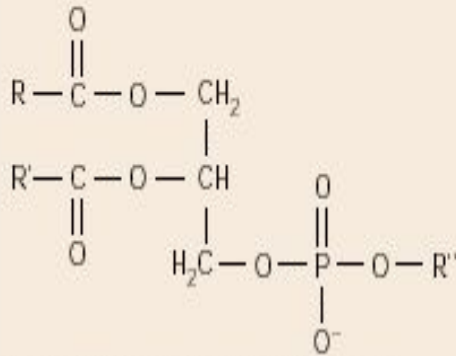


Липиды и везикулярный транспорт

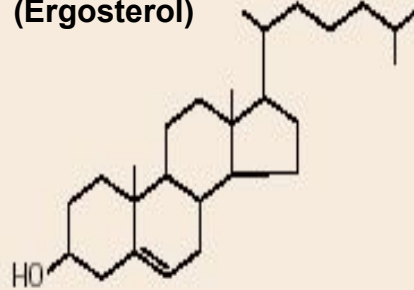
Box 1 | Glossary of lipid structures

Phospholipids (glycerophospholipids)

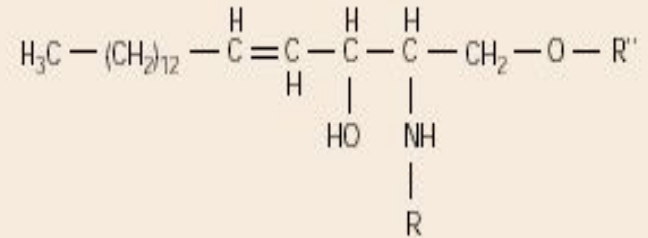


R, R', Hydrocarbon chains of fatty acids
R'', Head-group

Cholesterol (Ergosterol)



Sphingolipids



+

- Огромное количество модификаций головных групп, по-разному гликозилированных
- Различия в длине хвостов и степени их насыщенности



В настоящий момент известно более 100 липидов в биол. мембранах

Box 1 | Structure of mammalian membrane lipids

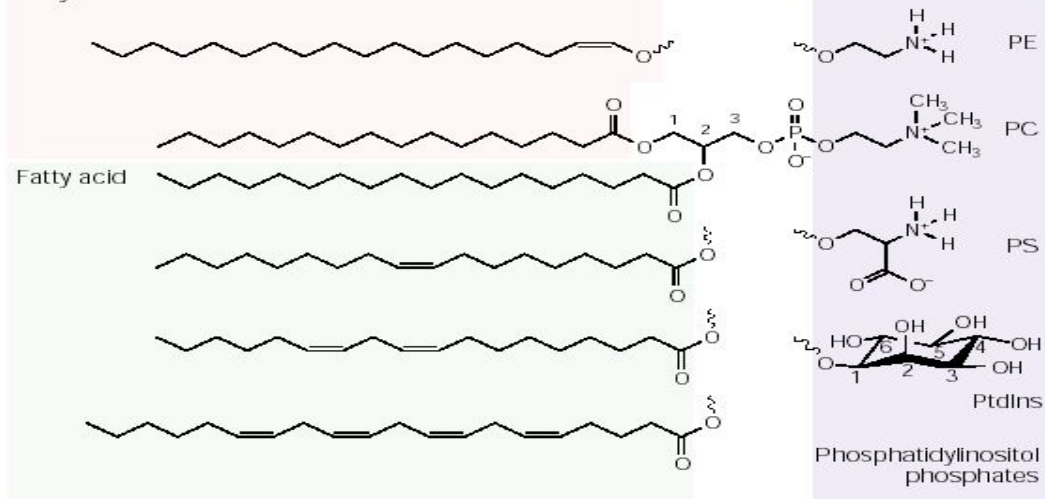
The most abundant animal lipid, phosphatidylcholine (PC), consists of glycerol, two fatty acid chains on sn-1 and -2, and phosphate (phosphatidic acid, PA) carrying the head group choline. Various C16–C20 fatty acids can be esterified at sn-2, but, generally, C16:0 or C18:0 is esterified at sn-1 (diacylglycerol). A long-chain alcohol can be ether-bonded at sn-1 (alkyl-acylglycerol). In plasmalogens, the alcohol is unsaturated (alkenyl-acylglycerol). In plasmalogens, the alcohol is unsaturated (alkenyl-acylglycerol). A *cis*-double bond kinks the ether and acyl chains and increases the membrane area of the lipid. PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine.

Sphingolipids contain a C18–C20 sphingoid base, mostly sphingosine, and a fatty acid, amide-linked to the nitrogen (ceramide). In dihydroceramide, sphingosine lacks the *trans*-double bond (sphinganine). Phytoceramide contains phytosphingosine (C4-OH sphinganine). The fatty acid can be long, *cis*-unsaturated at C15, and hydroxylated at C2. SM, sphingomyelin; GalCer, galactosylceramide; GlcCer, glucosylceramide; LacCer, lactosylceramide. Yeast sphingolipids contain inositolphospho-phytoceramide with longer fatty acids, notably C26:0.

Sterols are defined by their planar and rigid tetracyclic ring. Animal membranes contain cholesterol and low quantities of related sterols such as 7-dehydrocholesterol. Cholesterol esters with fatty acids are storage lipids, just like triacylglycerol. Yeasts contain ergosterol, plants mainly stigmasterol and sitosterol.

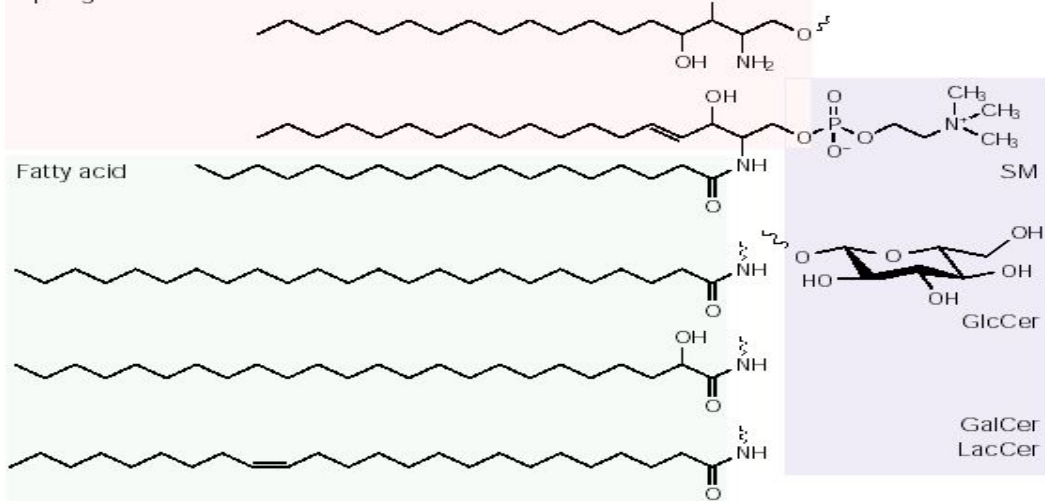
Glycerolipids

Fatty acid or alcohol

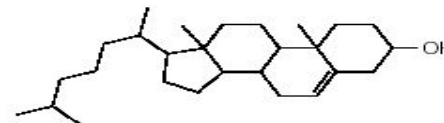


Spingolipids

Sphingoid base



Cholesterol



Способов заякоривания белков в мембране много:

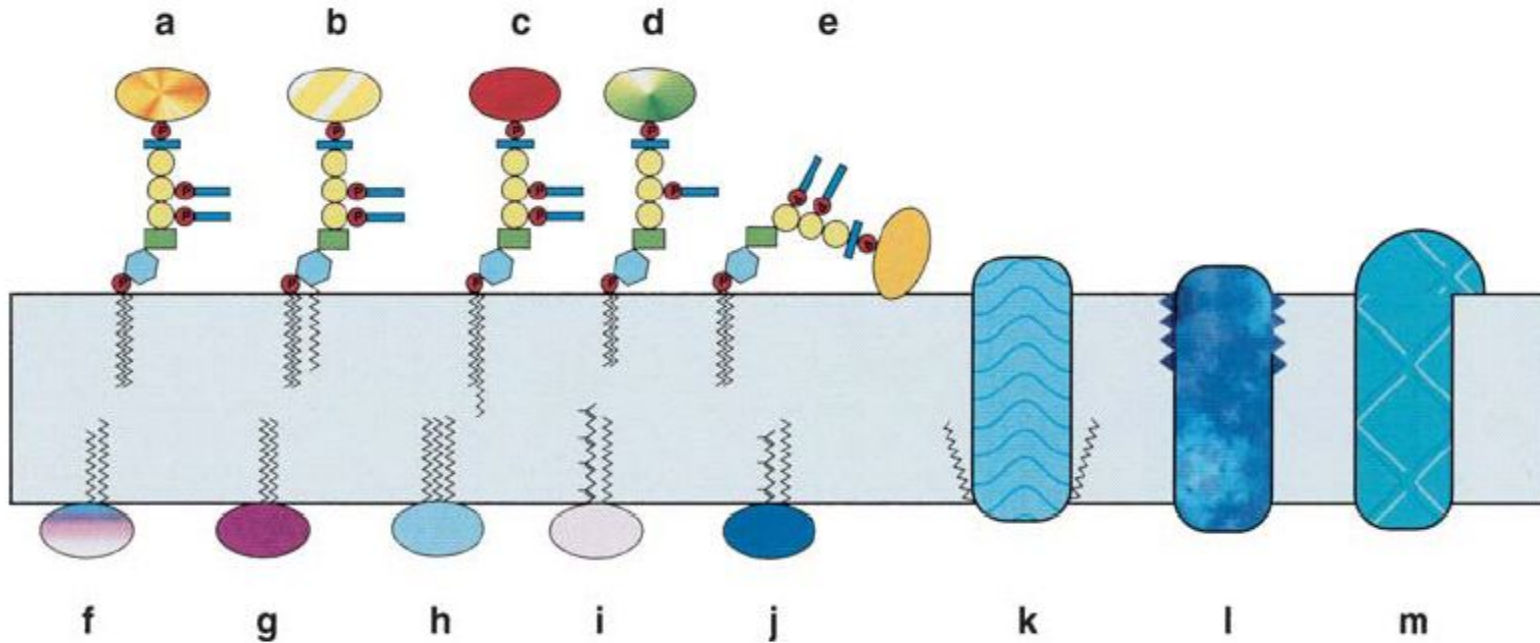


Figure 2 Heterogeneity in the mechanisms through which proteins are targeted to lipid rafts

(a) GPI-anchored protein in which the phosphatidylinositol moiety contains two $C_{18:0}$ acyl groups. (b) GPI-anchored protein in which the inositol head group is acylated. (c) GPI-anchored protein in which the glycerophospholipid moiety is replaced with a ceramide. (d) GPI-anchored protein in which the *sn*-1 and *sn*-2 acyl chains have been remodelled to contain myristate. (e) GPI-anchored protein in which an additional raft-targeting signal is present in the protein component of the molecule. (f) A protein modified by the addition of a myristate and a palmitate group. (g) A protein modified by the addition of two palmitate groups. (h) A protein modified by the addition of three palmitate groups. (i) A protein modified by the addition of a geranylgeranyl group and a palmitate. (j) A protein modified by the addition of a farnesyl group and a palmitate. (k) A transmembrane protein modified by the addition of two palmitate groups. (l) A transmembrane protein targeted to rafts via interaction of amino acid residues with the exoplasmic leaflet of the plasma membrane. (m) A transmembrane protein targeted to rafts by interaction of its extracellular domain with raft constituents. The list is not complete as other examples are known to exist.

Исходно считалось, что липиды мембран играют роль инертной платформы, пассивного двумерного растворителя, в котором заякорены функционально активные белки

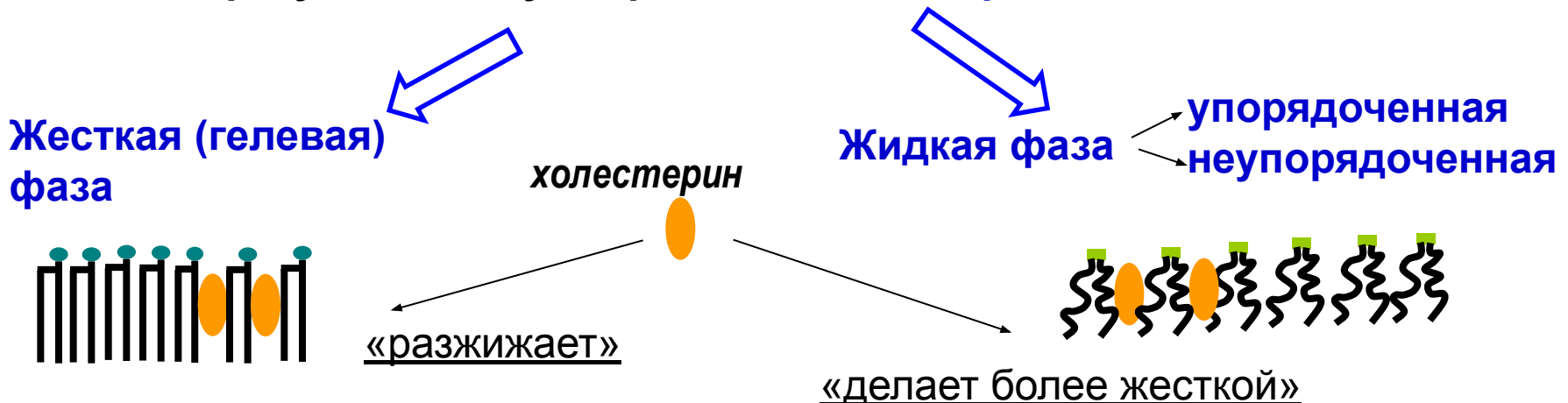
С развитием методических подходов, позволивших анализировать липидный состав отдельных органелл и маленьких участков мембран (флуоресцентно-меченые производные липидов, FRET, FRAP)

оказалось, что мембраны устроены по доменному принципу, т.е. существует латеральная асимметрия

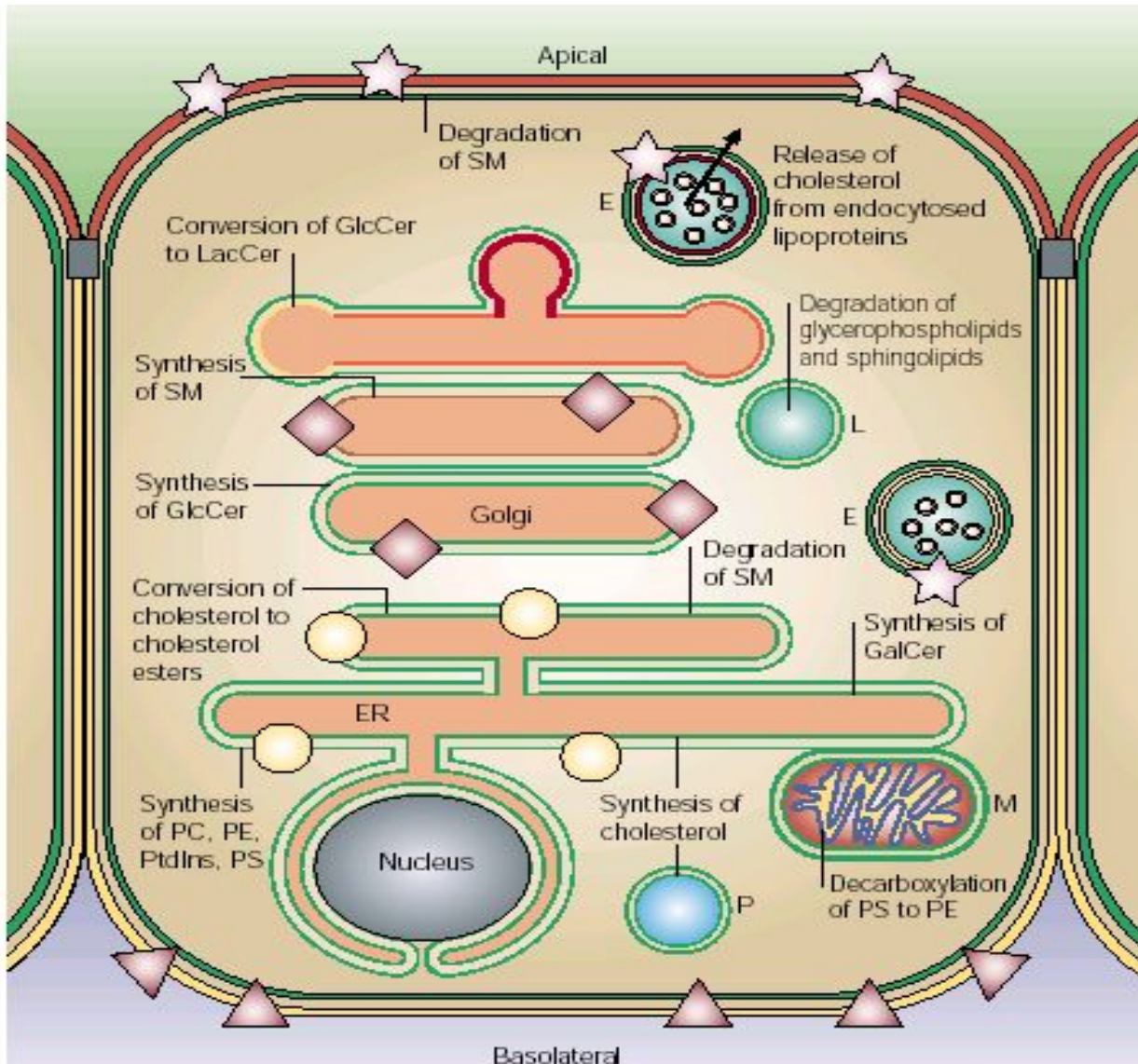
Домены могут быть огромными (\approx микроны) – **апикальная и базолатеральная мембраны**);

могут быть маленькими (микродомены, \approx 10 -100 нм, от нескольких десятков до неск. тысяч молекул липидов – **рафты, DIGs, DRM**)

В зависимости от свойств хвостов возможна более или менее тесная упаковка - результатом будет разделение на «**фазы**»



Липидный состав мембран разных компартментов неоднороден



PM: 25% PC
10% SL
5% PS
30-40% cholesterol
aPM of polarized epithelial cells:
GSL/SM, PC ▲

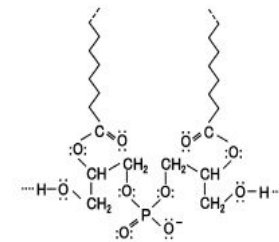
ER: 60% PC
10% PE
10% PI

■ Sphingomyelin ■ LBPA ■ Phosphatidylcholine ■ Cardiolipin

Липидные «территории» на эндоцитозном пути

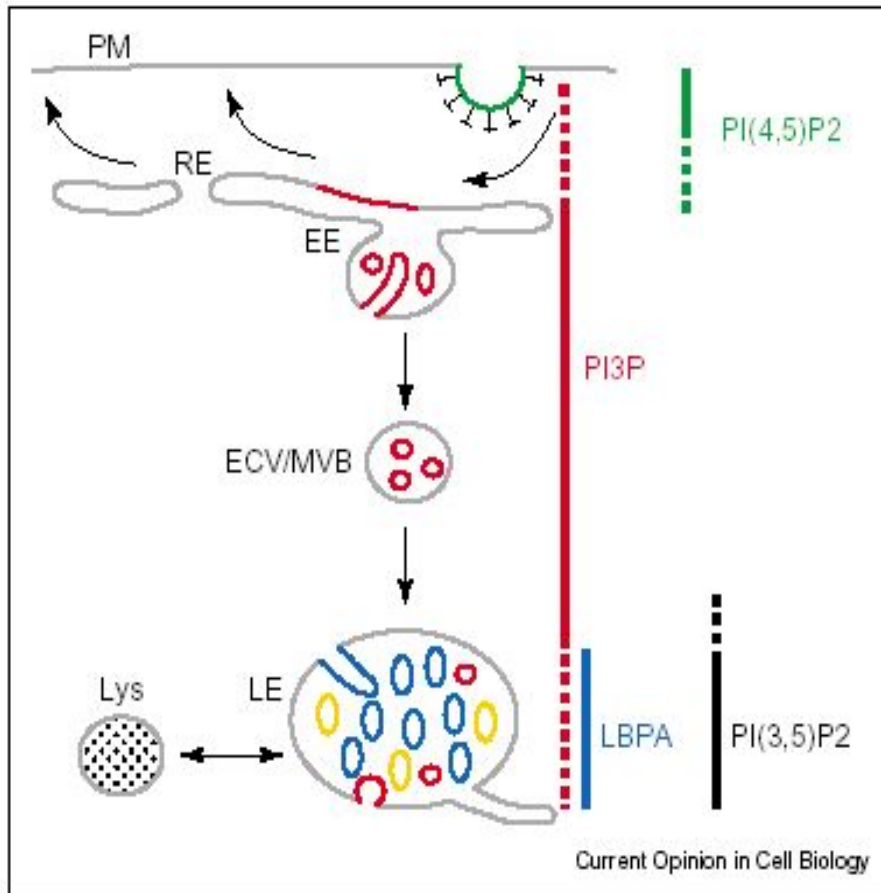
Различные фосфатидилинозитиды, продукты фосфатидилинозитолкиназ, работают на эндоцитозном пути

LBPA (lysobiphosphatic acid) – в тотальном пуле клет. липидов < 1%;
а в мембранах внутренних пузырьков МВТ – 15%;



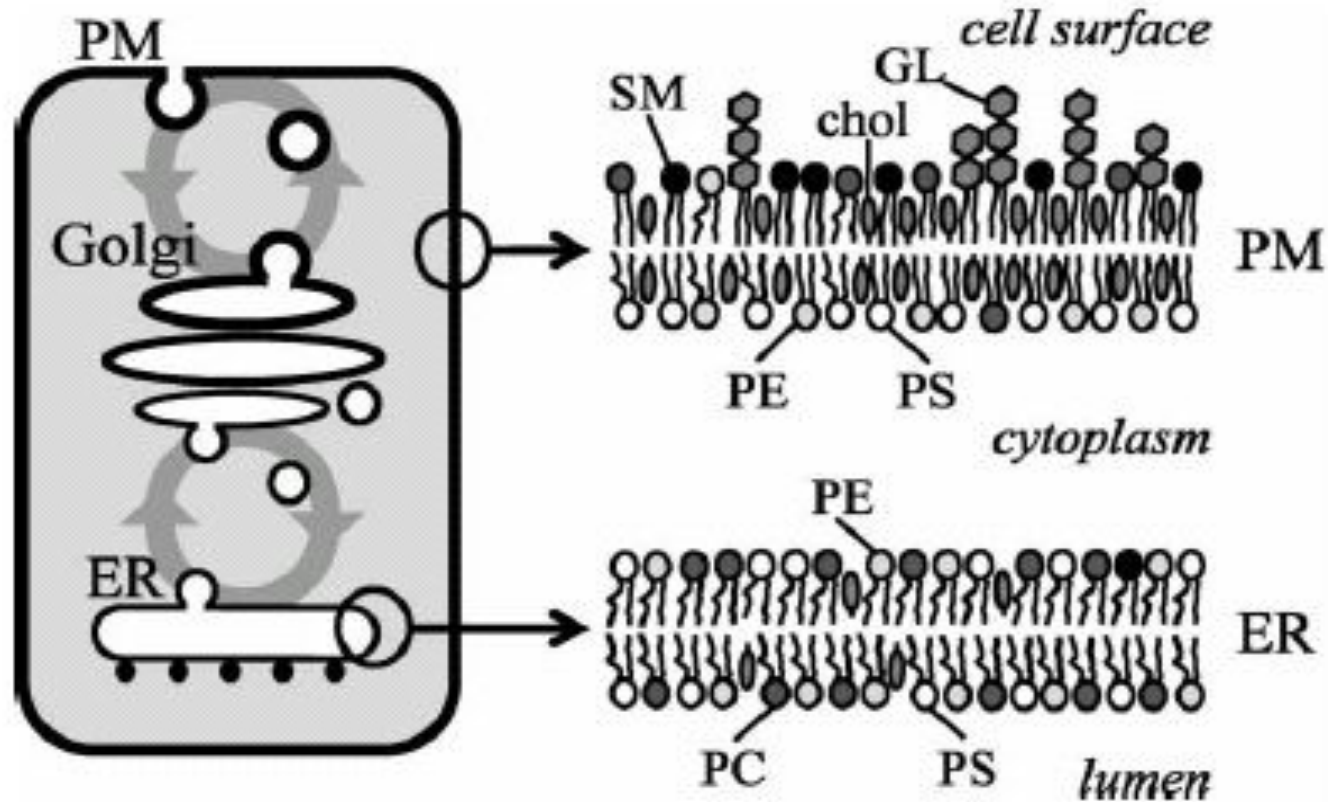
LBPA

Истощение клеток по LBPA блокирует возвратный транспорт в транс-Гольджи из поздних эндосом



Transbilayer lipid distribution

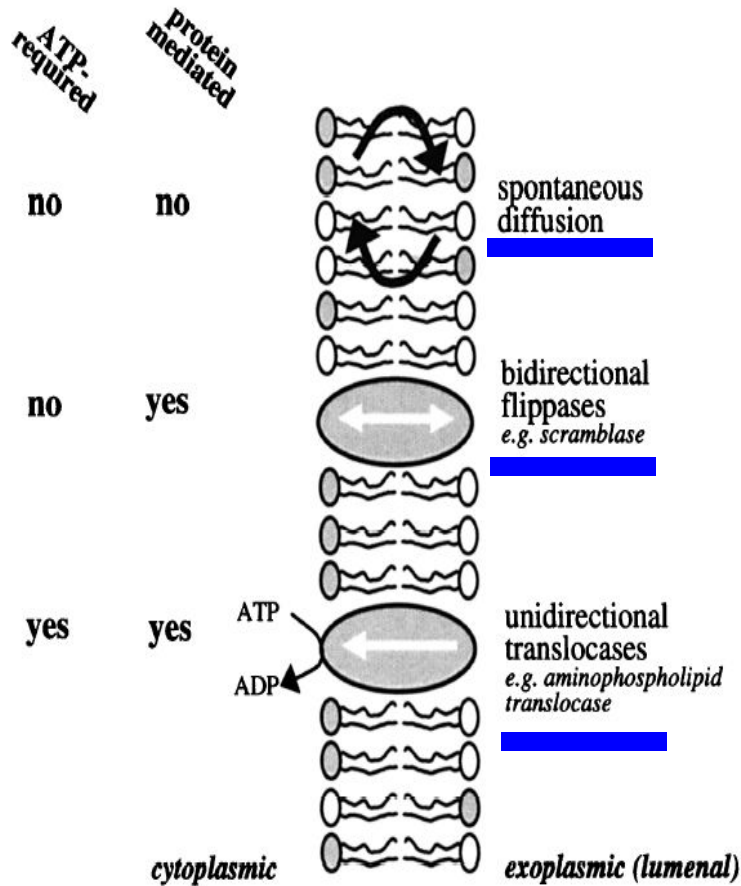
На ПМ липиды расположены асимметрично



Синтез липидов в ЭПР происходит в цитоплазматическом слое, а распределение между внутренним и внешним - одинаковое

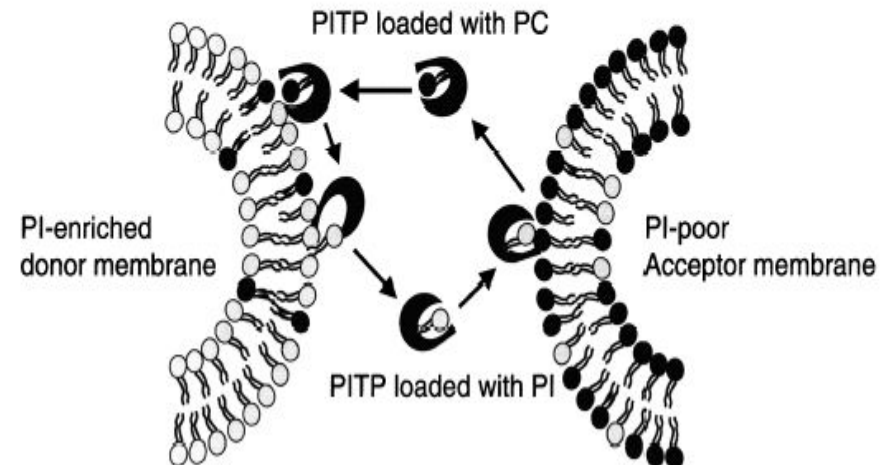
Механизмы создания «трансмембранной» асимметрии

«мембранный»



«ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ»

Transfer of PI and PC between membranes



Латеральная асимметрия и процесс сортировки липидов связаны между собой

Рафты: участки мембраны, обогащенные гликосфинголипидами, сфингомиелином и холестерином, сохраняют подвижность в контексте мембраны

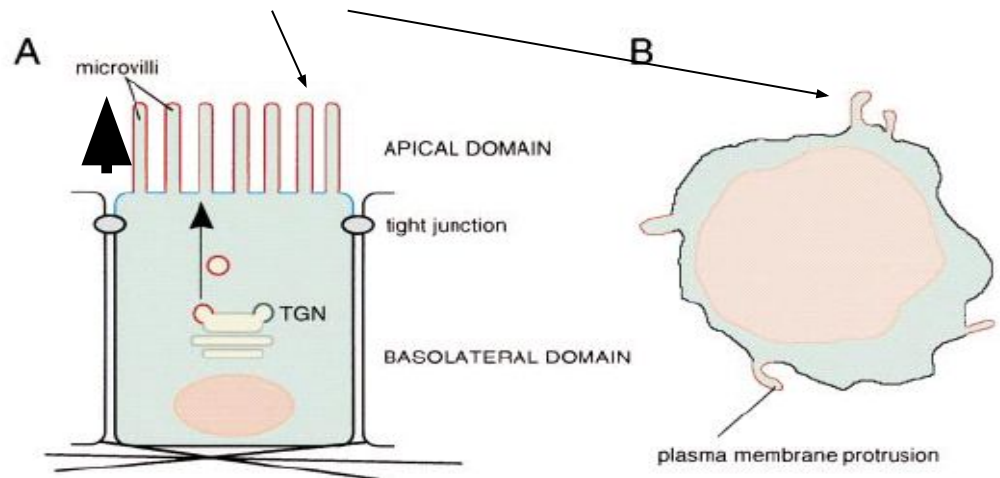
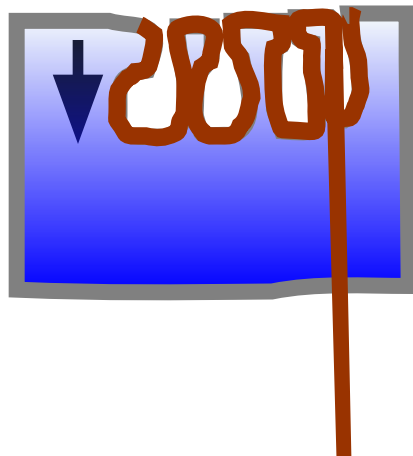


Рафты способны включать одни липиды и исключать другие

DIG (detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes) or DRM (detergent-resistant membranes) - нерастворимы в Тритоне X-100 (0,1%, 4° C, 30 мин)

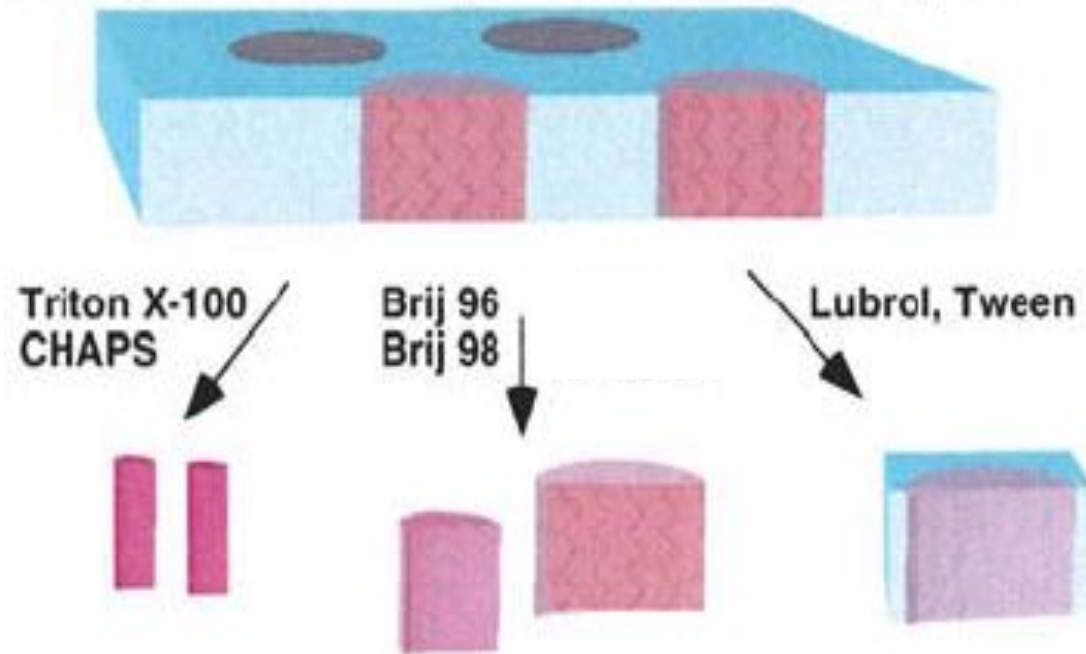
Примеры рафтов:

1. Кавеолы (кавеолин + холестерин)
2. Промининовые рафты (промнинин + холестерин)



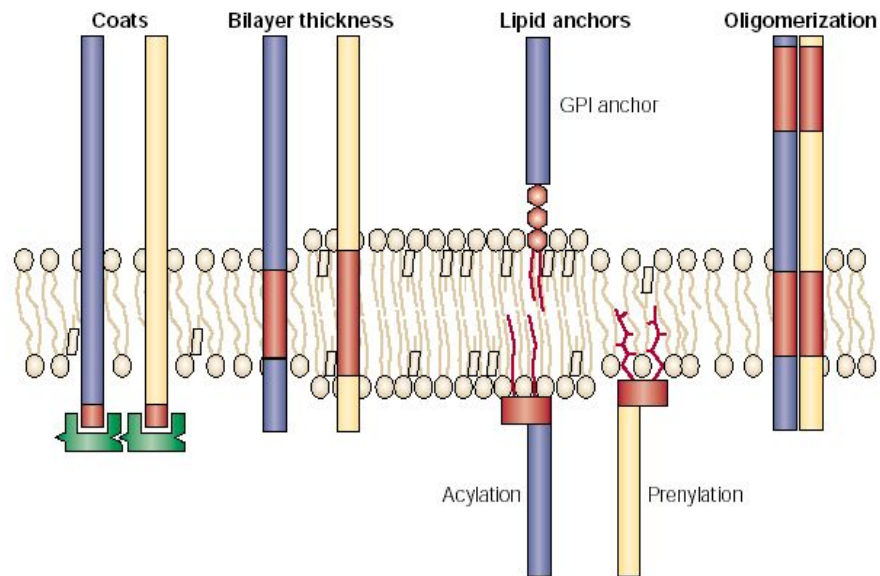
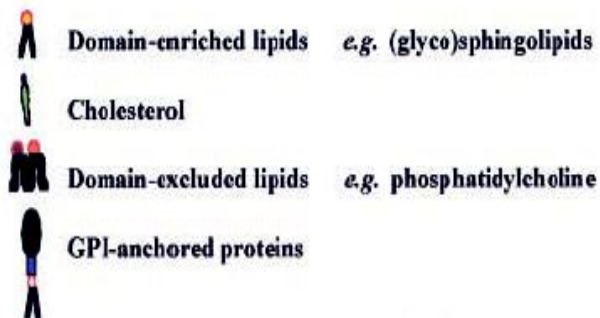
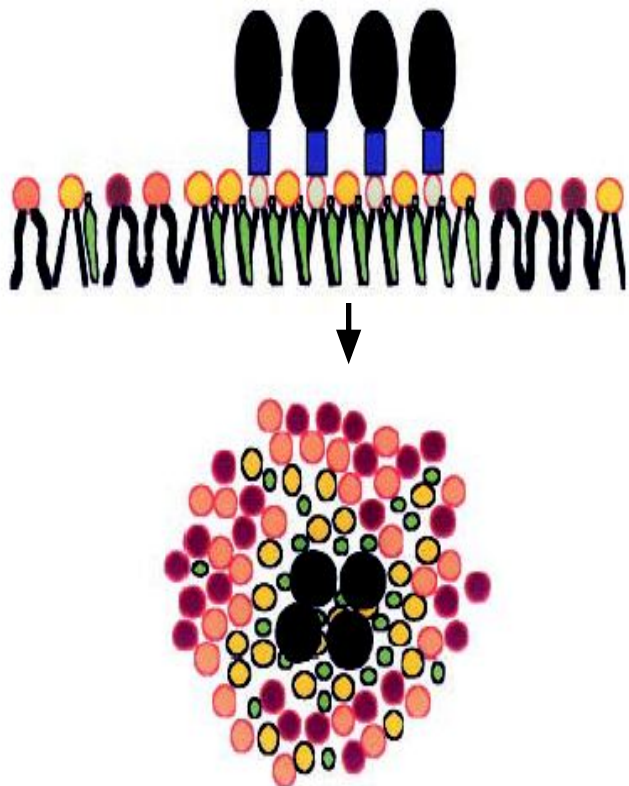
Нечувствительность к одному детергенту не означает устойчивость к детергентам вообще

Homogeneous rafts with selective extraction of lipids



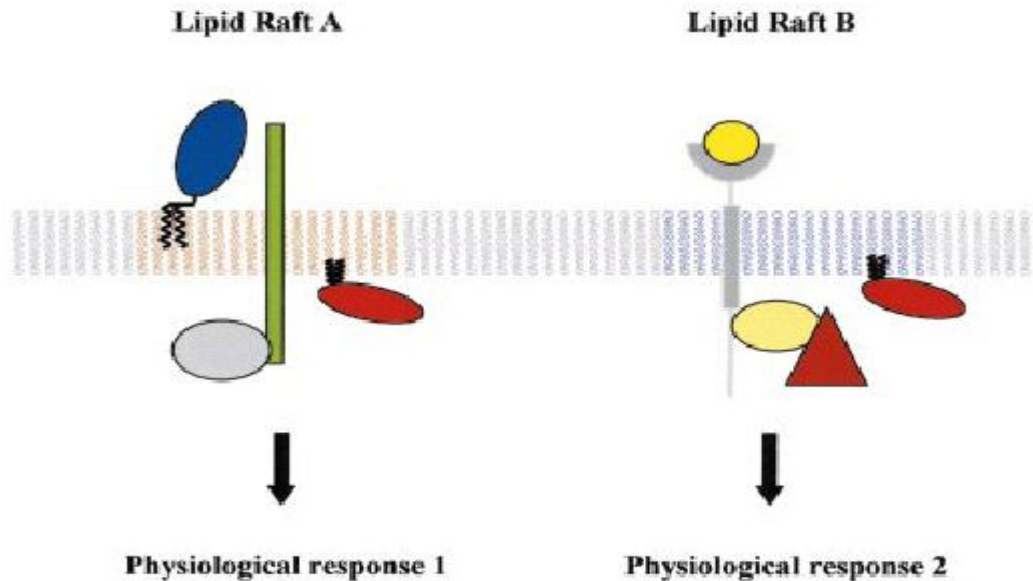
EGFR локализуется на ПМ в рафтах, растворимых в Тритоне-Х100, но нерастворимых в Brij98

Рафты способны включать одни липиды и исключать другие, а также специфически ассоциироваться с определенными белками



GPI-связанные белки рециклируют через один и тот же рециклирующий компартмент в 3 раза медленнее, чем рецепторы трансферрина. Но если истощить клетки по холестерину, то скорость рециклирования будет одинакова.

Липидная композиция рафта (минорные липиды) могут определять набор белков, включаемых в данный рафт и т. образом, способствовать специфичности клеточных реакций –
участие в передаче сигнала

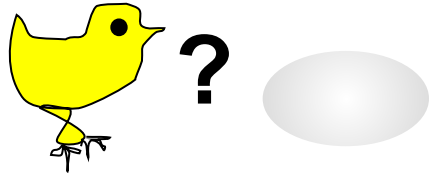
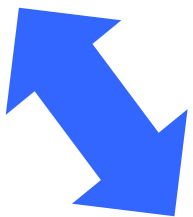
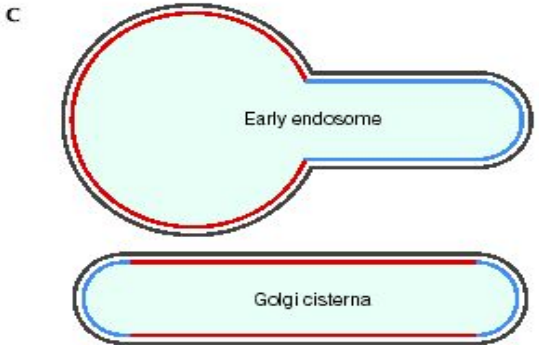
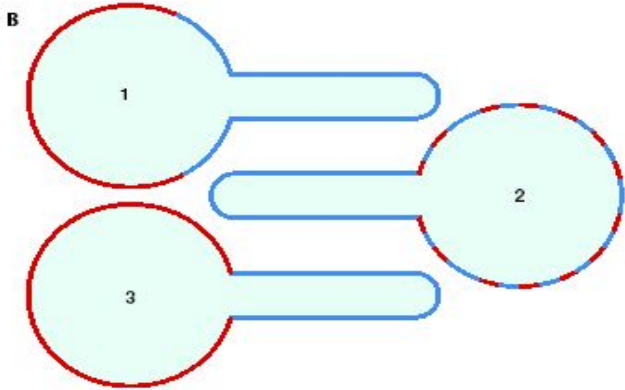
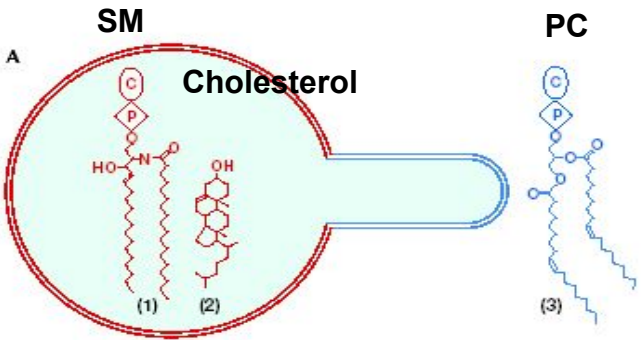


Единичный рафт – Ø50нм, 3500 мол. сфинголипидов, 10-30 белковых молекул.

Один рафт не может свести воедино все белки, участвующие в сигналинге, поэтому образуются кластеры рафтов.

Сегрегация липидов может стимулироваться формобразованием

Модельная система (LUV)

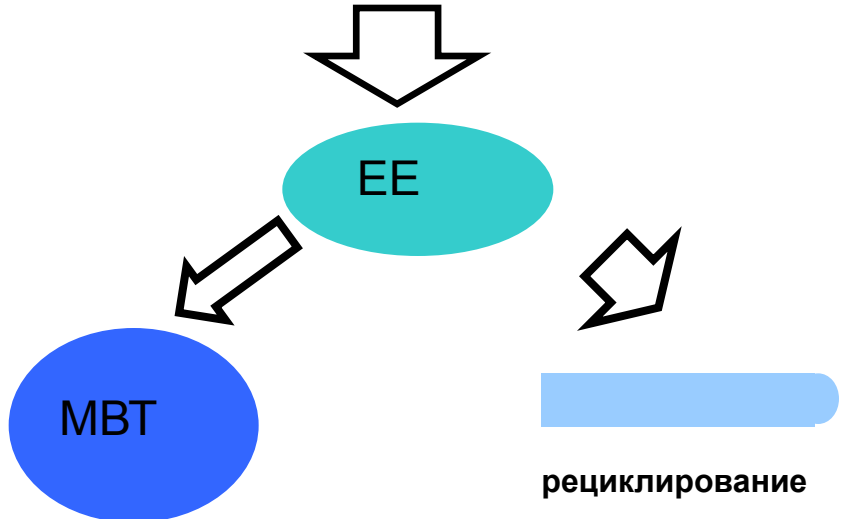


Форма может определять сортировку липидов:

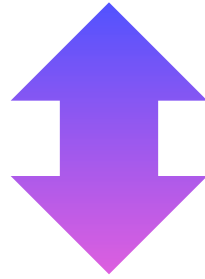
Модельная система : флуоресцентные аналоги липидов

DiIC₁₆ (3)
короткий насыщенный хвост «жесткий»

FAST DiI длинный ненасыщенный хвост «жидкий»

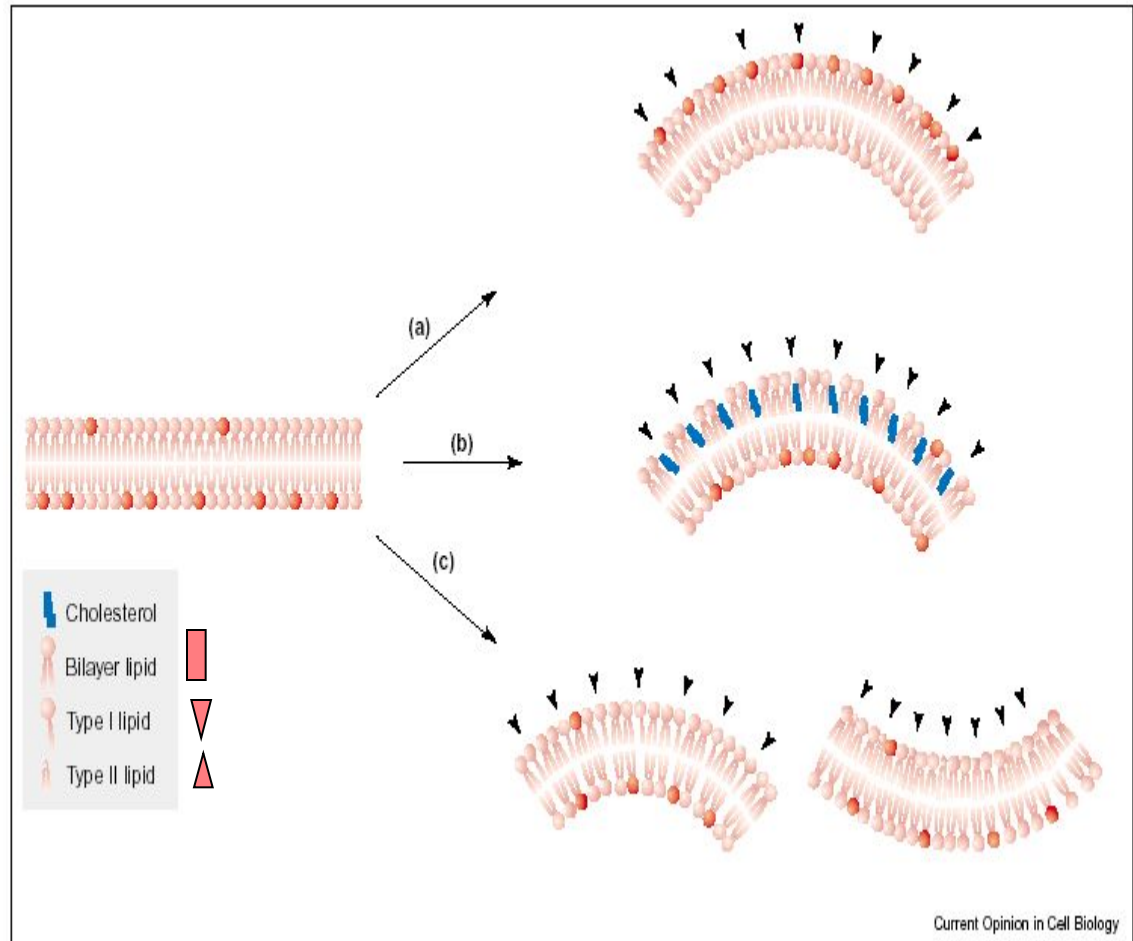
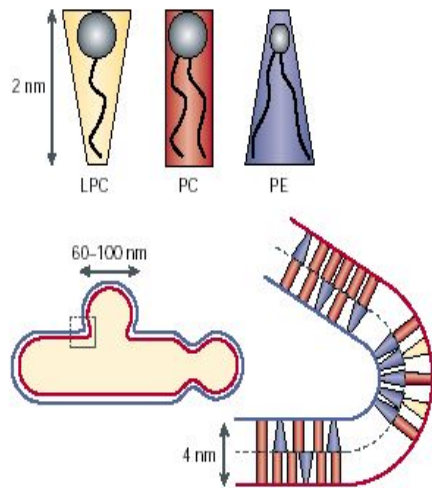


Липидный состав органелл в значительной степени определяется формой органеллы



Структура конкретной липидной молекулы диктует ее предпочтительную локализацию

Сама форма липидных молекул (конус, цилиндр, инвертированный цилиндр) может определять кривизну мембраны, а перераспределение липидов вызывать ее искривление



Активность липид-модифицирующих ферментов также может приводить к изменению формы липида, и следовательно, кривизны мембраны, как это имеет место в случае эндофилина (LPA-acyl-transferase) при формировании клатриновых окаймлений или PLD при сборке COPI-везикул

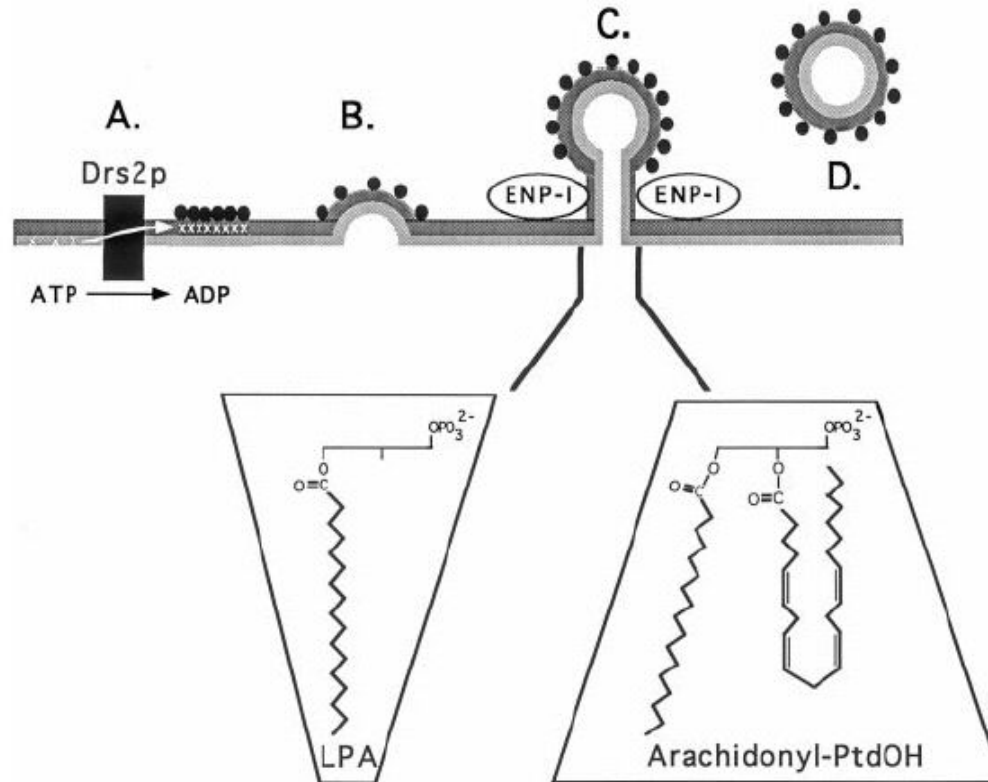
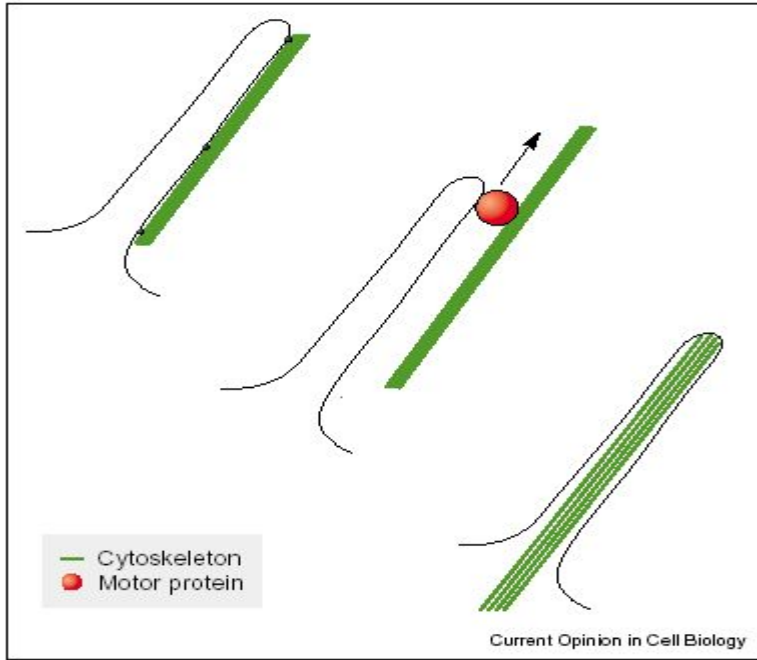


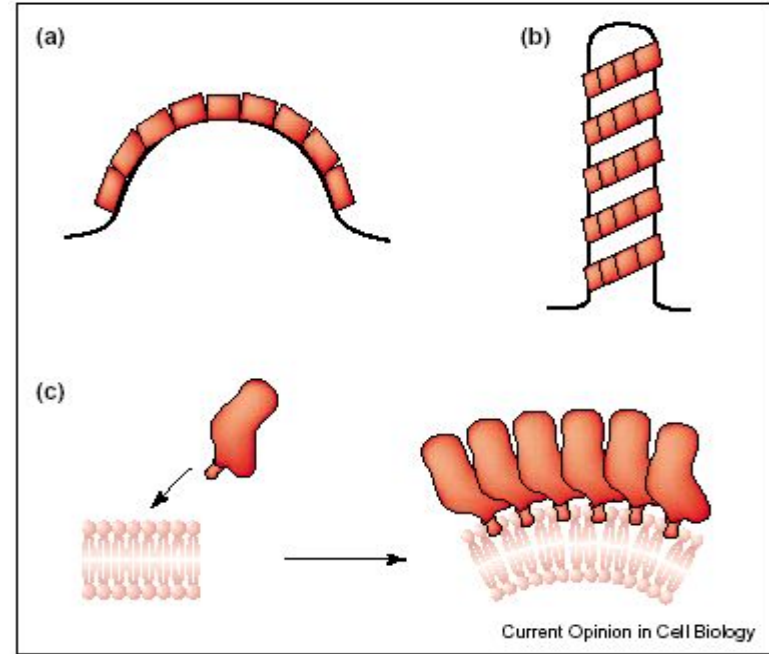
Figure 3: Phospholipid asymmetry and geometry in clathrin vesicle budding. Drs2p, a potential aminophospholipid flippase, is required for efficient biogenesis of clathrin-coated vesicles. Perhaps formation of phosphatidylserine and/or phosphatidylethanolamine microdomains (x) on the cytosolic leaflet of Golgi membranes (A) facilitates recruitment of clathrin, or its adapter proteins, to the membrane to initiate budding (B) (73). By catalyzing addition of a highly unsaturated arachidonyl fatty acid at the sn-2 position of LPA, endophilin I effects a geometric switch that imposes negative curvature to restricted regions of the bud neck of clathrin-coated vesicles (C), thereby stimulating fission and release of these vesicles from the plasma membrane (D) (75).

Как правило, искривление мембран происходит именно в области рафтов, что вовлекает их в процессы как слияния мембран, так и формирования транспортных везикул

Механизм деформации с участием цитоскелета



Деформация определяется белками (динамин, белки окаймлений)



В конечном итоге, форму мембраны или ее изменение определяют совместно как липиды, так и белки

Вклады каждого компонента могут различаться: кавеолы, жидкофазный эндоцитоз и клатрин-опосредованный эндоцитоз зависят от наличия холестерина, но при его истощении первыми исчезают кавеолы, затем останавливается пиноцитоз и только потом – РОЭ.

Многочисленные липидозы (заболевания, вызываемые накоплением липидов в клетках) также связаны с нарушением их нормальной транспортировки

При синдроме накопления сфинголипидов *GSLs* вместо рециклирования на ПМ и доставки в Гольджи, отправляются через поздние эндосомы в липидные депо и не участвуют в дальнейшем метаболизме

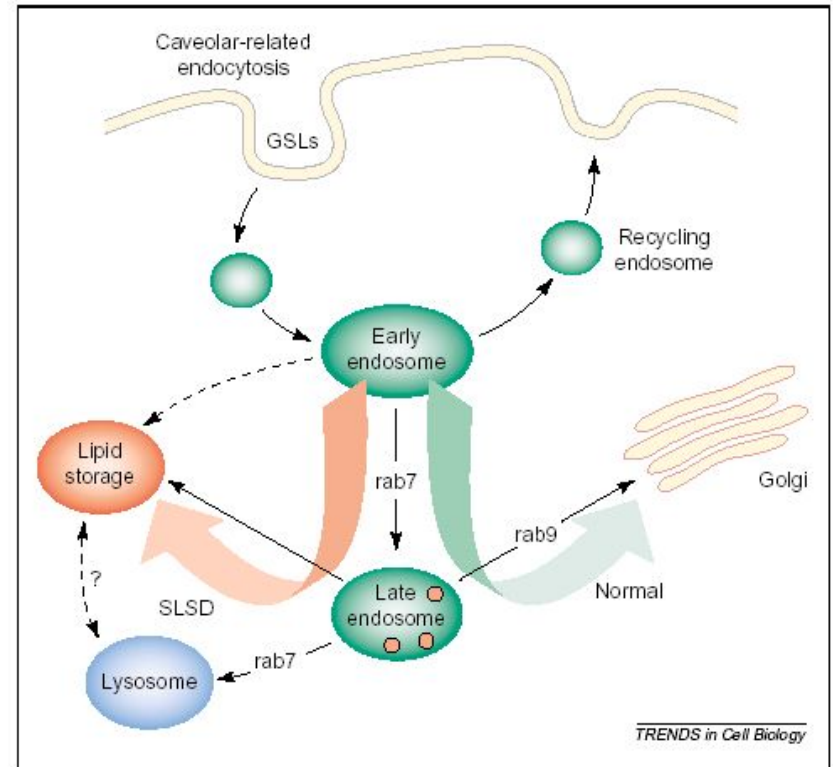
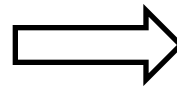
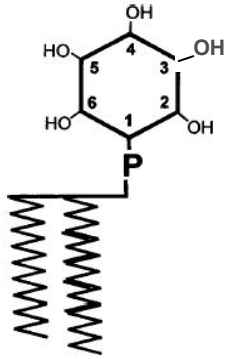


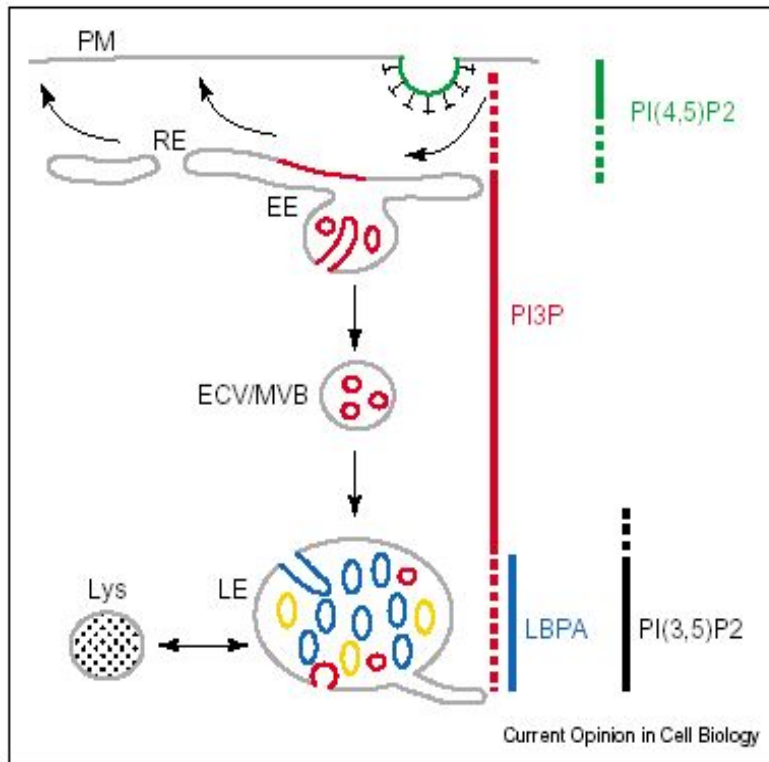
Fig. 2. Model for glycosphingolipid (GSL) internalization and transport in fibroblasts. GSLs are internalized from the plasma membrane (PM) by a caveolar-related mechanism [19] whose properties are summarized in Table 1. In the case of BODIPY-lactosylceramide (-LacCer), ~50% of internalized GSLs are recycled to the PM. In normal human skin fibroblasts (HSFs), the remainder is transported to the Golgi apparatus in a process that is rab7- and rab9-dependent. In sphingolipid storage disease (SLSD) fibroblasts, as well as in normal HSFs overloaded with cholesterol, Golgi transport of GSL analogs and of cholera toxin (CT) is inhibited [16- 19], resulting in lipid accumulation in late endosomes, lysosomes, and possibly other storage organelles.

Фосфатидилинозитиды (PtdIns)
играют важную регуляторную роль
в сигнальных и транспортных
процессах

PtIns

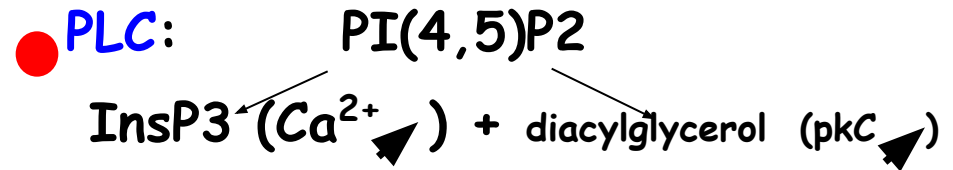


Может быть
фосфорилирован
по D3, 4 и 5-
положениям
инозитольного
кольца



PtdIns - менее 10% общего пула
липидов

Ферменты их метаболизма:



● PI-киназы: PI3K, PI4K, PIP5K

D4 - 5% PhtIns

D4,5 - 5%

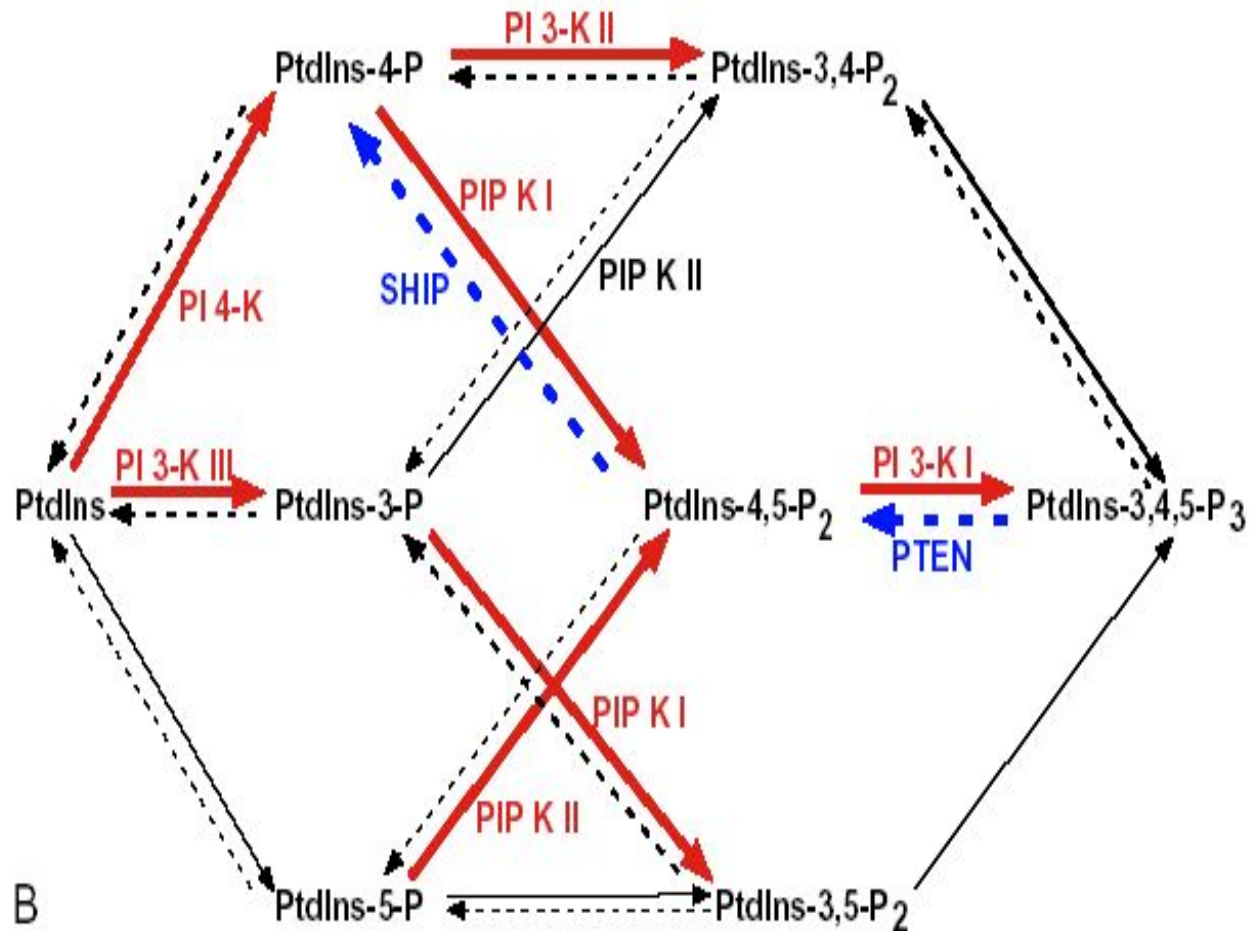
D3 < 0.25%

● фосфатазы (напр., синаптоджанин)

● дефосфорилируют все PIns,
кроме PI3P

PI3P дефосфорилируется т. в
лизосомах

Пути взаимопревращений фосфорилированных форм PtdIns с участием фосфатидилинозитол-3-киназ



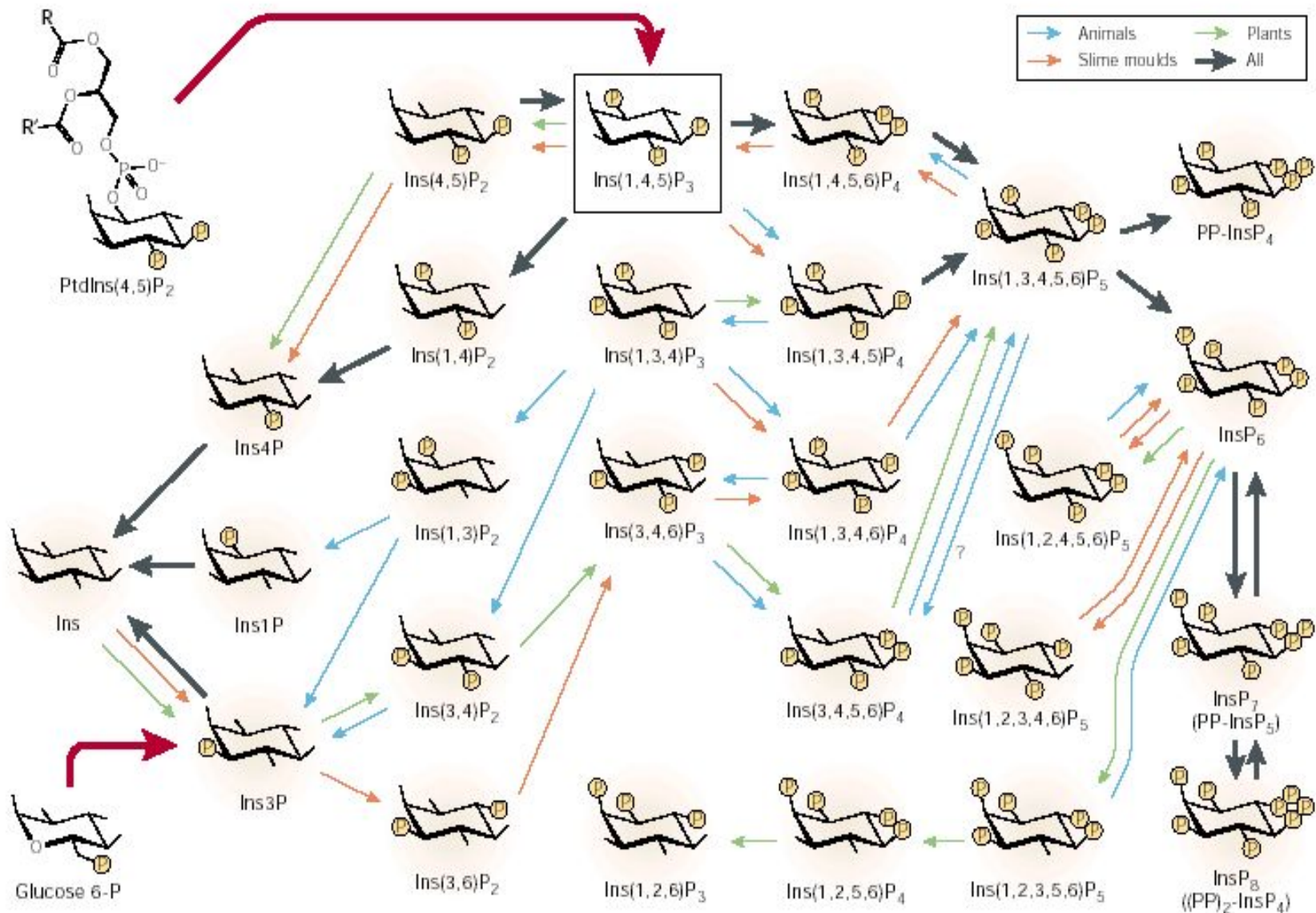
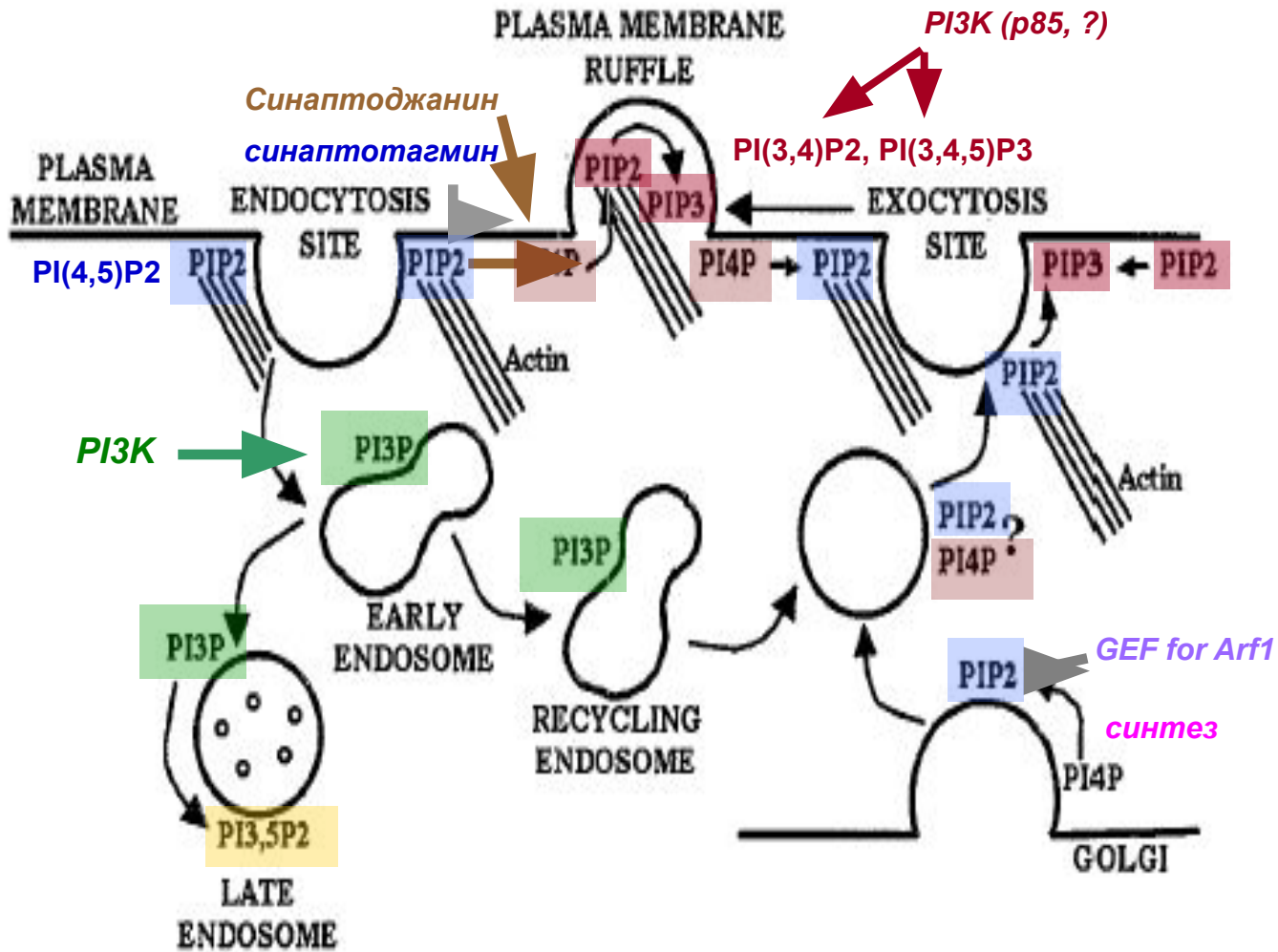
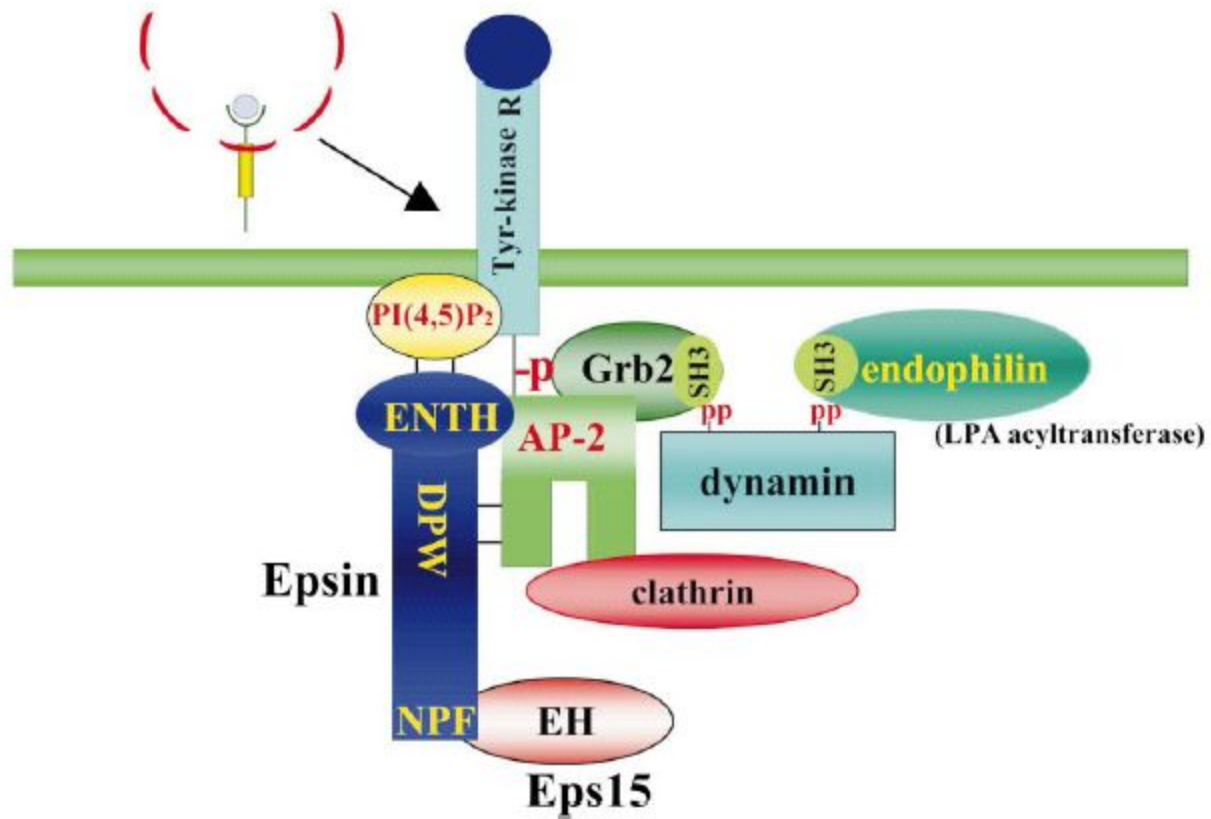


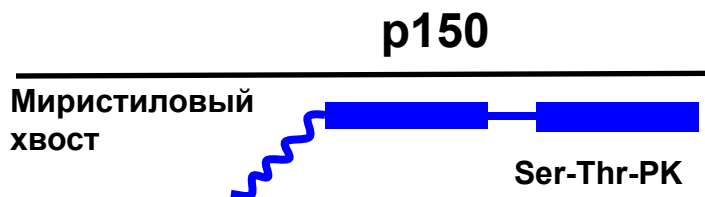
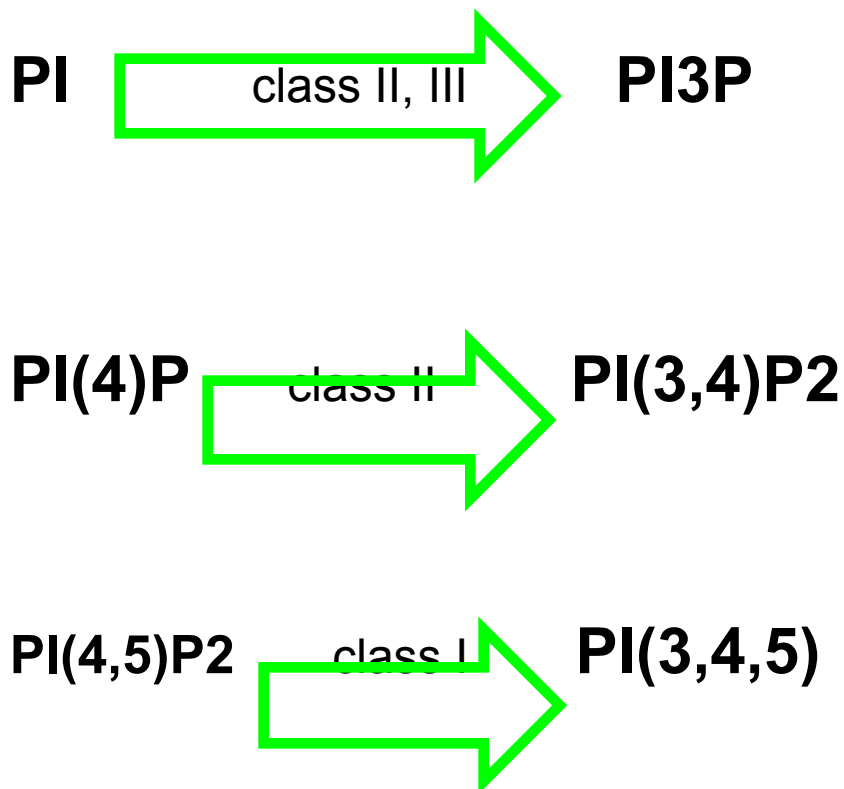
Figure 1 | Pathways of metabolism of inositol phosphates. This figure outlines the pathways that have been reported to exist, using the strategies outlined in BOX 3. For many of them, we do not know whether they are the main pathways (indeed, some are almost certainly not, as discussed in BOX 3). The arrows are colour-coded for the organisms in which they have been shown (note that yeast inositol phosphate metabolism is frequently discussed in the text, but we have no separate colour for this group of organisms, as all the reactions described in them are probably universal).

Ассиметричная локализация ключевых фосфоинозитидов в клеточных мембранах





Субстраты и продукты PI3K:



Классификация PI3Ks

Class Ia

p110 - каталитическая субъединица

p85 α , β ; p55 α , γ ; p50 α - регуляторная субъединица

Class Ib

P110 γ - каталитическая

P101 - регуляторная

Class II

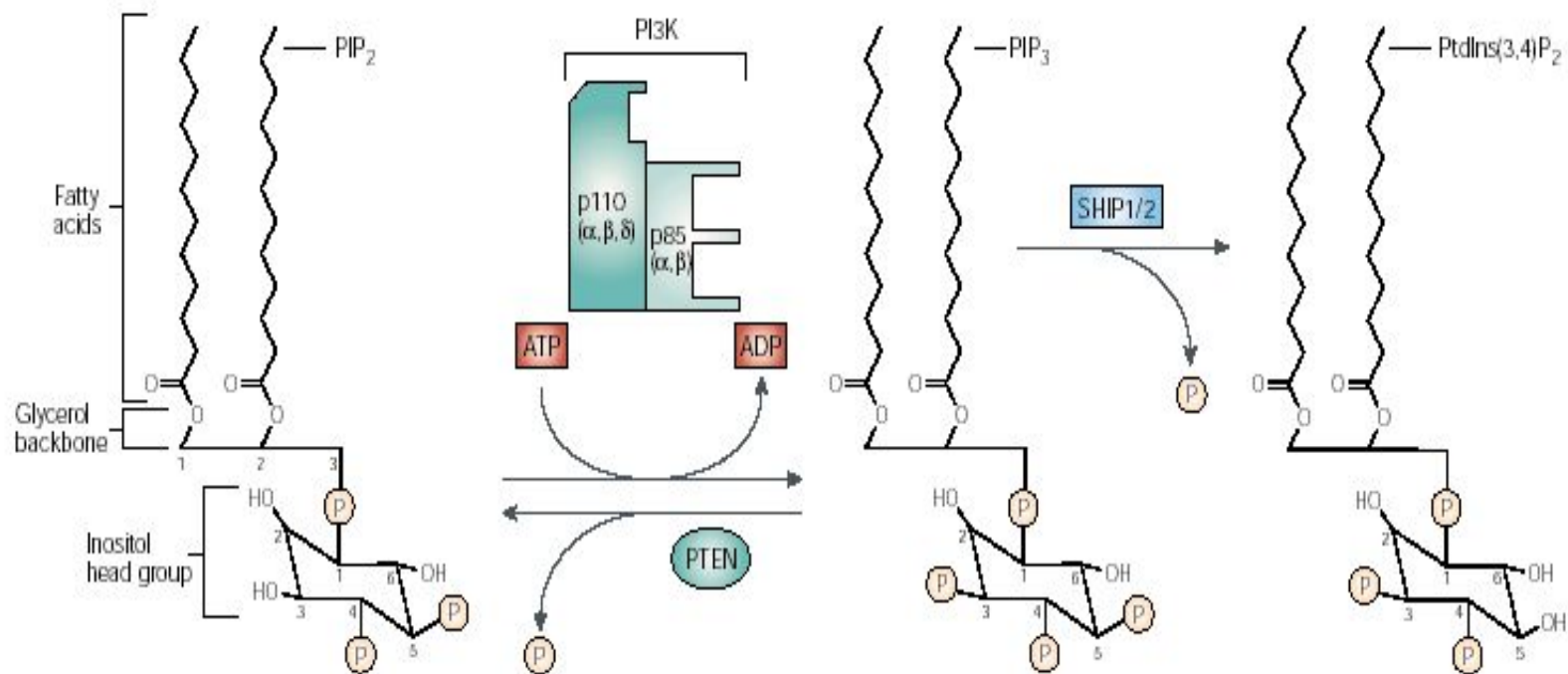
Мономерные, 175-210 кДа (PIK α , β , γ)

Class III

Vps34 - каталитическая

P150 - вспомогательная

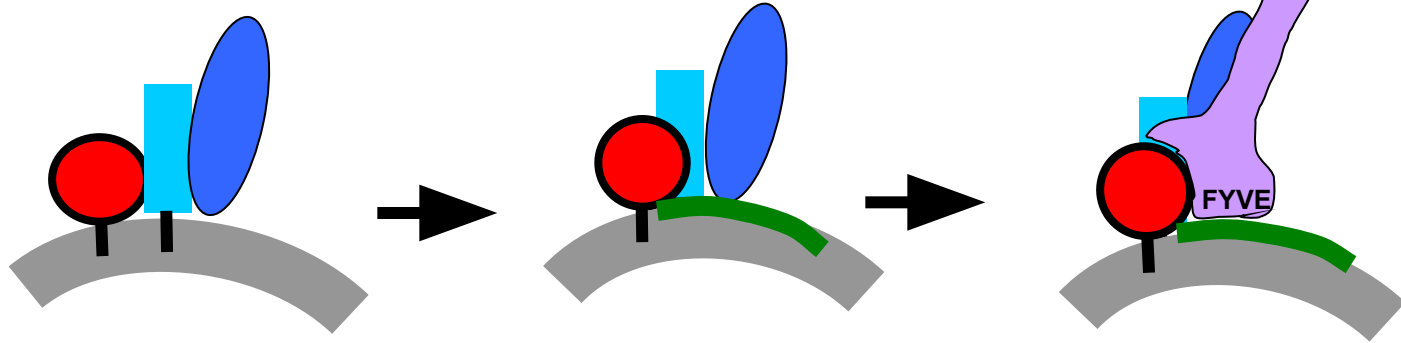
PI3K I класса p85/p110



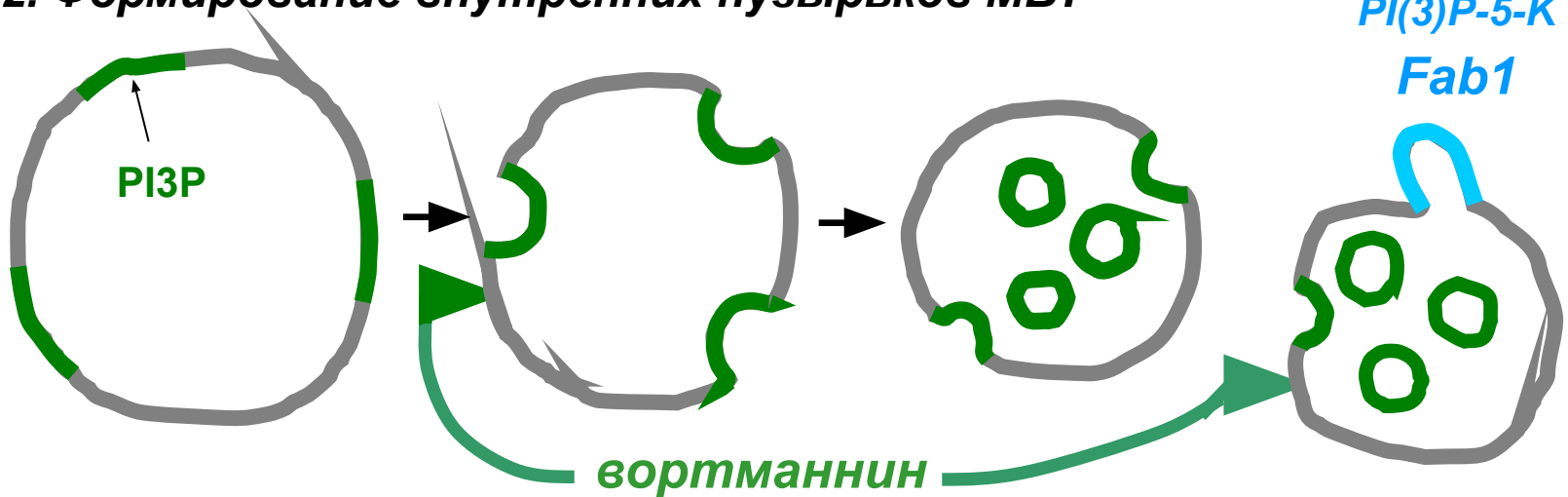
Сайты действия mVps34

1. Гомотипическое слияние ранних эндосом

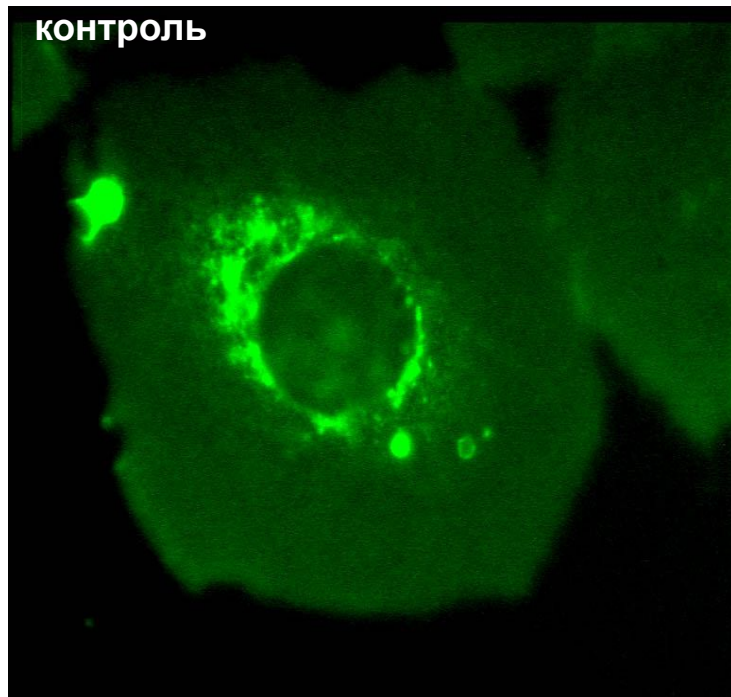
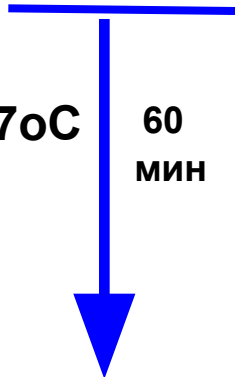
Rab5* → **p150** → **mVPS34** → **PI3P** → **EEA1**



2. Формирование внутренних пузырьков MBT



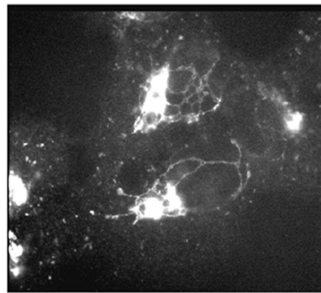
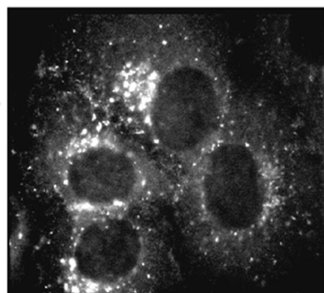
EGFR



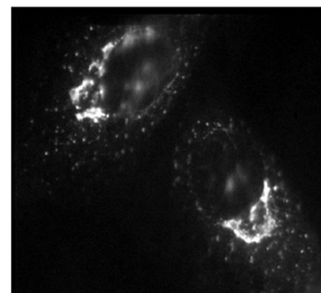
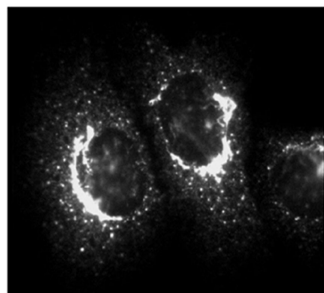
контроль

вортманнин

ТФ-Р

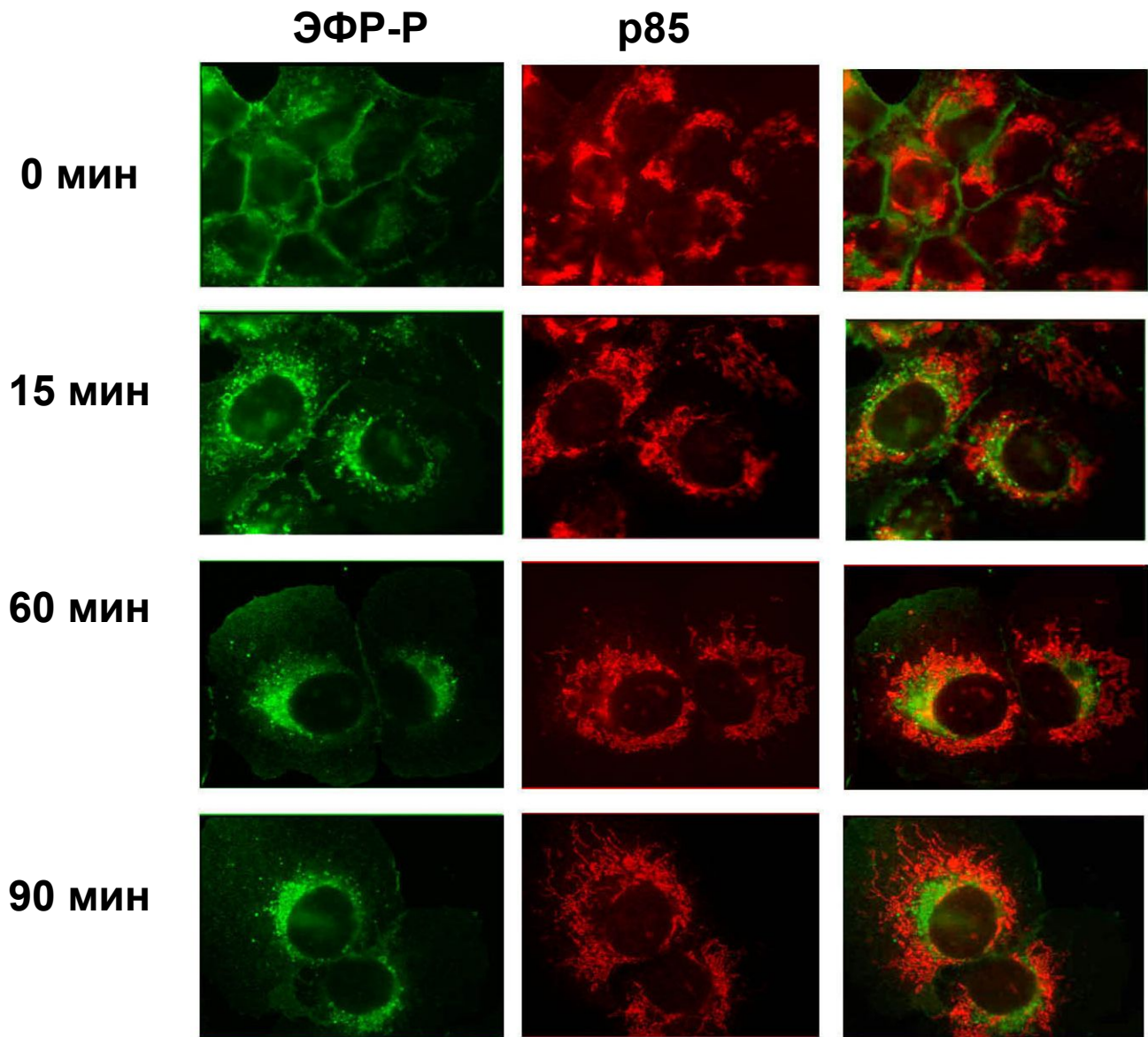


ERD
2

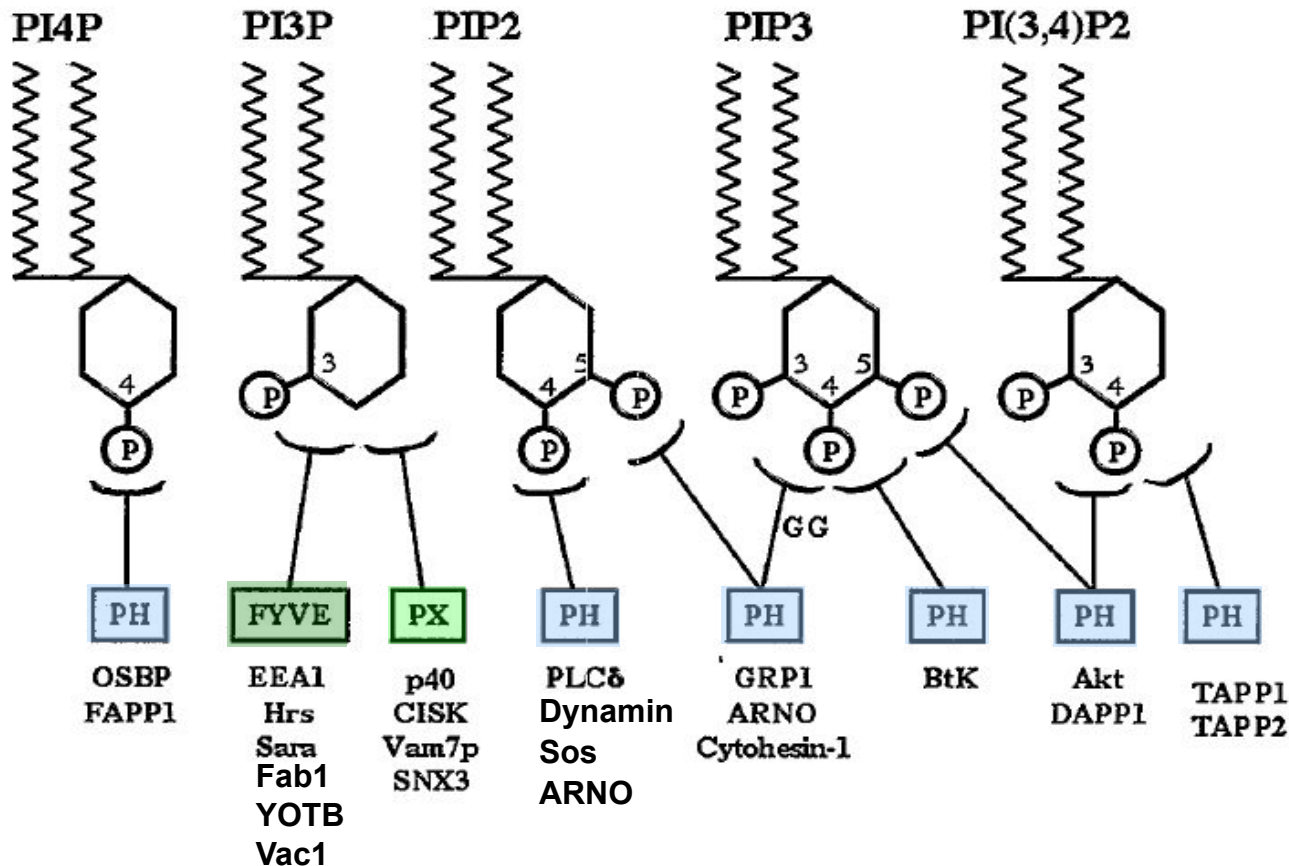


Вортманнин - ингибитор активности PI3K I и III классов, - подавляет формирование МВТ и приводит к тубулированию рециклирующих эндосом

ФИ-3-киназа p85 отвечает на действие ЭФР, но не ко-локализуется с рецептор-содержащими эндосомами.



Регуляторная роль PtdIns связана с тем, что ряд белков обладает доменами, способными узнавать их определенные фосфорилированные формы и рекрутироваться к мембране в тех сайтах, где они локализованы



PH – plekstrin homology;

PX – p47phox oxidase;

FYVE - Fab1, YOTB, Vac1, EEA1