

第六章
细胞内功能区隔
与蛋白质分选



INTRACELLULAR COMPARTMENT AND PROTEINS SORTING

本章内容提要

第一节 蛋白质分选的基本原理

第二节 膜泡运输

第三节 内质网

第四节 高尔基体

第五节 溶酶体与过氧化物酶体



- 定义：结构、功能和发生上相关的内膜形成的细胞结构称为细胞内膜系统。
- 功能：区隔化；增加表面积。
- 系统发生上内膜起源于质膜的内陷和内共生。
- 个体发生上内膜来源于原有内膜系统的分裂，具有epigenetic的特性。



第一节 蛋白质分选的基本原理

- 细胞内合成的蛋白质、脂类等物质之所以能够定向的转运到特定的细胞器取决于两个方面：
 - 其一是蛋白质中包含特殊的**信号序列**（signal sequence）。
 - 其二是细胞器上具特定的信号**识别装置**（分选受体， sorting receptor）。

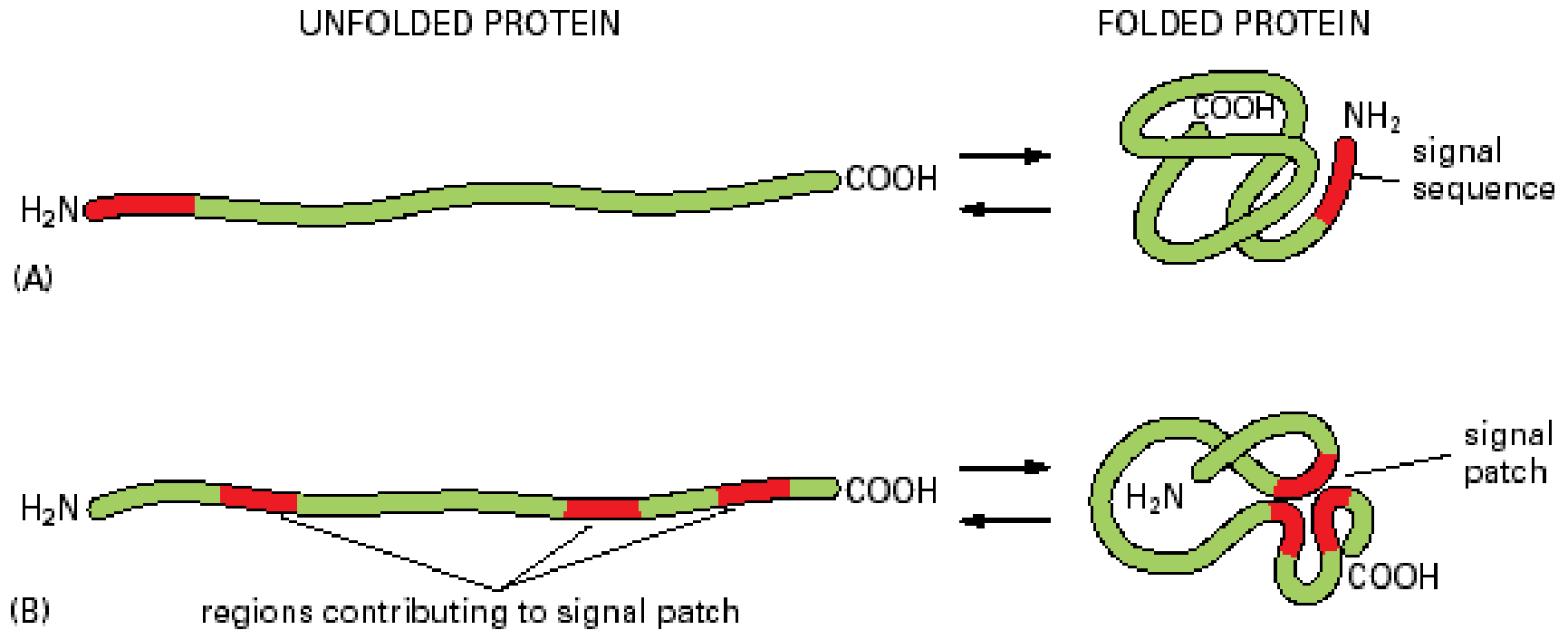


一、蛋白质分选信号

- ①信号序列（**signal sequence**）：引导蛋白质定向转移的线性序列，通常15-60个氨基酸残基，对所引导的蛋白质没有特异性要求。
- ②信号斑（**signal patch**）：存在于完成折叠的蛋白质中，构成信号斑的信号序列之间可以不相邻，折叠在一起构成蛋白质分选的信号。



signal sequence and signal patch

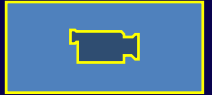


一些典型的分选信号

功能	信号序列
输入细胞核	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
输出细胞核	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
输入线粒体	⁺ 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 ⁻
输入质体	⁺ H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu- Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu- Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
输入过氧化物酶体	-Ser-Lys-Leu-COO ⁻
输入内质网	⁺ 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-
返回内质网	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻



二、蛋白质分选运输机制



- 1、门控运输（gated transport）：如通过核孔复合体的运输。
- 2、跨膜运输（transmembrane transport）：蛋白质通过跨膜通道进入目的细胞器。
- 3、膜泡运输（vesicular transport）：蛋白质在内质网或高尔基体中被包装成衣被小泡，选择性地运输到靶细胞器。



第二节 胞内膜泡运输

- 内膜系统之间的物质传递常通过膜泡运输进行。
- 多数运输小泡在膜的特定区域以出芽的方式产生。表面具有一个笼子状的由蛋白质构成的衣被（coat）。衣被在运输小泡与靶细胞器的膜融合之前解体。



- 衣被小泡在细胞内沿微管或微丝运输。
- 与膜泡运输有关的马达蛋白有3类，在这些马达蛋白的牵引下，可将膜泡运到特定的区域。
 - 动力蛋白（dynein），趋向微管负端；
 - 驱动蛋白（kinesin），趋向微管正端；
 - 肌球蛋白（myosin），趋向微丝的正极。



一、衣被类型

- 已知三类：
 1. 笼形蛋白（clathrin）
 2. COPI
 3. COPII
- 主要作用：
 1. 选择性的将特定蛋白聚集在一起，形成运输小泡；
 2. 如同模具一样决定运输小泡的外部特征。




三种衣被小泡的功能

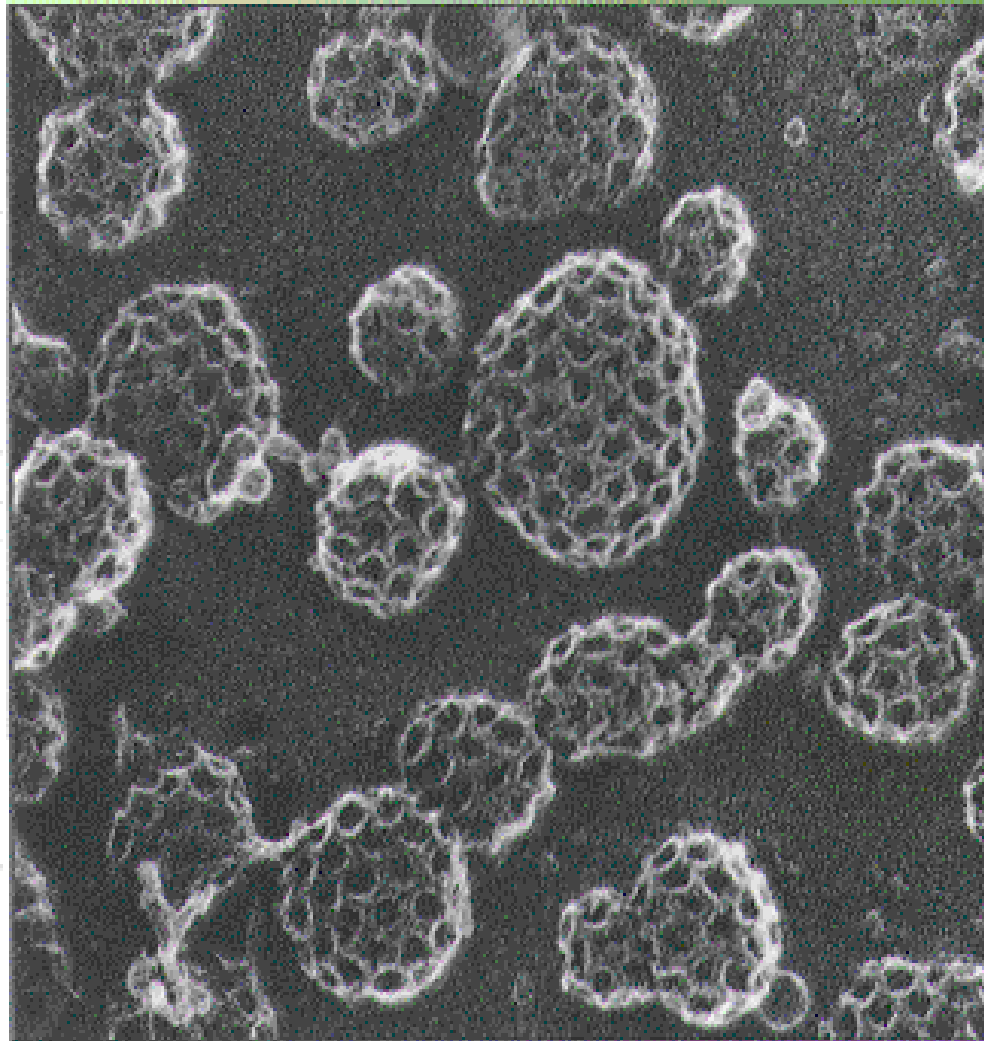
衣被类型	GTP酶	组成与衔接蛋白	运输方向
clathrin	ARF	Clathrin重链与轻链, AP2	质膜→内体
		Clathrin重链与轻链, AP1	高尔基体→内体
		Clathrin重链与轻链, AP3	高尔基体→溶酶体, 植物液泡
COP I	ARF	COP $\alpha\beta\beta'\gamma\delta\epsilon\zeta$	高尔基体→内质网
COP II	Sar 1	Sec23/Sec24复合体, Sec 13/31复合体, Sec 16	内质网→高尔基体



(一) 笼形蛋白衣被小泡

- 运输途径：质膜→内体；高尔基体→内体；高尔基体→溶酶体、植物液泡。
- 衣被结构：3重链、3轻链，形如triskelion。clathrin的曲臂交织在一起，形成5边形网孔的笼子。
- 衔接蛋白：连接衣被与受体。 

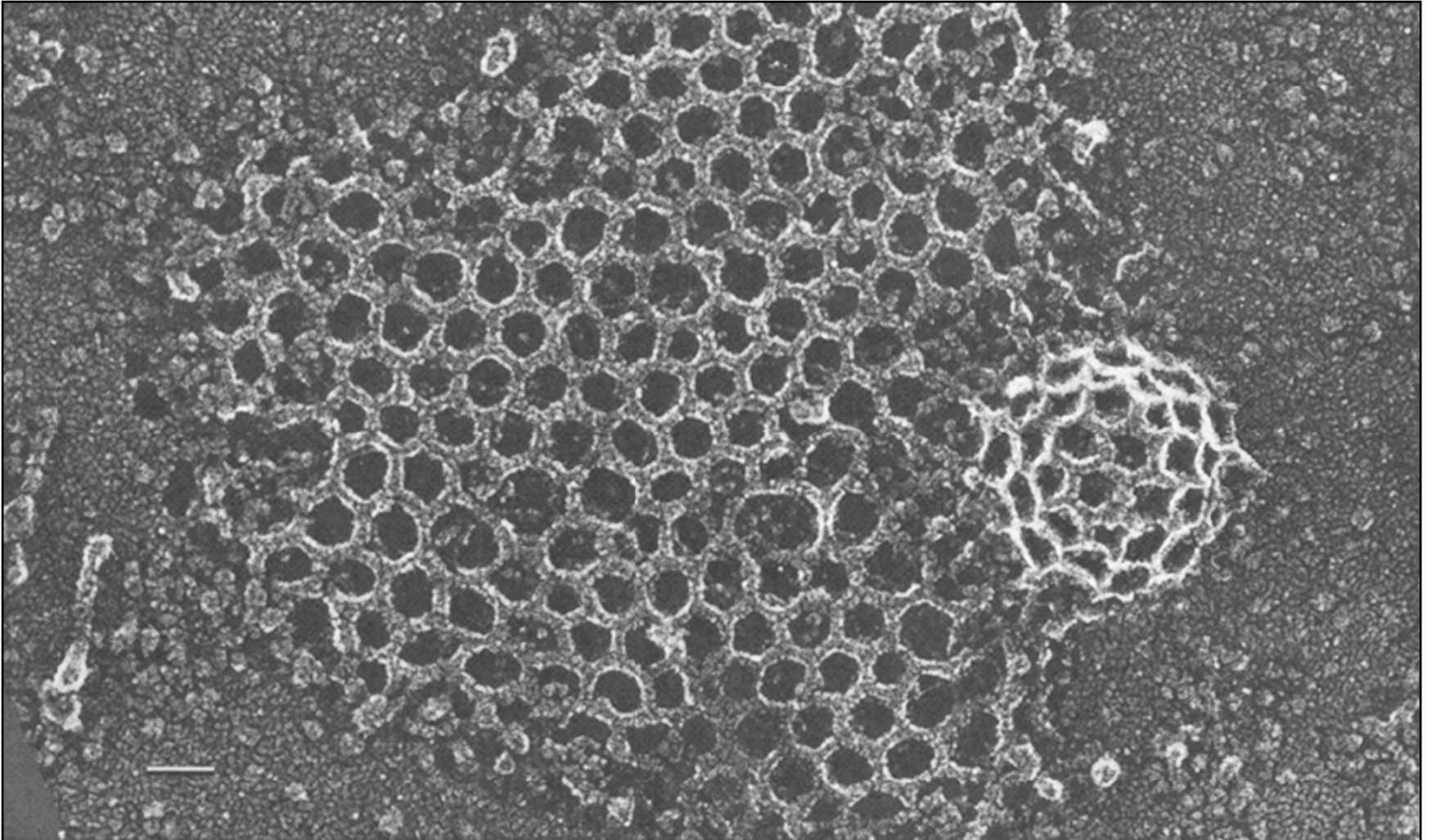




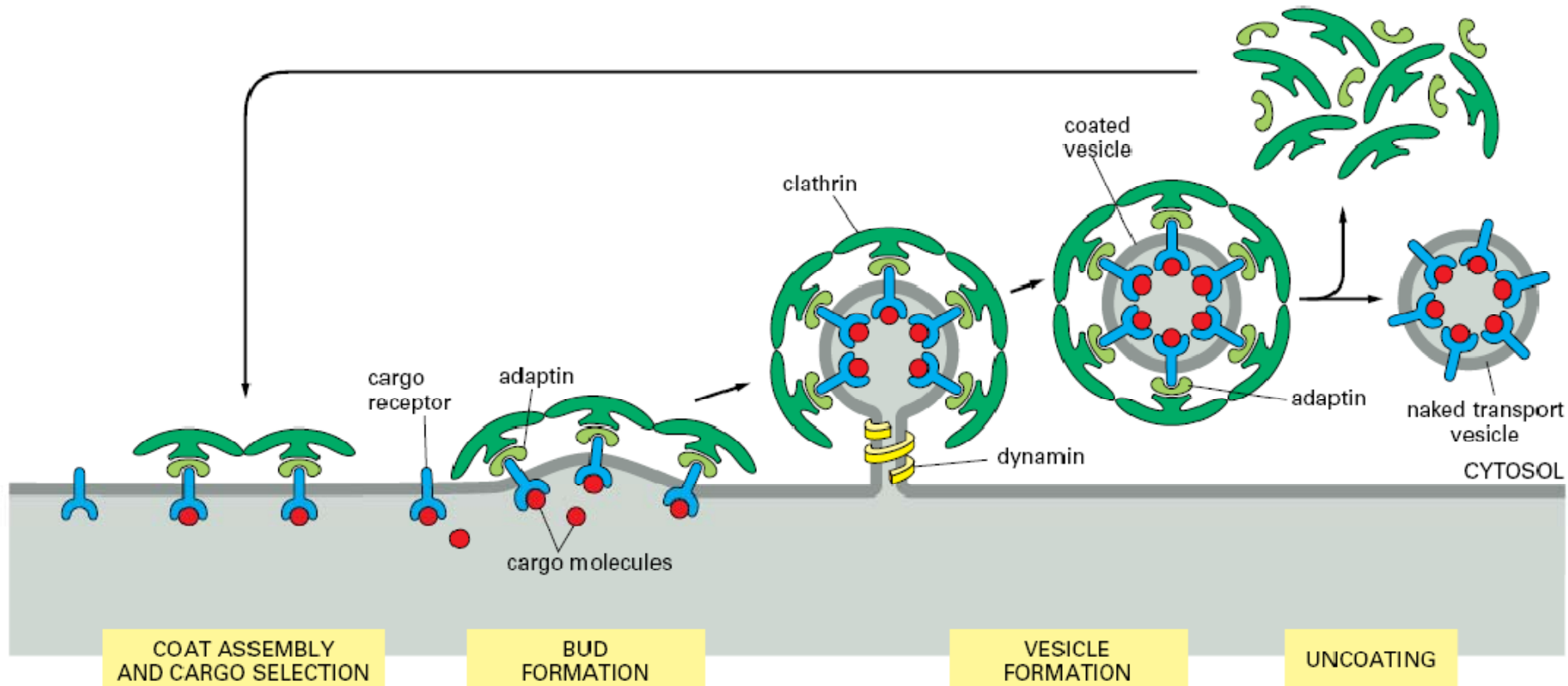
0.2 μm

Clathrin coated vesicles

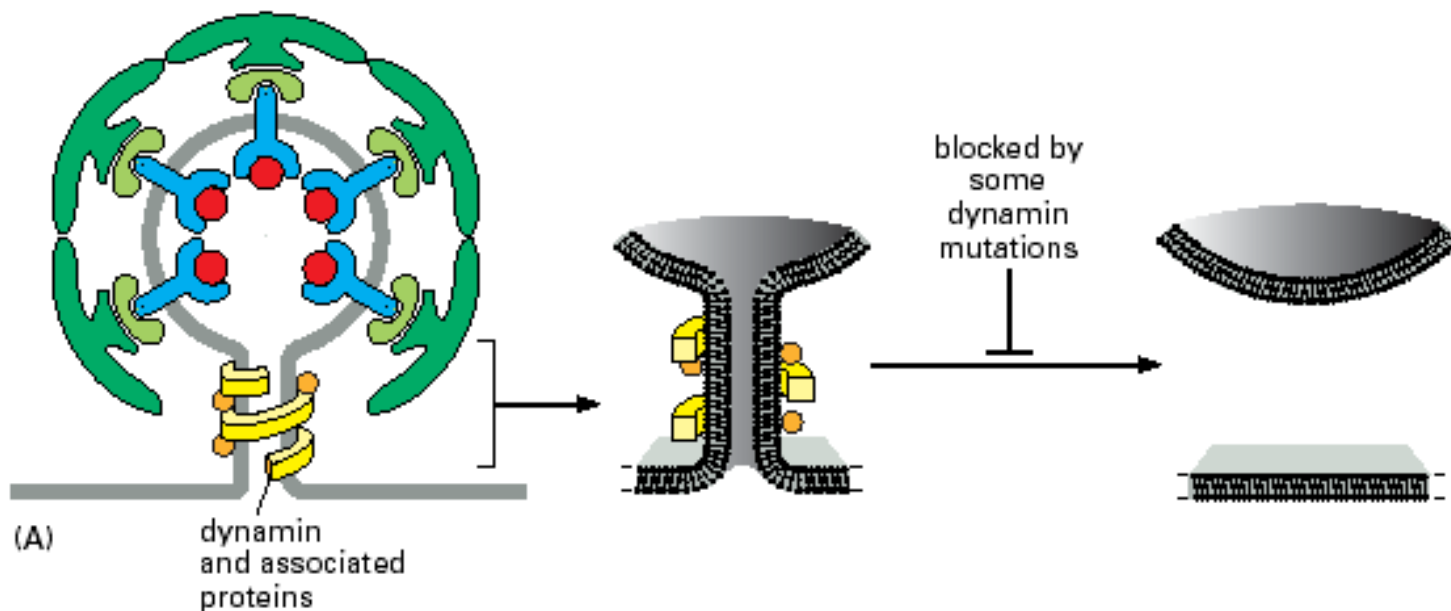
Deep-etch view of a typical clathrin lattice



Selective transport by clathrin coated vesicles



- 当衣被小泡形成时，可溶性蛋白dynamamin聚集成一圈围绕在芽的柄部，使柄部的膜尽可能地拉近（小于1.5nm），导致膜融合，pinch off衣被小泡。

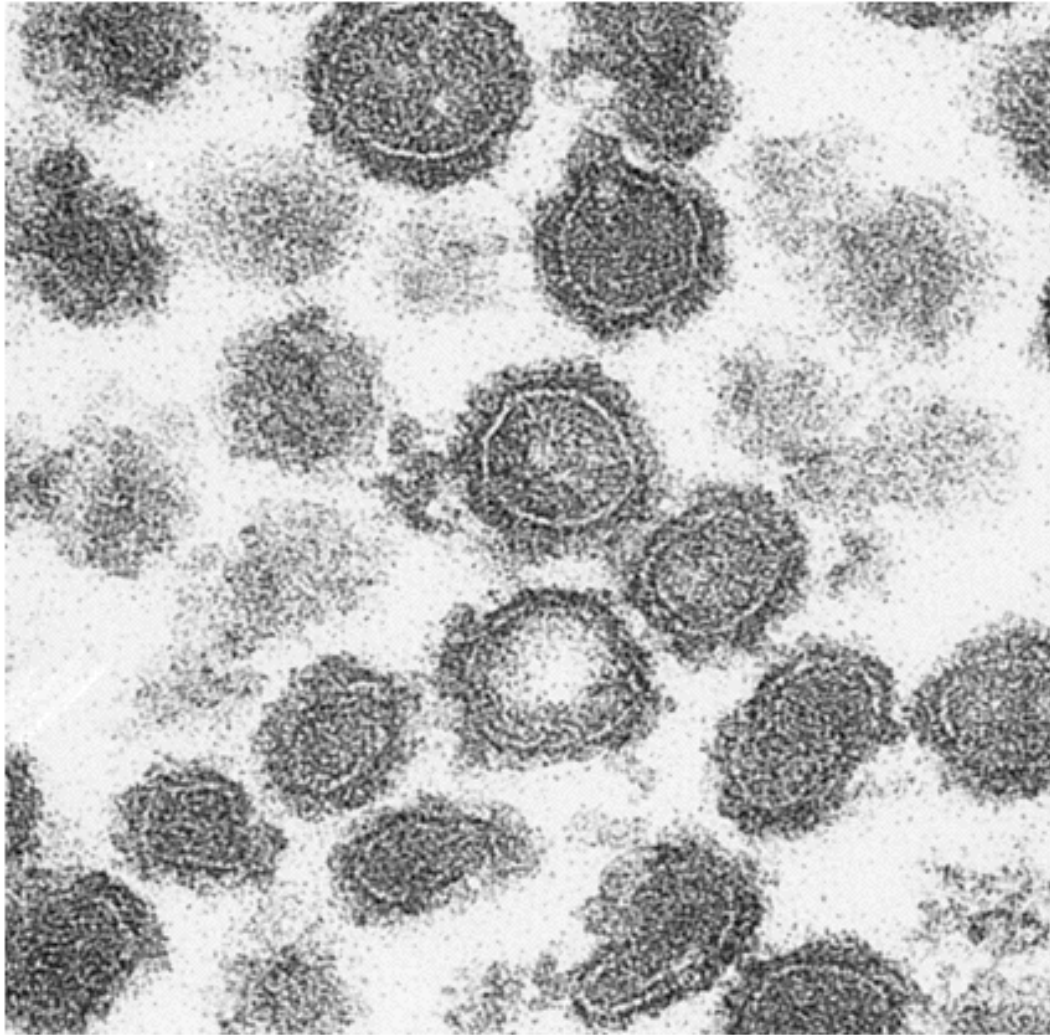


(二) COP I衣被小泡

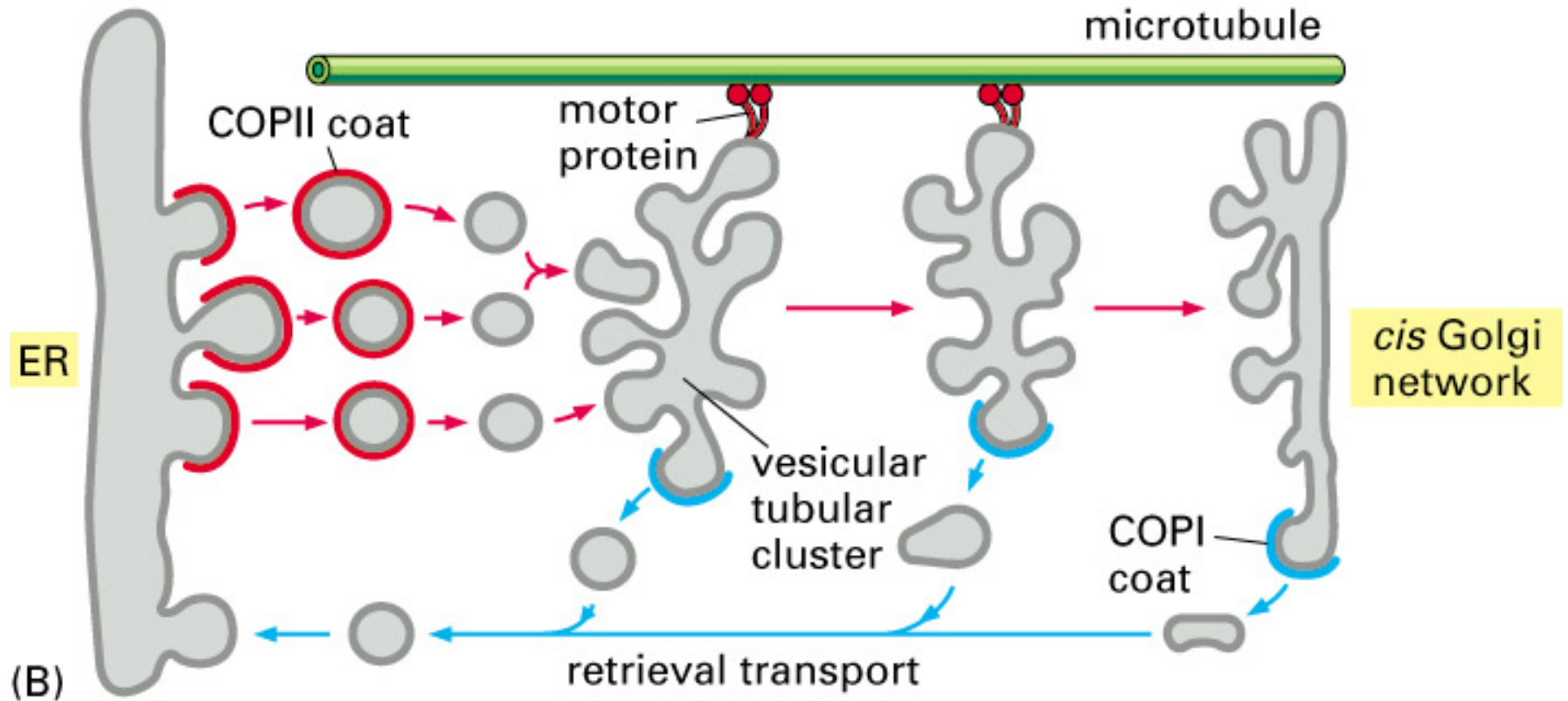
- 功能：回收、转运内质网逃逸蛋白（escaped proteins）返回内质网；也可介导高尔基体不同区域间的蛋白质运输。
- 组成：由7种蛋白组成。
- 回收信号：Lys-Asp-Glu-Leu（KDEL）。



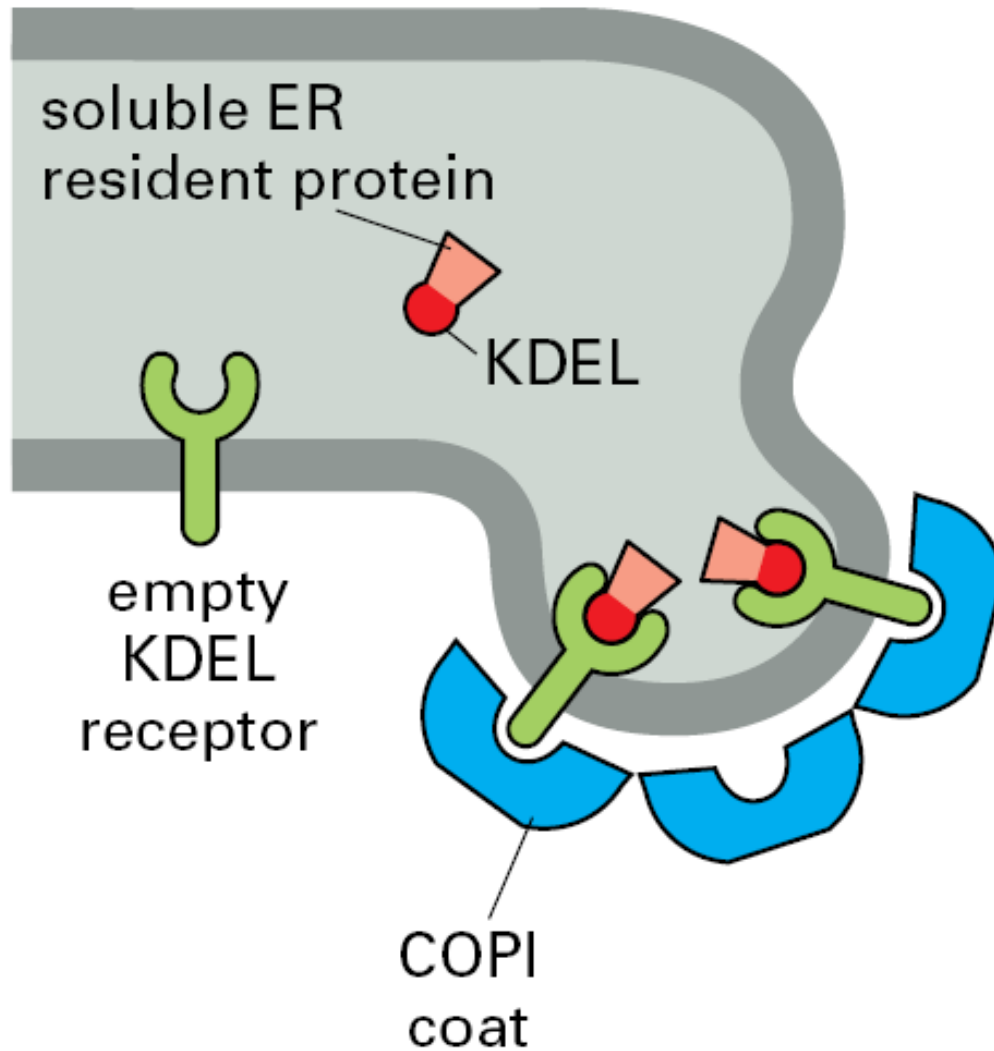
COP I Vesicles



Cop I and II Vesicles



Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)

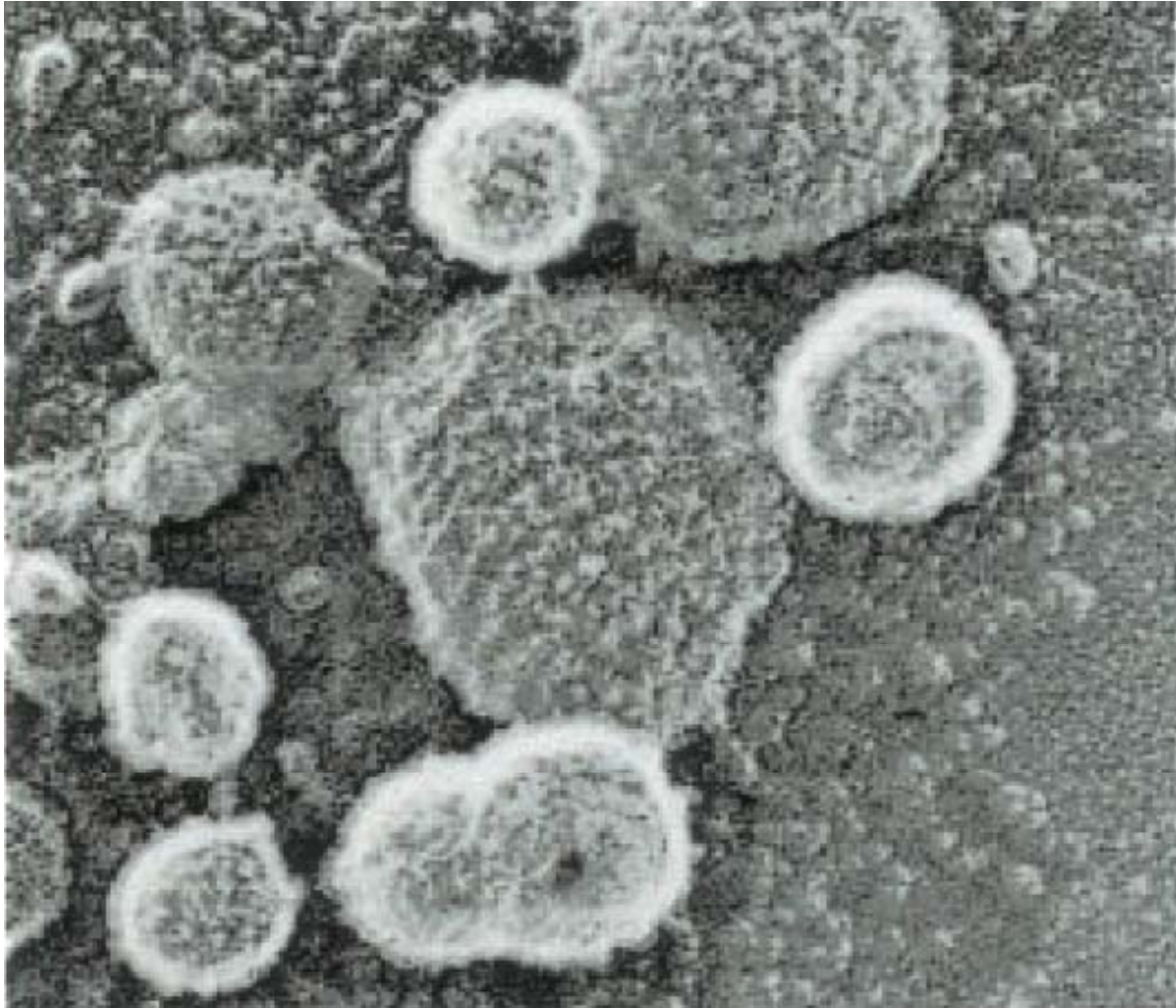


(三) COP II 衣被小泡

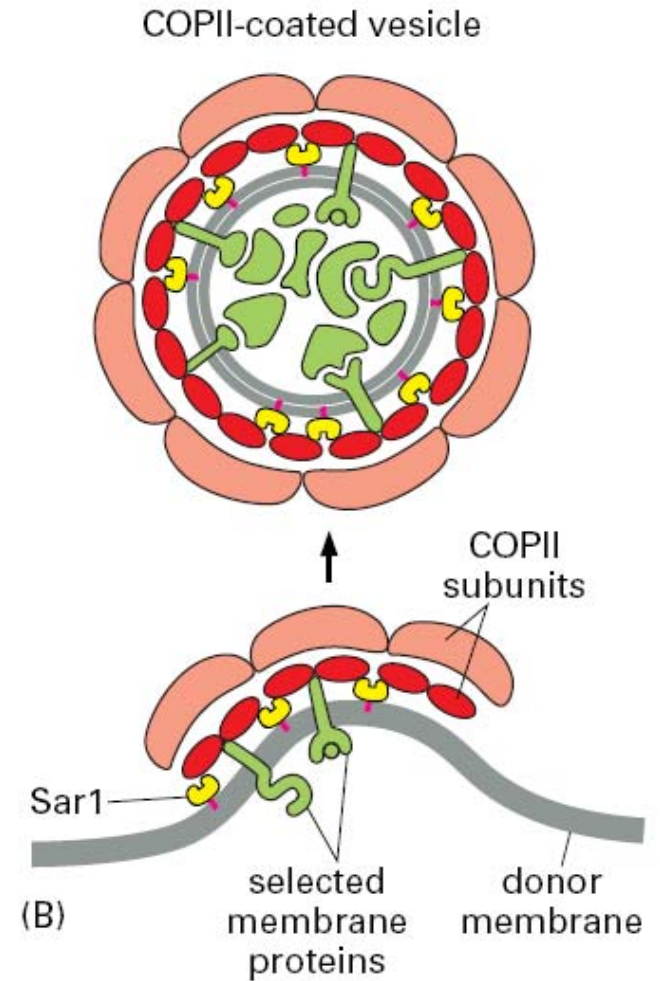
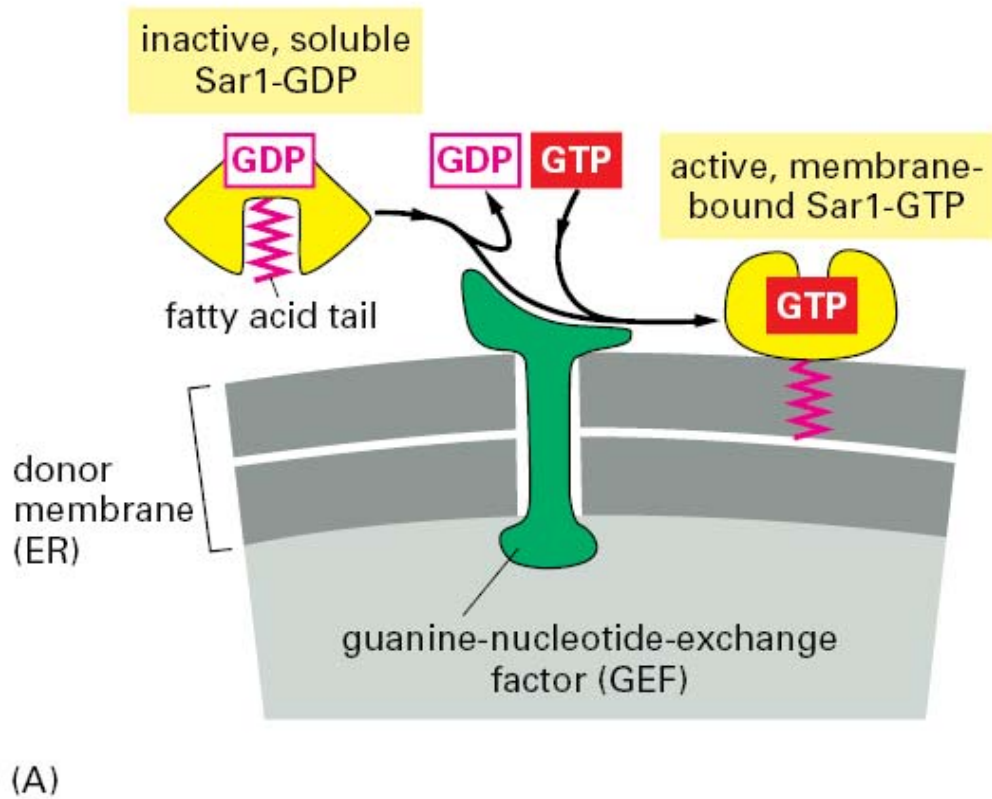
- 介导内质网到高尔基体的物质运输。形成于内质网出口位点，该处无核糖体。
- 主要亚基：Sar1GTP、Sec23/Sec24、Sec13/Sec31。
- 多数跨膜蛋白直接与COP II结合，少数跨膜蛋白和多数可溶性蛋白通过受体与COP II结合。
- 分选信号：位于跨膜蛋白胞质面，形式多样，常包含双酸性基序[DE]X[DE]，如Asp-X-Glu。



COP II Vesicles



COPII Coated vesicle



二、衣被形成

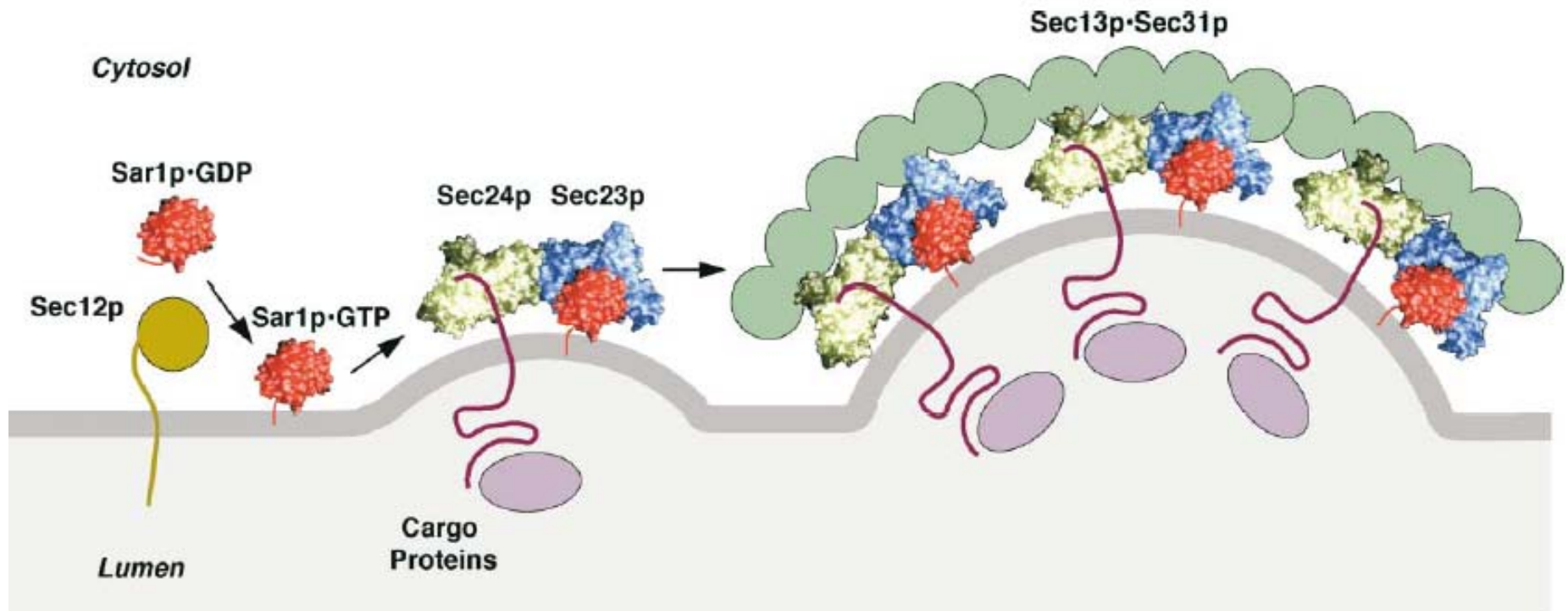
- 衣被召集GTP酶：为G蛋白，活化状态可引起衣被蛋白聚集，包括ARF和SAR 1。存在于细胞质，激活后转位到膜上。
- ARF：参与clathrin和COP I衣被的形成。
- SAR 1：参与COP II衣被的形成。



- ER上形成COPII小泡时，SAR1交换GDP/GTP而激活。
- 激活的SAR1暴露出脂肪酸链尾巴，插入ER膜，促进衣被蛋白的核化和组装。
- SAR1可激活磷脂酶D，将一些磷脂水解，使衣被蛋白牢固地结合在膜上。
- 当小泡从膜上释放后，衣被很快就解体。



Coat assembly

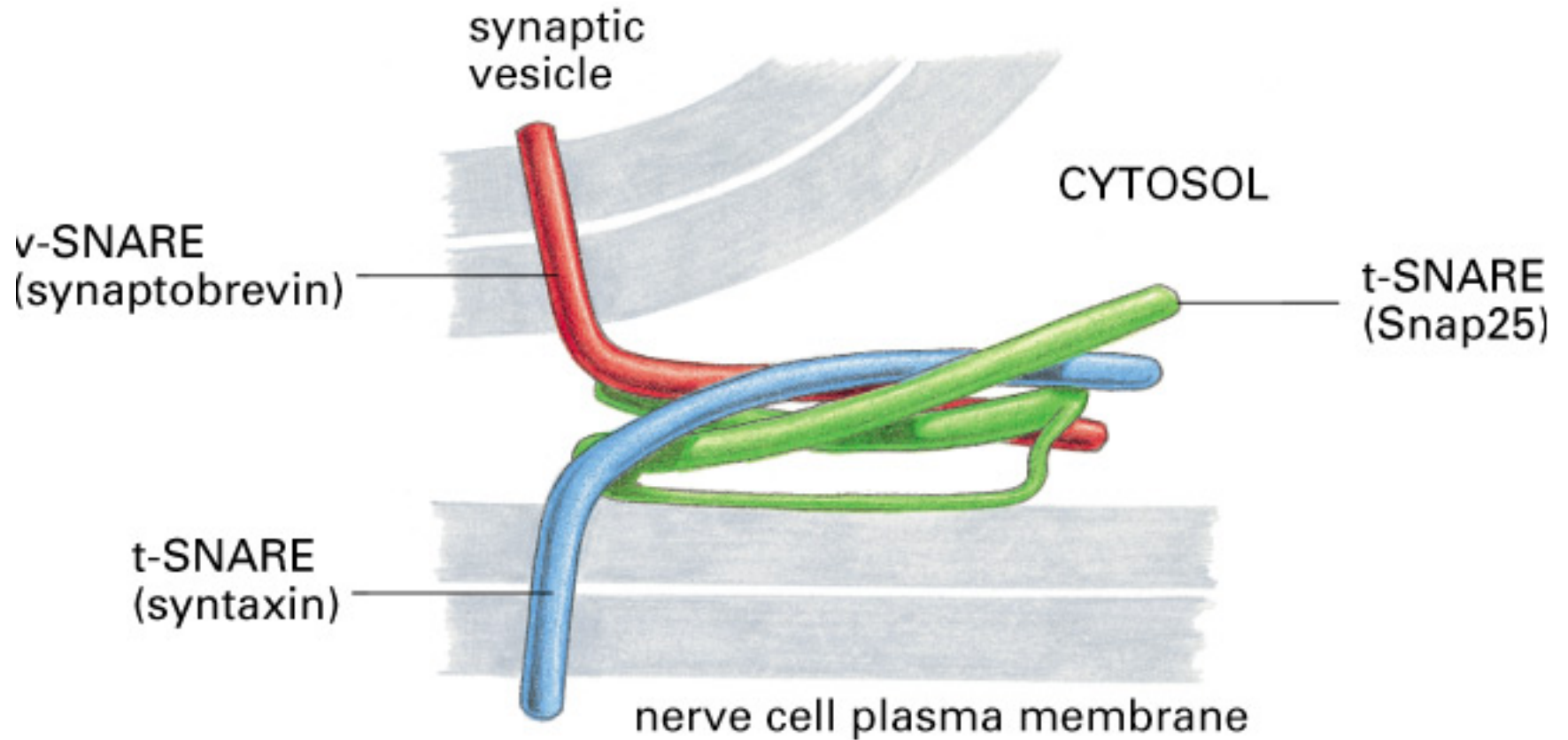


三、膜泡运输的定向机制

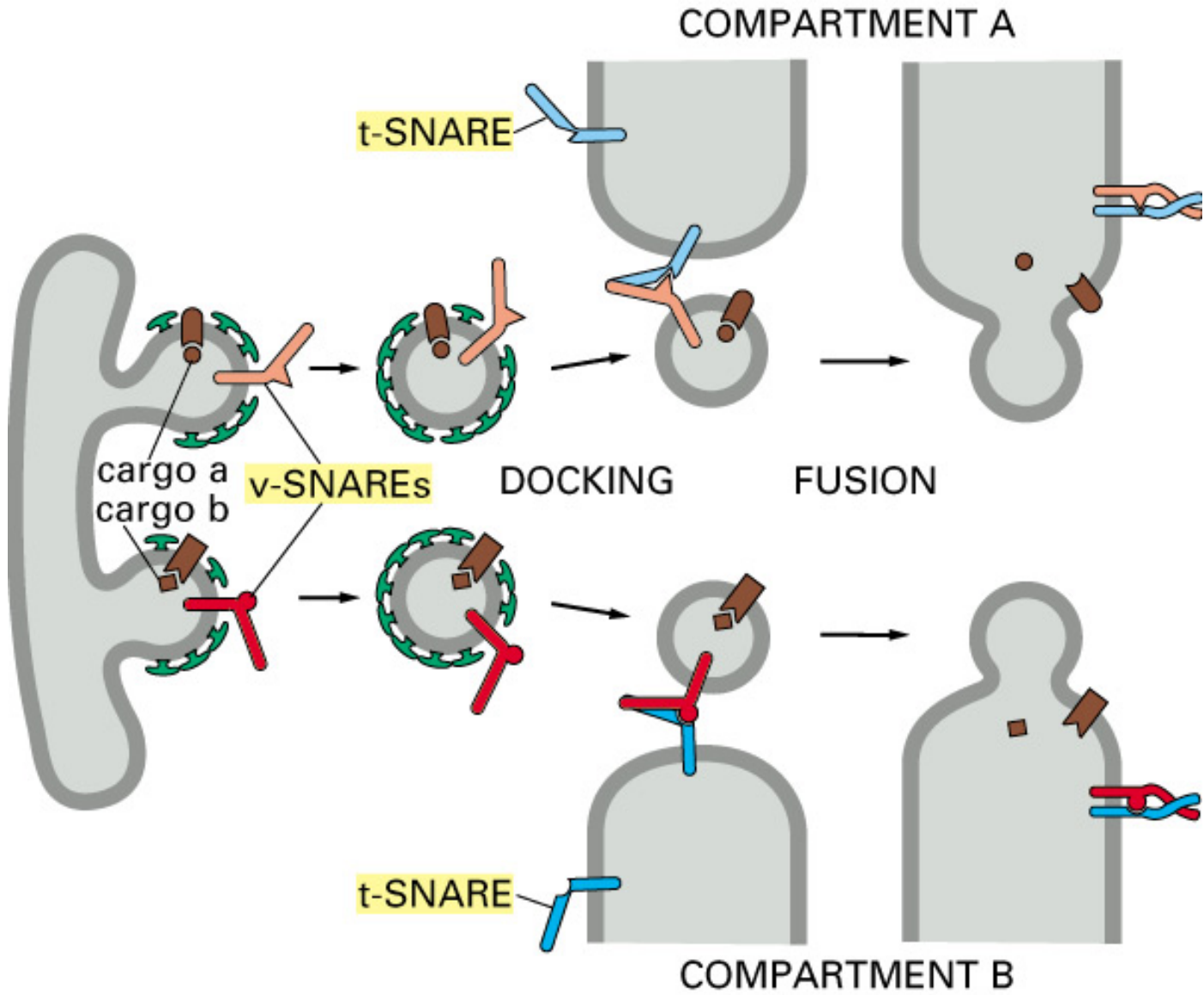
- (一) SNAREs
- 功能：介导运输小泡与靶膜的融合。
- 类型：v-SNAREs和t-SNAREs。
- 结构：具有一个螺旋结构域，相互缠绕形成跨SNAREs复合体，将小泡与靶膜拉在一起。



SNAREs



SNAREs in vesicle transport



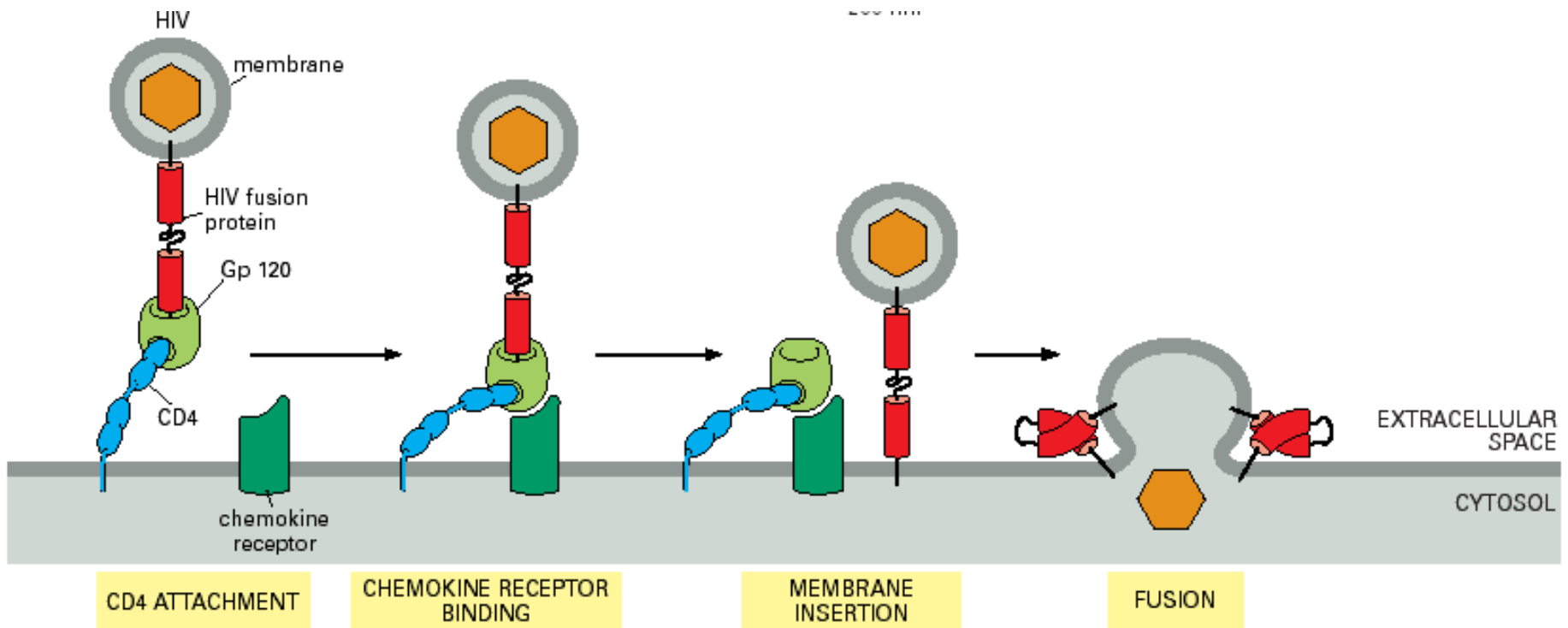
- 神经细胞中，SNAREs负责突触小泡的停泊和融合。

破伤风毒素和肉毒素能选择性地降解SNAREs，阻断神经传导。

- 病毒融合蛋白的工作原理与SNAREs相似，介导病毒与宿主质膜的融合。



HIV fusion protein

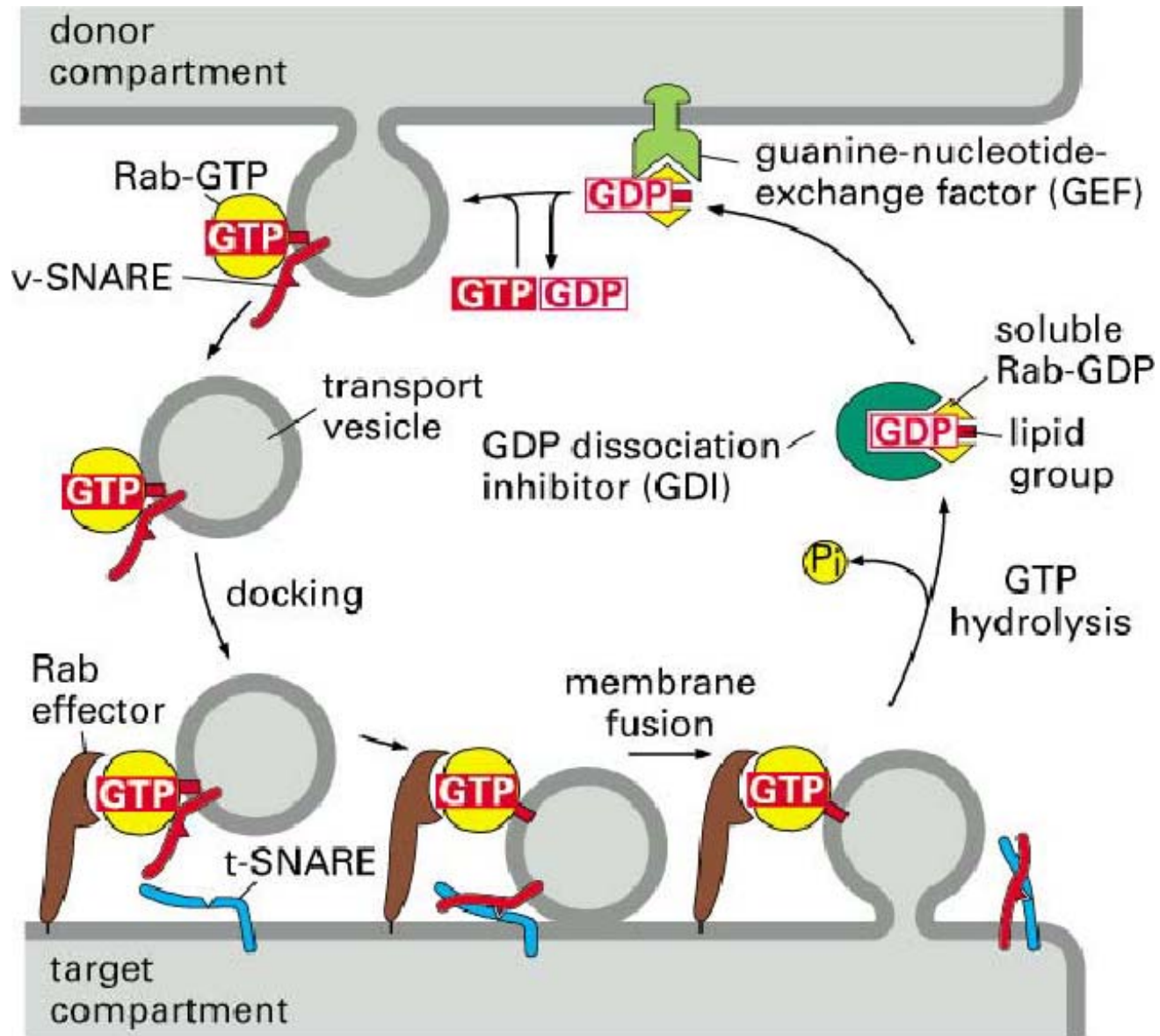


(二) Rabs

- 也叫targeting GTPase，属于G蛋白，起分子开关作用。已知30余种，不同膜上具有不同的Rabs。
- Rabs促进和调节运输小泡的停泊和融合。
- Rabs还有许多效应因子，帮助运输小泡聚集和靠近靶膜，触发SNAREs抑制因子。



Rabs in docking



四、受体介导的内吞

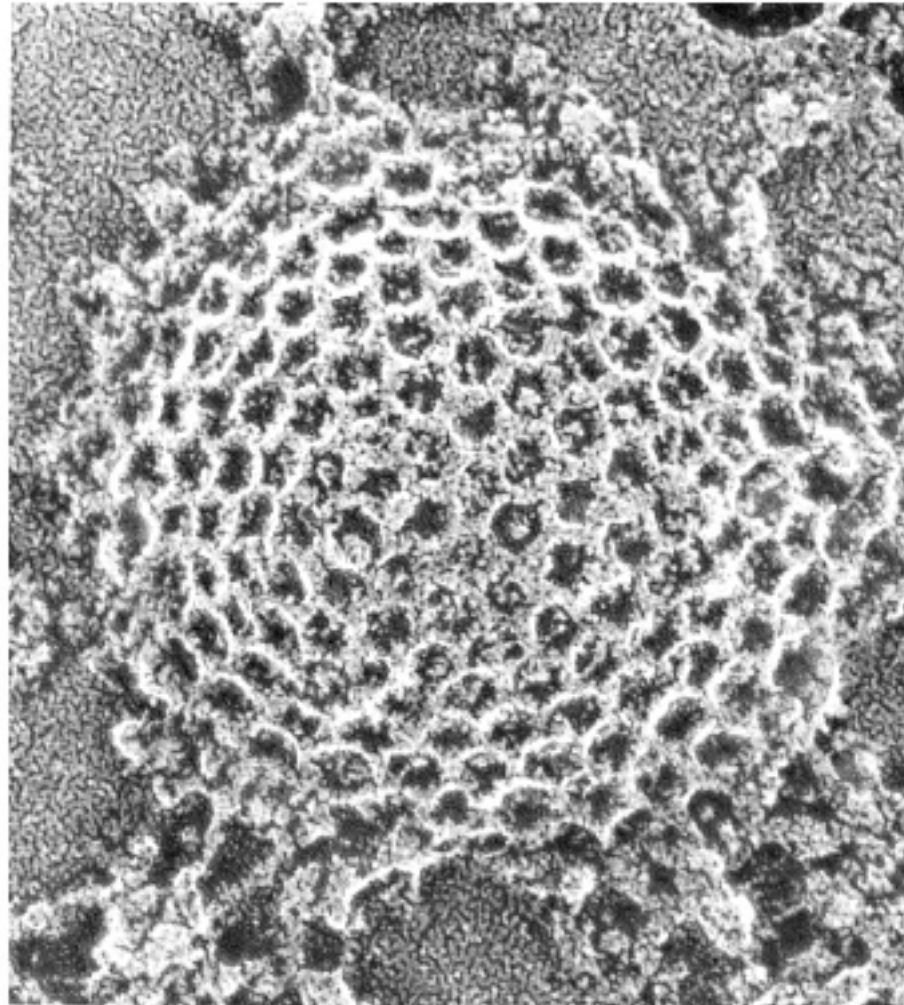
- 批量内吞（Bulk-phase endocytosis）：非特异性的摄入细胞外物质，穴样内陷（caveolae）是发生批量内吞的部位。
- 受体介导的内吞 (receptor mediated endocytosis) 是一种选择浓缩机制。LDL、运铁蛋白、生长因子、胰岛素等都通过RME转运。



- 衣被小窝（coated pits）是质膜内凹的部位，相当于分子过滤器(约占肝细胞表面积2%)。受体、笼形蛋白和衔接蛋白大量集中于此处。
- 受体胞质端的Tyr-X-X-Φ是衔接蛋白识别的信号，X为任何氨基酸，Φ为分子较大的疏水氨基酸(如Phe、Leu、Met)。
- 受体同配体结合后启动内化作用，衣被开始组装。



**Clathrin coated pit
on the cytosolic
face of a cell**



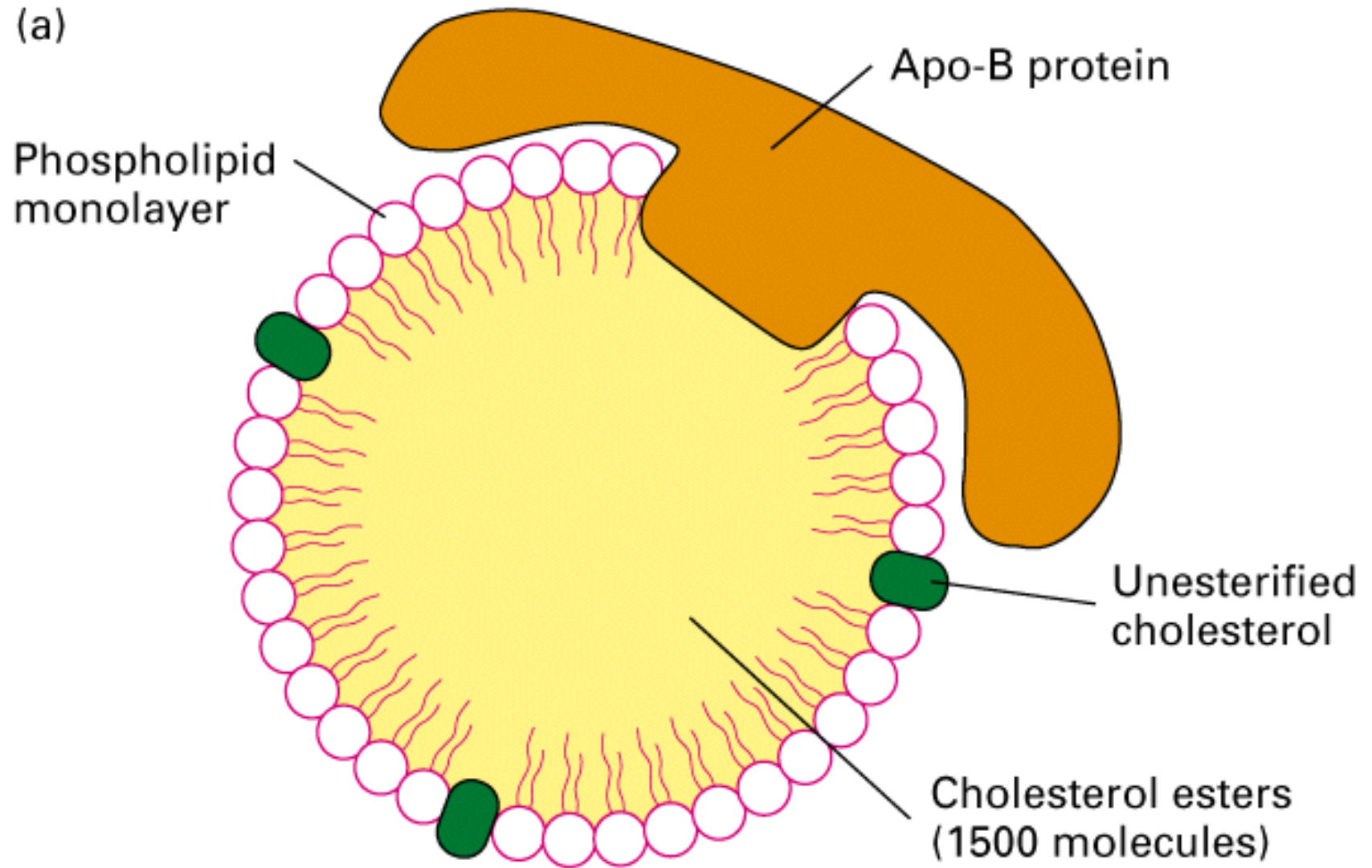
0.1 μm

- 低密脂蛋白的吸收：
- 胆固醇主要在肝细胞中合成，以低密脂蛋白（low-density lipoproteins, LDL）释放到血液。
- LDL颗粒芯部含有被长链脂肪酸酯化的胆固醇分子。周围由磷脂和胆固醇构成的脂单层包围，有一个较大的Apo-B蛋白（配体）。

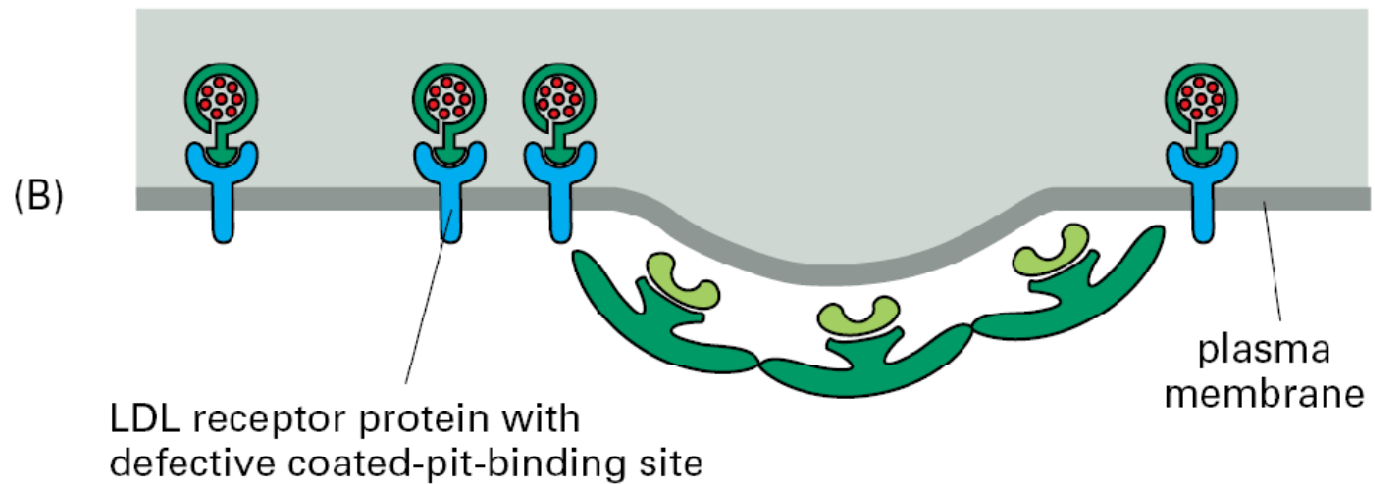
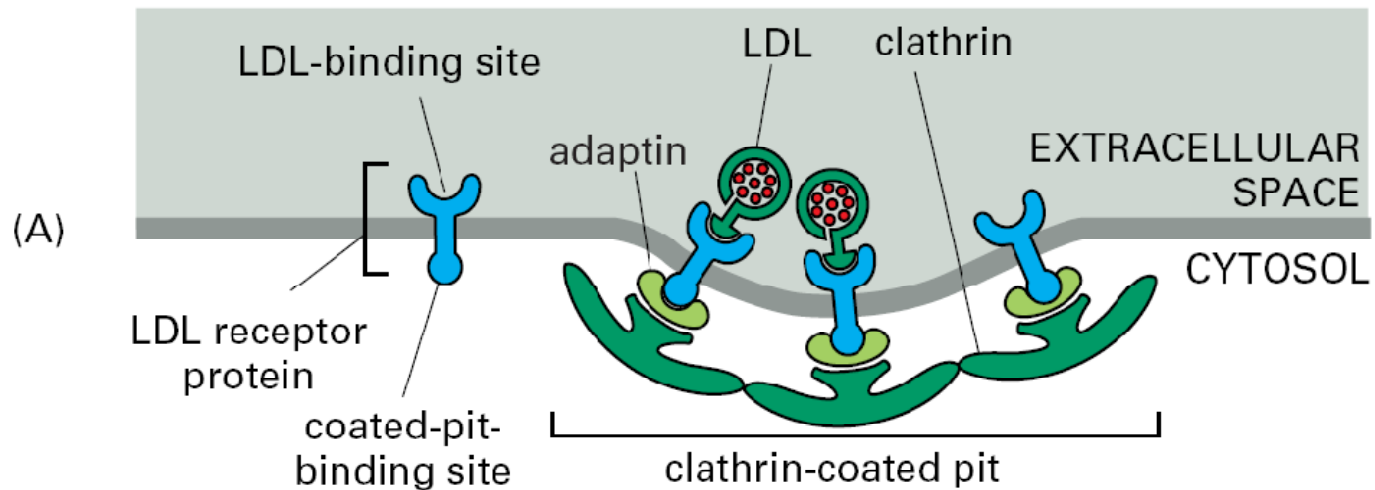


LDL Particle

(a)



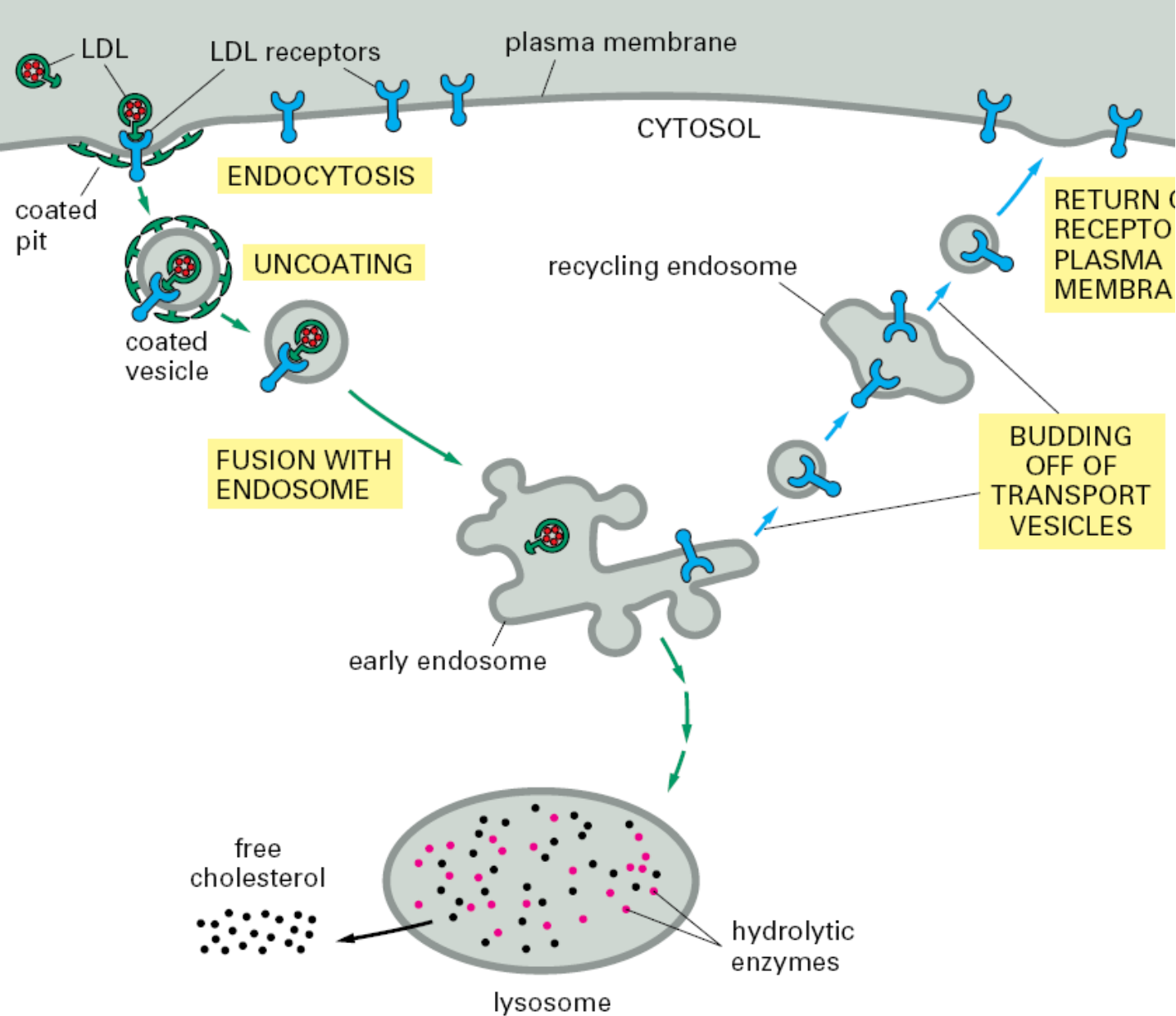
LDL endocytosis



- 细胞需要胆固醇时，合成LDL跨膜受体蛋白。
- 受体与LDL颗粒结合后，形成衣被小泡；
- 进入细胞质的小泡随即脱掉衣被，成为平滑小泡，同早期内体融合，内体中PH值低，使受体与LDL颗粒分离；再经晚期内体将LDL送入溶酶体。
- 在溶酶体中，LDL被水解成游离的胆固醇。

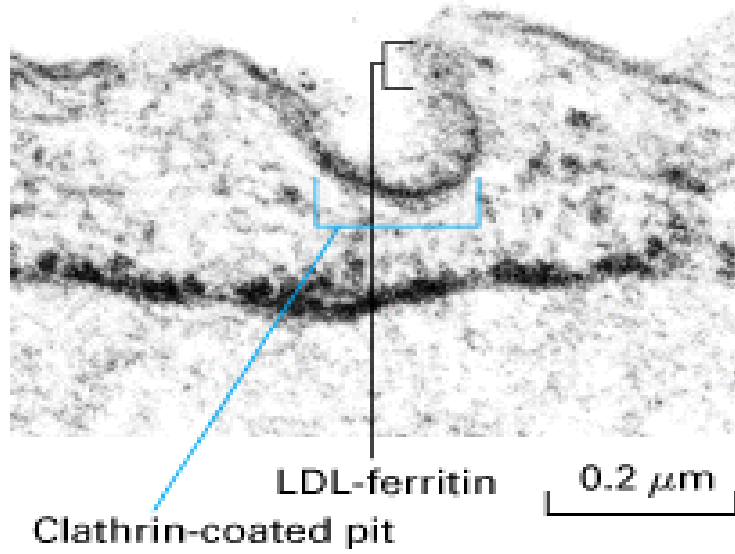


The receptor-mediated endocytosis of LDL

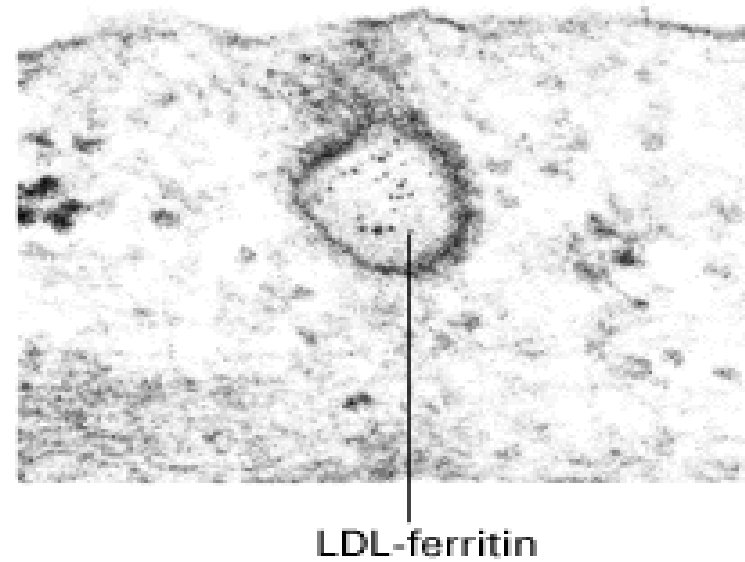


LDL Endocytosis

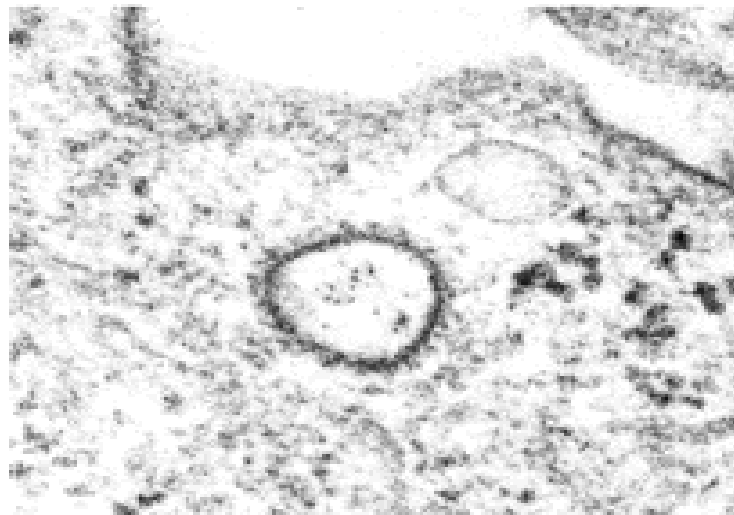
(a)



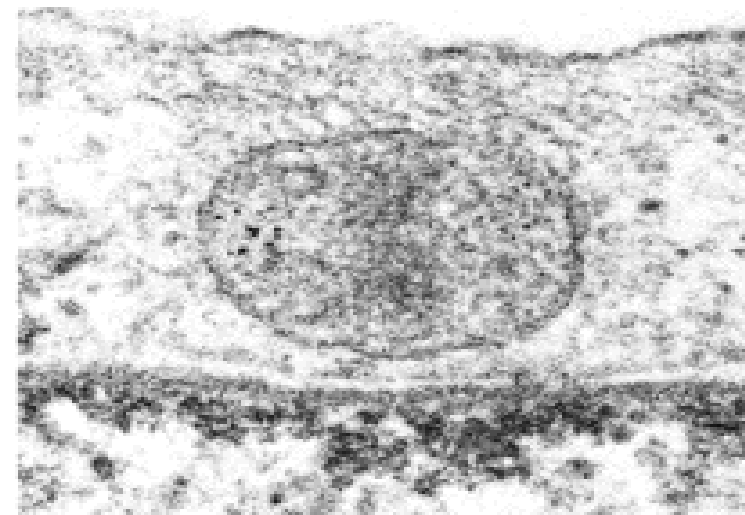
(b)



(c)



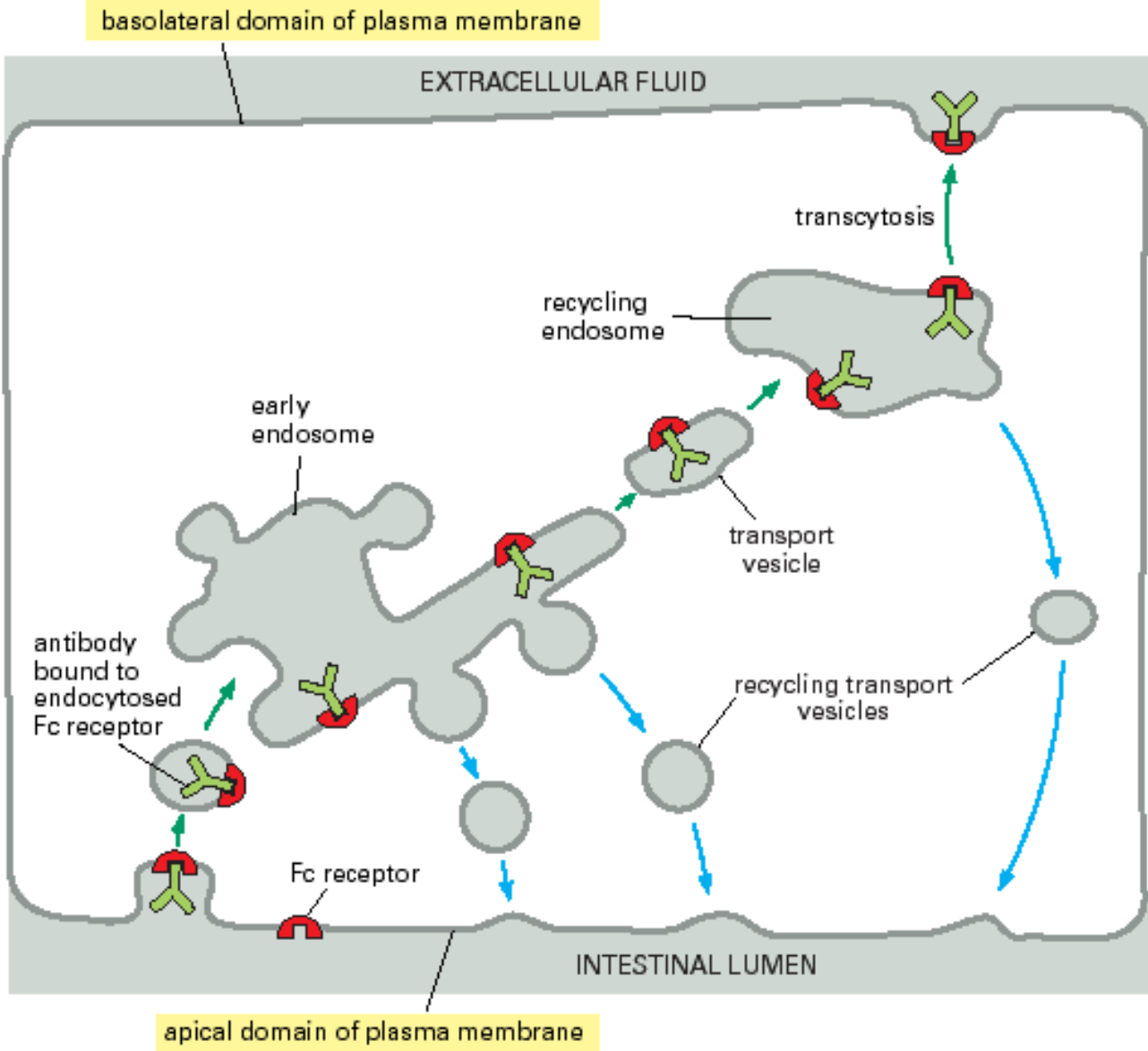
(d)



- 受体回收途径：
- ①大部分返回原来的质膜结构域，如LDL受体；
- ②有些进入溶酶体被消化，如EGF的受体，称为受体下行调节（receptor down-regulation）；
- ③有些被运至质膜不同的结构域，形成穿胞运输（transcytosis）。



Transcytosis

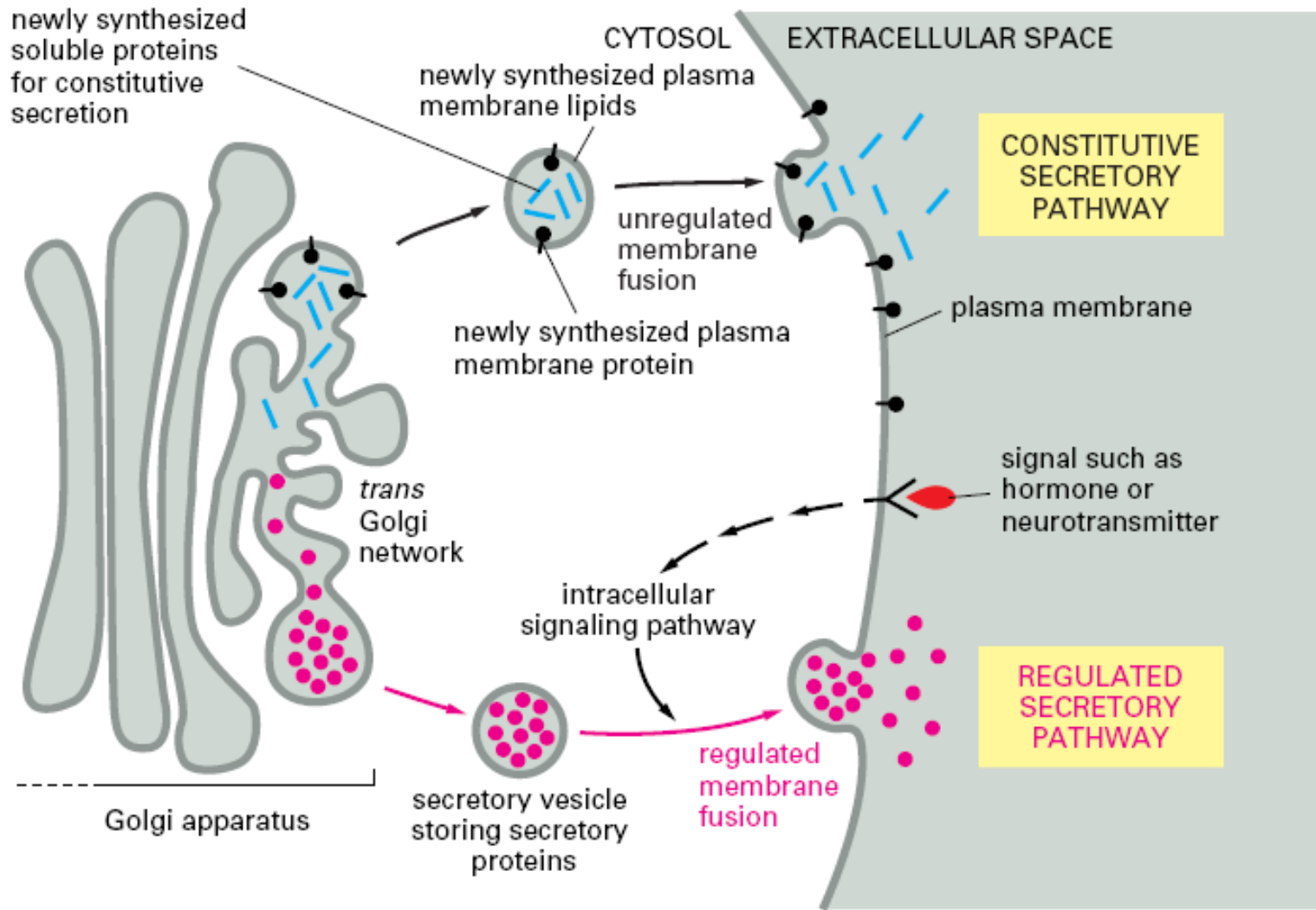


五、外排作用

- 组成型外排途径：由TGN区分泌囊泡向质膜运输，通过default pathway完成转运。更新膜蛋白和膜脂、形成ECM、营养成分或信号分子。
- 调节型外排途径：如激素或酶储于分泌泡内，当细胞在受到胞外信号刺激时，分泌泡释放出去。



The constitutive and regulated secretory pathways



第三节 内质网

- Porter等于1945年发现于培养的小鼠成纤维细胞，因最初看到的是位于细胞质内部的网状结构，故名endoplasmic reticulum，ER。



一、形态与组成

- 约占细胞总膜面积的一半，是封闭的网络系统。
- 分为RER和SER。
- RER呈扁平囊状，排列整齐，有核糖体附着。
- SER呈分支管状或小泡状，无核糖体附着。
- 细胞不含纯粹的RER或SER，它们分别是ER连续结构的一部分。

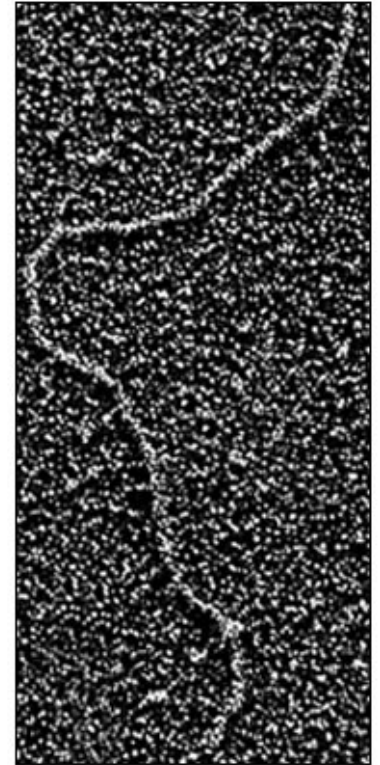


RER



(B)

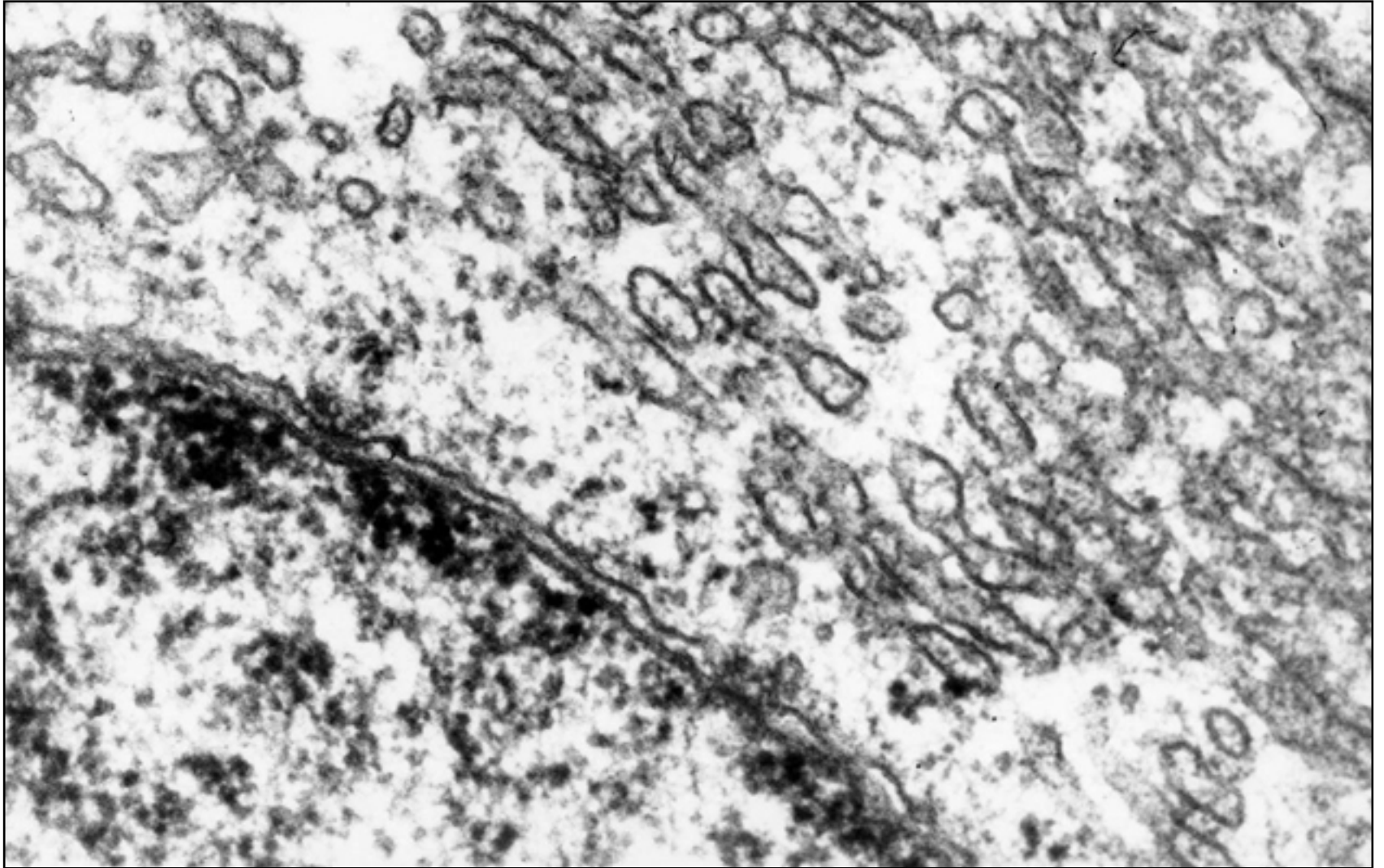
2 μ m



(C)

200 nm

SER



- 膜含60%的蛋白和40%的脂类，PC含量较高，SM含量较少，没有或很少含胆固醇。
- 约30多种膜结合蛋白，另有30多种位于ER网腔。
- 葡糖-6-磷酸酶是ER标志酶，核糖体结合糖蛋白（ribophorin）只分布在RER，P450酶系只分布在SER。

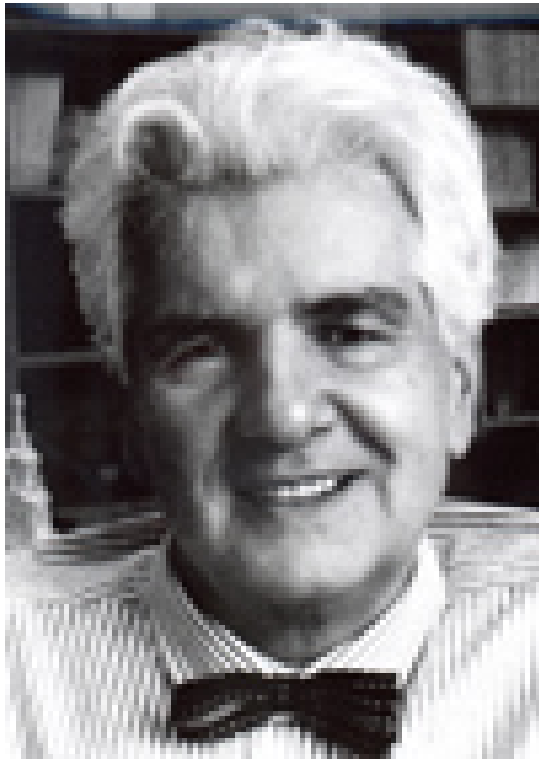


二、ER的功能

- (一) 蛋白质合成
- 内质网上合成的蛋白主要有：
 1. 向细胞外分泌的蛋白、如抗体、激素；
 2. 膜的整合蛋白；
 3. 需要与其它细胞组分严格分开的酶，如溶酶体的各种水解酶；
 4. 需要进行修饰的蛋白，如糖蛋白。



Blobel等（1975）提出信号假说，认为蛋白质N端的信号肽，指导蛋白质转至内质网上合成，获1999年诺贝尔生理医学奖。



Günter Blobel



Blobel with members of his laboratory

- 蛋白质转移到内质网合成涉及以下成分：
 1. 信号肽：位于N端，约16~30个氨基酸，含有6-15个连续排列的带正电荷的非极性氨基酸，又称开始转移序列。
 2. 信号识别颗粒（SRP）：6种多肽和1个7S RNA组成，属RNP。与信号序列结合，导致Pr合成暂停。



AA Sequences of ER Signal Peptides

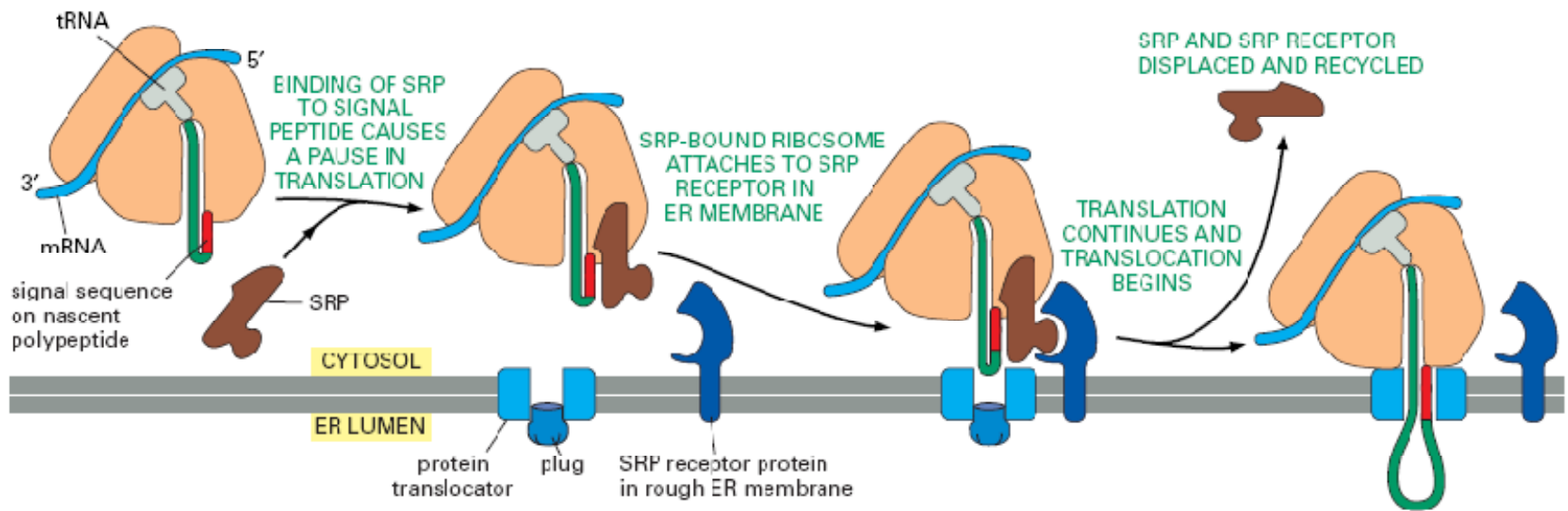
Protein Sequence	Amino Acid
Preproalbumin	Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Phe-Ser↓Arg...
Pre-IgG light chain	Met-Asp-Met-Arg-Ala-Pro-Ala-Gln-Ile-Phe-Gly-Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Pro-Gly-Thr-Arg-Cys↓Asp...
Prelysozyme	Met-Arg-Ser-Leu-Leu-Ile-Leu-Val-Leu-Cys-Phe-Leu-Pro-Leu-Ala-Ala-Leu-Gly↓Lys...



3. SRP受体，ER膜的整合蛋白，异二聚体，可与SRP特异结合。
4. 停止转移序列，与内质网膜的亲合力很高，阻止肽链继续进入网腔，成为跨膜蛋白。
5. 转位因子，由3-4个Sec61蛋白构成的通道，每个Sec61由3条肽链组成。



Translocation of proteins across ER

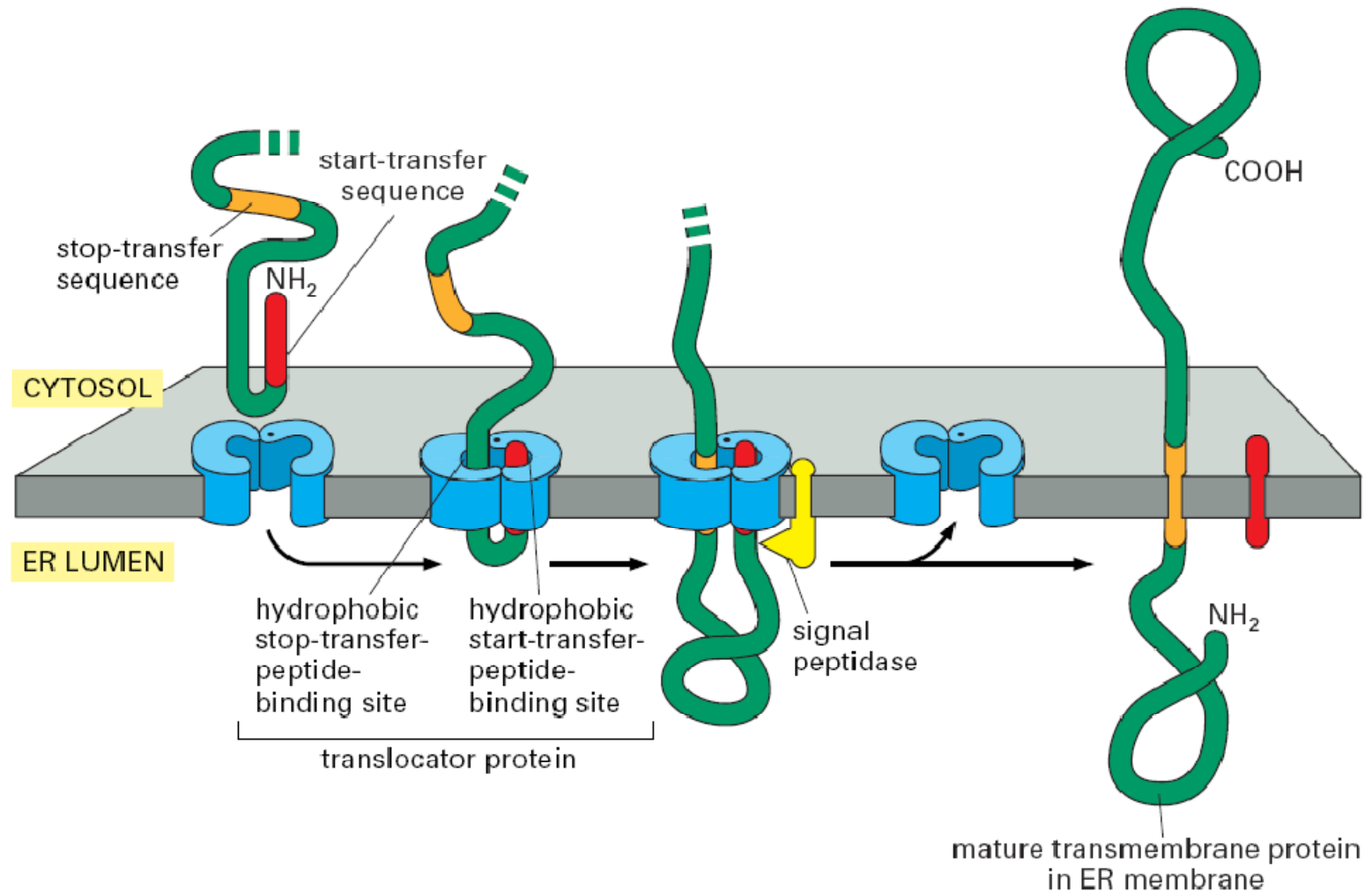


蛋白质转入内质网合成的过程：

- 信号肽与SRP结合→肽链延伸终止→SRP与受体结合→SRP脱离→肽链进入内质网→信号肽切除→肽链延伸至终止。
- 这种肽链边合成边向内质网腔转移的方式，称为co-translation。



Insertion of Transmembrane protein into the ER membrane



（二）蛋白质的修饰与加工

- 包括糖基化、羟基化、酰基化、二硫键形成等，几乎所有内质网上合成的蛋白最终都被糖基化。
- 糖基化的作用：
 - ①使蛋白质能够抵抗消化酶的作用；
 - ②赋予蛋白质传导信号的功能；
 - ③某些蛋白只有在糖基化之后才能正确折叠。



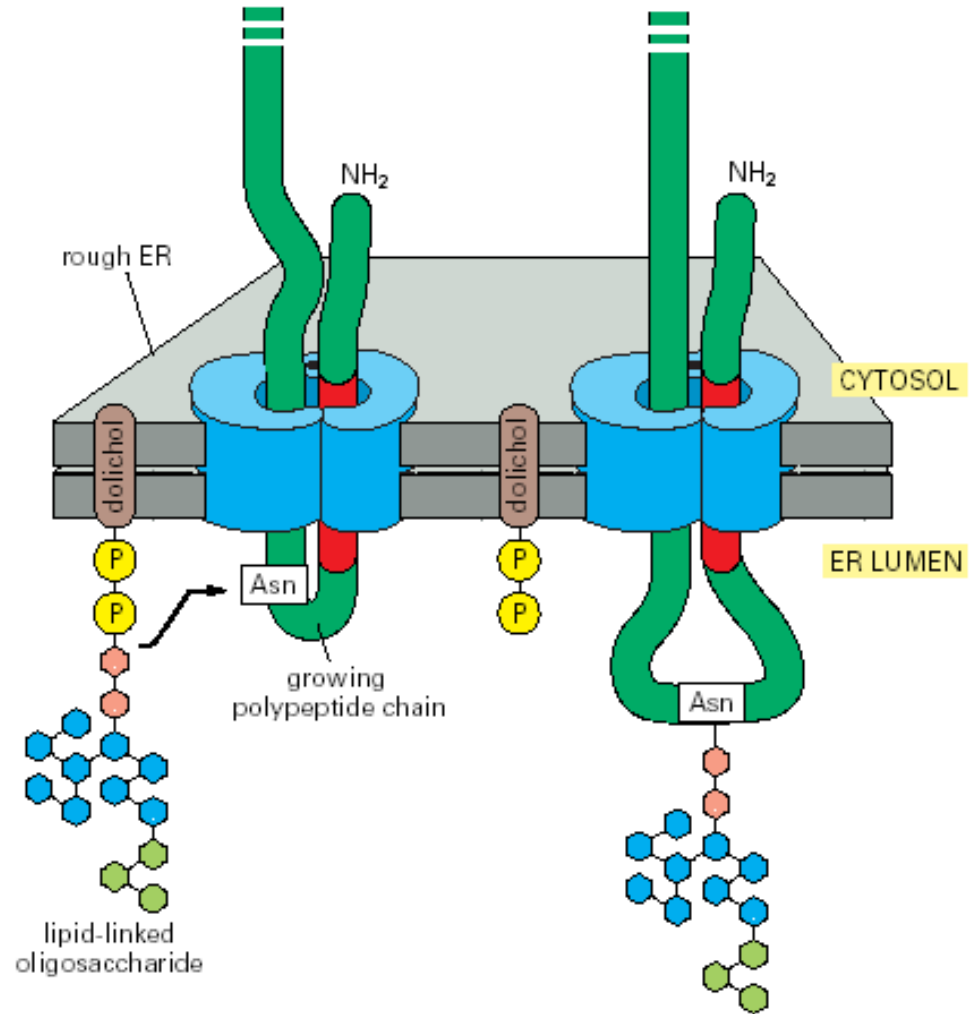
- 糖基一般连接在4种氨基酸上，分为2种：
- N-连接的糖基化：与天冬酰胺残基的 NH_2 连接，糖为N-乙酰葡萄糖胺。
- O-连接的糖基化：与Ser、Thr和Hyp的OH连接，连接的糖为半乳糖或N-乙酰半乳糖胺，在高尔基体上进行。



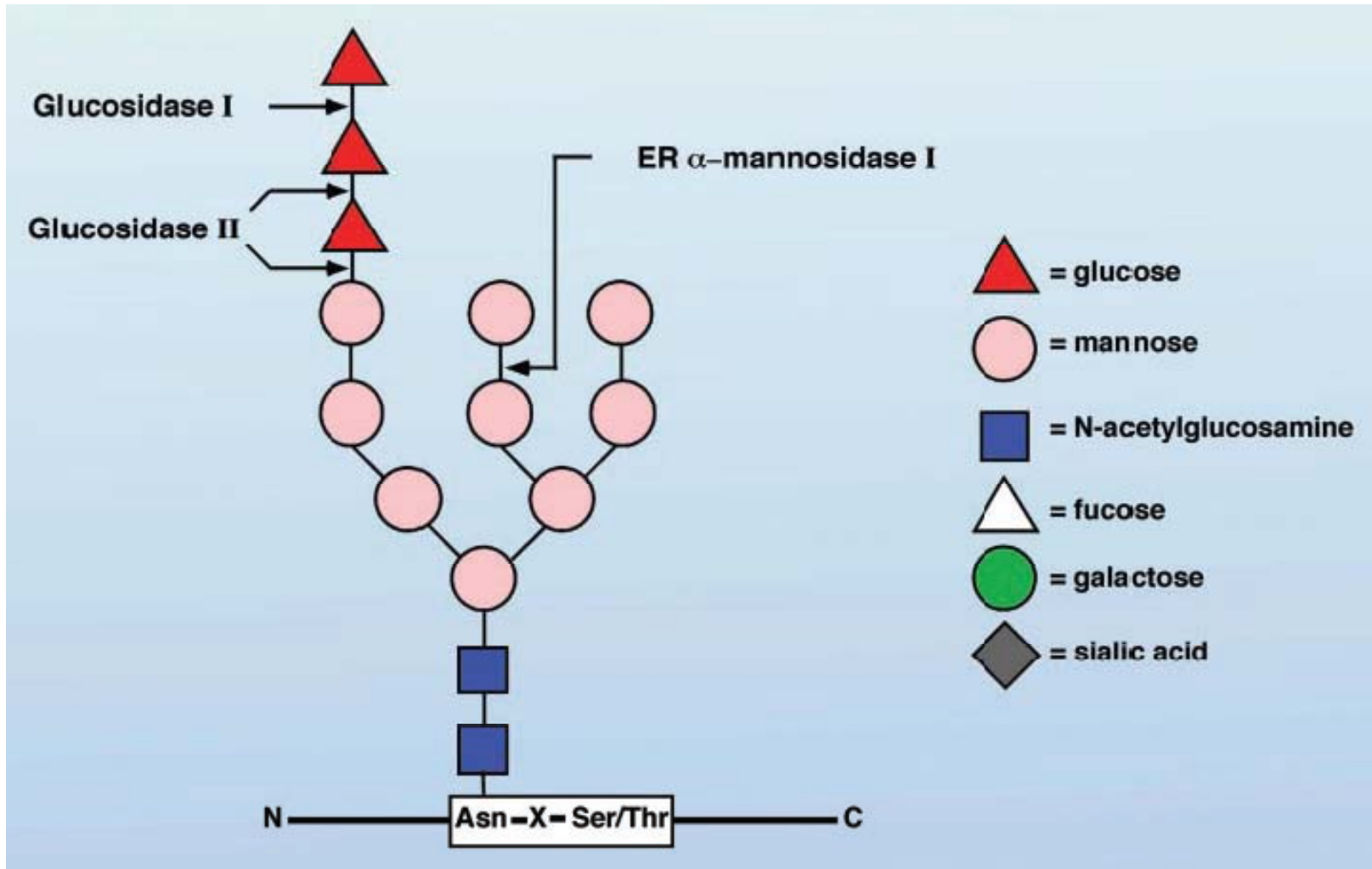
- 内质网上进行N-连接的糖基化。糖的供体为核苷糖，如GDP-甘露糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺。
- 糖分子首先被糖基转移酶转移到膜上的磷酸长醇分子上，装配成寡糖链。
- 再被寡糖转移酶转到Asn-X-Ser或Asn-X-Thr的Asn上。



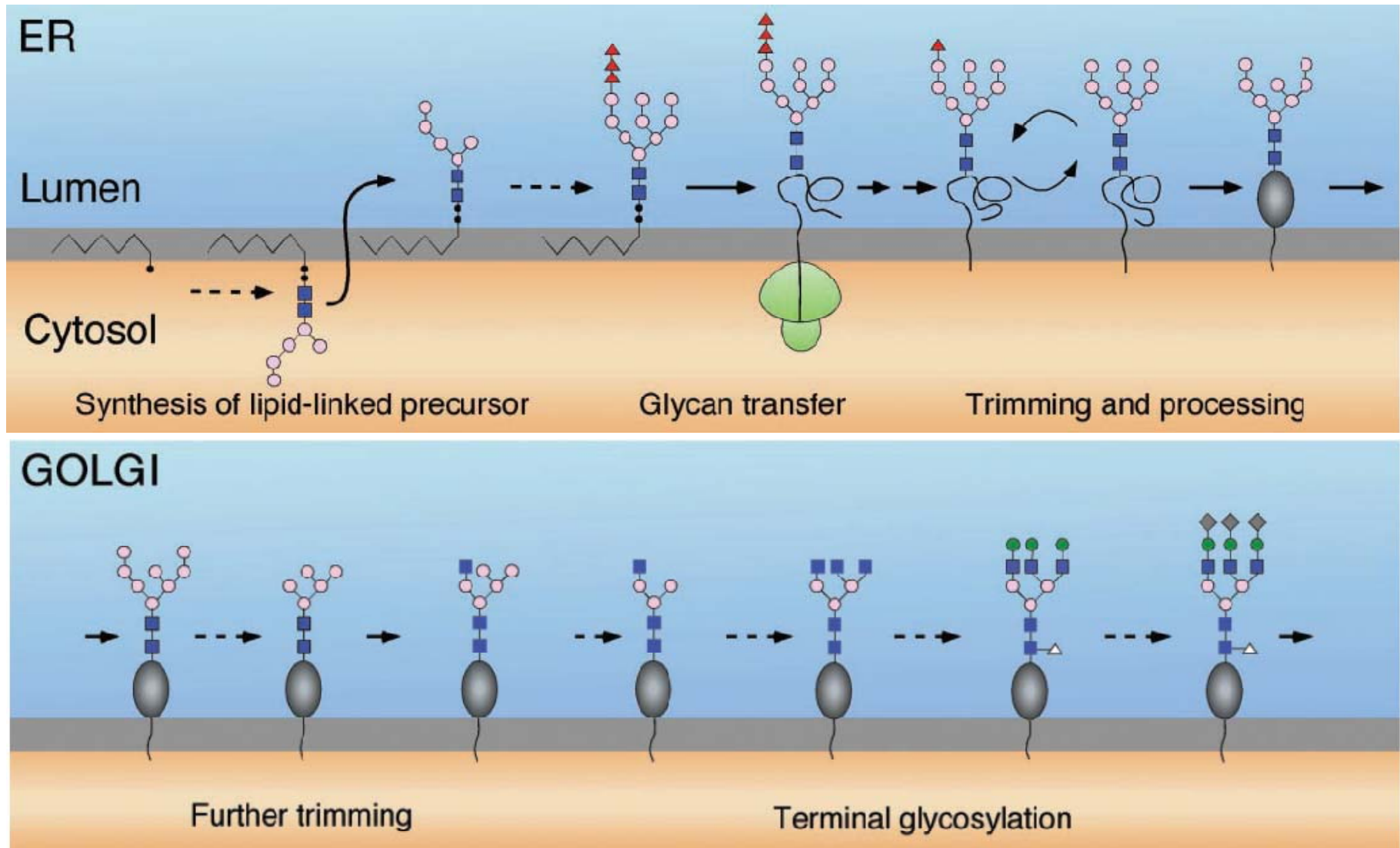
Protein glycosylation in RER



Protein glycosylation in RER



Protein glycosylation in RER



（三）新生肽链的折叠、组装和运输

- 蛋白的折叠在hsp70家族的ATP酶的作用下完成。
- 无法正确折叠的蛋白被转入溶酶体降解，约90%的新合成T细胞受体亚单位和ACh受体都被降解，而从未到达靶膜。
- COP II介导由ER输出的膜泡运输。



（四）内质网的其它作用

1. 合成磷脂、胆固醇等。
2. 解毒，如肝细胞的细胞色素P450酶系。
3. 参与甾体类激素的合成。
4. 使葡萄糖6-磷酸水解，释放糖至血液中。
5. 储存钙离子，作为胞内信号物质，如肌质网。
6. 提供酶附着的位点和机械支撑作用。



第四节 高尔基体

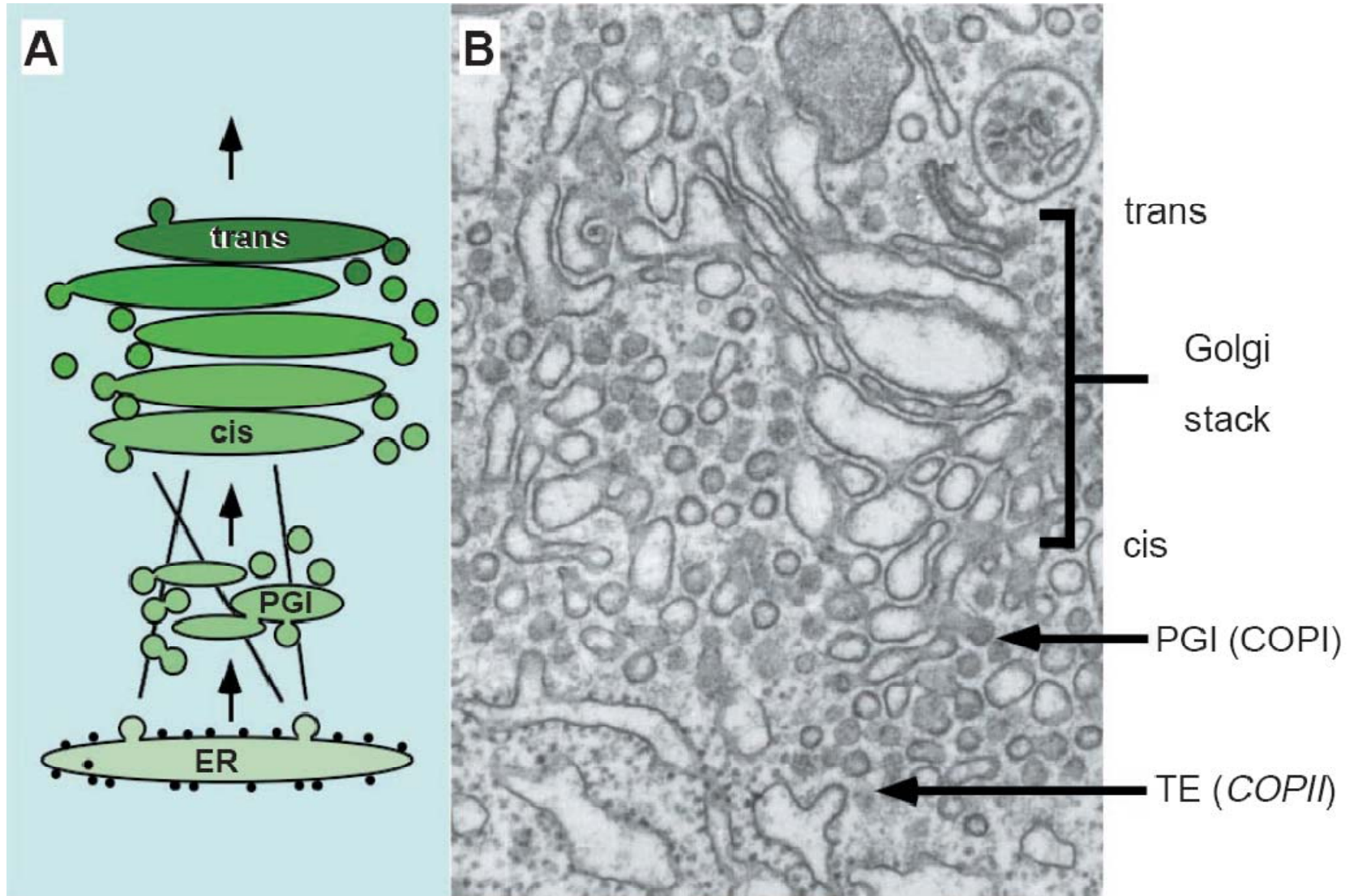
- 发现于1855年，1889年，Golgi用银染法，在猫头鹰的神经细胞内观察到了清晰的结构，因此定名为高尔基体。

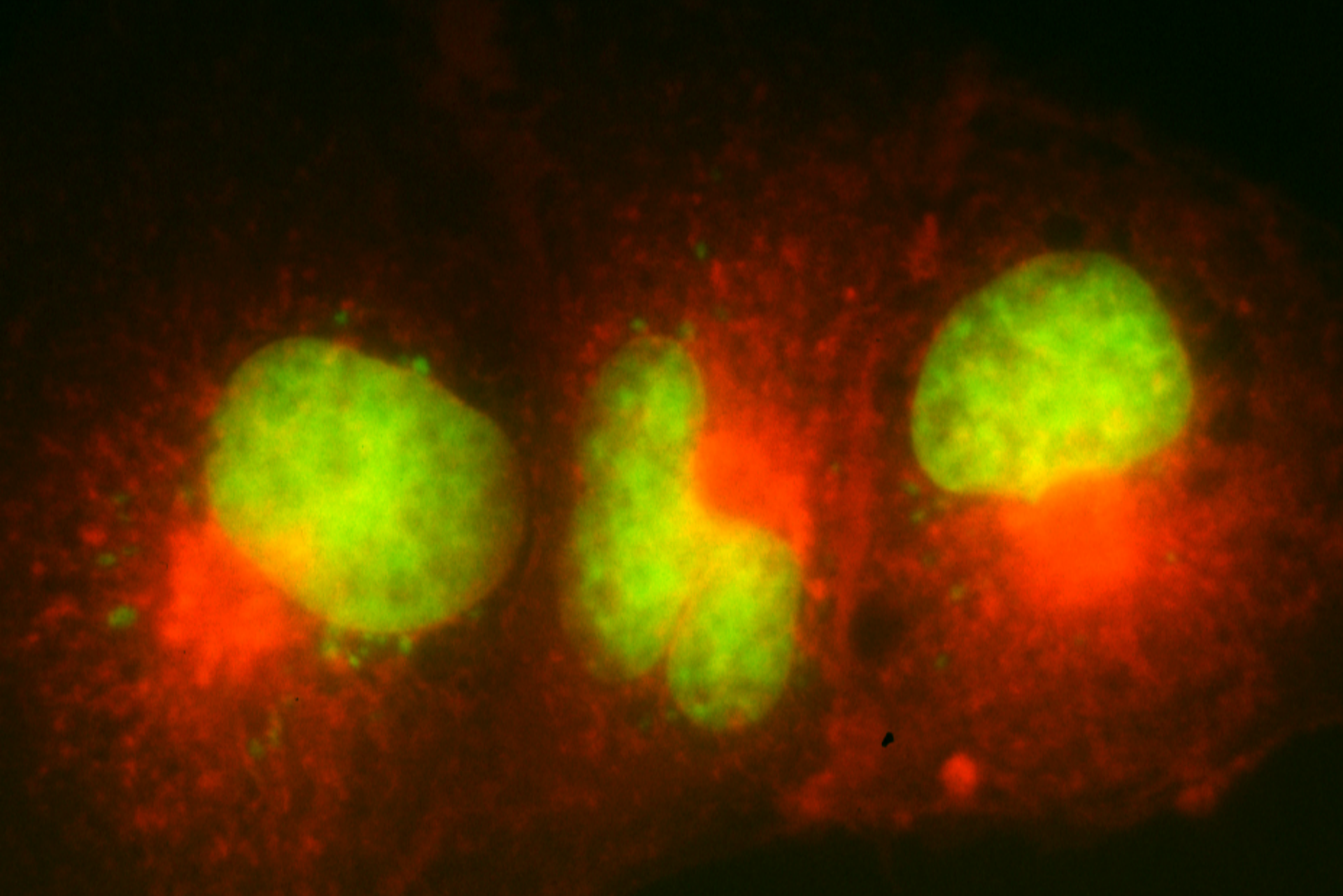
一、形态与组成

- 由扁平囊泡堆积而成，有极性。通常4~8个(某些藻类较多)扁平囊在一起，构成Golgi stack。
- 分布于ER与细胞膜间，呈弓形或半球形。
- 凸出的一面对着ER称为顺面（cis face），凹进的一面对着质膜称为反面（trans face）。



Structure of the Golgi Complex





Distribution, nucleus green, Golgi body red

- 膜含有约60%的蛋白和40%的脂类，具有一些和ER共同的蛋白成分。
- 主要的酶有糖基转移酶、磺基-糖基转移酶、氧化还原酶、磷酸酶、蛋白激酶、甘露糖苷酶、转移酶和磷脂酶等。
- 标志酶为糖基转移酶。

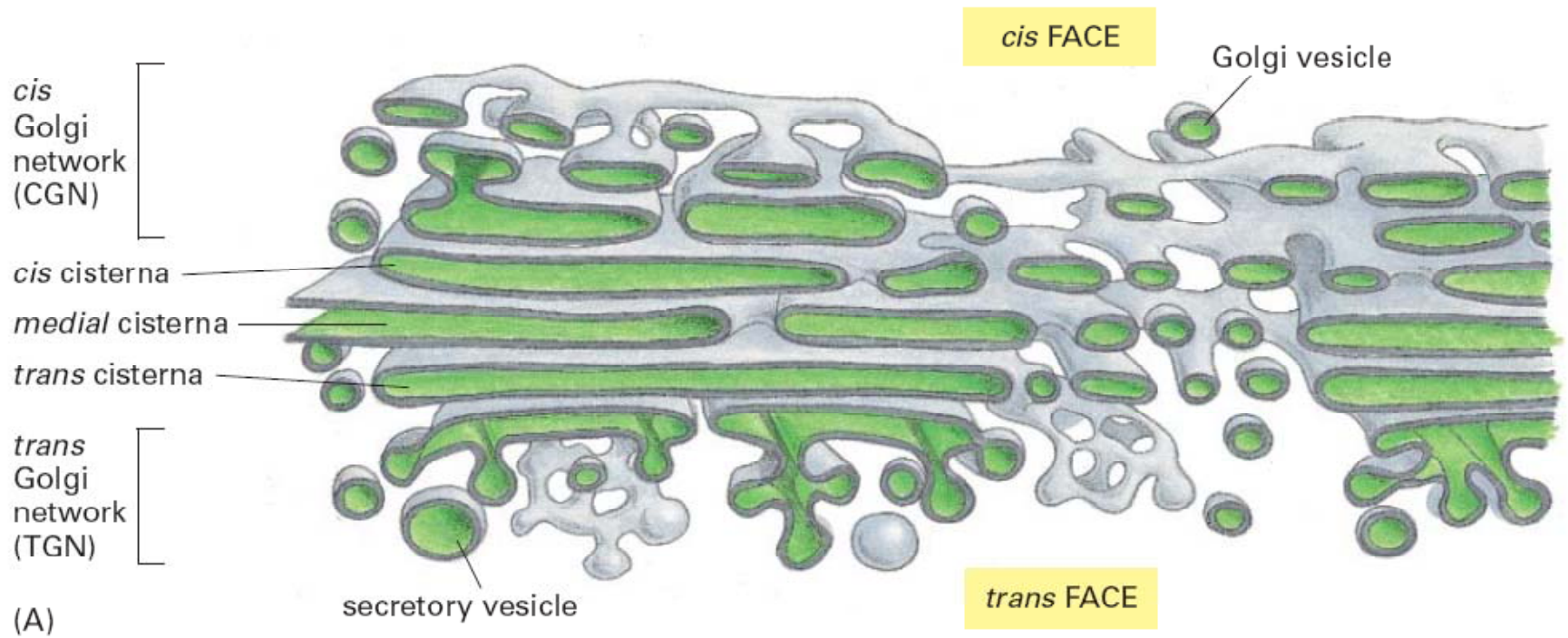


二、功能区隔

1. cis Golgi network, CGN是入口区域。
2. medial Golgi, 多数糖基修饰, 糖脂的形成以及
与高尔基体有关的糖合成发生于此处。
3. trans Golgi network, TGN是出口区域, 参与蛋白
质的分类与包装, 最后输出。



Golgi network



- 高尔基体不同区域的细胞化学反应：
- ①嗜银反应： cis面膜囊被特异地染色；
- ②TPP酶： trans面的膜囊；
- ③NADP酶： 显示中间的膜囊；
- ④CMP酶： trans面的囊状和管状结构。



三、主要功能

- 1、参与细胞分泌活动： RER合成Pr→ER腔→COPII小泡→CGN→medial Gdgi加工→TGN区形成运输泡→与质膜融合、排出。
- 高尔基体依据信号序列或信号斑对蛋白质分类。
- 2、O-连接的糖基化：糖的供体为核苷糖。



- 3、进行膜的转化功能：ER合成膜脂转移至高尔基体，经过修饰和加工，形成运输泡与质膜融合。
- 4、将蛋白水解为活性物质：如将胰岛素C端切除；或将神经肽前体降解为活性片段。
- 5、参与形成溶酶体。
- 6、植物细胞壁的形成，合成纤维素和果胶质。



第五节 溶酶体与过氧化物酶体

- Lysosome 为 de Duve 与 Novikoff 1955 年发现。
Peroxisome 由 Rhodin 1954 在鼠肾小管上皮细胞中发现。



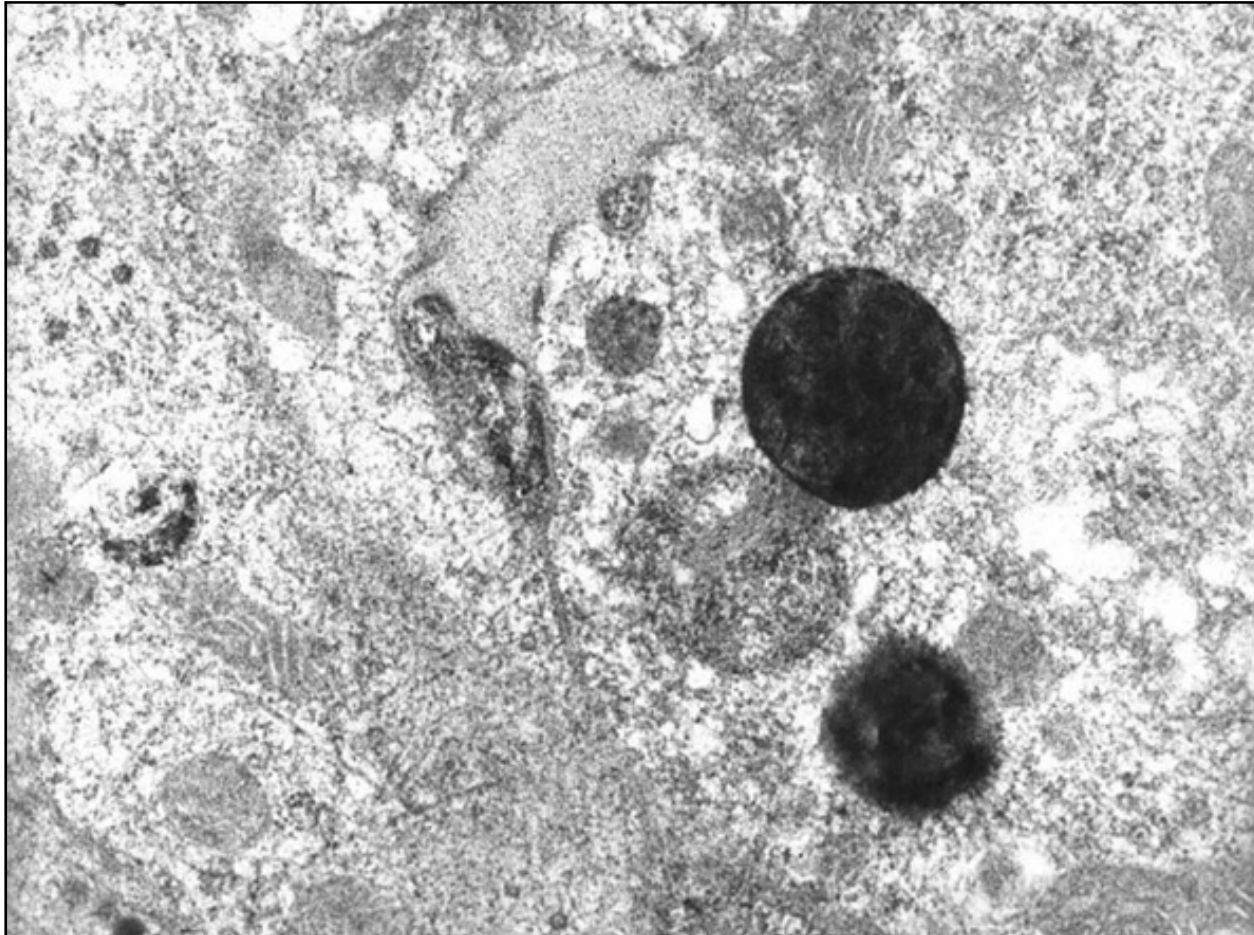
一、溶酶体的结构

- 含酸性水解酶（最适pH=5），执行细胞内消化。
- 具有异质性，酸性磷酸酶是标志酶。
- 膜有质子泵，溶酶体内pH值低。
- 膜蛋白高度糖基化。



1、初级溶酶体（primary lysosome）

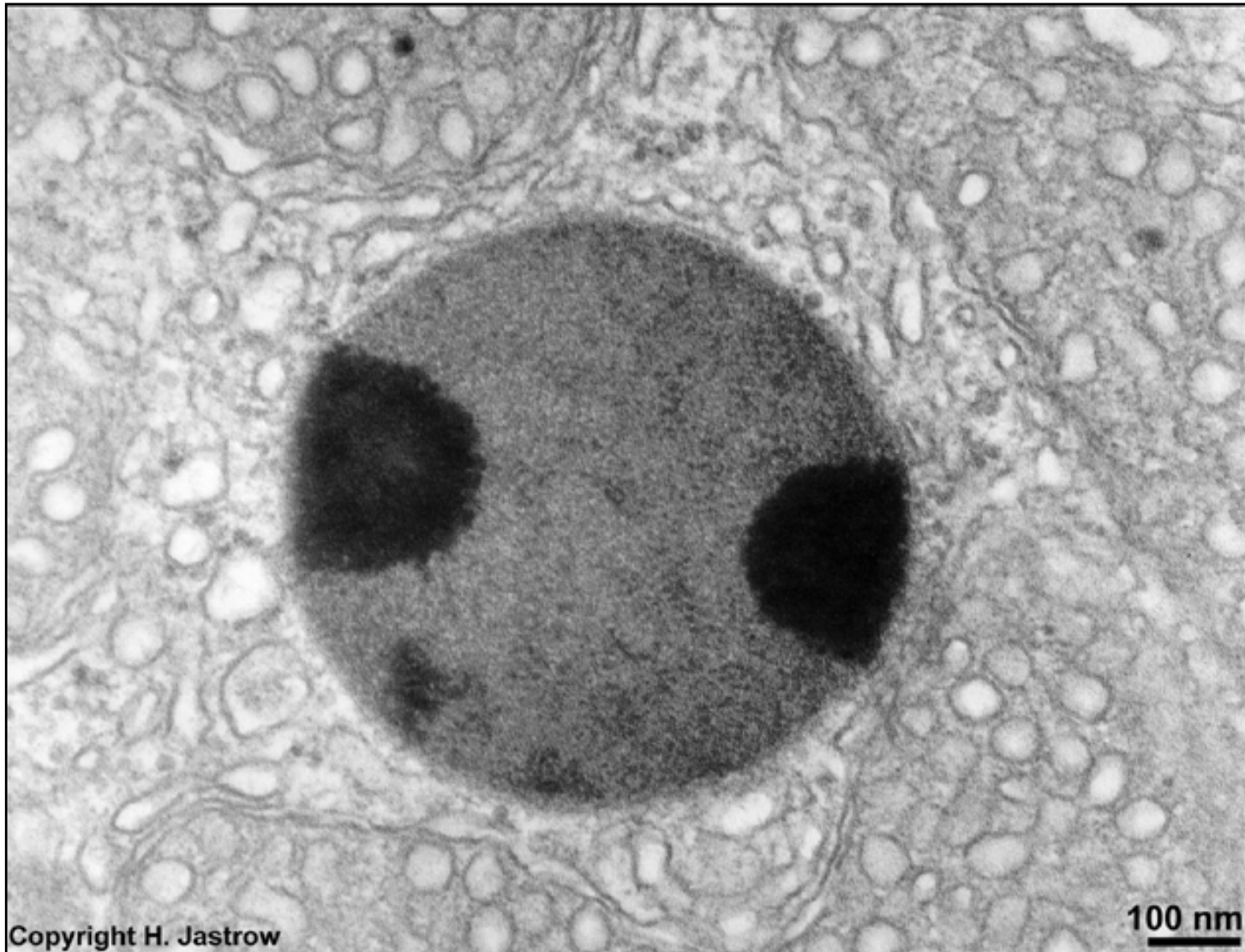
由高尔基体分泌形成，含多种酸性水解酶。



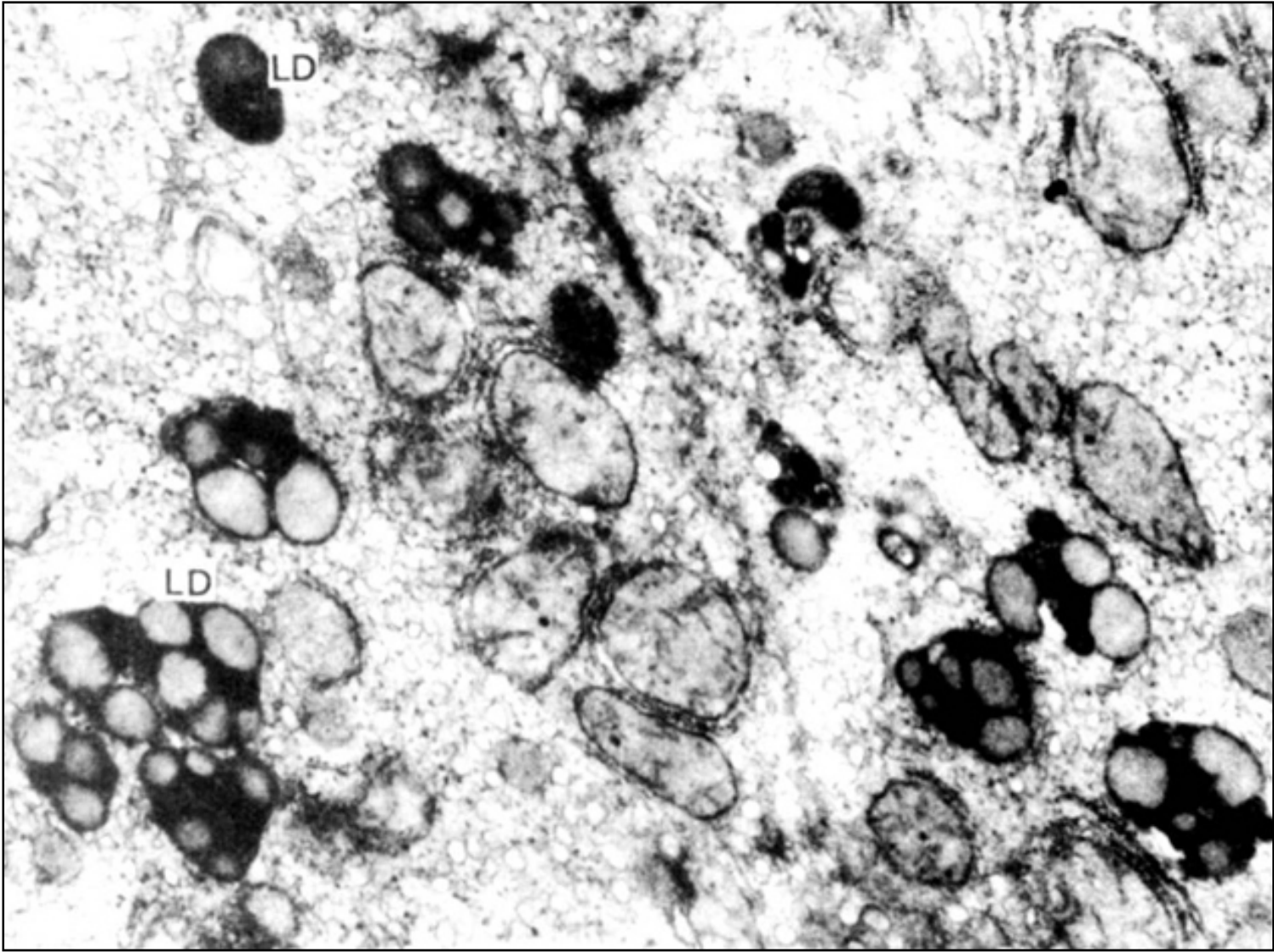
- 2、次级溶酶体（secondary lysosome）
- 是正在进行或完成消化作用的溶酶体，分为自噬溶酶体和异噬溶酶体。
- 3、残体（residual body）
- 又称后溶酶体（post-lysosome），已失去酶活性，仅留未消化的残渣，故名。可排出细胞，也可能留在细胞内逐年增多，如表皮细胞的老年斑，肝细胞的脂褐质。



Secondary lysosome



肝细胞脂褐质



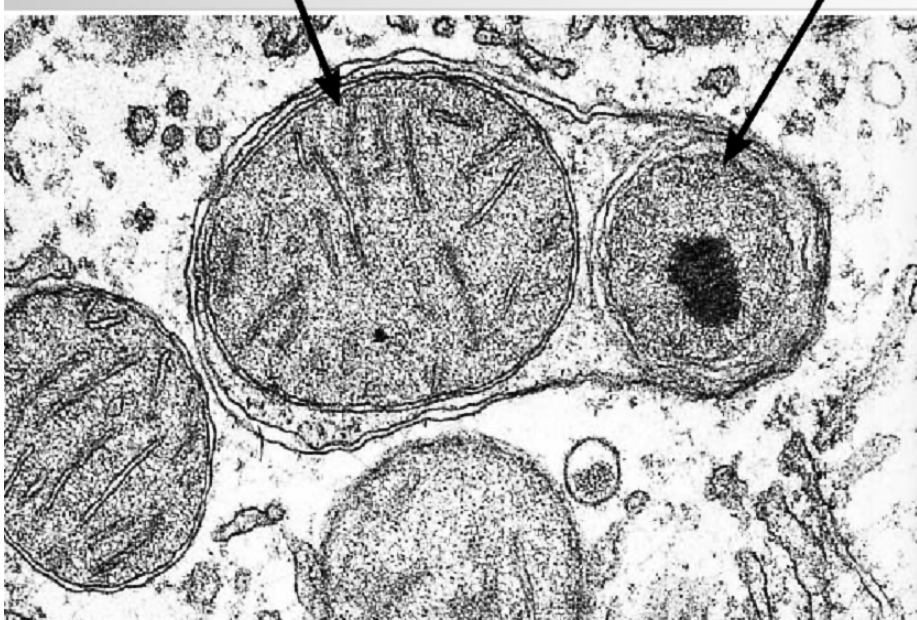
二、溶酶体的功能

1. 细胞内消化：如从LDL释放胆固醇，单细胞真核生物籍其消化食物。
2. 自体吞噬：清除无用生物大分子，衰老细胞、细胞器、个体发育中多余的细胞。
3. 防御作用：如巨噬细胞。
4. 参与分泌过程的调节：如将甲状腺球蛋白降解成有活性的甲状腺素。
5. 形成精子的顶体。



with a mitochondrion

Lysosome

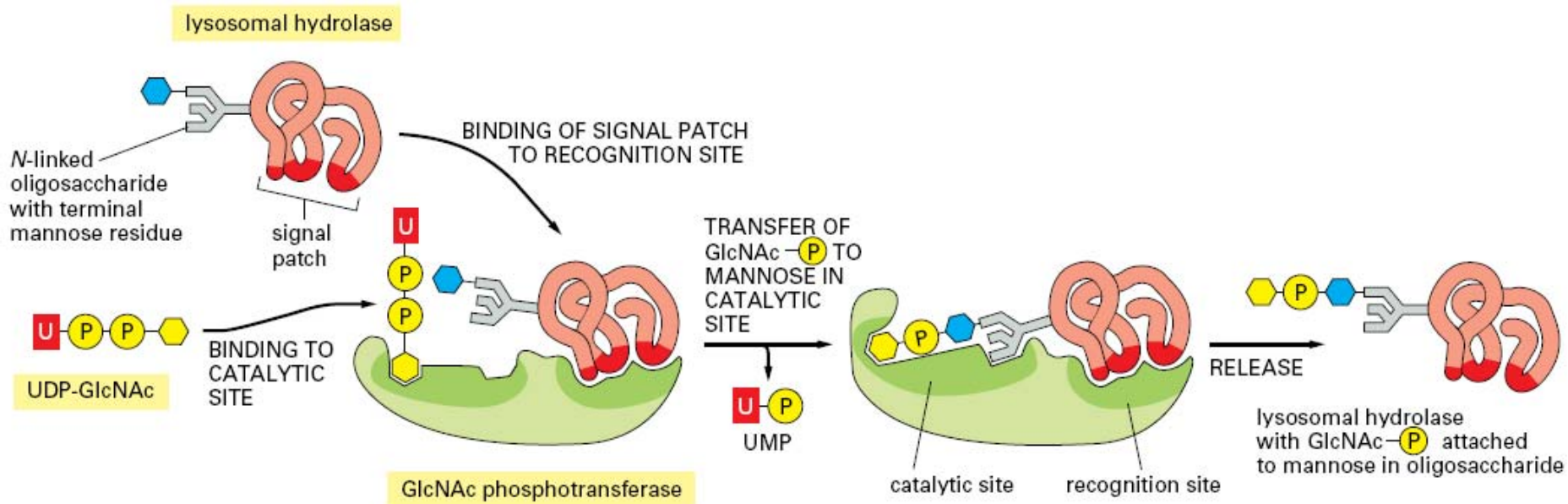


三、溶酶体的发生

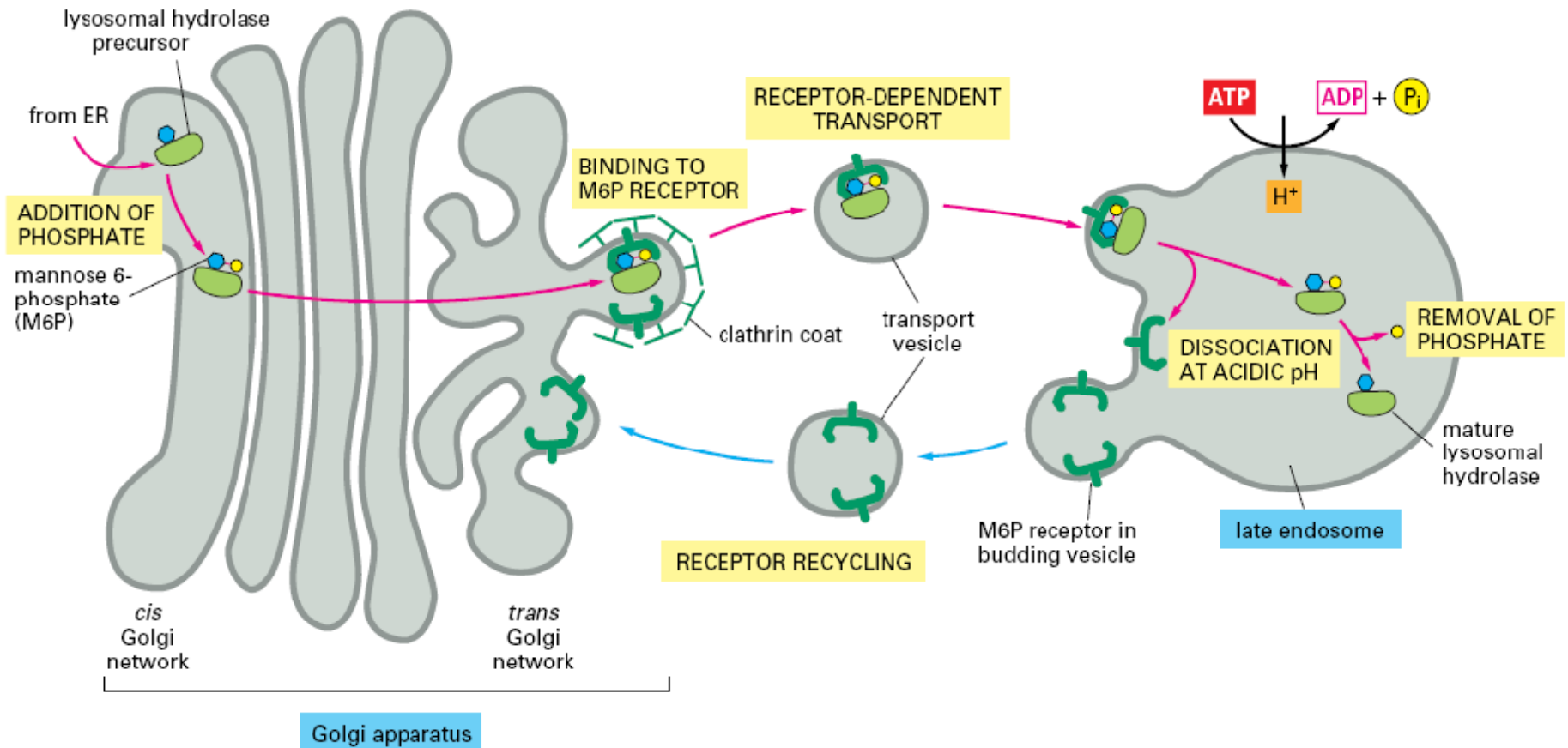
- 在高尔基体的trans面以出芽的方式形成：
- 前溶酶体蛋白→N-连接的糖基化→高尔基体→磷酸转移酶识别信号斑→将N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移在1~2个甘露糖残基上→在中间膜囊切去N-乙酰葡萄糖胺形成M6P配体→与trans膜囊上M6P受体结合→通过clathrin衣被包装成运输小泡→与晚期的内体融合，受体解离→切除甘露糖残基上的磷酸。



The recognition of a lysosomal hydrolase in Golgi and mannose phosphorylation



Transport of newly synthesized hydrolases to lysosomes



四、溶酶体与疾病

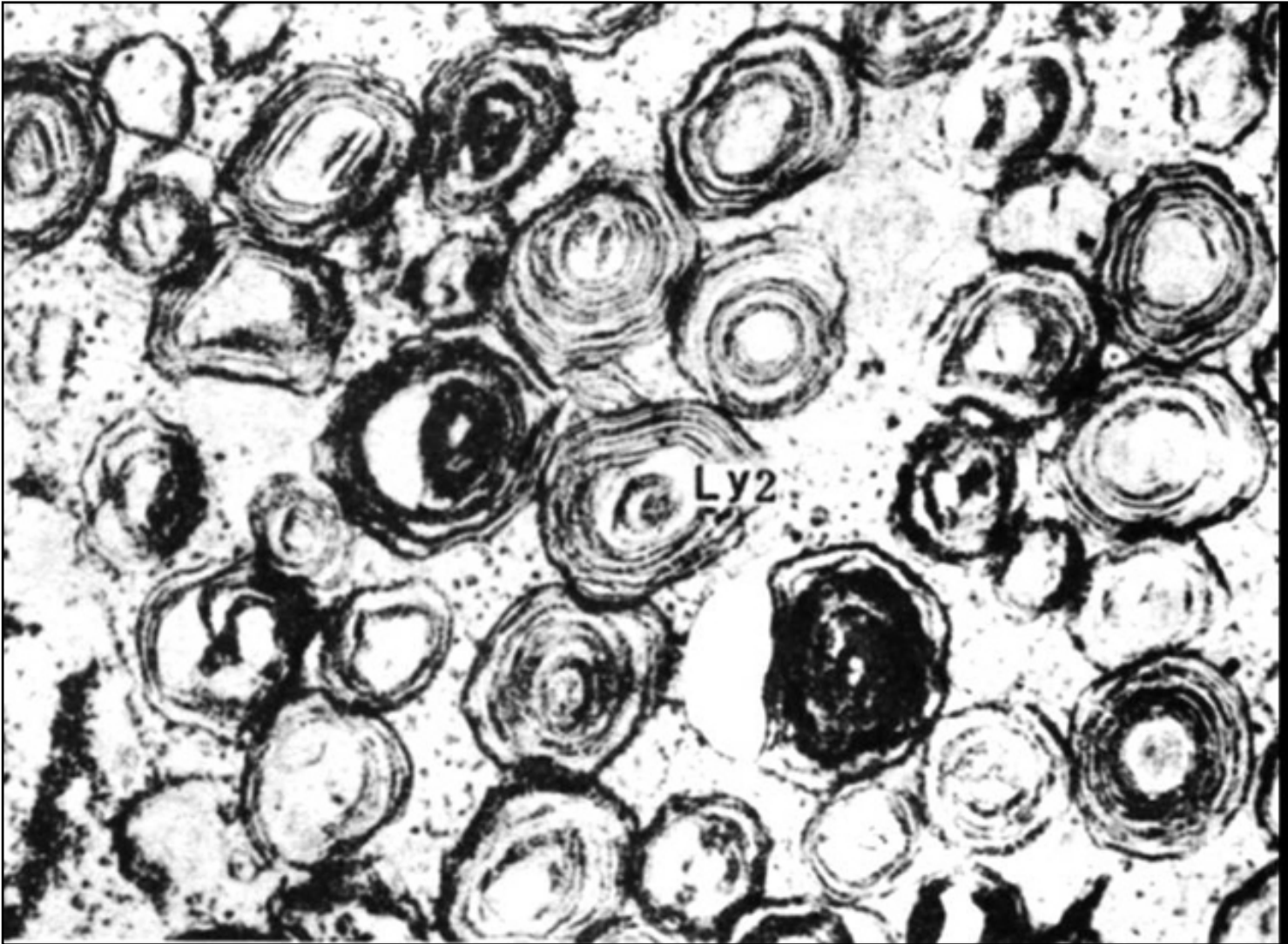
1. 矽肺：二氧化硅尘粒（矽尘）吸入肺泡后被巨噬细胞内吞噬，导致吞噬细胞溶酶体破裂。激活成纤维细胞，导致胶原纤维沉积，肺组织纤维化。
2. 肺结核：结核杆菌引起肺组织钙化和纤维化。
3. 类风湿性关节炎：溶酶体膜易脆裂。



- 3. 各类贮积症
- 台-萨氏综合症：缺少氨基己糖酯酶A。
- II型糖原累积病：缺乏 α -1,4-葡萄糖苷酶。
- Gaucher病：缺乏 β -葡萄糖苷酶。
- 细胞内含物病：N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶单基因突变。

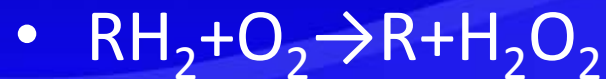


台-萨氏综合症溶酶体的同心圆结构

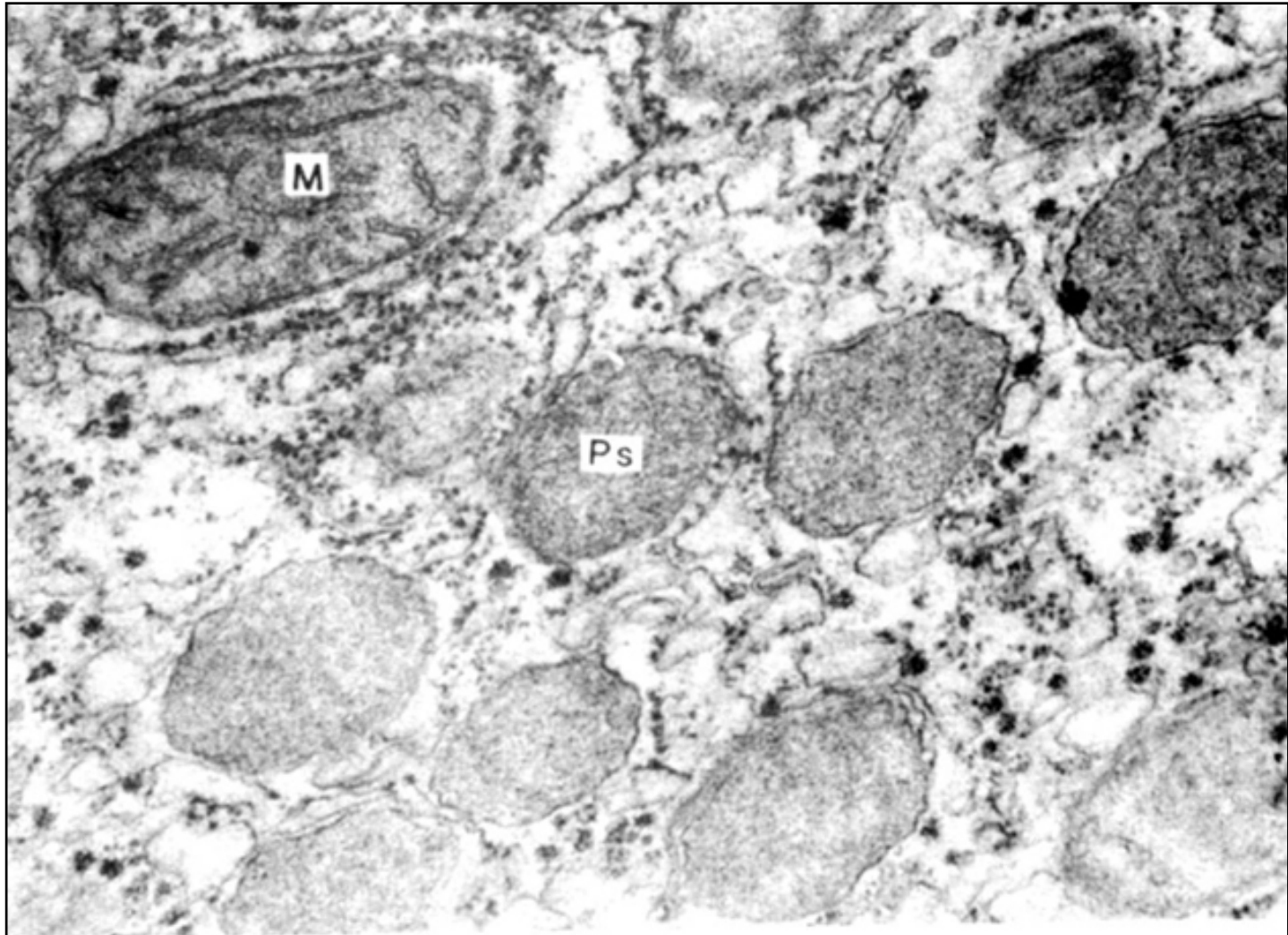


五、过氧化物酶体

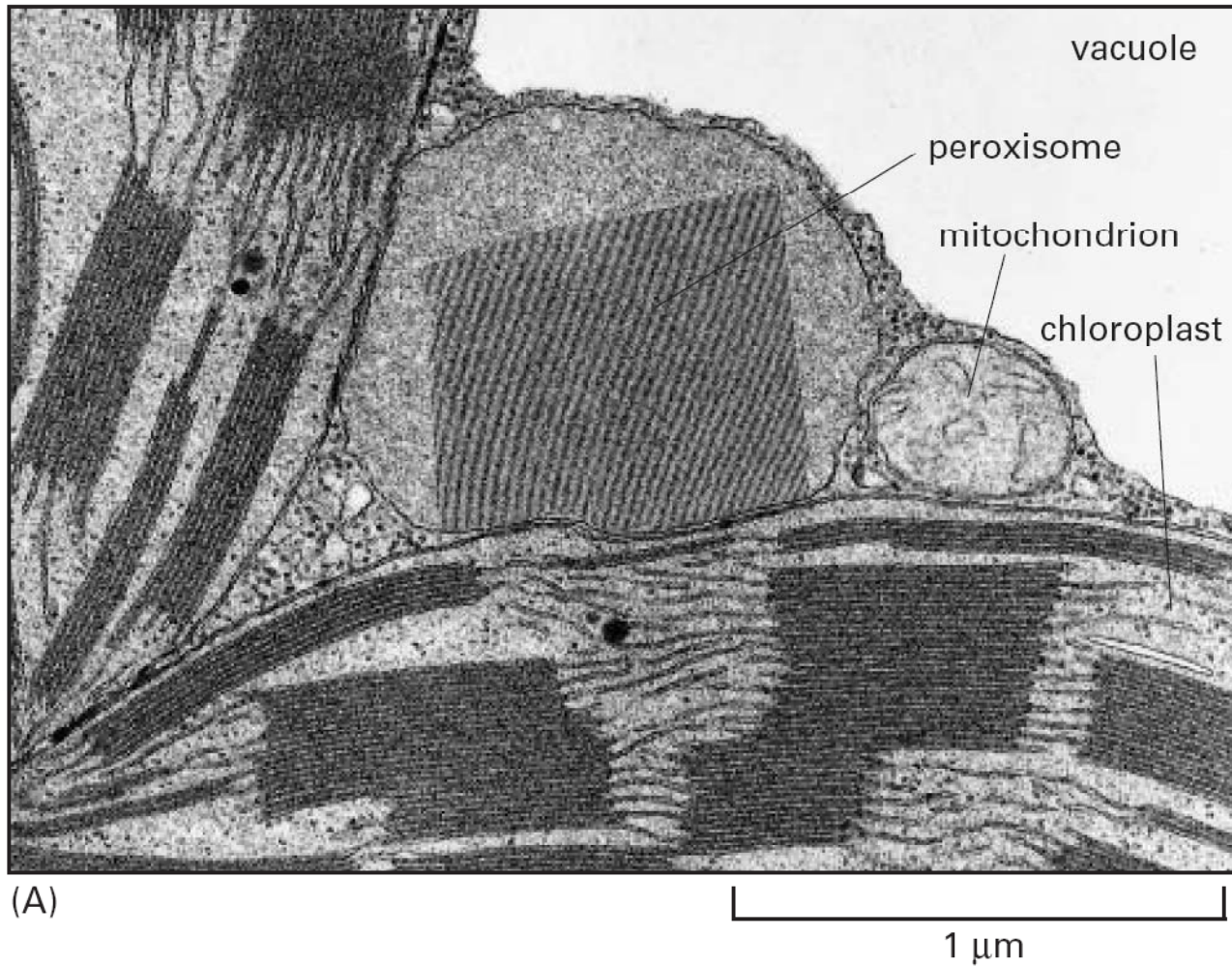
- Rhodin 1954发现于鼠肾小管上皮细胞。
- 具有异质性，由单层膜围绕而成。
- 特点：含过氧化氢酶（标志酶）和一至多种依赖黄素（flavin）的氧化酶，已发现40多种氧化酶。
酶特点是将底物氧化后生成过氧化氢，而过氧化氢酶又利用 H_2O_2 去氧化其它底物。



Peroxisome of hepatocyte



烟草叶肉细胞的过氧化物酶体（中央具有尿酸氧化酶形成的晶体状核心）



1. 在动物中：①参与脂肪酸的 β -氧化；②具有解毒作用，过氧化氢酶氧化有害物质，饮入的酒精1/4是在微体中氧化为乙醛。
2. 在植物中：①参与光呼吸，将光合作用的副产物乙醇酸氧化为乙醛酸和过氧化氢，②在萌发的种子中，进行脂肪的 β -氧化。



- 酶由核基因编码，在细胞质基质中合成，信号序列为-Ser-Lys-Leu-COO-。
- 膜脂在内质网上合成，通过磷脂转移蛋白PTP转移而来。
- 已有的过氧化物酶体在细胞分裂时，以分裂方式传给子代细胞。



- Zellweger综合征:
- 也叫脑肝肾综合征;
- 患者细胞的过氧化物酶体中, 酶蛋白输入有关的蛋白质变异, 酶体是“空的”;
- 脑、肝、肾异常, 出生3-6个月后死亡。

