

TRASPORTO

amb. extracell-citosol



IONI
e
PICCOLE
MOLECOLE
ORGANICHE

TRASPORTO TRANS-MEMBRANA

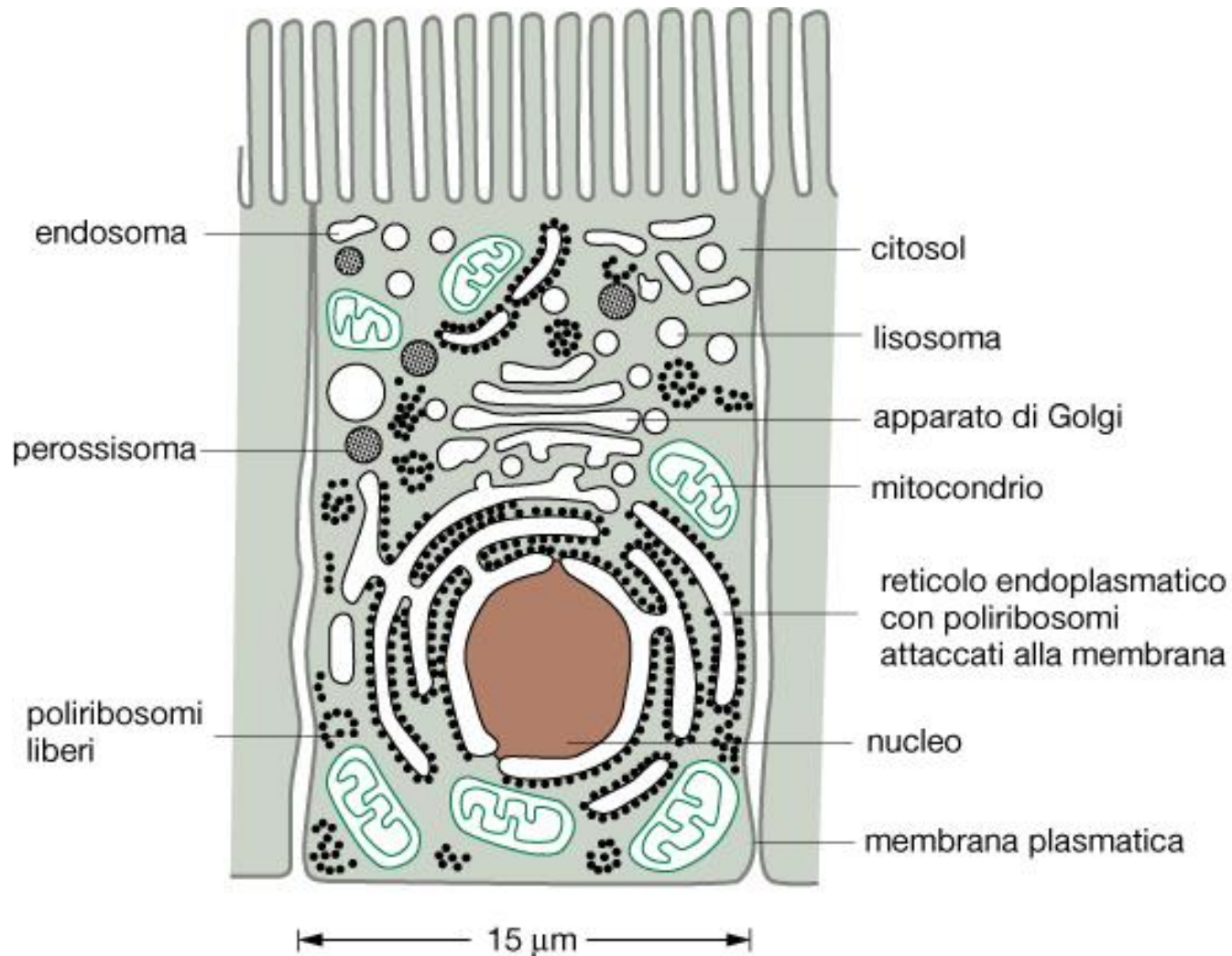
TRASPORTO

- La cellula deve trasportare sostanze anche tra i suoi compartimenti intracellulari oltre che tra il citosol e l'ambiente extracellulare



trasporto intracellulare

Ogni organello contiene una serie distinta di **PROTEINE** che mediano le sue specifiche funzioni



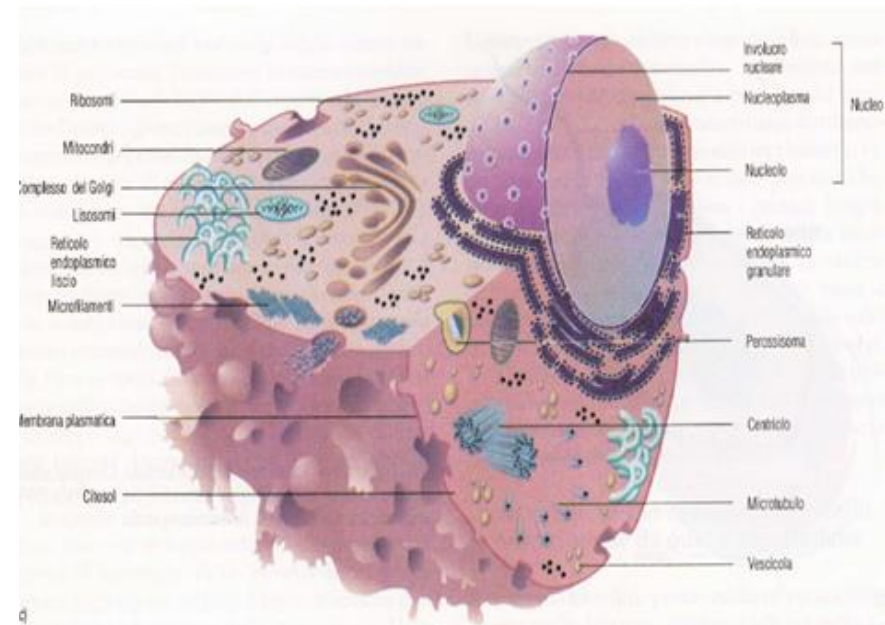
La cellula ha bisogno di trasportare **MACROMOLECOLE** (ad. es **proteine**, complessi lipoproteici, ecc.) e **PARTICELLE** di varia natura (frammenti

Possibili sistemi di trasporto della cellula

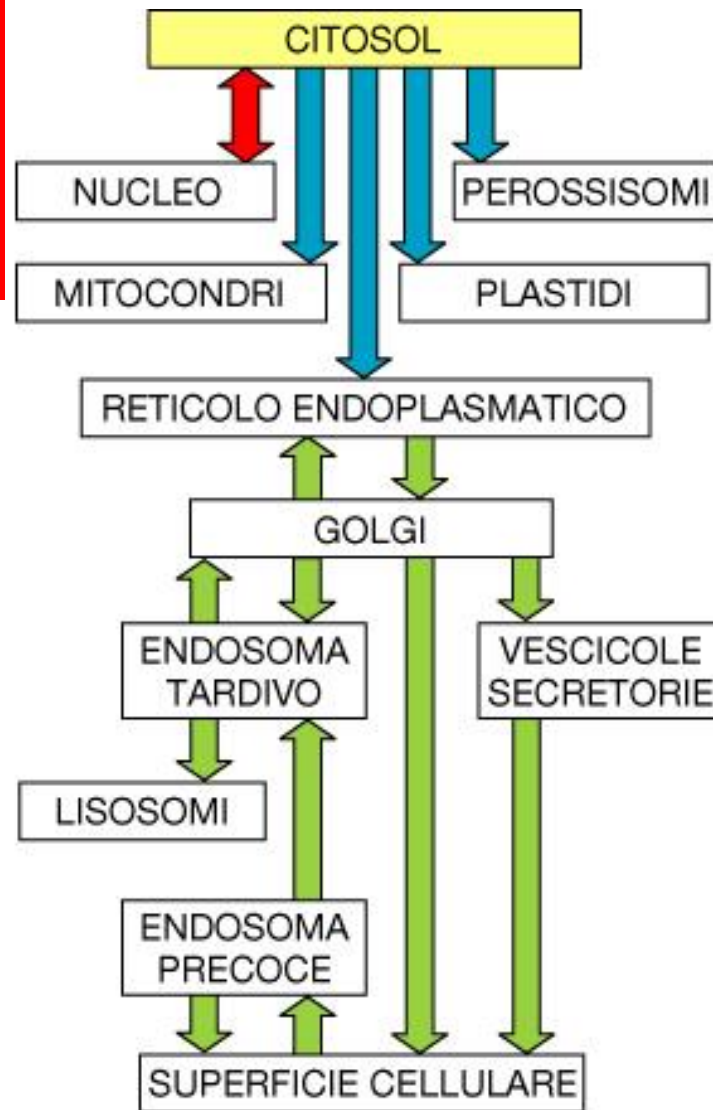
**TRASPORTO TRANS-
MEMBRANA**

**TRASPORTO
VESCICOLARE**

**TRASPORTO ATTRAVERSO I
COMPLESSI DEI PORI
NUCLEARI**



**TRASPORTO
ATTRAVERSO I
COMPLESSI DEI
PORI NUCLEARI**



**TRASPORTO
TRANS-MEMBRANA**

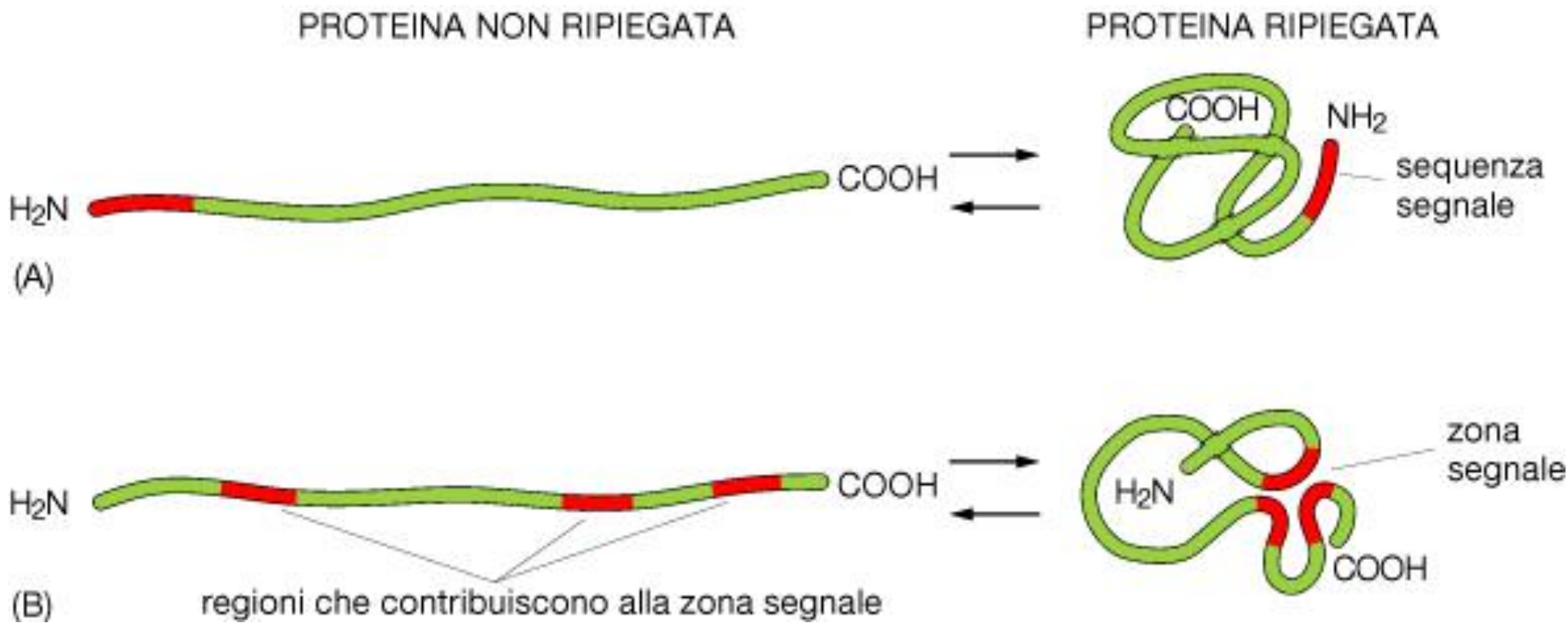
**TRASPORTO
VESCICOLARE**

possibili sistemi di trasporto della cellula

SMISTAMENTO INTRACELLULARE DELLE PROTEINE

- Per ogni proteina il viaggio inizia dal **LUOGO DI SINTESI (RIBOSOMA)** nel citosol e termina quando viene raggiunta la **destinazione finale**
- Le proteine possono muoversi da un compartimento all'altro della cellula
- Nel suo viaggio la p. è guidata da **SEGNALI** nella sequenza aminoacidica (**sequenze segnale o zone segnale**) che sono riconosciuti da recettori di smistamento complementari che consegnano la proteina al giusto organello.
- A ciascuna stazione intermedia viene deciso se la proteina viene trattenuta in quel compartimento o trasportata ulteriormente (un segnale può essere richiesto o per la ritenzione o per l'uscita)
- Le proteine che devono funzionare nel citosol non possiedono sequenze/zone segnale di smistamento perciò dopo la sintesi restano nel citosol

Le proteine vengono smistate dal citosol al corretto organello (nucleo, mitocondrio, perossisoma) grazie a SEQUENZE o ZONE SEGNALE



Studio del trasporto intracellulare mediante proteine di fusione con GFP

(green fluorescent protein)

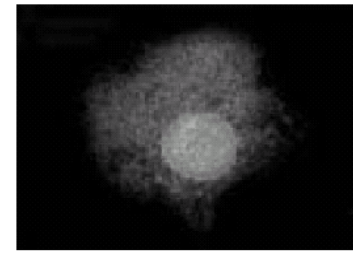
- *L'aggiunta del GFP alla proteina d'interesse non altera la funzione della proteina*

Un modo di seguire la posizione di una proteina in cellule viventi è quello di costruire proteine di fusione, in cui la proteina fluorescente verde (GFP) è attaccata mediante tecniche di ingegneria genetica alla proteina di interesse. Quando un cDNA che codifica una proteina di fusione è espresso in una cellula, la proteina è facilmente visibile in un microscopio a fluorescenza, così che può essere seguita nelle cellule viventi in tempo reale. Fortunatamente, per la maggior parte delle proteine studiate l'aggiunta di GFP ad una proteina non perturba la funzione della proteina.

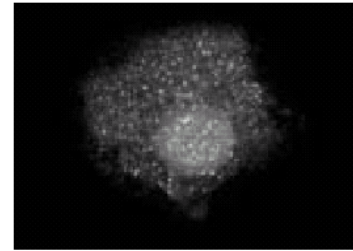
Le proteine di fusione con GFP sono usate largamente per studiare la posizione e il movimento di proteine nelle cellule. La GFP fusa a proteine che vanno avanti e indietro dal nucleo, per esempio, è usata per studiare gli eventi di trasporto nucleare e la loro regolazione. La GFP fusa a proteine dei mitocondri o del Golgi è usata per studiare il comportamento di questi organelli. La GFP fusa a proteine della membrana plasmatica è usata per misurare la cinetica del loro movimento dall'ER attraverso la via secretoria.

Lo studio di proteine di fusione con GFP è spesso combinato con tecniche FRAP e FLIP (vedi Capitolo 10), in cui la GFP in regioni selezionate della cellula è sbiancata da una forte luce laser. La velocità di diffusione delle proteine di fusione con GFP non sbiancate in quell'area può allora essere determinata per fornire una misurazione della diffusione della proteina o del suo trasporto nella cellula. In questo modo, per esempio, è stato determinato che molti enzimi del Golgi riciclano fra l'apparato del Golgi e l'ER.

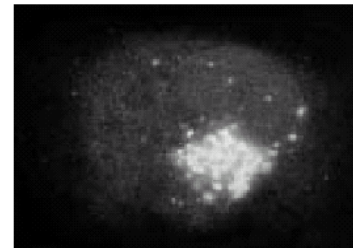
(A-D, a destra, per gentile concessione di Jennifer Lippincott-Schwartz Lab.)



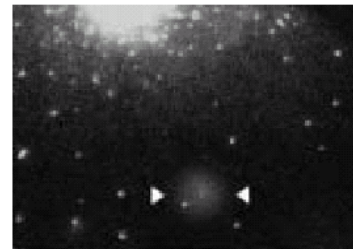
(A) In questo esperimento, la GFP fusa alla proteina di rivestimento del virus della stomatite vescicolare è stata espressa in cellule in coltura. La proteina virale è una proteina integrale di membrana che normalmente si muove attraverso la via secretoria dall'ER alla superficie cellulare, dove il virus sarebbe assemblato se le cellule esprimessero anche gli altri componenti virali. La proteina virale contiene una mutazione che permette l'esportazione dall'ER soltanto a bassa temperatura. Così, all'alta temperatura mostrata, la proteina di fusione marca l'ER.



(B) All'abbassarsi della temperatura, la proteina di fusione con GFP si accumula rapidamente ai siti di uscita dall'ER.

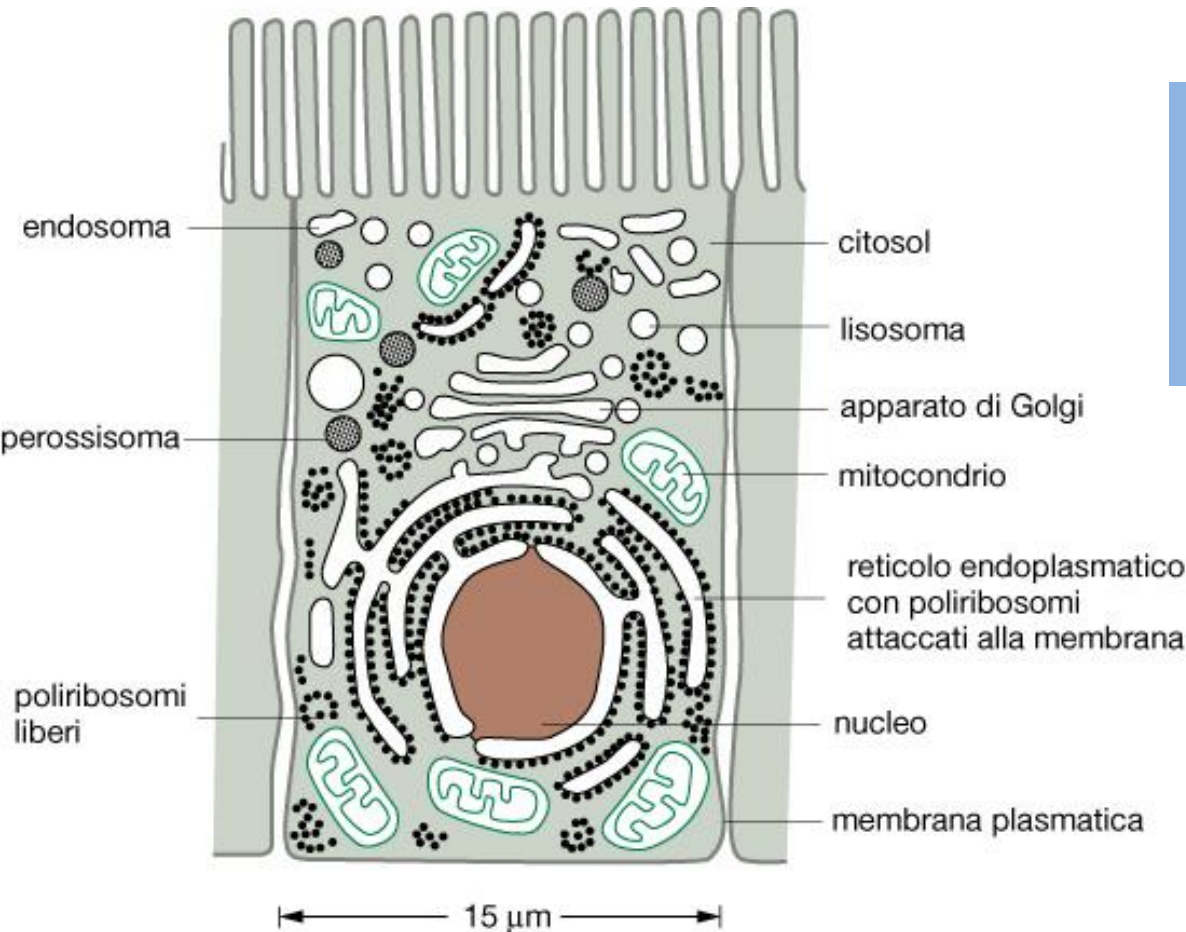


(C) La proteina di fusione si muove poi all'apparato di Golgi.

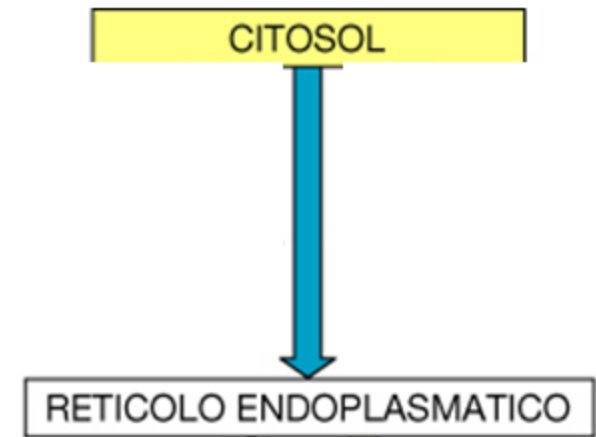


(D) Infine, la proteina di fusione è portata fino alla membrana plasmatica. Da questi studi si può determinare la cinetica di ciascun passaggio della via.

Trasporto di proteine nel RETICOLO ENDOPLASMATICO (ER)



TRASPORTO TRANS-MEMBRANA



- proteine destinate alla secrezione sono **prima importate dal citosol nel RE**

- Sequenza segnale
- importazione co-traduzionale

Reticolo endoplasmatico (ER)

- Labirinto reticolare di tubuli ramificati e sacchi appiattiti interconnessi esteso per tutto il citosol

- **PRODUZIONE DI QUASI TUTTI I LIPIDI CELLULARI**

- Superficie citosolica del ER → **PARTE DELLA SINTESI PROTEICA**



ruolo centrale

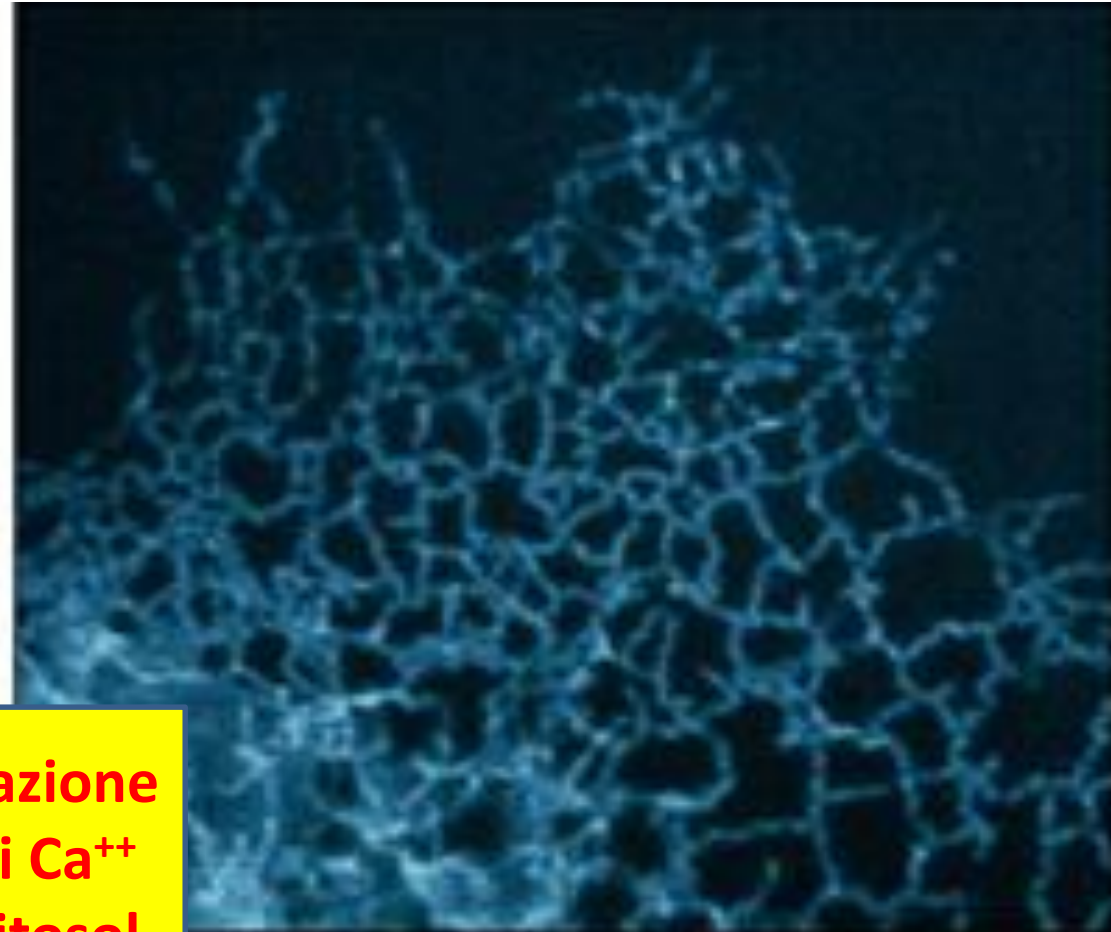
biosintesi

LIPIDI e PROTEINE

regolazione

livelli Ca^{++}

nel citosol

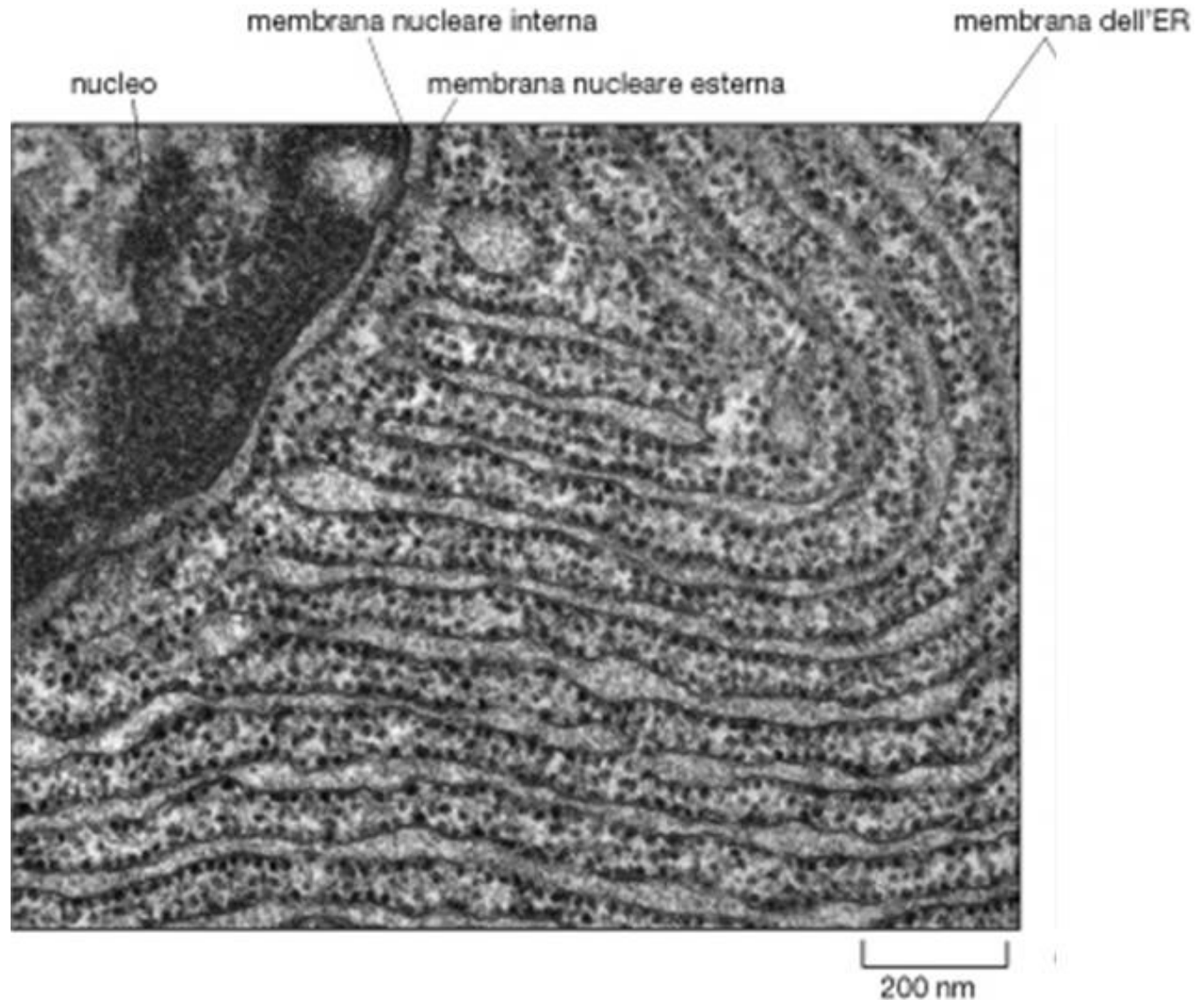


2 μm

- *la M del ER sintetizza quasi tutte le classi principali di LIPIDI, compresi fosfolipidi e colesterolo*

- *nel ER è assemblata la maggior parte dei bilayer lipidici delle M*

Alcuni **ribosomi sintetizzano le proteine attaccati direttamente alla M dell'ER**, creando regioni dette **RETICOLO ENDOPLASMATICO RUVIDO**



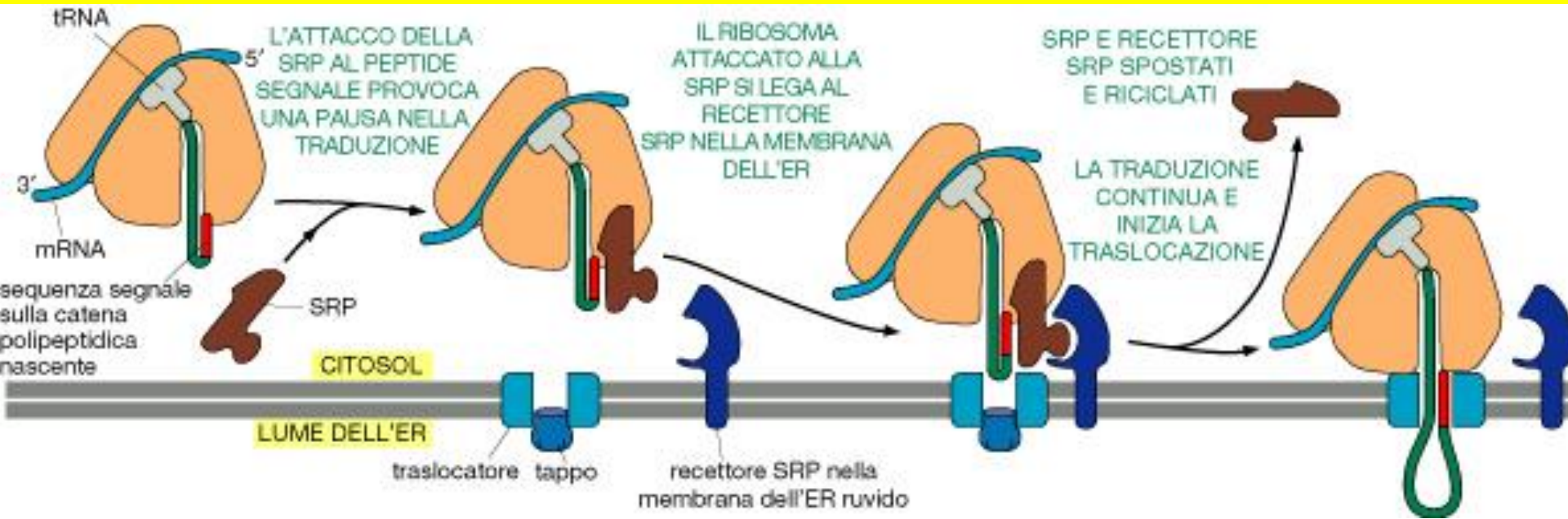
La **M nucleare esterna** è in continuità con il ER ed è anch'essa costellata di ribosomi

Nelle cellule ci sono anche **ribosomi liberi nel citosol**

TRASPORTO DELLE PROTEINE NEL ER

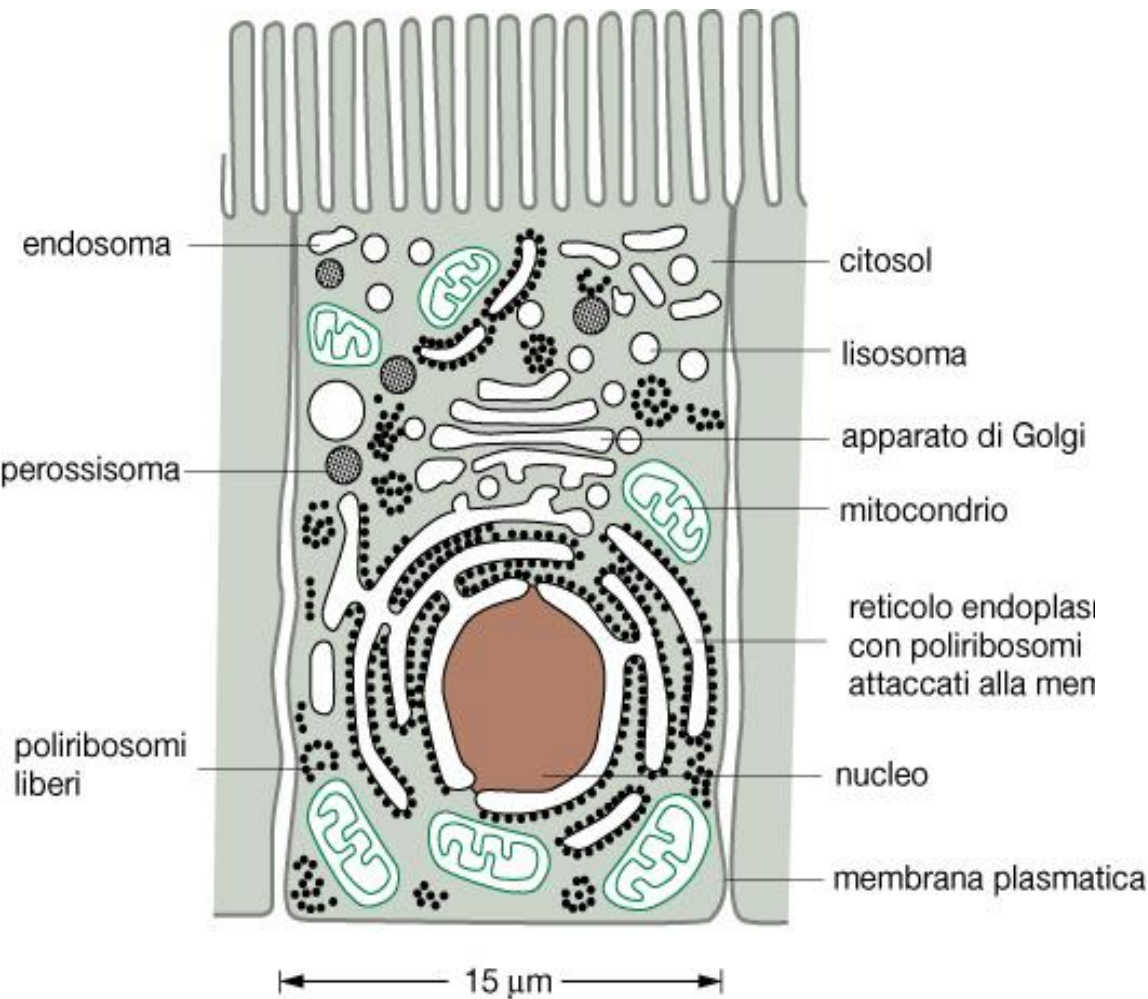
(riguarda le proteine di membrana e le proteine solubili **destinate alla secrezione** o allo **smistamento mediante trasporto vescicolare** in organuli quali Golgi, lisosomi, vescicole secretorie)

Le sequenze segnale del ER e la SRP (particella di riconoscimento del segnale) dirigono i ribosomi alla M del ER

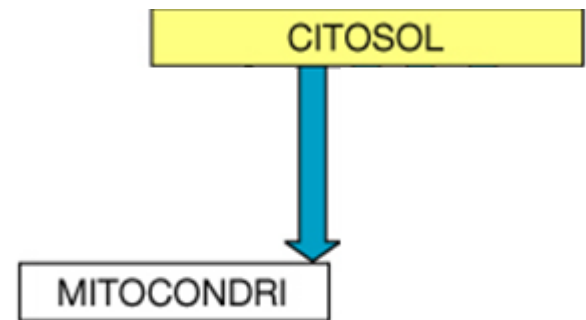


- La maggior parte delle proteine sintetizzate **nell' ER** vengono poi **glicosilate** tramite l'aggiunta di un polisaccaride comune

Il trasporto di proteine nei mitocondri



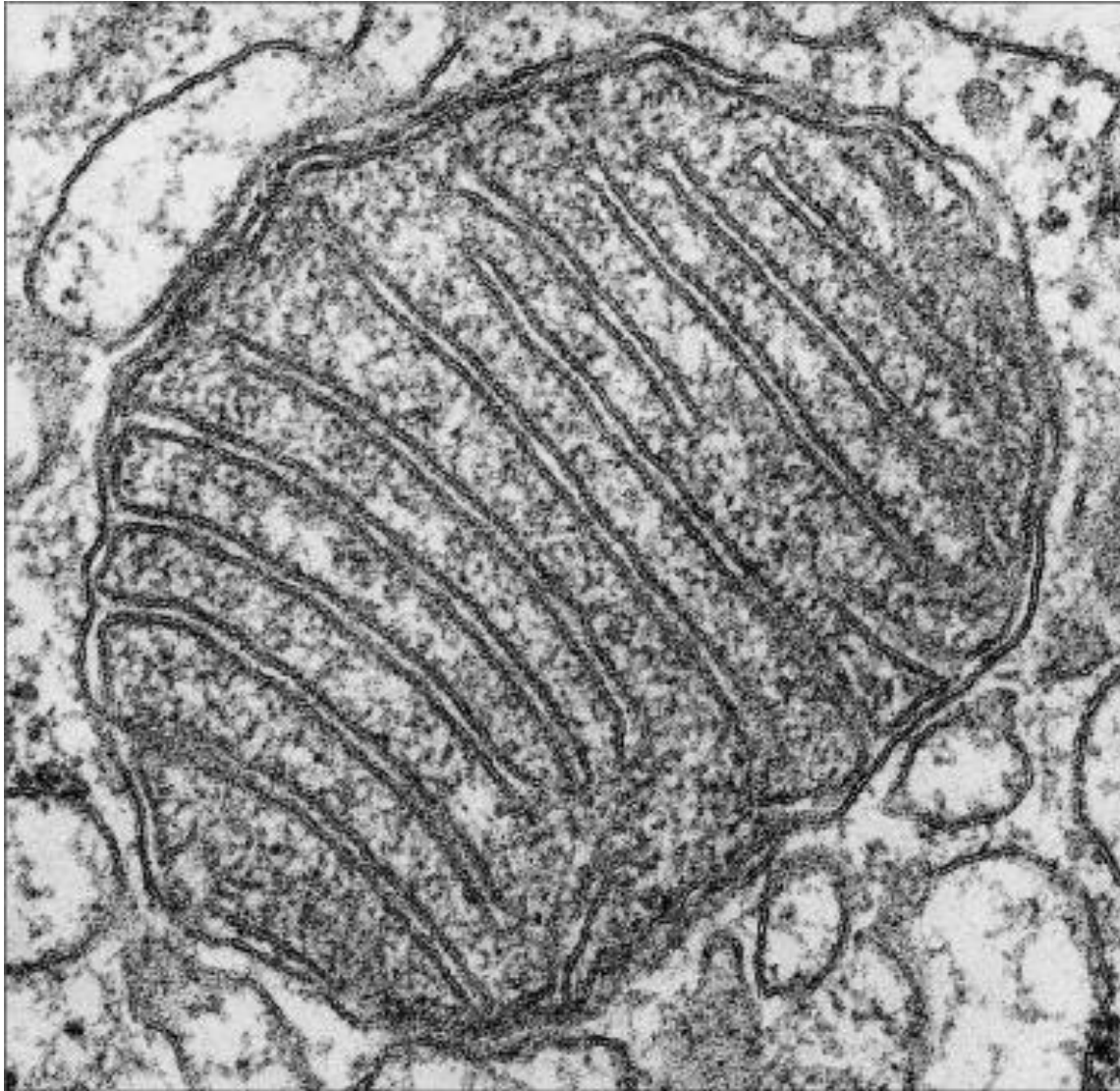
TRASPORTO TRANS-MEMBRANA



MITOCONDRI

Sono presenti in tutte le cellule animali e vegetali (compresi funghi)

Il mitocondrio contiene una M esterna, una M interna e 2 compartimenti interni



(A)

100 nm



(B)



(C)

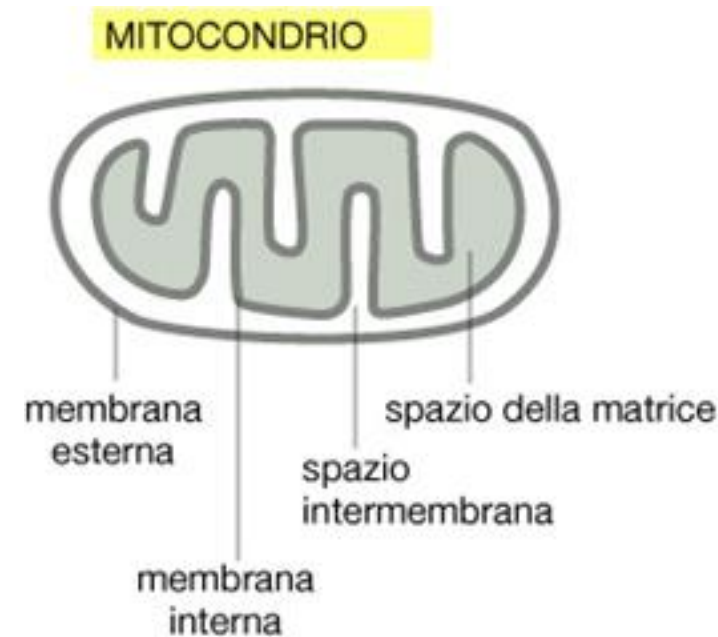
MITOCONDRI

Sono gli organuli cellulari in cui convergono tutti i processi che **producono energia**, sia che inizino con zuccheri, sia con grassi o con proteine

Negli Eucarioti le **membrane specializzate** all'interno dei mitocondri forniscono l'impalcatura per una serie di **processi di trasporto di elettroni** che producono la maggior parte dell'**ATP** della cellula

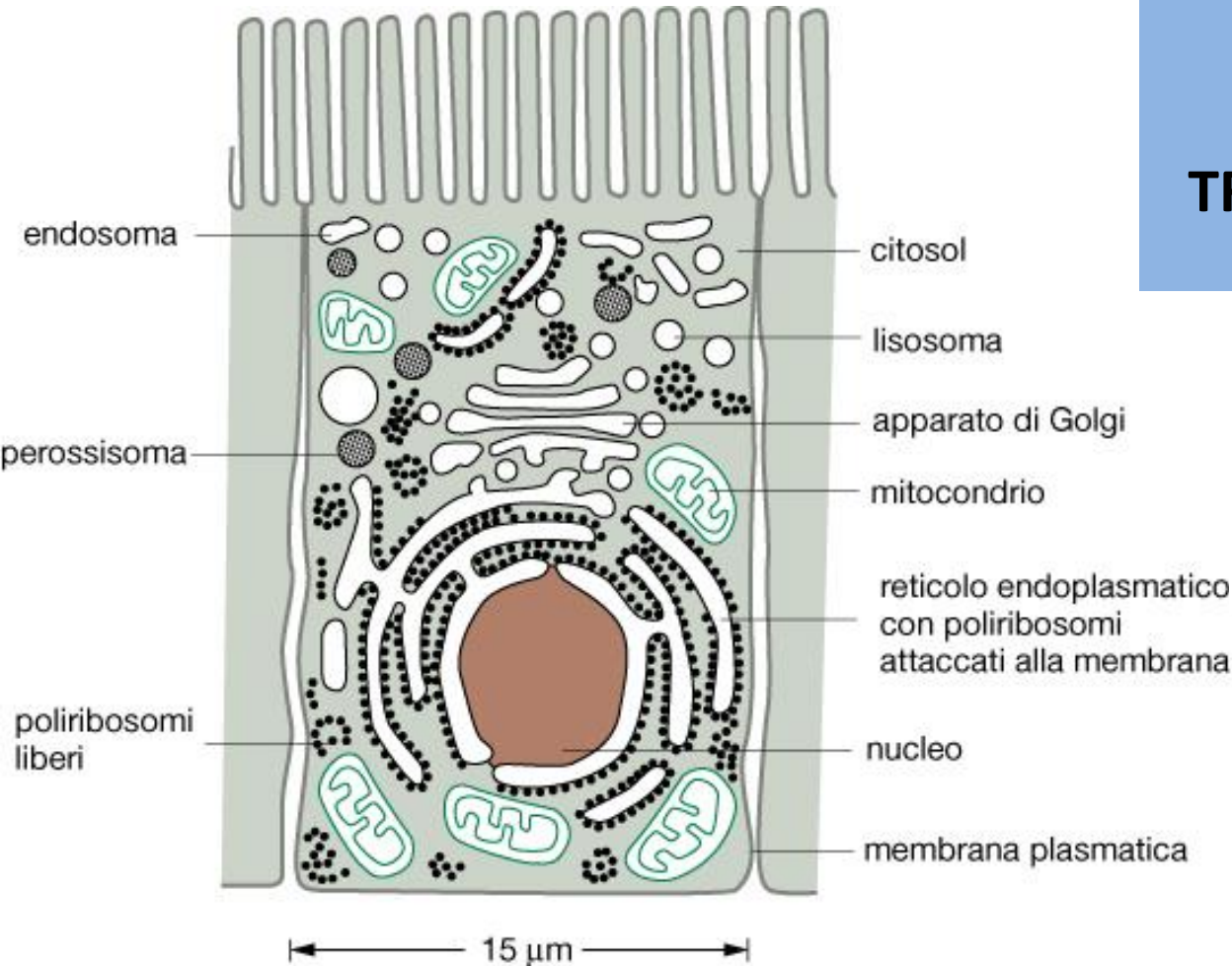
Trasporto di proteine attraverso le membrane mitocondriali

- anche se capaci di sintesi proteica autonoma
i mitocondri importano la > parte delle loro proteine dal citoplasma
- **TRASPORTO TRANS MEMBRANA MEDIATO DA COMPLESSI PROTEICI** multisubunità chiamati **TOM** (traslocasi della m. esterna) e **TIM** (traslocasi della m. interna)
- **trasporto attivo**: (idrolisi ATP)
- necessario **gradiente protonico** tra matrice e spazio compreso tra le 2 membrane
- **Sequenza segnale specifica** (tagliata dopo importazione)
- **Sequenza segnale interna**: guida trasporto ulteriore

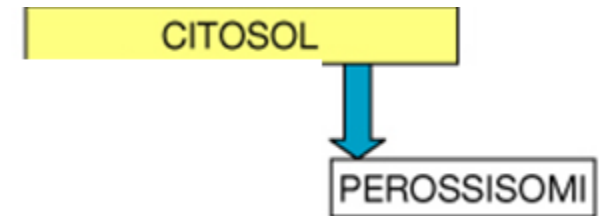


Trasporto di proteine nei PEROSSISOMI

non contengono né DNA né ribosomi e perciò devono importare le loro proteine dal citosol



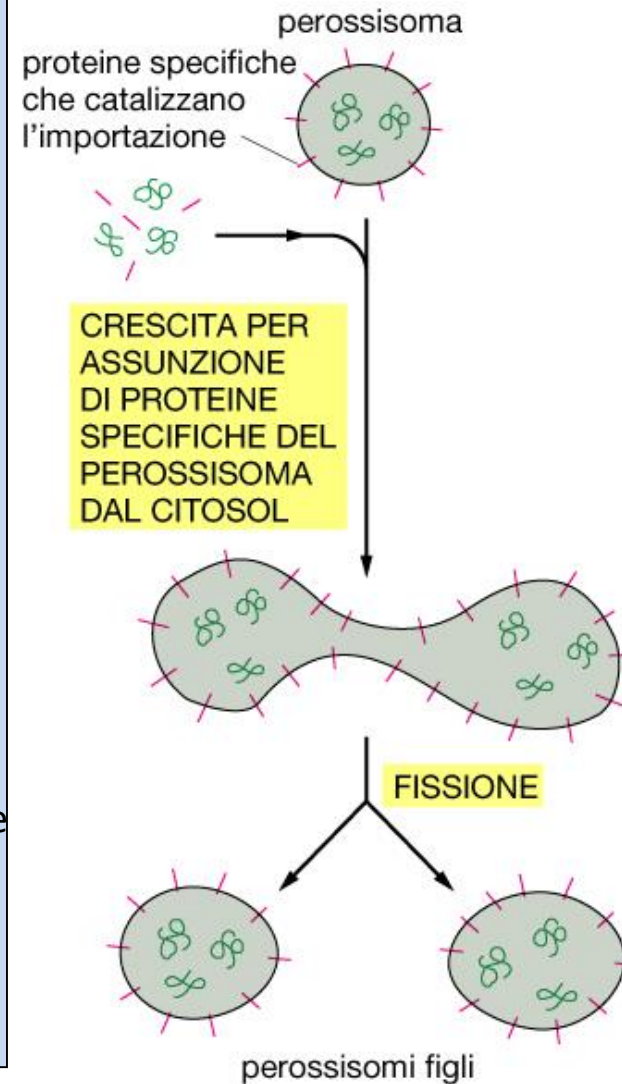
TRASPORTO TRANS-MEMBRANA



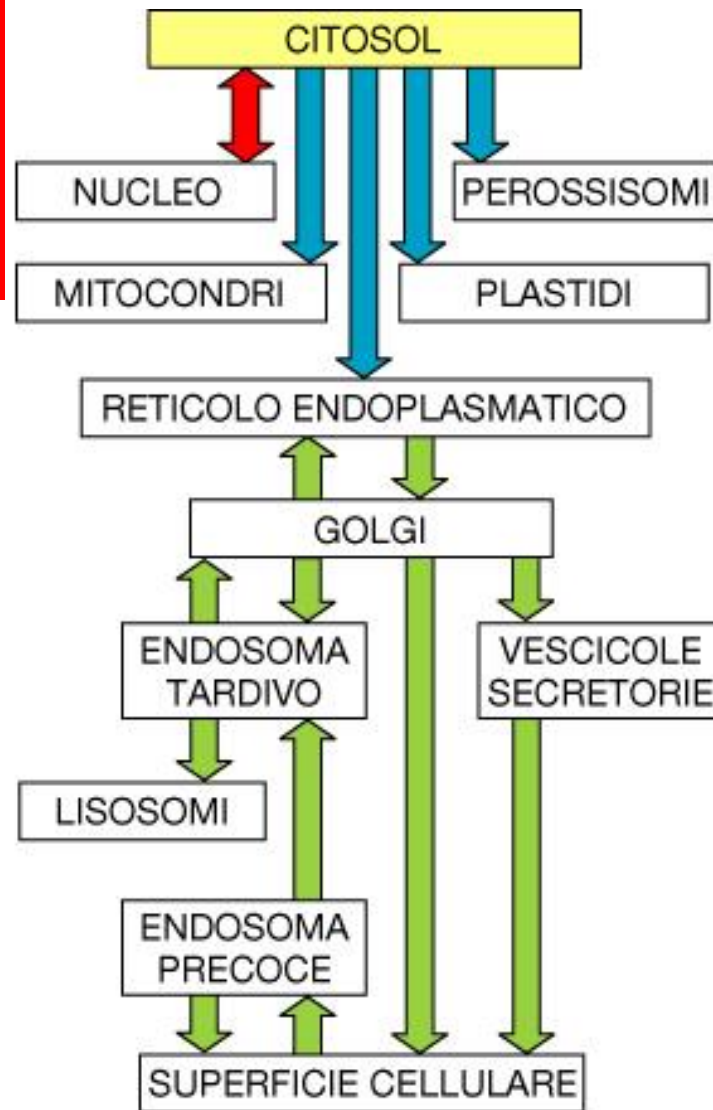
PEROSSISOMI

- Svolgono **reazioni ossidative** (es. demolizione ac. grassi) usando ossigeno molecolare
- Generano **H₂O₂** che usano per scopi ossidativi:
$$\text{RH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$$

l'eccesso viene distrutto dalla **CATALASI** che contengono:
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$
- Sintesi di **fosfolipidi specializzati** per la mielinazione delle cellule nervose
- Molto importanti nelle cellule del fegato e del rene dove **detossificano molecole tossiche che entrano nel sangue**
- Importano le loro proteine dal citosol, senza svolgerle, mediante **TRASPORTO TRANSMEMBRANA** mediato da specifiche proteine
- **segnale di importazione**
- Autoreplicazione (come mitocondri e plastidi)



**TRASPORTO
ATTRAVERSO I
COMPLESSI DEI
PORI NUCLEARI**



**TRASPORTO
TRANS-MEMBRANA**



**TRASPORTO
VESCICOLARE**

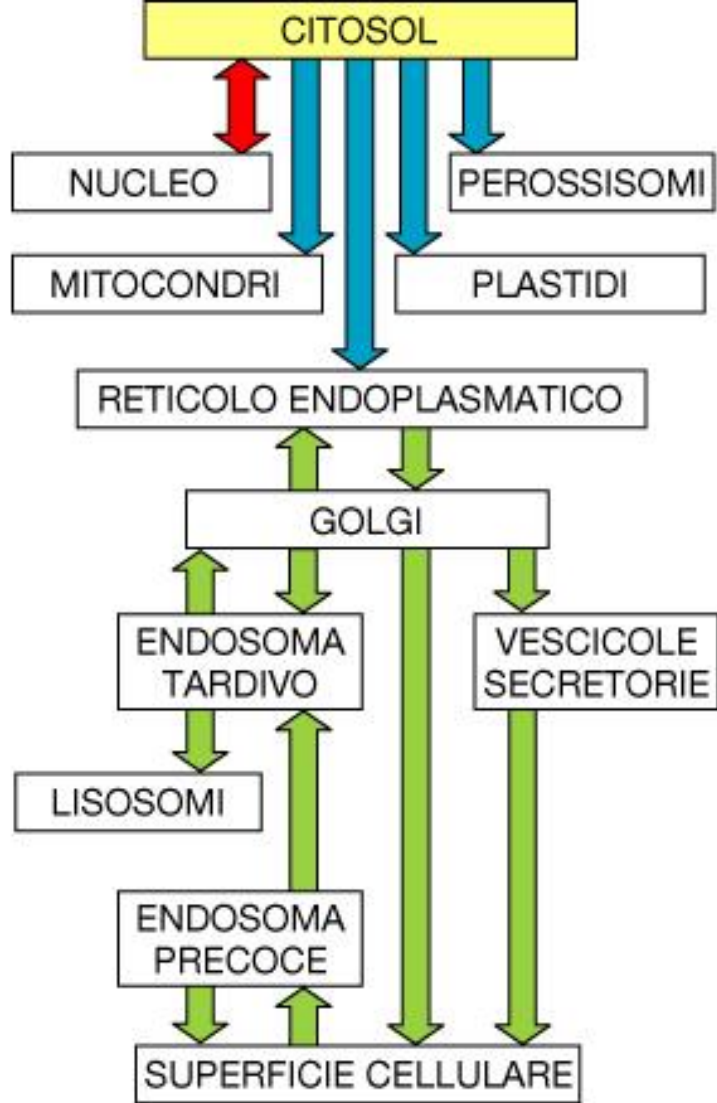
possibili sistemi di trasporto della cellula

TRASPORTO VESCICOLARE

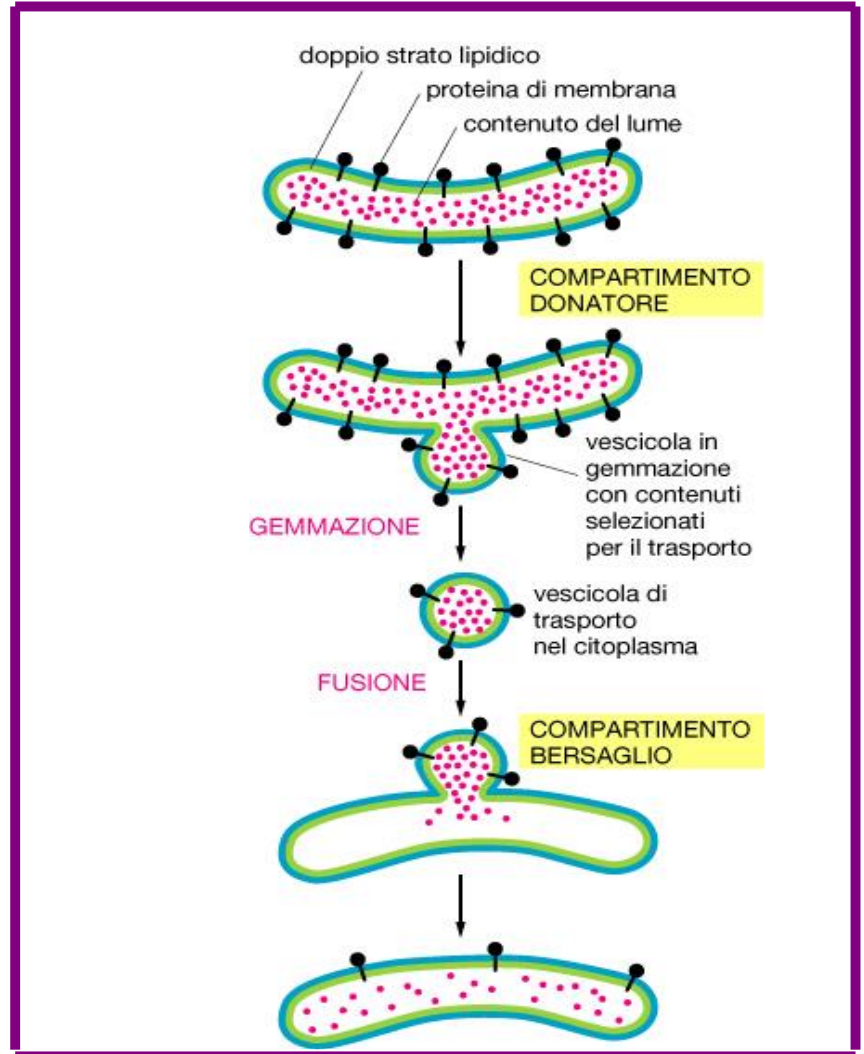
- Le cellule possono assumere macromolecole (ad es. **PROTEINE**) e sostanze di grosse dimensioni mediante un trasporto detto **trasporto vescicolare** che convoglia materiali ai vari compartimenti della cellula
- comporta dispendio energetico per la cellula quindi può essere considerato un **trasporto attivo**
- richiede la formazione di **vescicole di m.** in grado di spostare il loro **cargo** (ad es. neurotrasmettitori, proteine, complessi lipoproteici, particelle di varia natura (ad es frammenti cellulari) **attraverso** le m. cellulari

➤ **ENDOCITOSI**

➤ **ESOCITOSI**

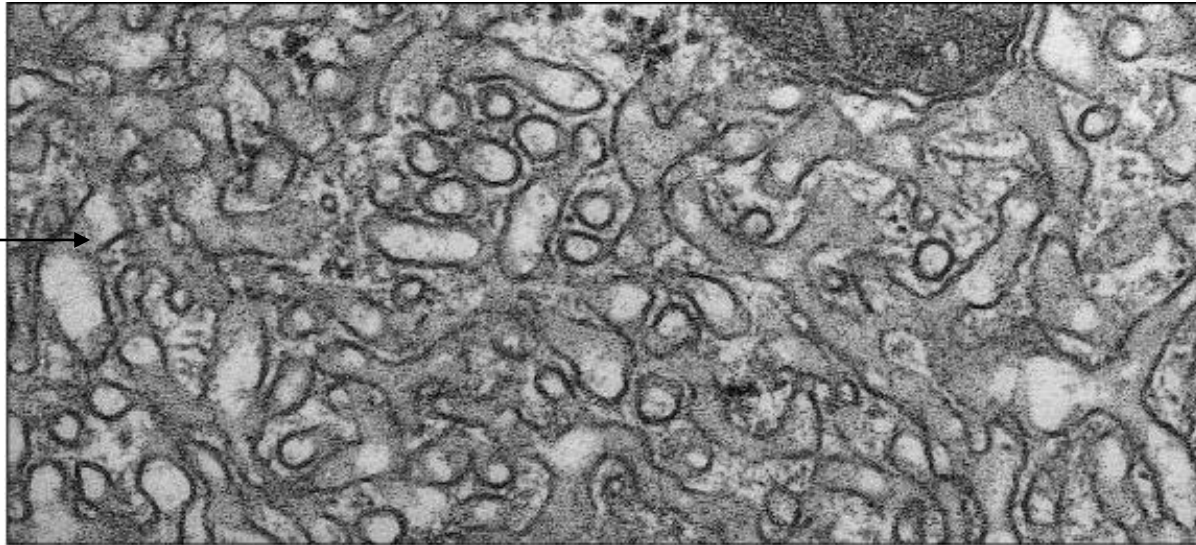


TRASPORTO VESCICOLARE



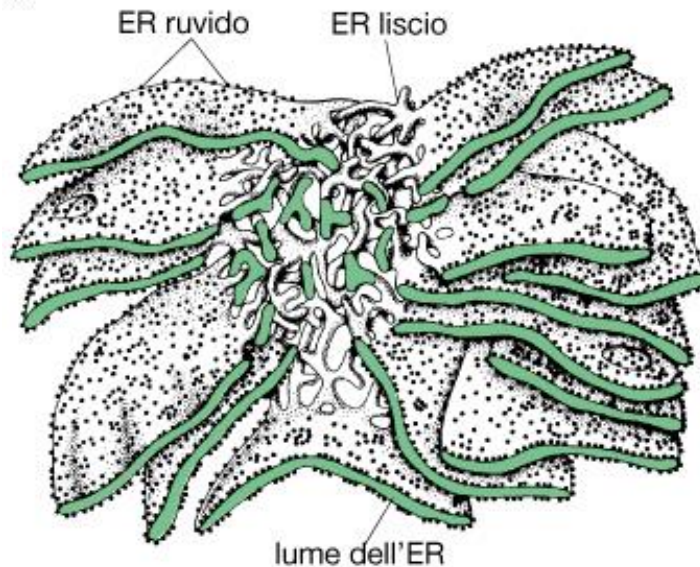
L'ER LISCIO è abbondante in alcune cellule specializzate nel metabolismo dei LIPIDI

C. di Leydig del testicolo che secerne **ormoni steroidei** (testosterone)



(A)

200 nm



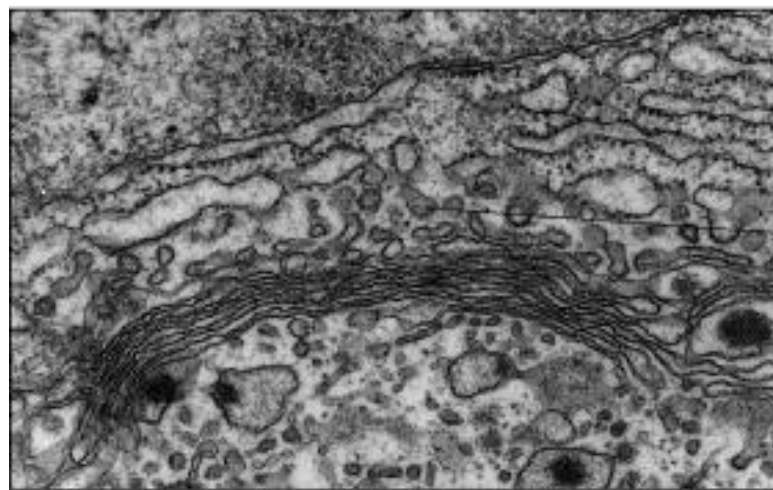
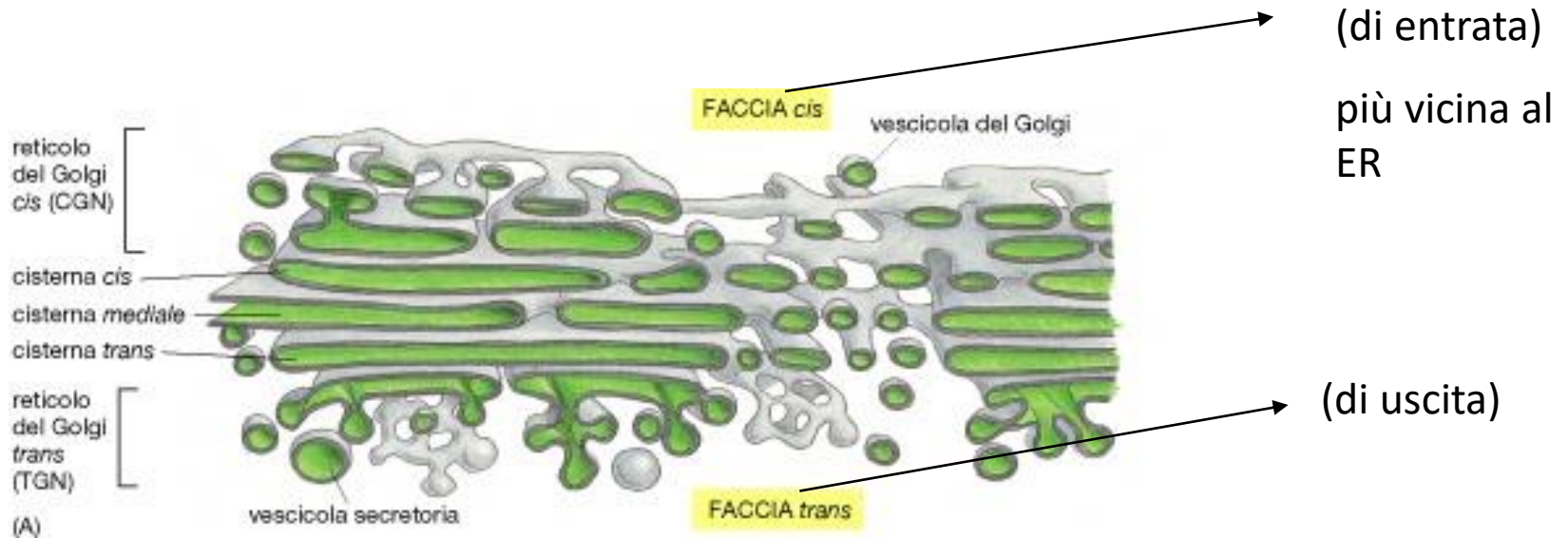
(B)

dal **ER liscio** normalmente **gemmano vescicole di trasporto** che portano al Golgi proteine e lipidi appena sintetizzati

Apparato di Golgi

particolarmente abbondante in cellule specializzate per la secrezione

Insieme di cisterne appiattite racchiuse da M

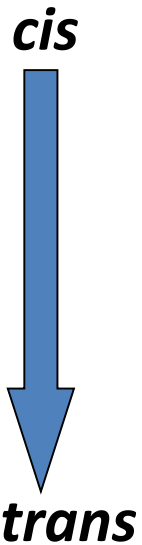


(B)

(C)

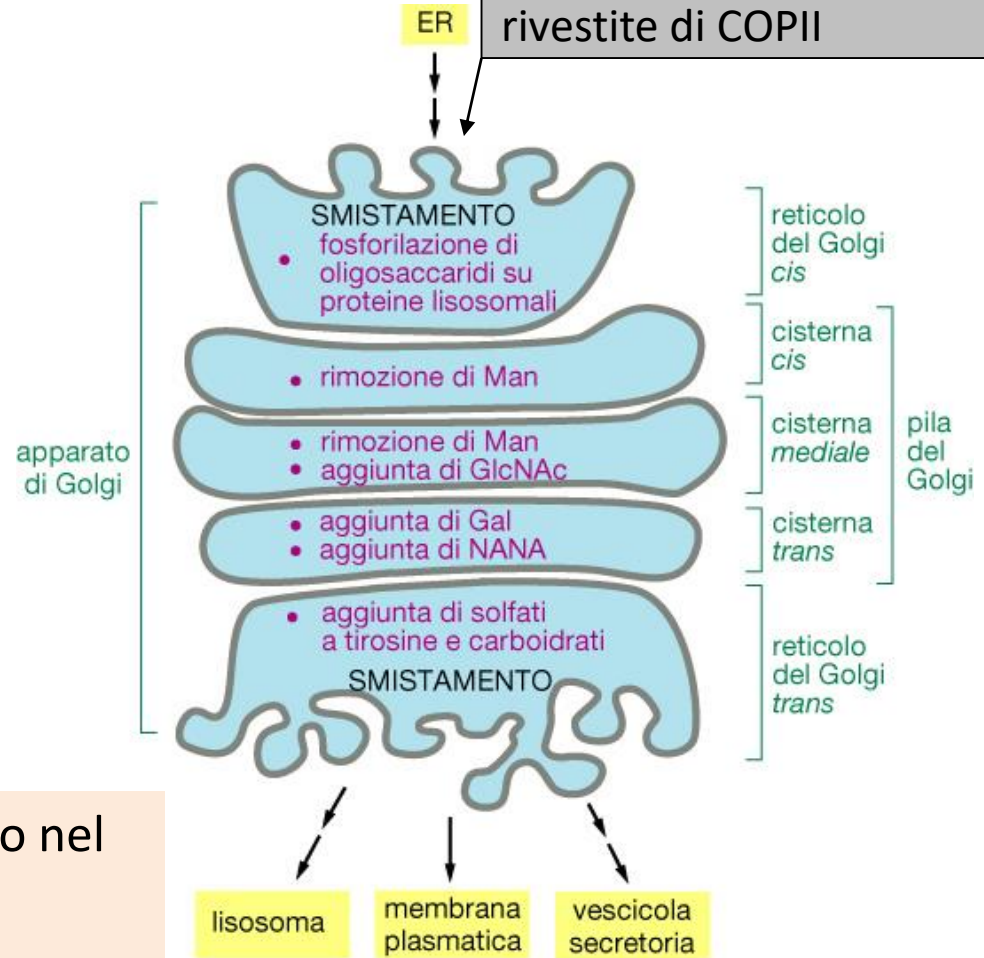
Compartimentazione funzionale del Golgi

IL GOLGI MODIFICA E DISTRIBUISCE LE MOLTE PROTEINE E LIPIDI CHE RICEVE DAL ER



(enzimi di modificazione)

proteine che lasciano ER in vescicole di trasporto rivestite di COPII



le nuove proteine modificate finiscono nel reticolo del golgi trans

che le impacchetta in **vescicole di trasporto** e le invia alle loro destinazioni specifiche nella cellula

La maggior parte delle vescicole di trasporto si forma a partire da **regioni specializzate rivestite** delle membrane

Il rivestimento ha 2 funzioni:

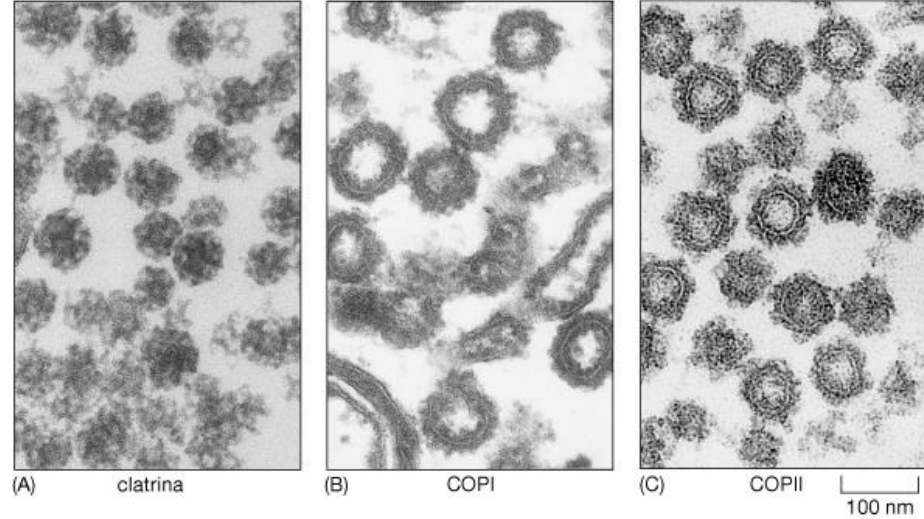
1. concentrare in quella zona della M le proteine da trasportare come cargo
2. deformare (curvare) la M modellando così le vescicole in formazione

Vescicole rivestite

• processi mediati da **GTP-asi**

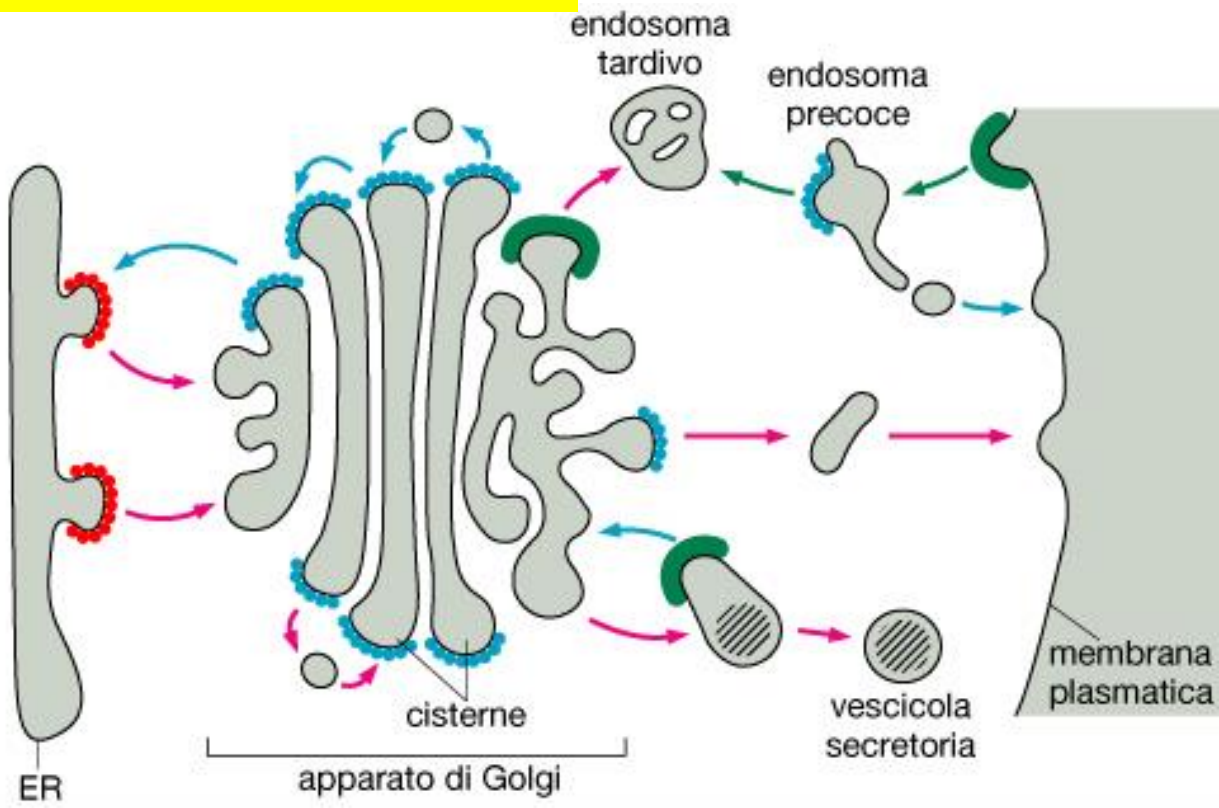
esistono diversi tipi di vescicole:

- Le vescicole rivestite di **CLATRINA**: mediano il trasporto dalla M plasmatica e dal Golgi
- Le vescicole rivestite di **COPI** e di **COPII**: mediano il trasporto tra ER e Golgi e fra le cisterne del Golgi



LEGENDA:

- clatrina
- COPI
- COPII

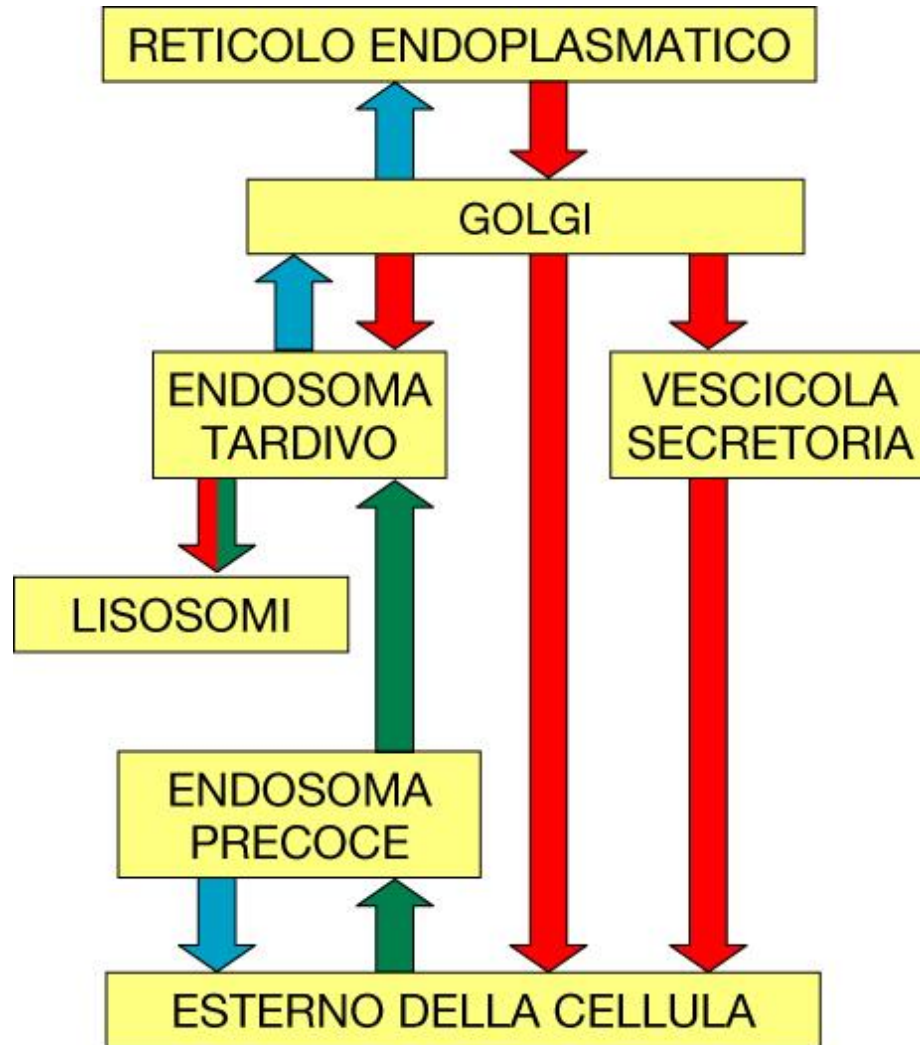


Il rivestimento viene perduto dopo la gemmazione il che è necessario affinché una vescicola si fonda con una M bersaglio appropriata

Traffico vescicolare intracellulare

(mediato da GTP-asi)

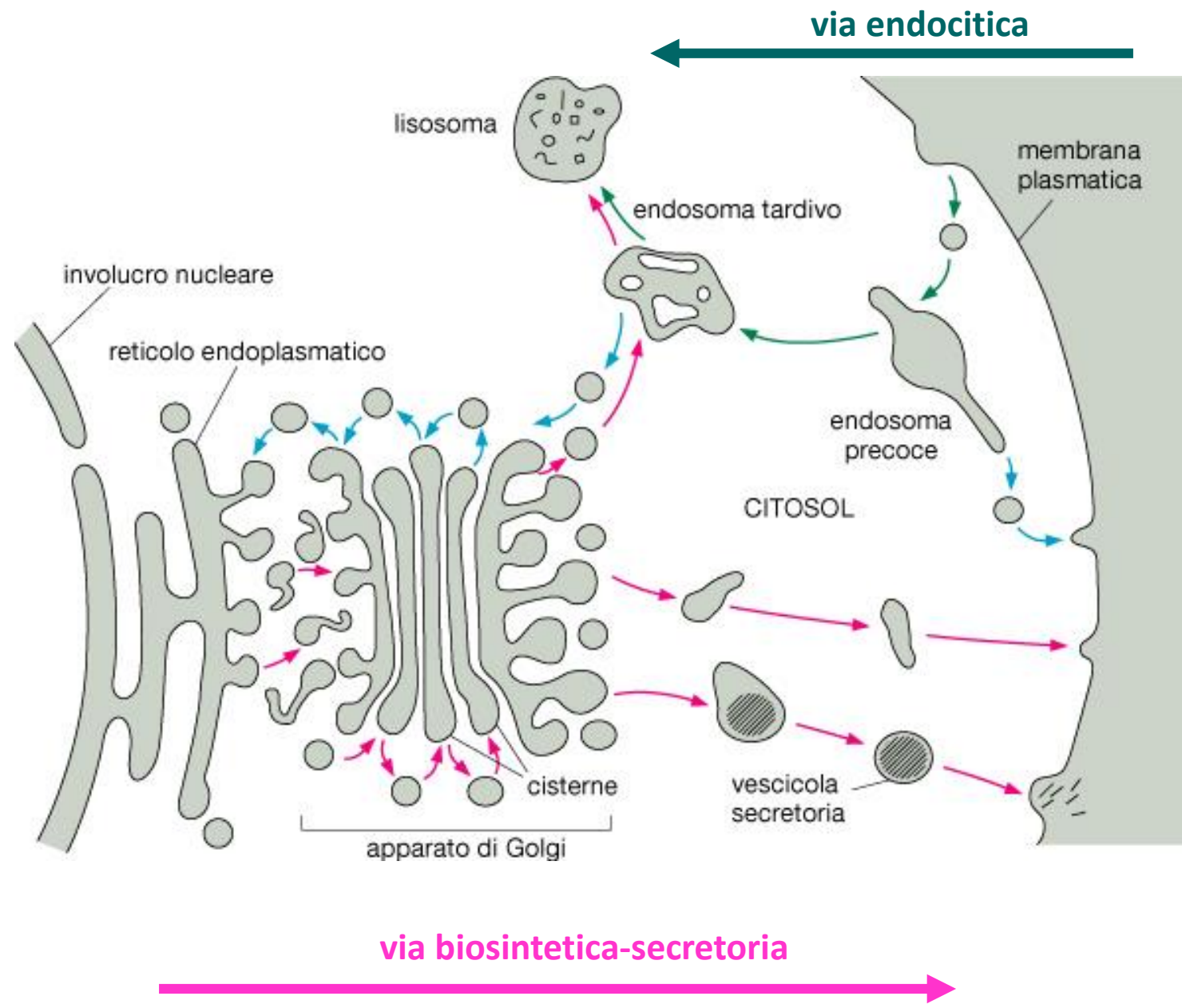
**via
endocitica**
(ingestione di
macromolecole)



**via biosintetica-
secretoria**
(esocitosi)

VIA BIOSINTETICA-SECRETORIA

(connessione tra il ER e la M): trasporto di proteine, carboidrati, lipidi neo-sintetizzati all'esterno della cellula: prima di essere esocitate le molecole possono essere modificate e conservate momentaneamente

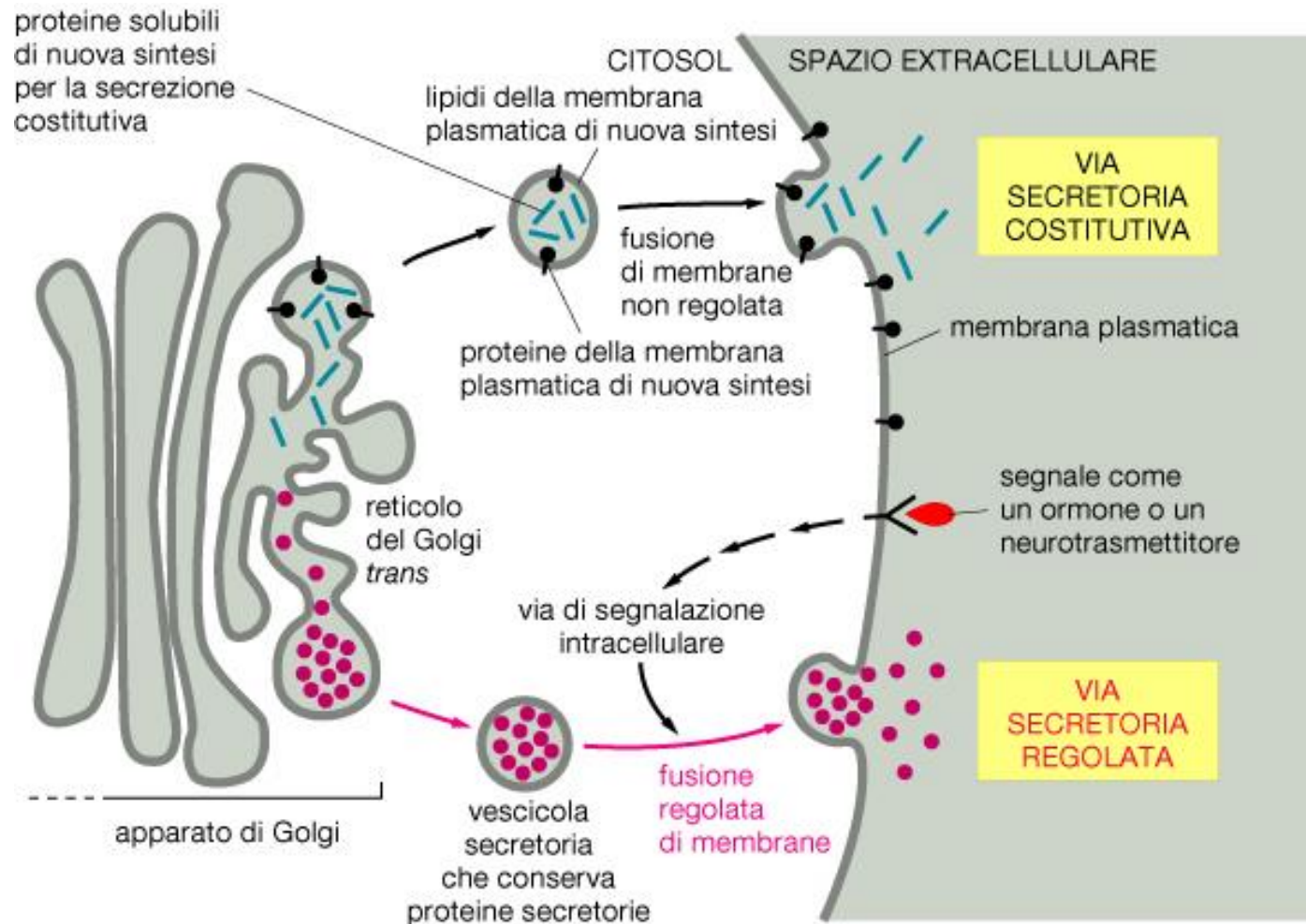


via biosintetica-secretoria

Trasporto dal reticolo del Golgi trans all'esterno della cellula: **ESOCITOSI**

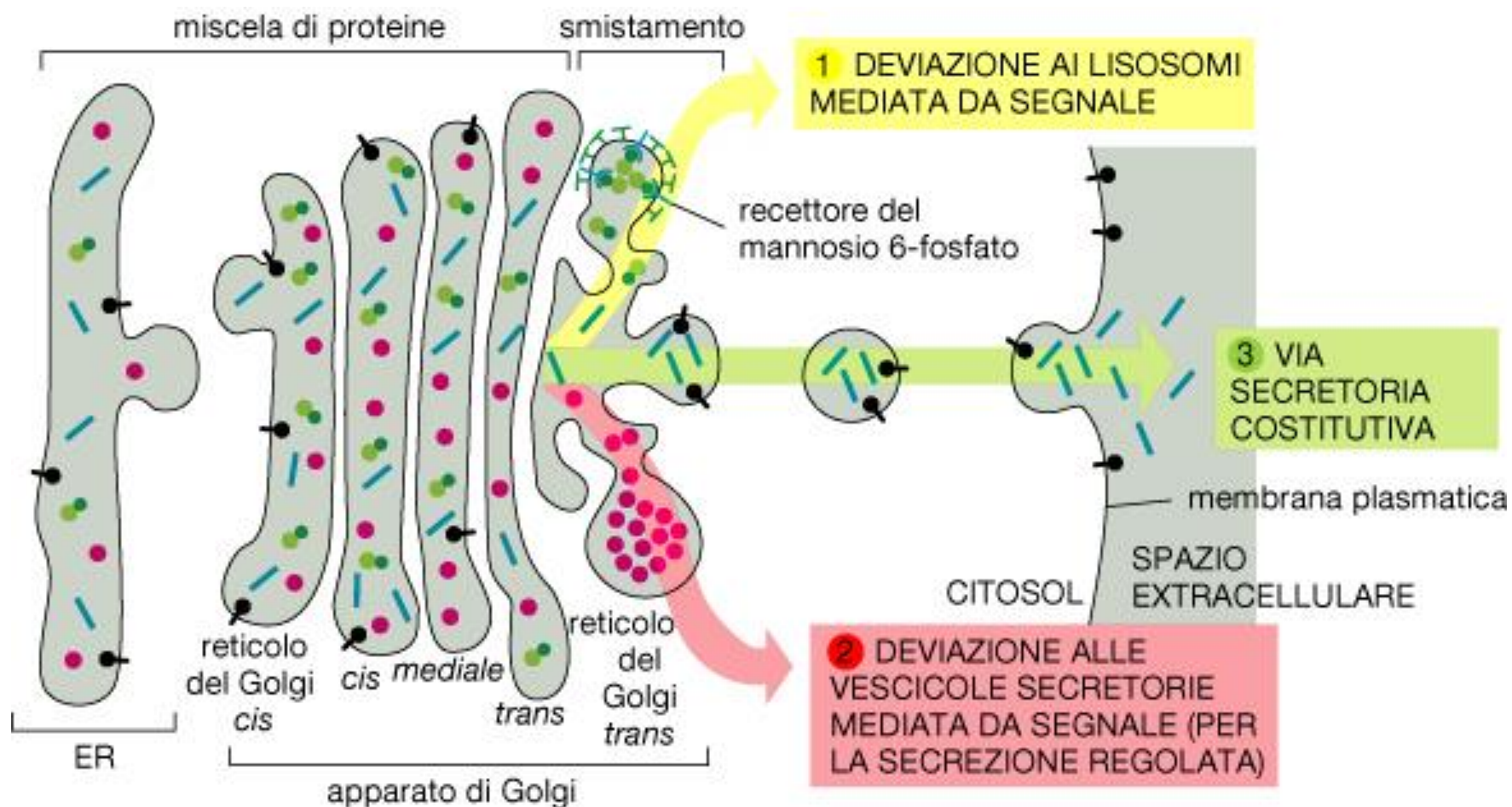
- Tutte le cellule richiedono una **via secretoria costitutiva**
(ad es. secrezione della > parte dei proteoglicani e delle glicoproteine della matrice extracellulare)
- Cellule specializzate dispongono anche di una **via secretoria regolata**
*(proteine ed altre sostanze solubili sono conservate temporaneamente in vescicole secretorie per il successivo **rilascio indotto "a richiesta" e in modo rapido**)*

La via secretoria **costitutiva** e la via secretoria **regolata**

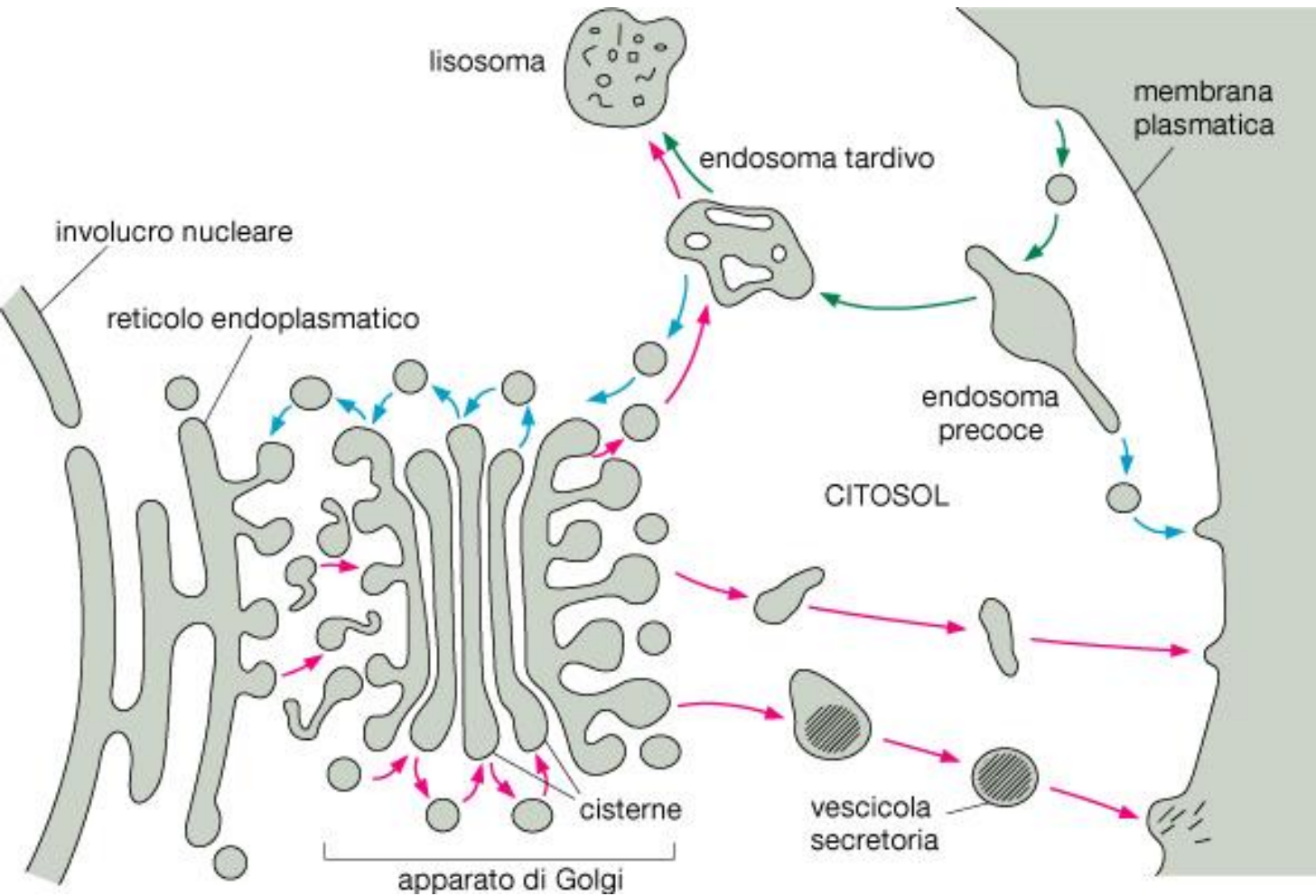


Le 2 vie si separano nel reticolo del golgi trans

Le 3 vie di smistamento delle proteine nel reticolo del Golgi trans



via endocitica

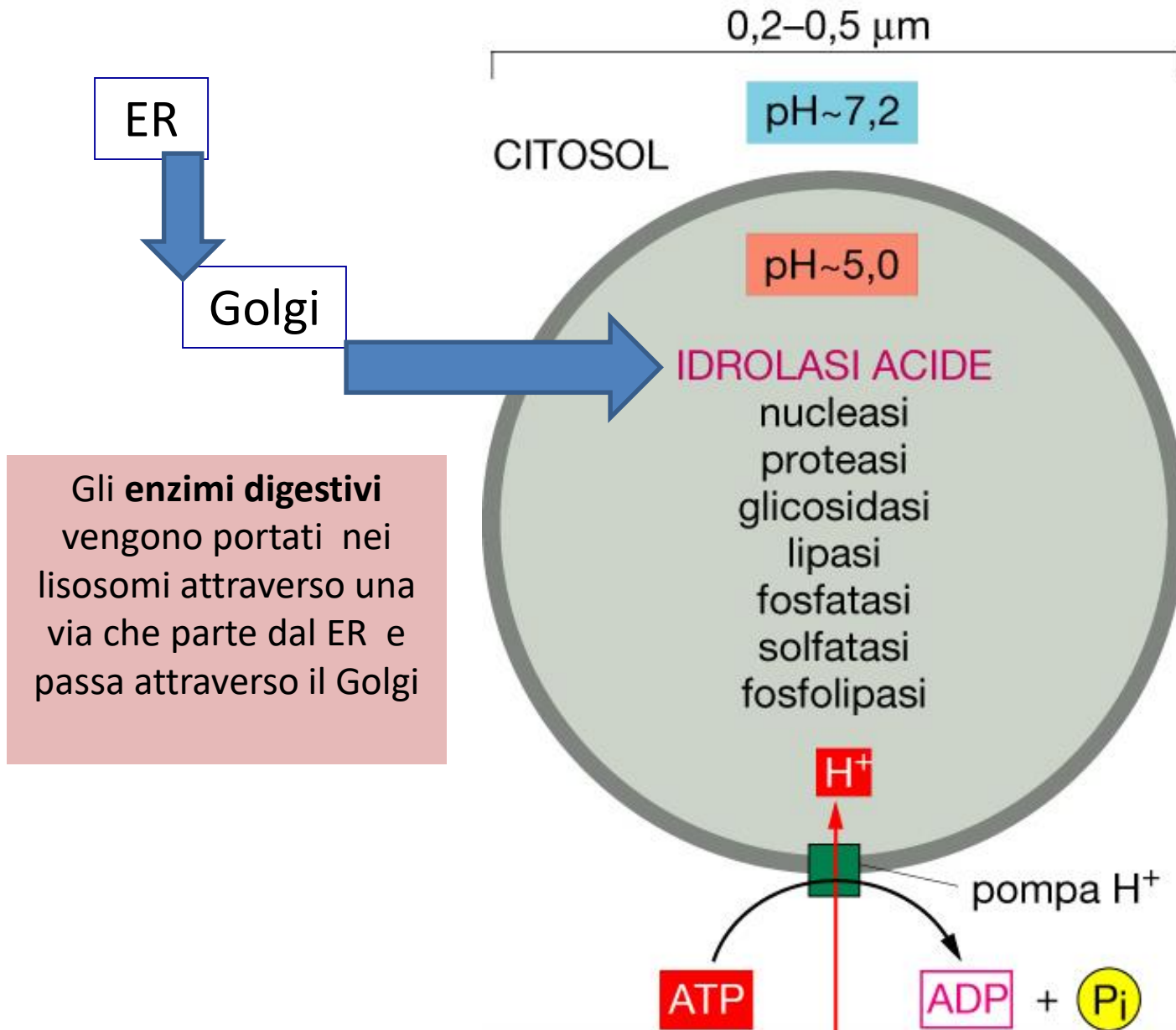


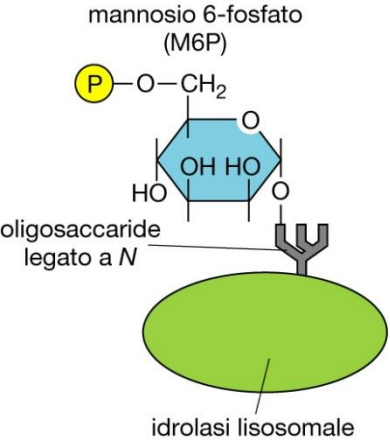
VIA ENDOCITICA:

attraverso un sistema di M interne le macromolecole vengono assunte per **ENDOCITOSI** e vengono portate agli enzimi digestivi immagazzinati nei **lisosomi** dentro la cellula: appena digeriti, i metaboliti derivanti dalla digestione delle macromolecole vengono portati dai lisosomi al citosol

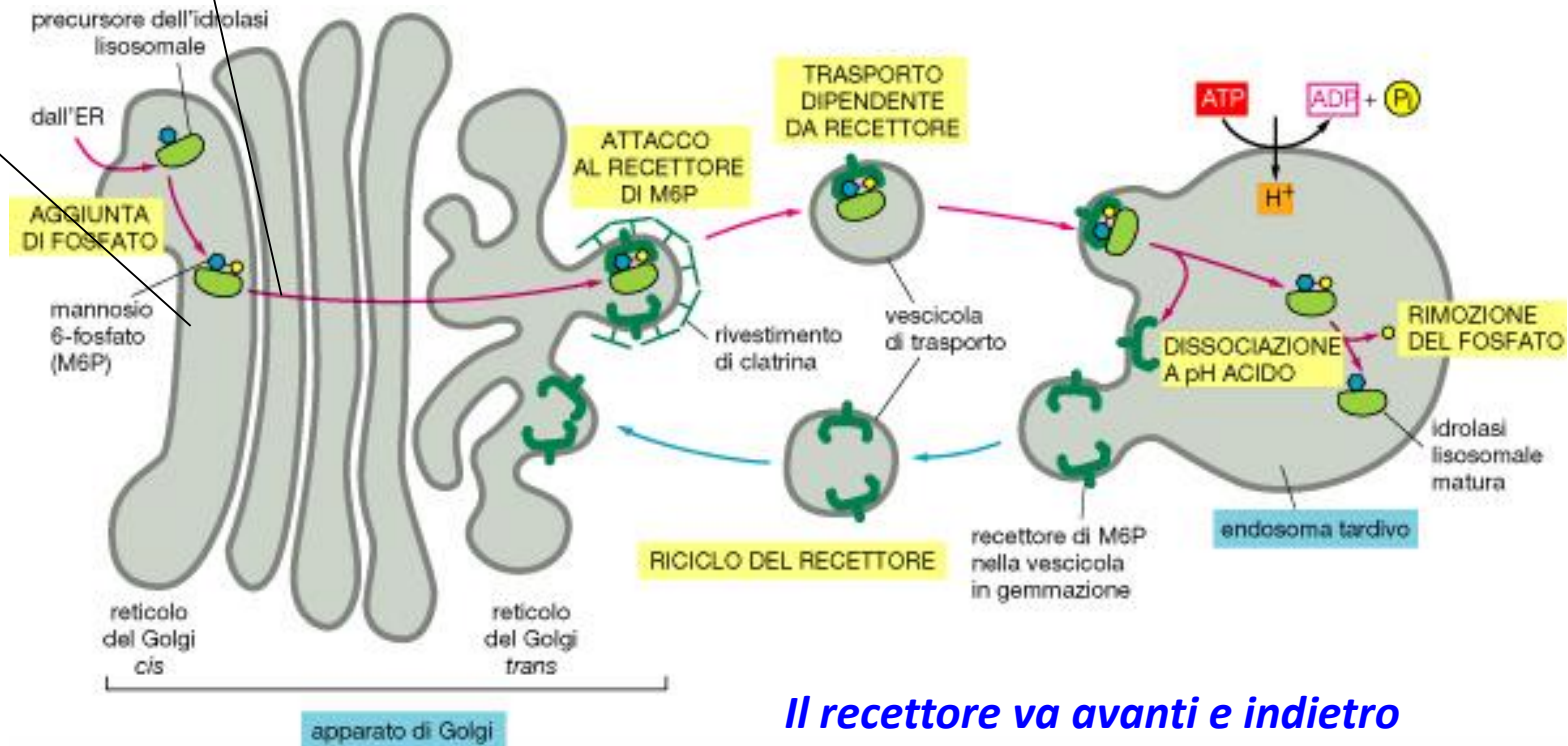
via biosintetica-secretoria

I lisosomi sono i siti principali di digestione intracellulare





In che modo le proteine lisosomiali sono riconosciute e selezionate nel reticolo del Golgi trans?

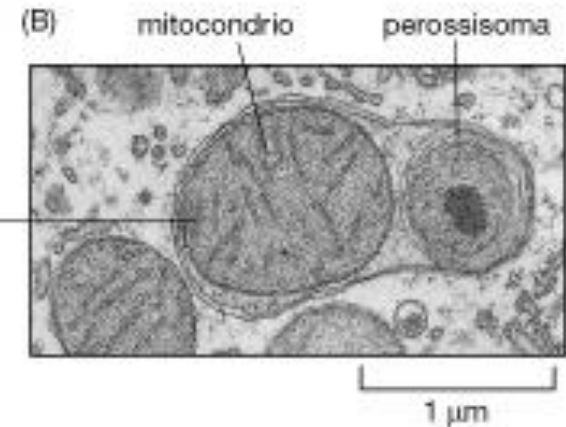
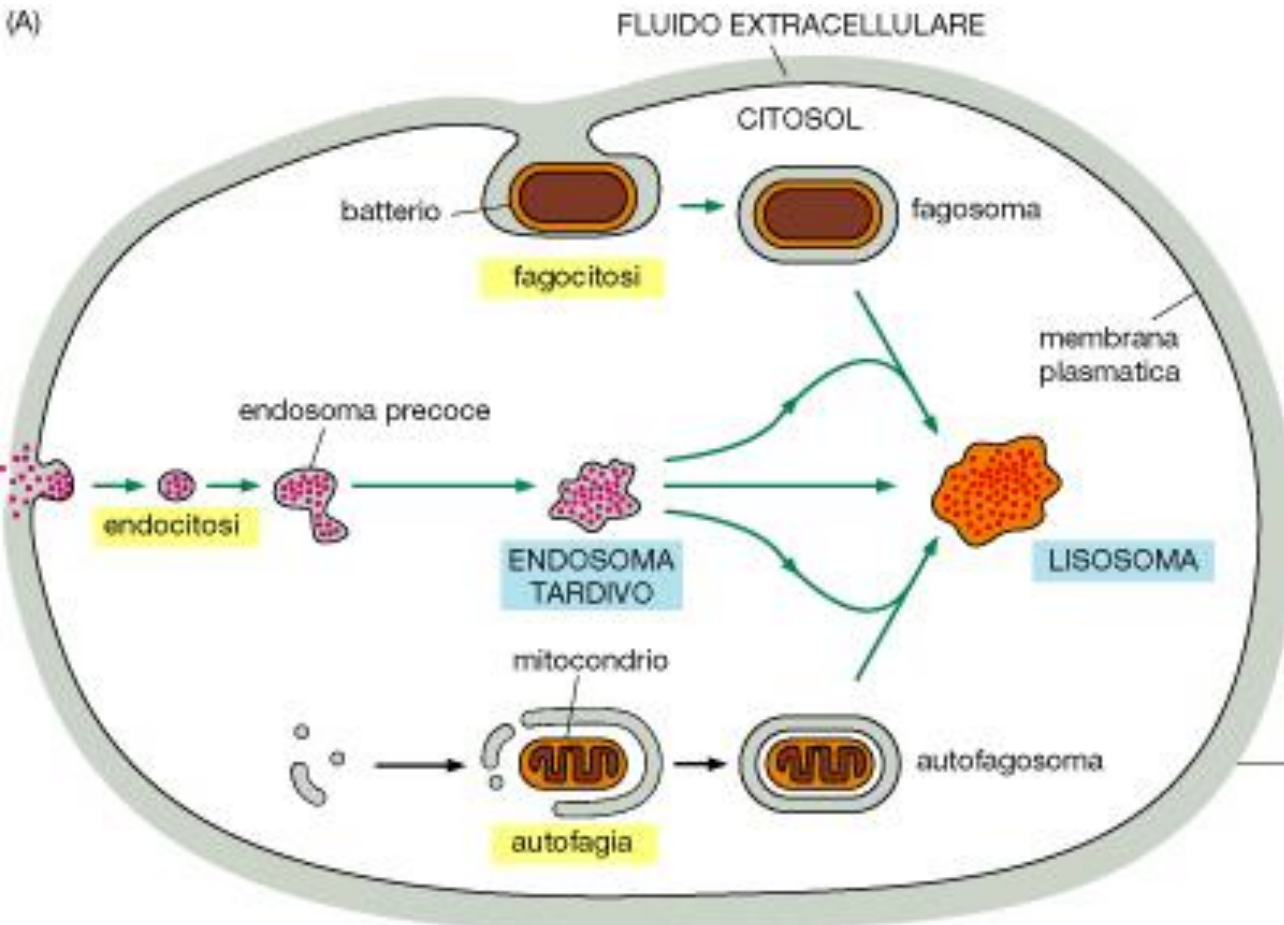


Il recettore va avanti e indietro

Le sostanze da digerire arrivano da almeno 3 vie:
ciascuna porta alla digestione di materiali derivanti da una fonte diversa

3 vie di degradazione dei lisosomi

- endocitosi
- autofagia
- fagocitosi



TRASPORTO VESICOLARE

trasporto nella cellula dalla M plasmatica: **ENDOCITOSI**

PINOCITOSI (assunzione di **soluzioni acquose**)

FAGOCITOSI (formazione di un **fagosoma** che poi si fonde con lisosoma)

MEDIATA DA RECETTORI (formazione di complessi recettore-ligando/ adaptine/
vescicole di clatrina)

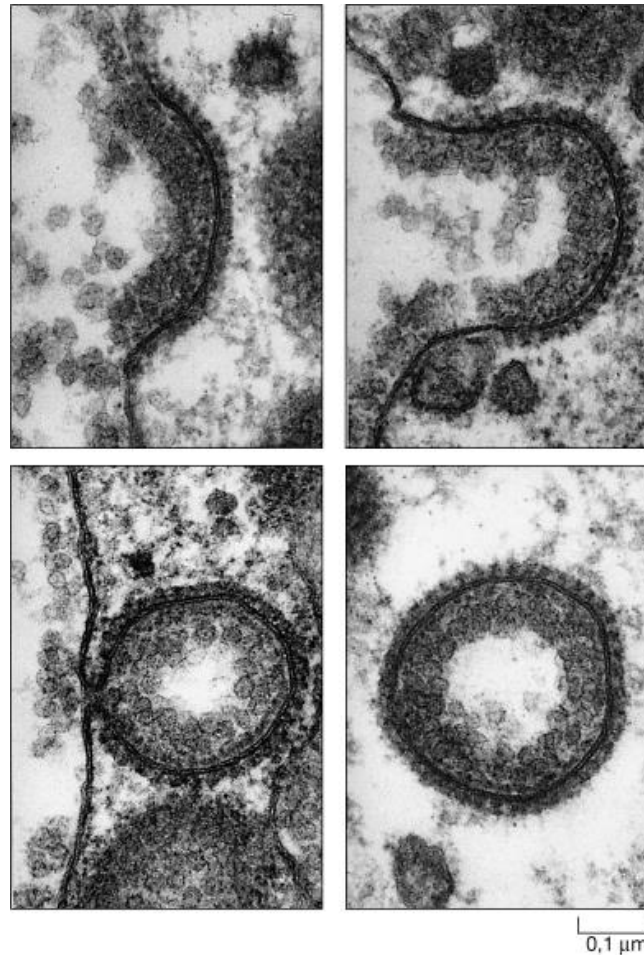
Il trasporto nella cellula dalla M plasmatica:

ENDOCITOSI

2 processi si distinguono **in base alle dimensioni della vescicola endocitica:**

- **Fagocitosi:** ingestione di grosse particelle, come microrganismi o cellule morte, tramite **fagosomi** (>250 nm di diametro)
- **Pinocitosi:** ingestione di fluidi e di soluti tramite piccole vescicole pinocitiche (circa 100 nm di diametro)

PINOCITOSI (assunzione di soluzioni acquose)



Le vescicole pinocitiche si formano da **fosse rivestite di clatrina** nella M plasmatica

la vita di una fossa rivestita da clatrina è breve:

- nel giro di 1 minuto dalla sua formazione si invagina nella cellula e si distacca formando una **vescicola rivestita di clatrina***
- dopo pochi secondi dalla formazione perdono il loro rivestimento e si fondono con gli endosomi precoci*

FAGOCITOSI (formazione di un **fagosoma** che poi si fonde con lisosoma)

Cellule fagocitiche specializzate possono ingerire grosse particelle

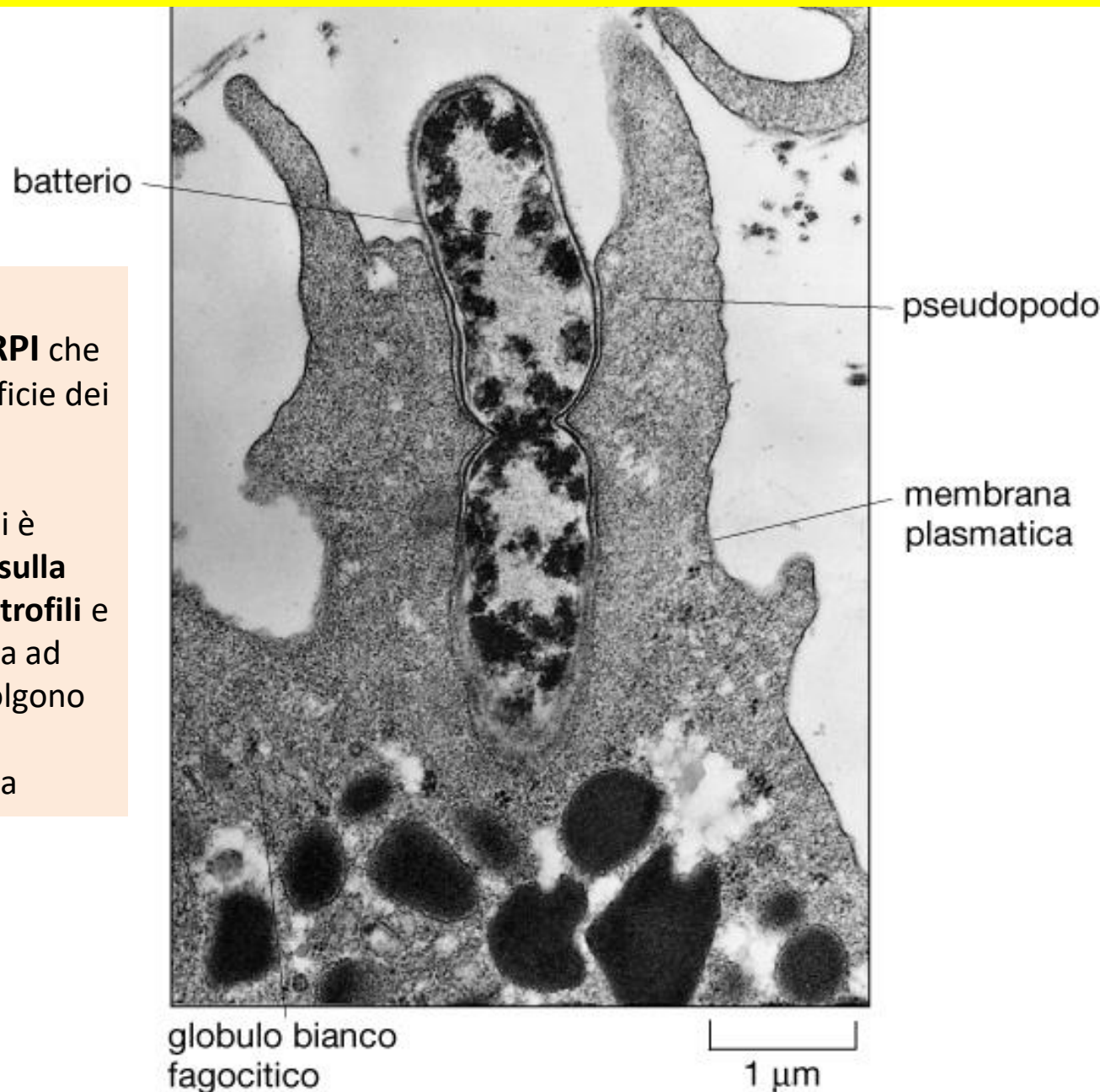
- Nei **protozoi** la fagocitosi è una forma di **nutrizione**, mentre poche cellule degli organismi pluricellulari sono capaci di ingerire in modo efficiente particelle così grandi
- La fagocitosi negli animali e nell'uomo è importante per scopi diversi dalla nutrizione ed è attuata principalmente da **cellule specializzate**:
nei mammiferi **3 classi di globuli bianchi** ⇒ **macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche**

A differenza della pinocitosi, che è un processo che avviene continuamente, **LA FAGOCITOSI È UN PROCESSO CHE VIENE ATTIVATO da recettori** che trasmettono segnali all'interno della cellula e iniziano la risposta cellulare

FAGOCITOSI da parte di un neutrofilo

I **segnali di attivazione** meglio caratterizzati sono gli **ANTICORPI** che ci proteggono legandosi alla superficie dei microrganismi infettivi.

Questo *rivestimento* degli anticorpi è riconosciuto da **recettori presenti sulla superficie dei macrofagi e dei neutrofil** e il legame induce la cellula fagocitica ad estendere gli pseudopodi che avvolgono la particella e si fondono alle loro estremità per formare un fagosoma

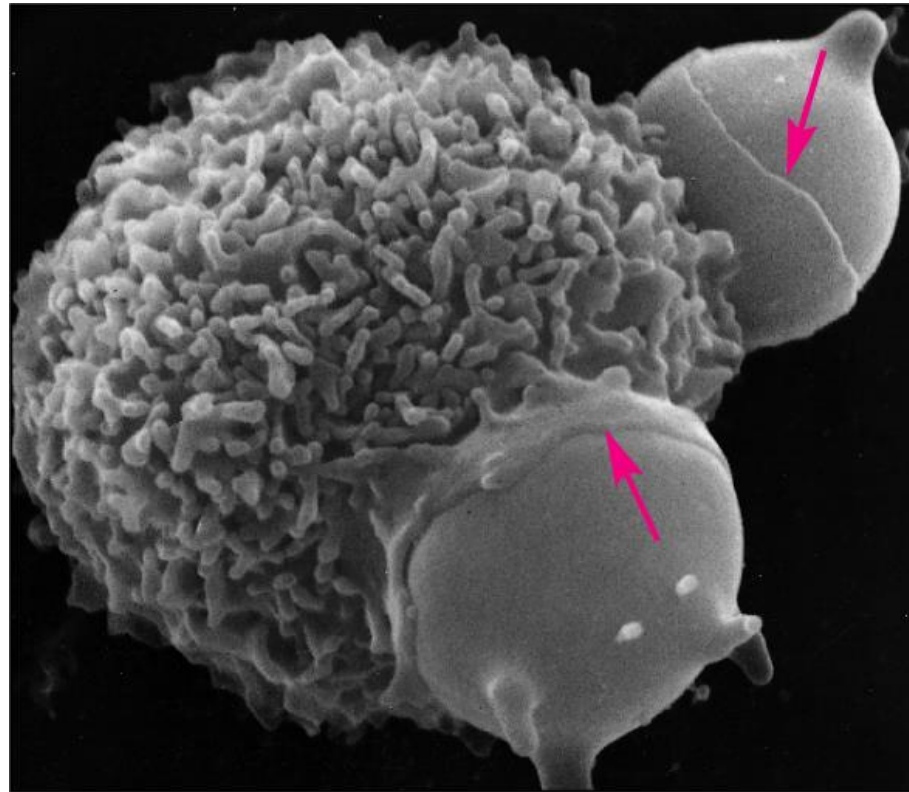


Altri segnali di attivazione della fagocitosi:

- **oligosaccaridi** presenti sulla superficie di certi microrganismi
- **fosfatidilserina** (cellule morte per apoptosi)

FAGOCITOSI da parte di un macrofago

- difesa dalle infezioni tramite ingestione dei microrganismi invasori



Fagocitosi da parte di un macrofago 5 μm

- rimozione di cellule senescenti o morte per apoptosi

i nostri macrofagi fagocitano più di 10^{11} globuli rossi senescenti al giorno!!!