

**REVIEW****L'APPARATO DEL GOLGI: NUOVI RUOLI PER UN VECCHIO ATTORE  
THE GOLGI APPARATUS: NEW ROLES FOR AN OLD STARRING**

Tiziana Apuzzo  
Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona (Switzerland)  
Corrispondenza: Tizi7@hotmail.it

**ABSTRACT:** L'Apparato del Golgi viene generalmente considerato come deputato alla secrezione, all'impacchettamento e alla condensazione dei prodotti di secrezione. Tuttavia negli ultimi 15 anni, numerose osservazioni sperimentali oltre a confermare questo ruolo, hanno suggerito altre funzioni più complesse. Sembra interessante il comportamento del Golgi e di altre proteine ad esso associate durante i processi di divisione cellulare. GRASP65 una proteina dinamicamente associata al Golgi, sembra essere coinvolta nel processo di disassemblamento dell'organulo durante la mitosi.

Le diverse funzioni che GRASP65 è in grado di svolgere durante la varie fasi del ciclo cellulare sostengono la nostra ipotesi che vedono GRASP65 determinante nella regolazione del destino differenziativo della cellula. Tutto questo porta ad un concetto nuovo che vede il Golgi come un'importante centro di smistamento delle informazioni tra nucleo e la superficie cellulare nonché ipoteticamente coinvolto in ruoli diversi da quelli ormai noti.

CAPSULA EBURNEA, 1,3:1-5, 2006.

Keywords: GRASP65, Golgi, Mitosis

Parole chiave: GRASP65, Golgi, Mitosi

**Introduzione**

Come è ben noto già dalla prima metà del secolo scorso, l'osservazione al microscopio ottico mostra come l'intero volume cellulare sia occupato da un nucleo circondato da una zona più o meno estesa di citoplasma. Questo è costituito da un mezzo strutturato, amorfo, detto matrice ialoplasmatica o citosol, nel quale sono contenuti un numero variabile di organelli e numerose inclusioni. Gli organelli sono strutture presenti in tutte le cellule e possono essere considerati come componenti cellulari adibiti a funzioni specifiche. Nonostante le nozioni consolidate attribuiscono specifiche attività a ciascuno di questi organelli, nuove e approfondite ricerche hanno determinato l'affacciarsi di nuove ipotesi su loro funzioni alternative.

In particolare, l'apparato del Golgi (AG) è stato tradizionalmente considerato deputato alla secrezione, all'impacchettamento e alla condensazione dei prodotti di secrezione. Tuttavia, negli ultimi 15 anni, numerose osservazioni sperimentali oltre a confermare questa idea, hanno suggerito anche funzioni più complesse.

L'AG è un sistema di membrane e vescicole, solitamente localizzato nella regione centrale del citoplasma delle cellule metabolicamente attive (fig. 1). Dal punto di vista ultrastrutturale è costituito da tre tipi di componenti: 1) *cisterne appiattite impilate le une sulle altre*; 2) *microvescicole o vescicole transfer*; 3) *macrovescicole o vescicole secernenti*. L'AG presenta inoltre una sua intrinseca polarità che gli viene conferita non soltanto dalla forma delle singole cisterne ma anche da specifiche attività enzimatiche ad esse correlate; distinguiamo quindi una *faccia prossimale*, detta anche *cis*, ed una *faccia distale* detta *trans*. La faccia *cis* guarda generalmente verso l'involucro nucleare o alternativamente è orientata verso porzioni di Reticolo

Endoplasmatico (RE). Si ritiene che questa faccia rappresenti la "camera di ingresso" che accoglie le vescicole di trasporto smistate dalle regioni di sintesi delle cellule all'AG. La faccia *trans* è generalmente orientata verso la periferia cellulare; essa presenta nella porzione esterna numerose vescicole di gemmazione che si distaccano portando all'interno un materiale più o meno denso agli elettroni [1].

Lo spessore delle membrane golgiane è caratteristico e costante. Esse risultano più spesse rispetto a quelle del RE ma meno spesse della membrana citoplasmatica; tale ispessimento è generalmente progressivo estendendosi dalla porzione prossimale a quella distale. È interessante verificare come queste osservazioni morfologiche siano correlate con specifiche valutazioni biochimiche; infatti la composizione biochimica delle cisterne è diversa: la quantità delle sfingomieline e di steroli aumenta spostandosi progressivamente dalle cisterne prossimali a quelle distali, le lectine invece mostrano un andamento inverso.

Più recentemente, si è convenuti a considerare ogni pila di cisterne costituita da almeno tre compartimenti differenti (*cis-mediano-trans*), ciascuno dotato di particolari enzimi ed adibito da una determinata fase dell'elaborazione delle glicoproteine giunte dal RE. Infatti l'AG è implicato nei processi di modificazione delle catene oligosaccaridiche di membrana, delle glicoproteine di membrana e di altre proteine con legami N-glicosilici e O-glicosidici.

Forma, dimensioni e posizione sono estremamente variabili a seconda dei diversi citotipi. Per esempio nei distretti ghiandolari esocrini ed in particolare nel Sistema Nervoso, l'AG presenta un volume considerevole, mentre è modesto nelle cellule scarsamente attive o quiescenti. Circa la sua posizione, si osserva che gene-

ralmente nelle popolazioni cellulari di origine ectodermica l'AG si mostra polarizzato disponendosi tra il nucleo e la periferia della porzione apicale della cellula; al contrario nella cellule costituenti le ghiandole endocrine, dove la sua posizione è variabile, un tipico esempio è dato dalla diversa posizione che può assumere nei tireociti, dove oscilla in concomitanza con lo stato funzionale del follicolo [2]. Il REL, il RER e l'AG formano quindi un sistema collegato strutturalmente e funzionalmente in modo sinergico: per questo motivo essi vengono considerati come elementi dell'apparato vacuolare interno.

I componenti di questo sistema trasportano proteine ed altri materiali tra loro e la membrana plasmatica, attraverso vescicole e vacuoli di trasporto, mediante meccanismi diretti e indiretti. In generale, le proteine appena sintetizzate sui poliribosomi legati alla membrana del RE vengono trasportate fuori del reticolo attraverso elementi liberi da ribosomi; tali proteine attraversano i vari compartimenti dell'AG fino a raggiungere la faccia trans dell'organulo. Qui le proteine destinate alla membrana plasmatica o quelle secrete in maniera costitutiva vengono trasportate sulla superficie della cellula attraverso endosomi precoci o tardivi, altre ancora penetrano nei prelisosomi e vengono poi selettivamente trasferiti nei lisosomi [3]. Inoltre alcune proteine possono attraversare l'AG ma ritornano attraverso un trasporto vescicolare retrogrado al RE, il quale rappresenta la loro destinazione finale (fig. 2).

### Il trasporto vescicolare

In questi ultimi anni si è iniziato a far luce sugli eventi implicati nella formazione e nel trasporto delle vescicole. Secondo il modello proposto da Rotman e colle-

ghi [4], il trasporto anterogrado delle vescicole può essere diviso in 8 tappe principali. Alla base di questo modello sta il concetto che ogni vescicola di trasporto contiene un unico specifico marcatore che fornisce l'indirizzo rappresentato da una o più proteine v-SNARE (vescicola contenente il recettore di SNAP), mentre nelle membrane bersaglio sono presenti una o più proteine complementari t-SNARE (bersaglio di SNARE) che interagiscono con le prime; le tappe sono:

1. formazione del rivestimento che ha inizio quando il fattore di ADP-ribosilazione (ARF) viene attivato mediante lo scambio GDP-GTP portando all'associazione del complesso ARF-GTP con il suo recettore presente sulla membrana del RE;
2. ARF associato alla membrana recluta dal citoplasma le proteine di rivestimento che vanno a costituire le pareti delle gemme;
3. estrusione della gemma;
4. distacco del rivestimento;
5. le proteine v-SNARE si legano alle proteine complementari t-SNARE presenti sulla membrana ricevente per ancorare su di essa le vescicole;
6. organizzazione del complesso molecolare di fusione sulle proteine SNARE includendo un ATP-asi, NSF (Fattore Sensibile al NEM) e le proteine SNAP (Fattore solubile di Attacco al NEM).

Le SNAP si legano alle SNARE (recettori di SNAP) rendendo possibile l'idrolisi dell'ATP da parte di NSF, essenziale per la fusione [5].

Interessante per capire la relazione tra struttura e funzione dell'AG sembra essere l'azione del metabolita fungineo *Brefeldina* che impedisce il legame del GTP alla proteina ARF, inibendo così l'intero processo [6]. In sua presenza il Golgi sembra disgregarsi probabil-

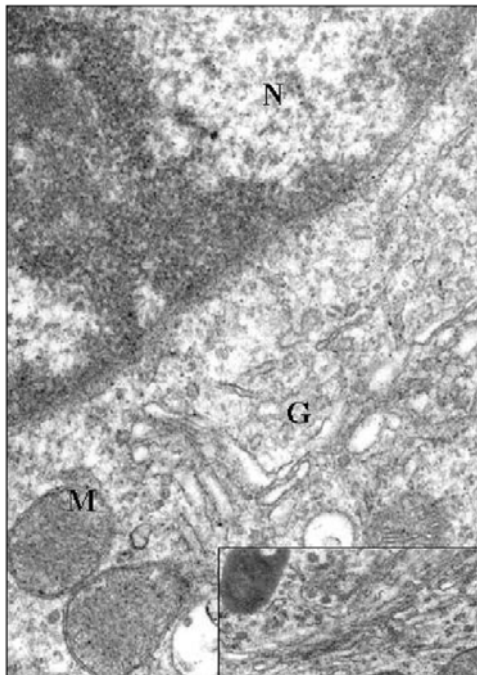


Fig.1: Immagine al microscopio elettronico a trasmissione di una cellula del tubulo renale dove si evidenzia l'AG in posizione perinucleare. L'inset mette in evidenza le cisterne golgiane impilate le une sulle altre.

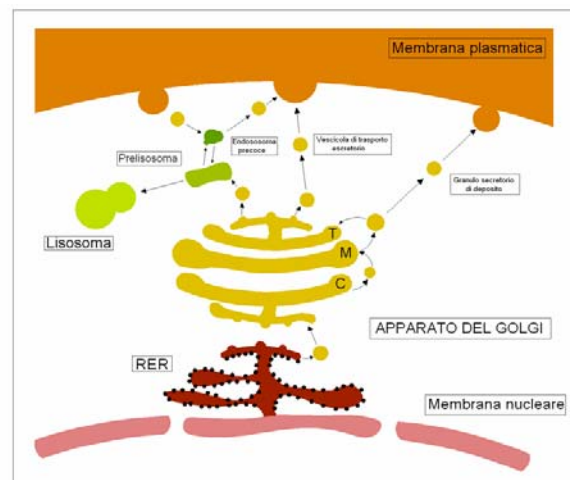


Fig.2: Schema del processo di trasferimento delle proteine sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER). Le proteine appena sintetizzate sui ribosomi legati alla membrana del reticolo sono trasportate fuori attraverso elementi di trasporto liberi da ribosomi. Tali proteine attraversano i vari subcompartimenti del Golgi fino a raggiungere la parte più esterna dell'apparato, dove vengono segregate in vescicole e smistate (C: faccia cis; M: compartimento mediale; T: faccia trans).

mente in seguito agli effetti inibitori delle brefeldina sugli scambiatori di nucleotidi guaninici. A questo proposito sembra interessante il comportamento dell'AG e di alcune proteine ad esso associate durante i processi di divisione cellulare. La mitosi comprende diversi processi altamente conservati come la condensazione della cromatina, la formazione del fuso, l'allineamento e la segregazione dei cromosomi [7]. Gli organelli dotati di membrana come il RE e i mitocondri rimangono intatti durante la mitosi; tuttavia l'AG si disassembla in maniera reversibile [8]. Una ipotesi plausibile è che probabilmente questo serve a distribuire in maniera equa tra le cellule figlie il sistema di membrane del Golgi [9]. Una diversa spiegazione prevede questo possa essere un potenziale meccanismo di regolazione delle attività e della localizzazione di diverse molecole segnale ed effettori che si trovano associate alla membrana del Golgi [10].

### Il Golgi nella mitosi e la GRASP65

La GRASP65 (Golgi Reassembly Stacking Protein of 65 kDa), una proteina dinamicamente associata al AG, sembra essere coinvolta nel processo di disassemblamento dell'organulo durante la divisione cellulare [11]. GRASP65 è localizzata sulla membrana della faccia cis del Golgi e rappresenta uno dei due membri della famiglia di proteine GRASP (GRASP65, GRASP55), la cui localizzazione ha permesso di ipotizzare il loro coinvolgimento nell'impilamento delle cisterne dell'apparato del Golgi [12].

Entrambe le GRASP sono in grado di legarsi ad alcuni membri della famiglia delle *golgine*; in particolare GRASP65 si lega al dominio C-terminale di GM130 la quale è coinvolta nell'ancoraggio delle vescicole COP-I alla membrana del Golgi [13].

Infatti, GM130 agisce come recettore della proteina P115 [14], un fattore coinvolto nel riconoscimento delle vescicole di trasporto al Golgi prima della loro fusione [15, 16]. GM130 viene fosforilata durante la mitosi e non può più legare p115 bloccando, come è stato osservato, il trasporto delle vescicole durante la divisione cellulare [17]. È ipotizzabile che questo possa essere correlato con il fatto che anche GRASP65 viene fosforilata ed inattivata durante la mitosi.

Le proteine GRASP sono target di diverse chinasi che agiscono durante la mitosi. GRASP65 in particolare viene fosforilata, sia in vivo che in vitro, dal complesso cdc2/ciclica B1 e da una polo-like chinasi (PKL). Non sono ancora noti gli eventi conseguenti alla fosforilazione [18]. Diversi studi hanno dimostrato la stabilità del legame tra GRASP65-GM130 tale da formare un complesso di circa 1,2 MDa [19, 20]. Resta ancora da chiarire in che modo GRASP65 e GM130 sono correlate oltre che nel trasporto vescicolare, anche nel mantenimento, come vedremo, della struttura dell'AG. Infatti, sembra che il complesso GRASP65-GM130 contribuisca al riconoscimento delle cisterne che devono impilarsi.

GRASP65 è stata una delle prime proteine ad essere stata identificata sulle membrane del Golgi, e la sua

funzione è risultata essere sensibile al NEM (N-ethylmaleimide), un agente alchilante, ma solo dopo l'avvenuto disassemblamento delle cisterne del Golgi durante la mitosi [21], in seguito a questo trattamento queste non riescono più a riassemblarsi, suggerendo che GRASP65 potrebbe essere coinvolta nella organizzazione delle cisterne golgiane [22].

In seguito, ulteriori studi hanno identificato la proteina GRASP65 come una proteina strutturale avente un ruolo chiave nel mantenimento dell'integrità del AG; inoltre il clivaggio di GRASP65 mediato dalle caspasi è richiesto per la frammentazione del Golgi durante l'apoptosi [23]. Strutturalmente, GRASP65 si presenta sotto forma di omodimero; tuttavia, durante l'interfase è capace di formare eterodimeri con altre molecole, cosa che non accade durante la mitosi quando la formazione di questi eterodimeri viene impedita da eventi di fosforilazione da parte del complesso cdc2/B1 e dalla PKL [13].

Questi cicli di fosforilazione e defosforilazione risultano essere correlati con l'organizzazione delle cisterne del Golgi. Studi sul rapporto struttura-funzione tra GRASP65, AG e mitosi hanno dimostrato la presenza di anomalie nell'organizzazione del fuso mitotico in cellule che presentavano deplezione di GRASP65, con l'insorgenza anche di eventi di morte cellulare. Durante l'interfase, infatti, il centrosoma subisce una riorganizzazione per la formazione del fuso e diversi fattori contribuiscono in questo processo soprattutto durante il reclutamento del complesso  $\gamma$ -tubulina citosolico attorno al centrosoma [24]. È stato infatti scoperto che la proteina GRASP65 gioca un ruolo chiave nella formazione del fuso, regolando il reclutamento di questo complesso [11]. Benché l'esatta funzione di GRASP65 nella riorganizzazione del centrosoma non è stata ancora chiarita, è stato così dimostrato che l'AG e il centrosoma sono strettamente legati non solo spazialmente ma anche funzionalmente. Alcune recenti evidenze supportano questa ipotesi, come la scoperta che ZW10, un componente del check point che interviene durante la formazione del fuso, e RIN1, il quale partecipa al check point durante il passaggio da G2 a M, sono capaci di interagire con alcune proteine coinvolte nel traffico anterogrado dal RE al AG come le proteine t-SNARE [25] (fig.3).

Abbiamo già accennato al possibile coinvolgimento di GRASP65 nel pathway apoptotico e come il clivaggio da parte delle caspasi sia necessario per la frammentazione dell'AG; tuttavia è stato scoperto un altro ruolo della GRASP65 nel processo apoptotico, suggerendo un probabile ruolo regolatorio nell'induzione della morte cellulare. Lo studio della patofisiologia di alcune delle maggiori cause di morte come le coronariopatie ischemiche, il cancro e alcune patologie polmonari, hanno dimostrato che i gravi eventi di ipossia che si verificano in questi casi sono responsabili di alcuni cambiamenti nell'espressione di diversi geni che contribuiscono alla patogenesi della malattia [26]. In particolare, è stato dimostrato essere rilevante l'over espressione di Bcl-XL, un fattore anti-apoptotico della

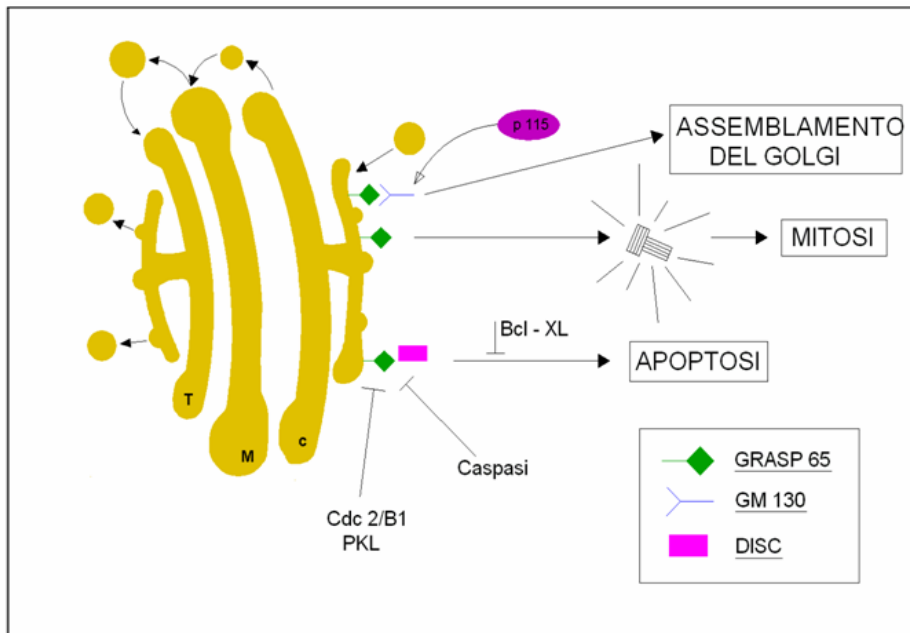


Fig.3: Modello che illustra le diverse potenziali funzioni di GRASP65, nonché il coinvolgimento dell'apparato del Golgi in diversi processi cellulari come la proliferazione e la morte cellulare.

famiglia di BCL.2. In questo caso, GRASP65 sembra essere coinvolto nell'induzione della morte cellulare, in particolare sembra essere capace di complessarsi con la caspasi 8 e FAS, determinandone lo spostamento alla membrana e la loro successiva attivazione. La formazione di questo complesso viene inibita dall'azione di Bcl-XL [26]. Quindi è ipotizzabile che la diversa regolazione di GRASP65 in alcuni processi chiave del ciclo cellulare possa determinare una variazione nel destino differenziativo della cellula. Ad esempio nel caso precedente Bcl-XL agendo su GRASP65 blocca l'induzione dell'apoptosi, ma se si verifica una modifica strutturale o funzionale a carico di GRASP65 tale da impedirgli il riconoscimento da parte di Bcl-XL, non è chiaro cosa succederebbe alla cellula, né in che modo l'alterazione di GRASP65 si ripercuoterebbe nel mantenimento della struttura dell'AG e nel suo coinvolgimento nella mitosi.

Quest'ultimo quesito ci riporta ad un concetto nuovo già accennato precedentemente: essendo GRASP65 una proteina associata al Golgi, davvero può l'AG svolgere ruoli diversi da quelli che abitualmente gli vengono attribuiti all'interno della cellula?

Oggi l'AG viene a proporsi non solo come un centro importante nello scambio di informazioni tra il nucleo e la superficie cellulare, ma anche in alcuni eventi chiave del ciclo cellulare, come la mitosi e la morte. Questo ci permette di fare delle ipotesi che sarà nostro interesse verificare nell'immediato futuro.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Neutra M and Leblonde CP: The Golgi Apparatus. *Sci Am* 1969; 200:100
2. Dalton AJ, Felix MD: A comparative study of the Golgi complex. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2:79
3. Jamieson JD in F Clementi and B Ceccarelli: Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins. Raven Books, Abelard-Schuman ,

limited (eds) 1971; 1:83

4. Rotman JE: Mechanism of intracellular protein transport. *Natur* 1994; 372-375

5. Rotman JE, Wieland Ft. *Science* (1996) 272, 227

6. Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger E G, Hauri HP, Yuan LC, Klausner RD. *Cell* (1990) 821-836

7. Nasmyth K, Peterson JM, Uhlmann F. *Science* (2000) 288: 1379-1384

8. Marsh BJ, Howell KE: *Nat. Rev. Mol. Cell. BIOL.* (2000) 3:789-795

9. Shorter J, Warren G: A role for the vesicle tethering protein, p115 in the post-mitotic staking of reassembling Golgi cisternae in a cell-free system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18:379-420

10. Altan-Bonnet N., Phair DR, Polishchuk RS, Weigert R, Lippincott-Schwartz J: A role for Arf1 in mitotic Golgi disassembly, chromosome segregation, and cytokinesis. *PNAS* 2003, 100:13314-13319

11. Sütterlin C, Polishchuk R, Pecot M, Malhotra V: The Golgi-associated protein GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division. *Mol Biol Cell* 2005; 16:3211-3222

12. Shorter J, Watson R, Giannakoli ME, Clarke M, Warren G, Barr FA. *EMBO J* (1999) 18: 4949-4960

13. Barr FA, Nakamura N, Warren G: Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the staking of Golgi cisternae. *EMBO J* 1998; 17:3258-3268

14. Nakamura N, Lowe M, Levine TM, Rabouille C and Warren G: The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* 1997; 89:445-455

15. Waters MG, Clary DO, and Rotman JE: A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intracisternal protein transport in the Golgi stack. *J Cell Biol* 1992; 118:1015-1026

16. Saperstain SK, Walter DM, Grosvenor AR,

Heuser JE, Waters MG: p115 is a general vesicular transport factor related to the Yeast endoplasmic reticulum to golgi transport factor Uso 1p. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:522-526

17. Levine TM, Rabouille C, Kieckbusch RH, Warren G: Binding of the vesicle docking protein p115 to Golgi membranes is inhibited under mitotic conduction. *J Biol Chem* 1996 271: 17304-1740

18. Lin CY, Madsen ML, Farm FR, Jang YJ, Lin X, Erikson RL: Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (PLK) and Cdc2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12589-12594

19. Moremen KW, Touster O, Robbins PW: Novel purification of the catalytic domain of Golgi  $\alpha$ -mannosidase. *J Biol. Chem* 1991; 266: 16876-16885

20. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE and Warren G: Characterization of cis-golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* 1995; 131: 1715-1726

21. Barr FA, Puyepe M, Vandekerckhove J, Warren G: GRASP65 a protein involved in the staking of Golgi cisterne. *Cell* 1997;91:253-262

22. Rabouille C, Levine TP, Peters JM, Warren G: An NSF-like ATPase, p97 and NSF mediate cisternal re-growth from mitotic Golgi fragments. *Cell* 1995a; 82:905-914

23. Lane JD, Lucocq J, Pryde J, Barr FA, Woodmon PJ, Allan VJ, Lowe M: Caspase-mediated cleavage of the staking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J. Cell Biol* 2002; 156: 495-509

24. Khodjakov A, Reider CL. *Cell J. Biol.* (1999) 146: 585-596

25. Hirose K, Arosoli K, Dohmae N, Takio K, Hatazawa K, Nagohama M, Toni K, Yamamoto A, Tohyama, Togaya m. *EMBO J.* (2004) 23. 1267-1778

26. Wang X, Zhang J, Pyo Kim H, Wang Y, Choi A M K, Ryter SW: a direct role for GRASP65 as mitotically regulated Golgi staking factor. *FASEB J* 2004; 18:1826-1833.