

Lezione 13

Il traffico Vescicolare

- Formazione delle vescicole
- Le proteine di rivestimento ed i loro ruoli
- L'attacco, l'ormeggio e la fusione di vescicole ai compartimenti bersaglio
- Ruolo di NSF, SNAPs, SNARE e RAB
- Il ruolo dei fosfoinositidi

- I cis-Golgi network
- L'apparato di Golgi e il trans-Golgi network
- Secrezione costitutiva e secrezione regolata

L'autofagia

- Macroautofagia e autofagia mediata da chaperon molecolari
- L'esempio della mitofagia
- Conseguenze delle alterazione della via autofagica

L'endocitosi

- L'endocitosi in fase fluida e mediata da recettori
- Endocitosi della transferrina, delle LDL e dell'EGF: differenze e peculiarità
- Endosomi precoci di smistamento e di riciclo
- Endosomi tardivi
- Corpi multivescicolari e lisosomi
- Il trasporto ai lisosomi e il mannosio-6-fosfato
- Disfunzioni lisosomiali e malattie di accumulo
- L'endocitosi nelle cellule polarizzate
- La transcitosi (esempio delle immunoglobuline)
- La fagocitosi e le sue funzioni

Traffico di Membrana Intracellulare: Vie Principali del Traffico

Importanza del traffico di membrana

- Le cellule devono:
 - Nutrisi.
 - Comunicare con l'ambiente.
 - Rispondere rapidamente ai cambiamenti.
- Strumento: **sistema di membrane interne dinamiche.**
- La composizione della membrana plasmatica e degli organuli è continuamente rimodellata.

Topologia dei compartimenti

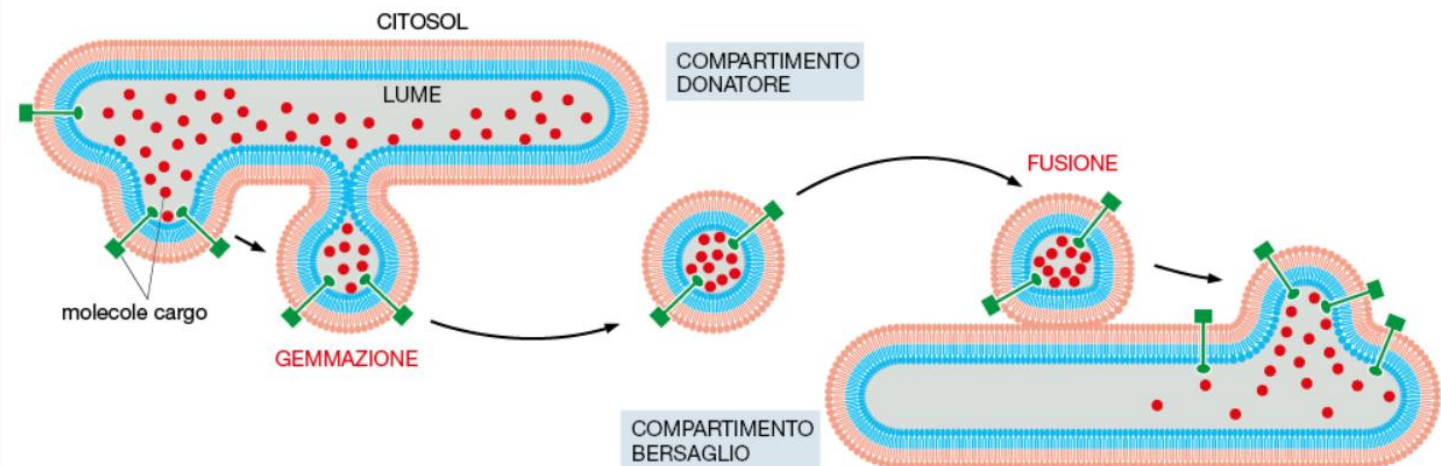
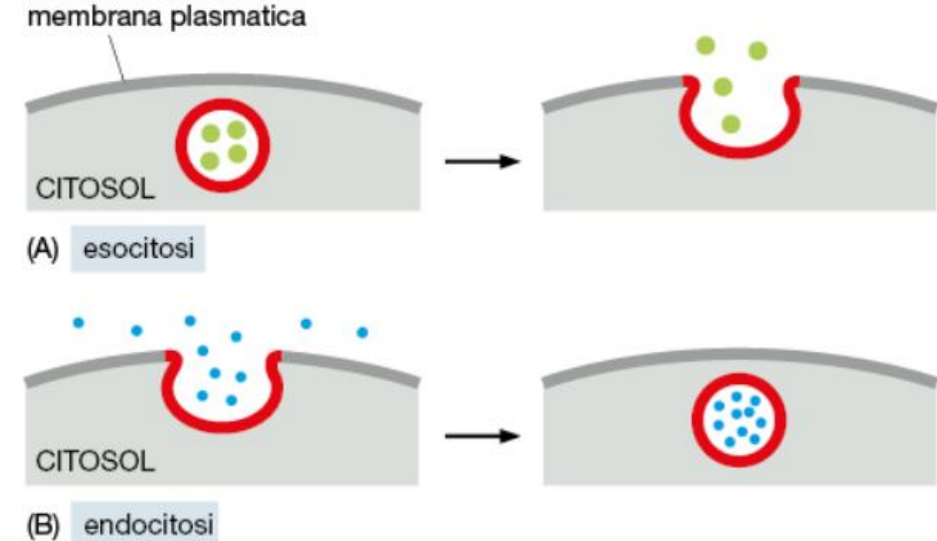
Lo **spazio interno (lume)** di compartimenti secretori ed endocitici è **equivalente all'esterno della cellula**.

Conseguenza:

- Le proteine **possono muoversi da un compartimento all'altro senza attraversare ulteriori membrane.**

Trasporto tramite **vescicole di trasporto**:

- Derivano per **gemmazione** da una membrana.
- Si **fondono con un compartimento bersaglio.**



Vie Principali del Traffico

Via secretoria:

- RE → Golgi → membrana plasmatica / spazio extracellulare.
- Include proteine, lipidi e carboidrati di nuova sintesi.
- Processo: **esocitosi**.

Via endocitica:

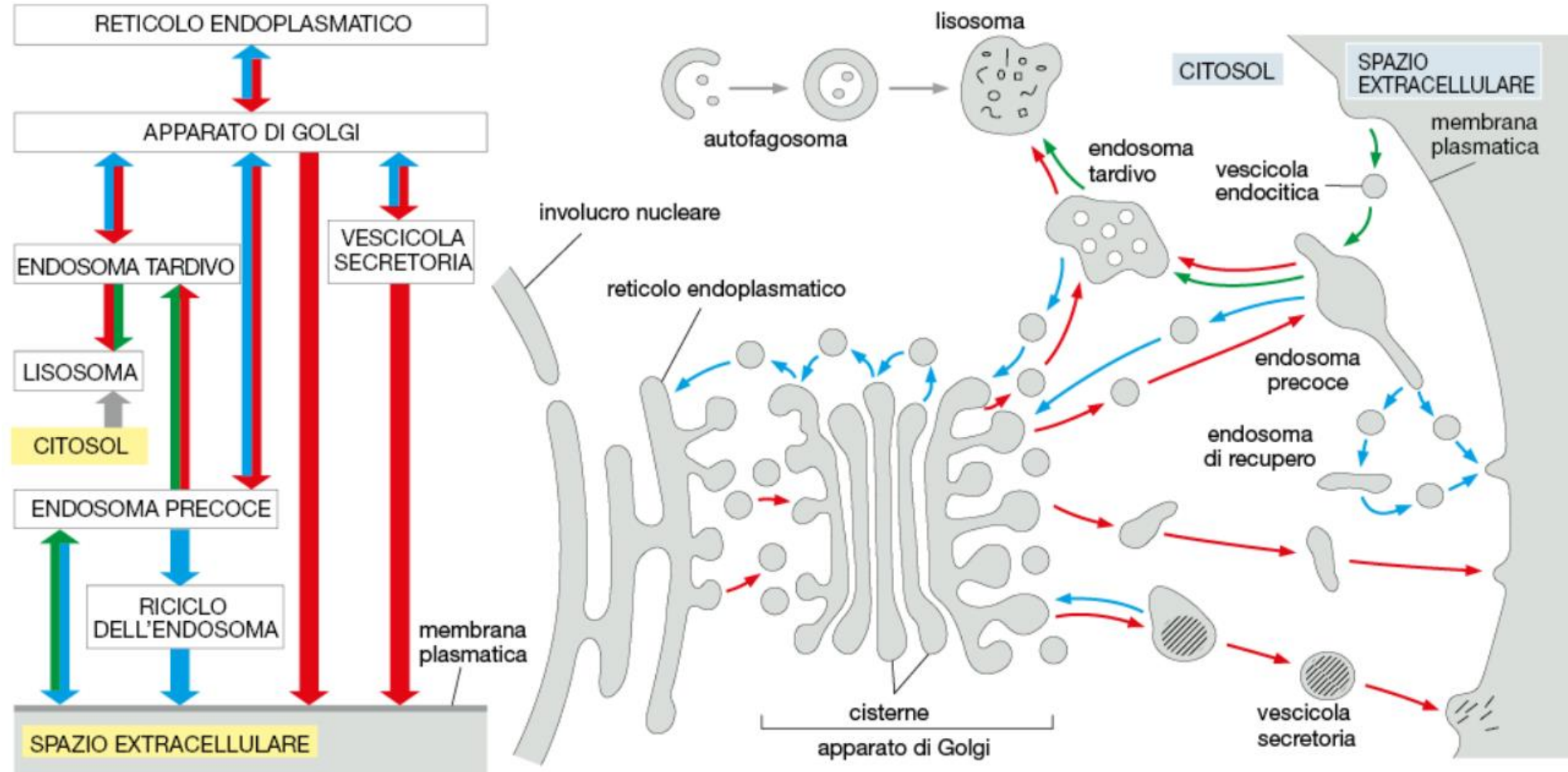
- Membrana plasmatica → endosomi → lisosomi.
- Processo: **endocitosi**.

Autofagia:

- Compartimenti citoplasmatici → autofagosoma → lisosoma.

Vie di Recupero/Riciclo

- Endosomi → membrana plasmatica.
- Endosomi → Golgi.
- Golgi → RE.



Vescicole di Trasporto

Trasporto vescicolare: principi generali

Media lo scambio continuo tra >10 compartimenti distinti.

- **Formazione di vescicole** dal compartimento di origine.
- **Selezione** e concentrazione del **carico (cargo)**.
- **Trasporto e fusione selettiva** con il compartimento bersaglio.

Identità dei compartimenti

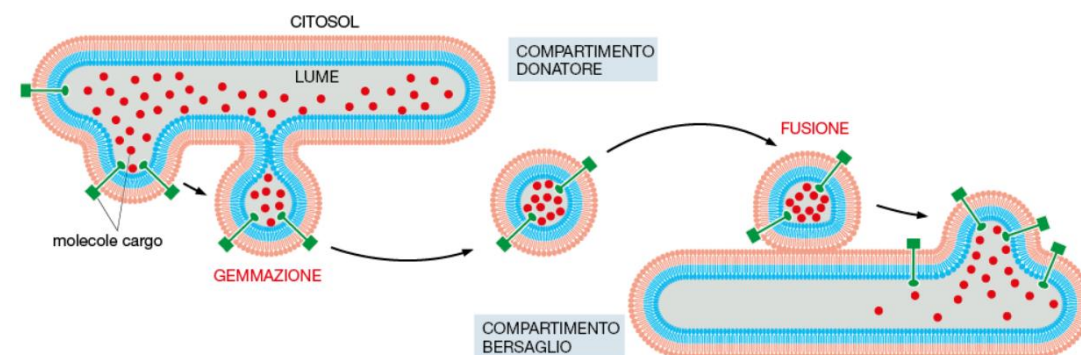
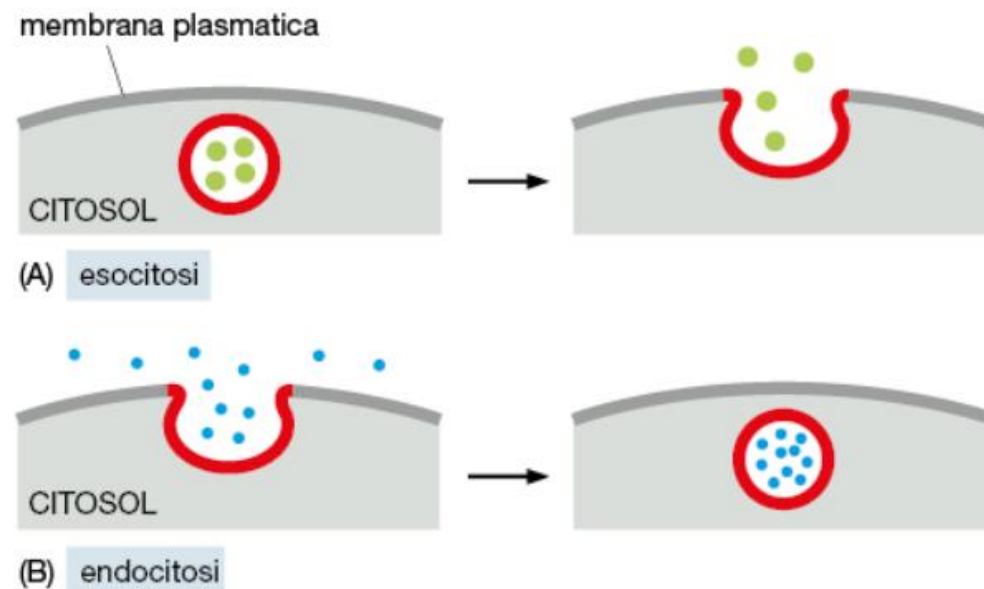
Ogni organulo mantiene una **firma molecolare unica** nonostante il continuo scambio.

Marcatori di identità:

Proteine e lipidi specifici sulla faccia citosolica.

Guidano sia il traffico in uscita sia l'arrivo delle vescicole.

L'**identità unica** deriva dalla **combinazione di più marcatori**, non da uno solo.



Vescicole di Trasporto

Vescicole di trasporto

- Piccole vescicole sferiche.
- Vescicole irregolari più grandi.
- Tubuli.
 - **Cargo di membrana** (lipidi, proteine integrali).
 - **Cargo lumenale** (proteine, nutrienti, molecole solubili).

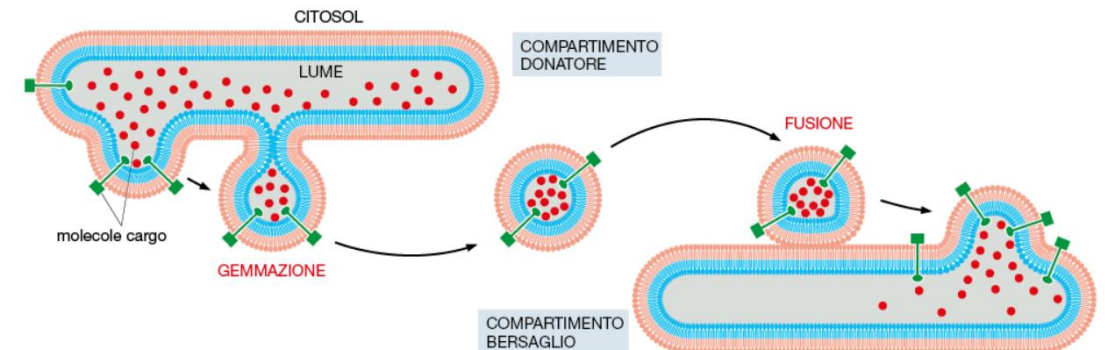
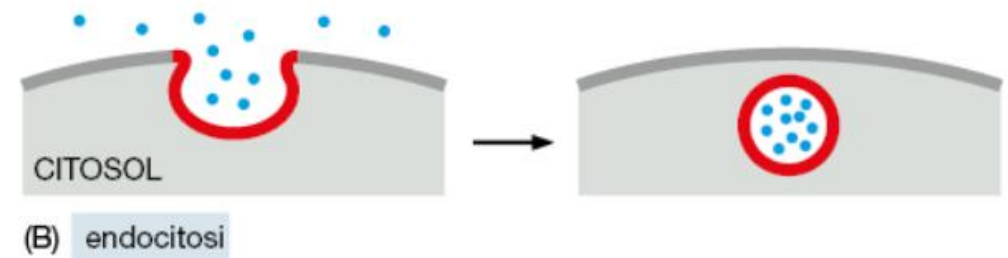
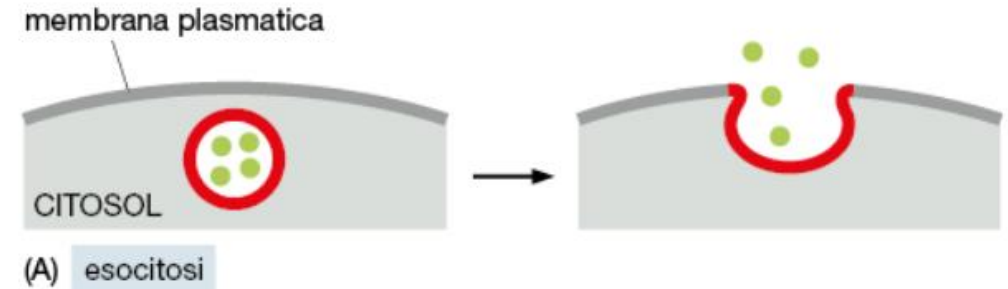
Direzionalità e organizzazione

Il traffico vescicolare segue percorsi:

- Altamente **organizzati**.
- **Direzionali** (RE → Golgi → superficie; endocitosi → lisosomi).

Ogni vescicola deve:

- Selezionare **solo le molecole appropriate**.
- Fondersi con la **membrana bersaglio corretta**.



Vescicole di Trasporto

Formazione delle vescicole

Inizio: assemblaggio di uno **strato proteico** sulla **faccia citosolica** della membrana.

Funzioni dello strato:

Raccoglie componenti specifici di membrana e lumenali.

Modella la membrana in una vescicola di trasporto.

Dopo il distacco, la vescicola:

Raggiunge il compartimento bersaglio.

Si fonde con esso → consegna il carico.

Vescicole rivestite

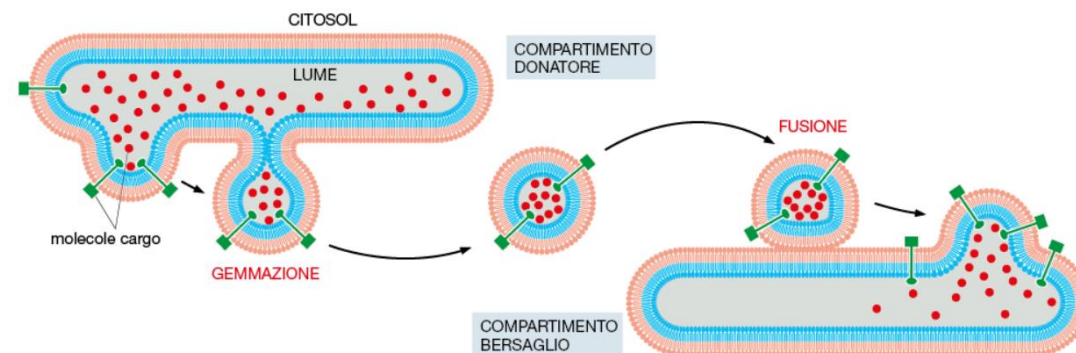
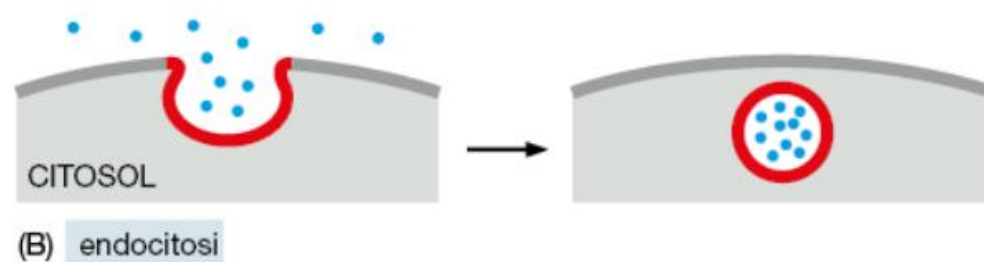
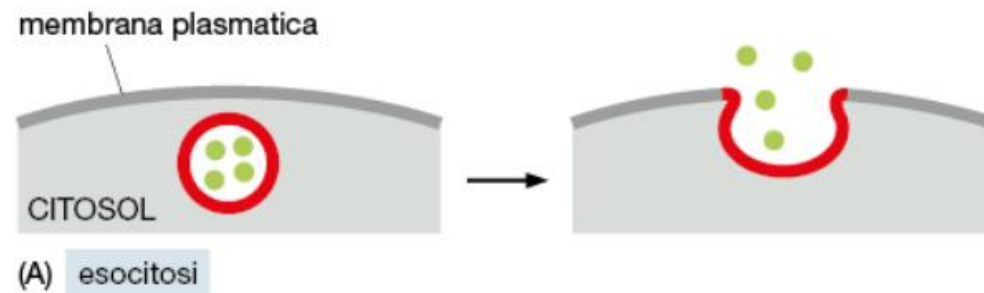
La maggior parte delle vescicole **si forma in zone rivestite** della membrana.

Rivestimento = **gabbia proteica citosolica**.

Prima della fusione, il rivestimento viene **rimosso**.

• Funzioni del rivestimento (2 strati):

- **Interno: seleziona molecole** di membrana appropriate **per il trasporto**.
- **Esterno: forma reticolo** a “canestro” che deforma e curva la membrana.



Vescicole di Trasporto

Tipi principali di vescicole rivestite

Clatrina:

Tra Golgi $\leftrightarrow$ endosomi $\leftrightarrow$ membrana plasmatica.

COPI:

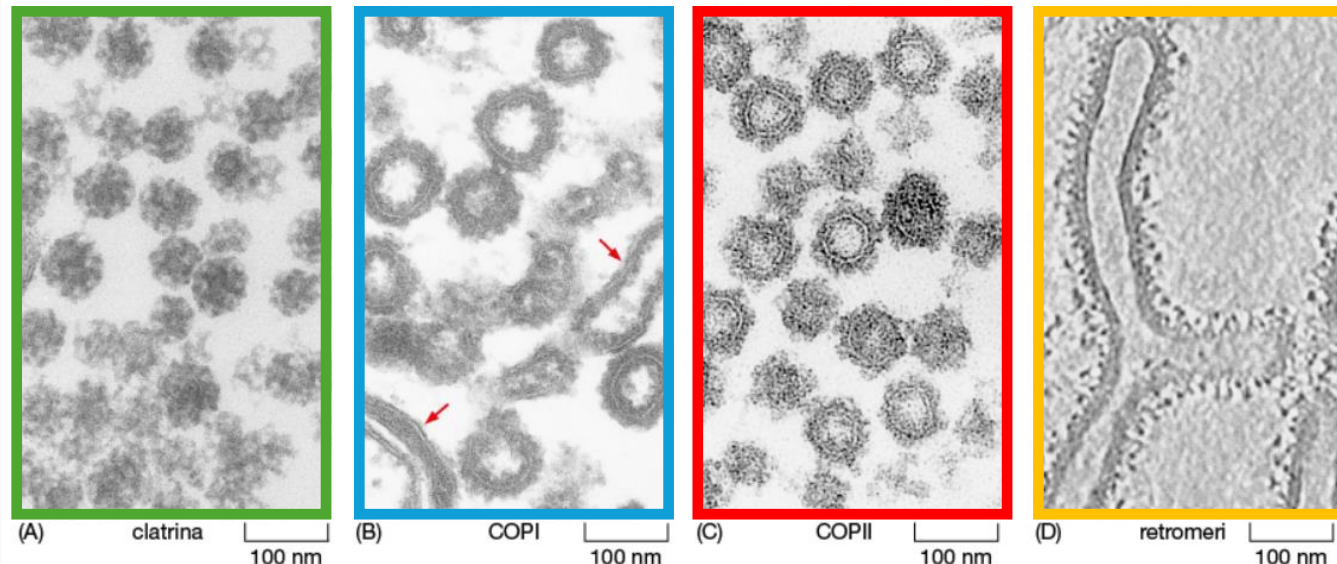
Tra cisterne del Golgi.

COPII:

Dal RE $\rightarrow$ Golgi.

Retromeri:

Recupero endosomi $\rightarrow$ Golgi.



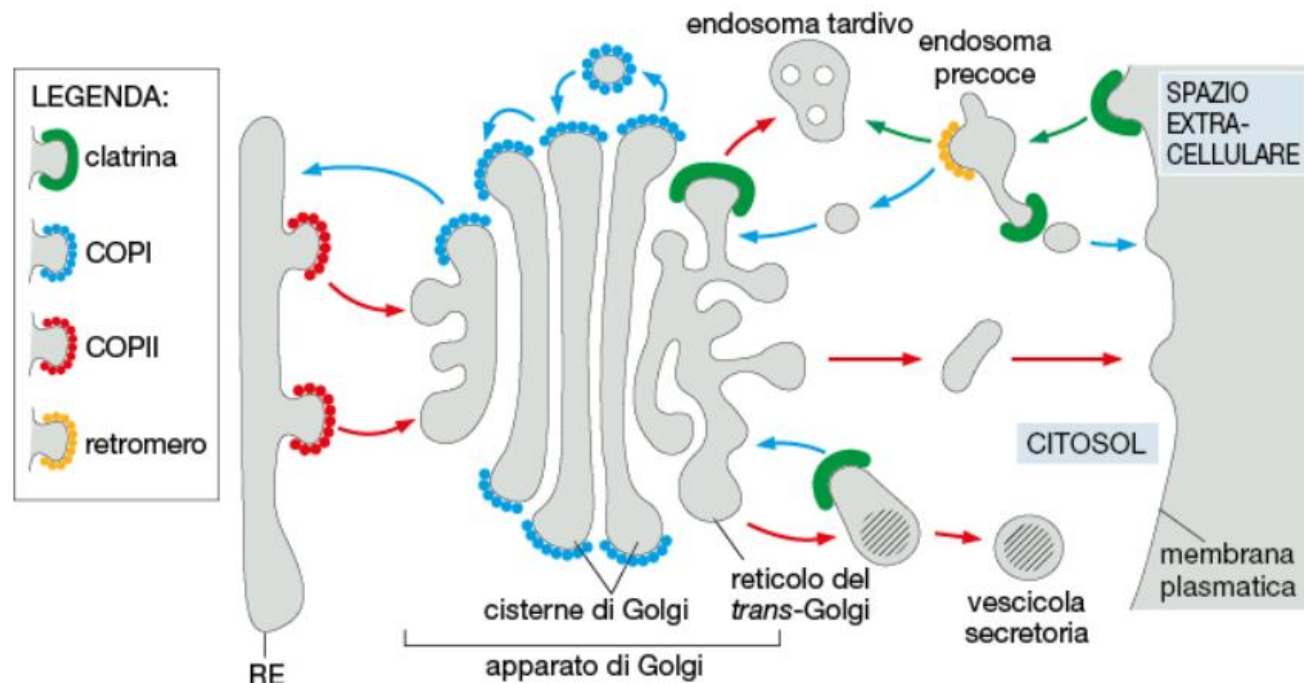
Specializzazione dei rivestimenti

Ogni rivestimento può avere **varianti specializzate**:

- **Diversi sottotipi di clatrina** $\rightarrow$ trasporti differenti.
- **COPI e COPII con subunità variabili** $\rightarrow$ flessibilità funzionale.

Vie ulteriori nelle cellule differenziate:

- **Smistamento trans-golgi network (TGN)** $\rightarrow$ superficie apicale (cellule epiteliali).
- **Riciclo vescicole sinaptiche** nei neuroni.



Vescicole Rivestite di Clatrina

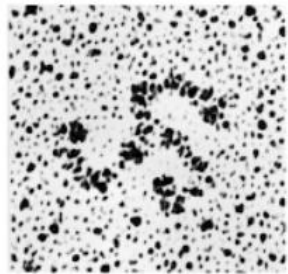
La clatrina

Proteina principale delle vescicole rivestite di clatrina.

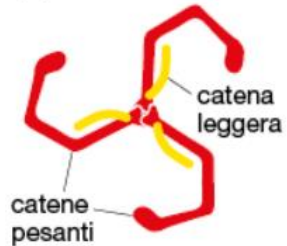
- Struttura:
 - **Catena pesante** (subunità maggiore).
 - **Catena leggera** (subunità minore).
- **3 catene pesanti + 3 leggere** → **trischelio** (struttura a 3 gambe).
- I trischeli **si assemblano** in una **gabbia poliedrica** di esagoni e pentagoni → forma a canestro.

Autoassemblaggio e geometria

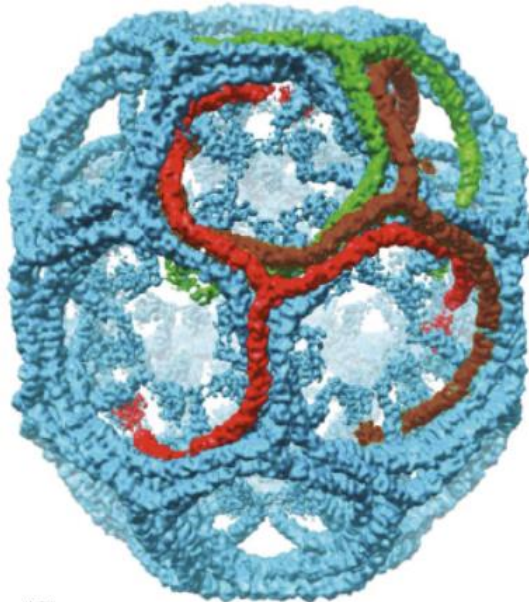
- I **trischeli** isolati si autoassemblano **spontaneamente** in vitro.
- La geometria della gabbia è determinata unicamente dal trischelio.
- Risultato: formazione di **fosse rivestite** (pozzetti) → si staccano come **vescicole rivestite di clatrina**.



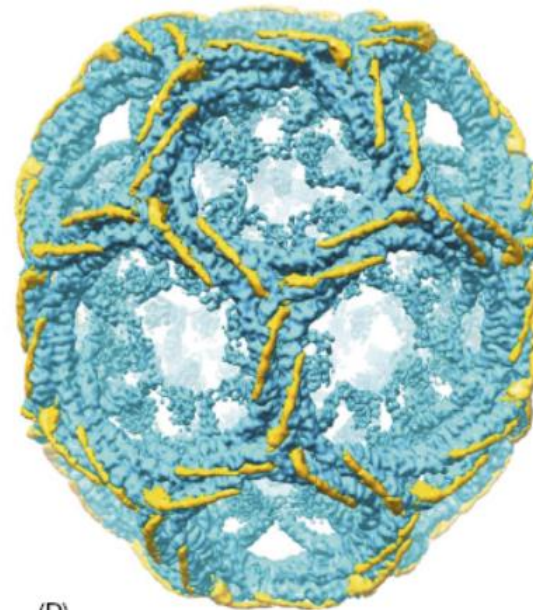
(A)



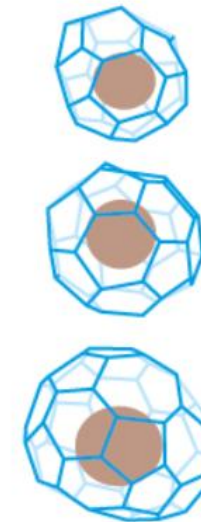
(B)



(C)

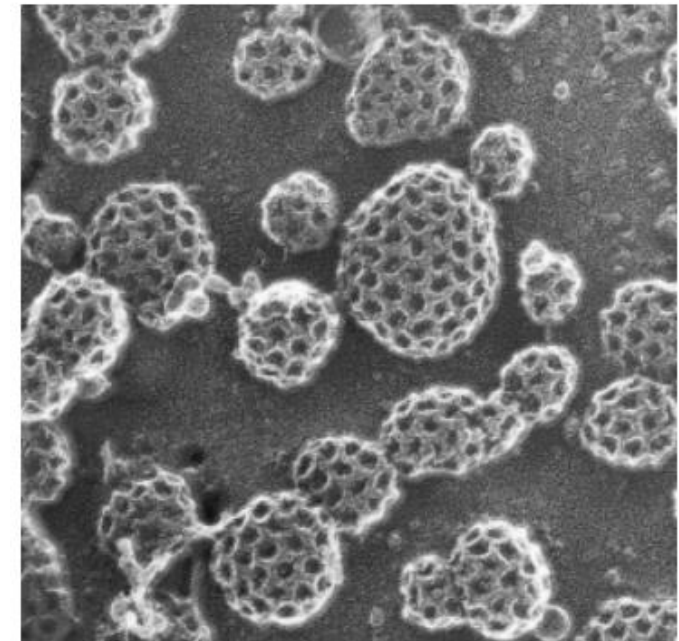


(D)



(E)

50 nm



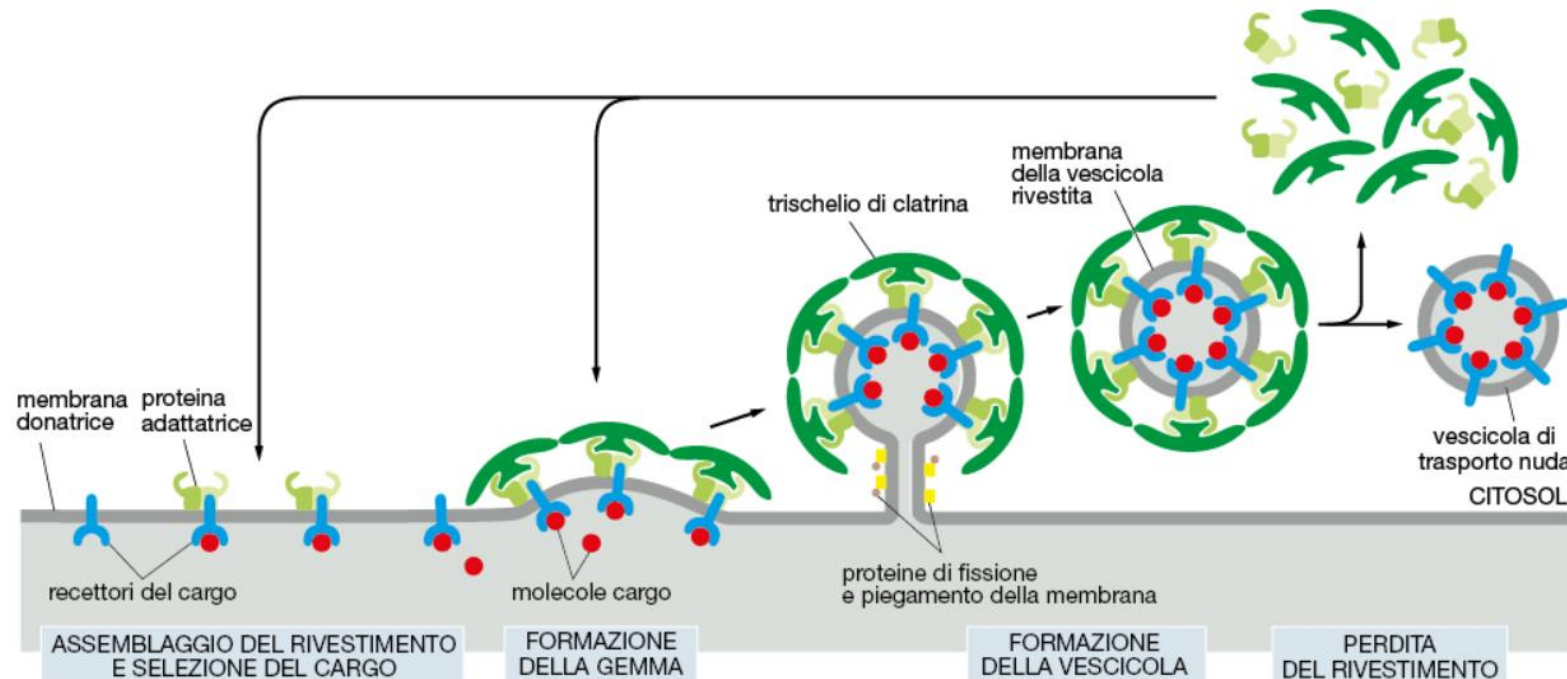
Vescicole Rivestite di Clatrina

Struttura del rivestimento

- Rivestimento a **due strati**:
 - **Strato esterno** = **trischeli di clatrina** → struttura del canestro.
 - **Strato interno** = **proteine adattatrici** → **selezionano il carico** e **collegano clatrina alla membrana**.
- Le catene leggere della clatrina interagiscono con **actina (forze per gemmazione e movimento)**.

Proteine adattatrici

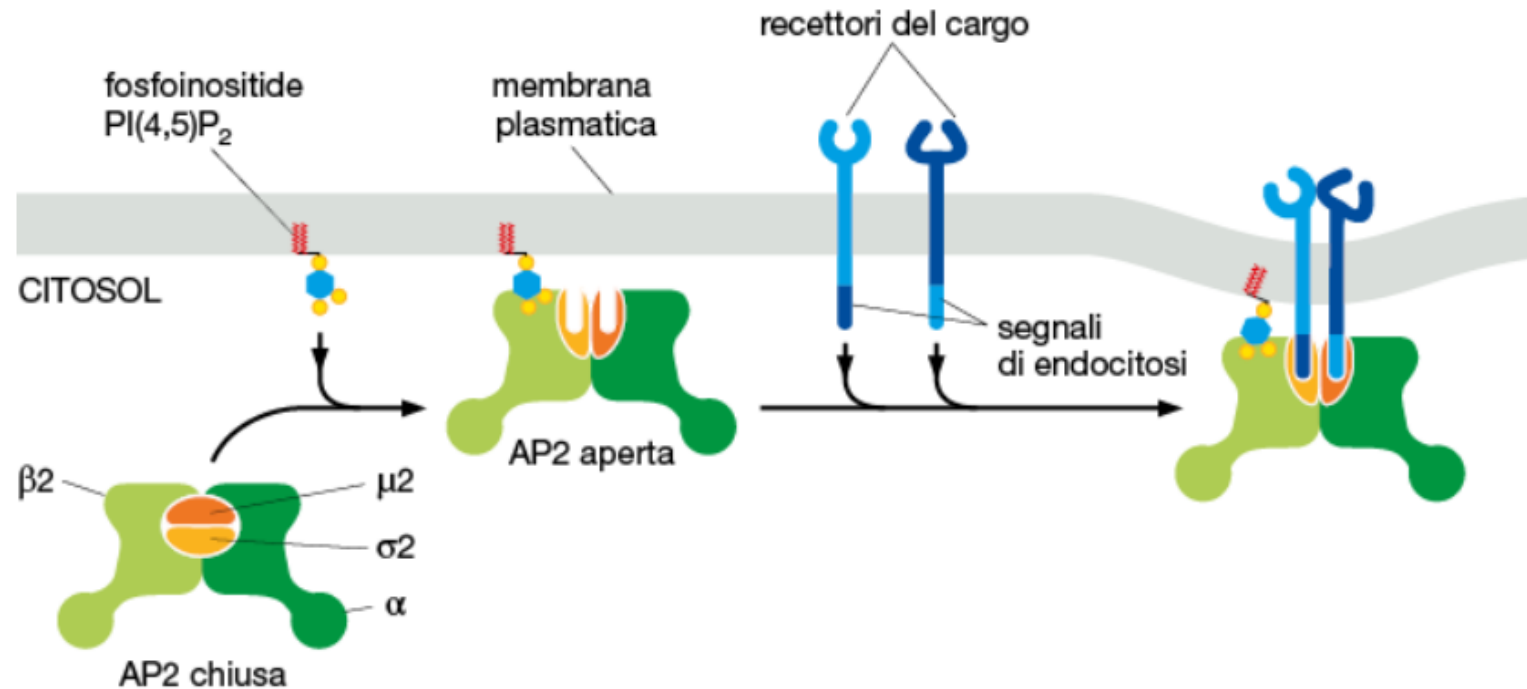
- Si posizionano **tra gabbia di clatrina e membrana**.
- Funzioni:
 - **Legano proteine cargo transmembrana**.
 - **Legano recettori del cargo** → catturano molecole solubili.
 - **Collegano il carico alla clatrina, guidando l'assemblaggio**.
- Ogni nuova vescicola include un **set specifico di cargo** selezionato.



Le Proteine Adattatrici

Controllo dell'assemblaggio

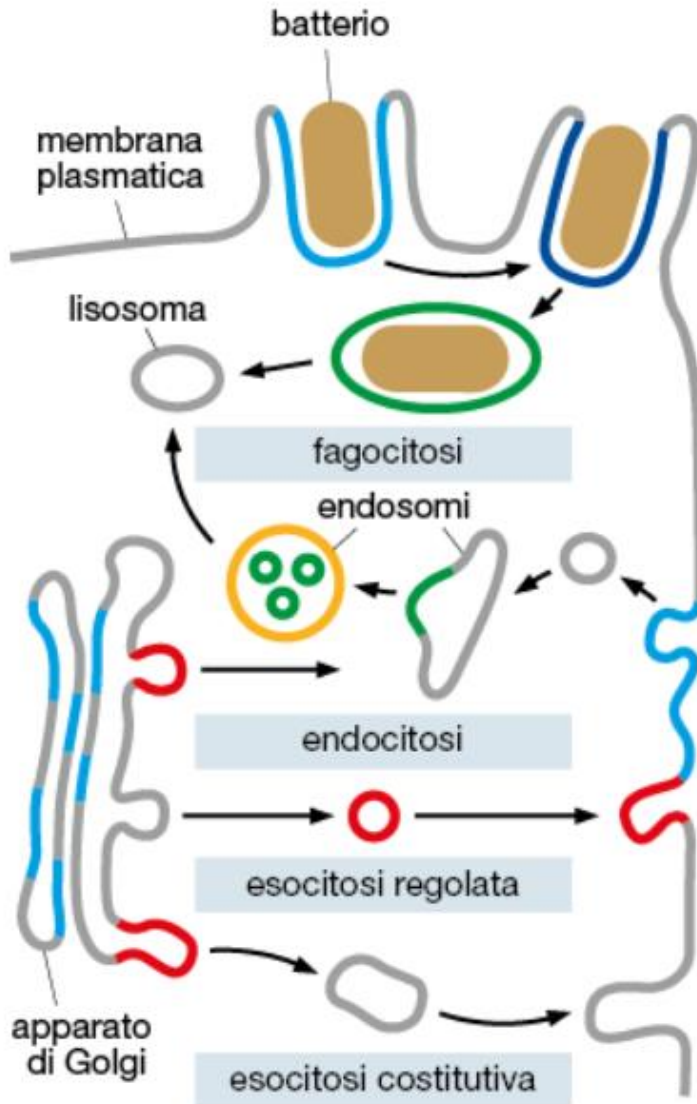
- Le proteine adattatrici sono **regolate da**:
 - Interazioni cooperative con membrana, cargo e clatrina.**
 - Legame con fosfoinositidi specifici.**
- Esempio: **AP2**
 - Riconosce un fosfoinositide** della membrana plasmatica.
 - Cambia conformazione** → espone siti per **recettori del cargo**.
 - Legame simultaneo a lipidi e recettori** → rafforza l'ancoraggio alla membrana.



Assemblaggio cooperativo

- AP2 induce curvatura della membrana.**
- Reclutamento di più AP2** nelle vicinanze.
- Clatrina si lega** → amplificazione dell'assemblaggio.
- Risultato: **formazione** di una **gemma rivestita** → **distacco della vescicola**.
- Dopo la formazione**, il rivestimento viene **rapidamente rimosso** → vescicola pronta alla fusione.

Fosfatidilinositolo



LEGENDA:

PI(3)P PI(4)P PI(4,5)P₂ PI(3,5)P₂ PI(3,4,5)P₃

PIP come codici di indirizzamento

- I PIP reclutano proteine tramite **domini** che **riconoscono forme specifiche**.
- Reclutamento = **localizzazione temporanea/rapida** di **proteine regolatrici**.
- Effetto:
 - **Controllo** della **formazione vescicole**.
 - **Regolazione** di **passaggi specifici del trasporto**.
 - Risposte rapide a stimoli extracellulari (es. recettori attivati).

Esempi chiave

- **Endosomi** → ricchi di **PI(3)P** → **reclutano proteine endocitiche**.
- **Vescicole secretorie** → **PI(4)P**.
- **Membrana plasmatica** → **PI(4,5)P₂**:
 - Recluta **AP2** e **proteine adattatrici** → **formazione di fosse di clatrina**.
 - Dopo gemmazione, **PI(4,5)P₂** viene **defosforilato** → **rivestimento rimosso**.

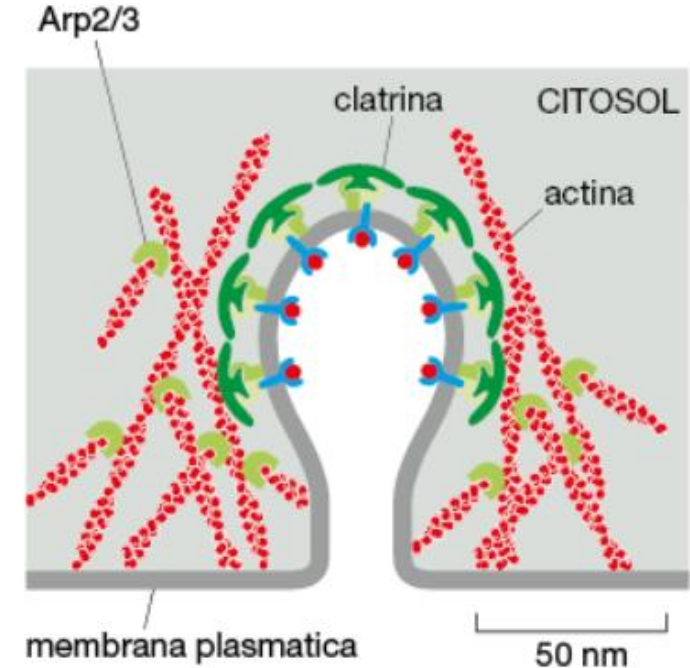
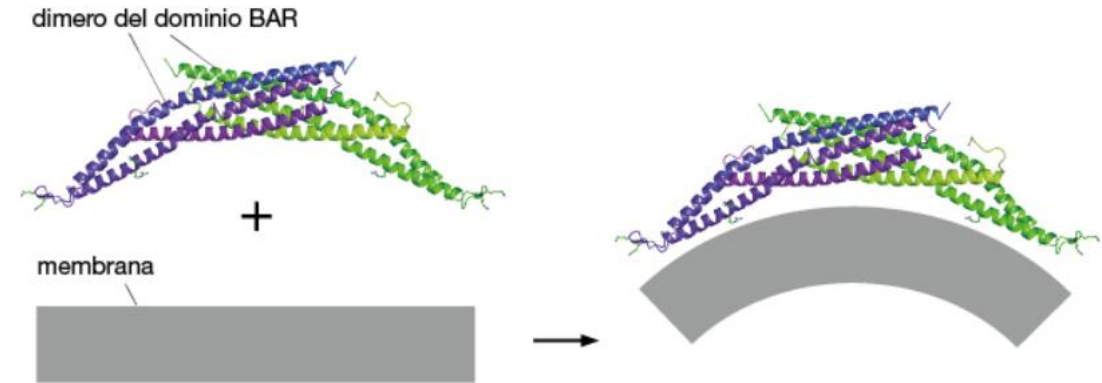
Vescicole su Membrana Plasmatica

Problema da risolvere

- La **membrana plasmatica** è **rigida** (colesterolo + corteccia di actina).
- Il **solo** rivestimento di **clatrina** **non basta** a generare la curvatura.
- **Servono proteine accessorie** che **piegano e strozzano** la membrana.

Domini BAR: “scaffold curvi”

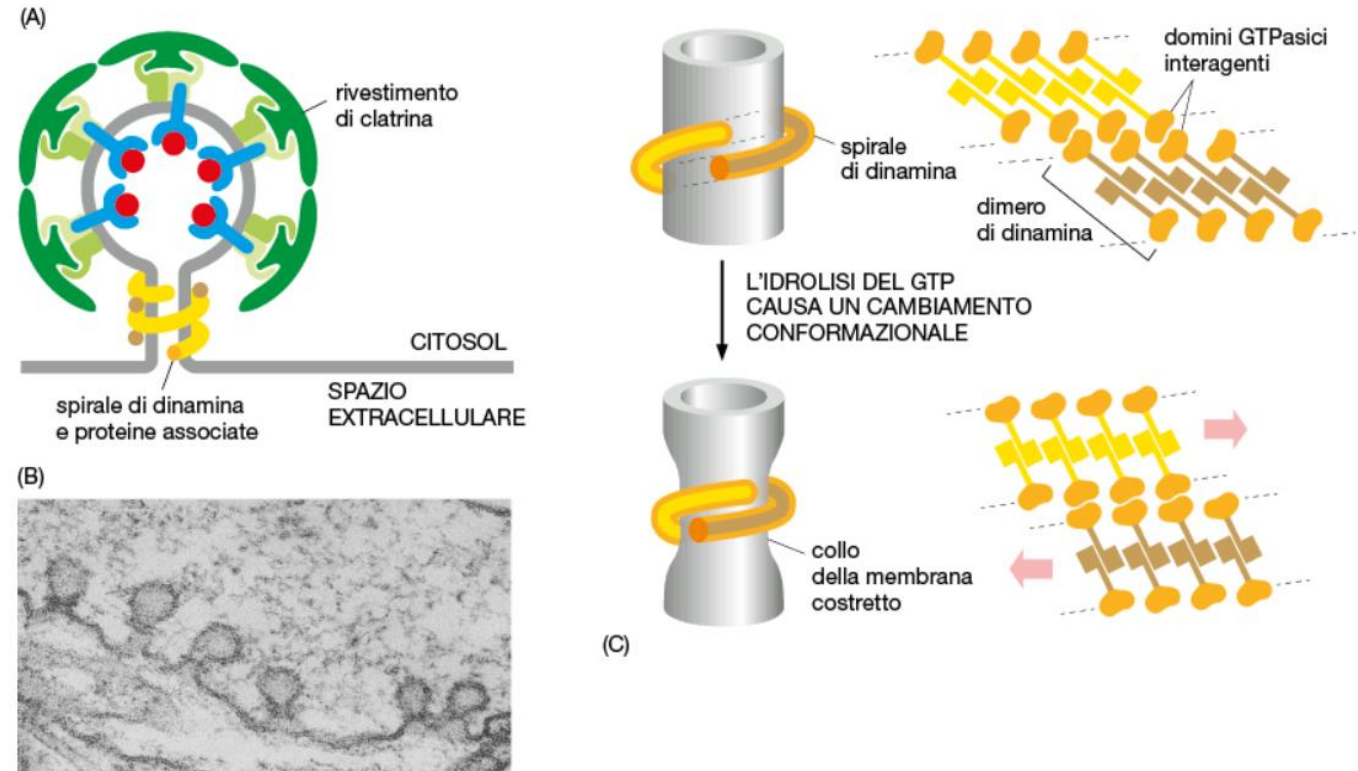
- **Proteine con dominio BAR** = coiled-coil a forma di mezzaluna.
- Superficie **positivamente carica** → **interagisce con lipidi anionici**.
- Funzioni:
 - **Impongono curvatura locale**.
 - **Alcune inseriscono eliche anfipatiche** come “cunei” → aumentano la curvatura.
 - **Attivano nucleazione di actina** → forze aggiuntive per gemmazione.



Dinamina: la “Ghigliottina Molecolare”

Dinamina: la “ghigliottina molecolare”

- **Proteina GTPasica** che si assembla a **spirale attorno al collo della gemma**.
- Domini:
 - **Legame a PIP** (ancoraggio membrana).
 - **Dominio GTPasi** (forza meccanica).
- Meccanismo:
 - **Polimerizza a spirale intorno al collo**.
 - **Idrolisi del GTP** → cambiamento conformazionale.
 - **La spirale si restringe** → porta i due **foglietti** non citosolici a **fusione**.
 - **La vescicola si stacca** dalla membrana madre.



Smontaggio del rivestimento

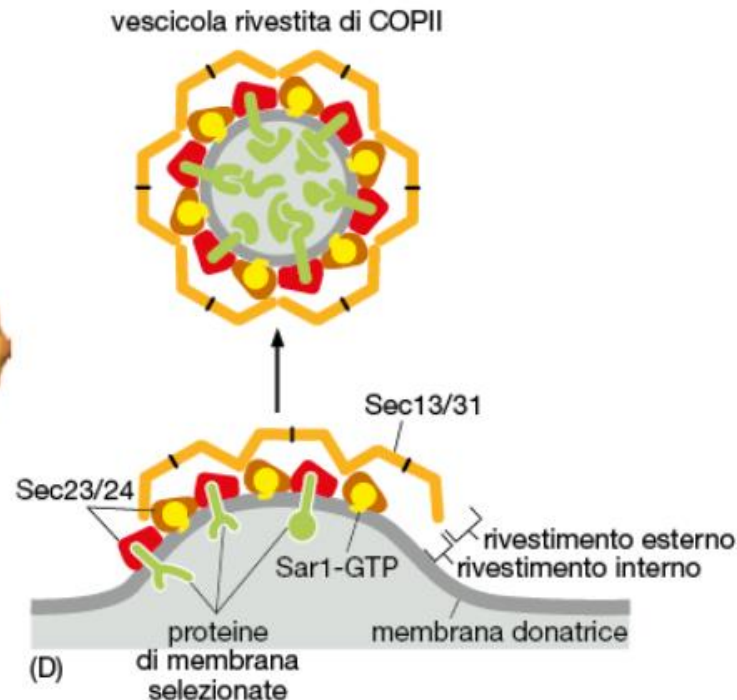
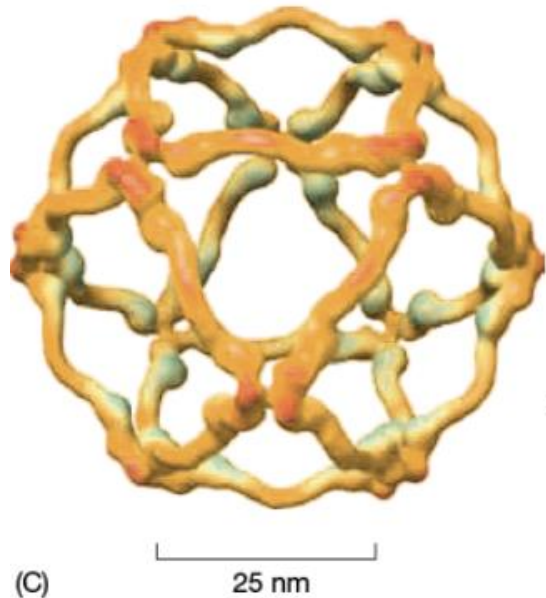
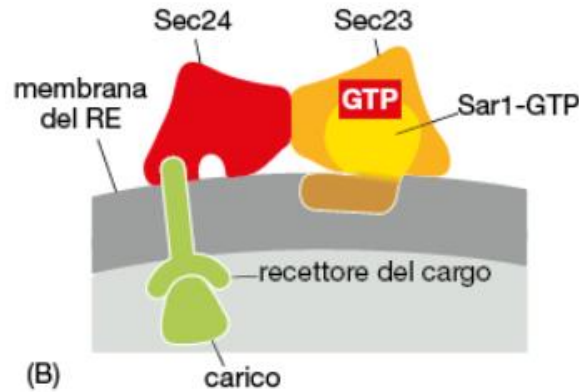
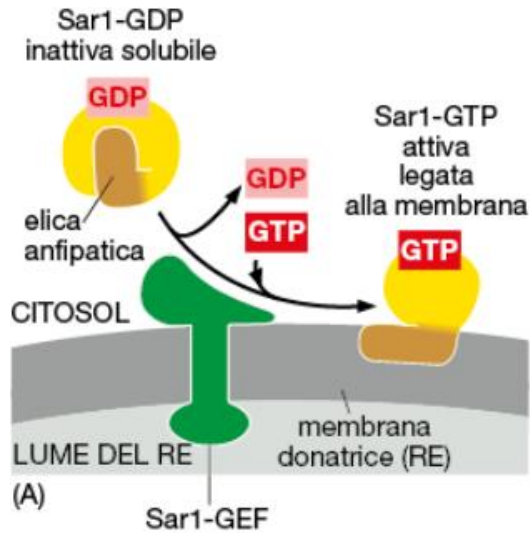
Dopo il distacco: **rivestimento di clatrina deve essere rimosso**.

- **Fosfatasi PIP** → rimuove i **lipidi-segnale** che legano AP2.
- **Auxilina** → recluta **Hsp70** ATPasi.
- **Hsp70** usa ATP per **staccare i trischeli di clatrina**.

Schema: La formazione di una vescicola:

- **Clatrina + AP2** → selezione carico e inizio curvatura.
- **Domini BAR + actina** → rinforzano la curvatura e strozzano il collo.
- **Dinamina + GTP** → taglia il collo e rilascia la vescicola.
- **Auxilina + Hsp70** → smontano il rivestimento.

COPII: Principali GTPasi di Reclutamento



Concetto base

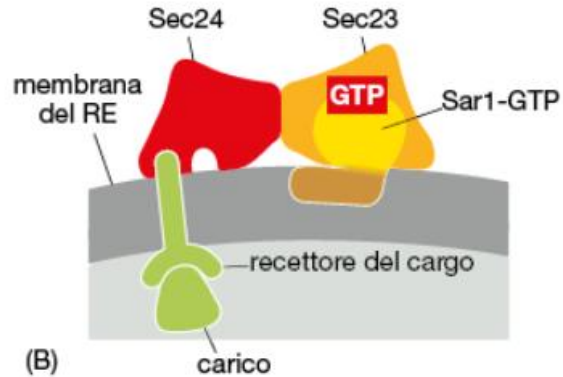
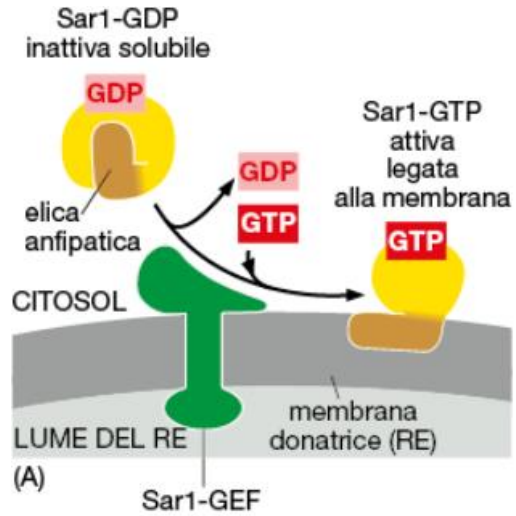
- Le vescicole **non si formano ovunque a caso**, ma in punti precisi.
- La formazione è controllata da **GTPasi monomeriche** che:
 - Sono **interruttori molecolari** (**GTP = ON, GDP = OFF**).
 - Si attivano grazie a **GEF** (**scambio GDP→GTP**).
 - Si disattivano grazie a **GAP** (**idrolisi GTP→GDP**).

Principali GTPasi di reclutamento

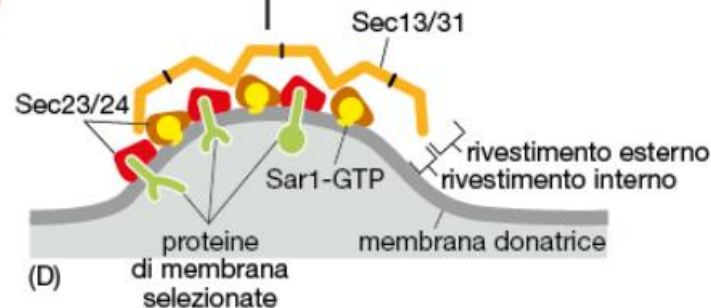
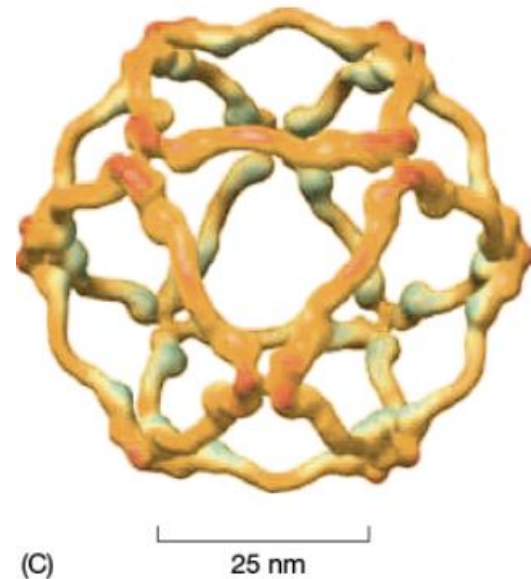
- **Sar1** → avvia **rivestimento COPII** (dal RE).
- **Arf** → avvia **rivestimento COPI** e clatrina (Golgi).
- **Rab7** → avvia **rivestimento retromeri** (endosomi).

Ogni GTPasi è attivata da un **GEF localizzato** → garantisce **specificità spaziale**.

Meccanismo di Sar1 (esempio COPII)



vescicola rivestita di COPII



Meccanismo di Sar1 (esempio COPII)

1. **Sar1-GDP (inattiva)** → **solubile** nel citosol.
2. Una **Sar1-GEF** sulla **membrana del RE** → **scambia GDP con GTP**.
3. **Sar1-GTP** espone un'**elica anfipatica** → si **inserisce nella membrana**.
4. **Recluta proteine adattatrici interne** (Sec23/Sec24) → **legano cargo**.
5. **Recluta proteine del rivestimento esterno** (Sec13/Sec31) → **formano la gabbia**.
6. **Curvatura + sigillatura** → **vescicola COPII pronta**.

Altri esempi

- **Arf-GTP**: usa un **lipide ancorato** per inserirsi nella membrana → **recluta COPI o clatrina**.
- **Rab7-GTP**: localizzato sugli **endosomi tardivi**, innesca **rivestimento retromeri**.

Disassemblaggio del Rivestimento Vescicolare

Perché smontare il rivestimento?

- Il rivestimento serve per **germinazione e selezione del carico**.
- Dopo il distacco → deve essere smontato:
 - Altrimenti **la vescicola non potrebbe fondersi** con il compartimento di destinazione.
- Meccanismo comune:
 - La **GTPasi di reclutamento idrolizza GTP** → passa a GDP.
 - **Cambiamento conformazionale** → la coda idrofoba lascia la membrana.
 - **Disassemblaggio del rivestimento**.

Tempistica del disassemblaggio

COPII (Sar1):

- **Idrolisi di GTP temporizzata** → garantisce che la **gemma si stacchi solo se la formazione è abbastanza rapida**.
- Se non avviene → **il rivestimento si smonta prima** e il processo ricomincia.

COPI (Arf):

- Una **ARF-GAP** rileva la **curvatura** della membrana.
- Quando la vescicola ha raggiunto la **curvatura giusta** → **stimola l'idrolisi di GTP** → **smontaggio**.

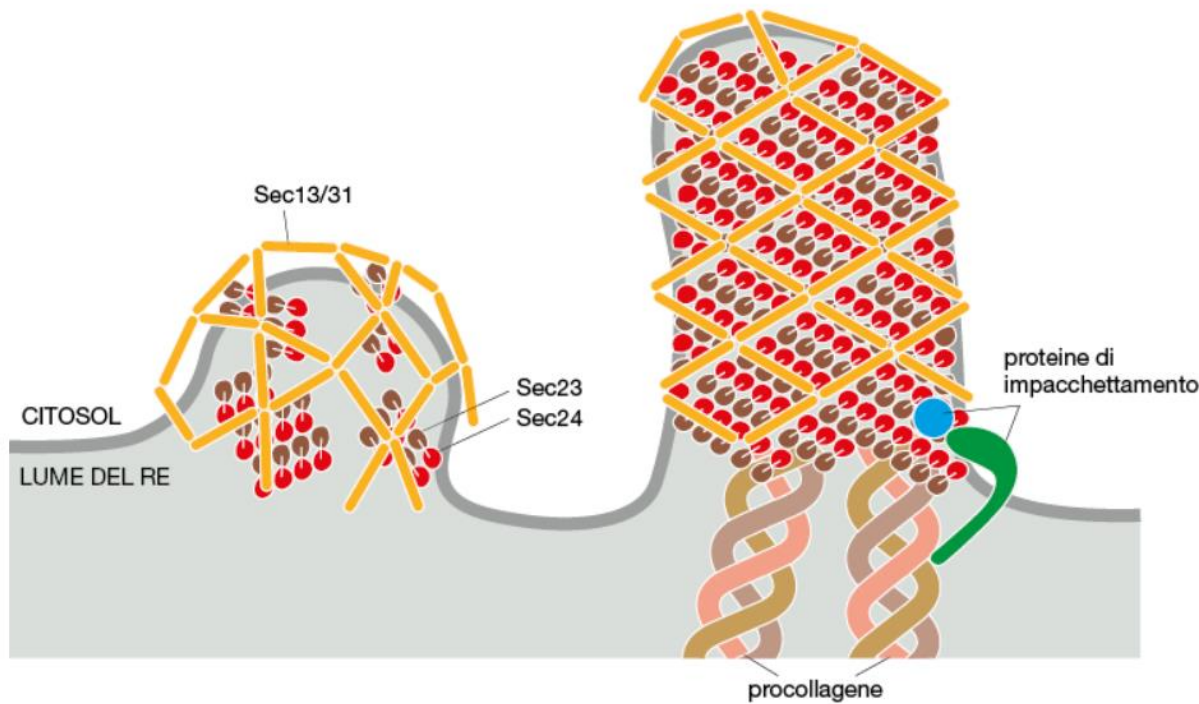
Clatrina (AP2):

- Smontaggio **subito dopo il distacco**.
- Richiede **auxilina + Hsp70 (ATP-dipendente)**.

Dopo il distacco

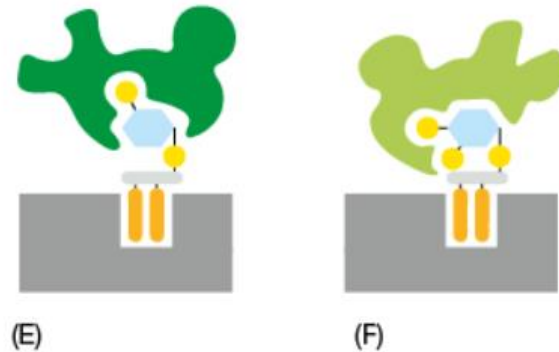
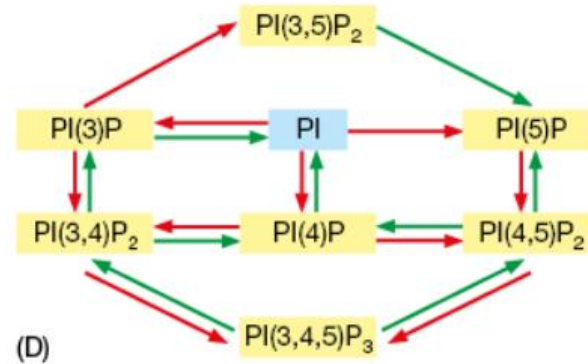
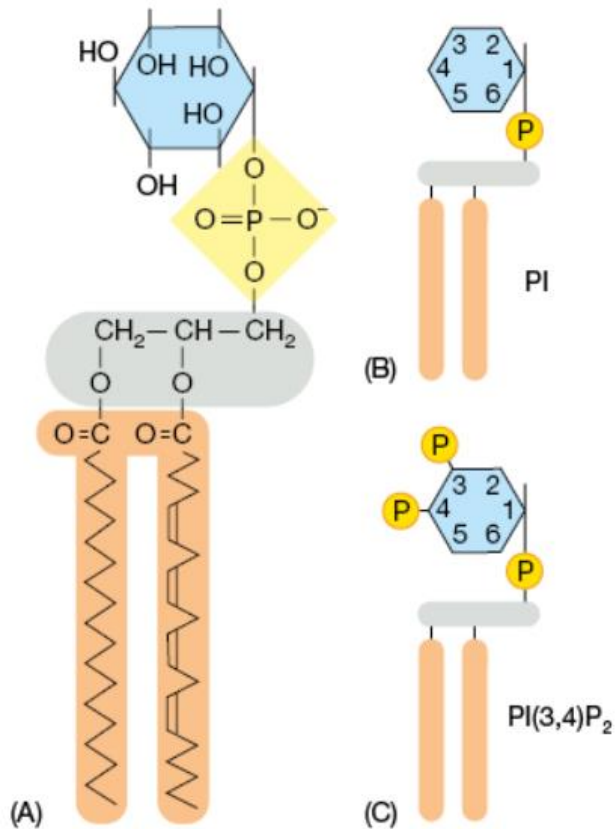
- Il rivestimento può restare **parzialmente stabilizzato** da **interazioni con i recettori cargo**.
- **Smontaggio completo** avviene quando la vescicola **raggiunge la membrana target**.
- Una **chinasi** → **fosforila proteine del rivestimento** → favorisce il distacco finale.

Variazioni nelle Dimensioni delle Vescicole



- Le vescicole **non hanno tutte la stessa forma**.
- Carichi diversi → necessitano adattamenti:
 - **Procollagene**: bastoncini rigidi lunghi 300 nm → **troppo grandi per vescicole standard** (60–80 nm).
 - Soluzione: **proteine di impacchettamento specializzate** + modifiche al rivestimento COPII → formazione di **vescicole/tubuli molto più grandi**.
 - Mutazioni → difetti nel collagene → anomalie scheletriche.
- **Tubuli di membrana**:
 - **Superficie/volume più alto** → ricchi di proteine transmembrana.
 - **Tipici negli endosomi** → **smistamento proteine**.
 - I **retromeri** favoriscono la formazione di tubuli.

Fosfatidilinositolo



Fosfoinositidi: regolatori chiave

- **<10% dei fosfolipidi totali → ma ruolo cruciale nella regolazione.**
- **Il gruppo inositolo può essere fosforilato alle posizioni 3', 4', 5'.**
- **Ne derivano diverse specie di PIP** (Phosphatidylinositol Phosphates).
- **Conversione dinamica PI ↔ PIP tramite chinasi e fosfatasi specifiche.**

Compartimentalizzazione

- **Le vie secretoria ed endocitica hanno set distinti di chinasi/fosfatasi.**
- **Risultato → ogni organulo mantiene una firma lipidica unica.**
- **Anche all'interno di una stessa membrana si creano domini specializzati.**

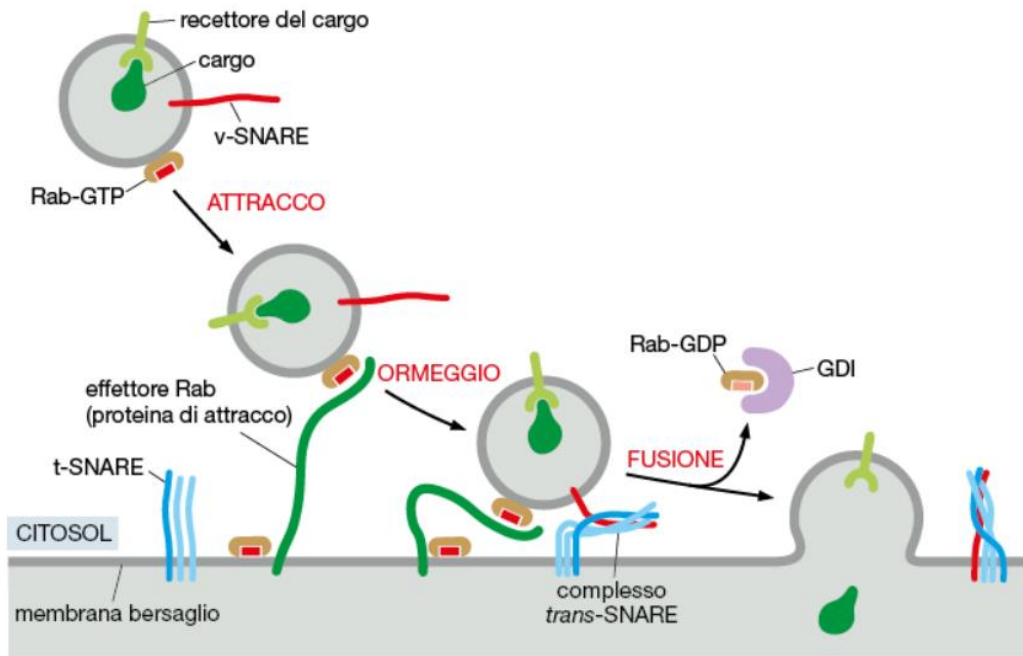
Le Proteine Rab

Famiglia delle Rab

- Sono **GTPasi monomeriche** (>60 membri).
- Ogni **Rab** → **legata a un organulo o tipo di vescicola specifica**.
- Funzionano come **marcatori molecolari di compartimenti e vescicole**.
- Ciclo attivo/inattivo:
 - **Rab-GDP** → **inattiva**, citosolica **legata a GDI**.
 - **Rab-GTP** → **attiva**, ancorata alla **membrana**, **recluta effettori**.

Perché servono le Rab?

- Nel citoplasma: **tante membrane potenziali bersaglio**.
- **Le vescicole** devono **riconoscere solo quella giusta**.
- **Due step di specificità**:
 - **Rab** → guida e attracco (indirizzo).
 - **SNARE** → fusione (porta d'ingresso).



Proteine	Organulo
Rab1	RE e apparato di Golgi
Rab2	Reticolo del <i>cis</i> -Golgi
Rab3A	Vescicole sinaptiche, vescicole secretorie
Rab4/Rab11	Endosomi di recupero
Rab5	Endosomi precoci, membrana plasmatica, vescicole rivestite di clatrina
Rab6	Reticolo mediale dell'apparato di Golgi e del <i>trans</i> -Golgi
Rab7	Endosomi tardivi
Rab8	Ciglia
Rab9	Endosomi tardivi, <i>trans</i> -Golgi

Schema Generale Meccanismo delle Rab

Fase	Stato della Rab	Proteine coinvolte	Funzione
1. Attivazione	Rab-GTP	GEF (sulla membrana di origine)	Reclutamento su vescicola
2. Trasporto	Rab-GTP	Effettori (motori, tethering factors)	Direzione verso il compartimento corretto
3. Tethering e fusione	Rab-GTP → interazione con effettori e SNARE	Tethering factors, SNARE	Ancoraggio e fusione specifica
4. Disattivazione e riciclo	Rab-GDP	GAP, GDI	Distacco e riutilizzo nel ciclo successivo

Tipo di vescicola	Rivestimento	Rab coinvolte principali	Fase regolata	Funzione chiave
Clatrina	Clatrina + adattine (AP-1, AP-2)	Rab5, Rab4, Rab7	Endocitosi e traffico TGN → endosomi	Regolano maturazione, uncoating, fusione con endosoma
COPII	Sec13/31, Sec23/24 (Sar1-GTP)	Rab1, Rab2	RE → Golgi	Direzionamento, tethering e fusione con ERGIC/cis-Golgi
COPI	Arf1-GTP + coatomer	Rab6, Rab33	Golgi → RE (retrogrado)	Fusione retrograda e mantenimento compartimentale

Funzioni delle Rab attivate (Tethering)

Guidano la vescicola:

- Legano proteine di ancoraggio (“lenze da pesca”) **sulla membrana bersaglio.**

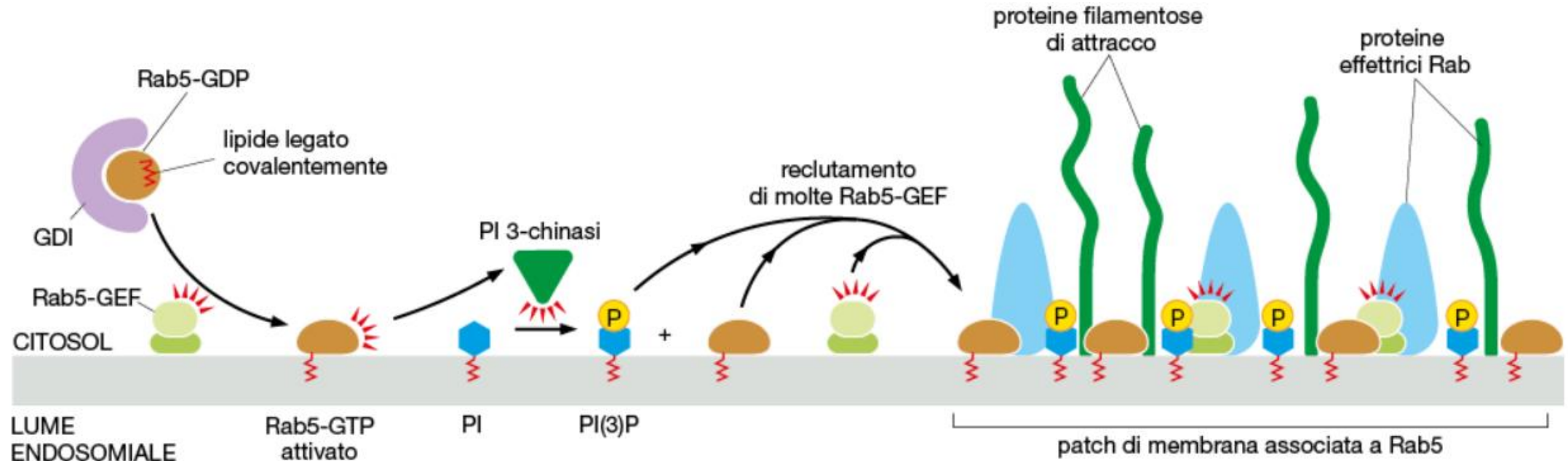
Trasporto:

- Interagiscono con motori → **spostamento su actina/microtubuli.**

Preparano la fusione:

- Reclutano effettori che **riconoscono SNARE sulla membrana bersaglio.**

Es.: Rab7 → sugli endosomi tardivi, è anche una GTPasi di reclutamento per i retromeri



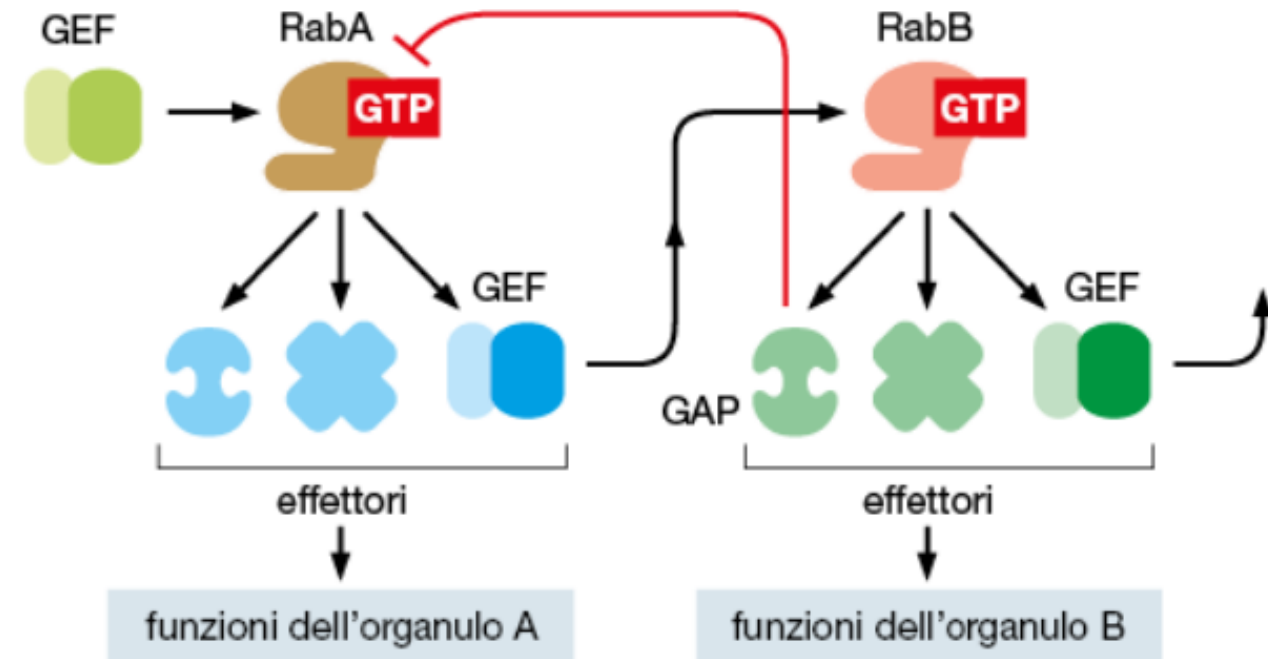
Cascata delle Rab

Rab e identità degli organuli

- Le Rab **non solo guidano** vescicole, **ma definiscono l'identità di un organulo**.
 - Es.: *Rab5* sugli endosomi precoci → recluta *PI 3-chinasi* → genera *PI(3)P* → attira effettori → crea un "dominio *Rab5*".
- Questi **domini sono patch funzionali** di membrana → regolano traffico in entrata/uscita.

Cascata Rab

- Una Rab può attivare la successiva → cambiamento di identità dell'organulo.
 - Es.: ***Rab5* → *Rab7*** durante la **maturazione endosomiale**.
 - Rab5*** attiva una **GEF per *Rab7***.
 - Rab7*** a sua volta recluta una **GAP per *Rab5*** → lo spegne.
- Risultato: endosoma precoce → endosoma tardivo → traffico verso lisosoma.
- Processo **unidirezionale e irreversibile**.



Le SNARE

Perché servono le SNARE?

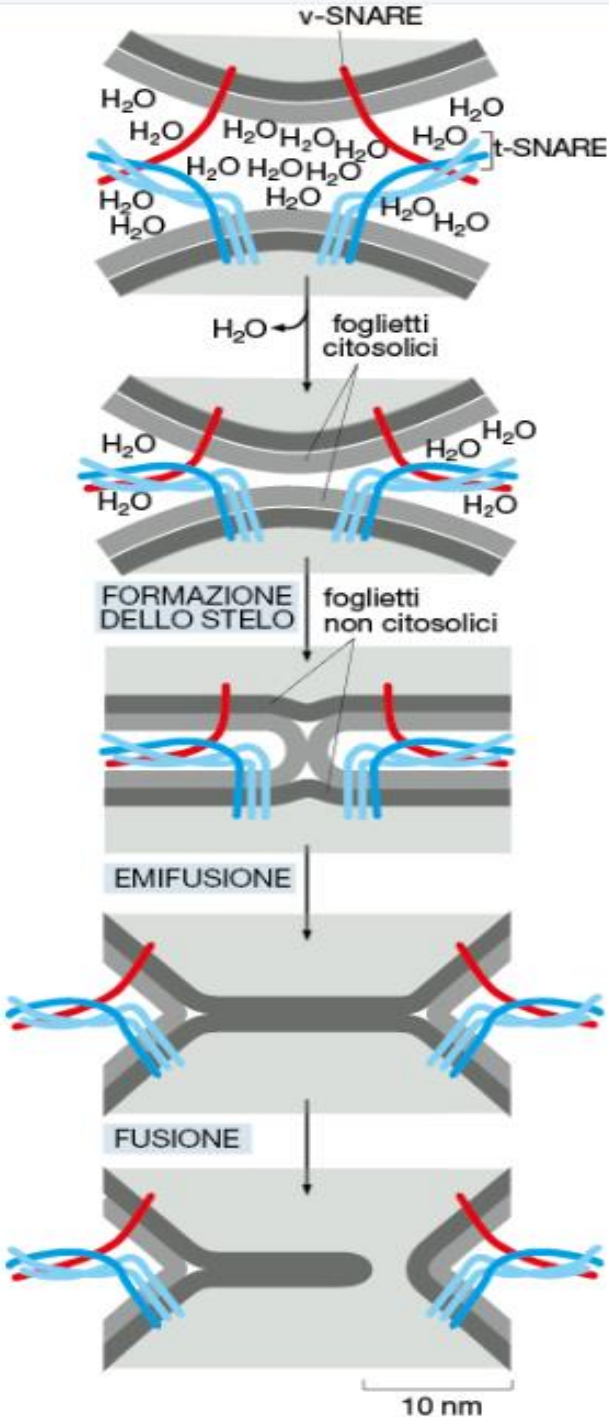
- La **fusione** richiede **avvicinare i doppi strati lipidici** a $< 1,5$ nm.
- Questo avvicinamento è **energeticamente sfavorevole** (molecole d'acqua da spostare).
- Servono **proteine di fusione specializzate** → le **SNARE**.

Tipi di SNARE

- **v-SNARE** → sulla **vescicola (singola catena)**.
- **t-SNARE** → sulla **membrana bersaglio (tipicamente 3 subunità)**.
- L'appaiamento è **altamente specifico** → garantisce corretto riconoscimento.

Meccanismo di fusione

1. v-SNARE e t-SNARE si avvolgono formando un **complesso a 4 eliche** (trans-SNARE).
2. Questo “cavo molecolare” tira le membrane l'una contro l'altra.
3. Espulsione delle molecole d'acqua → lipidi si riorganizzano.
4. Fasi:
 1. **Stelo di connessione**
 2. **Emifusione** (fusione dei foglietti citosolici)
 3. **Fusione completa** (apertura del poro).



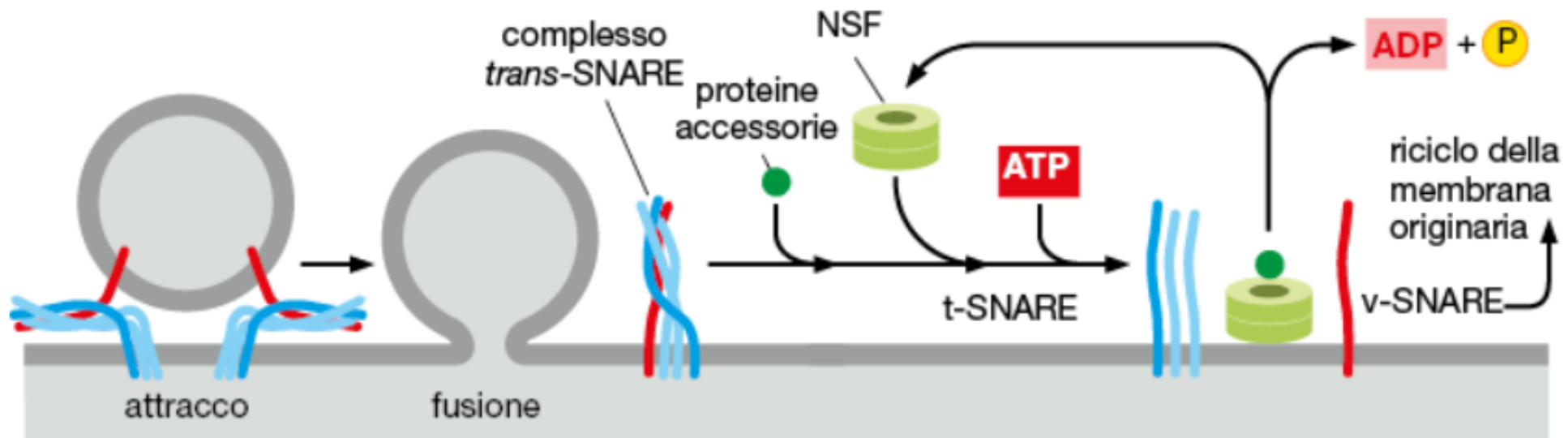
La Regolazione delle SNARE

Regolazione

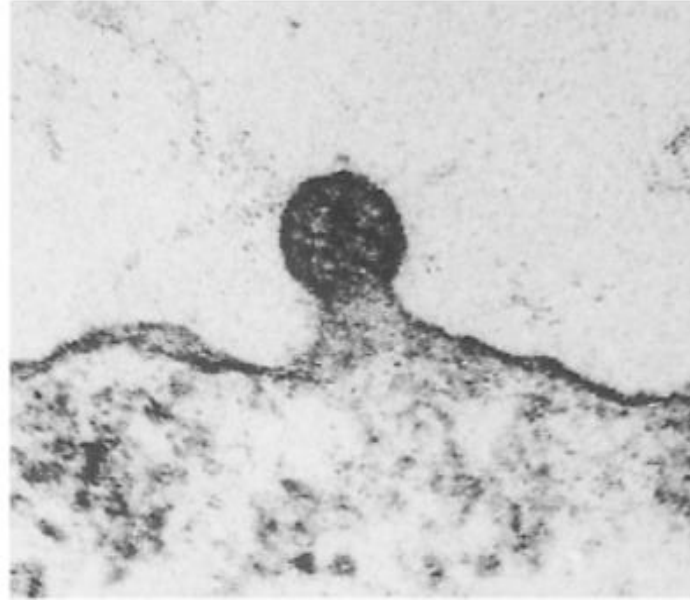
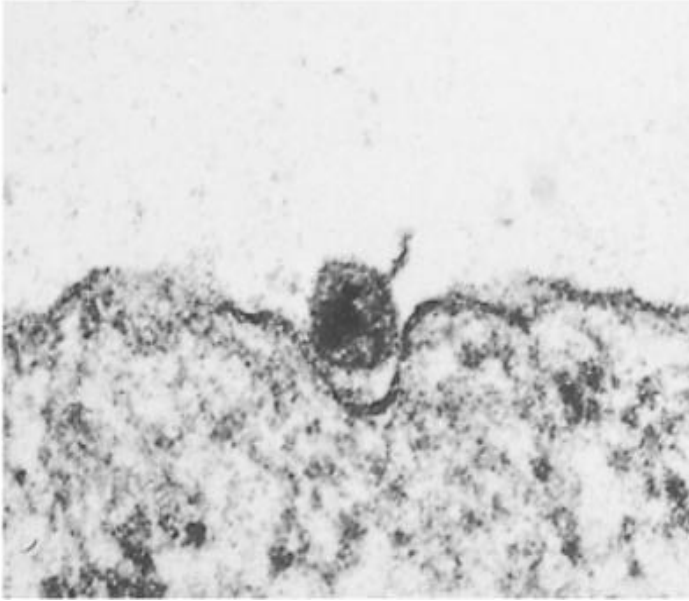
- L'assemblaggio SNARE è **spontaneo e molto stabile** → rilascia energia per la fusione.
- In processi regolati (es. **esocitosi sinaptica**), il completamento dell'appaiamento è **bloccato finché** non arriva un **segnale** (Ca^{2+} , ormoni, ecc.).

Reset del sistema

- Dopo la fusione, le **SNARE** devono essere **separate**.
- Proteine dette **SNAP** reclutano **NSF (AAA-ATPasi esamerica)** → che usano ATP per **disassemblare i complessi**.
- Le **v-SNARE** vengono **riciclate** al **compartimento di origine**.



I virus con Envelope Entrano per Fusione



I virus rivestiti da membrana (**enveloped viruses**) devono **fondersi con la membrana cellulare** per rilasciare il genoma.

- Due vie principali:
 - **Fusione diretta con la membrana plasmatica** (es. HIV).
 - **Fusione da endosoma** dopo endocitosi (es. influenza, coronavirus).

Meccanismo molecolare

Diverso dalle **SNARE**. Basta la sola proteina virale:

- **Si allunga verso la membrana** ospite.
- Inserisce una **regione idrofobica (peptide di fusione)** nella membrana.
- **Ripiega su se stessa** → trascina vicino le membrane.

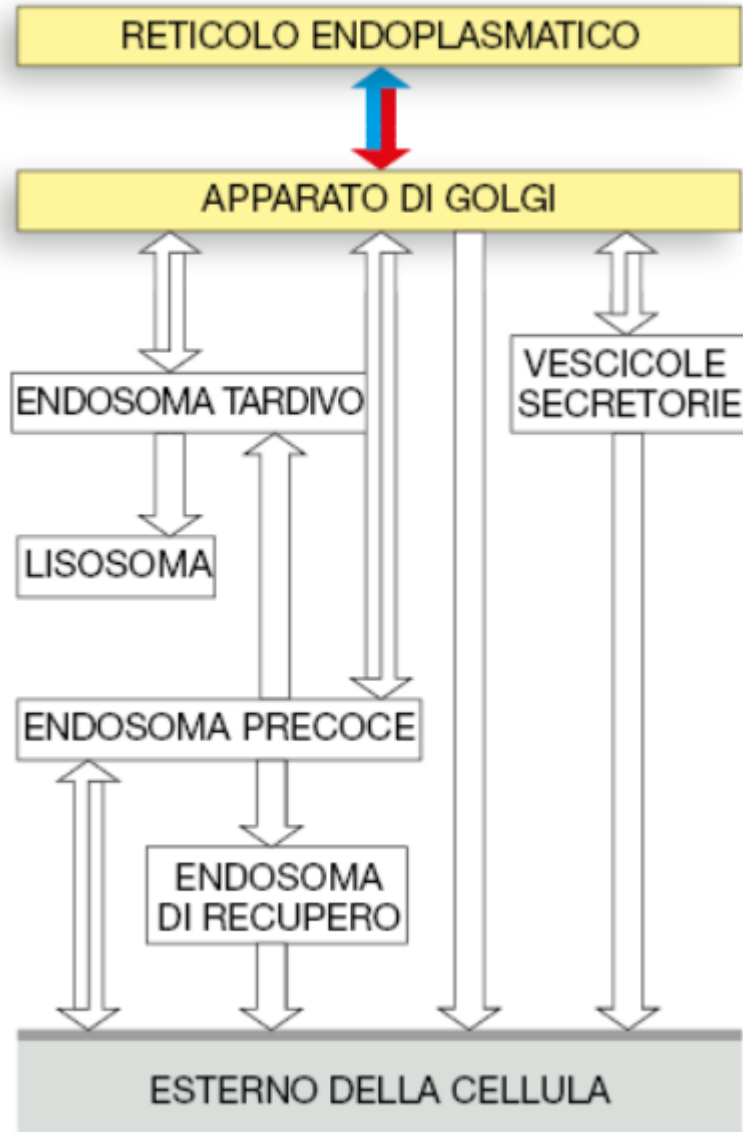
HIV

- L'HIV si **lega a recettori specifici** (**CD4** + co-recettori CCR5/CXCR4).
- Successivamente, **la sua proteina di fusione** media la fusione con la **membrana plasmatica**.
- Risultato → rilascio del **nucleocapside virale** nel citosol.

SARS-CoV-2

- La proteina **Spike (S)** è la **proteina di fusione**.
- **Richiede proteasi cellulari** (es. TMPRSS2, furina) che la clivano **per attivarla**.
- **Dopo il clivaggio**, la Spike **si compatta** → avvicina le membrane e **innesca la fusione**.

La via Secretoria dal RE al cis-Golgi

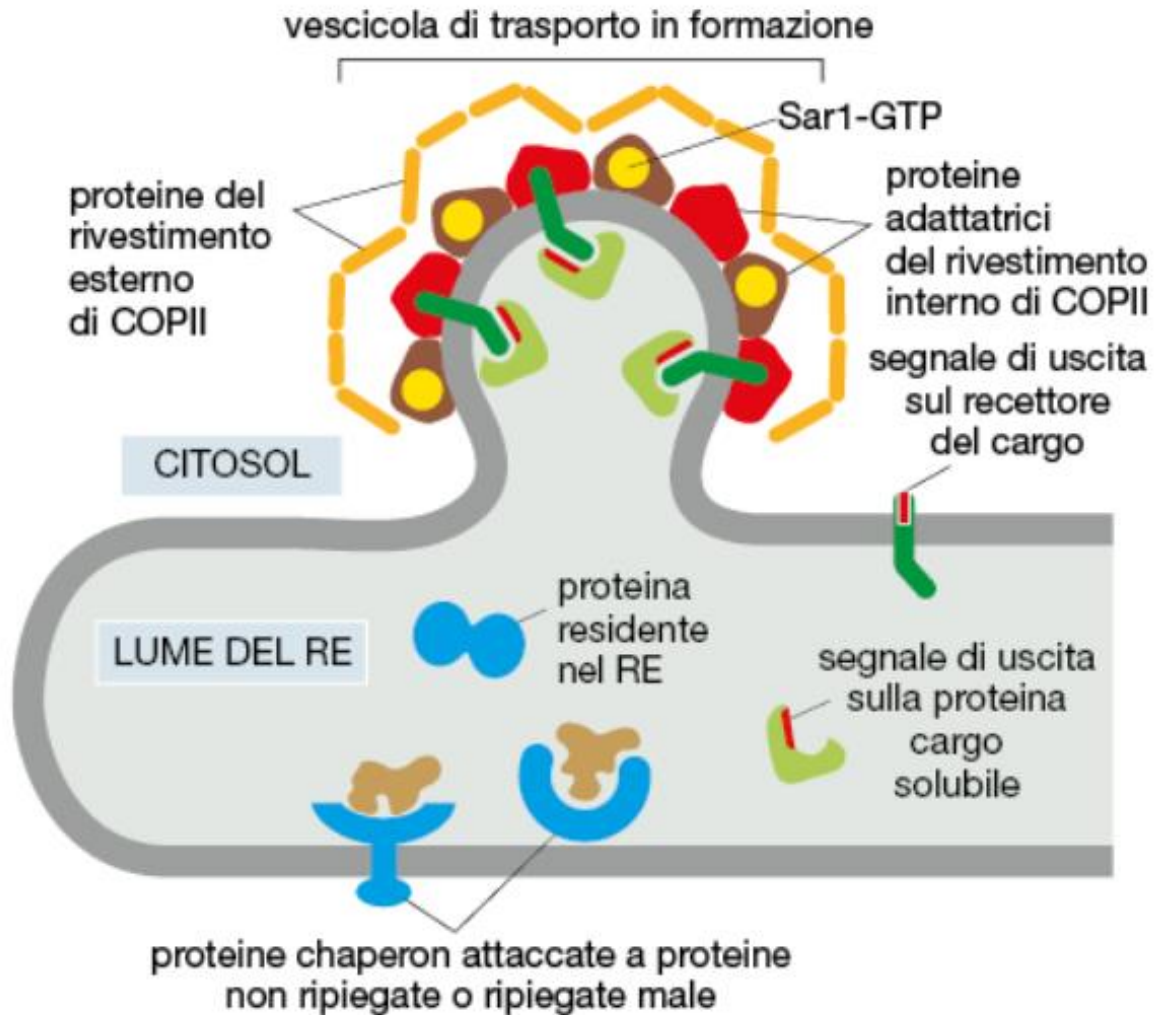


- Le **proteine neo-sintetizzate** entrano nel **RE** dal citosol.
- Successivamente: → **modificate e smistate** → **Golgi** → superficie cellulare o altri compartimenti.
- **È un sistema bilanciato:**
 - **Trasporto anterogrado** (RE → Golgi → membrana plasmatica / endosomi).
 - **Trasporto retrogrado** (recupero proteine che devono restare nel RE o nel Golgi).

Funzioni dell'Apparato di Golgi

- **Sintesi carboidrati:** polisaccaridi (es. pectina e glicosamminoglicani negli animali).
- **Glicosilazione:** aggiunta e rimodellamento di oligosaccaridi a proteine e lipidi.
- **Smistamento e spedizione:**
 - **Etichette oligosaccaridiche** dirigono proteine verso endosomi/lisosomi.
 - Altre **proteine/lipidi** sono **instradati verso la membrana plasmatica** o secrezione.

Uscita dal RE: Vescicole COPII



Uscita dal RE: Vescicole COPII

- Le proteine destinate al Golgi escono dal RE tramite **vescicole rivestite di COPII**.
- Origine: **siti di uscita dal RE** (senza ribosomi).

Selezione del carico: Selettiva o di default

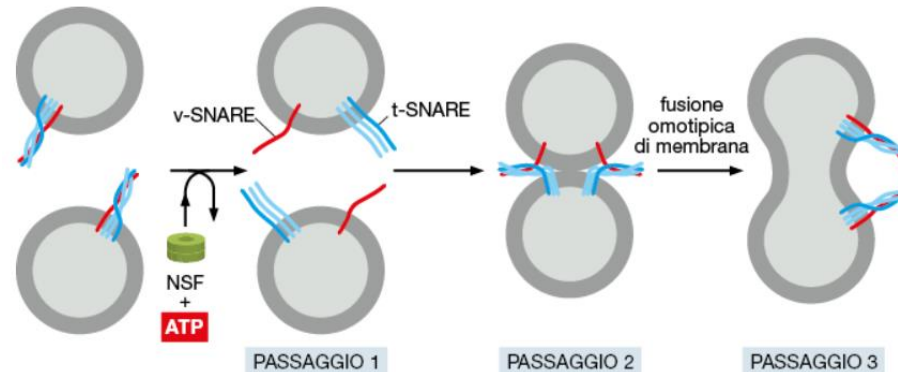
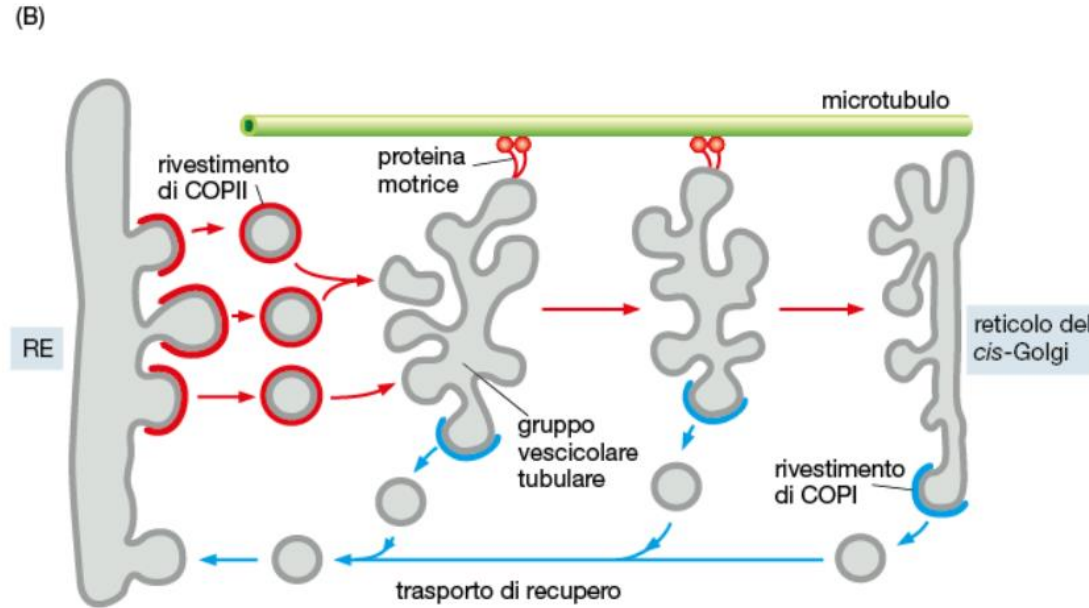
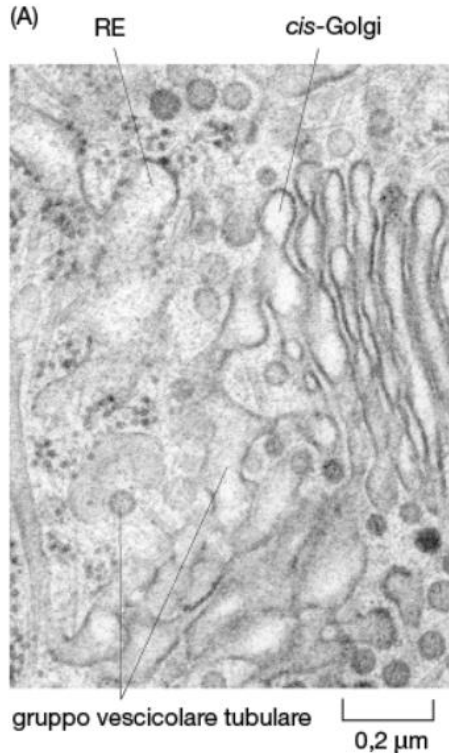
- Molte proteine transmembrana hanno **segnali di uscita** riconosciuti da adattatori COPII.
- Proteine solubili → **legate a recettori transmembrana del cargo**.
- Proteine senza segnali → possono uscire comunque (flusso di massa).

Le **proteine residenti del RE** che sfuggono vengono recuperate (via retrograda).

Controllo di qualità

- **Solo proteine** correttamente **ripiegate e assemblate** passano.
- **Proteine non ripiegate** → trattenute da **chaperon**.
- Meccanismo essenziale per la funzionalità cellulare.

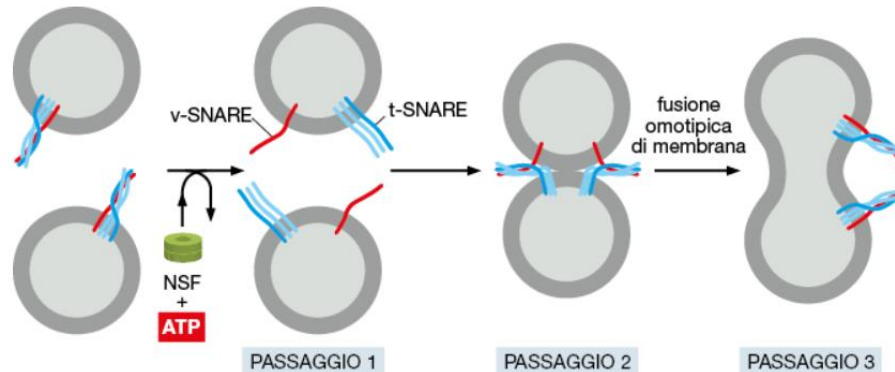
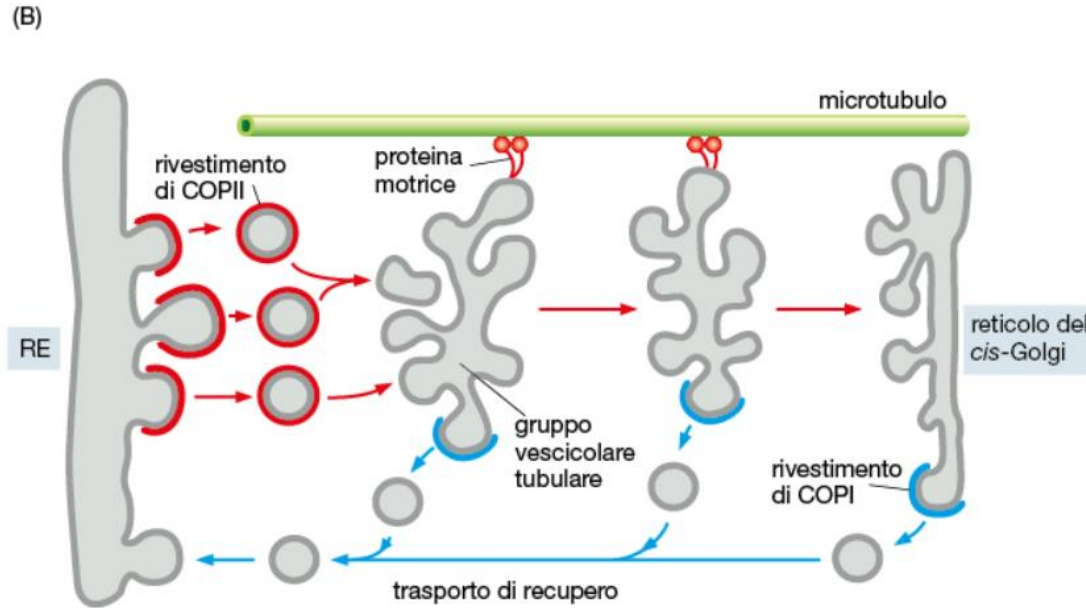
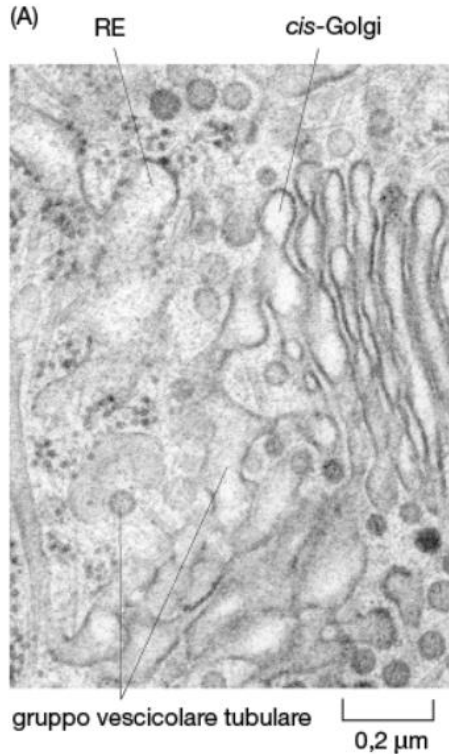
Dal RE al *cis*-Golgi: i Gruppi Vescicolari Tubulari



- ☐ Vescicole COPII gemmano dal RE
- ☐ Perdono il rivestimento
- ☐ Fusione omotipica
- ☐ Formazione di gruppi vescicolari tubulari (GVT).

- Sono **compartimenti transitori** distinti dal RE.
- Si muovono lungo i **microtubuli** → Golgi.
- Subito iniziano a gemmare vescicole **COPI** → recupero al RE.

Trasporto Retrogrado (COPI)

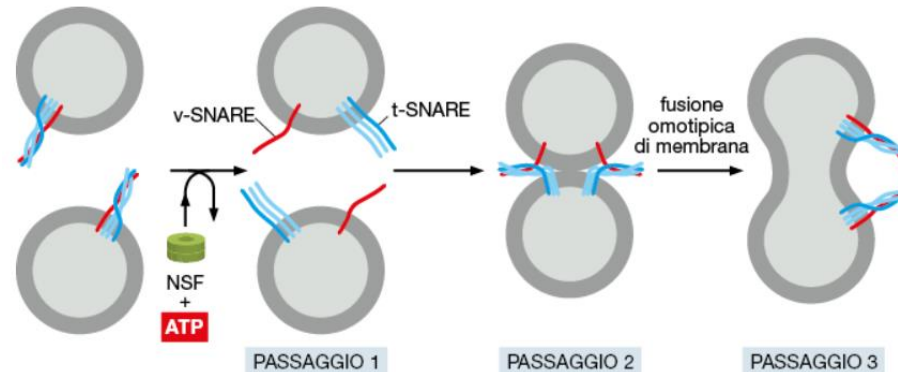
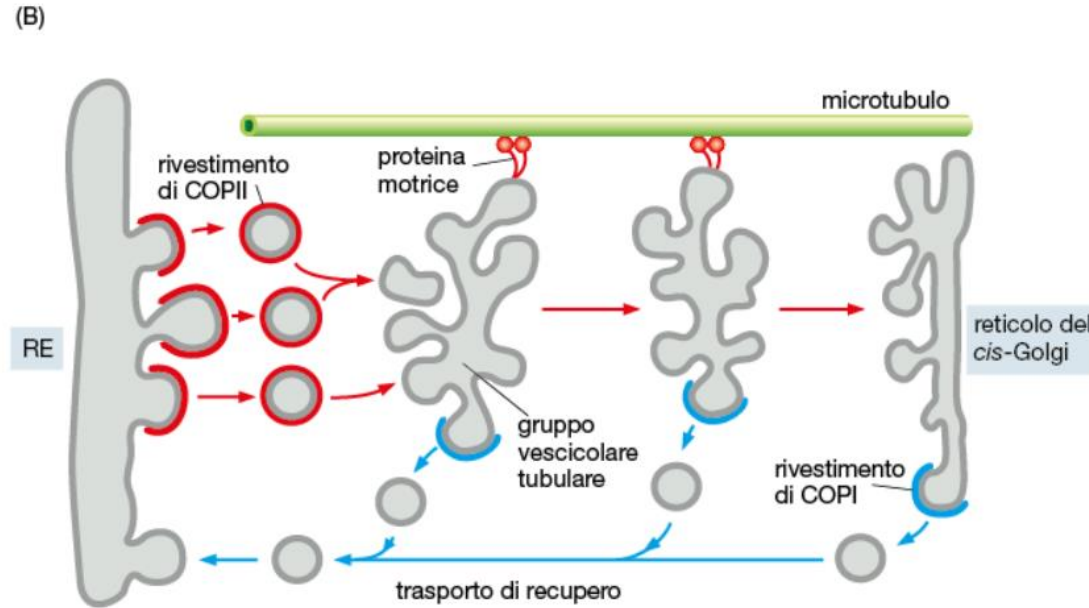
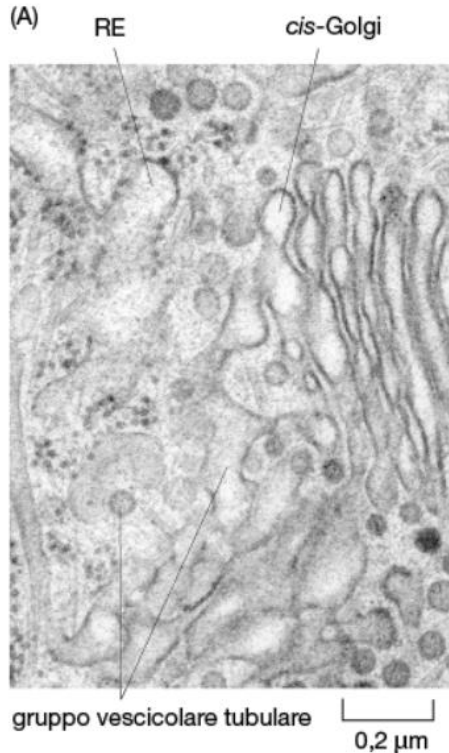


❑ Le vescicole COPI riportano indietro:

- **Proteine residenti del RE** sfuggite.
- **Recettori del cargo.**
- **SNARE e altre proteine** usate nella gemmazione e fusione.

Il recupero avviene sia dai GVT sia direttamente dal Golgi.

Dinamica del Trasporto



❑ **Trasporto anterogrado (COPII) e retrogrado (COPI) avvengono in parallelo.**

Il GVT maturano continuamente:

- Perdono proteine recuperate al RE.
- Arricchiscono proteine destinate al Golgi.

Un fine coordinamento → mantiene l'identità dei compartimenti.

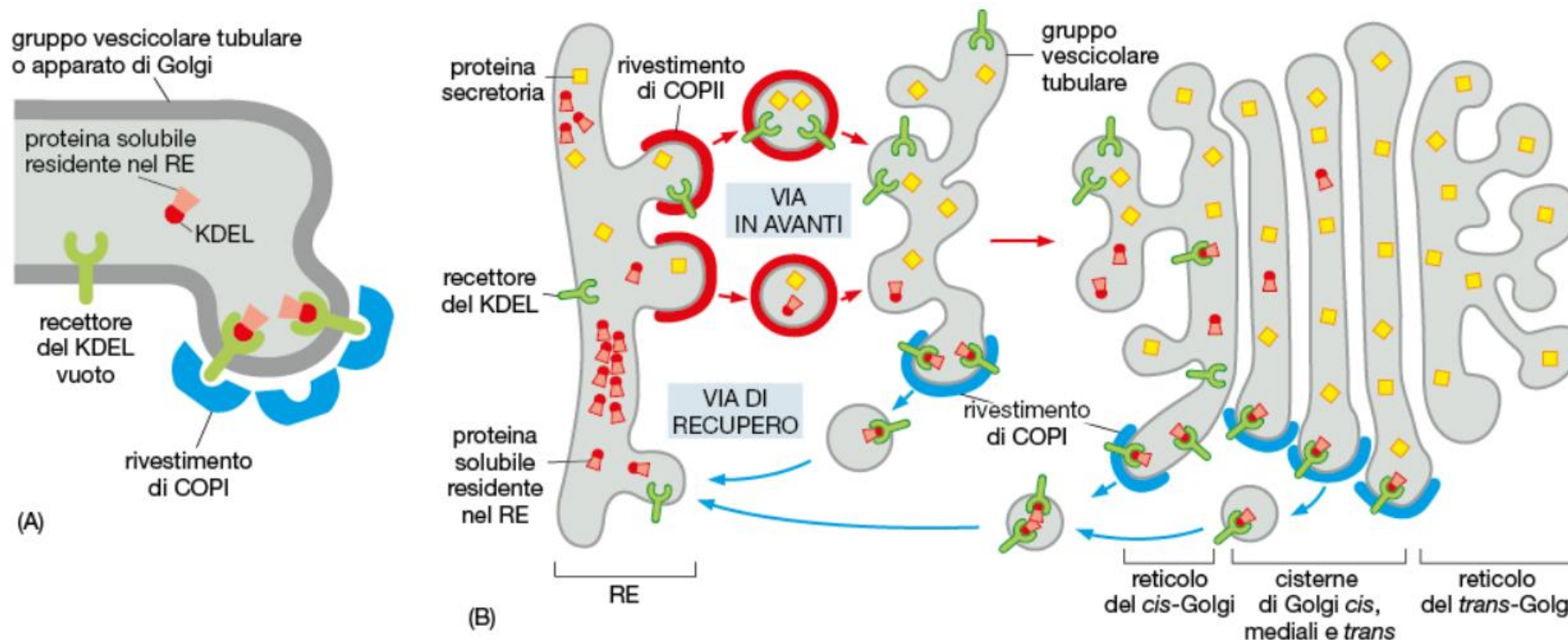
Segnali di recupero per proteine di membrana

Perché serve il recupero?

- Alcune proteine residenti del RE (es. **chaperon**, **SNARE**, **recettori del cargo**) sfuggono verso i **gruppi vescicolari tubulari** o il **Golgi**.
- **Devono essere riportate indietro** al RE.
- Il recupero avviene tramite **vescicole COPI retrograde**.

Segnali di recupero per proteine di membrana

- Le **proteine transmembrana residenti nel RE** espongono segnali specifici sulla coda citosolica.
- Segnale più noto: **sequenza KKXX** (Lys-Lys-X-X, al C-terminale).
- Funzione: **interagisce direttamente con il rivestimento di COPI** → reclutamento nella **vescicola retrograda**.



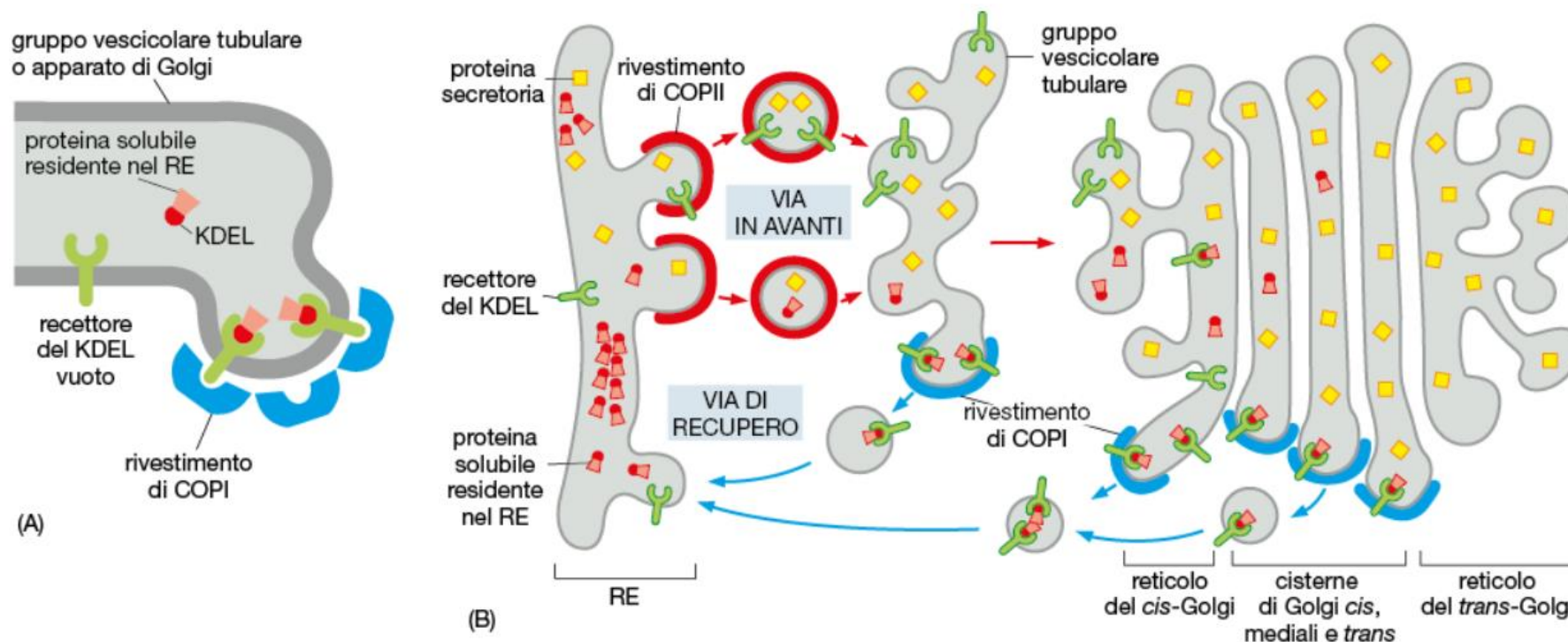
Segnali di recupero per proteine solubili

Segnali di recupero per proteine solubili

- Proteine solubili del RE (es. **BiP**) hanno un segnale diverso: **sequenza KDEL** (Lys-Asp-Glu-Leu, al C-terminale).
- Da sole **non possono interagire con COPI**.
- **Necessitano di un recettore transmembrana KDEL.**

Il recettore KDEL

- **Riconosce proteine con KDEL** nel Golgi e nei GVT.
- **Le impacchetta in vescicole COPI** per riportarle nel RE.
- Il **legame tra recettore KDEL e proteine KDEL è pH-dipendente**.
- **Nel Golgi: pH più acido** → un'istidina nel recettore si protona → **alta affinità per KDEL**.
- **Nel RE: pH più neutro** → **il recettore rilascia la proteina**.
- Questo meccanismo assicura **direzionalità** al trasporto.



Meccanismi di Ritenzione nel RE

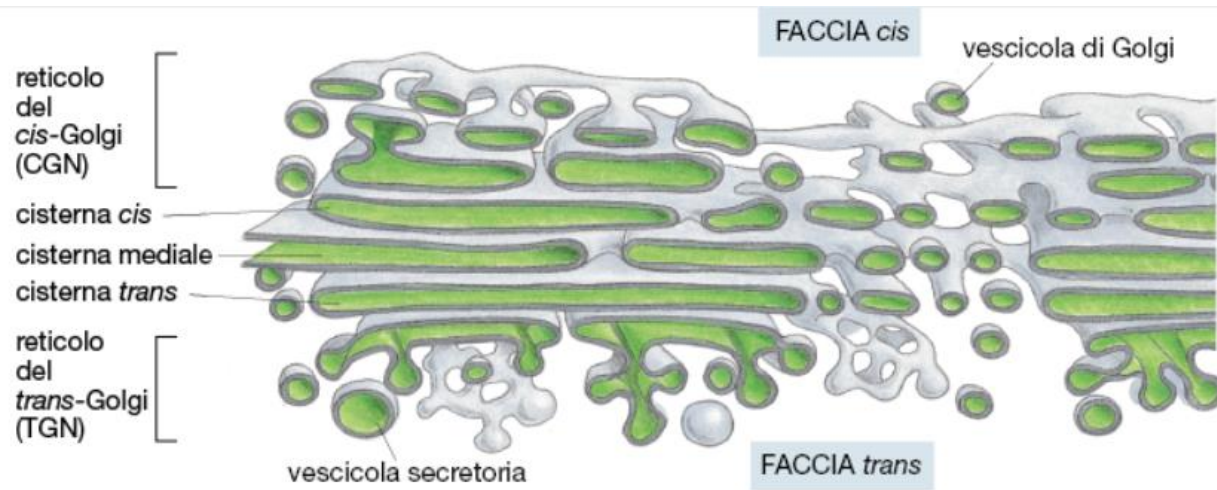
Meccanismi di ritenzione nel RE

- La via **KDEL** spiega solo in parte la localizzazione delle proteine residenti.
- Esiste un meccanismo addizionale:
 - **Formazione di complessi proteici** → **troppo grandi per entrare nelle vescicole** di trasporto.
 - Favorito dall'**alta concentrazione** di **proteine residenti nel RE** (millimolare).
- Risultato:
 - Solo **le proteine che sfuggono a questa ritenzione** sono catturate e **recuperate via KDEL**.

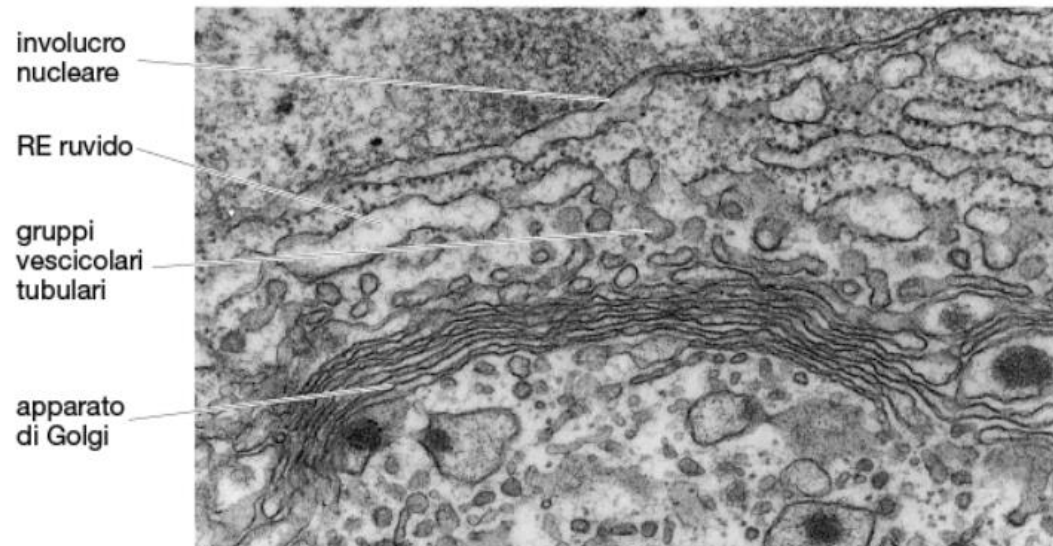
Ritenzione in Golgi

- **Meccanismo generale:** aggregazione/legami multipli tra proteine residenti.
- Esempio: **enzimi del Golgi** che agiscono in sequenza → **formano complessi** → **restano nelle loro cisterne** specifiche.
- Questo **evita che enzimi chiave entrino in vescicole** in uscita.

Struttura dell'Apparato di Golgi

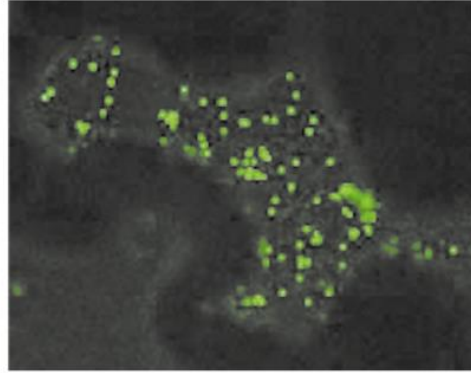
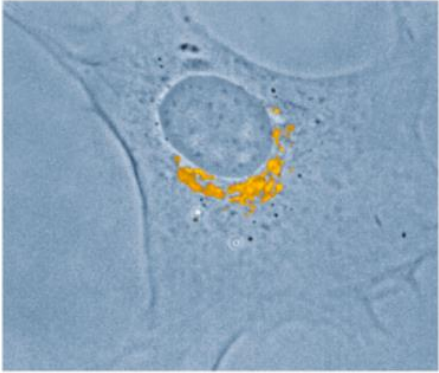


(A)



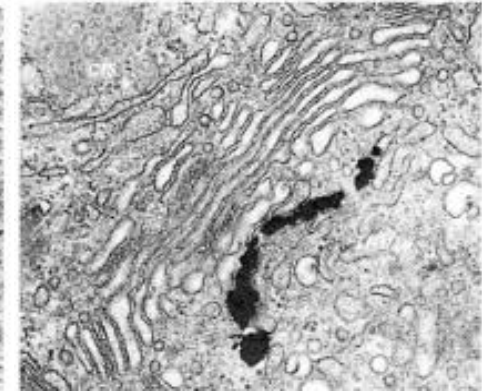
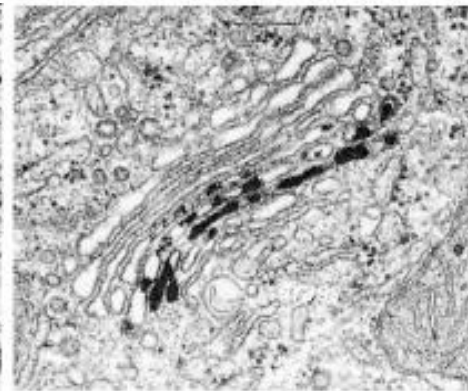
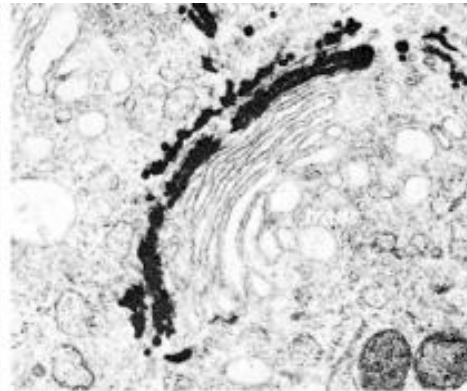
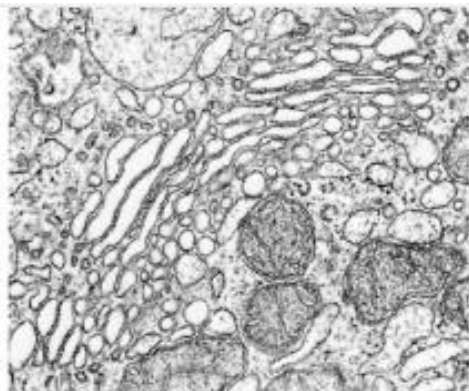
- Organulo a forma di **pila di cisterne appiattite** (4–6 nelle cellule animali, fino a 20 nei flagellati).
- **Due facce distinte:**
 - **Cis** (entrata, lato RE).
 - **Trans** (uscita, verso membrana plasmatica/altra destinazione).
- Associate a due reti:
 - **CGN (cis-Golgi network):** riceve proteine dal RE, smista tra avanzamento o recupero.
 - **TGN (trans-Golgi network):** smista proteine mature → lisosomi, membrana plasmatica, secrezione.

Struttura e Localizzazione del Golgi



Localizzazione del Golgi

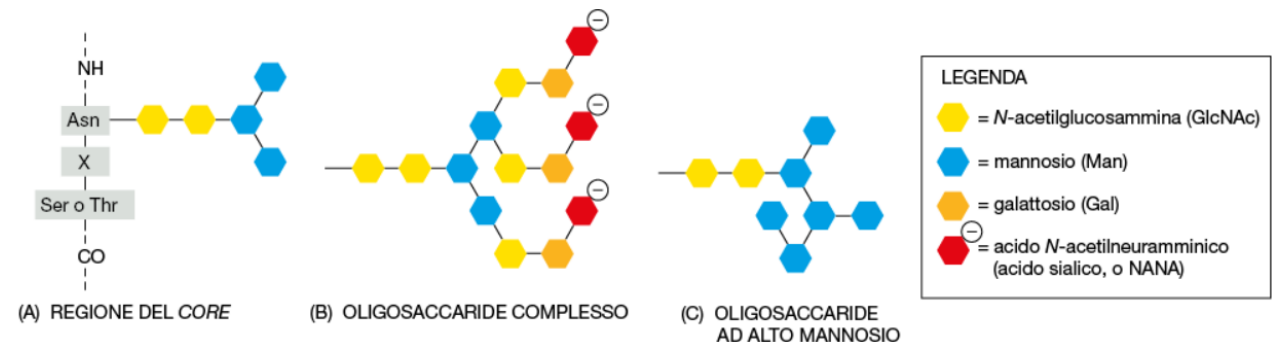
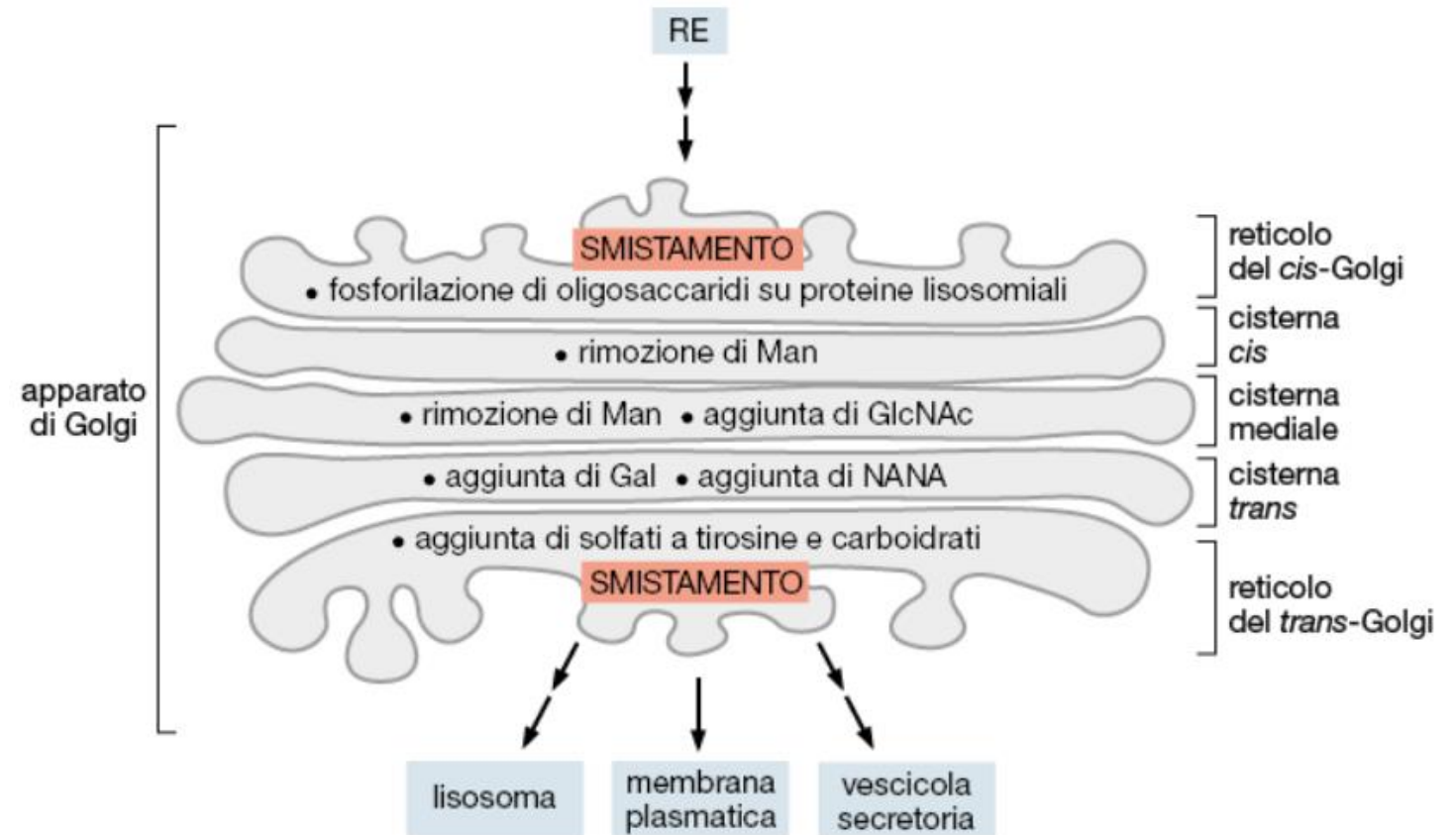
- **Nelle cellule animali:** vicino al **nucleo** e al **centrosoma**, organizzato dai microtubuli.
- Se i microtubuli sono depolimerizzati: Golgi → frammentato in pile separate vicino ai siti di uscita del RE.
- Nelle cellule vegetali: centinaia di pile di Golgi sparse nel citoplasma.



Modifiche degli Oligosaccaridi

Modifiche degli Oligosaccaridi

- Dopo il RE, gli **oligosaccaridi legati a N** vengono **rimodellati nel Golgi**.
- Ogni cisterna contiene **enzimi specifici**, distribuiti in modo graduale:
 - **Cis/mediale** → **rimozione mannosio, aggiunta GlcNAc**.
 - **Trans/TGN** → **aggiunta galattosio e acido sialico (NANA)**.
- Risultato: formazione di **catene oligosaccaridiche mature** → essenziali per funzione e smistamento delle proteine.



Due classi di Oligosaccaridi N-linked

Due classi di oligosaccaridi N-linked

- **Alto mannosio:** subiscono solo tagli → nessuna aggiunta di zuccheri.
- **Complessi:** tagli + aggiunta di nuovi zuccheri (Gal, GlcNAc, NANA, ecc.).
- La conversione dipende dall'**accessibilità del sito**:
 - **esposto** → **processato a complesso**.
 - **nascosto** → resta **alto mannosio**.
- L'**acido sialico** conferisce **carica negativa** → importante per interazioni extracellulari.

Enzimi del Golgi

- Le **proteine residenti del Golgi** sono **tutte transmembrana** (passaggio singolo).
- **Glicosidasi e glicosil-transferasi** sono spesso organizzate in **complessi multienzimatici**.
- **Distribuzione ordinata nelle diverse cisterne** → sequenza di modifiche precisa.

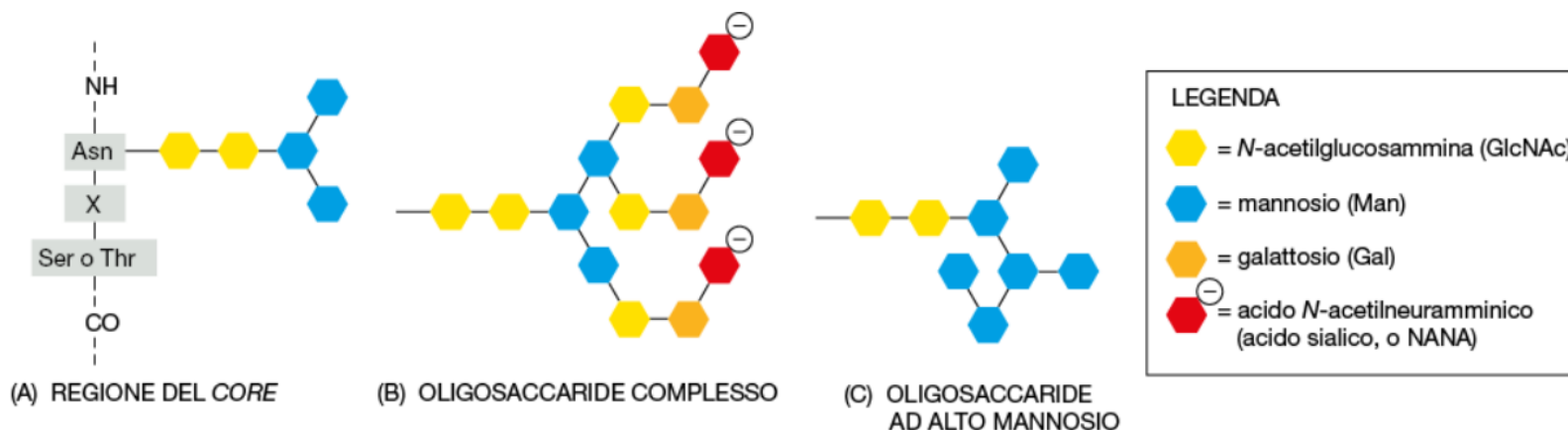


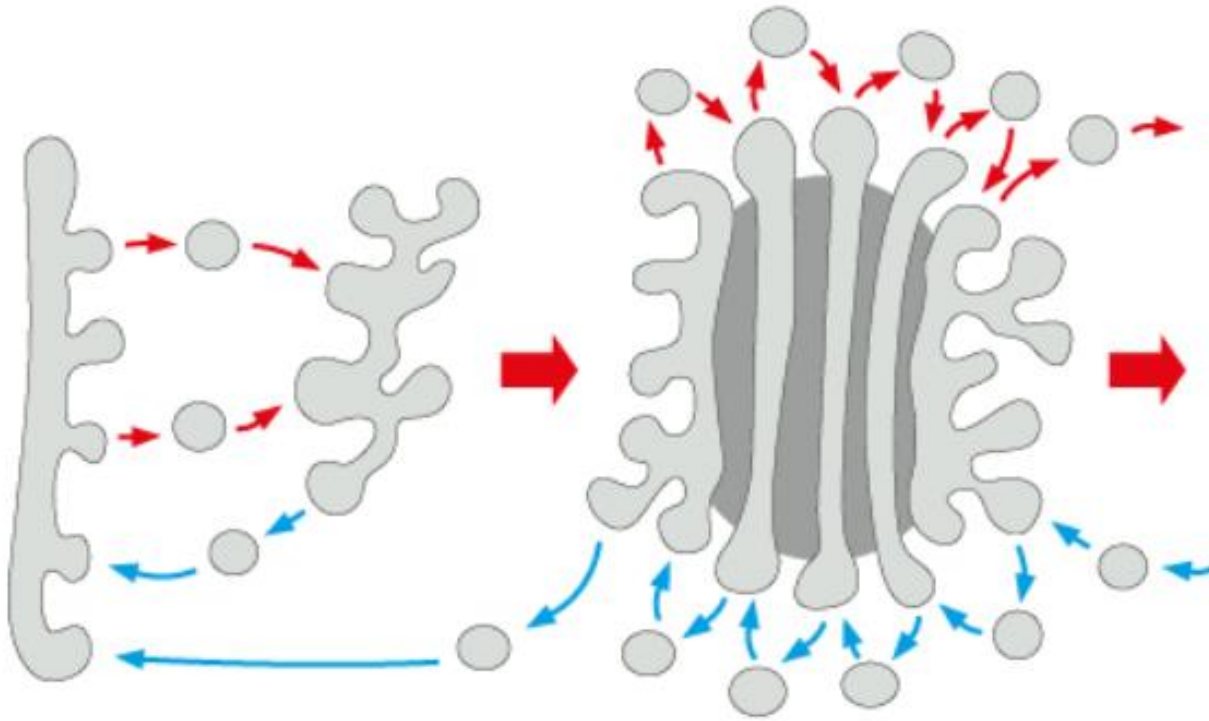
Diagram illustrating the structure of a protein with a glycan chain. The protein backbone is shown in blue, yellow, and red. The glycan chain is shown in blue, yellow, and red. Labels indicate the components: mannosio (mannose), GlcNac (N-acetylglucosamine), and asparagina (asparagine).

- Promuove il **ripiegamento proteico** (solubilità + “codice glucidico”).
- **Protezione** da **proteasi** (rivestimento di zuccheri).
- **Partecipazione** allo **smistamento nel TGN**.
- **Riconoscimento cellula-cellula** (lectine, selectine).
- Modula le **proprietà antigeniche e funzionali**



- **Presente in tutti gli eucarioti**, simile nei lieviti e perfino negli archei.
- **Probabile origine antica** → funzione iniziale di “**mantello protettivo**” flessibile.
- Evoluta per **ruoli multipli in sviluppo**, **immunità e fisiologia** cellulare.

Trasporto attraverso il Golgi: Modello del Trasporto Vescicolare



(A) MECCANISMO DI TRASPORTO VESCICOLARE

Il Golgi deve:

- mantenere **polarità e struttura multicisterna**,
- **garantire** il **transito ordinato** delle proteine,
- **trattenere** le **proteine residenti**.

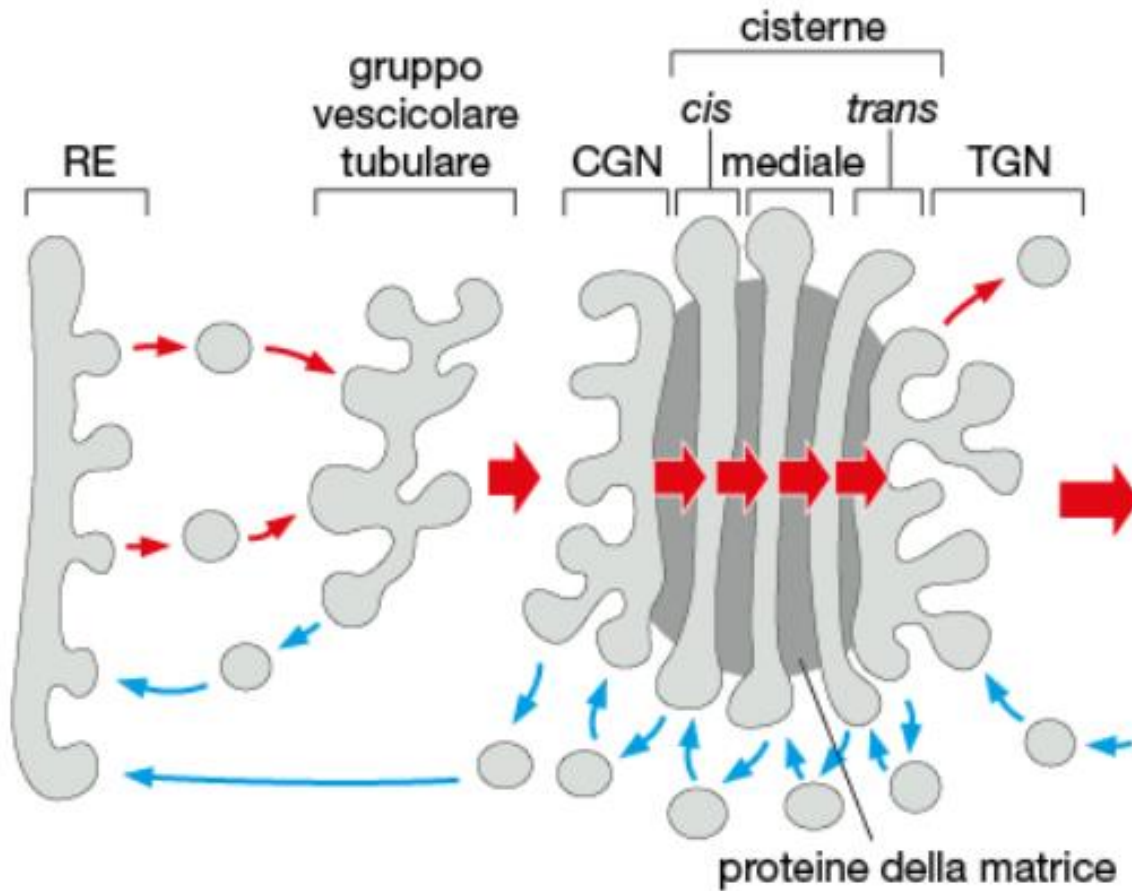
Due principali modelli:

- **Trasporto vescicolare**
- **Maturazione delle cisterne**

Modello del trasporto vescicolare

- Le cisterne sono **compartimenti statici**.
- Le **vescicole COPII** trasportano il carico **da cis a trans** (forward).
- Le **proteine residenti sfuggite** vengono **riportate** indietro da **vescicole di recupero**.
- **Analogia** con il trasporto **RE → Golgi**.

Trasporto attraverso il Golgi: Modello della Maturazione delle Cisterne

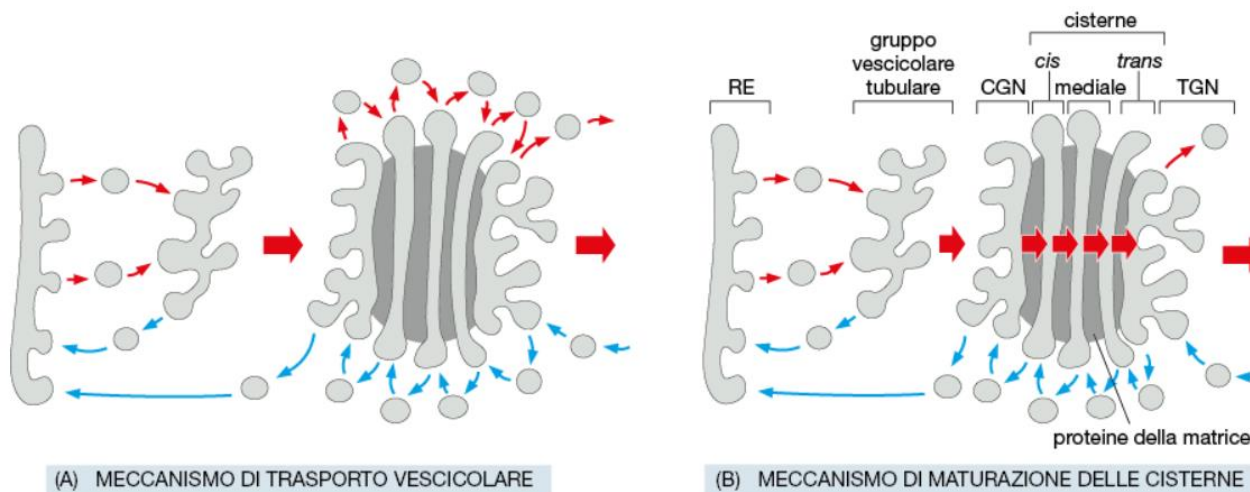


(B) MECCANISMO DI MATURAZIONE DELLE CISTERNE

Modello della maturazione delle cisterne

- **Le cisterne si formano continuamente** a partire dai **gruppi vescicolari tubulari** (dal RE).
- **Una cisterna cis → diventa mediale → poi trans**, man mano che **cambia composizione enzimatica**.
- Gli **enzimi residenti migrano all'indietro** in vescicole COPI.
- Adatto a **spiegare il trasporto di grandi cargo** (procollagene, lipoproteine).

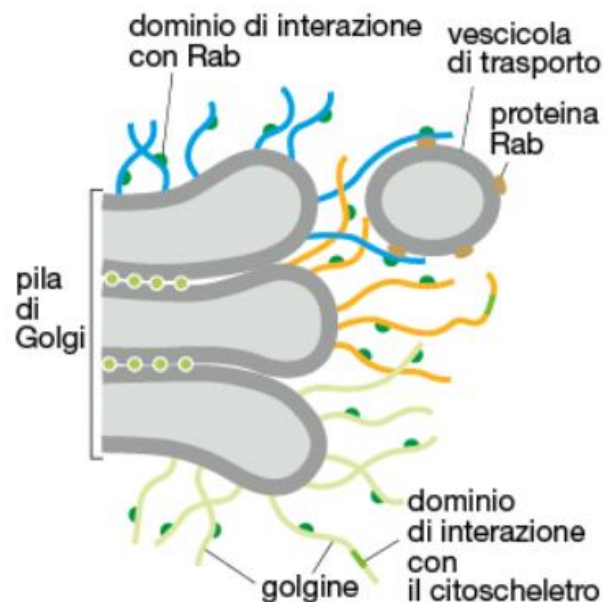
Visione Integrata



Probabile coesistenza dei due meccanismi:

- **Trasporto vescicolare** → per piccoli cargo solubili e rapidi.
- **Maturazione delle cisterne** → per grandi complessi macromolecolari.

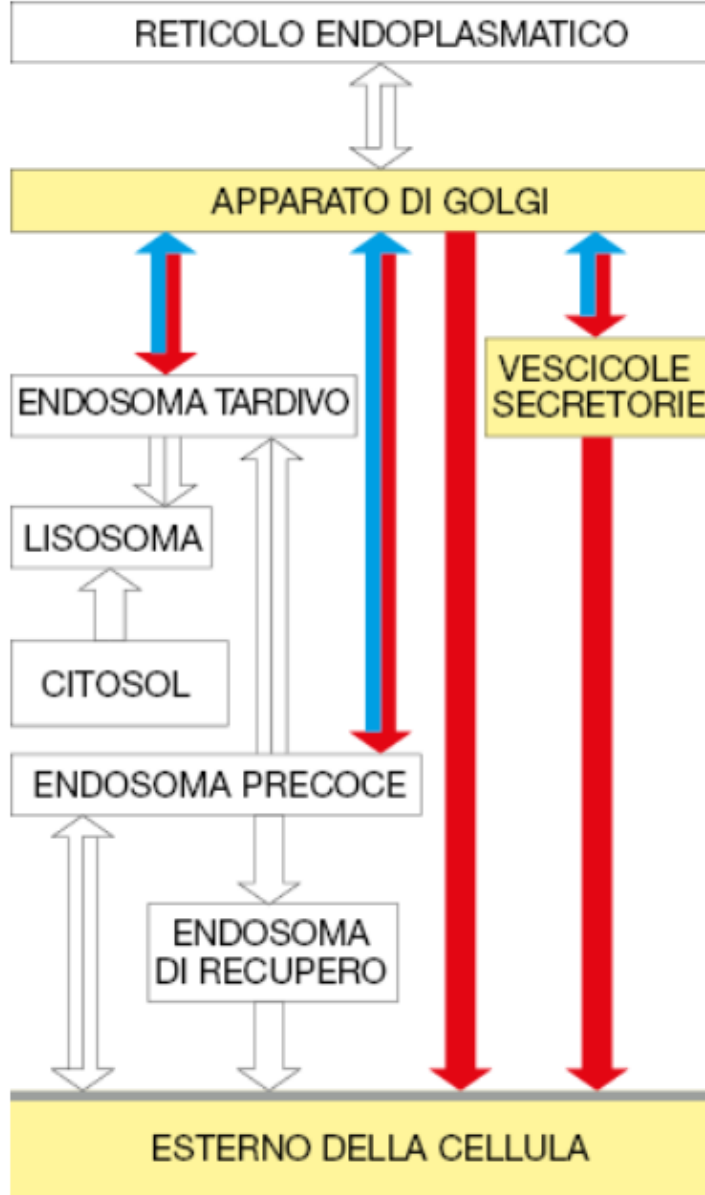
Ipotesi di un core stabile al centro della cisterna, con **regioni periferiche** soggette a maturazione e fusione.



Organizzazione della pila: proteine della matrice

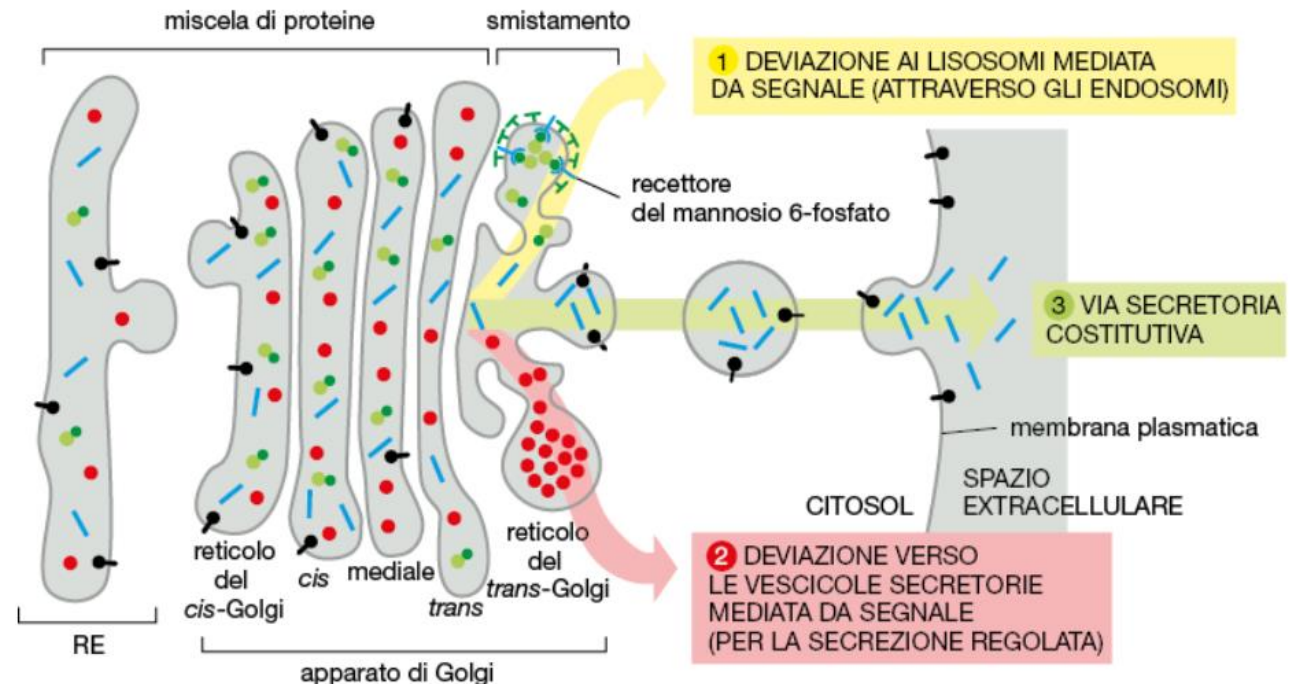
- **GRASP** → scaffold che impila le cisterne.
- **Golgine** → lunghe proteine coiled-coil, creano una “foresta” che:
 - **interagisce** con **Rab** specifiche,
 - **cattura le vescicole** in arrivo.

La via Secretoria dal *trans*-Golgi all'Esterno della Cellula

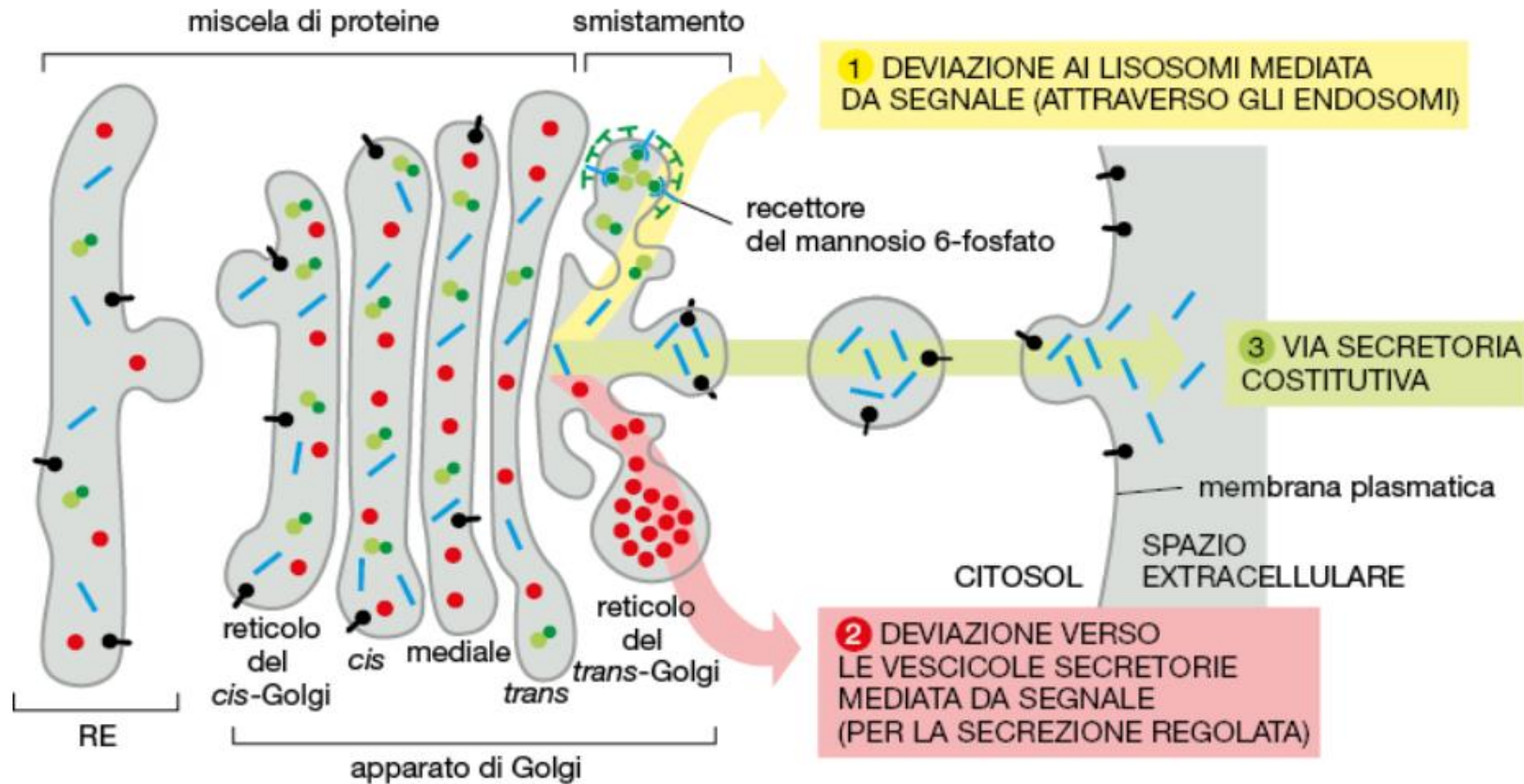


Smistamento al TGN (*trans*-Golgi Network)

- Il **TGN** è una stazione di smistamento.
- Dal TGN partono **tre principali vie di trasporto**:
 - **Secrezione costitutiva**
 - **Secrezione regolata**
 - **Via endosoma → lisosoma**



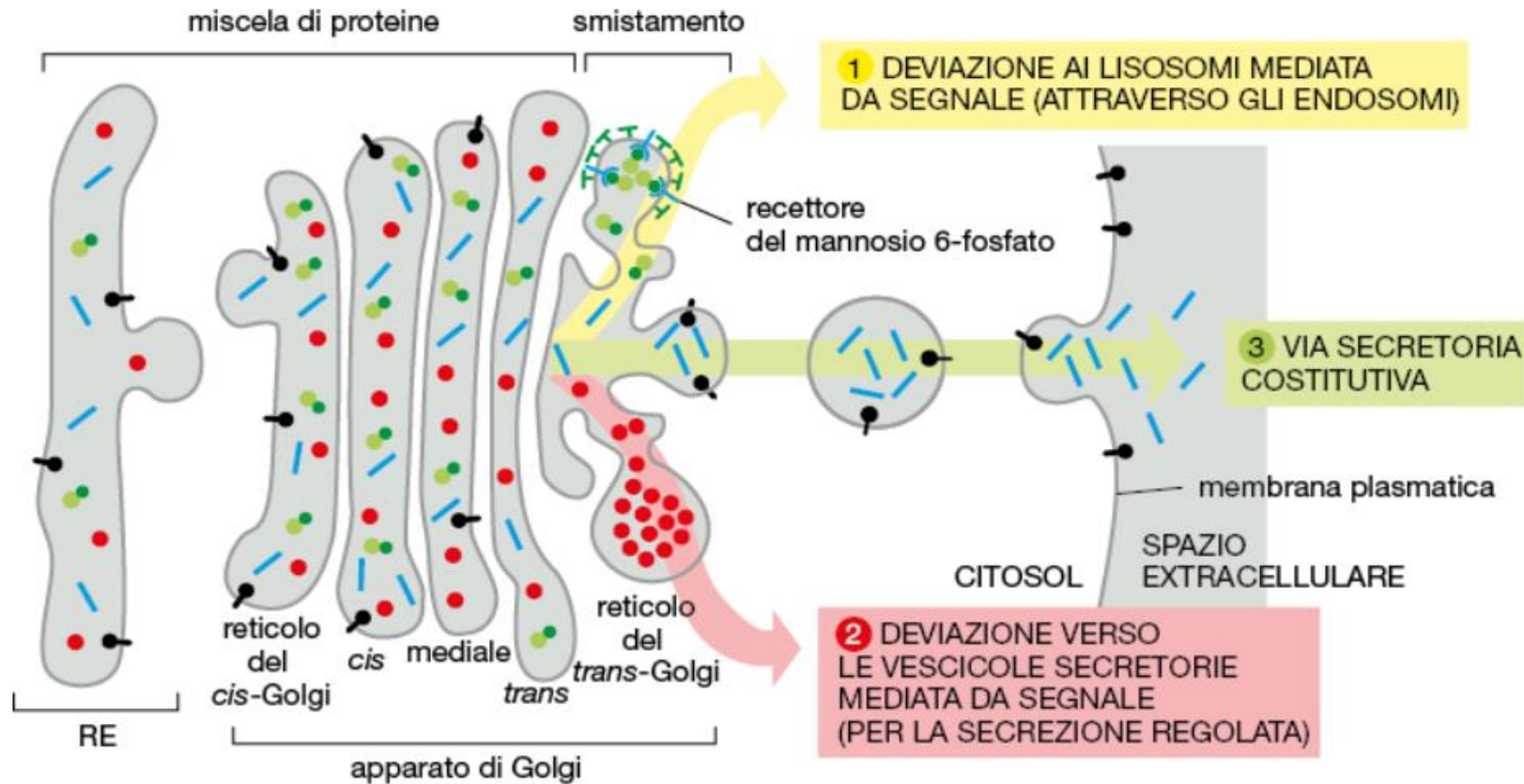
La via Secretoria dal *trans*-Golgi all'Esterno della Cellula



Via secretoria costitutiva

- È presente in **tutte le cellule**.
- Funziona **continuamente**.
- Porta:
 - Lipidi e proteine di membrana → **rinnovo membrana plasmatica**.
 - **Proteine solubili** → **secrete nello spazio extracellulare** (es. proteoglicani, glicoproteine ECM).
- **Non richiede segnali specifici** → **via di default**.

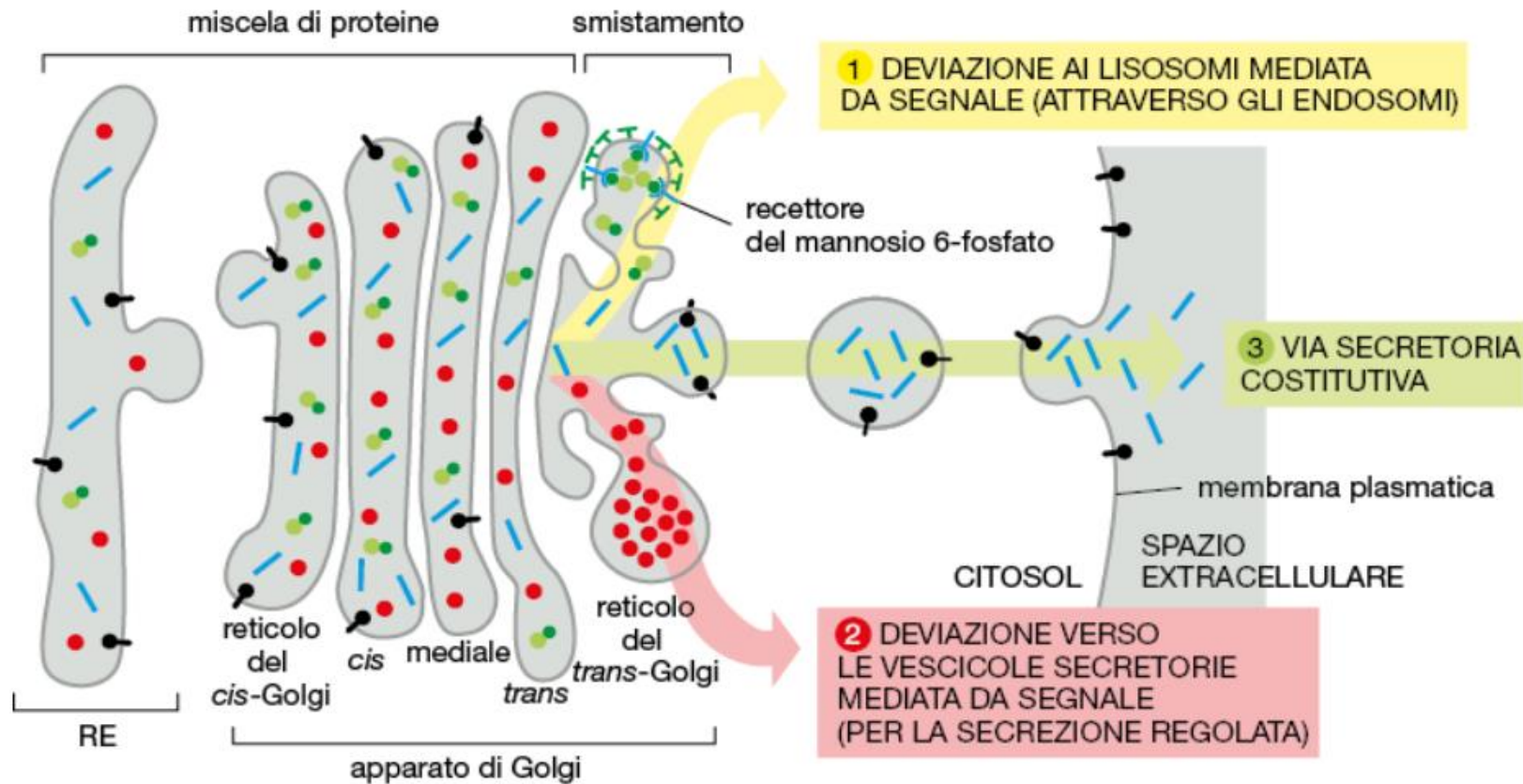
La via Secretoria dal *trans*-Golgi all'Esterno della Cellula



Via secretoria regolata

- **Presente solo** in **cellule specializzate** (es. endocrine, neuroni, cellule esocrine).
- **Cargo** (es. ormoni, neurotrasmettitori, enzimi digestivi) **immagazzinati** in **vescicole secretorie**.
- **Esocitosi avviene solo** in risposta a un **segnale extracellulare** (es. Ca^{2+}).
- Consente un **rilascio rapido e massivo su richiesta**.

La via Secretoria dal *trans*-Golgi all'Esterno della Cellula



Via verso lisosomi (attraverso endosomi)

- **Cargo principali: idrolasi lisosomiali.**
- Smistate al TGN grazie al **marcatore mannosio-6-fosfato (M6P)**.
- **Trasporto tramite vescicole rivestite di clatrina.**
- Le proteine **arrivano prima agli endosomi**, che maturano in lisosomi.

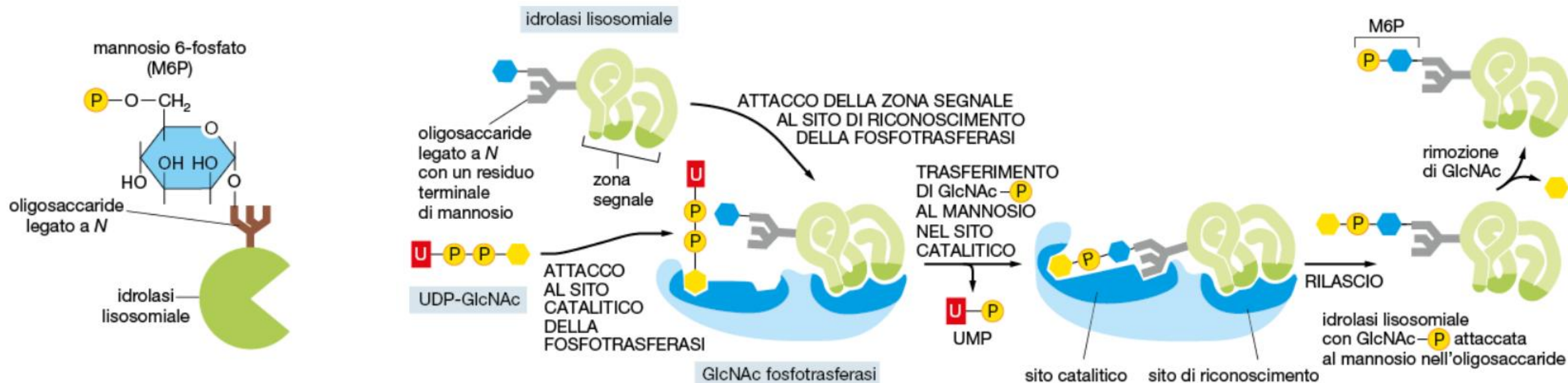
Recettore del Mannosio-6-Fosfato (M6P)

Problema biologico

- I **lisosomi** contengono ~**40 idrolasi** necessarie per **degradare macromolecole**.
- Questi **enzimi** devono essere **selezionati e indirizzati in modo specifico dal TGN agli endosomi → lisosomi**.
- Rischio: **senza smistamento**, sarebbero secreti **fuori dalla cellula**.

Il marcatore M6P

- Nel **cis-Golgi**, le **idrolasi lisosomiali** ricevono un **mannosio-6-fosfato (M6P)** sui loro oligosaccaridi N-linked.
- Questo gruppo M6P è il “**passaporto**” esclusivo per il riconoscimento.
- Aggiunta catalizzata da **GlcNAc-fosfotransferasi**, che riconosce una **zona segnale aminoacidica** sull'idrolasi.



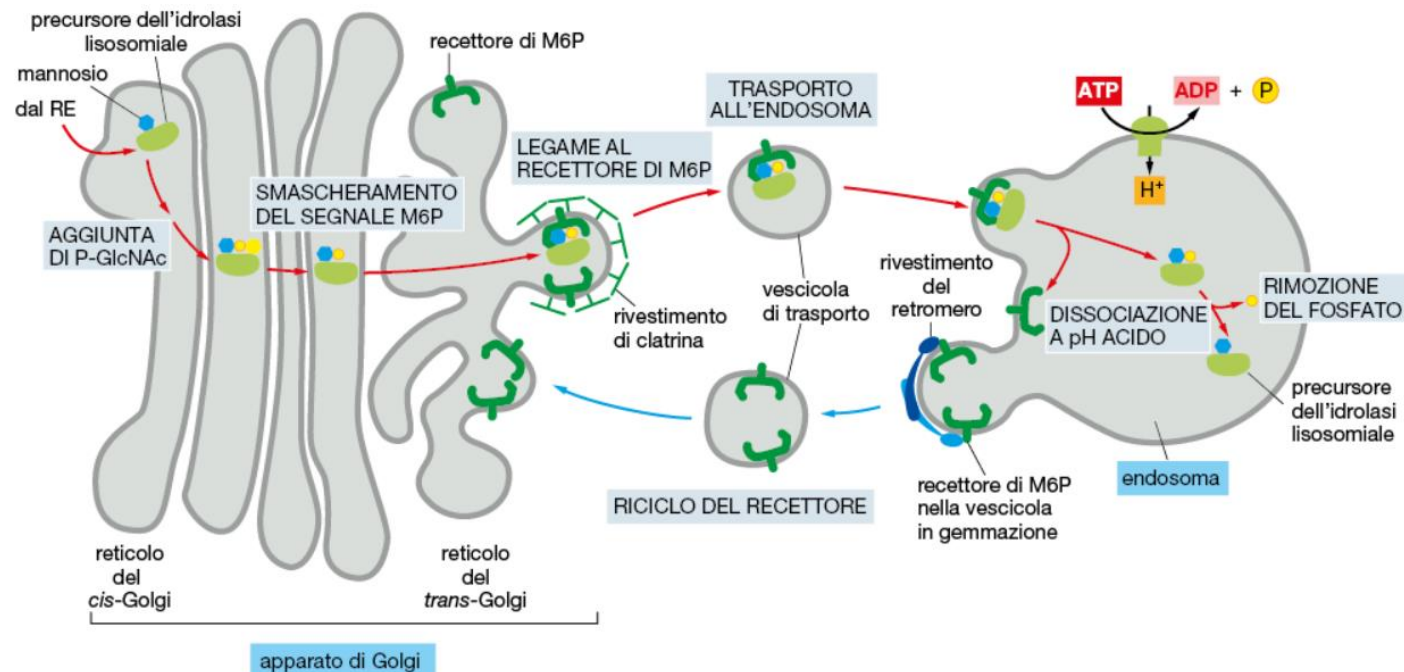
Recettore del Mannosio-6-Fosfato (M6P)

Il recettore M6P

- **Recettore transmembrana** presente **nel TGN**.
- Lato luminale: **lega M6P delle idrolasi**.
- Lato citosolico: **lega adattatori del rivestimento di clatrina**.
- **Le vescicole rivestite** di clatrina gemmano dal TGN e trasportano il carico negli **endosomi precoci**.

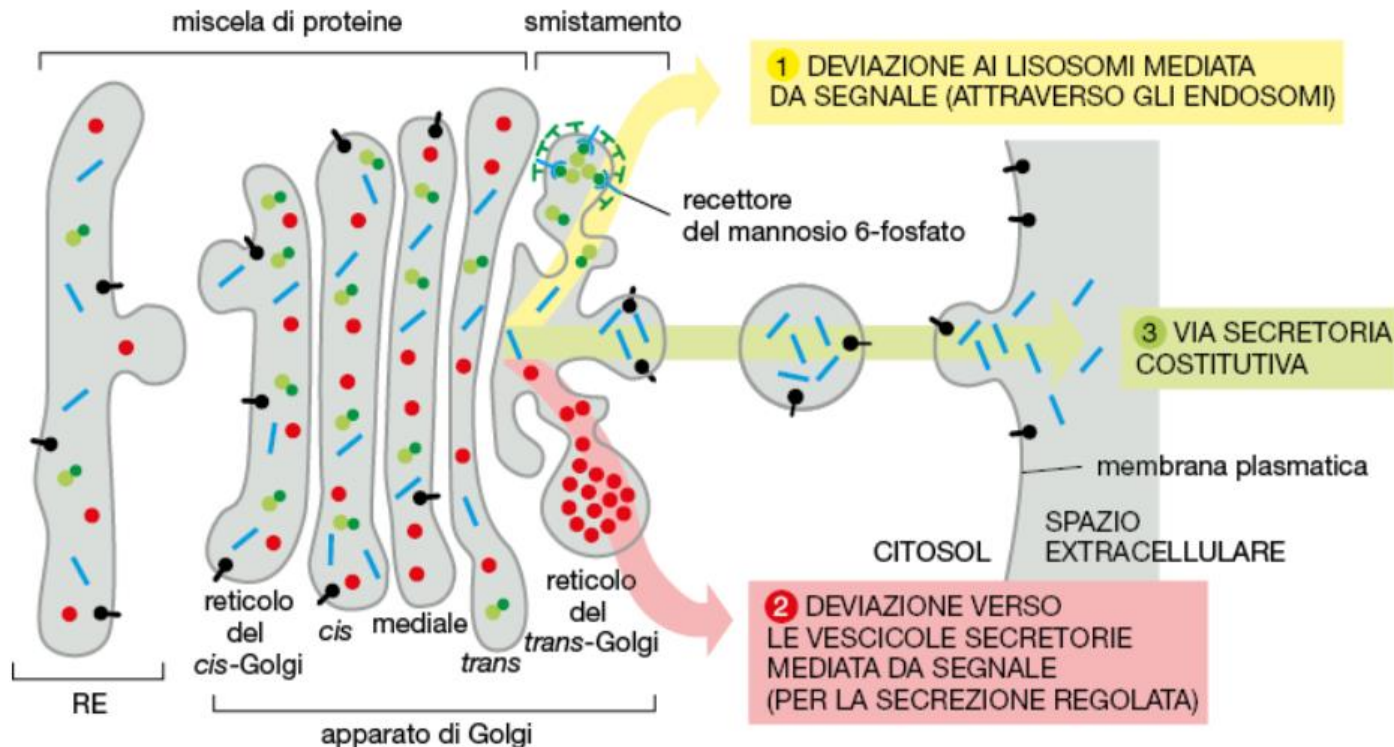
Rilascio e riciclo

- Negli **endosomi a pH ~6**, le **idrolasi si dissociano dal recettore**.
- Le **idrolasi proseguono** verso i **lisosomi**.
- Il **recettore M6P** viene **recuperato dai retromeri** e riportato **al TGN** per riuso.
- Segnali specifici nella coda citosolica dirigono traffico avanti ($\rightarrow$ endosoma) e indietro ($\leftarrow$ TGN).



Vescicole Secretorie dal *trans*-Golgi

- Le **vescicole secretorie** (o **granuli secretori**, “vescicole a core denso”) **derivano** dal **TGN**.
- Funzione: conservare **prodotti secretori** (ormoni, enzimi, neuropeptidi, istamina) per un **rilascio rapido e regolato** tramite **esocitosi** in **risposta a segnali specifici**.
- **Distinte dalla via costitutiva**, sempre attiva in tutte le cellule.



Meccanismo di smistamento

- Nel **TGN**, le **proteine secretorie** tendono ad **aggregare selettivamente**
- I **segnali precisi di smistamento non sono ancora del tutto noti**, ma:
 - Funzionano anche in proteine “estranee” espresse in cellule secretorie → **meccanismo universale**.
- Possibile analogia con la fagocitosi: la **membrana del TGN si chiude intorno agli aggregati**.

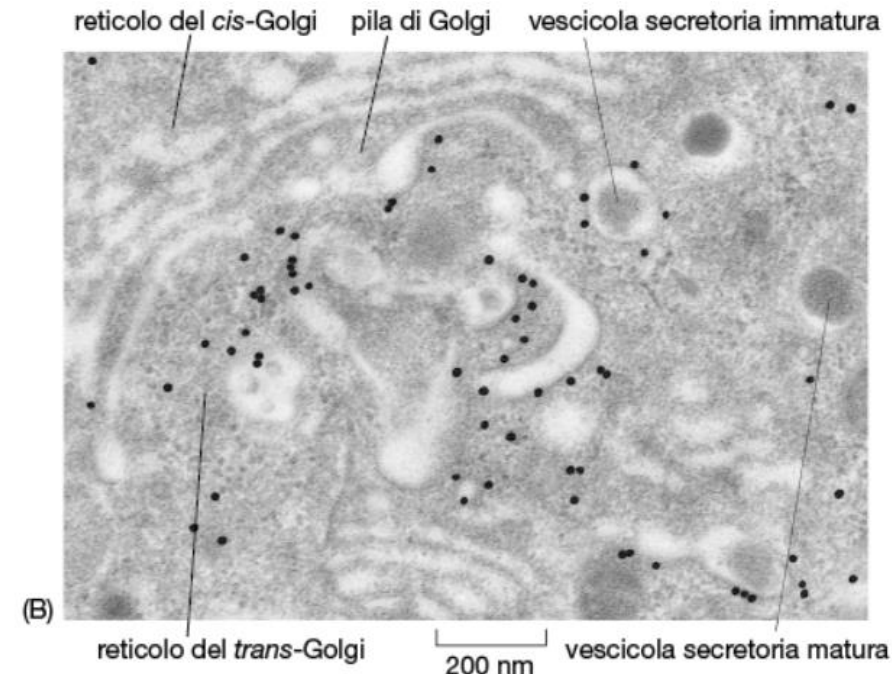
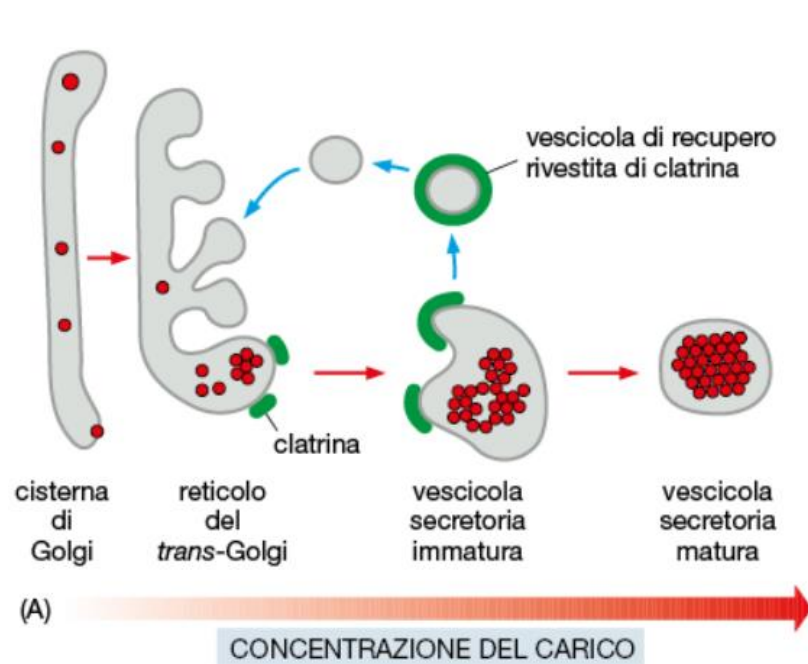
Maturazione delle Vescicole Secretorie

Vescicole immature

- Le prime vescicole secretorie che gemmano dal TGN sono **vescicole immature**.
- Caratteristiche:
 - **Aspetto simile a cisterne dilatate** del trans-Golgi.
 - **Contengono aggregati proteici** ancora “**larghi**”.
 - **Presentano rivestimenti di clatrina** in zone specifiche.

Maturazione

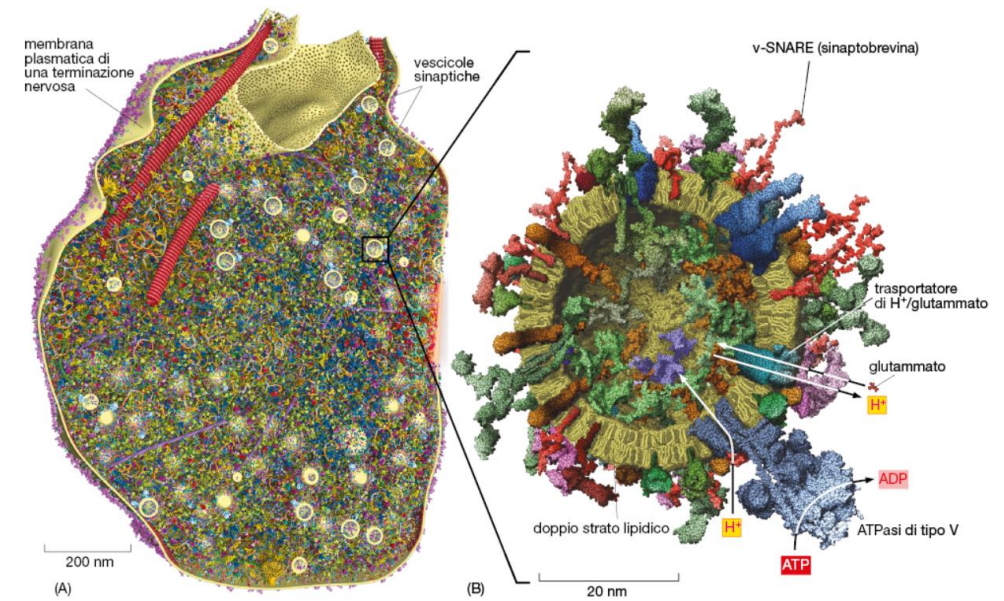
- Due processi principali:
 - **Recupero di membrana e proteine non necessarie** → tramite vescicole rivestite di clatrina **che tornano al TGN**.
 - **Acidificazione progressiva (ATPasi di tipo V)** → **aumenta la condensazione delle proteine** secretorie.
- Le **vescicole immature** possono anche **fondersi tra loro** durante la maturazione.



Maturazione delle Vescicole Secretorie

Vescicole mature

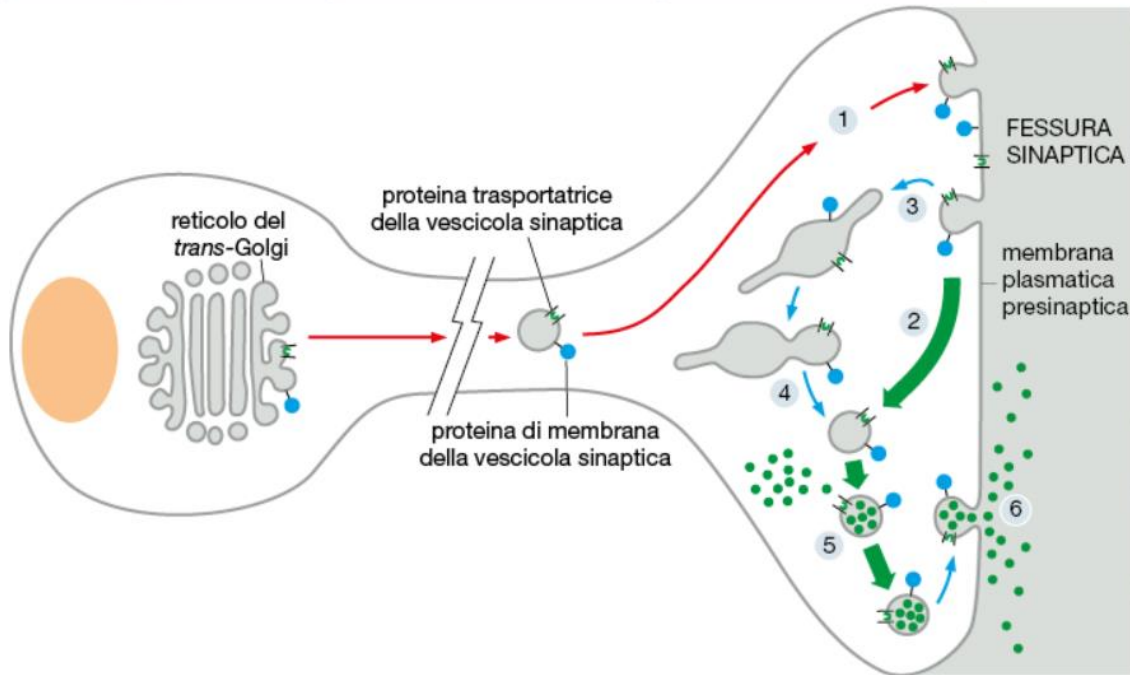
- Contengono **aggregati proteici molto condensati**.
- **Quasi prive di membrana in eccesso**.
- **Pronte a fondersi** con la membrana plasmatica in **risposta a stimoli** → rilascio massivo di contenuto (**esocitosi regolata**).



CORPO DELLA CELLULA
NERVOSA

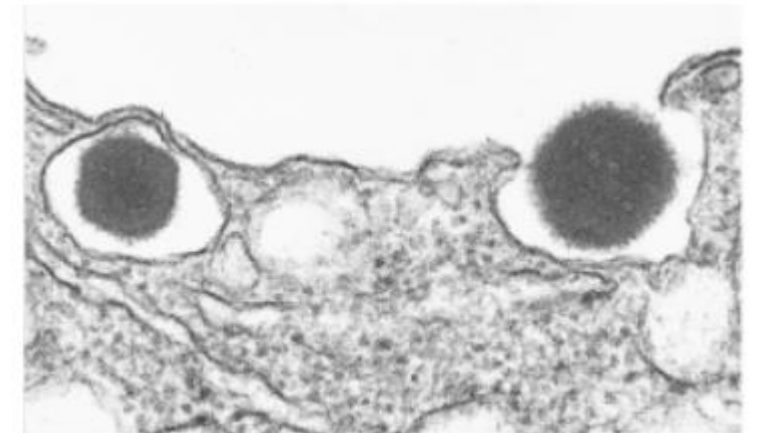
ASSONE

TERMINAZIONE NERVOSA

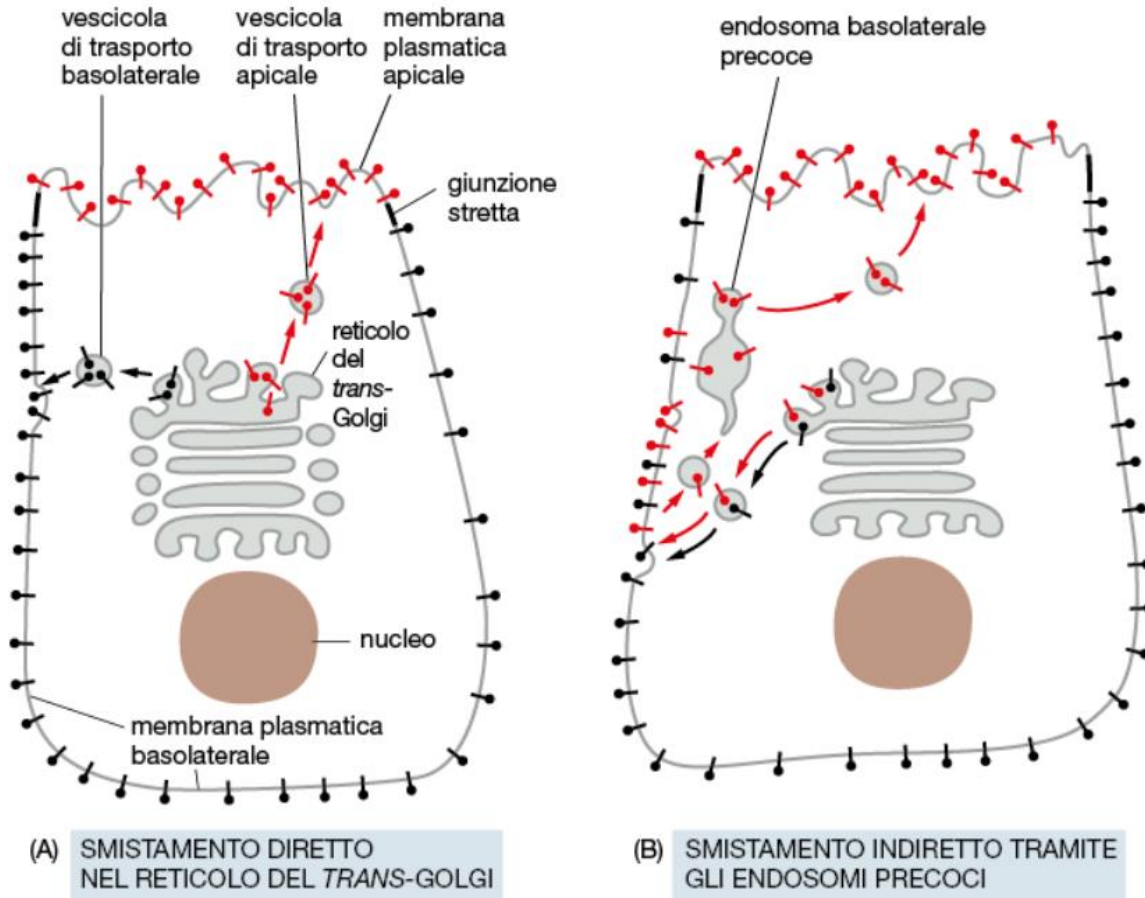


- 1 TRASPORTO DEI COMPONENTI DI MEMBRANA DELLA VESCICOLA SINAPTICA ALLA MEMBRANA PLASMATICA PRESINAPTICA
- 2 ENDOCITOSI DEI COMPONENTI DI MEMBRANA DELLA VESCICOLA SINAPTICA PER FORMARE DIRETTAMENTE NUOVE VESCICOLE SINAPTICHE
- 3 ENDOCITOSI DEI COMPONENTI DI MEMBRANA DELLA VESCICOLA SINAPTICA E TRASPORTO AGLI ENDOSOMI
- 4 GEMMAZIONE DELLA VESCICOLA SINAPTICA DALL'ENDOSOMA
- 5 CARICAMENTO DEL NEUROTRASMETTITORE NELLA VESCICOLA SINAPTICA
- 6 SECREZIONE DEL NEUROTRASMETTITORE MEDIANTE ESOCITOSI IN RISPOSTA A UN POTENZIALE D'AZIONE

ATTRACCO FUSIONE



Secrezione Polarizzata nelle Cellule Epiteliali



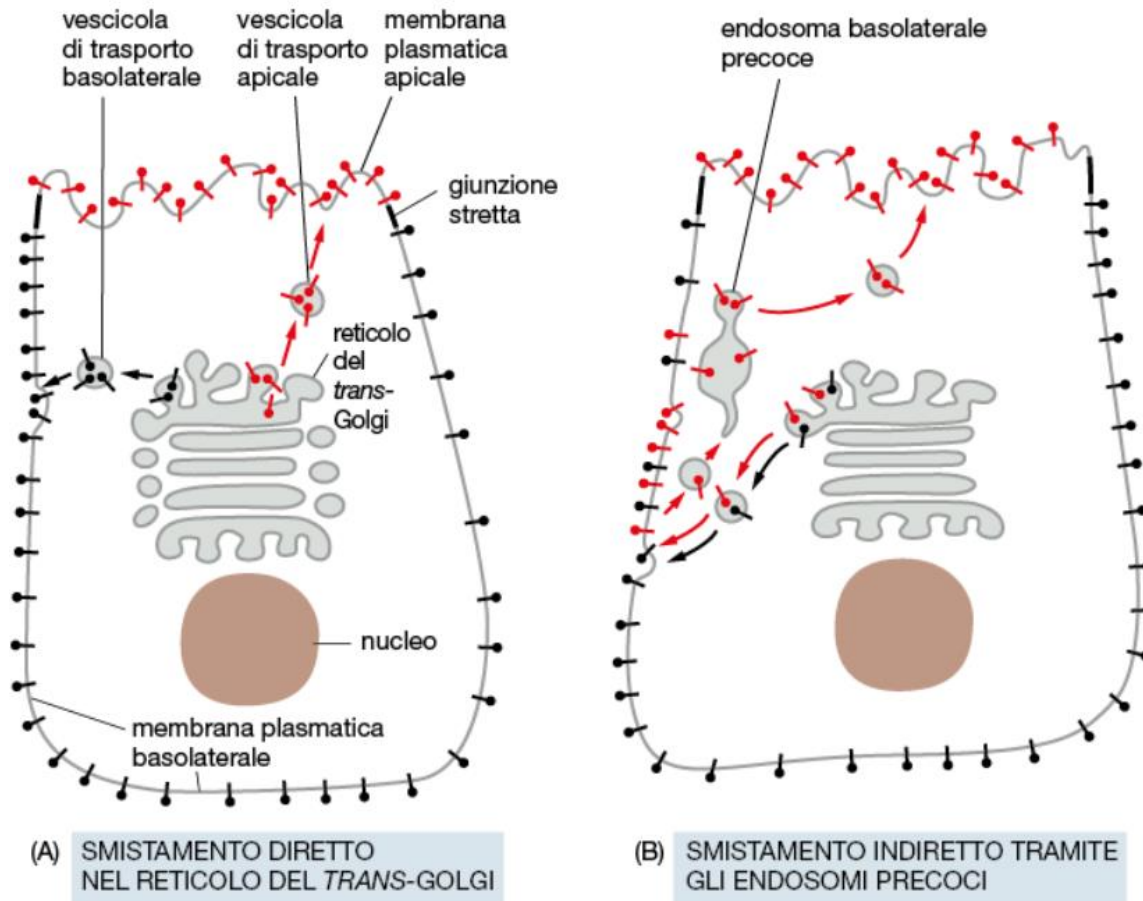
Polarità cellulare

- Le cellule epiteliali hanno **due domini distinti**:
 - Apicale** → rivolto verso lume o esterno (es. microvilli, ciglia).
 - Basolaterale** → rivolto verso altre cellule e matrice.
- I domini sono separati da **giunzioni strette** → **impediscono diffusione laterale di lipidi/proteine**.
- Ogni dominio** ha una **composizione** e una **funzione specifica**.

Smistamento dal TGN

- Dopo il transito nell'apparato di Golgi, le **proteine raggiungono il TGN**.
- Qui vengono **smistate in base alla destinazione**:
 - Superficie apicale**
 - Superficie basolaterale**
- Lo smistamento può avvenire:
 - Via diretta: separazione già al TGN.**
 - Via indiretta: consegna iniziale alla membrana sbagliata → correzione tramite endosomi (transcitosi).**

Secrezione Polarizzata nelle Cellule Epiteliali



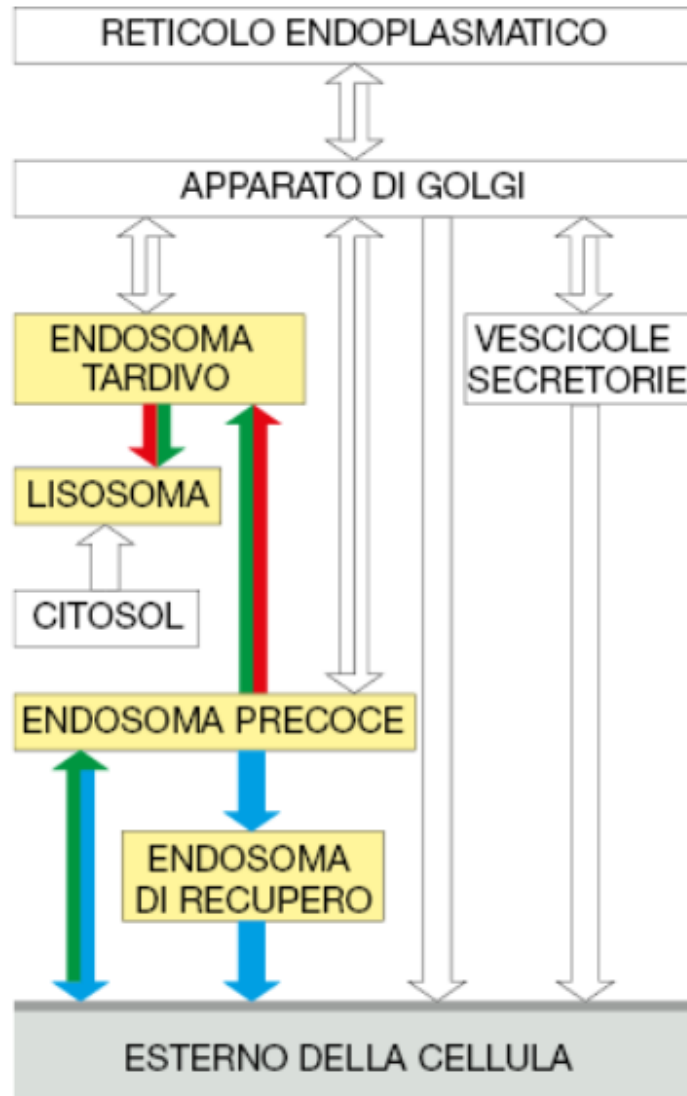
Vie dirette

- **Carico apicale:**
 - **Proteine con ancora GPI** → associate a **zattere lipidiche** (glicosfingolipidi + colesterolo).
 - **Glicosfingolipidi abbondanti** sulla superficie apicale (**protezione contro enzimi digestivi/pH acido**).
- **Carico basolaterale:**
 - **Proteine con segnali** nella coda citosolica → riconosciute da **proteine di rivestimento**

Vie indirette (transitosi)

- Alcune **proteine raggiungono prima la membrana basolaterale**.
- Se destinate all'apicale → **recuperate per endocitosi**.
- **Trasferite agli endosomi precoci**, quindi **inviate al dominio corretto**.

Il Trasporto nella Cellula dalla Membrana Plasmatica: l'Endocitosi



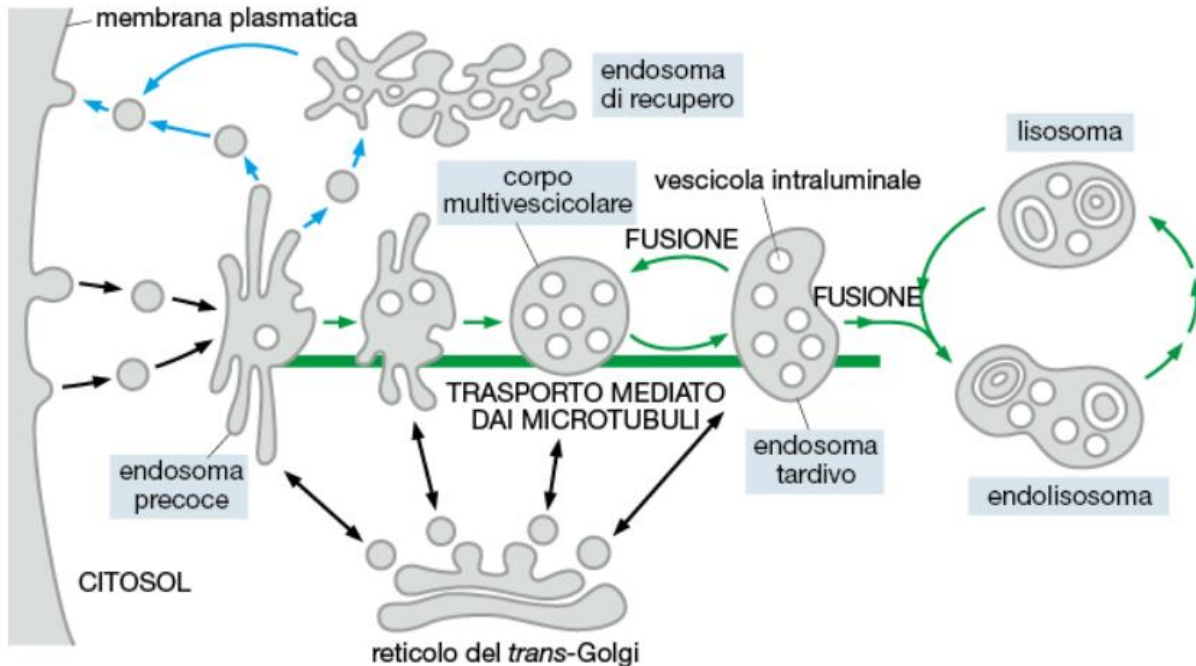
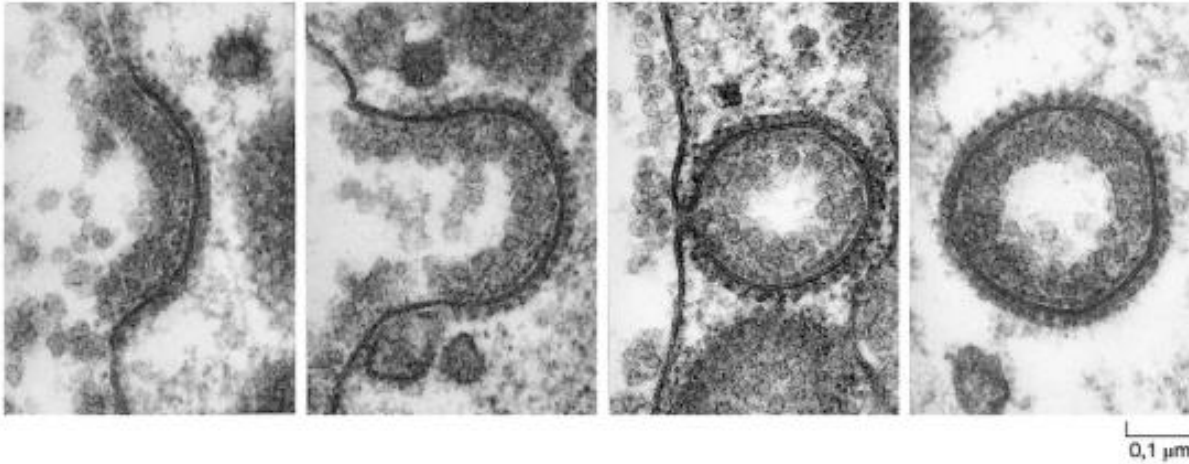
Cos'è l'endocitosi

- **Processo** mediante il quale la cellula **internalizza**:
 - Membrana plasmatica
 - Fluidi e soluti
 - Macromolecole, detriti, microbi e virus
- Funzioni principali:
 - **Nutrizione**
 - **Difesa**
 - **Riciclo e rimodellamento della membrana plasmatica**



Endocitosi ↔ Esocitosi: processi **accoppiati** che mantengono costante la superficie cellulare.

Tipi di Endocitosi



Tipi di endocitosi

- **Pinocitosi** (“cellula che beve”) → **continua in quasi tutte le cellule.**
- **Fagocitosi** (“cellula che mangia”) → **in cellule specializzate** (es. macrofagi, neutrofili).
- Vari **meccanismi di invaginazione** della membrana:
 - **Vescicole rivestite di clatrina** (via principale).
 - **Caveole** → zattere lipidiche ricche di colesterolo e caveoline.
 - **Macropinocitosi** → introito massivo di fluido extracellulare.
 - **Fagosomi** → grandi particelle o intere cellule.

Tipi di Endocitosi

Pinocitosi mediata da clatrina/caveolina

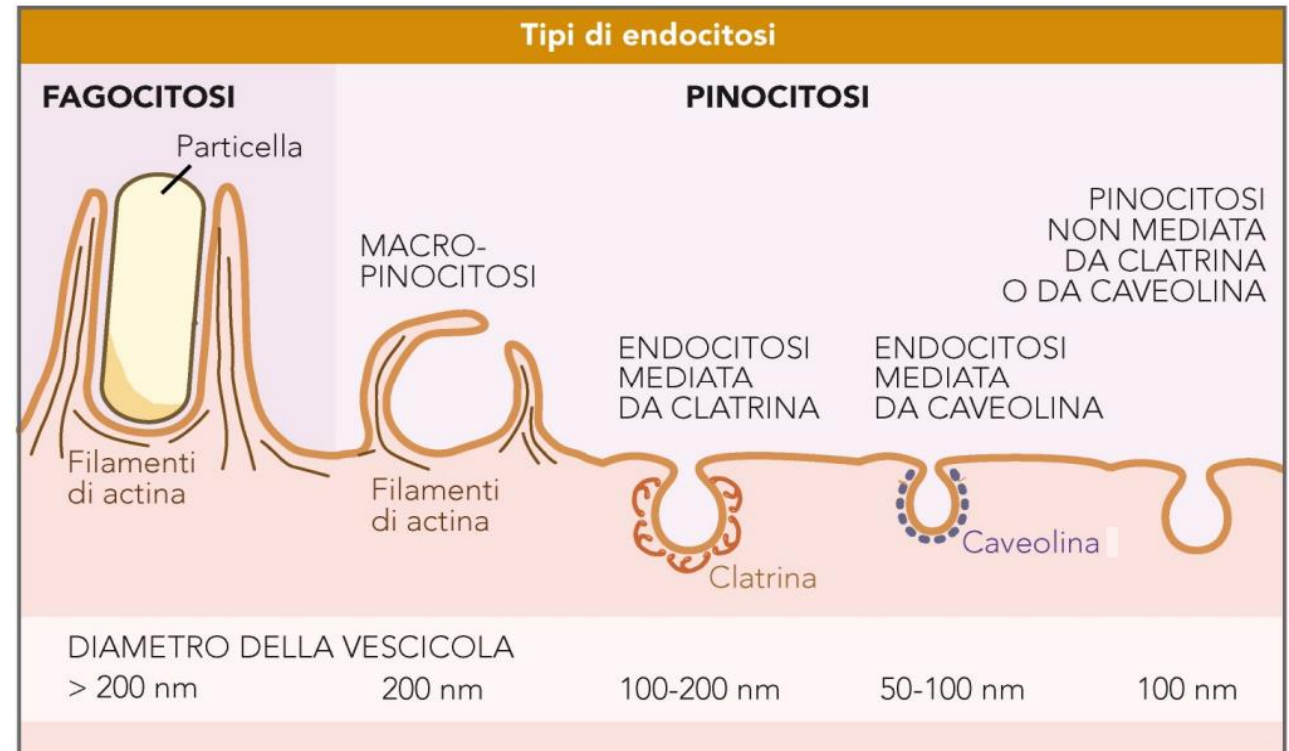
- Le **fosse rivestite di clatrina** coprono ~2% della membrana plasmatica.
- **Ciclo rapido** (~1 min): fossa → invaginazione → vescicola → **fusione con endosoma precoce**.
- Funzione: **importazione selettiva di recettori, ligandi e nutrienti**.

Caveole

- **Strutture statiche a fiasca** → **riserve di membrana plasmatica**.
- Ricche in **caveoline, colesterolo, glicosfingolipidi, proteine GPI**.
 - Resilienza meccanica
 - Endocitosi indipendente dalla clatrina.

Macropinocitosi e fagocitosi

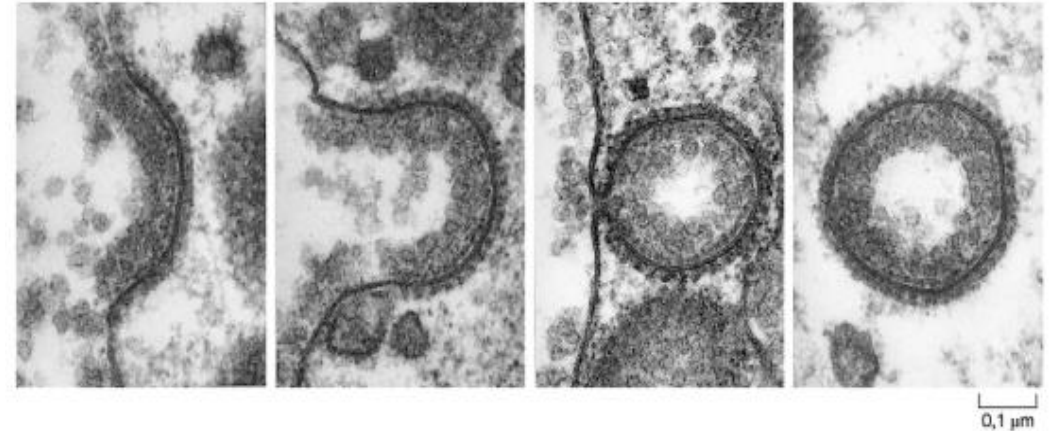
- **Macropinocitosi**: invaginazioni ampie, non selettive, per inglobare grandi volumi di fluido.
- **Fagocitosi**: avvolgimento attivo di particelle (es. batteri) → formazione di fagosoma.
- Entrambi dipendono dalla **polimerizzazione dell'actina**.
- Destino: fusione con i lisosomi → degradazione del contenuto.



Differenza tra Pinocitosi mediata da Clatrina e da Caveolina

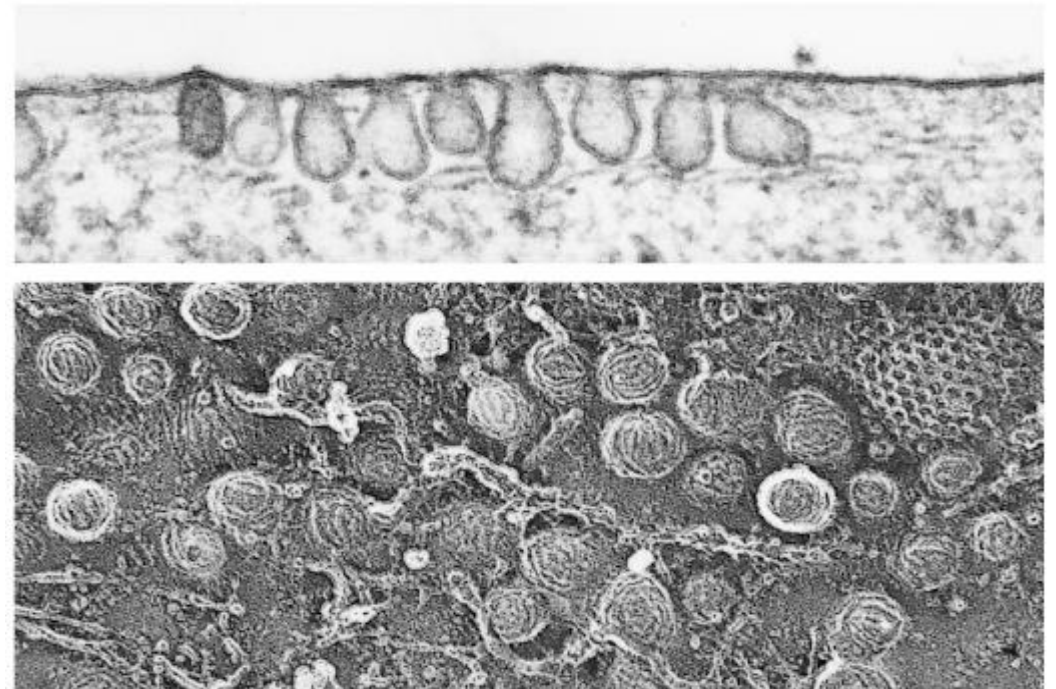
Pinocitosi mediata da clatrina

- **Meccanismo:** Le proteine **della clatrina**, che formano una **struttura simile a un canestro** sulla superficie interna della membrana, interagiscono con le **proteine adattatrici per piegare** la membrana e formare vescicole rivestite di clatrina, che si staccano e vengono internalizzate nella cellula.
- **Ruolo:** La clatrina guida la **formazione della vescicola** e la sua gemmazione dalla membrana.
- **Materiale:** Viene utilizzata per l'assunzione di liquidi e sostanze disciolte.



Pinocitosi mediata da caveolina

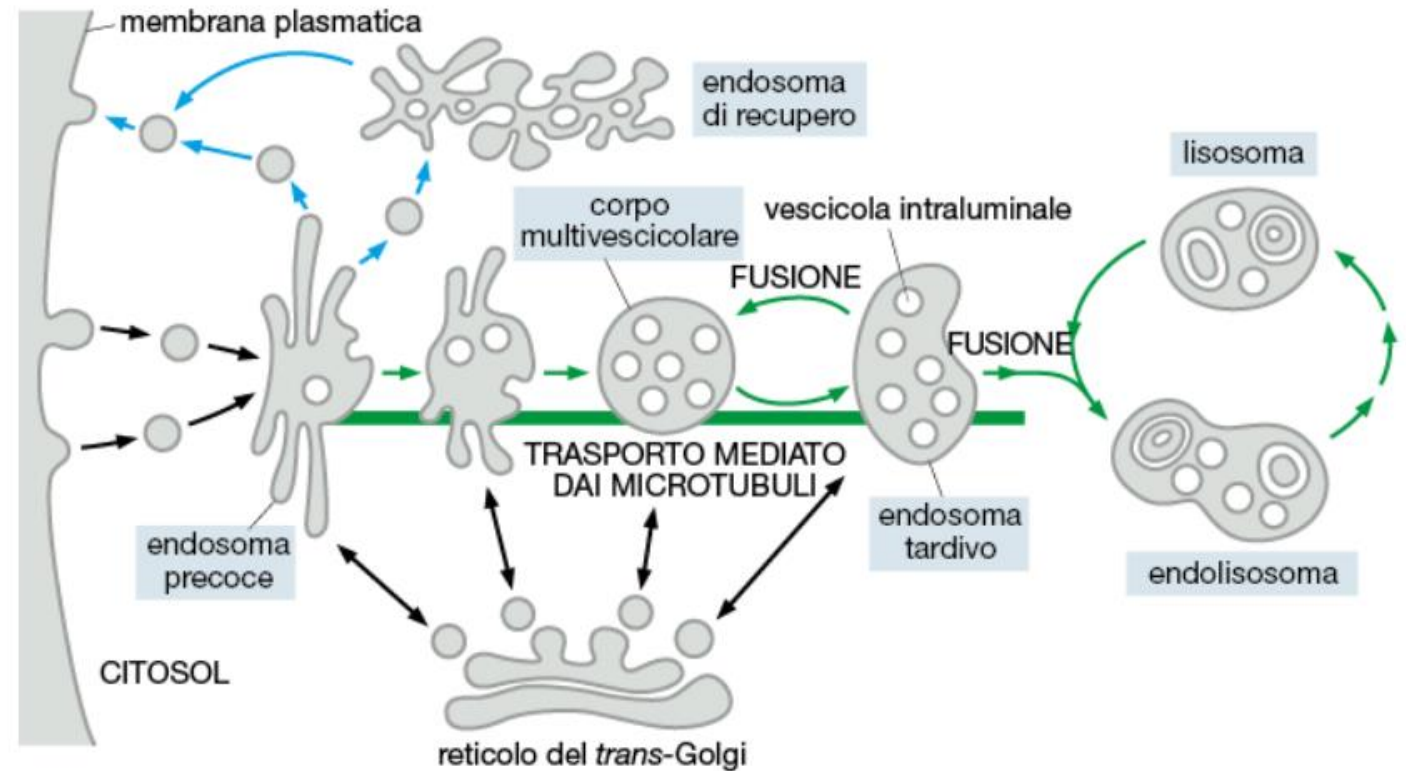
- **Meccanismo:** Coinvolge le **caveoline**, **proteine integrali della membrana** che formano delle **invaginazioni** a forma di sacca chiamate caveole. Queste caveole possono anche gemmare dalla membrana formando vescicole.
- **Ruolo:** Le caveoline sono responsabili della **formazione delle caveole**, **strutture molto conservate** durante l'evoluzione.
- **Materiale:** Questo processo è coinvolto nell'**attraversamento di molecole specifiche** attraverso le membrane capillari, come **anticorpi e fattori della coagulazione**.



Dall'Endosoma al Lisosoma

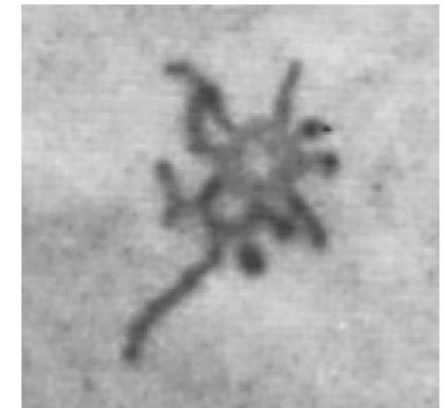
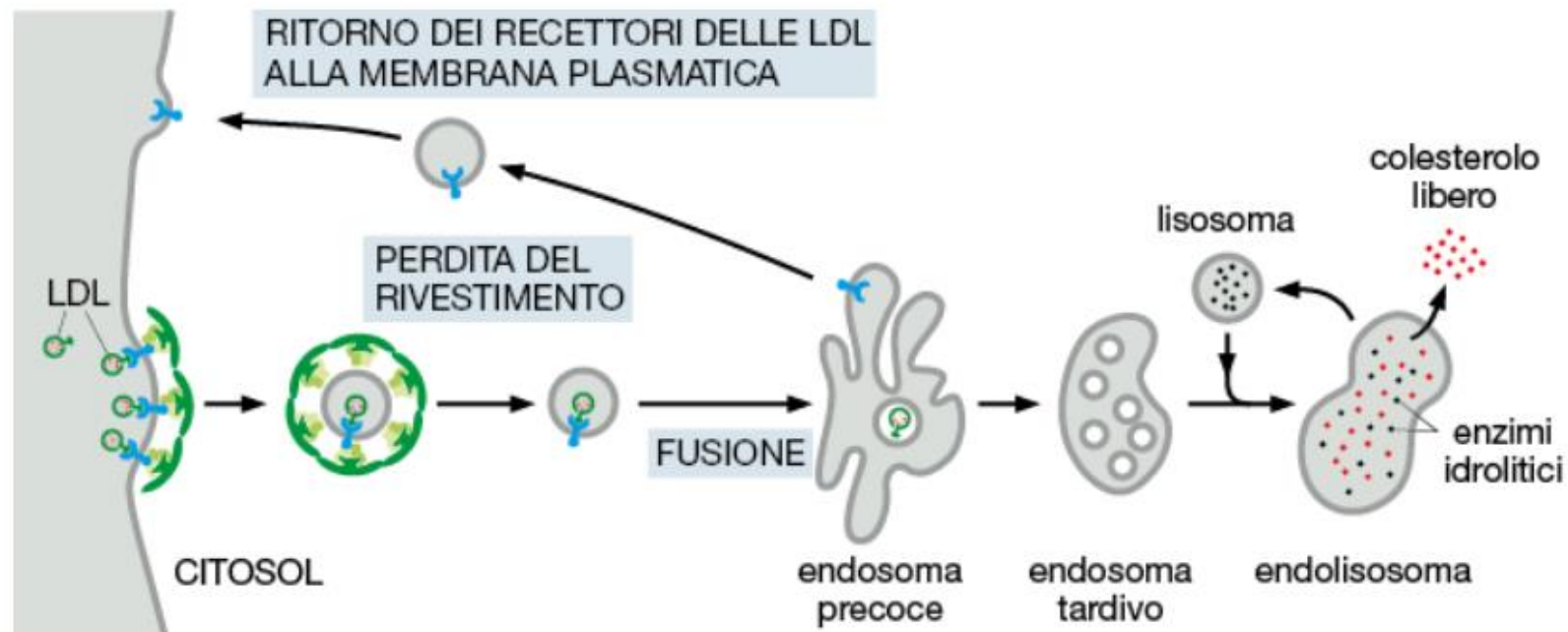
Dall'endosoma al lisosoma

- **Le vescicole endocitiche convergono negli endosomi precoci** (prima stazione di smistamento).
- Destini:
 - **Riciclo rapido** → **membrana plasmatica**.
 - **Riciclo** tramite **endosoma di recupero**.
 - **Maturazione** in **endosoma tardivo** → **endolisosoma** → **degradazione**.
- **Gli endosomi sono in comunicazione bidirezionale col TGN** (es. riciclo recettore M6P).



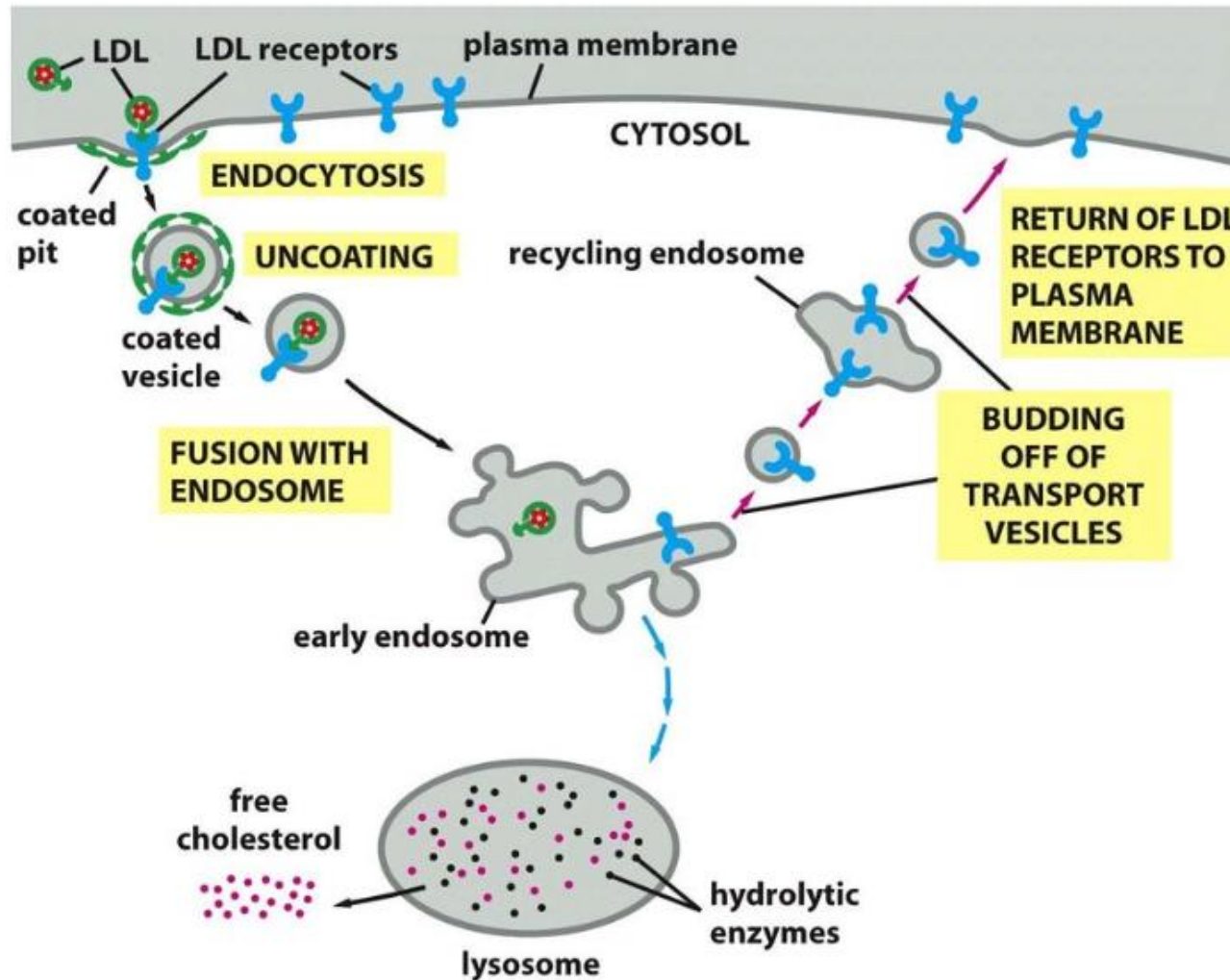
Endocitosi Mediata da Recettore

- **Endocitosi mediata da recettore** = **internalizzazione selettiva** e ad alta efficienza.
- Le **molecole** extracellulari si **legano** a **recettori transmembrana** → **accumulo** in **fosse rivestite di clatrina**.
- **Efficienza**: ↑ oltre 100 volte rispetto alla pinocitosi casuale.
- Garantisce **l'assunzione mirata anche di ligandi poco abbondanti**.



Endocitosi Mediata da Recettore: Il Recettore LDL

Assorbimento del colesterolo

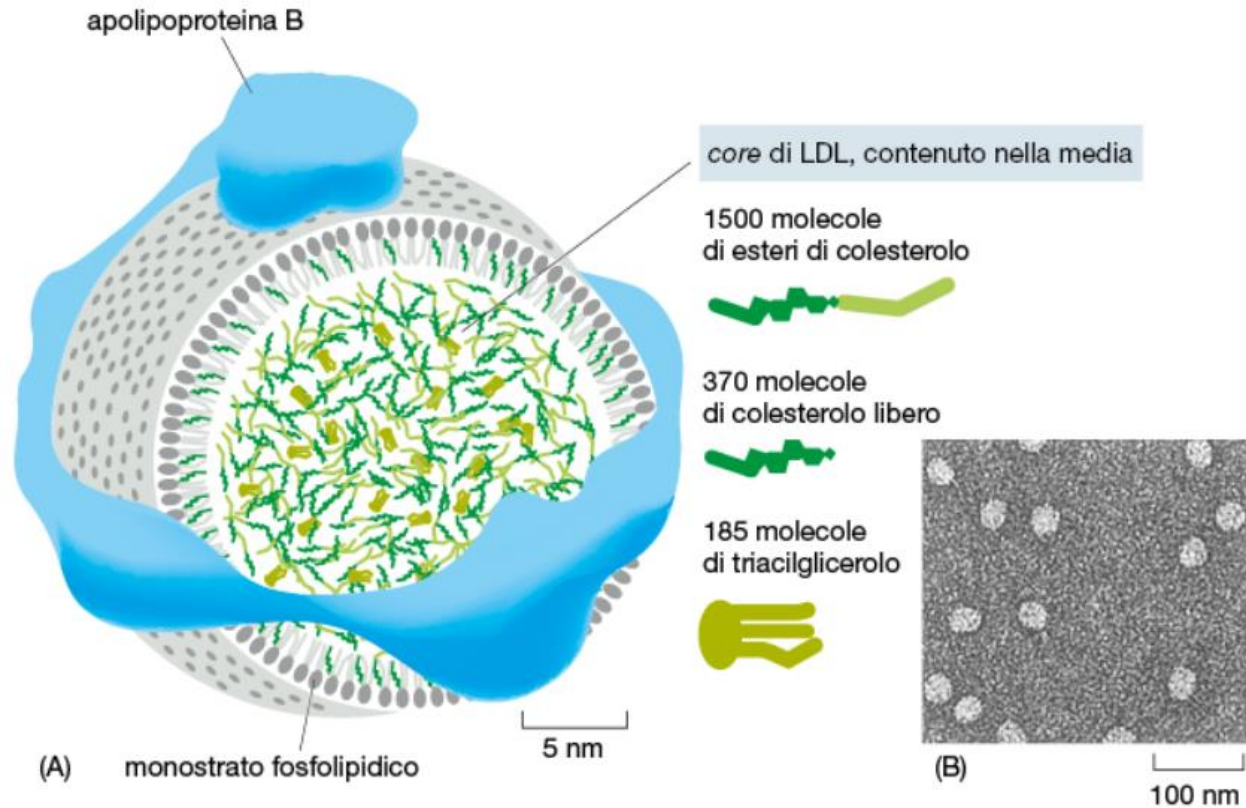


- **Colesterolo circola** nel sangue come **LDL** (Low-Density Lipoproteins).
- **Struttura: core lipidico + apolipoproteina B** come involucro proteico.
- **Recettori LDL** prodotti nel RE → inseriti in **membrana plasmatica**.
- **Segnale nella coda citoplasmatica** → legame ad **AP2 + clatrina**.
- **Formazione di vescicole rivestite** → **endosomi precoci** → **lisosomi**.
- **Nei lisosomi: idrolisi degli esteri del colesterolo** → **rilascio di colesterolo libero**.
- **Feedback: troppo colesterolo** → ↓ **sintesi recettori LDL** + ↓ **sintesi endogena**.

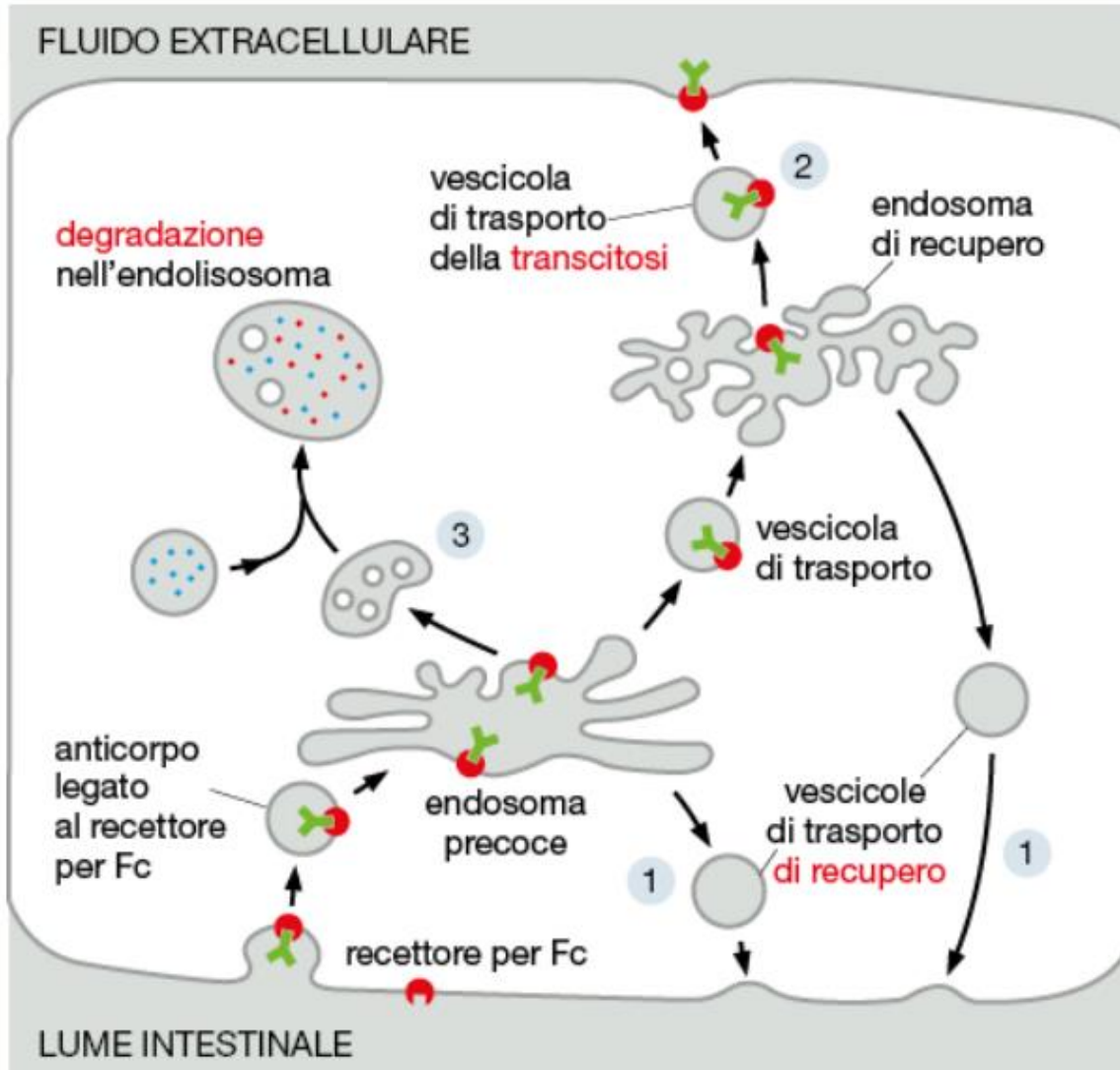
Endocitosi Mediata da Recettore: Il Recettore LDL

Difetti e patologie

- Mutazioni **recettore LDL** → **incapacità di internalizzare LDL** → **aumento di colesterolo circolante**
- Risultato: **ipercolesterolemia familiare** → **aterosclerosi** precoce, infarto, ictus.
- Possibili difetti:
 - Mancanza totale del recettore.
 - Difetto nel dominio di legame per LDL.
 - Difetto nella coda citoplasmatica → recettore non si concentra in fosse di clatrina.
- Terapie: **statine** (↓ sintesi colesterolo, ↑ espressione recettori LDL).



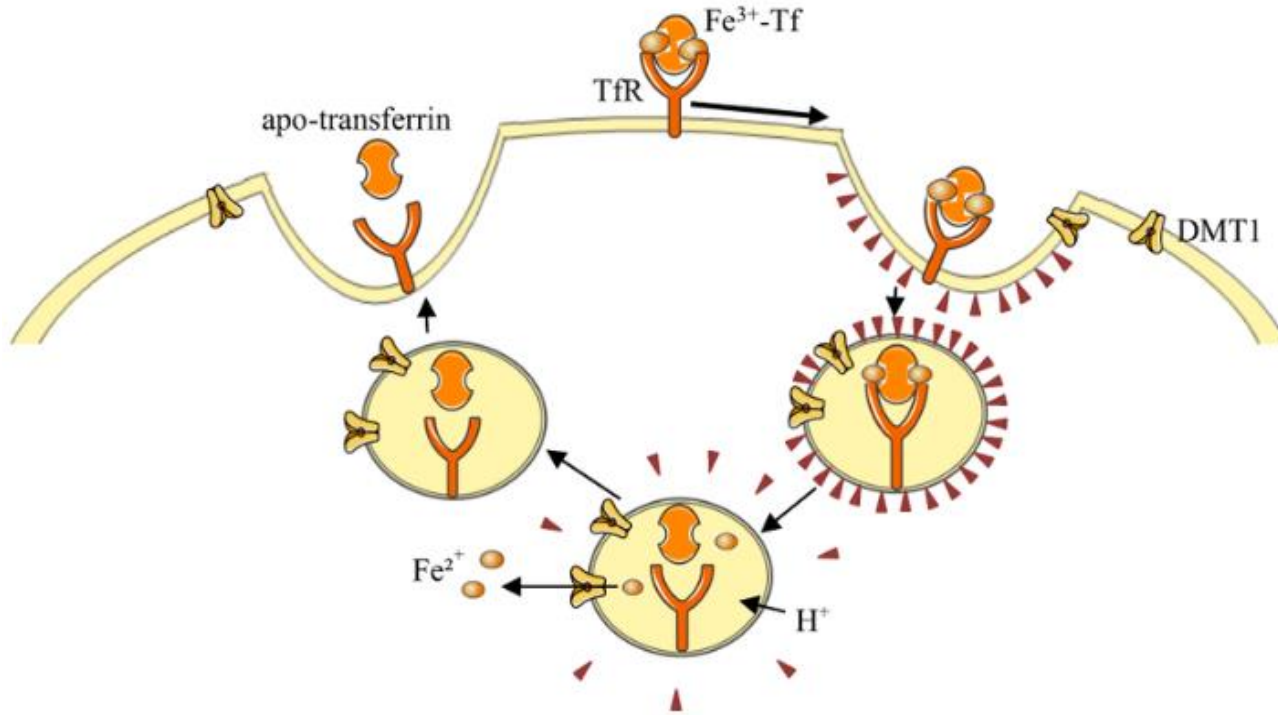
Endocitosi Mediata da Recettore: Il Recettore delle Immunoglobuline



Transcitosi

- **Alcuni recettori non tornano allo stesso dominio → transcitosi.**
- Esempio: **recettore Fc** negli **enterociti neonatali** → **trasferisce anticorpi materni dal lume intestinale → circolazione sanguigna.**
- **Passaggio attraverso endosomi di recupero → rilascio al dominio basolaterale.**
- Ruolo fondamentale: **protezione immunitaria del neonato.**

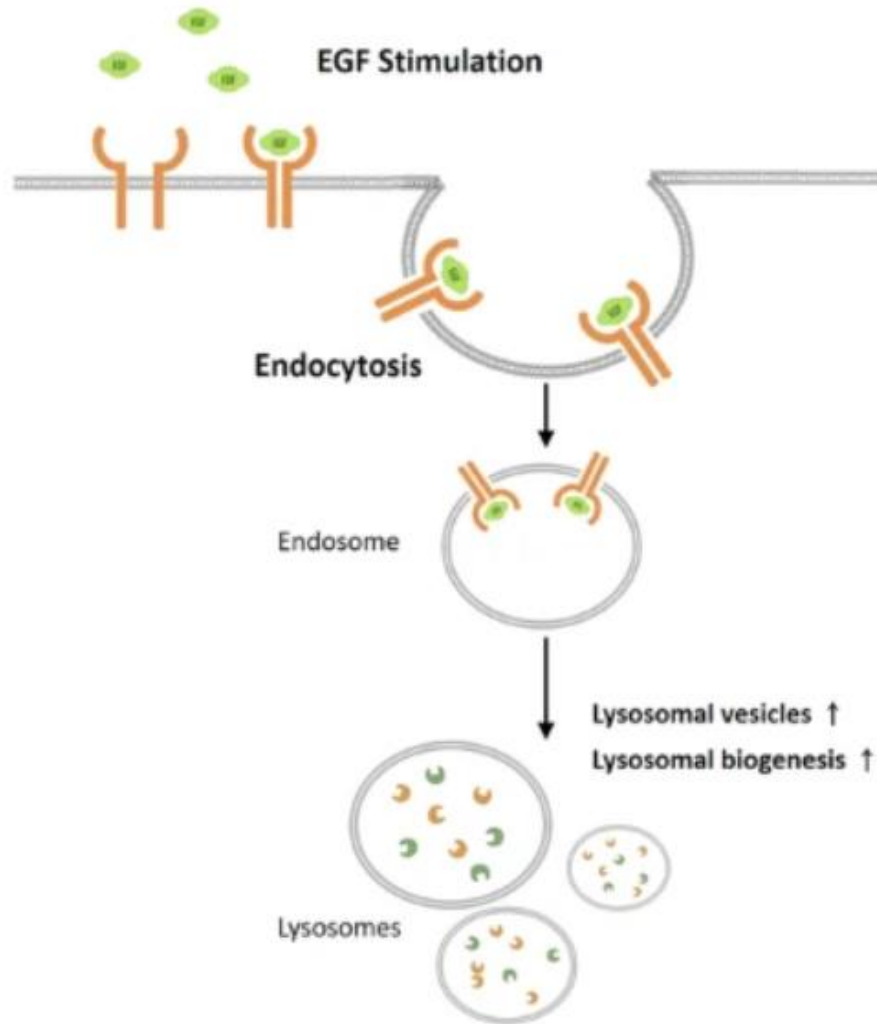
Endocitosi Mediata da Recettore: Il Recettore della Transferrina



Recettore della transferrina

- Il ferro nel sangue viaggia legato alla transferrina.
- La transferrina legata al ferro incontra il suo recettore sulla membrana → complesso internalizzato
- Endosoma precoce: pH basso → rilascio del ferro.
- La apotransferrina resta legata al recettore → riciclo alla membrana.
- Al pH extracellulare neutro → apotransferrina si stacca dal recettore → pronto un nuovo ciclo di legame del ferro libero nel sangue

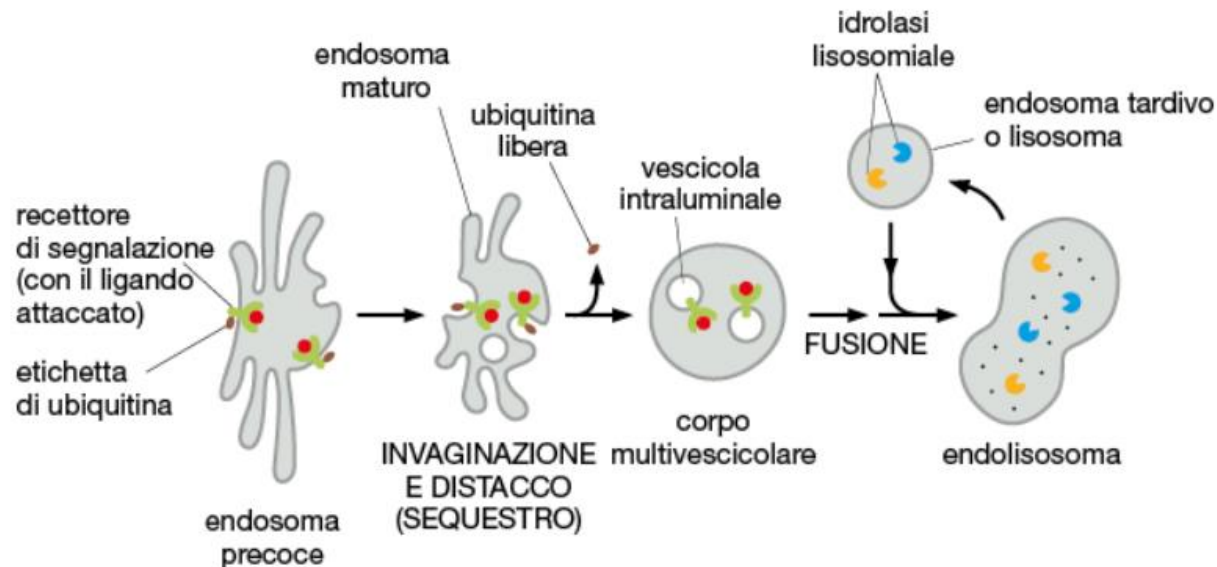
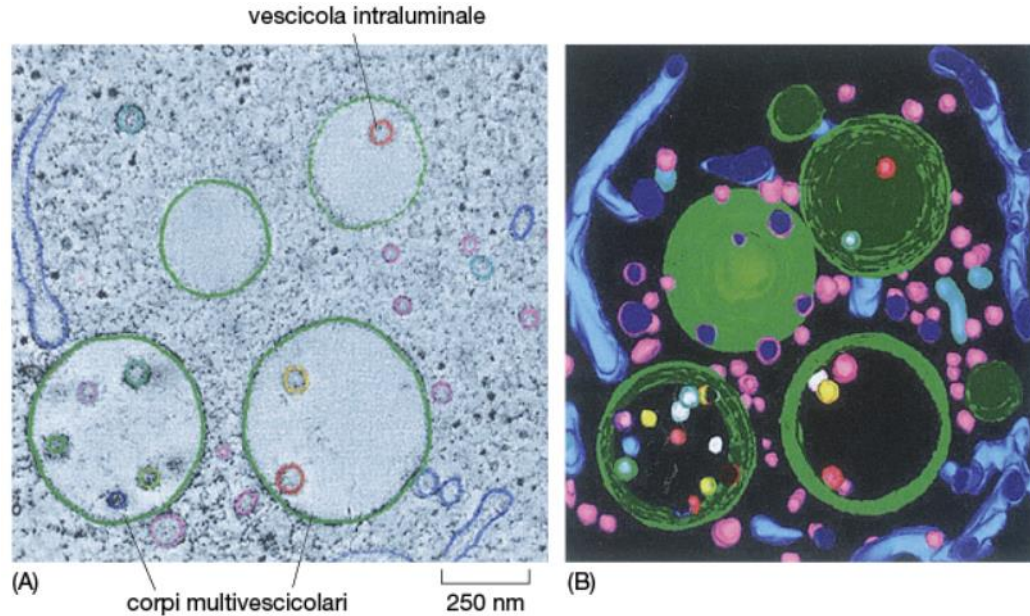
Endocitosi Mediata da Recettore: Il Recettore de EGF



Downregulation dei recettori di segnalazione

- **Molti recettori endocitati → degradazione nei lisosomi.**
- Esempi: **recettori oppioidi e recettore dell'EGF.**
- Meccanismo:
 - **Ligando (EGF) si lega → attivazione della via di segnalazione.**
 - **Recettore + ligando → endocitosi in fosse rivestite di clatrina.**
 - Destino: **degradazione** (non riciclo).
- Effetto: **↓ recettori di superficie → ↓ sensibilità cellulare (sottoregolazione).**

Ruolo dell'Ubiquitina nell'Endocitosi mediata da Recettore



Ruolo dell'ubiquitina

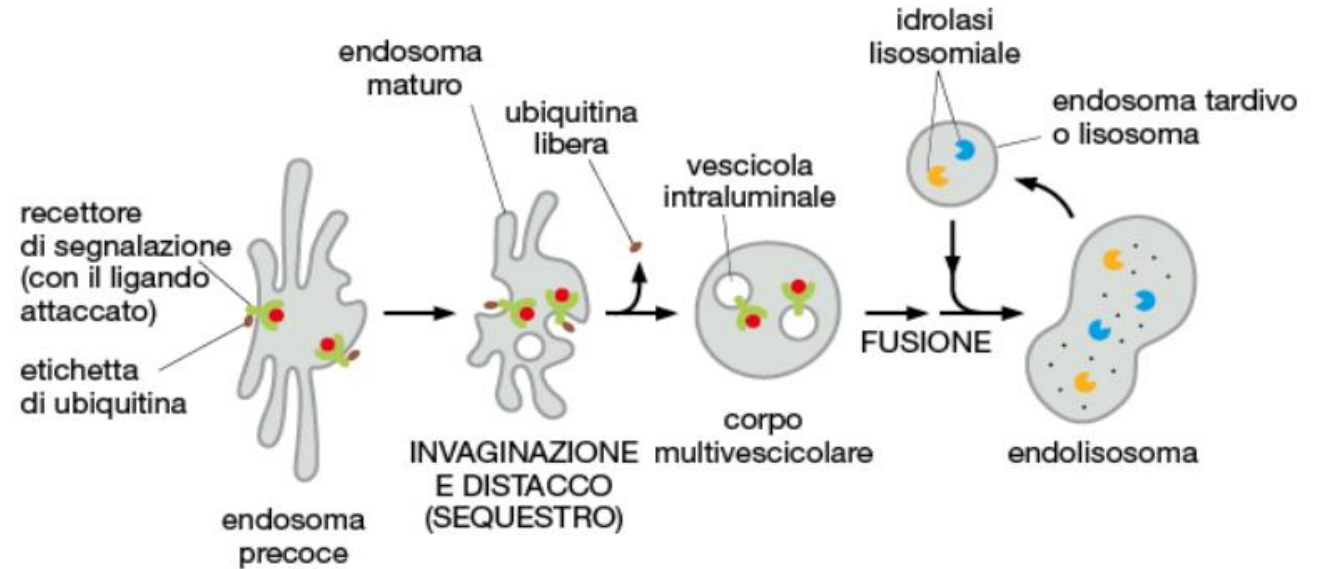
- **I recettori attivati sono marcati da mono-/multiubiquitinazione.**
- **Diverso dalla poliubiquitinazione → degradazione proteasomiale.**
- La ubiquitina:
 - **Guida i recettori nelle fosse rivestite di clatrina.**
 - **Blocca il loro riciclo.**
 - **Indirizza recettore + ligando nelle vescicole intraluminali dell'endosoma.**
- Risultato: **cessazione della segnalazione → degradazione nei lisosomi.**

Maturazione dell'Endosoma

Maturazione dell'endosoma

Cambiamenti progressivi da **endosoma precoce**
→ **endosoma tardivo** → **endolisosoma**:

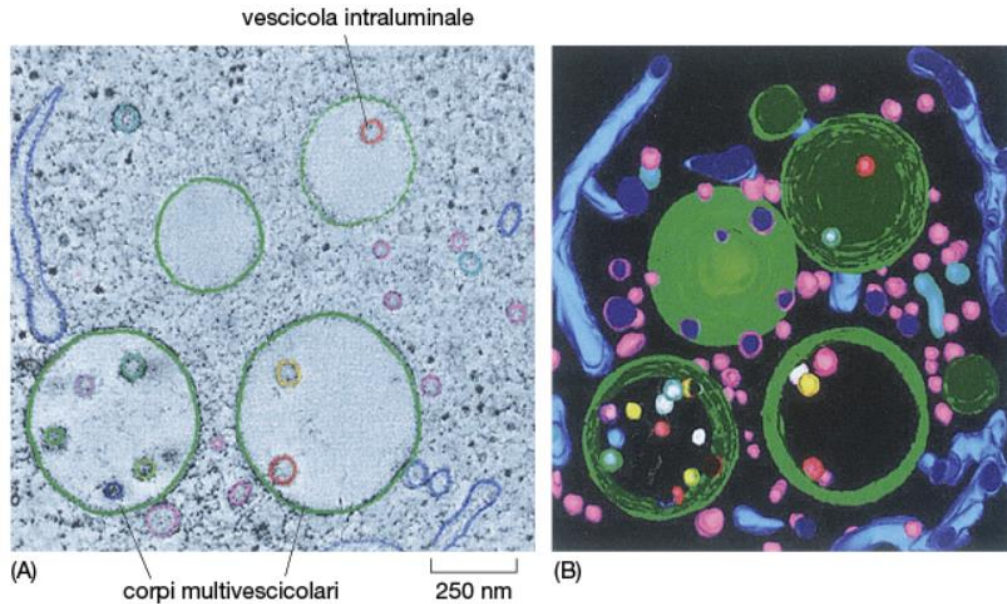
1. **Forma/posizione**: perdita tubuli → organulo più vacuolare; migrazione verso il nucleo.
2. **Proteine Rab / PI**: sostituzione progressiva → cambio identità.
3. **Fornitura dal TGN**: arrivo di idrolasi lisosomiali + pompe H⁺.
4. **Acidificazione**: ATPasi V pompa H⁺ → pH più basso.
5. **Vescicole intraluminali**: sequestrano recettori → stop segnalazione.



Funzioni della maturazione

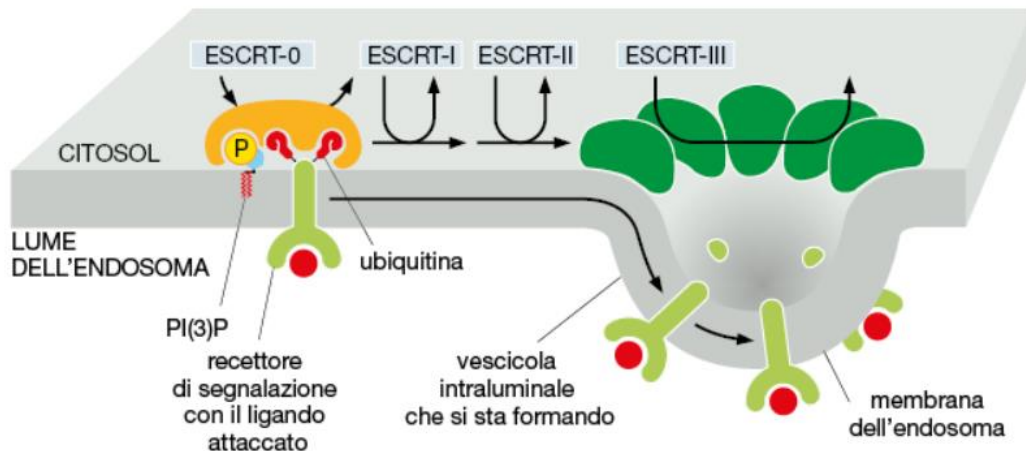
- Attivazione graduale delle **idrolasi acide** (da **zimogeni inattivi** → **enzimi attivi**).
- Permette di **iniziare una degradazione controllata**.
- **Mantiene il pool dei lisosomi** rifornendo continuamente proteine e enzimi.
- Garantisce il **recupero di proteine riciclabili** prima della digestione finale.

I Corpi Multivescicolari



Cosa sono i corpi multivescicolari

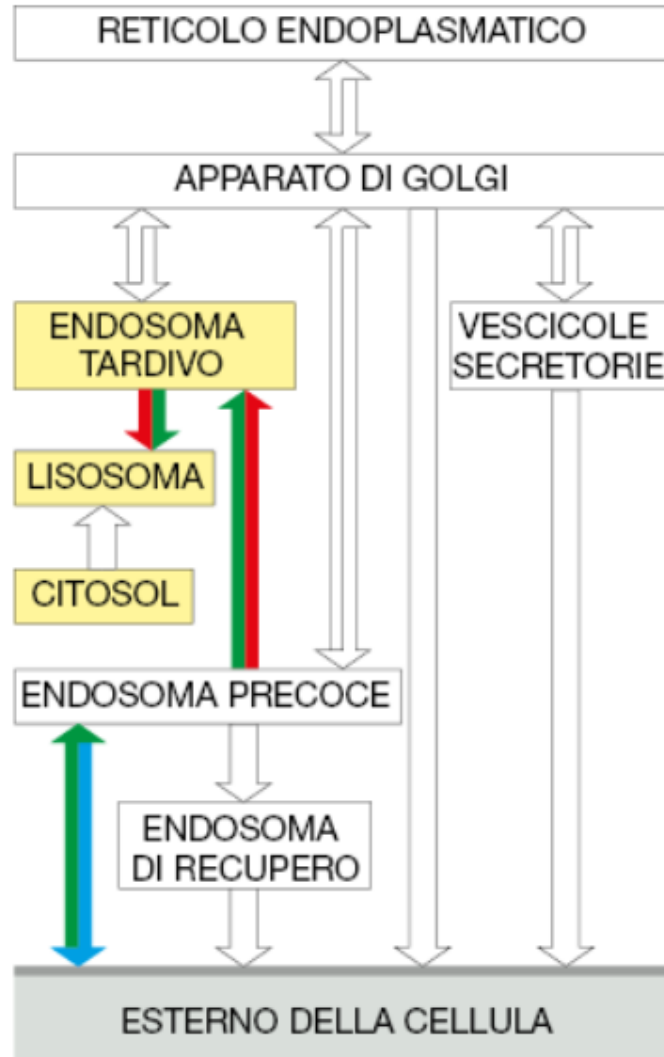
- **Endosomi in maturazione** che **invaginano la propria membrana** → **vescicole intraluminali (ILV)**.
- Funzione:
 - Sequestrare **recettori ubiquitinati** (es. EGFR) → **inattivazione della segnalazione**.
 - **Rendere i recettori accessibili agli enzimi lisosomiali** → **degradazione**.
- Aspetto al microscopio: endosomi “a corpo multivescicolare” (MVB).



Ruolo dell'ubiquitina/ESCRT

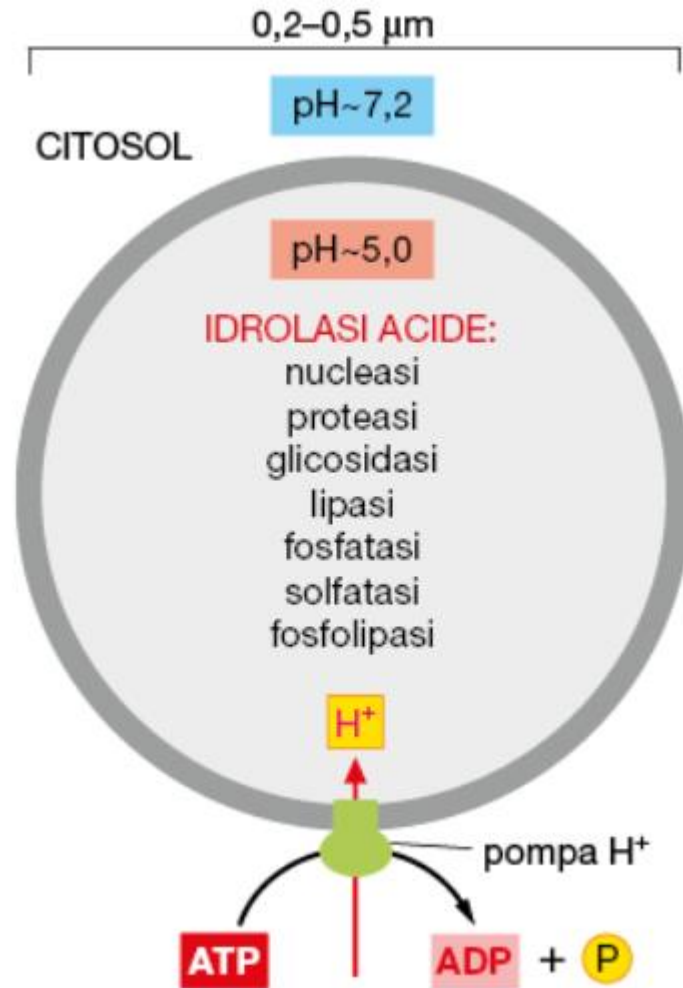
- **Direziona i recettori alle fosse rivestite di clatrina** (endocitosi).
- **Successivamente** → **riconoscimento da parte del macchinario ESCRT**.
- **L'ubiquitina viene rimossa e riciclata** prima della chiusura delle ILV.

Lisosomi, Degradazione e Riciclo



- **Lisosomi = centri di digestione intracellulare.**
- **Destinazione terminale per:**
 - Molecole introdotte da **endocitosi e fagocitosi**.
 - **Organuli e proteine citoplasmatiche** tramite **autofagia**.
- **Scopo: degradazione → riciclo → rifornimento di mattoni molecolari.**

Lisosomi



Contenuto enzimatico

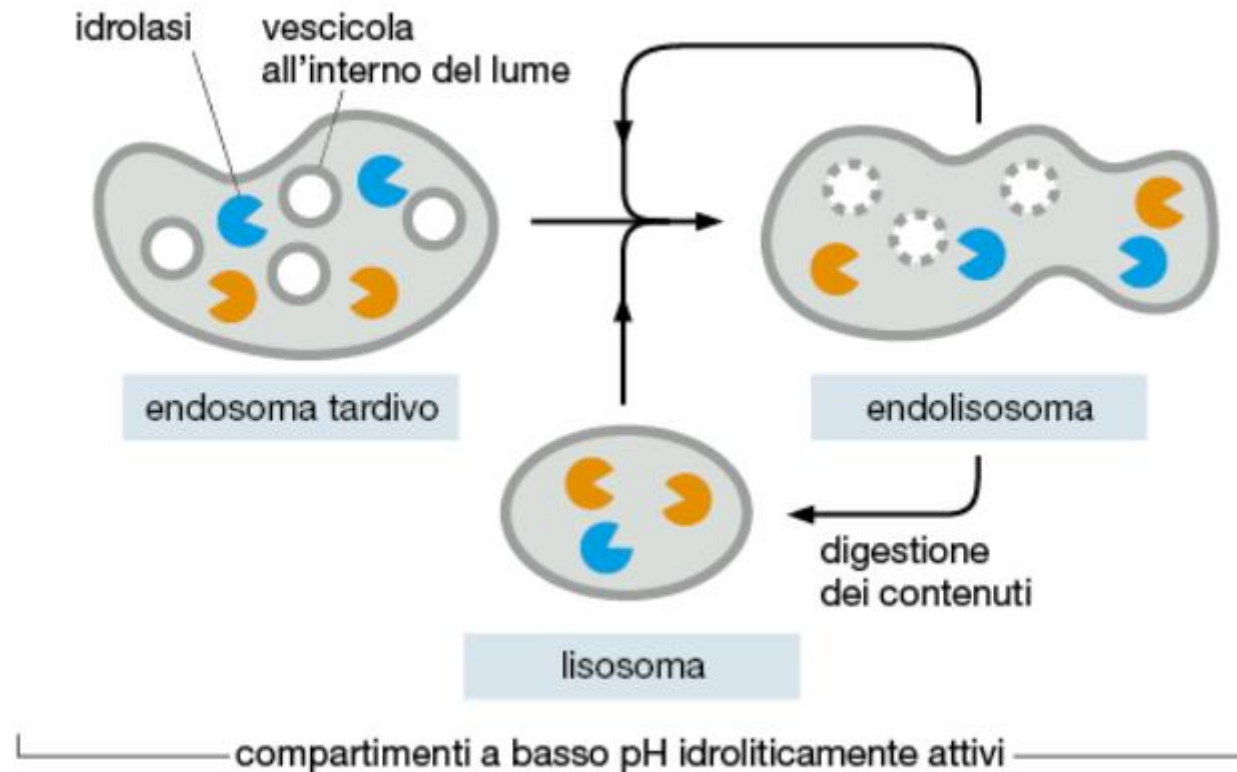
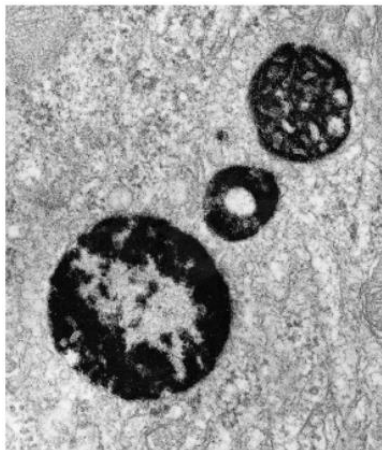
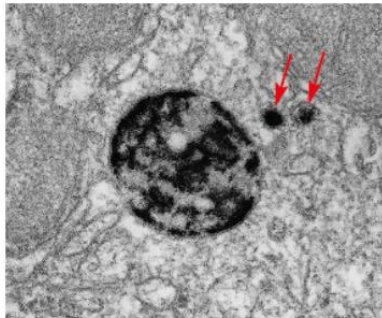
- Circa **40 tipi di idrolasi acide**:
 - Proteasi, nucleasi, glicosidasi, lipasi, fosfolipasi, fosfatasi, solfatasi.
- Caratteristiche:
 - **Attività ottimale a pH acido (4,5–5,0).**
 - Molti enzimi richiedono **attivazione proteolitica (proenzimi)**.
- Sicurezza cellulare:
 - **Doppia barriera**: membrana lisosomiale + **inefficacia a pH citosolico (7,2)**.

Membrana lisosomiale

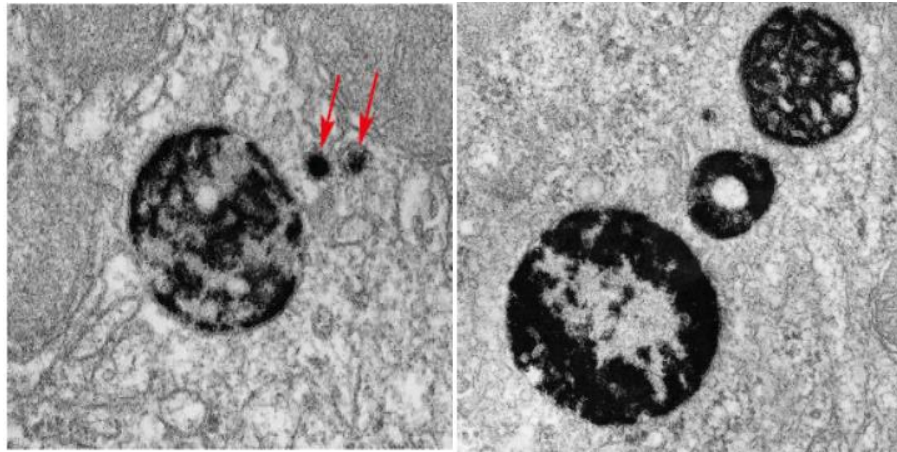
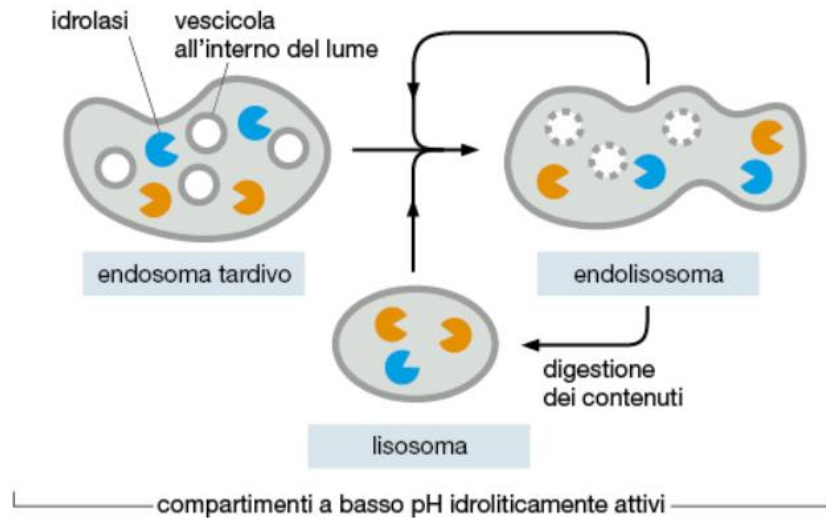
- **Proteine fortemente glicosilate** → protezione dalle proteasi.
- **Trasportatori**: esportano nel citosol i prodotti finali della digestione (aa, zuccheri, nucleotidi).
- **Pompa H⁺ (ATPasi V-type)** → **mantiene acidità interna**.
 - Struttura simile alle ATP sintasi di mitocondri/cloroplasti, ma funzione inversa:
 - usa ATP → pompa H⁺ dentro.

Ruolo del Gradiente Protonico

- Mantiene **pH acido** adatto agli enzimi digestivi.
- **Fornisce energia** per il **trasporto secondario** di **metaboliti** attraverso la membrana lisosomiale.
- **Acidificazione comune a tutti gli organuli del traffico vescicolare:**
 - Lisosomi, endosomi, compartimenti Golgi, vescicole secretorie.



Eterogeneità del Lisosoma

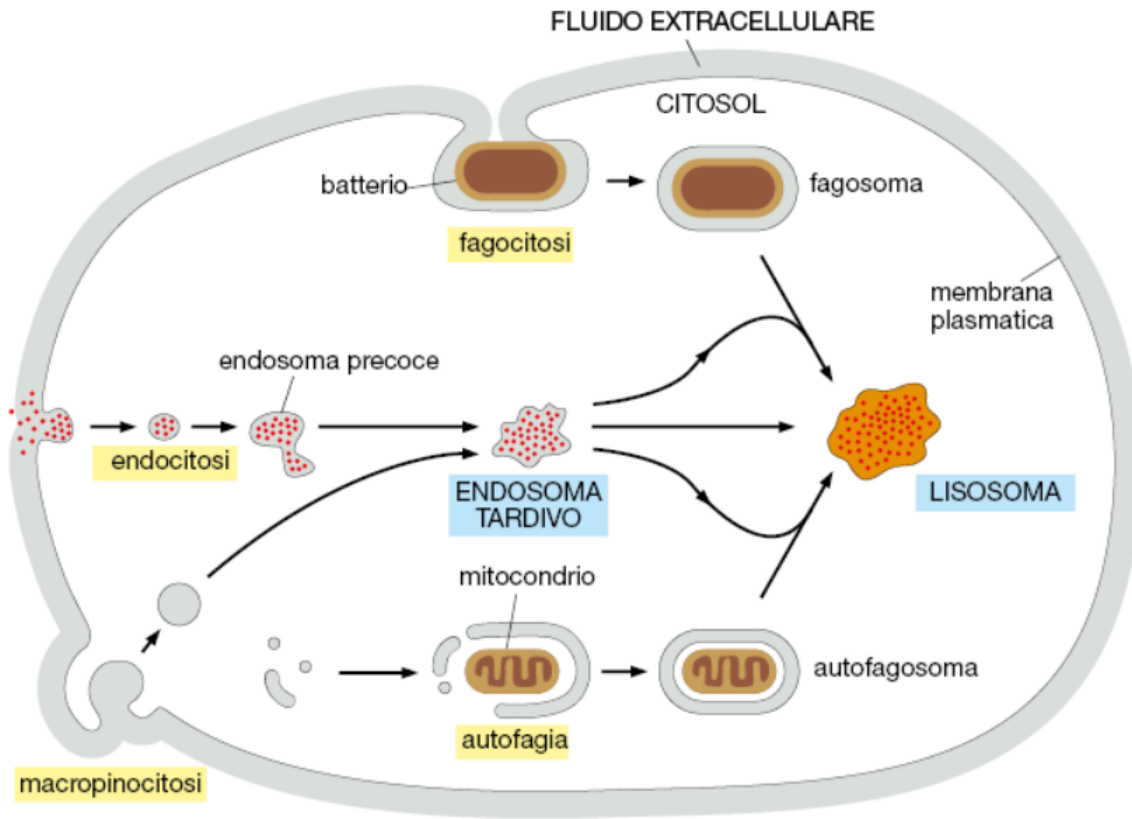


- Differenti da altri organuli → **morfologia molto variabile** (dimensioni, forma).
- Dovuta alle **funzioni digestive multiple**:
 - Degradazione di detriti intracellulari ed extracellulari.
 - Distruzione di microrganismi fagocitati.
 - Produzione di nutrienti riciclati.
- Legata anche al **ciclo di formazione e maturazione**:
 - Endosomi tardivi + lisosomi preesistenti → **endolisosomi**.
 - Endolisosomi maturano → lisosomi “classici” (piccoli, densi, rotondi).
 - Lisosomi possono fondersi di nuovo con endosomi tardivi → ciclo continuo.

Endolisosomi vs Lisosomi

- Non esiste distinzione netta:
 - **Endolisosomi** = **stadio intermedio** (materiale in **digestione**).
 - **Lisosomi classici** = **stadio terminale** (solo residui).
- Insieme formano una **famiglia eterogenea di organuli digestivi**.

Vie Multiple ai Lisosomi

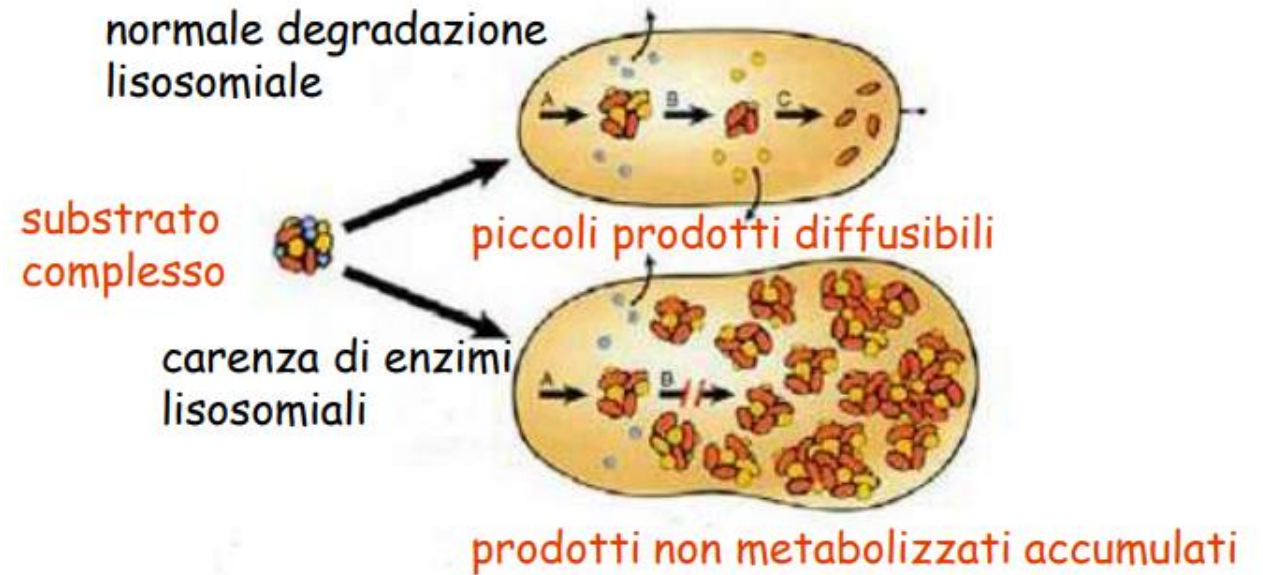


Convergenza nei lisosomi

- **I lisosomi = punto di incontro** di molte vie di traffico:
 - **Endocitosi classica** (macromolecole → endosomi → lisosomi).
 - **Macropinocitosi** → assorbimento non selettivo di fluidi e particelle.
 - **Fagocitosi** → ingestione di grosse particelle e microrganismi.
 - **Autofagia** → degradazione di organuli e porzioni di citoplasma.
- Funzione complessiva: **digestione e riciclo di materiali extra e intracellulari.**

Malattie da Deposito Lisosomiale (LSDs)

- **Malattie da deposito lisosomiale**
- Le LSDs sono **state classificate in base al maggiore prodotto di accumulo** in Mucopolisaccaridosi, Sfingolipidosi, Glicoproteinosi e altre.
- La mutazione genetica può determinare **l'assenza di enzima**, la sua **non funzionalità** o la **mancata capacità di essere trasportato nel lisosoma**

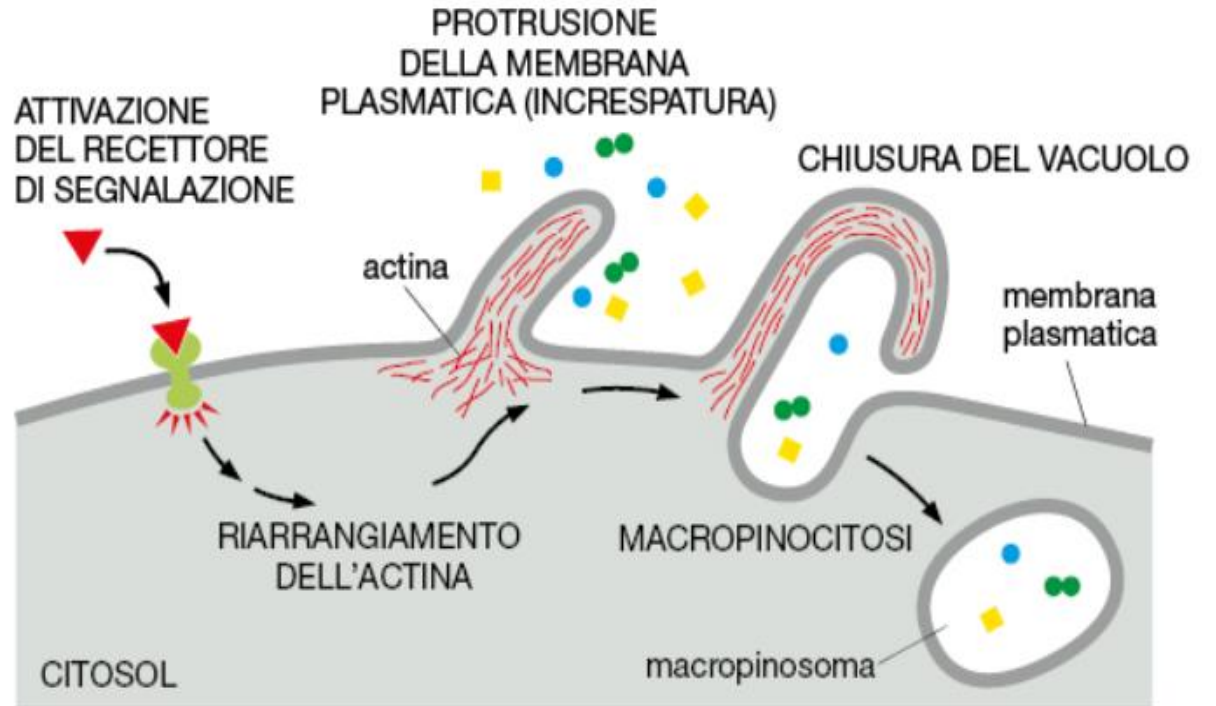


- **Malattia di Hurler** difetti di una singola idrolasi (Mucopolisaccaridosi).
- **provoca l'accumulo di zuccheri** (glicosaminoglicani) **nei lisosomi** delle cellule. Questo accumulo **danneggia organi** come cuore, cervello, fegato, milza e scheletro, **portando a difetti scheletrici, ritardo cognitivo, cardiomiopatie**

- **I-cell disease** o **malattia da inclusioni cellulari**:
- Difetto della **GlcNAc-fosfotransferasi**.
- Tutte le **idrolasi non vengono fosforilate** → **non riconosciute dai recettori M6P**.
- **Enzimi secreti nel sangue**, lisosomi vuoti → accumulo substrati → **gravi difetti sistemici**.

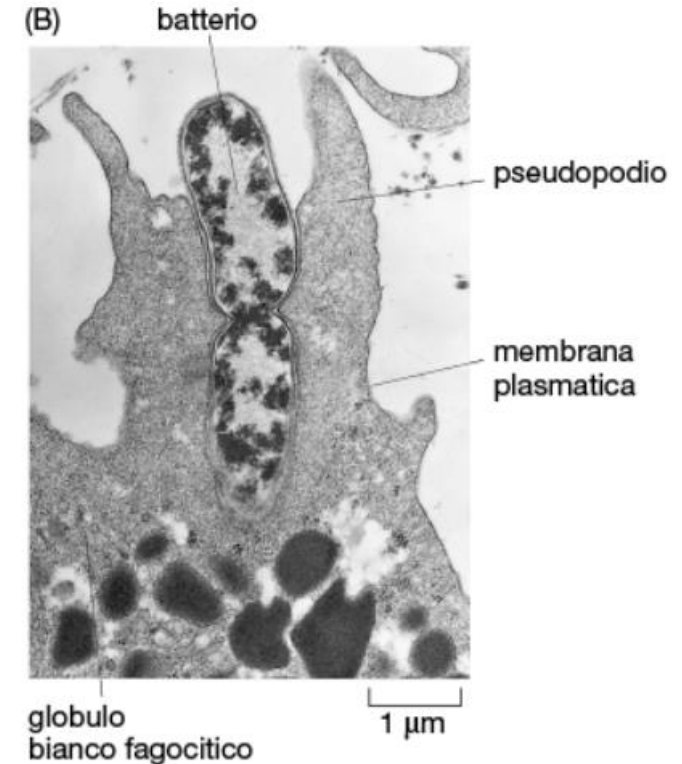
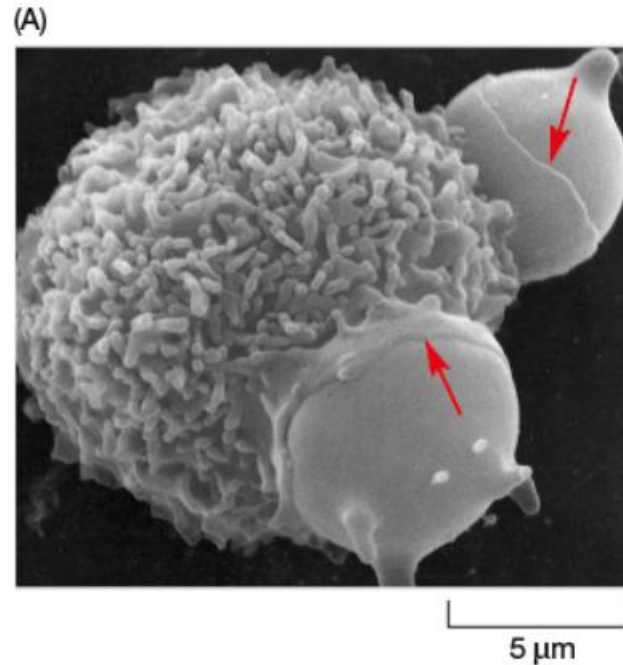
Macropinocitosi

- **Definizione:** endocitosi di grandi volumi di fluido extracellulare → **macropinosomi**.
- **Meccanismo:**
 - **Attivazione recettori** (fattori di crescita, integrine, virus).
 - **Riorganizzazione actina** → **increspature di membrana** che inglobano fluido.
- **Caratteristiche:**
 - **Non ricicla il contenuto** → **fusione diretta con endosomi tardivi/endolisosomi**.
 - Stimolata da **Ras** → molto attiva in cellule tumorali (nutrizione aggiuntiva).
- **Impatto:** può aumentare assorbimento di liquidi fino a 10 volte.

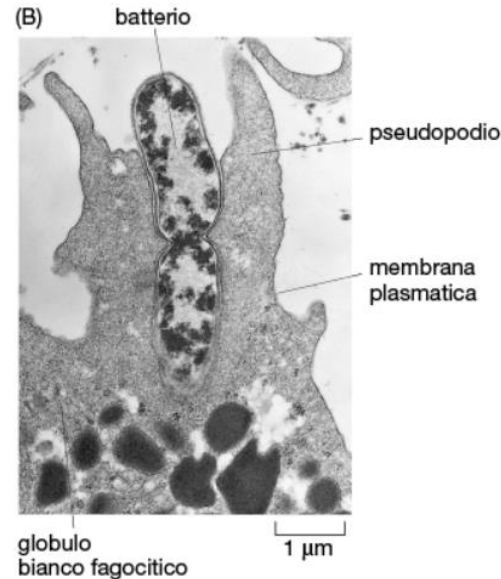
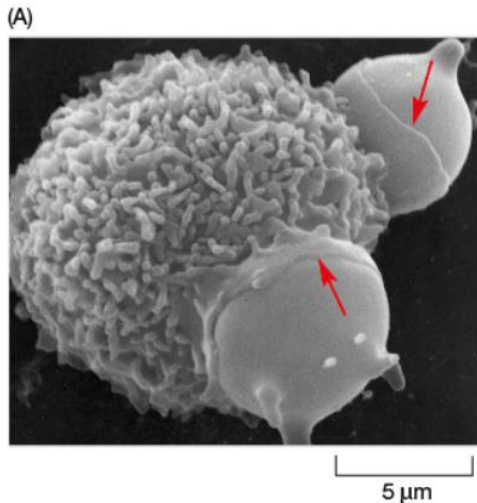
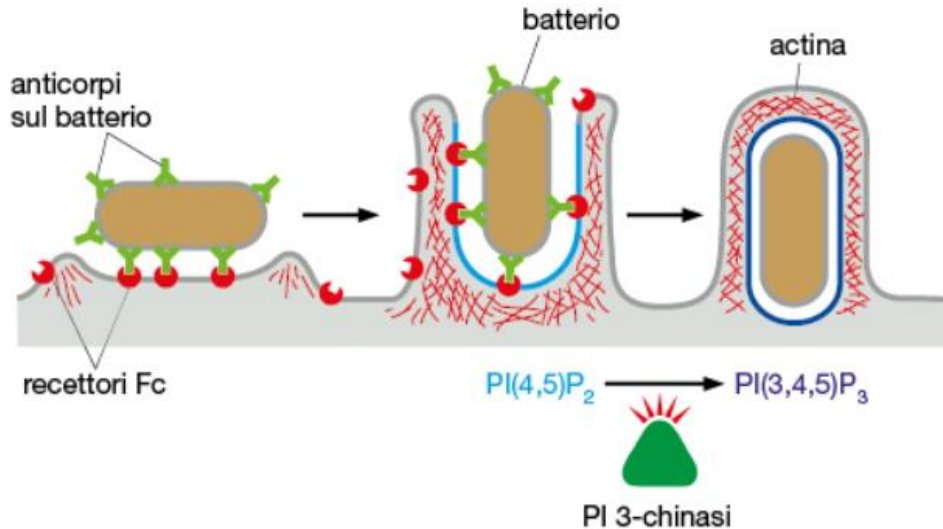


Fagocitosi

- **Definizione:** ingestione di grandi particelle in vescicole → **fagosomi**.
- **Funzioni:**
 - Nei protozoi = nutrizione.
 - Nei mammiferi = **difesa immunitaria e rimozione di cellule senescenti**.
- **Fagociti professionisti:**
 - **Macrofagi e neutrofili** (da staminali emopoietiche).
 - Esempio: macrofagi eliminano $>10^{11}$ globuli rossi senescenti.
- **Destino:** fagosoma + lisosoma → **degradazione** del contenuto.
 - Residui **indigeribili** → **corpi residui**, **eliminati per esocitosi**.
 - **Alcuni componenti di membrana recuperati** al plasmalemma.



Fagocitosi: un Processo Guidato da Recettori



- **Indotta dal carico:** richiede attivazione di recettori specifici.
- **Esempi di recettori:**
 - Fc (anticorpi legati a patogeni → segnale di ingestione).
 - Recettori per il complemento.
 - Recettori per carboidrati microbici.
 - Recettori che riconoscono cellule apoptotiche (fosfatidilserina esposta).
- **Segnali molecolari:**
 - GTPasi Rho → polimerizzazione actina.
 - $PI(4,5)P_2$ stimola polimerizzazione → $PI(3,4,5)P_3$ favorisce chiusura fagosoma.
- **Controllo bilanciato:**
 - “Mangiami” (PS esposta, apoptosi).
 - “Non mangiarmi” (proteine inibitorie → recettori che reclutano fosfatasi).

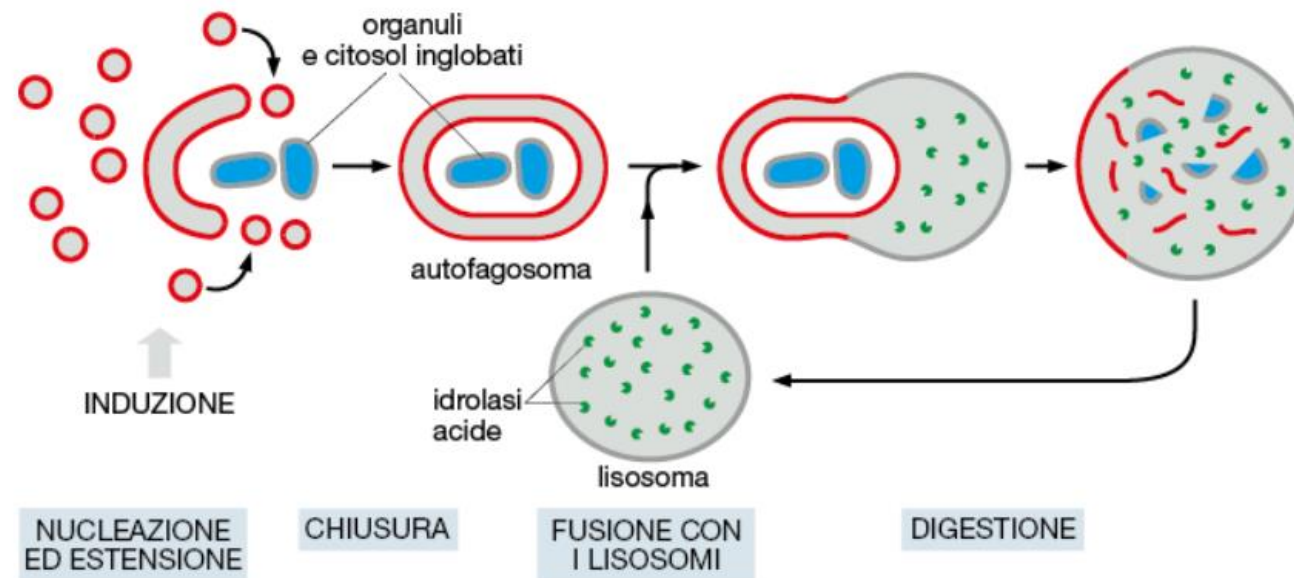
Autofagia: “Mangiare se stessi”

Definizione: degradazione intracellulare in autofagosomi → lisosomi.

- **Non selettiva: porzioni generiche di citoplasma** → riciclo di nutrienti (stress/carenza).
- **Selettiva: targeting specifico** → organelli danneggiati, proteine aggregate, patogeni intracellulari.

Ruoli:

- Rimodellamento durante sviluppo.
- Risposta a stress e nutrienti bassi.
- Difesa antivirale/batterica.
- Prevenzione di patologie (neurodegenerazione, cancro).



Autofagia Selettiva e Non Selettiva

Autofagia non selettiva

- **Complesso mTORC1:** inibisce **ATG1** → blocco autofagia.
- **Carenza di nutrienti** → ↓ **mTORC1** → attivazione **ATG1** → **autofagia attiva**.
- Feedback: **degradazione** → **produzione aminoacidi** → **riattiva mTORC1**.
- **Ruolo fisiologico:**
 - **Sostegno** metabolico **immediato alla nascita**.
 - **Risposta a stress** e carenza di ATP.
 - Integrazione con segnali di fattori di crescita.

Autofagia selettiva

- **Cargo mirati:** microrganismi, organelli obsoleti, aggregati proteici.
- **Recettori cargo:** legano **ATG8** + segnali specifici (es. ubiquitina).
- **Meccanismo:**
 - **Ubiquitinazione del target.**
 - **Reclutamento recettori cargo.**
 - **Formazione autofagosoma** che avvolge il carico → lisosoma.
- **Mitofagia:**
 - **Mitocondri danneggiati** → **Pink1 accumulato in membrana**.
 - **Pink1** → **recluta Parkina** → **ubiquitinazione proteine mitocondriali**.
 - **Reclutamento recettori cargo** → **degradazione**.
- **Rilevanza clinica:** mutazioni **Pink1/Parkina** → **Parkinson a insorgenza precoce**.

Autofagia Selettiva e Non Selettiva

Macroautofagia (meccanismo classico)

- La cellula **forma una doppia membrana** (detta **fagoforo**) che circonda parte del citoplasma o organelli danneggiati.
- Il fagoforo si chiude formando una **vescicola a doppia membrana** chiamata **autofagosoma**.
- L'autofagosoma si **fonde con un lisosoma**, generando un **autolisosoma**, dove il contenuto viene degradato da enzimi idrolitici.
- Regolata da **proteine ATG** e dal **pathway di mTOR**

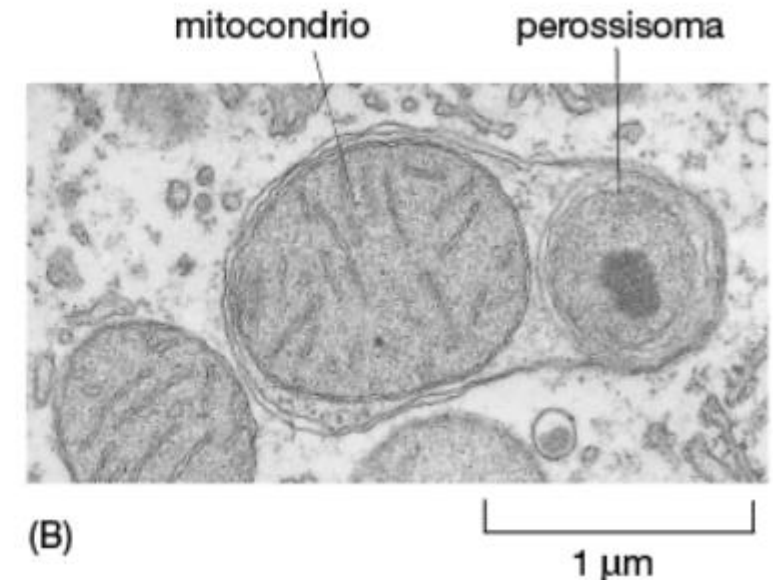
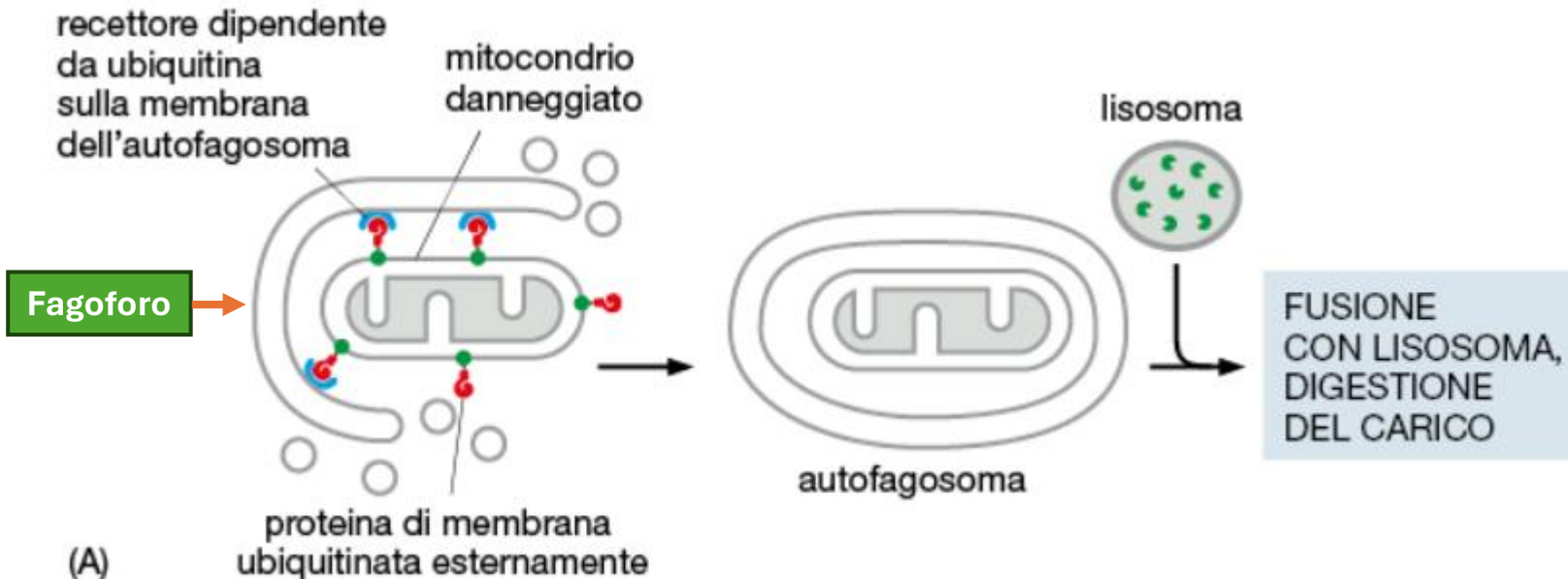
Microautofagia

- È un processo **molto più diretto e morfologicamente semplice**:
- Il **lisosoma stesso** (o vacuolo, in cellule vegetali e fungine) **invagina la propria membrana** per **ingerire porzioni di citoplasma**.
- Il materiale viene **internalizzato in piccole vescicole** all'interno del lisosoma e **degradato direttamente**.
- Quindi, nella microautofagia, **non si forma un autofagosoma separato**.

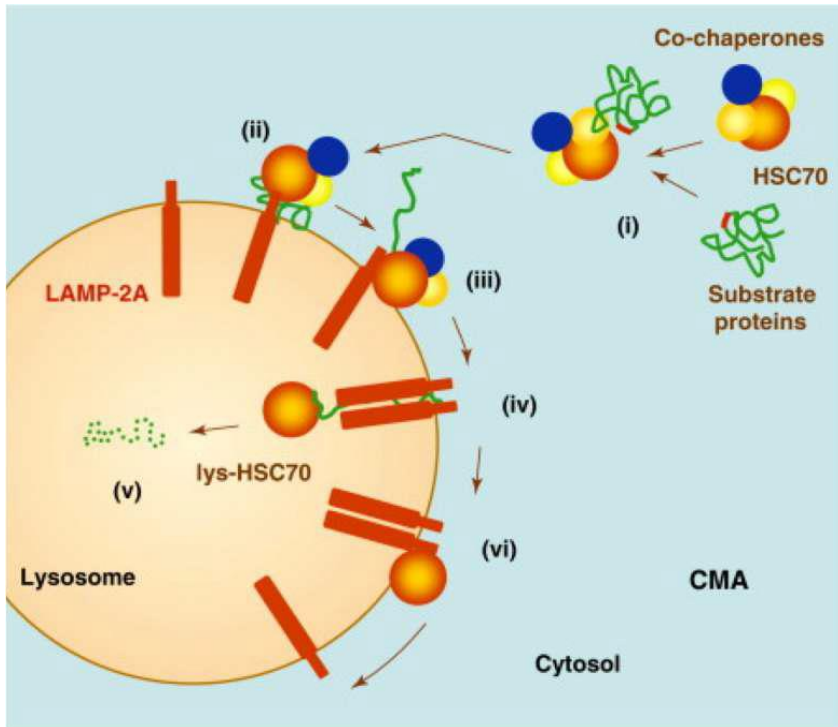
Meccanismo Molecolare dell'Autofagia

L'autofagosoma si assembla mediante la fusione di **piccole vescicole di origine sconosciuta**

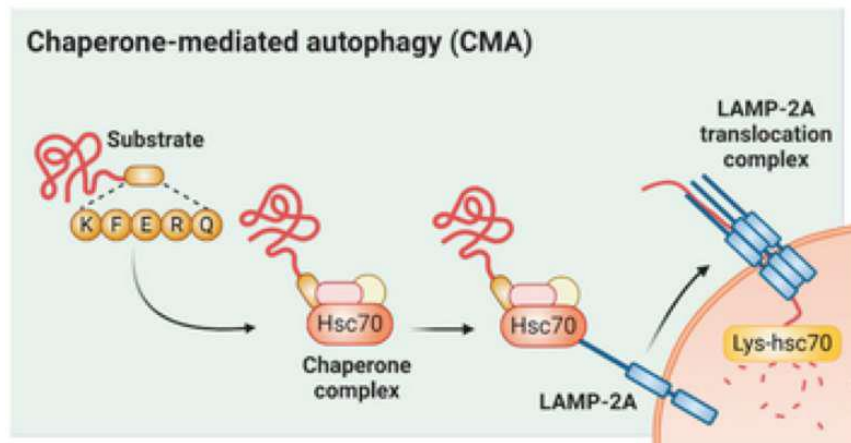
1. **Inizio:** complesso **chinasi ATG1** produce localmente **PI(3)P** → **reclutamento** proteine **ATG (fagoforo)**.
2. **Espansione membrana:** stimolano **attacco di ATG8** a **fosfatidiletanolamina** → le **vescicole marcate con ATG8 si fondono** (o con ATG8, omotipica o con ATG9, eterotipica).
3. **Struttura:** membrana **a disco** (non sferica) → chiusura in **doppia membrana** (autofagosoma).
4. **Chiusura e Fusione:**
 - **Membrana esterna** → **fusione con lisosoma** (mediata da SNARE).
 - **Membrana interna + contenuto** → **degradazione da idrolasi acide**.



Chaperone-Mediated Autophagy (CMA)



TRENDS in Endocrinology & Metabolism



Chaperone-Mediated Autophagy (CMA)

Le **proteine non correttamente ripiegate** possono **esporre il motivo KFERQ** (il 30% delle proteine cellulari possiede questa sequenza aminoacidica) che permette il **riconoscimento** da parte di un sistema di **chaperoni** e co-chaperoni come ad esempio HSC70. **Il complesso si lega a LAMP2A** sulla membrana del **lisosoma** che trasloca la **proteina** malripiegata nel lume lisosomiale dove **sarà degradata**.

Cosa succede quando l'autofagia è alterata?

- **Disfunzione cellulare:**
Una carenza di autofagia porta all'**accumulo di proteine e organelli danneggiati** all'interno della cellula, **compromettendone la funzione**.
- **Invecchiamento:**
L'alterazione dell'autofagia è uno dei **segni distintivi dell'invecchiamento**, poiché le **cellule diventano meno efficienti** nel liberarsi dai rifiuti cellulari.
- **Malattie:**
 - Difetti nell'autofagia sono stati osservati in diverse condizioni, tra cui:
 - **Malattie neurodegenerative** (come l'Alzheimer, il Parkinson)
 - **Tumori**
 - **Malattie infettive e autoimmuni**
 - **Malattie genetiche ereditarie** (es. miopatie e distrofie muscolari)