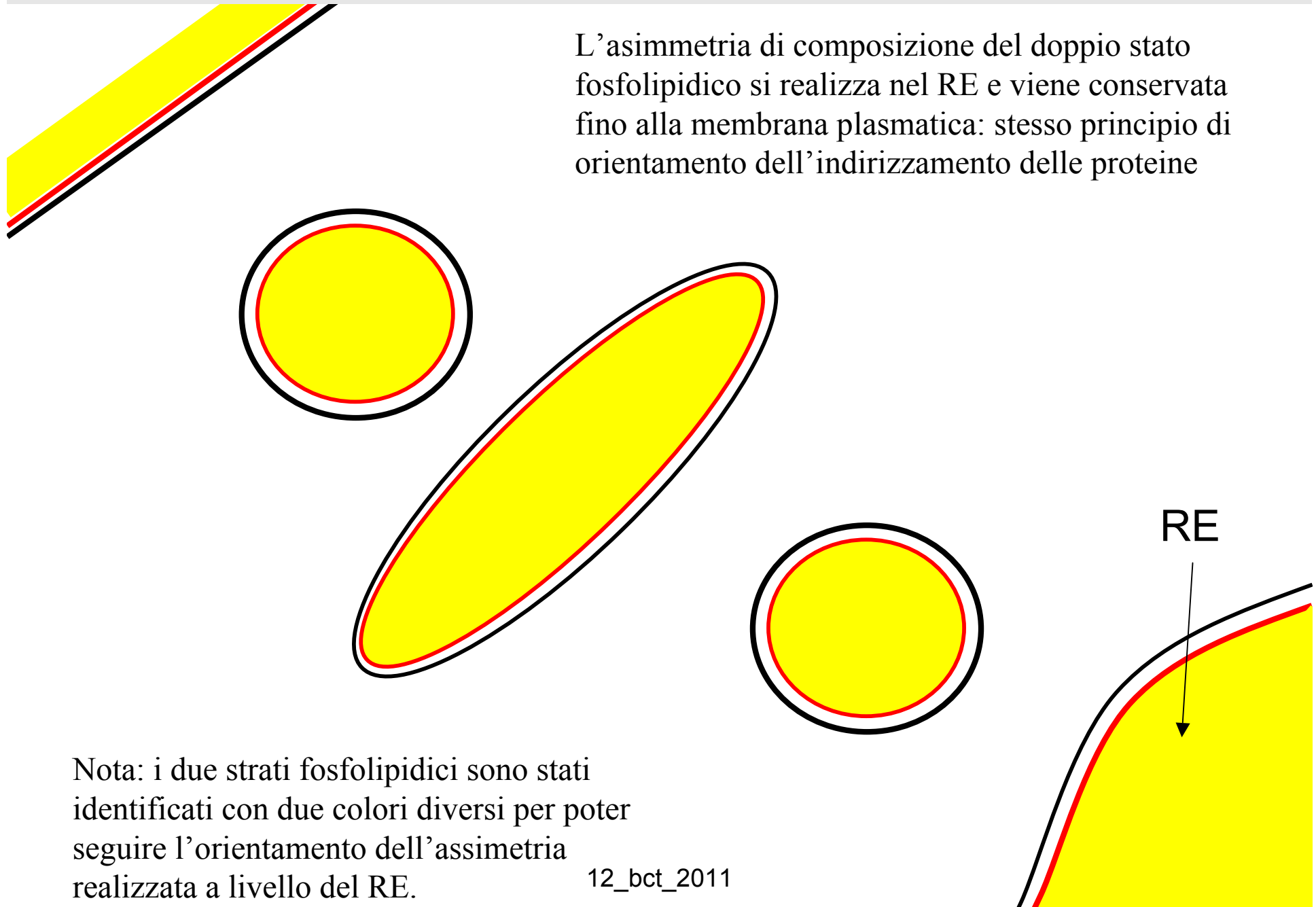


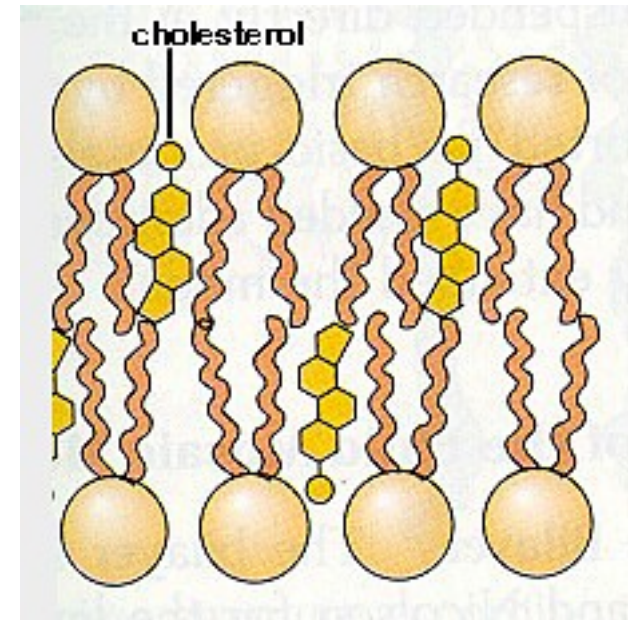
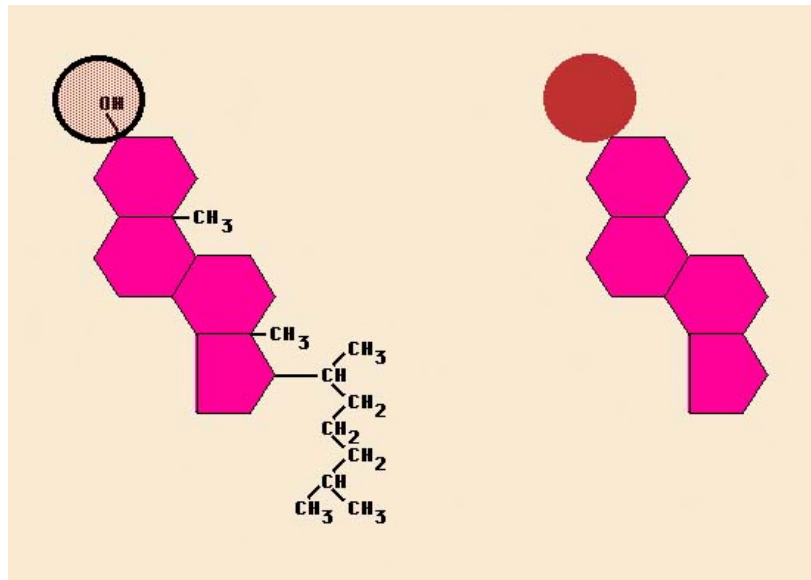
L'asimmetria di composizione del doppio strato fosfolipidico si realizza nel RE e viene conservata fino alla membrana plasmatica: stesso principio di orientamento dell'indirizzamento delle proteine



Nota: i due strati fosfolipidici sono stati identificati con due colori diversi per poter seguire l'orientamento dell'assimmetria realizzata a livello del RE.

12_bct_2011

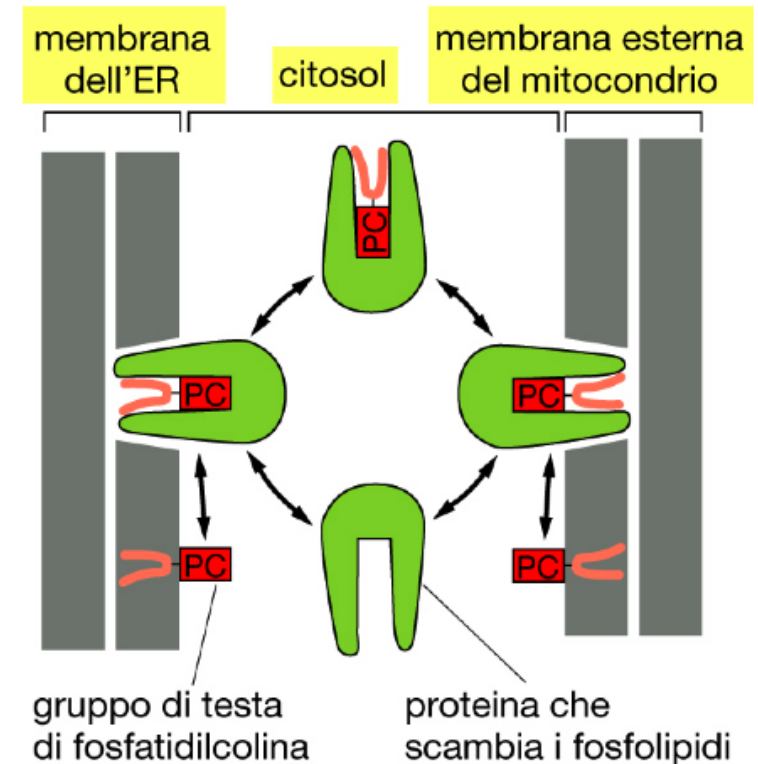
Funzioni del REL: Oltre alla produzione dei fosfolipidi, il REL svolge un ruolo essenziale nella sintesi del colesterolo e degli ormoni steroidei



Il REL è particolarmente sviluppato in cellule che producono gli ormoni steroidei (ghiandola surrenale, gonadi) ed è in stretto contatto con i mitocondri perché gli enzimi della sintesi degli ormoni steroidei sono suddivisi tra questi due organelli. La prima e l'ultima parte della sintesi degli ormoni steroidei avviene nella membrana dei mitocondri, mentre modifiche intermedie sono svolte da enzimi appartenenti alla membrana del REL.

La cooperazione tra REL e mitocondri nella sintesi degli ormoni steroidi richiede punti di contatto tra le membrane di questi organelli che si scambiano delle molecole senza l'intervento di vescicole, ma semplicemente grazie a dei trasportatori associati alle membrane.

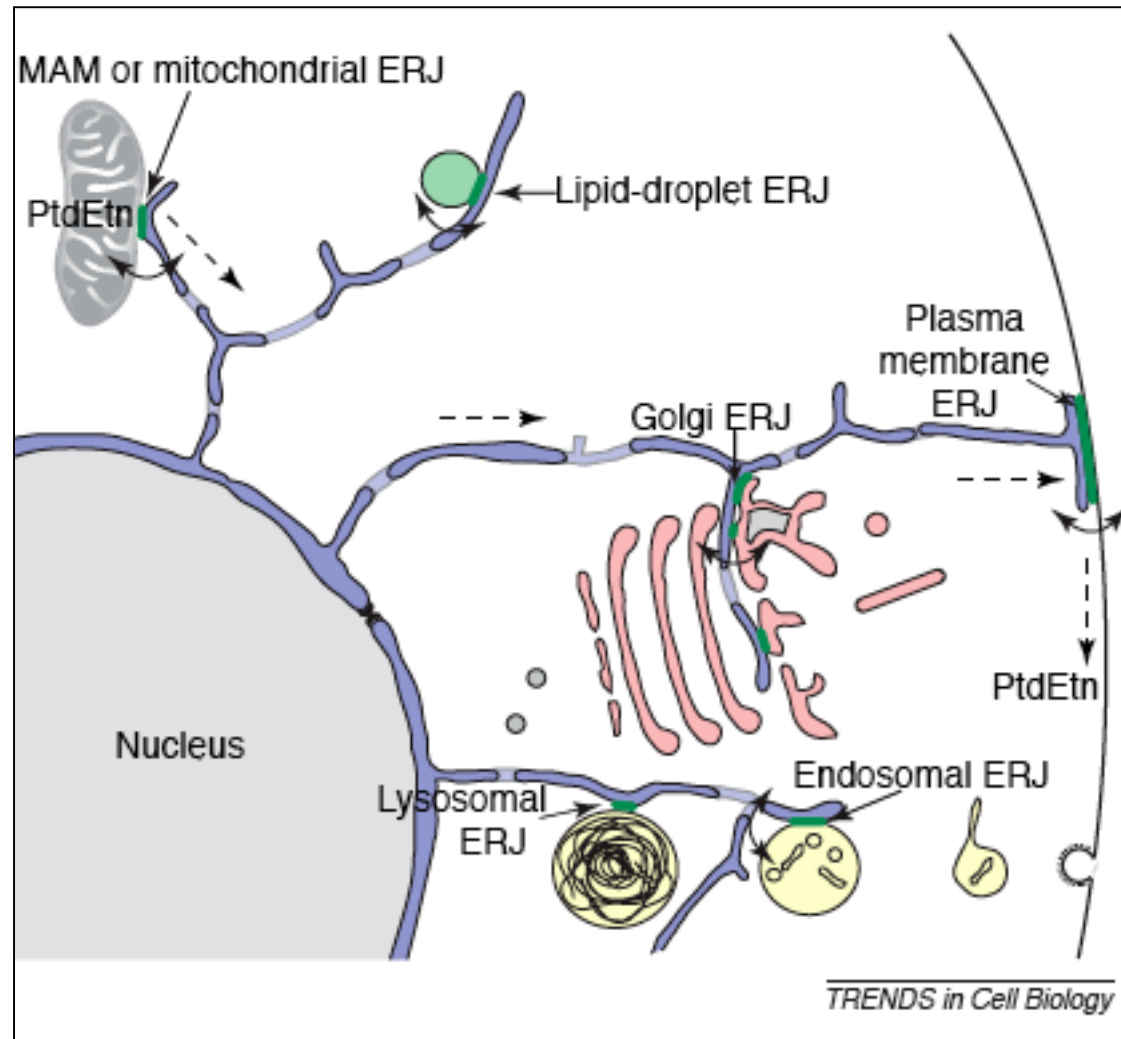
A fianco dello scambio di materiale attraverso la formazione di vescicole esistono probabilmente altri sistemi di scambio di molecole tra compartimenti. Punti di contatto tra il RE e altri organelli o la membrana plasmatica sono probabilmente più frequenti di quanto generalmente descritto e le interazioni metaboliche frequenti.



A transport network based on the endoplasmic reticulum (ER).

Different membrane contact sites (MCSs) (green lines) can be categorized on the basis of the organelle that partners the ER, with each one forming a different type of ER junction (ERJ). Curved arrows indicate non-vesicular trafficking of small molecules at ERJs.

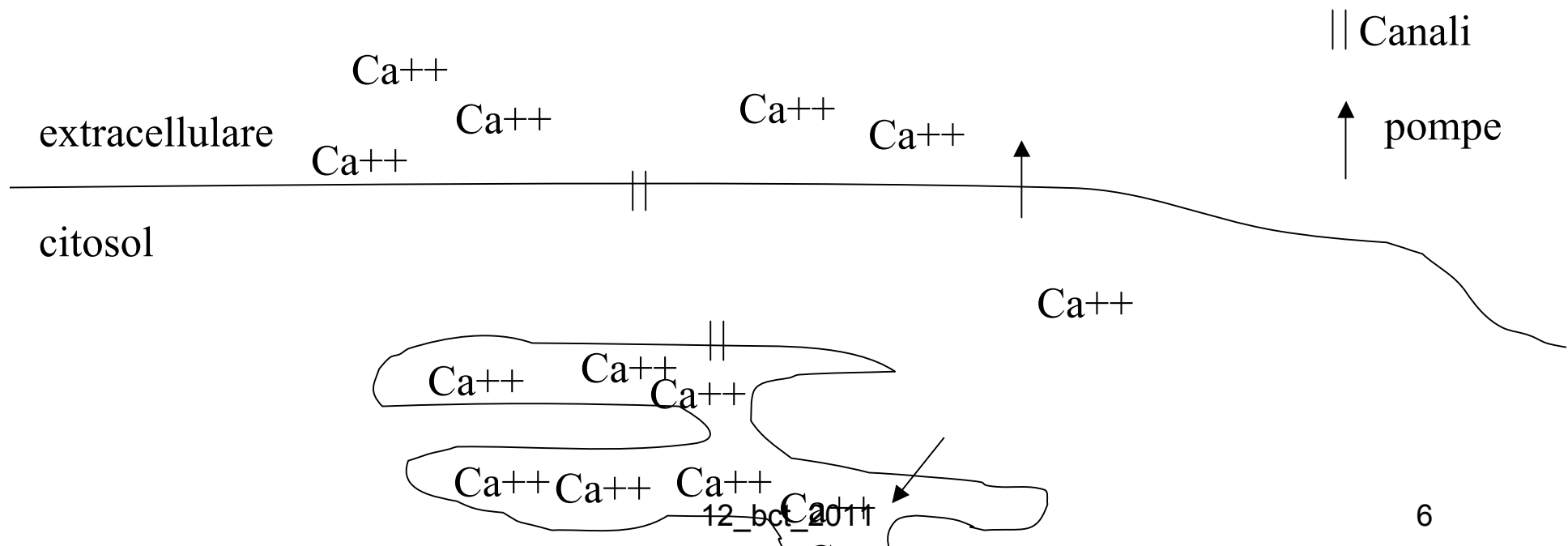
The universal involvement of the ER enables non-vesicular trafficking of molecules between two compartments that form ERJs. For example, phosphatidylethanolamine (PtdEtn) that is synthesized in the inner mitochondrial membrane efficiently accesses the plasma membrane by a non-vesicular route (broken arrows) that involves both mitochondrial ERJs [mitochondrial associated ER membrane (MAM)] and plasma membrane ERJs [plasma membrane-associated membrane (PAM)].



- Funzioni del REL: Detossificazione

Il REL dispone di enzimi che , catalizzando reazioni di idrossilazione, rendono molecole tossiche (compresi farmaci, inquinanti, droghe) più facilmente solubili nell'acqua e dunque più facilmente eliminabili (urine).

- Funzioni del REL: Immagazzinamento e rilascio di calcio intracellulare



RE granuloso
(RER)

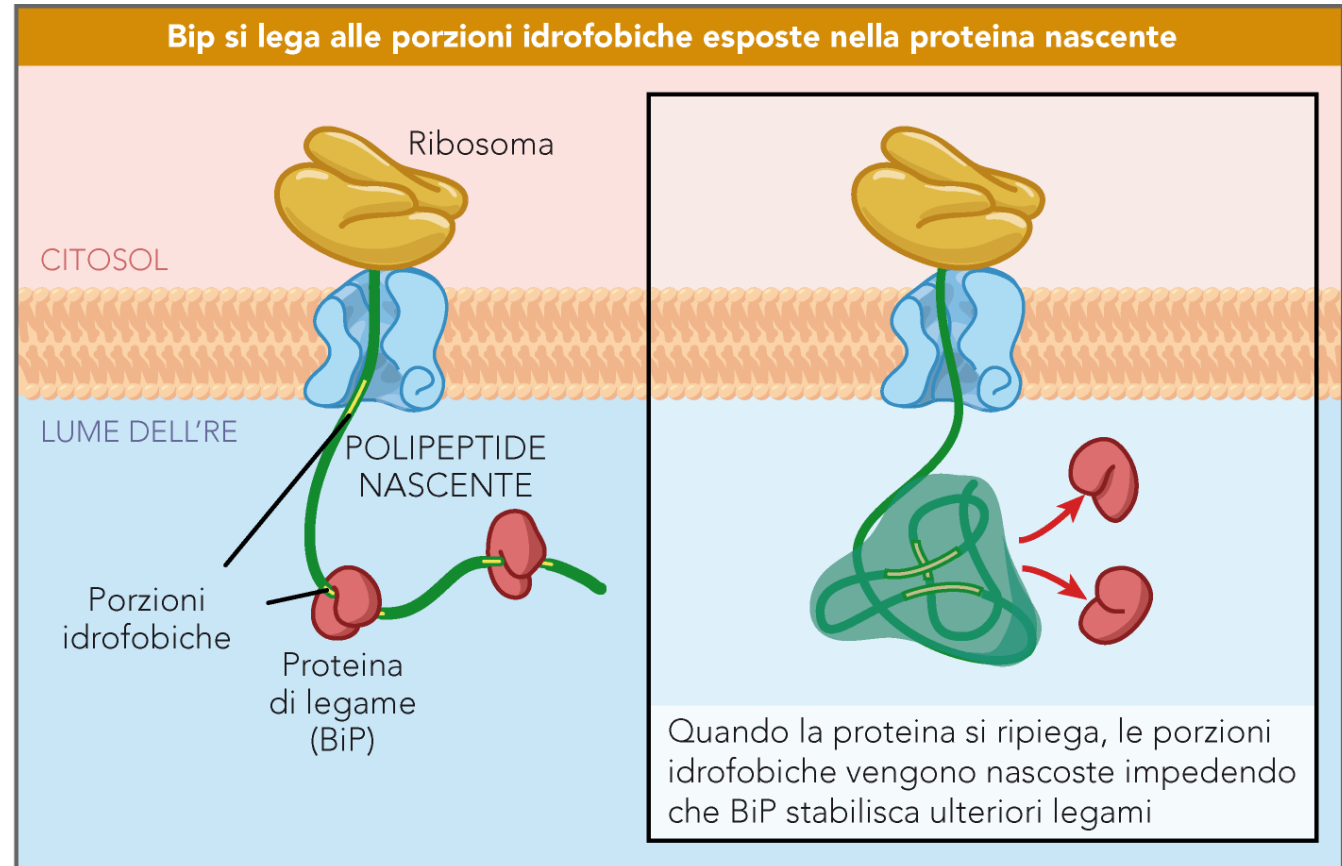
- Sintesi (sul lato citoplasmatico del RER) e maturazione delle proteine di membrana, delle proteine secretorie e di quelle destinate al Golgi e ai lisosomi.
- Modifiche post traduzionali delle proteine:
 1. Taglio proteolitico del peptide segnale*
 2. Struttura (Folding)
 3. Modifiche covalenti a carico di aminoacidi
 4. Realizzazione di eventuali legami disolfuri
 5. Eventuale inserimento di un'àncora lipidica (GPI),
 6. Aggiunta di una struttura glucidica complessa (glicosilazione N-terminale)

1- Taglio proteolitico del peptide segnale

vedi lezione precedente

2-Le molecole “chaperone” intervengono nel ripiegamento (folding) delle proteine appena traslocate.

Bip interagisce con i primi domini idrofobici del polipeptide nascente e l'interazione termina quando le porzioni idrofobiche interagiscono fra di loro e sono coperte dalle porzioni idrofiliche della proteina terminata



3- Modifiche covalenti a carico di aminoacidi: idrossilazioni

Tra le modifiche covalenti a carico di aminoacidi si può citare:

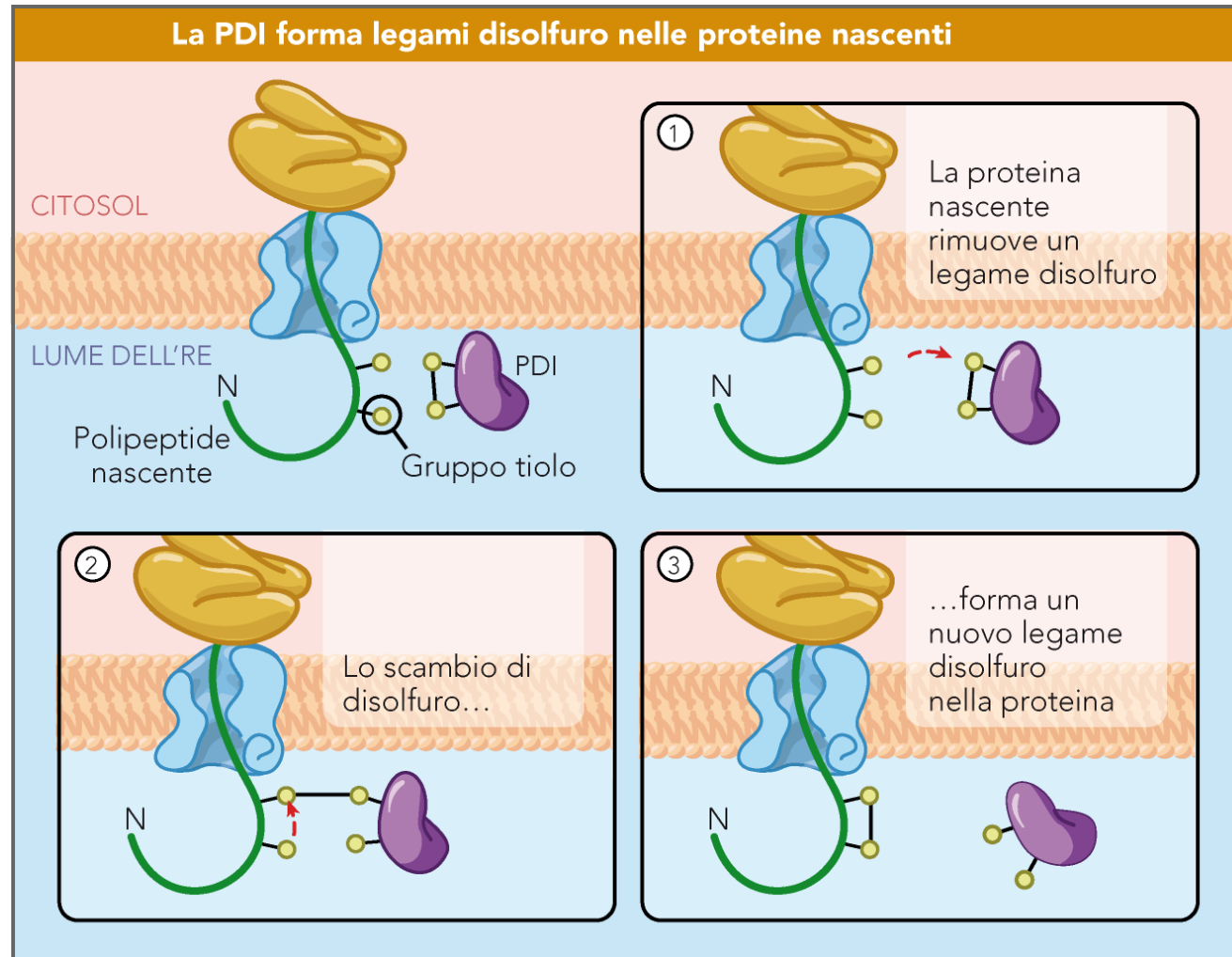
- idrossiprolina
- idrossilisina

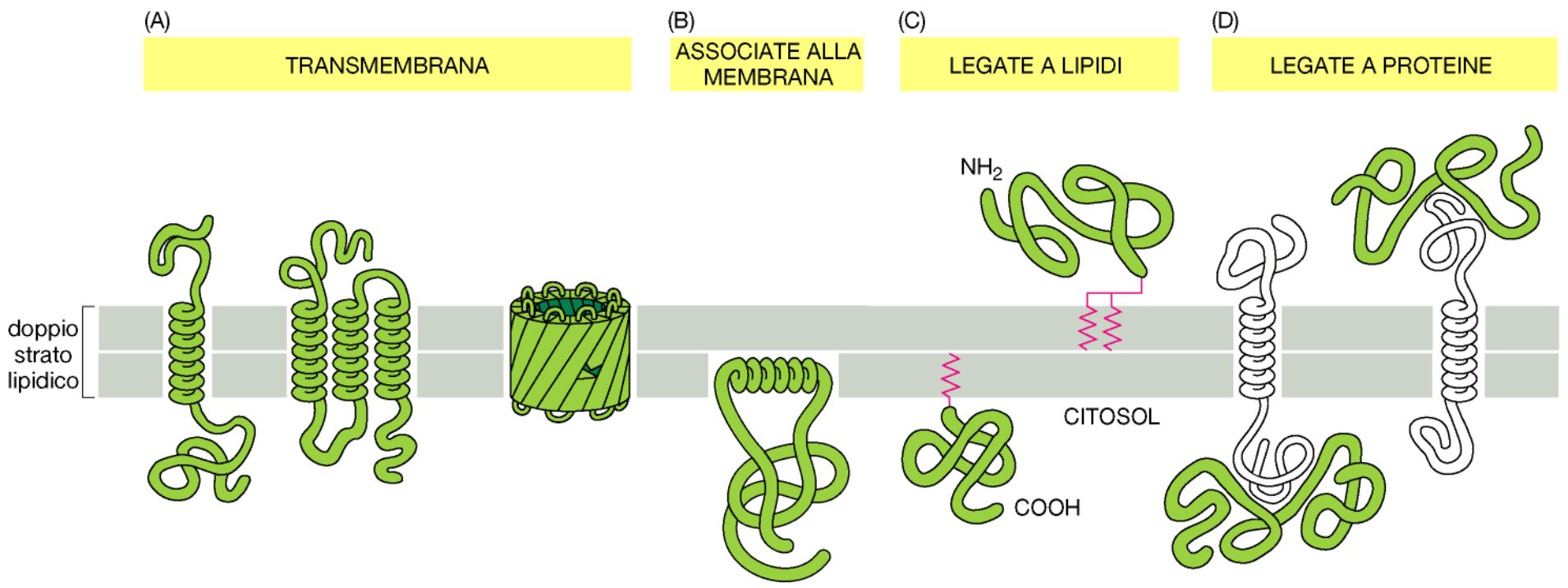
Questi aminoacidi particolarmente abbondanti nel collagene dei tessuti connettivi umani, non fanno parte dei venti tipi compresi nel codice genetico, ma risultano dall'idrossilazione post-traduzionale della prolina e della lisina.

L'idrossilazione si verifica nel RER, grazie all'intervento di idrossilasi per la cui attività è indispensabile la presenza dell'acido ascorbico (vitamina C).

3- Modifiche covalenti a carico di aminoacidi: Ponti di zolfo

La proteina disolfuro isomerasi (PDI) è localizzata nel lume del RER e ha per funzione di catalizzare i legami disolfuri: legami covalenti tra residui di cisteine

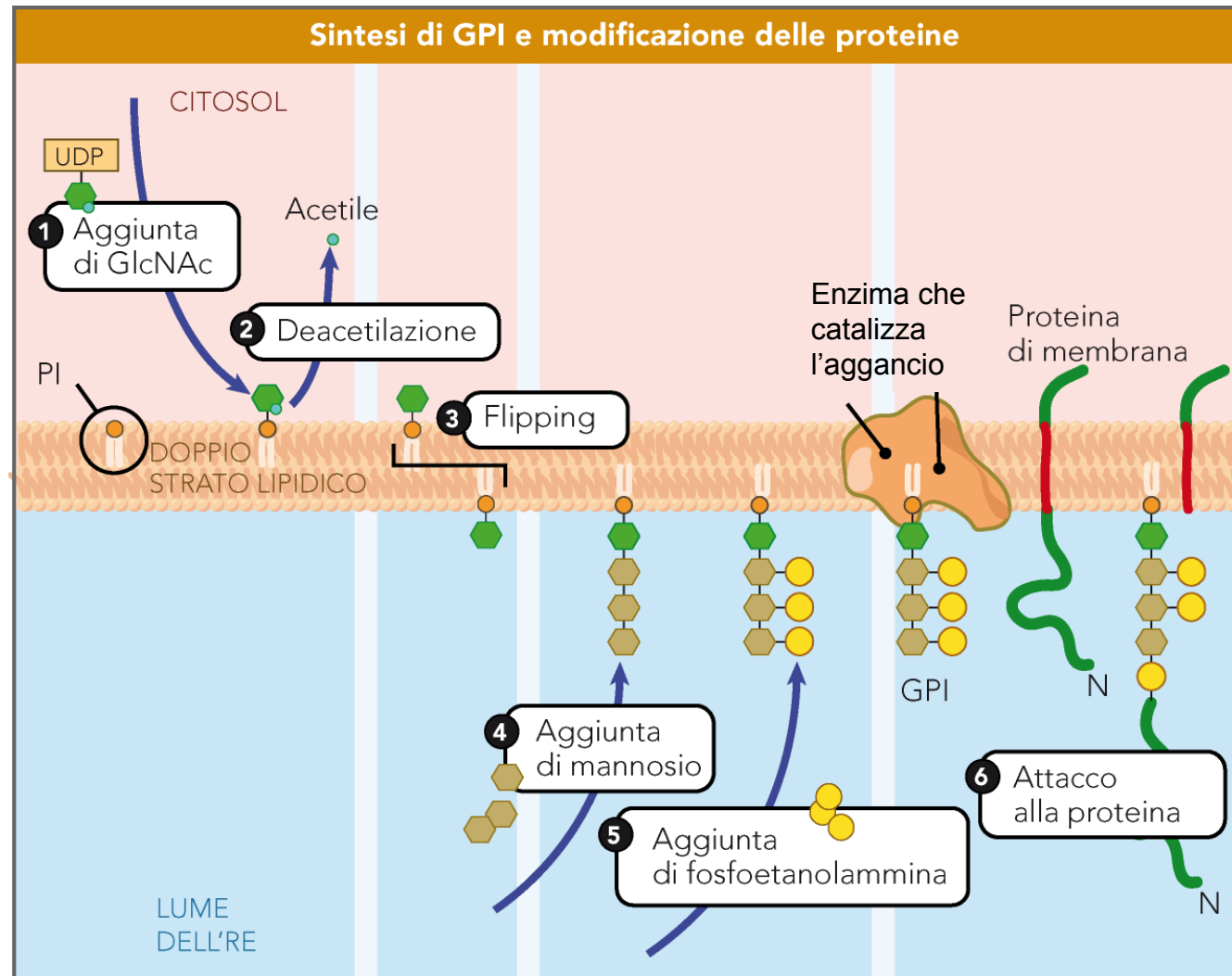




3- inserimento di un'ancora lipidica. GPI: glicosilfosfatidilinositolo

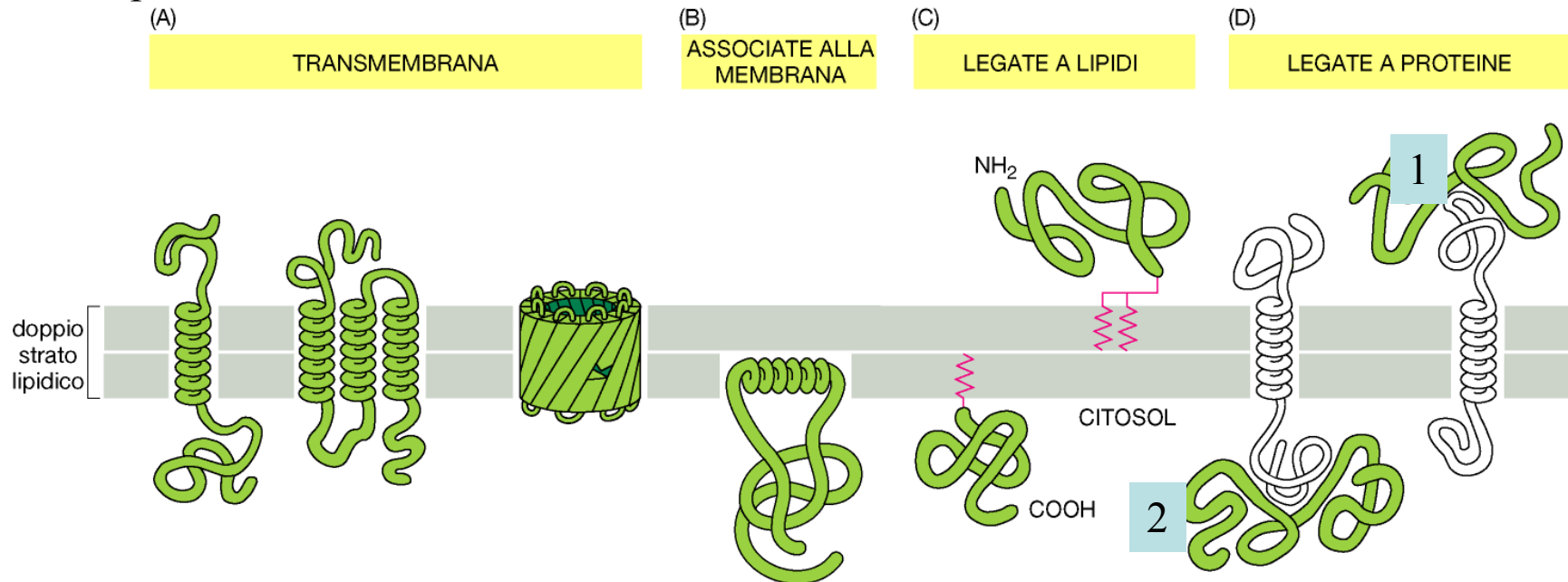
Un piccolo ma significativo gruppo di proteine traslocate all'interno del RE viene modificato per legame covalente a un fosfolipide.

Notare la localizzazione delle principali fasi della reazione. La proteina così ancorata sarà esposta alla superficie esterna della cellula



Proteine di membrana (ma non transmembrana) ancorate a lipidi




- 1 Proteine extracellulari ancorate a lipidi sono sintetizzate da ribosomi associati al RE, traslocate in modo co-traduzionale nel lume del RER, agganciate a GPI, trasportate da vescicole attraverso il Golgi fino alla membrana plasmatica

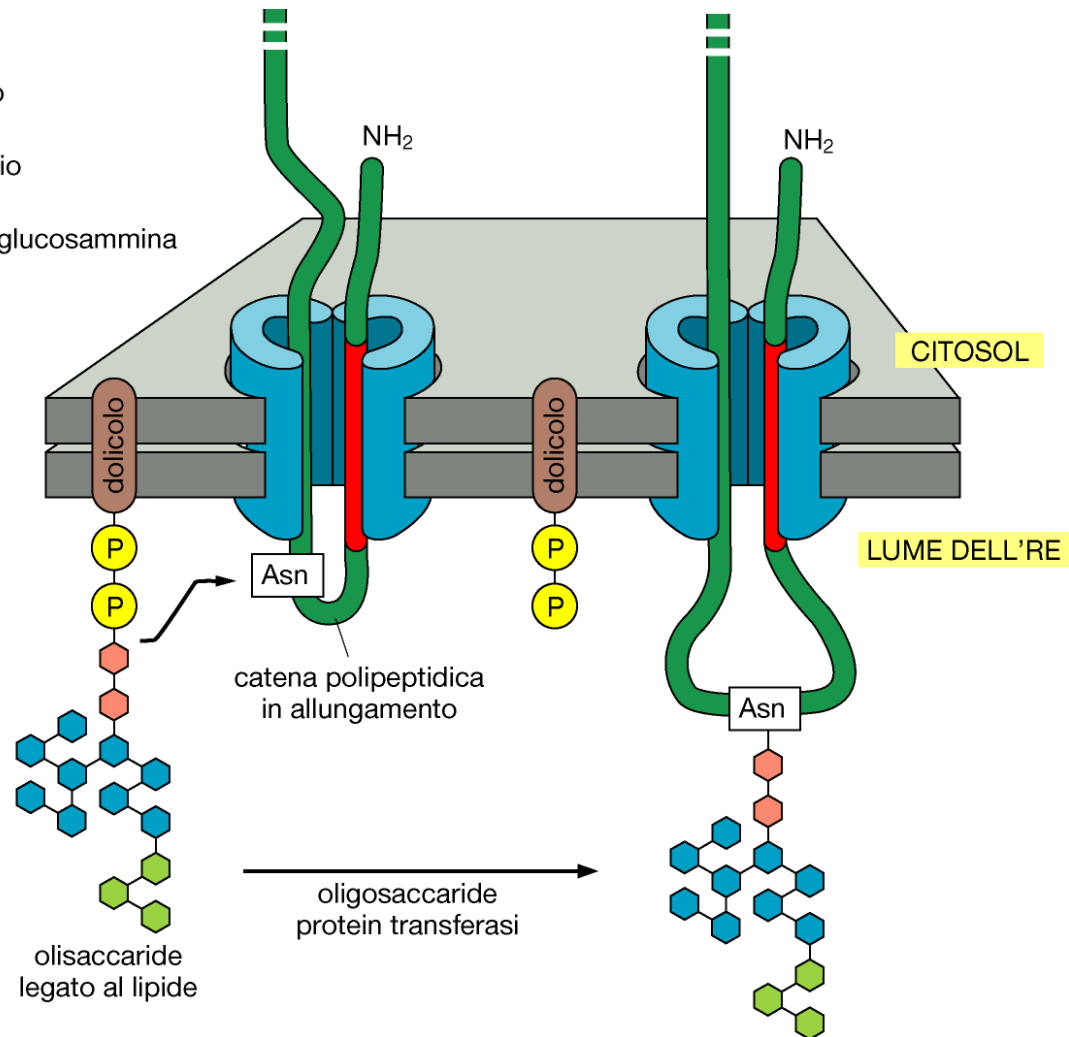


- 2 Proteine intracellulari (citoplasmatiche) ancorate a lipidi sono sintetizzate da ribosomi liberi, ancorate alla membrana del RE sul lato citoplasmatico e trasportate fino alla membrana plasmatica associate a vescicole (vedi diapo successiva)

3- Modifiche covalenti a carico di aminoacidi: Ponti di zolfo

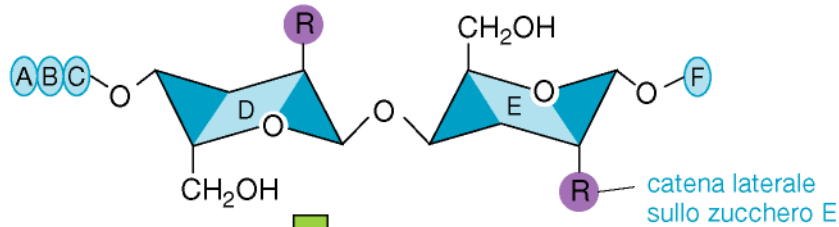
SIMBOLI:

-  = glucosio
-  = mannosio
-  = N-acetilglucosammina



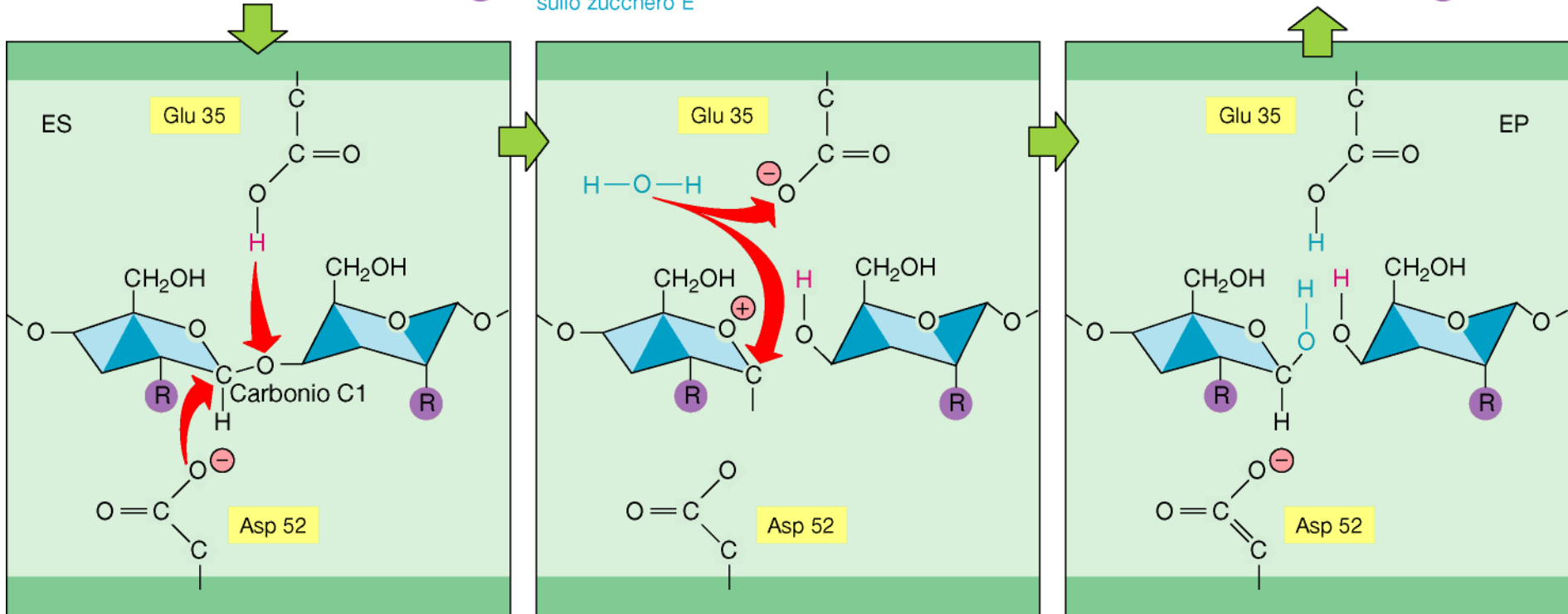
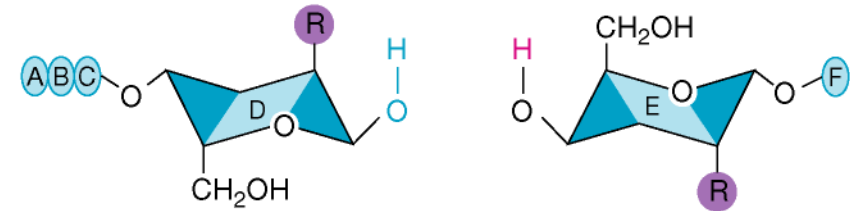
substrato

Questo substrato è un oligosaccaride di sei zuccheri, indicati con le lettere A-F. Qui è riportata solo la formula degli zuccheri D ed E in dettaglio.



prodotti

I prodotti finali sono un oligosaccaride di quattro zuccheri (a sinistra) e un disaccaride (a destra), derivanti da idrolisi.

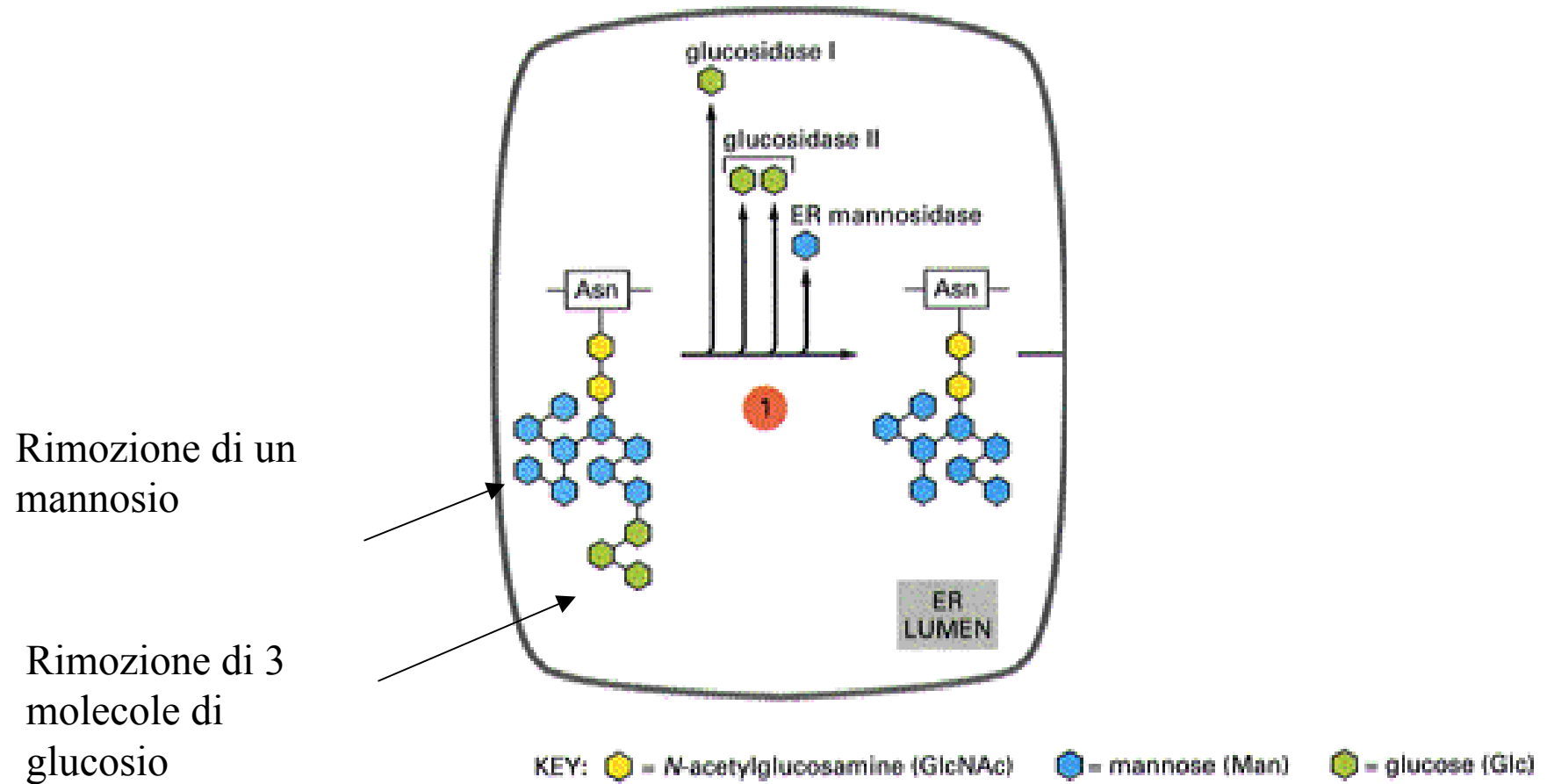


Nel complesso enzima-substrato (ES) l'enzima induce lo zucchero D ad assumere una conformazione tesa, disponendo Glu di posizione 35 ad agire come un acido, (dona il protone H^+ che attacca il legame zucchero-zucchero più vicino, E), e preparando Asp in posizione 52 ad attaccare l'atomo di carbonio C1.

Asp 52 ha formato un legame covalente tra l'enzima e l'atomo di carbonio C1 dello zucchero D. Glu 35 polarizza una molecola di acqua (in rosso), in modo che il suo atomo di ossigeno possa attaccare il carbonio C1, spostando Asp 52.

La reazione della molecola di acqua (in rosso) completa l'idrolisi, riporta l'enzima allo stato iniziale con formazione del complesso finale enzima-prodotto (EP).

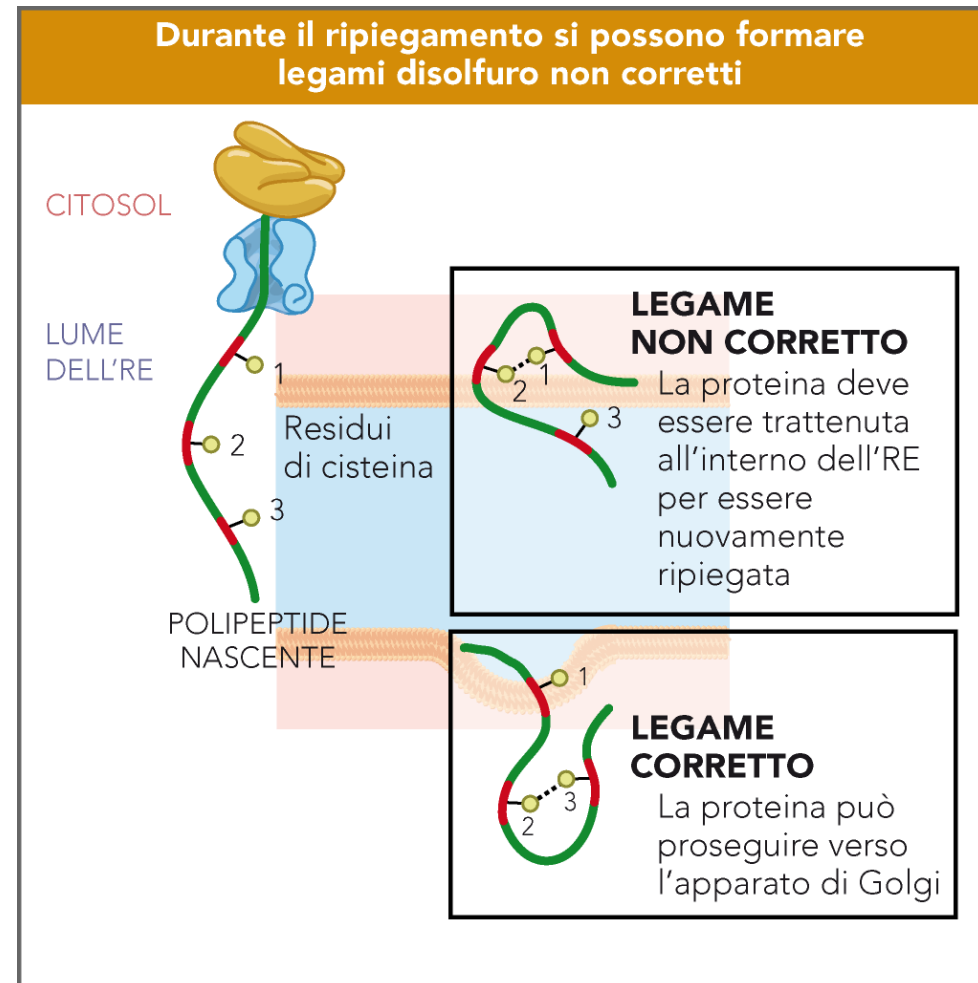
Dopo che una proteina è stata glicosilata, subisce varie modificazioni nella struttura oligosaccaridica, inclusa la rimozione di alcuni residui glucidici.



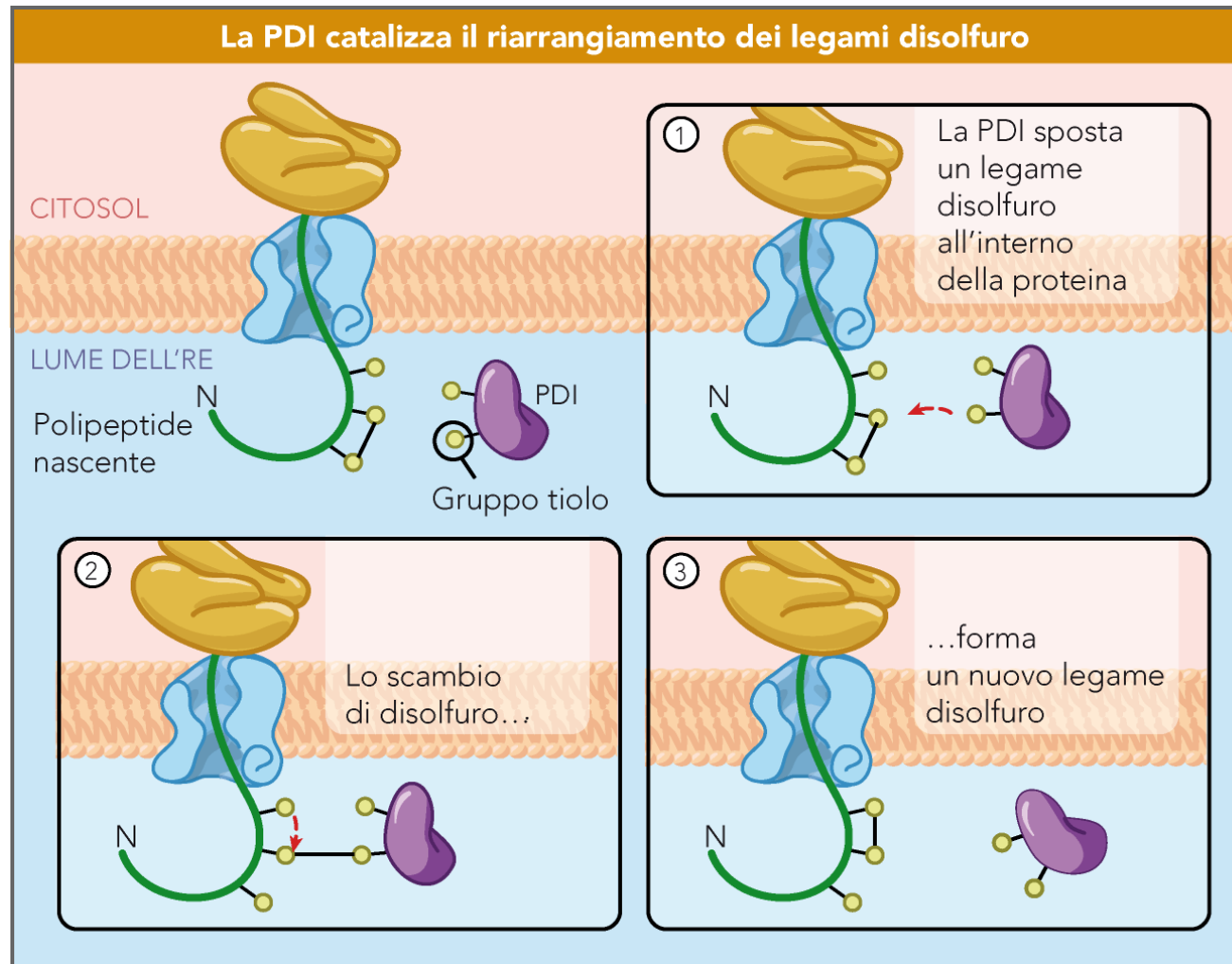
I meccanismi cellulari non sono perfetti ma l'evoluzione ha selezionato efficienti meccanismi di identificazione e correzione degli errori.

La corretta struttura tridimensionale delle proteine è monitorata dall'interazione con proteine residenti nel RER.

Soltanto proteine correttamente ripiegate e con legami disolfuri corretti possono essere convogliate verso l'apparato di Golgi.

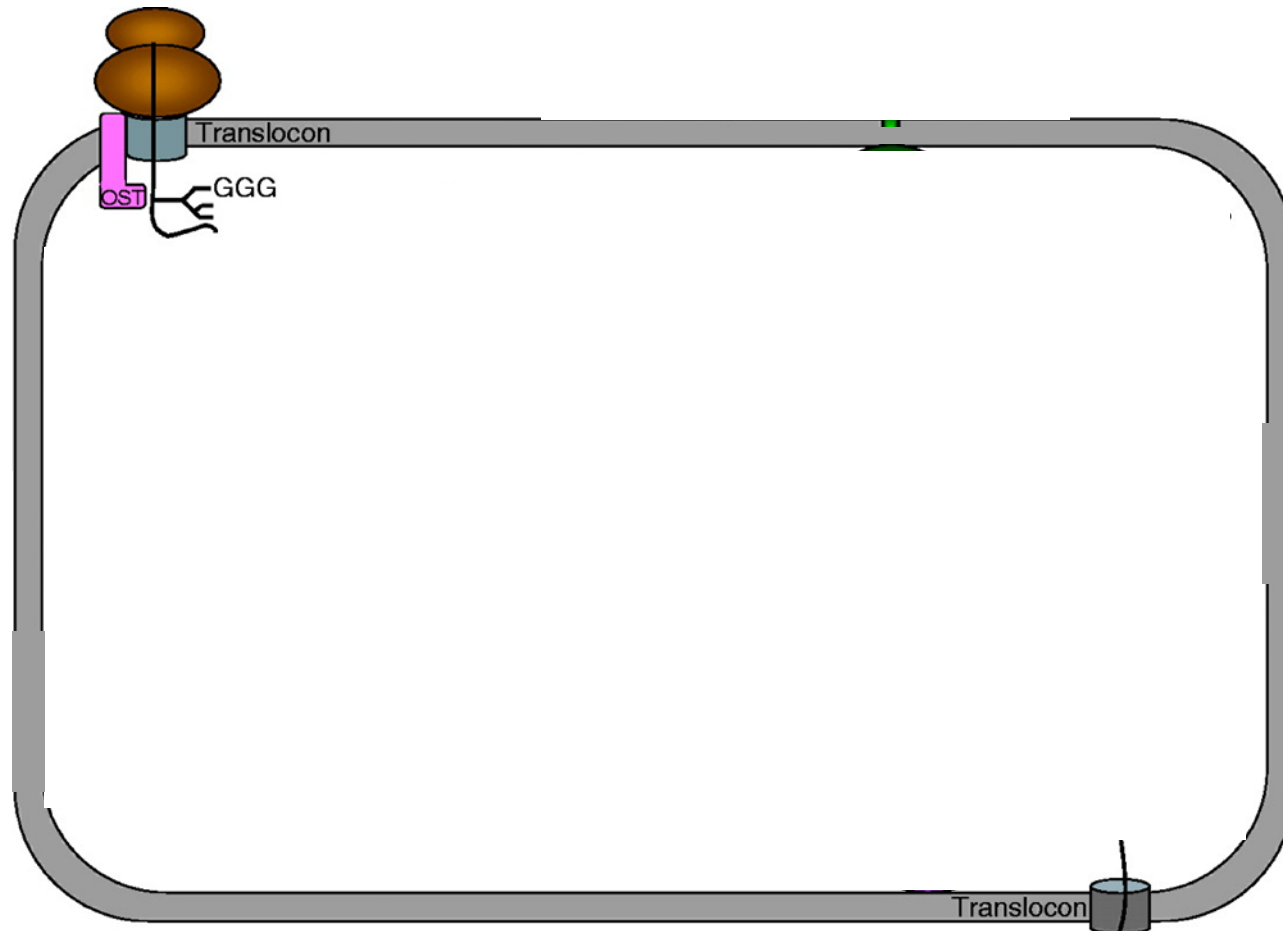


La proteina disolfuro isomerasi svolge una funzione di correzione dei legami disolfuri non corretti.



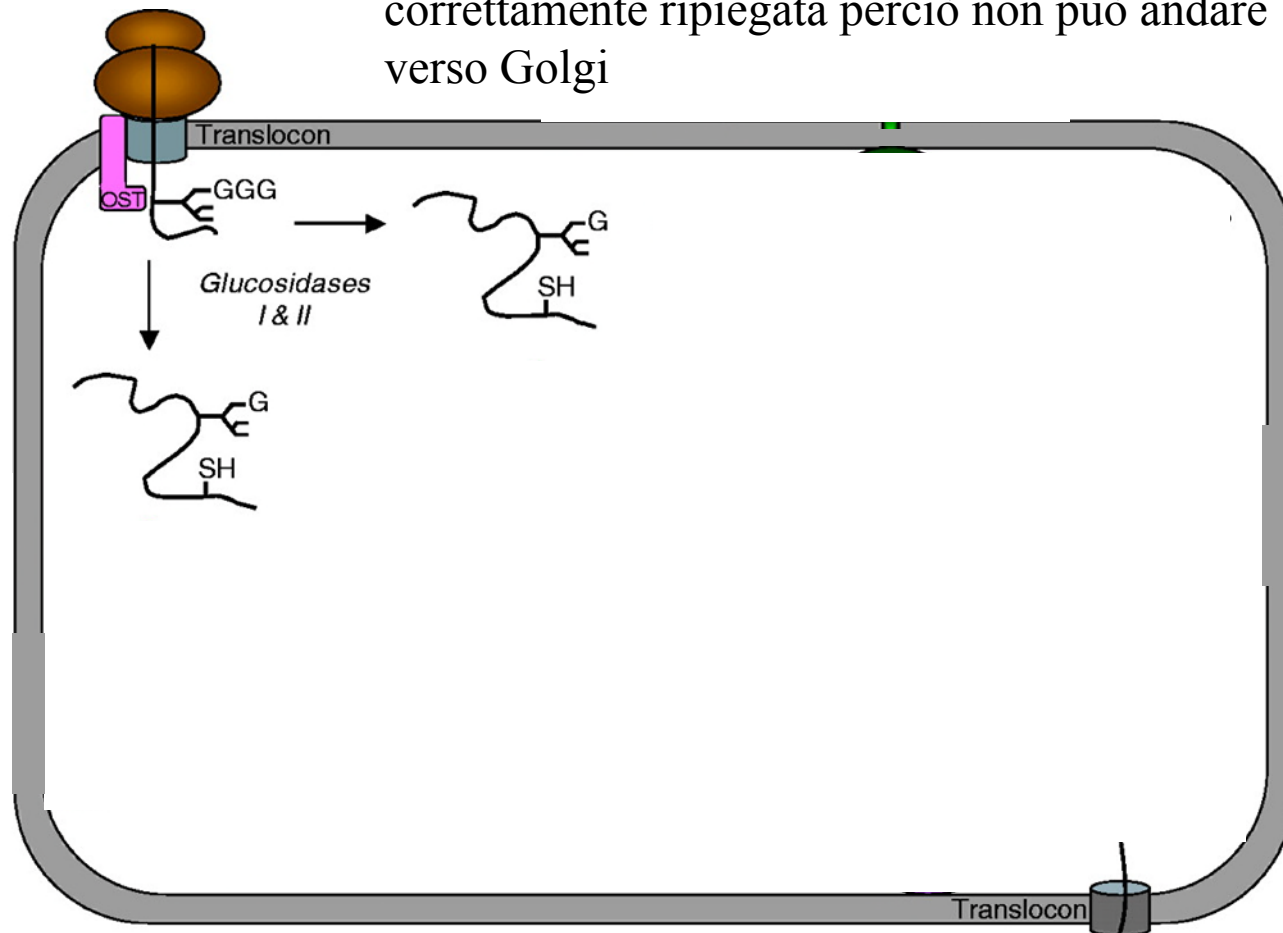
La corretta struttura tridimensionale delle proteine è monitorata dall'interazione con proteine residenti nel RER.

Gli oligosaccaridi sono utilizzati come etichette per indicare lo stato di ripiegamento delle proteine

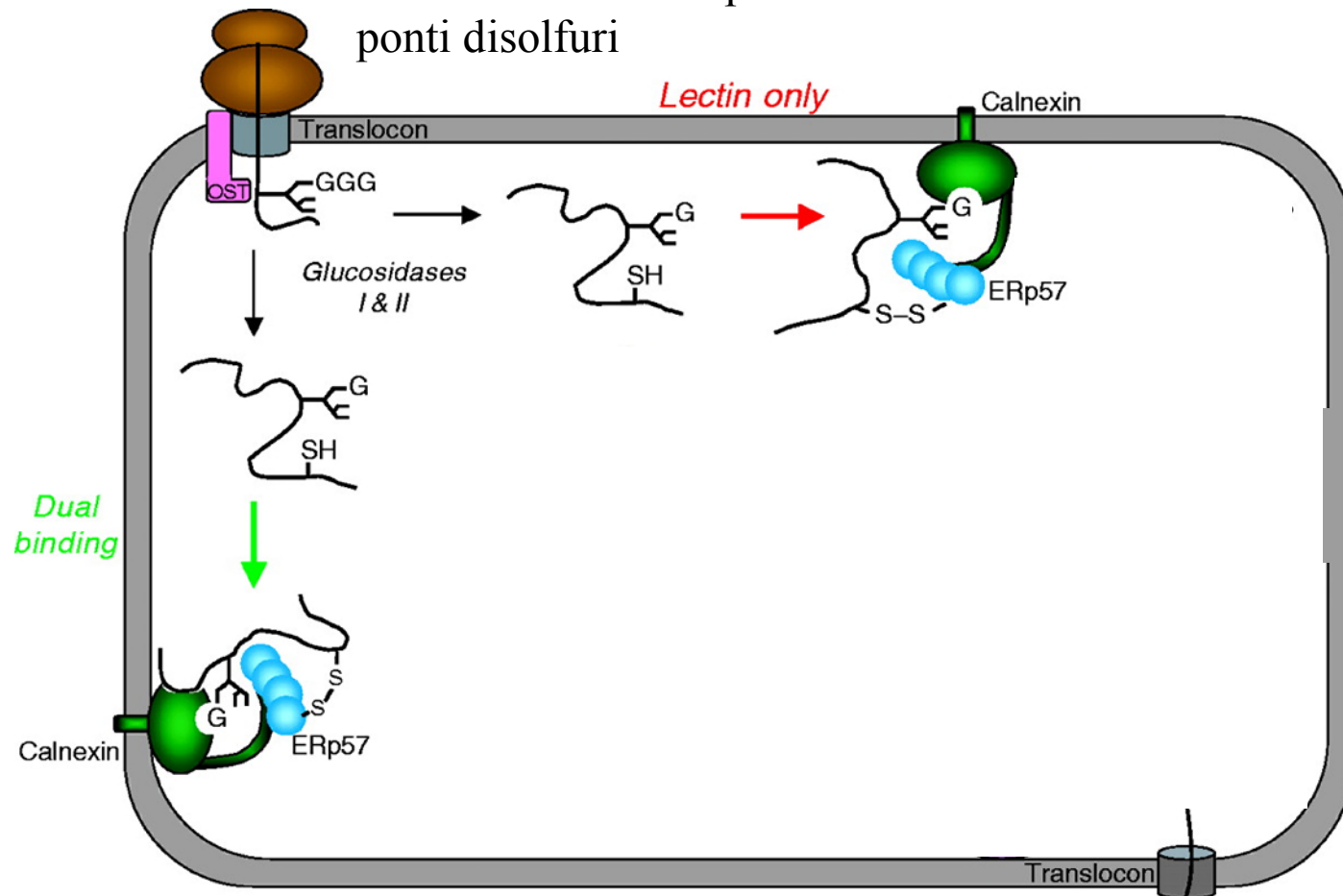


)

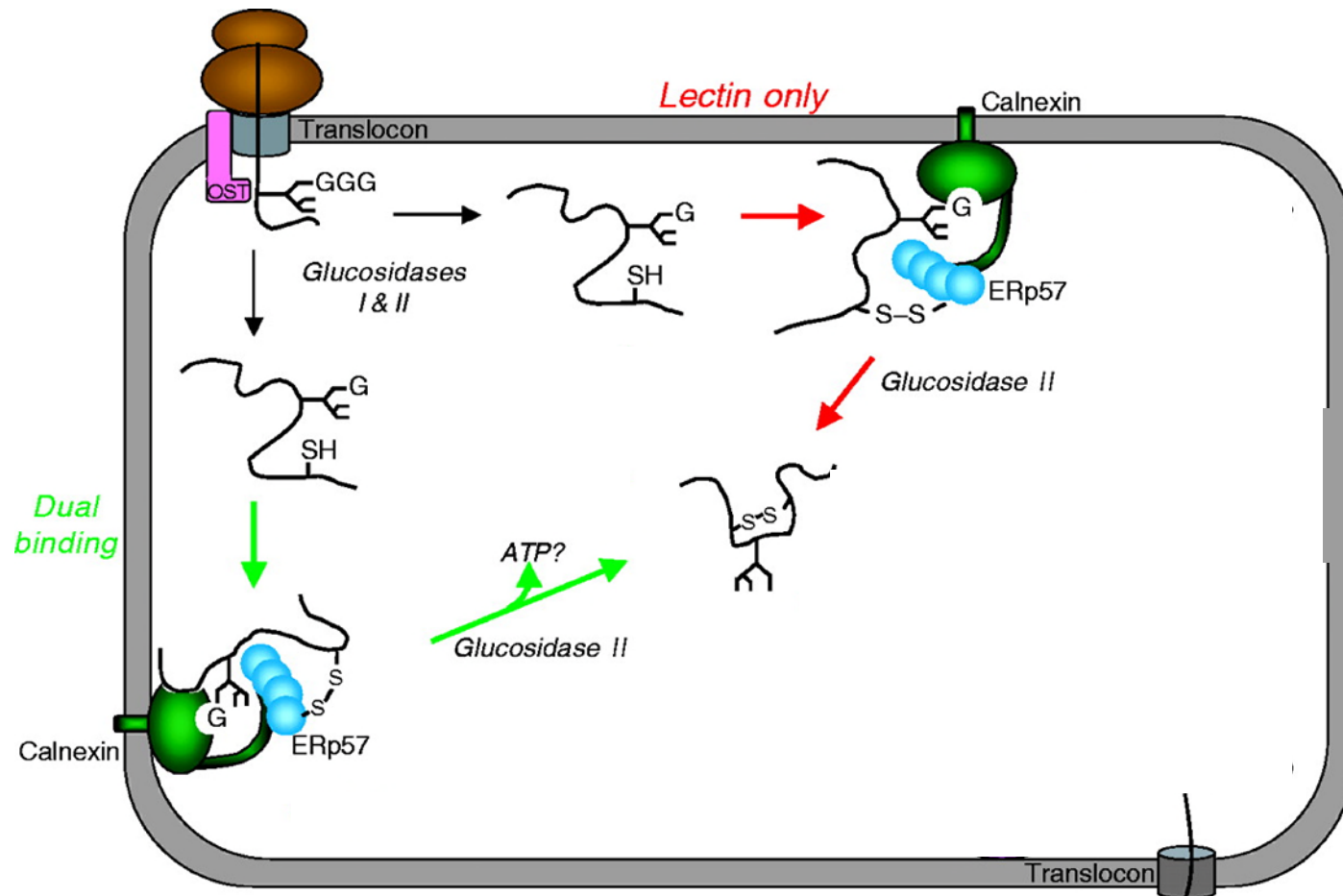
1- Rapida “Spunta” di glucosio ma proteina non correttamente ripiegata perciò non può andare verso Golgi



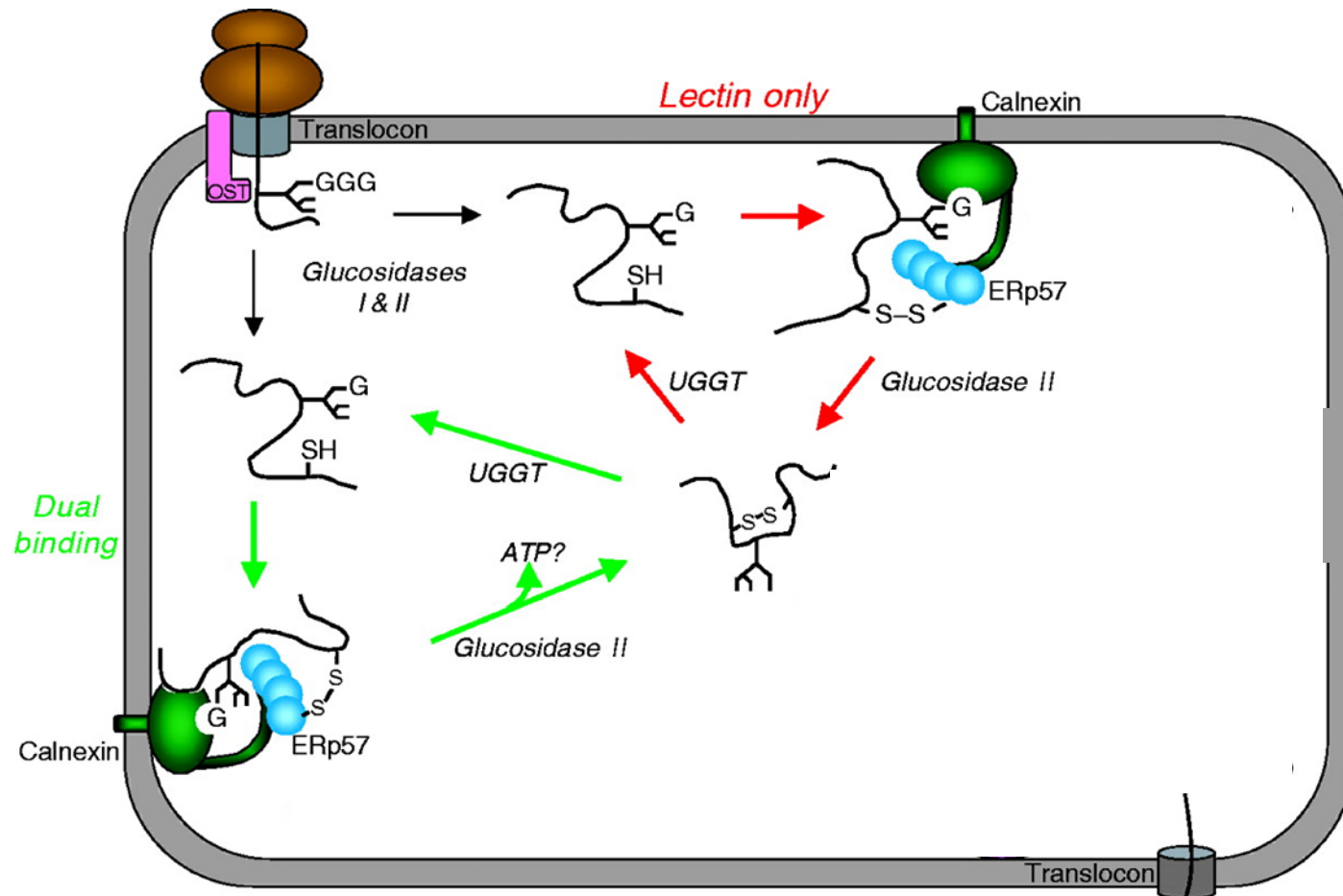
2- Con il riconoscimento dell'ultimo glucosio, interazione con calnessine (o calreticine) che sono "chaperone" e favoriscono il ripiegamento delle proteine. Queste chaperone associano anche ERp57 che favorisce la corretta formazione ponti disolfuri



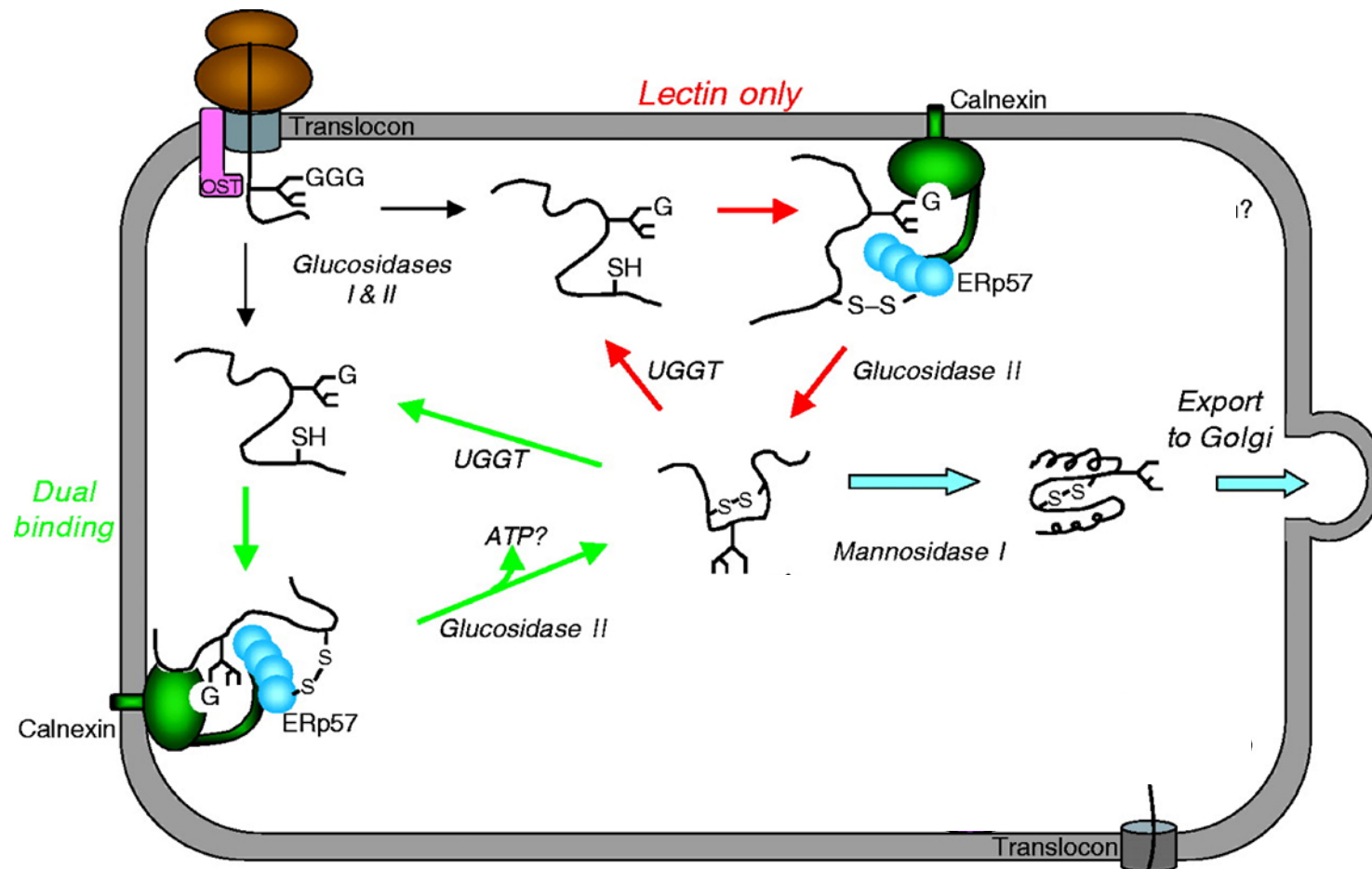
4- la proteina si stracca dalla chaperone perché la glucosidase II rimuove l'ultimo glucosio: se la proteina non è correttamente ripiegata viene riconosciuta dalla glicosil trasferasi (UGGT) che aggiunge nuovamente un glucosio.



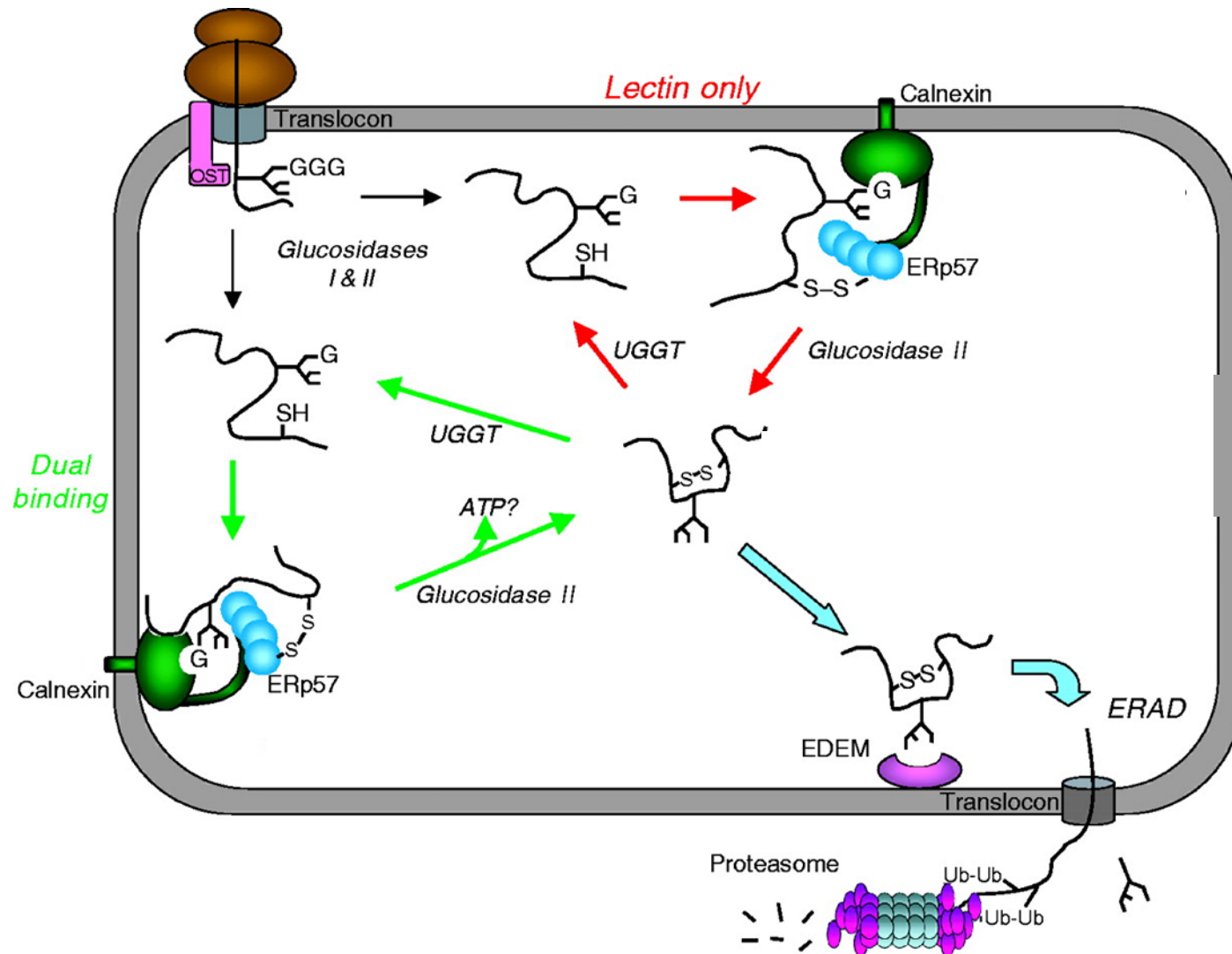
5- In questa forma la proteina viene nuovamente associata alla calnessina: processo ciclico fino a ripiegamento corretto.



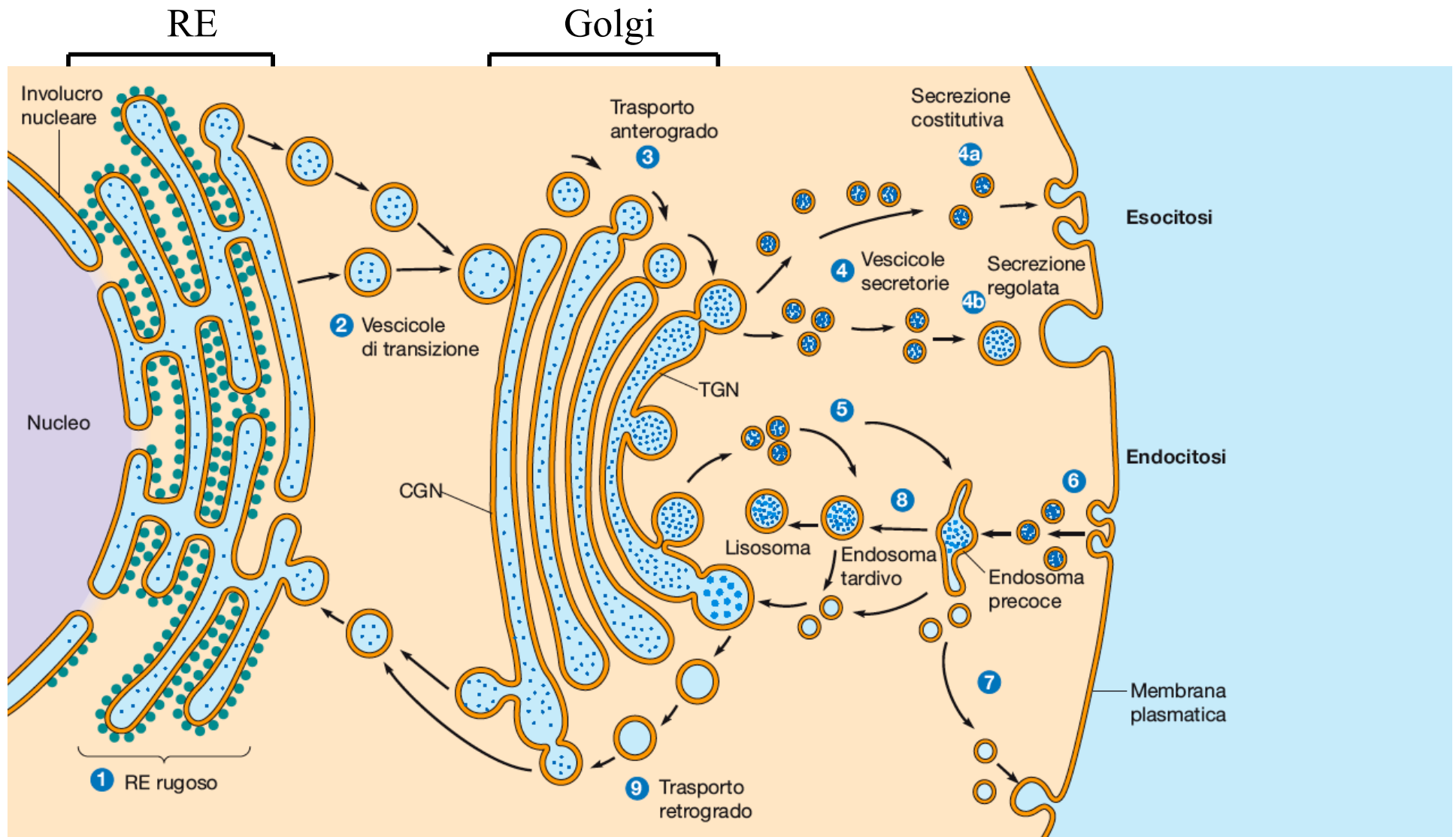
5- La proteina correttamente ripiegata può essere trasportata verso il Golgi



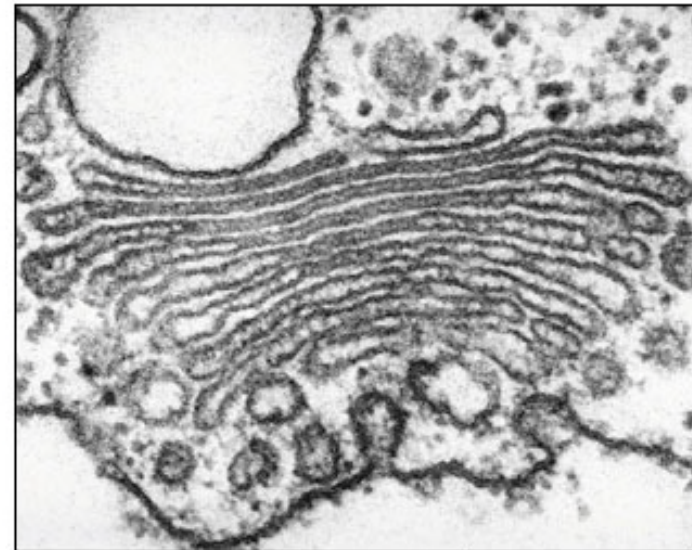
6- La proteina non correttamente ripiegata viene mandata verso i sistemi di degradazione delle proteine (proteosoma)



Apparato di Golgi

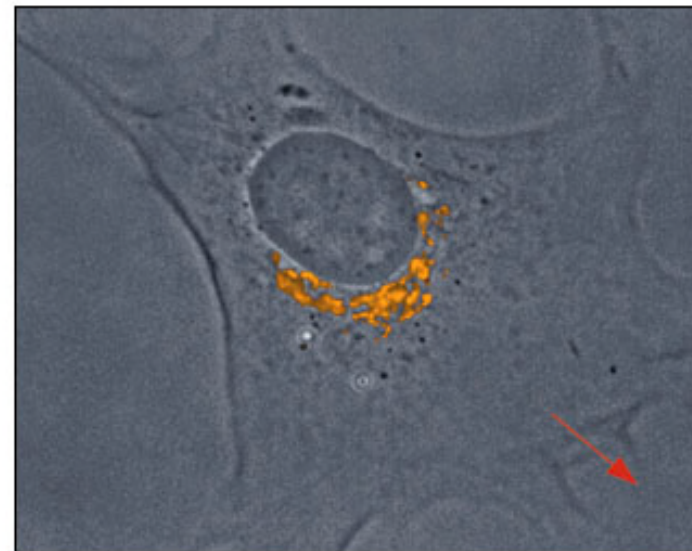


- L'apparato di Golgi è formato da cisterne o sacchi discoidali impilati gli uni su gli altri cui sono associate piccole vescicole.
- E' di solito situato vicino al nucleo, attorno ai centrioli.
- Ogni gruppo di cisterne forma una pila di circa 1 um di diametro detta pila di Golgi o dittiosoma.
- L'apparato di Golgi è coinvolto nella modificazione, nella separazione e nell'impacchettamento di macromolecole per la secrezione o per la spedizione ad altri organelli.



(B)

200 nm

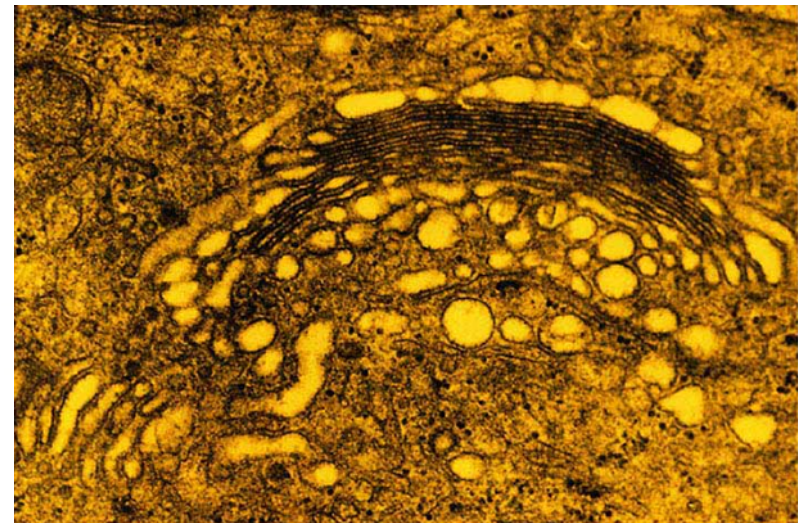
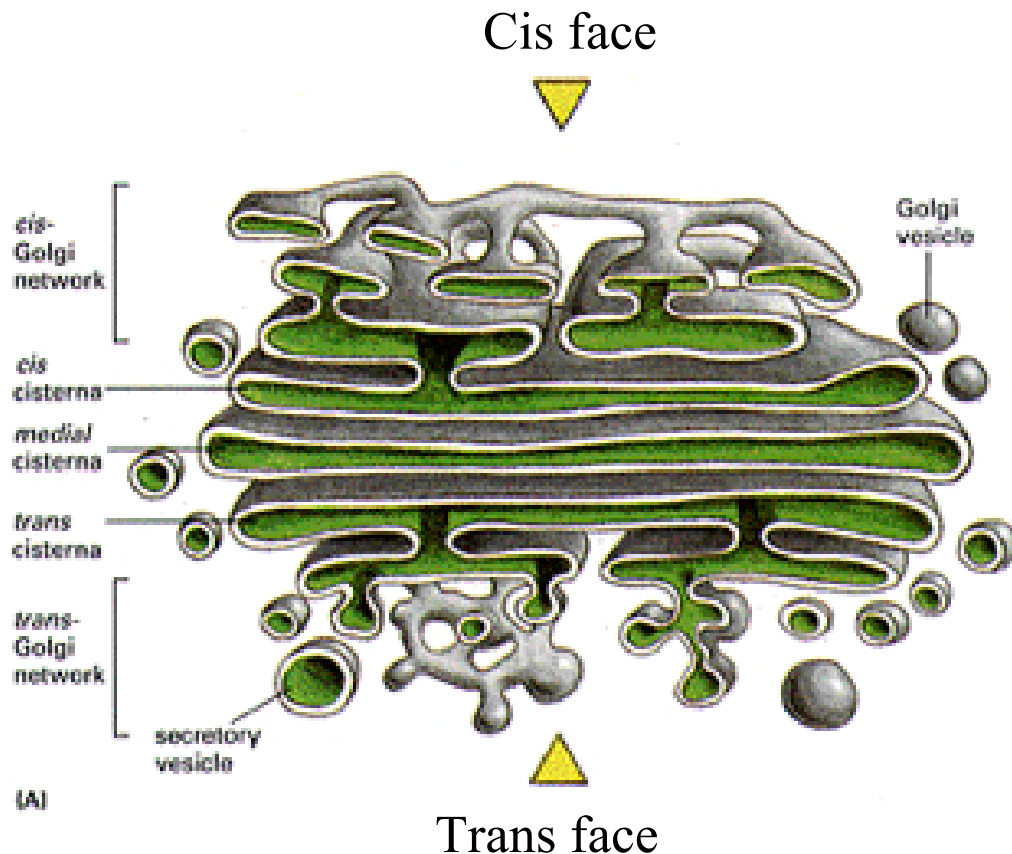


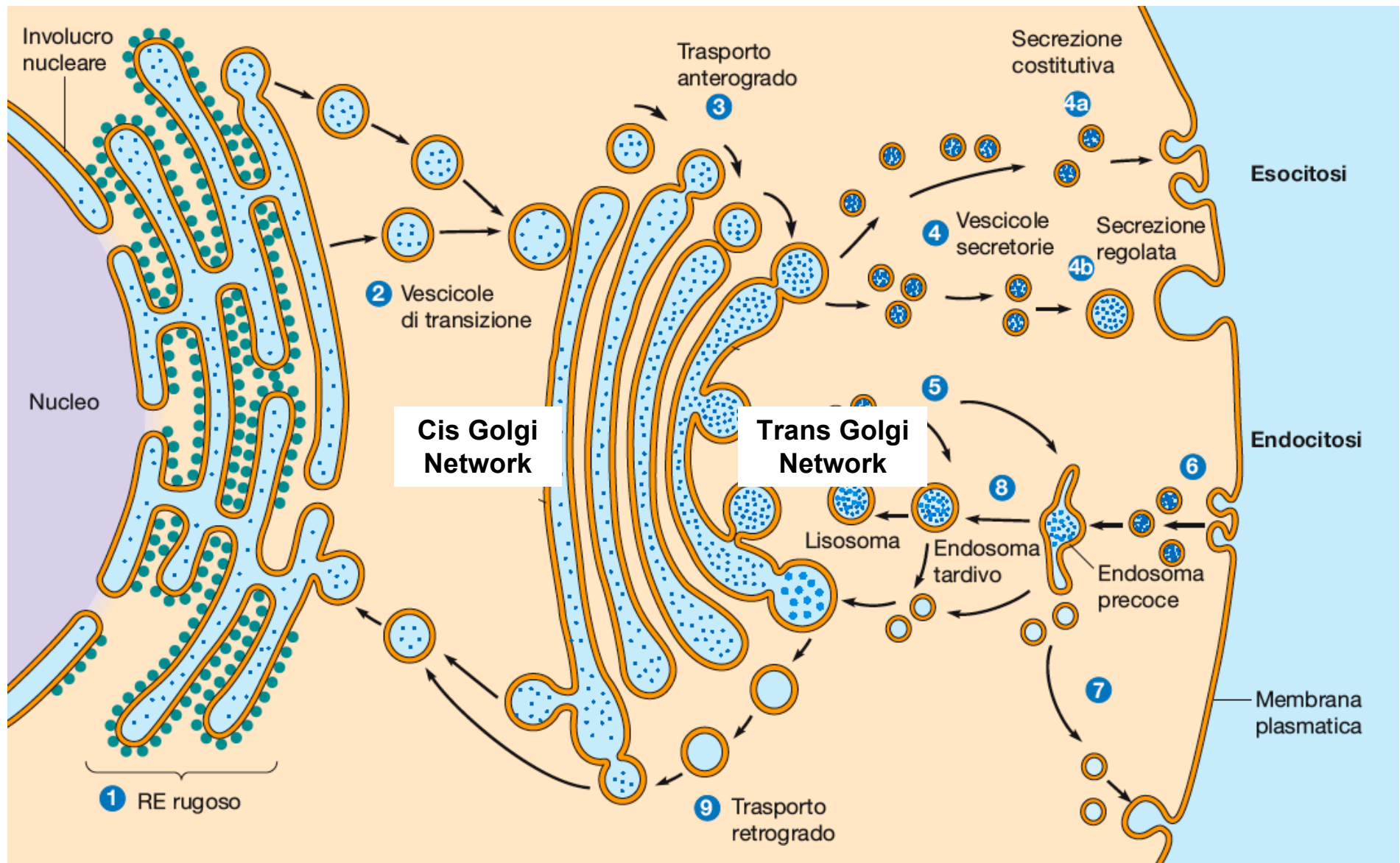
(C)

12_bct_

29

Nell'apparato di Golgi esiste una polarizzazione strutturale e biochimica. Si distinguono due facce: una faccia cis o di formazione (convessa) rivolta verso il nucleo ed una faccia trans o di maturazione (convava) rivolta verso la periferia della cellula.

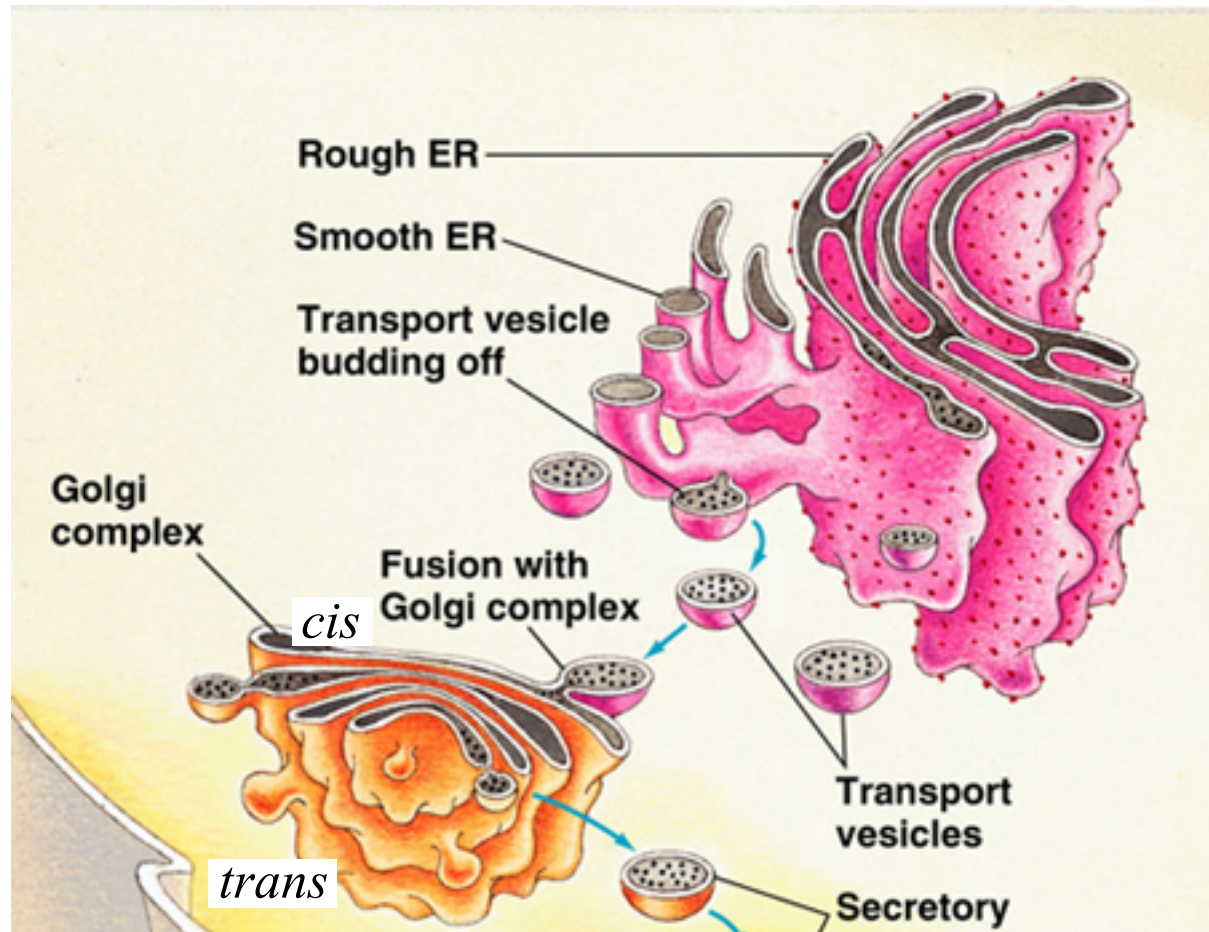




Trasporto anterogrado

Le vescicole che si trovano in prossimità della faccia cis, contengono proteine neo sintetizzate, che si staccano dal reticolo endoplasmatico e penetrano nell'apparato di Golgi.

A livello della faccia trans si accumulano invece vescicole contenenti proteine che verranno distribuite nelle varie parti della cellula o escrete all'esterno di essa.

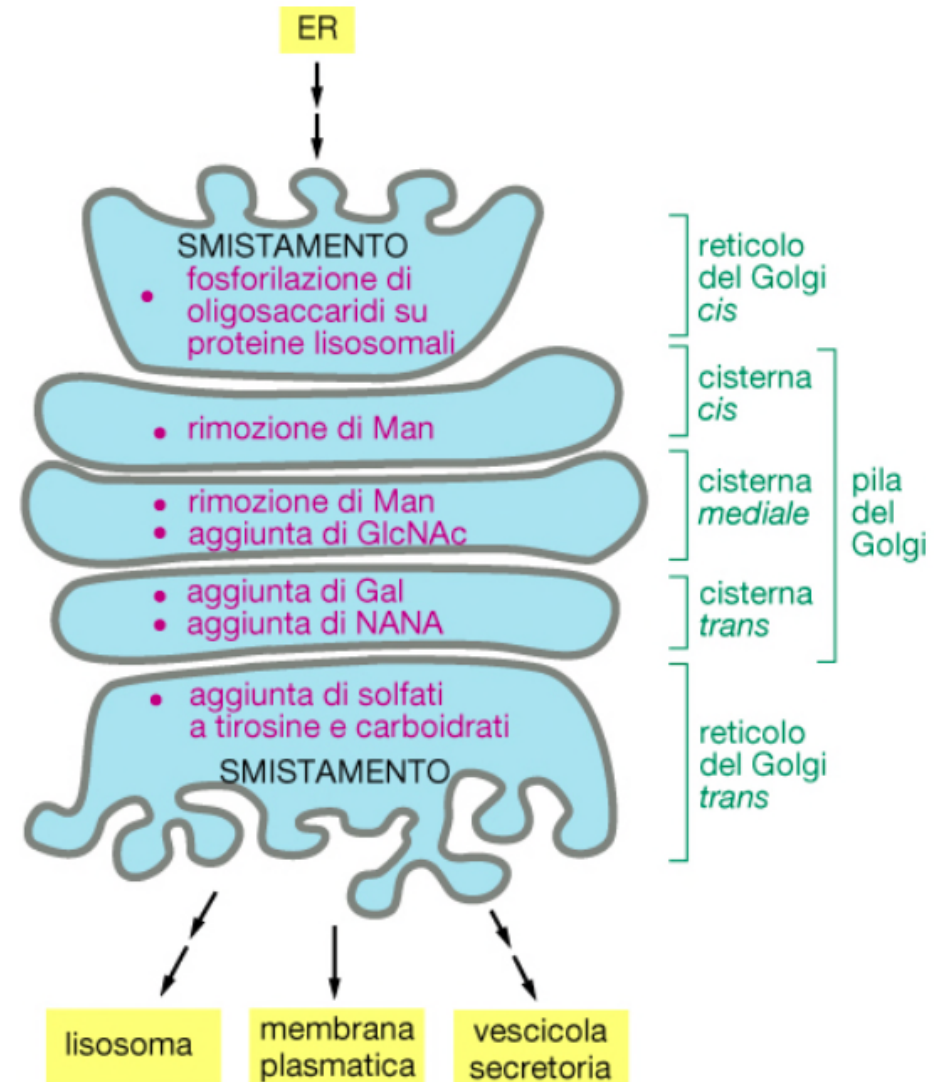


Le due facce dell'apparato di Golgi possiedono enzimi diversi

A livello dell'apparato di Golgi avvengono i seguenti fenomeni:

- Glicosilazioni, o comunque modificazioni nei residui oligosaccaridici già associati alle proteine.
- Modificazione della struttura di alcune proteine (glicosilazione terminale, fosforilazioni, solfatazione, e parziale proteolisi)
- Sintesi di glicosaminoglicani
- Smistamento delle proteine produzione di diversi tipi di vescicole (vescicole di secrezione costitutiva, vescicole di secrezione regolata, vescicole lisosomiali, vescicole retrograde verso il RE).

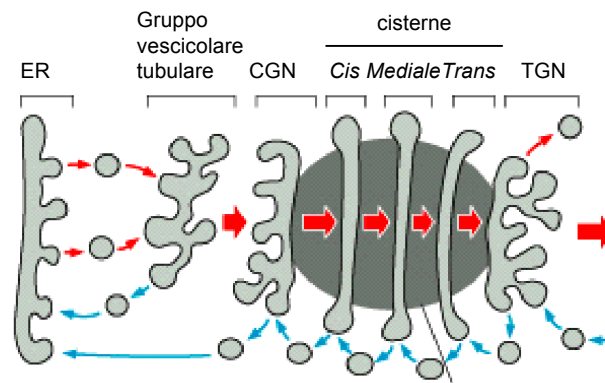
Legenda: GlcNAc(Nacetilglucosammina), Man (Mannosio), Gal (galattosio), NANA o acido sialico (Nacetilmuramminico)



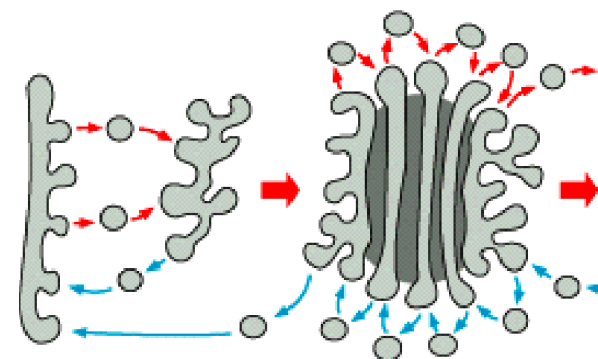
Poiché uno o più oligosaccaridi legati ad N sono presenti in tutte le proteine trasportate attraverso il RE ed il Golgi, via esclusiva delle cellule eucarioti, si suppone che questa glicosilazione serva per il ripiegamento delle proteine (vedi RE) e per il trasporto (vedi mannosio 6P per il trasporto della idrolasi dall'apparato del Golgi verso il lisosoma). Gli zuccheri, poiché sporgono dalla proteina, limitano l'avvicinamento di altre molecole alla superficie della proteina; così una proteina può essere più resistente all'azione di proteasi. E' stato anche ipotizzato che in una cellula eucariote ancestrale gli zuccheri fornissero un rivestimento protettivo, che a differenza della parete cellulare rigida dei batteri, permetteva alla cellula di cambiare forma e muoversi

L'apparato di Golgi è un organello costituito da più compartimenti che contengono una serie ordinata di enzimi che modificano in modo sequenziale le glicoproteine e i lipidi che transitano dalle cisterne *cis* alle cisterne *trans*. Le molecole trasportate (carico), quindi, devono passare attraverso ognuno dei compartimenti di cui è costituito questo organello, ma il meccanismo utilizzato è stato oggetto di un ampio dibattito.

Sulla base dei risultati ottenuti utilizzando carichi di diversa grandezza, sono stati definiti due modelli di trasporto anterogrado attraverso l'apparato di Golgi: la maturazione delle cisterne e il trasporto mediato da vescicole.

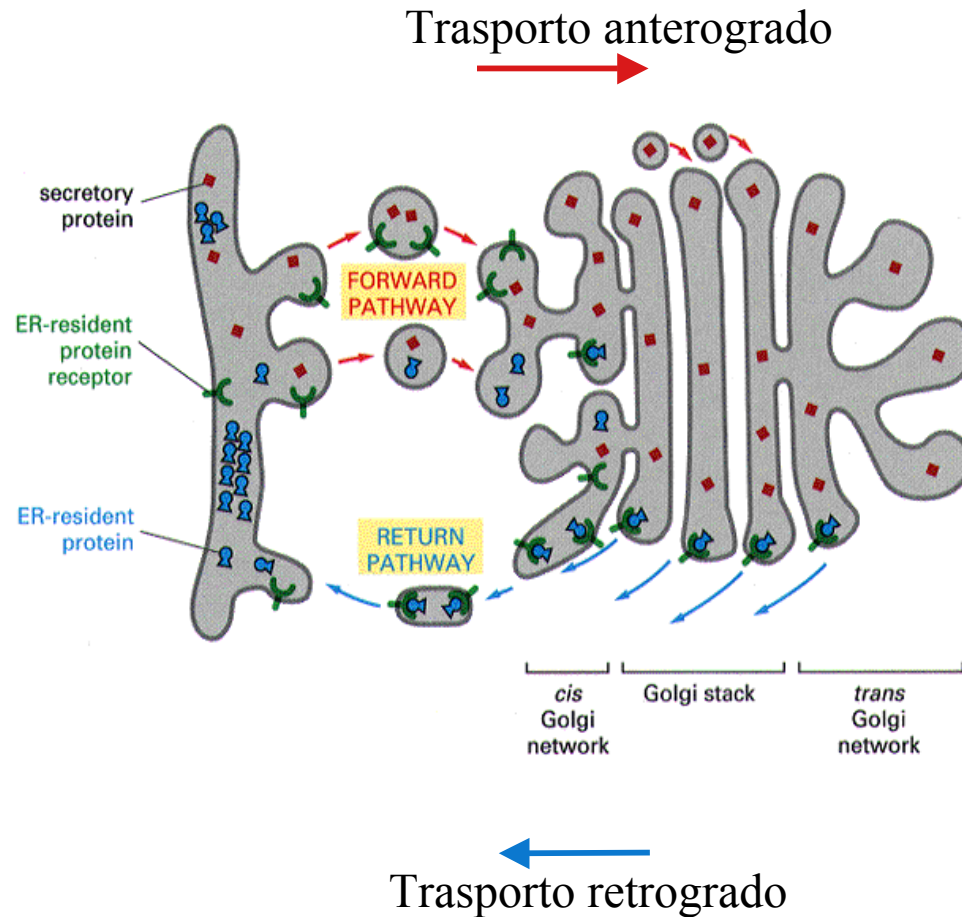


Modello della maturazione delle cisterne



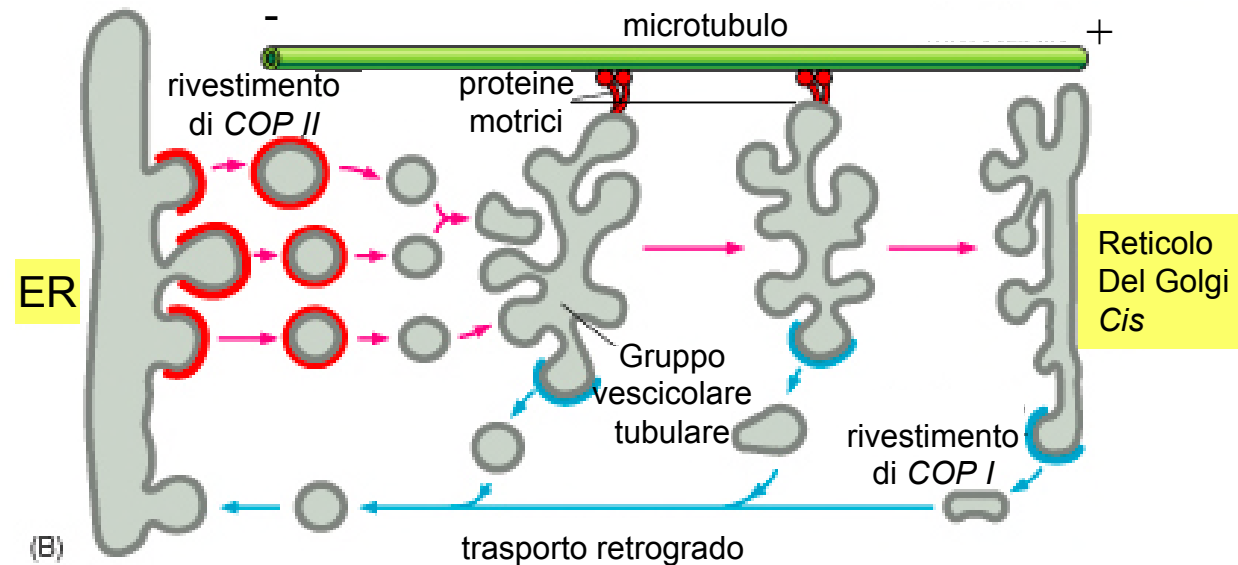
Modello del trasporto vescicolare

Il trasporto retrogrado (Golgi ---> RE) permette di ricondurre al RE proteine solubili o transmembrana residenti nel RE. Queste proteine possiedono segnali di “recupero” al RE.



Tipi di segnali di recupero	
Segnale KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)	<p>PROTEINE SOLUBILI</p> <p>- Ser Glu Lys Asp Glu Leu -COOH</p> <p>BiP</p>
Segnale dilisina (Lys-X-Lys) o (Lys-Lys)	<p>PROTEINA TRANSMEMBRANA DI TIPO I</p> <p>-TM- Val Lys Lys Ala His Lys Ser Lys Thr His -COOH</p> <p>UDP-glucuronosil-transferasi 1A</p> <p>-TM- Arg Ser Phe Ile Asp Glu Lys Lys Met Pro -COOH</p> <p>Proteina E19 di Tipo 2 dell'adenovirus</p>
Segnale diarginina (Arg-Arg) o (Arg-X-Arg)	<p>PROTEINE TRANSMEMBRANA DI TIPO II</p> <p>-TM- Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg -NH₂</p> <p>Catena invariante associata alle MHC di classe II</p>

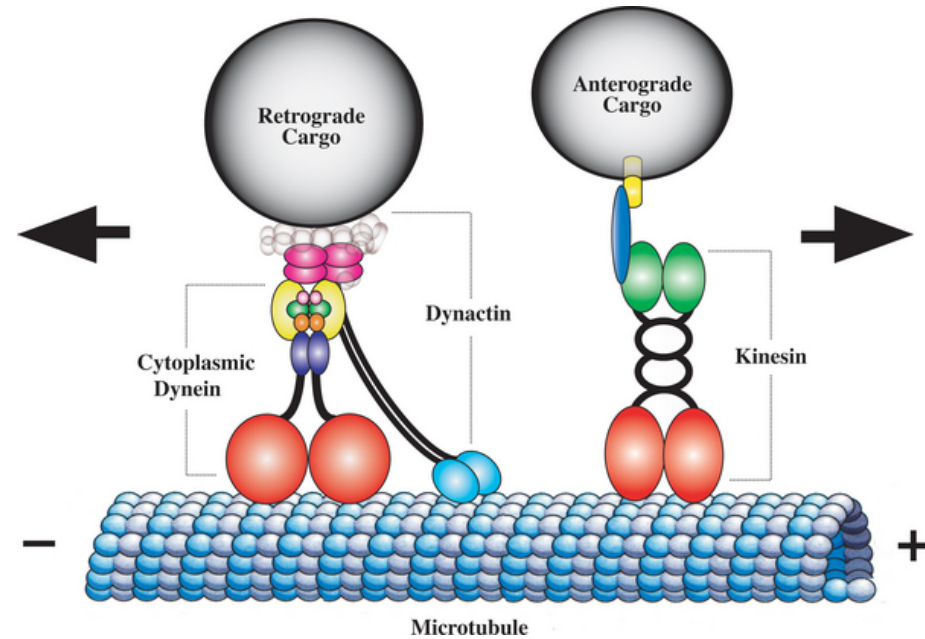
In maggioranza, le vescicole che dal RE si dirigono verso il Golgi (trasporto anterogrado) sono rivestite di proteine *COP II* (coatomer II); mentre le vescicole che dal Golgi si dirigono verso il RE (trasporto retrogrado di recupero) sono rivestite di proteine *COP I* (coatomer I).



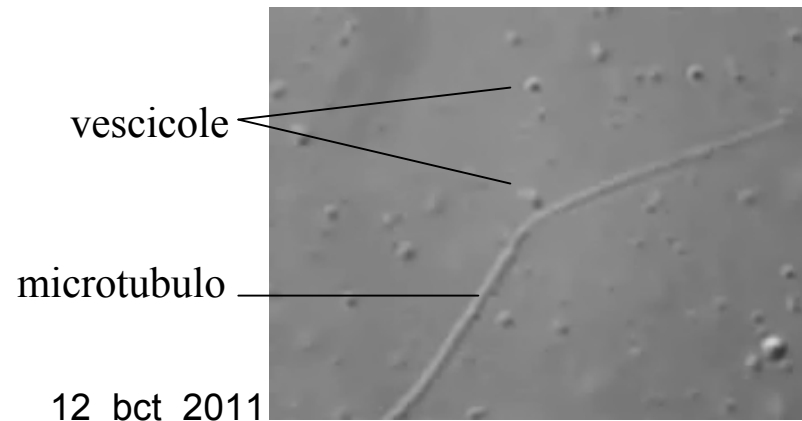
Proteine motrici (motore proteico) mediano l'interazione degli di organelli, vescicole o singole moecole con i microtubuli. La localizzazione dell'apparato di Golgi vicino al nucleo dipende dalle proteine motrici e dai microtubuli del citoscheletro; se questi sono depolimerizzati, l'apparato di Golgi perde la sua tipica organizzazione e localizzazione e si riorganizza in pile sparse in tutto il citoplasma.

Proteine motrici che si spostano verso l'estremità (+) dei microtubuli, in maggioranza proteine della famiglia delle kinesine, assicurano il trasporto anterogrado delle vescicole.

Proteine motrici che si spostano verso l'estremità (-) dei microtubuli, in maggioranza proteine della famiglia delle dineine, assicurano il trasporto retrogrado.

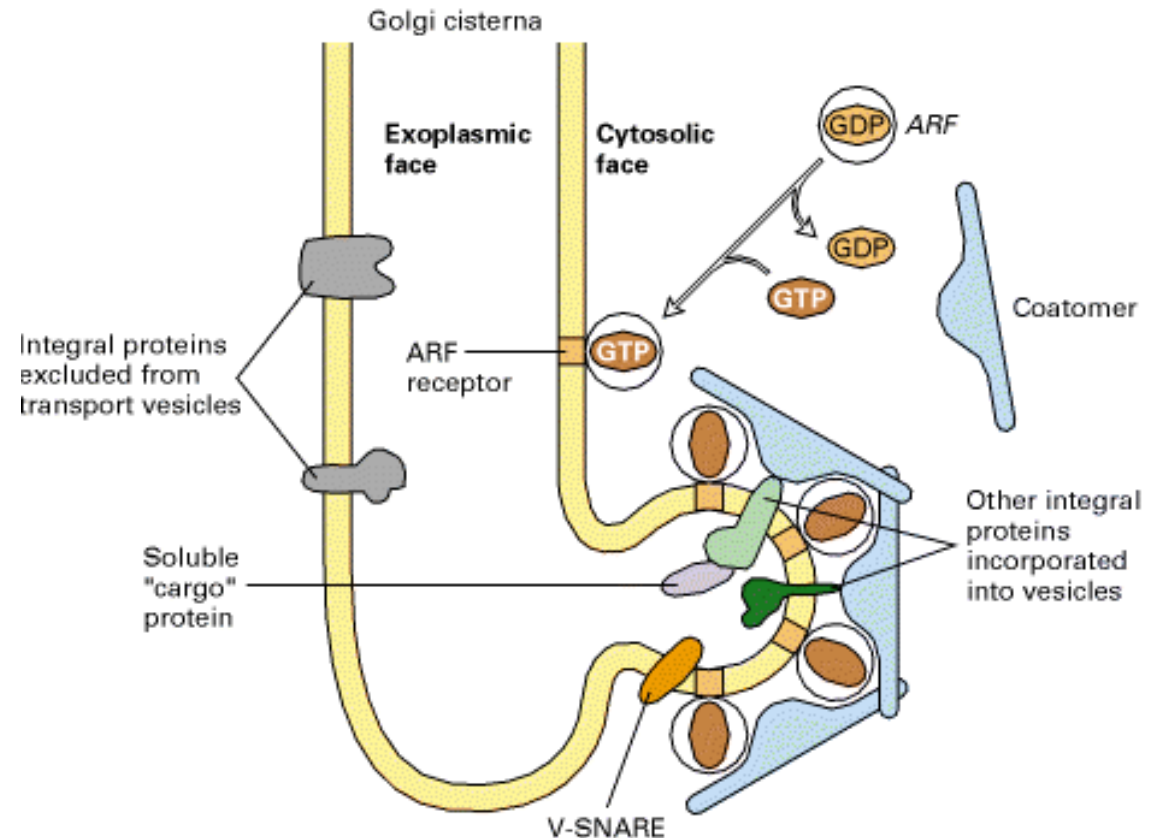


*Vedi filmato:
movimento di organelli*

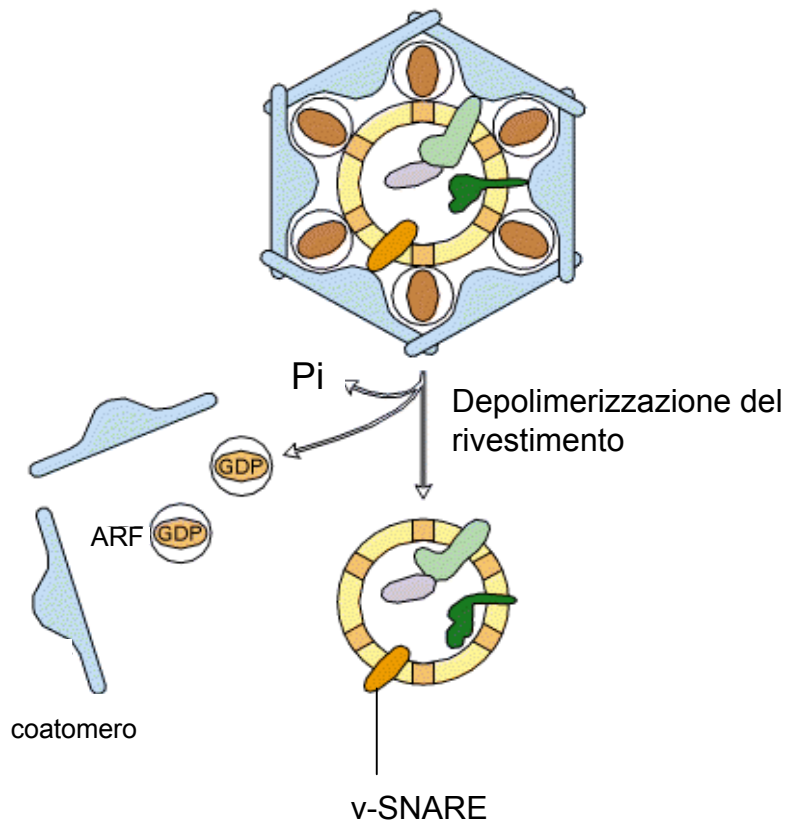


Modello di formazione delle vescicole rivestite di coatomero.

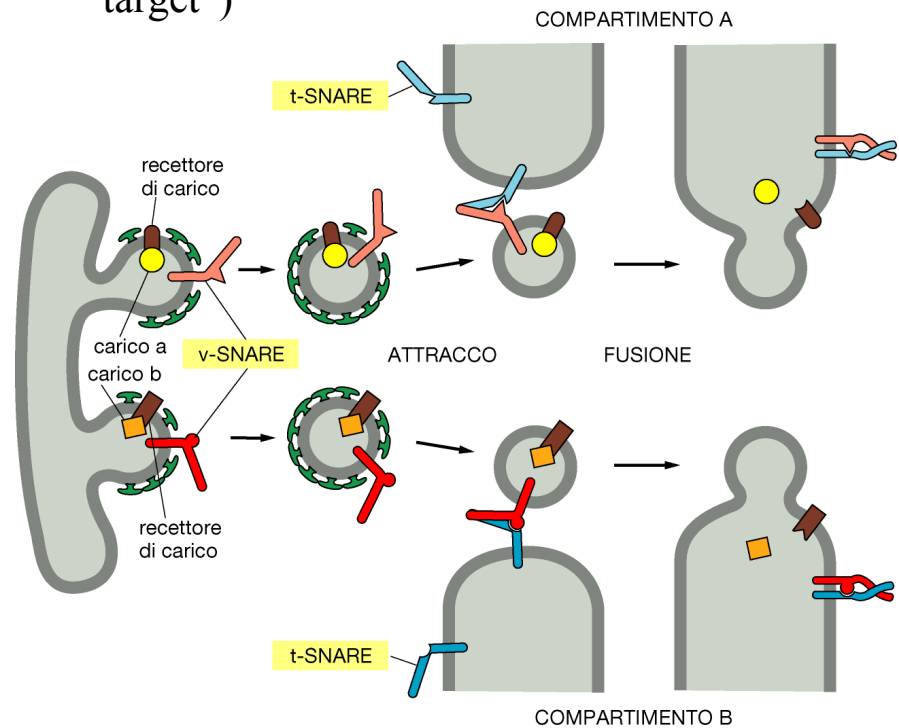
La formazione della vescicola inizia dallo scambio del nucleotide legato alla proteina ARF, da ARF-GDP ad ARF-GTP, una reazione catalizzata da un enzima della membrana del Golgi. Di seguito ARF-GTP si lega al suo recettore sulla cisterna del Golgi, i coatomeri si legano a loro volta sulla faccia citosolica della cisterna del Golgi e polimerizzano a formare un rivestimento che favorisce la formazione della vescicola. Proteine transmembrana che legano i coatomeri sono incorporate nella vescicola in formazione. Tra queste, ci sono le proteine V-SNARE responsabili della specificità di fusione della vescicola con elementi di membrana del compartimento bersaglio. Proteine solubili contenute nelle vescicole sono selezionate a fare parte di specifiche vescicole grazie all'interazione con specifici recettori di membrana.



Per permettere la fusione della vescicola con l'elemento di membrana bersaglio è necessaria la depolimerizzazione del rivestimento di coatomero. Questo avviene grazie all'idrolisi del GTP legato ad ARF che provoca la depolimerizzazione del rivestimento di cotomeri e il rilascio sia dei cotomeri che di ARF-GDP.

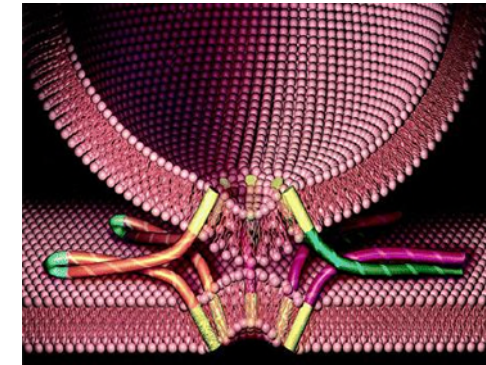
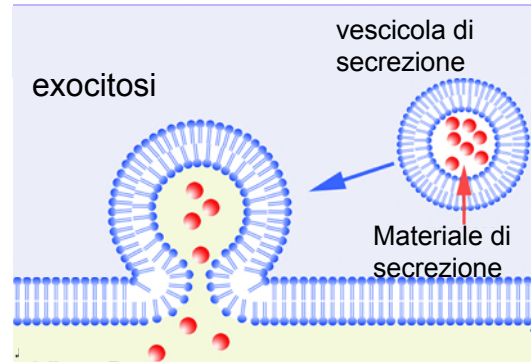


Il tipo di V-SNARE contenuto in ciascuna vescicola determina la specificità di interazione con elementi di membrana del compartimento bersaglio. La specificità di riconoscimento avviene tra v-SNARE (della vescicola) e t-SNARE (del bersaglio, "target")

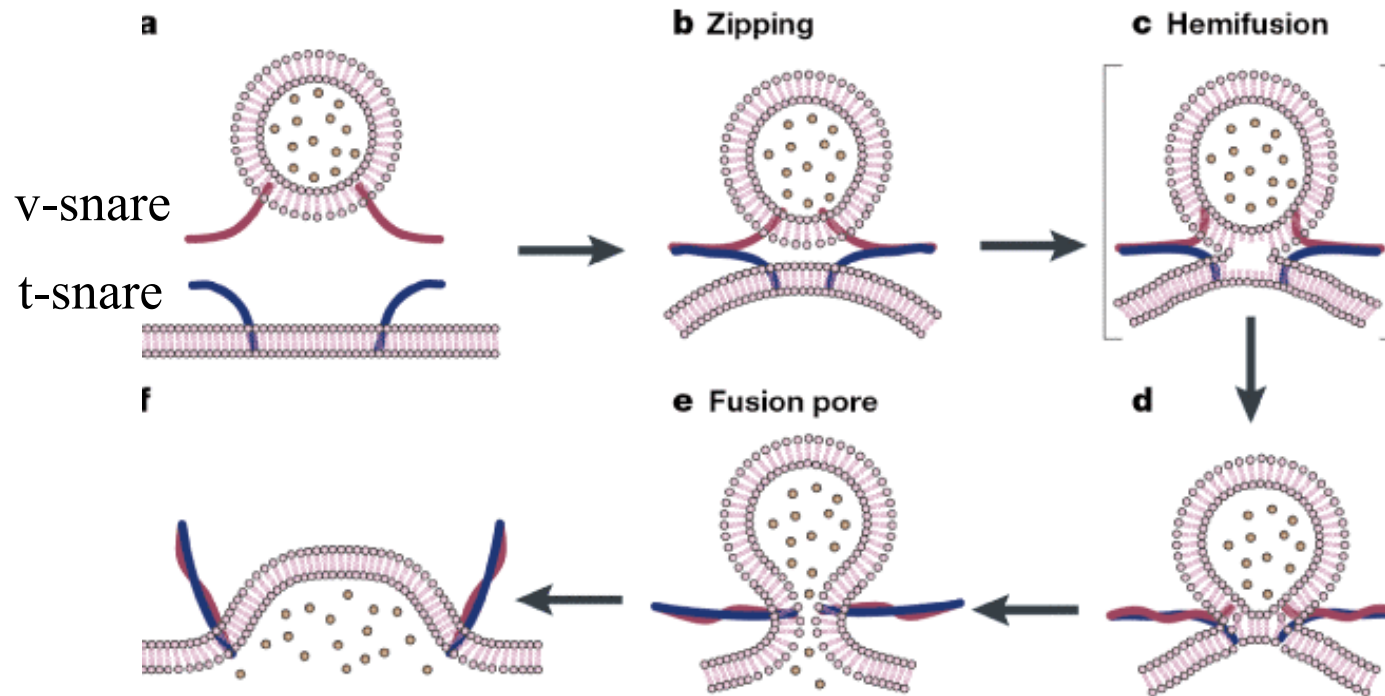


Exocitosi

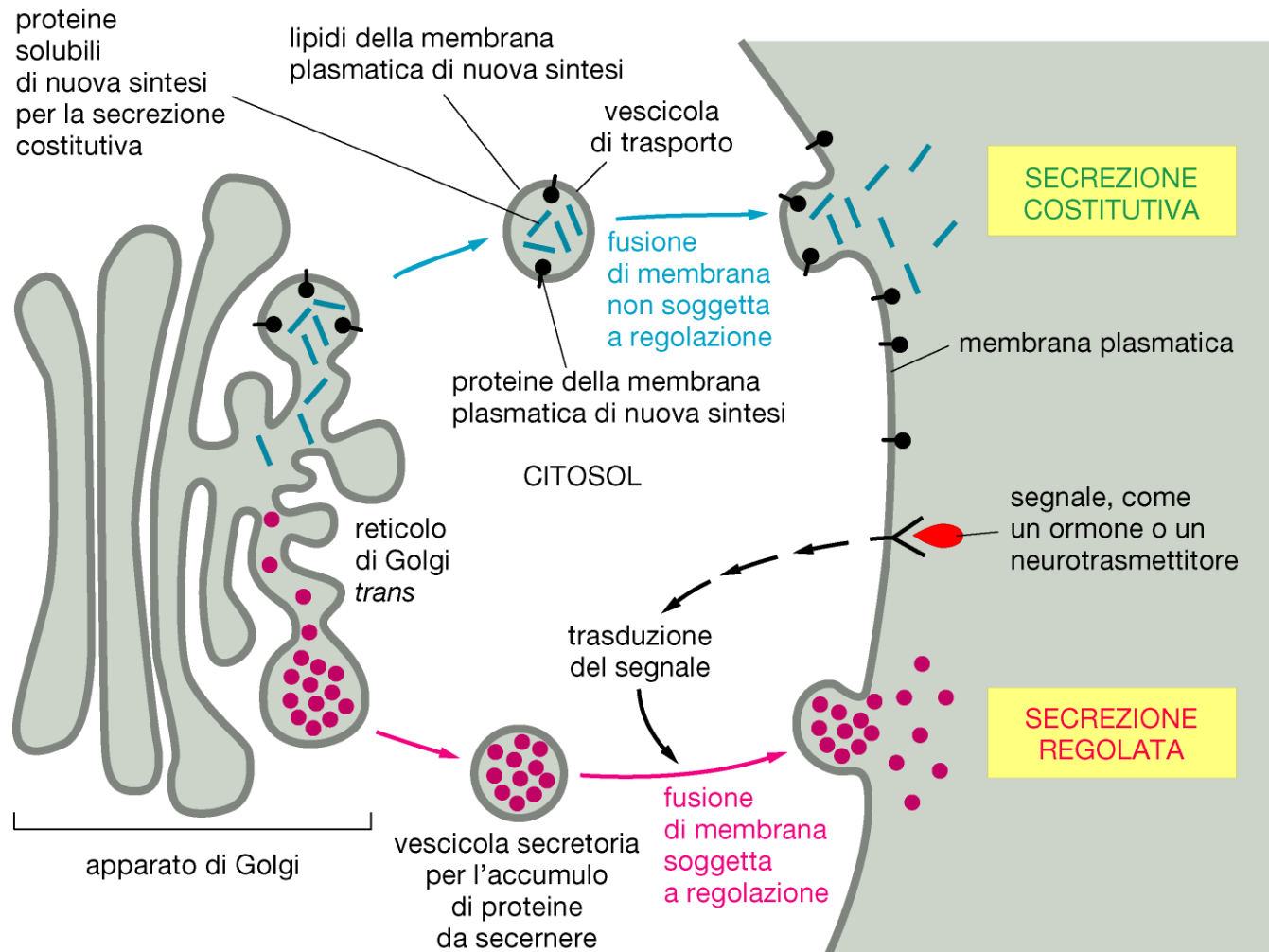
Interazione tra proteine SNARE vescicolari (v-SNARE) e proteine SNARE del compartimento target (t-SNARE)



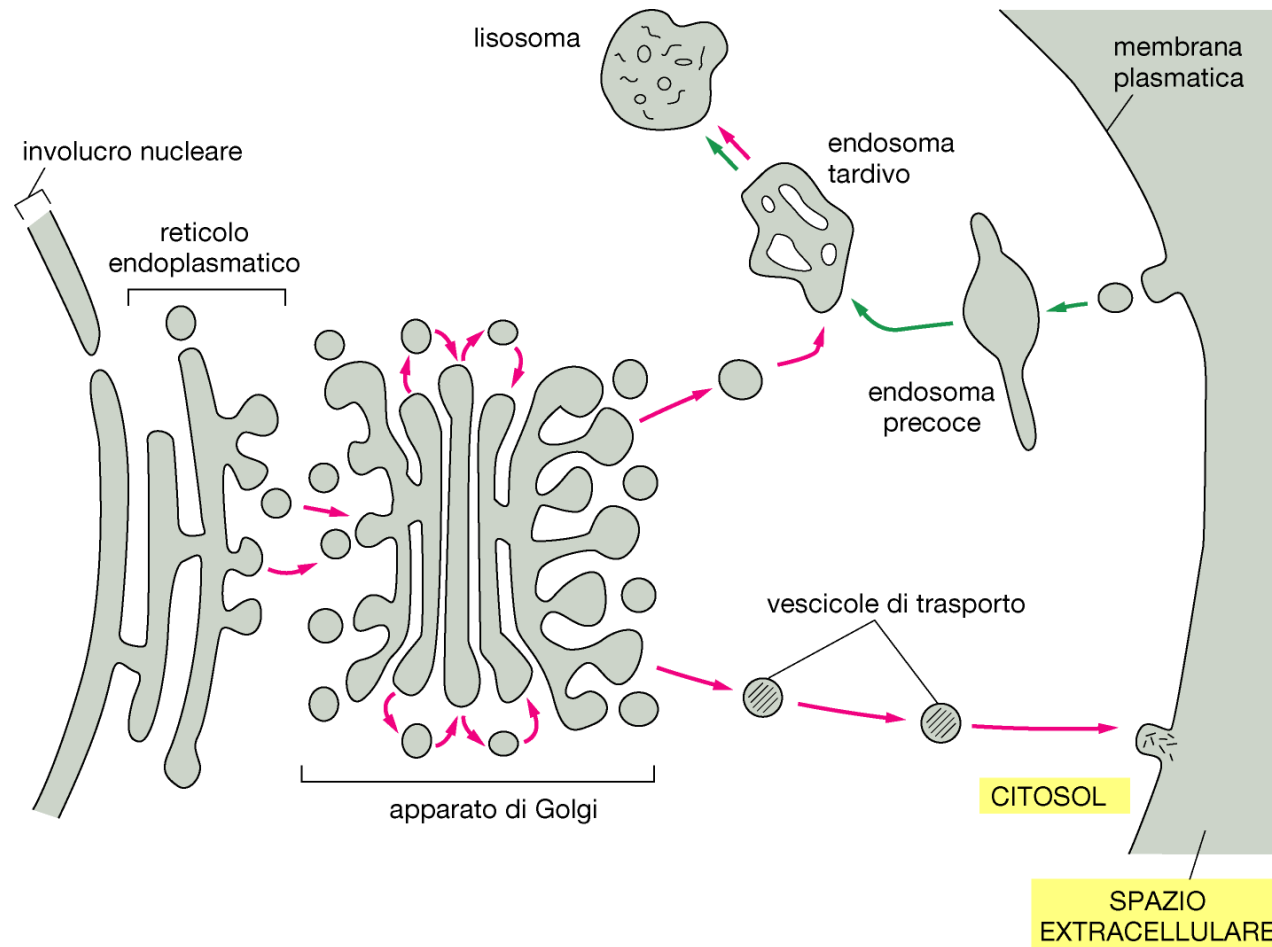
vesicola di secrezione



Se la fusione della vescicola con la membrana plasmatica non richiede ulteriori segnali regolativi, la secrezione è detta “costitutiva”; negli altri casi, le vescicole sono stoccate nella cellula e la fusione con la membrana plasmatica avviene soltanto in risposta a segnali di comunicazione cellulare.



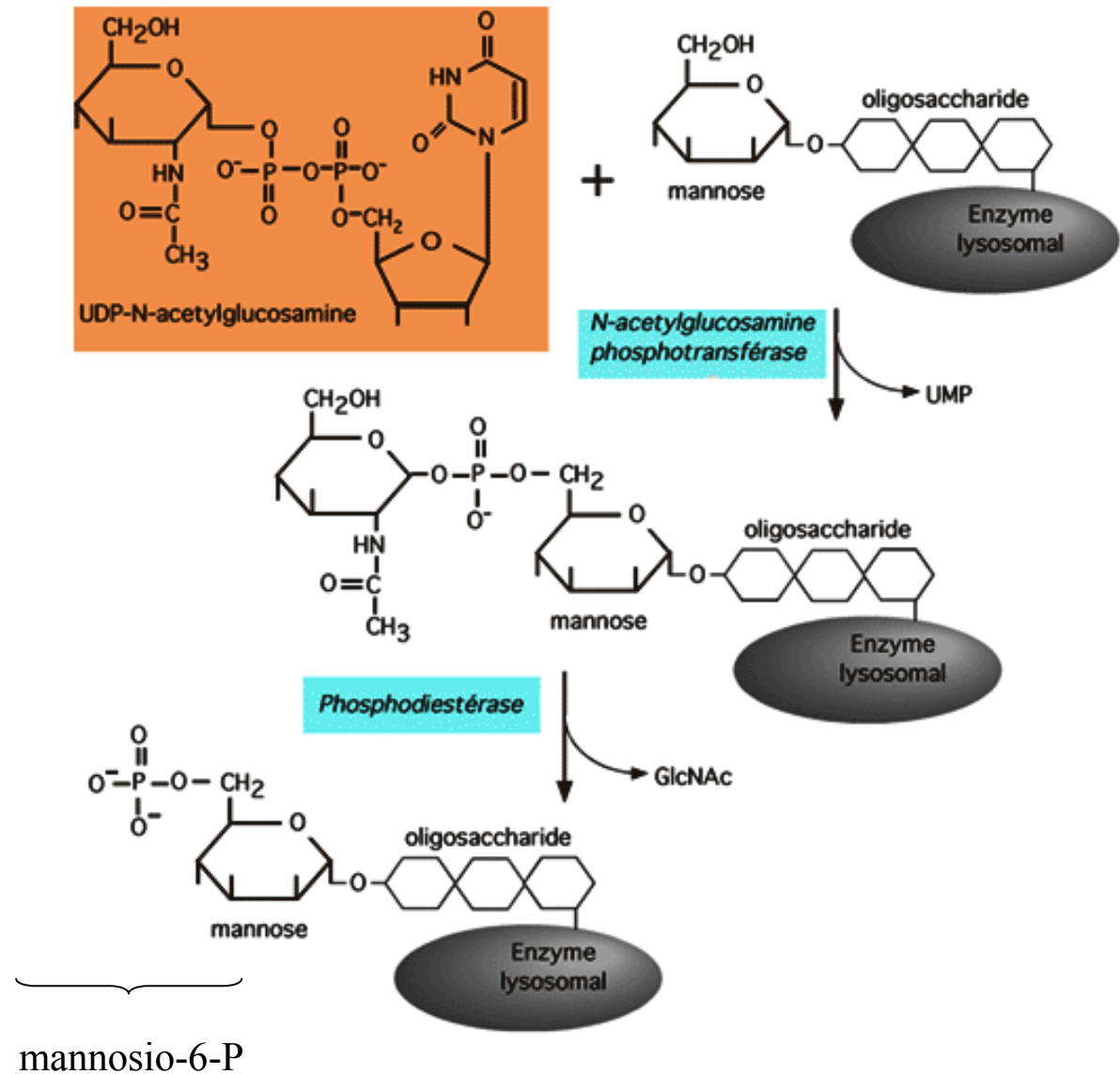
Oltre alle vescicole di secrezioni sono prodotte dal TGN vescicole precursori dei lisosomi: queste vescicole contengono specificamente gli enzimi lisosomali e sono rivestite di clatrina



Smistamento degli enzimi lisosomali

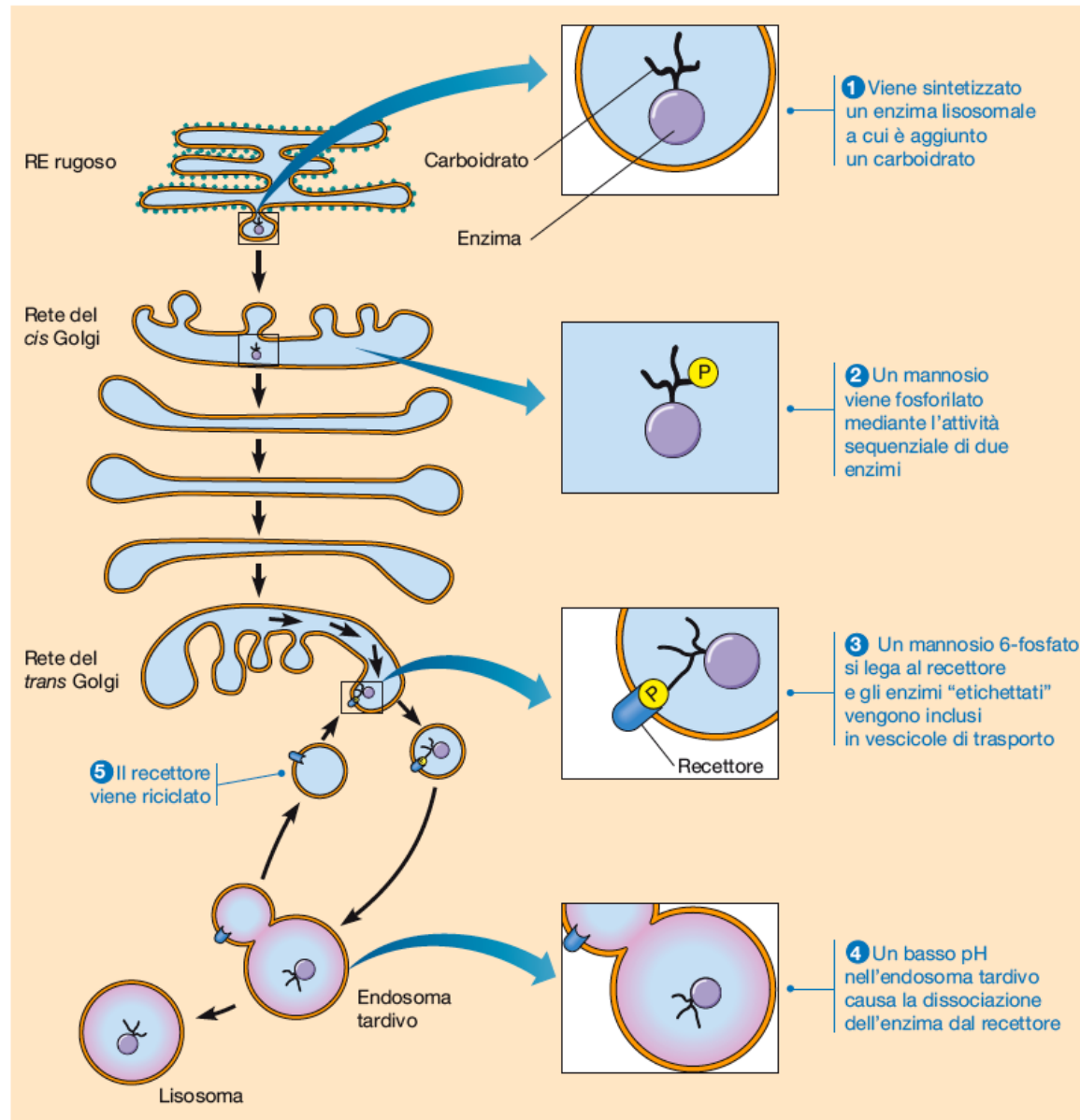
L'oligosaccaride legato a N del precursore dell'idrolasi lisosomiale, costruito nel RE, viene modificato nel reticolo del Golgi *cis*. Il segnale di smistamento degli enzimi lisosomali precursori consiste nell'aggiunta di un gruppo fosfato in corrispondenza del carbonio in posizione 6 del mannosio nel Golgi *Cis*.

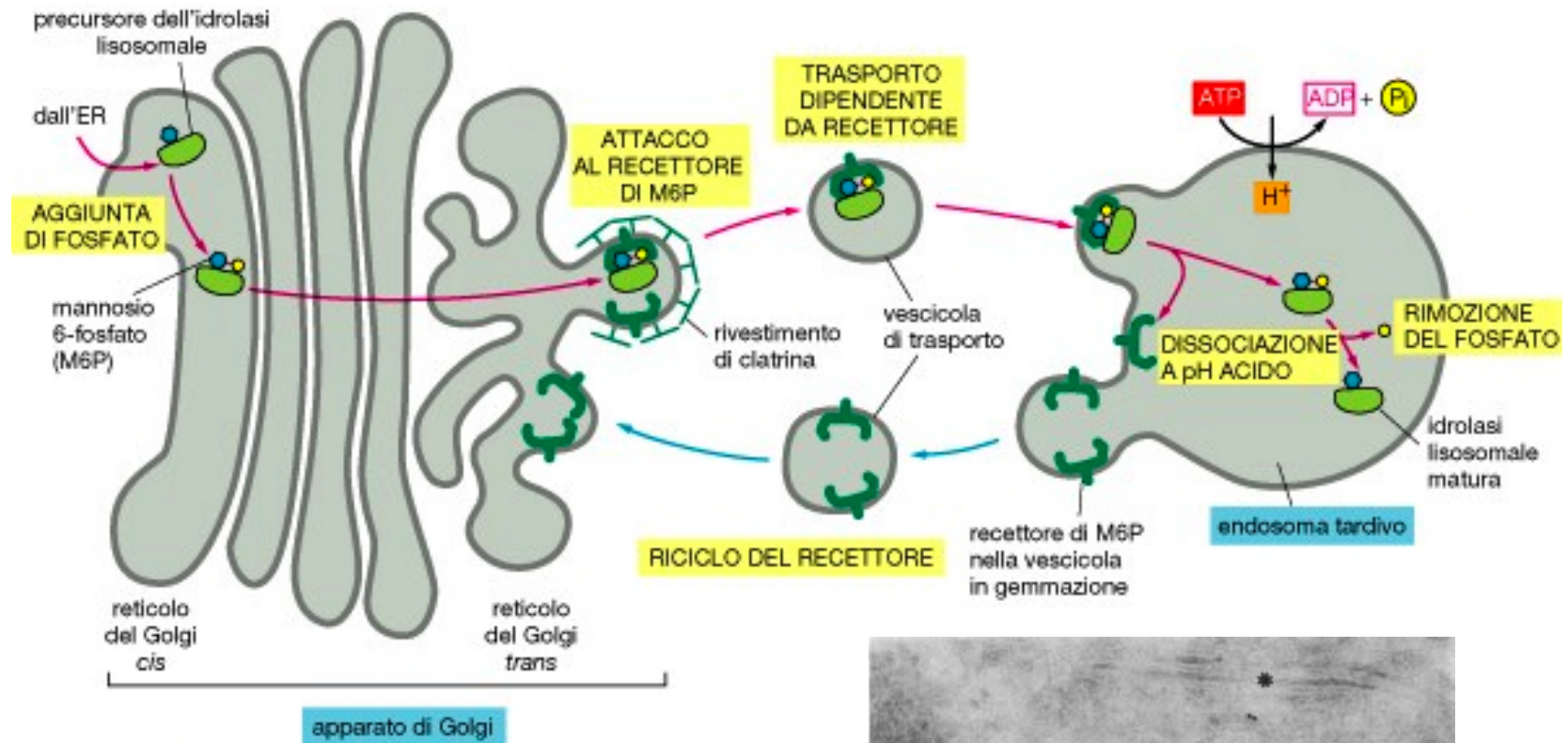
Il mannosio-6-P sarà poi riconosciuto da specifici recettori transmembrana nel *Trans Golgi network* (TGN) che permetteranno l'indirizzamento degli enzimi lisosomali in specifiche vescicole.



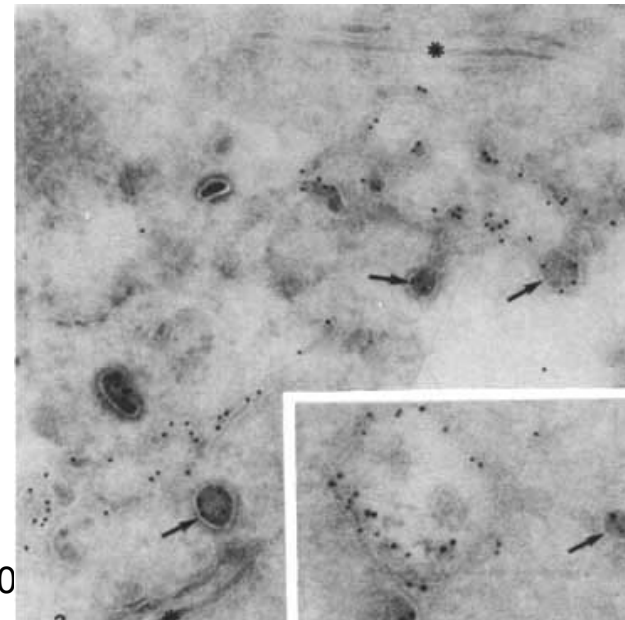
12_bct_2011

44





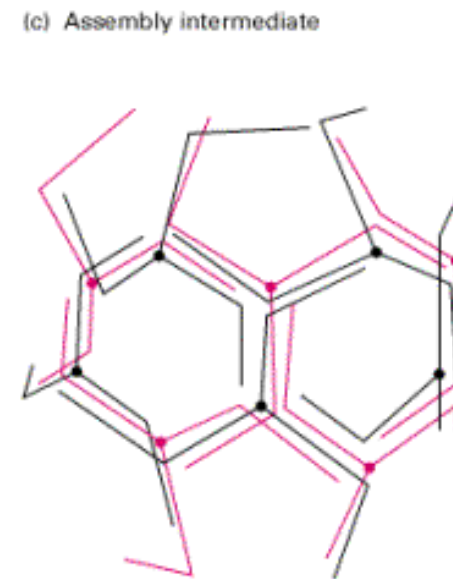
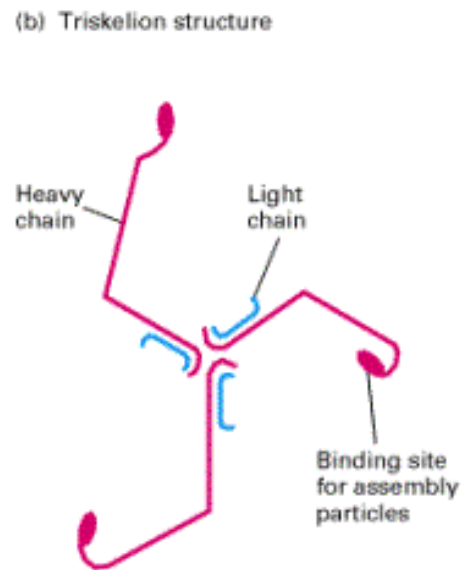
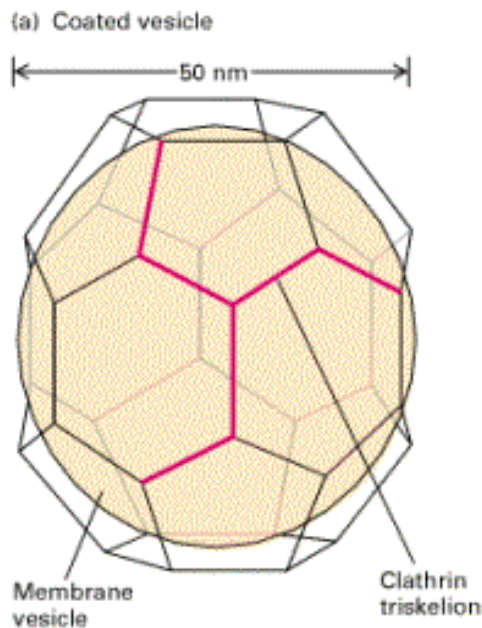
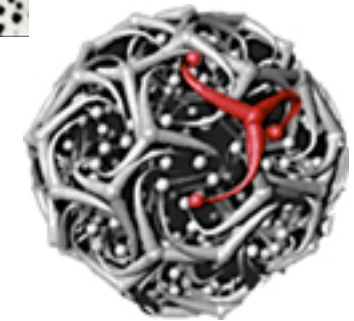
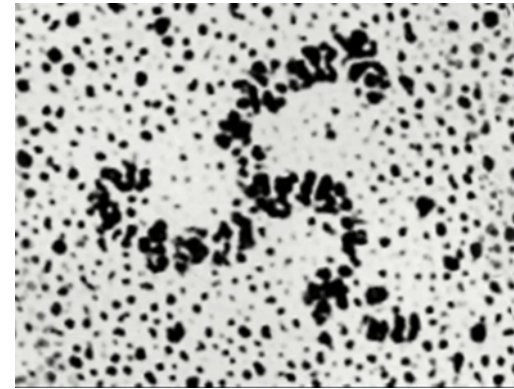
Immunogold con anticorpi anti mannosio-6-P



12_bct_20

46

Il ruolo della clatrina è simile a quello dei coatomeri COP I e COP II
L'associazione delle molecole di clatrina catalizzata dalla presenza di molecole ARF-GTP deforma la membrana del TGN e favorisce la formazione della vescicola. Una volta formata la vescicola ricoperta di clatrina, l'idrolisi del GTP permette il rilascio di ARF-GDP e della clatrina lasciando la vescicola "nuda"



Continuità dei compartimenti intracellulari con lo spazio extracellulare

