

Sekreční dráha a endocytóza (vesikulární transport)

Charakteristika pojmů

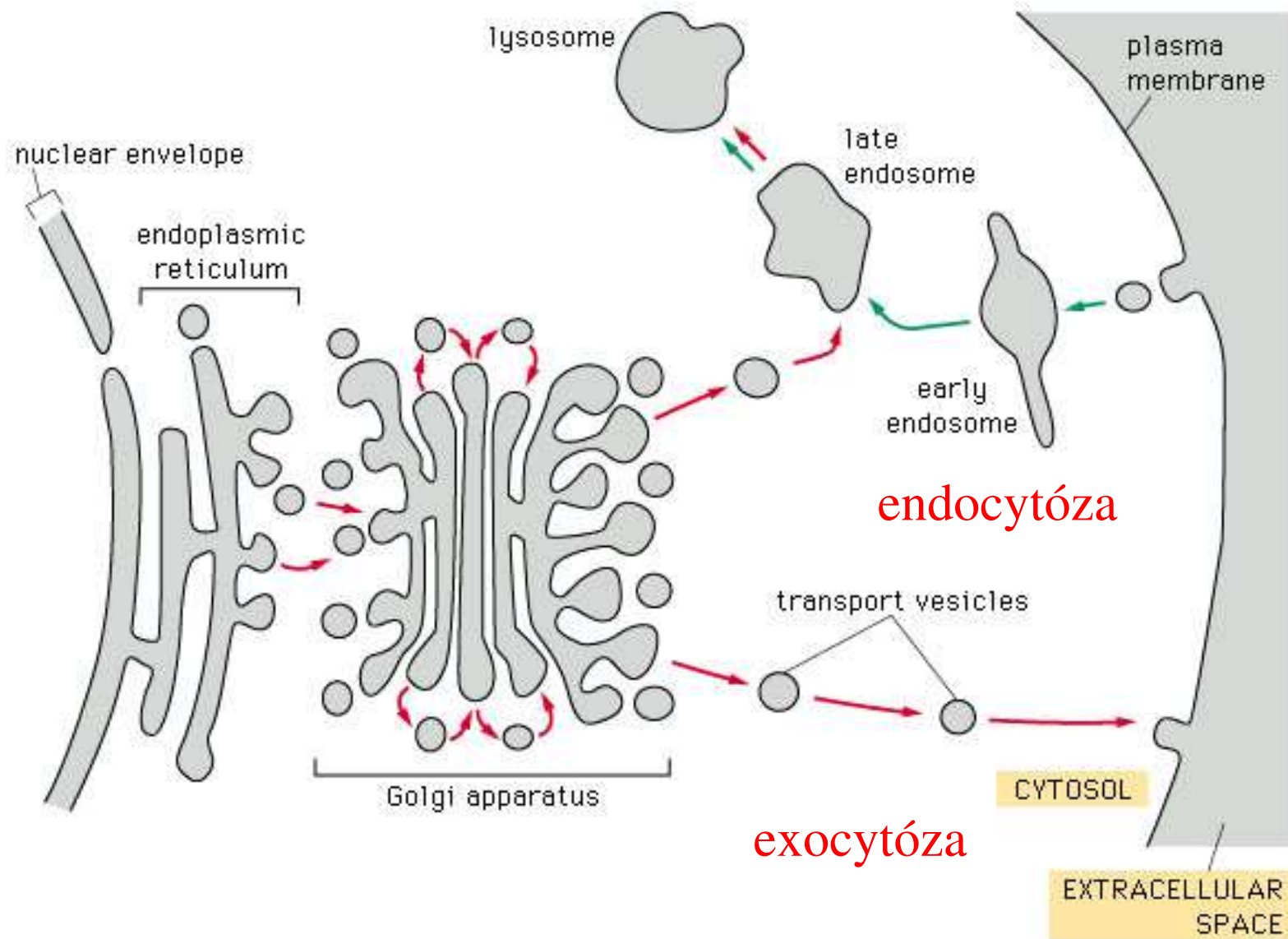
endocytóza

pinocytóza

fagocytóza

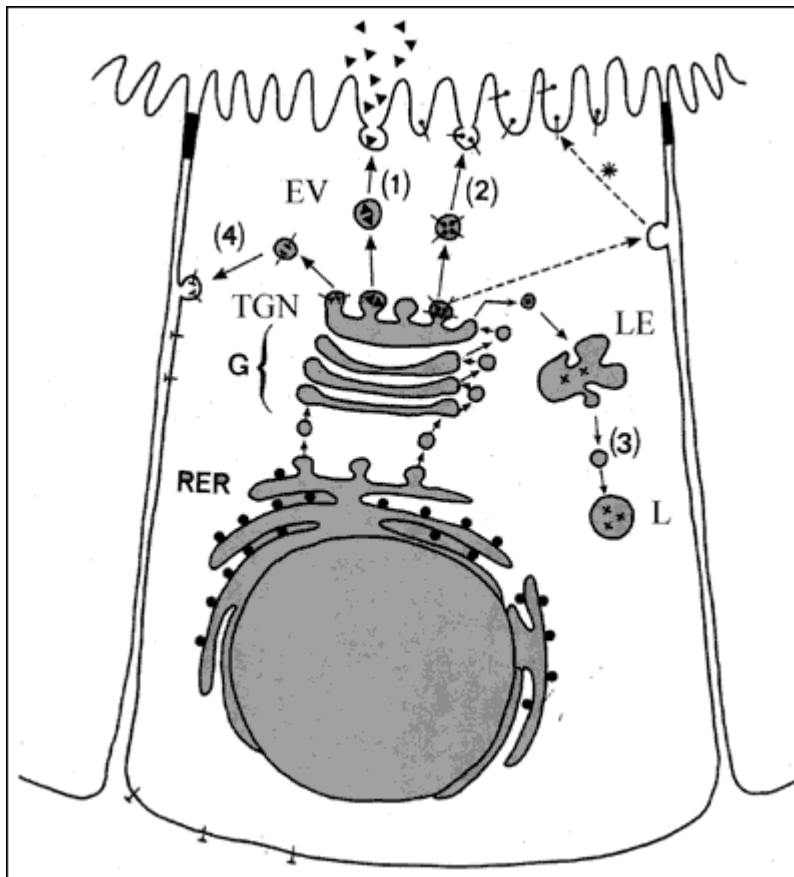
exocytóza

sekrece



Polarizovaná sekreční buňka

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



Při sekreci se plocha PM zvětšuje o plochu membrán sekrečních vāček (u sekrečních buněk pankreatu až o 140% za 1 hod). Plocha PM se tedy musí redukovat, a to endocytózou.

Kompartmenty sekreční dráhy:

ER → GA → vesikly

Kompartmenty endocytózové dráhy:

endosomy → lysosomy (vakuoly v
rostlinných buňkách a v buňkách hub)

Jak byla objevena sekreční dráha?

- ve žlázových buňkách jsou tyto sekreční kompartmenty abundantní
 - izotopové techniky prokázaly že po pulse-chase je radoaktivita nejprve nad ER, pak GA a pak u povrchu
- v zymogeních granulích

Vědecké problémy k řešení:

1. Jak je kontrolován postup sekrečního produktu po sekreční dráze?
2. Jaký je molekulární mechanismus spuštění endocytózy a exocytózy?
3. Jak jsou funkčně svázány procesy endocytózy a exocytózy?

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

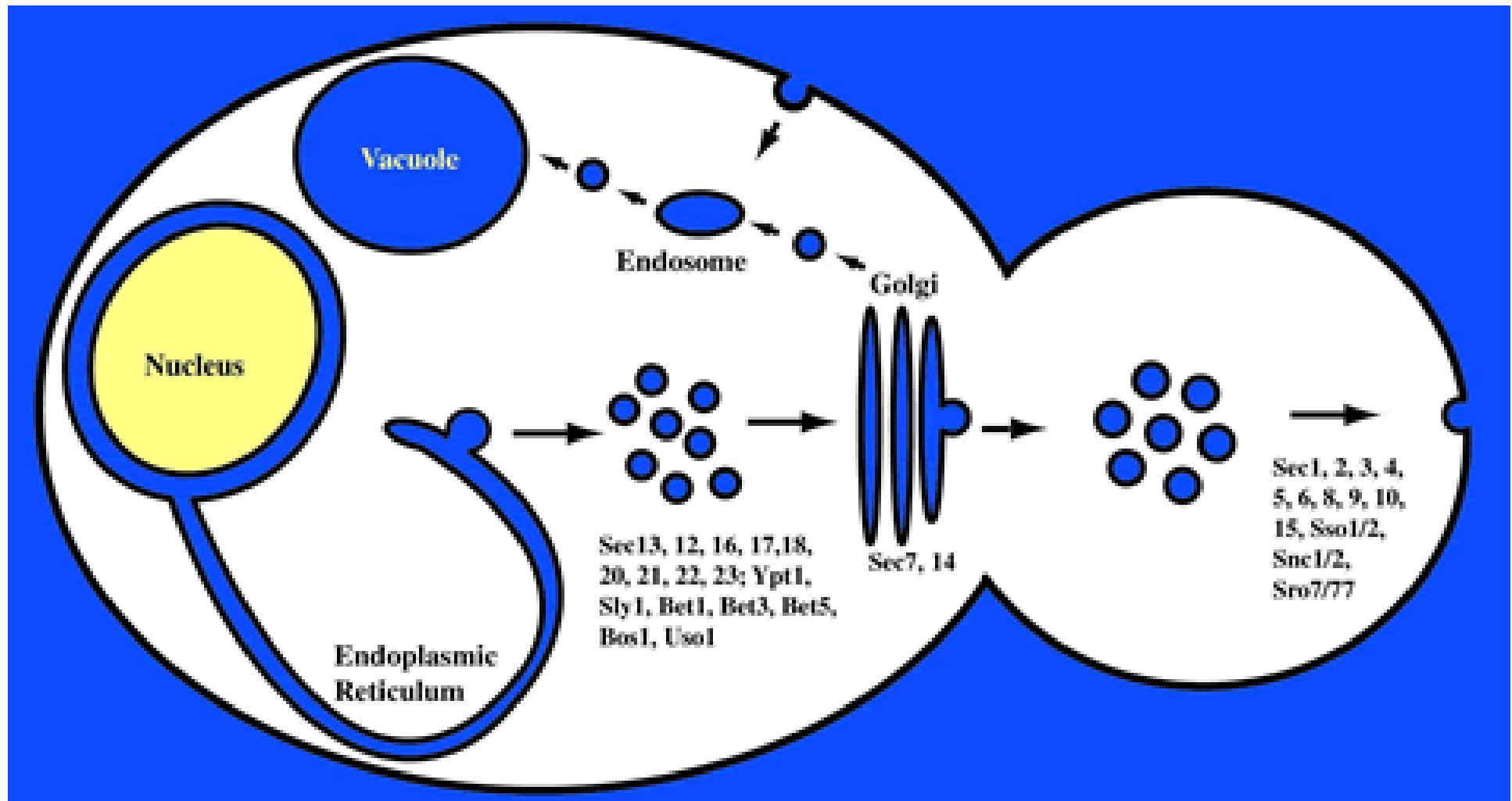


Randy Schekman

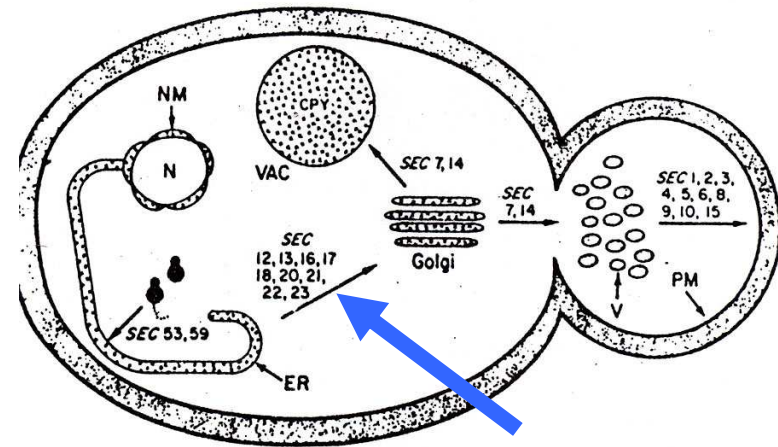
[James E. Rothman](#) , [Randy W. Schekman](#) a [Thomas C. Südhof](#)

„za objevy strojů regulujících pohyb vezikul, hlavního transportního systému v našich buňkách“ (Nobelova cena za medicínu a fyziologii 2013).

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



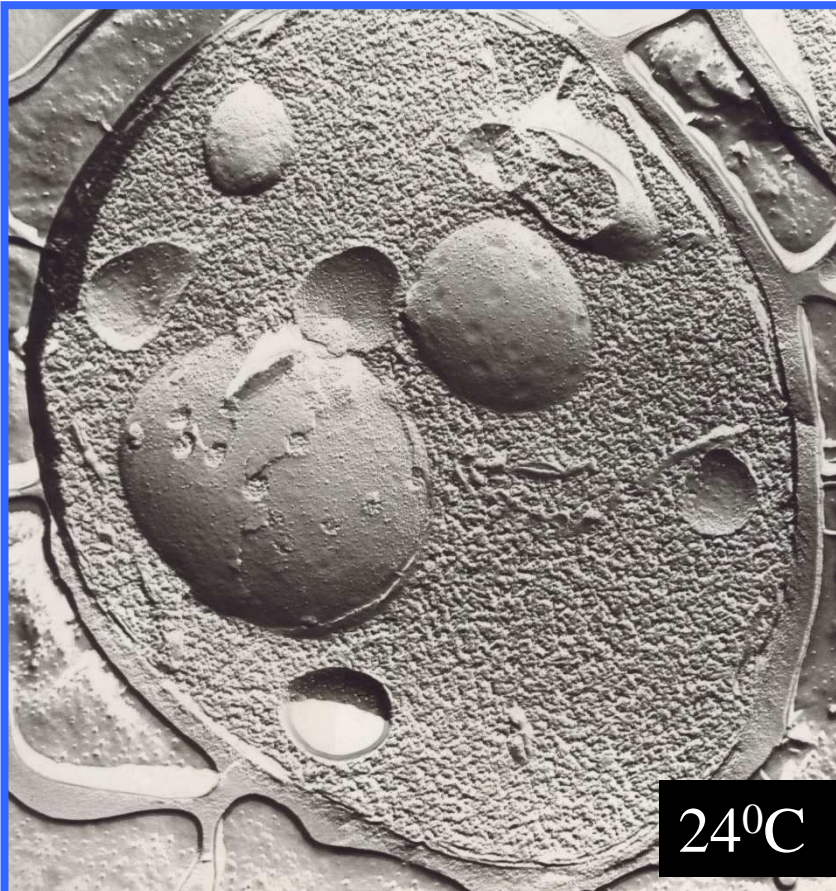
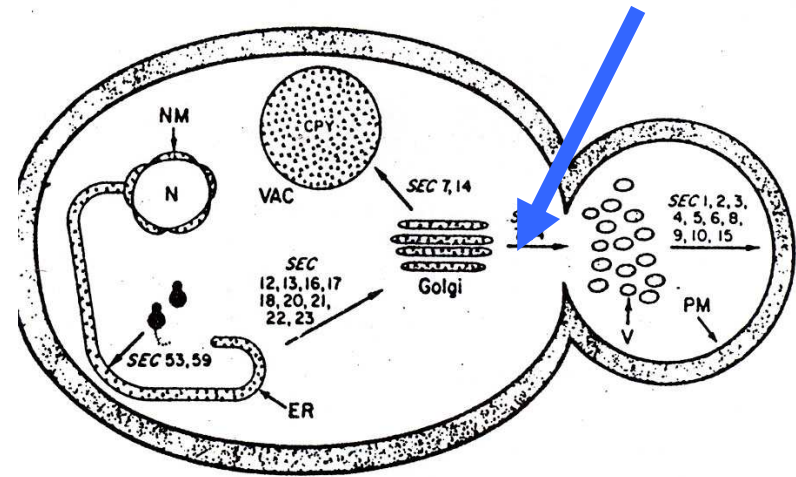
Sekreční mutanta *S. cerevisiae*
sec 18, transfer 25 °C do 37 °C



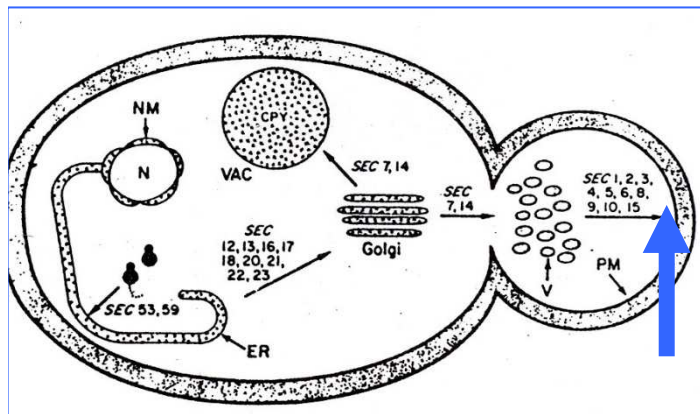
Sekreční mutanta *S. cerevisiae*

sec 7

Transfer z 25 °C do 37 °C



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

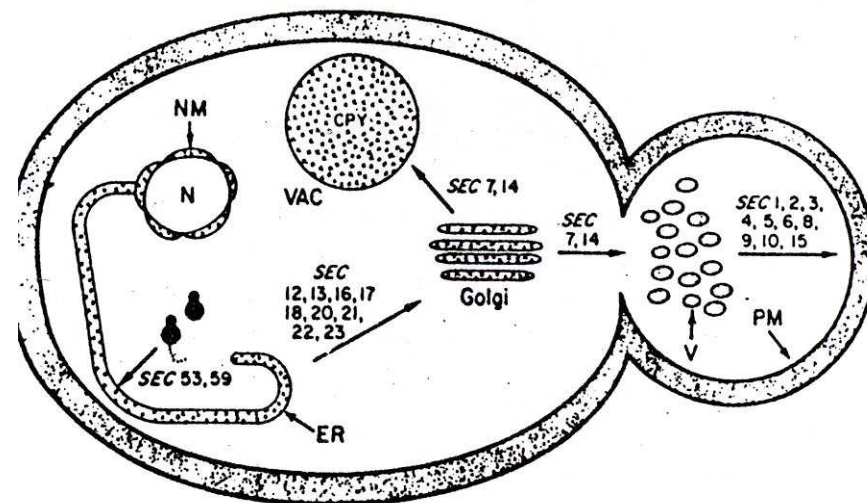


Jak jsou geny (genové produkty) seřazeny podél sekreční dráhy ?

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

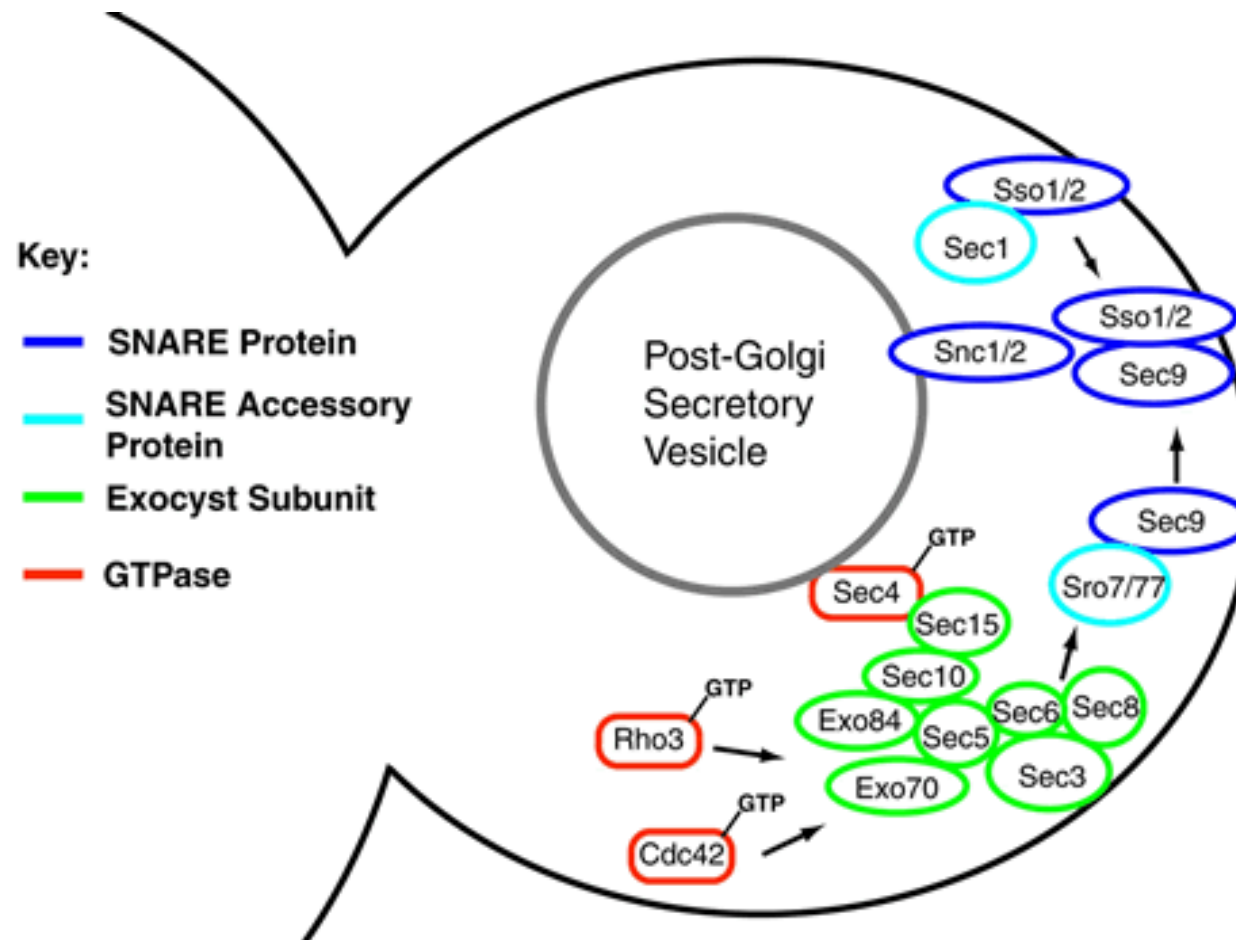


Jaký význam má pasáž přes sekreční kompartmenty?

Kvasinky secernují mannanproteiny, které se ukládají ve stěně, 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.

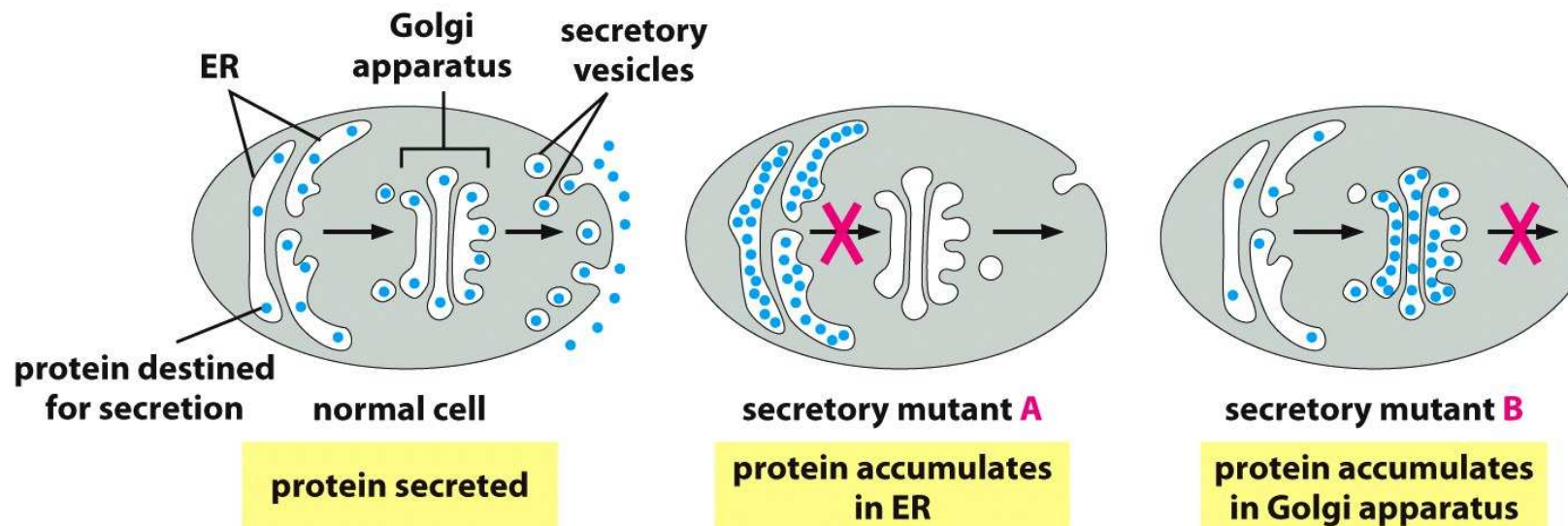
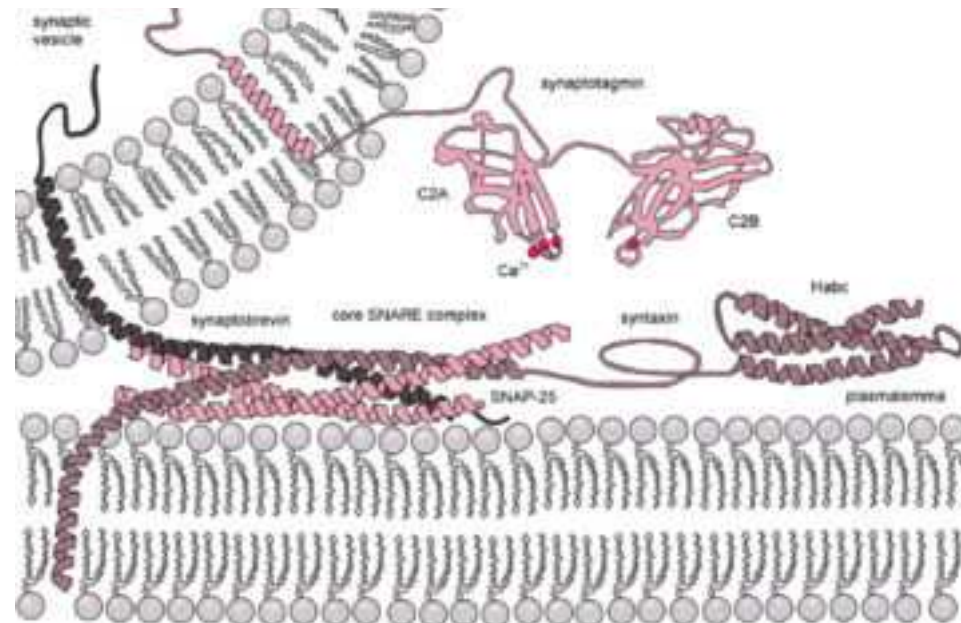
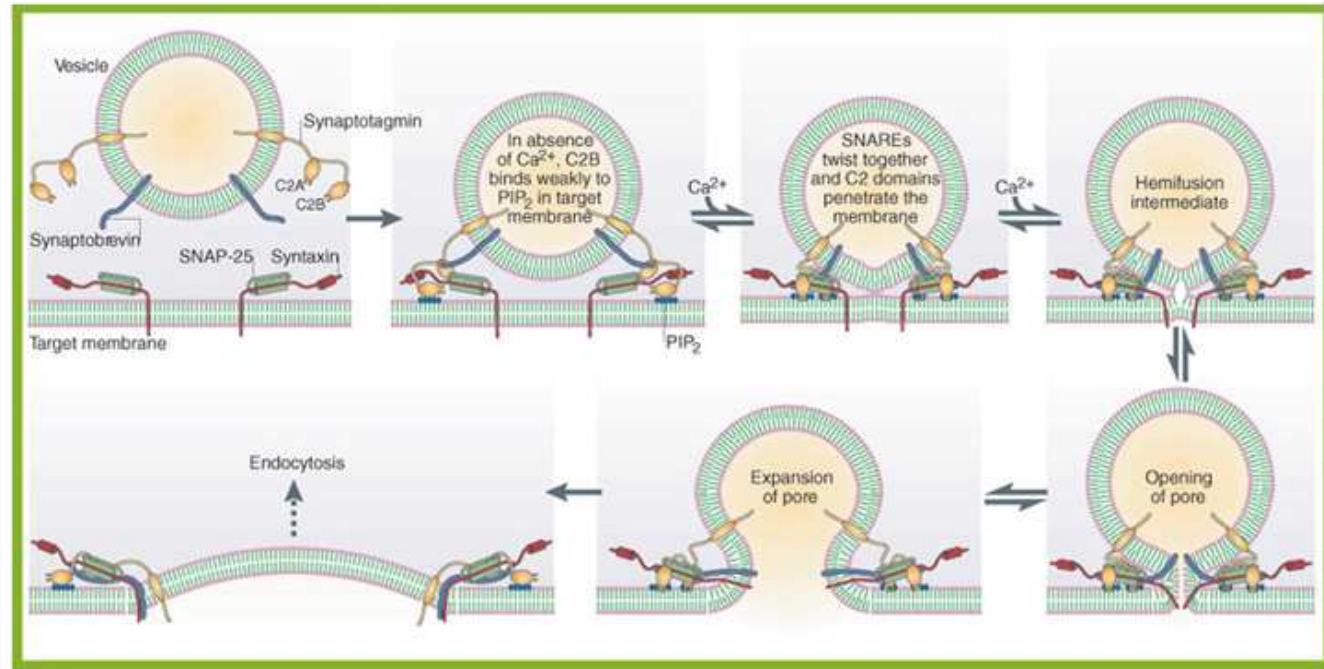


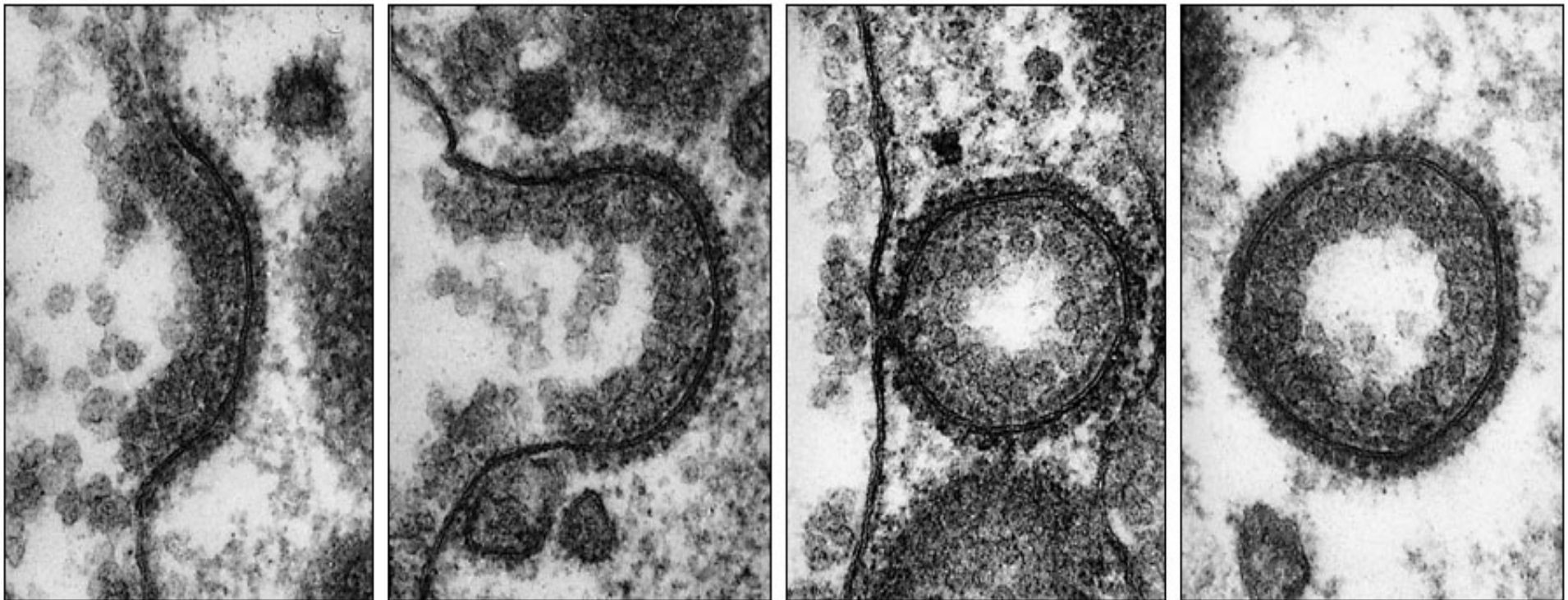
Figure 15-30 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Exocytosa

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

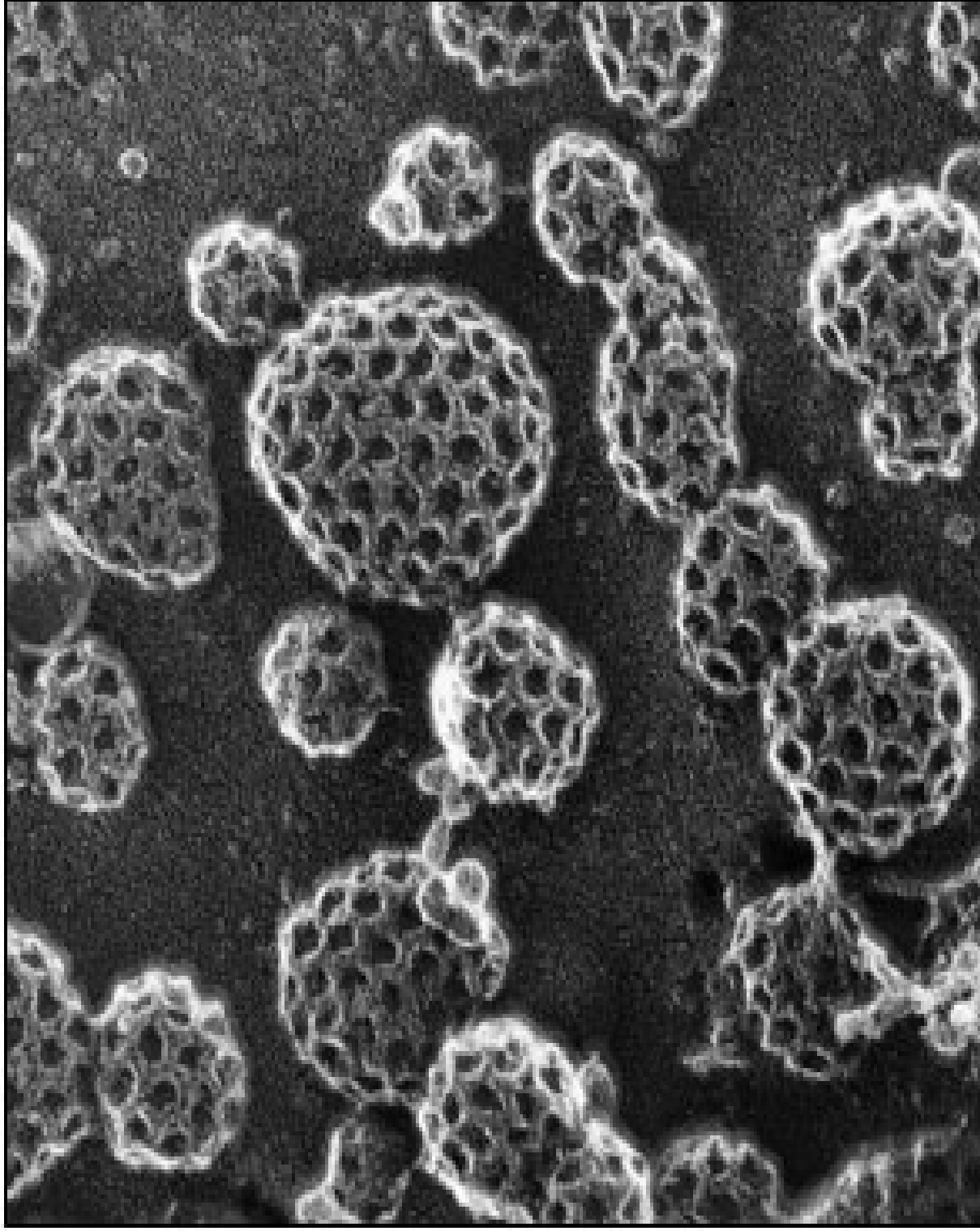


Endocytóza: invaginace plasmatické membrány. Tvorba a odštěpení váčku - endosomu



(A)

0.1 μm

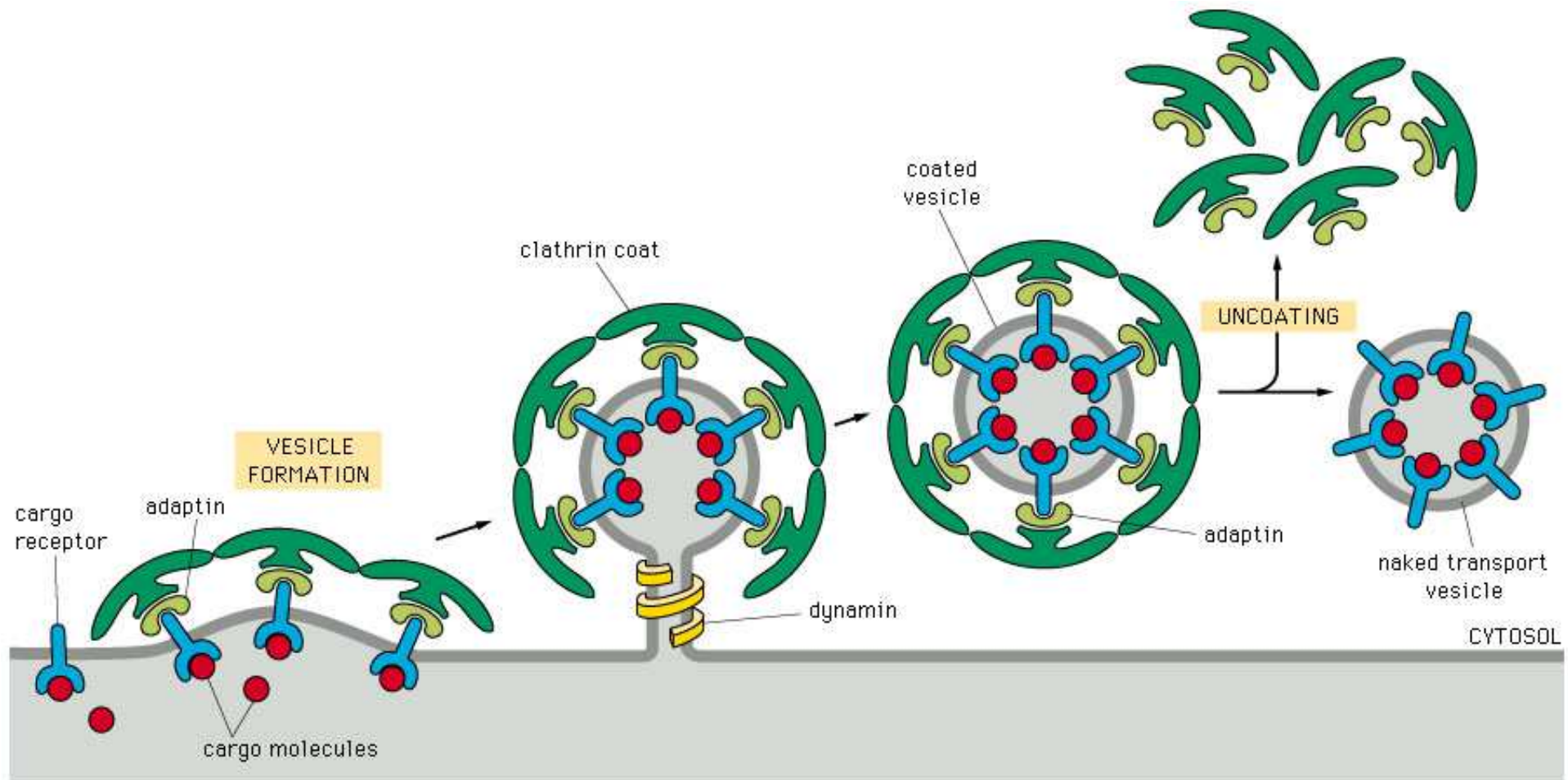


(B)

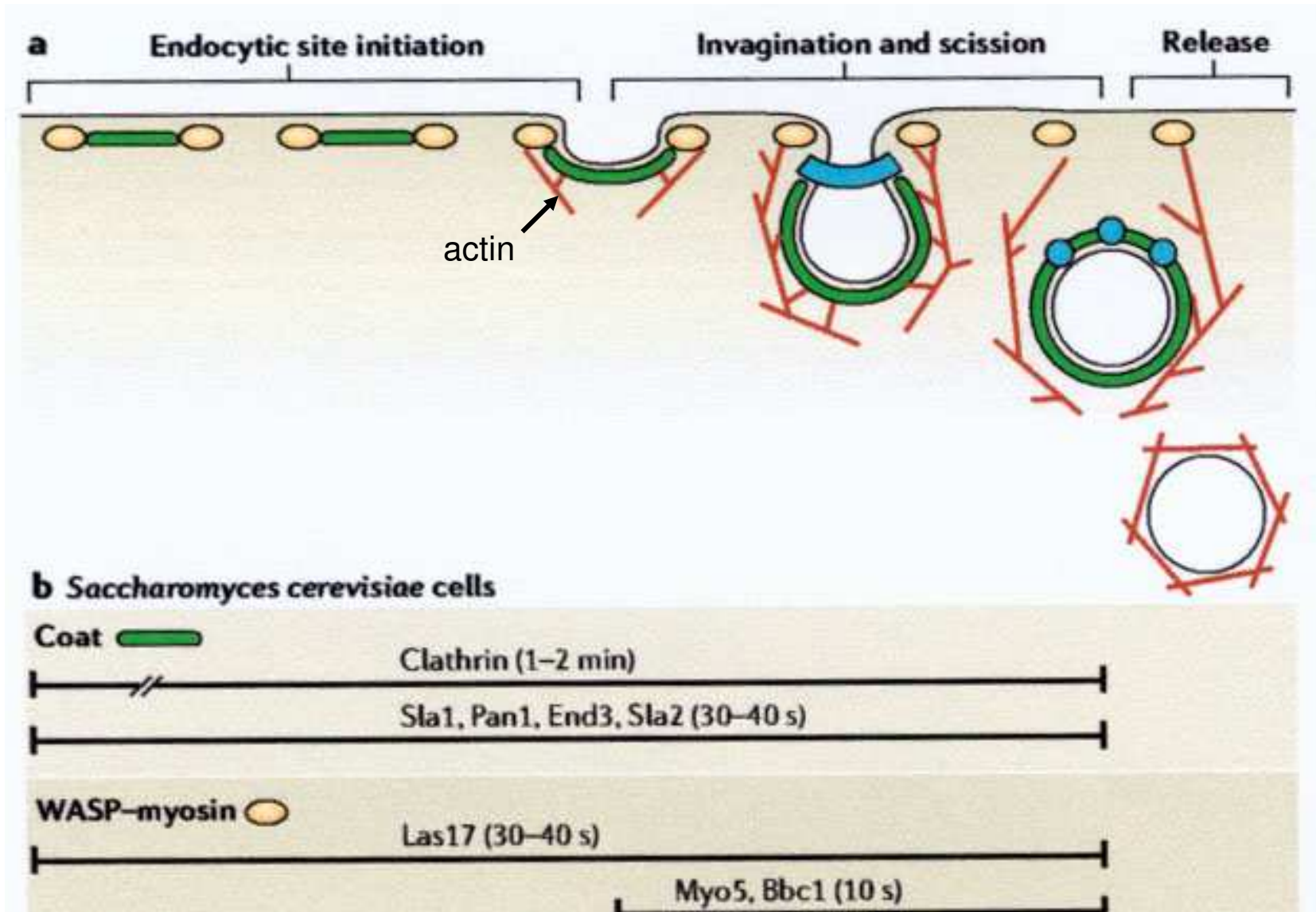


0.2 μm

Účast některých proteinů na vytváření (assembly) endocytického měchýřku



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.

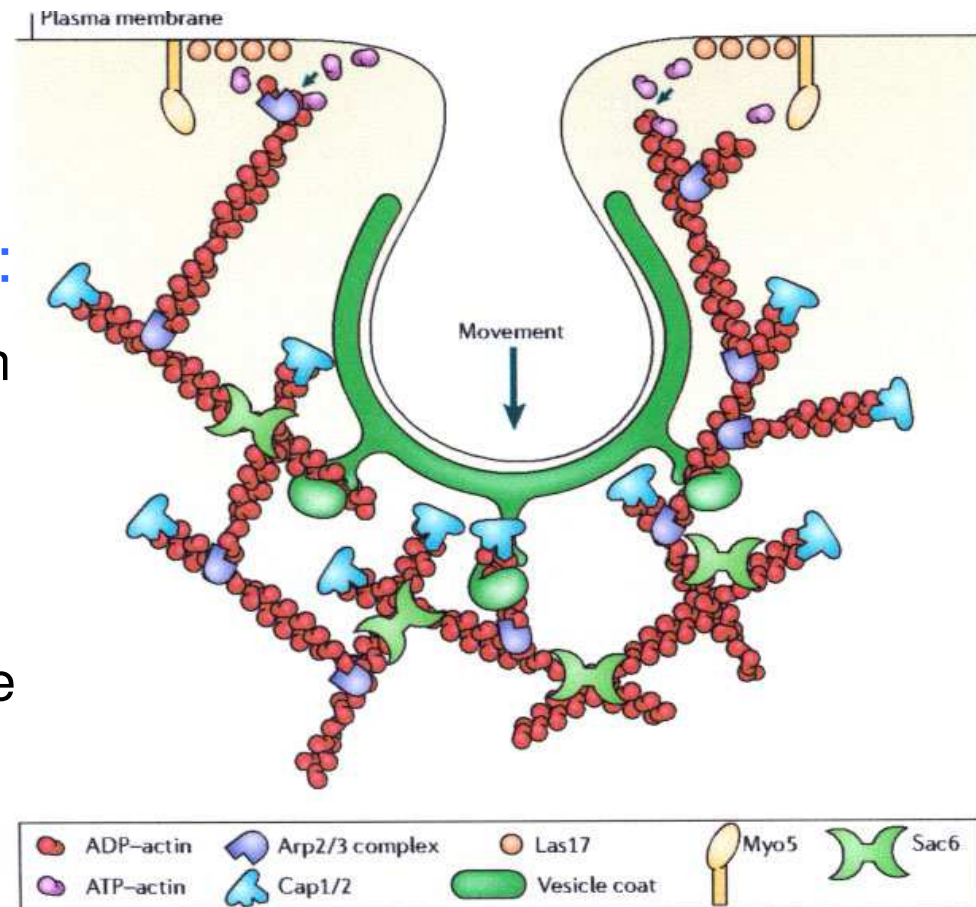


Figure 4 | **Current model for actin-driven endocytic internalization.** This schematic diagram illustrates putative functions of different actin-cytoskeleton proteins during endocytic internalization in *Saccharomyces cerevisiae*. Las17 (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) in mammals) together with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

