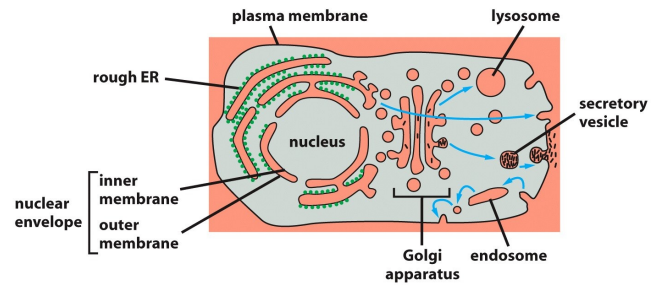


# HOOFDSTUK 4: HET ENDOMEMBRAANSYSTEEM

## Endomembraansysteem

- lipiden en membraaneiwwitten verdelen over cel
- transport naar de rand van de cel
- secretie naar extracellulair milieu
- opname en afbraak van voedingscomponenten



## Endoplasmatisch reticulum

Het **endoplasmatisch reticulum** is een continu netwerk van zakjes, tubules en vesikels

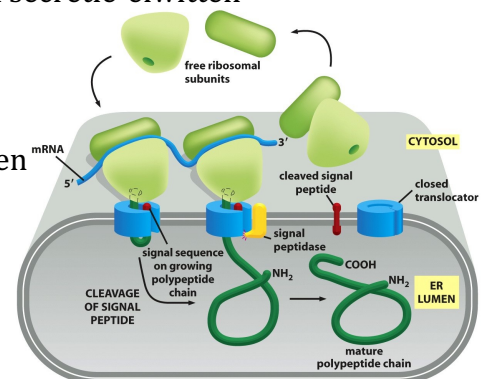
- **perinucleair netwerk**: membraan continu met buitenste kernmembraan
- **cisternen**: membraan omsloten zakjes, **ER lumen**: de omsloten ruimte
- **functie van ER**
  - o biosynthese van proteïnen → incorporatie in plasmamembraan/organelen OF export
  - o biosynthese van lipiden → triacylglycerol, sterol → belangrijkste bron membraanlipiden
- **2 types in ER**: bezitten beide dezelfde lumenale ruimte → zijn één organel
  - o RER: ribosomen, membranen vormen afgeplatte vlakken
  - o SER: vrij van ribosomen, membranen vormen tubulaire structuren
- **morfologie** vormt een reflectie van **functioneel onderscheid**
  - o prominent RER voor cellen gespecialiseerd in productie van secretie-eiwitten
  - o prominent SER voor steroïde-producerende eiwitten

## Synthese en maturatie van proteïnen in RER

RER: **biosynthese** van integrale membraaneiwwitten & excretieproteïnen

**Co-translationele translocatie** via SRP, signaalpeptide → translocon

→ integrale eiwitten verankerd via hydrofobe sequenties of binding met membraanlipiden  
↳ = start-stopsignalen



**Post-translationele modificatie** regelt de eerste stappen van proteïne maturatie

→ glycosylatie, vorming disulfide bruggen, opvouwing, ERAD & assemblage tot multimeren

## Functies van het SER

### Drugdetoxificatie

- wordt geregeld door **enzym-gekatalyseerde hydroxylatie**
  - additie van hydroxyl-groepen maakt hydrofobe drugs meer oplosbaar
  - vnl. door **cytochroom P450 superfamilie**
- voorbeeld: eliminatie van barbituraten in hepatocyten
  - toename in barbituraat-detoxificerende enzymen + proliferatie van dat ER
- **pharmacogenomics**: studie van differentiële drug respons door verschillen in het genoom

### Suikermetabolisme

- ER van hepatocyten: **enzymatische degradatie** van opgeslagen **glycogeen**
- **fosforylyse** door enzym glucose-6-fosfatase:  
glucose-6-fosfaat → glucose — GLUT2 transporter → bloed

### Calciumopslag

- **sarcoplasmatisch reticulum** (soort ER in spiercellen) heeft als rol calciumopslag
- $\text{Ca}^{2+}$  uit SR gelost (spiercontractie) en dan terug in SR gepompt door ATP-ases

### Steroïde biosynthese

- bijnier (cortisol), ovaria (oestrogeen), testis (testosteron) → ER dé plaats v. hormoon synthese

## Membraanbiosynthese

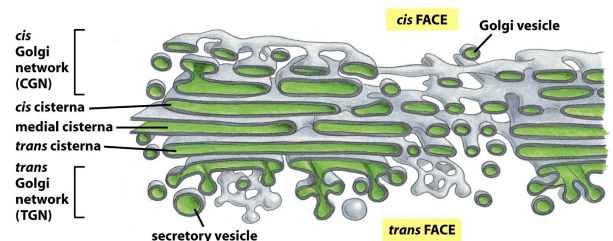
**Primaire bron** van **membraanlipiden** is het ER

- mitochondriën, chloroplasten, peroxisomen kunnen dit in principe zelf  
→ indien toch overdracht van ER naar deze organellen: via **fosfolipide transferproteïnes**
- biosynthese van vetzuren in het cytoplasma  
→ **incorporatie in fosfolipiden** aan cytoplasmatisch membraan in ER
- verdeling in membraan via flippases → vervolgens overdracht naar organellen of membraan

## Het Golgi apparaat

Het **Golgi-complex** bestaat uit schijfvormige membranen die op elkaar gestapeld zijn (**stack**)

- duidelijke polarisatie en verdeling
- CGN, TGN en med. c. zijn biochemisch & functioneel verschillend, bezitten elk eigen enzymen
  - **cis-deel CGN of *cis* Golgi Network**
    - gericht naar het ER
    - nieuw gesynthetiseerde lipiden en proteïnen worden continu hier aangeleverd
  - **mediale cisternae**
    - hier gebeurt het grootste deel van proteïnemodificaties
  - **trans-deel TGN of *trans* Golgi Network**
    - vertrek richting endosomen, lysosomen en plasmamembraan

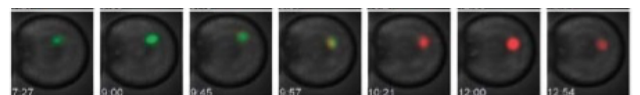


### **Vesiculair transportmodel of stationair cisternenmodel**

- elk compartiment is een stabiele structuur
- transport tussen compartimenten verloopt via vesikels

### **Cisternal maturation model**

- totale inhoud van cisternen rijpt gradueel en wordt omgezet van cis naar trans
- gerijpte cisternen vallen t.h.v. TGN uit elkaar in verschillende blaasjes
- experimenteel (foto) is dit model aangetoond, toch worden 2 modellen **wetenschappelijk niet uitgesloten**
- **live cell imaging**: CGN proteïne groen gekleurd, TGN proteïne rood  
→ er is een duidelijke geleidelijke overgang van groene naar rode fluorescentie



Afbeelding 1: Live cell imaging: CGN (groen) naar TGN (rood)

# Proteïneglycosylatie

**Glycosylatie** is een progressief proces waarbij enzymen opeenvolgende stappen katalyseren

- reacties gebeuren sequentieel in verschillende compartimenten van ER en Golgi
- **N-linked glycosylatie**: suikergroep op N van eindstandige aminogroep van asparagine
- **O-linked glycosylatie**: oligosacharide op O van hydroxyl op serine/threonine

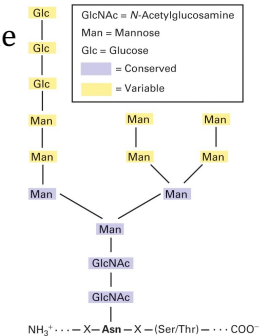
## Initiële glycosylatie in het ER

→ hier gebeuren de eerste stappen van glycosylatie, vnl. deze van N-linked glycosylatie

Alle suikergroepen: **core oligosaccharide**

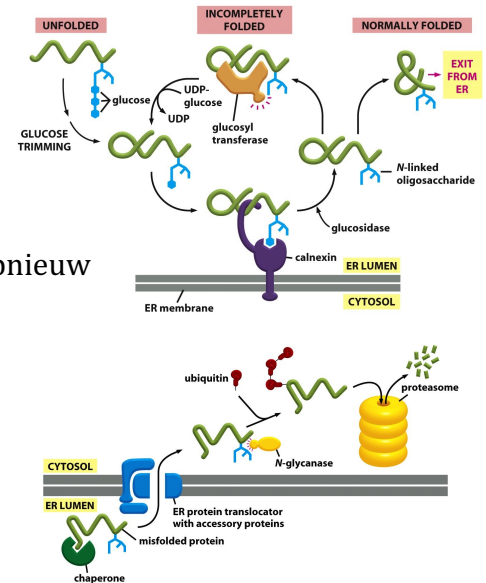
- bestaat uit: 2 N-acetylglucosamines GlcNAc, 9 mannoses en 3 Glc
- onderdelen sequentieel erop gezet via **dolichol fosfaat**: oligosacharide carrier

1. dolichol fosfaat is een **oligosacharide carrier** in ER membraan
2. **core oligosacharide synthese** begint aan cytoplasmatische kant
  - a. GlcNAc en Man worden toegevoegd aan dolichol fosfaat
3. **translocatie** van oligosacharide van cytoplasmatische naar luminale zijde via een **flippase**
4. vervolledigen van core oligosacharide als meer Man en Glc worden toegevoegd
5. **transfer** van het volledig core oligosaccharide naar **asparagine** residu van **doeleiwit**
6. **final processing**: verwijdering van 3 Glc en 1 Man



## Co-translationele glycosylatie: quality control voor opvouwing

- **calnexine/calreticuline** → bevorderen disulfidebrugvorming
- **glucosidase**: glucose wordt verwijderd
- **UGGT** (UDP-glucose glycoprotein **glycotransferase**)
  - = sensor voor juiste opvouwing van het proteïne
  - slechte opvouwing: voegt Glc eenheid toe en cyclus start opnieuw
  - goede opvouwing: proteïne niet meer herkend door UGGT
- als het niet lukt om goed op te vouwen
  - **polyubiquitinetag** of 'kiss of death'
  - = merker zodat proteïne gedegradeerd wordt in proteasoom



## Afwerking in Golgi-complex

- echte diversiteit in suikergroepen ontstaat pas in het Golgi
- enkele groepen van N-linked core verwijderd, gevolgd door additie van complexe suiker
    - o vb. GlcNAc, galactose, NANA, fucose
  - **trans-Golgi**: O-linked oligosachariden gevormd door overdracht van nucleotide precursoren
    - dit zijn nucleotide suikers (UDP-Gal, GDP-Man, ...)
    - in Golgi-vesikel binden zij op OH-groep van een suiker m.b.v. glycosyltransferase
  - **mature glycoproteïnen** bevinden zich aan **luminale zijde** van ER of Golgi
    - o lumen van organel ≈ buitenzijde van cel → glycoproteïnen aan extracell. zijde membr.

# Vesiculair transport

**Vesiculair transport:** integrale of opgeloste eiwitten krijgen na modificatie een eindbestemming

- eindbestemmingen: ER zelf, Golgi, endosomen, lysosomen of plasmamembraan
- **cargo** of lading zit vast in de membraan
  - o als **integraal membraaneiwit**
  - o **verankerd** door membraangebonden receptor aan vesikelmembraan
- elk proteïne bevat een **tag**, het adres: deze zit vervat in
  - o az-sequentie
  - o suikerketen
  - o fosfaatgroepen op fosfatidylinositol voor membraanlipiden

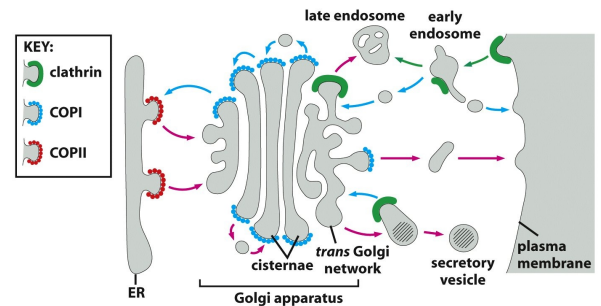
## Basisprincipes van vesiculair transport

zowel voor de biosynthese pathway als endocytose pathway gelden volgende principes:

### 1. Vesikels worden gekenmerkt door specifieke mantelproteïnes

**mantelproteïnen** fungeren als mechanisme om

- vlakke membraan om te buigen tot een vesikel
- selectiemechanisme voor herkenning en sortering van vesikel



### Types mantelproteïnen

- **COPII-gecoate vesikels:** **anterograad transport** van ER naar Golgi
- **COPI-gecoate vesikels:** **retrograad transport** van Golgi naar ER (van TGN naar CGN)
- **Clathrine-gecoate vesikels:**
  - transport van TGN naar endosomen en lysosomen
  - van plasmamembraan naar compartimenten (endocytose)
- **Caveolin-gecoate vesikels:** **caveolae** gespecialiseerde lipid rafts voor endo- en transcytose

### 2. Monomere GTP-asen controleren de assemblage van vesikels

een **klein GTP-ase** regelt de assemblage en afbraak van de coat

- voor COPI en Clathrine: GTP'ase van ARF type, voor COPII: Sar1

1. Sec12 (membraaneiwit) stimuleert uitwisseling GDP voor GTP
2. dit GTP bindt op Sar1 → hydrofobe uiteinde van Sar1 plooit naar buiten (membr. verankering)
3. Sar1-GTP initieert vorming van COPII vesikel
4. **timer principe:** na vorming van het vesikel zal coat uitenvallen (hydrolyse)

### 3. Signaalsequenties bepalen de sortering

Mantelproteïnen herkennen signaalsequenties op transmembraan-cargo-proteïnen

- mantel zal clustering van membraancargo's induceren
- in cytoplasma zullen oplosbare proteïnen herkend worden door membraancargo's
  - opl.: fungeren als receptoren en dirigeren hen naar celcompartimenten

#### 4. Rab GTP-assen gidsen het aanmeren

Rab-proteïnen leveren een belangrijke bijdrage in vesikelfusie

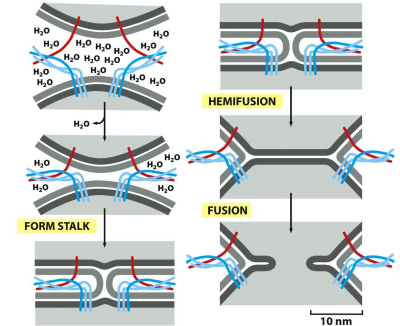
- bij activatie (GEF) wisselen zij hun GDP voor GTP en worden actief
- Rab-effector op doelmembraan stimuleert GTP-ase activiteit: aanmeren van vesikel

#### 5. SNARE's bepalen vesikelfusie V: Vesicle, T: Target, SNARE: attachment protein receptor

Hechting van een vesikel: **fusiecomplex** tussen

V-SNARE proteïnen en T-SNARE op doelmembraan

- V- en T-snares verstrengelen en verdrijven water om energetische barrière voor fusie te verlagen
- vb. synaps: vrijstelling neurotransmitters voor spiercontractie
- Botox: knipt SNARE's → dit verlamt de spierfunctie rimpels worden veroorzaakt door spiercontracties



#### 6. SNARE's en receptoren worden gerecupereerd

Na fusie en afgifte vesikelinhoud worden SNARE's opnieuw gescheiden m.b.v. NSF eiwit

- V-SNARE's nemen oude plaats terug in via retrograad transport

### Biosynthese pathway

**Finale sortering** gebeurt t.h.v. TGN, waar lipiden en proteïnen worden verpakt in vesikels met verschillende bestemmingen

#### Retentie en retrieval

compositie van beide organellen moet bewaard blijven: **retrieval pathway**

- via RXR-retentie tag wordt materiaal via retrograad (CGN→ER) transport teruggebracht

**Retrograde transport via KDEL-sequentie:** uit ER ontsnapte oplosbare moleculen met KDEL tag worden herkend door transmembraanreceptor van Golgi met KKXX sequentie

- binding zorgt voor wijziging naar COPI gecoatg vesikel voor ER-transport
- wordt gebruikt om SNARE-proteïnen te recupereren

#### Lysosomale targeting

- tijdens beweging in ER en Golgi worden lysosomale enzymen **geglicosyleerd**
  - glycoproteïnen worden naar lysosoom gericht bij vorming **mannose-6-fosfaat**
    - 2 enzymen zijn hierbij betrokken: **fosfotransferase** en **fosfodiesterase**
    - lumenale zijde TGN heeft M6F-receptoren
      - bij **binding: verpakking in vesikels** die zullen fuseren met endosomen
      - enzymen komen los van receptor door lage pH
        - ontwikkeling/fusie tot/met **lysosoom**
    - merkteken om proteïne naar het lysosoom te loodsen
      - **inclusion cell disease:** M6F ontbreekt → lysosomale inhoud komt in intercellulair weefsel terecht

#### Exocytose (secretorische pathway)

materiaal wordt via het ER en Golgi verpakt in blaasjes die versmelten met plasmamembraan

- binnenste, lumenaal membraan van blaasje versmelt buitenste lipidenlaag plasmamembraan
- exocytose is **gepolariseerd**: secretie zal enkel aan apicaal deel (verteringsenzymen) of aan synapsen (neuronen) plaatsvinden



## Constitutieve exocytose

= voortdurende secretie van eiwitten (bv. in darmmucosa of opbouw extracellulaire matrix)

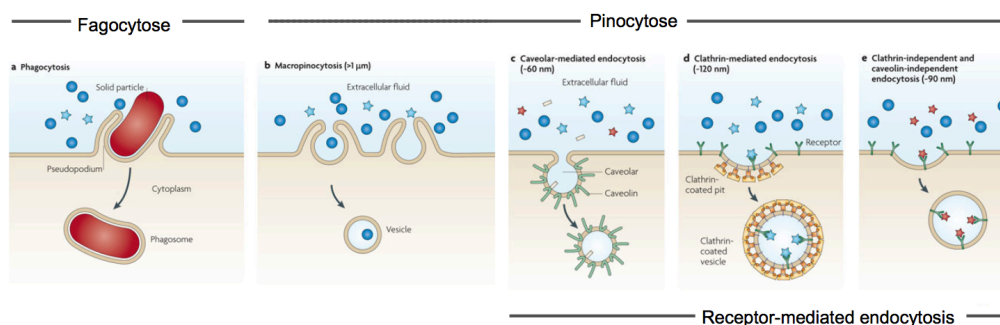
- lijkt een ongereguleerd proces van continu migrerende vesikels die fuseren met plasmamembraan om inhoud te lossen via exocytose
  - wordt eigenlijk geregeld door korte aminozuursequenties

## Gereguleerde exocytose

= secretorische blaasjes accumuleren in de cel en fuseren enkel pas met membraan na signaal

- vesikels ondergaan **maturatie**, proteïnen worden geconcentreerd (**condensatie**) en wachten dan op plaats van secretie op ECM-signaal voor fusie
- vb. zymogeenkorrels in pancreascellen of neurotransmitters in neuronen
  - binding van hormonen of neurotransmitters leidt tot vrijstelling second messengers
  - fusie van synaptische blaasjes voorkomen door een klem: synaptotagmine
    - door calcium flux wordt blokkade opgeheven → vesikelfusie

## Endocytose pathway



## Endocytose

- om materiaal vanuit de plasmamembraan in te snoeren en op te nemen
- om bepaalde componenten uit de membraan te recupereren
- voedingsbestanddelen opnemen via fagocytose en pinocytose → lysosomen
  - afbraakproducten door lysosomale wand in cytoplasma transporteren

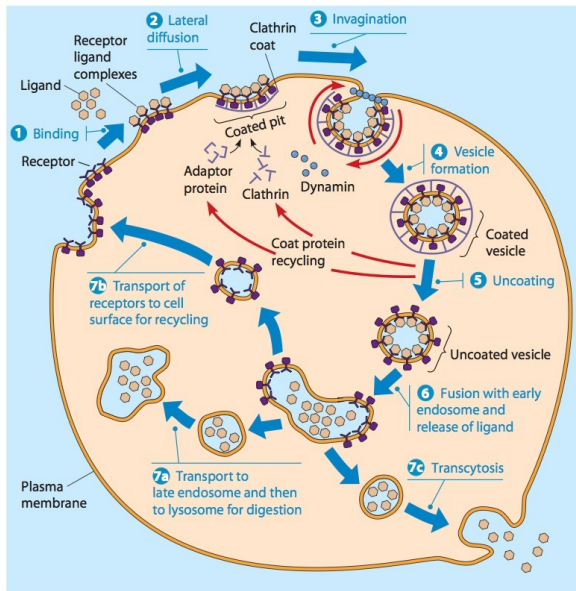
## Fagocytose

- **grote partikels**: aggregaten, organellen, micro-organismen of cellen
- unicellulaire organismen: voedingswijze, multicellulaire organismen: defensie (macrofaag)
- vormen van **membranauitstulpingen** of **pseudopodia**: omarmen het object
  - vorming van fagocytotische vacuole of **fagosoom**
- fagocytose gaat gepaard met mobilisatie van cytoskelet, pinocytose niet

## Receptor-gemedieerde endocytose

of clathrine-afhankelijke endocytose: primair proces voor opname van macromoleculen

1. receptoren binden liganden (macromoleculen) en bewegen ze rond in het membraan
2. ze komen een **coated pit** tegen: collectie en internalisatie van macromoleculen
3. curvatuur en **invaginatie** als receptor-ligand complexen ophopen → vormig gecoat vesikel
  - rekrutering van proteïnen (clathrine, adaptine en dynamine)
4. clathrine-mantel verdwijnt: 'naakt' vesikel fusioneert met TGN om vroeg endosoom te vormen
  - efficiënte sortering van membraancomponenten
  - endosoom rijpt verder tot laat endosoom en lysosoom
5. ATP-ase gekoppelde H<sup>+</sup>-pomp zal endosoominhoud verzuren → receptor komt los van ligand
  - receptor wordt gerecycled naar plasmamembraan



Receptorrecyclage gebeurt niet altijd:

- receptor-ligand complexen kunnen in lysosomen worden gedegradeerd
- andere worden naar TGN vervoerd
- **transcytose**: terug naar andere regio van plasmamembraan gevoerd om gesecreteerd te w.

## Clathrine-gecoate vesikels

Clathrine-coat vormt triskelion complexen die op hun beurt een polyonaal rasterwerk vormen

Tussen clathrine-skelet en membraan bevinden zich **adaptor proteins**

→ concentratie van juiste macromoleculen in coated pits

Dynamine (GTP-ase) regelt de finale afsnoering uit de membraan

- wikkelt zich rond de nekregio
- verbruikt GTP voor constrictie

## Clathrine-onafhankelijke endocytose

### vloeistof-fase endocytose

- vorm van pinocytose: niet-specifieke opname
- vrij consante snelheid: compenseert voor exocytose

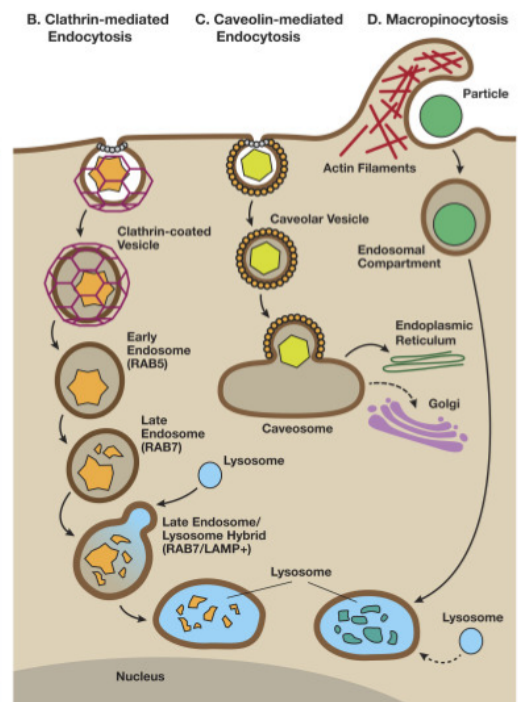
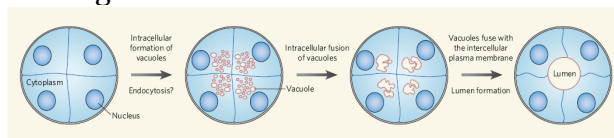
### Caveolae, caveoline-gemedieerde endocytose

- flesvormige instulpingen van lipid rafts, met langs cytoplasmatische kant caveolines
- vermoeden: vorming van neutrale endosomale vesikels of **caveosomen** (misbruik dr virus)

## Weefselfifferentiatie door endo- en exocytose

Ontwikkeling van bloedvaten is essentieel voor een organisme

- via time-laps en fluorescerende **quantum dots**
- lumen van bloedvat ontstaat door **intra- en intercellulaire uitholling** van endotheliale cellen
  - o **intracellulair**: vorming en fusie van vacuoles afkomstig van pinocytose
  - o **intercellulair**: versmelten van gelijkaardige vacuoles met aangrenzende cellen
- vorming van een intercellulaire ruimte



# Lysosomen

**Lysosomen** zijn de verteringsapparaten van de cel

- enzymen voor grote klassen biomoleculen af te breken
  - o fosfatasen, proteasen, nucleasen, lipasen, glycosidasen en sulfatasen
- omsloten door een **lipidendubbellaag**
- **luminale** zijde is sterk **geglycosyleerd** → bescherming cytosol tegen proteasen en lage pH
  - o zure pH bevordert degradatie door activatie hydrolases en denaturatie macromoleculen

## Herkomst

**Lysosomale enzymen** worden gesynthetiseerd op ER en gemodificeerd en gesorteerd in Golgi

- krijgen specifieke mannose-6-fosfaat modificatie
- via clathrine-gecoate vesikels migreren ze naar endosomale compartimenten

**Endosomale compartimenten** ontstaan door fusie van blaasjes TGN & blaasjes v. plasmamembr.

- rijpen tot late endosomen waarbij de pH daalt
- d.m.v. ATP-ase pomp daalt pH verder tot 4: activatie hydrolases → begin digestie

## Lysosomale enzymen katalyseren verteringsprocessen

**heterofagische lysosomen:** lysosomen met extracellulair materiaal

**autofagische lysosomen:** lysosomen met intracellulair materiaal

### Heterofagie in bescherming en voeding

**Lysosomen** ontstaan door fusie van fagocytotische vacuoles met vroege endosomen

**Vroege endosomen** ontstaan door fusie van receptor-gemedieerde endocytotische vesikels met pre-lysosomale blaasjes afgesplits door TGN

Na digestie worden oplosbare moleculen als nieuwe bron van nutriënten aangewend

- debris komt terecht in **residueel lichaamje**
  - o accumulatie van dit debris draagt bij aan cellulaire veroudering
  - o in witte bloedcellen wordt dit gebruikt om immuunsysteem te trainen
- debris → macrofagen → B- en T-lymfocyten → vorming geheugencellen stimuleren

### Autofagie als recyclagesysteem

ook vertering van cellulaire structuren of organellen die beschadigd of niet meer nodig zijn

- in de meeste cellen; toch prominent in rode bloedcellen
  - hier worden quasi alle organellen verwijderd door autofagie (meer O<sub>2</sub> kunnen binden)
- **uithongeren** van cellen resulteert in autofagie als wanhoospoging voor voedselvoorziening

**macro-autofagie:** organel/structuur omgeven door dubbele membraan uit ER → **autofagosoom**

**micro-autofagie:** kleinere blaasjes uit cytoplasma omhuld door enkel membraan

### Extracellulaire digestie

- lysosomale enzymen via exocytose afgeven aan ECM: bvb. door spermacel voor eicelwand

### Lysosomale opslagziekten

accumulatie van schadelijke substanties (bv. accumulatie gangliosides bij Tay-Sachs disease) <sup>door ontbreken van N-acetylhexosaminidase</sup>



# Peroxisomen

**Peroxisomen** zijn niet afkomstig van het ER en behoren dus niet tot het endomembraansysteem

- kristallijne kern van uraatoxidase
- aanwezigheid van catalase ( $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ) en ook enzymen voor vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$

## Peroxisomale functies

### 1. Waterstofperoxide metabolisme

- Oxidasen katalyseren oxideerbaar substraat  $\text{RH}_2$  met  $\text{O}_2$  ( $\text{RH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2$ )
- Catalase kan waterstofperoxide detoxificeren op 2 manieren

### 2. Detoxificatie van schadelijke componenten

**Peroxisoom** speelt belangrijke rol in detoxificatie van:

- toxische substraten ( $\text{R}'\text{H}_2$ , vb. methanol, fenol) die catalase gebruikt als peroxidase
- ontmijning van **ROS, reactive oxygen species** (zoals superoxide  $\text{O}_2^-$  of hydroxylradicaal  $\text{OH}$ )
  - o worden gevormd bij normaal metabolisme en accumuleren bij oxidatieve stress

### 3. Oxidatie van vetzuren

20-25% van vetzuurafbraak via  $\beta$ -oxidatie in peroxisomen (rest in mitochondriën)

→ primair eindproduct, acetyl-co-enzym A, naar cytosol om deel te nemen in citroenzuurcyclus

### 4. Metabolisme van stikstof-bevattende producten

**Uraat oxidase:** afbraak van uraat dat ontstaat tijdens nucleïnezuurafbraak

**Aminotransferasen:** transfer van aminogroep van aminozuren naar  $\alpha$ -ketozen

### 5. Katabolisme van ongewone substanties

→ sommige substraten van peroxisomale oxidases zijn zeldzame producten waar cel geen andere degradatiemechanismen voor heeft, zoals: D-aminozuren of xenobiotica

## Peroxisoombiogenese

**Endosomen** en **lysosomen** ontstaan door knopvorming van vesikels van TGN en plasmamembraan

↔ **peroxisomen** groeien en delen uit bestaande peroxisomen

- proteïnen voor peroxisomale functie worden gemaakt in vrije ribosomen
- post-translationeel geïmporteerd

## Take-home messages

- Het **endomembraansysteem** zorgt voor **uitwisseling van macromoleculen** tussen de cel en de extracellulaire omgeving door exo- en endocytose
- De belangrijkste componenten van het endomembraansysteem zijn het ER, het Golgi apparaat, de plasmamembraan en de lysosomen.
- Het **ruw** ER zorgt voor **synthese en maturatie van secretorische eiwitten** en lipiden. Het **glad** ER is verantwoordelijk voor drug **detoxificatie**, **glycosylatie**, **calcium** opslag en **steroïde** synthese.
- Een slecht opgevouwen proteïne wordt gemerkt met een **polyubiquitine** staart en gedegradeerd in het **proteasoom**.
- Het Golgi apparaat is een **gepolariseerd compartiment** dat instaat voor proteïne **glycosylatie** en finale **proteïnesortering**
- De biosynthese en endocytose pathways maken gebruik van **vesiculair transport**. Proteïnesortering in vesikels berust op de aanwezigheid van **signaalsequenties** en wordt gekenmerkt door **specifieke mantelproteïnes**. **GTP-asen** controleren **assemblage** en aanmeren van vesikels. **SNARE's** mediëren **vesikelfusie**.
- De **biosynthese pathway** start in het ER en heeft als **eindbestemming** de **plasmamembraan** tenzij er signalen voor **retentie**, **retrieval** of **lysosomale targeting** aanwezig zijn.
- In tegenstelling tot **constitutieve exocytose**, dat **continu** plaatsvindt, gebeurt **gereguleerde exocytose** op basis van een **extracellulair signaal**.
- Cellen nemen materiaal op via **fagocytose**, **pinocytose** of **receptor-gemedieerde endocytose**. De eindbestemming is meestal het lysosoom.
- De **balans** tussen **exo- en endocytose** bepaalt de **samenstelling** van de **plasmamembraan**. De combinatie van beide processen wordt ook gebruikt bij weefselvorming (bloedvaten).
- Lysosomen zijn **zure verteringsorganellen** die extern (heterofagie) of cel-eigen (autofagie) materiaal afbreken.
- Peroxisomen staan in voor de afbraak van peroxiden, vetzuren ( $\beta$ -oxidatie) en vreemde en/of schadelijke componenten.