

Aparatul Golgi

(cum să devii din suspect, fascinant)

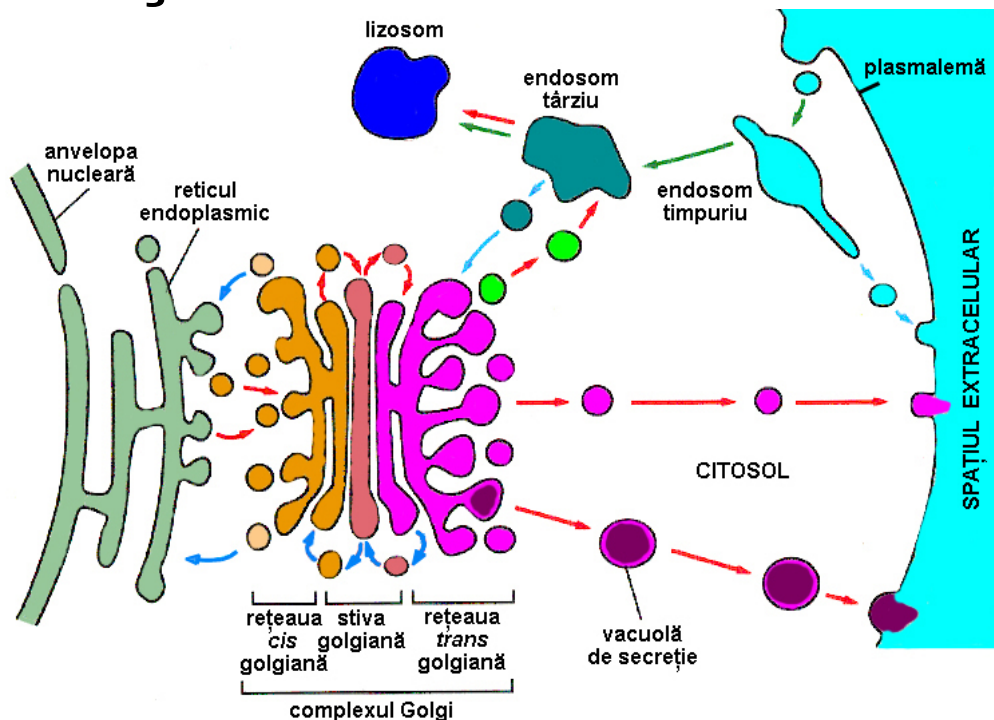
Definiția

Structura, ultrastructura

Funcțiile

Cooperarea RE-Golgi în biogeneza și traficul intracelular al membranelor

Structuri celulare implicate în biogeneza și traficul membranelor



Premiul Nobel pentru fiziologie sau medicină , 2013:

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

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

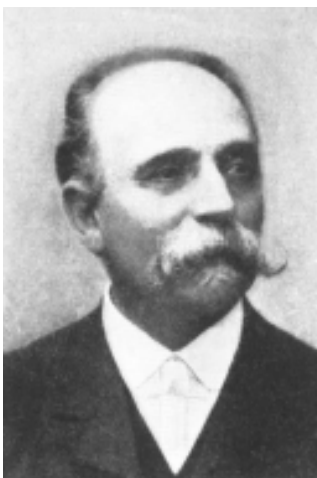
Prelegerea lui Randy W. Schekman:
***Genes and Proteins That Control the
Secretory Pathway***

Prelegerea lui James E. Rothman:
The Principle of Membrane Fusion in the Cell

<http://www.nobelprize.org/mediaplayer/index.php?id=1977>

<http://www.nobelprize.org/mediaplayer/index.php?id=1975>

Evidențiere la microscopul optic



1898

1906, Premiul Nobel pentru
fiziologie sau medicină;
motivația juriului:
*"in recognition of their work on the
structure of the nervous system"*

Camillo Golgi (1843-1926)



Fig. 11

Istoric

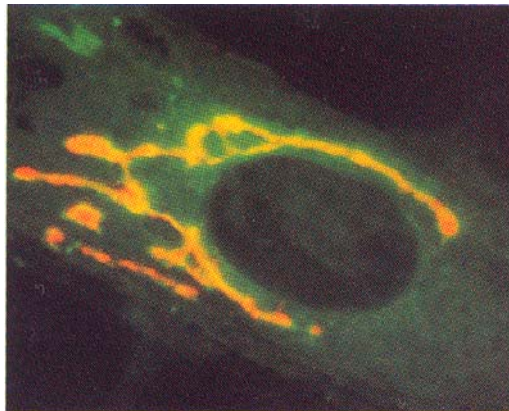


http://ucsdnews.ucsd.edu/archive/newsrel/health/03_22_Palade.asp

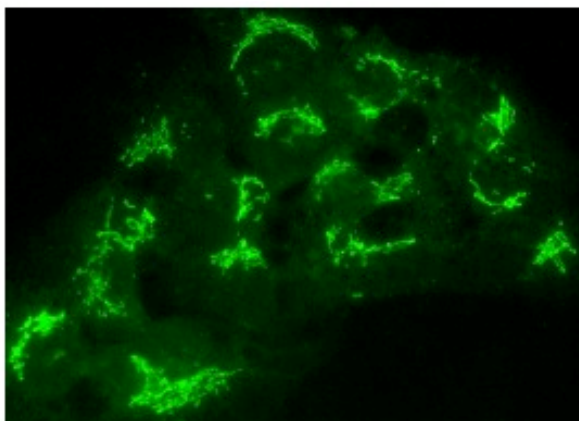
Preluat din:
Fraquhar MG, Palade GE. (1998)
The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy.
Trends in Cell Biology, 8, 2-10

TABLE 1 - SOME IMPORTANT MILESTONES IN GOLGI RESEARCH		
Year	Event	Discoverer(s)
1898	Discovery of the Golgi apparatus	Golgi
1954	First electron microscopy (EM) description of the Golgi apparatus	Dalton and Felix
1957	Cisternal maturation model of Golgi transport	Grassé
1961	Compartmentalization: regional distribution of enzymes	Novikoff and Goldfischer
1964	Involvement in sulfation	Godman and Lane
1966	Involvement in glycosylation: glucose incorporation	Neutra and Leblond
1967-1975	Role in secretory pathway defined and vesicular transport documented	Palade, Jamieson and coworkers
1969	Incorporation of mannose in endoplasmic reticulum (ER), galactose in Golgi Galactosyltransferase as a biochemical marker for the Golgi apparatus	Whur, Herscovics and Leblond B. Fleischer <i>et al.</i> ; Morré <i>et al.</i>
1971	GRL concept	Novikoff and Novikoff
1973-1981	Role of mannose 6-phosphate in lysosomal enzyme sorting by Golgi	Sly, Neufeld, Kornfeld, Jourdan
1977	Demonstration of recycling plasma membrane to Golgi	Herzog and Farquhar
1980	Introduction of glycosidase (endo H) treatment to assess transport	Strous and Lodish
1981-1983	Topology of N-glycosylation Immunocytochemical localization of galactosyltransferase to <i>trans</i> Golgi Reconstitution <i>in vitro</i> of transport within Golgi stack	Dunphy and Rothman Roth and Berger Rothman <i>et al.</i>
1984	Description of 15° block and cargo accumulation in pre-Golgi intermediate compartment	Saraste and Kuismanen
1985	Regulated vs. constitutive secretory pathways	Moore and Kelly
1986	Description of 20° block and cargo accumulation in <i>trans</i> -Golgi network (TGN) Transmembrane domain required for retention of resident Golgi proteins KDEL retrieval signal for resident ER proteins	Griffiths and Simons Machamer and Rose Munro and Pelham
1987	Involvement of small GTP-binding proteins in vesicular transport Heterotrimeric G-proteins implicated in traffic control Reconstitution <i>in vitro</i> of ER-to-Golgi transport	Salminen and Novick Melançon <i>et al.</i> Becker and Balch
1988	Isolation of ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)	Schweizer <i>et al.</i>
1990	Application of brefeldin A to study Golgi-ER transport Phosphoinositide 3-kinase implicated in control of Golgi traffic	Lippincott-Schwartz <i>et al.</i> Herman and Emr; Schu <i>et al.</i>
1991	Discovery of COPI coat Demonstration of role of Gol3 in traffic control	Duden <i>et al.</i> ; Serafini <i>et al.</i> Waters <i>et al.</i> Stow <i>et al.</i>
1993-1994	Demonstration that ER-to-Golgi transport is selective	Balch <i>et al.</i> ; Mizuno and Singer; Resach <i>et al.</i>
1994	Discovery of COPII coated vesicles COPII functions in Golgi-to-ER retrograde transport	Barlow <i>et al.</i> Letourneur <i>et al.</i>

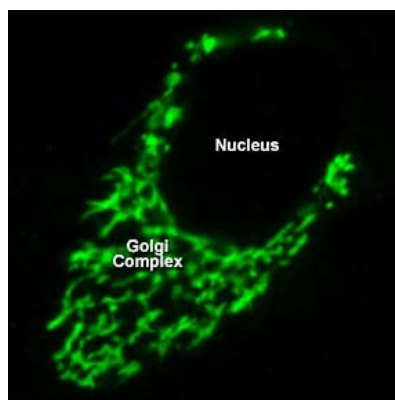
Evidențiere la microscopul optic



<http://www.lifetechnologies.com/ro/en/home/technical-resources/research-tools/image-gallery/image-gallery-detail.altid.g000513.html>

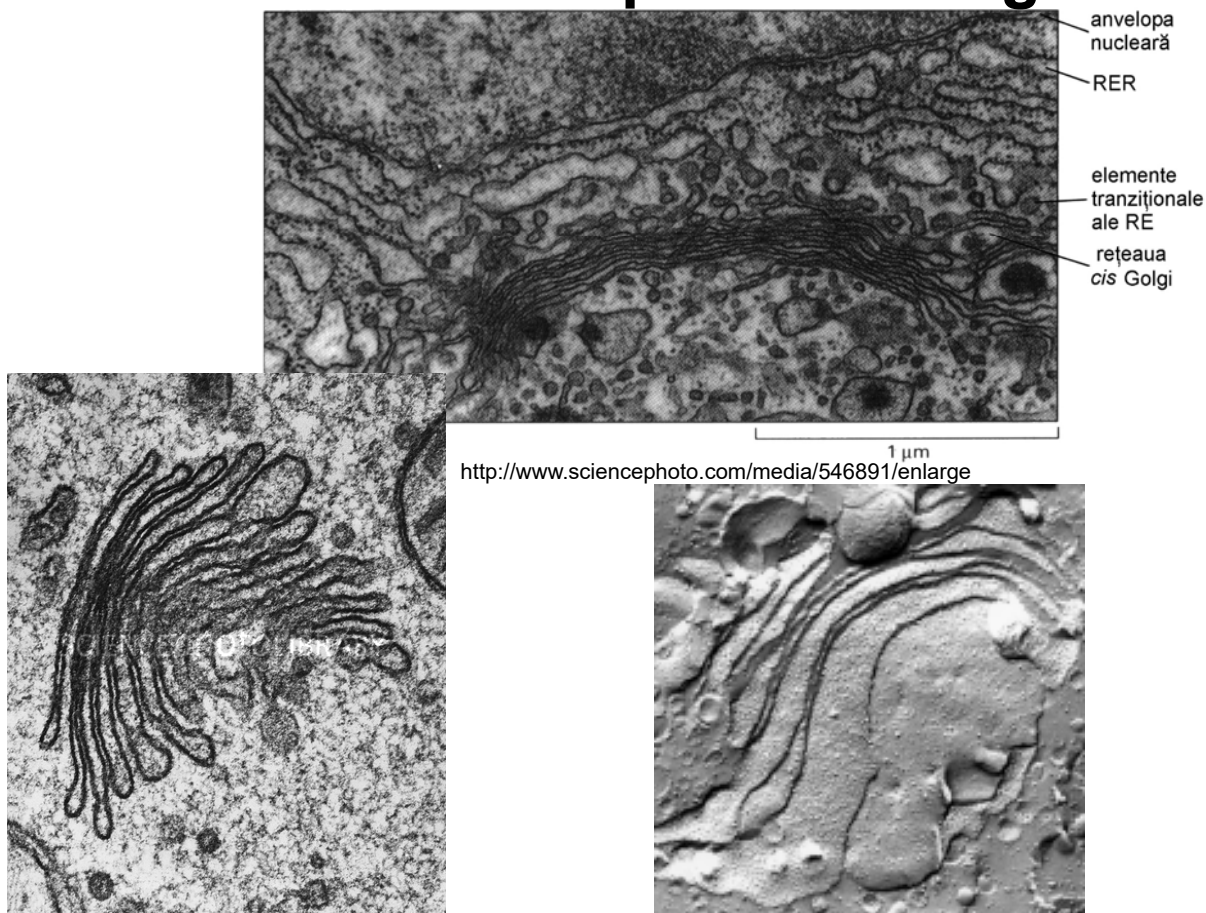


<http://www.scbt.com/datasheet-19481-grasp65-c-20-antibody.html>



<http://hamamatsu.magnet.fsu.edu/galleries/digitalvideo/spinningdisk/ok473laser/OK-EGFP-Golgi.html>

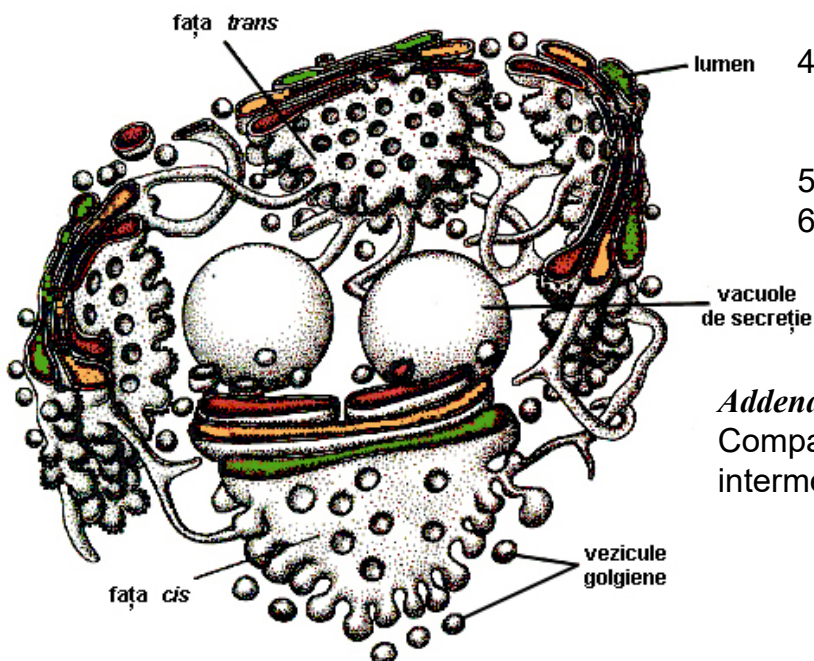
Ultrastructura complexului Golgi



Organizarea spațială a complexului Golgi

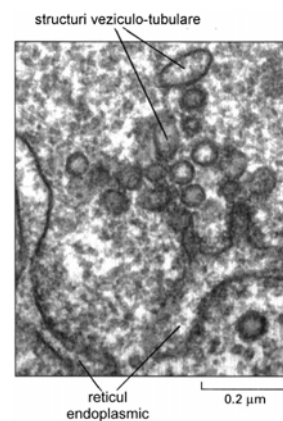
Elementele ultrastructurale ale aparatului Golgi:

1. Membrană organizată în mozaic fluid
2. Stivă de cisterne delimitate de endomembrană recurvate, definind două fețe *cis/trans*



3. Cisterne dilatate la periferie și efilate către centru
4. Lumen cu grosime crescândă, de la fața *cis* către fața *trans* (sugerează polaritate)
5. Microvezicule ($\phi \sim 50\text{nm}$)
6. Rețea *trans-golgi* + macrovezicule

Addendum:
Compartiment intermediar – ERGIC



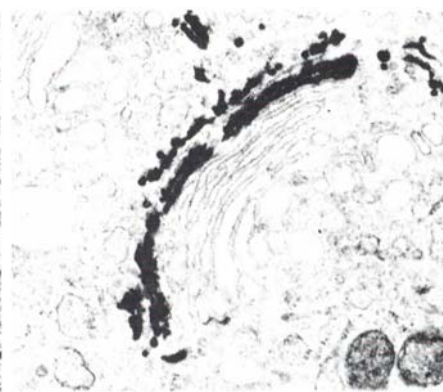
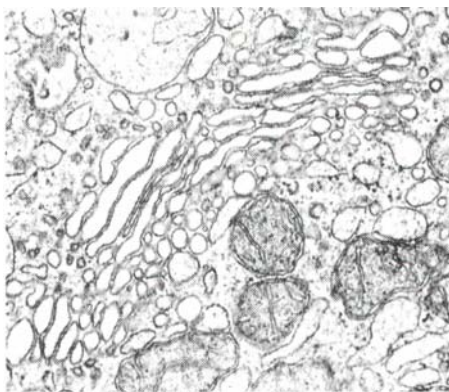
Funcțiile complexului Golgi

1. Prelucrarea sfingolipidelor (sfingomieline, glicolipide);
2. Glicozilarea proteinelor (glicozilare terminală a structurilor *N*-glicozidice, formarea structurilor *O*-glicozidice);
3. Producerea glicozaminoglicanilor (GAG);
4. Sulfatarea unor glucide (glicoproteine, GAG);
5. Fosforilarea manozei în enzimele lizosomale, biogeneza lizozomilor;
6. Maturarea (glico)proteinelor (inclusiv punctele 2-5);
7. Sortarea și transportul biomoleculelor/structurilor moleculare complexe la destinația finală.

N.B. *Sucesiunea pas-cu-pas, ordonată a proceselor biochimice din aparatul Golgi*

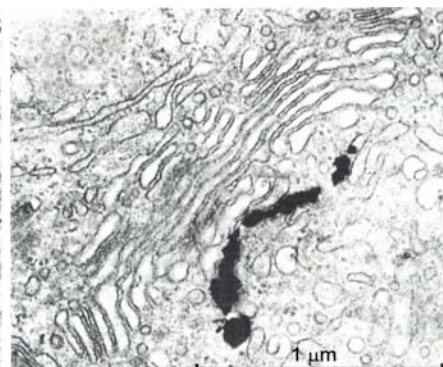
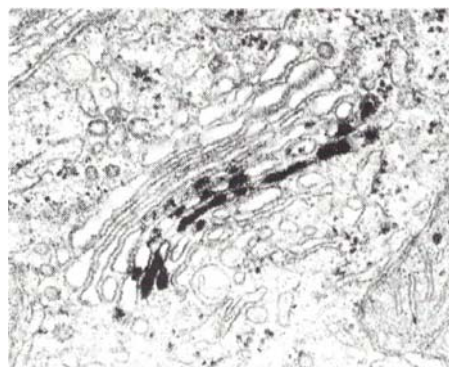
Polarizarea ultrastructurală/ biochimică a complexului golgian

Fără reacție
citochimică



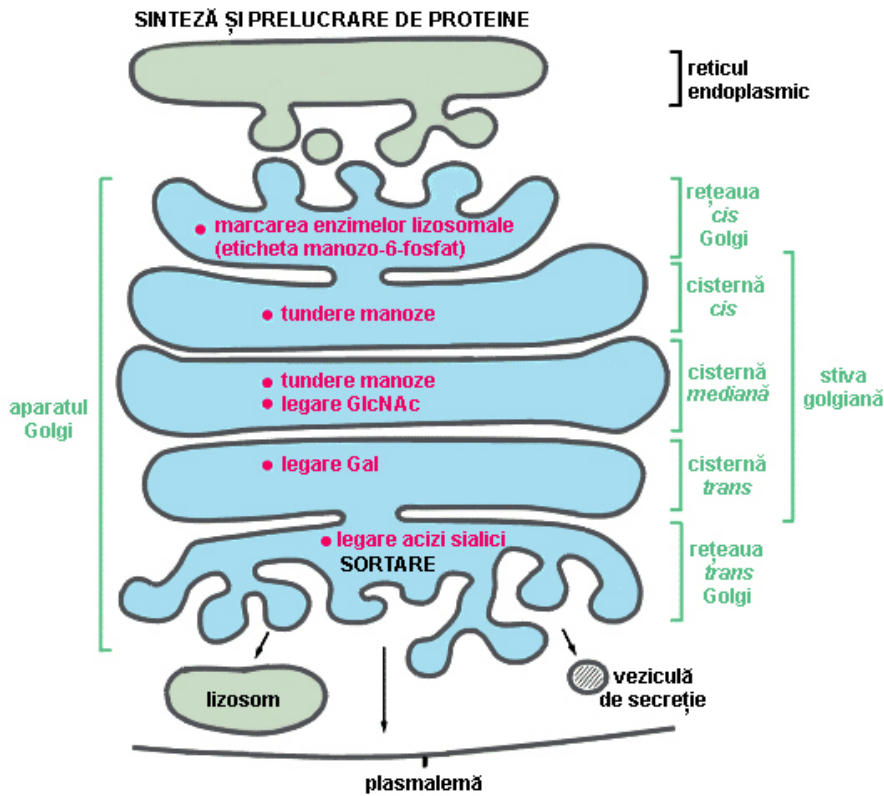
Reducere
săruri
metalice,
reductaze

Reacție ptr.
nucleozid-
difosfataze



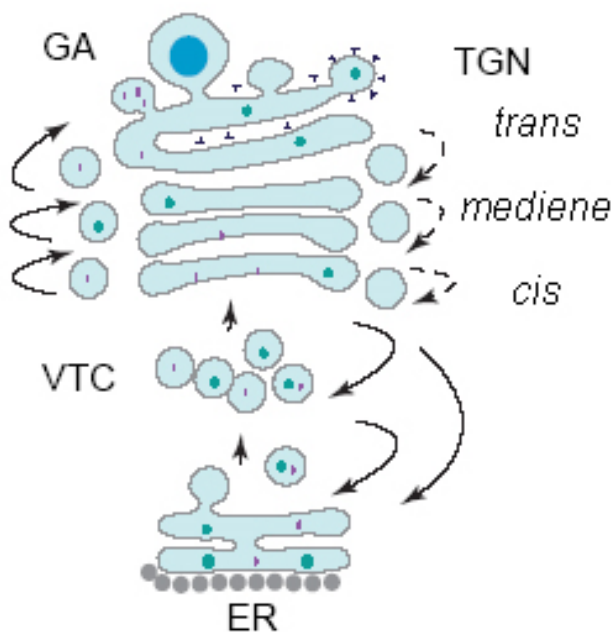
Reacție ptr.
fosfatază
acidă

Polarizarea biochimică a complexului Golgi

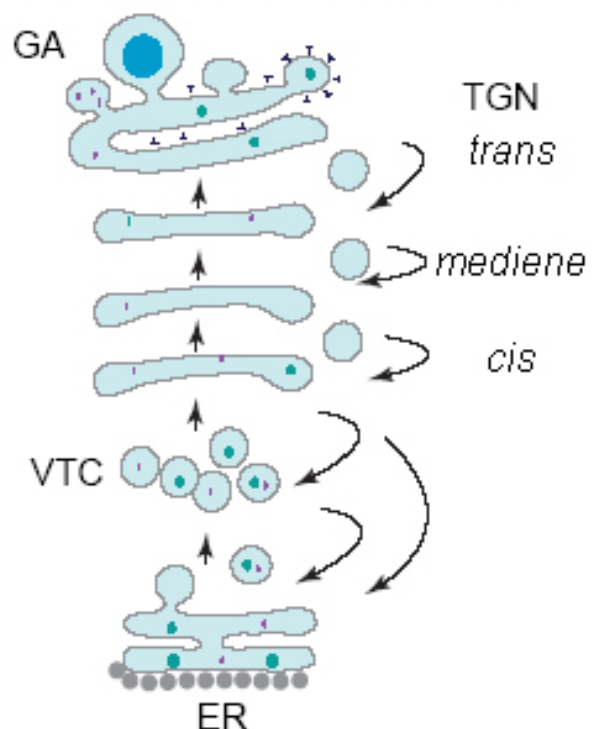


Modele asupra dinamicii golgiene

modelul transportului vezicular (model suveică)

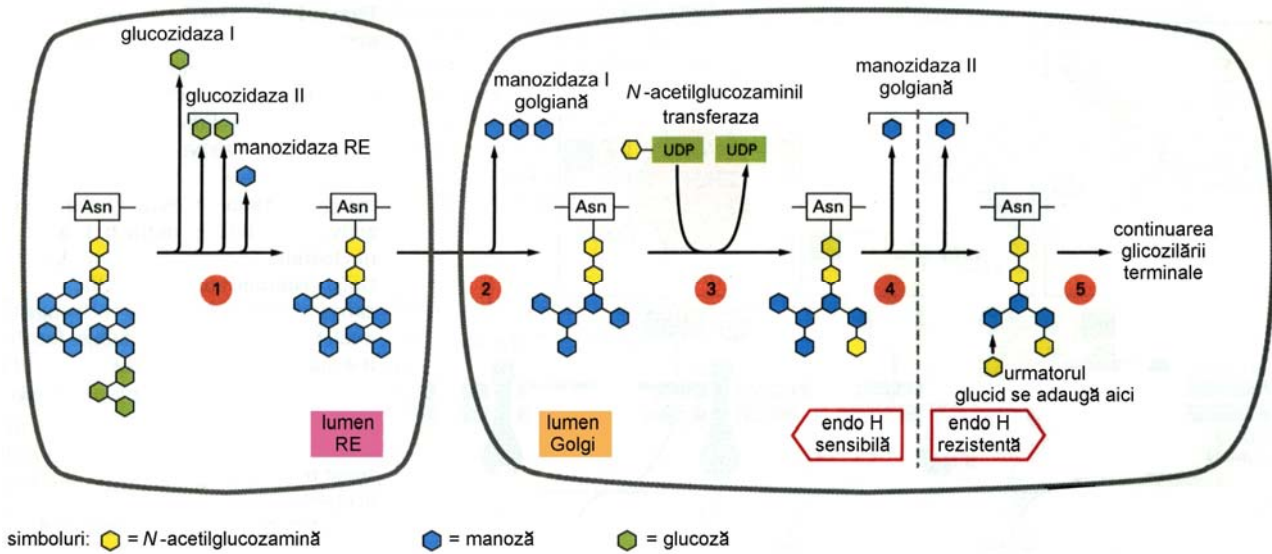


modelul maturării cisternelor



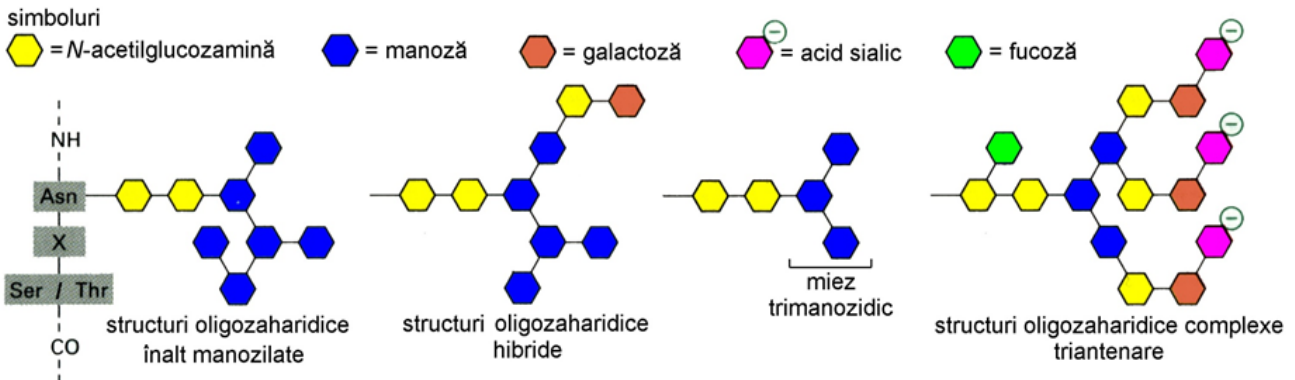
Prelucrări ale (glico)proteinelor

Tunderea structurilor N-glicozidice



Structuri glucidice elaborate în complexul Golgi

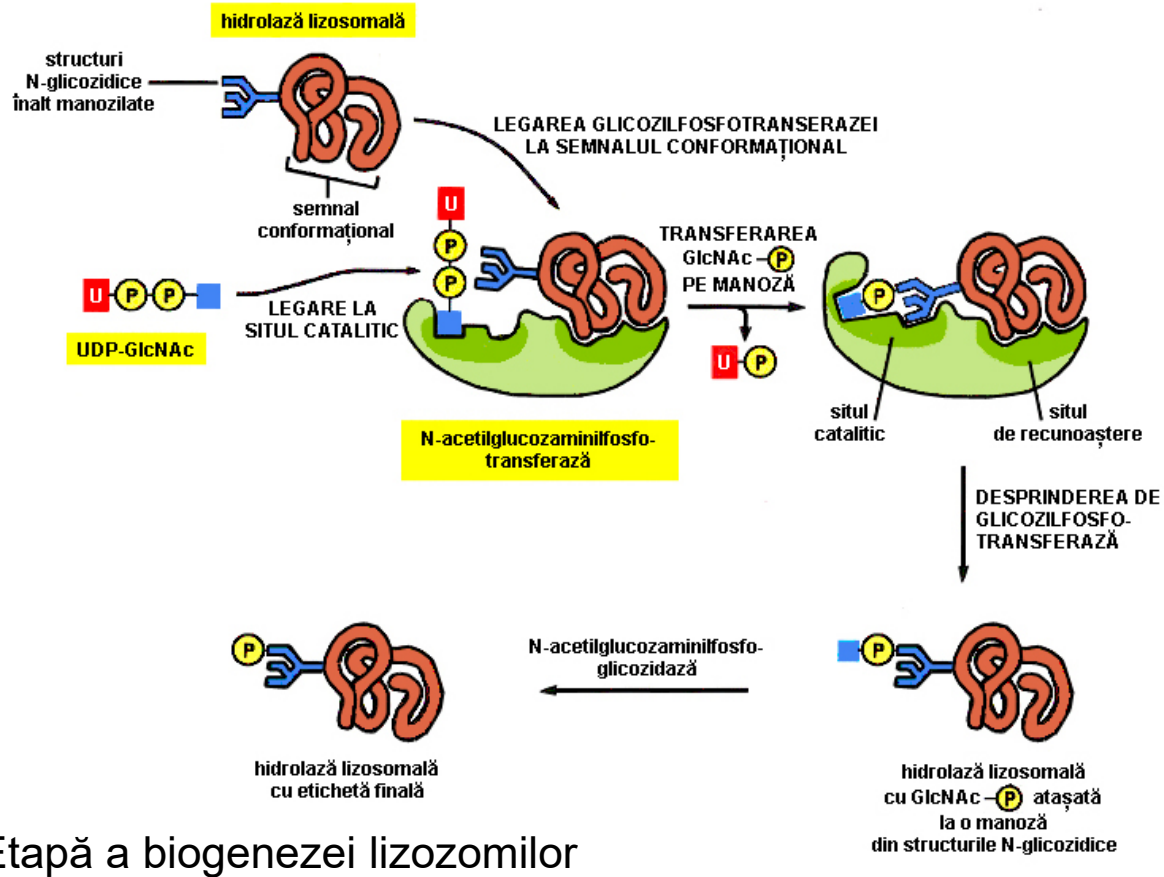
1. Glicozilarea terminală a structurilor N-glicozidice



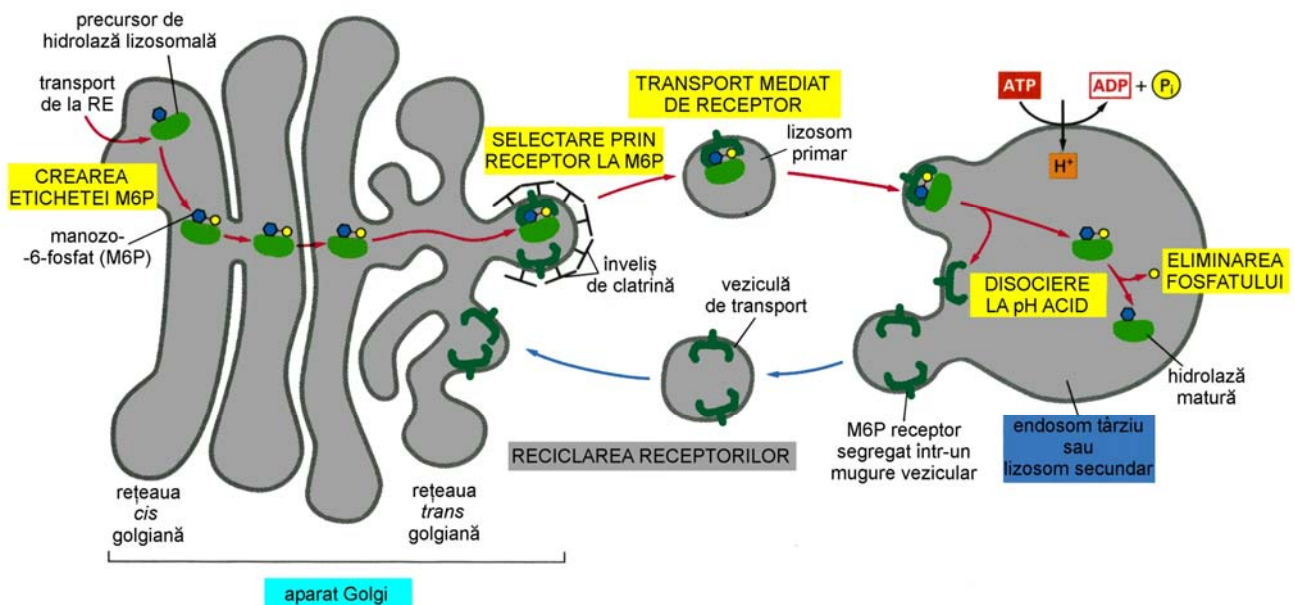
2. Biosinteza structurilor O-glicozidice (de tip mucinic)



Etichetarea enzimelor lizozomale



Biogeneza lizozomilor (contribuția aparatului Golgi)



1. Etichetarea enzimelor lizozomale, în zona *cis*
2. Transportul dinspre fața *cis*, către fața *trans*, cu maturarea componentelor
3. Sortarea, înmugurirea și detașarea lizozomilor primari, în zona *trans*
4. Fuziunea cu endozomi târzii sau lizozomi secundari pre-existenți

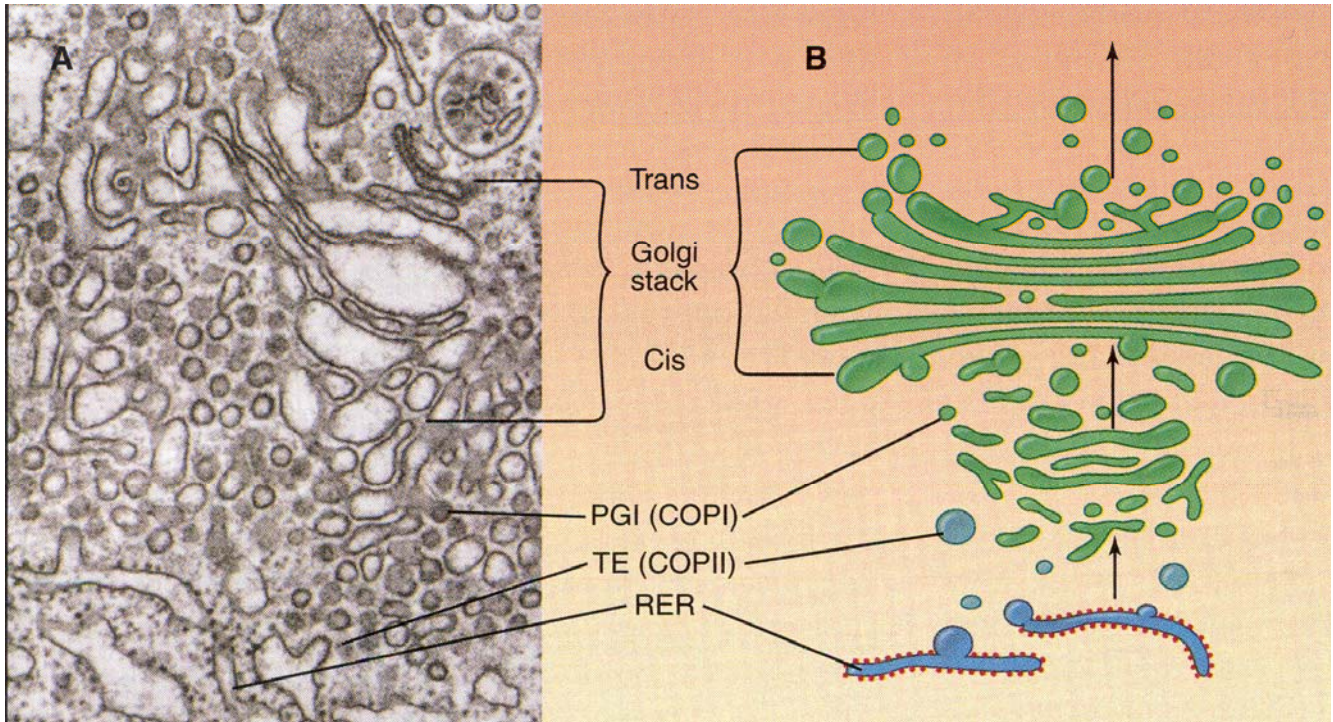
Cooperarea RE – Golgi în biogeneza și traficul intracelular al membranelor

- Biogeneza membranelor
- Traficul RE – Golgi;
- Traficul Golgi – membrană celulară / sistem endozomal;
- Ciclul secretor (calea secretorie)

Biogeneza membranelor

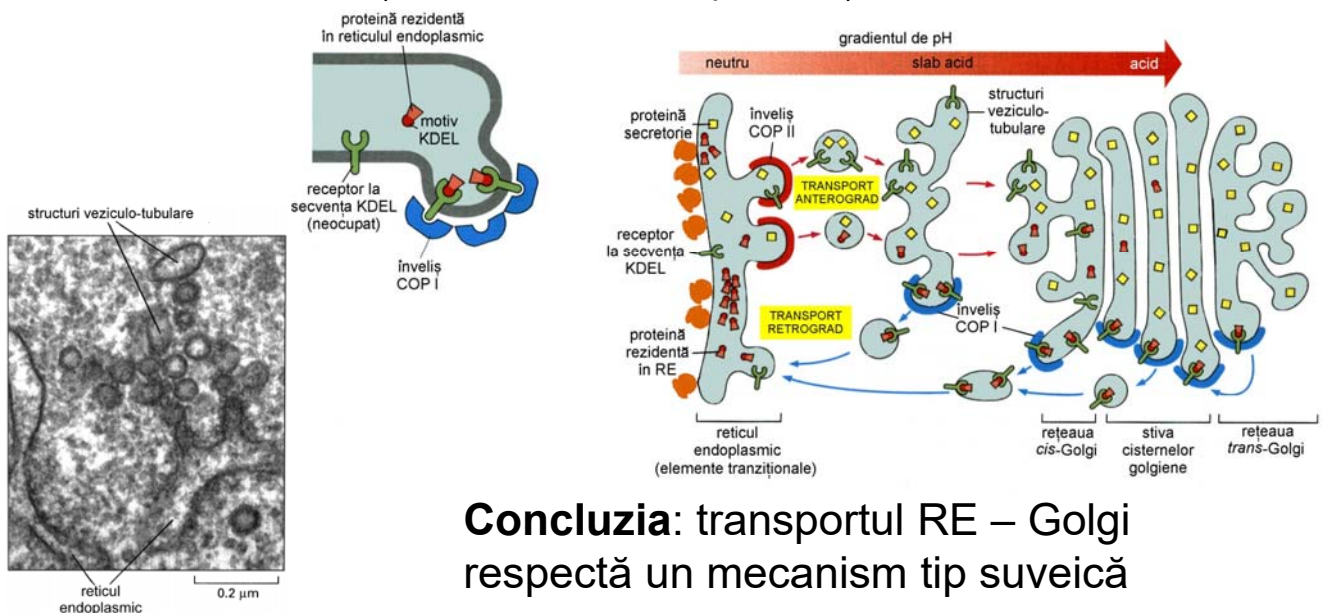
- Proces complex cu implicarea multor structuri:
 - Ribosom
 - Reticul endoplasmic
 - Aparat Golgi
- Presupune:
 - Biosinteza componentelor moleculare ale membranelor
 - Asamblarea corectă a acestora la nivelul structurii
 - Maturarea structurii la una funcțională
 - Transportul direcționat al noilor membrane la destinație
- Necesită un complex, dar bine elaborat și controlat trafic de membrane

Relația funcțională dintre reticulul endoplasmic și complexul Golgi



Traficul RE - Golgi

- Transport anterograd:
 - Sortarea la nivelul elementelor tranzitionale ale RE (COP II, Sar1);
 - Traficul către aparatul Golgi (ERGIC);
- Transport retrograd:
 - Sortarea la nivelul complexului Golgi (COP I, Arf1);
 - Returul la RE (reciclarea unor componente).



Concluzia: transportul RE – Golgi respectă un mecanism tip suveică

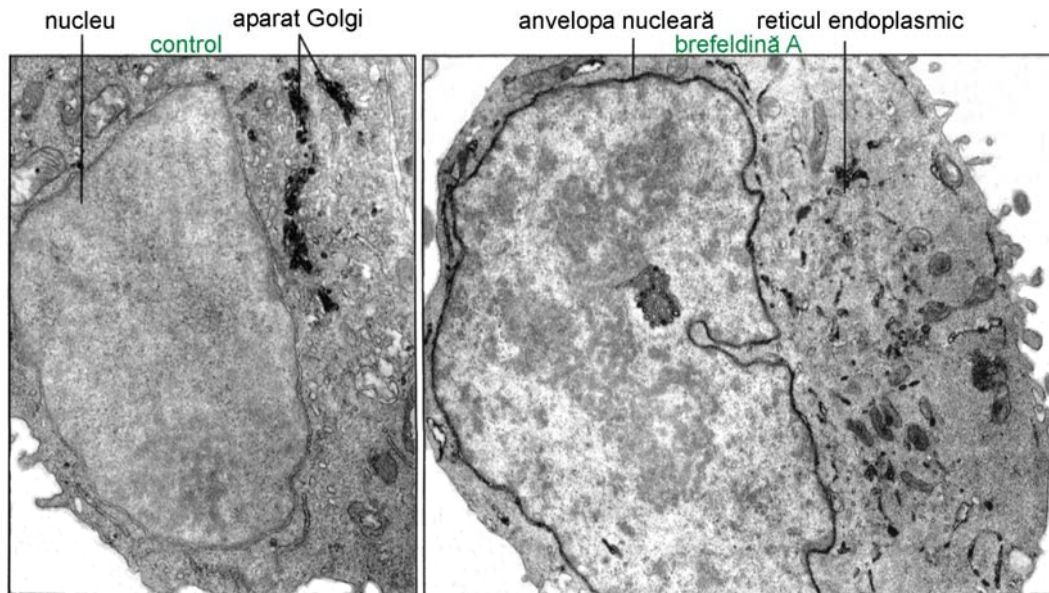


Jennifer Lippincott-Schwartz (NIH)

Dovezi experimentale pentru mecanismul tip suveică

1989: Brefeldina A

Inhibarea transportului anterograd RE – Golgi, dependent de COP II



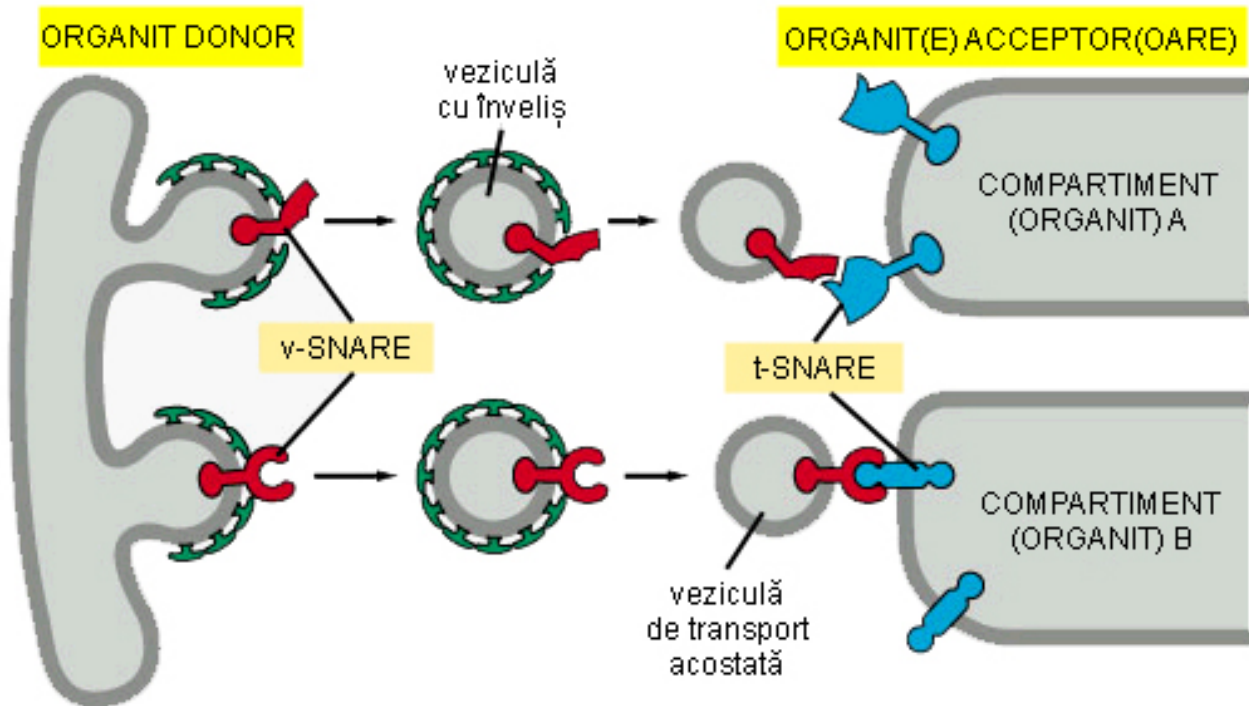
Traficul Golgi – destinația finală

= rolul rețelei *trans*-Golgi (TGN) =

- **Golgi – lizozom:** sortarea prin M6P, segregarea și vezicularea prin adaptine (AP1, AP3) și clatrină;
- **Golgi – membrana apicală:** sortarea prin mecanisme lumenale și plute lipidice, transport cooperativ prin dyneine (ruta microtubulilor, cap –) și miozine (ruta actinei F);
- **Golgi – membrana latero-bazală:** sortarea prin motive de aminoacizi, transport prin kinesine (ruta microtubulilor, cap +);
- **Reglare:** prin proteine G monomerice;
- **Țintire corectă:** prin SNARE* (v-SNARE, t-SNARE)

* Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein *RE*ceptor

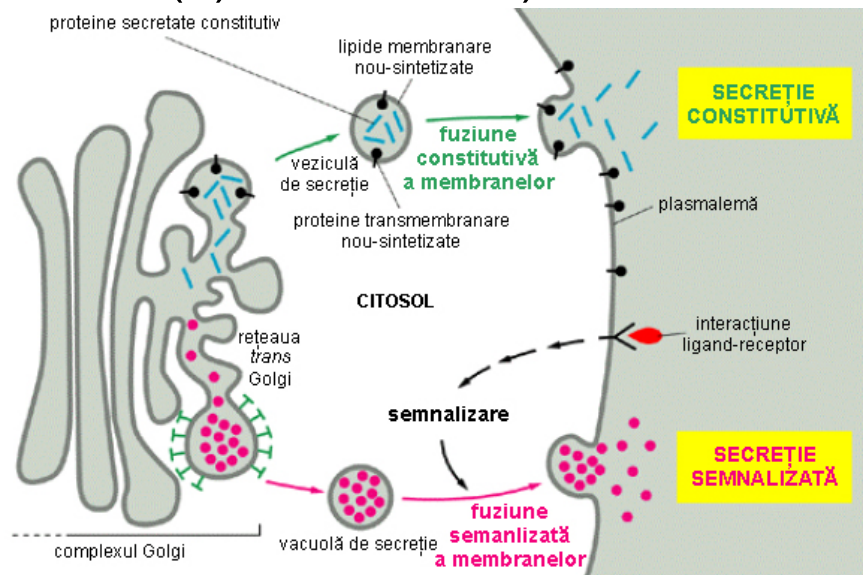
Direcționarea/țintirea transportului vezicular prin SNARE specifice



Fuziunea corectă între vezicule și membranele țintă este asigurată de împerecherea adecvată v-/t-SNARE

Ciclul secretor

- Biosinteza proteinelor de secreție (RE);
- Prelucrarea (maturarea), sortarea și condensarea în vezicule / vacuole de secreție (RE, apoi Golgi);
- Secreția propriu-zisă – exocitoză (2 tipuri: (i) constitutivă, (ii) semnalizată).

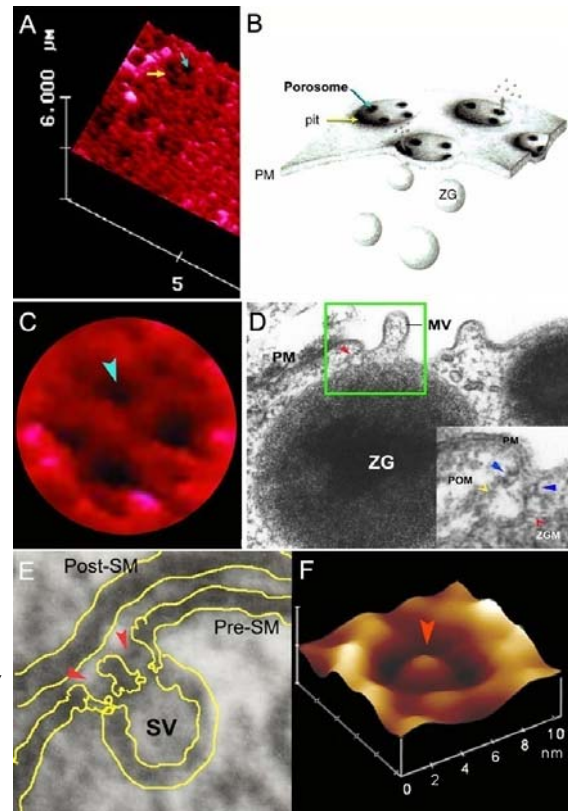


Porozomul

- Microdomeniu de membrană
- Portalul universal al secreției celulare
- Nanostructură în curs de elucidare a organizării moleculare



*Prin amabilitatea Dr. Bahnu Jena,
George E. Palade University Professor,
Department of Physiology,
Wayne State University
School of Medicine
Director,
NanoBioScience Institute,
Detroit, Michigan, USA*



Rezumat

- Aparatul Golgi – singurul organit care a captivat inițial prin suspiciune, ulterior prin complexitate structurală/morfologică și funcțională;
- Prezintă polaritate ultrastructurală, dar și bio-chimică între cele două fețe și între cisterne;
- Funcționează ca o placă turnantă pentru maturarea, sortarea și transportul direcționat, către locul final, al componentelor lizozomale, membranare sau de secreție.

APARATUL GOLGI

Organizarea cursului

Aspecte introductive

Considerente istorice

Ultrastructura aparatului Golgi

Funcțiile aparatului Golgi

- *Considerații generale asupra funcțiilor aparatului Golgi*
- *Prelucrarea și definitivarea structurilor glucidice N-glicozidice*
- *Biosinteza structurilor O-glicozidice*
- *Modele referitoare la dinamica structurilor golgiane*
- *Biogeneza lizosomilor*

Cooperarea reticul endoplasmic – Golgi în biogeneza și traficul intracelular al membranelor

- *Traficul RE – Golgi*
- *Traficul rețea trans-Golgi – locație finală*
- *Direcționarea transportului intermembranar*

Ciclul sectoror celular (calea secretorie celulară)

Considerații finale

Bibliografie

Aspecte introductive

Aparatul Golgi, denumit și complexul Golgi este un organit celular delimitat de endomembrane, structurat sub forma unei stive de cisterne recurvate, prezentând polaritate morfologică și biochimică, cu rol cheie în procesele de biogeneza a membranelor, în maturarea, sortarea și distribuția de molecule și macromolecule atât către locurile celulare cărora le sunt destinate cât și în calea secretorie. Face parte din sistemul de organite implicat în traficul intracelular al membranelor, care începe cu reticulul endoplasmic și se termină la membrana celulară sau la componentele sistemului endosomal.

Termenul de „polaritate” este folosit în acest context pentru a sublinia existența unei diferențe între doi poli, două extremități – în cazul aparatului Golgi, două fețe – *cis* și *trans*. Există o multitudine de exemple de structuri polarizate – de la molecule, la organite și chiar celule în asamblul lor. De exemplu actina, deși este o proteină globulară, prezintă un pol care favorizează polimerizarea, denumit capăt plus (+) și un pol care favorizează depolimerizarea filamentului de actină – capăt minus (-). Enterocitul sau nefrocitul sunt două exemple de celule polarizate, ai căror poli apicali, prezentând microvili, diferă de cei latero-bazali, atât morfologic, cât și biochimic.

Organitul a fost pentru prima dată evidențiat în 1898 de către Camilo Golgi, în celulele Purkinje, prin impregnare argentică. Structura intracelulară s-a dezvăluit ca o dantelărie țesută sub formă de coș, în jurul nucleului. Golgi a denumit-o, pe baza morfologiei, aparat reticular endocelular (“*endocellular reticular apparatus*” în conferința prilejuită de decernarea Premiului Nobel), sau aparat reticular intern. În scurt timp, organitul a primit denumirea de aparat Golgi, așa cum se numește (fără alternativă) și în momentul de față. În 1906, Camilo Golgi a primit, împreună cu Santiago Ramon y Cajal, Premiul Nobel pentru fiziologie sau medicină. Motivația juriului a fost: "in recognition of their work on the structure of the nervous system". Unul din aspectele legate de structura sistemului nervos îl reprezintă descrierea aparatului reticular endocelular. Microscopia optică, prin varianta ei microscopia de fluorescență, permite în momentul de față atât evidențierea, cât și studiul complexului Golgi în celulele vii, prin procesele de trafic membranar în care el este semnificativ implicat. La nivelul morfologiei evidențiată prin microscopie optică, pe baza identificării unor componente biochimice specifice (lipidice sau proteice), aparatul Golgi

apare ca un organit complex mai mult sau mai puțin elaborat (în funcție de tipul celular investigat), cu o localizare în profunzimea citoplasmei, de regulă excentric față de nucleu.

Considerente istorice

Din 1898, când a fost descoperit, până în 1954, când i-a fost pentru prima dată descrisă ultrastructura în imagini de microscopie electronică, informațiile despre aparatul Golgi nu au evoluat spectaculos. După descrierea sa ultrastructurală, deși a existat suspiciunea că această structurare “ciudată” poate fi artefactuală, datele au început să se acumuleze în favoarea existenței reale a acestui organit. Între altele, menționăm contribuția colectivului de cercetători condus de G. E. Palade, care a evidențiat implicarea complexului Golgi în calea secretorie celulară (numită și ciclul secretor celular; vezi mai jos la secțiunea cu acest nume). Suspiciunea a fost spulberată când, prin citochimie ultrastructurală, s-a dovedit că cisternele golgiene prezintă polaritate biochimică. O asemenea distribuție ordonată și selectivă a bagajului enzimatic între cisterne, evidențiată încă din 1961, nu poate fi posibilă într-o structură artefactuală. Astfel, structurile *cis*-golgiene (rețeaua *cis*-golgiană, cisternele *cis* cele mai proximale) și numai ele, au proprietatea de a reduce ioni metalici (argint, osmiu); cisternele *cis* distale, către cele *mediene* prezintă reacție citochimică specifică pentru manozidază golgiană (diferită de manozidazele reticulului endoplasmic); cisternele *mediene* și *trans* dau reacție citochimică specifică nucleozid-difosfatazelor (cunoscute și sub denumirea veche de tiamin-pirofosfatază); porțiunile cele mai distale ale organitului, cunoscute sub numele de rețea *trans*-golgiană, prezintă reacție citochimică pentru fosfataza acidă, o enzimă lizosomală. Parte dintre aceste distribuții vor fi motivate prin asocierea cu aspectele legate de funcțiile organitului, pe măsură ce vom detalia aspecte legate de rolul acestuia (vezi la secțiunea “Funcțiile aparatului Golgi”). Cu timpul datele referitoare la organizarea moleculară și funcționarea complexului Golgi au început a se acumula cu respectarea unei curbe exponențiale. Aparatul Golgi a devenit din suspect, fascinant și el reprezintă una dintre structurile celulare ce suscită, prin dinamicitatea sa raportată la menținerea polarității biochimice, un acut interes în lumea biologilor celulari, în momentul de față.

Ultrastructura aparatului Golgi

Complexul Golgi este structurat, așa cum am menționat deja în definiția organitului, ca o stivă de cisterne recurbate. Numărul cisternelor este variabil, diferind de la un tip de celulă la altul. Dispoziția și numărul cisternelor aparatului Golgi diferă în funcție de tipul celular și, implicit, de activitatea de sinteză a proteinelor destinate ciclului secretor. În celulele eukariote, aparatul Golgi este format din mai multe astfel de stive, unite prin tubuli înrețelați care formează o panglică în vecinătatea nucleului, în zona pericentrozomală. Din cele amintite în comentariile anterioare se desprinde ideea că aparatul Golgi este o structură caracterizată ultrastructural prin **polaritate morfologică**, dar și prin **polaritate biochimică**. Vom defini astfel, din punct de vedere morfologic, următoarele caracteristici ultrastructurale:

- (i) o **față convexă**, numită și **față cis**, orientată către cisterne ale reticulului endoplasmic din care înmuguresc vezicule (**reticul endoplasmic de tranziție**);
- (ii) o **față concavă**, numită și **față trans**;
- (iii) o **rețea trans-Golgi**, un sistem de vezicule și/sau vacuole, tubuli înrețelați și fragmente de cisterne din care rezultă (macro)vezicule ce vor fi trimise către destinațiile lor finale. Această rețea este în continuarea feței *trans*.
- (iv) Între RE de tranziție/tranzițional și fața *cis*-golgiană au fost evidențiate **microvezicule** cu diametrul mediu de 50 nm, care, în momentul de față, sunt dovedite a conflua (fără a prezenta o reală independență) într-un sistem veziculo-tubular (**compartiment veziculo-tubular**), considerat un

compartiment intermediar între RE și Golgi. Acest compartiment este numit prescurtat fie **VTC** (de la Vesicular Tubular Cluster), fie **ERGIC** (de la Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment). Prezența unui asemenea compartiment face să se vorbească, de regulă și de o **rețea cis-Golgi**;

Între rețeaua *trans*-Golgi și sistemul endosomal se descrie de asemenea un sistem de recirculare a unor vezicule de transport, denumit **compartiment de reciclare endosomal**.

În ceea ce privește stiva de cisterne, se operează cu noțiunile: **cisterne cis**, **cisterne mediene** și **cisterne trans**, după cum acestea sunt așezate către fața *cis*-Golgi, în zona din mijloc a stivei sau către fața *trans*-Golgi.

Morfologic, polaritatea se poate evidenția atât între cisterne – și nu numai datorită recurbării – (cisternele *cis* au lumenul mai subțire, cele *trans* mai gros), cât și în cadrul cisternelor (mai efilate în zonele centrale și mai îngroșate în zonele limitrofe). Pentru a ne completa imaginea în spațiu a morfologiei complexului Golgi, este bine să specificăm faptul că cisternele trebuie văzute ca îmbrăcând un sector de sferă, ca și cum ar forma un căuș. Deși corespondența dintre polaritatea morfologică și cea biochimică a fost dovedită între cisterne, nu același lucru s-a întâmplat în ceea ce privește polaritatea din cadrul aceleiași cisterne. Nu există, în momentul de față, dovezi cum că între zonele mediene ale cisternelor (mai subțiri în grosime) și zonele lor limitrofe (mai gonflante) ar exista diferențe de molecularitate. Dimpotrivă, prin metode de refacere a fluorescenței după foto-stingere (**FRAP**, de la „Fluorescence Recovery After Photo-bleaching”), coroborate cu rezultate obținute prin tehnici de pierdere a fluorescenței prin foto-stingere (**FLIP**, de la „Fluorescence Loss In Photo-bleaching”) s-a evidențiat că moleculele și/sau macromoleculele din cisternele golgiene difuzează fără restricții în planul membranelor fiecărei cisterne. Metodele FLIP presupun stingerea repetată a fluorescenței în aceeași zonă micronică a unei structuri celulare și observarea efectului asupra fluorescenței la nivelul întregii structuri. Dacă moleculele difuzează fără restricții în membrana structurii, este de așteptat ca fluorescența la nivelul acesteia să dispară complet după stingeri repetate. Acest lucru a fost observat la nivelul cisternelor golgiene.

Din punct de vedere al structurii biochimice, la nivelul aparatului Golgi se descriu două tipuri de proteine:

- i) Structurale, cu rol în formarea matricei aparatului Golgi, responsabile de organizarea lui tridimensională și poziționarea corectă intracelular; din această familie fac parte golgina și proteinele din familia GRASP (abreviere de la „Golgi Re-Assembly Stacking Protein”). Experimental s-a demonstrat că proteinele din familia GRASP sunt capabile să reasambleze în aproximativ 12 ore panglica/aparatul Golgi, după extragerea organitului din celulă prin microdisecție laser.
- ii) Funcționale – enzimele specifice aparatului Golgi, cu rol în definitivarea structurii proteinelor și lipidelor glicozilate, enzime despre care vom discuta în secțiunile următoare

Funcțiile aparatului Golgi

Problema izolării și purificării cisternelor golgiene, în vederea studierii funcțiilor, rămâne încă o provocare pentru cercetători. Au existat încercări dintre cele mai ingenioase, însă marea problemă o reprezintă eficiența. Întrucât complexul golgian reprezintă o fracțiune membranară slab reprezentată în structura celulelor, toate metodele presupun consum de forțe și mijloace, care nu se justifică sub aspectul randamentelor. O metodă cu mare grad de specificitate a fost dezvoltată de colectivul lui G.E. Palade la sfârșitul deceniului nouă al secolului trecut, folosindu-se izolarea pe suporturi de polizaharide (utilizate și în tehnicile cromatografice) conjugate cu anticorpi anti-proteine rezidente în membranele golgiene. Legarea prin interacțiuni de afinitate (antigen-anticorp) a permis depunerea prin centrifugare a cisternelor adsorbite pe bile de Sepharose (sefaroză, un polimer de galactoză). Metoda nu a

avut însă impact în lumea cercetătorilor, din motivele amintite mai sus: consum mare de efort și resurse, care nu erau recompensate de rezultate. De aceea, au fost găsite alternative de studiu, pentru a surmonta aceste dezavantaje.

Considerații generale asupra funcțiilor aparatului Golgi

Ceea ce cunoaștem în momentul de față asupra funcțiilor complexului Golgi provine, în general, din studii de citochimie ultrastructurală și din folosirea de diverse căi de inhibare a proceselor celulare care antrenează acest organit.

Să începem cu o enumerare a funcțiilor mai bine cunoscute ale acestui organit:

1. prelucrarea sfinolipidelor (biosinteza sfinomielinelor și glicolipidelor prin modificarea ceramidelor produse în RE);
2. glicozilarea proteinelor (prelucrarea structurilor *N*-glicozidice – continuarea tunderii oligozaharidului introdus la arginină în RE și efectuarea glicozilării terminale; formarea în întregime a structurilor *O*-glicozidice inserate pe serină sau treonină);
3. producerea glicozaminoglicanilor cu asamblări ale proteoglicanilor membranari, sau ai matricei extracelulare;
4. sulfatarea unor glucide (atât din glicozaminoglicani, cât și din unele glicoproteine); substratul de pe care **sulfo-transferazele** transferă sulfatul este **3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfatul**;
5. marcarea enzimelor lizosomale prin eticheta manozo-6-fosfat (M6P) și biogeneza lizosomilor;
6. maturarea proteinelor (proces ce implică atât modificări enumerate la punctele 2 – 5, cât și prelucrări proteolitice);
7. sortarea și transportul moleculelor și macromoleculelor la destinația finală în celulă, sau pentru secretarea (exocitarea) lor;
8. biogeneza și traficul intracelular al membranelor (proces care nu poate fi separat de toate celelalte enumerate și care necesită un comentariu mai detaliat).

Dintre cele opt funcții enumerate, vom detalia doar o parte, astfel încât să înțelegem mai bine importanța prezenței aparatului Golgi pentru economia celulei.

De menționat că toate aceste procese se petrec într-o succesiune ordonată de etape bine controlate și reglate, pe măsură ce substanțele primite de la RE avansează prin aparatul Golgi dinspre fața *cis*, către fața *trans*. Acest lucru este posibil prin menținerea polarizării biochimice a organitului, despre care am punctat mai sus unele detalii și pe care le putem îmbogăți cu date referitoare la polaritatea enzimelor implicate în prelucrarea și definitivarea structurii chimice a lanțurilor *N*-glicozidice ale glicoproteinelor. Fenomenele legate de formarea structurilor *N*-glicozidice din glicoproteine au fost unele dintre primele studiate și sunt printre cele mai bine cunoscute procese ce se petrec în aparatul Golgi.

Enzimele implicate în prelucrarea, în diverse direcții, a structurilor *N*-glicozidice prezintă următoarea distribuție între cisterne:

- (i) în rețeaua *cis*-Golgi este prezentă enzima care produce precursorul etichetei M6P a enzimelor lizosomale (o *N*-acetil-glucozaminil-fosfotransferază; vezi mai jos la "Biogeneza lizosomilor" detalii asupra procesului);
- (ii) în cisternele *cis*-Golgi este localizată manozidaza I, care tunde anumite manoze din oligozaharidul inserat pe asparagină în RE;
- (iii) în cisternele *mediene* se află manozidaza II, dar și *N*-acetil-glucozaminil-transferaza care începe glicozilarea terminală;
- (iv) în cisternele *trans* se găsește galactozil-transferaza ce continuă glicozilarea terminală a structurilor *N*-glicozidice;
- (v) în sfârșit, în rețeaua *trans*-Golgi sunt întâlnite sialil-transferazele care definitivează glicozilarea terminală prin adăugarea de acizi sialici.

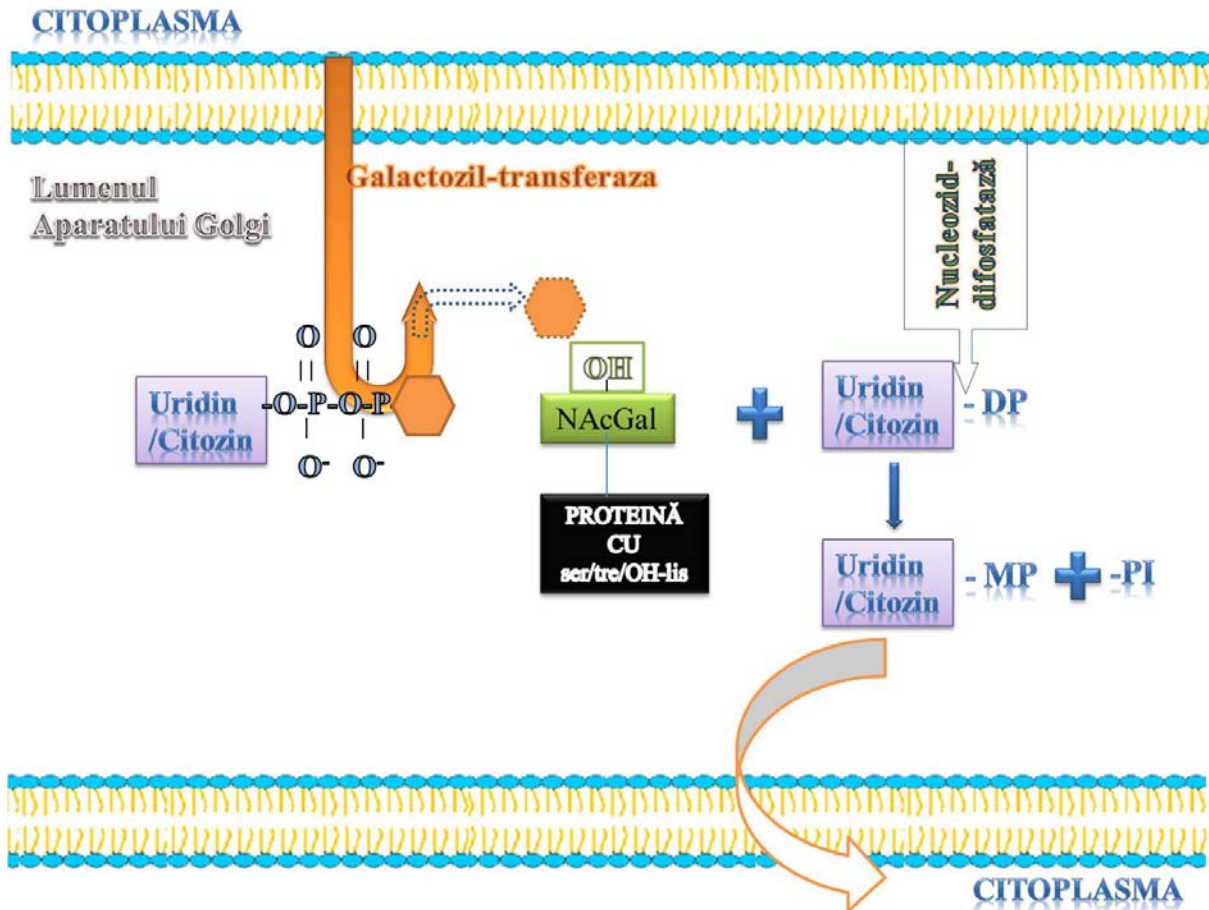



Fig. 1. Exemplificarea procesului de O-glicozilare.

Legendă: Monozaharidele () se găsesc în lumenul aparatului Golgi cuplate cu nucleozid-difosfați, de pe care sunt transferate, de către o glicozil-transferază, către lanțul oligozaharidic în formare. În urma acestui proces rezultă nucleozid-difosfat, care este mai departe defosforilat la nucleozid-monofosfat, care este eliminat în citoplasmă printr-un transportor specific.

Distribuția glicozil-transferazelor, prezentată mai sus, justifică și prezența nucleozid-difosfatazelor la nivelul cisternelor *mediene* și *trans*. Explicația o constituie faptul că glucidele sunt transferate pe lanțul oligozaharidic în creștere de pe nucleozid-difosfo-glucide (de ex: uridin-difosfogalactoza). După transfer, rămân în lumenul cisternelor golgiene nucleozid-difosfați (de ex: uridin-difosfat). Aceștia nu au transportori în membrane cisternelor golgiene, care să-i transfere în citosol pentru re folosire (Fig. 1). Nucleozid-monofosfații și fosfatul au însă transportorii corespunzători, astfel încât este necesară scindarea nucleozid-difosfaților, pentru asigurarea reciclării moleculelor. Ne achităm parțial, prin acest comentariu de promisiunea făcută în secțiunea “Considerente istorice”, legată de explicarea prezenței diferitelor enzime în diversele sectoare ultrastructurale ale complexului Golgi.

Prelucrarea și definitivarea structurilor glucidice N-glicozidice

Analizând polaritatea enzimatică putem deduce în ce constă activitatea complexului Golgi asupra structurilor N-glicozidice. Cunoaștem că producerea acestora este inițiată în RE sub forma unei structuri complexe oligozaharidice, triantenare formată (considerând dinspre asparagină spre capătul liber) din 2 N-acetil-glucozamine, 9 manoze și 3 glucoze. Cunoaștem deasemenea că, după inserarea pe asparagina aflată într-o secvență consens (-N-X-S/T-), structura începe să fie tunsă chiar în RE (mai întâi glucozele, apoi o manoză); și mai

cunoaștem semnificația funcțională a tunderii primelor două glucoze (asigurarea împachetării corecte prin acțiunea calnexinei, o șaperonă cu activitate de tip lectinic). Ei bine, după ajungerea în Golgi, celula este în măsură să decidă asupra destinului acestor glicoproteine. Cele care sunt menite a deveni enzime lizosomale, sunt marcate la cel puțin una dintre manozele cu care ajunge aici, prin fosforilare la hidroxilul carbonului 6 (vezi mai jos detalii ale fenomenelor, la “Biogeneza lizosomilor”). Cele care au alte destinații vor fi prelucrate, prin continuarea tunderii manozelor și, de regulă, prin glicozilări terminale, pentru a deveni **structuri înalt manozilate, structuri hibride**, sau **structuri complexe** (Fig. 2).

Structurile înalt manozilate sunt slab reprezentate în afara enzimelor lizosomale (unde sunt modificate prin fosforilare). Structurile hibride conțin încă un număr mai mare de manoze (de cel puțin cinci), dar și glicozilare terminală, de regulă nedefinitivă până la acizi sialici. În sfârșit, structurile complexe conțin un miez trimanozidic (cu manoză legată de *N*-acetilglucozamina predecesoare, ca punct de ramificare) și, pe fiecare ramură inițiată de o manoză, cel puțin câte un lanț de glicozilare terminală definitivă. Aceste structuri se numesc biantenare. Structurile *N*-glicozidice complexe pot fi însă și triantenare (exemplul din Fig. 2), sau, mai rar, tetra-antenare când ambele manoze distale ale miezului trimanozidic conțin câte două lanțuri de glicozilare terminală. Glicozilările terminale implică așadar tunderea de manoze și adăugarea, pas cu pas (pe măsura înaintării prin cisternele golgiene), de *N*-acetilglucozamină, apoi de galactoză și, la sfârșit, de acid sialic. Structurile complexe pot conține și fucoză legată pe cea mai profundă *N*-acetilglucozamină. Corespunzător tipurilor de structuri glucidice numite mai sus definim și tipuri de glicoproteine: glicoproteine înalt manozilate, glicoproteine hibride sau glicoproteine complexe.

Biosinteza structurilor O-glicozidice

Structurile *O*-glicozidice se produc în întregime la nivelul cisternelor golgiene. Deși nu există date referitoare la distribuția glicoziltransferazelor implicate în aceste glicozilări și deși lanțurile oligozaharidice sunt mai puțin elaborate (vezi Fig. 3 pentru cele mai simple exemple) este probabil ca aceste enzime să respecte tot o aranjare polarizată între cisterne.

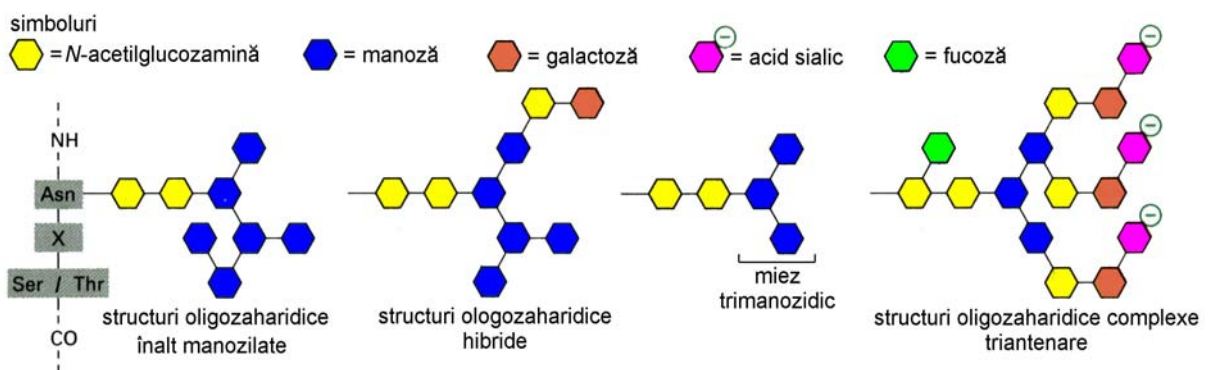


Fig. 2. Tipuri de structuri *N*-glicozidice definitivate în aparatul Golgi.

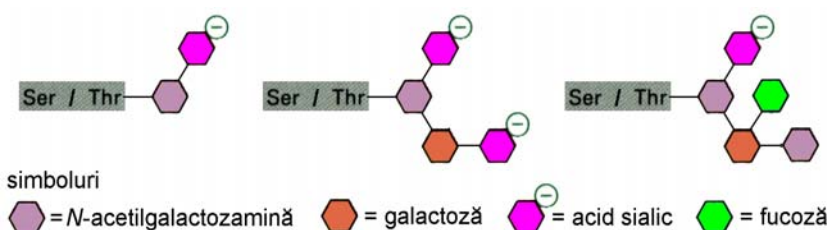


Fig. 3. Tipuri de structuri *O*-glicozidice biosintetizate în complexul Golgi

Modele referitoare la dinamica structurilor golgiene

Explicarea menținerii polarizării biochimice a cisternelor golgiene, în pofida mișcării anterograde a materialului prelucrat, a reprezentat și reprezintă o provocare pentru cercetătorii din domeniu. Pentru înțelegerea acestor mecanisme au fost elaborate două modele:

1. **modelul transportului vesicular** (model tip suveică);
2. **modelul maturării cisternelor.**

Modelul transportului vezicular stipulează că transportul anterograd este făcut prin microvezicule (diametru de ~50 nm) și presupune segregarea moleculelor a căror prelucrare este terminată în microdomenii ale membranei cisternelor donoare, desprinderea lor sub forma unor vezicule de transport, migrarea către cisterna următoare (acceptoare), fuzionarea cu membrana acesteia și predarea moleculelor/macromoleculelor transportate în vederea prelucrării corespunzătoare bagajului enzimatic al noii cisterne. Moleculele implicate în aceste procese de transport selectiv, ca și cele care scapă accidental în veziculele de transport sunt apoi returnate printr-un transport vezicular retrograd, la cisterna donoare.

Modelul maturării cisternelor presupune că transportul anterograd se face prin înaintarea întregii cisterne dinspre fața *cis* către fața *trans*, pe măsură ce procesele biochimice avansează. Din cisternele maturate, în fiecare etapă, proteinele rezidente sunt returnate la cisternele anterioare printr-un transport vezicular.

Așadar, ambele modele presupun un transport vezicular retrograd, iar prezența unor vezicule accesorii organitului ce conțin molecule rezidente în cisternele golgiene este singura realitate dovedită fără echivoc, în momentul de față. În rest, controversa rămâne actuală, deși fiecare model are dovezile, dar și contra-argumentele sale. Astfel, au fost evidențiate vezicule de transport (ce conțin molecule ce sunt transportate și prelucrate la nivelul organitului) în toată adâncimea complexului Golgi, ceea ce reprezintă un argument în favoarea modelului tip suveică. Totodată, prin Golgi sunt transportate și agregate moleculare ce depășesc diametrul unor asemenea vezicule de transport, ceea ce favorizează modelul maturării cisternelor. Totuși, modelul maturării cisternelor nu poate justifica observația că molecule ce își încep aventura golgiană în același moment, parcurg cisternele cu viteze diferite, ajungând în rețeaua *trans*-golgiană defazat. Fără îndoială că eforturile care se fac pentru studierea transportului membranar intracelular, transport care implică aparatul Golgi într-un mod semnificativ, vor avea ca rezultat și soluționarea disputei pe marginea celor două modele: modelul tip suveică, respectiv modelul maturării cisternelor. Nu putem exclude posibilitatea ca procesele caracteristice celor două modele să fie utilizate simultan de celulă pentru rezolvarea traficului intragolgian de substanță.

Recent a fost propus un nou model, denumit modelul partiționării rapide, care presupune separarea (partiționarea) cisternelor golgiene în domenii care concentrează proteine cargo și domenii care concentrează proteine structurale. Această separare pe domenii este rezultatul existenței unor zone de membrană cu compoziție lipidică diferită, în cadrul fiecărei cisterne. Acest model a apărut ca urmare a unor observații de cinetică proteică, făcute în sisteme celulare în timp real, pe baza cărora se stipulează că proteina glicozilată poate părăsi aparatul Golgi la orice nivel, din oricare cisternă. Acest model contravine însă polarizării biochimice și funcționale ale aparatului Golgi, motiv pentru care este încă contestat.

Biogeneza lizosomilor

Lizosomii reprezintă organitul prin care celula își asigură moleculele fundamentale atât pe baza reciclării acestora din unele componente intracelulare cât și prin preluări de substanță din afara celulei. Funcția lor se bazează pe bogatul conținut în hidrolaze acide, pe care celula le produce și le direcționează corect printr-o colaborare înalt specializată dintre RE și complexul Golgi care implică și un trafic adecvat, selectiv de membrană. Acest proces poartă denumirea de biogeneza lizosomală. El constă în biosinteza proteinelor lizosomale

(enzime, proteine ale membranei lizosomale) care implică mai întâi activitatea RE, apoi pe aceea a aparatului Golgi pentru maturarea, sortarea și direcționarea spre lizosomi a bagajului molecular specific.

Două sunt aspectele mai bine cunoscute asupra biogenezei lizosomilor și prezentându-le pe acestea ne vom face o imagine clară asupra realității biologice legate de acest proces:

- (i) marcarea enzimelor lizosomale și
- (ii) sortarea, segregarea moleculelor și înmugurirea, respectiv desprinderea lizosomilor primari.

Ambele fenomene se petrec la nivelul aparatului Golgi.

Marcarea enzimelor lizosomale presupune formarea unei etichete (**manozo-6-fosfat**, prescurtat M6P) și este un proces ce conține cel puțin două etape. În prima etapă, care are loc la nivelul rețelei *cis*-Golgi, proteinele care sunt destinate a deveni enzime lizosomale și care poartă obligatoriu structuri oligozaharidice *N*-glicozidice sunt complexate de enzima ***N*-acetil-glucozaminil-fosfotransferază**. Aceasta modifică cel puțin una dintre manoze la hidroxilul carbonului 6, prin transferarea unei *N*-acetil-glucozamine împreună cu un fosfat, de pe substratul *N*-acetil-glucozaminil-difosfo-uridină. Se formează, în acest fel, un precursor al etichetei finale M6P, care este, în acest moment, căpăcită cu molecula de *N*-acetil-glucozamină. Specificitatea interacțiunii dintre viitoarea enzimă lizosomală și *N*-acetil-glucozaminil-fosfotransferază este asigurată de un **semnal conformațional** pe care îl structurează toți precursorii de enzime lizosomale (pe baza împachetării, asistată și de calnexină, din reticulul endoplasmic). Semnalul conformațional reprezintă o sumă de segmente din secvența primară a unei proteine, care în structurarea terțiară a acesteia se dispun alături, formând domeniul de interacțiune cu partenerul. Aceste tipuri de semnale sunt afectate, pierzându-și funcția, atunci când structura terțiară a proteinei este denaturantă. După transferul structurii fosfo-glicidice, complexul precursor de enzimă lizosomală/*N*-acetil-glucozaminil-fosfotransferază se disociază. Unde are loc etapa a doua a formării etichetei (eliminarea *N*-acetil-glucozaminei), adică prelucrarea ulterioară a etichetei la forma ei finală, ca și prelucrările pe care enzimele lizosomale le suferă pentru a deveni funcționale sunt aspecte aflate deocamdată în studiu. Cert este însă faptul că în rețeaua *trans*-Golgi capacul de *N*-acetil-glucozamină nu mai maschează eticheta M6P, care devine funcțională și este folosită în procesele de sortare, segregare și producere a lizosomilor primari. Dovedirea importanței M6P în biogeneza lizosomilor s-a făcut prin folosirea culturilor de celule ce prezentau **boala incluziilor celulare** (I-cell disease; I de la “Inclusions”). Aceste celule prezentau un defect structural necunoscut, prin care enzimele în loc să fie direcționate la lizosomi, ajungeau să fie exocitate. S-a constatat că aceste celule, crescute în mediu suplimentat cu enzime lizosomale din celule normale, își recăpătau funcția lizosomală. Analizându-se diferențele din structura chimică a enzimelor din cele două tipuri de celule (normale, respectiv deficiente) s-a constatat că singura diferență consta în prezența de manoze fosforilate la hidroxilul 6 în enzimele celulelor normale.

Sortarea are la bază interacțiunea M6P cu un receptor specific transmembranar (**receptorul la M6P**). Acesta din urmă este, la rândul său, folosit pentru segregarea și aglomerarea componentelor lizosomale la nivelul unor **structuri cu înveliș de clatrină** din rețeaua *trans*-Golgi. Acestea evaginează din structurile *trans*-golgiene și se desprind, pierzându-și instantaneu învelișul de clatrină și devenind ceea ce numim lizosomi primari. Specificitatea activității clatrinei la acest nivel, prin comparație cu și pentru diferențiere de activitatea sa din procesele de endocitoză mediată de receptori (vezi la „Transportul membranar”), este dată de tipul de proteine accesorii (**adaptine**) implicate: în endocitoza mediată de receptori operează adaptinele **AP2** (AP de la **A**daptor **P**rotein), pe când în biogeneza lizosomilor operează **AP1/AP3**.

În etapa următoare lizosomii primari fuzionează fie cu endosomi târzii, producând lizosomi secundari, fie cu lizosomi secundari preexistenți, pentru a le spori bagajul de enzime cu componente proaspete. Biogeneza lizosomilor se sfârșește cu procesele de reciclare a

componentelor membranare implicate în sortare, segregare, veziculare și transport direcționat al lizosomilor primari.

Pentru a încheia comentariile referitoare la biogeneza lizosomilor, punctăm, odată în plus, faptul că, la nivelul rețelei *trans*-Golgi, enzimele lizosomale se prezintă în stare funcțională, gata maturate. Acesta este motivul pentru care aici se poate evidenția o reacție citochimică pentru fosfataza acidă (o enzimă lizosomală). În ciuda faptului că sunt funcționale deja în rețeaua *trans*-Golgi, enzimele lizosomale nu pot activa aici deoarece pH-ul în lumenul structurii, deși se plasează în domeniul acid, este cu cel puțin o unitate mai ridicat decât în lizosom.

Cooperarea reticul endoplasmic – Golgi în biogeneza și traficul intracelular al membranelor¹

Din ce am discutat până aici, rezultă că, în tot ceea ce face, aparatul Golgi este dependent de cooperarea cu RE. Dar această cooperare nu are semnificație funcțională numai pentru complexul golgian, ci și pentru reticulul endoplasmic. Așa cum aparatul Golgi nu ar avea ce face dacă nu ar primi molecule și macromolecule spre prelucrare de la RE, la fel RE nu și-ar vedea munca finalizată dacă nu ar exista în avalul său cisternele golgiene cu aspectele lor structurale și funcționale caracteristice. Pentru a completa imaginea complexității acestei cooperări RE – Golgi, vom aborda câteva aspecte legate de biogeneza și traficul intracelular al membranelor. Aceste aspecte sunt cu atât mai importante cu cât vizează structuri fără de care celulele nu ar putea exista: biomembranele.

Biogeneza membranelor este un proces deosebit de complex, care implică mai multe organele. Le amintim doar pe cele care participă pentru tipurile de membrane ale organelor neautonome: ribosomul, RE și complexul Golgi. Practic biogeneza membranelor presupune:

- (i) biosinteza componentelor moleculare ale membranelor;
- (ii) asamblarea corectă a acestora la nivelul structurii;
- (iii) maturarea structurii la una funcțională;
- (iv) transportul direcționat al noilor membrane la destinație.

Întrucât nu este obligatoriu ca toate aceste procese să se întâmple în succesiunea în care au fost enumerate, ci, de regulă, ele se întrepătrund, este de la sine înțeles că necesită un bine elaborat, controlat și reglat trafic de membrane. Altfel spus, biogeneza și traficul intracelular al membranelor formează un sistem integrativ de procese esențiale pentru organizarea și funcționarea celulei. Deși, în cea mai mare parte, fenomenele se potentează reciproc, fără o anumită secvențiere rigidă, cel puțin biosinteza moleculelor și macromoleculelor trebuie să se petreacă, în principiu, înaintea altor procese dintre cele patru menționate mai sus. Chiar și pentru această etapă a biosintezei, pentru unele componente inițierea se petrece într-un compartiment celular, iar finalizarea în altul. Amintim cazul sfingolipidelor ai căror precursori sunt produși în RE (ceramidele), în timp ce produșii finali (sfingomielinele, respectiv glicolipidele) sunt obținuți în complexul Golgi.

Referitor la biosinteza componentelor moleculare ale membranelor avem deja informații din ceea ce am prezentat la RE ca și din ceea ce am abordat, până acum, la aparatul Golgi. La fel stau lucrurile și legat de asamblarea corectă a (macro)moleculelor în cadrul structurilor nou-formate (vezi detaliile, despre flipaze și cele asupra inserării proteinelor transmembranare în bistrat, de la “Reticulul endoplasmic”). Cât privește maturarea structurii la una funcțională ea presupune aducerea componentelor ei moleculare în stare funcțională prin maturare (vezi prelucrarea (glico)proteinelor la “Reticulul endoplasmic” ca și (mai sus)

¹ Importanța traficului intracelular al membranelor a fost recunoscută și prin acordarea Premiului Nobel pentru fiziologie sau medicină în 2013. Cei trei laureați, James E. Rothman, Randy W. Schekman, Thomas C. Südhof, au avut contribuții semnificative în descifrarea mecanismelor care guvernează traficul intracelular al membranelor în celulele eucariote, așa cum se menționează și în motivația juriului: "for their discoveries of machinery regulating vesicle traffic, a major transport system in our cells".

prelucrarea sŃingolipidelor și (glico)proteinelor în complexul Golgi. Rămâne să mai discutăm traficul de membrane, în decursul căruia și prin care toate celelalte sunt posibile. În această privință, vom aborda mai întâi traficul dintre RE și Golgi, după care traficul dintre rețeaua *trans*-Golgi și locul destinației finale a noilor membrane.

Traficul RE – Golgi

Traficul de membrane, care asigură și transportul de substanță între RE și aparatul Golgi (vezi detaliile la “Reticulul endoplasmic”), implică mai multe procese:

- (i) Sortarea componentelor ce trebuie traficate la nivelul elementelor tranziționale ale RE (cu participarea proteinelor de înveliș COP II și proteinei G monomerice Sar1, cu rol reglator);
- (ii) Traficul anterograd către aparatul Golgi;
- (iii) Sortarea nivelului complexului Golgi a componentelor ce trebuie returnate la RE (cu participarea proteinelor de înveliș COP I și proteinei G monomerice Arf1, pentru reglare);
- (iv) Returul la RE, prin trafic retrograd (reciclarea unor componente).

Referitor la acest transport este dovedit în prezent, fără controverse, că respectă un mecanism de tip suveică. Dacă transportul anterograd nu a fost pus la îndoială, existența transportului retrograd a fost subiect de dispută până în 1989. În acest an colectivul condus de Jennifer Lippincott-Schwartz (de la NIH, adică National Institute of Health, Bethesda, USA) a raportat observația că, în celulele tratate cu **brefeldină A** (un metabolit fungic), complexul Golgi se dezorganizează și dispare, iar enzimele sale se regăsesc în structuri ale RE, inclusiv în anvelopa nucleară. Prezența enzimelor golgiene în anvelopa nucleară s-a constituit într-o dovadă îndubitabilă că celelalte structuri pozitive la reacția citochimică (reacția imunocitochimică pentru manozidaza golgiană) aparțin tot RE. Rezultatele nu pot fi explicate decât acceptând că brefeldina A blochează specific transportul anterograd și că, drept urmare, aparatul Golgi „se varsă” în RE datorită unui transport retrograd, de la Golgi către RE, care nu este blocat de brefeldina A. Deși transportul RE – Golgi în ambele direcții este acum indiscutabil, mecanismele prin care acesta se face, într-una sau cealaltă direcție, sunt departe de a fi elucidate. Cert este că el implică:

- (i) structurile intermediare ERGIC/VTC;
- (ii) proteine de înveliș diferite;
- (iii) reglatori (proteine G monomerice) specifici direcției.

Transportul RE – Golgi implică, de asemenea, sortări pe bază de motive de aminoacizi (grupe de doi, trei aminoacizi; vezi la “Reticulul endoplasmic”) și proteine motor specifice microtubulilor (experimental a fost dovedit că dezorganizarea microtubulilor afectează traficul).

Traficul membranal discutat mai sus rezolvă aspectele legate de biogeneza membranelor golgiene și inițiază aspectele legate de biogeneza celorlalte tipuri de membrane destinate sistemului endosomal și membranei celulare. Ce se întâmplă mai departe, pentru aceste din urmă membrane, punctăm mai jos.

Traficul rețea *trans*-Golgi – locație finală

1. Traficul *trans*-Golgi – lizosom, ne este deja familiar. Amintim că el presupune sortări prin M6P, segregări prin receptorii la M6P, AP1/AP3 și clatrină, precum și transport direcționat prin proteine transmembranare (vezi mai jos la “Direcționarea transportului intermembranar”).

2. Traficul *trans*-Golgi – membrană celulară implică o discuție mai nuanțată.

Vom aborda mai întâi traficul *trans*-Golgi membrană celulară în celulele polarizate, cu cele două componente ale sale:

- (i) traficul *trans*-Golgi – membrană apicală;
- (ii) traficul *trans*-Golgi – membrană latero-bazală.

Traficul trans-Golgi – membrană apicală se caracterizează prin următoarele aspecte:

Mecanismele sortării nu sunt pe deplin elucidate, dar există rapoarte care propun fenomene ce implică ectodomeniile proteinelor și chiar interacțiuni de tip lectinic, ce presupun participarea structurilor glucidice ale glicoproteinelor, sau glicolipidelor de pe fața luminală a organitului. Pe de altă parte, este propusă participarea structurilor de tip plută lipidică (lipid raft), care sunt descrise preferențial pentru domeniile apicale ale membranei.

Transportul elementelor rezultate prin sortare implică un mecanism cooperativ, care folosește inițial ruta microtubulilor, apoi ruta filamentelor de actină. Asemenea mecanisme au fost dovedite în 1993, într-un articol publicat de K.R. Fath și D.R. Burgess în *The Journal of Cell Biology*. Mecanismele au fost descrise pentru enterocite (celule intestinale absorbante) și ele exploatează organizarea specifică a citoscheletului în aceste celule. În enterocite microtubulii ce trec pe lângă cisternele golgiene sunt orientați cu capătul (-) către membrana apicală, străbătând parțial țesătura de filamente de actină (ce formează trama terminală, cu aderarea la joncțiunile tip *zonula adherens*) și terminându-se în proximitatea filamentelor de actină ce structurează axul citoscheletal al microvililor. Folosind această structurare și orientare, microveziculele ce transportă componente nou sintetizate ale membranei apicale (de fapt suprafețe de membrană produse *de novo*) folosesc inițial **proteine motor** din familia **dyneinelor**, pentru a se deplasa către capătul (-) al microtubulilor. Când ajung la filamentele de actină ce străbat axul microvililor, trec la folosirea unei alte proteine motor, **miozina I**, cu ajutorul careia se deplasează de-a lungul acestor filamente. Ajungând la nivelul membranei apicale de la baza microvililor, membrana veziculelor fuzionează cu membrana celulară, sporindu-i suprafața. Mecanismul descris concordă cu rezultate experimentale raportate de alte colective, în care celule epiteliale intestinale au fost incubate cu nocodazol, sau colchicină, substanțe care depolimerizează tubulina dezorganizând microtubulii. După acest tratament, eficiența transportului către membrana apicală se reduce cu ~50%, iar veziculele care pot ajunge aleatoriu la filamentele de actină ale tramei terminale, sunt direcționate la membrana laterală, către care aceste filamente sunt orientate, conducând la apariția nefirească de microvili la acest nivel.

Traficul trans-Golgi – membrană latero-bazală presupune sortări prin motive de aminoacizi din endodomeniile proteinelor transmembranare. Transportul se face tot pe calea microtubulilor, însă către capătul (+), prin folosirea **kinezinelor** (alte proteine motor specifice pentru microtubuli). Este astfel folosită orientarea diferită a microtubulilor, cu capătul (+) către membrana latero-bazală.

O mențiune care trebuie făcută este referitoare la reglarea acestui trafic. Ei bine, reglarea mecanismelor de selecție, sortare și veziculare în sisteme diferite de transport se face prin proteine G monomerice. Diversitatea acestora (probabil că încă nu cunoaștem toate entitățile moleculare din această super-familie de proteine) asigură o bună reglare a situațiilor pe care celula le are de rezolvat. Fără îndoială, controlul și reglarea acestor mecanisme de sortare și transport se vor dovedi mult mai complexe, pe măsură ce cunoașterea noastră asupra fenomenelor se va detalia.

Direcționarea transportului intermembranar

Specificitatea de direcționare a traficului membranar este asigurată de diversitatea proteinelor din familia denumită prescurtat **SNARE** (vezi la “Reticulul endoplasmic”, secțiunea “Sortarea și transportul către aparatul Golgi”). Pentru fiecare membrană țintă există o pereche specifică **v-SNARE/t-SNARE**. Specificitatea acestei perechi asigură transportul corect către membrana acceptoare. Împerecherea corectă atrage declanșarea mecanismelor de fuziune a membranelor. Procesul implică o serie de proteine accesorii care structurează o mașinărie de fuziune, ce este activată după legarea v-SNARE la t-SNARE.

Se consideră că specificitatea interacțiunii dintre partenerii corecți ai perechii v-SNARE/t-SNARE împiedică fuzionările dintre vezicule și alte membrane la care pot ajunge accidental. Acest punct de vedere pare totuși a fi contrazis, cel puțin în cazul experimentelor amintite mai sus pentru transportul membranei apicale în enterocite. Acolo se dovedește că mecanismul nu excelează în privința specificității; altfel nu s-ar putea forma microvili la nivelul membranei laterale. Există totuși explicații, dar validitatea lor trebuie dovedită experimental. O primă explicație o poate constitui faptul că afectarea transportului direcționat către membrana apicală, poate induce apariția de t-SNARE specifice membranei apicale, în membrana latero-bazală. Nu putem însă exclude nici posibilitatea existenței unor aspecte de detaliu ale mecanismului direcționării, care deocamdată ne scapă și care este posibil să nuanțeze situațiile.

Abordarea experimentală a rolului complexului Golgi în traficul intracelular al membranelor prin folosirea proteinelor himerice obținute prin cuplarea proteinelor golgiene rezidente cu **proteină fluorescentă verde (GFP)**, de la “**Green Fluorescent Protein**”) ar putea să aducă în viitor informații detaliate asupra mecanismelor. GFP a fost extrasă dintr-o meduză. Proteinele himerice se obțin modificând genele corespunzătoare celor două proteine (proteina de studiat, respectiv GFP) prin cuplarea lor, pentru a obține o nouă genă corespunzătoare unei proteine himerice. Cuplarea se poate face pentru adăugarea polipeptidei fluorescente fie la capătul amino-terminal al proteinei de interes, fie la cel carboxi-terminal, astfel încât himera să păstreze funcția și distribuția intracelulară ale proteinei studiate. Expimarea proteinei himerice în celule se face după **transfecție**. Transfecția este un procedeu prin care gena modificată (înglobată într-o plasmidă sau într-o structură virală inactivată) este introdusă în celula care se supune studiului. Adesea materialul genetic este inserat în genom și se exprimă, ducând la obținerea de proteine cu funcție cunoscută marcate fluorescent. Asemenea studii au fost deja realizate, pentru studiul mobilității proteinelor la nivelul membranelor cisternelor golgiene, ca și pentru studiul structurilor implicate în transportul RE-Golgi, respectiv Golgi-membrană celulară. O dezvoltare interesantă o reprezintă o reușită relativ recentă a colectivului condus de J. Lippincott-Schwartz. Acesta a reușit să obțină mutante ale GFP, care devin fluorescente numai după foto-activare. Această reușită va ușura urmărirea proteinei himerice fluorescente, fără a mai fi pericolul ca celula să se supraîncarce cu fluorescență prin producerea continuă a himerei și fără să mai necesite inhibitori ai sintezei proteice. Viitorul în studiul aparatului Golgi rămâne interesant și pare a deveni mai de succes.

Ciclul secretor celular (calea secretorie celulară)

Celulele organismului produc alături de (macro)molecule necesare folosinței interne și unele a căror destinație este aceea de a fi secretate (exocitate). Această proprietate a celulelor, de a secreta componente biosintetizate, se poate manifesta permanent, sau periodic și implică, bineînțeles, un trafic membranar.

Ciclul secretor se definește ca o succesiune de fenomene prin care se realizează:

- (i) biosinteza moleculelor/macromoleculor de secreție;
- (ii) prelucrarea (maturarea), sortarea, vezicularea și condensarea veziculelor/vacuolelor de secreție;
- (iii) secreția propriu-zisă, care poate fi constitutivă (se produce de la sine) sau semnalizată (stimulată).

Aspectele legate de primele două etape din calea secretorie ne sunt familiare din tot ce am discutat la reticulul endoplasmic și la aparatul Golgi, până acum. La acestea trebuie adăugat că în multe cazuri maturarea presupune proteoliza unor pro- sau pre-pro-componente. De exemplu, în cazul insulinei, maturarea presupune eliminarea mai multor fragmente din lanțul polipeptidic inițial, unic. Pre-pro-insulina înseamnă lanțul ce conține peptida semnal necesară translocării prin membrane RE. Pro-insulina reprezintă lanțul proteic fără peptida

semnal, eliminată de semnal-peptidază. Așadar, pre-pro-insulina ar fi precursorul inserat în membrana RE (care, de regulă, nu există ca atare, deoarece funcția semnal-peptidazei se manifestă ca fenomen co-traducere), iar pro-insulina (formă cu existență reală) este proteină solubilă, liberă în lumenul RE, respectiv în lumenul cisternelor golgiene. Insulina matură se produce în granula de secreție prin eliminarea proteolitică a unei secvențe din centrul lanțului polipeptidic, astfel încât cele două subunități ale moleculei de insulină rămân solidarizate, dar prin două punți disulfurice.

Adesea, conținutul vacuolelor de secreție suferă un proces de condensare, ce constă în eliminarea apei din lumen către citosol.

Ceea ce este necesar să mai adăugăm, pentru o mai bună stăpânire a proceselor celulare legate de secreție, vizează etapa secreției propriu-zise. În ceea ce privește fenomenele de direcționare a veziculelor/vacuolelor de secreție, în traficul lor către membrană, se consideră că respectă principiile deja prezentate.

Calea de **secreție constitutivă** operează în toate tipurile de celule. Se consideră că ea se petrece concomitent cu traficul noilor suprafețe de membrană necesare a înlocui componente devenite nefuncționale sau a satisface nevoile de creștere a suprafeței de membrană din anumite fenomene de organizare/reorganizare a țesuturilor ce însoțesc situații fiziologice sau patologice. Aceste fenomene necesită și organizări/reorganizări ale spațiilor extracelulare, astfel încât este necesară secreția de componente ale matricei extracelulare, cel puțin. Fenomenele par a se desfășura de la sine prin transport și fuziuni constitutive de membrane, deși în momentul de față se acumulează date ce indică faptul că în situațiile patologice, fenomenele care în situații normale corespund secreției constitutive, necesită amplificări care par a fi rezultatul unor fenomene de semnalizare în care capacitatea integrinelor de a semnaliza bidirecțional (dinspre exterior către celulă, respectiv dinspre celulă către matricea extracelulară) intervine activ.

Așadar, trebuie să fim circumspecți și să evităm tentația de a încerca trasarea de granițe ferme între cele două căi de secreție.

Calea de **secreție semnalizată** este, de regulă, specifică celulelor specializate în secreție (spre exemplu celulele glandulare). Ea presupune exocitarea componentelor acumulate în vezicule/vacuole de secreție, pe care celulele le stochează, până la primirea unui semnal (stimul). Acest stimul înștiințează că organismul are nevoie de substanțele stocate în vederea secreției ulterioare. Molecula mesager se leagă de un receptor specific din membrana celulei secretoare și declanșază mecanisme de semnalizare, al căror efect este inducerea fuziunii membranei veziculelor/vacuolelor de secreție cu membrana celulară și exocitarea conținutului. În multe cazuri, fuziunea semnalizată a membranelor se datorează creșterii concentrației de Ca^{2+} în citosol.

De menționat că, în unele situații, completa maturare a moleculelor secretate se petrece exact în momentul exocitozei. Acesta este, de exemplu, cazul colagenului tip I a cărui maturare finală înseamnă eliminarea, prin proteoliză, a unor fragmente din capetele pro-proteinei, eliminare care permite fibrilarea moleculei. Dacă maturarea s-ar produce în celulă, colagenul ar forma fibre în structurile intracelulare, afectând funcționarea acesteia și inducând situații patologice.

În concluzie, ciclul secretor (numit mai frecvent cale secretorie) implică atât cooperarea dintre RE (la nivelul căruia se sintetizează componentele moleculare destinate exportului) și aparatul Golgi (răspunzător, de regulă, de finalizarea maturării moleculelor de secretat, de sortarea, condensarea și formarea vacuolelor de secreție), cât și traficul membranal aferent acestor procese.

O remarcă merită făcută asupra termenului de ciclu secretor, sau cale secretorie. Dacă ar fi să considerăm că noțiunea de ciclu implică reciclări ale unor componente, atunci mai corect ar fi, în momentul de față, termenul de cale secretorie. Aceasta deoarece nu există dovezi asupra reciclării unor componente implicate în mecanismele celulare ce realizează procesul. Mai mult, pentru secreția constitutivă există dovezi că dinamica procesului implică ajungerea veziculelor în imediata apropiere a membranei, unde, după o așteptare de 15-30

secunde, fuzionează rapid, iar componentele membranei veziculare se împrăștie aproape instantaneu în planul membranei. (Asemenea dovezi experimentale au fost obținute prin folosirea himerelor proteice fluorescente, despre care am amintit mai sus.) Asta înseamnă că dacă ar fi vorba de fenomene de reciclare, acestea ar trebui să se producă în alte circumstanțe, ca însoțind alte procese celulare. Cât privește secreția semnalizată, datele acumulate în cel mai recent deceniu arată că atașarea veziculelor de secreție la membrana celulară are loc tranzitoriu, la nivelul unor microdomenii de membrană denumite **porosomi**, care facilitează fuzionarea celor două membrane și descărcarea produsului de secreție, decărcare care se face mai mult sau mai puțin complet.

În sfârșit, merită să evidențiem aici că pionierul deslușirii căii secretorii este G.E. Palade, care prin tehnici de autoradiografie, adaptate microscopiei electronice, a arătat că aminoacizii tritizați se regăsesc la nivelul reticulului endoplasmic imediat după administrarea lor celulelor pancreatice acinare, apar la nivelul aparatului Golgi, 20 de minute mai târziu și marchează vacuolele secretorii, sau materiale exocitate, după 90 de minute de la administrare.

Considerații finale

Putem rezuma în finalul prezentării datelor esențiale cunoscute asupra complexului Golgi că:

- este singurul organit care a captivat permanent comunitatea cercetătorilor; mai întâi prin suspiciune, apoi prin complexitate structurală și funcțională;
- se prezintă ca o stivă de cisterne recurvate, cu polaritate morfologică, dar și biochimică;
- primește materialul asupra căruia operează de la RE și funcționează ca o placă turnantă pentru maturarea, sortarea și direcționarea componentelor lizosomale, membranare, sau de export către destinația finală;
- în tot ceea ce face este implicat un trafic intracelular permanent de membrane, pe care îl controlează și reglează prin mecanisme care sunt departe de a fi pe deplin elucidate;
- este un organit intens studiat în momentul de față, pe celule vii, folosindu-se proteine himerice fluorescente, exprimate după transfecții cu gene inserate în plasmide.

Este de așteptat ca viitorul apropiat să aducă noi date legate de acest organit cu implicații semnificative asupra cunoașterii și înțelegerii unor procese celulare esențiale în descrierea celulei normale și în stabilirea limitelor de la care se poate defini patologia celulară. Se va putea astfel trece de la definirea patologicului prin simptomatologie clinică, la definirea sa pe baza deviațiilor subtile de la ceea ce reprezintă normalul la nivel fenomenelor celulare și moleculare.

Bibliografie

- Fraquhar MG, Palade GE.** (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8, 2-10.
- Leabu M.** (2006) Membrane fusion in cells: Molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med.* 10, 423-427.
- Glick BS.** (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 450-456.
- Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirschberg K.** (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 557-589.
- Bonifacio JS, Glick BS.** (2004) The mechanism of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116, 153-166.
- Fath KR, Burgess DR.** (1993) Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J Cell Biol.* 120, 117-127.
- Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA.** (2002) Motoring around the Golgi. *Nature Cell Biol.* 4, E236-E242.
- Palade G.** (1975) Intracellular aspects of the proces of protein synthesis. *Science.* 189, 347-358.
- Nakano A. and Luini A** (2010) Passage through the Golgi *Curt Opin in Cell Biol.* 2010, 22:471–478

Dr. Mircea Leabu, Dr. Ana Maria Enciu – Aparatul Golgi, curs pentru studenții la medicină

Nakamura N, Wei JH and Joachim Seemann J (2012) Modular organization of the mammalian Golgi apparatus. *Cell*. Jun 13;133(6):1055-67. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.044

Patterson GH, Hirschberg K, Polishchuk RS, Gerlich D, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. (2008) Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Curr. Opin Cell Biol* **24**:467–474.

Leabu M, Nicolson GL. (2014) Cell secretion and membrane fusion: highly significant phenomena in the life of a cell. *Discoveries*. 2014 Jul-Sep; 2(3): e30. DOI: 10.15190/d.2014.22

Leabu M, Niculite CM. (2014) Porosome: a membrane microdomain acting as the universal secretory portal in exocytosis. *Discoveries*. 2014 Jul-Sep; 2(3): e29. DOI: 10.15190/d.2014.21