

# Compartimentalização Intracelular (pt 2): Citosol → Retículo

*Rafael H.F. Valverde*

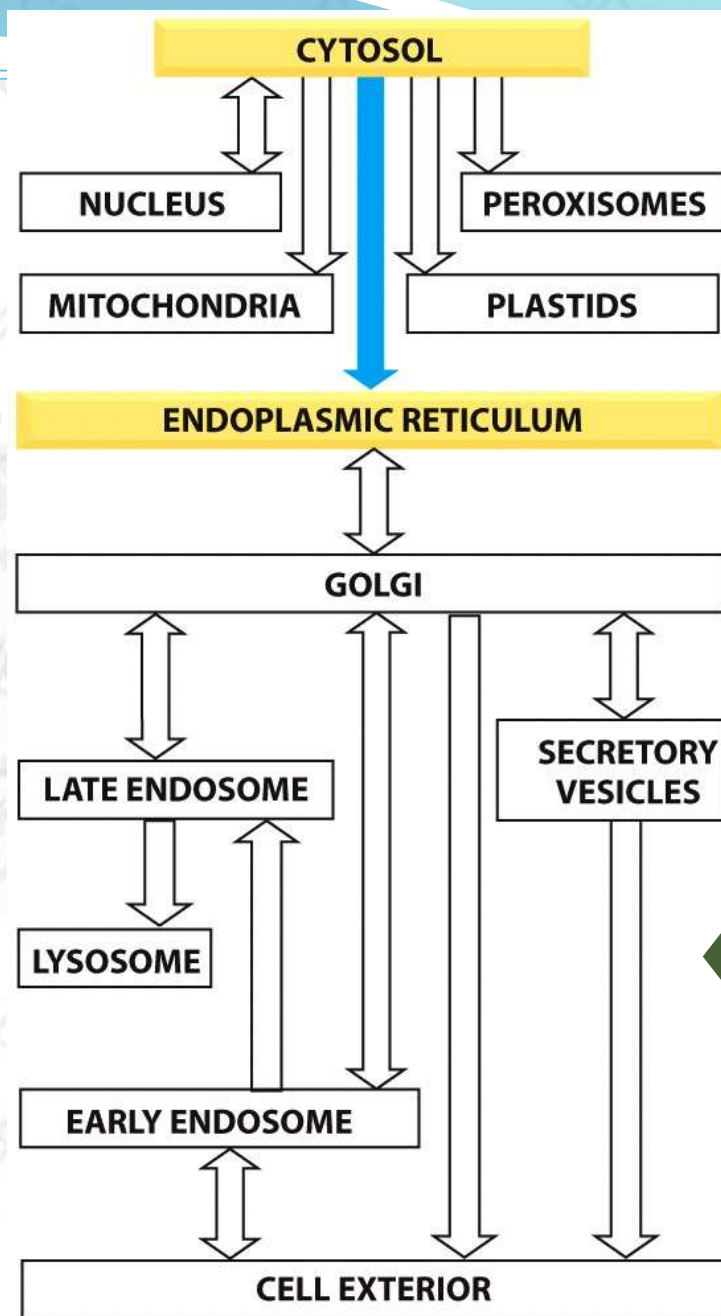
[valverde@nano.ufrj.br](mailto:valverde@nano.ufrj.br)

Laboratório de Biomembranas G-37

Biologia Celular para Nanotecnologia  
IBCCFº UFRJ



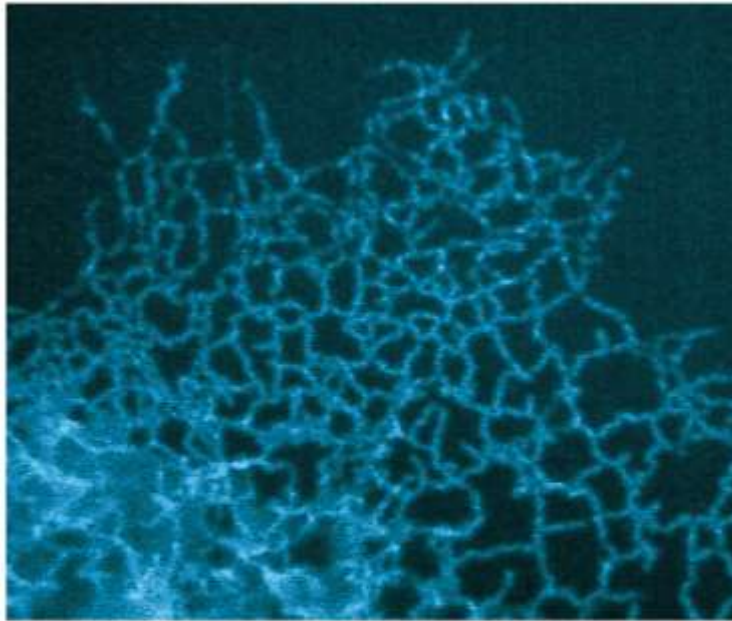
Maio – 2022



proteínas destinadas ao **Golgi**,  
**membrana plasmática**,  
**lisossomas**, **endossomas**  
devem ser primeiramente  
internalizadas no **RE**

# Microscopia de Fluorescência do Retículo Endoplasmático

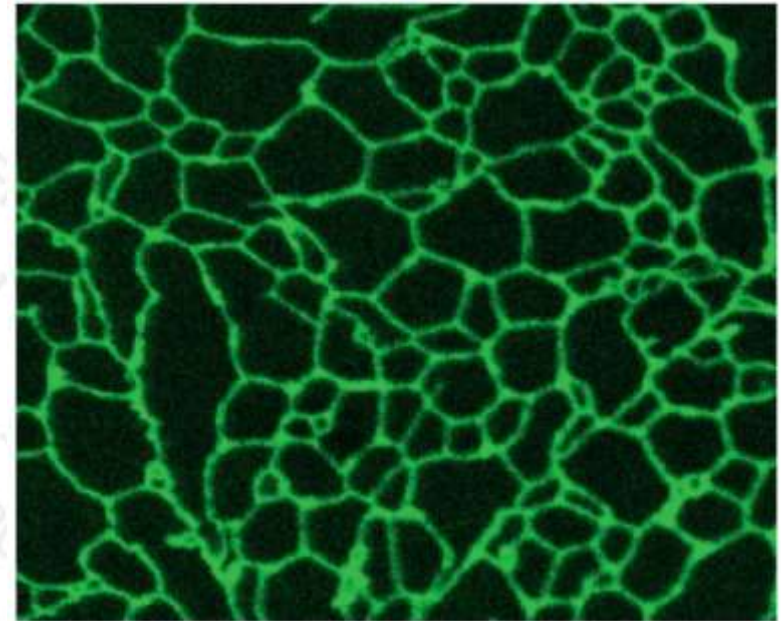
RE tem papel importante na biossíntese de proteínas, lipídeos e no estoque de  $\text{Ca}^{2+}$



2 μm

todos os eucariotos tem um **retículo endoplasmático**

mais da metade da **membrana** de uma célula animal

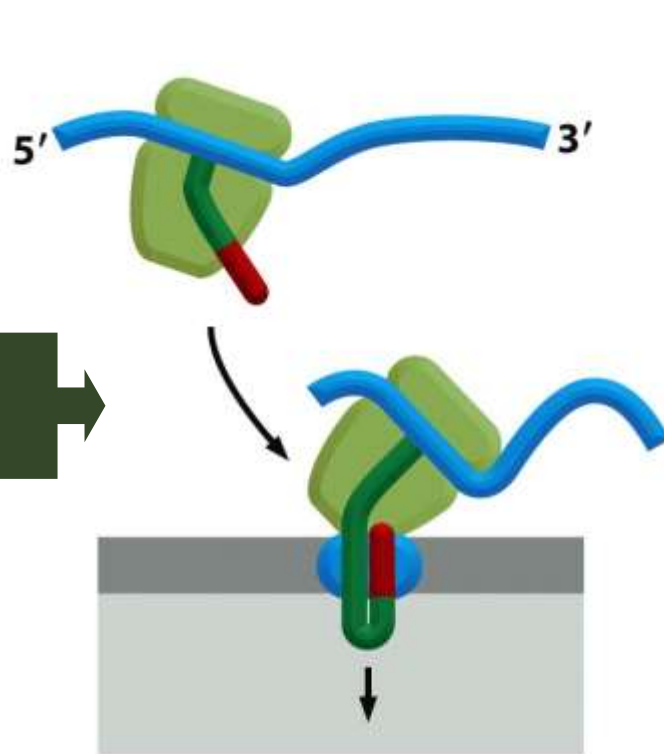


10 μm

cisternas tubulares interconectadas e contínuas ao **envelope nuclear** (um único espaço interno ou **lúmen**)

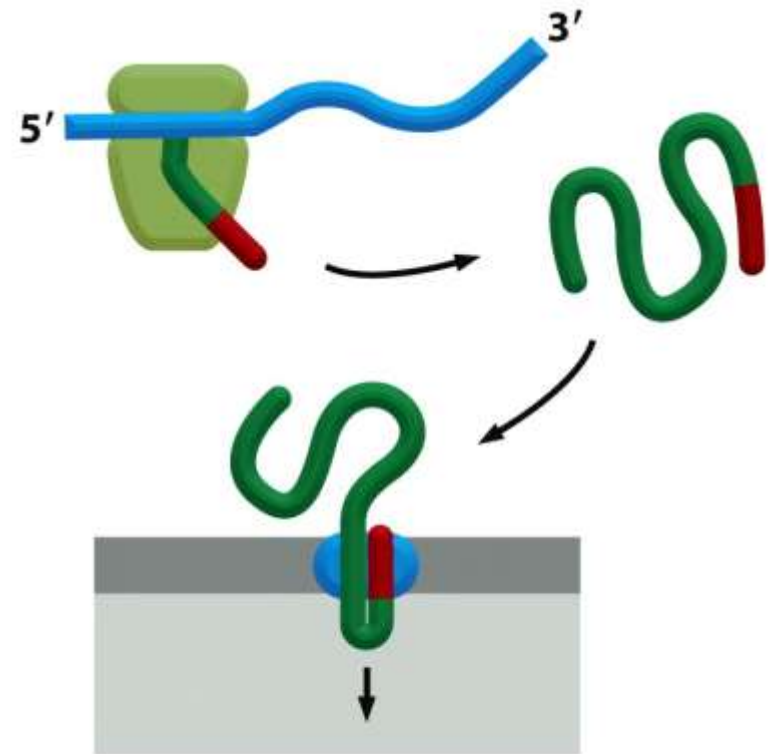
todas as partes do citosol estão próximas de uma parte do **retículo**

# Translocação Proteica Co- e Pós-Traducional



translocação co-  
traducional no RE  
rugoso

(A) CO-TRANSLATIONAL  
TRANSLOCATION



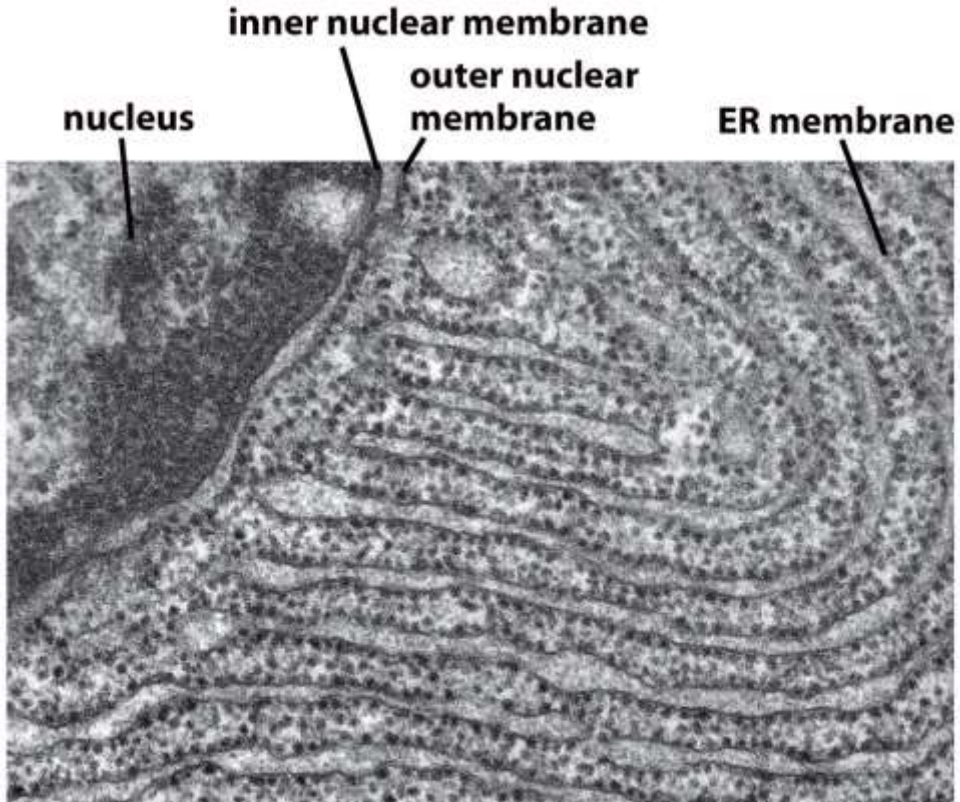
(B) POST-TRANSLATIONAL  
TRANSLOCATION

determinadas regiões do RE são  
especializadas

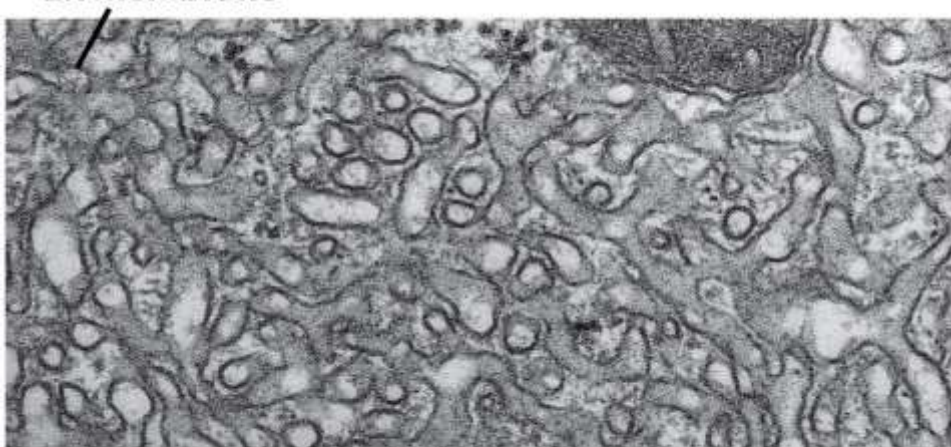
RE rugoso: ribossomos associados a  
membrana (cadeia polipeptídica é  
translocada durante a síntese)

importação pós-traducional de proteínas  
é típica de outras organelas:  
mitocôndria, peroxissomos, núcleo

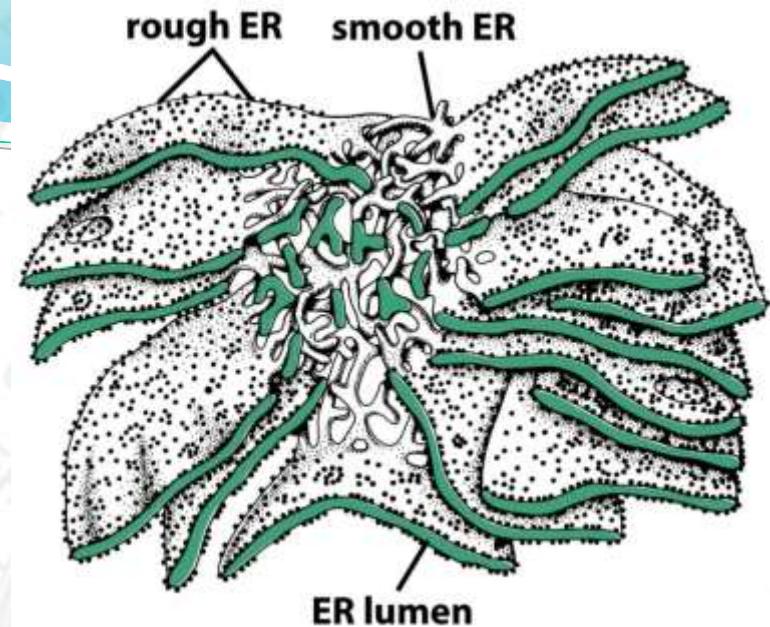




ER membrane



200 nm



ribossomos cobrem a superfície do RE rugoso, as demais cisternas irregulares são denominadas RE liso

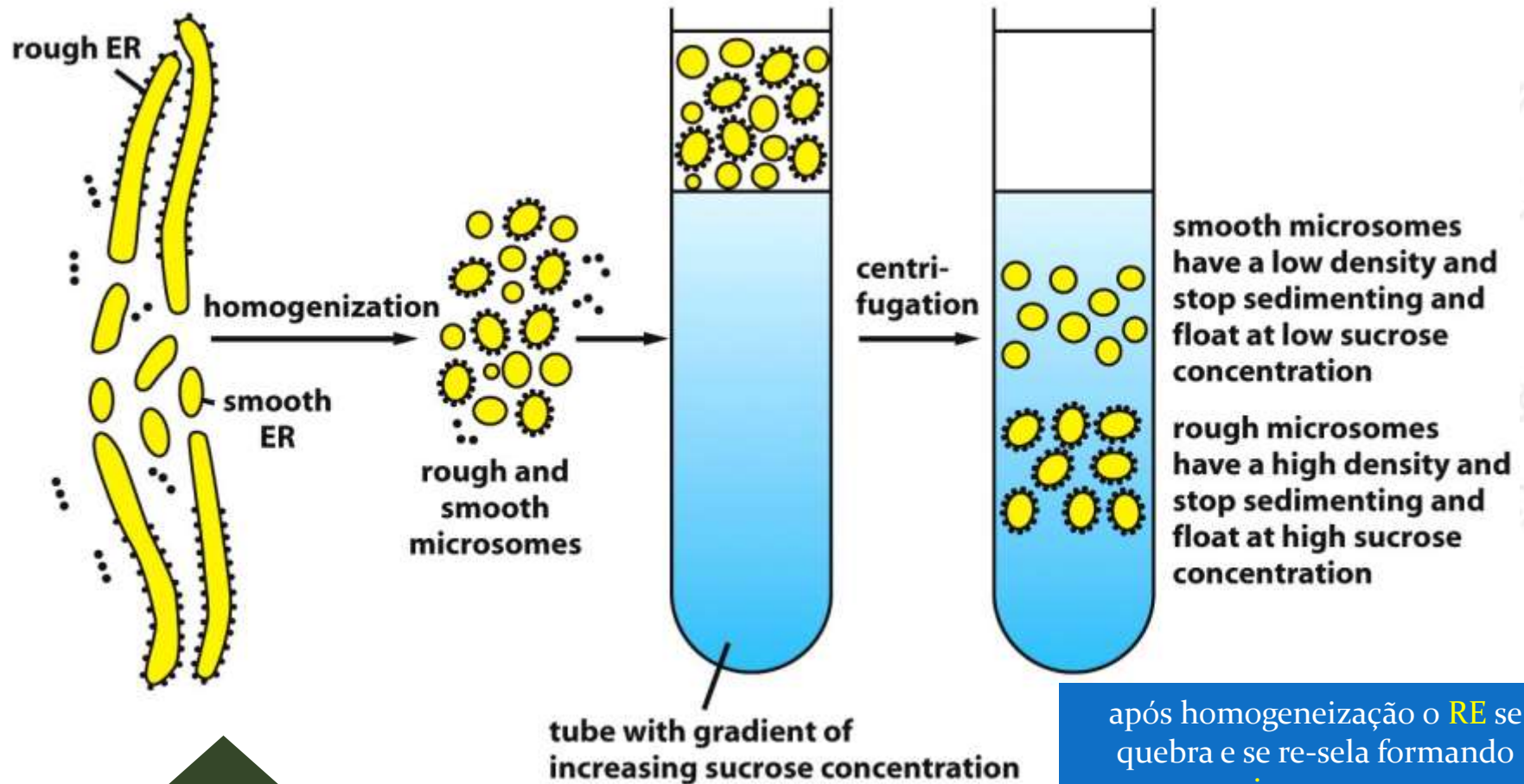
área onde brotam vesículas contendo cargas entre o RE e o Golgi: RE transicional

estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  (sinalização) (RE sarcoplasmático maior em células musculares)

em células importantes para o metabolismo de lipídeos o RE liso é maior (ex: hepatócitos)

ao lado: células de Leydig (síntese de testosterona)

# Isolamento e Purificação do RE liso e Rugoso

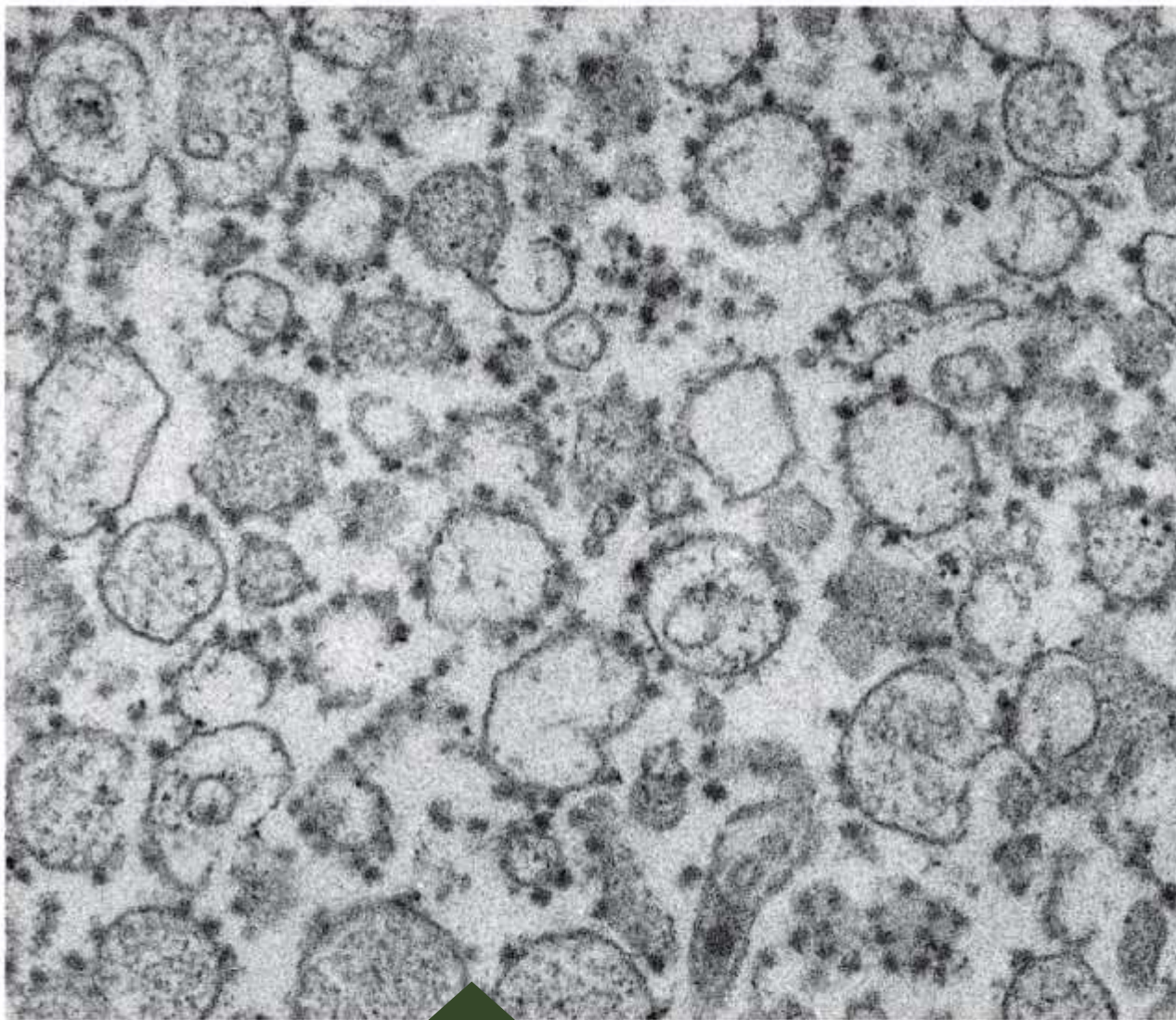


gradiente de sacarose separa RE liso do rugoso pela diferença de densidade das membranas

após homogeneização o RE se quebra e se re-sela formando **microssomas**

preservam suas funções (**estocam**  $\text{Ca}^{2+}$ , **glicosilam** proteínas, **translocam** proteínas, **sintetizam** lipídeos)





microssomas de RE rugoso com ribossomos no lado externo

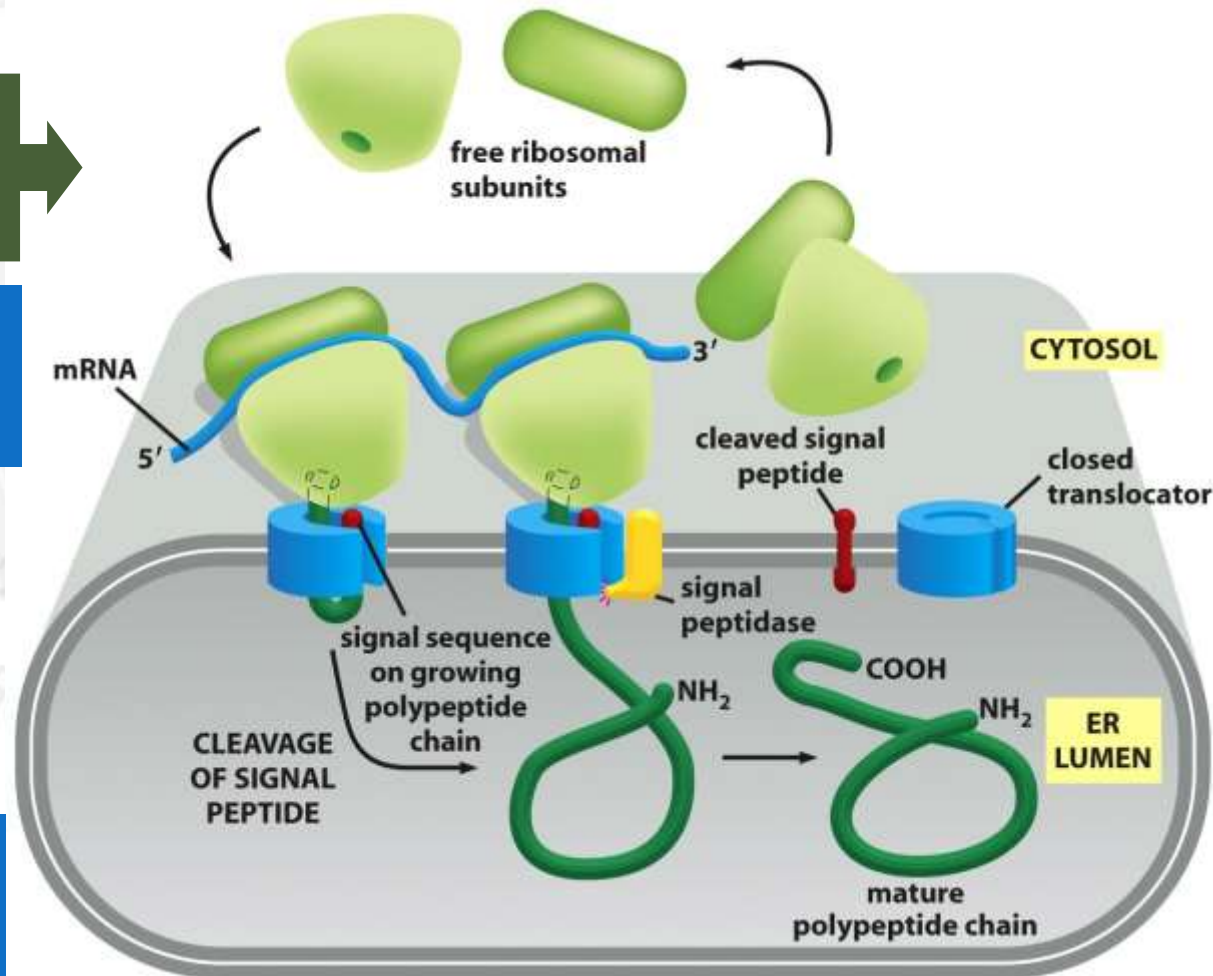
200 nm

# O Peptídeo Líder

RE captura proteínas **transmembrana** (translocadas parcialmente na membrana do RE) e **solúveis** (translocadas para o lúmen do RE)

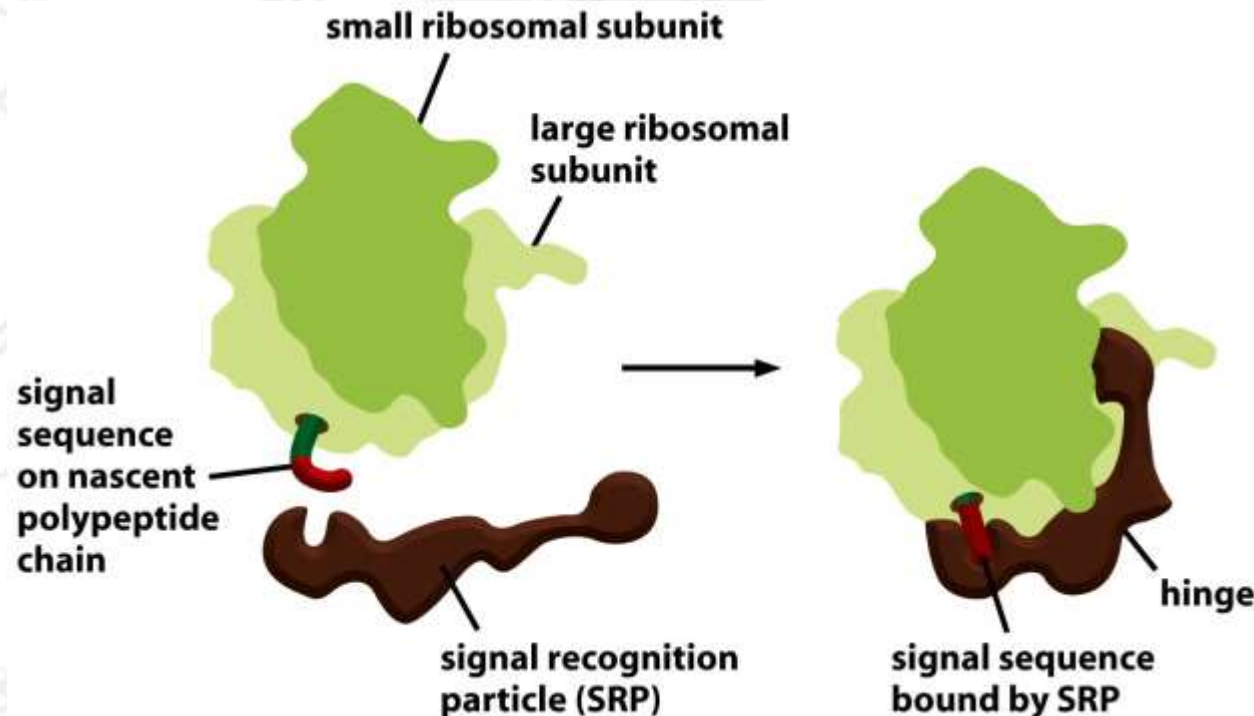
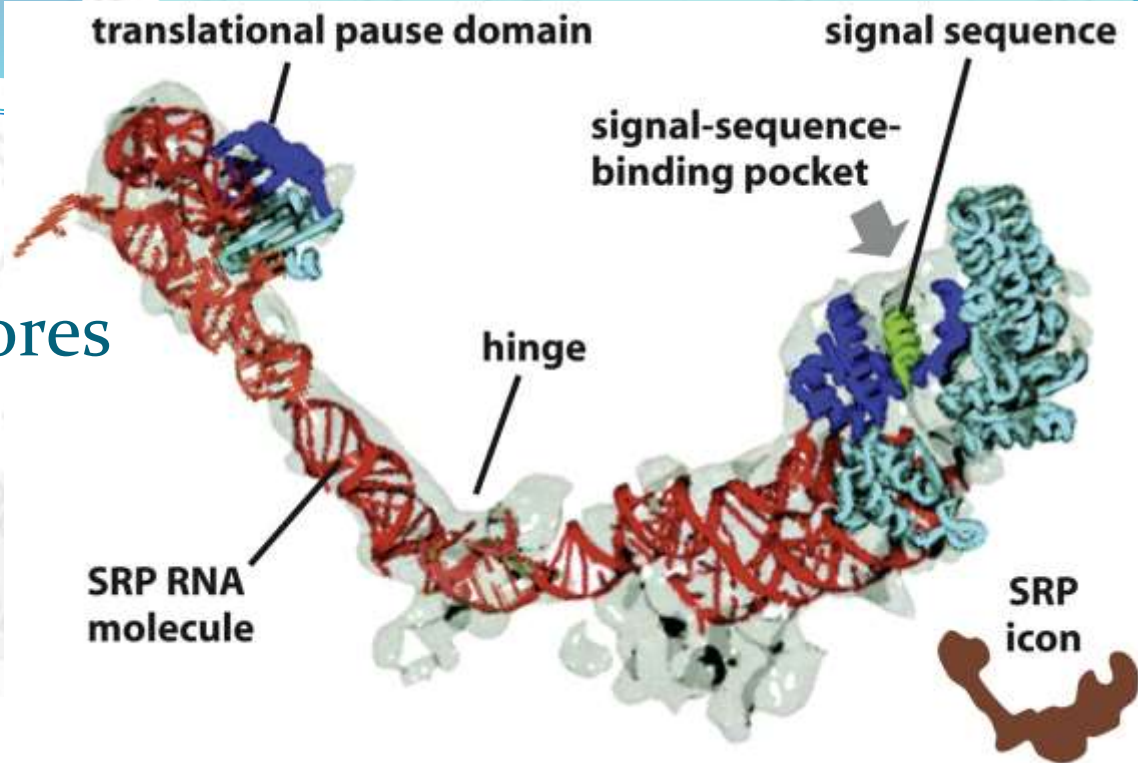
proteínas destinadas ao próprio RE e outros compartimentos: são direcionadas ao RE por **sequência sinal**

”**peptídeo líder**”: direciona cadeia polipeptídica para o RE (é clivado por **peptidase** na membrana interna do RE)





# SRPs Direcionam Peptídeos Sinais do RE aos Translocadores

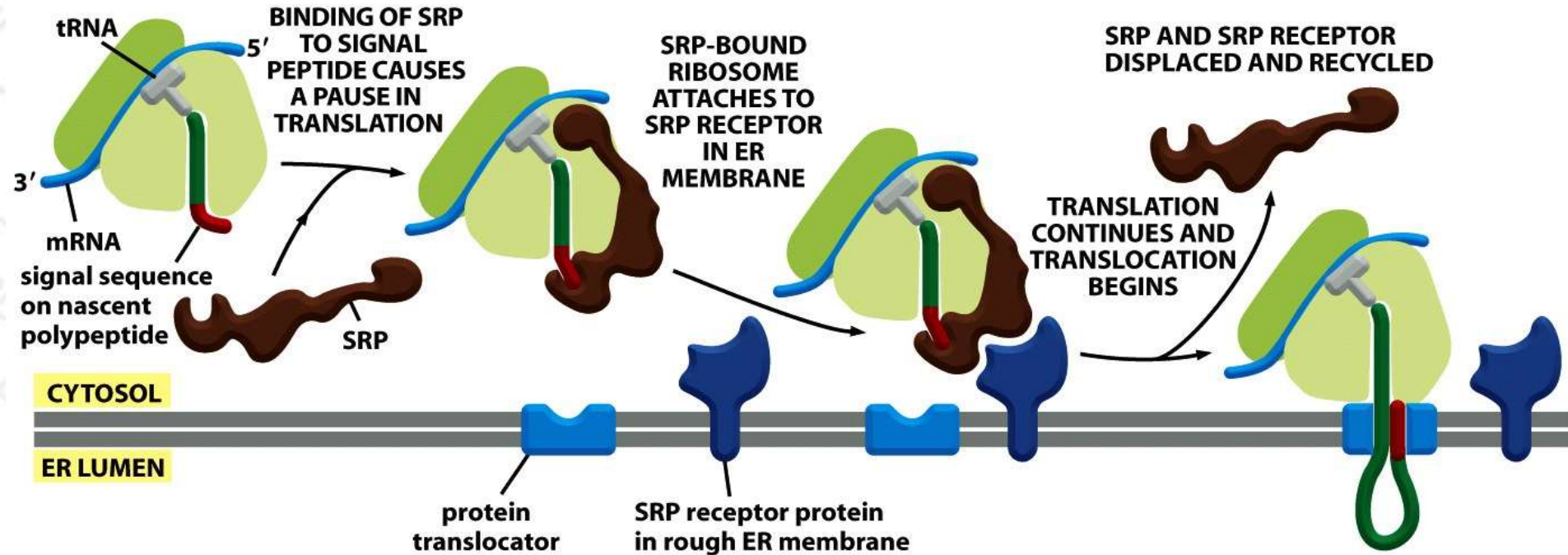


6 polipeptídios e um RNA

a **sequência sinal** é reconhecida e guiada ao RE pela **signal-recognition particle** (SRPs)

SRP interrompe a **tradução**

# Como Sequências Sinal do RE e SRPs Direcionam Ribossomos a Membrana do RE



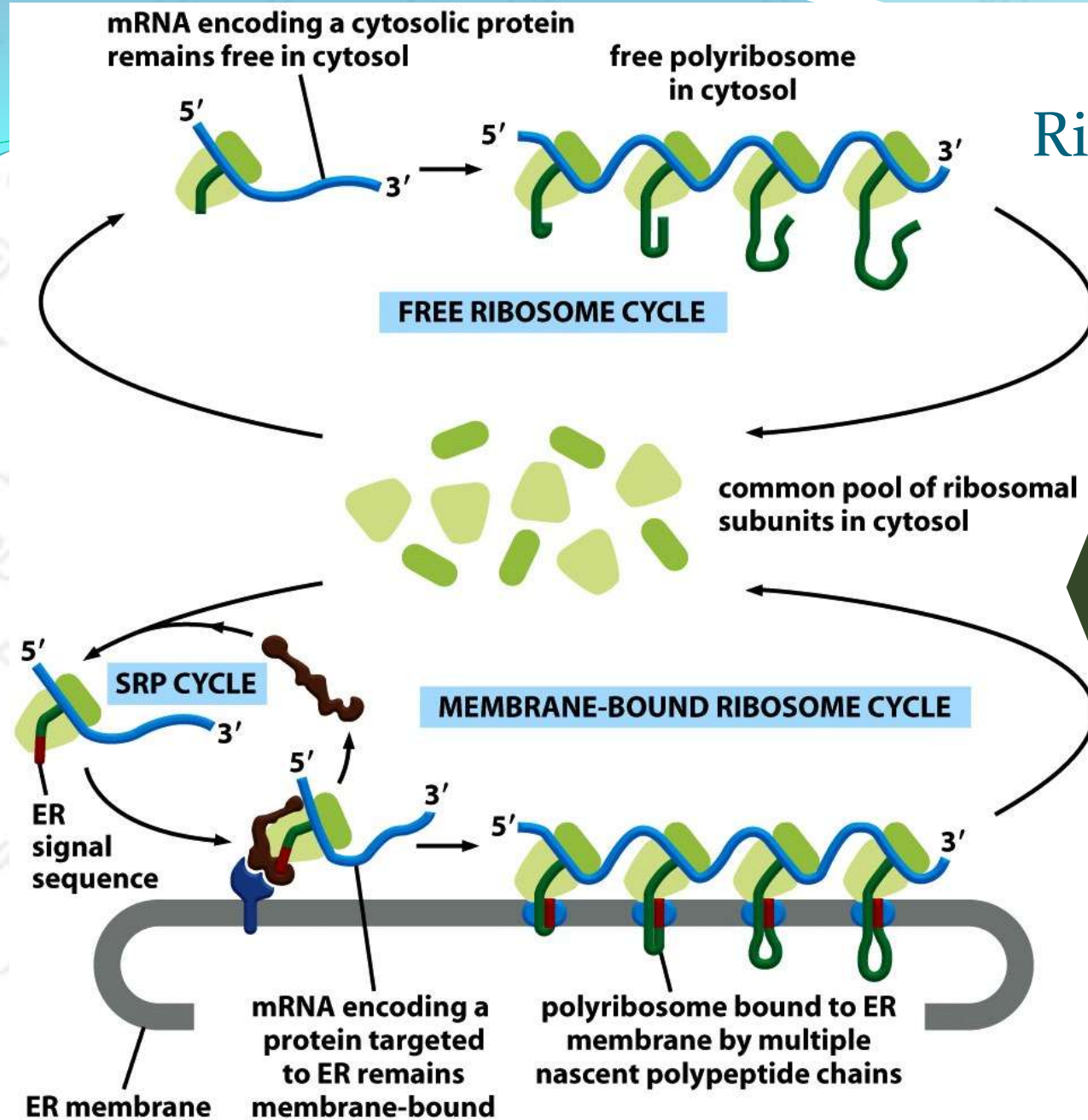
complexos **SRP-ribossomo** interrompem tradução impedindo a ligação dos **fatores de alongamento**

complexos **SRP-ribossomo** se ligam a **receptores de SRP** na membrana do **RE**

ligação ao **receptor de SRP** permite que **ribossomo** se ancore ao translocador (liberação de **SRP**)

translocação da cadeia polipeptídica através da membrana

# Ribossomos Livres ou Associados a Membrana



**poliribossomos** (diversos ribossomos traduzindo um **mRNA**) são atraídos a membrana do **RE**

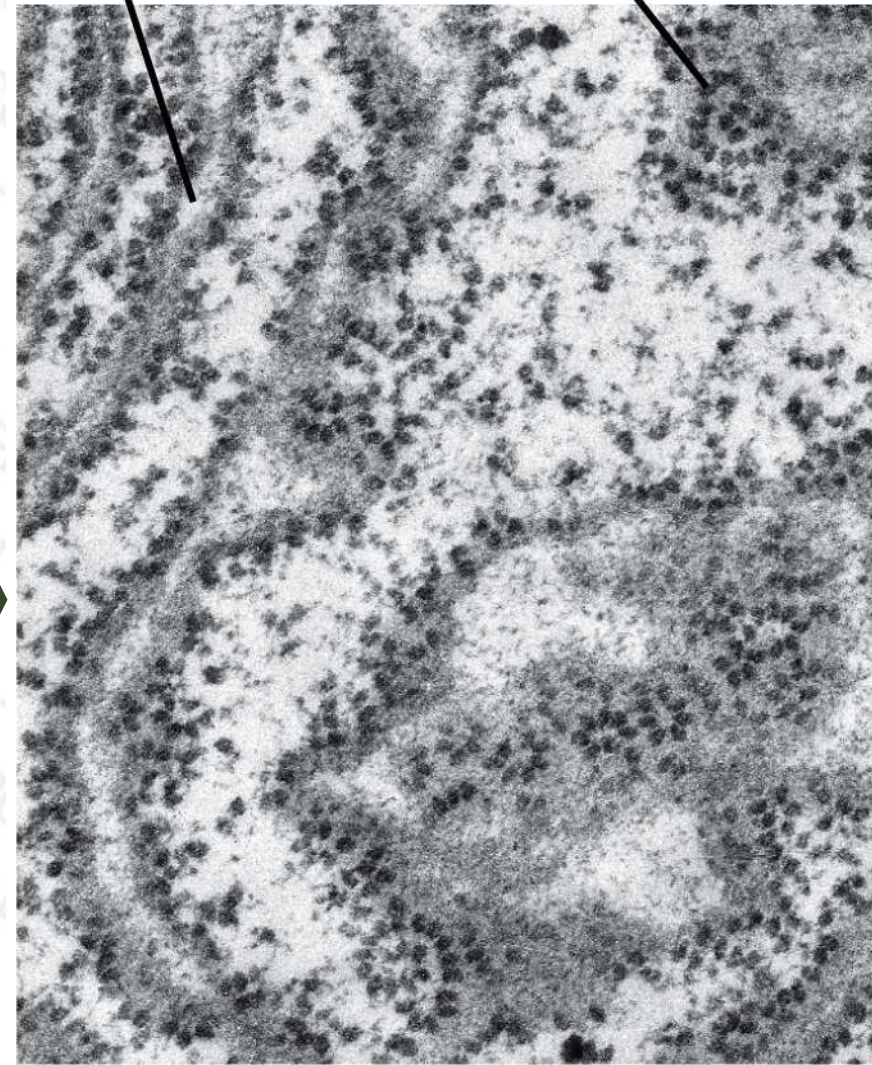
**mRNA** permanece próximo a membrana do **RE** graças a uma população intercambiável de **ribossomos** que iniciam e terminam a **tradução**



micrografia eletrônica dos **poliribossomos** associados a membrana do **RE**

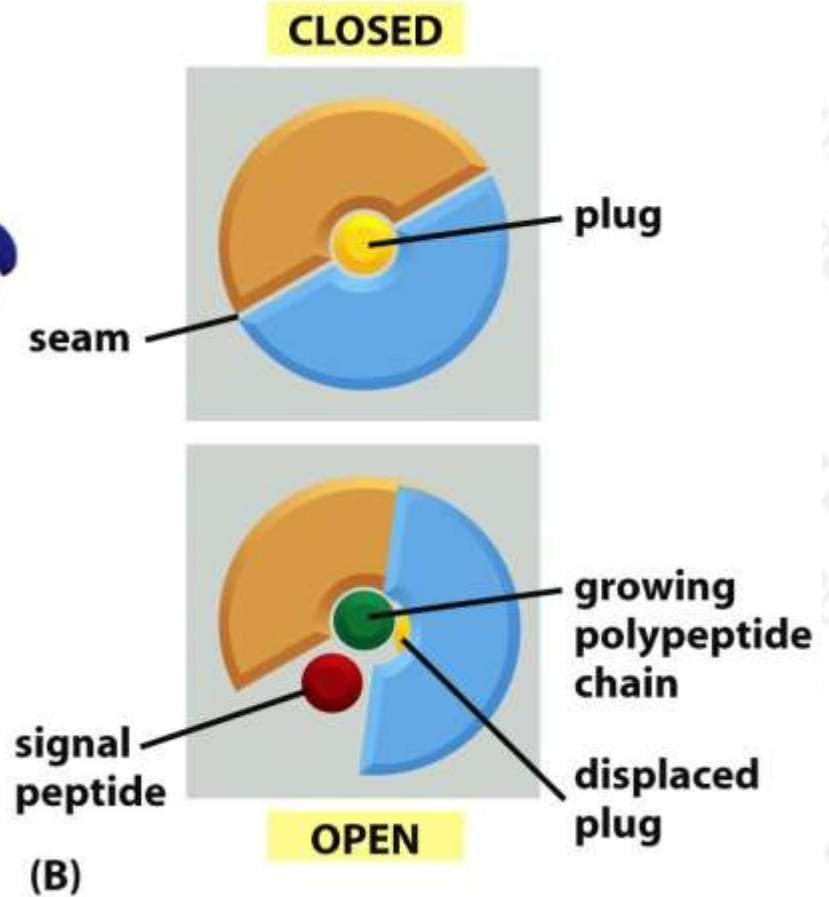
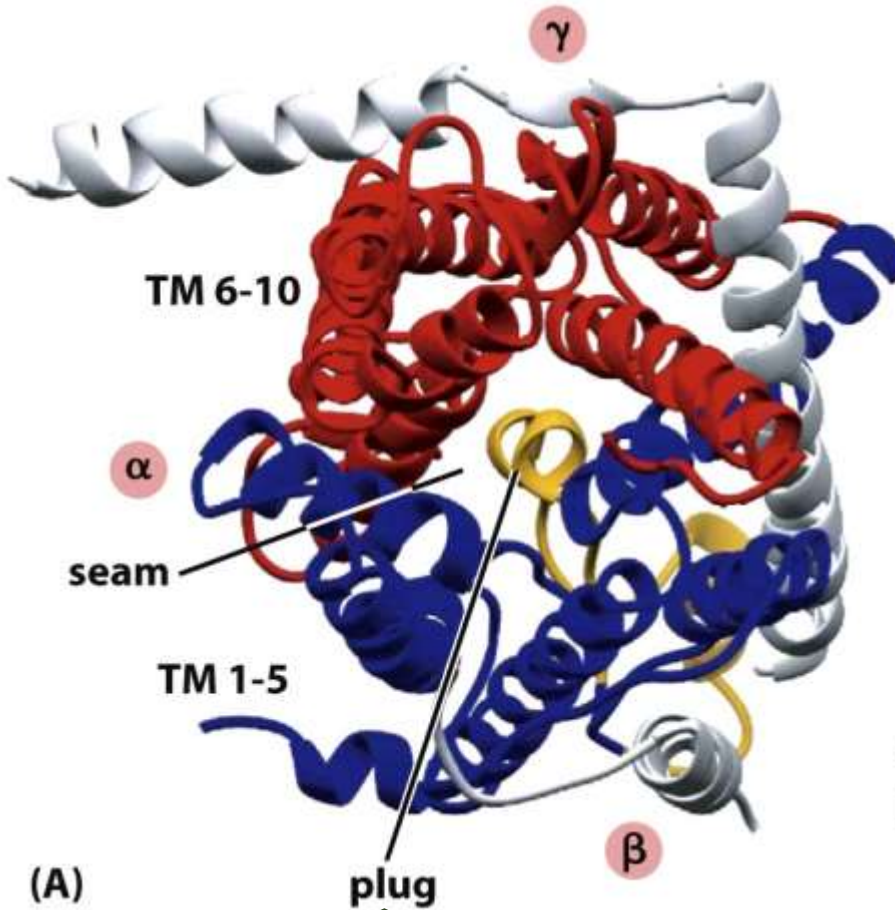
**ER membrane**

**polyribosome**



**400 nm**

# Estrutura do Complexo sec61



estrutura do **translocador** (sec61) contém três subunidades

pequena  $\alpha$ -hélice (**plug**) mantém o poro fechado no **translocador** em repouso (impede vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$ !)

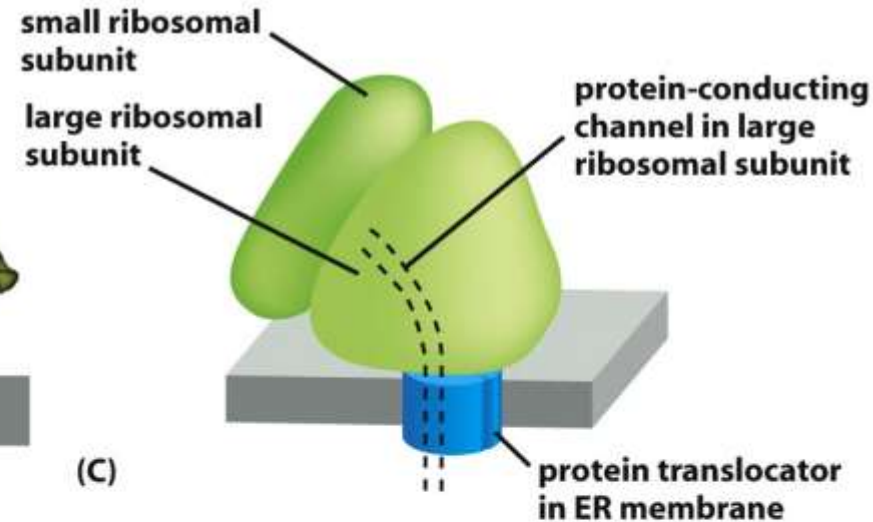
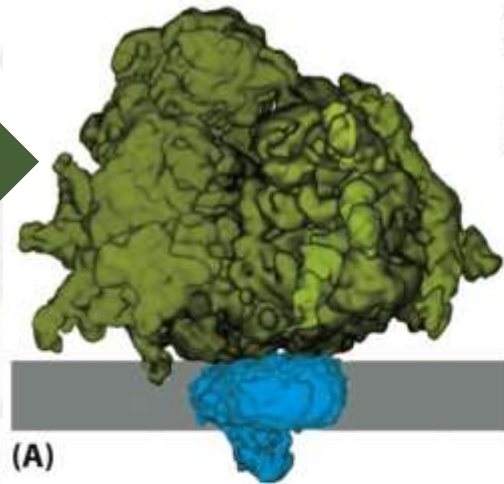
**plug** se desloca quando **translocador** é acionado e deixa a cadeia polipeptídica passar

sec61 pode se abrir lateralmente para inserir a cadeia polipeptídica na membrana (**proteínas integrais de membrana!**)

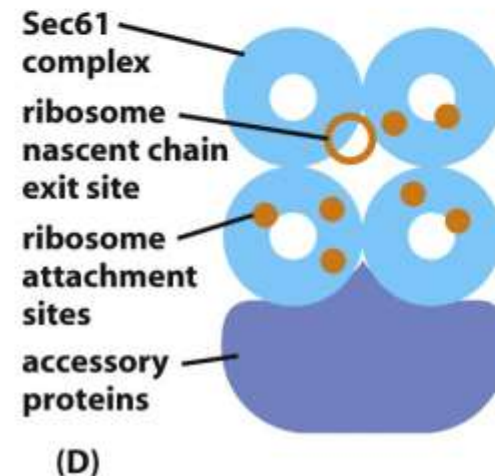
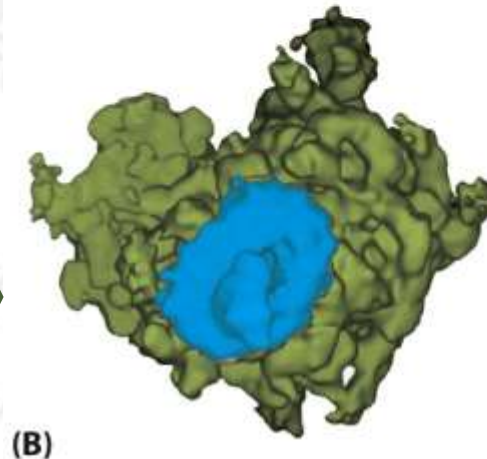


# Ribossomo Ligado ao Translocador

**ribossomo** se encaixa com precisão sobre **Sec61** (espaço interior contínuo ao **lúmen** do RE)



**Sec61** formam complexos de 4 unidades: nem todos participam da **translocação** (apoio para o **ribossomo** e **proteínas acessórias**)

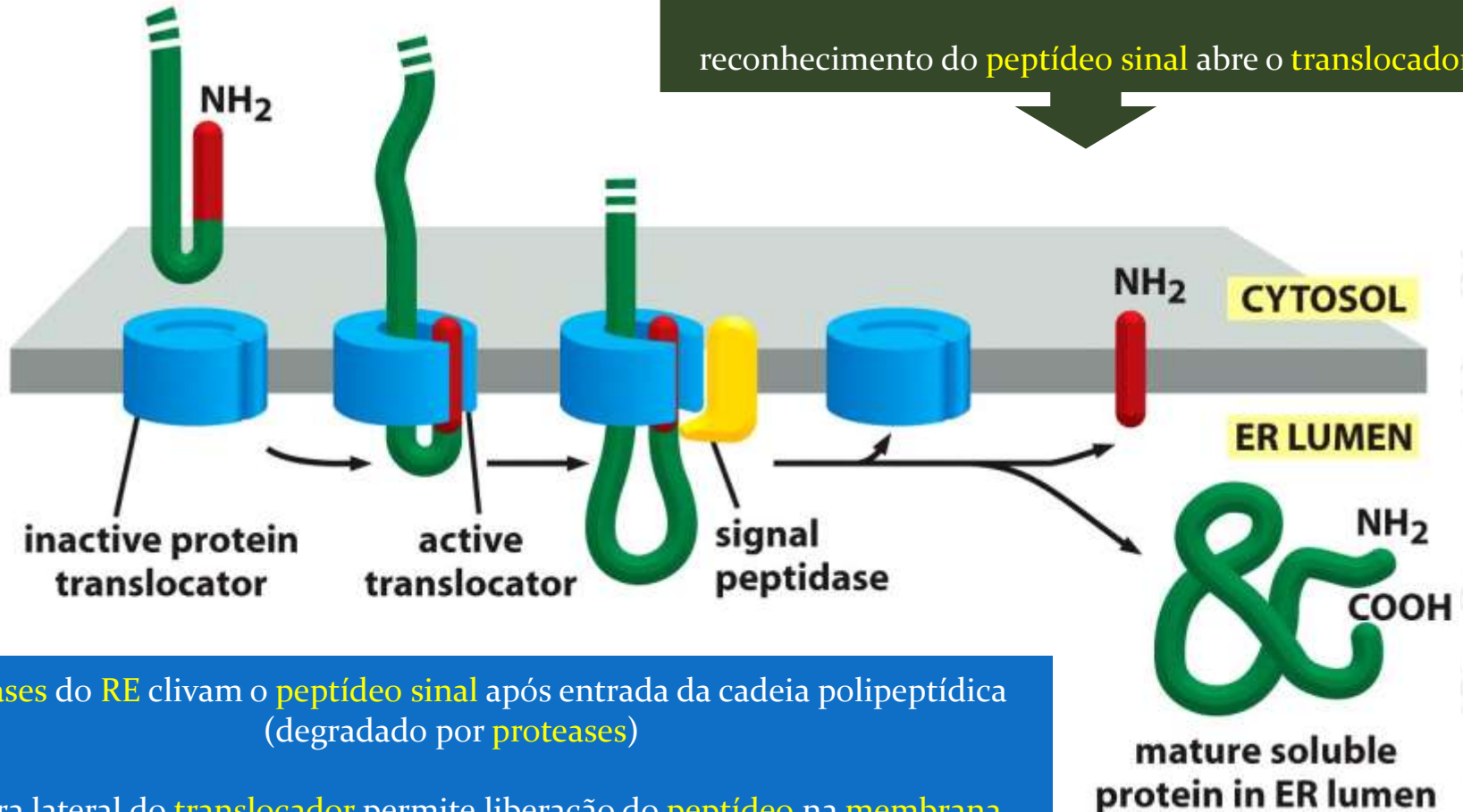




# Translocação de uma Proteína Solúvel Através da Membrana do RE

sequencia sinal é reconhecida duas vezes, por **SRPs** no citosol e pelo **translocador** (só proteínas corretas entram no RE)

reconhecimento do **peptídeo sinal** abre o **translocador**



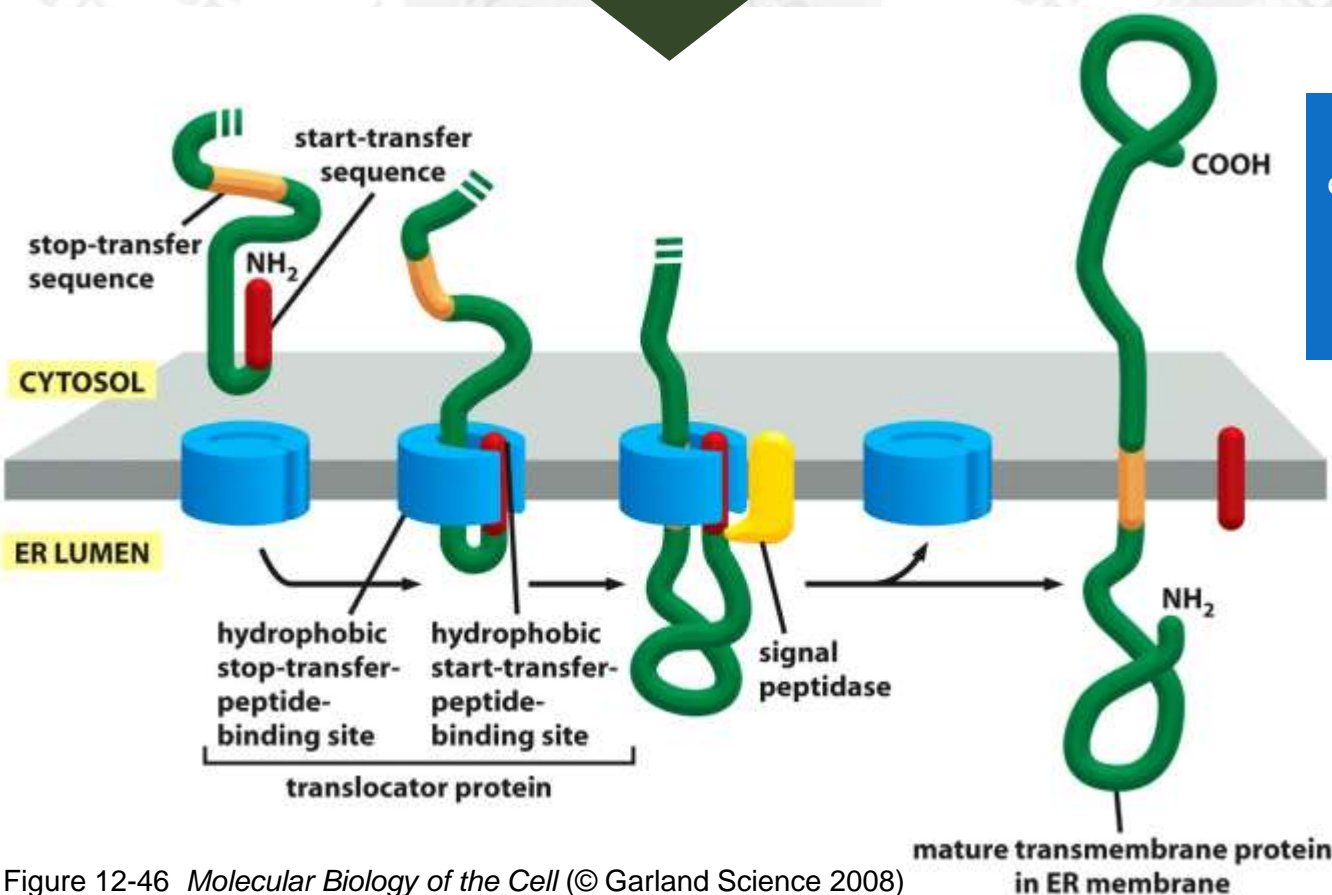
**peptidases** do RE clivam o **peptídeo sinal** após entrada da cadeia polipeptídica (degradado por **proteases**)

abertura lateral do **translocador** permite liberação do **peptídeo** na **membrana** (inserção de domínios hidrofóbicos das proteínas na **bicamada lipídica**!!)

# Translocação de uma Proteína Transmembrana

proteínas integrais de membrana tem domínios alocados no interior da **bicamada lipídica**

bolso hidrofóbico (além do **peptídeo sinal**) da cadeia polipeptídica determina a parada da translocação (**sequência de parada**)



após clivagem do **peptídeo sinal**, cadeia polipeptídica na região da **sequência de parada** é transferida para a membrana pela abertura do **translocador**

**N-terminal** voltado para o lúmen do **RE**

sequencia sinal de localização no RE (e de início da translocação) pode ser interna e não N-terminal

reconhecida por SRP de forma semelhante

neste caso a sequencia não será clivada por peptidases, proteína será inserida na membrana contendo o peptídeo sinal

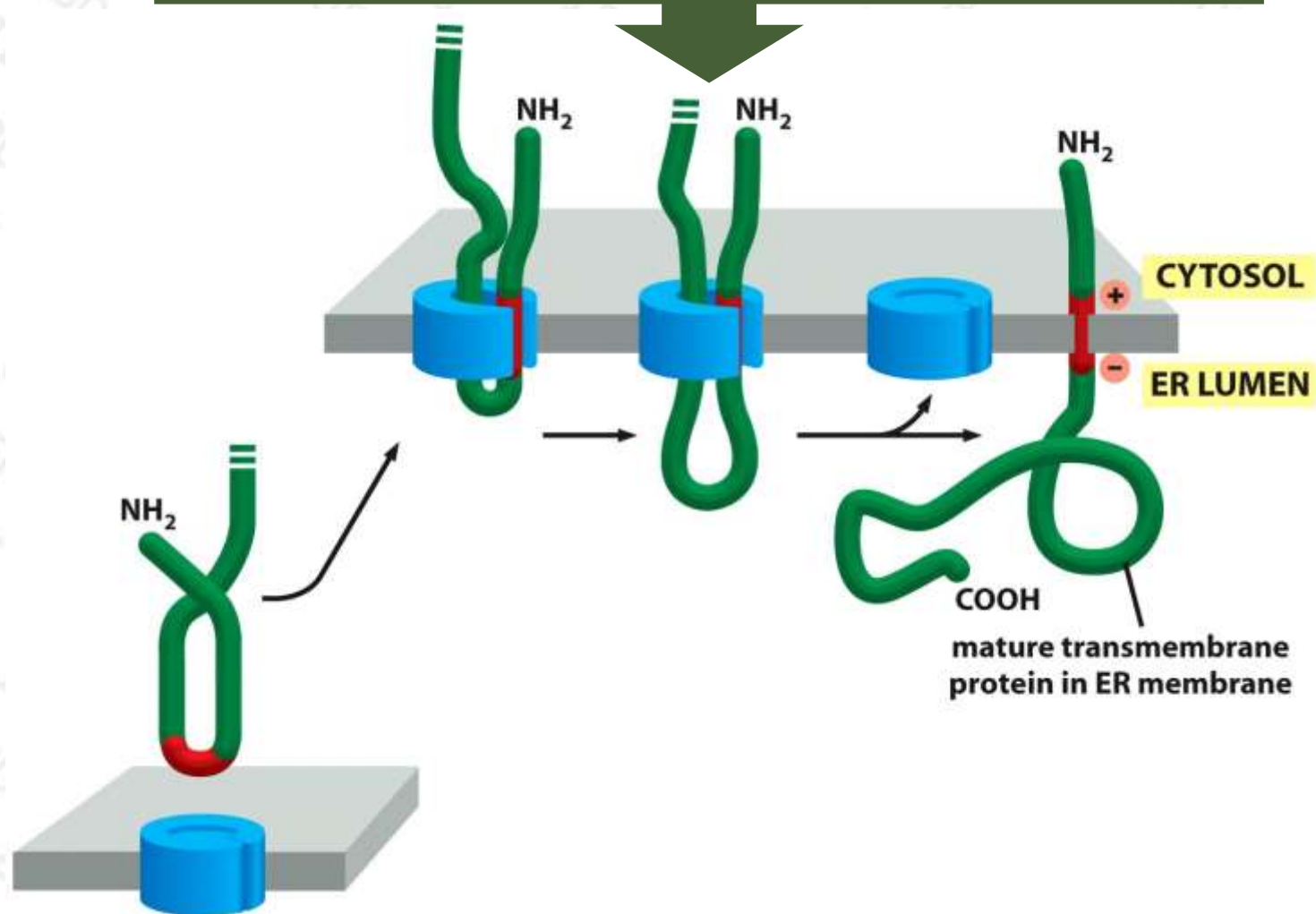


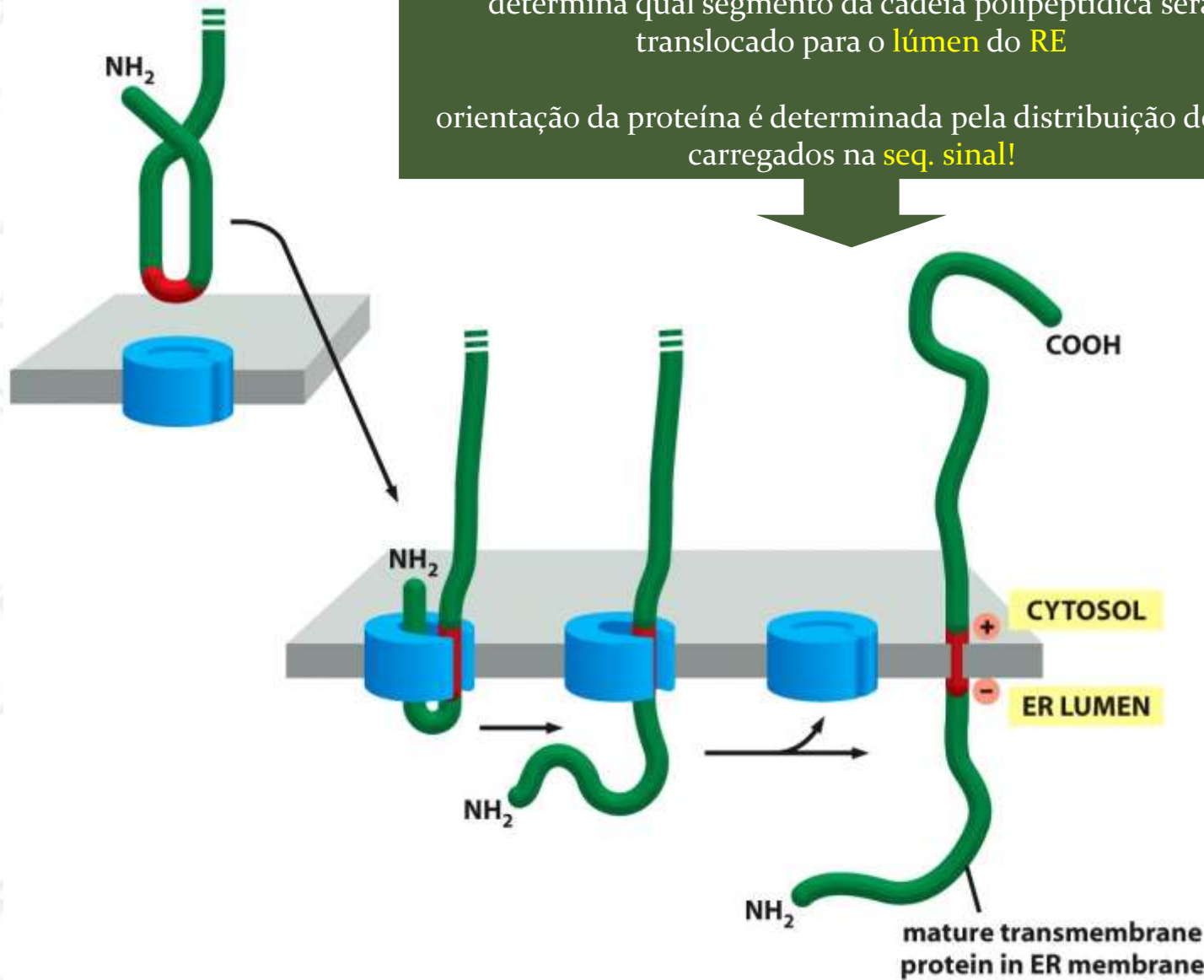
Figure 12-47 (part 1 of 2) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



seqs. sinal podem se ligar aos translocadores em ambos os sentidos

determina qual segmento da cadeia polipeptídica será translocado para o **lúmen** do RE

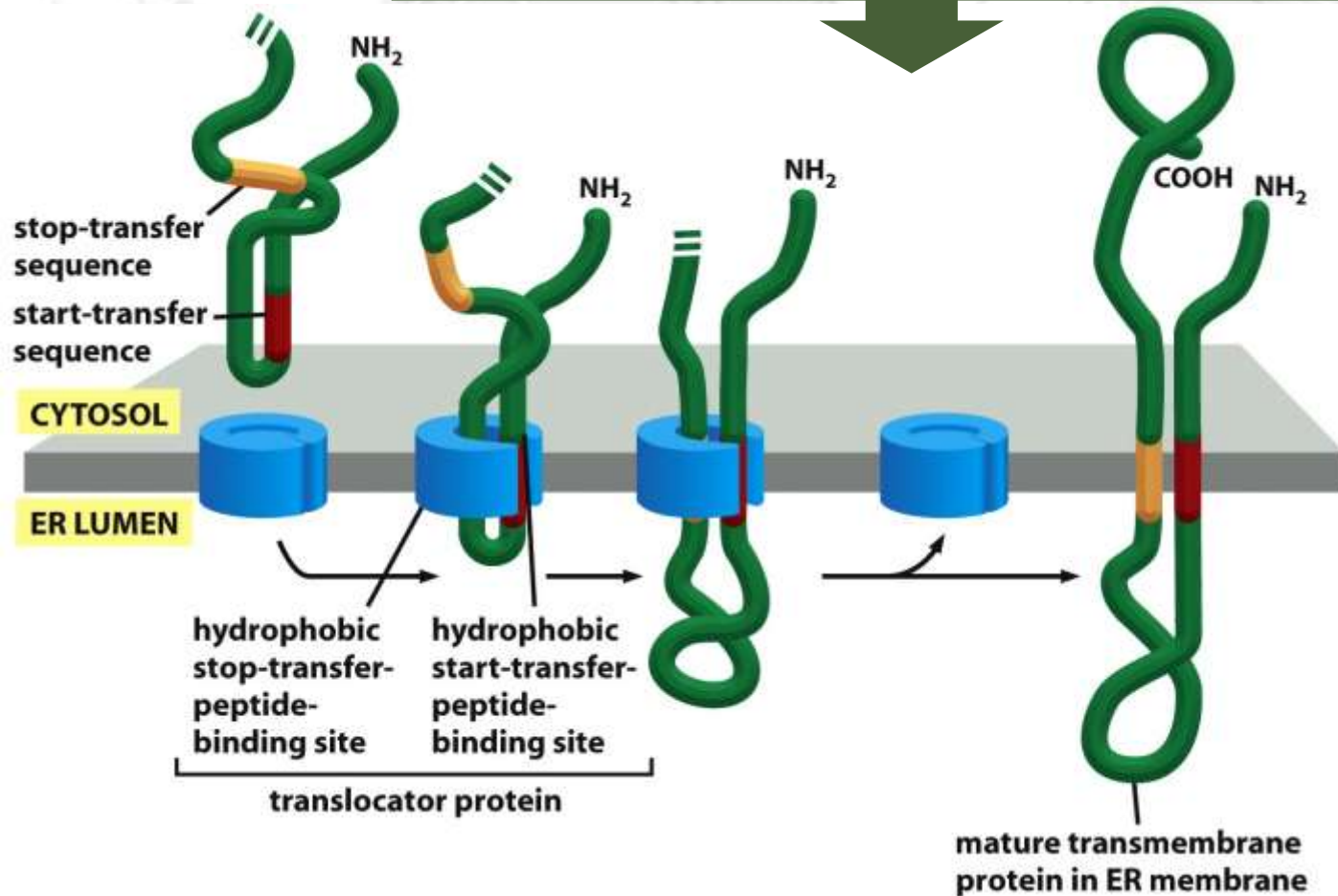
orientação da proteína é determinada pela distribuição dos aa carregados na **seq. sinal**!



# Integração de uma Proteína Transmembrana *Double-Pass*

em **proteínas transmembrana *multipass*** a cadeia polipeptídica atravessa a membrana varias vezes

**peptídeo sinal interno** inicia a translocação que continua até encontrar um **domínio hidrofóbico de parada** (cadeia polipeptídica é transferida pra membrana)



em proteínas *multipass* mais complexas: diversos domínios hidrofóbicos

primeiro peptídeo hidrofóbico reconhecido pelo SRP define o frame

seqs de início e parada de translocação (liberação da cadeia na membrana a cada stop)

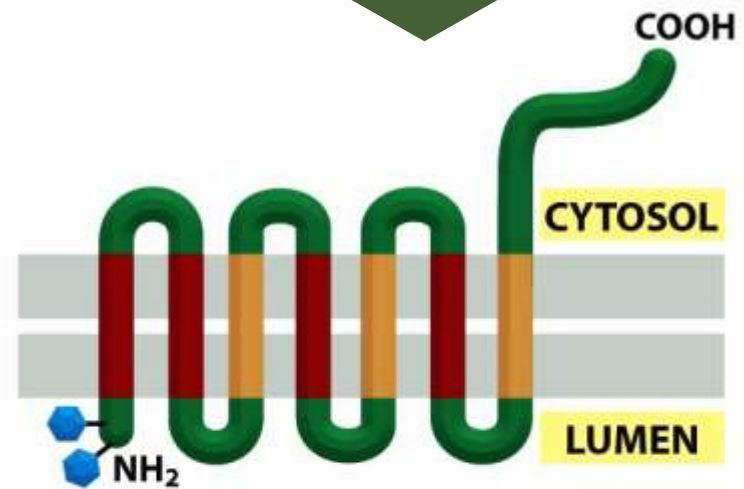
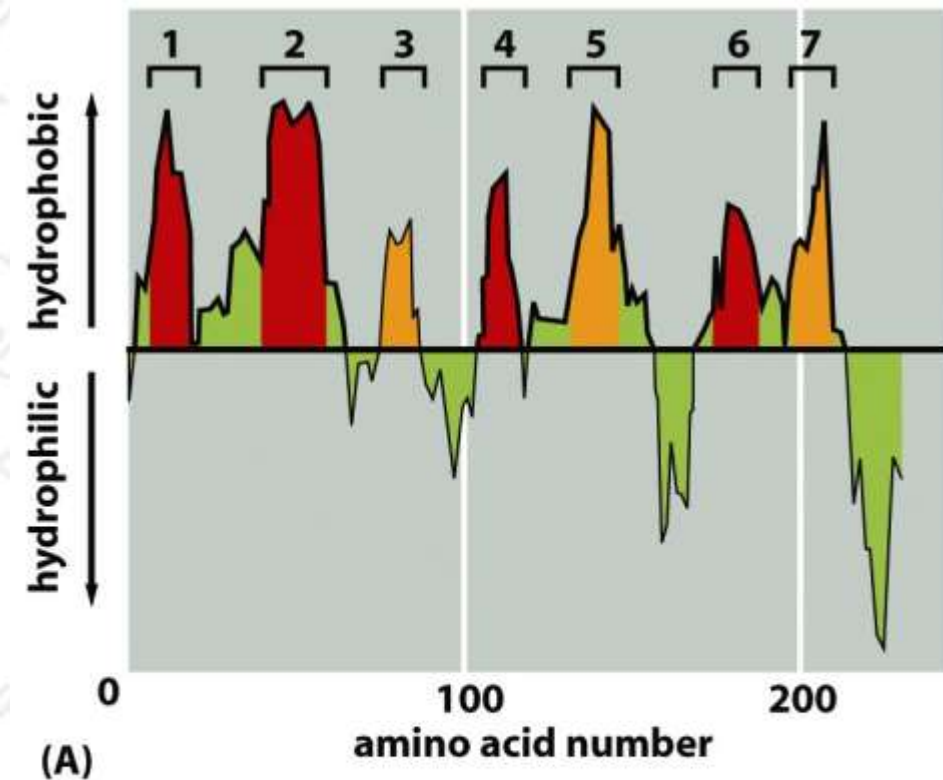
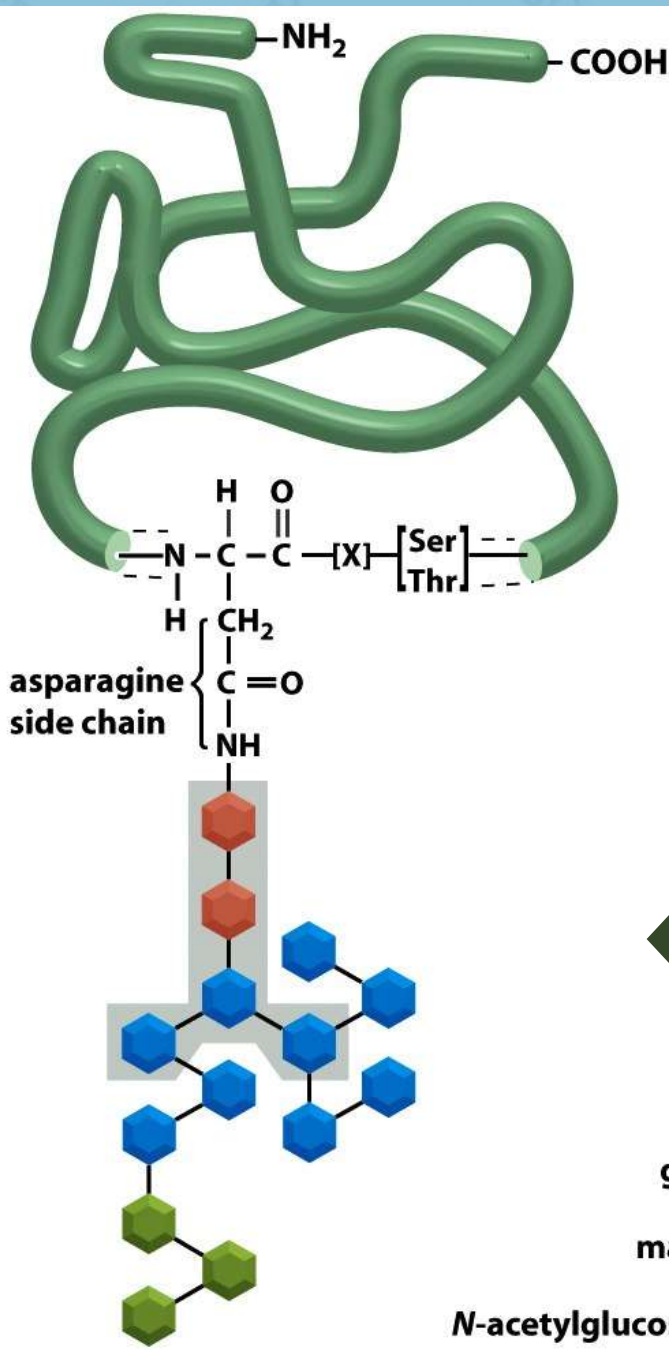


Figure 12-49 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Oligossacarídeo Precursor da N-glicosilação

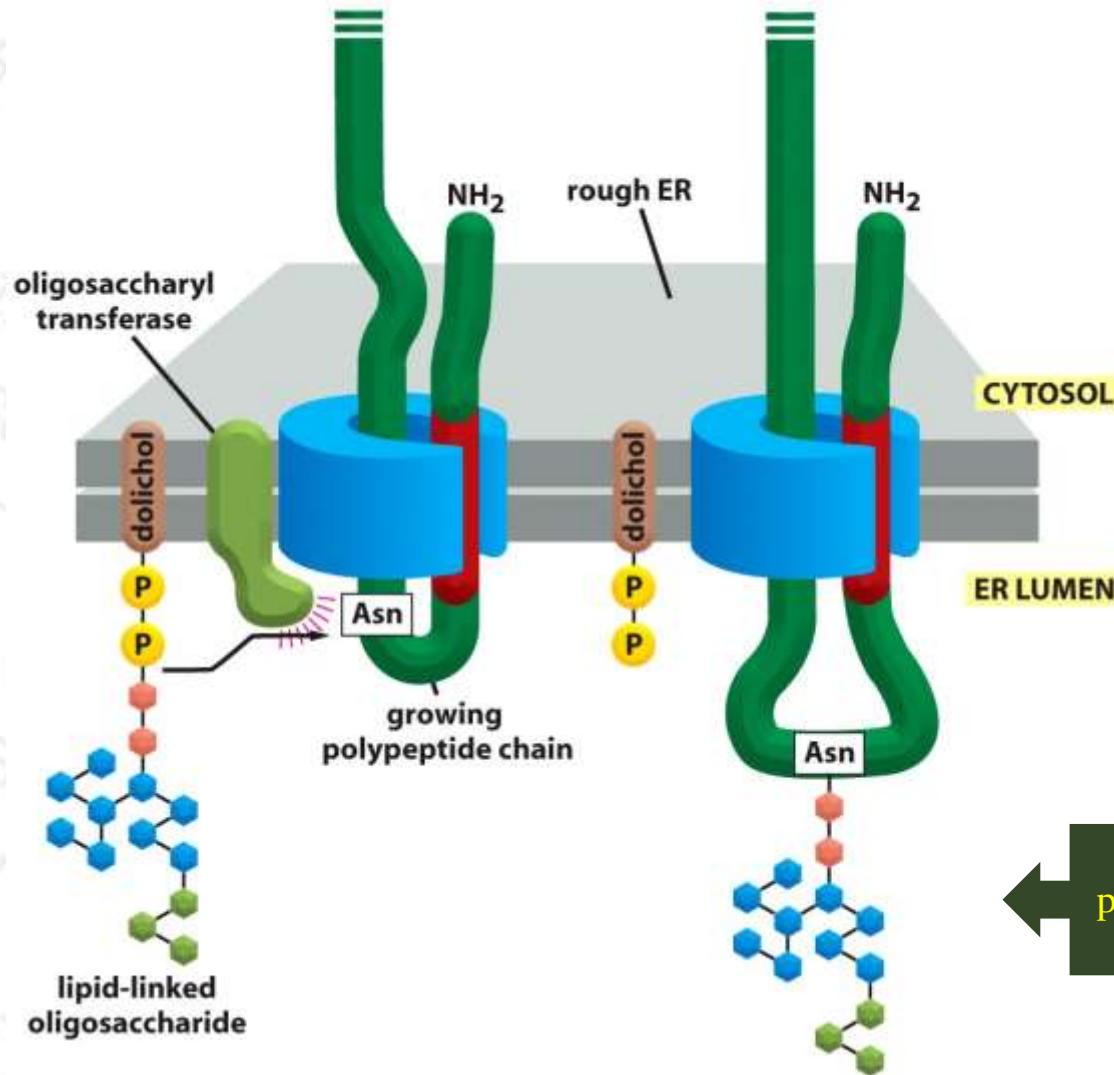


residentes definitivas do RE possuem sequência de retenção no C-terminal (ex: BIP da família das Hsp-70)

proteínas de passagem pelo retículo recebem açúcares (N-glicosilação)

transferência “em bloco” de uma cadeia oligossacarídica (14 açúcares) a cadeia lateral de uma asparagina (N) da proteína

# Glicosilação de Proteínas no RE Rugoso.



oligossacarídeo fica ancorado ao **dolicol** na membrana luminal do **RE**

transferência em bloco do oligossacarídeo é catalizada em um único passo pela **oligosacaril-transferase** na membrana interna

**oligosacaril-transferase** se associa a cada **translocon** (scaneia e glicosila a cadeia polipeptídica nascente)

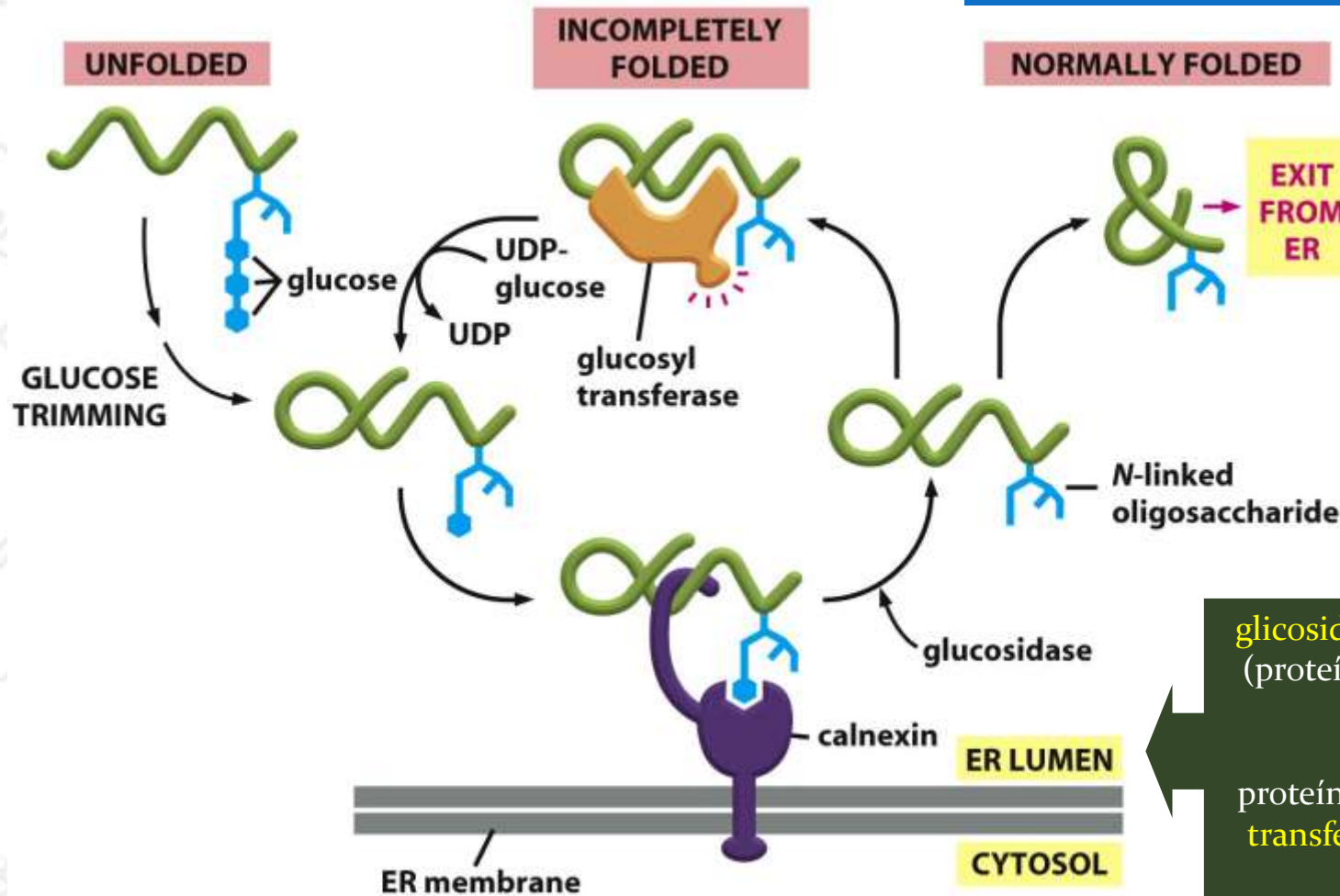
oligossacarídeo é ancorado ao **dolicol** por um **pirofosfato** (fornece a energia de ativação para a **glicosilação**)

# Oligossacarídeos Marcam o Enovelamento Proteico

porque a **glicosilação** é comum em proteínas que entram no **RE**?

proteínas no **RE** requerem **N-glicosilação** para se enovelarem, **glicoses** são “podadas” no processo

**calnexina** retém proteínas com uma **glicose** original do oligossacarídeo



**glucosidase** cliva a ultima **glicose** (proteína enovelada solta-se da chaperona)

proteína mal enovelada: **glucosil transferase** recoloca glicose no oligossacarídeo



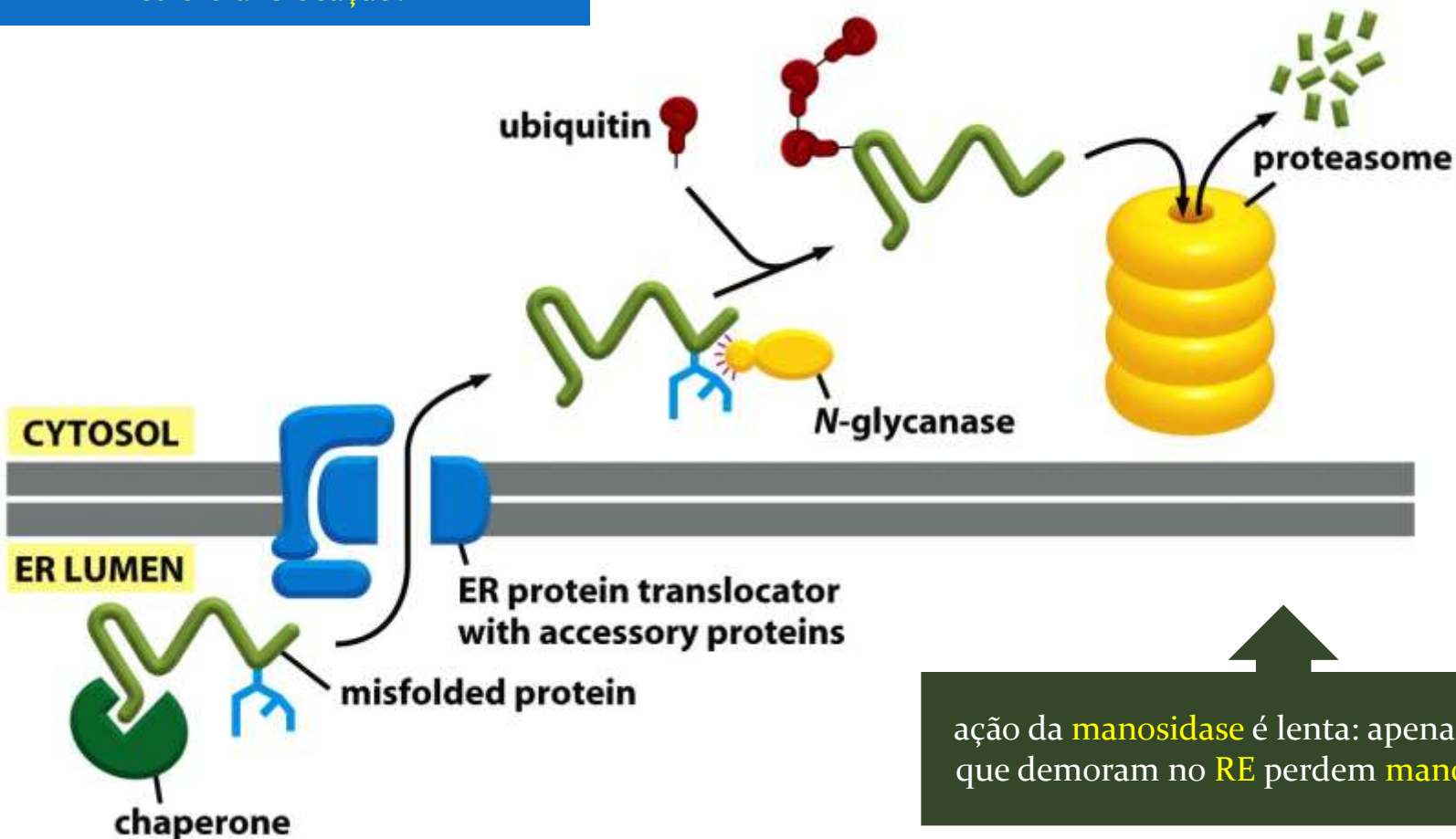
# Proteínas Mal-Enoveladas são Exportadas do RE e Degradadas no Citosol

proteínas que não atingem estrutura enovelada final são devolvidas ao **citossol**

**retro-translocação!**

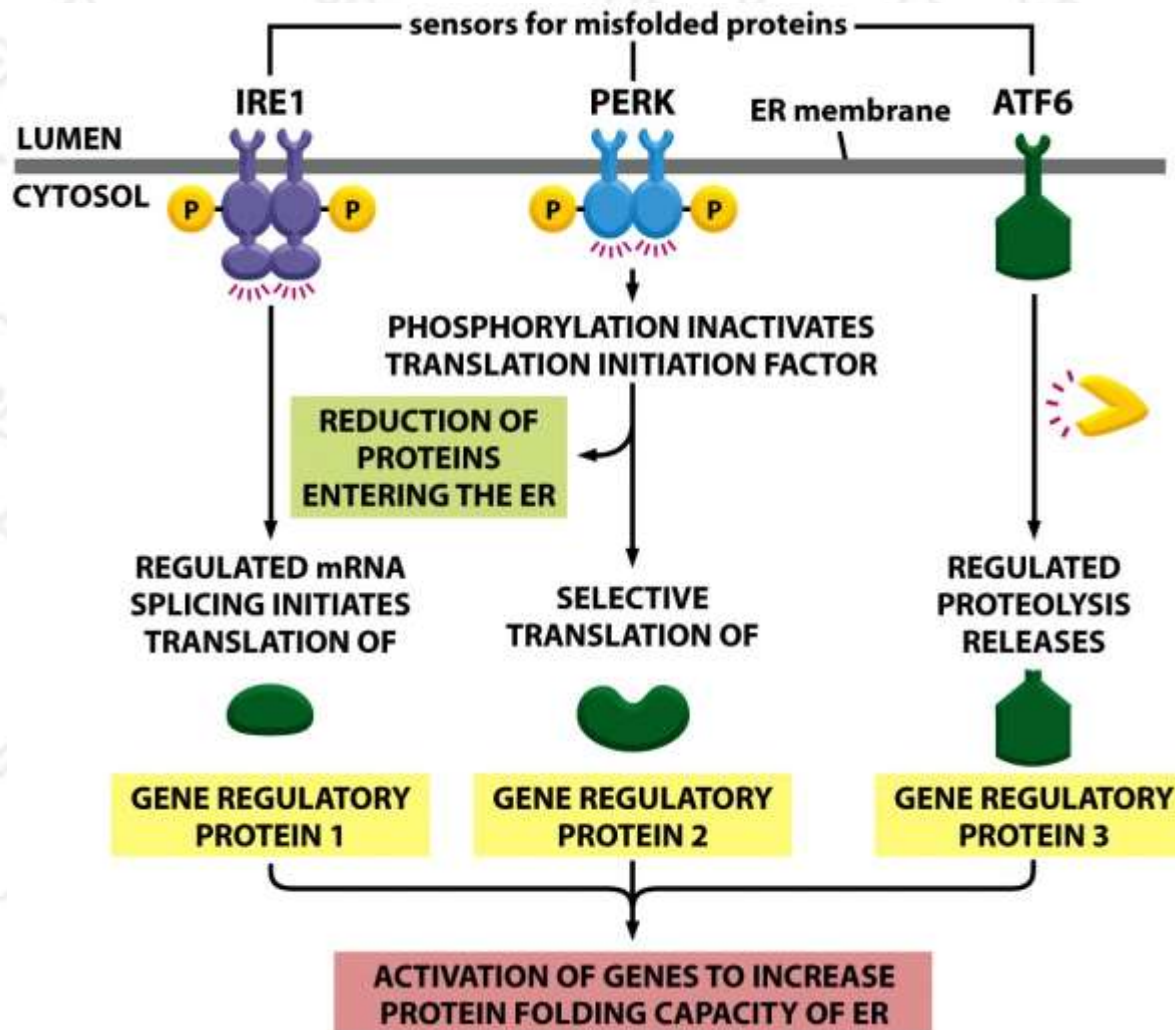
**oligossacarídeo** serve como *timer* do tempo gasto pela proteína no **RE**

detecção da ausência de uma **manose**!!



ação da **manosidase** é lenta: apenas proteínas que demoram no **RE** perdem **manose** (*timer*)

# Resposta ao Acúmulo de Proteínas Mal-Enoveladas no Lúmen do RE



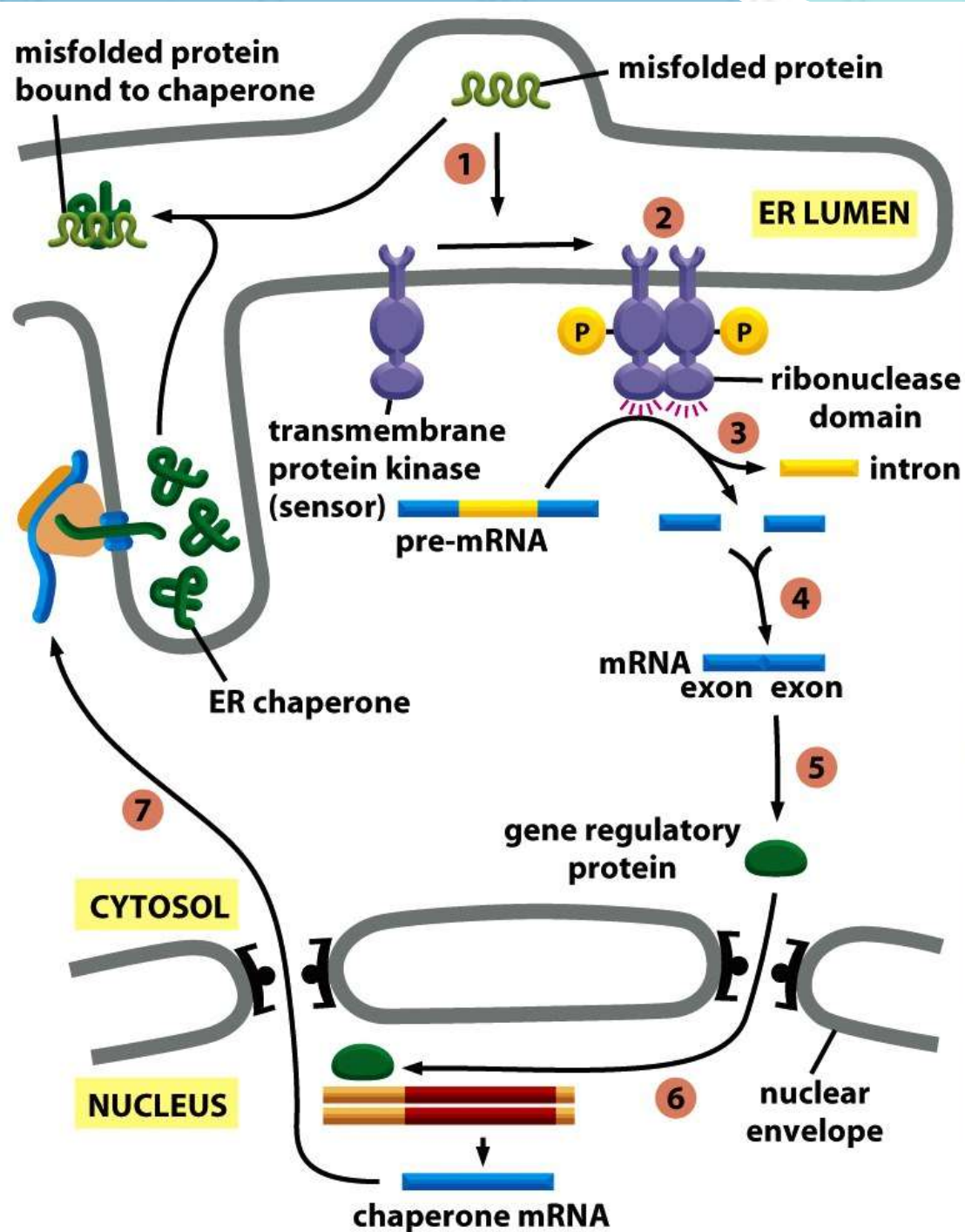
proteínas mal-enoveladas ativam 3 vias distintas de resposta ao **estresse de enovelamento**

**Via 2:** proteínas mal-enoveladas acionam uma **cinase de membrana (PERK)** que inibe um **fator de iniciação da tradução**

↓tradução: ↓influxo de proteínas no RE

**Via 3:** receptor de membrana (**ATF6**) ativado por proteínas mal-enoveladas tem sua porção citosólica clivada

**proteína regulatória gênica:** ↑genes de resposta ao **stress** de enovelamento



**1 MISFOLDED PROTEINS IN ER SIGNAL THE NEED FOR MORE ER CHAPERONES BY ACTIVATING A TRANSMEMBRANE KINASE**

**2 ACTIVATED KINASE TURNS INTO AN ENDORIBONUCLEASE**

**3 ENDORIBONUCLEASE CUTS SPECIFIC RNA MOLECULES AT TWO POSITIONS, REMOVING AN INTRON**

**4 TWO EXONS ARE LIGATED TO FORM AN ACTIVE mRNA**

**5 mRNA IS TRANSLATED TO MAKE A GENE REGULATORY PROTEIN**

**6 GENE REGULATORY PROTEIN ENTERS NUCLEUS AND ACTIVATES GENES ENCODING ER CHAPERONES**

**7 CHAPERONES ARE MADE IN ER, WHERE THEY HELP FOLD PROTEINS**



# Cytoplasmic IRE1 $\alpha$ -mediated *XBP1* mRNA Splicing in the Absence of Nuclear Processing and Endoplasmic Reticulum Stress<sup>\*[S]</sup>

Received for publication, March 3, 2006, and in revised form, April 26, 2006 Published, JBC Papers in Press, April 27, 2006, DOI 10.1074/jbc.M602030200

Sung Hoon Back<sup>‡</sup>, Kyungho Lee<sup>‡1</sup>, Elizabeth Vink<sup>§</sup>, and Randal J. Kaufman<sup>‡§¶2</sup>

From the <sup>‡</sup>Howard Hughes Medical Institute and Departments of <sup>§</sup>Biological Chemistry and <sup>¶</sup>Internal Medicine, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, Michigan 48109-0650

*“Our experiments cannot rule out the possibility that some of the substrate RNA enters the **nucleus** where the **splicing** reaction may occur. Therefore, although the preponderance of our data indicates that cytoplasmic **splicing** of *XBP1* mRNA occurs, we cannot rule out that the reaction also occurs in the **nucleus**”*

# Compartimentalização Intracelular (parte 3): Mitocôndria e Peroxissoma

*Rafael H.F. Valverde*

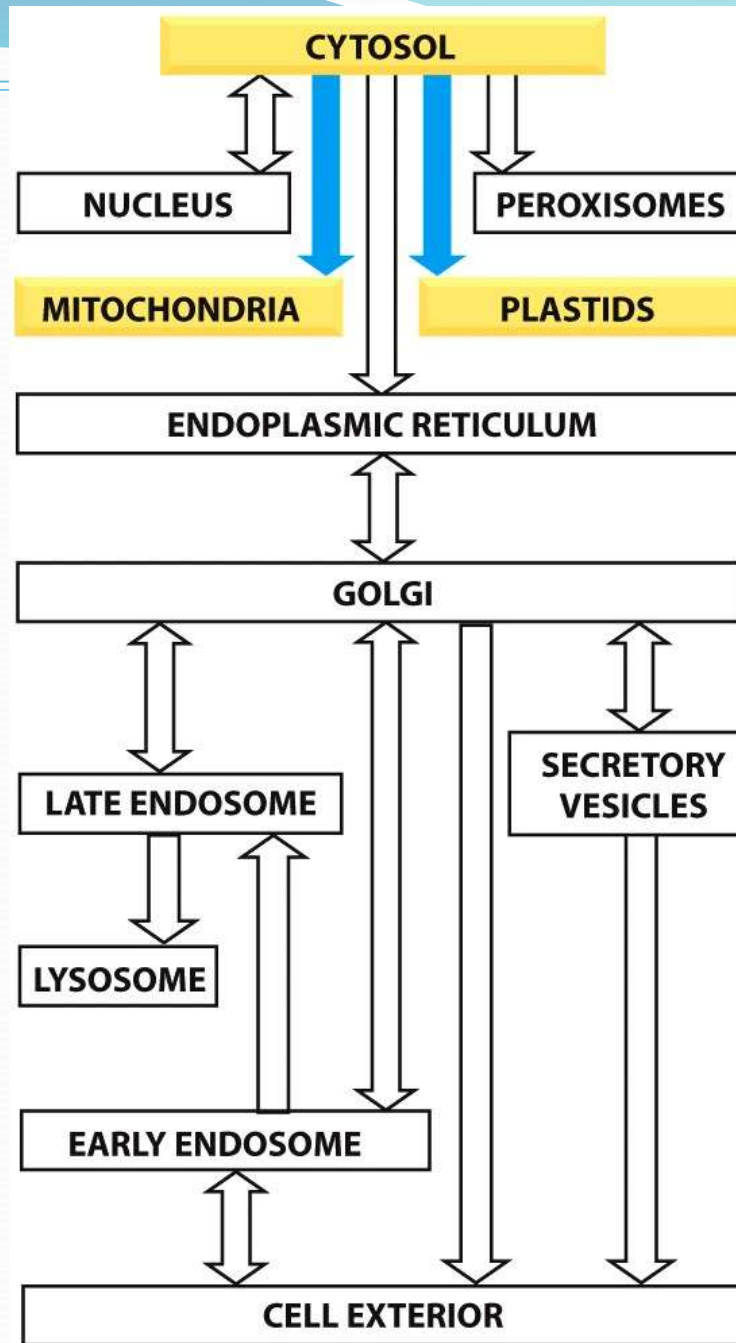
[valverde@biof.ufrj.br](mailto:valverde@biof.ufrj.br)

Laboratório de Biomembranas G-37

Biologia Celular para Nanotecnologia  
IBCCFº UFRJ

Maio – 2020

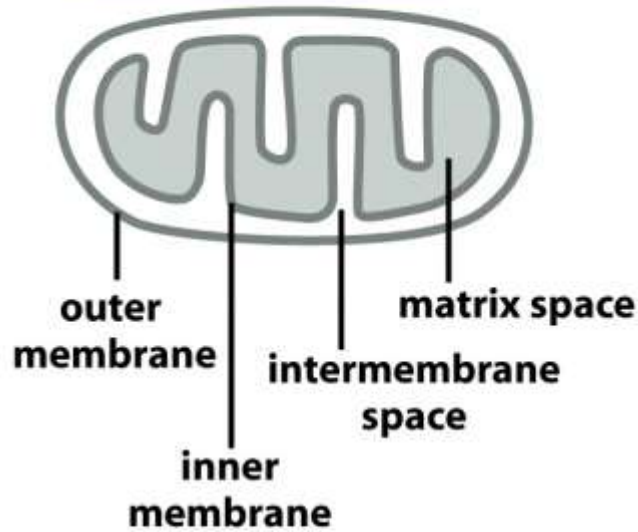




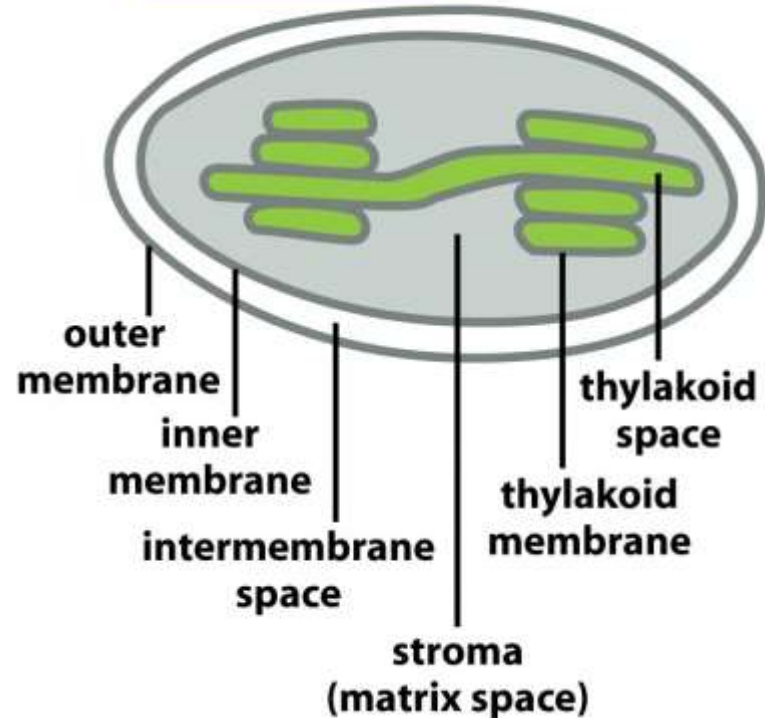


# Os Subcompartimentos de Mitocôndrias e Cloroplastos

(A) MITOCHONDRION



(B) CHLOROPLAST



mitocôndrias e cloroplastos possuem duas **bicamadas lipídicas**

especializadas na síntese de **ATP**

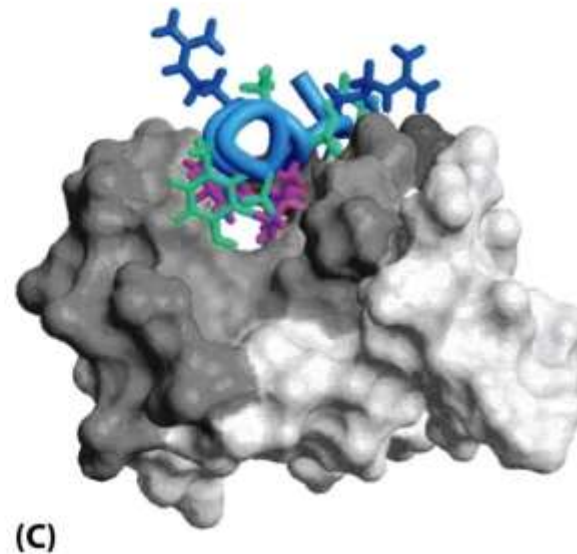
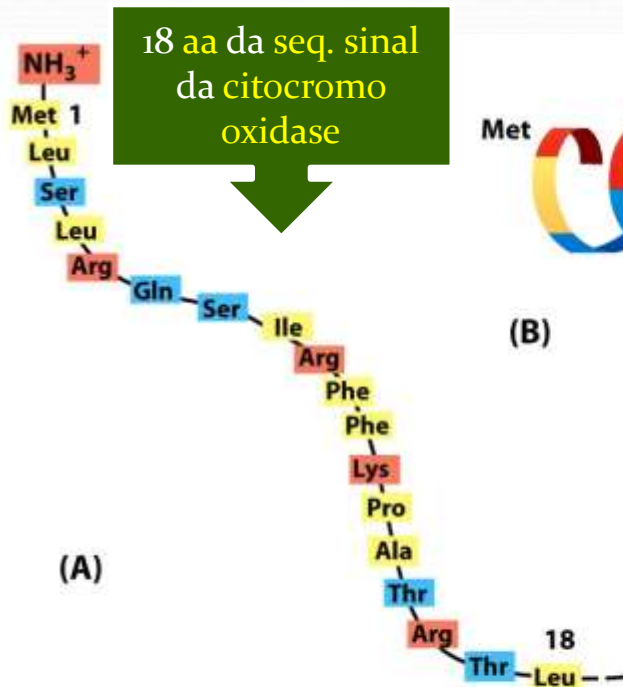
possuem **DNA**, **ribossomos**, componentes da síntese proteica e ptns importadas do **citósol**

sub-compartimentos em **mitocôndrias**: **matriz** e o **espaço intermembranar**

duas **membranas**: **interna** forma **cristas** e a **externa** contacta o **citósol**

**cloroplastos** possuem ainda as **membranas tilacóides**!

# A Sequencia Sinal de Importação Mitochondrial



proteínas **mitocondriais** são capturadas no **citossol** (**translocação pós-traducional!!**) ( $\neq$  RE)  
capturadas segs após tradução como **proteínas precursoras mitocondriais** (não enoveladas)

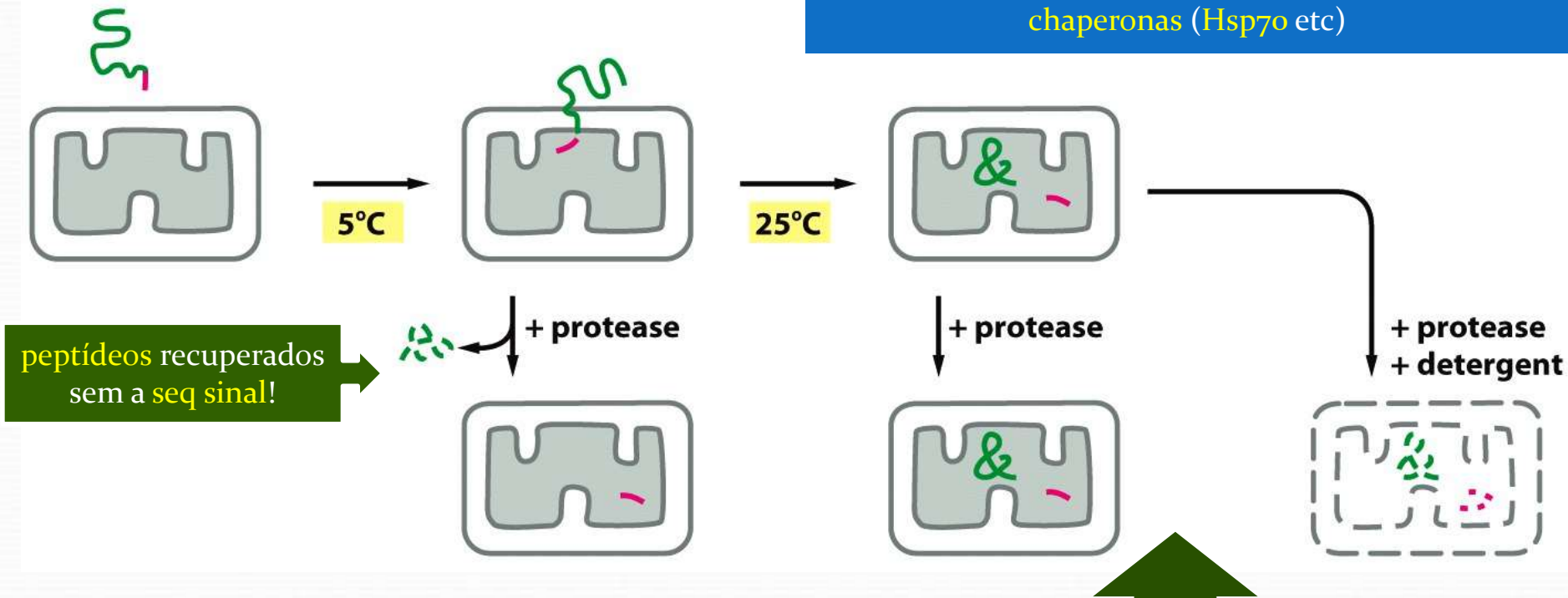
parte hidrofóbica da **sequência sinal** é reconhecida por proteína receptora

ptns destinadas a **matriz** tem uma **seq sinal** formando uma **hélice anfifílica** (aa apolares de um lado e aa **polares** em outro): **receptores** reconhecem a configuração!

- aa positivamente carregado
- aa hidrofóbico
- aa neutro

# Durante a Translocação para a Matriz a Proteína Atravessa duas Bicamadas

proteínas precursoras mitocondriais não se enovelam imediatamente após tradução: associam-se a chaperonas (Hsp70 etc)



peptídeos recuperados sem a seq sinal!

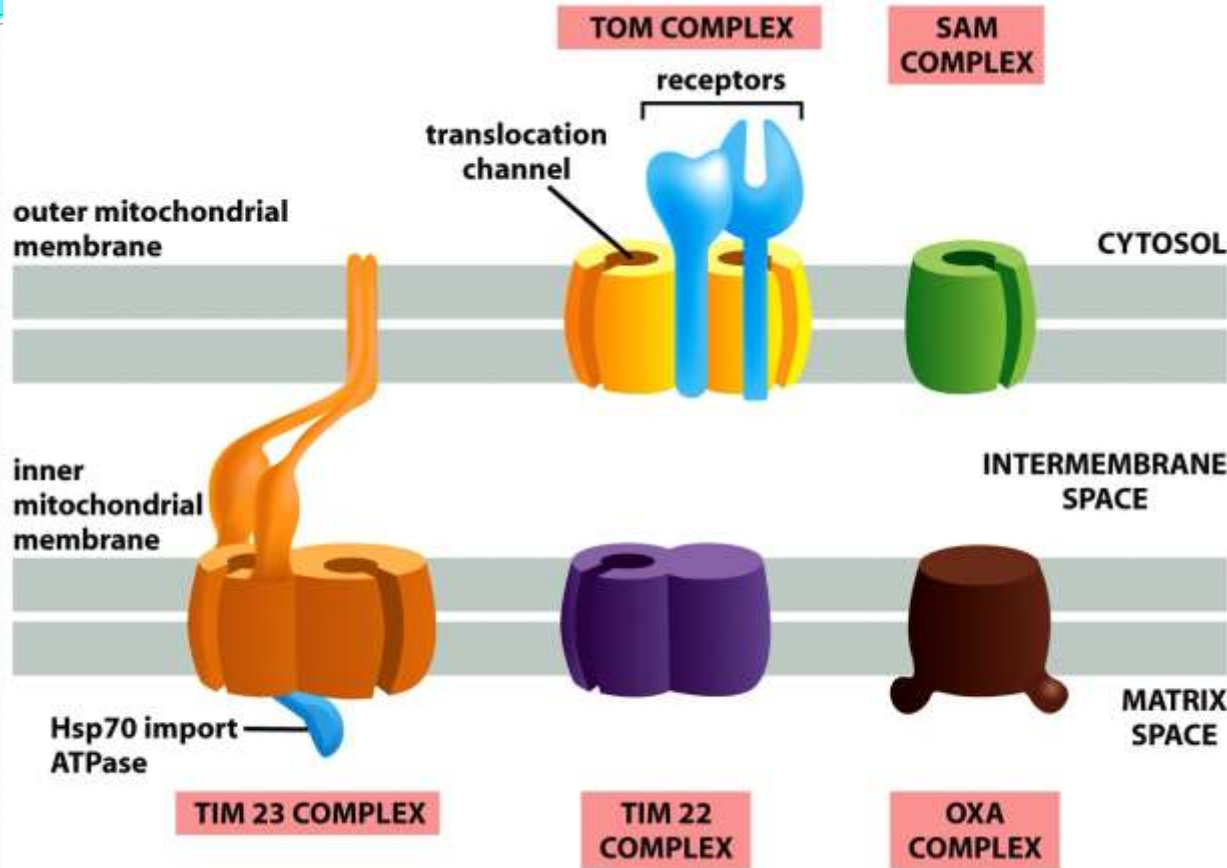
conhecimento da translocação mitocondrial é baseado em experimentos com mitocôndrias isoladas e proteínas precursoras radioativas

proteínas precursoras podem chegar a matriz atravessando ambas as membranas de uma vez (*in vitro*)

parar a translocação e tratar com protease recupera peptídeos sem peptídeo sinal (peptidase na matriz)



# Os Translocadores Mitocondriais



3

proteínas codificadas no **núcleo** passam por **TOM** (insere proteínas na **membrana externa**)

**proteínas** ricas em **folhas  $\beta$**  passam por **SAM** (ajuda o enovelamento)

**TIM<sub>23</sub>** transloca proteínas solúveis para a **matriz** ou as insere na **membrana interna**

**TIM<sub>22</sub>** insere proteínas específicas na **membrana interna** (**transportadores** de ATP, ADP e Pi por ex)

**OXA** (insere proteínas sintetizadas na mitocôndria)

1

translocadores da membrana mitocondrial: **TOM** e **TIM**

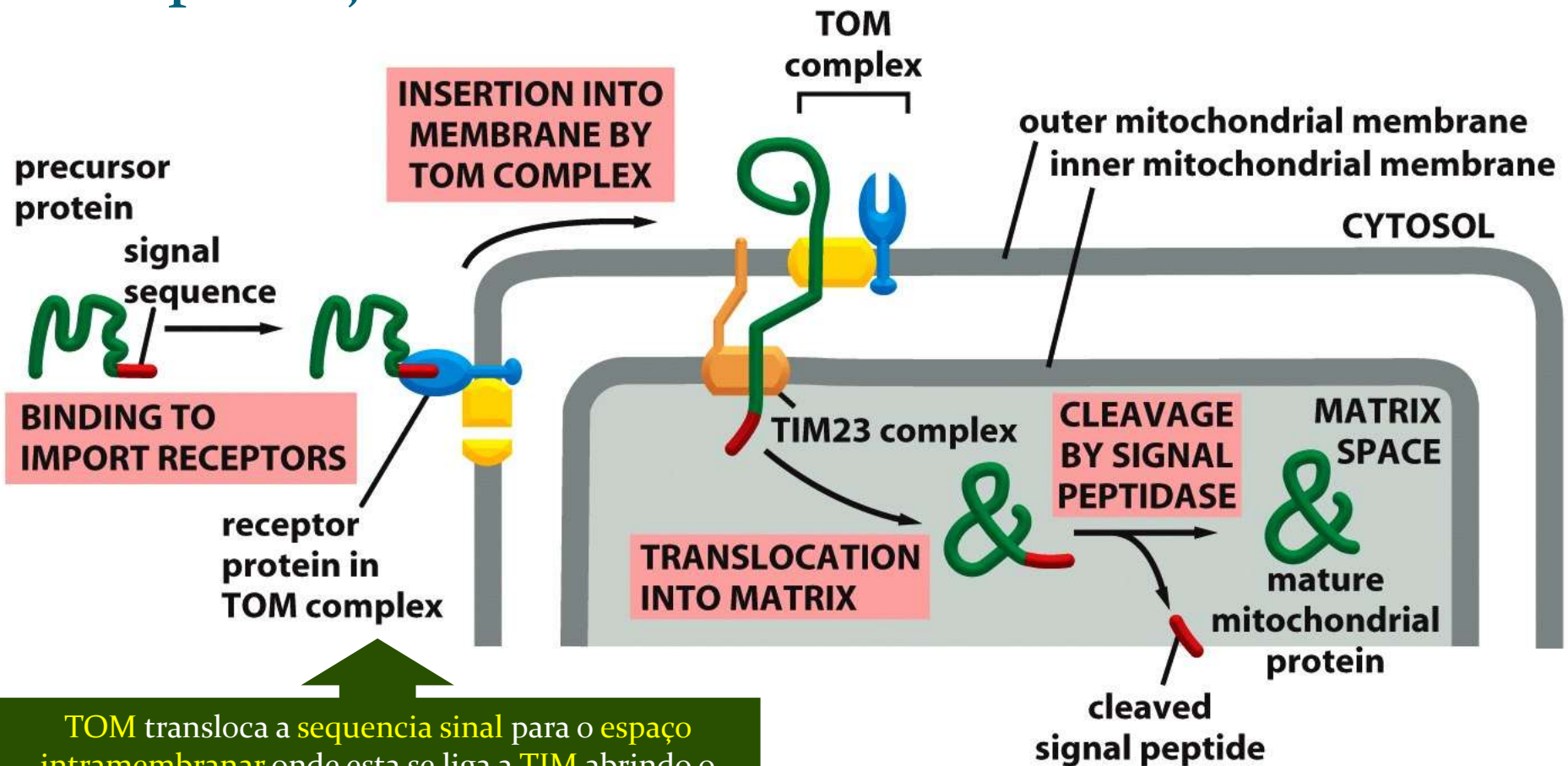
*“translocase of the outer” e “of the inner membrane”*

2

**TOM** transfere proteínas na membrana externa e complexos **TIM** (**23** e **22**) na interna

além dos **translocadores** os complexos contém receptores para **proteínas precursoras**

# Importação Proteica em Mitocôndrias

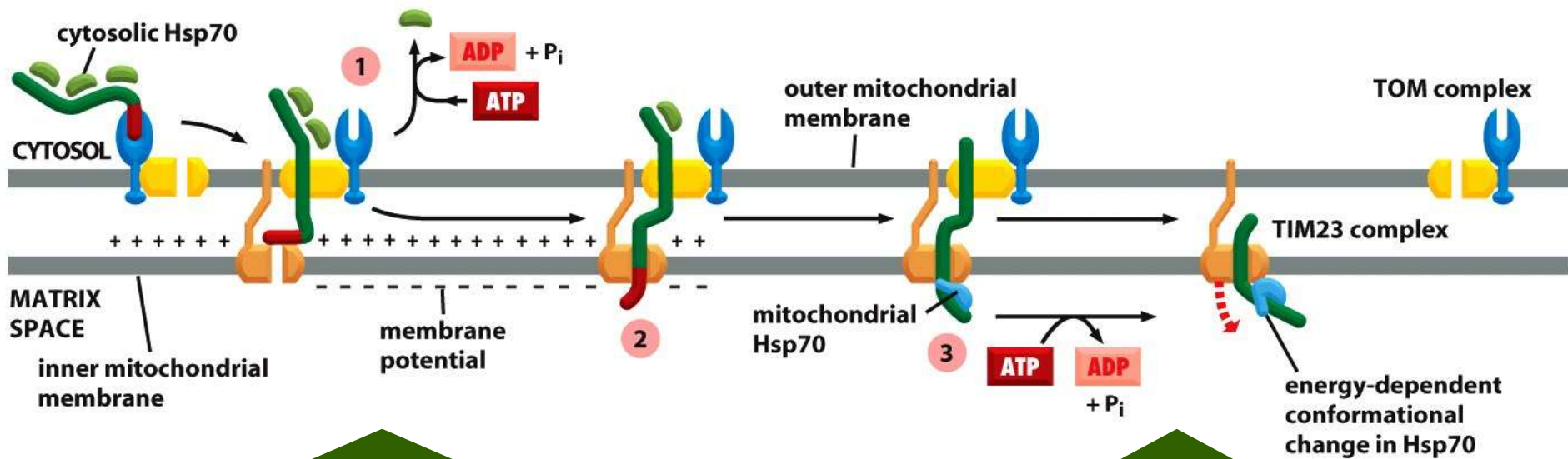


TOM transloca a **sequencia sinal** para o **espaço intramembranar** onde esta se liga a **TIM** abrindo o complexo

**TIM** transloca a ptn para a **matriz** ou então a insere na **membrana interna** mitocondrial

**TIM** e **TOM** podem trabalhar separadamente (rompimento experimental da **membrana**)

# O Papel da Energia na Importação Proteica para a Matriz



transporte direcional requer energia da hidrólise de ATP fora e na matriz da mitocôndria

ação de Hsp70 requer ATP

translocação através de TIM requer gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>!! (bombas de protons transportam H<sup>+</sup> para o espaço intermembrana!)

matriz com carga de membrana negativa em relação ao espaço intermembrana, direcionamento do peptídeo sinal positivo

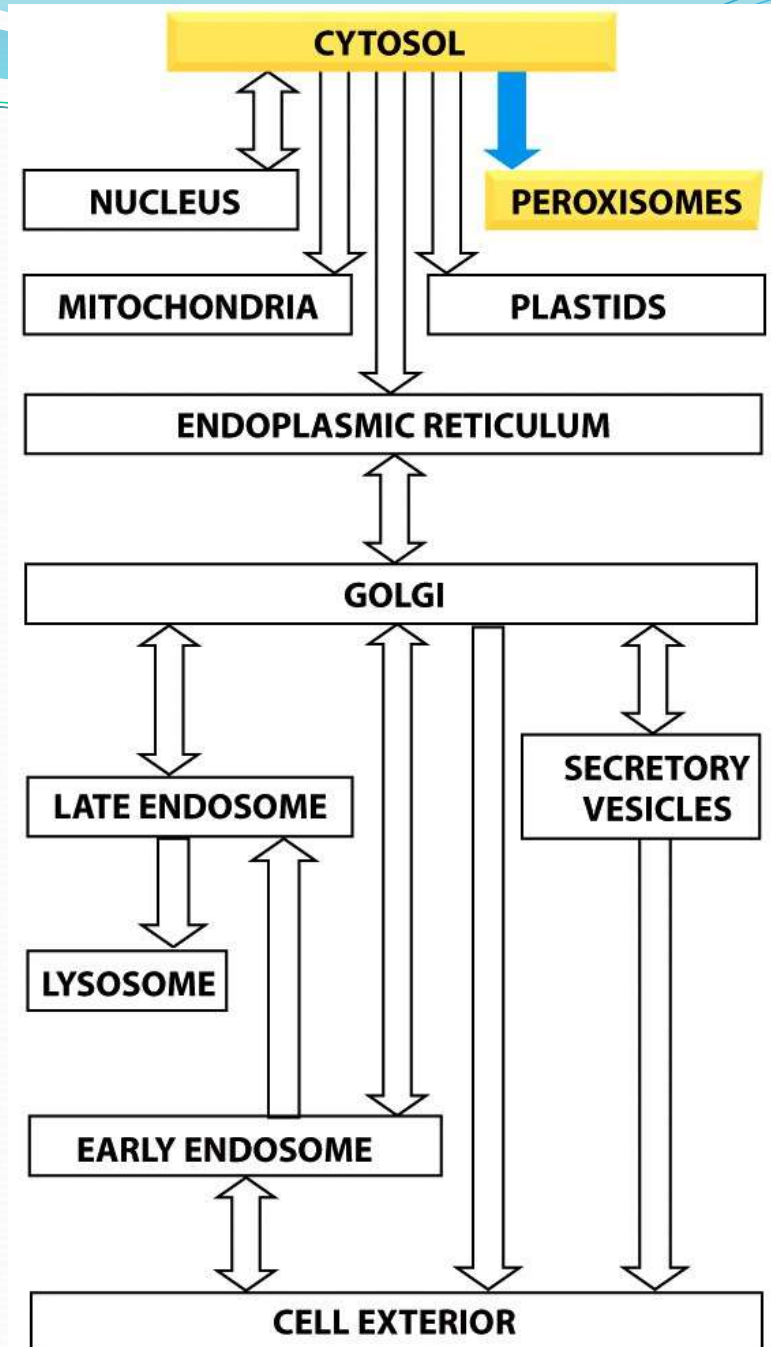
Hsp70 na matriz se associa a TIM23 a espera da proteína precursora (ciclos de quebra de ATP puxam a proteína) (Hsp60 ajuda enovelamento na matriz)



peroxissomas possuem uma única bicamada

não possuem DNA ou ribossomos  
(proteínas são codificadas no núcleo)

importação seletiva do citosol mas, em  
muito menor quantidade, vindas do RE



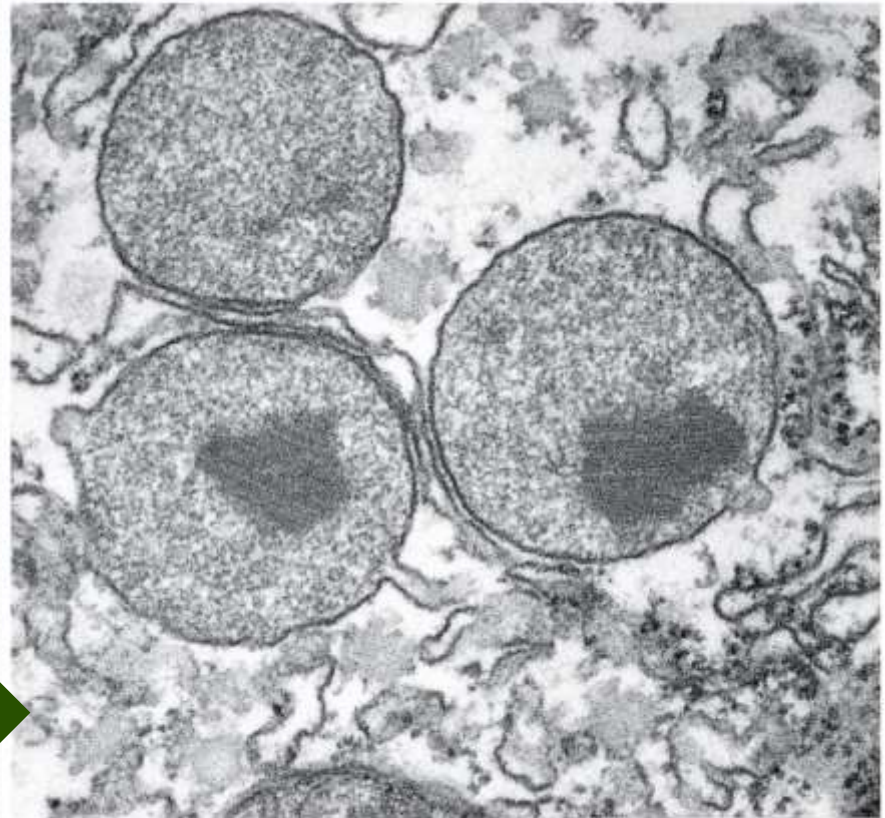
# Microscopia de Três Peroxissomas em um Hepatócito

todas as células eucarióticas possuem **peroxissomas**: ricos em enzimas oxidativas (**catalase** e **urato oxidase**)

organela ancestral: metabolismo do  $O_2$  em uma atmosfera tóxica (ajuda a  $\downarrow O_2$  na célula)

**mitocôndrias** tornaram os **peroxissomas** obsoletos (oxidação acoplada a produção de **ATP**)

enzimas oxidativas altamente concentradas no **peroxissoma** criam uma mancha escura na micrografia eletrônica



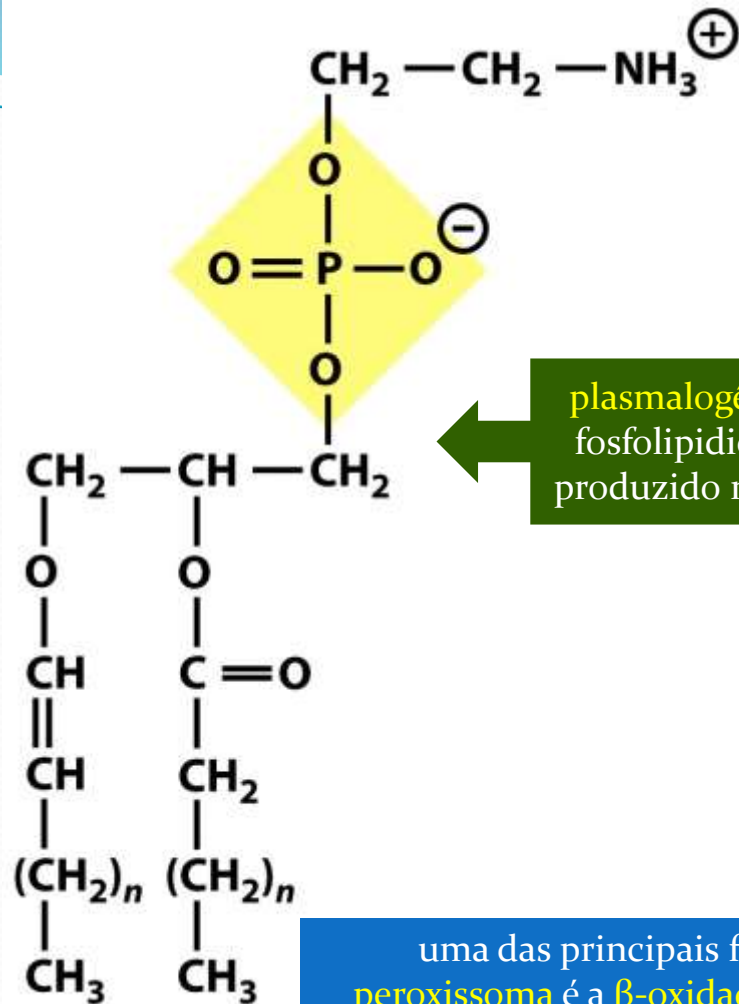
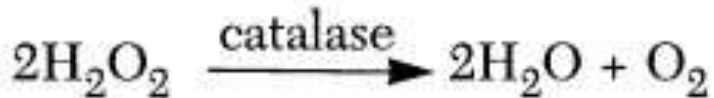
200 nm

no **peroxissoma**, enzimas utilizam oxigênio para remover hidrogênio de substratos orgânicos, produzindo  $\text{H}_2\text{O}_2$



**catalase** usa  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar substratos (fenóis, álcoois, formaldeído, etc):  
detoxificação

quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  se acumula na célula, a **catalase** o converte a  $\text{H}_2\text{O}$  em reação reversa



**plasmalogênio**, principal fosfolípido da **mielina** é produzido no **peroxissoma**

uma das principais funções do **peroxissoma** é a  **$\beta$ -oxidação**: quebra de **ácidos graxos** em blocos de 2 **carbonos** convertidos a **acetil CoA**

**acetil CoA** é exportada ao **citosol** onde é utilizada em reações biossintéticas

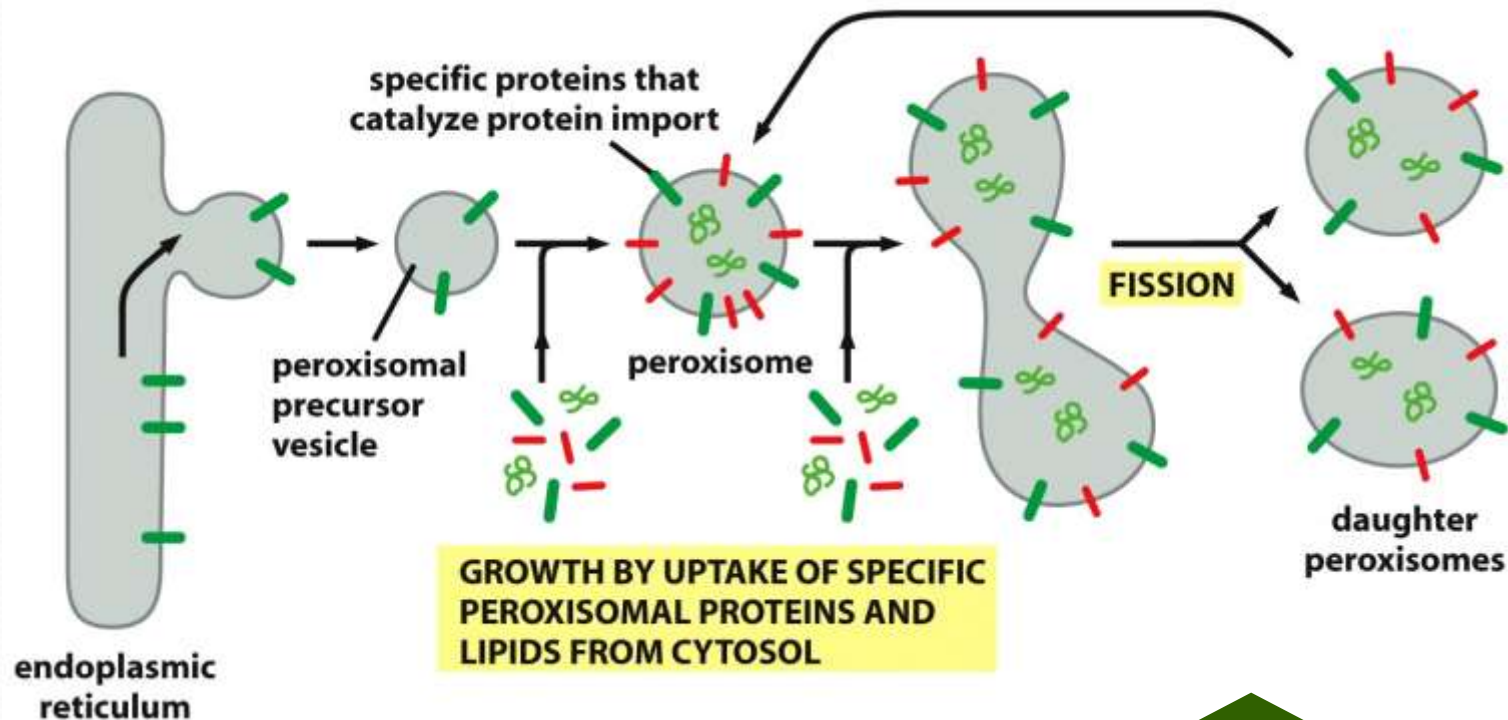
em eucariotos a  **$\beta$ -oxidação** ocorre em **peroxissomas** e **mitocôndrias**



# Surgimento de Novos Peroxissomas

mecanismo de importação obscuro envolve receptores solúveis e uma proteína de ancoragem na face citosólica

ao menos 23 proteínas (**peroxinas**) participam do processo de importação dependente de ATP



o **receptor solúvel** (**Pex5**) leva a carga até o **peroxissoma** voltando ao citosol após liberação (proteínas não precisam estar desoveladas!)

defeito nas **proteínas de importação** (**peroxissoma** vazio, Doença de Zellweger)

novos **peroxissomas** surgem de crescimento e fissão ou a partir de uma vesícula precursora do **RE**

conteúdo por fusão de vesículas vindas do **RE** e incorporação de proteínas do citosol