- AKAPs (A-Kinase Anchoring Proteins) - scaffold proteins
- Имеют множественные места связывания для:
-
- regulatory subunits of Protein Kinase A - **R**
- phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol
-
- G-protein-coupled receptors (GPCRs)
- Protein Kinase C - **PKC**
- Protein phosphatases
- Phosphodiesterases - **PDE**
- AKAPs структурируют передачу сигнала в клетке и также участвуют в регуляции угасания сигнала.

Общий признак всех AKAPs – домен связывания RI/II субъединиц cAK.

Тканевая экспрессия:

AKAP75/AKAP79/AKAP150 в плазматической мембране нервной ткани в синапсах;

AKAP82 – testis;

Yotiao – характерен для нервно-мышечных синапсов.

Ezrin , AKAP250, AKAP-KL связаны с цитоскелетом.

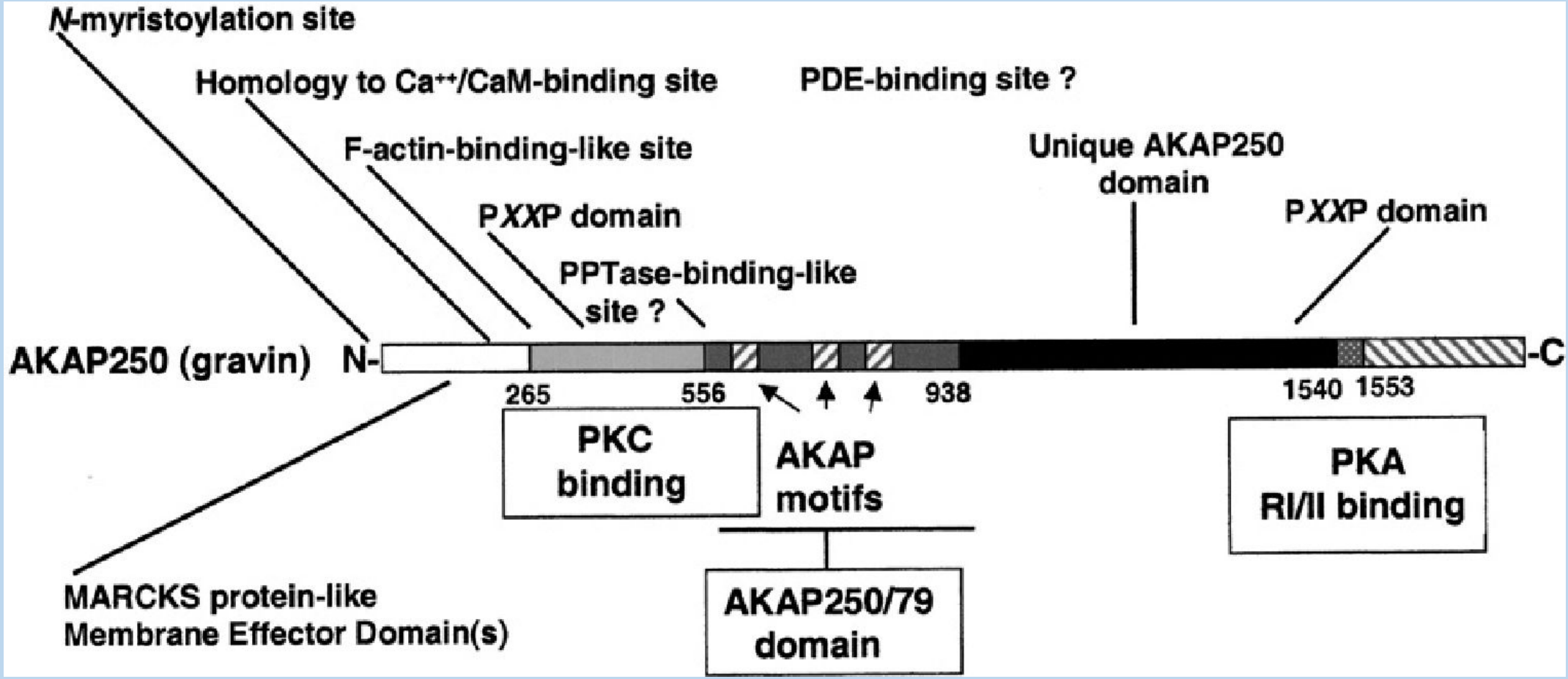
В эпителиальных клеткахAKAP-KL локализован в апикальной части, по-видимому участвует в их поляризации.

AKAP350, - Golgi and центросоме,

AKAP149 на мембране митохондрий,

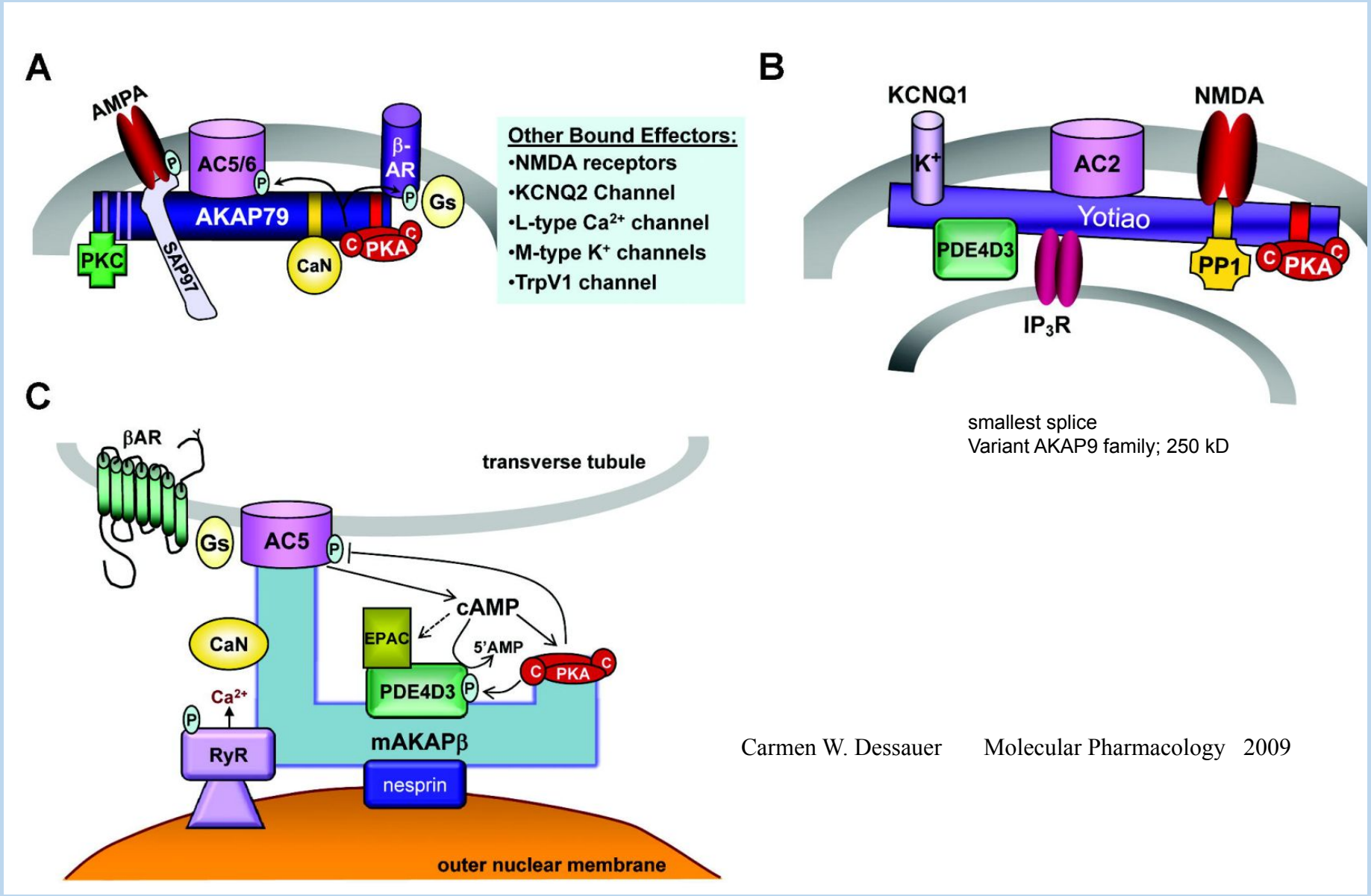
Некоторые домены могут перекрываться - MED (membrane effector domain), MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate), MED может включать в себя участки связывания PKC, F- актина, нерецепторной tyr киназы Src – регулятора GPCR, фосфопротеинфосфатазы (напр. кальцийнейрина)

Schematic view of AKAP250



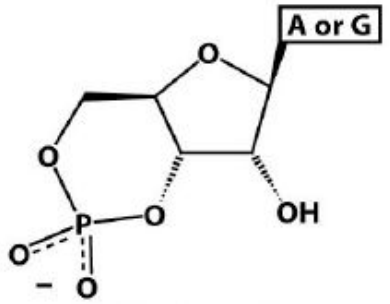
C.C. Malbon, J. Tao, E. Shumay and H.-Y. Wang Biochemical Society Transactions (2004)

Изоформы аденилатциклазы и AKAPs с которыми они образуют комплексы

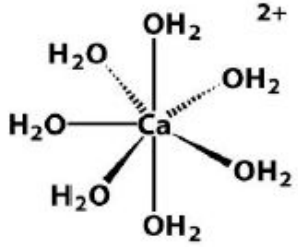


Carmen W. Dessauer Molecular Pharmacology 2009

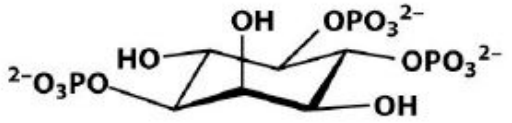
Common Secondary Messengers



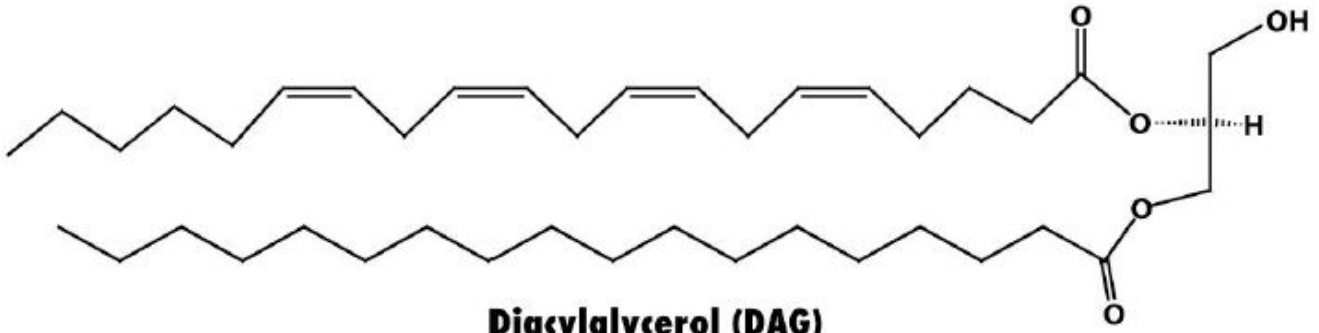
cAMP, cGMP



Calcium ion



Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)



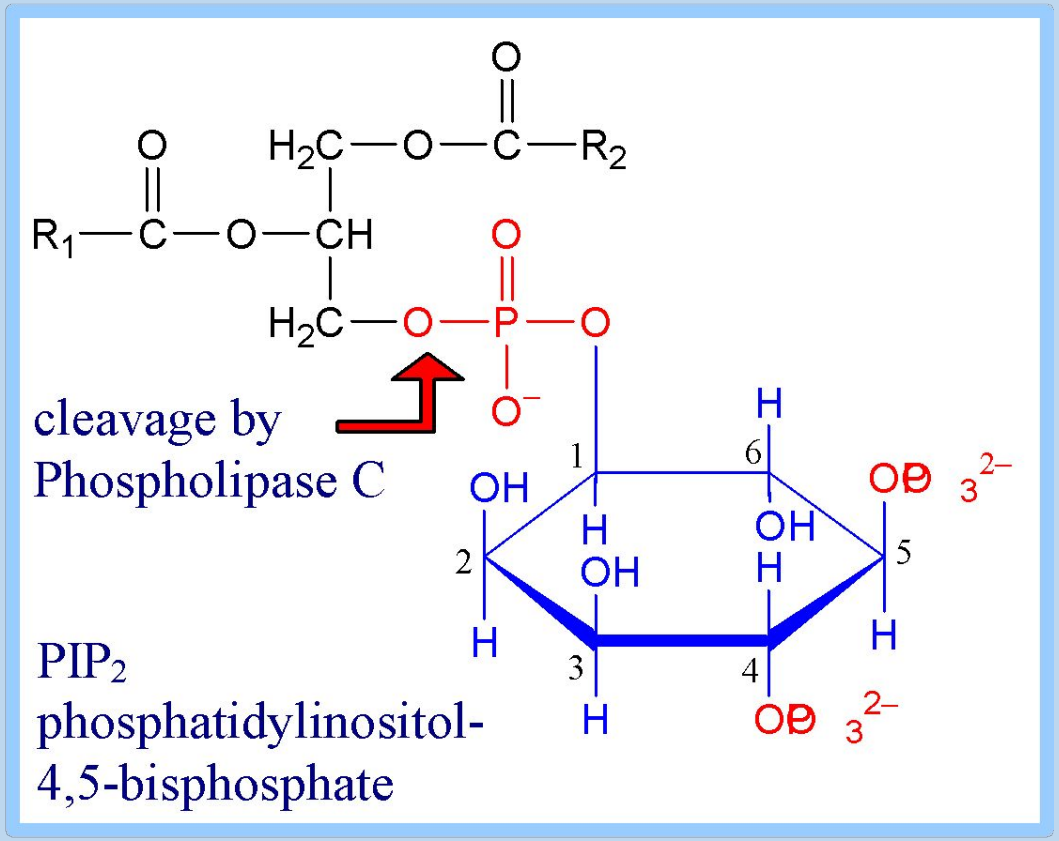
Diacylglycerol (DAG)

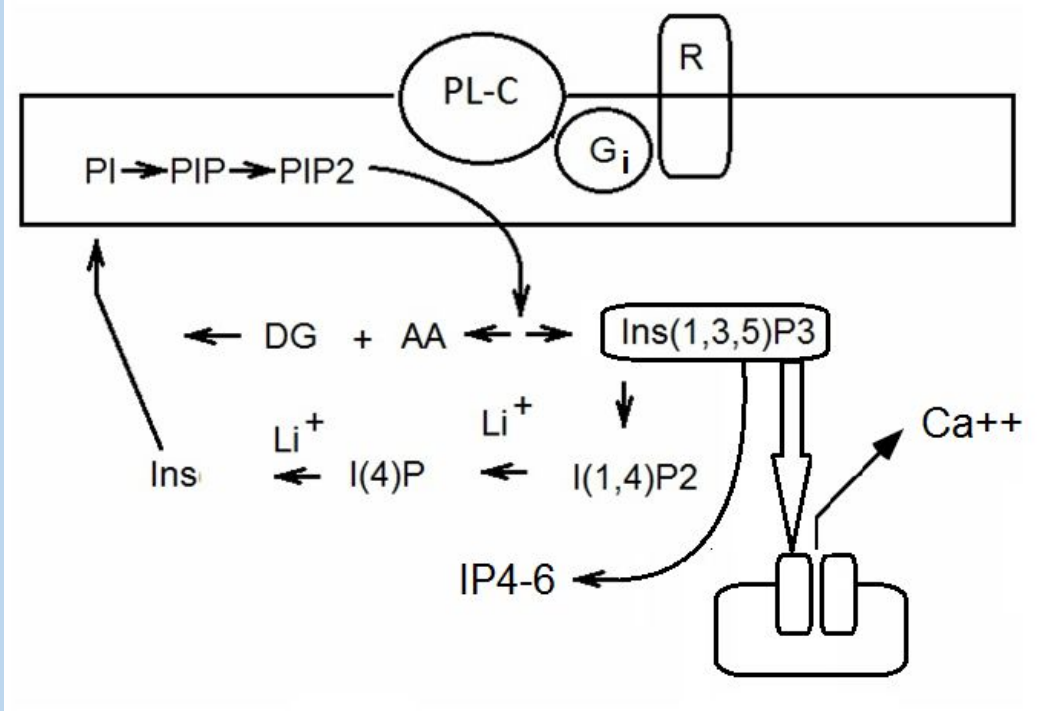
Figure 14-3

Secondary messengers: intracellular molecules that change in concentration in response to environmental signals. The consequences are:

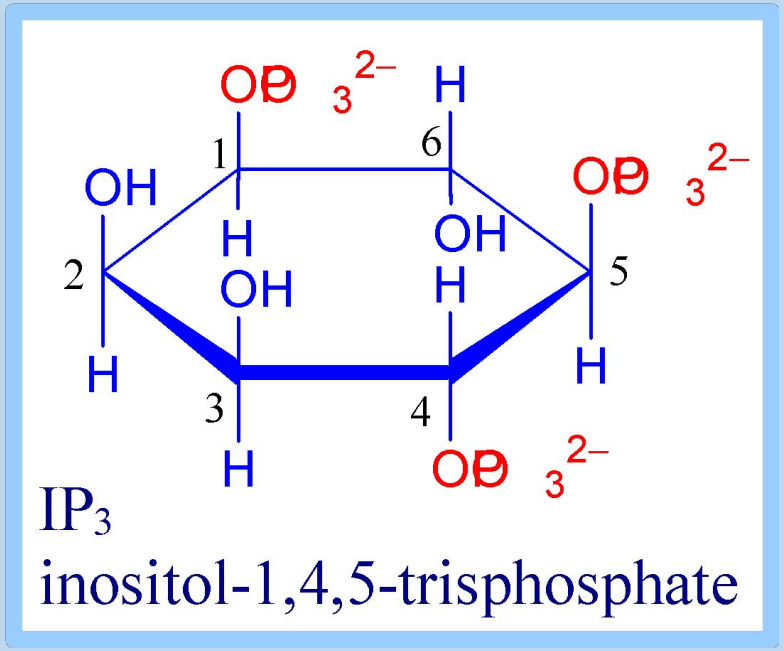
1. The signal may be amplified significantly.
2. Secondary messengers are often free to diffuse to other cellular compartments to influence processes throughout the cell.
3. Common secondary messengers cross talk among different pathways.

Ca2+ controlled processes



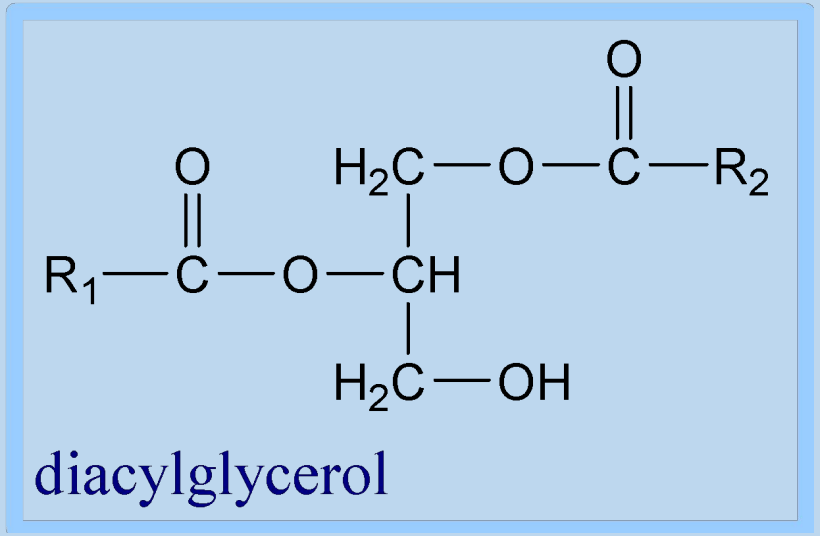


Berridge, M. J. 1984.
Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem. J. 220:345-360.



IP_3

inositol-1,4,5-trisphosphate



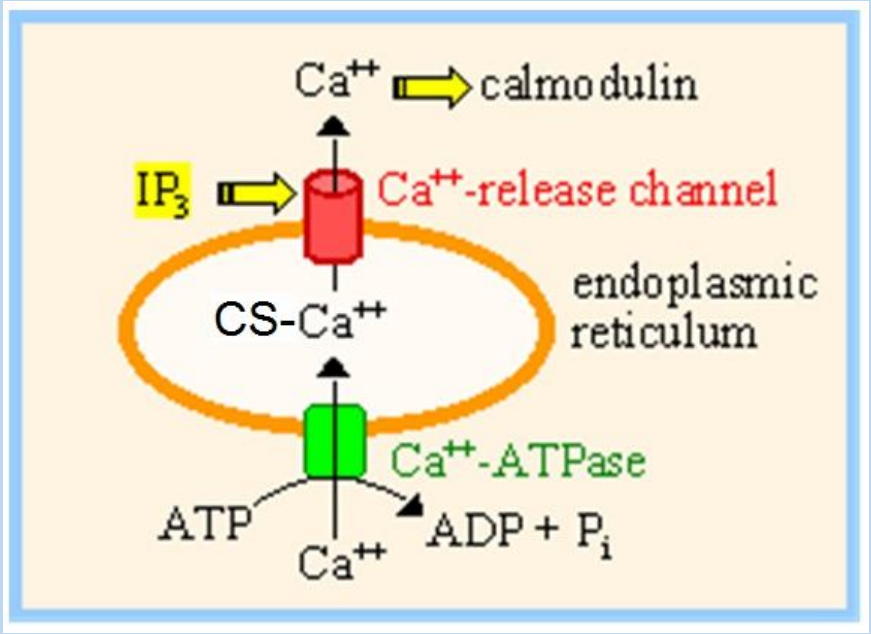
diacylglycerol

Cleavage of PIP_2, catalyzed by Phospholipase C, yields 2 **second messengers**:

- **inositol-1,4,5-trisphosphate** (**IP_3**)
- **diacylglycerol** (**DG**).

Diacylglycerol, with **Ca^{++}**, activates **Protein Kinase C**, which catalyzes phosphorylation of several cellular proteins, altering their activity.

Структура кальцисомы



protein kinase C (PKC)

Hypertonicity stimulates UT-A1 phosphorylation, urea permeability through protein kinase C (PKC) and intracellular calcium.

PKC-α is a calcium-dependent PKC isoform and PKC-α knockout mice have a urine-concentrating defect.

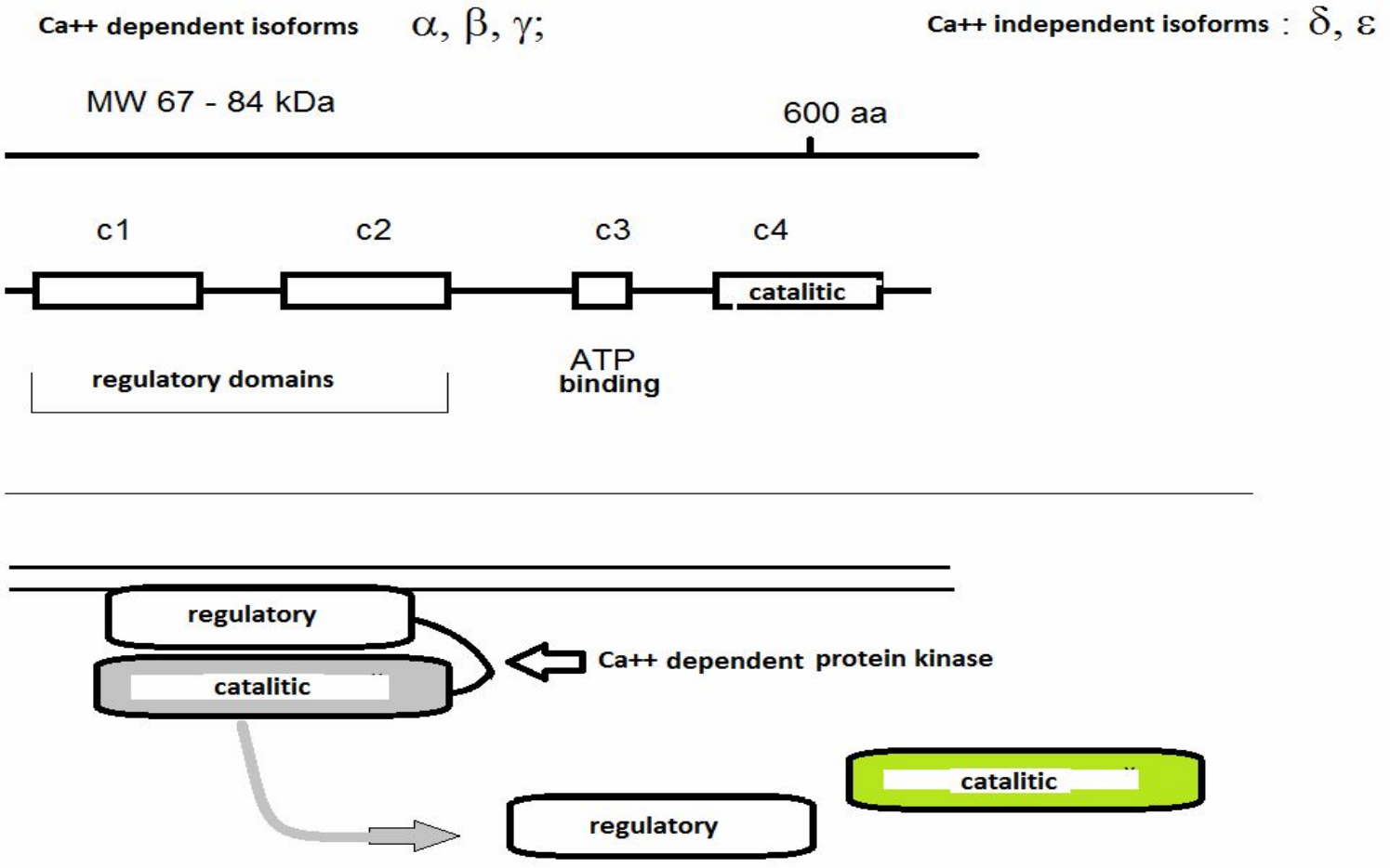
Joris H. Robben, Nine V. A. M. Knoers, and Peter M. T. Deen Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus Am J Physiol Renal Physiol 291: F257–F270, 2006
Star, R.A., Nonoguchi, H., Balaban, R. and Knepper, M.A. (1988) Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct. J. Clin. Invest. 81, 1879–1888

classical PKCs (PKCα, βI, βII, and γ)
are regulated by both **Ca2+** and by
diacylglycerol (DAG)

novel PKCs (PKCδ, ε, η , andθ) are
insensitive to Ca2+ and considered to be
primarily regulated by **DAG**

Atypical PKCs (PKCι and ξ)
are neither affected by Ca2+ nor by DAG

Domain structure of PKC



Mellor H, Parker PJ (1998). "The extended protein kinase C superfamily". Biochem. J.. 332 (Pt 2): 281–92

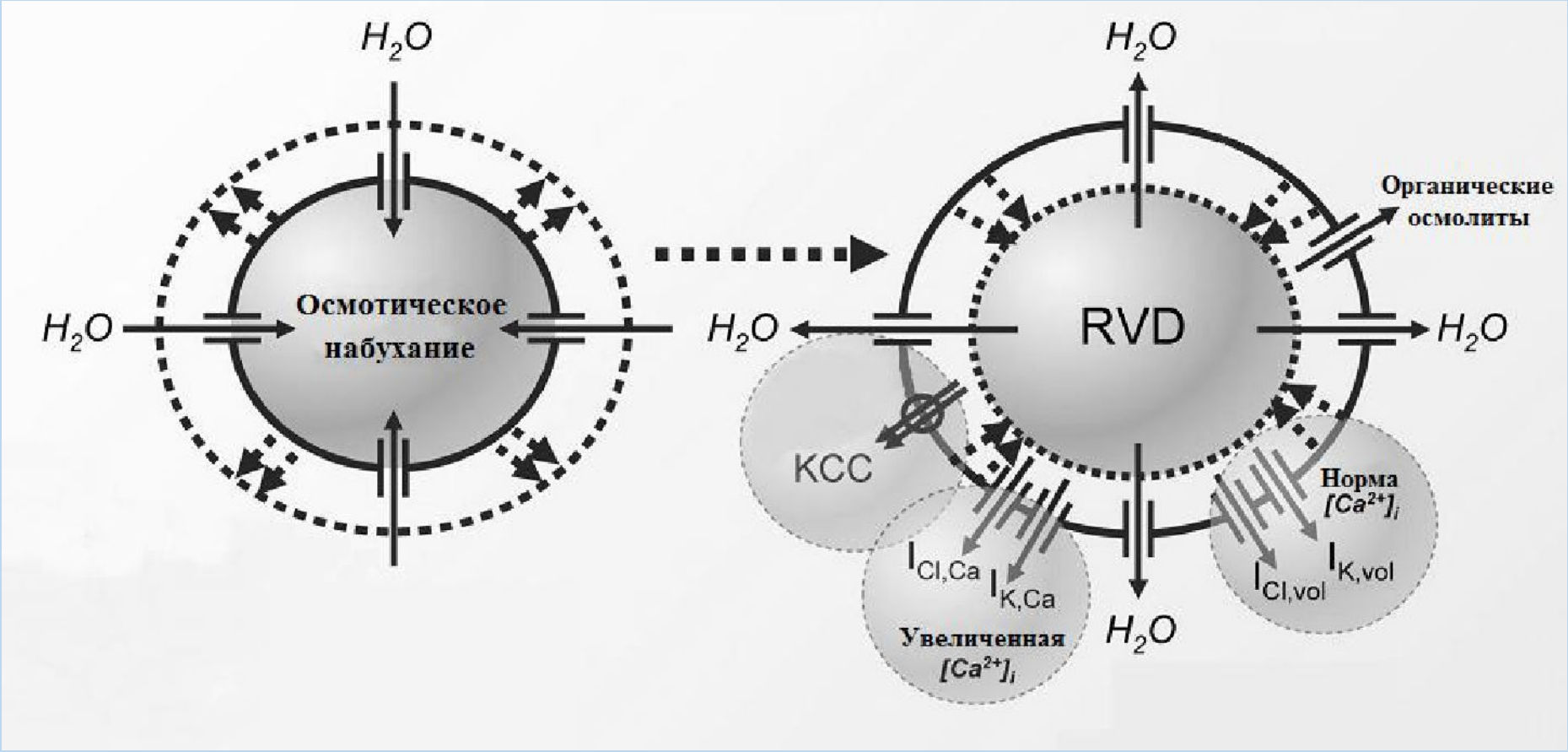
osmosis is

Закон Фика

Движущая сила при диффузии

Осмос, осмотическое давление

Основные механизмы трансмембранного транспорта, обеспечивающие регуляторное снижение объема клетки (RVD) (Hoffmann *et al*., 2009).



молекулярный перенос

$$v_i = B_i \mathbf{F_i}$$ B – подвижность

скорость дрейфа пропорциональна движущей силе

$$\mathbf{F_i} = -\frac{dP_i}{dx}$$ градиент потенциала

$\mathbf{F_i}$ **- сила**(поле); $\boldsymbol{P_i}$ **- потенциал**

$$j_i = c_i v_i$$ единичный поток (плотность)

$$j_i = c_i v_i = -c_i B_i \frac{dP_i}{dx}$$

молекулярный перенос

Закон Фика

$$j = -D\frac{dc}{dx}$$

$URT=D$

U – подвижность частицы

Химический потенциал для электронейтральных частиц

$$\mu_i = \mu_i^0 + kT\ln a_i$$

где $a_i = \frac{c_i}{c_i^0}$

градиент потенциала - движущая сила

$$\frac{dP_i}{dx} = \frac{d\mu_i}{dx} = kT\frac{d\ln a_i}{dx} = kT\frac{d\ln c_i}{dx} = \frac{kT}{c_i}\frac{dc_i}{dx}$$

Осмотический поток воды:
(Вант-Гофф)

$$J_w = -L_w RT \sum \Delta C_i .$$

осмотический перенос

van't Hoff equation:

$$\Pi = iMRT$$

где **П (pi)** осмотическое давление (kPa), M молярная концентрация, T абсолютная температура (°K), and R газовая константа .

движущая сила – разность между гидростатическим давлением ΔP, и осмотическим, ΔП

уравнение переноса массы:

$$\frac{dw}{dt} = KA[\Delta P - \Delta \Pi]$$

где dw/dt скорость переноса (поток), K коэффициент переноса, A площадь, ΔP гидростатическое давление (разность) на мембране, ΔП осмотическое давление(разность).

Макрокомпонентный состав, pH, Eh и общая минерализация соленых озер Кулундинской равнины

№	Название озера	pH	Eh	CO_3	HCO_3^-	SO_4^{2-}	Cl^-	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	M*	Si
			мВ	мг/л								г/л	мг/л
1	Кулундинское	8,7	121	228	1891	27972	63900	50	6436	43050	262	144	1,10
2	Кучукское	7,5	141	н.о.	570	51750	157250	145	14552	99000	503	324	1,42
3	Шошкалы	9,6	94	108	257	591	600	16	171	775	21	3	0,20
4	Джемансор	9,7	126	744	3538	12485	10380	11	228	13690	42	40	1,94
5	Б. Яровое	8,4	208	180	610	4978	80250	500	8967	37000	80	132	2,12
6	Бурлинское	8,1	195	н.о.	488	32767	169000	213	14817	97080	203	315	2,01
7	Б. Топольное	9,7	145	1140	3050	5330	6200	н.о.	970	5580	121	21	1,67
8	Куричье	8,5	220	120	610	17784	43500	33	4982	27260	164	94	0,59
9	Малиновое	8,4	205	н.о.	494	32354	173000	176	5748	116500	415	329	2,28

Примечание: н.о. – не обнаружено; М* – общая минерализация.

молекулярный перенос

$\mu = \mu 0 + RT\ln C + ZF\phi$ *электрохимический потенциал*

Z – заряд, F - число Фарадея, ϕ – электрический потенциал

$j = -UC\, d\mu/dx$ ***уравнение Теорелла***

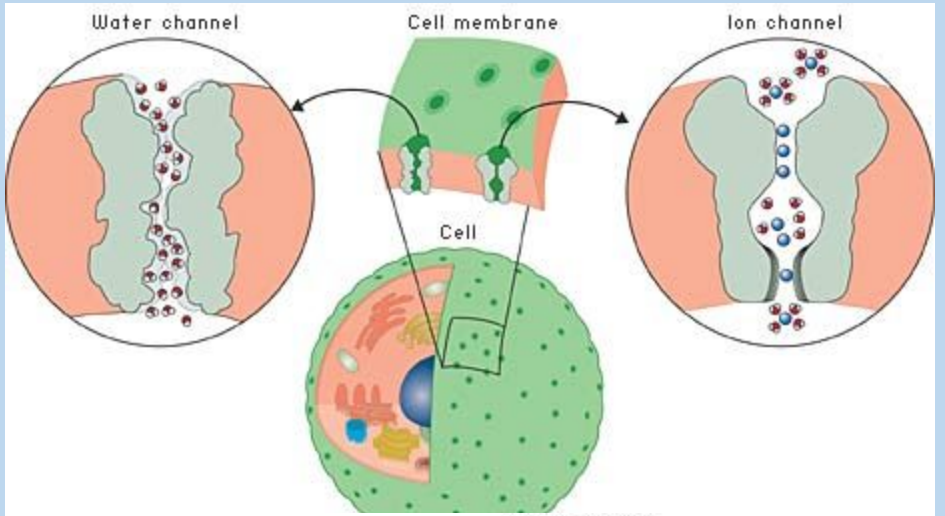
U – подвижность частицы

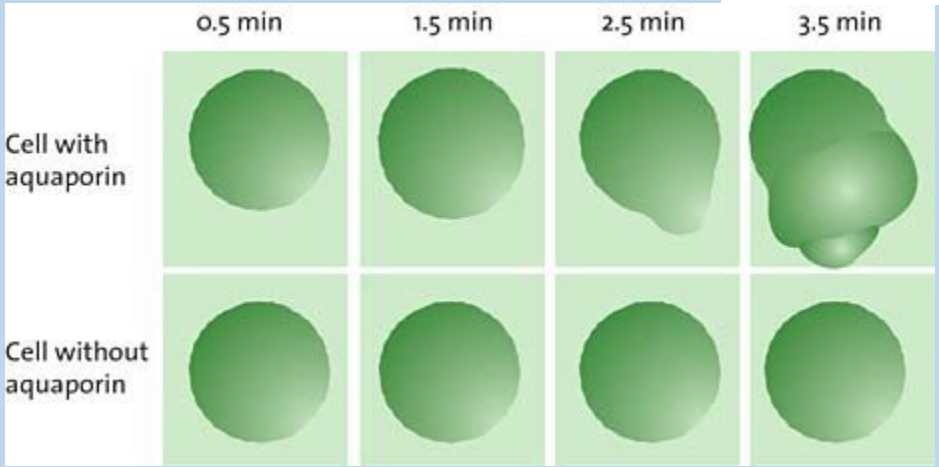
$I = -URT\, dC/dx - UCZF\, d\phi/dx$

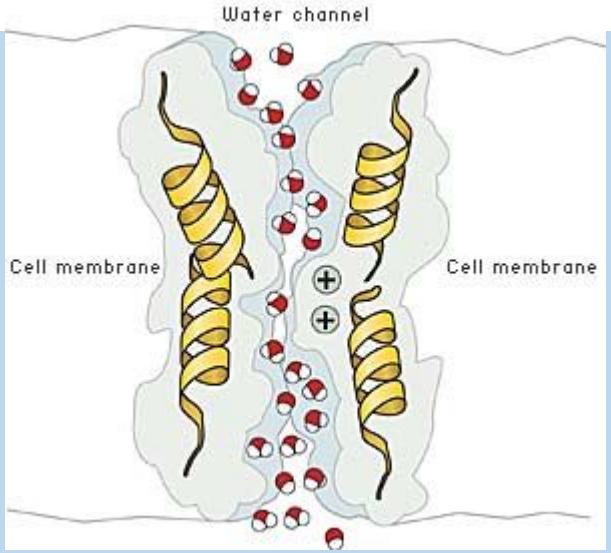
уравнение Нернста-Планка

The Nobel Prize in Chemistry

KUNGL. VETENSKAPSAKADEMIEN
THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES







AQP1 AQP0 AqpZ

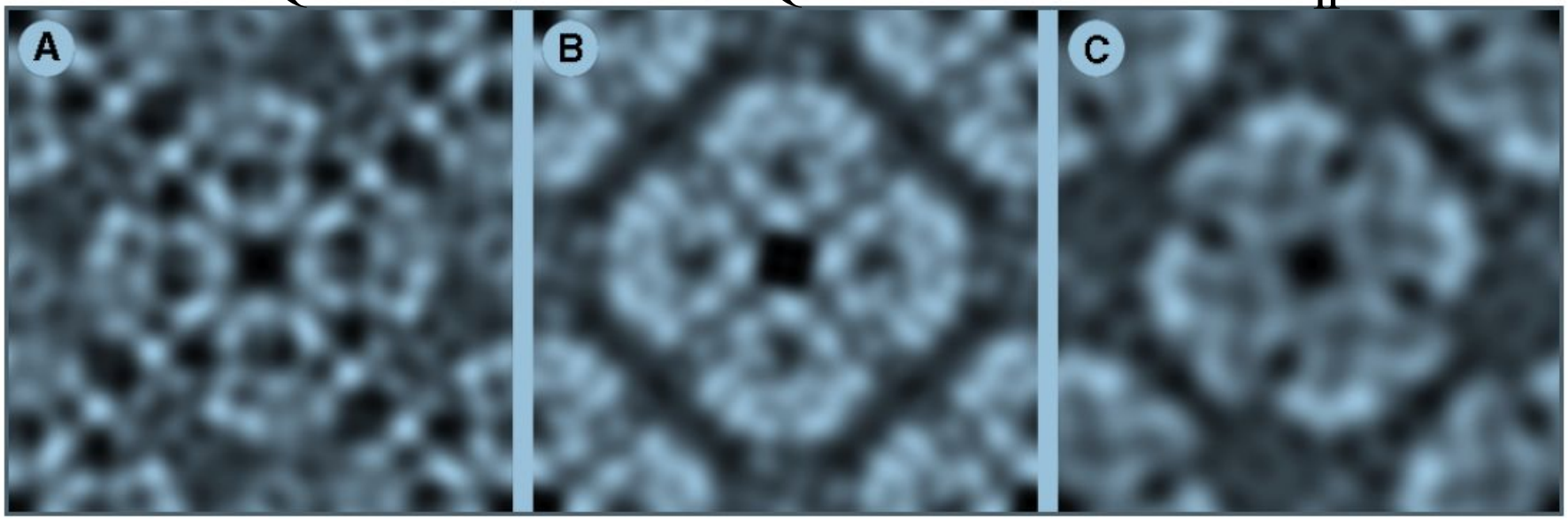
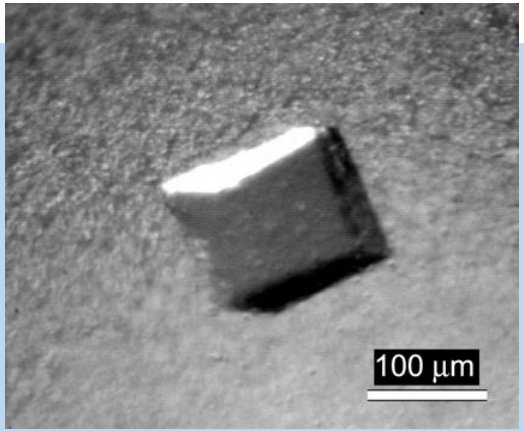
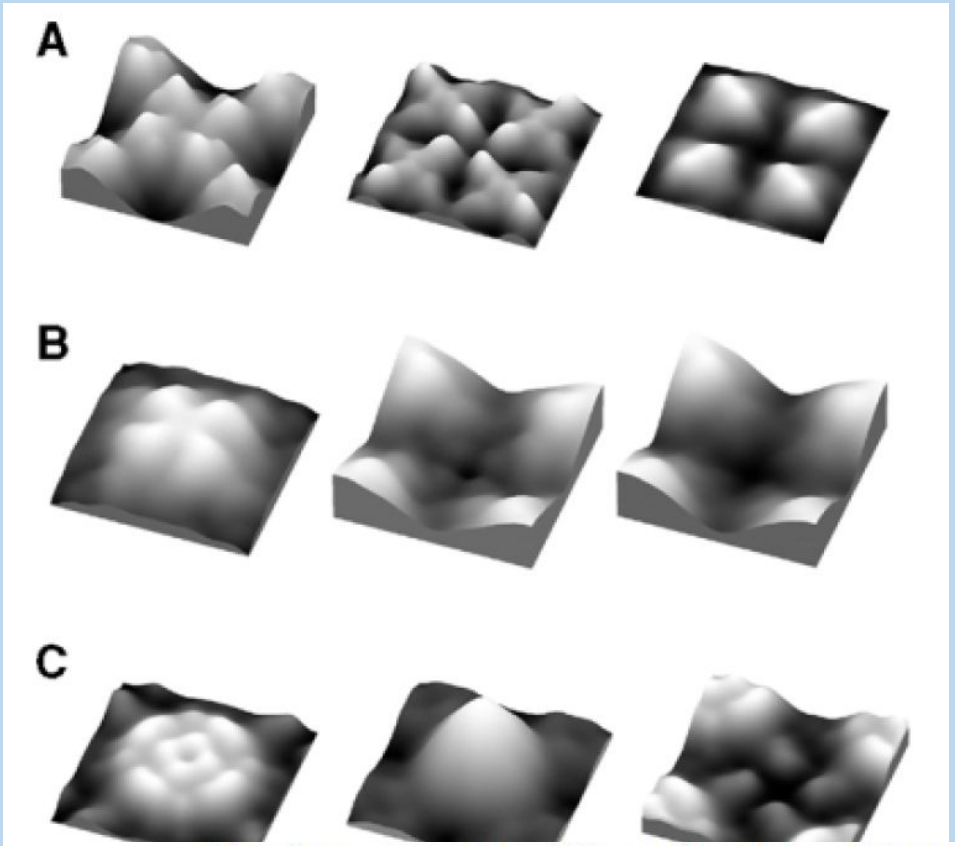


Fig. 3. Projection maps of water channel proteins acquired by cryo-electron microscopy and calculated using the MRC software (Crowther *et al.*, 1996). The maps reveal the structural similarity of the protein core that is embedded in the lipid bilayer and well conserved during sample preparation in spite of surface tension and interaction with the supporting carbon film. (**A**) The red cell water channel, AQP1, at 3.5 Å resolution. AQP1 packs into arrays with $P42_12$ symmetry, housing two tetramers per unit cell of size 96 Å. (**B**) The lens fiber cell water channel, MIP (AQP0), at 5.7 Å resolution (D.Fotiadis, L.Hasler, D.J.Muller, H.Stahlberg, J.Kistler and A.Engel, manuscript submitted). AQP0 packs into $P4$ arrays with a single tetramer per unit cell of 64 Å side length. The area shown comprises two unit cells. (**C**) The bacterial water channel, AqpZ, at 8 Å resolution (Ringler *et al.*, 1999). AqpZ is packed in an up-and-down orientation, as is AQP1, into unit cells of 94 Å width. All projections are viewed from the cytoplasmic side.





Surface topographies of water channel proteins are distinctly different, reflecting the differences in their sequences that are found mainly in the helix-connecting loops. Surface reliefs are acquired in buffer solution by atomic force microscopy. (**A**) Two-dimensional crystals assembled from AQP0 tetramers possess a *P*4 symmetry with one tetramer per unit cell of 64 Å width (Hasler *et al.*, 1998). Four bilobed domains protrude by 14 Å from the extracellular surface of AQP0 (left). They are involved in a 'tongue and groove' interaction in junctions formed by two packed crystal layers (D.Fotiadis, L.Hasler, D.J.Müller, H.Stahlberg, J.Kistler and A.Engel, manuscript submitted).

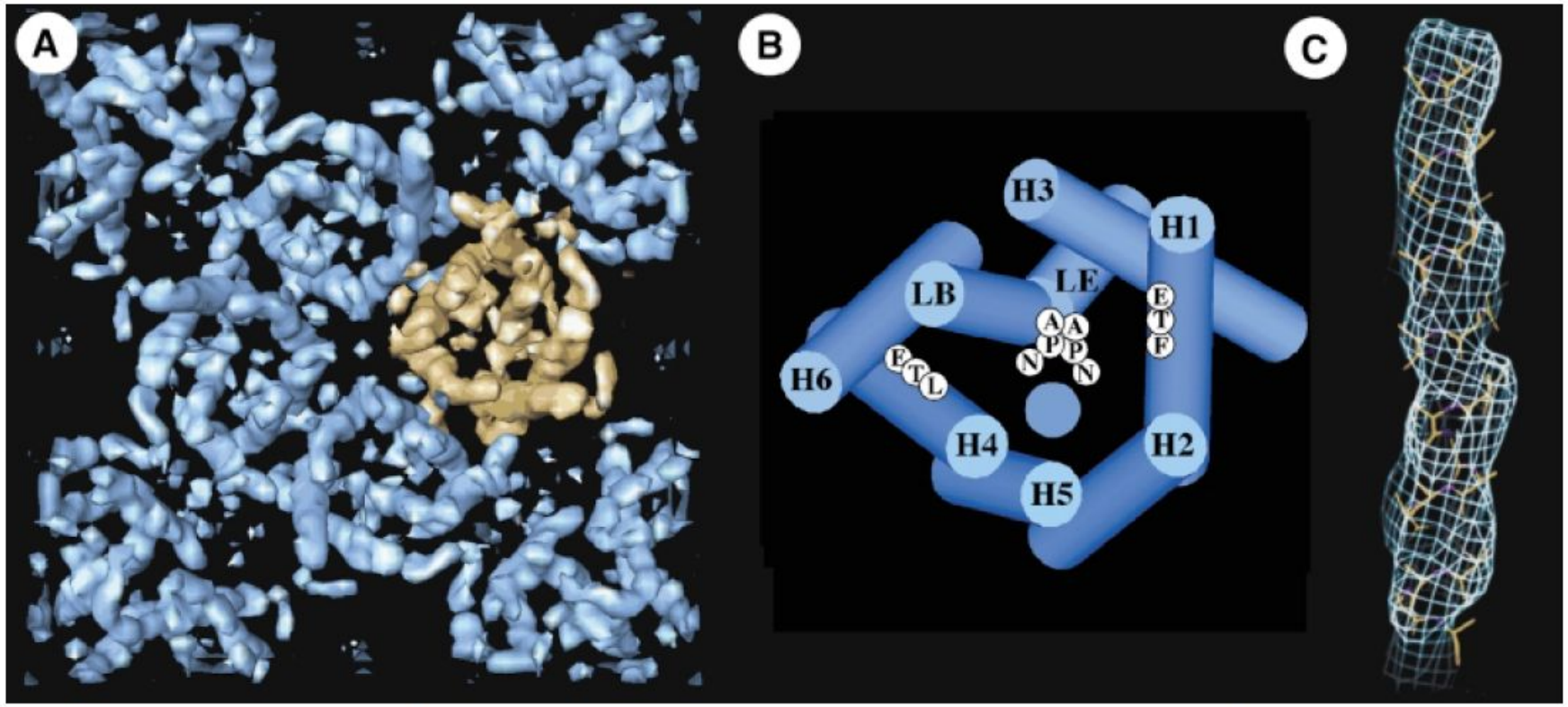
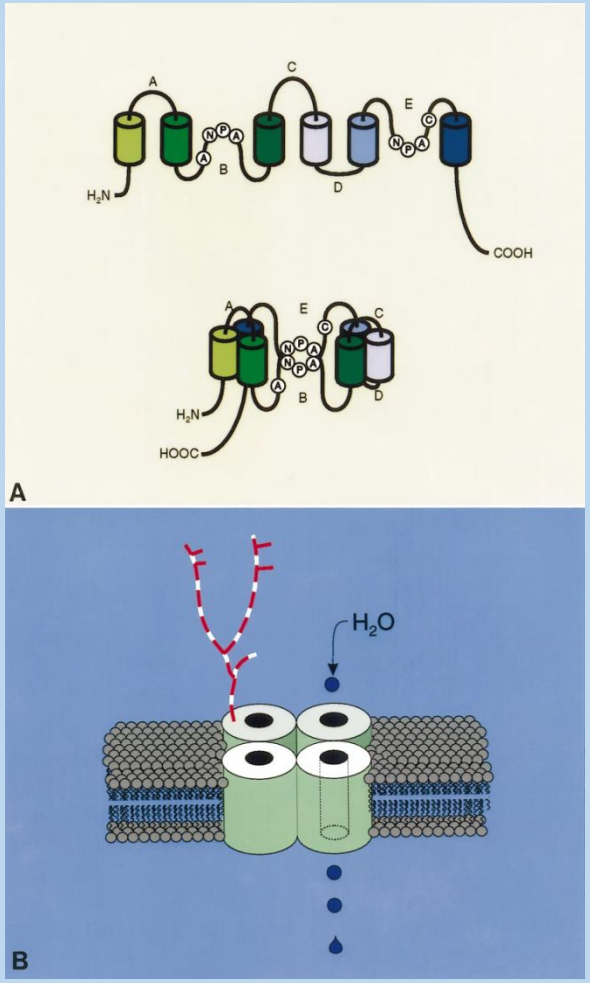
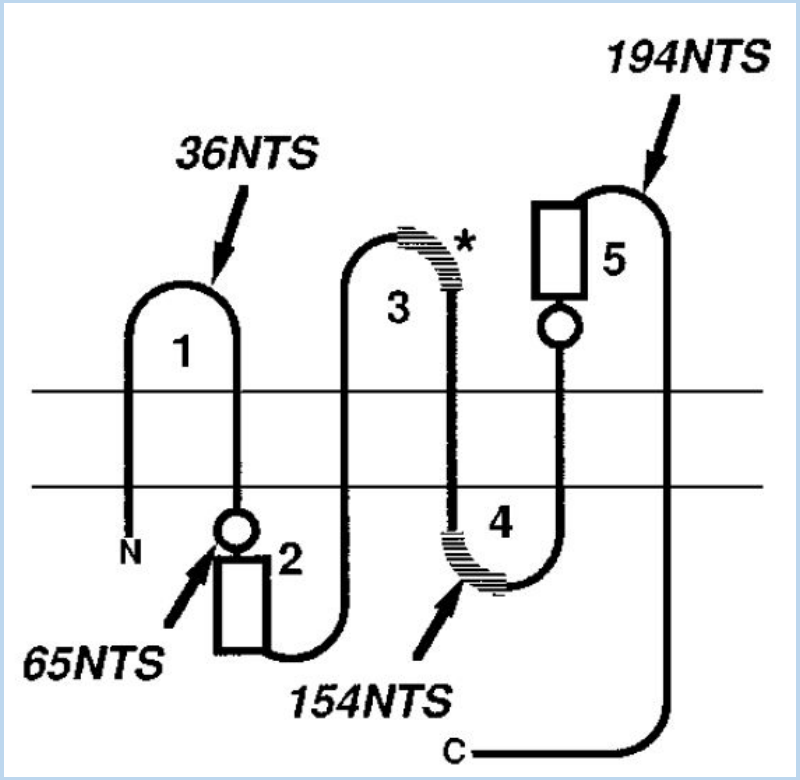


Fig. 4. The tetrameric arrangement of AQP1 and its molecular architecture is demonstrated three-dimensionally at 6 Å resolution (Walz *et al*., 1997). (**A**) Cytoplasmic view of one unit cell comprising the central tetramer and four monomers in the opposite orientation at the corners. Gaps within the tetramer indicate the monomer boundary. (**B**) The helix assignment derived from multiple sequence alignment (Heymann and Engel, 2000) is different from that proposed in Walz *et al*. (1997), but compatible with the 4.5 Å map established recently (Mitsuoka *et al*., 1999). The two NPA motifs are shown in the middle, and the hydrophobic residues on H1 (F) and H4 (L) are proposed to lie close to the channel (blue circle). (**C**) At 4.5 Å resolution, the helical nature of a membrane-spanning segment is revealed (Mitsuoka *et al*., 1999).



A schematic for structure of AQP-2

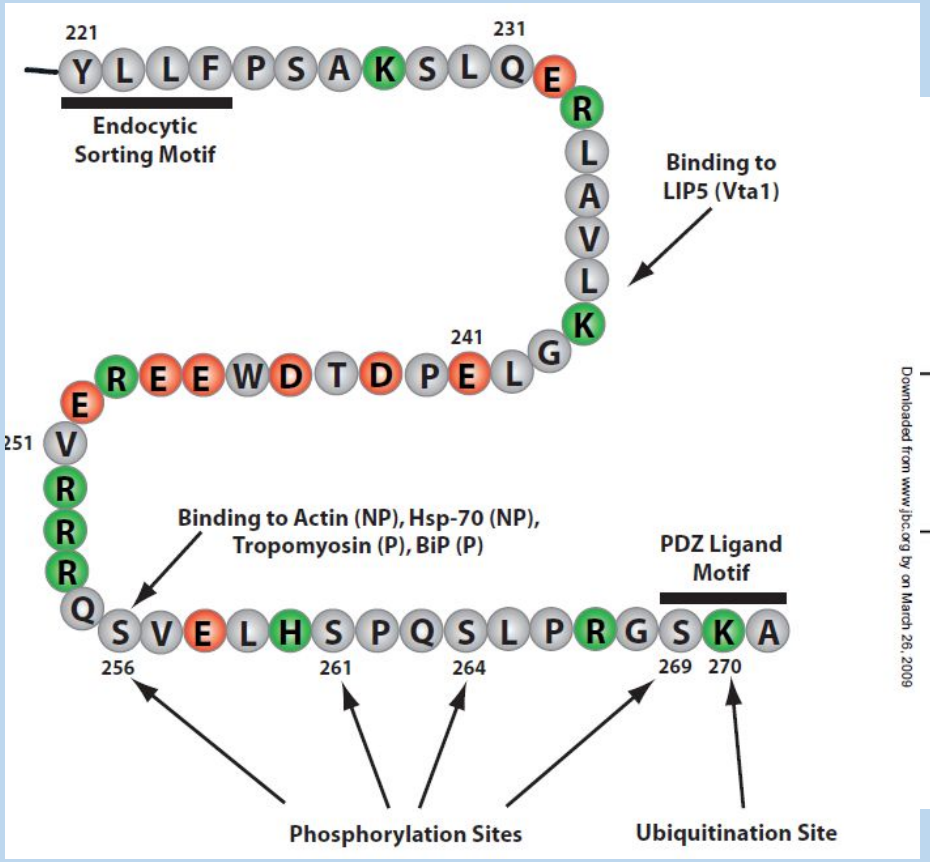


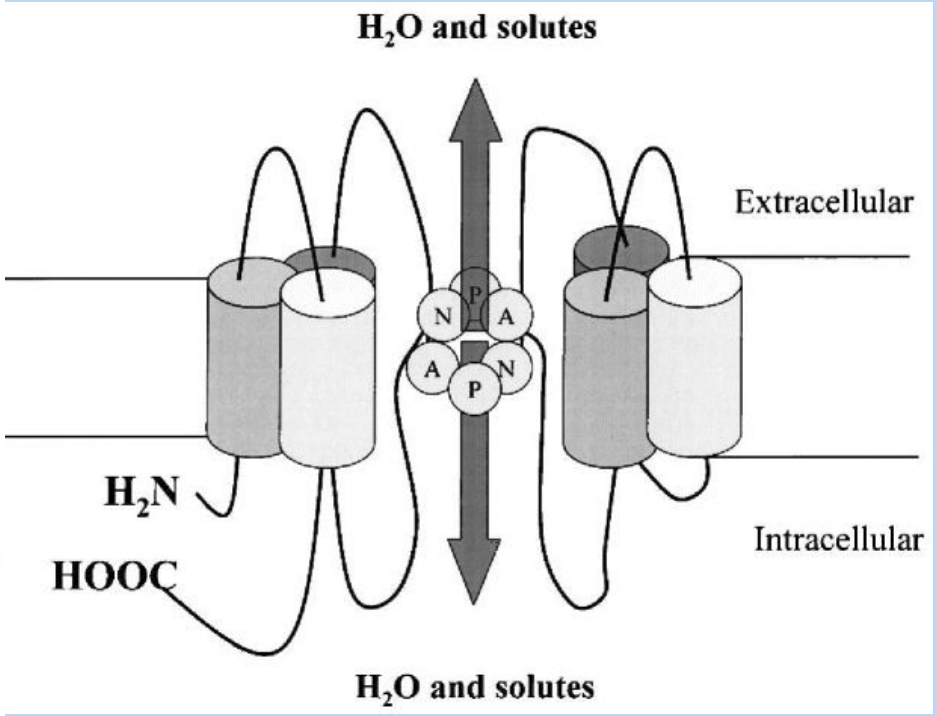
Conservative NPA sequences are illustrated as *open boxes*

Potential N-glycosylation site of wild-type AQP-2 is marked by an *asterisk.*

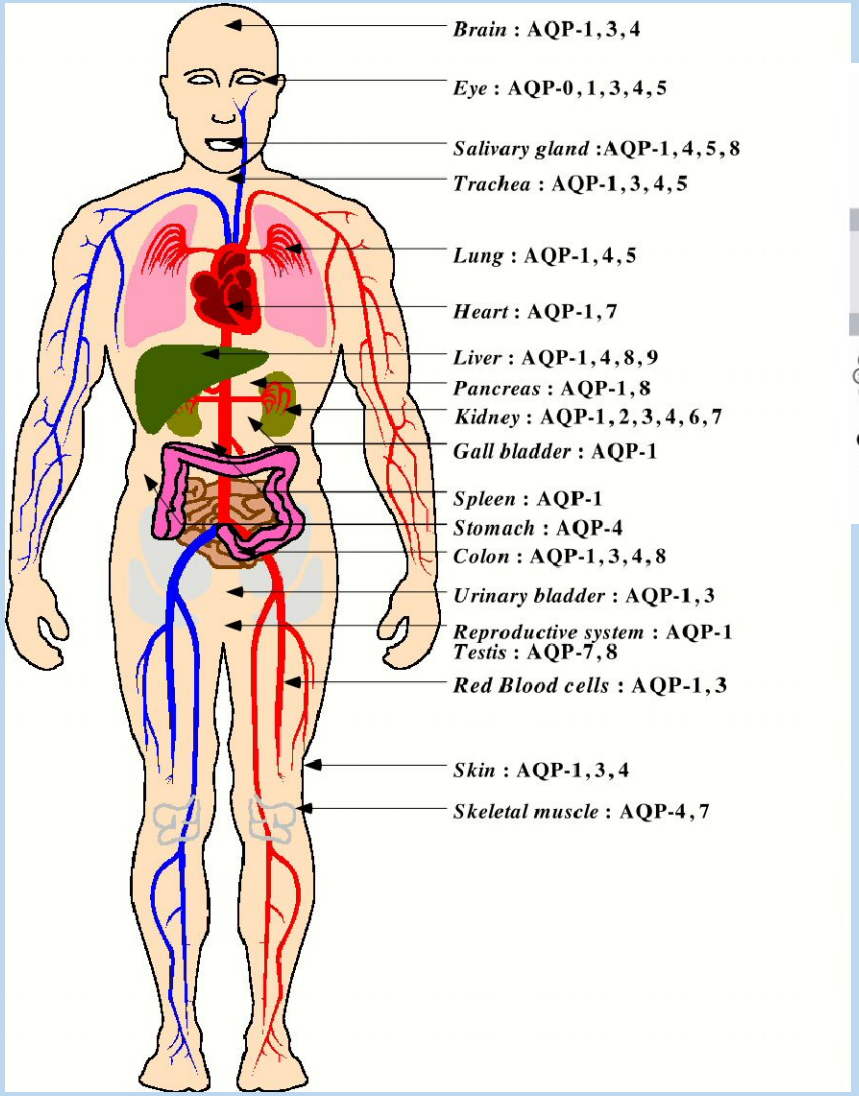
Alternative N-glycosylation signals are indicated as 36NTS, 65NTS, 154NTS, or 194NTS.

Potential mercury-sensitive sites of Cys-181 and Ala-65 are indicated

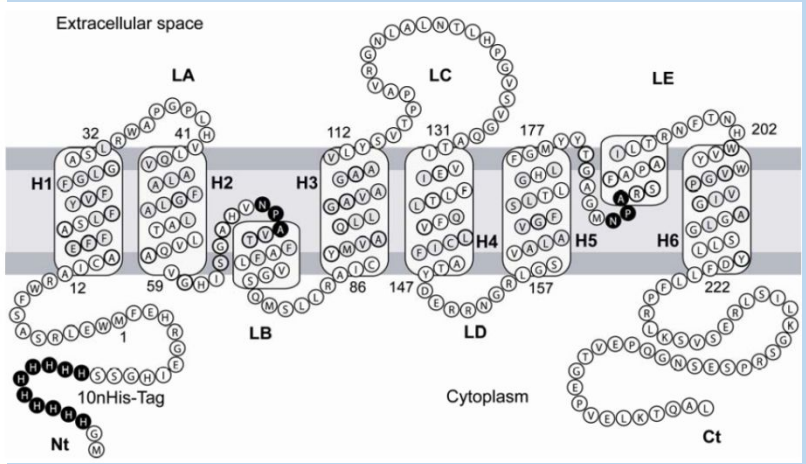




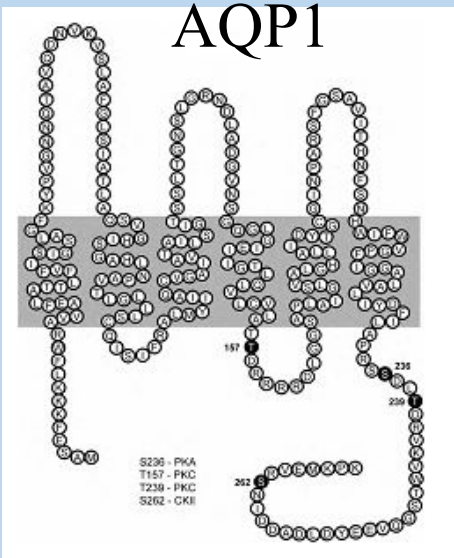
Downloaded from www.jbc.org by on March 26, 2009

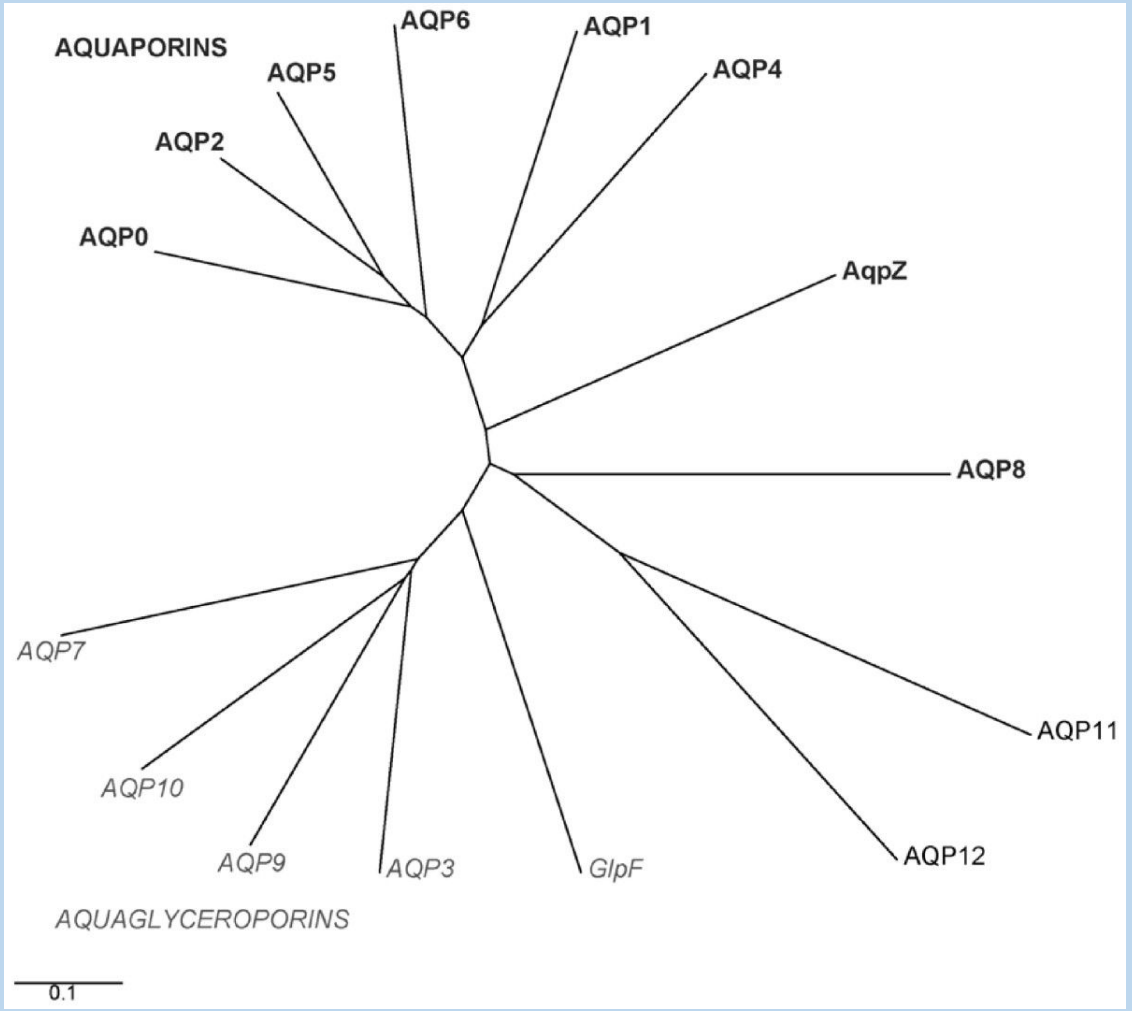

Brain : AQP-1, 3, 4
Eye : AQP-0, 1, 3, 4, 5
Salivary gland :AQP-1, 4, 5, 8
Trachea : AQP-1, 3, 4, 5
Lung : AQP-1, 4, 5
Heart : AQP-1, 7
Liver : AQP-1, 4, 8, 9
Pancreas : AQP-1, 8
Kidney : AQP-1, 2, 3, 4, 6, 7
Gall bladder : AQP-1
Spleen : AQP-1
Stomach : AQP-4
Colon : AQP-1, 3, 4, 8
Urinary bladder : AQP-1, 3
Reproductive system : AQP-1
Testis : AQP-7, 8
Red Blood cells : AQP-1, 3
Skin : AQP-1, 3, 4
Skeletal muscle : AQP-4, 7

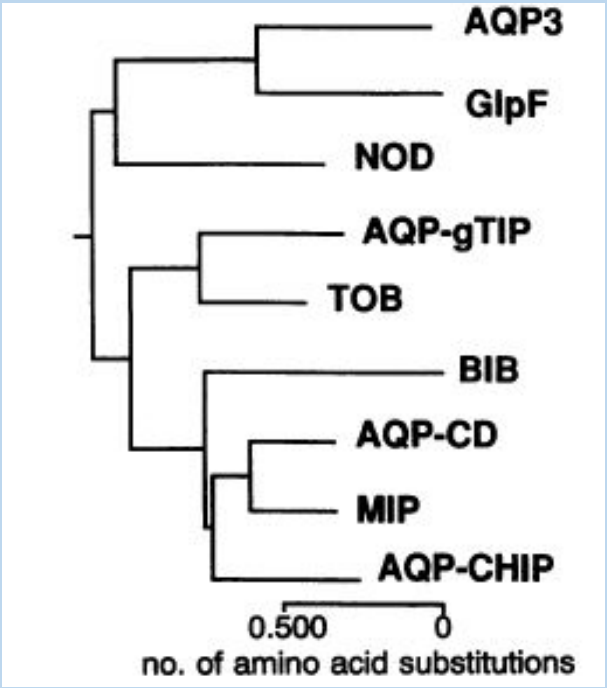
AQP0

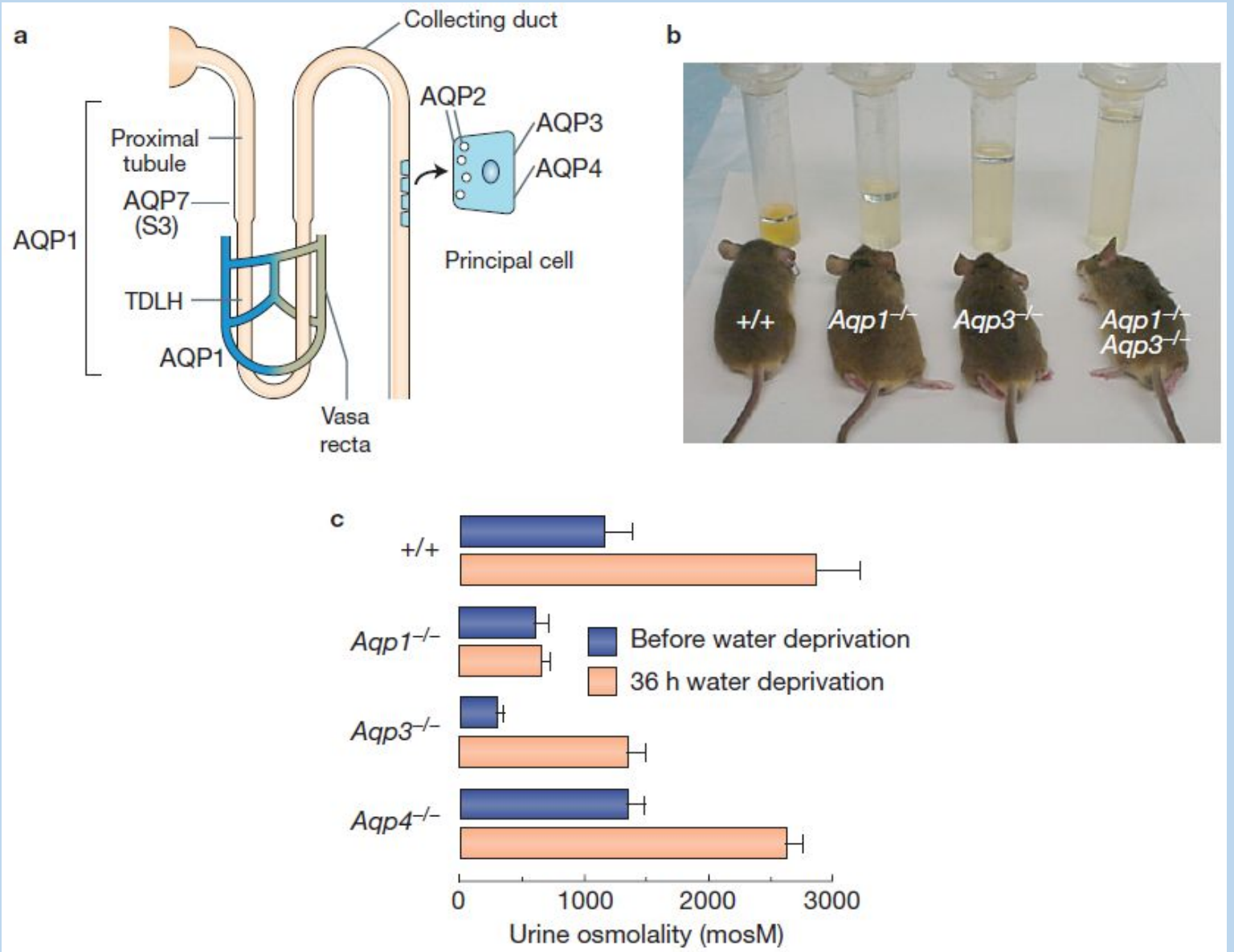

Extracellular space
LA
LB
LC
LD
LE
H1
H2
H3
H4
H5
H6
32
41
112
131
177
202
12
59
86
147
157
222
1
10nHis-Tag
Nt
Cytoplasm
Ct

AQP1


S236 - PKA
T157 - PKC
T239 - PKC
S262 - CKII

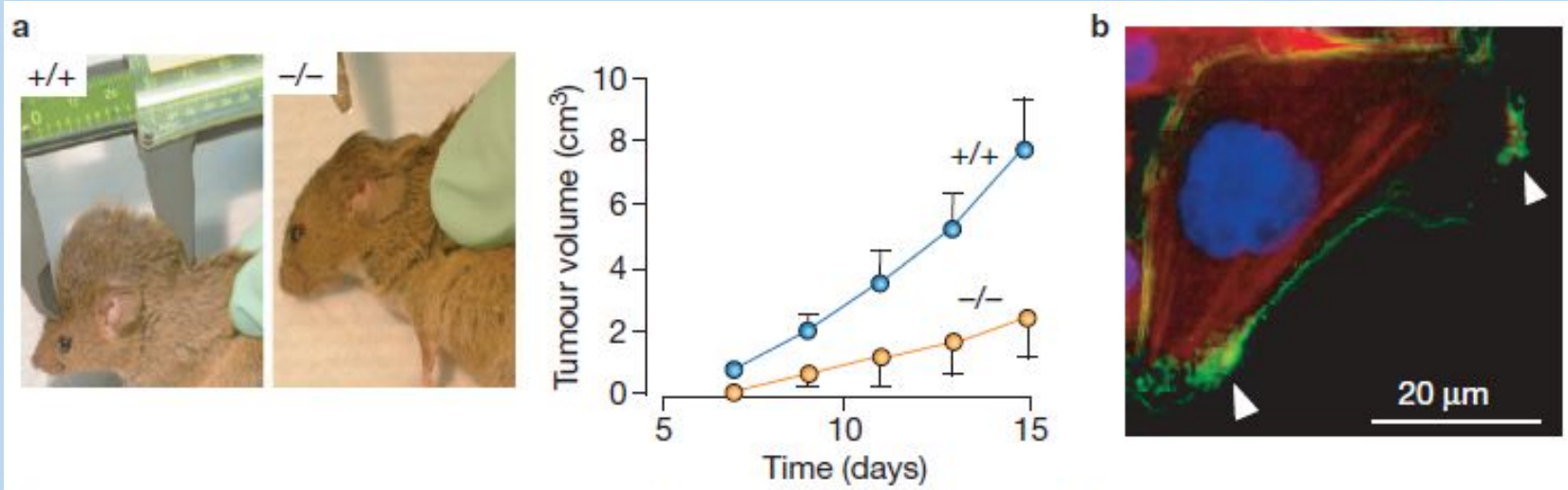

AQUAPORINS
AQP6
AQP1
AQP5
AQP4
AQP2
AQP0
AqpZ
AQP8
AQP7
AQP11
AQP10
AQP12
AQP9
AQP3
GlpF
AQUAGLYCEROPORINS
0.1


AQP3
GlpF
NOD
AQP-gTIP
TOB
BIB
AQP-CD
MIP
AQP-CHIP
0.500
0
no. of amino acid substitutions



Impaired urinary concentrating function in aquaporin deficiency

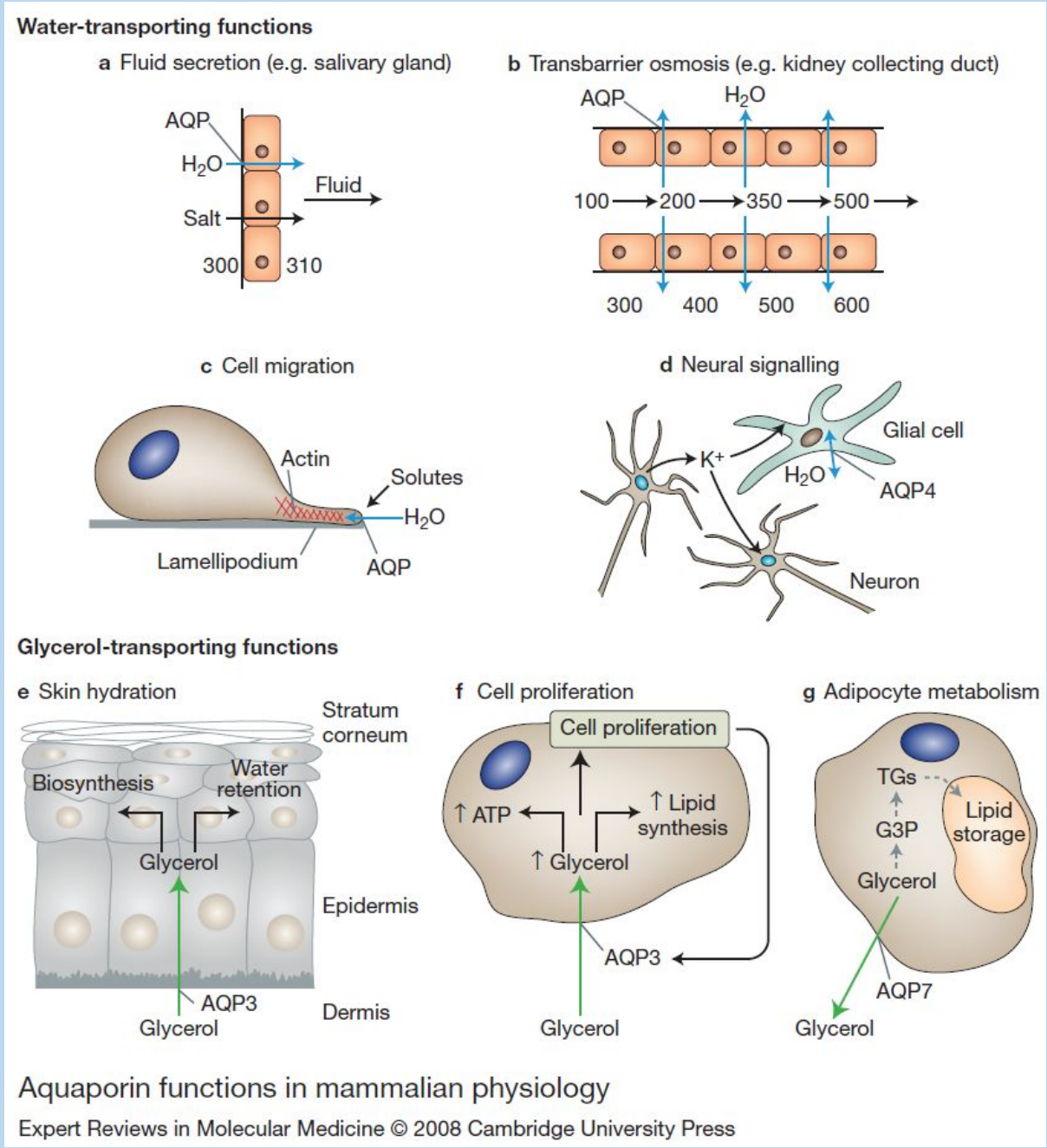
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press



Impairment in tumour growth and endothelial cell migration in aquaporin 1 deficiency

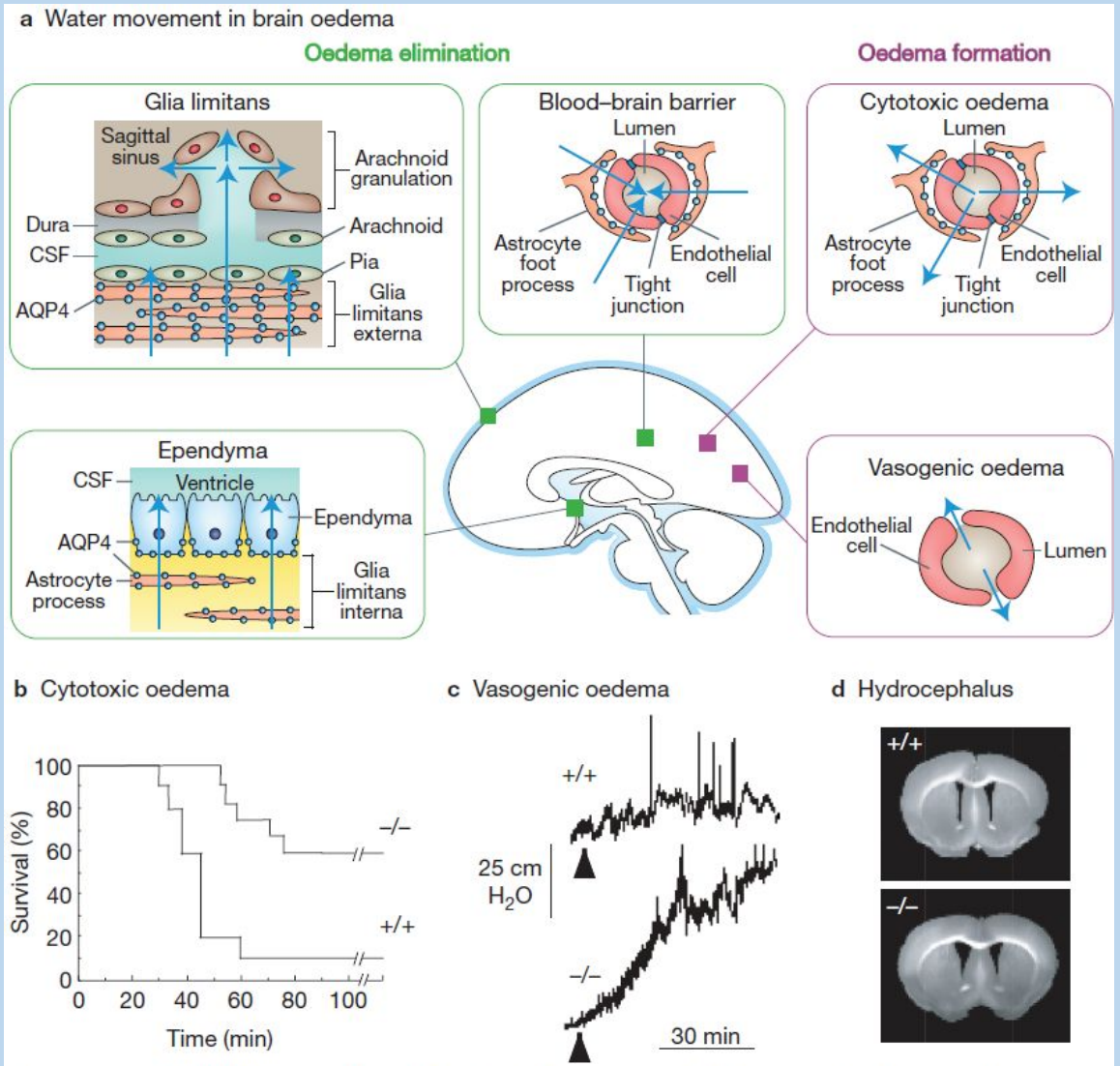
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press [part a (left) only]

Figure 4. Impairment in tumour growth and endothelial cell migration in aquaporin 1 deficiency. Aquaporin 1 (AQP1) deletion impairs tumour angiogenesis because, in part, of reduced migration of endothelial cells. (a, left) Reduced tumour size in AQP1-null mouse, two weeks after subcutaneous injection of one million B16F10 melanoma cells. (a, right) Tumour growth data (ten mice per group). (b) AQP1 protein (green) polarisation to lamellipodia (arrows) in a migrating CHO cell. Graph in part a and image in part b reprinted from Ref. 56.



Aquaporin functions in mammalian physiology

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press



Aquaporin 4 deficiency slows brain water accumulation in cytotoxic oedema, and brain water elimination in vasogenic oedema

Expert Reviews in Molecular Medicine 2008 Published by Cambridge University Press

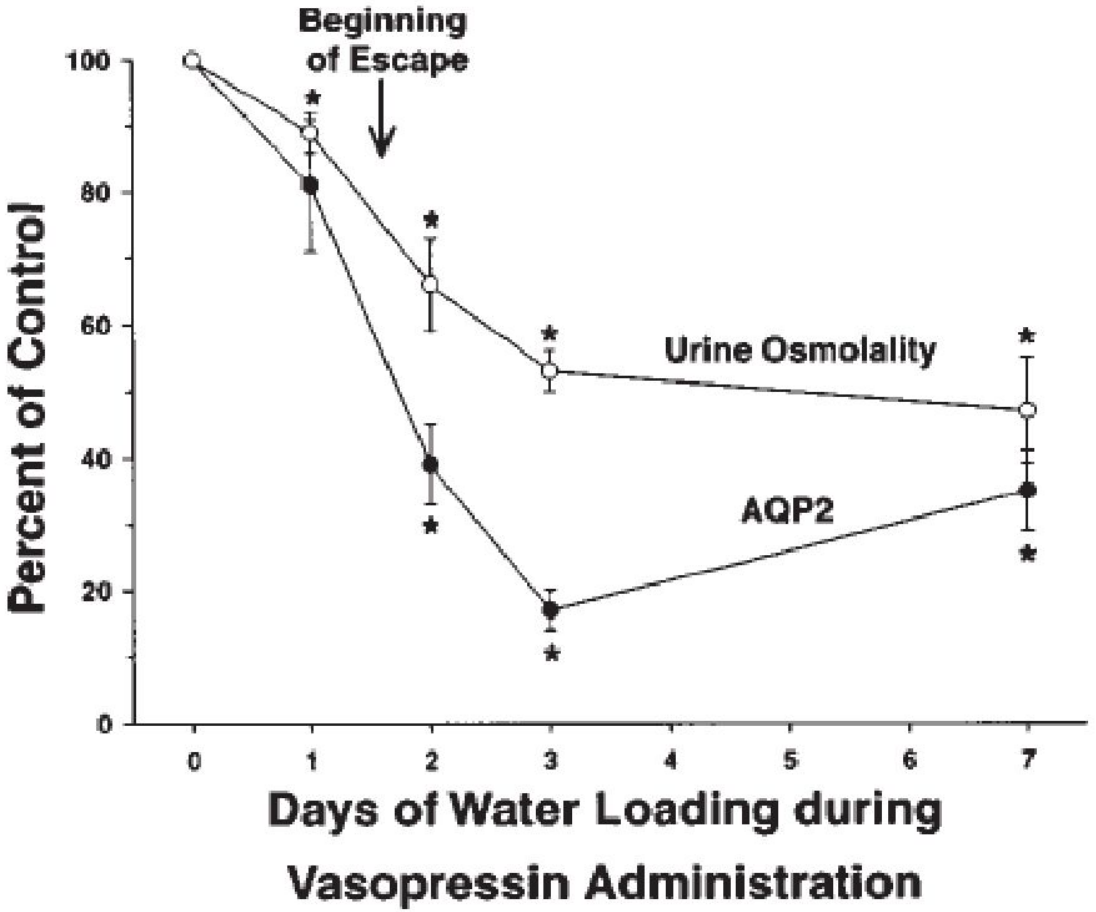
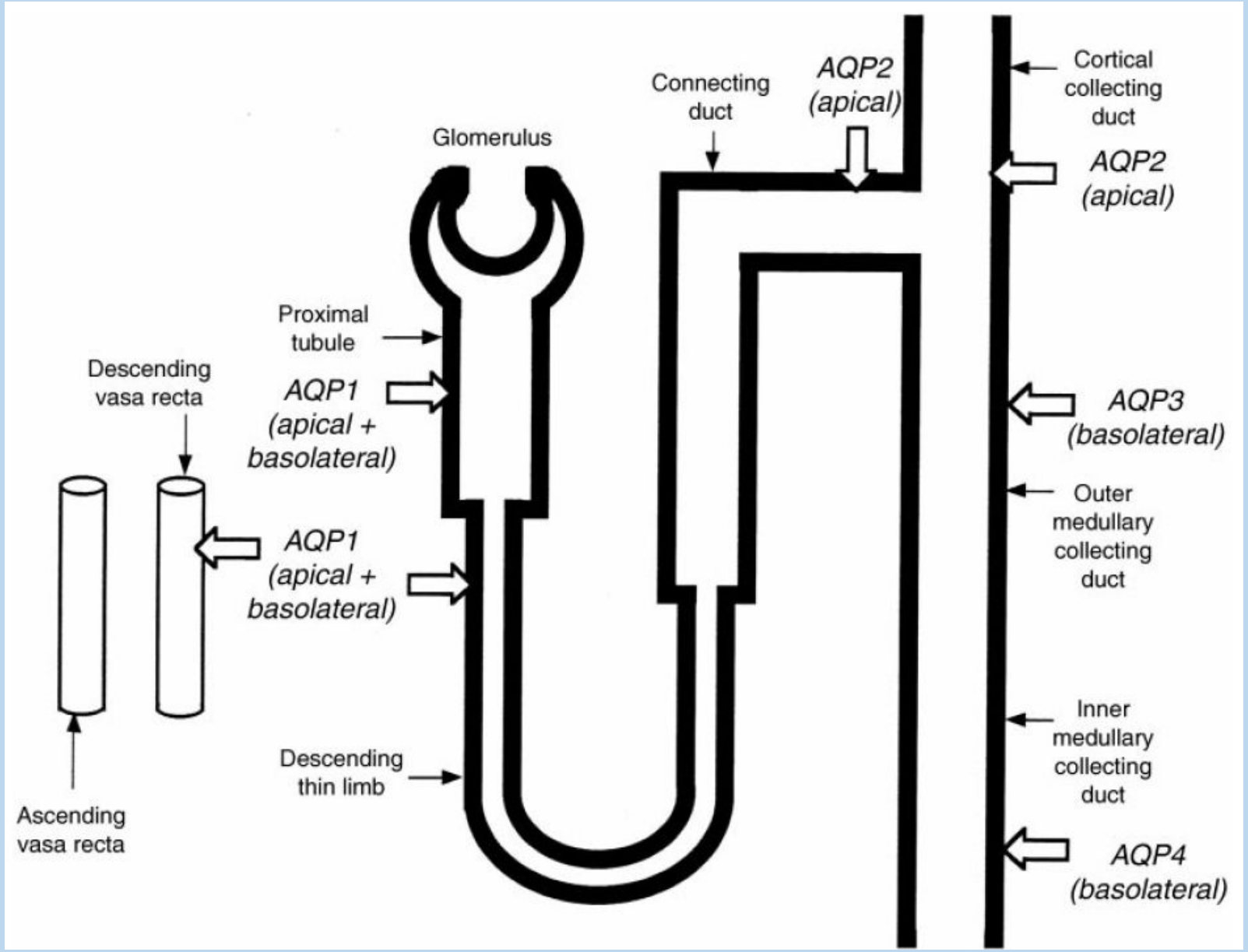
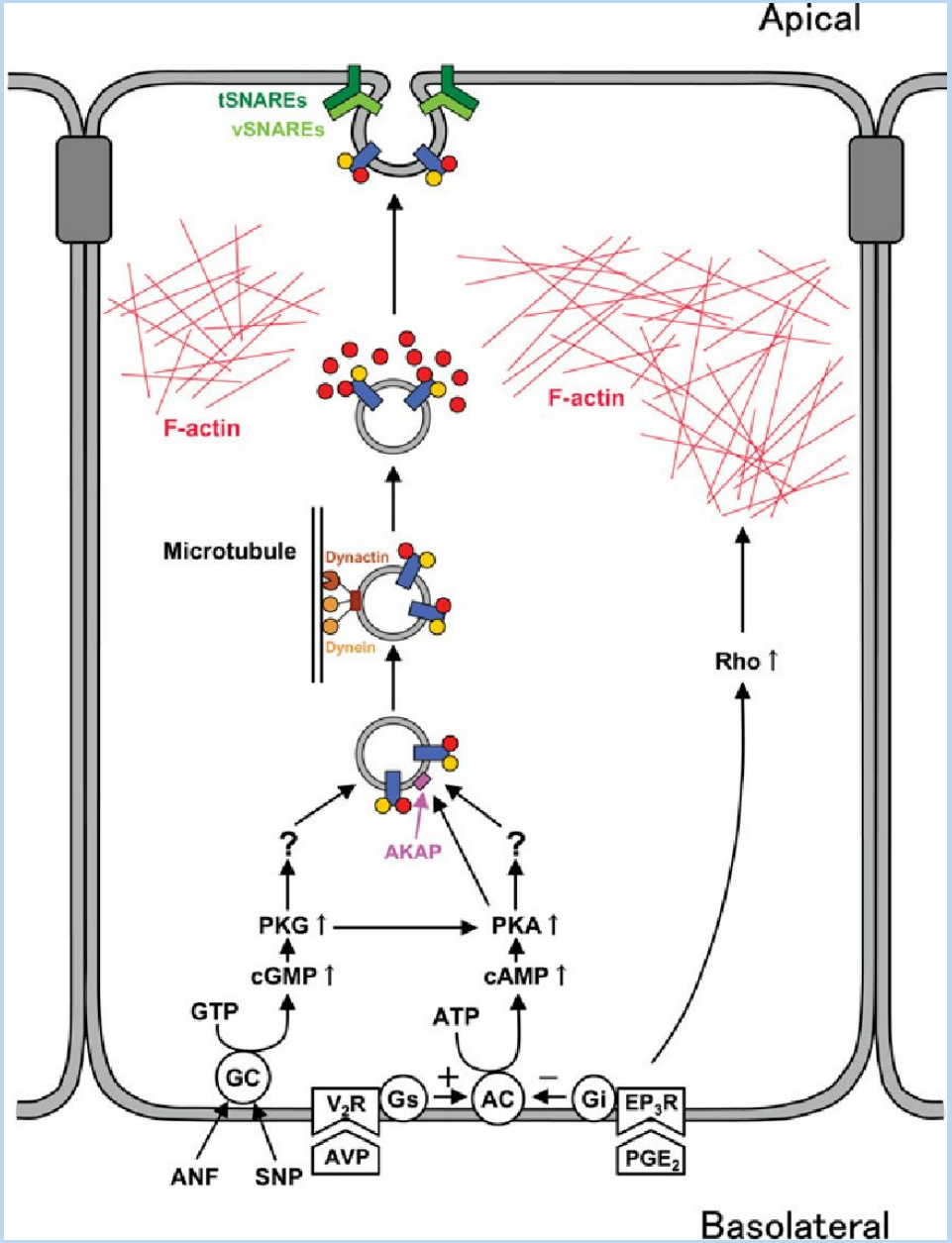


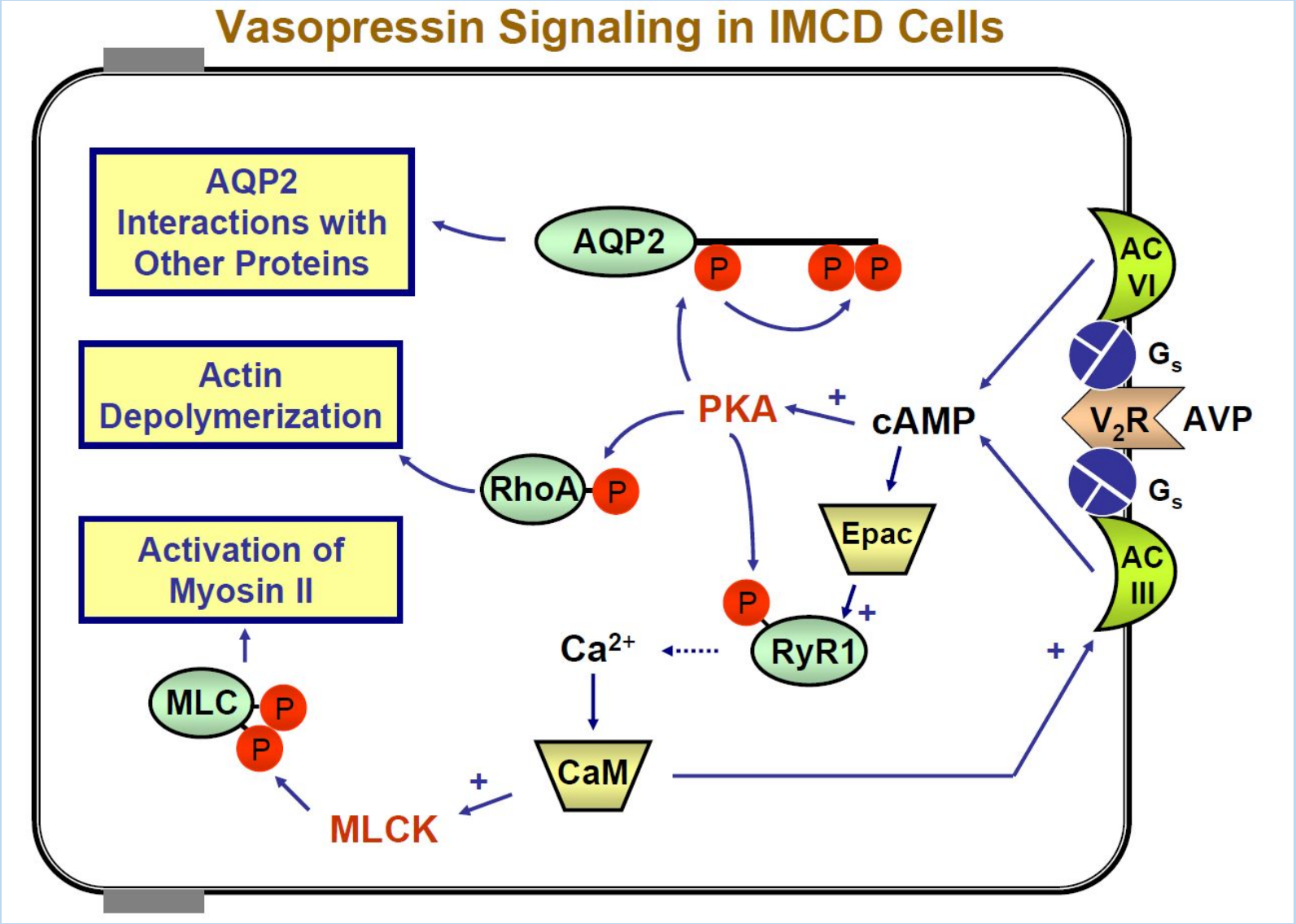
FIGURE 1. Correlation between relative changes in renal expression of aquaporin-2 (AQP2) and urine osmolality during escape from vasopressin-induced antidiuresis in rats. The experimental protocol is explained in the text. Mean values are expressed as percentages of the values in rats not undergoing escape (control rats). *Significant changes ($P < 0.05$) from controls.

"*Luckily, physiological mechanisms allow animals to escape. . . .*"

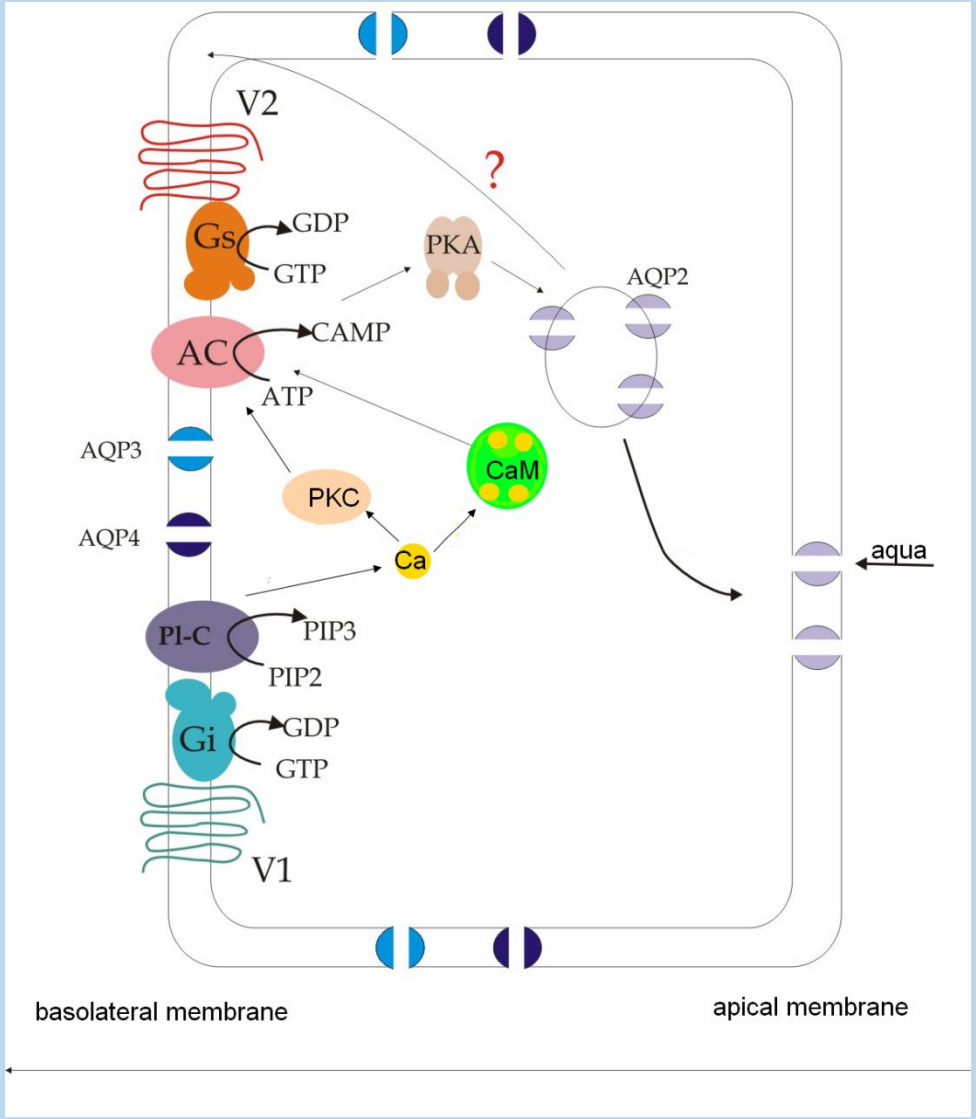

Connecting duct
AQP2 (apical)
Glomerulus
Cortical collecting duct
AQP2 (apical)
Proximal tubule
Descending vasa recta
AQP1 (apical + basolateral)
AQP3 (basolateral)
AQP1 (apical + basolateral)
Outer medullary collecting duct
Inner medullary collecting duct
Descending thin limb
Ascending vasa recta
AQP4 (basolateral)



Y. Noda and S. Sasaki 2005

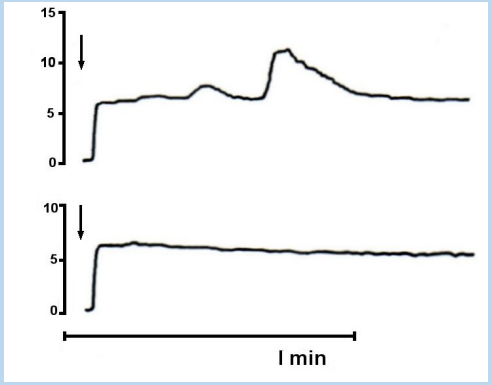


Jason D. Hoffert, Chung-Lin Chou, and Mark A. Knepper 2009

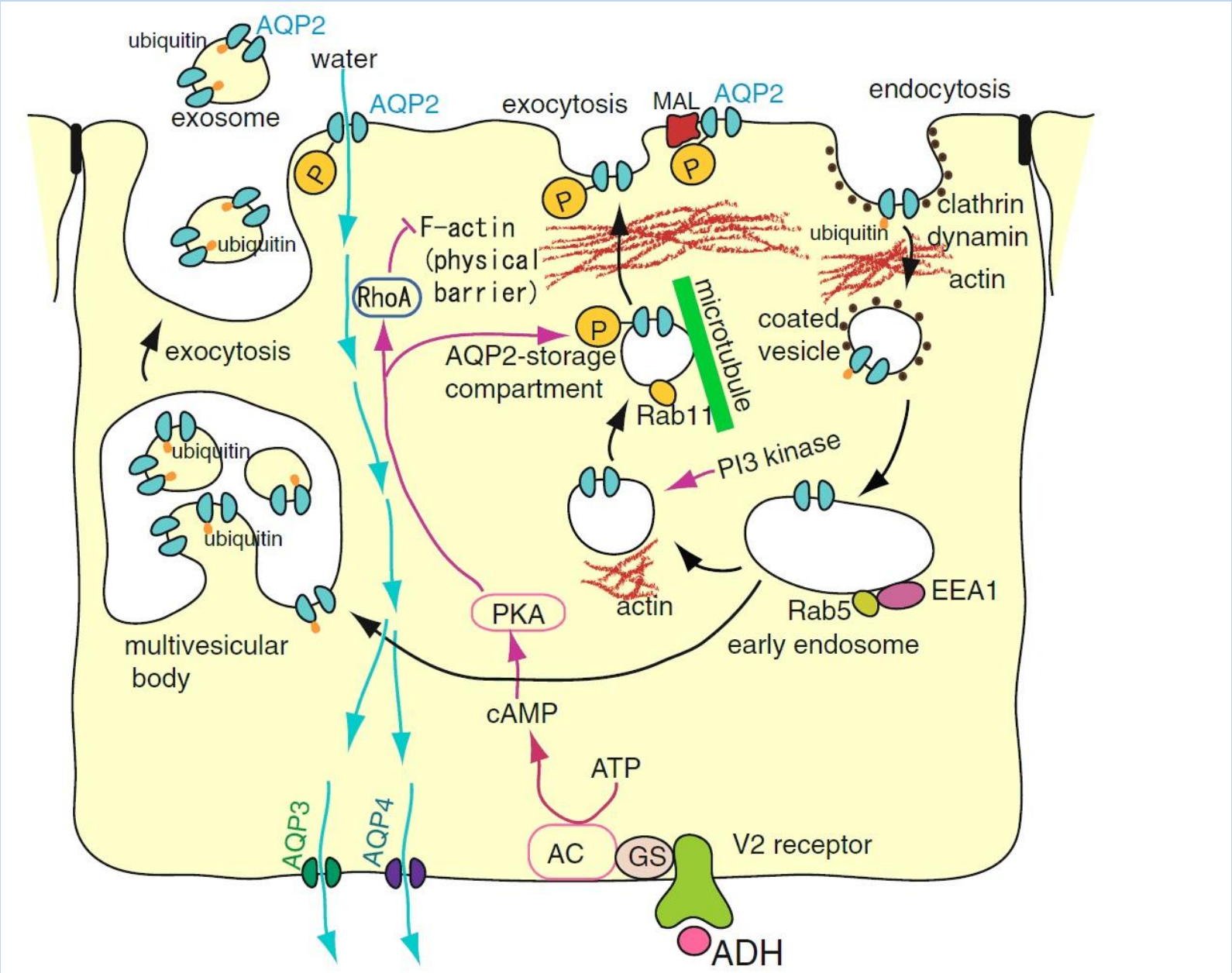


Ca+2/calmodulin plays a critical role in regulation of renal collecting duct water permeability by vasopressin

Vasopressin-stimulated elevation of intracellular Ca2+ concentration



Solenov EI, Logvinenko NS, Zelenina MN, Dzgoev SG, Ivanova LN.
Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova. 1986 Dec;72(12):1673-9



Kuniaki Takata · Toshiyuki Matsuzaki · Yuki Tajika ·

Abduxukur Ablimit · Takahiro Hasegawa; Histochem Cell Biol (2008)

в почках везикулы содержащие AQP2 для встраивания требуют SNARE (*The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein target receptor*), также как и VAMPs(vesicle-associated membrane proteins). VAMP2 и VAMP3 присутствуют в везикулах содержащих AQP2 в депо.
Изоформы синтаксинов (Stx) экспрессируются неравномерно. Stx3 и Stx4 представлены, соответственно, в апикальной и базолатеральных мембранах. Возможно они участвуют в поляризации клетки.

MSc

Faculty of Natural Sciences
Novosibirsk State University
Novosibirsk, Russia

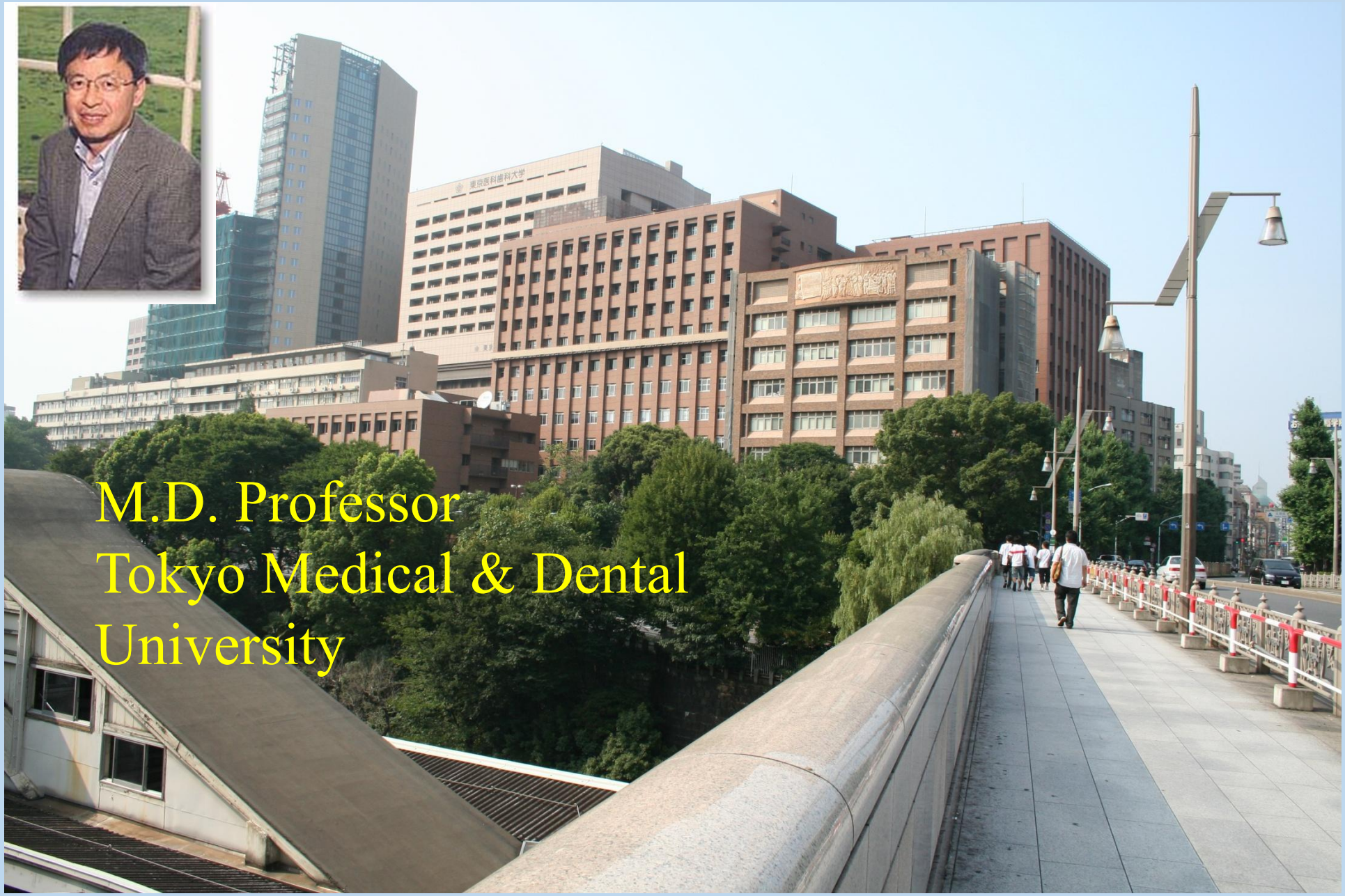
PhD

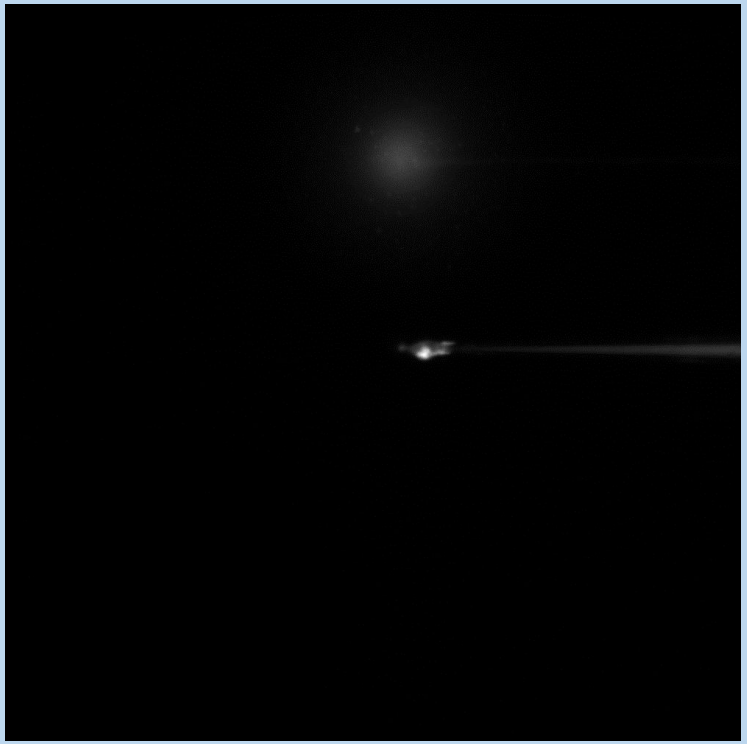
Institute of Cytology and Genetics
Novosibirsk, Russia

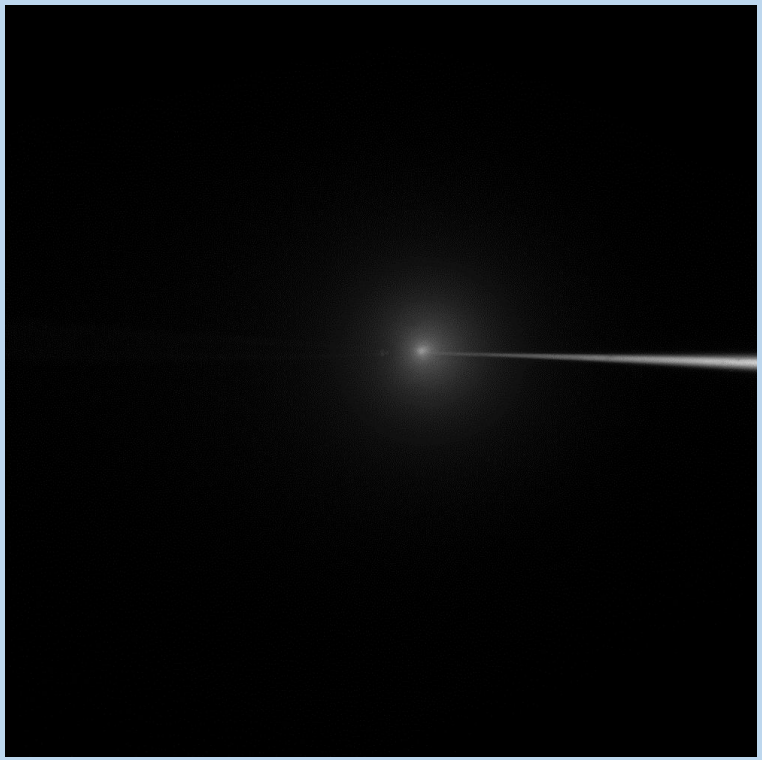
M.D. Professor

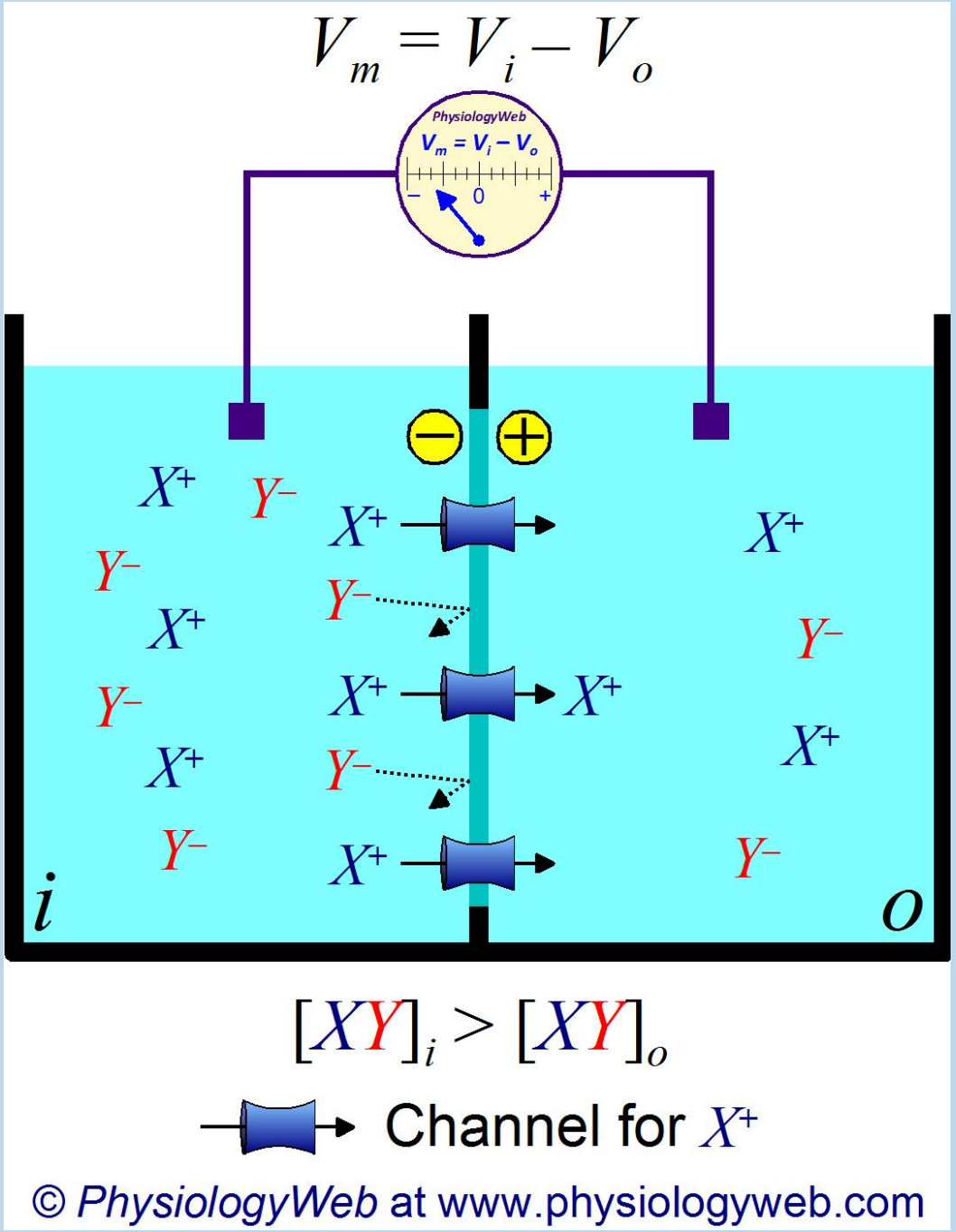
Tokyo Medical & Dental University

Lecturer at Cell Physics
Department of Applied Physics
School of Engineering Sciences
Royal Institute of Technology (KTH)
Stockholm, Sweden. *PhD*
Former:
Institute of Cytology and Genetics
Novosibirsk, Russia


M.D. Professor
Tokyo Medical & Dental
University






$V_m = V_i - V_o$
PhysiologyWeb
$V_m = V_i - V_o$
– 0 +
X^+
Y^-
i
o
$[XY]_i > [XY]_o$
Channel for X^+
© PhysiologyWeb at www.physiologyweb.com

Равновесие достигается когда соотношение вероятностей нахождения ионов («концентрация» в макро системе) в области высокой энергии – вне клетки и в области низкой энергии – в клетке приобретает значение соответствующее распределению **Boltzmann**:

$$n_{(out)} / n_{(in)} = e^{-\Delta E/kT}$$

Уравнение Нернста (Nernst)

$$V_m = (kT/ze) \ln\left(\frac{[K]_o}{[K]_i}\right)$$

Поток ионов через каналы:
(Goldman 1943; Hodgkin and Katz 1949)

$$J_i = P_i \frac{z_i E_m}{kT} \frac{C_{i,out} \exp\left(-\frac{z_i E_m}{2kT}\right) - C_{i,in} \exp\left(\frac{z_i E_m}{2kT}\right)}{\exp\left(\frac{z_i E_m}{2kT}\right) - \exp\left(-\frac{z_i E_m}{2kT}\right)},$$

Электрохимический потенциал иона X

$$\mu_i^X = \mu_0^X + RT \ln[X]_i + z_X F V_i$$

Где:

- стандартный химический потенциал иона X

Z – валентность иона X

V – электрический потенциал в области *i*

[X] – концентрация (активность) иона X в области *i*

R – универсальная газовая постоянная 8.314 J/K mol (Joules / Kelvin mole)

F – постоянная Фарадея 96485 C/mol (Coulombs / mole)

T – температура по шкале Кельвина (K = C+273.15)

$$\mu_i^X = \mu_o^X$$

$$\mu_0^X + RT\ln[X]_i + z_X F V_i = \mu_0^X + RT\ln[X]_o + z_X F V_o$$

The Nernst equation

$$V_{\text{Eq.}} = \frac{RT}{zF}\ln\left(\frac{[X]_{\text{out}}}{[X]_{\text{in}}}\right)$$

A few examples of the Nernst equation for ions of physiological interest are shown below:

Sodium ion (Na^+)

$$V_{Na} = \frac{RT}{(+1)F} \ln \frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i}$$

Potassium ion (K^+)

$$V_{K} = \frac{RT}{(+1)F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

Calcium ion (Ca^{2+})

$$V_{Ca} = \frac{RT}{(+2)F} \ln \frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i}$$

Hydrogen ion (Proton, H^+)

$$V_{H} = \frac{RT}{(+1)F} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i}$$

Chloride ion (Cl^-)

$$V_{Cl} = \frac{RT}{(-1)F} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

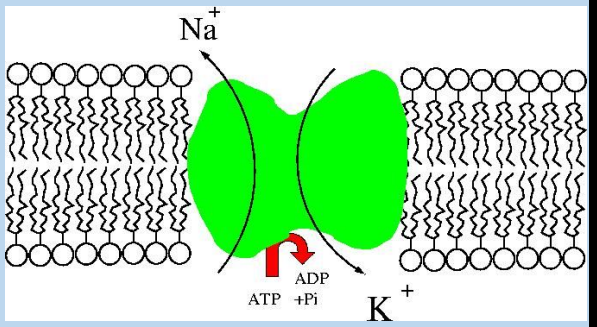
Goldman-Hodgkin-Katz

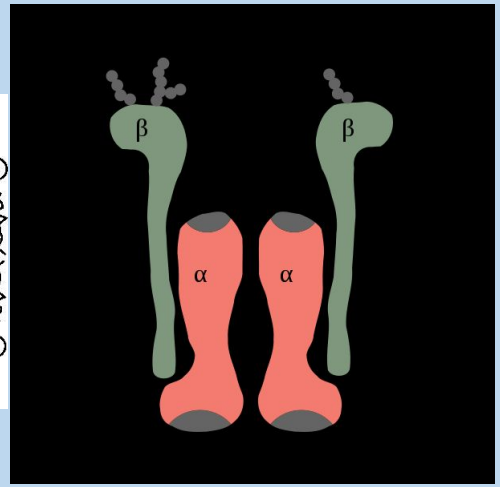
$$V_{i=0} = \left(\frac{RT}{F}\right) \log_e \left(\frac{P_K [K_{outside}] + P_{Na} [Na_{outside}]}{P_K [K_{inside}] + P_{Na} [Na_{inside}]}\right) \text{volts}$$

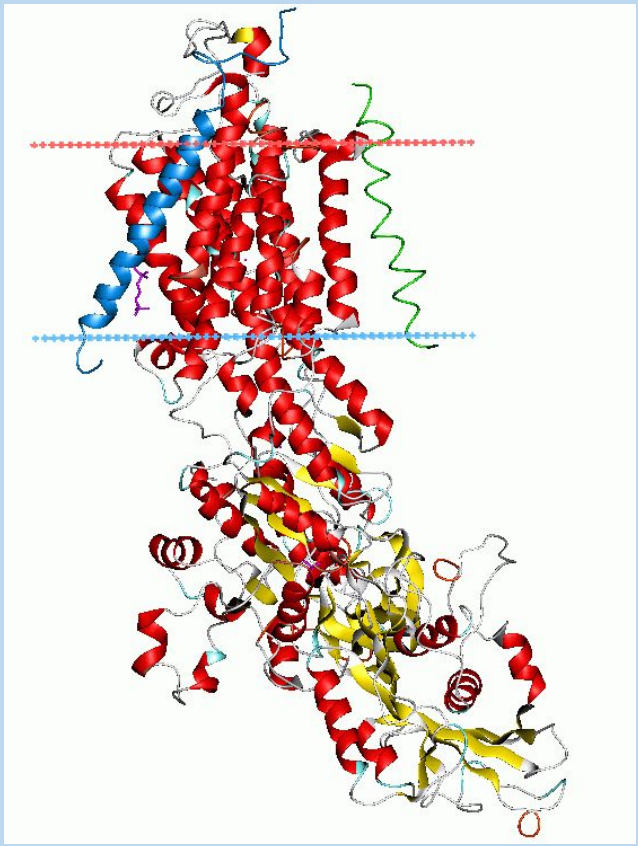
$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na^+}[Na^+]_{out} + P_{K^+}[K^+]_{out} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{in}}{P_{Na^+}[Na^+]_{in} + P_{K^+}[K^+]_{in} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{out}}\right)$$

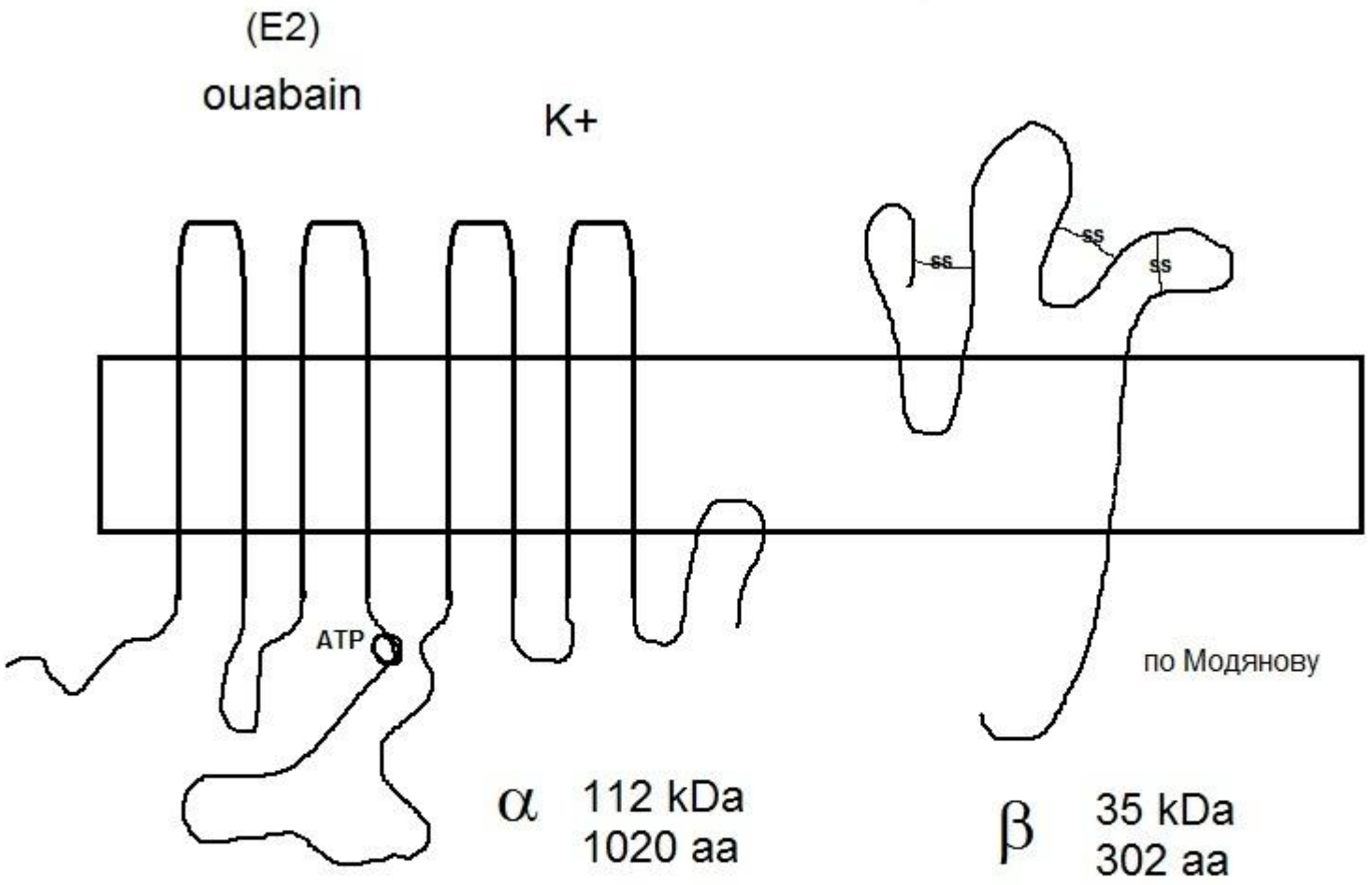
$$V_{Eq.} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[X]_{out}}{[X]_{in}}\right)$$

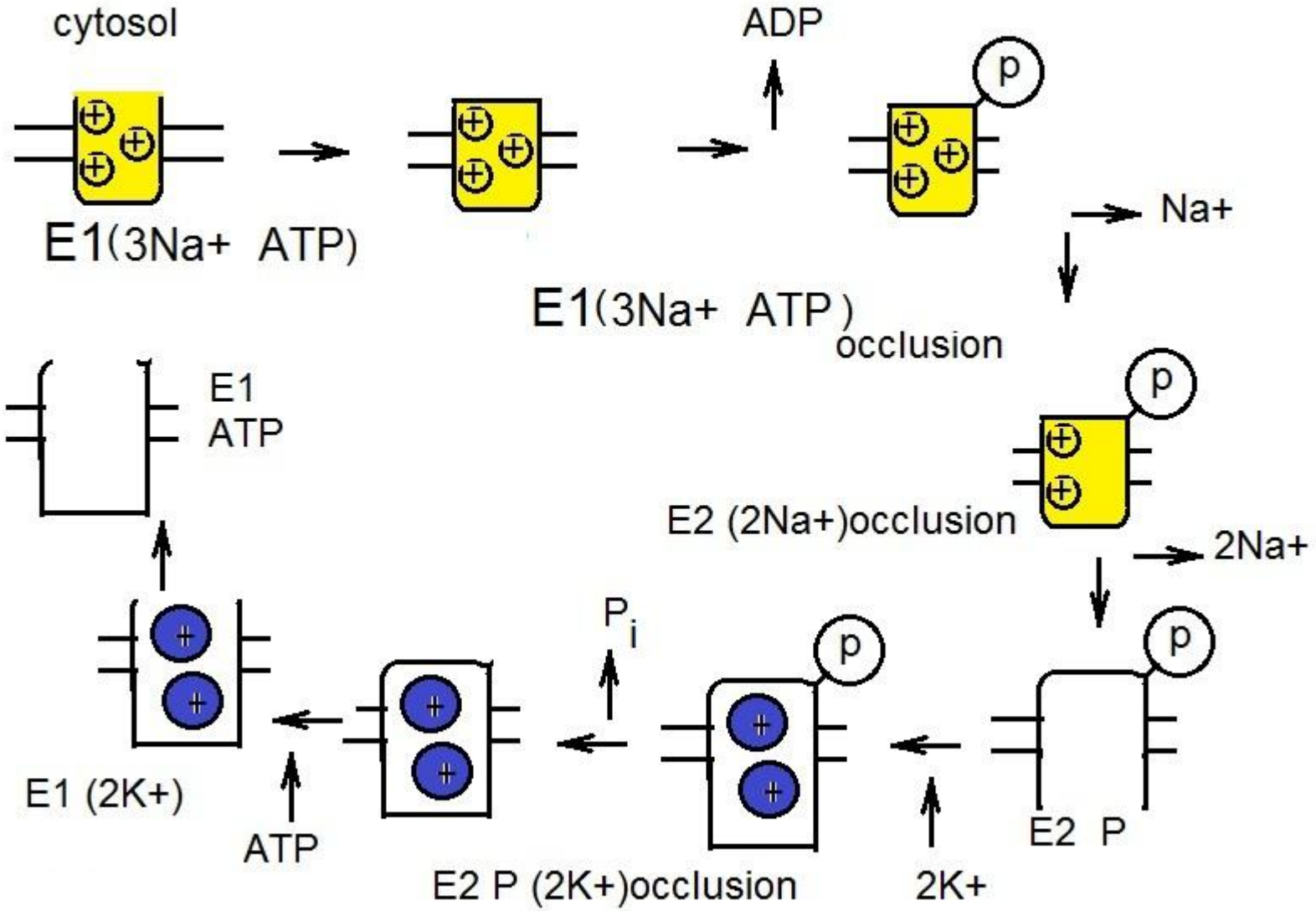
Jens Christian Skou
Born October 8, 1918) (age 91)
Nationality Danish
Aarhus University
1997, Nobel Prize in Chemistry



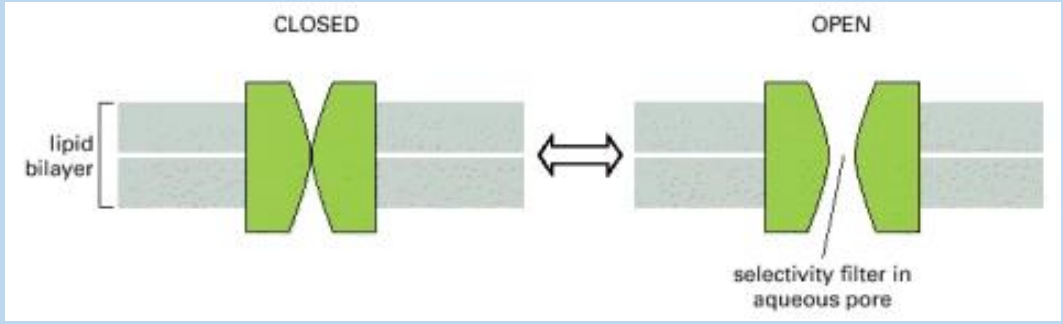


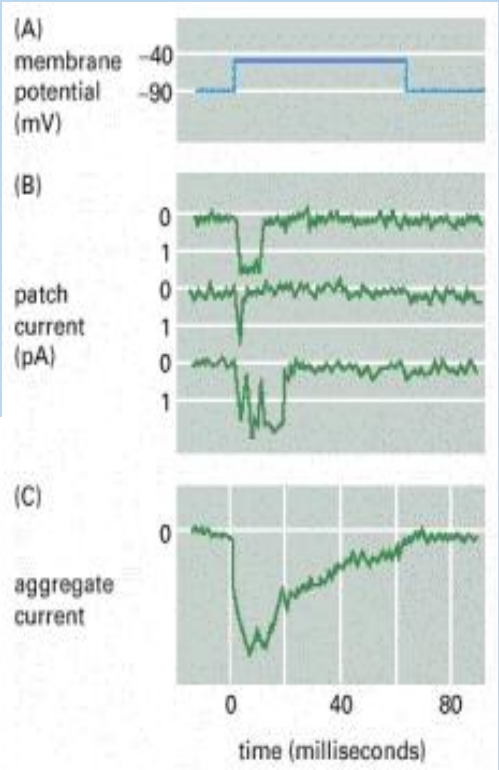


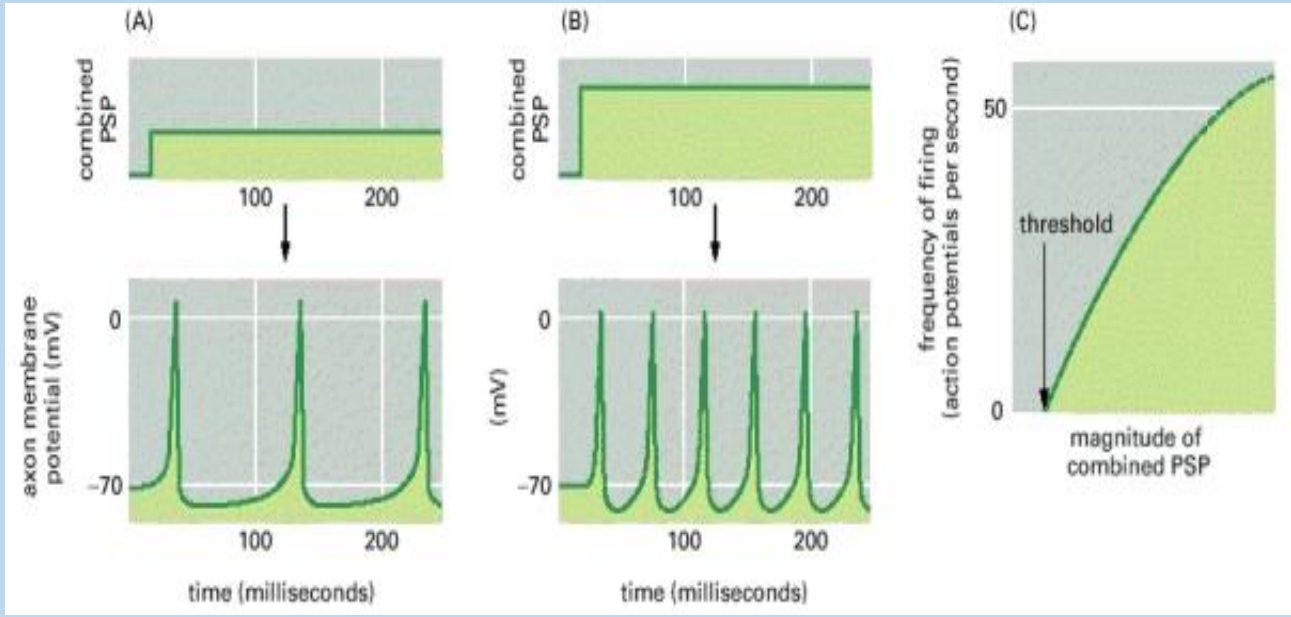

(E2)
ouabain
K+
SS
SS
SS
ATP
по Модянову
α 112 kDa
1020 aa
β 35 kDa
302 aa


cytosol
ADP
p
E1(3Na+ ATP)
Na+
E1(3Na+ ATP)
occlusion
E1
ATP
p
E2 (2Na+)occlusion
2Na+
p
p
P_i
E1 (2K+)
ATP
E2 P (2K+)occlusion
2K+
E2 P

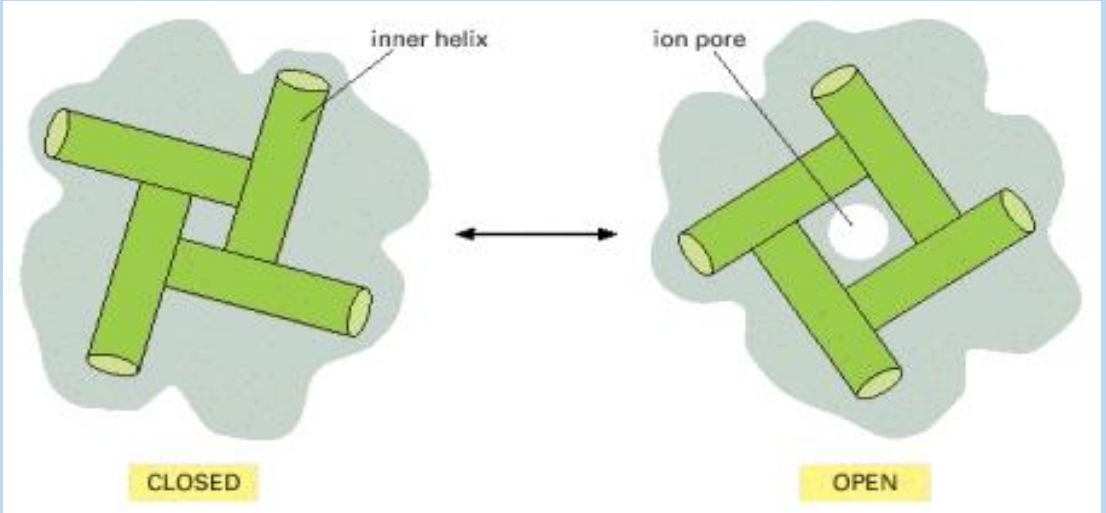
ионные каналы обладают селективностью и периодически меняют состояние открыто-закрыто

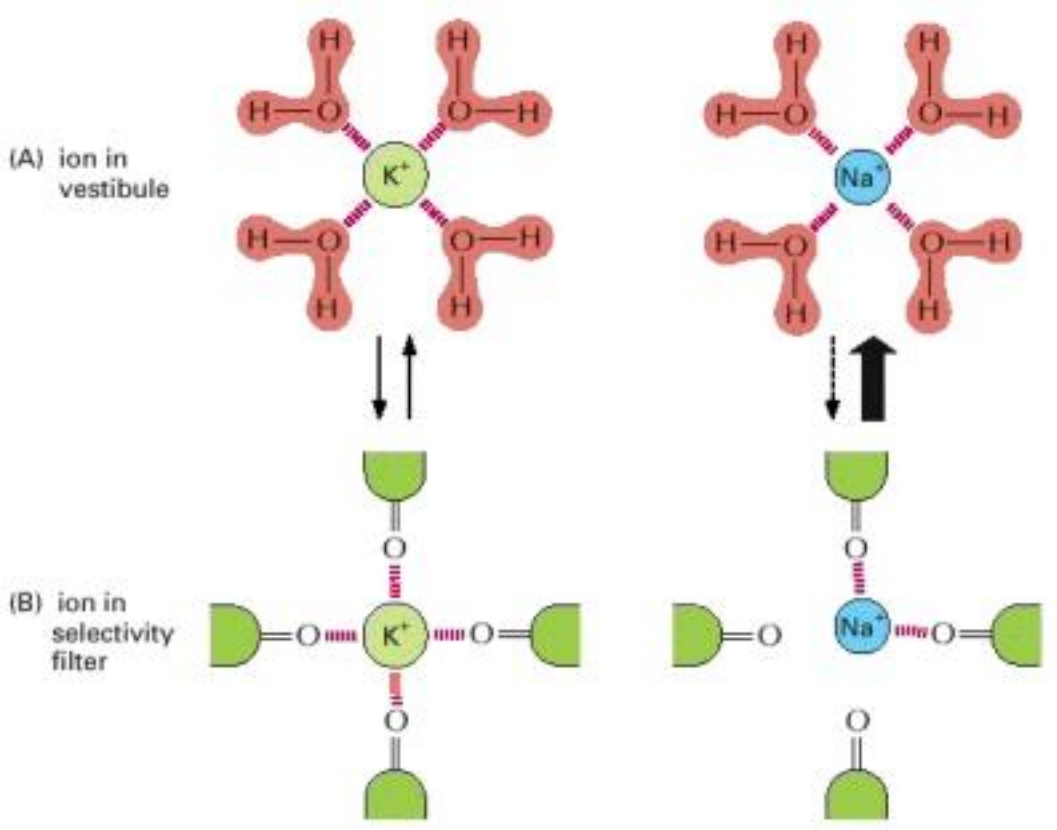




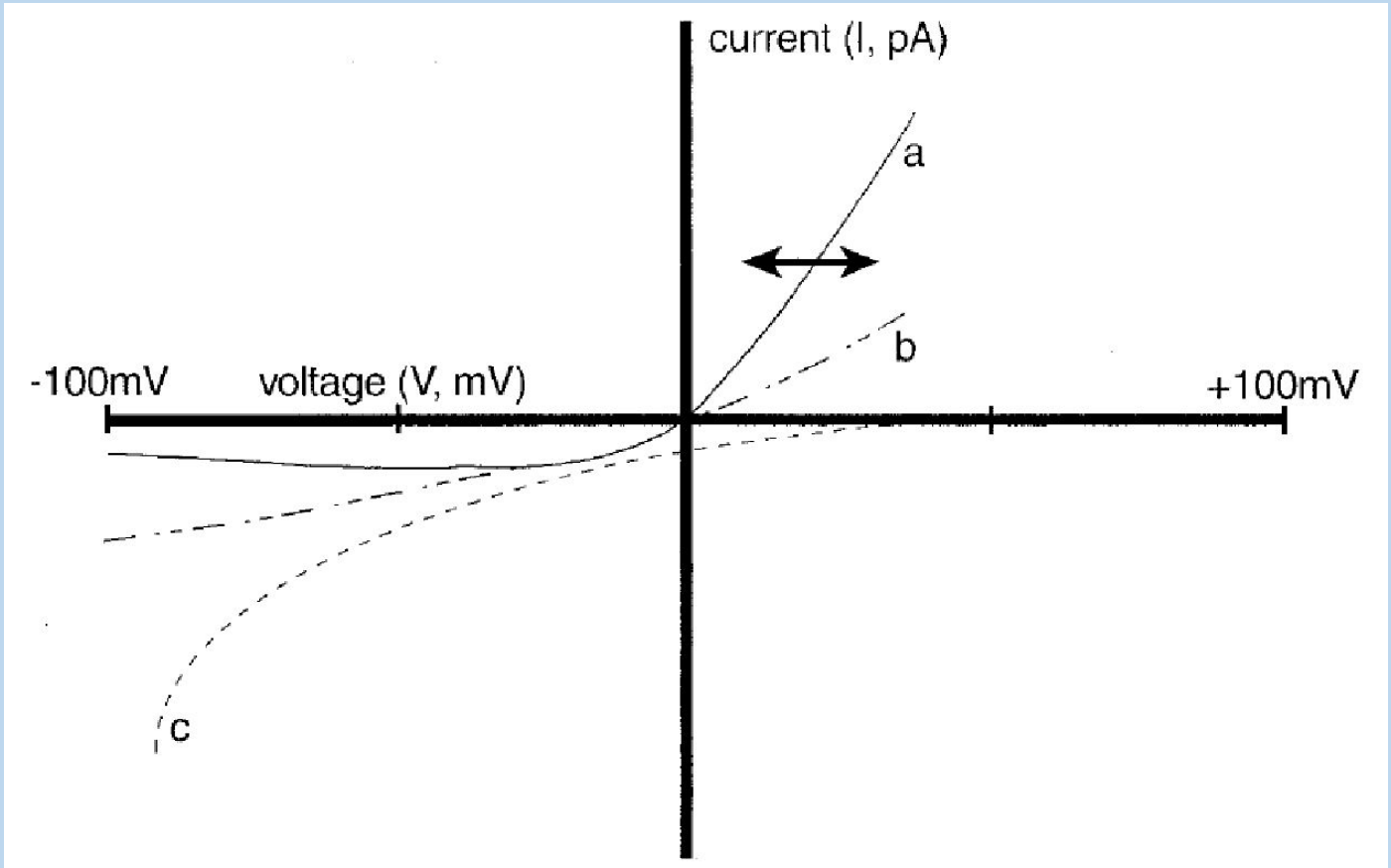


selectivity filter





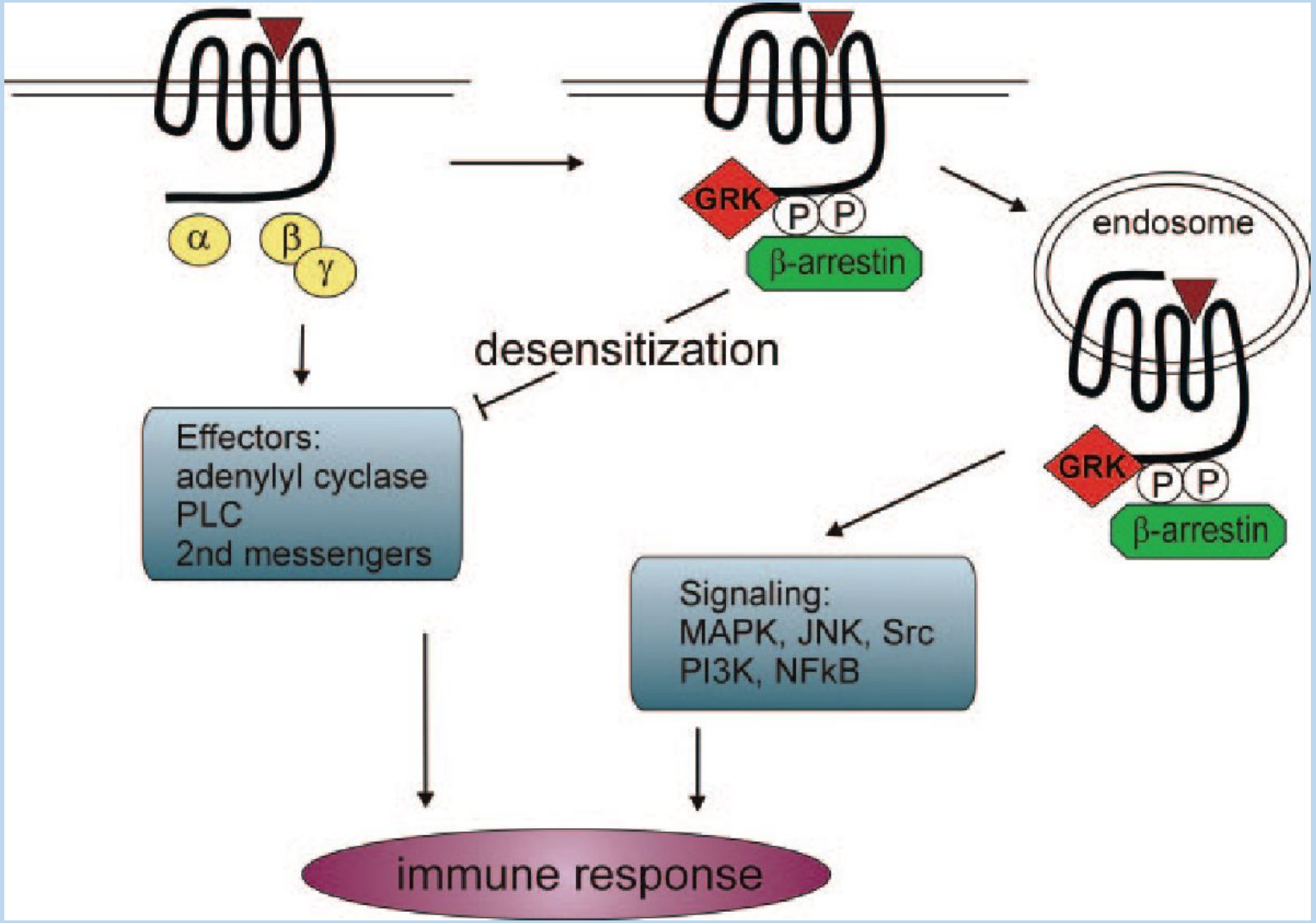
a, TRPC1 TRPC5 heteromer; **b**, TRPM5; **c**, TRPV5, TRPV6



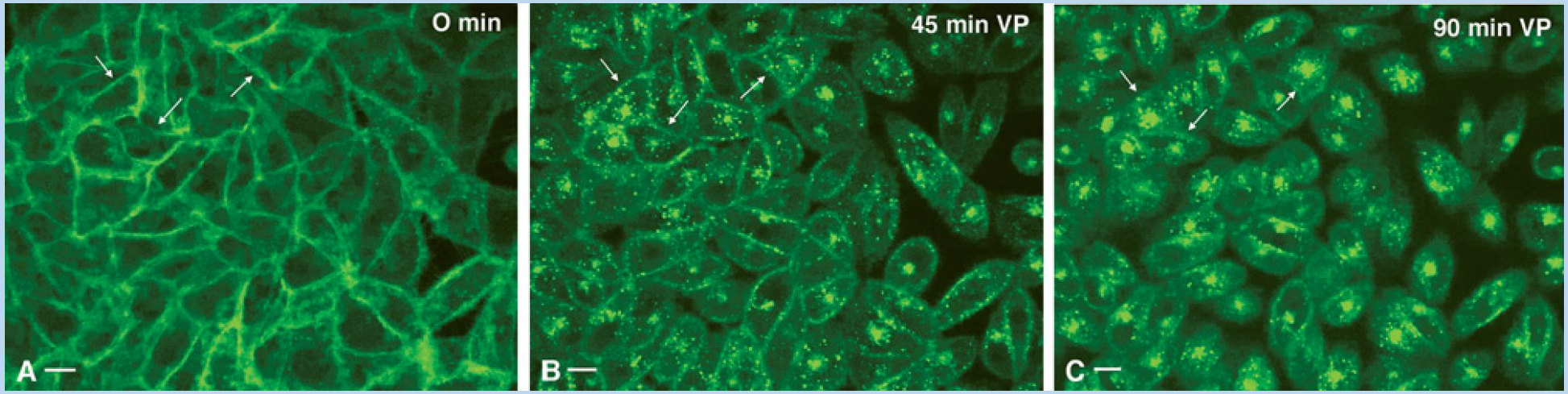
Образование клатриновых везикул, содержащих комплекс рецептора V2 с вазопрессином, повидимому, одно из звеньев механизма действия гормона. Интернализация рецепторов может не только снижать количество рецепторов в плазматической мембране, но и активировать альтернативные пути передачи сигнала, не связанные с cAMP

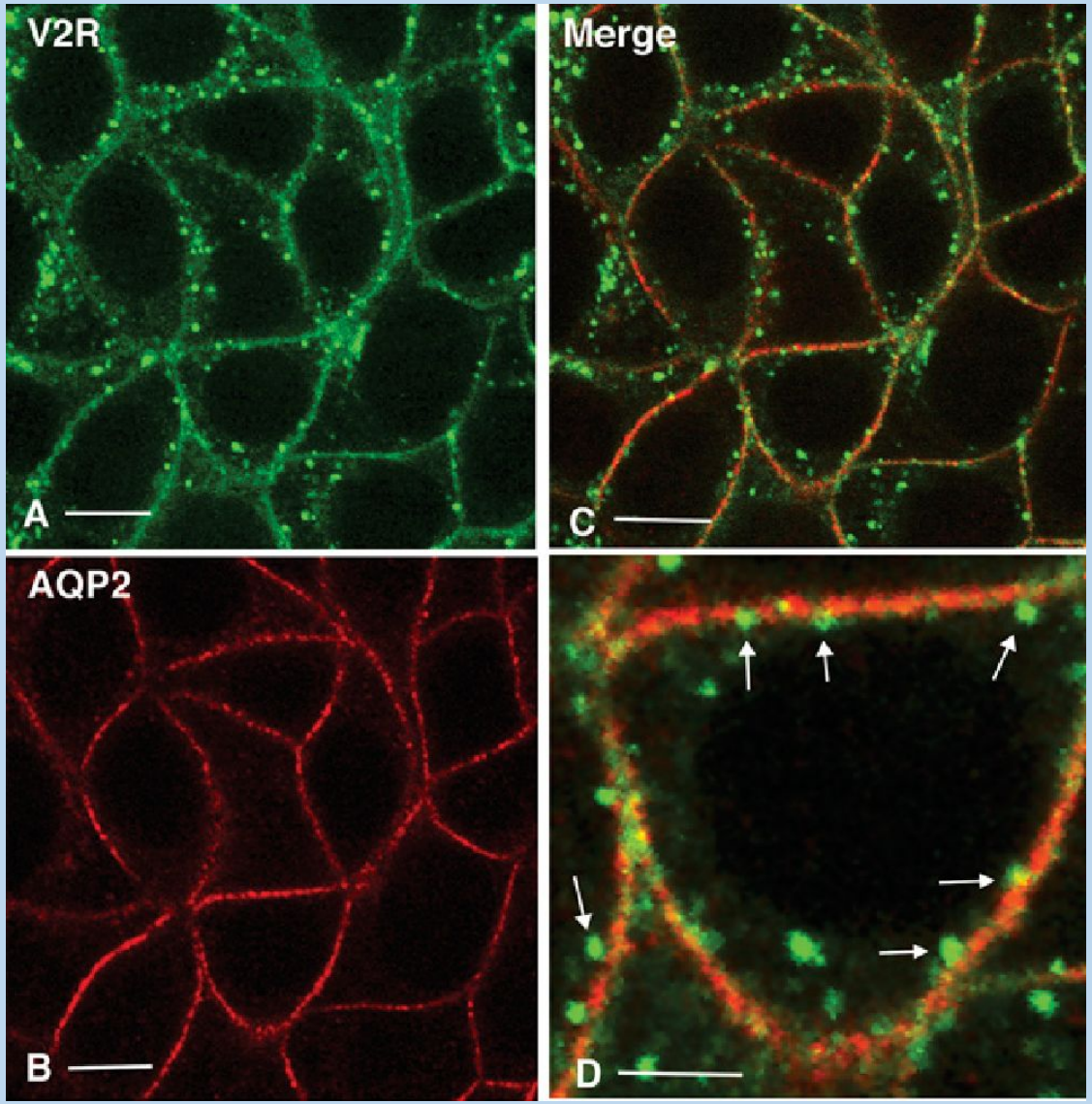
- Десенситизация рецептора
-
  - - фосфорилирование GRK (G-protein Receptor Kinase).
  - - связывание с **b-arrestin** и механизмом эндоцитоза
  - - дефосфорилирование **Protein Phosphatase** удаление фосфатов полученных при активации рецептора **PKA.**

GRKs/arrestins – роль в десенситизации GPCRs



Demonstration of VP receptor endocytosis in LLC-PK1a cells expressing V2R–GFP, visualized by spinning disc confocal microscopy



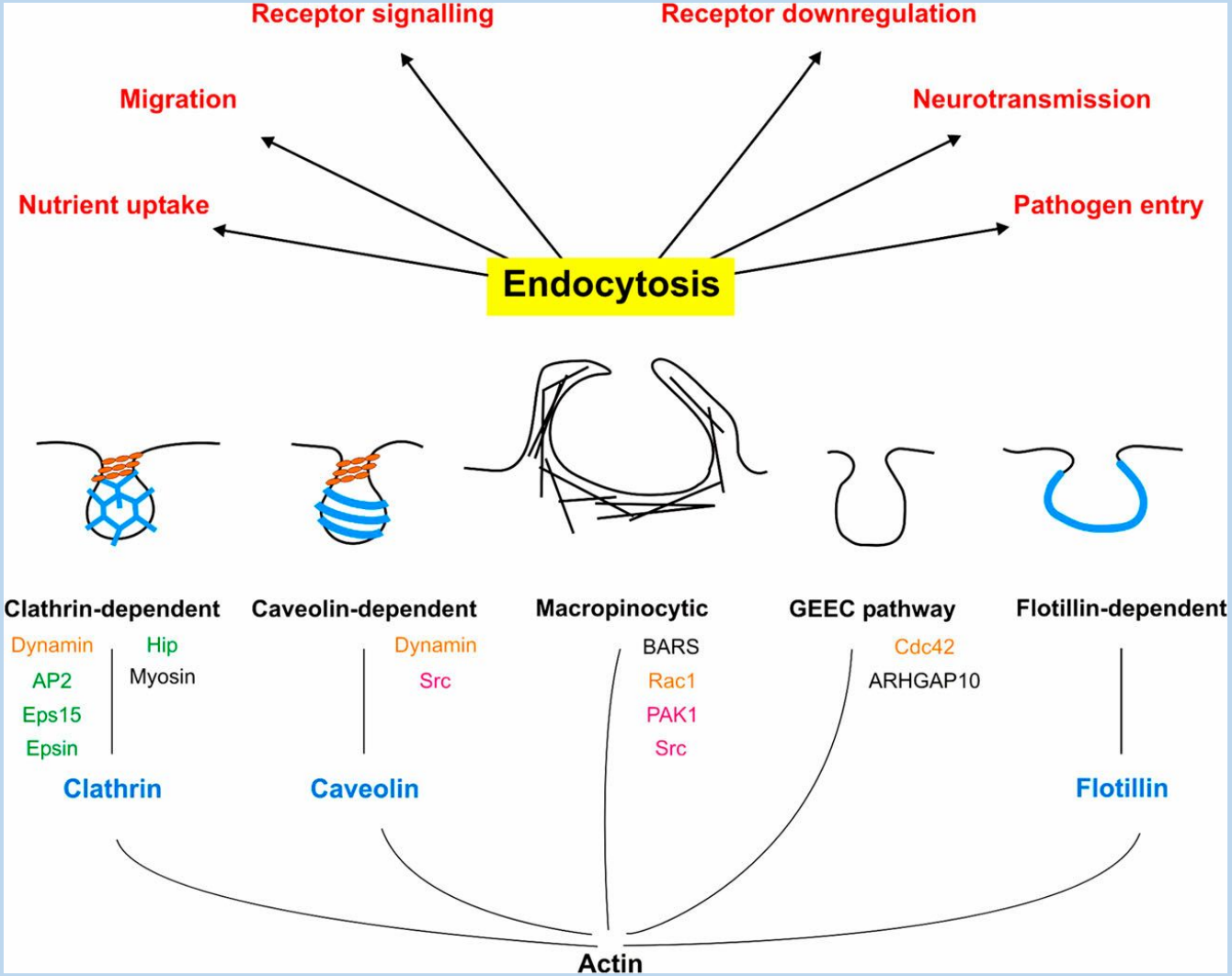


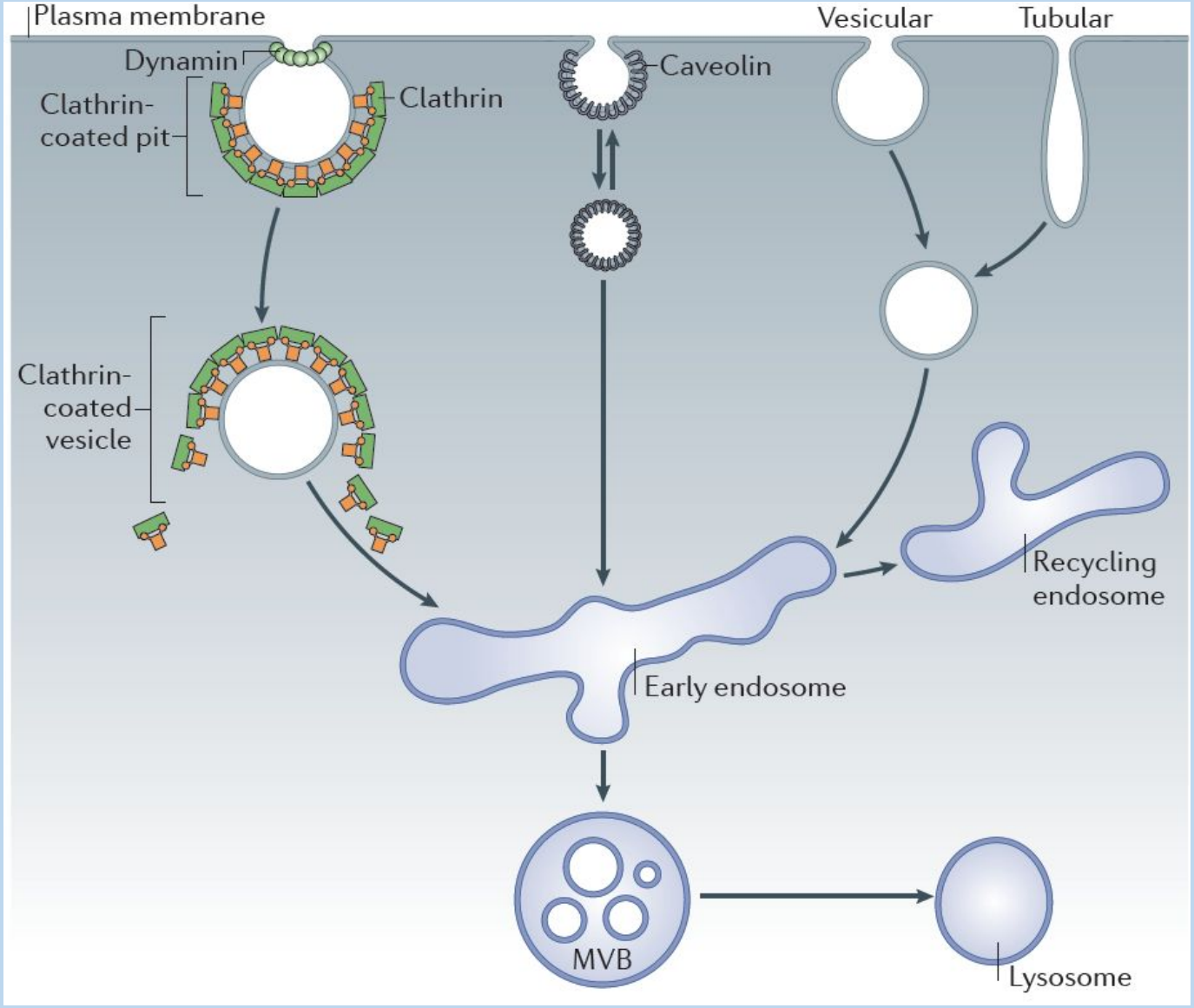
Confocal images showing localization of AQP2 (red) and V2R–GFP (green) in transfected cells expressing both Proteins

After VP treatment for 20 min, **V2R**–GFP was located on **intracellular vesicles**, (**A**, green),
AQP2 was localized mainly on the **plasma membrane** (**B**, red).

merged image (**C**) shows that the green **vesicles (endosomes) containing GFP–V2R did not contain detectable amounts of AQP2**.

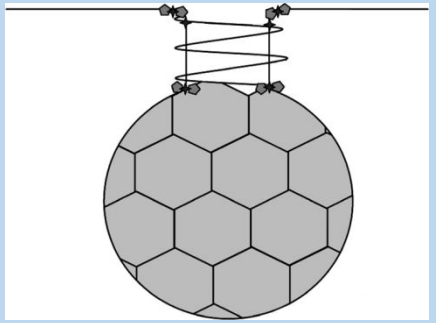
Различные функции и механизмы эндоцитоза

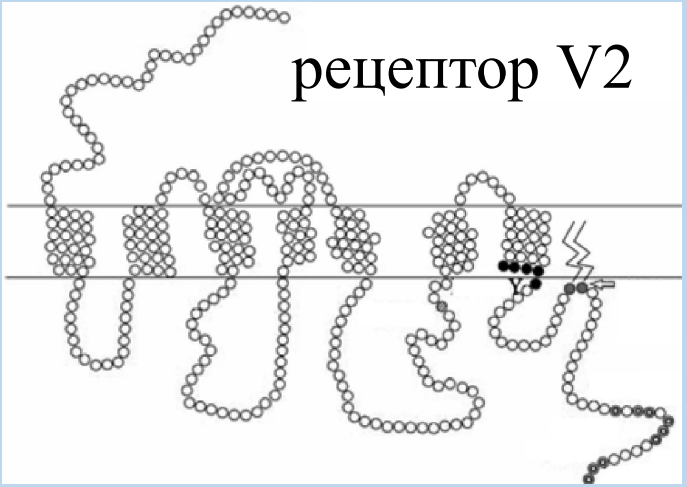



Plasma membrane
Vesicular
Tubular
Dynamin
Clathrin
Clathrin-coated pit
Caveolin
Clathrin-coated vesicle
Recycling endosome
Early endosome
MVB
Lysosome

В настоящее время нет однозначного ответа на вопрос, что служит стимулом к началу формирования клатриновых везикул, способен ли интернализуемый белок инициировать образование инвагинаций мембраны *de novo или же интернализуемый белок включается* в формируемые клатриновые комплексы и завершает их сборку

Эндоцитоз GPCRрецепторов связан с фосфорилированием их С-концевой области рядом киназ. Известно, что GPCR фосфорилируются такими киназами, как PKA, PKC, GRK (киназы рецепторов, сопряженных с Gбелками)





Образование везикулы, окаймленной клатрином, происходит благодаря формированию связанного с плазматической мембраной белкового комплекса

эндоцитоз рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), осуществляется субпопуляцией клатриновых везикул, формирование и динамика которых в значительной мере контролируются самим рецептором

Эндоцитоз начинается с формирования изгиба мембраны, направленной внутрь клетки. Значительную роль в создании и стабилизации кривизны мембраны играют белки, участвующие в формировании инвагинации путем внедрения в мембрану амфипатической спирали - BAR_белки, содержащие BAR_домены способные деформировать липидные мембраны.

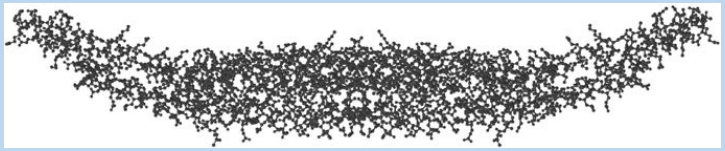
BAR_белки образует суперсемейство, в котором выделяют белки :

BAR/N_BAR, проявляющие сродство к мембранам с высокой положительной кривизной;

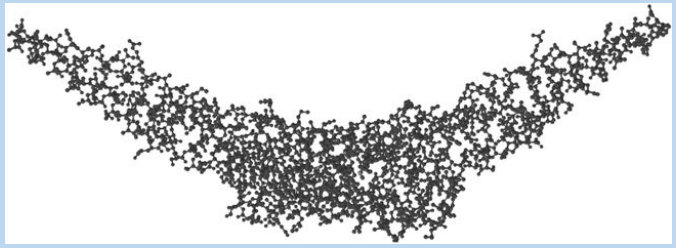
F_BAR_белки, связывающиеся с более плоскими мембранами

I_BAR_белки, образующие связи с мембранами отрицательной кривизны.

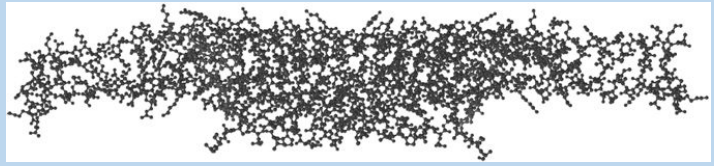
BAR домены формируют гомодимер (BAR модуль) серповидной формы, состоящий из двух суперспирализованных мономеров, при этом угол, под которым они димеризуются, определяет сродство BAR модуля к мембранам различной кривизны.



– *FCHo2 (FBAR)*



– амфифизин (BAR)

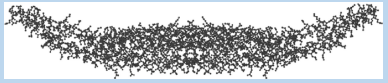


– IRSp53 (IBAR)

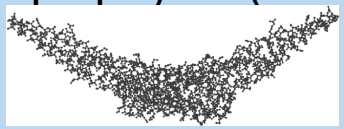
Endocytosis of V2R

membrane curvature-modulating proteins

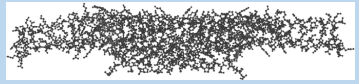
FCHo2 (FBAR)



amphiphysin (BAR)

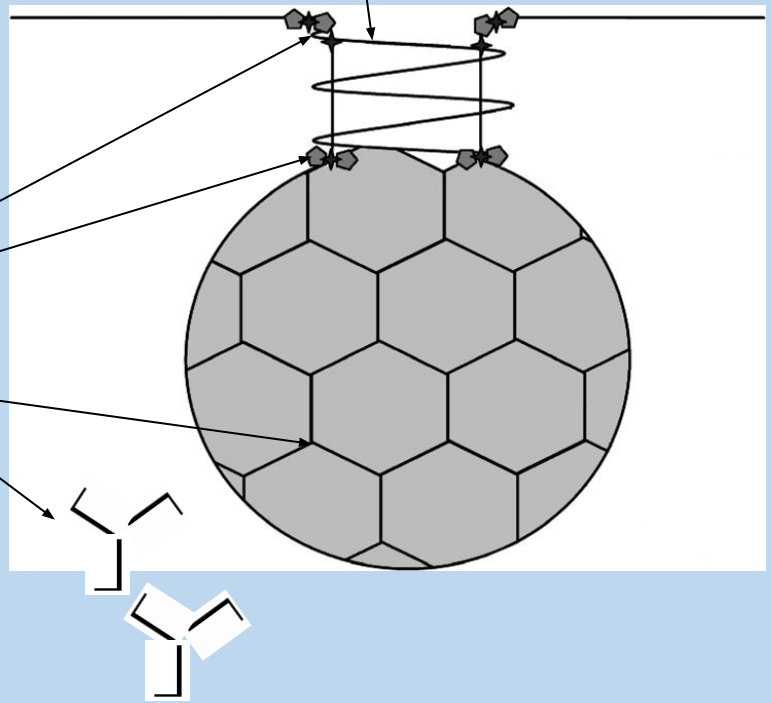


IRSp53 (IBAR)

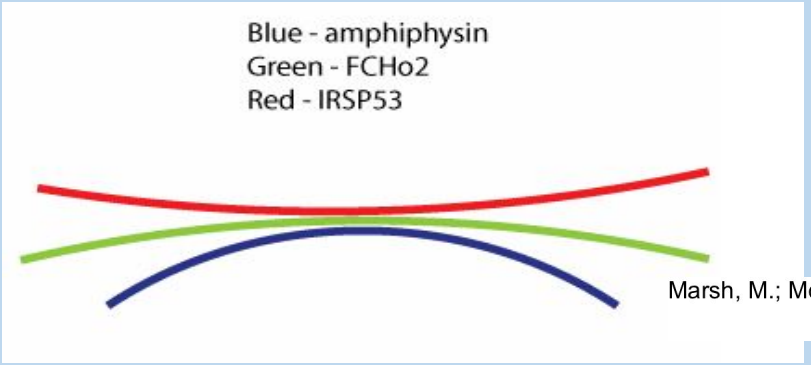


BAR proteins promote dynamin recruitment,
and together they form the vesicle neck

amphiphysin, SNX9, and other BAR proteins promote clathrin recruitment and assembly

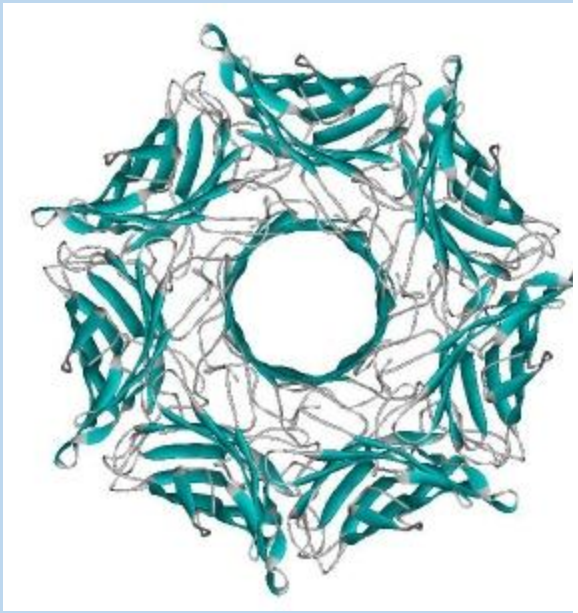


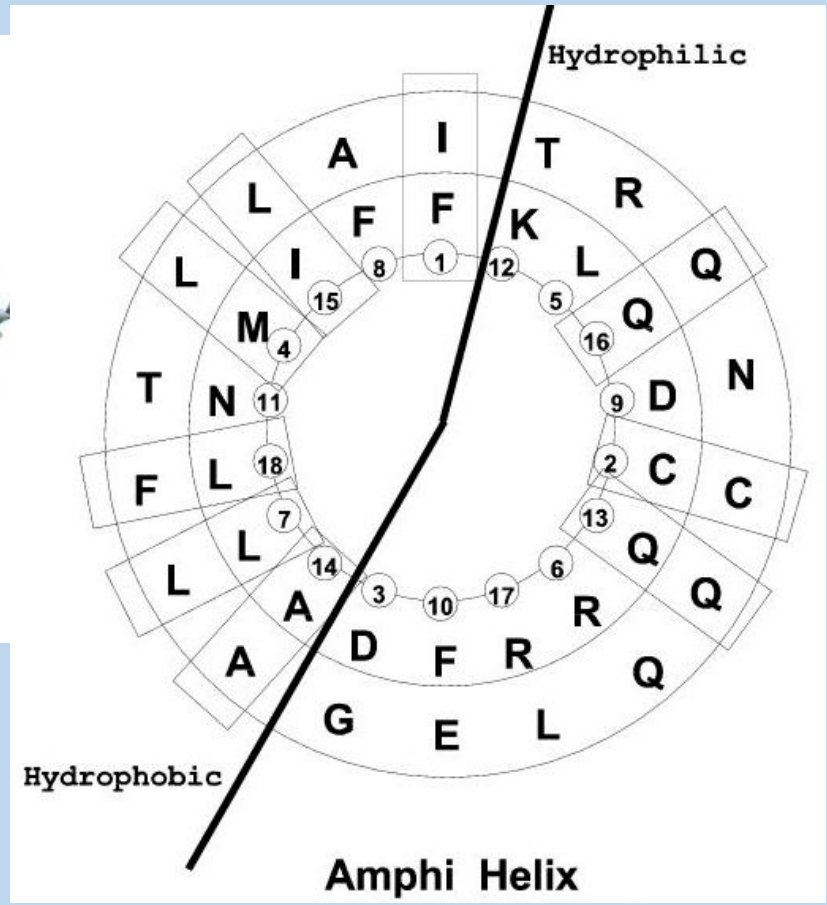
Uncoating to produce naked CCV

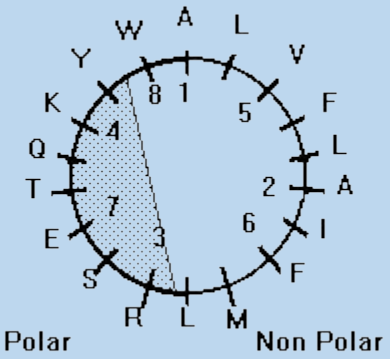


Marsh, M.; McMahon, HT (July 1999). "The Structural Era of Endocytosis". Science 285 (5425): 215–20.

формирование инвагинации путем внедрения в мембрану амфипатической спирали







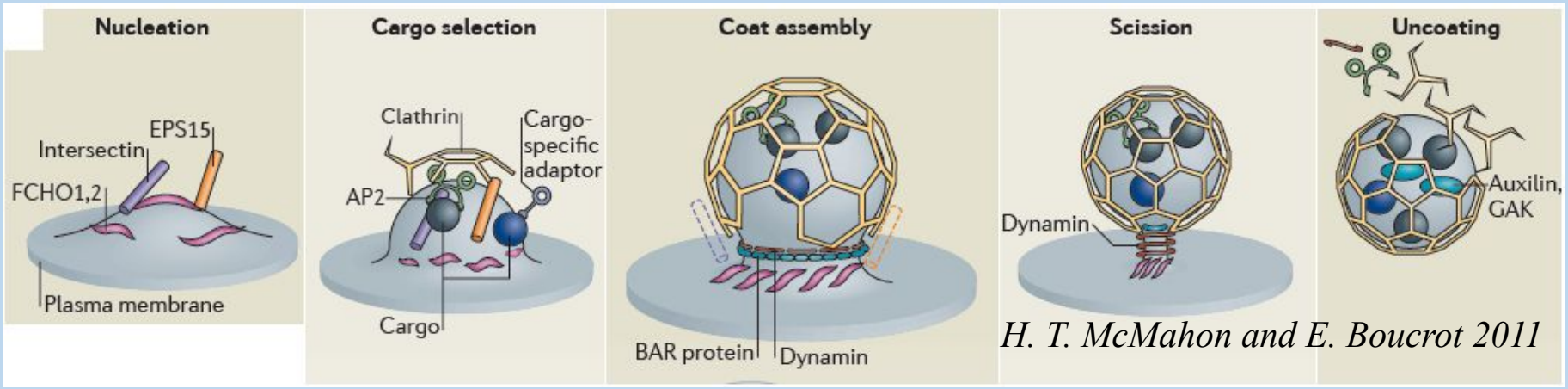
адаптерный комплекс AP2

AP2 – это узловой белок формирования динамичной сети низкоаффинных взаимодействий.

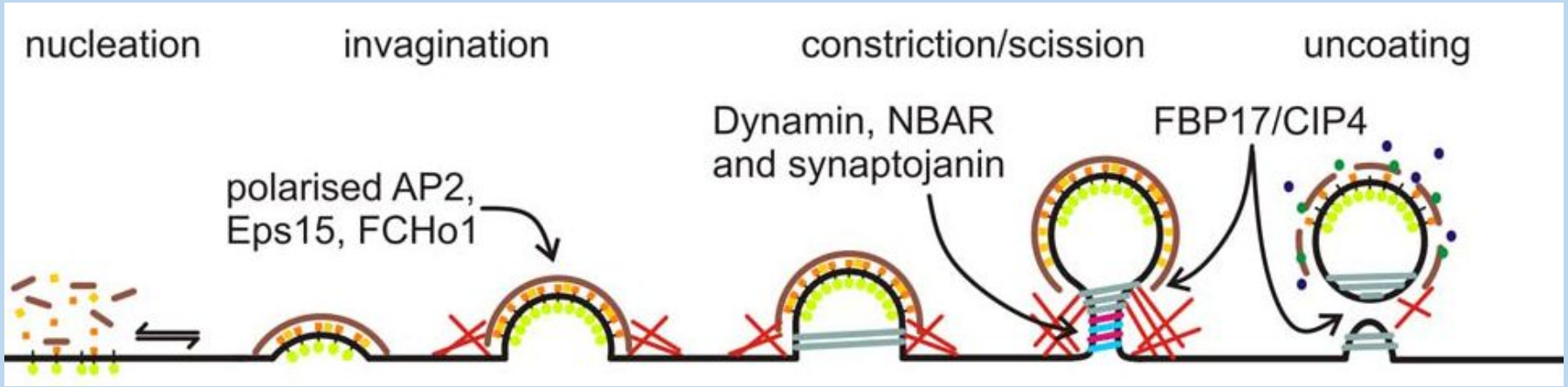
AP2 инициирует сборку клатриновой оболочки.

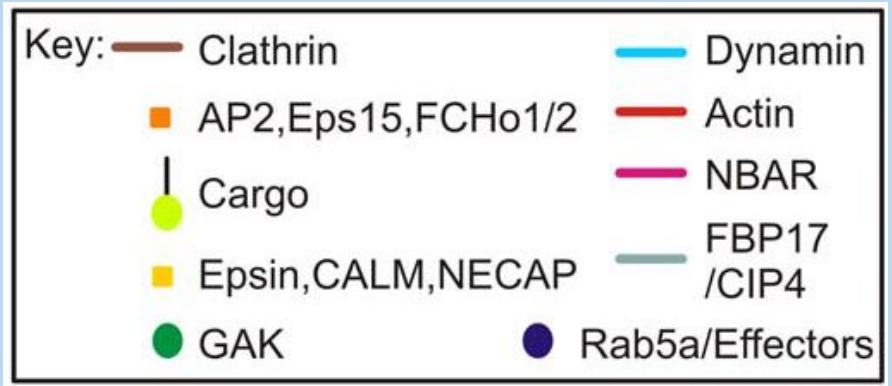
Клатрин, наряду с AP2, взаимодействует с множеством вспомогательных белков

формирование изгиба мембраны

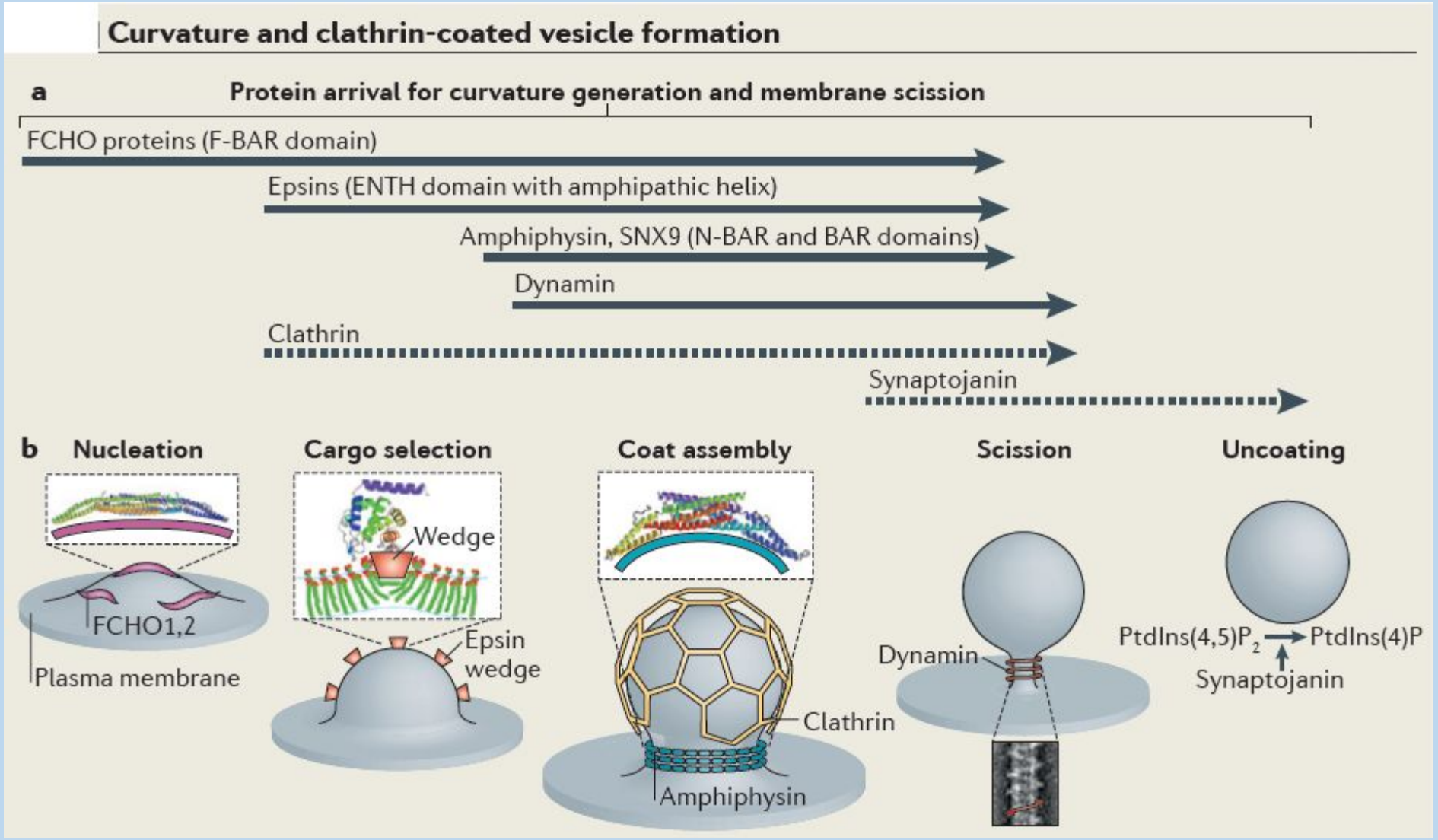


H. T. McMahon and E. Boucrot 2011





Marcus J. Taylor1, David Perrais2,3, Christien J. Merrifield,
PLoS Biology 2011


Curvature and clathrin-coated vesicle formation
a
Protein arrival for curvature generation and membrane scission
FCHO proteins (F-BAR domain)
Epsins (ENTH domain with amphipathic helix)
Amphiphysin, SNX9 (N-BAR and BAR domains)
Dynamin
Clathrin
Synaptojanin
b
Nucleation
Cargo selection
Coat assembly
Scission
Uncoating
FCHO1,2
Plasma membrane
Wedge
Epsin wedge
Clathrin
Amphiphysin
Dynamin
PtdIns(4,5)P2
PtdIns(4)P
Synaptojanin

отделение клатриновой везикулы от плазматической мембраны.

Полимеризация клатрина способствует искривлению мембраны и приводит к вытеснению некоторых вспомогательных белков.

BAR/NBAR белки могут стабилизировать высокую кривизну мембраны в районе шейки образующейся везикулы, облегчая ее отщепление динамином

в регуляцию кривизны мембраны вовлечен актиновый цитоскелет.

На высокоразрешающих электронных изображениях можно увидеть формирование актинового комплекса вблизи формирующейся везикулы.

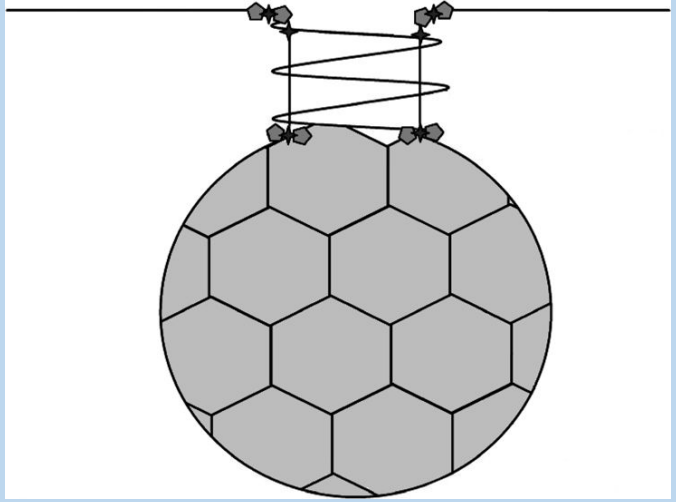
По-видимому, главная функция актина в клатринзависимом эндоцитозе состоит в транспортировке отделившейся клатриновой везикулы в цитоплазму

Везикулы отщепляются главным образом динамином.

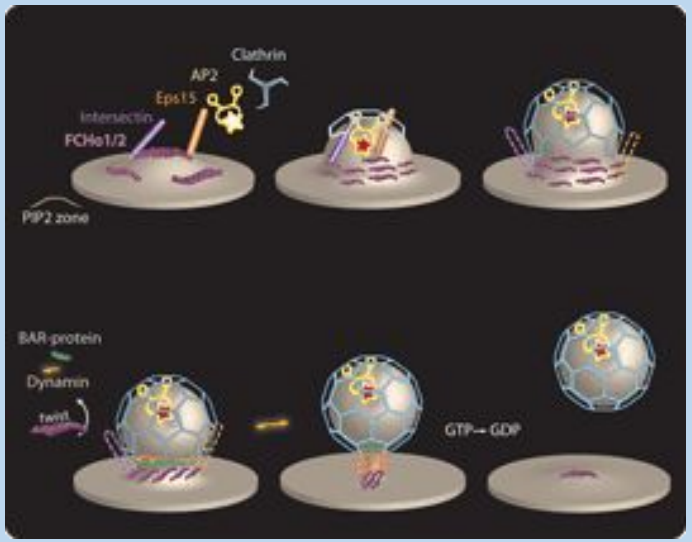
В клетке динамин формирует спираль вокруг шейки образующейся везикулы, что при водит к ее отщеплению

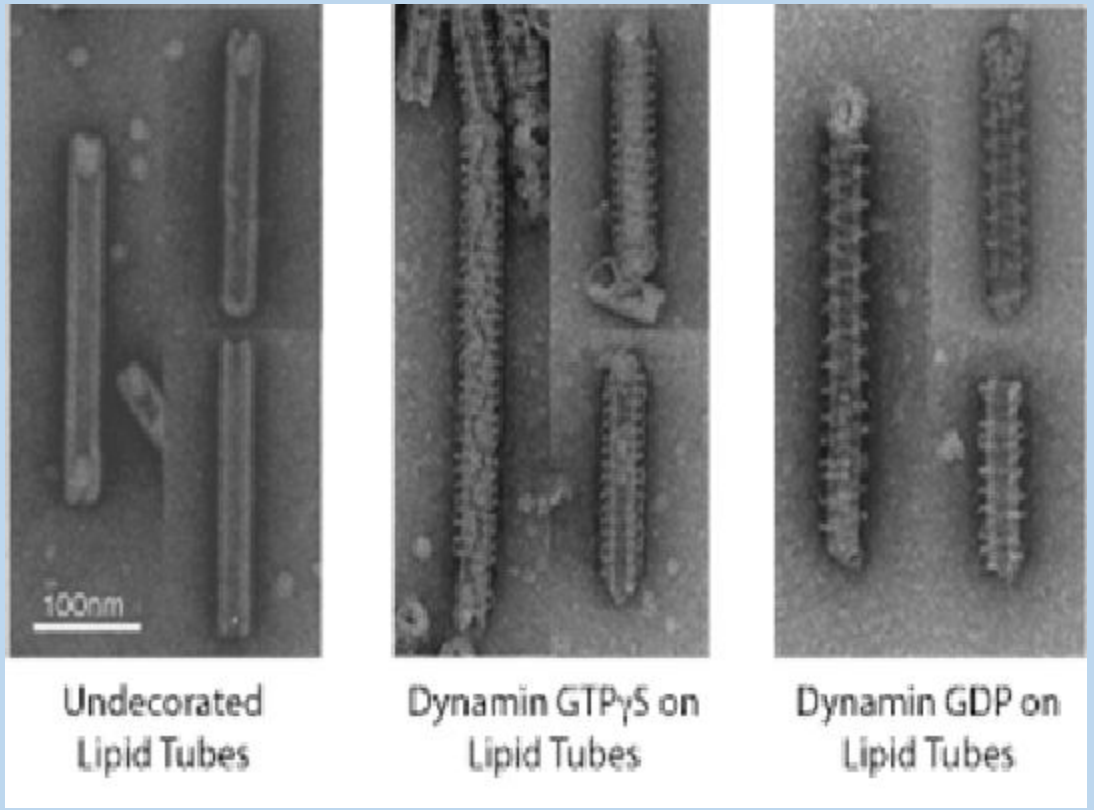
Динамин – белок размером порядка 100 кДа, обладающий GTPразной активностью и способный образовывать спиральные олигомеры, размер которых превышает 800 кДа.

При гидролизе GTP изменяется конформация спирального олигомера, что приводит к растягиванию липосом и липидных мембран *in vitro*.

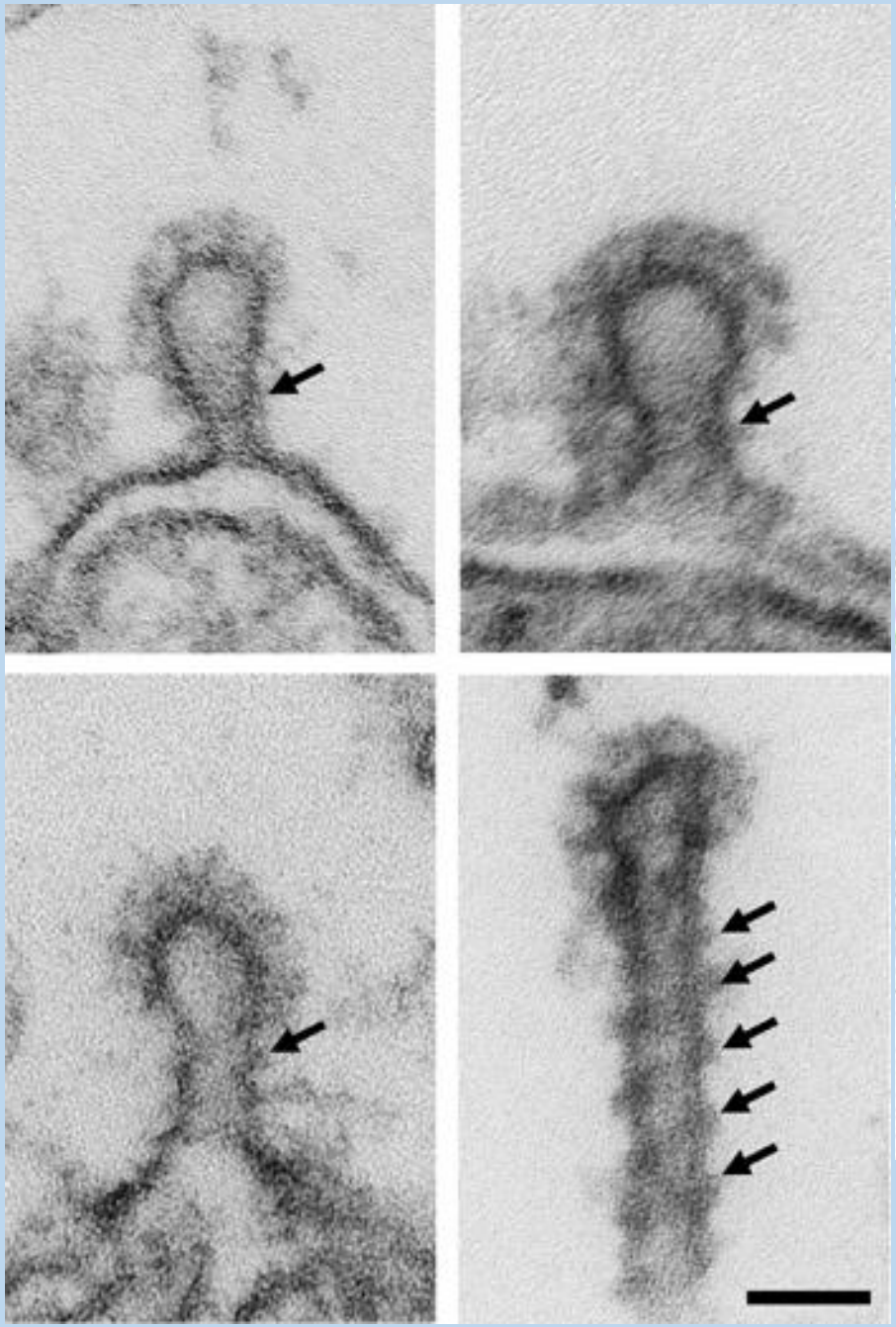


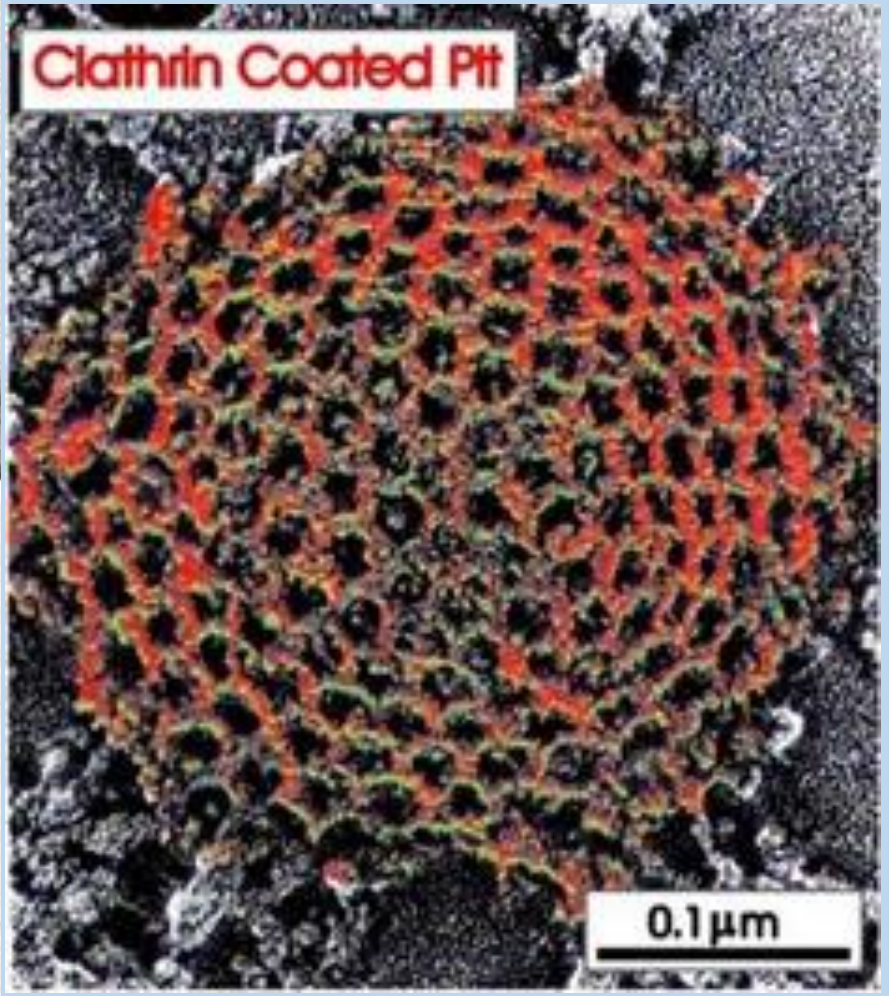
2013 г. А. В. Иляскин и др.



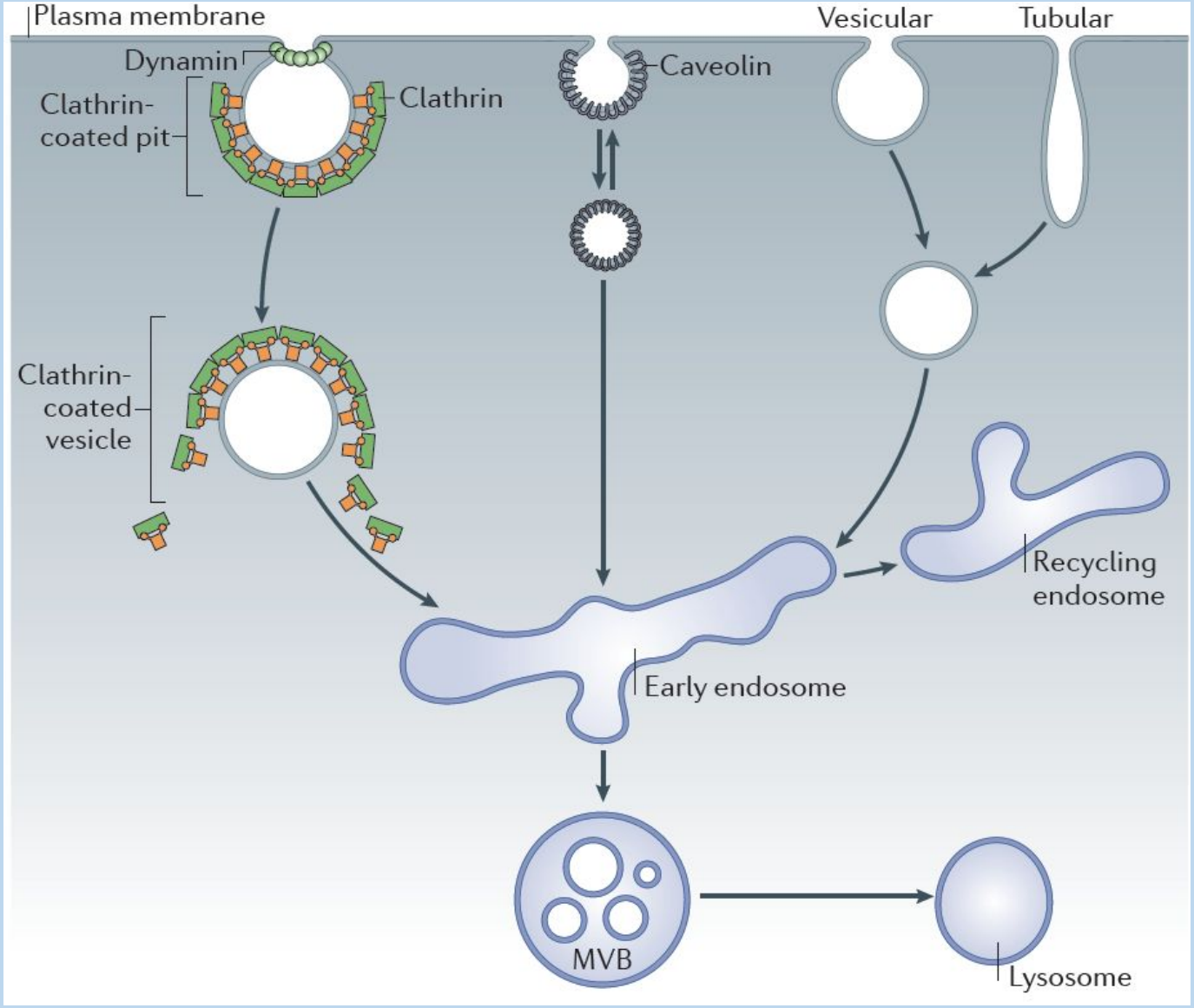


Praefcke, G.J.K. and McMahon, H.T. (2004)




Clathrin Coated Pit
0.1µm

Последний этап клатринзависимого эндоцитоза – разрушение клатриновой оболочки ATP азой Hsc70, ее кофактром ауксилином или циклин G-ассоциированной киназой GAK


Plasma membrane
Vesicular
Tubular
Dynamin
Clathrin
Clathrin-coated pit
Caveolin
Clathrin-coated vesicle
Recycling endosome
Early endosome
MVB
Lysosome

Интернализованные везикулы сливаются с ранними эндосомами , затем карго-белок рециклизуется в мембрану или направляется в лизосомы. В транспортных механизмах клетки участвует семейство Rab и сопряженные с ними GTPase-activating proteins (GAPs) и GTP exchange factors (GEFs

пять основных стадий формирования клатриновой везикулы:

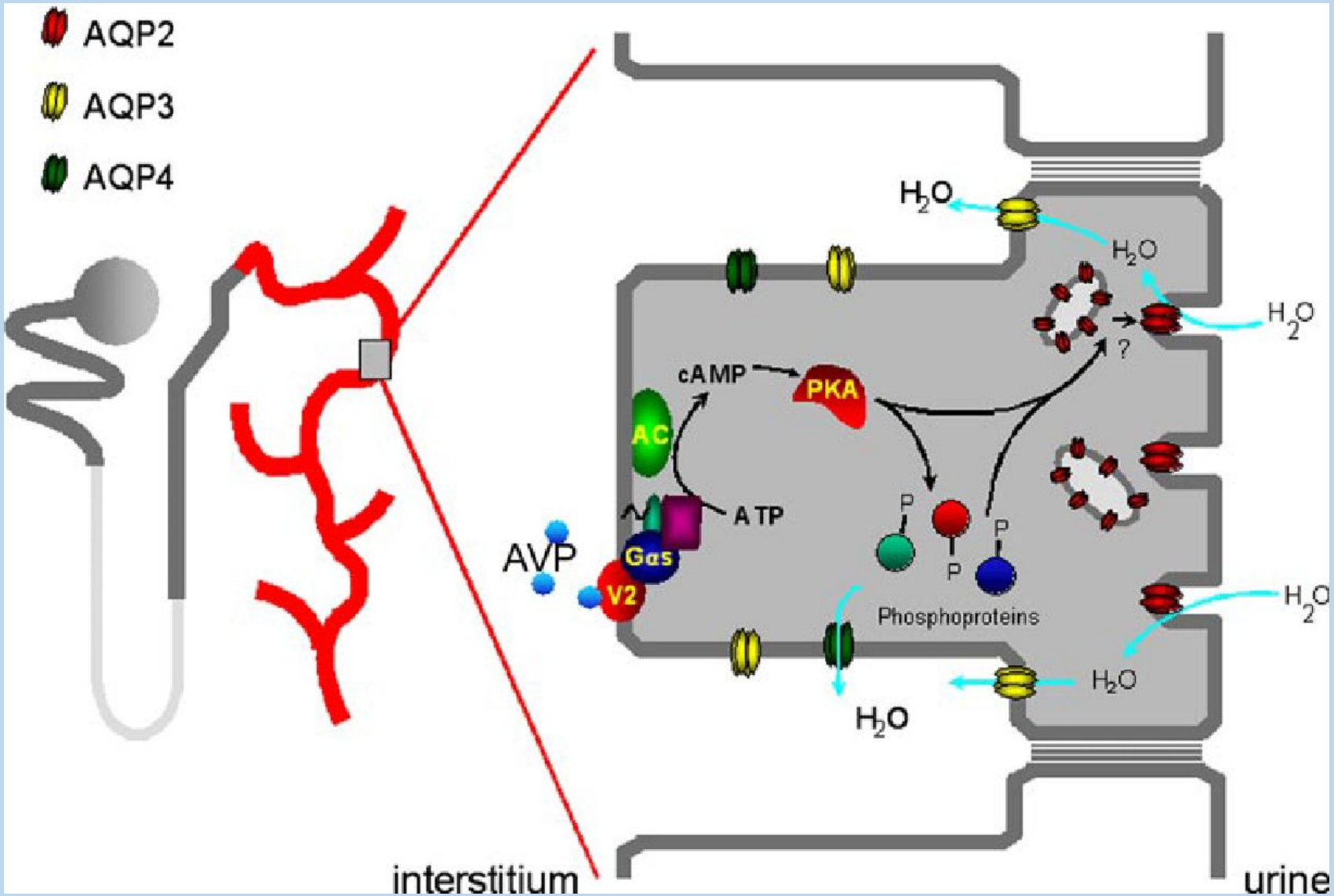
✔инициация,

✔селекция интернализуемого белка,

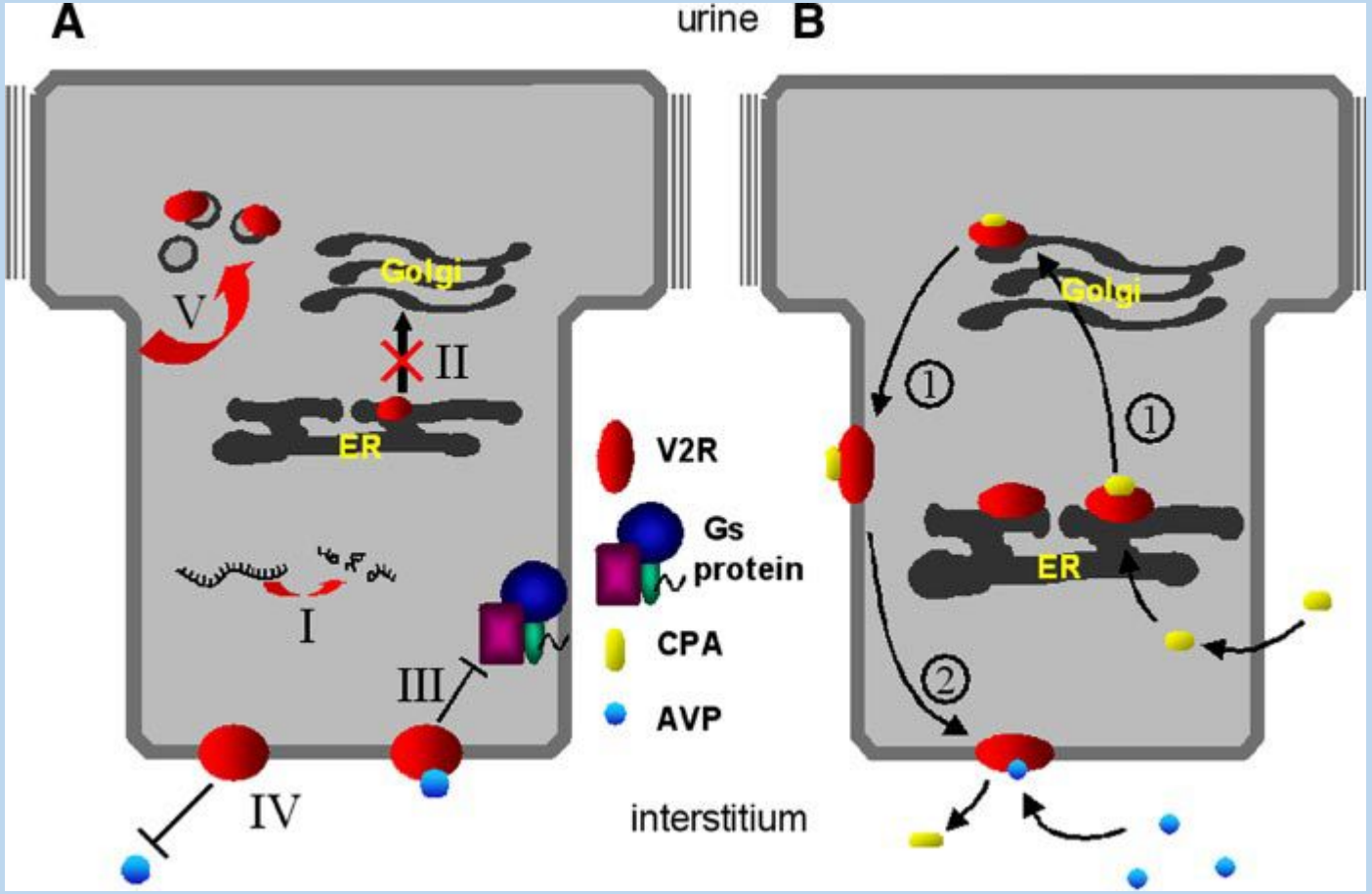
✔сборка клатриновой оболочки,

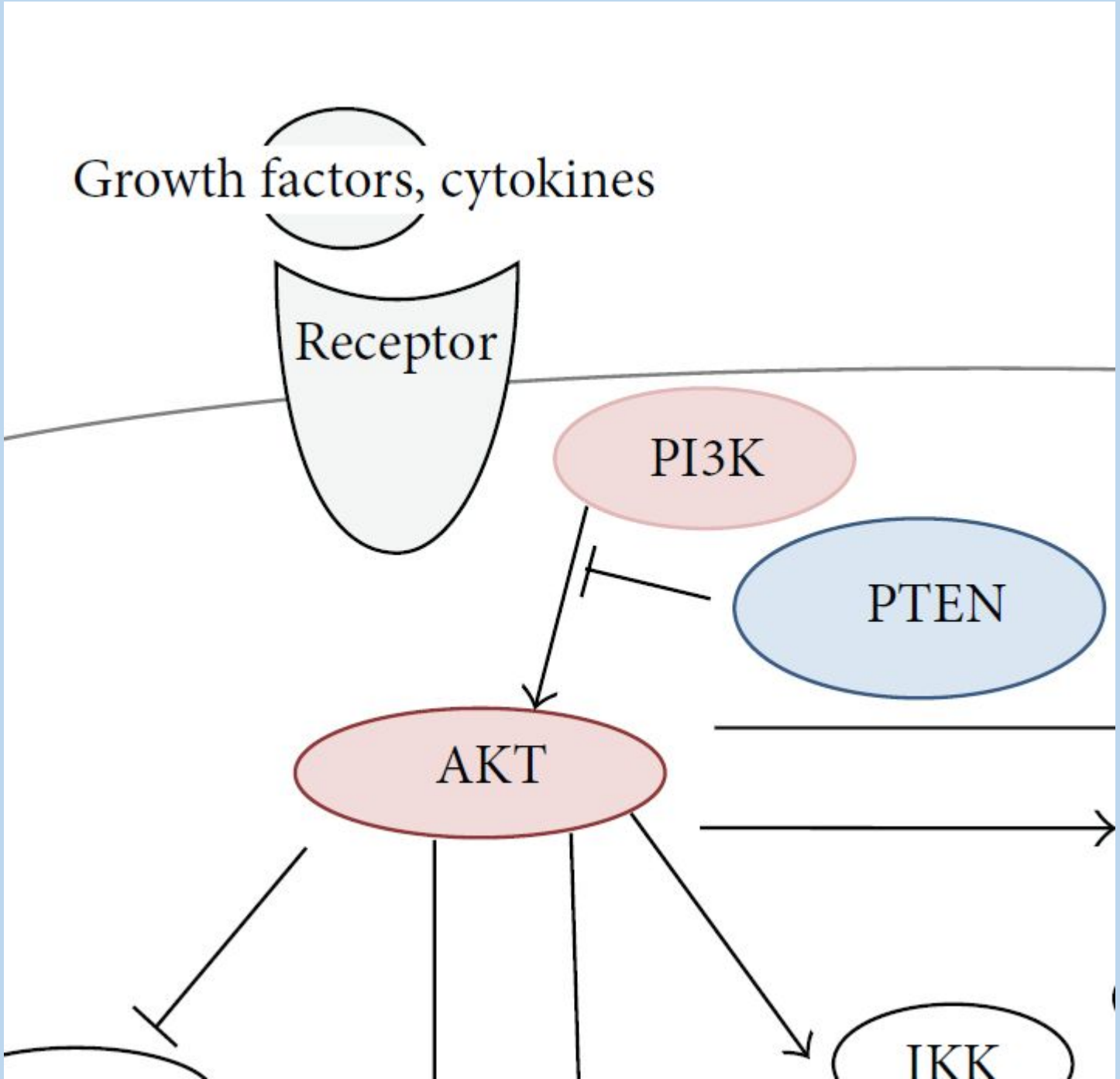
✔отщепление везикулы

✔разрушение клатриновой оболочки


AQP2
AQP3
AQP4
H_2O
H_2O
H_2O
?
cAMP
PKA
AC
ATP
AVP
Gαs
V2
P
P
P
Phosphoproteins
H_2O
H_2O
H_2O
interstitium
urine

Cellular fate of V2R mutants in nephrogenic diabetes insipidus (NDI) and their rescue.



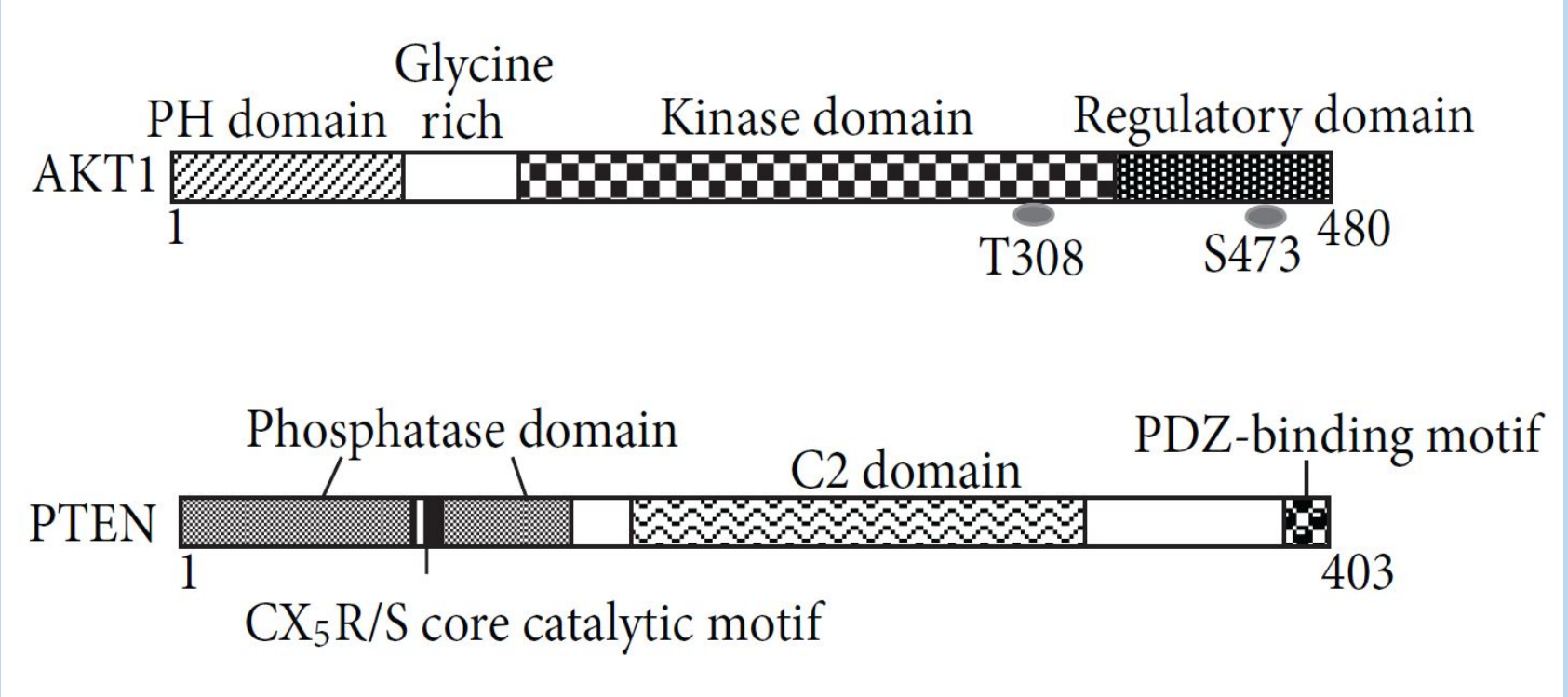

Growth factors, cytokines
Receptor
PI3K
PTEN
AKT
IKK

PTEN (название гена) (“phosphatase and tensin homolog”) семейство тирозиновых фосфатаз. Участвует в торможении клеточного деления, активатор апоптотического пути. Контролирует подвижность клеток, адгезию, формирование кровеносных сосудов. Препятствует образованию опухолей.

В панкреатических бета-клетках подавляет их рост, продукцию инсулина усиливает апоптоз. Делеции PTEN благотворны для мышей с гипофункцией бета-клеток.

PTEN ингибирует поглощение глюкозы клетками при действии инсулина.

PTEN ингибирует систему PI3K/AKT.



PH domain: pleckstrin homology domain;
C2 domain: домен связи с мембраной;
PDZ: a common structural domain in signaling proteins (PSD95, Dlg, ZO-1, etc.).

phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) участвует в регуляции клеточного роста и метаболизма. Активные мутантные формы PI3K участвуют в онкогенезе. В клетках млекопитающих семейство PI3K содержит 3 класса киназ. Фософолипид – продукт PI3K важный вторичный посредник, главным акцептором является serine-threonine protein kinase AKT(also known as protein kinase B).

PIP3 (продукт PI3K) связывается с АКТ , что приводит к перемещению на мембрану, где образуется связь через домен pleckstrin homology (PH) с киназой PDK1 (phosphoinositidedependent kinase 1), которая фосфорилирует киназный домен АКТ, но полная активация АКТ происходит после фосфорилирования регуляторного домена на С-конце киназой PDK2. Активированная АКТ перемещается в цитоплазму и ядро, где в частности ингибирует белки GAP (GTPase-activating protein)

Суперсемейство EF-hand белков

CaM кальмодулин

MW 16,700 ; 148 aa; K_d = 4 – 18 10^{-6} M;

4 гомологичных домена: I (8-40 aa), II (81-113 aa) низкая аффинность, III (44-76 aa), IV (117-148 aa) высокая аффинность

CaM

Фософодиестераза(PDE) , *аденилатциклаза, гуанилатциклаза , CaATPase ,*

диссоциация микротрубочек , ATPase актомиозина гладких мышц,

Киназа легких цепей миозина

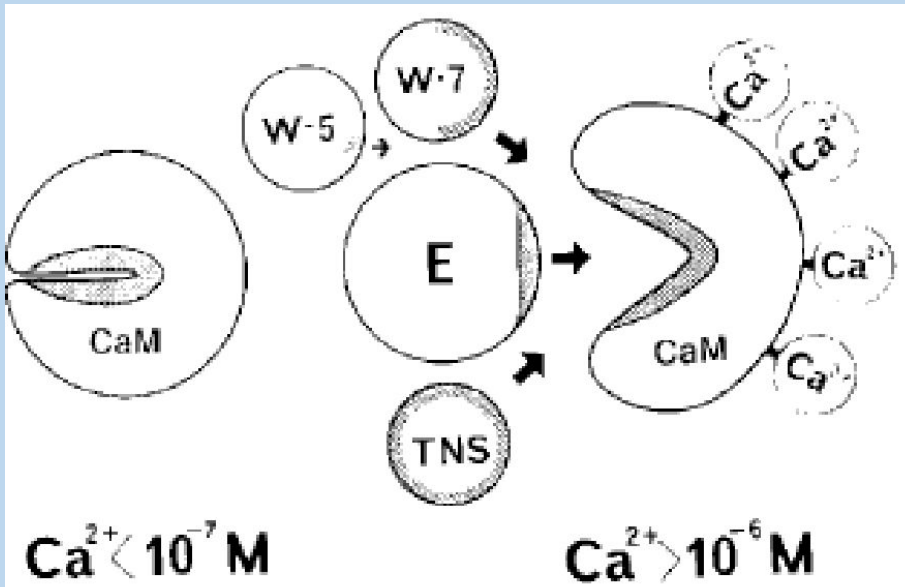


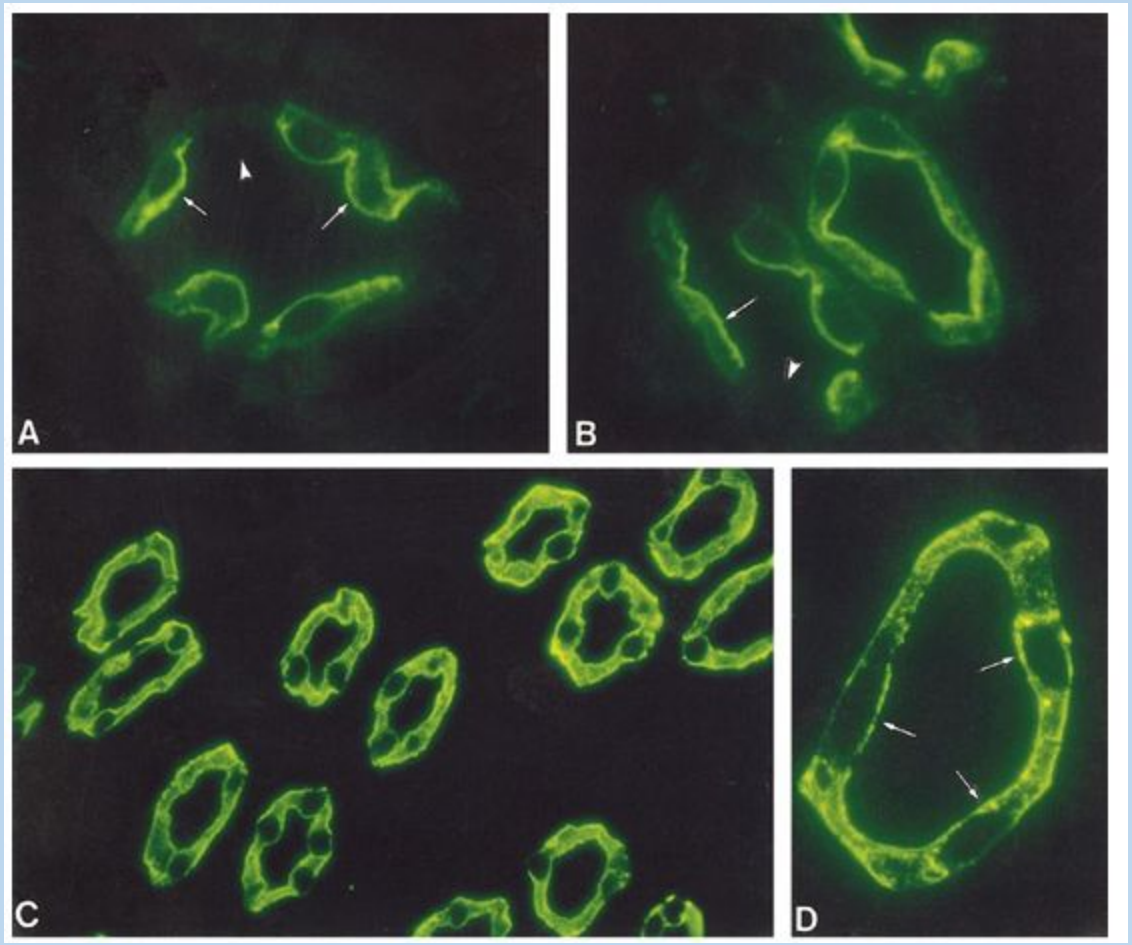
Fig. 2. Calcium-dependent interaction of calmodulin with target enzyme, calmodulin antagonists such as W-7, and hydrophobic fluorescent probes such as TNS. CaM, calmodulin; E, calcium, calmodulin-dependent enzyme; W-7, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide; W-5, the chlorine-deficient derivative of W-7, N-(6-aminohexyl)-1-naphthalenesulfonamide; TNS, 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate. $Ca^{2+} < 10^{-7}$ M, intracellular calcium ion concentration below 1×10^{-7} M; $Ca^{2+} > 10^{-6}$ M, intracellular calcium ion concentration above 1×10^{-6} M.

The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein target receptor (SNARE) предполагается, участвуют в присоединении/слиянии пузырьков на всех этапах их движения. На мембране в местах назначения формируются посадочные места куда входят Syntaxins и synaptosome-associated proteins (SNAPs: SNAP23, SNAP25) формирующие 2 SNARE motifs и еще два SNARE motifs создаются vesicle-associated membrane proteins (VAMPs или synaptobrevins) и syntaxin (Stx).

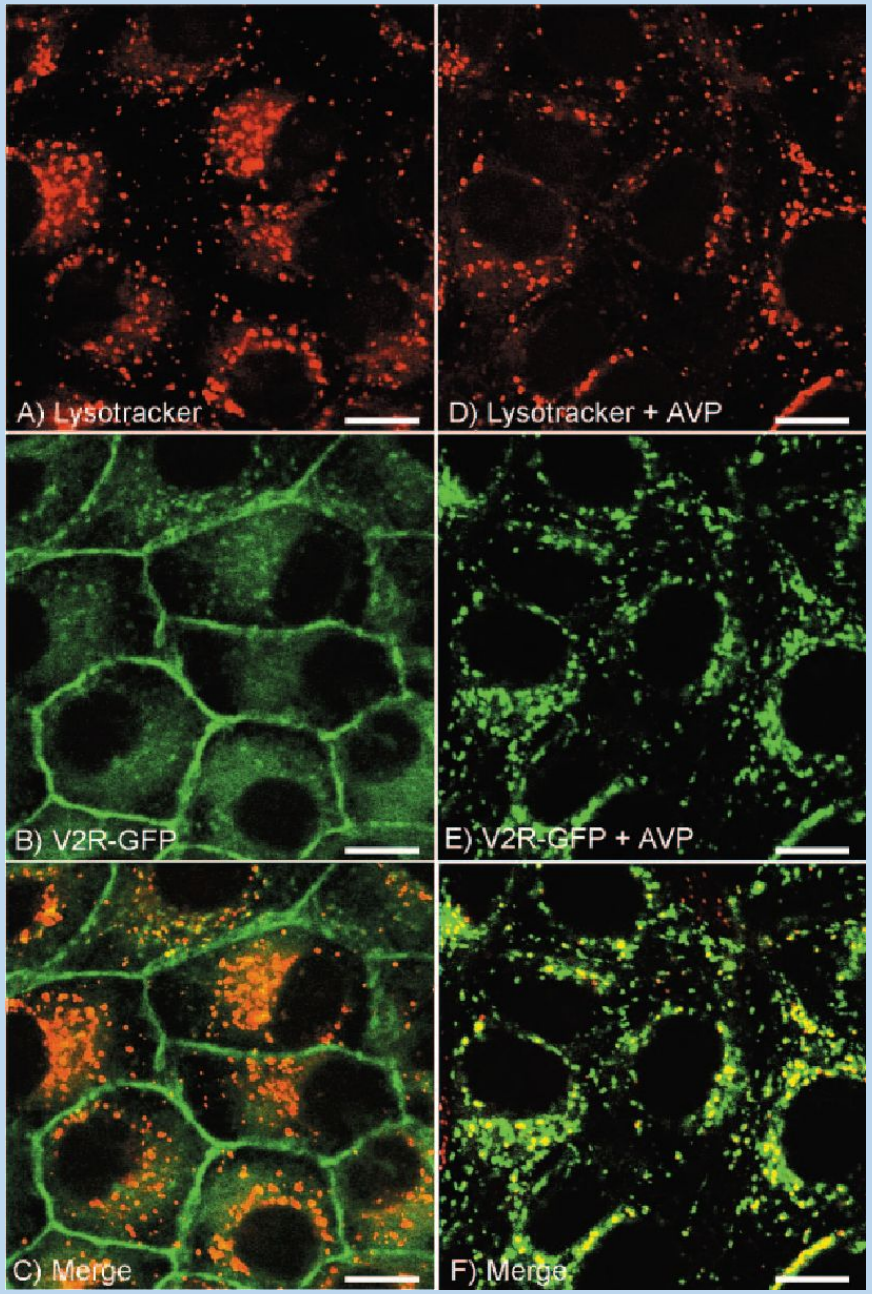
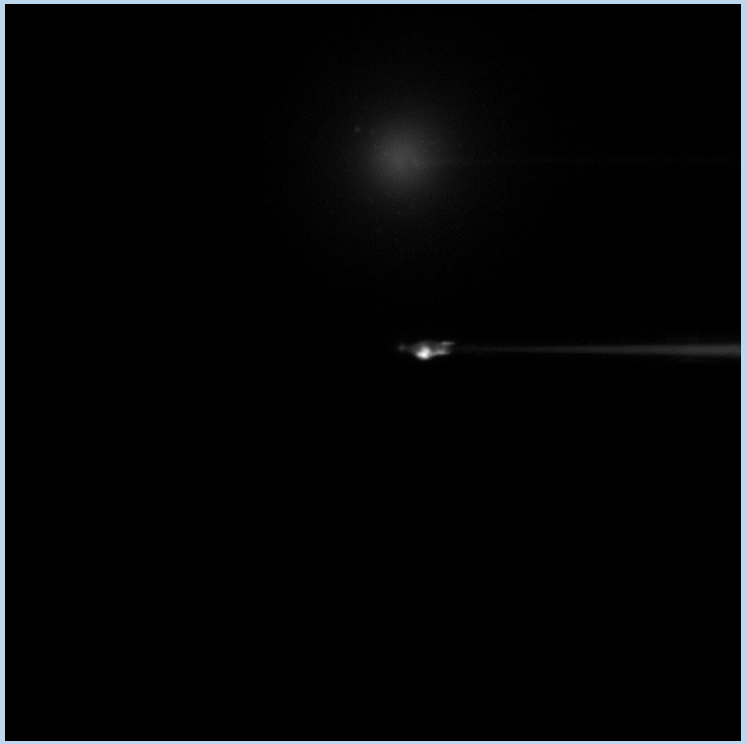
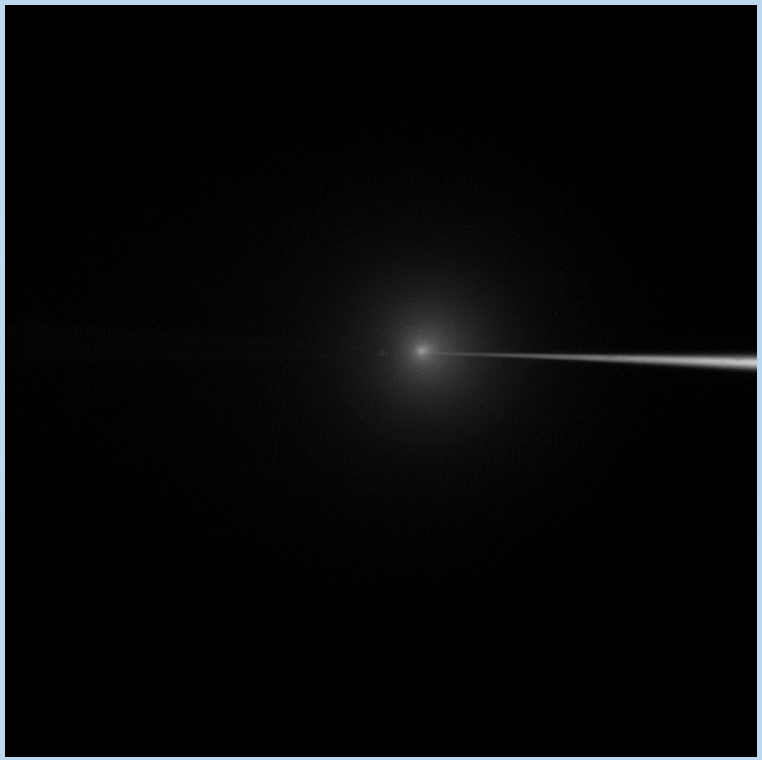
(synaptosome-associated protein) SNAP23

В почке его находят в апикальной мембране и везикулах AQP2 главных клеток.

участвует в слиянии везикул с плазматической мембраной (но не в нервных клетках). В мозгу SNAP23 связывается с синтаксинами Stx2, Stx3, Stx4.


A
B
C
D

The 5th International Conference of
Aquaporin
July 13 - 16, 2007 Nara, Japan



Effect of VP treatment on Lysotracker and V2R-GFP distribution in LLC-V2R-GFP cells. At 37°C, Lysotracker, a lysosome marker, is located in large vesicles in the cytoplasm (*A*; red), and V2R-GFP is located mainly at the cell surface (*B*; green). The merged image (*C*) shows little or no overlap in labeling. In the presence of VP (1μM) at 37°C for 2 h, Lysotracker staining also appears in vesicles (*D*; red), many of which contain V2R-GFP (*E*, green; *F*, yellow). These images are representative of six independent experiments. Bar, 5 m.