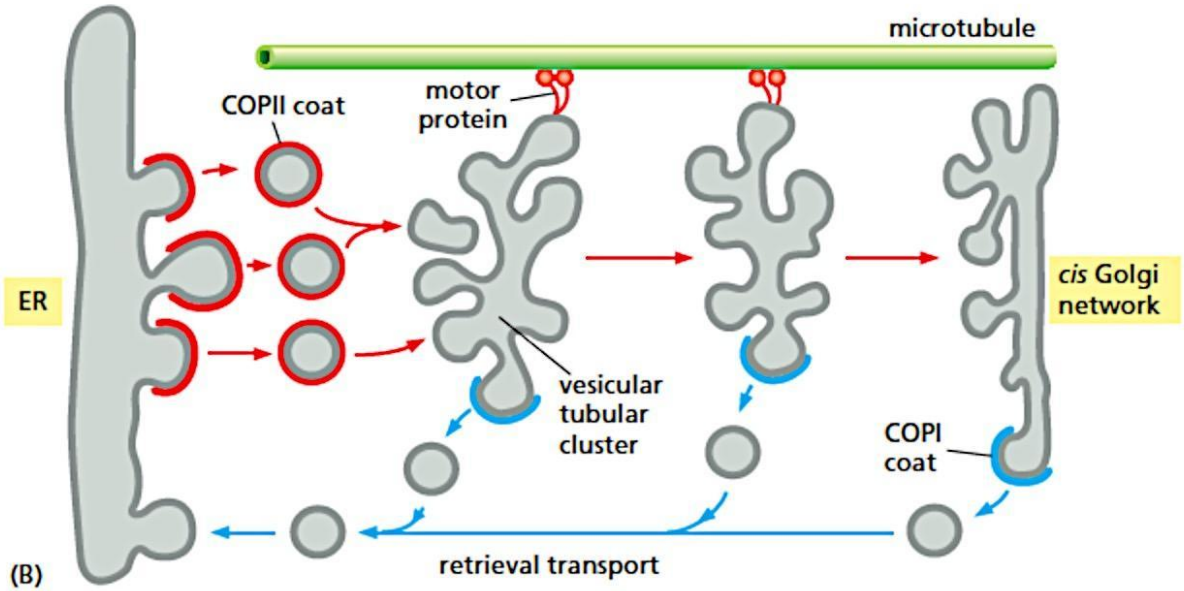



Возвращение резидентных белков люмена ЭПР (имеющих последовательность KDEL) из аппарата Гольджи. Этот процесс идет при помощи рецепторных белков, узнающих и сортирующих белки с KDEL последовательностями, в везикулы с COPI покрытием.

Molecular Cell Biology, 2014

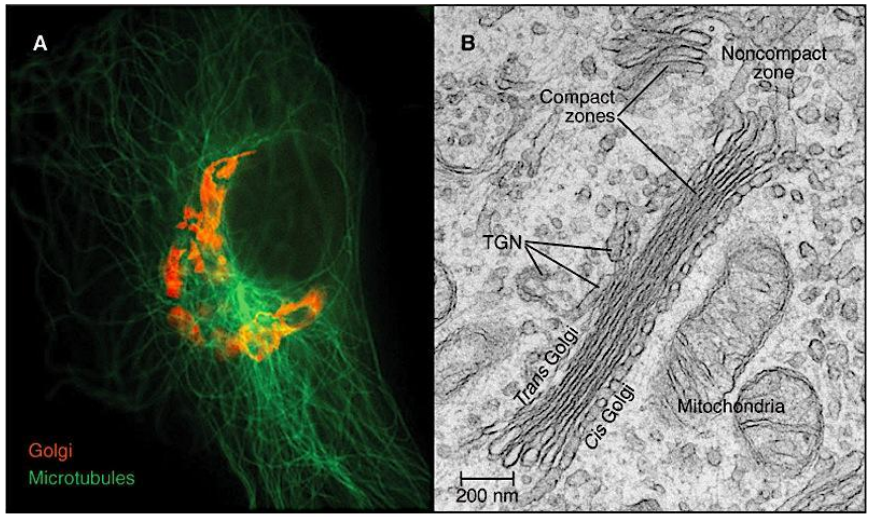
# Везикуло-тубулярный кластер (Vesicular-Tubular Cluster or VTC), формирующийся между сайтом выхода из ЭПР (ER Exit Sites or ERES) и аппаратом Гольджи называется ERGIC (ER Golgi Intermediate Compartment)



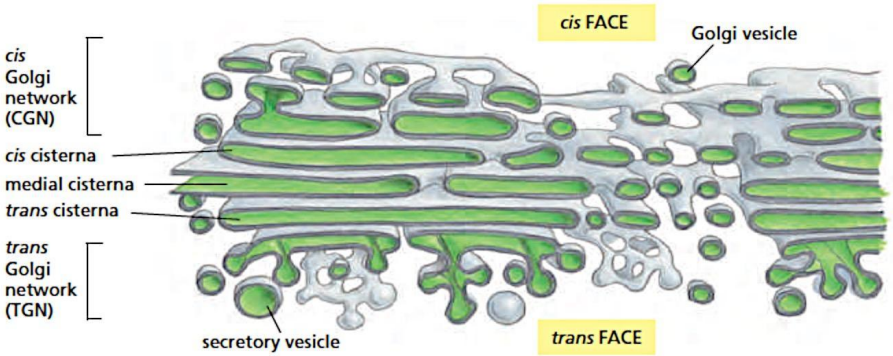




Molecular Cell Biology, 2014

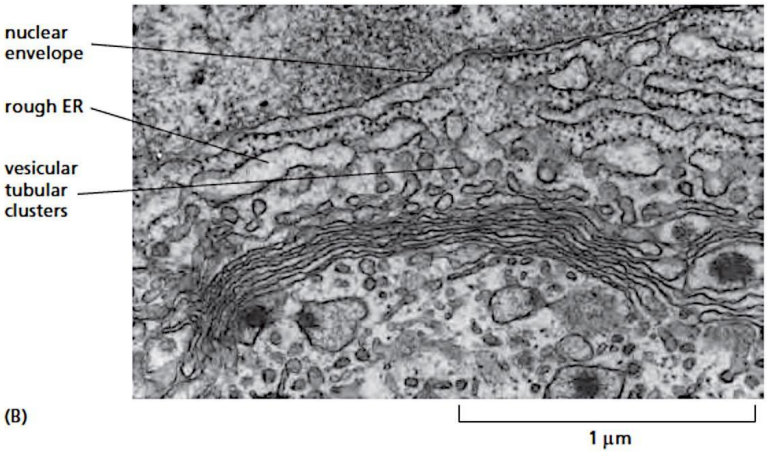
# Аппарат Гольджи состоит из структурно-функциональных единиц – стопок аппарата Гольджи




© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com




(A)

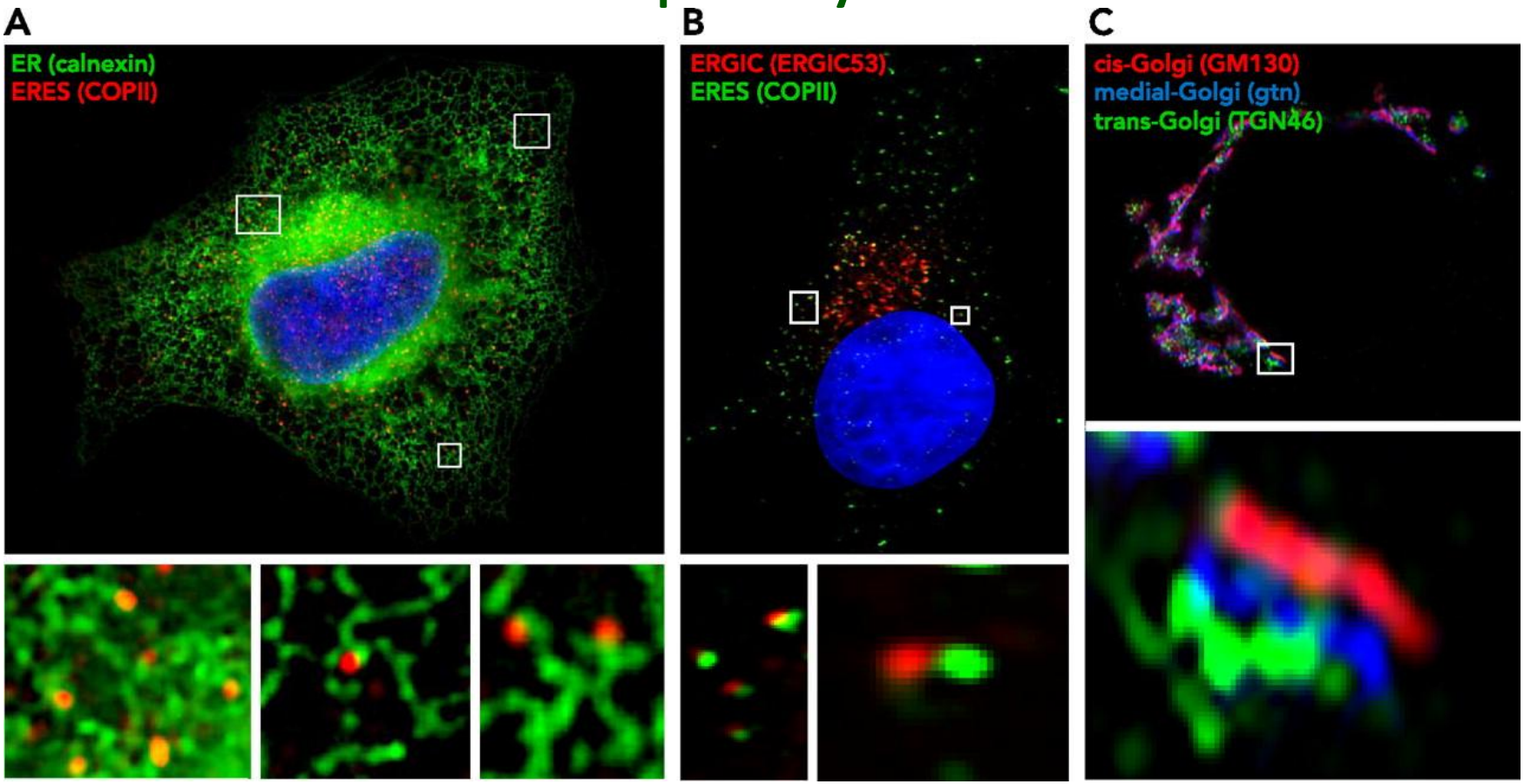



(B)

Стопки (stacks) имеют выраженную цис- и транс- полярность, которая отражает прохождение синтезированных в ЭПР белков. Белки из ЭПР входят в стопки с лицевой (цис) стороны. После прохождения через цистерны в средней части, карго затем покидает аппарат Гольджи с транс-стороны.

Molecular Cell Biology, 2014

# Compartments of the secretory pathway: immunofluorescence images of HeLa cells stained with markers of the secretory pathway



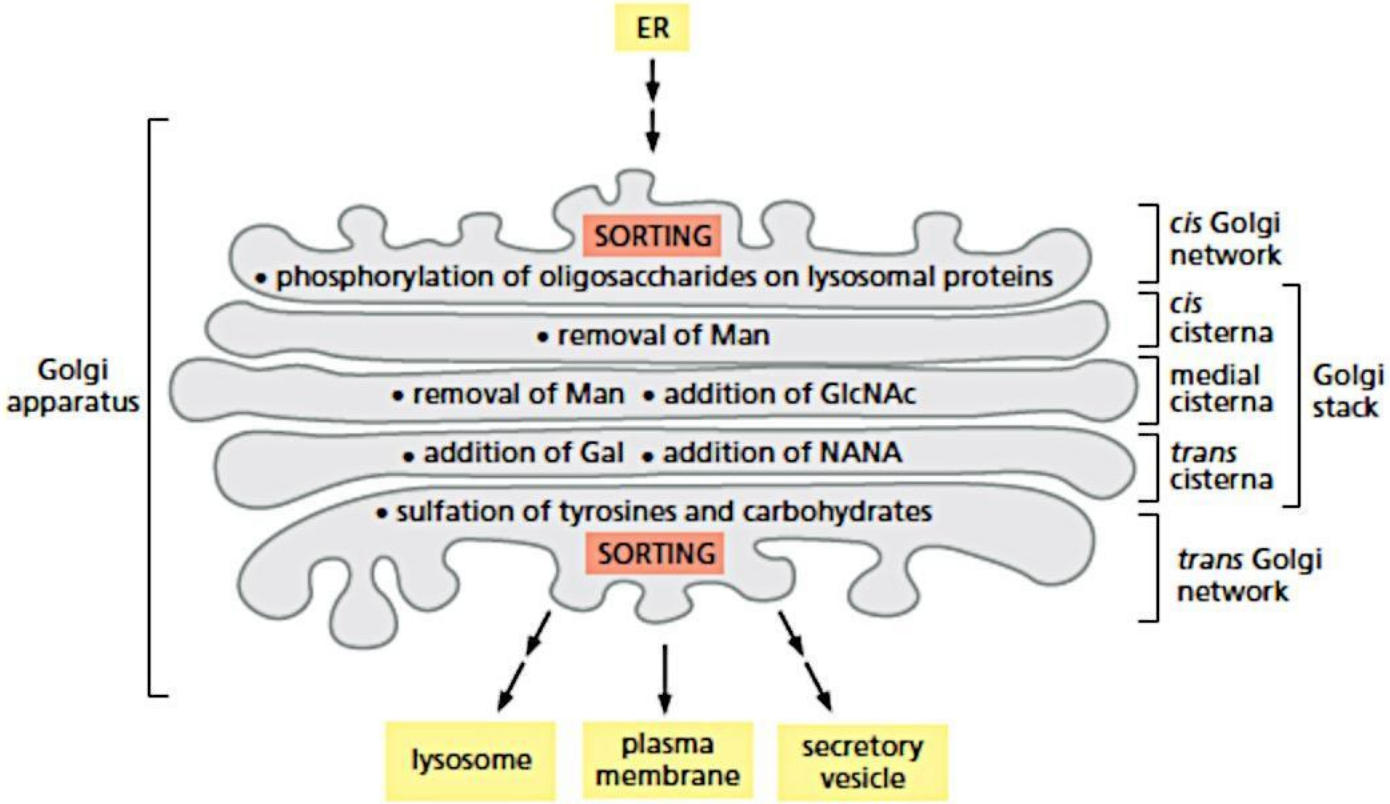

Tomasz Szul, and Elizabeth Sztul Physiology 2011;26:348-364

©2011 by American Physiological Society

# Функции комплекса Гольджи

- 1) В комплексе Гольджи продолжается дальнейшая модификация/процессинг гликопротеидов (вторичное гликозилирование); соединение синтезированных олигосахаридов с белками, поступившими из ЭПР (образование протеогликанов).
- 2) Комплекс Гольджи функционирует как станция по сортировке белков для их последующей доставки по определенному адресу. Это включает транспорт к плазматической мембране, секрецию, сортинг в эндосомы/лизосомы, и обратно в ЭПР.
- 3) Фосфорилирование олигосахаридов в цис-части комплекса Гольджи регулирует адресование белков в эндсомно-лизосомный компартмент.
- 4) Биосинтез и метаболизм липидов. В комплексе Гольджи синтезируются сфингомиелин и гликосфинголипиды.

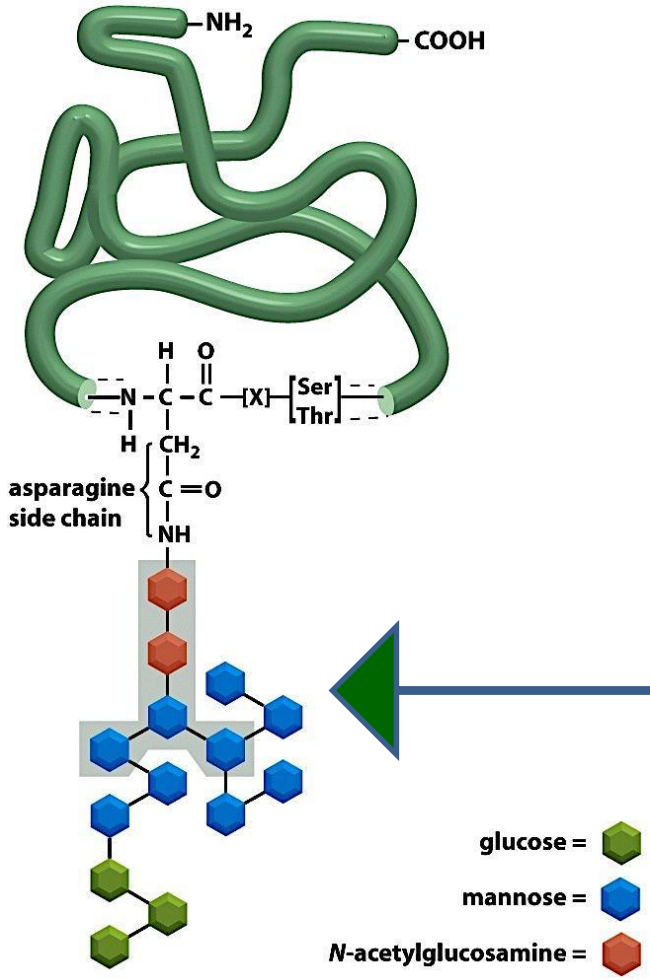
**Функциональная компартментализация комплекса Гольджи** подразумевает то, что функции, связанные с модификацией, сортировкой и адресованием карго, выполняются в определенных отсеках комплекса Гольджи




Molecular Cell Biology, 2014

# ФУНКЦИИ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ:
# 1. ПРОЦЕССИНГ ГЛИКОПРОТЕИДОВ (ВТОРИЧНОЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ) И СИНТЕЗ ПРОТЕОГЛИКАНОВ

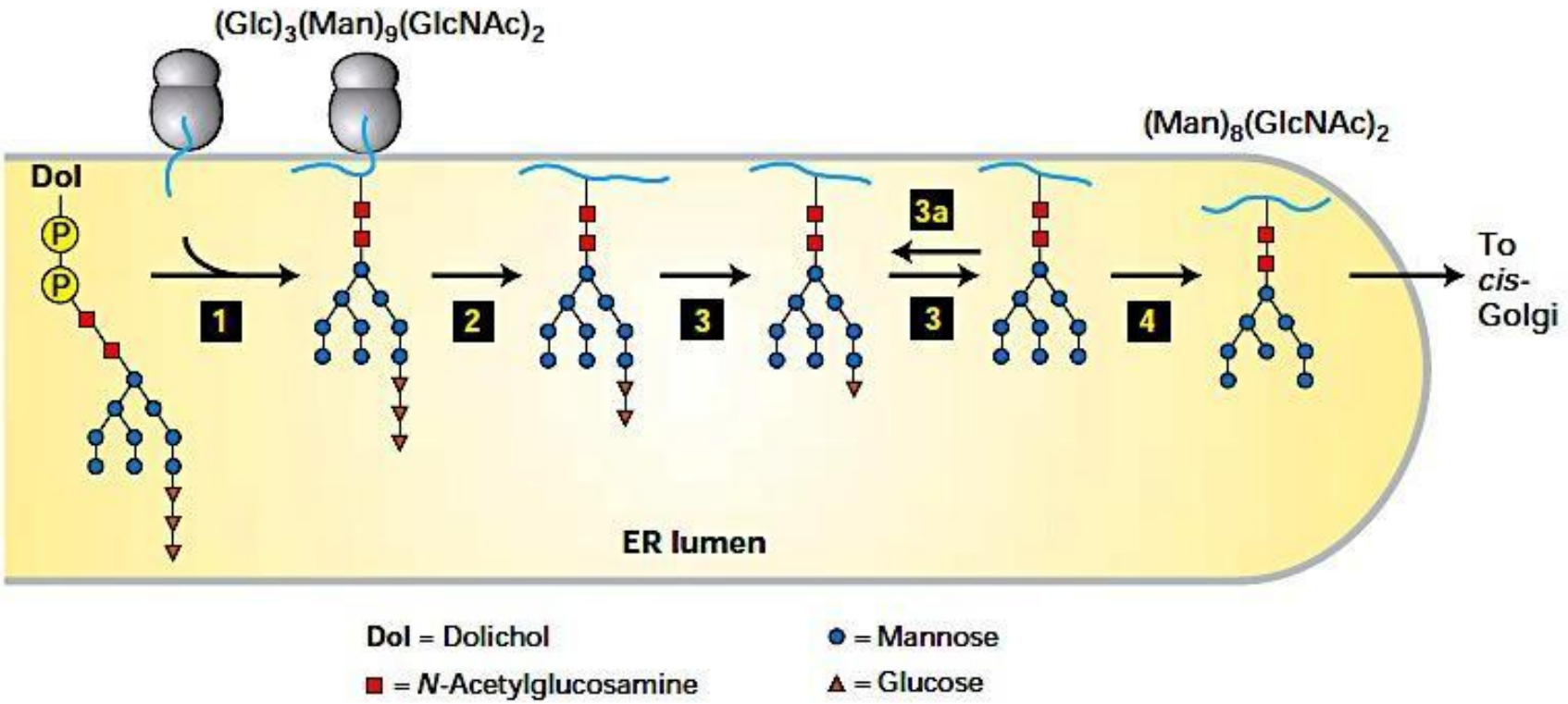
# В комплексе Гольджи продолжается дальнейшая модификация/процессинг гликопротеидов (вторичное гликозилирование)




Олигосахаридный предшественник добавленный к белку в ходе N-гликозилирования в ЭПР (пять сахаров отмеченные серым цветом образуют «коровый участок» олигосахарида).

Molecular Cell Biology, 2014

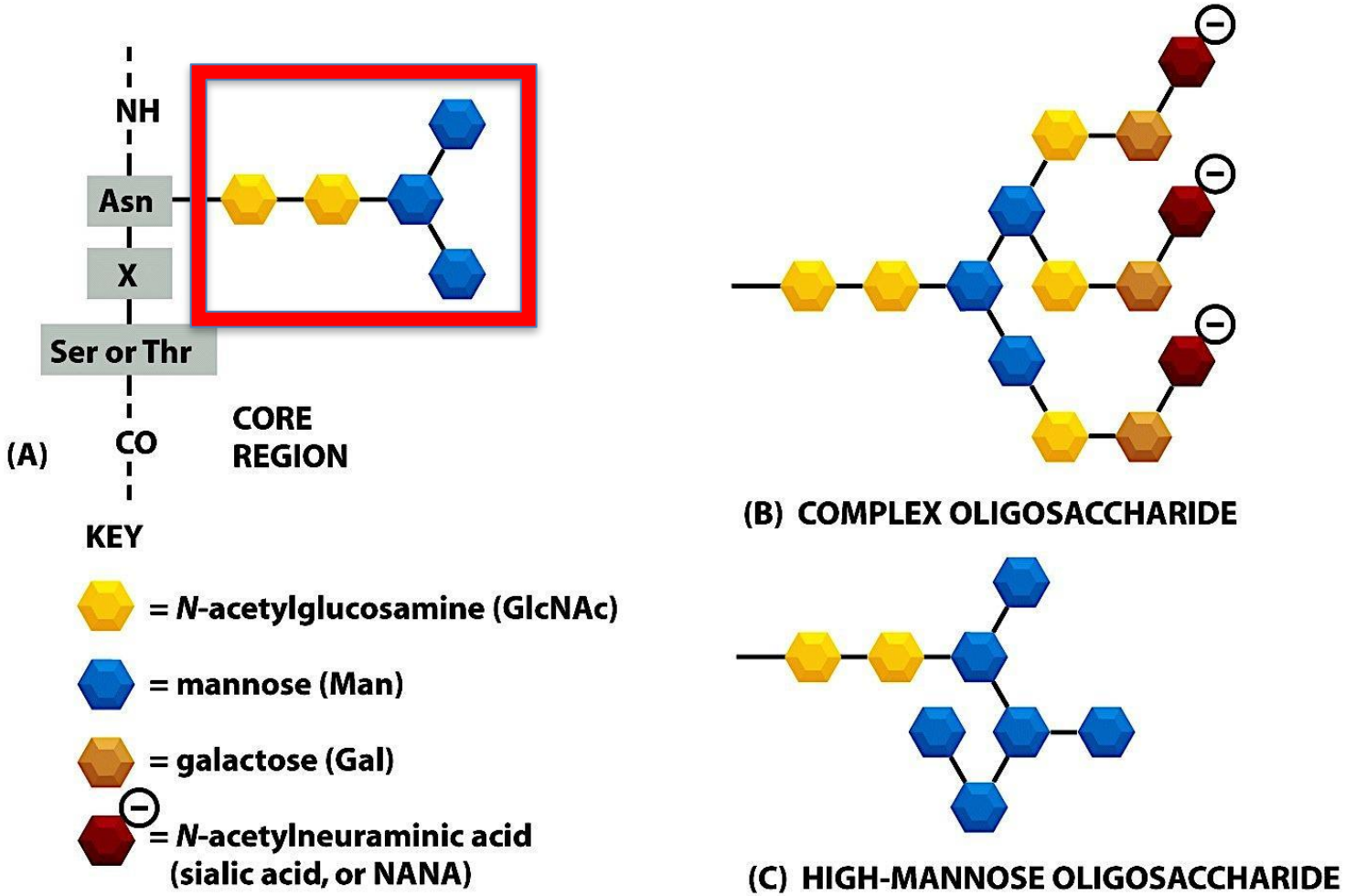
# Первичный тримминг олигосахаридных остатков в ЭПР




Присоединение сахарных остатков осуществляют ферменты гликозил-трансферазы, а отщепление – гликозидазы/гликозил гидролазы (глюкозидазы, маннозидазы).

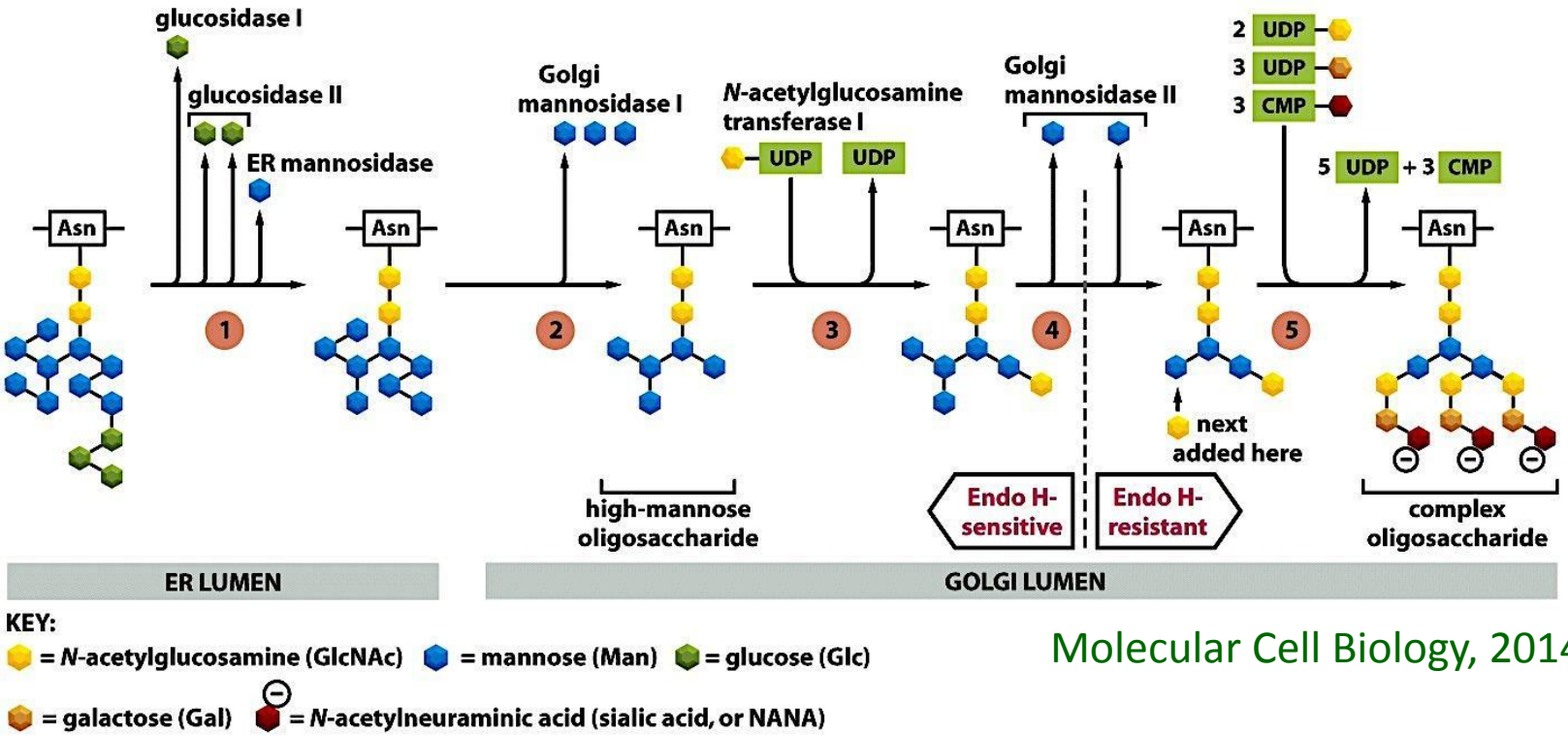
Molecular Cell Biology, 2003 (ed. Lodish H.)

# Два основных класса *N*-связанных олигосахаридов, обнаруженных среди зрелых гликопротеидов млекопитающих




Molecular Cell Biology, 2014

# Образование высокоманнозных и сложных *N*-связанных олигосахаридов начинается в среднем участке, и завершается в транс-сети комплекса Гольджи

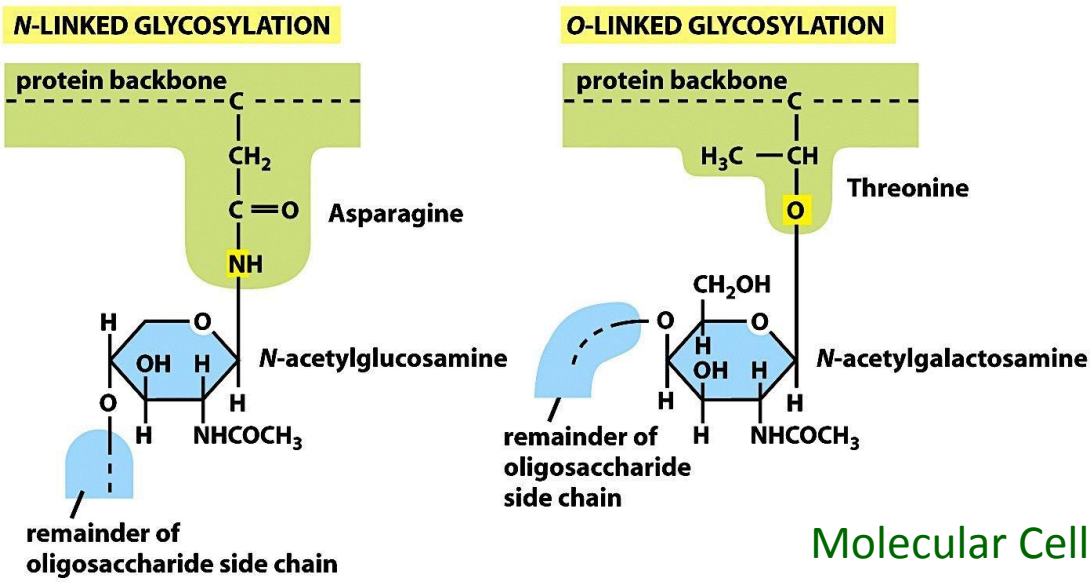



Molecular Cell Biology, 2014

Три типа гликозилтрансфераз добавляют работают последовательно, используя в качестве субстрата сахарные остатки (GlcNAC, Gal, NANA), которые активированы путем присоединения к соответствующим нуклеотидам.

**Цели гликозилирования**: правильное укладывание белков препятствуетих агрегации; защитные свойства белков; узнавание белков; регуляторные функции белков.

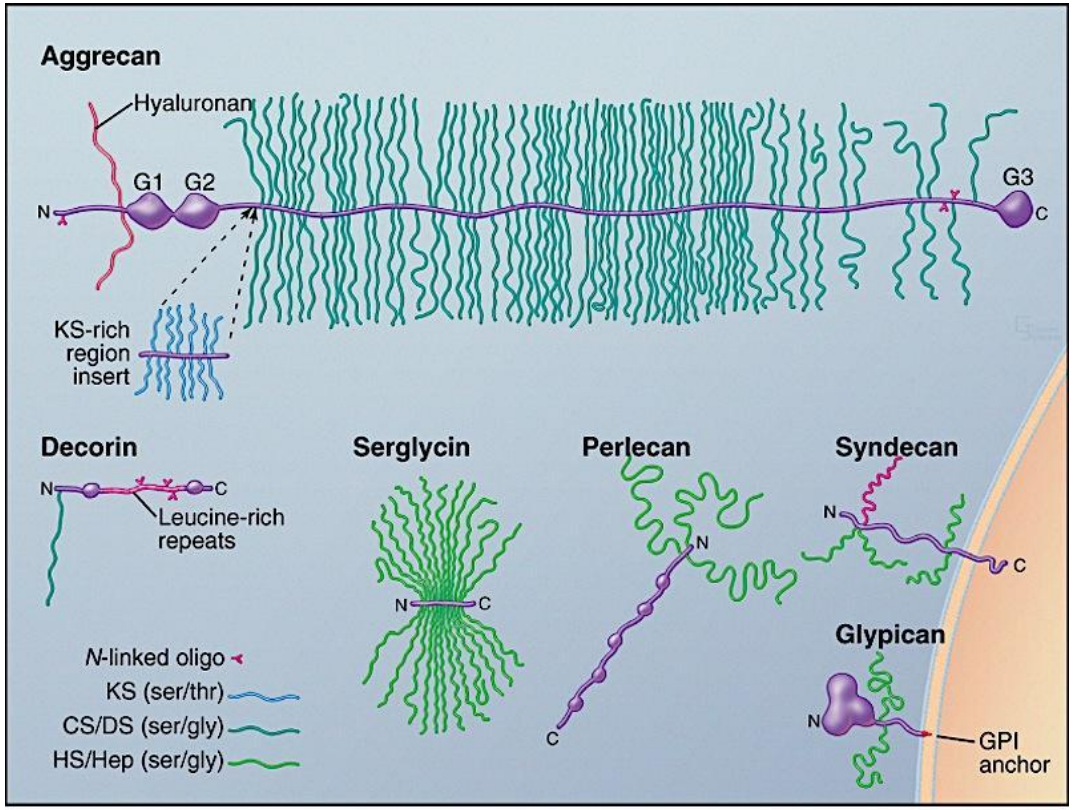
# *N*- и *O*- гликозилирование




Molecular Cell Biology, 2014

О-связанные олигосахариды образуются путем присоединения углеводных цепочек к гидроксильной группе (О) на аминокислотах серине и треонине. Этот процесс называется ***О*-связанным гликозилированием** и начинается в ЭПР с добавления коротких олигосахаридов к серину и треонину (если этих аминокислот много, то и олигосахаридных хвостиков будет много). Затем в комплексе Гольджи гликозил-трансферазы добавляют множество копий одного и того же дисахарида к полисахаридной цепи. Коровый белок, на который присоединяются такие сахарные остатки, является основой **протеогликанов. Протеогликаны – важный компонент внеклеточного матрикса**

# Разные типы молекул протеогликанов



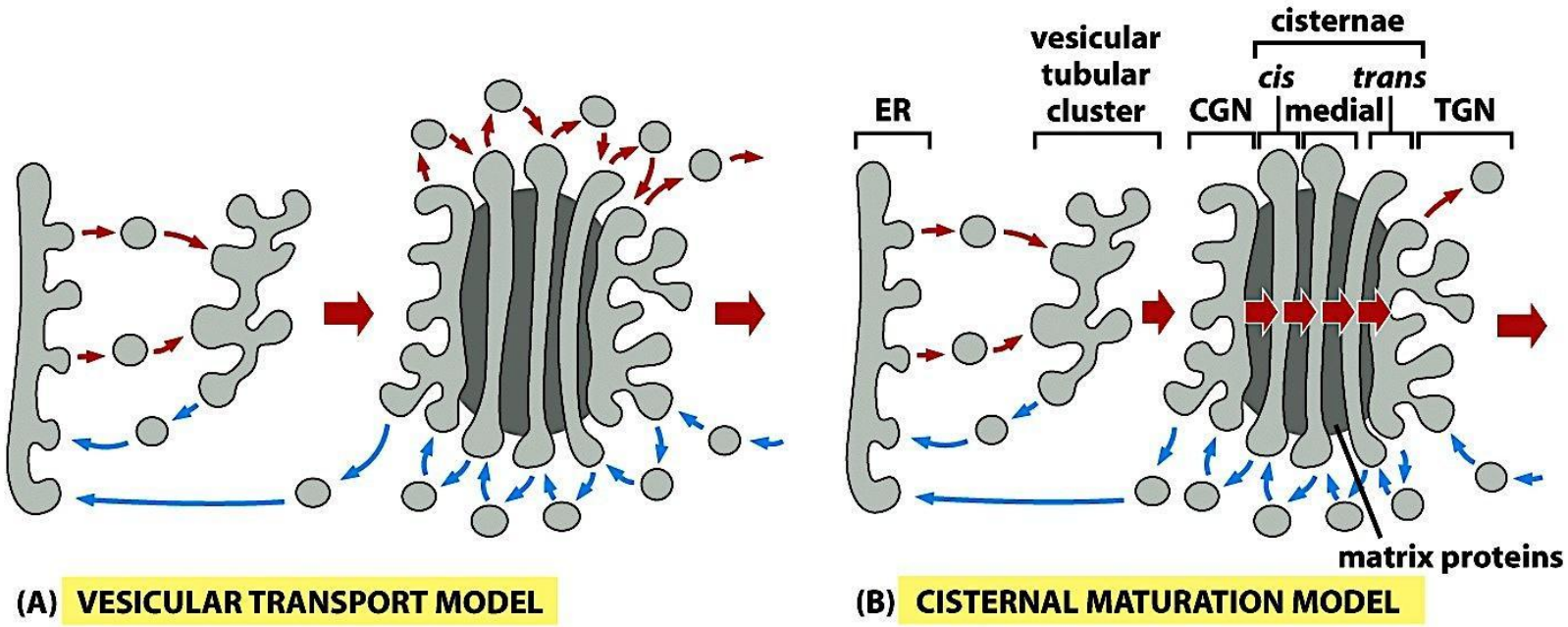

© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

Коровые белки показаны розовым или лиловым цветом, а глюкозамингликаны показаны разными цветами. Белки названы в соответствии с их характеристиками: аггрекан агрегирует вдоль гиалуронана; декорин декорирует коллагеновые фибриллы; перлекан похож на нитку жемчуга; серглицин имеет 24 ser-gly повтора; синдекан прикрепляет клетки к матриксу; глипикан имеет GPI якорь. CS - chondroitin sulfate; DS - dermatan sulfate; Hep - heparin; HS - heparan sulfate; KS - keratan sulfate

# Биосинтез и метаболизм липидов в комплексе Гольджи

- Одной из функций комплекса Гольджи является синтез сфинголипидов.
- Основой молекулы сфинголипидов является церамид.
- Цермид синтезируется в ЭПР и доставляется в комплекс Гольджи, где затем модифицируется до глюкозилцерамида и сфингомиелина.
- Сфинголипиды (сфингомиелин) и гликосфинголипиды (глюкозилцерамид и галактозилцерамид), играют важную роль в сортировке мембран в комплексе Гольджи и в пост-Гольджи компартментах.

# Модели организации комплекса Гольджи и транспорта белков между компартментами/цистернами




**Модель везикулярного транспорта**. Комплекс Гольджи является стационарной структурой, в которой ферменты остаются на месте, а транзитные молекулы перемещаются по цистернам в составе везикул.

**Модель созревания цистерн**. Комплекс Гольджи является динамичной структурой, в которой формируются, созревают и распадаются до везикул сами цистерны.

Molecular Cell Biology, 2014