

СМ

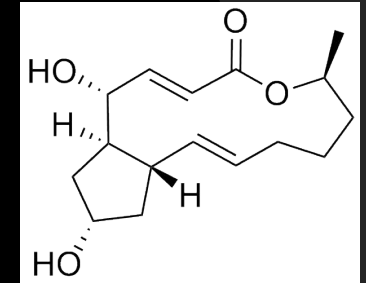
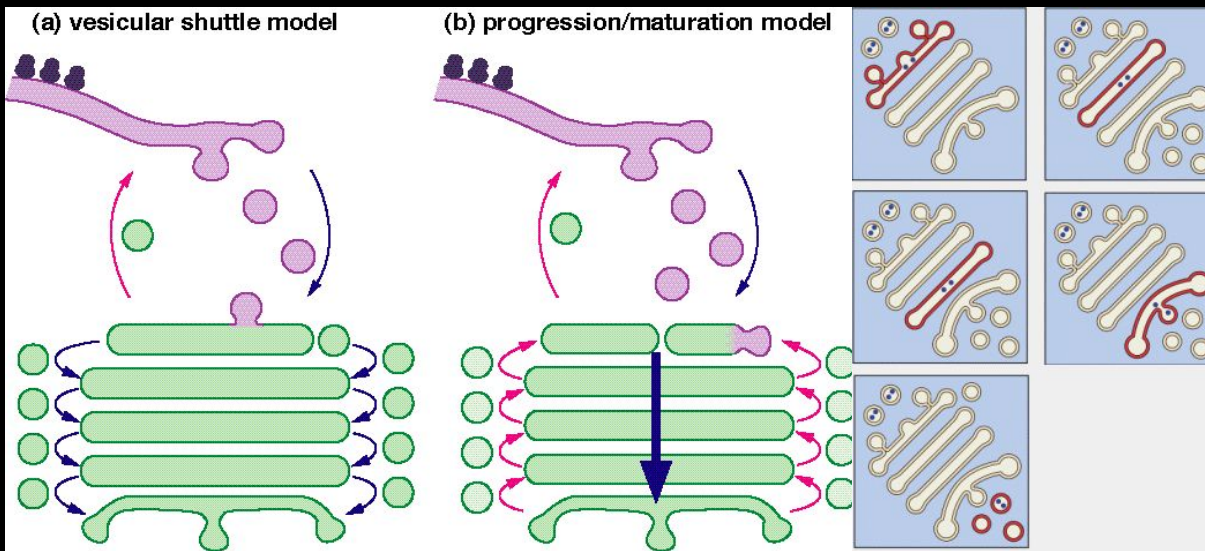
# АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

Сердце секреторного пути





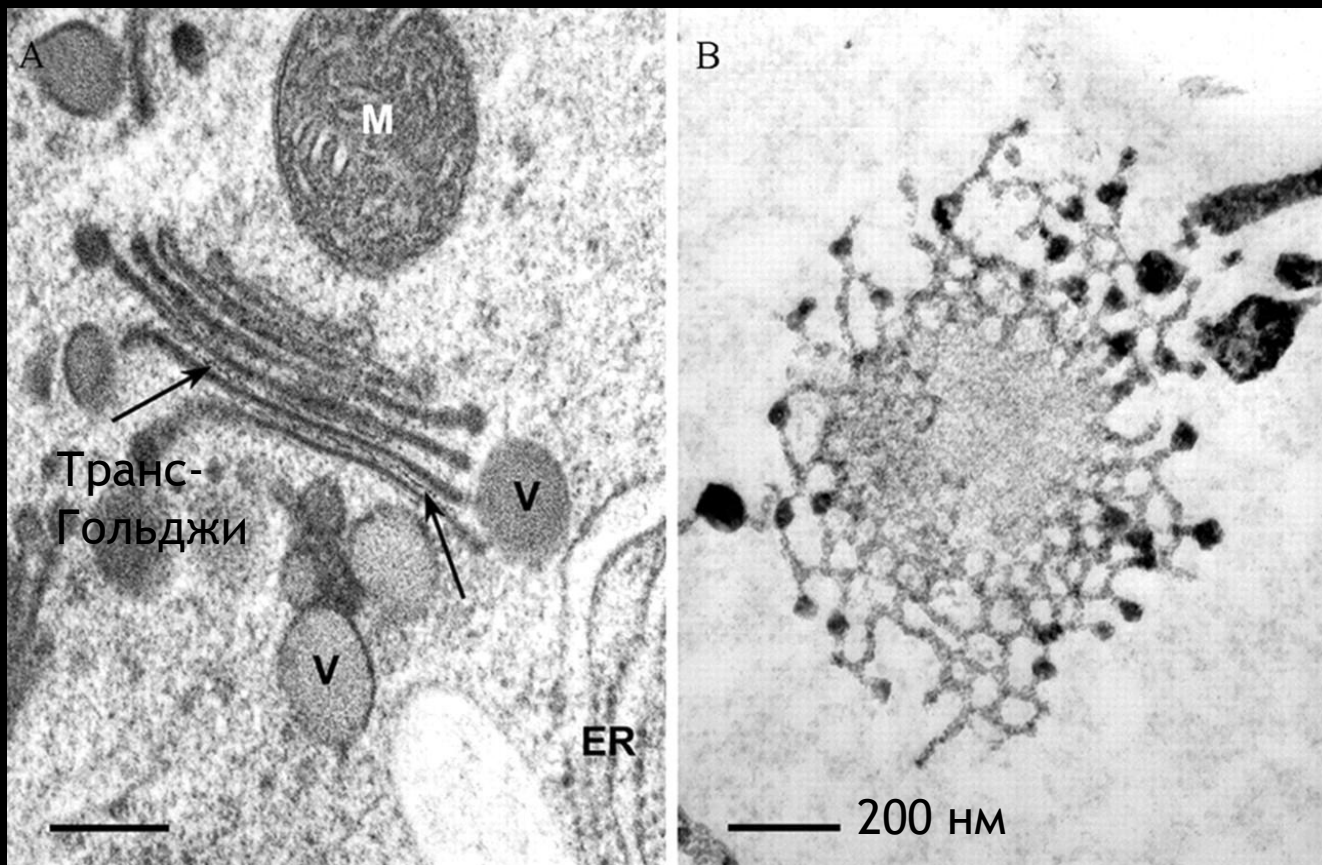
# Движение грузов: модели



Брефельдин А - ингибитор секреции  
(блокирует формирование COP-комплекса)

- Модель 1: везикулярный транспорт (разработана по клеткам человека и животных)
- Модель 2: мембранный континуум (основана на данных ЭМ о соединениях ЭПР и АГ у растений)
- Модель 3: созревание цистерн (разработана на простейших)

# Как выглядит АГ?

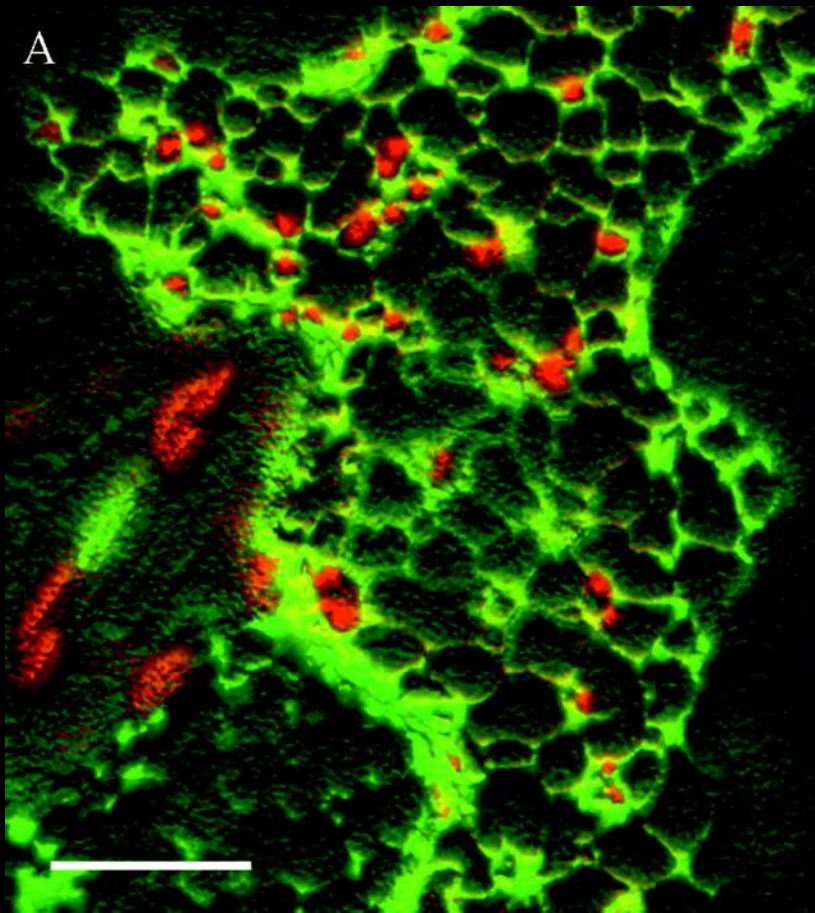


- © Фотография АГ из корневого чехлика табака (а) - «вид в разрезе», и апикальной меристемы корня кукурузы (б) - «вид сверху».

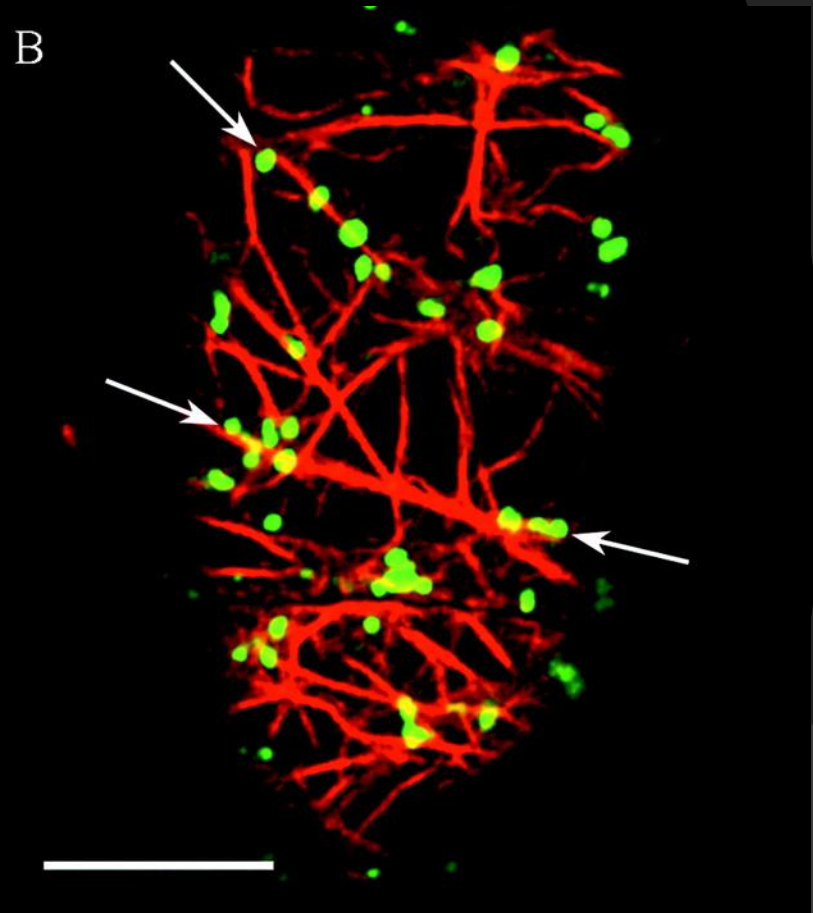


# Как расположен АГ?

АГ (красн.) и ЭПР (зел)



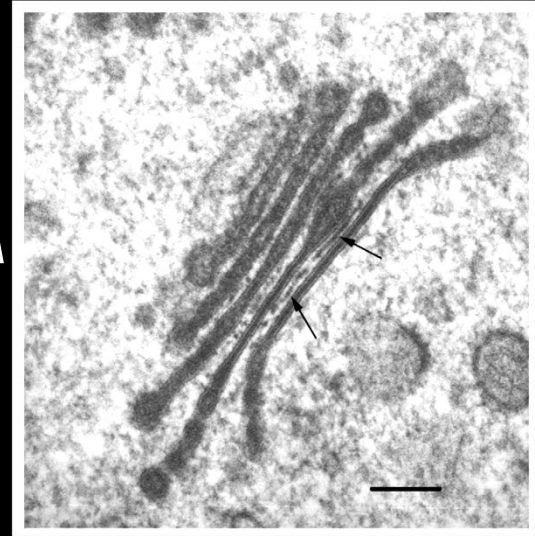
АГ(зел) и микрофидаменты (красн.)





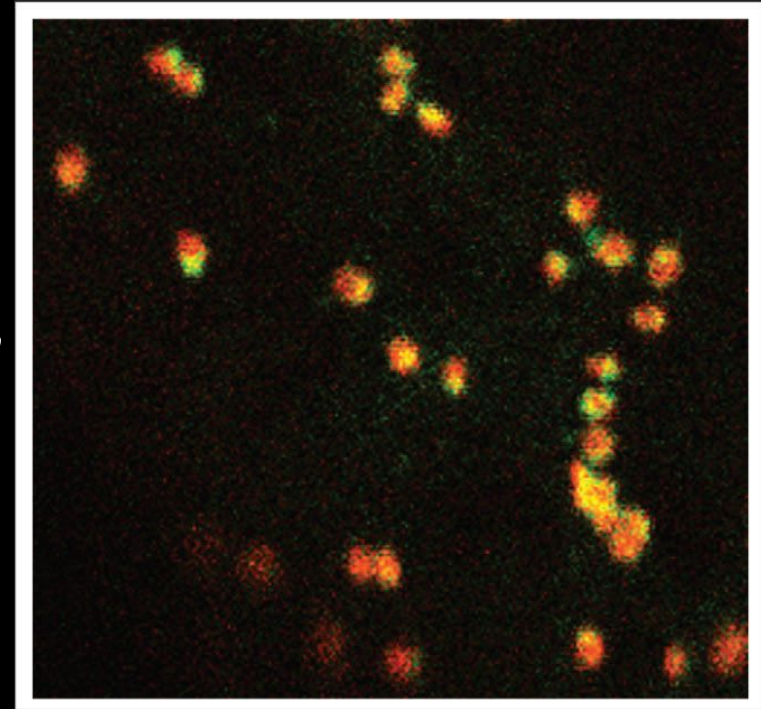
# Что держит цистерны вместе?

- ◎ Каждый АГ состоит из 5-8 цистерн.
- ◎ ribosome-exclusion zone - зона вокруг АГ, не содержащая рибосом (выявлена с помощью ЭМ)
- ◎ Считается, что эта зона заполнена неким матриксом, который обеспечивает скрепление цистерн.
- ◎ В этом процессе также участвуют *интерцистернальные элементы*. Так называли плотные структуры между транс-цистернами.



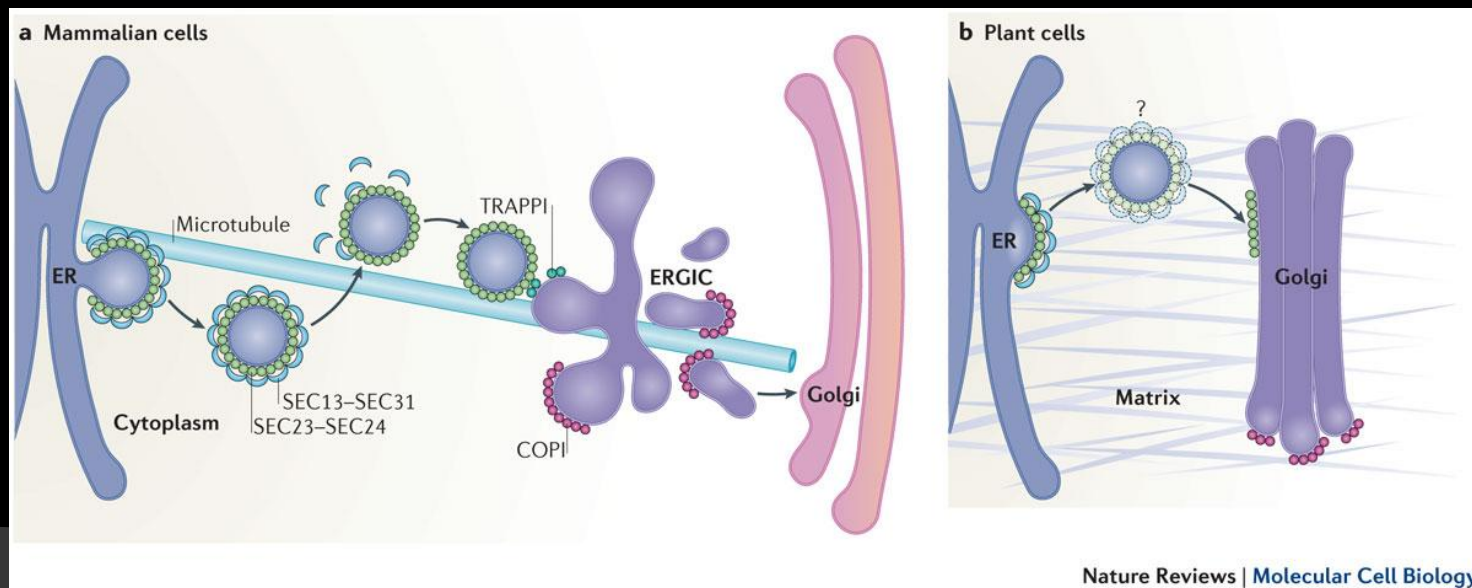
# Гольджины

- ◎ Белки матрикса, которые, естественно, были обнаружены сначала у животных.
- ◎ Детально их функции неизвестны, главная - структурная: связь между цистернами.
- ◎ Гомологи нескольких гольджинов обнаружены у растений
- ◎ Отсутствует та группа, которая у животных отвечает за распад АГ в митозе на отдельные цистерны
- ◎ Возможно, поэтому у растений АГ сохраняет целостность в процессе митоза.



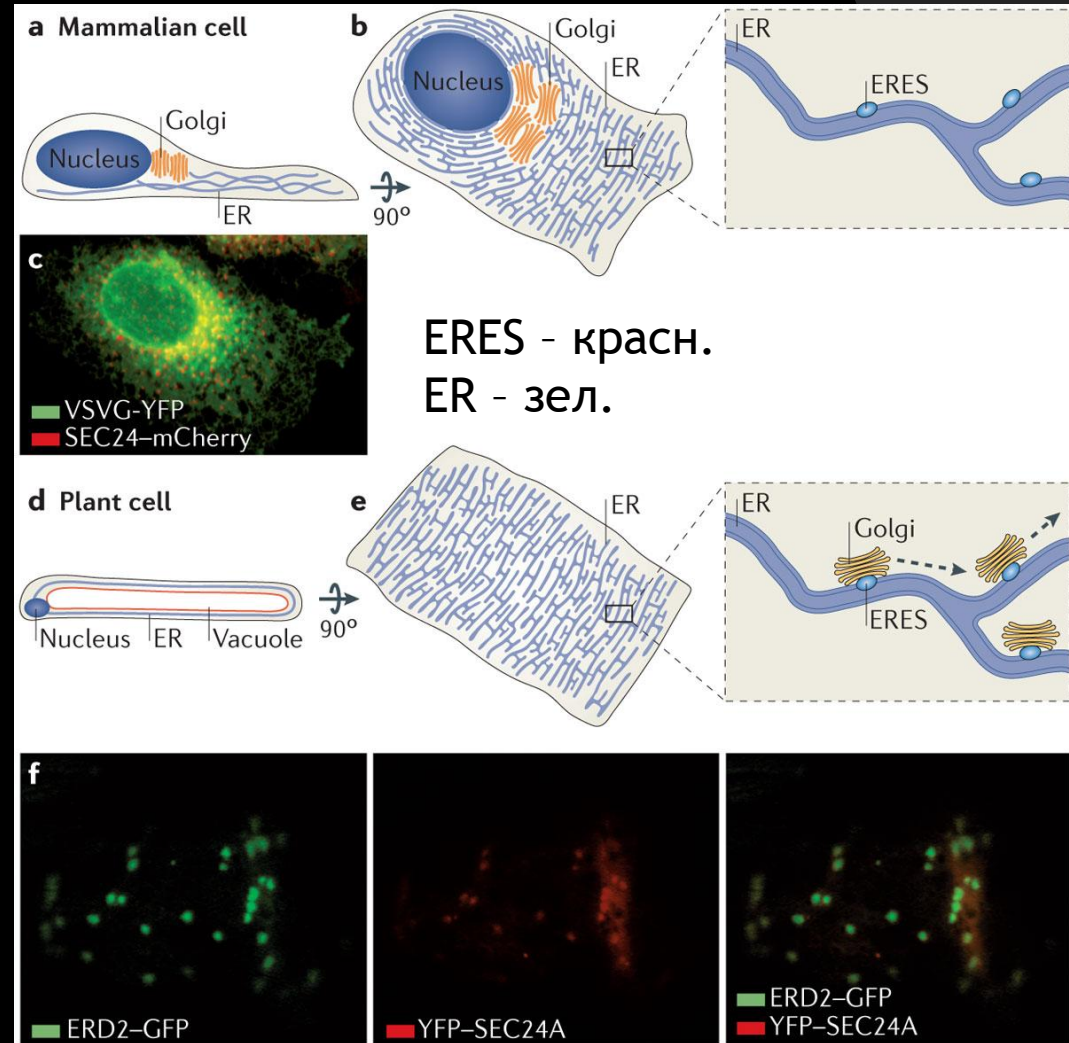
# ЭПР и АГ: работа в команде

- У растений есть существенные отличия в транспорте грузов между ЭПР и Гольджи:
- Они гораздо ближе друг к другу, между ними отсутствует посредник - ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) и микротрубочки, которые к нему ведут.
- ERES (ER exit sites) и Гольджи тесно ассоциированы друг с другом и находятся совсем рядом.



# Животные и растения: почему так?

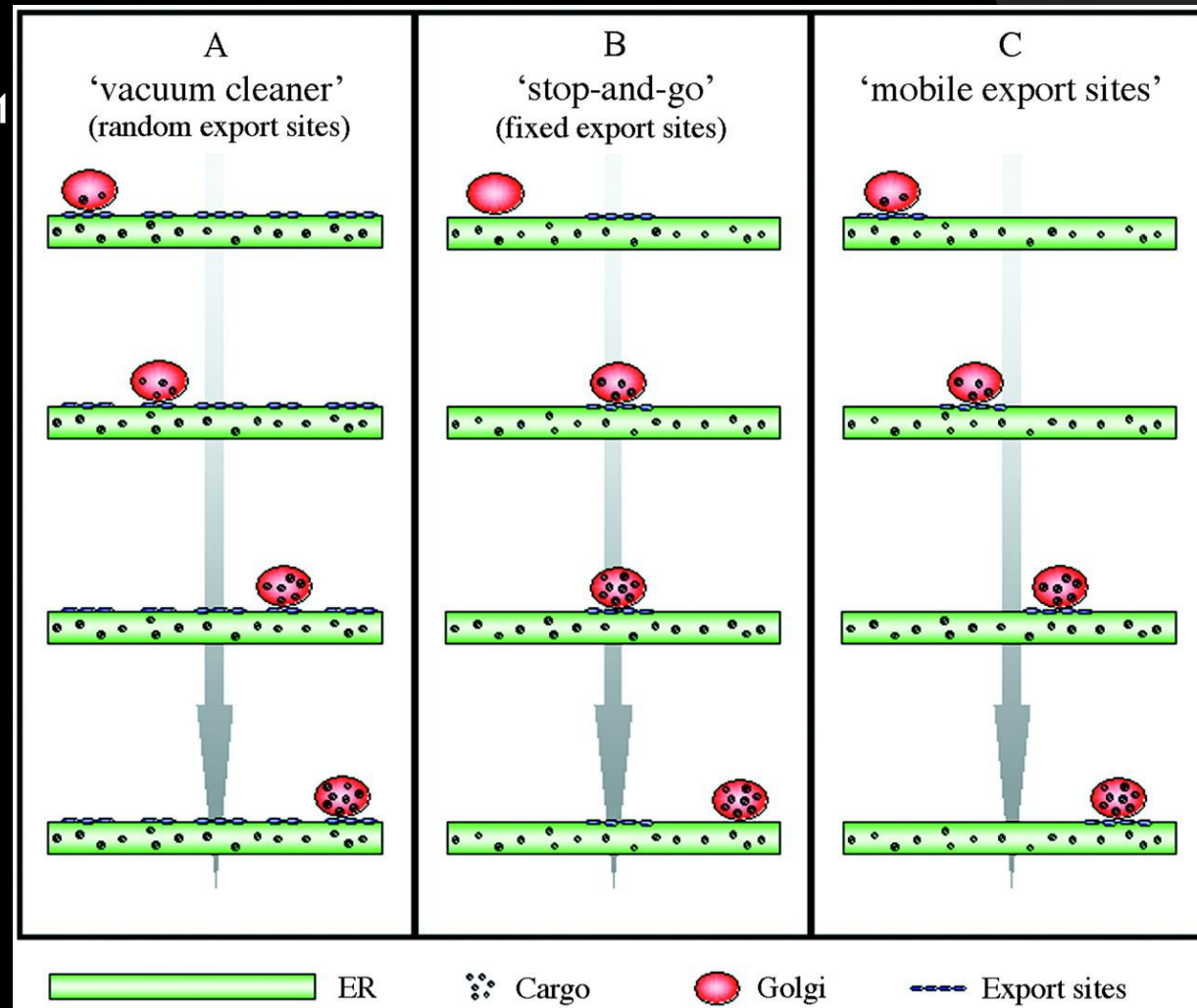
- У животных АГ находится неподалёку от ядра. ER exit sites (ERES) распределены по поверхности ЭПР и сконцентрированы около ядра - ближе к АГ.
- У растений АГ находятся по всей кортикальной цитоплазме и движутся вдоль ЭПР, тесно связанные с ERES.



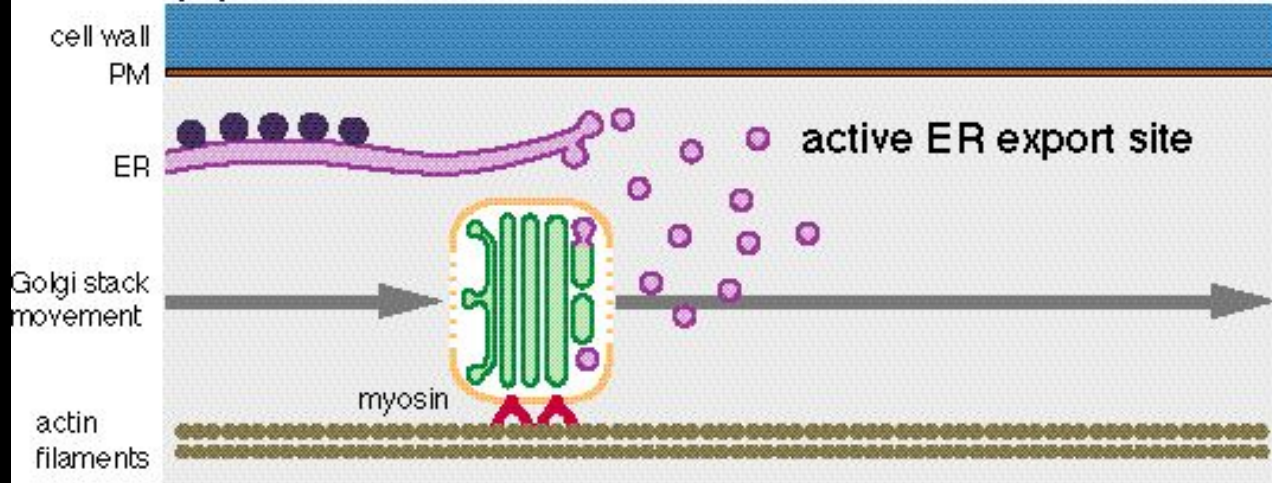


# ЭПР и Гольджи: опять модели

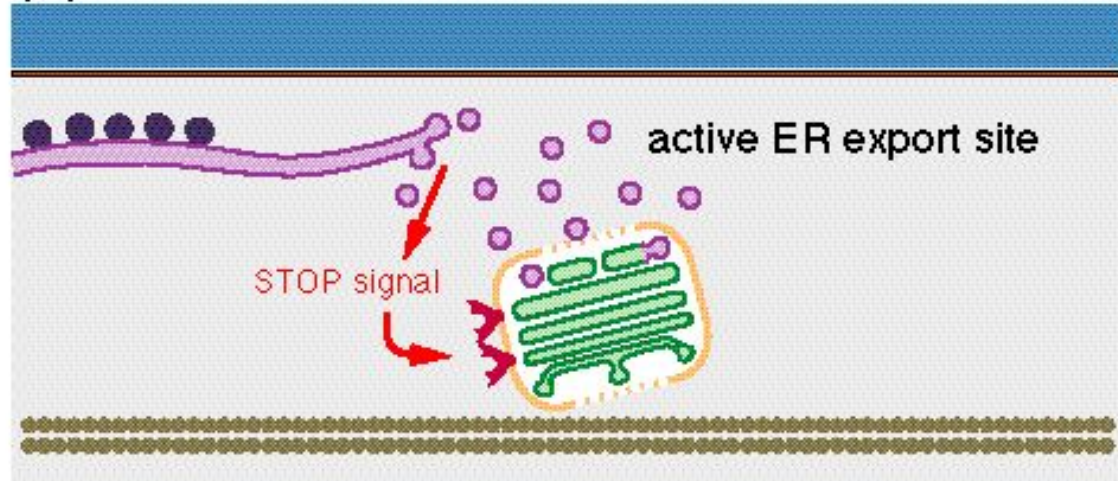
- Три модели взаимодействия ЭПР и Гольджи:
- Пылесос - Гольджи движется вдоль ЭПР, «собирая» груз. Экспорт происходит в любом месте.
- Стоп-пошёл: Гольджи движется, пока не получает сигнал остановиться и забрать груз.
- Мобильные сайты экспорта: движутся и Гольджи, и сайты «выдачи груза» в составе ЭПР.



### (a) "vacuum cleaner" model

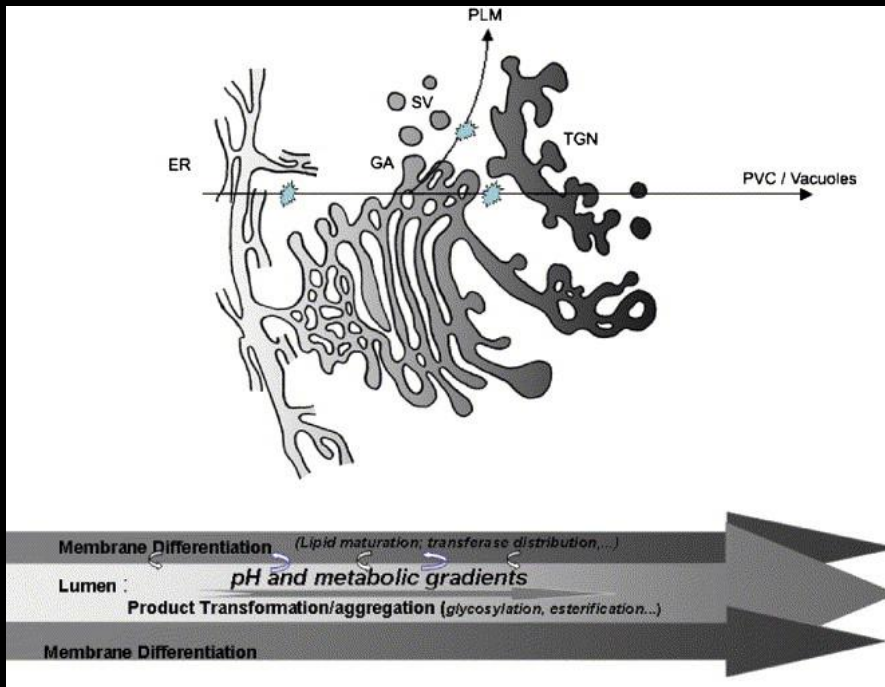


### (b) recruitment model





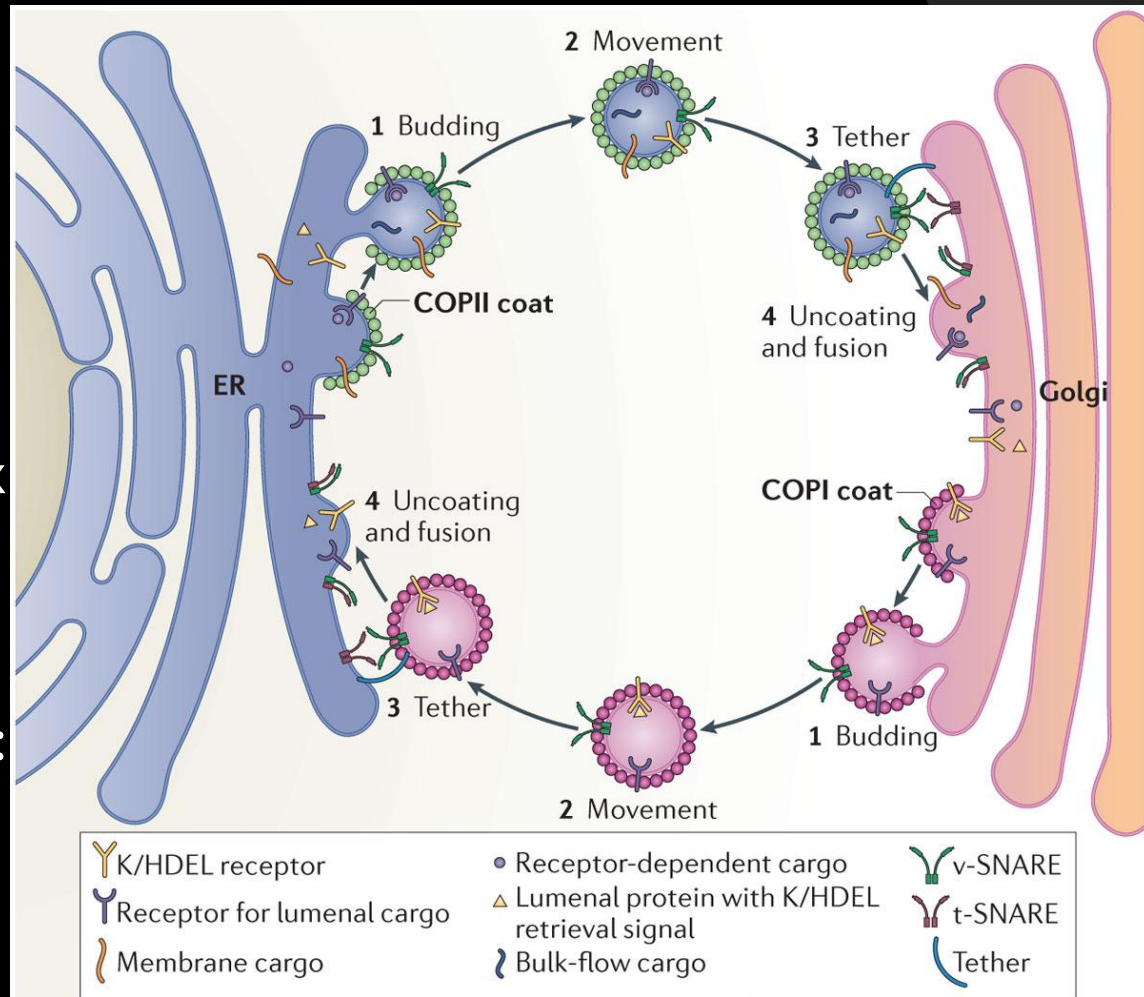
# Отцы и дети...



- Ряд авторов рассматривает АГ как «потомка» ЭПР.
- В принципе, это не влияет на изучение его строения и функций, однако включает в себя эволюционный и онтогенетический аспект.
- Эту гипотезу подтверждают работы, в которых нарушали формирование АГ, и тогда АГ-резиденты оставались в «отчем доме» - в ЭПР.

# COP1 и COP2: на раз, два...

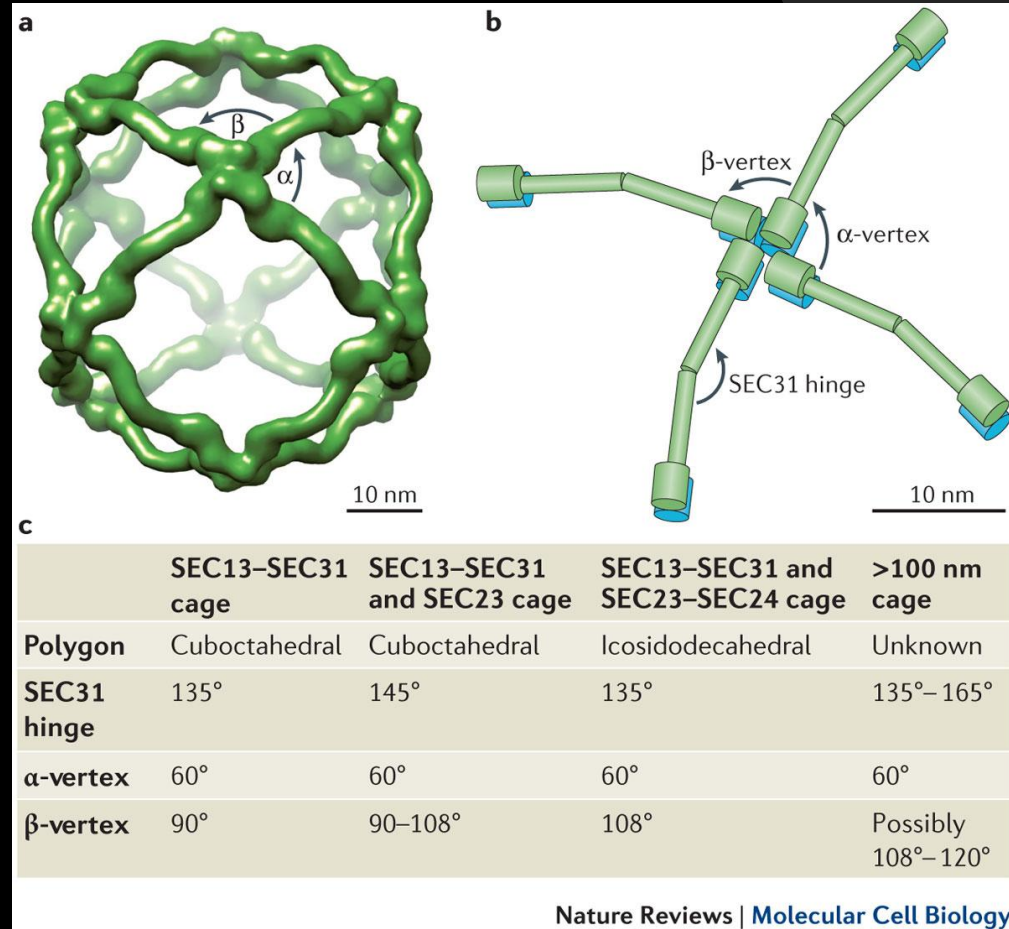
- Coat protein complex II обеспечивает основной поток грузов - антероградный транспорт ЭПР - Гольджи.
- COP1 обеспечивает ретроградный транспорт ЭПР-резидентов, имеющих сигнальную последоват. K/HDEL.
- В слиянии пузырьков принимают участие SNARE: vesicular (v-SNAREs) и target (t-SNAREs)
- Заякоривание происходит с помощью «тросов» (Tether)





# Белки COP2 – молекулярные клетки

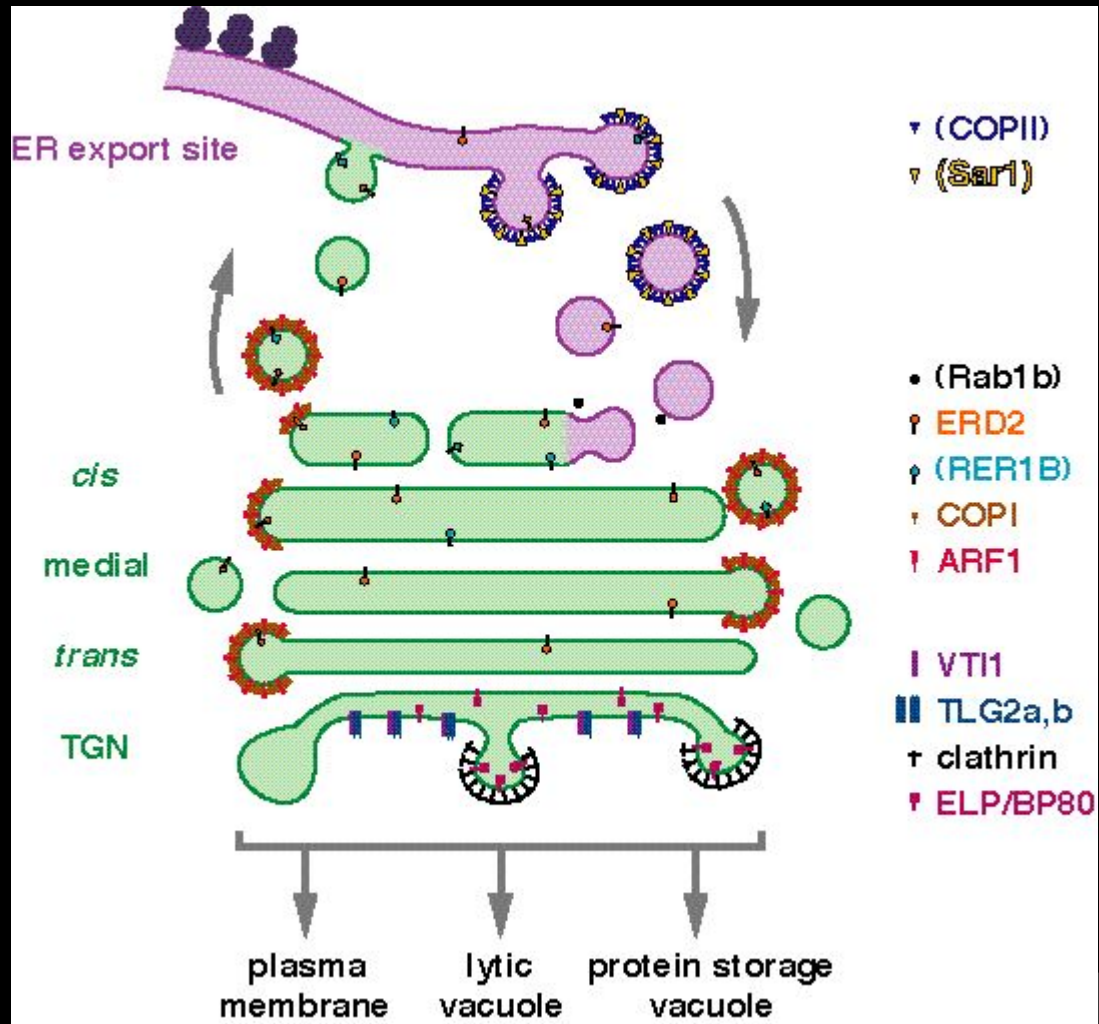
- Подвижная (гибкая) архитектура
- Формируют правильные многогранные «клетки»: 24-гранные 60-гранные
- При определенных условиях могут становиться почти плоскими.
- Такая гибкость важна для формирования/
- Рециклирования везикул



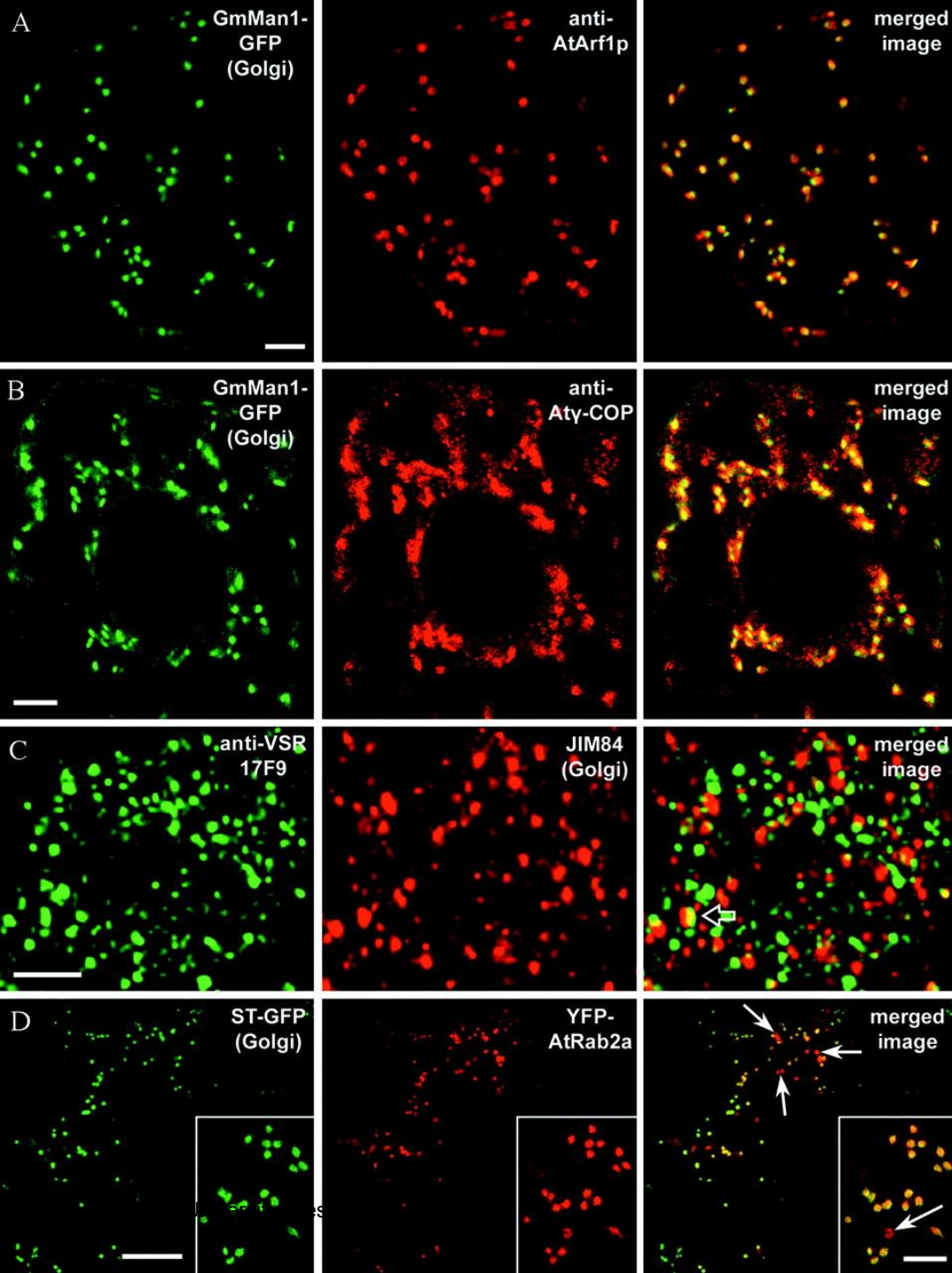
Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control

Federica Brandizzi & Charles Barlowe

Nature Reviews Molecular Cell Biology 14, 382-392 (June 2013)







Иммунофлуоресценция использовалась для изучения локализации белков АГ:

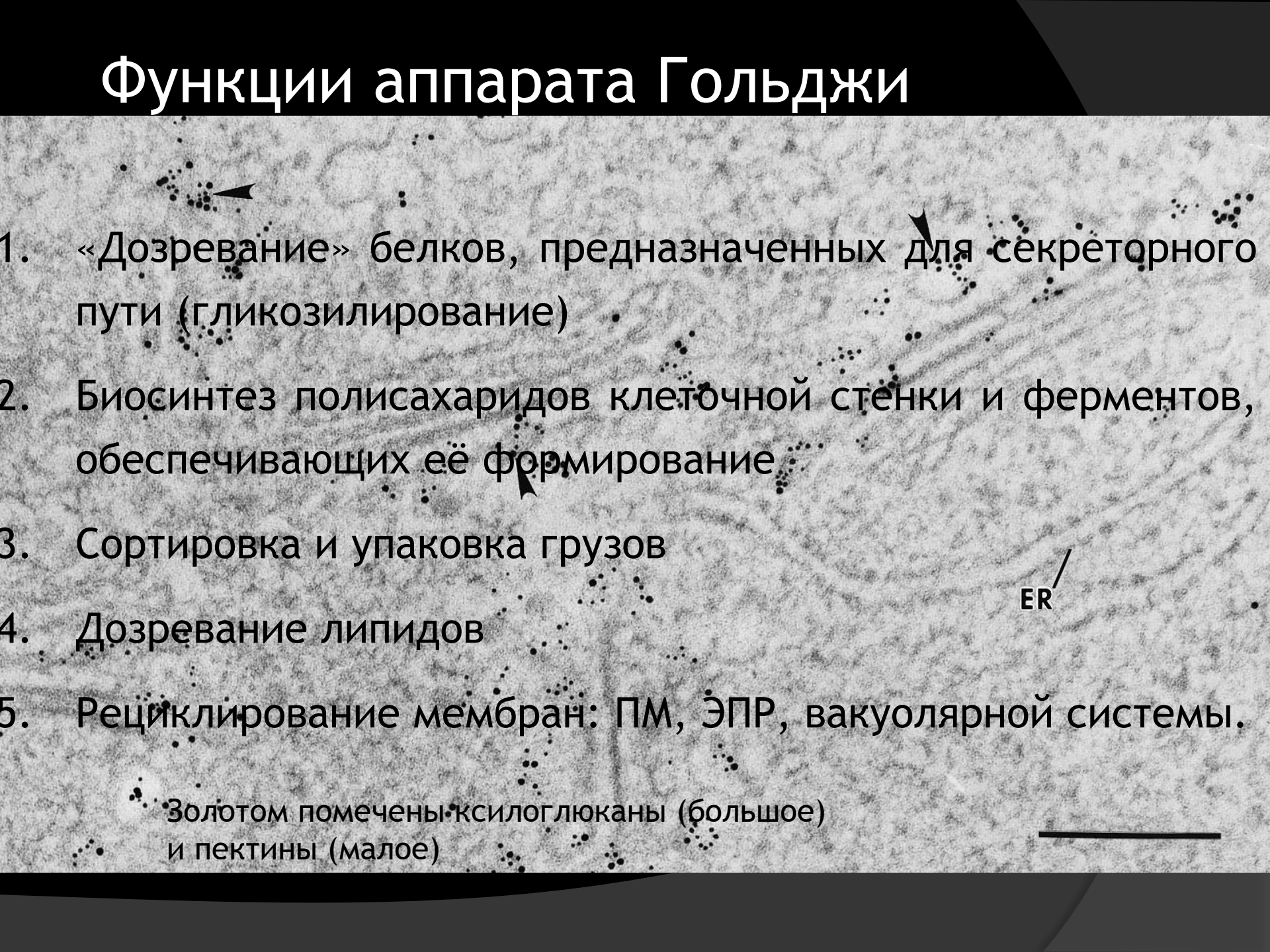
1. ARF1 (малая ГТФаза, компонент COP1-комплекса)
2. COP1
3. VSR (маркёр превакуолярных органелл)
4. Rab2 (малая ГТФаза)

ULLA NEUMANN et al. Ann Bot 2003;92:167-180

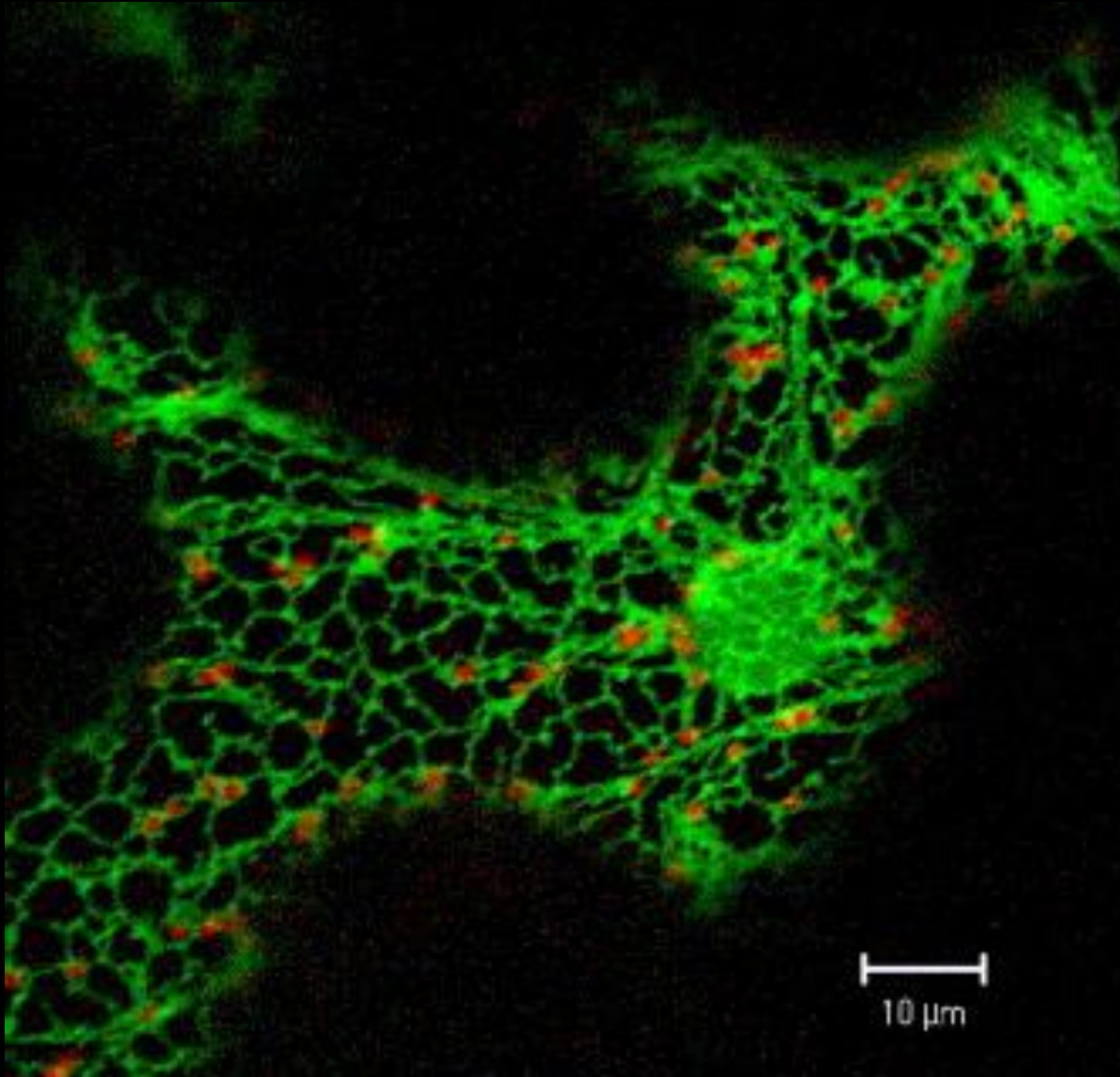
ANNALS OF  
BOTANY



# Функции аппарата Гольджи

- 
- The background image is a transmission electron micrograph of the Golgi apparatus. It shows several parallel, wavy membrane structures (cisternae) separated by narrow spaces. Numerous small, dark, electron-dense particles (gold particles) are scattered throughout the image, primarily concentrated in the spaces between the membranes. A label 'ER' with a line pointing to a membrane structure is visible on the right side. A horizontal scale bar is located at the bottom right.
1. «Дозревание» белков, предназначенных для секреторного пути (гликозилирование)
  2. Биосинтез полисахаридов клеточной стенки и ферментов, обеспечивающих её формирование
  3. Сортировка и упаковка грузов
  4. Дозревание липидов
  5. Рециклирование мембран: ПМ, ЭПР, вакуолярной системы.

Золотом помечены ксилоглюканы (большое)  
и пектины (малое)



Chris Hawes, Béatrice Satiat-Jeunemaitre

**The plant Golgi apparatus—Going with the flow**

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Volume 1744, Issue 2, 2005, 93–107

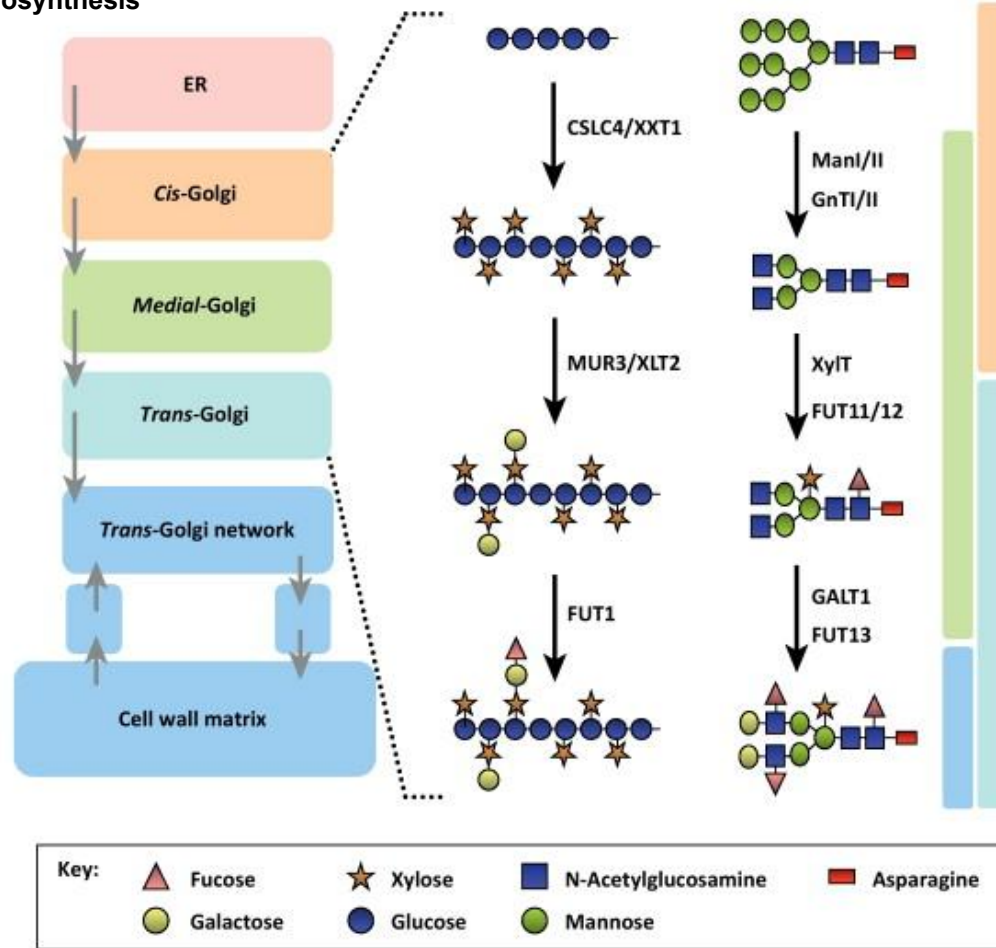


# Гликозилтрансферазы

- ◎ Задача - манипуляции с углеводным компонентом:
- ◎ - N-гликозилированных пептидов
- ◎ - Будущих полимеров клеточной стенки
- ◎ Это трансмембранные белки с активным центром в люмене АГ.
- ◎ В одной и той же цистерне могут идти различные реакции.
- ◎ Ферменты организуются в комплексы за счет белок-белковых взаимодействий.

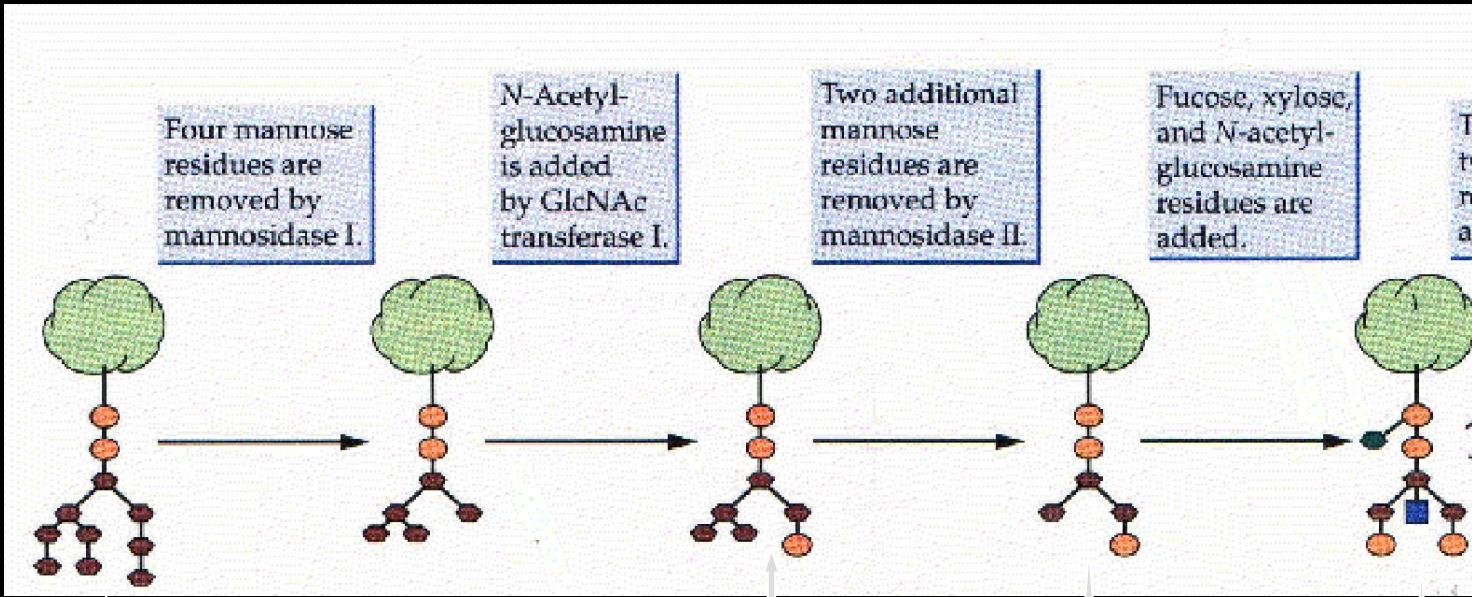
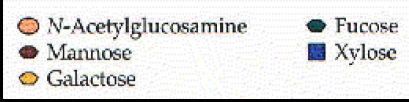
Ai Oikawa, Christian Havelund, Yumiko Sakuragi, Henrik V. Scheller

### Golgi-localized enzyme complexes for plant cell wall biosynthesis



TRENDS in Plant Science

- FUT,  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase;
- GALT1,  $\beta$ -1,2-galactosyltransferase;
- GnT, N-acetylglucosaminyltransferase; M
- an,  $\alpha$ -1,2-mannosidase;
- XylT,  $\beta$ -1,2-xylosyltransferase.
- CSLC4, cellulose synthase-like C4;
- FUT1,  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase 1;



**Маннозидаза I**  
отщепление 4 молекул маннозы

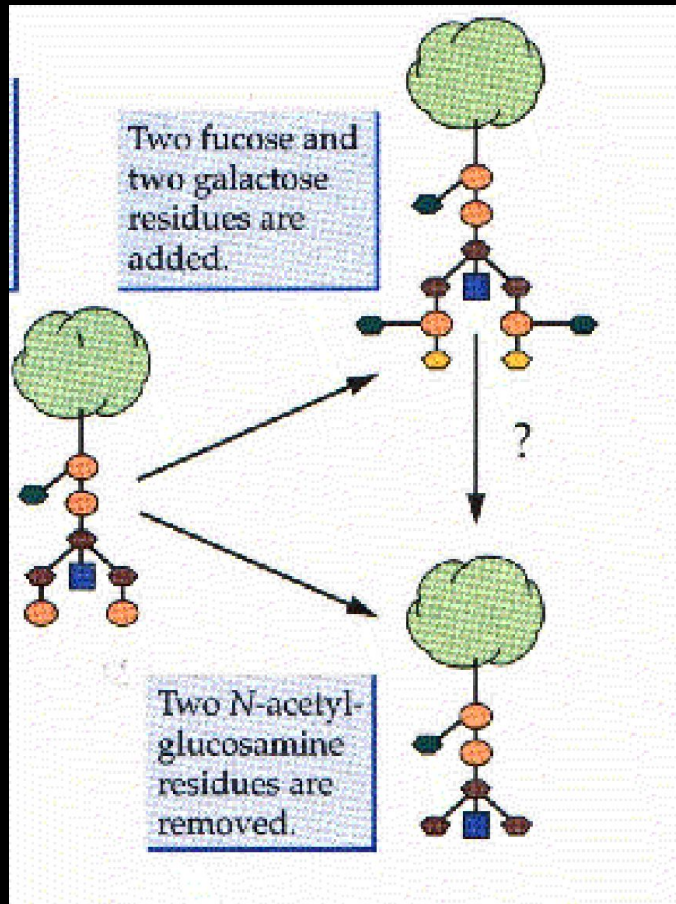
**GlcNAc-трансфераза I**  
присоединяет N-ацетилглюкозамин к одной из оставшихся молекул маннозы;

**Маннозидаза II** отщепляет еще два маннозных остатка;

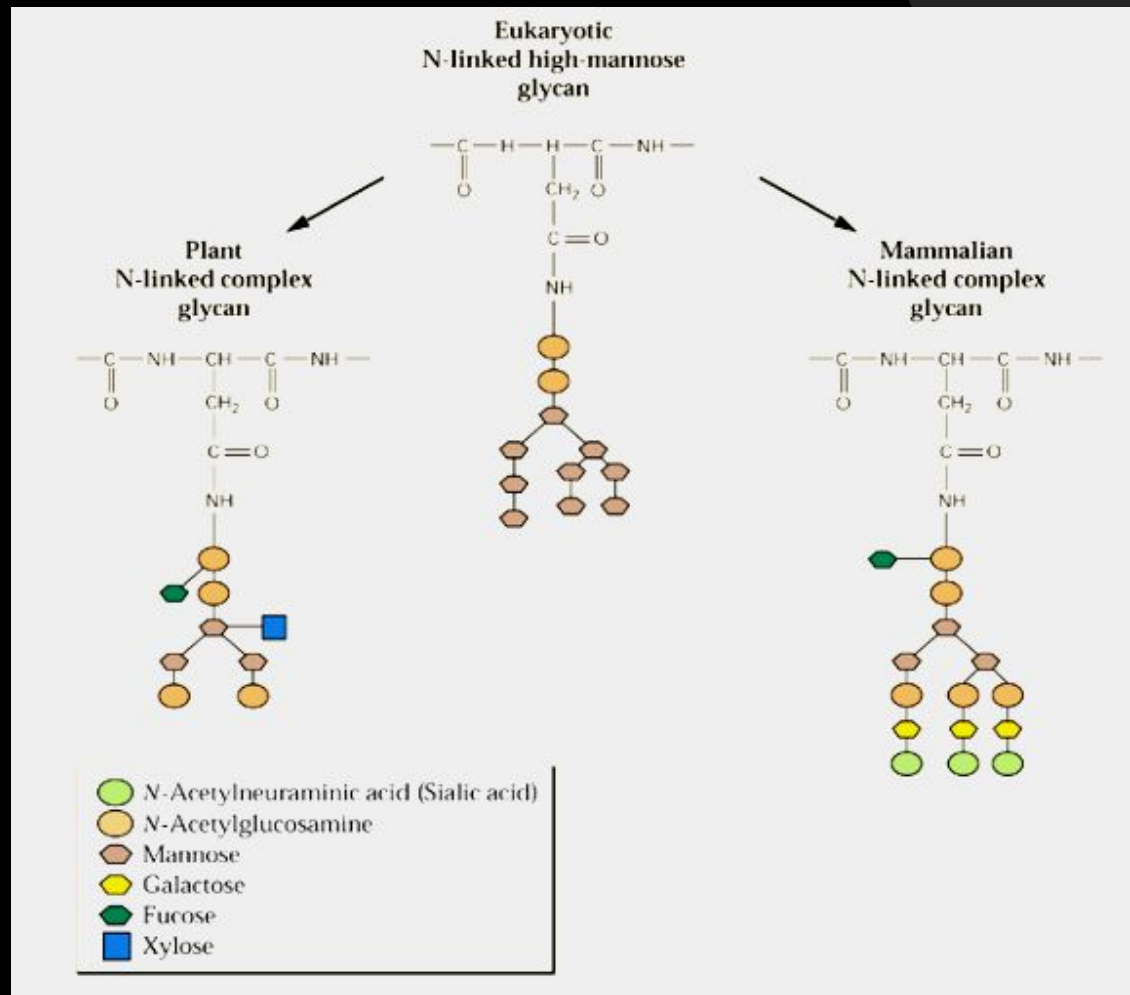
Присоединение фукозы, ксилозы и второй молекулы ацетилглюкозамина **GlcNAc-трансферазой II**



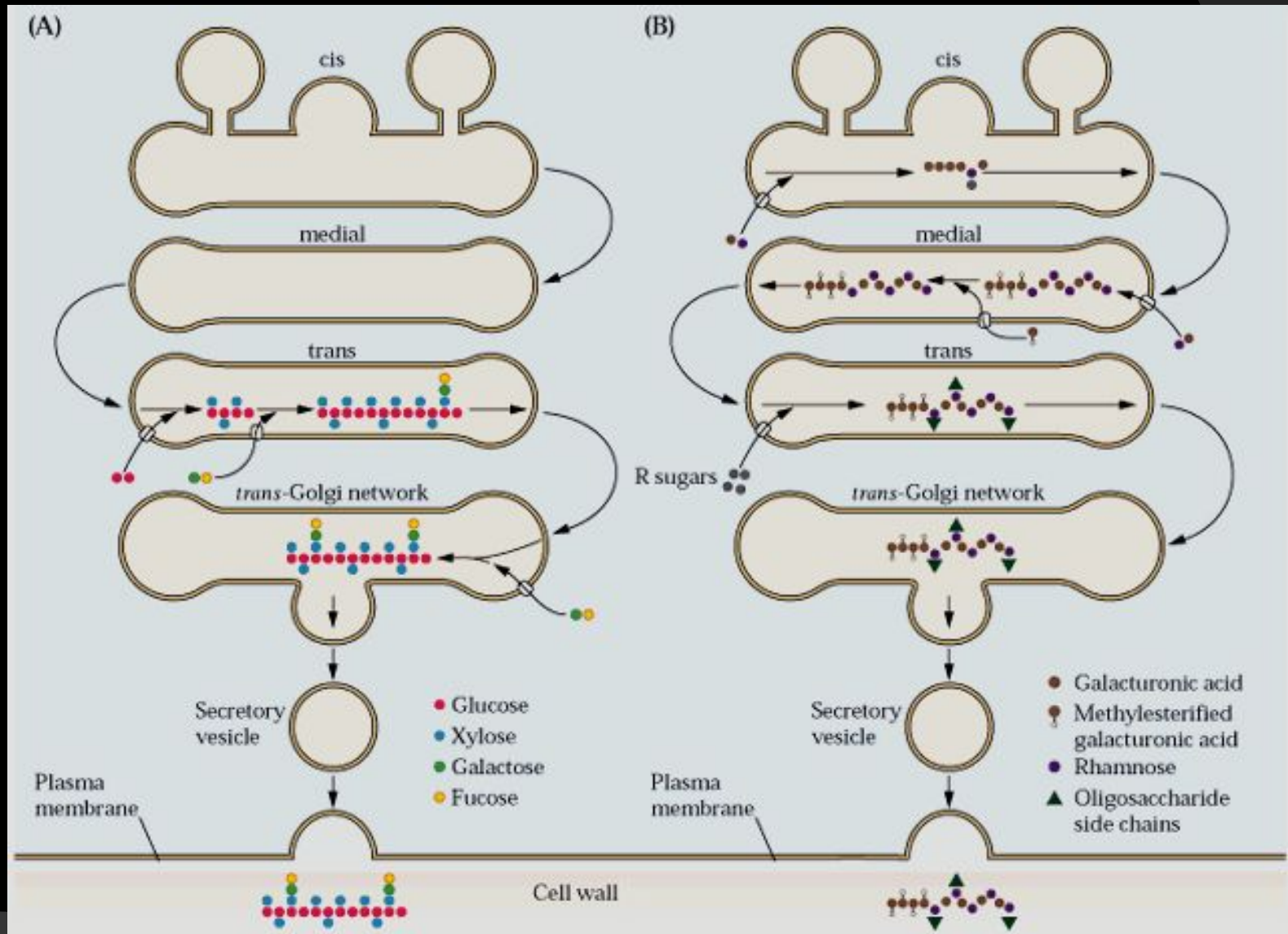




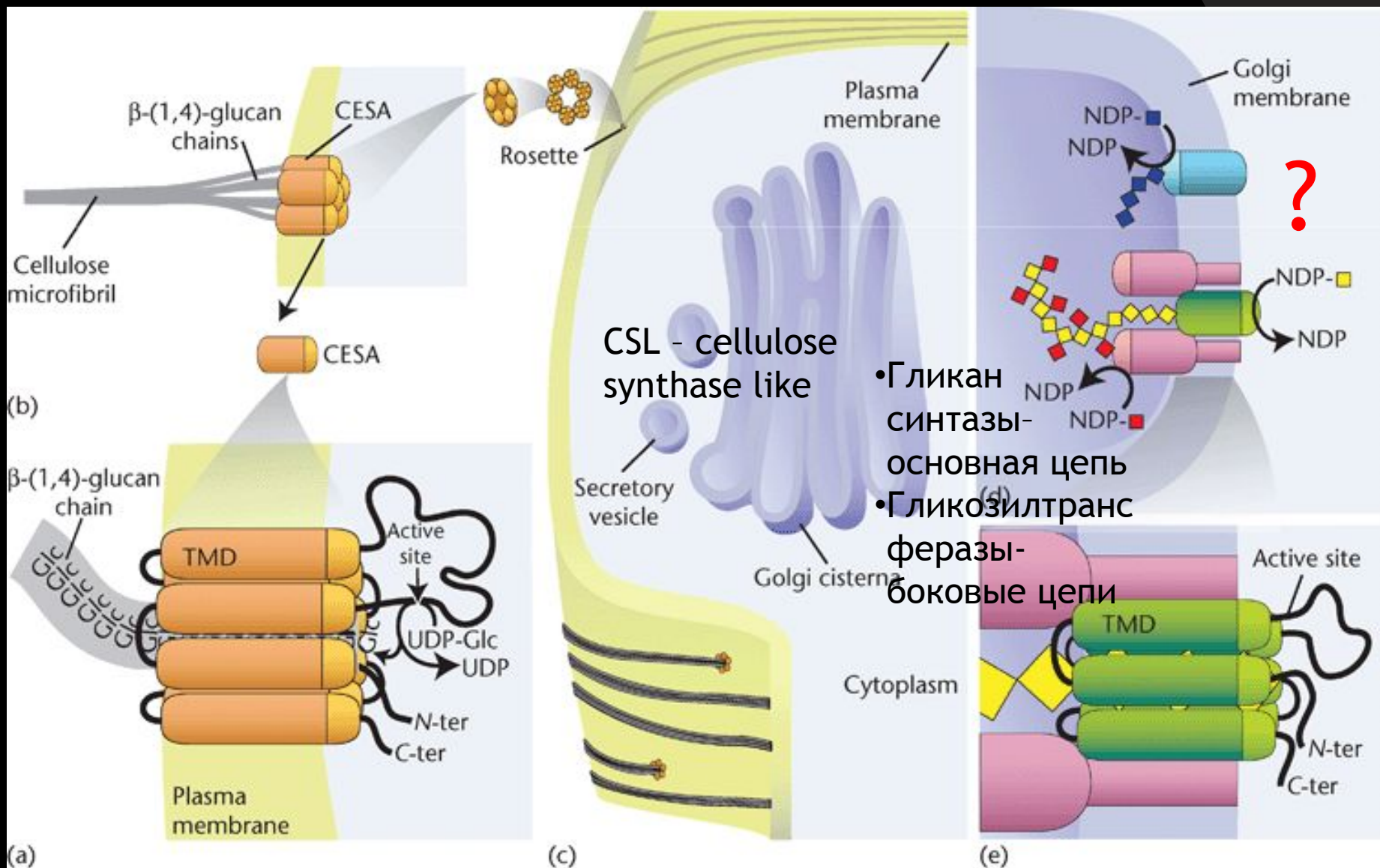
- N-Acetylglucosamine
- Mannose
- Galactose
- Fucose
- Xylose



# Биосинтез полисахаридов КС: гликанов и пектинов

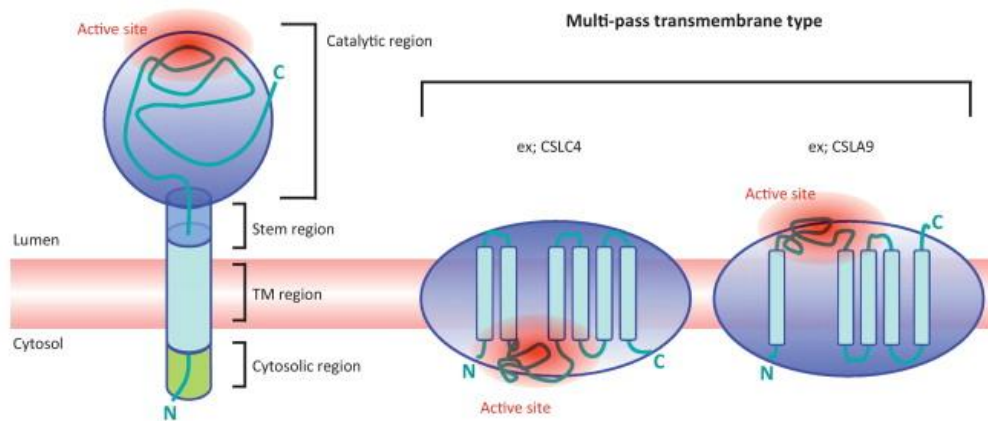


# Синтезы на ПМ и в АГ: аналогия?

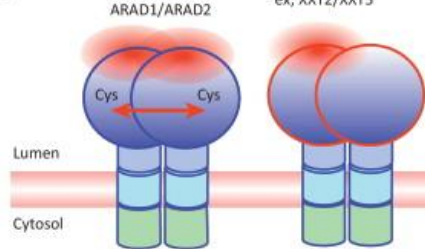




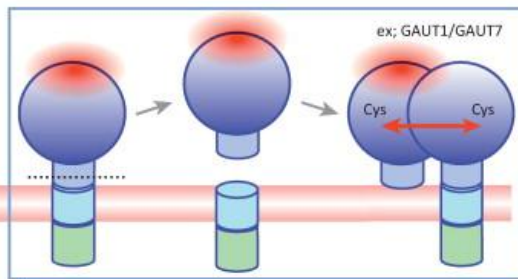
(a) Single-pass transmembrane type



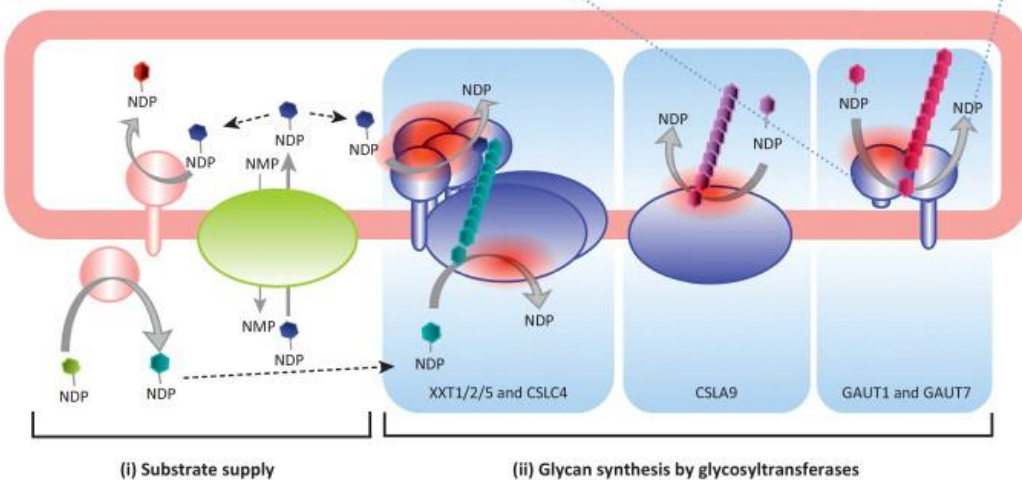
(b) ex: EXT1/EXT2 ARAD1/ARAD2 ex: XXT2/XXT5



(c)



(d)



- Гликозилтрансферазы могут иметь каталитическую часть на С-конце в люмене, трансмембранный домен (ТМД) и N-конец в цитозоле
- Другие белки имеют несколько ТМД.
- Между собой они взаимодействуют через цистеиновые остатки или нековалентные взаимодействия.
- Это помогает заякориваться некоторым ферментам, лишенных ТМД.
- Это помогает создавать мультифункциональные комплексы
- Это обеспечивает регуляцию активности ферментов
- Одни и те же ферменты могут входить в состав разных комплексов

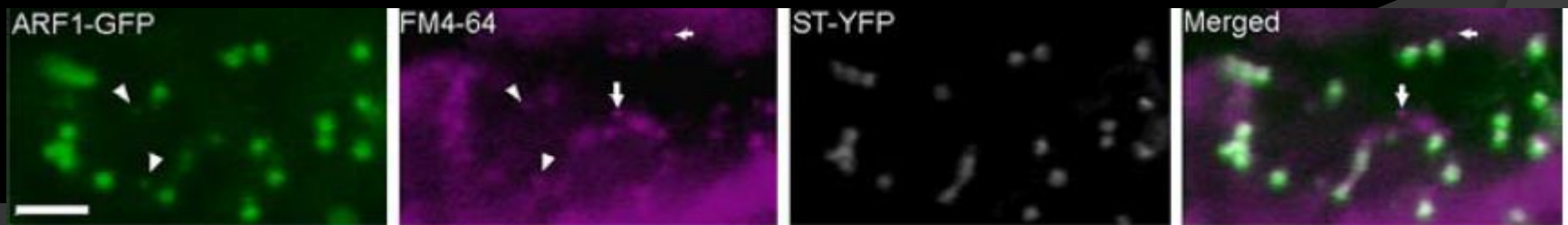
Как изучать направления и пути транспорта?

# Методы

# FM 4-64



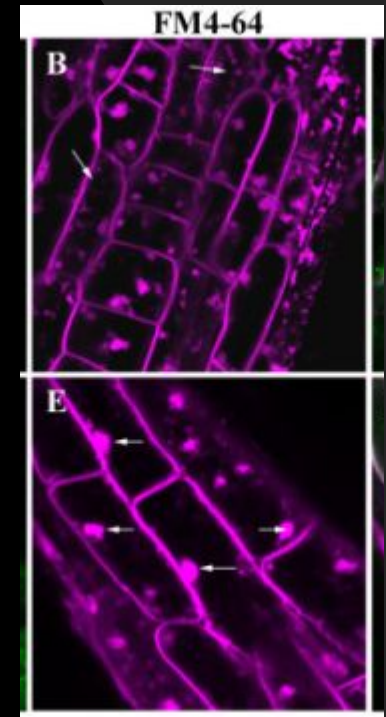
- Этот флуоресцентный краситель липофилен, поэтому связывается с плазматической мембраной и проникает в клетку только путём эндоцитоза, а затем рециклирует, возвращаясь к ПМ.
- Таким образом, следя за движением метки, можно наблюдать «маршрут» везикулярного транспорта.





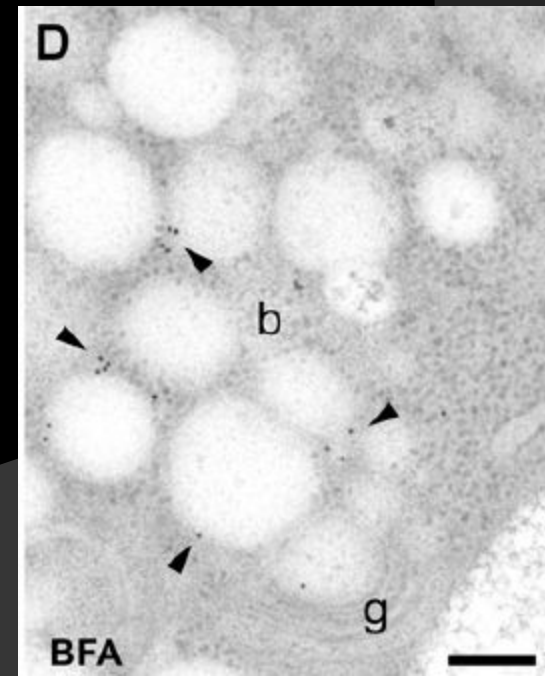
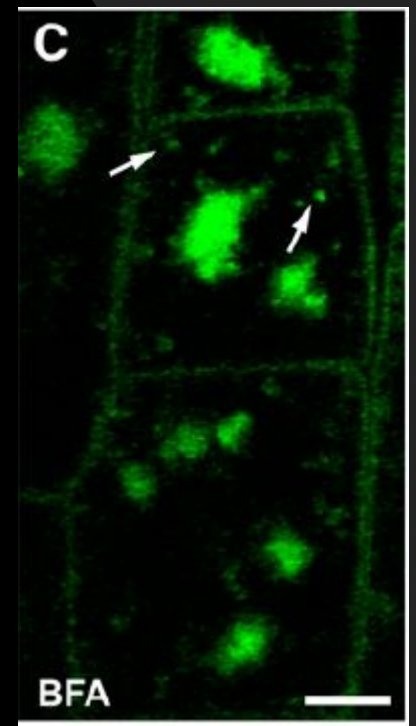
# ВФА-bodies: ингибиторный анализ

- ⊙ Давным-давно для изучения секреции начали использовать Брефельдин А - «ингибитор секреции».
- ⊙ Он останавливает транспортные процессы, приводя к образованию ВФА-телец, или агрегатов.
- ⊙ Изучение этих телец предоставляет массу информации о связи между органеллами эндомембранной системы.
- ⊙ Например, тельца из АГ и ТГС лежат отдельно, и те белки, которые шли по пути эндоцитоза, остаются в ТГС, но не в АГ.

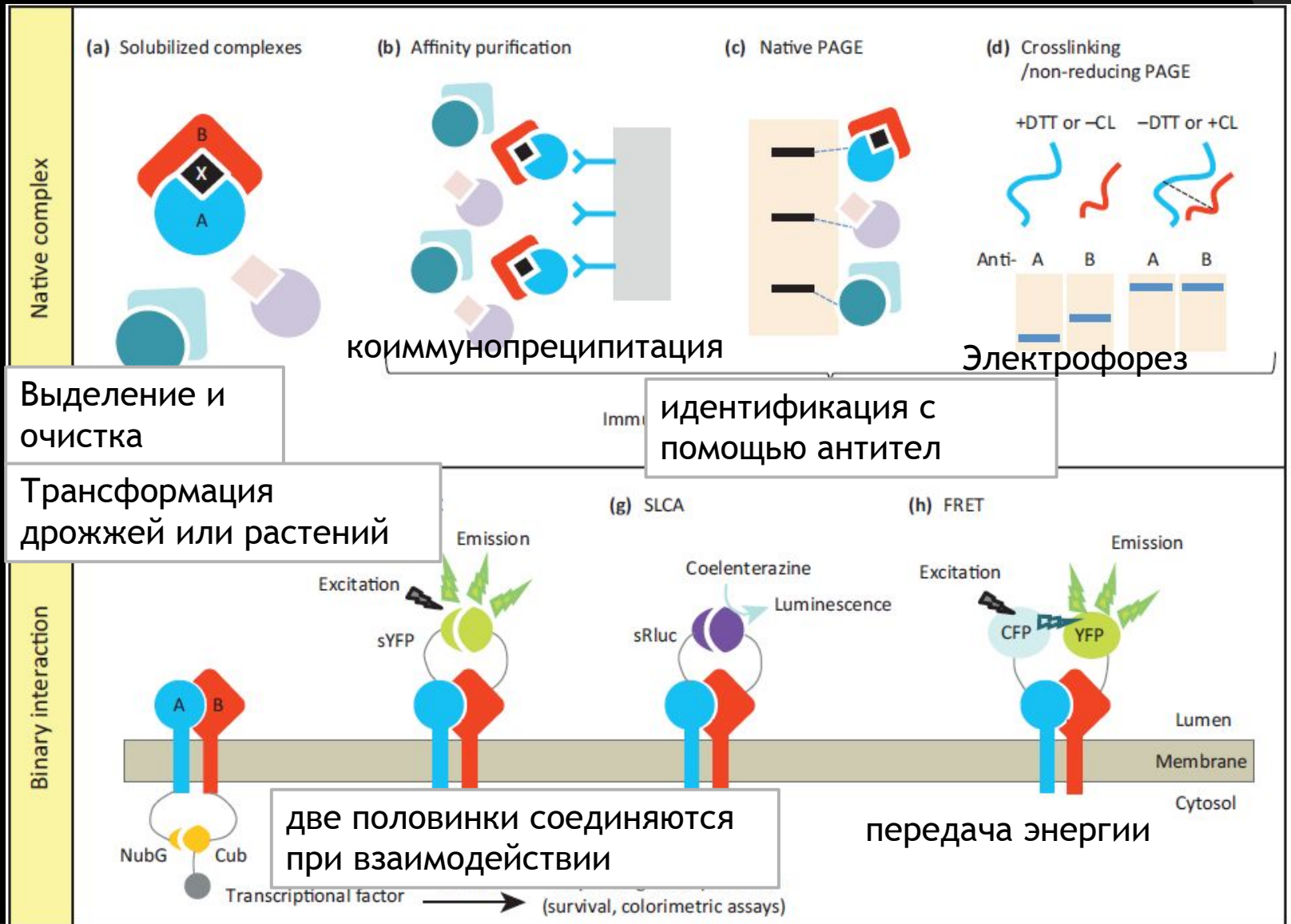


# Брефельдин А

- ⊙ Механизм действия этого ингибитора грибного происхождения на данный момент детально изучен:
- ⊙ Он предотвращает активацию ГТФазы ARF1 за счет блокирования фактора обмена нуклеотидов (GEF).
- ⊙ При этом практически все эндомембранные структуры оказываются в составе BFA-телец.



# Как изучать белок-белковые взаимодействия?





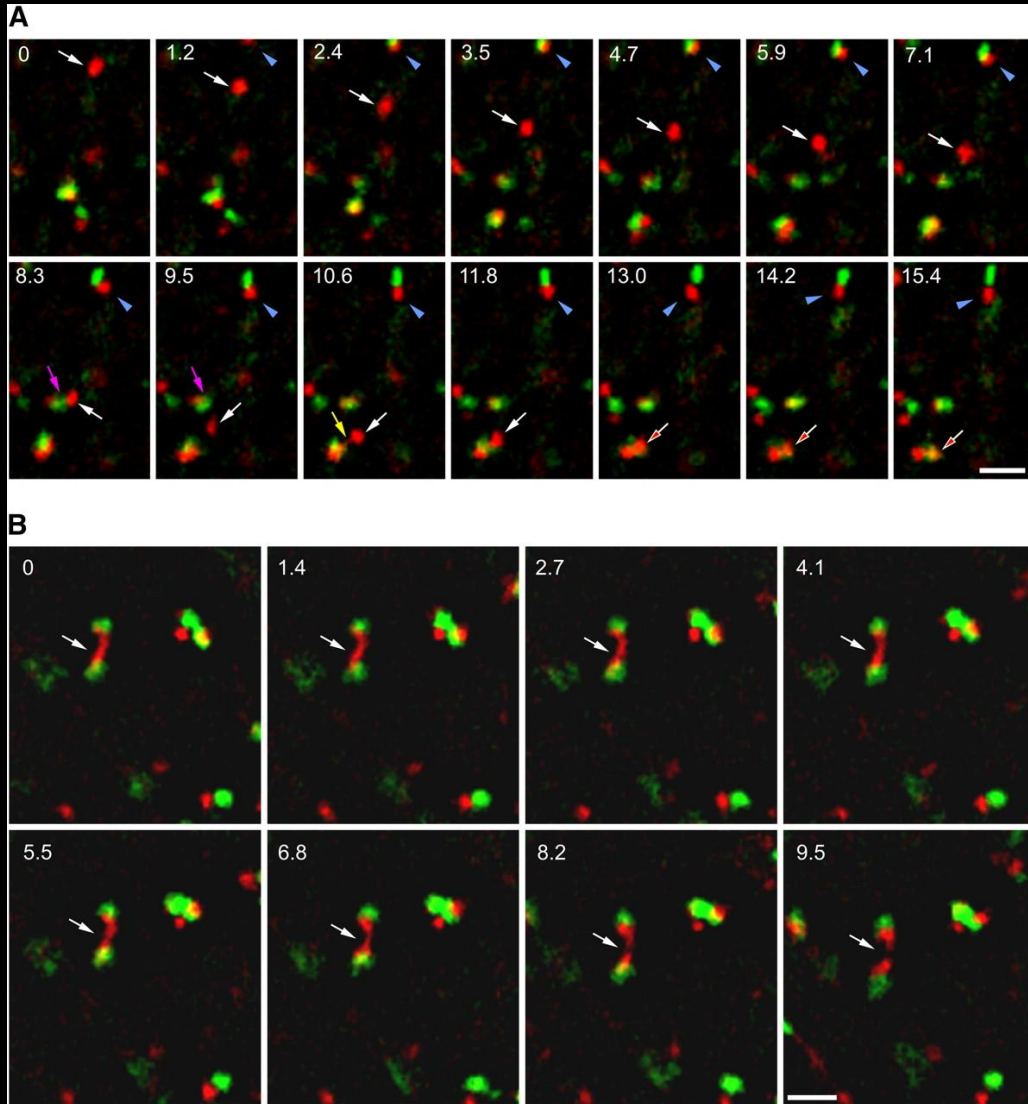
Секреторный путь. Эндоцитозный путь.  
Дополнительные органеллы.

# ПОСТ-ГОЛЬДЖИ ТРАНСПОРТ

# Транс Гольджи Сеть

- ◎ Также носит название «ЕЕ» (early endosome)
- ◎ Двигается независимо от АГ и лишь временно останавливается около одного из комплексов
- ◎ Участвует в рециклировании мембран
- ◎ Через TGN проходят белки как экспортные, так и идущие в вакуоль на дегградацию.

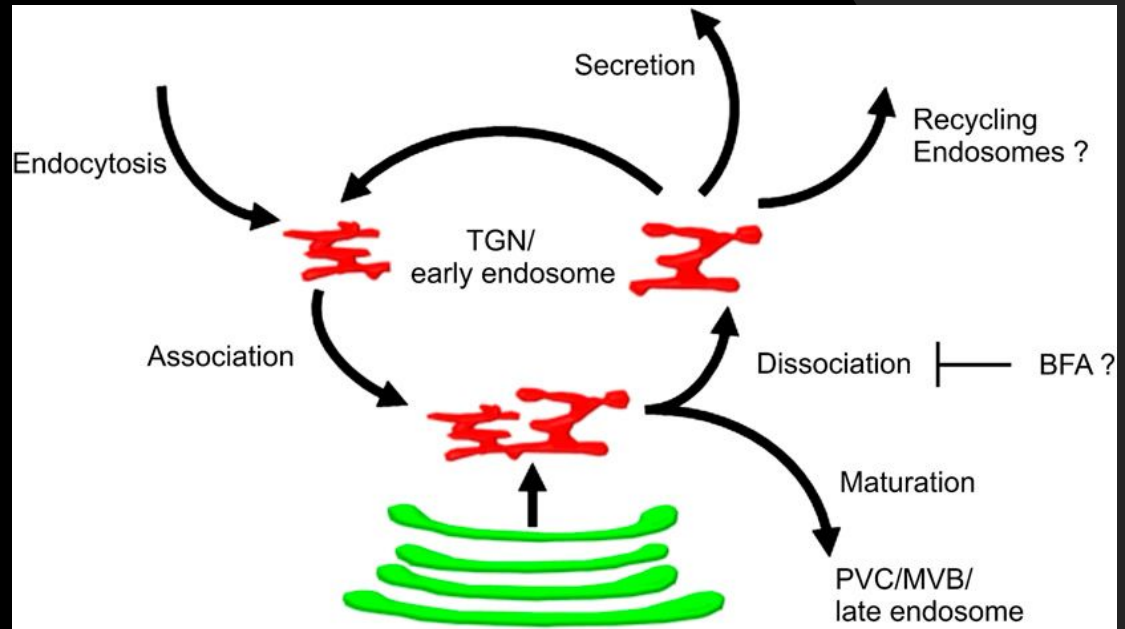
# Мобильная и независимая



- ТГС движутся, отмечены события взаимодействия как с АГ, так и между собой (гомотипичная ассоциация)
- Отмечены случаи «диссоциации»
- Происхождение ТГС от АГ подтверждено ингибиторным анализом.

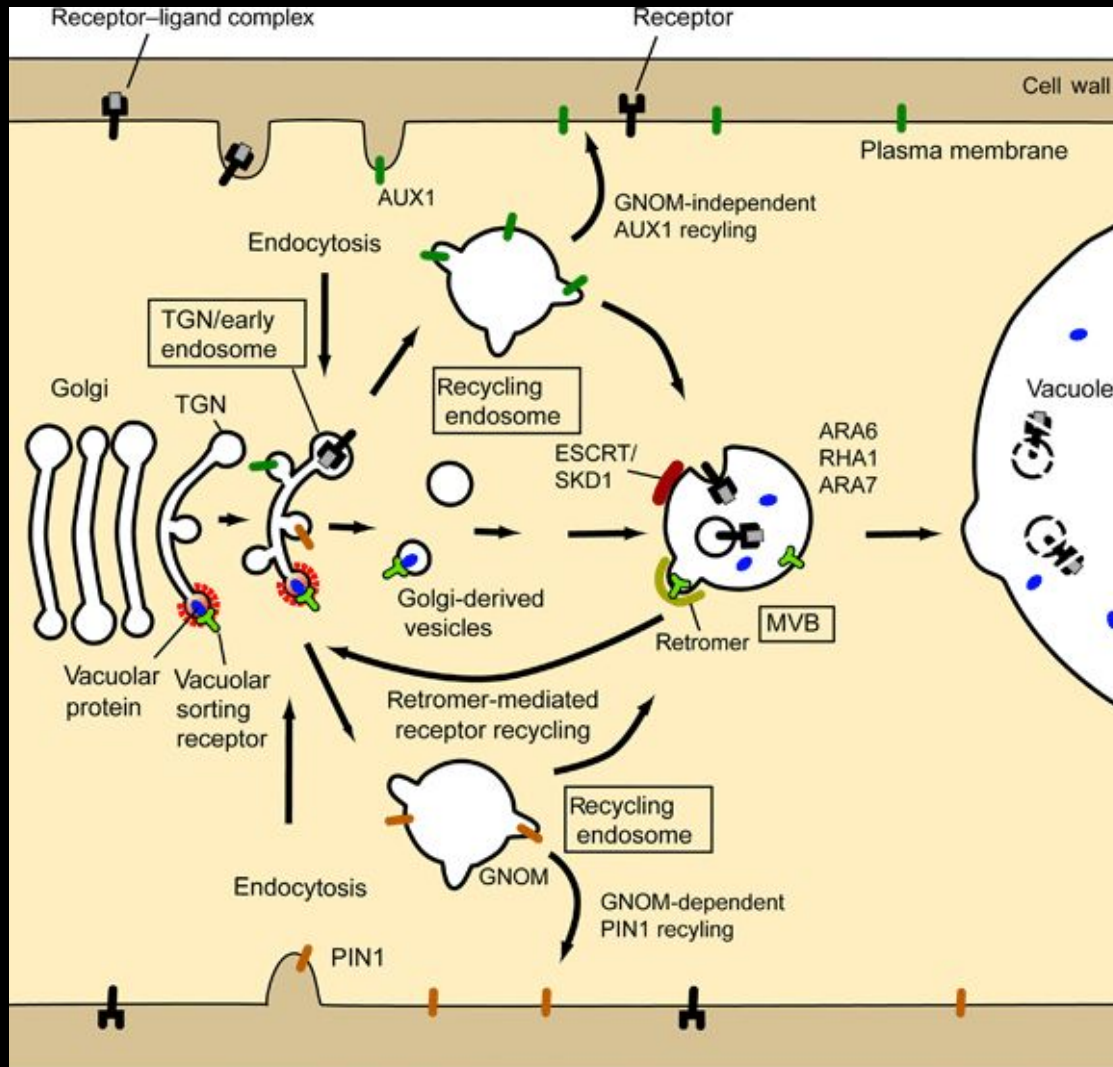


# Откуда и куда?



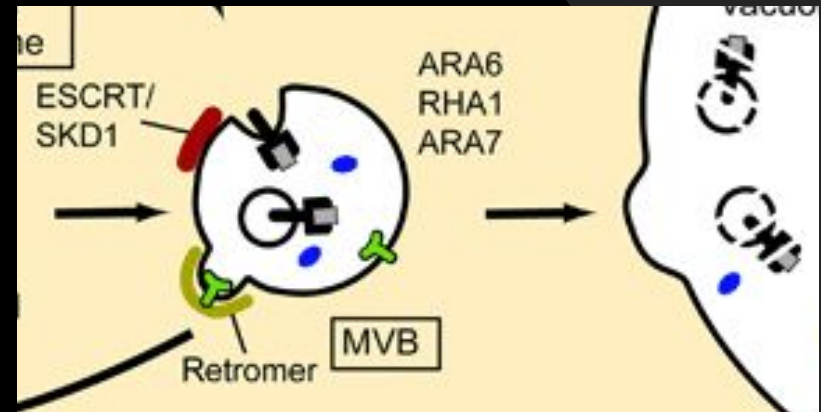
- ◎ С помощью иммуноцитохимии было показано, что через ТГС проходят все белки секреторного пути
- ◎ Также через ТГС проходят все белки, попавшие в клетку путём эндоцитоза и направляющиеся на деградацию в превакuoloлярный компартмент.

# Сложные пути эндосом



- ТГС принимает посылки от ПМ, посланные путём эндоцитоза
- Рециклирование мембранных белков происходит минимум 2-мя путями с помощью «рециклирующих эндосом».
- В ПВК попадают белки как из АГ (новые), так и из эндосомных компартментов (старые).

# ПреВакуолярный Компартмент



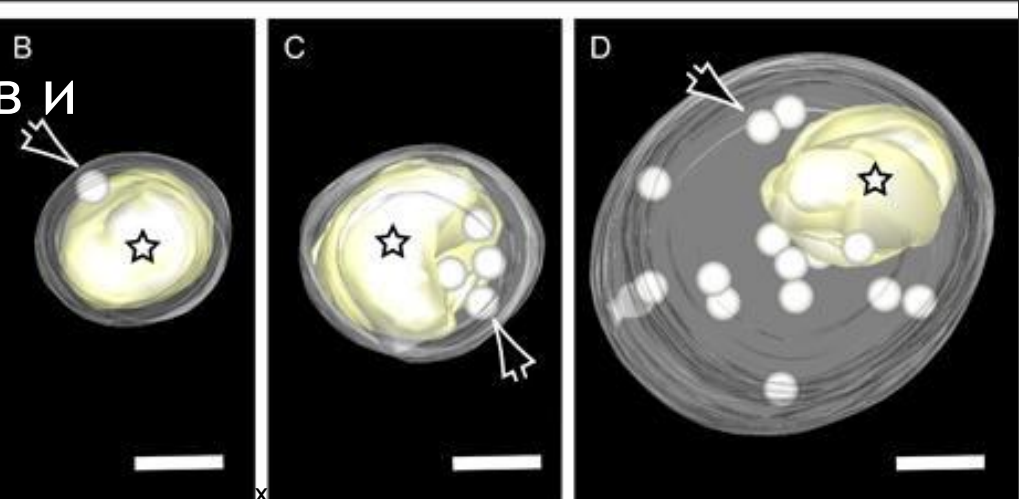
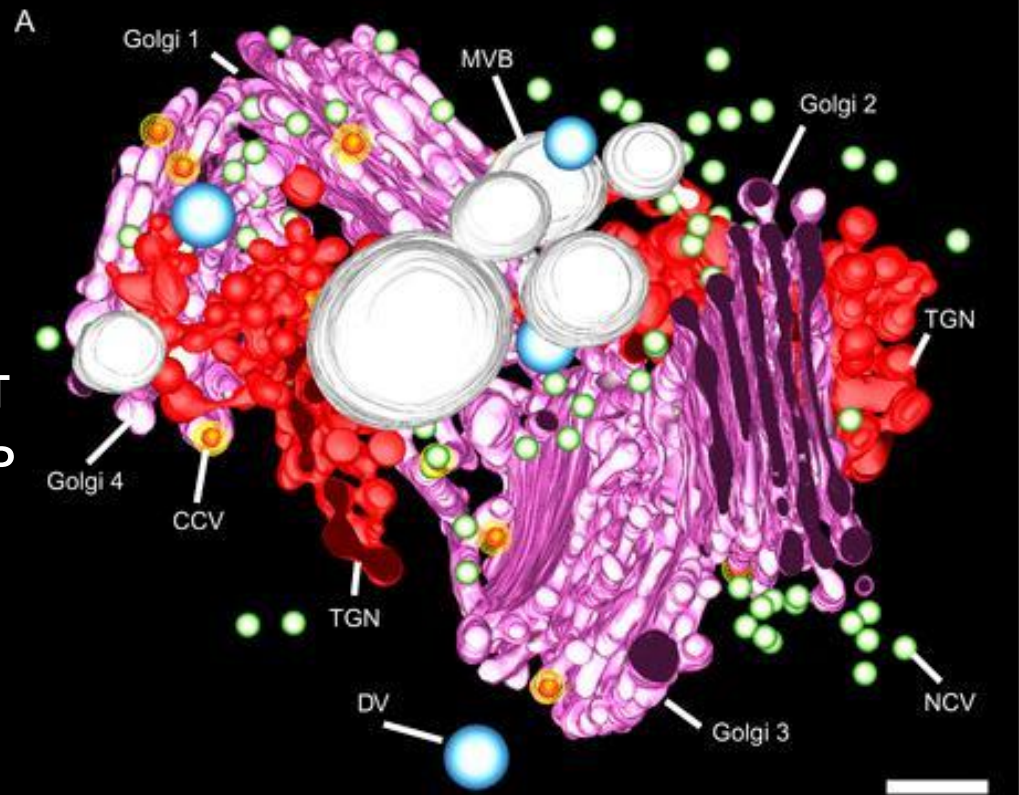
- ◎ ПВК получил свое второе название МВТ - мультивезикулярное тело - благодаря своей способности образовывать «внутренние везикулы» (с помощью ESCRT). Они содержат белки ПМ, подлежащие деградации.
- ◎ После слияния с вакуолью эти везикулы постепенно разрушаются.
- ◎ *Ретромерный комплекс* служит для выявления и рециклирования служебных белков - рецепторов вакуолярных грузов. Они возвращаются в ТГС.



# ПВК удалось

## «увидеть»

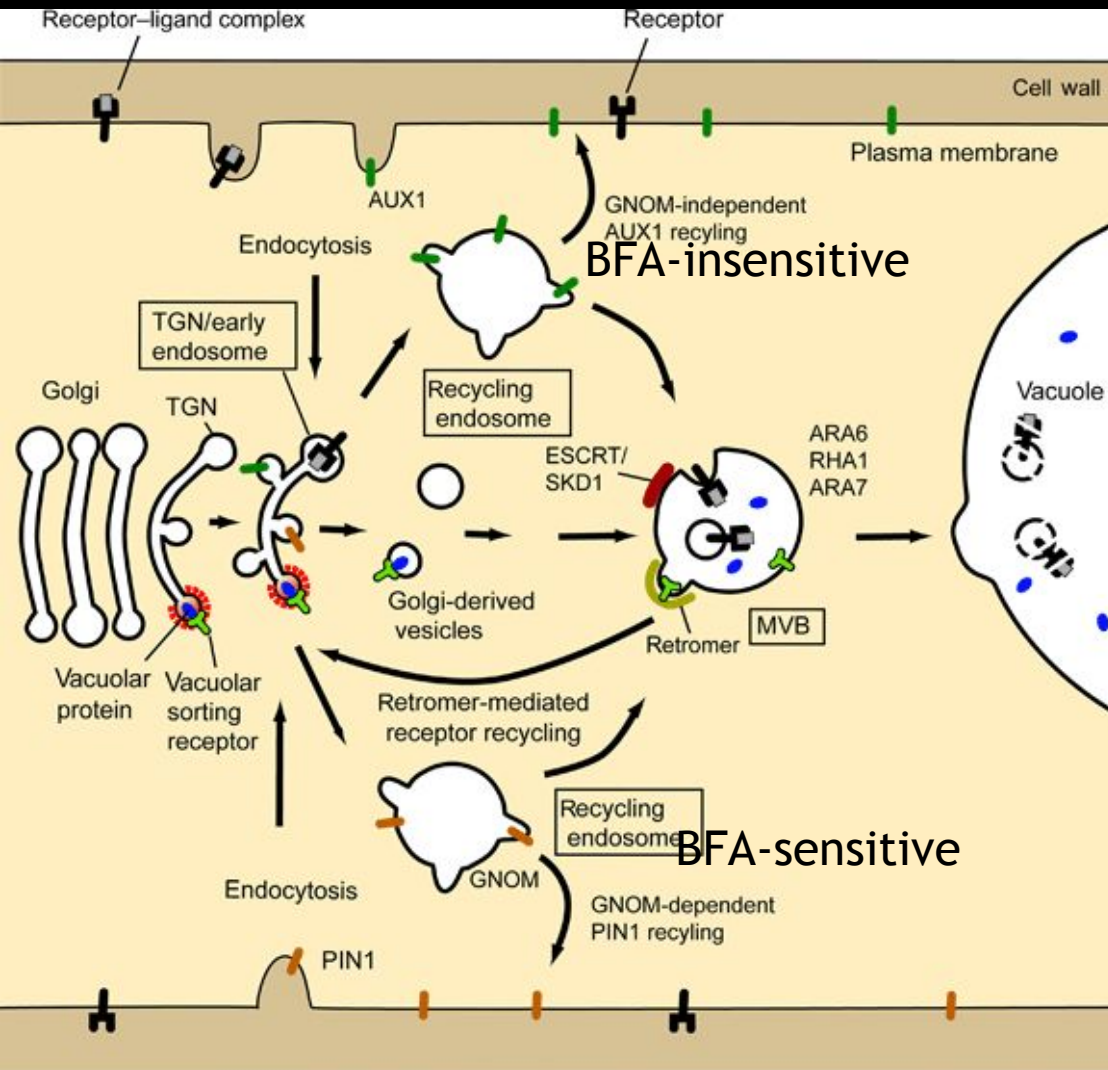
- Аппараты Гольджи + ТГС
- DV - dense vesicles - несут запасные белки в вакуоль
- CCV - clathrin-coated vesicles - выполняют все остальные перемещения
- MVB - превакуолярный компартмент
- Ниже - ПВК, содержащие агрегаты запасных белков и внутренние везикулы.
- ПВК образуются при слиянии везикул АГ, содержащих запасные белки (DV) и протеазы (CCV).



# Значение эндоцитоза

- Эндоцитоз и эндосомы играют ключевую роль в дифференциации зародыша, гравитропизме, дифференциация эпидермиса, устьичных движениях, защите от патогенов и др.
- Особенность растительных клеток - в разнообразии транспортных путей и вакуолей. Это разнообразие ведёт как к увеличению количества белков, участвующих в процессах, так и к их многофункциональности.
- *Конститутивное рециклирование* - постоянный трафик между эндосомой и ПМ, поддерживающий состав белков ПМ.
- *Индукцибельное рециклирование* - в ответ на сигнал, например, гормональный, - позволяет быстро изменять состав белков ПМ.

# Примеры рециклирования



Наиболее изученный пример рециклирования у растений - белки транспорта ауксина PIN1 и AUX1. Это *конститутивное рециклирование*, причём эти 2 белка задействуют 2 разных пути: BFA-чувствительный и BFA-нечувствительный. Пример *индуцибельного рециклирования* - закрытие устьиц, при котором эндоцитоз белка  $K^+$ -канала активируется абсцизовой кислотой.

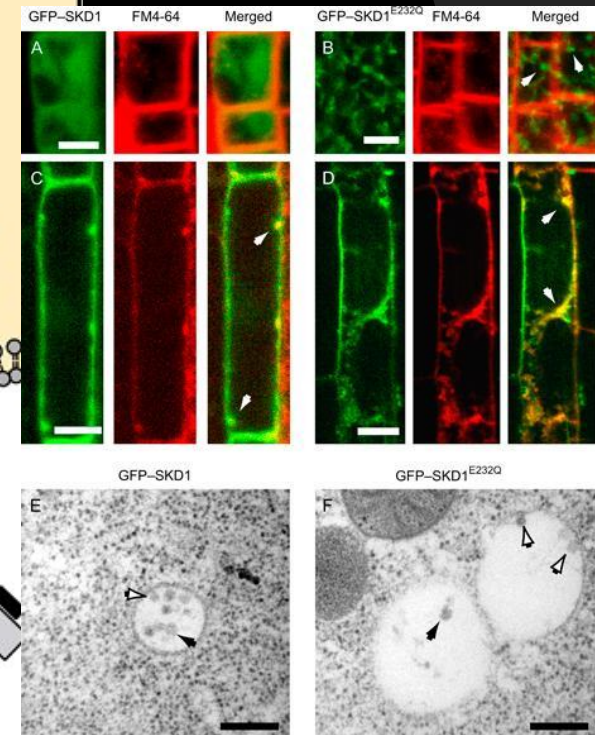
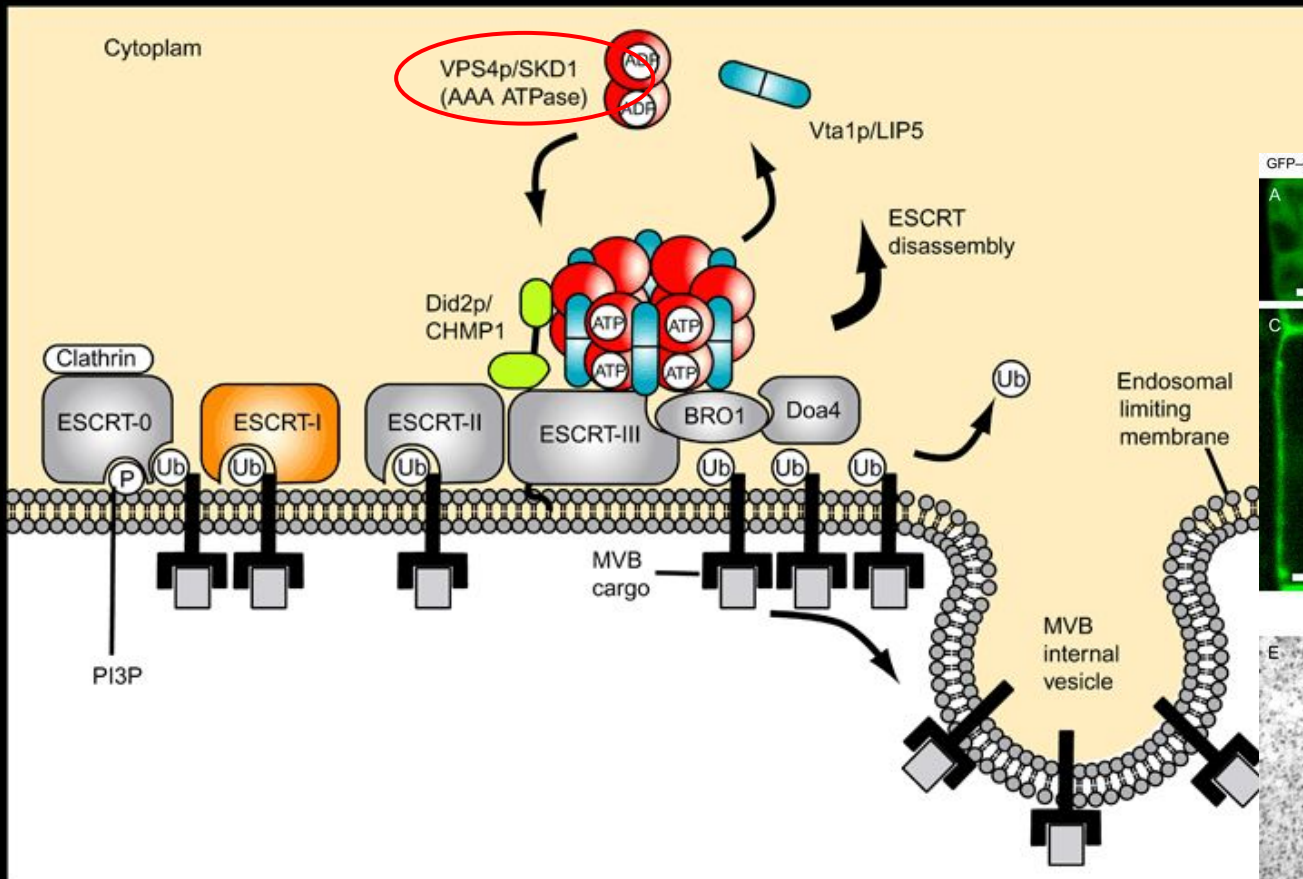
# На деградацию!

- ◎ Сортировка белков ПМ в эндоцитозные везикулы и далее во внутренние везикулы ПВК - важный этап отрицательной регуляции рецепторов, вовлеченных в физиологические процессы.
- ◎ Инвагинации в ПВК - особый случай образования везикул, поскольку во всех остальных случаях везикулы формируются в цитоплазме.
- ◎ Для образования инвагинации нужно проставление метки - убиквитинирование белка-рецептора.



# Как образуются «внутренние везикулы»?

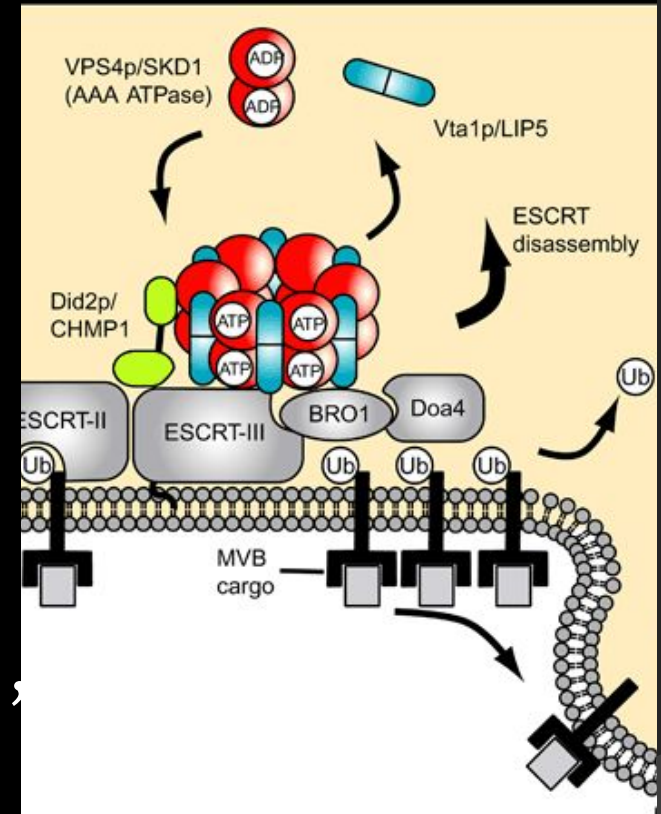
Traffic  
Volume 9, Issue 10, pages 1589-1598



- Образование везикул обеспечивает endosomal sorting complex required for transport (ESCRT).

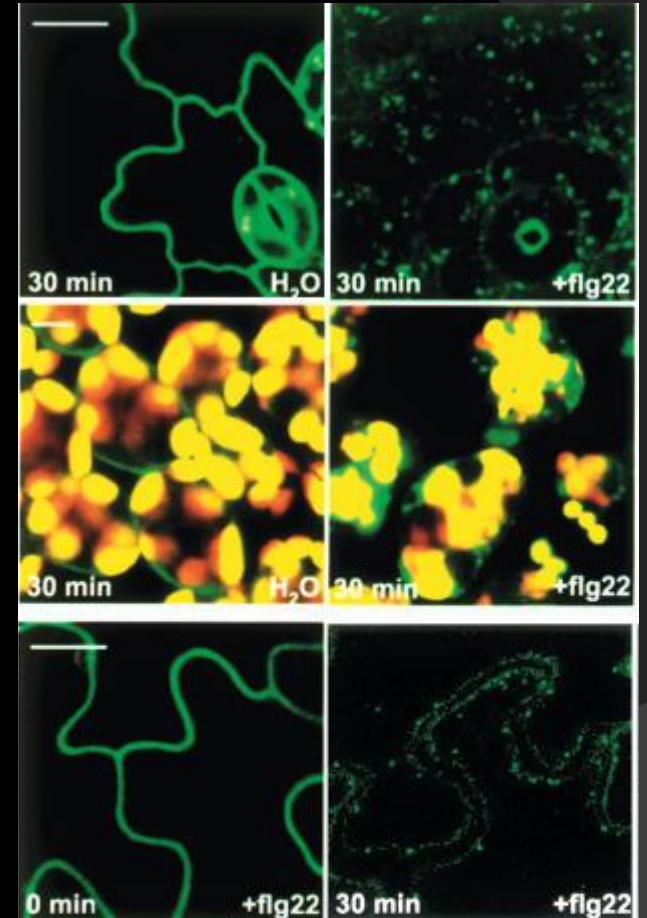
# Как образуются «внутренние везикулы»?

- ⊙ Меченый убиквитином рецептор попадает в эндосому и инициирует сборку клатриновой шубы.
- ⊙ В этом участвует комплекс ESCRT и АТФаза Vps4p/SKD1, которая в АТФ-связанной форме прикреплена к мембране, а в АДФ-связанной - растворима.

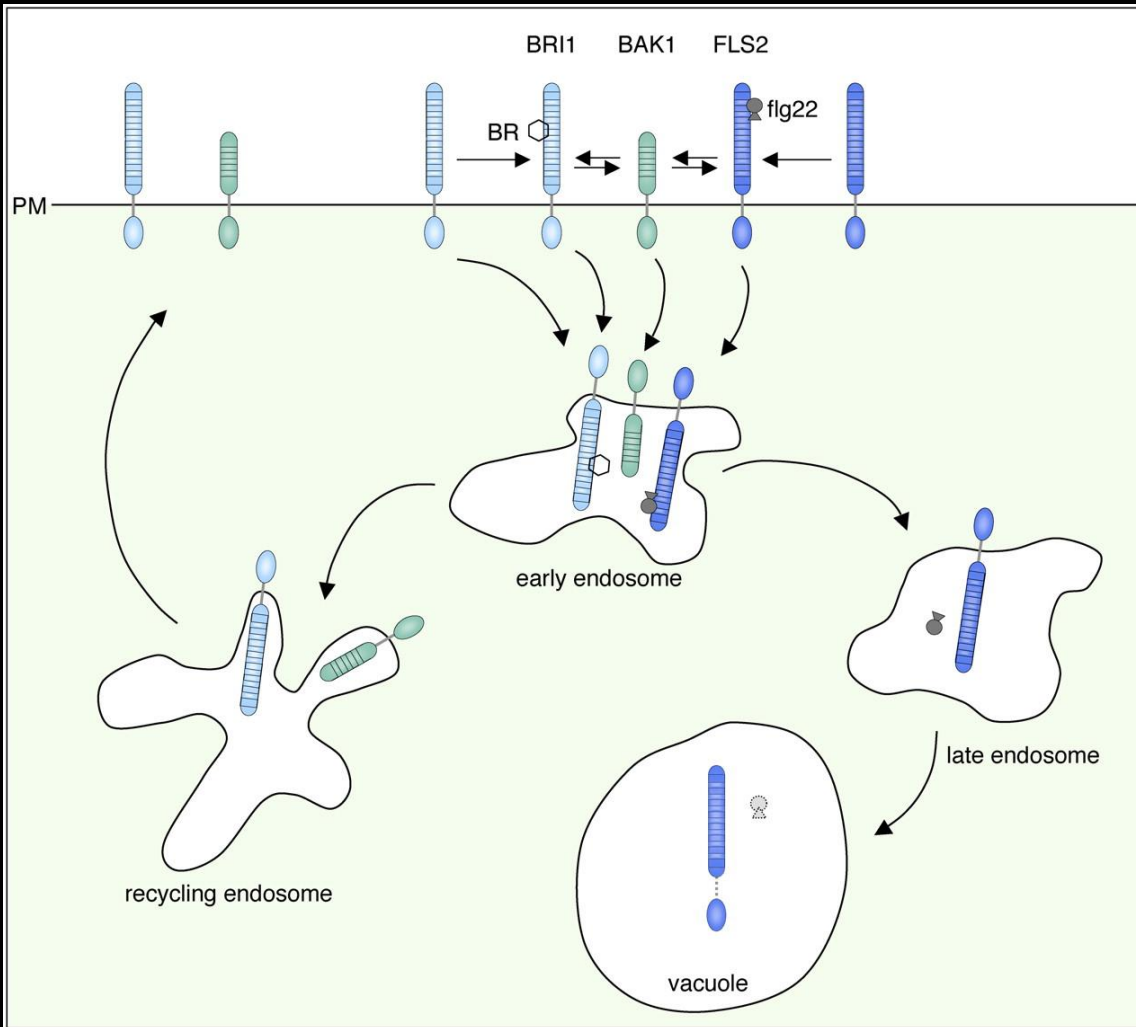


# Эндосомы и СИГНАЛИНГ

- ⊙ Эндоцитоз не только помогает убирать с поверхности активированные рецепторы
- ⊙ Он также может доставлять эти рецепторы к тому месту, где сигнал будет передан и усилен.
- ⊙ Пример: FLS2 (flagellin sensing) - киназа, которая активируется в ответ на заражение, и инициирует вторичный ответ после ЭНДОЦИТОЗА.



# Эндосомы и СИГНАЛИНГ



- ◎ Модель эндоцитоза BRI1 и FLS2 с участием корцептора BAK1.
- ◎ После ранней эндосомы их пути разделяются.

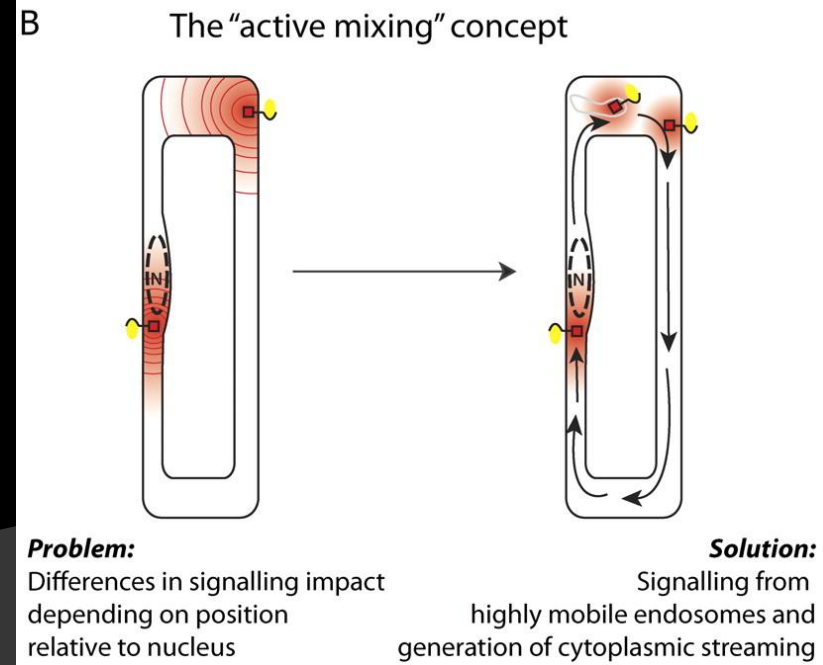
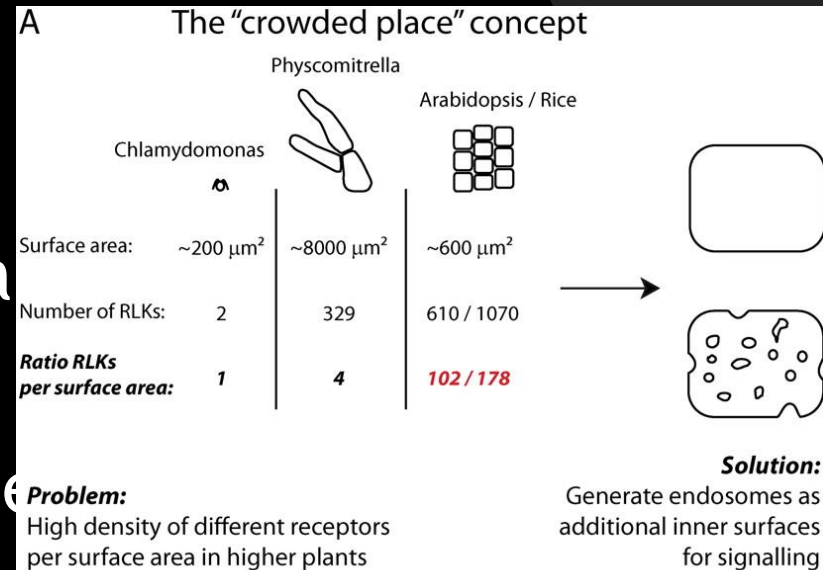
Niko Geldner, and Silke Robatzek Plant Physiol.  
2008;147:1565-1574



# Происхождения эндосомного сигналинга

«Столпотворение»?  
рецепторам не хватает места  
на поверхности клетки;  
эндоцитоз создаёт  
дополнительные «посадочные  
места».

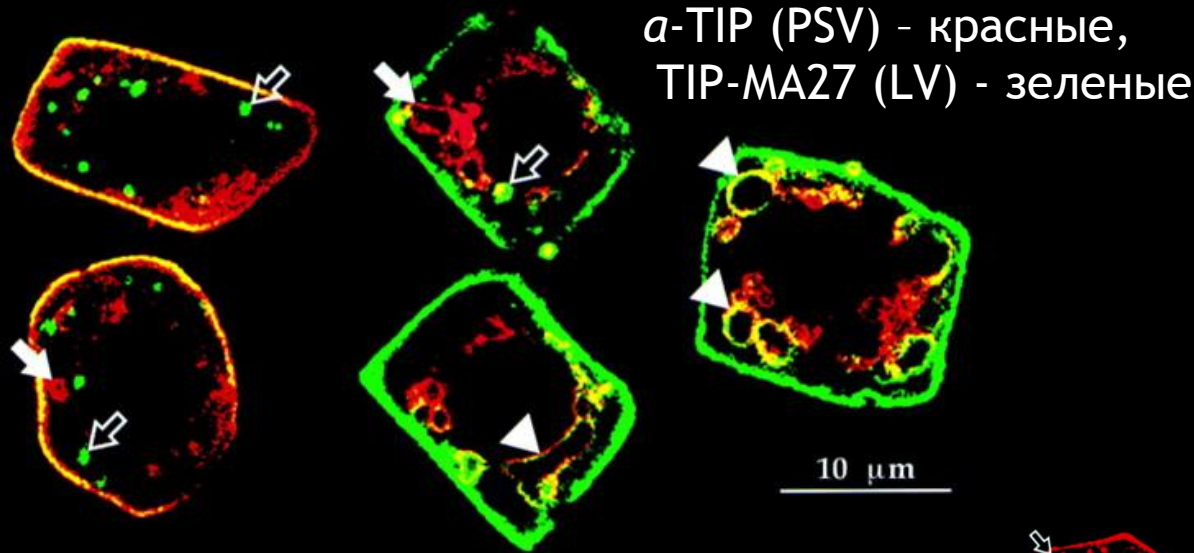
«Активное перемешивание»?  
Рецепторы находятся далеко  
от ядра, и трансдукция  
сигнала зависит от  
диффузии; эндоцитоз  
превносит активную  
компоненту («доставка  
сигнала»).



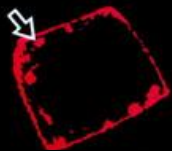
# Вакуоли: 2 или 1

- Известно 2 основных типа вакуолей: LV (литическая) и PSV (белок-запасающая). Их локализацию изучали с помощью GFP-слитых аквапоринов-маркёров  $\alpha$ -TIP (PSV) и  $\gamma$ -TIP (LV) или антител к ним.
- Белки, которые направляются в литическую вакуоль, имеют сигнальную последовательность ssVSSs, которая взаимодействует с рецептором семейства вакуолярных сортеров (VSR).
- Белки, предназначенные для хранения, имеют другой сигнал (ctVSSs), который связывается с другим рецептором (RMR).

# Иногда их чётко 2



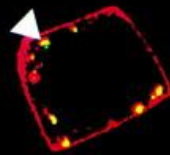
Ma27



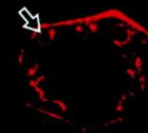
Aleurain



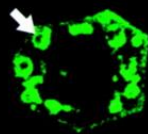
Both



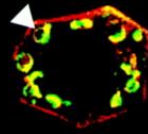
$\alpha$ -TIP



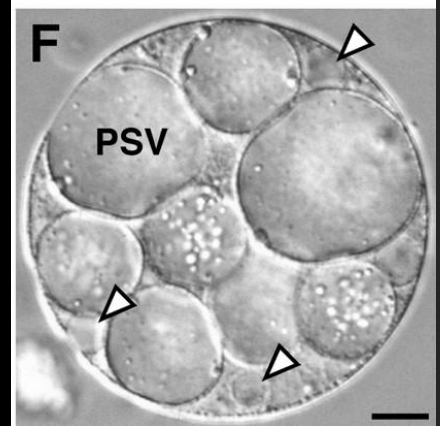
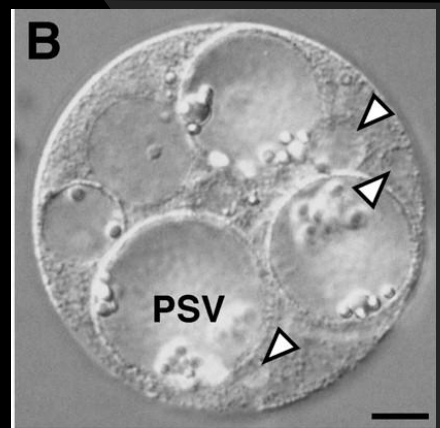
BL



Both



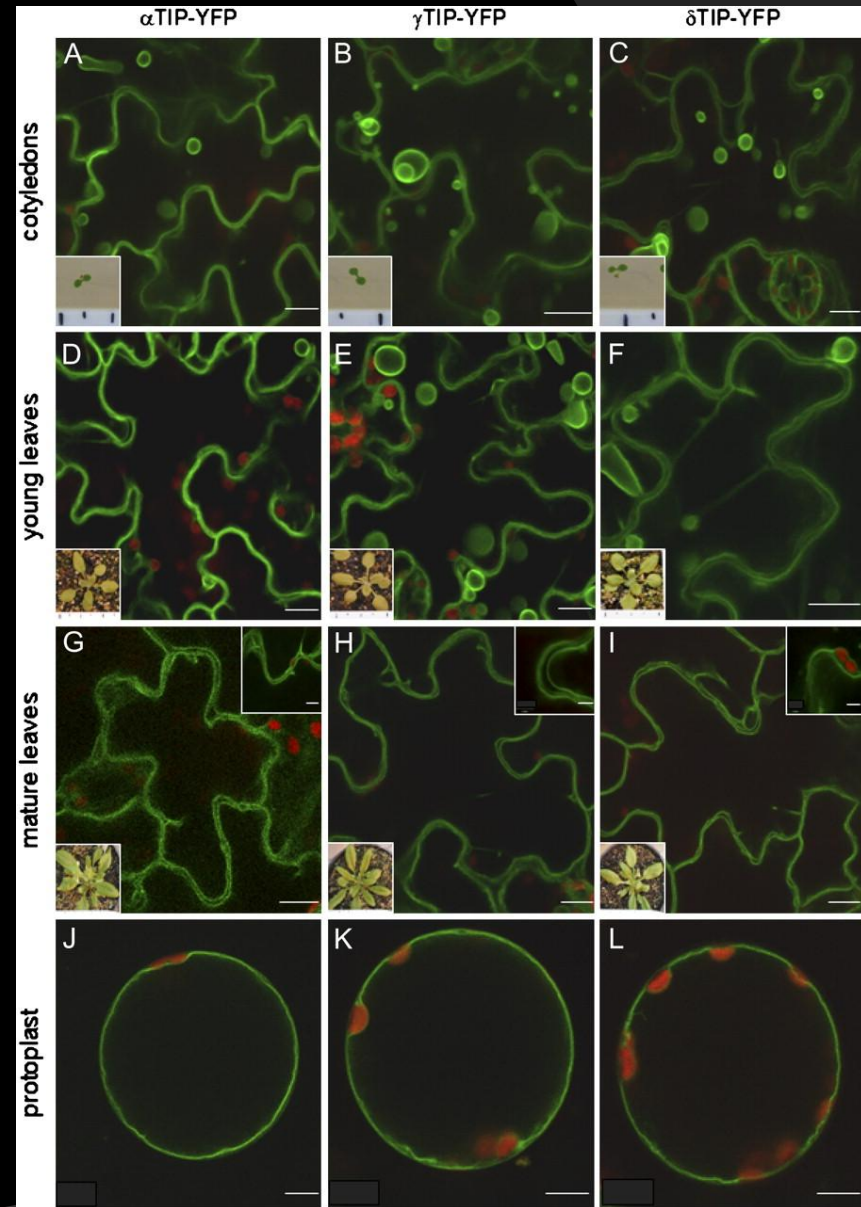
Алейрон в литической  
вакуоли



Лектин ячменя в  
запасающей вакуоли

# А иногда всего 1...

- Например, центральная вакуоль в корнях, листьях и зародыше Арабидопсиса содержит оба маркёра.
- Предполагают, что разные типы вакуолей чаще всего содержатся либо в разных типах клеток, либо в конце концов сливаются, формируя центральную вакуоль





# Итак, зачем нужны вакуоли?

- поддержание тургора
- гомеостатирование цитоплазмы
- запасание продуктов метаболизма
- изолирование ксенобиотиков
- разложение компонентов цитоплазмы
- защита от патогенов и травоядных
- пигментация