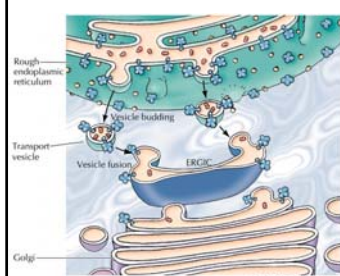


Funzione del sistema delle endomembrane

- ✦ Il sistema delle endomembrane è il **sistema di trasporto** della cellula.
- ✦ I materiali sono passati lungo la cellula e si muovono verso la membrana plasmatica da dove possono venire scaricati dalla cellula.
- ✦ Le vescicole si formano sia nel reticolo endoplasmatico che nell'apparato di Golgi.
- ✦ I lisosomi sono prodotti a partire da vescicole che si distaccano dall'apparato di Golgi.
- ✦ Alcune vescicole immagazzinano i prodotti per uso in un secondo tempo.

Trasporto vescicolare dal ER al Golgi



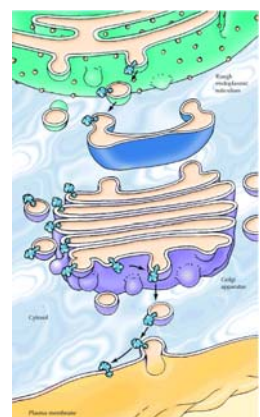
- ✦ **Proteine e lipidi** sono trasportate **del ER al Golgi in vescicole di trasporto** che gemmano dalla membrana del ER e si fondono per formare vescicole e tubuli nel compartimento intermedio ER-Golgi (ER-Golgi intermediate compartment; **ERGIC**).
- ✦ Le proteine che si trovano nel **lume del ER** sono inglobate dalle vescicole e rilasciate nel **lume del Golgi**. Le **proteine di membrana** mantengono lo stesso orientamento nel Golgi che avevano nel ER.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A1466&rendertype=figure&id=A1492>

Topologia della via secretoria

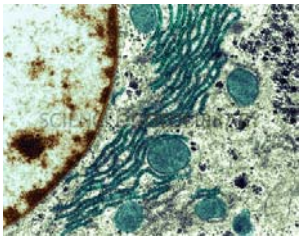
I lumi del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi sono topologicamente equivalenti all'esterno della cellula.

Perciò, quelle porzioni delle catene polipeptidiche che sono translocate verso l'interno dell'ER sono esposte sulla superficie cellulare in seguito al trasporto verso la membrana plasmatica.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1479/?rep=objectonly>

- ◻ L'aspetto "**ruvido**" del **reticolo endoplasmico ruvido** ("Rough Endoplasmic Reticulum, RER) deriva dalla presenza di di ribosomi legati al versante citosolico della membrana del reticolo endoplasmatico. La presenza di ribosomi nel RER indica che esso è coinvolto nella **sintesi proteica**.



EM; falsi colori

<http://www.sciencephoto.com/media/214893/view>

- ◻ Il **reticolo endoplasmatico liscio** ("Smooth endoplasmic Reticulum, SER) **non** ha ribosomi collegati. Invece è coinvolto:
 - Nel metabolismo del colesterolo e degli ormoni steroidei.
 - Nella sintesi dei fosfolipidi delle membrane.
 - Nella detossificazione di agenti esogeni (xenobiotici).
 - Nell'immagazzinamento del Ca^{2+} .
 - Nella sintesi e immagazzinamento del glicogeno

Reticolo endoplasmatico (1)

- ✚ Il reticolo endoplasmatico **fabbrica, processa e trasporta** una gran varietà di composti biochimici che verranno utilizzati **all'interno e all'esterno della cellula**.
 - Molte delle proteine che si trovano nel lume del reticolo si trovano lì soltanto di passaggio.
 - Altre proteine, tuttavia, sono **marcate per rimanere costantemente nel lume** e sono note come **proteine residenti del reticolo**.
 - Queste proteine speciali, necessarie perchè il RE svolga le sue funzioni specializzate, contengono un **segnale di ritenzione specializzato** che consiste in una **sequenza specifica di amminoacidi che permette alla proteina di venire trattenuta nell'organello**.
 - Esempio: proteina "chaperone" BiP (chaperone immunoglobulin-binding protein), che identifica altre proteine che sono state sintetizzate o processate in modo inappropriato ed impedisce loro di venire spedite alle loro destinazioni finali.

RETICOLO ENDOPLASMATICO (2)

- ✚ Gioca un ruolo fondamentale nella **biosintesi dei lipidi e proteine**
- ✚ La sua membrana é il sito di produzione di tutte le **proteine transmembrana** della maggior parte degli organelli cellulari, incluso:
 - ER stesso
 - apparato di Golgi
 - lisosomi
 - endosomi
 - vescicole di secrezione
 - membrana plasmatica
- ✚ Proteine solubili destinate alla secrezione

RETICOLO ENDOPLASMICO (3)

✚ La membrana dell'ER è inoltre il sito di produzione della maggior parte dei **lipidi** per le membrane di **tutti** gli organelli, incluso:

- Mitochondri
- Perossisomi
- Cloroplasti

✚ Inoltre sono inizialmente inserite nella cavità (lume) del ER:

- tutte le **proteine** che verranno **secrete verso l'esteriore** della cellula
- le **proteine** (solubili in acqua) **destinate al lume dell'ER**, dell'**apparato di Golgi** o dei **lisosomi**.

Reticolo Endoplasmatico

Traduzione su ribosomi legati al reticolo endoplasmatico

Traduzione nel RE

SEQUENZE SEGNALE DI INDIRIZZAMENTO AL RE

Sequenza segnale N-terminale

✚ La **sequenza segnale N-terminale per il RE** guida non solo qualsiasi proteina solubile che verrà secreta dalle cellule, ma anche i precursori di qualsiasi altra proteina sintetizzate dai ribosomi legati al RER, incluso le proteine di membrana.

Cleavage site of signal peptidase
↓

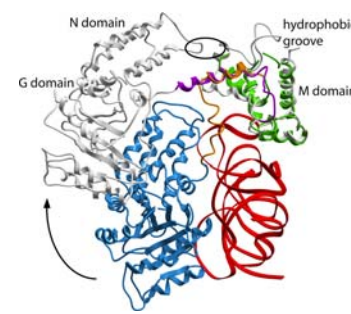
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Ser Ala Phe Pro Thr

La sequenza segnale dell'ormone della crescita

La maggior parte delle sequenze segnale contengono una sequenza di **amminoacidi idrofobici** preceduta da residui basici (ad es. Arginina)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1474/>

La particella che riconosce la sequenza segnale

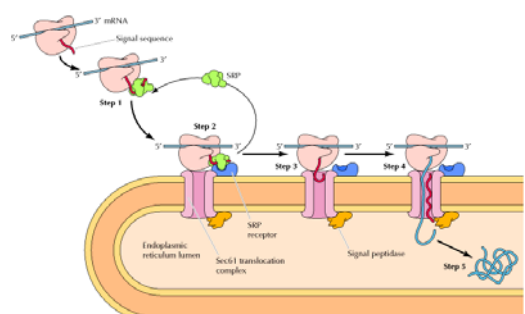


La **Signal Recognition Particle** è una particella complessa che comprende 6 diverse catene polipeptidiche legate ad una singola piccola molecola di RNA

Seminario

<http://www.pnas.org/content/104/38/14911/FS.expansion.html>

Indirizzamento co-traduzionale delle proteine di secrezione verso il reticolo endoplasmatico (ER)

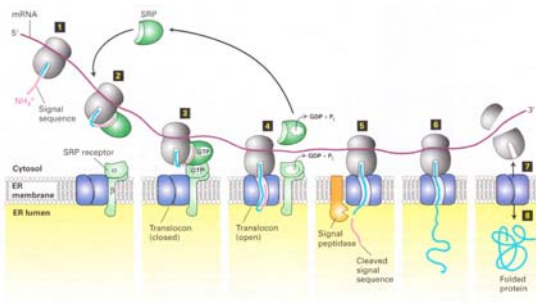


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1475/7report-objectonly>

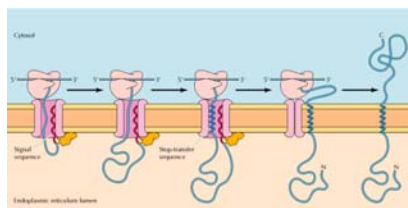
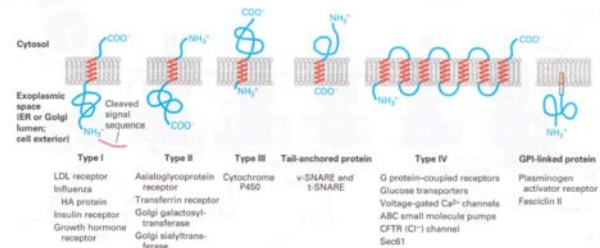
Indirizzamento co-traduzionale delle proteine di secrezione verso il reticolo endoplasmatico (ER).

- ✦ **Passo 1:** Man mano che la sequenza segnale emerge dal ribosoma, essa viene riconosciuta e legata alla particella di riconoscimento del segnale (SRP).
- ✦ **Passo 2:** La SRP scorta il complesso fino alla membrana dell'ER, dove esso si lega ad un recettore per la SRP.
- ✦ **Passo 3:** La SRP viene rilasciata, il ribosoma si lega ad un complesso di proteine Sec61 di traslocazione sulla membrana, e la sequenza segnale viene inserita in un canale di membrana.
- ✦ **Passo 4:** La traduzione riprende e la catena polipeptidica in crescita viene traslocata attraverso la membrana.
- ✦ **Passo 5:** La scissione della sequenza segnale da parte di peptidasi del segnale rilascia il polipeptide nel lume dell'ER.

Proteine solubili: di secrezione o destinate al lume del reticolo, del Golgi o dei lisosomi



Tipi di proteine di membrana



Inserimento di una proteina di membrana con una sequenza di segnale scindibile e una singola sequenza di stop.

Le sequenze segnale vengono scisse mentre la catena polipeptidica attraversa la membrana, e quindi il N-terminale della catena polipeptidica viene esposto nel lume dell'ER. Tuttavia, la traslocazione della catena polipeptidica viene interrotta dalla sequenza "stop trasferimento" che chiude il canale di traslocazione Sec61 ed esce dal canale lateralmente per ancorare la proteina alla membrana dell'ER. La traslocazione continua dà origine ad una proteina che attraversa la membrana con il suo terminale carbossilico nel versante citosolico.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1480/?report=objectonly>

Inserimento nella membrana del RE di una futura proteina di membrana

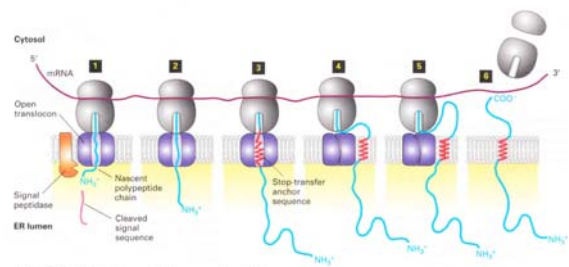
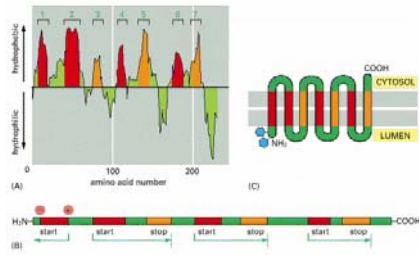


FIGURE 13-11 Positioning type I single-pass proteins. Step 1 transfer anchor sequence moves laterally between the translocon.

Inserimento della proteina di membrana multipasso rodopsina nella membrana del RE



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26841/figure/A2228/?report=objectonly>

Reticolo Endoplasmatico Ruvido

PROCESSI CARATTERISTICI

Azione delle proteine chaperones sulle proteine rilasciate nel citosol

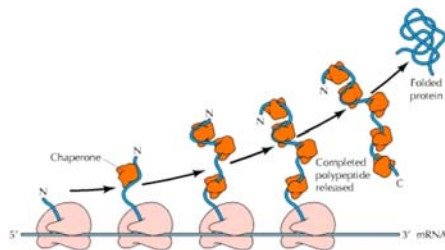
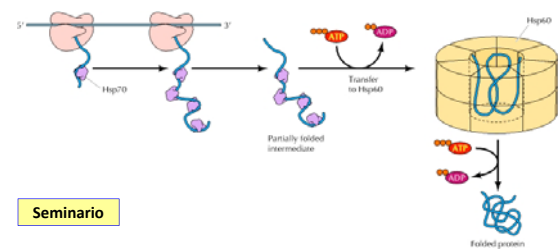


Figure 7.17 Action of chaperones during translation

Chaperones bind to the amino (N) terminus of the growing polypeptide chain, stabilizing it in an unfolded configuration until synthesis of the polypeptide is completed. The completed protein is then released from the ribosome and is able to fold into its correct three-dimensional conformation.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/figure/A1201/?report=objectonly>



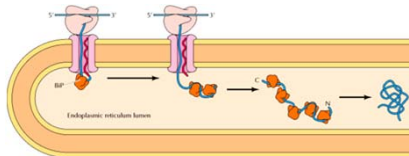
Seminario

Azione sequenziale delle chaperonine Hsp70 e Hsp60

Le chaperonine della famiglia Hsp70 si legano e stabilizzano le catene peptidiche non ripiegate durante la traduzione. Il polipeptide non ripiegato viene allora trasferito alle chaperonine della famiglia Hsp60, all'interno delle quali ha luogo il ripiegamento della proteina. E' richiesta l'idrolisi dell'ATP sia per rilasciare il polipeptide non ripiegato dalle Hsp70 che per il ripiegamento all'interno della Hsp60.

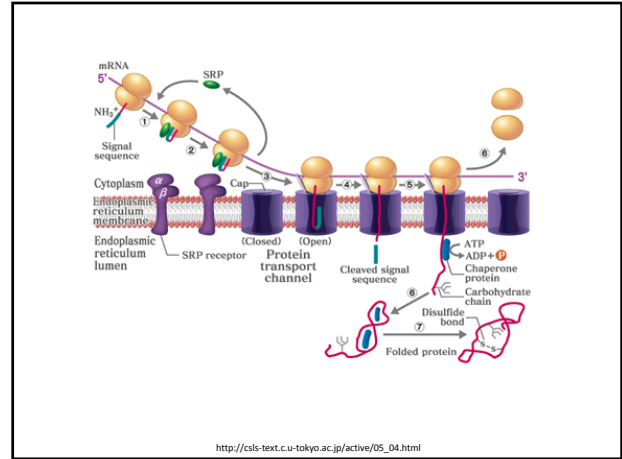
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/figure/A1205/?report=objectonly>

Ripiegamento delle proteine nel Reticolo Endoplasmatico (RE)



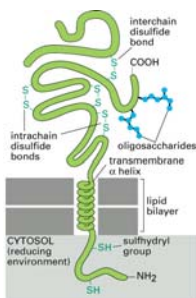
La proteina "chaperone" BiP si lega alle catene polipeptidiche mentre attraversano la membrana del RE e facilita il ripiegamento della proteina e l'assemblaggio all'interno dell'ER.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1484/?report=objectonly>



http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/05_04.html

PONTI S-S DELLE PROTEINE FORMATI NEL RETICOLO ENDOPLASMATICO



La **formazione dei ponti disolfuro** fra le catene laterali dei residui di cisteina è un importante aspetto del ripiegamento e assemblaggio delle proteine all'interno del Reticolo Endoplasmatico.

Questi legami non si formano nel **citosol**, che è caratterizzato da un **ambiente riducente** che mantiene i residui di cisteina nel loro stato ridotto (-SH). Tuttavia, all'interno del ER, un **ambiente ossidante promuove la formazione dei legami disolfuro (S-S)**, e i legami disolfuro che si formano nel ER giocano ruoli molto importanti nella struttura di proteine di secrezione o della superficie cellulare.

La formazione dei ponti disolfuro è facilitata dall'enzima "**proteina disolfuro isomerasi**", che si trova nel lume dell'ER.

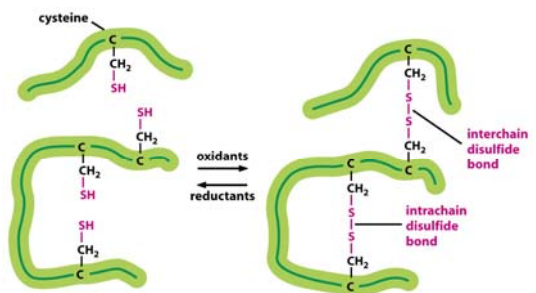


Figure 3-28 Molecular Biology of the Cell 5th (© Garland Science 2008)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/figure/A437/>

LEGAMI DISOLFURO (FORMATI NEL LUME DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO)

Importanza per le Biotecnologie (1)

- ✚ La maggior parte delle proteine utilizzate a scopo terapeutico nell'uomo e negli animali è costituita da **proteine secretorie stabilizzate da legami disolfuro (S-S)**.
- ✚ Utilizzando la **tecnologia del DNA ricombinante** si possono **sintetizzare proteine secretorie di mammifero in cellule batteriche**, ma generalmente **queste proteine non vengono secrete** (anche quando la sequenza segnale batterica viene inserita al posto di quella normale).
 - Queste **tendono piuttosto ad accumularsi nel citosol del battere**, dove spesso si denaturano e precipitano a causa della mancata formazione di legami disolfuro.
 - Per permettere il ripiegamento di queste proteine fatte produrre dai batteri sono necessari metodi chimici molto sofisticati e pertanto molto costosi.

LEGAMI DISOLFURO (FORMATI NEL LUME DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO)

Importanza per le Biotecnologie (2)

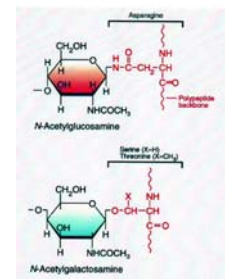
- ✚ Una volta appurato che **la formazione di legami disolfuro avviene spontaneamente soltanto nel nel lume del RE** (ambiente ossidante, mentre il citosol è un ambiente riducente) i biotecnologi si sono resi conto che **le cellule batteriche non costituiscono un sistema appropriato per la sintesi di proteine che sono normalmente stabilizzate tramite ponti disolfuro**.
- ✚ Infatti, oggi giorno, si preferisce utilizzare le **culture di cellule animali** per la produzione su larga scala di proteine d'importanza terapeutica, come ad es.:
 - Anticorpi monoclonali
 - Attivatore tissutale del plasminogeno (un fattore anticoagulante)
 - Eritropoietina (ormone che stimola la formazione dei globuli rossi).

Reticolo Endoplasmatico Ruvido

INIZIO DELLA N-GLICOSILAZIONE

Glicoproteine (1)

- ✚ Le glicoproteine dei mammiferi si distinguono in glicoproteine con zuccheri legati all'ossigeno («**O-linked**») o legati all'azoto («**N-linked**»).
- ✚ Le glicoproteine **N-linked** contengono un residuo di **N-acetilglucosamina** legato ad un gruppo ammidico di un residuo di asparagina della proteina. Sono le più comuni.
- ✚ Il più comune **legame in O-** comporta il legame tra un residuo terminale di **N-acetilgalattosamina** dell'oligosaccaride e un residuo di serina o treonina.
- ✚ Gli zuccheri contenuti in questi oligosaccaridi sono il fucosio (Fuc), il galattosio (Gal), la N-acetilgalattosamina (GalNAc) e l'acido sialico (Sia).



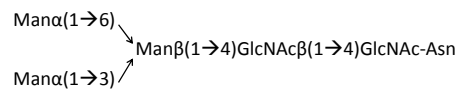
Mathews, Van Holde, Ahern: Biochimica 3ª ed., Casa editrice Ambrosiana, 2004

Glicoproteine N-linked (1)

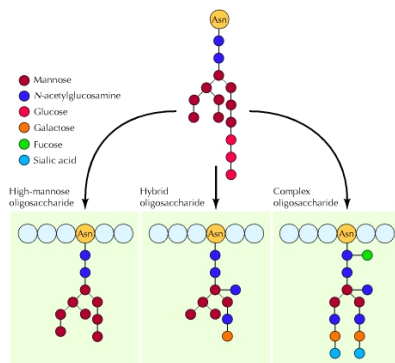
- L'assemblaggio della porzione oligosaccaridica non avviene sulla catena polipeptidica (come per le O-linked GP) ma su un **intermedio lipidico**.
- Un precursore oligosaccaridico viene poi trasferito ad una catena polipeptidica, mentre viene sintetizzata:
 - **Glicosilazione COTRADUZIONALE.**
- L'oligosaccaride trasferito viene sottoposto a vari passaggi di modificazione durante il passaggio dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi.

Glicoproteine N-linked (2)

- Possono essere suddivise in categorie sulla base di tre strutture fondamentali della porzione oligosaccaridica: **proteine complesse**, **proteine ibride** e **proteine ad alto contenuto in mannosio**.
- Tutti gli **oligosaccaridi N-linked** hanno una porzione interna pentasaccaridica in comune:



Esempi di oligosaccaridi N-linked

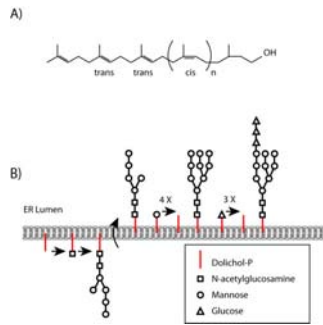


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/figure/A1215/?report=objectonly>

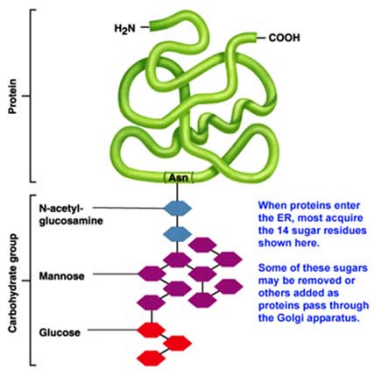
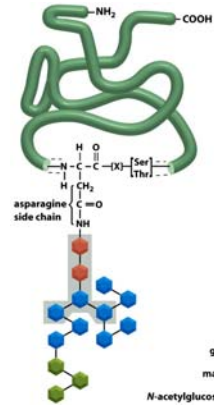
Glicoproteine N-linked (3)

- La parte centrale viene assemblata come parte di un oligosaccaride intermedio più grande legato ad un complesso lipidico isoprenoide: **dolicolo fosfato**.
- Nei vertebrati, il dolicolo contiene da 18 a 24 unità isoprenoidi con due doppi legami in trans e le rimanenti unità in configurazione cis, ad eccezione dell'ultima unità isoprenoide che è satura.

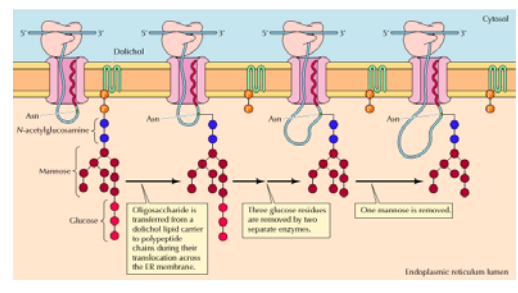
Struttura dei dolicoli e loro funzione durante la N-glicosilazione delle proteine



Seminario



Glicosilazione delle proteine nell'ER



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1485/?report=objectonly>

Glicosilazione delle proteine nel ER ruvido

Quasi nel momento in cui una catena polipeptidica entra nel lume dell'ER, viene glicosilata su amminoacidi di asparagina selezionati. L'oligosaccaride precursore viene trasferito all'asparagina sotto forma di un'unica entità in una reazione catalizzata da un enzima di membrana, la *oligosaccaril transferasi*. Così come avviene per il peptide segnale, ad ogni traslocatore sulla membrana dell'ER è associato una copia di questo enzima. (Il ribosoma non è illustrato per semplicità).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26841/figure/A2232/?report=objectonly>

Sintesi e inserimento nella membrana del recettore per le asialoglicoproteine e proteine con orientamento simile, che usano una sequenza interna di segnale

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21731/figure/A4778/?report=objectonly>

Sintesi e inserimento nella membrana dell'ER del trasportatore per il glucosio GLUT-1 e di altre proteine con molteplici segmenti transmembrana ad α -elica.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21731/figure/A4783/?report=objectonly>

Aggiunta e processamento iniziale degli oligosaccardi «N-linked»

Dol = Dolichol
 ● = Mannose
 ■ = N-Acetylglucosamine
 ▲ = Glucose

To cis Golgi

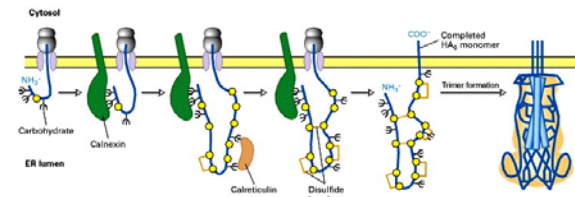
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21744/figure/A4828/?report=objectonly>

Didascalia della figura precedente

- Nel RE delle cellule dei vertebrati, il **precursore $\text{Glu}_3\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$** viene trasferito dal trasportatore dolico ad un residuo di asparagina specifico nella proteina nascente subito quando quel residuo di asparagina compare nel versante luminale dell'ER [1].
- In tre passi successivi, **vengono rimossi prima un residuo di glucosio [2], in seguito due residui di glucosio [3] e successivamente un residuo di mannosio [4]**.
- La ri-aggiunta di un residuo di glucosio [3^o] gioca un ruolo importante nel corretto ripiegamento di molte proteine dell'ER.
- Qui è illustrato il processo di glicosilazione N-linked di una proteina integrale di membrana possono essere modificate su residui di asparagina mediante lo stesso meccanismo.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21744/figure/A4828/?report=objectonly>

Collaborazione di proteine del RER ai processi di glicosilazione e formazione di ponti disolfuro



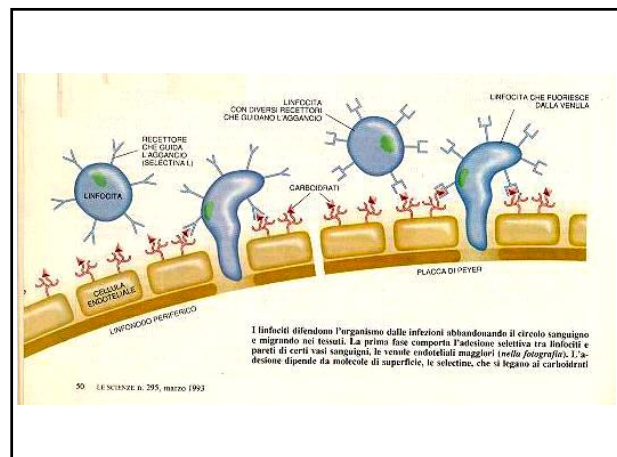
Lodish et al., Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Seminario

Le catene laterali di oligosaccaridi possono promuovere il ripiegamento e la stabilità delle glicoproteine (1)

- Alcune proteine richiedono oligosaccaridi N-linked per **ripiegarsi adeguatamente** nell'ER.
- Gli oligosaccaridi N-linked possono anche conferire **stabilità** a molte glicoproteine che vengono secrete.
- Gli oligosaccaridi su certe glicoproteine sulla superficie cellulare giocano un ruolo **nell'adesione cellula-cellula**.
 - La membrana plasmatica dei leucociti contiene molecole di adesione cellula-cellula estesamente glicosilate.
 - Gli oligosaccaridi su queste molecole interagiscono con domini che riconoscono gli zuccheri (lectine) presenti su certe molecole di adesione cellulare nelle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni.
 - Questa interazione aggancia i leucociti all'endotelio e collabora al loro movimento verso i tessuti nelle risposte infiammatorie all'infezione.

Adattato da Lodish et al., Molecular Cell Biology, 7^a ed.



Molecole di adesione

Seminario

Le catene laterali di oligosaccaridi possono promuovere il ripiegamento e la stabilità delle glicoproteine (2)

- Altre glicoproteine presenti sulla superficie cellulare possiedono catene oligosaccaridiche laterali che possono **indurre una risposta immunitaria**.
 - Un esempio comune sono gli antigeni dei gruppi sanguigni A,B, O, che sono oligosaccaridi O-linked legati a glicoproteine e glicolipidi sulla superficie degli eritrociti e di altri tipi cellulari. [N.B. Gli oligosaccaridi O-linked sono aggiunti a proteine o lipidi nell'apparato di Golgi]

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

The ABO Blood System

Blood Type (genotype)	Type A (AA, AO)	Type B (BB, BO)	Type AB (AB)	Type O (OO)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	A agglutinogens only	B agglutinogens only	A and B agglutinogens	No agglutinogens
Plasma Antibodies (phenotype)	b agglutinin only	a agglutinin only	NONE	a and b agglutinin

Seminario

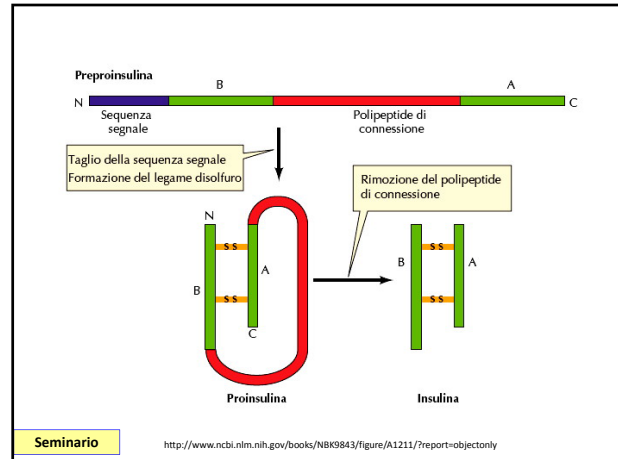
<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/traits/blood/images/ABObloodsystem.gif>

Reticoli

«MATURAZIONE» DELLE PROTEINE

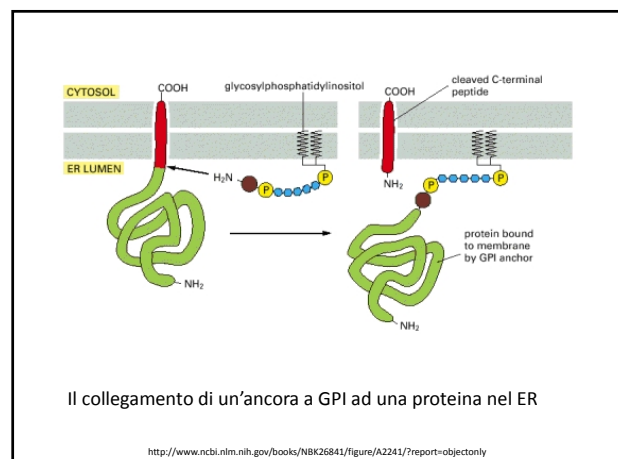
**“MATURAZIONE” DELLE PROTEINE
E ALTRE
MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI (1)**
(tutte le proteine, anche quelle rilasciate nel citosol)

- ✚ **Ripiegamento tridimensionale corretto** (aiuto di chaperoni molecolari): struttura terziaria.
- ✚ **Assemblaggio delle subunità peptidiche** di proteine con struttura quaternaria
- ✚ **Rimozione di aminoacidi:**
 - sequenze segnale di indirizzamento al reticolo endoplasmatico (RE)
 - metionina iniziale (RE)
 - sequenze presenti nei precursori di altre molecole (es. ormoni, nelle molecole delle proteine della cascata di coagulazione del sangue o del complemento [sistema per marcare una cellula per la distruzione da parte del sistema immunitario], monomeri di proteine destinate alla polimerizzazione extracellulare [es. collageni, elastina]) (fuori dalle cellule)



**“MATURAZIONE” DELLE PROTEINE
E ALTRE
MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI (2)**
(tutte le proteine, anche quelle rilasciate nel citosol)

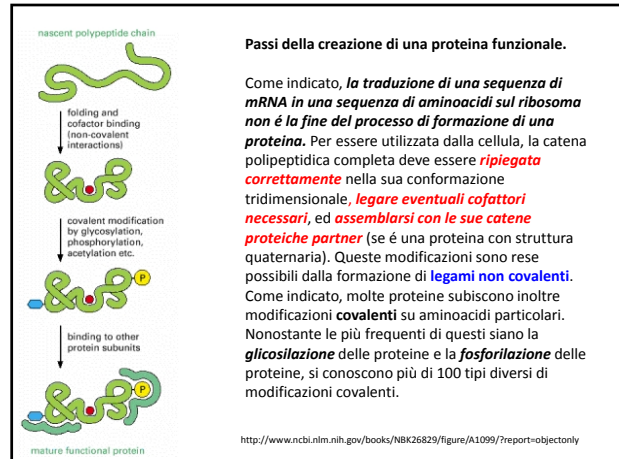
- ✚ **Formazione di legami S-S fra gruppi laterali di cisteine** (richiesto ambiente ossidante)
- ✚ **Aggiunta di carboidrati e successiva elaborazione** (rimozione di residui e/o aggiunta di nuovi residui)
- ✚ **Aggiunta di code lipidiche** (acido grasso o gruppo farnesilico a proteine associate al foglietto citosolico della membrana plasmatica; coda di glicosil-inositol-fosfato [GPI] a proteine associate al versante extracellulare della membrana plasmatica).



**“MATURAZIONE” DELLE PROTEINE
E ALTRE
MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI (3)
(tutte le proteine, anche quelle rilasciate nel citosol)**

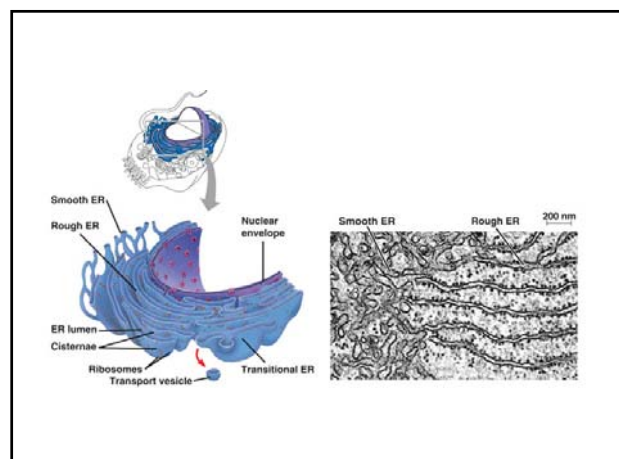
✚ **Modificazioni covalenti** di aminoacidi: legame di un gruppo chimico ai gruppi carbossilici o aminici terminali o a gruppi reattivi nelle catene laterali dei residui interni. Es:

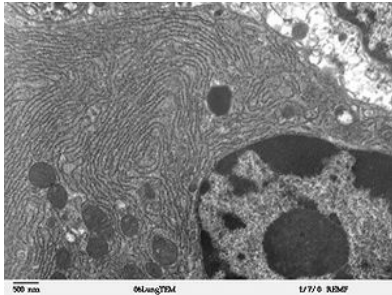
- fosforilazione/defosforilazione [mediata da chinasi e fosfatasi rispettivamente] di residui OH di tirosina, serina o treonina)
- acetilazione (ad es. degli istoni)
- metilazione (id., importante per il silenziamento dei geni)
- idrossilazione (importante per la formazione di ponti d'idrogeno fra proteine; es. collageno).



Reticoli

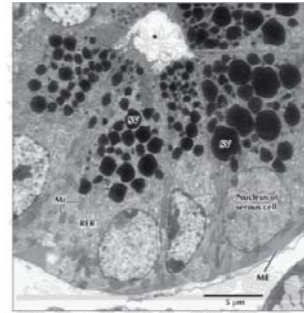
**ESEMPI DI CELLULE AD ATTIVA SINTESI
PROTEICA RICONOSCIBILI DAL FATTO CHE IL
RETICOLO ENDOPLASMATICO RUVIDO È
MOLTO SVILUPPATO**





Micrograph of rough endoplasmic reticulum network around the nucleus (shown in lower right-hand side of the picture). Dark small circles in the network are mitochondria.

http://en.wikipedia.org/wiki/Endoplasmic_reticulum



ERM of part of a secretory cell in a parotid gland. A cluster of secretory cells with basal nuclei is situated around the nucleus (arrow). Several large tips of these secretory cells showing rough endoplasmic reticulum (RER) and numerous mitochondria (MI) are in basal cytoplasm. Conspicuous electron-dense secretory vesicles (SV) of various sizes and shapes, dispersed around cytoplasm. These vesicles (progenies of secretory product) will be released into the lumen by exocytosis. At the apical base, the thin process of a microvillus cell (ME) shares the thin basement membrane with the secretory cells. 48224.

© ELSEVIER, INC. - NETTERIMAGES.COM

<http://www.netterimages.com/images/48224.htm>