

Lezione 11

I Diversi Compartimenti Cellulari e le loro Relazioni Topologiche

Il Nucleo

- L'involucro nucleare
- Il nucleolo
- I pori nucleari
- Le nucleoporine

Lo Smistamento delle proteine

- I segnali di indirizzamento ai compartimenti
- Trasporto regolato attraverso i pori nucleari, tramite traslocatori o tramite vescicole

Il Trasporto Nucleare

- I segnali di localizzazione nucleare e di esportazione nucleare
- Il ruolo delle importine, delle esportine, della proteina Ran e di RanGEF e RanGAP
- Regolazione dell'importazione nucleare (esempi: ormoni steroidei, NF-kB, SREBP1)
- Trasporto degli RNA dal nucleo al citosol

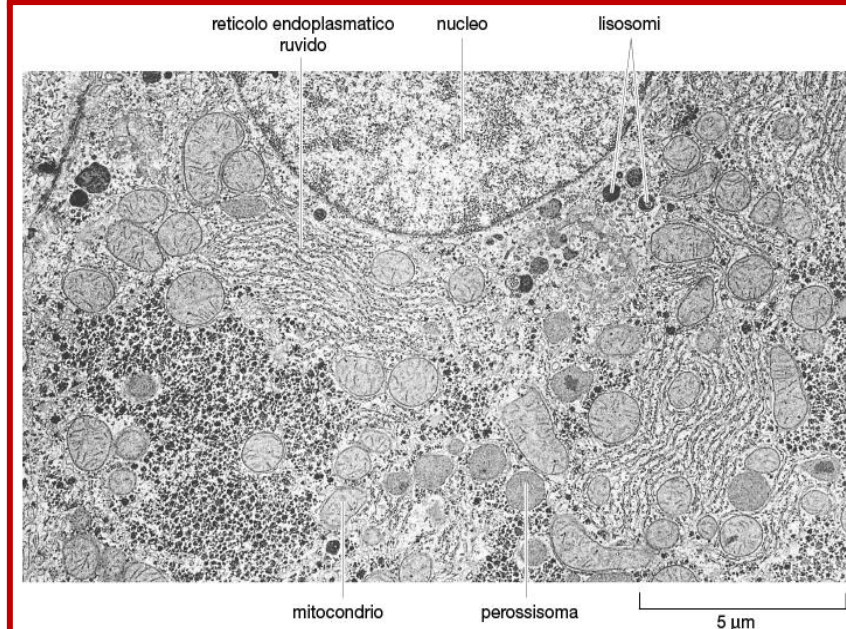
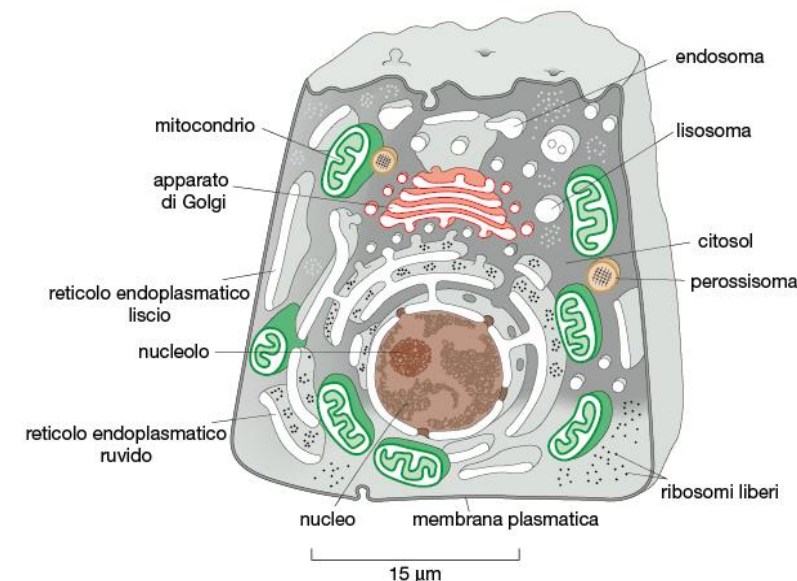
La Compartimentalizzazione della Cellula

Organuli eucariotici di base

- Tutte le cellule eucariote possiedono **la stessa serie fondamentale di organuli delimitati da membrane**.
- **Funzioni principali delle membrane cellulari:**
 - **Sedi di processi biochimici vitali** (es. metabolismo dei lipidi, fosforilazione ossidativa, fotosintesi).
 - **Creazione di compartimenti** acquosi specializzati.
 - **Separazione** del citosol **da microambienti con condizioni biochimiche distinte**.

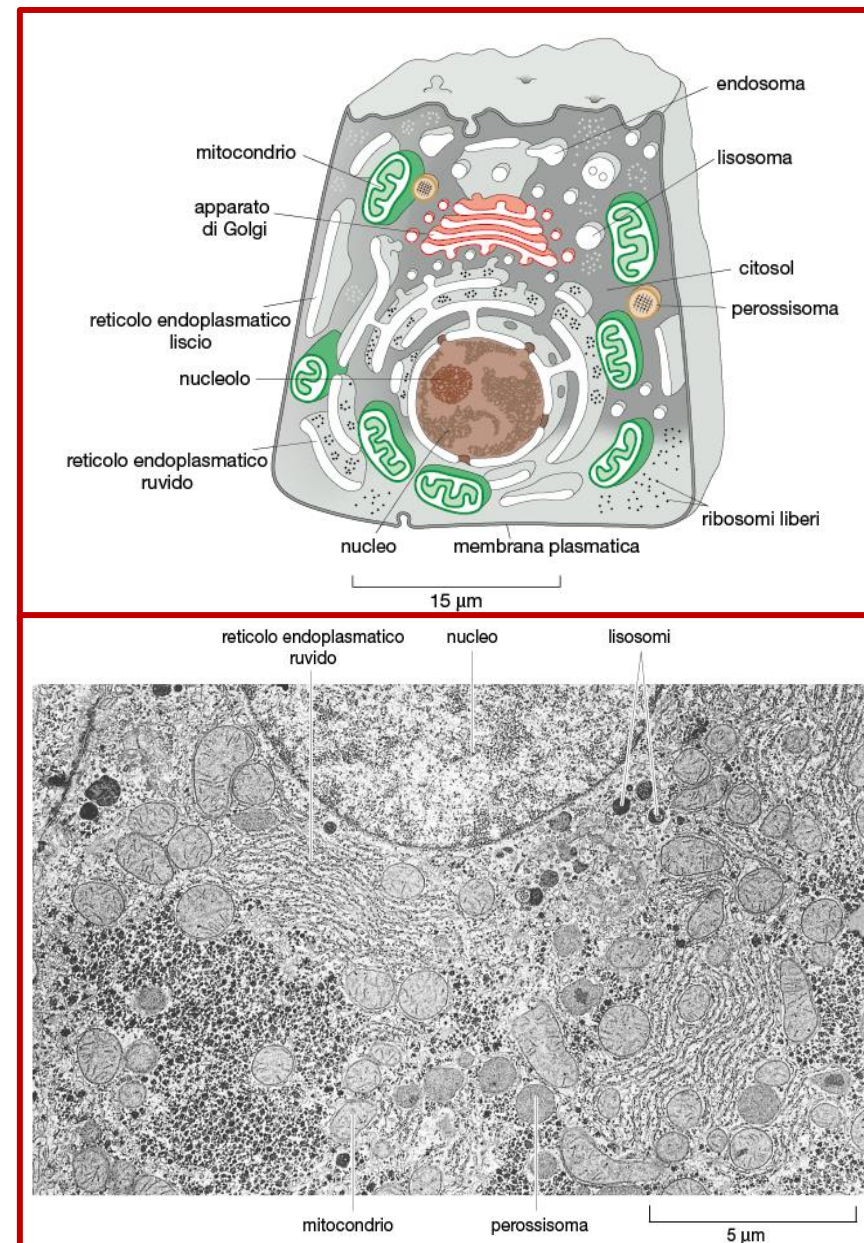
Vantaggi della compartimentazione

- **Concentrazione di proteine, ioni e reagenti** → ottimizzazione delle reazioni biochimiche.
- Possibilità di **svolgere reazioni diverse** o in competizione **simultaneamente**.
- **Necessità di proteine di trasporto:**
 - Importazione/esportazione di metaboliti specifici.
 - Inserimento di proteine specializzate che rendono unico ciascun organulo.

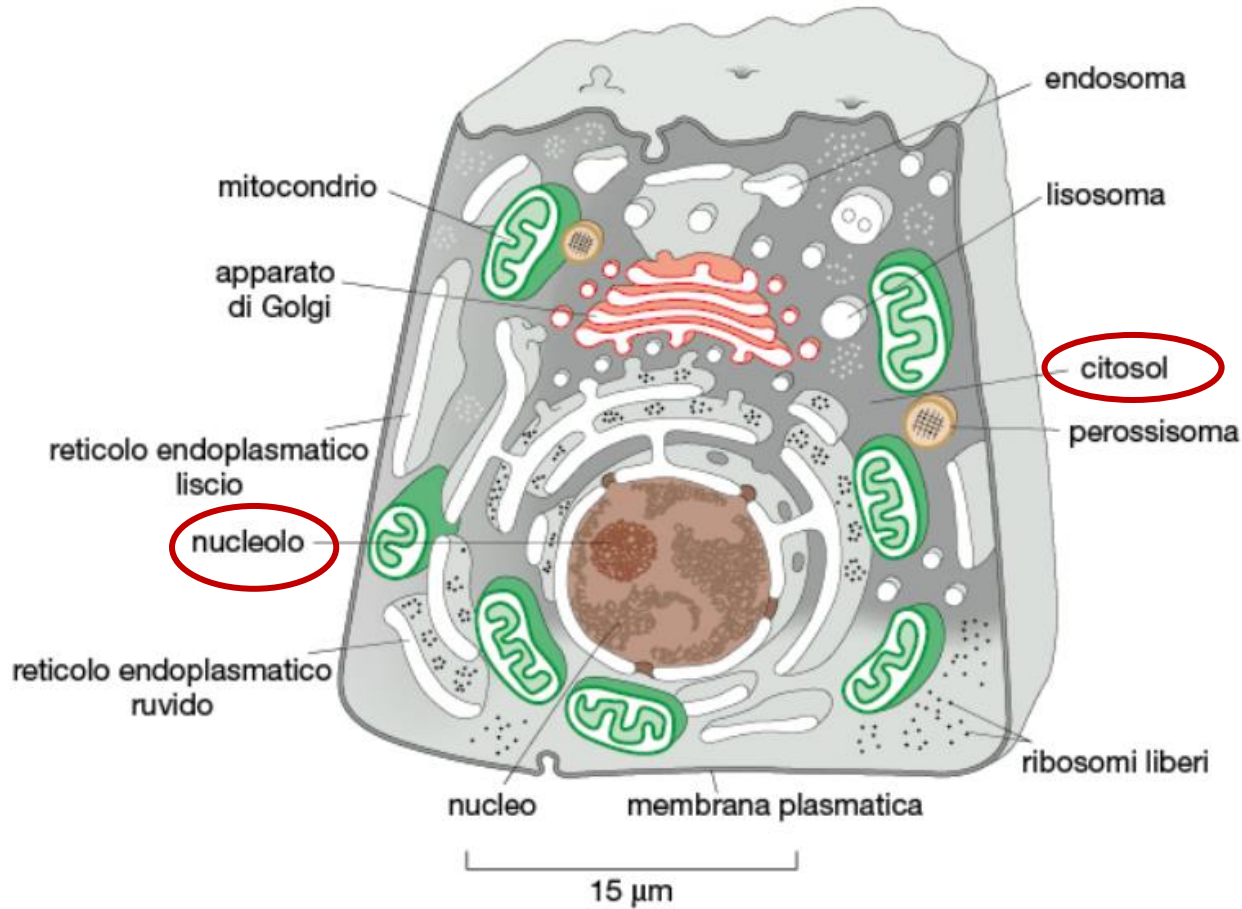


La Compartimentalizzazione della Cellula

- **Nucleo:** Contiene il genoma
- **Citosol**
- **RE rugoso:** Associato a ribosomi. Sintesi di proteine di membrana, di secrezione e per altri organuli.
- **RE liscio:** Produzione di lipidi e steroli. Deposito di ioni Ca^{2+} .
- **Endosomi:** Endocitosi - Tappe intermedie prima di raggiungere i lisosomi.
- **Apparato di Golgi:** Serie di cisterne appiattite e impilate. Riceve proteine/lipidi dal RE. Li modifica (glicosilazioni, fosforilazioni) e smista
- **Lisosomi:** Contengono enzimi digestivi idrolitici. Degradano organuli danneggiati (autofagia), macromolecole e materiali introdotti per endocitosi.
- **Mitocondri:** Metabolismo di molte sostanze + Producono ATP tramite fosforilazione ossidativa.



La Compartimentalizzazione della Cellula



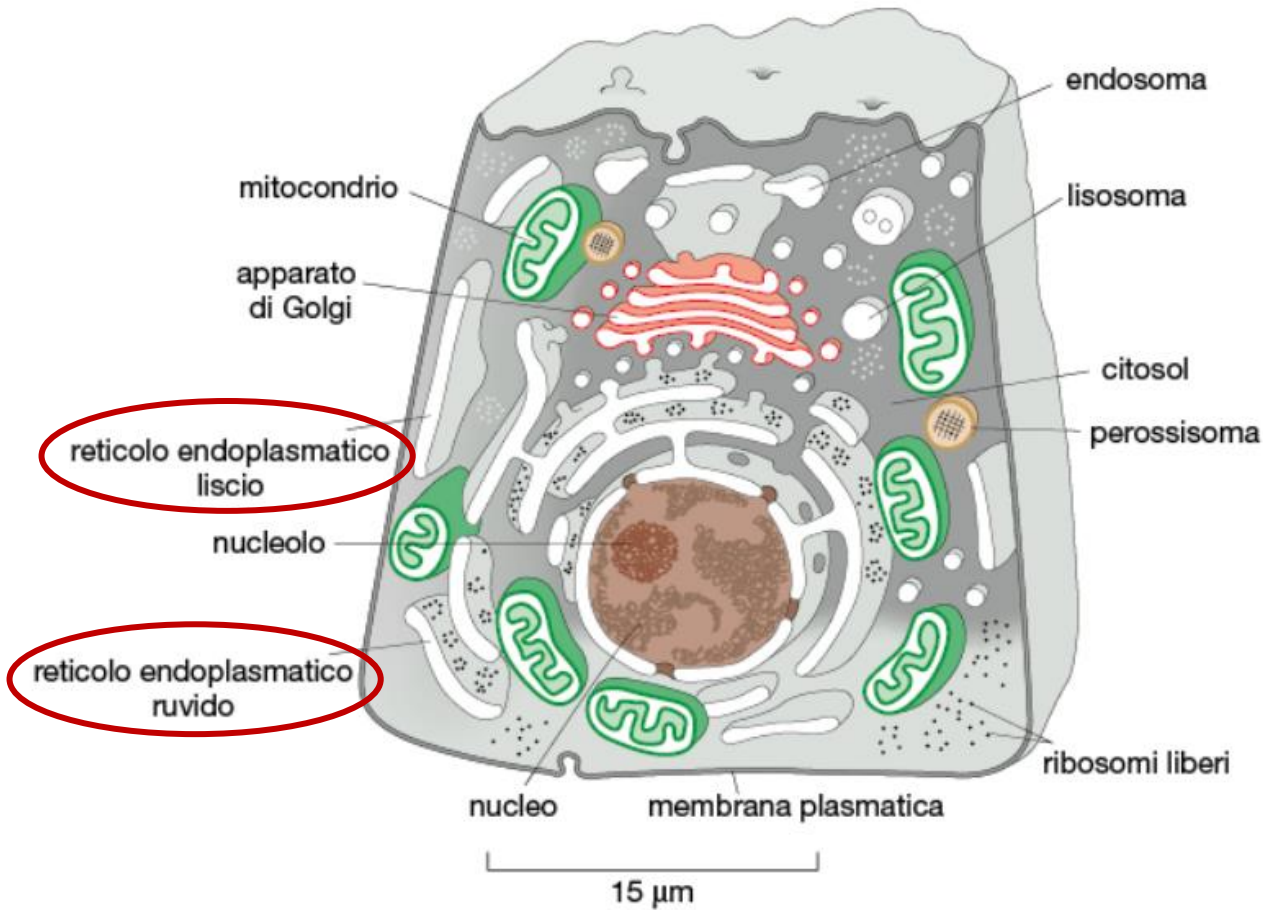
Nucleo:

- Contiene il genoma (eccetto DNA mitocondriale e cloroplastico).
- Sede principale di sintesi di DNA e RNA.

Citoplasma:

- Include citosol e organuli sospesi.
- **Citosol:** poco più della metà del volume cellulare.
 - **Sintesi e degradazione delle proteine.**
 - **Metabolismo intermedio (catabolismo e sintesi di piccole molecole).**

La Compartimentalizzazione della Cellula



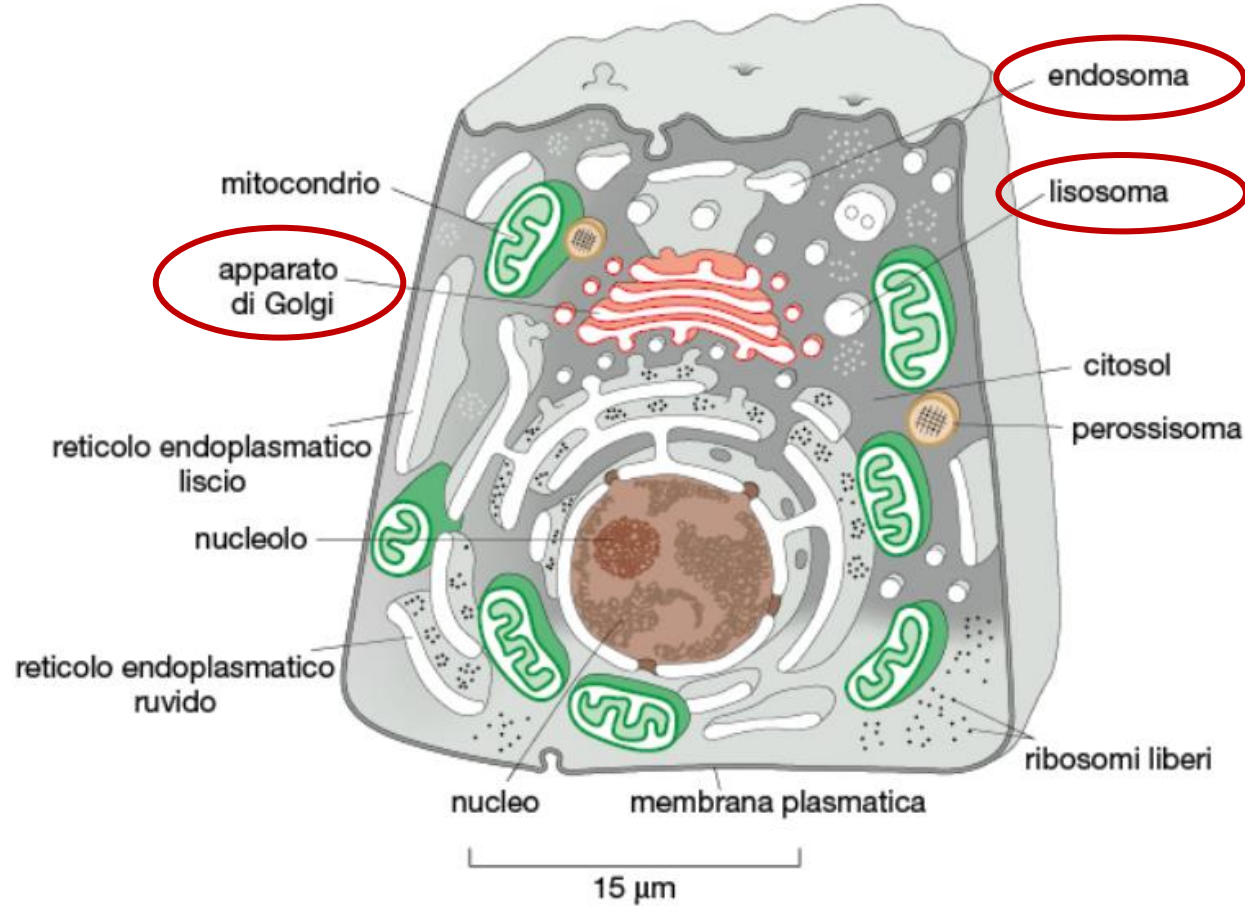
Reticolo endoplasmatico (RE)

Occupava **circa metà delle membrane** intracellulari.

RE **esteso dal nucleo in tutto il citosol**.

- **RE ruvido:**
 - **Ribosomi** attaccati.
 - Sede di **assemblaggio delle proteine** di membrana e secretorie.
- **RE liscio:**
 - Privo di ribosomi.
 - **Sintesi di lipidi e steroli.**
 - **Deposito di ioni Ca^{2+} .**

La Compartimentalizzazione della Cellula



Distribuzione legata alle interazioni con il **citoscheletro**

Apparato di Golgi

Struttura a pile di cisterne a forma di disco **vicino al nucleo**.

- **Riceve proteine e lipidi** dal RE.
- **Li modifica covalentemente** durante il trasporto.
- **Li smista verso le varie destinazioni** cellulari.

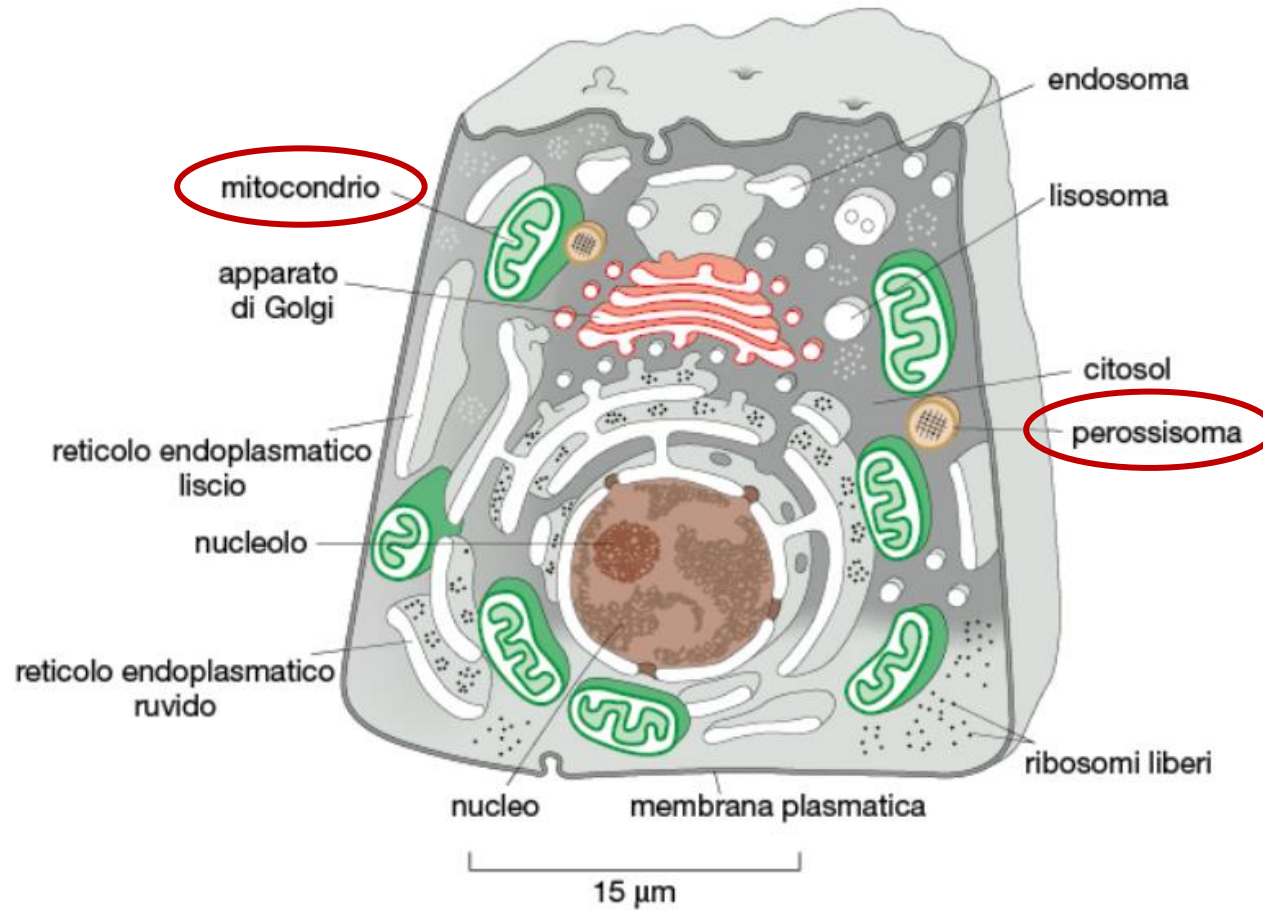
Lisosomi:

- Contengono **enzimi digestivi**.
- Degradano **organuli danneggiati, macromolecole** e materiale esogeno **introdotto per endocitosi**.

Endosomi:

- Stazioni di **transito per materiali endocitati** prima di raggiungere i lisosomi.

La Compartimentalizzazione della Cellula



Mitocondri

- producono la maggior parte dell'**ATP**.

Cloroplasti (e plastidi):

- Specializzati nella **fotosintesi**.
- Deposito di molecole o **riserva di pigmenti**

Perossisomi

- Piccoli **compartimenti vescicolari**.
- Contengono **enzimi coinvolti in reazioni ossidative**.

Dimensioni Relative dei Compartimenti

- I compartimenti delimitati da **membrane occupano circa metà del volume cellulare.**
- **Elevata richiesta di membrane** intracellulari.
 - Cellule epatiche → superficie del RE $\approx 25\times$ quella della membrana plasmatica.
 - Cellule pancreatiche → superficie del RE $\approx 12\times$ quella della membrana plasmatica.
- **Nota:** la membrana plasmatica rappresenta solo una parte minoritaria delle membrane totali.

Compartimento intracellulare	Percentuale del volume cellulare totale
Citosol	54
Mitocondri	22
Cisterne del RE ruvido	9
Cisterne del RE liscio	5
Cisterne di Golgi	1
Nucleo	6
Perossisomi	1
Lisosomi	1
Endosomi	1

Dimensioni Relative delle Membrane Cellulari

Tabella 12.2 Quantità relative di tipi di membrane in due specie di cellule eucariote

Tipo di membrana	Percentuale delle membrane cellulari totali	
	Cellula di fegato (epatocita)*	Cellula pancreatica esocrina*
Membrana plasmatica	2	5
Membrana del RE ruvido	35	60
Membrana del RE liscio	16	<1
Membrana dell'apparato di Golgi	7	10
Mitocondri - Membrana esterna - Membrana interna	7	4
	32	17
Nucleo - Membrana interna**	0,2	0,7
Membrana di vescicole secretorie	Non determinata	3
Membrana dei lisosomi	0,4	Non determinata
Membrana dei perossisomi	0,4	Non determinata
Membrana degli endosomi	0,4	Non determinata

*Queste due cellule hanno dimensioni molto diverse: l'epatocita medio ha un volume di circa $5000 \mu\text{m}^3$ in confronto ai $1000 \mu\text{m}^3$ della cellula pancreatica esocrina. Le aree totali delle membrane cellulari sono stimate rispettivamente in circa $110\,000 \mu\text{m}^2$ e $13\,000 \mu\text{m}^2$.

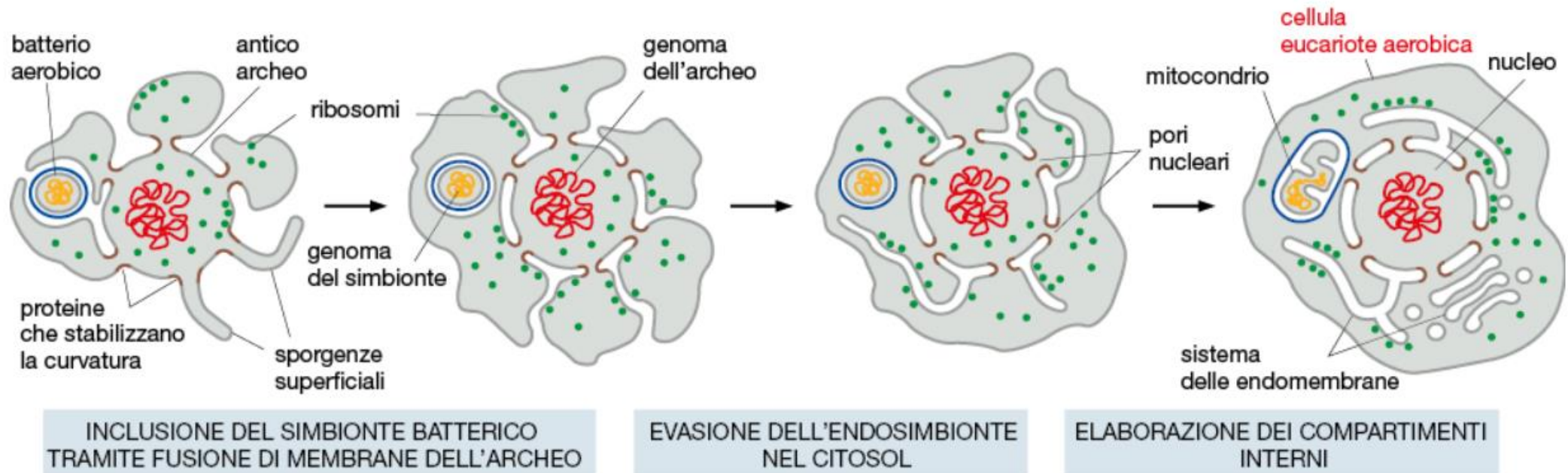
** La membrana nucleare esterna è inclusa nella misurazione del RE ruvido ed è circa uguale a quella interna.

Origini delle Membrane Interne

Le prime cellule eucariote derivano da **precursori** semplici, simili a batteri/archei:

- **Solo membrana plasmatica, nessuna membrana interna.**
- **La membrana plasmatica svolgeva tutte le funzioni vitali** (ATP, pompaggio ioni, secrezione proteine, sintesi lipidi).

- **Cellule ancestrali molto più piccole:** volume 1000–10.000× inferiore rispetto alle eucariote attuali.
- **Aumento di volume** richiedeva mantenere il **rapporto superficie/volume** → **comparsa di sporgenze** della membrana plasmatica.



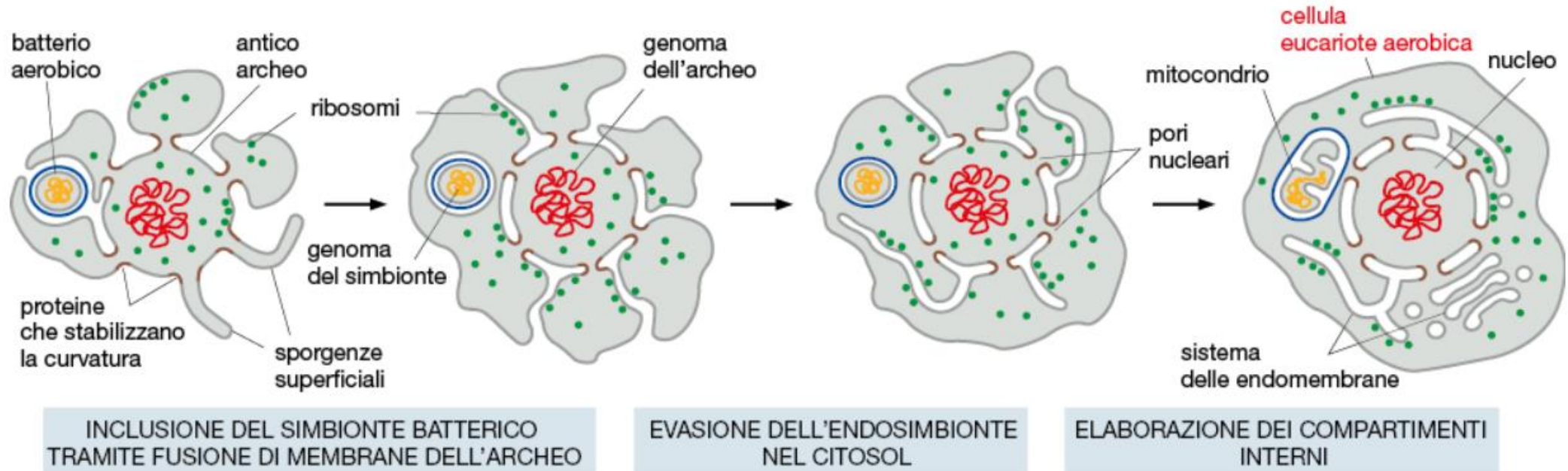
Espansione e Fusione delle Membrane

Sintesi delle origini evolutive

Circa 1,6 miliardi di anni fa → un archeo anaerobico + batterio aerobico = origine cellula eucariote.

- **Espansione della membrana** plasmatica dell'archeo attraverso la **protrusione di sporgenze**
- La membrana altamente ricurva al collo di queste **sporgenze** può essere stata **stabilizzata da proteine** → **precursori dei pori nucleari**.

- **Sporgenze** di membrana **aumentavano gli scambi con l'ambiente**
- **Fusione delle sporgenze** → formazione di una rete di **compartimenti interni chiusi da membrane**.
- Una **relazione proficua con un batterio aerobico** potrebbe aver permesso all'archeo di **aumentare di volume**.
- Queste **sporgenze si sono poi fuse** per **inglobare** anche il **batterio simbiote** → **mitocondri** (e plastidi).



Espansione e Fusione delle Membrane

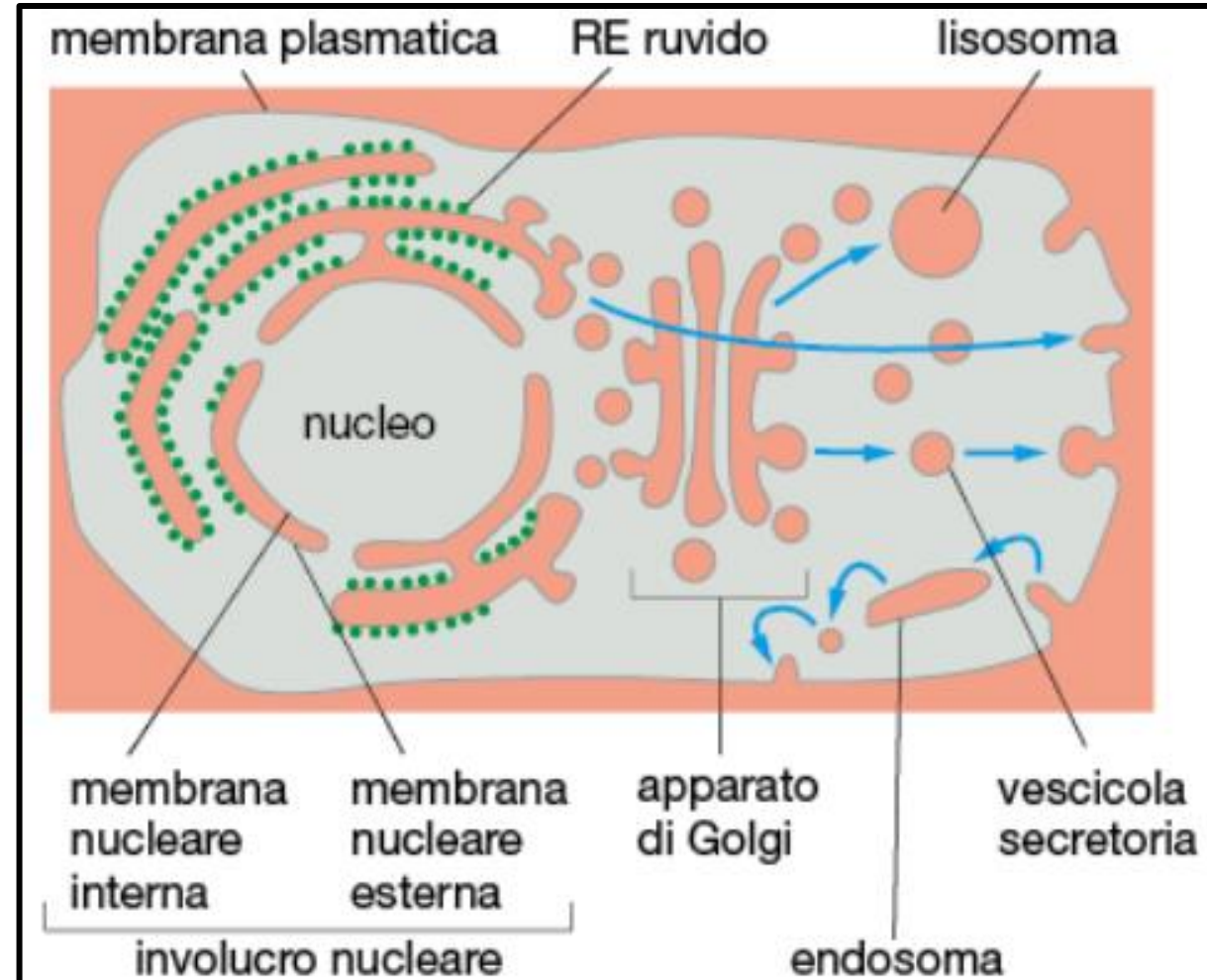
Conseguenza 1: compartimenti topologici

Membrane interne derivate dalla **membrana plasmatica ancestrale**.

Spazi interni di **RE**, **Golgi**, **endosomi**, **lisosomi**, **perossisomi** → **topologicamente equivalenti** tra loro e con lo spazio extracellulare.

Comunicazione tramite **vescicole di trasporto** che gemmano e si fondono.

Proteine entrate nel RE possono essere secrete **all'esterno della cellula**.



Espansione e Fusione delle Membrane

Conseguenza 2: origine del nucleo

Membrana plasmatica ancestrale che circondava il genoma → **diventa membrana nucleare interna.**

In continuità con la **membrana nucleare esterna** e altre membrane interne.

Pori nucleari → **comunicazione nucleo–citosol.**

Vantaggi:

- **Maggiore protezione del materiale genetico.**
- **Separazione trascrizione** (nucleo) e **traduzione** (citosol) → **regolazione più complessa** dell'espressione genica.

Conseguenza 3: endosimbiosi

Simbionti inizialmente **esterni** → **intrappolati e diventati endosimbionti.**

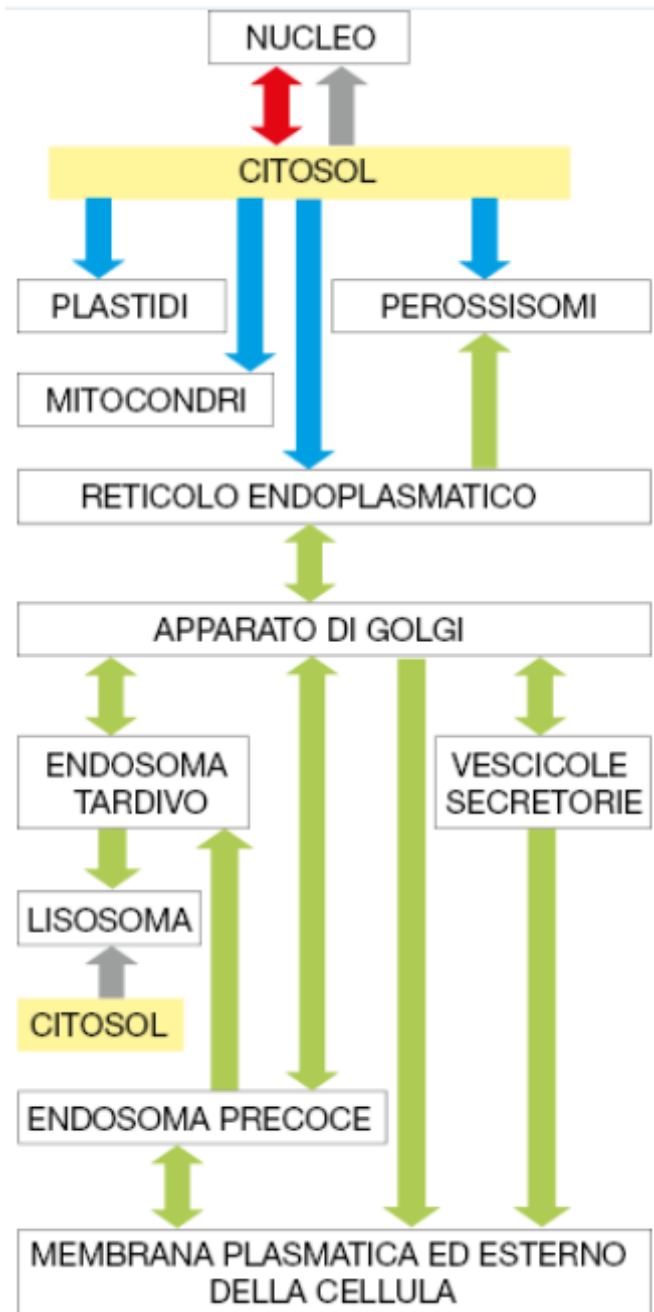
Successivamente liberati nel citosol → origine di mitocondri e plastidi.

Evidenze:

- **Presenza di genomi propri.**
- **Doppia membrana.**
- **Somiglianza delle proteine** con quelle batteriche moderne.

Mitocondri e plastidi restano isolati dal traffico vescicolare.

Relazioni Topologiche tra Organuli



Classificazione delle famiglie di organuli

1. Nucleo e citosol

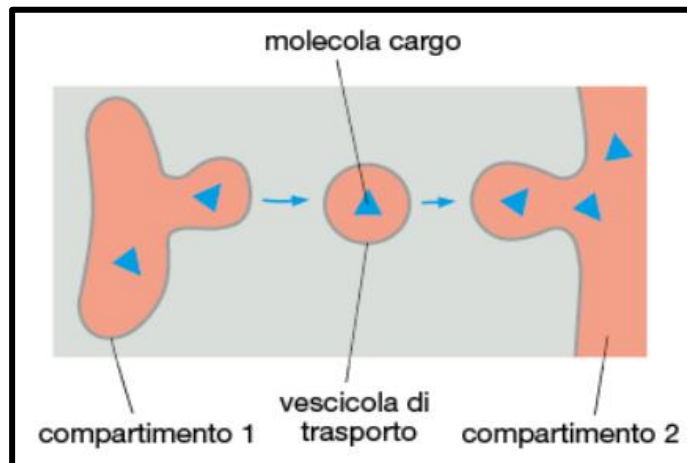
- Topologicamente equivalenti, collegati dai pori nucleari.

2. Via secretoria ed endocitica

- RE, Golgi, endosomi, lisosomi, perossisomi, vescicole di trasporto.

3. Organuli endosimbionti

- Mitochondri e plastidi (nelle piante).



Spiegazione della topologia:

- **Nucleo e citosol** equivalenti.
- **Vie secretorie collegate da vescicole.**
- **Mitochondri/plastidi isolati.**

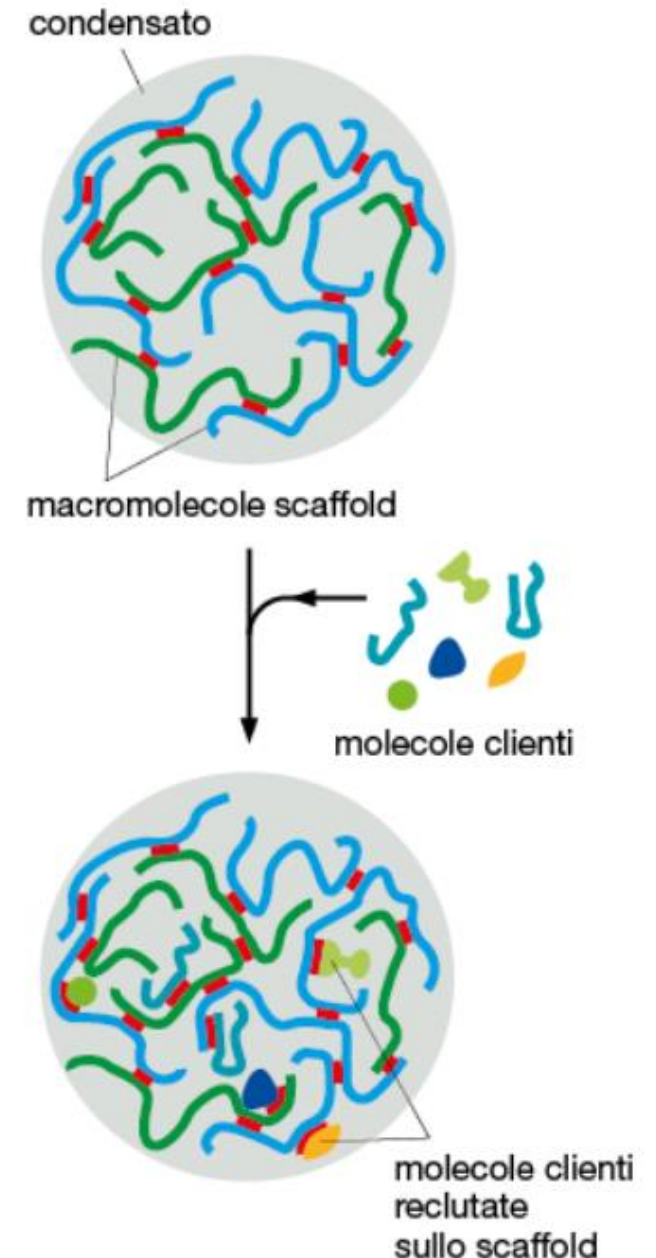
Segregazione Senza Membrane: Condensati Biomolecolari

Le cellule possono **segregare macromolecole anche senza** una barriera lipidica.

Al contrario, i **condensati biomolecolari** sono un diverso tipo di **struttura cellulare**, formata da proteine (e spesso RNA) **tenute insieme da un gran numero di interazioni deboli** e in **continuo cambiamento**

Funzione: concentrare enzimi, substrati e cofattori → **aumentare l'efficienza** di vie biochimiche e ridurre reazioni collaterali.

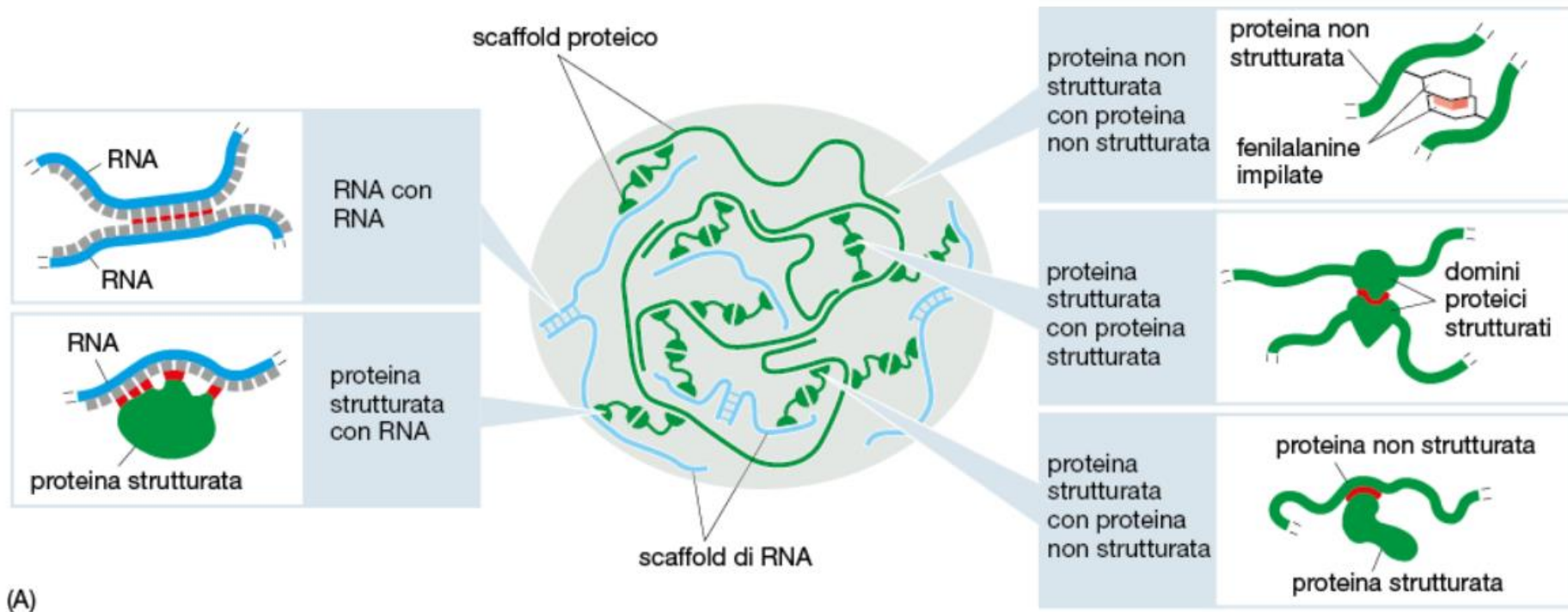
- **Creati da proteine o acidi nucleici “scaffold”.**
- **Interazioni deboli e dinamiche** generano un compartimento liquido.
- **Reclutano proteine e acidi nucleici specifici (“clienti”).**
- **Favoriscono alta concentrazione locale** → efficienza biochimica.
- Esempi: **Nucleoli, P-bodies, stress granules.**



Requisiti per la Formazione dei Condensati

- **Necessario** almeno **uno scaffold** (proteina o acido nucleico) con **interazioni deboli e multivalenti** con sé stesso o con altri componenti.
- Spesso presenti **regioni intrinsecamente disordinate (IDR)** delle proteine sono coinvolti nelle **interazioni di legame fluttuanti e deboli** che formano un condensato, contribuendo in modo significativo alla loro formazione.

- Tipicamente, **ciascuna delle singole interazioni** tra queste proteine multivalenti e gli RNA è molto debole, quindi **si forma e si rompe frequentemente**.
- **Quando si rompe** una qualsiasi di queste interazioni, **altre interazioni in siti diversi impediscono** che la **macromolecola si diffonda** e la **mantengono localmente concentrata**.



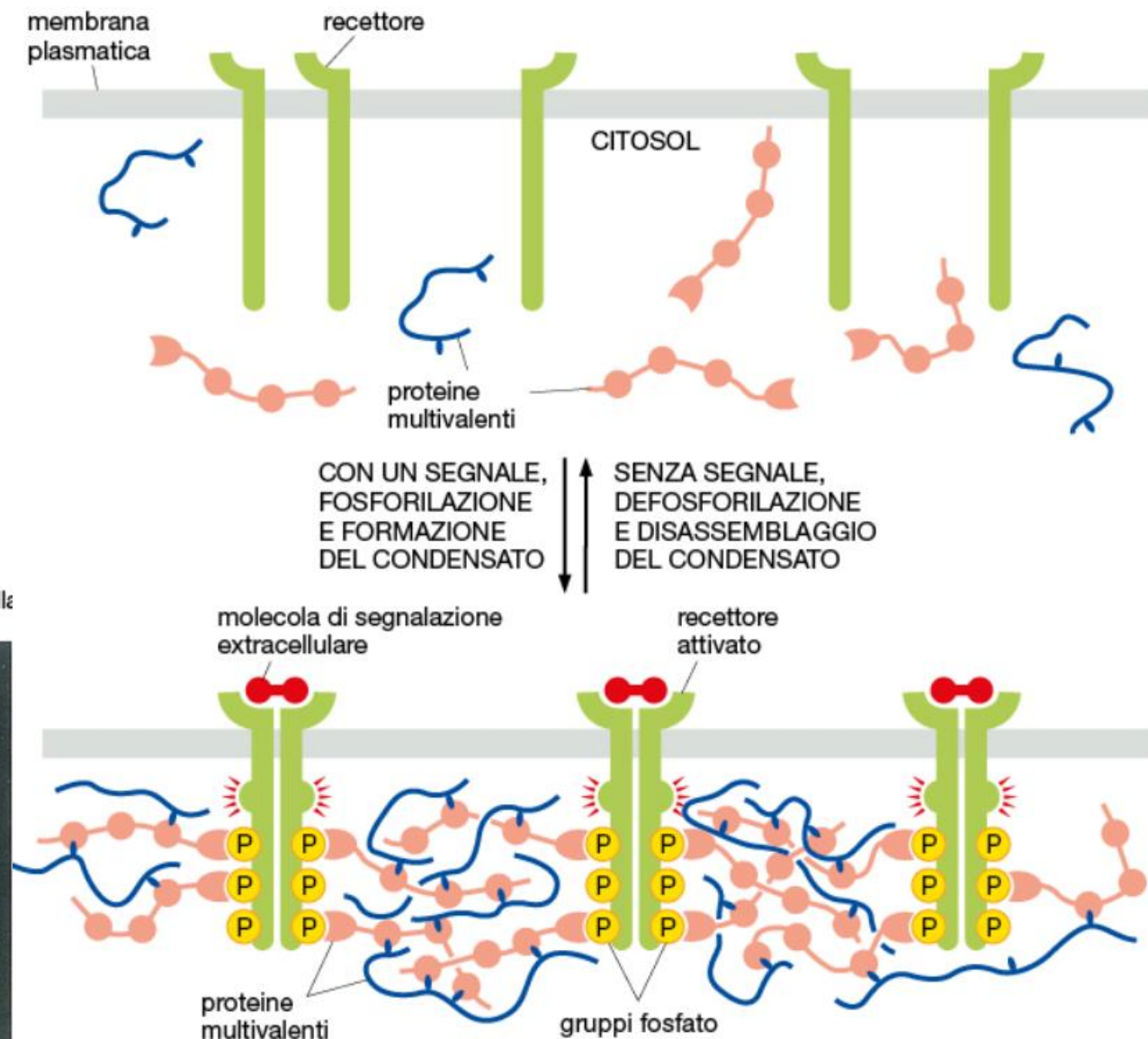
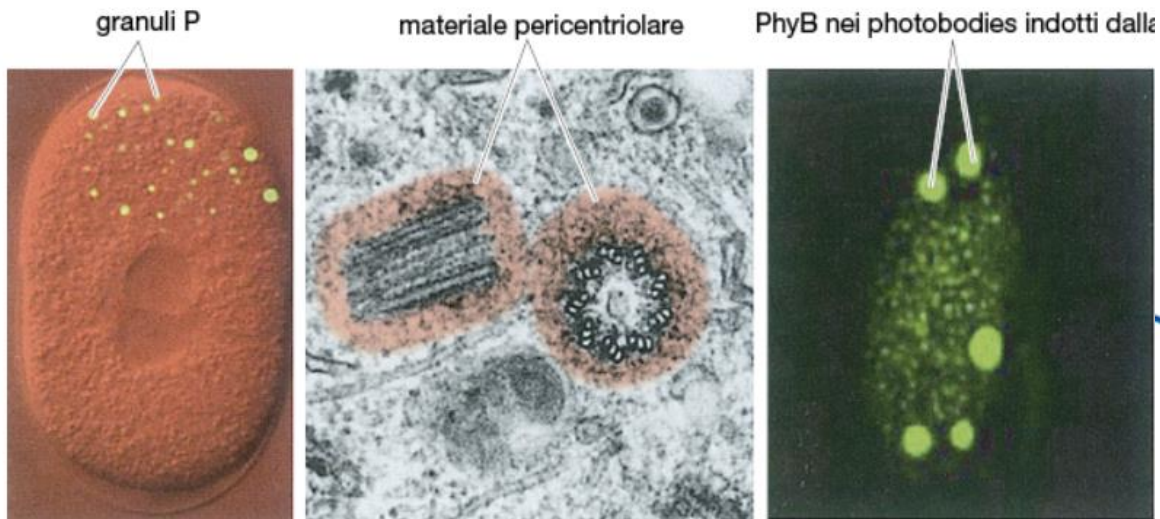
Panorama dei Condensati Biomolecolari

- Presenti **in tutti gli organismi**; nelle eucariote esistono **≥10 tipologie** (e spesso di più) per cellula.
- **Dimensioni** tipiche: **~50 nm** (poco > dei ribosomi) → **≥1 µm** (nucleolo).
- Ogni condensato possiede un **complemento caratteristico** di proteine e (spesso) acidi nucleici → **identità e funzione** specifiche.

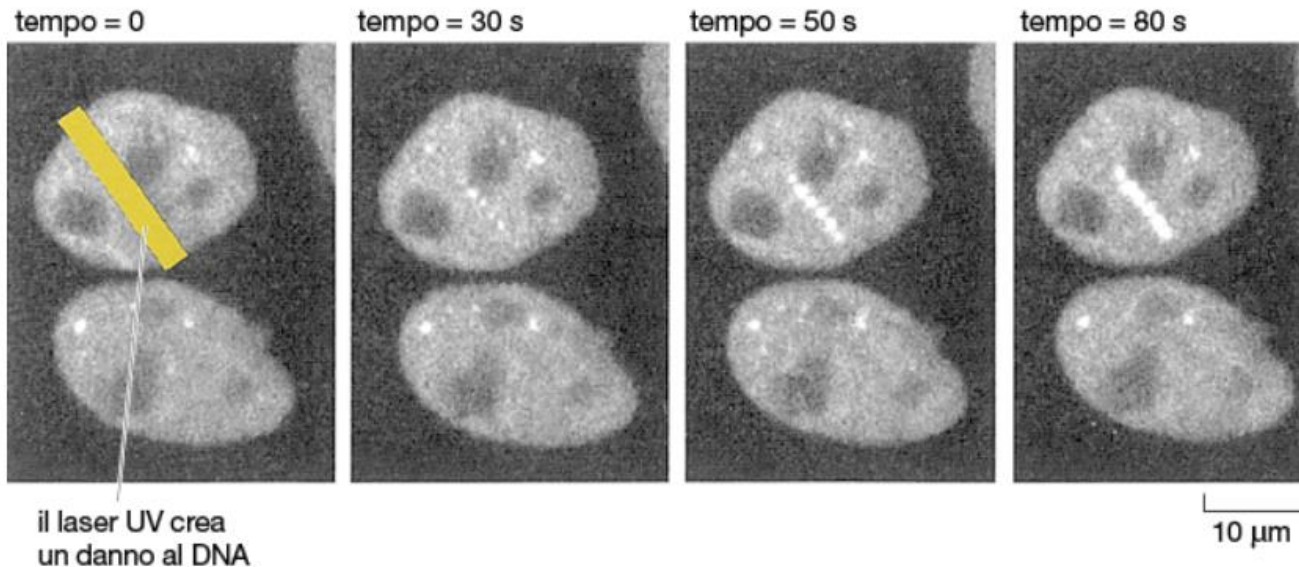
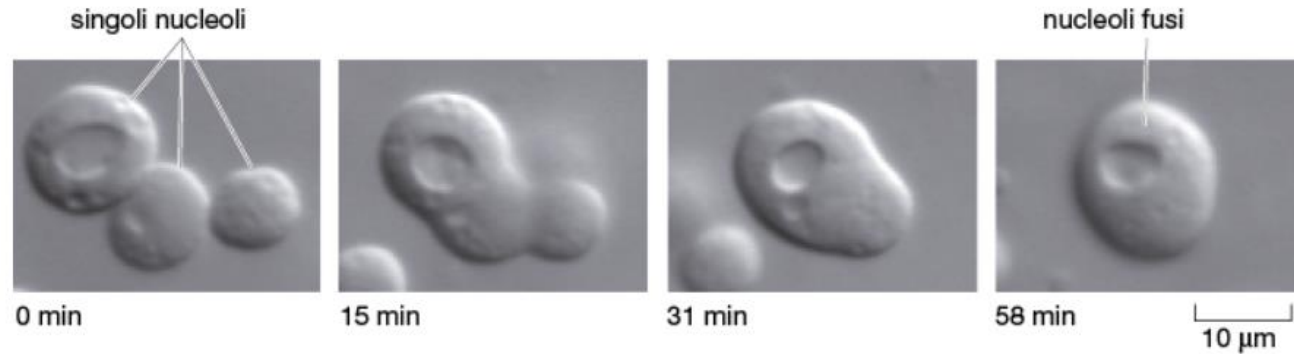
Condensato biomolecolare	Posizione	Funzioni proposte associate
Nucleolo	Nucleo	Trascrizione dell'rRNA e assemblaggio dei ribosomi
Pirenoide	Cloroplasto	Fissazione del carbonio dal CO ₂ nelle alghe
Granuli da stress	Citosol	Immagazzinamento temporaneo, in particolare di componenti legati alla traduzione
Granuli P	Citosol	Metabolismo dell'RNA ed ereditarietà
Corpi di Balbiani	Citosol	Localizzazione ed ereditarietà di mRNA e organuli
Corpi di Cajal	Nucleo	Maturazione dell'mRNA
Paraspeckles	Nucleo	Regolazione dell'espressione genica
Granuli di trasporto dell'RNA	Neuroni	Localizzazione in posizioni subcellulari dell'RNA durante lo sviluppo e nei neuroni
Corpi PML	Nucleo	Immagazzinamento di fattori nucleari; regolazione dell'espressione genica
Densità postsinaptica	Dendrite	Organizzazione di macromolecole necessarie per la trasmissione neuronale

Panorama dei Condensati Biomolecolari

- **Condensati RNP (ribonucleoproteiche):** nucleari (es. **corpi nucleolari**) e citoplasmatici (es. ***P-bodies***, ***stress granules***).
- **Cluster di segnalazione** associati alla membrana plasmatica.
- “**Fabbriche Biochimiche**” temporanee per riparazione DNA, replicazione e trascrizione.

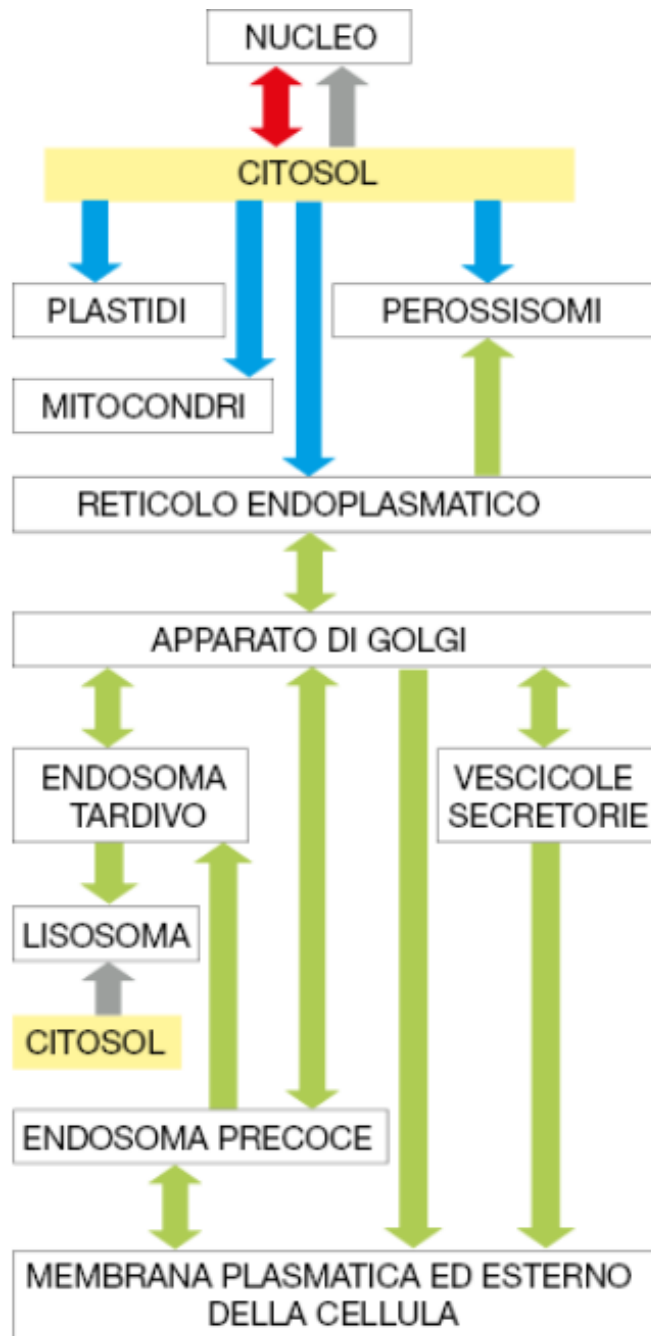


Condensati Biomolecolari: la loro Natura Dinamica



- Poiché il **condensato rimane intatto e distinto dal liquido circostante**, il processo attraverso il quale si forma è comunemente definito è detto **separazione di fase liquido-liquido** o (come l'olio nell'acqua)
- Una **caratteristica distintiva** dei condensati biomolecolari che riflette **la loro natura dinamica** è il fatto che **l'assemblaggio e lo smontaggio di molte di queste strutture siano facilmente reversibili**.
- Per esempio, il **nucleolo scompare durante la mitosi e si riforma all'inizio dell'interfase tramite la fusione delle goccioline** separate che si formano su diversi cromosomi all'inizio di ogni interfase.
- **Allo stesso modo, le fabbriche di riparazione, replicazione e trascrizione del DNA nel nucleo appaiono solo dove e quando avviene** ciascuno di questi processi

Le Proteine si possono Muovere tra i Compartimenti



Il **trasporto di proteine** è un **meccanismo essenziale** e antico, conservato durante l'evoluzione.

La **maggior parte delle proteine** (eccetto alcune in mitocondri e plastidi) inizia la sintesi su **ribosomi citosolici**.

La **destinazione finale** dipende dalla **sequenza amminoacidica**:

- Presenza di **segnali di smistamento** → trasporto verso organuli specifici.
- Assenza di segnali → permanenza nel **citosol**.

I segnali sono riconosciuti da **recettori complementari** che mediano il trasporto

LEGENDA:

- █ = traslocazione proteica
- █ = trasporto regolato
- █ = trasporto vescicolare
- █ = ingestione

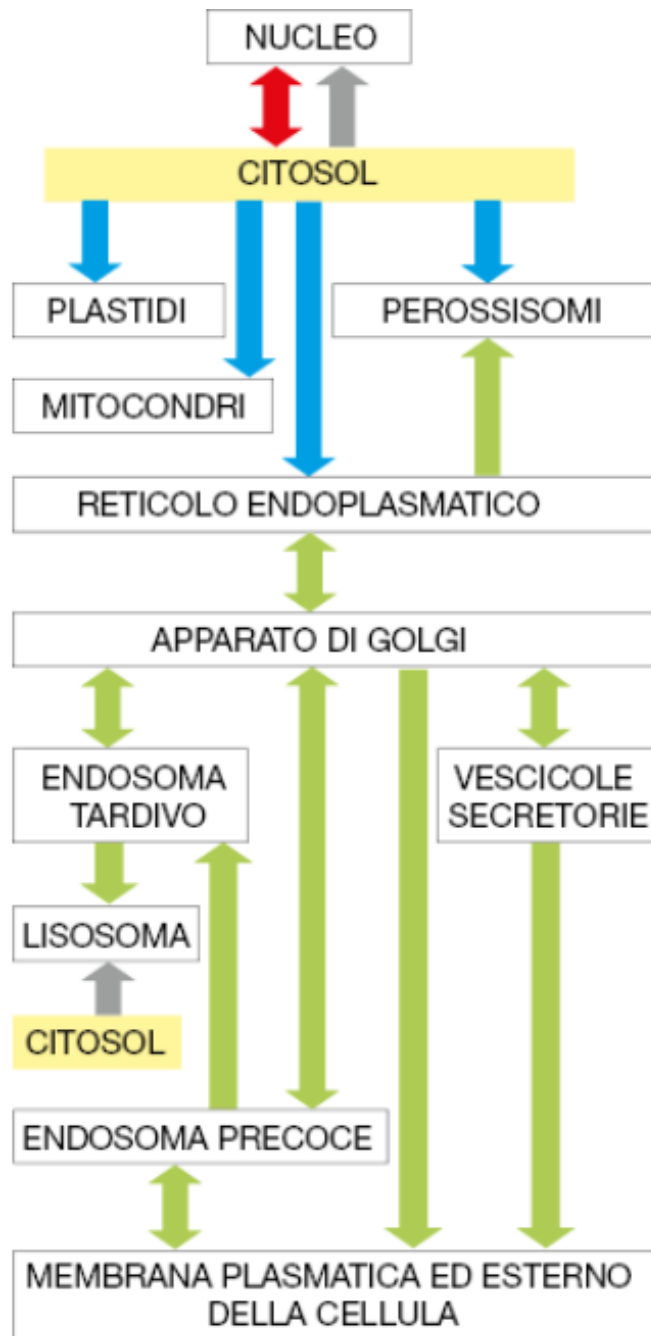
Quattro Vie Principali di Trasporto Proteico

1. Traslocazione proteica:

- **Traslocatori transmembrana** spostano **proteine dal citosol a compartimenti** topologicamente distinti.
- **Necessario** spesso **disfare il ripiegamento** della proteina.
- Esempi: import nel **RE** o nei **mitocondri**.

2. Trasporto regolato:

- **Tra citosol e nucleo** attraverso i **complessi dei pori nucleari**.
- Funzionano da **cancelli selettivi** per macromolecole specifiche.



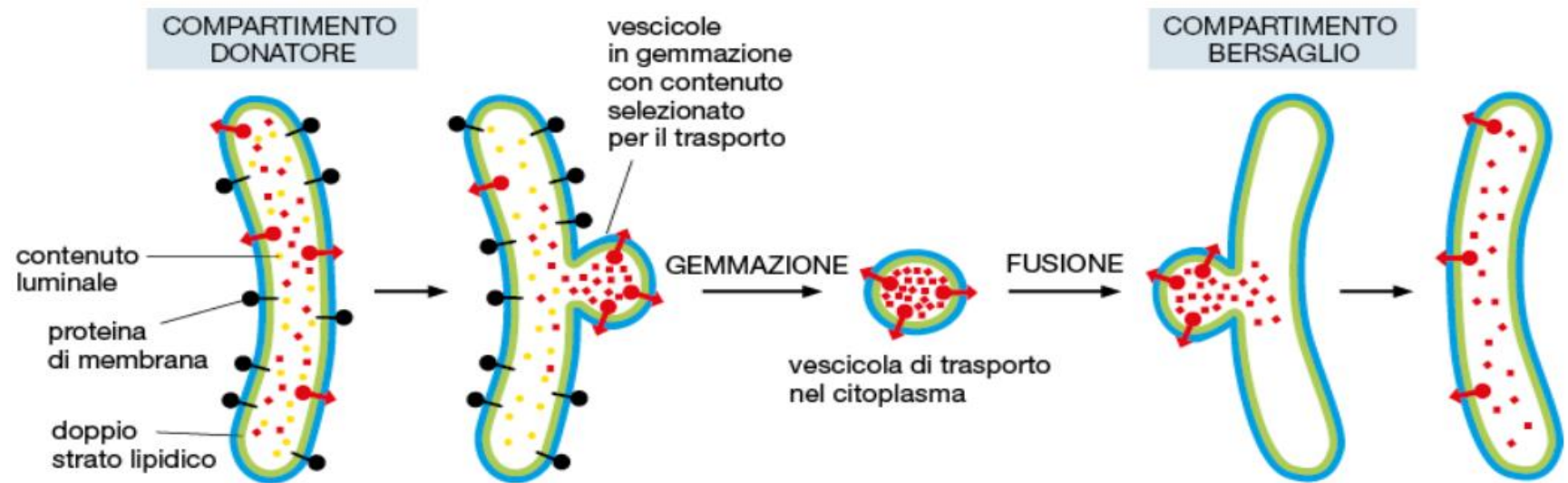
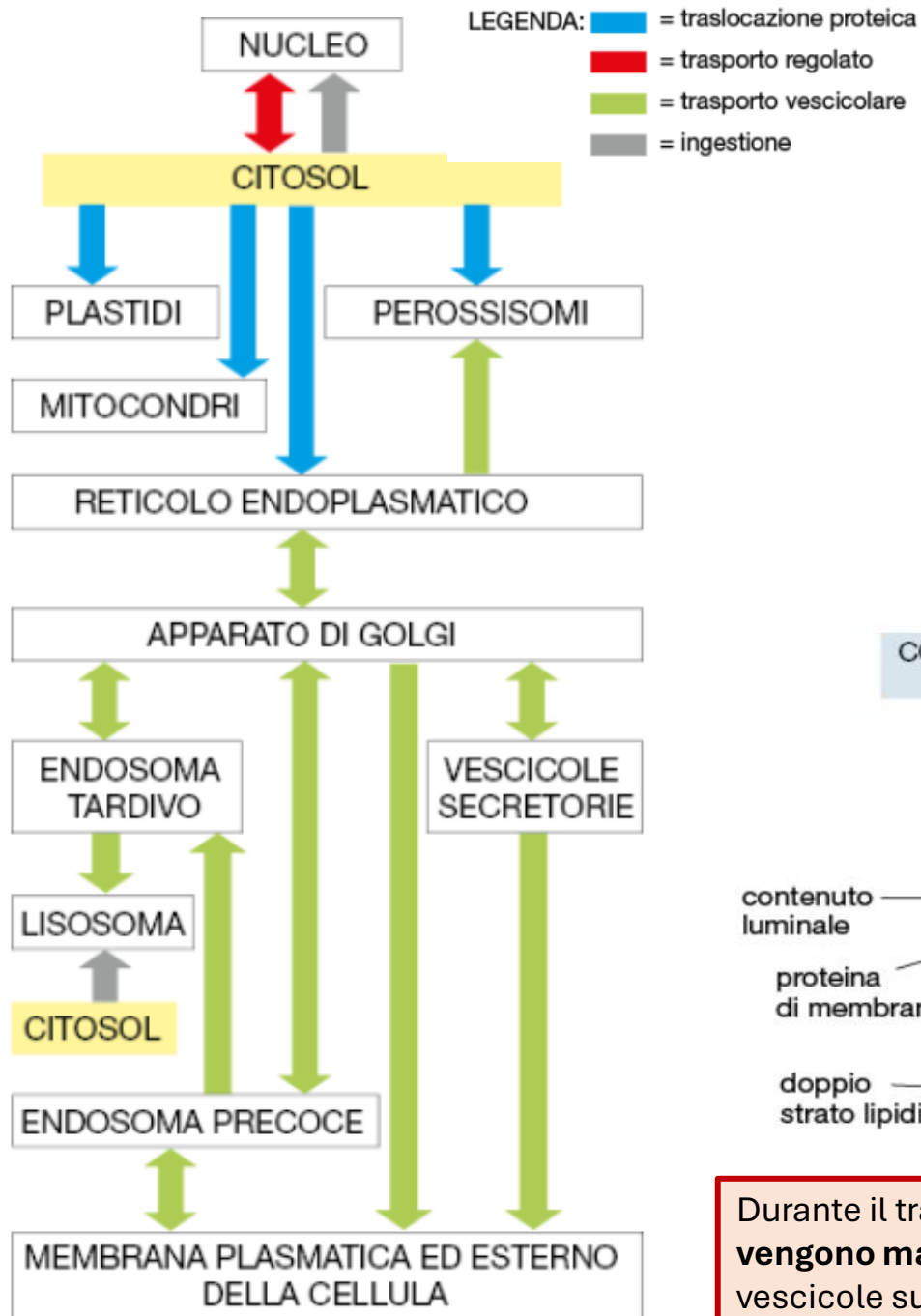
LEGENDA:

- █ = traslocazione proteica
- █ = trasporto regolato
- █ = trasporto vescicolare
- █ = ingestione

Quattro Vie Principali di Trasporto Proteico

3. Trasporto vescicolare:

- Vescicole, tubuli o frammenti di organuli traghettano molecole.
- Caricano proteine dal lume o dalla membrana di origine.
- Si fondono con il compartimento di destinazione → rilascio del carico.
- Esempio: trasferimento **RE** → **Golgi**.

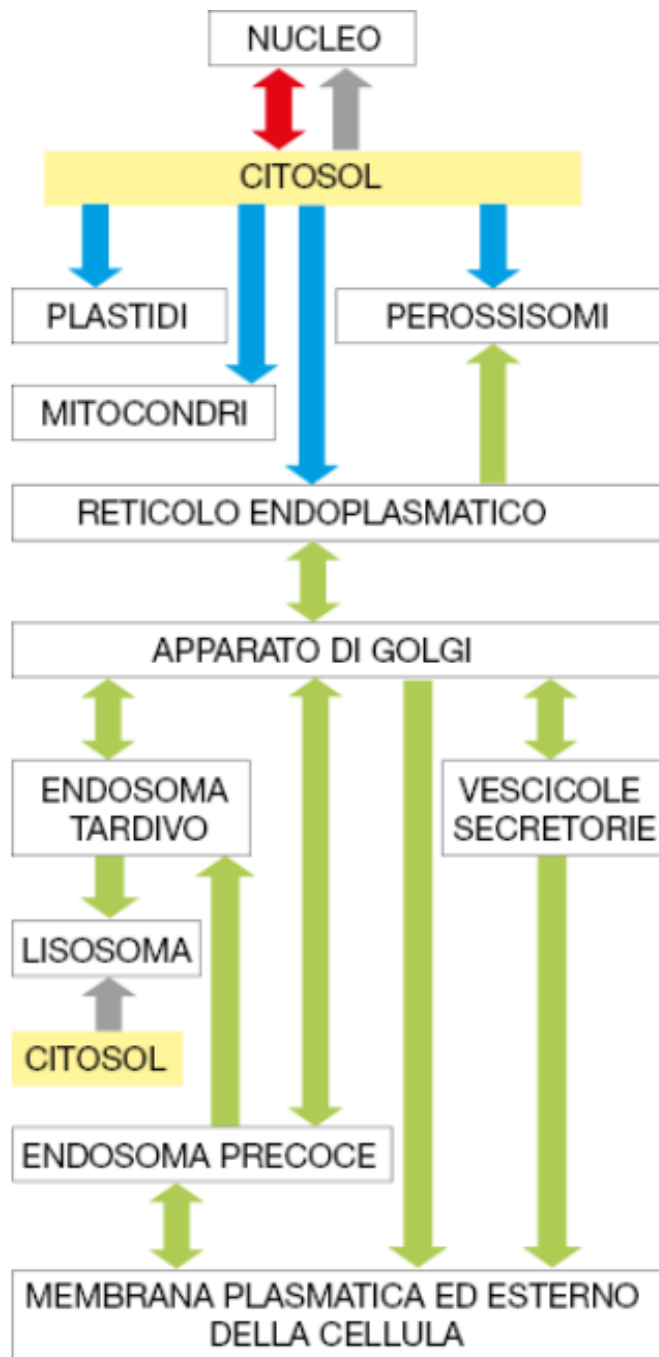
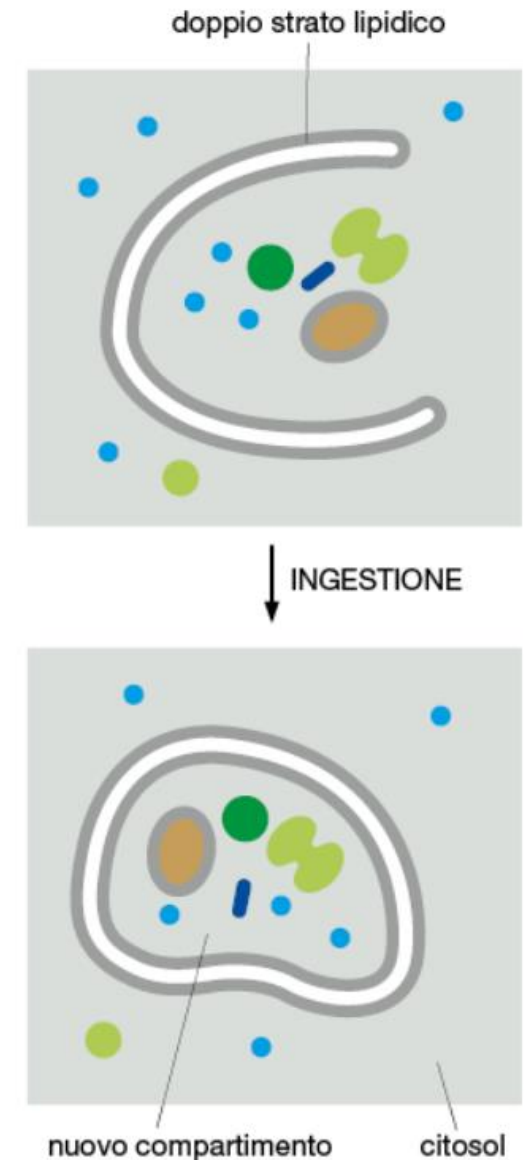


Durante il trasporto vescicolare, **le proteine non attraversano membrane. Le relazioni topologiche vengono mantenute**. Es.: una proteina solubile nel lume del RE rimane nel lume anche nel Golgi e nelle vescicole successive

Quattro Vie Principali di Trasporto Proteico

4. Processo di ingestione (es. autofagia):

- Fogli di doppio strato avvolgono porzioni di **citoplasma o organuli**.
- Formano **autofagosomi**, poi **fusi con lisosomi**.
- Concettualmente simile alla **riformazione dell'involucro nucleare post-mitosi**.



LEGENDA:

- █ = traslocazione proteica
- █ = trasporto regolato
- █ = trasporto vescicolare
- █ = ingestione

Tipi di Segnali di Smistamento

Definizione: brevi sequenze di amminoacidi che indirizzano le proteine verso la destinazione corretta.

• **Due forme principali:**

- **Sequenza segnale lineare** (sequenza continua di amminoacidi).
- **Zona segnale** (specifica disposizione tridimensionale di amminoacidi).

• **Localizzazione:**

- **Traslocazione negli organuli** → **sequenze lineari**. Spesso si possono trovare al **N-terminale** e sono rimosse da una **peptidasi del segnale**, una volta **completato lo smistamento**.
- **Trasporto nucleare e vescicolare** → possono essere sia **lineari** che **zone segnale**.

importazione nel nucleo

– Pro – Pro – Lys – Lys – Lys – Arg – Lys – Val –

esportazione dal nucleo

– Met – Glu – Glu – Leu – Ser – Gln – Ala – Leu – Ala – Ser – Ser – Phe –

importazione nel mitocondrio

N – Met – Leu – Ser – Leu – Arg – Gln – Ser – Ile – Arg – Phe – Phe – Lys – Pro – Ala – Thr – Arg – Thr –
Leu – Cys – Ser – Ser – Arg – Tyr – Leu – Leu –

importazione nei plastidi

N – Met – Val – Ala – Met – Ala – Met – Ala – Ser – Leu – Gln – Ser – Ser – Met – Ser – Ser – Leu – Ser –
Leu – Ser – Ser – Asn – Ser – Phe – Leu – Gly – Gln – Pro – Leu – Ser – Pro – Ile – Thr – Leu – Ser – Pro –
Phe – Leu – Gln – Gly –

importazione nei perossisomi

– Ser – Lys – Leu – C

importazione nel RE

N – Met – Met – Ser – Phe – Val – Ser – Leu – Leu – Leu – Val – Gly – Ile – Leu – Phe – Trp – Ala – Thr –
Glu – Ala – Glu – Gln – Leu – Thr – Lys – Cys – Glu – Val – Phe – Gln –

ritorno al RE

– Lys – Asp – Glu – Leu – C

Tipi di Segnali di Smistamento

- **RE (lume):** sequenza **N-terminale idrofobica** (5–10 aa); spesso rimossa dopo lo smistamento.
- **Proteine residenti del RE:** sequenza di **4 aa al C-terminale** → riconosciute e riportate al RE.
- **Mitocondri:** sequenze con **alternanza di aa carichi positivi e idrofobi**.
- **Nucleo:** segnali **ricchi di aa basici** (carichi positivi).
- **Perossisomi:** peptide **C-terminale di 3 aa caratteristici**.

Proprietà dei segnali

- **Necessari e sufficienti:** dimostrato sperimentalmente tramite **ingegneria genetica**.
 - **Inserimento della sequenza** → proteina reindirizzata all'organulo.
 - **Rimozione/mutazione** di una sequenza segnale → proteina bloccata nel citosol.
- **Le sequenze possono variare molto, ma sono funzionalmente intercambiabili** tra proteine con stessa destinazione.
- **Spesso contano più le proprietà fisiche** (es. idrofobicità) **che la sequenza esatta**.

importazione nel nucleo

– Pro – Pro – Lys – Lys – Lys – Arg – Lys – Val –

esportazione dal nucleo

– Met – Glu – Glu – Leu – Ser – Gln – Ala – Leu – Ala – Ser – Ser – Phe –

importazione nel mitocondrio

N – Met – Leu – Ser – Leu – Arg – Gln – Ser – Ile – Arg – Phe – Phe – Lys – Pro – Ala – Thr – Arg – Thr –
Leu – Cys – Ser – Ser – Arg – Tyr – Leu – Leu –

importazione nei plastidi

N – Met – Val – Ala – Met – Ala – Met – Ala – Ser – Leu – Gln – Ser – Ser – Met – Ser – Ser – Leu – Ser –
Leu – Ser – Ser – Asn – Ser – Phe – Leu – Gly – Gln – Pro – Leu – Ser – Pro – Ile – Thr – Leu – Ser – Pro –
Phe – Leu – Gln – Gly –

importazione nei perossisomi

– Ser – Lys – Leu – C

importazione nel RE

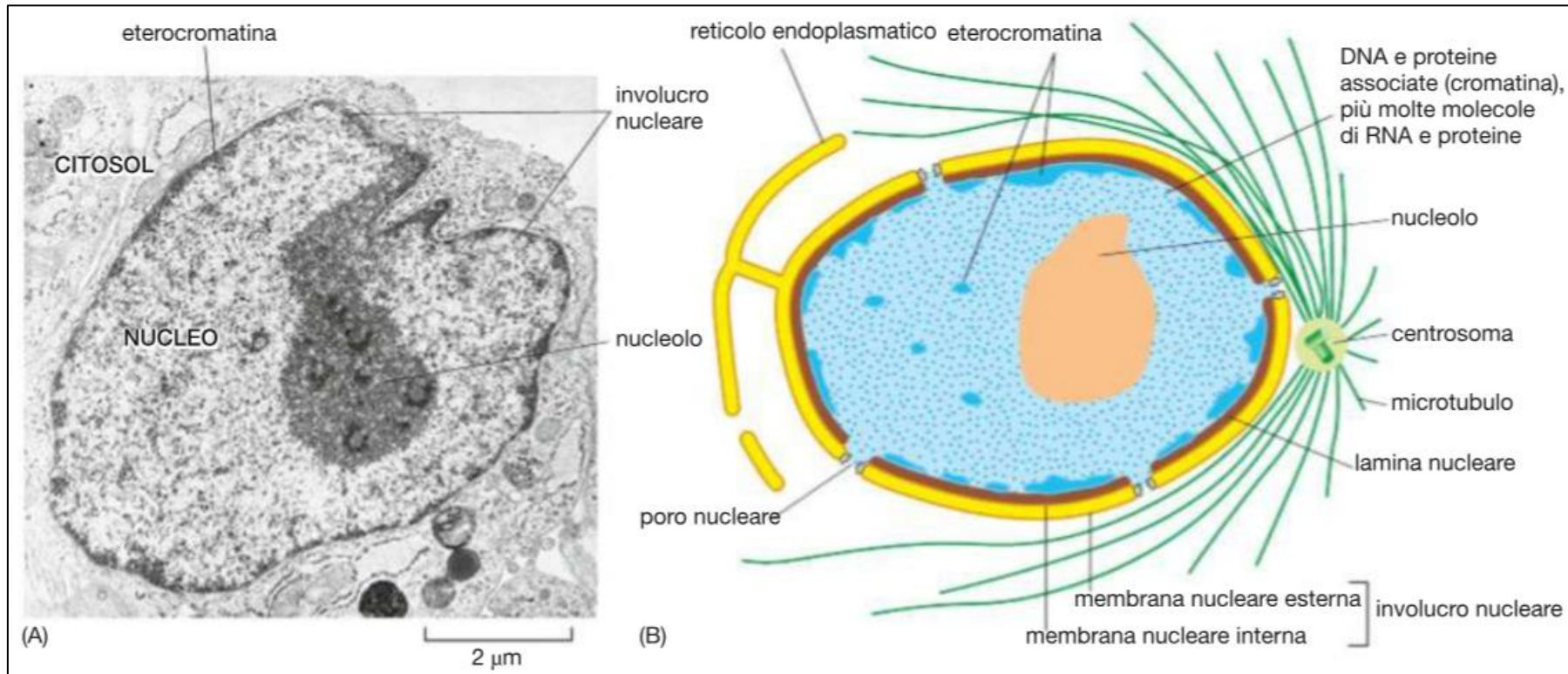
N – Met – Met – Ser – Phe – Val – Ser – Leu – Leu – Leu – Val – Gly – Ile – Leu – Phe – Trp – Ala – Thr –
Glu – Ala – Glu – Gln – Leu – Thr – Lys – Cys – Glu – Val – Phe – Gln –

ritorno al RE

– Lys – Asp – Glu – Leu – C

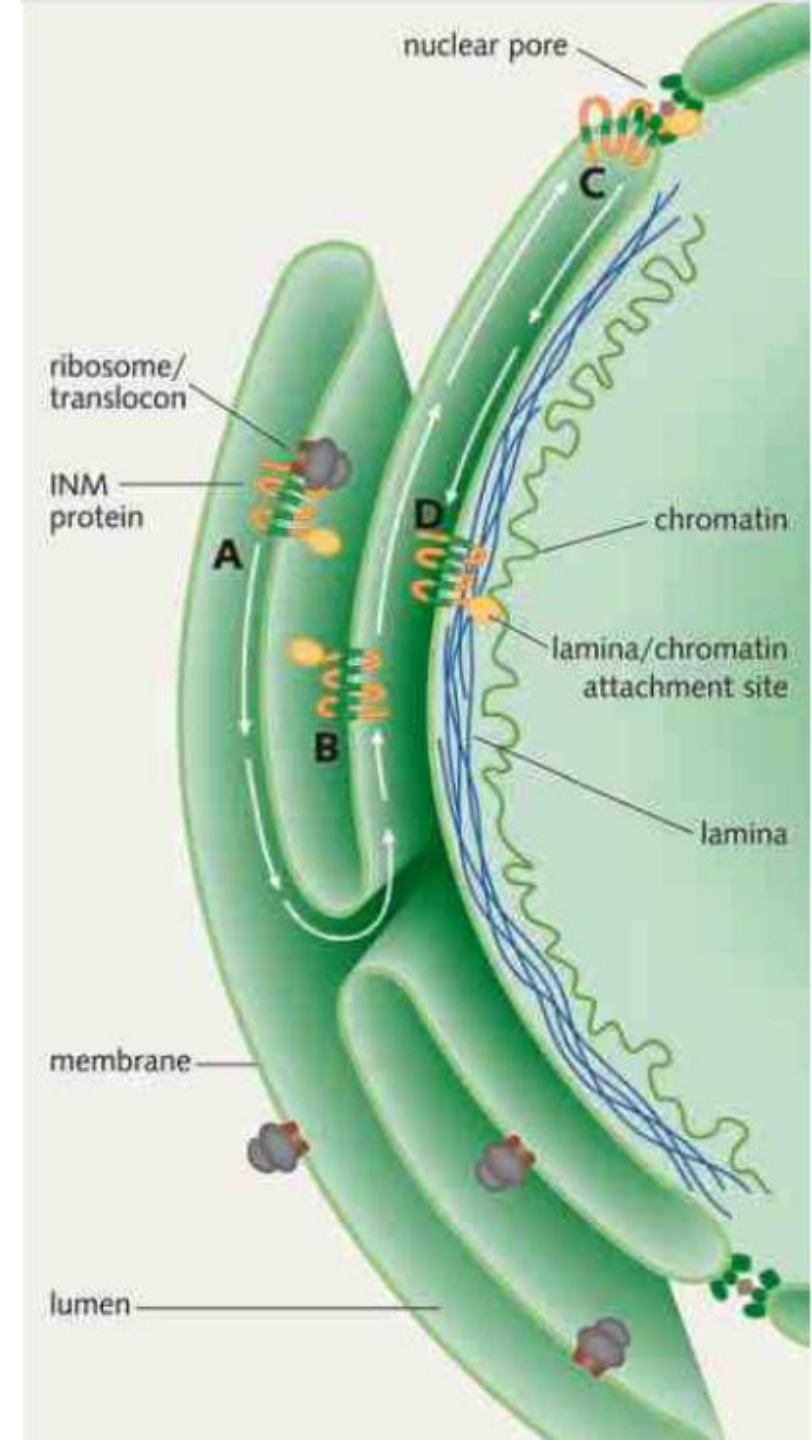
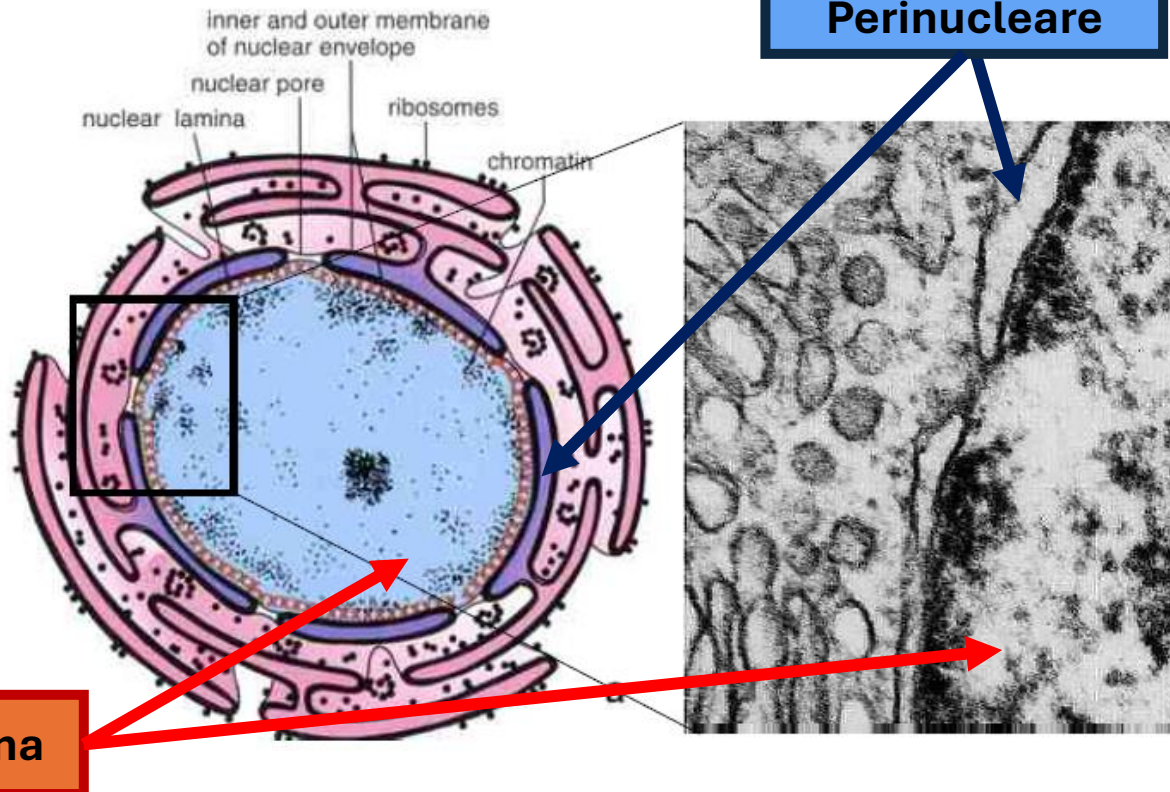
Nucleo

- Descritto per la prima volta da **Robert Brown (1831)**.
- Organulo più ampio e ben visibile delle cellule eucariotiche.
- **Differenza chiave:** distingue cellule eucariotiche da procariotiche.
- Variabile per dimensione, forma e posizione.
- Di solito **un solo nucleo** per cellula,
- **Sede dell'informazione genetica:**
- **Ruoli principali:**
 - Duplicazione del DNA.
 - Trascrizione in RNA.

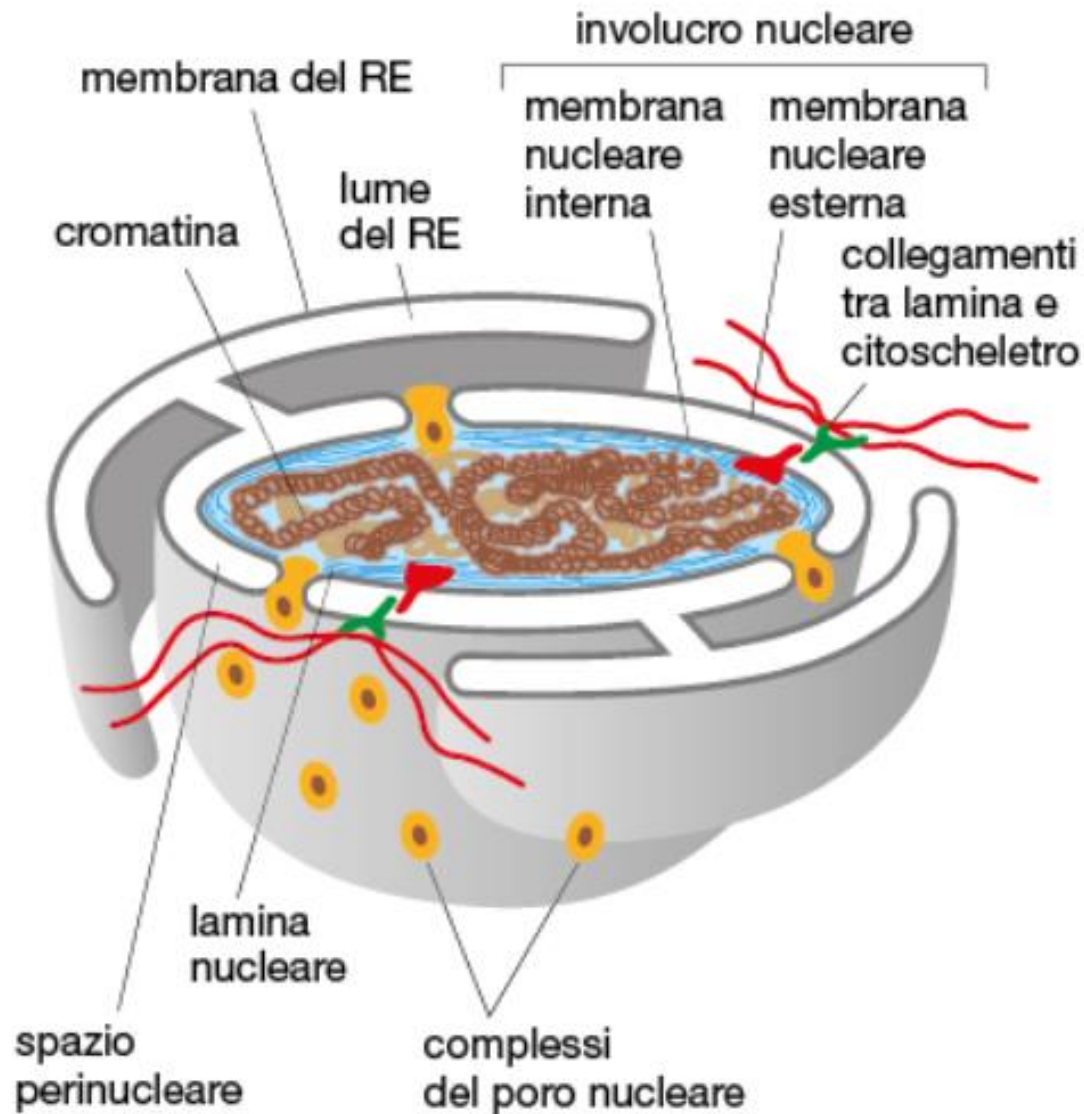


Involucro Nucleare o Carioteca

- ❖ **Delimita il nucleo: doppia membrana (esterna + interna), separate da spazio perinucleare (~30 nm).**
 - **Membrana esterna:** continua con il **reticolo endoplasmatico** e associata a **ribosomi**.
 - **Membrana interna:** rivolta verso nucleoplasma.
- ❖ **È in continuità con la cisterna del RER**



Involucro Nucleare o Carioteca

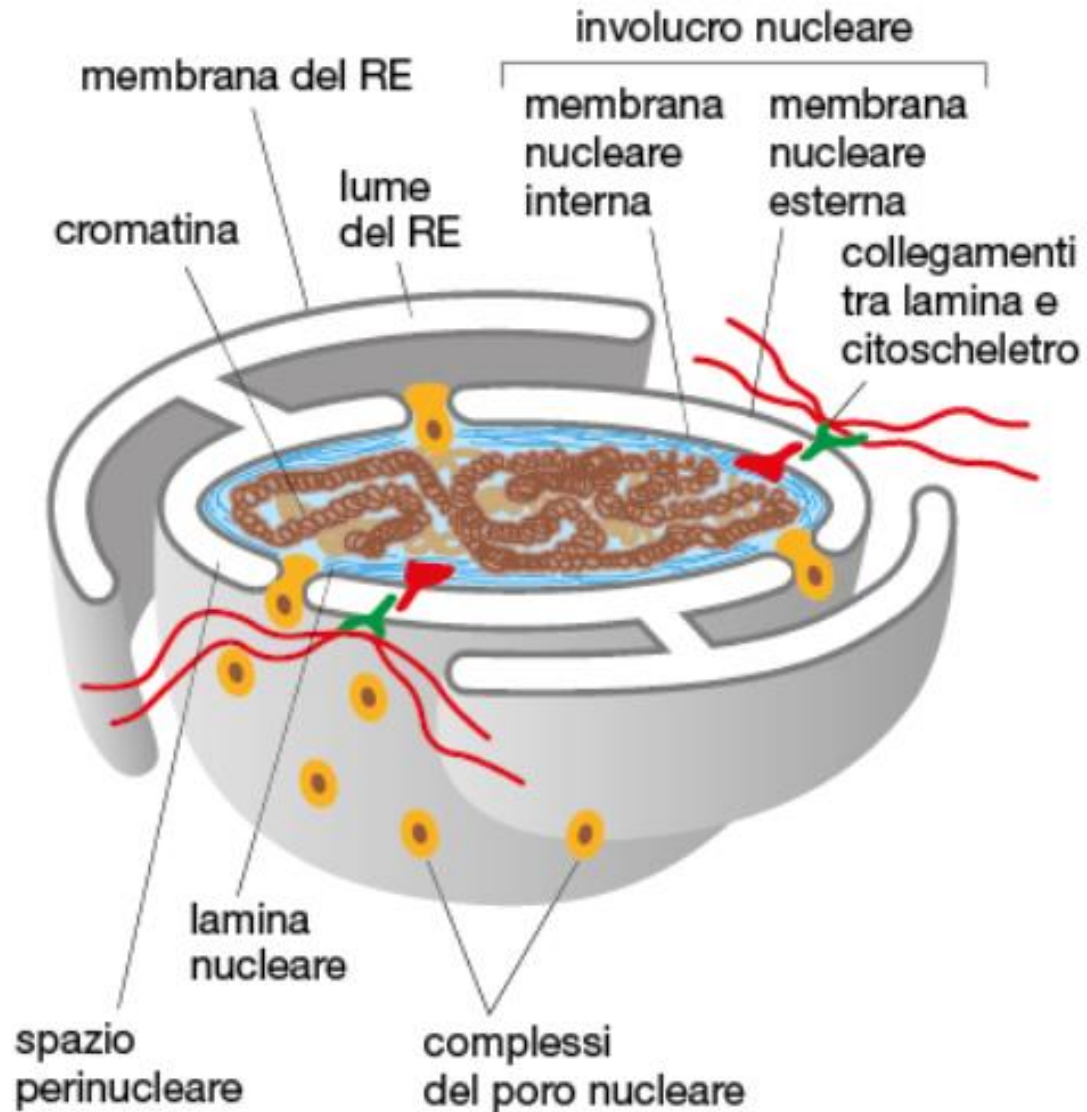


Nonostante siano **in continuità**, le due membrane hanno **composizioni proteiche distinte**.

Membrana nucleare interna

- **Contiene proteine specifiche** che:
 - Servono da **siti di attacco** per la **lamina nucleare**.
 - Consentono **ancoraggio** ai **cromosomi** e ai **complessi dei pori nucleari**.
- **Lamina nucleare:**
 - **Reticolo di subunità proteiche polimerizzate**.
 - **Formata da lamine**, membri dei **filamenti intermedi** del citoscheletro.
 - Funzioni: **supporto strutturale**, **collegamento con DNA e pori nucleari**.
- **Collega DNA ↔ involucro nucleare ↔ citoscheletro** tramite complessi proteici transmembrana.

Involucro Nucleare o Carioteca

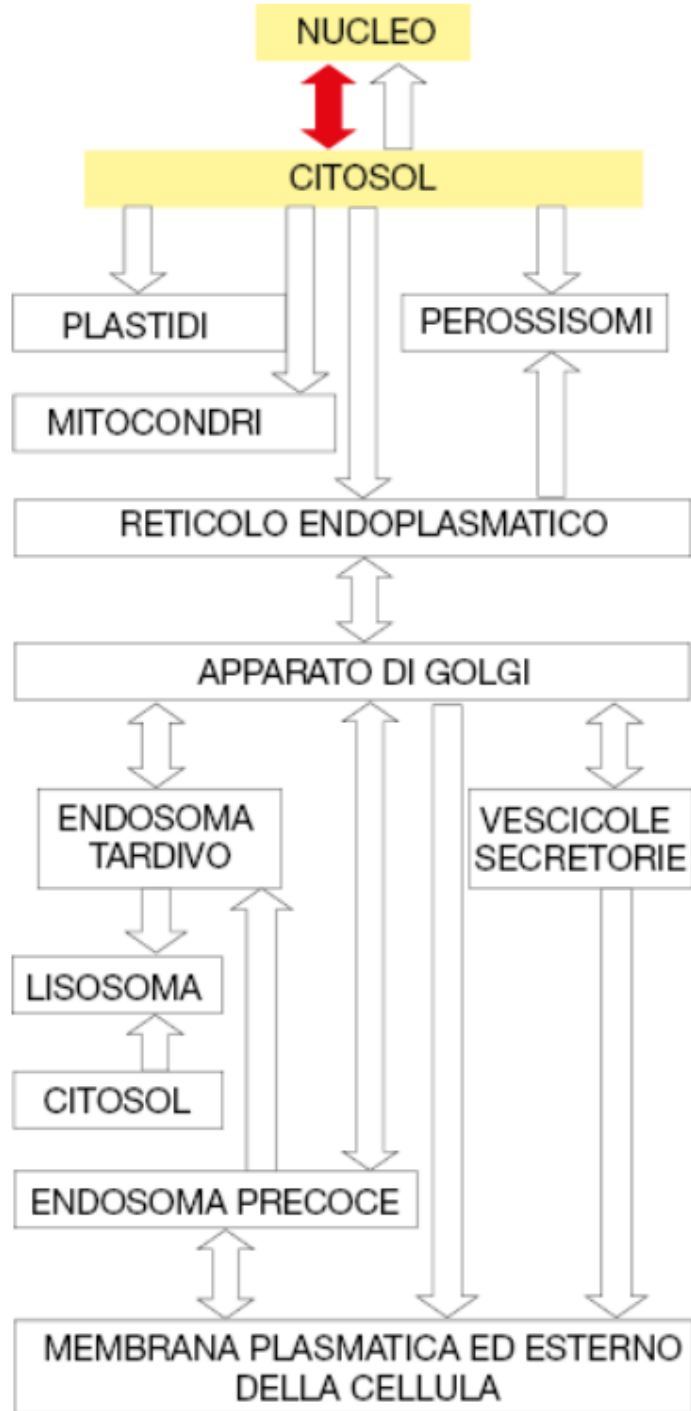


Nonostante siano **in continuità**, le due membrane hanno **composizioni proteiche distinte**.

Membrana nucleare esterna

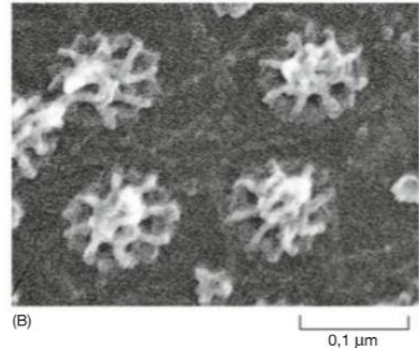
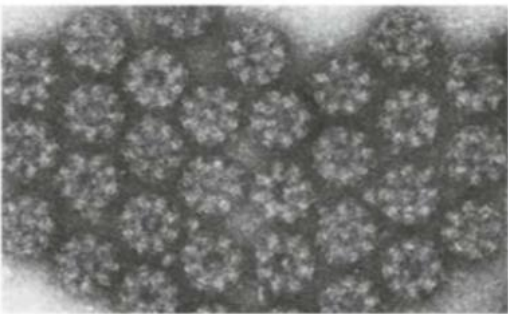
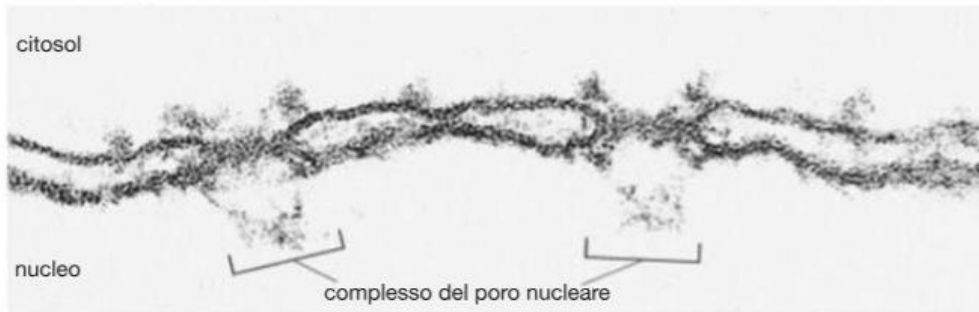
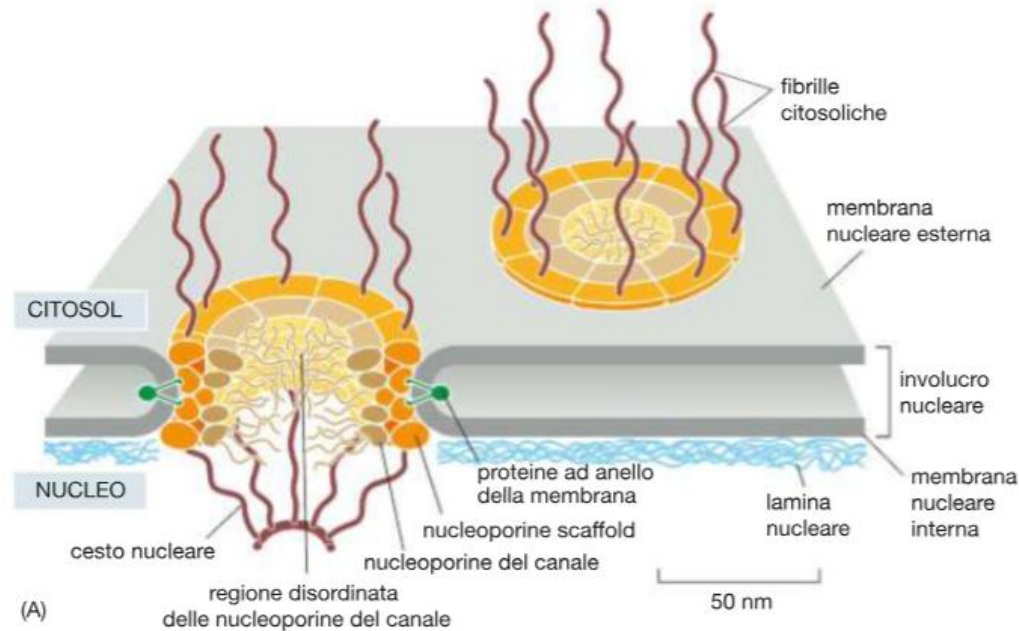
- **In continuità** con la **membrana del reticolo endoplasmatico (RE)**.
- **Costellata** di **ribosomi** attivi nella **sintesi proteica**.
- Le **proteine sintetizzate** sono **trasportate** nello **spazio perinucleare**.
- **Spazio perinucleare:**
 - Situato **tra le due membrane** nucleari.
 - **In continuità** con il **lume del RE**.

Traffico nucleare: import ed export



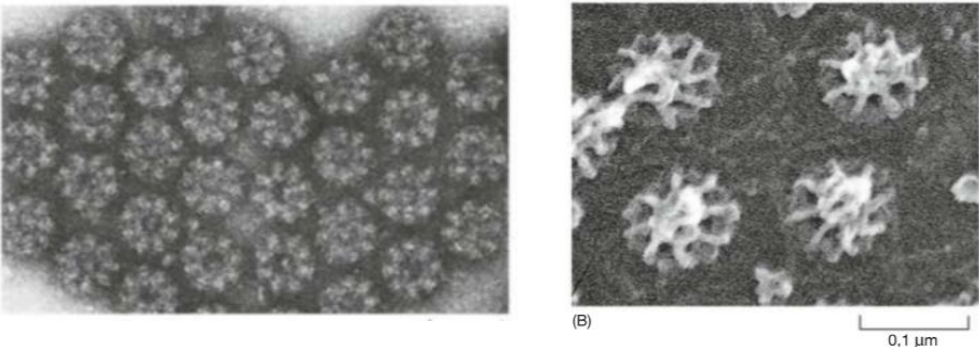
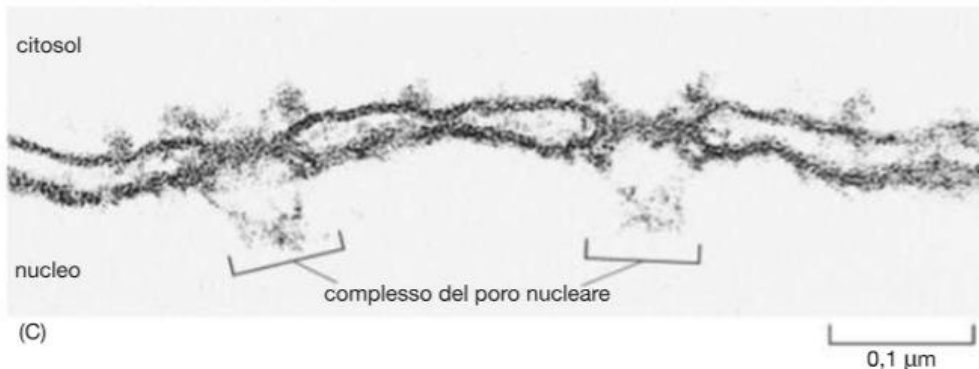
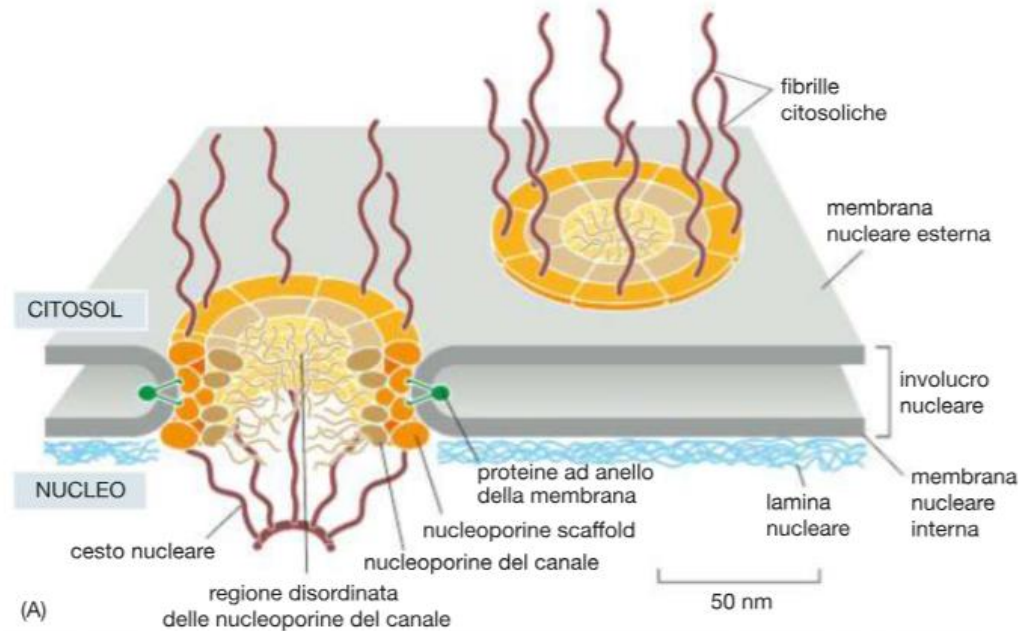
- I pori nucleari gestiscono un **traffico bidirezionale massiccio**.
- **Importazione selettiva** dal citosol → nucleo:
 - Istone.
 - DNA/RNA polimerasi.
 - Fattori di trascrizione.
 - Proteine di processamento dell'RNA.
- **Esportazione selettiva** dal nucleo → citosol:
 - mRNA, rRNA, tRNA, miRNA.
 - Solo se opportunamente **processati e modificati**.
- **Assemblaggi complessi (es. ribosomi)** richiedono **più passaggi di trasporto**.

Complessi dei Pori Nucleari (NPC)



- Strutture giganti che **attraversano l'involucro nucleare**.
 - Ogni NPC composto da ~**30 nucleoporine** diverse **presenti in multiple copie** per formare una struttura simmetrica (**simmetria rotazionale ottupla**)
 - NPC assemblato: **500–1000 copie proteiche**.
 - Massa totale: ~66 MDa (lievito), ~125 MDa (vertebrati).
 - Nucleoporine evolute da **uplicazioni geniche (domini proteici ripetuti)**.
-
- Tipi di nucleoporine:
 - **Transmembrana**: ancorano NPC all'involucro.
 - **Scaffold**: formano gli anelli e stabilizzano curvature.
 - **Canale**: rivestono il poro centrale.
 - Possibile origine comune da **una proteina ancestrale** che **modellava la membrana**.

Complessi dei Pori Nucleari (NPC)



Architettura e visualizzazione degli NPC

- **Simmetria circolare** a base otto.
- **Simmetria trasversale doppia del core.**
- **Fibrille citosoliche e fibrille nucleari** (queste ultime formano un **cesto distale**).

Fibrille nucleoporine

- Fibrille sporgono da entrambi i lati dell'NPC:
 - **Lato citosolico:** fibrille **disposte radialmente**.
 - **Lato nucleare:** fibrille **convergono distalmente** formando un **cesto**.
- **Differenze strutturali spiegano la regolazione asimmetrica tra import e export.**

- **Capacità di trasporto:** fino a **1000 macromolecole/sec**, in entrambe le direzioni.
- **Diametro interno** ≈ 40 nm $\rightarrow$ abbastanza grandi da consentire il passaggio di subunità ribosomiali e particelle virali.

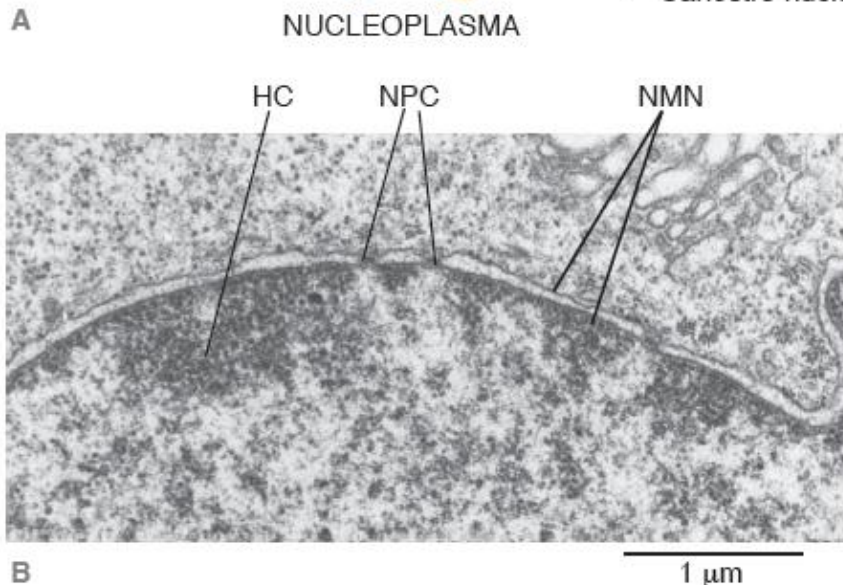
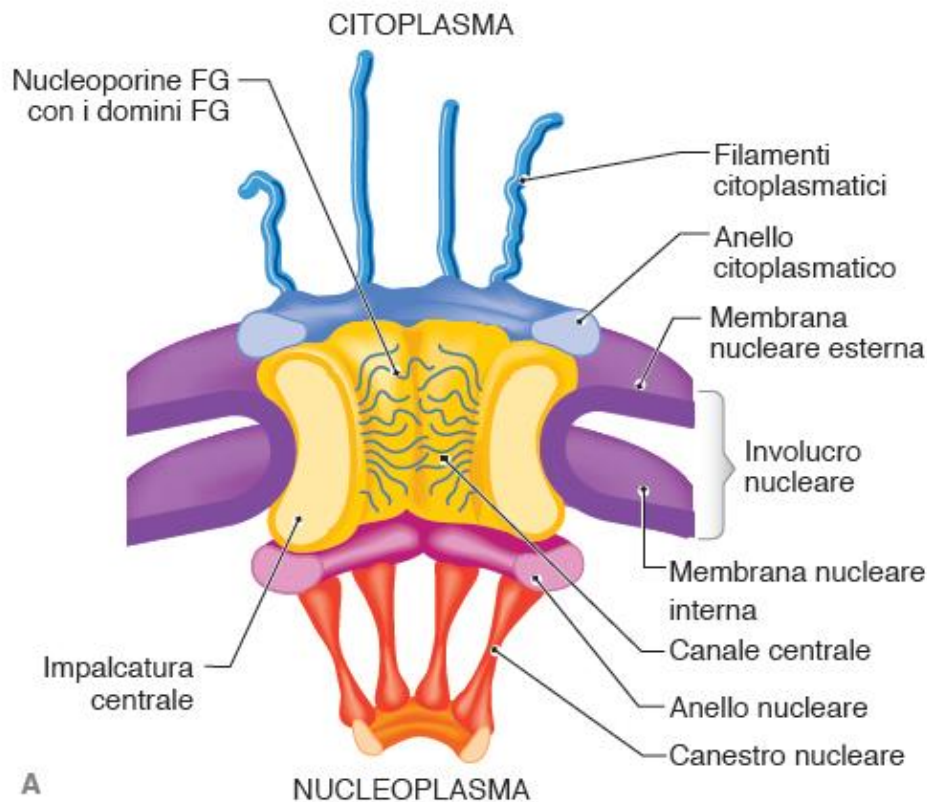
Complessi dei Pori Nucleari (NPC)

Filtro selettivo degli NPC

- Il poro centrale non è vuoto: riempito da **regioni proteiche non strutturate**.
- **Nucleoporine del canale** contengono motivi **FG (fenilalanina-glicina)** ripetuti.
- **Formano** una rete tipo **gel**:
 - **Permette** il passaggio di molecole piccole (< 5 kDa).
 - **Ostacola** macromolecole > 40 kDa o > 5 nm

Conseguenze del setaccio NPC

- **Piccole molecole** diffondono liberamente.
- **Macromolecole grandi** → richiedono trasporto mediato da recettori.
- Esempi:
 - DNA/RNA polimerasi (100–200 kDa).
 - Istoni (piccoli, ma usano recettori per efficienza).
 - Subunità ribosomiali (30 nm) → trasporto attivo.
- Risultato: **nucleo e citosol** mantengono **composizioni proteiche distinte**.



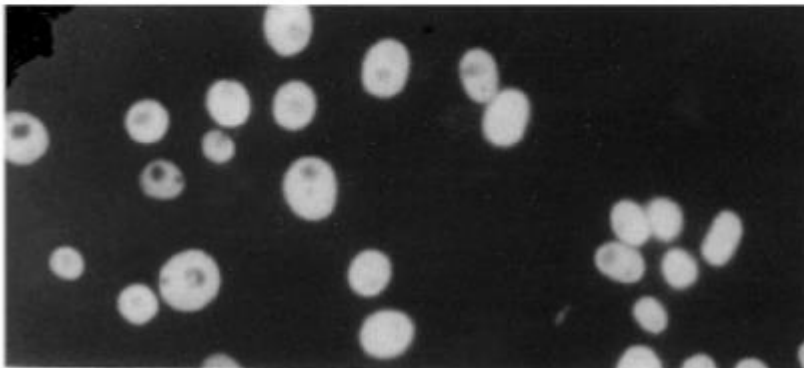
I Segnali di Localizzazione Nucleare

- Sequenze ricche di **lisina e arginina** (cariche **positive**).
- Possono consistere in **una o due brevi sequenze**.
- La **sequenza esatta varia** tra proteine diverse.
- Gli **NLS possono trovarsi in qualunque punto** della proteina.
- **Alcuni segnali NLS non** sono stati **ancora caratterizzati**.

- Gli NLS **tendono a formare anse/zoni superficiali** accessibili al riconoscimento.
- **Se un complesso** multiproteico ha anche **una sola subunità con NLS** → **l'intero complesso** può essere **importato**.
- **Gli NLS sono** quindi **necessari e sufficienti** per l'import nucleare.

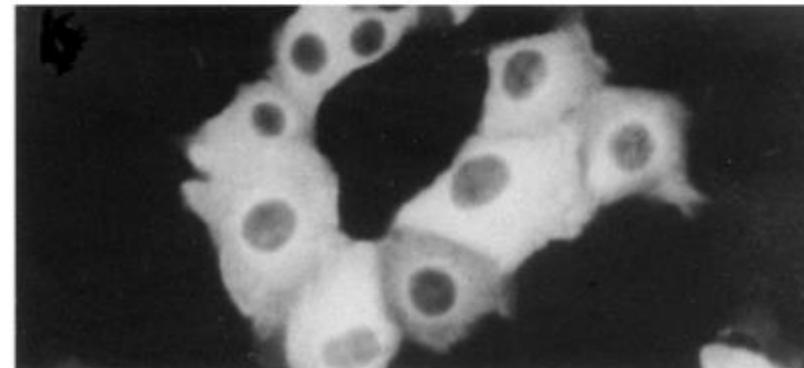
(A) LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE T CONTENENTE IL SUO NORMALE SEGNALE DI IMPORTAZIONE NUCLEARE

Pro — Pro — Lys — Lys — Lys — Arg — Lys — Val —

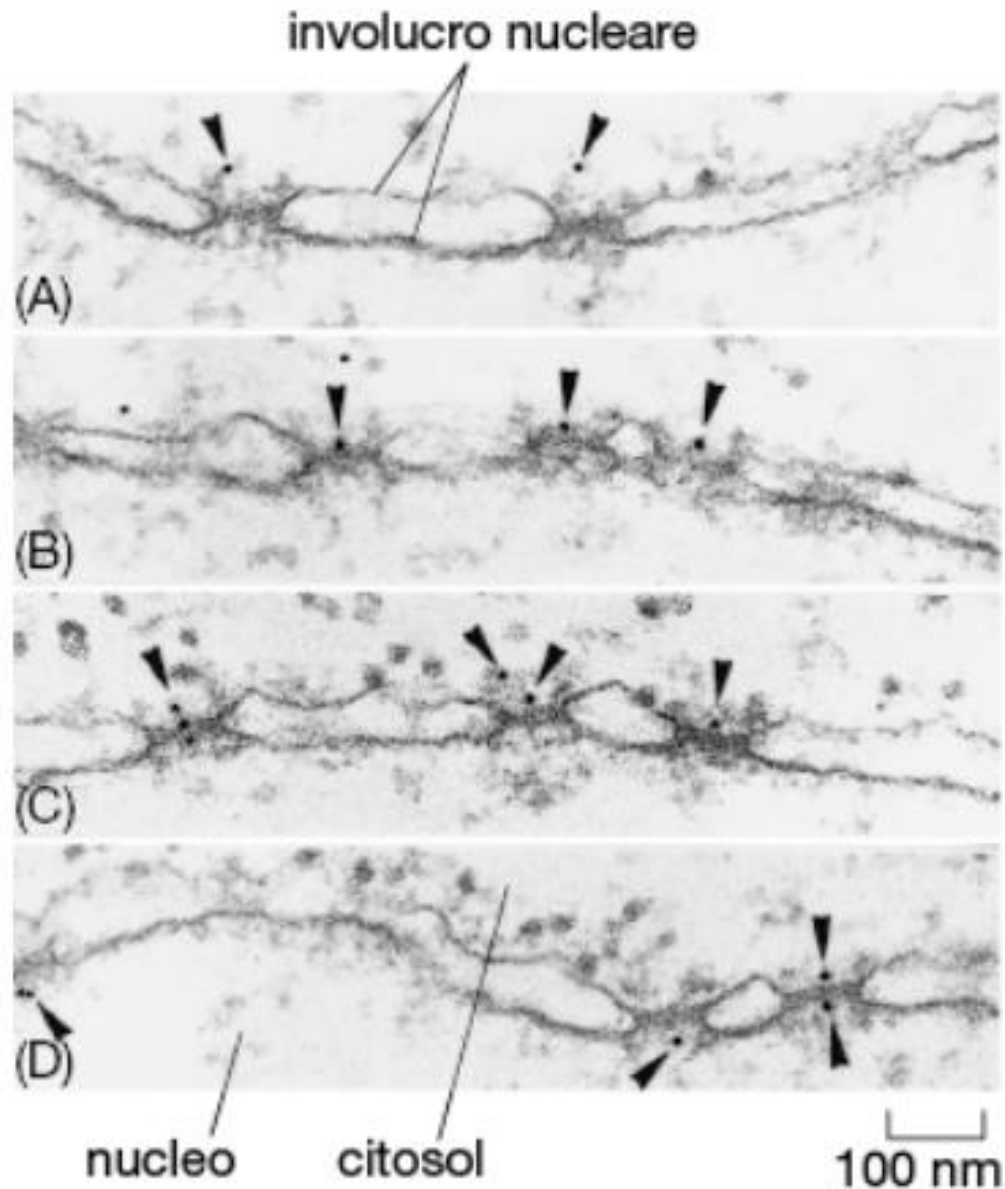


(B) LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE T CONTENENTE UN SEGNALE DI IMPORTAZIONE NUCLEARE MUTATO

Pro — Pro — Lys — Thr — Lys — Arg — Lys — Val —



Trasporto Attraverso NPC vs altri Organuli



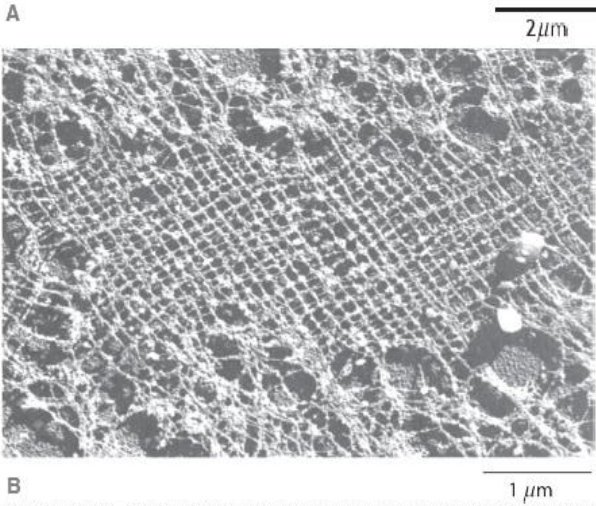
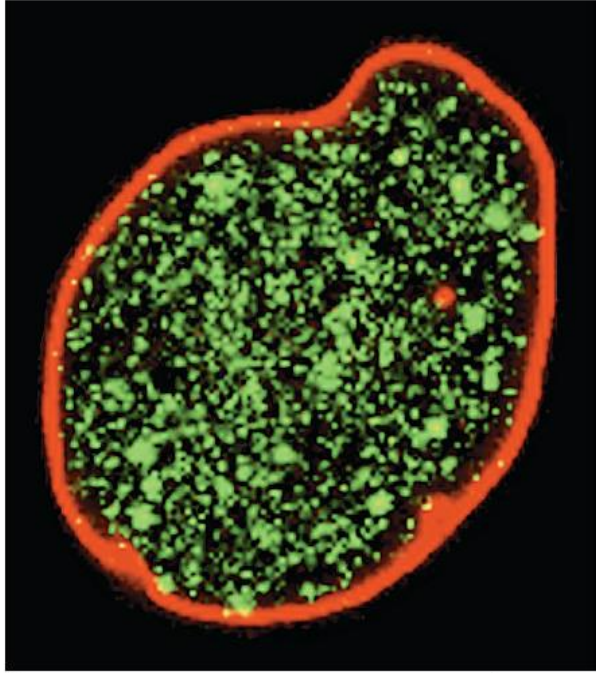
NPC: poro **largo**, **sempre aperto**, con maglia disordinata.

- Permette passaggio di proteine **completamente ripiegate** e grandi complessi multiproteici.
- **Trasporto NPC = bidirezionale**

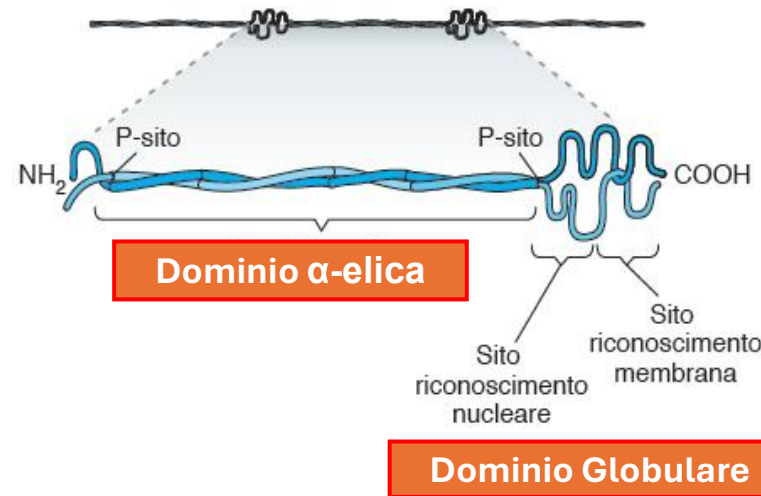
Traslocatori di RE/mitocondri/cloroplasti:

- **Porzione acquosa stretta**, normalmente **chiusa**.
- Richiedono **proteine srotolate** per attraversare.
- Trasporto **traslocatori = unidirezionali**

Lamina Nucleare



- ❖ La **lamina nucleare** è una sottile (**30 e 80 nm**) aderente alla membrana interna nucleare che garantisce **sostegno meccanico e forma** al nucleo
- ❖ **Ancoraggio per i cromosomi**, in particolare per i telomeri durante la meiosi.
- ❖ È composta da tre tipi principali di polipeptidi: **lamine A, B e C**.
 - **Lamine A e C**: simili ai **filamenti intermedi** del citoscheletro, formano dimeri che si aggregano in fibre di 10 nm.
 - **Lamina B**: strettamente ancorata alla membrana interna, fornisce stabilità al rivestimento nucleare.

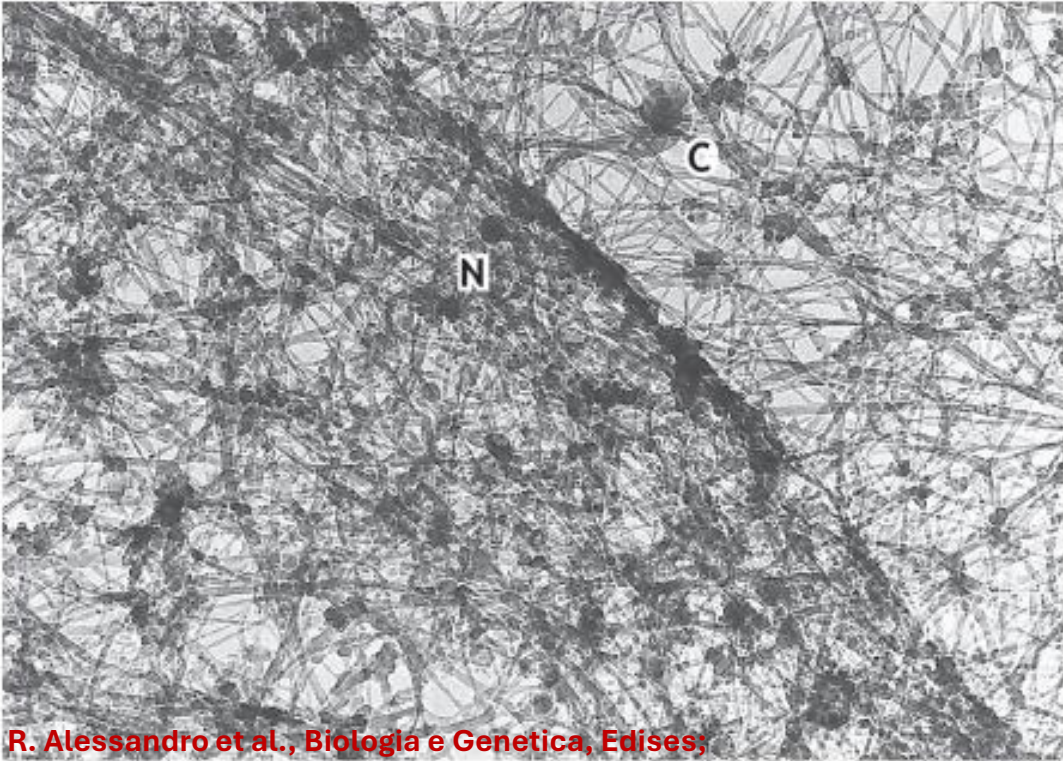


Struttura: un **dominio centrale ad α -elica** con **due domini globulari** terminali

Laminopatie:

- **Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD2)**
- **Progeria (HGPS)** → nuclei deformi e **invecchiamento precoce**, con morte in adolescenza.

Matrice Nucleare

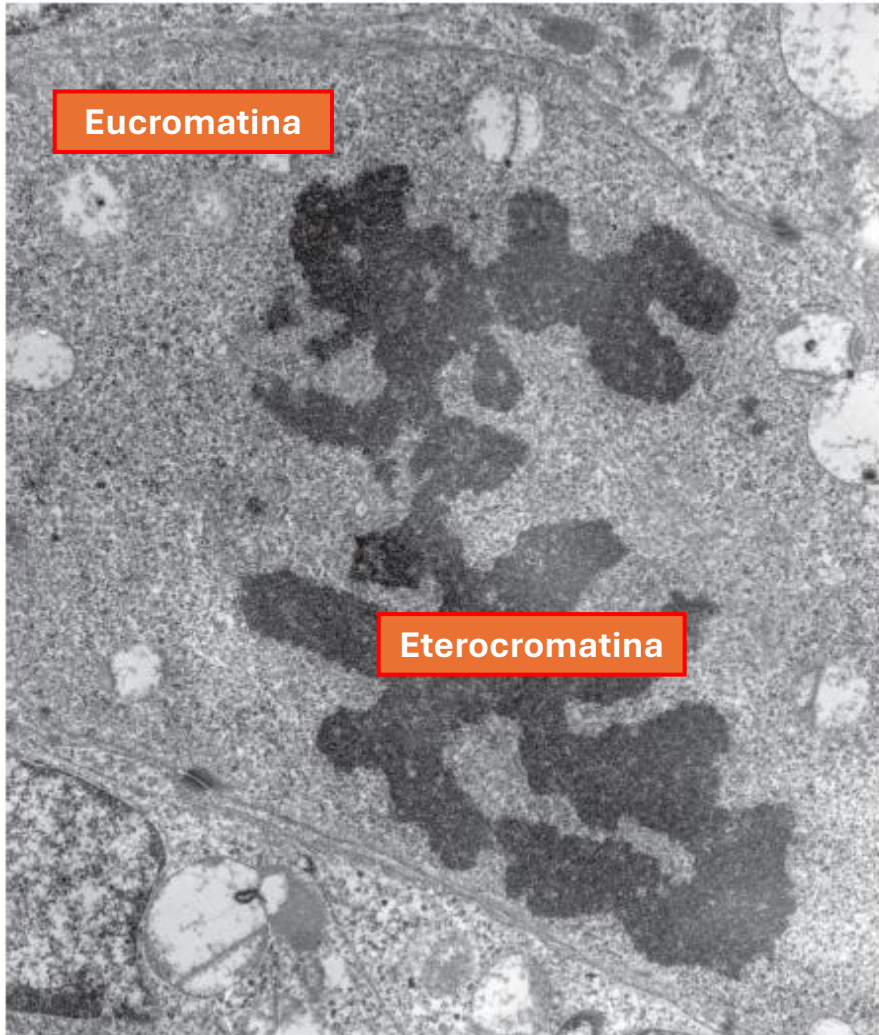


- La **matrice nucleare** è una rete fibro-granulare insolubile, spesso definita **nucleoscheletro**.
- Funziona come una vera e propria **impalcatura interna** che stabilizza e organizza le componenti nucleari.
- È **strettamente associata alle fibre di cromatina** e a diversi complessi molecolari.

È un elemento essenziale per collegare la **struttura fisica** del nucleo ai suoi **processi funzionali fondamentali**.

1. **Mantiene la disposizione ordinata della cromatina.**
2. **Siti di ancoraggio** a complessi enzimatici coinvolti in duplicazione e trascrizione
3. **DNA e l'RNA neo-sintetizzati restano associati** alle fibrille della matrice.

Cromatina e Cromosomi



R. Alessandro et al., Biologia e Genetica, Edises;

- ❖ Negli **eucarioti**: DNA contenuto nel **nucleo**, suddiviso in più molecole: i cromosomi (si chiamano così perché si colorano intensamente con i coloranti basici)
- ❖ Ogni specie possiede un **numero caratteristico di cromosomi**.
- ❖ Nelle cellule **non in divisione**, il **DNA non è condensato** ma è in forma **rilassata e distesa**: questa forma prende il nome di **cromatina**.
- ❖ Il livello di **compattamento** varia in base allo stato funzionale della cellula. Esistono due forme principali:
 - **Eucromatina** → organizzazione **lassa**, poco compatta, **attiva** nella trascrizione.
 - **Eterocromatina** → molto **compatta**, scarsa attività trascrizionale.

Nucleolo

- ❖ Struttura **più evidente** del nucleo
- ❖ **Non è circondato da membrana** → è un **condensato macromolecolare**
- ❖ Proprietà di “**goccia liquida**” → **mantenute da deboli interazioni** proteina–RNA → assemblaggio per transizione di fase

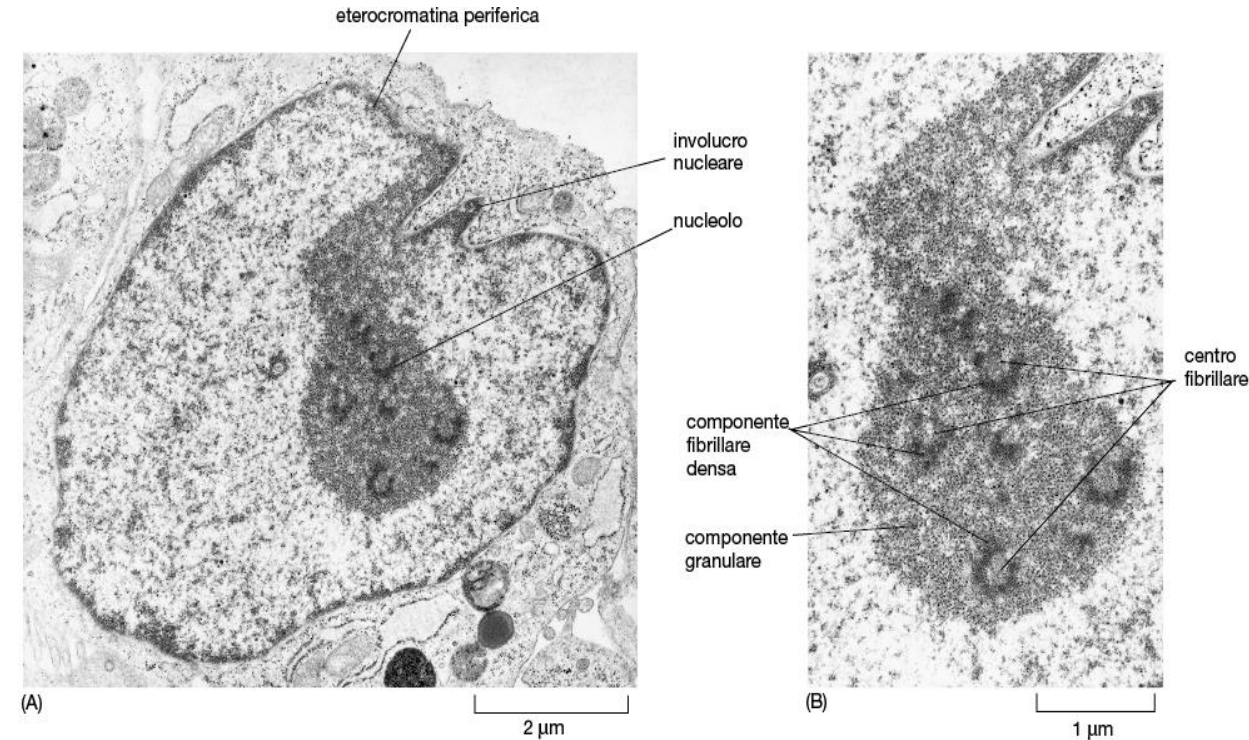
Contiene:

- geni per gli **rRNA** (DNA ribosomale, rDNA)
- **precursori e rRNA maturi**
- **proteine ribosomiali**
- enzimi di modifica (nucleasi, RNA elicasi, ATPasi)
- **snoRNP** (small nucleolar RNPs).

Non solo rRNA:

- Centro di **assemblaggio macromolecolare** (ribosomi, snoRNP, telomerasi).
- Importante anche per la **modificazione chimica degli RNA** (es. metilazioni, pseudouridilazioni).

Le sue **dimensioni** riflettono **l'attività biosintetica della cellula** → cellule che producono molte proteine hanno nucleoli molto grandi.



Regione fibrillare

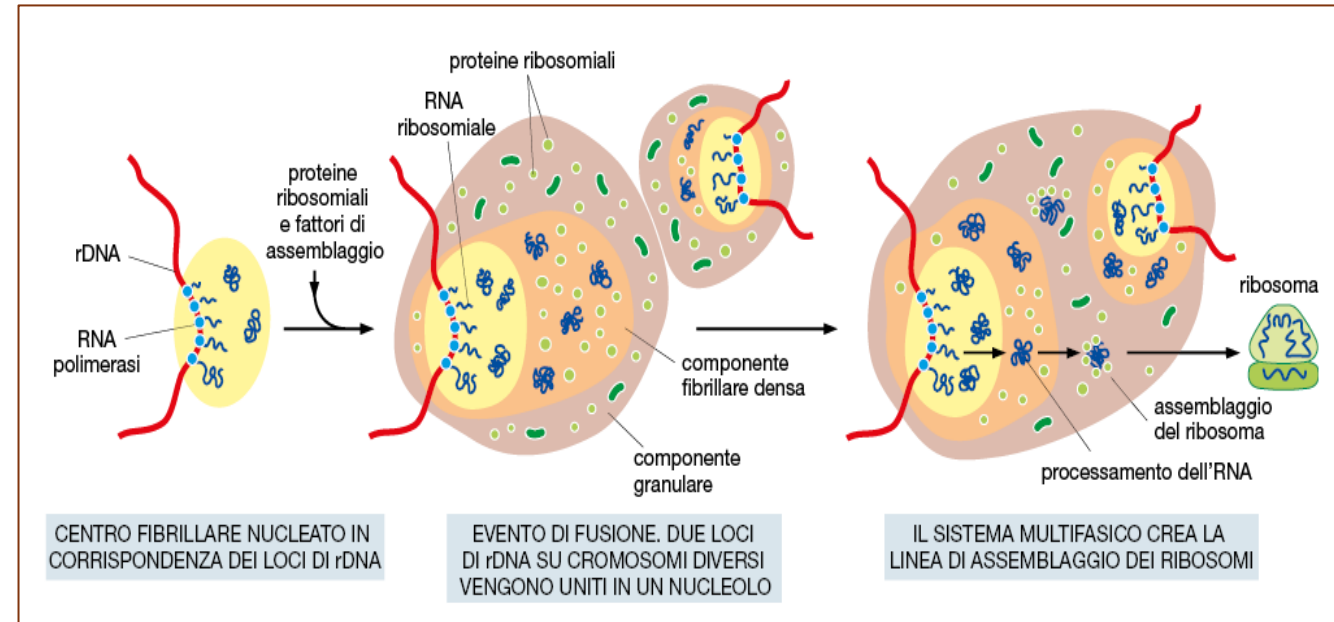
- ❖ Include i **centri fibrillari** → rDNA + RNA pol I + fattori di trascrizione.
- ❖ Cromatina parzialmente compattata → geni rRNA **attivi**.

Regione granulare

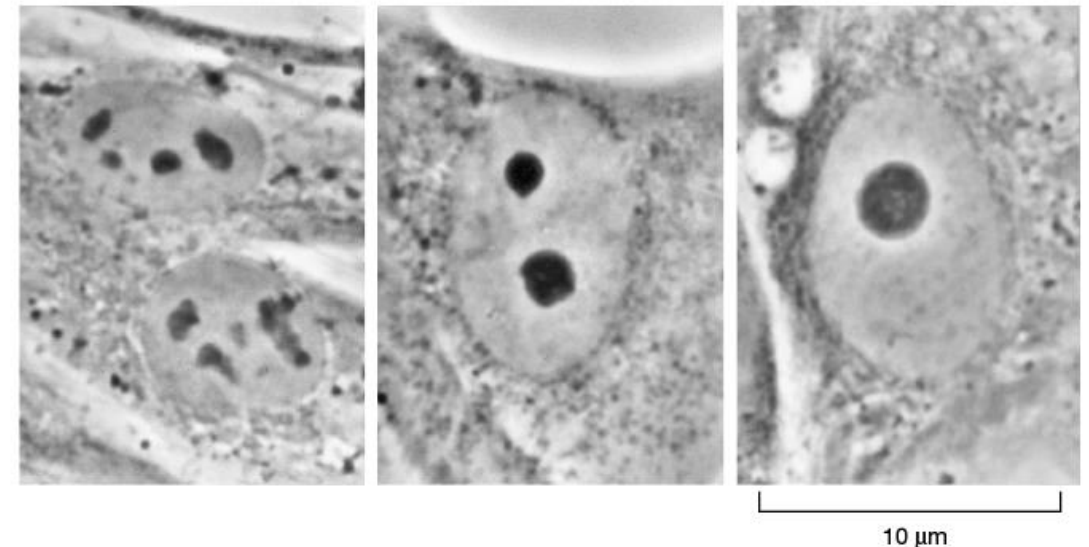
- ❖ Masse compatte di particelle ribosomiali (15–20 nm).
- ❖ Ribosomi in **diversi stadi di assemblaggio**.

Nucleolo

- I **geni per gli rRNA** sono organizzati in **unità ripetute in tandem** (testa-coda) su **5 coppie di cromosomi** acrocentrici (13, 14, 15, 21, 22).
- Queste regioni specifiche sono dette **NOR (Nucleolar Organizer Regions)** o **organizzatori nucleolari**.
- **Ogni unità → contiene le sequenze necessarie** per la sintesi di un precursore di rRNA.
- Questa organizzazione modulare permette una **produzione massiva di rRNA**.

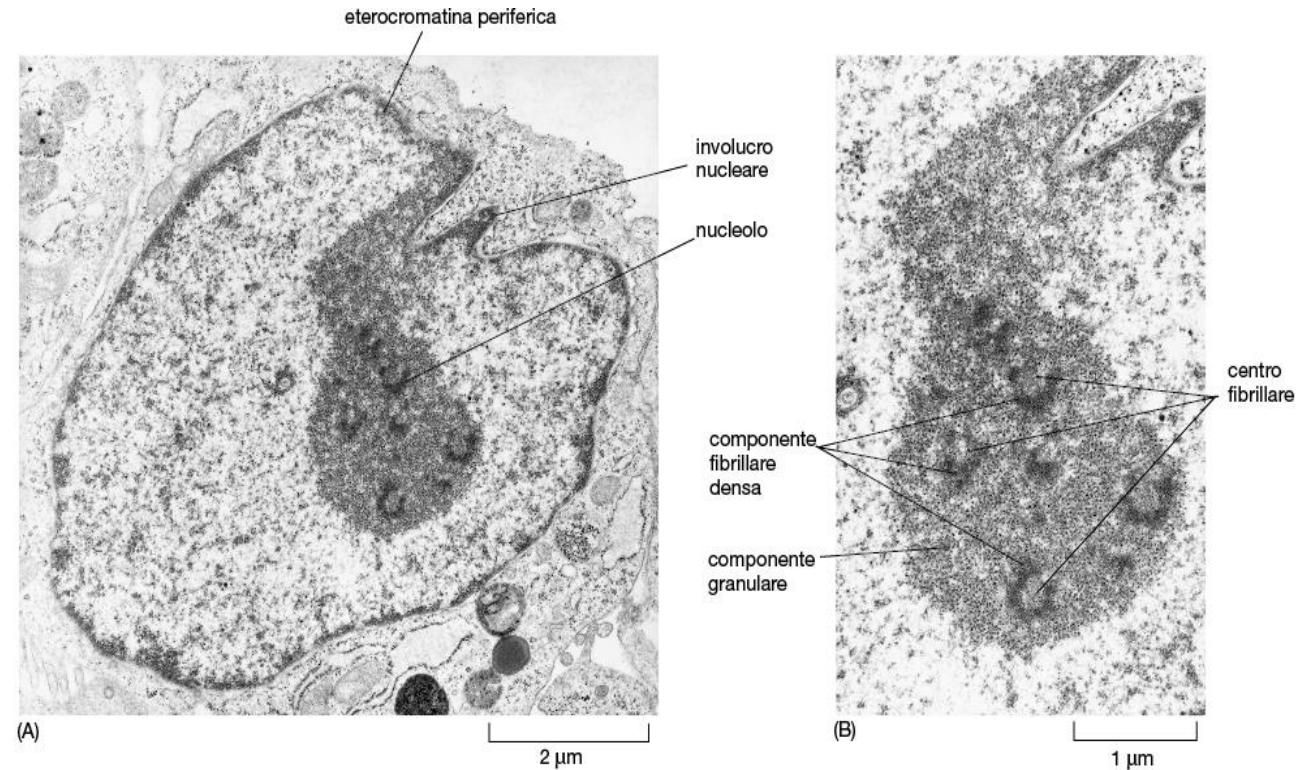


- Durante la **mitosi** → il **nucleolo si disgrega**.
- Alla fine della divisione → le **NOR** guidano la **riformazione di piccoli nucleoli**
- **Piccoli nucleoli si fondono**
- Le NOR sono quindi **essenziali per la ricostruzione del nucleolo** a ogni ciclo cellulare.
- Tutti gli eucarioti possiedono almeno un cromosoma con regione NOR



Condensati Biomolecolari: Il Nucleolo - il condensato “bandiera”

- **Nucleolo** = più grande condensato eucariotico; sede dell'**assemblaggio dei ribosomi**.
- **Scaffold principale: pre-rRNA nascente** trascritto da cluster di geni rRNA.
- Il pre-rRNA **recluta**: molte **proteine** e **snoRNA** per l'**elaborazione del pre-rRNA**.
- Ulteriore **reclutamento**: proteine scaffold aggiuntive + **clienti** (**proteine ribosomali**, **chaperonine** di assemblaggio, **enzimi di modifica**).
- **>400 proteine ed RNA contribuiscono** alla formazione e funzione del nucleolo.



Condensati Biomolecolari: Il Nucleolo - il condensato “bandiera”

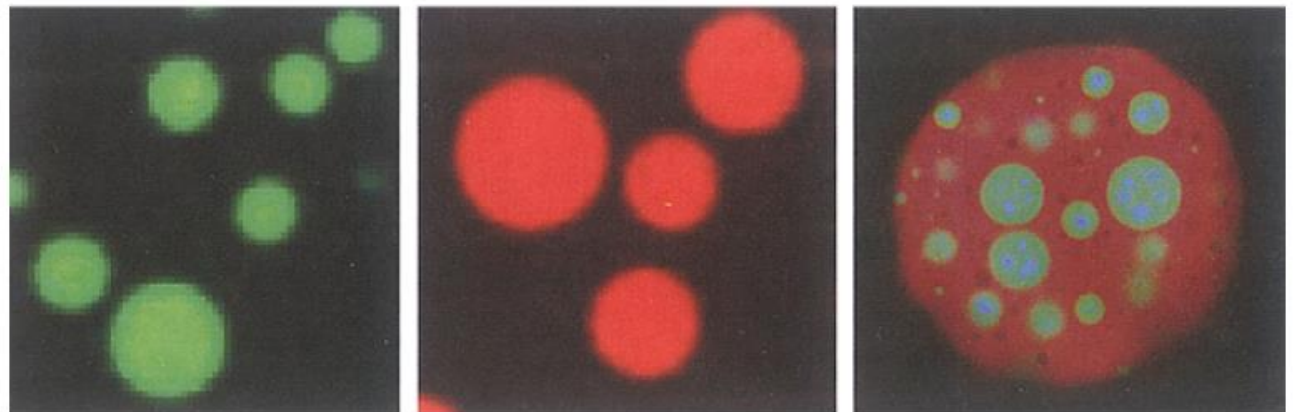
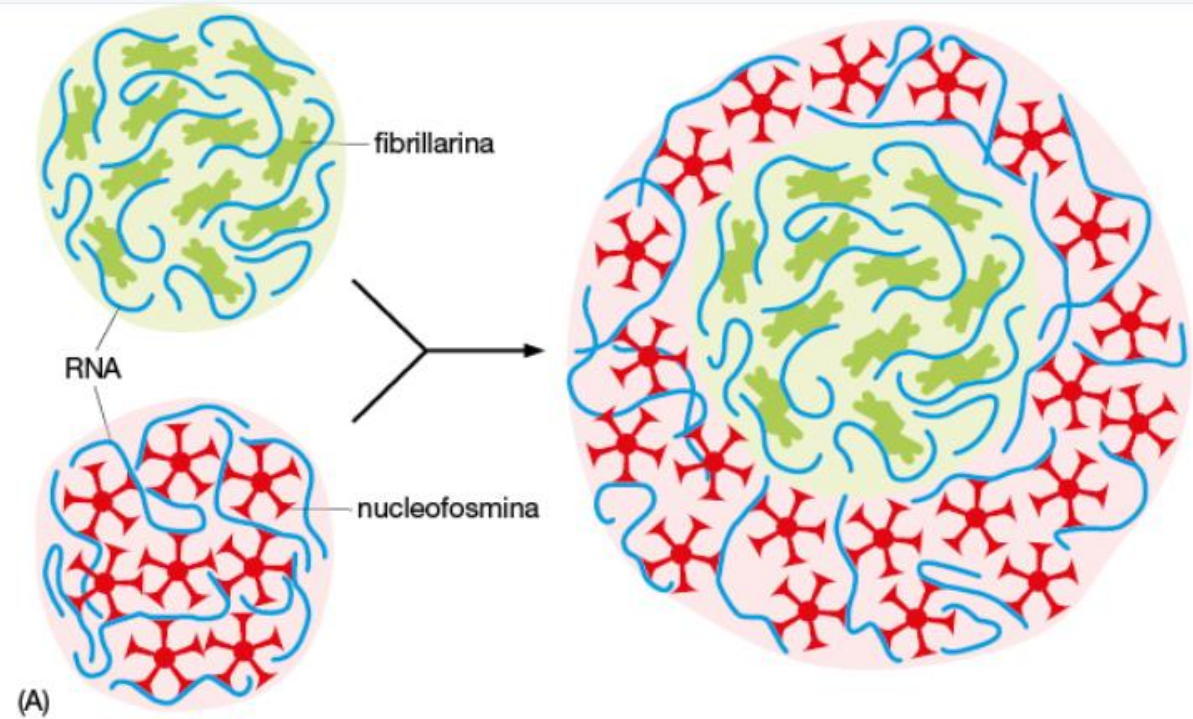
Il **nucleolo** è un **condensato** composto da **tre regioni morfologicamente e funzionalmente distinte, una dentro l'altra**, ciascuna formata da un diverso insieme di macromolecole scaffold.

Le **molecole scaffold** di due sottostrutture nucleolari:

- la **fibrillarina** dalla **componente fibrillare** del nucleolo;
- la **nucleofosmina** dalla sua **componente granulare**.

Entrambe queste proteine scaffold **contengono siti di legame per l'RNA** e, quando vengono mescolate con l'RNA in una provetta, ciascuna proteina scaffold purificata si **assembla in un condensato RNA-proteina**,

Tuttavia, **quando vengono mescolate insieme formano una struttura multistrato** in cui un tipo di condensato è racchiuso all'interno dell'altro tipo di condensato



Nucleoplasma ed Altre Strutture del Nucleo

Il **nucleo** contiene diversi **compartimenti privi di membrana**.

- Sono strutture **dinamiche** →
- **concentrare RNA e proteine specifiche** →
- **aumentare velocità ed efficienza dei processi nucleari**.

Principali esempi:

- **Corpi di Cajal** → **Maturazione** finale di **snRNP** e **snoRNP**
→ **Riciclo** degli **snRNP** usati nello **splicing**
- **Speckles (granuli intercromatinici)** → Fattori **modifica dell'RNA**
→ “**depositi pronti all'uso**” di **snRNP** mature
- “**Fabbriche di trascrizione**” → **condensati locali di splicing e trascrizione**

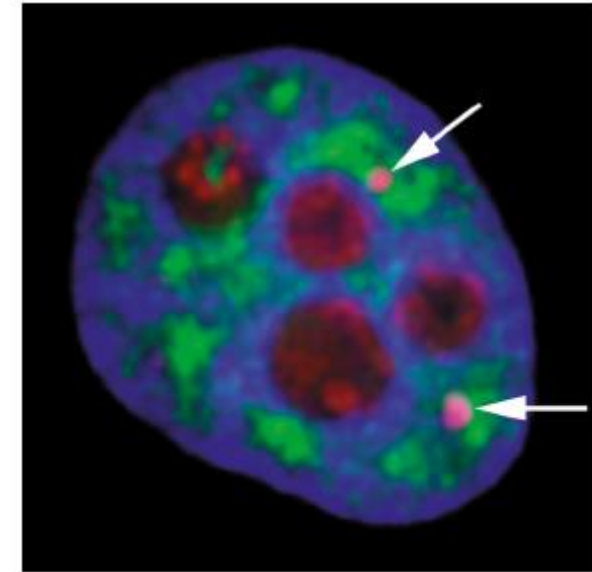
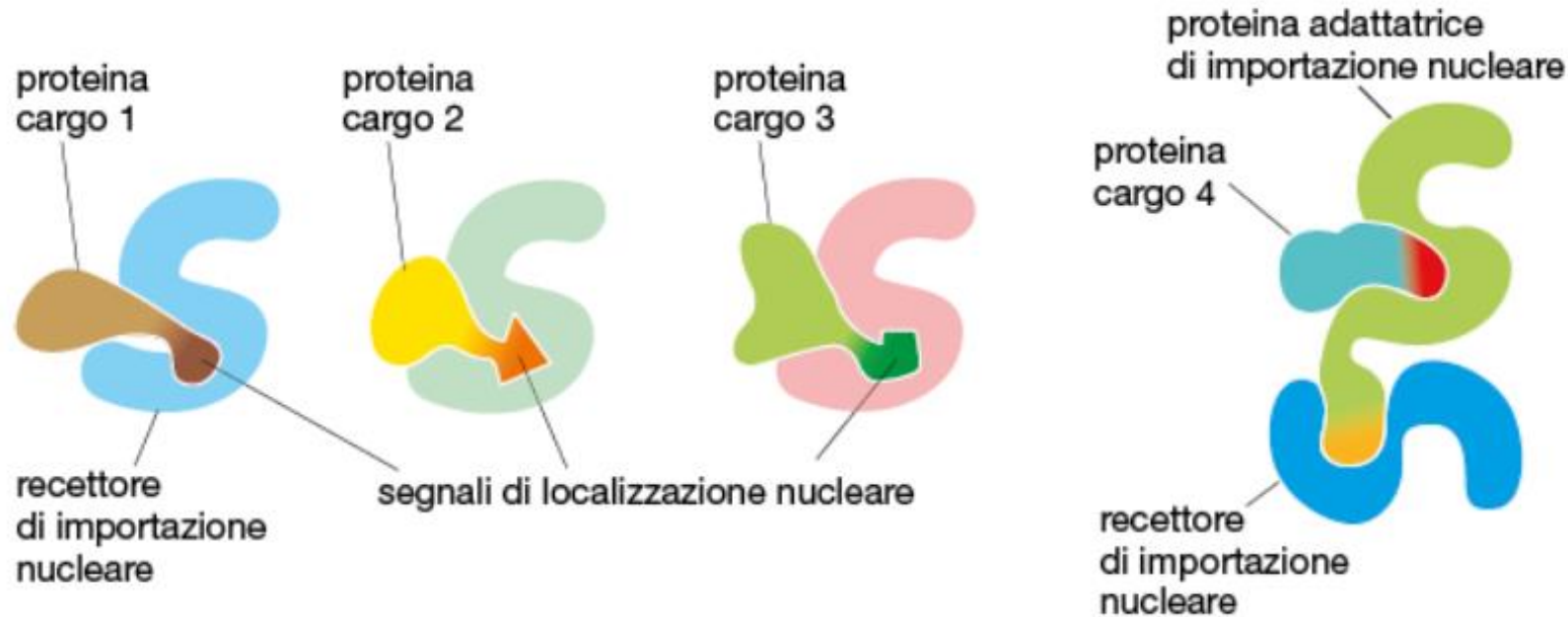


Figura 6.50 Visualizzazione di alcuni importanti compartimenti senza membrana nel nucleo. La proteina fibrillarina (rossa), un componente di parecchie snoRNP, è presente sia nei nucleoli sia nei corpi di Cajal, questi ultimi indicati da frecce. I corpi di Cajal (ma non i nucleoli) sono evidenziati anche mediante colorazione di uno dei loro componenti principali, la proteina coilina. La sovrapposizione delle colorazioni delle snoRNP e della coilina risulta di colore rosa. I gruppi di granuli intercromatinici (verdi) sono stati rilevati usando anticorpi contro una proteina coinvolta nello splicing del pre-mRNA. Il DNA è colorato in blu mediante colorante DAPI. [Da Swedlow, J.R. e Lamond, A.I. *Genome Biol.* **2**, 1-7 (2001). Micrografia per gentile concessione di Judith Sleeman.]

Recettori di Importazione Nucleare

- I **segnali di localizzazione nucleare (NLS)** sono riconosciuti da **carioferine**, una grande **famiglia di recettori di trasporto nucleare**.
 - **Recettori di importazione nucleare.**
 - **Recettori di esportazione nucleare.**
- Ogni recettore lega un **sottoinsieme di proteine cargo con NLS appropriati**.

- Alcuni recettori necessitano di **proteine adattatrici** per collegarsi al cargo. Le adattatrici **formano un ponte** tra il recettore e l'**NLS**.
- Alcune adattatrici sono **strutturalmente correlate** ai recettori stessi → possibile **origine evolutiva comune**.
- Insieme, **recettori + adattatori** permettono il riconoscimento di un **ampio repertorio di segnali nucleari**.

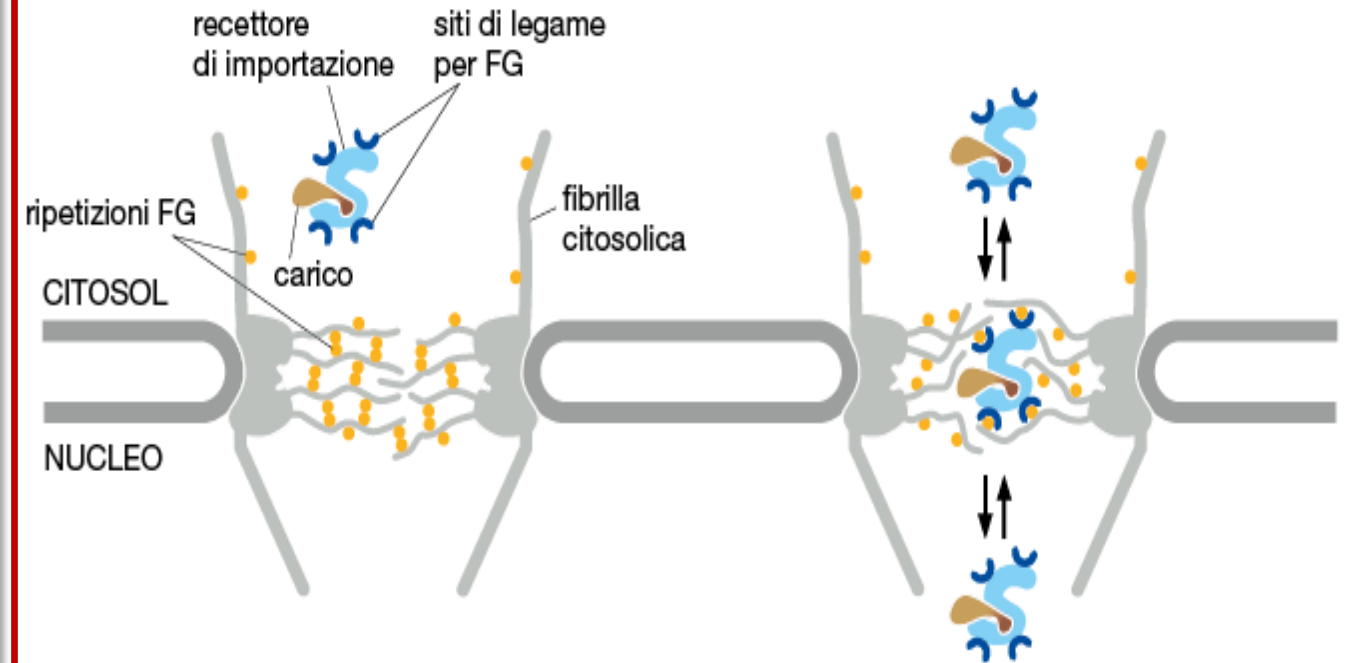


Interazioni con Ripetizioni FG – Direzionalità del Trasporto

Recettori hanno molti **siti di legame** a **bassa affinità** per **ripetizioni FG**.

- **Reclutamento iniziale:** interagiscono con le fibrille FG rivolte verso il citosol.
- **Attraversamento del poro:** legano e **allentano** localmente la rete di FG.
- **Diffusione facilitata:** **dissolvono momentaneamente la maglia** gelatinosa per permettere il passaggio.

Senza siti di legame FG → diffusione **molto lenta**.



- **La diffusione** mediata dal recettore **non è intrinsecamente direzionale**.
- La direzionalità deriva da:
 - **Dissociazione selettiva del carico** solo sul lato nucleare.
 - **Rilascio del cargo** → accumulo nel nucleo.
- **Dopo il rilascio, il recettore ritorna al citosol** per nuovi cicli di importazione.

Ran: una GTPasi come interruttore molecolare

Ran è una **GTPasi** che alterna due stati:

- **Ran-GTP** → conformazione attiva.
- **Ran-GDP** → conformazione inattiva.

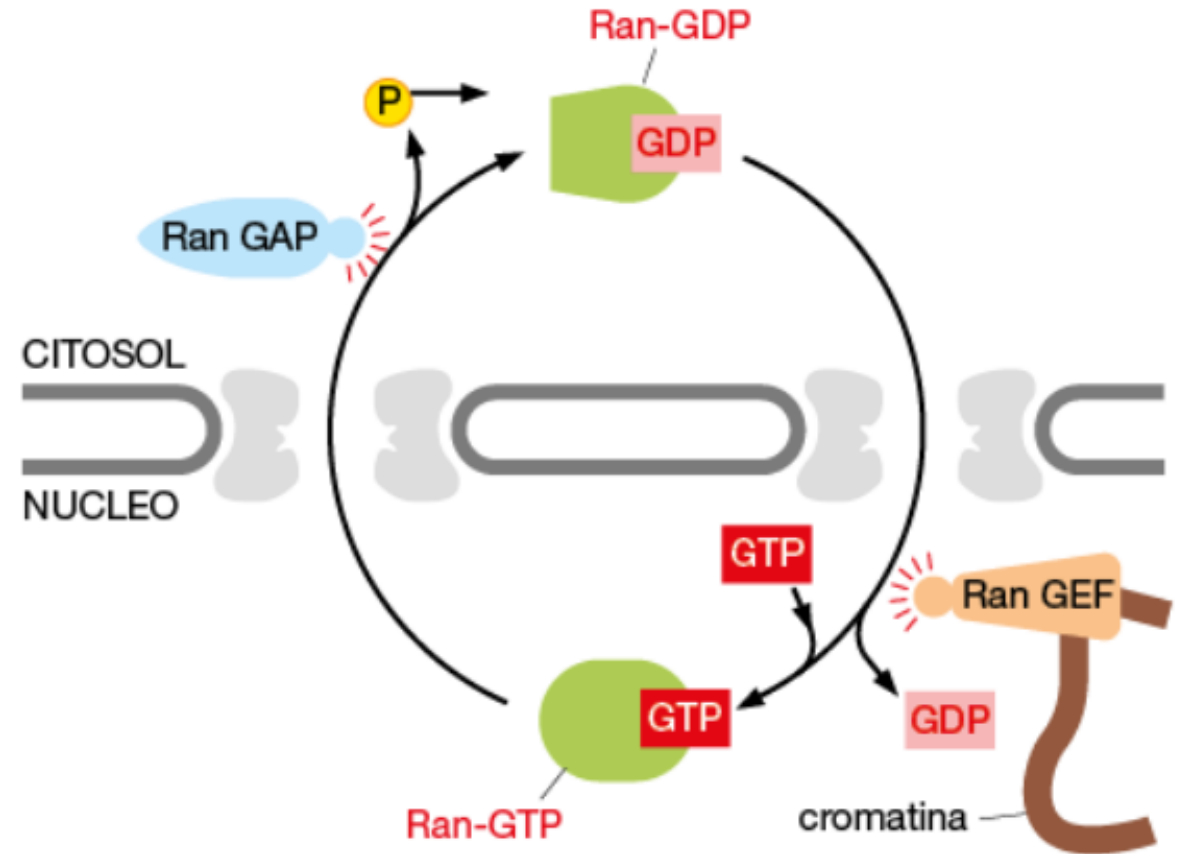
Conversione regolata da:

- **Ran-GAP** (**citoplasmatica**): stimola **idrolisi** $\text{GTP} \rightarrow \text{Ran-GDP}$.
- **Ran-GEF** (**nucleare**): promuove **scambio** $\text{GDP} \rightarrow \text{GTP} \rightarrow \text{Ran-GTP}$.

Gradiente Ran-GTP / Ran-GDP

- Distribuzione asimmetrica generata da Ran-GAP e Ran-GEF.
- **Citoplasma:** **Ran-GDP** – Legato a **citoscheletro**
- **Nucleo:** **Ran-GTP** – Legato a **cromatina**

Il gradiente crea una **forza direzionale** per il trasporto nucleare.



Meccanismo di Importazione Nucleare

Direzionalità dell'importazione nucleare

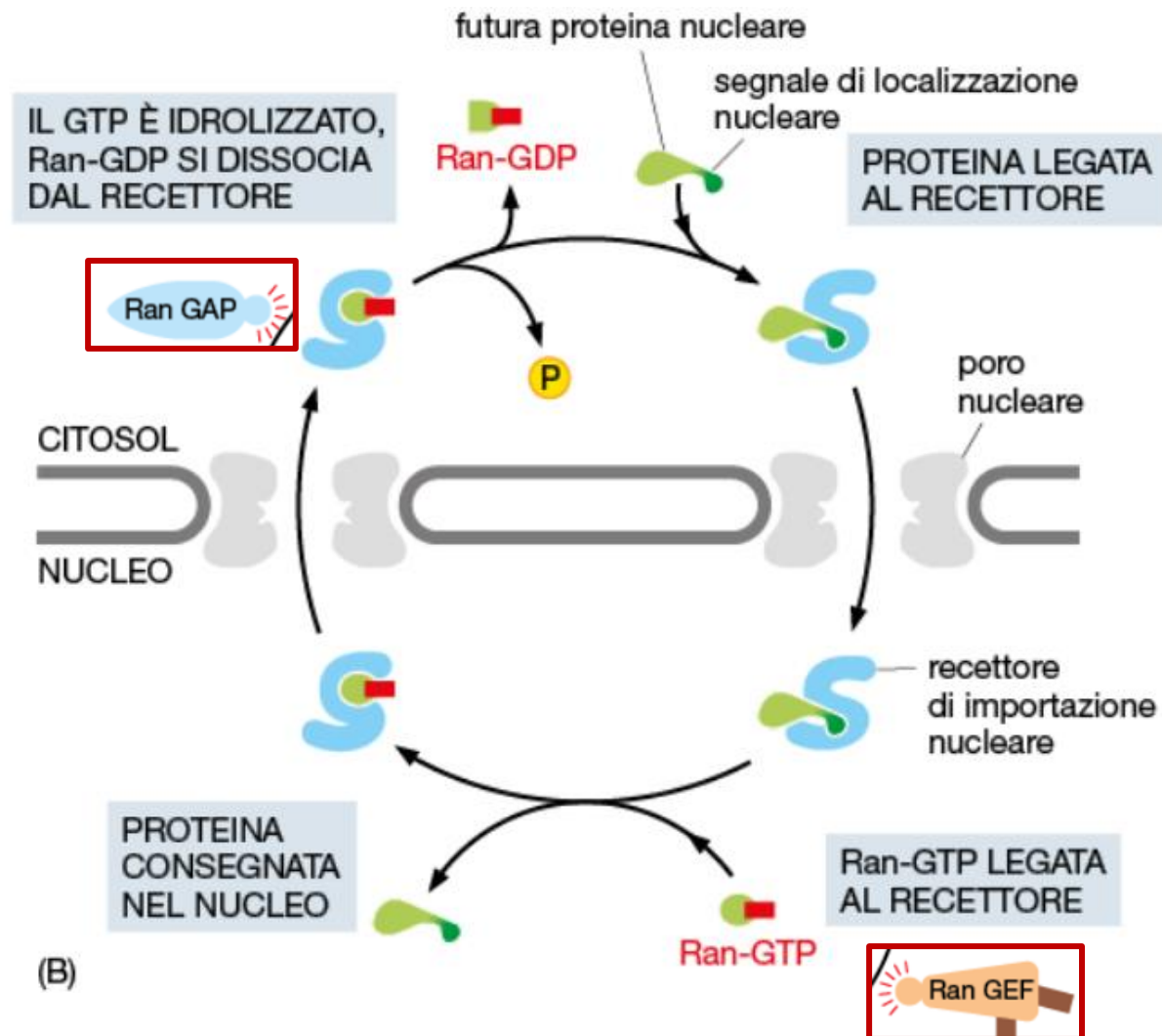
- Inizialmente, **Ran GTP** è legato al recettore (in assenza di cargo)
- L'idrolisi di **Ran-GTP** in **Ran-GDP** da parte di **Ran-GAP** libera il **sito di legame** del recettore per il cargo.
- **Recettore + cargo** diffondono **attraverso NPC** grazie a ripetizioni FG.
- **Lato nucleare: Ran-GEF** catalizza lo **scambio da Ran-GDP a Ran-GTP** che si lega al recettore → spiazzamento e **rilascio del cargo**.
- **Processo reso unidirezionale** dal gradiente Ran.

Riciclo dei recettori

Dopo rilascio del cargo:

- **Recettore + Ran-GTP** tornano al **citosol**.
- **Nel citosol: Ran-GAP** → idrolisi Ran-GTP → Ran-GDP.
- **Ran-GDP** perde affinità per il recettore → **recettore libero**.

Recettore pronto per nuovo ciclo di importazione.

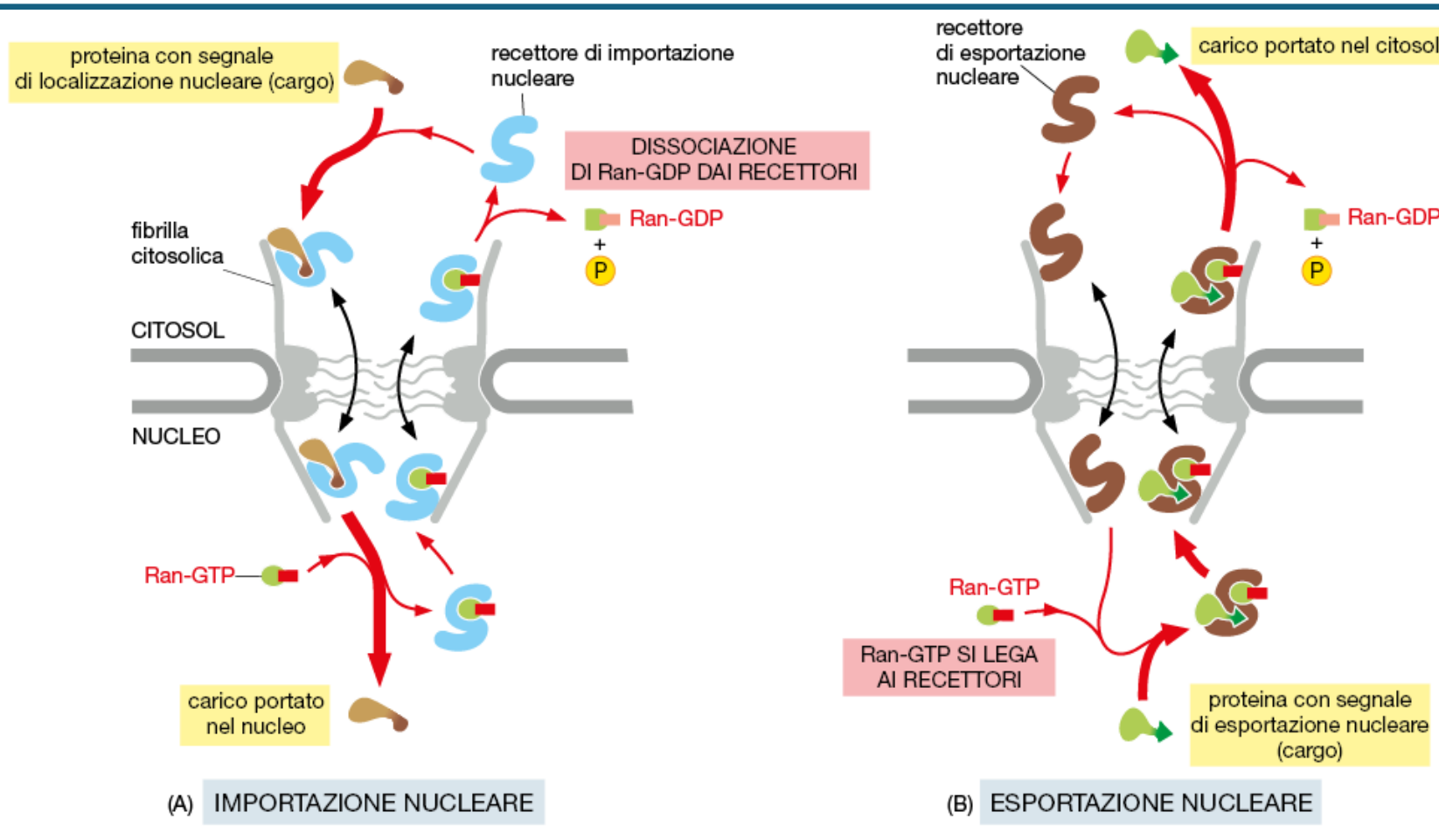


Meccanismo di Esportazione Nucleare

- **Stesso principio** dell'importazione ma **direzionalità opposta**.
- Sistema basato su **segnali di esportazione nucleare (NES)** presenti nei cargo.

I recettori di esportazione:

- Si legano al NES (direttamente o tramite adattatori).
- Interagiscono con le proteine dell'NPC.
- Guidano il cargo verso il citosol.



Ruolo della GTPasi Ran

Ran-GTP nel nucleo:

- Favorisce il **legame cargo-recettore** (opposto all'importazione).

Citoplasma:

- Ran-GAP induce idrolisi di Ran-GTP $\rightarrow$ Ran-GDP.
- Recettore cambia conformazione $\rightarrow$ rilascia cargo + Ran-GDP.

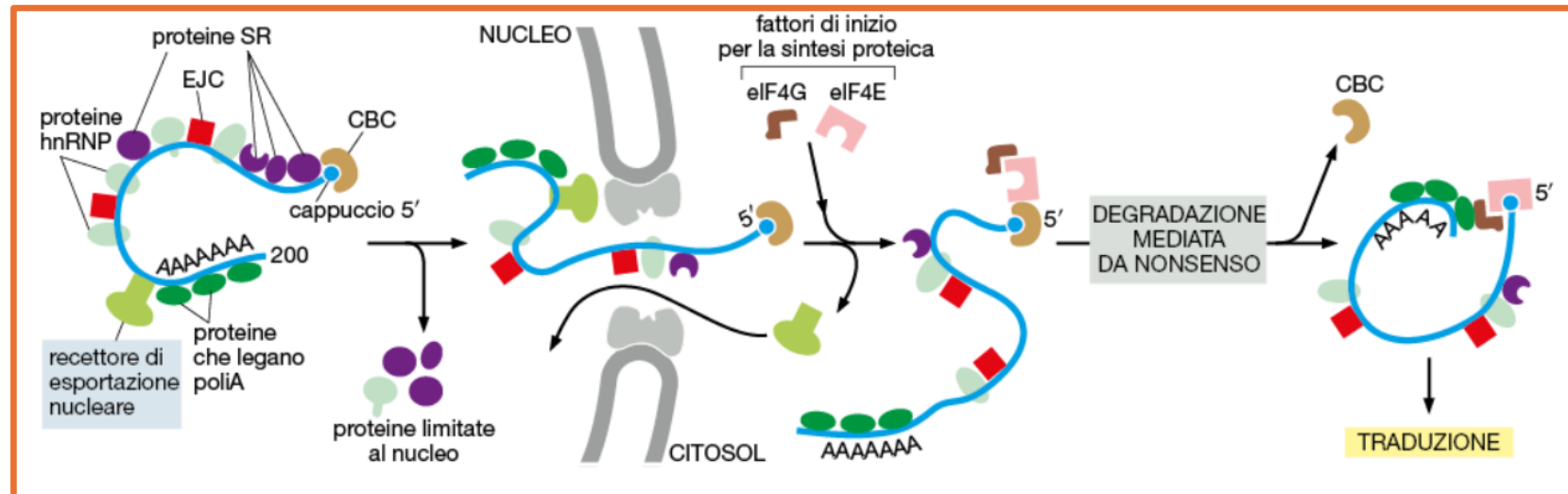
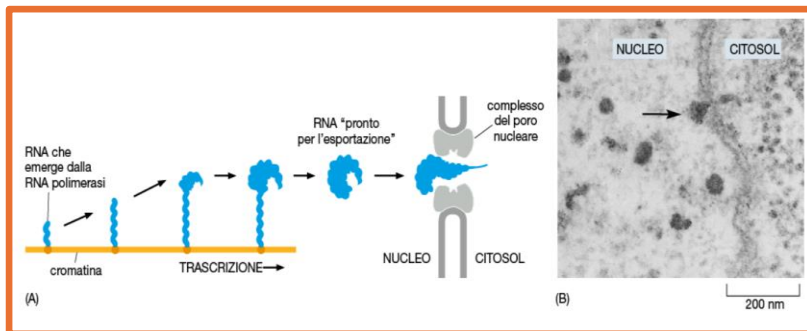
Recettore e Ran-GDP rientrano nel nucleo via sistema di importazione.

Trasporto mRNA dal Nucleo a Citosol

- **snRNA, miRNA, tRNA:**
 - Usano recettori di esportazione nucleare.
 - **Dipendono da Ran-GTP.**
- **mRNA:**
 - Meccanismo **indipendente da Ran.**
 - **mRNA maturo** forma un **complesso mRNP** con proteine leganti RNA:
 - **Alcune proteine si legano** al lato nucleare dell'**NPC**.
 - **Altre alle ripetizioni FG.**

mRNA:

- Il complesso mRNP **attraversa la rete FG** all'interno dell'**NPC**.
- **Lato citosolico: elicasi ATP-dipendente rimuove proteine mRNP.**
- Risultato:
 - **mRNA** esportato **non può rientrare.**
 - **Trasporto reso unidirezionale.**
- Le proteine rimosse vengono rapidamente **importate di nuovo nel nucleo** via Ran.



Proteine Navetta (Shuttling Proteins)

Alcune proteine **si muovono continuamente tra nucleo e citosol.**

- **Dimensioni ridotte** → diffusione attraverso NPC.
- **Presenza di segnali di importazione/esportazione** che le riciclano.

Localizzazione all'equilibrio dipende da:

- **Velocità relativa di importazione vs esportazione.**
- Importazione > esportazione → prevale nel nucleo.
- Esportazione > importazione → prevale nel citosol.

Regolazione tramite segnali nucleari

- **Cellule modulano import/export accendendo o spegnendo i segnali.**
- Meccanismi:
 - **Fosforilazione** di amminoacidi adiacenti alle sequenze segnale.
 - **Mascheramento di NLS** tramite legame con proteine citosoliche.
 - **Ancoraggio a citoscheletro o organuli** → impedisce importazione.

Stimoli appropriati liberano la proteina e permettono trasporto.

Trasporto Nucleare: NF-AT

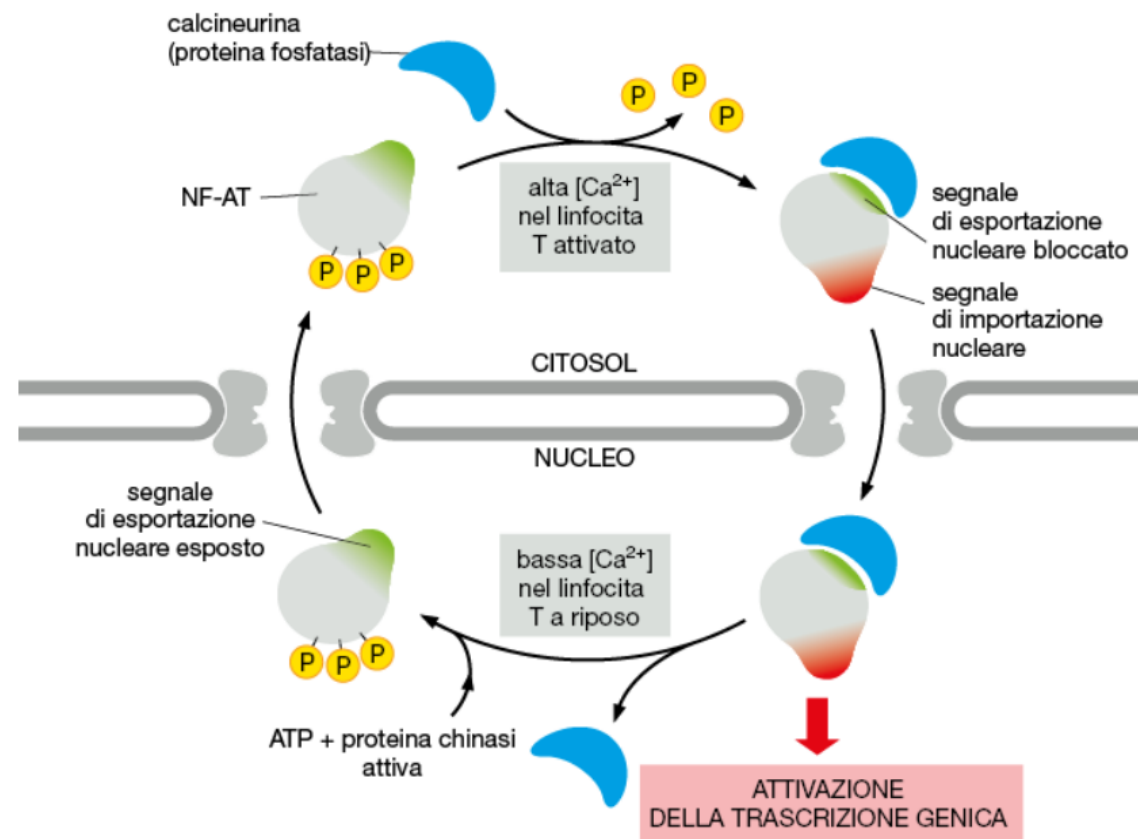
Stato a riposo: NF-AT fosforilato → nel citosol.

Attivazione linfociti T:

- Aumento $\uparrow\uparrow\uparrow[\text{Ca}^{2+}]_i$ (secondo messaggero)
- **Calcineurina** si lega a NF-AT e lo **defosforila**.
- **Espone segnali di importazione** nucleare e **inibisce segnale di esportazione**.
- **NF-AT entra nel nucleo** → attiva geni per risposta immunitaria.

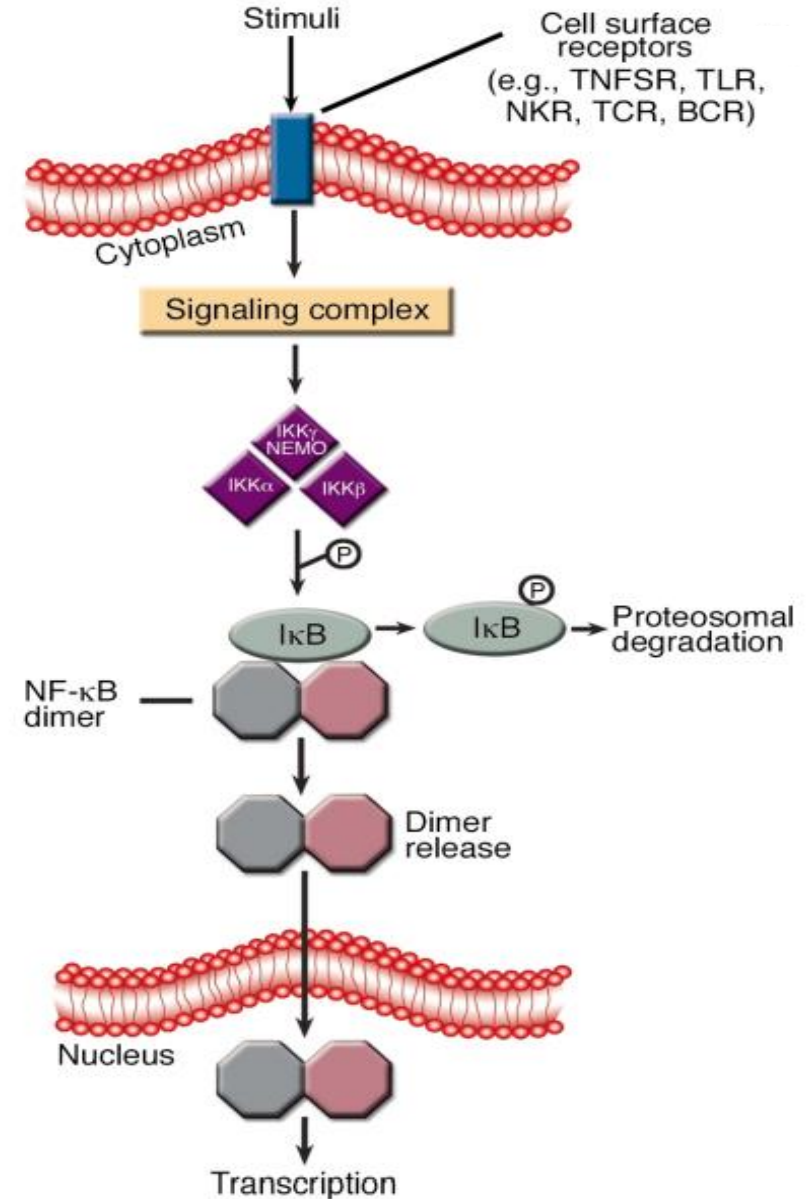
Spegnimento risposta:

- Diminuzione $\downarrow\downarrow\downarrow[\text{Ca}^{2+}]_i$.
- **Rifosforilazione** → **inattiva importazione** e **riattiva esportazione**.
- **NF-AT torna nel citosol**.
- **Farmaci immunosoppressori** (ciclosporina A, FK506): **bloccano defosforilazione NF-AT** → **inibiscono risposta immunitaria**.



Trasporto Nucleare: NF- κ B

- In **condizioni basali**, **NF- κ B** è **sequestrato nel citosol** legato a **I κ B**, che **maschera la sua NLS** impedendo l'ingresso nel nucleo
- **Stimoli esterni inducono l'attivazione** del complesso **I κ B-kinasi (IKK)**,
- **I κ B-kinasi (IKK) fosforila I κ B** $\rightarrow$ questo viene ubiquitinato e degradato
- La **NLS viene smascherata**, permettendo a **NF- κ B** di **entrare nel nucleo**



Trasporto Nucleare: SREBP1

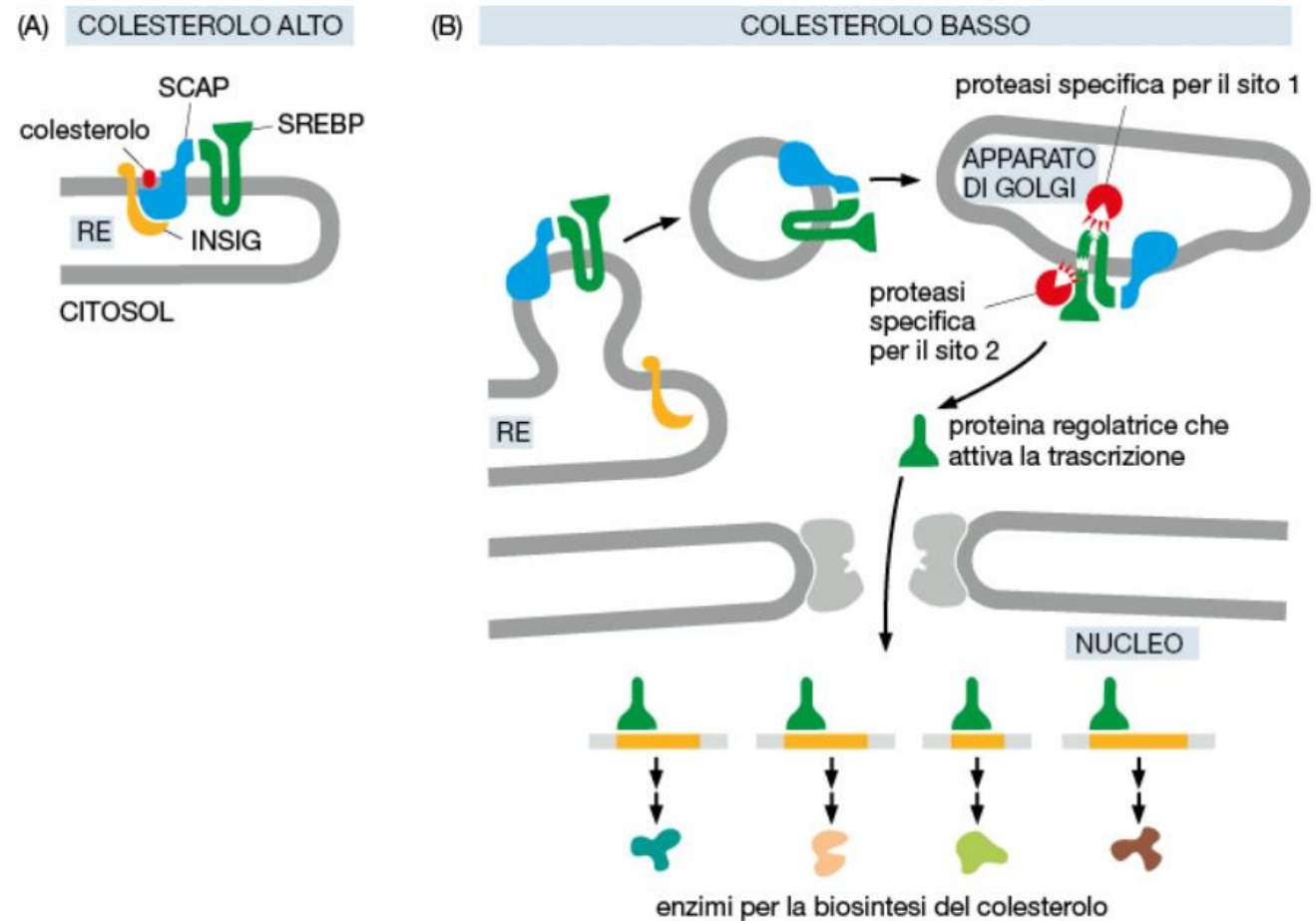
Condizione normale (alto colesterolo):

- **SREBP ancorato al RE** come proteina di membrana.
- **Il colesterolo legato con SCAP-INSIG** che mantiene **complesso inattivo e legato alla membrana** (*SREBP Cleavage Activation Protein*, proteina di attivazione di SREBP mediante taglio).

Condizione bassa concentrazione colesterolo:

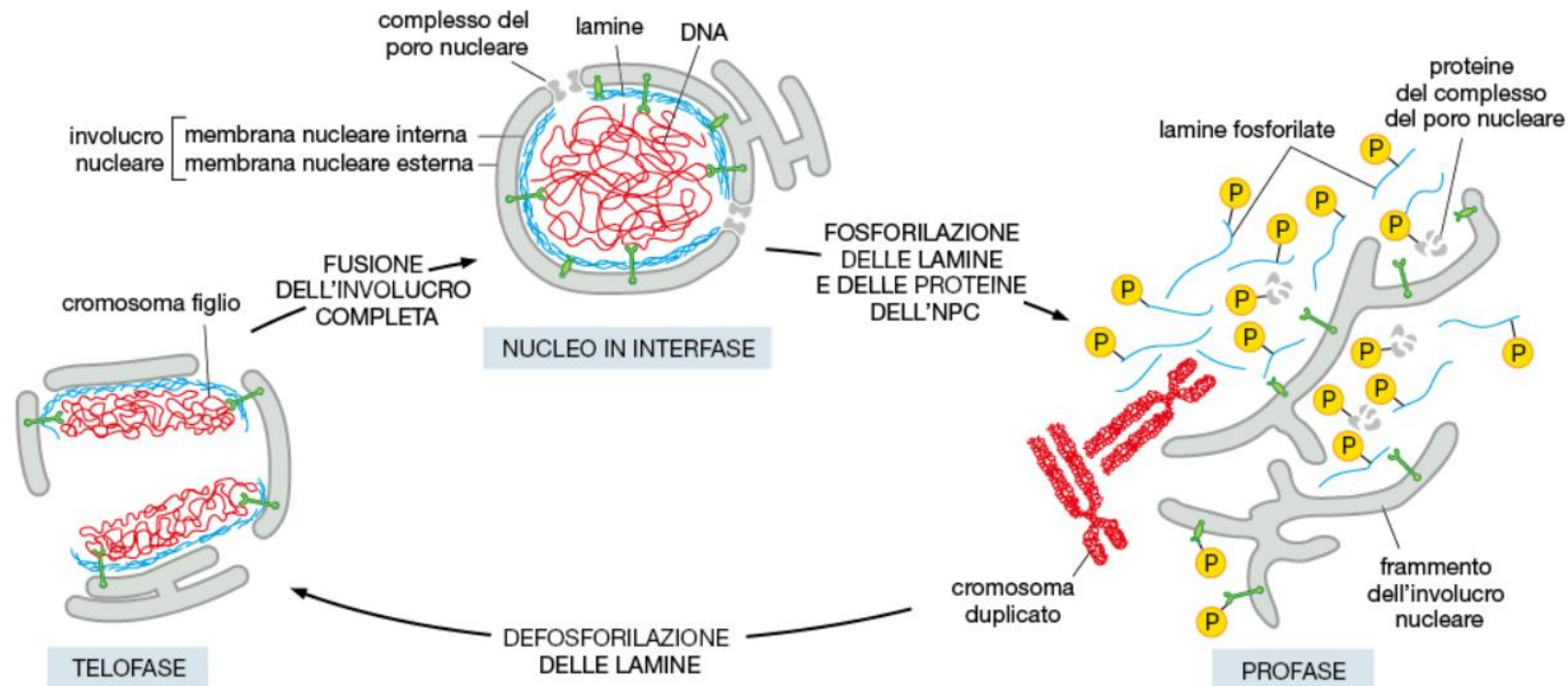
- **SCAP cambia conformazione** e si dissocia da INSIG.
- Complesso **SCAP-SREBP** impacchettato in **vescicole** → **Golgi**.
- Nel Golgi: **proteasi tagliano SREBP** → **rilascio dominio citosolico**.
- Dalla **membrana al nucleo** → **attiva geni per biosintesi colesterolo**.

Feedback: quando [colesterolo] scende, cellula attiva trascrizione enzimi biosintetici.



Smontaggio dell'Involucro Nucleare

- Necessario per permettere ai **microtubuli** di accedere ai cromosomi.
- Strutture da smontare:
 - **Lamina nucleare.**
 - **NPC (complessi dei pori nucleari).**
 - **Membrane dell'involucro.**



Innesco:

- **Cdk (Cyclin-dependent kinase)** attiva → **fosforilazione di nucleoporine, lamine e proteine della membrana nucleare.**

Conseguenze:

- **Rottura legami con cromatina.**
- **Dispersione proteine NPC nel citosol.**
- **Membrane nucleari → distribuite nel RE.**
- **Dineina reclutata → forza meccanica di distacco.**