**Лизосома**

Лизосомы – это гетерогенные органеллы. Они чрезвычайно разнообразны по форме и размеру, но могут быть идентифицированы как одно семейство органелл методами гистохимии. Лизосомы были обнаружены во всех эукариотических клетках.

Лизосомы специализируются на внутриклеточном расщеплении веществ. Они содержат уникальные мембранные белки и большое количество разных гидролитических ферментов, которые лучше всего работают при кислых значениях pH (pH5), характерных для содержимого лизосом. Кислый pH в лизосомах поддерживается при помощи АТР-зависимой протонной помпы в их мембранах. Вновь синтезированные белки лизосом переносятся в полость ЭР, затем транспортируются через аппарат Гольджи и из транс-сети Гольджи с помощью транспортных пузырьков доставляются в промежуточный компартмент (эндолизосому). Таким образом гетерогенность лизосом отражает широкий спектр реакций расщепления, протекающих с участием кислых гидролаз, включая расщепление внутри- и внеклеточных отходов, переваривание фагоцитированных микроорганизмов и даже питание клетки (поскольку лизосомы – это основное место накопления холестерола из поступающих в клетку путем эндоцитоза сыворочных липопротеинов). На этом основании лизосомы иногда рассматривают как группу разнородных органелл, общим свойством которых является высокое содержание гидролитических ферментов.

Лизосомные гидролазы содержат N-связанные олигосахариды, которые модифицируются в цискомпартменте Гольджи таким образом, что их остатки маннозы фосфорилируются. Эти маннозо-6-фосфатные (М6Ф) группы узнаются в транс-сети Гольджи М6Ф-рецептором, который отбирает гидролазы и помогает упаковывать их в отпочковывающиеся покрытые клатрином пузырьки. Транспортные пузырьки, держащие рецептор маннозо-6-фосфата, действуют подобно челнокам, доставляя рецептор от транс-сети Гольджи к эндолизосомам и обратно. Низкий уровень pH в эндолизосомах вызывает диссоциацию комплекса лизосомной гидролазы и рецептора, делая транспорт гидролаз однонаправленным.

Все белки, проходящие через аппарат Гольджи, кроме тех, которые остаются там в качестве постоянных компонентов, сортируются в соответствии с местом конечного назначения в транс-сети Гольджи. Особенно хорошо механизм этой сортировки изучен для белков, направляющихся в полость лизосом.

Лизосома представляет собой мембранный мешок, наполненный гидролитическими ферментами, которые служат для контролируемого внутриклеточного расщепления макромолекул. Повреждение мембраны лизосом, вызванное осмотрическим лизисом или старением препарата, приводит к высвобождению этих ферментов из лизосом в неосаждаемой форме.

Известно около 40 гидролитических ферментов, содержащихся в лизосомах. Это различные протеазы, нуклеазы, гликозидазы, липазы, фосфолипазы, фосфатазы и сульфатазы. Кроме того, все они – кислые гидролазы, обладающие наибольшей активностью при pH5. Именно такое значение pH поддерживается в лизосомах. В норме мембрана лизосом не проницаема для этих ферментов, но даже в случае их утечки необходимость кислого pH для функционирования гидролаз защищает цитоплазму от разрушения.

Лизосомы не только содержат уникальный набор ферментов, но и окружены необычной, непохожей на остальные, мембраной. Эта мембрана, например, содержит транспортные белки, позволяющие продуктам расщепления макромолекул покидать лизосому, после чего они могут либо выделяться из клетки, либо использоваться внутри нее вторично. Кроме того полагают, что в мембране лизосомы находится специальный белок, использующий энергию АТР для накачки ионов водорода в лизосому. Именно это поддерживает в полости данной органеллы pH около 5. Большинство белков лизосомной мембраны необычно сильно гликолизированы, что, возможно, защищает их от действия протеаз в полости органеллы.

Транспорт молекул в лизосомы происходит по-разному и зависит от источника этих молекул. Наиболее хорошо изучен путь, по которому идет расщепление материала, поглощенного путем эндоцитоза. Он включает окаймленные ямки, эндосомы, и, наконец, лизосомы.

Поглощенные путем эндоцитоза молекулы проходят последовательно от периферических к перинуклеарным эндосомам. Те компоненты, которые не были извлечены из этих эндосом, чтобы вернуться в плазматическую мембрану, попадают затем в третий «промежуточный компартмент», получающий новосинтезированные лизосомные гидролазы и белки лизосомной мембраны из аппарата Гольджи. Поскольку среда в этом эндолизосомном компартменте слабокислая, полагают, что именно здесь начинается гидролитическое расщепление эндоцированного материала. Для превращения эндолизосом в зрелые лизосомы необходимо, чтобы они утратили определенные компоненты мембран, а уровень pH внутри них еще понизился. Как происходит это превращение, неизвестно.

Существует и второй путь транспорта материала в лизосомы. Именно с ним связано разрушение отработанных частей самой клетки – процесс, называемый аутофагией. Известно, например, что в клетках печени среднее время жизни одной митохондрии составляет около 10 дней. На электронных микрофотографиях нормальных клеток можно увидеть лизосомы, содержащие митохондрии и секреторные пузырьки. Вероятно, это отработанные органеллы, которые должны быть утилизированы в лизосомах. Процесс деградации, по-видимому, начинается с окружения органеллы мембранами, происходящими из ЭР, в результате чего образуется аутофагосома. Затем, как полагают, аутофагосома сливается с лизосомой (или эндолизосомой), образуя аутофаголизосому, в которой уже начинается процесс деградации. Этот процесс хорошо отрегулирован; отдельные компоненты клетки могут направляться в лизосомы для расщепления по мере необходимости: например, гладкий ЭР, образовавшийся в клетках печени в ответ на лекарственные препараты, после выведения препарата из организма удаляется путем аутофагии.

Третий путь поступления материала в лизосомы имеется только у клеток, специализированных для фагоцитоза больших частиц и микроорганизмов. Такие клетки, как макрофаги и нейтрофилы, могут поглощать крупные объекты, образуя фагосомы. Предполагают, что фагосома превращается в фаголизосому тем же способом, который описан для аутофагосомы.

Лизосомы образуются путем синтеза специфических лизосомных гидролаз и мембранных белков. И те, и другие белки синтезируются в ЭР и транспортируются через аппарат Гольджи. Транспортные пузырьки, доставляющие их в эндолизосомы, отделяются от транс-сети Гольджи. Эти пузырьки должны включать именно лизосомные белки и не включать множество других белков, которые упаковываются в другие транспортные пузырьки и доставляются в другие органеллы.

Механизм узнавания лизосомных белков и точность отбора на молекулярном уровне известен только для одного класса ферментов – лизосомных гидролаз. Они имеют уникальный маркер – маннозо-6 – фосфат, который присоединяется к N-связанным олигосахаридам этих растворимых лизосомных ферментов. Реакция протекает в пространстве цис – компартмента Гольджи. Соответствующие маннозофосфатные рецепторы группируются на мембране и затем концентрируются в покрытых клатрином окаймленных пузырьках. Эти рецепторы представляют собой трансмембранные белки, которые связывают лизосомные ферменты, отделяя их таким образом от всех остальных белков и собирая в окаймленные транспортные пузырьки. Эти пузырьки быстро теряют свою кайму и сливаются с эндолизосомами.

В некоторых клетках небольшое количество рецепторов маннозо-6-фосфата присутствует в плазматической мембране, где они участвуют в эндоцитозе лизосомных ферментов, которые были выделены во внеклеточную среду. Благодаря этим рецепторам ферменты через окаймленные ямки попадают к эндосомам, а оттуда к лизосомам. Таким необычным путем, с помощью «старьевщиков» и доставляются в лизосомы гидролазы, которые избежали процесса упаковки в транс-сети Гольджи и были поэтому транспортированы к клеточной поверхности и выведены наружу.

Маннозофосфатный рецептор связывает специфический олигосахарид при pH7 и отщепляет его при pH6; именно такой pH существует внутри эндолизосом. Лизосомные ферменты в эндолизосоме отделяются от белка – рецептора маннозо-6-фосфата и начинают расщеплять поглощенный материал, содержавшийся в эндосомах. Отделившись от «своих» ферментов, рецепторы восстанавливают структуру и возвращаются в мембрану транс-сети Гольджи, возможно, в составе окаймленных пузырьков. Такой механизм возвращения мембран из эндолизосом обратно в аппарат Гольджи весьма напоминает круговорот мембран между эндосомами и плазматической мембраной при опосредованном рецепторами эндоцитозе. Опосредствованный рецепторами транспорт лизосомных гидролаз из аппарата Гольджи к эндолизосомам аналогичен эндоцитозу внеклеточных молекул, направляющему их от плазматической мембраны в эндосомы. В обоих случаях рецепторы собираются в покрытых клатрином участках мембраны (называемых окаймленными ямками); эти участки отшнуровываются от мембраны, образуя покрытые клатрином окаймленные пузырьки. Пузырьки доставляют затем лиганд к следующему компартменту, имеющему кислую среду, и оттуда рецепторы возвращаются в исходную мембрану.

Круговорот маннозофосфатного рецептора был прослежен с помощью специфических антител, позволяющих локализовать этот белок в клетке. В норме рецепторы маннозо-6-фосфата обнаруживают в мембране аппарата Гольджи и мембране эндолизосом, но не в зрелых лизосомах. Показано, что перемещению рецептора обратно в аппарат Гольджи способствует его конформационное изменение, связанное с отщеплением гидролазы.

Челночная система рецептора маннозо-6-фосфата является специфичной – пузырьки, несущие этот рецептор, сливаются только с нужными органеллами-мишенями, а не, к примеру, с мембраной ЭР. Считают, что клатриновая кайма на формирующихся пузырьках действует подобно «молекулярному фильтру», изолирующему рецептор и его лиганд внутри пузырьков. Однако клатрин может отвечать за специфичность доставки пузырьков, так как кайма удаляется вскоре после их образования. Удаление клатрина катализируется hsp 70-подобным белком, а соответствующая реакция требует гидролиза АТР. Один или несколько белков, остающихся на внешней стороне мембраны пузырька, вероятно служат специфическими «сигналами погрузки», которые узнаются комплементарным «приемщиком» на мембране органеллы-мишени.

Изучение механизмов сортировки лизосомных гидролаз дает представление о протекающих в клетках эукариот процессах переноса веществ с помощью транспортных пузырьков. Неважно, что олигосахаридные маркеры, по-видимому, больше нигде не используются, все остальные события – распознавание «груза» мембранным рецептором при отпочковании пузырька, слияние пузырька со специфичной мембраной-мишенью, высвобождение «груза» в компартмент – мишень и возвращение освободившегося рецептора в исходный компартмент – вероятно, являются общими для всех видов везикулярного транспорта.

Для присоединения маннозофосфатных групп к лизосомным гидролазам необходима последовательная работа двух ферментов. N-ацетилглюкозамин – фосфотрансфераза (GlcNAc-фосфотрансфераза) переносит GlcNAc-P-часть молекулы нуклеотид-сахара UDP-GlcNAc к остатку маннозы в олигосахариде, а второй фермент – фосфогликозидаза – затем удаляет концевой GlcNAc, оставляя фосфат, в результате образуется маннозо-6-фосфат. Фосфотрансфераза специфически связывается с гидролазой благодаря участку (или сайту) узнавания, не совпадающему с активным центром этой реакции

По-видимому, в данном случае сигнал узнавания представляет собой трехмерный участок, а не сигнальный пептид. Об этом свидетельствует тот факт, что при частичном разворачивании гидролазы распознавание практически прекращается.

Как только фосфотрансфераза узнает сигнал на гидролазе, она присоединяет GlcNAc-P к одному или двум маннозным остаткам в каждой олигосахаридной цепи. Поскольку большинство лизосомных гидролаз несут многочисленные олигосахариды, они приобретают много остатков М6Ф, что приводит к многократному усилению сигнала. Если при связывании обычной лизосомной гидролазы с сайтом узнавания фосфотрансферазы К(а) составляет 100000 л/моль, то для множественно фосфорилированной гидролазы и маннозофосфатного рецептора соответствующий показатель равен 1000000000 л/моль, т.е. их связь в 10000 раз прочнее.

Общее название наследственных заболеваний, связанных с нарушением функции лизосом – внутриклеточных органелл, которые осуществляют переваривание экзогенного материала или отработавших органелл клетки с помощью ферментов. Генетически детерминированное нарушение синтеза одного или нескольких ферментов лизосом приводит к накоплению в них специфического субстрата этих ферментов. Проявляются прогресирующим отложением вещества определенного типа (например, гликогена, гликозаминогликанов (мукополисахаридов)) в клетках различных тканей. Примерами таких заболеваний являются гликогенозы, мукополисахаридозы.

Болезни накопления липидов характеризуются рядом постоянных признаков:

1) в тканях накапливаются сложные липиды, структурным компонентом которых является церамид;

2) скорость синтеза запасаемого липида сравнима со скоростью его биосинтеза у здоровых людей;

3) при этих заболеваниях наблюдается недостаток специфичного фермента в лизосомах, необходимого для гидролиза липида;

4) степень снижения активности фермента во всех тканях одинакова. С учетом всех вышеизложенных признаков были разработаны специальные методы диагностики данных заболеваний. Стало возможным также выявлять гетерозиготных носителей дефектных генов, ответственных за развитие этих заболеваний, и определять сфинголиподистрофию у плода.

Лизосомные болезни накопления сыграли решающую роль в раскрытии механизма сортировки лизосомных гидролаз. Эти болезни обусловлены генетическими нарушениями, в результате которых одна или несколько лизосомных гидролаз оказываются дефектными. Нерасщепленный субстрат такой гидролазы накапливается в лизосомах, что и обусловливает патологию. Обычно такие болезни вызываются мутацией в структурном гене, кодирующем отдельную гидролазу. Наиболее тяжелые симптомы характеризуют редкую форму патологии, называемую I-клеточной болезнью (inclusion cell disease). У таких больных в лизосомах фибробластов отсутствуют почти все гидролитические ферменты, а соответствующие нерасщепленные субстраты накапливаются в клетках в виде крупных «включений. I-клеточная болезнь обусловлена рецессивной мутацией единственного гена. Это означает, что она проявляется только у людей, получивших дефектные копии гена от обоих родителей.

При изучении I-клеточной болезни оказалось, что в лизосомах все гидролазы отсутствуют, но в крови они обнаруживаются. Из этого следует, что структурные гены, кодирующие их, не повреждены. Аномалия в данном случае вызвана нарушениями процесса сортировки в аппарате Гольджи, в результате чего гидролазы вместо того, чтобы поступать в лизосомы, секретируются. Неправильная сортировка происходит из-за повреждения или отсутствия GlcNAc-фосфотрансферазы. Лизосомные ферменты в таких клетках не фосфорилируются и маннозофосфатный рецептор не может собрать их окаймленные пузырьки в транс-сети Гольджи. Вместо этого они доставляются к клеточной поверхности и секретируются. Те олигосахариды, которые у нормальных лизосомных ферментов содержали бы М6Ф, превращаются в олигосахариды «сложного» типа, содержащие GlcNAc, галактозу и сиаловую кислоту. Это показывает, что в норме фосфорилирование маннозы в цискомпартменте Гольджи предотвращает последующий процессинг олигосахаридов гидролаз в сложные формы в промежуточном компартменте Гольджи и транс – компартменте Гольджи.

Установлено, что все лизосомные ферменты имеют общий маркер – маннозо-6-фосфат; выделены и очищены рецептор маннозо-6-фосфата, GlcNAc – фосфотрансфераза, кроме того была выяснена роль аппарата Гольджи в механизме сортировки лизосомных гидролаз.

При I-клеточной болезни лизосомы в клетках некоторых типов, например, в гепатоцитах, содержат нормальный набор лизосомных ферментов. Это означает, что существует и другой механизм, направляющий гидролазы в лизосомы, который используется в одних клетках и не используется в других. Природа этого М6Ф – независимого пути в настоящее время неизвестна. Возможно, в данном случае сортировка гидролаз происходит путем прямого узнавания их сигнальных участков. Подобный М6Ф-независимый путь существует во всех клетках в транс-сети Гольджи для сортировки лизосомных мембранных белков и направления их в эндолизосомы. Непонятно, почему клетке необходим более чем один способ построения лизосом.

Гипертриглицеридемия является одним из признаков как болезни Гоше, так и нарушения запасания гликогена, и, как было показано, исчезает после операции портакавального шунтирования.