

RETICULUL ENDOPLASMIC

Organizarea cursului:

1. Definierea organitului;
2. Structura și ultrastructura reticulului endoplasmic; etimologia denumirii;
3. Abordarea experimentală a organitului;
4. Funcțiile reticulului endoplasmic;
 - a. Funcțiile reticulului endoplasmic neted;
 - b. Funcțiile reticulului endoplasmic rugos;
5. Considerații asupra biogenezei membranelor.

Definiția

Reticulul endoplasmic (RE) este un organit delimitat de endomembrană, structurat sub forma unor cisterne și/sau tubuli, cu numeroase anastomoze, a căror față citoplasmatică prezintă, sau nu, rugozități și a cărei funcție de bază este aceea de a produce molecule și macromolecule esențiale organizării și funcționării celulelor. RE face parte din grupul organitelor implicate în biogeneza și traficul intracelular al membranelor, alături de aparatul Golgi, lizozomi și sistemul endozomal, sistem reprezentat de o multitudine de vezicule și/sau vacuole care facilitează fie schimbul de substanță între organitele enumerate mai sus, fie între acestea și membrana celulară pentru a asigura desfășurarea fenomenelor de exocitoză, respectiv endocitoza. RE este primul organit din seria celor implicate în traficul intracelular al membranelor, adică cel care inițiază procesele celulare ce se desfășoară în și între aceste organite. Reticulul endoplasmic reprezintă cea mai abundentă structură delimitată de endomembrane din celulă, conținând mai mult de jumătate din sistemul de membrane ale acesteia.

Structura și ultrastructura RE

Prezența RE în celule a fost dovedită de către citologi, primii specialiști în biologie celulară, datorită bazofilei sale, primind la început denumiri diferite în funcție de tipul celular în care a fost descris, ca și de numele celui care l-a evidențiat. De exemplu: (i) în neuroni, prin colorația Nissl, au fost descrise structuri granulare bazofile, care au fost denumite corpi Nissl; (ii) în hepatocite a fost descris ca o structură bazofilă cu aspect reticulo-granular care a primit denumirea de corpusculi Berg; (iii) în celulele acinare pancreatice, prezența RE se evidențiază în colorația hemalaun-eozină ca o zonă puternic bazofilă în treimea bazală a celulei, având uneori capacitatea de a estompa conturul nucleului. În celulele pancreasului endocrin, denumirea utilizată pentru structură a fost aceea de ergastoplasmă (plasmă lucrătoare). Timpul a dovedit că toate aceste structuri bazofile din citoplasmă reprezintă același organit: reticulul endoplasmic.

Denumirea de reticul endoplasmic are la bază caracteristicile morfologice evidențiate de citologi: aspectul de rețea (reticul) și localizarea preferențială în profunzimea citoplasmei (în endoplasmă) și nu în ectoplasmă (adică nu peri-plasmalemal, nu către periferia celulelor).

Detaliile structurale asupra organizării reticulului endoplasmic au fost însă cunoscute prin examinarea celulelor prin microscopie electronică. Preparatele standard de microscopie electronică de transmisie și examinarea de secțiuni seriate au dezvăluit ultrastructura RE. Informațiile astfel obținute au fost confirmate și pe preparate de înghețare/fracturare/sublimare. Organitul este organizat pe baza unor endomembrane sub formă de cisterne ce prezintă numeroase anastomoze și/sau tubuli înrețelați. Spațiul din interiorul membranelor (echivalent exteriorului celular din punct de vedere topologic) este denumit lumen și are o grosime/diametru de 30-60 nm, putând fi mai mare în stări de activitate crescută a organitului sau în situații nefiziologice. Lumenul RE este continuu între

cisterne și tubuli, iar la nivelul cisternelor se realizează anastomoze și cu anvelopa nucleară. Astfel, există continuitate între lumenul RE și lumenul anvelopei nucleare. De regulă zonele organitului organizate sub formă de cisterne prezintă ribozomi atașați pe fața citosolică a membranei, care dau aspectul rugos acestor arii; ele formează ceea ce a fost denumit **reticul endoplasmic rugos (RER)**. De notat că ribozomii sunt prezenți și pe fața citosolică a membranei externe a anvelopei nucleare. Zonele organizate sub formă de tubuli, care sunt ca niște prelungiri ale cisternelor RER, nu prezintă rugozități și au fost denumite **reticul endoplasmic neted (REN)**. Facem specificarea că RER și REN nu reprezintă două organite independente ci sunt zone, organizate diferit la nivel ultrastructural, ale aceluiași organit: reticulul endoplasmic. În ceea ce privește raportul RER/REN, acesta este diferit la diverse tipuri celulare, corespunzând funcțiilor respectivelor celule (vezi mai jos la “Abundența și distribuția intracelulară a RE”).

Abordarea experimentală în studiul RE

În deceniul nouă al secolului XX (să fi fost prin 1983-1984), la una dintre conferințele ținute la Institutul de Biologie și Patologie Celulară din București, George Emil Palade și-a început prelegerea făcând următoarea afirmație: “*Functions must be understood in terms of structures; structures must be understood in terms of chemistry*”. Așa stând lucrurile, iar acest cerc voluptos al corespondențelor biunivoce între (ultra)structuri, biochimie și funcții operând la nivelul oricăror structuri biologice, este de așteptat ca partea rugoasă a RE să aibă, cel puțin în parte, funcții diferite de partea sa netedă. Se pune problema: cum putem separa, pentru abordarea studiului funcțiilor lor, cele două zone de reticul endoplasmic?

Șansa (!?) face ca la omogenizarea celulară reticulul endoplasmic să se dezintegreze în elemente veziculare (alături de membrana celulară, de complexul Golgi și de elemente ale sistemului endozomal), formând ceea ce este cunoscut sub numele de fracțiune microzomală. Aceasta poate fi separată de celelalte fracțiuni celulare (nucleară, mitocondrial-lizozomală, citosolică) prin centrifugare diferențială. Fracțiunea microzomală conține microzomi (vezicule) rușoși (cu ribozomi atașați), și microzomi netezi. Cele două tipuri de vezicule din fracțiunea microzomală pot fi, ulterior, separate prin centrifugare în gradient de densitate, cu un bun randament al purității. Ținând cont de faptul că, în funcție de tipul de reticul endoplasmic pe care dorim să-l studiem, putem alege celule bogate în una dintre aceste forme (RER sau REN), rezultă că putem obține un preparat biologic consistent, de puritate ridicată, astfel încât informațiile artefactuale să fie sub limitele de detecție ce caracterizează metodele și tehnicile biochimice de investigare a funcțiilor.

Rezolvată fiind problema obținerii eșantioanelor de material biologic în cantitate și de puritate corespunzătoare, se poate trece la studiul bagajului molecular al acestora, pentru a intui, respectiv detecta și apoi dovedi funcțiile structurilor celulare de interes, în speță funcțiile REN și RER, mai bine-zis funcțiile părții netede, respectiv părții rușoase ale organitului celular denumit reticul endoplasmic.

Funcțiile REN

În momentul de față sunt destul de bine descrise următoarele funcții pentru partea netedă a RE:

1. Metabolismul lipidelor, adică:
 - a. biosinteza lipidelor membranare
 - b. metabolismul hormonilor steroizi
 - c. sinteza lipoproteinelor
 - d. sinteza trigliceridelor
 - e. de-saturarea acizilor grași

2. Implicare în metabolismul glucozei
3. Detoxificarea celulară;
4. Funcții speciale (depozit dinamic de ioni de calciu).

Biosinteza lipidelor membranare

RE participă practic la biosinteza tuturor lipidelor membranare fie direct în forma finală, fie prin producerea de precursori ce sunt apoi prelucrați în aparatul Golgi.

Componenta lipidică membranară este formată în principal din glicerofosfatide (~70%). Vom exemplifica biosinteza glicerofosfatidelor alegând producerea fosfatidilcolinelor (PC), caz care ne va permite să punctăm diversitatea de fenomene legate de producerea bistratului lipidic cu caracteristicile sale (vezi la “Organizarea moleculară a membranelor”).

Fosfatidilcolinele sunt biosintetizate la nivelul foii citosolice (interne) a membranei RE (lucru valabil și pentru celelalte glicerofosfatide), plecându-se de la acil-CoA și glicerol-3-fosfat, printr-o secvență de 3 reacții:

1. Primul pas îl constituie obținerea acidului fosfatidic, din precursorii amintiți, sub acțiunea **acil-transferazelor**. Acidul fosfatidic astfel format rămâne inserat în foia internă (cea orientată către citosol) a bistratului.
2. Pasul al doilea îl constituie eliminarea fosfatului din acidul fosfatidic, sub acțiunea **fosfatidil-fosfatazei**, cu formarea diacilglicerolului, la nivelul aceleiași foii interne a bistratului.
3. Ultimul pas îl reprezintă adăugarea fosfo-colinei la hidroxilul diacilglicerolului, prin acțiunea **colinfosfo-transferazei**, ce folosește ca substrat citidil-difosfo-colina (un compus macroergic care facilitează reacția enzimei).

Procesul descris mai sus ar trebui să ne stârnească cel puțin două întrebări: **(i)** de ce este nevoie de scoaterea fosfatului de pe acidul fosfatidic, dacă tot apare, în final, în structura PC? și **(ii)** de ce este produsă fosfatidilcolina în foia internă a bistratului lipidic, atâta timp cât trebuie să ajungă acolo unde se află preferențial, adică în foia externă? Altfel spus: dacă PC este produsă *de novo* în foia citosolică a bistratului lipidic, cum ajunge ea eficient în foia externă, știut fiind că pentru aceasta trebuie să sufere mișcare de “flip-flop”, a cărei frecvență este aproape nulă?

Răspunsul la prima întrebare implică aspecte concrete, dar ne permite să facem și afirmații de principiu referitor la semnificația și importanța complexității proceselor celulare.

În primul rând, întrucât unul din precursorii primei reacții din procesul de obținere a fosfatidilcolinei este glicerol-3-fosfatul, este firesc să se obțină, ca produs de reacție, acidul fosfatidic. Cât privește folosirea ca precursori a acil-CoA și glicerinei fosforilate, aceasta este motivată atât de considerente energetice (este favorizată reacția enzimatică, substraturile fiind activate, în comparație cu acizii grași necuplați la coenzima A, sau glicerina nefosforilată), cât și de aspecte legate de eficiența fenomenelor anterioare etapelor descrise: atât acizii grași cât și glicerina sunt molecule care în formă nativă pot difuza prin membrană și pot fi pierdute de celulă, iar celula nu-și permite risipa. Pentru a contracara pierderea de resurse și pentru a păstra moleculele eliberate din depozitele de trigliceride, sau produse prin consum energetic în celulă, acestea trebuie să fie menținute în complexe moleculare care le modifică proprietățile fizico-chimice. Atât CoA, cât și fosfatul transformă moleculele în discuție în compuși pentru care membrana celulară nu este permeabilă.

Pe de altă parte, trebuie menționat că o regulă de eficientizare a proceselor celulare este aceea că ele cu cât sunt mai complicate (cu cât au mai multe etape biochimice), cu atât pot fi mai riguros controlate. Mai mult, adesea un avantaj de procese celulare au căi inițiale comune, astfel încât aceste etape inițiale să se petreacă frecvent, iar celula să poată decide, pe parcurs, încotro le direcționează.

Decizia ține de nevoile în permanentă schimbare ale celulei, ca răspuns la semnale interne sau externe, semnale receptate, analizate și prelucrate prin fenomene complicate, numite procese de semnalizare celulară. În felul acesta, fenomene deja declanșate din anumite considerente, nu vor rămâne suspendate sau anulate, ci conduse în direcțiile în care apar noi nevoi celulare. Astfel, celula va evita risipa de energie și mijloace.

Cât privește cel de-al doilea aspect, referitor la corecta distribuție a fosfatidilcolinei în membrana plasmatică, redistribuirea ei se face prin complexe macromoleculare de translocare numite generic **flipaze** (cele mai multe din categoria transportorilor ABC).

Există, în membrane, inclusiv cea a RE trei categorii de flipaze: **(i) flopaze**, care transferă fosfolipidele din foița internă, în cea externă, **(ii) flipaze**, care translochează fosfolipidele din foița externă, în cea internă și **(iii) scramblaze**, care transferă lipidele membranare în ambele sensuri. Astfel, pentru fosfolipide există, în membrana RE, o scramblază care le translochează din foița internă a bistratului lipidic, unde sunt produse, în cea externă pe măsură ce diferitele tipuri se formează, acumulându-se în foița de biosinteză, inclusiv pe cele care trebuie să se găsească în stratul extern al bistratului lipidic membranar. Scramblazele, din câte cunoaștem până în prezent, sunt lipsite de specificitate și operează fără consum energetic. Ele măresc de ~100.000 de ori frecvența mișcării de flip-flop la nivelul membranei RE, fiind cele care, mai întâi echilibrează fosfolipidele nou biosintetizate între cele două foițe ale endomembranei.

Flipazele și flopazele, acționează ulterior, fiind principalele responsabile de crearea și asigurarea menținerii eficiente a asimetriei de distribuție a lipidelor membranare la nivelul endomembranelor și membranei plasmatică. Acestea se caracterizează prin specificitate pentru structura capului hidrofил al fosfolipidelor și acționează cu consum de energie.

Cum este reglată activitatea acestei diversități de translocaze pentru lipidele membranare, translocaze care se întâlnesc la nivelul tuturor membranelor, dar acționează diferit de la o membrană la alta, este o problemă încă neelucidată. Se cunosc mai multe lucruri legate de procesele în care translocazele lipidelor membranare se activează. Spre exemplu, scramblazele de la nivelul membranei celulare sunt cele care duc la fliparea fosfatidilserinelor (PS) și apariția lor în foița externă a bistratului lipidic în apoptoză, ca și în plachetele sanguine activate. Acest fenomen este însoțit de sporirea adeziunii celulare, a tendinței de agregare (inducerea proprietăților procoagulante la plachete), ca și de recunoașterea de către celulele fagocitare (fagocitarea corpilor apoptotici). Fliparea PS a fost evidențiată și în situații patologice cu risc crescut cardiovascular, cum ar fi în diabet.

Un aspect interesant, care merită punctat, este faptul că celula nu este nevoită să sintetizeze întotdeauna fosfolipidele *de novo*, atunci când proporția dintre diferitele tipuri trebuie să se schimbe la nivelul bistratului. Fosfolipidele pot suferi reacții de disproporționare, adică acele reacții prin care ele pot trece dintr-una în alta. Posibilitățile de disproporționare nu sunt nici universale (adică oricare dintre ele să poată trece în oricare dintre celelalte), nici întotdeauna bidirecționale. Astfel sunt cunoscute următoarele posibilități de disproporționare:

a) La nivelul RE:

1. fosfatidiletanolamina poate trece în fosfatidilcolină (conversia implică reacții de metilare pentru care există enzima adecvată: **fosfatidiletanolamin-N-metil-transferaza**);
2. există posibilități de conversie în ambele sensuri între fosfatidilcolină, respectiv fosfatidiletanolamină și fosfatidilserină (prin reacții de schimb la nivelul capului hidrofил: colina, sau etanolamina sunt schimbate cu serină, sub acțiunea unor **PS sintaze**); de menționat că în celulele de mamifere, PS se produce numai prin acest mecanism de schimb.

b) La nivelul mitocondriei

1. fosfatidilserina poate trece în fosfatidiletanolamină (prin decarboxilare sub acțiunea **fosfatidilserin-decarboxilazei**).

Distribuirea lipidelor nou sintetizate către celelalte membrane din celulă este considerată a se face prin difuzie laterală pentru anvelopa nucleară, sau constitutiv (adică de la sine) pentru organitele implicate în traficul intracelular al membranelor (aparatură Golgi, lizozomi, endozomi, membrană celulară). Pentru organitele din afara acestui trafic, așa-numitele organite (semi)autonome (mitocondrie, peroxizomi) există părerea că distribuția se face prin **transportori de schimb fosfolipidic**. Acești transportori ar avea specificitate pentru structura capului hidrofil și ar extrage fosfolipidele din membrana RE, le-ar transporta prin citosol, ascunzând coada hidrofobă a acestora, cedându-le membranelor țintă. Obiecțiunile referitoare la acest model sunt legate de eficiență, deși zonele de apropiere nanometrică între membranele RE și membrana externă a mitocondriilor sunt numeroase, iar aici asemenea procese pot fi extrem de facile și rapide. În ceea ce privește peroxizomul, studii recente, legate de biogeneza organitului, dovedesc elegant prezența unor structuri microveziculare, care fac transport de la RE către acesta [transport de bistrat lipidic cu câteva (puține) proteine, numite peroxine la peroxizom]. De menționat că cea mai mare parte a peroxinelor este preluată de peroxizom din citosol, prin mecanisme de translocare dovedite, dar în curs de descifrare a detaliilor.

Colesterolul este produs de RE în orice tip de celulă animală, printr-un proces biologic complex, bine elaborat și atent reglat. Anumite celule, cum ar fi hepatocitele, celulele intestinale, celulele glandei suprarenale, ale ovarului sau ale testiculului, au o viteză mai ridicată de biosinteză a colesterolului. Materia primă este acetil-CoA (CoA – coenzima A) rezultată în urma oxidării mitocondriale a acizilor grași sau oxidarea citosolică a etanolului. În citosol, din acetil-CoA se formează HMG-CoA (HMG – 3-hidroxi-3-metil-glutaril) care va fi preluat în lumenul RE unde, sub acțiunea **HMG-CoA reductazei**, se formează intermediarul de bază – acidul mevalonic. Aceasta este etapa limitantă de viteză a procesului de biosinteză a colesterolului, activitatea **HMG-CoA reductazei** fiind reglată atât prin feedback negativ, de către nivelul de colesterol (acelerează „turn-over-ul” enzimei), cât și prin acțiunea anumitor hormoni (insulină/glucagon), care induc modificări covalente prin fosforilare/defosforilare. În etapele următoare, prin intermediul farnezil-fosfatului se produce scualenul, sub acțiunea **scualen-sintazei**, care apoi suferă, sub acțiunea **scualen-oxidociclazei**, ciclizările ce duc la obținerea intermediarului conținând nucleul tetra-ciclic, lanosterolul. Transformarea lanosterolului la colesterol implică multe faze mai puțin elucidate. Enzimele menționate mai sus fac toate parte din bagajul molecular al RE.

Colesterolul rezultat în urma biosintezei endogene (precum și cel care provine din alimentație) va fi folosit în orice celulă pentru biogeneza unor noi suprafețe membranare, în anumite glande endocrine pentru sinteza de hormoni steroizi și, în cea mai mare proporție, pentru sinteza de acizi biliari în ficat. Colesterolul poate fi depozitat în celulă sub formă de colesterol esterificat în incluziuni lipidice, sau transportat prin sânge de către lipoproteine. Alături de colesterolul esterificat sunt depozitate, respectiv transportate și trigliceridele.

Reticulul endoplasmatic neted deține enzimele corespunzătoare sintezei trigliceridelor prin esterificarea unei molecule de glicerol cu trei lanțuri de acizi grași. Tot la nivelul reticulului endoplasmic se găsesc enzimele necesare hidrolizei trigliceridelor cu eliberarea acizilor grași și a glicerinei. Acest lucru se întâmplă atunci când celula are nevoie de producții din compoziția trigliceridelor, iar eliberarea se face sub forma unor compuși activați: glicerol-3-fosfat, respectiv acil-coenzimă A, compuși amintiți mai sus la secțiunea „**Biosinteza fosfolipidelor membranare**”.

Prezența bagajelor enzimatice necesare metabolismului lipidic poate fi intuitiv sugerată și prin preparate de microscopie electronică pentru celule care prezintă incluziuni lipidice. De regulă, acestea

ne arată că incluziunile lipidice sunt în strânsă corelație cu structuri ale REN, ceea ce sugerează rolul organitului în **producerea**, respectiv **hidroliza trigliceridelor**.

Incluziunile lipidice se formează prin acumularea lipidelor neutre (trigliceride, colesterol esterificat) între cele două foițe ale membranei reticulului endoplasmic neted. Pe măsură ce volumul de lipide neutre crește, acumularea se va desprinde de reticulul endoplasmic pentru a deveni un organit independent. Așadar, incluziunea lipidică va fi delimitată de monostrat de fosfolipide provenite din membrana reticulului, asociate cu o serie de proteine implicate în stabilizarea acestora, dar și în dinamica materialului lipidic inclus.

Lipoproteinele sunt complexe macromoleculare formate dintr-un miez ce conține trigliceride și colesterol esterificat și un înveliș format dintr-o foiță de fosfolipide și apoproteine (apoproteina B – apo B, fiind cea mai importantă). Componenta proteică este biosintetizată în partea rugoasă a reticulului endoplasmic, dar celelalte componente biochimice sunt produse la nivelul porțiunii netede. În lumenul reticulului endoplasmic neted există și enzimele necesare asamblării complexului trigliceride-apo B, însă maturarea particulelor lipoproteinelor se va definitiva în aparatul Golgi.

În anumite glande endocrine, colesterolul depozitat în picăturile lipidice va fi utilizat pentru biosinteza hormonilor steroizi (progesteron, androgeni, estrogen, glucocorticoizi, mineralocorticoizi). Steroidogeneza este un proces care presupune cooperarea strânsă între reticulul endoplasmic neted și mitocondrie. Deși prima etapă în prelucrarea colesterolului se desfășoară în mitocondrie, reticulul endoplasmic neted deține în bagajul său enzimatic majoritatea enzimelor implicate în acest proces, precum și pe cele implicate în degradarea hormonilor steroizi. Acesta este motivul pentru care în celule specializate în producerea de hormoni steroidici componenta netedă a reticulului endoplasmic este foarte bine reprezentată, ocupând cea mai mare parte din volumul citoplasmei.

Tot la nivelul RE sunt produse **ceramidele**, precursorii sfinngomielinelor și glicolipidelor. Ceramidele se obțin prin amidarea sfinnganinei, un aminodiol alifatic, precursor al sfinngozinei, obținută din L-serină și palmitil-CoA. Dihidro-ceramidele astfel obținute sunt dehidrogenate. Transformarea ceramidelor în sfinngomieline, sau glicolipide (cerebrozide) se petrece la nivelul complexului Golgi.

Un alt proces care implică metabolismul lipidic, cu importanță în capacitatea celulelor de a modula proprietățile fizico-chimice ale membranelor, este **desaturarea acizilor grași**. Aceasta se face prin acțiunea unui complex enzimatic ce conține **citocrom b₅** (**NADH-citocrom b₅-reductază**) și **acid gras desaturaze**. Procesul are loc adesea cu alungirea lanțului alifatic. Nu există dovezi că aceste procese s-ar petrece direct pe fosfolipide, ci doar pe acizii grași esterificați, ca tioesteri, cu CoA. Modularea cantității de acizi grași nesaturați în fosfolipidele membranare permite celulelor să-și regleze fluiditatea membranelor, în conformitate cu nevoile de moment. Faptul că desaturarea se face pe acizi grași, în afara lipidelor membranare, ar însemna că modularea fluidității se face prin sinteza *de novo* a fosfolipidelor. O problemă care se ridică este legată de eficiența răspunsurilor în modularea fluidității pe această cale.

Implicarea în metabolismul glucozei

Glucoza este un glucid util celulei în multiple modalități. Este singurul glucid care, în condiții fiziologice, circulă liber în umorile organismului, iar homeostazia sa este importantă pentru o serie de fenomene biologice care necesită o bună coordonare a organismului. De aceea, metabolismul glucozei este un aspect de biochimie și de biologie celulară de interes major, justificat pentru cercetătorii domeniului, în general, ca și pentru medici, în particular. Glucoza este preluată din alimentație și, fiziologic, creșterea concentrației ei în sânge este însoțită de preluarea de celulele care o folosesc intens (celulele musculare sau hepatocitele, dar nu numai) și depozitarea sub formă de glicogen, pentru a o elibera, atunci când este necesar fie pentru nevoile celulelor care o stochează, fie pentru

nevoile generale ale organismului. RE (cu precădere cel din hepatocite), prin partea sa netedă, intervine în metabolismul glucozei pentru controlul homeostaziei acestui compus în organism. Atunci când este nevoie, glucoza din glicogenul acumulat în citosolul hepatocitelor este eliberată, prin procesul denumit glicogenoliză, sub formă de glucozo-1-fosfat. Acest compus nu este un metabolit util și de aceea este transformat, prin acțiunea unei fosfo-gluco-mutaze, în glucozo-6-fosfat care fie intră în procesul de glicoliză, pentru nevoile energetice ale celulei, fie este translocat de un transportor specific al membranei RE în lumenul organitului unde glucozo-6-fosfataza îl hidrolizează la glucoză și fosfat, ambele produse ale reacției de hidroliză fiind apoi retrimise prin transportori adecvați în citosol. De aici, glucoza este eliminată în spațiul extracelular pentru asigurarea concentrației optime a compusului în umorile organismului, în principal echilibrând homeostazia sanguină a glucidului.

Detoxificarea celulară

Procesele care asigură această funcție, de eliminare a unor compuși toxici din celule și din organism, sunt în sarcina REN. Fenomenele implică metabolizarea, pentru eliminarea din celulă, a compușilor liposolubili (unele medicamente, insecticide, carcinogeni etc.), care s-ar putea acumula în bistratul lipidic, afectându-i, într-un mod necontrolat de celulă, fluiditatea și prin aceasta funcționarea optimă a membranelor. Disfuncționalitățile membranare, induse de acumularea unor asemenea produși în bistratul lipidic, se datorează alterării interacțiunilor dintre lipide și proteinele integrale, ce se exercită în zona hidrofobă a membranei. Aceste interacțiuni controlează, de exemplu, conformația domeniilor transmembranare și prin aceasta funcționalitatea proteinelor imersate în bistrat. Afectarea lor de către compuși care nu trebuie să se afle acolo înseamnă pierderea controlului celular asupra funcționalității proteinelor integrale. Acești produși, pe care celula trebuie să-i elimine din bistratul lipidic, pot fi fiziologici, patologici, sau farmacologici. La nivelul RE acești compuși hidrofobi sunt mai întâi hidroxilați, prin acțiunea unui complex enzimatic bazat pe **citocrom P₄₅₀/NADPH-citocrom P₄₅₀-reductază**. Compușii hidrofobi sunt astfel transformați în structuri hidrofile, ușor de eliminat din celulă sau amfifile cu posibilități mai complexe de metabolizare. Dacă este cazul, aceste prime modificări sunt urmate de grefarea, la grupările hidroxil astfel obținute, a unor structuri glucidice sau grupări sulfat, care măresc hidrofilicitatea produșilor rezultați, fiind ușor eliminați din celulă.

Rolul în detoxificarea celulară este spectaculos sugerat și de fenomenul de hiperplazie (creșterea cantității, sau numărului de tubuli) a REN în hepatocitele animalelor de experiment tratate, pentru o perioadă mai îndelungată, cu barbiturice. La scurt timp după începerea perioadei de tratament, crește semnificativ cantitatea de REN în celulele ficatului. Hiperplazia este reversibilă, cantitatea de REN revenind la normal, după încetarea medicației. De remarcat faptul că, în hepatocitele normale, componentele netedă și rugoasă ale RE prezintă o proporție de echilibru (~1:1), astfel încât modificările acestui raport sunt ușor de observat.

Reticulul endoplasmic – depozit dinamic de Ca²⁺

Această funcție se manifestă pregnant la celulele musculare striate. La aceste celule, la care reticulul endoplasmic este denumit reticul sarcoplasmic (RS), funcția și dinamica celulară sunt realizate prin cooperarea mai multor componente moleculare. O primă componentă este **calsechestrina**, proteină cu mare afinitate pentru ionii de calciu, aflată în cantitate mare în lumenul organitului. Prezența calsechestrinei contribuie (conform constantei sale de afinitate) la controlul cantității de Ca²⁺ liber din lumenul RS, în condițiile unei concentrații totale de Ca²⁺ crescute. La stimularea celulelor, se deschid în membrana RS **canale de calciu controlate chimic** (prin inozitol tris-fosfat – IP₃, vezi la „Transportul membranal” și la „Semnalizarea celulară”), prin care ionii de calciu, aflați liberi în lumen, pătrund în citosol și declanșează contracția. Trecerea Ca²⁺, din lumenul RS în citosol, are loc atâta timp cât canalele sunt deschise, pe baza deplasării echilibrului din lumen dinspre calciul legat pe

calsechestrină, spre calciul liber, determinând menținerea în permanență a unei concentrații de calciu liber în RS mai ridicată decât în citosol. Ciclul se închide prin acțiunea unor **pompe de calciu** din membrana RS, care reintroduc Ca^{2+} în lumenul RS, unde calsechestrina îl complexează, pentru a păstra constantă concentrația de ioni liberi. Readucerea rapidă a concentrației de Ca^{2+} liber din citosol se poate face și prin acțiunea unor pompe de calciu din sarcolemă, sau a unor canale de schimb ionic, ambele eliminând Ca^{2+} în exteriorul celulei. Detalii asupra acestor fenomenele veți studia la cursul de „Țesut muscular” de la disciplina „Histologie generală”.

Funcțiile RER

Funcțiile părții rugoase a RE au stârnit mai mare interes pentru comunitatea biologilor celulari, astfel încât multe dintre ele sunt cunoscute în detaliu, chiar dacă nu pe deplin. Vom căuta, în cele ce urmează, să le prezentăm în atâtea detalii, câte să ne ajute să le înțelegem corect și să ne permită să ne dăm seama de complexitatea lor și de importanța acestei părți a organitului pentru organizarea și funcționarea celulei ca sistem integrativ. Iată despre ce vom discuta:

1. Biosinteza unor proteine: **(i)** proteine membranare, **(ii)** proteine destinate a funcționa în RE, în aparatul Golgi, lizozomi, sau în sistemul endozomal **(iii)** proteine destinate exportului. De notat că peste o treime din proteinele biosintetizate într-o celulă sunt recrutate la nivelul RE.
2. Prelucrarea proteinelor sintetizate la nivelul RE.
3. Sortarea și transportul componentelor biochimice către aparatul Golgi.

Biosinteza proteică al nivelul RE

Biosinteza tuturor proteinelor într-o celulă se inițiază în citosol. Excepție fac proteinele codificate de ADN-ul mitocondrial (puține; nu mai mult de 10% dintre proteinele necesare funcționării mitocondrii). Așa stând lucrurile, se pune problema: cum știe RE care dintre complexe de biosinteză proteică (poli-ribozomi) trebuie să fie preluate la nivelul membranei sale?

Ei bine, informația prin care se face selecția se află în însuși lanțul polipeptidic în formare. Ea este o secvență compactă de 15-30 aminoacizi hidrofobi (sau preponderent hidrofobi) denumită **peptidă semnal**, sau **secvență semnal**. De regulă, peptida semnal este localizată foarte aproape de capătul amino-terminal al proteinelor în cauză, sau se identifică cu acesta. Prezența peptidei semnal deși este necesară, nu este suficientă. Peptida semnal nu are un receptor corespunzător în membrana RE. În procesul de recrutare a poli-ribozomilor, care au produs peptida semnal în proteina a cărei biosinteză o desfășoară, intervine un alt complex macromolecular ribonucleoproteic, care a fost denumit **particulă de recunoaștere a semnalului** (prescurtat SRP – de la “**S**ignal **R**ecognition **P**article”). Particula de recunoaștere a semnalului conține o moleculă mică de ARN (7S constantă de sedimentare), complexată cu 6 subunități polipeptidice, adoptând forma unui bastonaș flexibil cu lungimea de ~25nm și grosimea de ~5nm. Acest complex structurează la un capăt un sit de interacțiune cu peptida semnal din lanțul polipeptidic în curs de sinteză, iar la celălalt capăt un domeniu de legare la situl A al ribozomului. Adiacent sitului de interacțiune cu peptida semnal, după această interacțiune și legarea pe ribozom, SRP expune un sit de legare la un receptor specific din membrana RE, **receptorul la SRP** (SRPR). În această conjunctură poli-ribozomul (la nivelul căruia alungirea lanțului este blocată, prin legarea domeniului specific al SRP la situl A) este recrutat de membrana RE. După legarea complexului ribozom operațional + lanț polipeptidic în biosinteză + particulă de recunoaștere a semnalului, receptorul predă întreaga mașinărie unui alt complex macromolecular transmembranar, din membrana RE, constituit din mai multe proteine, care rezolvă translocarea lanțului polipeptidic, pe măsura alungirii. Acest complex de translocare este denumit

translocon. Transloconul este astfel organizat încât structurează pe de o parte un sit de acomodare a peptidei semnal hidrofobe, iar pe de altă parte, un canal hidrofil (mai bine-zis un por hidrofil, deoarece diametrul său în conformație deschisă, activă în translocare este de 4-6 nm; diametrul său în stare neocupată este de 0,9-1,5 nm). Prin acest por hidrofil este translocat lanțul polipeptidic în lumenul RE, pe măsura alungirii sale. Din momentul în care transloconul preia ribozomul, SRP este eliberată în citosol, iar biosinteza proteinei poate continua, deoarece situl A devine disponibil și poate fi ocupat cu ARNt, corespunzător codonului ce urmează în ARNm care este tradus. Acestea sunt fenomenele ce se petrec pentru selecția poli-ribozomilor corespunzători, la membrana RE și inițierea translocării prin aceasta. Pe scurt, etapele descrise ar fi:

1. inițierea sintezei proteice în citosol;
2. apariția peptidei semnal;
3. recunoașterea peptidei semnal de către SRP (aflat întotdeauna în exces în citosol), interacțiunea dintre ele și blocarea sintezei prin ocuparea sitului A;
4. legarea complexului macromolecular astfel format la SRPR din membrana RE;
5. interacțiunea dintre SRPR și translocon urmată de transferul complexului, legarea ribozomului și deblocarea sintezei proteice prin eliberarea SRP în citosol;
6. translocarea lanțului polipeptidic, pe măsură ce se alungește, prin membrana RE, intermediată și controlată de translocon.

Ceea ce se întâmplă mai departe depinde de tipul de proteină care este sintetizată. Proteinele destinate exportului (proteinele de secreție), sau cele care trebuie să funcționeze ca proteine solubile în lumenul RE, al cisternelor golgiene, al lizozomilor, sau al sistemului endozomal conțin adiacent peptidei semnal (către capătul carboxi-terminal) o secvență consens recunoscută de o hidrolază, numită **semnal-peptidază**, care elimină peptida semnal hidrofobă (ce ar ține altfel proteina inserată în bistratul lipidic, ca proteină transmembranară unipas de tip II) și eliberează proteina în lumenul RE.

Pentru proteinele transmembranare, procesele se nuanțează semnificativ. O serie de proteine transmembranare unipas conțin peptide semnal dispuse mult mai profund în lungimea lanțului polipeptidic, nu către capătul extrem amino-terminal. În această situație, deși etapele de inițiere a translocării sunt aceleași, caracteristicile fizico-chimice ale lanțului polipeptidic, în zonele adiacente peptidei semnal, influențează sensul în care are loc inserarea în translocon și translocarea. Să specificăm mai întâi că întotdeauna (din câte cunoaștem până în prezent) inserarea în translocon se face cu sarcinile pozitive din lanțul polipeptidic către fața citoplasmatică a membranei RE. Asta înseamnă că, atunci când porțiunea dinspre peptida semnal către capătul amino-terminal conține aminoacizi cu sarcini pozitive (lizină, arginină), inserarea în translocon se face în sens direct, capătul amino-terminal al proteinei rămâne în citosol (în endodomeniu), iar proteina rezultată va fi transmembranară, unipas, tip II. Dacă însă porțiunea dinspre peptida semnal către capătul carboxi-terminal al proteinei conține aminoacizi pozitivi, atunci inserarea în translocon se face în sens invers, capătul amino-terminal deja format al lanțului polipeptidic va fi translocat în lumenul RE, iar sinteza va continua cu eliberarea capătul carboxi-terminal în citosol. Proteina integrală rezultată va fi transmembranară, unipas, de tip I (capătul amino-terminal în ectodomeniu).

Proteinele transmembranare multipas conțin mai multe secvențe cu aminoacizi hidrofobi (sau preponderent hidrofobi) care vor rămâne inserate în bistratul lipidic străbătându-l. Selecția și inițierea translocării urmează aceleași etape descrise mai sus. Pentru înțelegerea secvenței de etape ce urmează în sinteza și inserarea în membrană a proteinelor în aceste cazuri, vom defini noțiunile de **secvență start transfer**, respectiv **secvență stop transfer**. Astfel, secvențele hidrofobe, care în ordinea apariției în cursul sintezei proteinei au număr fără soț, vor opera ca secvențe start transfer. Apariția acestora inițiază procesul de translocare a lanțului ce se formează către lumenul RE și de

aceea sunt denumite secvențe start transfer. Secvențele hidrofoabe care au număr cu soț (în funcție de ordinea în care apar în cursul biosintezei) acționează ca secvențe stop transfer. Iată, într-o încercare de sistematizare pe puncte, cum trebuie înțelese fenomenele în această situație, deși ele nu sunt elucidate în toate detaliile:

1. Pe măsură ce secvențele stop transfer (hidrofoabe) cu număr par se formează și pătrund în porul hidrofil al transloconului, este determinată închiderea acestuia (datorită tensiunilor de acomodare care apar), lanțul polipeptidic se deplasează lateral, etanșeitatea interacțiunii ribozom-translocon dispăre, iar lanțul polipeptidic în curs de alungire iese în citosol. De menționat că a fost evidențiat experimental faptul că închiderea și deschiderea porului de translocare se face la capătul lumenal al transloconului, iar interacțiunea ribozom-translocon asigură etanșeitatea canalului față de citosol, în cursul translocării.

2. Următoarea secvență hidrofoabă (număr impar, secvență start transfer) restabilește etanșeitatea interacțiunii ribozom-translocon, redeschide porul, iar lanțul polipeptidic ce rezultă din etapa de alungire a biosintezei este translocat din nou către lumenul RE.

Aceste fenomene se repetă de câte ori apare o nouă secvență hidrofoabă, până proteina este sintetizată în toată lungimea ei. Dintre cele ce nu se cunosc cu certitudine, în momentul de față, referitor la aceste procese amintim: **(i)** cum este reglată închiderea și deschiderea porului transloconului, **(ii)** cum are loc migrarea laterală a secvențelor hidrofoabe și dacă ele părăsesc transloconul inserându-se chiar atunci în bistratul lipidic, **(iii)** cum se modulează interacțiunea dintre ribozom și translocon, sau dacă ribozomul se desprinde de translocon sub acțiunea secvenței stop transfer, **(iv)** ce se întâmplă concret la reluarea translocării.

Numărul de treceri prin planul membranei, care formează domeniul transmembranar al proteinelor multipas astfel formate, depinde de numărul de secvențe hidrofoabe codificate de ARNm, dar și de prezența sau absența, după prima secvență start transfer a secvenței consens hidrolizată de semnal-peptidază. Dacă proteinele transmembranare multipas care rezultă vor fi de tip I, sau tip II depinde de mai multe aspecte, printre care modul direct, sau invers de inserare a primei secvențe start transfer (vezi mai sus importanța proprietăților electrice ale porțiunilor adiacente primei secvențe start transfer), sau prezența, respectiv absența secvenței de clivare prin semnal-peptidază.

Prelucrarea proteinelor sintetizate în RE

Preocuparea RE pentru proteinele care fac interesul său nu se rezumă doar la biosinteza lanțului polipeptidic și eliberarea sa în lumen, sau inserarea în membrană. RE își asumă mai departe și prelucrarea lanțurilor polipeptidice, prelucrare care înseamnă pe de o parte modificarea chimică la unele resturi ale aminoacizilor, iar pe de altă parte asistarea proteinelor pentru o împachetare adecvată, adică pentru adoptarea unei conformații corecte, funcționale. La nivelul RE se petrec o serie de transformări asupra proteinelor care au loc concomitent cu traducerea (**modificări co-traducere**), sau după terminarea acesteia (**modificări post-traducere**). O modificare co-traducere despre care am vorbit deja este acțiunea semnal-peptidazei și clivarea peptidei semnal în cazurile existenței secvenței consens specifice activității enzimei.

Modificările co-/post-traducere constituie etape ale fenomenului pe care îl numim **maturarea proteinelor**. Rolul maturării proteinelor este atât acela de a le aduce în stare funcțională, cât și acela de a le asigura sortarea și de a le direcționa către locurile din celulă cărora le sunt destinate. Procesele de maturare, care încep la nivelul RE, vor fi continuate și finalizate fie în complexul golgian (cel mai adesea), fie pe drumul către destinația finală (uneori maturarea se termină la ajungerea proteinelor la destinație. În cele ce urmează, vom prezenta o parte dintre modificările co-, respectiv post-traducere, a căror semnificație este mai bine cunoscută. De menționat că repartizarea proceselor în una sau alta dintre cele două categorii nu este pentru toate complet justificată, dovezile

fiind uneori echivoce. Autorii acceptă riscul ca viitorul să impună revizuirea includerii unora dintre procese într-una sau cealaltă dintre categorii. Mai mult, sunt unele procese (cum ar fi formarea punților disulfurice corecte) care se pot petrece atât simultan cu traducerea, cât și după terminarea acesteia.

Modificări co-traducere ale lanțului polipeptidic

Modificările co-traducere sunt realizate, după cum este ușor de intuit, atâta timp cât lanțul polipeptidic se află la nivelul transloconului (adică în timpul etapei de alungire a biosintezei), de regulă prin proteine accesorii ale mașinării de translocare (transloconului). Rămâne de stabilit în ce măsură aceste proteine sunt doar accesorii, sau participă la însăși organizarea transloconului.

Dintre modificările co-traducere prima detaliată în cele ce urmează este una dintre cele mai frecvente, care presupune o pregătire laborioasă și are efecte majore asupra proprietăților și comportamentului produsului final, proteina matură.

a) Inițierea glicozilării proteinelor. Am arătat când am vorbit de organizarea moleculară a membranelor că glicoproteinele acesteia pot conține structuri glucidice *N*-glicozidice sau *O*-glicozidice. În RE începe formarea structurilor *N*-glicozidice ale glicoproteinelor, adică acele structuri glucidice purtate de azotul amidic al asparaginei. Această inițiere se petrece numai atunci când asparagina se află într-o secvență consens, cu alcătuirea ...-Asn-X-Ser(Thr)-... (considerată dinspre capătul amino, către capătul carboxil al lanțului polipeptidic), unde X poate fi oricare dintre aminoacizii uzuali, cu excepția prolinei. Glicozilarea este realizată de o enzimă numită **oligozaharid-transferază**, care citește lanțul polipeptidic în curs de formare pe măsură ce acesta iese din porul transloconului. Când află o asparagină în ambianța menționată, enzima îi grefează la azotul amidic un oligozaharid (ce reprezintă o porțiune dintr-un substrat al ei), cu structura globală – (GlcNAc)₂Man₉Glc₃ și cu o geometrie triantenară, două dintre antene fiind terminate cu manoze, cea de a treia cu cele trei glucoze legate una de alta. Substratul de pe care enzima transferă acest oligozaharid complex este **dolicil-difosfo-oligozaharid** (dol-P-P-oligozaharid), inserat prin dolicil în bistratul lipidic. Dacă asparagina nu se află într-o secvență consens, oligozaharid-transferaza rămâne indiferentă. Trebuie menționat că dol-P-P-oligozaharidul este sintetizat de celulă la nivelul membranei RE, cu mare consum energetic, prin adăugarea pas cu pas a glucidelor (adică unul după altul) începând cu GlcNAc. Acest lucru justifică afirmația făcută mai sus și anume ca acest proces de glicozilare este unul cu o pregătire laborioasă. Inițial, glucidele se adaugă la dolicil-difosfat pe fața citoplasmatică a membranei RE, până la primele cinci manoze. Apoi, compusul intermediar este flopat, iar sinteza continuă secvențial pe fața lumenală a membranei RE, unde are loc și transferul oligozaharidului la asparagină. Spun că trebuie menționat acest lucru deoarece, în ciuda efortului depus în producerea structurii oligozaharidice, celula pare a se deda la risipă, începând să tundă parte din glucide, după ce acestea ajung pe proteină, eliminându-se în RE cele trei glucoze și o manoză. Tunderea va continua ulterior în complexul Golgi, unde vor avea loc și glicozilările finale ale structurilor *N*-glicozidice, care se termină de regulă cu acizi sialici. Nu se cunoaște, în momentul de față, cu certitudine câte dintre aceste procese de tundere reprezintă modificări co-traducere și câte post-traducere. Dar astăzi cunoaștem că această paradoxală risipă are o însemnătate funcțională (vezi mai jos la secțiunea “Asistarea proteinelor pentru împachetarea corectă”).

Modificări post-traducere ale proteinelor

a) Hidroxilări la nivelul lanțului polipeptidic. Asemenea modificări au fost evidențiate, la unele proteine, constituindu-se ca hidroxilări în poziția 4 a unor proline, sau în poziția 5 a unor lizine. Enzima care realizează hidroxilarea prolinei, **prolin-4-hidroxilaza**, este un

heterotetramer $\alpha_2\beta_2$, în care subunitatea β este identică **protein-disulfură izomerazei** (vezi mai jos la secțiunea „Asistarea proteinelor pentru împachetarea corectă”). Hidroxilările prolinei și lizinei (prin enzima **lizil-hidroxilază**) se petrec în proteine ale matricei extracelulare (de exemplu în collagen, sau elastină), aceste modificări asigurând asamblarea lor sub formă fibrilară și în fascicule de fibre pentru corecta organizare a țesuturilor conjunctive.

b) Carboxilarea acidului glutamic în poziția γ . Această modificare este operată de o proteină transmembranară (**carboxilază**) al cărei sit de activitate este expus pe fața lumenală a membranei RE. Modificarea a fost evidențiată la proteine ce participă la coagularea sângelui (de exemplu la protrombină, factorii VII, IX și X) și, se pare, în unele proteine ale matricei osoase, ajutând la mineralizare.

c) Glipiarea este procesul prin care unele ectoproteine sunt atașate mai ferm la bistratul lipidic prin ceea ce se numește **ancoră glicofosfatidilinozitolică**. Procesul implică o clivare a peptidei semnal din unele proteine a căror inserare în translocon a fost în sens invers, cu atașarea concomitentă a capătului carboxil nou format la gruparea amino a unei etanolamine atașată glucidului terminal din lanțul oligozaharidic al glicozil-fosfatidilinozitolului. Așadar, ancorarea se face printr-o legătură amidică. A fost evidențiat un mare număr de proteine membranare (ectoproteine) modificate astfel, dar și faptul că distribuția lor se face preferențial la nivelul plutei lipidice. Unul din rolurile acestei modificări este în direcționarea proteinelor astfel ancorate către domeniul apical al membranei în celulele polarizate. Deși nu există dovezi în acest sens, se poate specula că ancorarea prin glicofosfolipid ar putea permite eliberarea acestor proteine prin activarea de fosfolipaze, ca răspuns la diverse semnale. De altfel, primele evidențieri ale acestor tipuri de modificări au fost făcute la proteine cu rol în adeziunea celulară (NCAM, de la termenul englez „**N**eural **C**ell **A**dhesion **M**olecule”), care apar la nivelul crestei neurale în dezvoltarea embrionară, ceea ce poate susține o asemenea ipoteză. Eliberarea NCAM din legătura la ancoră ar putea permite celulelor să-și schimbe partenerul de contact (celulele cu care se asociază), ceea ce este de așteptat să se întâmple în dezvoltarea embrionară.

Asistarea proteinelor pentru împachetarea corectă

Ca și tunderea structurilor oligozaharidice (amintită mai sus și descrisă detaliat mai jos), apartenența acestor procese de asistare la prelucrările co-, sau post-traducere este în dezbatere, cel mai probabil având loc și concomitent cu, dar și după terminarea traducerii. Asistarea este realizată de proteine numite **șaperone** (chaperone). Așadar, șaperonele sunt proteine specializate în a asista lanțurile polipeptidice nou sintetizate pentru adoptarea conformației corecte, acea conformație care asigură funcționalitatea macromoleculilor. Deși mecanismele lor de acțiune sunt departe de a ne fi pe deplin cunoscute, pentru unele modul de principiu al operării este cvasi-unanim recunoscut. O primă șaperonă pe care o discutăm este **calnexina**. Calnexina este o proteină integrală, transmembranară, unipass, tip I, din membrana RE, cu o masă moleculară de 90kD și un endodomeniu mic (domeniul carboxi-terminal al lanțului polipeptidic, expus pe fața citosolică a membranei), format din 90 de aminoacizi. Ectodomeniul ei este mare (50kD) și are un domeniu ce leagă calciu și care prezintă activitate de tip lectinic, având glucoza ca determinant al specificității. Dovedirea activității ei șaperonice ne-a făcut să înțelegem de ce tunderea parțială a glucidelor de pe structurile inserate pe asparagină iese de sub spectrul risipei. Calnexina, prin activitatea ei de tip lectinic, leagă structurile N-glicozidice rămase cu o singură glucoză, după tunderea efectuată de **glucozidazele I și II**, aflate în lumenul RE. Prin această interacțiune, calnexina menține precursorul de glicoproteină legat, asistându-l în adoptarea unei conformații corecte pentru stadiul în care se află la nivelul RE. Desprinderea din interacțiunea cu calnexina nu se face decât după realizarea plierii corecte, prin acțiunea glucozidazei II din lumenul RE. Mai mult, în cazul în care, accidental, glucoza este clivată

Înainte de terminarea rolului calnexinei, glicoproteina asistată nu poate părăsi RE către complexul Golgi, ci este reglucozilată de o glucozil-transferază (**UDP-glucoză:glicoprotein glucozil-transferază**), care transferă glucoza de pe substratul uridil-difosfo-glucoză și asigură reatașarea glicoproteinei la calnexină pentru definitivarea procesului de asistare. De menționat că activitatea calnexinei este dependentă atât de Ca^{2+} , cât și de ATP, adică este consumatoare de energie. Nu ne sunt cunoscute, încă, mecanismele prin care celula (în speță RE) controlează calitatea împachetării, lucru valabil și pentru celelalte activități șaperonice evidențiate în lumenul RE.

Am menționat, când am descris ultrastructura RE, că lumenul organitului este echivalentul spațiului extracelular. Asta înseamnă că în lumenul RE sunt condiții oxidante,¹ ceea ce favorizează realizarea de punți disulfurice. Întrucât în structura cuaternară a proteinelor punțile disulfurice nu se stabilesc neapărat între două cisteine în succesiunea în care ele apar în secvența primară (uneori, dimpotrivă, ele trebuie să se formeze între cisteine din zonele amino-terminale și cisteine din zonele carboxi-terminale), realizarea acestor legături trebuie bine controlată. Acest lucru se face prin asistarea printr-o enzimă numită **protein-disulfură izomerază**. Această enzimă leagă tranzitoriu cisteinele din proteina născândă, sau desface punțile incorecte din proteinele a căror traducere s-a terminat și ajută la realizarea punților –S–S– corecte.

Paradoxal este faptul că pentru șaperona cu cea mai largă sferă de acțiune nu cunoaștem detaliile acțiunii sale (sau poate această situație se datorează tocmai sferei prea largi de acțiune). Este vorba de șaperona numită **proteină de legare** (prescurtat **BiP**, abreviere care aparent ar proveni de la termenul „**Binding Protein**”, dar care în realitate provine de la sintagma „**Binding immunoglobulin Protein**”, numită astfel deoarece a fost identificată pentru prima dată în limfocite pre-B, adică în pre-plasmocite, ca proteină ce interacționează în RE cu lanțul greu al imunoglobulinelor). Această proteină, care se mai cunoaște și prin abrevierea **GRP-78** (de la „**Glucose-Regulated Protein**” și masa ei moleculară de **78**), se pare că este responsabilă și pentru controlul deschiderii și închiderii porului transloconului, pe fața lumenală a membranei RE. BiP, parte constitutivă a transloconului, complexează noile proteinele translocate și nu le eliberează decât atunci când împachetarea lor este corect definitivată. Mai mult, dacă proteina eșuează în adoptarea conformației corecte, BiP o “menține” la translocon, care, prin asocierea cu proteine accesorii diferite de cele de internalizare, expulzează în citosol lanțul polipeptidic cu pliarea “rătăită”, unde este **poliubiquitinat** și intră în procesul de degradare proteolitică din **proteazom**, organit de degradare a proteinelor citosolice nefuncționale sau devenite inutile. Această expulzare către citosol a proteinelor care eșuează în pliarea corectă este denumită **retrotranslocare**.

Deoarece procesele de asistare a împachetării corecte a proteinelor sunt esențiale pentru producerea de macromolecule funcționale (cu structură terțiară și cuaternară corectă), celula și-a creat mecanisme de control necesare desfășurării eficiente a acestor fenomene.

Stresul reticulului endoplasmic

Eșuarea în pliarea corectă a proteinelor, indiferent din ce motiv s-ar petrece, conduce la o tendință de acumulare de proteine incorect împachetate, nefuncționale în lumenul reticulului endoplasmic, ceea ce ar perturba homeostazia organitului. Celula și-a dezvoltat mecanisme care supraveghează permanent capacitatea RE de a face ce trebuie cu proteinele pe care le recrutează, mecanisme de alertare și de contracarare a unor asemenea situații care induc un stres la nivelul organitului. În fața unei astfel de situații de stres, RE reacționează printr-o cascadă de evenimente cunoscute sub

¹ Trebuie menționat, în contextul acestei discuții, că citosolul reprezintă un mediu cu proprietăți reducătoare. Mai mult, celula și-a dezvoltat mecanisme de a menține aceste proprietăți reducătoare ale citosolului, iar afectarea acestor mecanisme poate induce numeroase patologii. În plus, proteinele citosolice au puțină cisteină în lanțul polipeptidic, probabil ca o măsură suplimentară de a nu favoriza formarea de punți –S–S–, cu alterarea funcționalității lor.

denumirea de "răspuns la proteinele nepliate" (abreviat **UPR**, de la „**U**nfold**I**ng **P**rotein **R**esponse”) sau, mai sugestiv pentru o exprimare cu semantică proprie limbii române, „răspuns la proteinele eronat împachetate”. Această reacție de răspuns încearcă să adapteze celula la noile condiții și să restabilească homeostazia proteică intracelulară.

Există evidențiate trei căi de răspuns care acționează concertat și sunt toate dependente de funcția complexă a BiP. Pe de o parte, sunt activate mecanisme de inhibare a traducerii ARNm pentru proteine recrutate la nivelul RE. Mecanismul implică eliberarea din interacțiunea cu BiP a unor proteine transmembranare ale RE, denumite kinaze ale RE pancreatic, abreviat **PERK**, de la „**P**ancreatic **E**ndoplasmic **R**eticulum **K**inase”. Odată eliberată din interacțiunea cu BiP, PERK di-/oligo-merizează și se trans-autofosforilează, activând domenii kinazice cu specificitate pentru eIF2 α , factor care controlează inițierea traducerii. Fosforilarea factorului de inițiere a traducerii îl inactivează, conducând la blocări ale sintezei proteice. Aceasta este una din căile de răspuns.

Pe de altă parte, sunt activate căi de semnalizare care conduc la creșterea producției de șaperone care acționează în lumenul reticulului endoplasmic. Mecanismul de răspuns prin această cale implică tot proteine transmembranare ale RE, care sunt și ele complexate de BiP în condiții normale. Acumularea de proteine nepliate și de agregate ale acestora în lumenul RE induce și pentru aceste proteine dependente de fosfoinozotide (**IRE1 α** , abreviere de la „**I**nositol **R**Equirng”) eliberarea și di-/oligo-merizarea urmată de trans-autofosforilare. Forma fosforilată a IRE1 α capătă funcție endonucleazică prelucrând, prin eliminarea unui intron, o proformă de ARNm care conduce la formarea în citosol a unei proteine cu rol de factor de transcriere care, apoi, migrează în nucleu și activează transcrierea unor gene pentru proteine implicate, în asistarea plierii proteinelor (șaperone), dar și în retrotranslocarea proteinelor eronat împachetate și diminuarea stresului în RE. Prin retrotranslocare, proteinele incorect împachetate sunt supuse unui proces de expulzare în citosol, unde sunt poliubiquitinate și direcționate către proteozomi pentru degradare. Acest proces complex de reducere a stresului din RE, prin trimiterea în citosol a proteinelor incorect pliate, este cunoscut în literatură sub prescurtarea **ERAD**, de la „**E**ndoplasmic **R**eticulum-**A**ssociated **D**egradation”.

În sfârșit, a treia cale implică transportul către aparatul Golgi a unei proteine transmembranare (**ATF6 α** , de la „**A**ctivating **T**ranscription **F**actor **6 α** ”) care în condiții normale este menținută în RE prin interacțiunea cu aceeași proteină de legare, BiP. Odată ATF6 α ajunsă în complexul golgian, domeniul citosolic al proteinei este clivat prin acțiunea unei proteaze rezidente a complexului Golgi care, odată eliberat în citosol, migrează în nucleu activând transcrierea de gene din calea de producere a șaperonelor pentru lumenul RE (de exemplu BiP și PDI). Noile șaperone, astfel biosintetizate, asigură nevoia crescută de molecule de asistare a împachetării proteinelor în lumenul RE, eficientizând procesele. Însă, în situația în care RE este supus unui stres cronic, sunt activate mecanismele de alarmă și, în final, de moarte celulară programată (apoptoză), orchestrate de aceiași senzori de stres care pot activa și factori proapoptotici, când situația o impune. Mecanismele prin care senzorii de stres al RE virează către inducerea căilor de moarte celulară programată sunt în curs de descifrare fiind recent sugerate de unele rezultate experimentale.

Stresul reticulului endoplasmic a fost intens studiat întrucât se pare că, atunci când celula nu reacționează eficient, el poate contribui, cel puțin parțial, la dezvoltarea unor boli grave cum sunt bolile neurodegenerative (boala Alzheimer), diabetul zaharat de tip II, boli cardiovasculare sau diferite forme de cancer. Studii recente au demonstrat ca stresul reticulului endoplasmic poate conduce și la alterarea metabolismului lipidic și la inducerea steatozei hepatice întrucât anumite componente ale sistemului de semnalizare prin UPR intervin și în reglarea metabolismului lipidic prin creșterea biosintezei anumitor enzime implicate în lipogeneză. Datele obținute până în prezent sugerează existența unei asocieri strânse între stresul RE și dislipidemii sau obezitate.

Așadar, atenuarea stresului RE reprezintă la ora actuală una dintre potențialele ținte terapeutice pentru o serie de boli pentru care, până în momentul de față, nu au fost identificate posibilități terapeutice eficiente.

Sortarea și transportul de biomolecule către aparatul Golgi

Așa cum am menționat mai sus, procesele prin care proteinele nou formate sunt prelucrate fac parte din fenomenul denumit **maturare**. Maturarea începe la nivelul RE, dar este continuată și, de regulă, definitivată la nivelul complexului Golgi. Spun de regulă, deoarece în unele cazuri, pentru anumite proteine de secreție, de exemplu, completa maturare se realizează în momentul exocitozei, sau chiar după aceea, în spațiul extracelular, adesea prin clivări proteolitice. Procese de maturare se petrec și pentru sfingolipide; transformarea ceramidelor în sfingomielină, sau în glicolipide are loc tot în aparatul Golgi.

Pentru realizarea acestor procese, este necesar un trafic de (macro)molecule între RE și complexul golgian. Traficul nu se face pentru macro(molecule) individuale ci pentru porțiuni membranare care aglomerează componentele ce trebuie tranzitate. Traficul biomoleculelor ce trebuie să ajungă în complexul Golgi se face prin intermediul veziculelor. Intermedierea implică existența unor **ultrastructuri veziculo-tubulare** (prescurtat **VTC**, de la “**V**esicular **T**ubular **C**lusters”), cunoscute și sub numele **ERGIC** (de la “**E**ndoplasmic **R**eticulum-**G**olgi **I**ntermediate **C**ompartment”). Prezența acestor ultrastructuri a fost evidențiată în preparatele de microscopie electronică. În acest paragraf vom descrie ceea ce se cunoaște referitor la acest proces de transport dintre RE și aparatul Golgi.

Transportul între RE și Golgi respectă un mecanism tip suveică. Prin acest mecanism se rezolvă pe de o parte exportul de substanță destinată a ajunge în alte locuri din celulă (calea anterogradă), iar pe de altă parte reciclarea componentelor necesare reluării procesului, ca și returnarea componentelor rezidente în RE (calea retrogradă), adică a acelor componente care scapă accidental în microveziculele de transport în timpul selectării și segregării materialului exportat, respectiv în timpul înmuguririi și desprinderii din membrana RE a ultrastructurilor de transport. Mecanismul de tip suveică a fost elegant evidențiat prin tratamentul celulelor cu metabolitul fungic **brefeldina A**. Brefeldina A are ca efect disiparea aparatului Golgi în celulă. Explicația constă în capacitatea acestei substanțe de a inhiba specific transportul anterograd dintre RE și Golgi, în timp ce transportul retrograd este neafectat. Acest lucru conduce la “vărsarea” cisternelor golgiene în RE, ceea ce nu s-ar putea întâmpla, dacă nu ar exista transportul retrograd dinspre Golgi, înspre RE.

Selectarea și segregarea materialului destinat exportului către aparatul Golgi se face la nivelul unor cisterne ale RE cu o organizare specifică. Aceste cisterne sunt denumite **elemente de tranziție**, sau **reticul endoplasmic tranzițional** și se caracterizează prin faptul că, de regulă, cisterne ale RE au pe o parte ribozomi atașați, iar pe cealaltă parte (orientată către Golgi) vezicule ce înmuguresc. Acești muguri veziculari prezintă pe fața citoplasmatică a membranelor lor un înveliș proteic format din **proteine de înveliș II**, sau **coatomeri II** (prescurtare **COP II**, COP de la “**CO**at **P**roteins”; II de la faptul că au fost identificate după COP I, alte specii proteice ce organizează învelișuri pe fața citosolică a unor endomembrane, despre care vom vorbi puțin mai jos). COP II operează atât în selecția și segregarea componentelor de transportat în zonele supuse înmuguririi, cât și în procesele de desprindere a veziculelor de transport. Procesele de transport anterograd, facilitate de COP II, sunt reglate de **Sar1** (prescurtare de la „**S**ecretion-**a**ssociated **R**AS-**r**elated protein **1**”) macromoleculă cu rol de comutator molecular din clasa proteinelor G mici, denumite și **proteine G monomerice** (vezi la capitolul “Semnalizare celulară”). Proteinele G mici sunt cele care controlează și țintirea corectă a membranelor la destinație, de către veziculele de transport. Veziculele odată desprinse își pierd învelișul și fuzionează unele cu altele, sau cu VTC (sistemul veziculo-tubular) adiacent. Fuzionarea este mediată de proteine numite **SNARE** (de la “**S**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive **A**ttachment

protein **RE**ceptor”): **v-SNARE** (v de la “vesicle”) din membrana veziculelor, respectiv partenerul de interacțiune din membrana de destinație **t-SNARE** (t de la “target” = țintă). Aceste două forme de proteină SNARE sunt esențiale în asamblarea aparatului de fuziune a microveziculelor cu membranele țintă.

Procesele de selecție și segregare sunt continuate în VTC unde se formează și mugurii înveliți în COP I, care prin desprindere dau naștere veziculelor de transport retrograd. Acest transport este reglat de **Arf1** (prescurtare de la „ADP-ribosylation factor 1”), altă proteină G monomerică. Tehnicile de imunocitochimie ultrastructurală au evidențiat că în mugurii înveliți în COP I sunt selectate proteinele care trebuie reciclate la RE, în timp ce proteinele solubile ce trebuie direcționate către Golgi sunt absente. Mecanismele prin care se face sortarea în VTC nu ne sunt deocamdată cunoscute. Cât privește selecția proteinelor ce trebuie returnate la RE, aceasta are la bază **secvențe/motive de aminoacizi** cu rol de semnal. Au fost, până în momentul de față, descoperite secvențe/motive semnal de reținere, sau returnare în RE cum ar fi:

- (i) secvența **KDEL**, abreviere rezultată din folosirea simbolurilor aminoacizilor din înșiruirea ...–Lys–Asp–Glu–Leu–COO⁻ (evident aflată în capătul carboxi-terminal, după cum rezultă din descriere), pentru proteinele solubile în lumenul organitului;
- (ii) motivul **di-lizină** (KK) pentru proteinele transmembranare tip I (aflat în endodomeniul carboxi-terminal);
- (iii) motivul **di-arginină** (RR) pentru proteinele transmembranare tip II (aflat în endodomeniul amino-terminal).

Aceste motive operează pe de o parte în menținerea în RE a proteinelor rezidente, neimplicate în transportul către Golgi, dar și, pe de altă parte, în returnarea proteinelor ce asigură selecția, segregarea și transportul în cauză, sau a celor care pot scăpa accidental în microveziculele de transport.

Mai departe, modul în care se face transportul între VTC și rețeaua *cis*-golgiană nu este elucidat. Dacă acesta se face prin vezicule ce se desprind din VTC, sau dacă acest sistem însuși se transformă în rețeaua *cis*-golgiană și, apoi în prima cisternă a feței *cis*-Golgi, rămâne o problemă în studiu.

La nivelul cisternelor Golgi au fost evidențiate ultrastructuri învelite în COP I a căror mișcare este reglată de **Rab6**, o altă proteină G monomerică. Aceste ultrastructuri pot fi o a doua cale de transport retrograd Golgi-RE, sau o cale de transport între cisternele acestui organit. Aceasta este însă o problemă ce trebuie abordată la discuția de acolo.

Considerații asupra biogenezei membranelor

Am afirmat, când am definit RE, că principala lui menire este aceea de a biosintetiza molecule și macromolecule esențiale pentru organizarea și funcționarea celulei. Este acum momentul să justificăm, în mai mare cunoștință de cauză, această afirmație.

Am văzut că RE biosintetizează lipide membranare și are mecanismele de a le asambla într-un bistrat asimetric și eterogen. Am văzut, de asemenea, că RE produce, între alte proteine, pe cele transmembranare, în toată diversitatea lor (vezi la „Organizarea moleculară a membranelor”). Asta înseamnă, de fapt, că la nivelul RE se pun bazele organizării unor noi suprafețe de membrană. Din parcurgerea aspectelor pe care le cunoaștem despre RE, am remarcat că nu la toate componentele noilor membrane, a căror biogeneză este astfel inițiată, componentele sunt definitivare (integral maturate) la nivelul RE. Maturarea continuă în aparatul Golgi (definitivarea glicozilării structurilor *N*-glicozidice, formarea structurilor *O*-glicozidice, transformarea ceramidelor în sfingomieline, sau glicolipide, producerea glicozaminoglicanilor din structura proteoglicanilor membranari – adică definitivarea elementelor care organizează glicocalixul – și altele), astfel încât traficul dintre RE și complexul Golgi este parte componentă din procesul de biogeneză a membranelor. Însă noile

suprafețe de membrană trebuie să ajungă acolo unde sunt menite să funcționeze (adică la diversele organite, sau în membrana celulară. Ei bine, pentru aceasta este nevoie de continuarea “aventurii turistice” a noilor membrane într-un mod direcționat și riguros controlat de celulă, ceea ce se și întâmplă. Numai după ce membranele produse *de novo* ajung la destinație (direcționarea lor este menirea aparatului Golgi), procesul biogenezei membranelor se poate considera încheiat, începând un altul, acela de reciclare.

Așadar, prin biogeneza membranelor trebuie să înțelegem totalitatea proceselor de biosinteză și maturare a componentelor acestora, de asamblare corectă a lor în noua structură și de transportare a lor în locurile corespunzătoare din celulă. Aceste procese nu se petrec neapărat secvențial ci amalgamat, astfel încât ultimele “retușuri” se pot petrece chiar în momentele, sau după ajungerea noilor structuri la destinație. Vom reveni asupra biogenezei membranelor la prezentarea unui alt organit esențial în realizarea acestui fenomen complex, aparatul Golgi.

Abundența și distribuția intracelulară a RE

Reticulul endoplasmic este un organit ubicuitar. Rolul său în biogeneza membranelor îl face indispensabil organizării și funcționării celulelor. Chiar și în cazul eritrocitului (lipsit de organite), reticulul endoplasmic a fost prezent și a funcționat în timpul diferențierii precursorilor, până în momentul maturării elementului circulant. Dacă, de regulă, RE conține cel puțin jumătate din membranele dintr-o celulă, raportul dintre componenta rugoasă și cea netedă variază în funcție de tipul de celulă. Există celule în care RER este preponderent (celule specializate în biosinteza și secreția de proteine; exemplul tipic îl formează celulele acinare pancreatice), sau celule în care REN este preponderant (celule specializate în sinteza și secreția de hormoni steroidici; de exemplu celulele zonei corticale a glandei suprarenale, sau celulele Leydig din testicul). Un alt caz (reprezentat prin hepatocite de exemplu) este acela al celulelor în care raportul RER/REN este aproximativ unitar. Cât privește distribuția intracelulară a RE aceasta poate fi difuză, cum ar fi în hepatocite, eteroclitice, sau polarizată, cum este în cazul celulelor acinare pancreatice, unde RER este localizat în jumătatea bazală a celulelor, polul apical al acestora fiind ocupat de vacuolele de secreție.

Rezumat

Reticulul endoplasmic este un organit delimitat de endomembrane cu o dublă structurare de reticul endoplasmic rugos, respectiv reticul endoplasmic neted. El este implicat în biosinteza propriilor componente, a componentelor membranare (lipide, proteine, componentă glucidică), dar și a componentelor celorlalte organite neautonome (aparat Golgi, lizozomi, sistem endozomal) și a componentelor destinate exportului din celulă. În îndeplinirea funcțiilor sale cooperează cu ribozomul (în amonte) și complexul Golgi (în aval) într-un mod eficient, prin mecanisme bine elaborate și controlate. În colaborarea din aval este necesar un permanent schimb de substanță, ce se face printr-un transport vezicular despre care multe detalii așteaptă să fie elucidate. De altfel, în fiecare din procesele în care reticulul endoplasmic este implicat mai există și pete albe, care așteaptă să fie eboșate, sau crochiuri care așteaptă să fie finalizate (mecanismul de integrare a proteinelor transmembranare în bistratul lipidic la nivelul transloconului, mecanismele de selectare și segregare a componentelor de transportat către Golgi, pentru a le denumi doar pe cele mai actuale sub aspectul interesului comunității științifice).

Bibliografie specifică, selectivă

Basseri S, Austin RC (2011) Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochem Res Int.* 2012. **2012**: 841362. doi: 10.1155/2012/841362.

- Daleke DL.** (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J lipid Res.* **44**: 233-242.
- Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M** (2008) The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus *Endocrine Reviews* **29**(1): 42–61
- Fagone P, Jackowski S.** (2009) Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res.* **50** Suppl.: S311-S316. doi: 10.1194/jlr.R800049-JLR200.
- Haas IG, Wabl M.** (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* **306**(5941): 387-389.
- Hammond C, Braakman I, Helenius A.** (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 913-917.
- Johnson AE, van Waes MA.** (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 799-842.
- Leabu M.** (2006) Membrane fusion in cells: Molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med.* **10**: 423-427.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD.** (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell.* **56**: 801-813.
- Martin S, Parton RG.** (2006) Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 373-378.
- Nikonov AV, Kreibich G.** (2003) Organization of translocon complexes in ER membranes. *Biochem Soc Trans* **31**: 1253-1256.
- Oakes SA, Papa FR.** (2015) The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* **10**: 173-194. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C.** (2015) The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 308(6):C415-25. doi: 10.1152/ajpcell.00334.2014.
- Vance JE, Vance DE.** (2004) Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* **82**, 113-128.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC.** (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions *J Clin Invest.* **115**(10):2656–2664.

Bibliografie generală

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular Biology of the Cell.* 5th edition. New York: Garland Science; 2008.