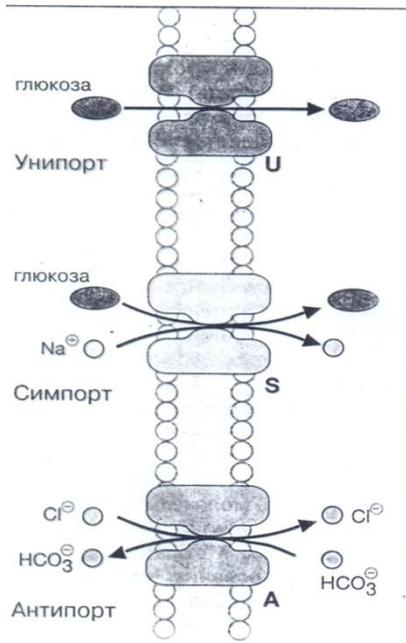
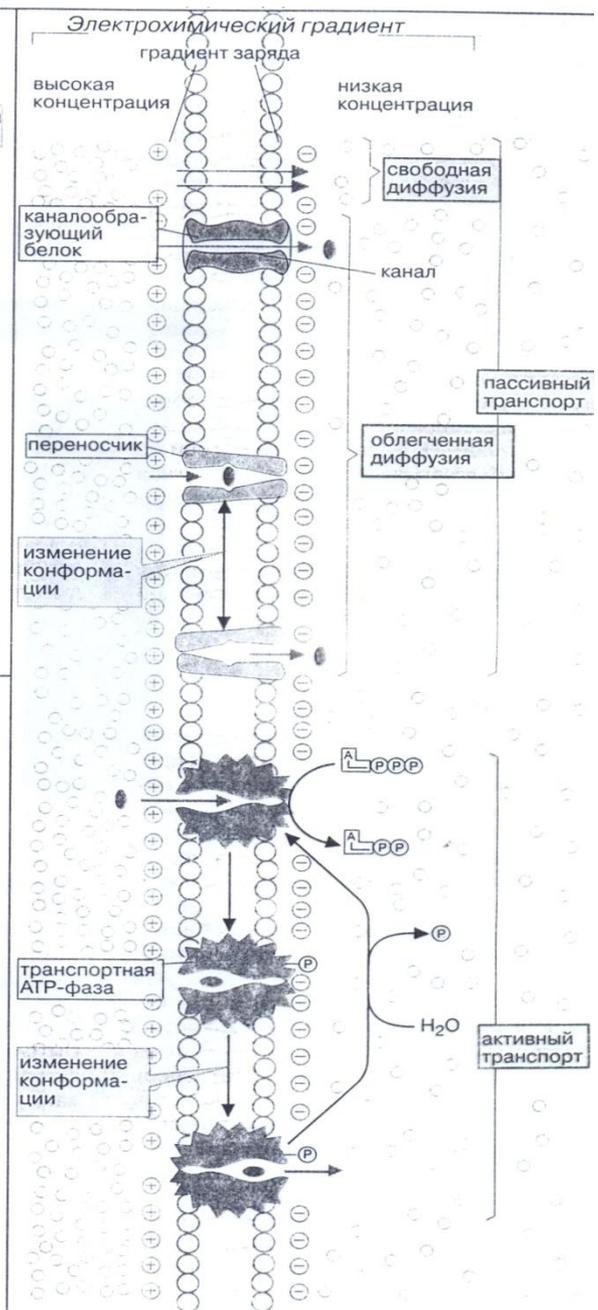


А. Проницаемость мембран



В. Транспортные процессы



Б. Пассивный и активный транспорт

$$\Delta G = 2,3RT \lg(c_2/c_1),$$

где – R - универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, c_2 , c_1 - концентрации вещества

$\Delta G = zF\Delta\phi$, где z – величина заряда молекулы, F – постоянная Фарадея, $\Delta\phi$ – мембранный потенциал

а) экзергоническая – не требует энергии

б) эндергоническая – требует энергию

Электрохимический градиент

- $\Delta G(\text{общее}) = \Delta G(\text{конц.}) + \Delta G(\text{эл.заряд})$

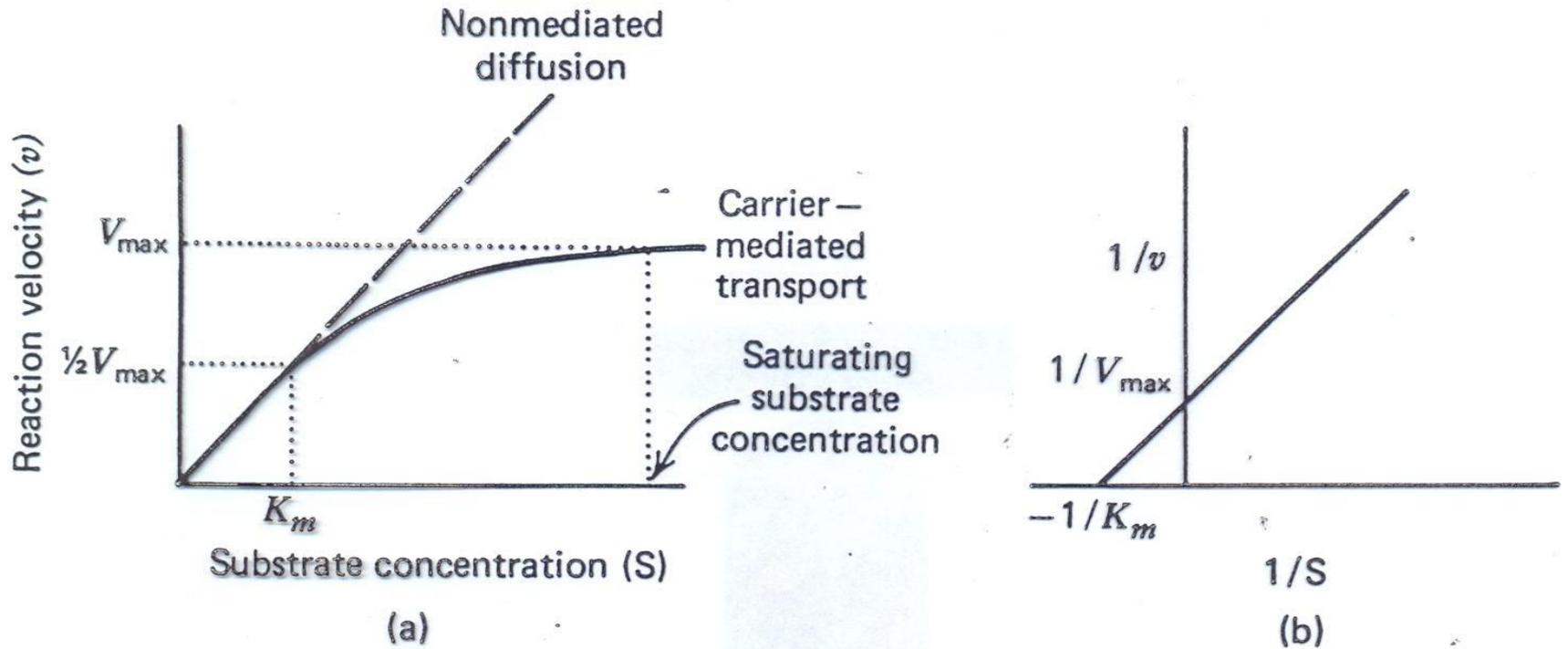


Figure 2.13 Kinetics of transport across membranes. (a) Transport via a carrier (—) becomes saturated at high substrate concentrations, but transport via nonmediated diffusion (---) does not. (b) Data for carrier-mediated transport graphed in a double-reciprocal plot.

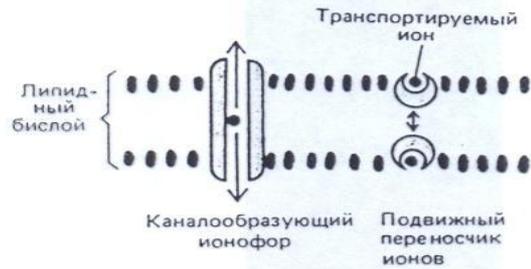


Рис. 6-66. Подвижный переносчик ионов и каналообразующий ионофор. В обоих случаях поток ионов проходит через мембрану только по электрохимическому градиенту.



Рис. 6-67. Молекула валиномицина, связанная с расположенным в центре кольцевой структуры ионом K^+ при помощи шести атомов кислорода.

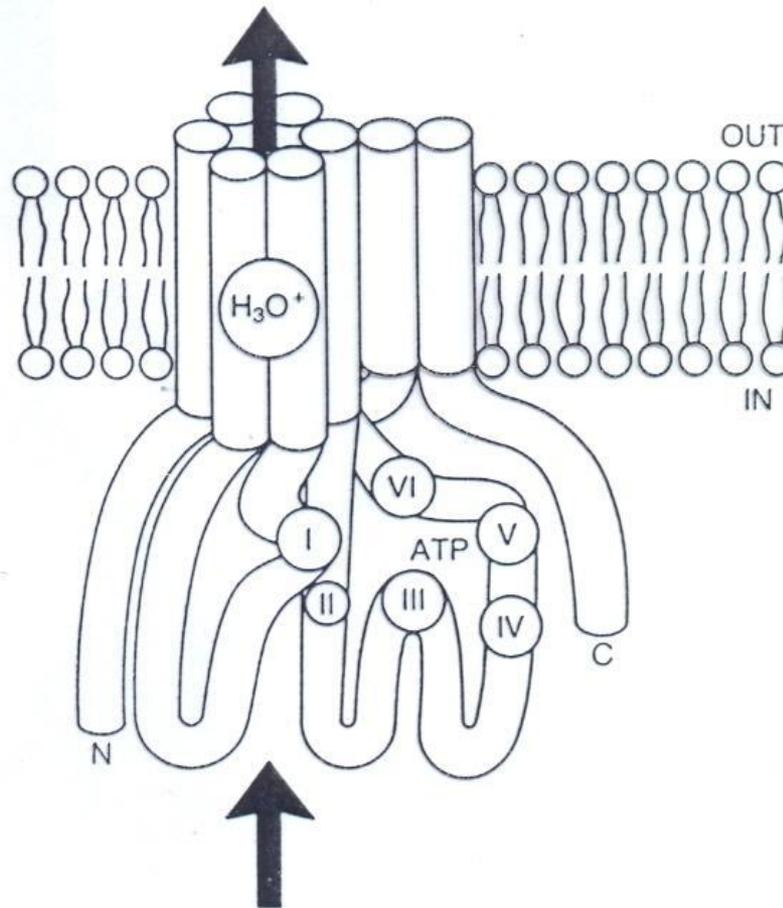


Figure 4.2 Hypothetical model of fungal proton-ATPase in the membrane, showing eight membrane-spanning domains, a proton translocating pore, the ATP binding site, and the amino and carboxyl termini in the cytoplasm. Roman numerals indicate amino acid domains conserved in all P-type ATPases ('P' signifying the mechanism of action). N and C indicate amino and carboxyl ends of the polypeptide. (Figure and information kindly supplied by Brian Monk and Ramon Serrano.)

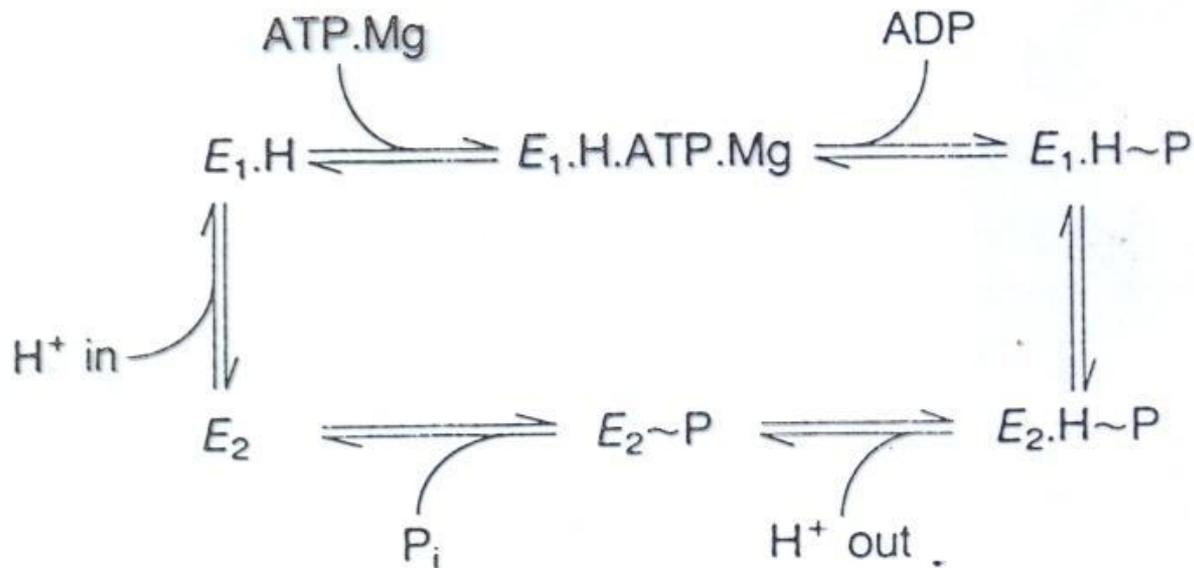
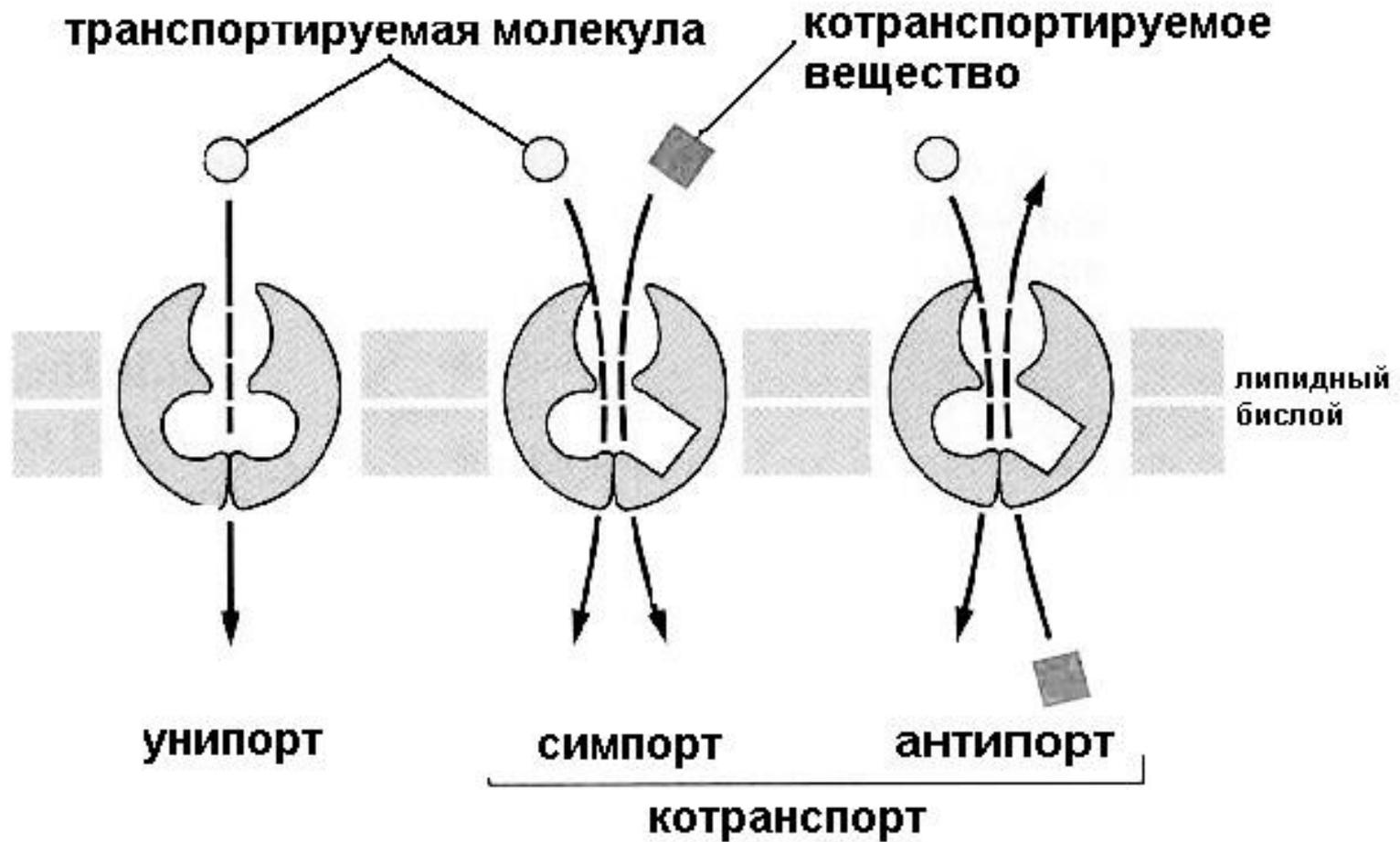


Figure 8.1 Reaction cycle of the fungal plasma membrane H^+ -ATPase. A high-energy conformation of the enzyme results from phosphorylation via MgATP. A proton binds on the internal face and a conformational change either carries the charge through the membrane or alternatively moves the membrane field around the charge releasing the proton at the external face. The protein is then dephosphorylated and undergoes a conformational change back to the original ATP binding state.

Вторичный активный транспорт



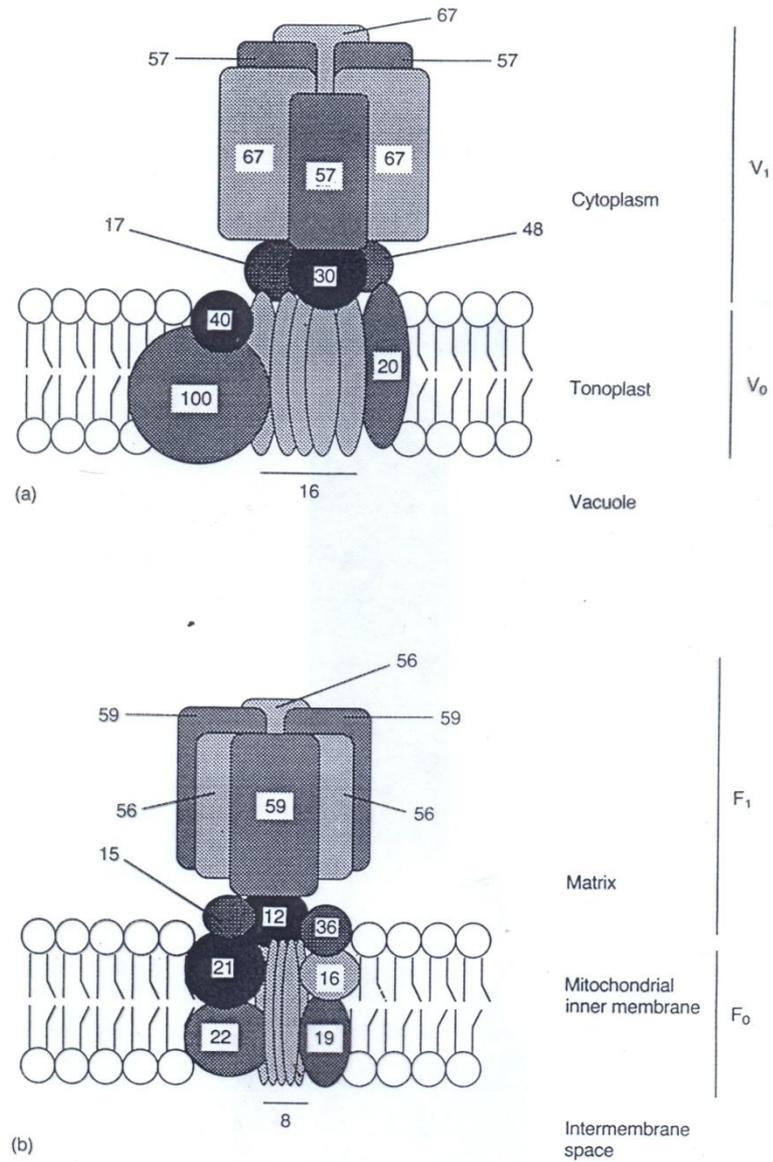


Figure 8.3 Structural models for the (a) vacuolar and (b) mitochondrial H⁺-ATPases. There is significant structural homology between some subunits of the respective enzymes (see text) suggesting that they arose from a common ancestral gene. (Modified from Nelson, 1992.)

Table 8.1 H⁺-ATPases of fungal membranes

	<i>Plasma membrane H⁺-ATPase</i>	<i>Vacuolar H⁺-ATPase</i>	<i>Mitochondrial H⁺-ATPase</i>
ATPase type	<i>P</i> (E ₁ E ₂)	<i>V</i> (V ₀ V ₁)	<i>F</i> (F ₀ F ₁)
Composition	Single polypeptide	At least nine polypeptides	At least ten polypeptides
Approximate <i>M_r</i> of subunits (for <i>N. crassa</i> enzyme)	100	(V ₁) 67, 57, 48, 30, 17 (V ₀) 100, 40, 20, 16	(F ₁) 59, 56, 36, 15, 12 (F ₀) 22, 21, 19, 16, 8
pH optima	Acidic (5.0–6.7)	Neutral (7.0–7.5)	Basic (8.0–9.0)
<i>K_m</i> (ATP) (mM)	0.4–4.8	0.2	0.3
Nucleotide specificity	ATP	ATP>GTP, ITP>UTP>CTP	ATP>GTP, ITP>UTP>CTP
Commonly used inhibitors	Vanadate DCCD NEM	Nitrate Bafilomycin A1 NEM	Azide

DCCD, dicyclohexylcarbodiimide.

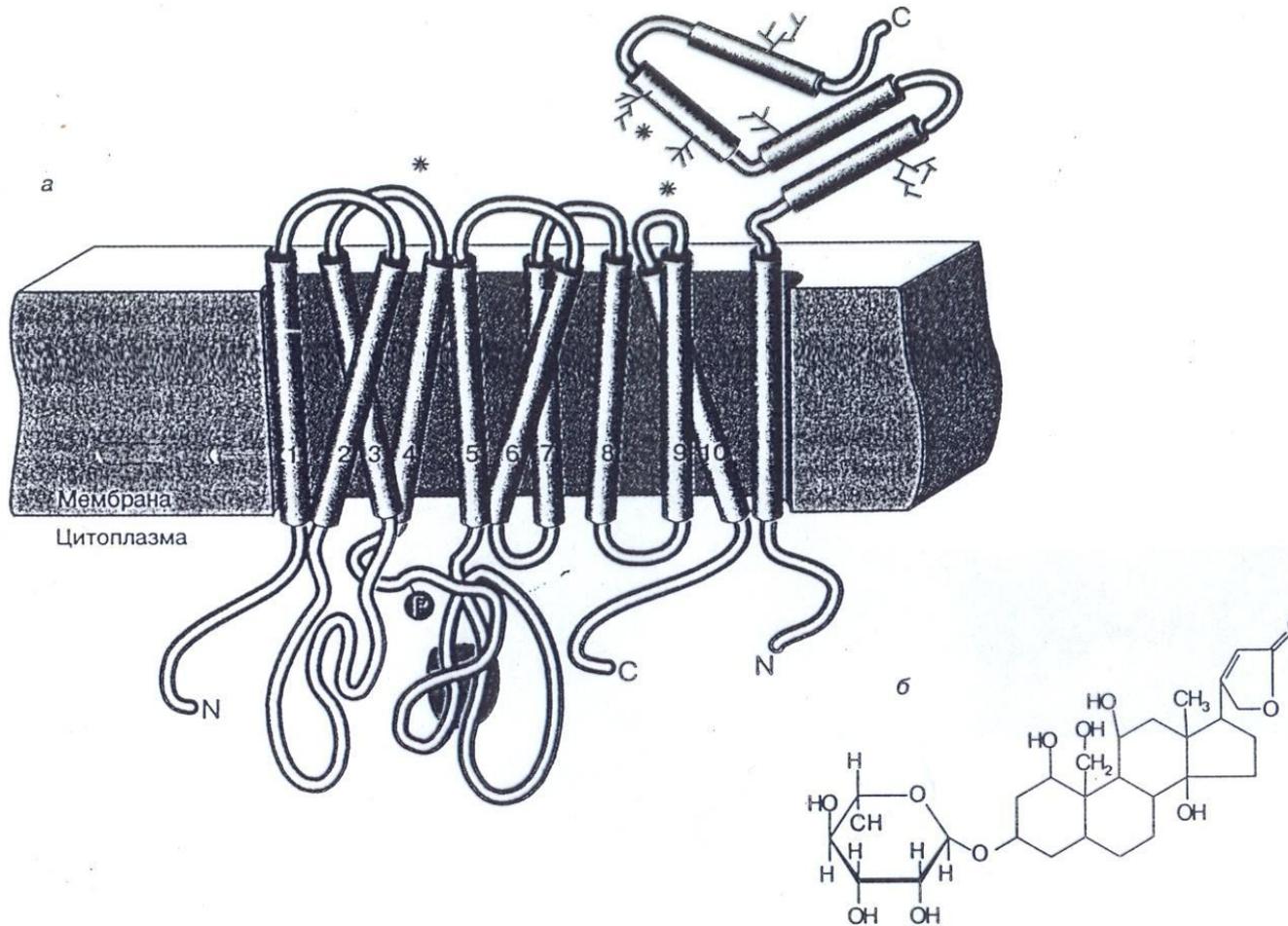


Рис. 1. Схема расположения Na/K-АТФазы в клеточной мембране (а) и структура ее специфического ингибитора убаина (б). Протомер фермента состоит из одной альфа- и одной бета-субъединицы. Расположение N- и С-концов полипептидных цепей указано соответствующими буквами. Мембранная часть альфа-субъединицы (окрашена голубым) представлена 10 альфа-спиральями (колоннами), пересекающими мембрану и образующими несколько петель. Петля между 2-й и 3-й колоннами (помечена красным) принимает участие в формировании центра связывания ионов. На петле между 4-й и 5-й колоннами локализованы центр связывания АТФ (показан сиреневым цветом) и участок фосфорилирования (Р). Зеленым цветом окрашены альфа-спиральные участки бета-субъединицы, к С-концу которой присоединены гликозильные радикалы. Звездочками отмечены вероятные участки связывания специфического ингибитора Na/K-АТФазы – убаина

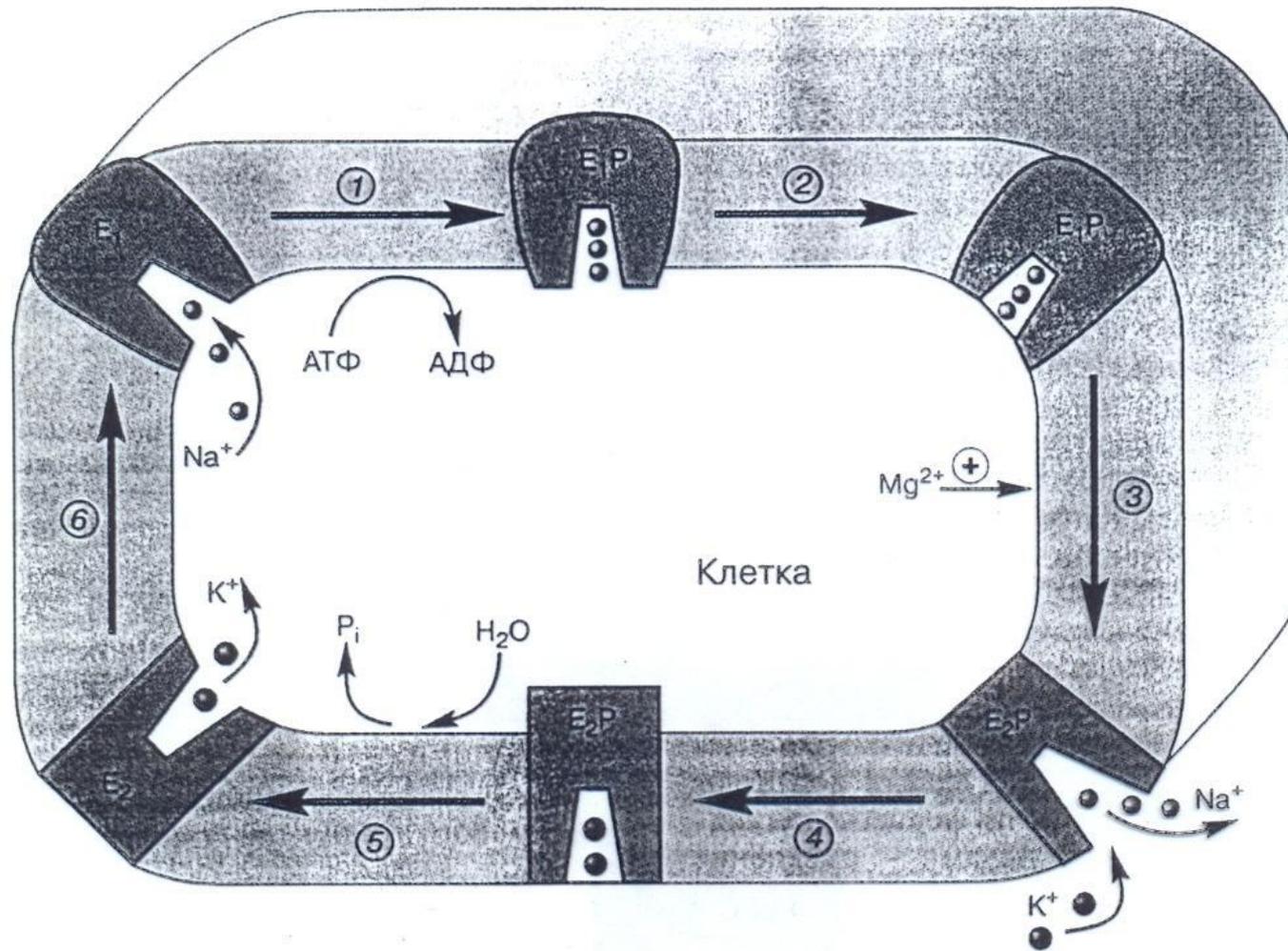


Рис. 3. Реакционный цикл Na/K-АТФазы. Шесть основных последовательных реакций включают связывание ионов натрия E_1 -конформером, его взаимодействие с АТФ и образование фосфорилированного интермедиата (стадия 1), окклюзию ионов натрия конформацией E_1P (стадия 2), активируемый ионами магния переход $E_1P \rightarrow E_2P$, приводящий к высвобождению ионов натрия во внеклеточную среду и связыванию с ионным центром внеклеточного калия (стадия 3), окклюзирование ионов калия (стадия 4), дефосфорилирование фермента, приводящее к высвобождению ионов калия во внутриклеточное пространство (стадия 5), и переход конформации E_2 в конформацию E_1 , приводящий к началу нового цикла (стадия 6)

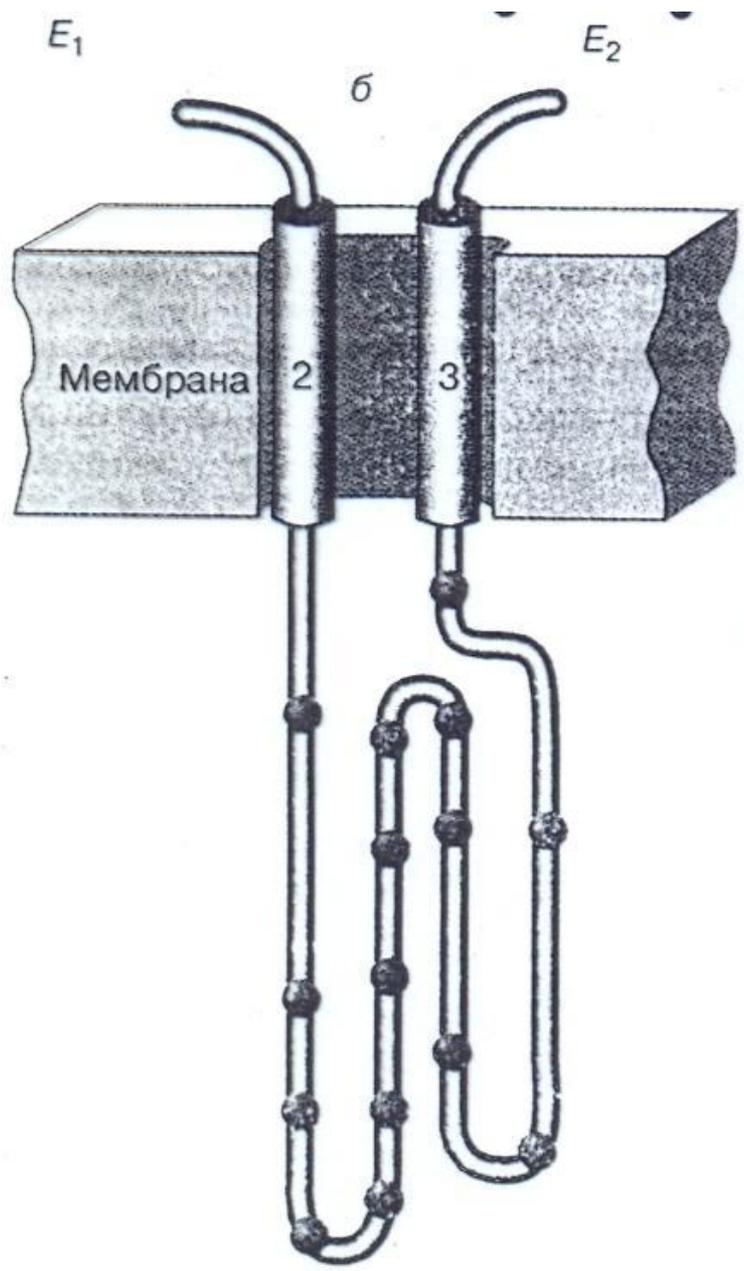


Таблица 3. Метаболические реакции, регулируемые ионами натрия и калия [6]

Реакция	Активатор	Ингибитор
Синтез ацетилхолина	K^+	Na^+
Синтез белка на рибосомах	K^+	Na^+
Синтез липидов	Na^+	—
Дыхание митохондрий	K^+	Na^+
ДНК-полимеразная реакция	K^+	Na^+
РНК-полимеразная реакция	K^+	—
Фосфофруктокиназная реакция	K^+	—

Table 8.2 Amino acid transporters of the plasma membrane of *N. crassa* (All L isomers except ^a = both D and L isomers) (modified from Horak, 1986)

<i>System</i>	<i>Amino acids</i>	<i>Range of K_T (μM)</i>	<i>Gene</i>
I (N) constitutive	Gly, Leu, Val, Phe, Trp, His, Gln, Asp	48 (Phe) – 1000 (Gly)	<i>mtr</i>
II (B) constitutive	Arg, Lys, His	1.6 (Arg) – 3500 (His)	<i>pmb</i>
III (G) constitutive	Gly, Leu ^a , Val, Asn, Glu, Phe ^a , Trp, Arg, Lys ^a , His, Asp	1.6 (Arg) – 3400 (Asp)	<i>pmg</i>
IV	Asp, Glu	13 (Asp) 16 (Glu)	
V	Met	2.3	

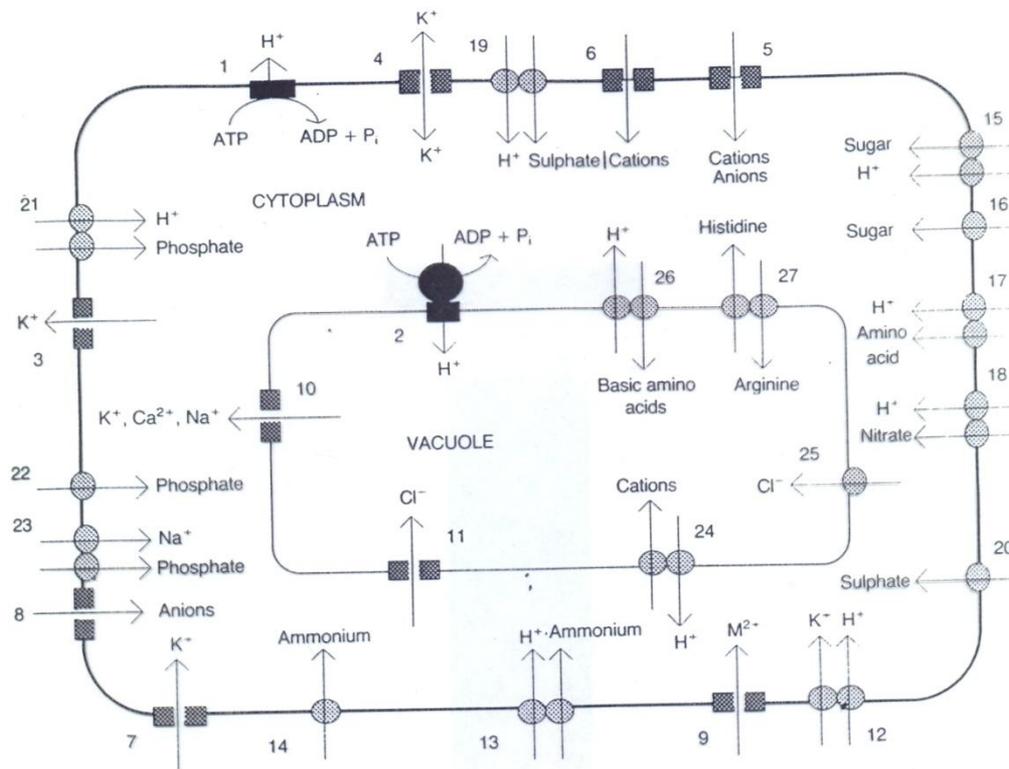
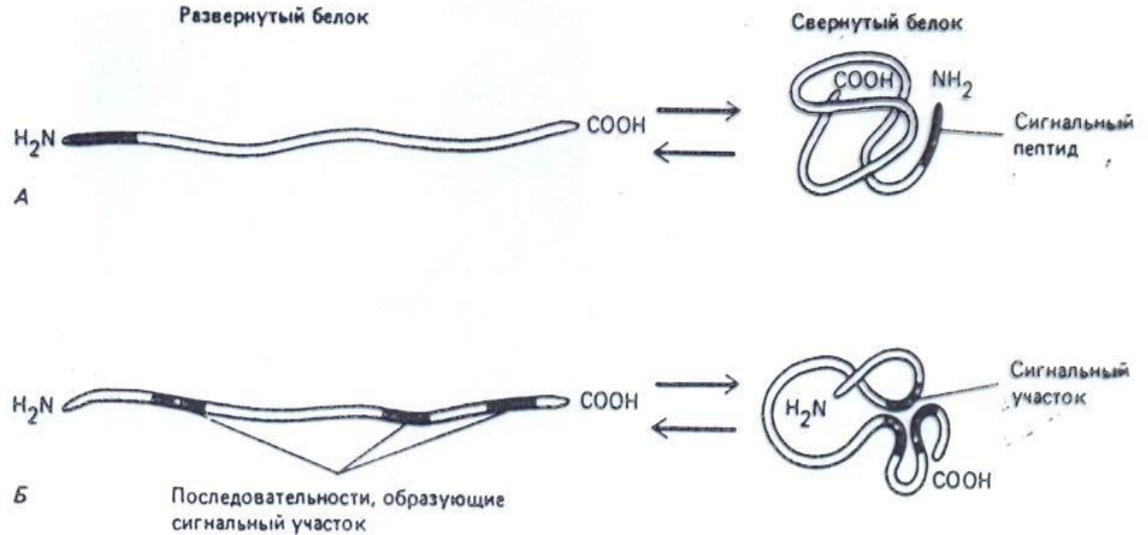


Figure 8.4 Schematic representation of transport processes operating in the fungal plasma membrane and tonoplast which are discussed in the present chapter. For actual stoichiometries see text. The low-affinity transport systems for certain solutes have been shown as carriers but may actually be channels (as indicated below). (1,2) Pumps: (1) plasma membrane H⁺-ATPase (Slayman, 1977; Goffeau and Slayman, 1981; Serrano, 1984, 1988; Bowman and Bowman, 1986); (2) vacuolar H⁺-ATPase (Bowman and Bowman, 1986). (3-11) Channels: (3) voltage gated outward rectifying K⁺ channel (Gustin *et al.*, 1986; Bertl and Slayman, 1992; Bertl *et al.*, 1992); (4) K⁺ channel which activates at positive and negative voltages (Ramirez *et al.*, 1989); (5) unselective stretch-activated channel (Gustin *et al.*, 1988); (6) cation selective stretch-activated channel (Zhou *et al.*, 1991; Zhou and Kung, 1992; Garrill *et al.*, 1992, 1993); (7) Ca²⁺-activated K⁺ channel (Garrill *et al.*, 1992, 1993; Lew *et al.*, 1992); (8) anion-selective channel (Caldwell *et al.*, 1986); (9) divalent cation channel (Chapter 9); (10) tonoplast cation selective inward rectifier channel (Bertl and Slayman, 1990, 1992; Bertl *et al.*, 1992); (11) low-affinity Cl⁻ transporter (Wada *et al.*, 1992). (12-27) Carriers: (12) K⁺/H⁺ symporter (Rodriguez-Navarro *et al.*, 1986); (13) high-affinity NH₄⁺ transporter (Dubois and Grenson, 1979); (14) low-affinity NH₄⁺ transporter (channel mediated?) (Dubois and Grenson, 1979); (15) high-affinity sugar uptake (via H⁺/sugar symport) (Scarborough, 1970b; Slayman and Slayman, 1975); (16) low-affinity sugar transporter (channel-mediated?) (Scarborough, 1970a); (17) H⁺/amino acid symporter (Horak, 1986); (18) high affinity nitrate transporter (Eddy and Hopkins, 1985); (19) high-affinity sulphate transporter (Marzluf, 1970b), (20) low-affinity sulphate transporter (channel-mediated?) (Marzluf, 1970a); (21) high-affinity phosphate transporter (Lowendorf *et al.*, 1975; Burns and Beaver, 1977); (22) low-affinity phosphate transporter (channel-mediated?); (23) Na⁺ phosphate symporter (Siegenthaler *et al.*, 1967; Belsky *et al.*, 1970; Roomans and Borst-Pauwels, 1977, 1979); (24) H⁺/cation antiporter (Gadd, 1993); (25) high affinity Cl⁻ transporter (Wada *et al.*, 1992); (26) H⁺/amino acid antiporter (Sato *et al.*, 1984a); (27) arginine/histidine antiporter (Sato *et al.*, 1984b).

Для этого сигнальный пептид с помощью методов рекомбинантных ДНК «пришивают» к какому-нибудь другому белку. *Б.* Сигнальный участок может быть сформирован при наложении аминокислот из удаленных друг от друга районов при сворачивании молекулы; или же такой сигнал образуется из отдельных «пятен» на поверхности свернутого белка, удаленных друг от друга на известное расстояние. И в том, и в другом случае транспортный сигнал зависит от трехмерной конформации белка. По этой причине точно локализовать такие сигналы чрезвычайно трудно.



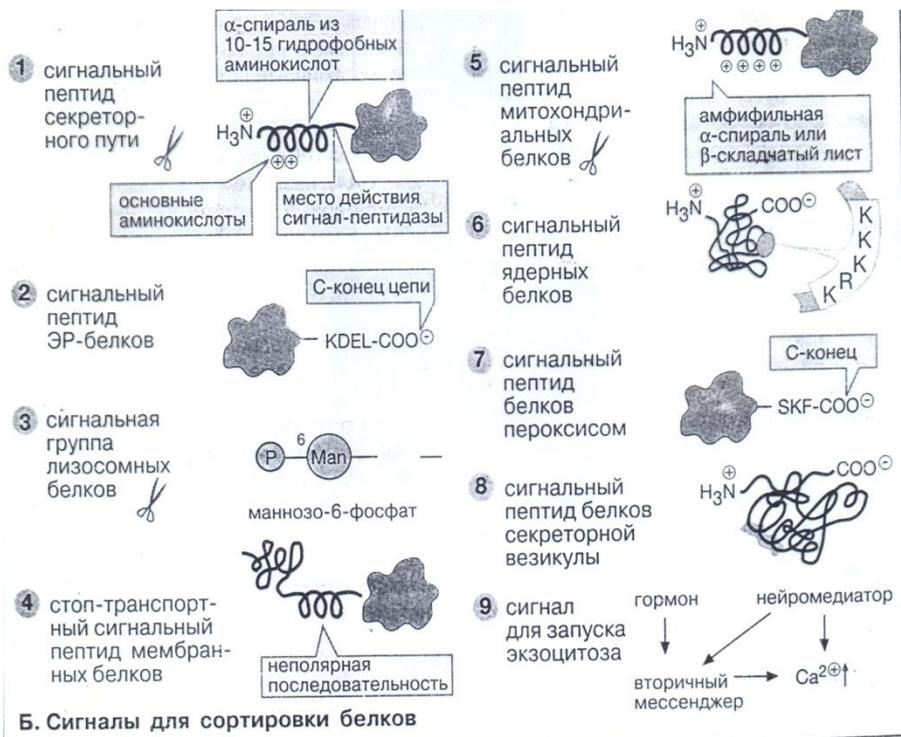
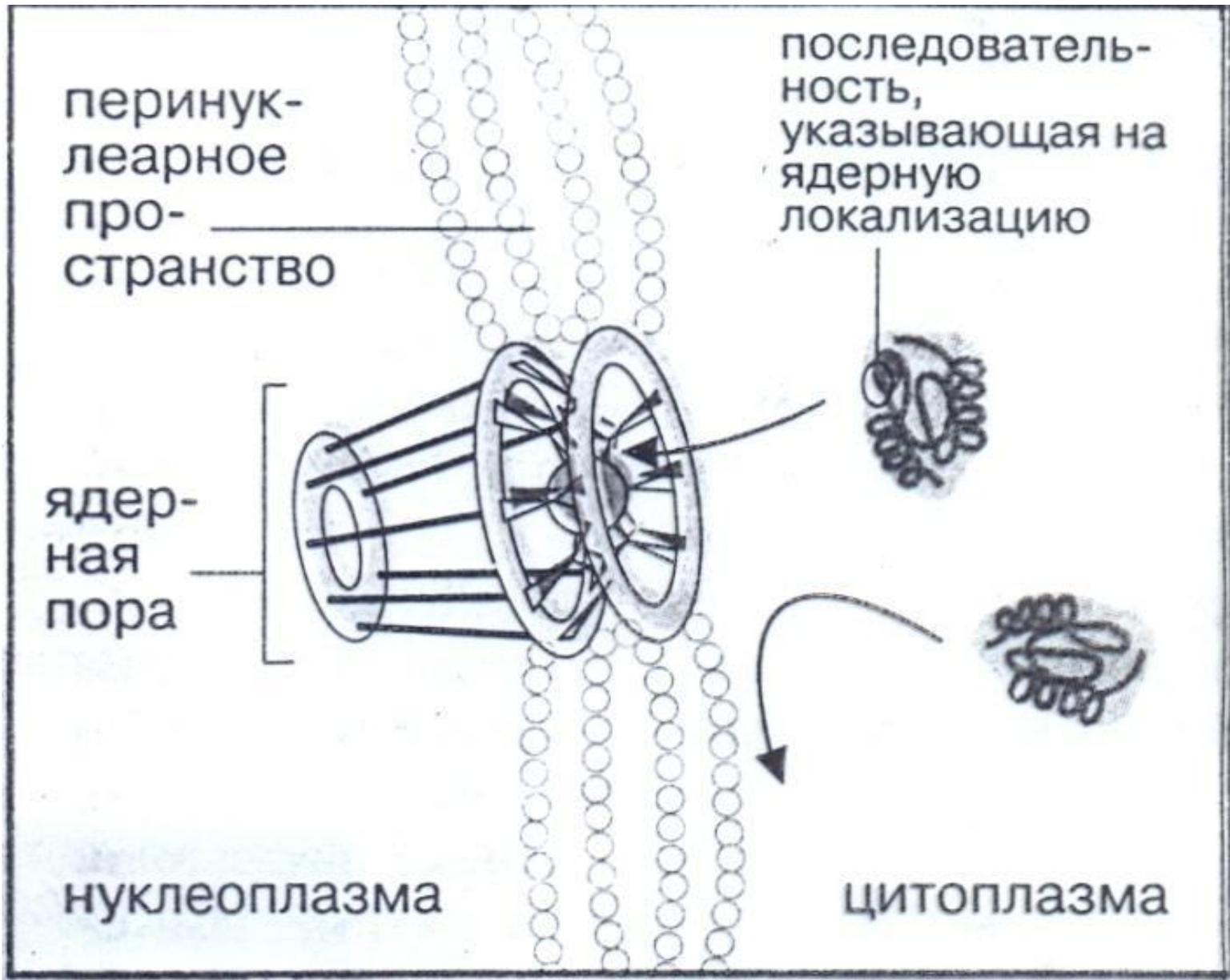


Таблица 8-3. Типичные последовательности сигнальных пептидов

Функция сигнального пептида	Пример сигнального пептида
Импорт в ЭР	H ₃ N ⁺ -Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser- Leu-Leu-Leu-Val Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala -Thr-Glu-Ala-Glu- Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Оставление в просвете ЭР	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻
Импорт в митохондрии	H ₃ N ⁺ -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe- Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser- Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Импорт в ядро	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Присоединение к мембране путем ковалентного связывания миристиновой кислоты с N-концом	H ₃ N ⁺ -Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys-

Заряженные остатки обозначены + или -. Большой блок гидрофобных остатков заключен в рамку. H₃N⁺ обозначает N-конец белка; -COO⁻ обозначает карбоксильный конец



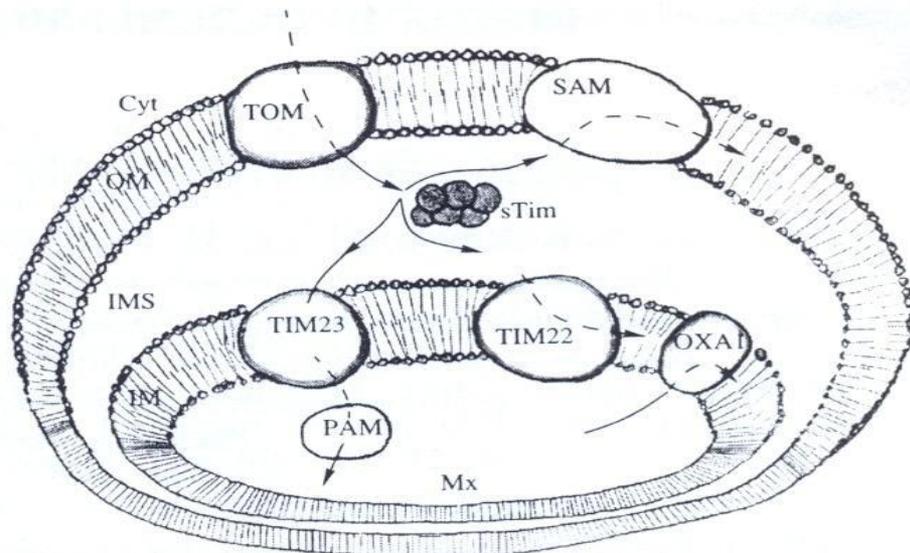


Рис. 1. Общая схема импорта белков в митохондрии. Пути импорта белковых предшественников показаны стрелками. Все предшественники импортируются из цитоплазмы (Cyt) через внешнюю мембрану митохондрий (OM) при помощи TOM-комплекса. Затем события могут развиваться по трем основным сценариям: 1) интегральные белки внешней мембраны встраиваются в нее при помощи SAM-комплекса; 2) предшественники митохондриальных белков, содержащие N-концевую сигнальную последовательность, импортируются через внутреннюю мембрану митохондрий (IM) при помощи TIM23-комплекса; в этом процессе участвует также транслокационный мотор (PAM). В результате предшественники проникают в митохондриальный матрикс (Mx). 3) Белки, содержащие внутренние сигнальные последовательности, при помощи TIM22-комплекса встраиваются во внутреннюю мембрану митохондрий. Во всех трех сценариях участвуют малые Tim-белки (sTim) межмембранного пространства (IMS). OXA1-комплекс осуществляет встраивание белков митохондриального матрикса во внутреннюю мембрану. (Все рисунки данного обзора являются авторскими.)

- $\text{RH}_2 + \text{O}_2 = \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2$
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}'\text{H}_2 = \text{R}' + 2\text{H}_2\text{O}$
 - $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

таким образом, паузу в трансляции.
(По V. Siegel и P. Walter, Nature 320:
82-84, 1986.)

Рис. 8-38. Для синтеза белков цитозоля и белков, поступающих в ЭР, используются одни и те же рибосомы. Если на вновь синтезированной молекуле белка имеется сигнальный пептид, то он направляет связанную с этой молекулой рибосому к мембране ЭР. Молекула мРНК может все время оставаться связанной с мембраной ЭР, тогда как рибосомы, движущиеся вдоль нее, постоянно рециркулируют; в конце каждого цикла белкового синтеза субъединицы рибосом освобождаются и возвращаются в общий пул рибосом в цитозоле.

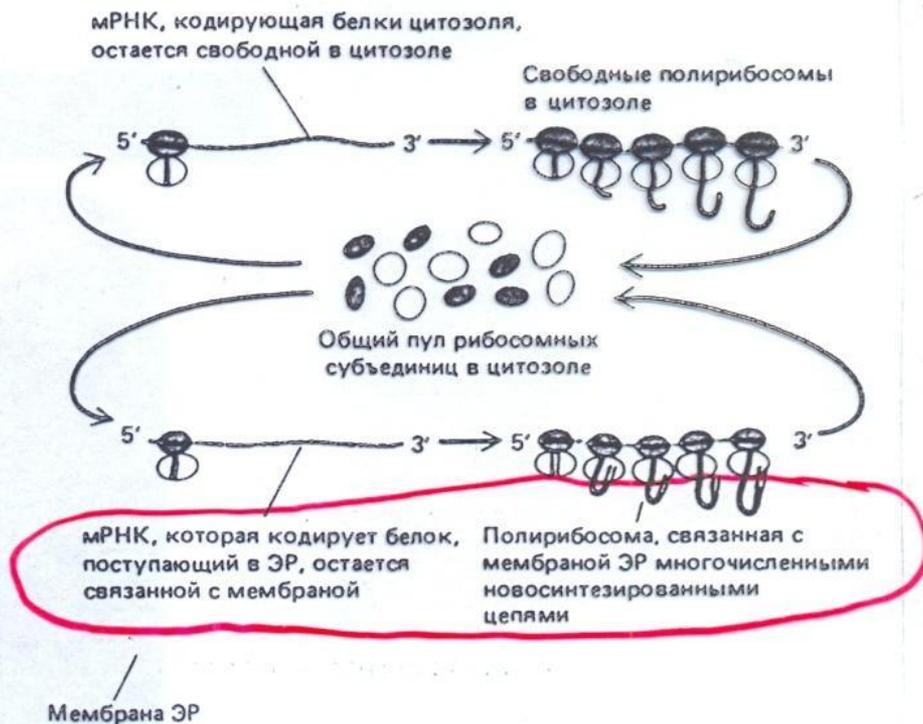
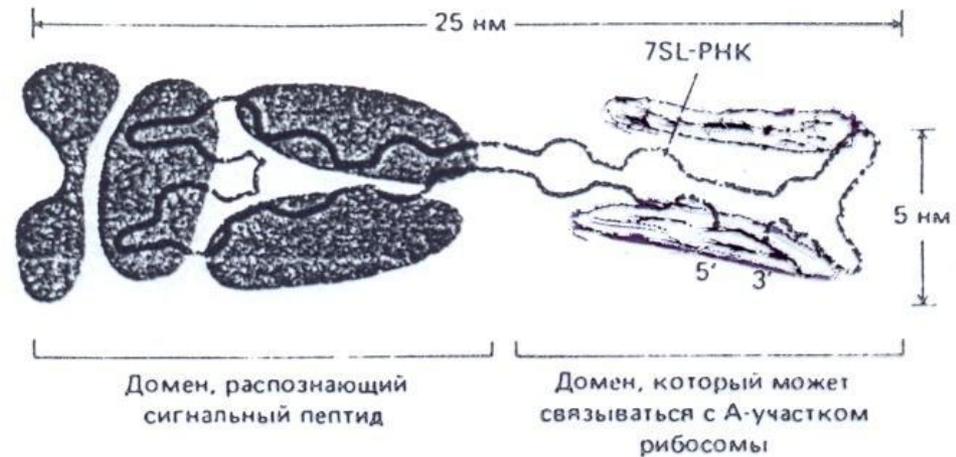
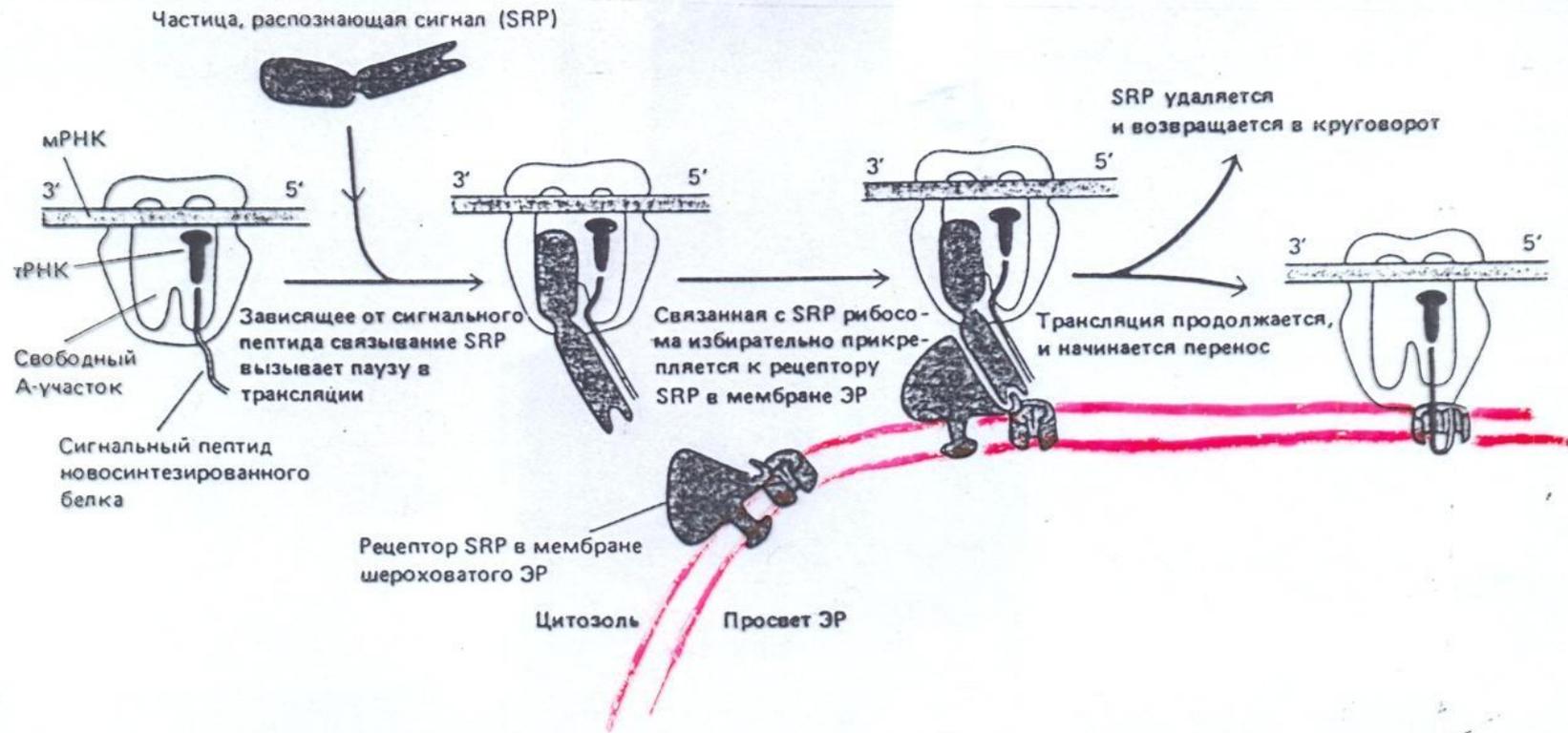
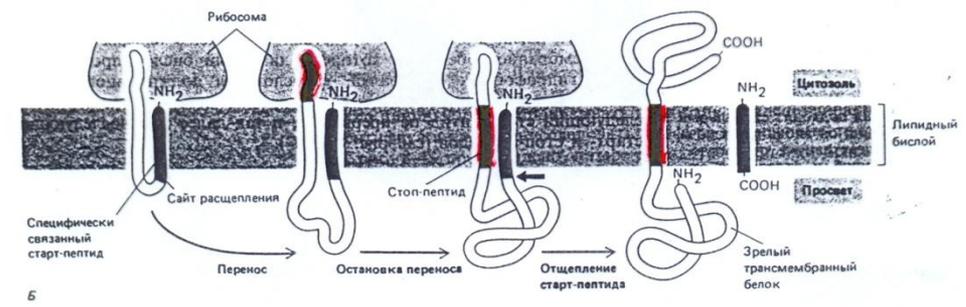
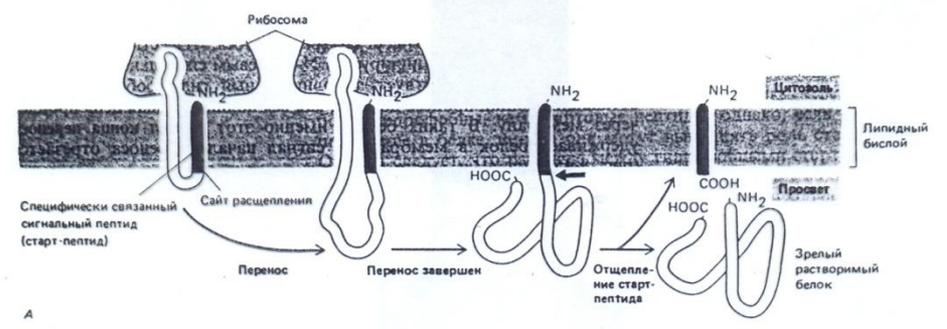
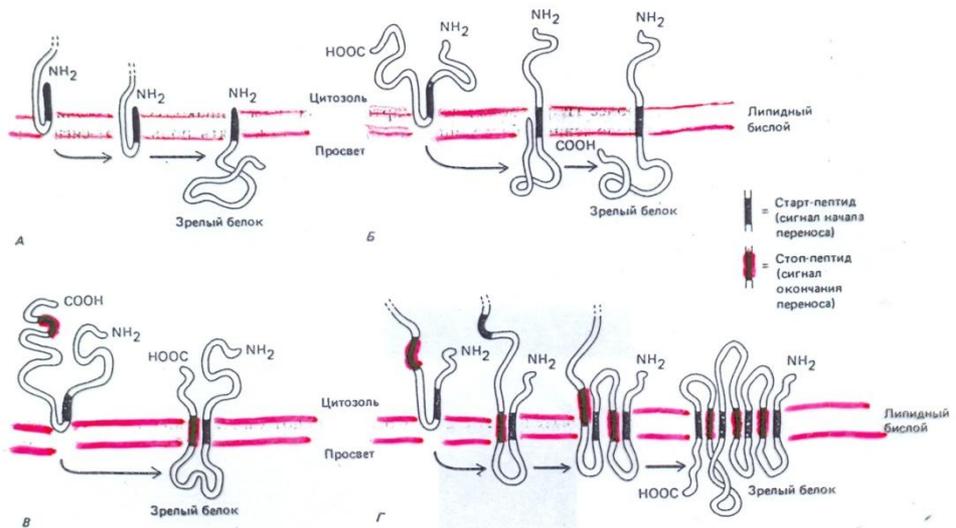
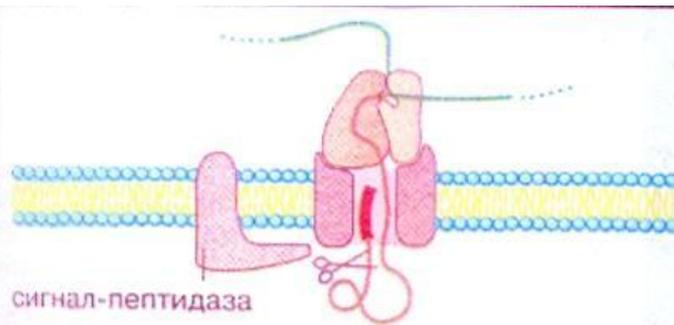


Рис. 8-42. Сильно упрощенная схема частицы, распознающей сигнал (SRP). Она представляет собой вытянутый комплекс, состоящий из шести полипептидных цепей (закрашенные участки) и одной молекулы 7SL-РНК. Один конец этой частицы связывается с рибосомой, а другой — с сигнальным пептидом вновь синтезированной полипептидной цепи. Было сделано предположение, что часть 7SL-РНК может сворачиваться в тРНК-подобную структуру, которая конкурирует в А-участке рибосомы с поступающими аминоацил-тРНК, вызывая, таким образом, паузу в трансляции.

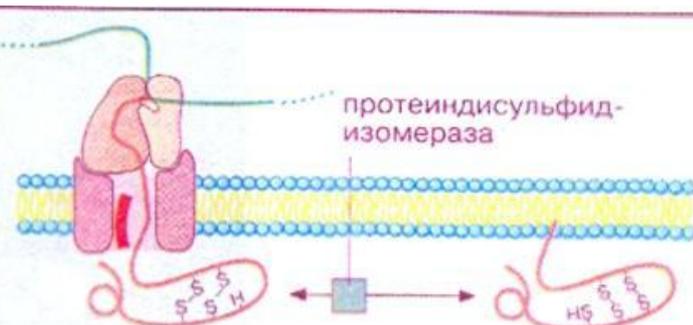




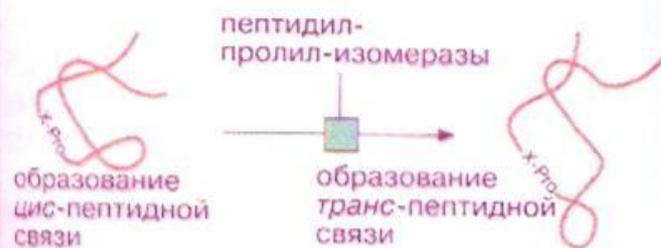




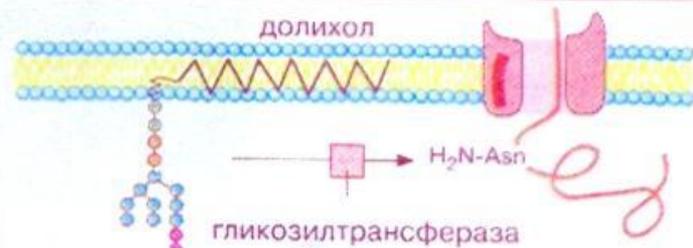
1. Отщепление сигнального пептида



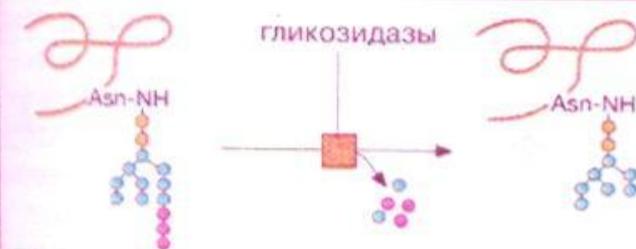
2. Перестройка дисульфидных мостиков



3. Изомеризация X-Pro-связей



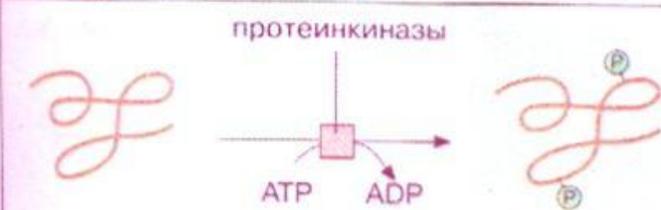
4. Перенос олигосахаридов



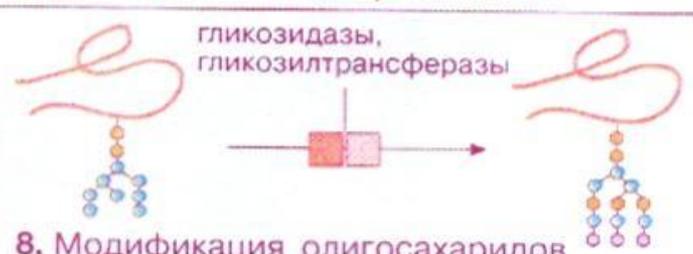
5. Укорачивание олигосахаридов



6. Связывание с шаперонами



7. Фосфорилирование

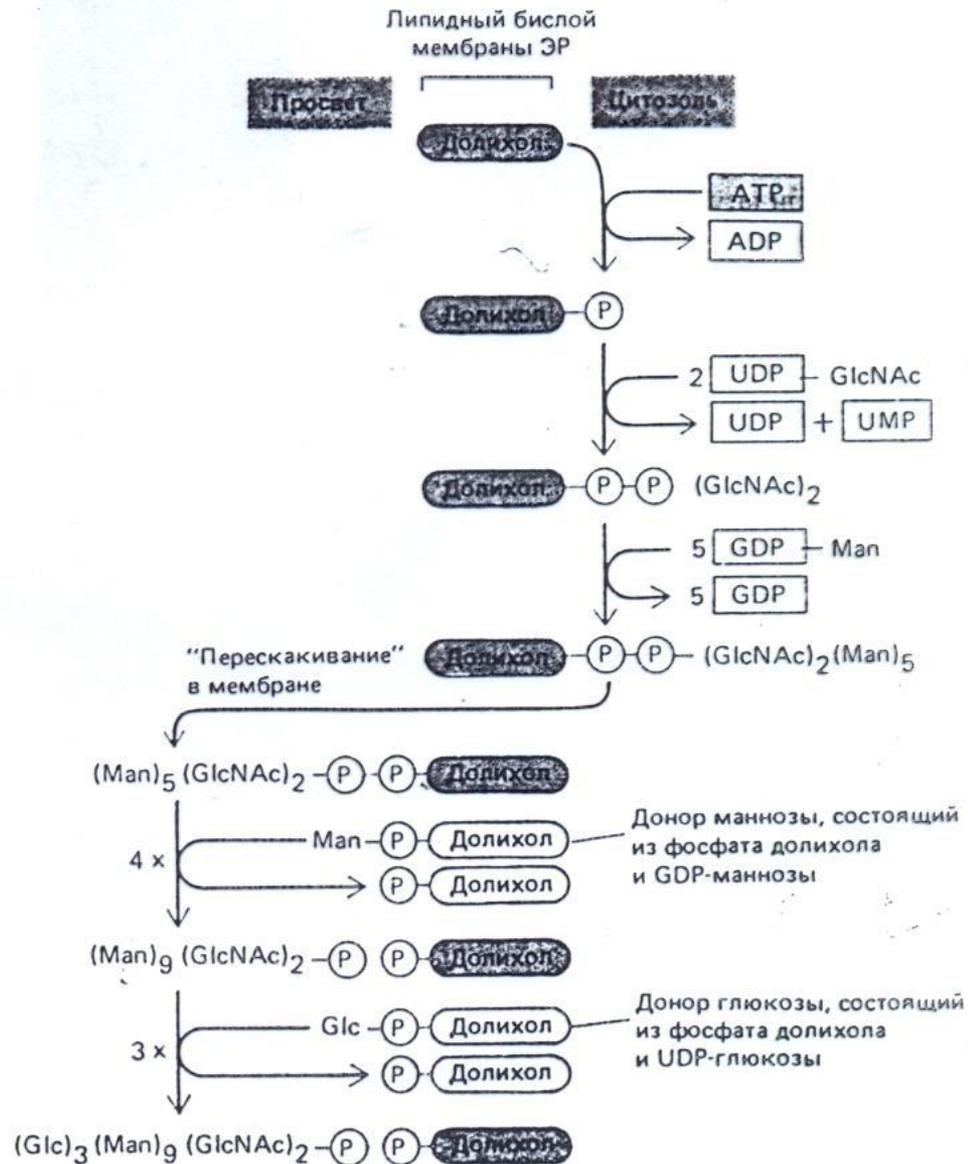


8. Модификация олигосахаридов

Б. Модификация белков

и ЭР. Сахара, выделенные бразуют «сердцевину», этого олигосахарида. Во тикопротейнах после раз ой «доделки» олигосаха парате Гольджи в нем от первоначальной струк ько сахара, составляющие рис. 8-63). Обратите вни о аспарагин находится вательности Asp-X-Ser (-Thr, где X может быть инокислотой, кроме

Рис. 8-54. Синтез липид-связанного олигосахарида, который переносит ся к остаткам аспарагина на внут ренней стороне мембраны ЭР. Этот олигосахарид собирается сахар за сахаром на каркасе из молекулы липида долихола (полиизопрено ид – см. схему 2-4). Первый сахар присоединяется к долихолу пиро фосфатным мостиком. Эта высоко энергетическая связь затем активи рует олигосахарид для переноса его от молекулы липида к боковой цепи аспарагина. Синтез олигосахарида начинается на цитозольной стороне мембраны ЭР. После того, как промежуточный продукт – липид Man₅GlcNAc₂ «перепрыгнет» через мембрану, синтез продолжается на внутренней ее стороне. Сокраще ния: GlcNAc – N-ацетилглюкоза- амин, Man – манноза, Glc – глюкоза.



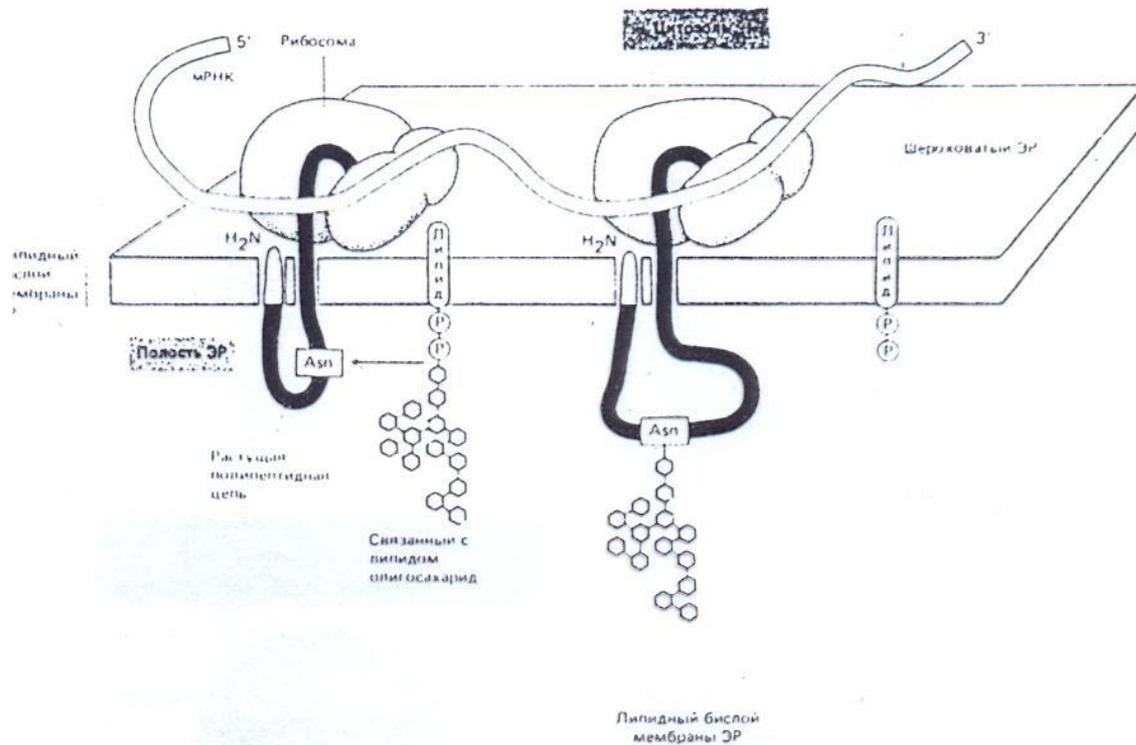


Рис. 8-53. N-связанное гликозилирование белков в ЭР. Почти тотчас после того, как полипептидная цепь попадает в просвет ЭР, она гликозилируется по доступным остаткам аспарагина. Олигосахарид, показанный на рис. 8-52, переносится к аспарагину как целая единица; эту реакцию катализирует связанный с мембраной фермент *гликозилтрансфераза*.

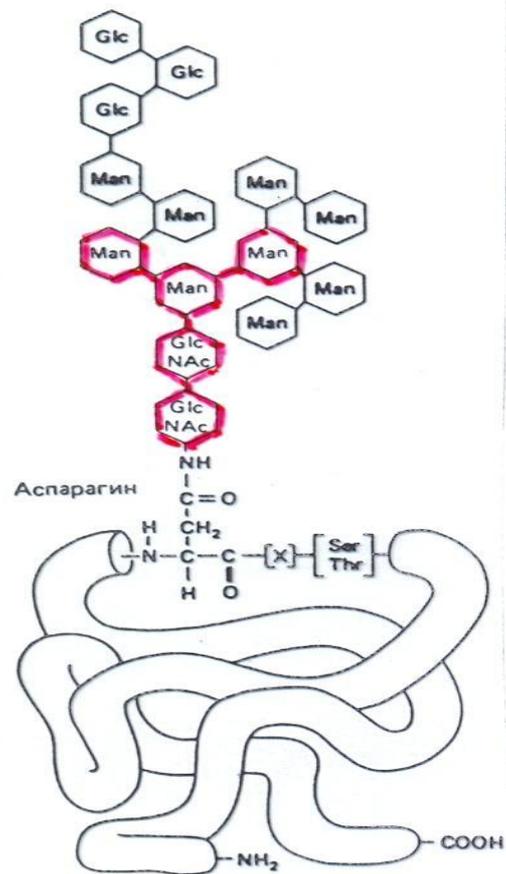


Рис. 8-52. Структура связанного с аспарагином олигосахарида, который добавляется к большинству белков на внутренней стороне мембраны ЭР. Сахара, выделенные цветом, образуют «сердцевину», или кор, этого олигосахарида. Во многих гликопротеинах после разнообразной «доделки» олигосахарида в аппарате Гольджи в нем остаются от первоначальной структуры только сахара, составляющие кор (см. рис. 8-63). Обратите внимание, что аспарагин находится в последовательности Asp-X-Ser или Asp-X-Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина.

Рис. 8-61. Примеры двух основных классов связанных с аспарагином (N-связанных) олигосахаридов, обнаруженных в зрелых гликопротеинах: «сложные» олигосахариды (А) и «олигосахариды с высоким содержанием маннозы» (Б). Существует множество вариаций этих структур. Например, показанный здесь сложный олигосахарид имеет три концевых цепи, но часто встречаются также олигосахариды с двумя или четырьмя концевыми цепями, в зависимости от гликопротеина и от клетки, в которой он образуется. Встречаются также «гибридные» олигосахариды с одной маннозной концевой цепью и одной — с GlcNAc-Gal. Три аминокислоты, выделенные цветом, представляют собой последовательность, которую узнает фермент, добавляющий к белку исходный олигосахарид. Сокращения: Asn — аспарагин; Man — манноза; GlcNAc — N-ацетилглюкозамин; NANA — N-ацетилнейраминная кислота (сиаловая кислота); Gal — галактоза; X — любая аминокислота.

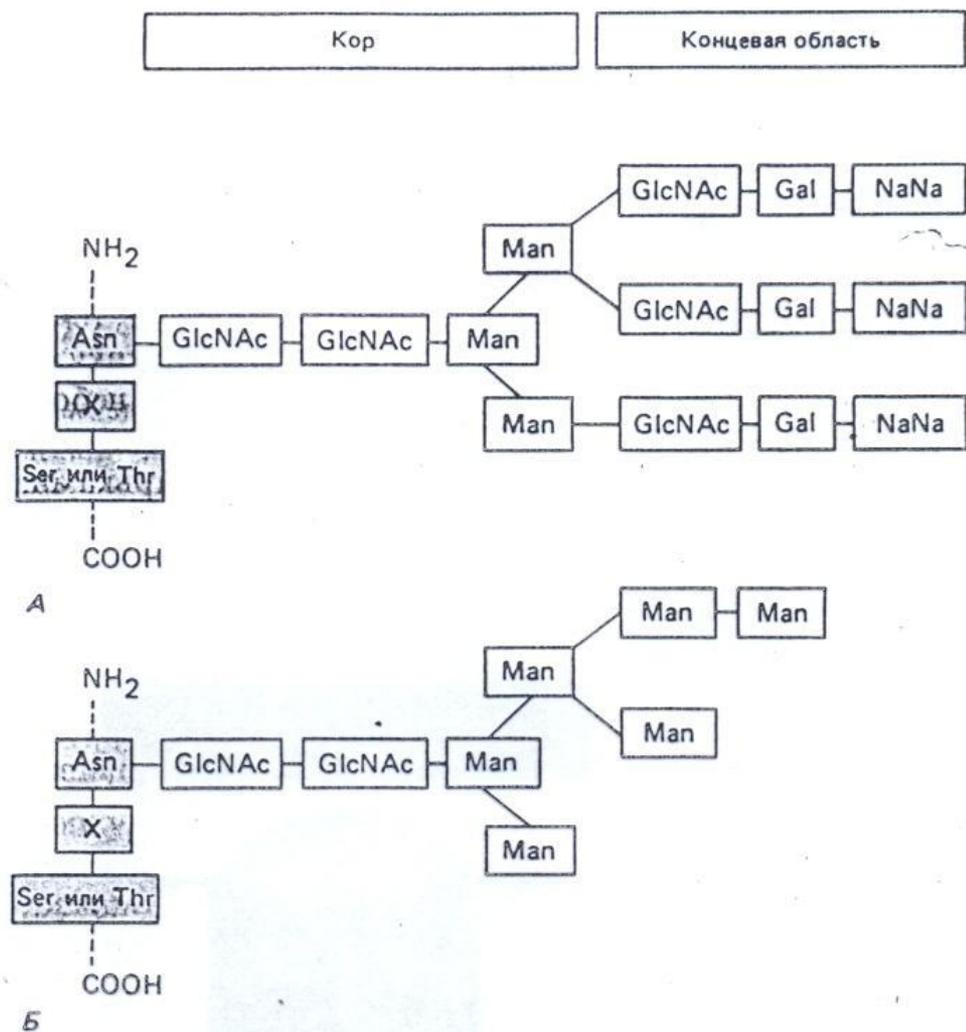
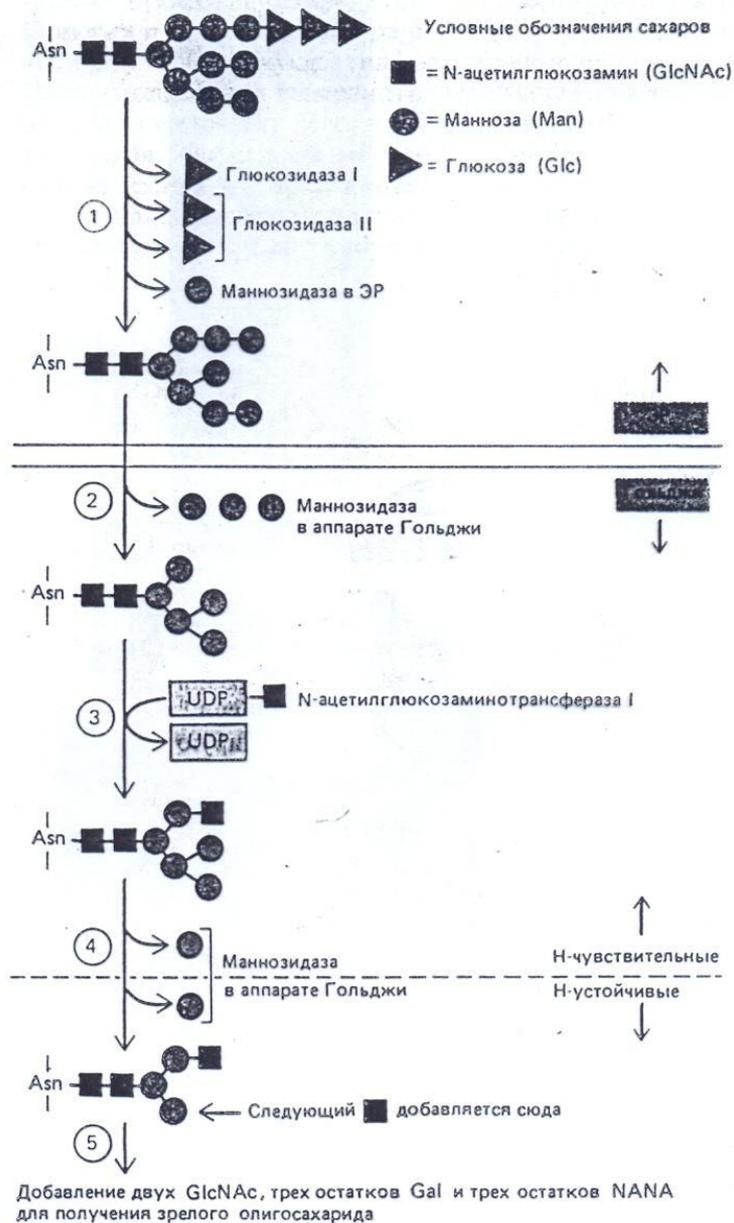


Рис. 8-63. Процессинг олигосахаридов, протекающий в ЭР и аппарате Гольджи. Процессинг высокоупорядочен, и каждая стадия, показанная здесь, зависит от предыдущей реакции в серии. Процессинг начинается в ЭР с удаления у олигосахарида, исходно перенесенного к белку, остатка глюкозы. Еще до завершения синтеза белка могут быть удалены все три остатка глюкозы. Затем маннозидаза в мембране ЭР удаляет определенный остаток маннозы. В стопке Гольджи маннозидаза I удаляет еще три остатка маннозы, а N-ацетилглюкозаминотрансфераза I добавляет остаток GlcNAc, не дающий маннозидазе II удалить два дополнительных остатка маннозы. В конце концов это приводит к образованию кора из трех остатков маннозы, присутствующего в олигосахаридах «сложного» типа. На этом этапе связь между двумя остатками GlcNAc в коре становится устойчивой к атаке высокоспецифичной эндогликозидазы (EndoH). Так как все последующие стадии данного процесса тоже устойчивы к действию EndoH, обработка этим ферментом широко применяется для разделения сложных олигосахаридов и олигосахаридов с высоким содержанием маннозы. Наконец, добавляются дополнительные остатки GlcNAc, галактозы и сиаловой кислоты. Степень процессинга исходного олигосахарида зависит от типа белка и от положения остатка аспарагина в том белке, к которому присоединен олигосахарид. Процессинг некоторых олигосахаридов прерывается в аппарате Гольджи, другие же претерпевают в различной степени изображенные здесь модификации. Сокращения см. в подписи к рис. 8-61.



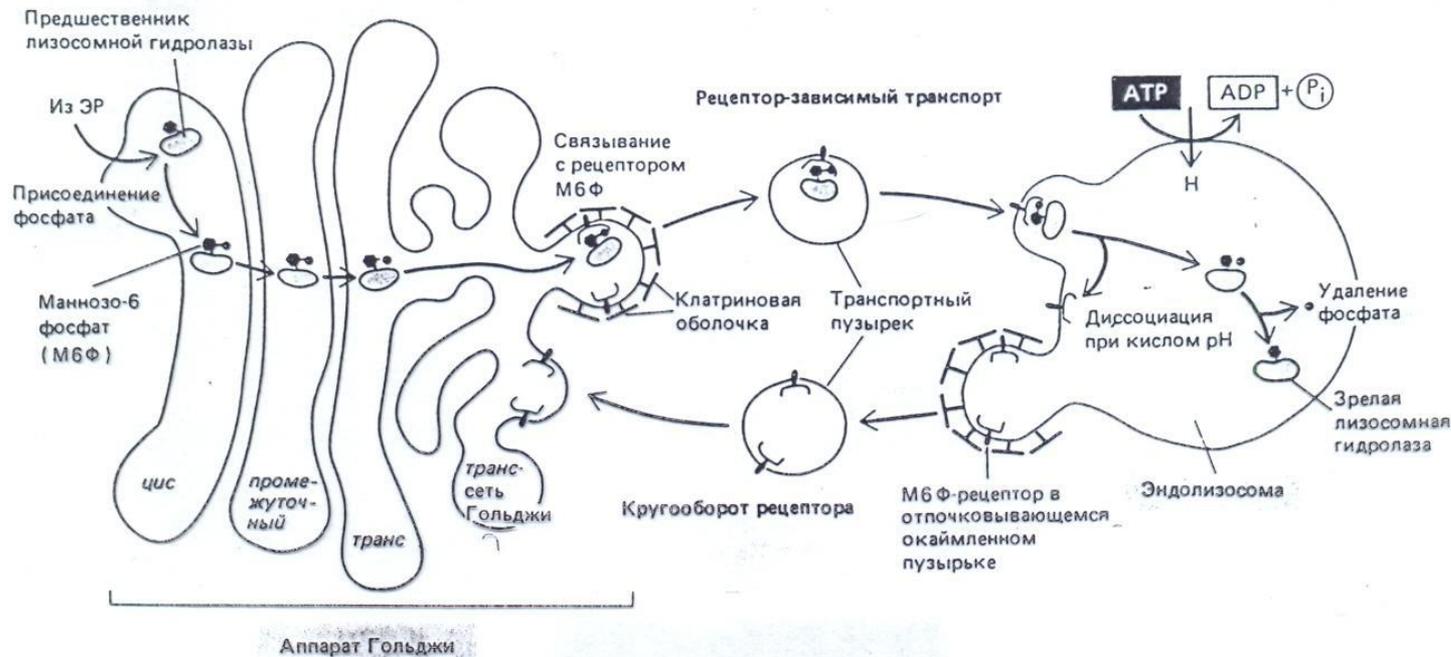


Рис. 8-72. Транспорт вновь образованных лизосомных гидролаз в лизосомы. В *цис*-аппарате Гольджи предшественники лизосомных гидролаз «метятся» при помощи маннозо-6-фосфатных групп, а в *транс*-сети Гольджи отделяются от других типов белков. Это отделение происходит потому, что отпочковывающиеся от *транс*-сети Гольджи клатриновые окаймленные пузырьки содержат рецепторы маннозо-6-фосфата, связывающие лизосомные гидролазы. Пузырьки утра-

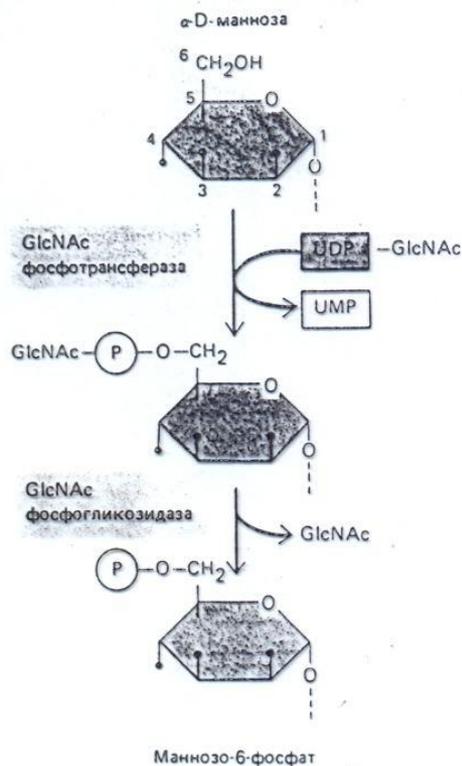


Рис. 8-74. Образование маннозо-6-фосфатного маркера на лизосомной гидролазе происходит в два этапа. Сначала GlcNAc-фосфотрансфераза присоединяет P-GlcNAc к 6-му углеродному атому некоторых остатков маннозы N-связанного олигосахарида, связанного с лизосомным гликопротеином-предшественником. Затем фосфогликозидаза отрезает остаток GlcNAc и в результате образуется маннозо-6-фосфатный маркер. Первый фермент специфически активируется сигнальным участком на лизосомных гидролазах (см. рис. 8-75), тогда как фосфогликозидаза является неспецифическим ферментом. Такая модификация некоторых остатков маннозы в *цис*-компарimente Гольджи защищает их от действия маннозидаз, которые встретятся позже, в *промежуточном* компартменте аппарата Гольджи.

Рис. 8-75. У фермента GlcNAc-фосфотрансферазы, узнающей лизосомные гидролазы в аппарате Гольджи, участок узнавания и активный центр не совпадают. В активном центре связываются богатые маннозой N-связанные олигосахариды и UDP-GlcNAc. Сайт узнавания объединяется с сигнальным участком, имеющимся только на поверхности лизосомных гидролаз и их предшественников.

