**Лекція №3**

 **Тема: Внутрішньоклітинний транспорт біологічних молекул**

 У зв’язку з тим, що в компартменталізації клітини відіграють центральну роль білки (здійснюють каталіз реакцій, вибірково транспортують малі молекули всередину органел та з них, слугують специфічними поверхневими, які спрямовують нові партії білків та ліпідів до відповідних компартментів. Клітина ссавців містить біля 10 мільярдів молекул білків, що належить до 10000 різних типів, синтез майже всіх цих білків починається в цитозолі. Кожний синтезований білок специфічно транспортується до тієї органели, яка його потребує. Простежуючи шлях білка з одного компартмента до наступного, можна розібратись у заплутаному лабіринті клітинних мембран. Отже одним з найголовніших **завдань лекції** і буде – **простежити за внутрішньоклітинним переміщенням білків**.

 Багато важливих біохімічних процесів відбувається всередині мембран або на їхніх поверхнях. Наприклад під час окислювального фосфорилювання і під час фотосинтезу використовується напівпроникна мембрана для сполучення транспорту протонів із синтезом АТФ. Більш того, мембрани слугують каркасом для синтезу своїх власних компонентів. Внутрішні мембрани клітини еукаріотів створюють можливості функціональної спеціалізації різних органел, що є вирішальним фактором у розділенні багатьох процесів, які відбуваються в клітині.

 Взаємозв’язки між компартментами можна прослідкувати за допомогою особливостей синтезу і транспорту білків.

 Методи вивчення транспорту білків всередині клітини були розроблені в 60-ті роки 20 століття і вперше застосовані для спостережень транспорту з ЕПС до зовнішньоклітинного простору. Спеціалізовані секреторні клітини, такі, як ацинарні клітини підшлункової залози, містять велику кількість білкового секрету, який знаходиться в секреторних везикулах. У відповідь на стимуляцію клітини зовнішнім сигналом вміст цих пухирців швидко вивільнюється у зовнішньоклітинний простір шляхом екзоцитозу. **Цей процес відомий як регульована секреція.**

 Його слід розрізняти від **конститутивної секреції**, другої форми екзоцитозу, який відбувається постійно, у відсутності стимулюючого сигналу. Ацинарні клітини підшлункової залози секретують різні травні ферменти (амілазу, ліпазу, дезоксирибонуклеазу і рибонуклеазу), а також попередники ферментів, так звані зимогени (наприклад, трипсиноген і хімотрипсиноген). Ці попередники активуються після їх специфічного розщеплення ферментами протеазами.

 Завдяки тому, що група білків, які синтезуються в ацинарних клітинах підшлункової залози, призначена для секреції, ми можемо судити про шляхи їх транспортування від місця синтезу до місця вивільнення. Цей шлях можна прослідкувати, сполучаючи радіоавтографію з електронною мікроскопією. Якщо клітини короткочасно проінкубувати з міченими тритієм амінокислотами (імпульсна мітка), а потім протягом різних часових інтервалів вирощувати в нерадіоактивному середовищі, то новосинтезовані білки в першу чергу виявляються в ендоплазматичній сітці (ЕПС), а потім в комплексі Гольджі (КГ). Пізніше мічені тритієм білки виявляються в великих, незрілих секреторних везикулах поблизу стосика Гольджі, де вони все більше концентруються; в результаті формуються зрілі пухирці, що добре розрізняються на електронних мікрофотографіях завдяки електронощільному вмісту.

 Секреторні везикули накопичуються в апікальній частині ацинарної клітини (в частині, оберненій до системи протоків) між комплексом Гольджі і плазматичною мембраною. Коли пухирець зливається з плазматичною мембраною, його вміст потрапляє до зовнішньоклітинного простору. Ці пухирці зливаються лише з апікальною частиною плазматичної мембрани, тим самим попереджується некорисне і небезпечне виділення секрету до міжклітинного простору або до порожнини інших органел. Більше того, екзоцитоз відбувається лише у відповідь на зовнішньо клітинний хімічний сигнал, що подається нервовими клітинами або клітинами кишечника тоді, коли для процесу травлення необхідні ферменти. Вивчено багато секреторних білків з різних типів клітин. Виявилось, що всі вони проходять один і той шлях: рибосома----ЕПС----КГ---міжклітинний простір. Ті білки, які повинні залишитись у плазматичній мембрані, лізосомах або цистернах КГ, також спочатку потрапляють до ЕПС і потім звідти крізь КГ спрямовуються до місця кінцевої локалізації. Для виявлення більш тонких деталей метаболічних шляхів, що починаються в ЕПС, необхідні більш складні методи. Деякі з білків, що потрапили до ЕПС залишаються там для виконання ферментативних функцій. Більшість цих білків потрапляє до транспортних пухирців (діаметр 50-100 нм ), які потім відокремлюються в спеціальних місцях мембрани ЕПС (так званих перехідних елементах), і специфічно зливаються з найближчою цистерною КГ. Після злиття мембрана пухирця стає частиною мембрани КГ, а розчинні білки вмісту пухирця потрапляють до порожнини цистерни КГ. Таким чином розчинні білки вибірково переносяться з одного оточеного мембраною компартмента до іншого без проникнення крізь мембрани. Припускають, що за допомогою такого ж механізму відокремлення і злиття пухирців білки переносяться з однієї цистерни Гольджі до наступної, а потім до різних місць кінцевого призначення у відповідності до їх функцій. На цьому шляху білки проходять крізь цілу серію замкнених просторів, топологічно еквівалентних один одному і зовнішньоклітинному простору.

 **На кожному етапі метаболізму білки обирають, чи залишитись у цитозолі, або транспортуватись до ЕПС, залишитись у ЕПС або потрапити до КГ, стати вмістом пухирця, який спрямовується до лізосом, або замість цього потрапити до пухирців, що переміщуються до клітинної мембрани і, таке інше. Вибір у кожному випадку залежить від амінокислотної послідовності молекули білка, що містить сигнали сортуванні, які визначають шлях білка в середині клітини.**

 Майже всі білки утворюються на рибосомах, що розміщені у цитозолі ( окрім декількох, що синтезуються на мітохондріальних рибосомах або рибосомах хлоропластів). Потім їхні шляхи розходяться. Білки, що належать одній транспортній гілці, після завершення синтезу виділяються до цитозолю. Деякі з них містять сигнали сортування, що спрямовують їх з цитозоля до мітохондрій , хлоропластів (у рослин), ядра або пероксисом, інші ж – їх більшість – не мають сигналів сортування і залишаються у цитоплазмі у якості постійних компонентів. Білки, які функціонують у ядрі, потрапляють до каріоплазми крізь ядерно-порові комплекси.

 Другий основний шлях транспорту використовується при синтезі білків, призначених для виведення з клітини, а також білків, які повинні стати компонентами ЕПС, КГ, плазматичної мембрани або лізосом. Всі ці білки по мірі їх утворення переносяться до ЕПС за допомогою сигналів сортування, розміщених звичайно на N-кінці білкової молекули. Рибосоми, на яких збираються такі білки, залишаються поєднаними з мембраною ЕПС протягом незначного часу після початку синтезу поліпептидного ланцюга. Як тільки чергова ділянка поліпептидного ланцюга синтезується, він транспортується крізь ліпідний бішар цієї мембрани до порожнини ЕПС. Деякі білки по закінченню синтезу потрапляють до порожнини ЕПС, тоді як деякі залишаються частково вбудованими до мембрани, формуючи трансмембранні білки.

 Звичайно проходить не більше однієї або двох хвилин з моменту вивільнення білка до цитозолю до надходження його до відповідної органели. Білки, що призначені для ядра, мітохондрій або пероксисом, досягнувши цих органел, на цьому припиняють свій шлях, тоді як білки, що потрапили до ЕПС, проходять складний шлях у складі транспортних пухирців. Можливо, для досягнення кінцевого пункту призначення повинно відбутись декілька таких циклів і шлях від мембрани ЕПС до місця призначення може зайняти одну годину.

 Щоб зрозуміти загальні принципи роботи сигналів сортування, важливо розрізняти два зовсім різних шляхи, по яких білки переміщуються з одного компартмента до іншого. По-перше, вони можуть безпосередньо проникати крізь мембрану, потрапляючи з простору топологічно еквівалентного цитозолю , до простору, топологічно еквівалентного зовнішньо клітинному, або навпаки. Цей шлях вимагає наявності в мембрані спеціального білка –транслокатора, крім того, молекула білка, що транспортується, повинна розгорнутись, щоб подібно змії, проповзти крізь мембрану. Як приклад може слугувати переміщення білку крізь мембрану ЕПС. Другий шлях руху білкових молекул опосередкований транспортними пухирцями. Ці пухирці захоплюють певні молекули в порожнині одного компартмента (від якого вони відокремлюються) і переносять їх до другого компартмента, зливаючись з ним. Саме так відбувається транспорт розчинних білків з ЕПС до апарату Гольджі. **При такому везикулярному транспорті білки не проходять крізь мембрани, тому вони переносяться між компартментами, топологічно еквівалентними один одному.**

 Обидва типа транспортних процесів вибірково контролюються за допомогою спеціальних білків, які виконують роль сигналів сортування. У білка, який безпосередньо переноситься крізь мембрану, ці сигнали розпізнаються **транслокаторами у мембрані.** А у транспортний пухирець білок потрапляє, якщо його сигнал сортування поєднується з рецептором на мембрані пухирця. Імовірно існують і такі транспортні пухирці, які здатні захоплювати білки, що втратили специфічні сигнали сортування. В будь-якому випадку нові пухирці переносять лише призначені для цього білки.

 У наш час деякі сигнали сортування у складі білків відомі, тоді як більшість комплементарних їм мембранних рецепторів – ні. Крім того, ми ще не знаємо майже нічого про транспортні пухирці. Можна припустити тільки, що їх існує багато видів, у відповідності до різних переносів, які вони повинні здійснювати. Щоб виконати свої функції, кожний пухирець повинен захопити тільки певні білки і зливатись тільки з певною мембраною-мішенню: наприклад, пухирець, що переносить молекули від ЕПС до КГ, не повинен включати білки, які залишаться в ЕПС, і повинен зливатись з КГ, а не з іншими органелами.

 Припускають, що на білках існують два типи сигналів сортування, що спрямовують їх крок за кроком вздовж розгалужених транспортних шляхів. Для деяких стадій сигнали сортування являють собою частину білкової молекули – сигнальний пептид довжиною 15-60 амінокислотних залишків. Коли стадія впізнавання минає, такий сигнальний пептид відрізається. Сигналом сортування для інших стадій імовірно, слугує певна трьохмірна структура, що утворюється частиною молекули білку при її згортанні. Сигнальні пептиди спрямовують білки з цитозолю до ЕПС, мітохондрій, хлоропластів та ядра; вони також відповідають за те, щоб деякі білки залишались у ЕПС. Сигнальні ділянки, можливо, відіграють важливу роль при розпізнаванні білків лізосом спеціальним ферментом у комплексі Гольджі.

 Щоб з’ясувати пункт призначення того чи іншого білку всередині клітини, необхідно визначити тип його сигнального пептиду. Білки, які повинні потрапити до ЕПС, звичайно несуть N-кінцевий сигнальний пептид. Його центральна частина утворена 5-10 гідрофобними амінокислотними залишками. Більшість цих білків спрямовується з ЕПС до КГ, ті ж які мають на С-кінці специфічну послідовність з 4 амінокислот залишаються як постійні компоненти в ЕПС. Багато білків, які призначені для мітохондрій, мають сигнальні пептиди, у яких позитивно заряджені амінокислотні залишки чергуються з гідрофобними. Серед білків, які спрямовують шлях до ядра, більшість має сигнальні пептиди, які утворені кластером позитивно заряджених амінокислотних залишків. Нарешті деяким білкам цитозоля притаманні сигнальні пептиди, з якими ковалентно поєднується жирна кислота, яка спрямовує ці білки до мембран без проникнення у ЕПС.

Табл. 1. Сигнальні пептиди

|  |  |
| --- | --- |
| Органела | Сигнальний пептид |
| Ядро | 5-6 амінокислотних залишків, що мають лужні властивості (пролін-пролін-лізин-лізин-лізин-аланін-лізин-валін) |
| Мітохондрія | N-кінцевий пептид з12-18 амінокислот, що утворюють амфіфільну завитку (заряджені залишки на одному боці, тоді як неполярні - на другому) |
| Пероксисоми | С-кінцевий пептид , що має у своєму складі серін-лізин-лейцин. |
| ЕПС | N-кінцевий пептид складається з гідрофобних амінокислот |

 Роль кожного такого сигнального пептиду у шляху переносу до пункту призначення була продемонстрована в дослідах з генної інженерії. Наприклад, розміщення N-кінцевого сигнального пептиду, який складається з 20-30 гідрофобних амінокислот, було визначальним для транспорту цього білка до ЕПС.

 Ділянки мембрани гранулярної ЕПС містять білки, які відповідальні за поєднання рибосом. Ділянка поєднання з мембраною ЕПС міститься на великій субодиниці рибосом. **Імпорт білків до ЕПС**. У спрямуванні сигнального пептиду до мембрани ЕПС бере участь частка, що розпізнає сигнал,яка поєднує сигнальний пептид та призупиняє трансляцію. Під час цієї паузи рибосома приєднується до мембрани ЕПС. Пауза триває доки частка, що захопила рибосому, не поєднається з рецептором на мембрані ЕПС Рецептор – це інтегральний мембранний білок, що складається з двох ланцюгів. Він взаємодіє з часткою таким чином, що вона змінює положення і трансляція відновлюється. Одночасно рибосома поєднується з мембраною ЕПС, поліпептидний ланцюг переноситься до системи транс- локації у мембрані. Більшість сигнальних пептидів видаляється спеціальною сигнальною пептидазою, яка поєднана з мембраною ЕПС. У деяких білків сигнальні пептиди, що розміщені всередині поліпептидних ланцюгів, ніколи не вирізаються. Можливо, що не видалені сигнальні пептиди відіграють важливу роль в реалізації різних способів вбудовування білків у мембрану, які виявлені у трансмембранних білків. У відповідності з сучасними уявленнями, гідрофобний сигнальний пептид розчинного білку, окрім інших функцій, слугує сигналом початку переносу і залишається зануреним до мембрани весь час доки решта молекули білку проходить крізь неї у вигляді великої петлі. Коли крізь мембрану проходить карбоксильний кінець молекули, білок залишається поєднаним з нею лише сигнальним пептидом. Таким чином, якщо цей пептид відрізається, білок вивільнюється у порожнину ЕПС.

 Для мембранних білків ситуація складніша, оскільки частина їх поліпептидного ланцюга переноситься крізь мембрану, а частина – ні. Сигнальний пептид може бути позбавлений ділянки розрізання. Внаслідок цього білок стає трансмембранним. У мембрану занурений N-кінець, на якому сигнальний пептид утворює сигнальний сегмент з 20-30 гідрофобних амінокислот, що знаходяться у формі α-спіралі. Перенесені до порожнини ЕПС білки, набувають конформації знову. В порожнині ЕПС міститься велика кількість зв’язуючого білку BiP, який впізнає неправильно згорнуті білки. Цей білок зв’язує АТФ і є структурно спорідненим білкам теплового шоку, які беруть участь в імпорті білків. В ЕПС утворюються дисульфідні містки. Більшість білків, які надходять до порожнини ЕПС, перед тим як потрапити до комплексу Гольджі, лізосоми, плазматичну мембрану або зовнішньоклітинний простір, стають глікопротеїнами, тоді як в цитозолі лише небагато білків гліколізовані. До білків ЕПС приєднується лише один олігосахарид, який містить N-ацетилглюкозамін, молекули маннози, глюкози і складається лише з 14 залишків і приєднується до залишку амінокислоти аспарагіну.

 Сигнальні пептиди білків, що мають одне і теж кінцеве значення, функціонально взаємно замінні, хоча їх амінокислотні послідовності можуть значно розрізнятись. Можливо для процесу розпізнавання сигналу фізичні властивості такі, як гідрофобність, виявляються більш важливими, ніж точна послідовність амінокислот.

 Сигнальні ділянки аналізувати важче, ніж сигнальні пептиди, тому про їх структуру відомо менше. Оскільки вони утворюються із складної трьохмірної конфігурації згорнутого білка, їх неможливо просто перенести з одного білка до іншого. Більш того, експериментальне пошкодження сигнальної ділянки часто призводить до пошкодження самого білка.

 Коли клітина відтворюється і поділяється, вона повинна подвоювати свої мембранні органели. Зазвичай це відбувається шляхом збільшення розмірів цих органел при включенні до них нових молекул; збільшені органели потім поділяються і розподіляються по двох дочірніх клітинах. Навряд чи клітина здатна створювати ці органели de novo. Якщо з клітини повністю видалити ЕПС, вона не зможе його реконструювати. Це пояснюється тим, що мембранні білки, які визначають специфіку ЕПС, і які виконують дуже багато ключових функцій, самі є продуктами ЕПС: без ЕПС або принаймні без мембрани, яка містить транслокатори, необхідні для імпорту білків до ЕПС ( і при відсутності транслокаторів, які вимагаються для імпорту білків до інших органел), новий ЕПС не може бути побудований.

 **Таким чином, для формування мембранних органел недостатньо лише інформації ДНК, яка визначає білки органел. Необхідна також епігенетична інформація у вигляді хоча б одного білка в мембрані органели. Ця інформація передається від батьківської клітини потомству з самою органелою. Ймовірно, така інформація необхідна для підтримання компартменталізації клітини, тоді як інформація, яка міститься в ДНК, необхідна для „розмноження” нуклеотидних і амінокислотних послідовностей.**

 Таким чином, еукаріотичні клітини містять внутрішньоклітинні мембрани, які оточують майже половину загального об’єму клітини в окремі внутрішньоклітинні компартменти. Кожна органела має у своєму складі різні білки, які визначають її унікальні функції.

 Кожний новосинтезований білок органел проходить від рибосоми до органели особливий шлях, який визначається або сигнальним пептидом, або сигнальною ділянкою. Сортування білків починається з первинного розподілу, при якому білок або залишається в цитозолі, або переноситься у інший компартмент (наприклад, до ядра, мітохондрії або ендоплазматичної сітки). Білки, які потрапляють до ЕПС, піддаються подальшому сортуванню по мірі того, як вони переносяться до апарату Гольджі і потім з комплексу Гольджі. Білки, які призначені для інших компартментів, ймовірно потрапляють до транспортних пухирців, які відшнуровуються від одного компартмента і зливаються з іншим.

 Транспорт білків до мітохондрій і хлоропластів передбачає втрату білками третинної і вторинної структури і відбувається за допомогою білків-транслокаторів. Цей механізм був вивчений для мітохондрій дріжджів. Білок переноситься до матриксу мітохондрії крізь зони злипання зовнішньої та внутрішньої мембран. Для цього транспорту необхідно гідроліз АТФ, а також електрохімічний градієнт на внутрішній мембрані. Білок, що транспортується, розгортається, коли долає мітохондріальні мембрани. До мітохондрій або хлоропластів переносяться білки, які містять специфічний сигнальний пептид. Цей сигнальний пептид звичайно розміщується на N—кінці молекули білка і відрізається після переносу її всередину органели. На другому етапі транспорту білок може переноситись у внутрішню мембрану. Для цього він повинен мати ще гідрофобний сигнальний пептид; цей пептид відкривається після видалення першого сигналу. У випадку хлоропластів для переносу білків із строми у тилакоїд також вимагається другий сигнальний пептид.

 Транспорт білків до мітохондрій вимагає використання енергії гідролізу АТФ та електрохімічний потенціал на внутрішній мембрані. Сигнальний пептид складається з 20-80 амінокислот. Центральна частина з 12 амінокислот, що утворюють амфіпатичні альфа-спіральні структури, в яких позитивно заряджені амінокислоти орієнтуються в один бік, тоді як гідрофобні – у інший.