

Вакуолярная система
внутриклеточного
транспорта.

Вакуолярная система.

Вакуолярная система - состоит из одномембранных разнообразных по строению и функциям органелл:

- эндоплазматический ретикулум;
- аппарат Гольджи;
- лизосомы;
- эндосомы;
- секреторные вакуоли.

Функции вакуолярной системы.

- общая функция синтеза;
- перестройка (модификация);
- сортировка и выведение (экспорта) из клетки биополимеров (главным образом белков-гликопротеидов);
- функция синтеза мембран этой системы и плазматической мембраны.

Синтез белков.

Синтез основной массы клеточных белков протекает на полисомах в цитозоле. Особенностью белкового синтеза в цитозоле является то, что в зависимости от типа иРНК синтезируются различные белки, направляющиеся строго к своим внутриклеточным компонентам. Это связано с тем, что разные по назначению белки имеют определенные “сигнальные” последовательности аминокислот, как бы адреса, по которым разные белки распределяются в клетке. Так ядерные белки имеют NLS-сигнальную последовательность, белки митохондрий имеют свою, так же как белки цитозоля, цитоскелета, пластид и пероксисом - свои сигнальные последовательности. Характерным является то, что все типы перечисленных белков начинают и заканчивают синтез в цитозоле, и затем **посттрансляционно** с помощью внутриклеточных белковых комплексов переносятся “по адресам”.

Синтез белков.

В отличие от выше перечисленных типов белков, белки экспортного назначения и белки мембран синтезируются на рибосомах, расположенных на мембранах эндоплазматического ретикулума и попадают внутрь вакуолей, по мере синтеза полипептидной цепи, **котрансляционно**. Затем эти белки уже внутри вакуолей, или в составе мембран вакуолей транспортируются внутри клетки.

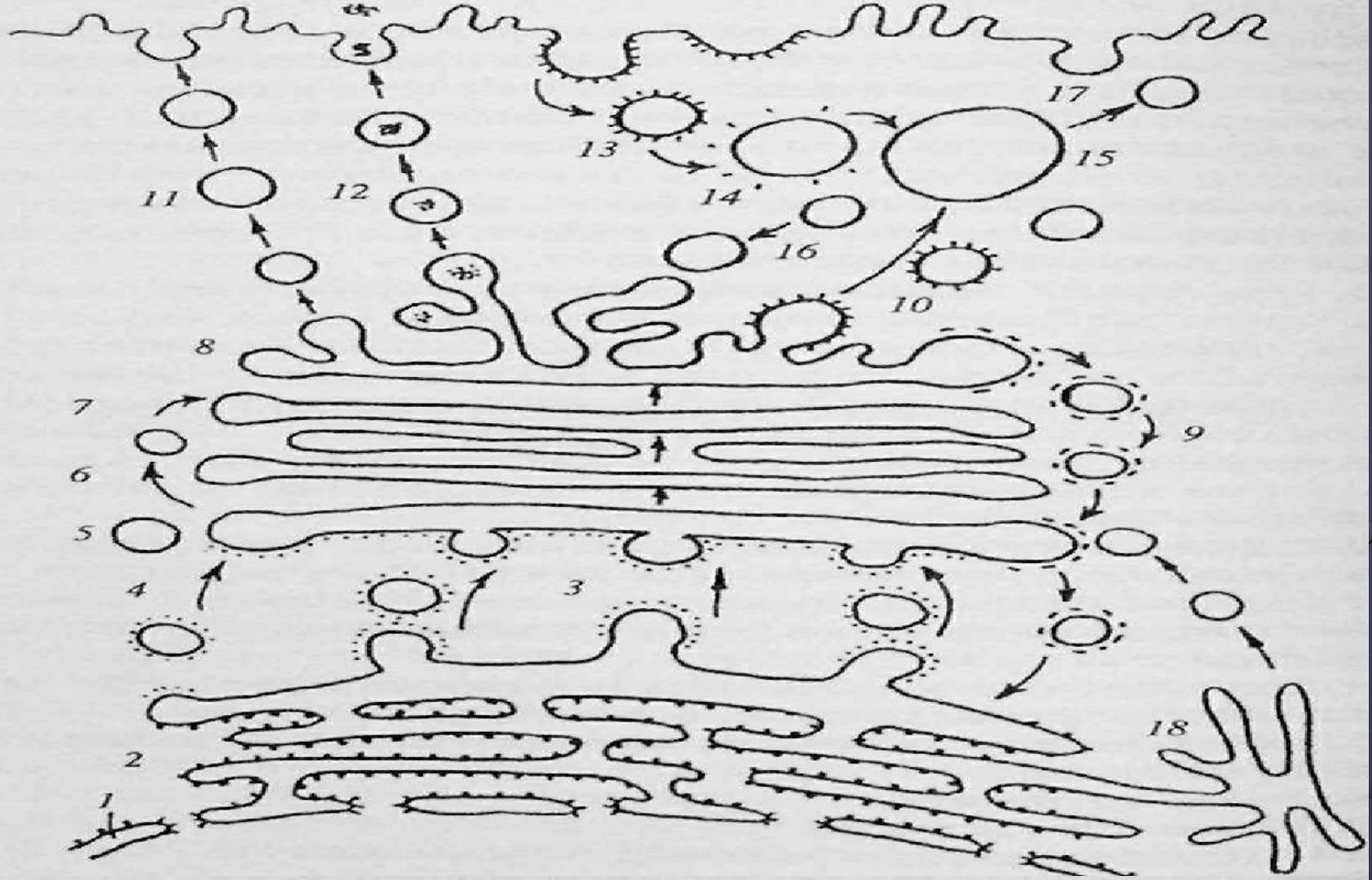


Рис. 163. Общая схема вакуолярной системы клетки

1 – ядерная оболочка; 2 – гранулярный эндоплазматический ретикулум (ЭПР); 3 – переходная зона (ЭПР–АГ-комплекс); 4 – перенос от ЭПР к аппарату Гольджи (АГ); 5 – проксимальные участки (*цис*) АГ; 6 – средняя часть (*мед*) АГ; 7 – дистальная (*транс*) часть АГ; 8 – *транс*-сеть АГ (ТGN); 9 – возвратный путь вакуолей АГ; 10 – отделение первичных лизосом; 11 – постоянная экскреция (секреция); 12 – сигнальная секреция; 13 – эндоцитоз; 14 – эндосома; 15 – вторичная лизосома; 16 – возврат лизосомных мембран в ТGN; 17 – возврат рецепторов в плазматическую мембрану; 18 – гладкий эндоплазматический ретикулум

Свойства вакуолярной системы.

Для всей вакуолярной системы характерны

- кооперативность ее функционирования;
- взаимосвязь и последовательность этапов образования, перестройки, транспорта и экспорта синтезированных белков.

Гранулярный ЭПР.

The background of the slide is a dark blue gradient. Overlaid on this is a 3D perspective view of a grid. The grid consists of numerous small, dark blue spheres (nodes) arranged in a regular pattern. These nodes are connected by thin, light blue lines, forming a mesh that recedes into the distance, creating a sense of depth and a three-dimensional lattice structure.

История открытия ЭПР.

- Открытие этой внутриклеточной мембранной структуры произошло на заре электронной микроскопии. В 1945 г. К. Портер с сотрудниками изучал фибробласты цыплят в электронном микроскопе. В это время еще не была разработана техника ультратонких срезов, поэтому авторы просматривали клетки на просвет, целиком. В световом микроскопе в фибробластах после фиксации и окраски видно, что периферия клеток (эктоплазма) окрашивается слабо, в то время как центральная часть клеток (эндоплазма) хорошо воспринимает красители. *Портер увидел в электронном микроскопе, что зона эндоплазмы заполнена большим числом мелких вакуолей и каналов, соединяющихся друг с другом и образующих что-то наподобие рыхлой сети (ретикулум).* Было видно, что стопки этих вакуолей и канальцев ограничены тонкими мембранами. Так был обнаружен **эндоплазматический ретикулум, или эндоплазматическая сеть.**

История открытия ЭПР.

- Позднее, в 50-х гг., при использовании метода ультратонких срезов удалось выяснить структуру этого образования и обнаружить его неоднородность. Самым же главным оказалось, что эндоплазматический ретикулум (ЭР) встречается практически у всех эукариот.
- Подобный электронно-микроскопический анализ позволил выделить два типа ЭР: *гранулярный (шероховатый) и гладкий.*

ЭПР.

- На ультратонких срезах гранулярный ЭПР представлен замкнутыми мембранами, которые образуют на сечениях вытянутые мешки, цистерны или же имеют вид узких каналов. Ширина полостей цистерн может очень варьировать в зависимости от функциональной активности клетки. Наименьшая ширина их может составлять около 20 нм, в расширенном виде они достигают диаметра в несколько мкм. Отличительной чертой этих мембран является то, что они со стороны гиалоплазмы покрыты мелкими (около 20 нм) темными, почти округлыми частицами, **гранулами**, которые и есть не что другое как **рибосомы**.

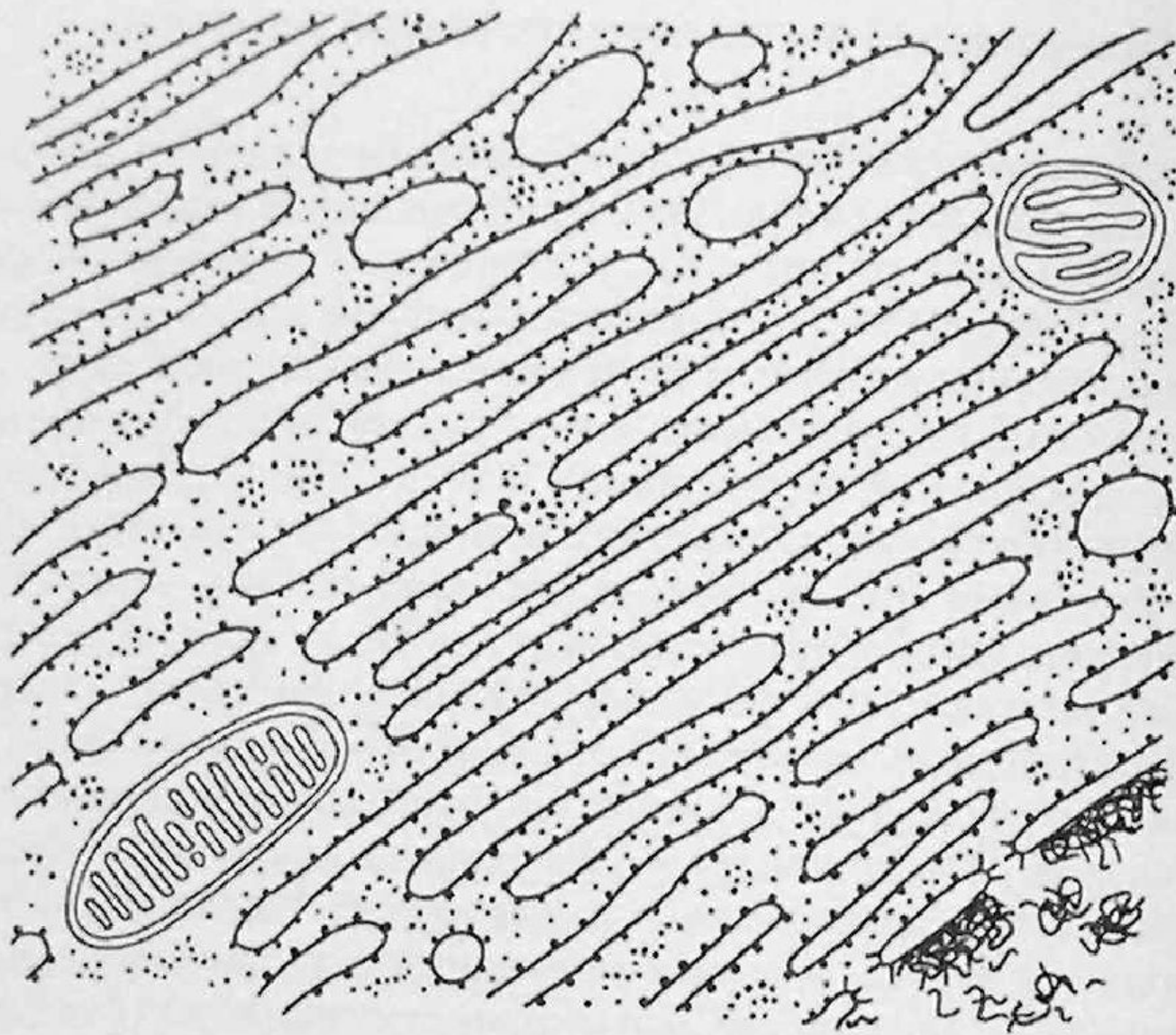


Рис. 164. Гранулярный эндоплазматический ретикулум (эргастоплазма) в клетке поджелудочной железы (ультратонкий срез)

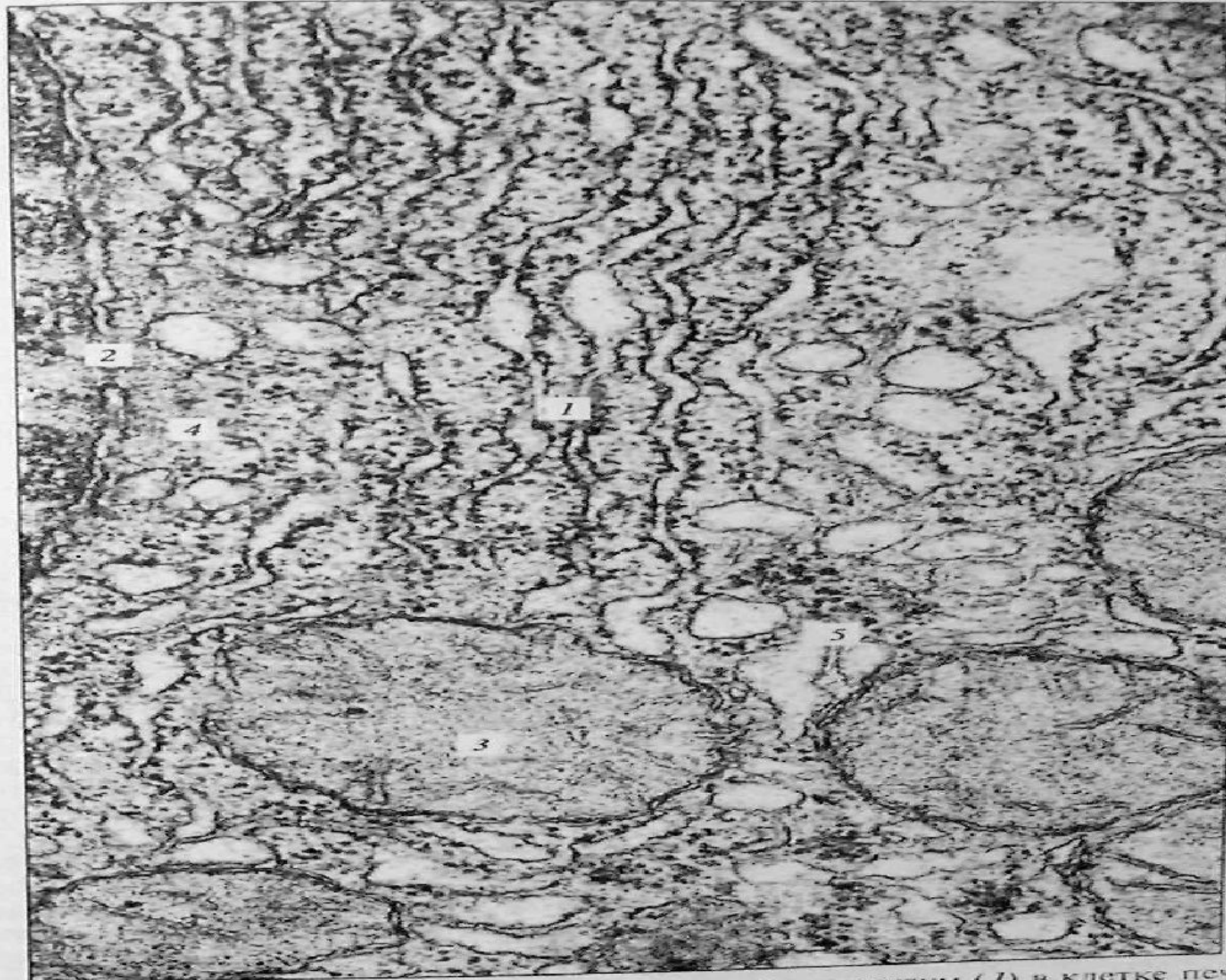


Рис. 165. Гранулярный эндоплазматический ретикулум (1) в клетке печени
мышы
2 — ядерная оболочка; 3 — митохондрия; 4 — рибосомы цитозоля; 5 — зона вакуоле
гладкого ретикулума

Гранулярный ЭПР.

- Гранулярный (или шероховатый, в отличие от гладкого) ЭПР может в клетках быть представлен или в виде редких разрозненных мембран или же в виде локальных скоплений таких мембран (эргастоплазма).
Эргастоплазма характерна для клеток, активно синтезирующих секреторные белки.

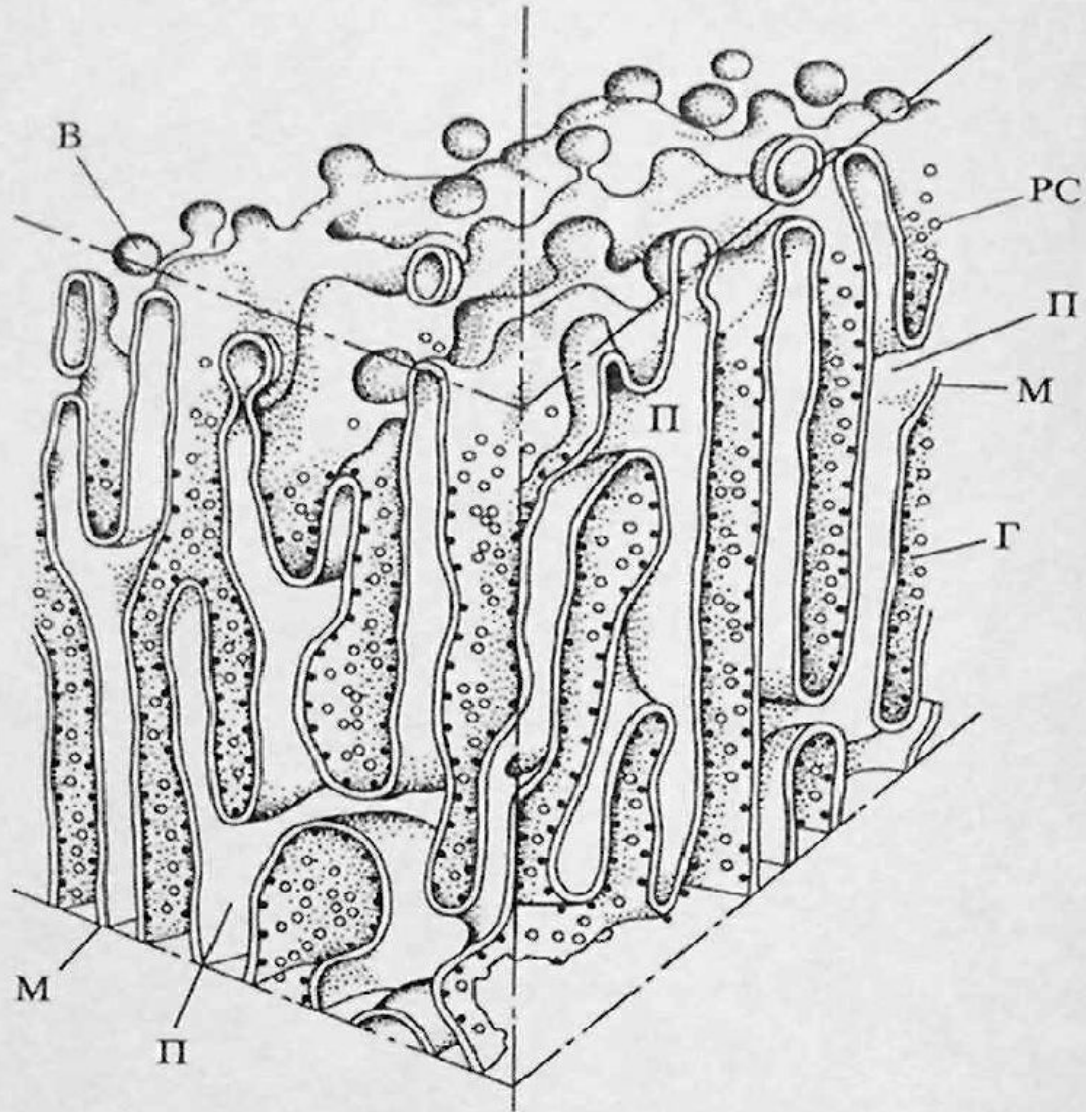


Рис. 166. Схема строения каналов и полостей гранулярного эндоплазматического ретикулума

РС – рибосомы, прикрепленные к мембранам со стороны гиалоплазмы (Г); П – полости плоских цистерн и каналов, отделенных мембранами (М) от гиалоплазмы; В – вакуоли с синтезированными продуктами, отщепляющиеся от цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. В зонах отщепления вакуолей исчезают рибосомы на мембранах

Гранулярный ЭПР.

- Действительно, большое число клеток многоклеточных организмов, богатых гранулярным ЭПР, синтезирует и выводит огромное количество белков.
- Другими словами, у многоклеточных организмов клетки, богатые эргастоплазмой, синтезируют выводимые из этих клеток белки, необходимые или для работы других клеток, или для выполнения общеорганизменных функций (пищеварительные ферменты, белки плазмы крови, гормоны и др.).
- У одноклеточных также можно наблюдать гранулярный ЭПР, который, по-видимому, участвует в синтезе выводимых экспортируемых белков. Среди таких белков могут быть не только ферменты внеклеточного пищеварения.

Гранулярный ЭПР.

- Следовательно, роль гранулярного ЭПР заключается не просто в участии в синтезе белков на рибосомах его мембран, но и в процессе сегрегации, обособления этих синтезированных белков, в их изоляции от основных функционирующих белков клетки. Эта функциональная особенность гранулярного ЭПР очень важна, так как она связана с целым рядом процессов, приводящих к выделению таких белков с помощью вакуолей аппарата Гольджи.

Котрансляционный синтез растворимых белков



Рис. 167. Синтез растворимых (секреторных) белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР)

1 – иРНК; 2 – функционирующая рибосома; 3 – сигнальный конец синтезирующегося пептида; 4 – SRP-частица; 5 – SRP-частица связывается с сигнальным пептидом и прекращает синтез белка; 6 – рецептор SRP-частицы; 7 – связь рецептора с SRP-частицей; 8 – каналные белки мембраны ЭПР; 9 – освобождение SRP-частицы и продолжение роста белковой молекулы; 10 – отщепление и деградация сигнальной последовательности синтезируемого белка; 11 – продолжение роста белковой цепи; 12 – синтезированный белок в просвете вакуоли ЭПР; 13 – диссоциированная рибосома

- Пути синтеза белков на рибосомах ЭПР можно представить в следующем виде. Еще в гиалоплазме происходит связывание иРНК, кодирующей секреторный белок, с рибосомой и начинается синтез белковой цепи. Важным является то, что сначала синтезируется “сигнальная последовательность”, богатая гидрофобными аминокислотами. В нее входит 16-30 аминокислот. Эта “сигнальная последовательность” в цитозоле узнается и связывается с “узнающей сигнал частицей” (SRP-частица), состоящей из одной молекулы 7S РНК и 6 различных полипептидных цепей. SRP-частица связывается после узнавания сигнального конца синтезирующейся молекулы белка с рибосомой, что приводит к полной остановке синтеза белка. На поверхности же мембраны ЭПР, обращенной к гиалоплазме расположены интегральные рецепторные белки, связывающиеся с SRP-частицами. В результате SRP-частица связывается со своим рецептором и одновременно связывает данную рибосому с мембраной ЭПР.

Синтез нерастворимых (мембранных) белков

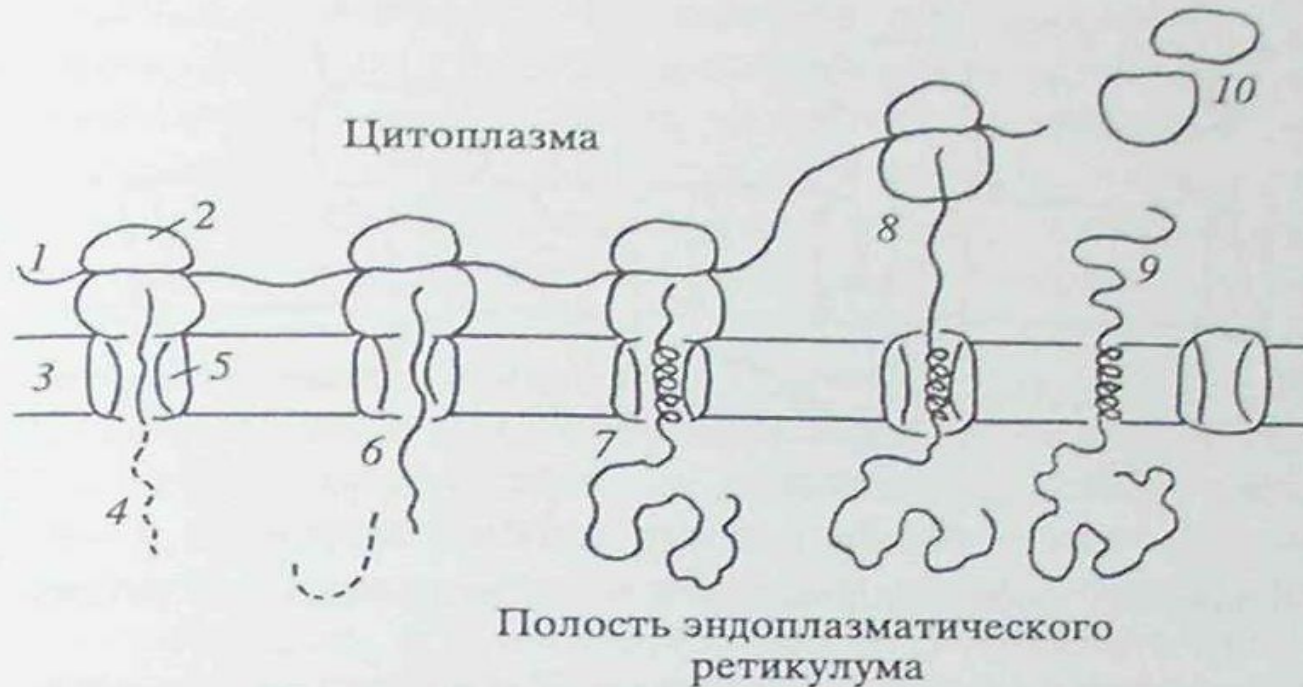


Рис. 168. Синтез мембранных белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР)

1 – иРНК; 2 – рибосома; 3 – мембрана ЭПР; 4 – растущий пептид после освобождения SRP-частицы; 5 – каналы белки мембраны ЭПР; 6 – отщепление сигнального пептида; 7 – «стоп»-сигнальный участок растущего пептида закрепляет его в мембране ЭПР; 8 – продолжение роста белка в цитозольное пространство; 9 – образовавшийся интегральный мембранный белок; 10 – диссоциированная рибосома

Синтез нерастворимых (мембранных) белков

- Начальные стадии синтеза мембранных белков похожи на таковые при синтезе растворимых белков. Здесь также участвуют SRP-частицы, узнающие сигнальную последовательность, также происходит прохождение начального участка белковой цепи через транслакон. Однако в цепи синтезирующегося мембранного белка существует одна или несколько аминокислотных **стоп-последовательностей**, которые препятствуют белковой цепи пересекать мембрану и белок в области стоп-сигнала остается связанным с мембраной, но при этом синтез белка на рибосоме не останавливается. Это приводит к тому, что в области стоп-сигнала локализуется гидрофобный α -спиральный участок, а весь белок остается встроенным в мембрану. В некоторых белках число α -спиральных “заякоряющих” участков может быть от одного до нескольких. Так, например, белок транспорта глюкозы (GLUT-1) имеет 12 таких участков. Мембранные белки, также как и растворимые могут подвергаться различным модификациям. Наиболее характерной из них для ЭПР является **первичное гликозилирование** - ковалентное связывание белковой цепи со сложным олигосахаридом. В результате этого синтезирующийся белок становится гликопротеидом.

Синтез клеточных мембран

- В ЭР происходит синтез и сборка липидов самих мембран, включая фосфолипиды и холестерол. Ферменты, участвующие в синтезе липидов, встроены в мембрану ЭР со стороны цитозоля, и синтез липидов происходит на мембране там же. Таким образом синтезированные липиды встраиваются в мембрану ЭР в липидный слой со стороны цитоплазмы, но переносятся на внутреннюю сторону с помощью переносчиков фосфолипидов. Таким образом билипидный слой мембраны растет, увеличивая поверхность вакуоли или цистерны ЭР. Этот процесс идет одновременно с синтезом интегральных мембранных белков, так что липопротеидная мембрана, как таковая, строится и растет за счет двух процессов: синтеза и встраивания липидов, и синтеза и интеграции мембранных белков. **Необходимо подчеркнуть, что такое “зарождение” мембран вакуолярной системы происходит только в гранулярном ЭР.**

Синтез клеточных мембран

- Сегодня можно сказать, что важнейшей функцией гранулярного ЭР, вне зависимости от специализации или тканевой принадлежности клеток, является функция образования, построения клеточных мембран, которая заключается в том, что элементы гранулярного ЭР синтезируют все мембранные белки, синтезируют липидный компонент мембран, но, кроме того, именно в гранулярном ЭР происходит сборка липопротеидных мембран.

Гранулярный ЭПР.

- Следовательно, гранулярный эндоплазматический ретикулум представляет собой настоящую “фабрику” клеточных мембран. От того, какие интегральные и периферические белки будут синтезированы на рибосомах ЭПР, и от того, какие фосфолипиды будут здесь синтезированы и включаться в мембрану, будет зависеть тип образующегося нового участка мембраны; будет ли он компонентом гладкого ЭПР, мембран аппарата Гольджи, лизосомы, или плазматической мембраны.

Транспорт между ЭР и аппаратом Гольджи

- Дистальные участки гранулярного ЭР, которые расположены в зоне, приближенной к аппарату Гольджи (АГ), теряют рибосомы и образуют мембранные выступы, от которых отпочковываются мелкие вакуоли, содержащие синтезированные в ЭР белки. Эта зона называется ЭР-АГ-промежуточный компартмент (ERGIC) или везикулярно-тубулярная группа (VTC).

Транспорт между ЭР и аппаратом Гольджи

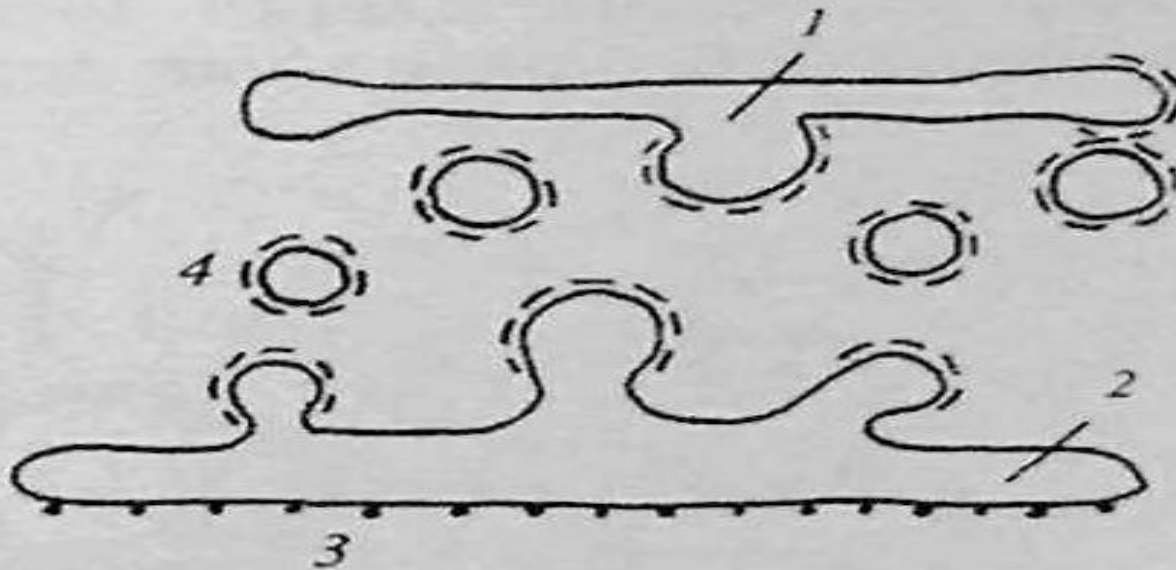
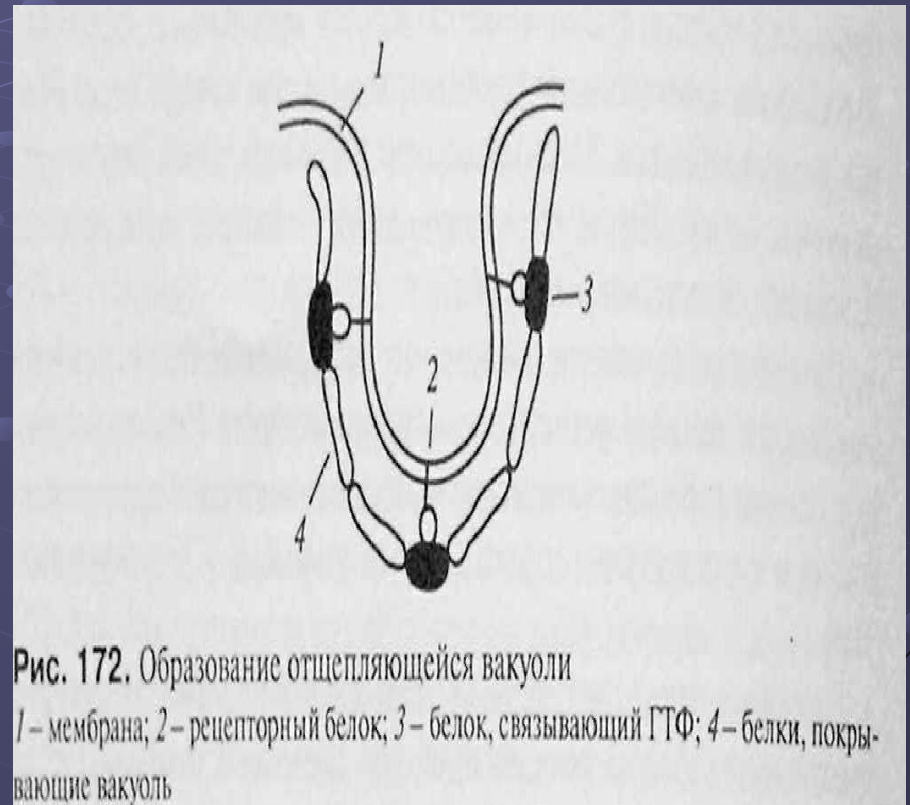


Рис. 171. Переходная зона эндоплазматический ретикулум—аппарат Гольджи (ЭПР—АГ)

1 — вакуоль цис-зоны АГ; *2* — ЭПР; *3* — рибосомы; *4* — мембраны и вакуоли, покрытые СОР II

Транспорт между ЭР и аппаратом Гольджи

- Вакуоли, отщепившиеся в этой зоне от ЭР, транзитные элементы, покрыты окаймляющим белковым слоем, аналогичным клатриновому слою эндоцитозных вакуолей. Белки этого слоя также относятся к COP-белкам, в данном случае отщепляющиеся вакуоли покрыты комплексом COP II, состоящим из нескольких гетеродимеров, связанных с мембраной посредством белка

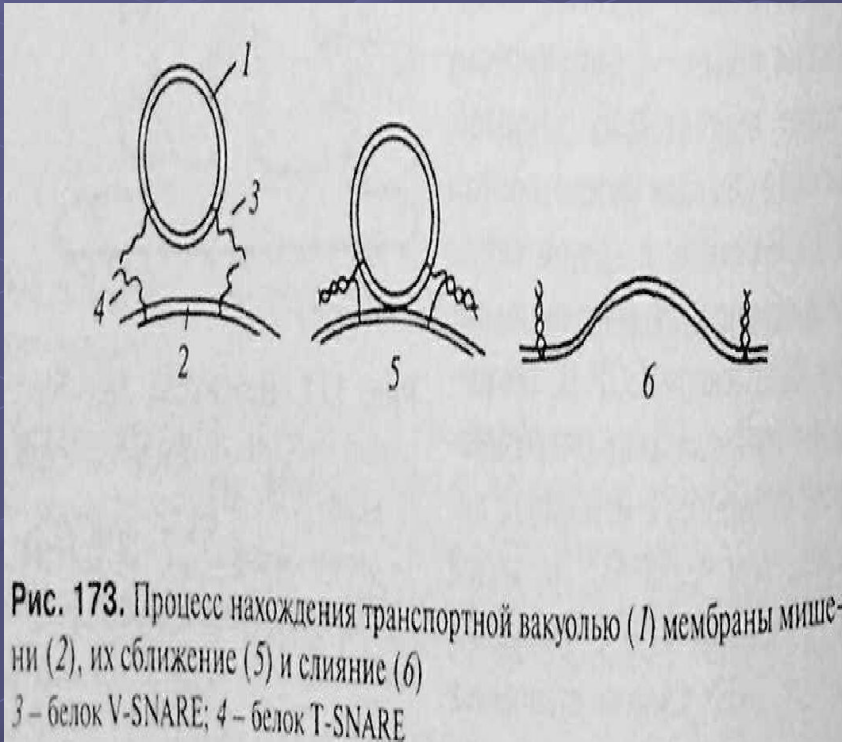


Транспорт между ЭР и аппаратом Гольджи

- Отделившиеся от ЭР вакуоли становятся окаймленными пузырьками, затем они теряют белковую оболочку и сливаются друг с другом и транспортируются с помощью микротрубочек к цис-зоне аппарата Гольджи, где и сливаются с его мембранами. Адресность и точность слияния любых вакуолей с другими мембранами определяется специальными белками SNARE (рецептор белков, участвующих в прикреплении и слиянии мембран).
- После деполимеризации окаймляющего слоя COP II на поверхности вакуоли открываются интегральные мембранные белки - V-SNARE. Эти белки специфичны для каждого типа вакуолей, направляя их к тому участку, где они должны слиться с другими мембранами. Там они связываются с мембранными белками T-SNARE и SNAP25. В местах взаимодействия этих двух групп белков и происходит слияние мембран.

Транспорт между ЭР и аппаратом Гольджи

- Таким образом происходит транспорт синтезированных белков в зону аппарата Гольджи.

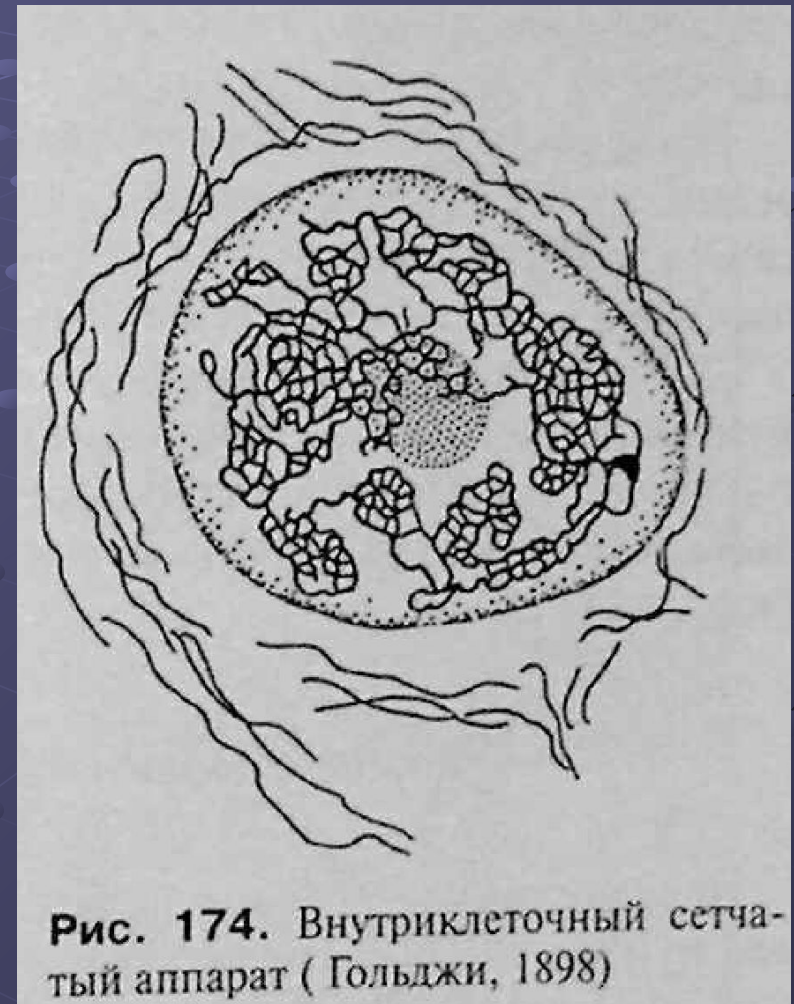


Аппарат Гольджи.



История открытия.

- В 1898 г. итальянский ученый К. Гольджи, используя свойства связывания тяжелых металлов (осмия и серебра) с клеточными структурами, выявил в нервных клетках сетчатые образования, которые он назвал “внутриклеточным сетчатым аппаратом”



Типы аппарата Гольджи.

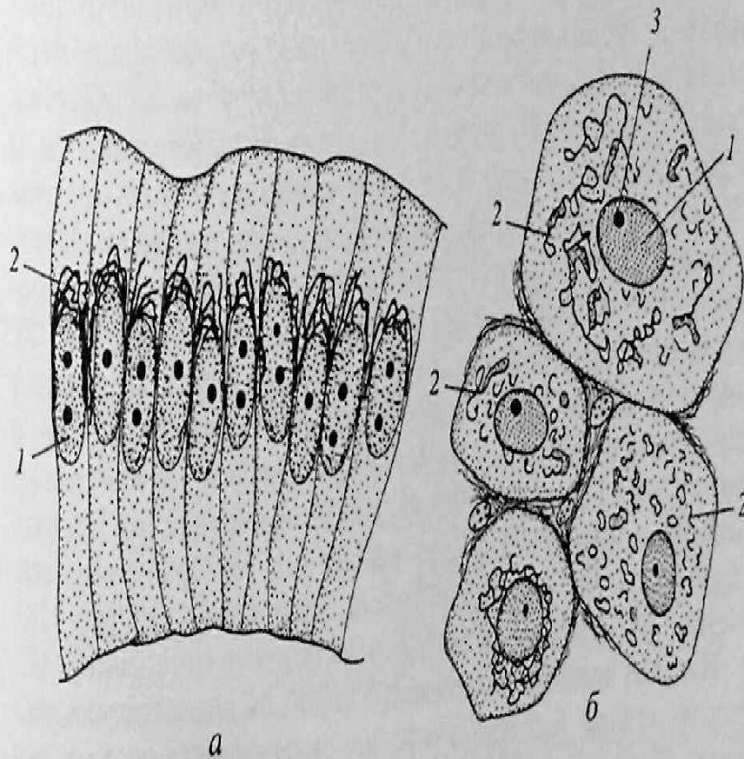


Рис. 175. Типы аппарата Гольджи
а – сетчатый в клетках кишечного эпителия; *б* – диффузный в клетках спинального ганглия. 1 – ядро; 2 – аппарат Гольджи; 3 – ядрышко

- Элементы аппарата Гольджи расположены около ядра, вблизи клеточного центра (центриоли)
- Элементы аппарата Гольджи часто связаны с вакуолями, что особенно характерно для секретирующих клеток.

Тонкое строение аппарата Гольджи.

- В электронном микроскопе видно, что аппарат Гольджи представлен мембранными структурами, собранными вместе в небольшой зоне

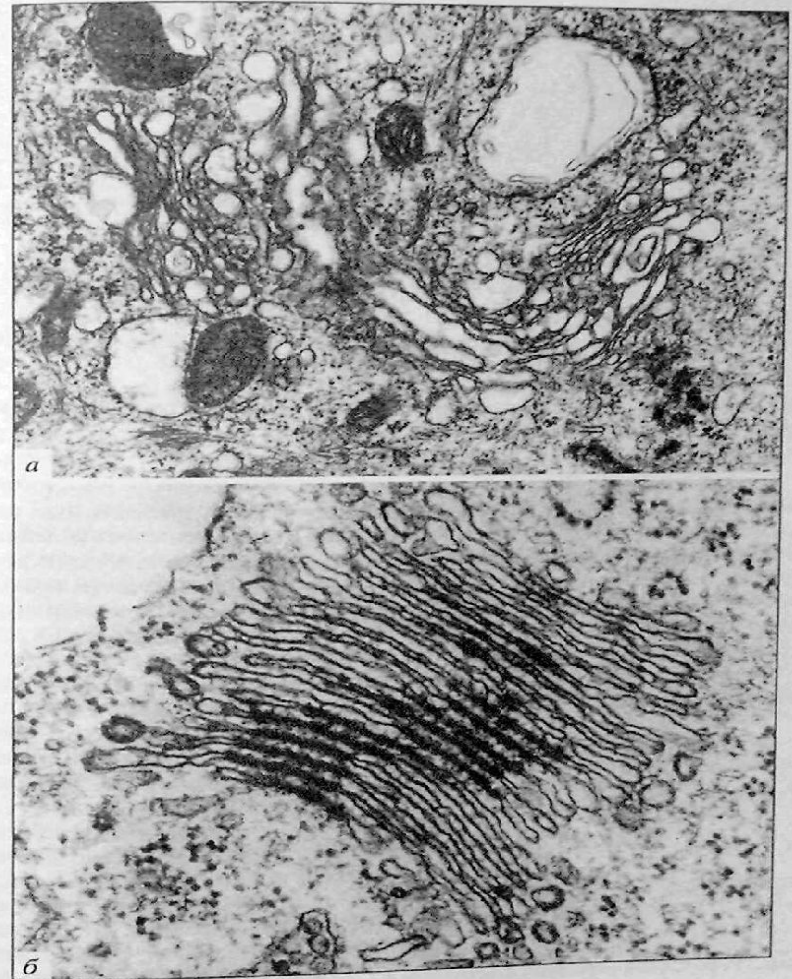
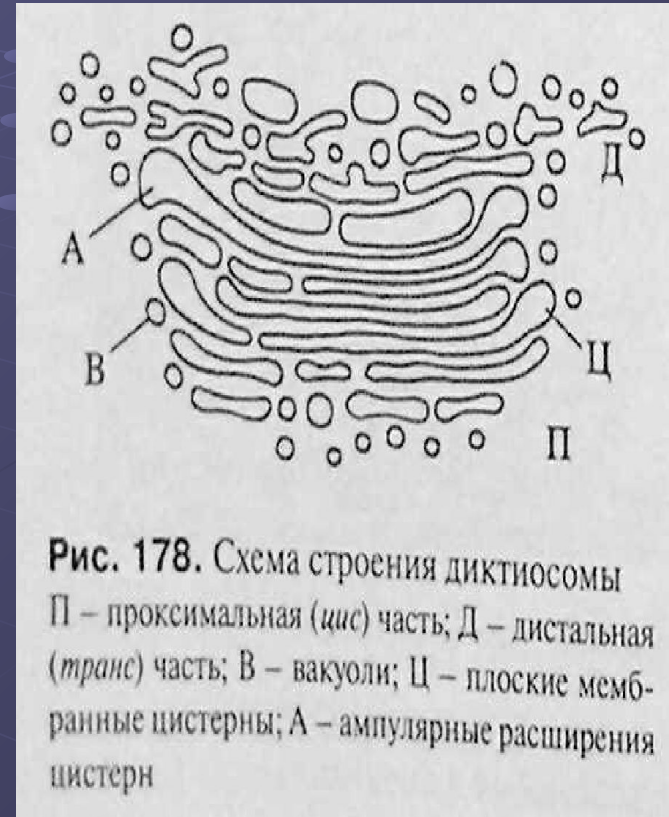


Рис. 176. Микрофотография аппарата Гольджи (АГ), полученная с помощью электронного микроскопа
a – цистерны АГ в покровном эпителии ноги прудовика (фото К.Е. Домарацкого);
б – диктиосома клетки эвлены (фото А.В. Володина)

Тонкое строение аппарата Гольджи.

- Отдельная зона скопления этих мембран является **диктиосомой**. В диктиосоме плотно друг к другу (на расстоянии 20-25 нм) расположены в виде стопки плоские мембранные мешки, или цистерны, между которыми располагаются тонкие прослойки гиалоплазмы. Каждая отдельная цистерна имеет диаметр около 1 мкм и переменную толщину; в центре ее мембраны могут быть сближены (25 нм), а на периферии иметь расширения, ампулы, ширина которых непостоянна. Количество таких мешков в стопке обычно не превышает 5-10. У некоторых одноклеточных их число может достигать 20 штук. Кроме плотно расположенных плоских цистерн в зоне АГ наблюдается множество вакуолей. Мелкие вакуоли встречаются главным образом в периферических участках зоны АГ; иногда видно, как они отшнуровываются от ампулярных расширений на краях плоских цистерн.



Секреторная функция аппарата

Гольджи

- Участие АГ в процессах выведения секреторных продуктов было очень хорошо изучено на примере экзокринных клеток поджелудочной железы. Для этих клеток характерно наличие большого числа секреторных гранул (зимогеновых гранул), которые представляют собой мембранные пузырьки, заполненные белковым содержимым. В составе белков зимогеновых гранул входят разнообразные ферменты: протеазы, липазы, карбогидразы, нуклеазы. При секреции содержимое этих зимогеновых гранул выбрасывается из клеток в просвет железы, а затем перетекает в полость кишечника. Так как основным продуктом, выводимым клетками поджелудочной железы, является белок, то исследовали последовательность включения радиоактивных аминокислот в различные участки клетки

Обнаружение метки.

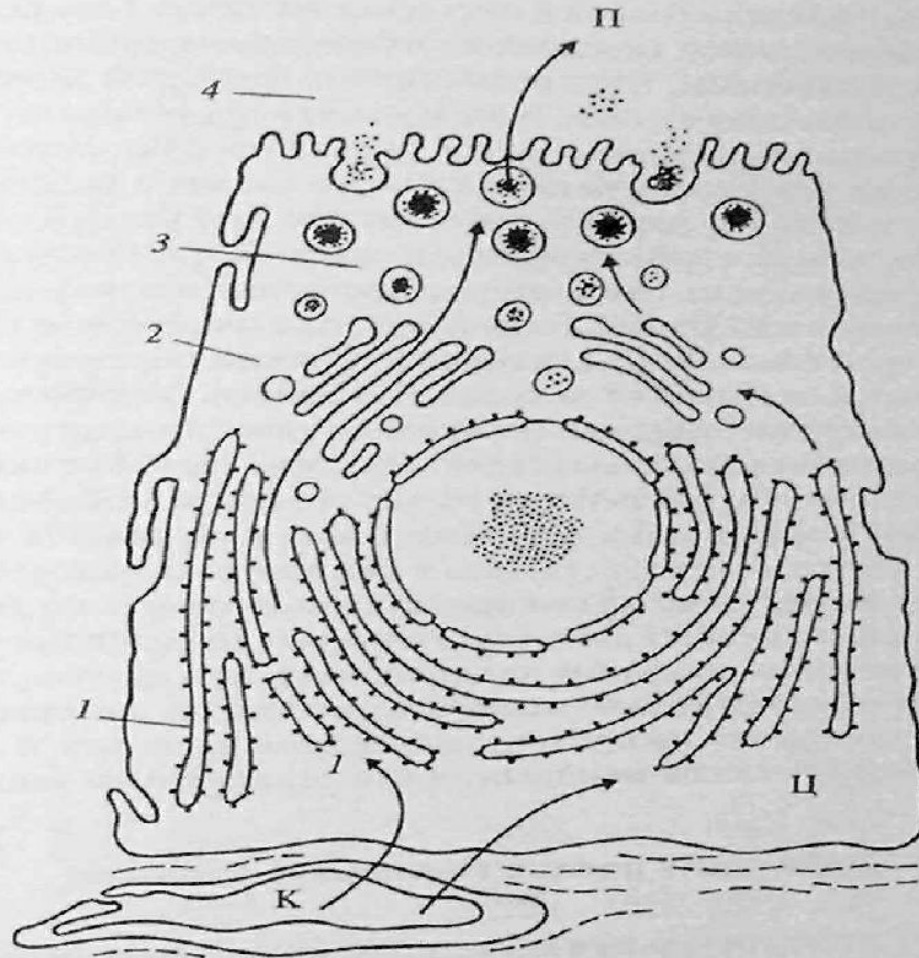


Рис. 181. Последовательность обнаружения (1–4) метки от ^3H -лизина при синтезе и выведении белкового секрета из клетки поджелудочной железы
К – кровеносный капилляр; Ц – цитоплазма клетки; П – просвет железы. Стрелки показывают пути миграции метки

Секреторная функция аппарата

Гольджи

- Для этого животным вводили меченную тритием аминокислоту (3H-лейцин) и с помощью электронно-микроскопической радиоавтографии следили во времени за локализацией метки. Оказалось, что через короткий промежуток времени (3-5 мин) метка локализовалась только в базальных участках клеток, в участка, богатых гранулярным ЭР. Так как метка включалась в белковую цепь во время синтеза белка, то было ясно, что ни в зоне АГ, ни в самих зимогеновых гранулах синтез белка не происходит, а он синтезируется исключительно в эргастоплазме на рибосомах. Несколько позднее (через 20-40 мин) метка кроме эргастоплазмы была обнаружена в зоне вакуолей АГ. Следовательно, после синтеза в эргастоплазме белок был транспортирован в зону АГ. Еще позднее (через 60 мин) метка обнаруживалась уже и в зоне зимогеновых гранул. В дальнейшем метку можно было видеть в просвете ацинусов этой железы. Таким образом, стало ясно, что АГ является промежуточным звеном между собственно синтезом секретиремого белка и выведением его из клетки.

Модификация белков в аппарате Гольджи

- В аппарате Гольджи клеток животных происходит синтез длинных неразветвленных полисахаридных цепей глюкозаиногликанов. Один из них, гиалуроновая кислота, входящая в состав внеклеточного матрикса соединительной ткани, содержит несколько тысяч повторяющихся дисахаридных блоков. Многие глюкозаиногликаны ковалентно связаны с белками и образуют протеогликаны (мукопротеины). Такие полисахаридные цепи модифицируются в аппарате Гольджи и связываются с белками, которые в виде протеогликанов секретируются клетками. В аппарате Гольджи происходит также сульфатирование глюкозаиногликанов и некоторых белков.

Локализация ферментов модификации белков.

- В средней части диктиосом протекает вторичное гликозилирование секреторных белков: дополнительное удаление маннозы и присоединение N-ацетилглюкозамина. В транс-участке к олигосахаридной цепи присоединяются галактоза и сиаловые кислоты

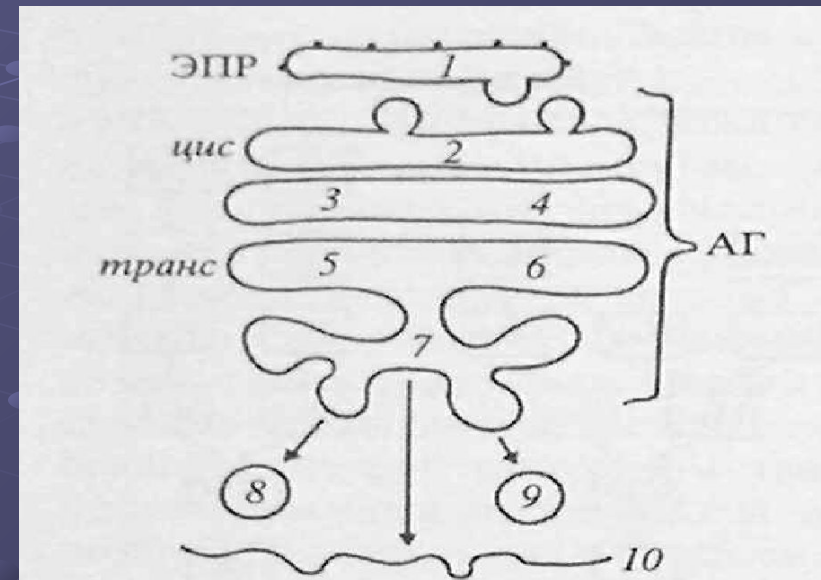


Рис. 183. Локализация ферментов модификации белков в аппарате Гольджи (АГ)

1 – синтез белка в ЭПР; 2 – фосфорилирование лизосомных олигосахаридов; 3 – отщепление маннозы; 4 – присоединение N-ацетилглюкозамина; 5 – присоединение маннозы; 6 – присоединение сиаловой кислоты; 7 – сортировка белков на рецепторах в транс-сети; 8 – лизосома; 9 – секреторная вакуоль; 10 – плазмалемма

Сортировка белков в аппарате Гольджи

- Собственно разделение белков, их сортировка, происходит в транс-участке аппарата Гольджи. Этот процесс не до конца расшифрован, но на примере сортировки лизосомных ферментов можно понять принцип отбора определенных белковых молекул

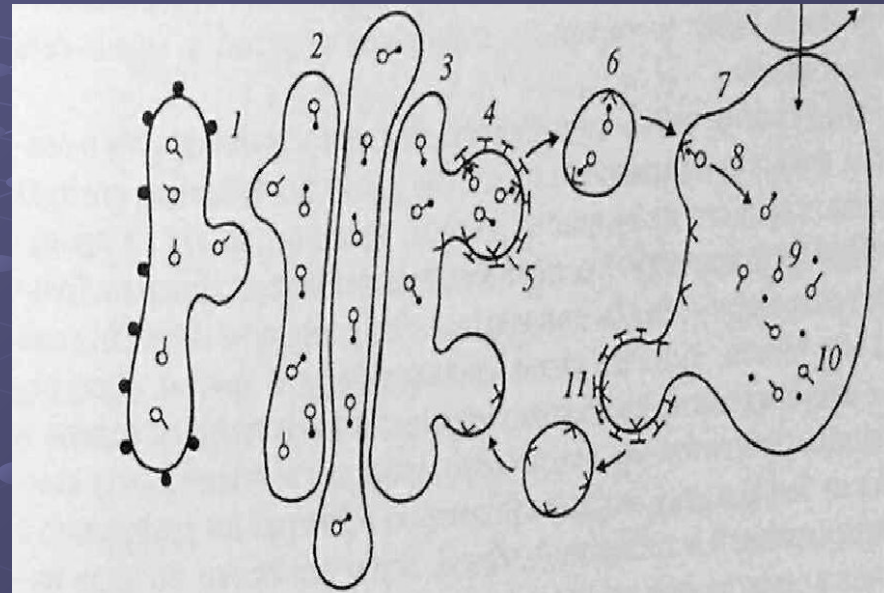


Рис. 184. Сортировка кислых гидролаз в аппарате Гольджи (АГ)
1 – поступление гидролаз из ЭПР; 2 – фосфорилирование; 3 – перенос в *транс*-сеть АГ; 4 – связывание с рецептором; 5 – клатриновая оболочка; 6 – первичная лизосома; 7 – объединение со вторичной лизосомой; 8 – диссоциация от рецептора; 9 – дефосфорилирование; 10 – активированная гидролаза; 11 – возврат (рециклизация) рецепторов

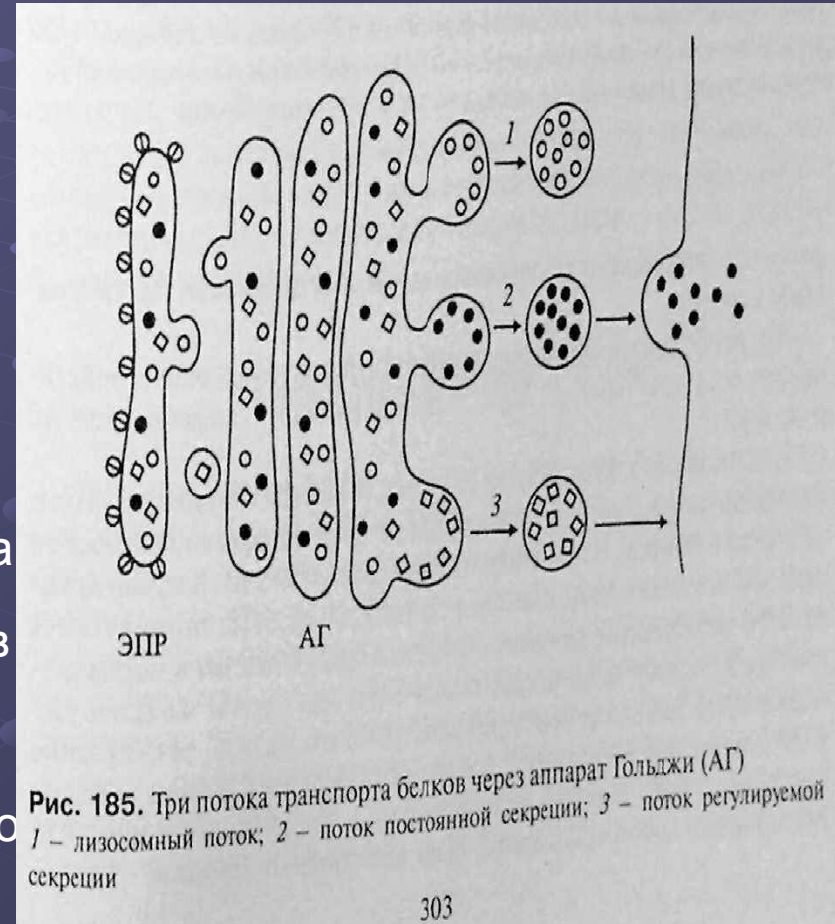
Сортировка белков в аппарате

Гольджи

- белки-предшественники лизосомных гидролаз имеют специфическую олигосахаридную, а именно маннозную группу. В цис-цистернах эти группировки фосфорилируются и дальше вместе с другими белками переносятся от цистерны к цистерне, через среднюю зону в транс-участок. Мембраны транс-сети аппарата Гольджи содержат трансмембранный белок - рецептор (манноза-6-фосфатный рецептор или М-6-Ф-рецептор), который узнает фосфорилированные маннозные группировки олигосахаридной цепи лизосомных ферментов и связывается с ними. . В транс-сети аппарата Гольджи происходит их отделение, отпочковывание и дальнейший перенос к эндосомам. Оторвавшись от транс-сети эти пузырьки быстро теряют шубу, сливаются с эндосомами, перенося свои лизосомные ферменты, связанные с мембранными рецепторами, в эту вакуоль.

Сортировка белков в аппарате Гольджи

- От аппарата Гольджи исходит и третий поток вакуолей, связанный с постоянной, конститутивной секрецией. Так фибробласты выделяют большое количество гликопротеидов и муцинов, входящих в основное вещество соединительной ткани. Многие клетки постоянно выделяют белки, способствующие связыванию их с субстратами, постоянно идет поток мембранных пузырьков к поверхности клетки, несущие элементы гликокаликса и мембранных гликопротеидов. Этот поток выделяемых клеткой компонентов не подлежит сортировке в рецепторной транс-системе аппарата Гольджи. Первичные вакуоли этого потока также отщепляются от мембран и относятся по своей структуре к окаймленным вакуолям, содержащим клатрин.



Аппарат Гольджи.

- Заканчивая рассмотрение строения и работы такой сложной мембранной органеллы, как аппарат Гольджи, необходимо подчеркнуть, что несмотря на кажущуюся морфологическую однородность его компонентов, вакуоли и цистерны, на самом деле, это не просто скопище пузырьков, а стройная, динамичная сложно организованная, поляризованная система.

A 3D grid of spheres on a dark blue background. The spheres are arranged in a regular, repeating pattern, creating a perspective effect that recedes into the distance. The lighting is soft, highlighting the top of each sphere.

Благодарю за
внимание!!!