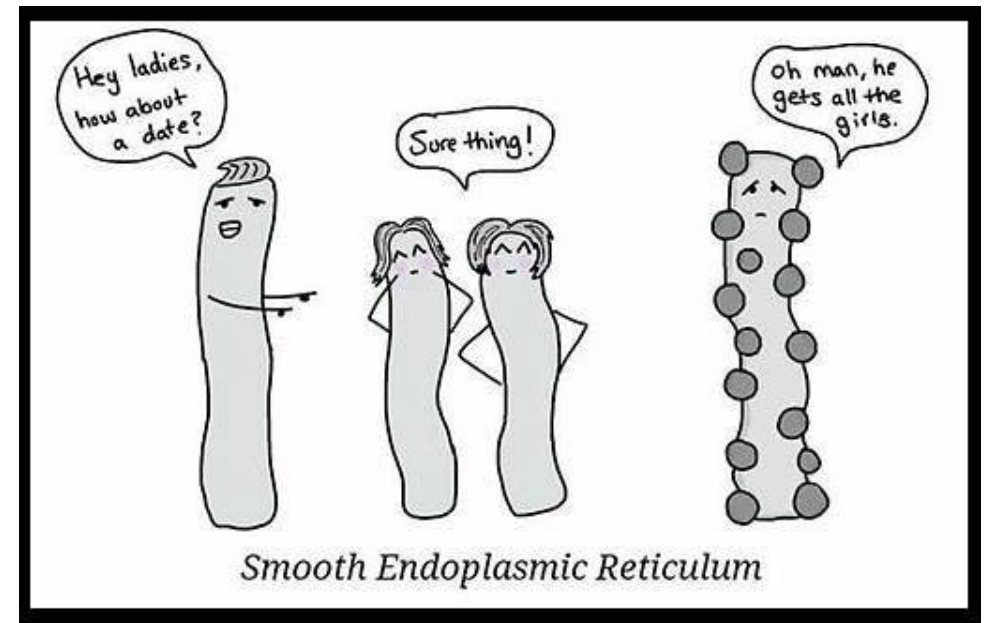


## SISTEMA ENDOMEMBRANOSO

- . Retículo endoplasmático rugoso e liso
- . Complexo de Golgi
- . Sistemas de Controlo de Qualidade



## “Sorting” de proteínas

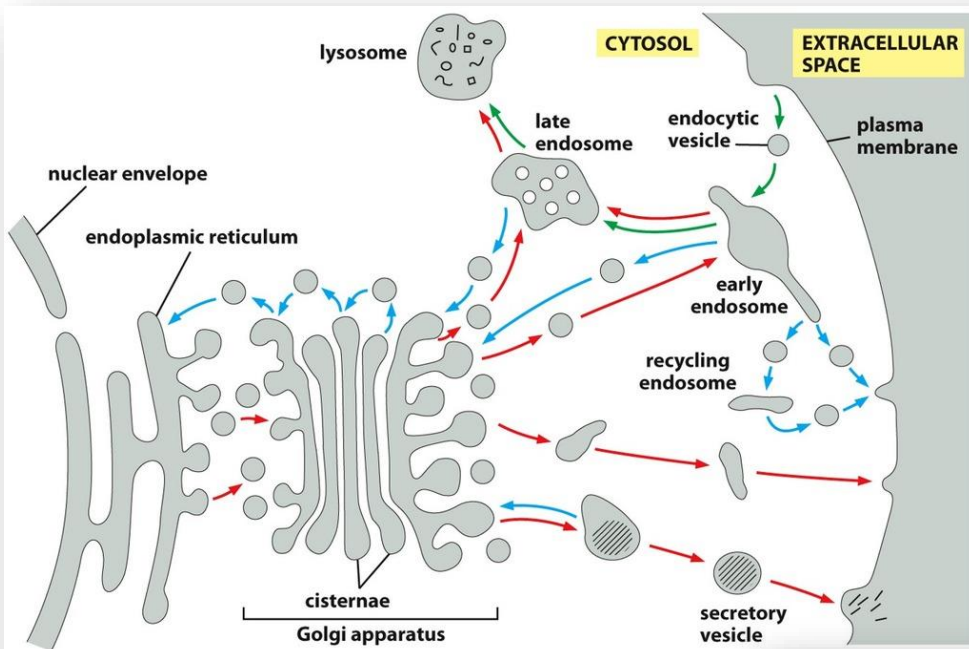
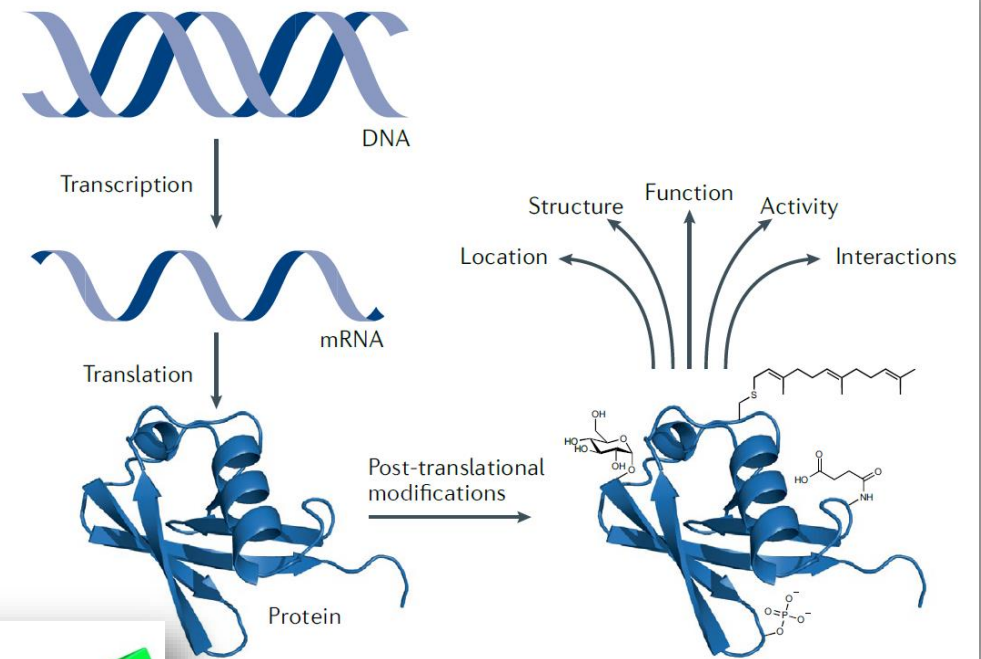


Figure 13-3b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Modificações pós-tradução



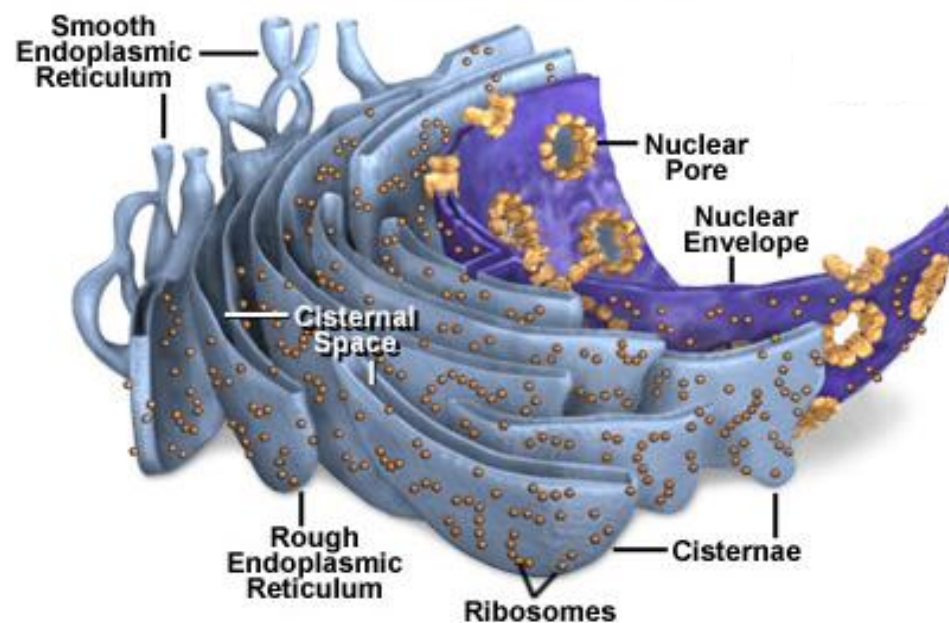
**Table 12-2 Relative Amounts of Membrane Types in Two Kinds of Eucaryotic Cells**

MEMBRANE TYPE	PERCENTAGE OF TOTAL CELL MEMBRANE	
	LIVER HEPATOCYTE*	PANCREATIC EXOCRINE CELL*
Plasma membrane	2	5
Rough ER membrane	35	60
Smooth ER membrane	16	<1
Golgi apparatus membrane	7	10
Mitochondria		
Outer membrane	7	4
Inner membrane	32	17
Nucleus		
Inner membrane	0.2	0.7
Secretory vesicle membrane	not determined	3
Lysosome membrane	0.4	not determined
Peroxisome membrane	0.4	not determined
Endosome membrane	0.4	not determined

## O Retículo Endoplasmático

O **retículo endoplasmático (ER)** é um complexo conjunto membranar de cisternas, canais, vesículas e sacúolos. O ER está normalmente em continuidade com a membrana nuclear.

As cisternas, canais, vesículas e sacúolos, geralmente **anastomosados**, ligando entre si o lúmen dos seus diversos compartimentos, sendo que a membrana do ER forma um folheto contínuo que envolve um único espaço interno (**lúmen ou espaço da cisterna do ER**).



O **ER tem um papel central na biossíntese de lípidos e proteínas**. A sua membrana é o local de produção de todas as proteínas transmembranares e lipídios para a maioria dos organelos celulares: ER, complexo de Golgi, lisossomas endossomas, vesículas secretoras, membrana plasmática, mitocôndrias, os peroxissomas.

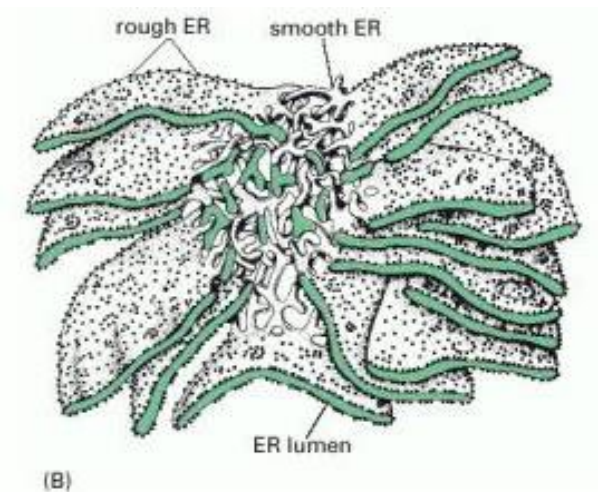
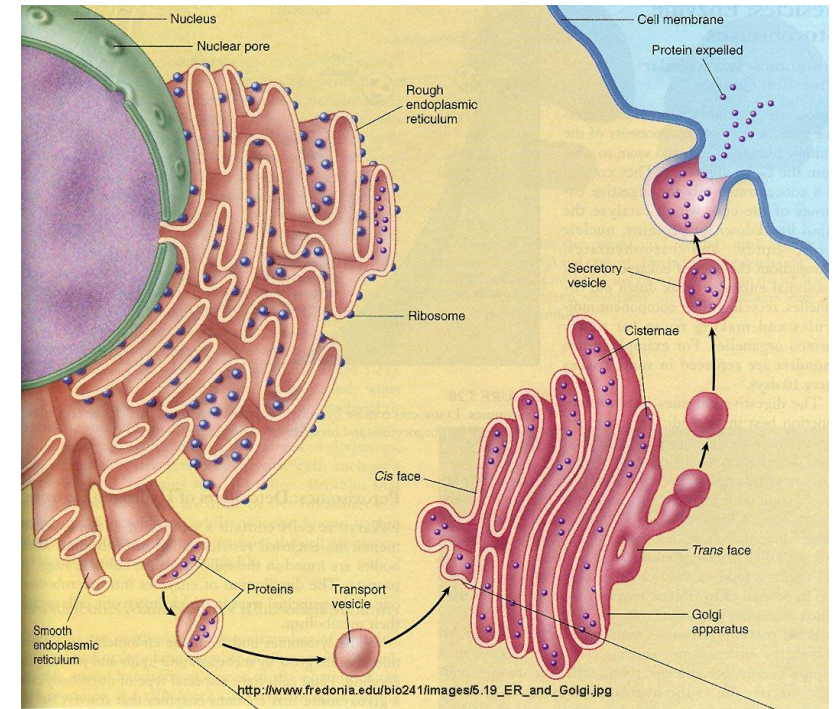


## O retículo endoplasmático liso

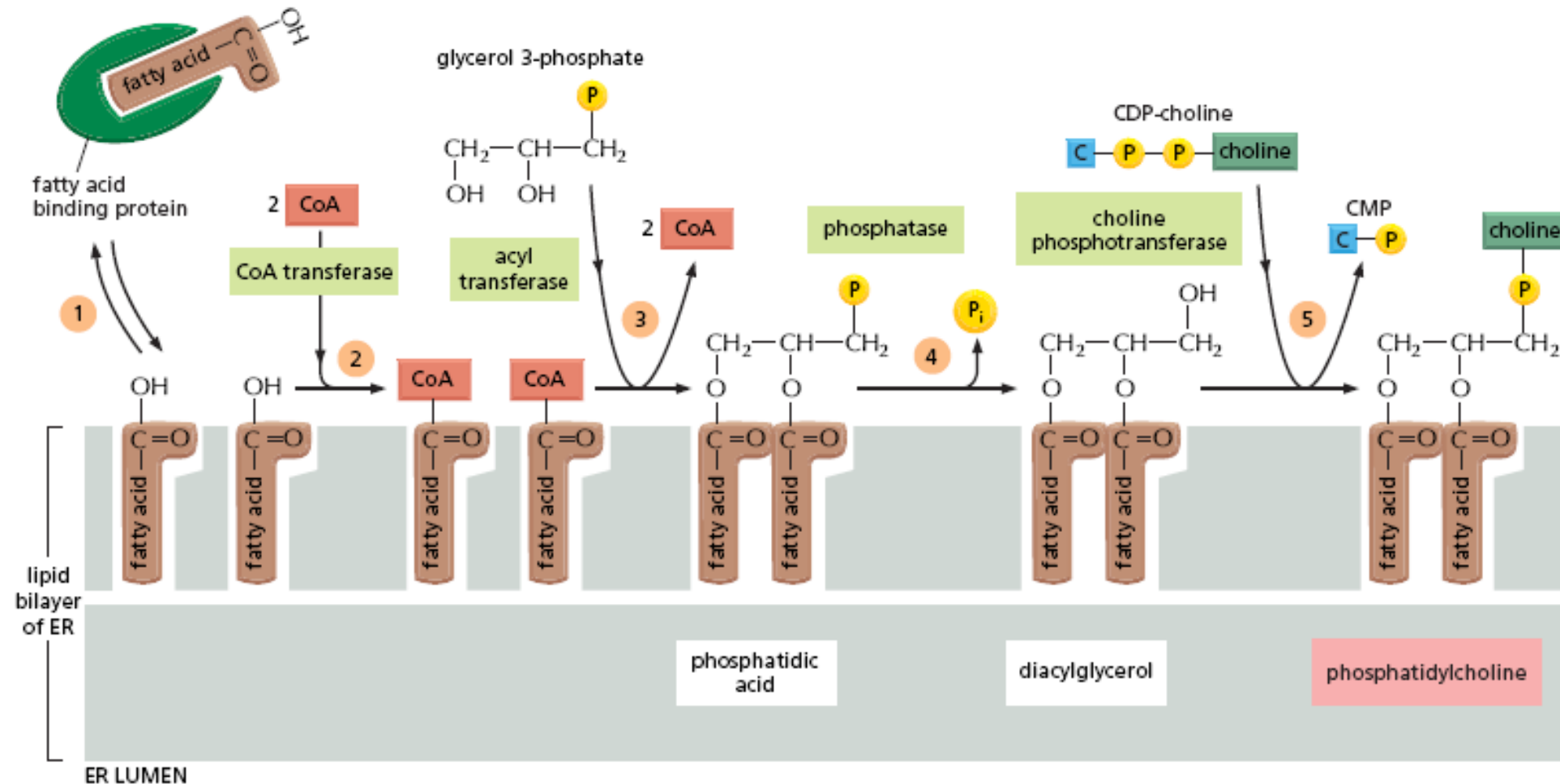
As regiões do ER isentas de ribossomas são designadas por **ER liso**. O ER liso tem como principal função o **metabolismo lipídico e a regulação dos níveis de cálcio** (também o ER rugoso).

Há um tipo particular de ER liso denominado por **ER transicional** porque está envolvido na formação de vesículas membranares contendo proteínas sintetizadas de novo e lípidos se destacam para continuar o transporte via complexo de Golgi.

Em algumas células especializadas, o ER liso é muito proeminente e desempenha funções adicionais. Normalmente é mais proeminente em células especializadas no metabolismo lipídico. As células que sintetizam hormonas esteróides a partir do colesterol, por ex., têm um ER liso expandido por forma a acomodar as enzimas necessárias na biossíntese das hormonas esteróides.



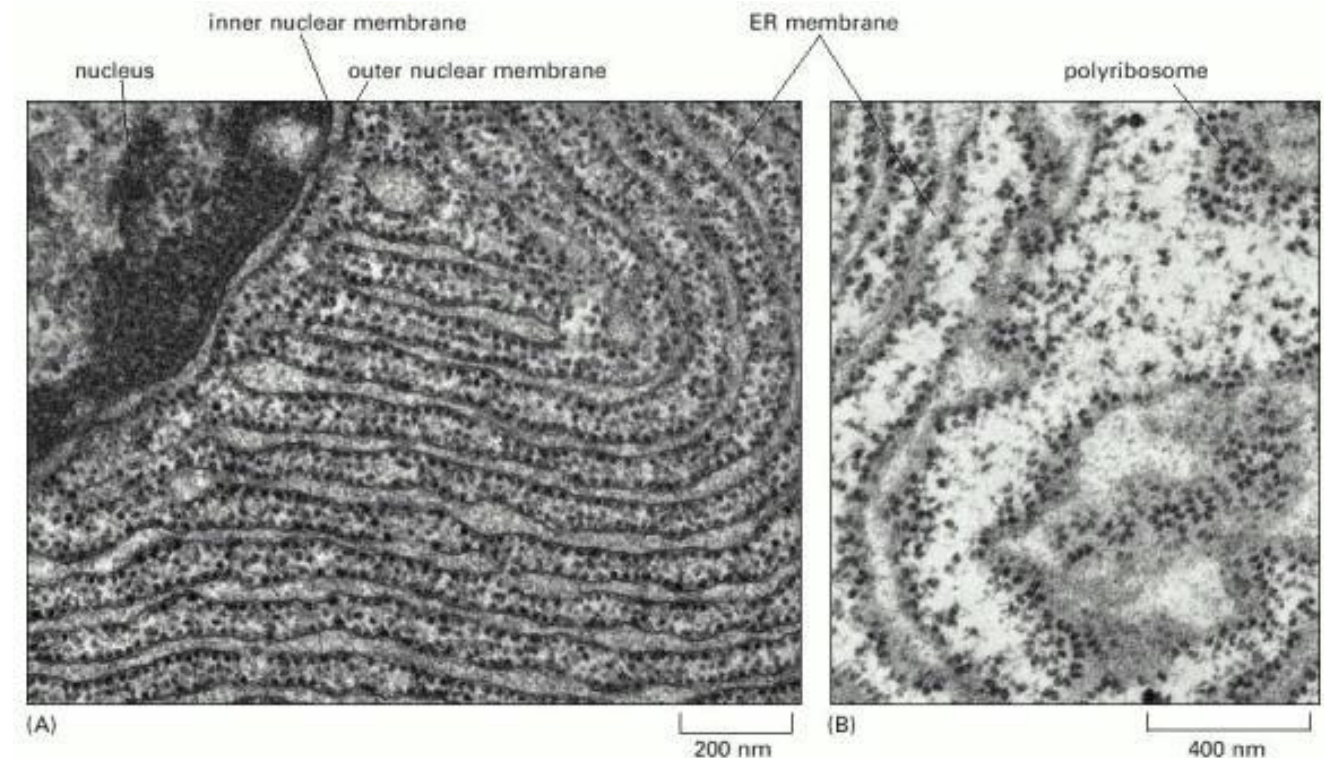
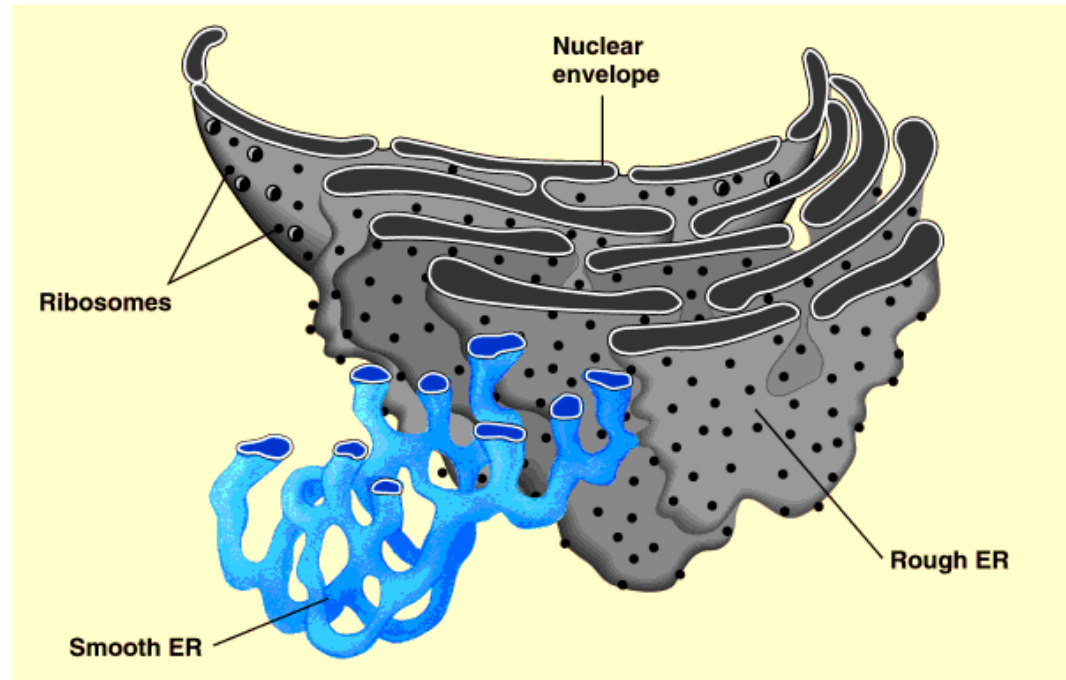
A membrana do ER sintetiza praticamente todas as **principais classes de lípidos**, incluindo os **fosfolípidos** e o **colesterol**, necessários para a produção de novas membranas celulares. O principal fosfolípido produzido é a **fosfatidilcolina**, que é formada em 3 passos a partir da colina, 2 ácidos gordos e glicerol fosfato.



O **ER rugoso** está repleto de ribossomas e é o local de **síntese e processamento de proteínas**. Os ribossomas estão directamente ligados à membrana do ER.

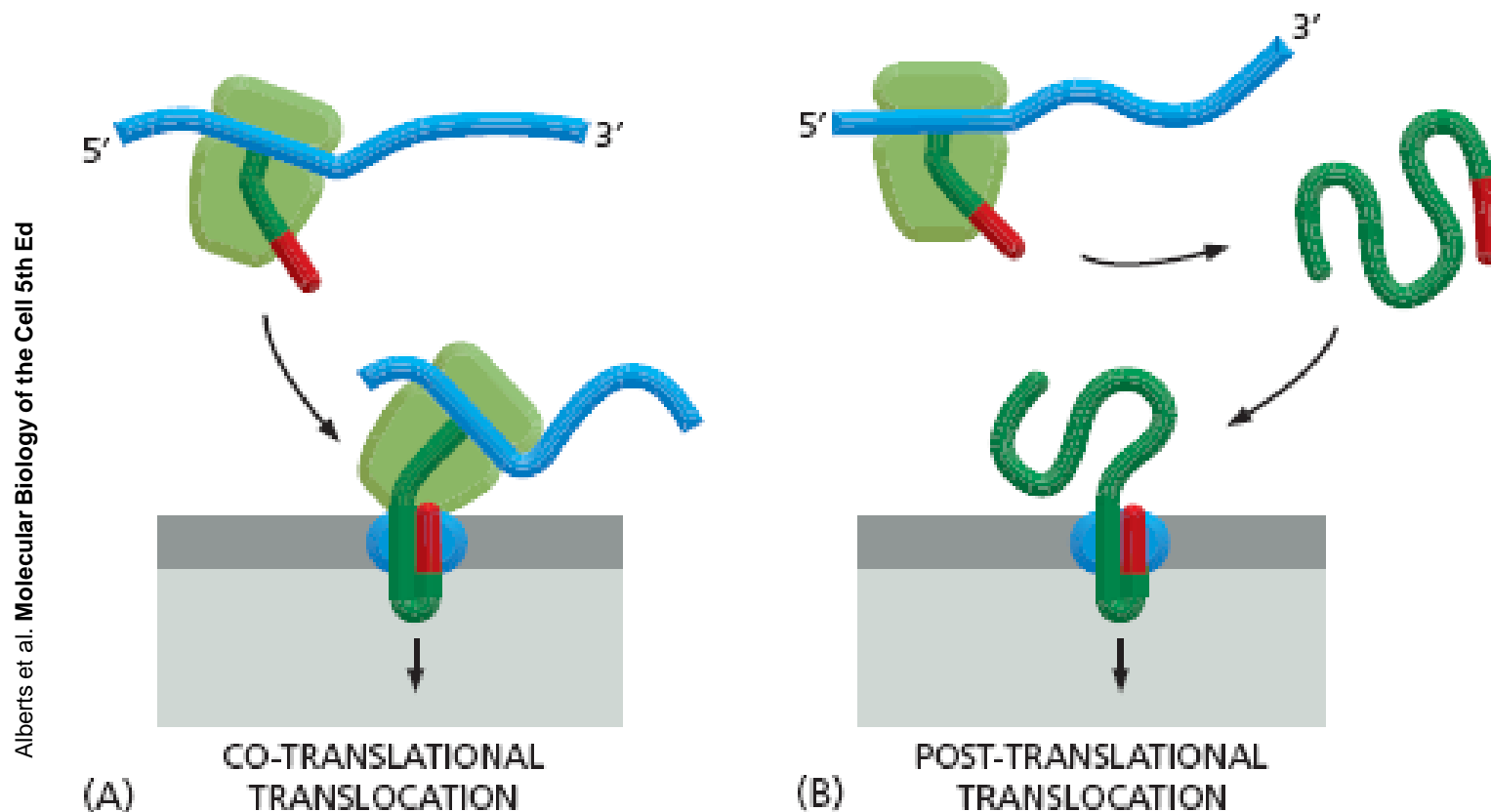
O **ER liso** é isento de ribossomas e é o local de **síntese de fosfolípidos** e de **empacotamento de proteínas** em vesículas, entre outras funções.

Figure 4.9 Smooth endoplasmic reticulum



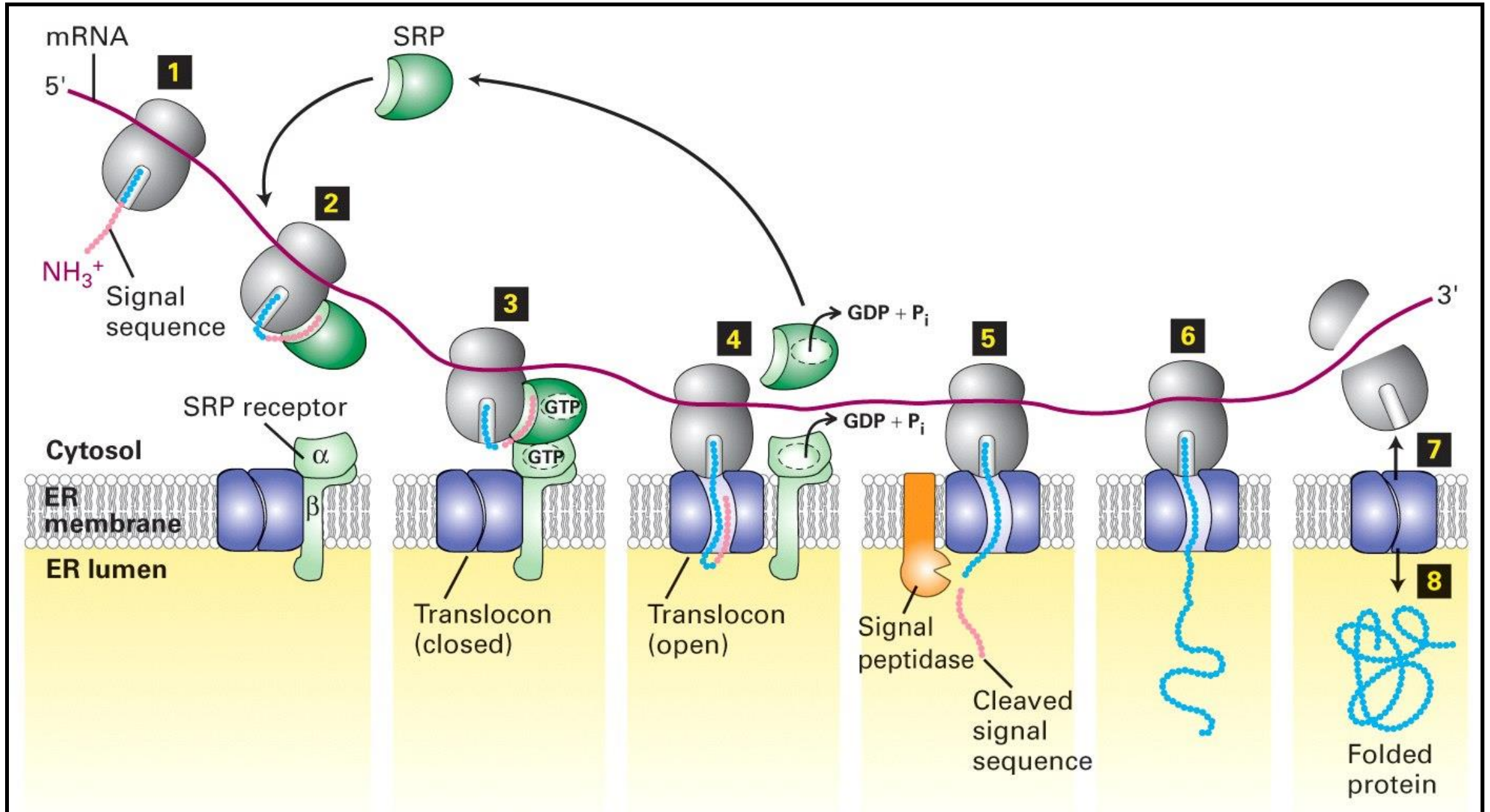
## Retículo endoplasmático rugoso

O ER captura proteínas seleccionadas do citosol à medida que vão sendo sintetizadas (A). Em células de mamíferos, a importação de proteínas para o ER começa antes da cadeia polipeptídica estar completamente sintetizada – **processo co-tradução** (“co-translational”). Os ribossomas ligados à membrana, no lado citosólico do ER, estão envolvidos na síntese de proteínas que estão a ser simultaneamente translocadas para o lúmen do ER. Isto distingue este processo da importação de proteínas para dentro das mitocôndrias, núcleo, e peroxissomas, que são **processos pós-tradução** (“post-translational”) (B).



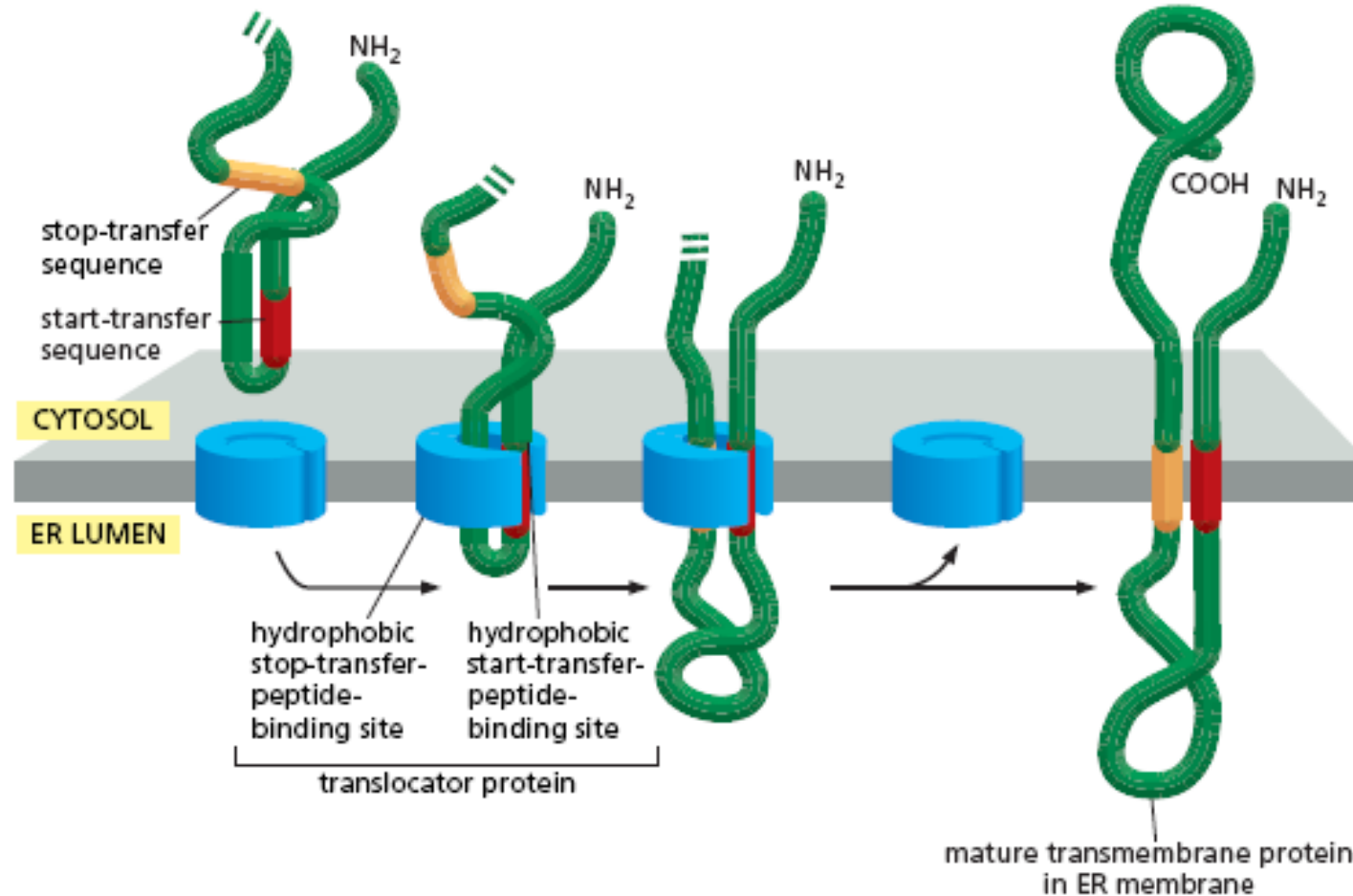


# Synthesis of secretory proteins and their cotranslational translocation across the ER membrane



## Integração de proteínas transmembranares

Alberts et al. Molecular Biology of the Cell 5th Ed



A cadeia polipeptídica **passa para trás e para a frente repetidamente** através da bicamada lipídica. Pensa-se que uma sequência de sinal interno sirva como um sinal de início de transferência nestas proteínas para iniciar a translocação, que continua até o translocador encontrar uma sequência de paragem de transferência (stop-transfer).

As proteínas de membrana são sempre inseridas a partir do lado citosólico do ER, de forma programada e todas as cópias da mesma cadeia polipeptídica terão a mesma orientação na bicamada lipídica.

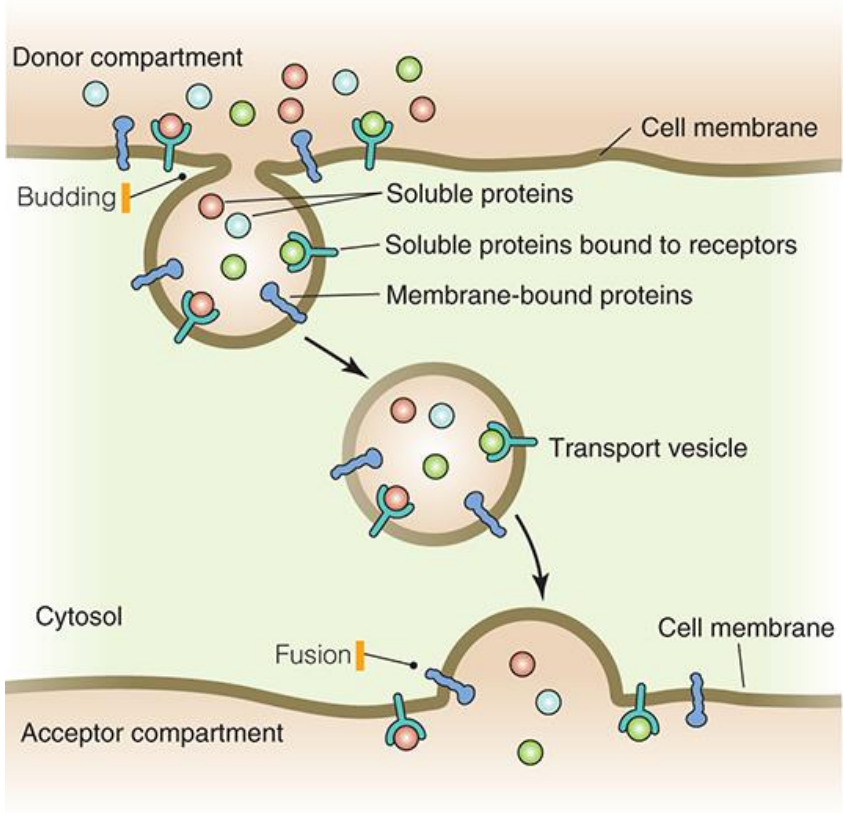
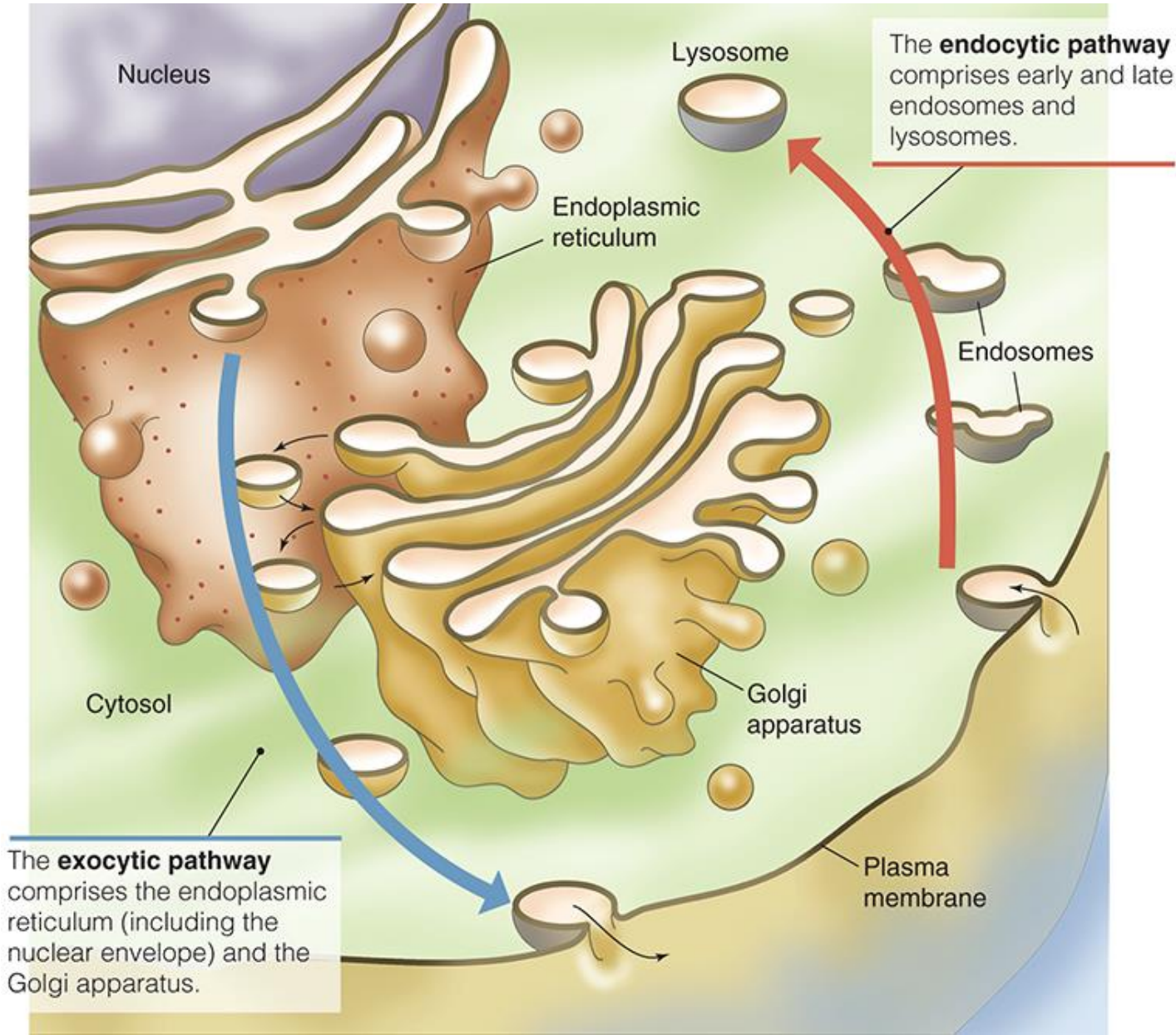
Este processo determina uma membrana do ER assimétrica, na qual os domínios das proteínas expostos de um lado são diferentes dos domínios expostos do lado contrário.

Esta assimetria é mantida durante muitos eventos de destacamento de membrana (budding) e de fusão, que ocorrem durante o transporte de proteínas do ER para outras membranas celulares.

A forma como uma proteína sintetizada de novo é inserida na membrana do ER determina a sua orientação em todas as outras membranas.

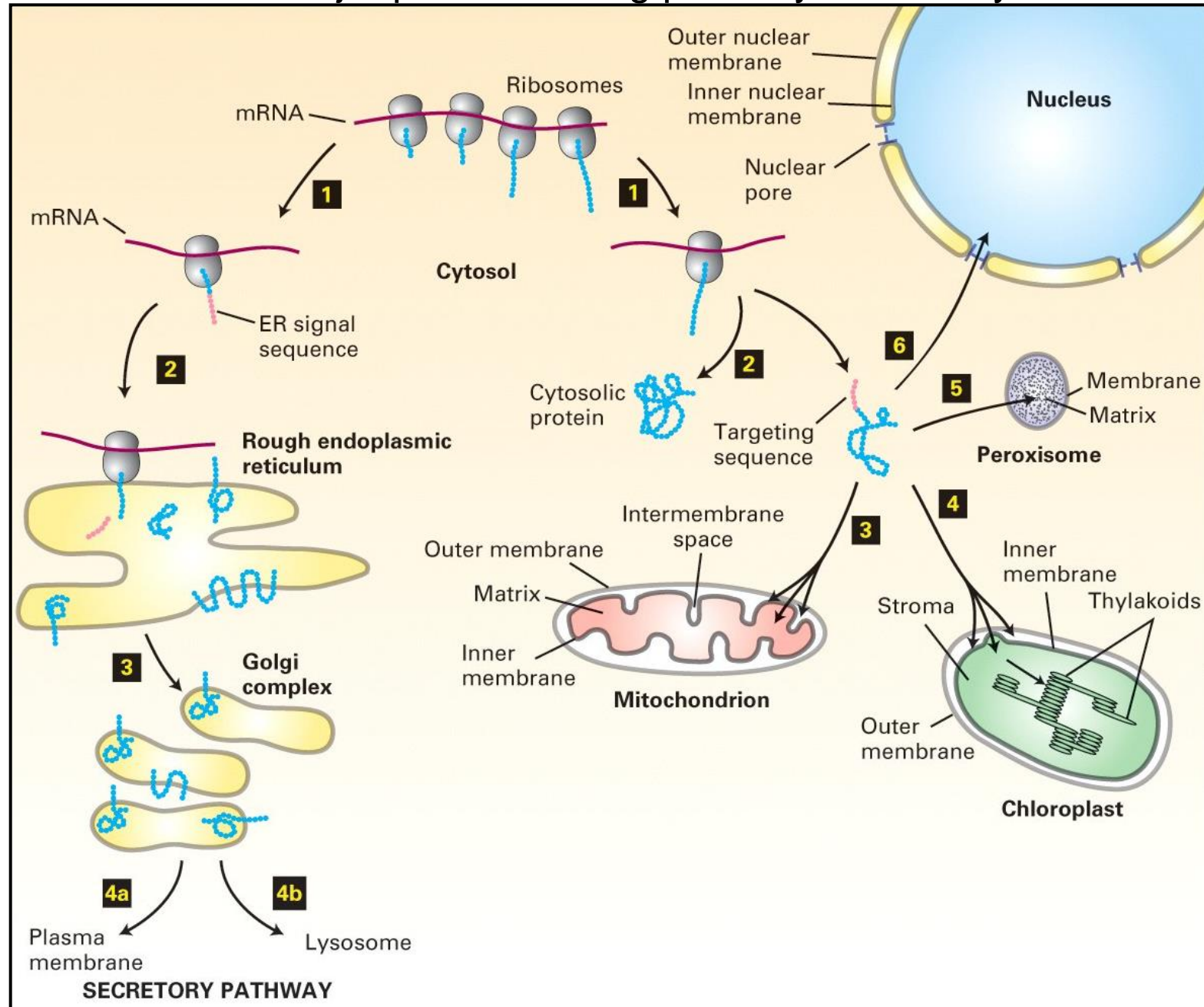


# Secretory and endocytic pathways of protein sorting

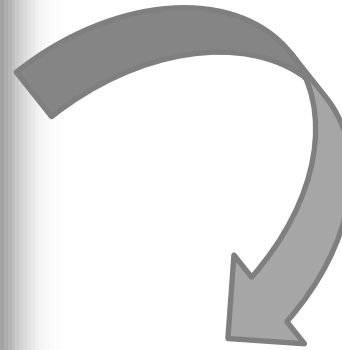




# Overview of major protein sorting pathways in eukaryotic cells



**Sorting**  
**Modificações /Especializações**





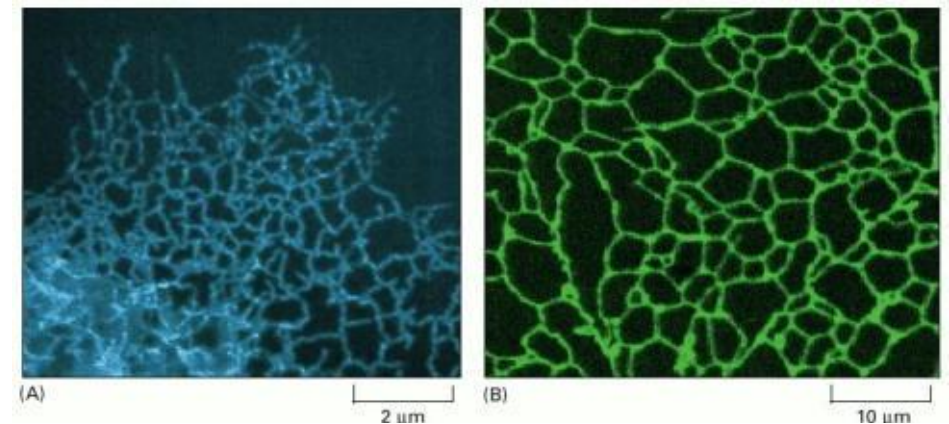
Uma célula eucariota é subdividida de forma muito precisa e elaborada em **compartimentos envolvidos por membrana** todos funcionalmente distintos.

Cada compartimento, ou organelo, contém o seu conjunto próprio e característico de enzimas e outras moléculas especializadas, e **complexos sistemas de distribuição e de transporte** de produtos específicos de um compartimento para outro.

Muitos processos bioquímicos essenciais ocorrem na **superfície da membrana**.

A membrana de cada organelo tem de ter um mecanismo para **importar, e incorporar** (concentrar no interior) no seu interior (lúmen), as **proteínas específicas** que caracterizam o organelo (que o tornam único).

O **transporte intracelular de proteínas** é, portanto, um mecanismo essencial nas células.



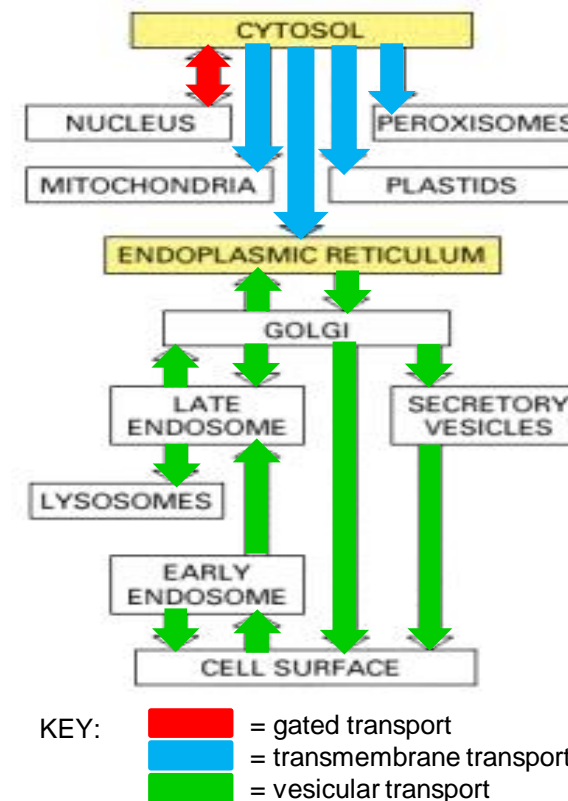
- (A) Part of the **ER** network in a cultured mammalian cell, stained with an antibody that binds to **a protein** retained in the ER. The ER extends as a network throughout the entire cytosol, so that all regions of the cytosol are close to some portion of the **ER membrane**.
- (B) Part of an ER network in a living plant cell that was genetically engineered to express a fluorescent protein in the ER.

A maioria das proteínas começa a ser sintetizada em ribossomas no citosol. O seu destino subsequente depende da sua sequência de aminoácidos, que pode conter **sinais de “sorting”** (triagem/classificação) que dirigem o seu encaminhamento para locais fora do citosol.

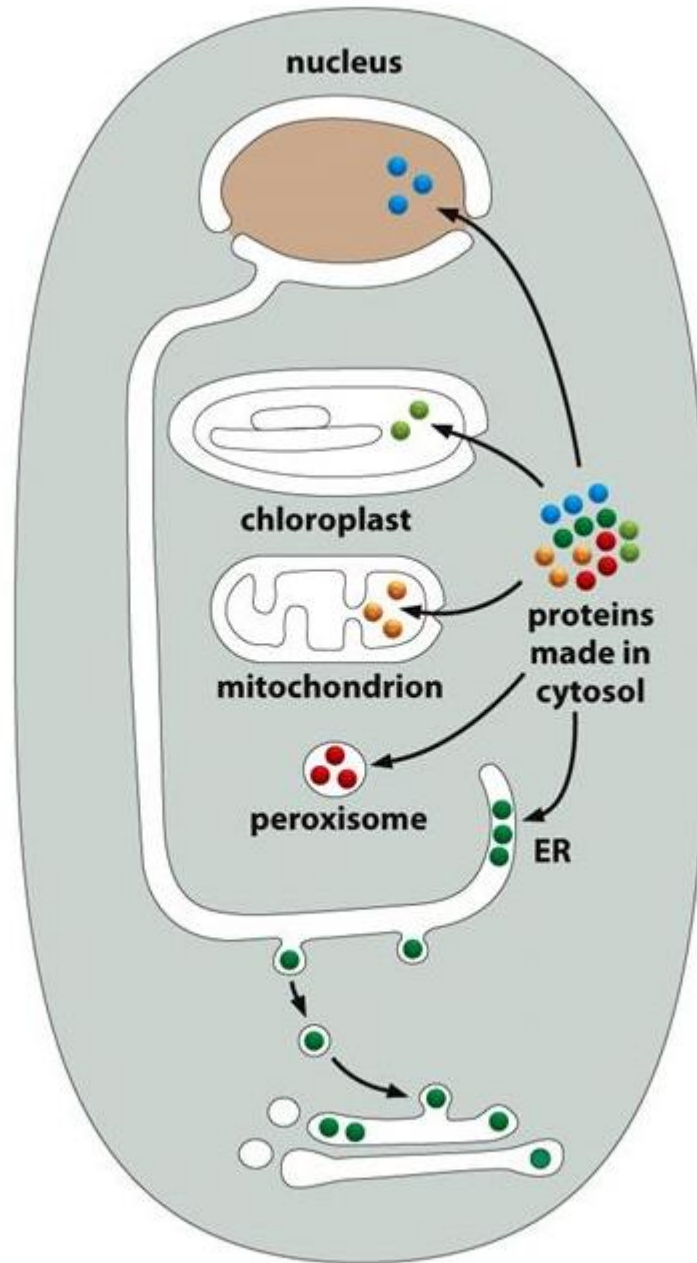
A maioria das proteínas não tem um sinal de “sorting” e permanece no citosol. Muitas outras, no entanto, têm **sinais de “sorting” específicos que dirigem o seu transporte a partir do citosol** para o núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria, plastídios ou peroxissomas.

### TIPOS DE TRANSPORTE

1. **“Gated”**: entre citoplasma e núcleo, através de poros nucleares complexos (que funcionam como portões/”gates” seletivos).
2. **Transmembranar**: através de proteínas translocadoras acopladas à membrana.
3. **Vesicular**: através de transporte de intermediários envolvidos por membrana, ie, vesículas esféricas pequenas ou fragmentos de organelos maiores e irregulares.







①  
**TRANSPORT  
THROUGH  
NUCLEAR  
PORES**

cytosol ↔ núcleo

②  
**TRANSPORT  
ACROSS  
MEMBRANES**

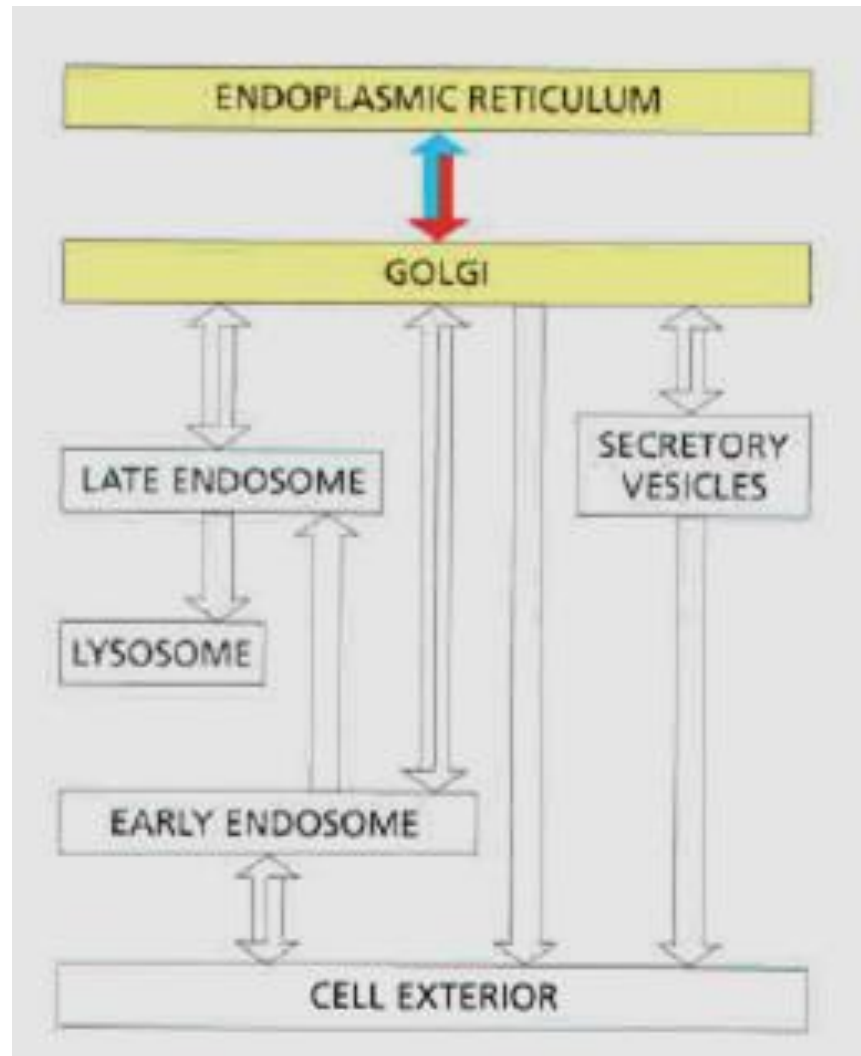
cytosol → mitocôndrias  
cytosol → cloroplastos  
cytosol → peroxissomas  
cytosol → RE

③  
**TRANSPORT BY  
VESICLES**

RE ↔ Golgi  
Golgi ↔ endossomas  
Golgi → Membrana Plasmática (MP), ou espaço extracelular  
Golgi ↔ Vesículas de secreção → Membrana plasmática  
Membrana plasmática ↔ endossomas  
endossomas → lisossomas

## Via biossintética de secreção

Proteínas sintetizadas de novo atravessam a membrana do ER a partir do citosol para entrar na [via biossintética de secreção](#). Durante o seu transporte subsequente, do ER para o [complexo de Golgi](#), e do Golgi para a superfície celular ou outras localizações subcelulares, estas proteínas vão sendo sucessivamente modificadas.



A via do ER para a superfície da célula consiste em vários [passos de triagem](#) (“[sorting](#)”), que envolve uma seleção contínua de proteínas de membrana e do lúmen para empacotamento e [transporte em vesículas](#) ou [fragmentos de organelos](#) que se destacam do complexo de Golgi.



**TABLE 15–3 SOME TYPICAL SIGNAL SEQUENCES**

<b>FUNCTION OF SIGNAL</b>	<b>EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE</b>
Import into ER	$^+\text{H}_3\text{N}$ -Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Retention in lumen of ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO $^-$
Import into mitochondria	$^+\text{H}_3\text{N}$ -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import into nucleus	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Import into peroxisomes	-Ser-Lys-Leu-

Positively charged amino acids are shown in **red**, and negatively charged amino acids in **blue**. An extended block of hydrophobic amino acids is shown in **green**.

$^+\text{H}_3\text{N}$  indicates the N-terminus of a protein;  $\text{COO}^-$  indicates the C-terminus.

The ER retention signal is commonly referred to by its single-letter amino acid abbreviation, KDEL.



**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 $\alpha$ and $\beta$ subunits	COPI
Di-acidic (e.g., Asp-X-Glu)	Cargo membrane proteins in ER (cytosolic domain)	COPII / 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- $\Phi$ (YXX $\Phi$ )	Membrane proteins in <i>trans</i> -Golgi (cytosolic domain)	AP1 ( $\mu$ 1 subunit)	Clathrin/AP1
	Plasma membrane proteins (cytosolic domain)	AP2 ( $\mu$ 2 subunit)	Clathrin/AP2
Leu-Leu (LL)	Plasma membrane proteins (cytosolic domain)	AP2 complexes	Clathrin/AP2
*X = any amino acid; $\Phi$ = hydrophobic amino acid. Single-letter amino acid abbreviations are in parentheses.			



# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1999



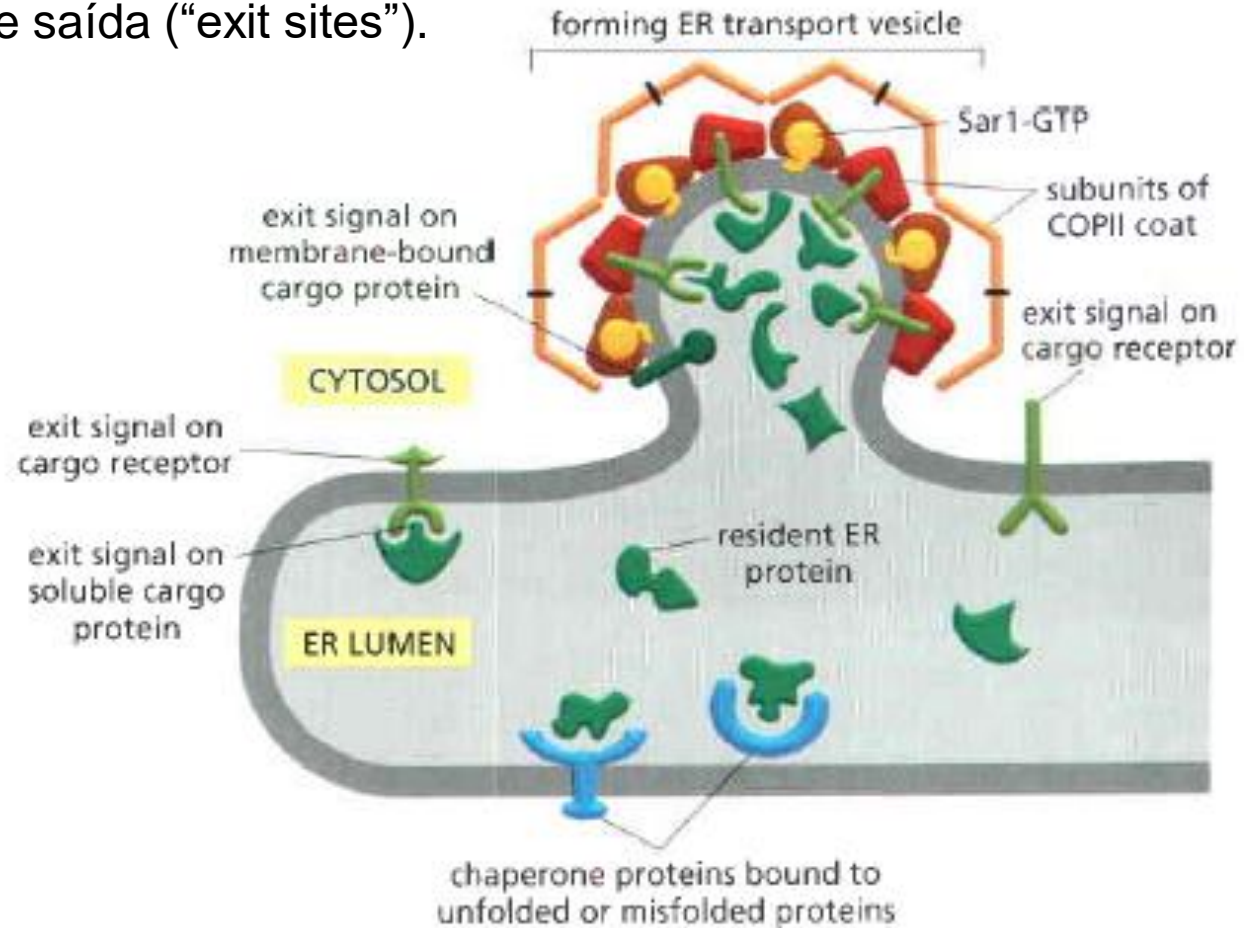
Günter Blobel

Prize share: 1/1

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1999 was awarded to Günter Blobel *"for the discovery that proteins have intrinsic signals that govern their transport and localization in the cell"*.

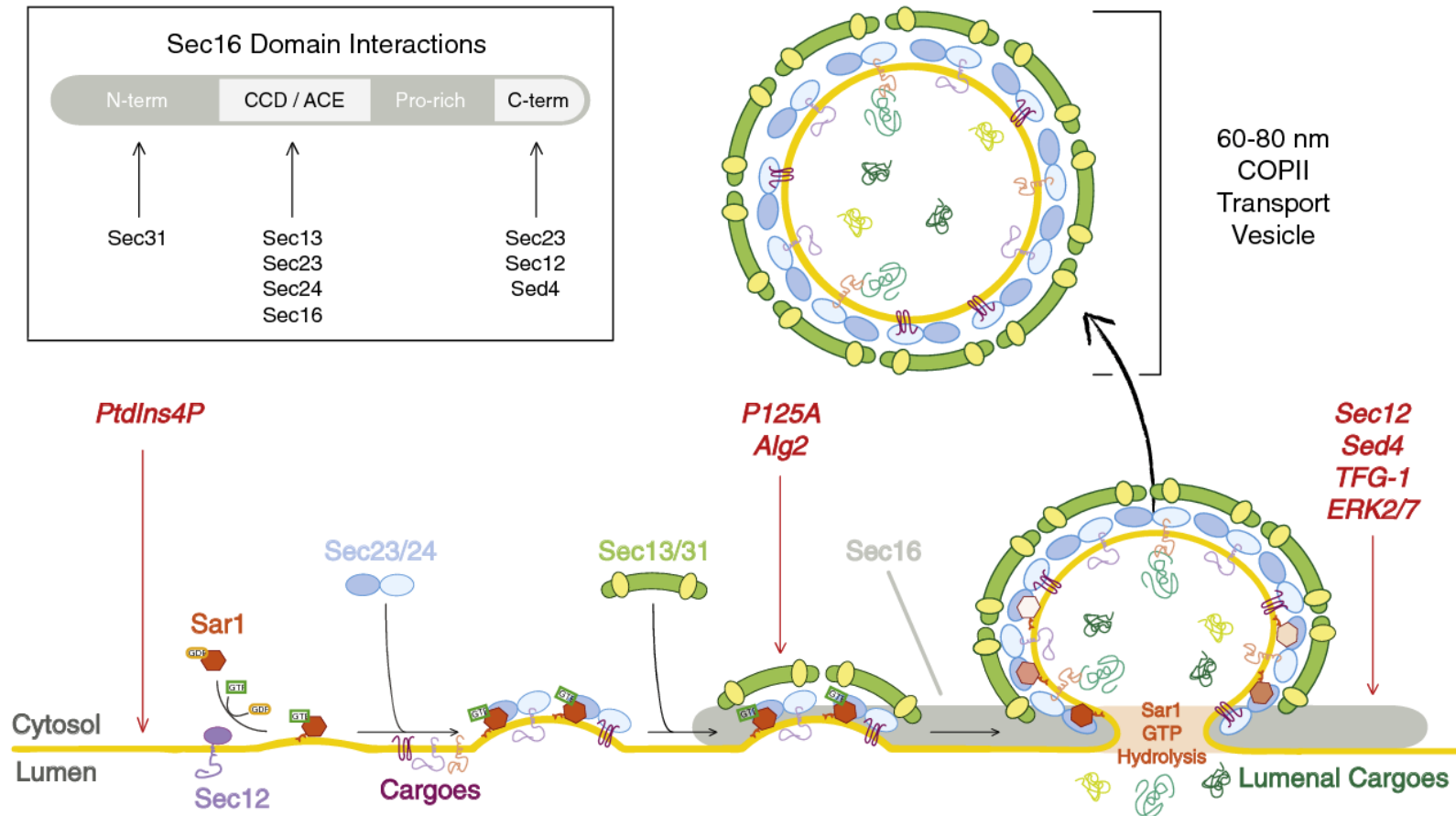
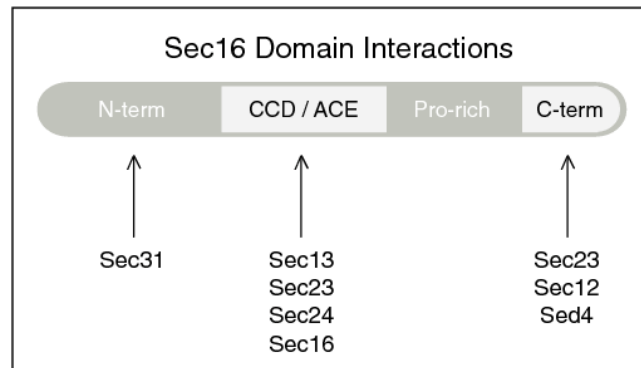
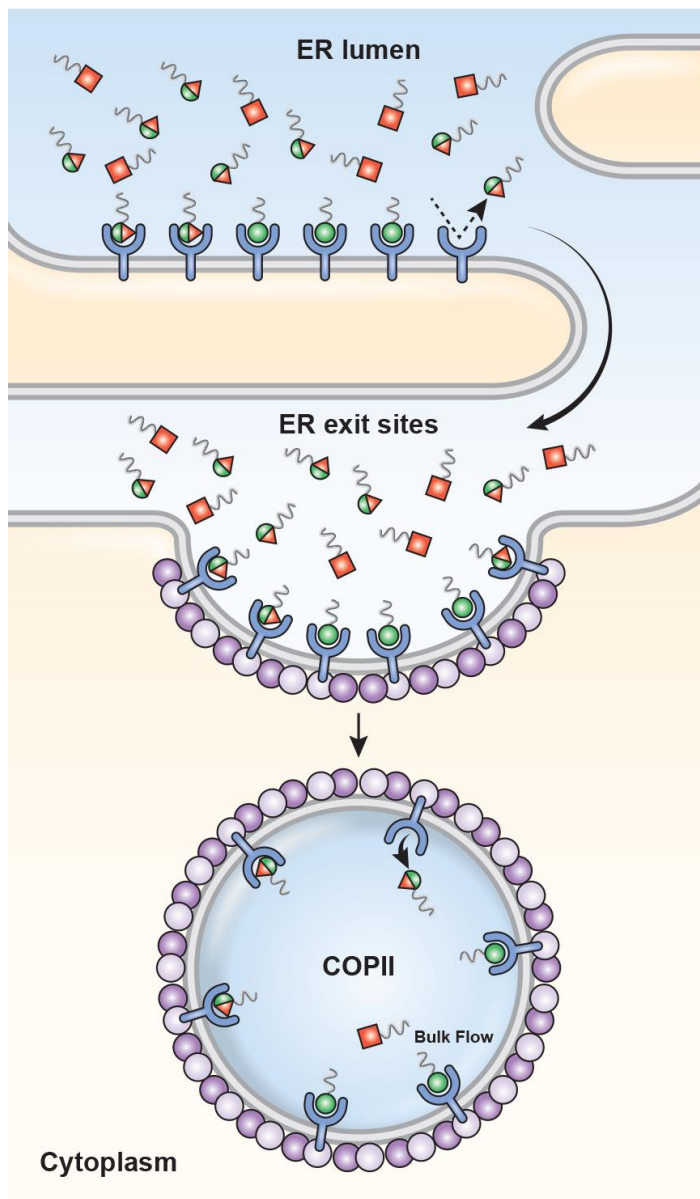
As proteínas que entraram no ER e que se destinam ao complexo de Golgi, ou a outros destinos subsequentes, são em 1º lugar empacotadas em pequenas **vesículas de transporte revestidas por COPII**, as quais são libertadas do ER pelos locais de saída (“exit sites”).

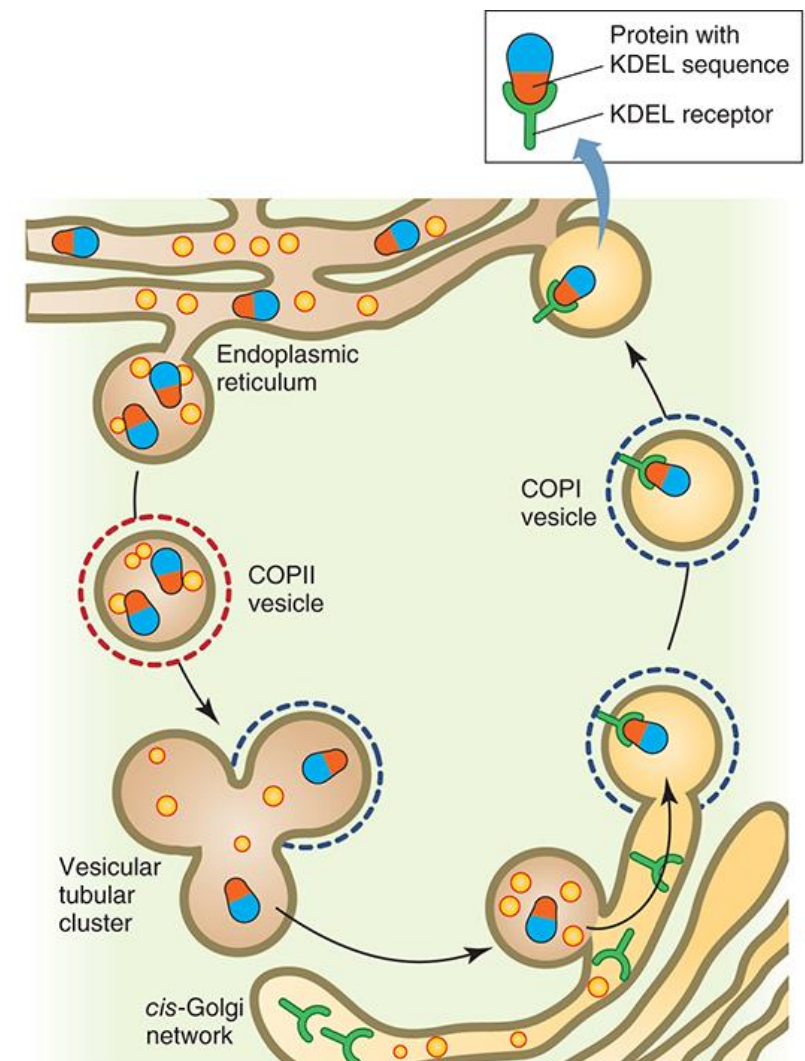
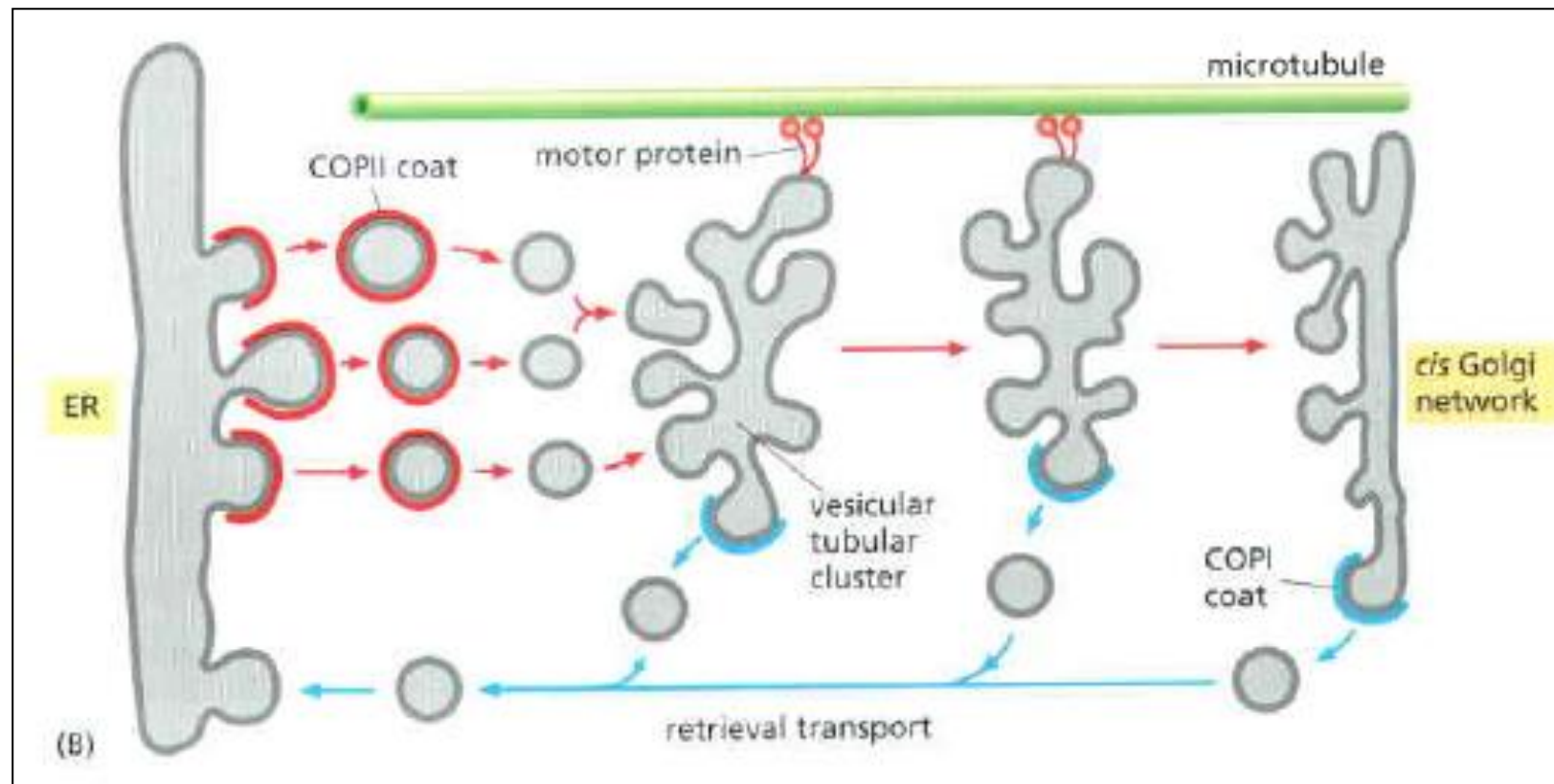
Muitas proteínas de membrana são activamente recrutadas para vesículas, nas quais são concentradas. Estas proteínas “carga” possuem **sinais de saída/transporte** (“exit”) no seu lado citosólico que são reconhecidos por componentes de COPII.



As proteínas “carga” solúveis no lúmen do ER lumen, por outro lado, têm sinais de saída (“exit”) que as ligam a receptores “carga” transmembranares, que por seu lado se ligam através dos sinais de saída na sua extremidade citoplasmática a componentes de COPII.

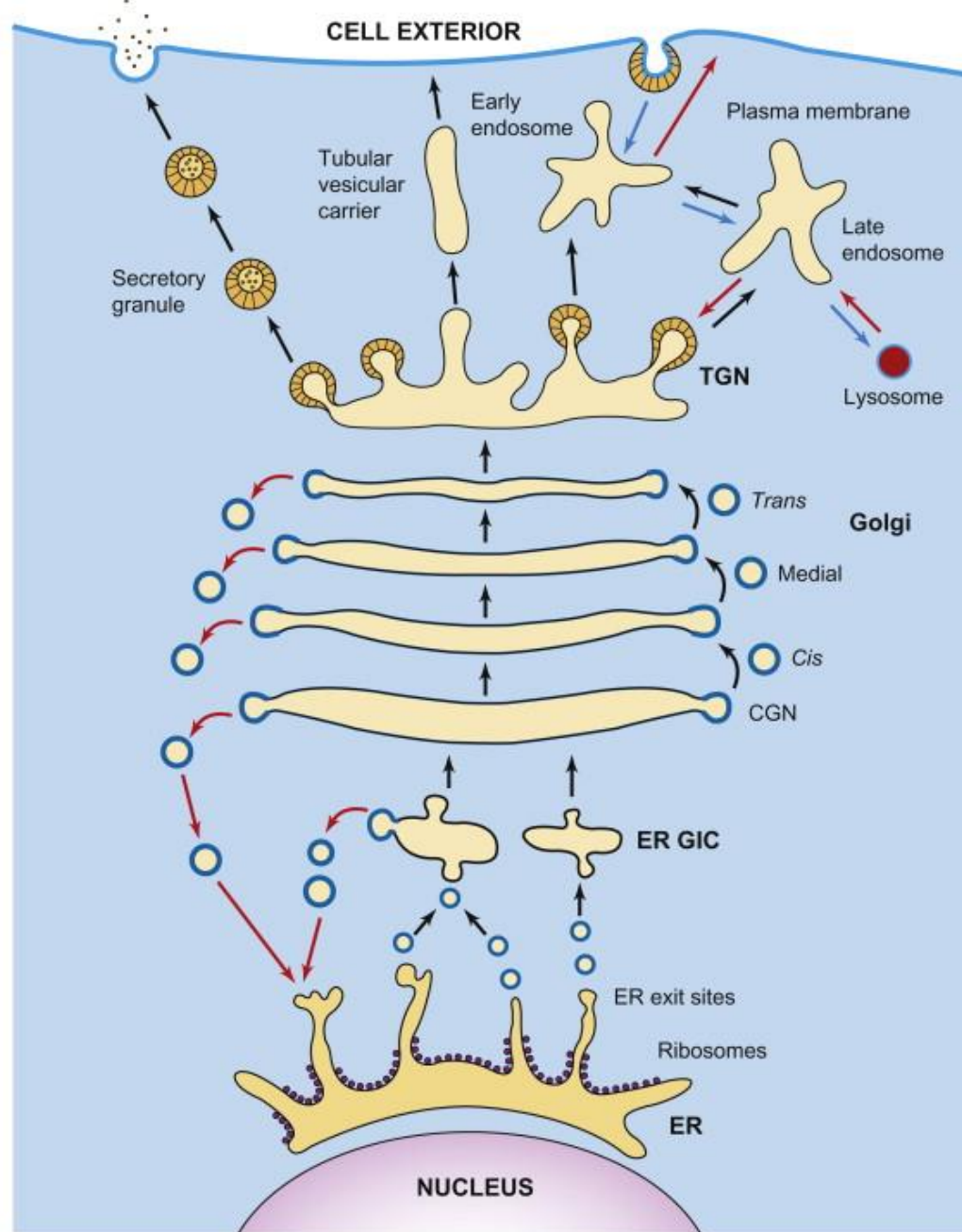
**Só podem sair do ER proteínas com folding e sequência correctos.**





O **revestimento com COPI** medeia o destacamento das vesículas dos clusters que voltam para o ER. Estas vesículas contêm proteínas residentes do ER que “escaparam” e receptores de “carga” – **Transporte Retrogrado**.





● Clathrin-coat

○ COPI-coat

○ COPII-coat

← Retrieval pathway

← Endocytic pathway

← Biosynthetic pathway

## O complexo/aparelho de Golgi ou dictiossoma

Apesar das dúvidas acerca da origem do complexo de Golgi – invólucro nuclear, ER, vesículas de pinocitose e endocitose ?? – muito já se sabe sobre a sua função.

O complexo de Golgi participa nos seguintes processos:

- . Glicosilação e armazenamento de proteínas para exportar
- . Formação da lipoproteínas
- . Sulfatação
- . Processamento proteolítico de proteínas
- . Armazenamento das proteínas para exportação
- . Biogénese de membranas
- . Recuperação de membranas
- . Tráfego e segregação de produtos de secreção
- . Formação dos lisossomas
- . Formação de vesículas com neuromoduladores (neuropéptidos)

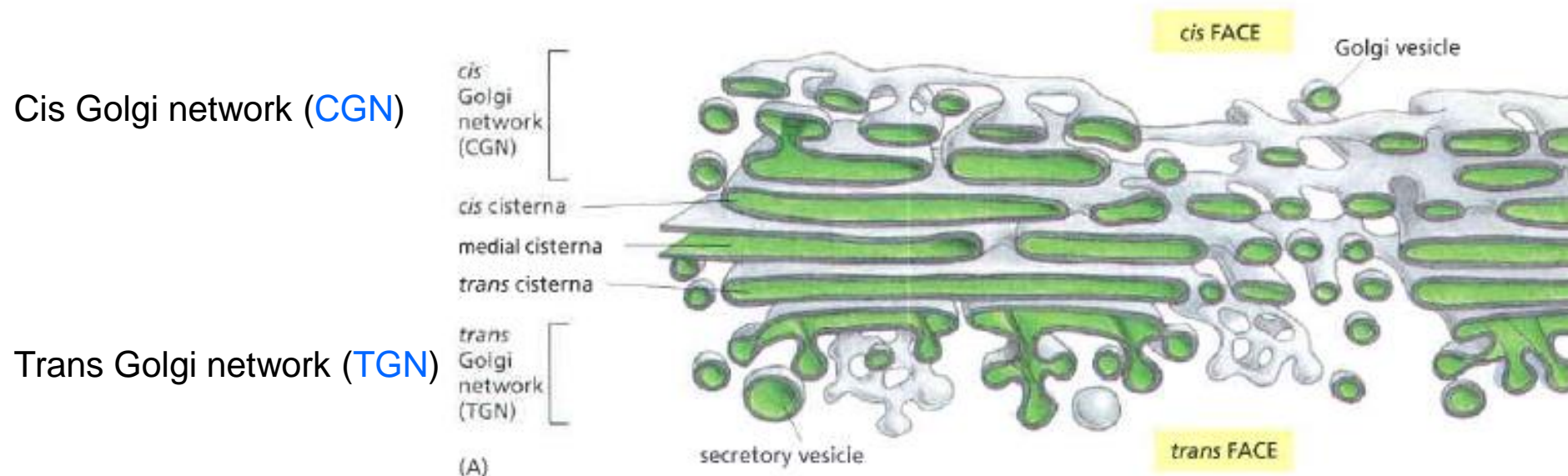
Processamento de  
proteínas

Sorting e  
secreção  
de proteínas

## O Complexo de Golgi

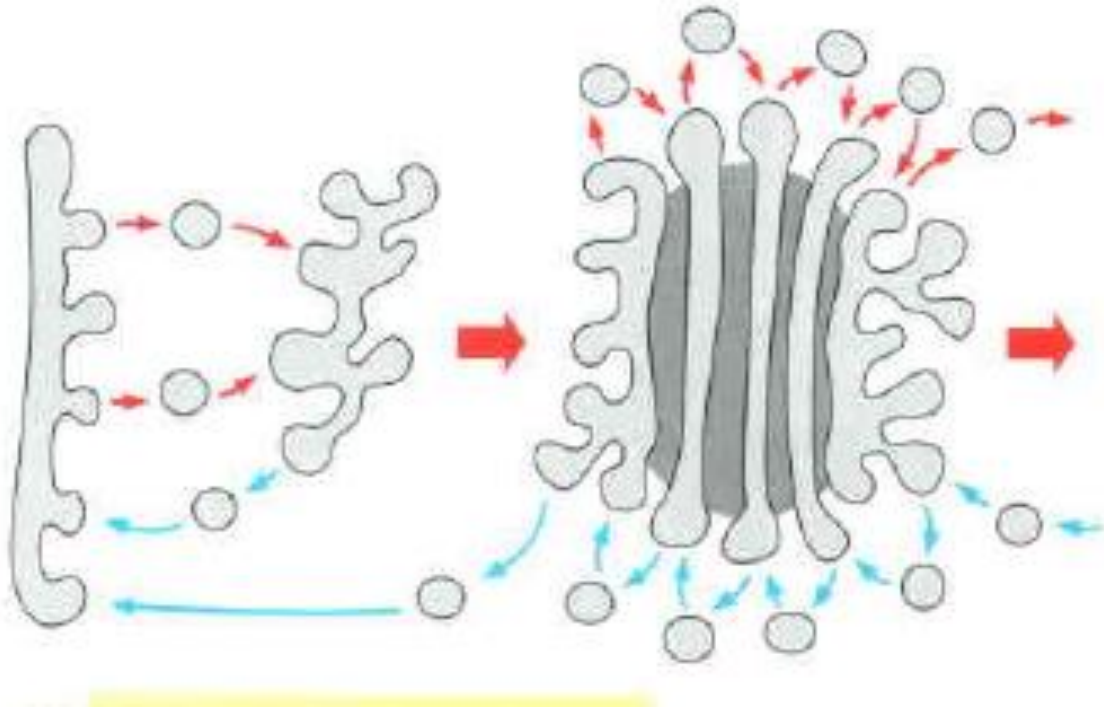
O complexo de Golgi consiste numa coleção de compartimentos envolvidos por membrana, achatados, designados por **cisternas ou sáculos**. As cisternas dispõem-se em fiadas sobrepostas constituindo uma **pilha ou dictiossoma** com 3-7 cisternas.

O complexo de Golgi é importante no “**sorting**” de **proteínas**. As proteínas chegadas à **face Cis** podem prosseguir no complexo de Golgi ou ser reencaminhadas para o ER. Da mesma forma, as proteínas que deixam a **face Trans** podem prosseguir e ser triadas de acordo com o destino final (lisossomas, vesículas de secreção, membrana celular) ou voltar para um compartimento (sacúolo) anterior (mais *cis*).





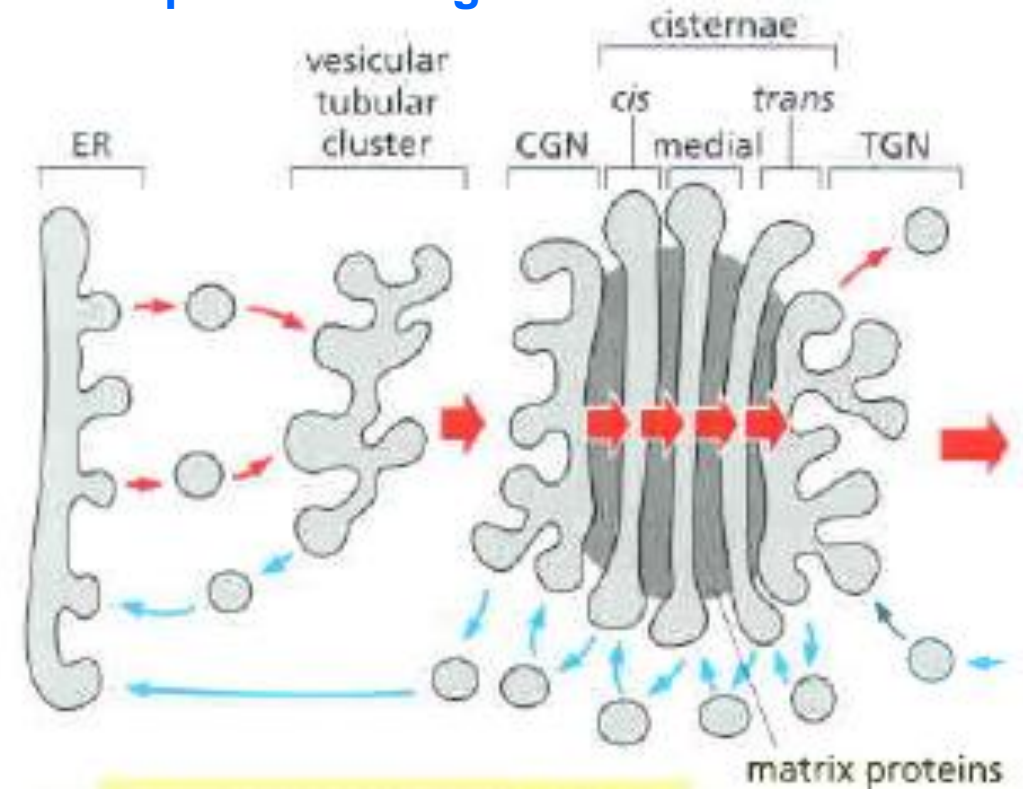
## Transporte de conteúdos/materiais no complexo de Golgi



### Hipótese do transporte vesicular

As cisternas do Golgi são organelos estáticos, com enzimas características. O conteúdo progride dentro de vesículas que o transportam de cis para trans sucessivamente de uma cisterna para a seguinte, onde encontram as diferentes enzimas que o transformam.

O conteúdo é transportado activamente dentro de vesículas próprias, de cisterna para cisterna.

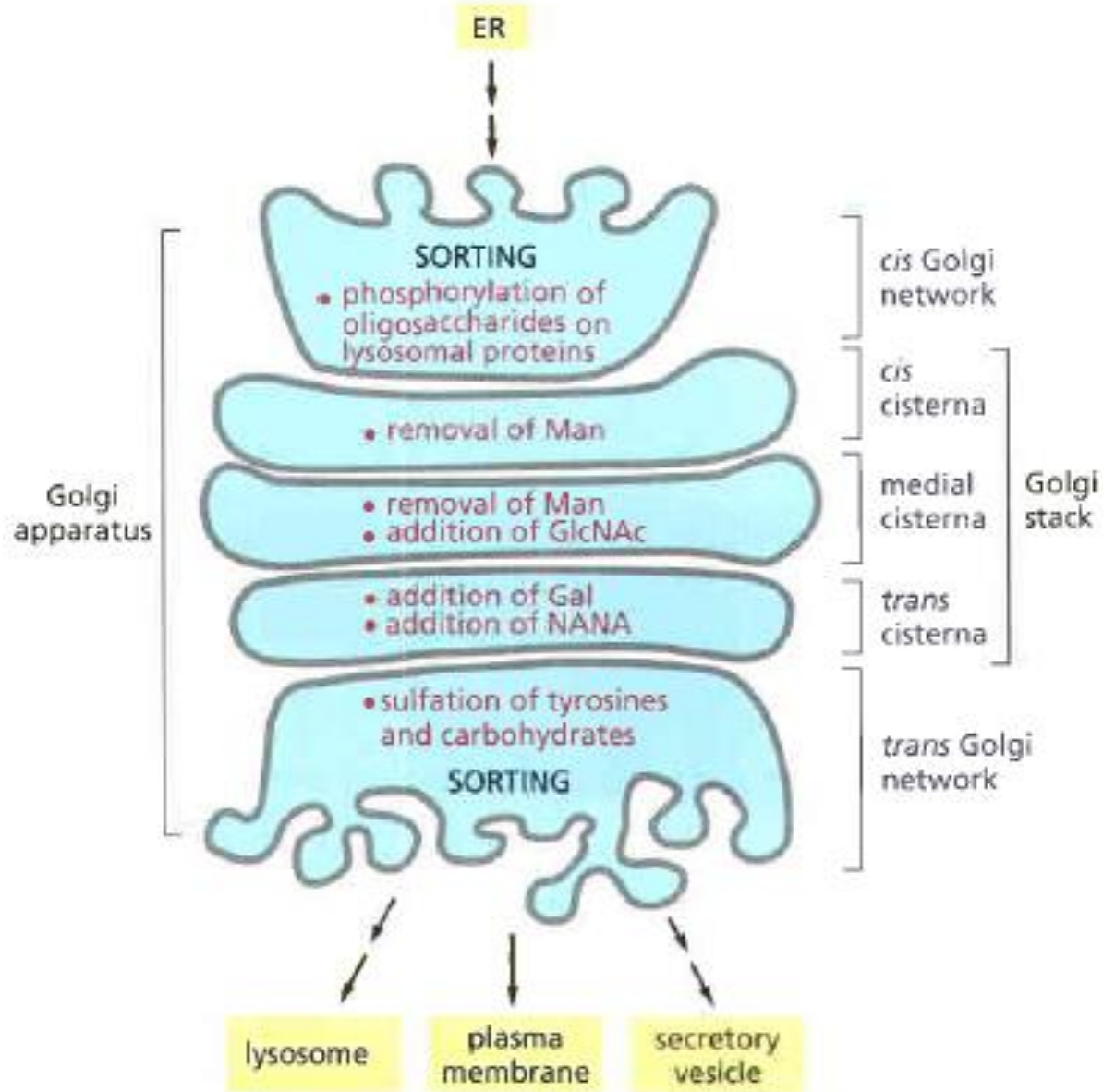


### Hipótese da maturação das cisternas

Cada cisterna do Golgi cisterna matura à medida que migra de cis para trans. O conteúdo progride dentro da mesma cisterna e é modificado por enzimas transportadas em vesículas revestidas de COPI que se deslocam retrogradamente de uma cisterna trans para a cis imediatamente anterior.

O conteúdo é transportado passivamente dentro das cisternas que amadurecem.

No dictiossoma ocorre o transporte e maturação das proteínas, em particular das glicoproteínas, que permite o posterior direccionamento para o futuro destino celular.



Os passos do processamento ocorrem numa **sequência organizada**, na qual cada cisterna contém um determinado conjunto de enzimas específicas.

Por ex. as enzimas dos lisossomas têm um N-linked oligossacarídeo idêntico ao das proteínas secretoras, mas na face *cis*, um ou mais resíduos de manose são fosforilados. Esta fosforilação marca o destino da proteína.

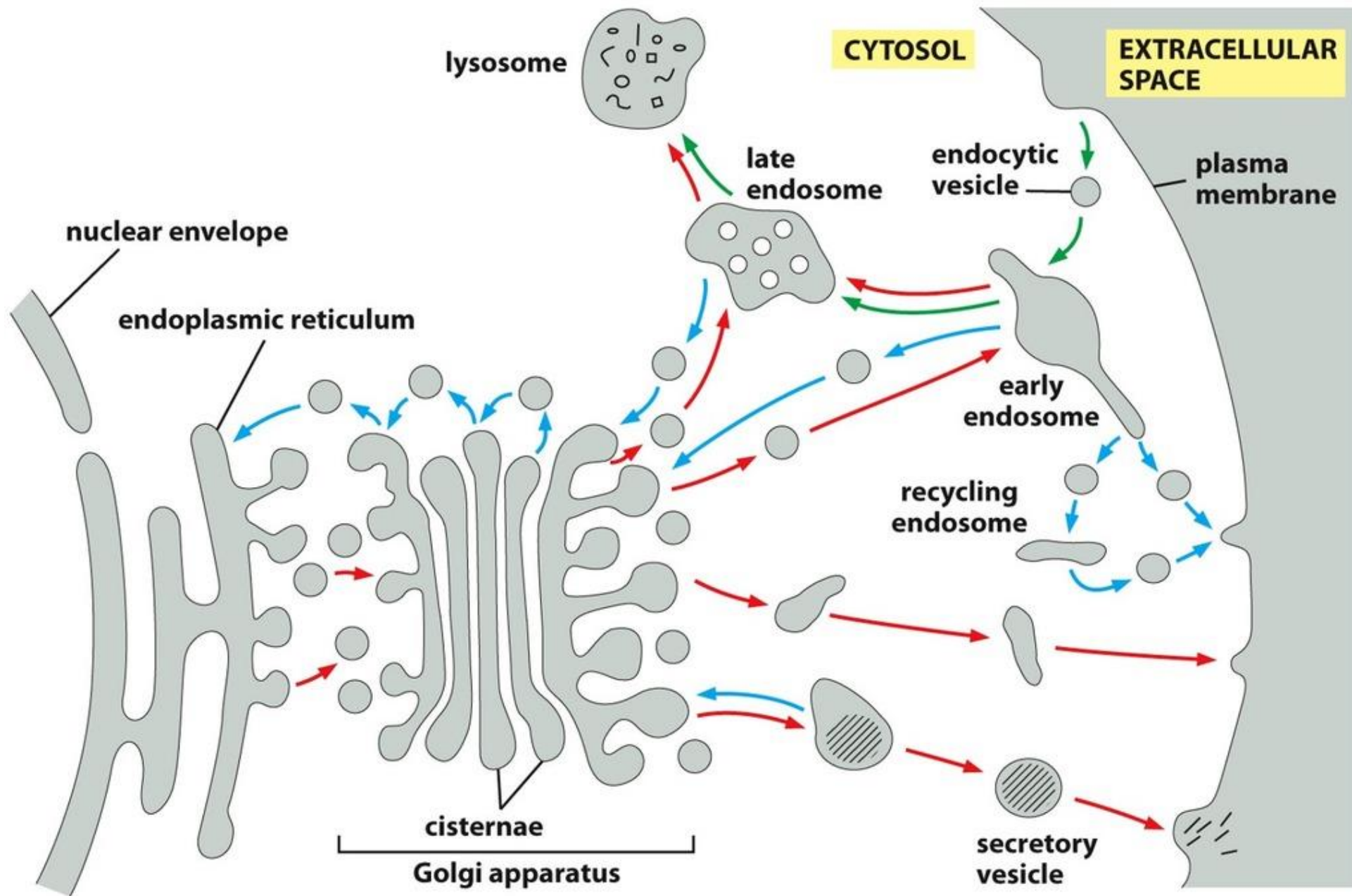
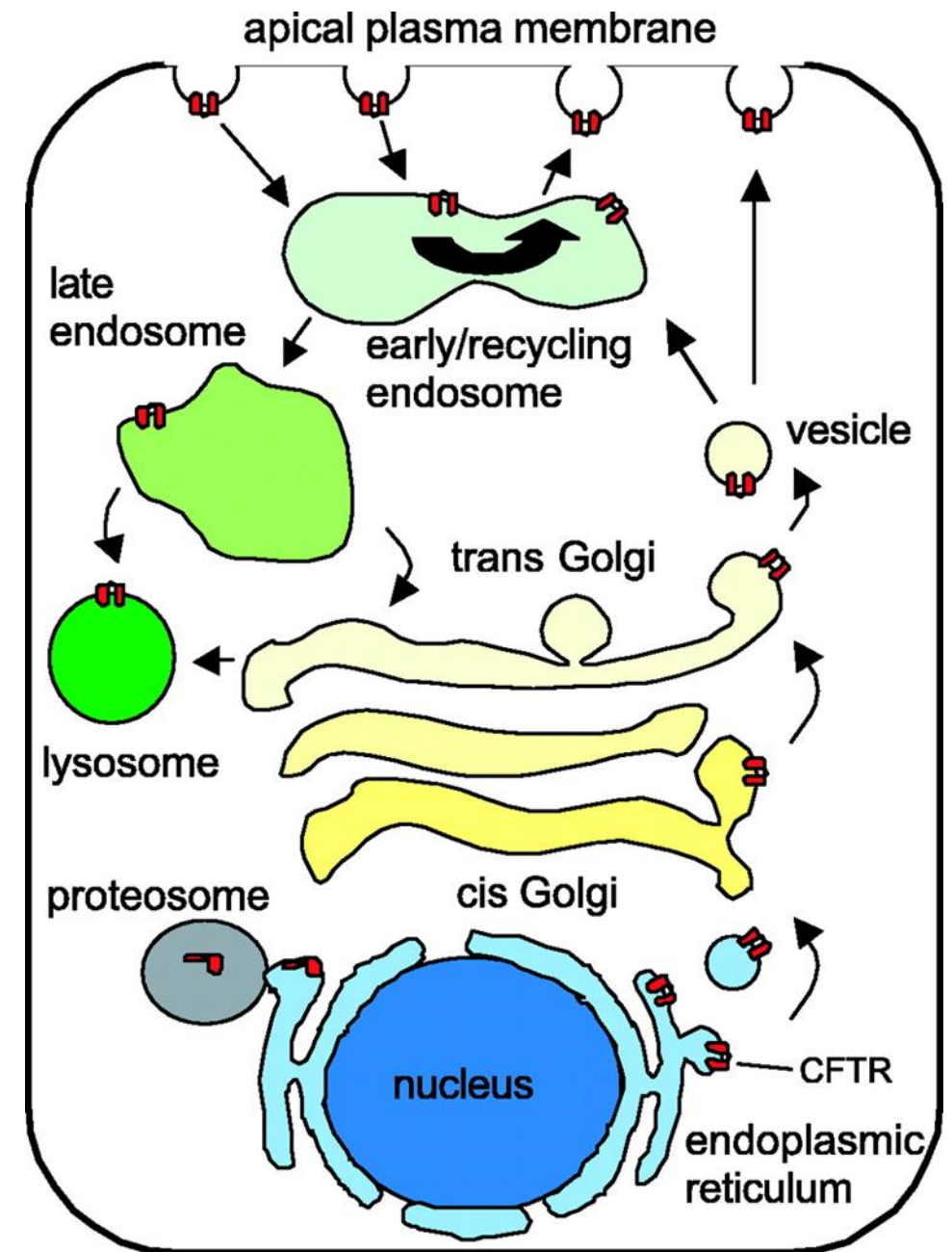
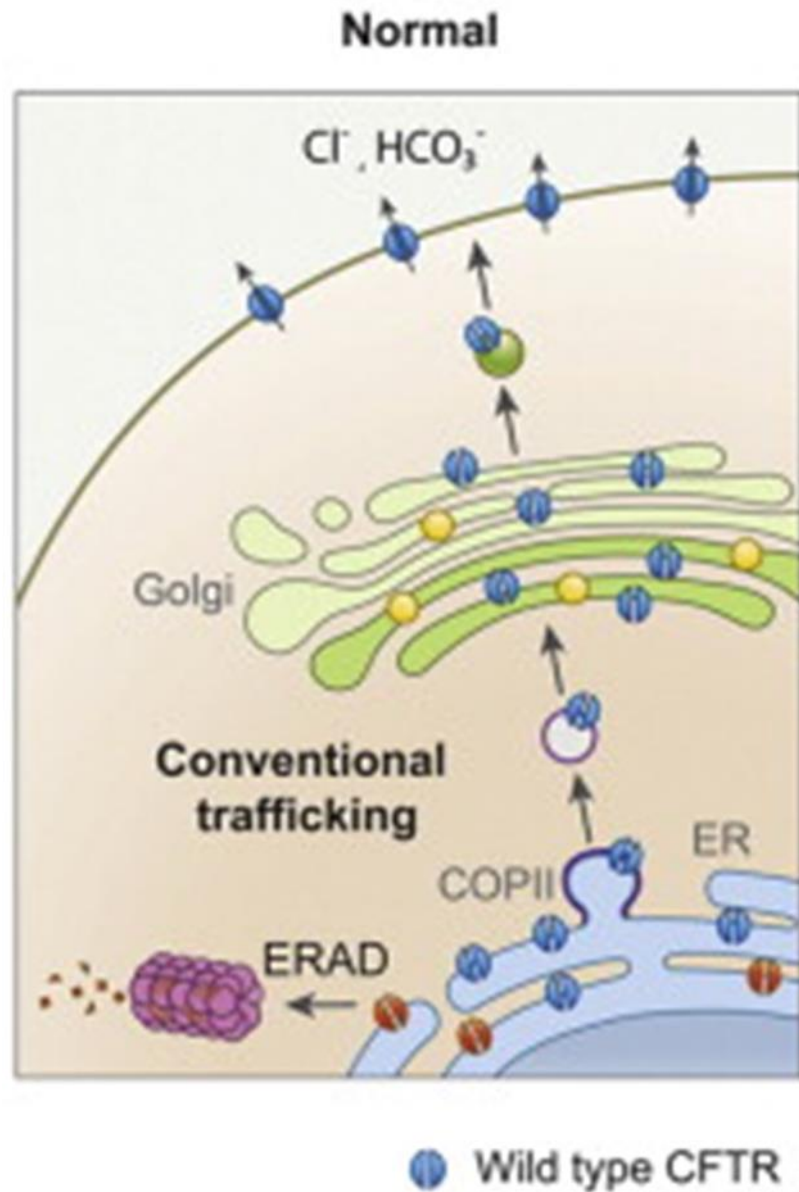
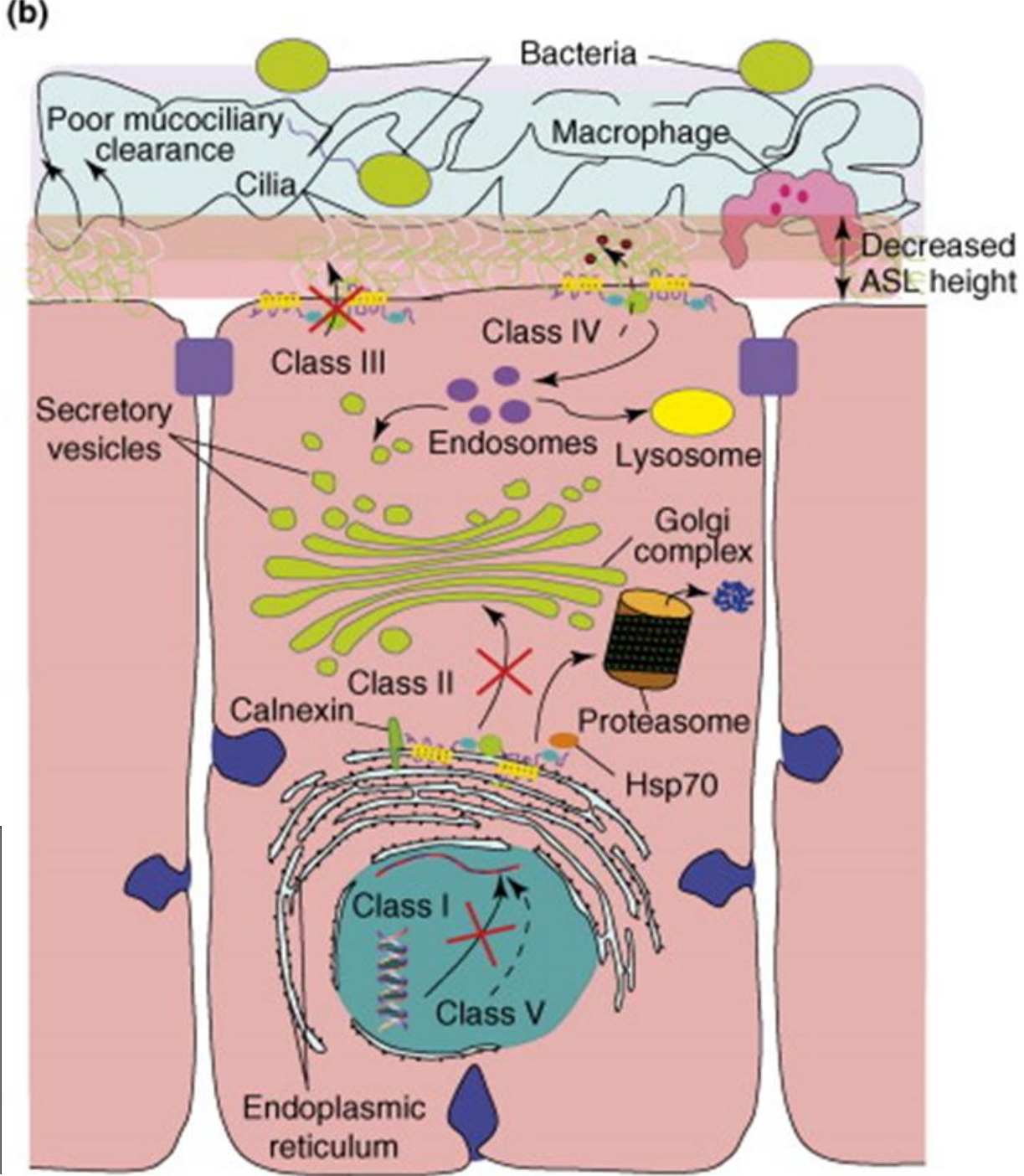


Figure 13-3b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

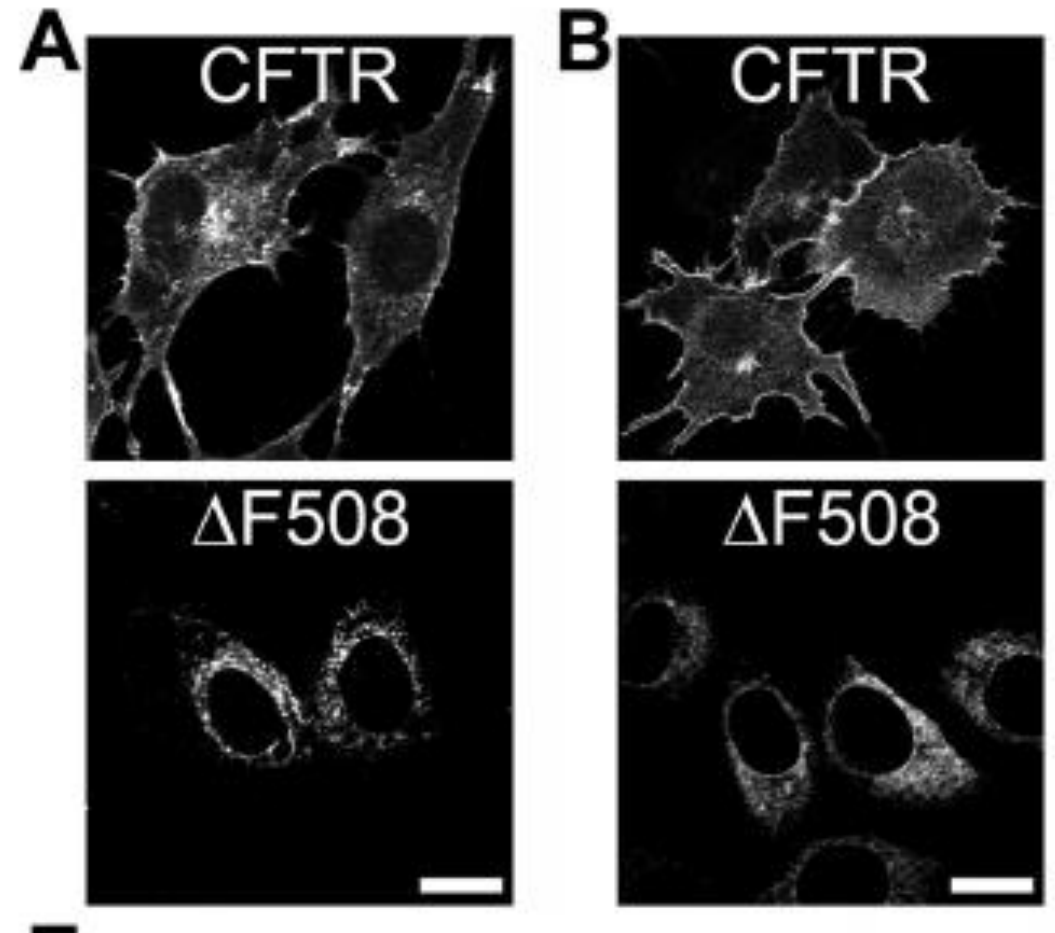


# Tráfego intracelular da proteína CFTR para a membrana apical das células pulmonares



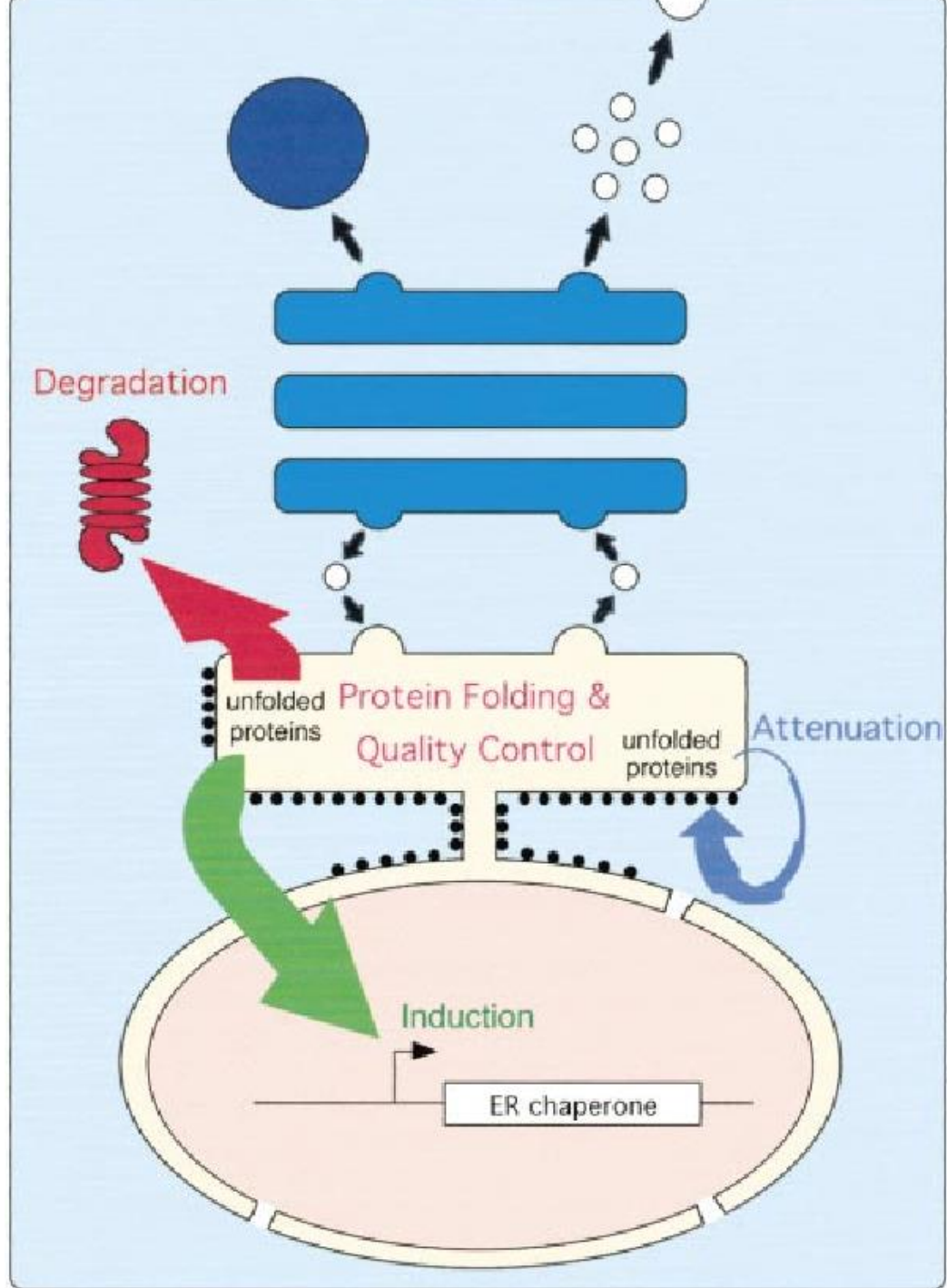


Tráfego intracelular da proteína CFTR para a membrana apical das células pulmonares afectado por mutações associadas à fibrose quística



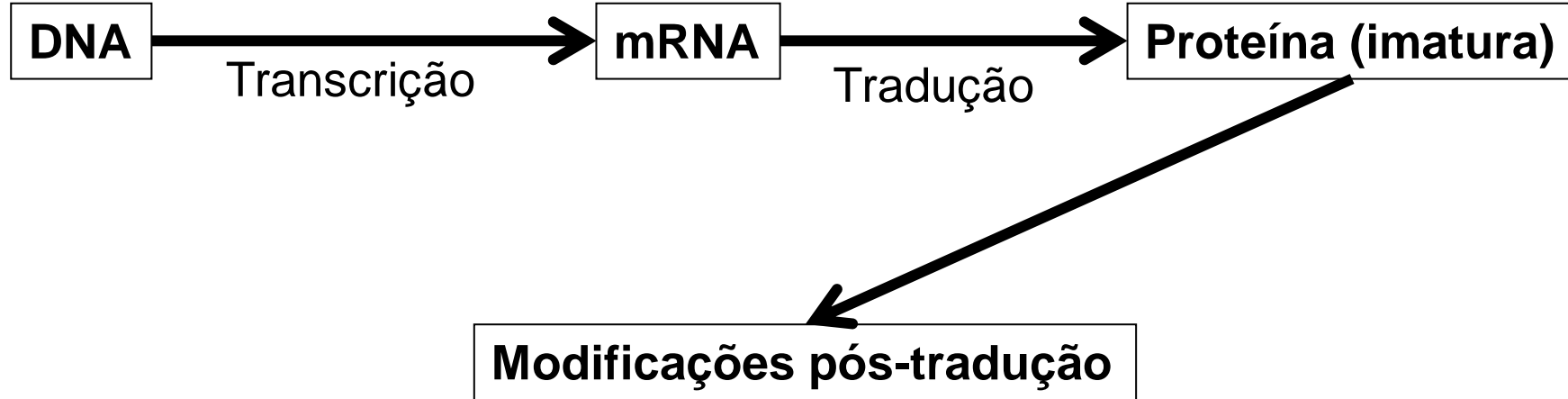


## Tripartite Management of Unfolded Proteins in the Endoplasmic Reticulum





## Síntese Proteica



Modificações químicas das proteínas que ocorrem depois da tradução (formação do polipéptido):

- . Estabilidade da proteína
- . Regulação da atividade bioquímica da proteína
- . “Targeting” da proteína (localização subcelular)
- . Sinalização celular: interação proteína-proteína e/ou célula-célula

# Modificações pós-tradução

. Modificações que envolvem ligações peptídicas

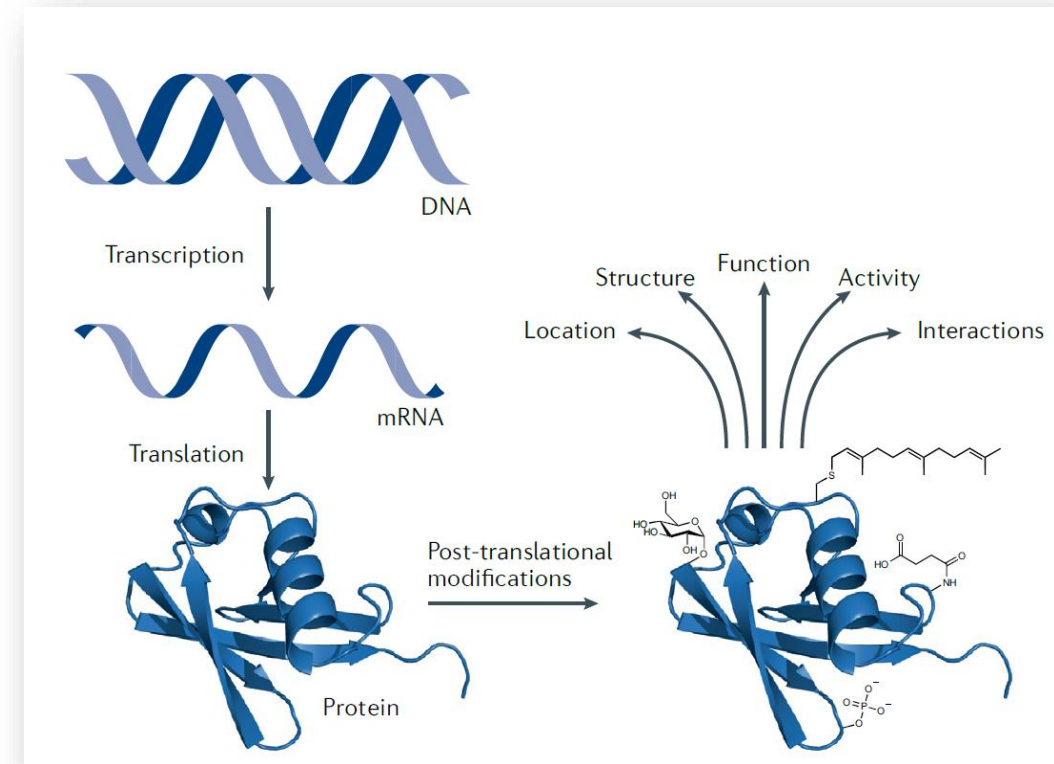
. “Folding” e chaperones

. Agregação de subunidades

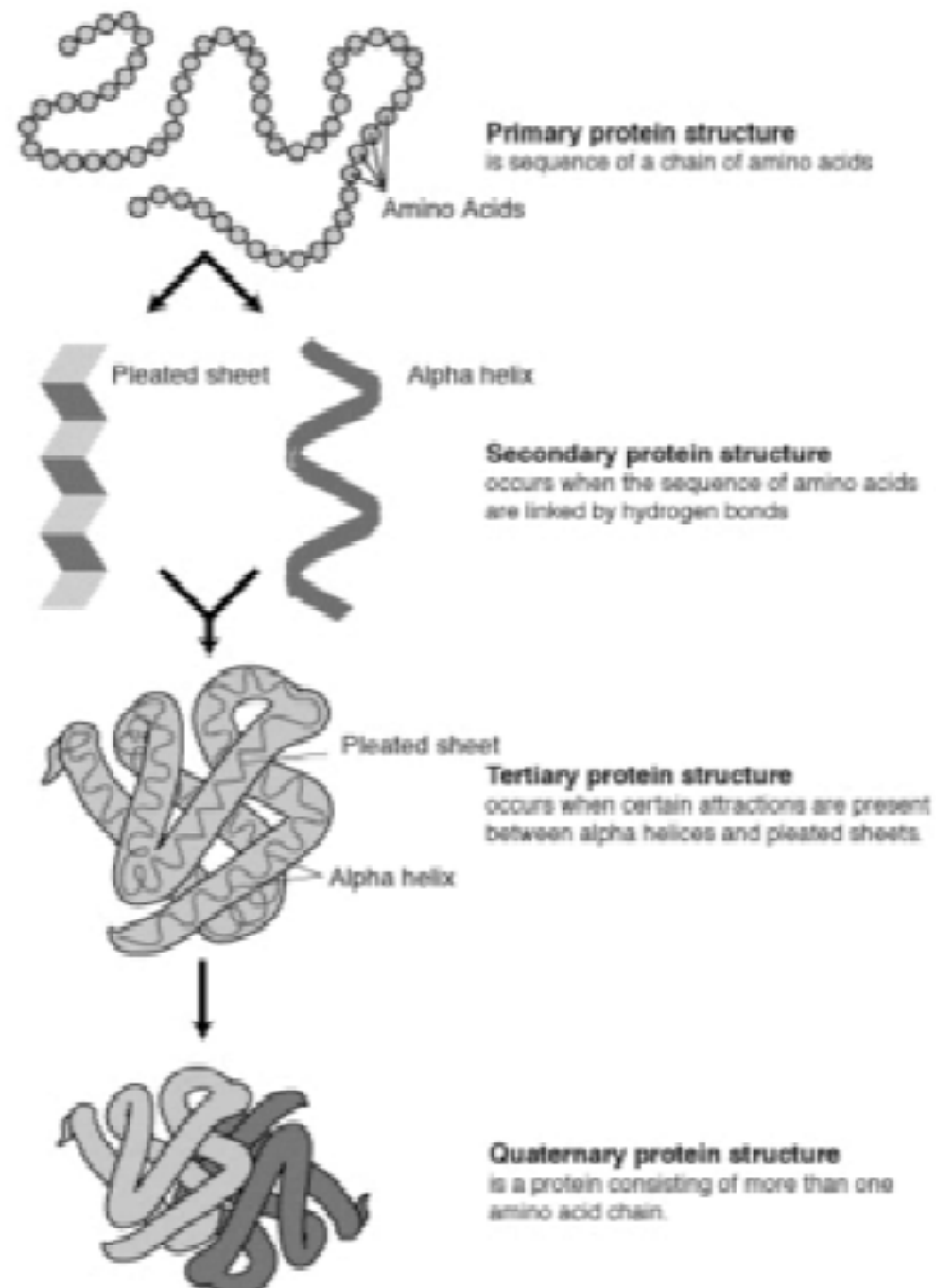
. Modificação de aminoácidos

- . Acetilação
- . Carboxilação
- . Hidroxilação
- . Metilação
- . Prenilação
- . Fosforilação
- . Glicosilação

....



# Folding de proteínas





Newly transcribed mRNA strand



Folded protein



Misfolded protein



Protein aggregate

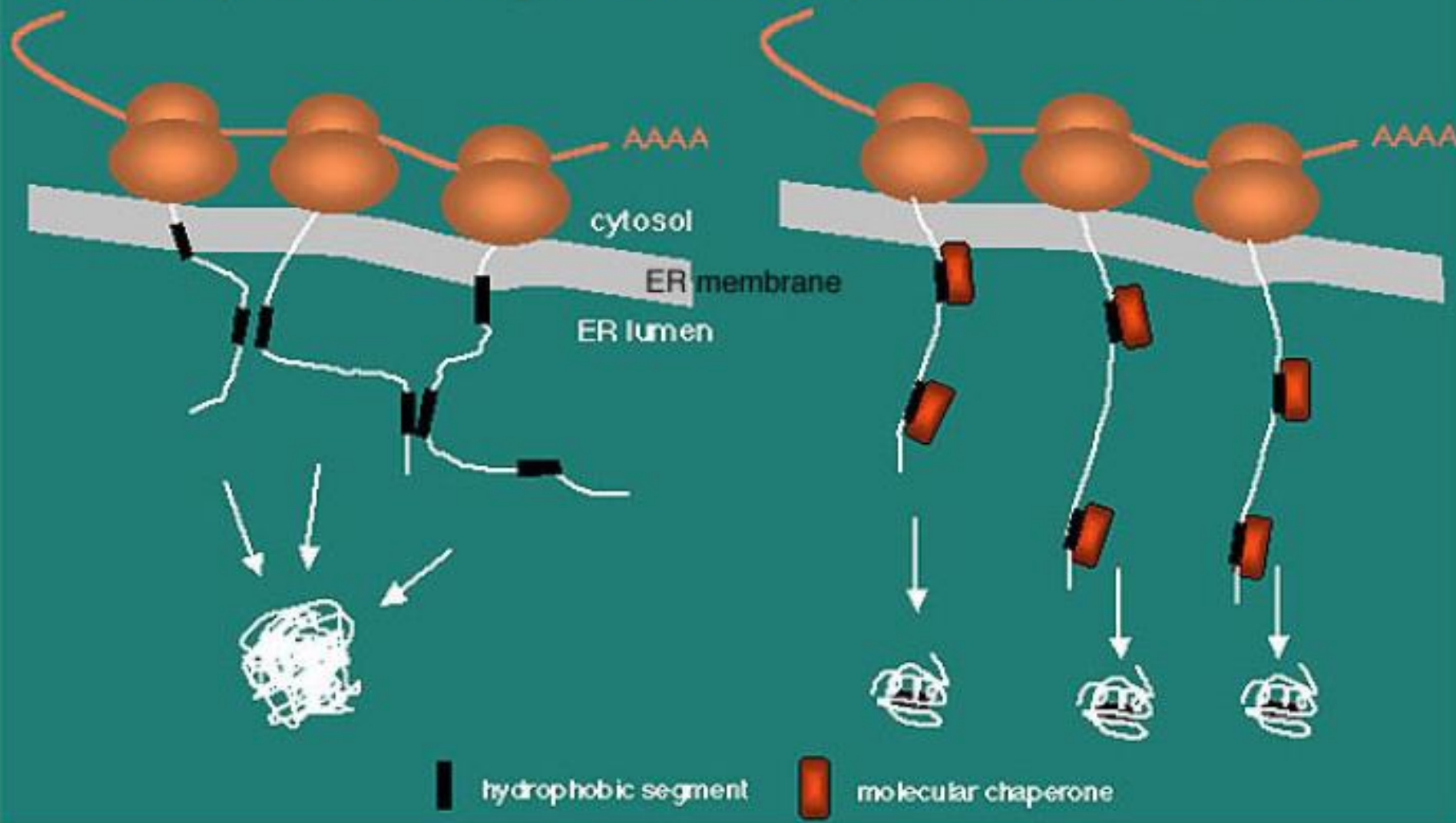


Amyloid fibril

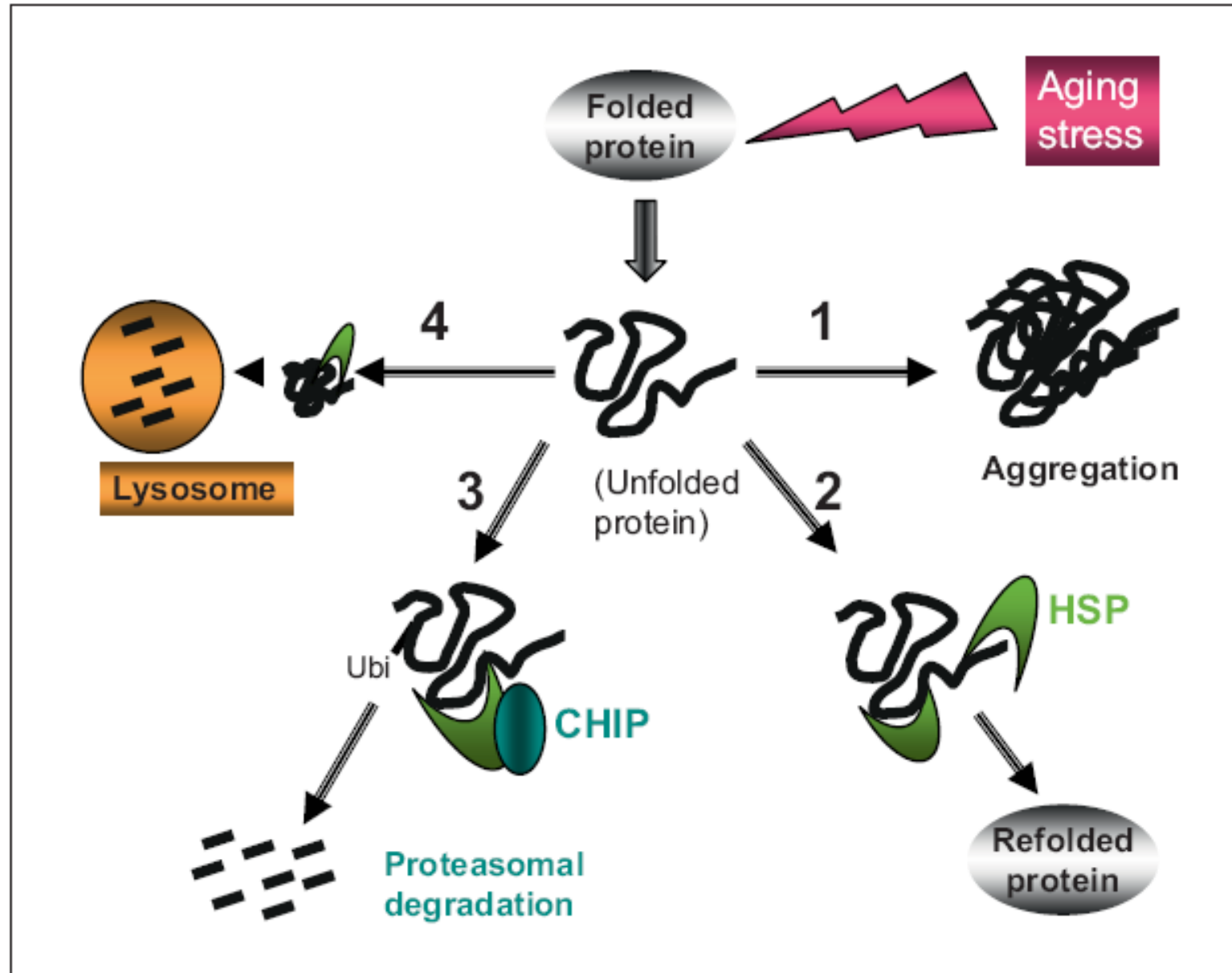


Degraded protein

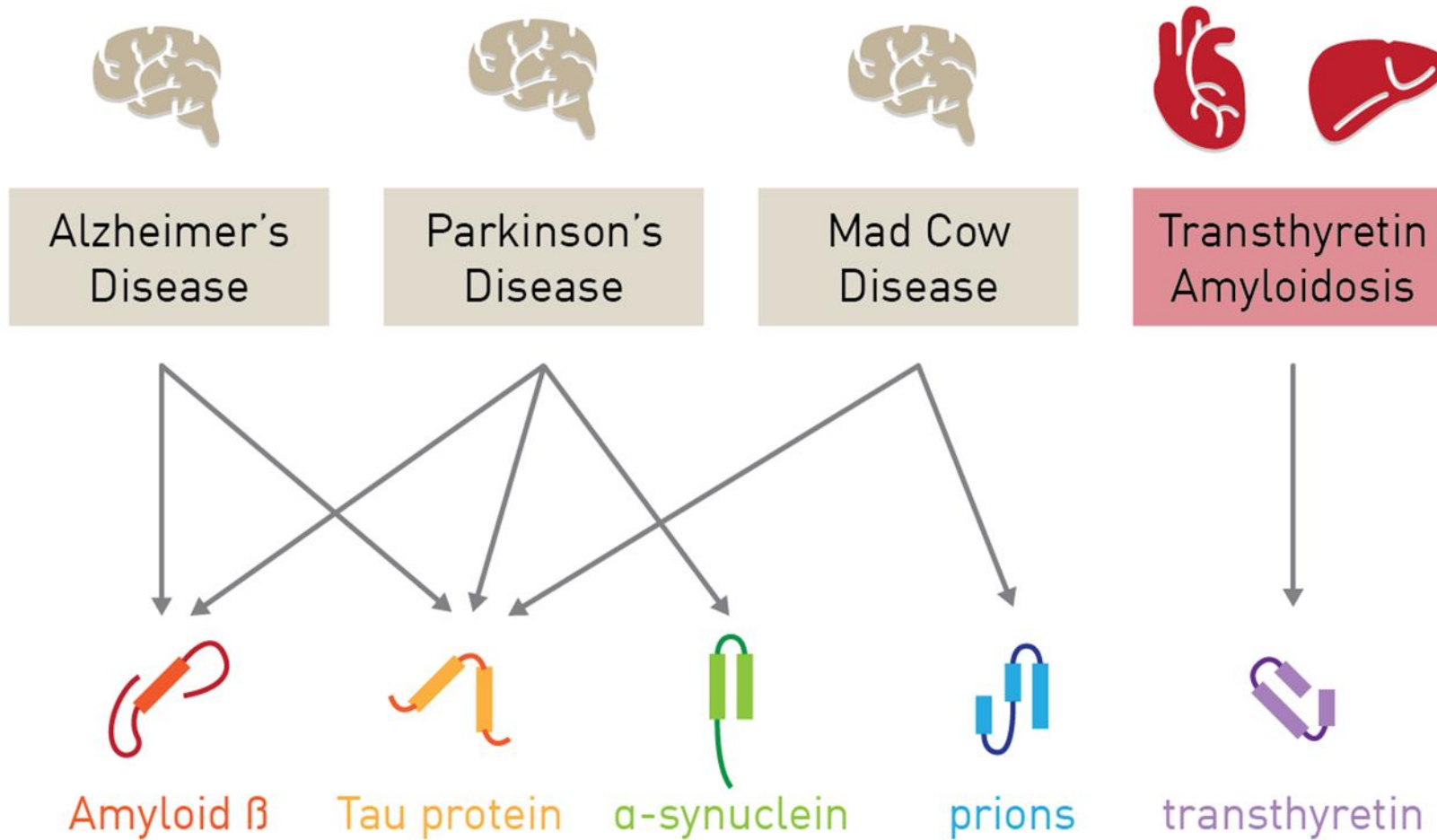
## In vivo protein folding in absence or presence of chaperones



## Quality control, salvage and disposal pathways for damaged proteins

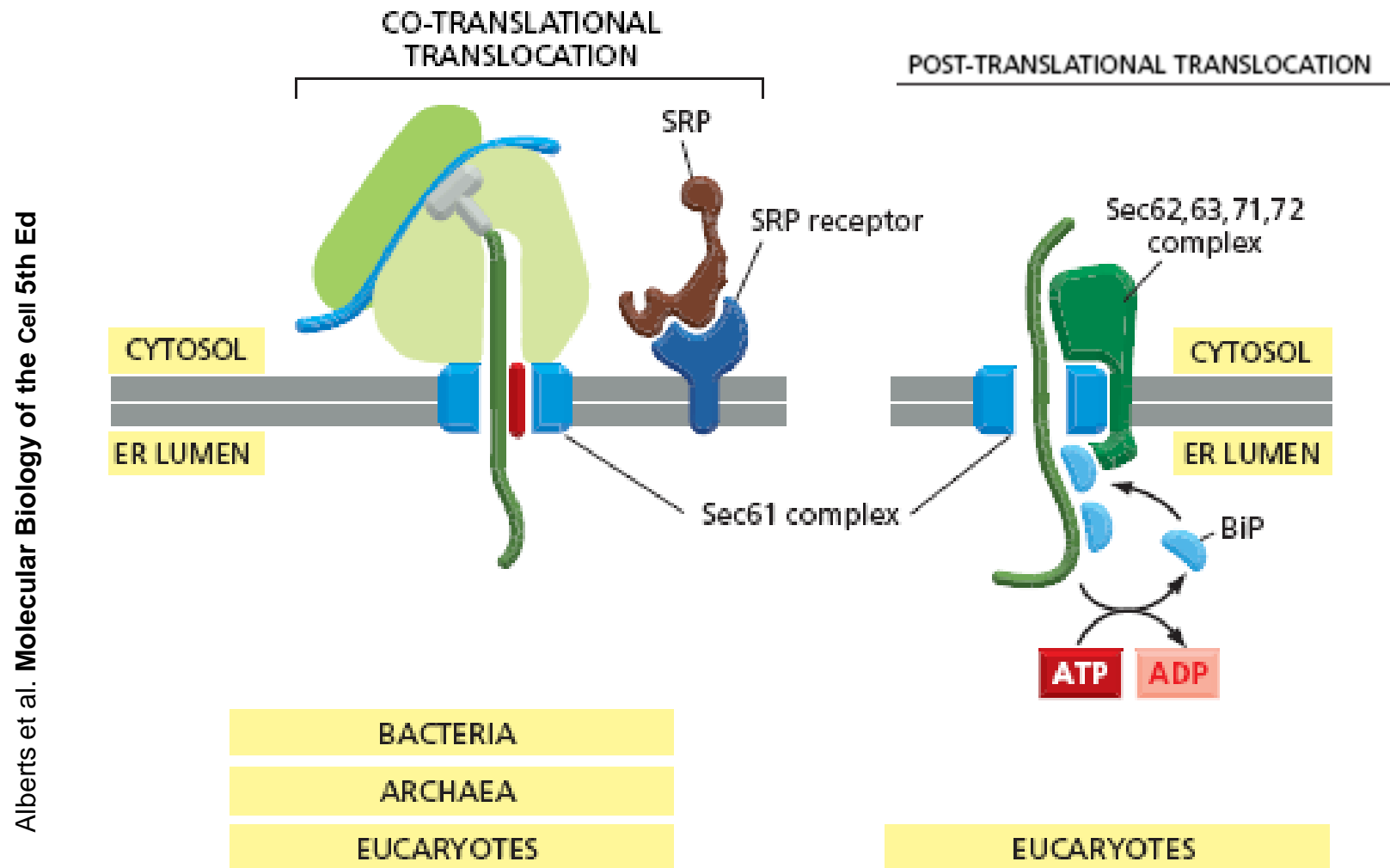


# Unfolded and/or aggregated proteins in disease

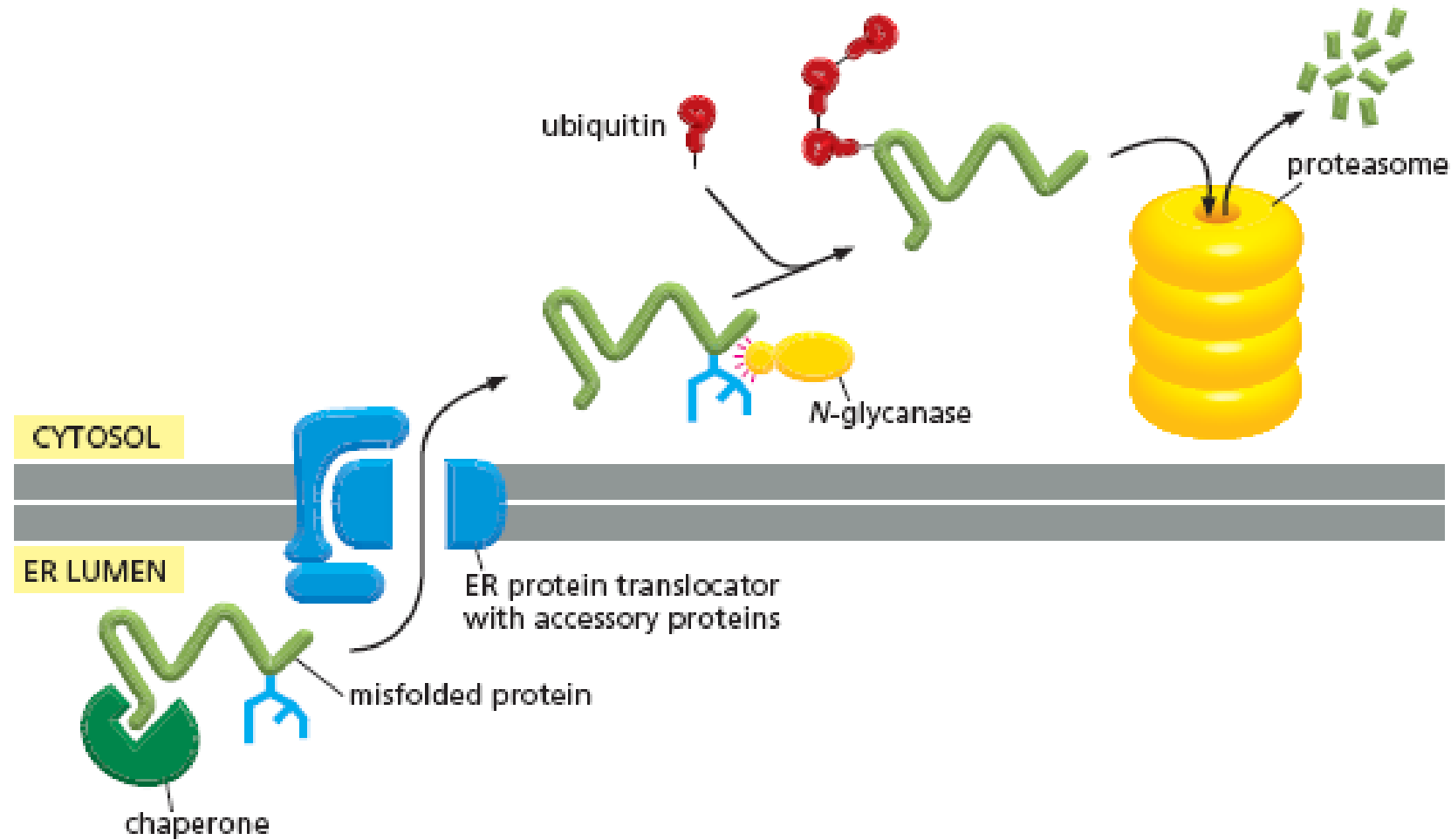


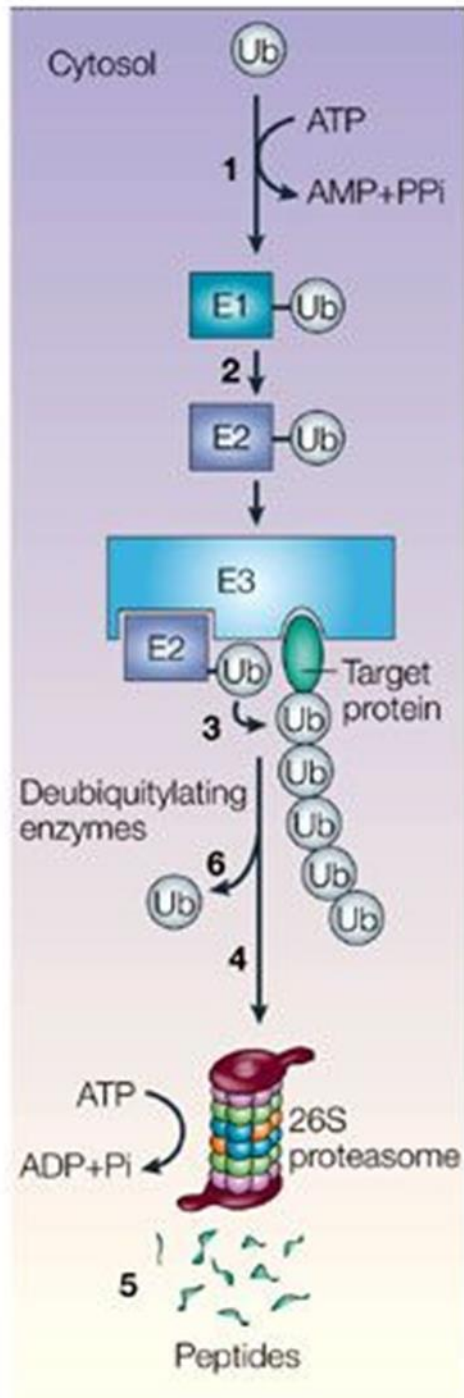


Algumas proteínas **completamente sintetizadas**, no entanto, são importadas para o ER. Um complexo adicional composto pelas proteínas sec62, Sec63, sec71, sec72 está ligado ao translocador Sec61 e deposita/recruta a proteína **BiP** (uma chaperone d tipo Hsp70) para a cadeia nascente que está a ser translocada à medida que esta emerge para o lúmen do ER. Ciclos de ligação e libertação de BiP, dependentes de ATP acabam por “puxar” a proteína para o lúmen do ER.



Proteínas solúveis e membranares que estão “misfolded” no lúmen do ER são translocadas de volta para o citosol, onde são des-glicosiladas, ubiquitinadas e degradadas pelo proteossoma.



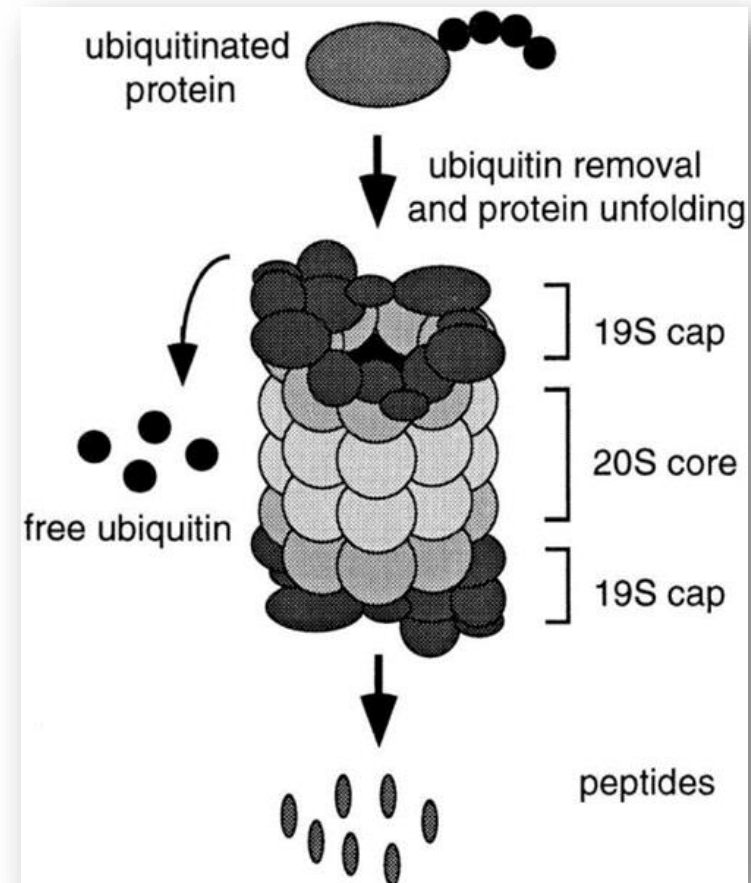


## Via Ubiquitina-Proteossoma (UPS; ubiquitin proteasome system)

1-3 – Conjugação da ubiquitina com a proteína substrato – ubiquitinação.

4-5 – Degradação de proteínas poliubiquitinadas pelo proteossoma 26S.

*A ubiquitinação pode ser usada para alterar a função de uma proteína, sem implicar a sua degradação pelo proteossoma 26 S*



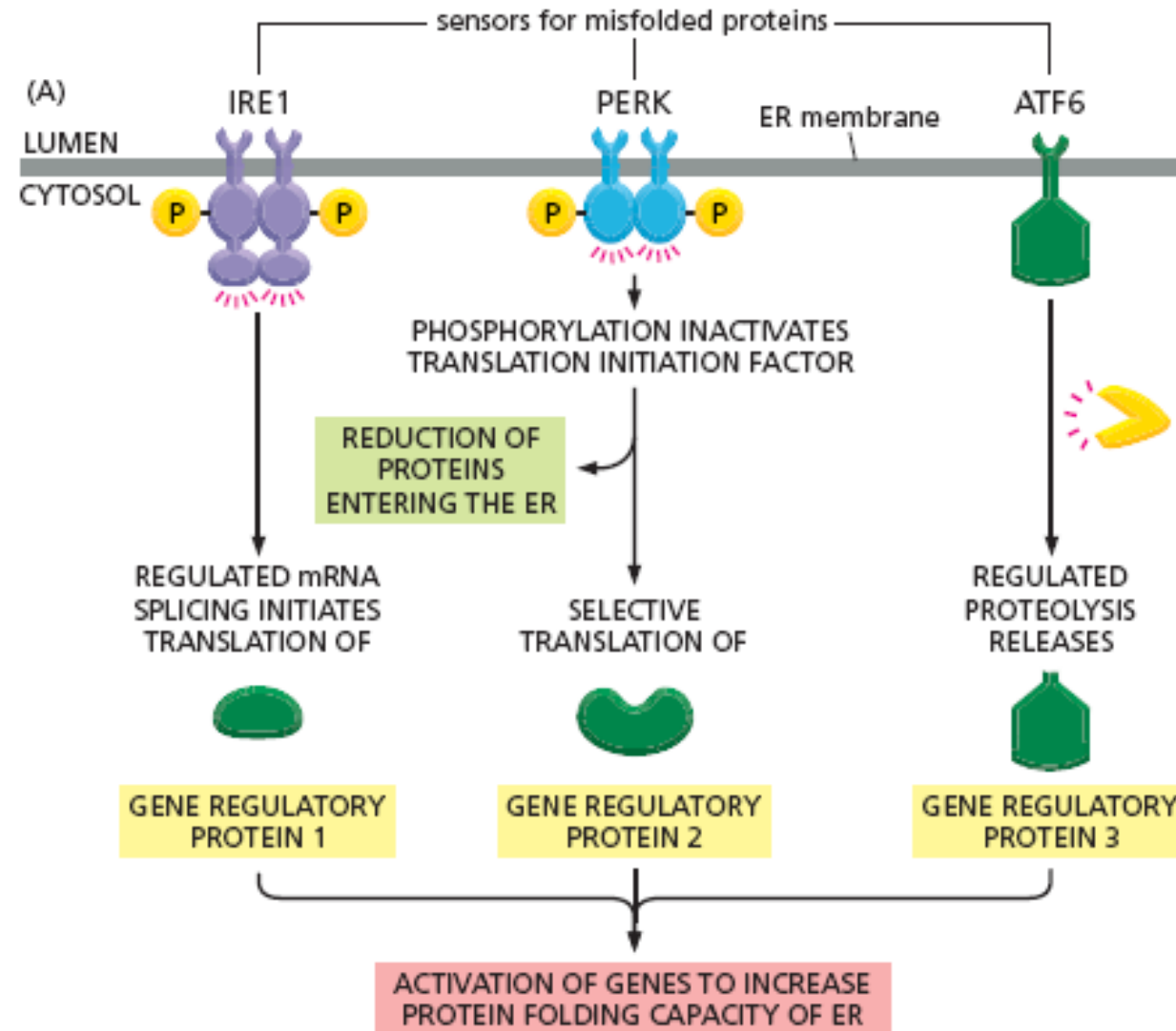
## Unfolded Protein Response – ER Stress

Quando a capacidade de folding de proteínas no RE está comprometida, como por um aumento da taxa de síntese proteica (aumento de necessidade de maquinaria de folding) ou por capacidade enzimática reduzida, as proteínas misfolded acumulam-se no RE. Este processo leva ao **ER stress**, o que desencadeia a ativação de uma via de sinalização, a **UPR (Unfolded Protein Response)**. Existem muitos tipos de insultos que desencadeiam ER stress, incluindo hipoxia, depleção de cálcio e privação de glicose.

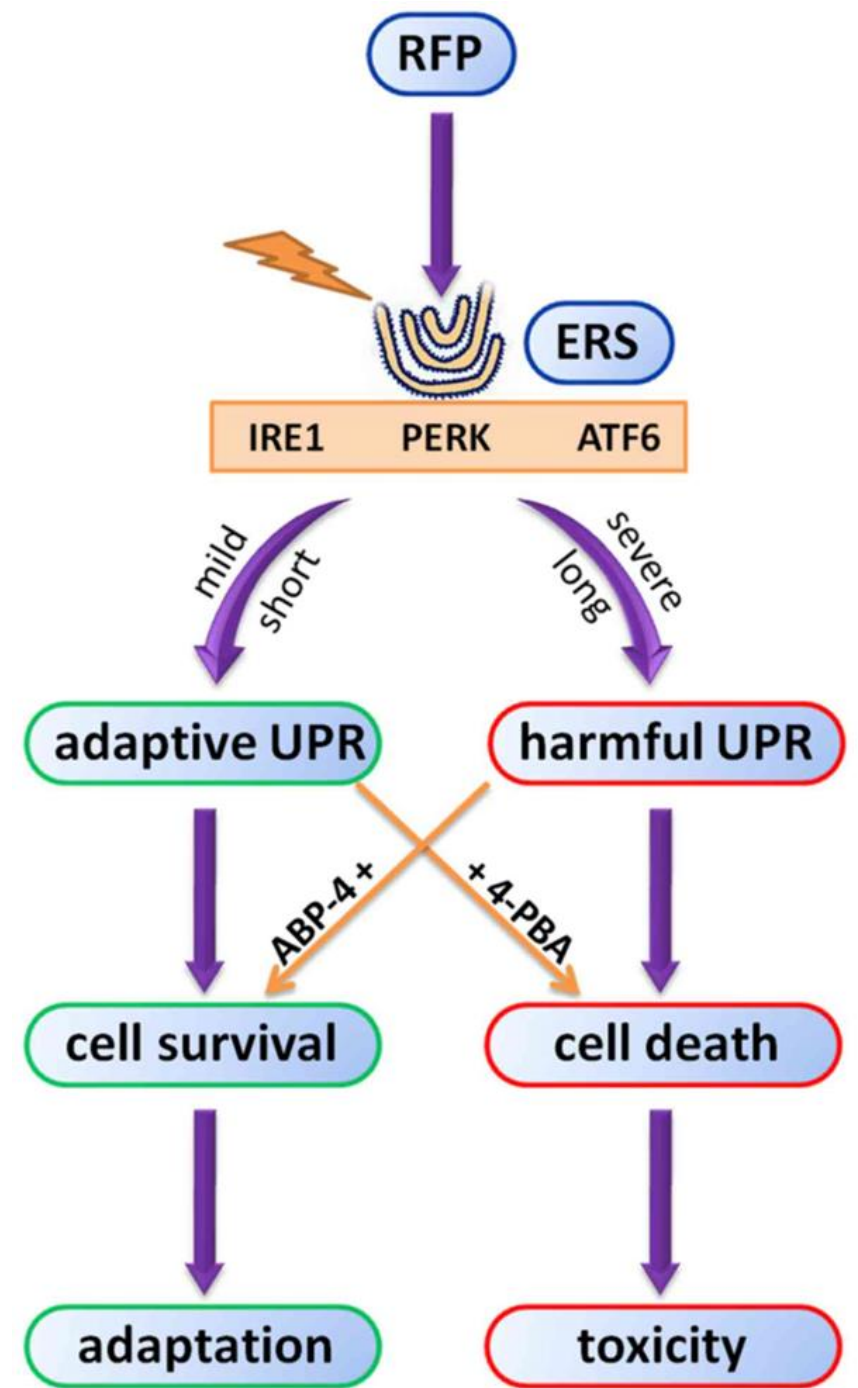
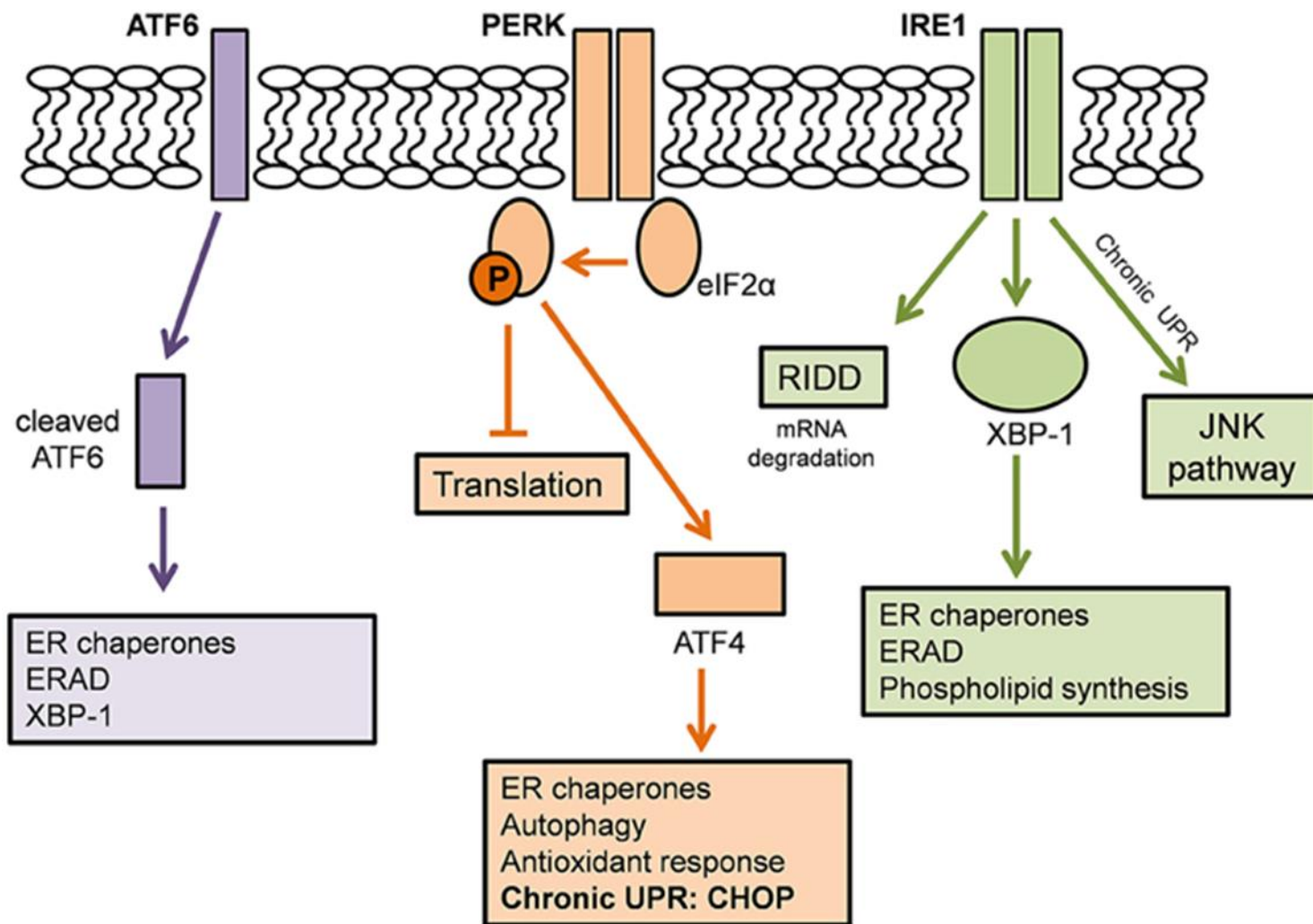
A UPR posteriormente transfere essa informação do RE para o núcleo e citoplasma, onde os processos de transcrição e tradução são ajustados à necessidade de folding das proteínas. **Esta via de sinalização é responsável por uma diminuição da síntese proteica e a degradação de proteínas misfolded, bem como pela estimulação da transcrição de chaperones do ER de enzimas envolvidas no folding proteico.** Estes processos tendem a aliviar o ER stress, reduzindo a carga biossintética e estimulando a capacidade de folding do ER, respectivamente. No entanto, quando a acumulação de proteínas misfolded é continuada, o stress torna-se muito severo, e a UPR não será suficiente para recuperar a homeostase; nesta situação a célula activará mecanismos de morte celular (**apoptose**).



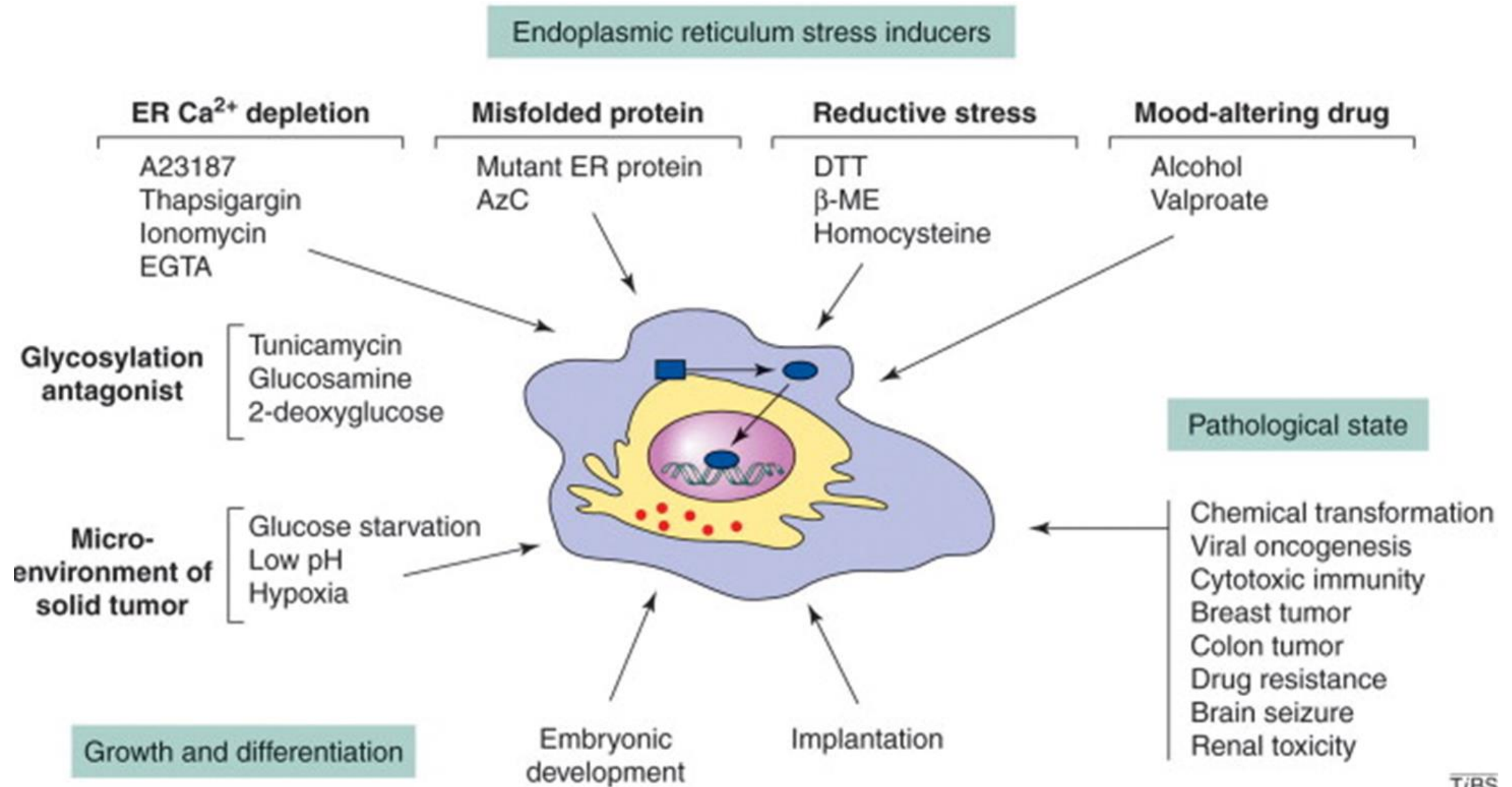
A acumulação de proteínas “misfolded” no ER desencadeia a “**unfolded protein response**”, que inclui um aumento da transcrição de genes que codificam para chaperones do ER, proteínas envolvidas na re-translocação e degradação proteica no citosol, e muitas outras proteínas que contribuem para aumentar a capacidade de “folding” no ER, ao mesmo tempo que inibe a tradução geral de proteínas.



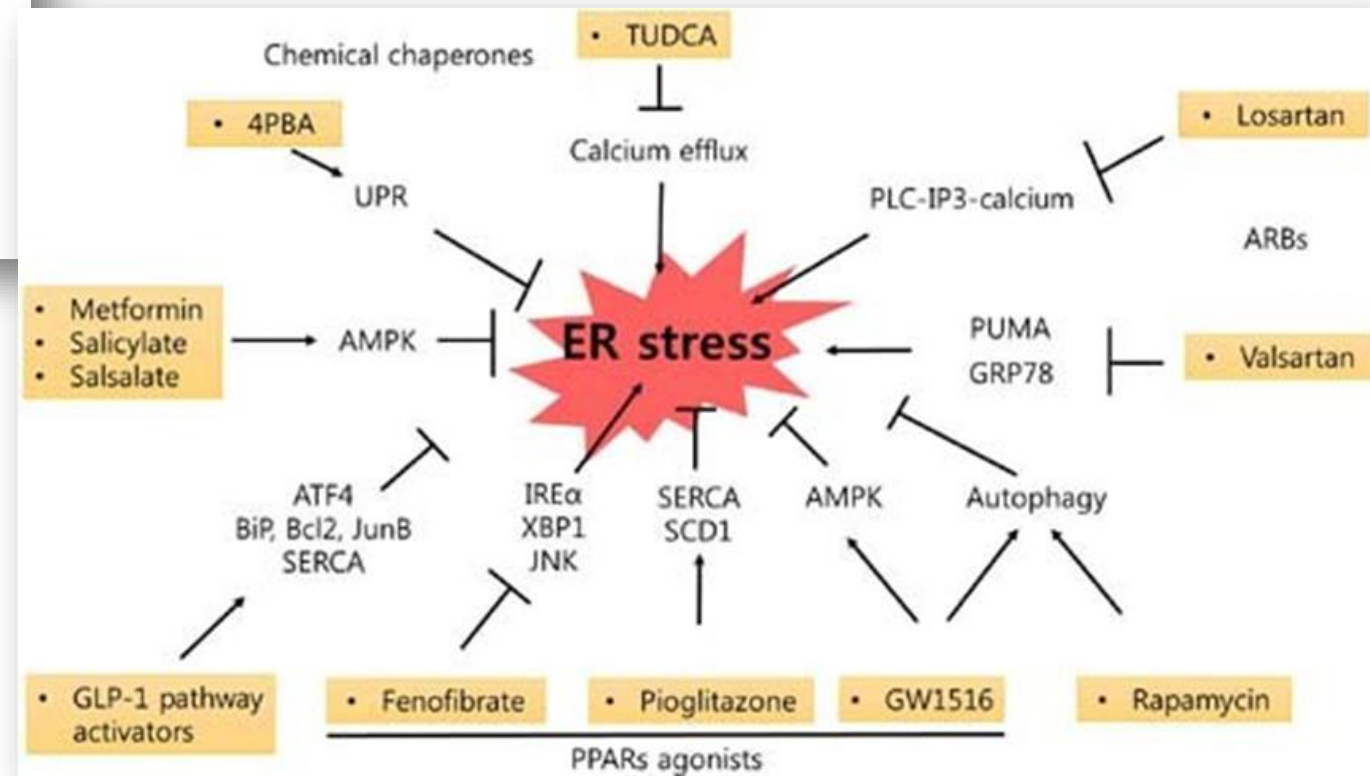
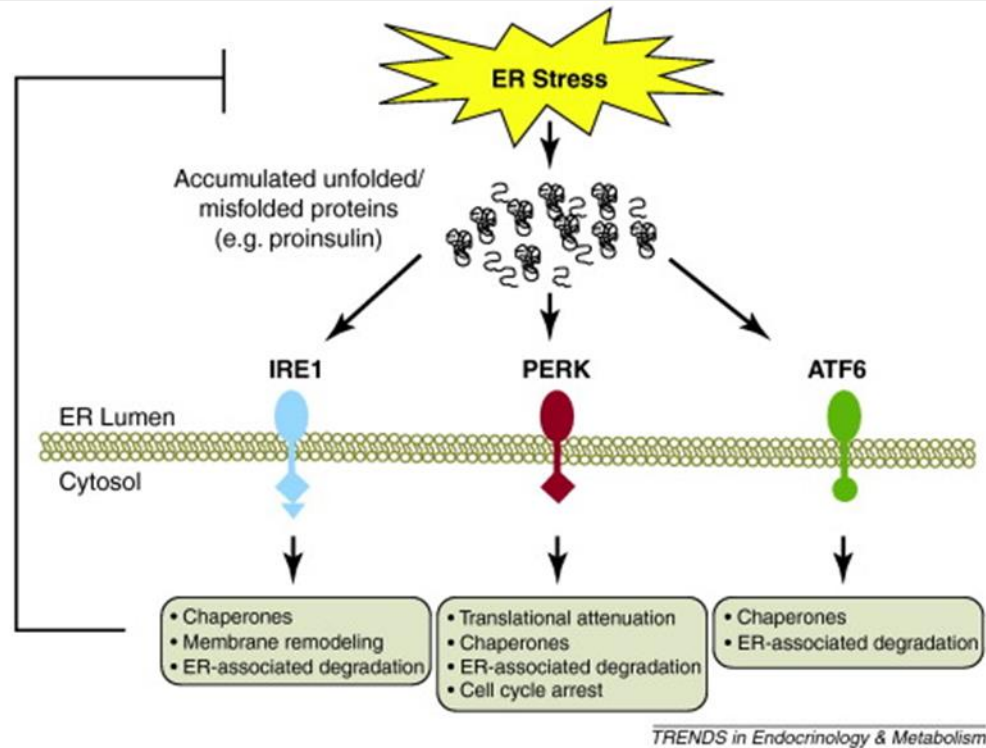
# Unfolded Protein Response – ER Stress



# Indutores de ER stress



# Inibidores de ER stress





# Press Release

2013-10-07

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet has today decided to award

The 2013 Nobel Prize in Physiology or Medicine

jointly to

James E. Rothman, Randy W. Schekman  
and Thomas C. Südhof

for their discoveries of machinery regulating vesicle traffic,  
a major transport system in our cells



## **Reticulo Endoplasmático e Aparelho de Golgi**

Sistema endomembranoso: <https://www.youtube.com/watch?v=Fcxc8Gv7NiU>

ER e síntese proteica: <https://www.youtube.com/watch?v=XaoTtCj4r3U~>

<https://www.youtube.com/watch?v=PIRZtrSSiwY>

[https://www.youtube.com/watch?v=\\_lbgtXiixKI](https://www.youtube.com/watch?v=_lbgtXiixKI)

Transporte de proteínas ER – Golgi: <https://www.youtube.com/watch?v=rvfvRgk0MfA>

Mecanismos de controlo de qualidade de proteínas

UPR – Unfolded Protein Response (ER stress): <https://www.youtube.com/watch?v=Edx3x7-PRzY>

[https://www.youtube.com/watch?v=vy4m-fUOn9o&list=PLaUZ6e-V9c0AwdunZA4k\\_pKf0wR3ppwCu&index=200](https://www.youtube.com/watch?v=vy4m-fUOn9o&list=PLaUZ6e-V9c0AwdunZA4k_pKf0wR3ppwCu&index=200)

UPS – Ubiquitin proteasome system:

<https://www.youtube.com/watch?v=hvNJ3yWZQbE>

<https://www.youtube.com/watch?v=jbc1QCu9hFg>

Chaperones:

<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Chaperone-Proteins.aspx>