

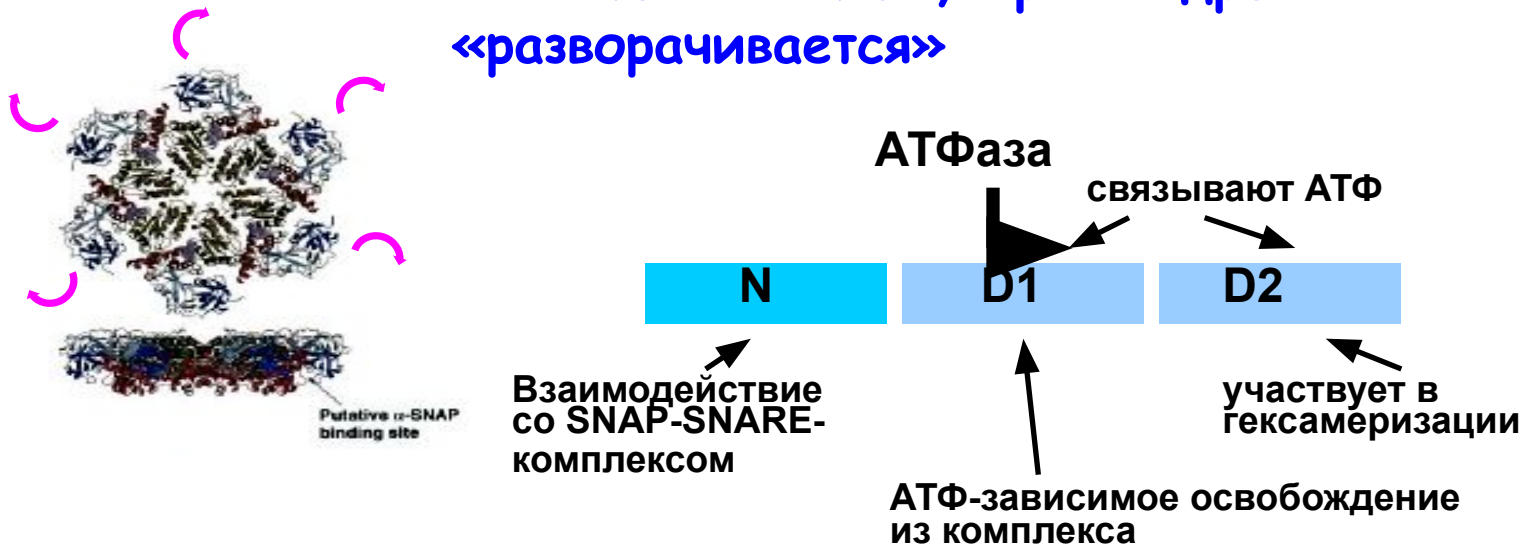
Регуляция слияния мембран

NSF-SNAP-SNARE-complex (20S-fusion particle):

- NSF - N-ethylmaleimide-sensitive factor
- SNAP- Soluble NSF-attachment protein
- SNAREs - SNAP's receptors

NSF- гексамер (6 x 75 кДа)

Является АТФазой, при гидролизе АТФ «разворачивается»



NSF-related proteins:

P97 – постмитотическая сборка аппарата Гольджи; не требует SNAP (*in vitro*)

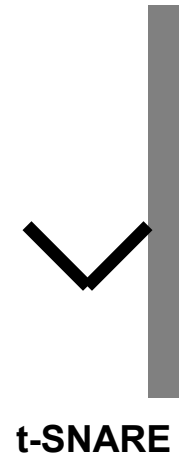
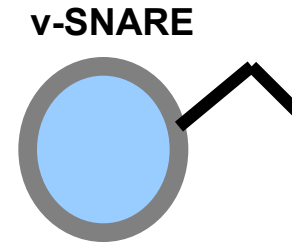
Cdc48 – гомотипическое слияние при сборке ER и ядерной оболочки

SNAP – α , β , γ

SNAREs - 18-47 кДа

Гетерогенная группа мембранных белков,
способных образовывать высокостабильные
компаратмент-специфические пары;

Заякорены в мембране с помощью коротких хвостов
(белковых или изопренильных)



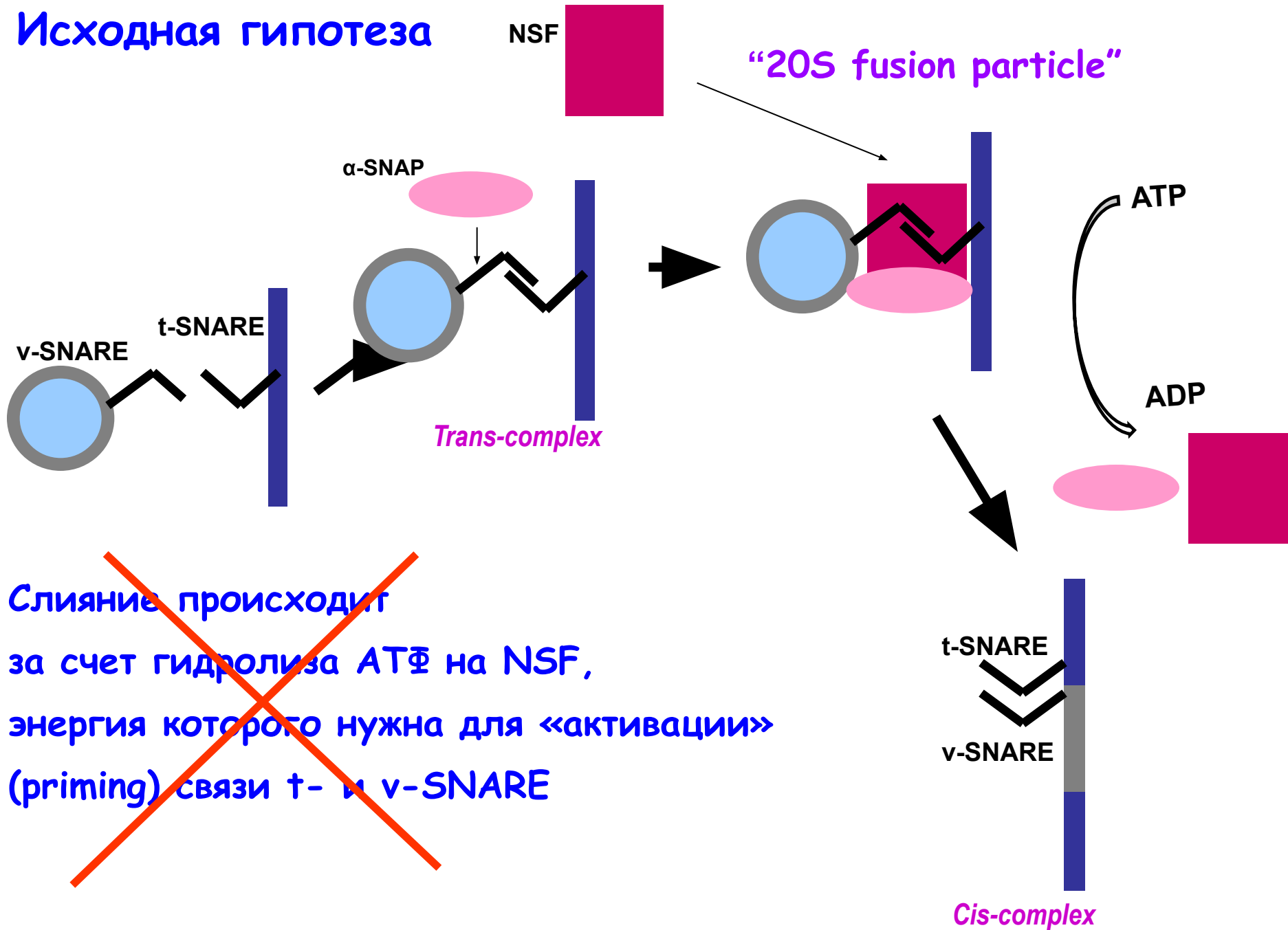
первоначальная классификация:

v-SNAREs - VAMP (vesicle-attached membrane proteins)

t-SNAREs - syntaxins;

SNAP25

Исходная гипотеза



~~Слияние происходит за счет гидролиза АТФ на NSF, энергия которого нужна для «активации» (priming) связи t- и v-SNARE~~

Но:

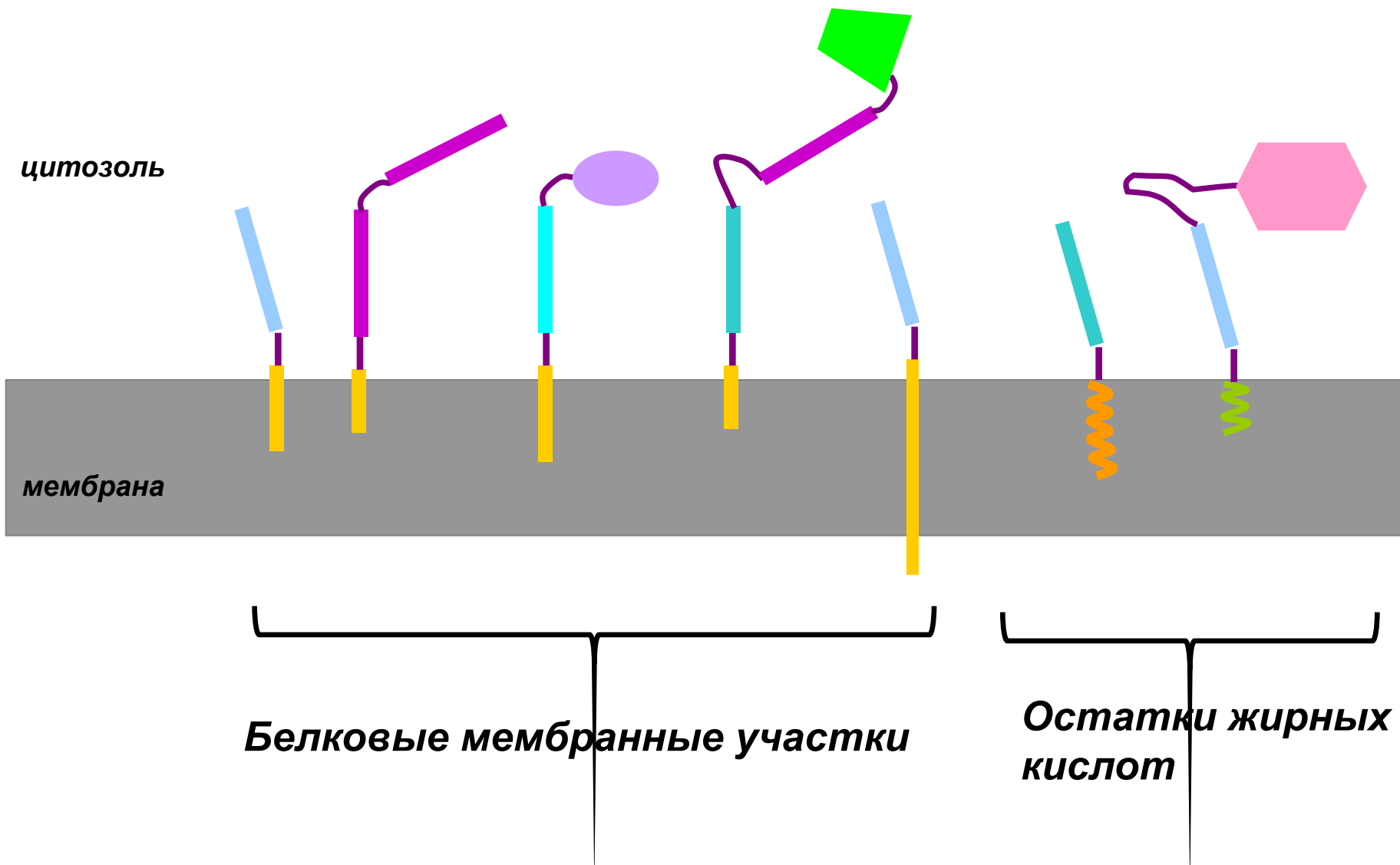
Скорость слияния мембран гораздо выше, чем скорость гидролиза АТФ на NSF > эта энергия не может быть использована для слияния

Но:

1. некоторые стадии обслуживаются более чем 2-мя SNARE
2. некоторые SNARE обеспечивают более чем одну стадию транспортного процесса

**Как же обеспечивается
специфичность слияния?**

Структура SNARE



SNARE- комплекс наиболее стабилен, если образован «пучком» из 4 суперскрученных участков таким образом, что **против ключевого аргининового остатка (R) лежат три остатка глутамина (3Q):**

Q-R-гипотеза: **R+3Q**

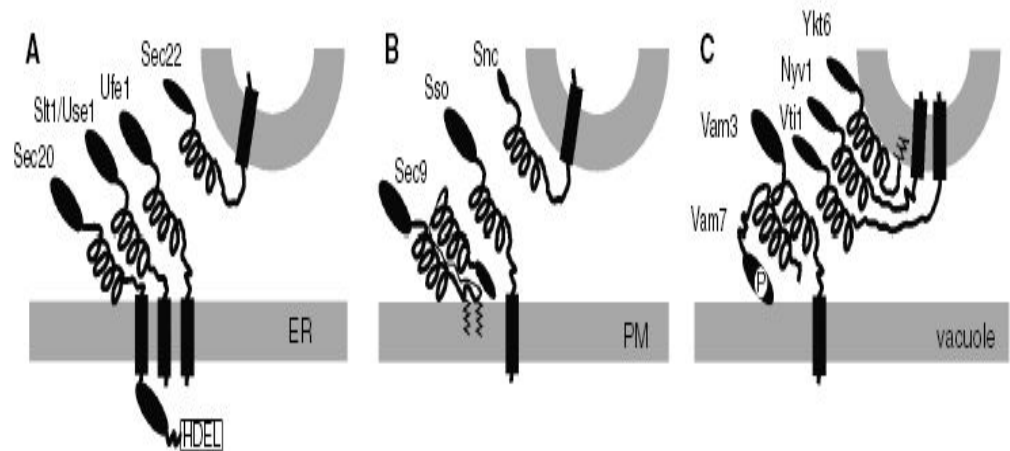
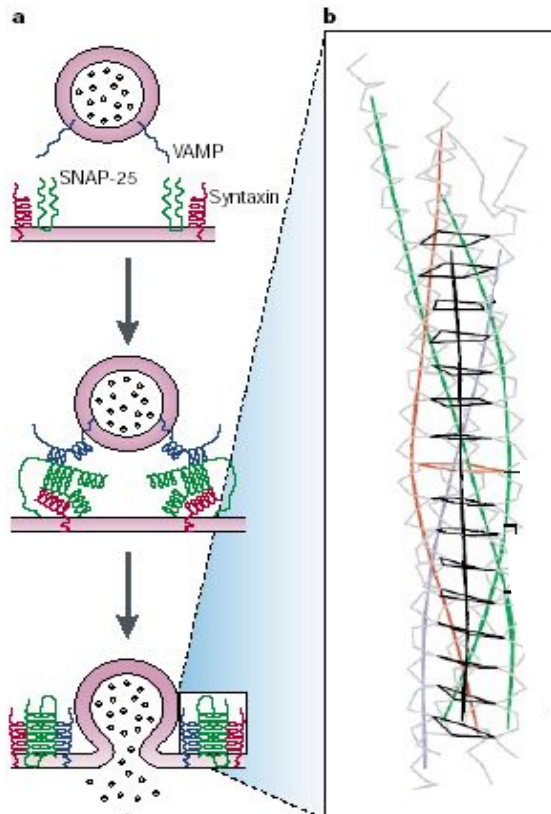


Figure 2: Architecture of yeast SNAREpins.

Примеры SNARE-комплексов

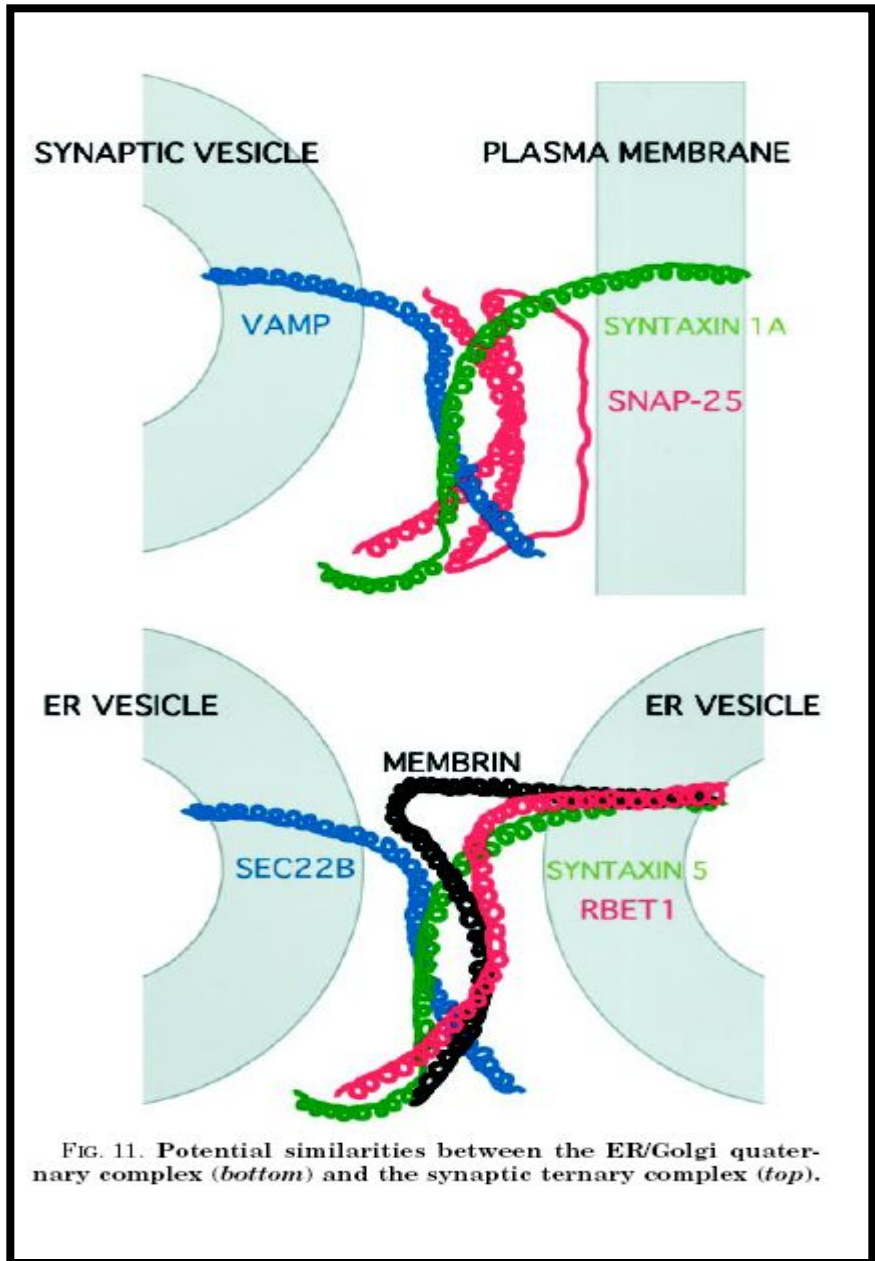
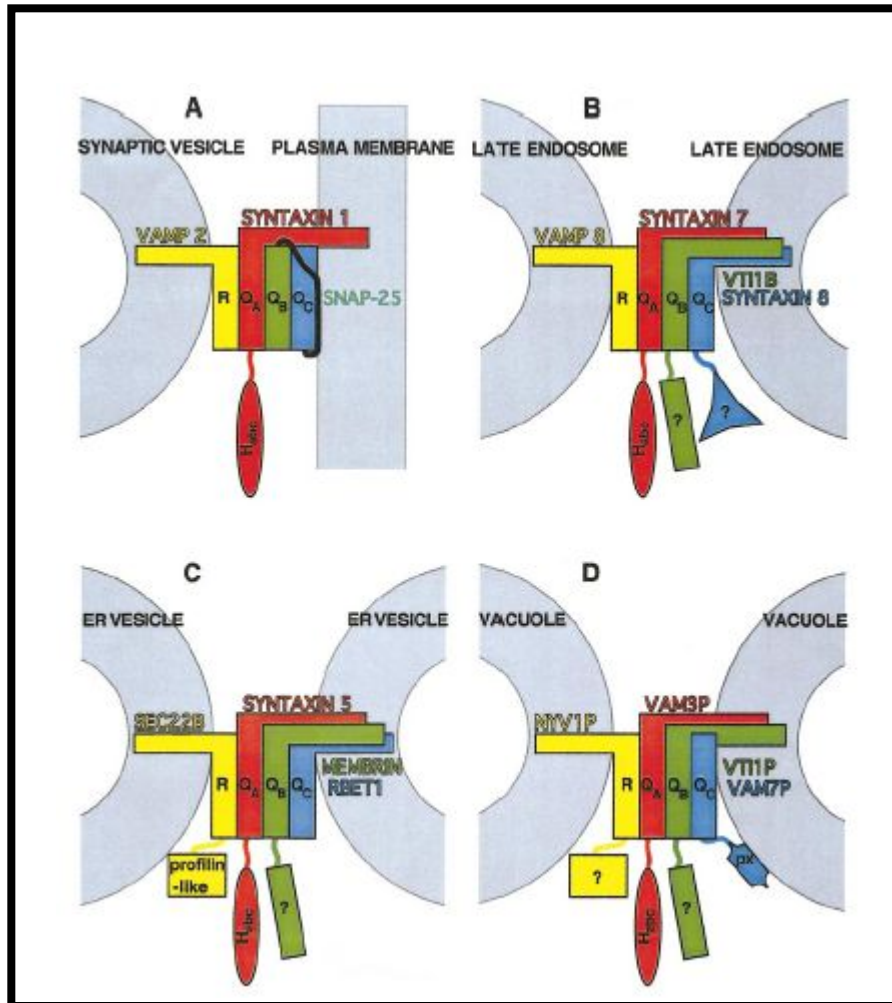


FIG. 11. Potential similarities between the ER/Golgi quaternary complex (bottom) and the synaptic ternary complex (top).

Как правило:

R - v-SNARE,

Q - t-SNARE

Q

R

Mammalian SNARE	Yeast ortholog	Structural role	Mammalian localization; functional role; notes; alternate names	N-terminal domain
Syntaxin 1a, 1b	Sso1, 2p	Q-A	PM; neurotransmission; enriched in neurons (<i>syntaxin 1a</i> , <i>SNAP-25</i> , <i>VAMP2</i>)	H _{A,B,C}
Syntaxin 2		Q-A	PM; varied functions, e.g., sperm acrosomal reaction and platelet dense core granule exocyt. (w/SNAP-23); splice isoforms w/ different PM domain and tissue distributions	H _{A,B,C}
Syntaxin 3		Q-A	PM; varied functions, e.g., apical delivery in intestinal epith. and exocyt. in ribbon synapses	H _{A,B,C}
Syntaxin 4		Q-A	PM; varied functions, e.g., GLUT4 translocation in muscle/fat and mast cell granule exocyt. and platelet α -granule exocyt.; binds synip	H _{A,B,C}
Syntaxin 5	Sed5p	Q-A	ER, VTCs, throughout Golgi; ER $\rightarrow$ Golgi, intra-Golgi, endosome $\rightarrow$ Golgi?; partic. in multiple SNARE complexes (<i>syntaxin 5</i> , <i>membrin</i> , <i>rbet1</i> , <i>sec22b</i>)	H _{A,B,C}
Syntaxin 7	Vam3p	Q-A	Endosomal compartments; LE $\rightarrow$ L, homotypic LE and L fusion, PM $\rightarrow$ EE? (<i>syntaxin 7</i> , <i>vtilb</i> , <i>syntaxin 8</i> , <i>VAMP8</i>)	H _{A,B,C}
Syntaxin 11		Q-A	LE, TGN; enriched in immune system; no TMD; palmitoylated?	H _{A,B,C}
Syntaxin 13	Pep12p	Q-A	EE, RE; EE and RE fusion and neural axon extension; binds pallid	H _{A,B,C}
Syntaxin 16	Tlg2p	Q-A	Golgi; ubiquitous expression; cytosolic splice variant lacks SNARE motif and TMD	H _{A,B,C}
Syntaxin 17		Q-A	Smooth ER; enriched in steroidogenic cells; two TMDs; bound to sec22b and rbet1	H _{A,B,C}
Syntaxin 18	Ufe1p	Q-A	ER; homotypic ER fusion? ER $\rightarrow$ Golgi? G $\rightarrow$ ER?	H _{A,B,C}
vtila	Vtilp	Q-B	Golgi; intra-Golgi?, endosome $\rightarrow$ Golgi; SV variant vtila- β involved in SV biogenesis?	?
vtilb		Q-B	Endosomes, Golgi; homotypic LE fusion, intra-Golgi?; E in middle of TMD	?
vtilc		Q-B	Not characterized; no TMD	?
vtild		Q-B	Not characterized; no TMD	?
GOS-28	Gos1p	Q-B	Golgi; intra-Golgi, late ER $\rightarrow$ Golgi?; binds GATE-16/aut7	?
Membrin	Bos1p	Q-B	VTCs and throughout Golgi; ER $\rightarrow$ Golgi and perhaps intra-Golgi	?
Syntaxin 6	Tlg1p	Q-C	TGN, endosomes, ISGs, neutrophil PM; TGN $\rightarrow$ endosome, ISC $\rightarrow$ endosome, neutrophil exocyt.; binds FIG and EEA1	?
Syntaxin 8	Vam7p	Q-C	EE, LE; homotypic LE fusion, EE $\rightarrow$ LE?	?
Syntaxin 10		Q-C	Golgi, TGN	?
rbet1	Bet1p	Q-C	ER, VTCs; early ER $\rightarrow$ Golgi, Golgi $\rightarrow$ ER?	No
gs15	Sft1p	Q-C	Golgi; intra-Golgi?	No
SNAP-23	Sec9p	Q-BC	PM of most cell types, basolateral PM in acinar cells, pool in RE; GLUT4 transloc., platelet L and α -granule exocyt. and dense granule exocyt., TR cycling, mast cell compound exocyt; no TMD	No
SNAP-25		Q-BC	PM; regulated exocyt.; neuron-specific; C-terminus binds synaptotagmin; no TMD	No
SNAP-29	Spo20p	Q-BC	Several organelles; enriched in Golgi; many cell types; no TMD	No
VAMP1, 2	Snc1, 2p	R	SVs, SGs, REs; regulated exocyt.; enriched in neurons; multiple splice isoforms; also called synaptobrevin 1 and 2	No
VAMP3		R	constitutive REs; RE $\rightarrow$ PM, e.g., TR, possibly GLUT4 translocation; most cell types; also called cellubrevin	No
VAMP 4		R	TGN, ISGs; TGN $\rightarrow$ LE?; binds syntaxin 6 and synaptophysin	No
VAMP 5		R	PM, peripheral vesicles; induced in differentiating myotubes; expressed in skeletal muscle and heart, not in brain; also called myobrevin	No
VAMP 7	Nyv1p	R	LE, lysosomes, TGN, novel compartment involved in neurite extension; endosome $\rightarrow$ L, homotypic L fusion, neurite extension and apical exocyt. in polarized epithelia; also called TI-VAMP	Sim. to sec22b
VAMP 8		R	EE, LE, apical RE in polarized epithelia; homotypic EE and LE fusion; also called endobrevin	No
sec22b	Sec22p	R	ER, VTCs, COPII buds; early ER $\rightarrow$ G, G $\rightarrow$ ER?, COPII homotypic vesicle fusion?	Profilin-like
ykt6	Ykt6p	R	Golgi?; Late ER $\rightarrow$ Golgi?; no TMD, prenylated, >50% cytosolic	Profilin-like
Tomosyn		R	Nerve terminals; neurotransmission, mast cell exocyt.; enriched in brain; binds syntaxin 1 and SNAP-23/25; regulator or SNARE?	?

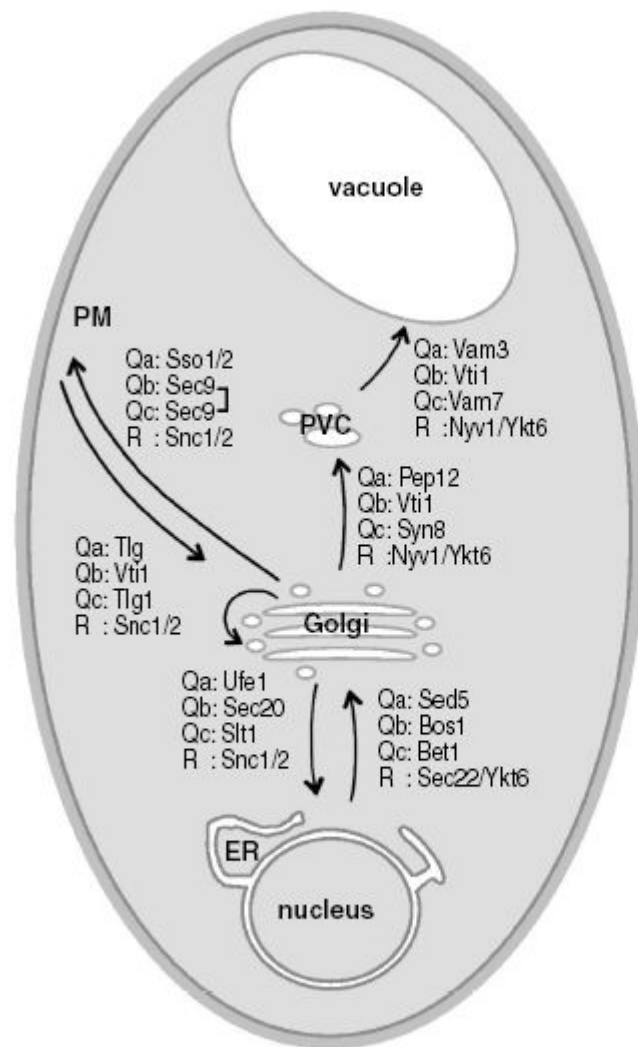


Figure 1: Subcellular location of yeast SNAREs. Each c

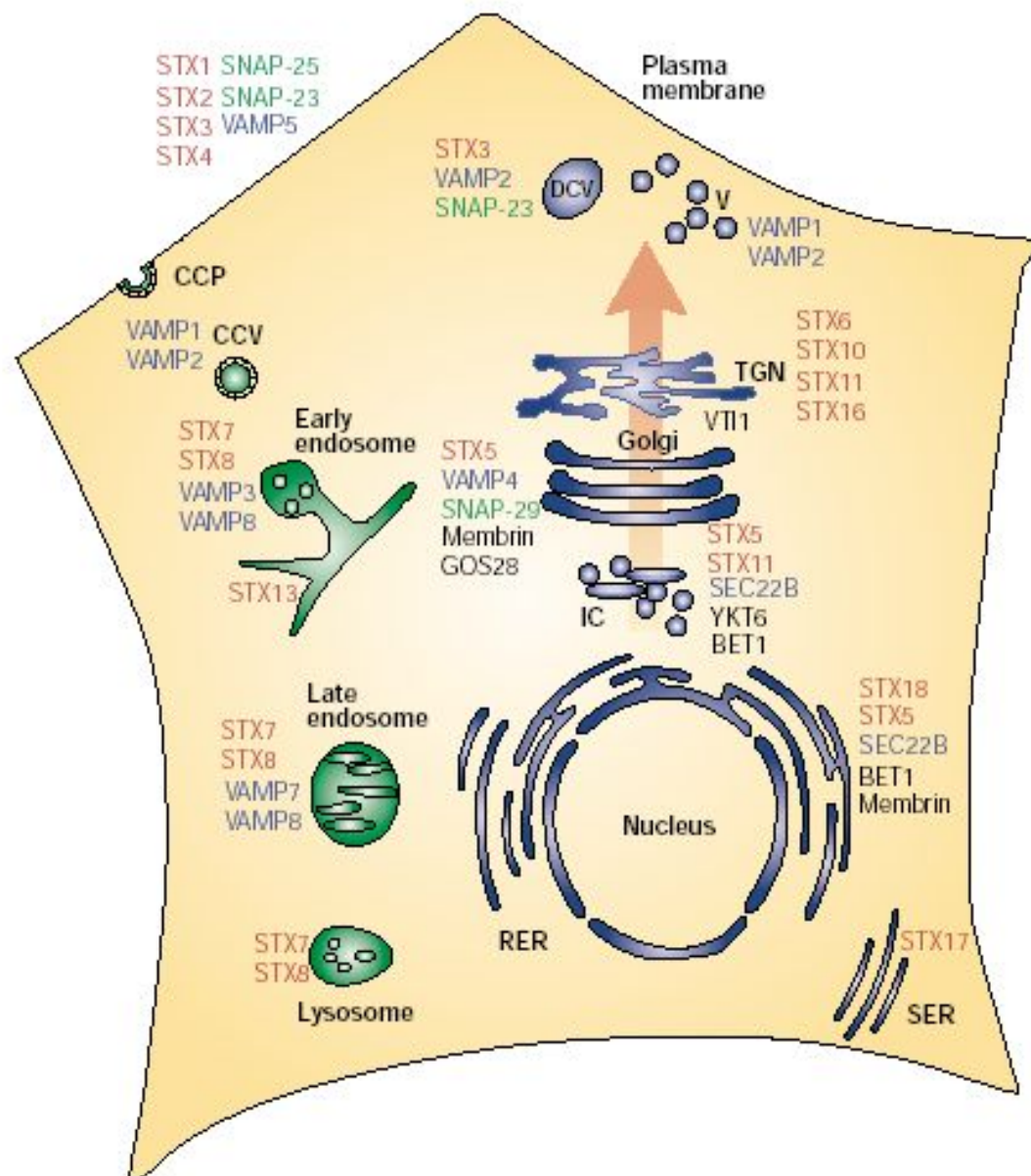


Figure 1 | Subcellular localization of mammalian SNAREs. The mammalian SNAREs that

Таким образом, специфичность слияний поддерживается за счет того, что каждой стадии транспортного пути соответствует свой уникальный комплекс, **составляющие которого, однако, могут меняться не полностью.** Это, в свою очередь, обеспечивает жесткую последовательность отдельных стадий одного пути.

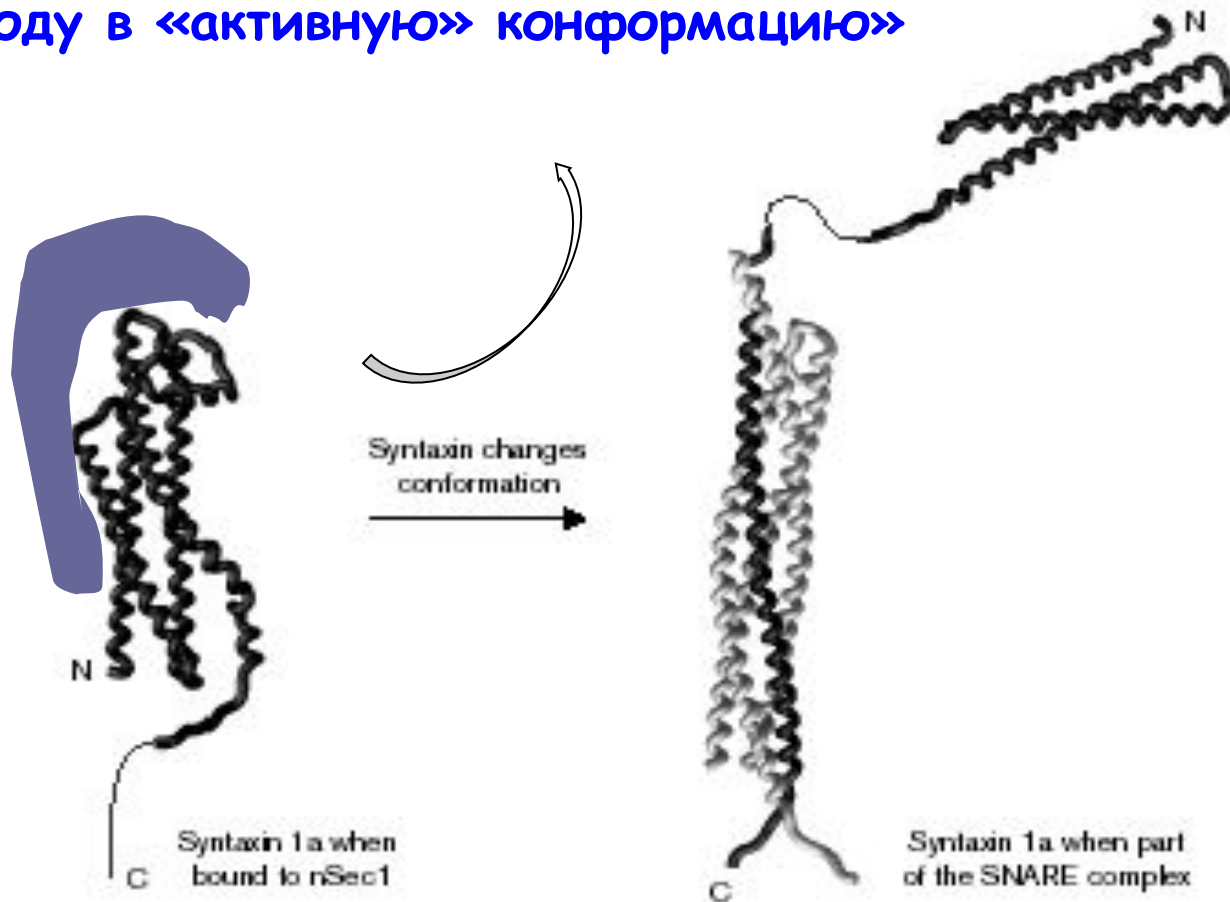
Например, Sed5p/Syn5 входит в состав всех комплексов, регулирующих слияния на биосинтетическом пути:

SNARE complexes including Sed5p / syntaxin 5

	Complex	May include	Excludes	Transport step
Yeast		Ykt6p		ER to Golgi
Mammals		mYkt6	GOS-28	
Yeast		Ykt6p Sft1p		Intra-Golgi retrograde
Mammals		mYkt6	rBet1	
Yeast		Gos1p Sft1p	Sec22p	Intra-Golgi retrograde? Endosome - Golgi?

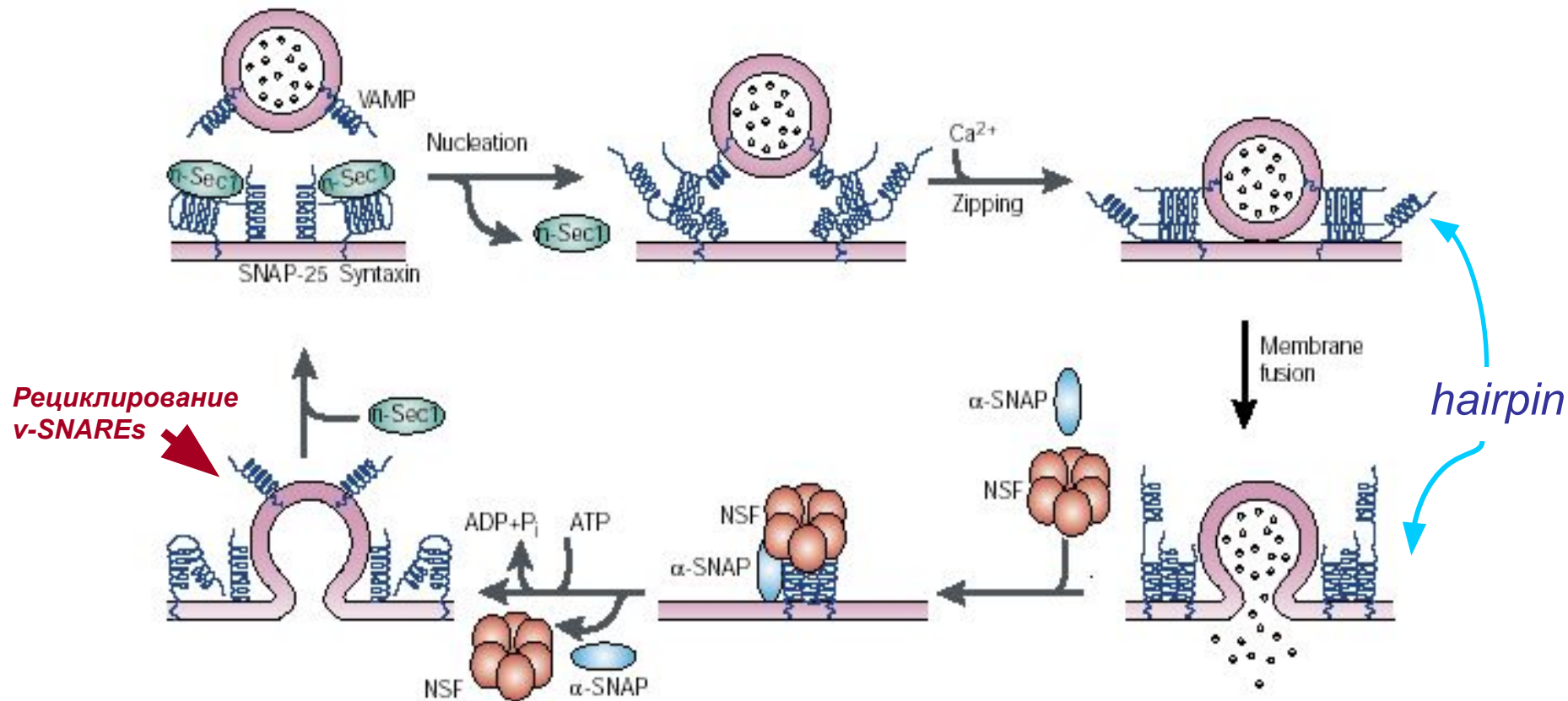
Еще один уровень контроля слияний мембран:

Способность синтаксинов к слиянию подавлена в норме в результате взаимодействия с **протекторным белком семейства *n-Sec1***, который препятствует его спонтанному переходу в «активную» конформацию»



n-Sec1 – *t*-SNARE протектор; подавляет скорость слияния в 2000 раз; вз-ет с N-концом синтаксинов

Действующая модель регуляции слияния с помощью SNARE-комплексов



Энергия гидролиза АТФ на NSF используется для диссциации cis-SNARE-комплекса. Т.о. NSF действует не до, а после слияния мембран

Rab-белки (Ras-related proteins from brain)

Rab-белки, несомненно, участвуют в регуляции слияния мембран:

ГДФ-связанные их формы блокируют транспорт, а ГТФ-γS-связанные – стимулируют образование сильно увеличенных компарментов

Rab-белки (Ras-related proteins from brain)

Малые ГТФазы

Компартмент-специфичны:

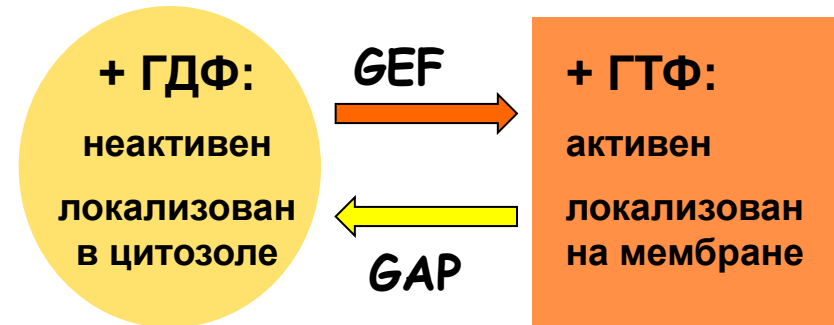
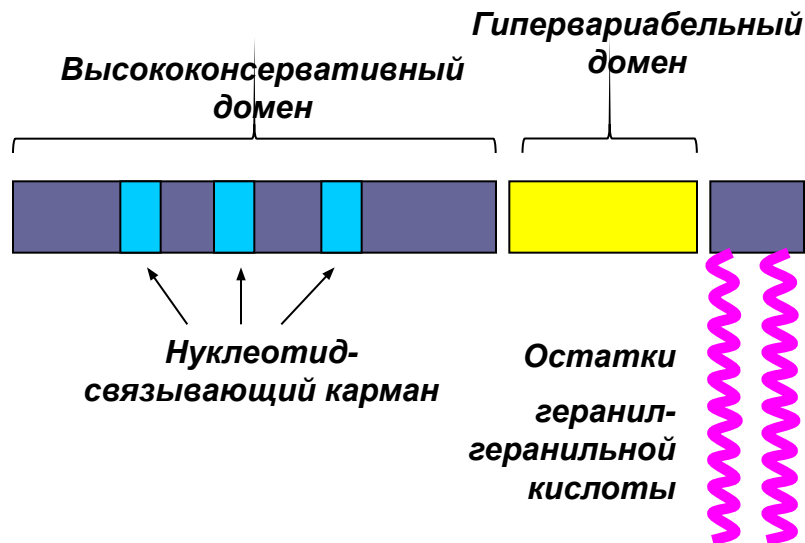
НО: большинство компартментов имеют более чем один

Rab- белок

Идентифицировано ок. 60 генов у млекопитающих,

11 - в дрожжах

высококонсервативны



Каждый Rab-белок может иметь более одного GEF или GAP, что позволяет координировать транспортные потоки

Table 2 | **Regulatory proteins**

Rab/Ypt	GAP	GEF
Rab1	?	Mss4
Rab3	Rab3-GAP	Mss4, possibly Rabin 3
Rab5	Tuberous sclerosis 2 (?) RN-Tre	Rabex5 RIN1, PLC γ 1
Rab6	GAPcenA	?
Rab8	?	Mss4
Rab10	?	Mss4
Ypt1p	?	TRAPP* Dss4p
Ypt51p/ Vps21p	Gyp1p, Gyp3p	Vps9p
Ypt6p	Gyp2p Gyp3p, Gyp4p, Gyp6p	Ric1p–Rigp1p
Ypt7p	Gyp4p, Gyp7p	HOPS [†]
Sec4p	Gyp1p, Gyp2p/Mdr1p, Gyp3p, Gyp4p/Msb4p	Sec2p Dss4p

ER-to-Golgi

секреция

*TRAPP complex: Trs20p, Trs23p, Trs31p, Trs33p, Trs65p, Trs85p, Trs120p, Trs130p, Bet3p, Bet5p. [†]HOPS complex: Vps11p, Vps16p, Vps18p, Vps33p, Vps39p, Vps41p.

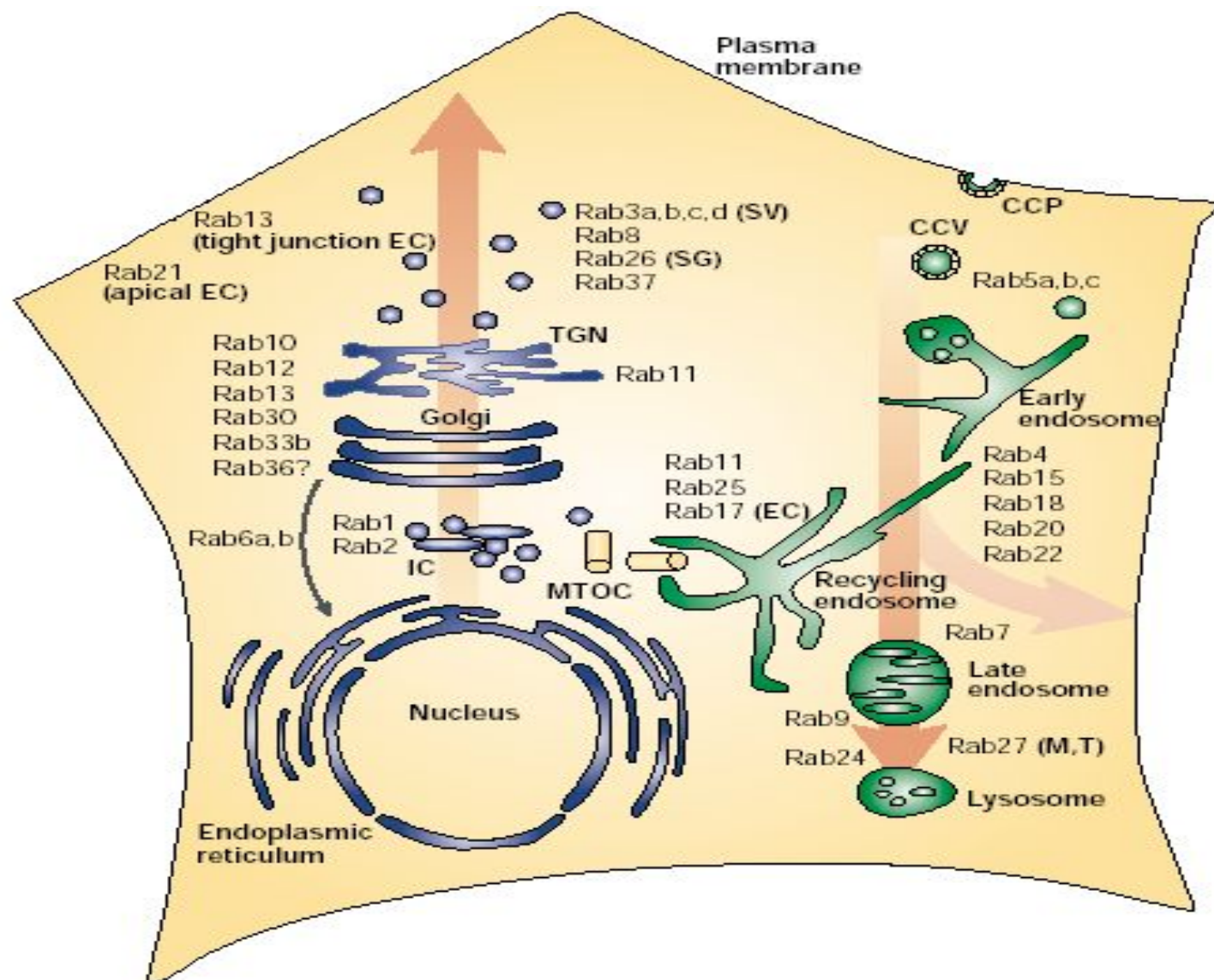
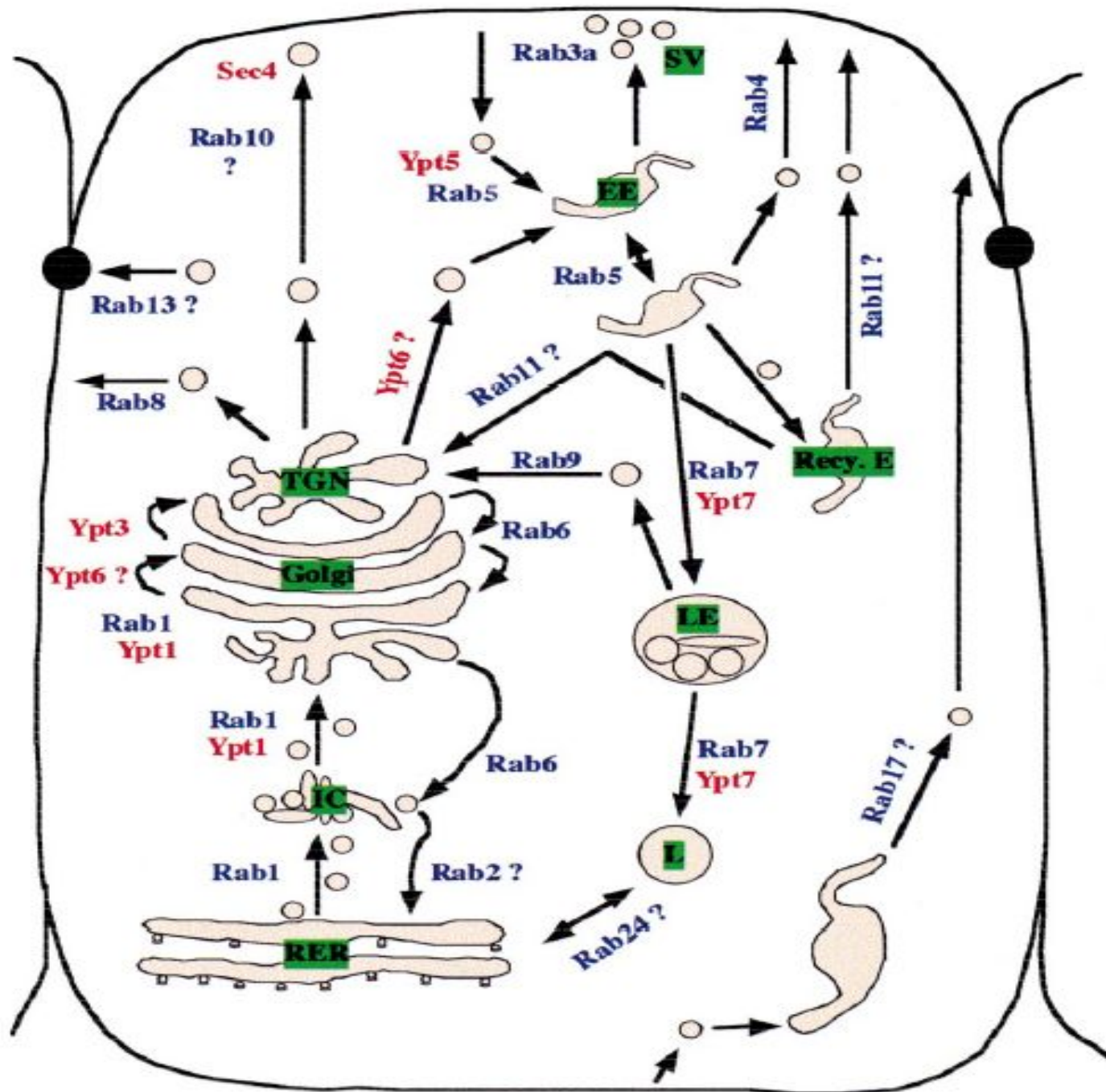
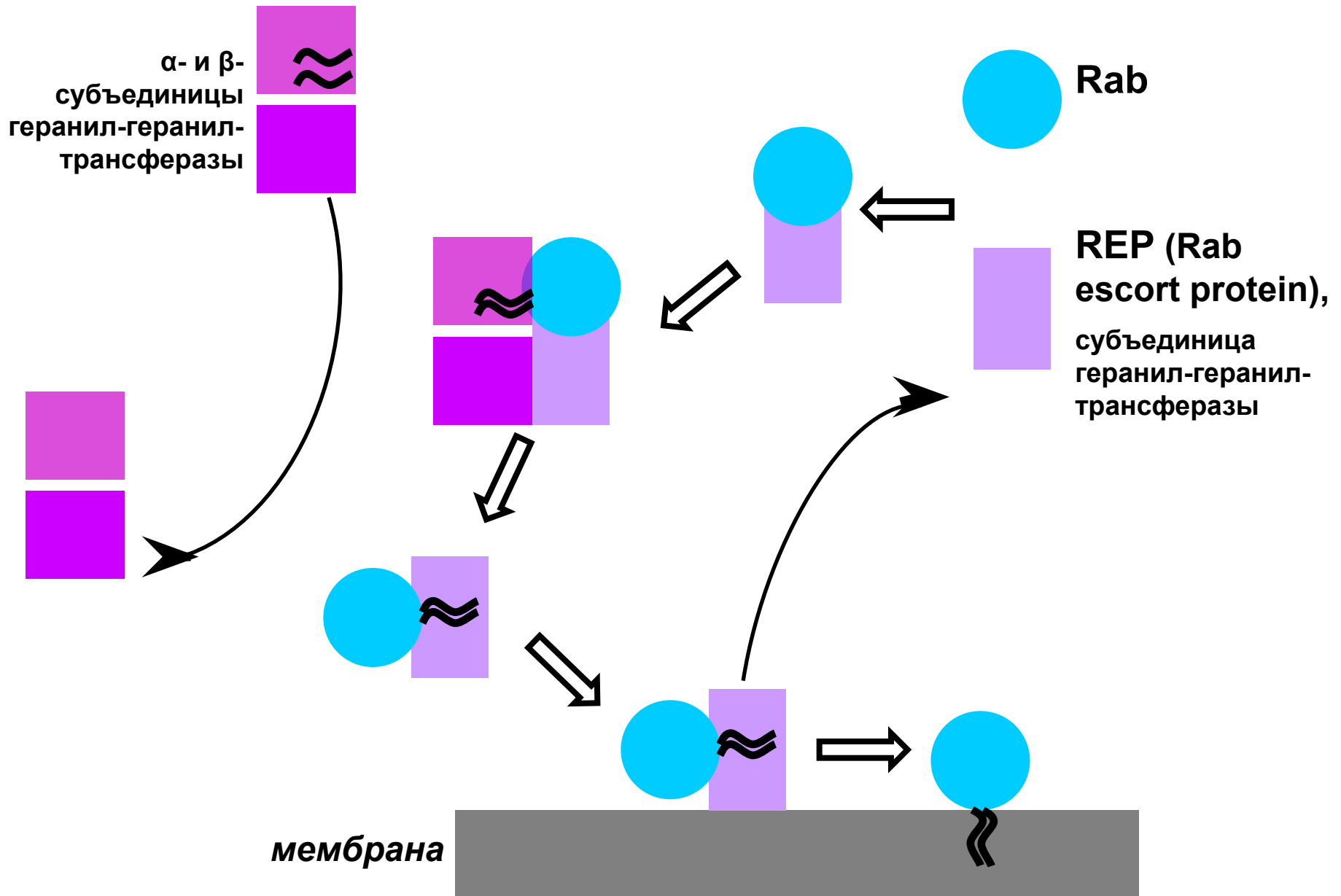


Figure 1 | Map of intracellular localization of Rab proteins. Summarizes the intracellular localization of Rab proteins in mammalian cells. Some proteins are cell- (for example, Rab3a in neurons) or tissue-specific (for example, Rab17 in epithelia) or show cell-type-specific localization (for example, Rab13 in tight junctions). (CCV, clathrin-coated vesicle; CCP, clathrin-coated pit; EC, epithelial cells; IC, ER-Golgi intermediate compartment; M, melanosomes; MTOC, microtubule-organizing centre; SG, secretory granules; SV, synaptic vesicles; T, T-cell granules; TGN, *trans*-Golgi network.)

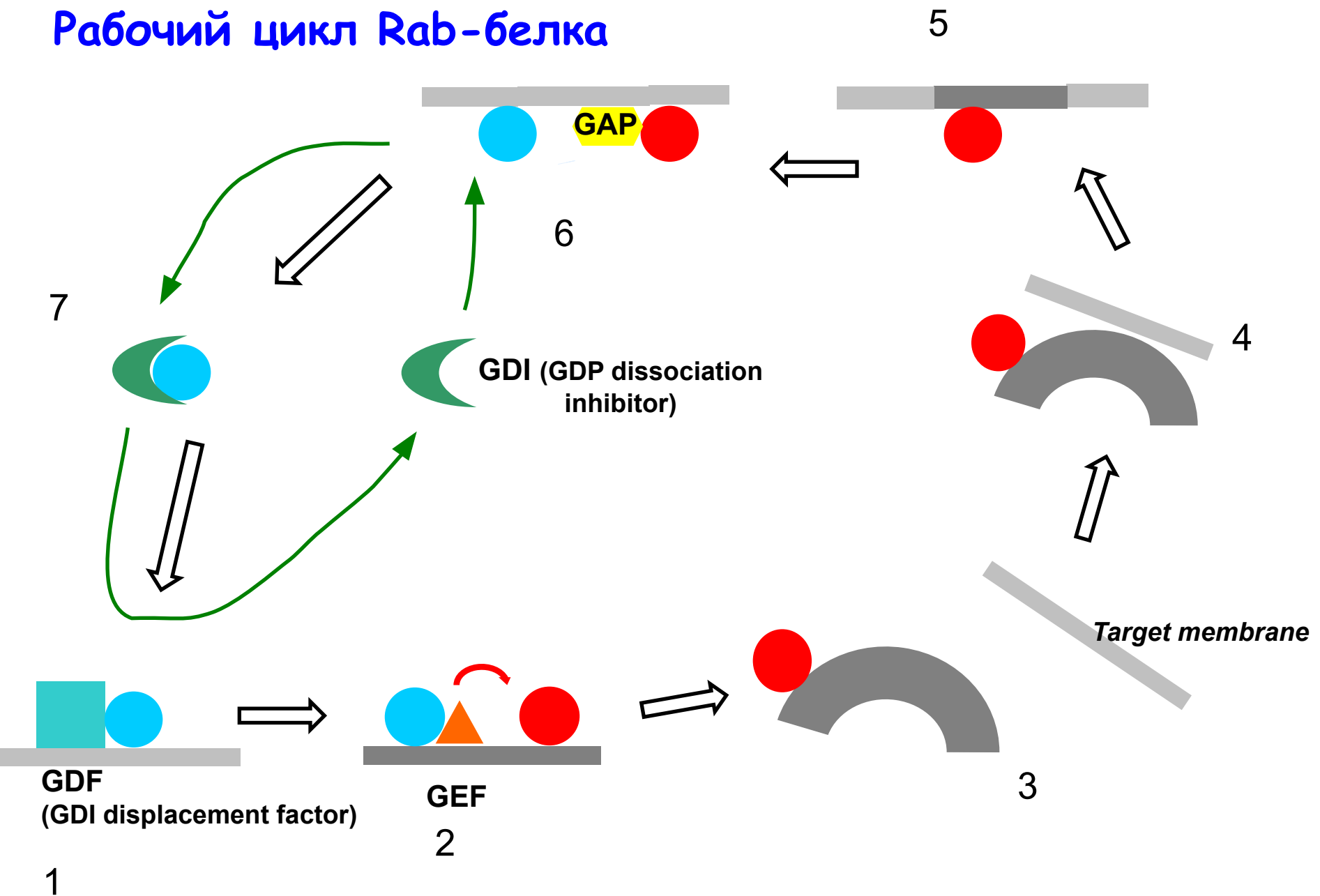


Basolateral membrane

Первый цикл Rab-белка после синтеза



Рабочий цикл Rab-белка



Гидролиз ГТФ не нужен для слияния мембран

Но как же конкретно они работают?

Ответ был получен по мере накопления
данных по идентификации белков,

**способных взаимодействовать с
активированными Rab-белками**

Множество партнеров Rab-белков представляют собой комплексы белков, выстроенные линейно, или белки, обладающие линейными гибкими доменами.

Эти партнеры узнают активированные Rab-белки

Table 1 Recently described tethering and docking interactions

Event	GTPase	Tethering/docking factor	Comments
Endosome fusion (mammalian cells) ⁵⁹	Rab5	EEA-1/Rabaptin-5	Homotypic interaction
Golgi-to-prevacuole (yeast) ^{46,47}	Ypt21	Vac1	Vac1 links vesicle to Sec1 homologue Vps45 at the target
ER-to-Golgi (yeast) ^{35,38}	Ypt1	Uso1/TRAPP	TRAPP is at the target; not yet known if Uso1 interacts with TRAPP
Intra-Golgi (mammalian) ^{38,39}	Rab1 *	p115/giantin/GM130	Giantin is on the vesicle; GM130 and p115 are on the Golgi
Secretory vesicle to plasma membrane (yeast) ⁵¹	Sec4	Exocyst	Exocyst links vesicle with target; Sec3 marks release site; Sec15 is recruited by the GTPase Sec4

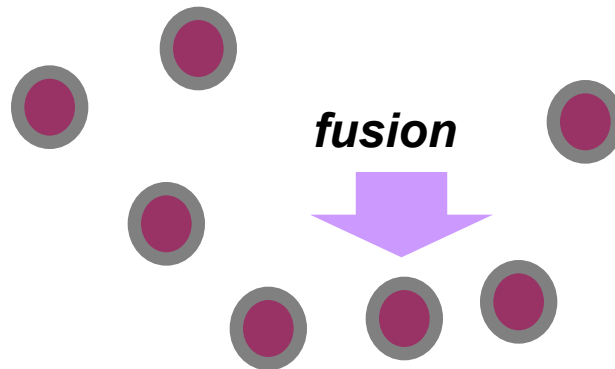
* Rab1 is important for intra-Golgi transport but it is not yet known to which docking factor it is linked.



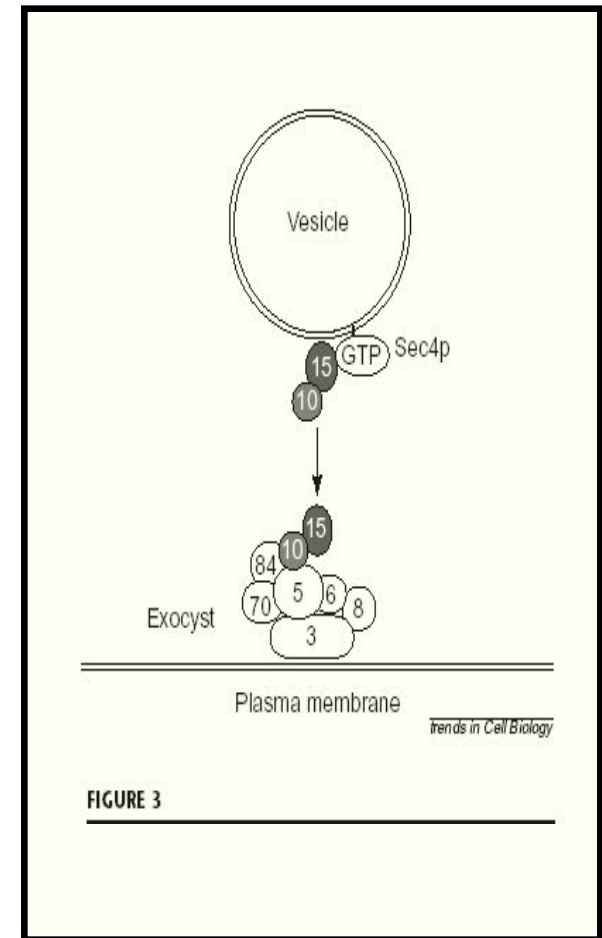
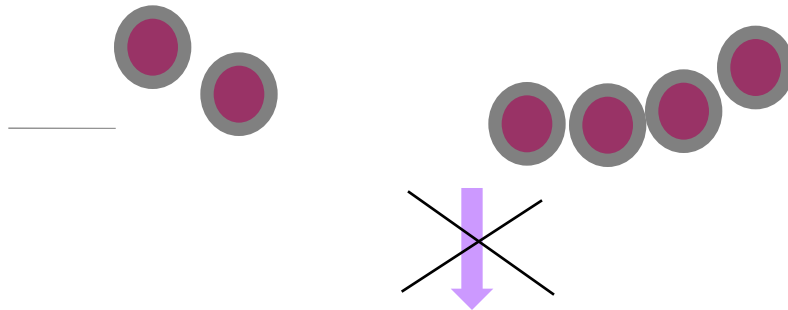
Секреция: Sec4 и Exocyst

Слияние секреторных пузырьков с ПМ происходит только в тех доменах ПМ, где локализован Exocyst

Wilde type



Δ SNARE



Заякоривание COPI-везикул (транспорт между цистернами Гольджи):

Rab1- GM130/p115

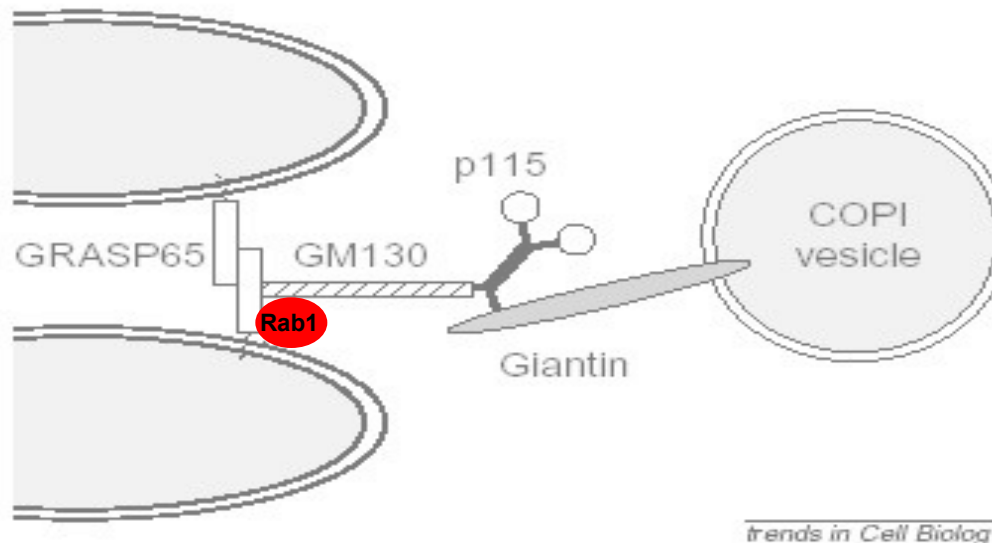


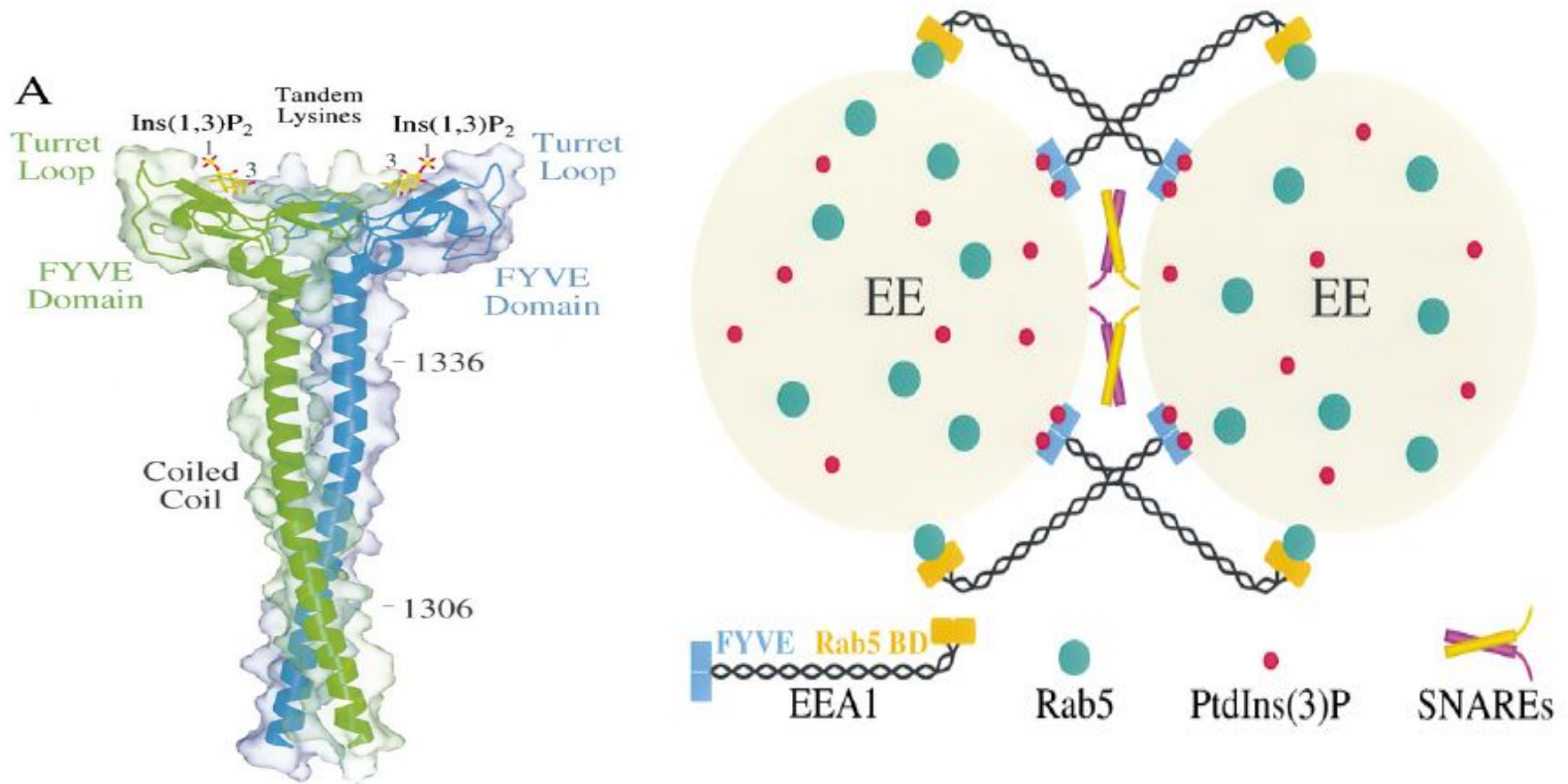
FIGURE 2

Protein interactions involving GRASP65, GM130, p115 and giantin mediate the tethering of COPI vesicles to the Golgi membrane.

Гомотипичекое слияние ранних эндосом:

Rab5 - EEA1 (early endosome's autoantigene 1)

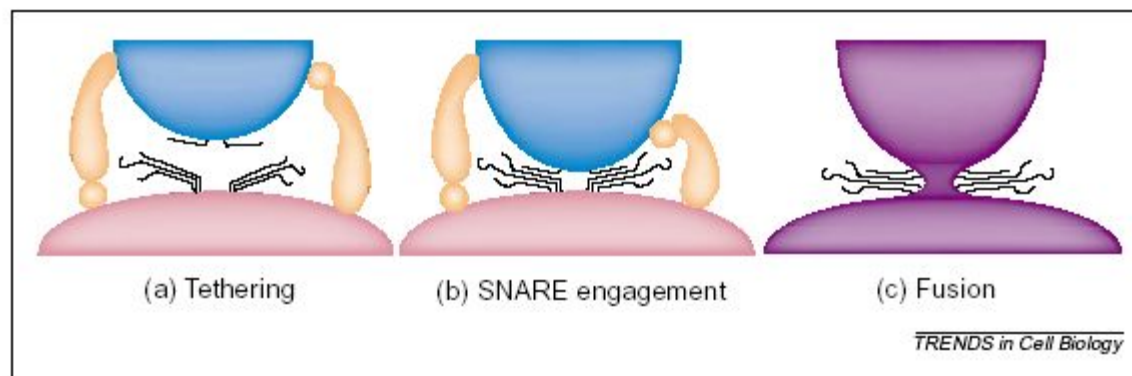
Multivalent Endosome Targeting by Homodimeric EEA1
949



Эти белки или белковые комплексы получили название
tethers (от «привязь», «коновязь»)

Работают как арканы, осуществляя заякоривание (tethering) мембраны на первой стадии слияния, когда расстояние между пузырьком и мишенью еще велико (около 25 нм) – т.е. являются факторами дистанционного взаимодействия

Стабилизируют мембраны для дальнейшего сближения (< 10 нм)



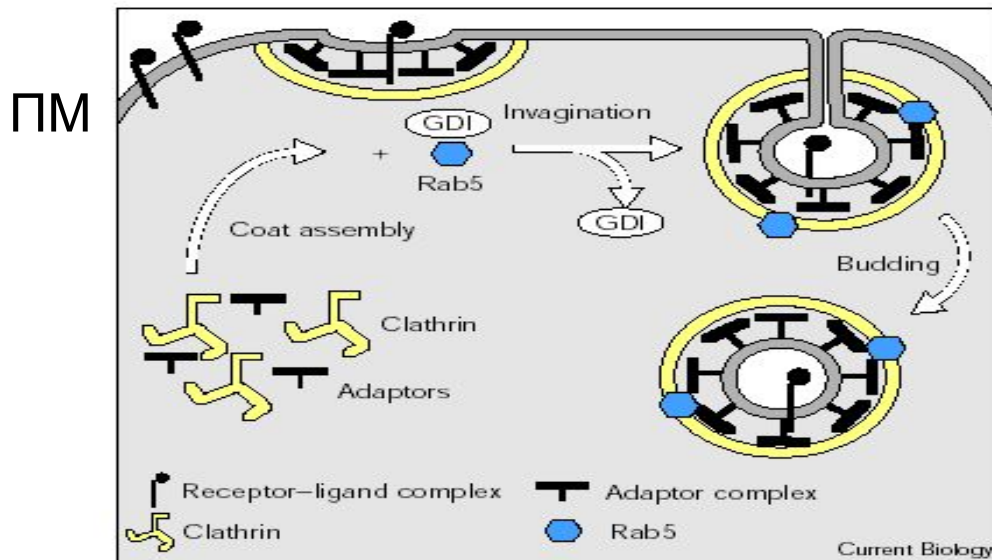
Rab-белки и/или их факторы дистанционного взаимодействия могут узнавать соответствующие SNARE, тем самым координируя взаимодействия «везикула-мишень»

Tether type	Putative tether	Localization	Rab	Membrane receptors	SNARE interaction
Large complex	COG/sec34/35	early Golgi	Rab1/ <i>Ypt1</i>	nd	nd
Coiled-coil	P115/ <i>Uso1</i> , GM130	early Golgi	Rab1/ <i>Ypt1</i>	GRASP65, Giantin	syntaxin 5, GOS-28
Large complex	GARP/ <i>VPS 51/52/53/54</i> , <i>VFT</i>	late Golgi	<i>Ypt6</i>	nd	<i>Tlg1</i>
Coiled-coil	EEA1	endosomes	Rab 5	PI-3P and others?	syntaxin 6
Large complex	<i>Class C VPS complex/HOPS</i>	yeast vacuole	<i>Ypt7</i>	nd	<i>Vam3</i>
Large complex	Exocyst	plasma membrane (polarized secretion)	<i>Sec4</i>	<i>Rho1</i> , <i>CDC42</i> and others	nd
Coiled-coil?	Rim 1	plasma membrane (active zone, neuron)	Rab3	nd	SNAP-25

Роль Rab-белков не ограничивается регуляцией слияния.

1. Rab-белки, как правило, встраиваются в везикулу еще на стадии ее формирования за счет связи либо с v-SNARE, либо с элементами окаймления, либо с рецепторами грузов

Но ассоциация активированного Rab-белка может происходить и позже, уже после отделения транспортной везикулы от донорной мембраны (Rab5)



2. Rab-белки взаимодействуют с цитоскелетом в процессе передвижения транспортной везикулы

Table 1

Microtubule-based motors.

Motor	Rab	Organelle
Rabkinesin-6 RB6K/Rab6-KIFL	Rab6	Golgi-derive vesicles
Unknown, minus- end-directed kinesin	Rab5	Early endosi
Rab33b-BP (kinesin homologue)	Rab33b	Golgi memb
Dynein /RILP	Rab7	EE, LE

Table 2

Actin-based motors.

Motor	Rab	Organelle
Myosin Va	Rab27a	Melanosomes lytic granules
Myosin Vb	Rab11a, 11b, 25	Pericentrosomal recycling compartment
Myo2p	Sec4p (Sec2p)	Secretory vesicles

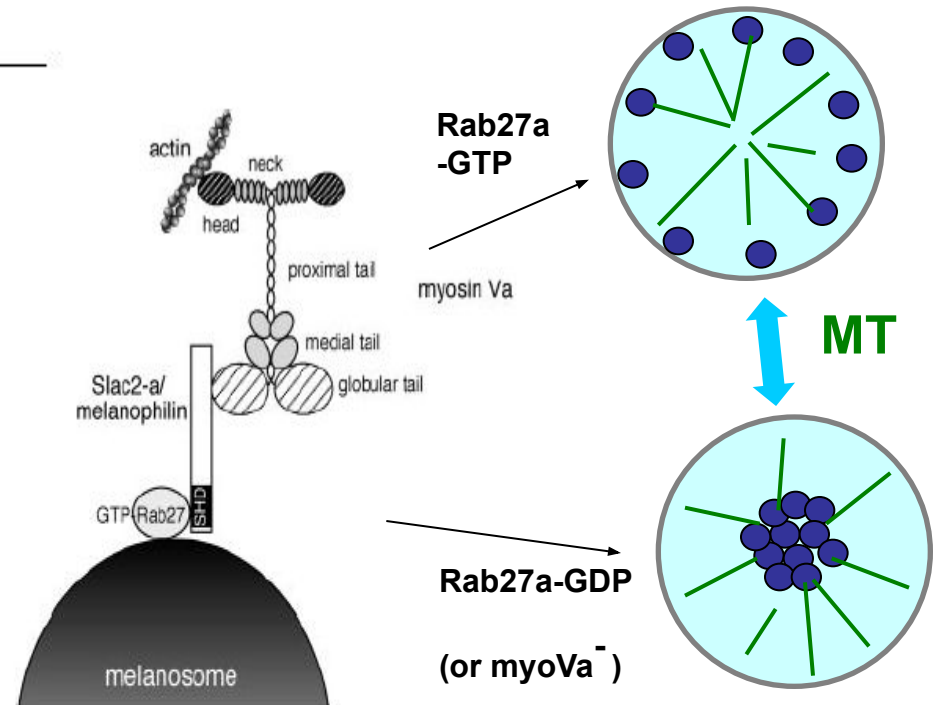
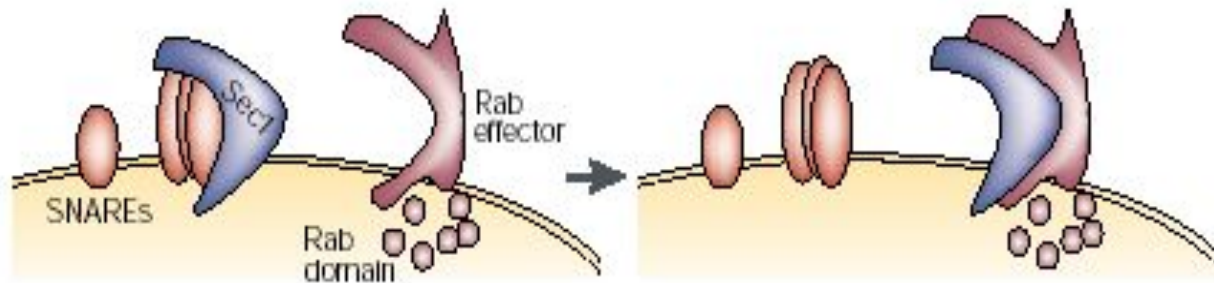


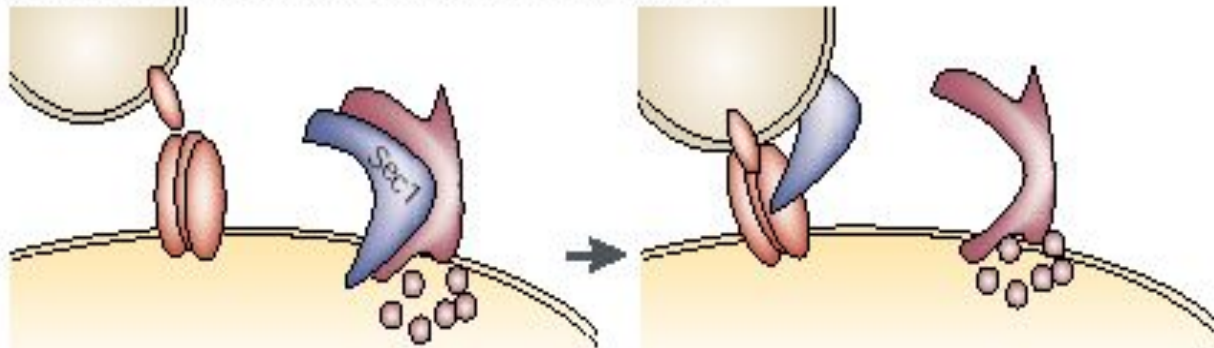
FIG. 4. Schematic representation of the tripartite protein complex responsible for melanosome transport. Rab27A is associated with the melanosome (15, 19, 42). Slac2-a binds the GTP-bound form of Rab27A through its SHD (Fig. 1) (13) and also directly binds the globular tail of myosin Va through the C-terminal domain (Fig. 3). The head (motor) domain of myosin Va interacts with actin filaments. Thus, the tripartite protein complex of Rab27A, Slac2-a/melanophilin, and myosin Va is essential to the capture and local movement of melanosomes in the actin-rich cell periphery (25).

3. В процессе заякоривания Rab-белок (GTP-связанный) способен снимать протекторный белок n-Sec1 с t-SNARE и активировать его для участия в образовании SNARE-комплекса

a Sec1 homologues bind Rab effectors
Rab effector removes negative regulation



Rab effector delivers Sec1 to stabilize *trans*-SNARE pairs



Rab-белки:

1. Участвуют в формировании транспортной везикулы (за счет взаимодействия со SNARE, окаймлениями и/или грузами)
2. Участвуют в ее перемещении к мембране-мишени (за счет взаимодействия с цитоскелетом)
3. Опосредуют 1-ю фазу слияния, стабилизируя везикулу напротив мембраны-мишени
4. Активируют t-SNARE, удаляя протекторный белок, могут взаимодействовать со SNARE (как v-, так и t-)

т.е. только 3+4 – участие в регуляции слияния

Table 1 | **Rab proteins and their effectors**

Rab	Rab function	Direct effector	Effector function	Rab specificity	Effector partners	Partner features
Rab1	• ER–Golgi transport	p115	• Tethering • Sequestering SNAREs into budded vesicles	Rab1–GTP	Giantin GM130	• Tethering of COPI-coated vesicles to Golgi
		PRA1	• Rab receptor (proposed)	Rab1 Rab3 Rab4b Rab5a Rab5c	VAMP2	• v-SNARE involved in bilayer fusion
Rab3	• Rab3a: synaptic vesicle and chromaffin granule secretion • Rab3b, c, d: regulated secretion	Rabphilin-3	• Potentiates fusion	Rab3–GTP	α -actinin Rabaptin-5	• Crosslinks actin filaments into bundles • Stimulated by Rabphilin-3 interactions • Also binds Rabaptin-5, an effector of Rab5 and Rab4
		RIM1 RIM2	• Membrane fusion	Rab3–GTP	RIM-BP1	• Contains fibronectin type III repeats and SH3 domains
		Calmodulin	• Confers calcium sensitivity to protein interactions	Rab3	Many	• Multiple functions
Rab4	• Localized to early/recycling endosomes • Role in sorting/recycling in early endosomes	Rabaptin-5, Rabaptin-5 β Rabaptin-4	• Activates Rab5 through complex with Rabex-5 • Implicated in protein sorting and recycling	Rab4–GTP Rab5–GTP	Rabex-5	• Nucleotide exchange factor
Rab5	• Ligand sequestration at plasma membrane • CCV–EE and EE–EE fusion • Endosome motility	Rabaptin-5 Rabaptin-5 β EEA1	• Stabilizes Rabex-5 recruitment • Tethering, core fusion component	Rab5–GTP Rab4–GTP Rab5–GTP	Rabex-5 Rabphilin-3 Syntaxin13 Syntaxin6	• Nucleotide exchange factor • t-SNAREs essential for bilayer fusion
		p150	• Class III PI(3)K regulatory subunit	Rab5–GTP	hVps34	• Class III PI(3)K catalytic subunit
		p110 β	• Class I PI(3)K catalytic subunit	Rab5–GTP	p85- α	• Class I PI(3)K regulatory subunit
		Rabenosyn-5	• Required for CCV–EE and EE–EE fusion	Rab5–GTP Rab4–GTP	hVps45	• Regulates SNARE complex formation or disassembly
Rab6	• Retrograde Golgi–ER and intra-Golgi transport	Rabkinesin-6	• Vesicle motility • Cytokinesis	Rab6–GTP	Microtubules	
Rab8	• TGN–plasma membrane traffic (basolateral in epithelial cells)	Rab8IP	• Stress-activated protein kinase	Rab8–GTP		
Rab9	• Late endosome to Golgi	p40	• Stimulates fusion	Rab9–GTP		
Rab11	• Recycling through perinuclear recycling endosomes • Plasma membrane–Golgi traffic	Rab11BP	• Unclear	Rab11–GTP	mSec13	• Coat component of COPII vesicles
Rab13	• Involved in the formation of the tight junction	δ -PDE	• Extracts Rab13 from membrane	Rab13		
Rab33b	• Intra-Golgi transport	Rab33b-BP	• Probably regulates motility of Rab33 vesicles	Rab33b–GTP		

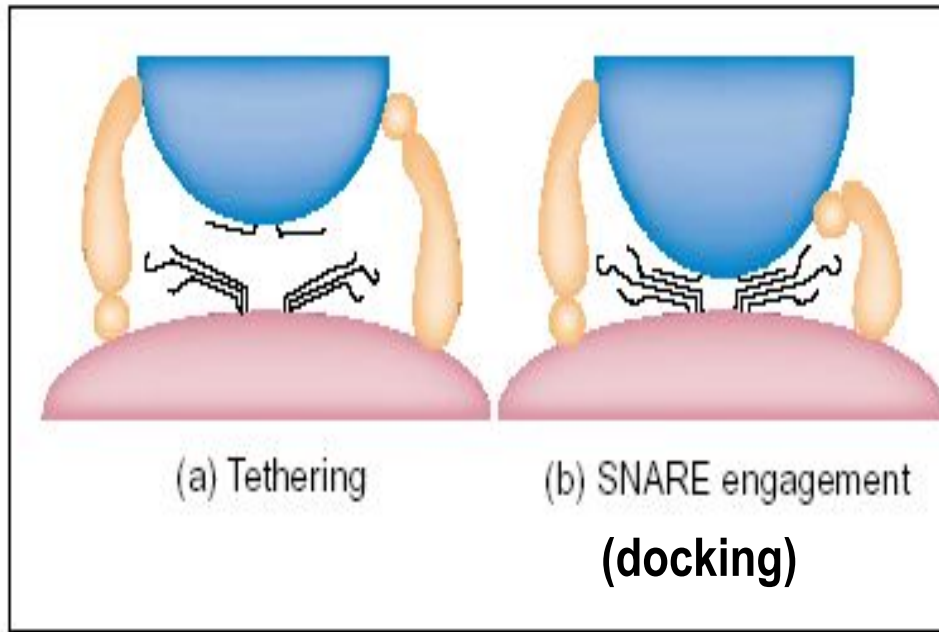
Rab-белки в дрожжах:

Ypt1p	• ER-Golgi	Uso1p	• Tethering of ER-derived vesicles	Recruitment regulated by Ypt1p		
		Yp1p-Yif1p complex	• Ypt GTPase binding to the Yp1p-Yif1p complex essential for vesicle docking and fusion	Ypt1p, Ypt31p Sec4p		• Integral membrane protein • Possible receptor and GDI-releasing factor
Sec4p	• Delivery of TGN-derived vesicles into the bud	Sec15p	• Tethering through interaction of vesicular Sec15p and Sec10p with target complex in the bud	Sec4p-GTP	Exocyst	• Marks the site for docking or fusion
Ypt51p/Vps21p	• Golgi-endosome and plasma membrane-endosome transport	Vac1p	• TGN-Golgi transport	Ypt51p-GTP	Vps45p Pep12p	• Regulates SNARE complex formation or disassembly • Pep12p is a t-SNARE
Ypt7p	• Vacuole fusion	Vam2p-Vam6p	• Tethering and nucleotide exchange activity • Budding of AP3 vesicles?	Ypt7p-GTP	HOPS complex Vam3p SNARE complex δ-adaptin	• Links SNAREs with Ypt activation • Marks the site for tethering/fusion • AP3-vesicle formation at the Golgi

(CCV, clathrin-coated vesicle; EE, early endosome; ER, endoplasmic reticulum; PDE, phosphodiesterase; PI(3)K, phosphoinositol-3-OH kinase; SH3, Src homology region 3 domain; TGN, *trans*-Golgi network; Vamp, vesicle-associated membrane protein.)

Слияние происходит в 3 фазы:

1. Tethering (> 20 nm), Rabs
2. Docking (< 10 nm), SNAREs
3. lipid bilayers reorganization



Для полного слияния необходима реорганизация липидных бислоев обеих мембран

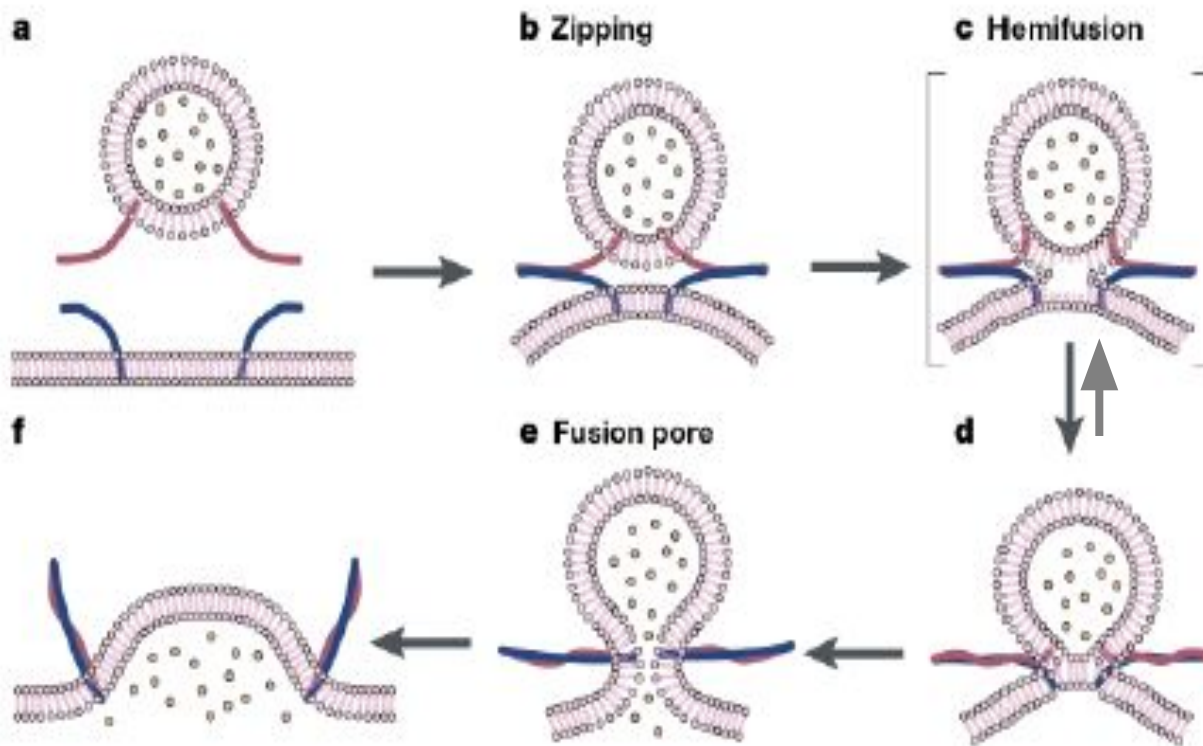


Figure 5 | Model of SNARE-mediated lipid fusion.

Это промежуточное состояние, когда пора может полностью открыться, а может и закрыться

↓
flickering

В качестве «носителя» для реорганизации липидных бислоев может выступать V_0 -субъединица везикулярной протонной помпы V_1/V_0

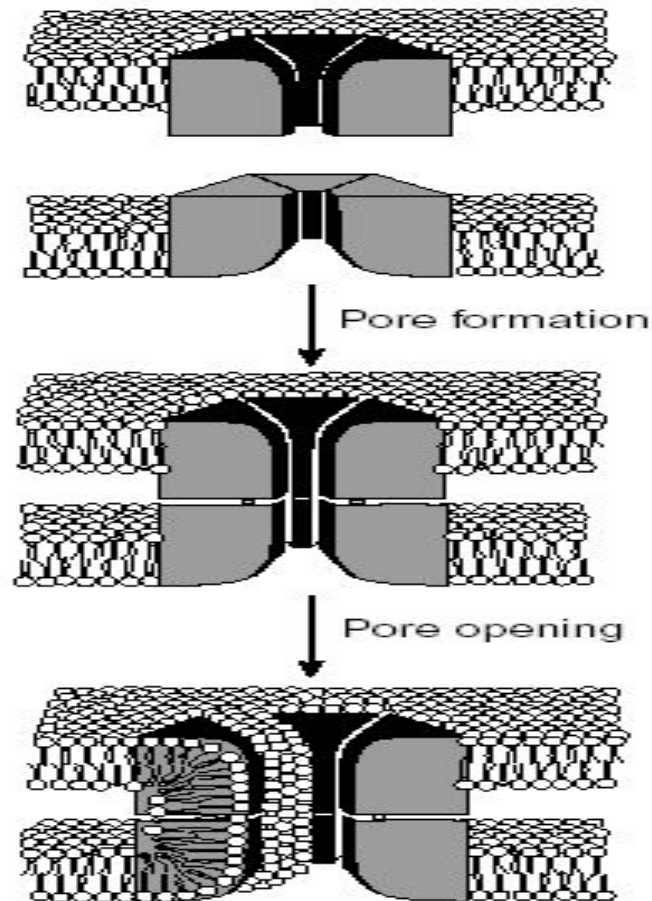
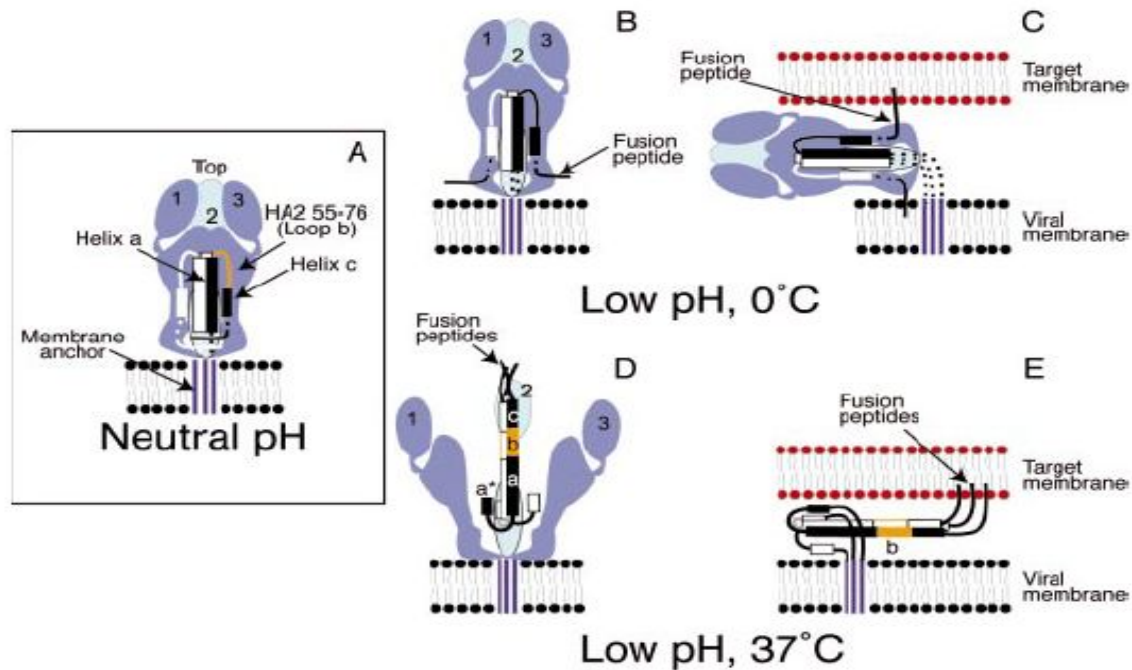


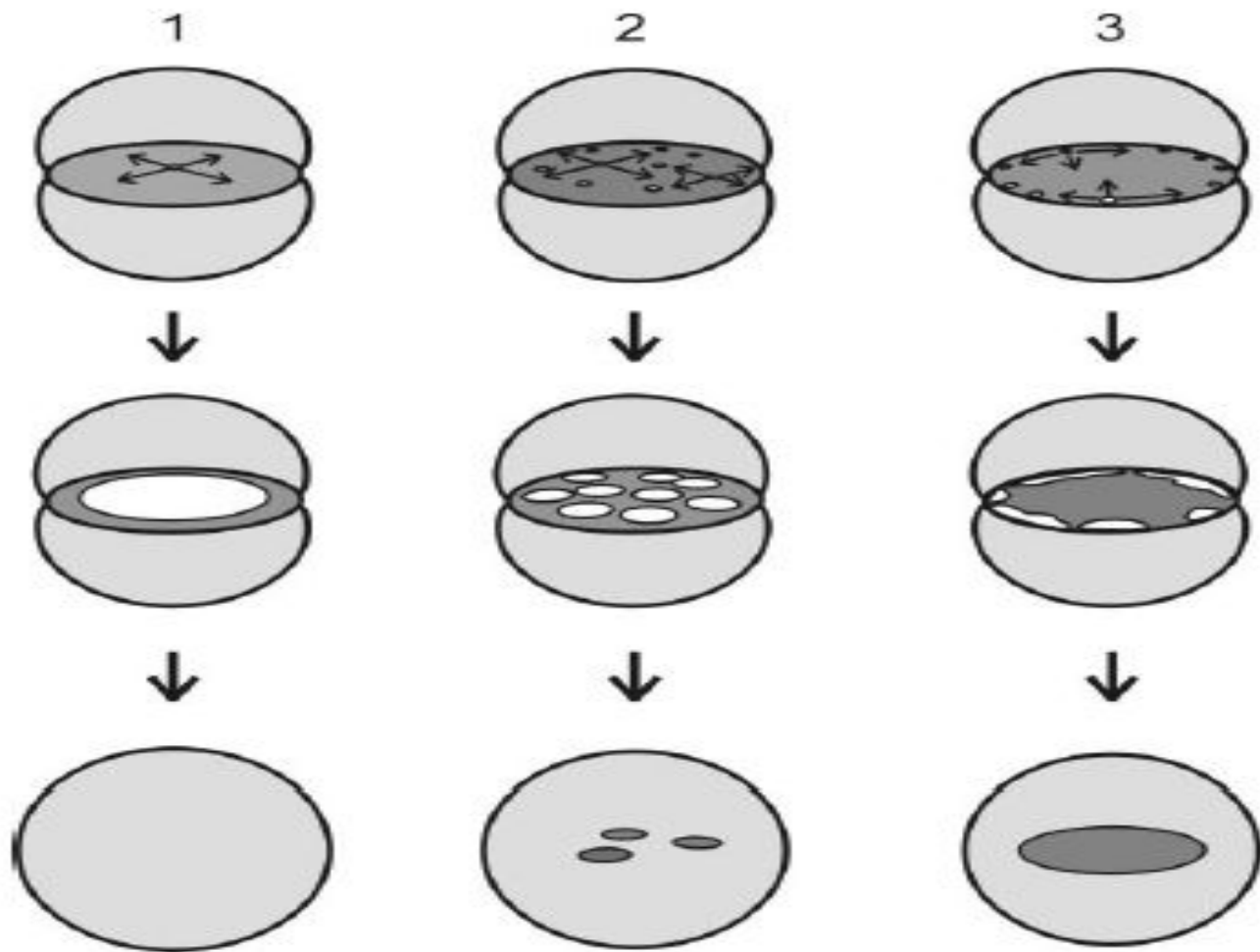
Figure 2 One possibility of a pore model for fusion (Almers 1990). Integral mem-

Не все слияния в клетке опосредуются NSF-SNAP-SNARE-системой:

Пероксисомы и митохондрии не имеют SNAREs (и Rab), но тем не менее способны к гомотипическому слиянию.

Вирусы имеют свою машинерию для образования пор слияния





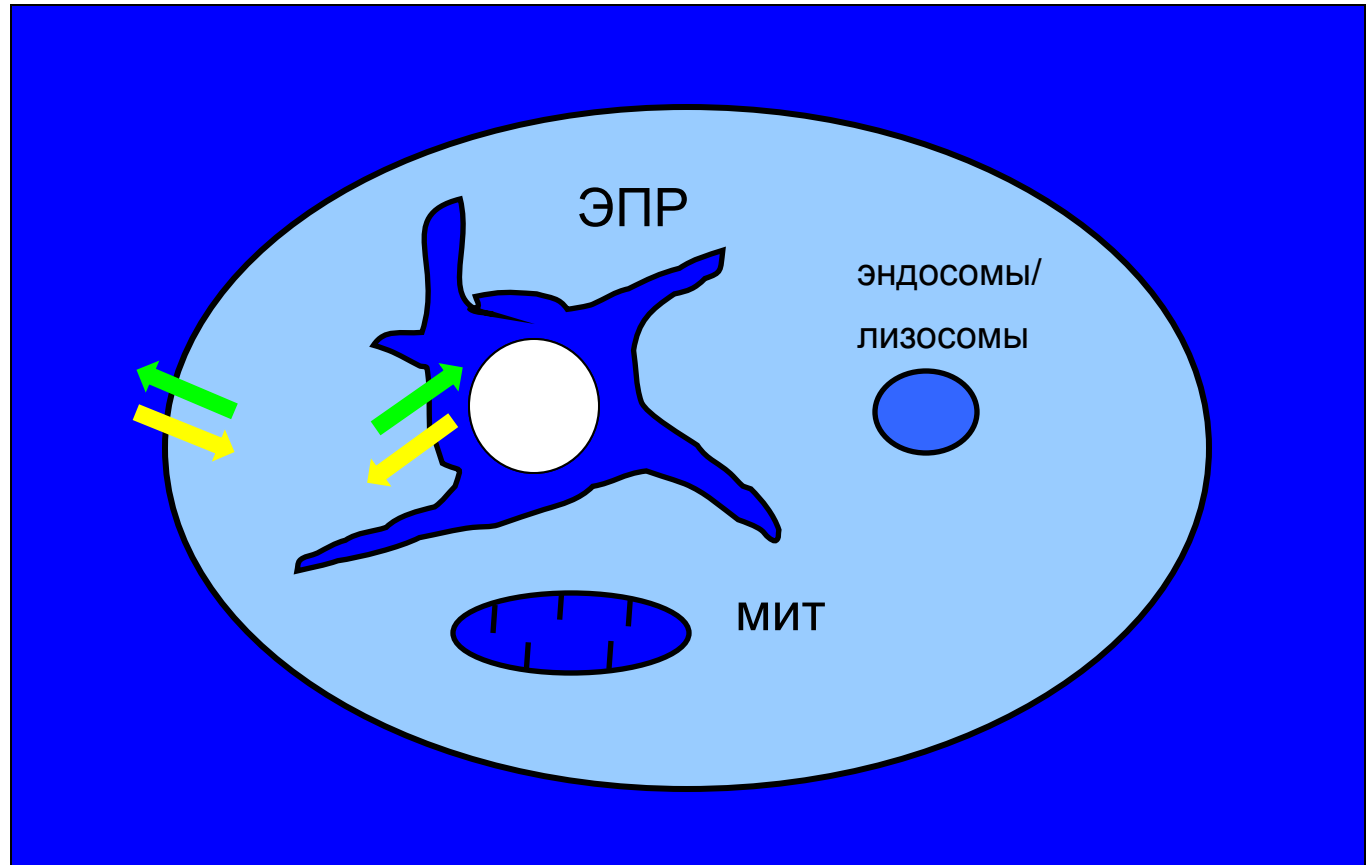
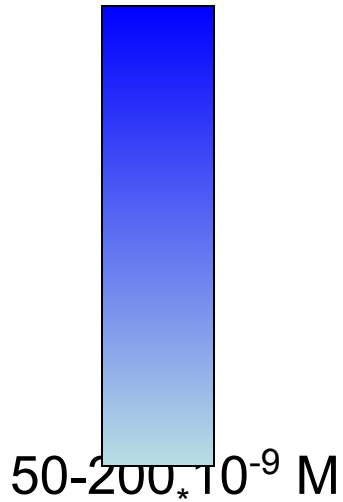
Possible Scenarios during Fusion of Two Big Vesicles with a Large Contact Area (Shaded)

1. Radial expansion of a single central fusion pore.
2. Radial expansion of multiple, randomly scattered fusion pores. If all pores expand radially, small pieces of the connecting double-membrane layer are expected to be left in the lumen.
3. Expansion of fusion pores aligned along the rim of the connected area. A central membrane disk is excised.

Ca^{2+} и слияние мембран

Концентрация
 Ca^{2+}

10^{-3}M



Существует множество ионных каналов (как регулируемых, так и каналов утечки) и транспортеров, селективных по отношению к кальцию

В результате даже массированный вход Ca^{2+} может быть быстро нивелирован за счет его выброса в окружающую среду и обратной закачки в депо.

Кальций участвует в регуляции

- слияния синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной
- слияния экзоцитозных пузырьков с ТМ в случае регулируемой секреции в электроневозбудимых клетках
- гомотипического слияния COPII-везикул
- слияния эндосом друг с другом и с лизосомами



Сложилось представление о том, что все процессы слияния являются кальций-зависимыми



Это предполагает существование универсального молекулярного механизма, с помощью которого Ca^{2+} регулирует слияние мембран

Однако, такого механизма до сих пор не обнаружено

ВАРТА и EGTA – «быстрый» и «медленный» хелаторы кальция

в концентрации 10 мМ ВАРТА гасит типичный кальциевый градиент за 0,3 микросекунды

EGTA - за 1,2 миллисекунды

быстрый хелатор подавляет слияния эндосом и СОРII-везикул, тогда как медленный – нет



для эффективного слияния повышение уровня Ca^{2+} требуется на время меньше 1 миллисекунды.



источник кальция (т.е. открытый канал) должен находиться на расстоянии порядка 20 нм от объекта влияния

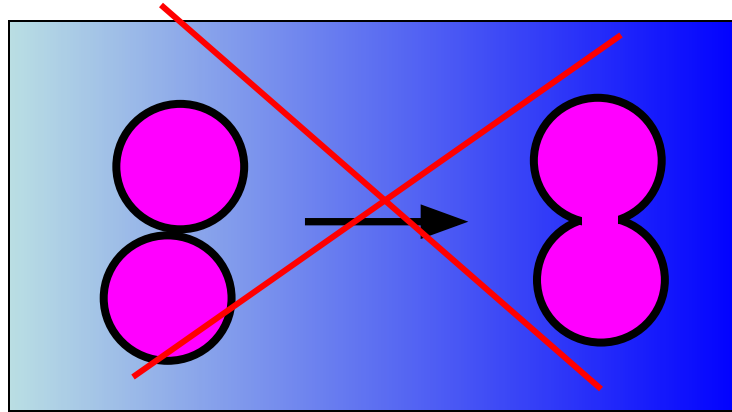
Слияния идут за счет локального повышения уровня кальция



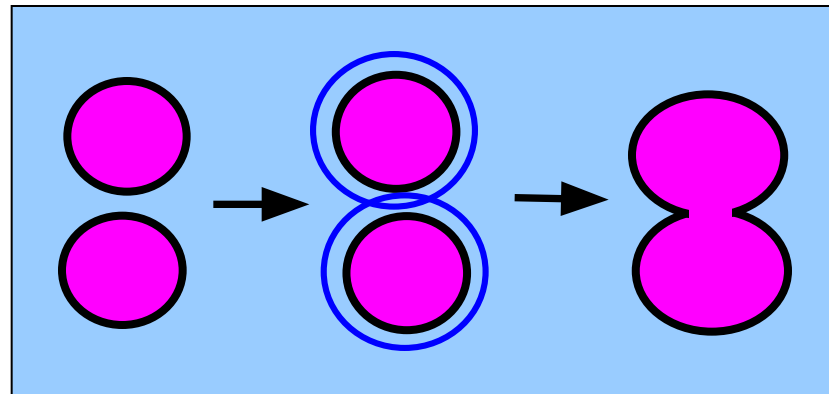
объект влияния - машинерия, связанная со слиянием;

При действии ростовых факторов, запуская механизм опустошения внутриклеточных депо, «все должно слиться со всем», чего не происходит в действительности

Тотальное повышение уровня кальция



Локальное повышение уровня могут обеспечивать сами везикулы благодаря наличию в их мембранах кальциевых каналов



Мишени и механизмы действия кальция?

Гипотеза: докинг комплекса SNARE стимулирует выброс Ca^{2+} , а он, в свою очередь, активирует некие Ca^{2+} -связывающие белки, которые и регулируют слияние.

1. В синапсах:

Синаптотагмин –

имеет 2 кальций-связывающих C2-домена,

стабилизирует SNARE-комплекс до момента выброса Ca^{2+} через ассоциированный со SNAP25 канал,

после чего связывает Ca^{2+} и изменяет свою конформацию таким образом, что частично погружается в мембрану, способствуя быстрой реорганизации липидов.

Сам он после этого диссоциирует, что и прекращает дальнейшие слияния.

Позитивная регуляция слияния

2. На эндосомах:

HRS – (компонент сортирующего комплекса ESCRT0, необходимого для направления груза в лизосомы)

напрямую взаимодействует с Q-SNARE SNAP-25 за счет своего SNARE-подобного домена, препятствуя формированию комплекса слияния с синтаксином-13 и подавляя связывание с R-SNARE VAMP2.

Это ингибиторное взаимодействие существует до тех пор, пока не происходит выброс кальция из эндосом, в результате чего HRS высвобождается из комплекса, освобождая путь для SNARE-опосредуемого слияния.

Время выброса Ca^{2+} из эндосом, в свою очередь, определяется моментом достижения определенного уровня pH (6,2 – 6,7) за счет работы вакуолярной протонной помпы и осуществляется через pH-чувствительный кальциевый канал

Таким образом, в данном случае **кальциевый сенсор скорее является протектором несанкционированного слияния, которое могло бы произойти и в отсутствие кальция.**



Негативная регуляция слияния

3. На биосинтетическом пути компонентами транспортной машинерии, зависимой от Ca^{2+} , оказались некоторые белки окаймлений COPI и COPII.

Связывание кальция стабилизирует эти окаймления.

Как это может повлиять на слияния?

Во-первых, стабилизация окаймлений может способствовать формированию транспортных пузырьков или препятствовать их обратным слияниям.

Во-вторых, даже на стадии взаимодействия с ERGIC везикулы могут сохранять часть окаймления, однако и в этом случае **нельзя сказать, ингибиторное или стимулирующее действие на слияния будет оказывать Ca^{2+} .**

Итак,

- **универсального механизма регуляции кальцием слияния мембран не существует.**
- **некоторые стадии транспортных процессов, например, транспорт из ЭПР в ERGIC, в отличие от слияний между ERGIC и АГ, не подавляются BAPTA-AM – на некоторых путях слияния могут не зависеть от кальция**

Еще одна функция Rab-белков – организация функциональных доменов на мембране органеллы

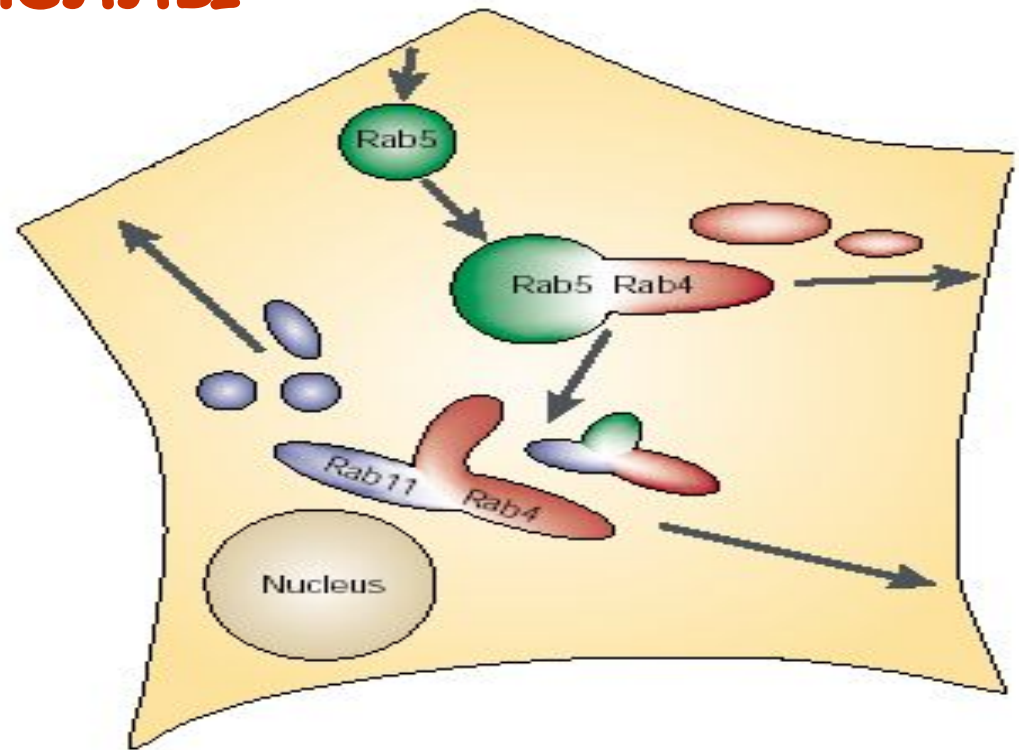
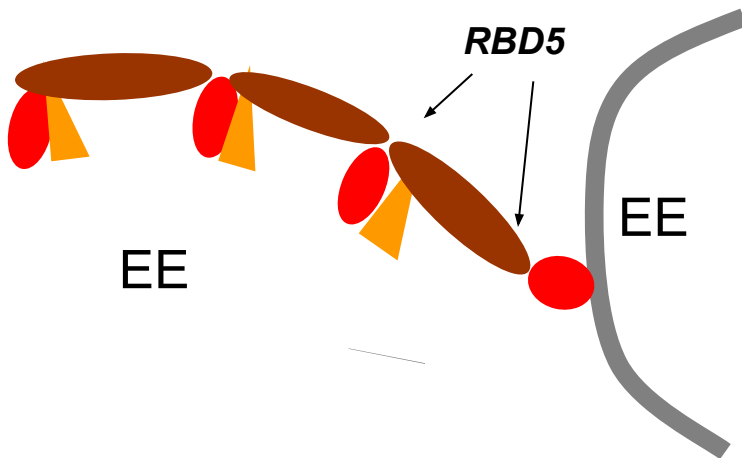


Figure 2 | **Model of Rab domains on endosomes.** Studies of Rab5, Rab4 and Rab11 tagged with green fluorescent protein (GFP) have shown that these Rab proteins are compartmentalized within the membrane of early endosomes⁶⁸. Cargo flows sequentially through these domains as indicated by the arrows. The Rab domains also have a specific distribution and different pharmacological properties⁶⁸. We propose that, similarly to the Rab5 effectors, Rab4 and Rab11 effectors are clustered in defined areas of the endosome membranes that are linked to each other through bifunctional Rab effectors.

Эффекторы Rab5 –

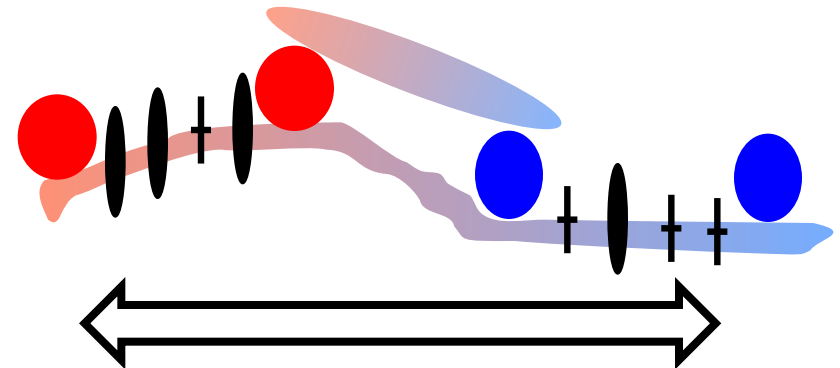
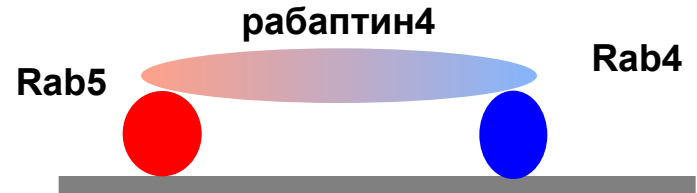
Рабаптин5, рабаптин5а, - стабилизируют связь Rab5 с Rabex5, поддерживая Rab5 в активированном состоянии



Таким образом рабаптин 5 может регулировать гомотипическое слияние ранних эндосом

рабаптин4 – 2 сайта связывания с Rab5 и Rab4

Но Rab4 связан с рециклирующими везикулами, т. е. с отшнуровывающимися от ранних эндосом !



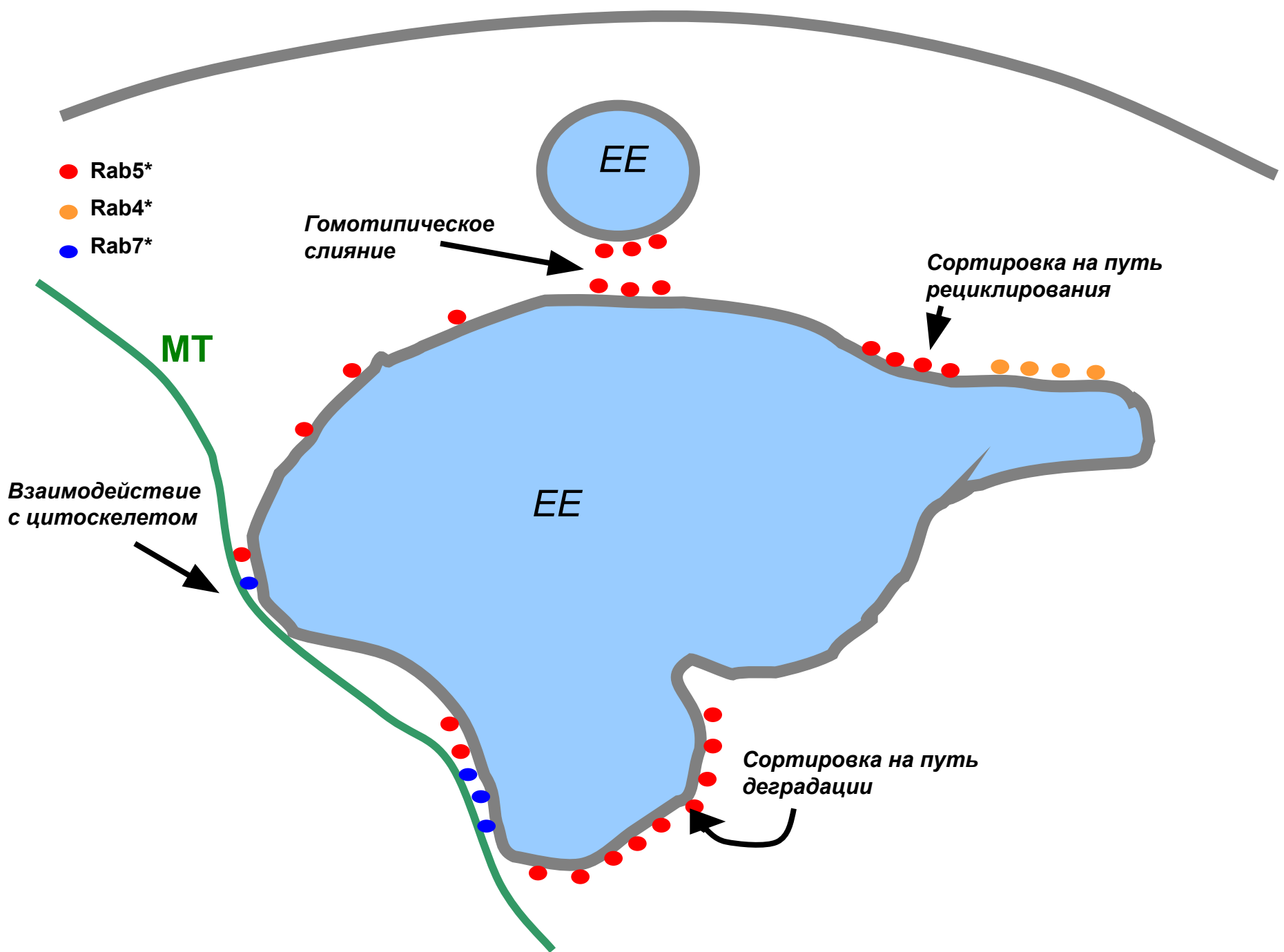
Заякоривание
в EE

Рециклирование
на ПМ

Множество эндосомных Rab-белков, собранных в субдомены, отражает многообразие сортирующих функций эндосом, а также многообразие их ролей

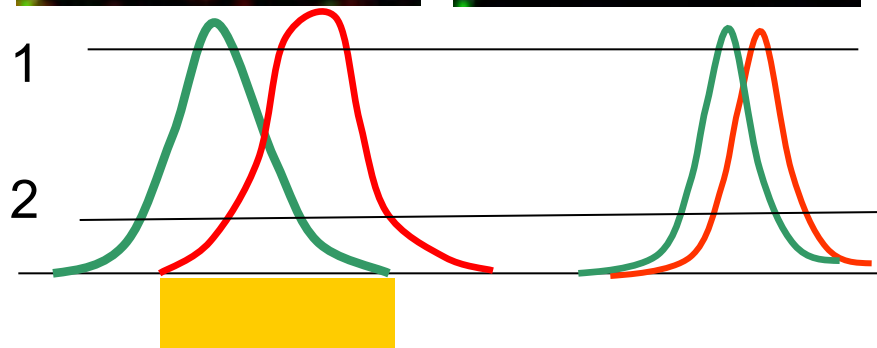
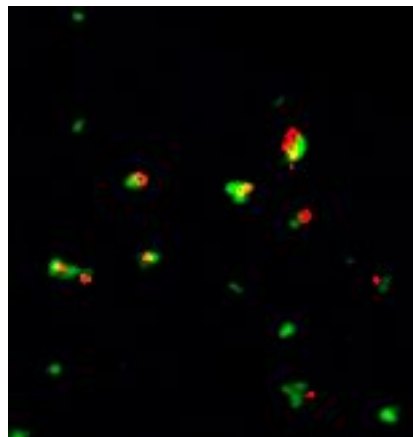
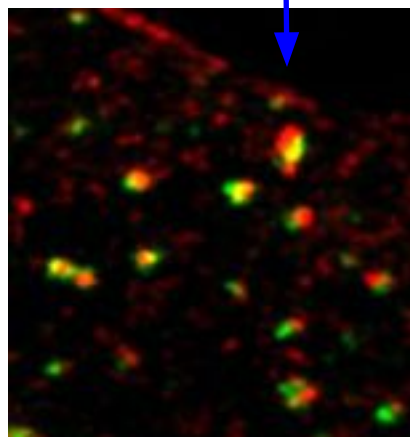
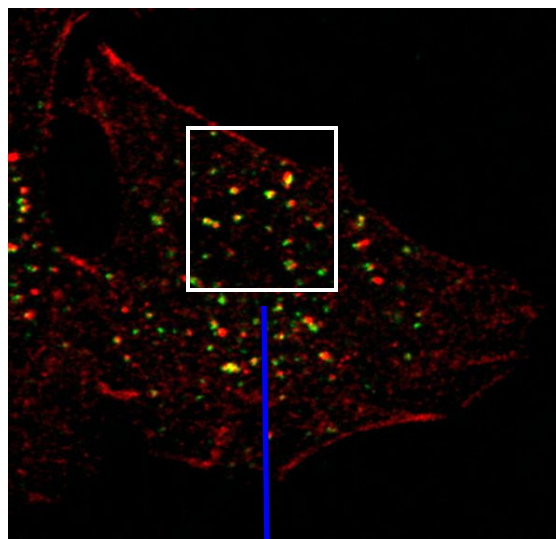
Table 1. Endosomal Rab proteins

Rab	Intracellular Localization	Function	References
Rab4	Early and recycling endosomes	Endocytic recycling to plasma membrane	Daro et al., 1996; Mohrmann and van der Sluijs, 1999
Rab5	Clathrin coated vesicles and early endosomes	Endocytic internalization and early endosome fusion	Bucci et al., 1992; Gorvel et al., 1991
Rab7	Late endosomes	Transport from early to late endosomes	Feng et al., 1995; Gorvel et al., 1991; Mukhopadhyay et al., 1997; Vitelli et al., 1997
Rab9	Late endosomes	Transport from late endosomes to the trans-Golgi	Lombardi et al., 1993; Riederer et al., 1994
Rab11	Golgi and recycling endosomes	Export from the Golgi via endosomes, apical and basolateral endocytic recycling	Chen et al., 1998; Duman et al., 1999; Goldenring et al., 1996; Ren et al., 1998; Ullrich et al., 1996; Urbé et al., 1993
Rab15	Early and recycling endosomes	Inhibitor of endocytic internalization	Zuk and Elferink, 1999
Rab17	Epithelial specific; apical recycling endosome	Transport through apical recycling endosomes (see also text)	Hunziker and Peters, 1998; Zacchi et al., 1998
Rab18	Epithelial specific; kidney dense apical tubules and basolateral domain of intestine	Uncharacterized	Lütcke et al., 1994
Rab20	Epithelial specific; kidney dense apical tubules	Uncharacterized	Lütcke et al., 1994
Rab22	Endosomes and plasma membrane	Uncharacterized	Olkkonen et al., 1993
Rab24	Endoplasmic reticulum, Golgi and late endosomes	Uncharacterized	Olkkonen et al., 1993
Rab25	Epithelial specific; apical recycling endosome	Transport through apical recycling endosomes (see also text)	Casanova et al., 1999

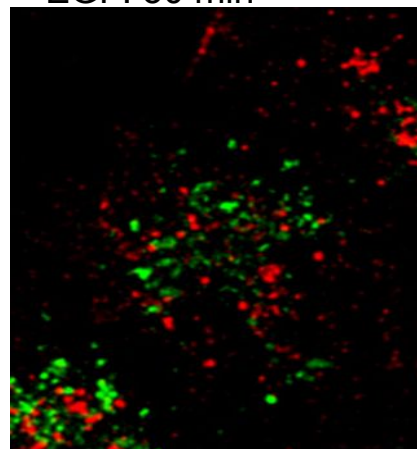


EGF 30 min **EGFR**, **EEA1**

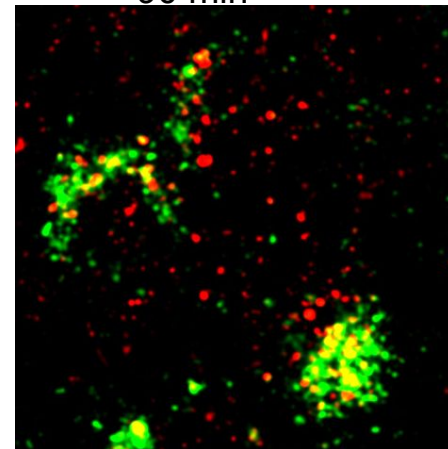
Ранние
эндосомы



EGF: 30 min

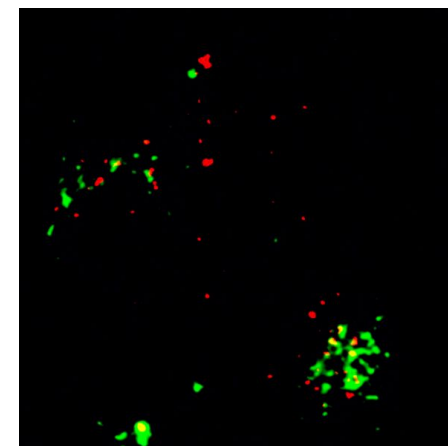


90 min

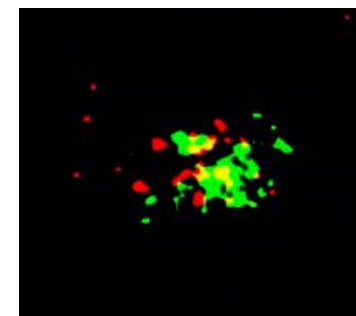
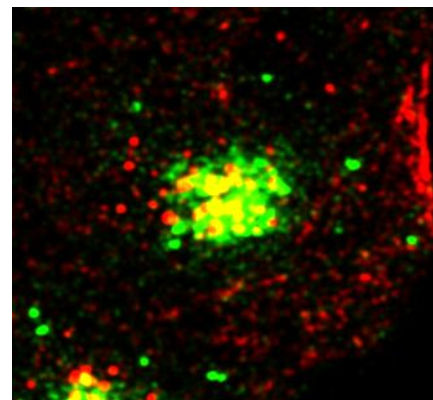


EGFR, **Lamp1**

ЛИЗОСОМЫ



BafA1



Localization and function of Rab proteins in yeast and mammals

Protein	Localization	Function	References
Sec4	post-Golgi vesicles, plasma membrane	Golgi to plasma membrane transport	[72–74]
Ypt1	ER, early Golgi	ER to Golgi, intra-Golgi transport	[48,75,76]
Ypt31, Ypt32	Golgi?	intra-Golgi, Golgi to vacuole transport?	[66]
Ypt51, Ypt52, Ypt53	endosomes	transport in early endocytic pathway	[77]
Ypt6	?	intra-Golgi, Golgi to vacuole transport	[65,67]
Ypt7	?	transport in late endocytic pathway, homotypic fusion of vacuoles	[78–80]
Rab1A, Rab1B	intermediate compartment, CGN	ER to Golgi and intra-Golgi transport	[45,47,49,81–83]
Rab2	intermediate compartment, CGN	ER to Golgi transport	[47,84]
Rab3A	synaptic vesicles, secretory granules	regulated exocytosis in neurons and neuro-endocrine cells	[3,4,85,86]
Rab3B	synaptic vesicles?	regulated exocytosis in neurons?	[87,88]
	tight junctions of polarized epithelial cells	?	
Rab3C	synaptic vesicles	similar to rab3A?	[89]
Rab4A, Rab4B	early endosomes	recycling from early endosomes to plasma membrane	[90]
Rab5A, Rab5B, Rab5C	plasma membrane, clathrin-coated vesicles, early endosomes	plasma membrane to early endosome transport fusion of early endosomes	[84,91–95]
Rab6	medial/trans-Golgi, TGN	intra-Golgi retrograde transport?	[54,55,57–59,61,63]
Rab7	late endosomes	early to late endosome transport late endosome to lysosome transport	[96,97]
Rab8	post-Golgi basolateral vesicles, tight junction in polarized cells	Golgi to basolateral plasma membrane transport in polarized cells	[98,99]
Rab9	late endosomes, TGN	late endosome to TGN transport	[100,101]
Rab10	Golgi and post-Golgi vesicles	?	[68]
Rab11	TGN, recycling endosomes, post-Golgi vesicles	transport through recycling endosomes endosomes to TGN transport?	[102,103]
Rab12	Golgi complex?	?	[104]
Rab13	tight junctions in polarized epithelial cells	?	[105]
Rab17	basolateral plasma membrane in epithelial cells, apical endosomes	transcytosis?	[5]
Rab24	ER, cis-Golgi, late endosomes	?	[104]
Rab27	retinal cells	?	[106]