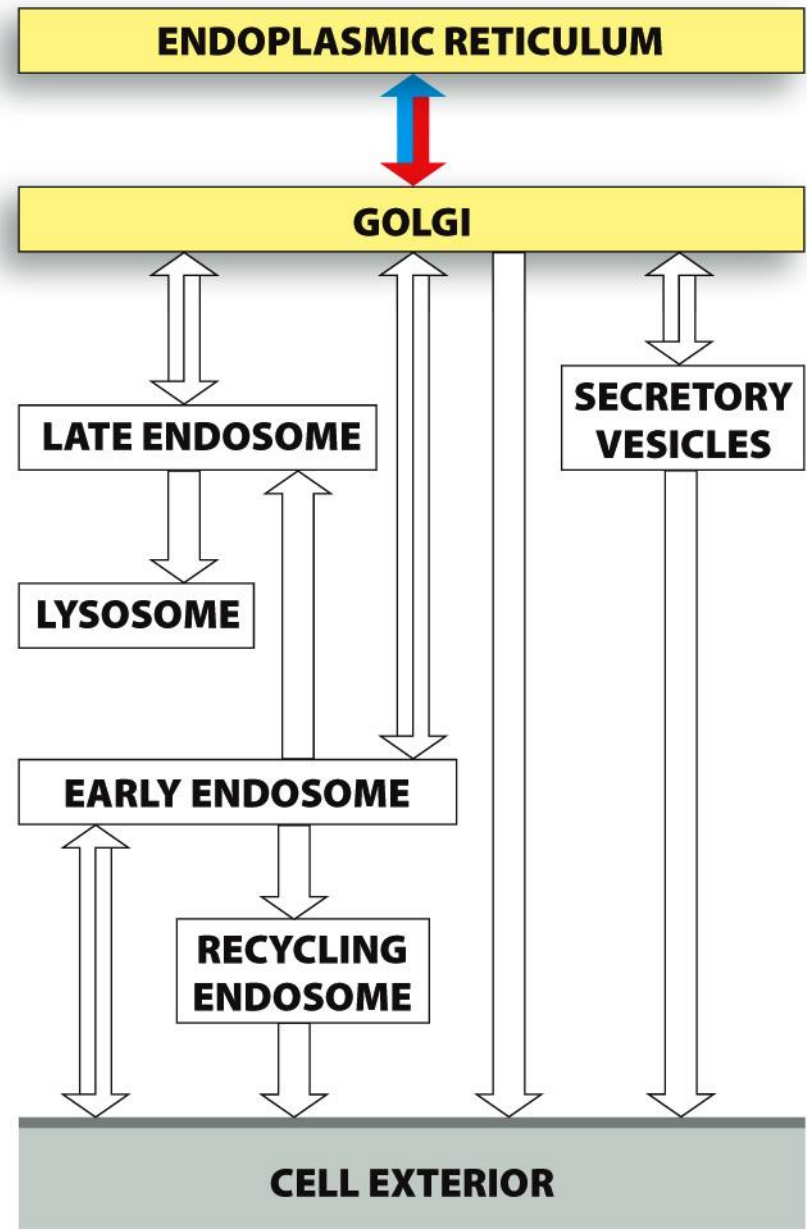


Trasporto vescicolare – Reticolo endoplasmico → Golgi

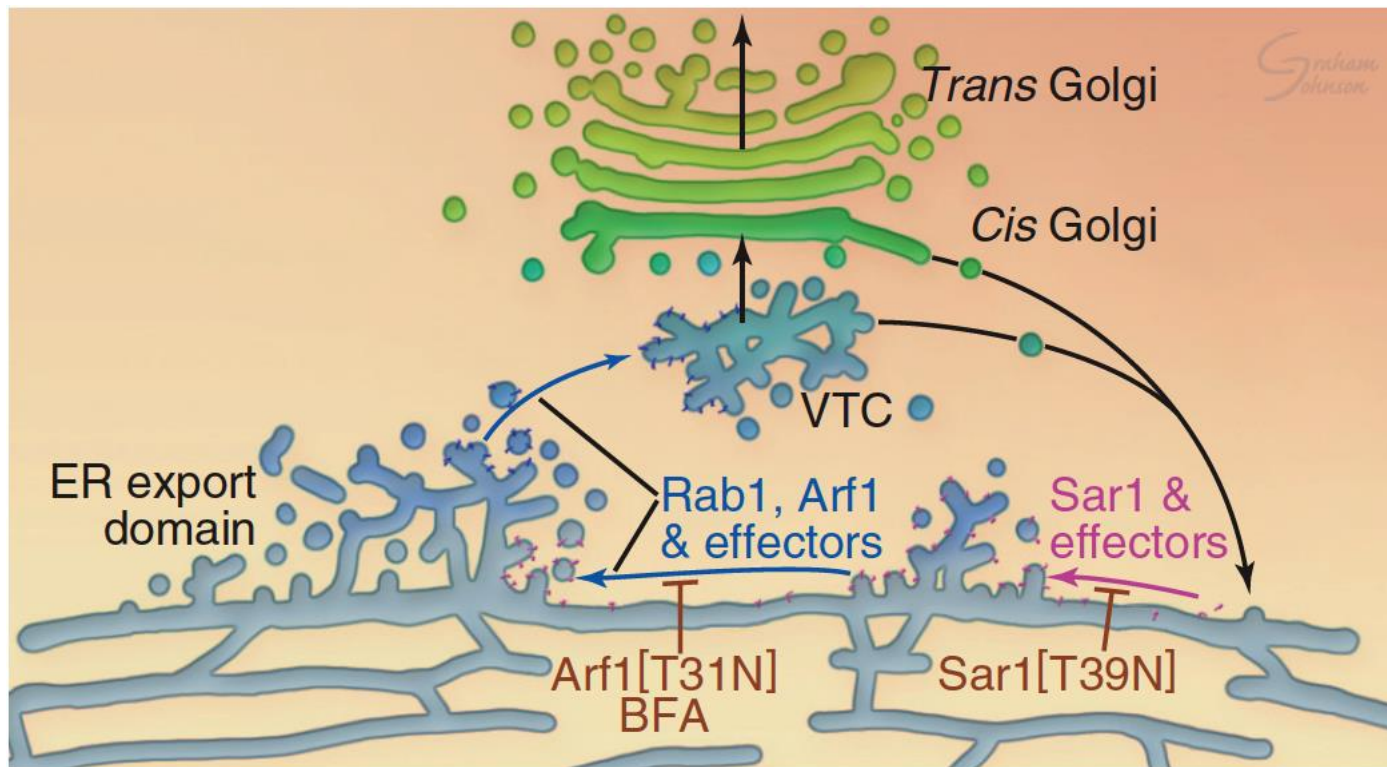
Trasporto dal RE al Golgi

- Le proteine in uscita dal RE sono sottoposte ad un controllo di qualità
- Solo le proteine correttamente ripiegate possono lasciare il RE
- Altrimenti vengono rimandate al citosol per essere degradate
- Le cellule quindi producono un largo eccesso di proteine



Le vescicole gemmano dai **siti di uscita dal RE** privi di ribosomi (export domains).

Le proteine possono distribuirsi passivamente, oppure avere dei segnali di smistamento, oppure ripartirsi nel doppio strato in base alle proprie caratteristiche fisico-chimiche.



© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

TABLE 17-2 Known Sorting Signals That Direct Proteins to Specific Transport Vesicles

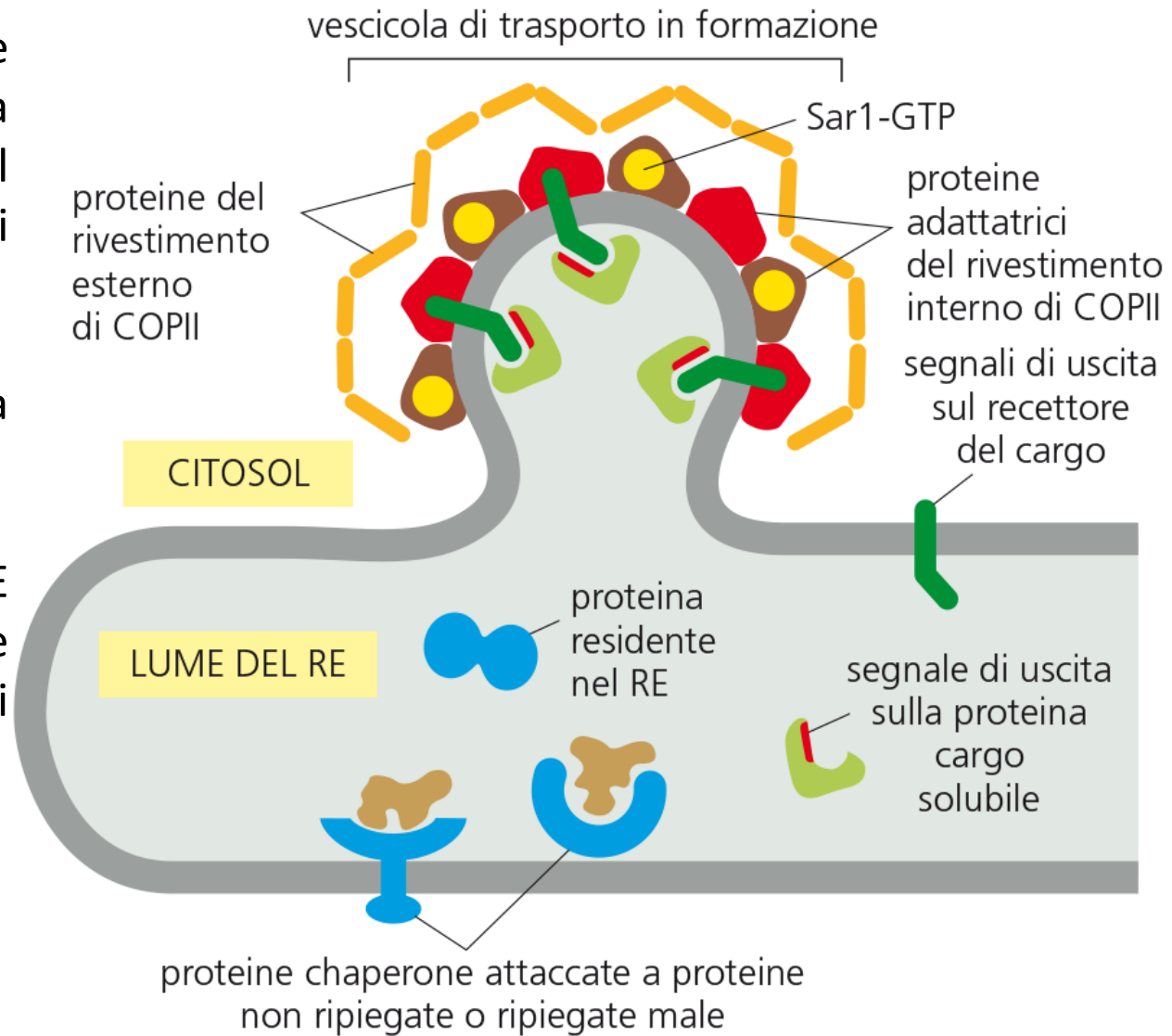
Signal Sequence*	Proteins with Signal	Signal Receptor	Vesicles That Incorporate Signal-bearing Protein
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	ER-resident luminal proteins	KDEL receptor in <i>cis</i> -Golgi membrane	COPI
Lys-Lys-X-X (KKXX)	ER-resident membrane proteins (cytosolic domain)	COPI α and β subunits	COPI
Di-acidic (e.g., Asp-X-Glu)	Cargo membrane proteins in ER (cytosolic domain)	COPII Sec24 subunit	COPII
Mannose 6-phosphate (M6P)	Soluble lysosomal enzymes after processing in <i>cis</i> -Golgi	M6P receptor in <i>trans</i> -Golgi membrane	Clathrin/AP1
	Secreted lysosomal enzymes	M6P receptor in plasma membrane	Clathrin/AP2
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	LDL receptor in the plasma membrane (cytosolic domain)	AP2 complex	Clathrin/AP2
Tyr-X-X- Φ (YXX Φ)	Membrane proteins in <i>trans</i> -Golgi (cytosolic domain)	AP1 (μ 1 subunit)	Clathrin/AP1
	Plasma membrane proteins (cytosolic domain)	AP2 (μ 2 subunit)	Clathrin/AP2
Leu-Leu (LL)	Plasma membrane proteins (cytosolic domain)	AP2 complexes	Clathrin/AP2

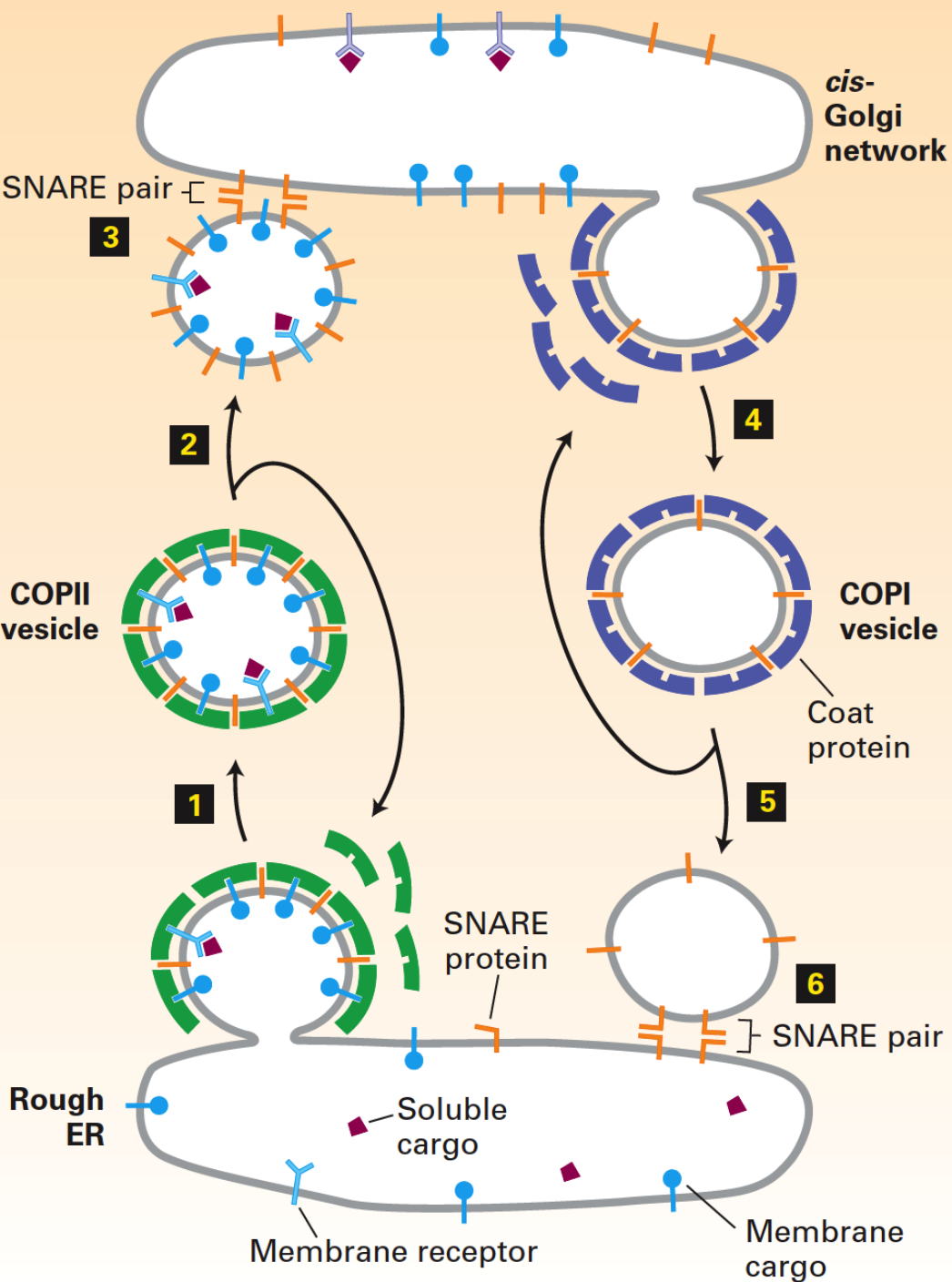
*X = any amino acid; Φ = hydrophobic amino acid. Single-letter amino acid abbreviations are in parentheses.

Le proteine lasciano il RE in vescicole rivestite di COPII

Le proteine hanno sequenze segnale riconosciute da proteine adattatrici del rivestimento interno di COPII.

Le proteine della membrana vengono riconosciute dalle proteine adattatrici, quelle del lume del RE hanno segnali che le attaccano ai recettori transmembrana del cargo.





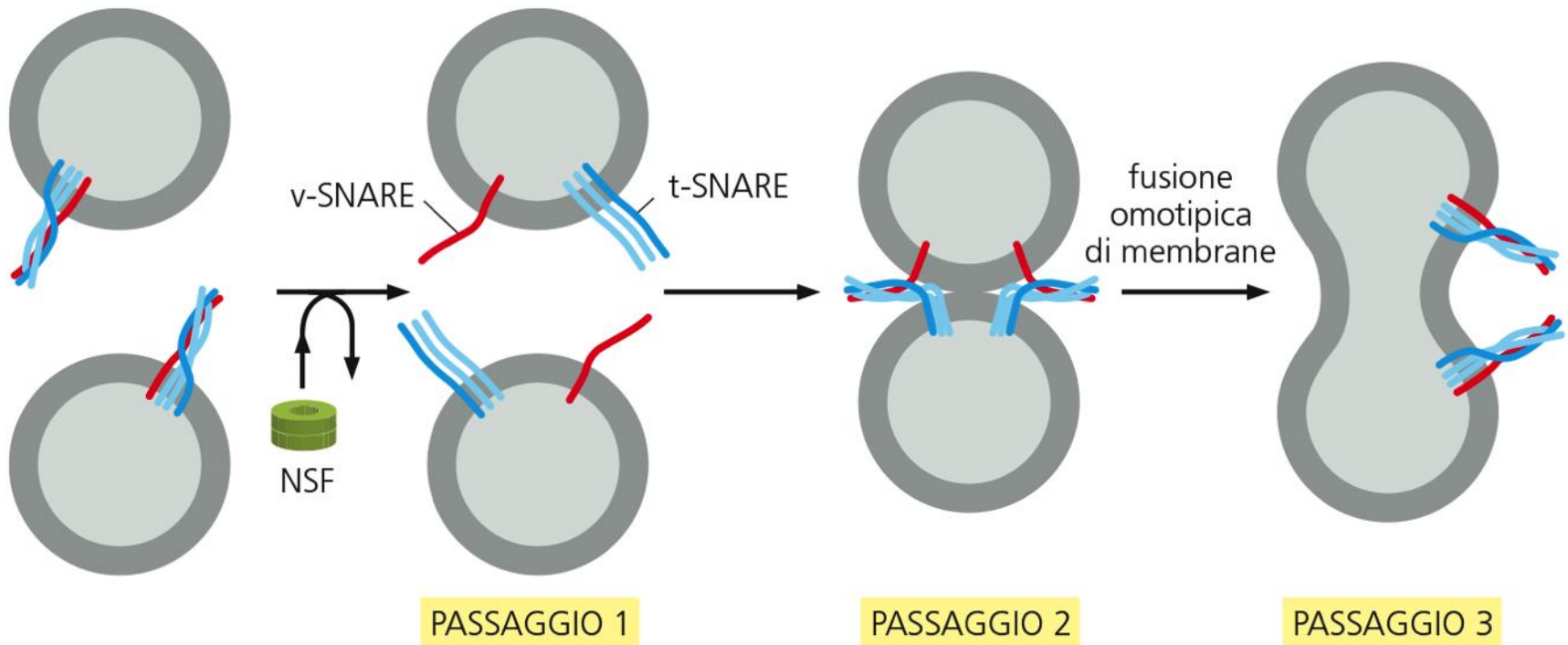
1-3 trasporto anterogrado mediato da COPII

4-5 trasporto retrogrado mediato da COPI

IL CONTROLLO QUALITA' nel RE

- Il RE esercita un controllo di qualità sulle proteine in uscita
- Solo le proteine correttamente foldate possono lasciare il RE
- Quelle non correttamente foldate vengono legate dagli chaperoni e inviate al proteasoma
- In alcuni casi viene degradato più del 90% della proteina sintetizzata (recettore dell'acetilcolina)
- In altri casi questo rigido controllo è un problema (mutanti CFTR, fibrosi cistica → canale per il trasporto del Cl^- non correttamente foldato ma potrebbe funzionare se non fosse trattenuto dal sistema di controllo qualità del RE)

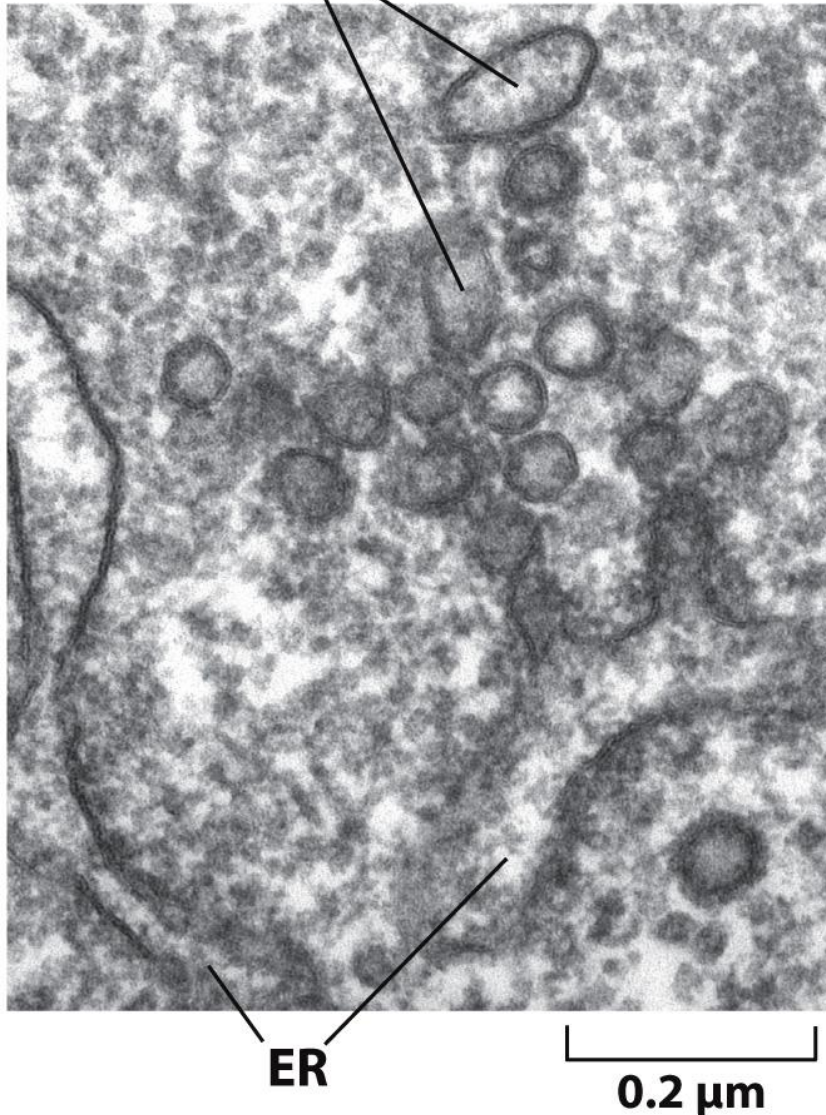
Il trasporto dal RE al Golgi è mediato dai **GRUPPI VESICOLARI TUBULARI**



Una volta gemmate le vescicole si fondono tra di loro (**fusione omotipica**). Questa fusione è mediata da v-SNARE e t-SNARE fornite da entrambe le membrane.

Le strutture di fusione sono dette **gruppi vescicolari tubulari**.

vesicular tubular cluster



I gruppi vescicolari tubulari costituiscono un compartimento separato dal RE.

Si muovono rapidamente lungo i microtubuli, assistiti dal complesso motorio dineina-dinactina, verso il Golgi.

Figure 13-24a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

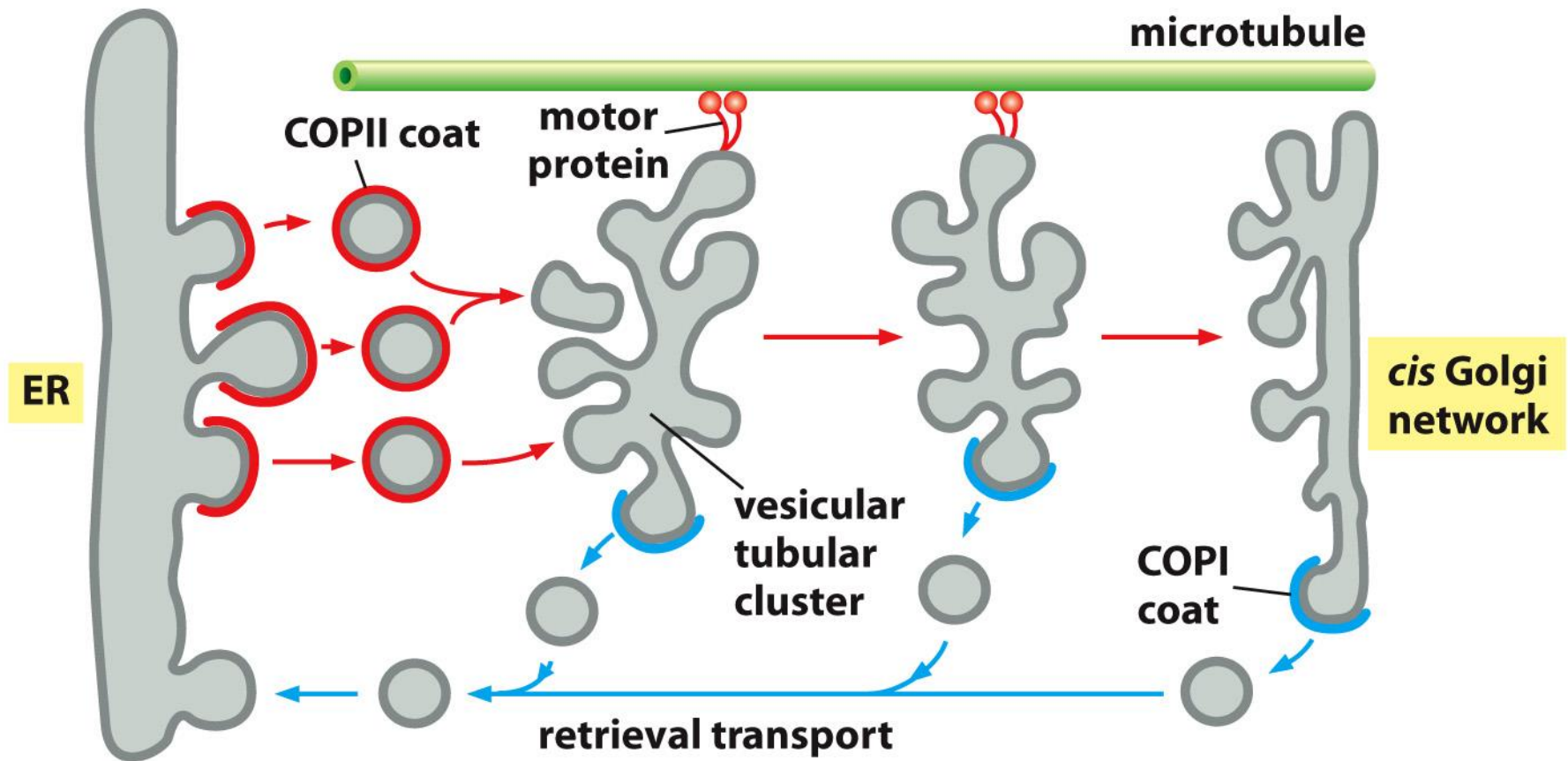


Figure 13-24b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

I gruppi vescicolari tubulari gemmano vescicole di trasporto **COPI**, rivestite da **coatomeri**.

Queste vescicole sono una **via di recupero** che riporta al RE proteine sfuggite, SNARE e recettori del cargo.

Segnali di smistamento della via di recupero verso il RE

vesicular tubular cluster
or Golgi apparatus

soluble ER
resident protein

KDEL

empty
KDEL
receptor

COPI
coat

- Il segnale di recupero per le proteine di membrana del RE è la **sequenza KKXX** al C-term, che lega il rivestimento COPI.
- Le proteine residenti nel lume del RE contengono la **sequenza KDEL** al C-term e si legano ai **recettori del KDEL**, per essere impacchettate nelle vescicole rivestite da COPI.

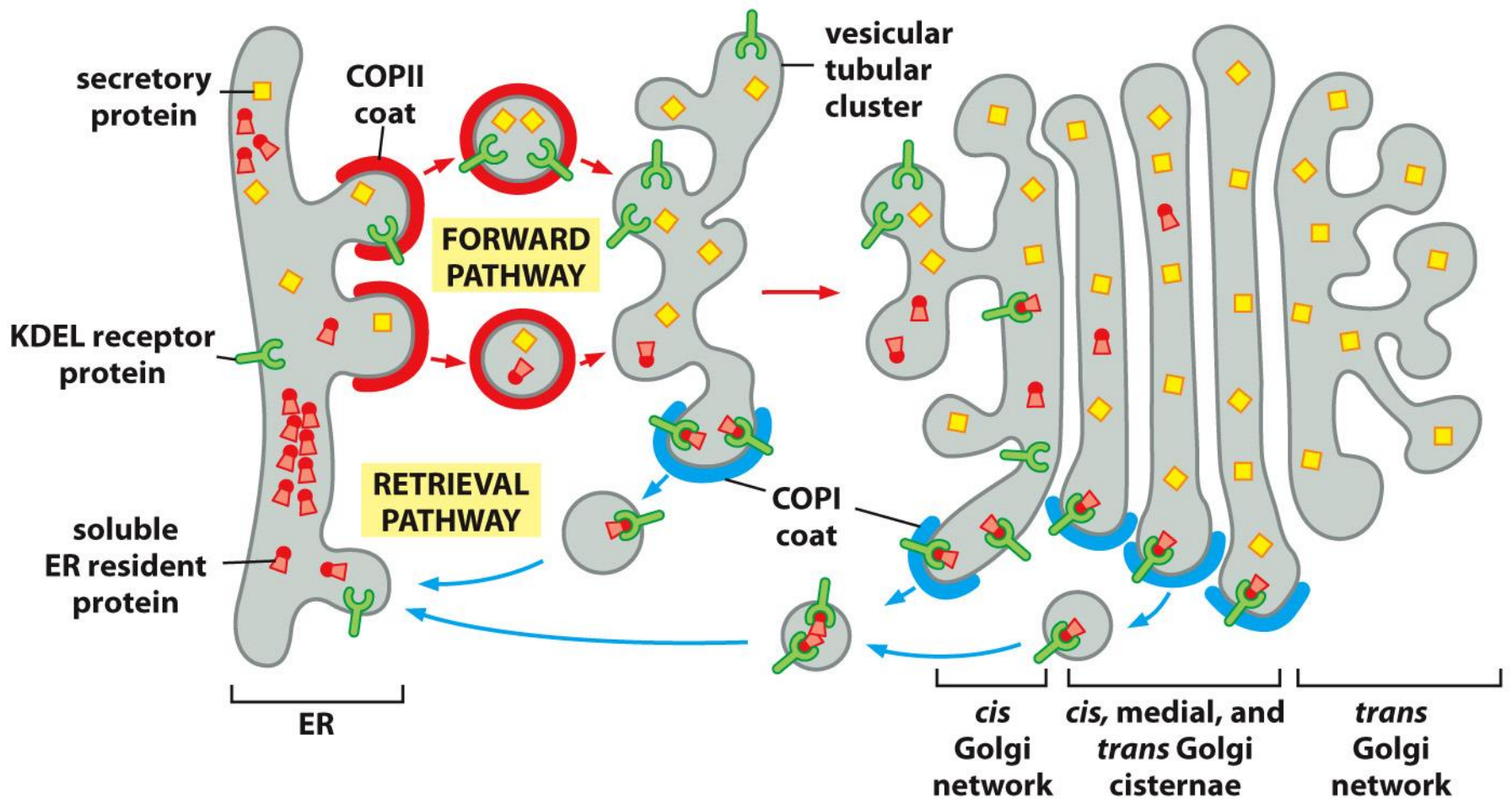


Figure 13-25b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

I recettori del KDEL circolano tra il RE e il Golgi e la loro affinità per la sequenza KDEL è maggiore nei gruppi vescicolari tubulari e nel Golgi (per catturare le proteine del RE) e minore nel RE (per rilasciarle).

Higher H^+ concentration (lower pH), peptide binding

cis-Golgi network

Missorted ER-resident protein
KDEL peptide

KDEL receptor

COPI coat

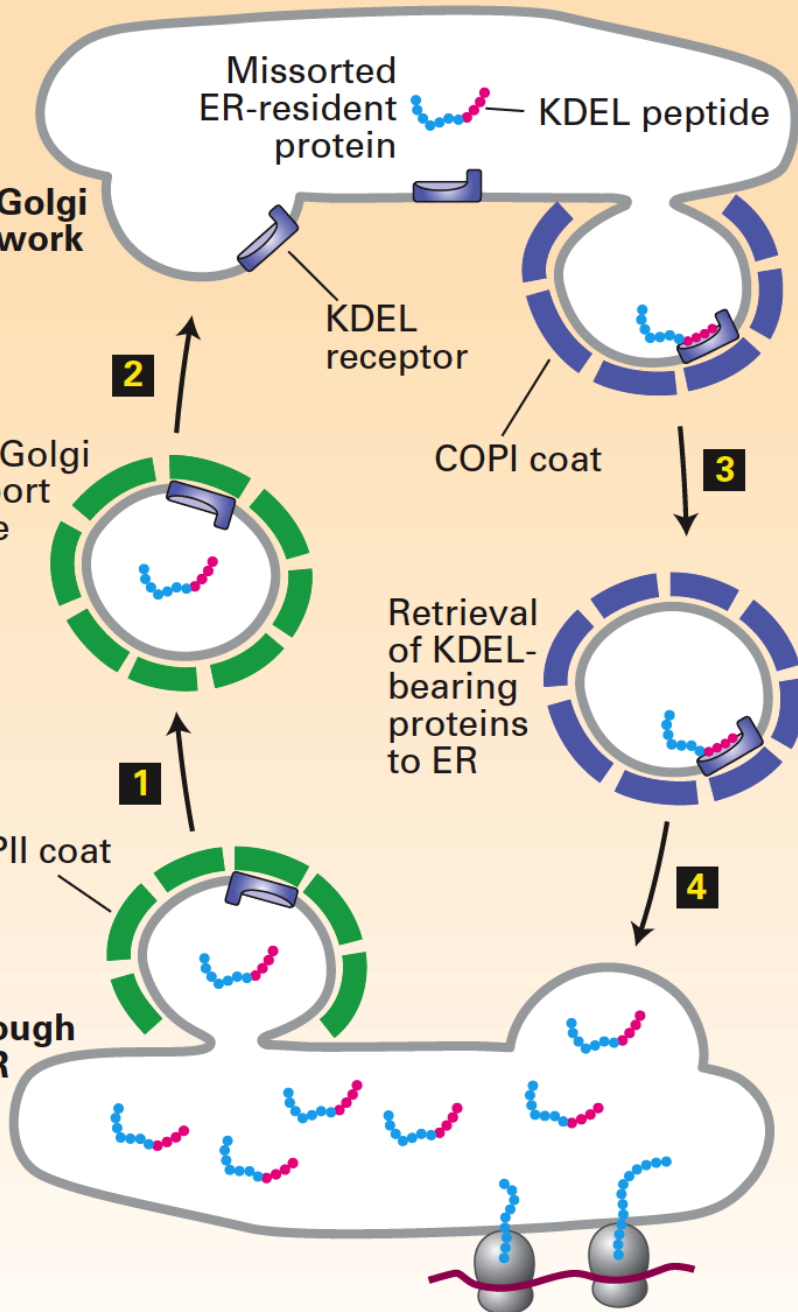
ER-to-Golgi transport vesicle

Retrieval of KDEL-bearing proteins to ER

COPII coat

Rough ER

Lower H^+ concentration (higher pH), peptide release



La diversa affinità è dovuta al **diverso pH** (minore nel Golgi, grazie a pompe H^+).

Le proteine residenti nel RE sono trattenute anche da altri meccanismi. Si ipotizza che formino dei **complessi, troppo grossi per entrare nelle vescicole** e quindi per uscire dal RE.

L'apparato di Golgi è costituito da una serie ordinata di compartimenti

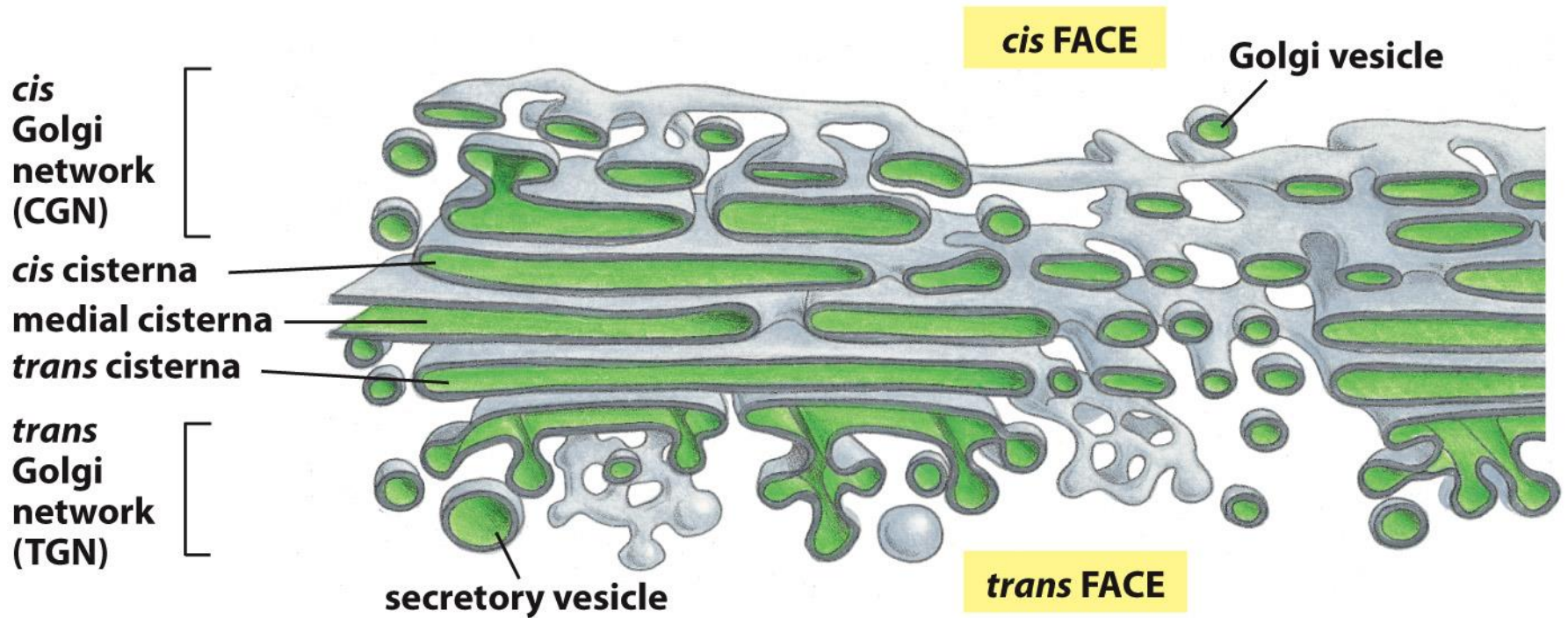


Figure 13-26a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

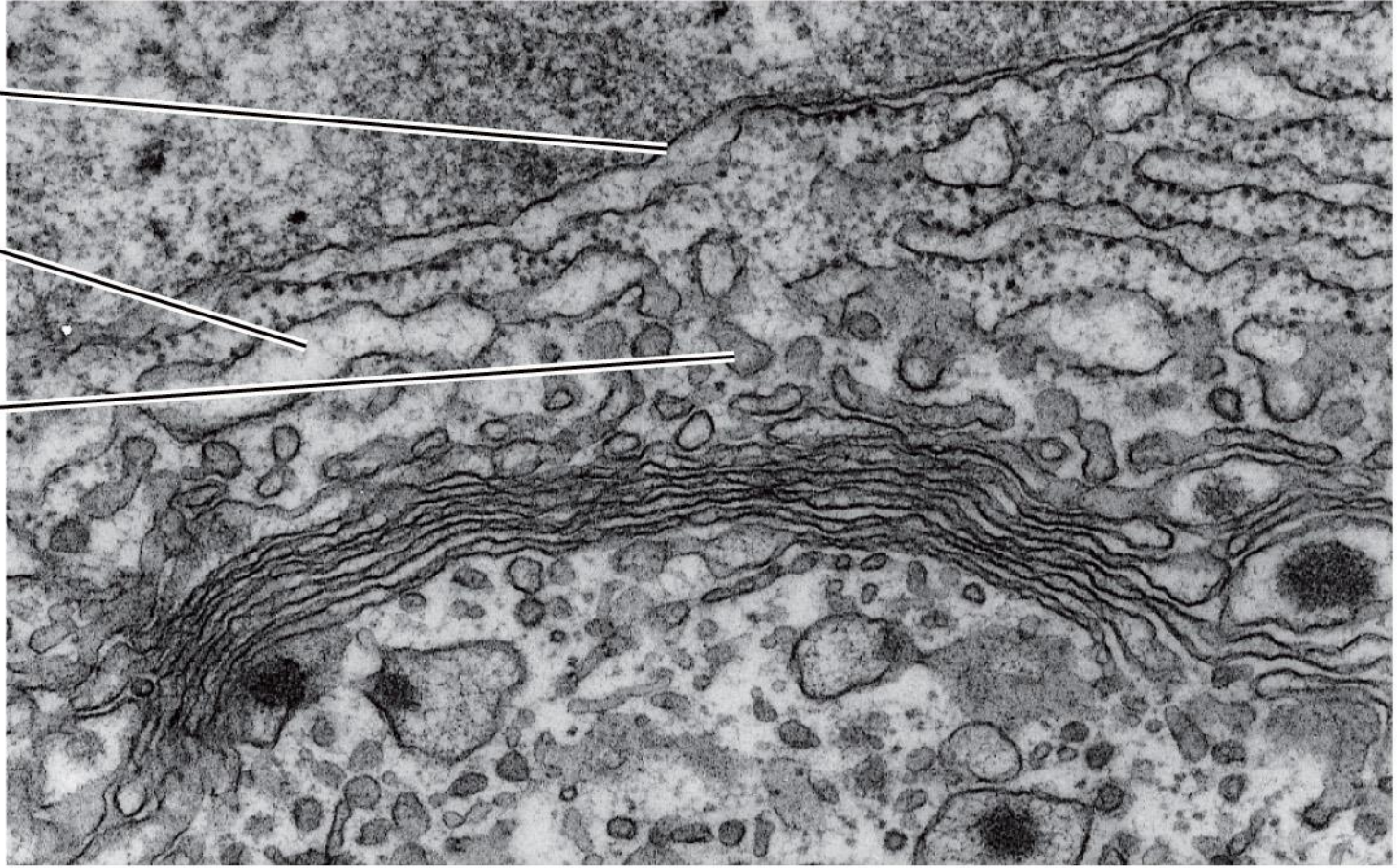
E' formato da cisterne, che nelle cellule animali sono collegate fra loro da connessioni tubulari, tenute insieme da microtubuli.

Ogni pila di cisterne ha una faccia cis e una faccia trans, associate rispettivamente al reticolo del cis-Golgi (CGN) e al reticolo del trans-Golgi (TGN).

nuclear envelope

rough ER

vesicular tubular clusters

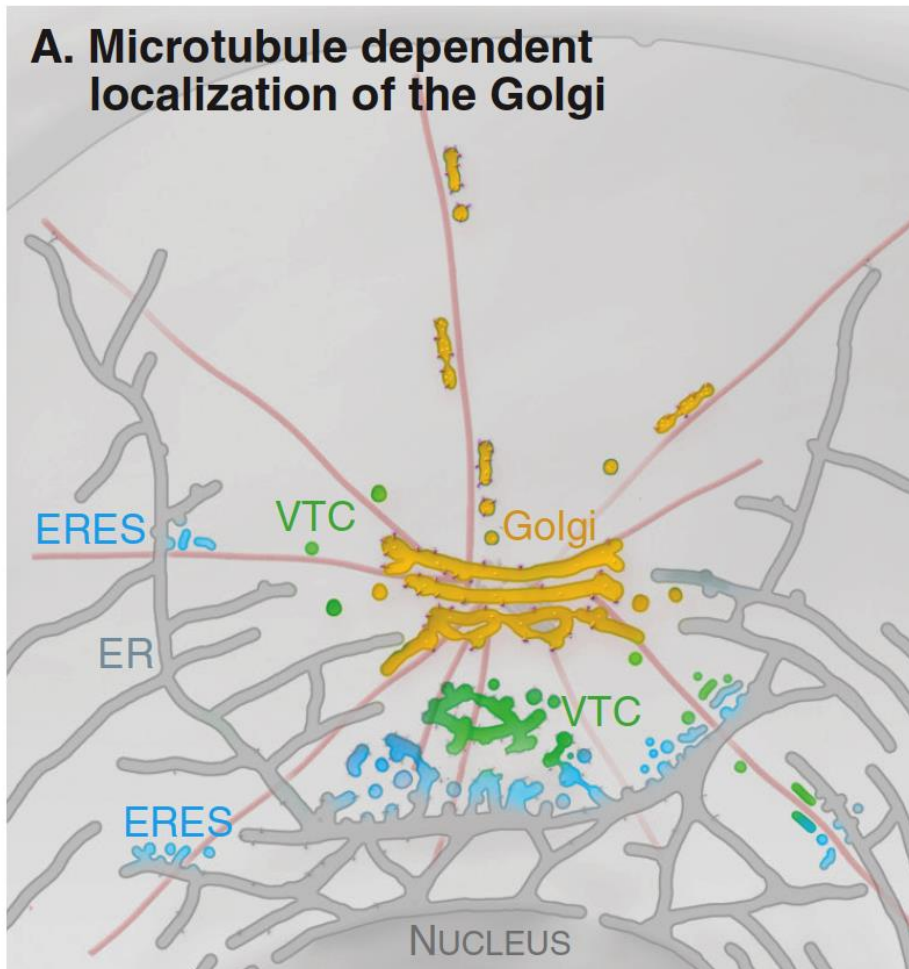


1 μ m

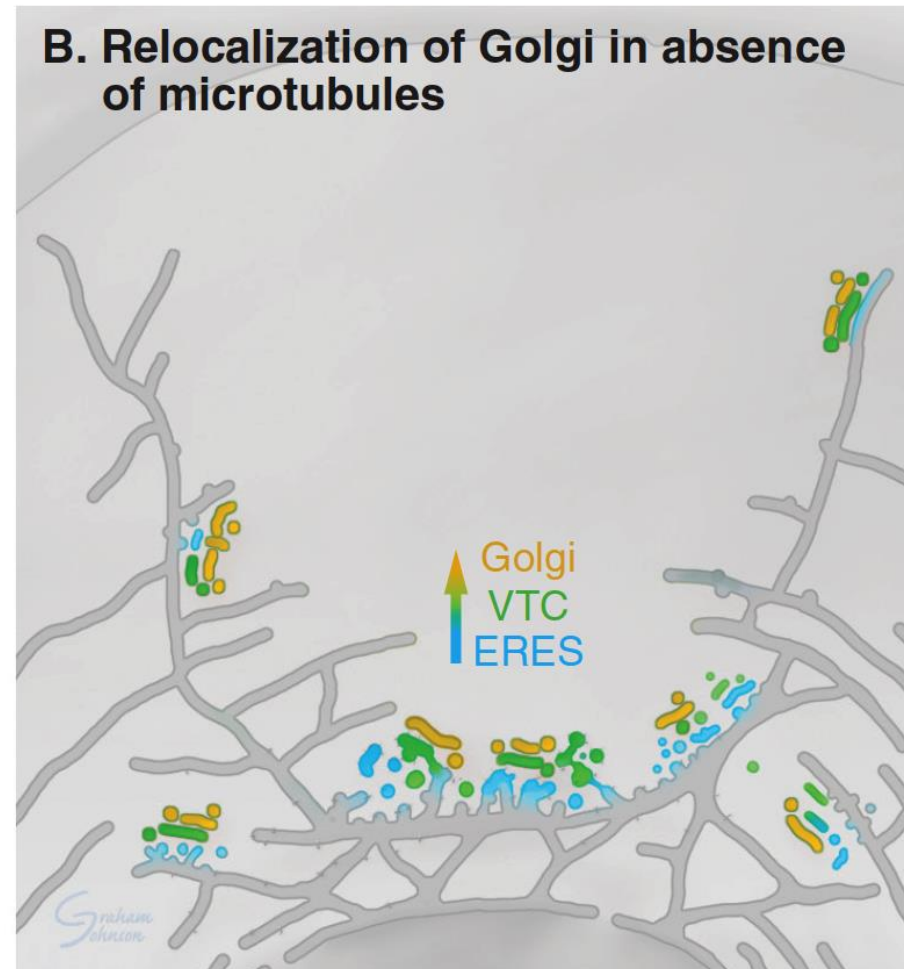
Figure 13-26b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Se i microtubuli vengono depolimerizzati, il Golgi delle cellule animali perde la sua struttura e diventa simile a quello delle cellule vegetali (= pile di cisterne individuali vicine ai siti di uscita del RE)

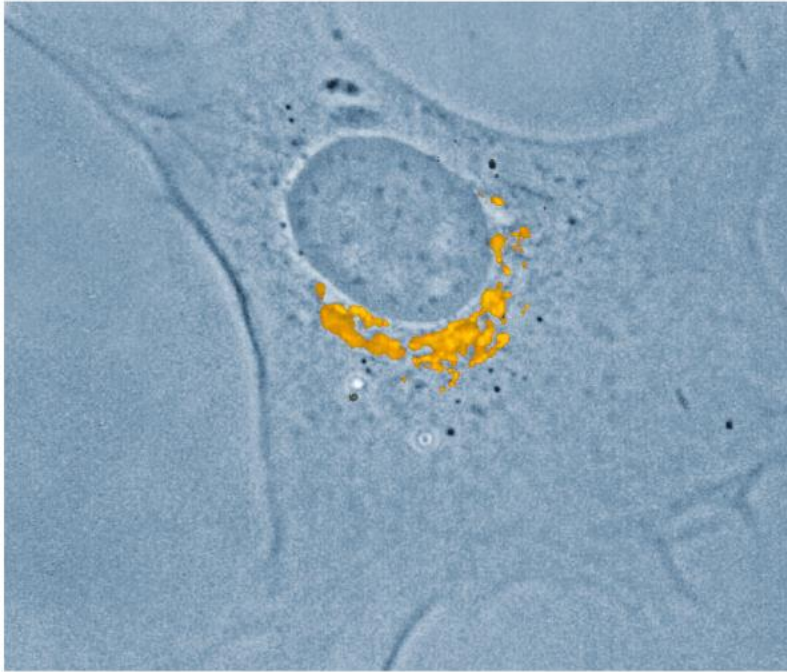
A. Microtubule dependent localization of the Golgi



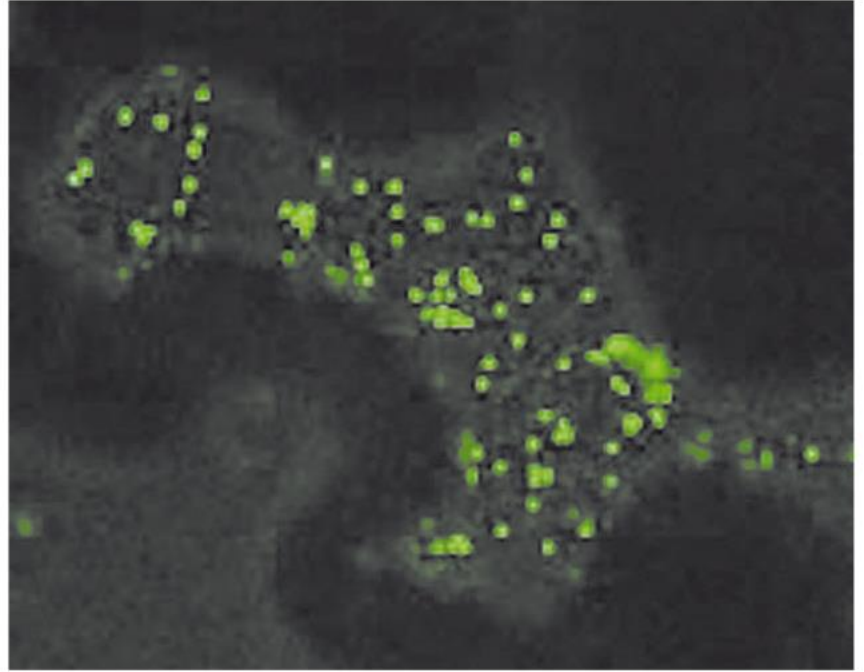
B. Relocalization of Golgi in absence of microtubules



L'apparato di Golgi in una cellula animale (A) e vegetale (B)



(A)



(B)

Le proteine del Golgi sono tutte legate alla membrana.

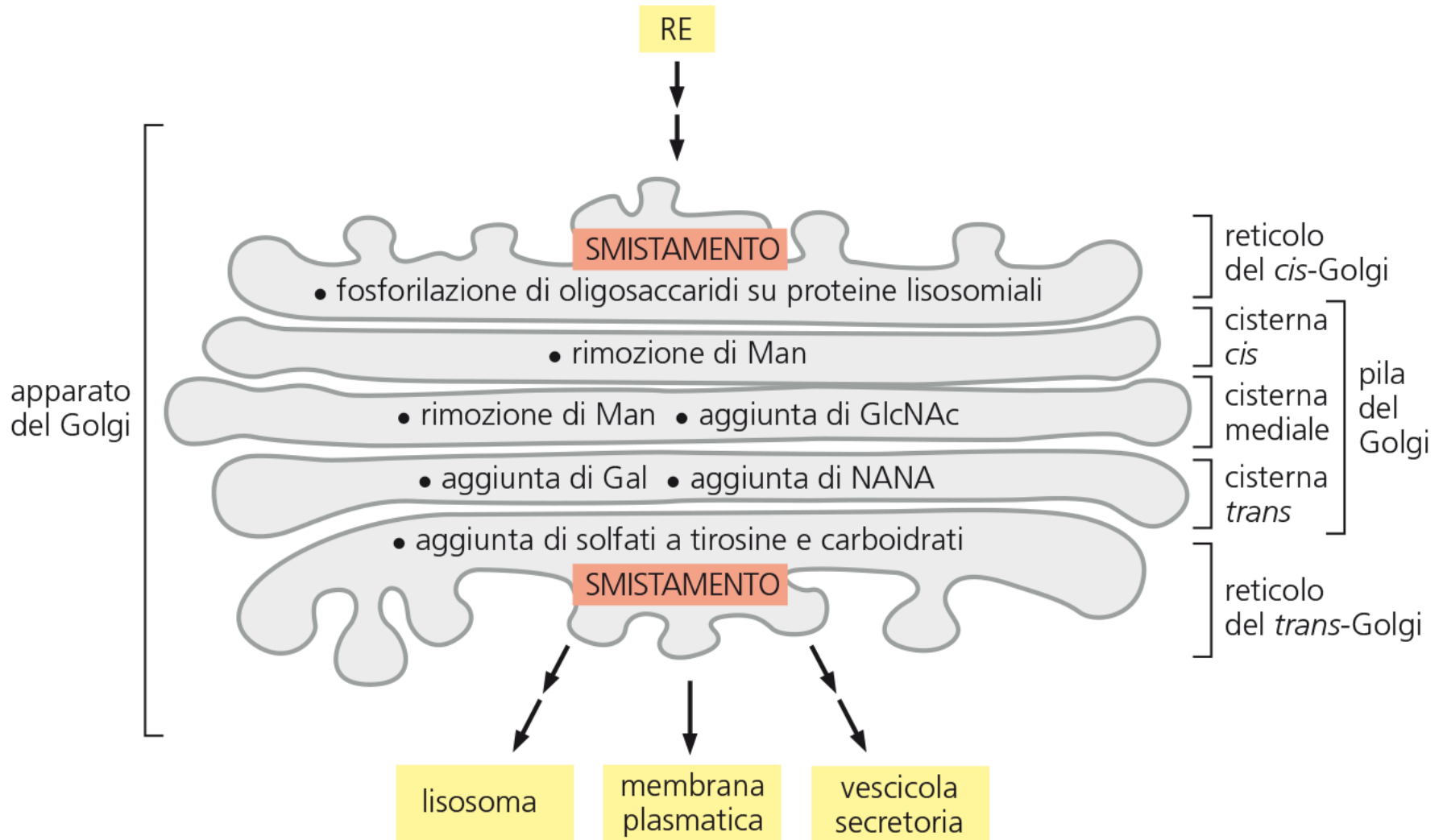
Glicosidasi e glicosil transferasi sono proteine transmembrana a singolo passaggio, spesso organizzate in complessi multi-enzimatici.

Ricapitolando:

MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI NELLA VIA SECRETORIA

- Formazione di ponti disolfuro (solo nell'ER)
- Ripiegamento assistito da chaperoni (solo nell'ER)
- Assemblaggio delle subunità di proteine oligomeriche (solo nell'ER)
- Addizione e rimaneggiamento di carboidrati (= *glicosilazione*)
- Maturazione proteolitica mediante proteolisi limitata (rimozione delle *sequenze segnale* nell'ER e delle *prosequenze* nelle vescicole secretorie)

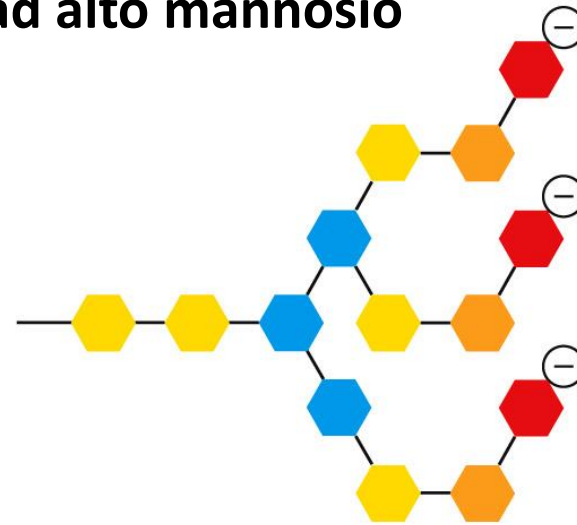
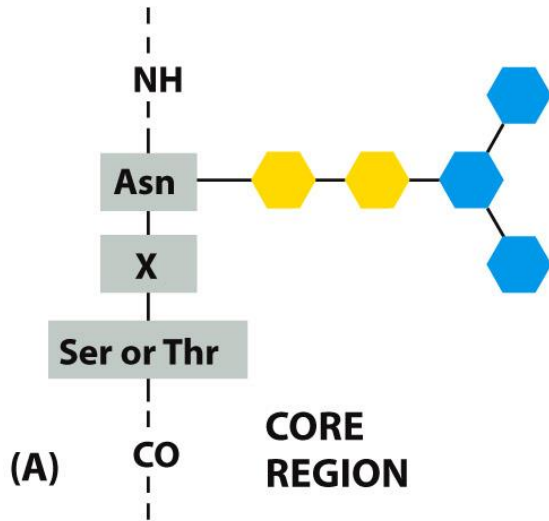
Le catene degli oligosaccaridi sono processate sul Golgi da enzimi che si trovano sulla membrana



N-glicosilazione

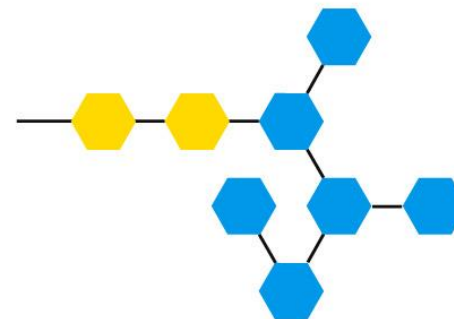
Gli oligosaccaridi legati in N alle proteine appartengono a 2 categorie:

1. Oligosaccaridi complessi
2. Oligosaccaridi ad alto mannosio

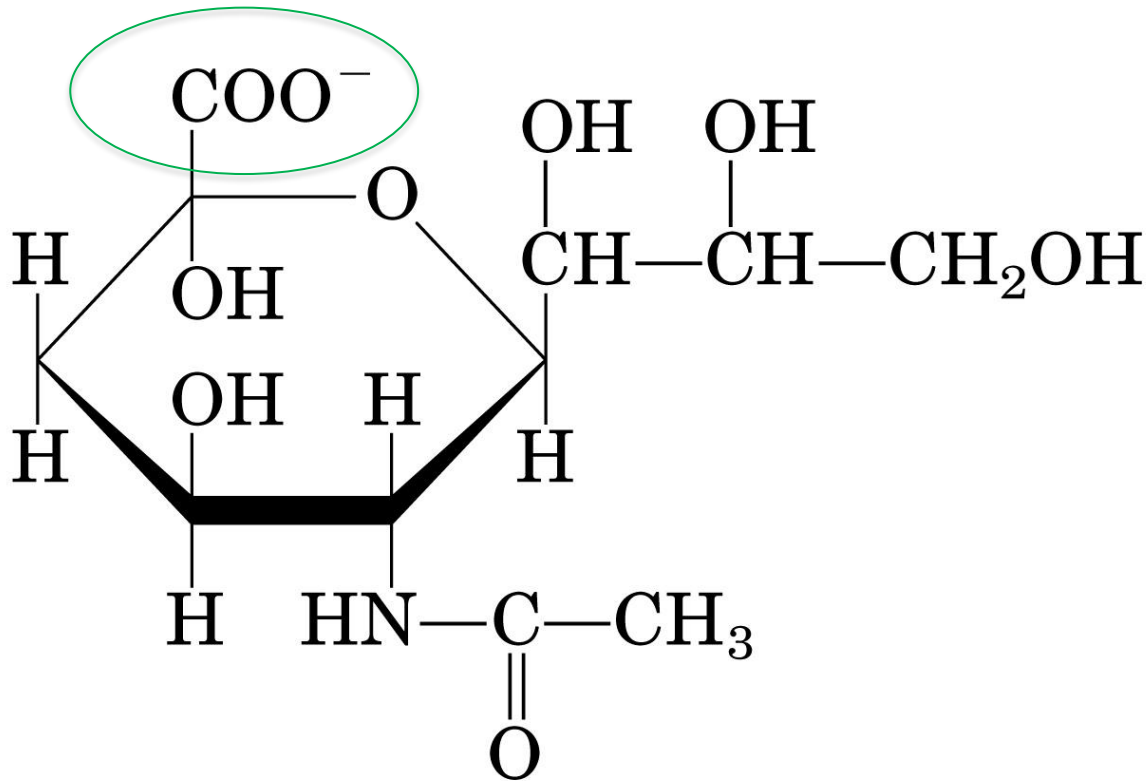


KEY

- = N-acetylglucosamine (GlcNAc)
- = mannose (Man)
- = galactose (Gal)
- = N-acetylneuraminic acid (sialic acid, or NANA)



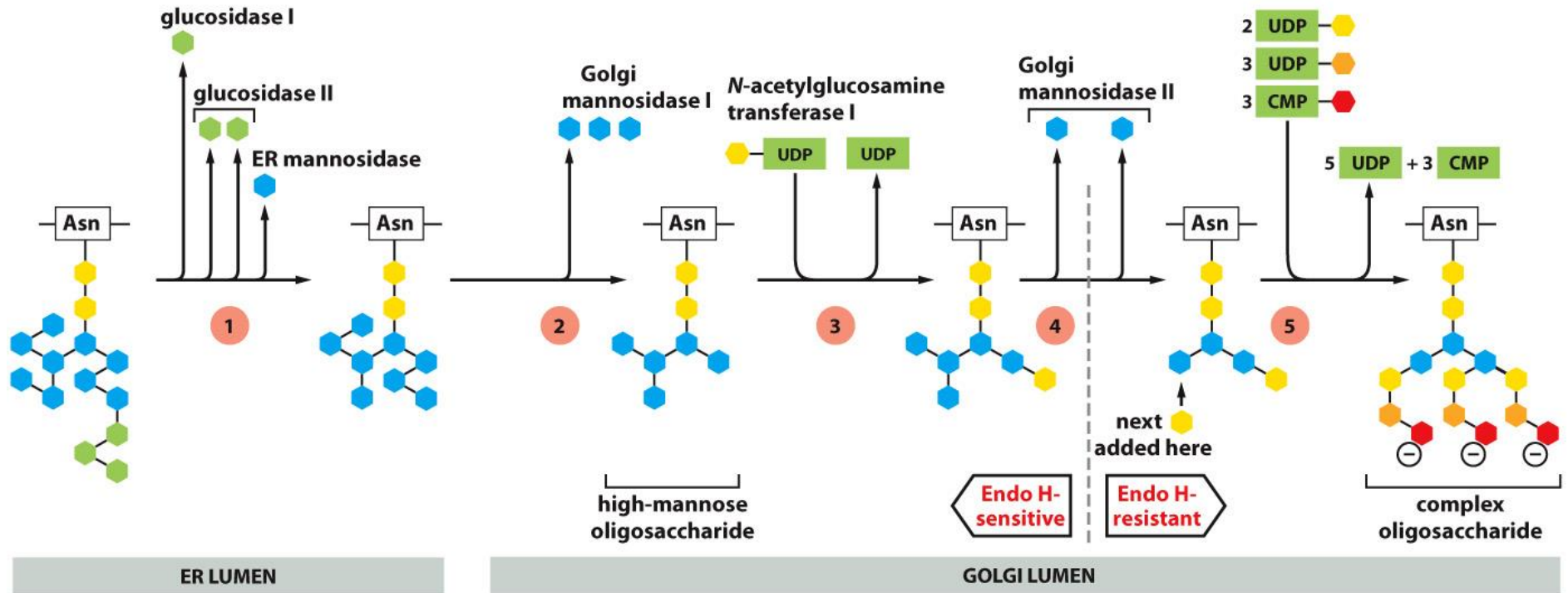
Acido sialico



N-Acetylneuraminic acid (sialic acid)
(Neu5Ac)

L'acido sialico (identificato nella saliva) è importante perché è carico negativamente.

Sempre su proteine di membrana sul lato esterno.



KEY:

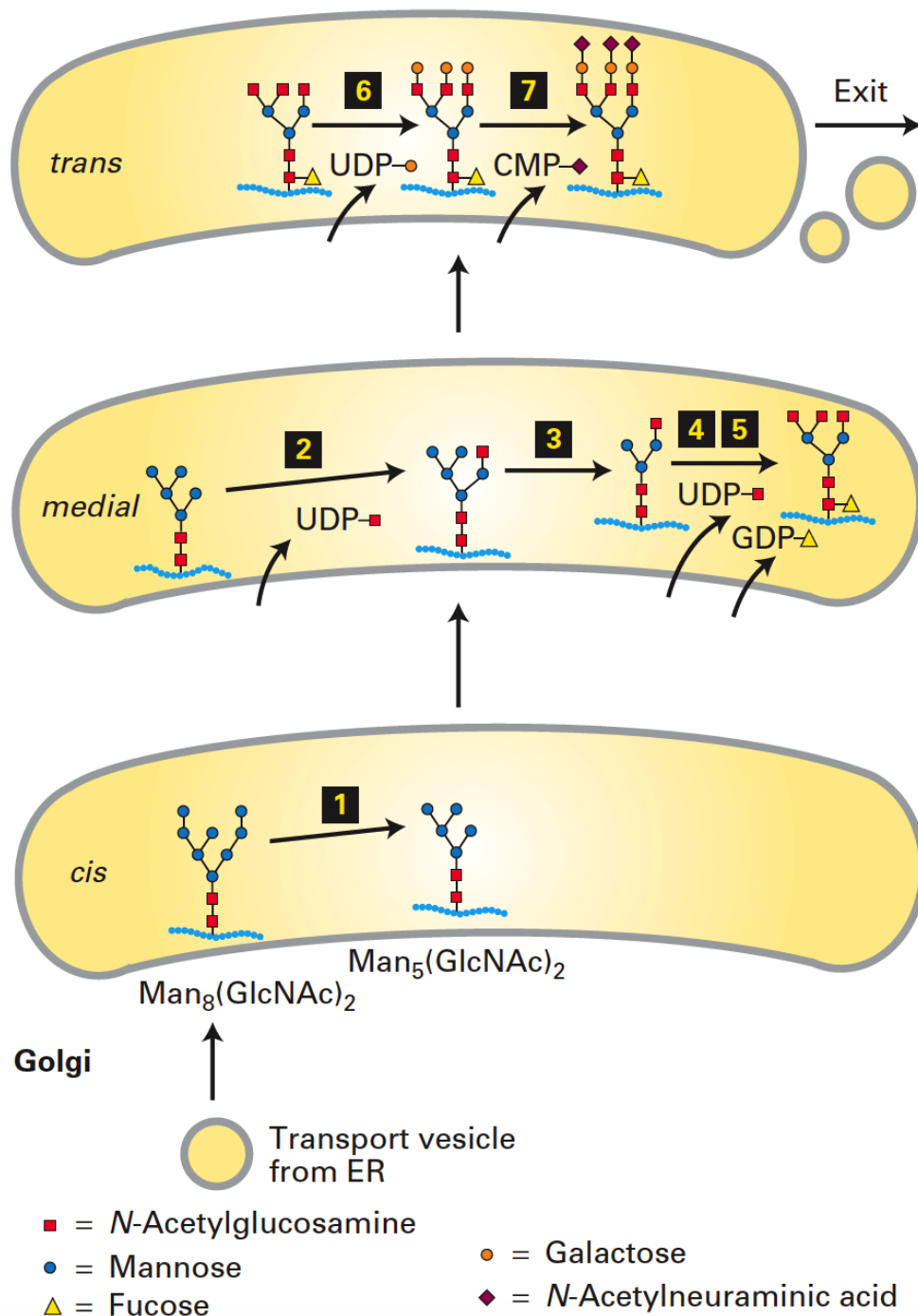
● = N-acetylglucosamine (GlcNAc) ● = mannose (Man) ● = glucose (Glc) ● = galactose (Gal) ●⁻ = N-acetylneuraminic acid (sialic acid, or NANA)

Figure 13-31 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

L'oligosaccaride originario viene aggiunto nel RE.

- Gli oligosaccaridi complessi vengono tagliati nel Golgi e vengono aggiunti altri zuccheri.
- Gli oligosaccaridi ad alto mannosio vengono solo tagliati.

Il fatto che ad un oligosaccaride vengano aggiunti zuccheri dipende dalla sua posizione e accessibilità sulla proteina.



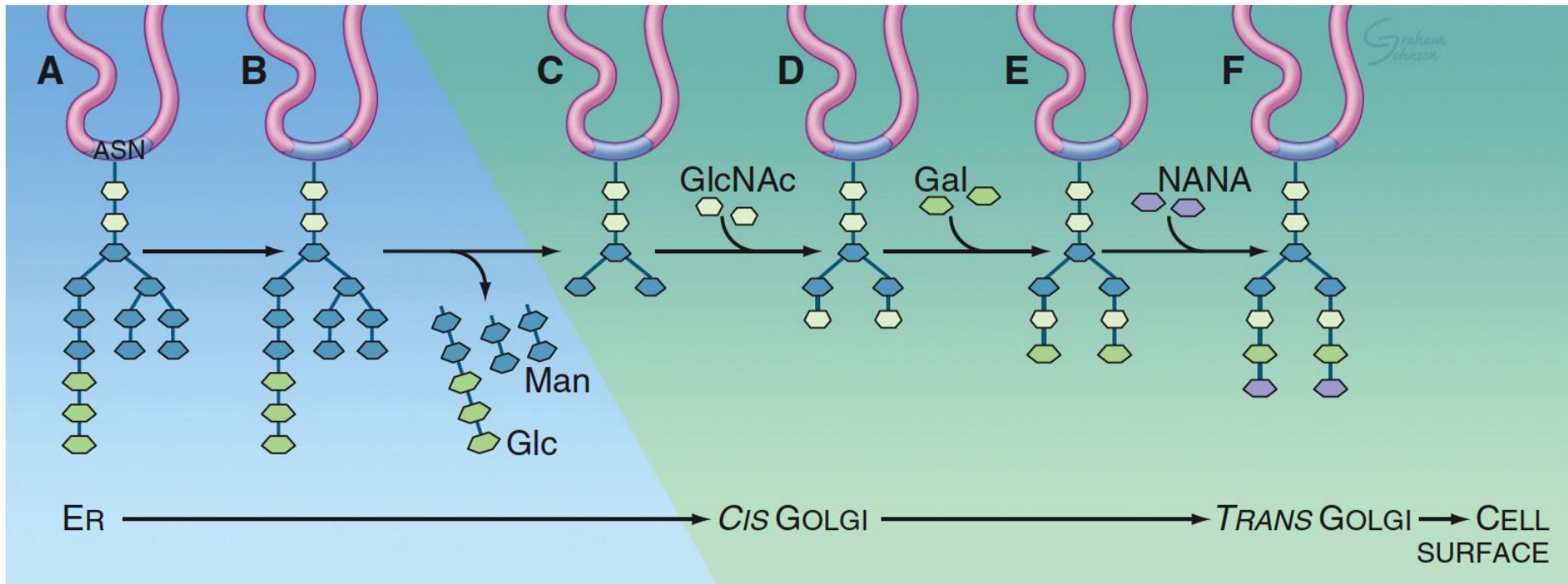
Processamento degli zuccheri dell'N-glicosilazione nel Golgi:

1. Nel cis Golgi: rimozione di 3 mannosì (1)
2. Nella cisterna mediana: aggiunta di 3 GlcNAc (1,4) rimozione di 2 Man (2) e aggiunta di 1 fucosio (5)
3. nel trans Golgi: aggiunta di 3 galattosio (6) e aggiunta di acido sialico (7)

Il genoma umano codifica per centinaia di glicosil transferasi del Golgi e molte glicosidasi

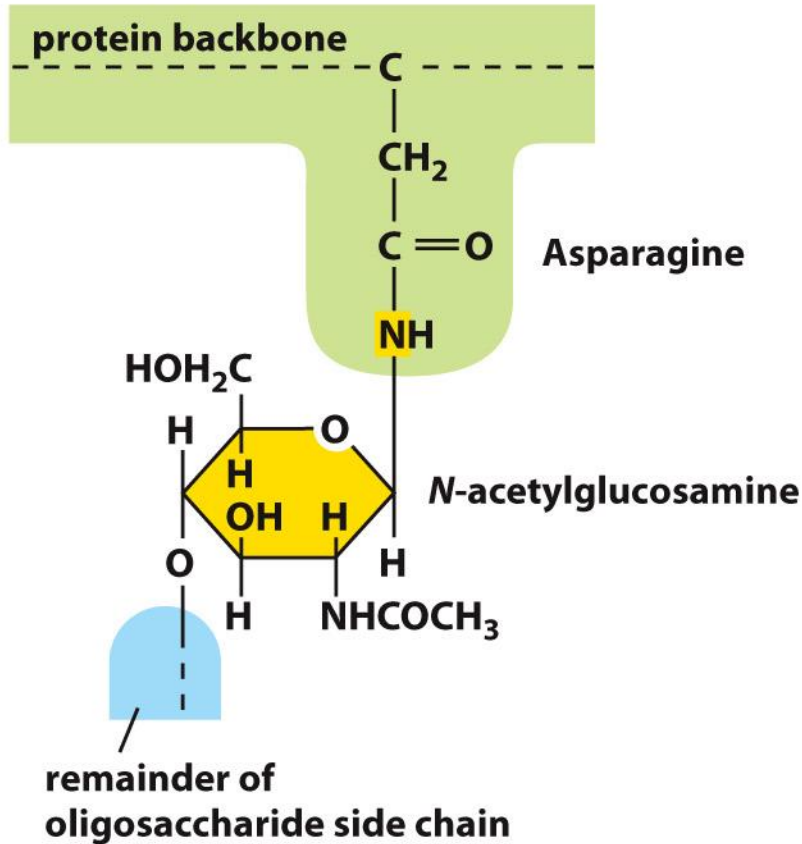
Glicosidasi diverse sono espresse in tipi cellulari diversi o in stadi del differenziamento diversi, dando origine a forme di glicosilazione diverse sulle proteine.

La **GLICOBIOLOGIA** studia la complessità delle glicosilazioni.



O-glicosilazione e proteoglicani

N-LINKED GLYCOSYLATION



O-LINKED GLYCOSYLATION

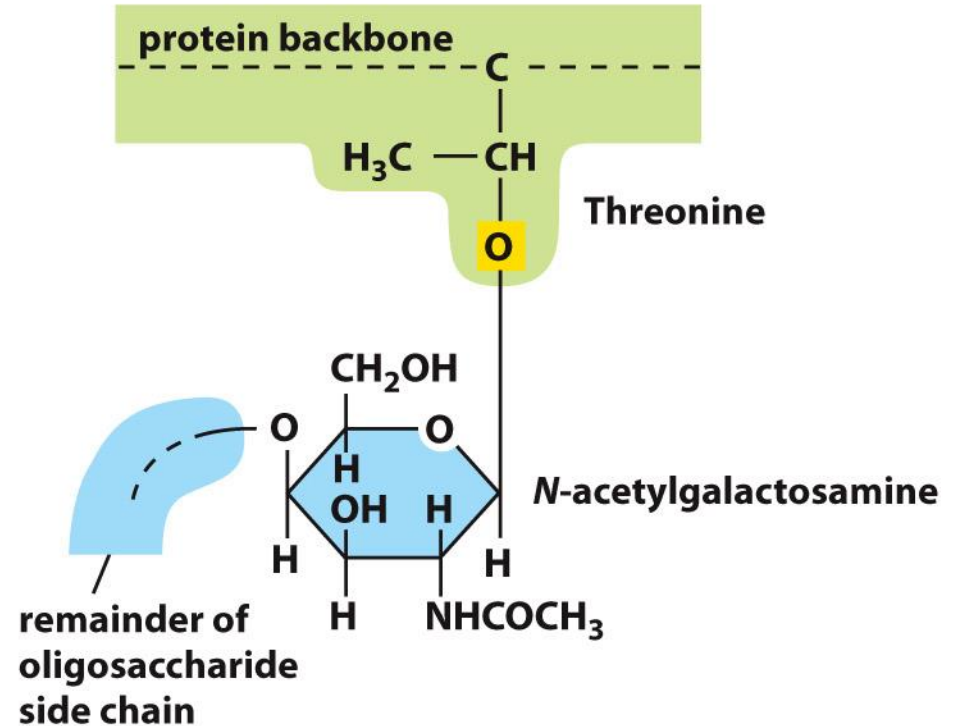


Figure 13-32 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Gli zuccheri possono essere anche legati in O alle proteine (su Ser e Thr).
La O-glicosilazione delle mucine e delle proteine dei proteoglicani è catalizzata da glicosil transferasi a partire da zuccheri nel lume del Golgi.

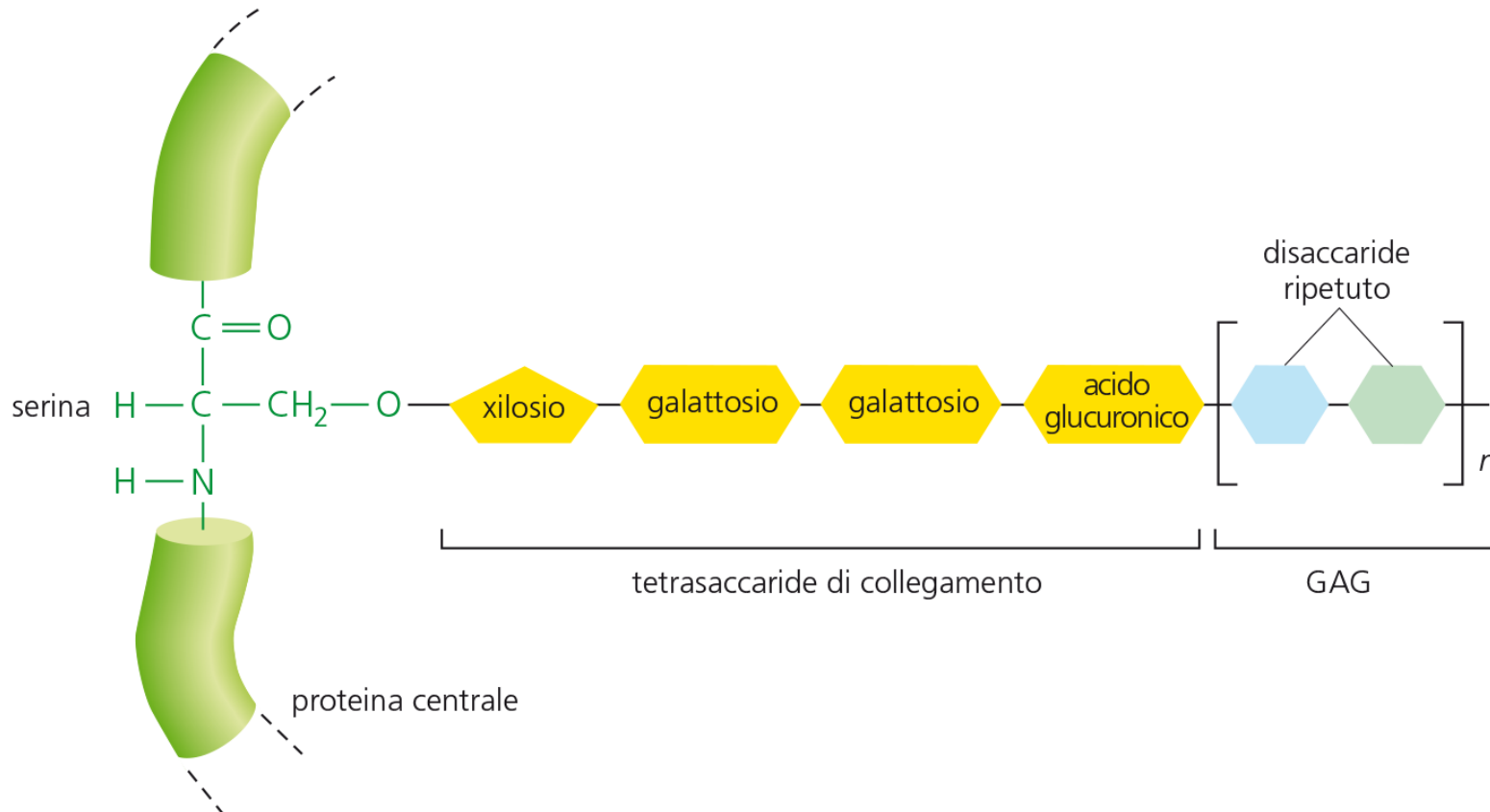
PROTEOGLICANI

I proteoglicani sono costituiti da glicosamminoglicani (GAGs) legati covalentemente (su Serina) a un core proteico.

Molti proteoglicani sono secreti e formano la matrice extracellulare.

Altri restano ancorati alla membrana rivolti verso lo spazio extracellulare.

Altri ancora costituiscono il muco che protegge molti epitelii.



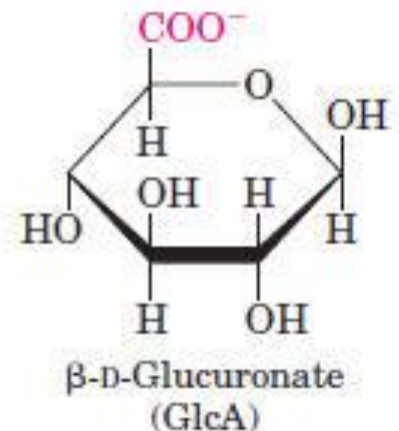
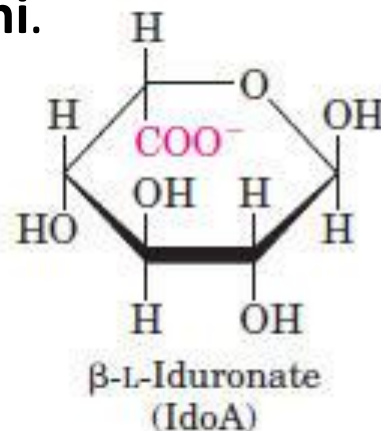
GLICOSAMMINOGLICANI (GAG)

I Glicosamminoglicani (GAGs) sono eteropolisaccaridi, polimeri lunghi e non ramificati costituiti da **unità disaccaridiche ripetute**.

Le unità ripetute sono formate da un ammino zucchero (o **N-acetyl glucosamina** o **N-acetyl galactosamina**) e da uno zucchero uronico (or **D-glucuronic acid** o **L-iduronic acid**) o galattosio.

I GAGs sono molto polari e idrofilici. I gruppi idrossilici degli amminozuccheri possono essere legati a gruppi solfato, aumentando la densità di cariche negative.

I GAG possono anche essere legati a proteine extracellulari, i **proteoglicani**.



I GAGs formano gel idratati che occupano molto spazio e sono molto resistenti alla compressione.

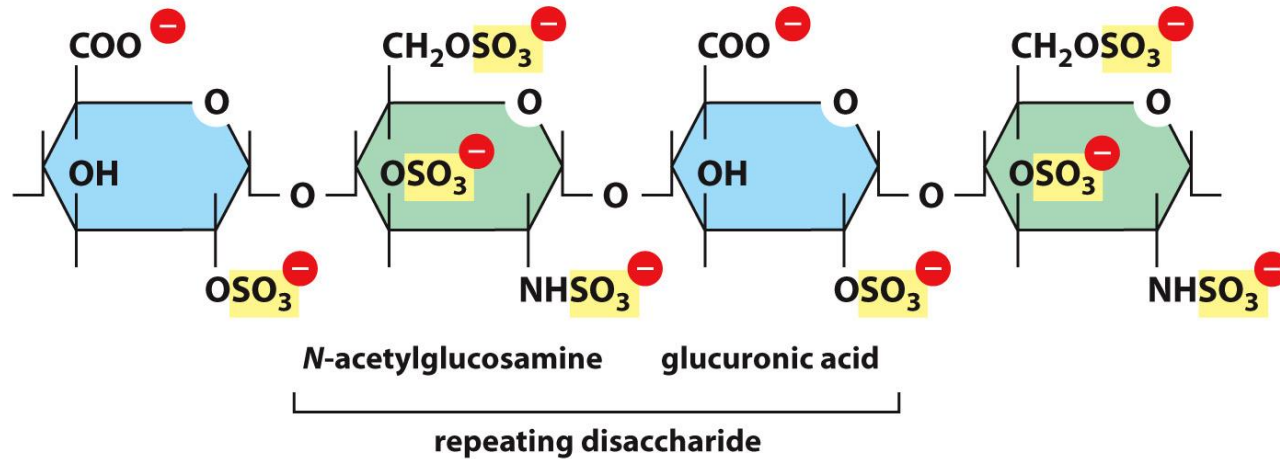
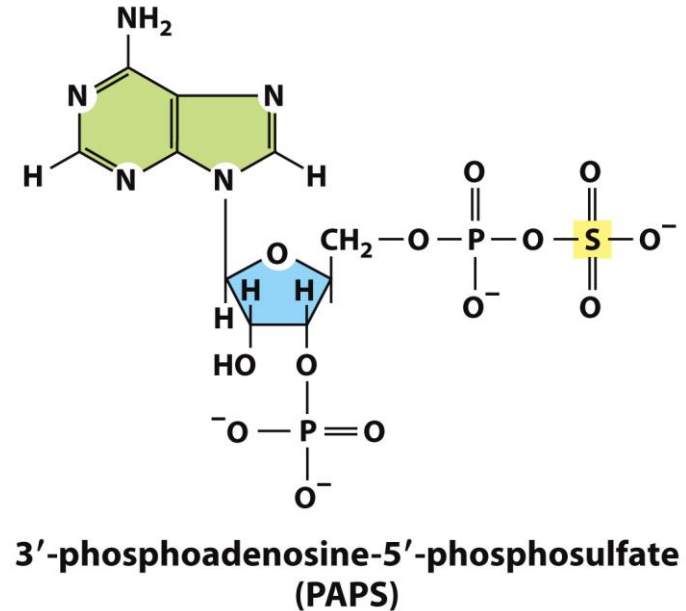


Figure 19-32 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Sul trans Golgi avviene anche la solfatazione dei GAGs.

L'aggiunta di gruppi SO_4^{2-} aumenta le cariche negative.

Il donatore di solfati è la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato.



● globular protein (MW 50,000)

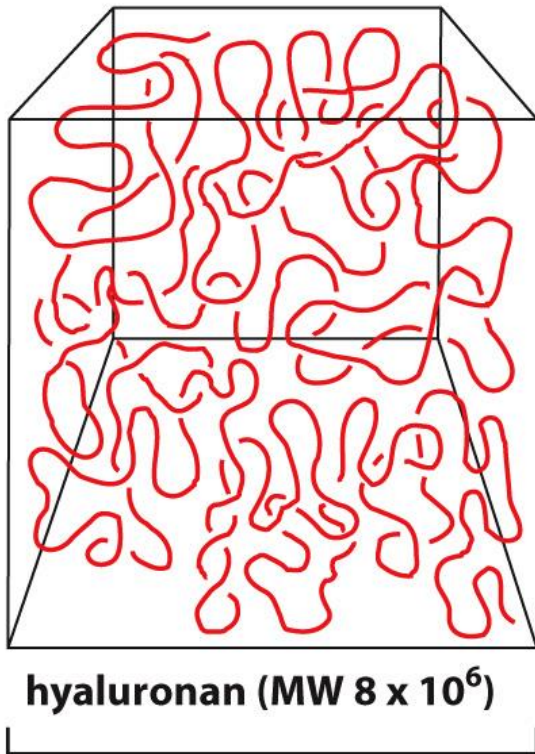


glycogen (MW ~400,000)



spectrin (MW 460,000)

collagen (MW 290,000)



hyaluronan (MW 8×10^6)

300 nm

I GAGs sono molecole di grandi dimensioni che tendono ad occupare un grande volume rispetto alla loro massa.

Acido ialuronico (GAG)

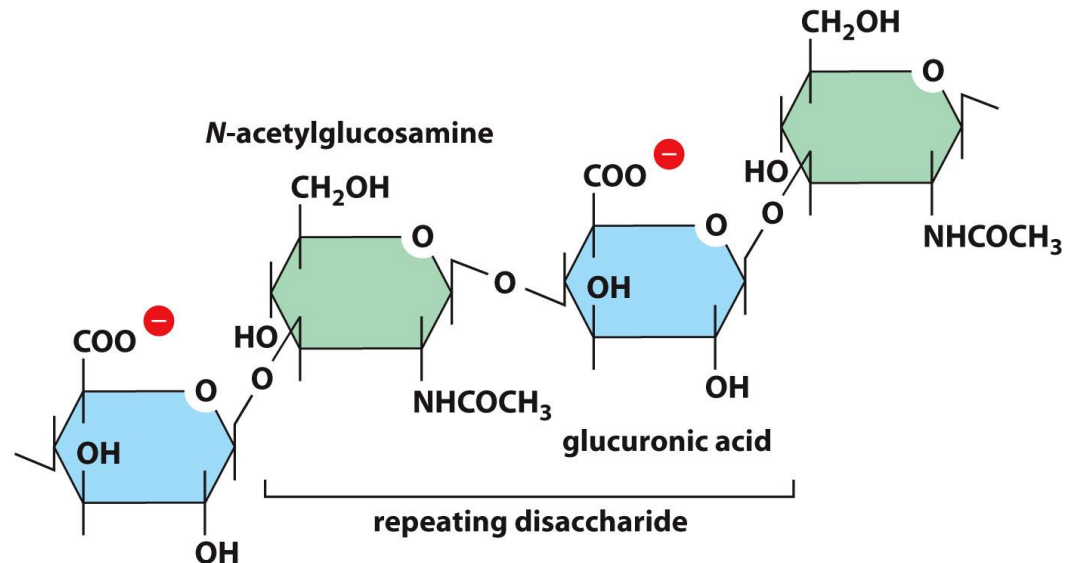


Figure 19-34 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Figure 19-33 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

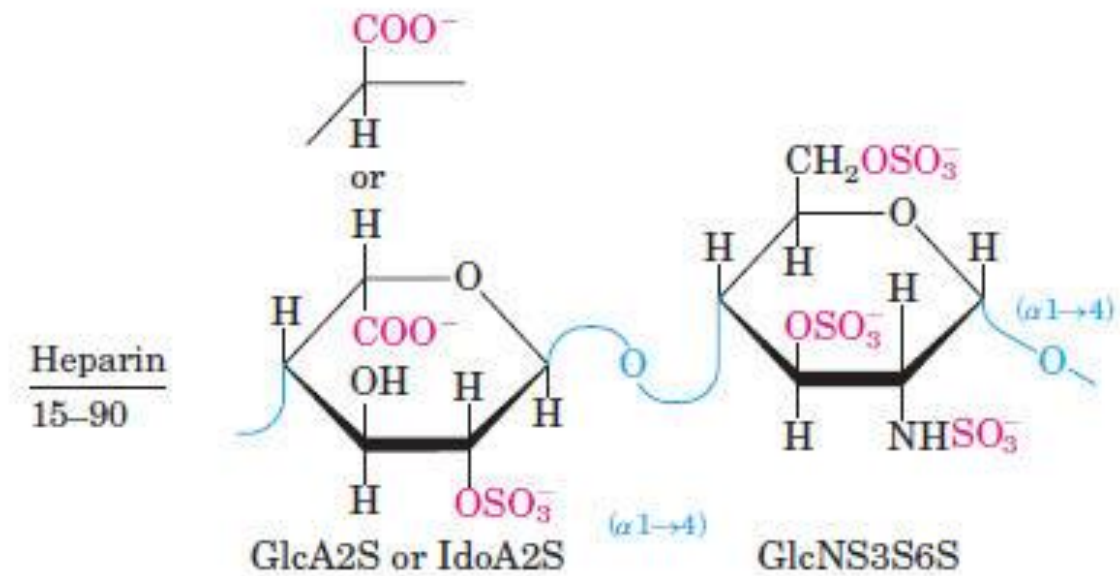
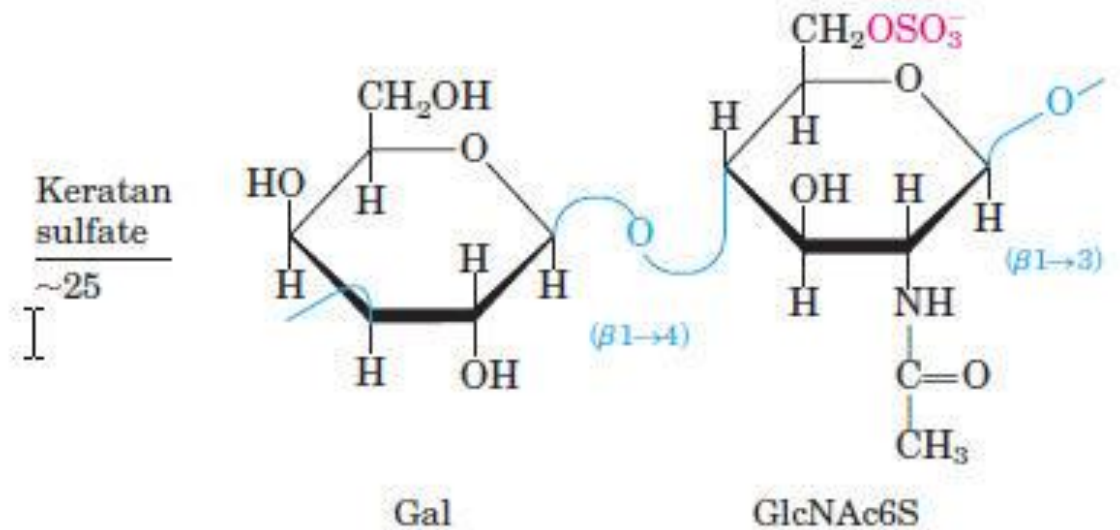
ALTRI GAGs

Il **Keratan sulfate** è un polimero lineare.

L'unità disaccaridica base del keratan sulfato è $3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$.

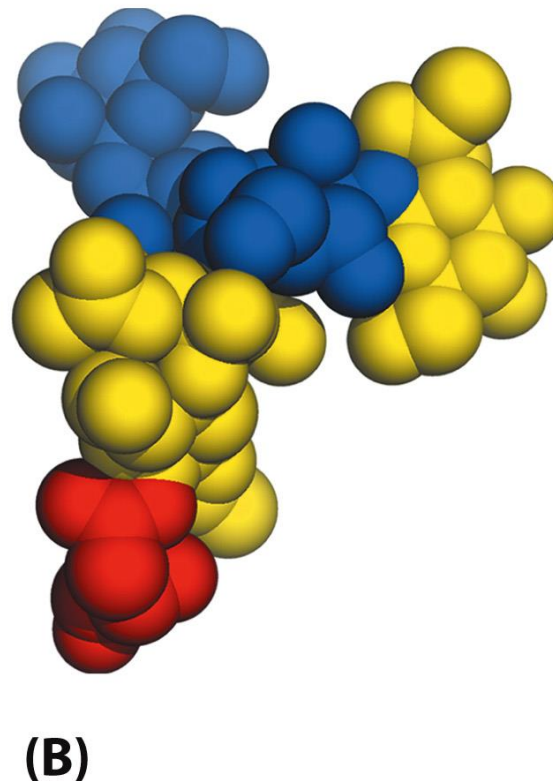
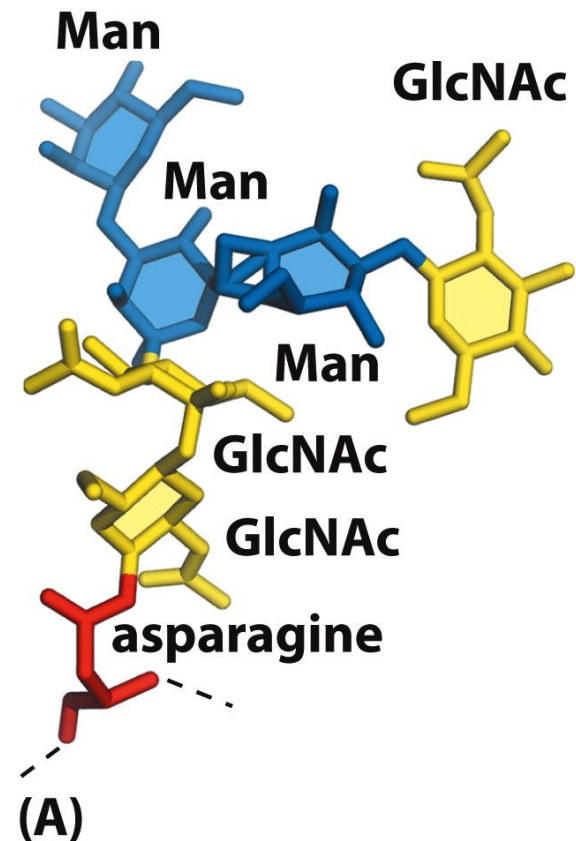
Il keratan sulfate si trova nella cornea, ossa, cartilagini, capelli, unghie, corni e zoccoli.

L'**eparina** è un anticoagulante naturale con una grande densità di cariche negative.

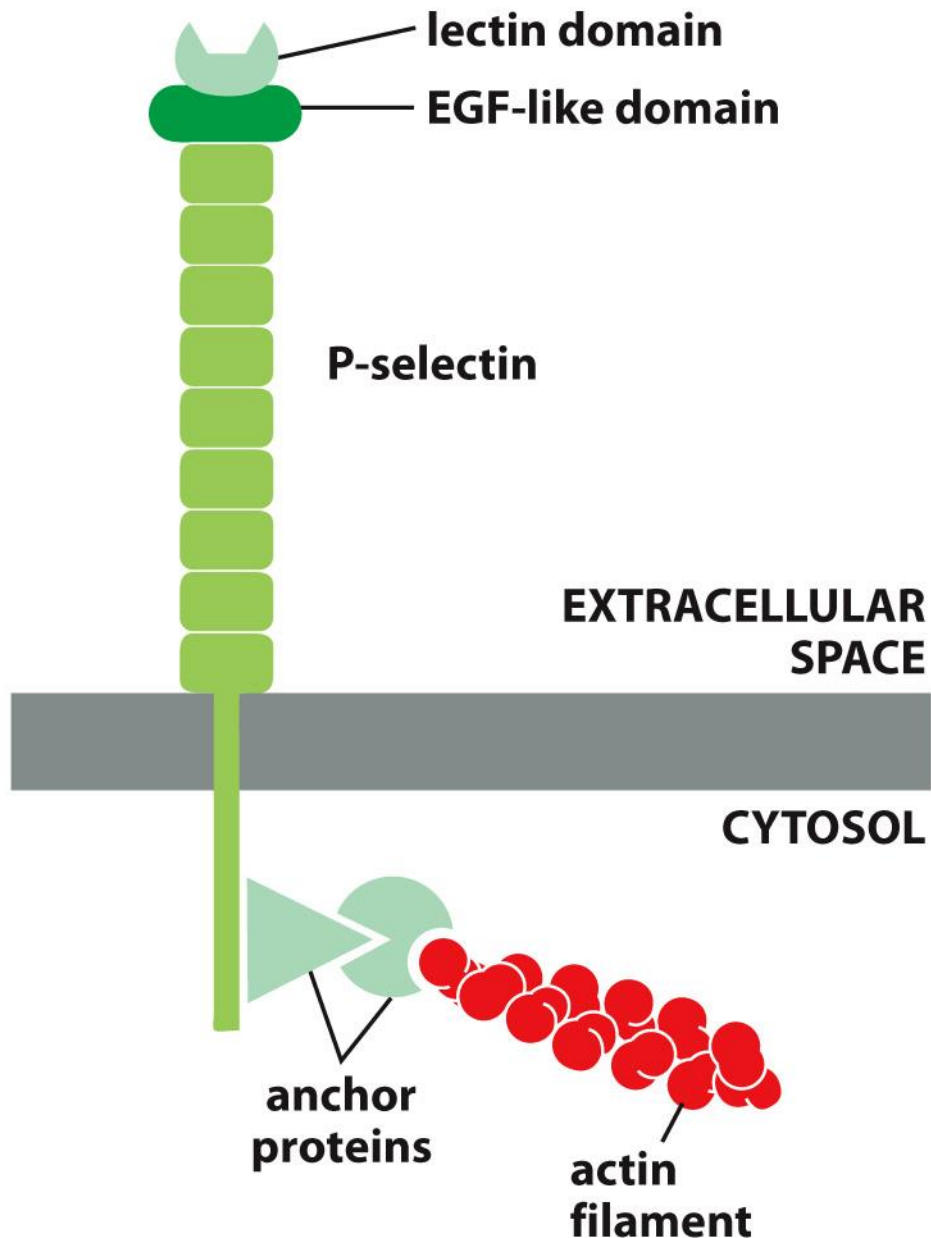


A cosa serve la glicosilazione?

- La N-glicosilazione promuove il folding corretto e rende le proteine più solubili.
- Rende le proteine più resistenti all'attacco proteolitico.



- Le mucine proteggono polmoni e intestino dai patogeni.
- Il riconoscimento da parte delle lectine è importante nei processi di sviluppo e riconoscimento cellula-cellula.



Le **selectine** sono lectine TM che riconoscono oligosaccaridi e mediano le interazioni cellula-cellula nel torrente circolatorio.

Il loro ruolo è il controllo del traffico dei globuli bianchi e il loro attacco alle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni per consentir loro di migrare dentro a un tessuto (rolling).

Hanno un **dominio di lectina** che si lega all'oligosaccaride di un'altra proteina. Richiedono Ca^{2+} per la loro funzione adesiva.

Figure 19-28a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

ROLLING

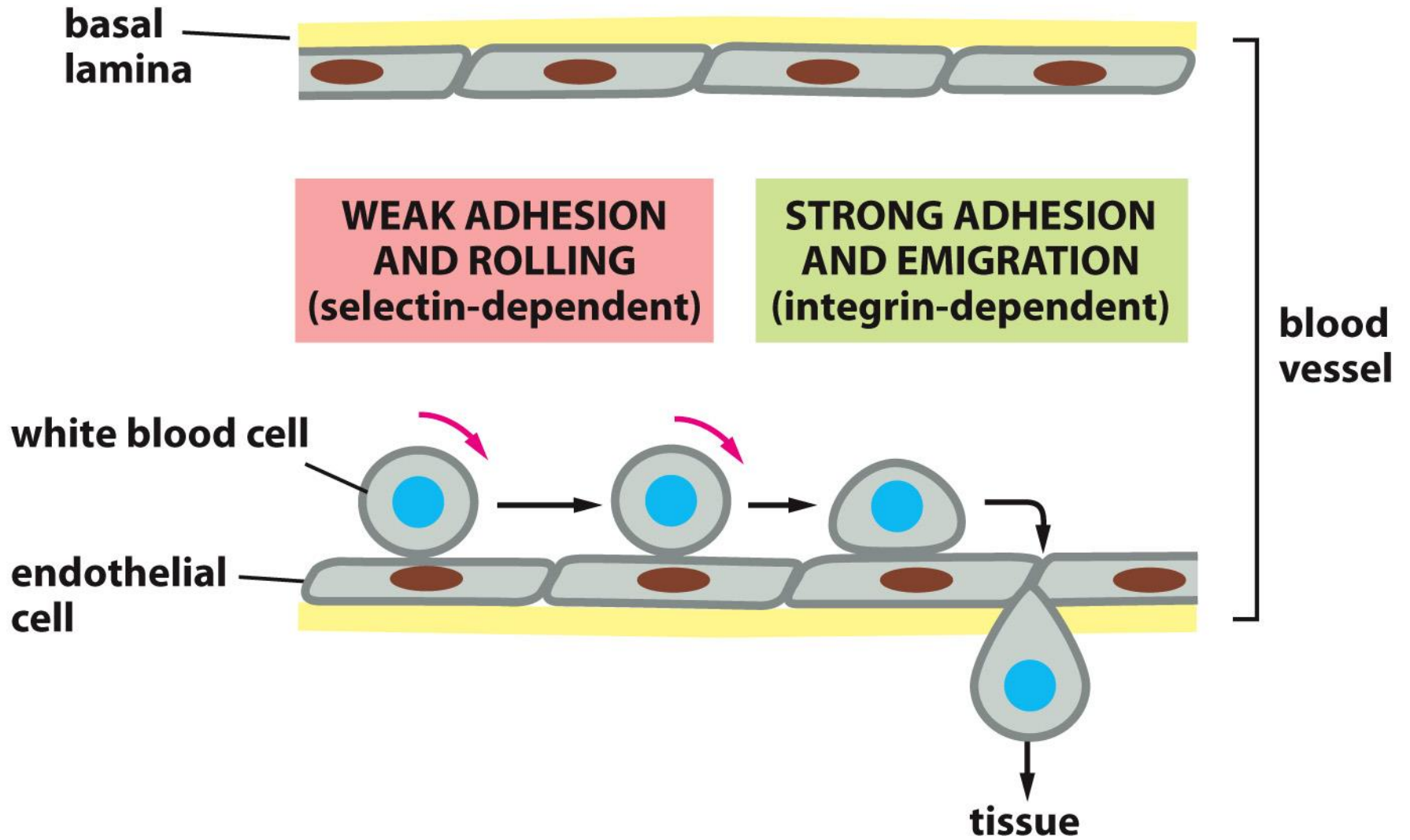


Figure 19-28b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

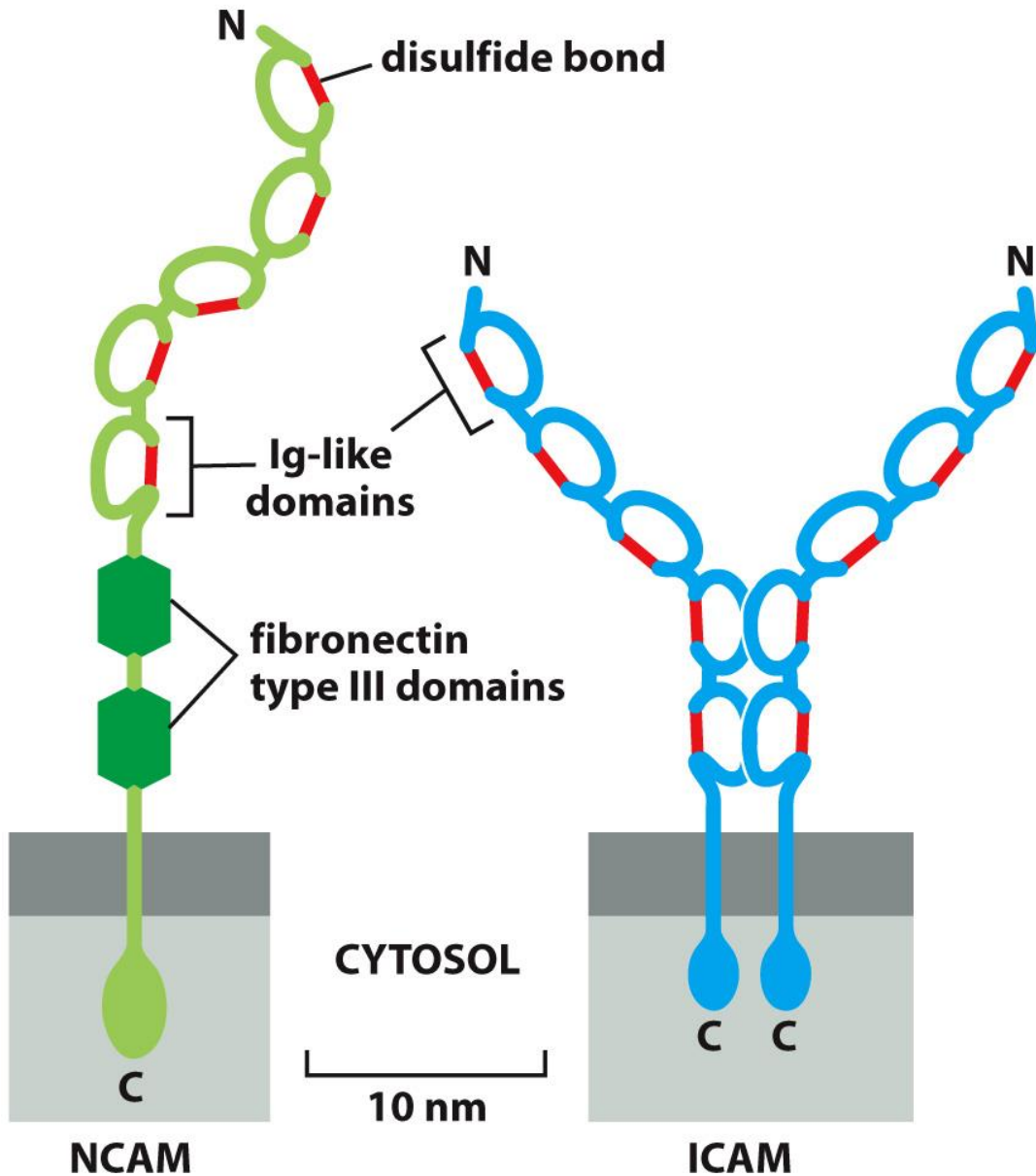
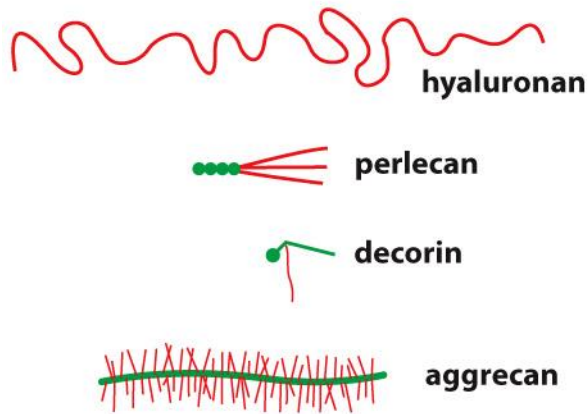


Figure 19-29 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

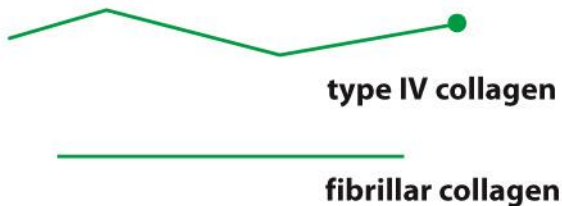
Alcune **glicoproteine di adesione** appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline.

Tra di esse le **ICAM** dell'endotelio che legano i globuli bianchi; e le **NCAM** dei neuroni che inibiscono l'adesione cellulare (perchè ricche di acido sialico).

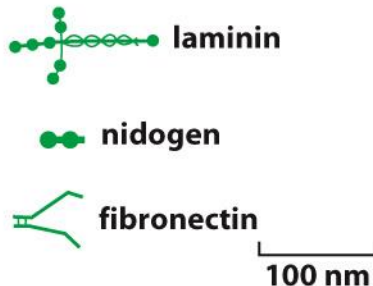
proteoglycans and GAGs



fibrous proteins



glycoproteins



Macromolecole della matrice extracellulare

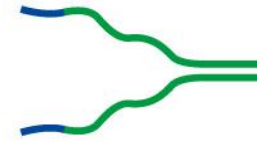
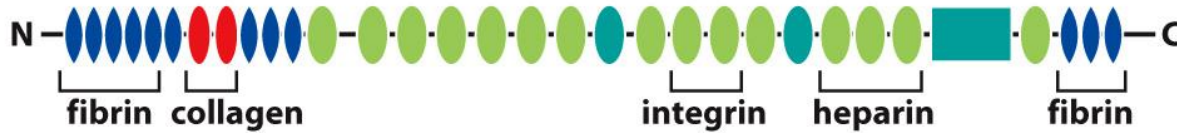
La matrice è prodotta dalle cellule della matrice ed è costituita da 3 diverse componenti:

1. Proteoglicani e GAGs
2. Proteine fibrose (collagene)
3. Glicoproteine non collagene

Figure 19-31 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Glicoproteine della matrice extracellulare

fibronectin

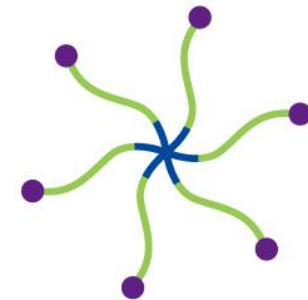


CYR61

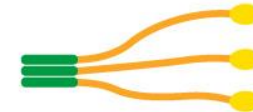


La fibronectina è un dimero tenuto insieme da ponti disolfuro

tenascin



thrombospondin



KEY TO REPEAT DOMAINS

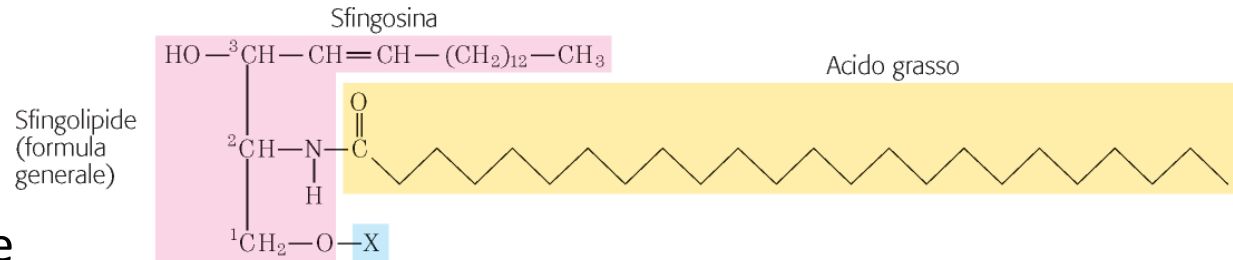


Sintesi degli sfingolipidi

Sul Golgi vengono sintetizzati gli sfingolipidi (componenti del gradiente lipidico della via secretoria).

Colesterolo e ceramide sono sintetizzati sul RE. A partire dalla ceramide, nel Golgi dove viene ultimata la sintesi delle sfingomieline e dei glicosfingolipidi.

La sfingomielina sintasi (su lato luminale del Golgi) catalizza la sintesi della sfingomielina.



Nome dello sfingolipide	Nome di X	Formula di X
Ceramide	—	— H
Sfingomielina	Fosfocolina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—P—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array}$
Glicolipidi neutri Glicosilcerebroside	Glucosio	
Lattosilceramide (un globoside)	Di-, tri- oppure tetrasaccaride	
Ganglioside GM2	Oligosaccaride complesso	

Il trasporto attraverso il Golgi può avvenire per maturazione delle cisterne o per trasporto vescicolare

Secondo l'ipotesi della **maturazione delle cisterne**, nuove cisterne cis si formano continuamente dai gruppi vescicolari tubulari e maturano diventando cisterne mediali e poi cisterne trans

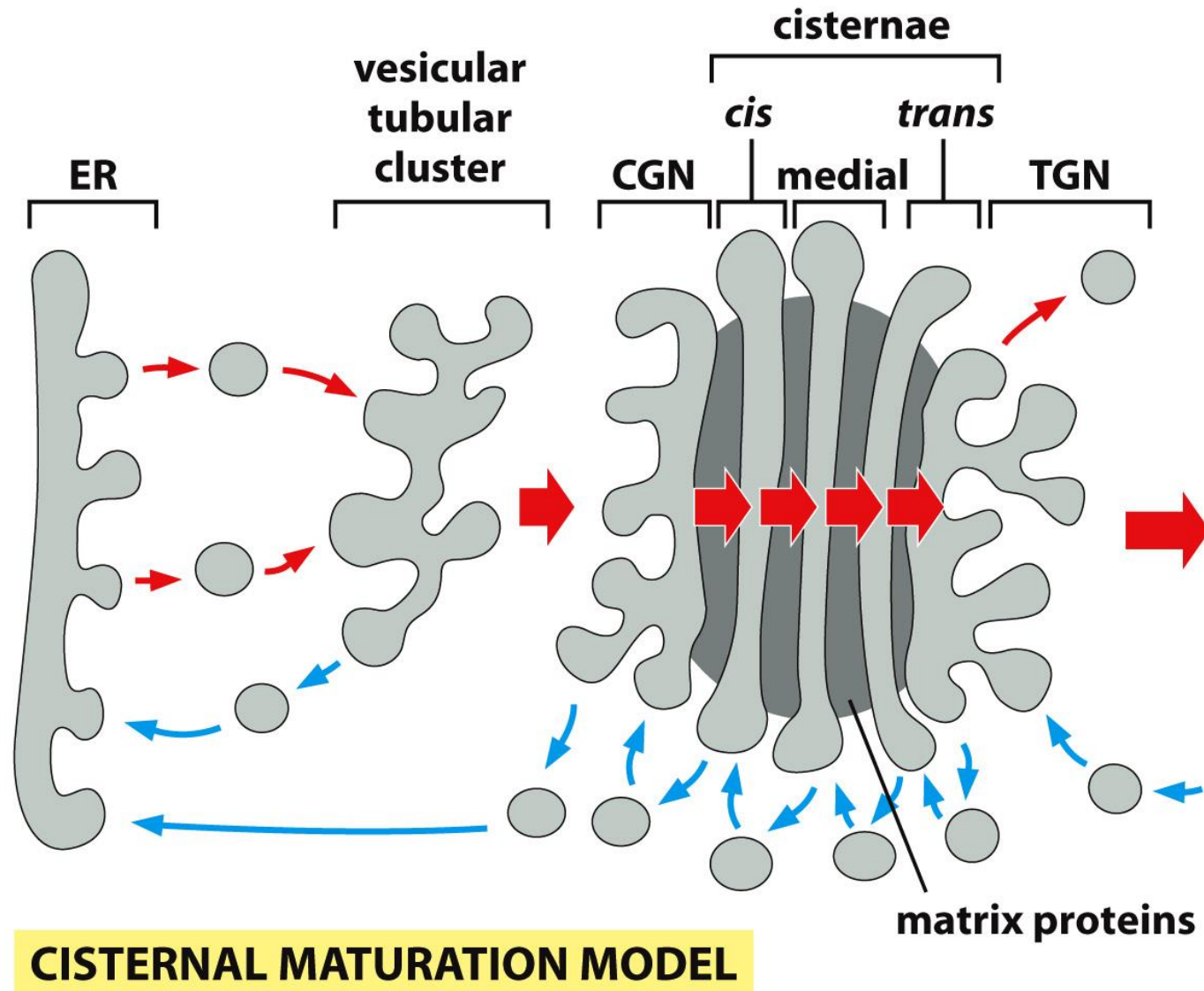
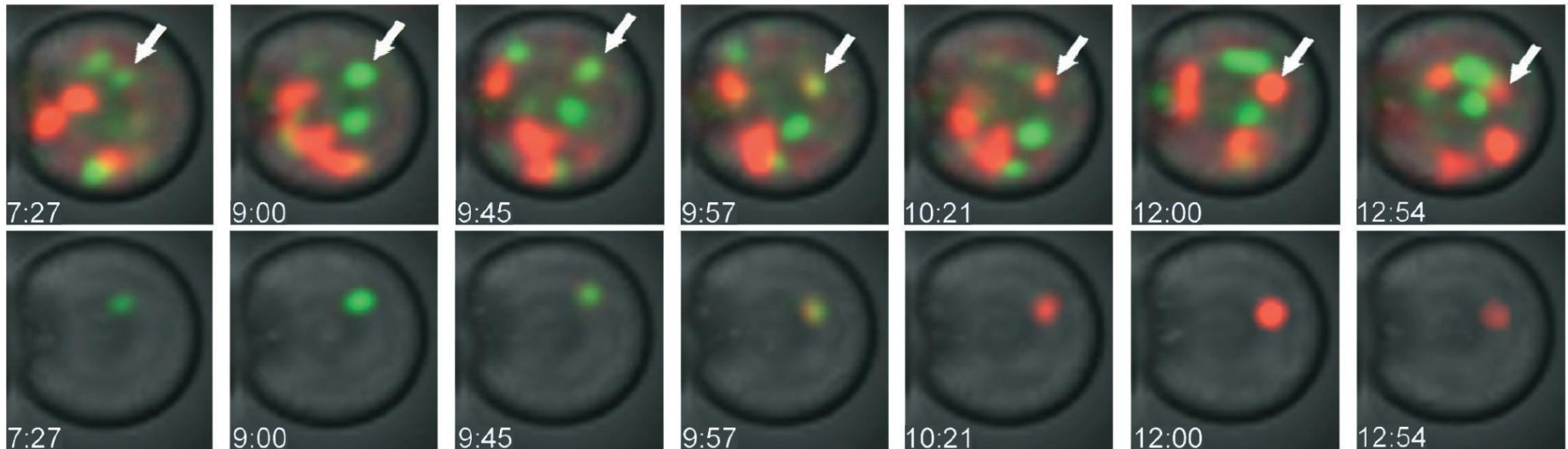


Figure 13-35a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Esperimento sulla maturazione delle cisterne

Vrg4-GFP cis Golgi

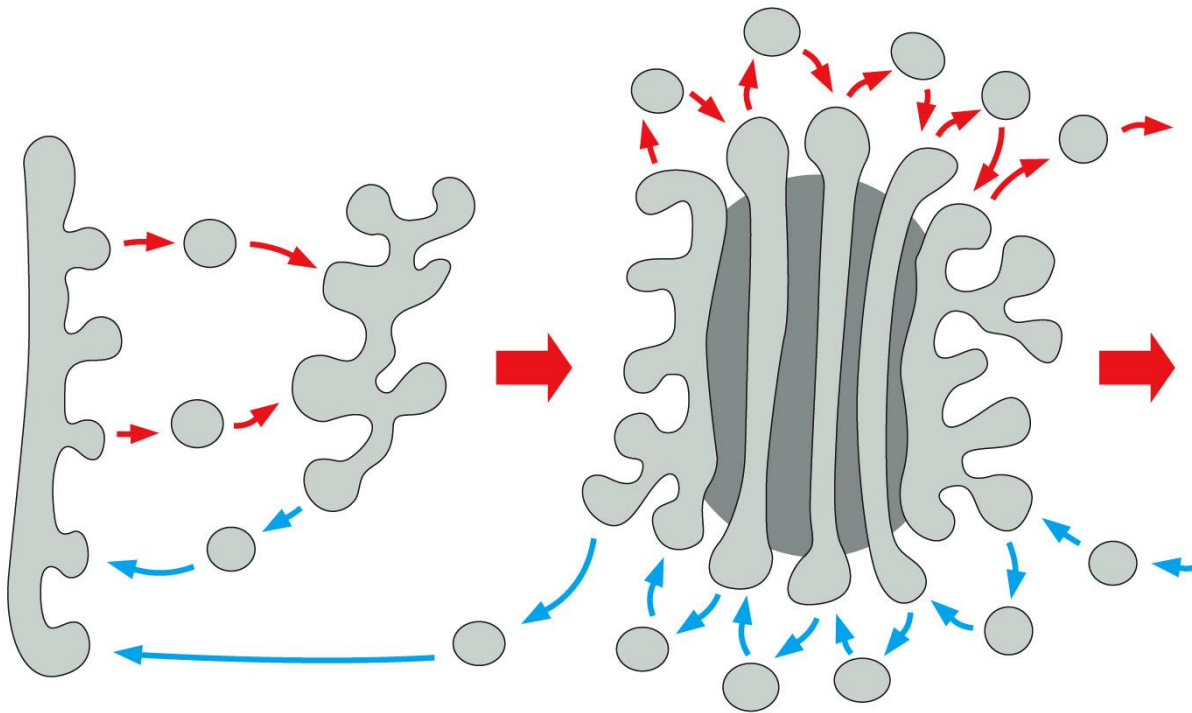
Sec7-DsRed trans Golgi



Questo esperimento condotto nelle cellule di lievito dimostra che almeno in parte è valida la teoria della maturazione delle cisterne del Golgi. La cisterna indicata dalla freccia bianca passa da cis (verde) a trans (rossa) nel tempo.

Secondo il **modello del trasporto vescicolare**, le cisterne sono stabili e le proteine cargo sono trasportate da una cisterna alla successiva mediante vescicole.

Si ottiene un flusso direzionale perchè le molecole sono impacchettate selettivamente in vescicole contenenti proteine adattatrici diverse.



VESICLE TRANSPORT MODEL

Figure 13-35b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

E' possibile che entrambi i modelli siano in parte veri: le cisterne avrebbero un nucleo centrale stabile e delle regioni laterali in maturazione. Inoltre piccole vescicole trasporterebbero i loro carichi in avanti e indietro.

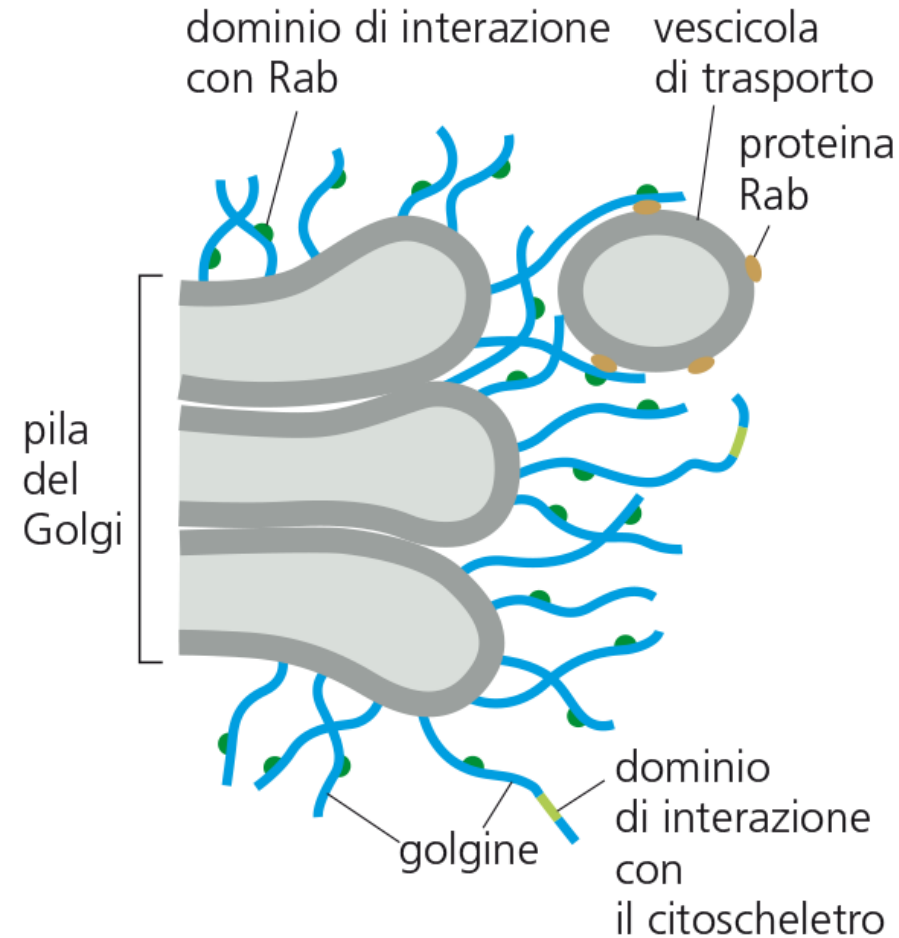
Durante la divisione cellulare

Le Golgine

Le **golgine**, proteine della matrice ricche di regioni coiled-coil intervallate da regioni cerniera, formano una foresta di tentacoli sulla superficie del Golgi e trattengono le vescicole vicino al Golgi grazie all'interazione con Rab.

La fosforilazione delle golgine promuove la frammentazione del Golgi durante la divisione cellulare; la defosforilazione consente il riassetto del Golgi dopo la divisione cellulare.

Le golgine sono fosforilate anche durante l'apoptosi per la frammentazione dell'apparato di Golgi.



Sorting dal Trans-Golgi

Le proteine escono da una regione chiamata TGN (Trans Golgi Network) e sono destinate a:

- Membrana plasmatica e esterno della cellula
- Sistema lisosomi/endosomi
- Superficie delle cellule polarizzate e organelli/granuli secretori.

