**CELBIOLOGIE HOOFDSTUK 11: Het endomembraansysteem**

0. Algemeen

* Cel functioneel maken
  + moeten lipiden en membraaneiwitten herverdeeld worden over de cel of getransporteerd tot aan de rand vd cel
  + Voedingscomponenten van buitenaf opnemen en afgebroken worden
  + Gebeurt via endomembraansysteem
* Endomembraansysteem
  + = Uitgebreid netwerk van mobiele membranaire vesikels
  + Vesikels verbinden de organellen
  + Topologische equivalentie
    - Het lumen/ binnenkant heeft een equivalentie met de buitenkant/ extracellulair
      * Buitenkant vh plasmamembraan -> glycolisatie -> suiker glasrand
      * Die suikerglasrand vinden we ook aan de binnenkant vd organellen = equivalentie

1. Het endoplasmatisch reticulum

1.1 Structuur

* ER of endoplasmatisch reticulum
  + = een continu netwerk van afgeplatte zakjes, tubules en geassocieerde vesikels dat zich doorheen het cytoplasma uitstrekt
  + = perinucleair netwerk, membraan continu met buitenste kernmembraan
  + Cisternen = de membraan omsloten zakjes
  + Lumen = de omsloten ruimte
* 2 types
  + Ruw ER
    - afgeplatte vlakken + ribosomen
  + Glad ER
    - tubulaire structuur zonder ribosomen

1.2 Functie

* in ruw ER:
  + Biosynthese van proteïnen en lipiden
    - RER maakt alle integrale membraan eiwitten en de proteïnen voor excretie
    - Deze eiwitten worden tijdens de eiwitsynthese in het RER getransporteerd via cotranslationale translocatie
      * Cotranslationele translocatie (zie vorig H)
        + Signaal en SRP
        + Translocon
        + Lading bepaalt de oriëntatie
        + Start-stop signalen verankeren eiwitten in ER membraan
  + Post-translationele modificaties
    - Glycolysatie
      * Additie van suikergroepen
    - Vorming van disulfide bruggen
    - Opvouwing van polypeptideketens
    - Assemblage van multimere eiwitten
* Glad ER:
  + Drugdetoxificatie
    - wordt gemedieerd door enzym gecatalyseerde hydroxylatie (additie OH)
      * Hydroxylatie maakt drugs meer oplosbaar -> makkelijk excreteren
      * Hydroxylatie gebeurt door een lid vd cytochroom P450 superfamilie
  + Suikermetabolisme
    - glycogeenafbraak (lever)
      * Zo kan de lever de suikerspiegel vh bloed op pijl houden
  + Calciumopslag
    - Sarcoplasmatisch reticulum
      * = gespecialiseerde vorm vh ER
      * Komt enkel voor in spiercellen
      * Slaagt calcium op -> komt vrij uit SR -> spiercontracties
  + Steroïde biosynthese
    - In cellen vd bijnier, ovaria en testis

2. Het golgi complex/apparaat

* Golgi complex of Golgi apparaat
  + = een reeks afgeplatte schijfvormige membranen die op elkaar gestapeld zijn (stack)
  + = stacks van cisternae
  + Polarisatie
    - Cis-deel: CGN -> naar ER gericht, dichtste vd kern
    - Trans-deel: TGN -> verste vd kern
    - Medial-deel: centrale cisternae
      * Hier gebeuren de proteïne modificaties
* Afgelegde weg
  + ER -> Vesikels met lipiden en proteïnen -> CGN -> medial -> TGN -> endosomen, lysosomen en plasmamembraan
* 2 niet-exclusieve modellen
  + Vesiculair of stationair transportmodel
    - Elk compartiment is een stabiele structuur
    - Transport tussen de compartimenten gebeurt via vesikels
  + Cisternal maturation model
    - De totale inhoud van de cisternen rijpen gradueel -> worden omgezet van cis naar trans
    - Rijpe cisternen vallen uit elkaar ter hoogte van TGN
* Experiment: live cell imaging
  + Aantonen welk model van de 2 juist is
  + Gistcellen getransformeerd met een
    - CGN proteïne gefuseerd met groen fluorescent proteïne
    - TGN proteïne gefuseerd met rood fluorescent proteïne
  + Toont aan dat de golgi vesikels geleidelijk overgaan van groene naar rode fluorescentie
    - Bewijs van het cisternal maturation model

3. Proteïneglycolysatie

* Proteïnemodificaties vinden plaats in Golgi en ER
  + Vb: glycolysatie = toevoegen van suikergroepen aan AZresiduen
* Compartimentalisatie van proteïnemodificatie
  + Proteïnen worden gemodificeerd door gelokaliseerde enzymen
    - Gelokaliseerd in welbepaalde compartimenten vh ER of Golgi
  + Reacties gebeuren sequentieel in verschillende compartimenten van ER en Golgi
* 2 types glycolysatie:
  + O-linked:
    - Suikerbindingen aan OH van serine en Threonine
    - Sequentiële overdracht via UMP glycosides
    - Voornamelijk in golgi
  + N-linked:
    - Suikerbindingen aan N van Asparagine
    - Integrale overdracht via dolichol
    - Core in ER, complex in golgi

3.1 N-linked glycolysatie

* De initiële stappen vd glycolysatie gebeuren in ER
  + Proces
    - Alle suikergroepen bestaan uit eenzelfde kern = core oligosaccharide
    - De core wordt sequentieel opgezet met behulp van doichol fosfaat = olisaccharide carrier
    - Afgewerkte core -> overgedragen op asparagine residu
  + Cotranslationele glycolysatie
    - = glycolysatie gebeurt tijdens de proteïnesynthese
    - = helpt bij de opvouwing van proteïnen
  + Quality control opvouwing
    - Glucose trimming
      * 3-> 1 glucose
    - Calnexine/calreticuline binding
      * Glc eenheid is een signaal voor difsulfide bruggen: calnexine en calreticuline
    - Glucosidase
      * Oude glucose verwijderen na dissociatie
    - Glycogyltransferase (UGGT)
      * herkennen van fout opgevouwen proteïnen -> toevoegen van nieuwe glucose eenheid om opnieuw te proberen
      * Fail: indien onmogelijk om juist op te vouwen -> proteïne merken met een polyubiquitine tag (kiss of death) -> gedegradeerd in proteasoom)
* Afwerking in golgi-complex
  + Enkele groepen vd N-linked glycolysatie worden verwijderd (trimming)
  + Additie van complexe suikergroepen
  + In trans-golgi
    - O-linked glycolysatie

4. Vesiculair transport

* Eiwitten aangemaakt in RER
  + Worden verder gemodificeerd in Golgi en glad ER
  + Daarna naar hun definitieve bestemming -> via vesiculair transport!
    - ER zelf
    - Golgi
    - Endosomen
    - Lysosomen
    - Plasmamembraan
* Zowel de biosynthetische pathway als de endocytose pathway maken gebruik van vesiculair transport

4.1 De basisprincipes van vesiculair transport

* Vesikels gekenmerkt door mantelproteïnes
* Monomere GTP-asen controleren assemblage vesikels
* Signaalsaquenties/cytoplasmatische sequenties bepalen sortering
* Rab-GTPasen gidsen het aanmeren van vesikels
* SNARE’s katalyseren fusie

4.1.1 Mantelproteïnes

* Mantelproteïnen
  + Vesikels hebben aan hun cytoplasmatische zijde mantelproteïnen
  + 2 functies
    - Mechanische functie: knopvorming
      * Vlakke membraan ombuigen tot een vesikel
    - Specificiteit: herkenning en sortering
  + Types
    - COPII-gecoate vesikels:
      * Bewegen materiaal van ER naar golgi
      * = **anterograad transport** (COP = coat proteïn)
    - COPI-gecoate vesikels:
      * Bewegen lipiden en proteïnen van golgi terug naar ER en van TGN naar CGN; endocytosis
      * = **retrograad transport**
    - Clathrin-gecoate vesikels:
      * Betrokken bij transport van TGN naar endosomen en lysosomen
      * Transporteren materiaal vd plasmamembraan naar cytoplasmatische compartimenten via de endocytose weg
    - Caveolae
      * Betrokken bij endocytose en transcytose
      * = lipid rafts

4.1.2 GTP-Asen controleren assemblage

* Proces
  + In iedere mantel van een vesikel zit een klein GTP-ase -> controleert de afbraak en assemblage van de coat
  + Een membraangebonden eiwit: Sec 12 (=Sar1-GEF) (GEF = guanine exchange factor) stimuleert de uitwisseling van GDP voor GTP
  + GTP-binding aan sar1 zorgt voor blootstelling vd hydrofobe staart vh sar 1
    - Staart plooit naar buiten -> verankerd zich
  + Door deze insertie in ER -> initieert GTP de vorming van COPII vesikel
  + COII vesikel komt los vh membraan -> zal door hydrolyse vh GDP -> COII uiteenvallen
  + Mantelproteïnes herkennen cytoplasmatische sequenties (cargo of receptor)
  + GTP-ase activiteit herstelt originele conformatie (timer)

4.1.3 Rab GTP-Asen gidsen aanmeren

* Rab-proteïnen = monomere rab-GTP-asen
  + In rust zijn ze gebonden met een GDP nucleotide
  + Bij activatie wisselen ze oiv een GEF hun GDP uit tegen GTP -> worden actief
  + Op doelmembraan: Rab-effector
    - Bevordert de GTP-ase activiteit
    - Drijft zo het aanmeren vh vesikel met Rab-GTP op voort
* Specificiteit vd aanmering door interactie tussen Rab-GTP en Rab effector match

4.1.4 SNARE’s medieren/bepalen fusie

* Specificiteit en katalyse van fusie
  + Hechting v/e vesikel aan een membraan gebeurt door de vorming v/e fusiecomplex tussen V-snare en T-snare proteïne
    - V= vesikel; T= target
  + V en T-snares verstrengelen -> overwinnen een energetische barrière om water te kunnen verplaatsen -> membraanfusie
* Recuperatie van receptoren en snare’s
  + Na fusie V en T-snares opnieuw gescheiden mbv een NSF eiwit en een groep oplosbare NSF bindende proteïnen
  + Scheiding = ATP afhankelijk
  + V-snares nemen dan oude plaats in dmv retrograde transport

4.2 De biosynthetische pathway

* Proteïne sortering begint in ER en in vroege compartimenten vh golgi
* Finale sortering gebeurt ter hoogte vh TGN
  + Hier worden lipiden en proteïnen in vesikels verpakt -> bestemmingen

4.2.1 Retentie en retrieval

* Bewaring compositie compartimenten en recyclage (e.g. SNARE’s)
  + Belangrijk dat de compositie van beide organellen bewaard blijft -> daarom compartiment specifieke proteïnes terugbrengen en behouden
* Retentie -tag RXR
  + = behouden van de proteïnen/ vasthouden
* ER-Retrieval pathway
  + = het terugbrengen van materiaal via retrograad transport van CGN naar ER
  + Ontsnapte moleculen uit ER kunnen herken worden dmv Retrieval tag
    - = KDEL of KKXX sequentie -> conformationele wijziging -> via COPI terug naar ER
  + Vb: om Snare proteïnen te recupereren
* Golgi retentie:
  + hydrofobe domeinen
    - er is een correlatie tussen de lengte vd hydrofobe membranen en de locatie

4.2.2 Lysosomale targeting

* Tijdens beweging door ER en vroege golgi worden lysosomale enzymen geglycoliseerd
  + Een zeer specifieke modificatie vd suikergroepen richt de proteïnen naar lysosomen
  + Hierdoor vorming van Mannose-6-fosfaat residuen
* Dissociatie door verzuring
  + Zorgt ervoor dat lysosomale enzymen loskomen van hun receptor
* Inclusion cell disease:
  + =kleuters met vreemde verhoudingen
  + Als mannose-6 fosfaat aanwezig is -> proteïne gaat naar lysosoom
  + Als mannose-6 fosfaat afwezig is -> proteïne uitgescheiden in intracellulair milieu -> weefsels aantasten

4.2.3 Exocytose (secretorische pathway)

* Exocytose
  + = Materiaal van ER en golgi verpakken in blaasjes die vervolgens versmelten met de plasmamembraan
    - Tijdens versmelting wordt binnenste membraan één met buitenste extracellulaire lipidenlaag vd plasmamembraan
* 2 soorten
  + Constitutieve exocytose
    - = continue stroom naar membraan (balanceert endocytose)
    - Na vesikelvorming aan TGN -> vesikels rechtstreeks naar celopp -> fuseren met plasmamembraan om inhoud te lossen via exocytose
    - = ongereguleerd proces
    - = geen signalen voor nodig
  + Gereguleerde exocytose
    - = vrijstelling van secretorische vesikels door signaal
    - Secretorische blaasjes zullen accumuleren in de cel en pas fuseren met plasmamembraan in aanwezigheid van een signaal!
* Voorbeeld van gereguleerde exocytose
  + Neuronen stellen neurotransmitters (signalen) vrij aan synaps
    - Synaptische blaasjes zitten vol neurotransmitters -> zijn verankerd in membraan
    - Fusie wordt tegengehouden
    - Wanneer calcium vrijkomt -> vesikelfusie treedt op (duwtje/ signaal nodig)
  + Mast cellen secreteren histamine wanneer ze worden gestimuleerd (allergische reactie)

4.3 De endocytose pathway

* Endocytose pathway
  + = Materiaal vanuit plasmamembraan insnoeren en opnemen
  + Tegengestelde van exocytose -> zorgt voor steady-state compositie vd plasmamembraan
* Functies:
  + Voedselopname
  + Modificatie membraancompositie
  + Regulatie extracellulair milieu
* Vormen:
  + Pinocytose (<150 nm): drinken
  + Fagocytose (>500 nm): eten
  + Receptor-gemedieerde endocytose

4.3.1 De fagocytose

* Fagocytose
  + = de opname van grote partikels, organellen, cellen
  + Proces gaat gepaard met
    - vorming van membraanuitstulpingen (=pseudopodia) die het object omarmen
    - vorming van een fagocytotische vacuole (=fagosoom)
    - een mobilisatie vh cytoskelet (om te eten)
  + fagosoom -> lysosoom
  + digestie

4.3.2 Receptor-gemedieerde endocytose of Clathrine afhankelijke endocytose

* Oplosbare moleculen kunnen worden opgenomen uit extracellulaire milieu
  + via receptor-gemedieerde endocytose of clathrine afhankelijke endocytose (clathrine-gecoate vesikels)
* Proces:
  + Receptoren in plasmamembraan binden liganden en bewegen rond tot ze gespecialiseerde regio vh membraan terechtkomen = coated pit
  + Coated pit zal invagineren en een gecoated vesikel of blaasje maken
    - = clathrine gecoate vesikel
  + Na verwijderen vd clathrine mantel -> naakte vesikel fuseert met blaasjes vh TGN
    - Vormen zo vroeg endosoom -> laat endosoom -> lysosoom
  + Opties receptor
    - Receptor recyclage
      * Receptor kan gerecycleerd worden naar de plasmamembraan
    - Degradatie
      * Receptor worden in de lysosomen gedegradeerd
    - Transcytose
      * Receptoren worden naar een andere regio vh plasmamembraan gevoerd -> en daar opnieuw gesecreteerd
* Clathrine gecoate vesikels
  + Hebben een dubbele mantel van multimere proteïnes
    - Binnenste laag: adaptor proteïnecomplexen
    - Buitenste laag: Clathrine vorm triskelion structuren
  + Vormt een triskelion structuur -> vormen polygonaal netwerk
  + Tussen clathrine skelet en membraan vh blaasje is een ruimte
    - Bevat adaptor proteïnes
      * Induceren polymerisatie van clathrine
      * Induceert membraanbuiging
  + Proces
    - Cargo bindt transmembraan receptors -> zorgen dat juiste macromoleculen aanwezig zijn
    - Cytoplasmatisch receptordomein bindt adaptines dat clathrine rekruteert
    - Vorming vereist ATP en drijft membraaninstulping
    - Chlathrine polymerisatie buigt membraan
      * Dynamine windt zich rond nekregio en verbruikt GTP voor constrictie
      * Vrij vesikel verliest mantel en fuseert met endosoom

4.3.3 Clatherine onafhankelijke endocytose

* Pinocytose
  + = clathrine onafhankelijke pathway
  + = vloeistof-fase endocytose
  + = opname van extracellulaire vloeistof op niet specifieke wijze
* Caveolae
  + = clathrine onafhankelijke pathway
  + = kleine flesvormige instulpingen vh plasmamembraan aangereikt met cholosterol en lipid rafts
  + Aan cytoplasmatische zijde caveolines -> vormen caveosomen (= neutrale endosomale vesikels)
  + = gevaarlijke pathway
    - Voor virussen, gevaarlijke stoffen etc

4.4 Weefseldifferentiatie door endo- en exocytose

* Bloedvatenvorming essentieel voor overleven meercellig organisme -> bepaald ontwikkeling organen
  + Vasculaire lumenvorming door intra- en intercellulaire vesikelfusie

5. Lysooihùsomen

5.1 Lysosomen compartimentaliseren het verteringsproces

* Lysosoom
  + = Verteringsorganel vd cel
  + Bevatten alle soorten enzymen (hydrolasen) om macromoleculen af te breken
  + Omsloten door een enkel membraan
    - Luminale zijde is sterk geglycolyseerd
      * Beschermt de lipiden vd membraan tegen lysosomale eiwitten en de zure omgeving (pH = 4-5)
  + Zure Ph bevordert enzymatische degradatie
  + Ontstaan uit fusie TGN en vesikels endosomen

5.2 Lysomale enzymen katalyseren verteringsprocessen

* Typische lysosomen:
  + Heterofagische lysosomen = bevatten het extracellulair materiaal
    - Betrokken in fagocytose en receptor-gemedieerde endocytose (heterofagie)
  + Autofagische lysosomen = bevatten het intracellulair materiaal
    - Betrokken bij autofagie
* Heterofagie:
  + Endocytose
    - Degradatie van vreemd materiaal bekomen door fagocytose en receptor-gemedieerde endocytose
  + Voeding
  + Bescherming
  + Residueel lichaam
    - stoffen die niet verteerd kunnen worden vormen residueel lichaam
    - Indicatie voor celouderdom
* Autofagie:
  + Vertering van cel-eigen materiaal
    - Organellen die niet meer nodig zijn of beschadigd zijn
  + Recyclage
  + 2 soorten:
    - Macro-autofagie = organel wordt omgeven door dubbele membraan en er vormt zich een autofagosoom
    - Micro-autofagie = kleinere blaasjes worden gevormd van stukjes cytoplasma met slechts een enkel membraan
  + Zeer prominent aanwezig in rode bloedcellen
    - Hier worden quasi alle organellen verwijderd door autofagie
  + Bij uithongering van cellen
    - Wanhoopspoging om zichzelf te voederen van eigen celmateriaal

6. Peroxisomen

* Peroxisoom
  + = kleine degradatiefabriekjes
  + = Behoren niet tot het endomembraansysteem
  + = variabele organellen met een kristallijne kern van uraatoxidase
* Peroxisomale functies
  + Waterstofperoxide metabolisme
  + Detoxificatie schadelijke componenten
    - Als peroxidase kan het catalase verschillende toxische substraten (RH2) gebruiken
    - Vb: methanol, fenol, ROS
  + Vetzuuroxidatie
    - Vetzuurafbraak door B-oxidatie in de peroxisomen
  + Uraatoxidatie
    - Noodzakelijk voor de afbraak van uraat
  + Xenobiotica katabolisme
    - Katabolisme van ongewone substanties
* Waterstofperoxide metabolisme
  + Di-oxigenases (reacties met O2)
    - Oxidasen katalyseren de reactie v/e oxideerbaar substraat RH2 met O2
    - RH2+O2-> R+ H2O
  + Mono-oxigenases (reactie met O)
    - SH+RH2+O2 -> SOH + R+ H2O
  + Catalase:
    - Het gevormde waterstofperoxide wordt door catalase gedetoxifieerd op 1 van de 2 manieren
      * Door reactie van 2H20 moleculen
      * Of het treedt op als peroxidase en gebruikt het een organische molecule als elektrondonor om H2O2 te reduceren
* Biogenese:
  + Peroxisomene hebben noch DNA noch ribosomen
  + Vermenigvuldiging door deling
  + Proteïne targeting: PTS1/2, SKL (Ser-Lys-Leu)
  + Peroxine (PEX) gemedieerd transport
  + ATP vereisend
* Extra biogenese
  + Endosomen en lysosomen ontstaan door knopvorming van vesikels van TGN en plasmamembraan
    - <-> Peroxisomen groeien en delen uit bestaande peroxisomen
    - Proteïnen die nodig zijn voor de peroxisomale functie worden gemaakt in vrije ribosomen en post-translationeel geïmporteerd vanuit het cytoplasme
    - Transport = ATP vereisend proces en wordt bijgestaan door membraangeboden peroxines die een porie vormen en één van de 2 perixosomale targeting signalen herkennen, hetzij een C-terminaal SKL, hetzij een N-terminaal signaal

6.1 Peroxisoomdysfunctie veroorzaakt pathologieën

* Zellweger (cerebrohepatorenal syndroom)
  + Defectief import door mutaties PEX genen
    - Lege/ghost peroxisomen
    - Accumulatie lange en vertakte vetzuren
* ALD (adrenoleukodystrofie)
  + ABC-D1 mutatie belet vetzuurtranslocatie
    - Accumulatie zeer lange vetzuren
    - Mentale retardatie

7. Kernpunten

* Endomembraansysteem -> uitwisseling macromoleculen tussen cel en extracellulaire omgeving door endo- of exocytose
* Belangrijkste componenten v/h endomembraansysteem zijn het ER, golgi, plasmamebraan en lysosomen
* Ruw ER -> synthese en maturatie secretorische eiwitten en lipiden.
* Glad ER -> drug detoxificatie, glycolysatie, calcium opslag en steroïde synthese
* Slecht opgevouwen proteïne opgemerkt met polyubiquitine staart en gedegradeerd in proteasoom
* Golgi is gepolariseerd compartiment -> proteïne glycolysatie en finale proteïnesortering
* Biosynthese en endocytose pathways gebruiken vesiculair transport. Proteïnesortering berust op aanwezigheid van signaalsequenties en gekenmerkt door mantelproteïnes. GTP-asen controleren assemblage en aanmeren vesikels. SNARE’s mediëren vesikelfusie.
* Biosynthetische pathway start in ER en eindbestemming plasmamebraan, tenzij signalen voor retentie, retrieval of lysomale targeting aanwezig zijn
* Constitutieve exocytose -> continu plaatsvindt; gereguleerde exocytose -> op basis van extracellulair signaal
* Cellen nemen materiaal op via fagocytose, pinocytose of receptor-gemedieerde endocytose; eindbestemming meestal lysosoom
* Balans tussen endo- en exocytose bepaalt samenstelling plasmamebraan. Combinatie beide processen bij weefselvorming (bloedvaten)
* Lysosomen -> zure verteringsorganellen die extern (heterofagie) of cel-eigen (autofagie) materiaal afbreken
* Peroxisomen -> afbraak peroxiden, vetzuren (β-oxidatie) en vreemde en/of schadelijke componenten