

Sekreční dráha a endocytóza (vesikulární transport) v kvasinkové buňce

Biologie kvasinek 2018

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

Kvasinková buňka sekretuje: glykoproteiny do buněčné stěny
pupene

endocytózou přijímá nadbytečný stěnový
materiál z pupene

Secretory and Endocytic Pathways Intersect

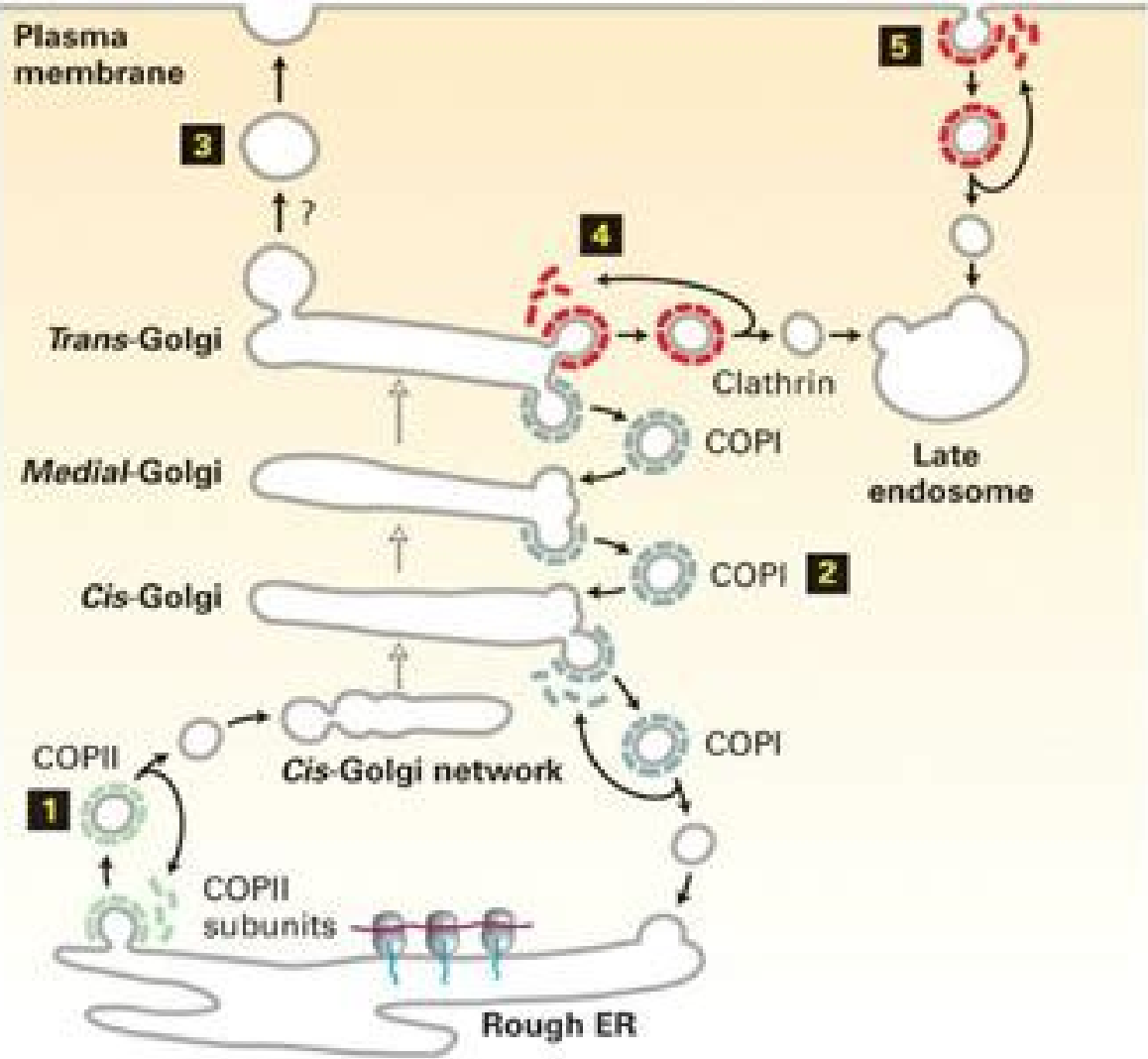
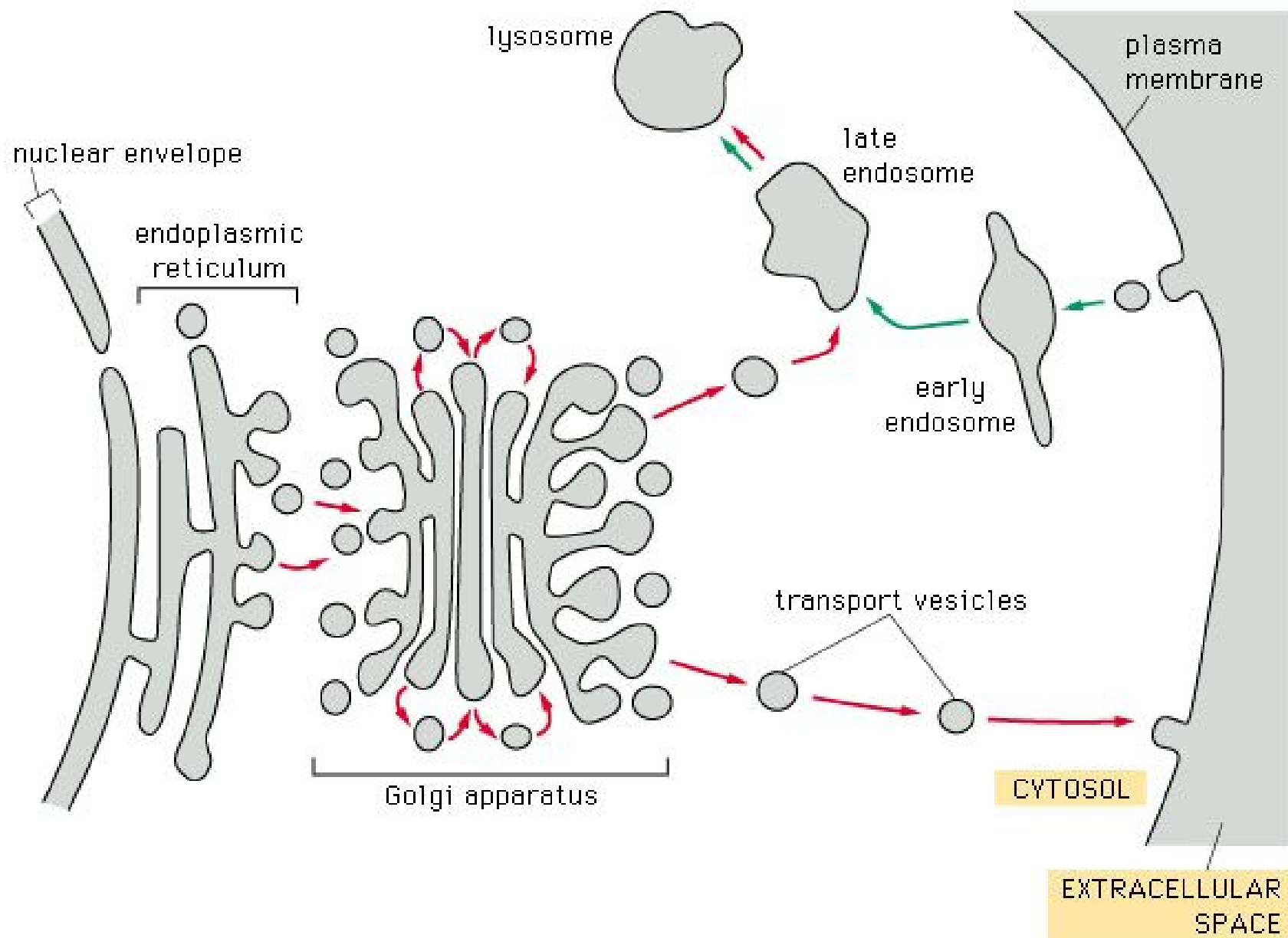
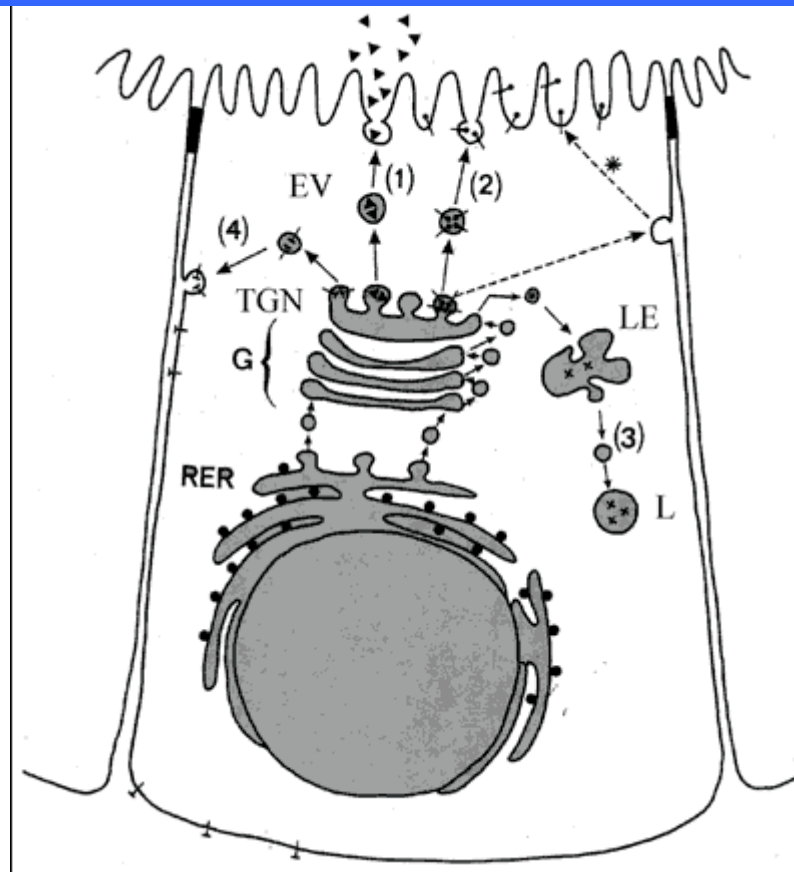


Schéma sekrece a endocytózy v živočišné buňce



Polarizovaná sekreční buňka

Sekreční organely – ER, GA a sekreční váčky - jsou uspořádány polárně a sekret je uvolňován do lumina žlázy



Jak byla objevena sekreční dráha

ER → GA → vesikly

- ve žlázových buňkách jsou tyto kompartmenty abundanční
- izotopové techniky prokázaly že po pulse-chase je radioaktivita sekretovaných molekul nejprve nad ER, pak nad GA a nakonec u povrchu plasmatické membrány v zymogeních granulích

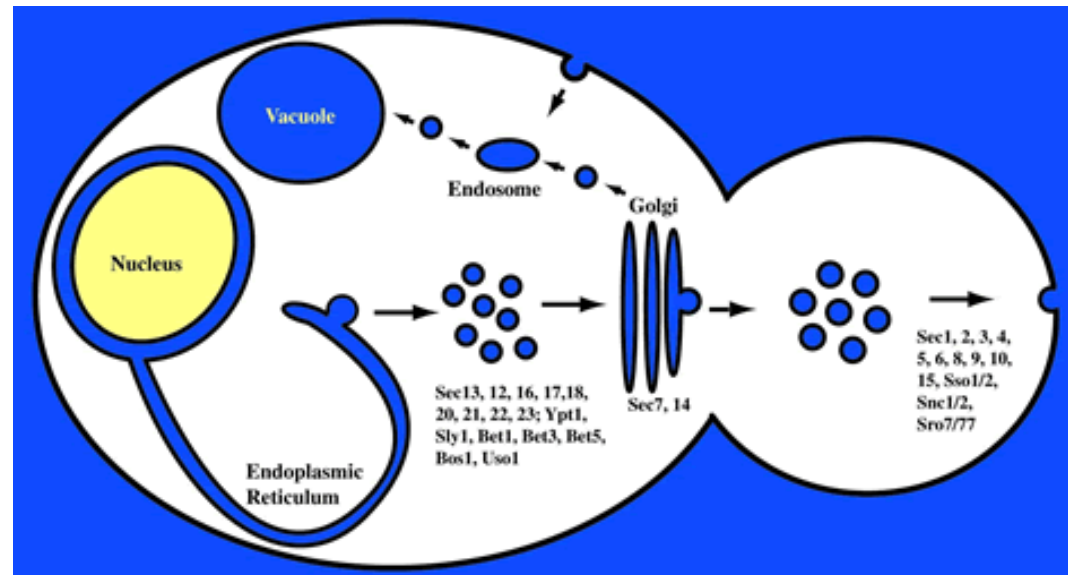
Jak je kontrolován postup sekrečního produktu po sekreční dráze?

U kvasinek *S. cerevisiae* byly detekovány geny, jejichž produkty jsou potřebné pro průběh sekrece a endocytózy. Mutací těchto genů je blokována sekreční dráha resp. endocytóza v místě, kde schází genový produkt



Randy Schekman
(Nobelova cena 2013)

Jak se izolují sec mutanty?

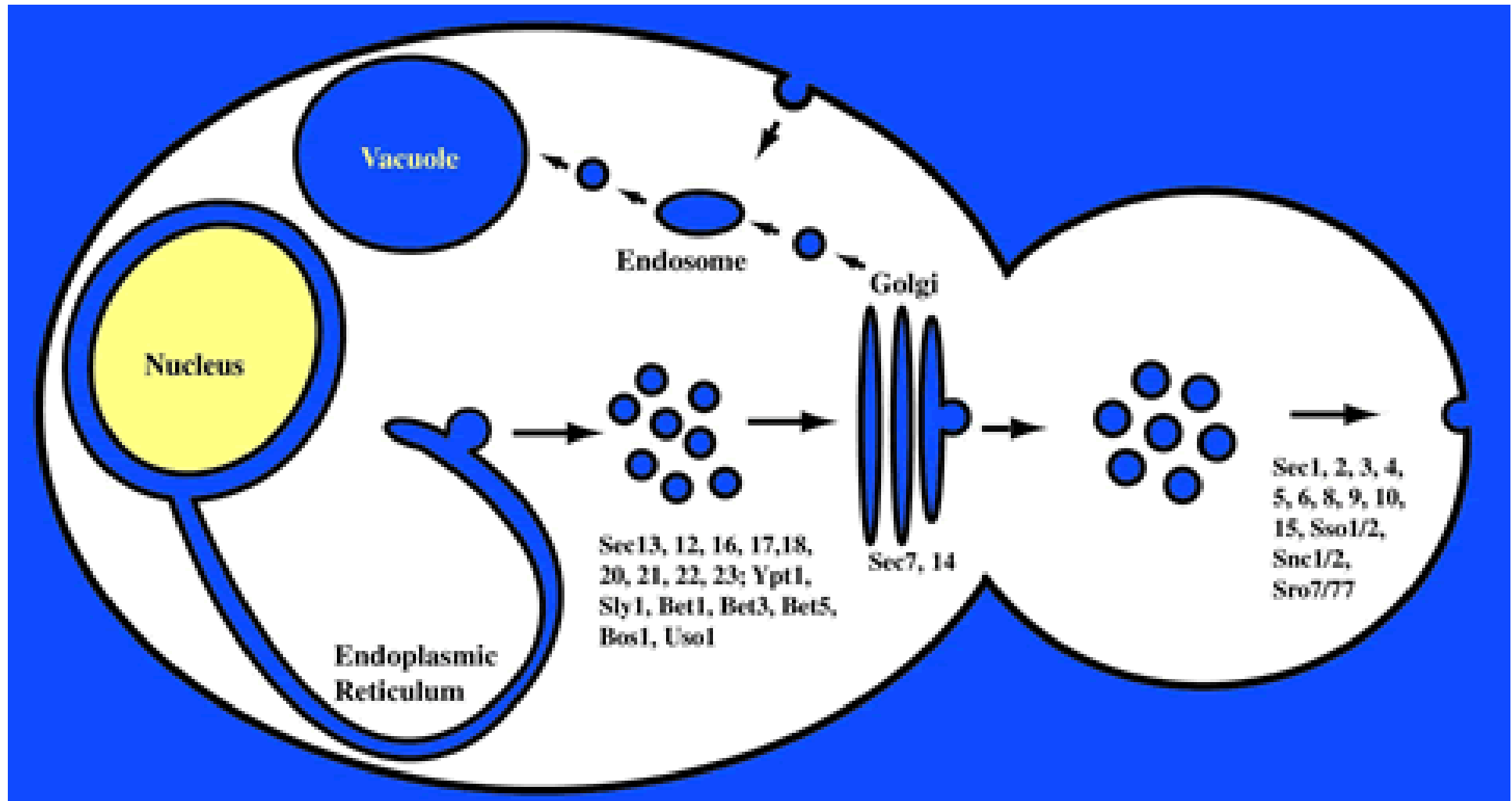


Jestliže syntéza bílkovin pokračuje, ale sekrece je zastavena, vzrůstá specifická hmotnost buněk a v hustotním gradientu jsou těžší!

Schekman (1982) provedl NG mutagenezi u kvasinek *S. cerevisiae* a po odstranění NG inkuboval kulturu 60 min při 37 °C.

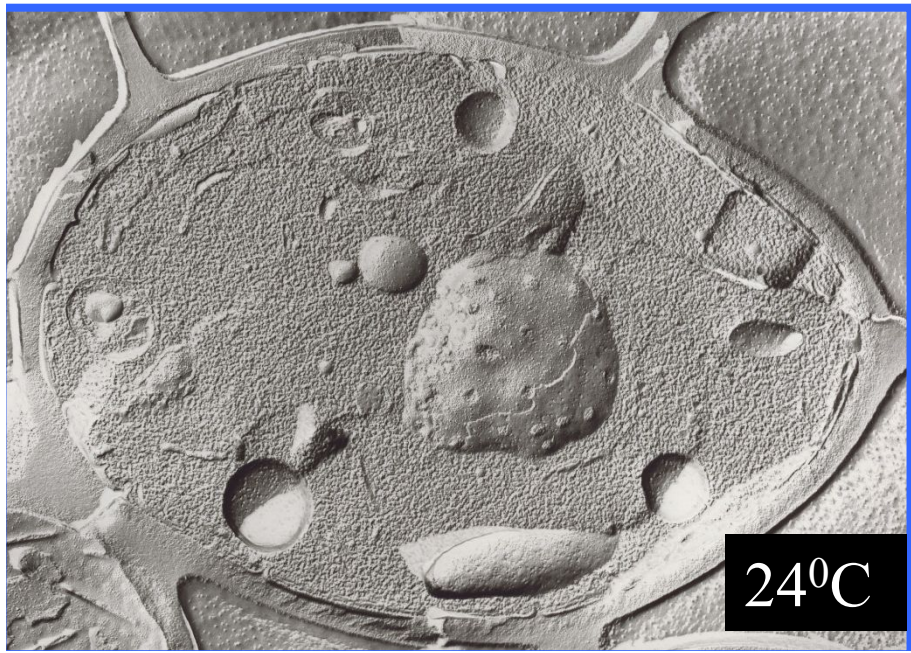
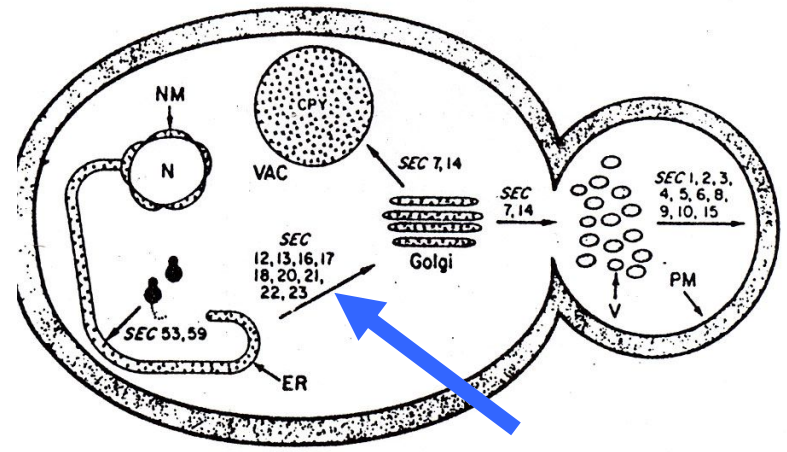
Následně buňky centrifugoval v gradientu sacharózy a izoloval nejtěžší frakci buněk. Tuto frakci nechal narůst při 24 °C na agaru a narostlé kolonie testoval na termosensitivitu. Buňky, které rostly při 24 °C a nerostly při 37 °C (asi 1800 kolonií) pak testoval na místo bloku v sekreční dráze (hustotní gradient, elektronová mikroskopie)

Geny kontrolující průběh sekreční dráhy v kvasinkové buňce – termosensitivní mutanty, zastavující sekreční dráhu na vyznačených místech z důvodu termolability proteinu



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

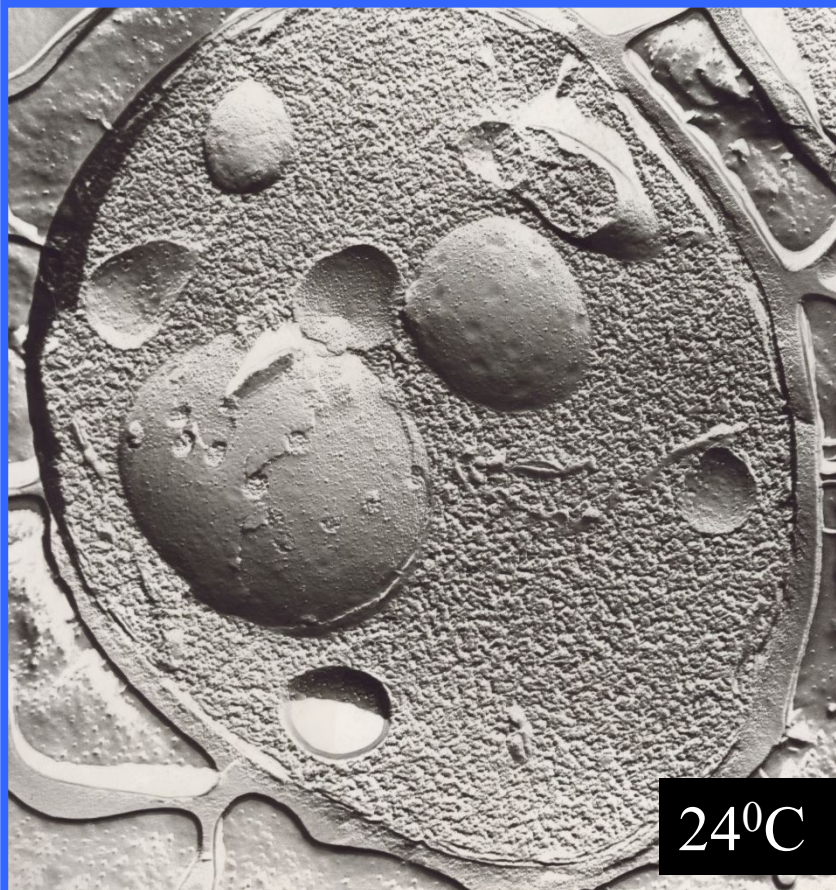
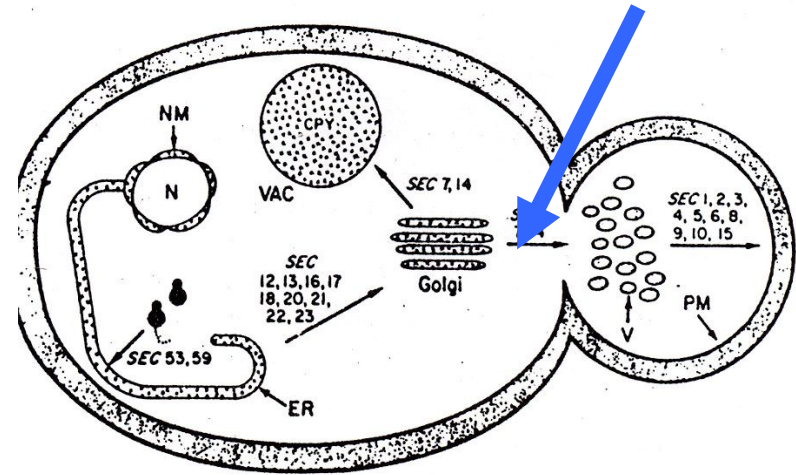




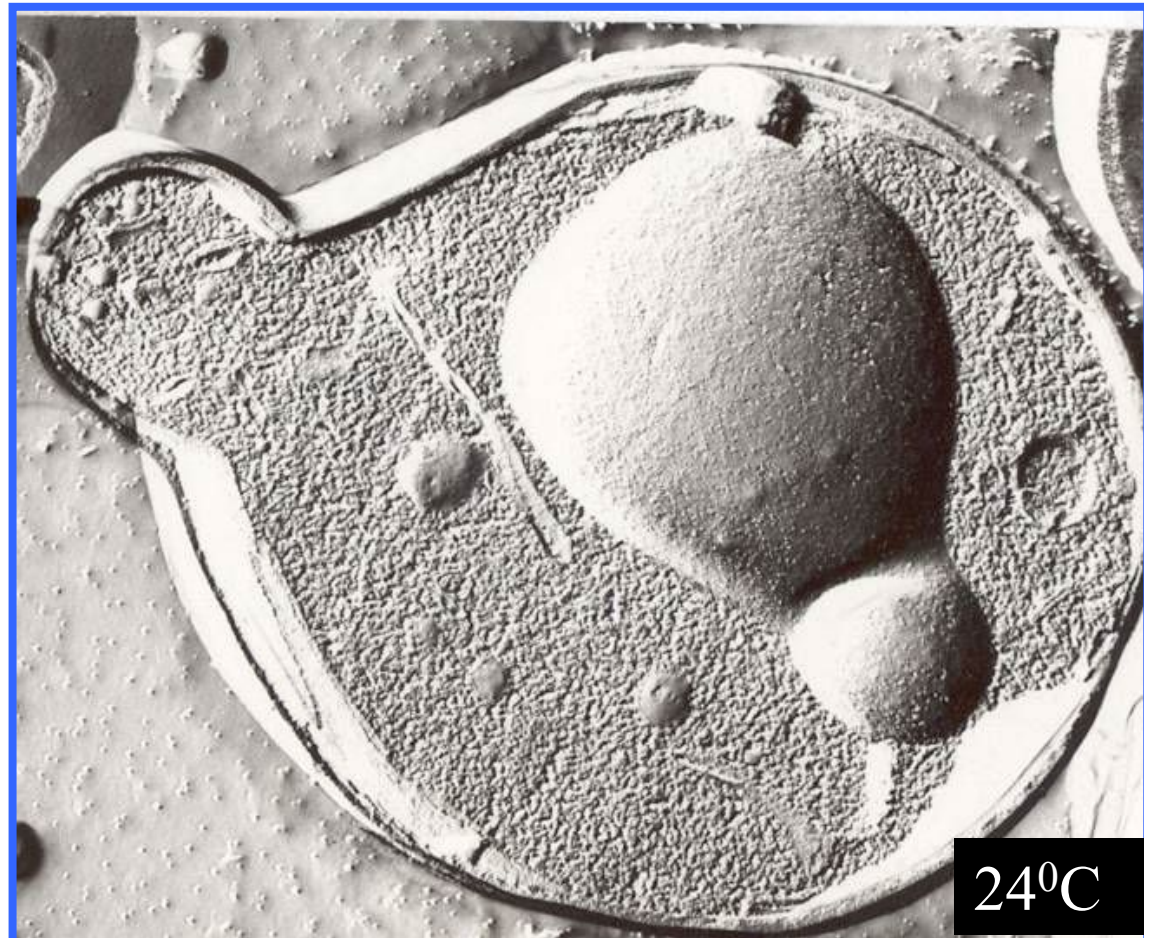
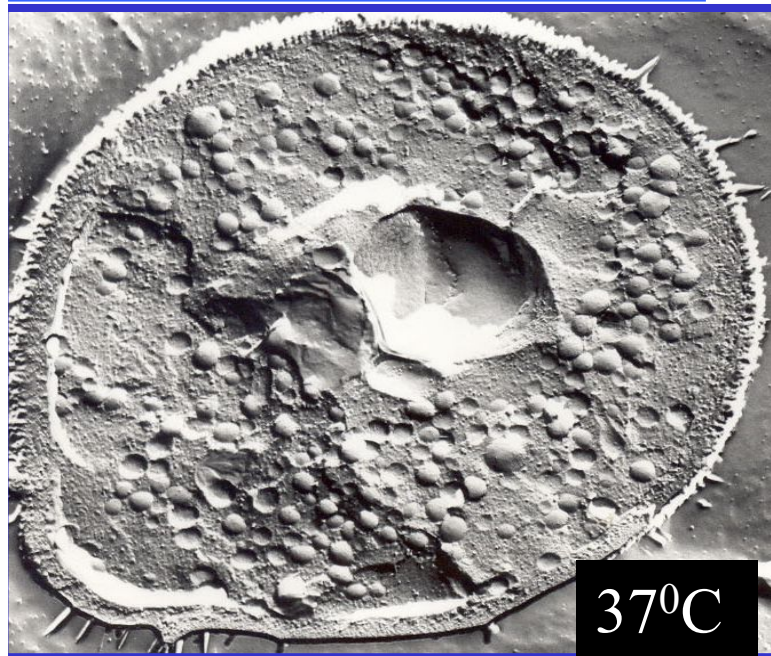
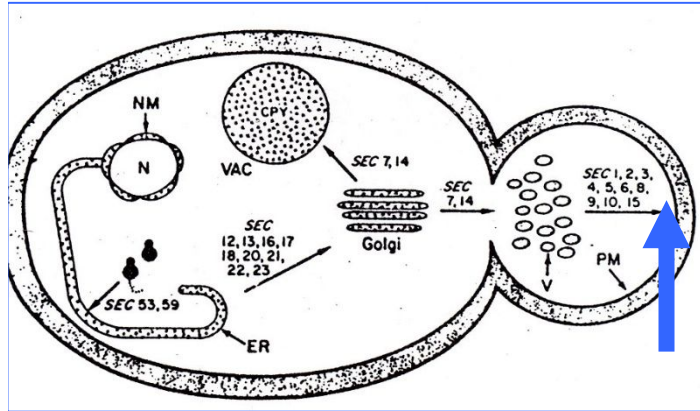
Sekreční mutanta *S. cerevisiae*

sec 7

Transfer z 25 °C do 37 °C



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



Jak jsou geny (genové produkty) seřazeny podél sekreční dráhy ?

křížení: α sec 18 x β sec 7 \rightarrow blok ER

sec 18 - blok ER

sec 7 - blok GA

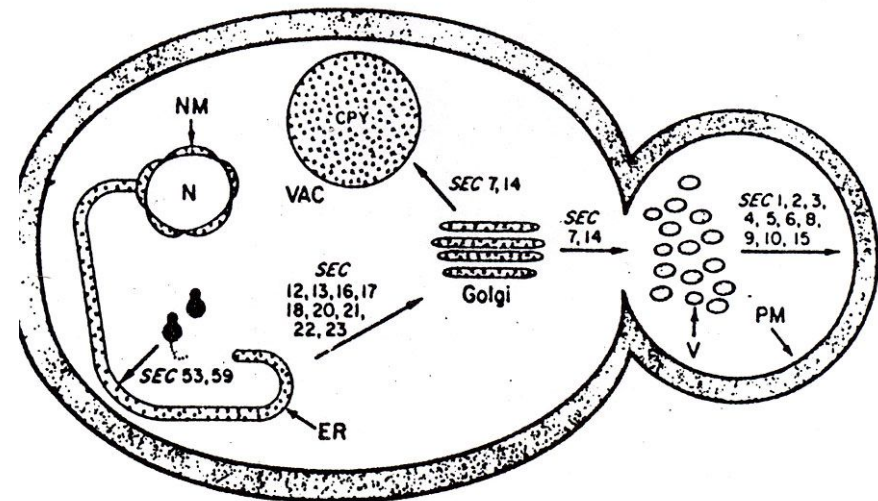
křížení: α sec 7 x β sec 1 \rightarrow blok GA

sec 1 - blok VES

sec 7 - blok GA

Produkty genů zasahují do sekreční dráhy v pořadí:

sec 18 \rightarrow sec 7 \rightarrow sec 1



Jaký význam má pasáž přes sekreční kompartmenty?

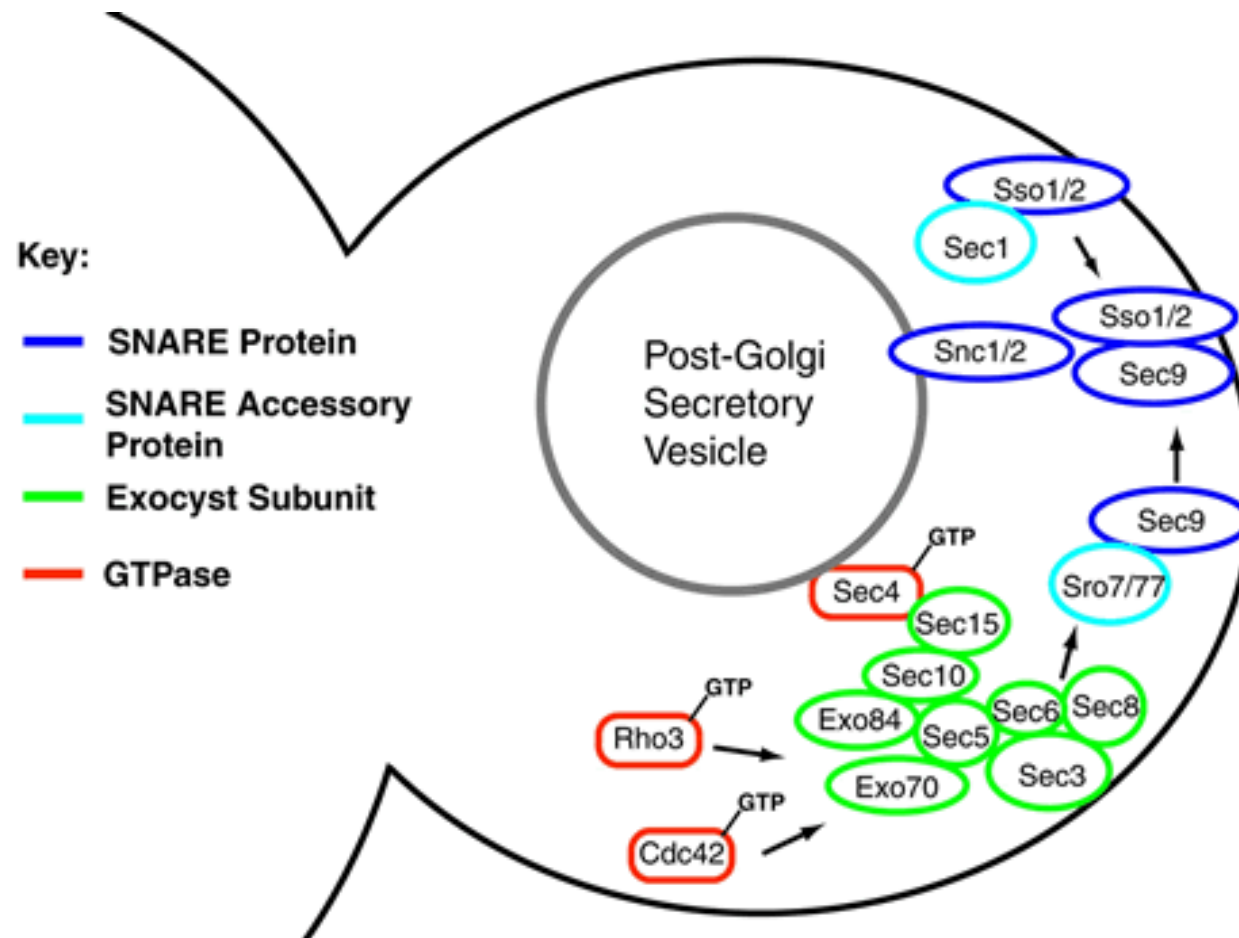
Kvasinky secernují mannanproteiny, které se ukládají ve stěně. Ty mají funkci strukturální nebo katalytickou (např. invertáza MV 270 000, z toho 55% je mannan

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



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.

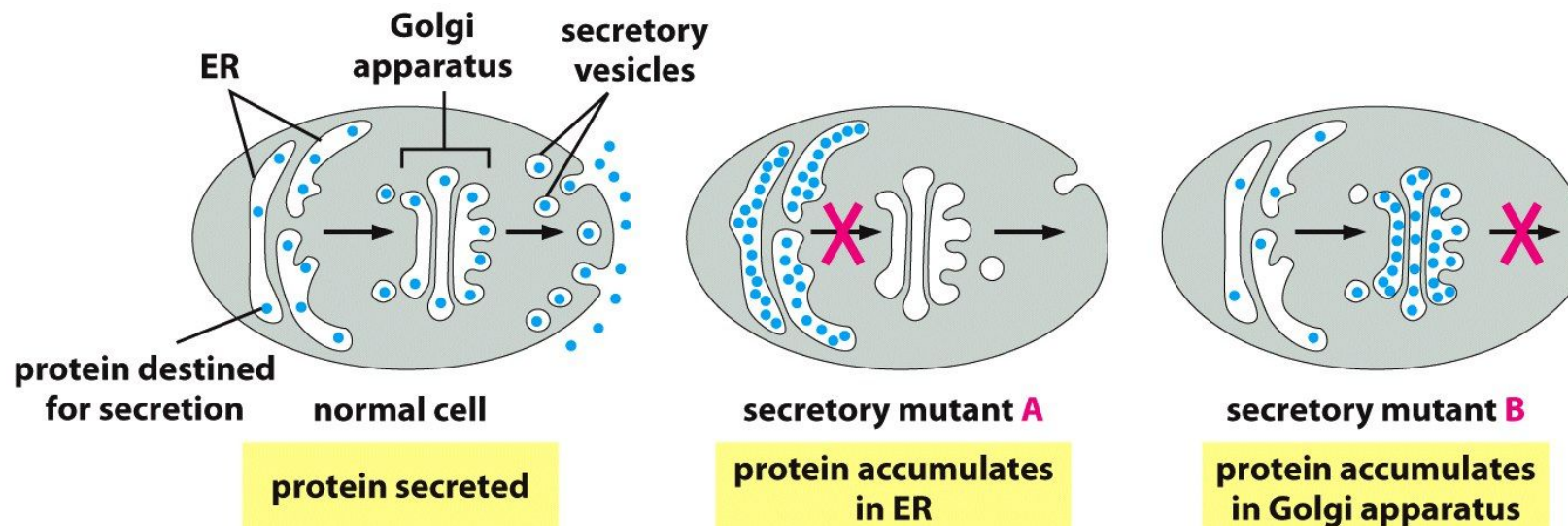
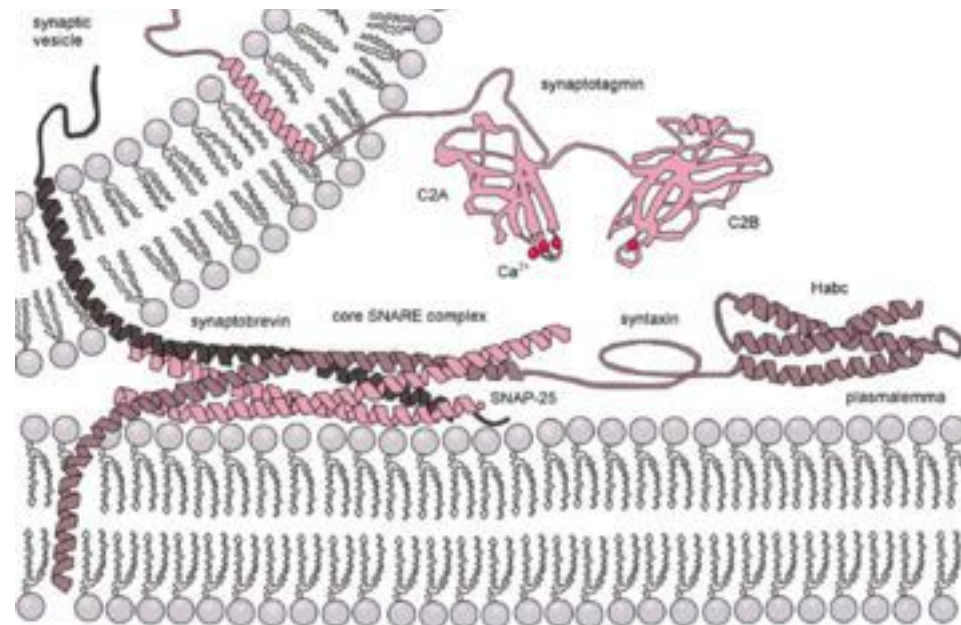
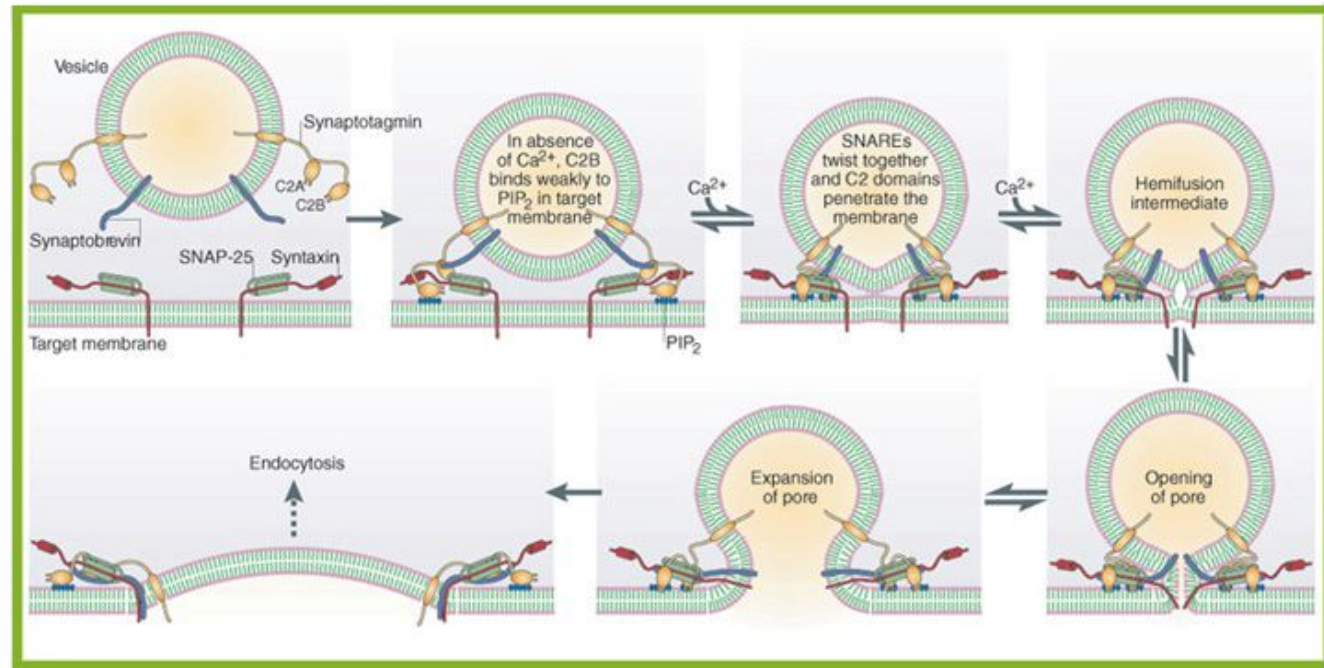


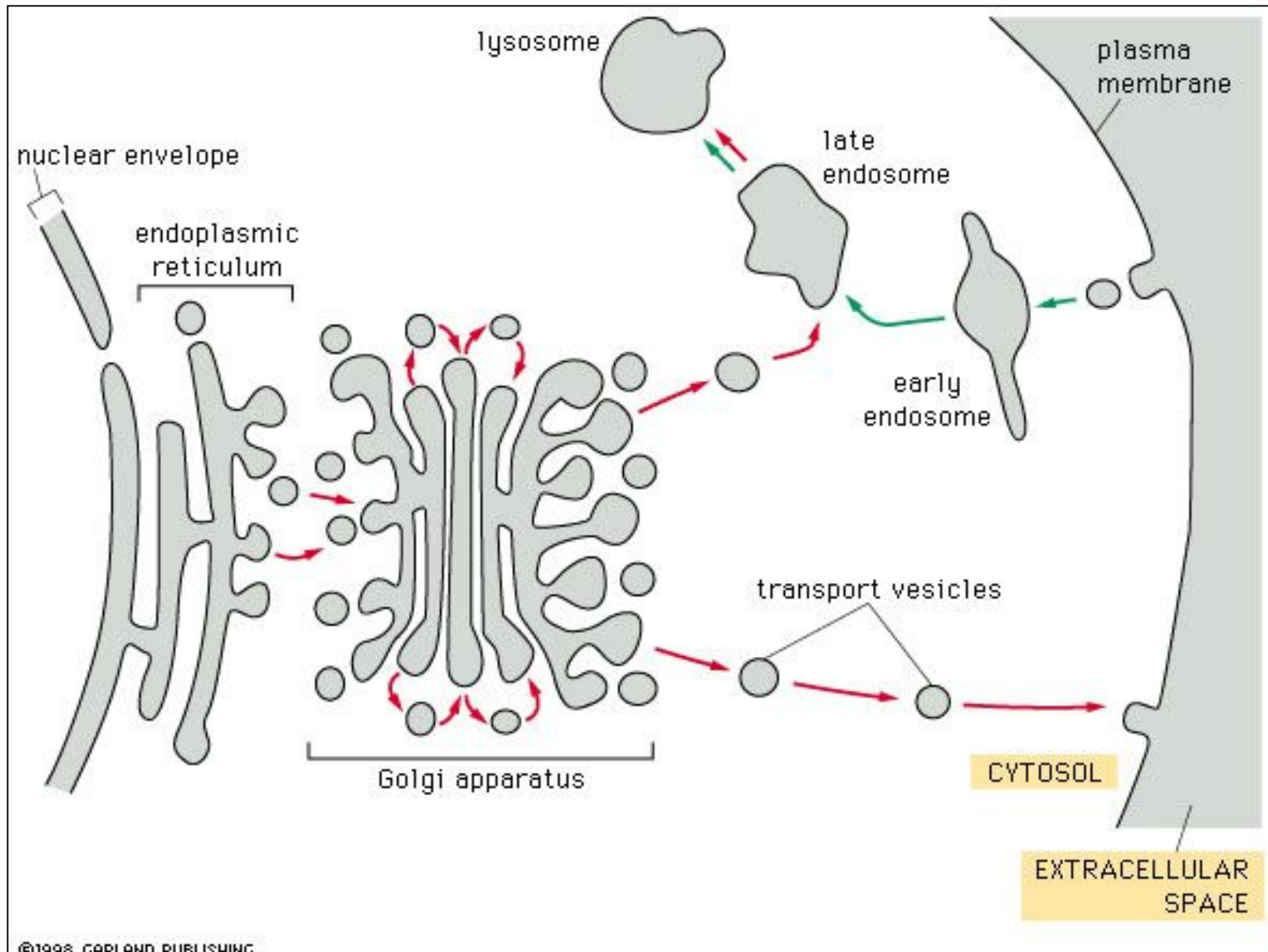
Figure 15-30 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Exocytosa

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



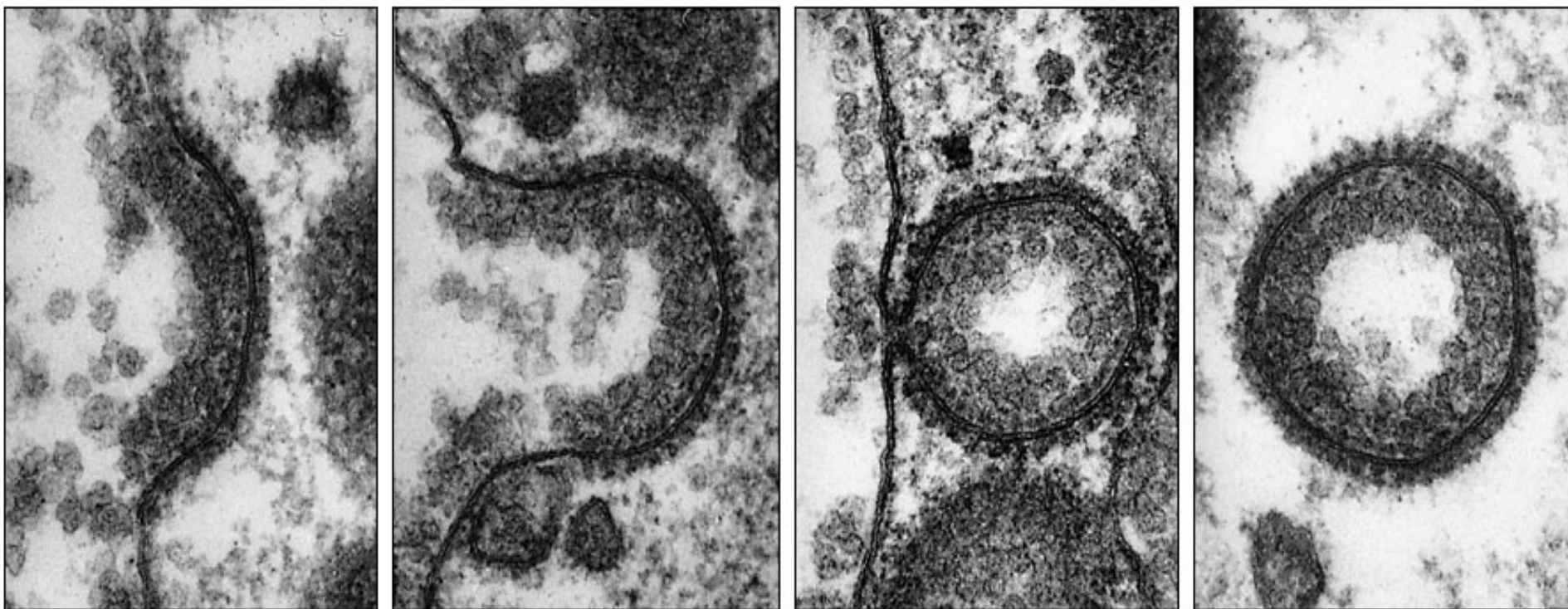
Endocytóza



Jak lze sledovat postup přijímaných molekul endocytózou:

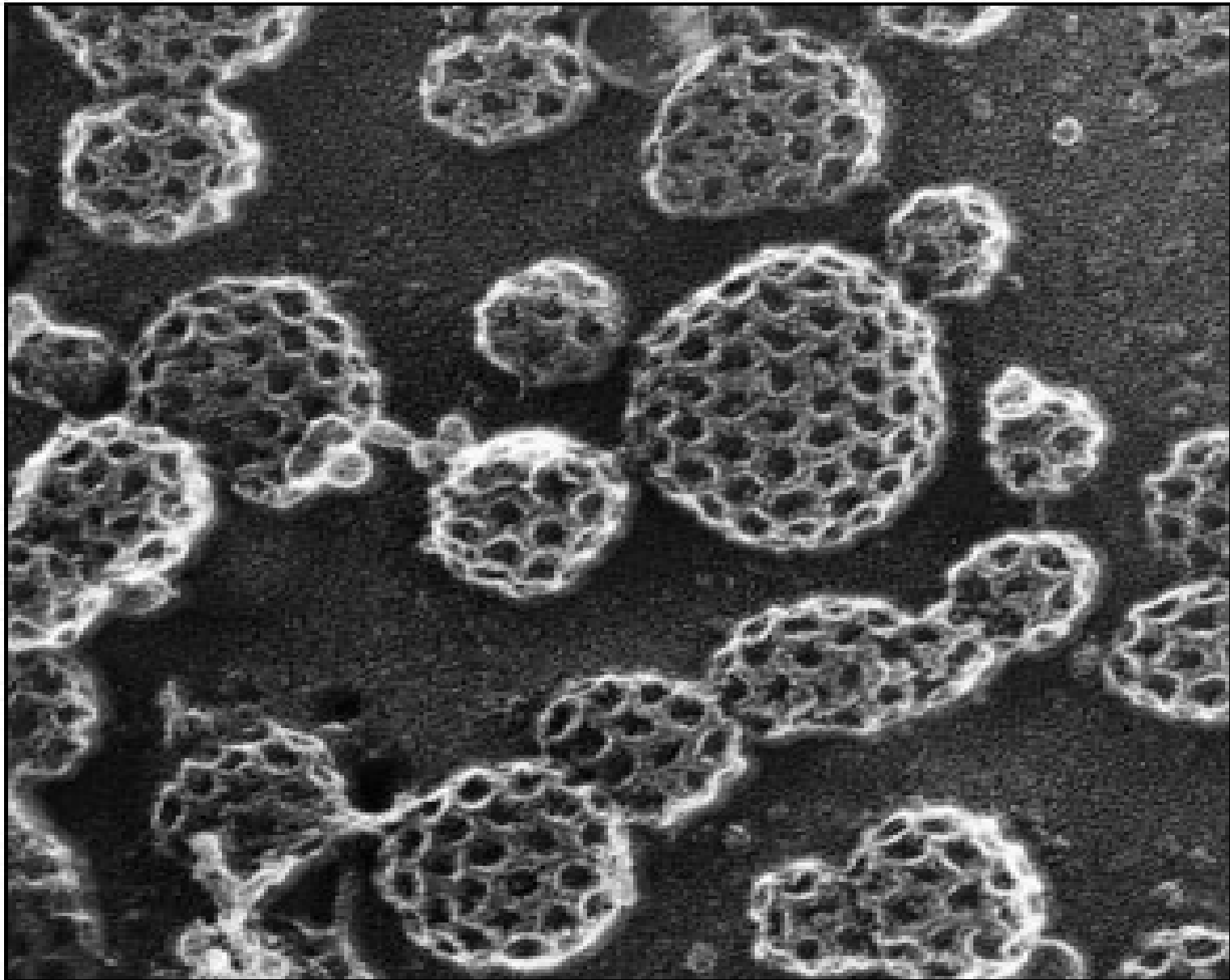
- radioaktivní polypeptid n. polysacharid
- ferritin (na ultratenkých řezech)
- FITTC - fluorescencí zabarvený substrát (luciferáza) se objeví nejprve ve frakci měchýřků - **endosomy**, pak ve frakci **lyzomů**

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



(A)

0.1 μm



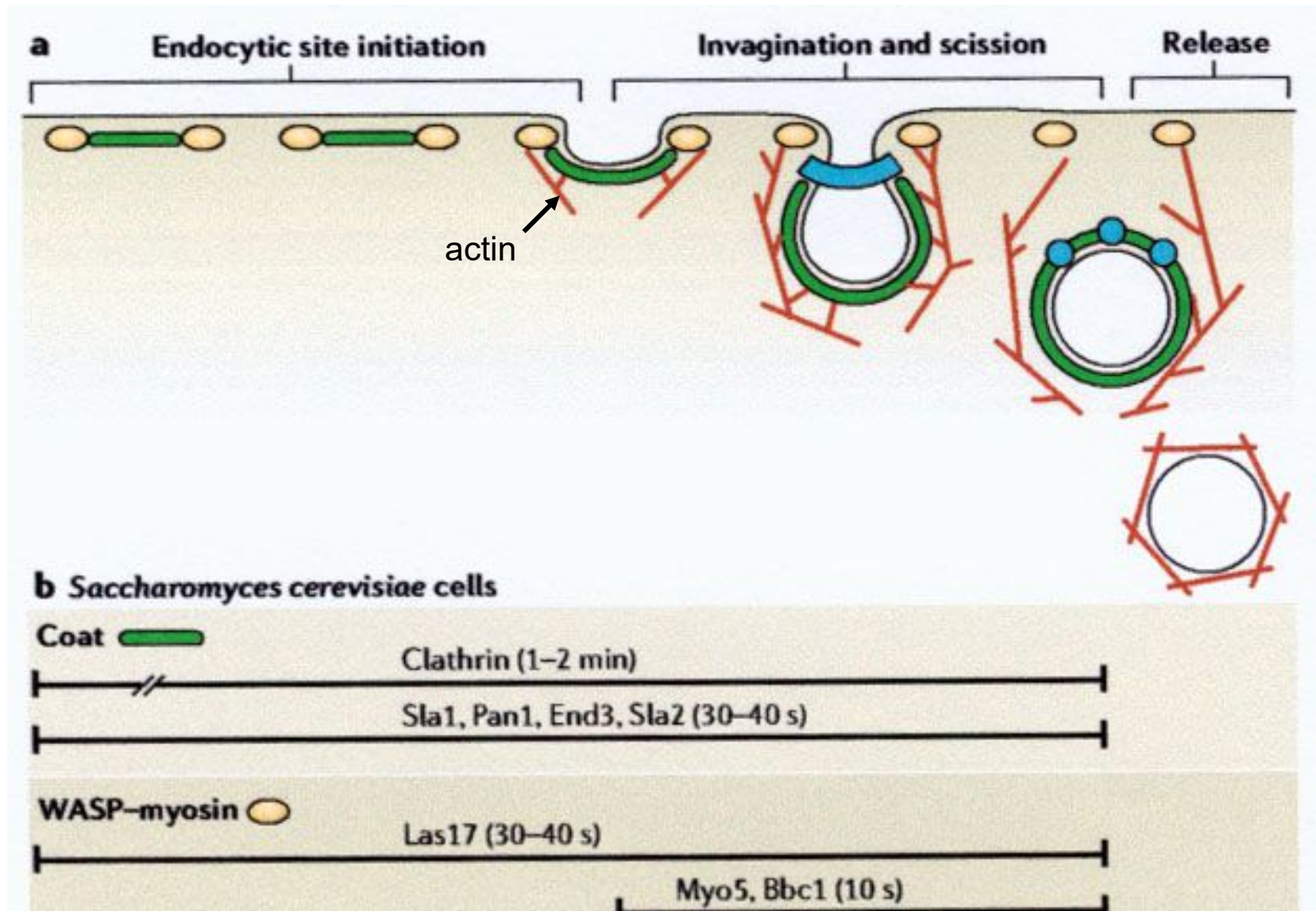
(B)



0.2 μm

©1998 GARLAND PUBLISHING

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.

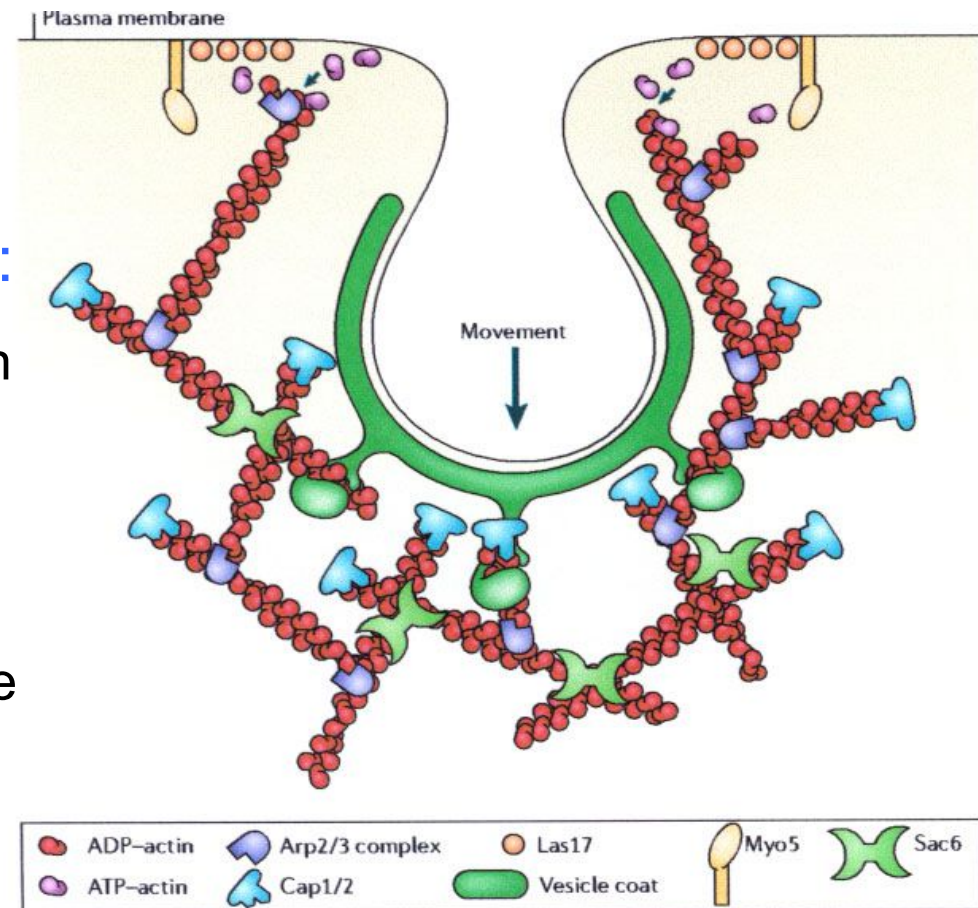


Figure 4 | **Current model for actin-driven endocytic internalization.** This schematic diagram illustrates putative functions of different actin-cytoskeleton proteins during endocytic internalization in *Saccharomyces cerevisiae*. Las17 (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) in mammals) together with 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

