

## COMPARTIMENTI INTRACELLULARE E TRAFFICO VESCICOLARE

Il citoplasma delle cellule eucariotiche è suddiviso in vari compartimenti (organelli) distinti, delimitati da membrane. Gli organelli del sistema endomembrane sono elementi di una rete dinamica e integrata, in cui i materiali sono trasportati da un distretto all'altro della cellula garantendo comunità di trasporto e comunicazione tra essi. I materiali sono trasportati da un organello all'altro, in piccole **vescicole di trasporto**, rivestite di membrana, che si formano per gemmazione dalla membrana di un compartimento donatore.

Con il termine vescicola si indica un trasportatore di forma sferica, un carico può anche essere trasportato in carrier membranosi di forma irregolare o tubulare.

Vengono identificati diversi percorsi nel citoplasma: la **via biosintetica** in cui le proteine sono sintetizzate nel RE, modificate nel passaggio attraverso il complesso di Golgi e trasportate da questo alle varie destinazioni quali la membrana plasmatica, i lisosomi o il vacuolo di una cellula vegetale. Questa via è definita anche come la **via secretoria** o via esocitica, dal momento che molte delle proteine sintetizzate nel RE sono destinate ad essere trasportate al di fuori della cellula, quindi **secrete**.

**VIA SECRETORIA:** materiali sintetizzati nel reticolo endoplasmatico, passano al Golgi e trasportati attraverso endosomi all'interno del citoplasma e alle varie destinazioni (lisosomi, membrana plasmatica).

Le attività secretorie delle cellule si possono dividere in due tipi: **costitutive** e **regolate**. Durante la *secrezione costitutiva*, i materiali sono trasportati, in vescicole secretorie, dai loro siti di sintesi e rilasciati nello spazio extracellulare in maniera continua. La maggior parte delle cellule svolge una secrezione costitutiva, processo che contribuisce alla formazione della matrice extracellulare e della membrana plasmatica.

Durante la *secrezione regolata*, i materiali che devono essere secreti sono accumulati in comparti delimitati da membrana e rilasciati soltanto in risposta ad uno stimolo appropriato. I materiali che devono essere secreti sono accumulati in grossi granuli di secrezione, densamente impacchettati e rivestiti di membrana.

Queste vescicole di trasporto si muovono nel citoplasma secondo direzioni precise, spesso sono spinte da proteine motrici lungo "binari" formati da micro tubuli del citoscheletro. Quando esse raggiungono la loro destinazione, si fondono con la membrana di un compartimento accettore differente, che riceve sia il carico solubile della vescicola che l'impallaggio membranoso.

Tutto ciò avviene secondo percorsi definiti all'interno delle cellule muovendosi lungo le strutture del citoscheletro. Il movimento delle vescicole non avviene in modo casuale, bensì diversi tipi di filamenti intracellulare sono specifici per la destinazione da raggiungere.

La sintesi di tutte le proteine presenti nella cellula inizia sui ribosomi nel citosol e il loro destino successivo dipende dalla loro sequenza aminoacidica. La maggior parte dei segnali di smistamento coinvolti nel trasporto transmembrana si trova in un tratto di sequenza amminoacidica, in genere lungo 15- 60 residui. Queste **sequenze segnale** si trovano spesso all'N-terminale della catena polipeptidica e in molti casi sono rimosse dalla proteina a opera di **peptidasi del segnale** specializzate, una volta che il processo di smistamento è stato completato. Le **sequenze segnale** possono anche essere tratti interni di amminoacidi, che restano parte della proteina. Questo tipo di segnali è usato nel trasporto regolato all'interno del nucleo. In alcuni casi i segnali sono composti da sequenze aminoacidiche interne che formano una disposizione tridimensionale specifica di atomi sulla superficie della proteina, queste **zone segnale** sono usate per l'importazione nucleare e nel trasporto vescicolare. Ciascuna sequenza segnale, specifica una particolare destinazione nella cellula. Proteine destinate al trasferimento iniziale nel RE in genere hanno una sequenza segnale al loro N-terminale, che comprende in modo caratteristico una sequenza composta da circa 5-10 aminoacidi idrofobici. Molte di queste proteine passeranno poi dal RE all'apparato del Golgi, ma quelle con una sequenza specifica di 4 aminoacidi all'oro C-terminale sono riconosciute come proteine del RE e sono riportate nel RE. Le proteine destinate ai mitocondri hanno sequenze segnale di un altro tipo ancora, in cui amminoacidi carichi positivamente si alternano con aminoacidi idrofobici. Infine, molte proteine destinate ai perossisomi hanno un peptide segnale di tre aminoacidi caratteristici al loro C-terminale. Le sequenze segnale sono riconosciute da recettori di smistamento complementari che guidano le proteine alla loro destinazione appropriata, dove i recettori scaricano il loro contenuto. I recettori agiscono *cataliticamente*: dopo aver completato un ciclo di indirizzamento, ritornano al loro punto di origine per essere riutilizzati. La maggior parte dei recettori di smistamento riconoscono classi di proteine anziché una sola specie di proteina. Essi possono perciò essere considerati come sistemi di trasporto pubblico destinati a consegnare i gruppi di componenti al loro giusto indirizzo nella cellula.

## RETICOLO ENDOPLASMATICO

Una singola membrana avvolta su se stessa (che da sola rappresenta più della metà delle membrane presenti in una cellula eucariotica) forma il **Reticolo Endoplasmatico** (RE), una rete complessa di cisterne appiattite e tubuli intercomunicanti in cui avvengono i processi di biosintesi cellulare. Un'altra importante funzione del reticolo, oltre alla costruzione delle macromolecole, è quella di segregare e incanalare le sostanze che vengono trasportate nella cellula. La membrana che separa il lume del reticolo endoplasmatico dal citoplasma media il trasporto di specifiche molecole tra questi due compartimenti cellulari. Il passaggio di sostanze tra il reticolo e l'apparato del Golgi avviene invece grazie a speciali vescicole di trasporto.

Nel reticolo endoplasmatico vengono costruite tutte le macromolecole destinate sia all'interno che all'esterno della cellula, con l'unica eccezione di quelle sintetizzate nei mitocondri e nei cloroplasti. Le proteine di membrana e i lipidi del reticolo endoplasmatico stesso, del Golgi, dei lisosomi e della membrana plasmatica vengono tutti sintetizzati in associazione con la membrana del reticolo endoplasmatico. Anche le proteine presenti nello spazio interno (o lume) del reticolo endoplasmatico, del Golgi e dei lisosomi, (nonché quelle destinate all'esterno della cellula) sono tutte inizialmente rilasciate nel lume del reticolo. Nel reticolo endoplasmatico si distinguono due porzioni: il **reticolo endoplasmatico rugoso**, con la superficie esterna coperta di *ribosomi*, e il **reticolo endoplasmatico liscio**, privo di queste particelle associate. I ribosomi, i siti in cui si svolge la sintesi proteica, non presentano tra loro differenze strutturali o funzionali: essi fluttuano nel citoplasma e si legano al reticolo endoplasmatico solo se stanno sintetizzando una proteina destinata a quel compartimento cellulare. I *polisomi* o *poliribosomi* sono ribosomi associati allo stesso mRNA che attua una codifica di proteine in serie. Nel caso (sui poliribosomi) il peptide nascente non presenti il peptide segnale, la sintesi proteica viene completata nel citoplasma stesso e le proteine sintetizzate, in dipendenza di specifici segnali, possono restare nel citoplasma, oppure grazie alla presenza di sequenza segnale essere trasferite:

- Nel nucleo
- Nei mitocondri
- Nei plastidi
- Nei perossisomi

Il trasferimento delle proteine in tali compartimenti avviene dopo la traduzione ed è pertanto detta **traslocazione post-traduzionale**.

La sequenza peptidica segnale può essere presente:

- All'estremità amino-terminale (traslocazione RER)
- All'estremità carbossi-terminale (traslocazione ai perossisomi)
- Intersperse (traslocazione nucleare, mitocondriale)

**La presenza delle sequenze segnale prevede che esse siano riconosciute da specifiche proteine, recettori di smistamento**, che le indirizzano al compartimento bersaglio, qui si legano a specifiche proteine e/o a canali di traslocazione presenti sulla membrana del compartimento bersaglio in modo da consentire l'inserimento della proteina o all'interno del comparto o alla sua membrana.

Le proteine sintetizzate sul RER in base all'assenza o presenza di una specifica sequenza di arresto di trasferimento o *sequenza topogenica* possono sia passare nello spazio luminale o restare inserite nella membrana, ovvero diventare proteine transmembrana. Le sequenze topogeniche guidano l'inserimento nella membrana e l'orientamento delle proteine integrali.

- In assenza di sequenza topogenica, eliminato il peptide segnale, la proteina passa nel lume del RER.
- In presenza di sequenza topogenica, eliminato il peptide segnale, la proteina resta inserita nella membrana, come proteina trans-membrana monopasso.
- In presenza di due o più sequenze topogeniche si avranno proteine trans-membrana dipasso, tripasso o multipasso.

Il trasferimento di proteine all'interno del reticolo endoplasmatico avviene prima che la catena proteica in corso di formazione sia stata completamente sintetizzata. Affinché una proteina venga trasferita nel reticolo endoplasmatico, durante la sua sintesi, il ribosoma cui essa si trova agganciata deve a sua volta ancorarsi alla membrana del reticolo endoplasmatico. È proprio l'insieme dei ribosomi attaccati alla membrana, che conferisce al reticolo endoplasmatico il caratteristico aspetto rugoso ed è la catena nascente della proteina a dirigere il ribosoma verso il reticolo endoplasmatico: una speciale particella presente sulla membrana del reticolo riconosce una particolare sequenza di amminoacidi della catena che ha appena iniziato a formarsi, la aggancia e la porta a contatto con la superficie della membrana stessa. A questo punto la catena nascente della proteina deve attraversare la membrana del reticolo endoplasmatico e, a seconda che sia una proteina solubile o una proteina integrale di membrana, viene rilasciata nel lume del reticolo endoplasmatico oppure resta parzialmente ancorata alla membrana. Specifici segnali presenti sulle nascenti catene proteiche dirigono il corretto inserimento della proteina all'interno della membrana. Nel reticolo endoplasmatico rugoso molte proteine vengono glicosilate (glicosilazione) per mezzo dell'aggiunta di oligosaccaridi, un processo che porta alla formazione delle glicoproteine in corrispondenza dell'apparato del Golgi. Inoltre, molti lipidi di membrana quali i fosfolipidi e il colesterolo sono sintetizzati sulla porzione citosolica della membrana del reticolo endoplasmatico (sol). La maggior parte delle cellule contiene una piccola quantità del compartimento membranario del reticolo endoplasmatico privo di ribosomi: il reticolo endoplasmatico liscio. Tuttavia, in alcune cellule specializzate, il reticolo endoplasmatico liscio può essere molto abbondante, come nel caso delle cellule del fegato. Il reticolo endoplasmatico liscio svolge funzioni diverse a seconda delle cellule in cui si trova: nelle cellule epatiche per esempio è specializzato nella produzione di lipoproteine e nella detossificazione di composti solubili nei lipidi. In particolari situazioni, per esempio dopo l'assunzione di alcuni farmaci che richiedono una maggiore capacità funzionale di questa struttura, il reticolo endoplasmatico liscio delle cellule epatiche può raddoppiare la propria superficie in pochi giorni, per poi tornare alle dimensioni originali.

In generale un grande sviluppo del reticolo endoplasmatico rugoso indica una grande attività di sintesi di proteine destinate a essere secrete. Le cellule in cui è particolarmente abbondante il reticolo endoplasmatico liscio invece sono specializzate nell'elaborazione dei lipidi e nel metabolismo del glicogeno.

### RETICOLO ENDOPLASMATICO RUGOSO

La membrana esterna del RER continua con la membrana esterna del nucleo, anch'essa presenta ribosomi sulla superficie esterna. Le cisterne del RER hanno la caratteristica forma appiattita, sono molto sviluppate ed abbondanti nelle cellule dove c'è un elevato metabolismo proteico. Nel RER vi è il *controllo di qualità*: proteine che non siano riuscite a conformarsi correttamente in un certo lasso di tempo sono riconosciute dal sistema ERAD (degradazione associata al RE) e retro-traslocate al citosol attraverso un canale. Nel caso di glicoproteine, una N-glicanasi citosolica rimuove l'oligosaccaride intanto che la proteina viene ubiquitinata e consegnata al proteosoma per la degradazione.

Le funzioni principali del RER:

- Sintesi di proteine secretorie
- Sintesi di proteine integrali di membrana
- Modificazioni post-tradizionali delle proteine
- Glicosilazione
- Controllo di qualità
- Biosintesi delle membrane

### RETICOLO ENDOPLASMATICO LISCIO

Il reticolo endoplasmatico liscio, privo di ribosomi sulla sua superficie, le cui cisterne hanno una forma tubulare.

Funzioni del REL:

- Sintesi di lipidi, i fosfolipidi che servono per le membrane cellulari, il colesterolo e gli steroidi e i glicolipidi. Sintesi di ormoni steroidei nelle cellule endocrine delle gonadi e della corteccia surrenale.
- Detossificazione nel fegato di composti organici. Questa funzione viene espletata da ossidati, tra cui i citocromi P450.
- Sequestro di ioni calcio
- Biogenesi delle membrane
- È coinvolto nel metabolismo del glicogeno, esso viene conservato come riserva energetica, nel fegato e nei muscoli. Per fornire energia, esso deve essere scisso in tante molecole di glucosio. Questo processo avviene grazie al reticolo endoplasmatico liscio. Infatti il glicogeno viene convertito dapprima in tante molecole di Glucosio-6-Fosfato (glucosio+P). In questa forma, però, il glucosio non può uscire dalla cellula. Grazie ad un enzima, la Glucosio-6-Fosfatasi, presente solo sulle membrane del REL, il gruppo P viene rimosso e il glucosio può uscire dalla cellula.
- Costituisce una riserva di ioni calcio, utile in alcune cellule come quelle muscolari.
- Tubuli reticolari e sacchi appiattiti diffusi in tutto il citosol. Lo spazio interno è il lume dell'ER o spazio delle cisterne dell'ER. Ha un ruolo centrale nella biosintesi dei lipidi e delle proteine e serve da deposito per gli ioni Ca<sup>2+</sup>, ciò è particolarmente importante in cellule come quelle della muscolatura scheletrica in cui si specializza in reticolo sarcoplasmatico.

L'importazione nell'RE può essere cotraduzionale (come nel reticolo endoplasmatico ruvido) o post-traduzionale come avviene per l'importazione in altri organelli.

Esiste una parte dell'RE, parzialmente liscia e parzialmente ruvida da cui gemmano vescicole di trasporto che prende il nome di RE di transizione.

L'epatocita ha un RE liscio diffuso, che produce particelle lipoproteiche.

Gli enzimi che sintetizzano lipidi e quelli necessari per le reazioni di detossificazione (citocromo P450, rende molecole insolubili sufficientemente solubili in acqua da lasciare la cellula ed essere escreti con l'urina) si trovano nella membrana dell'RE liscio.

Quando le cellule vengono rotte per omogenizzazione, l'RE si risalda in microsomi, vescicole derivanti anche da mitocondri, Golgi, membrana plasmatica ed endosomi. I microsomi lisci e ruvidi possono essere separati mediante centrifugazione all'equilibrio. Le proteine dirette dal citosol all'RE sono:

- Proteine Transmembrana: proteine traslocate nella membrana dell'RE ove rimangono intrappolate
- Proteine solubili in acqua: traslocate completamente attraverso la membrana dell'RE, entrano nel lume. Sono inviate in questo compartimento a causa di una precisa sequenza segnale. In effetti proprio a partire dall'RE furono individuate le prime sequenze segnale: proteine che non raggiungevano i microsomi ruvidi risultavano più grandi (a causa di un peptide N-terminale) rispetto a quelle che potevano traslocare nei microsomi. In questi compartimenti, è stata identificata una *peptidasi del segnale* che interviene prima del completamento della sintesi proteica e, di conseguenza, una sequenza segnale all'RE.

Le sequenze segnale all'RE hanno 8 amminoacidi non polari al centro della sequenza.

Una particella di riconoscimento del segnale (SRP), sei catene polipeptidiche attaccate a un RNA, lega il segnale e trasporta la proteina che lo presenta a un recettore SRP, localizzato sulla membrana dell'RE. La SPR ha una tasca idrofobica rivestita di metionine con una struttura abbastanza flessibile tale da poter accogliere sequenze segnali idrofobiche molto diverse tra loro.

La SRP ha una struttura che si lega alla subunità maggiore del ribosoma, riconosce e lega la sequenza segnale non appena essa è emersa dal ribosoma: si lega, bloccandolo, al sito di legame del fattore di allungamento all'interfaccia fra la subunità ribosomiale maggiore e quella minore causando un blocco della sintesi proteica. La pausa permette al ribosoma di spostarsi sulla membrana dell'RE, assicurando che la catena non venga rilasciata nel citosol (per esempio, per evitare ripiegamenti che impedirebbero la traslocazione nell'ER → non sono dunque necessarie proteine chaperone). Ciò è particolarmente importante per le idrolasi acide che potrebbero causare danni nel citosol (anche se cellule che secernono massicce dosi di idrolasi, presentano inibitori delle idrolasi).

Il complesso SRP-ribosoma si attacca al recettore SRP che è una proteina integrale di membrana dell'RE: questa interazione porta il complesso SRP-ribosoma a un traslocatore. SRP e il suo ricettore vengono rilasciati e la catena polipeptidica in crescita entra nel traslocatore.

Possono, dunque, essere distinti ribosomi liberi e ribosomi attaccati alla membrana. I poliribosomi, che si formano perchè più ribosomi si associano allo stesso mRNA possono essere liberi nel citosol o associati alla membrana dell'ER.

Il traslocatore Sec61 associato alla membrana attraverso il quale passa la catena polipeptidica in crescita è una struttura costituita da varie α eliche che circondano un poro pieno d'acqua, bloccato da una breve elica che si pensa tenga il traslocatore chiuso quando è a riposo. Il poro, dunque, sarebbe una struttura dinamica controllata. La struttura di Sec61 suggerisce che il poro possa aprirsi anche lungo un lato, permettendo al dominio idrofobico della molecola di entrare in contatto con il nucleo idrofobico della membrana.

Negli eucarioti, quattro Sec61 formano un complesso: parti di tale complesso sono siti di legame per il ribosoma e per proteine accessorie e dunque sono porzioni inattive. Il ribosoma potrebbe formare un'associazione tanto stretta con il traslocatore da impedire la fuoriuscita di altre molecole. In alternativa il poro del traslocatore può formare un diaframma talmente stretto intorno alla catena in traslocazione da impedire la fuoriuscita di altre molecole.

Per funzionare nella **traslocazione post-traduzionale**, il poro necessita di un "motore" che spinga la catena polipeptidica attraverso il poro: tale motore è rappresentato nei batteri dall'ATPasi SecA, che subisce cambiamenti conformazionali legati all'idrolisi di ATP che fanno inserire SecA nel poro trascinando con se un breve segmento della catena polipeptidica da traslocare. Negli eucarioti, altre proteine si associano a Sec61: esse attraversano la membrana e depositano sul lato luminale della membrana una proteina che prende il nome di BiP (binding protein), simile ad Hsp70. La traslocazione è unidirezionale ed è spinta da cicli di attacco e rilascio di BiP.

Dopo che la sequenza segnale è stata rilasciata da SRP, essa si lega a un sito specifico del poro, causandone l'apertura. La sequenza segnale, in questa sede, è riconosciuta una seconda volta e serve da segnale di inizio del trasferimento. Il doppio riconoscimento può essere considerato un meccanismo di controllo che assicura che solo le proteine corrette entrino nell'ER.

Quando si trovano il Sec61, le proteine sono in contatto anche con la componente lipidica della membrana: quando la catena polipeptidica diventa abbastanza lunga, una peptidasi del segnale taglia il segnale che resta bloccato nella membrana dove una proteasi lo degrada (il traslocatore si apre lateralmente, lasciando che le porzioni idrofobiche restino bloccate nella membrana). Come le proteine transmembrana a singolo passaggio vengono inserite nell'RE:

- una sequenza segnale N-terminale inizia la traslocazione come per una proteina solubile ma un segmento idrofobico della catena polipeptidica ferma la traslocazione (segnale di stop del trasferimento) e ancora la proteina alla membrana (N-terminale → lato luminale; C-terminale → lato citosolico)
- la sequenza segnale è interna invece che all'estremità N-term ed è legata ad SRP che porta il ribosoma alla membrana dell'ER dove la proteina è traslocata. La proteina transmembrana può avere un diverso orientamento a seconda dell'orientamento della sequenza segnale (dipendente dalla sua sequenza di amminoacidi): C-terminale sul lato luminale o N-terminale sul lato luminale.

Come le proteine transmembrana a passaggi multipli vengono inserite nell'RE:

Si pensa che in queste proteine una sequenza segnale interna serva da segnale di inizio del trasferimento per iniziare la traslocazione che continua fin quando il traslocatore incontra una sequenza di stop del trasferimento.

Nelle catene più complesse, una seconda sequenza di inizio del trasferimento inizia una nuova traslocazione lungo la catena polipeptidica, fino ad una nuova sequenza di stop e così via.

Il fatto che una sequenza segnali un inizio o uno stop dipende dalla sua posizione in una catena polipeptidica. Riconoscendo il primo segmento idrofobico come segnale di inizio, la SRP imposta un "quadro di lettura".

Le proteine vengono sempre inserite dal lato citosolico dell'ER: ciò dipende dal modo in cui le proteine sono inserite nella membrana. Le proteine residenti nell'RE presentano un segnale di ritenzione nell'ER di quattro amminoacidi al C-terminale. Importanti proteine residenti nell'RE sono la proteina disolfuro isomerasi (PDI) che permette l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici liberi su cisteine per formare legami disolfuro e la proteina chaperone Bip che si lega a sequenze amminoacidiche esposte (amminoacidi idrofobici) che sarebbero all'interno di una proteina se questa fosse ripiegata correttamente (idrolizza ATP). L'aggiunta di zuccheri alle proteine neosintetizzate (si formano glicoproteine) è una delle funzioni biosintetiche fondamentali dell'ER. Le glicosilazioni che avvengono nel citosol sono molto più semplici (solo un gruppo di N-acetilglucosammina è aggiunto a una serina o a una treonina). Un oligosaccaride precursore (N-acetilglucosammina, mannosio e glucosio per un totale di 14 zuccheri) è aggiunto in blocco all' NH<sub>2</sub> di un'asparagina (è legato a N o legato all'asparagina). Il trasferimento è catalizzato da un' oligosaccaride trasferasi che ha il sito attivo sul lato luminale dell'ER (per cui le proteine modificate nel citosol non presentano tale modificazione). L'oligosaccaride precursore è legato alla membrana dal dolicolo, una molecola lipidica (è costruito zucchero per zucchero su questa molecola. Gli zuccheri sono attivati nel citosol dalla formazione di intermedi nucleotide-zucchero che cedono il loro zucchero al lipide in sequenza ordinata. Durante questo processo, l'oligosaccaride viene girato da un trasportatore dal lato citosolico a quello luminale della membrana). Una coppia di oligosaccaride trasferasi è legata a ciascun traslocatore. L'oligosaccaride precursore è legato al *dolicolo* da un legame pirofosfato ad alta energia che spinge la reazione di glicosilazione. La varietà di oligosaccaridi su proteine mature deriva da modificazioni successive. Meno frequentemente gli oligosaccaridi sono legati al gruppo idrossile di una serina, di una treonina o di una idrossilina: tali oligosaccaridi legati ad O si formano nel Golgi. Gli oligosaccaridi possono essere usati come etichette per indicare lo stato di ripiegamento della proteina: *calnessina* e *calreticulina* (attività dipendente da Ca<sup>2+</sup>) sono proteine chaperone che si legano a carboidrati, o lettine che si legano a oligosaccaridi su proteine non completamente ripiegate e le trattengono nell'RE. *Calnessina* e *calreticulina* riconoscono un singolo glucosio attaccato a N (si legano alla proteina quando gli altri due glucosio sono eliminati): quando viene rimosso il terzo glucosio, la proteina si dissocia dal suo chaperone e può lasciare l'RE. *Calnessina* e *calreticulina* riconoscono proteine mal ripiegate perchè esse subiscono cicli continui di taglio dell'ultimo glucosio da parte di glicosidasi e aggiunta di glucosio finchè il ripiegamento non è corretto, mantenendo così una buona affinità per tali chaperoni. Proteine che non riescono a ripiegarsi correttamente vengono esportate nel citosol (retrotraslocazione o dislocazione) e qui degradate. Gli oligosaccaridi legati ad N sono una sorta di timer per definire da quanto tempo una certa proteina è stata prodotta e dunque da quanto tempo essa non riesce a ripiegarsi. Si pensa che la rimozione di un mannosio (da parte della mannosidasi) dall'albero del nucleo dell'oligosaccaride crei un nuovo oligosaccaride riconosciuto dall'apparato di retrotraslocazione. Quando la proteina ha raggiunto il citosol, gli oligosaccaridi legati a N sono rapidamente rimossi, la proteina è ubiquitinata e degradata. Un accumulo di proteine mal ripiegate nell'ER scatena la risposta alle proteine non ripiegate (aumento della trascrizione di geni che codificano per le proteine chaperone dell'ER):

- proteine dell'ER mal ripiegate si legano e attivano una chinasi che si autofosforila, causando l'attivazione di un dominio endoribonucleasico sulla stessa molecola che taglia un RNA citosolico, eliminandone un introne e generando un mRNA sottoposto a splicing che produce una proteina che regola i geni (attiva la trascrizione dei geni codificanti proteine che mediano la risposta alle proteine ripiegate male)
- proteine dell'ER mal ripiegate attivano una chinasi che fosforila un fattore di inizio della traduzione, inibendolo e riducendo la produzione di proteine in tutta la cellula. Alcune proteine sono tradotte di preferenza quando i fattori di inizio della traduzione sono scarsi: tra queste proteine vi sono proteine regolatrici dei geni che attivano la trascrizione di geni che codificano proteine attive nella risposta alle proteine non ripiegate.
- Una proteina integrale di membrana dell'ER è trasferita al Golgi quando nell'ER si accumulano proteine legate male. Nel Golgi vi sono proteasi che ne staccano il dominio citosolico, permettendone l'importazione nel nucleo dove possono attivare geni che codificano proteine attive nella risposta alle proteine non ripiegate.

Nell'RE, alcune proteine di membrana acquisiscono un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) al C-term. Molte proteine della membrana plasmatica sono modificate in questo modo. Le ancora GPI sono usate anche per dirigere particolari proteine di membrana nelle zattere lipidiche. La membrana dell'RE sintetizza le principali classi di lipidi. Il principale lipide prodotto è la fosfatidilcolina (colina, due acidi grassi e glicerolo fosfato).

Altri fosfolipidi prodotti in questa sede sono fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina oltre al fosfolipide minore fosfatidilinositolo.

Gli enzimi necessari per tale biosintesi sono tutti rivolti verso il citosol dove si trovano i metaboliti necessari.

Il foglietto citosolico e quello lumenale crescono contemporaneamente durante la sintesi dei lipidi sebbene siano prodotti solo sul foglietto citosolico per opera di scramblasi, che equilibrano i fosfolipidi nel doppio strato. La membrana plasmatica contiene un tipo diverso di trasportatore dei fosfolipidi che è una pompa di tipo P, la flippasi che rimuove fosfolipidi che presentano gruppi amminici dal foglietto extracellulare mantenendo l'asimmetria della membrana. La scramblasi della membrana plasmatica è attiva solo in particolari contesti come nel corso dell'apoptosi. L'RE produce anche colesterolo e ceramide (sfingosina derivante da serina e un acido grasso- e un secondo acido grasso; serve da precursore per la sintesi di glicofosfolipidi e sfingomieline che entrano a far parte del foglietto non citosolico del bilayer). Proteine di scambio dei fosfolipidi (o proteine di trasferimento dei fosfolipidi) potrebbero spostare i lipidi da un compartimento cellulare all'altro per distribuire i lipidi alle diverse membrane cellulari.

**N-GLICOSILAZIONE** Consiste nell'aggiunta di un oligosaccaride (formato da 14 residui zuccherini) alla proteina sintetizzata dai ribosomi presenti sul RER. L'oligosaccaride si forma sul *dolicolo*, un fosfolipide particolare che si trova in prossimità del canale d'ingresso attraverso il quale la proteina sintetizzata dal ribosoma entra nel RER. Successivamente, intervengono degli enzimi (*glicosidasi*) che eliminano tre molecole di glucosio ed uno di mannosio dall'oligosaccaride. Infine, quando entra una proteina appena sintetizzata dal ribosoma, l'oligosaccaride viene trasferito sul gruppo amminico (NH<sub>2</sub>) dell'amminoacido asparagina. La presenza dell'oligosaccaride è fondamentale perché:

- Permette alle proteine di essere più solubili
- Le rende meno attaccabili da parte delle proteasi
- Conferisce loro un corretto ripiegamento (*folding delle proteine*)

Una proteina, per funzionare correttamente, deve avere la giusta sequenza di aminoacidi ma soprattutto deve assumere anche una corretta conformazione spaziale.

Il folding proteico avviene attraverso diverse fasi:

1. La proteina appena prodotta dal ribosoma ed N-glicosilata viene sottoposta all'azione di *glicosidasi di tipo I e II*, che sottraggono all'oligosaccaride due molecole di glucosio.
2. A questo punto, interviene una proteina, la *calnexina*, che si attacca da una parte con il glucosio rimasto sull'oligosaccaride e dall'altra sulla proteina. La calnexina riesce a fare un primo ripiegamento della proteina, eliminando l'ultima molecola di glucosio rimasta.
3. La proteina appena ripiegata può andare incontro a due destini:
  - Se il primo ripiegamento della calnexina è sufficiente, la proteina esce dal RER. Prima di uscire perde, però, una molecola di mannosio dall'oligosaccaride (adopera dell'enzima mannosidasi).
  - Se la proteina necessita di più ripiegamenti, allora interviene un'altra proteina, la GGT (Glicoprotein-Glucosil-transferasi) che aggiunge una molecola di glucosio all'albero. In questo modo la proteina si può allegare nuovamente alla calnexina e subire un ulteriore ripiegamento. Questo percorso ciclico continua fino a quando la proteina non ha subito tutti i ripiegamenti di cui ha bisogno.
4. A questo punto, le proteine saranno tutte ripiegate, ma non tutte lo saranno correttamente. Le proteine ripiegate male dette *misfolding*, vengono riconosciute da un'altra proteina detta proteina degradante, la quale porta la proteina fuori dal RER verso il *proteosoma*, un complesso proteico che distrugge la proteina difettosa.

## MITOCONDRI

I **mitocondri** sono organelli racchiusi da una doppia membrana specializzati nella **sintesi di ATP**, utilizzando energia derivata dal trasporto degli elettroni e dalla fosforilazione ossidativa: contengono DNA, ribosomi e altri componenti necessari per la sintesi proteica propria, anche se la maggior parte delle loro proteine è codificata nel nucleo cellulare e importata dal citosol. Nei mitocondri ci sono sotto compartimenti separati: lo **spazio della matrice** interno e lo **spazio intermembrana**, che è in continuità con lo spazio delle creste. Questi compartimenti sono costituiti dalle due membrane mitocondriali concentriche: la membrana interna, che forma estese invaginazioni, le **creste**, e racchiude lo spazio della matrice, e la membrana esterna, che è in contatto con il citosol.

Traslocazione delle proteine: spostamento delle proteine attraverso la membrana.

Le proteine importate nei mitocondri sono prima sintetizzate come precursori delle proteine mitocondriali e traslocate da un meccanismo post-traduzionale.

La sequenza segnale N-terminale di molte proteine che entrano nella matrice è eliminata da una peptidasi del segnale, altre hanno una sequenza segnale interna che non viene rimossa. Sequenza segnale - matrice interna:  $\alpha$  elica anfipatica con i residui carichi positivamente su un lato dell'elica e i residui idrofobici sul lato opposto dell'elica.

Traslocatori di proteine mitocondriali:

- **complesso TOM** (M. Esterna)
- **complesso TIM** (TIM 22 e TIM23) (M. Interna)

TIM e TOM → traslocasi della membrana mitocondriale interna ed esterna -complesso SAM (aiuta le proteine a barile  $\beta$  a ripiegarsi correttamente)

- **complesso OXA** (media l'inserzione delle proteine sintetizzate nel mitocondrio nella membrana interna)

I precursori delle proteine mitocondriali restano nel loro stato svolto e interagiscono con proteine chaperone (come Hsp70) o proteine che si legano alle sequenze segnale che impediscono ai precursori di ripiegarsi prima di aver interagito con il complesso TOM.

Le proteine si legano ai recettori di importazione del complesso TOM, se ne staccano e vengono importate a partire dalla sequenza segnale.

TIM e TOM possono funzionare contemporaneamente (traslocando una proteina prima attraverso la membrana esterna, poi attraverso quella interna per localizzarla nella matrice) o indipendentemente l'uno dall'altro.

L'importazione delle proteine mitocondriali è alimentata dall'idrolisi di ATP sia fuori dai mitocondri (per il rilascio della proteina dallo chaperone) che nello spazio della matrice (Hsp70 mitocondriale idrolizza ATP per traslocare la proteina attraverso il canale di traslocazione. Questa proteina fa parte di un complesso multisubunità legato a TIM23\*). Inoltre è necessaria un'altra forma di energia che è il potenziale di membrana (gradiente elettrochimico attraverso la membrana interna).

\*dopo il passaggio con Hsp70, molte proteina interagiscono con Hsp60 mitocondriale per essere meglio ripiegate.

La membrana mitocondriale esterna, come le membrane dei batteri, presentano porine permeabili agli ioni inorganici (proteine a barile  $\beta$ ) importate attraverso il complesso TOM. Le porine sono trasportate nello spazio intermembrana dove si legano a chaperoni che impediscono l'aggregazione delle porine. Il complesso SAM si trova nella membrana esterna e inserisce le porine nella stessa. Una delle subunità centrali del complesso SAM è analoga nei batteri, adducendo un'ulteriore prova della teoria endosimbiontica.

Il meccanismo mediato da TOM e TIM23 serve anche per inserire proteine nella membrana mitocondriale esterna. Nella via più comune, solo la sequenza segnale N-terminale è traslocata nella matrice: una sequenza aminoacidica idrofobica agisce da sequenza di stop del trasferimento. Il complesso TOM tira la proteina attraverso la membrana esterna: la sequenza segnale è rimossa nella matrice e la sequenza idrofobica (rilasciata da TIM 23) è inserita nello strato lipidico.

Un'altra via di trasporto alla membrana interna o allo spazio transmembrana è mediata da TIM23 che trasloca l'intera proteina nello spazio della matrice, una peptidasi del segnale rimuove la sequenza segnale N-term, esponendo una regione idrofobica N-term che guida la proteina al complesso OXA che inserisce la proteina nella membrana interna [solo poche proteina importate usano questa via]. Molte proteine che usano questa via sono inserite nella membrana interna attraverso la loro sequenza segnale idrofobica, molte sono rilasciate nello spazio intermembrana da una proteasi che rimuove l'ancora di membrana, molte altre diventano protine periferiche di membrana alla superficie esterna della membrana interna dove formano complessi. Mentre la membrana esterna contiene porine che la rendono permeabile, la membrana interna non le contiene: vi sono famiglie specifiche di proteine per il trasporto di metaboliti attraverso la membrana interna (proteine transmembrana con sequenze segnale interne. Attraversano TOM e sono inserite nella membrana interna da TIM22).

Le proteine importate nei **mitocondri** sono in genere captate dal citosol. Le proteine mitocondriali sono prima sintetizzate completamente come precursori delle proteine mitocondriali nel citosol e quindi traslocate nei mitocondri tramite un meccanismo post-traduzionale. Uno o più sequenze segnale dirigono tutti i precursori delle proteine mitocondriali nel loro sotto compartimento mitocondriale appropriato. Molte proteine che entrano nella matrice hanno una sequenza segnale all'N-terminale che è rimossa dopo l'importazione da una peptidasi del segnale. Altre proteine importate, comprese tutte le proteine della membrana esterna e molte della membrana interna dello spazio intermembrana, hanno una sequenza segnale interna che non viene rimossa. Le sequenze segnale sono necessarie per l'importazione delle proteine che le contengono, questi segnali possono essere uniti a qualunque proteina citosolica per digerire la proteina nel compartimento mitocondriale corretto.

Le sequenze segnale che dirigono i precursori delle proteine nello spazio della matrice interna formano un'alfa-elica anfipatica, in cui i residui carichi positivamente sono raggruppati su un lato dell'elica, mentre i residui idrofobici privi di carica sono raggruppati sul lato opposto. E questa configurazione ad essere riconosciuta da recettori proteici specifici che iniziano la traslocazione delle proteine. La traslocazione delle proteine attraverso le membrane mitocondriali è mediata da complessi proteici multisubunità che funzionano come traslocatori di proteine. Il complesso TOM trasferisce proteine attraverso la membrana esterna e due complessi TIM (il TIM23 e il TIM22) trasferiscono proteine attraverso la membrana interna. TOM e TIM stanno rispettivamente per traslocasi della membrana mitocondriale esterna e interna. Questi complessi contengono alcuni componenti che agiscono come recettori per precursori di proteine mitocondriali e altri componenti che formano il complesso di traslocazione. Il complesso TOM è necessario per l'importazione di tutte le proteine mitocondriali codificate nel nucleo; trasporta inizialmente le loro sequenze segnale nello spazio intermembrana e aiuta a inserire proteine transmembrana nella membrana esterna. Le proteine a barile beta, che sono abbondanti nella membrana esterna, sono quindi trasferite ad un ulteriore traslocatore, il complesso SAM, che le aiuta a ripiegarsi in modo appropriato nella membrana esterna. Il complesso TIM23 trasporta alcune proteine solubili nello spazio della matrice e aiuta a inserire proteine transmembrana nella membrana interna. Il complesso TIM22 media l'inserimento di una sotto matrice che trasporta ADP, ATP e fosfato dentro e fuori dai mitocondri. Un altro traslocatore ancora nella membrana mitocondriale interna, il complesso OXA, media l'inserimento di quelle proteine della membrana interna che sono sintetizzate dentro i mitocondri aiuta anche a inserire alcune proteine della membrana interna, una volta importate, che sono inizialmente trasportate nella matrice dagli altri complessi. I precursori delle proteine mitocondriali dopo che sono stati sintetizzati non si ripiegano nelle loro strutture native, ma restano nel loro stato svolto mediante interazioni con altre proteine nel citosol. Alcune di queste sono proteine chaperone, mentre altre sono dedicate ai precursori delle proteine mitocondriali si legano direttamente alla loro sequenza segnale. Tutte queste proteine interagenti aiutano a impedire ai precursori di aggregarsi o di ripiegarsi spontaneamente prima di interagire con il complesso Tom nella membrana mitocondriale esterna. Come primo passaggio del processo di importazione, i recettori di importazione del complesso TOM legano le sequenze segnale dei precursori delle proteine mitocondriali. Le proteine interagenti quindi si distaccano e la catena polipeptidica non ripiegata viene inserita nel canale di traslocazione a partire dalla sequenza segnale. Una proteina potrebbe raggiungere lo spazio della matrice mitocondriale attraverso le due membrane una alla volta o potrebbe passare attraverso entrambe in una volta sola. Nel sistema di importazione mitocondriale, le proteine non contengono più la sequenza segnale, e ciò indica che il loro N-terminale deve localizzarsi nello spazio della matrice, dove si trova la peptidasi del segnale, ma il corpo della proteina può ancora essere attaccato dall'esterno dei mitocondri tramite l'aggiunta di enzimi proteolitici. I precursori delle proteine, possono quindi passare attraverso entrambe le membrane mitocondriali in una volta sola per entrare nella matrice. Il complesso TOM trasporta prima il segnale di indirizzo mitocondriale attraverso la membrana esterna nello spazio intermembrana, dove si lega un complesso TIM, aprendo il canale del complesso attraverso il quale la catena polipeptidica entra nella matrice o si inserisce nella membrana interna. Sebbene i complessi TOM team generalmente lavorino insieme per trasportare proteine attraverso ambedue le membrane in una volta sola, possono anche funzionare indipendentemente. I membrane isolate, per esempio, il complesso TOM può traslocare la sequenza segnale dei precursori delle proteine attraverso la membrana. In modo simile, i mitocondri con membrane esterne rotte, il complesso TIM23 esposto sulla loro superficie può importare in modo efficiente precursori delle proteine nello spazio della matrice.

## PEROSSISOMI

Singola membrana, importano tutte le proteine dall'esterno. Presentano enzimi ossidativi come *catalasi* e *urato ossidasi*. Talvolta questi enzimi costituiscono un nucleo cristalloide.

Sfruttano l'ossigeno: probabilmente lo sviluppo dei mitocondri li ha resi obsoleti, accoppiando alle reazioni con l'ossigeno la produzione di ATP. Usano ossigeno per rimuovere idrogeni da substrati specifici in una reazione che produce acqua ossigenata ( $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$ ). La catalasi sfrutta l'acqua ossigenata per ossidare altri substrati.

Quando essa però si accumula in eccesso viene convertita in acqua ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ). Nei perossisomi avvengono la  $\beta$  ossidazione delle catene alchiliche degli acidi grassi che vengono convertiti in acetil CoA e la formazione dei plasmalogeni, fondamentali fosfolipidi nella mielina. Una sequenza specifica di tre amminoacidi (Ser-Lys-Leu) al C-term (o talvolta all' N- term) di molte proteine funge da segnale di importazione nei perossisomi.

Il meccanismo di importazione coinvolge recettori proteici solubili nel citosol, le perossine (che formano un traslocatore transmembrana) ed è spinto dall'idrolisi di ATP. Almeno la perossina Pex5 accompagna la proteina durante l'intera traslocazione e dopo aver rilasciato il carico ricicla nel citosol. **SINDROME DI ZELLWEGER:** difetto delle proteine di importazione nel perossisoma, i perossisomi si presentano "vuoti". È dovuta alla mutazione di un gene che codifica per Pex2. Implica anomalie cerebrali, nel fegato e nei reni. La maggior parte delle proteine di membrana dei perossisomi è prodotta nel citosol ma altre sono prima integrate nella membrana dell'ER da cui possono formare vescicole specializzate che sono i precursori dei perossisomi che possono importare altre proteine per formare perossisomi maturi.