

Tráfego Intracelular (parte 1)

Rafael H.F. Valverde

valverde@nano.ufrj.br

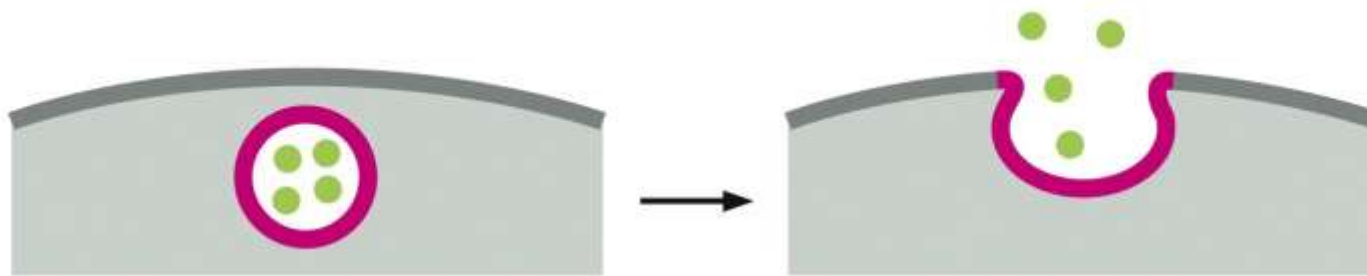
Laboratório de Biomembranas G-37

Biologia Celular para Nanotecnologia
IBCCFº UFRJ

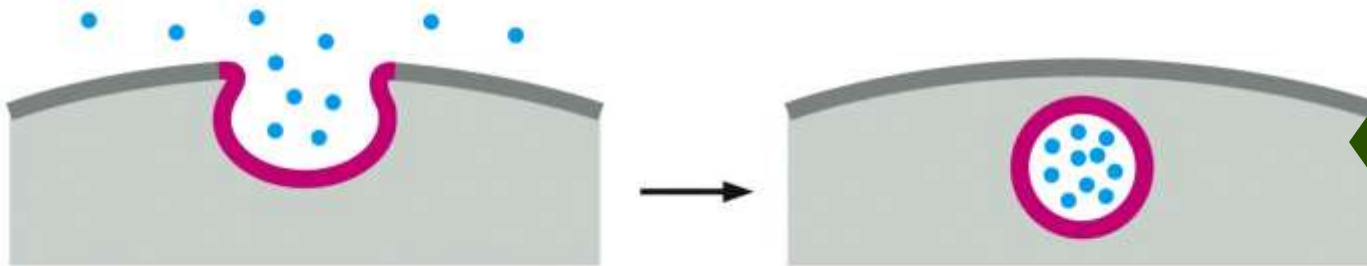
Maio – 2022



Exocitose e Endocitose



(A) **exocytosis**



(B) **endocytosis**

lúmen de uma **vesícula endossomal** tem composição igual a dos compartimentos ou a do **meio extracelular**

constante ajuste na composição da membrana respondendo ao meio externo

adquirir alimento, secretar substâncias (**exocitose**), entregar novos componentes e excreção

trechos da **membrana plasmática** podem ser removidos (**endocitose**) formando **endossomas**

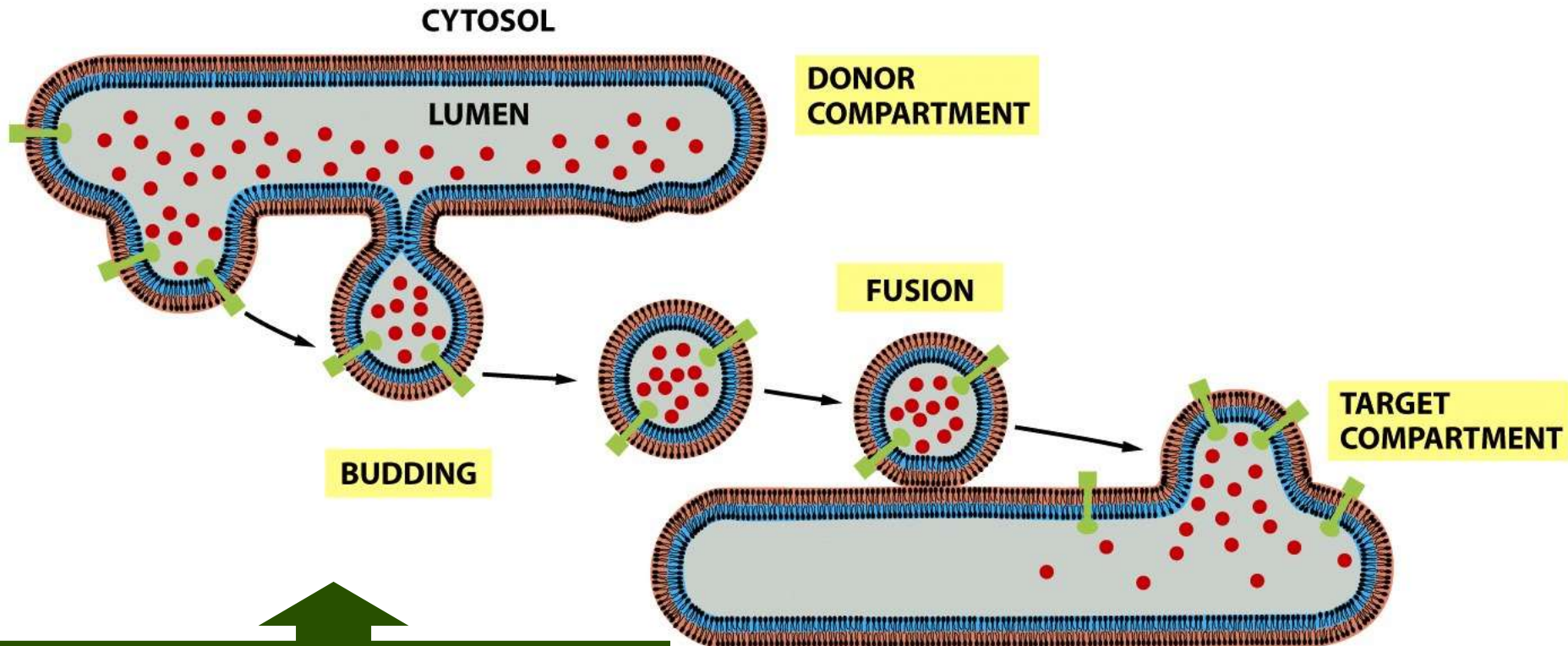
conteúdo é reciclado ou endereçado a outro compartimento (ex: **lisossoma**)

endocitose captura diversos nutrientes (ex: **colesterol**, **ferro**, lipídios)

O Transporte Vesicular

via secretória/biosintética é direcionada do RE → Golgi → superfície celular (e lisossoma)

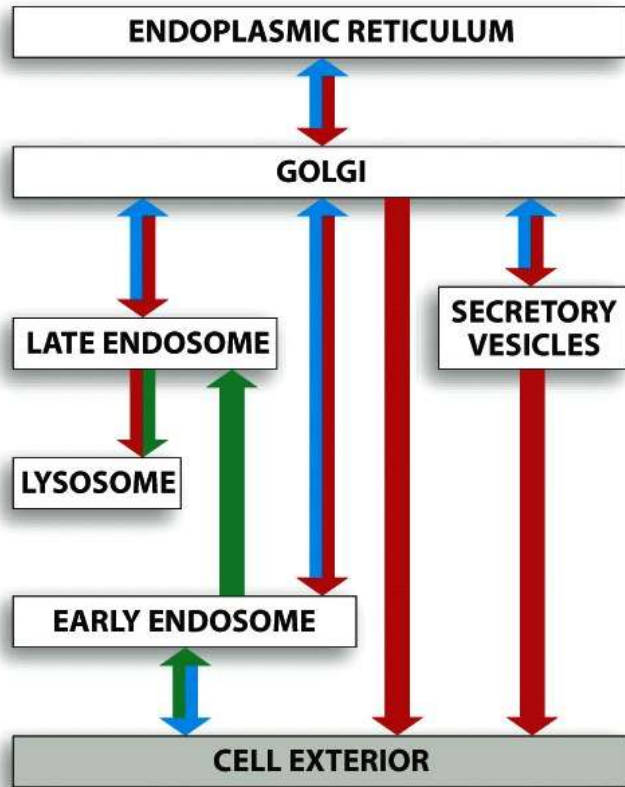
via endocítica no sentido membrana plasmática → meio intracelular



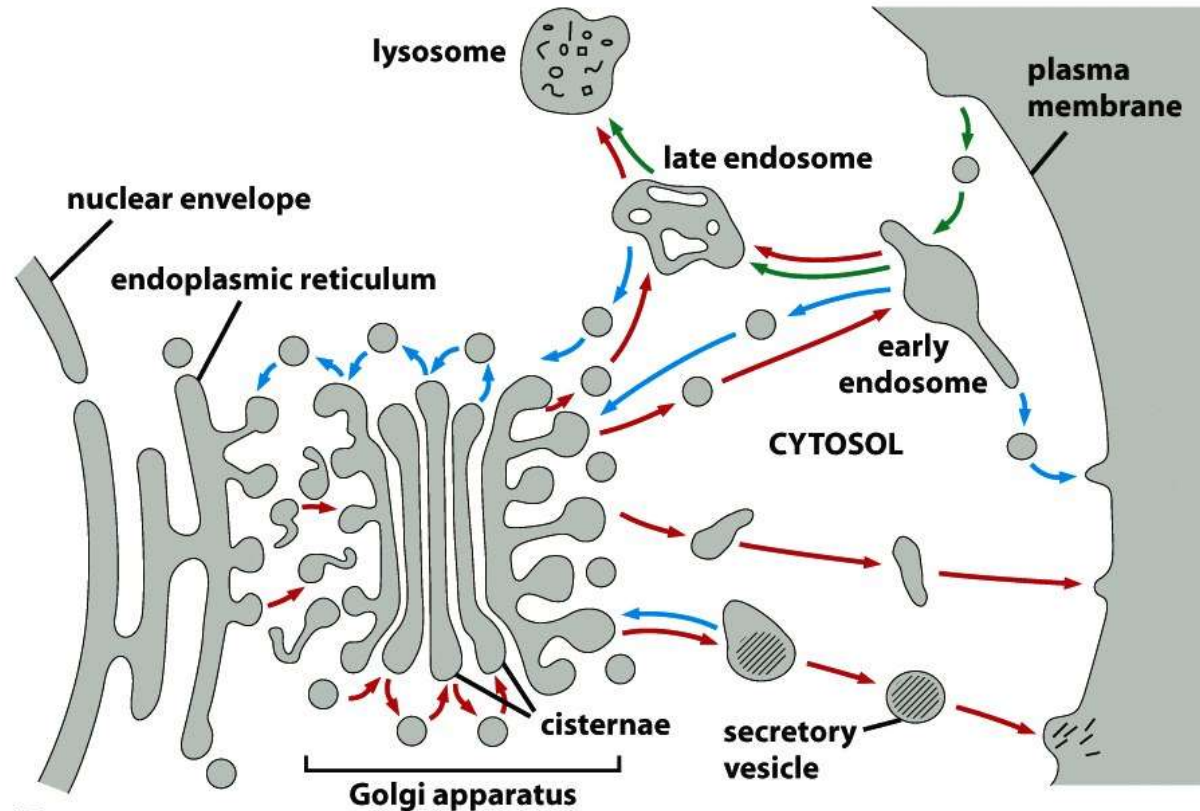
vesículas brotam de um compartimento e se fusionam a outro específico carregando moléculas solúveis e de membrana (**cargas**)

permitem a célula **secretar**, se alimentar e remodelar a membrana

Mapa das Vias Secretórias e Endocíticas



(A)



(B)

fluxo de membrana entre
compartimentos é balanceado

reconstituição da composição
lipídio/proteica dos compartimentos

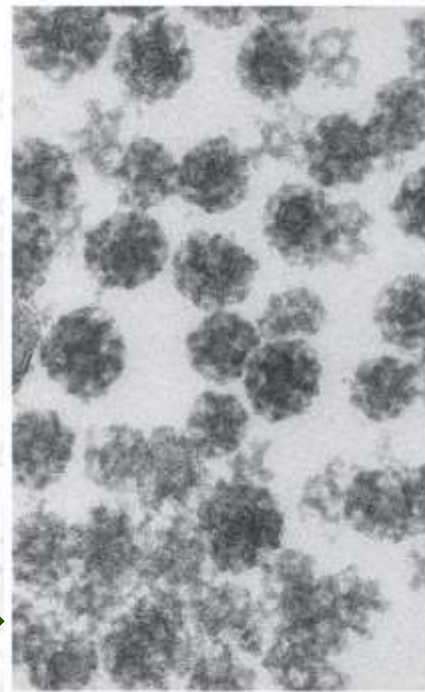
tráfego vesicular é específico em relação a carga e
compartimento destino

ex: **vesícula** saindo do **Golgi** para a **membrana
plasmática** deixa proteínas residentes do **Golgi** e se
fusiona apenas com a **membrana plasmática**

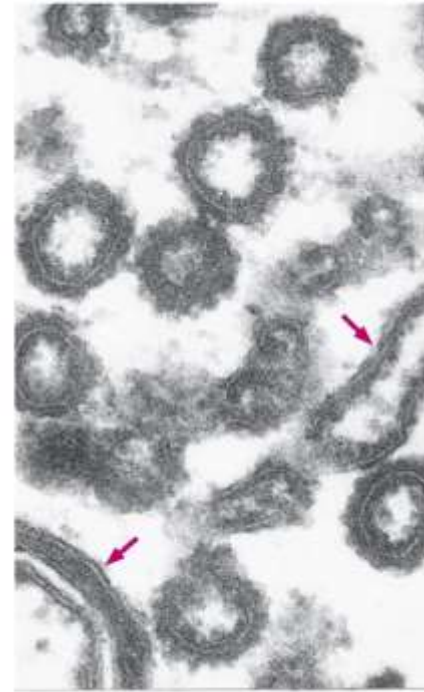
Microscopia do Coat de Clatrina, COPI e COPII

como compartimentos mantém a identidade molecular e separam moléculas em domínios de membrana distintos para formar **vesículas**?

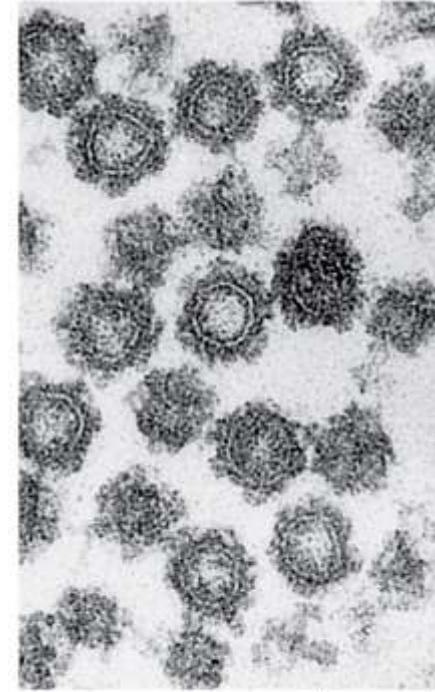
três tipos de **coat** distinguidos pela proteína que os forma



(A) clathrin



(B) COPI



(C) COPII 100 nm

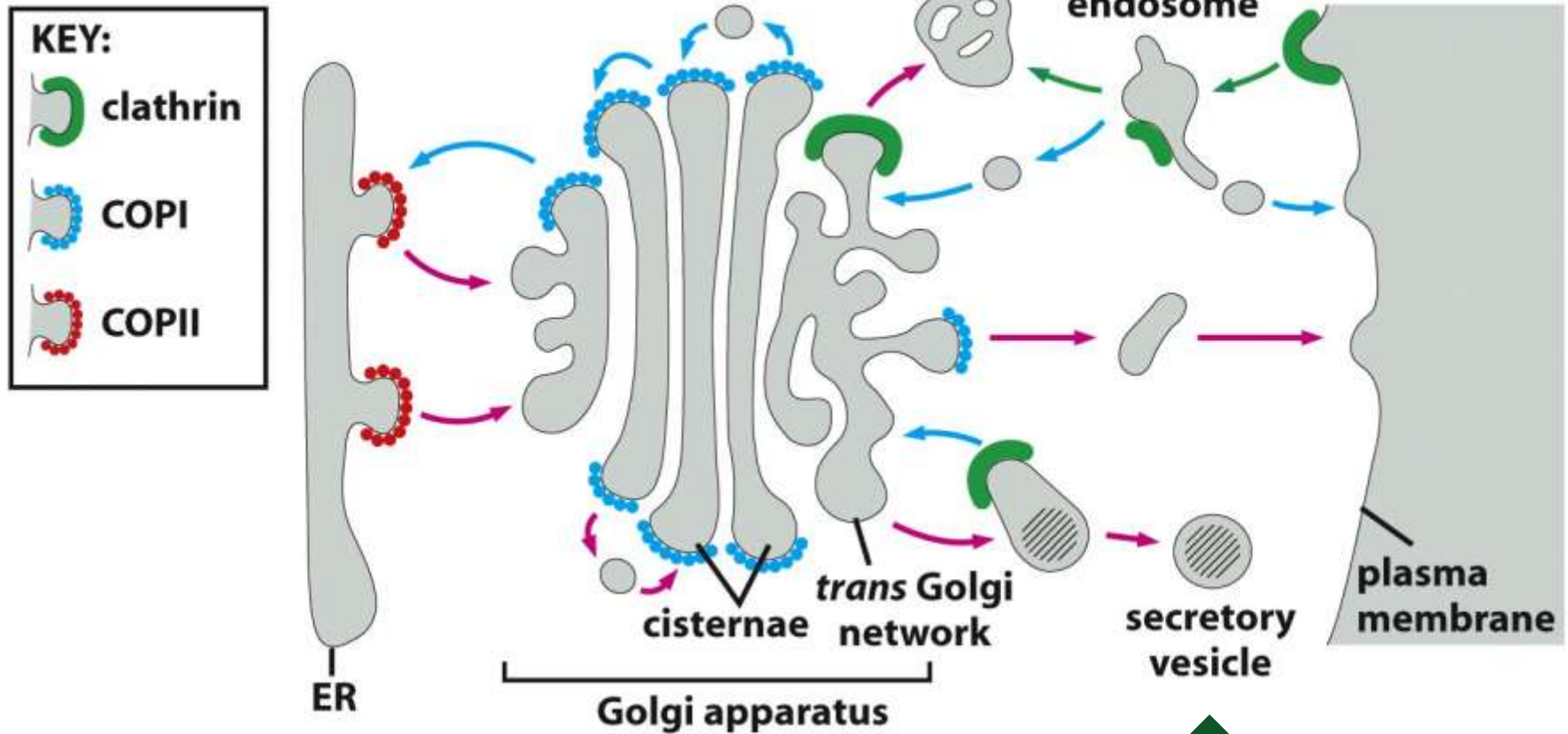
maioria das **vesículas de transporte** surge de regiões especializadas

revestimento proteico citosólico da **vesícula** (**coat**):
desmontado antes da fusão da **vesícula** ao
compartimento destino

coats tem duas funções:

01. **concentrar proteínas** de membrana específicas em uma região de membrana (que formará a **vesícula**)
02. **moldar a vesícula** (deformação em forma de cesta)

O Uso dos Diferentes Coats no Tráfego Vesicular



cada tipo de **coat** é usado em uma via de transporte
vesículas revestidas por **clatrina** transitam entre o
Golgi e a **membrana plasmática**

vesículas revestidas por **COPI** e **COPII** são encontradas
no tráfego entre o **RE** e o **Golgi** (direções opostas)

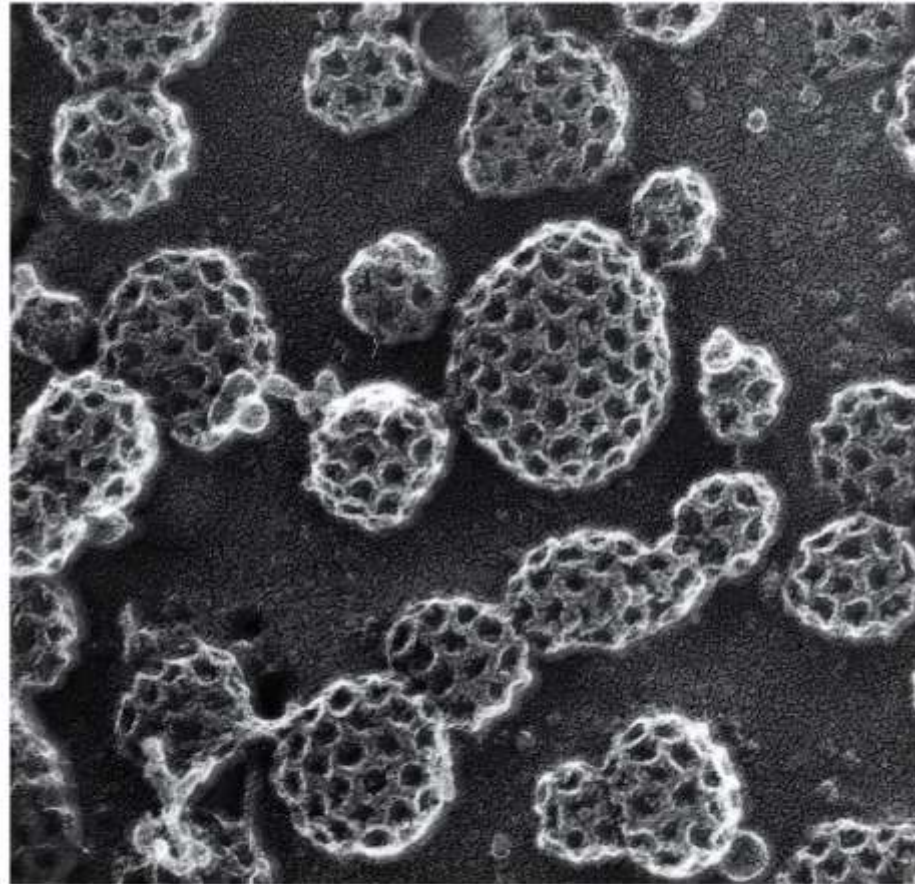
As Vesículas Revestidas por Clatrina

o principal componente de um **coat de clatrina** é a própria **clatrina**

clatrina tem três cadeias polipeptídicas pequenas e três grandes: **triskelion**

arranjos hexagonais do **coat de clatrina**
(criofratura)

“cesto” deforma a membrana da **vesícula**



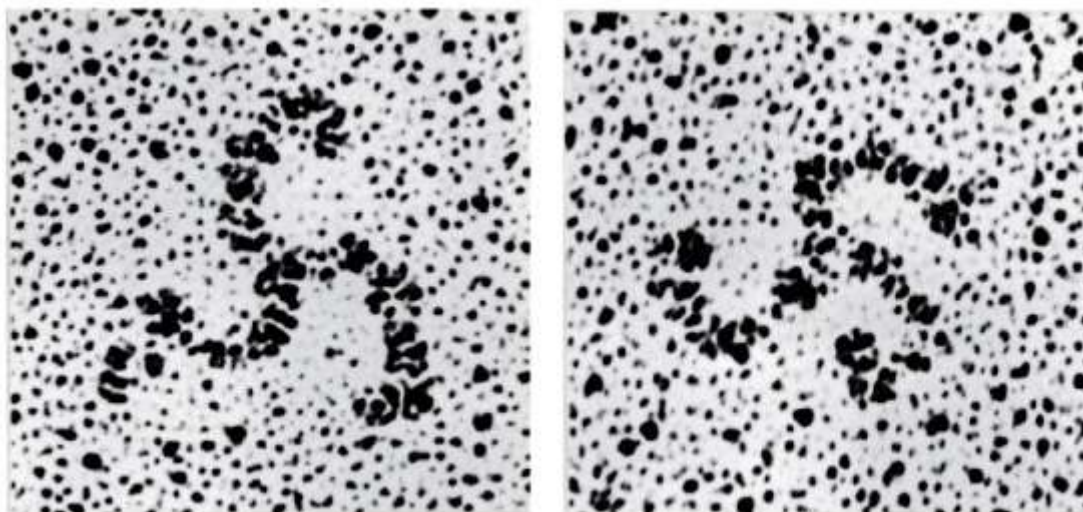
0.2 μm

Estrutura dos Coats de Clatrina

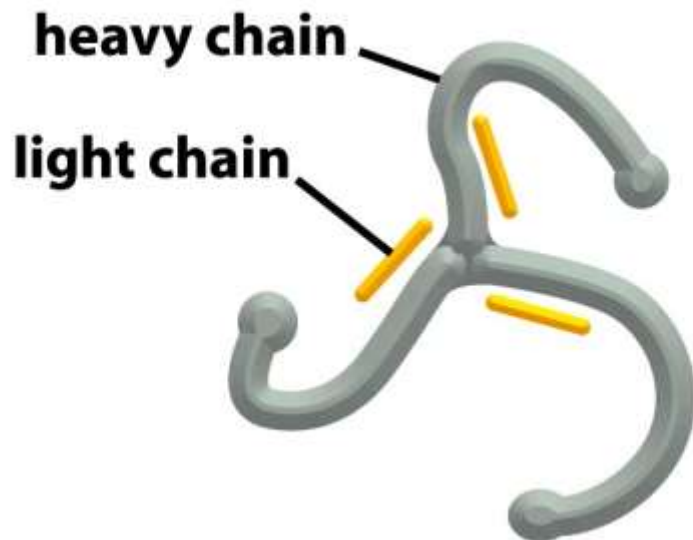
mesmo *in vitro*, sem membranas, **triskelions** se associam formando os **coats** (estrutura geométrica de cesto)

36 **triskelions**: 12 pentágonos e 6 hexágonos

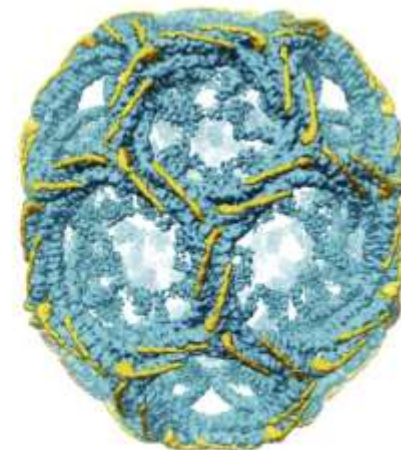
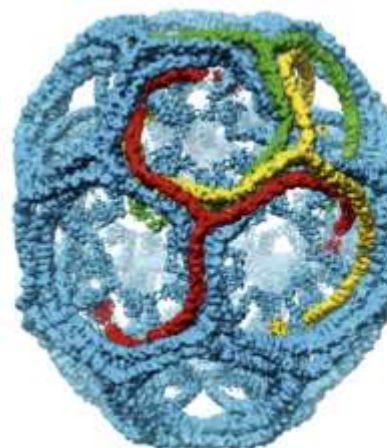
N-terminal voltado para dentro



(A)

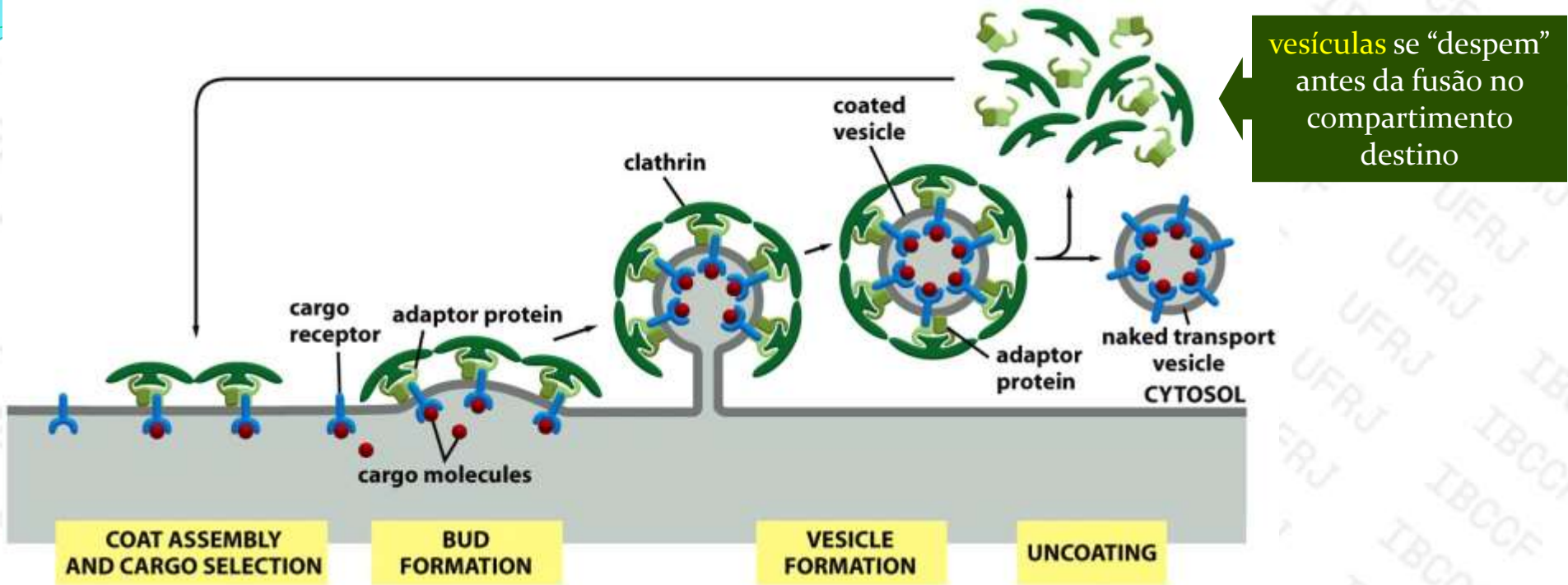


(B)



25 nm

A Formação de um Coat de Clatrina



proteínas adaptadoras são componentes importantes de **coats**: conectam o coat a **receptores** de membrana vesiculares

cada **proteína adaptadora** faz interações com **receptores** específicos (seleção da **carga**!)

vesículas de **clatrina** brotando de compartimentos \neq s usam \neq s **proteínas adaptadoras**: recrutam diferentes **receptores/cargas** (especificidade)

montagem da **clatrina** e **ptns adaptadoras** no lado citosólico da membrana provoca a formação de uma vesícula

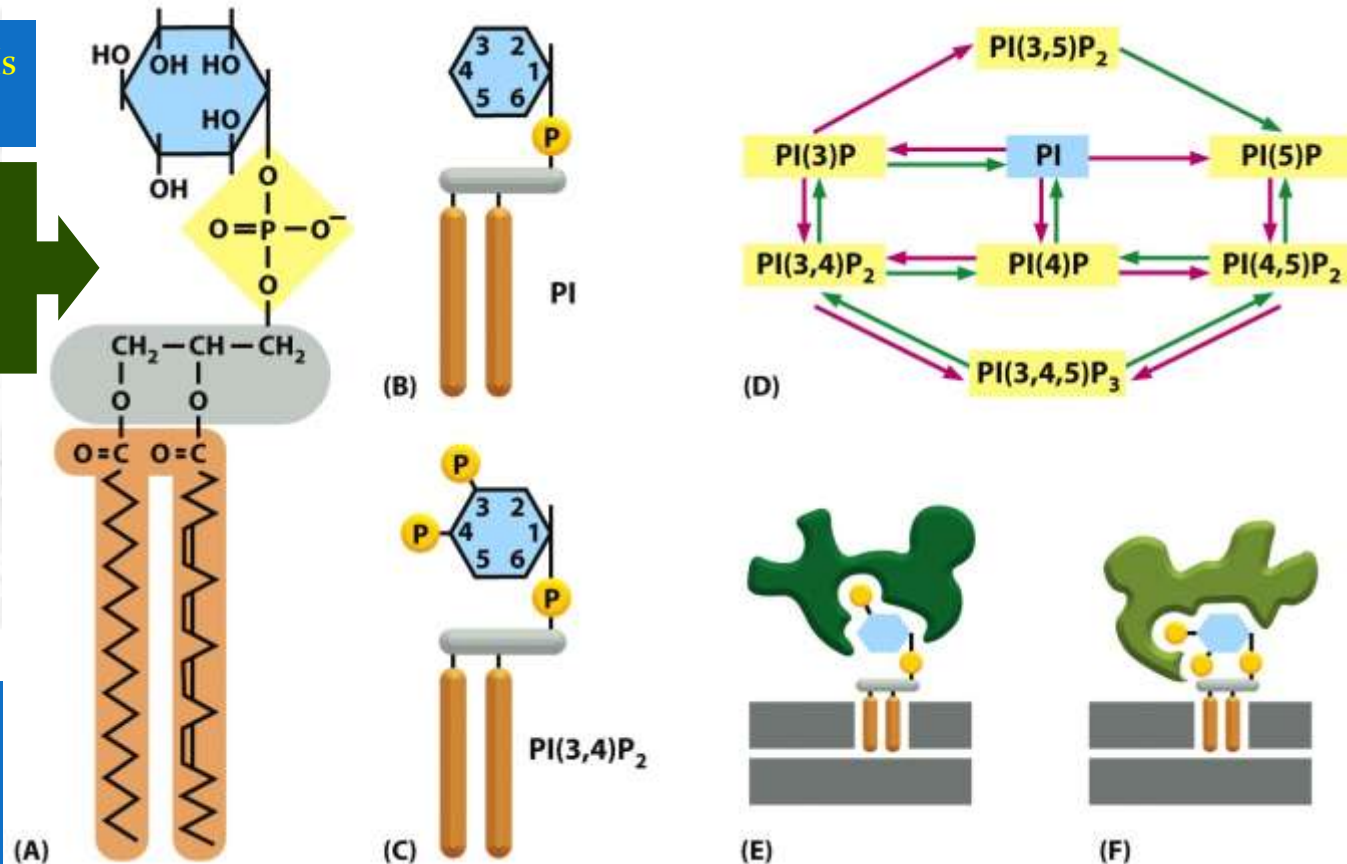
Fosfatidilinositol marca as Organelas e Domínios de Membrana

apesar da baixa concentração, **PIs** tem papel importante

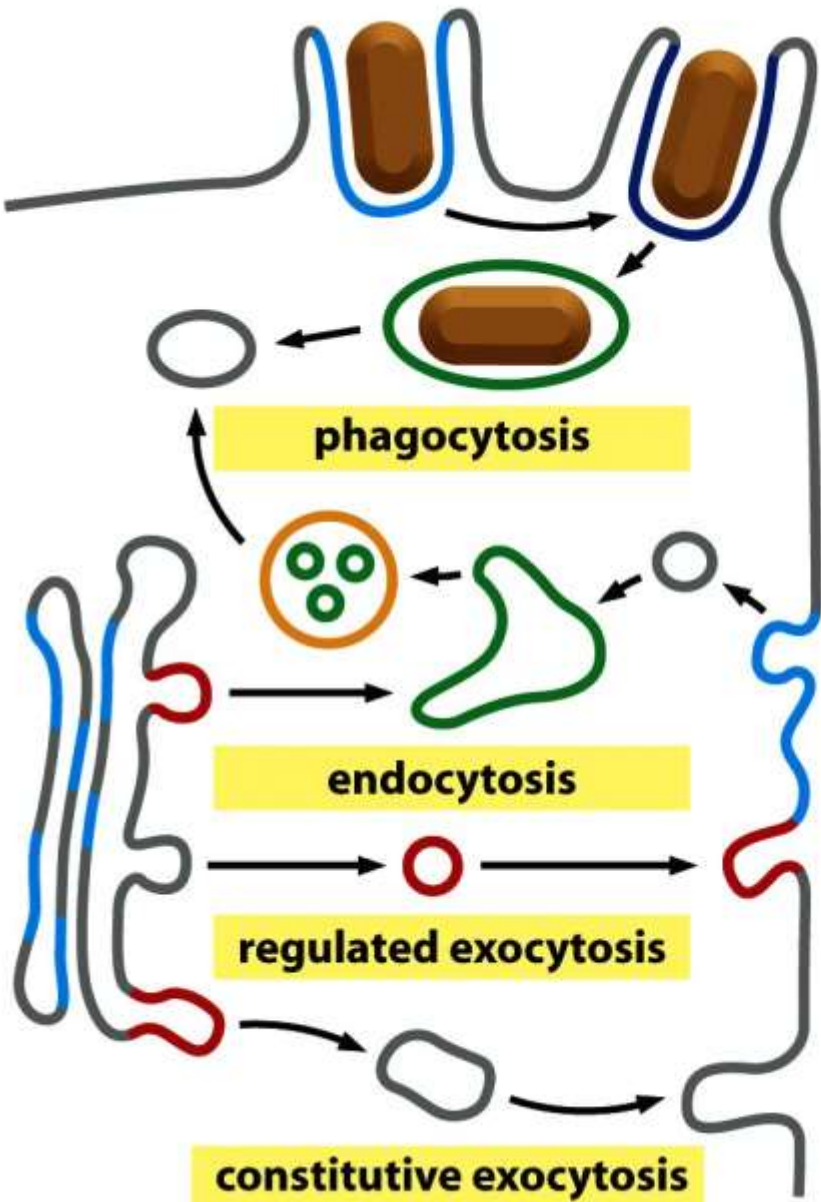
fosfatidilinositol (PI) pode ser **fosforilado** (por **quinasas**) em diferentes posições do anel de inositol

organelas ≠ tem **PIs**, **quinasas** e **fosfatases** diferentes

proteínas envolvidas no tráfego reconhecem e se ligam a **PIs** fosforilados (modulação da ligação destas proteínas)



Localização Diferenciada dos PIs



KEY:

PI(3)P

PI(4)P

PI(4,5)P₂

PI(3,5)P₂

PI(3,4,5)P₃

ex: **vesículas secretórias** são ricas em **PI₄P**

cinase residente na membrana plasmática fosforila de novo o anel de inositol (forma **PI(4,5)P₂**)

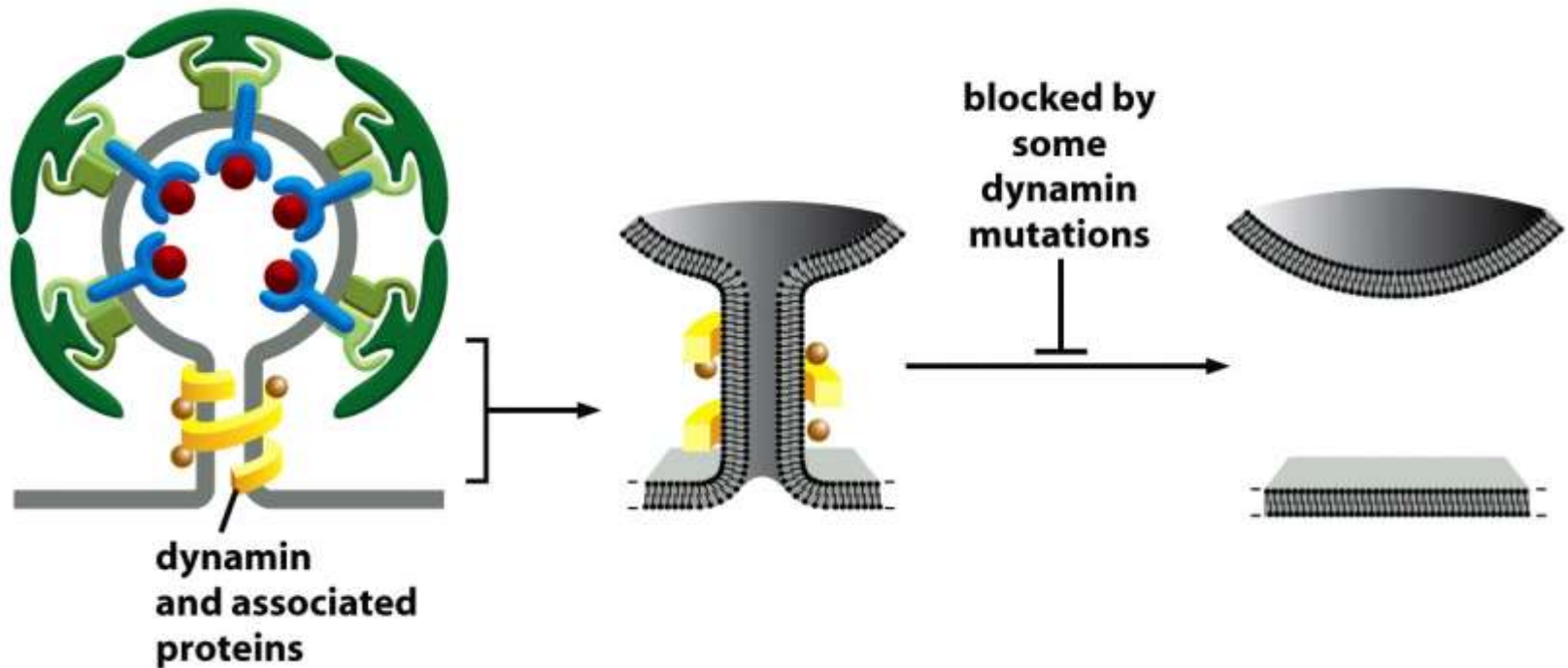
levando ao recrutamento de **proteínas adaptadoras** específicas

PI's dependem da presença de **cinases** e **fosfatases** em cada compartimento

presença de um tipo particular de **PIP** recruta proteínas específicas

ajudam a regular a formação das **vesículas** e outros passos no transporte vesicular

Proteínas Citoplasmáticas Regulam o Brotamento das Vesículas



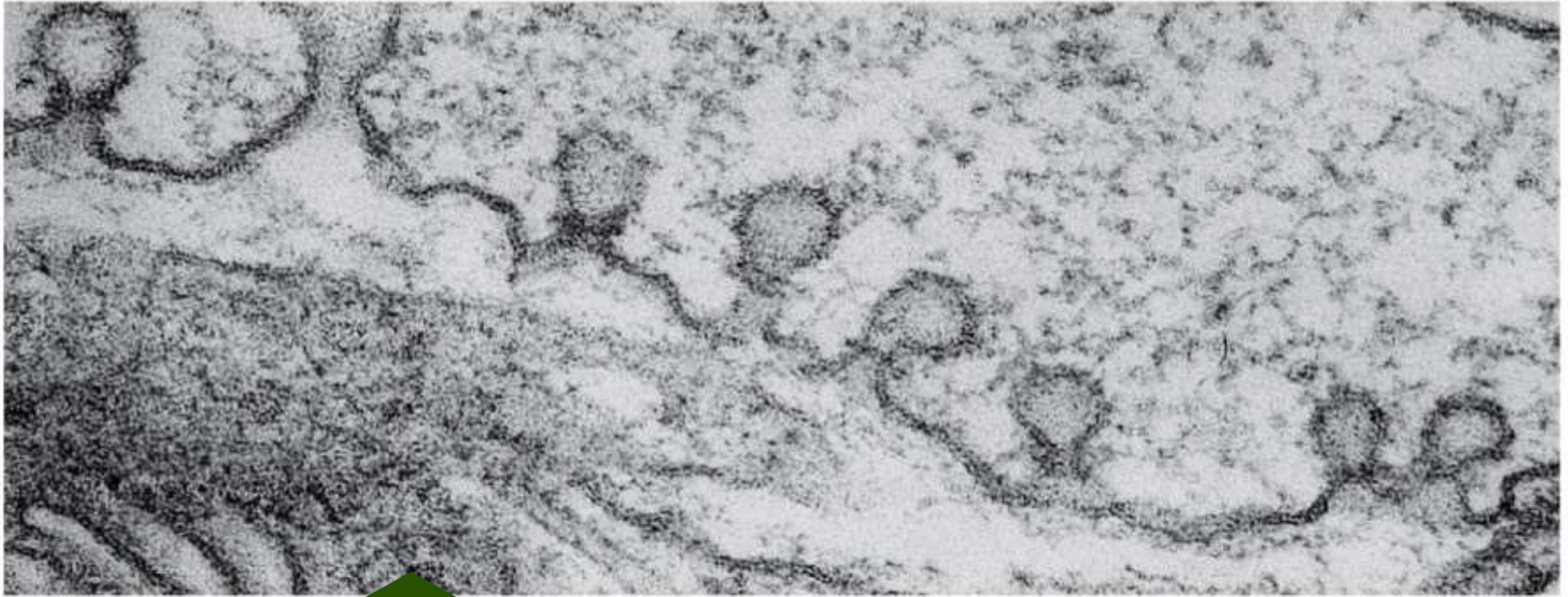
quando um broto é formado pela membrana revestida de **clatrina**, **dinaminas** formam um anel em torno das membranas adjacentes

dinaminas são atraídas por **PI(4,5)P₂** e quebram **GTP** no "estrangulamento" da membrana

membranas aproximadas se fusionam, selando a **vesícula**

coat de clatrina é perdido logo após liberação da vesícula (ação de fosfatases de **PIPs** e **Hsp70**)

Papel da Dinamina Evidenciado em *drosophilas*



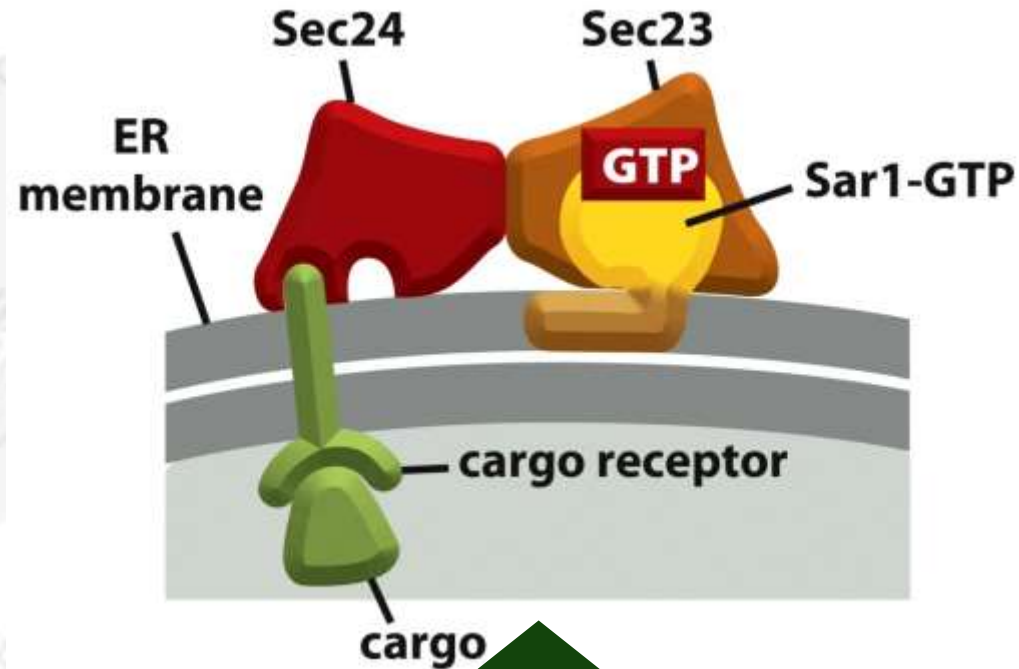
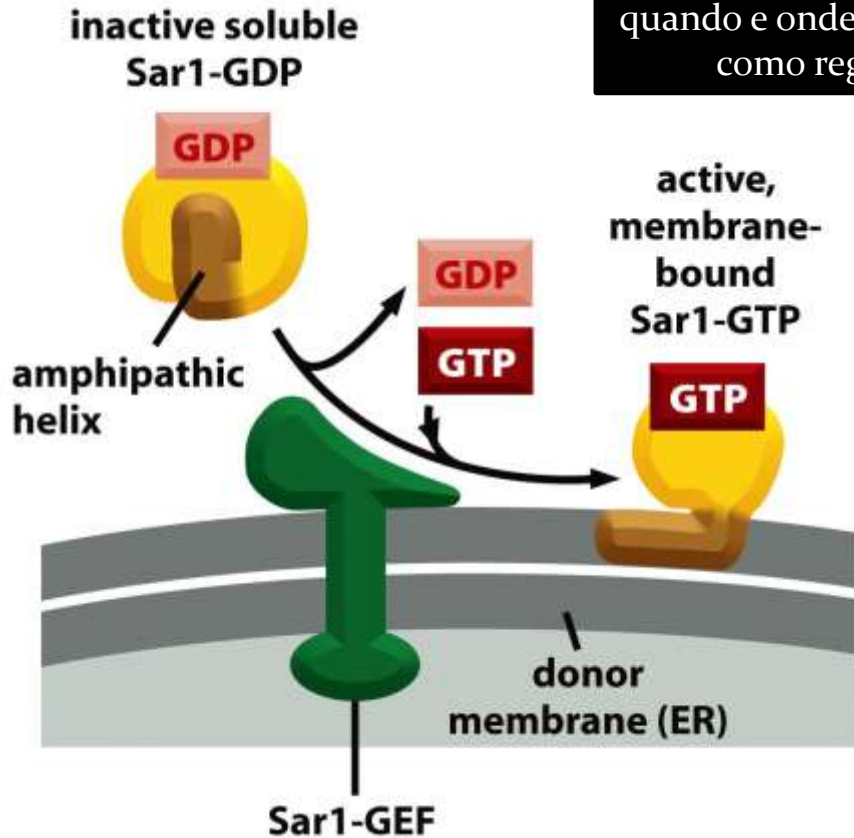
em *drosophilas* mutantes na proteína **dinamina**, as vesículas revestidas por **clatrina** não conseguem brotar

interrupção na secreção de neurotransmissores
(**exocitose**): paralisia

200 nm

GTPases Monoméricas Controlam a Formação do Coat

formação de **vesículas** deve se dar apenas quando e onde necessária. além de **PIPs**, como regular sua formação?



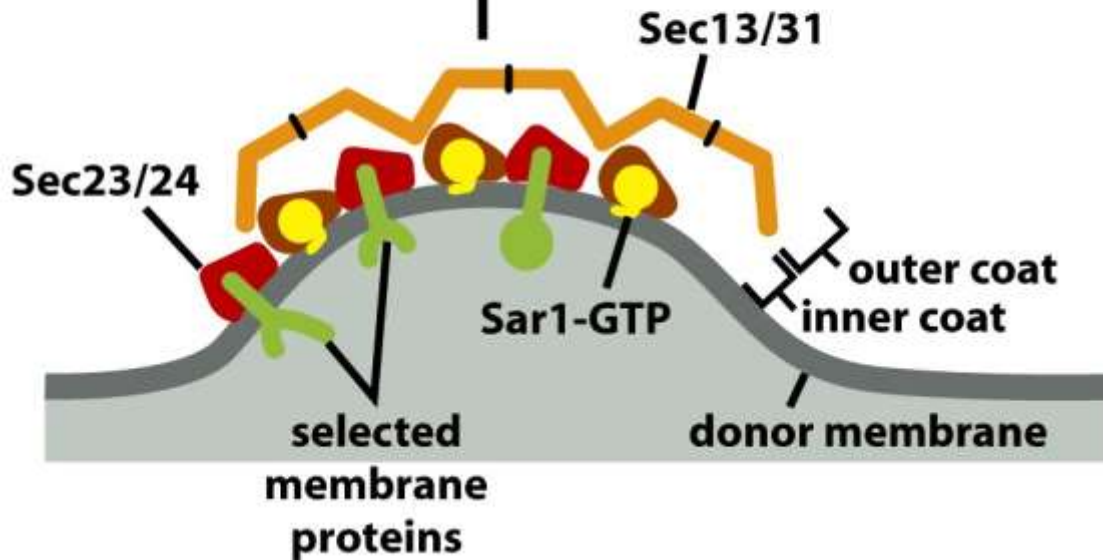
formação dos **coats** requer **GTPases** em alguns compartimentos (**RE**, **endossomas**)

GTPases citosólicas **GTP**-ligadas se inserem na membrana recrutando **receptores** ou **adaptadores** (**GEFs** específicas!!)

GTPases: *timers* para a perda do **coat** (após hidrólise do **GTP** a **GTPase** se solta da **vesícula**!!)

hipótese: hidrólise do **GTP** em intervalo de tempo regular (**vesícula** só vai se formar se ocorrer antes do tempo de desmontagem!!)

COPII-coated vesicle



2

fusão das membranas opostas
(**dinamina!**) leva a brotamento da
vesícula

1

GTPases ativadas recrutam
subunidades de **COPII** e **receptores**
para um trecho de membrana

deformação da membrana (formação
da **vesícula**) e seleção da **carga**
(**receptores** específicos!)

Rab e o direcionamento vesicular

cada vesícula tem pelo menos uma **Rab** (GTPases monoméricas)

Table 13-1 Subcellular Locations of Some Rab Proteins

PROTEIN	ORGANELLE
Rab1	ER and Golgi complex
Rab2	<i>cis</i> Golgi network
Rab3A	synaptic vesicles, secretory granules
Rab4/Rab11	recycling endosomes
Rab5A	plasma membrane, clathrin-coated vesicles, early endosomes
Rab5C	early endosomes
Rab6	medial and <i>trans</i> Golgi cisternae
Rab7	late endosomes
Rab8	early endosomes
Rab9	late endosomes, <i>trans</i> Golgi network

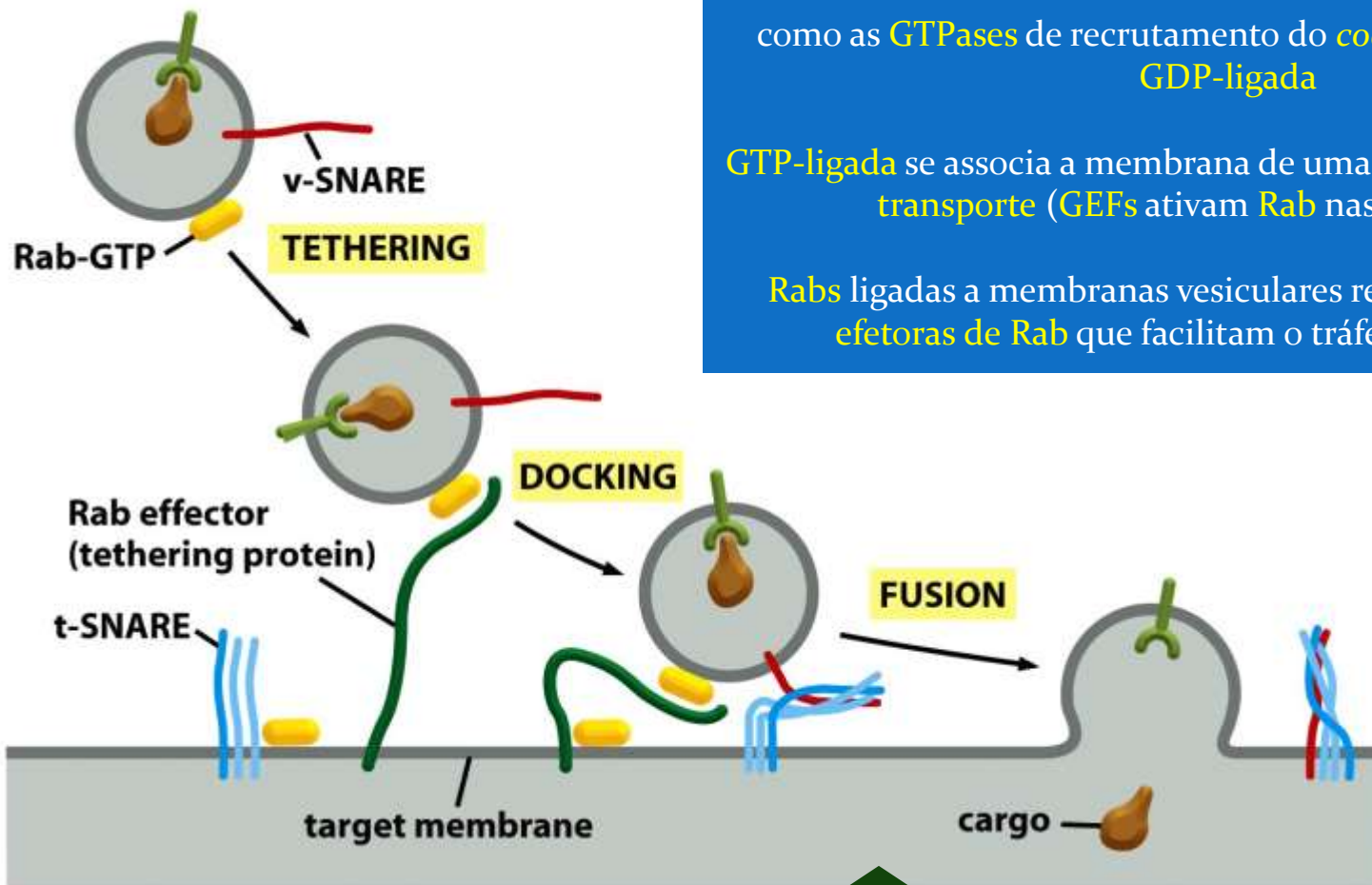
vesículas encontram diversas membranas alvo potenciais, mas se fusionam apenas com seu compartimento destino

especificidade: marcam a superfície, definem compartimento de origem e carga

compartimento destino possui **receptores** que reconhecem estes **marcadores**

proteínas essenciais: **Rab** direciona a vesícula para local exato na membrana alvo e **SNAREs** permitem a fusão da **vesícula** no compartimento destino

Rab e o Reconhecimento do Compartimento Alvo



como as **GTPases** de recrutamento do **coat**, **Rab** fica no citosol **GDP-ligada**

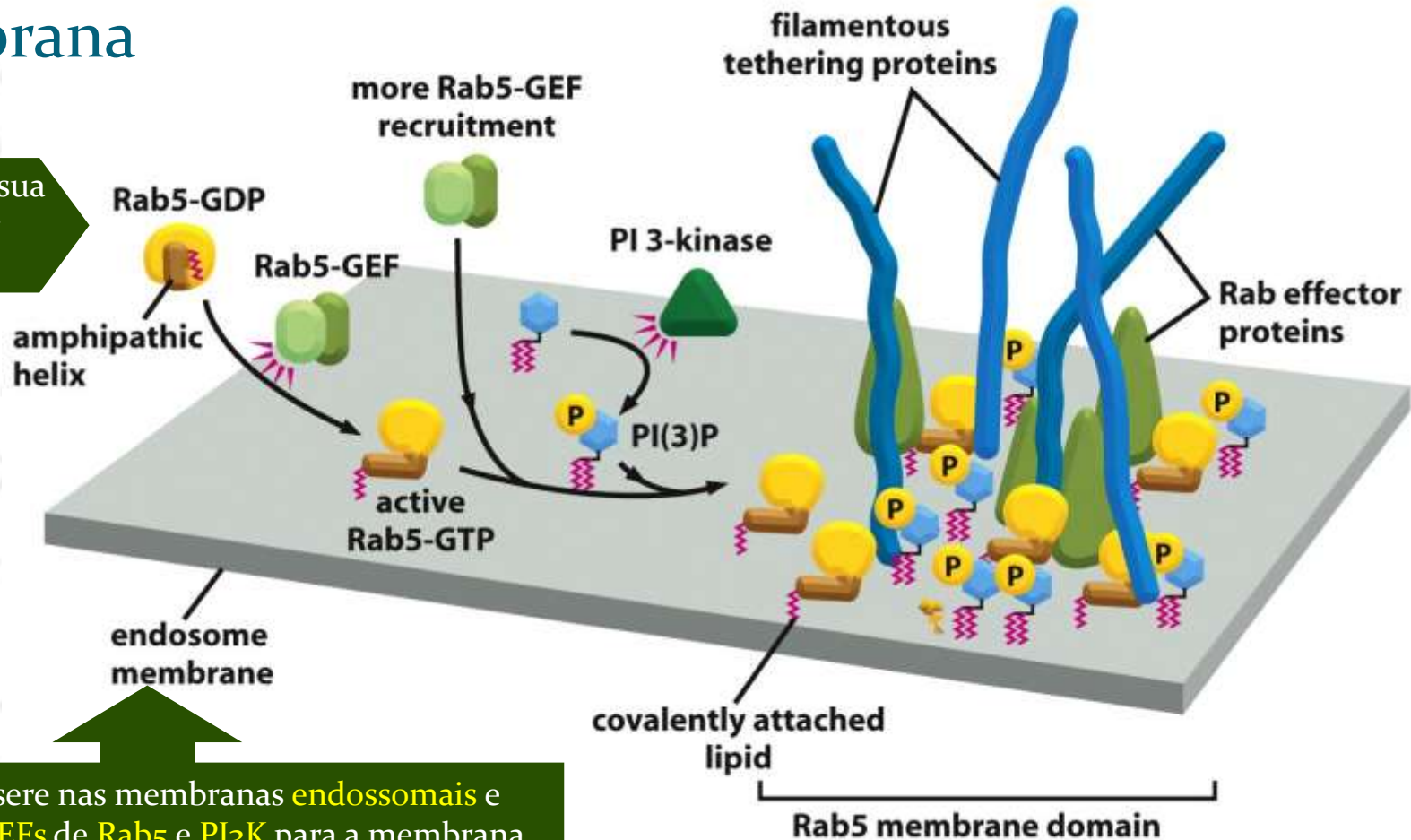
GTP-ligada se associa a membrana de uma **organela** ou **vesícula de transporte** (**GEFs** ativam **Rab** nas membranas)

Rabs ligadas a membranas vesiculares reconhecem **proteínas efetoras de Rab** que facilitam o tráfego das vesículas

estrutura das **proteínas efetoras de Rab** varia: proteínas motoras (propulsionam vesículas ao longo do citoesqueleto), proteínas de ancoragem (“**pesca**”!!)

Formação de um Domínio de Rab5 em uma membrana

Rab5 recrutando sua GEF (feedback positivo!!)

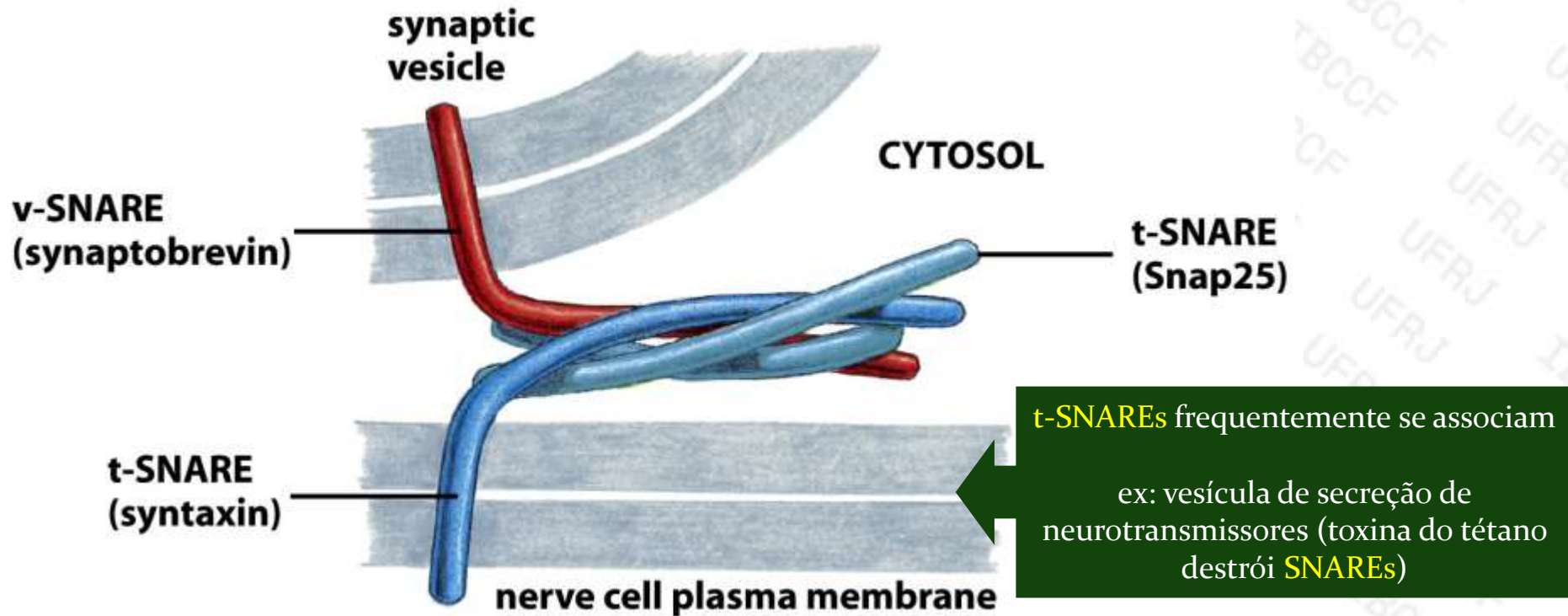


Ex: **Rab5** se insere nas membranas **endossomais** e recruta novas **GEFs** de **Rab5** e **PI₃K** para a membrana (ativação de mais **Rab5** e criação de **PI₃P**!!)

PI₃P atrai **efetoras de Rab** que ajudam no reconhecimento das **vesículas** vindas da **membrana plasmática**

uma **Rab** pode se ligar a diferentes **efetoras de Rab** na membrana **endossomal**, **Rab4** e **Rab11** formam domínios de geração de **vesículas** em direção a **membrana plasmática** (reciclagem)

SNAREs Medeiam a Fusão das Membranas



o descarregamento após ancoragem da **vesícula** é resultado da fusão das membranas da **vesícula** e do **compartimento destino**

bicamadas lipídicas são aproximadas e há intercâmbio dos **lipídios**

SNAREs catalizam a fusão de membranas

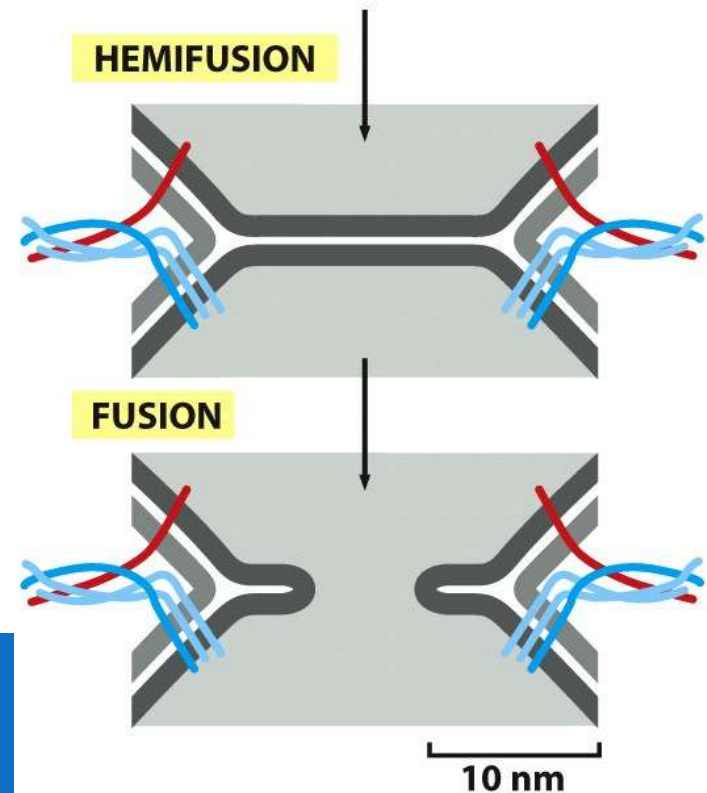
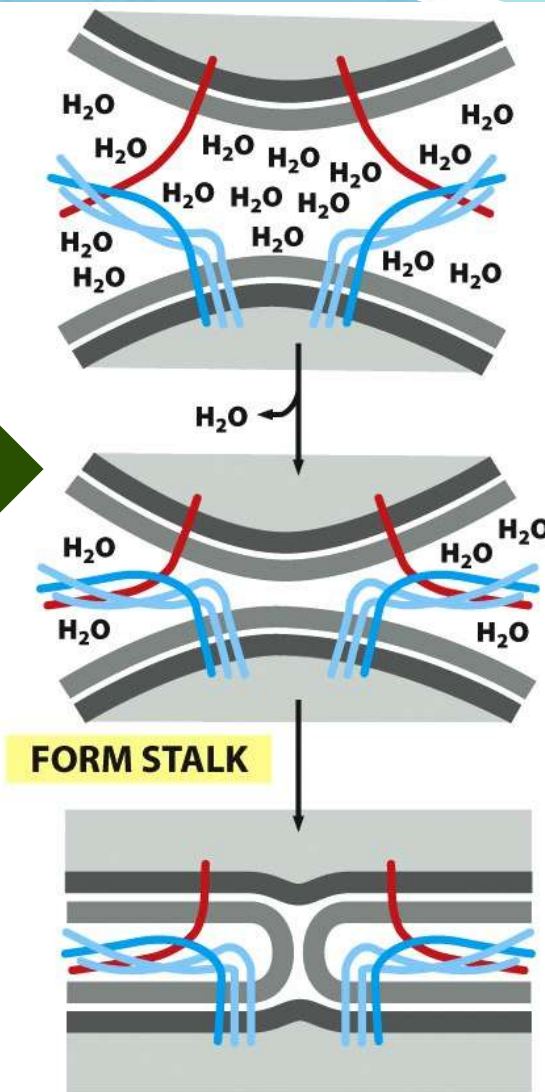
mais especificidade ao **tráfego vesicular**: só **vesículas** corretamente direcionadas se fusionam com o **compartimento destino**

35 SNAREs, cada uma associada a um compartimento diferente da via **secretória/endocítica**

V-SNARE (“vesicular”) e **T-SNARE** (“target”)

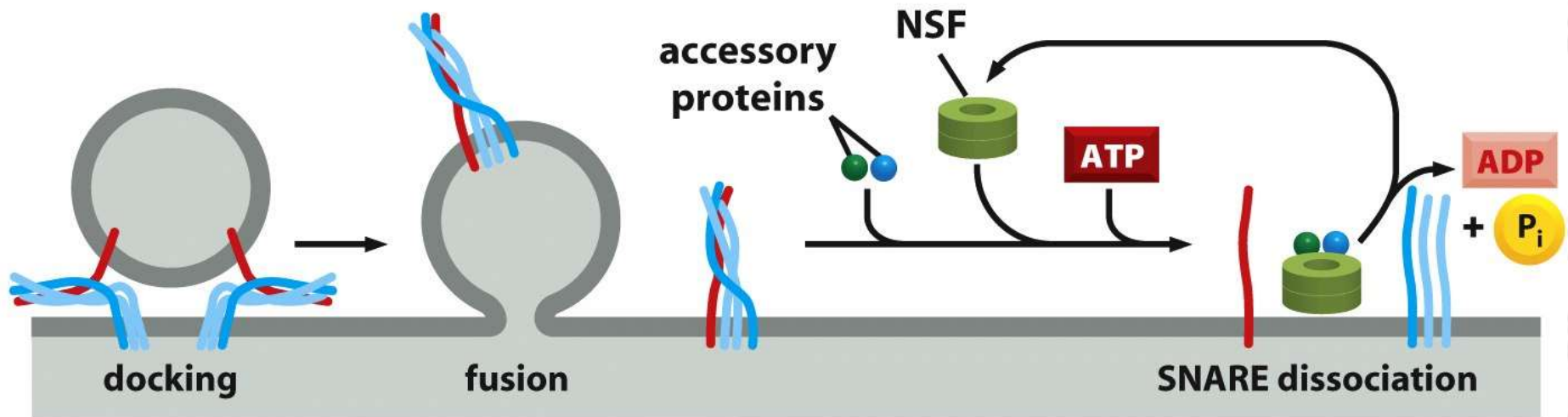
Modelo de Ação de SNAREs Catalizando Fusão de Membranas

entrelaçamento de **t** e **v-SNAREs** aproxima vesícula a membrana alvo expulsando H_2O



outro papel de **Rabs** é liberar **t-SNAREs** de inibidores proteicos para o **transporte vesicular** operar normalmente as vesículas devem conter grupo apropriado de **SNAREs** e **Rabs**

SNARES Precisam ser Separadas antes de Nova Fusão de Membranas



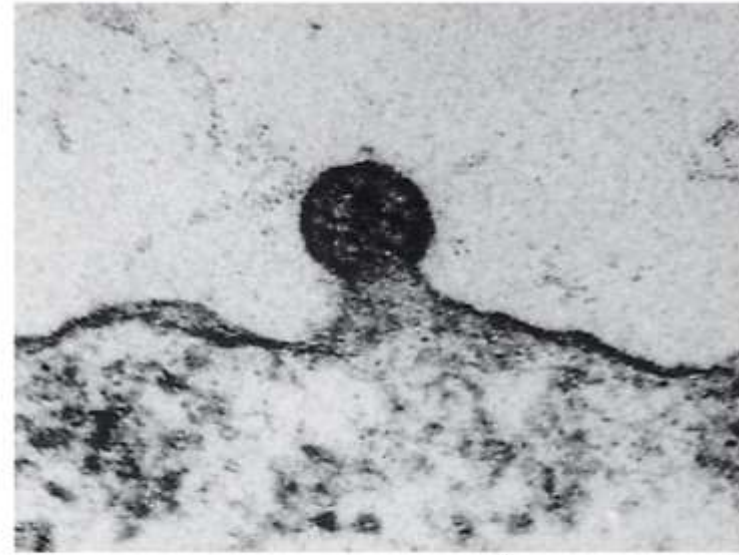
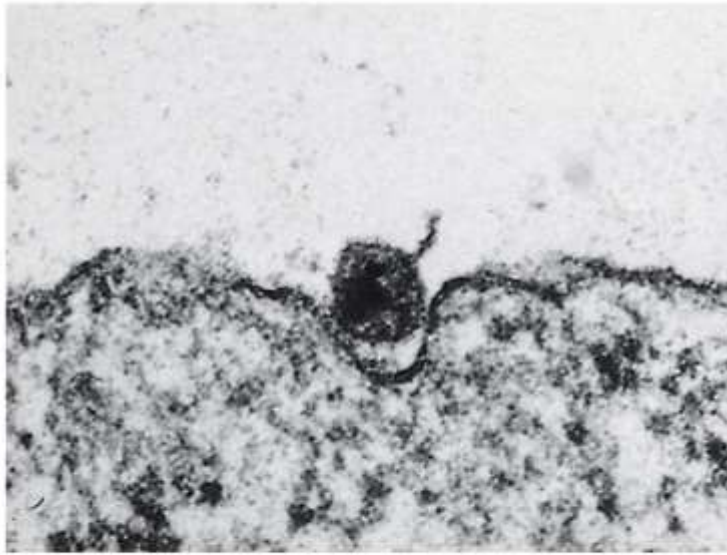
antes que **SNAREs** possam ser reutilizadas para outras fusões de membrana, complexo entre **v-** e **t-SNAREs** deve ser desfeito

NSF quebra ATP e desfaz o complexo

se as **t-SNAREs** na membrana alvo estivessem sempre disponíveis, **vesículas** contendo **v-SNAREs** corretas poderiam se fundir em qualquer momento

NSF possibilita controle de espaço/temporal da fusão (mecanismo regulatório não conhecido)

Proteínas de fusão virais e SNAREs utilizariam mecanismo similar de fusão



200 nm

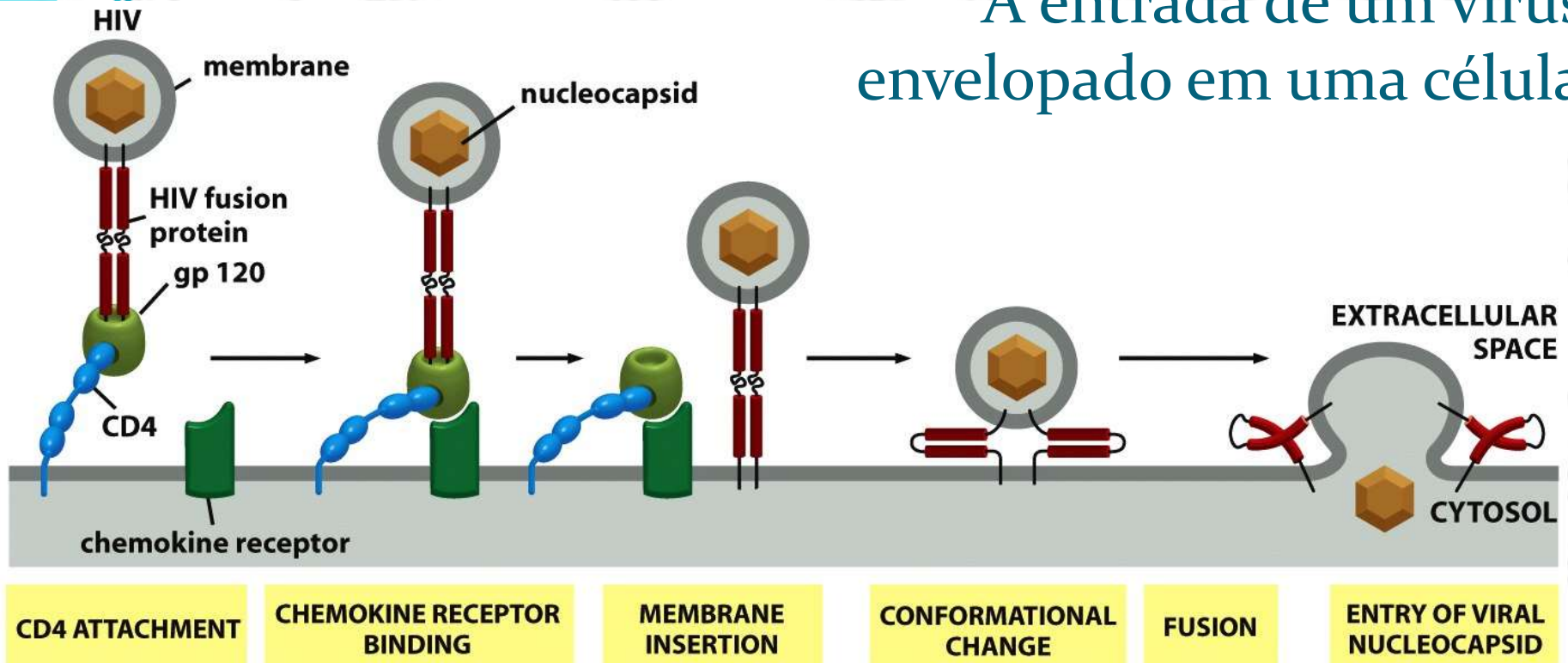
fusão entre membranas é importante em outros processos (fertilização, fibras muculares, etc)

proteínas de fusão virais tem papel chave na infecção por vírus envelopados por bicamadas lipídicas (ex: HIV, influenza)

o vírus HIV entra em uma célula fusionando sua membrana com a membrana plasmática da célula alvo

material genético viral adentra o citosol

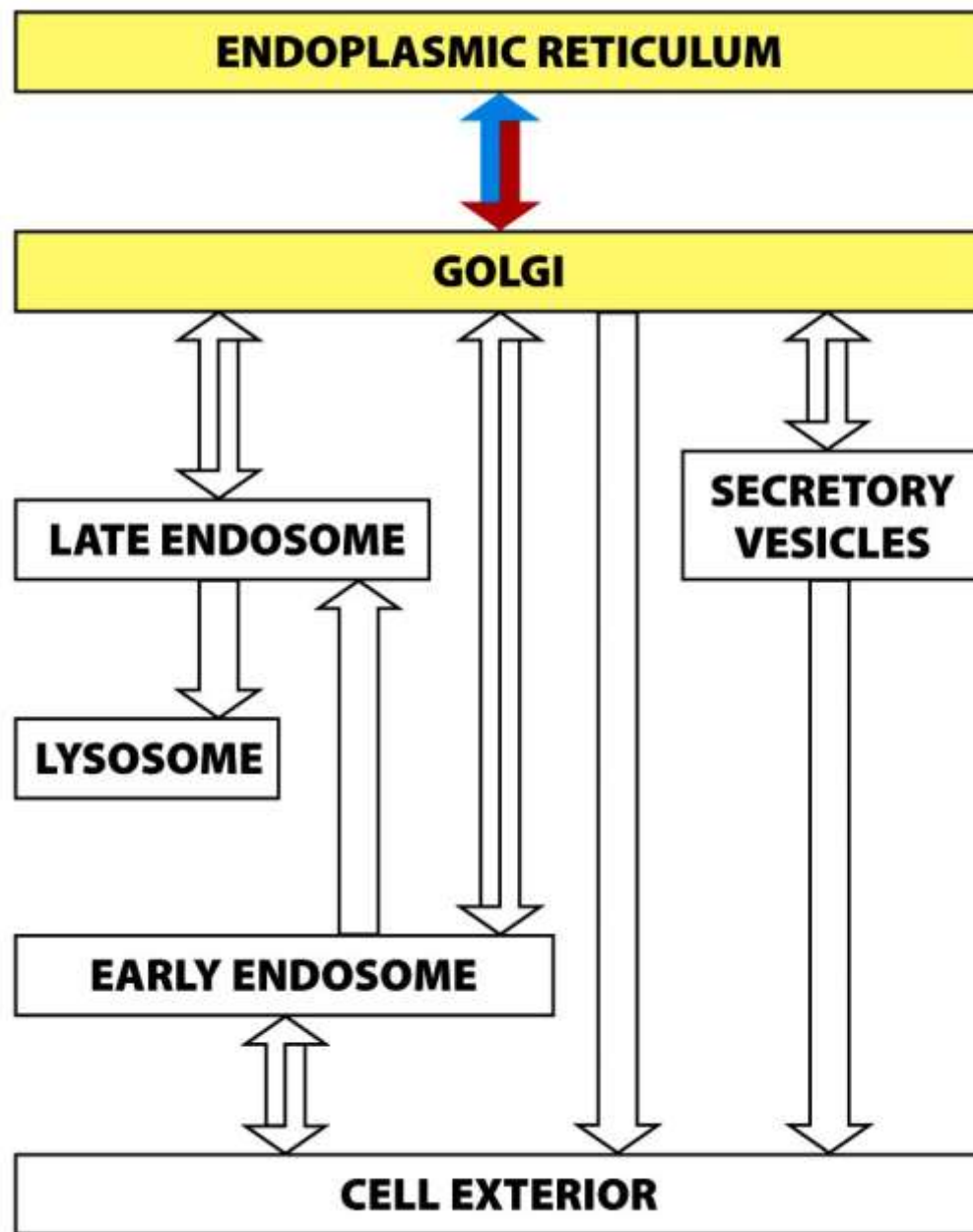
A entrada de um vírus envelopado em uma célula



virus *influenza* entra por **endocitose** mediada por **receptor** (ativação das proteínas de fusão do capsídeo viral pelo pH endossomal)

ligação das proteínas de fusão do **HIV** a **receptores** na membrana expõe domínios peptídicos hidrofóbicos

peptídios se inserem na membrana alvo e após mudança estrutural permitem a fusão das duas **bicamadas**



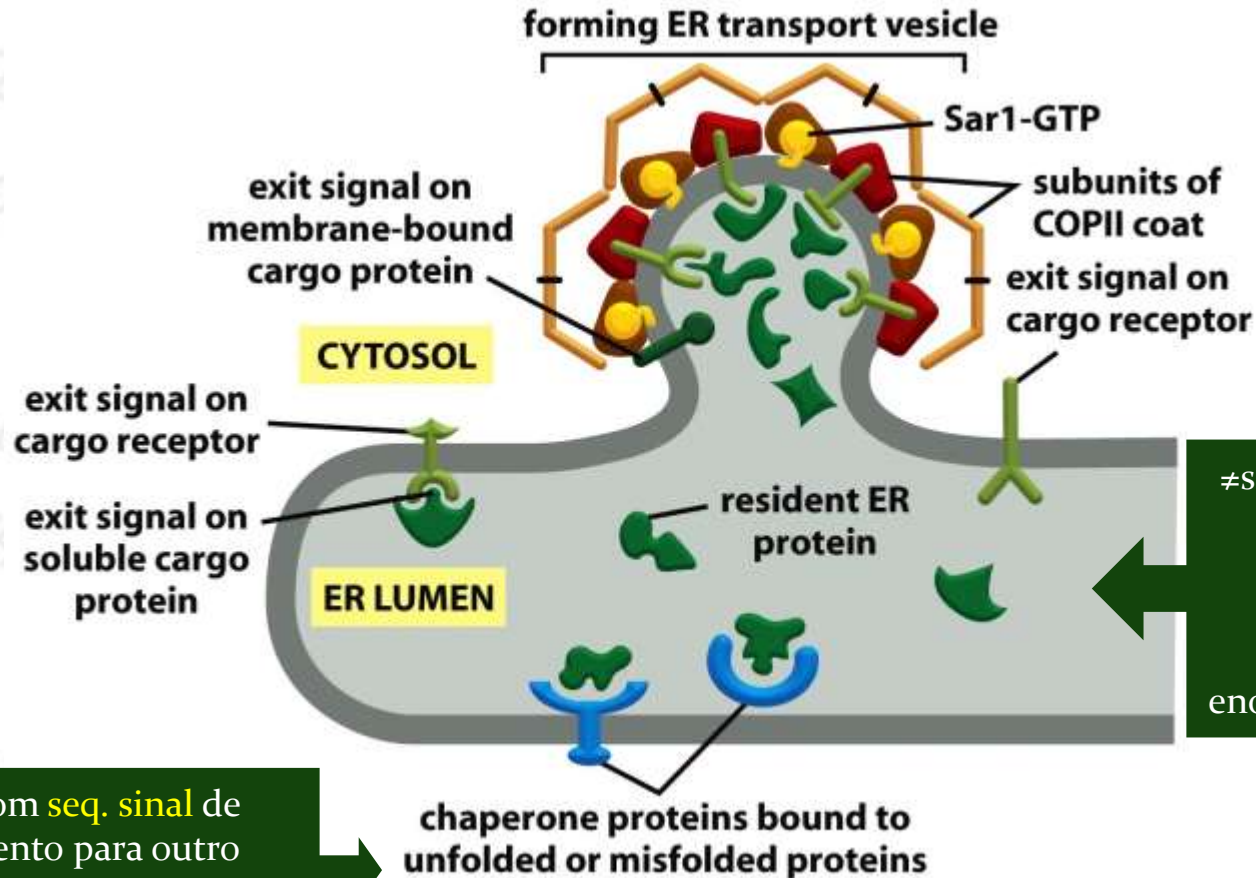
delicado balanço entre vias de exportação e importação:

algumas vesículas selecionam cargas para outros compartimentos

outras capturam proteínas e as devolvem ao compartimento de origem

proteínas sofrem modificações no **Golgi**

Proteínas Deixam o RE em Vesículas Revestidas de COPII



≠s **receptores** para ≠s **cargas**

proteínas não totalmente enoveladas são retidas

proteínas com **seq. sinal** de endereçamento para outro compartimento possuem **receptores** reconhecidos pelo **coat**

proteínas destinadas ao **Golgi** e outros compartimentos são empacotadas em **vesículas** de **COPII** (regiões sem **ribossomos**)

receptores voltam ao **RE** após liberação da carga

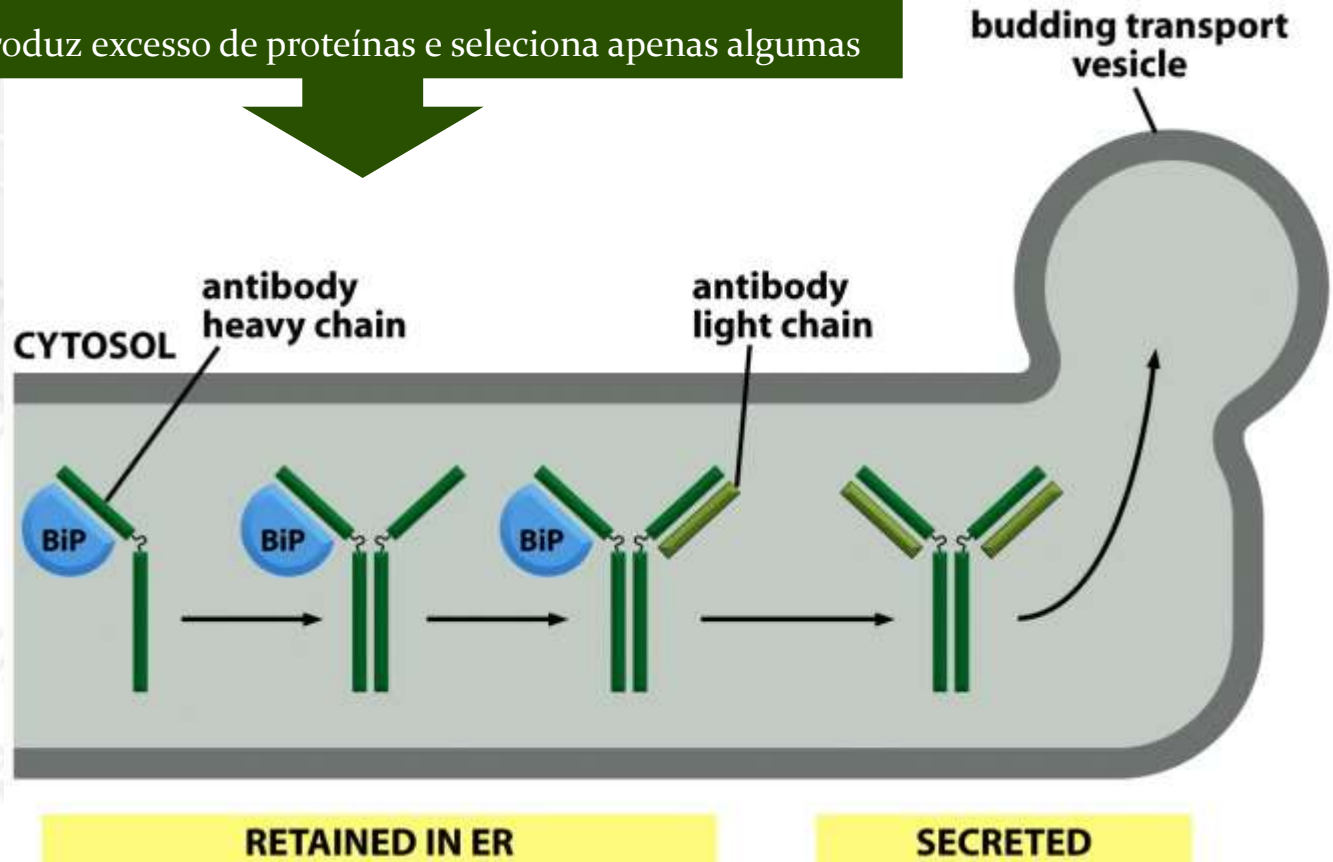
algumas proteínas solúveis de alta concentração acabam sendo transportadas sem possuir **seqs sinal**

Apenas Proteínas Corretamente Enoveladas Deixam o RE

só proteínas enoveladas ou montadas com suas subunidades podem deixar o RE

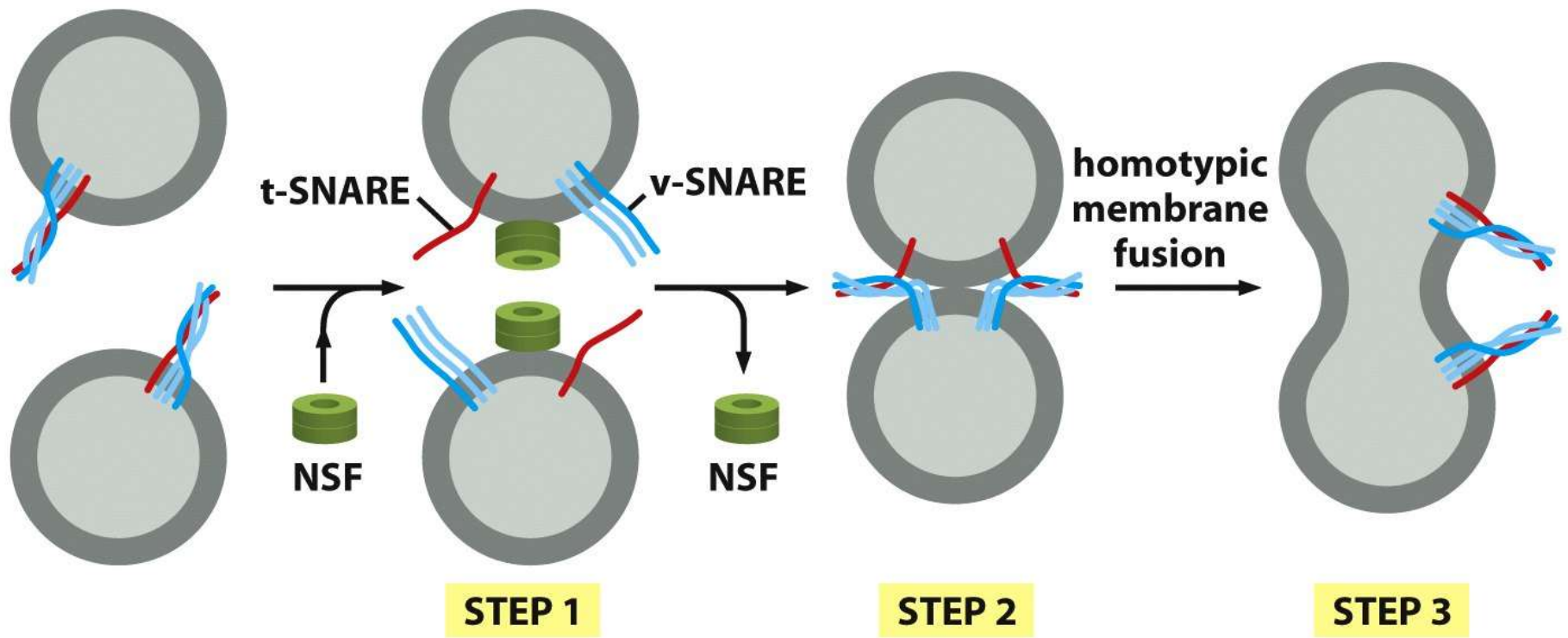
proteínas não finalizadas são retidas por **chaperonas** (BIP, **calnexina**), não expõem suas **seqs. sinal** ou são enviadas para degradação

célula produz excesso de proteínas e seleciona apenas algumas



Ex: 90% dos **receptores de ACh** são degradados

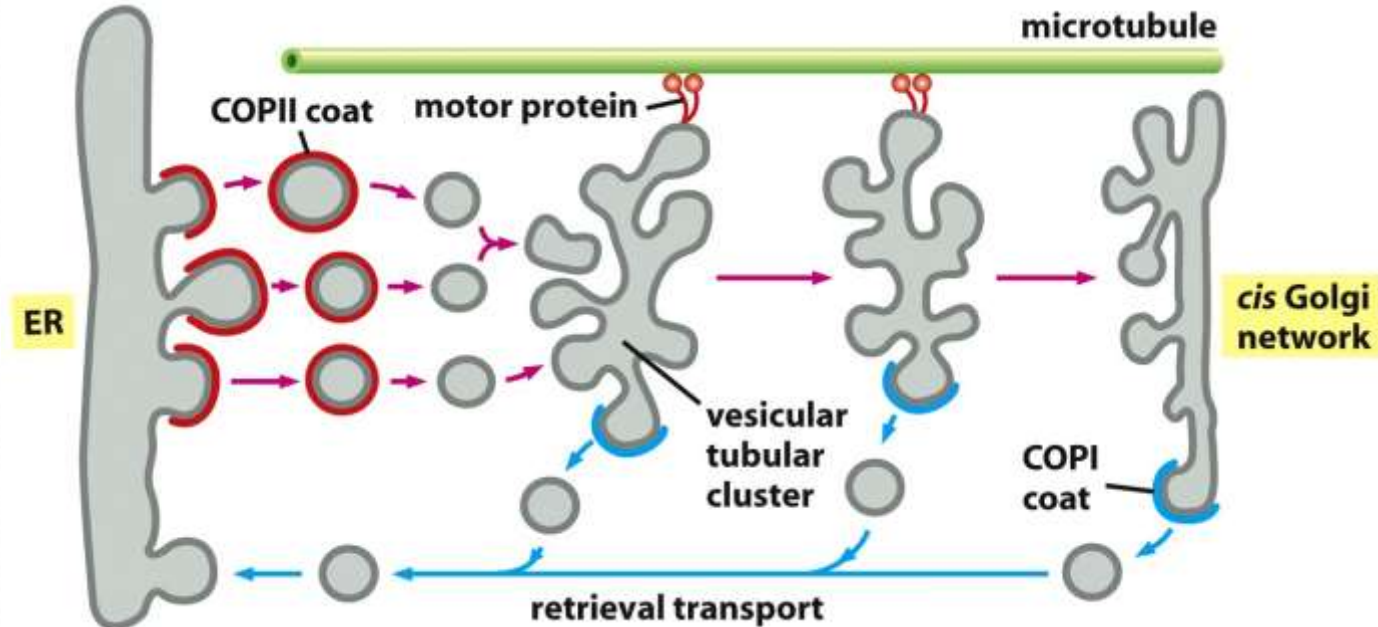
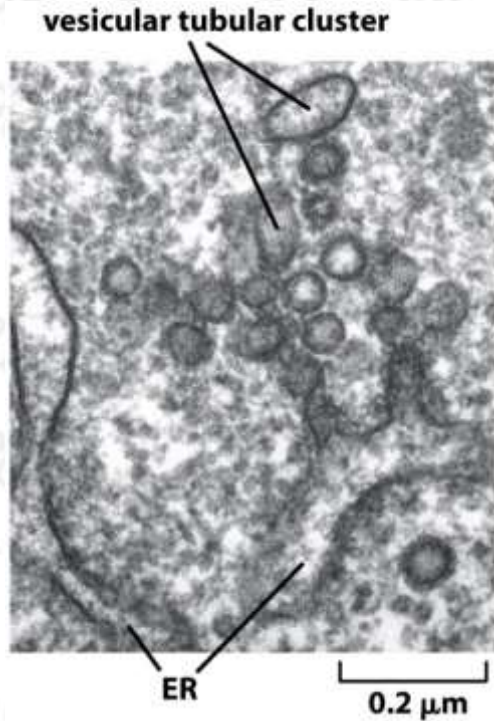
Fusão Homotípica das Vesículas



vesículas ao perderem seus **coats** podem se fundir: **fusão homotípica**
(membranas provenientes do mesmo compartimento)

ambas possuem **v-SNAREs** e **t-SNAREs** complementares

Formação de Vesículas Tubulares



fusão **homotípica** das vesículas gera estrutura **vesicular tubular** (*tubular cluster*)

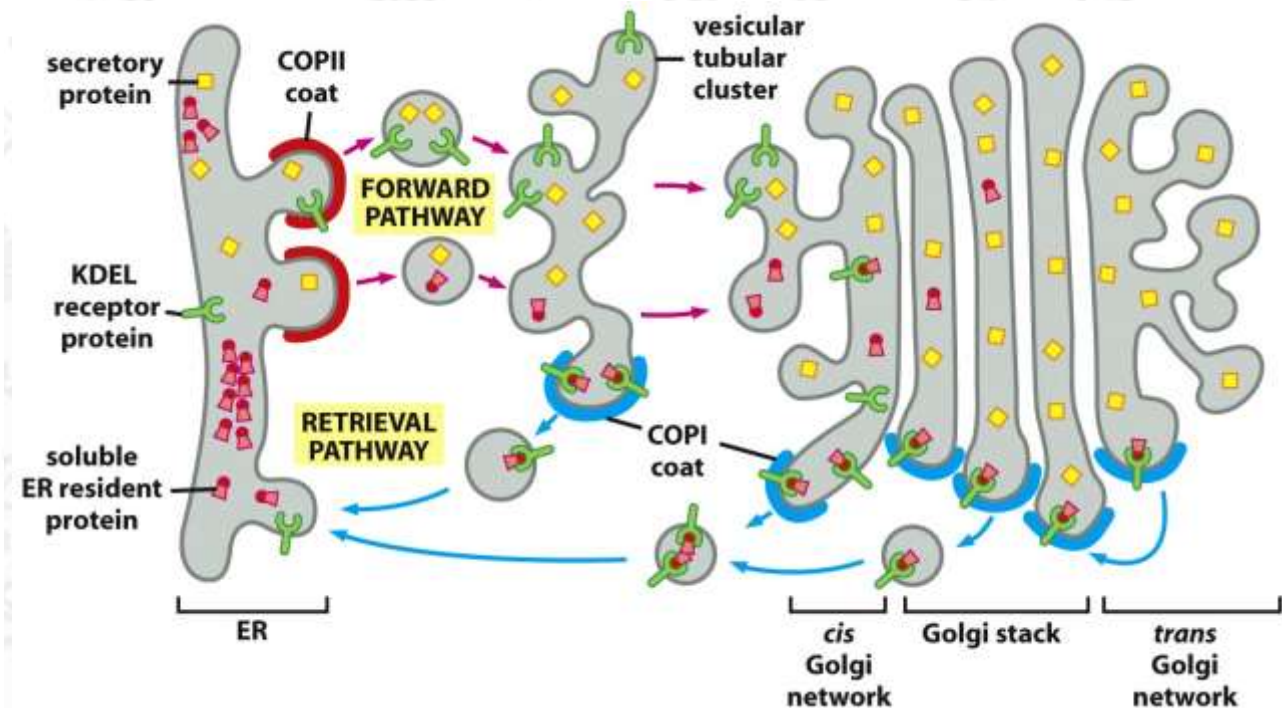
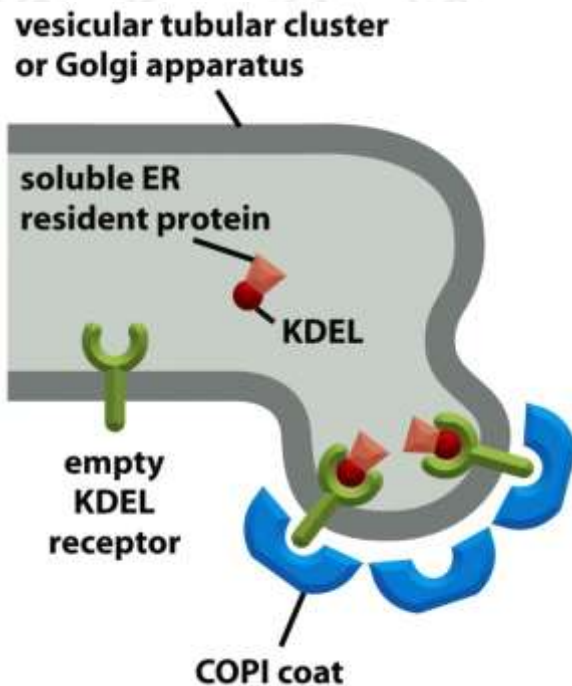
geradas continuamente entre o **RE** e o **Golgi** se movendo ao longo dos **microtúbulos** (meia vida curta)

algumas **vesículas** brotam das **vesículas tubulares** com **coats** de **COP1**

via retrógrada devolve ao **RE** proteínas com **seq. sinal** do **RE** que “escaparam” e **receptores de carga**

coat de **COP1** só se forma depois da desmontagem do **coat** de **COPII**

Via Retrógrada para o RE usa Sequência Sinal



proteínas de membrana residentes no **RE** possuem **seq. sinal** de interação com **COPI**

seq. KDEL é encontrada em proteínas solúveis do **RE** (ex: **BIP**) (receptores para **seq. KDEL** interagem com **coat** de **COPI**)

receptor deve ter afinidade pela proteína apenas nas **vesículas** e no **Golgi** capturando proteínas que escaparam (não no **RE**, onde descarregam)

diferença de pH dos compartimentos altera interação proteína-proteína!