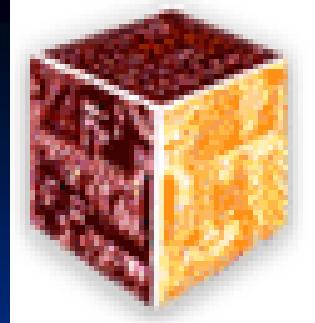


*Corso di laurea BIOTECNOLOGIE*

UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

# **Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari**

*Prof.ssa Luisa Gioia*



*Corso di laurea BIOTECNOLOGIE*

## Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE  
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER  
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI  
SEGUENTI LIBRI:

- “Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)
- “FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D’Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)
- “Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)
- “Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.* (Ed. Wiley-Blackwell)

# **Funzioni degli organelli e trasporto intracellulare**

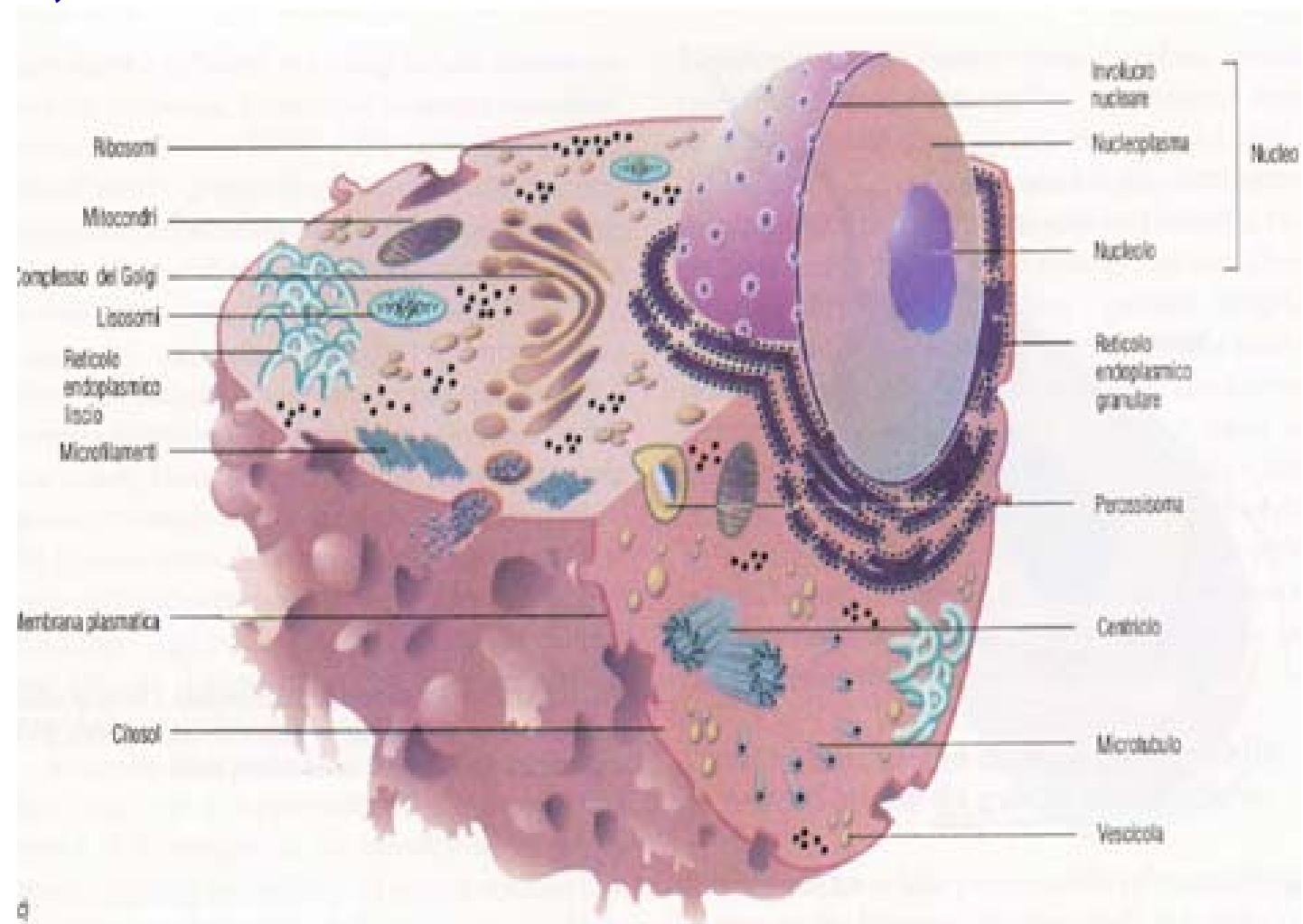
- Le cellule eucariote presentano una **compartimentazione interna** (organelli delimitati da membrana)
- Ogni organello contiene proteine strutturali e funzionali specifiche e svolge specifiche funzioni cellulari
- Dentro la cellula avviene un continuo smistamento di proteine e altre molecole da un compartimento all'altro

# Funzioni cellulari indispensabili

- Controllo genetico
- Mantenimento omeostatico
- Capacità di movimento
- Apparati biosintetici per la produzione di macromolecole
- Produzione di energia

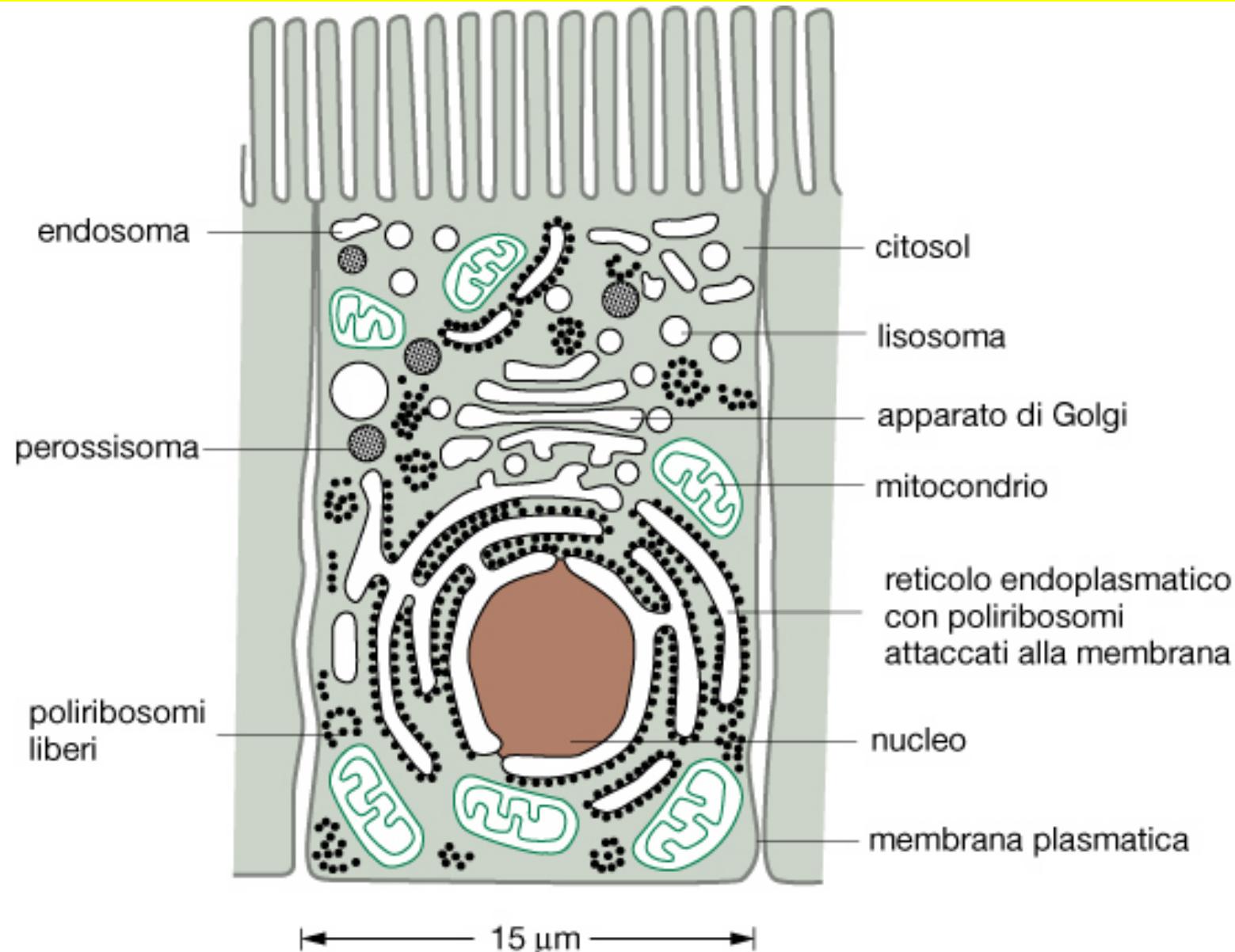
# I principali compartimenti intracellulari di una cellula

- nucleo
- reticolo endoplasmatico liscio e rugoso
- apparato del Golgi
- lisosomi, perossisomi, vescicole di trasporto
- citoscheletro
- mitocondri



Cellula eucariota animale

# Ogni organello della cellula comunica con qualsiasi altro organello e con lo spazio extracellulare



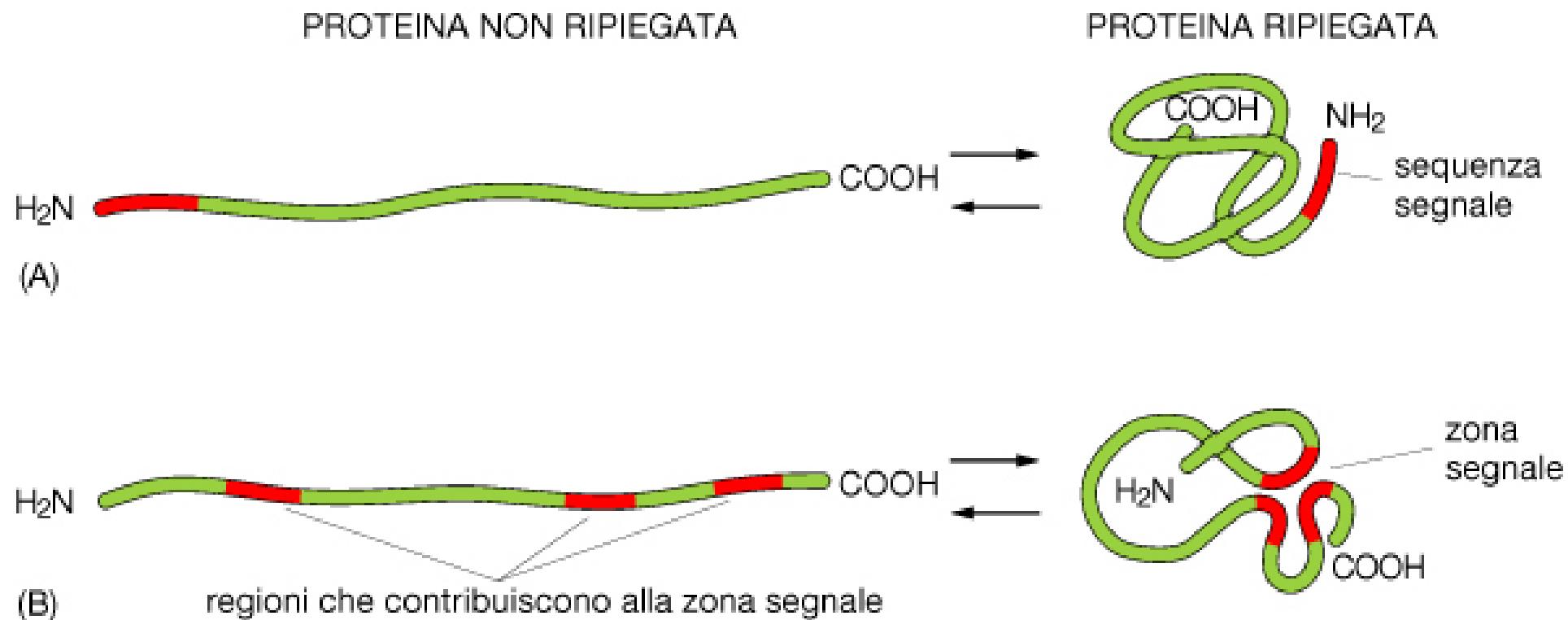
# TRASPORTO INTRACELLULARE DELLE PROTEINE

- Le proteine possono muoversi da un **compartimento** all'altro della cellula
- Per ogni proteina il viaggio inizia dal **LUOGO DI SINTESI** (ribosoma) nel citosol e termina quando viene raggiunta la **DESTINAZIONE FINALE**
- A ciascuna stazione intermedia (organulo) 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 destinate al **citosol, nucleo, mitocondri, cloroplasti, perossisomi**, sono sintetizzate sui **ribosomi liberi**

Le proteine destinate alla **secrezione, reticolo endoplasmatico, Golgi, lisosomi, m.plasmatica** sono sintetizzate sui **ribosomi associati al (RER)**

## Le proteine vengono smistate al corretto organello da SEQUENZE o ZONE SEGNALE



Le **sequenze segnale o zone segnale** sono riconosciute da recettori di smistamento complementari che consegnano la proteina al giusto organello.

Le proteine che devono funzionare nel citosol non possiedono queste sequenze/zona segnale di smistamento perciò dopo la produzione restano nel citosol.

# 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*

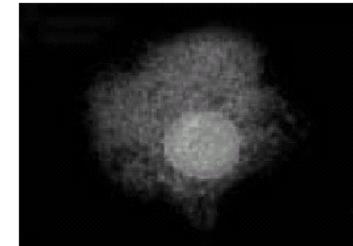
Proteine di fusione con GFP hanno rivoluzionato lo studio del trasporto intracellulare

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.

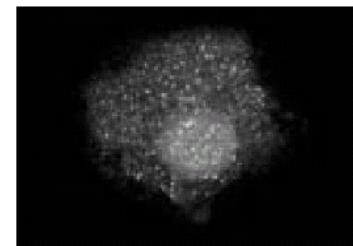
Le proteine di fusione con GFP sono usate largamente per studiare la posizione e il movimento di proteine nelle cellule. La GFP fusa a proteine che vanno avanti e indietro dal nucleo, per esempio, è usata per studiare gli eventi di trasporto nucleare e la loro regolazione. La GFP fusa a proteine dei 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 kinetica 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.

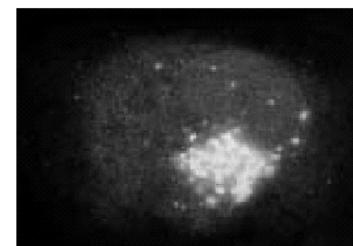
(A-D, a destra, per gentile concessione di Jennifer Lippincott-Schwartz Lab.)



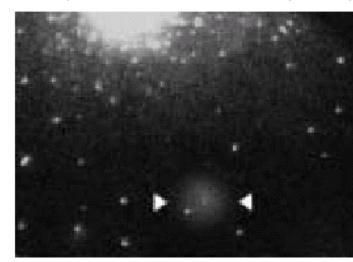
(A) In questo esperimento, la GFP fusa alla proteina di rivestimento del virus della stomatite vescicolare è stata espressa in cellule in coltura. La proteina virale è una proteina integrale di membrana che normalmente si muove attraverso la via secretoria dall'ER alla superficie cellulare, dove il virus 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.

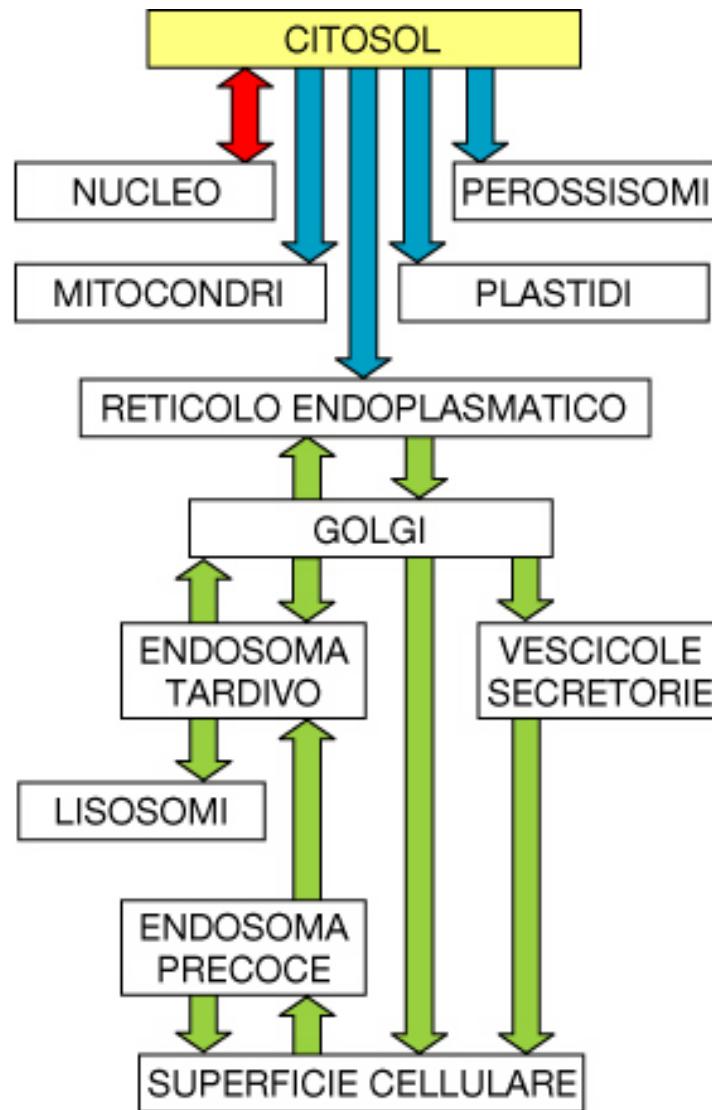


(C) La proteina di fusione si muove poi all'apparato di Golgi.



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

## MODALITA' DI TRASPORTO INTRACELLULARE DELLE PROTEINE



➤ trasporto tra nucleo e citoplasma attraverso i NPC

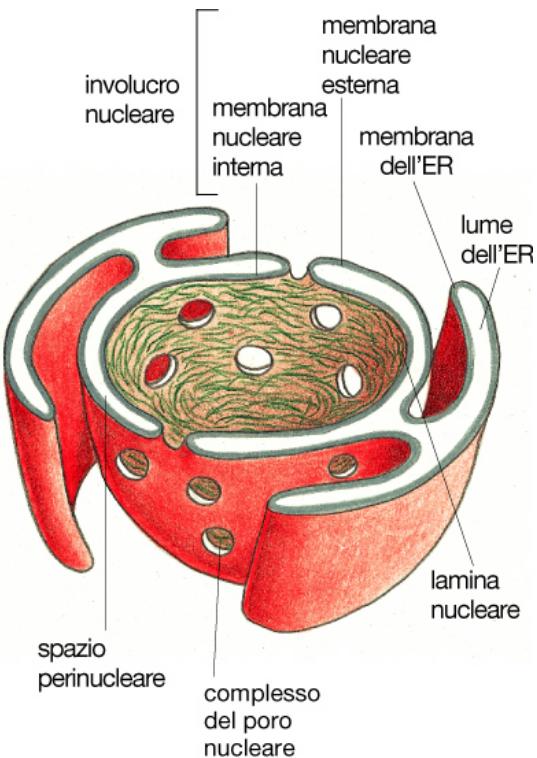
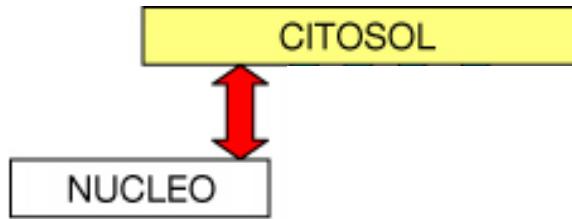
➤ trasporto trans-membrana

➤ trasporto vescicolare

CHIAVE: = Trasporto attraverso pori

= Trasporto transmembrana

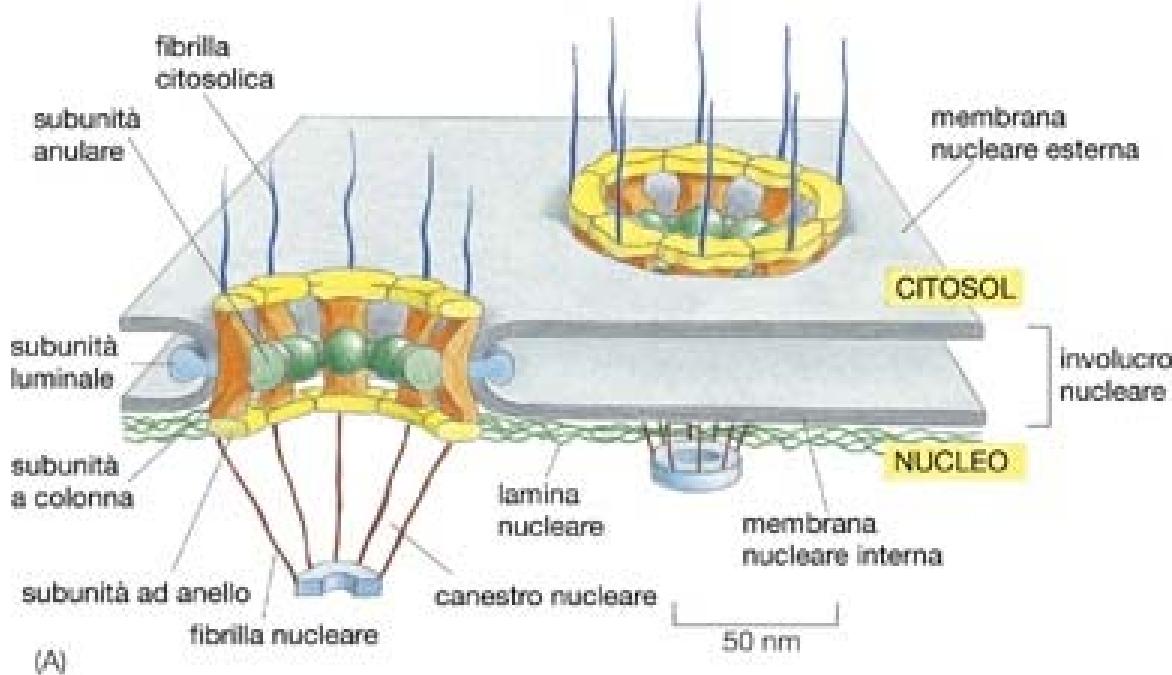
= Trasporto vescicolare



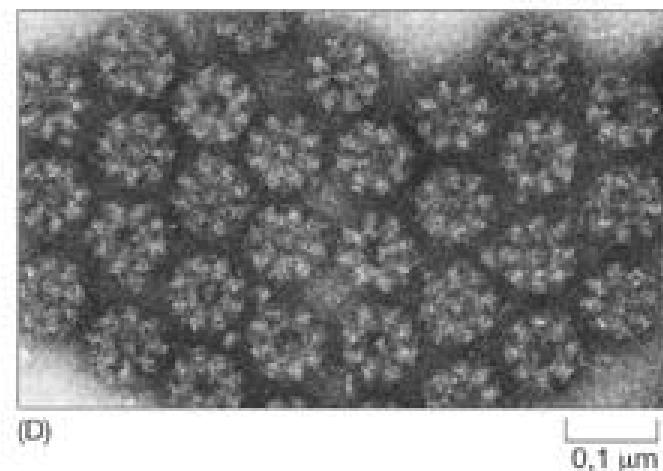
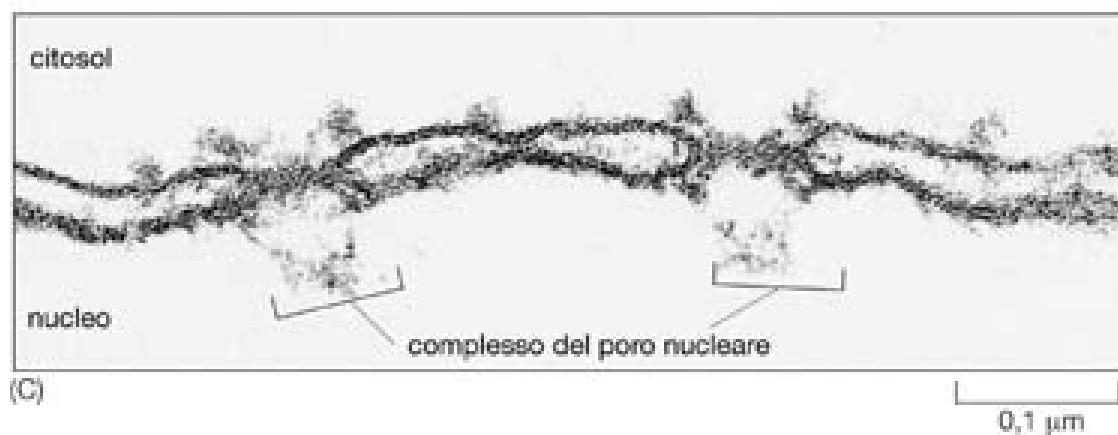
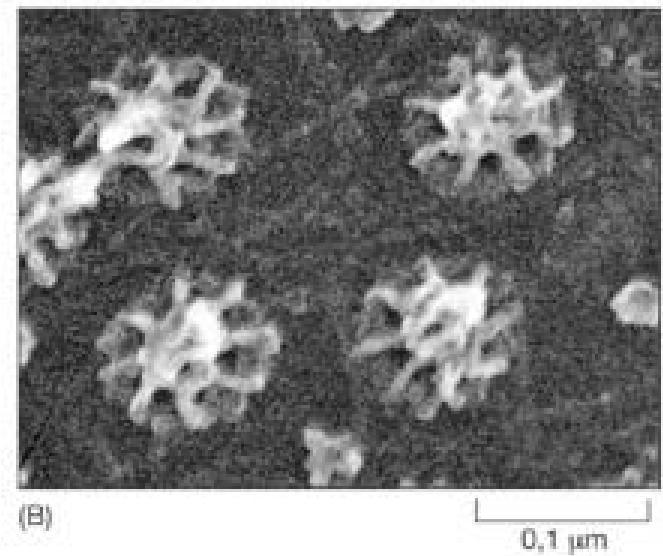
## Trasporto nucleo ↔ citoplasma

CHIAVE: = Trasporto attraverso pori

## Disposizione dei complessi dei PORI NUCLEARI nell'involucro nucleare

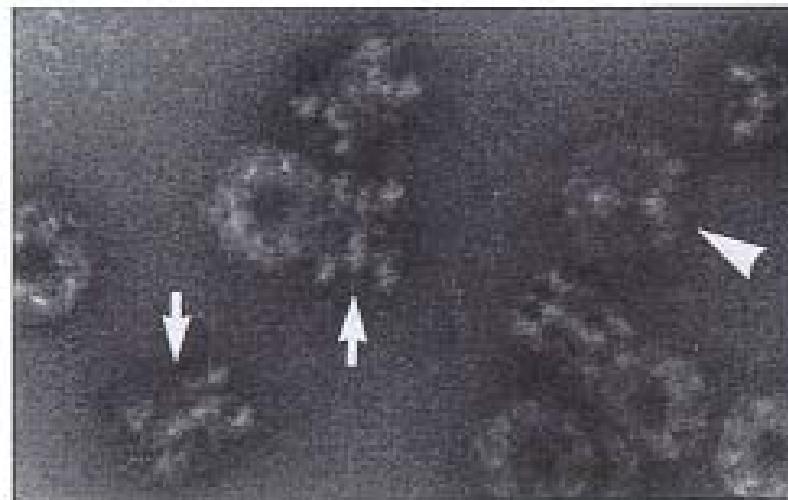
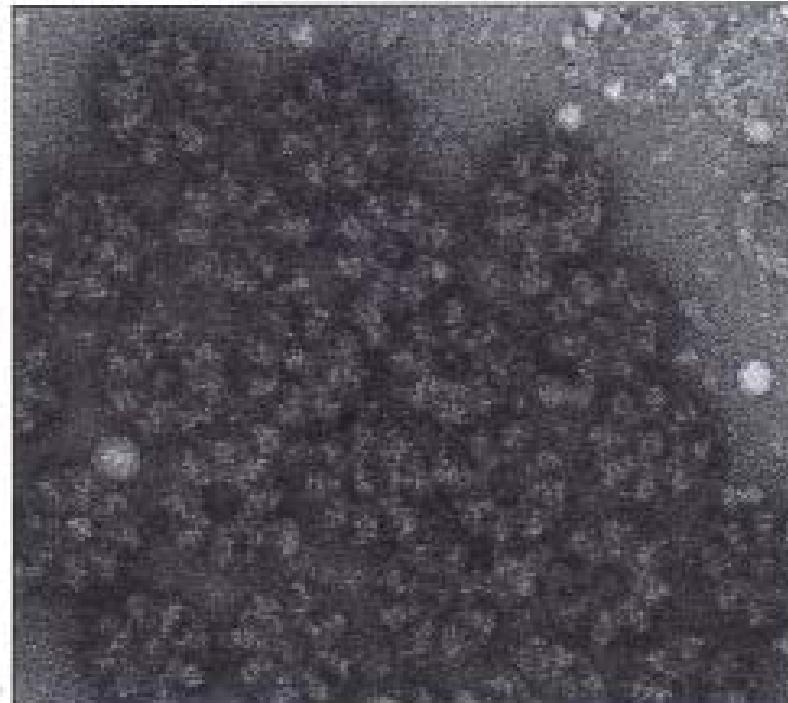


nucleoporine disposte con simmetria ottogonale

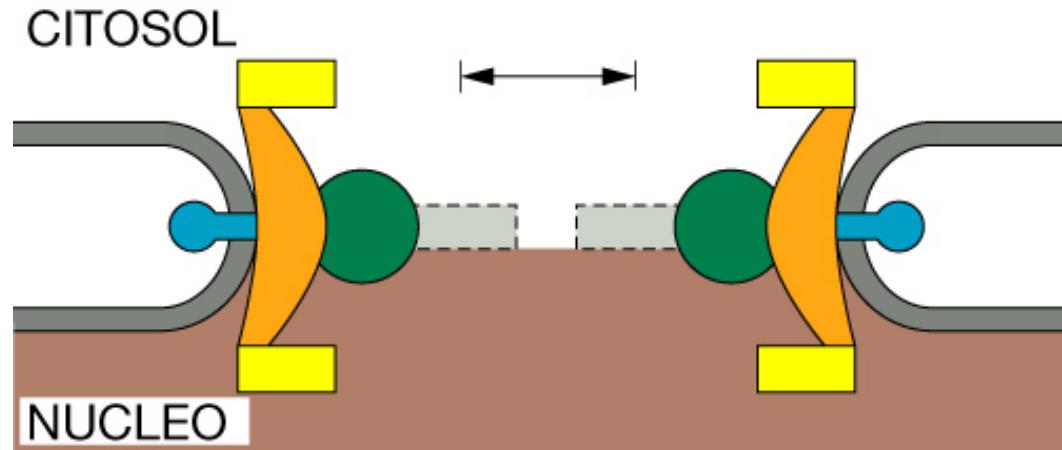


## COMPLESSI DEI PORI NUCLEARI

complessi proteici  
molto grandi  
(circa 125 milioni di  
Da)



Il canale acquoso per la **DIFFUSIONE LIBERA** (occupa solo una piccola frazione del volume totale del NPC) è un **canale cilindrico pieno di H<sub>2</sub>O** avente **diametro di circa 9nm e lungo 15nm**



Attraversano il canale **passivamente** piccole molecole idrosolubili (< di 5000 Da): esse diffondono così rapidamente che l'involucro nucleare può considerarsi liberamente permeabile ad esse

**How does the nuclear pore complex work to transport material in and out of the nucleus?**

## ***Diffusion***

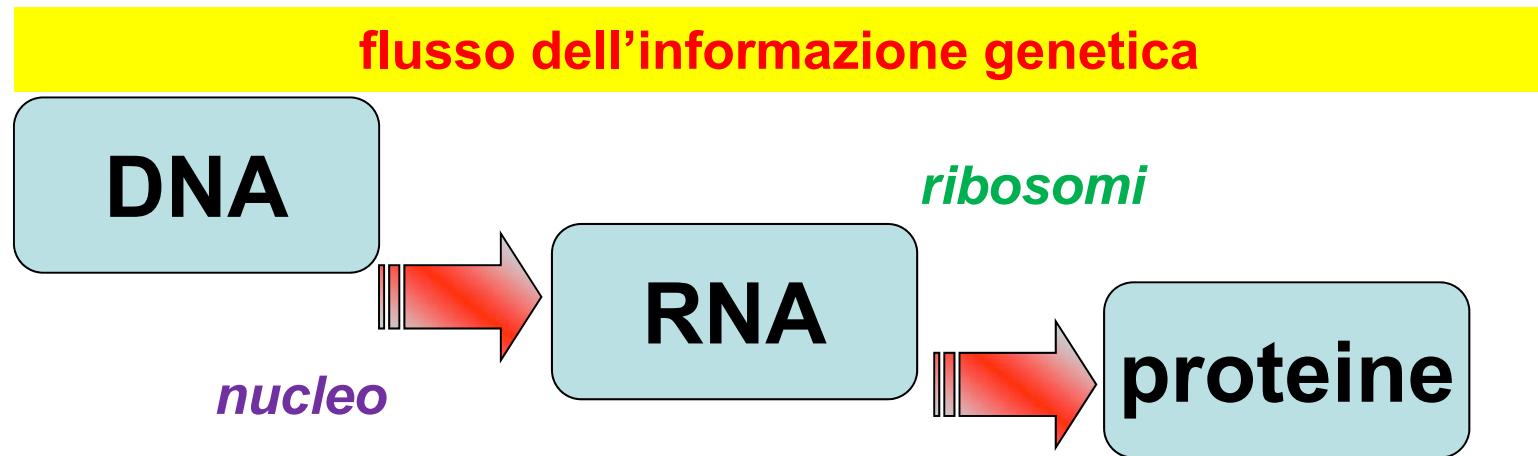
**Molecules of:**

**5,000 MW are freely diffusible**

**17,000 MW take 2 min to establish equilibrium**

**44,000 MW take 30 min to establish equilibrium**

**60,000 MW cannot move in by diffusion**



**REPLICAZIONE**  
degli acidi nucleici  
per trasmettere  
l'informazione  
genetica

**TRASCRIZIONE**  
**TRADUZIONE**  
degli acidi nucleici  
per la conversione a  
proteine

nelle cellule eucariotiche i  
processi di **TRASCRIZIONE** e  
**TRADUZIONE** sono sia  
spazialmente che  
temporalmente separati

# RIBOSOMI

Organelli di piccole dimensioni, formati da due subunità:

- subunità minore **40S**,
- subunità maggiore **60S**

(S indica la velocità di sedimentazione in un gradiente di glucosio misurata in unità Svedberg).

La subunità 40S è formata da **circa 30 diverse proteine** e da **una molecola di RNA ribosomiale (5S)**.

La subunità 60S è formata da **una cinquantina di proteine** associate ad **una molecola di RNA ribosomiale 18S**.

Le due subunità sono libere nel citoplasma e si congiungono a formare l'organello completo (80S) solo in presenza **RNA messaggero** dando inizio alla sintesi di proteine.

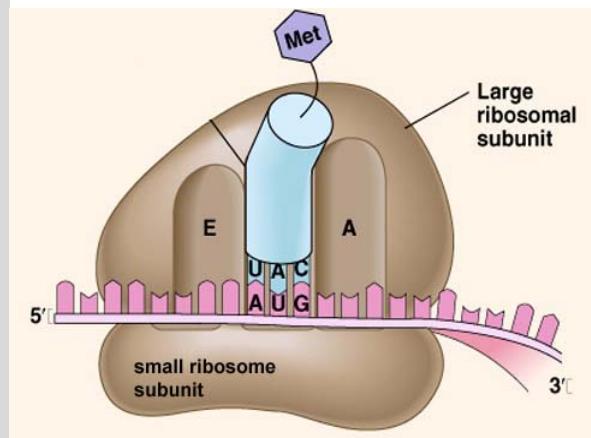
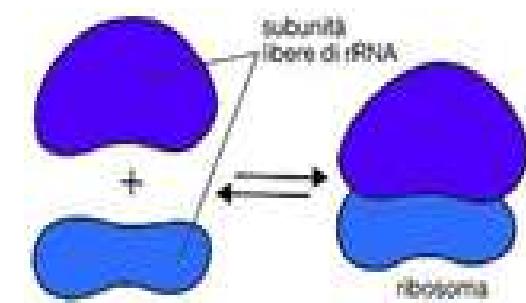
Il numero dei ribosomi della cellula varia notevolmente in funzione del tipo di cellula e del periodo.

Si possono distinguere **due popolazioni di ribosomi**, quelli liberi nel citoplasma e quelli legati alle membrane del Reticolo Endoplasmatico Rugoso.

## ENTRAMBE LE POPOLAZIONI DI RIBOSOMI

### SINTETIZZANO PROTEINE:

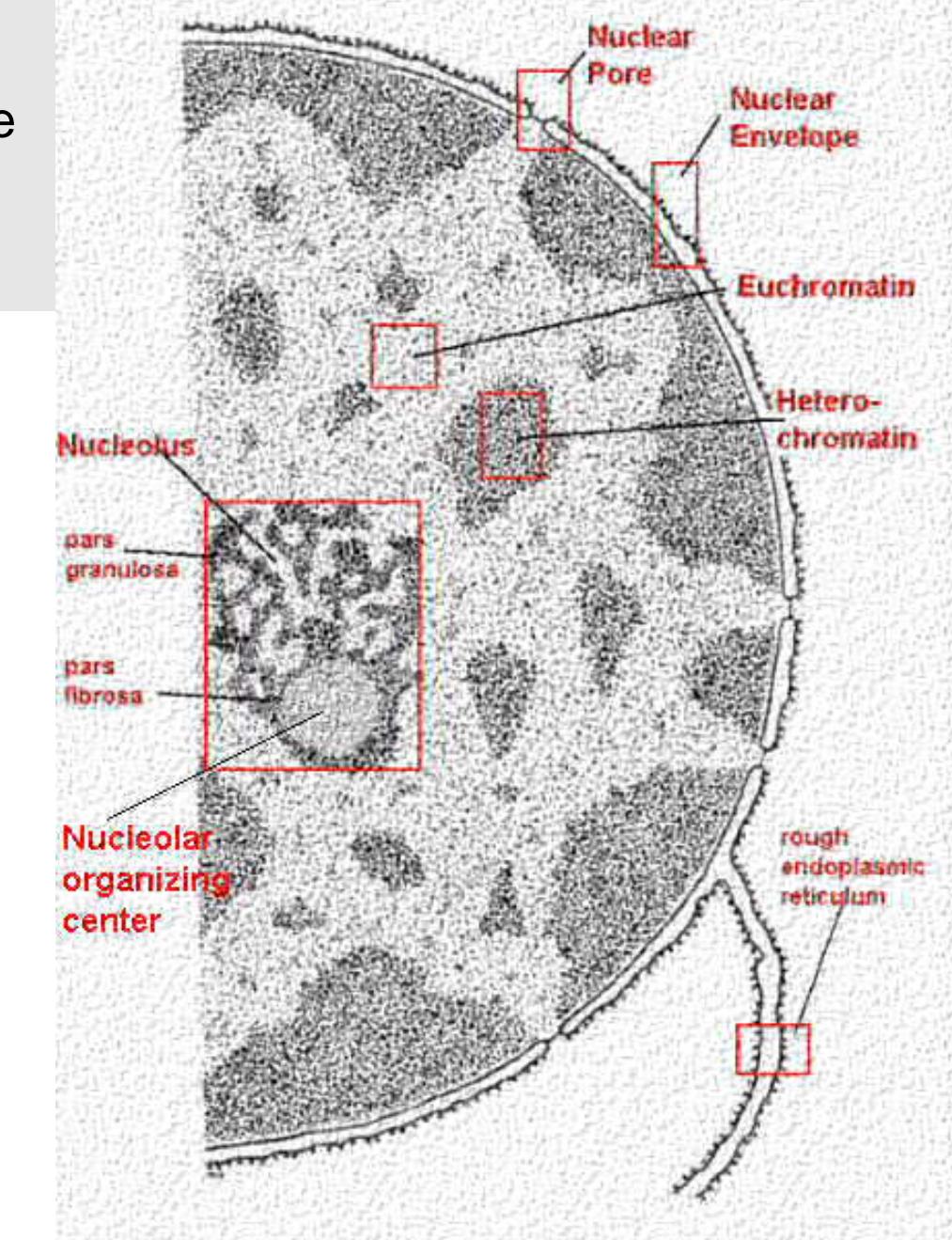
quelli liberi producono proteine citoplasmatiche e per i vari organelli cellulari, quelli del Reticolo Rugoso proteine per l'escrezione.



# Genesi dei RIBOSOMI cellulari

Il **NUCLEOLO** è una “fabbrica” che produce i ribosomi: in esso avviene la modificaione degli rRNA e il loro assemblaggio in ribosomi

- Il nucleolo **non è circondato da membrana**
- **E' un grosso aggregato di macromolecole**  
(compresi i geni per gli rRNA, i precursori per gli rRNA, rRNA maturi, enzimi di modificaione degli rRNA, subunità di proteine ribosomiali e ribosomi parzialmente assemblati)



Il **NUCLEOLO** è una “fabbrica” che **produce i ribosomi**: in esso avviene la modifica degli rRNA e il loro assemblaggio in ribosomi



-*come vengono trasportate nel citosol le subunità ribosomiali neo-sintetizzate?*

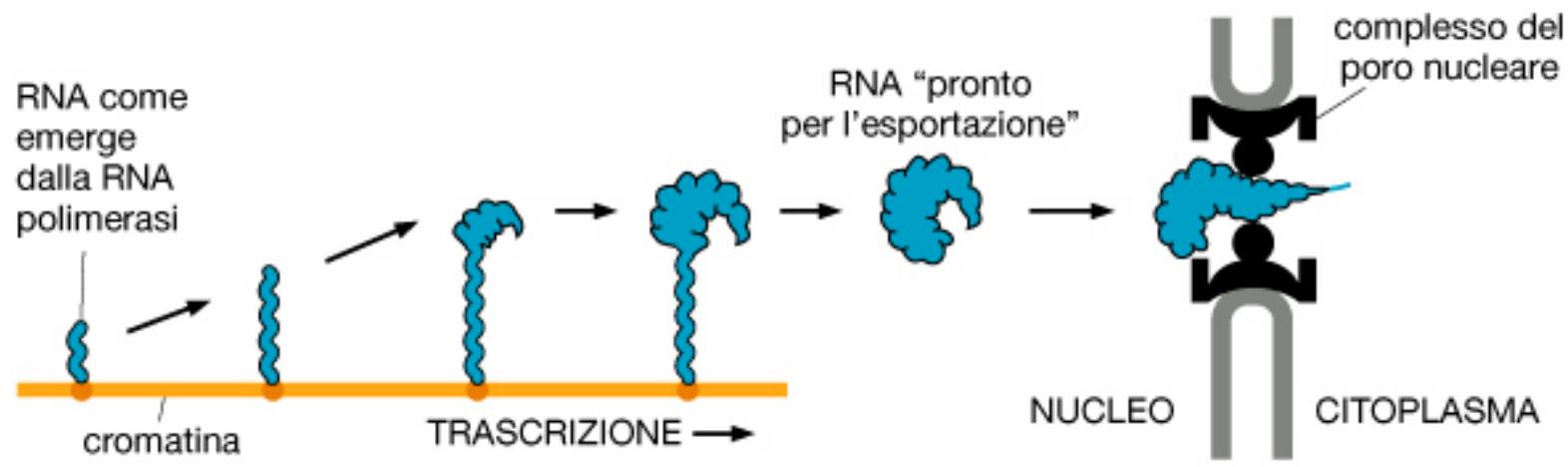
-*come vengono trasportate nel nucleo le proteine sintetizzate nel citoplasma?*

## **TRASPORTO ATTIVO**

*è la forma di trasporto che viene utilizzata quando molecole di dimensioni maggiori del poro nucleare (>10nm) devono attraversare l'involucro nucleare*

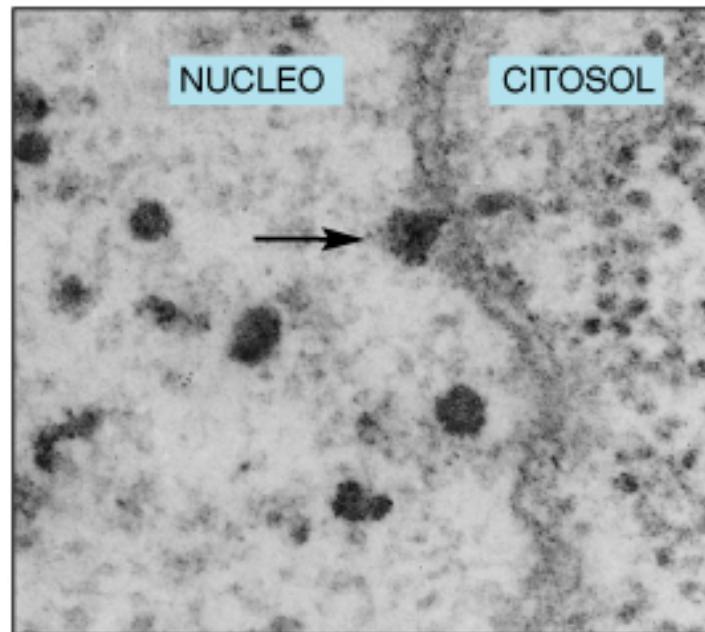
⇒ RICHIENDE ENERGIA

## Esportazione di una grossa molecola di mRNA attraverso il NPC



(A)

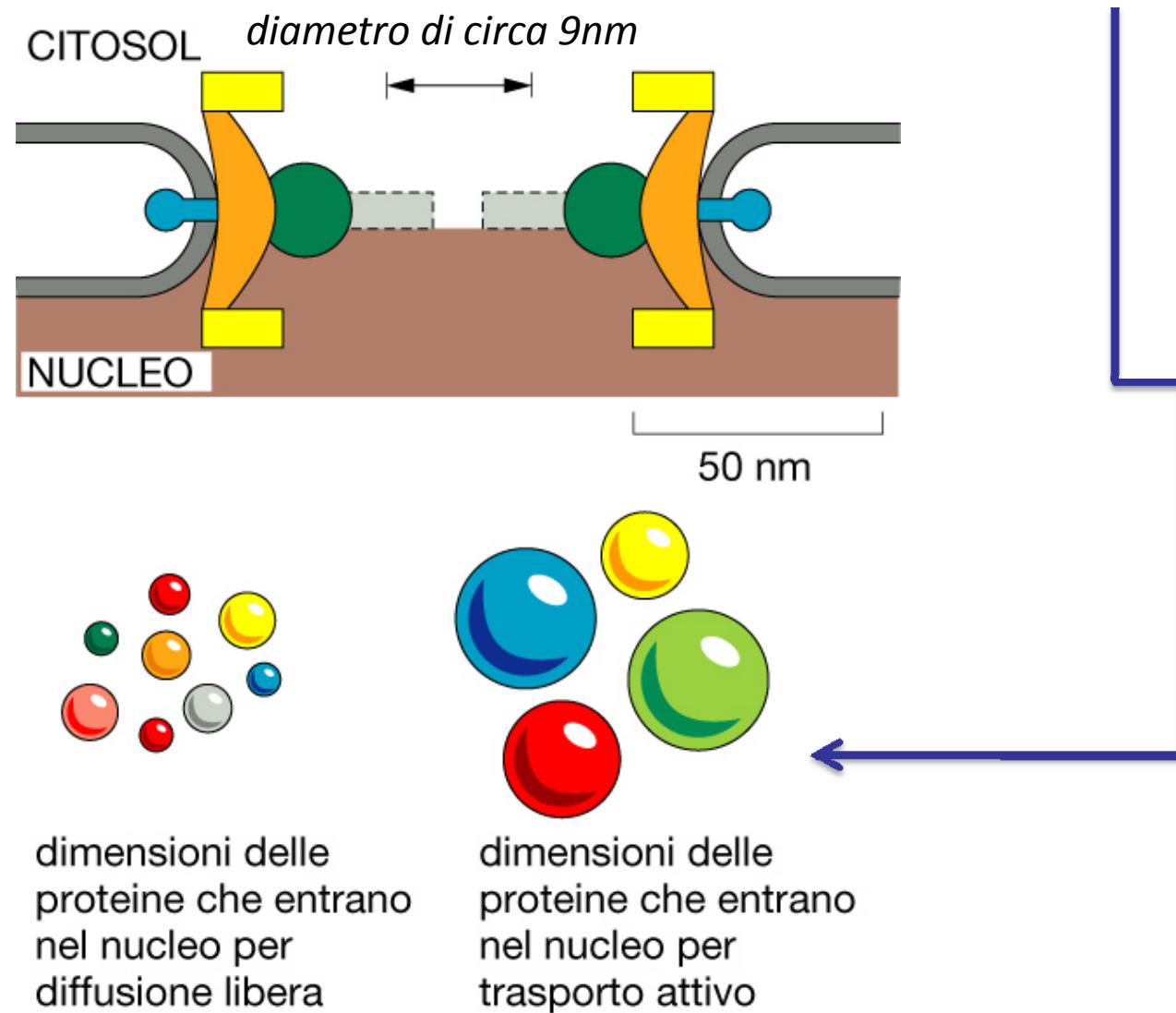
dopo la trascrizione  
l'RNAm subisce una  
fase di "maturazione"  
e successivamente  
viene esportato nel  
citosol



(B)

200 nm

SUBUNITÀ RIBOSOMIALI, MOLTE PROTEINE E MOLECOLE DI RNA SI LEGANO A RECETTORI PROTEICI SPECIFICI CHE LE TRASPORTANO ATTIVAMENTE ATTRAVERSO I NPC



poiché **molte proteine sono troppo grandi per passare per DIFFUSIONE** attraverso i NPC, si stabilisce un set diverso di proteine caratterizzanti il citoplasma ed il nucleoplasma

# How does the nuclear pore complex work to transport material in and out of the nucleus?

## *Active Transport*

Studies with gold markers show that the **pore** can actually **dilate up to 26 nm when it gets the appropriate signal.**

⇒ **What is the signal?**

The signal is in the peptide sequences.

These are **recognition sequences** rich in lysine, arginine, and proline.

# Segnali di localizzazione nucleare (NLS) dirigono le proteine nucleari nel nucleo

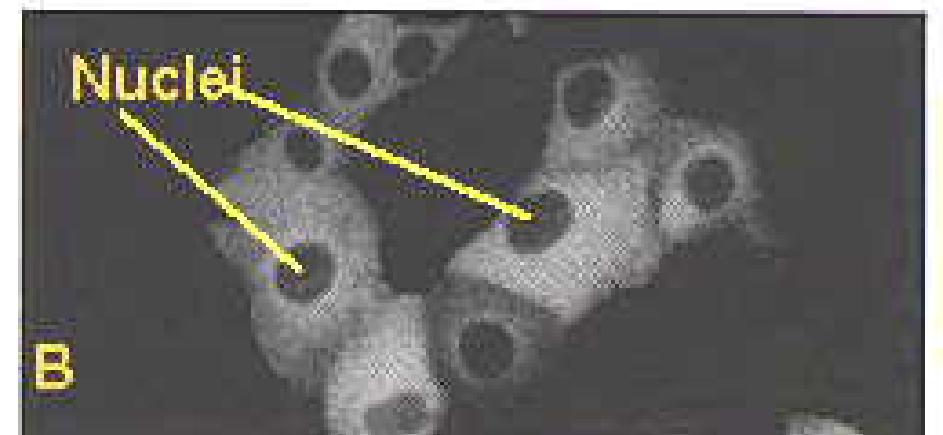
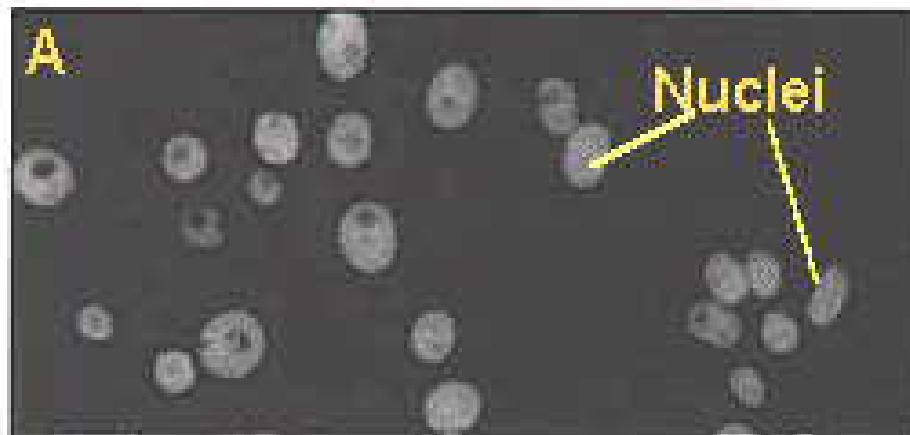
What tests can be used to prove a particular signal?

(A) LOCALIZATION OF T-ANTIGEN CONTAINING WILD-TYPE NUCLEAR IMPORT SIGNAL

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

(B) LOCALIZATION OF T-ANTIGEN CONTAINING A MUTATED NUCLEAR IMPORT SIGNAL

Pro — Pro — Lys — <sup>Thr</sup> — Lys — Arg — Lys — Val —

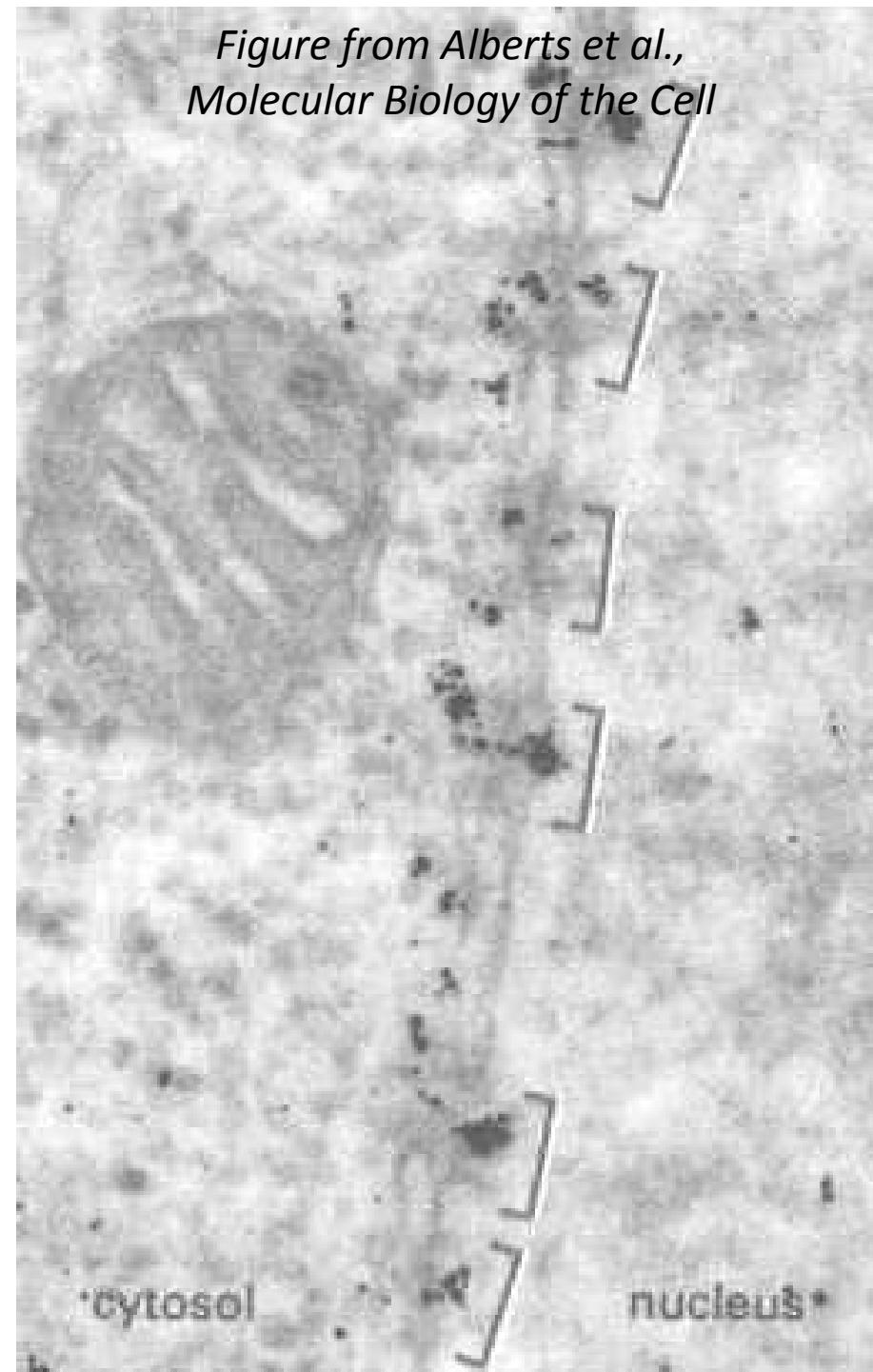


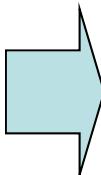
## Trasporto nucleo/citoplasma

A **peptide sequence linked to colloidal gold** then injected into an oocyte and traced with electron microscopy.

As shown in the figure, the gold particles mark the site of transport of the peptide showing that the peptide was transported into the nucleus.

Small gold markers are evident inside the nucleus.





**I NLS non sono tagliati via dopo il trasporto nel nucleo perché le proteine nucleari devono essere importate ripetutamente ad ogni divisione cellulare**

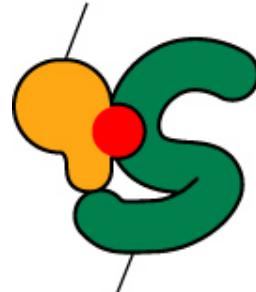
Al contrario, una volta che una proteina è stata importata **in qualsiasi altro organello cellulare racchiuso da membrana**, viene trasmessa di generazione in generazione all'interno di quel compartimento e non ha più bisogno di essere traslocata di nuovo:

**pertanto la sequenza segnale su queste molecole è spesso rimossa dopo la traslocazione della proteina nell'organulo**

## I recettori per l'importazione nucleare si legano ai NLS e alle nucleoporine →

alcune formano fibrille che contengono brevi ripetizioni di amminoacidi contenenti fenilalanina e glicina (dette **RIPETIZIONI FG**): servono da siti di attacco per i *recettori di importazione*

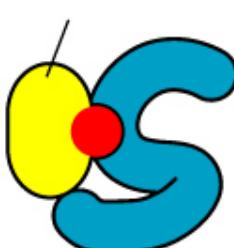
proteina da trasportare 1



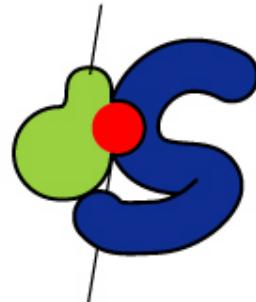
recettore di importazione nucleare

(A)

proteina da trasportare 2



proteina da trasportare 3

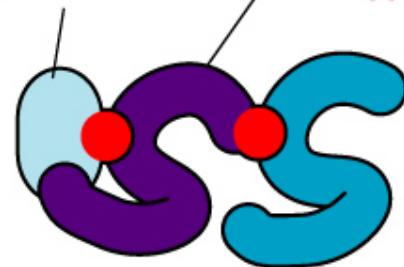


segna di localizzazione nucleare

proteina da trasportare 4

proteina adattatrice di importazione nucleare

(B)



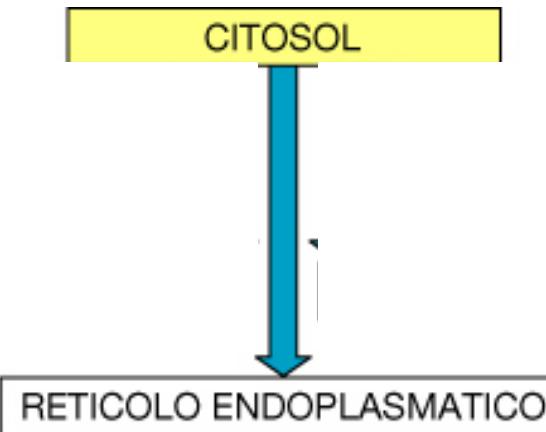
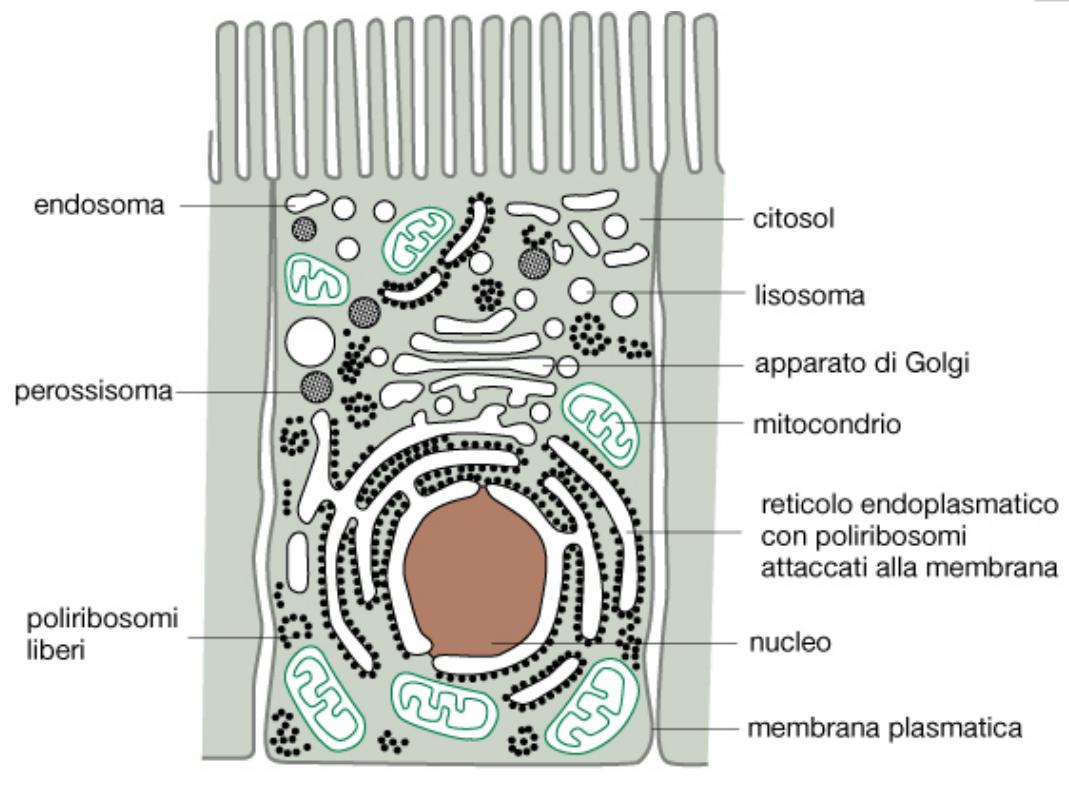
una volta nel nucleo i recettori di importazione si dissociano dal loro carico e vengono riportati nel citosol

- **L'ESPORTAZIONE DAL NUCLEO** funziona come l'importazione nucleare, ma alla rovescia
  - **Segnali di esportazione nucleare**  
(o carioferine)

L'**ENERGIA** necessaria per l'import-export è ottenuta dall'idrolisi di GTP da parte di un enzima detto **GTP-asi** monomerica **Ran**, che si trova sia nel citosol che nel nucleo

# TRASPORTO TRANS-MEMBRANA

## 1. Trasporto di proteine nel reticolo endoplasmatico



■ = Trasporto transmembrana

# Reticolo endoplasmatico (ER)

- Organulo più grande; labirinto reticolare di tubuli ramificati e sacchi appiattiti interconnessi esteso per tutto il citosol.
- Serbatoio intracellulare di ioni  $\text{Ca}^{++}$
- **Produzione di quasi tutti i lipidi cellulari**
- Superficie citosolica del ER → **parte della sintesi proteica**

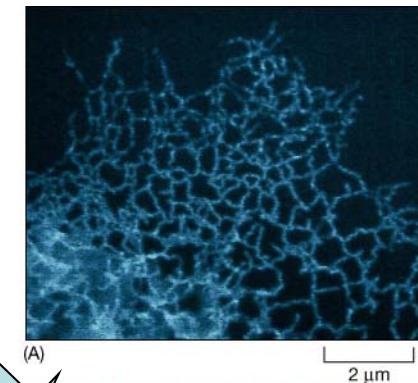
- Proteine destinate alla secrezione sono prima importate dal citosol nel ER

ER cattura proteine dal citosol: p. transmembrana (per M.) o p. solubili in  $\text{H}_2\text{O}$  (per lume o secrezione)

- Importazione **POST-TRADUZIONALE** (traslocazione successiva al completamento della sintesi sui ribosomi liberi nel citosol)

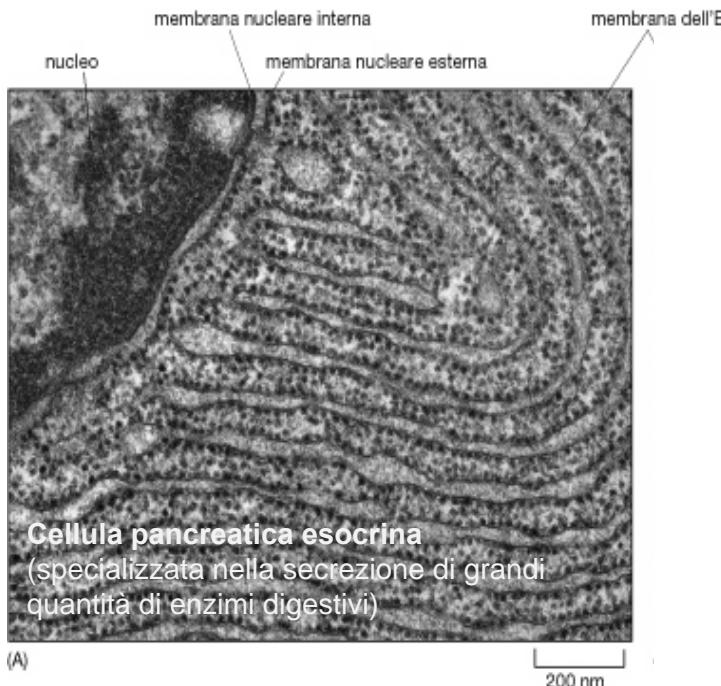
- Importazione **CO-TRADUZIONALE** (traslocazione durante la sintesi proteica)

Sequenza segnale



Ruolo centrale  
**biosintesi**  
**LIPIDI e PROTEINE**

Alcuni ribosomi sintetizzano attaccati direttamente alla M dell'ER, creando regioni dette **RETIKOLO ENDOPLASMATICO RUVIDO (RER)**



- **Proteine destinate alla secrezione** sono sintetizzate dai **ribosomi del ER** e prima di essere secrete vengono importate nel ER
- Anche le **proteine transmembrana** (per m.) sono sintetizzate sui **ribosomi del ER**

**-Importazione CO-TRADUZIONALE**  
(traslocazione durante la sintesi proteica)

Sequenza segnale

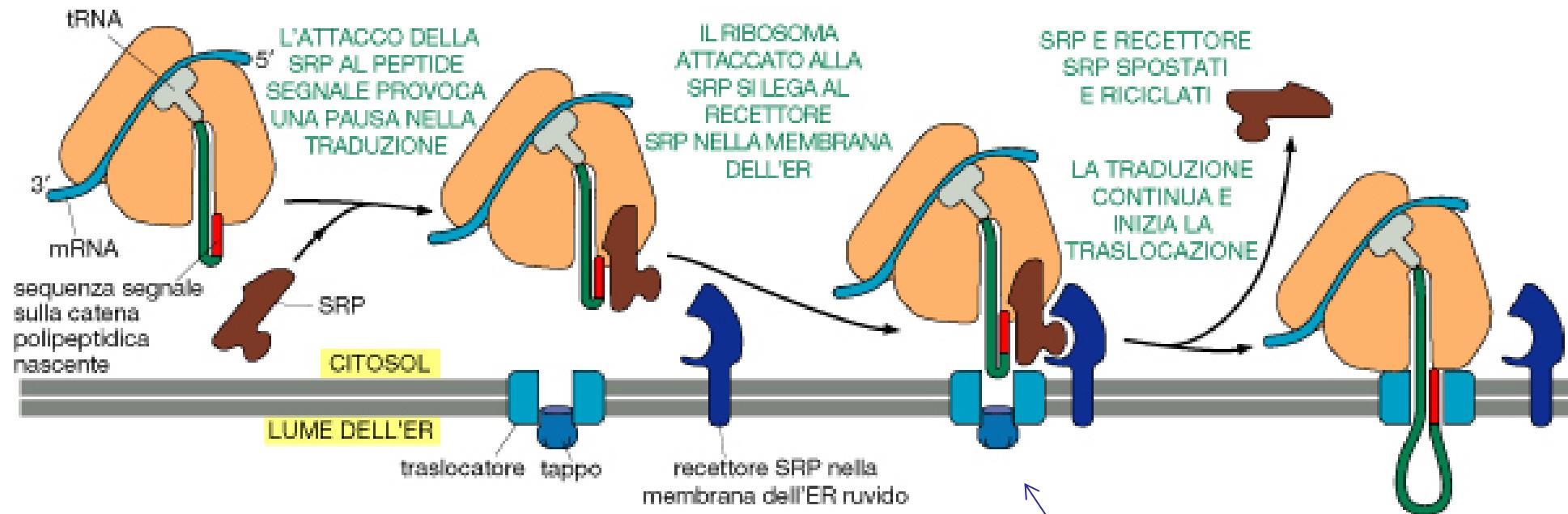
Nelle cellule ci sono anche **ribosomi liberi nel citosol** dove sono sintetizzate proteine destinate al **nucleo, mitocondri, cloroplasti, perossisomi**

**-Importazione POST-TRADUZIONALE**  
(traslocazione successiva al completamento della **sintesi sui ribosomi liberi nel citosol**)

Durante la traslocazione attraverso la membrana o nel lume del ER avvengono **modificazioni delle proteine** (es. *rimozione della sequenza segnale, ripiegamento, oligomerizzazione, formazione di legami disolfuro, aggiunta di oligosaccaridi legati a N*).

Le **proteine residenti nel lume del ER** hanno soprattutto il ruolo di assicurare il corretto ripiegamento (es. **proteine chaperone**) e assemblaggio delle catene polipeptidiche neosintetizzate.

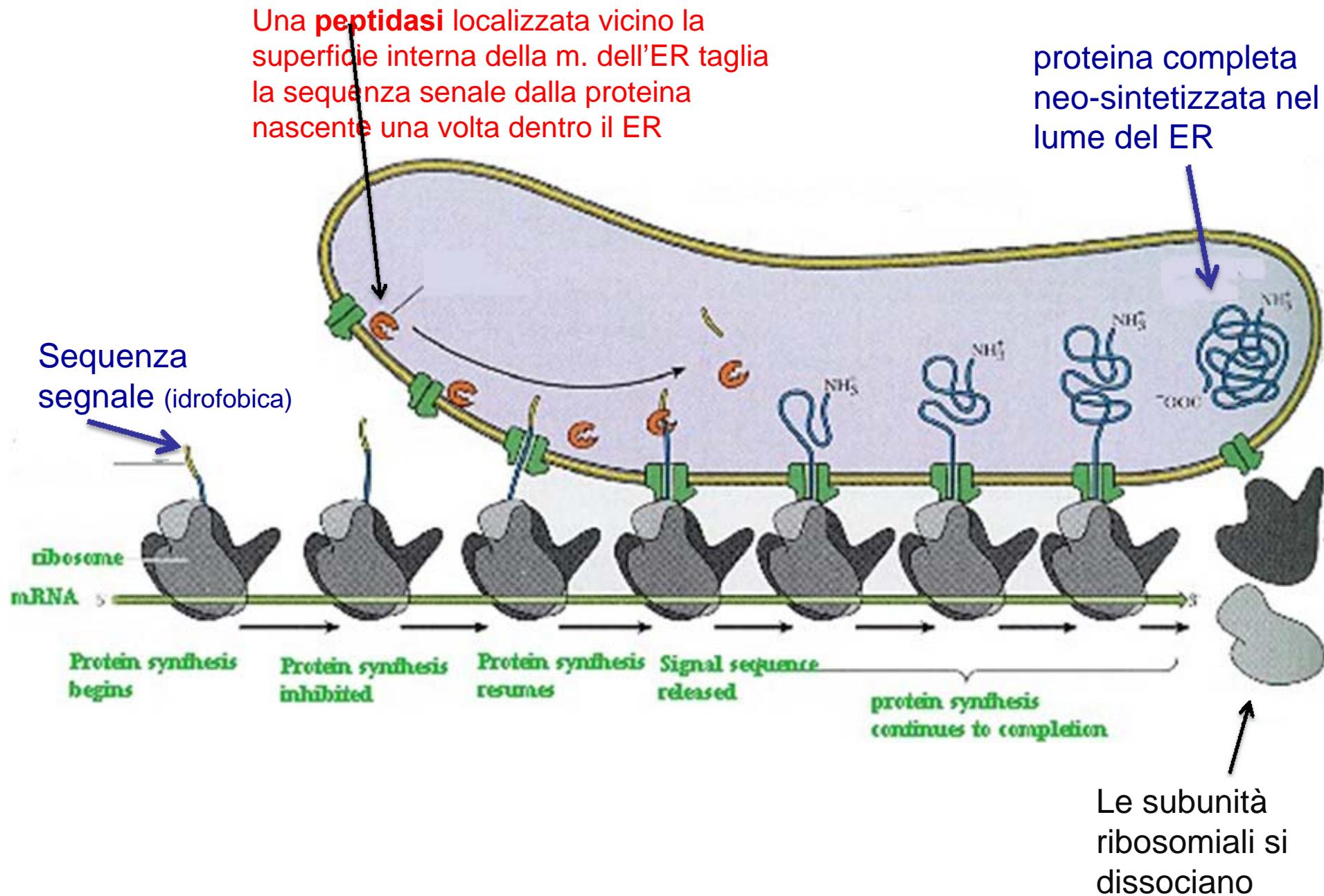
## Le sequenze segnale dell'ER e la SRP (particella di riconoscimento del segnale) dirigono i ribosomi alla m. del ER



Il complesso viene diretto in corrispondenza di una proteina canale (traslocatore) situata nella m. dell'ER; la catena polipeptidica viene inserita attraverso il bilayer

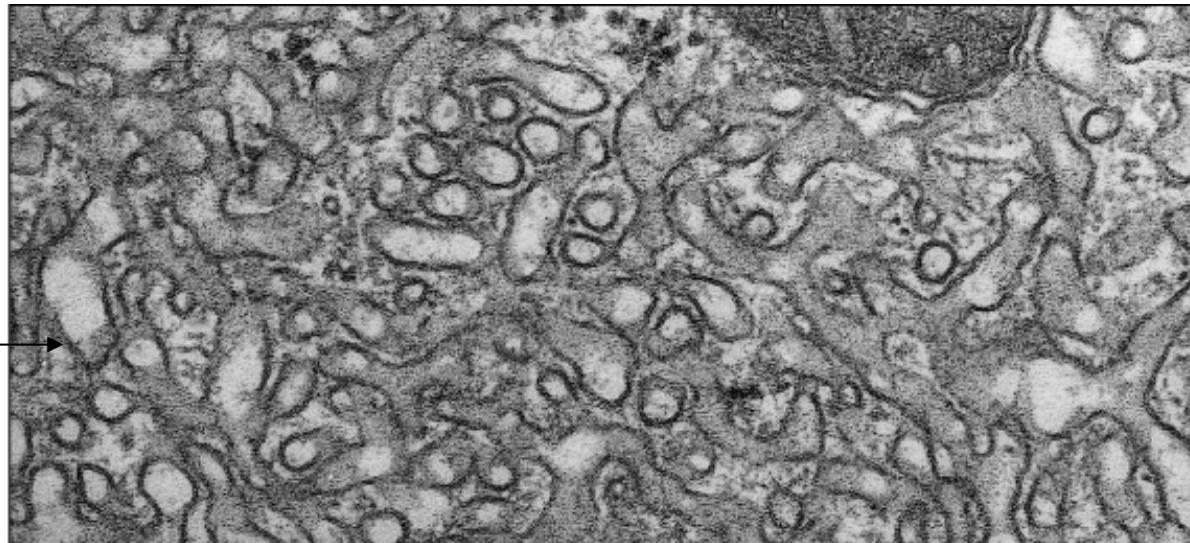
- La maggior parte delle proteine destinate al ER una volta sintetizzate nel ER subiscono un primo step di **glicosilazione**
- *La maggior parte dei bilayer lipidici delle M è assemblata nel ER*  
**la M del ER sintetizza quasi tutte le classi principali di lipidi, compresi i fosfolipidi e colesterolo**

## Proteine destinate al ER: traslocazione della proteina nel lume del ER



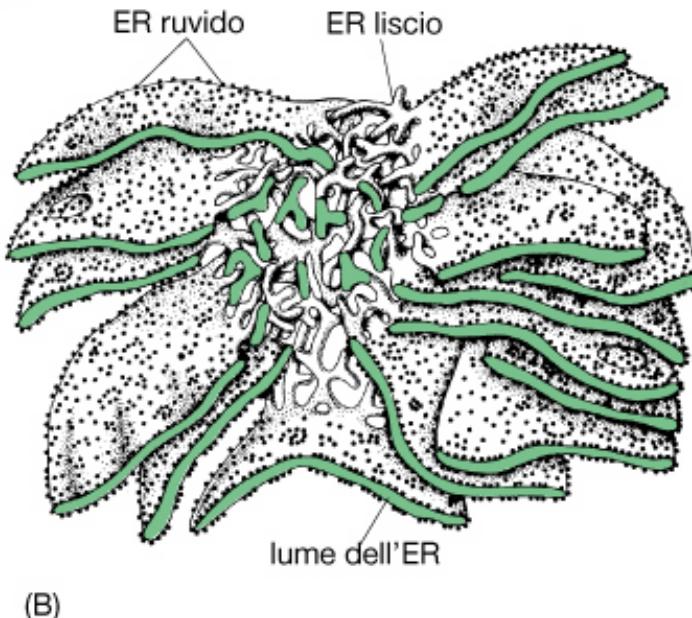
## L'ER LISCIO è abbondante in alcune cellule specializzate

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



(A)

200 nm



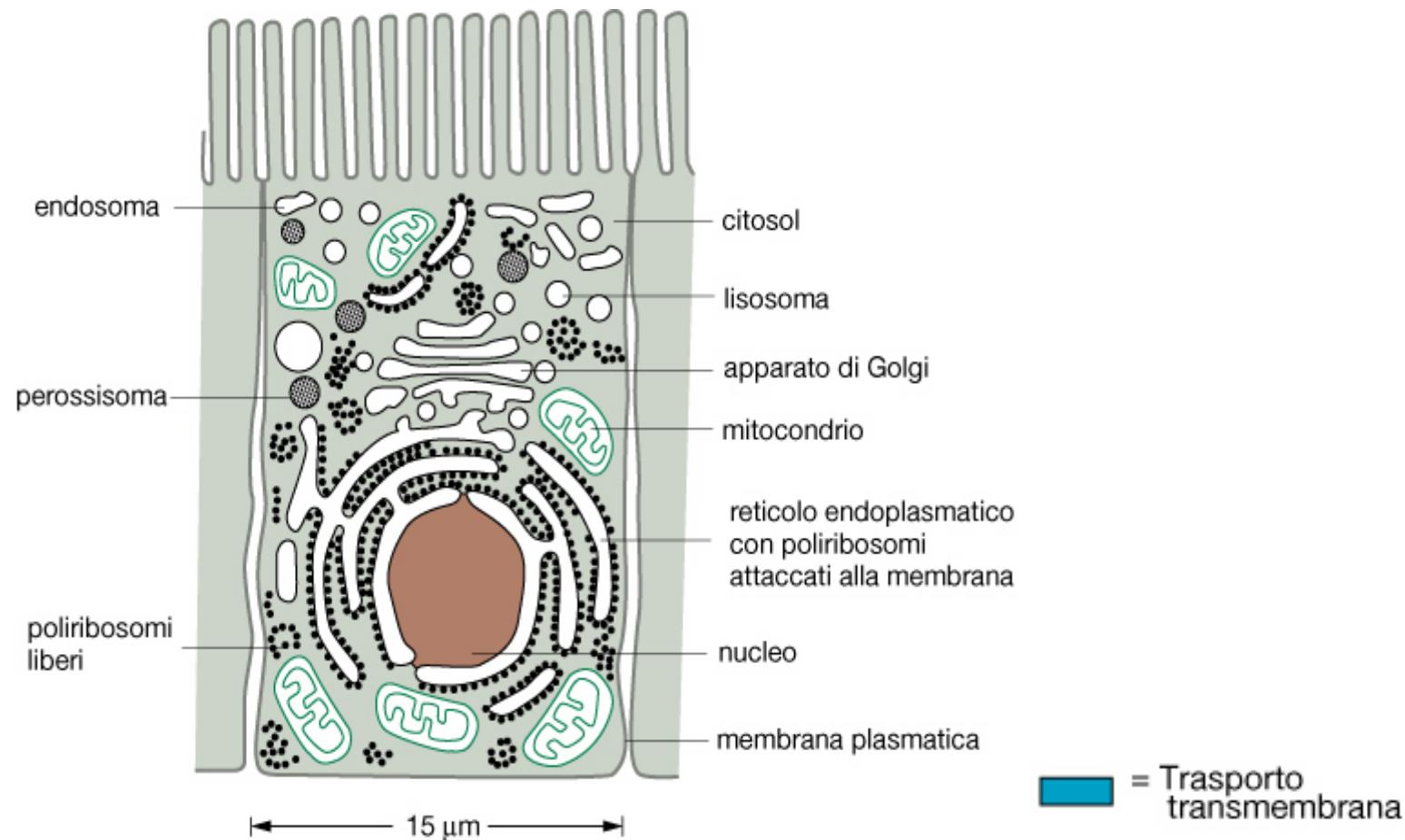
(B)

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

⇒ In cellule specializzate ha anche altre funzioni (**metabolismo dei lipidi**)

# TRASPORTO TRANS-MEMBRANA

## 2. Il trasporto di proteine nei mitocondri



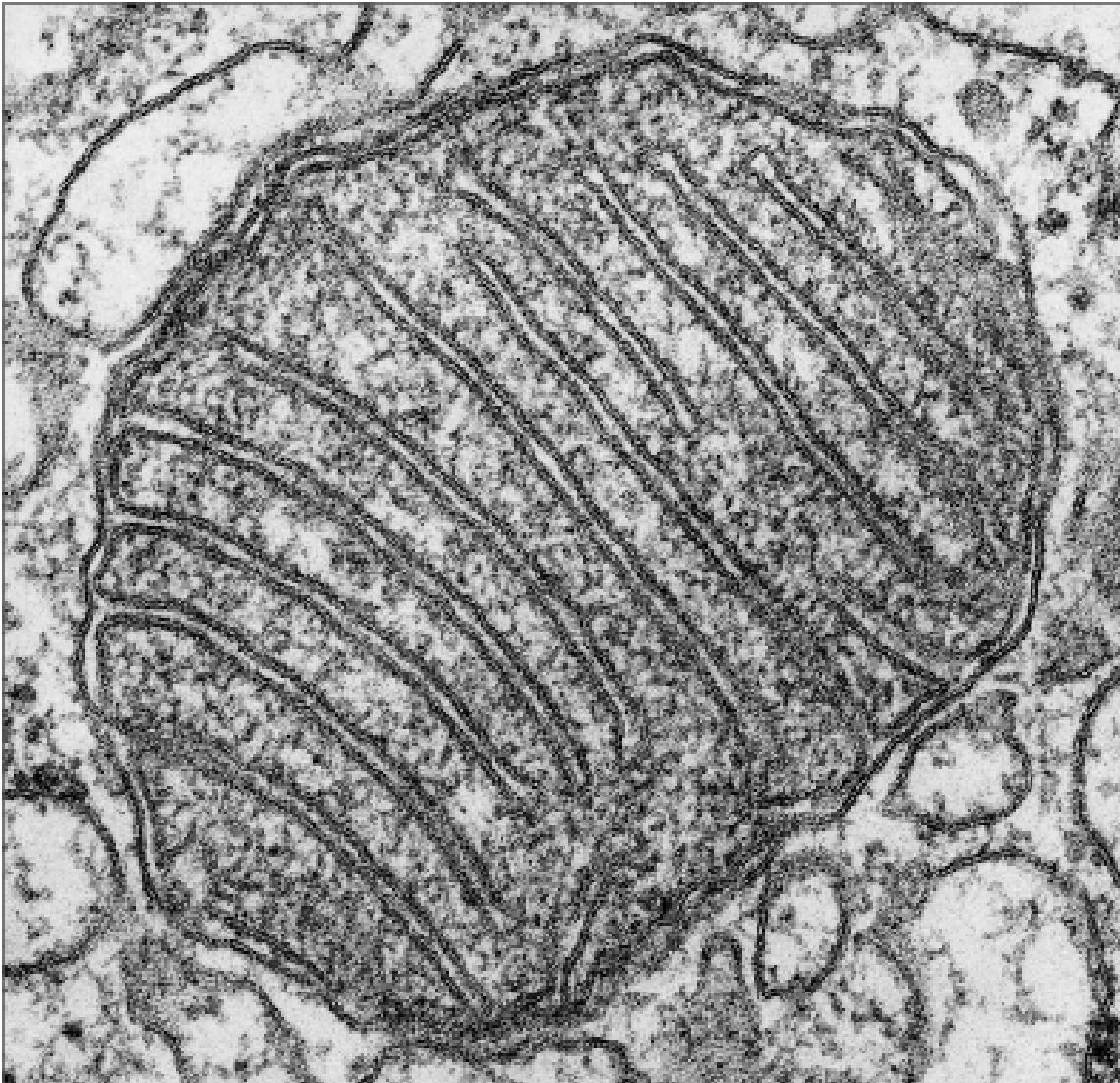
# FUNZIONE DEI MITOCONDRI

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**

# MITOCONDRI

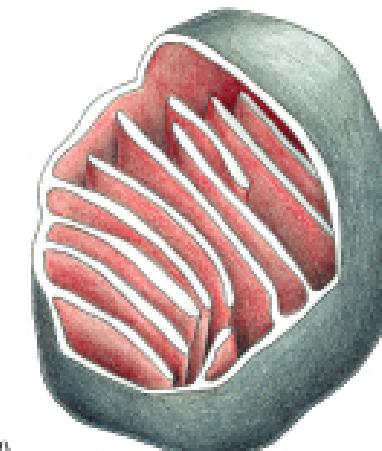
Sono presenti in tutte le cellule animali e vegetali (compresi funghi)



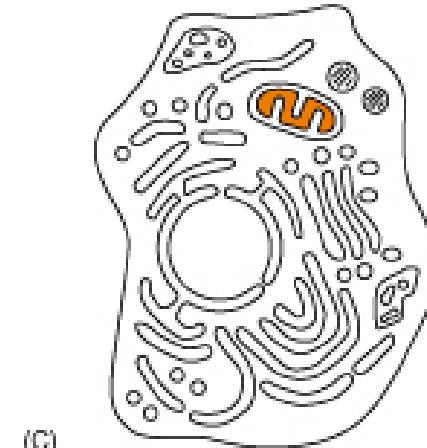
(A)

500 nm

Il mitocondrio contiene una m. esterna, una m. interna e 2 compartimenti interni



(B)

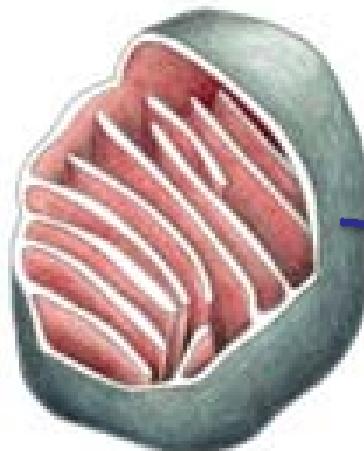


(C)

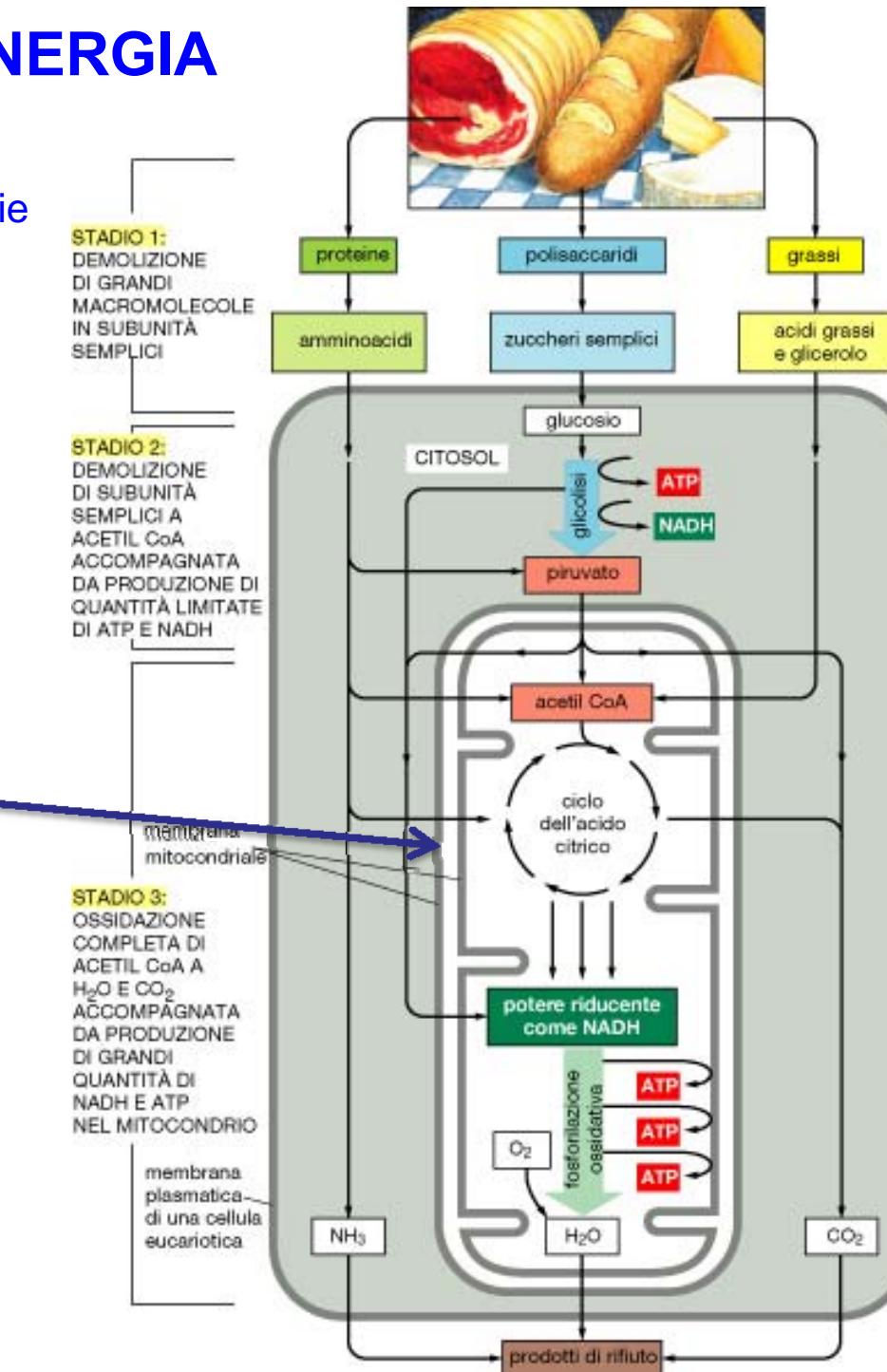
# Le cellule richiedono ENERGIA per i loro processi

forniscono l'impalcatura per una serie di processi di trasporto di elettroni

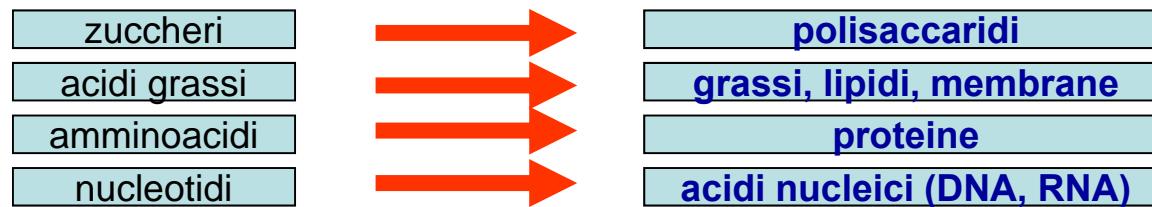
Attraverso le **membrane specializzate** dei **mitochondri** viene prodotta la maggior parte dell'**ATP** della cellula



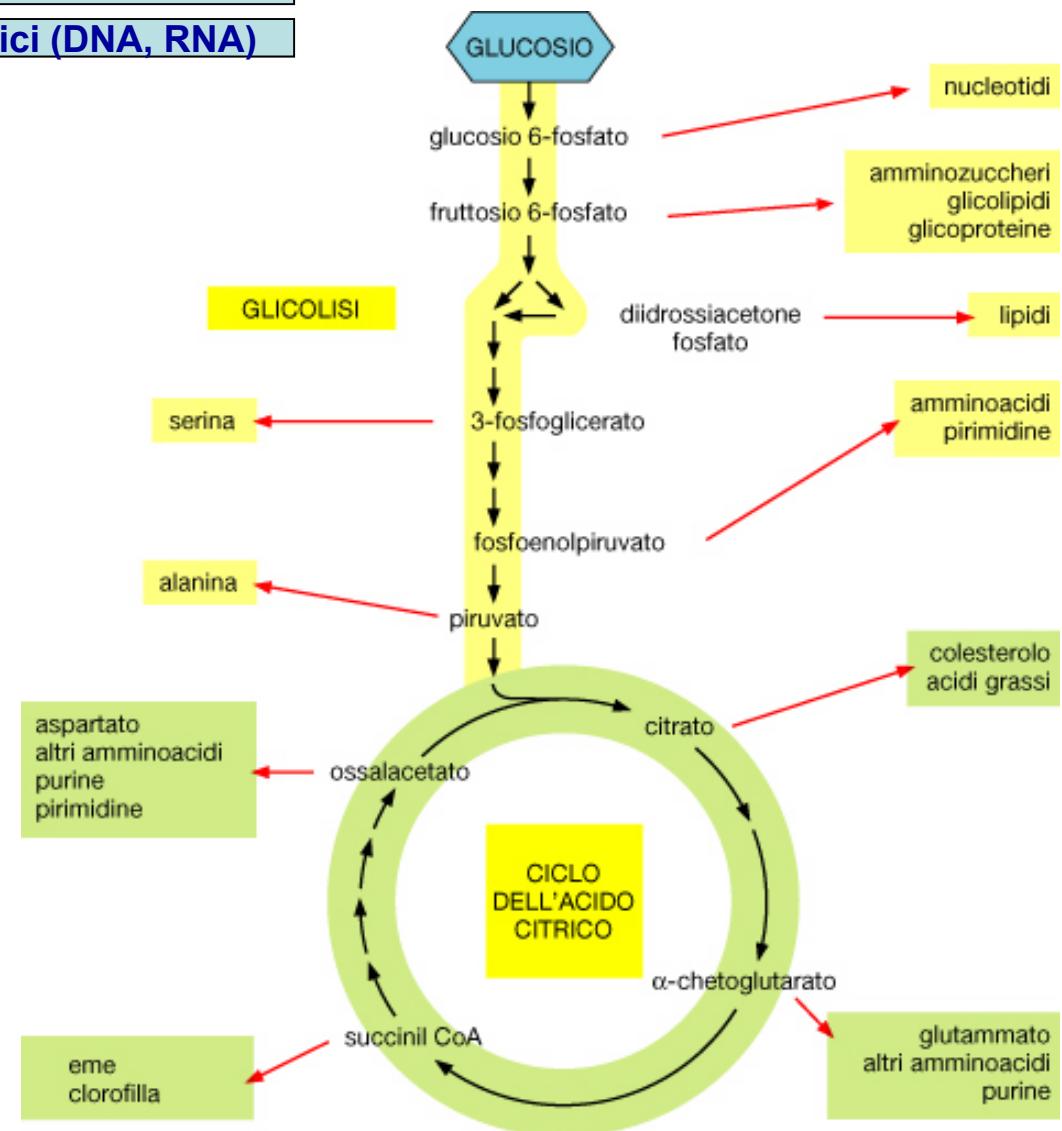
Nel **mitochondrio** convergono tutti i processi che producono energia, sia che inizino con zuccheri, sia con grassi o con proteine

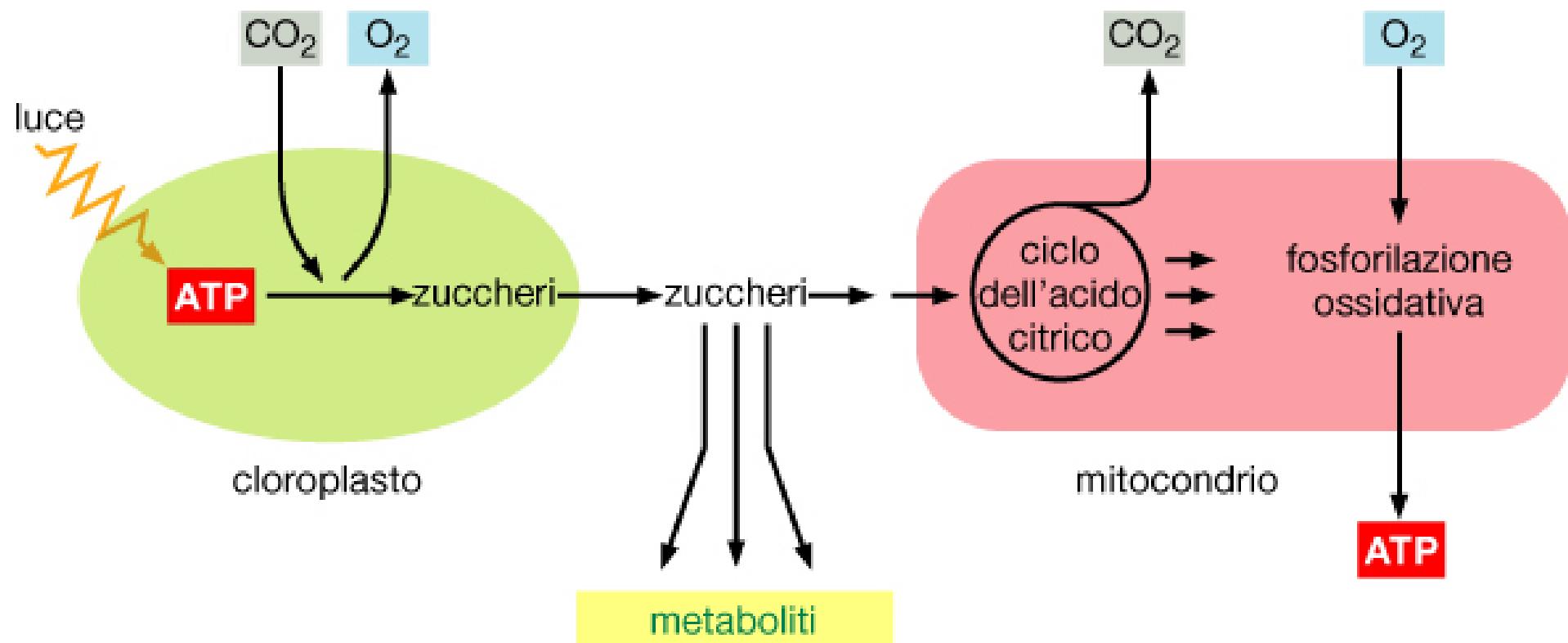


Le cellule funzionano da **fabbriche biochimiche** che utilizzano le stesse unità molecolari di base

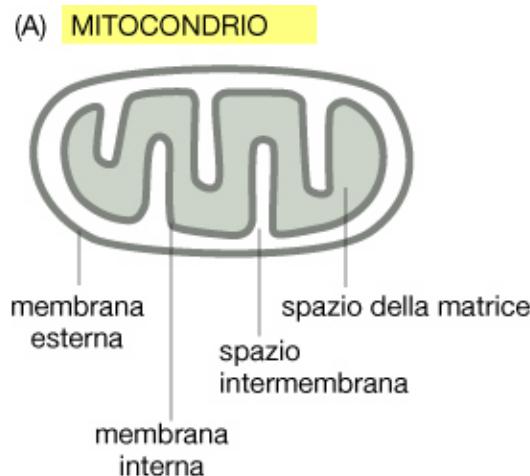


La **GLICOLISI** e il **CICLO DELL'ACIDO CITRICO** producono **ENERGIA**, ma anche molti **COMPOSTI INTERMEDI** (unità da costruzione) che vengono usati da enzimi diversi per produrre amminoacidi, nucleotidi, lipidi e le altre piccole molecole organiche di cui la cellula ha bisogno



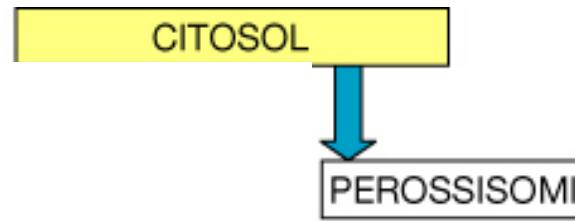


# Il trasporto di proteine nei mitocondri

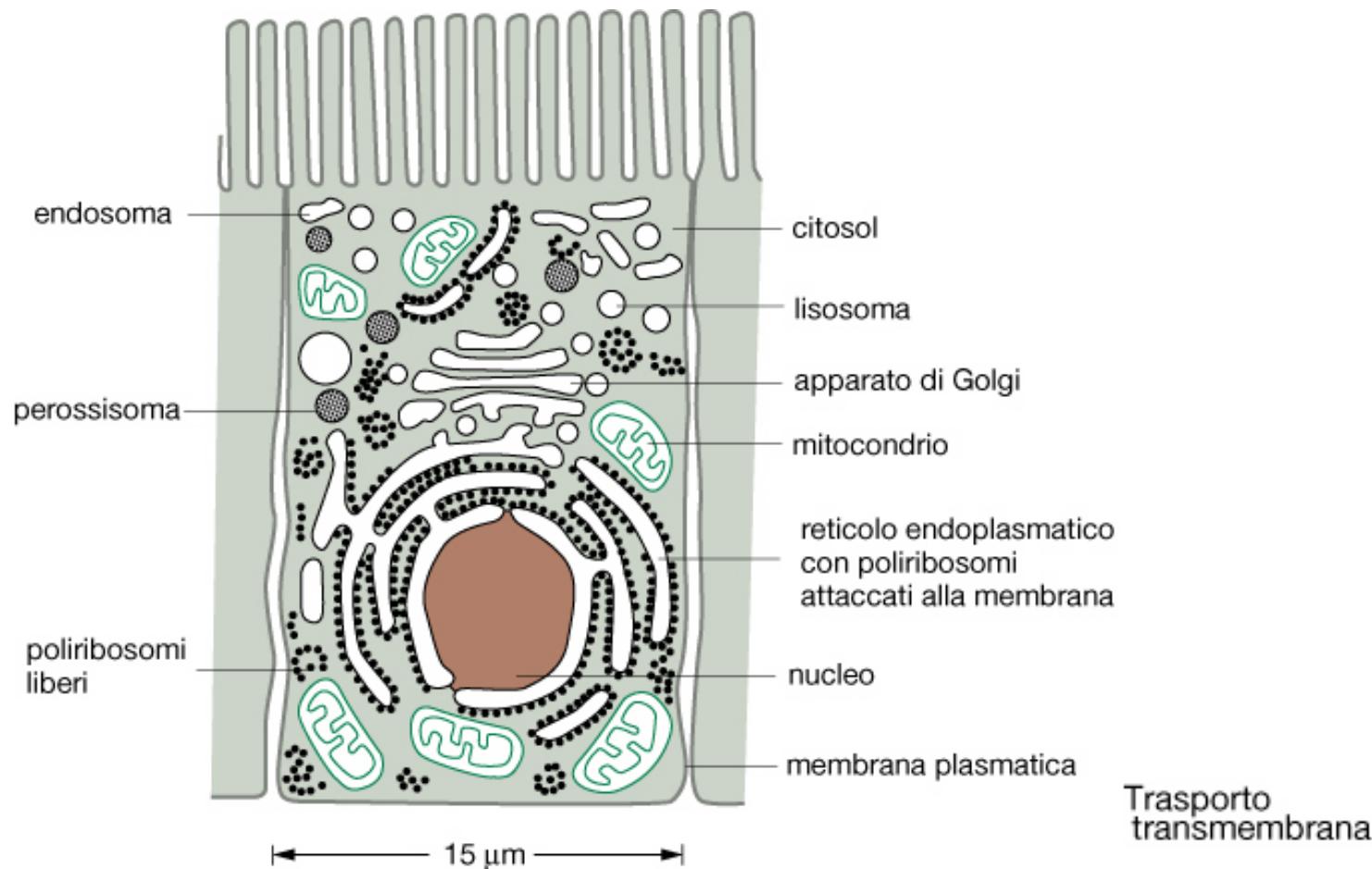


- Anche se hanno i loro sistemi genetici importano la maggior parte delle proteine dal citosol
- Le proteine sono importate in uno **stato non ripiegato** (mantenuto da proteine della famiglia hsp70)
- La traslocazione è **mediata da complessi proteici multisubunità** che fungono da traslocatori di proteine (complesso TOM, complessi TIM)
- La traslocazione è spinta sia dall' **idrolisi di ATP** che dal **gradiente elettrochimico di  $H^+$**  attraverso la m. interna
- **Sequenza segnale specifica** (tagliata dopo importazione)
- **Sequenza segnale interna:** guida trasporto ulteriore

# TRASPORTO TRANS-MEMBRANA

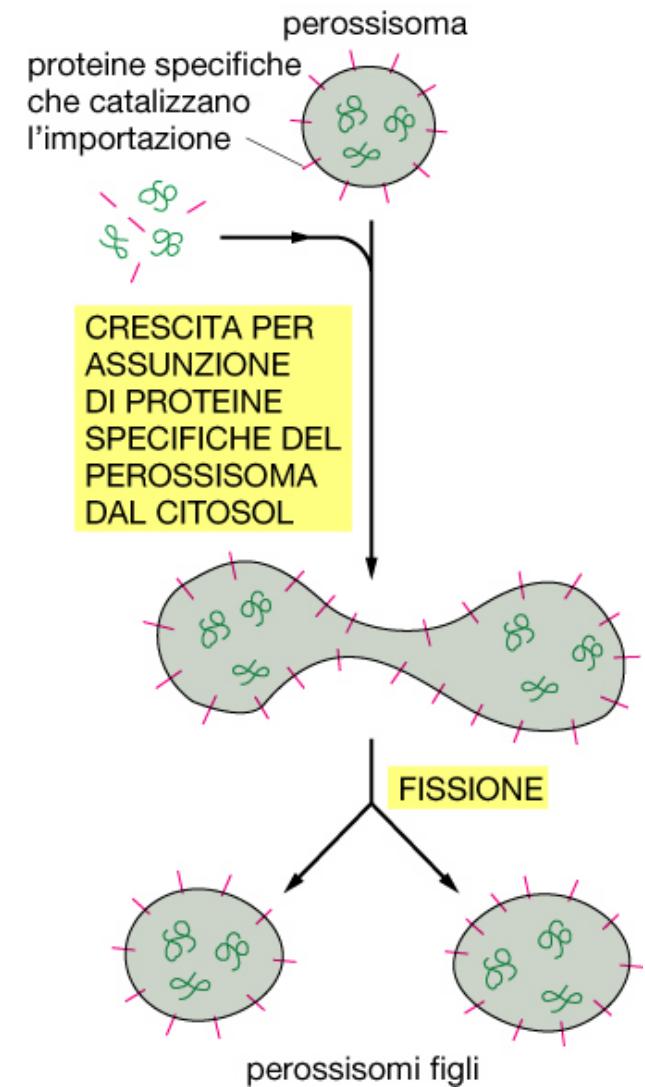


## 3. Trasporto di proteine nei perossisomi



# PEROSSISOMI

- Si trovano in tutte le cellule eucariotiche
- Svolgono **reazioni ossidative** (es. demolizione ac. grassi) usando ossigeno molecolare
- Generano  **$H_2O_2$**  che usano per scopi ossidativi:  
 $RH_2 + O_2 \rightarrow H_2O_2$   
l'eccesso viene distrutto dalla **CATALASI** che contengono:  
 $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- Sintesi di **fosfolipidi specializzati** per la mielinazione delle cellule nervose
- Importano le loro proteine dal citosol (**segnale di importazione**)
- Importano le proteine **senza svolgerle**
- Molto importanti nelle cellule del fegato e del rene dove **detossificano molecole tossiche che entrano nel sangue**
- Autoreplicazione (come mitocondri e plastidi)

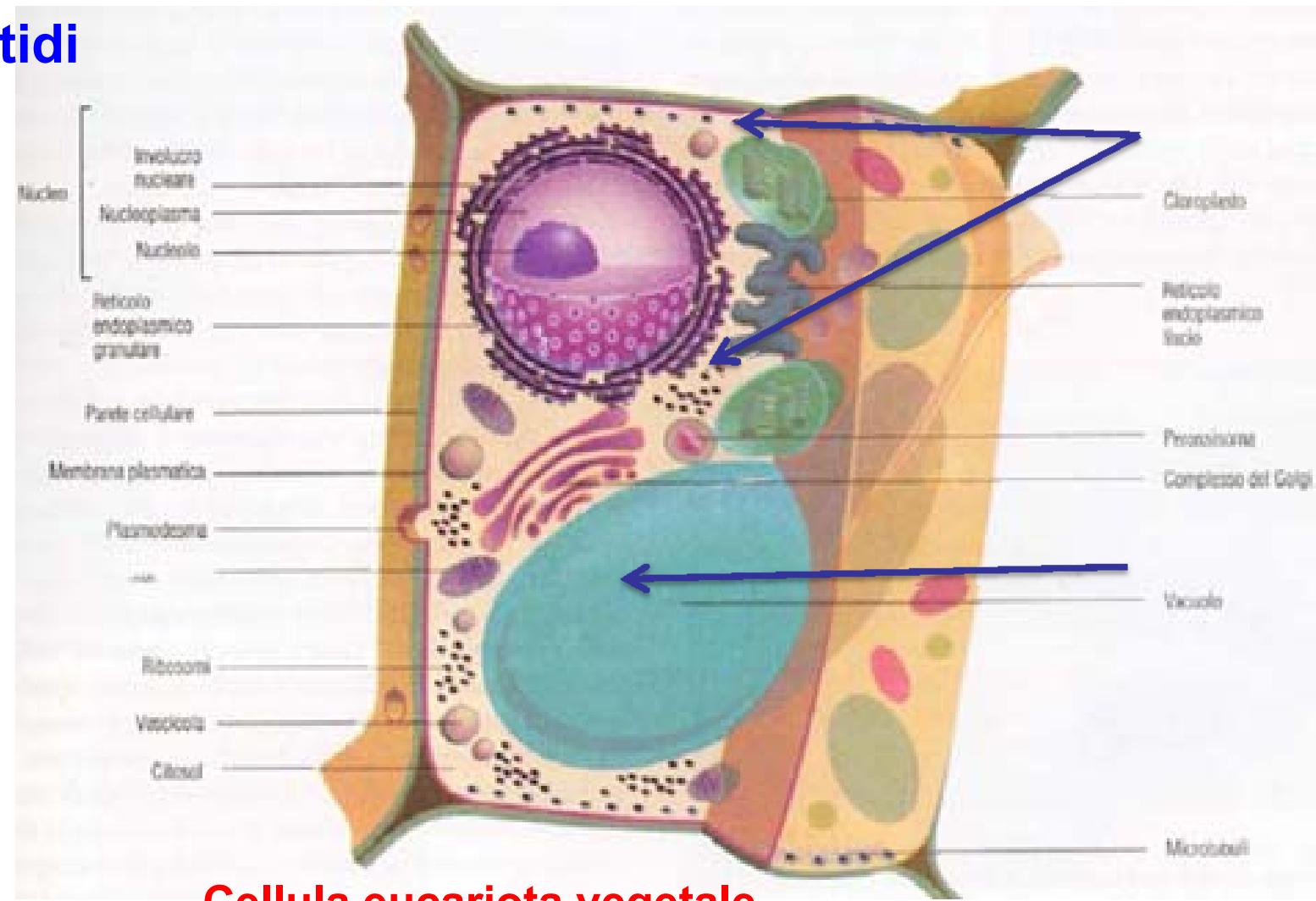


# TRASPORTO TRANS-MEMBRANA nelle cellule VEGETALI

## 4. Il trasporto di proteine

### nei plastidi

Le cellule vegetali, oltre la parete cellulare, contengono anche organuli specifici: **Cloroplasti (plastidi), vacuolo**



## **AUTOTROFI**

- vegetali
- alghe
- alcuni batteri

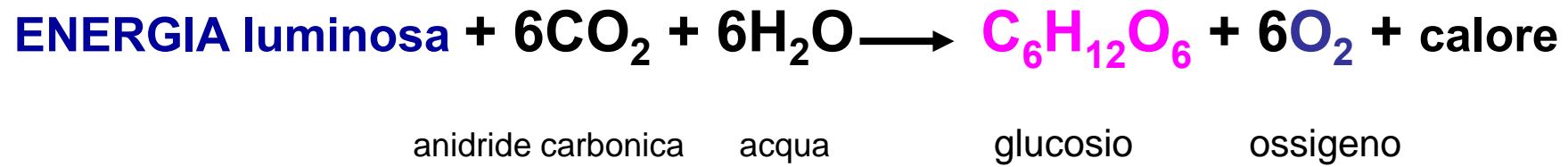
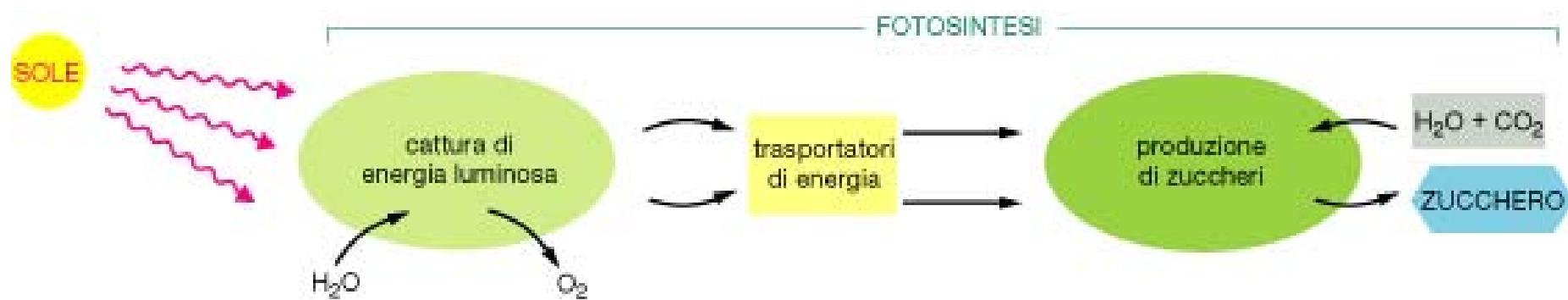
## **Organismi viventi**

## **ETEROTROFI**

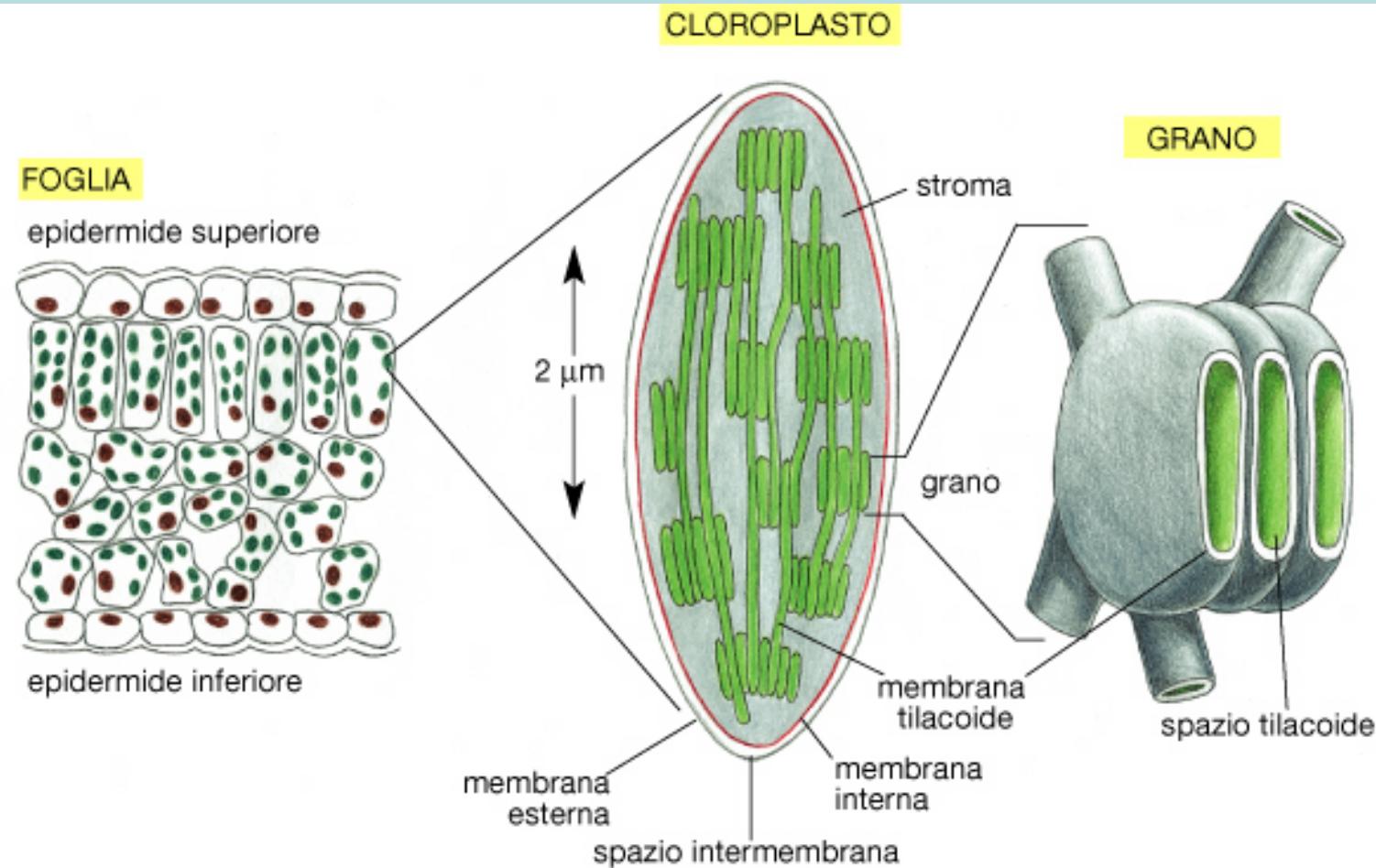
- animali



I vegetali sono detti **ORGANISMI FOTOSINTETICI** in quanto sono in grado di utilizzare la luce solare per **sintetizzare molecole organiche** nei cui legami chimici è conservata **energia**

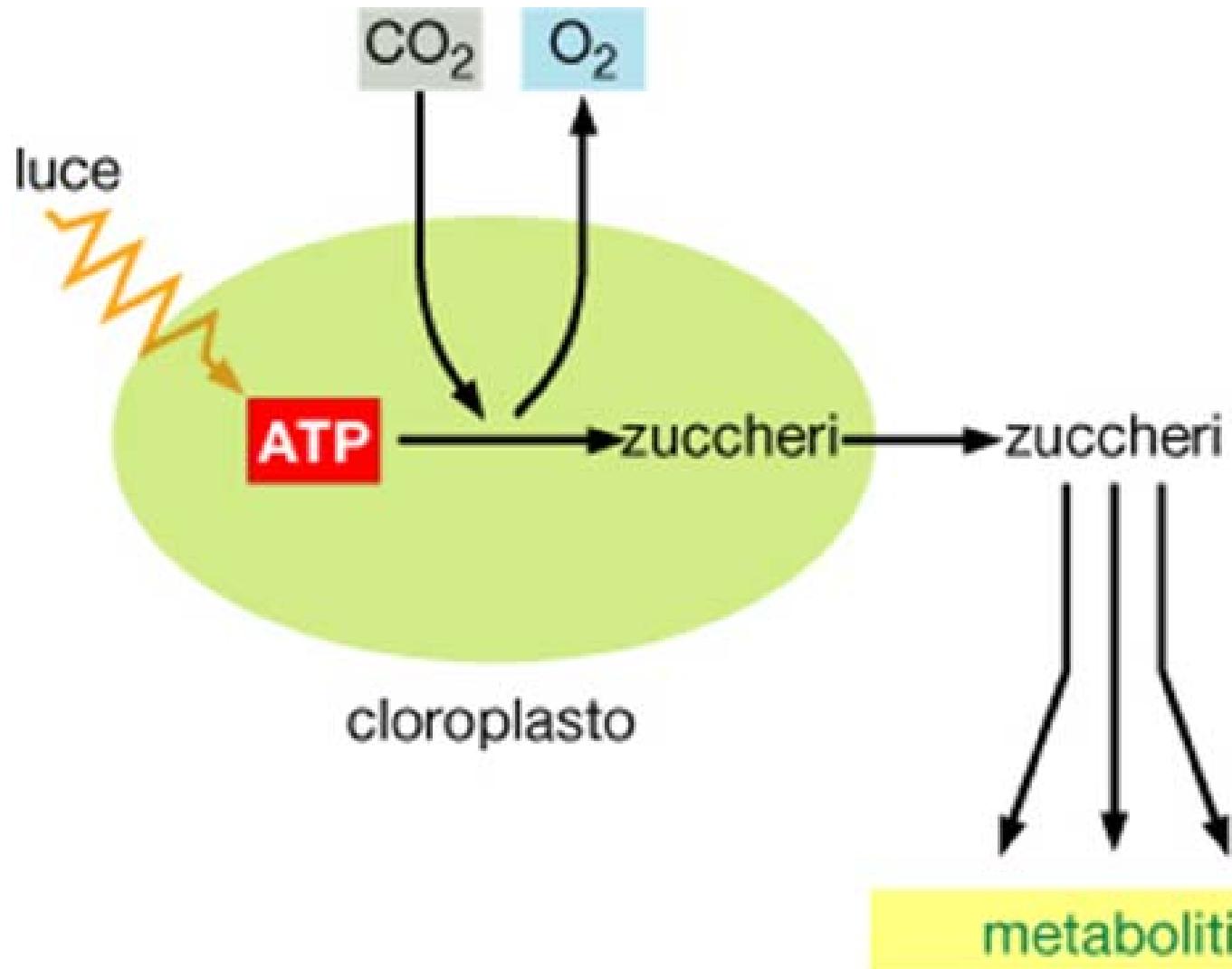


# La cellula vegetale contiene organuli specifici in cui avviene la **fotosintesi**: **i CLOROPLASTI**



All'interno dei cloroplasti c'è un **pigmento verde** detto **CLOROFILLA** che è in grado di assorbire la luce solare

# I vegetali sono all'origine della catena alimentare



## I VEGETALI SONO ALL'ORIGINE DELLA CATENA ALIMENTARE

I vegetali ottengono tutti gli **atomi** di cui necessitano da fonti inorganiche: il carbonio viene ricavato dall'anidride carbonica, l'idrogeno e l'ossigeno dall'acqua, l'azoto dall'ammoniaca, i nitrati dal terreno e altri elementi necessari in minori quantità dai sali inorganici presenti nel terreno.



Utilizzando l'energia solare costruiscono da questi atomi tutte le **piccole molecole organiche** (zuccheri, aminoacidi, nucleotidi, acidi grassi).



Le piccole molecole organiche a loro volta verranno utilizzate per costruire le **macromolecole biologiche** (polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, lipidi)

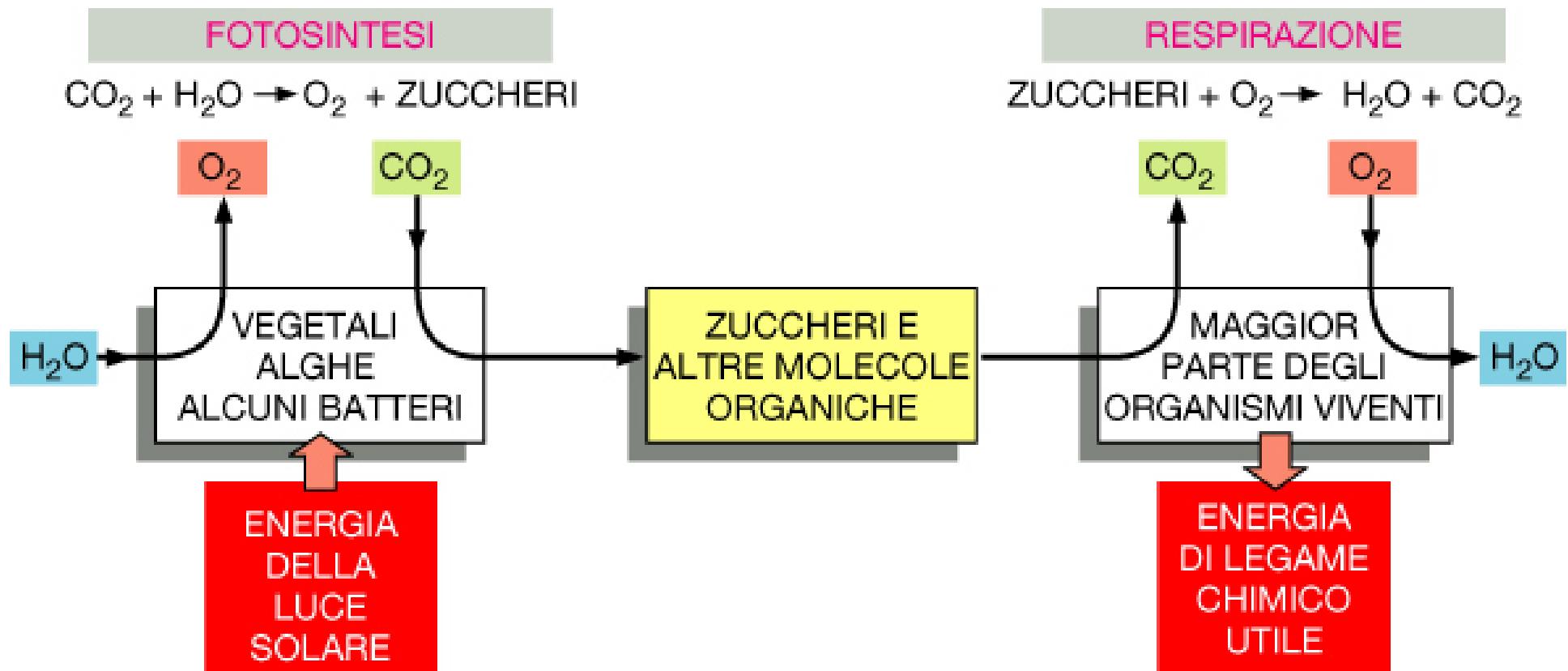


## Conseguenze della fotosintesi:

- Immissione **ossigeno** nell'atmosfera
- Formazione dello **strato di ozono** che scherma la Terra dalle radiazioni ultraviolette
- Comparsa della **respirazione**

In seguito a miliardi di **fotosintesi** sulla Terra sono state rilasciate quantità di ossigeno sufficienti a creare un'**atmosfera ricca di O<sub>2</sub>**

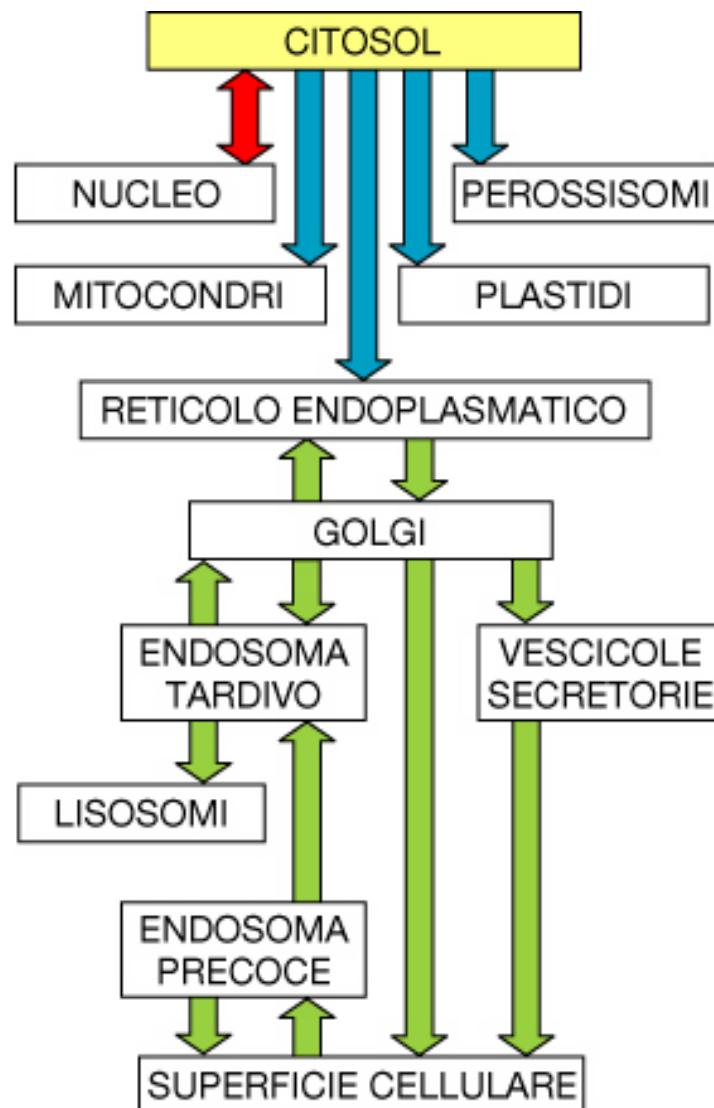
# La FOTOSINTESI e la RESPIRAZIONE sono due processi complementari nel mondo vivente



➤ I vegetali sono capaci di ricavare **energia** direttamente dall'ambiente (luce solare) invece che da altri organismi viventi

➤ Tutti gli animali vivono dell'**energia** immagazzinata nelle molecole organiche prodotte da altri organismi, che assumono come cibo.

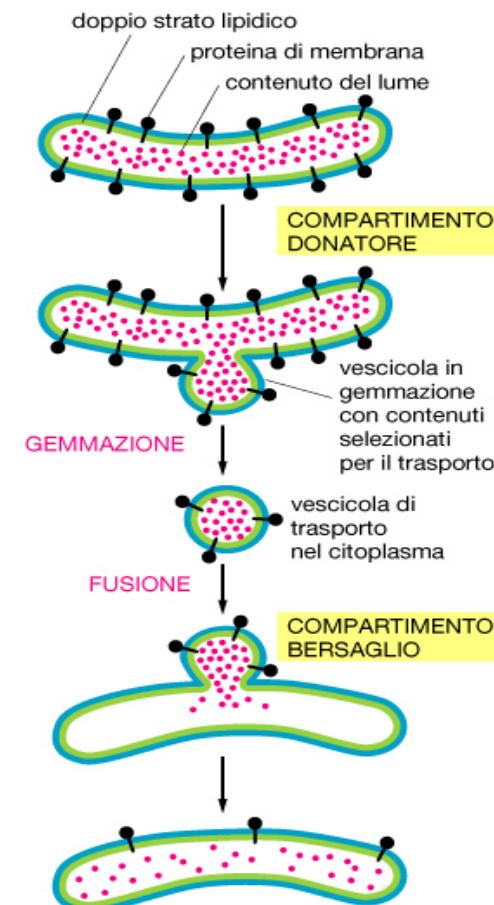
## MODALITA' DI TRASPORTO INTRACELLULARE DELLE PROTEINE



CHIAVE:

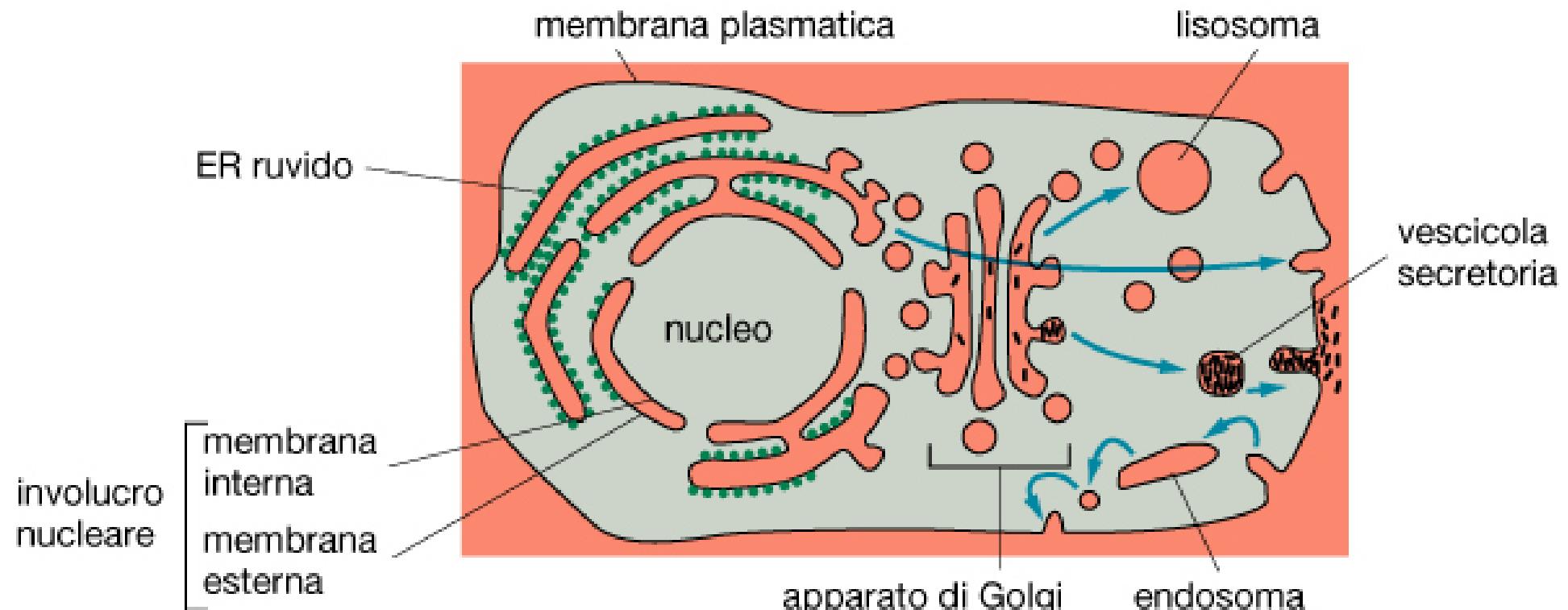
- = Trasporto attraverso pori
- = Trasporto transmembrana
- = Trasporto vescicolare

### ➤ trasporto vescicolare



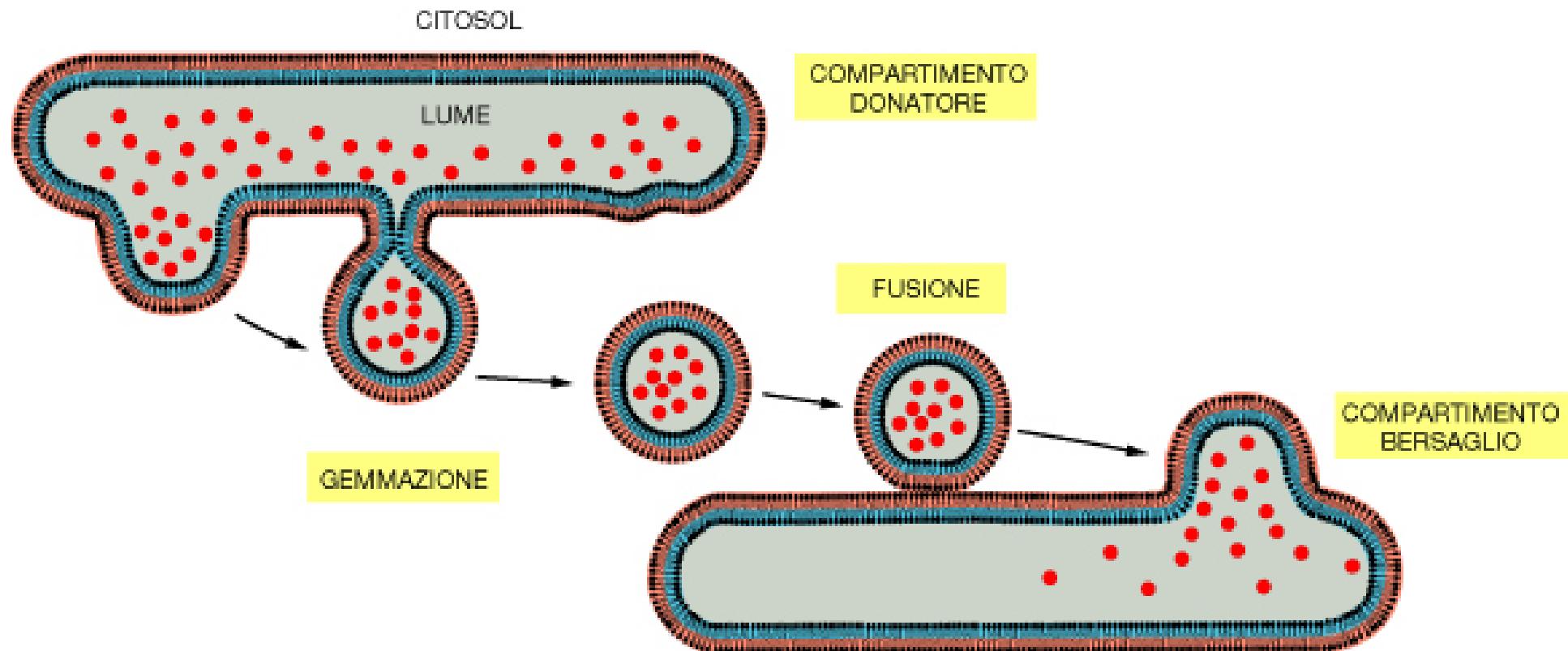
# TRASPORTO VESCOLARE

**Cicli di gemmazione e fusione di membrane permettono al lume di molti\* organelli di comunicare con qualsiasi altro organello e con lo spazio extracellulare per mezzo di VESCOLE DI TRASPORTO**



**\*i MITOCONDRI non prendono parte a questo sistema di comunicazione**

# Trasporto vescicolare



Questi compartimenti sono in comunicazione costante tra loro per mezzo di **VESCICOLE DI TRASPORTO** che gemmano da un compartimento e si fondono con un altro in continuazione

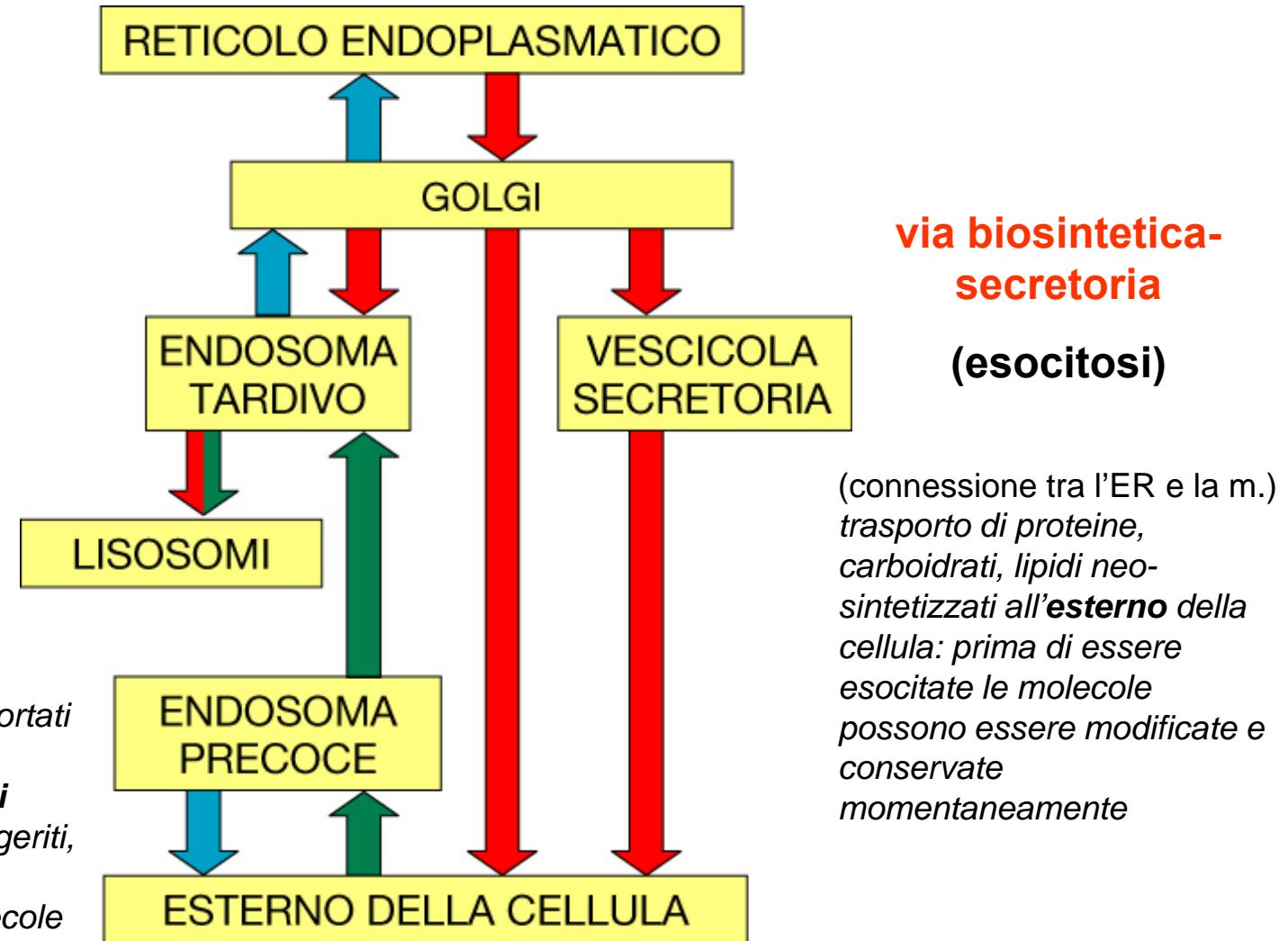
# Traffico vescicolare intracellulare

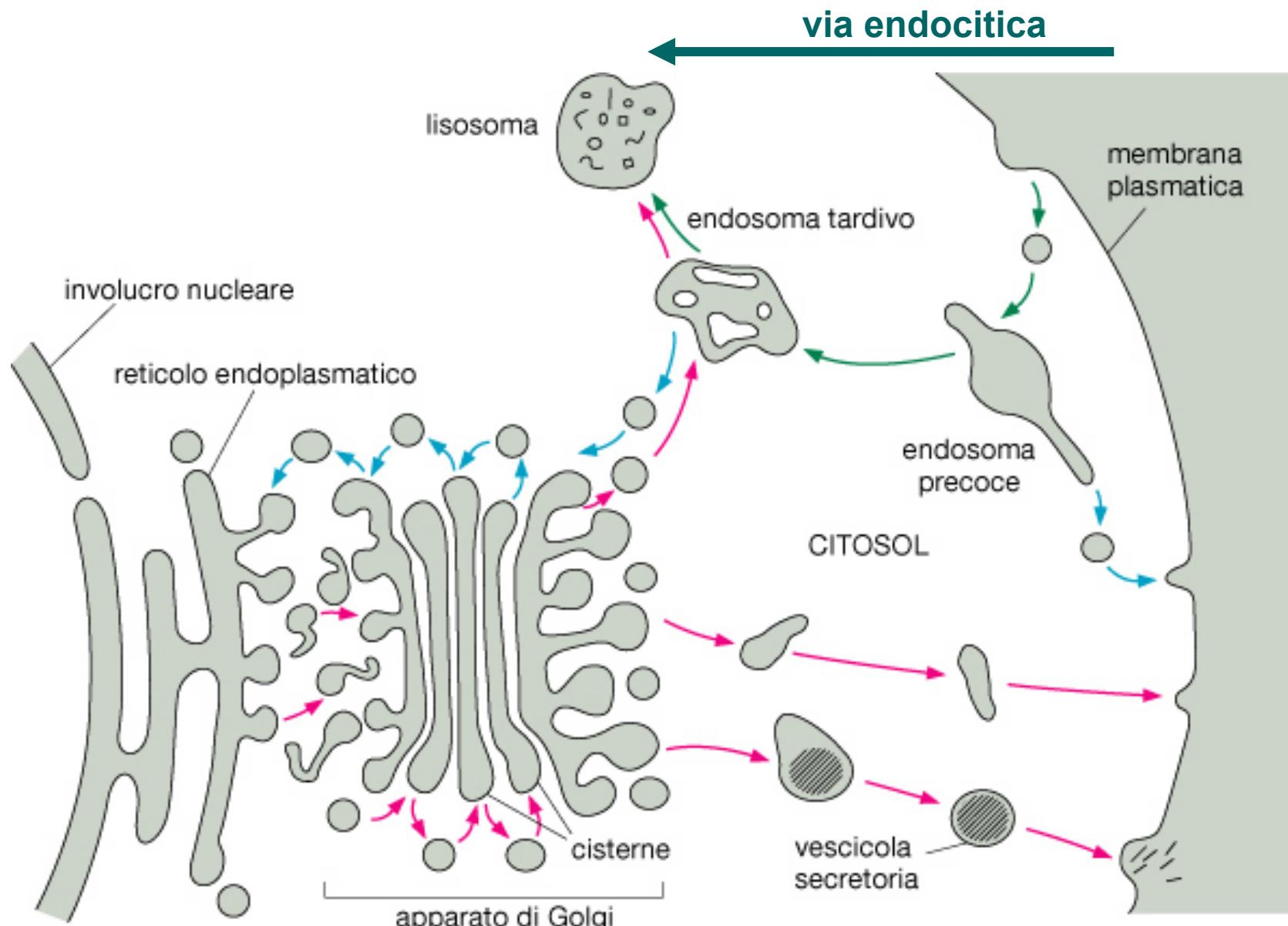
(mediato da GTP-asi)

## via endocitica

(ingestione di macromolecole)

attraverso un sistema di m. interne le macromolecole vengono assunte per **ENDOCITOSI** e vengono portati 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**

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

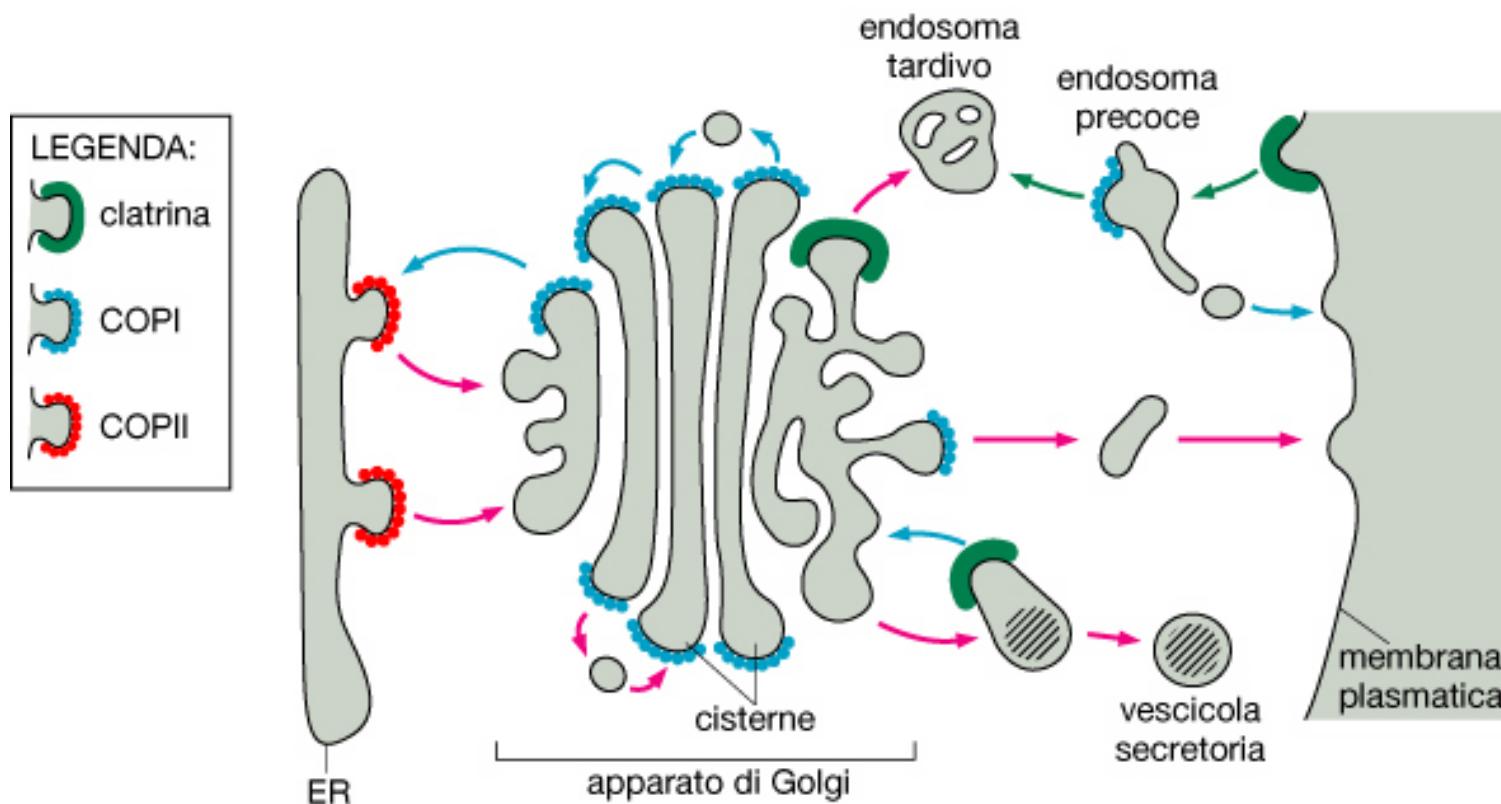
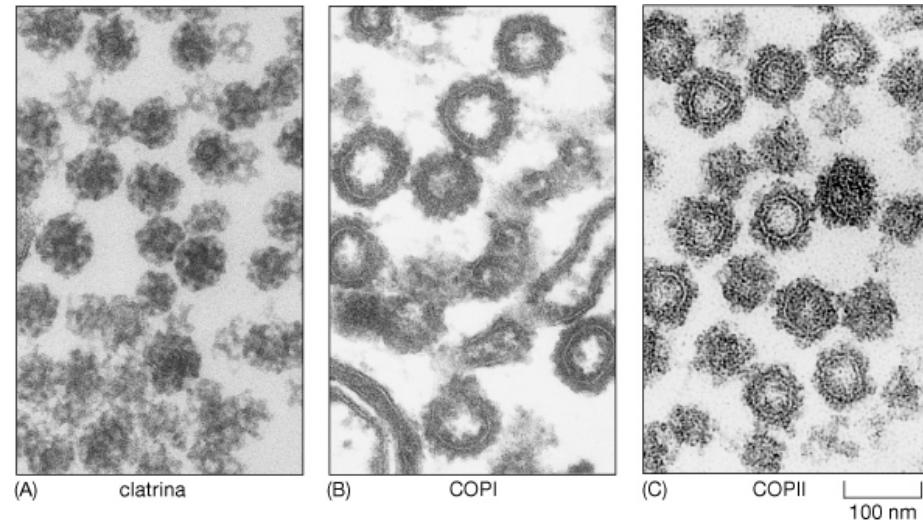
**Il **rivestimento** ha 2 funzioni:**

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

Ne esistono diversi tipi:

- 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



Dopo la gemmazione della vescicola è necessario che il rivestimento venga perduto affinchè la vescicola si fonda con una m. bersaglio appropriata

# I processi di **FUSIONE** di **MEMBRANE** sono mediati da 2 tipi di proteine:

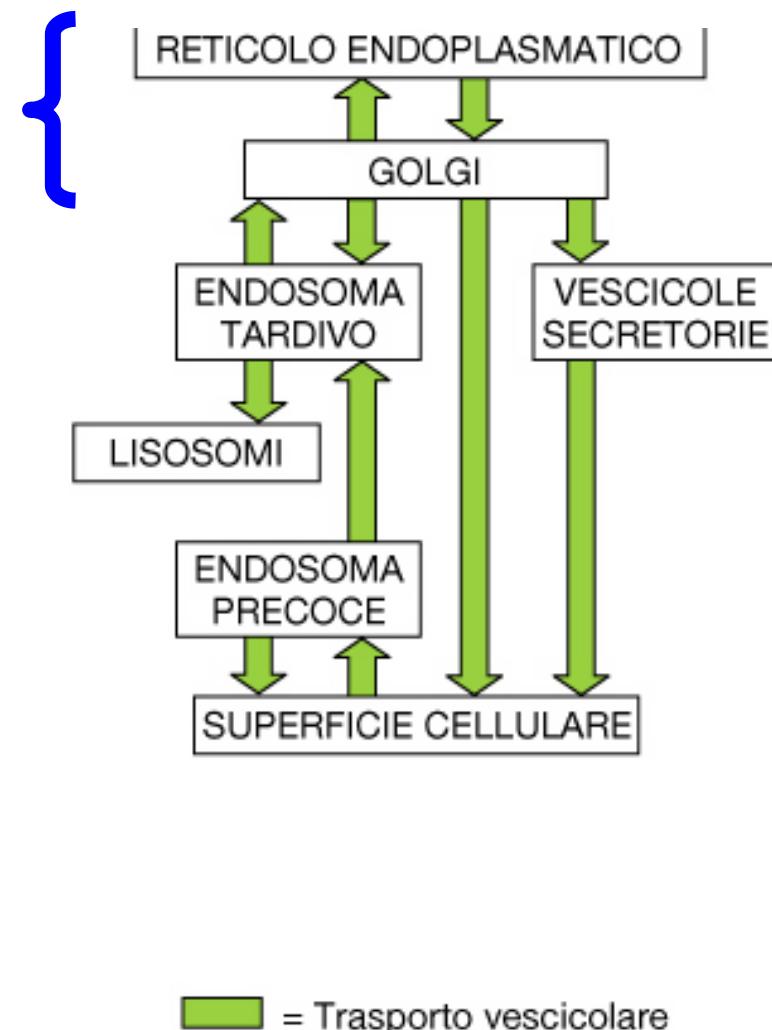
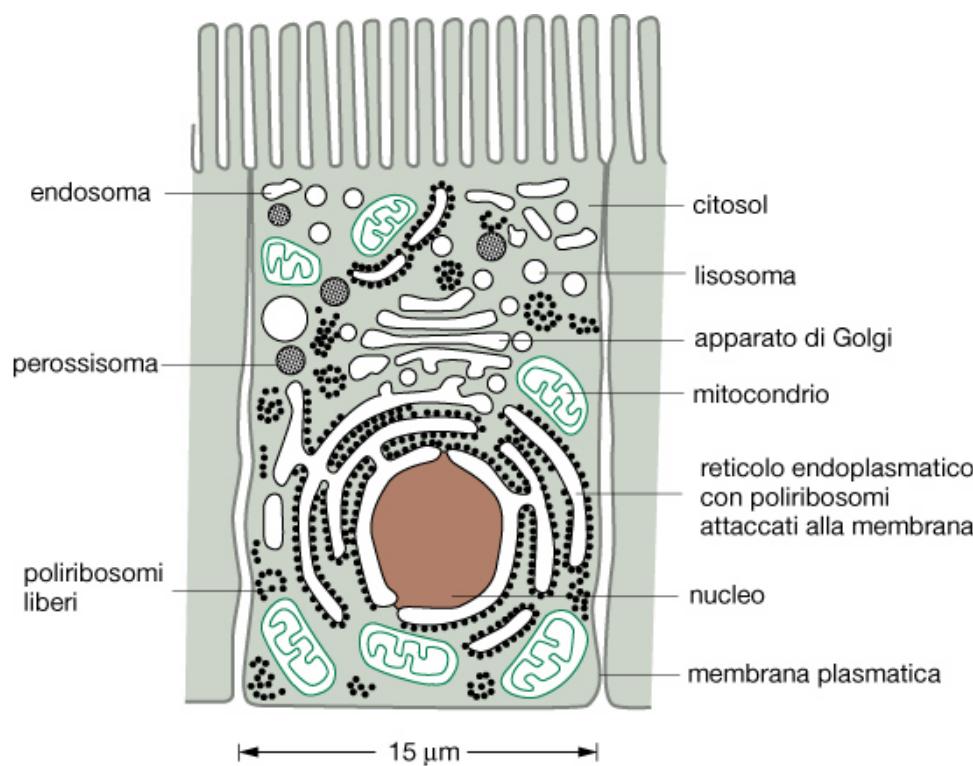
- **SNARE**
- **RAB GTPasi**

Le proteine **SNARE** sono localizzate sulle vescicole (**v-SNARE**) e sulle membrane bersaglio (**t-SNARE**) e interagiscono per formare un complesso stabile che mantiene le vescicole molto vicino alle membrane bersaglio

L'idrolisi di GTP da parte di Rab fornisce l'energia per il processo di fusione delle membrane

## trasporto vescicolare

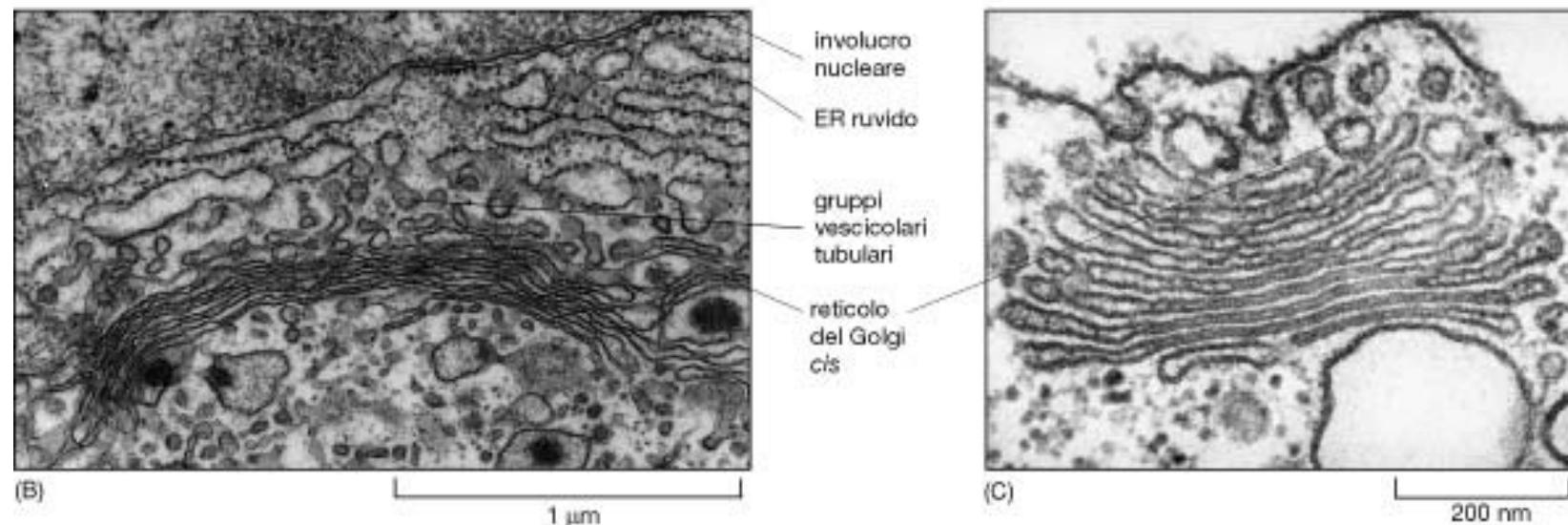
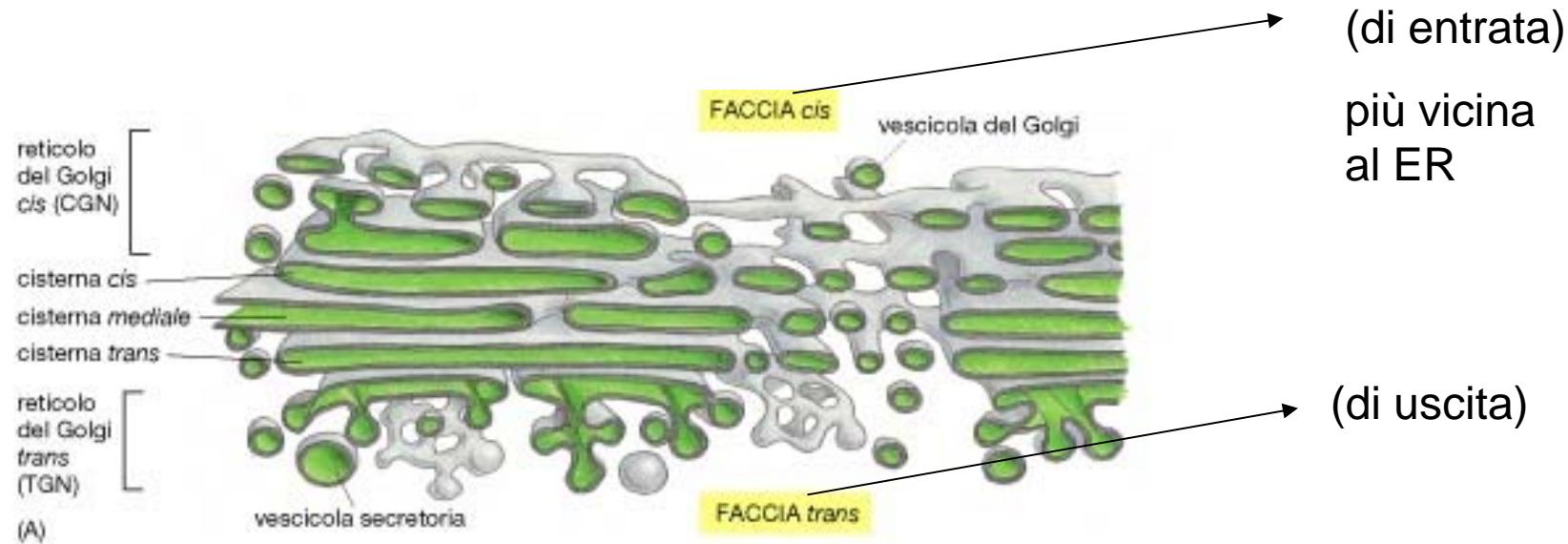
### Trasporto dal ER attraverso l'apparato di Golgi



# Apparato di Golgi

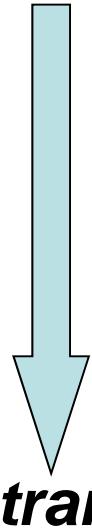
particolarmente abbondante in cellule specializzate per la secrezione

Insieme di cisterne appiattite racchiuse da M



# Compartimentazione funzionale del Golgi

il Golgi modifica e distribuisce le molte proteine e lipidi che riceve dal ER

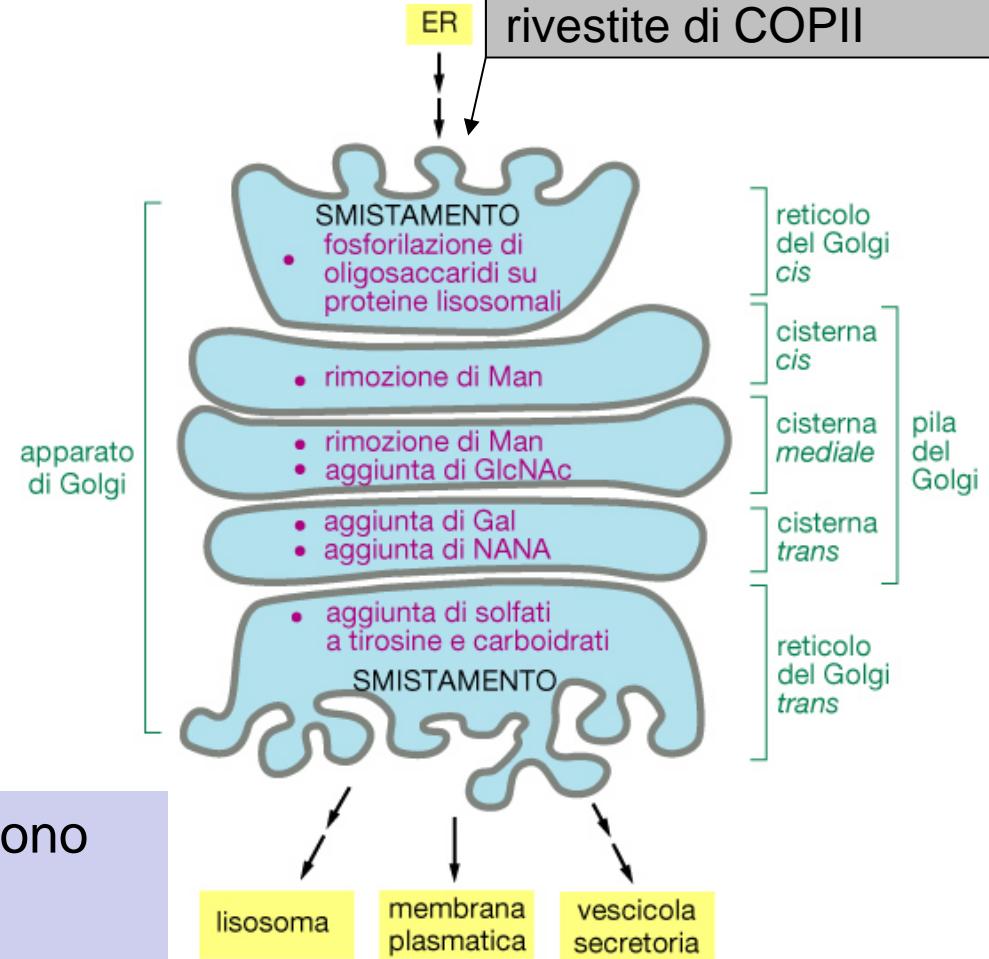
**cis**  


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

(enzimi di modifica-

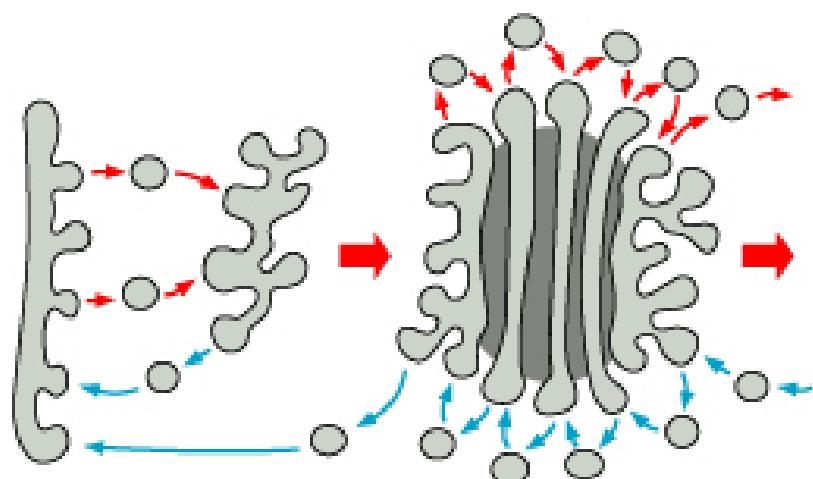
zione)

proteine che lasciano ER in vescicole di trasporto rivestite di COPII

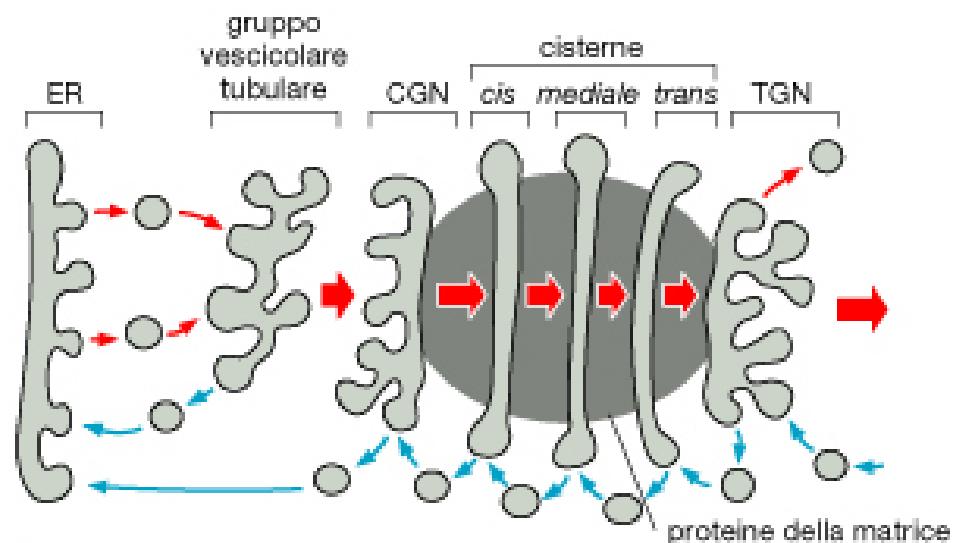


*Solo le proteine ripiegate e assemblate correttamente possono lasciare il ER*

Il trasporto attraverso le cisterne del Golgi può avvenire per **trasporto vescicolare** o per **maturazione delle cisterne**



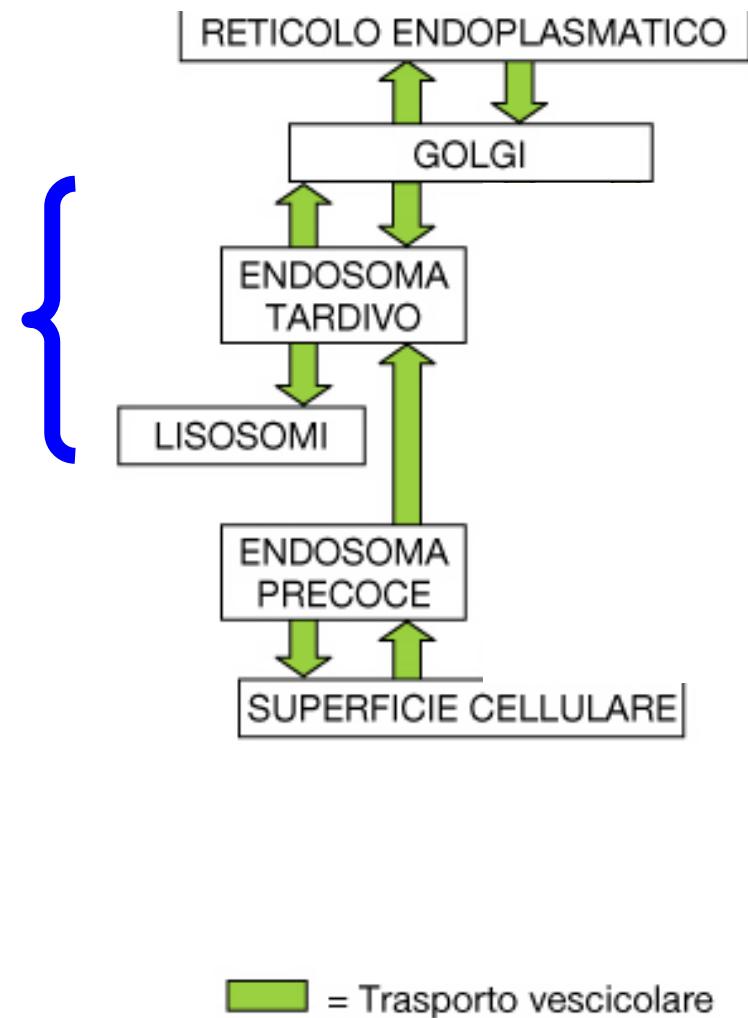
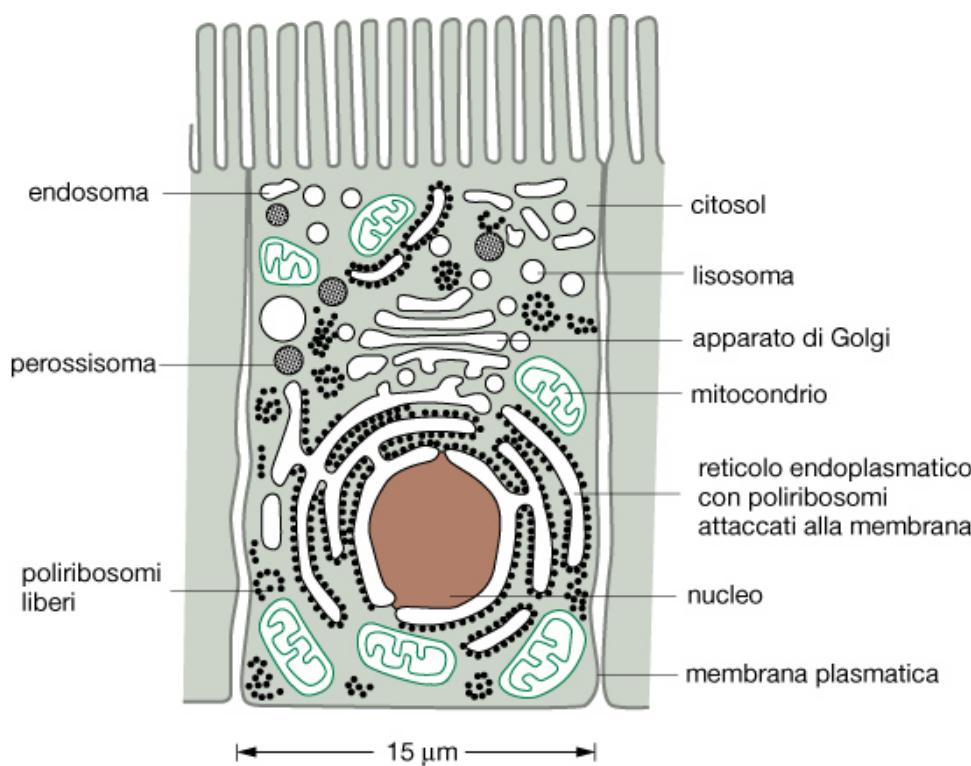
(A) MODELLO DEL TRASPORTO VESCOLARE



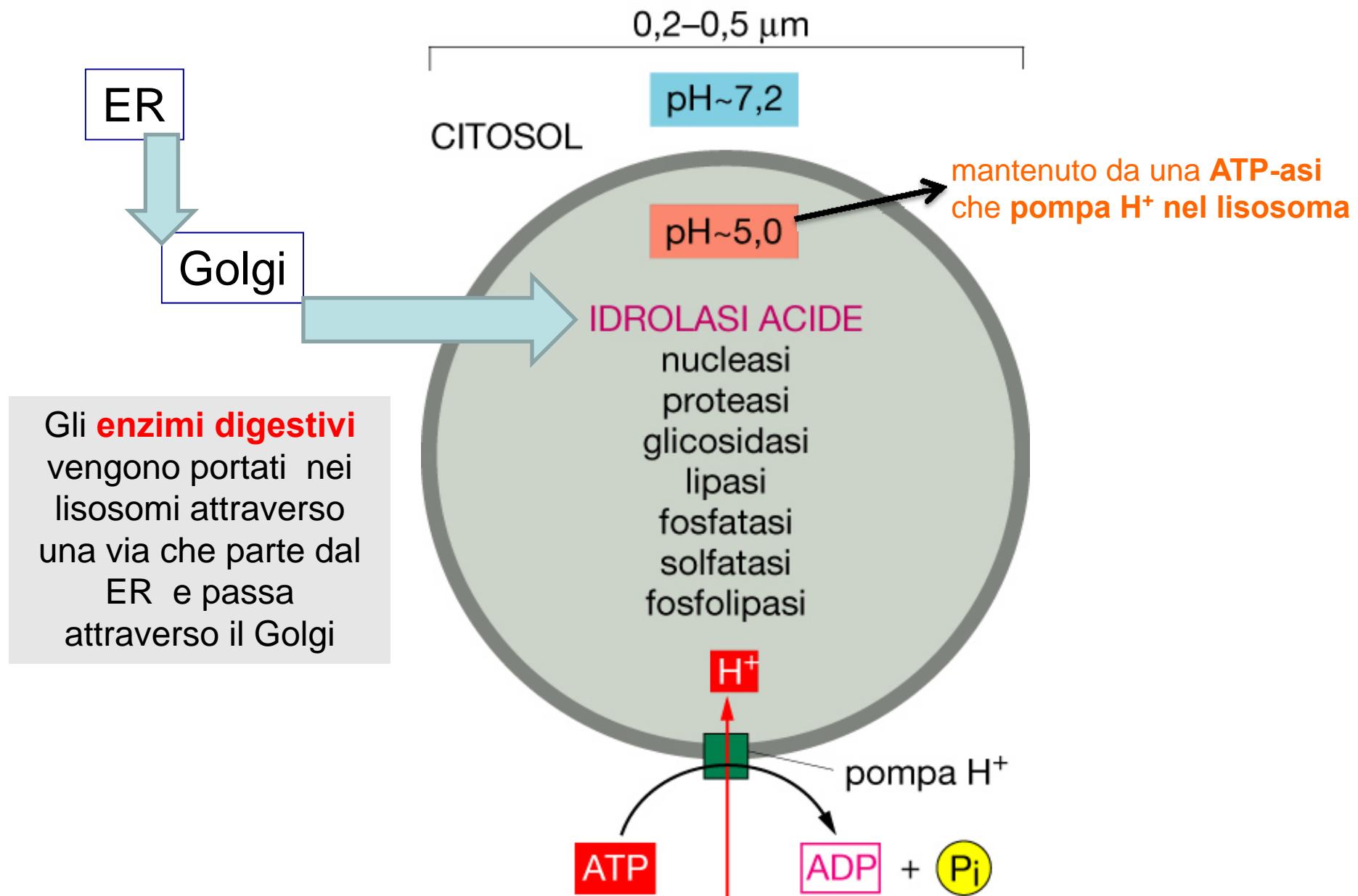
(B) MODELLO DELLA MATURAZIONE DELLE CISTERNE

## trasporto vescicolare

### Trasporto dal Golgi trans ai lisosomi

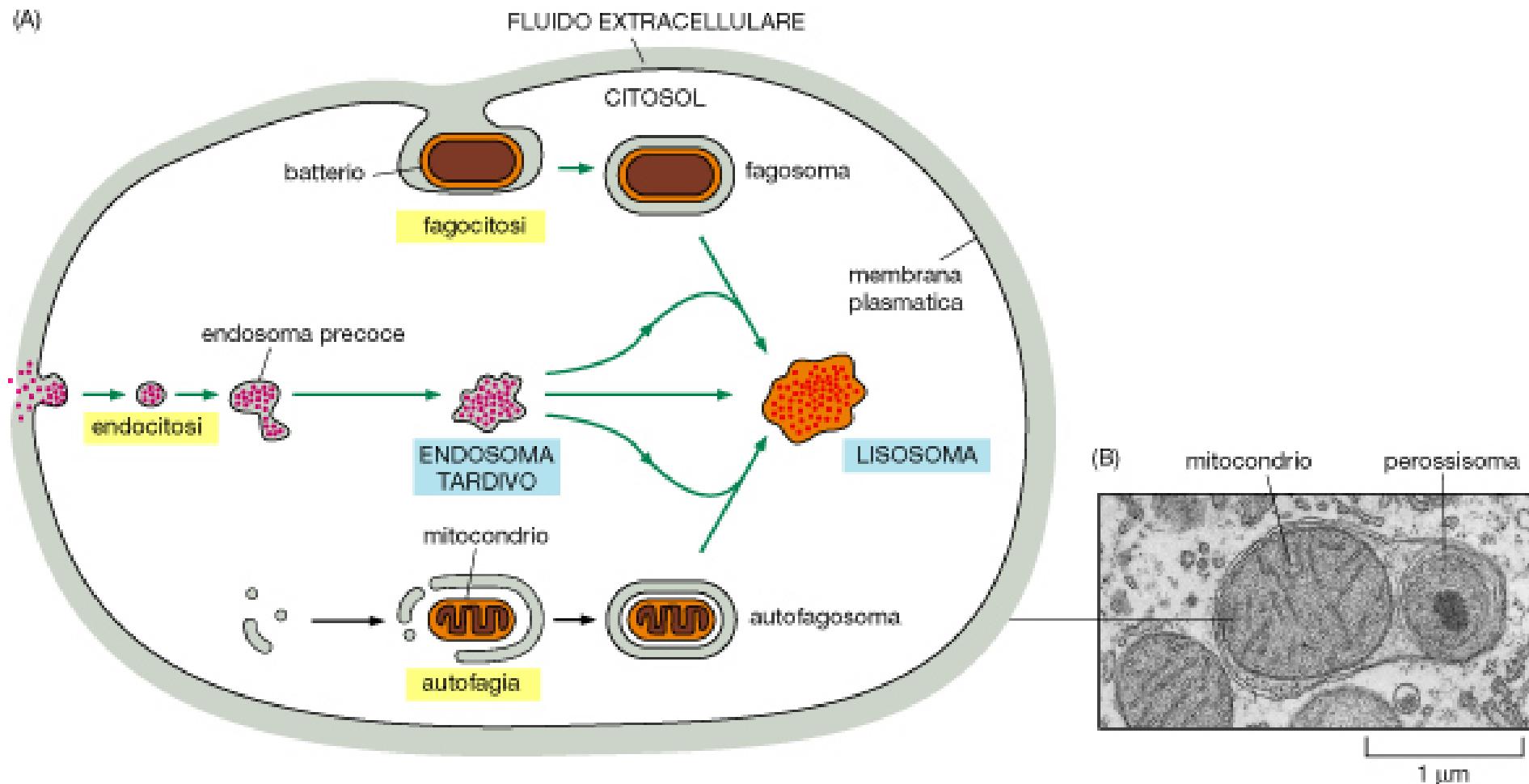


## I lisosomi sono i siti principali di digestione intracellulare



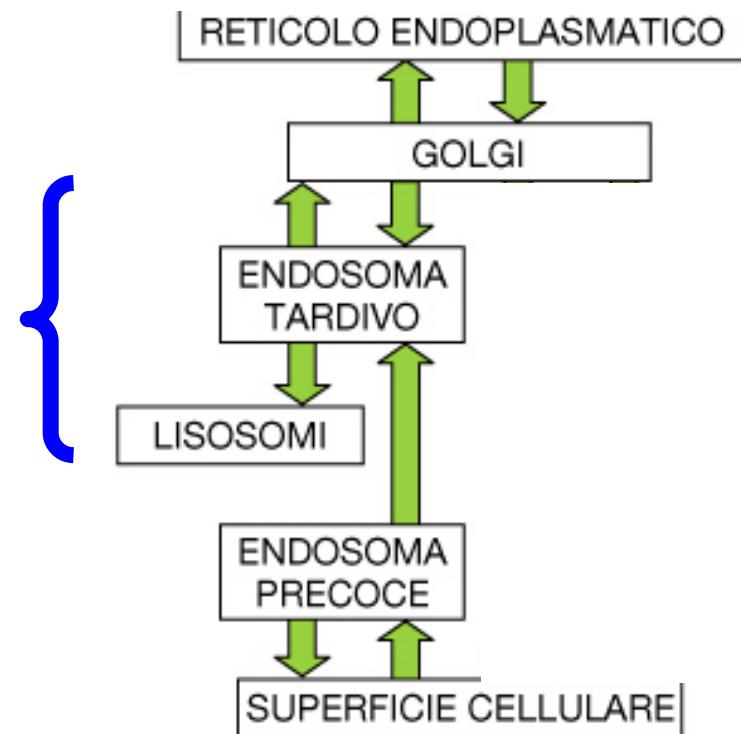
Le **sostanze da digerire** arrivano da almeno 3 vie:  
ciascuna porta alla digestione di materiali derivanti da una fonte diversa

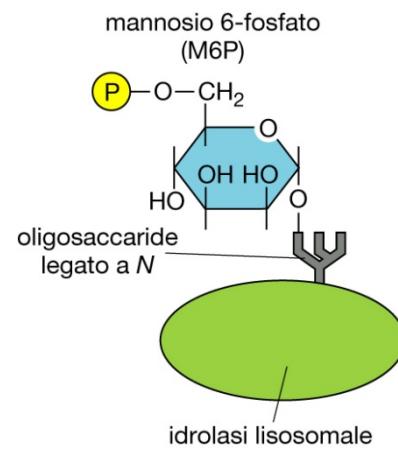
## 3 vie di degradazione dei lisosomi



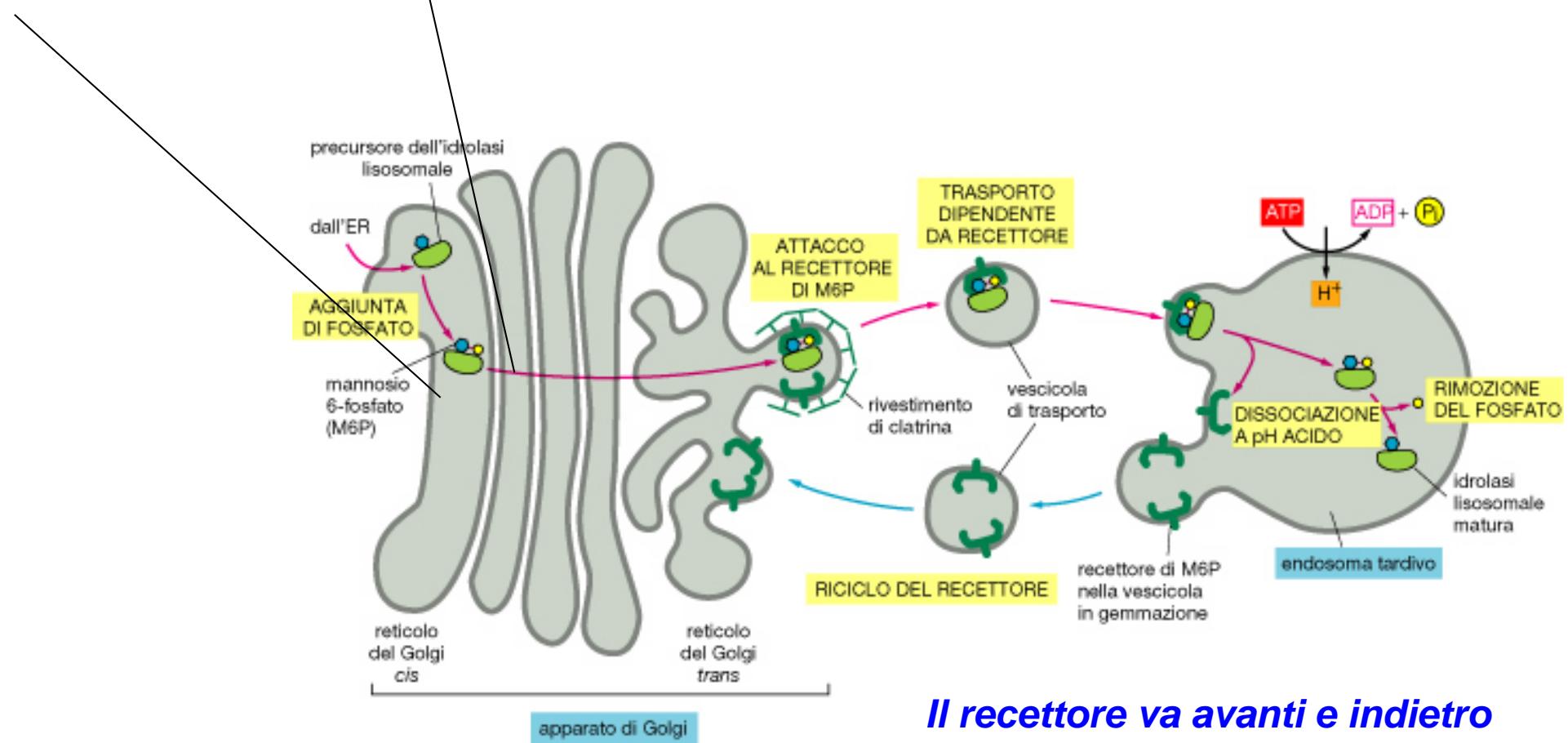
# Via che porta idrolasi lisosomiali e proteine di membrana ai lisosomi

trasporto vescicolare





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



**Il recettore va avanti e indietro**

Il trasporto nella cellula dalla M plasmatica:

## **ENDOCITOSI**

In base alle dimensioni della vescicola endocitica vengono distinti **2 tipi principali di endocitosi**:

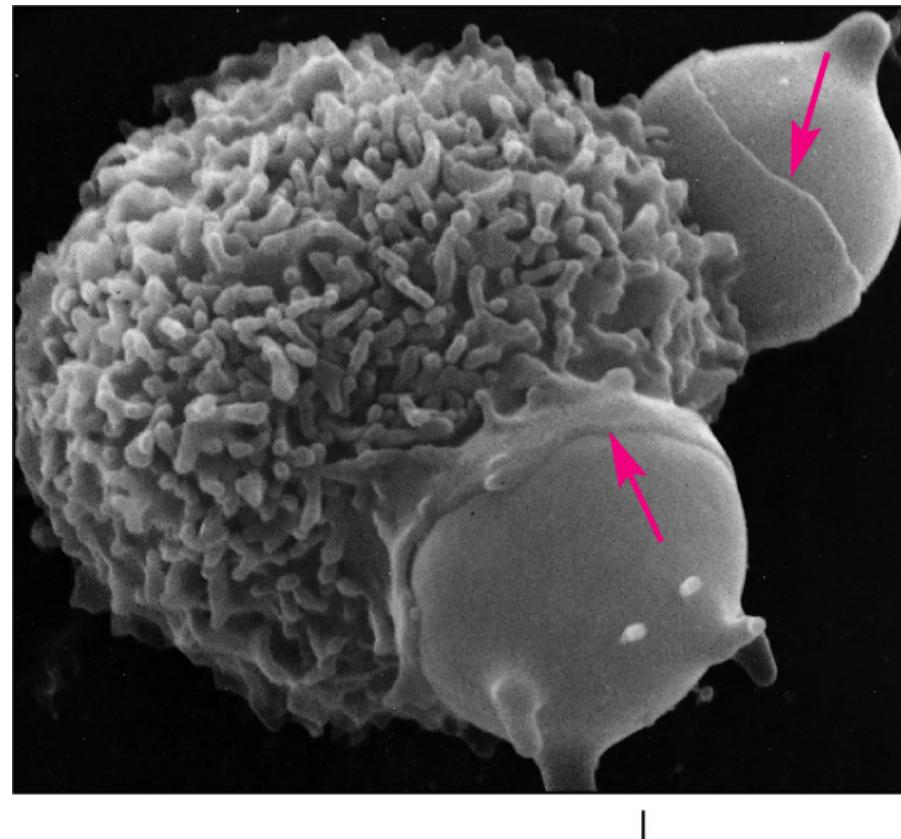
• **Fagocitosi**: ingestione di grosse particelle, come microrganismi o cellule morte, tramite fagosomi (>250 nm di diametro)

• **Pinocitosi**: ingestione di fluidi e di soluti tramite piccole vescicole pinocitiche (circa 100 nm di diametro)

## 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 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**

- difesa dalle infezioni tramite ingestione dei microrganismi invasori



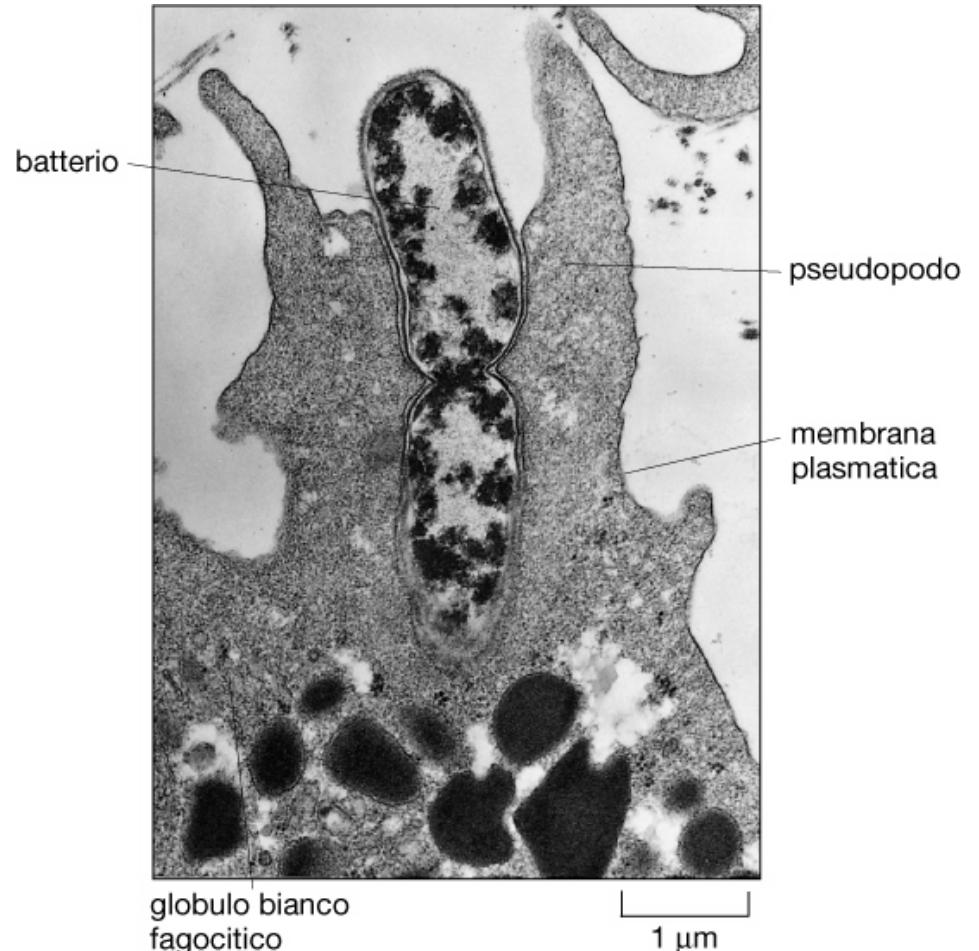
*Fagocitosi da parte di un macrofago* 5  $\mu$ m

- rimozione di cellule senescenti o morte per apoptosi

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

**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**

## Fagocitosi da parte di un neutrofilo



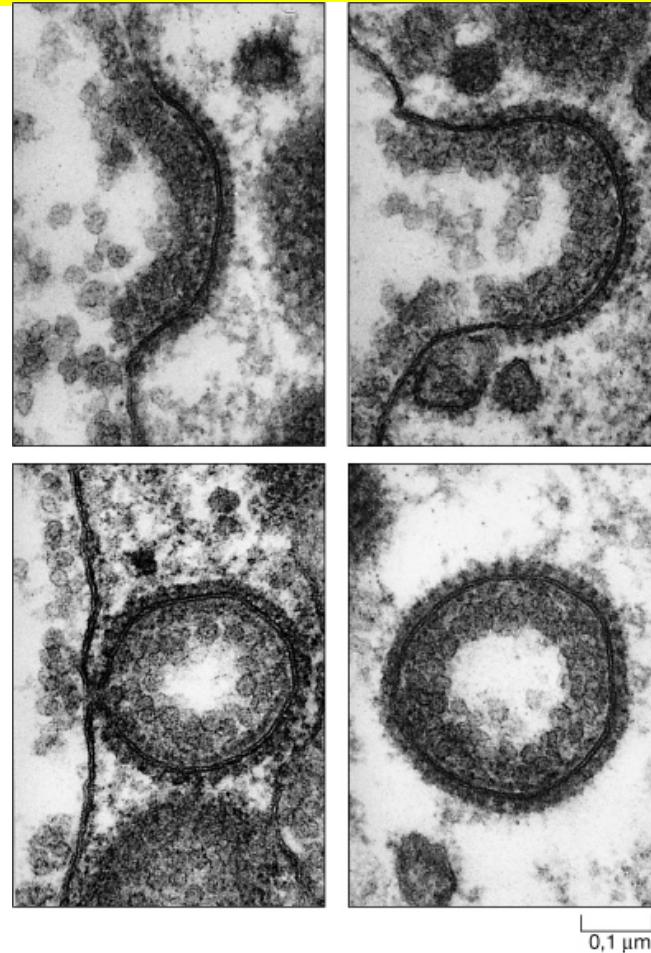
I **segnali di attivazione** meglio caratterizzati sono gli **ANTICORPI** che ci proteggono legandosi alla superficie dei microrganismi infettivi.

Questo *rivestimento* degli anticorpi è riconosciuto da **recettori presenti sulla superficie dei macrofagi e dei neutrofili** 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 apoptosis)

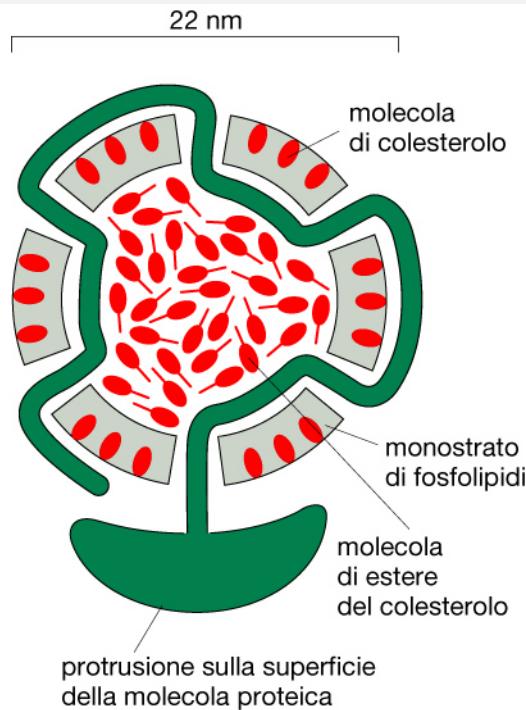
Le vescicole pinocitiche si formano da **fosse rivestite di clatrina** nella M plasmatica



*la vita di una fossa rivestita da clatrina è breve:*

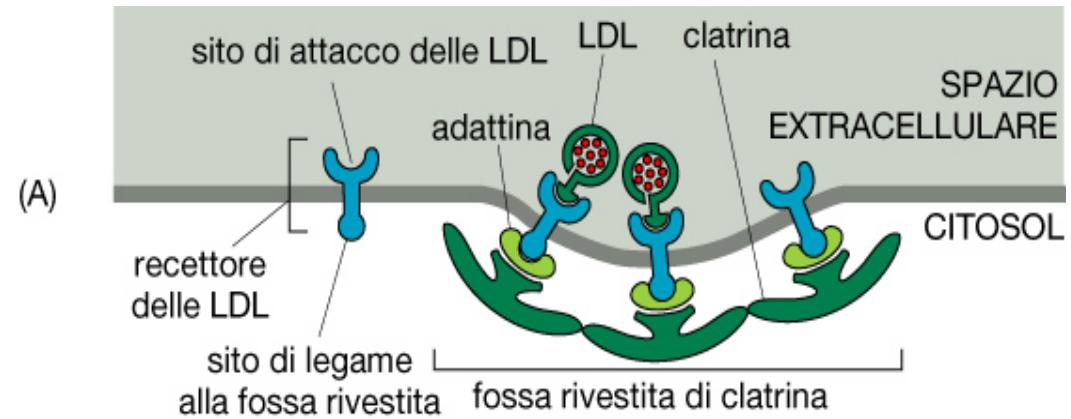
- nel giro di 1 minuto dalla sua formazione si invagina nella cellula e si distacca formando una **vescicola rivestita di clatrina***
- dopo pochi secondi dalla formazione perdono il loro rivestimento e si fondono con gli endosomi precoci*

Il C. è trasportato nel sangue sotto forma di **particella lipoproteica**:  
LIPOPROTEINA A BASSA DENSITÀ (LDL)

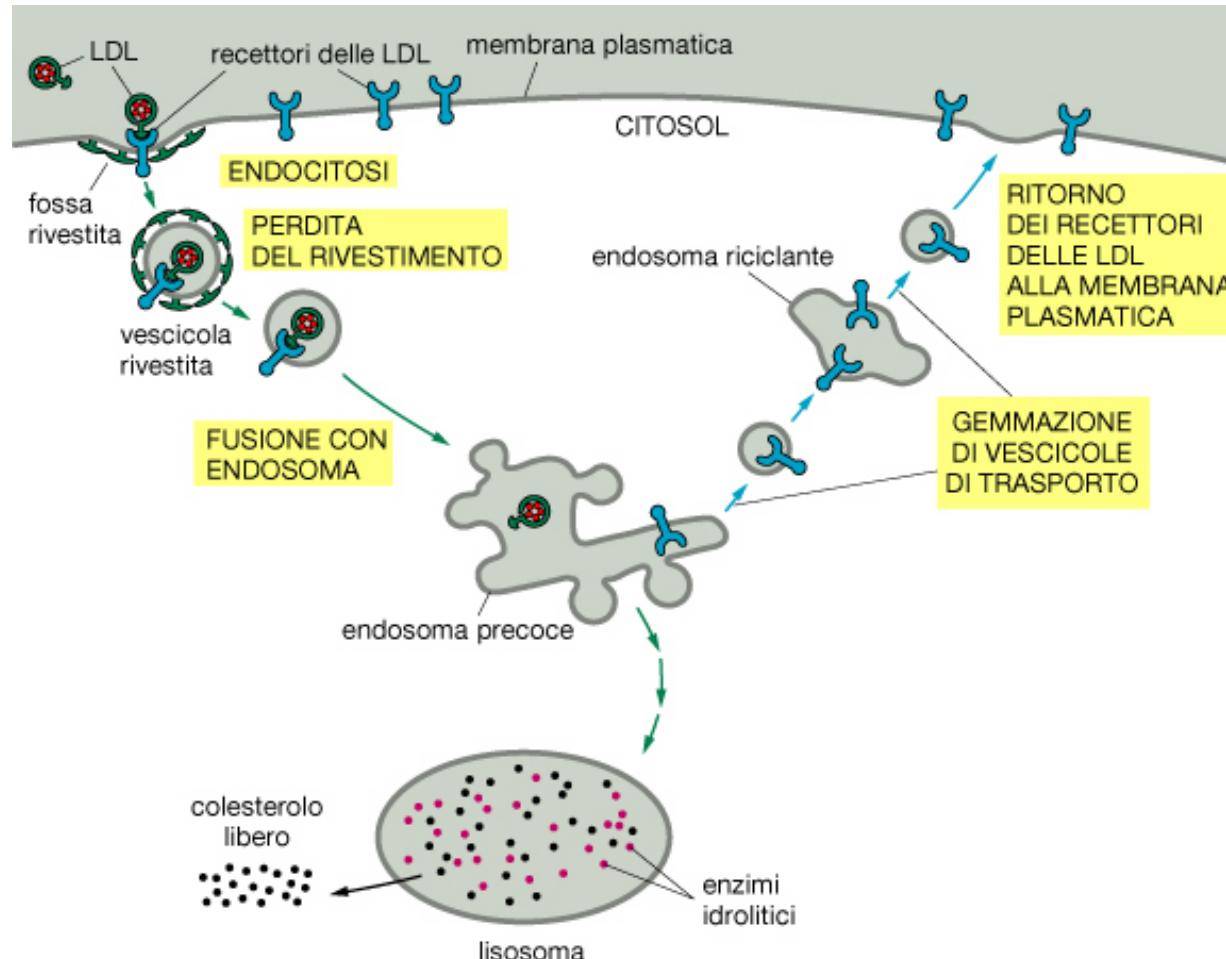


## ENDOCITOSI MEDIATA DA RECETTORE

(es. assunzione di colesterolo)



- 1) Quando una cellula ha bisogno di colesterolo per fare le membrane produce **recettori per le LDL** che si legano ad una fossa rivestita nella m. plasmatica



2) le particelle LDL vengono **internalizzate nelle vescicole di clatrina** che portano il loro contenuto agli **endosomi precoci**

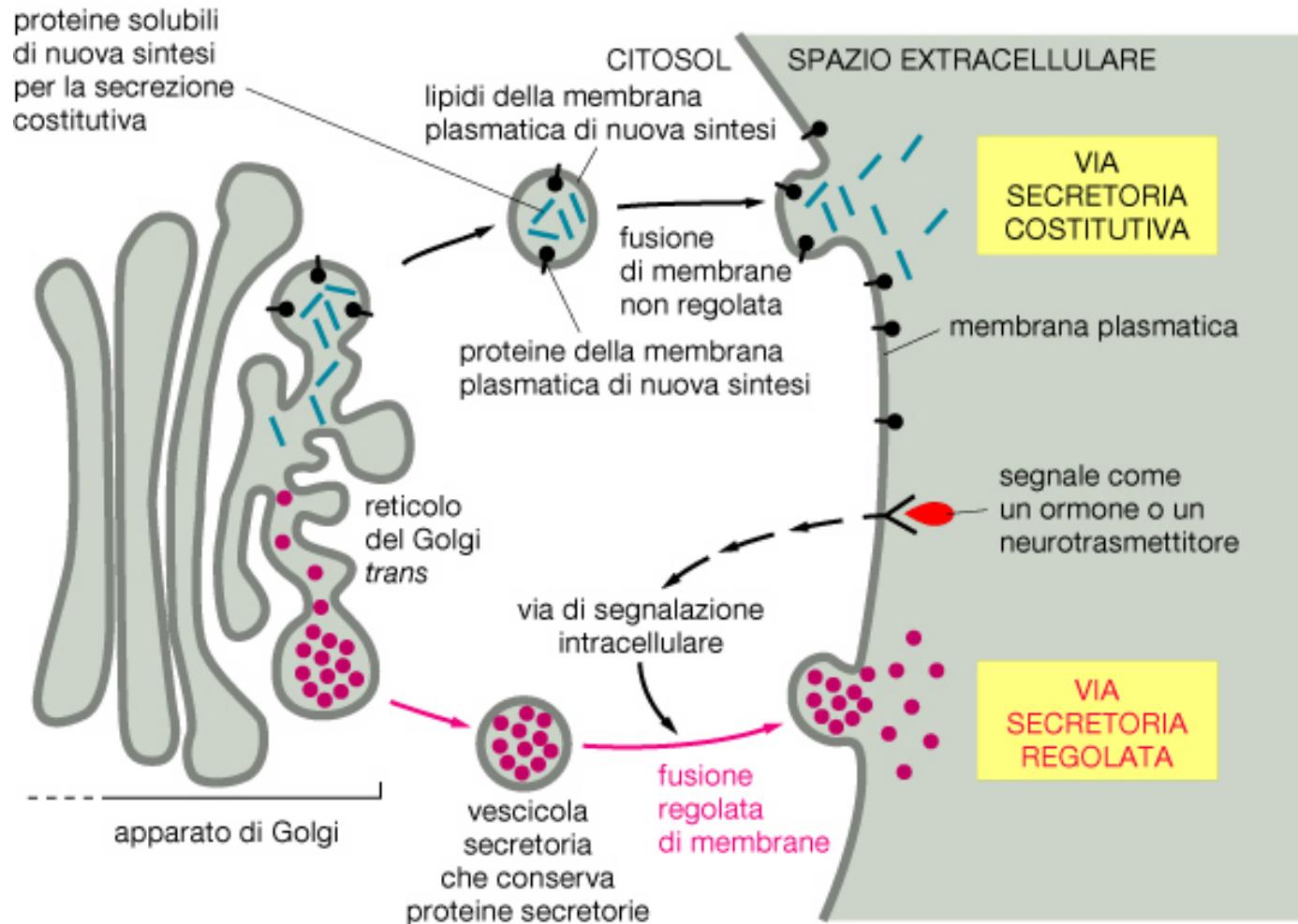
3) **endosomi tardivi** → **lisosomi** (idrolisi) → **colesterolo libero**

se l'assunzione è bloccata il colesterolo si accumula nel sangue → formazione nei vasi sanguigni delle **PLACCHE ATERIOSCLEROTICHE**

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

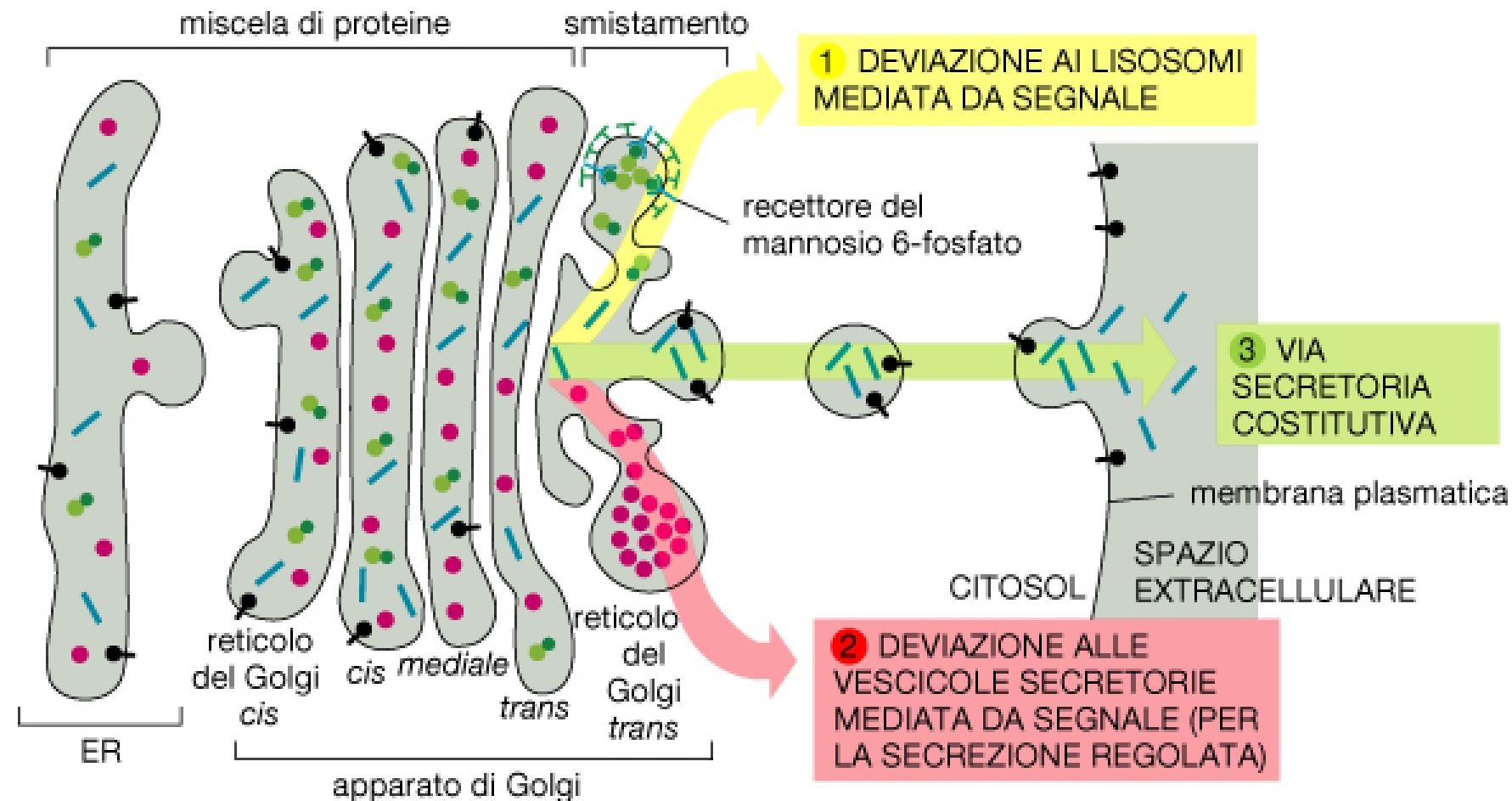
- Tutte le cellule richiedono una **via secretoria costitutiva**
- Cellule specializzate dispongono anche di una **via secretoria regolata**  
*(proteine ed altre sostanze solubili sono conservate temporaneamente in vescicole secretorie per il successivo rilascio)*

# 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 secretoria costitutiva: cellule polarizzate e non polarizzate**

# La formazione di vescicole sinaptiche

## Possono formarsi direttamente da vescicole endocitiche

Il neurotrasmettore è importato direttamente nelle piccole vescicole endocitiche  
(antiporti spinti da un gradiente di  $H^+$  mantenuto da pompe protoniche presenti nella m. delle vescicole)

