

Sekreční dráha a endocytóza (vesikulární transport) v kvasinkové buňce

Transport látek v buňce:

transport malých molekul (ionty, aminokyseliny, monosacharidy)

difuze (v cytoplasmě)

molekulární přenašeče (přes membránu)

transport makromolekul (glykoproteiny)

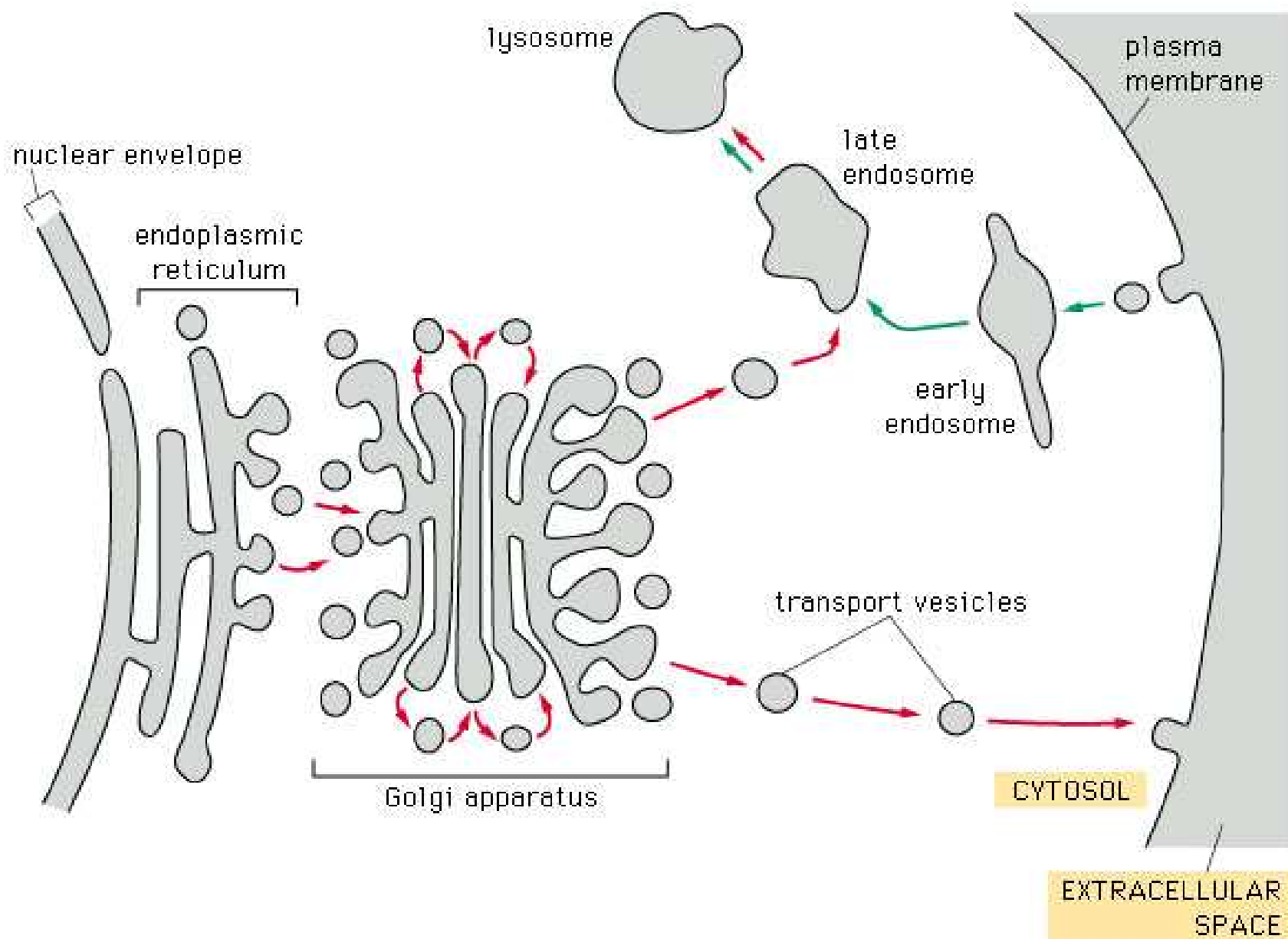
vesikulární transport (sekreční a endocytické váčky)

Metabolické dráhy:

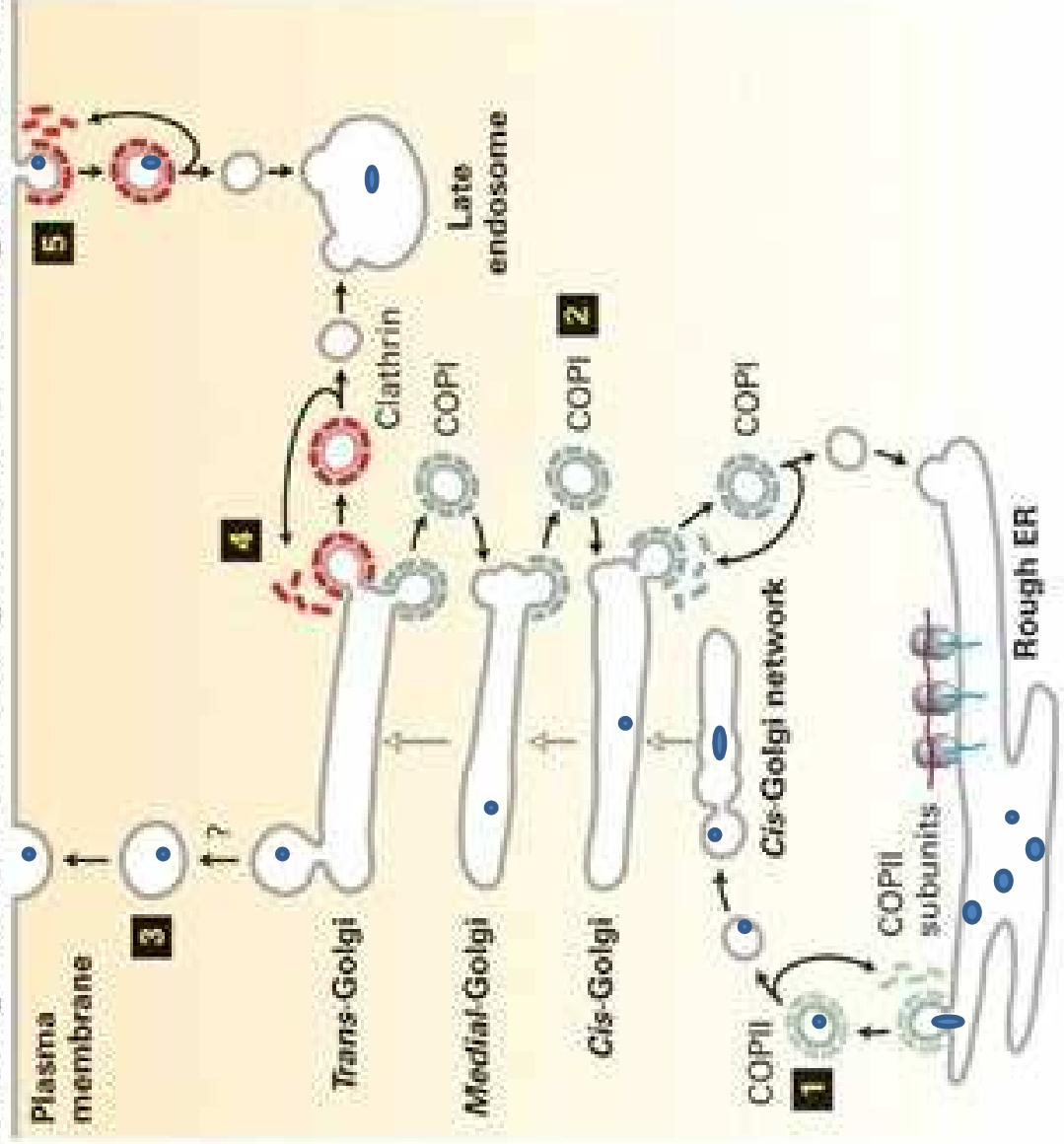
exocytóza (sekrece)

endocytóza

Schéma sekrece a endocytózy v živočišné buňce



Secretory and Endocytic Pathways



Jak je kontrolován postup sekrečního produktu po sekreční dráze ER---GA---SV?

Sekretované makromolekuly (glykoproteiny) jsou v buňce uzavřeny v membránových organelách – organelách sekreční dráhy - endoplasmatického retikula (ER), Golgiho aparátu (GA) a sekrečních váčků (SV).

Hypotéza:

jednosměrná dráha sekrečního produktu by mohla být řízena interakcí proteinů, které jsou na povrchu membrán organel sekreční dráhy – ER, GA, SV.

Model: kvasinková buňka:

- je eukaryotická, má rychlý metabolismus, reprodukuje se rychle, snadno se dají získat mutace většiny genů. Měla by mít rovněž sekreční orgány, neboť

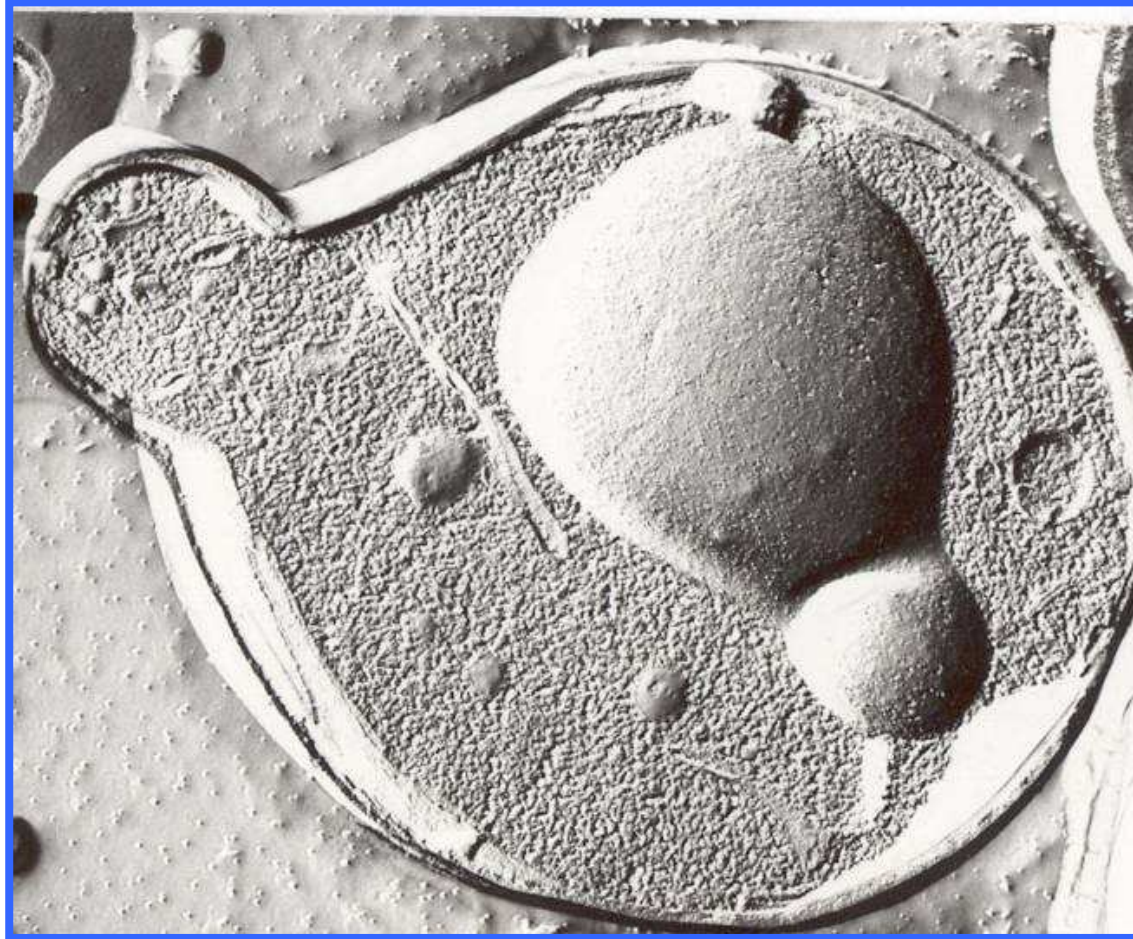
Kvasinková buňka
sekretuje:

glykoproteiny do buněčné stěny pupene

glykoproteiny do periplasmatického
prostoru (mezi buněčnou stěnou a
plasmatickou membránou)

endocytózou přijímá

nadbytečný membránový materiál z pupene



V kvasinkové buňce jsou orgány sekreční dráhy málo zřetelné, cisteren ER je relativně málo, sekreční vesikly jsou někdy vidět v pupenu, Golgiho cisterny nejsou přítomny.

U kvasinek *S. cerevisiae* byly detekovány geny, jejichž produkty jsou potřebné pro průběh sekrece a endocytózy.

Mutací těchto genů je sekreční dráha resp. endocytóza blokována v místě, kde schází genový produkt.

Mutanty genů sekreční dráhy (*sec mutanty*) izoloval R. Schekman



Randy Schekman
(Nobelova cena 2013)

Jak se izolují sec mutanty?

Jestliže syntéza bílkovin pokračuje, ale sekrece je zastavena, vzrůstá specifická hmotnost buněk a v hustotním gradientu jsou těžší.

Z frakce těžších buněk se případně izolují teplotně senzitivní mutanty: v pokojové teplotě 25°C probíhá sekrece proteinů normálně, avšak při zvýšení kultivační teploty na 37°C je sekrece zastavena na tom místě, kde schází teplotě denaturovaný protein.

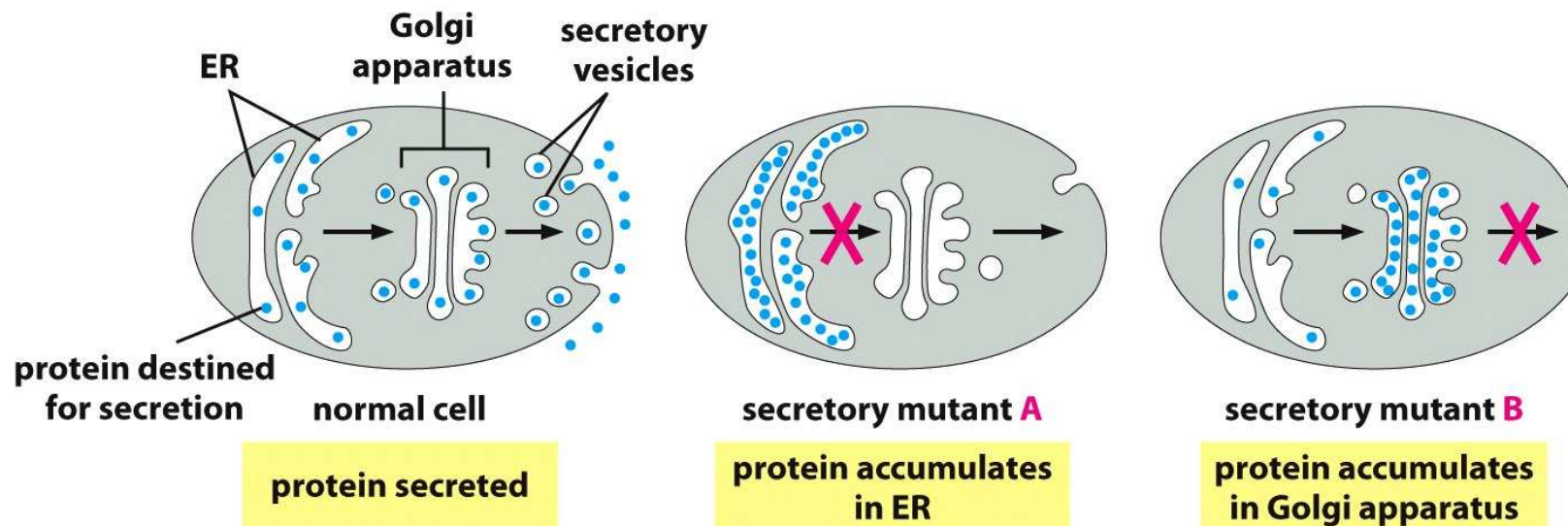
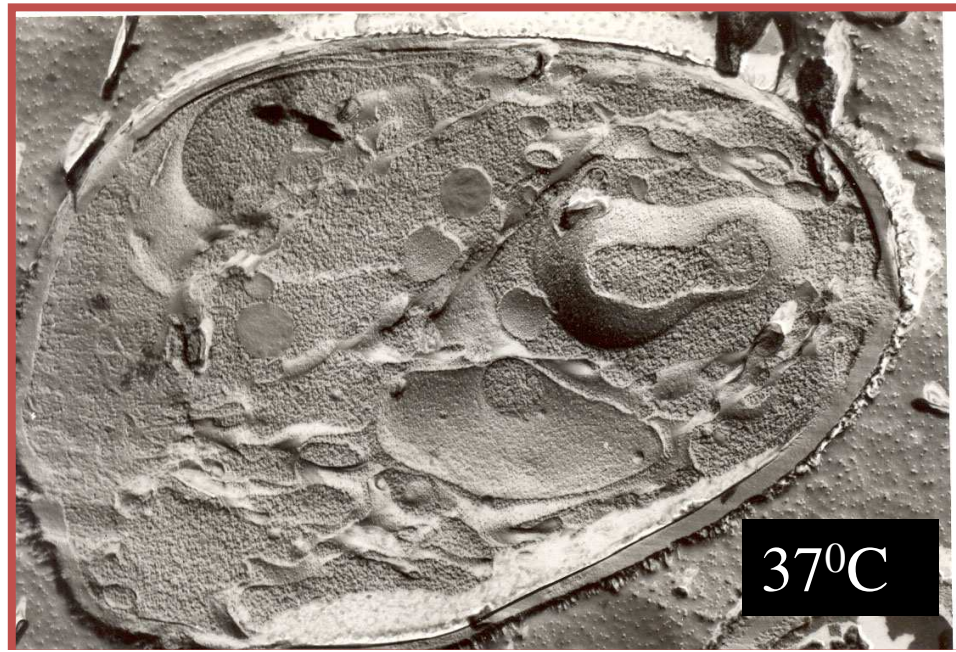
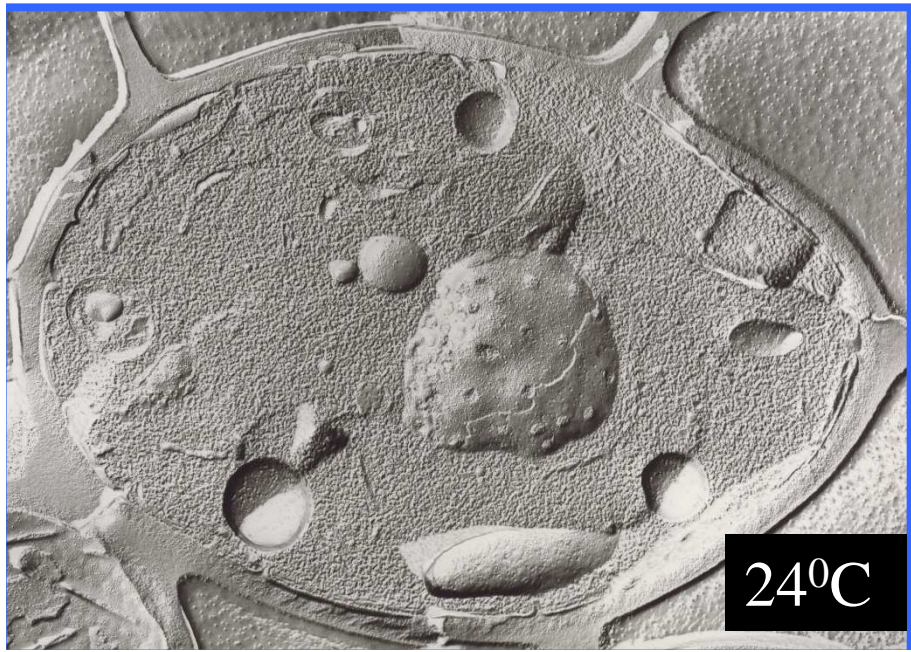
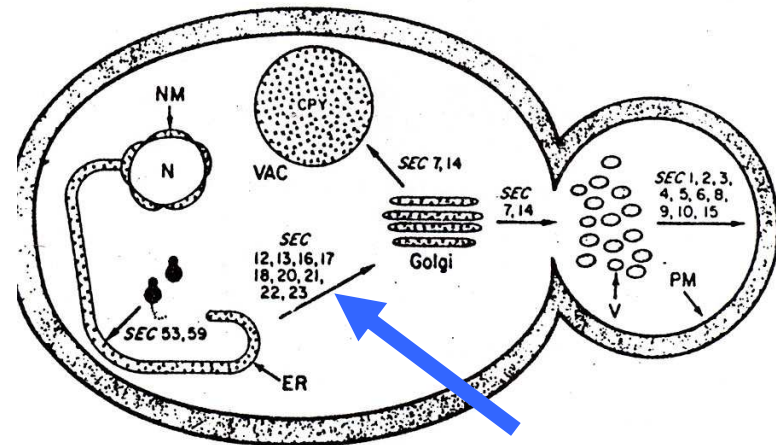


Figure 15-30 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

V kvasinkové buňce je relativně malé množství sekrečních organel, neboť proces sekrece je rychlý – během 90 min je třeba nasyntetizovat kompletní novou buněčnou stěnu. Chybí-li však některý z regulačních proteinů proces sekrece se na určitém místě zastaví a nahromadí se poslední funkční organela.

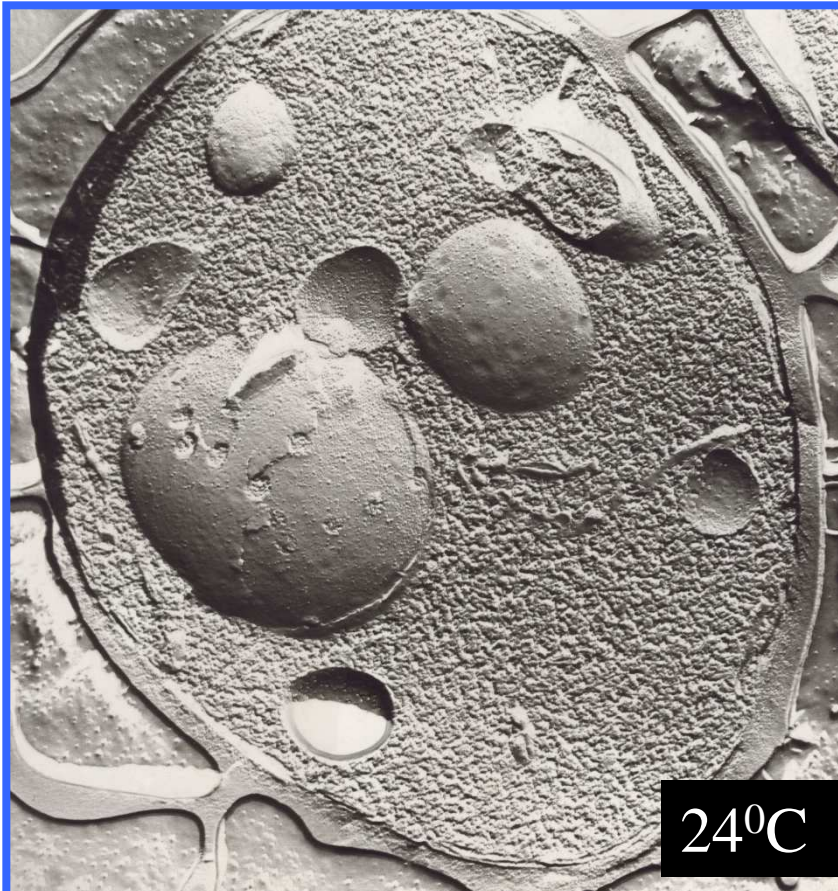
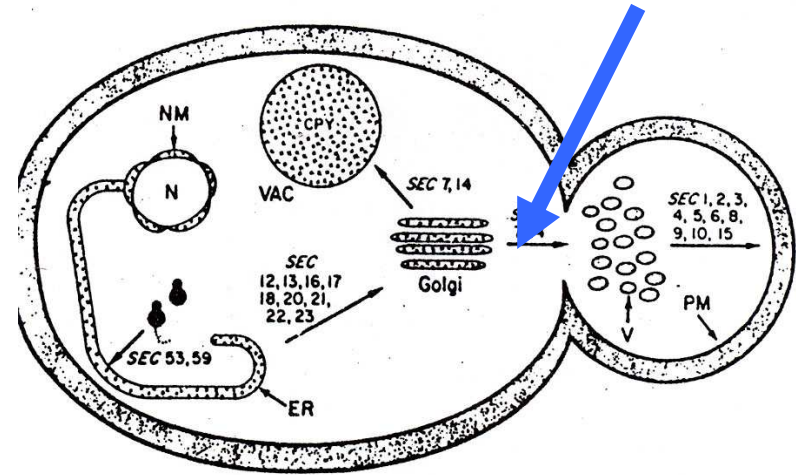
Sekreční mutanta *S. cerevisiae*
sec 18, transfer 25 °C do 37 °C



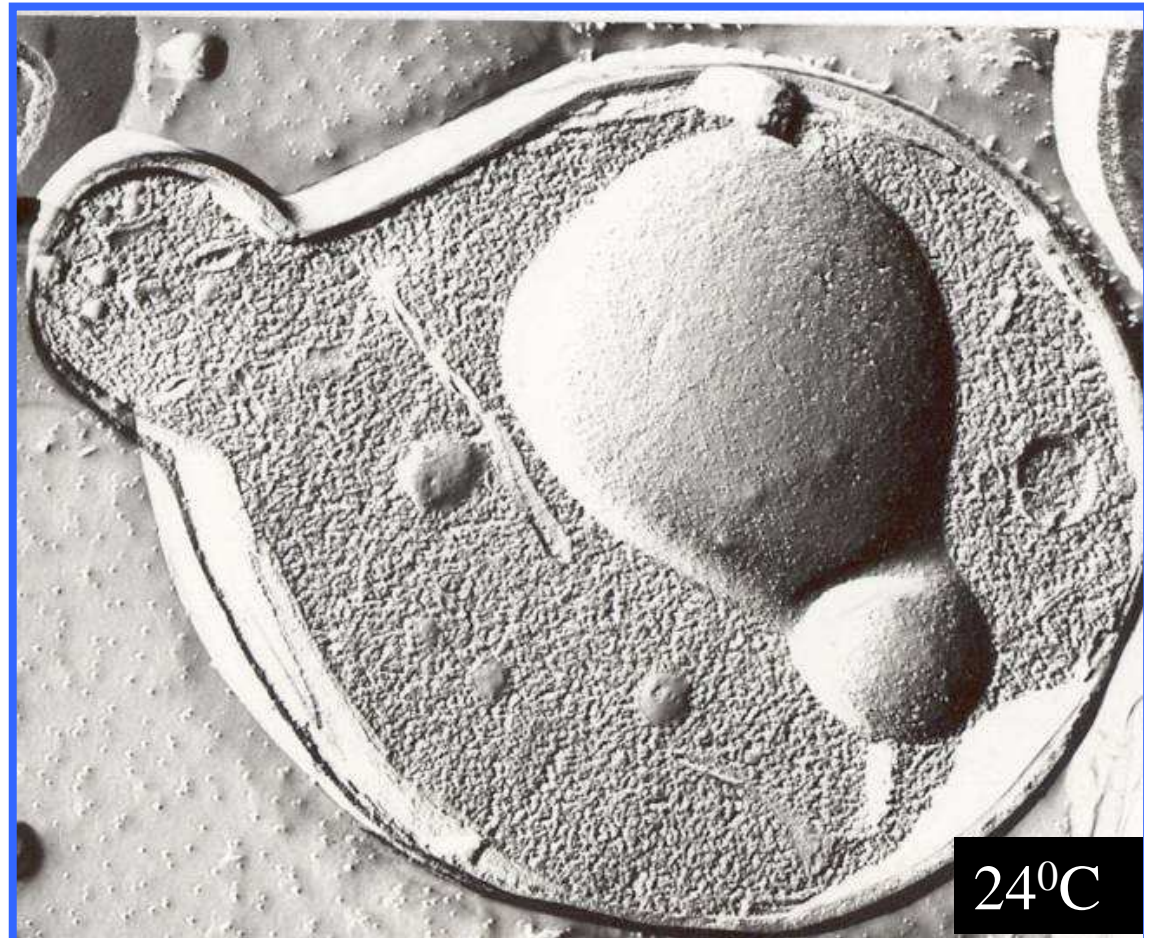
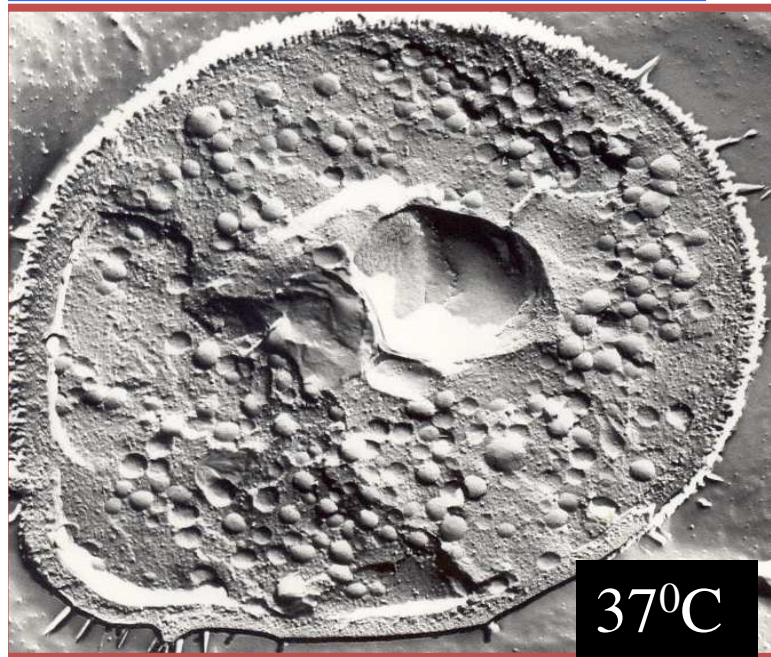
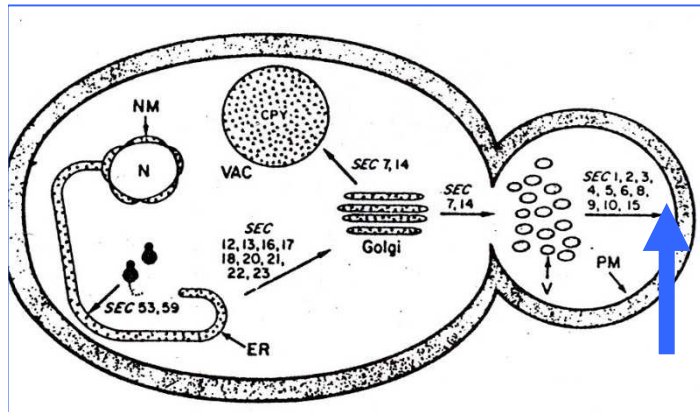
Sekreční mutanta *S. cerevisiae*

sec 7

Transfer z 25 °C do 37 °C



Sekreční mutanty kvasinek: ts sec 1, 24 °C → 37 °C



Jaký význam má pasáž přes sekreční kompartmenty?

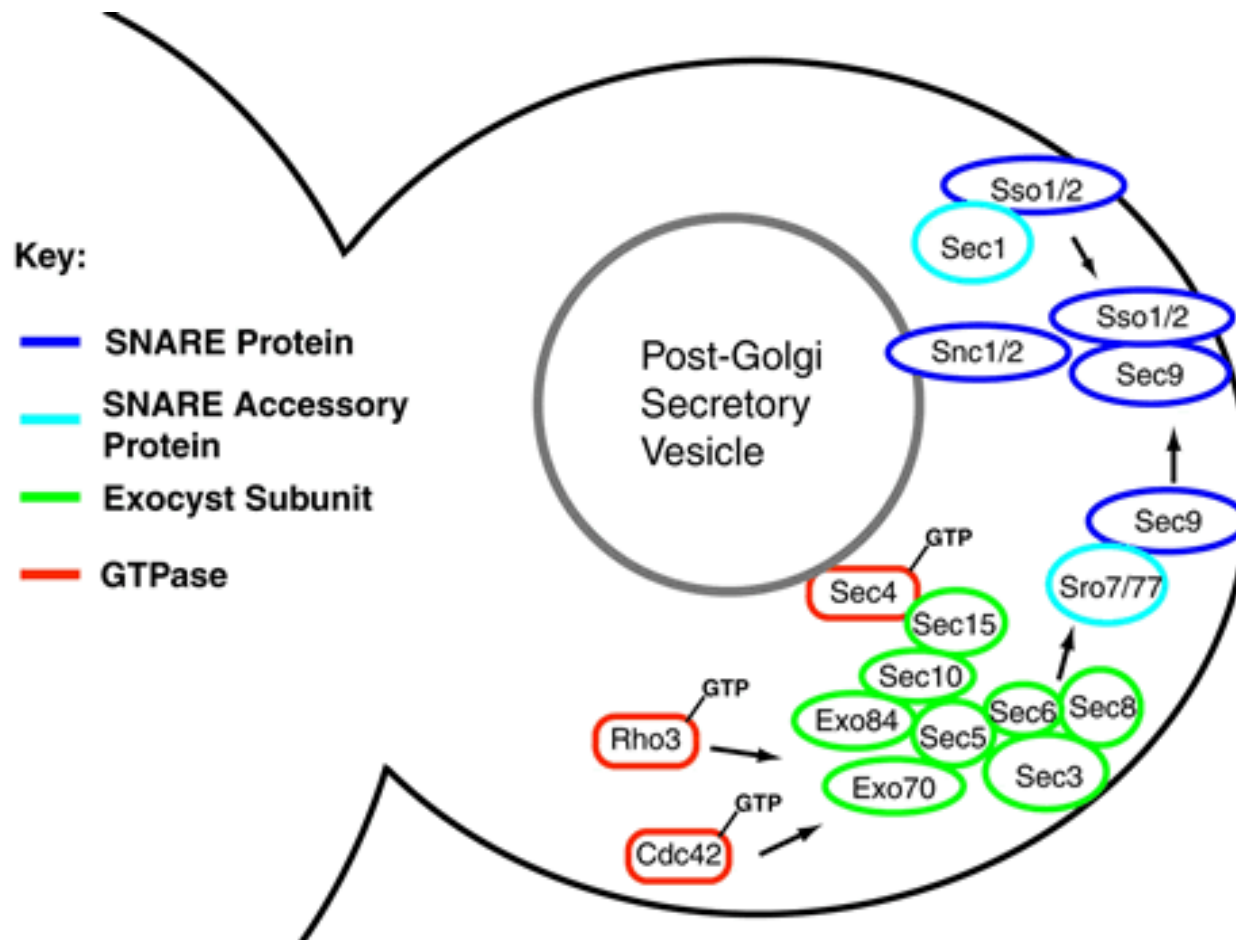
Kvasinky secernují mannanproteiny, které se ukládají ve stěně. Ty mají funkci strukturální nebo katalytickou (např. invertáza MV 270 000, z toho 55% je mannan

Při izolaci ER ze sec 18 byla zjištěna invertáza s malým obsahem mannanu.

Při izolaci GA ze sec 7 zjištěna invertáza plně glykosylována.

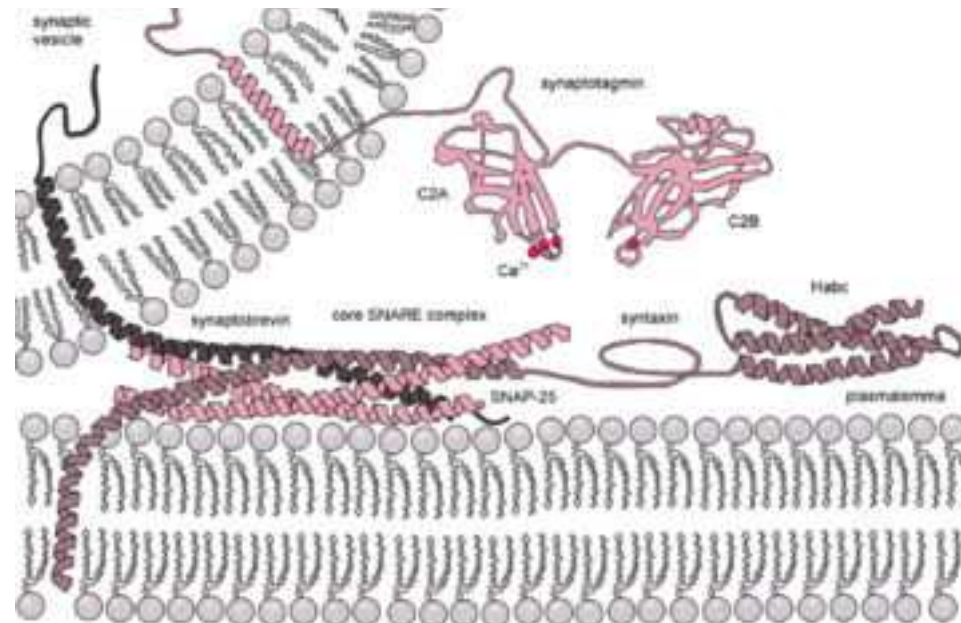
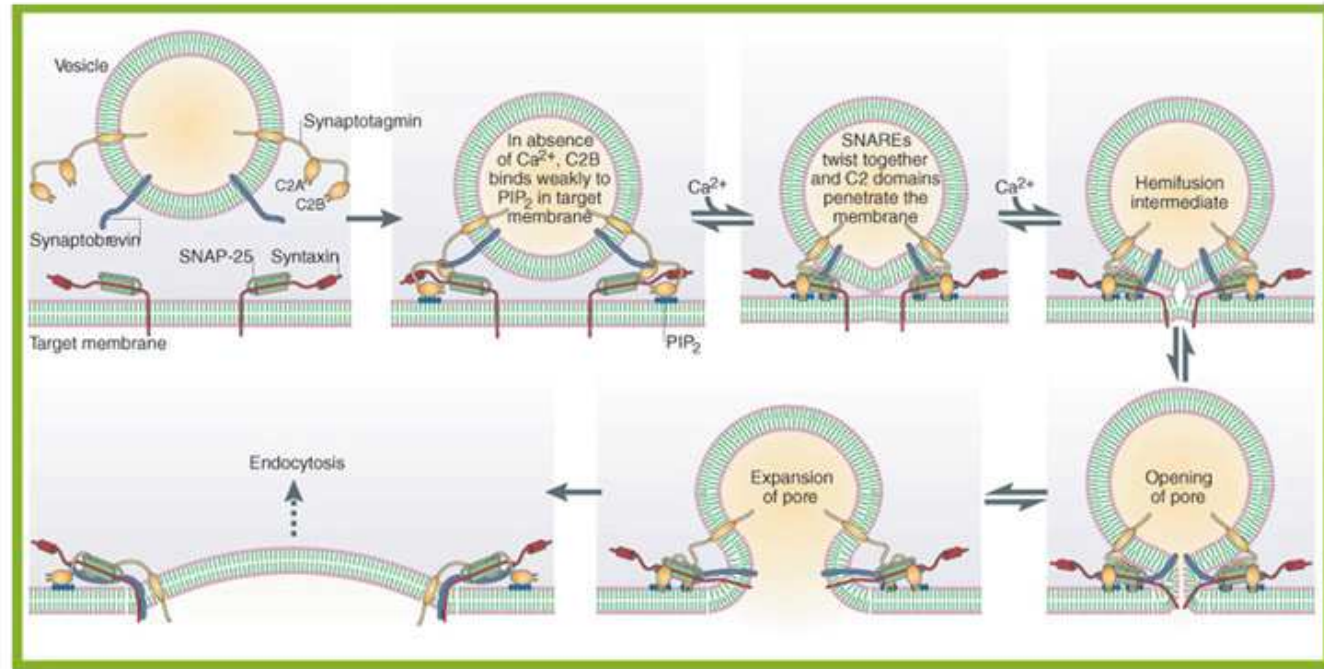
Proteinová část invertázy je tedy syntetizována v ER, kde je i částečně glykosylována. Glykosylace tohoto glykoproteinu je dokončena v GA.

Proteiny, potřebné k exocytóze sekrečního váčku (post-Golgi secretory vesicle), definované na základě genetické analýzy sekrečních mutant

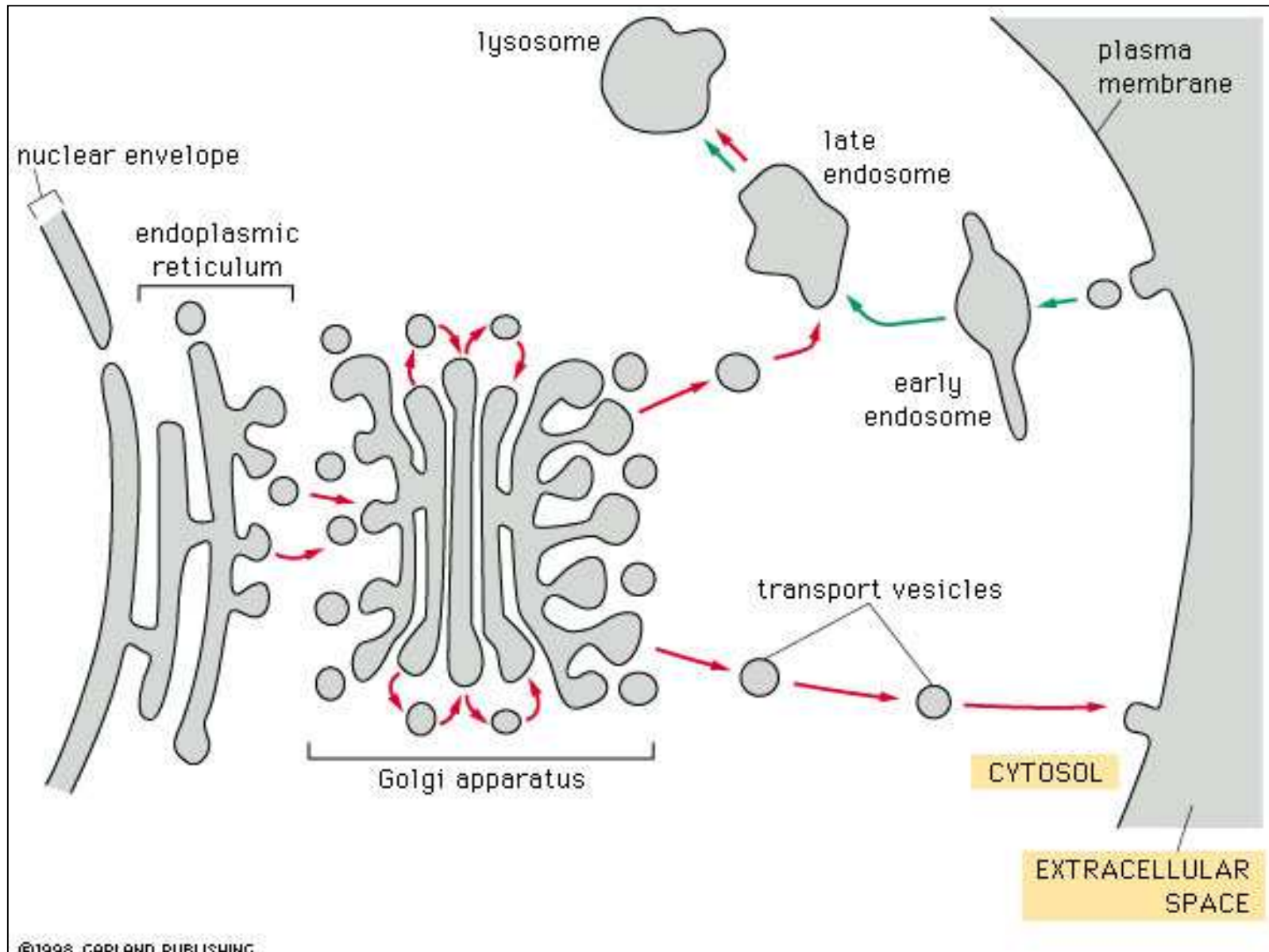


Exocytosa

Molekulární
mechanizmy fuze
membrány
sekrečního váčku s
plasmatickou
membránou:
interakce
membránových
proteinů startuje
fuzi membrány



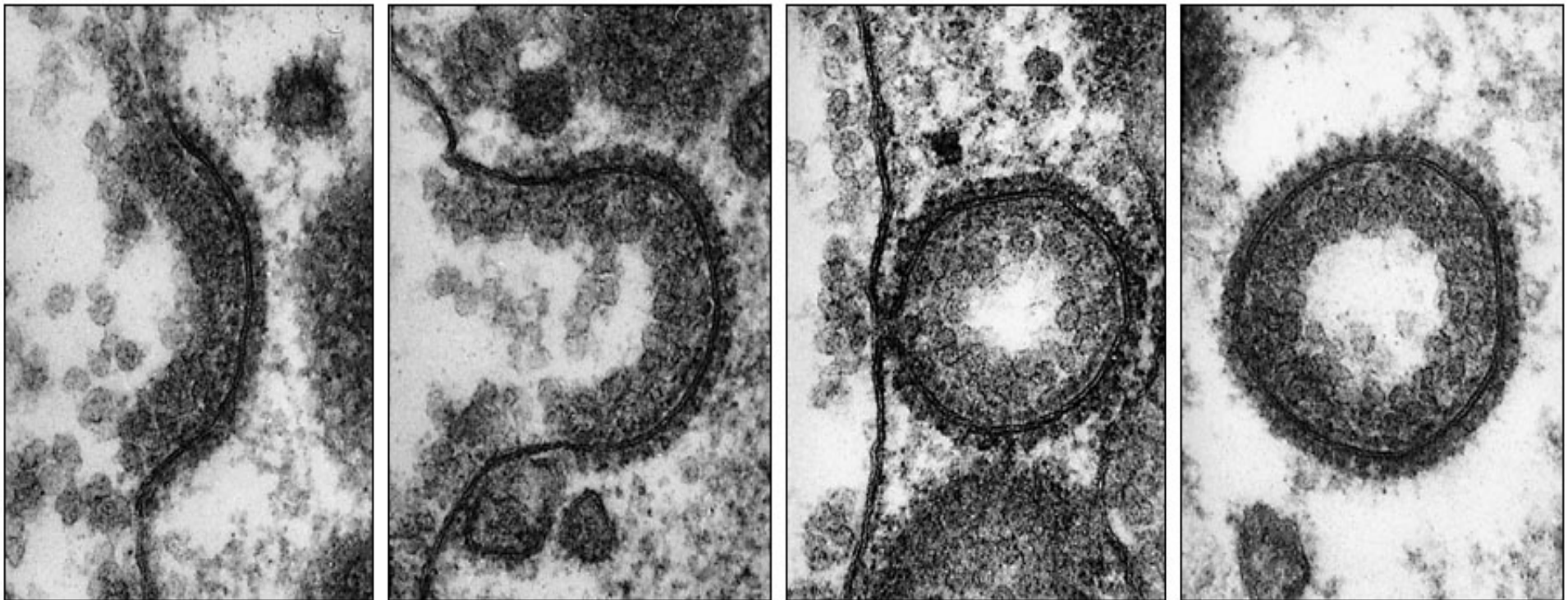
Endocytóza



Jak lze sledovat postup přijímaných molekul endocytózou:

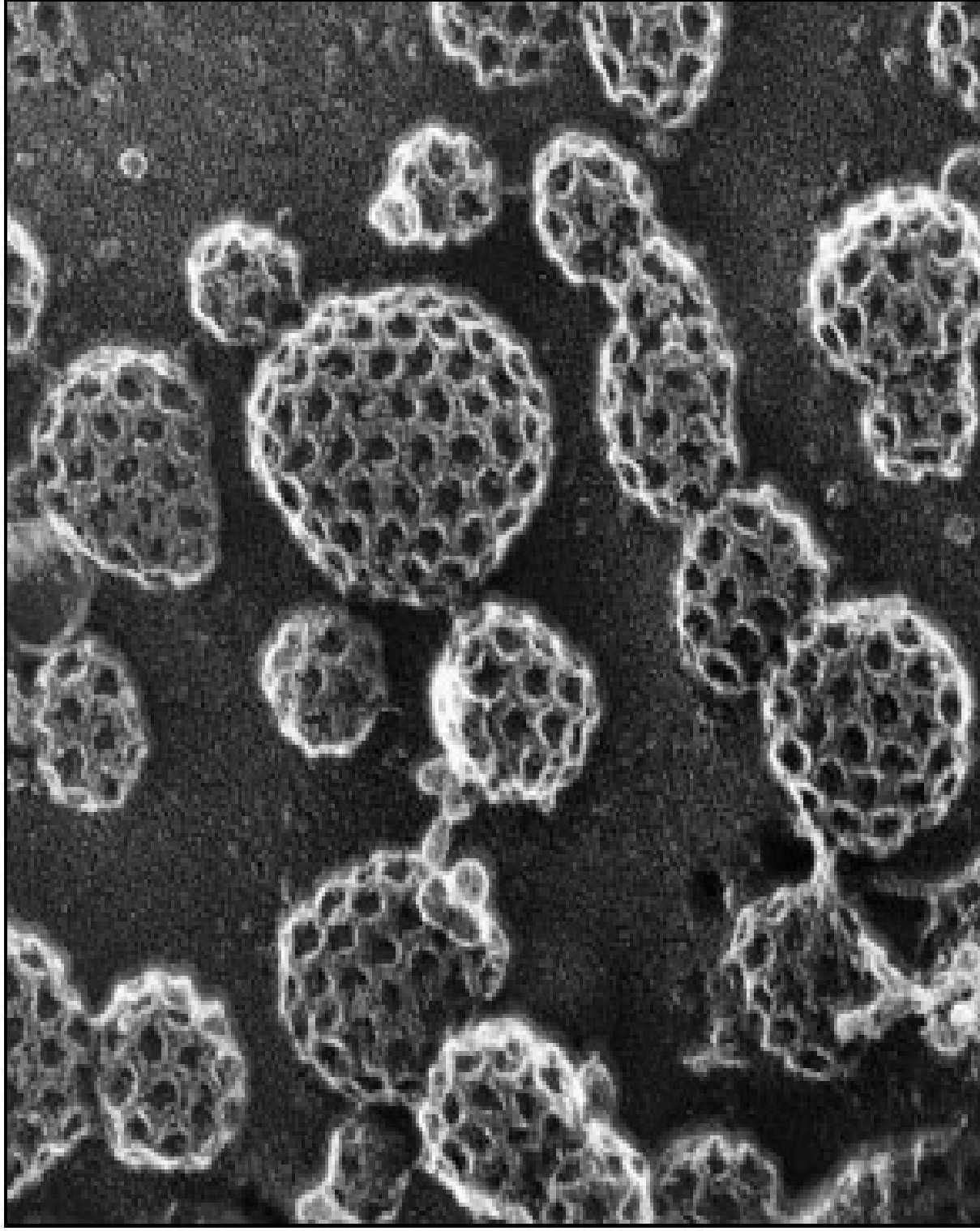
- radioaktivní polypeptid n. polysacharid
- ferritin (na ultratenkých řezech)
- FITTC - fluorescencí zabarvený substrát (luciferáza) se objeví nejprve ve frakci měchýřků - **endosomy**, pak ve frakci **lyzomů**

Endocytóza: invaginace plasmatické membrány. Tvorba a odštěpení váčku - endosomu



(A)

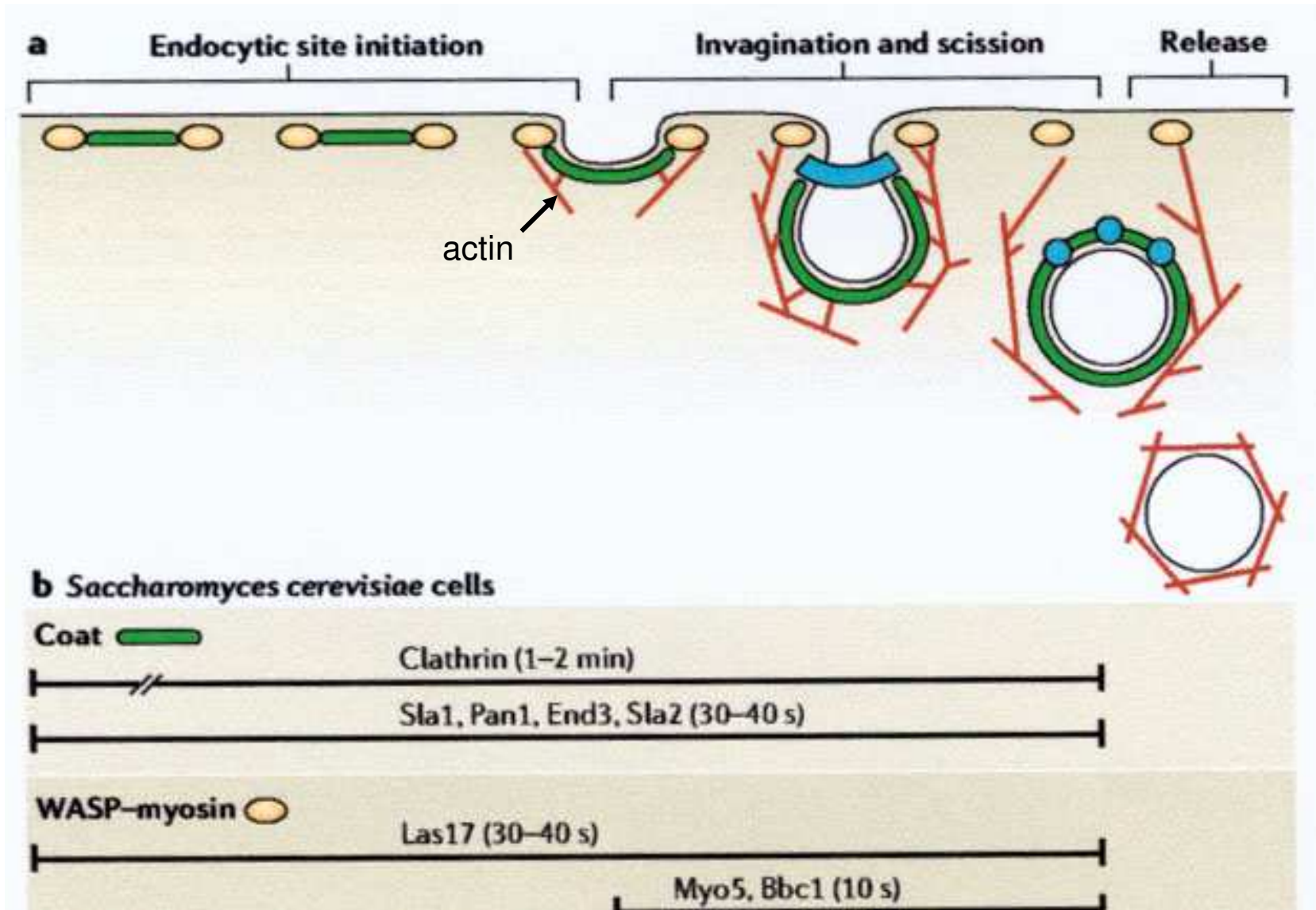
0.1 μm



(B)

0.2 μm

Analýza participace genů (genových produktů) na endocytóze u *S. cerevisiae* (Drubin)



Současný model molekulárního mechanismu endocytózy:

Las17 (WAS) a Myo1 aktivují protein 2/3(Arp2/3). Tento komplex aktivuje polymerizaci aktinu, kde hrají úlohu ještě další proteiny. Současně se organizuje clathrinový obal měchýřku. Polymerizace aktinu vede k prohlubování invaginace plasmatické membrány a oddělení měchýřku – endosomu.

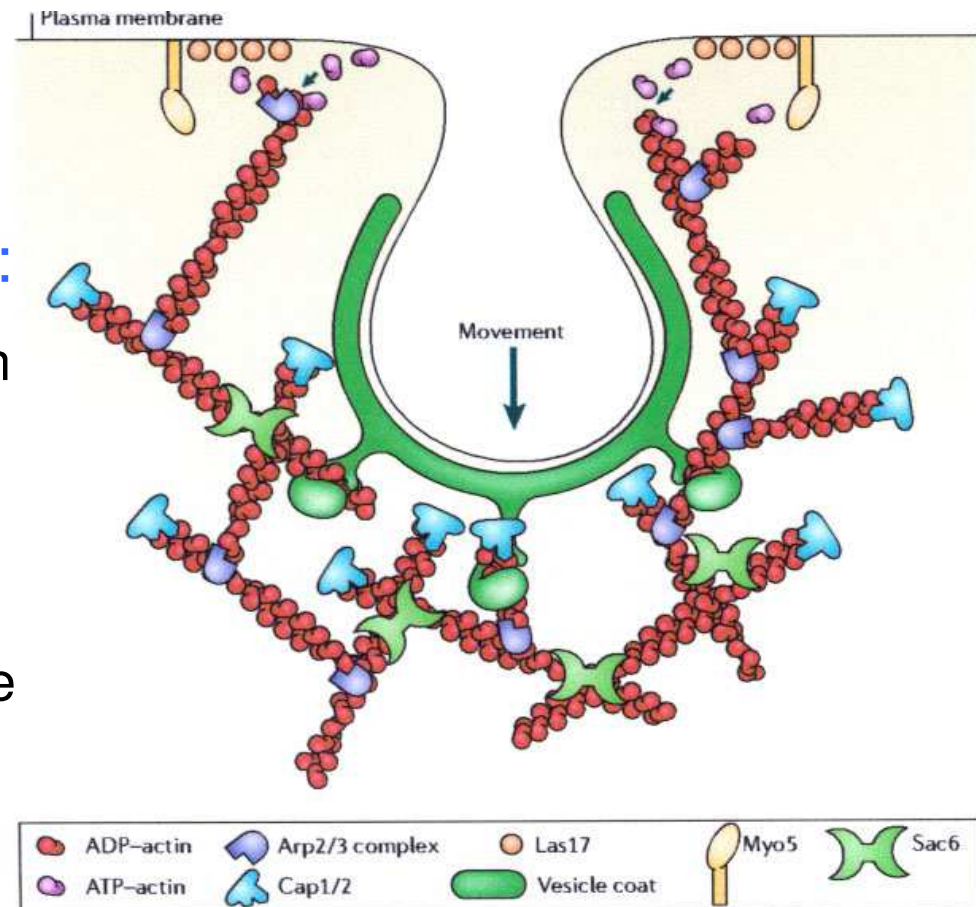


Figure 4 | **Current model for actin-driven endocytic internalization.** This schematic diagram illustrates putative functions of different actin-cytoskeleton proteins during endocytic internalization in *Saccharomyces cerevisiae*. Las17 (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) in mammals) together with the myosins Myo3 (not shown) and Myo5 activate the actin-related protein-2/3 (Arp2/3) complex at the cell surface. Myosins might also generate force on the actin network or anchor the actin filaments to the plasma membrane through their motor domains. The activated Arp2/3 complexes form branched actin filaments that grow through the addition of ATP-actin monomers near the plasma membrane. Older filaments are capped at their barbed ends by capping proteins (Cap1/2). The branched filaments are further crosslinked by Sac6. The crosslinked actin network is linked to the underlying vesicle coat by actin-binding proteins such as Sla2 and Pan1, which are represented by green hand-like structures. The growth of the actin network leads to the invagination of the coated membrane. For further information on the proteins involved, see TABLE 1.

Molekulární mechanismy vzniku hereditární hypercholesterolemie

1. Porucha syntézy receptorového proteinu na ER
2. Porucha postranlační modifikace proteinu v GA
3. Porucha vazby receptorového proteinu s ligandou (LDL – light density lipoproteins)
4. Porucha shlukování komplexu receptor-LDL v plasmatické membráně

