

Lezione 12

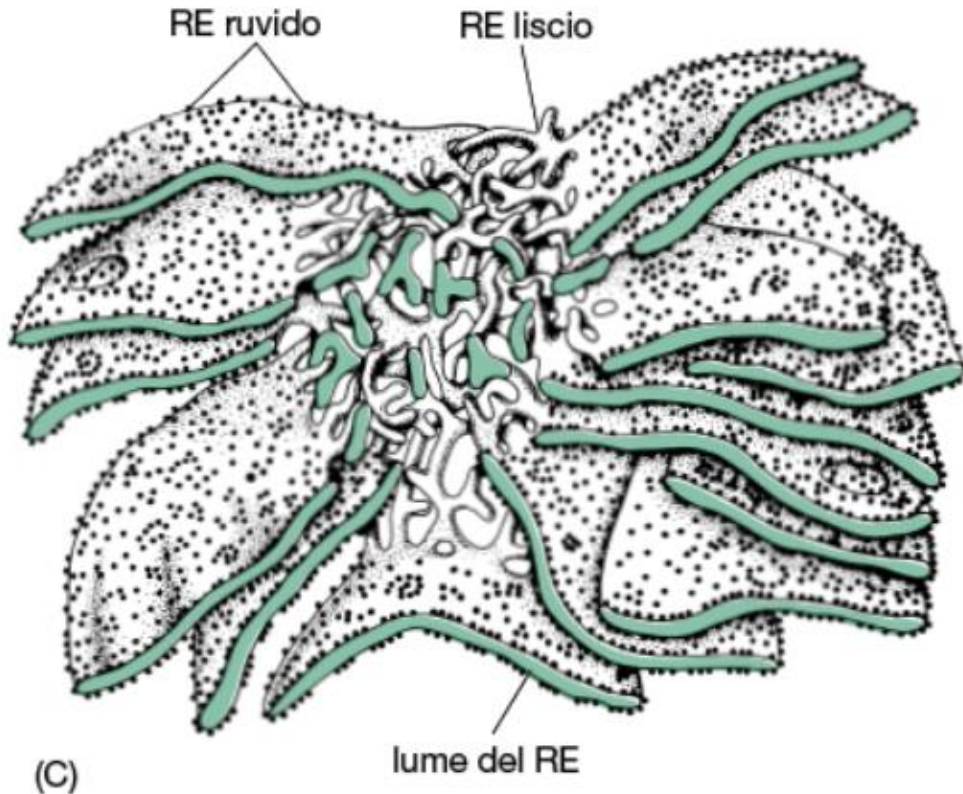
La via secretoria

- Il reticolo endoplasmatico liscio e ruvido
- I cis-Golgi network (Lezione 13)
- L'apparato di Golgi e il trans-Golgi network (Lezione 13)

Il Trasporto al Reticolo Endoplasmatico

- La sequenza di indirizzamento
- SRP e il suo recettore
- Il traslocone
- La peptidasi del segnale
- Le modificazioni delle proteine neosintetizzate nel reticolo endoplasmatico
- La glicosilazione ed il suo ruolo nel ripiegamento delle proteine tramite calnexina e calreticulina
- Il controllo di qualità del reticolo endoplasmatico (esempi: calnexina e immunoglobuline)
- Ruolo delle proteine chaperon durante la traduzione ed il trasporto degli organelli
- Le risposte UPR e l'attivazione del sistema ERAD
- L'esempio della fibrosi cistica
- **Secrezione costitutiva e secrezione regolata (Lezione 13)**

Reticolo Endoplasmatico (RE)

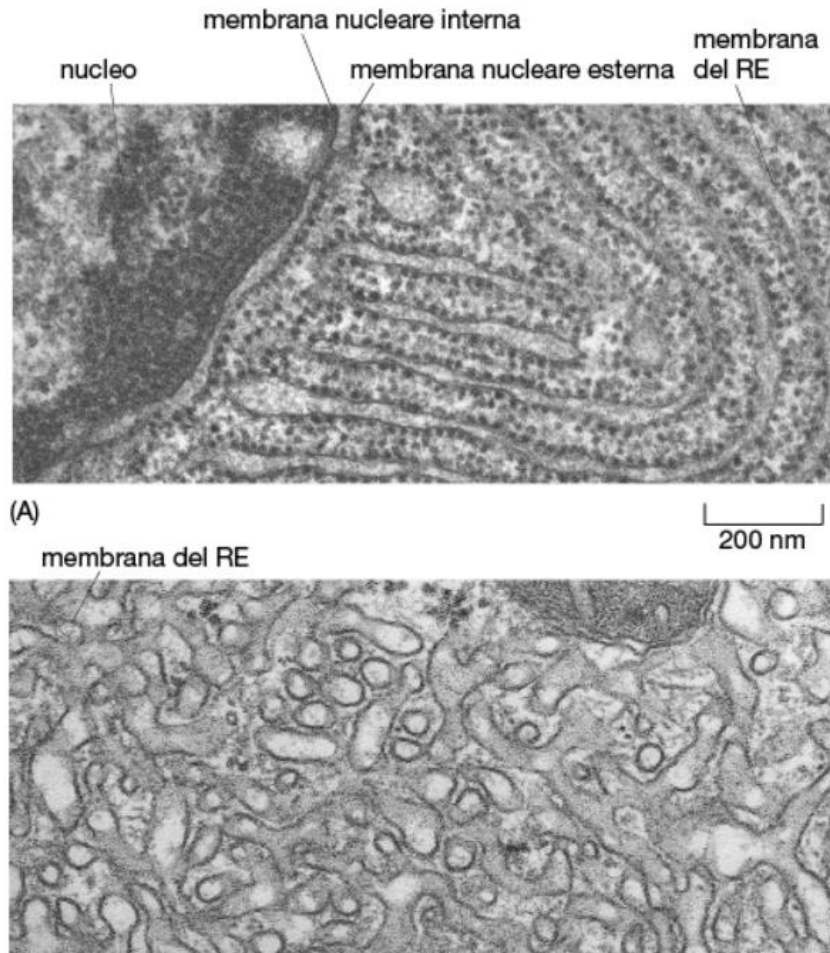


- La membrana del RE costituisce **più della metà delle membrane totali** di una cellula animale media.
- Struttura: **labirinto reticolare** di tubuli ramificati e sacchi appiattiti che si estendono nel citosol.
- Continuità: membrane del RE sono **in continuità** con la **membrana nucleare esterna**.

Funzioni generali del RE

- **Sintesi di proteine e lipidi** (*RE stesso, apparato di Golgi, lisosomi, endosomi, vescicole secretorie, perossisomi, membrana plasmatica*).
- **Produzione di lipidi** per membrane di **mitocondri** e **plastidi**
- **Proteine secrete**, destinate al lume del RE, Golgi o lisosomi
- **Immagazzinamento del Ca^{2+}** intracellulare

Reticolo Endoplasmatico Rugoso (RER)



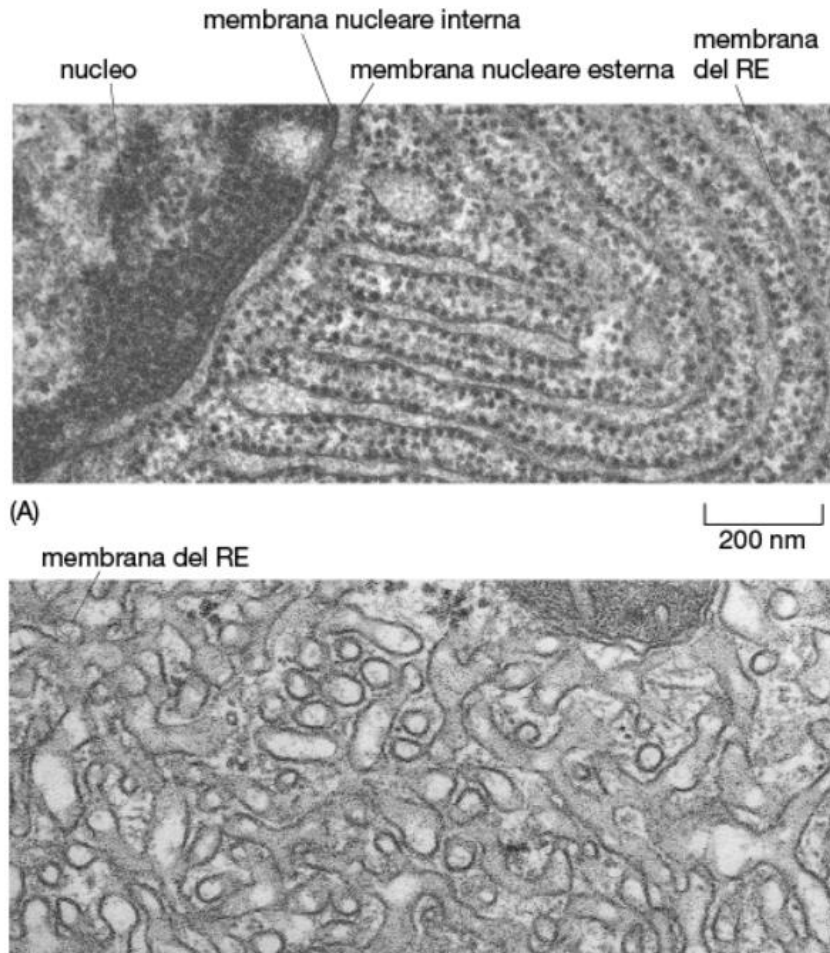
Diversificazione del RE

- Principali specializzazioni: **RE Ruvido** e **RE Liscio**.
- Strutturalmente e funzionalmente **diversificato**.
- L'importanza relativa delle **funzioni del RE varia nei diversi tipi cellulari**.
- **Cambiamenti nell'abbondanza proporzionale delle sue parti**.
- **Presenza di tipi di membrane distinti**.

RE Ruvido (RER)

- **Aspetto ruvido** dovuto ai **ribosomi legati alla superficie**.
- Funzione: **sintesi della maggior parte delle proteine secrete**.
- **Cellule con abbondante RER: Cellule esocrine del pancreas** → secernono enzimi digestivi (peso pari a quello della cellula ogni giorno); **Plasmacellule** → secernono anticorpi; **Cellule β pancreatiche** → secernono insulina.
- In queste cellule, il RER può costituire fino al **60% delle membrane cellulari**.

Reticolo Endoplasmatico Liscio (SER)



RE Liscio (SER)

- **Privo di ribosomi.**
- **Biosintesi e metabolismo dei lipidi.**
- **ER di transizione: origine delle vescicole** di trasporto per **Golgi**.
- Funzioni specializzate in cellule particolari:
- **Cellule** che sintetizzano **ormoni steroidei** → SER molto esteso
- **Epatociti** → Produzione di **particelle lipoproteiche** (trasporto lipidi)
- **Detossificazione** di farmaci e metaboliti tramite **citocromo P450**.

RE e metabolismo del Ca^{2+}

- **Sequestro del Ca^{2+}** dal citosol.
- **Rilascio Ca^{2+}** = risposte rapide a **segnali extracellulari**.
- Meccanismi:
 - **Pompa Ca^{2+}** → trasporta ioni dal citosol al lume del RE.
 - **Proteine che legano Ca^{2+}** nel lume → facilitano accumulo.
- Specializzazione:
 - **Cellule muscolari** → **reticolo sarcoplasmatico** (SER modificato).
 - Ruolo: **rilascio/riassorbimento Ca^{2+}** → **contrazione muscolare**

RE e Contatti con altri Organuli

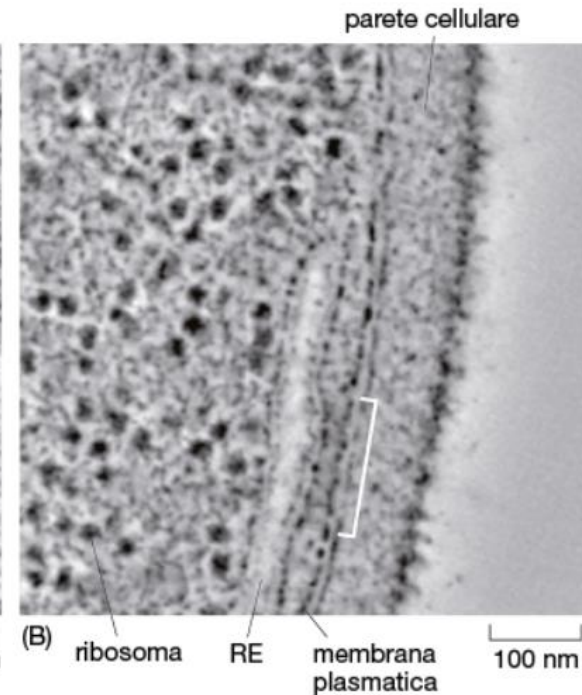
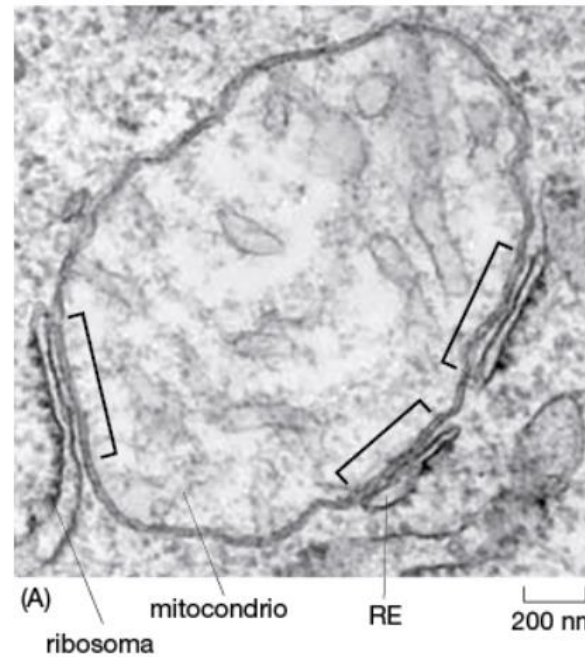
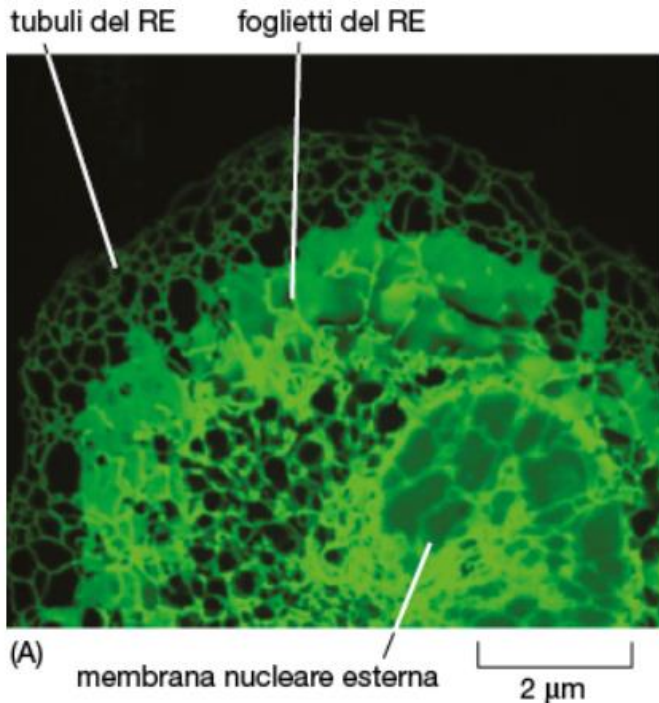
Regioni del **SER** stabiliscono **contatti stretti** con: **mitocondri, plastidi, endosomi, membrana plasmatica.**

Funzioni dei siti di contatto:

- **Trasporto di lipidi e metaboliti** fondamentali.
- **Comunicazione tra organuli.**

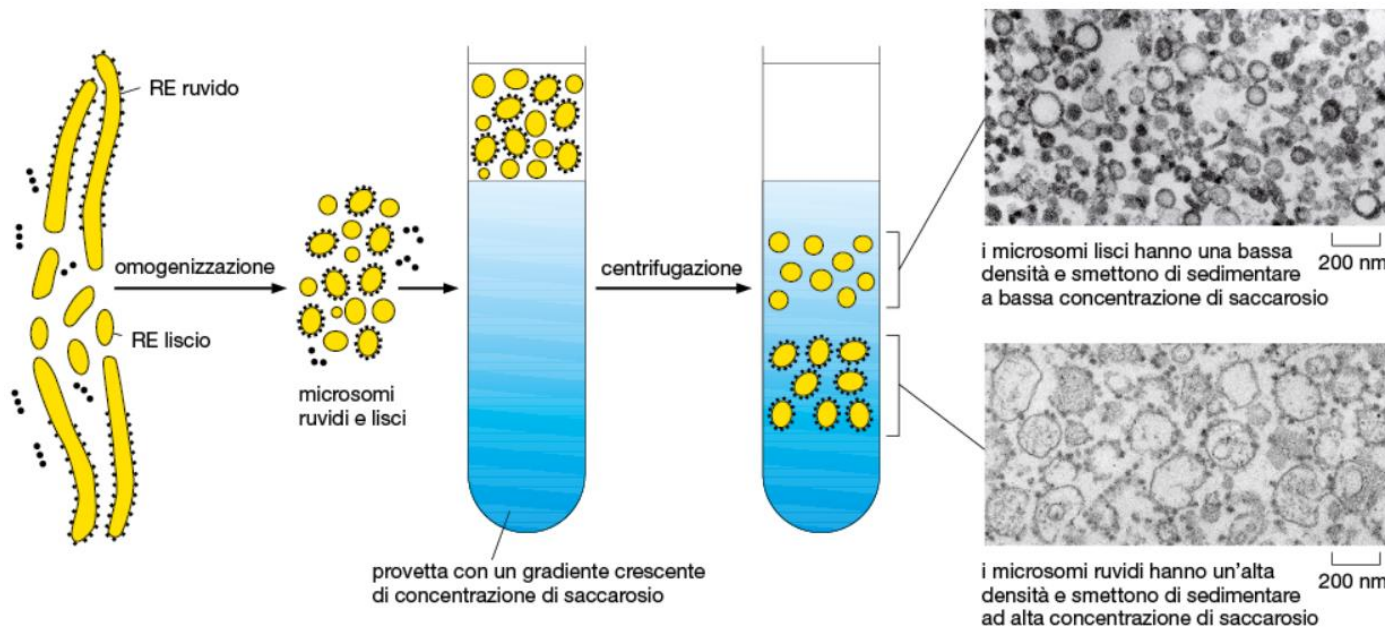
Esempi:

- Trasporto **lipidi RE → mitocondri.**
- Contatti **RE–membrana plasmatica** → modulano fosfoinositidi (coinvolti in vie di segnalazione).



Studio del RE: i Microsomi

- **Difficile isolare il RE** (intrecciato nel citoplasma).
- **Omogenizzazione cellulare** → RE si frammenta in **vescicole** (100–200 nm) = **microsomi**.
- **Strumenti fondamentali per studiare la biochimica del RE**



Tipi di microsomi:

- **Microsomi ruvidi** → con ribosomi, contengono parte del lume del RER.
- **Microsomi lisci** → privi di ribosomi, derivano da SER e altri organuli.

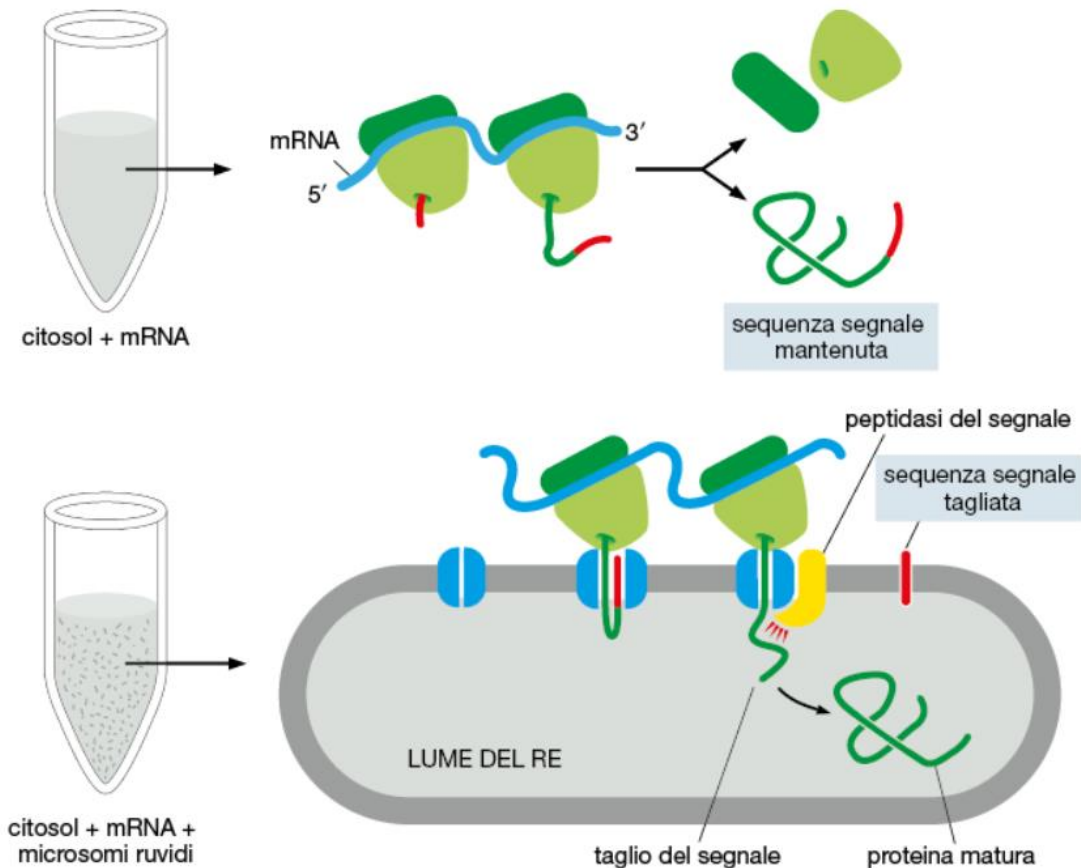
Separazione:

- I **microsomi ruvidi** sono **più densi** → separabili da quelli lisci tramite **centrifugazione su gradiente di densità**.

Utilità:

- Traslocazione e glicosilazione proteica.
- Sintesi lipidica.
- Assorbimento/rilascio Ca^{2+} .

Concetto di Sequenza Segnale



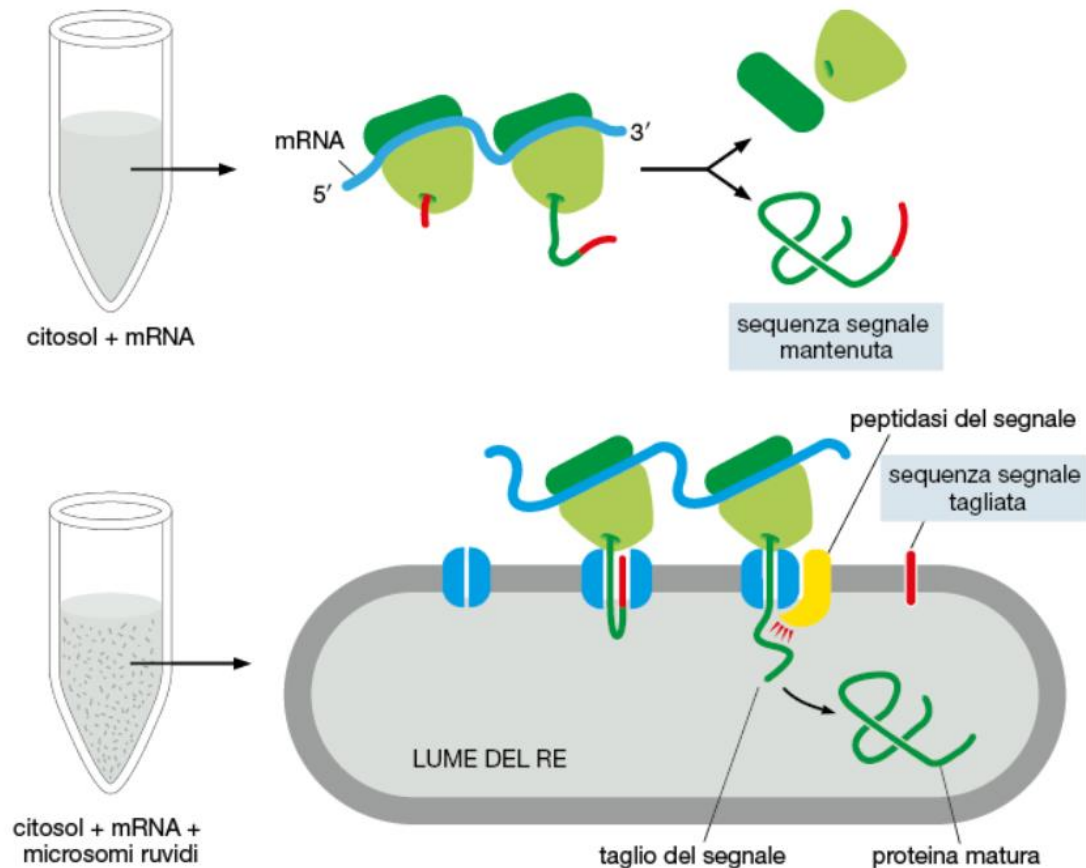
Ricostruzione in vitro del processo

- L'importazione nel RE può essere **ricostruita in provetta**.
- Permette di **dedurre l'esistenza delle sequenze segnale** prima che si potesse sequenziare l'mRNA.
- Componenti minimi: **mRNA, citosol, microsomi**.

L'ipotesi del segnale

- **Senza microsomi:** proteina più lunga (con sequenza N-terminale).
- **Con microsomi:** proteina più corta (sequenza segnale tagliata).

Concetto di Sequenza Segnale



- Per spiegare i risultati è stata formulata l'**ipotesi del segnale**
- L'**mRNA** codifica una **proteina inizialmente più lunga**.
- Estensione **N-terminale extra** = **sequenza segnale**.
- Funzione: **indirizza la proteina al RE**.
- Dopo la funzione → **la sequenza viene rimossa** da una **peptidasi del segnale**.
- Conclusione: la sequenza segnale è un **elemento transitorio ma essenziale per lo smistamento**.

Meccanismo Molecolare

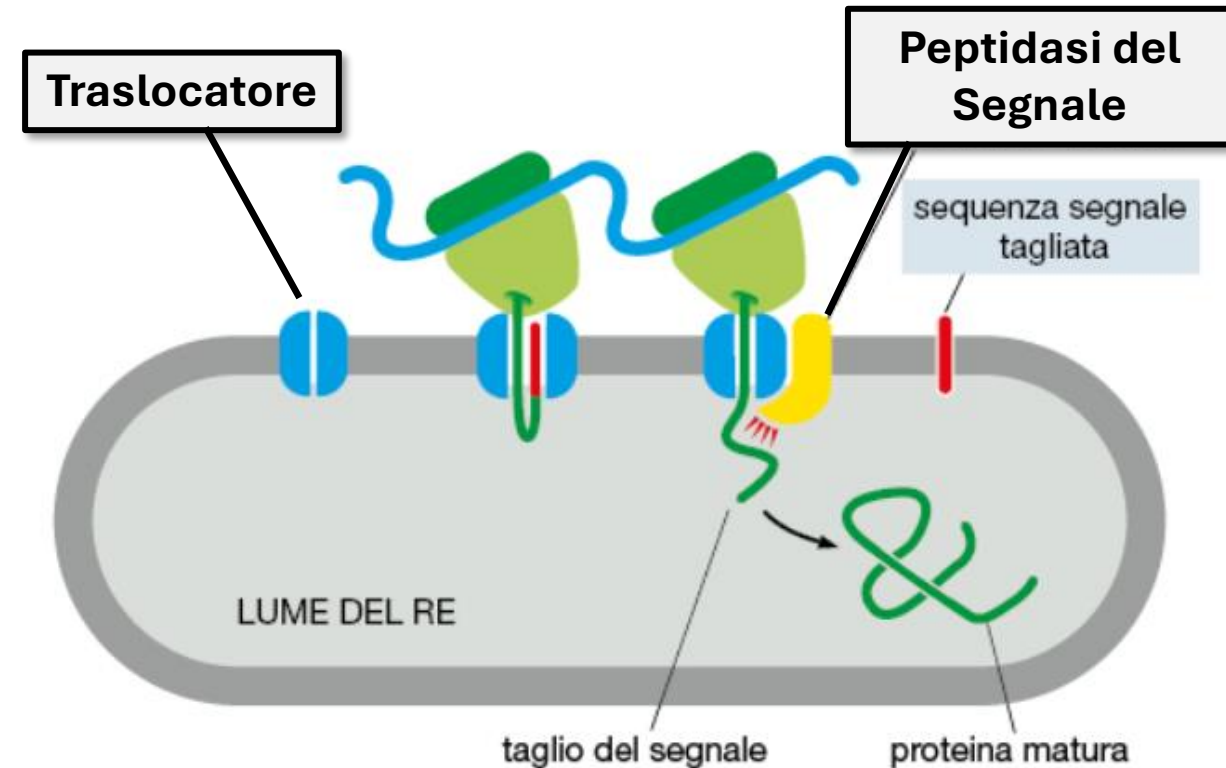
Il RE cattura proteine selezionate dal citosol durante la loro sintesi.

Quando la sequenza segnale emerge dal ribosoma:

- **Dirige il ribosoma** verso un **traslocatore** nella membrana del RE.
- **In assenza di ribosoma** → Il traslocatore **rimane chiuso** preserva la **barriera di permeabilità** del RE.
- **In presenza di ribosoma** → Il traslocatore forma un **poro transitorio** per il **passaggio del polipeptide**.

Peptidasi del segnale associata al traslocatore:

- **Taglia la sequenza segnale** durante la traduzione.
- **La proteina** matura viene **rilasciata nel lume del RE** appena completata la sintesi.



SRP e Sequenze Segnale del RE

Le sequenze segnale del RE sono **guidate** alla membrana **da due componenti principali**:

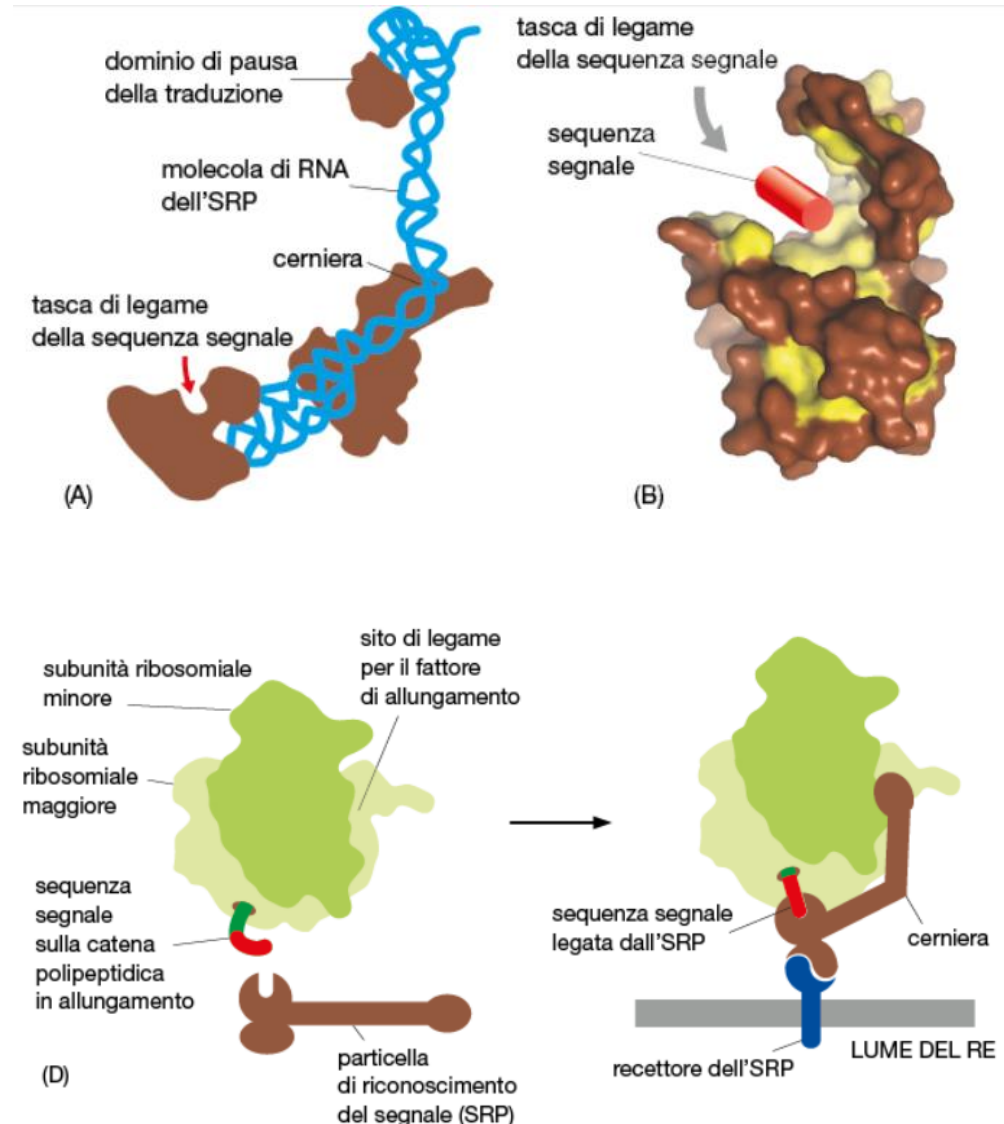
- **SRP** (Signal Recognition Particle) → è un **complesso ribonucleoproteico** che **lega la sequenza segnale**.
- **Recettore per SRP** → proteina integrale della **membrana del RE**, che **lega SRP in complesso con la sequenza segnale**.

Caratteristiche delle sequenze segnale

Sequenze segnale = **molto variabili**, ma hanno in comune la presenza di **amminoacidi non polari al centro**

SRP riescono a riconoscere sequenze così diverse, grazie a:

- **Tasca idrofoba ricca di metionine**
- Metionine = catene laterali flessibili → la tasca può adattarsi a sequenze idrofobe di dimensioni e forme diverse.



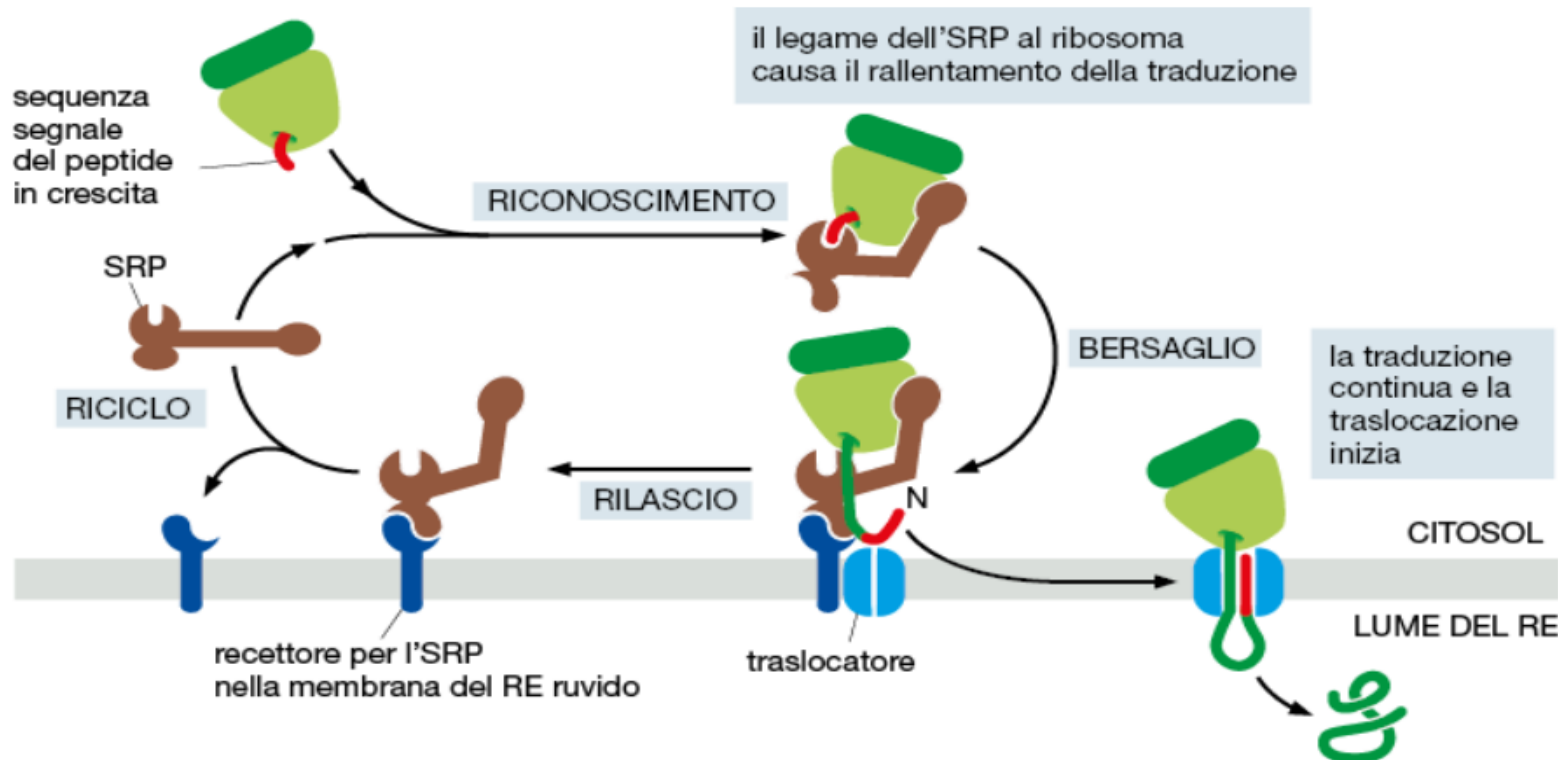
Struttura e Funzionamento della SRP

- La **tasca di legame** è posizionata **vicino al tunnel ribosomiale**, dove emerge il polipeptide
- Quando la **sequenza segnale esce** dal ribosoma → **SRP la aggancia** immediatamente.
- L'altra estremità di **SRP** si **lega** tra le **subunità ribosomiali maggiore e minore**

Traduzione rallenta:

- Dare **tempo** al ribosoma di **ancorarsi al RE**.
- Evitare **rilascio prematuro** di proteine nel citosol (es. **idrolasi** potenzialmente dannose).

- Quando **SRP** lega la sequenza segnale → **espone un sito di legame per il recettore SRP**
- Il recettore per **SRP** è una **proteina integrale** della membrana **del RER**.
- Il complesso **SRP-ribosoma** viene **portato a un traslocatore libero** nella membrana del RE.
- **SRP rilascia il peptide al traslocatore** e, col suo recettore si **dissociano e vengono riciclati**.
- La **traduzione riprende** alla massima velocità.
- Il traslocatore trasferisce la **catena polipeptidica nascente** attraverso la membrana del RE

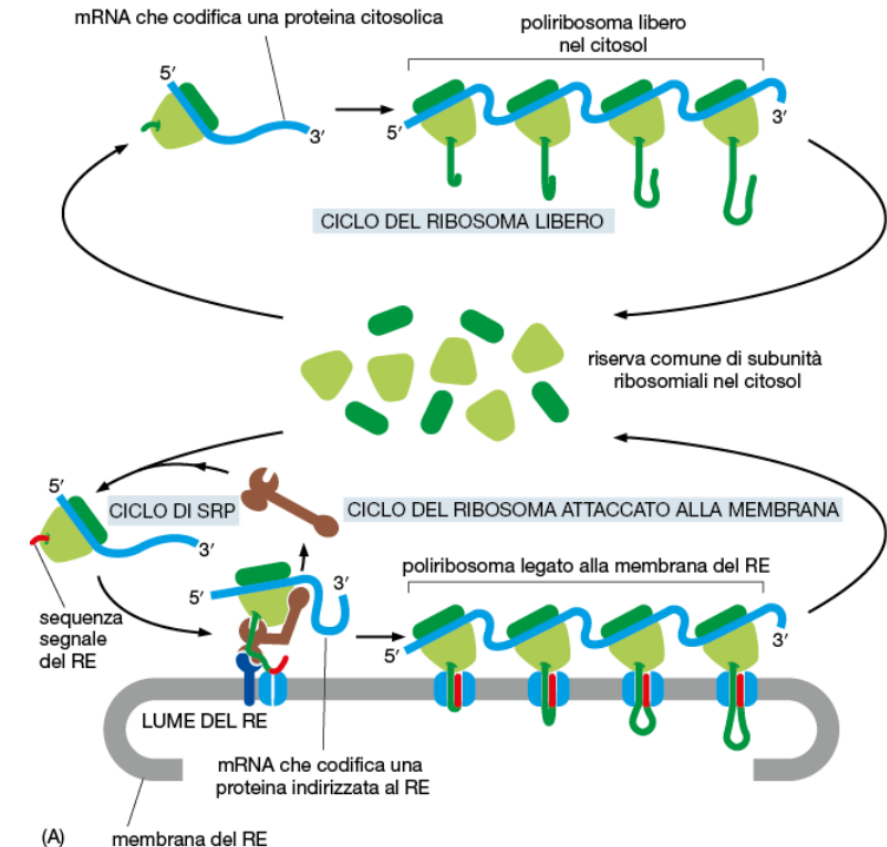
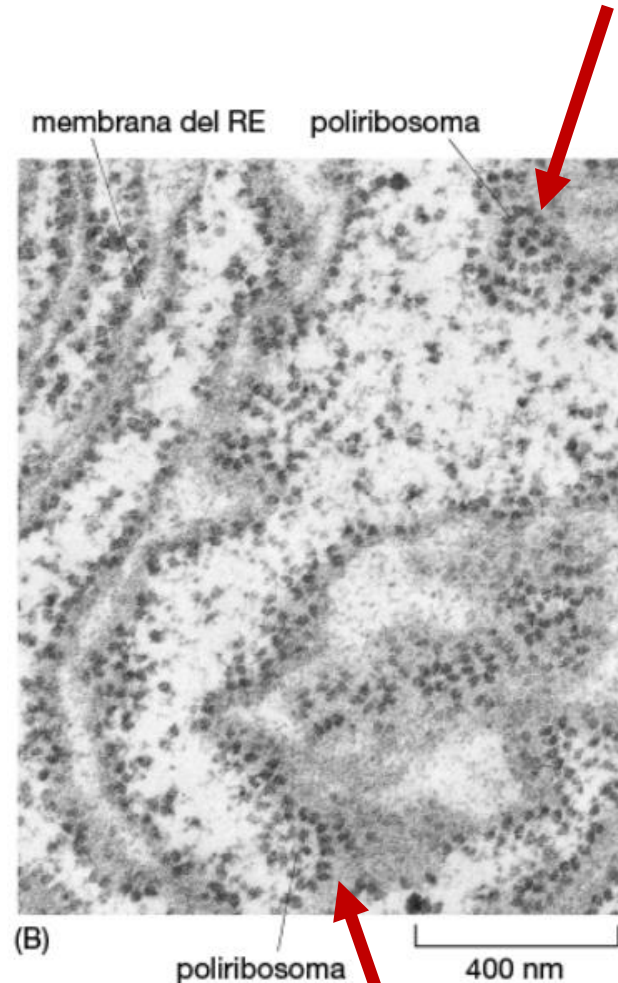


Ribosomi liberi e ribosomi legati al RE

- **Ribosomi attaccati alla membrana** (lato citosolico del RE) → sintetizzano proteine dirette al RE.
- **Ribosomi liberi** → sintetizzano tutte le altre proteine citosoliche.
- **Ribosomi attaccati e liberi sono identici, differiscono solo per le proteine che stanno producendo.**

Poliribosomi e attacco dell'mRNA

- Molti ribosomi possono attaccarsi a un singolo mRNA → **poliribosoma**.
- **Se l'mRNA** codifica una proteina con **sequenza segnale**:
- **Il poliribosoma si attacca al RE** → guidato dalle sequenze segnale su più catene polipeptidiche in crescita.
- **I ribosomi terminata la traduzione** → **tornano al pool dei ribosomi liberi** nel citosol.

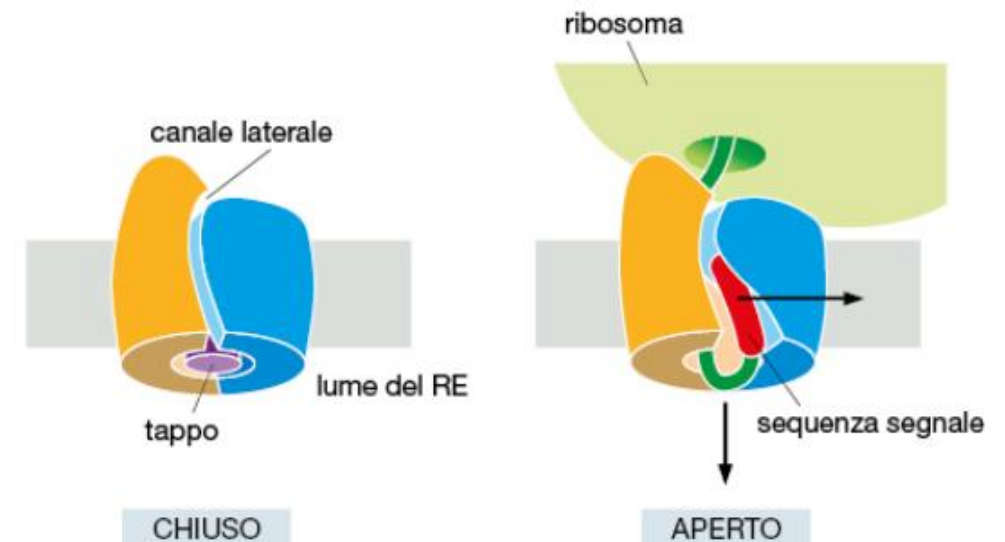
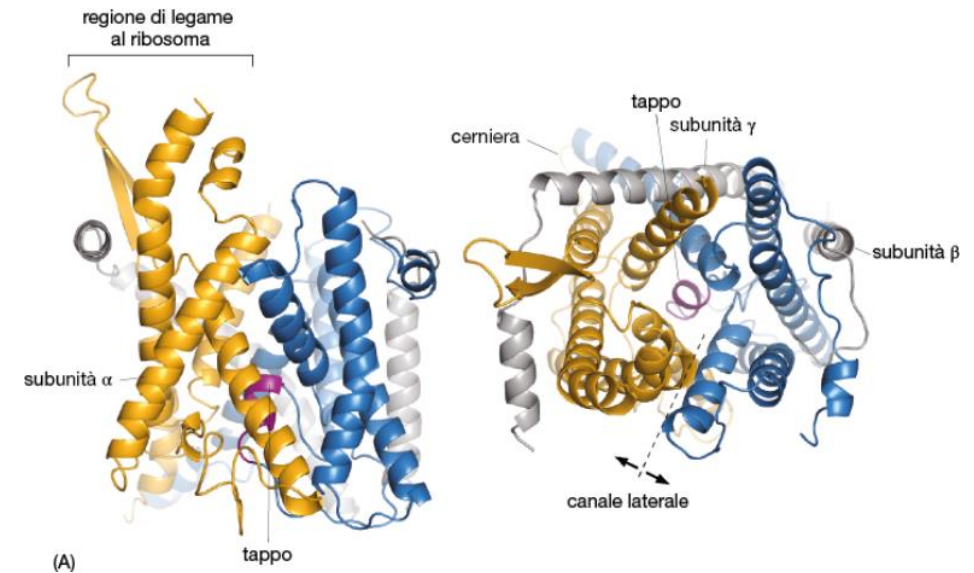


Il Problema della Traslocazione: Struttura del complesso Sec61

- Le catene polipeptidiche attraversano la **membrana del RE**:
 - **A contatto diretto** con il doppio strato lipidico?
 - **Oppure attraverso un poro proteico?**
- Soluzione: identificazione del **traslocatore Sec61** → forma un **poro acquoso** per il passaggio del polipeptide.

Core del traslocatore = complesso Sec61.

- Composizione: **3 subunità** (α , β , γ) → altamente conservate dai batteri agli eucarioti.
- Sec61 α : **10 α -eliche** che **circondano un poro centrale**. Canale chiuso da una **corta α -elica** (“**tappo**”) che sigilla il poro a riposo
- Impedisce la **fuoriuscita di ioni** (es. Ca^{2+}) dal RE.



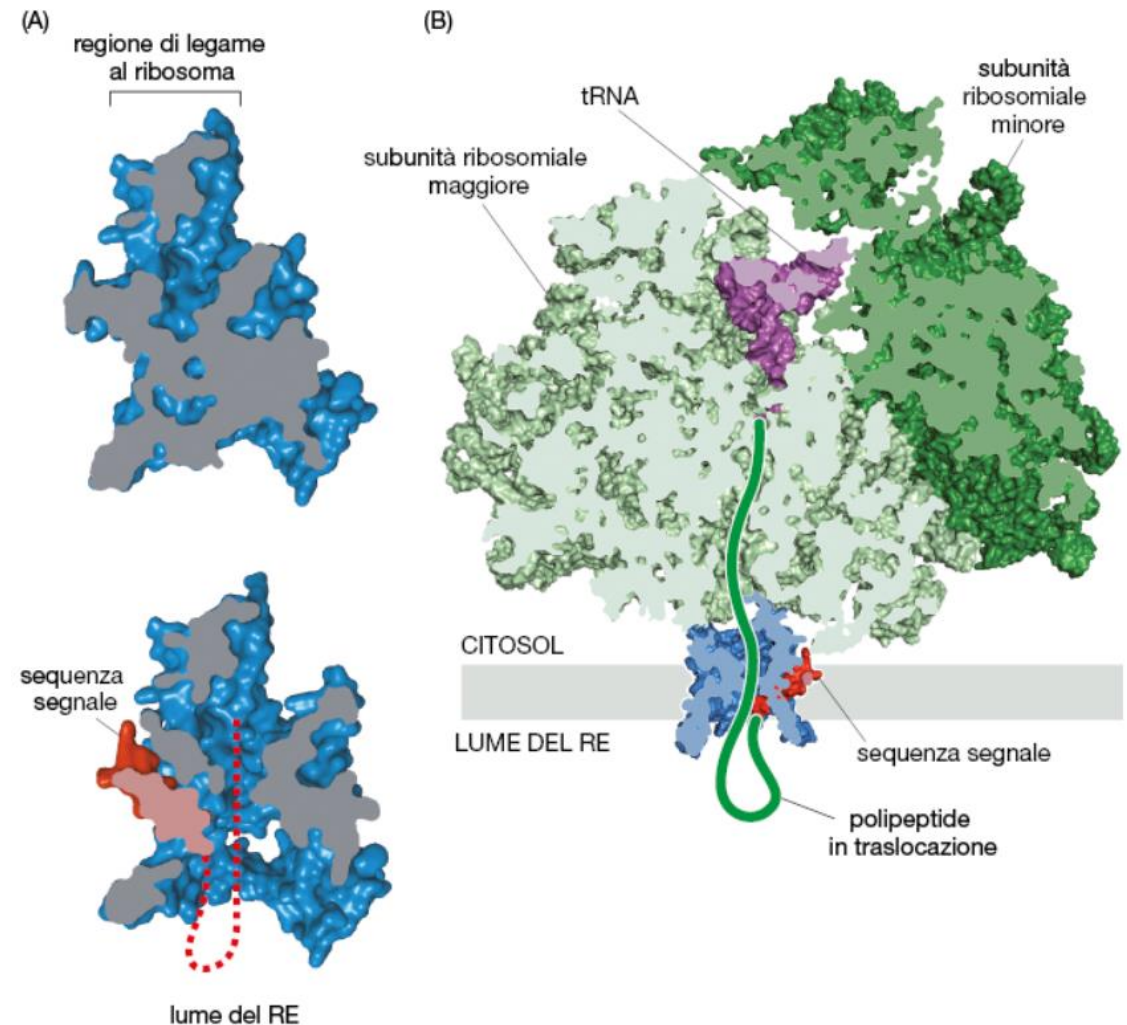
Apertura del Traslocatore

Apertura solo in presenza di **sequenze segnale**.

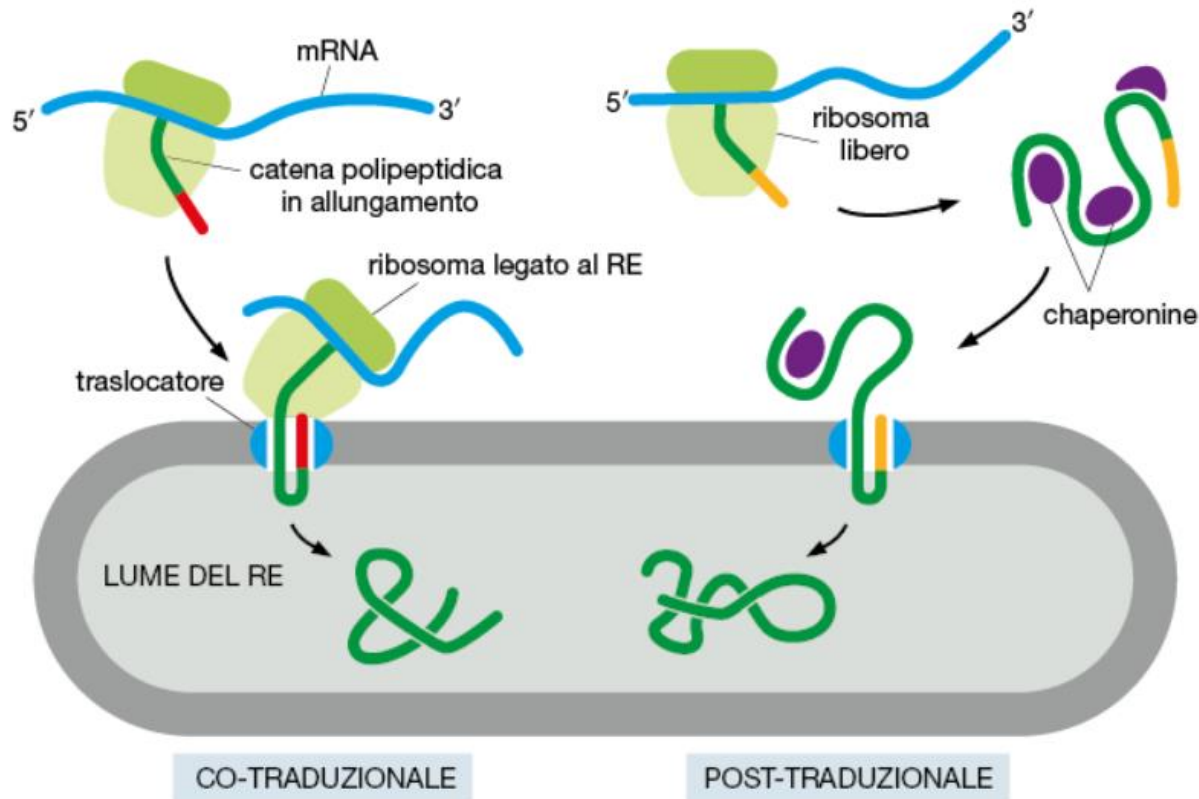
- Meccanismo:
 - La **sequenza segnale idrofoba** si inserisce in un **canale laterale** del Sec61.
 - Il **canale centrale si allarga**.
 - Il **tappo si sposta** → **poro aperto**.
- La **sequenza segnale (idrofoba)**:
 - **Esce lateralmente** nel **doppio strato lipidico**.
 - **Viene tagliata** dalla **peptidasi del segnale**.
 - Rapidamente **degradata da proteasi** nel RE e nel citosol.

Funzione del canale laterale

- Non solo riconoscimento delle sequenze segnale.
- Ruolo chiave: guida l'**integrazione delle proteine transmembrana** nel RE.
- Canale laterale = via d'accesso dal canale centrale al core idrofobo della membrana.



Traslocazione Co-traduzionale e Chiusura del Canale



Una volta aperto, **Sec61 si allinea con il ribosoma:**

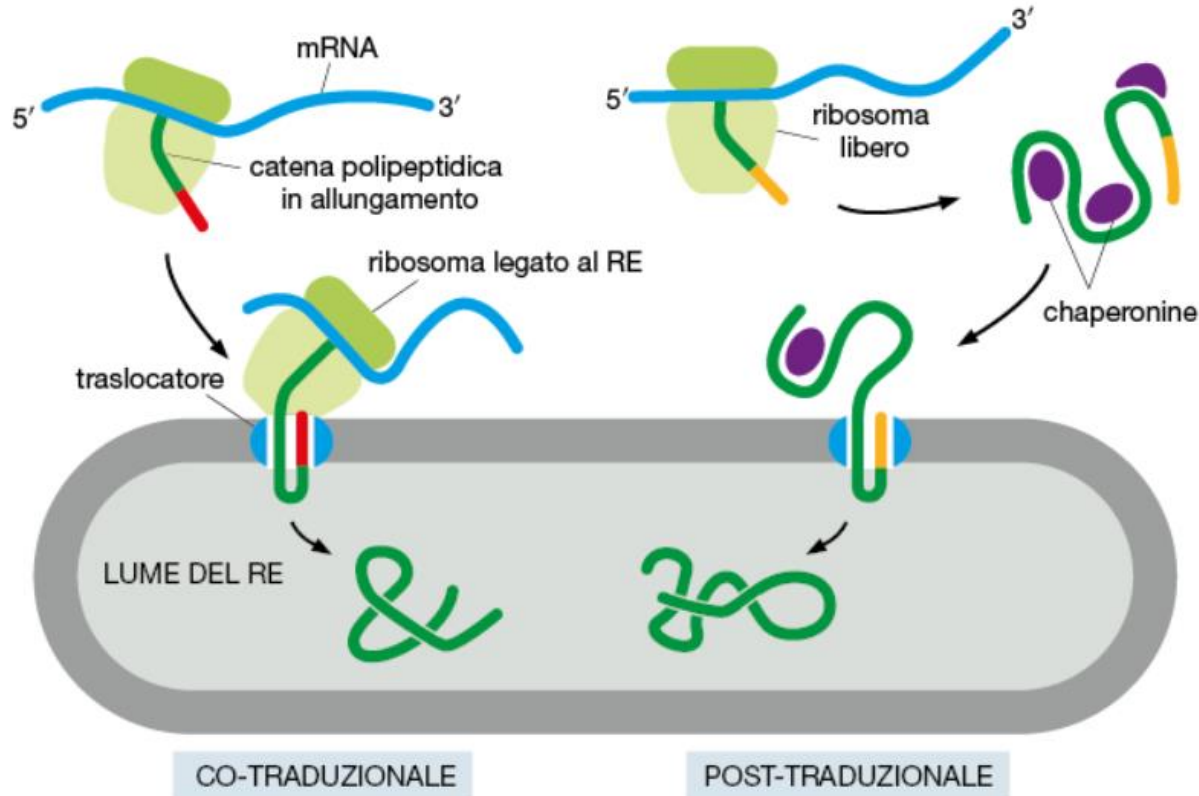
- **Tunnel polipeptidico** del ribosoma + canale Sec61 = **percorso continuo**.

L'energia usata per l'**allungamento polipeptidico** guida indirettamente anche la traslocazione.

La traslocazione avviene in **concomitanza con la traduzione**.

- Quando la traduzione termina:
 - Il **C-terminale** della proteina passa nel lume del RE.
 - Il **tappo si richiude, sigillando il canale**.
- Risultato: **proteina importata prima del ripiegamento** → soluzione efficace per superare la barriera di membrana senza perdite di piccoli ioni/metaboliti.

Non Sempre la Traslocazione Non Co-traduzionale

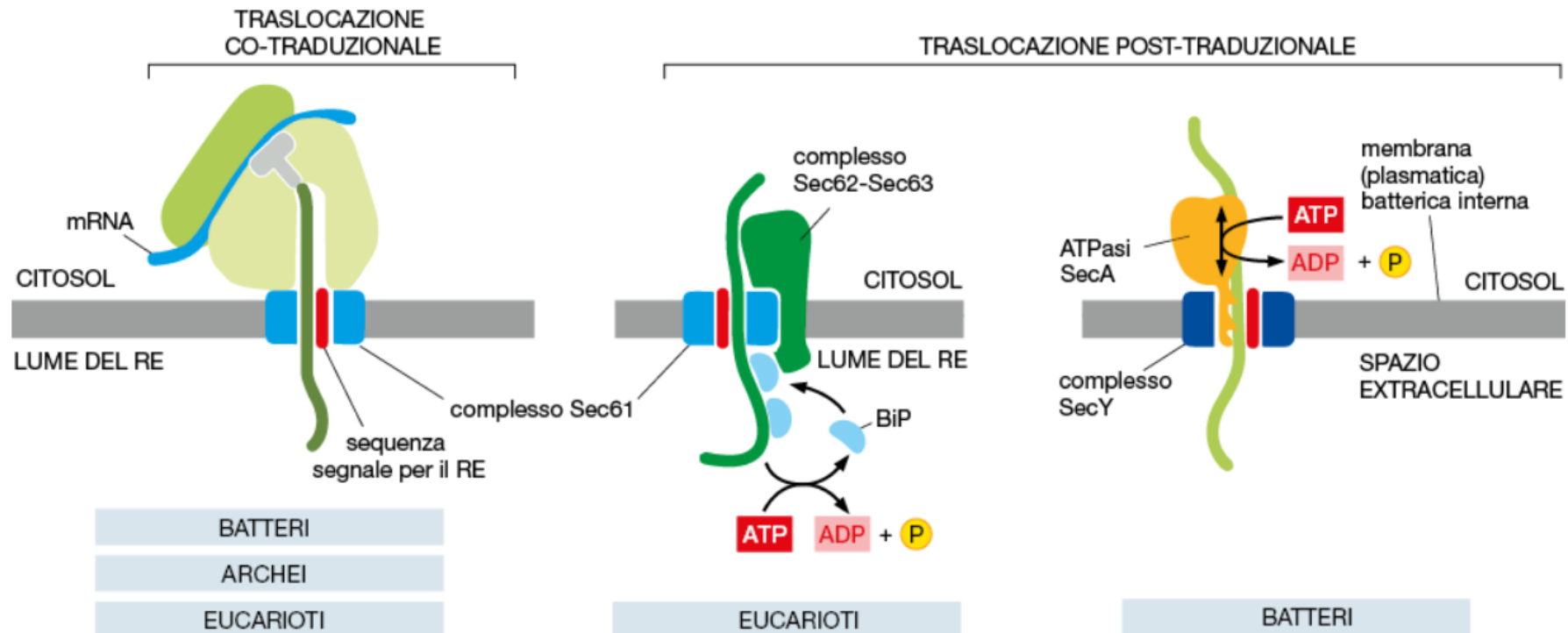


- Nella maggior parte dei casi, la traslocazione nel RE avviene **durante la traduzione** (co-traduzionale).
- Tuttavia, **alcune proteine vengono sintetizzate completamente nel citosol** come precursori → **traslocazione post-traduzionale** (più comune nel RE dei lieviti)

- Il traslocatore utilizzato è sempre **Sec61 (eucarioti)** o **SecY (batteri)**.
- **Canale è sempre stretto** → accetta **solo polipeptidi non ripiegati**.
- Le proteine precursori interagiscono con **chaperon citosolici** (es. **Hsp70**):
 - **Impediscono ripiegamento** o aggregazione.
 - **Si dissociano prima del passaggio** attraverso Sec61.
- **La sequenza segnale** del precursore **apre** comunque il canale Sec61.
- **Le proteine accessorie** che **forniscono energia** per il movimento della catena polipeptidica.

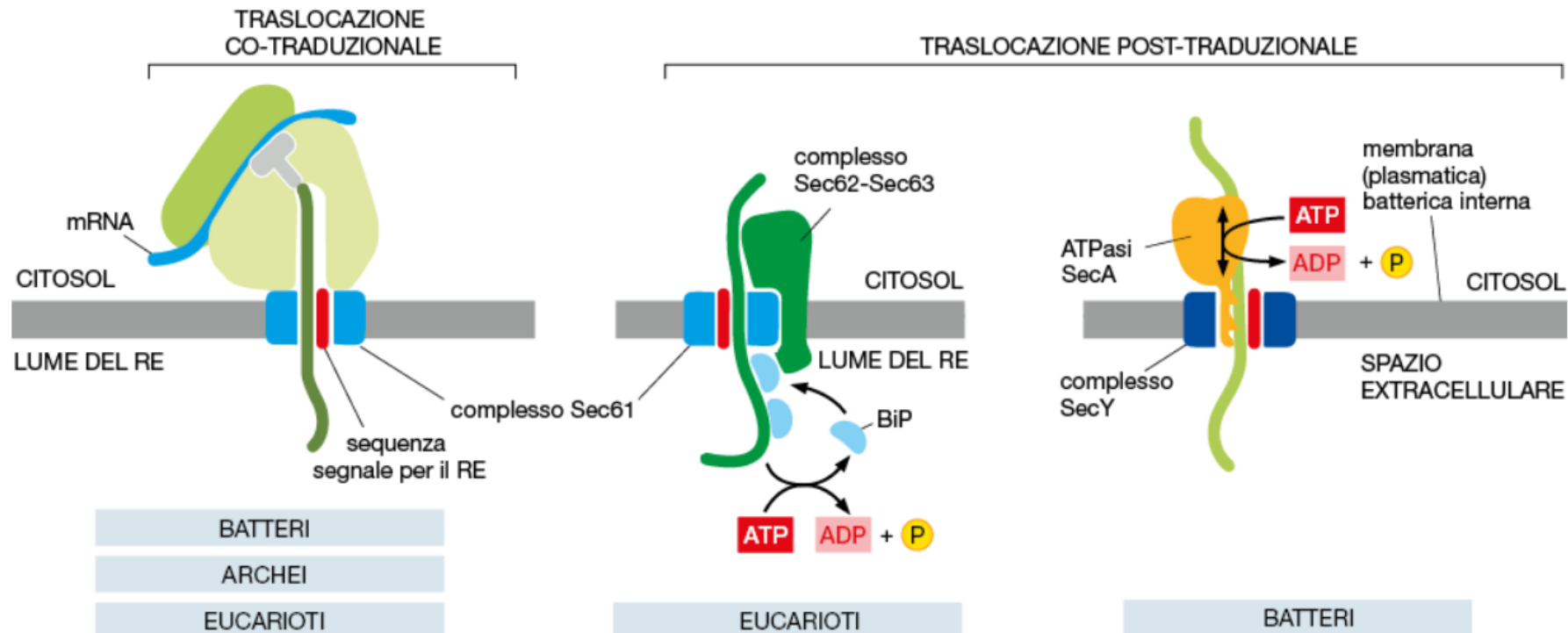
Traslocazione Non Co-traduzionale: Meccanismo Eucariotico

- Nelle cellule eucariotiche intervengono le proteine **Sec62 e Sec63** associate a Sec61.
- Queste **posizionano nel lume del RE la chaperonina BiP** (Binding Protein, simile a Hsp70).
 - **BiP ha alta affinità per polipeptidi non ripiegati.**
 - **Si lega alla catena emergente** dal traslocatore → **impedisce ritorno nel citosol.**
 - **L'idrolisi di ATP** da parte di BiP → **rilascio temporaneo** del polipeptide.
 - Il ciclo di **legame e rilascio ATP-dipendente** agisce da **meccanismo a cremagliera molecolare**, **trascinando la proteina** nel lume del RE.



Traslocazione Non Co-traduzionale: Meccanismo Batterico

- Nei batteri la traslocazione post-traduzionale **coinvolge la proteina SecA**, un'ATPasi citosolica.
- **SecA si lega al precursore proteico** e si associa al **traslocatore SecY** sulla **membrana batterica interna**.
- Una porzione di **SecA si inserisce nel poro**
- Ogni ciclo di **idrolisi di ATP** → **Spinge un tratto della catena** polipeptidica attraverso la membrana plasmatica **verso lo spazio extracellulare**



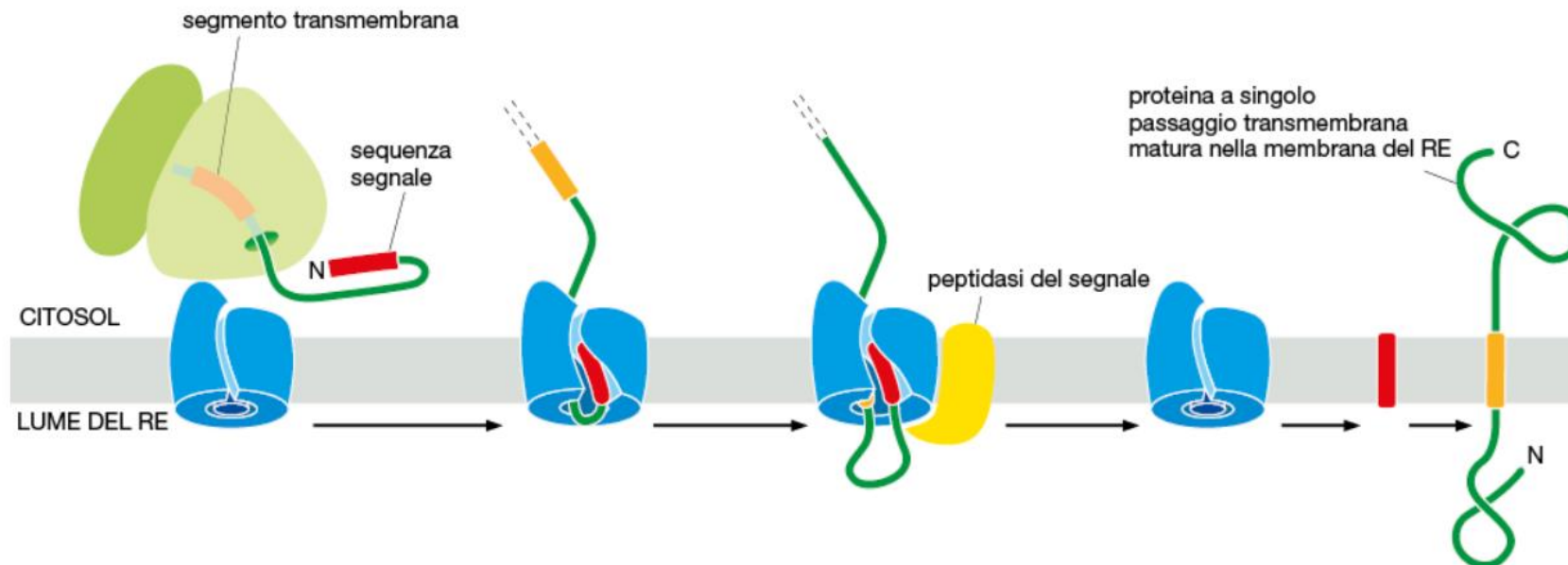
Inserimento delle Proteine Transmembrana e

Tutte le proteine transmembrana del RE, Golgi, lisosomi, endosomi, vescicole secretorie, membrana plasmatica → vengono **inserite nella membrana del RE prima di raggiungere la destinazione finale.**

Attraversano il doppio strato lipidico tramite **segmenti ad α -elica idrofobi**

Fattori coinvolti nell'inserimento sono gli **stessi** usati per le proteine solubili: **SRP, Recettore per SRP, e Traslocatore Sec61.**

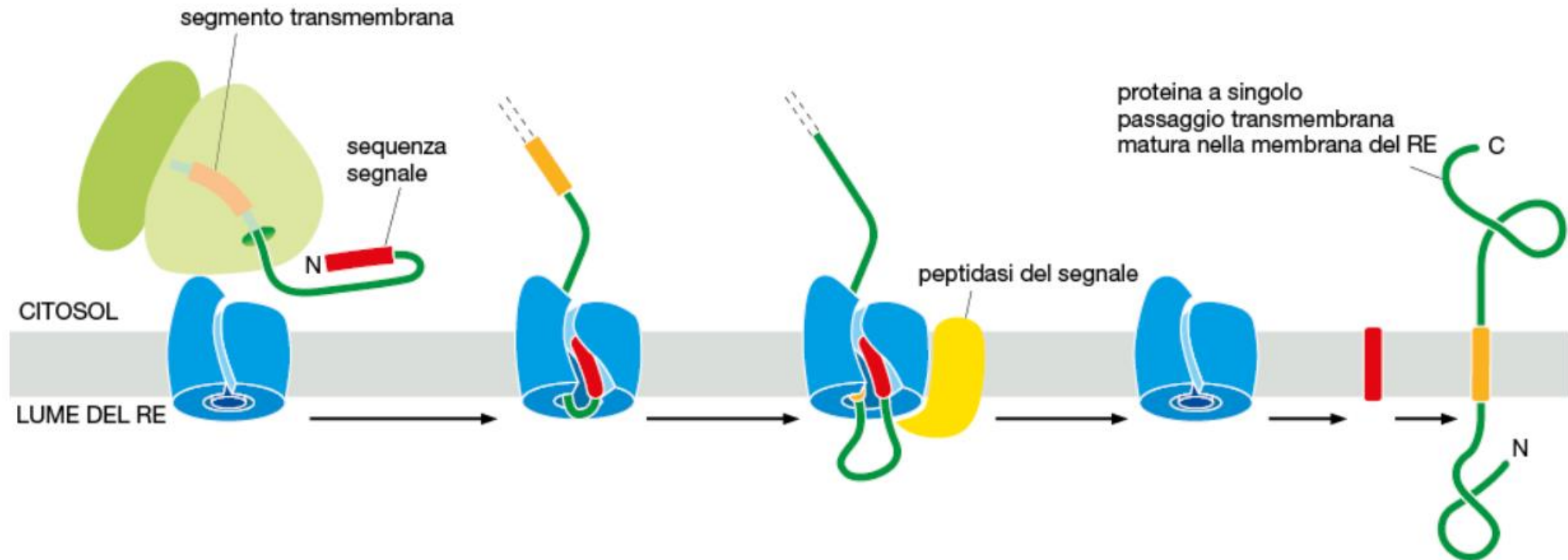
Motivo: i **segmenti transmembrana idrofobi** **assomigliano alle sequenze segnale idrofobe** → riconosciuti dallo stesso sistema.



Caso più semplice: Proteine a Singolo Passaggio

Meccanismo di Riconoscimento:

- Il **segmento idrofobo emerge** dal ribosoma.
- **SRP lo riconosce** come **sequenza segnale**.
- Il **ribosoma viene portato al traslocatore Sec61**.
- Il **segmento transmembrana si inserisce** nel **canale laterale** del Sec61.
- L'**orientamento di inserzione** nel canale laterale **determina: se** il segmento **N-terminale** o **C-terminale** attraversa la membrana nel lume.



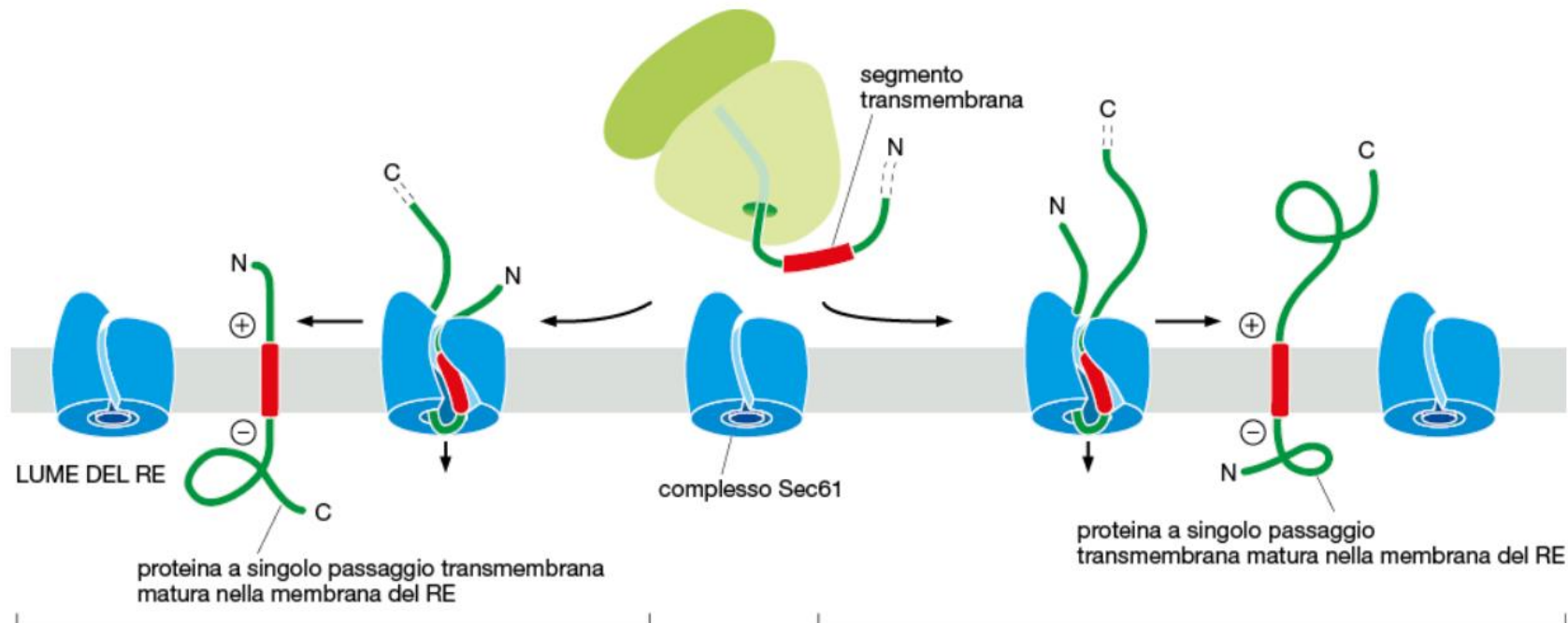
Proteine a Singolo Passaggio: Determinanti dell'orientamento

Lunghezza e ripiegamento del segmento N-terminale:

- Se lungo e stabile → **non passa** nel canale → **rimane citosolico**.
- Se corto e non ripiegato → **può attraversare** la membrana.

Distribuzione di cariche vicino al segmento transmembrana:

- **Cariche positive** vicine al lato **N-terminale** → **favoriscono orientamento** con **N-terminale citosolico**.
- **Cariche positive** vicine al lato **C-terminale** → **favoriscono orientamento** con **C-terminale citosolico**.

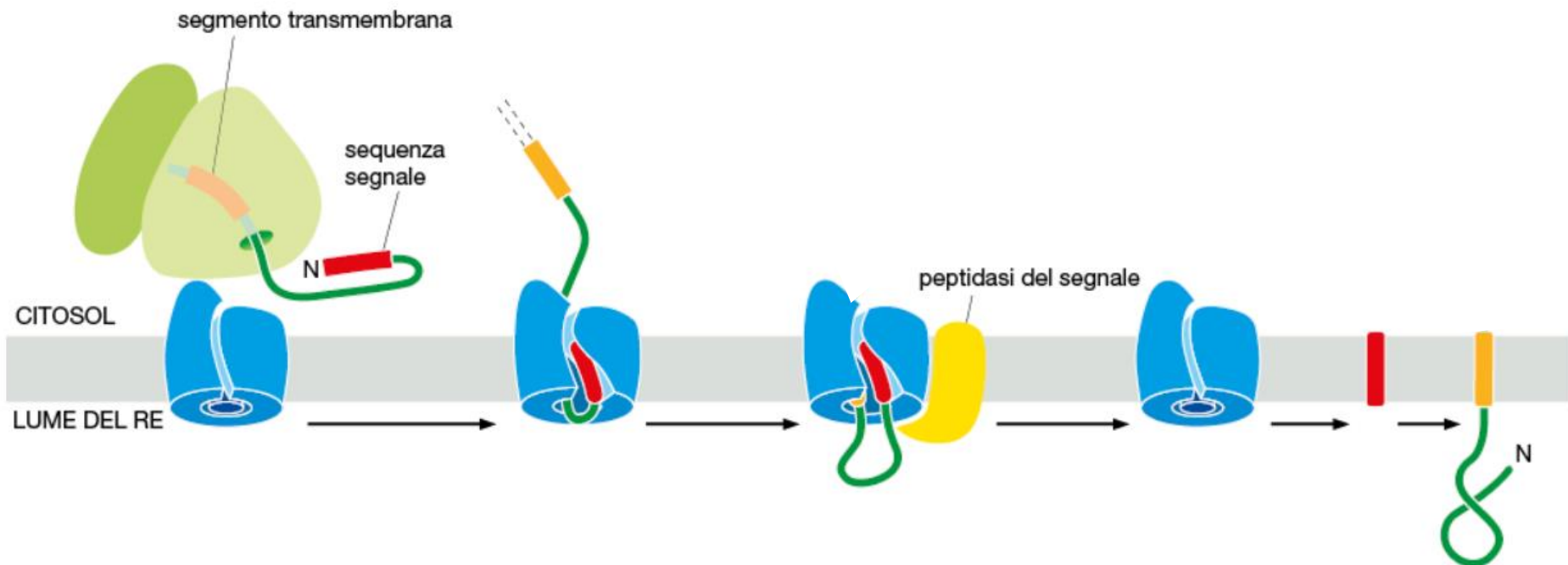


Proteine con Ampi Domini Luminali

Proteine con ampi domini luminali

Alcune proteine transmembrana hanno grandi domini **N-terminali luminali**.

- Una **sequenza segnale N-terminale** avvia la traslocazione (come nelle proteine solubili).
- L'**N-terminale** entra nel lume del RE.
- Quando un segmento transmembrana idrofobo emerge → si inserisce nel **canale laterale**.
- Il segmento idrofobo esce lateralmente nel doppio strato lipidico → **arresto della traslocazione**.
- Il resto della proteina viene sintetizzato sul lato **citosolico** della membrana



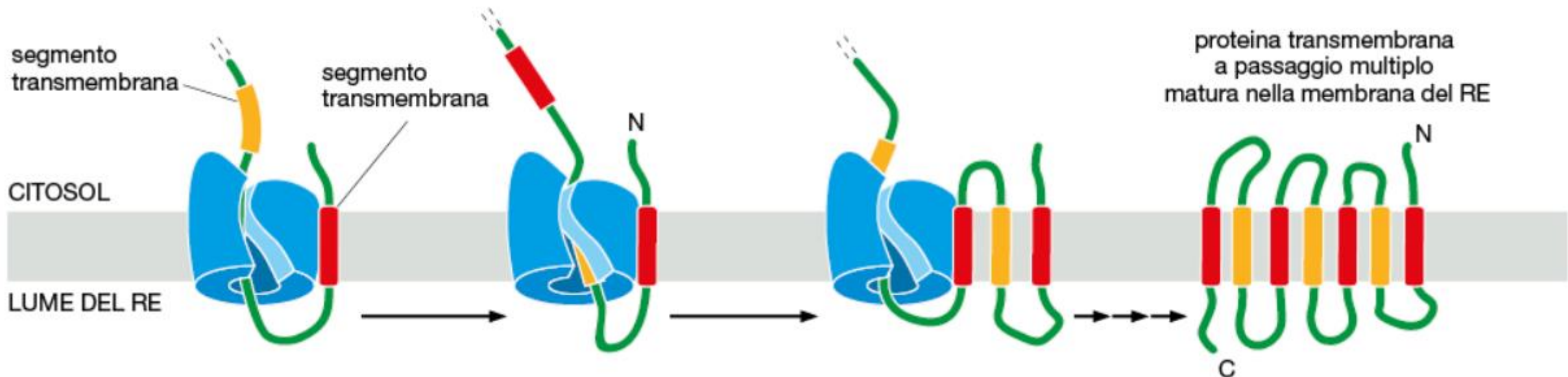
Proteine Transmembrana a Passaggio Multiplo

Definizione e contesto

- Le **proteine transmembrana a passaggio multiplo**
 - Fino al **primo segmento transmembrana** → **meccanismo analogo** alle proteine a singolo passaggio.
 - Il **primo segmento transmembrana si inserisce nel canale laterale** con orientamento determinato dal dominio N-terminale e dalle cariche vicine.

Ruolo del primo segmento transmembrana

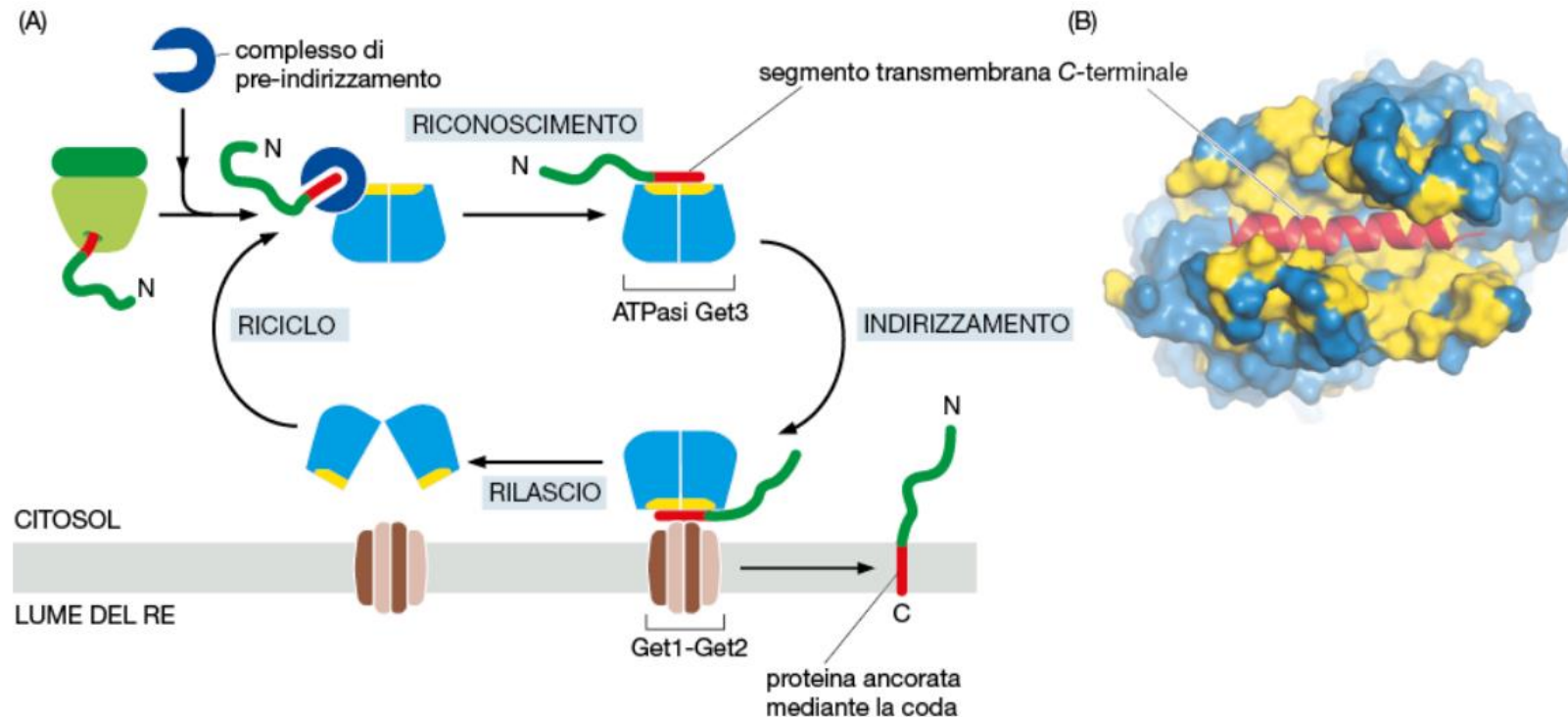
- L'inserimento del **primo segmento transmembrana blocca la topologia della proteina**.
- Da questo momento in poi:
- Una proteina multipasso viene intrecciata nella membrana con segmenti alternati fino al completamento.
- Si inserisce nella membrana con **orientamento opposto** a quello del segmento precedente
- La membrana del RE è **asimmetrica**



Proteine “Tail-Anchored”

Proteine “tail-anchored” (TA): concetto

- Importanti proteine di membrana **esposte al citosol** sono ancorate da un'unica α -elica molto vicino al **C-terminale**.
- Esempi: **subunità SNARE** del traffico vescicolare.
- Durante la traduzione, la coda idrofoba (C-terminale) è ancora nel **tunnel del ribosoma** quando arriva il **codone di stop** → **SRP non può riconoscere** → la proteina viene **rilasciata nel citosol**.



- Il **segmento idrofobo C-terminale** è riconosciuto da un **complesso di chaperonine** specializzato → consegna a **Get3**.
- **Get3**: fattore di indirizzamento con **tasca idrofoba ricca di Met**
- **Get1/Get2** (membrana del RE): **recettori** per Get3 e **traslocatori** che **inseriscono la coda idrofoba nel doppio strato**.
- **Analogia concettuale** con via **SRP**, ma **post-traduzionale** e specifica per **TM C-terminali**.
- Alcune TA sono indirizzate a **mitocondri/perossisomi** (meccanismi non chiariti).

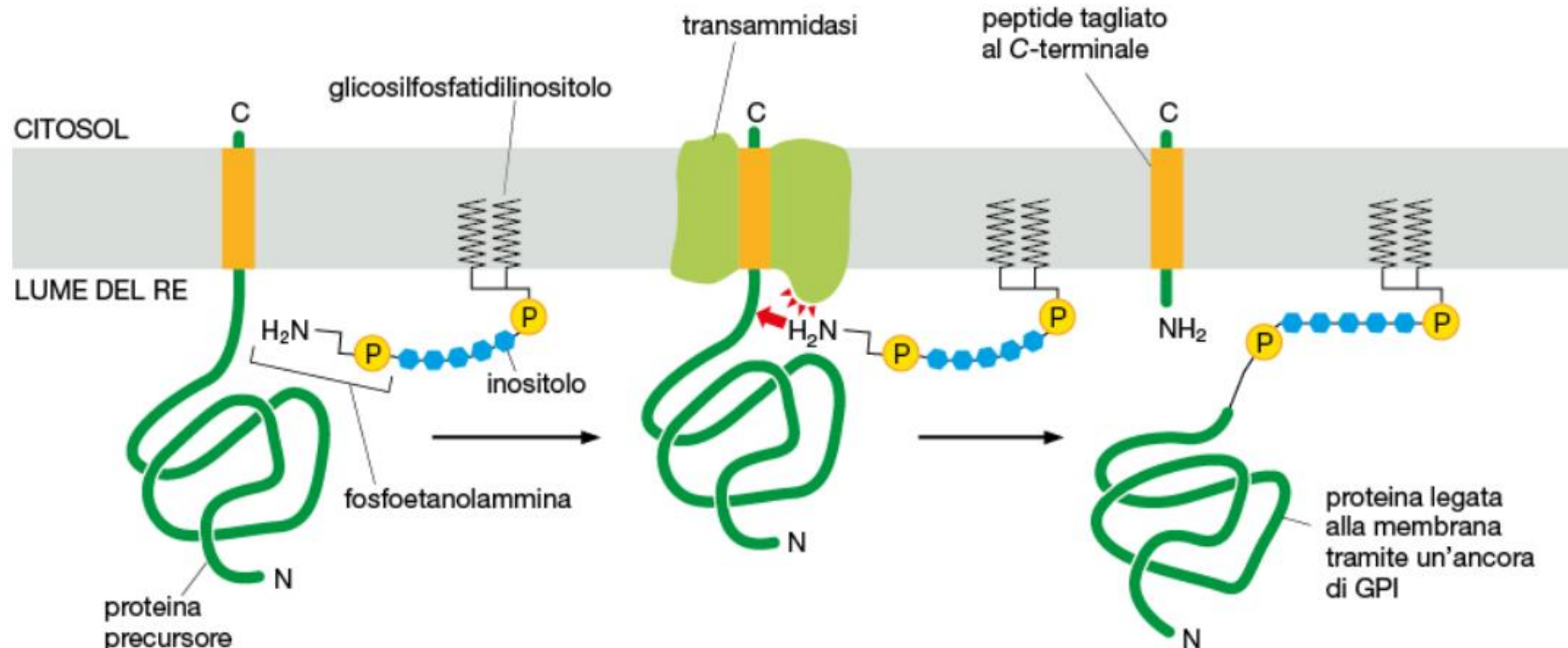
Proteine con Ancora GPI

Proteine con ancora GPI: principio

- Alcune proteine destinate alla **membrana plasmatica** sono **legate covalentemente** a un'**ancora GPI** (glicosil-fosfatidil-inositolo) al **C-terminale**.
- Produzione: sequenza segnale **N-terminale** → targeting al RE; **segmento idrofobo C-terminale** come **segnale di ancoraggio GPI**.
- **Transammidasi** nel RE: **taglia** il tratto idrofobo C-terminale e **attacca** l'**ancora GPI preformata** al nuovo C-terminale.

Conseguenze funzionali dell'ancora GPI

- Le proteine GPI-anchored sono esposte **lato luminale/esterno** e **restano ancorate** tramite il lipide.
- Possono essere **rilasciate** da una **fosfolipasi** specifica.
- **Targeting laterale**: tendono ad arricchirsi in **lipid rafts** (zattere lipidiche) → **microdomini** funzionali.



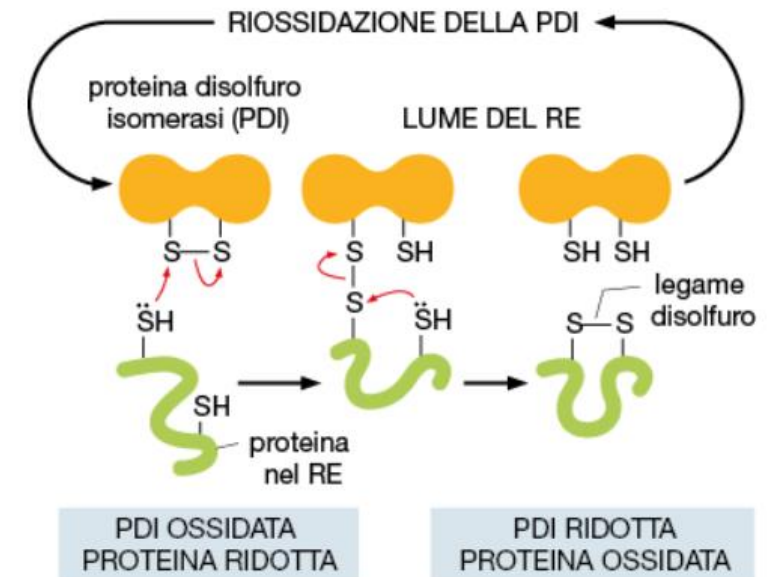
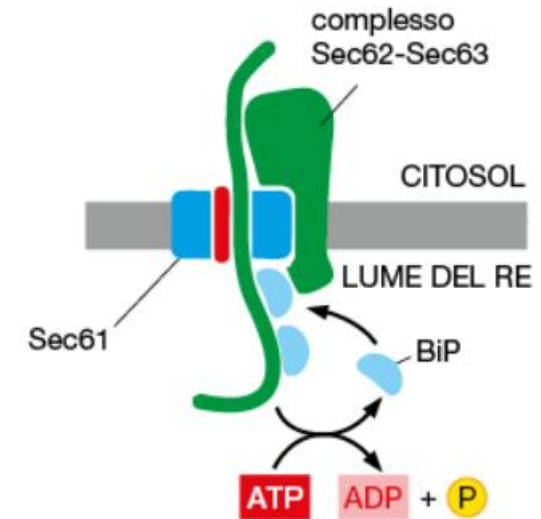
Ripiegamento nel Lume del RE

Ripiegamento nel lume del RE: visione d'insieme

- Le proteine entrano nel RE **non ripiegate** → necessitano di **chaperonine** per il folding.
- Le proteine **BiP (Hsp70 del RE)** spingono polipeptidi post-traduzionali nel lume (via Sec61) e **assiste il ripiegamento**.
- **Riconosce regioni idrofobe esposte** e in seguito a **cicli di idrolisi di ATP** → **legare/rilasciare** per favorire il **refolding**;
- **Trattiene le proteine non ancora foldate** nel RE, evitando traffico prematuro al Golgi.

PDI e legami disolfuro (S-S)

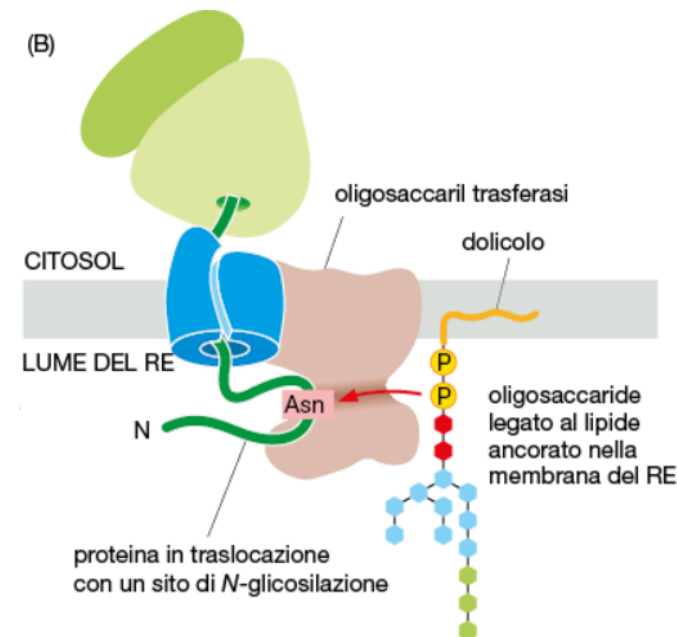
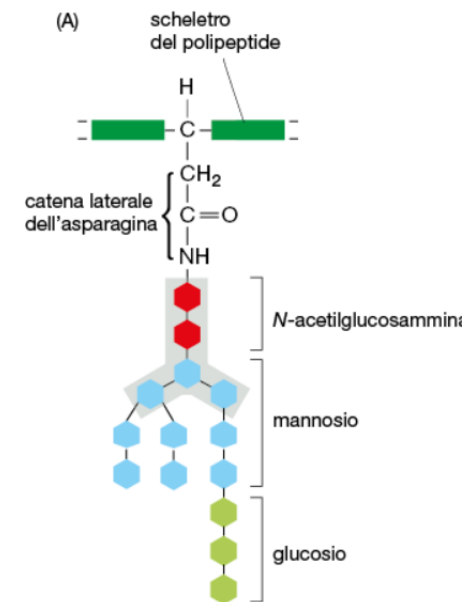
- **PDI** (protein disulfide isomerase): **ossidoreduttasi** che **forma/riorganizza** legami **S-S** tra cisteine.
- **Stabilizza lo stato ripiegato**, utile in ambienti extracellulari ostili.
- **Alcuni membri riducono S-S** proteine mal ripiegate per **dispiegamento** → **retro-traslocazione** e **degradazione**.
- **Ambiente redox**: il lume del **RE** è **ossidante** (→ S-S comuni); il **citosol** è **riducente** (→ S-S rari).



Glicosilazione N-linked nel RE

Glicosilazione N-linked: principio

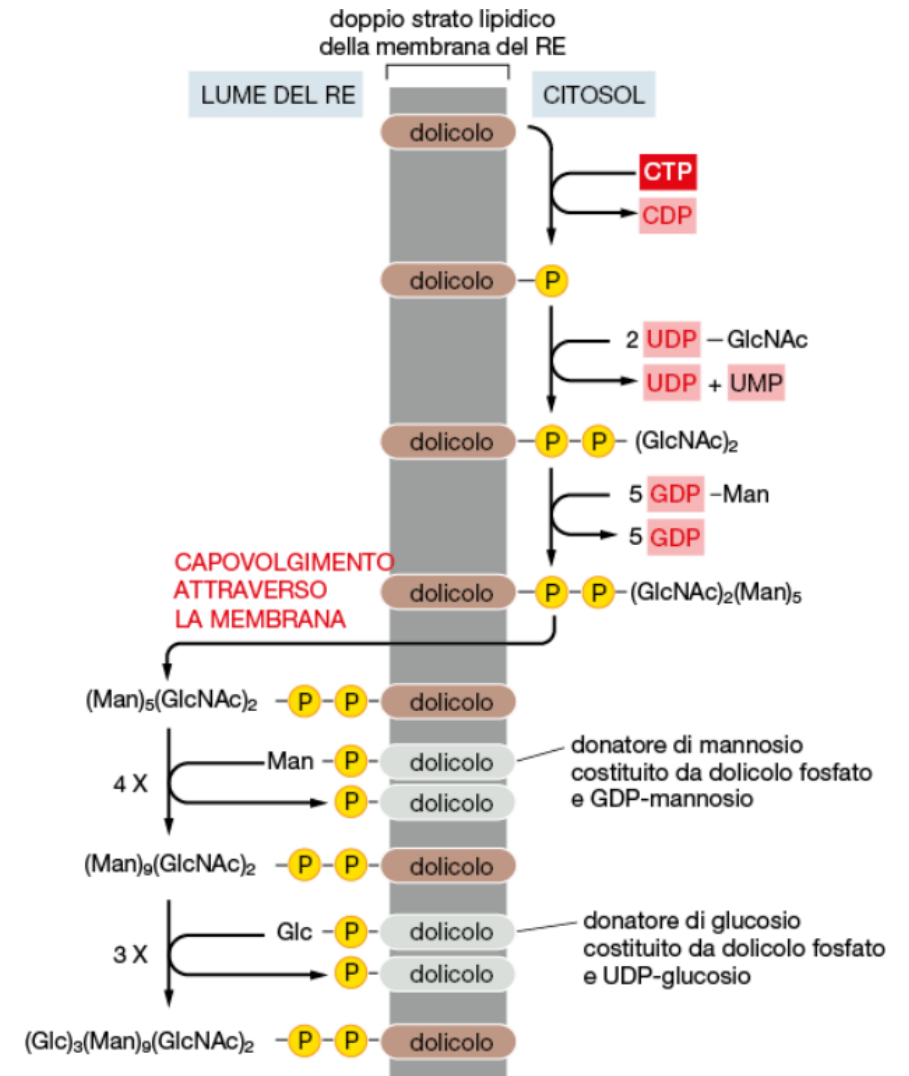
- ~**50%** delle proteine che entrano nel **RE** (solubili e di membrana) diventano **glicoproteine**.
- **Oligosaccaride precursore** (14 zuccheri: $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) **trasferito in blocco** all'**Asn** (sequenze **Asn-X-Ser/Thr**; $X \neq \text{Pro}$).
- **Enzima: oligosaccaril-transferasi (OST)** associata a **Sec61**, sito attivo luminale → **modifica co-traslocazionale**.
- **Dolicolo (lipide vettore)**, integrato nella **membrana del RE**, a cui viene legato l'oligosaccaride precursore.
- **La costruzione dell'oligosaccaride precursore** sul dolicolo avviene **sul versante citosolico** della membrana del RE con un meccanismo "**sugar-by-sugar**", che prevede l'attivazione con **UDP/GDP-zuccheri**,
- **Successivamente avviene il flip del dolicolo** che porta l'intermedio lipide-zucchero **sul versante luminale del RE**



Glicosilazione N-linked nel RE

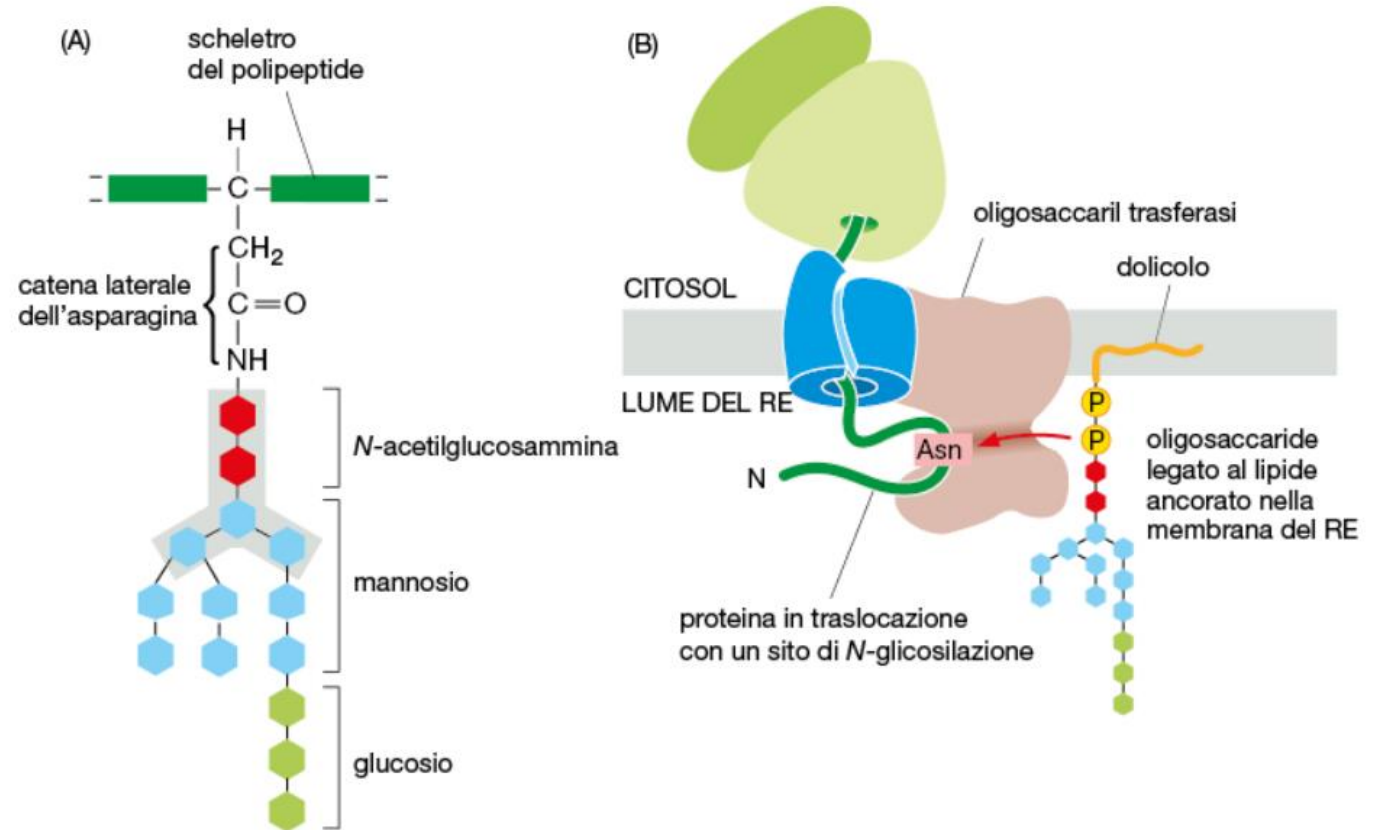
Glicosilazione N-linked: principio

- ~**50%** delle proteine che entrano nel **RE** (solubili e di membrana) diventano **glicoproteine**.
- **Oligosaccaride precursore** (14 zuccheri: $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) **trasferito in blocco** all'**Asn** (sequenze **Asn-X-Ser/Thr**; $X \neq \text{Pro}$).
- **Enzima: oligosaccaril-transferasi (OST)** associata a **Sec61**, sito attivo luminale → **modifica co-traslocazionale**.
- **Dolicolo** (lipide vettore), integrato nella membrana del RE, a cui viene legato l'oligosaccaride precursore.
- **La costruzione dell'oligosaccaride precursore sul dolicolo avviene sul versante citosolico** della membrana del RE con un meccanismo “**sugar-by-sugar**”, che prevede l'attivazione con **UDP/GDP-zuccheri**,
- **Successivamente avviene il flip del dolicolo** che porta l'intermedio lipide-zuccheri **sul versante luminale del RE**



Perché la N-glicosilazione è così comune?

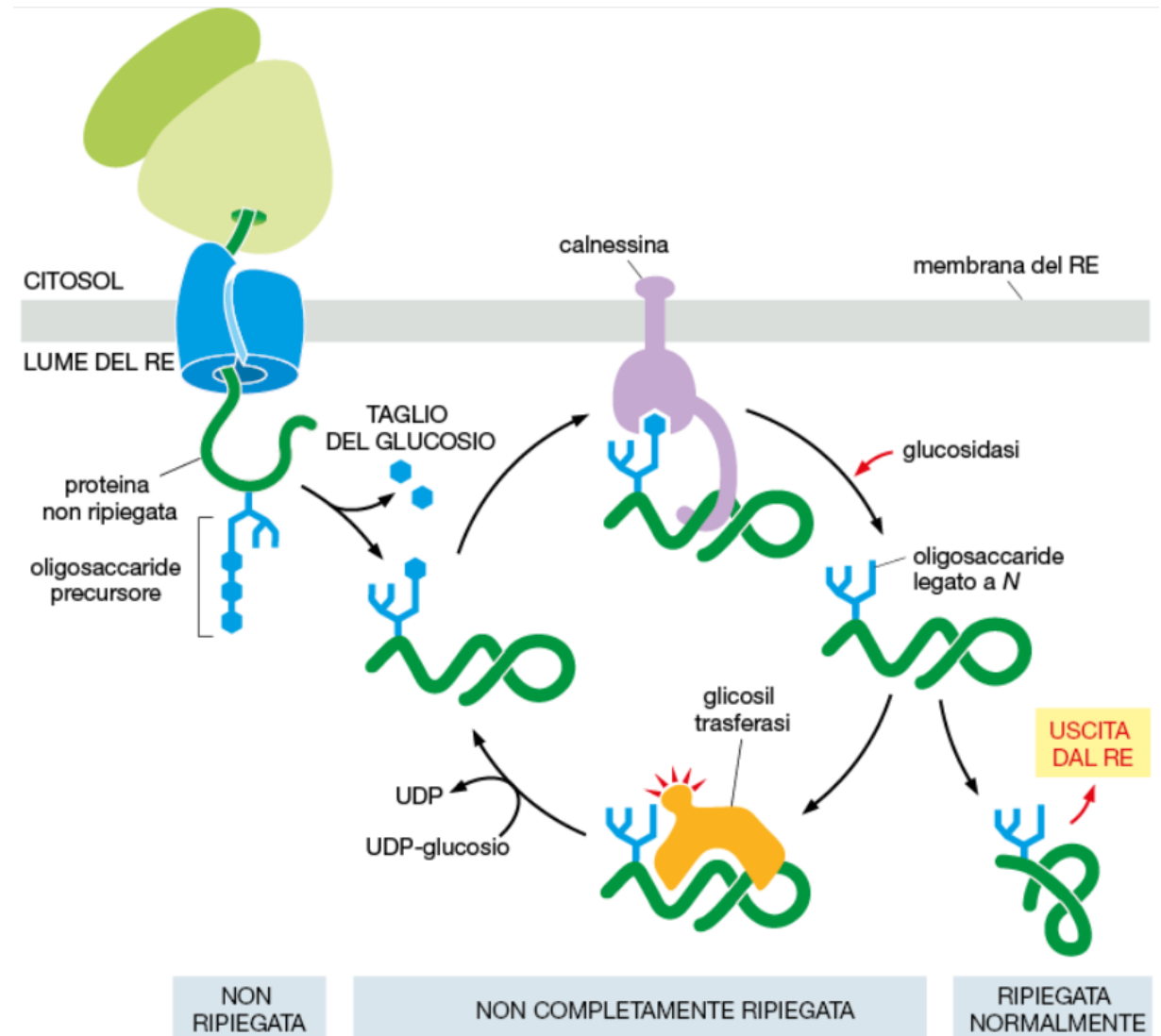
- Non sempre è importante il sito esatto in cui avviene la glicosilazione
- È la **presenza stessa** del glicano a **favorire ripiegamento e controllo qualità**.
- Introduce **etichette riconoscibili** da **chaperon lectine** (calnessina/calreticulina) e da **sensori del misfolding**



Ciclo Calnessina/Calreticulina: Controllo Qualità del RE

Ciclo calnessina/calreticulina (CQ del RE)

- Subito **dopo il trasferimento dell'oligosaccaride precursore**, degli **enzimi detti glucosidasi rimuovono 2 glucosi** → lasciando così un **1 solo Glc terminale**.
- **Calnessina (membrana RE)** e **calreticulina (solubile)** legano glicoproteine con 1 Glc →
 - **Trattengono** proteine **non completamente ripiegate**;
 - **Prevengono** aggregazione;
 - **Promuovono** interazione con **chaperon Erp57** (assiste nella **formazione/controllo dei S-S**).
- **Se le proteine sono ripiegate correttamente** → **Rimozione del Glc terminale** → **rilascio e uscita dal RE**.
- **Se ancora non ripiegata** → **glicosil-transferasi rimette 1 Glc** → **segnale per riconoscimento e legame a calnessina/calreticulina** → **ciclo riparte** fino a folding corretto.

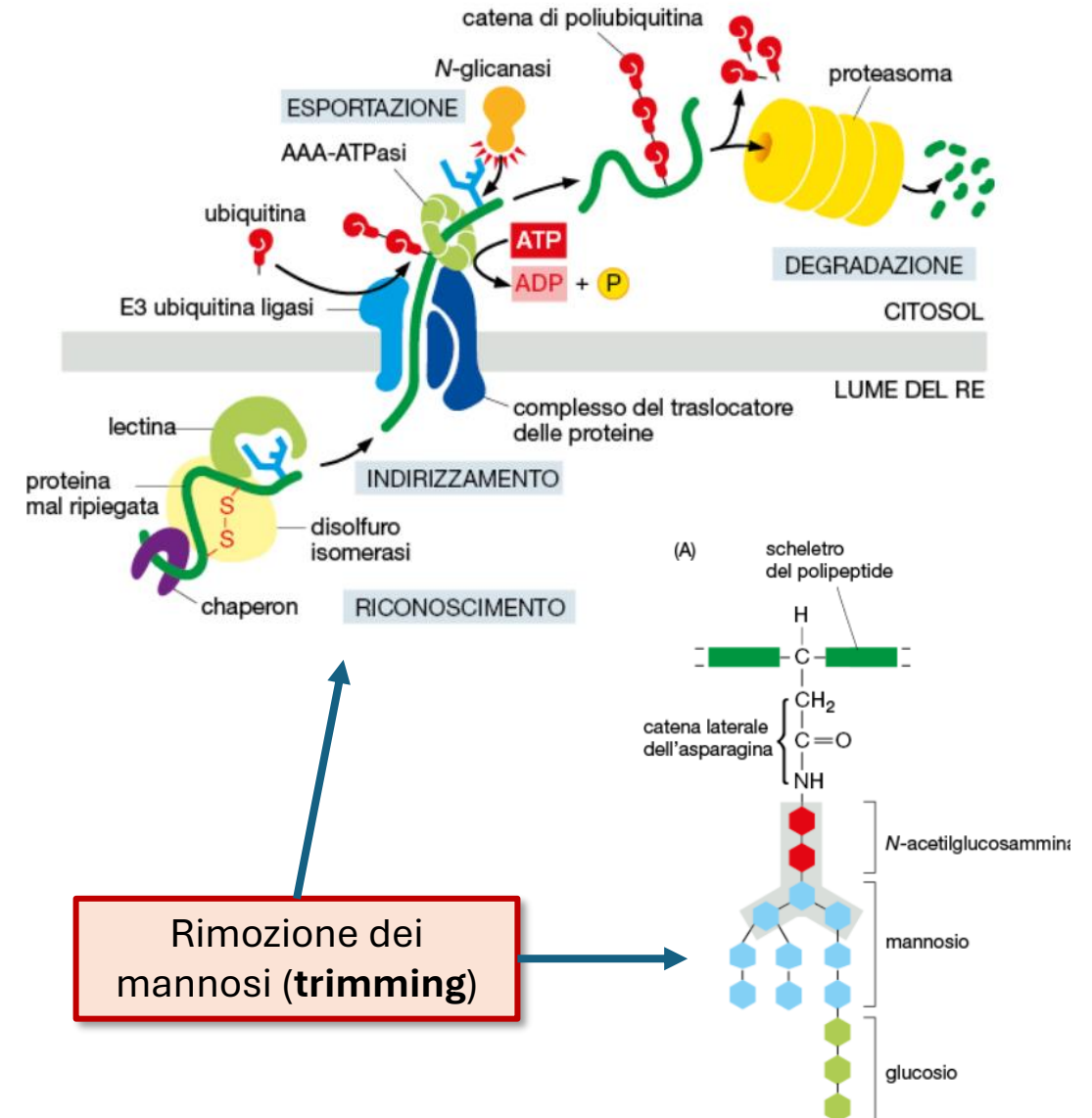


Dal controllo qualità alla degradazione (ERAD)

- Nonostante chaperon e catalizzatori del folding, molte proteine nel RE non raggiungono il corretto stato ripiegato/oligomerico.
- Soluzione: **retrotraslocazione** nel citosol e degradazione nei proteasomi.

Dal controllo qualità alla degradazione (ERAD)

- Se il folding tarda delle mannosidasi del RE rimuovono mannosì terminali dell'oligosaccaride → questo è il **segnale** per lectine che **instradano alla degradazione**.
- Solo le proteine che si ripiegano prontamente evitano il trimming e sfuggono all'eliminazione.



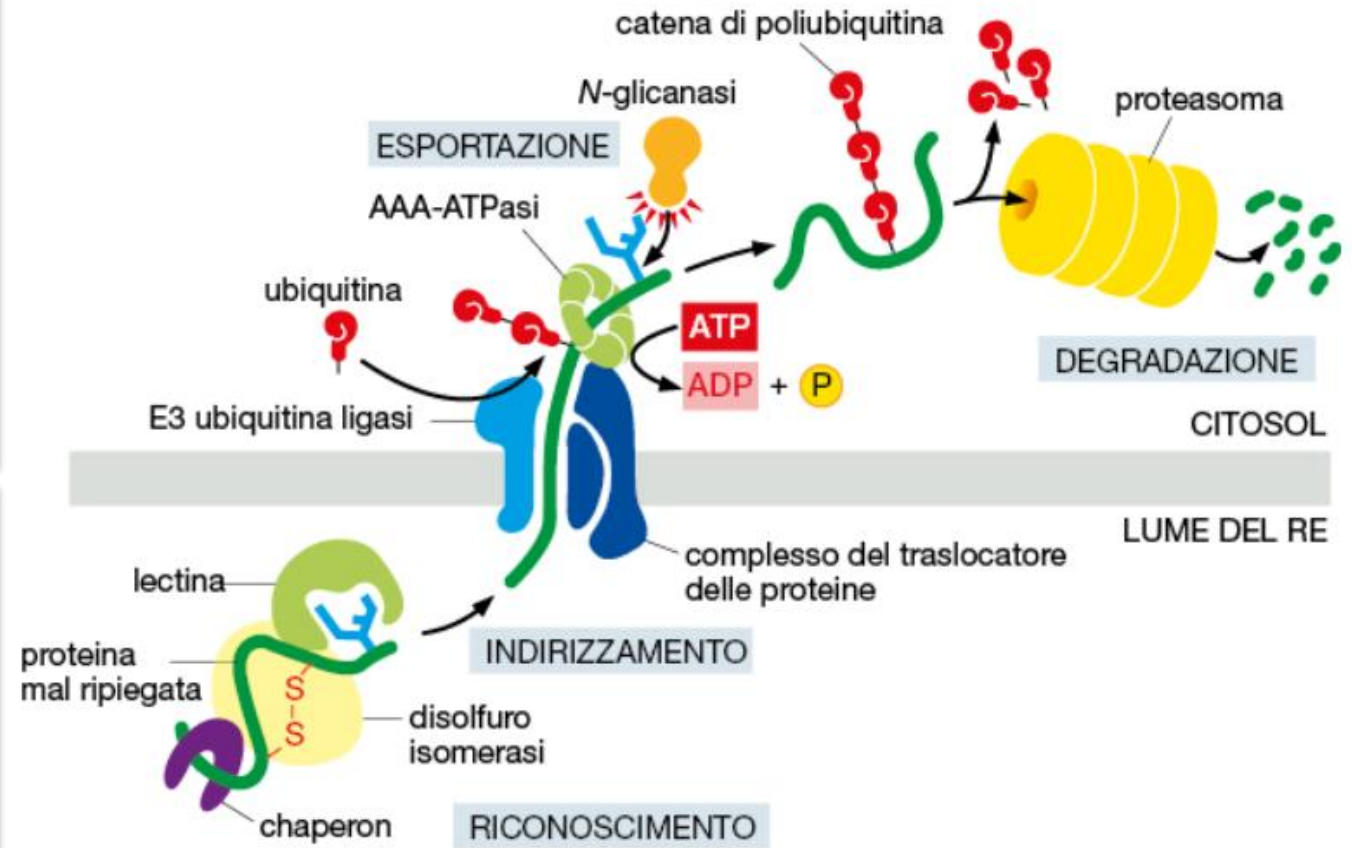
ERAD: (Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation)

Selezione delle proteine da degradare: il “timer” degli oligosaccaridi

- Oligosaccaridi N-linked come **timer**
- **Mannosidasi** del RE **rimuove lentamente un mannosio dal core** → **crea un epitopo riconosciuto da lectine** del lume coinvolte nell'apparato di **retrotraslocazione**.
- **Se la proteina si ripiega ed esce prima del trimming** → **sfugge alla degradazione**.

Fase di riconoscimento nel lume del RE

- Oltre alle **lectine**, **Chaperon** (impediscono **aggregazione**; mantengono **conformazione estesa**).
- **Proteine disolfuro isomerasi (PDI)**: **rompono/ridistribuiscono S-S errati** per **dispiegare** la catena.
- Output: substrato **lineare, non ripiegato**, pronto per la **retrotraslocazione**.



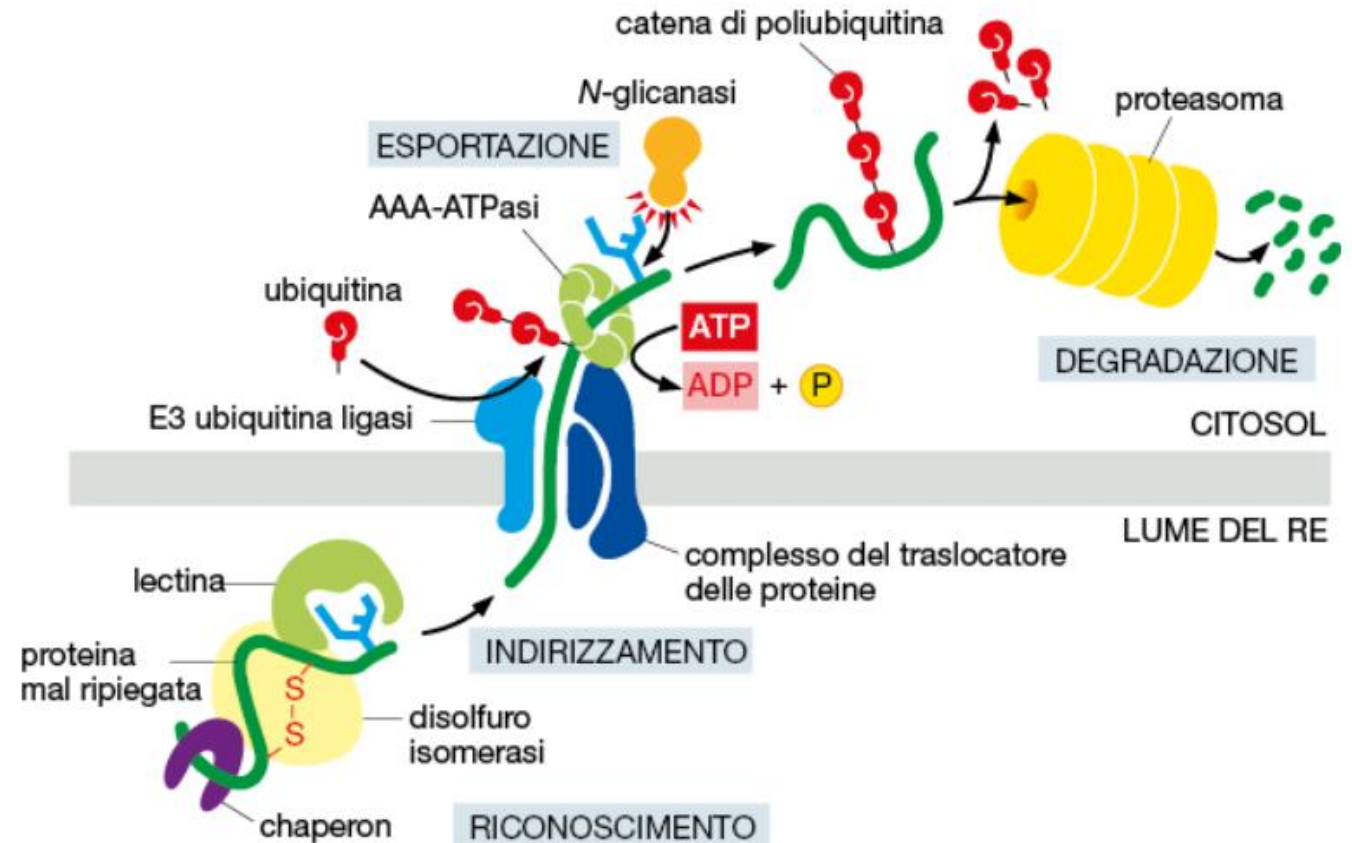
ERAD: (Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation)

Il “Retrotraslocatore” (complessi multipli)

- **Più complessi di traslocazione** nel RE (per diversi sottoinsiemi di substrati).
- **Ogni complesso contiene una ubiquitina ligasi E3** integrale di membrana (hub del complesso).

Ubiquitinazione e estrazione nel citosol

- **E3 ligasi** aggiunge **poliubiquitina** alla proteina. Le catene di ubiquitina **impediscono il ritorno nel RE** e fungono da maniglia.
- **AAA-ATPasi esamerica** (famiglia AAA; es. p97/Cdc48): Usa **ATP** per **tirare il polipeptide attraverso il traslocatore** nel citosol (forza direzionale).
- **N-glicanasi**: **rimuove in blocco gli oligosaccaridi** N-linked dalla proteina retrotraslocata.

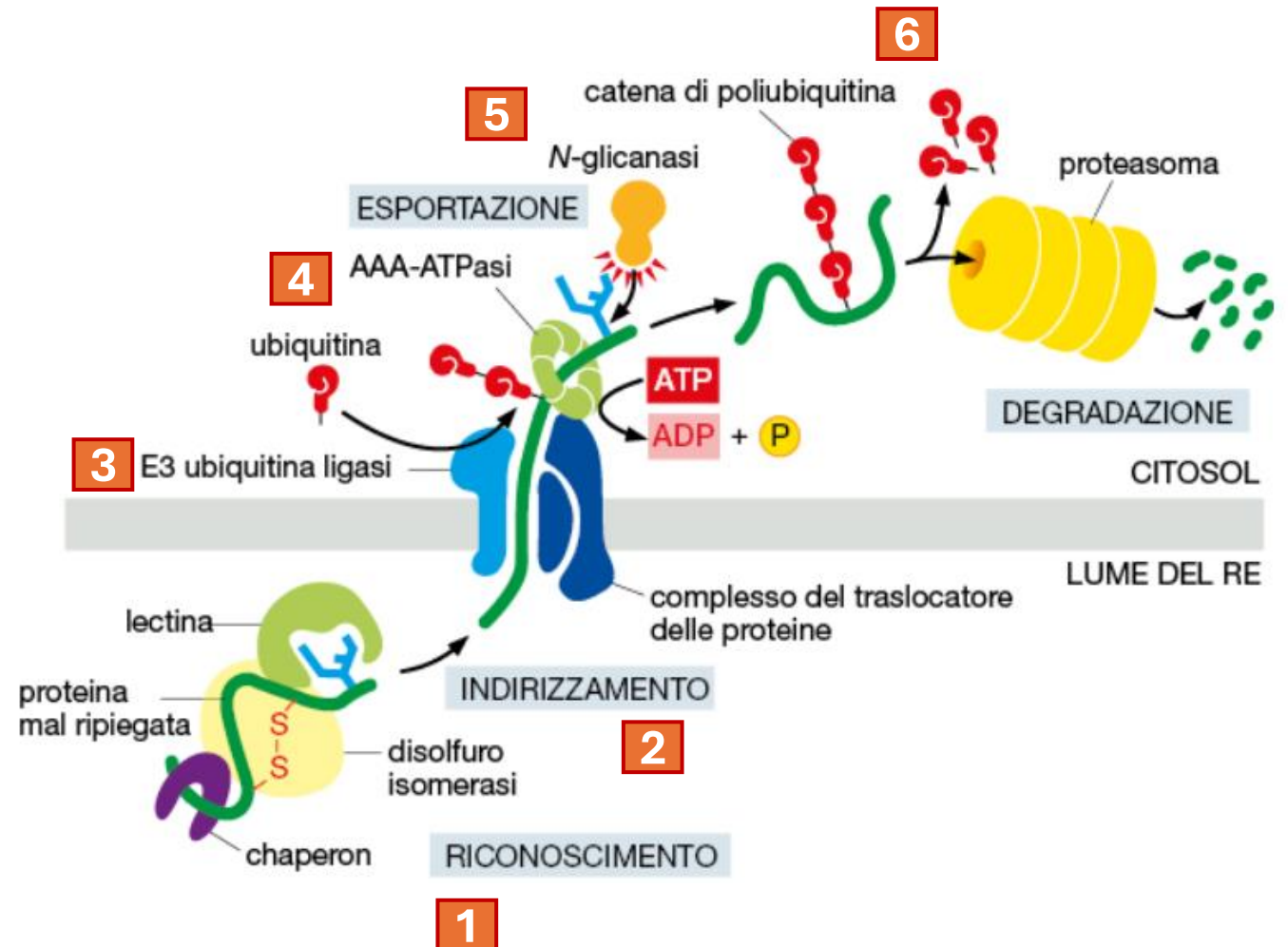


ERAD: (Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation)

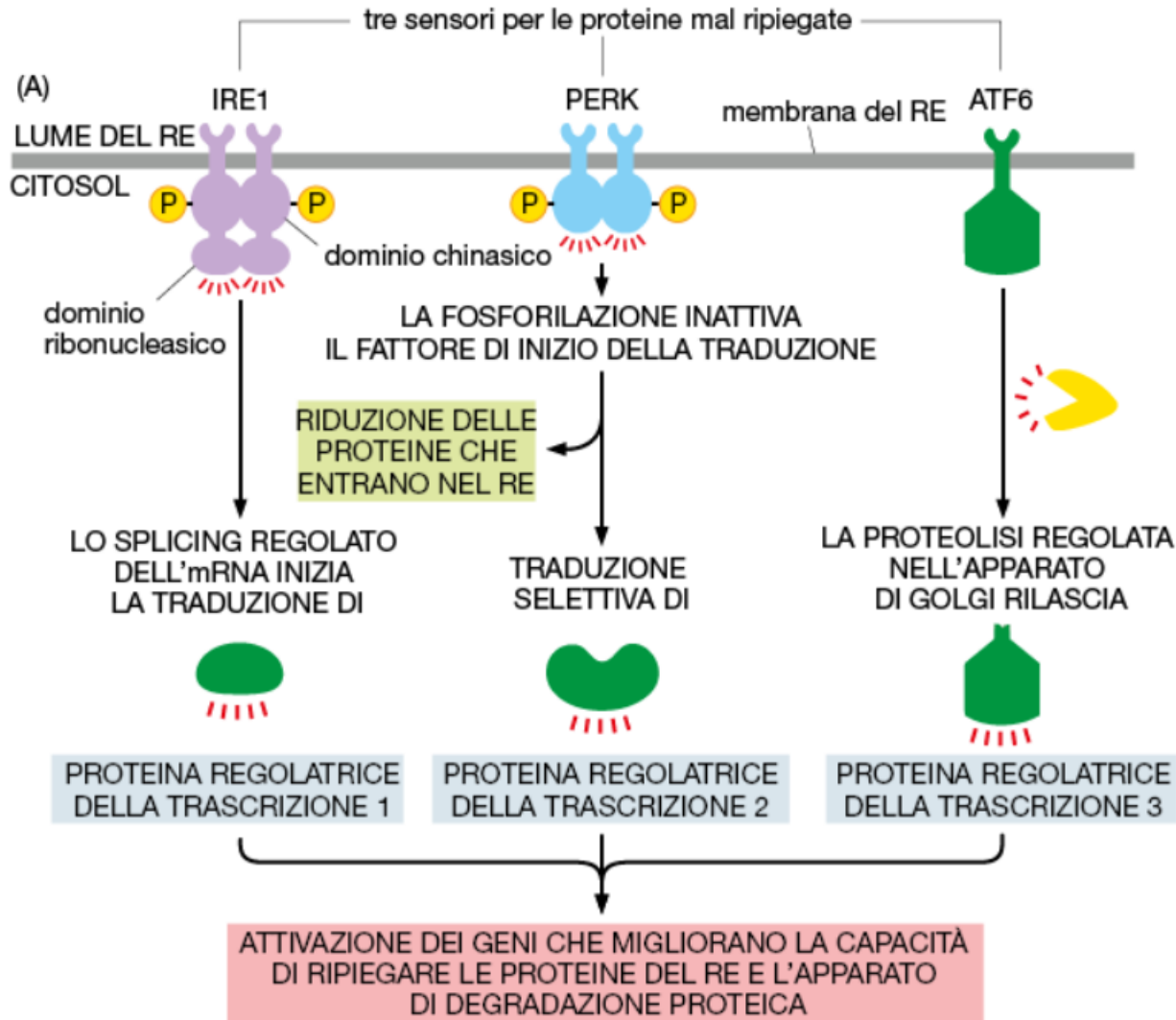
Degradazione finale

- La proteina **deglicosilata** e **poliubiquitinata** è rapidamente consegnata al **proteasoma** → **degradazione** in peptidi.
- Energia** richiesta: cicli di **idrolisi di ATP** (AAA-ATPasi; processività proteasomale).

- Riconoscimento nel lume**: lectine (timer N-glycan), chaperon, PDI.
- Consegna al traslocatore** (che è in **complesso con una E3**).
- Ubiquitinazione** mentre emerge nel citosol.
- Estrazione** con **AAA-ATPasi** (motore che trascina fuori la proteina).
- Deglicosilazione** (N-glicanasi).
- Degradazione** nel **proteasoma**.



UPR: Unfolded Protein Response



Perché serve una risposta del RE? Accumulo di proteine mal ripiegate:

- **Citosol** → risposta da shock termico (↑ chaperon citosoliche, Hsp).
- **RE** → **UPR (Unfolded Protein Response)**.
- Obiettivo: **aumentare la capacità di folding del RE** e **ridurre il carico proteico**.

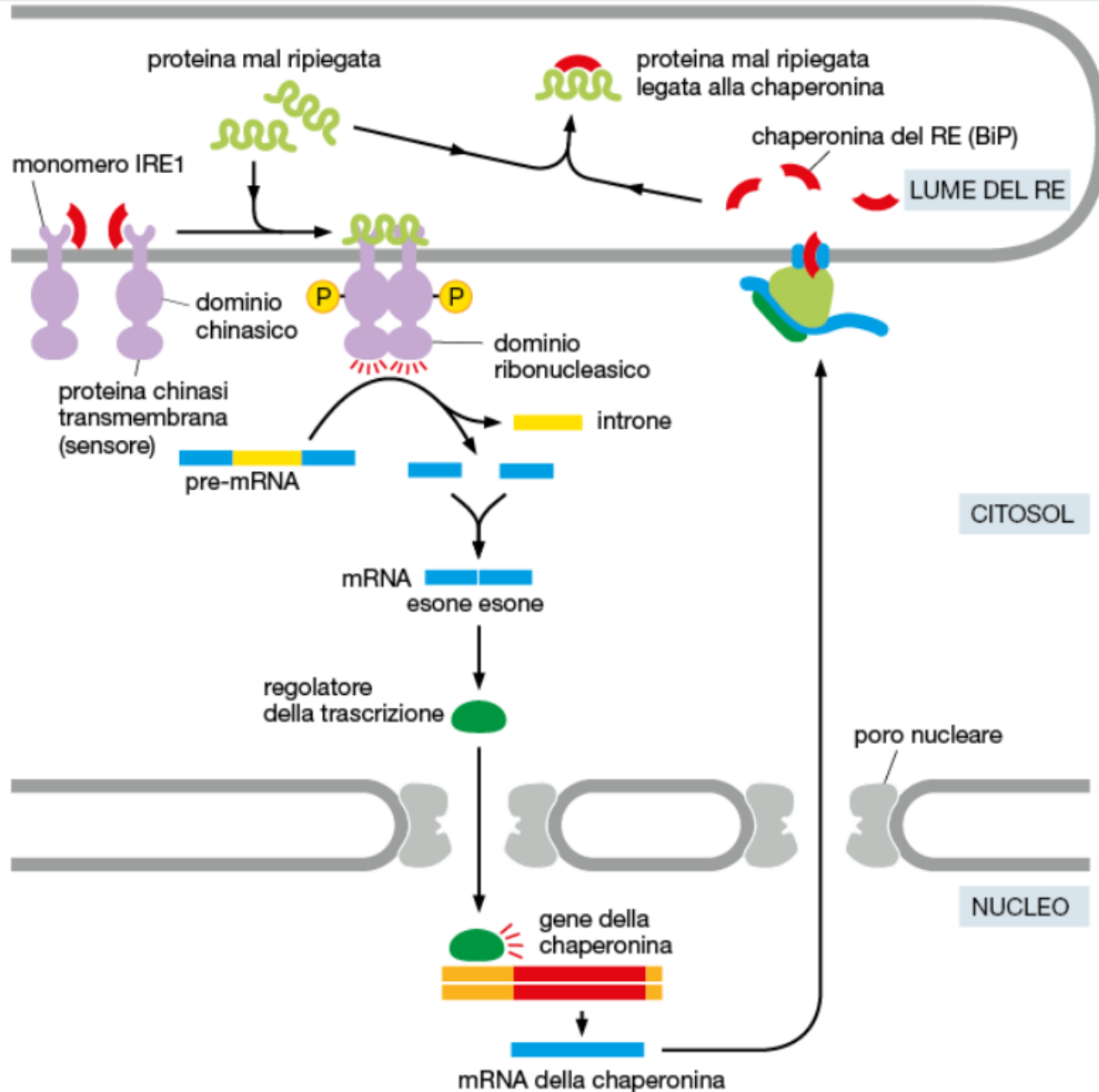
Effetti globali dell'UPR

- **Attivazione della trascrizione** di centinaia di geni:
 - **Chaperon del RE** (BiP, calnessina, calreticulina, PDI...).
 - **Macchinario di retrotraslocazione e degradazione** (ERAD).
 - **Fattori per il trasporto proteico** fuori dal RE.
 - **Fattori per espansione del RE** (lipidi di membrana, enzimi).

Le 3 vie parallele dell'UPR

1. **IRE1** → splicing regolato di mRNA citosolico → fattore trascrizione attivo.
2. **PERK** → fosforilazione fattore di inizio traduzione → ↓ sintesi globale, ↑ traduzione selettiva (ATF4).
3. **ATF6** → trasporto al Golgi → clivaggio proteolitico → dominio citosolico attivo → trasloca nel nucleo.

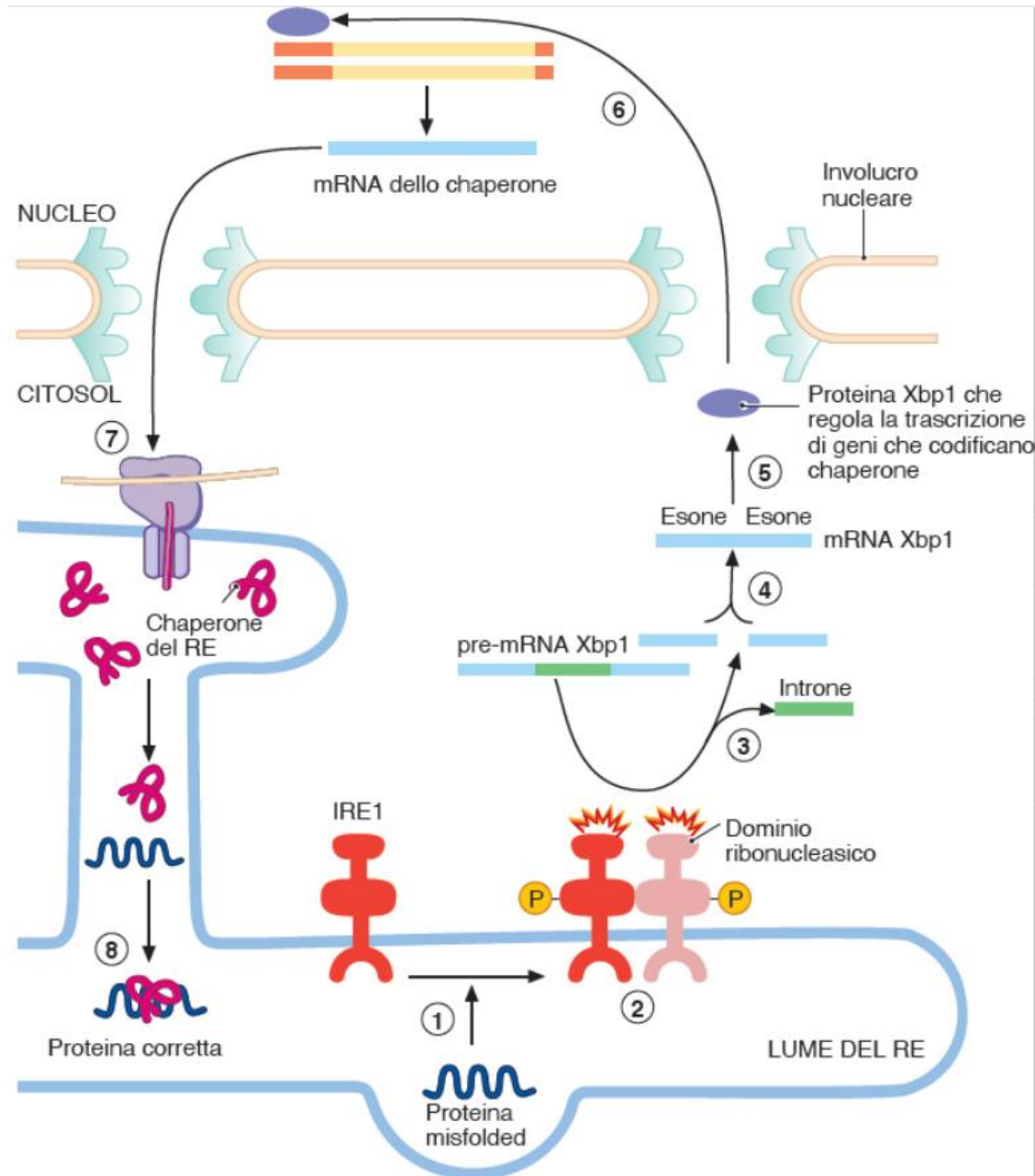
Pathway di IRE1



Pathway IRE1

- **IRE1: chinasi + endoribonucleasi** transmembrana del RE.
- In condizioni normali → inattiva, associata a BiP.
- Quando si accumulano proteine mal ripiegate:
 - BiP si dissocia da IRE1 per legare i substrati.
 - Proteine mal ripiegate si legano al dominio luminale di IRE1.
 - Oligomerizzazione + autofosforilazione IRE1.
 - Attivazione del dominio endoribonucleasico.
- Funzione: **splicing di un mRNA citosolico** (*rarissimo caso di **splicing al di fuori del nucleo***)
- Produzione **fattore trascrizione** attivo
- Aumento **trascrizione geni UPR** (chaperon, ERAD...).

Pathway di IRE1



Pathway IRE1

- **IRE1: chinasi + endoribonucleasi** transmembrana del RE.
- In condizioni normali → inattiva, associata a BiP.
- Quando si accumulano proteine mal ripiegate:
 - BiP si dissocia da IRE1 per legare i substrati.
 - Proteine mal ripiegate si legano al dominio luminale di IRE1.
 - Oligomerizzazione + autofosforilazione IRE1.
 - Attivazione del dominio endoribonucleasico.
- Funzione: **splicing di un mRNA citosolico** (*rarissimo caso di **splicing al di fuori del nucleo***)
- Produzione **fattore trascrizione** attivo
- Aumento **trascrizione geni UPR** (chaperon, ERAD...).

Pathway di PERK e ATF6

Pathway ATF6

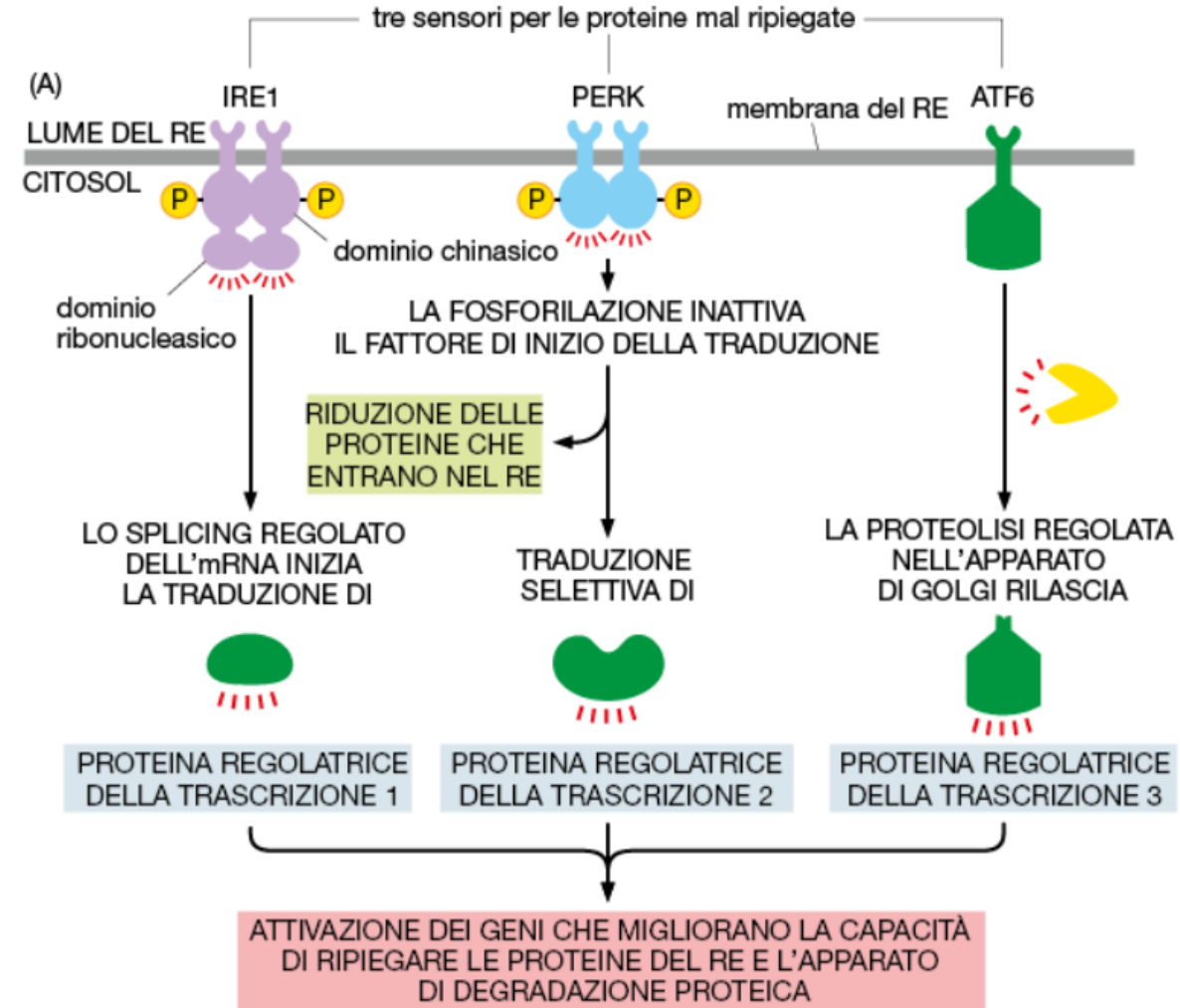
ATF6: proteina transmembrana del RE (fattore di trascrizione latente).

- In condizioni normali → **trattenuta nel RE**.
- In condizioni di stress:
 - **Trasloca al Golgi** dove le **proteasi residenti tagliano il dominio citosolico**.
 - Il frammento citosolico attivo → **migra al nucleo**.
- Output: **attiva geni UPR** (chaperon, proteine ERAD, enzimi per espansione del RE).

Pathway PERK

PERK = chinasi transmembrana del RE. Attivazione: **oligomerizzazione e autofosforilazione** (simile a IRE1).

- **Substrato principale:** fattore di inizio della traduzione (**eIF2 α**):
 - ↓ **traduzione globale** → **riduzione carico proteico** nel RE.
 - ↑ **traduzione selettiva di alcuni mRNA** (es. **ATF4**, fattore di trascrizione).
- Output: **regolazione di geni UPR, adattamento e – se stress persistente – apoptosi**.



Riepilogo Funzioni UPR

Funzioni fisiologiche dell'UPR

- Non solo “emergenza”, ma **anche regolazione fisiologica**:
 - **Cellule β pancreatiche**: durante pasti, PERK modula **velocità sintesi insulina**.
 - **Linfociti B $\rightarrow$ plasmacellule**: attivazione IRE1 $\rightarrow$ **grande espansione del RE** per produrre immunoglobuline.

Esiti a lungo termine

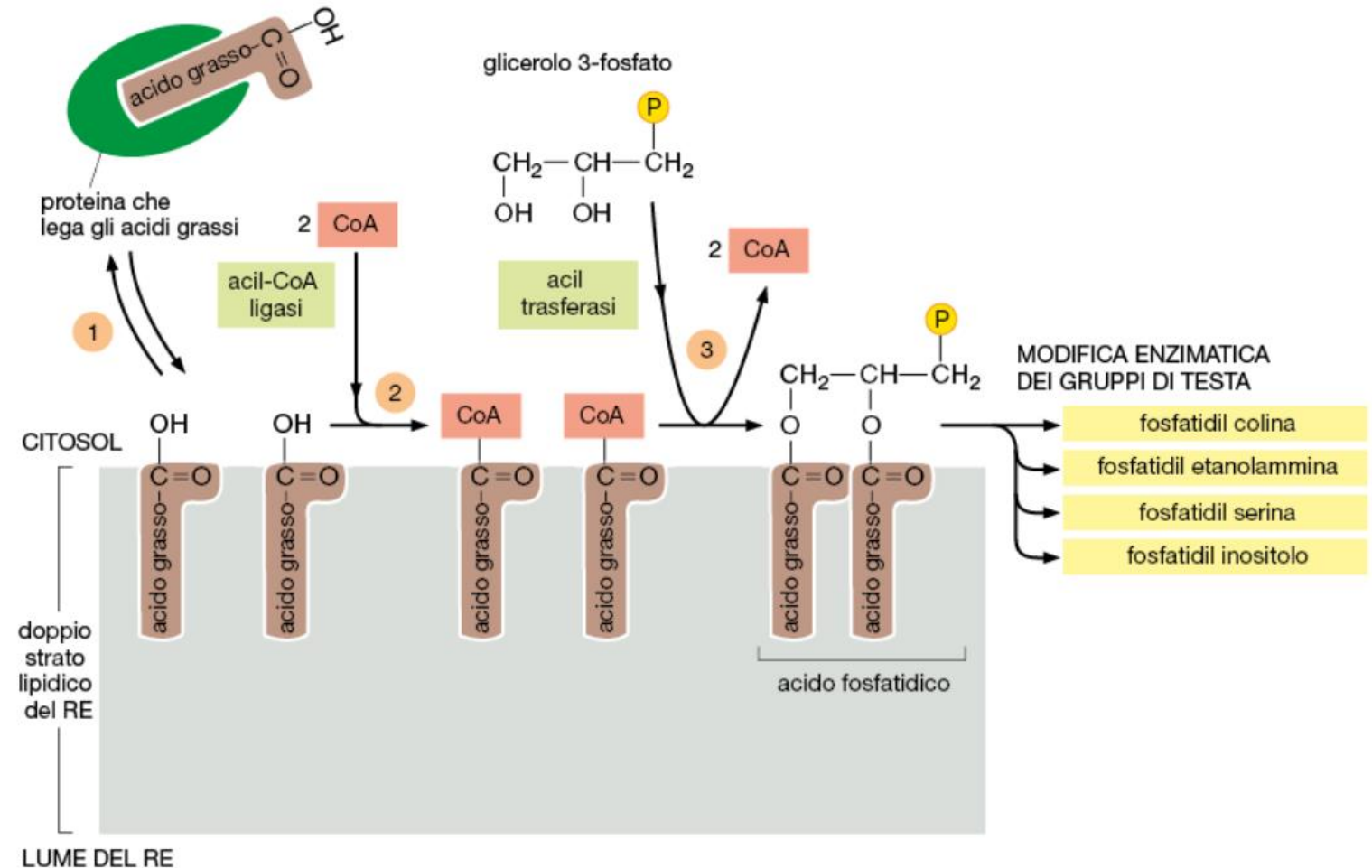
- **Se lo stress** proteico è **risolvibile** $\rightarrow$ $\uparrow$ capacità folding + ERAD $\rightarrow$ **ritorno omeostasi**.
- **Se lo stress** è **persistente** $\rightarrow$ UPR cronica $\rightarrow$ **apoptosi** (via PERK).
- Logica evolutiva: **meglio eliminare una cellula difettosa che rischiare conseguenze aberranti sull'organismo**.

Proteine mal ripiegate nel lume del RE $\rightarrow$ sensori transmembrana (IRE1, PERK, ATF6).

- Attivazione di vie parallele:
 1. **IRE1** $\rightarrow$ splicing mRNA $\rightarrow$ fattore trascrizione.
 2. **PERK** $\rightarrow$ fosforilazione eIF2 α $\rightarrow$ riduzione traduzione globale + $\uparrow$ ATF4.
 3. **ATF6** $\rightarrow$ clivaggio proteolitico al Golgi $\rightarrow$ fattore trascrizione.
- Tutte convergono sul **nucleo** $\rightarrow$ **trascrizione di geni UPR**.
- Effetto: $\uparrow$ **folding**, $\uparrow$ **degradazione proteine**, $\uparrow$ **capacità RE**, $\downarrow$ **carico proteico**.

RE: Principale sito di Sintesi Lipidica

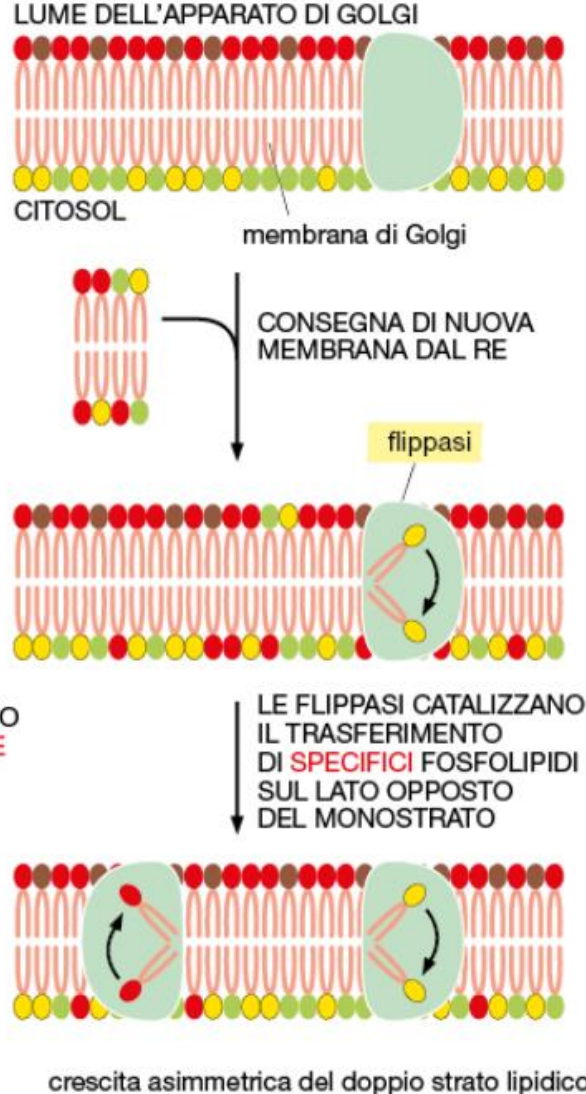
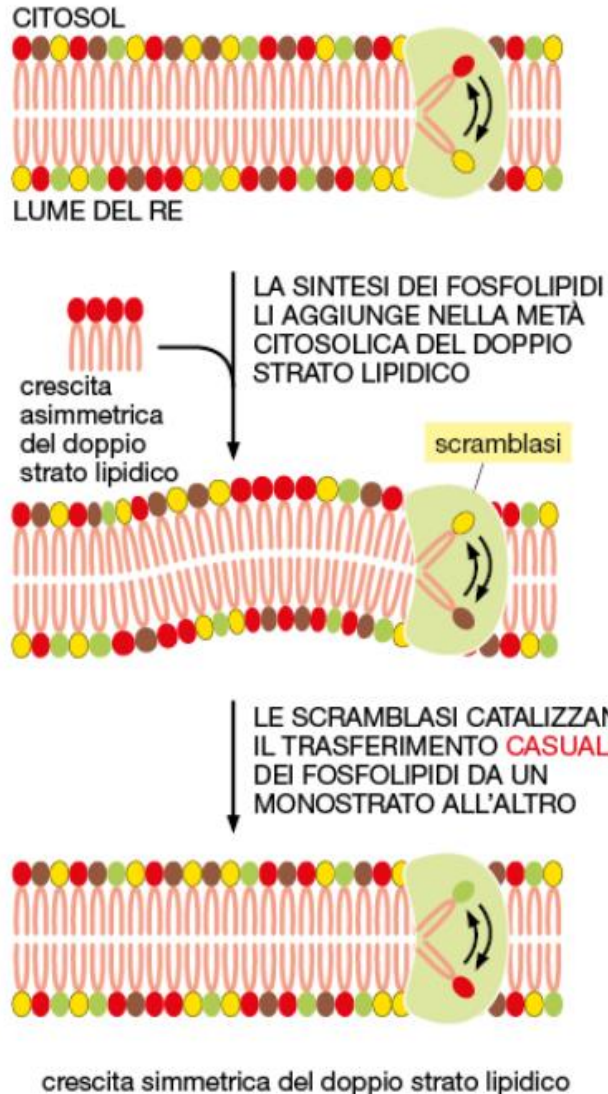
- La membrana del RE sintetizza quasi tutte le **classi di lipidi**:
 - **Fosfolipidi** (es. fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositolo).
 - **Colesterolo**.
 - **Ceramamide** (precursore di glicolipidi e sfingomieline).
- **Lipidi prodotti nel RE** → usati per la **crescita** e il **mantenimento** delle **membrane cellulari**.



Scramblasi e Flippasi: Simmetria e Asimmetria dei Fosfolipidi

NELLA MEMBRANA DEL RE, I FOSFOLIPIDI SONO DISTRIBUITI IN MODO CASUALE

NELL'APPARATO DI GOLGI E NELLE ALTRE MEMBRANE CELLULARI, LA DISTRIBUZIONE DEI FOSFOLIPIDI È ASIMMETRICA



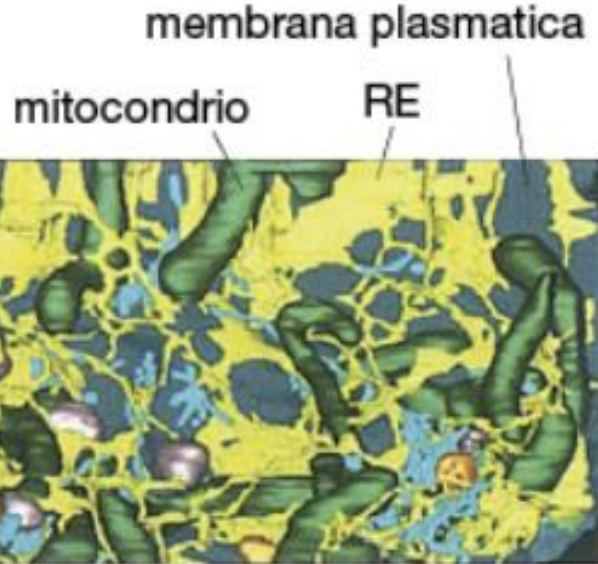
Equilibrio tra i due foglietti

- **Sintesi avviene nel foglietto citosolico** della membrana.
- **Per simmetria: fosfolipidi trasferiti al foglietto luminale da Scramblasi nel RE - traslocatori che muovono fosfolipidi in modo non selettivo.**
- **Flippasi nel Golgi** o altre membrane: traslocatori che **muovono fosfolipidi in modo specifico** creando **asimmetria** necessaria

Comunicazione del RE con altri organuli

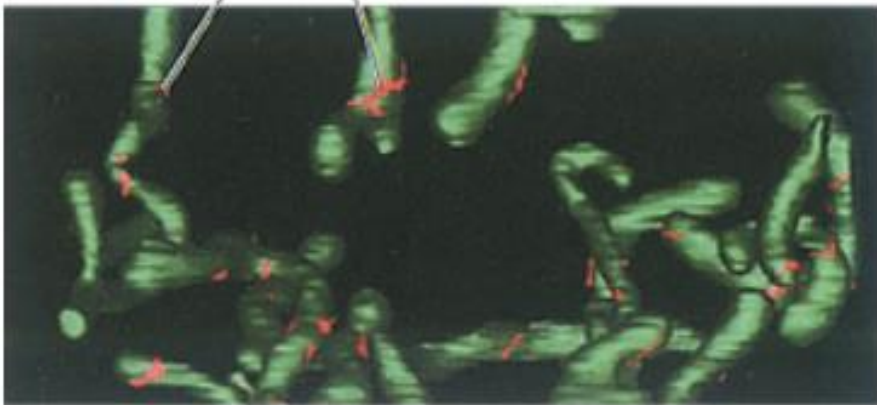
- Molti lipidi prodotti dal RE raggiungono Golgi, lisosomi, endosomi e membrana plasmatica tramite **vescicole di trasporto**.
- Tuttavia, ogni membrana ha **composizione lipidica distinta** → identità funzionale.

Trasferimento lipidi ad altri Organuli (non vescicolare)



(A)

siti di contatto con il RE

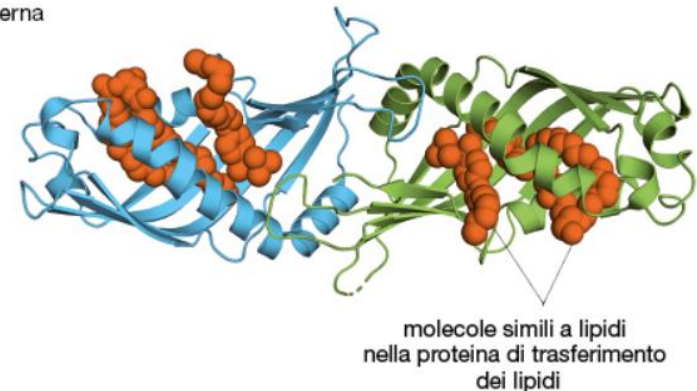
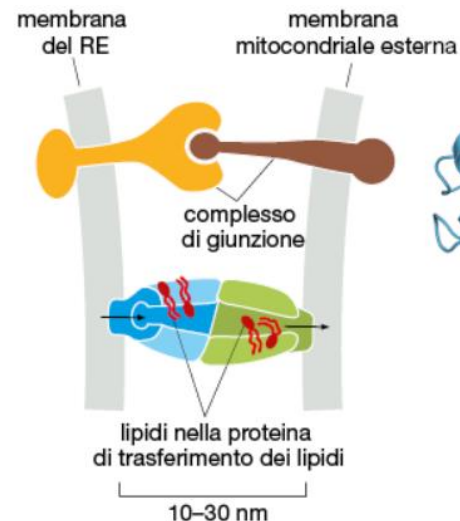


(B)

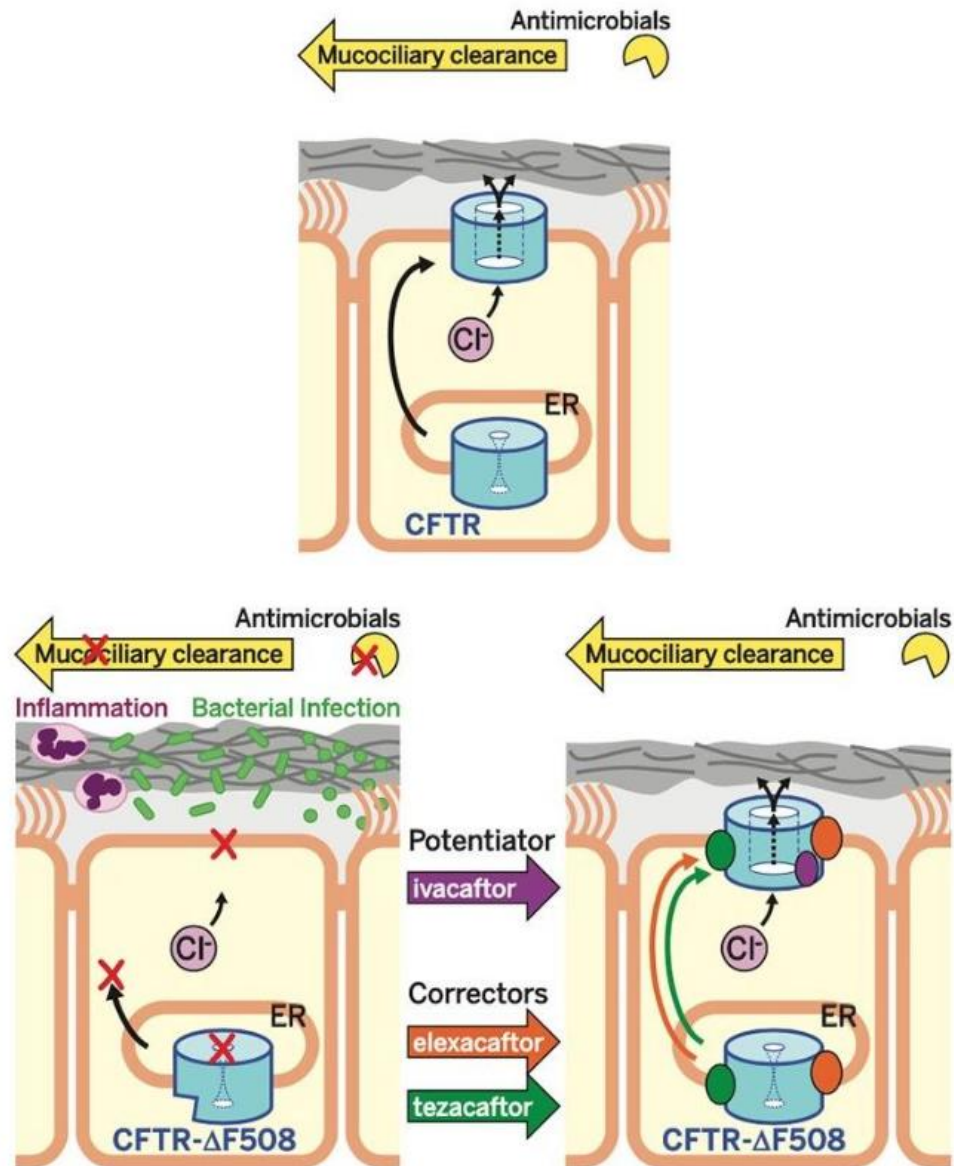
1 μm

Trasferimento lipidico non vescicolare

- Essenziale per organuli che **non comunicano tramite vescicole** (mitocondri, plastidi).
- **Proteine di trasferimento lipidico:**
 - Legano lipidi specifici e li trasportano da membrana a membrana.
 - Agiscono in **siti di contatto** tra organuli (membrane ravvicinate).
- Se compromesso → difetti nell'importazione lipidica e disfunzione mitocondriale.



La Mutazione $\Delta F508$ causa un Folding Anomale di CFTR nel ER



CFTR prodotta del nucleo passa nel **reticolo endoplasmatico** dove **completa la sua maturazione**

Se CFTR è mutata ($\Delta F508$) non riesce a **foldarsi correttamente** e viene **riconosciuta** come difettosa dalle **chaperonine** del ER che la **indirizzano alla degradazione**.

Un farmaco trivalente di ultima generazione, **aiutano CFTR- $\Delta F508$ a ripregarsi correttamente, aumentando la sua traslocazione in membrana**.

La proteina raggiunge la **superficie cellulare**, dove il **potenziatore inverte il deficit di gating di $\Delta F508$ CFTR: apre il canale sufficientemente** per consentire il flusso di ioni cloruro e **ripristina così l'equilibrio idrosalino** che supporta la normale clearance mucociliare e le funzioni antibatteriche.

Questo meccanismo è in grado di **attenuare i sintomi della Fibrosi Cistica**