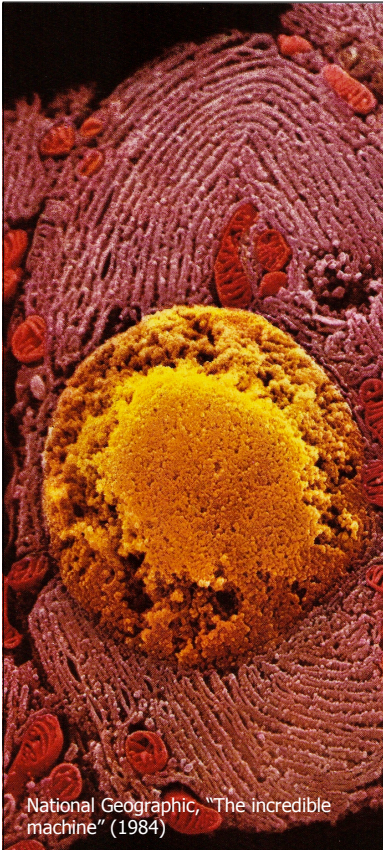


Endo-membranas



National Geographic, "The incredible machine" (1984)

- Estructura general y divisiones:
- Evolución:
- Funciones:
 - Síntesis de proteínas asociadas a membranas (clase nº2)
 - Destinamiento de proteínas (clase nº 3; ap. de Golgi)
 - Metabolismo lipídico
 - Síntesis de fosfolípidos
 - De-toxificación
 - Almacenamiento de Iones de Calcio y liberación regulada al citoplasma.

Referencias:

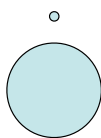
Alberts et al. Biología Molecular de la Célula
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=books>

Dr. Alejandro Roth, 2010

Evolución

Importancia de la Membrana:

- ¿Cuáles son las diferencias esenciales entre los Procariontes de los Eucariontes?
- ¿Qué razón existe entre el volumen y la superficie entre procariontes y eucariontes?



Diámetro (píxeles)	área de circunferencia (πr^2)	Superficie de una esfera ($4\pi r^2$)	Volumen ($\frac{4}{3}\pi r^3$)	Superficie/Volumen
6	28,27	113,1	113,1	1,0
60	2.827,433	11.309	113.097	0,1

OJO:
 Valores y fórmulas corregidos

FE DE ERRATAS



factorkippel.com

Ventajas:

1. Aumento de la razón superficie/volumen
2. Control de la diversidad de superficies
3. Heterotrofia

Evolución

Importancia de la Membrana:

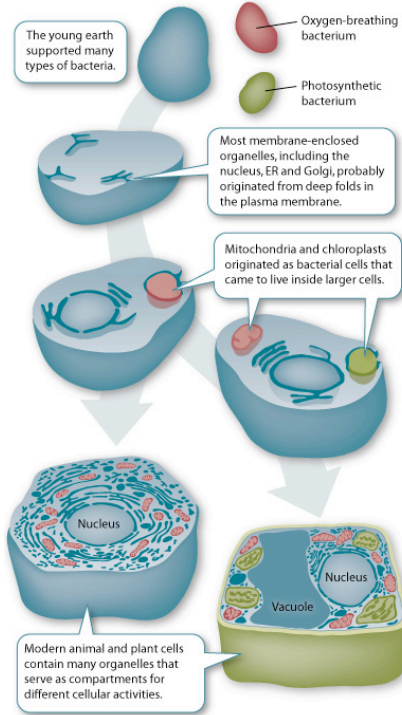
- ¿Cuáles son las diferencias esenciales entre los Procariontes de los Eucariontes?
- ¿Qué razón existe entre el volumen y la superficie entre procariontes y eucariontes?

Origen evolutivo:

• Proto-eucarionte?

– ¿Evidencias?

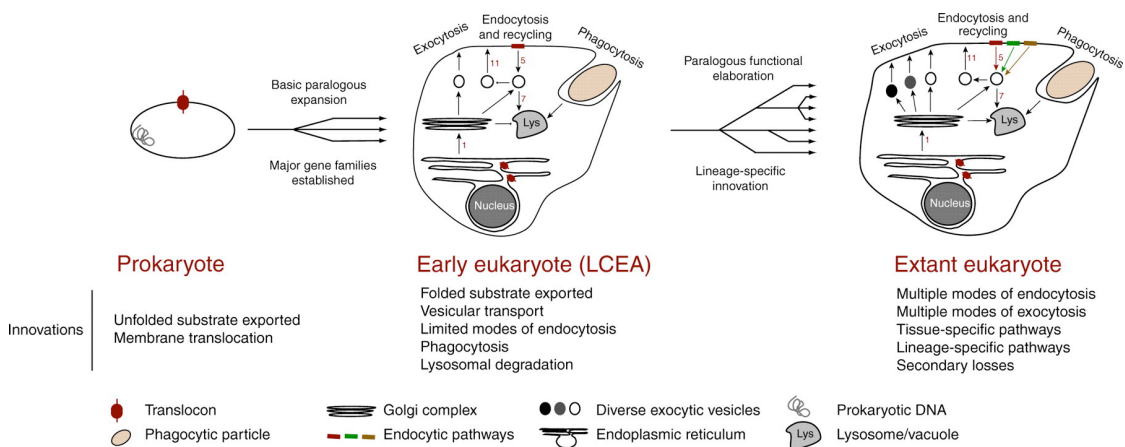
- **Proto-eucarionte:**
- **Virus fallido**
- **¿Endosimbiosis?**
 - » No hay evidencias clásicas (dobles membranas, genomas asociados, replicación autónoma)
 - » ¿Invaginación de la membrana?



Genetic Science Learning Center, "The Evolution of the Cell,"
Learn.Genetics, 8 October 2009, <<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/organelles/>>

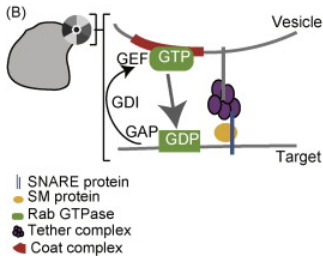
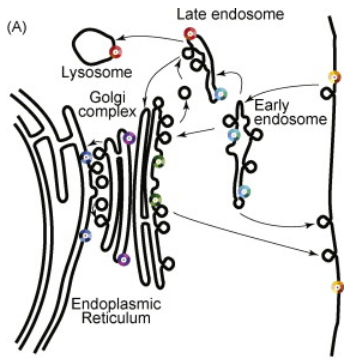
4

Major transitions in evolution of the endomembrane system.



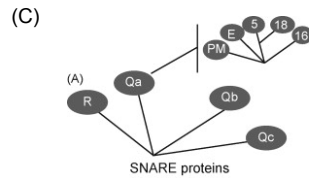
Transiciones en la evolución del sistema de Endomembranas:

- Procariontes:** la secreción es medianamente sencilla, solamente se debe hacer pasar por un poro acuoso cuyos componentes son homólogos al complejo Sec61 en el RER (*translocón*).
- Eucarionte temprano:** los componentes básicos de todas as funciones ya estarían presentes.
- Eucariontes actuales:** una radiación de las diversas familias de proteínas permitió aumentos a la complejidad de los procesos (múltiples vías de secreción o captura).



Vías de secreción/endocitosis (A) y Maquinaria Eucarionte para formación de vesículas y especificidad de transporte (B).

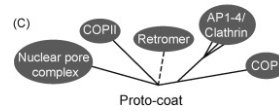
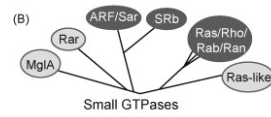
(B) Las proteínas incluidas en el "círculo de identificación": coatámeros, RabGTPasas, SNAREs



(C) Evolución de las proteínas que determinan especificidad

SNAREs: sin homologos evidentes en procariontes.

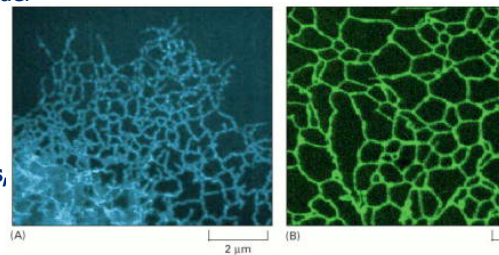
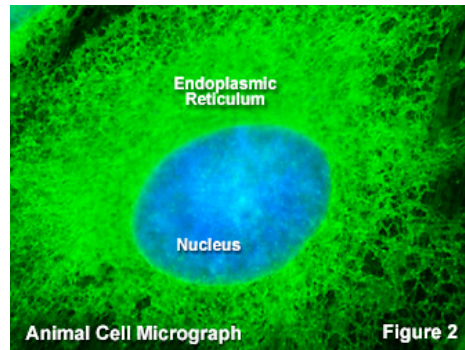
GTPases: Existirían dos orígenes
Complejos de deformación de membrana: sin homologos evidentes en procariontes.



eucariontes **procarionte**

El retículo endoplásmico, conceptos que DEBEN manejar:

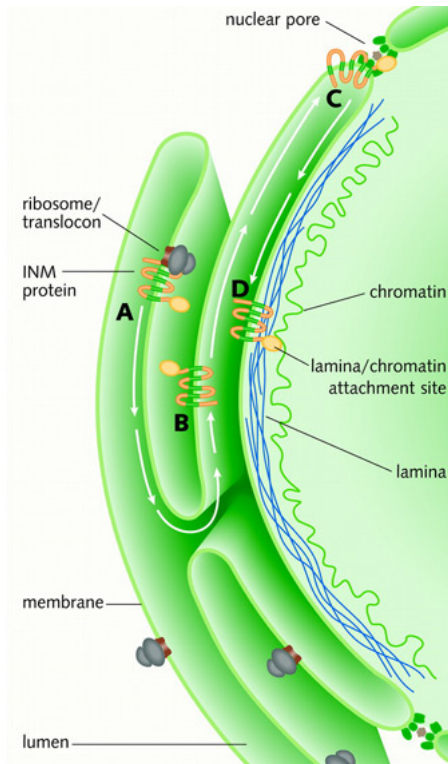
1. Cuando algo ingresa al lumen del RE, equivale a "salir" del citoplasma.
2. Importancia de la superficie de membrana
3. Existen dos clases de Réticulo Endoplásmico: Rugoso (RER) y Liso (REL).
4. RER recluta ribosomas a su superficie, donde se asocian a un complejo que transloca péptidos a través de la membrana. Este proceso, llamado **translocación-cotraduccion** posibilita la secreción de proteínas y la incorporación de proteínas a membranas.
5. La síntesis de proteínas requiere de **proteínas chaperonas**. En este caso, se encuentran en el lumen del RER, participan de las **modificaciones post-traduccionales** y son parte de los mecanismos que regulan la salida de proteínas al Aparato de Golgi.
6. El REL no posee sitios de unión de ribosomas, y se encuentra enriquecido en proteínas que participan de la **síntesis de fosfolípidos, metabolismo de azúcares, detoxificación de drogas y almacenamiento y liberación de Ca⁺²**.



Microfotografías de fluorescencia del RE en una célula animal (A) y una vegetal (B)

El Retículo Endoplásmico

- El RE es un organelo típico de las **células eucarióticas** y en células animales.
- Está organizado en **un red de tubos ramificados y sacos aplanados e interconectados** que se extiende a través de citoplasma y es continuo con la membrana nuclear (notar los complejos nucleares).
- Su distribución por toda la célula y su cercana aposición a otros organelos sugiere que transfiere lípidos a ellos.
- Constituye más de la mitad de la membrana total y representa alrededor del 10% de volumen celular.
- **La membrana del RE separa su lumen del citosol** y media el transporte selectivo de una serie de compuestos entre ambos compartimentos.



Gia K. Voeltz, Melissa M. Rolls & Tom A. Rapoport, EMBO reports 3, 10, 944–950 (2002)

- Está organizado en **un red de tubos ramificados y sacos aplanados e interconectados** que se extiende a través de citoplasma y es continuo con la membrana nuclear (notar los complejos nucleares).

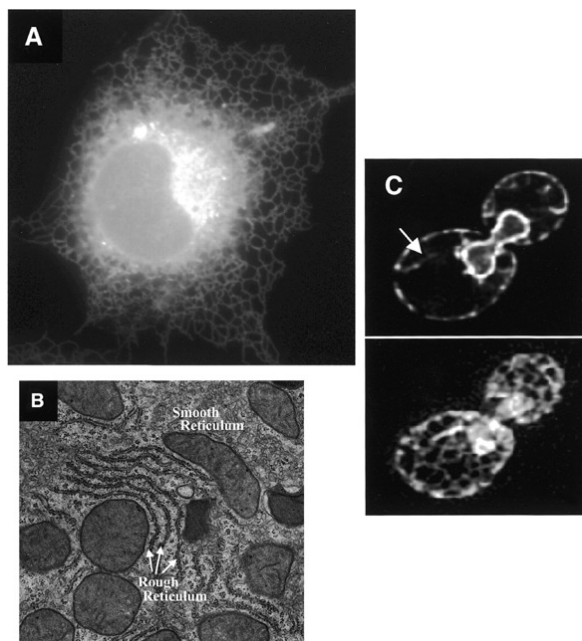
¿Cómo podemos demostrarlo?

Ultra-estructura del RER, REL y la Envoltura Nuclear:

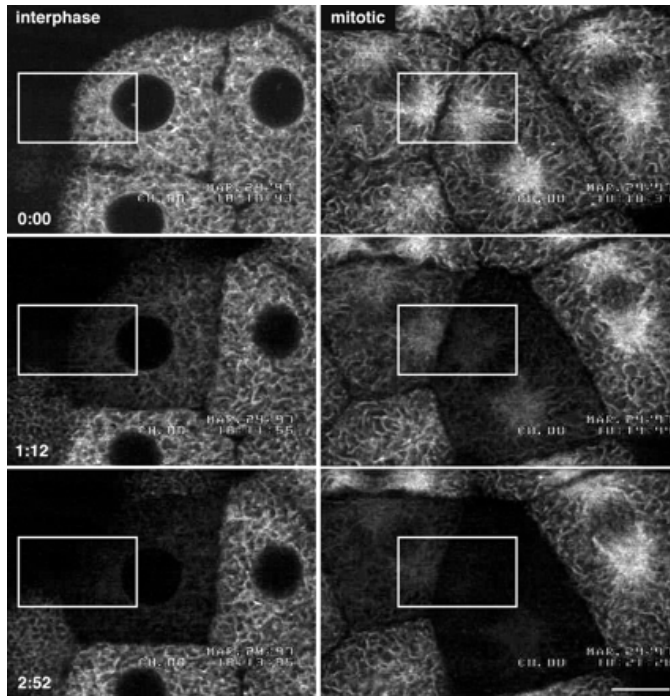
(A) Localización de una proteína de fusión destinada a RE (GFP-Sec61) expresada en células COS y observada por epi-fluorescencia.

(B) Microfotografía (microscopio electrónico) de un hepatocito. Se observa RER y REL

(C) Localización de proteína GFP-ER f (GFP-Sec63) expresada en levaduras y visualizada mediante microscopía confocal. La foto superior se enfoca en el plano medio de la célula, mientras que la foto inferior se enfoca en una zona cercana a la superficie.



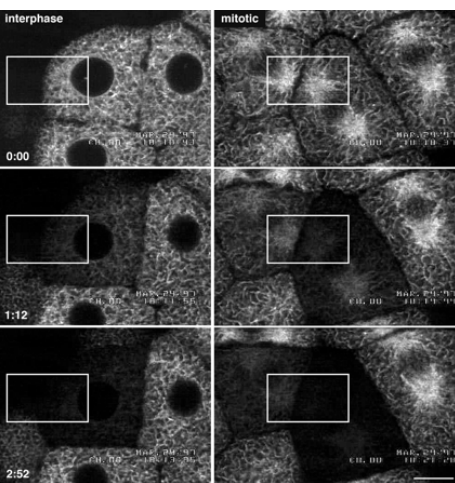
Gia K. Voeltz, Melissa M. Rolls & Tom A. Rapoport, EMBO reports 3, 10, 944–950 (2002)



El RE es continuo durante la Mitosis y la Interfase.

Blastómeros de larva de erizo de mar que expresan **GFP-KDEL** (en interfase o metafase) recibieron un blanqueamiento (bleached) mediante protocolo de FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*). Las imágenes superiores muestran las células antes de FLIP y luego se observa como la fluorescencia de toda la célula disminuye en la medida que se realiza el blanqueamiento. El rectángulo fue la zona sometida a blanqueamiento, pero se observa que toda la proteína GFP-KDEL se blanqueó. Barra: 10 μ m.

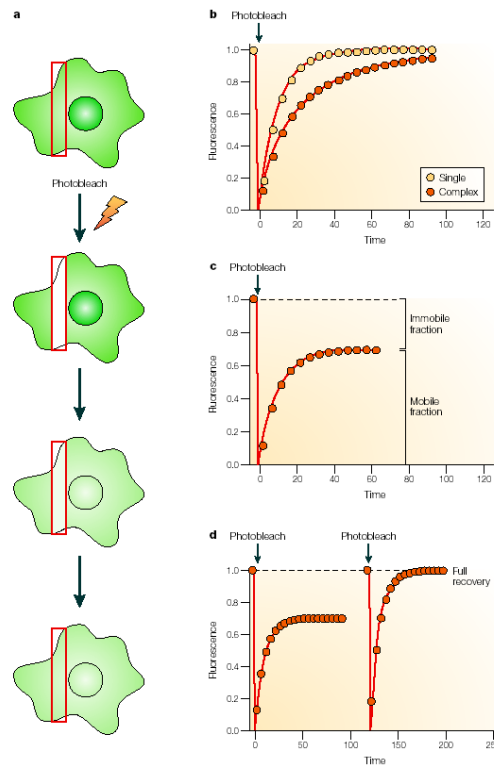
Mark Terasaki (2000) MBoC. 11 (3), 897-914



El RE es continuo durante la Mitosis y la Interfase.

Blastómeros de larva de erizo de mar que expresan GFP-KDEL (en interfase o metafase) recibieron un blanqueamiento (bleached) mediante protocolo de FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*). Las imágenes superiores muestran las células antes de FLIP y luego se observa como la fluorescencia de toda la célula disminuye en la medida que se realiza el blanqueamiento. El rectángulo fue la zona sometida a blanqueamiento, pero se observa que toda la proteína GFP-KDEL se blanqueó. Barra: 10 μ m.

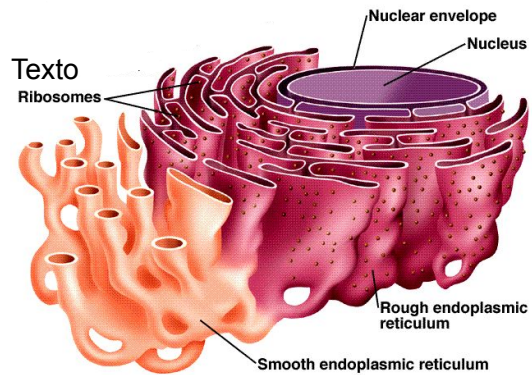
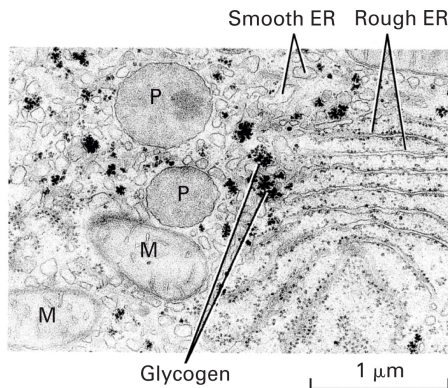
Mark Terasaki (2000) MBoC. 11 (3), 897-914



El Retículo Endoplásmico

El RE tiene un rol importante en una serie de funciones celulares, particularmente en la síntesis de numerosos lípidos y proteínas secretadas y de membrana. También es un **reservorio de Ca^{2+}** (ppal% retículo sarcoplásmico de los músculos).

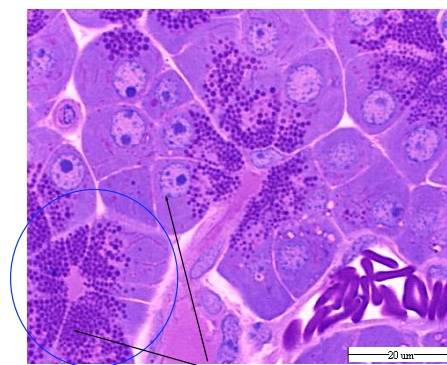
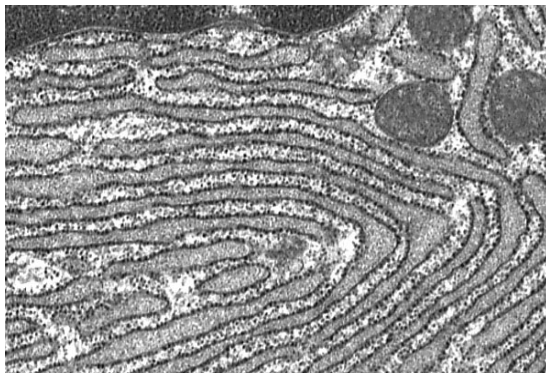
Se distinguen dos zonas en el organelo : el RE liso y el RE rugoso



Retículo endoplásmico rugoso

Denominado así por su aspecto debido a que **presenta regiones tapizadas de ribosomas**, donde se sintetizan proteínas de membrana (de organelos y de la MP) y proteínas solubles a ser secretadas por la célula y las destinadas al lumen del RE, del A. de Golgi y de lisosomas.

El RE rugoso es particularmente abundante en células secretoras de proteínas como linfocitos que secretan anticuerpos o células de los acinos pancreáticos que secretan enzimas digestivas.



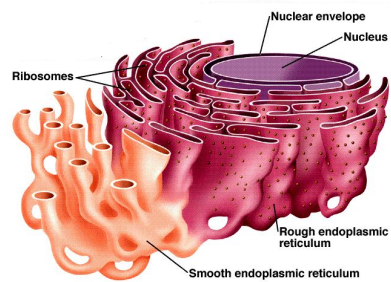
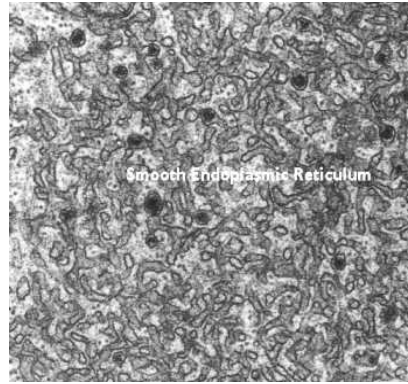
células acinares de páncreas

Retículo endoplásmico liso

En esta región ocurre la **síntesis** de **triglicéridos y fosfolípidos**.

Es **particularmente abundante en hepatocitos**: enzimas del RE liso modifican o detoxifican compuestos hidrofóbicos como pesticidas, drogas y carcinógenos, convirtiéndolos en productos conjugados más hidrosolubles que pueden ser excretados (complejos de citocromos P450).

De ciertas regiones del RE liso yeman vesículas de transporte destinadas al aparato de Golgi.

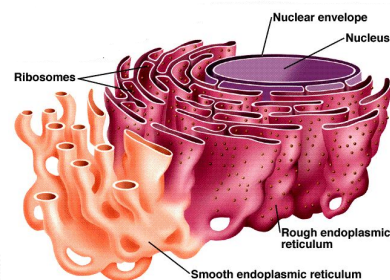
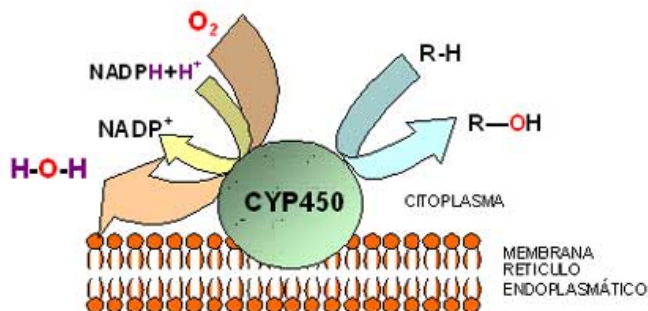


Retículo endoplásmico liso

Función detoxificadora: Citocromos P450 (**particularmente abundante en hepatocitos**)

¿Cómo se han estudiado? **MICROSOMAS (protocolo de purificación)**

- Estas enzimas del RE liso modifican compuestos hidrofóbicos como pesticidas, drogas y carcinógenos, convirtiéndolos en productos conjugados más hidrosolubles que pueden ser excretados (complejos de citocromos P450).

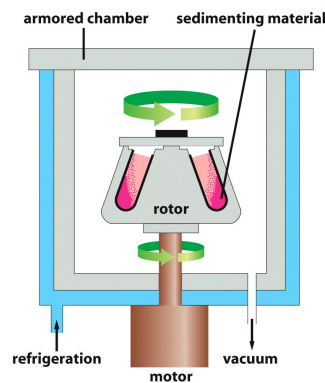
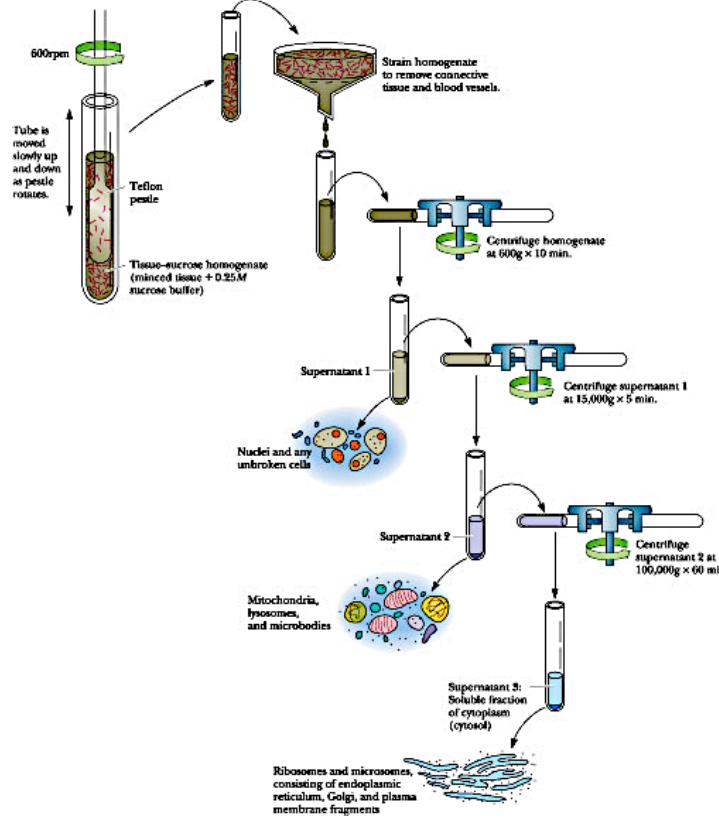


¿Cómo exploramos las células con una centrífuga?

Charles DeDuve : *Exploring cells with a centrifuge;*

Conceptos:

- Las enzimas residen en compartimentos.
- Estos compartimentos pueden ser purificados.
- Entre los diferentes compartimentos existe tráfico de proteínas y membranas



Medir actividad enzimática de cada fracción

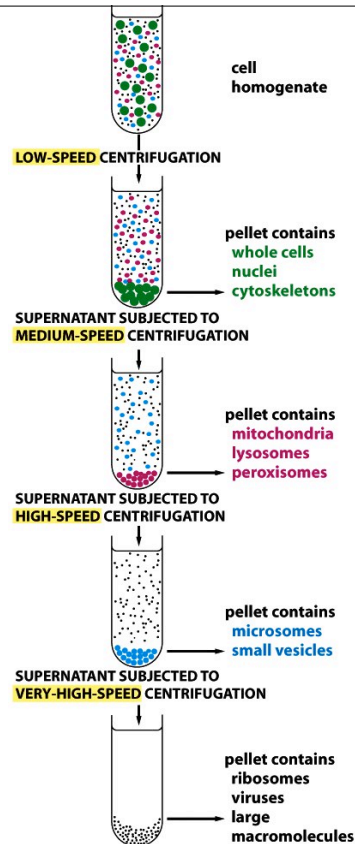
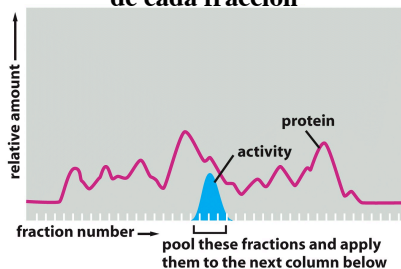
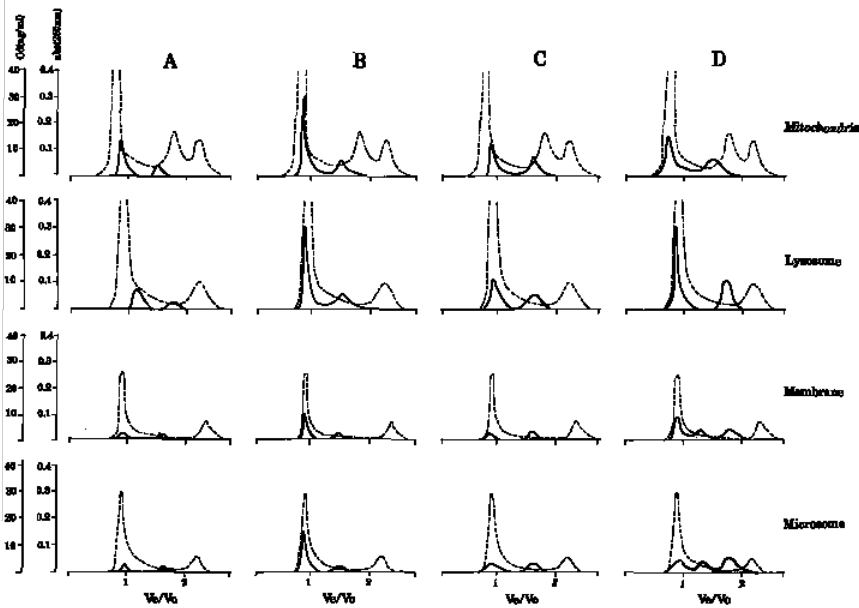
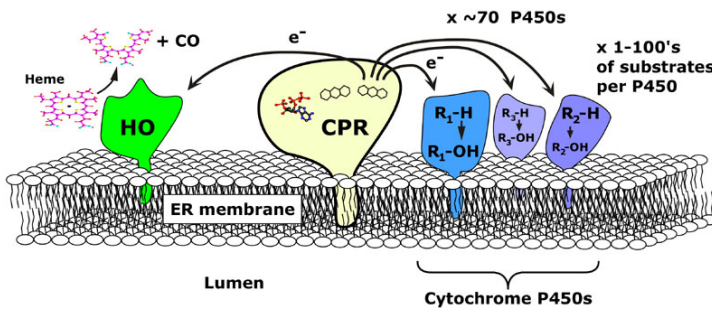


Figure 8-9 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



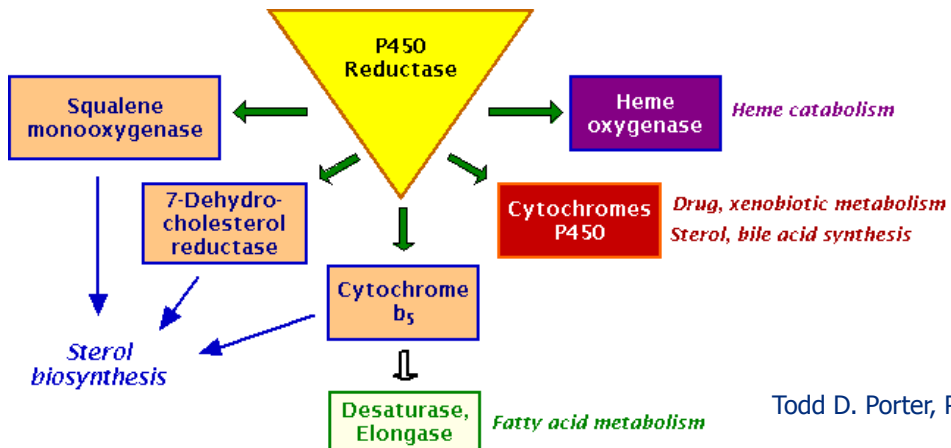
- Gel chromatography on G-75 Sephadex of subcellular fractions from kidney cortex of rats in nonpretreated groups (A and B) and CdCl₂-pretreated groups (C and D, 0.5, 1, 1, 2, and 2 mg Cd/kg as CdCl₂ subcutaneously) 1hr (groups A and C) and 4 hr (groups B and D) after a challenge dose of CdMT (0.4 mg Cd/kg as CdMT, sc). Column dimensions were 26 x 364 mm. Elution was carried out with 0.01 M Tris-HCl 0.05 M NaCl buffer, pH 7.5, containing 0.1% DOC and performed at 4°C. A portion of each fraction (3.5 ml) was assayed for absorbance at 250 nm (---) and radioactivity of ¹⁰⁹Cd (----). Ve/Vo of the peaks No. 1, 2, and 3 are 0.80-1.20, 1.20-1.40, and 1.60-2.10, respectively

18

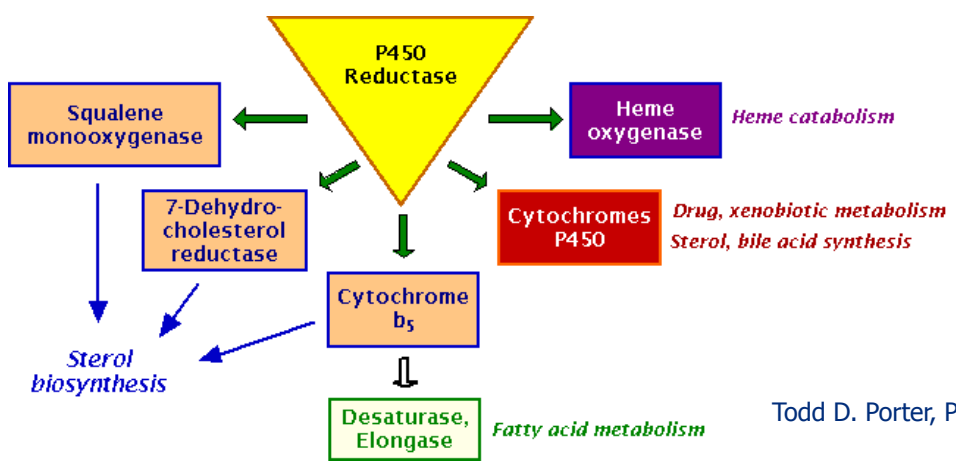
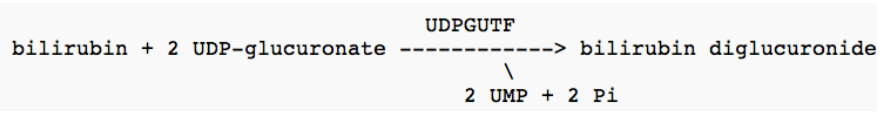
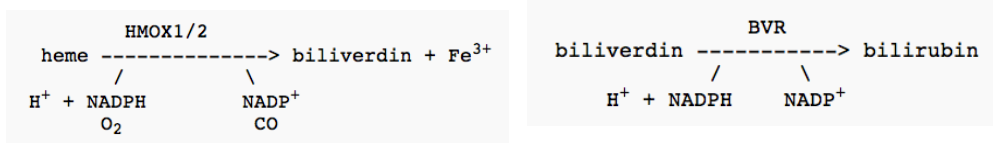


• CPR also provides electrons to Heme Oxygenase (HO, left side). P450s typically perform hydroxylation reactions (right side).

Kevin Edwards, PhD
Dept. of Biological
Sciences
Illinois State University



Todd D. Porter, Ph.D.



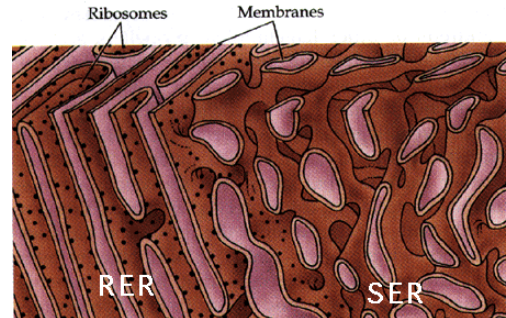
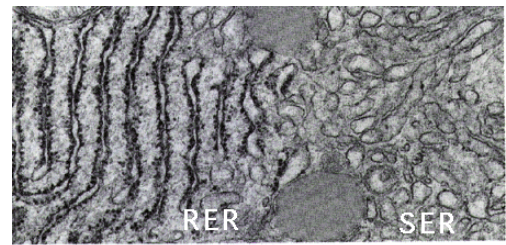
La síntesis de lípidos se realiza en el RE liso

Además de sus actividades en el procesamiento de las proteínas, secretadas de membrana el RE es el principal sitio de síntesis de lípidos en las células eucarióticas.

Debido a que son muy hidrofóbicos, los lípidos son sintetizados en asociación con membranas celulares preexistentes, y no en el ambiente hidrofílico del citosol.

Aunque algunos lípidos son sintetizados en asociación con otras membranas, la mayor parte son sintetizados en el RE.

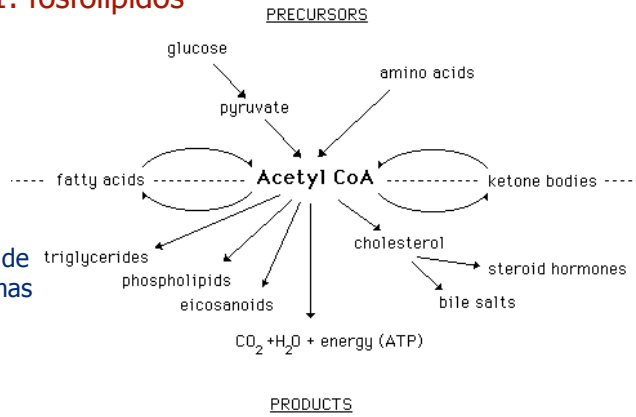
Son entonces transportados desde el RE a su destinos finales en vesículas o por proteínas transportadoras,



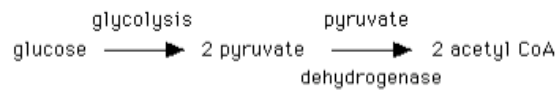
Metabolismo lipídico en el Reticulo endoplásmico: Síntesis de lípidos 1: fosfolípidos

El acetil-CoA es la molécula central del metabolismo lipídico:

1. Es utilizado para la síntesis de ácidos grasos (en el citoplasma)
2. Es el principal producto de la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias y peroxisomas
3. En conjunto con el oxalacetato son los precursores del ciclo de Krebs



Acetyl CoA is a central intermediate in lipid metabolism.



Glucose is the major source of acetyl CoA for fatty acid synthesis.

http://library.med.utah.edu/NetBiochem/FattyAcids/2_4.html

The image contains two diagrams. On the left is the structural formula of Acetyl CoA, showing an acetyl group ($H_3C-C(=O)-$) bonded to a sulfur atom, which is in turn bonded to a pantoic acid chain, a ribose sugar, and an adenine base. A 'high-energy bond' is indicated between the sulfur and the carbonyl carbon. The label 'acetyl group' points to the $H_3C-C(=O)-$ part, and 'CoA' is labeled at the bottom. On the right is a diagram of the Citric Acid Cycle (Krebs cycle). It shows a 2-carbon acetyl CoA entering the cycle at the start of Step 1, where it combines with 4-carbon oxaloacetate to form 6-carbon citrate. Through Steps 2 to 8, the cycle produces 3 molecules of NADH, 1 molecule of FADH₂, and 1 molecule of GTP. Two molecules of CO₂ are released during the cycle. The net result is summarized as: 'NET RESULT: ONE TURN OF THE CYCLE PRODUCES THREE NADH, ONE GTP, AND ONE FADH₂, AND RELEASES TWO MOLECULES OF CO₂'.

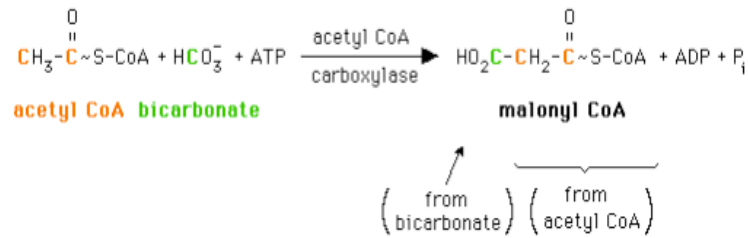
La Síntesis de ácidos grasos es citosólica
 (y no... no es necesario que se aprendan cada paso)

Los intermediarios se asocian covalentemente a una proteína transportadora
 (acyl carrier protein)

Acetyl CoA + CO₂ => MalonylCoA

Ciclo repetitivo que extiende la cadena en unidades de dos carbonos

Condensación
 Reducción
 Deshidratación
 Reducción



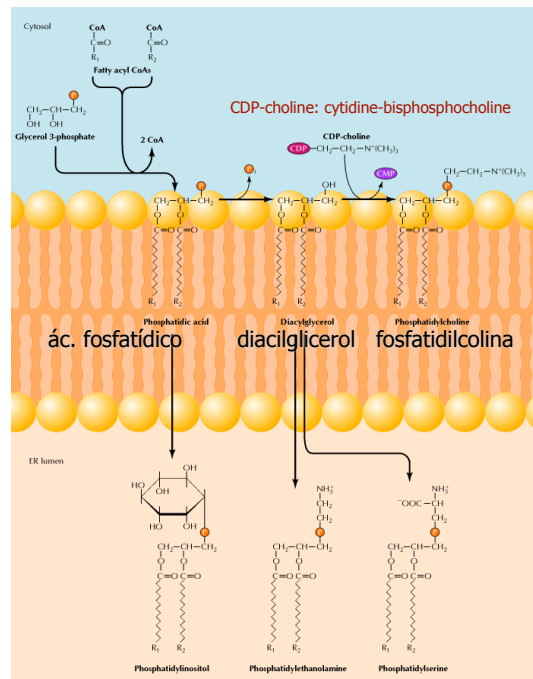
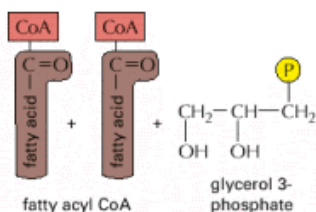
Síntesis de fosfolípidos

La mayoría de los fosfolípidos son sintetizados en la monocapa citosólica de la membrana del RE a partir de precursores citosólicos solubles.

Dos moléculas de acil-CoA se unen al glicerol-3-fosfato, dando ácido fosfatídico, que es insertado en la membrana.

Después una fosfatasa convierte el ácido fosfatídico a diacilglicerol

Enzimas de la cara citosólica de la membrana del RE catalizan la adición de diferentes grupos polares, resultando en la formación de fosfatidilcolina, fosfatidil-serina, fosfatidil-etanolamina, o fosfatidil-inositol.



Phospholipids are synthesized on the cytosolic face of the ER membrane

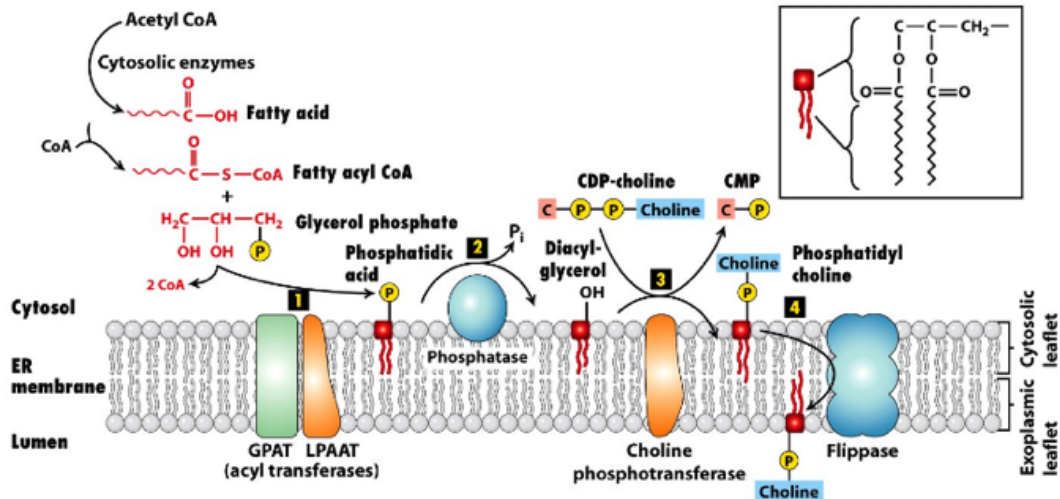


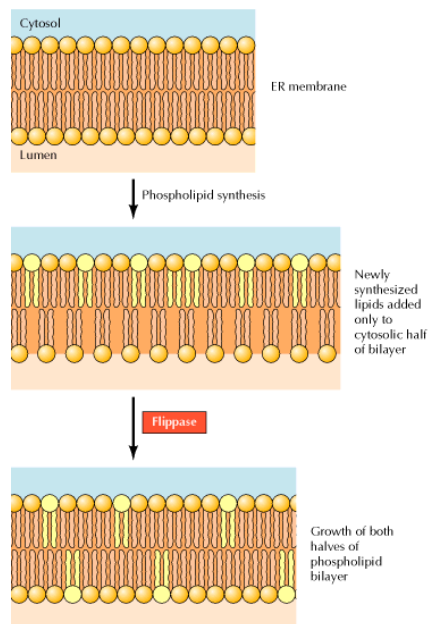
Figure 10-25
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

5

Los fosfolípidos se distribuyen asimétricamente en las dos monocapas, de las membranas plasmáticas.

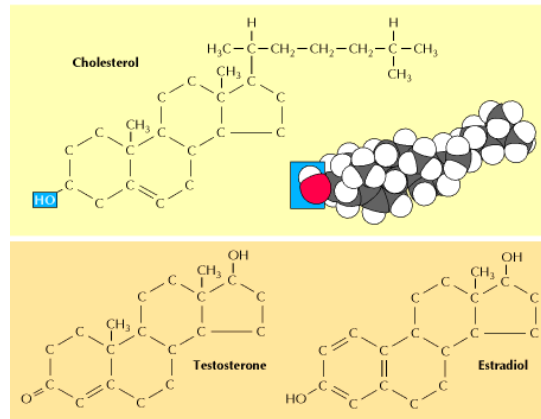
En eritrocitos: los fosfolípidos que poseen un grupo colina (SM y PC) se encuentran predominantemente en la monocapa externa y los lípidos con grupos amino (PS y PE) se encuentran en la cara citosólica.

Los FLs sintetizados en la monocapa citosólica de la membrana del ER son transferidos a la otra monocapa mediante enzimas denominadas flipasas o "scramblasas".



El RE liso también es el principal sitio de síntesis del colesterol, otro lípido de membrana.

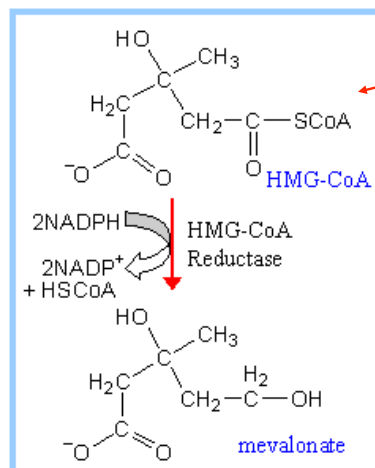
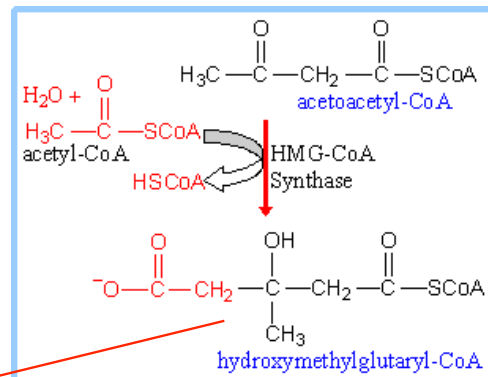
Las hormonas esteroidales son sintetizadas a partir del colesterol en el RE en células productoras de esteroides, presentes en testículo y ovario, tejidos que presentan abundante RE liso.



Cholesterol synthesis in rat liver peroxisomes. Conversion of mevalonic acid to cholesterol

Thompson, Burrows, Laub yKrisans (1986) J. Cell Biol. 103, 525

Enzima limitante de la síntesis de colesterol: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzymo A reductasa (HMG-CoA reductasa) proteína de TM, de 97-kilodalton residente del Retículo Endoplásmico y los peroxisomas.



Acumulación y liberación de Ca^{2+} en el RE

Otra importante función del RE es la acumulación activa de Ca^{2+} desde el citosol, o sea es un almacén de este ión.

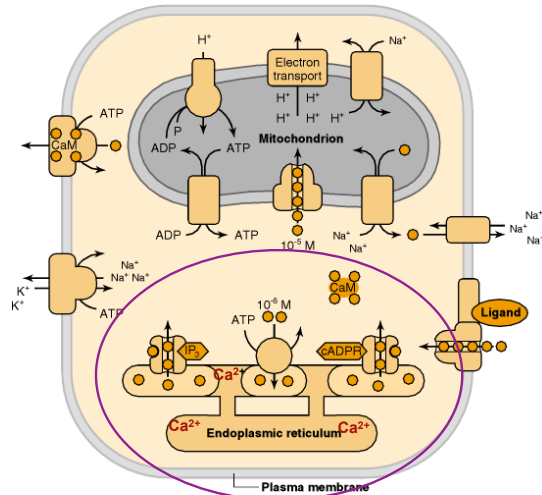
En la membrana del RE (así como en la del aparato de Golgi) existe una Ca^{2+} -ATPasa que bombea Ca^{2+} hacia su lumen.

El almacenamiento de Ca^{2+} en el lumen del RE es facilitado por las altas concentraciones de proteínas que ligan Ca^{2+} : calreticulina, calnexina.

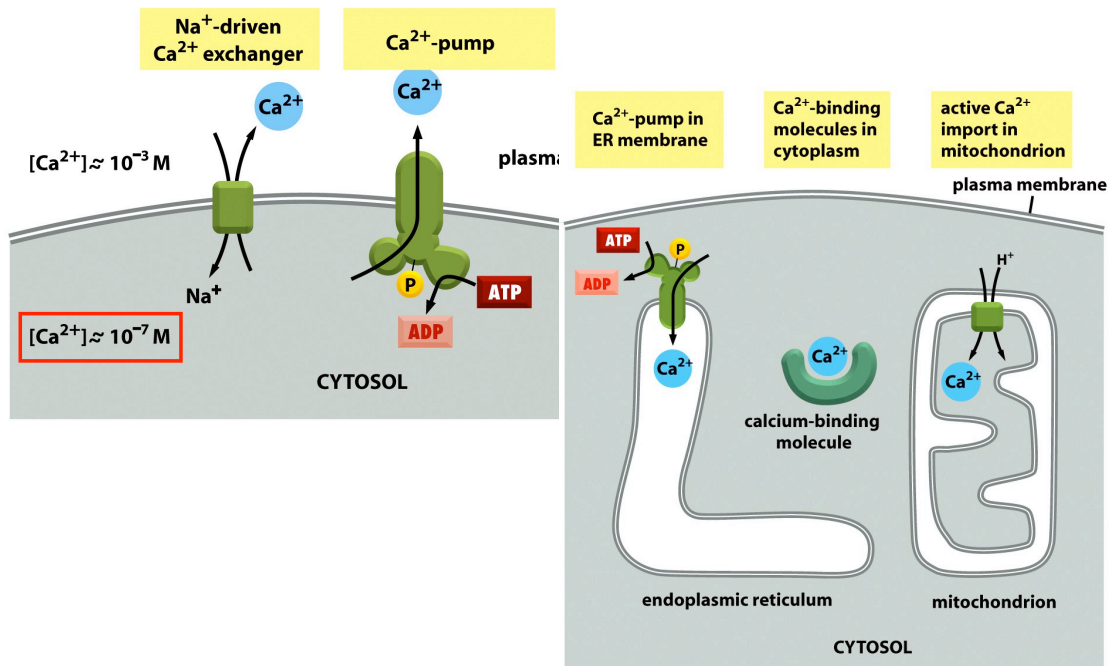
El Ca^{2+} acumulado puede ser liberado a través de canales de Ca^{2+} (IP_3R) que se abren al ser activados IP_3 que se genera en el citosol en respuesta a señales extracelulares.

Ejemplos:

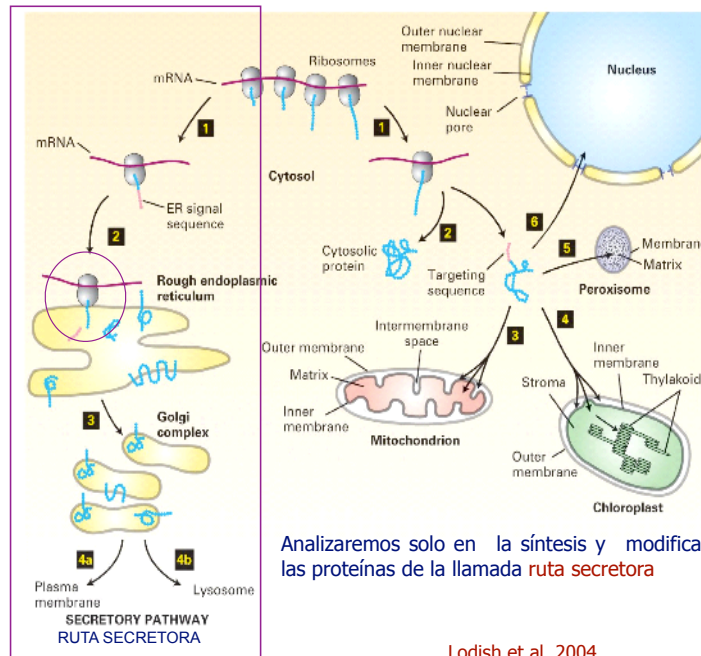
- Contracción Muscular
- Activación de Proteína Quinasa C



Regulación de las concentraciones de Calcio



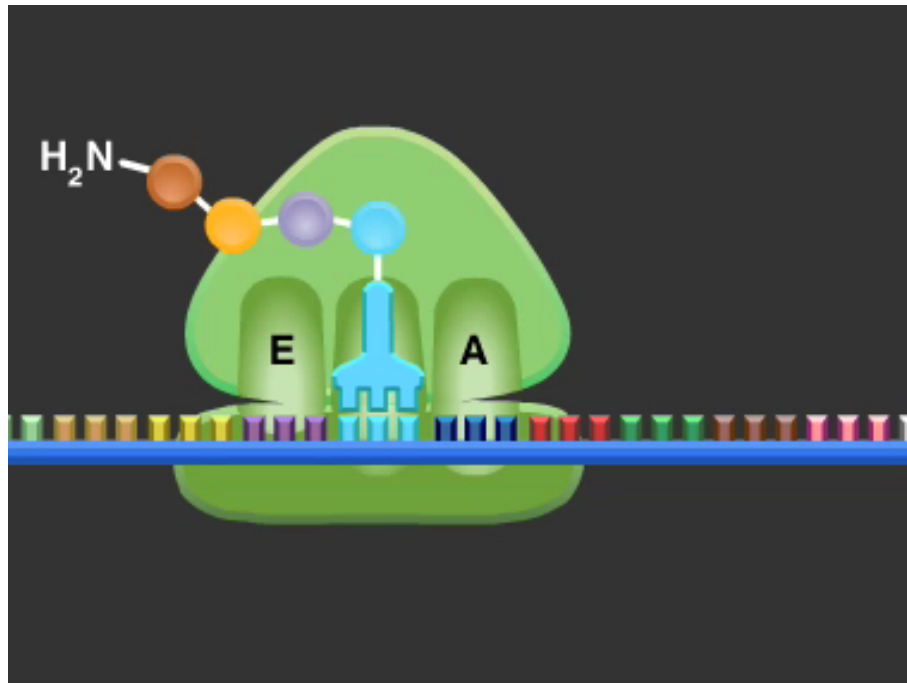
Síntesis de proteínas en la célula

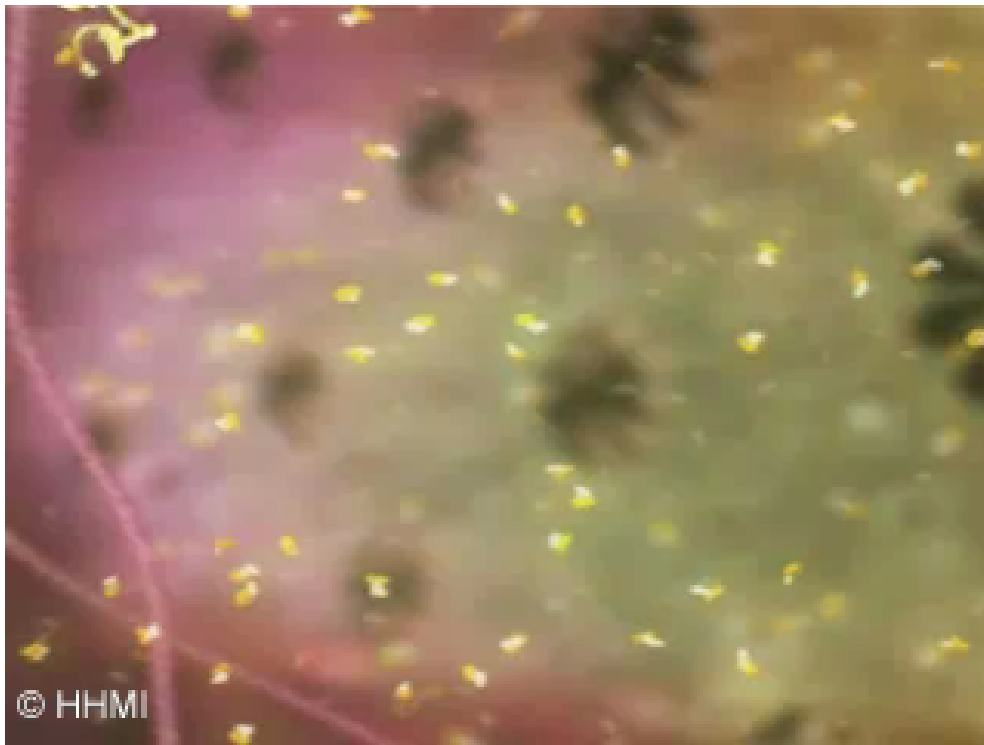


¿cómo se incorporan proteínas a estos organelos?

Analizaremos solo en la síntesis y modificaciones de las proteínas de la llamada **ruta secretora**

Lodish et al, 2004





Translocación Cotraduccional: Síntesis de proteínas asociadas en el RE

Las proteínas son ingresadas al **RE** en la medida que van siendo sintetizadas en los ribosomas que se han asociado al RE rugoso.

La asociación de los ribosomas al **RE** ocurre a través de la cadena polipeptídica nascente.

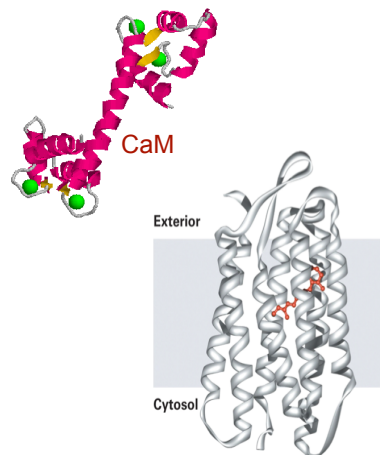
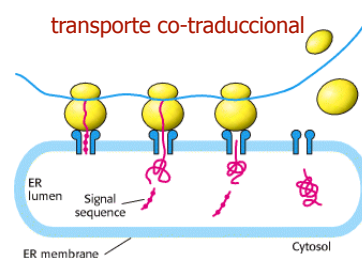
Una vez en el RE las proteínas son transportadas sin reentrar al citosol, a menos que sean destinadas a destrucción.

Proteínas solubles

Son totalmente transportadas y almacenadas en el lumen del RE antes de ser destinadas al lumen del organelo de destino (RE, A. de Golgi o lisosomas) o para secreción.

Proteínas de transmembrana

Son parcialmente translocadas y quedan embebidas en su membrana. Algunas de estas proteínas tienen funciones en el RE y otras en la membrana de otros organelos o en la MP.



Lodish et al, 2004

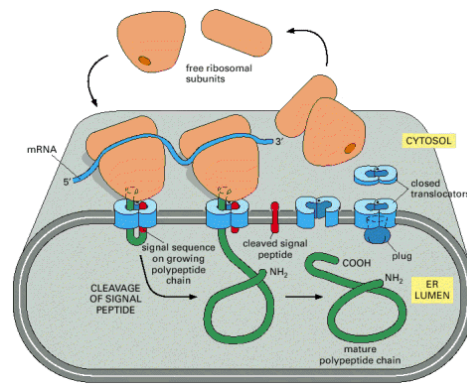
Síntesis de proteínas asociadas al RE

Las **proteínas solubles o de membrana** que serán destinadas al RE poseen una secuencia de aminoácidos que conforma una **señal hidrofóbica específica** ubicada en el extremo N-terminal (16-30 AA's) de la cadena nascente.

Esta señal es unida por la **partícula de reconocimiento del péptido señal**, el cual detiene la transcripción y dirige el complejo Ribosoma-ARN a la membrana del RE.

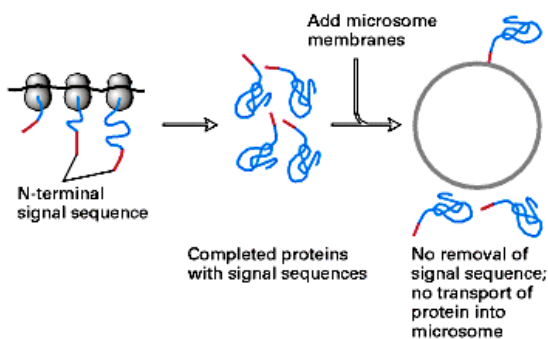
Mientras el polipéptido creciente emerge del ribosoma, atraviesa la membrana del RE vía proteínas específicas.

Las secuencias señal al RE fueron descubiertas a comienzo de los 1970's en proteínas secretadas que son internalizadas en el RE antes de ser descargadas fuera de la célula.

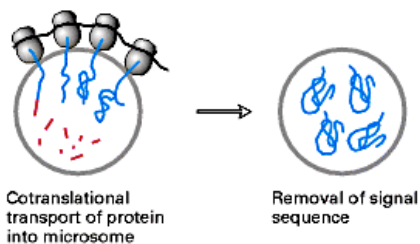


Alberts et al, 2002

(a) Cell-free protein synthesis; no microsomes present



(b) Cell-free protein synthesis; microsomes present



Lodish et al, 2000

Experimentos con microsomas de RE que demuestran la presencia de las secuencias señal en el polipéptido sintetizado.

Microsomas: vesículas obtenidas de las membranas internas de células homogeneizadas.

a) **Síntesis en un medio sin microsomas**, pero que contiene ribosomas, tRNA, ATP, GTP y enzimas citosólicas. Posteriormente se agregan microsomas. No se observa internalización de los polipéptidos en las vesículas. Los polipéptidos son 30 AA más grandes.

b) **La síntesis del polipéptido se hace en presencia de microsomas con ribosomas**, se demuestra que los polipéptidos permanecen en el interior de las vesículas, y que la secuencia señal es clivada en las vesículas de RE.

Table 17.4. Amino Acid Sequences of ER Signal Peptides in Three Eukaryotic Proteins

Protein	Amino Acid Sequence*
Preproalbumin	Met-Lys-Trp-Val-Thr- Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Phe-Ser ↓ Arg . . .
Pre-IgG light chain	Met-Asp-Met-Arg-Ala-Pro-Ala-Gln- Ile-Phe-Gly-Phe-Leu-Leu-Leu-Phe -Pro- Gly-Thr-Arg-Cys ↓ Asp . . .
Prelysozyme	Met-Arg-Ser- Leu-Leu-Ile-Leu-Val-Leu-Cys-Phe-Leu -Pro-Leu-Ala-Ala-Leu-Gly ↓ Lys . . .

arginine
(Arg, or R)

NC(CCCNC)C(=O)O

Cleavage site of signal peptidase

lysine
(Lys, or K)

NC(CCCCN)C(=O)O

phenylalanine
(Phe, or F)

NC(Cc1ccccc1)C(=O)O

leucine
(Leu, or L)

CC(C)C(C)C(N)C(=O)O

isoleucine
(Ile, or I)

CC(C)C(C)C(N)C(=O)O

serine
(Ser, or S)

NC(CO)C(=O)O

glycine
(Gly, or G)

NC(C)C(=O)O

alanine
(Ala, or A)

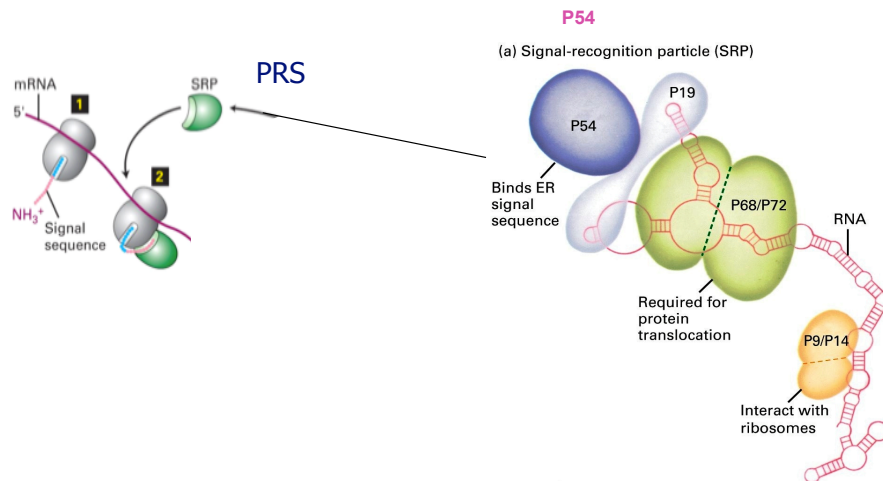
NC(C)C(=O)O

Las secuencias señal contienen uno o más AAs(+) (Arg, Lys) seguidos de 6 a 12 residuos hidrofóbicos.

Síntesis de proteínas solubles en el RE

La **secuencia señal** del RE (1) es guiada a la membrana del organelo mediante la **partícula de reconocimiento de señal** (PRS o SRP), que se liga a ella en el complejo cadena naciente/ribosoma.

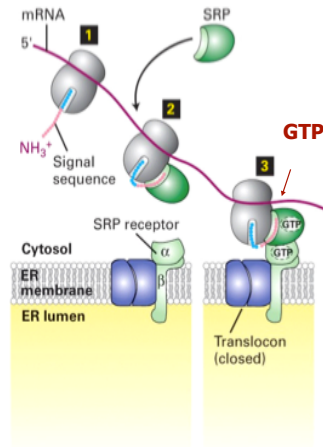
La PRS está compuesta de 6 diferentes cadenas polipeptídicas, unidas a una pequeña molécula de RNA.



Síntesis de proteínas solubles en el RE

Tan pronto como la secuencia señal del RE comienza a emerger del ribosoma se une a la PRS, produciéndose una pausa en la síntesis (2).

La PRS dirige al complejo cadena naciente/ribosoma un receptor de PRS (RPRS) ubicado en la membrana del RE. Esta interacción es inducida por la unión de GTP a la subunidad P54 de PRS y a la subunidad α del receptor de PRS (3).



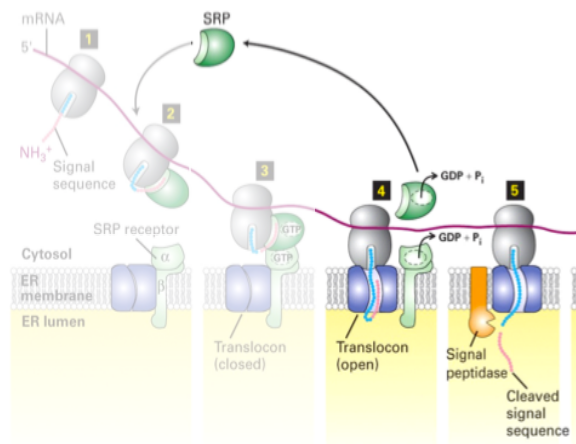
Lodish et al, 2004

Síntesis de proteínas solubles en el RE

El complejo se transfiere a una proteína-canal, el translocador (o translocón), asociado al RPRS, que se abre produciéndose la inserción de la secuencia señal y del segmento adyacente del polipéptido en el poro.

El receptor de PRS y la PRS se separan del translocador, hidrolizan sus GTPs y quedan listos para iniciar otro ciclo de inserción (4).

A medida que la cadena polipeptídica se elonga, pasa al lumen del RE donde la secuencia señal es cortada por una peptidasa y degradada (5).



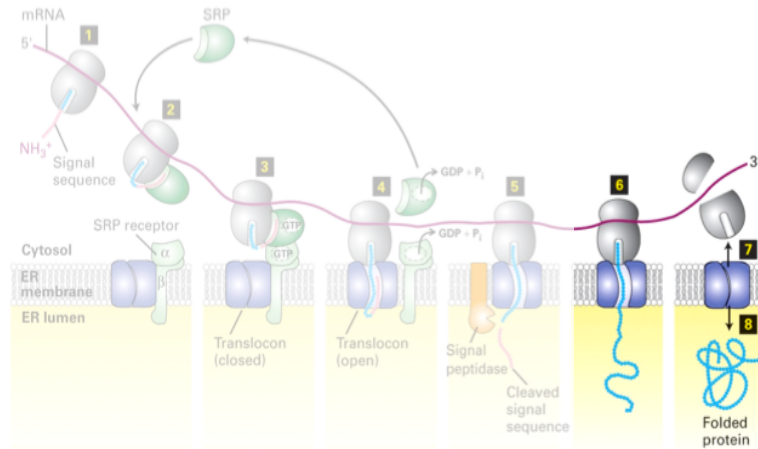
Lodish et al, 2004

Síntesis de proteínas solubles en el RE

El péptido termina de sintetizarse mientras el ribosoma permanece unido al poro (6).

Al terminar la síntesis se libera el ribosoma y el translocador se cierra (7).

La proteína pasa al lumen donde asume su conformación plegada (8).



Lodish et al, 2004

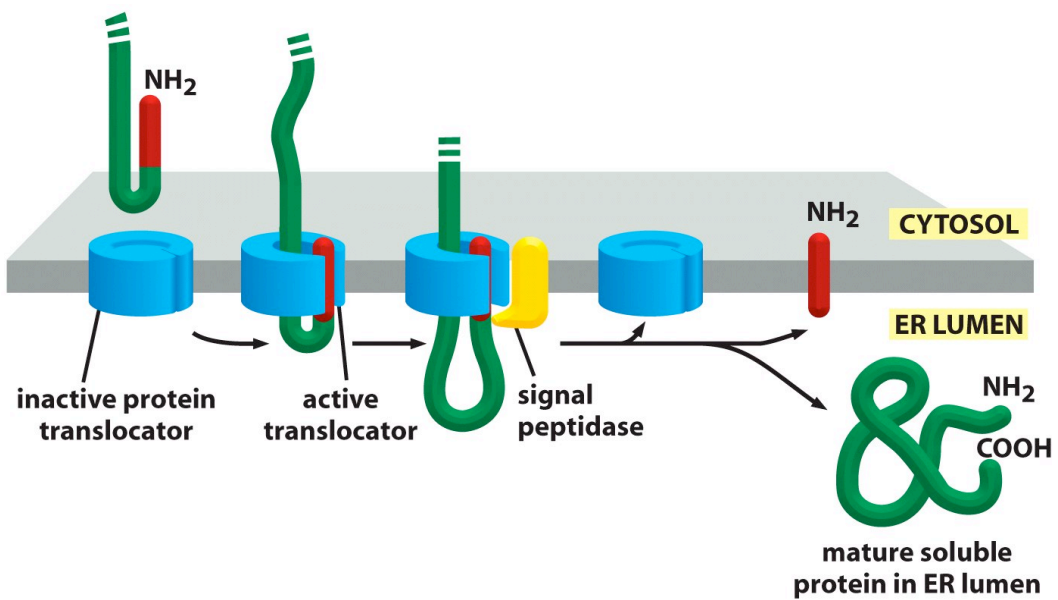


Figure 12-45 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Translocador, translocón o complejo Sec61

La cadena polipeptídica cruza la membrana del RE a través del poro acuoso en el centro del **translocador o translocón**, una proteína de membrana, que forma un poro acuoso.

El translocador o complejo Sec61 está formado por cuatro complejos, c/u formado de tres proteínas de transmembrana que se ensamblan formando una estructura de picarón (o dona).

Se postula que la secuencia señal en la cadena polipeptídica creciente gatilla la apertura del este poro.

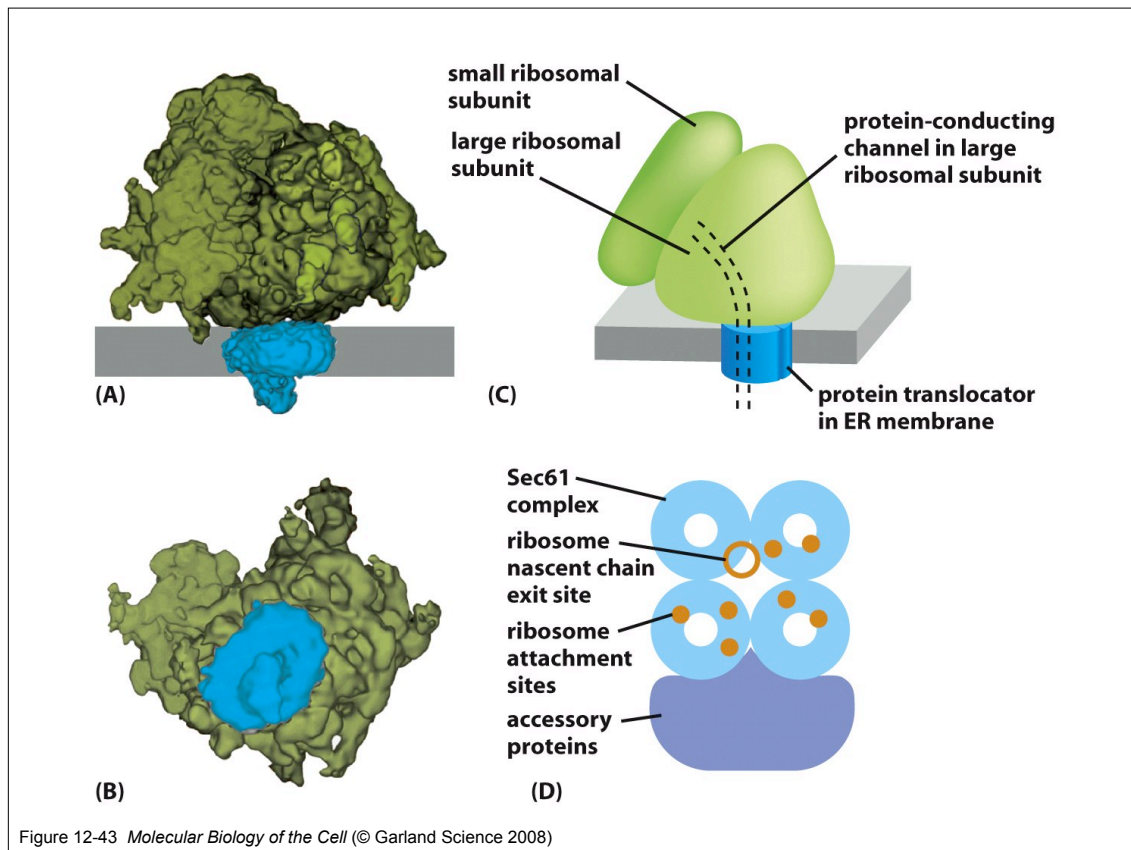
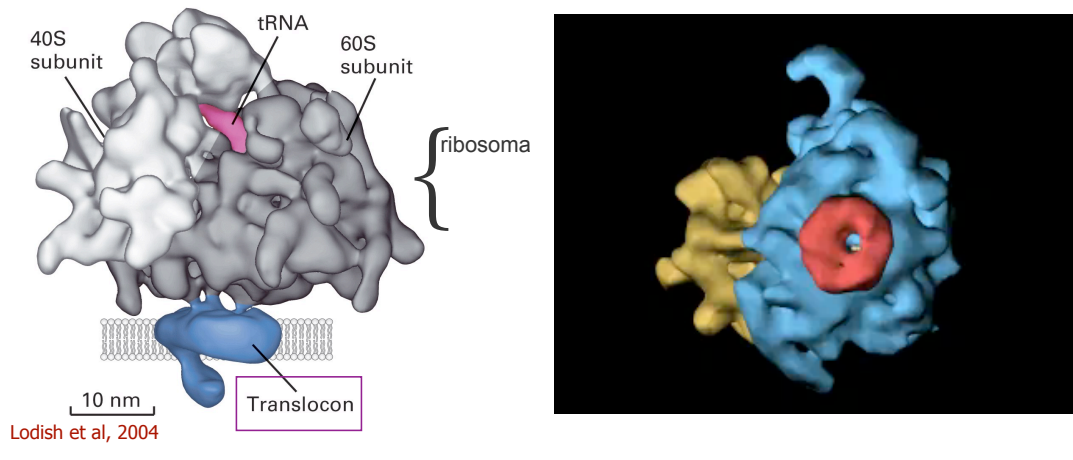
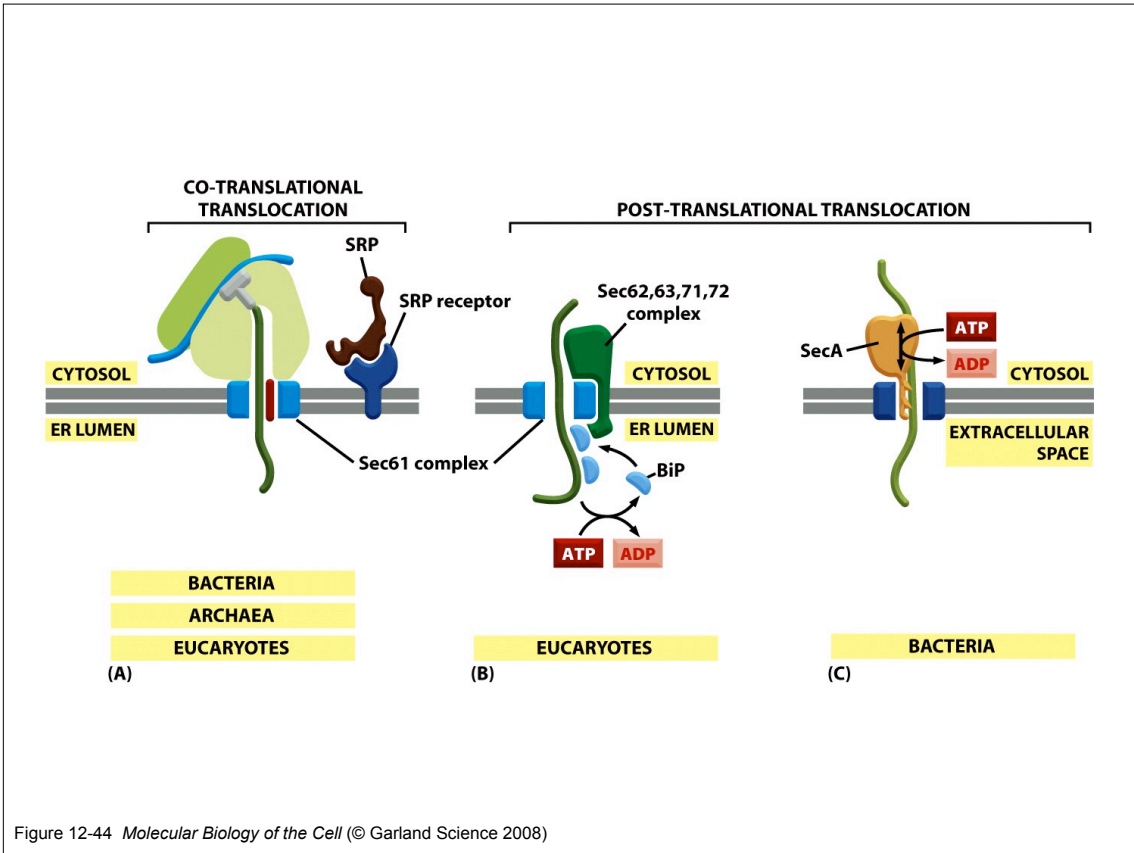
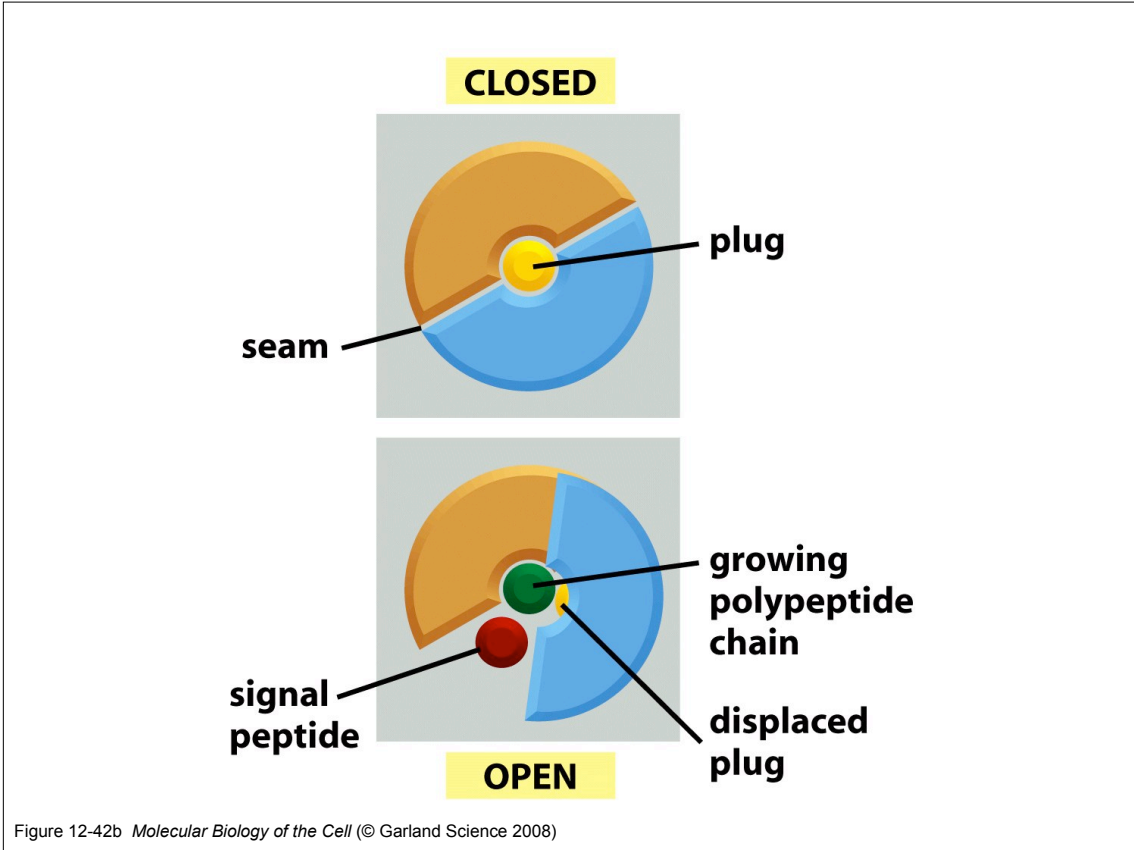


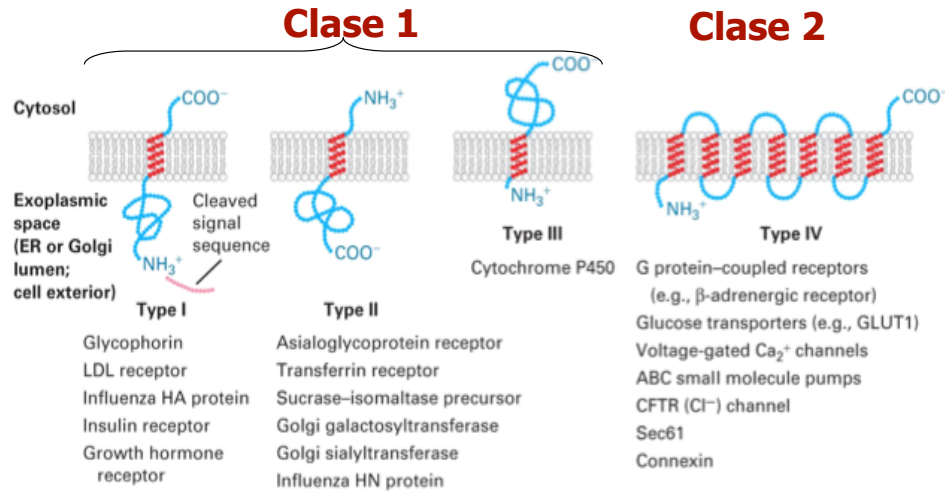
Figure 12-43 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



Síntesis e inserción de proteínas de membrana en el RE

Las proteínas de membrana presentes en la MP, Golgi, o lisosomas tienen una particular orientación o topología respecto de la bicapa lipídica.

Estas proteínas son sintetizadas en el RE y permanecen embebidas en la membrana a medida que se mueven a sus destinos finales a lo largo de la ruta secretora.



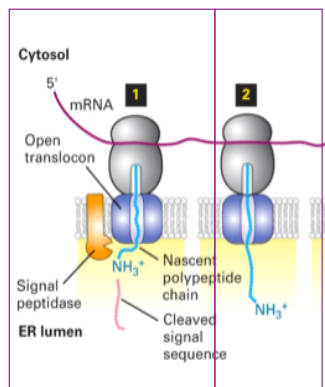
Lodish et al, 2004

Síntesis e inserción en la membrana del RE de proteínas con un segmento hélice α de transmembrana.

Las proteínas Tipo I poseen una **secuencia señal** y una **secuencia hidrofóbica interna** que constituirá el segmento hélice α de transmembrana.

Al igual que en las proteínas solubles la translocación co-traduccional se inicia a través de la actividad de la PRS y del receptor de PRS.

Una vez que el extremo N-terminal entra al lumen la secuencia señal es cortada por una peptidasa (1), mientras la cadena sigue creciendo (2).

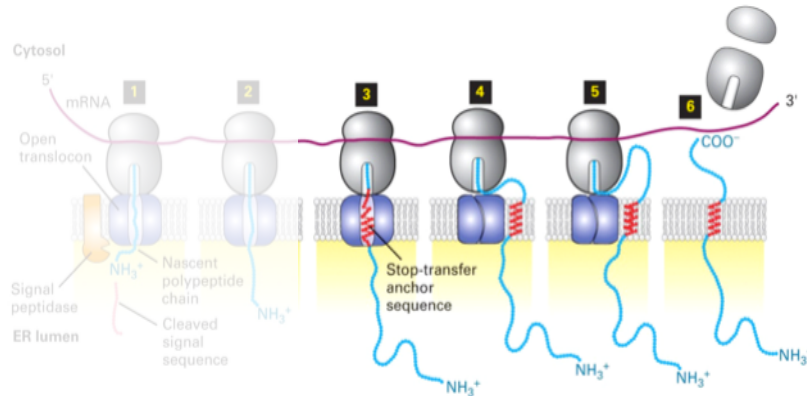


Lodish et al, 2004

Síntesis e inserción en la membrana del RE de proteínas con un segmento hélice α de transmembrana

Cuando se sintetiza una secuencia de aprox. ~22 AA's hidrofóbicos (**secuencia de detención de transferencia y anclaje**) se detiene la translocación (3).

La secuencia hidrofóbica se mueve lateralmente entre las subunidades del translocador y se ancla en la membrana (4). La traducción continúa hasta el que el extremo C terminal se desliza fuera del ribosoma todavía anclado al translocador cerrado (5). Al terminar la síntesis se libera el ribosoma (6).



Lodish et al, 2004

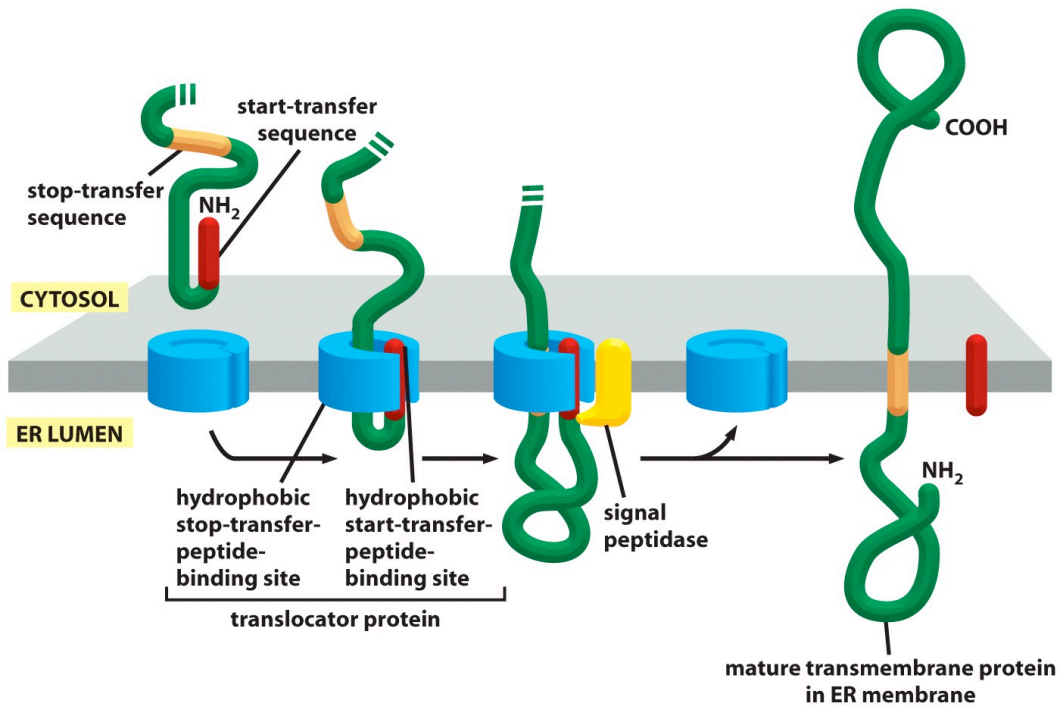


Figure 12-46 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

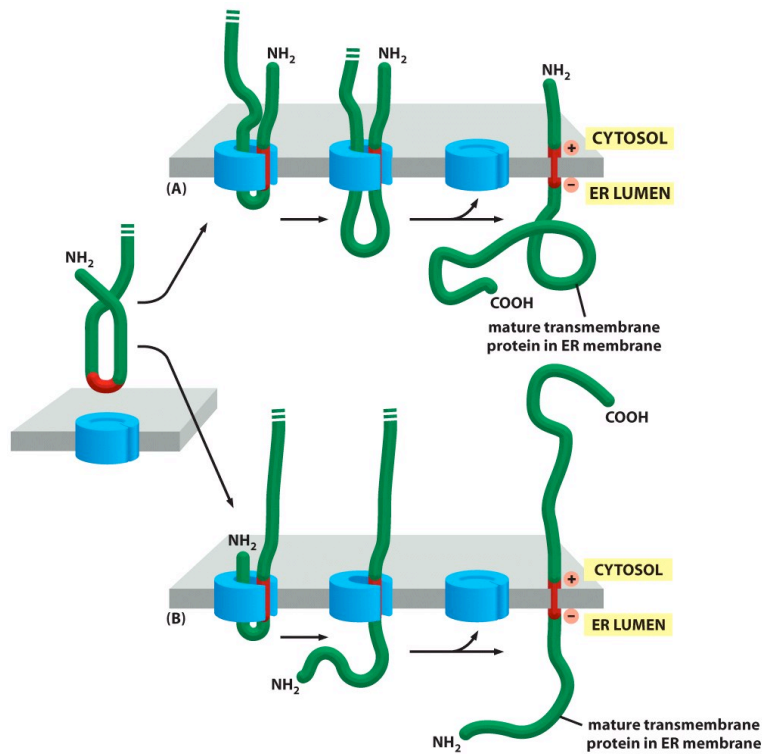
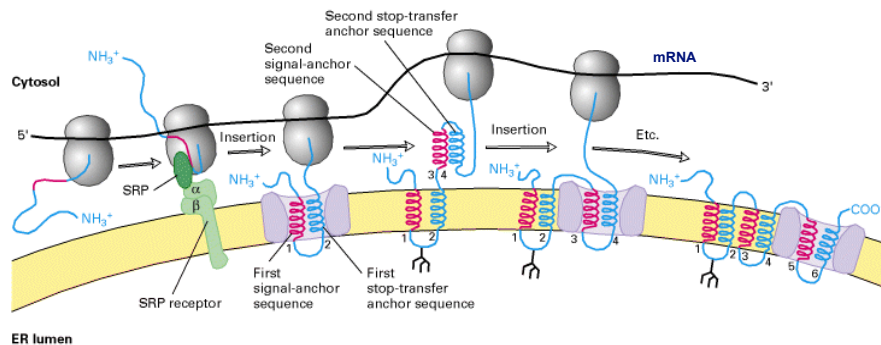


Figure 12-47 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Síntesis e inserción en la membrana del RE de proteínas con múltiples segmentos hélices α de transmembrana

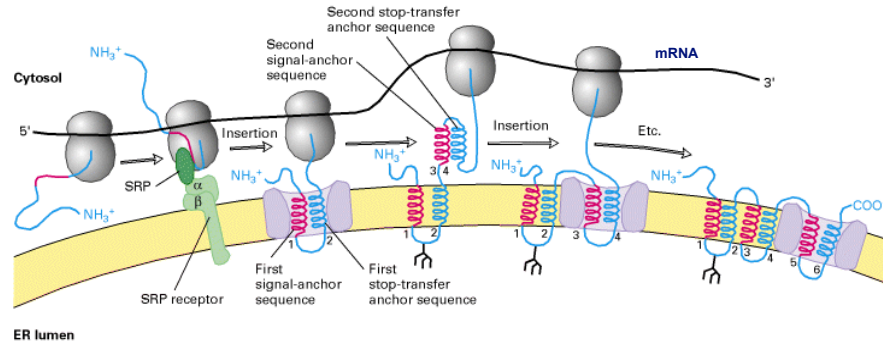
En las proteínas de transmembrana de **múltiples hélices α** el segmento N-terminal funciona como secuencia señal de anclaje que dirige la unión de la cadena polipeptídica naciente a través del poro del translocador. El plegamiento en hélice α aparentemente se realiza en el poro.

A medida que la cadena naciente que sigue al primer hélice α se elonga, se transporta a través del translocador hasta que se forma el segundo hélice α . Esta hélice actúa como una secuencia de detención de transferencia, previniendo mayor extrusión de la cadena a través del poro al lumen del RE.



Síntesis e inserción en la membrana del RE de proteínas con múltiples segmentos hélices α de transmembrana

Al sintetizarse el segundo hélice α cesa la extrusión de la cadena a través del translocon al lumen del RE. Las dos cadenas salen del translocon lateralmente hacia la membrana anclándose como una horquilla hélice α . El C-terminal de la cadena naciente continúa creciendo en el citosol. Las horquillas hélice α posteriores (3 y 4) de insertan de manera similar, sin la participación de SRP ni del receptor SRP.



Lodish et al, 2004

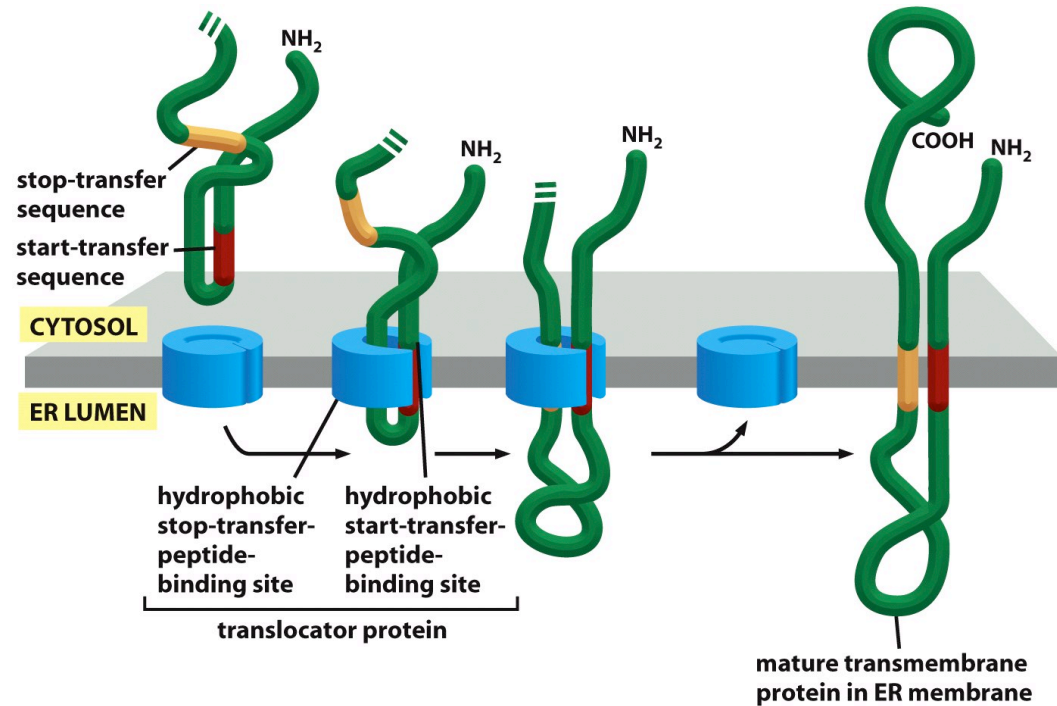


Figure 12-48 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

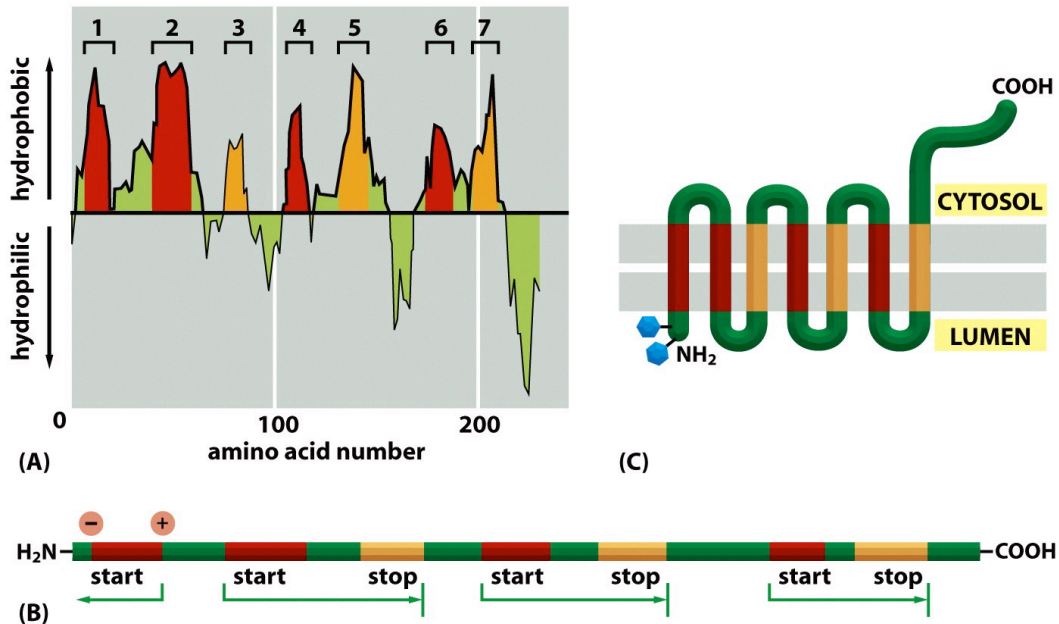
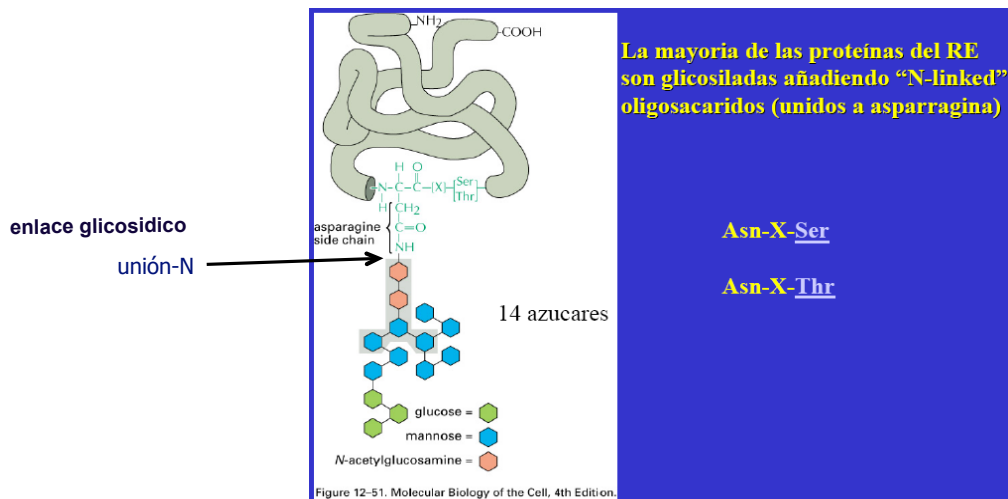


Figure 12-49 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

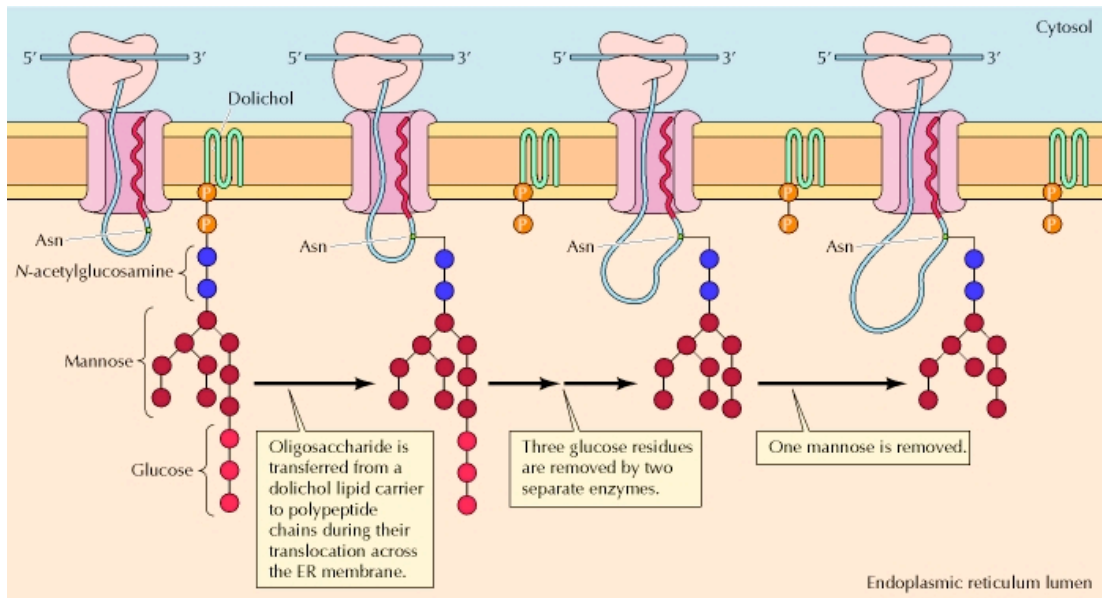
Glicosilación de unión-N

Las proteínas que ingresan al retículo pueden ser modificadas por la adición de azúcares (glicosilación) a la cadena lateral de residuos **Asparagina** dentro de una secuencia específica de Asn-X-Ser/Thr. Debido a que la glicosilación ocurre en el grupo NH₂ esto se llama glicosilación de unión-N o N-Glicosilación.

Este proceso ocurre en el tiempo que la proteína es ingresada al RER



Glicosilación de unión-N



No es cualquier Asparagina (Asn) si no una secuencia consenso de Asn-X-Ser/Thr

Si no se remueven las 3 moléculas de glucosa y una manosa, la proteína no puede ser exportada hacia el aparato de Golgi

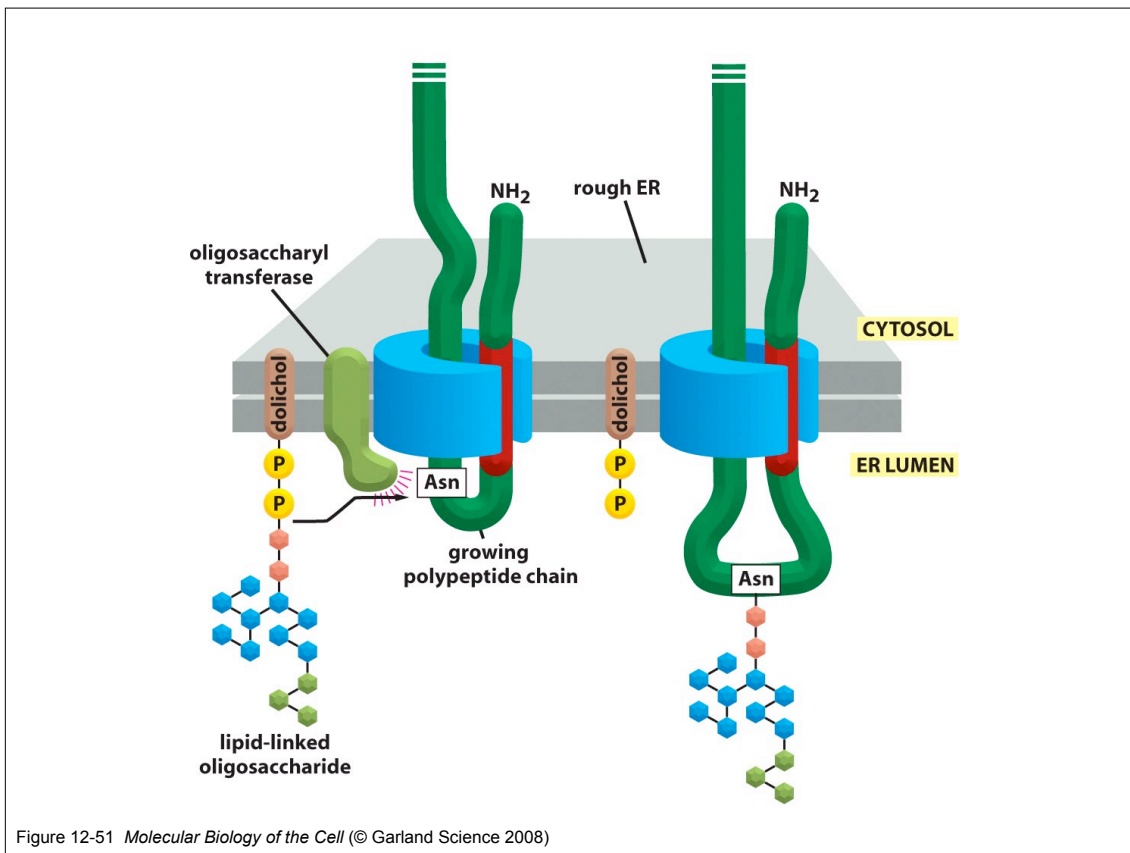


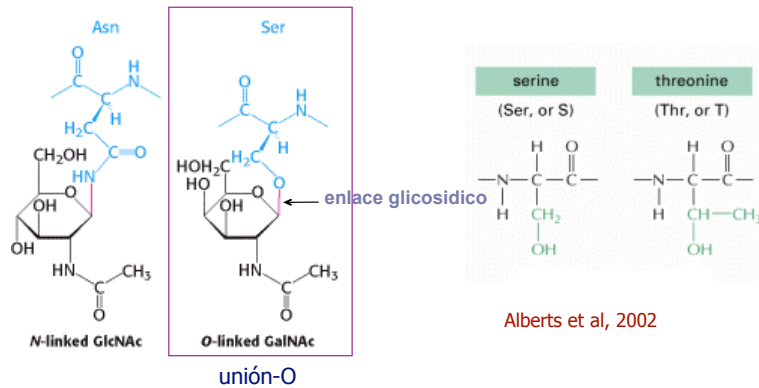
Figure 12-51 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Glicosilación de unión-O

Las proteínas también pueden ser modificadas por adición de azúcares a las cadenas laterales de residuos **serina** o **treonina** dentro de secuencias específicas de AAs. A esto se le llama **glicosilación de unión-O**.

Generalmente serina y treonina unen directamente **N-acetilgalactosamina** a la que se pueden agregar otros azúcares, de uno a la vez, y son catalizada por diferentes glicosiltransferasas. El proceso comienza en el Golgi cis y finaliza en el trans.

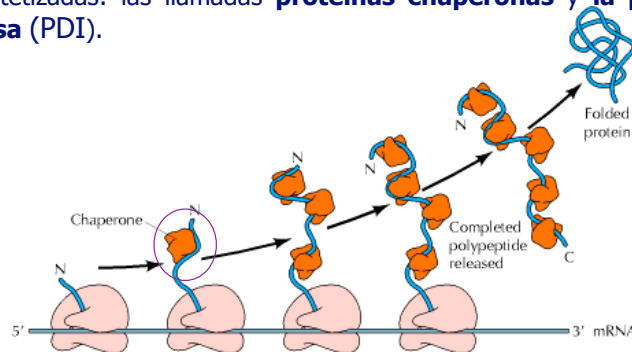
Los oligosacáridos de unión-O son generalmente cortos (1 a 4 residuos de azúcares).



Plegamiento de las proteínas en el lumen del RE

En la célula, el plegamiento adecuado de las proteínas, para lograr su conformación tridimensional es asistido por la actividad de otras proteínas.

El RE contiene en el lumen varias proteínas que catalizan el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas: las llamadas **proteínas chaperonas** y la **proteína disulfuro isomerasa (PDI)**.



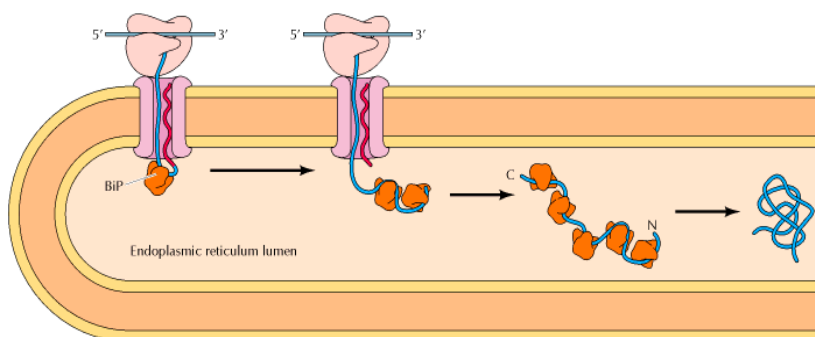
Durante la traducción de proteínas citosólicas, las chaperonas se unen al amino (N) terminal del polipéptido creciente, estabilizándolo en una configuración no plegada hasta que la síntesis se ha completado. Completada la síntesis, la proteína se libera del ribosoma y adquiere su correcta conformación tridimensional.

Plegamiento de las proteínas en el lumen del RE

Una de las más importantes proteínas chaperonas del RE de la familia de las Hsc 70 (**heat shock proteins**) es **BiP**.

BiP se une a la proteína no plegada apenas ésta cruza la membrana y luego media el plegamiento y ensamblaje de las proteínas formadas por múltiples subunidades dentro del RE.

BiP presenta afinidad por regiones hidrofóbicas expuestas e hidroliza ATP uniendo y liberando la proteína en cada ciclo de hidrólisis.



Primera importancia de la Glicosilación: Control de Calidad

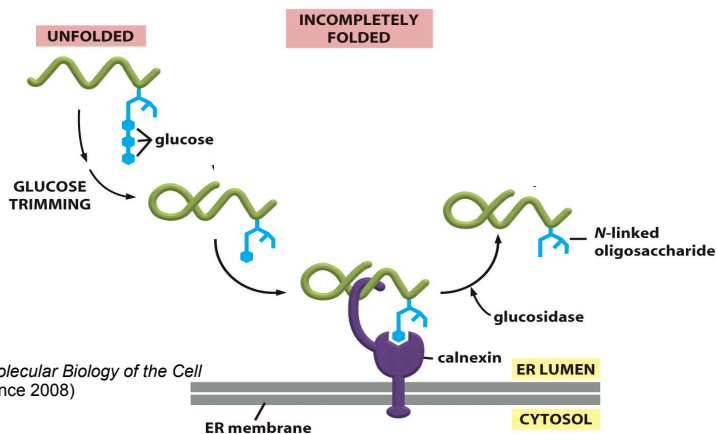


Figure 12-53 *Molecular Biology of the Cell*
(© Garland Science 2008)

Primera importancia de la Glicosilación: Control de Calidad

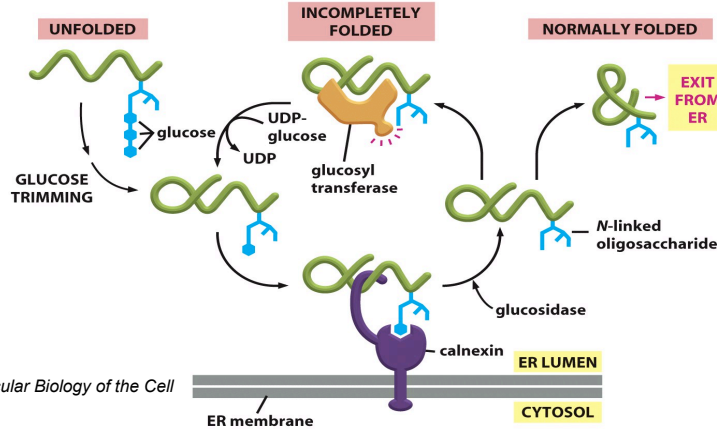


Figure 12-53 *Molecular Biology of the Cell*

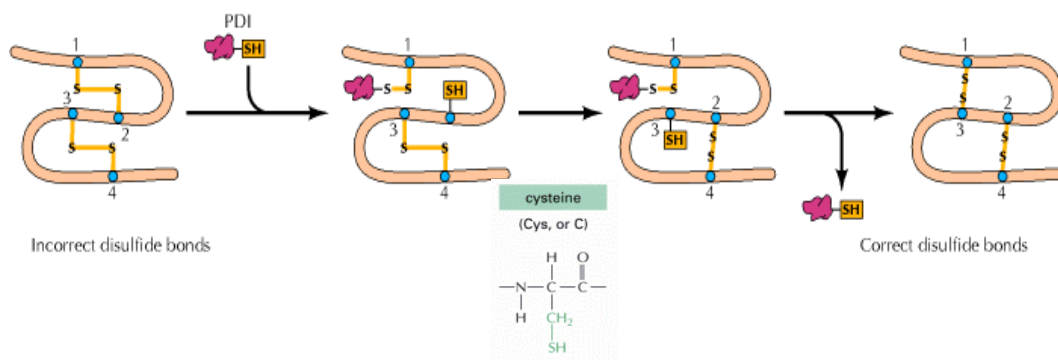
- No todos los dominios de las proteínas adquieren su estructura correcta de manera autónoma. Muchos necesitan apoyo de proteínas chaperonas.
- La unión de Calnexina y Calreticulina (chaperonas) permite que las proteínas adquieran su conformación correcta.
- La glucosil-transferasa evalúa la condición de las proteínas y, si están desestructuradas, le adiciona una glucosa a su árbol de glicosilaciones, devolviéndole la afinidad por las chaperonas.
- Pese a esto, hasta un 80% de los polipéptidos de algunas proteínas terminan mal estructurados (por ejemplo: hoja β en lugar de α helix). Estas proteínas son *dislocadas* al citoplasma, ubiquinadas y degradadas por el proteosoma.

Formación de enlaces disulfuro.

La formación de los enlaces disulfuro, S-S, entre las cadenas laterales de los residuos cisteína es un importante aspecto del plegamiento de proteínas en el RE.

Estos enlaces **no se forman en el citosol** que posee un ambiente reductor que mantiene los residuos cisteína en su estado reducido (R-SH). En el RE el ambiente es más oxidante lo que facilita la formación de estos enlaces.

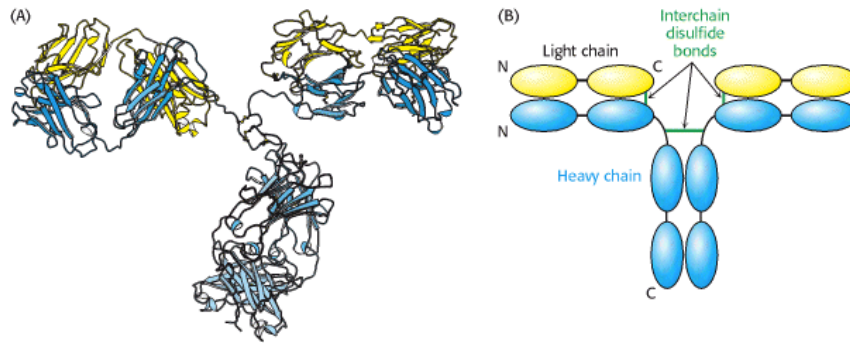
La formación de enlaces disulfuro es catalizada por la enzima proteína **disulfuro isomerasa (PDI)** localizada en el lumen del RE.



El ensamblaje de subunidades en proteínas multiméricas ocurre en el RE.

Muchas proteínas de membrana y secretadas están constituidas de dos o más cadenas polipeptídicas (o subunidades). En todos los casos son ensambladas en el RE.

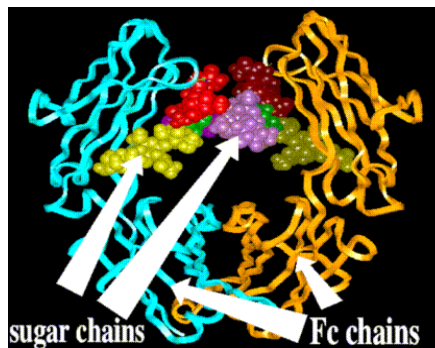
Ejemplos: inmunoglobulinas, que contienen dos cadenas pesadas y dos livianas todas unidas por puentes S - S.



Papel de la glicosilación en las proteínas

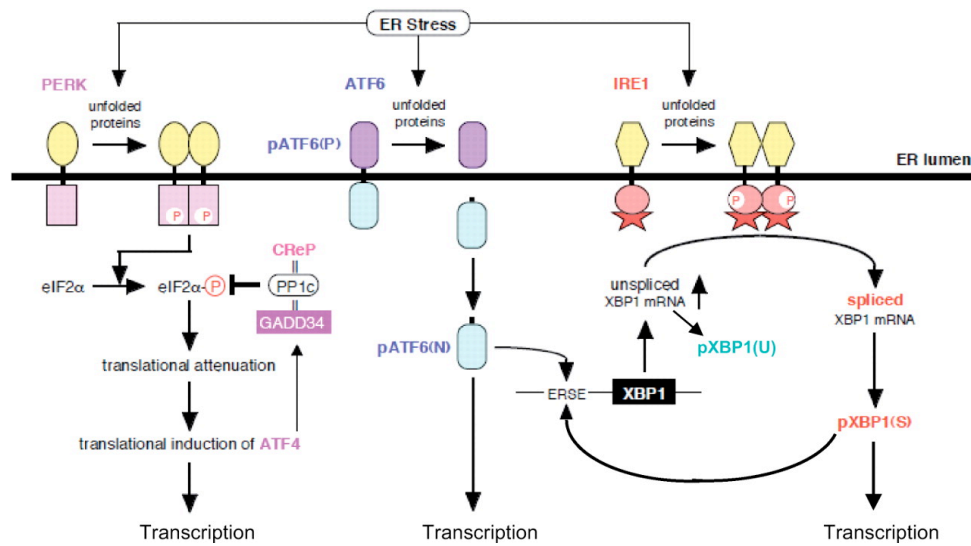
Los oligosacáridos pueden jugar variadas funciones según la proteína.

- 1.- Pueden hacer a la proteína más resistente a la digestión por proteasas
- 2.- Ayudar en el proceso de plegamiento en el ER.
- 3.- Guiar la proteína al organelo de destino, sirviendo de señal para el empacamiento de la proteína en la vesícula apropiada.
- 4.- Muchos oligosacáridos se exponen en la superficie celular formando la capa de carbohidratos y pueden funcionar en el reconocimiento entre las células.



Thy-I: precursor de glicoproteína de membrana

UPR mechanism in mammals.



Mori K J Biochem 2009;146:743-750

© The Authors 2009. Published by Oxford University Press on behalf of the Japanese Biochemical Society. All rights reserved

THE JOURNAL OF
BIOCHEMISTRY

Preguntas: Retículo Endoplásmico

- ¿Cuál es el origen del RE?
¿cómo se asocia con la membrana nuclear?
- ¿por qué hablamos de RE liso y rugoso?
- ¿Qué células están enriquecidas en cada uno de los RE?
- ¿Qué funciones cumplen los RE? ¿Son el mismo organelo?
- ¿Qué es el péptido señal?
¿Cómo lo reconocemos? ¿a dónde va después de la traducción?
- ¿Por qué hablamos de Partícula en el SRP? ¿Cómo cumple su función?
- ¿Cuál es la estructura de un dominio de transmembrana?
- ¿cómo se inserta una proteína de transmembrana de clase I? ¿y de clase II?
- ¿qué pasa si le retiro el péptido señal a una proteína soluble en el lumen del retículo? ¿y a una proteína de TM tipo I?
- ¿qué debo hacer para lograr que una proteína de TM de tipo I sea SECRETADA en forma soluble? ¿y una proteína mitocondrial o peroxisomal?
- ¿qué es una flipasa?
- ¿dónde se sintetiza el Colesterol?
¿Cuál es la enzima limitante?
- **¿cómo se van a aprender todo esto?**