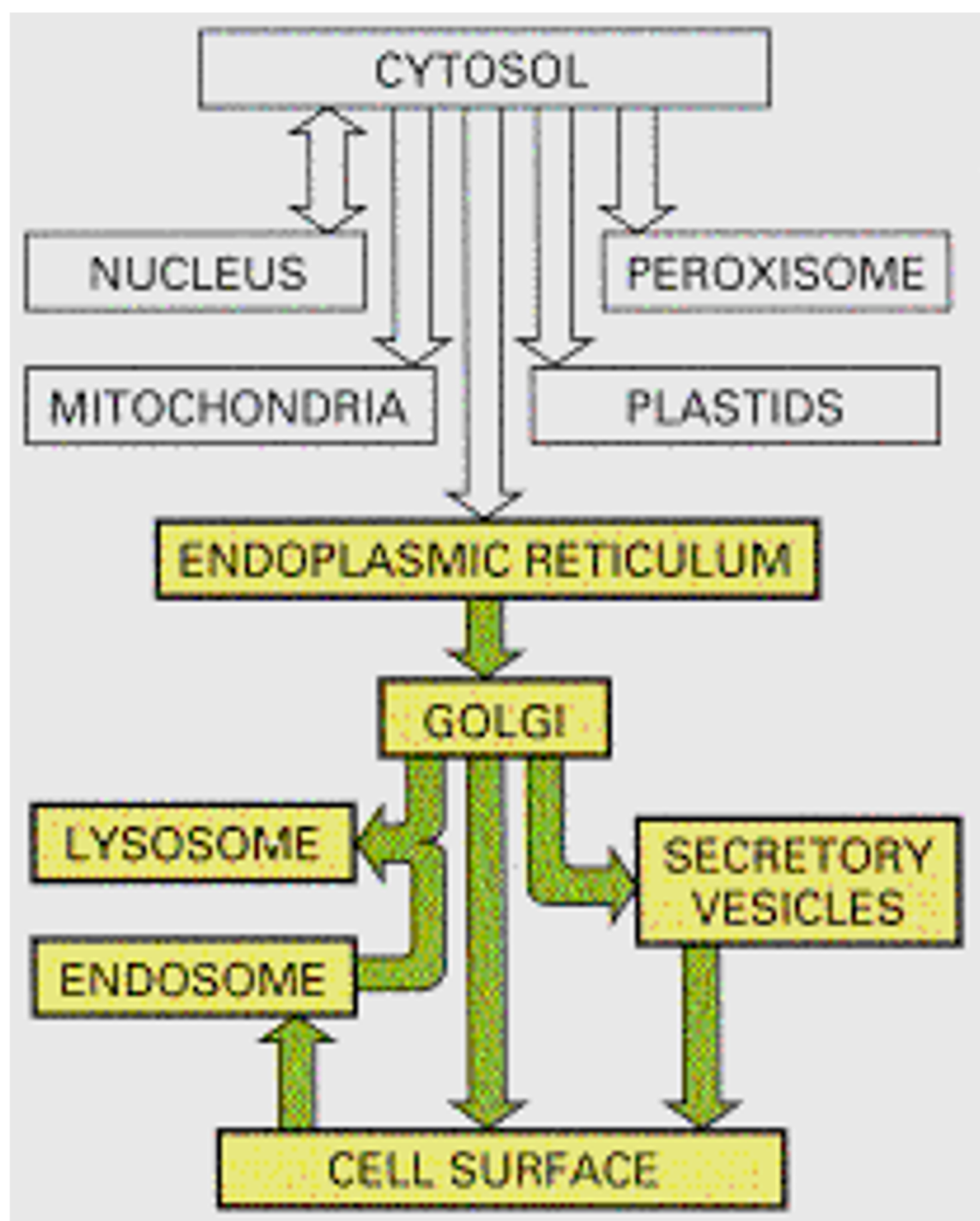


IL TRAFFICO VESCICOLARE

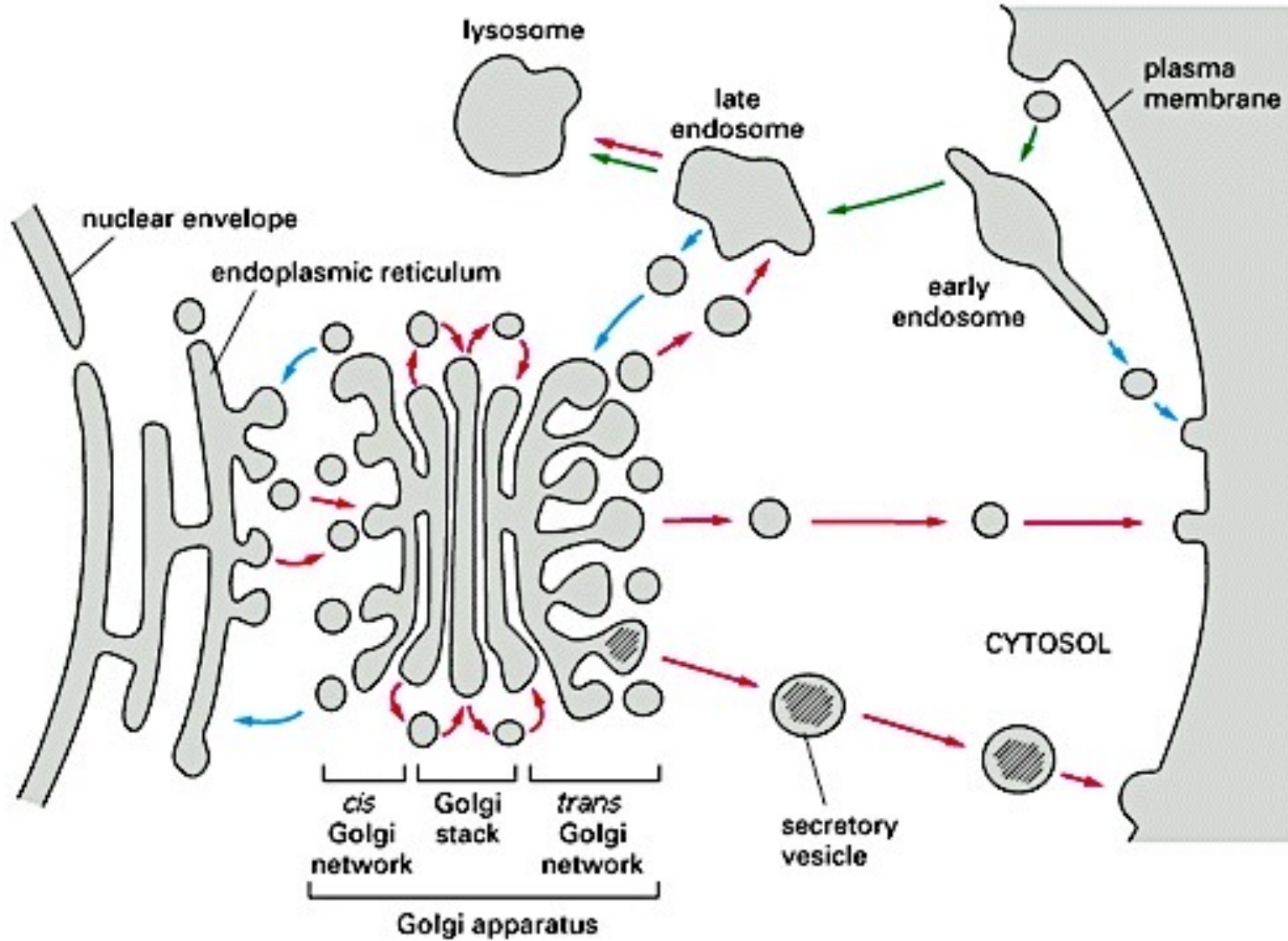
Alberts, cap. 13

Lewin, cap. 4

Karp, cap. 8

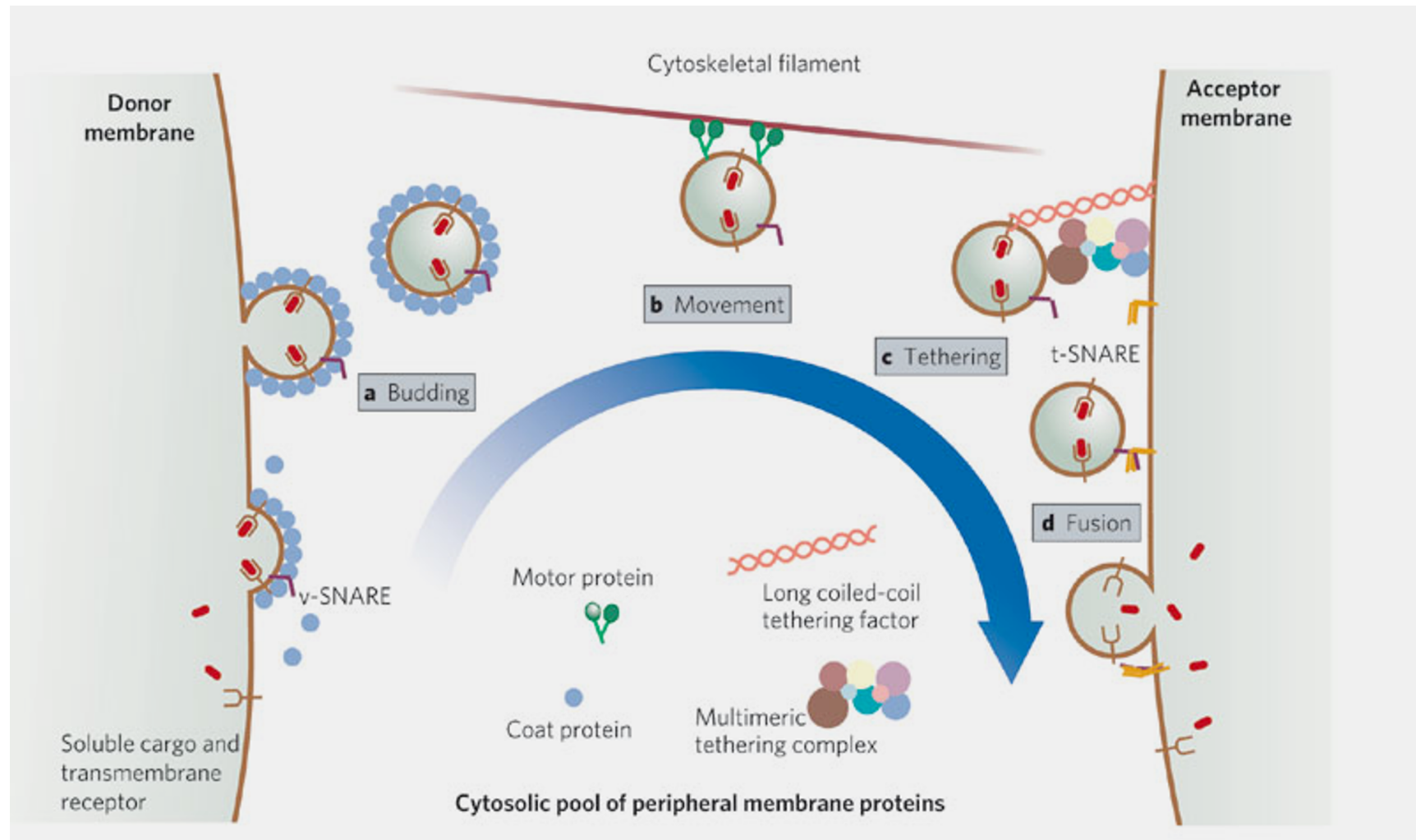


Il traffico vescicolare è richiesto per trasportare le proteine da un comparto membranoso all'altro all'interno della via secretoria



Le vescicole gemmano dalla membrana dell'organello di partenza venendo ricoperte da un **rivestimento proteico**.

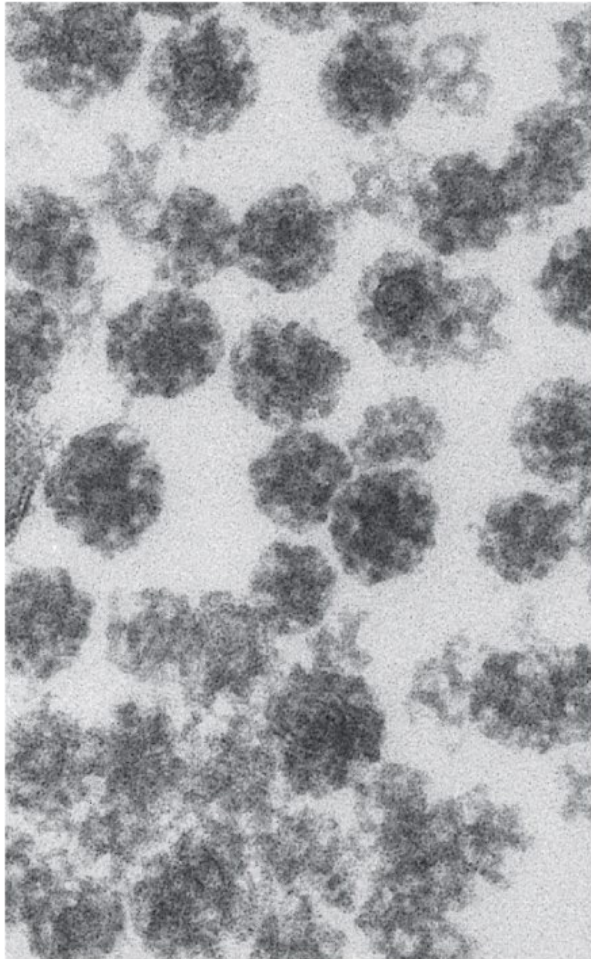
Il rivestimento viene perso, e le vescicole vengono trasportate verso l'organello di destinazione. Le vescicole vengono quindi riconosciute da un **complesso antenna**, che permette loro l'avvicinamento alla membrana dell'organello di destinazione. Lì giunta, la vescicola fonde il suo doppio strato lipidico con quello della membrana dell'organello di destinazione, liberando così il suo contenuto.



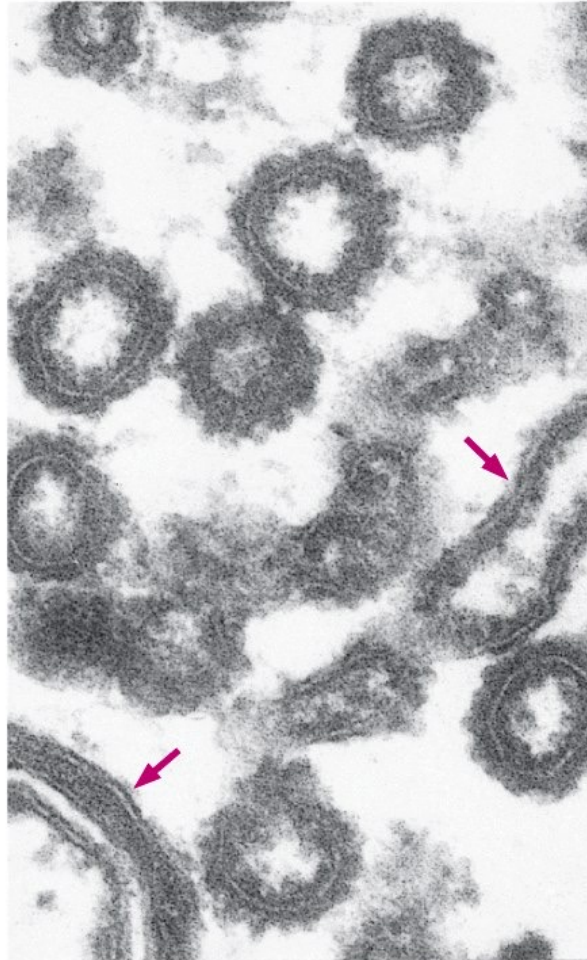
PROCESSO	EVENTI RICHIESTI	COMPONENTI MOLECOLARI
GEMMAZIONE	Assemblaggio dei complessi ligando-recettore e del rivestimento	<ul style="list-style-type: none"> • Rivestimento (COP I o II o Clatrina) • GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) • GTPasi (Sar-1, ARF, Rab) • Fosfoinositoli
TRASPORTO	Interazione con citoscheletro	Dineine, Chinesine, Microtubuli
RICONOSCIMENTO E AGGANCIAMENTO	Formazione complessi riconoscimento e trans-SNARE stabili	<ul style="list-style-type: none"> • Complessi di riconoscimento • Rab • Fosfoinositoli
FUSIONE	Formazione di complessi fusogeni	<ul style="list-style-type: none"> • SNARE • Altre proteine regolatrici (ad es. Complexina)

I rivestimenti delle vescicole

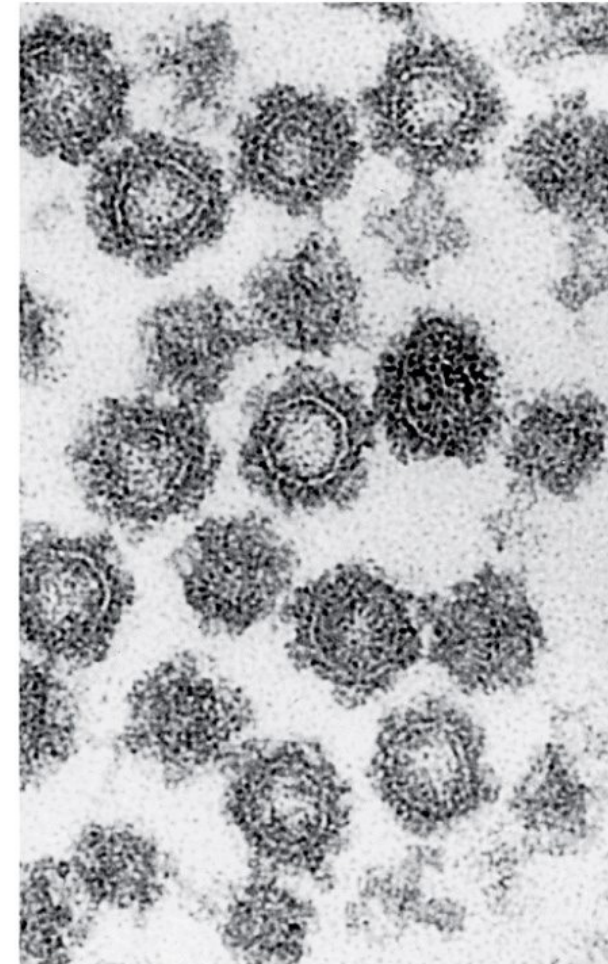
I rivestimenti delle vescicole servono ad impedire alle vescicole di fondersi di nuovo con la membrana che li ha generati



(A) clathrin
50nm



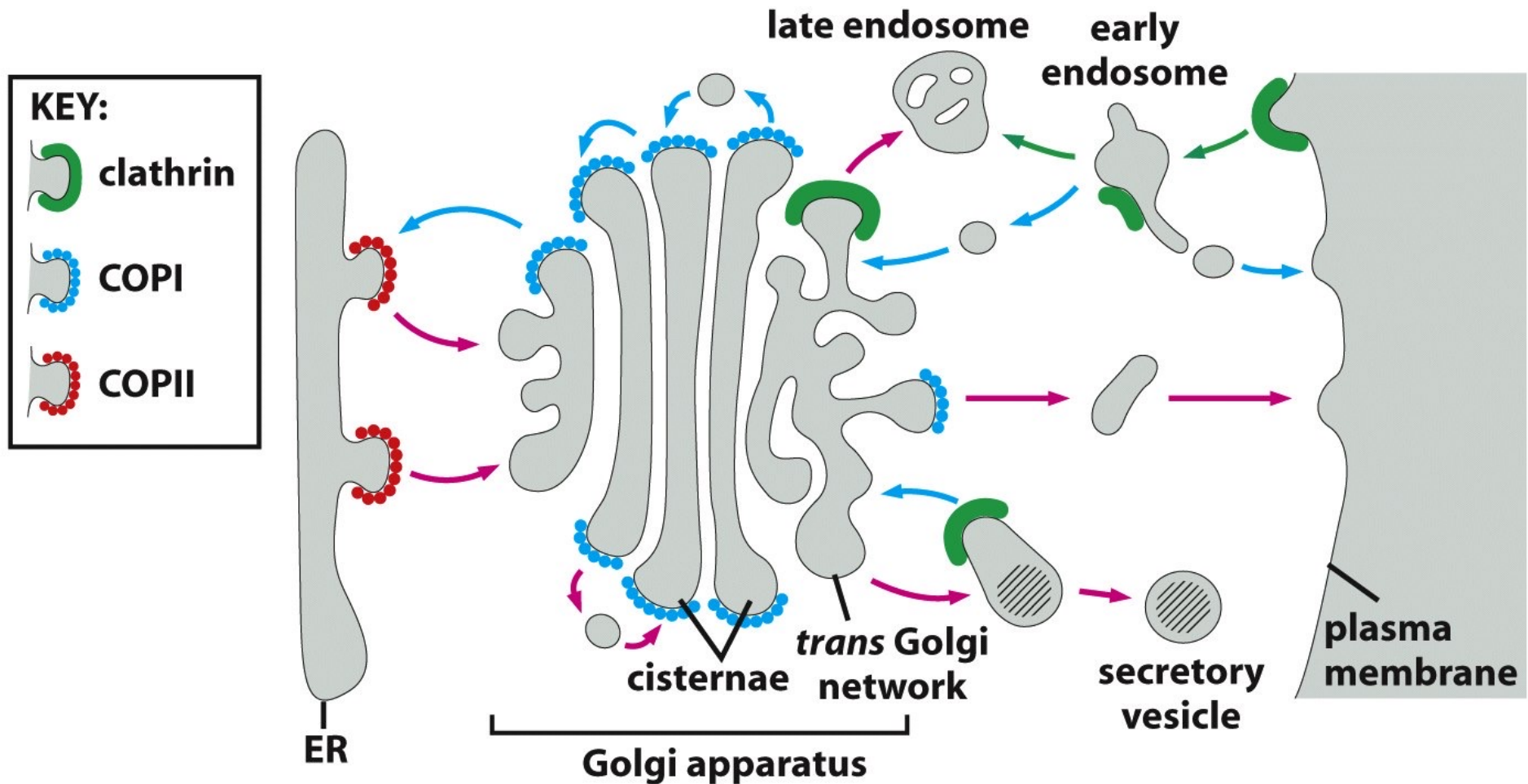
(B) COPI
100nm



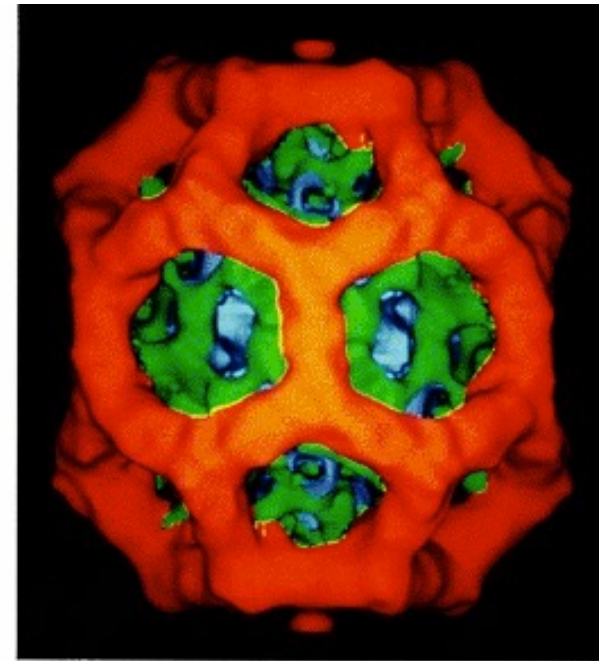
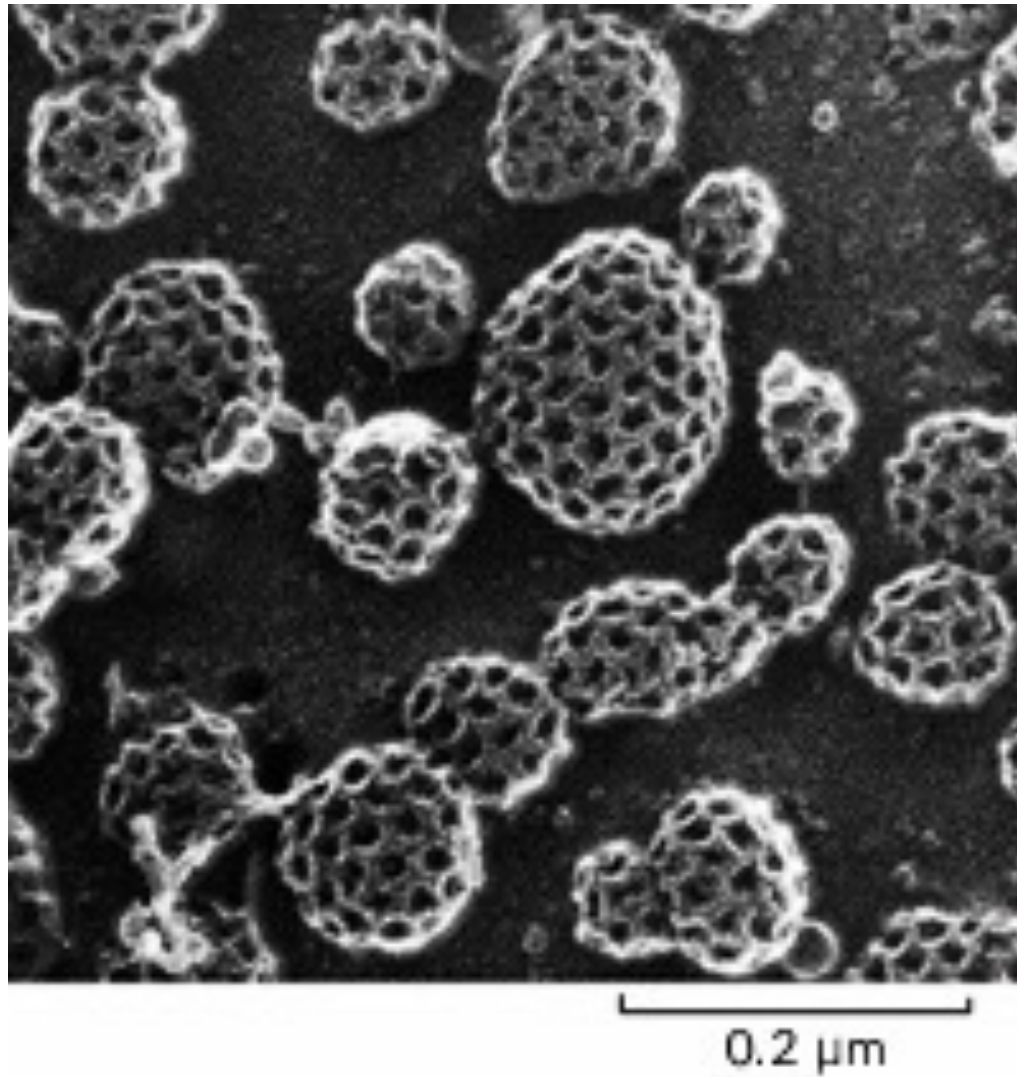
(C) COPII
50-90nm
100 nm

I rivestimenti delle vescicole

- Le vescicole rivestite da **COPII** gemmano esclusivamente dal RE per andare al Golgi
- Le vescicole rivestite da **COPI** gemmano dal Golgi per andare al RE, al Golgi stesso (flusso retrogrado) e alla membrana plasmatica. Anche i tubuli responsabili del trasporto anterogrado e retrogrado sono rivestiti da COPI.
- Le vescicole rivestite da **clatrina** possono gemmare: 1) dal trans-Golgi network dirette all'endosoma tardivo (maturazione in lisosoma); 2) dalla membrana plasmatica dirette all'endosoma precoce (endocitosi); 3) dall'endosoma precoce verso il Golgi; 4) dalle vescicole secretorie (secrezione regolata) al Golgi;

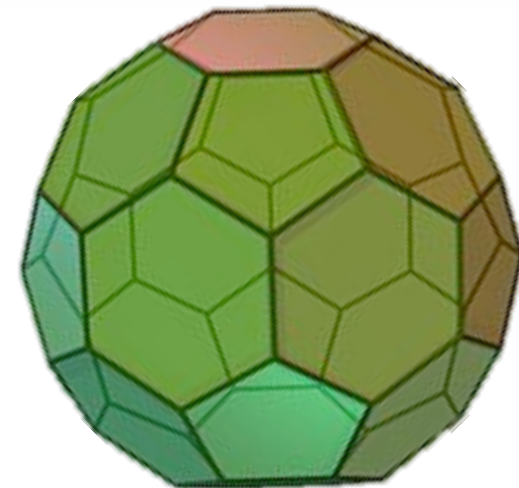


Il rivestimento di clatrina è a forma di icosaedro troncato

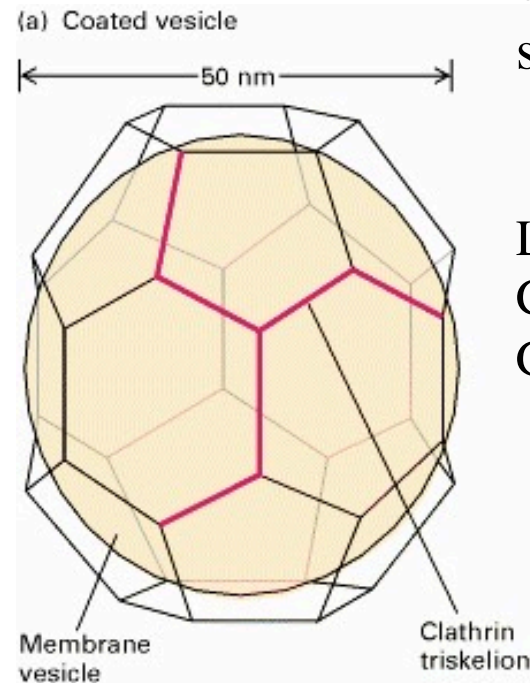
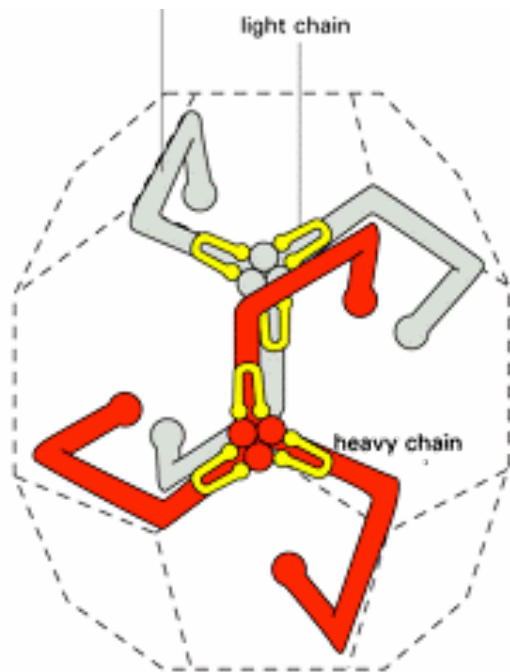
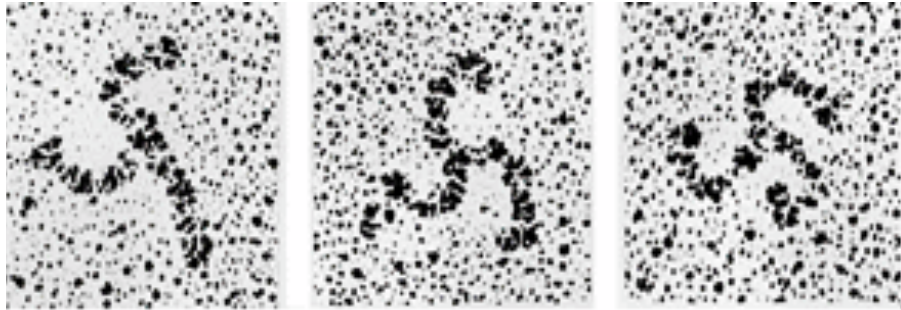


(C)

50 nm



La clatrina è formata da catene pesanti e leggere, che vanno a comporre dei trimeri detti **trischeli**

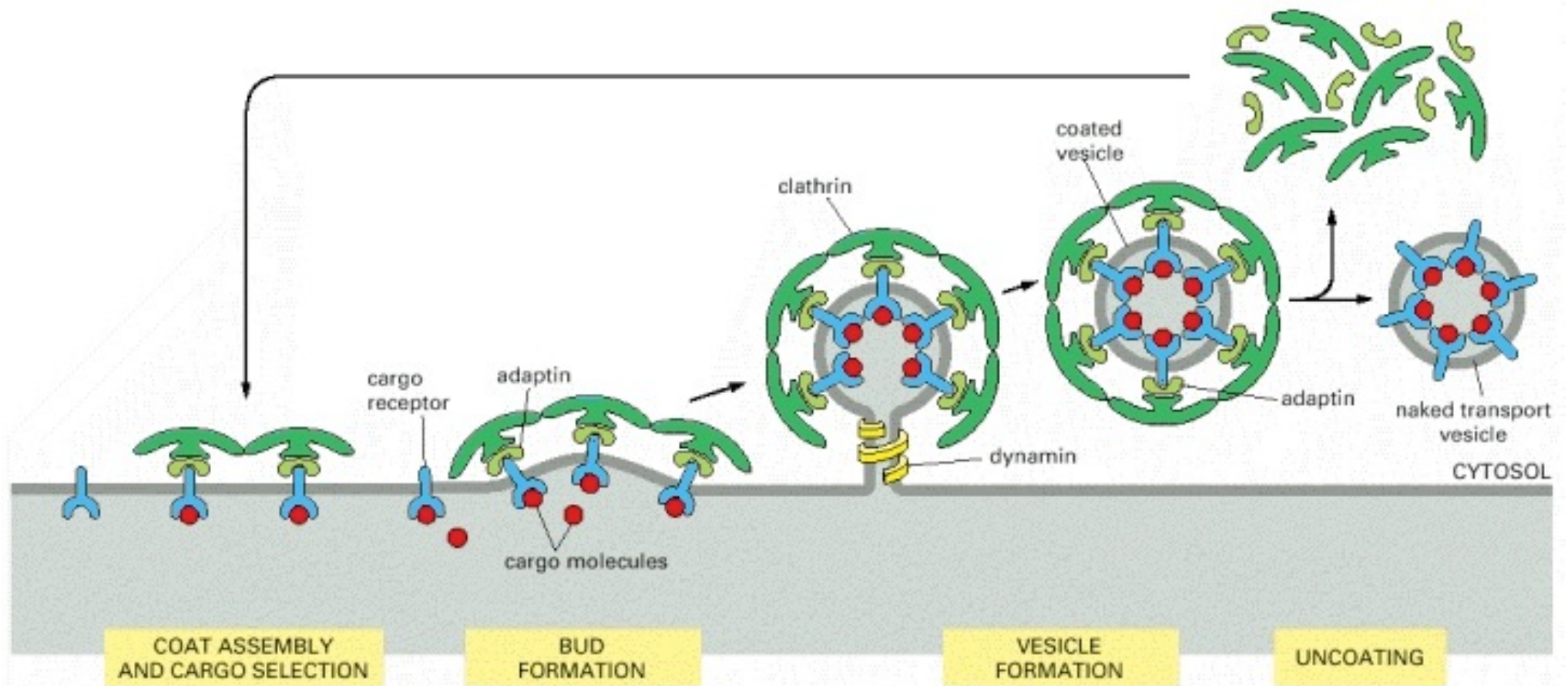


I trischeli poi si combinano tra loro andando a costruire la struttura del rivestimento

Il legame delle molecole di clatrina è cooperativo: il legame è favorito se se ne assemblano più di due

L'assemblaggio del rivestimento di Clatrina non richiede né le piccole GTPasi né energia

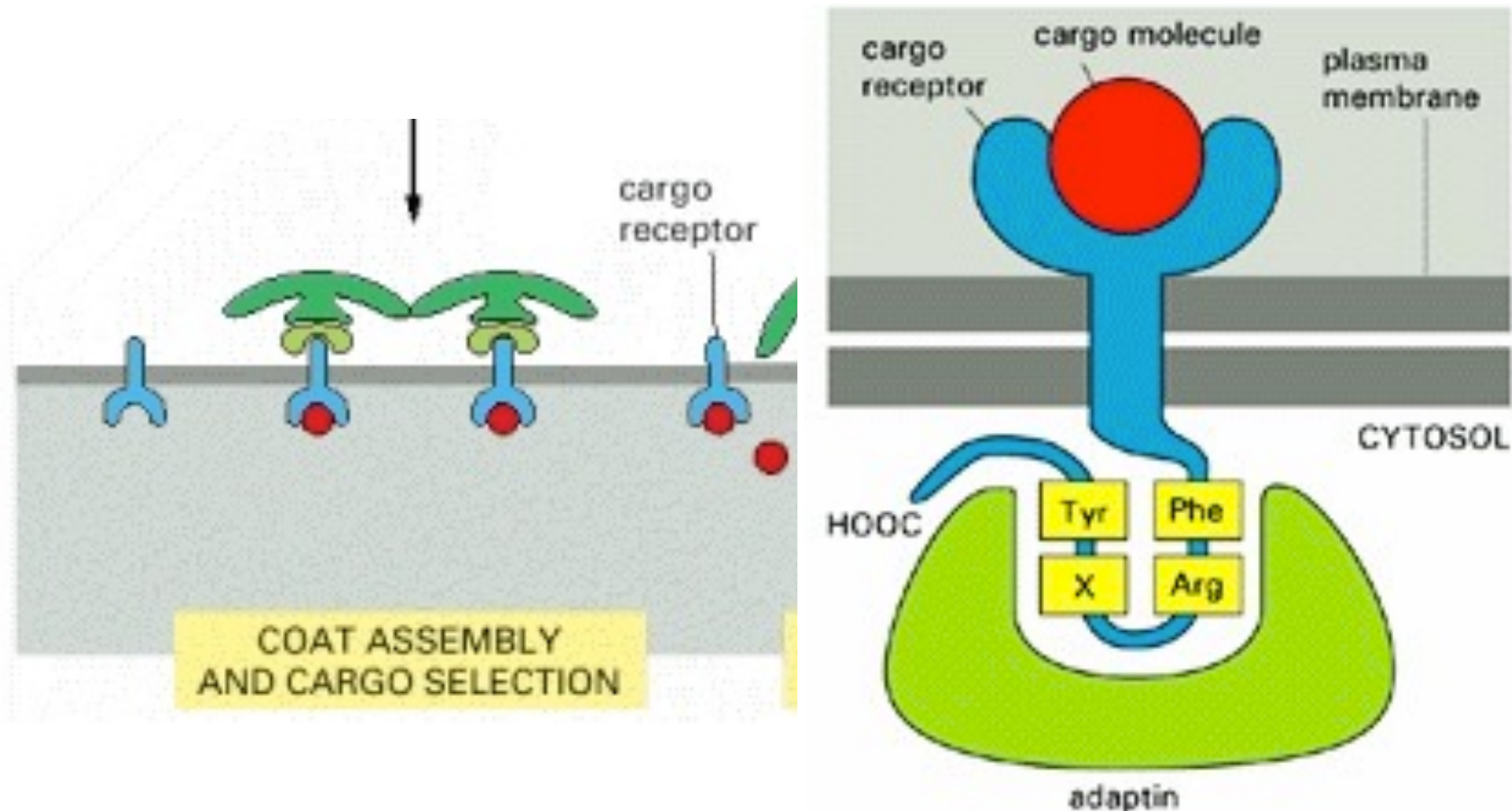
Formazione del rivestimento di clatrina



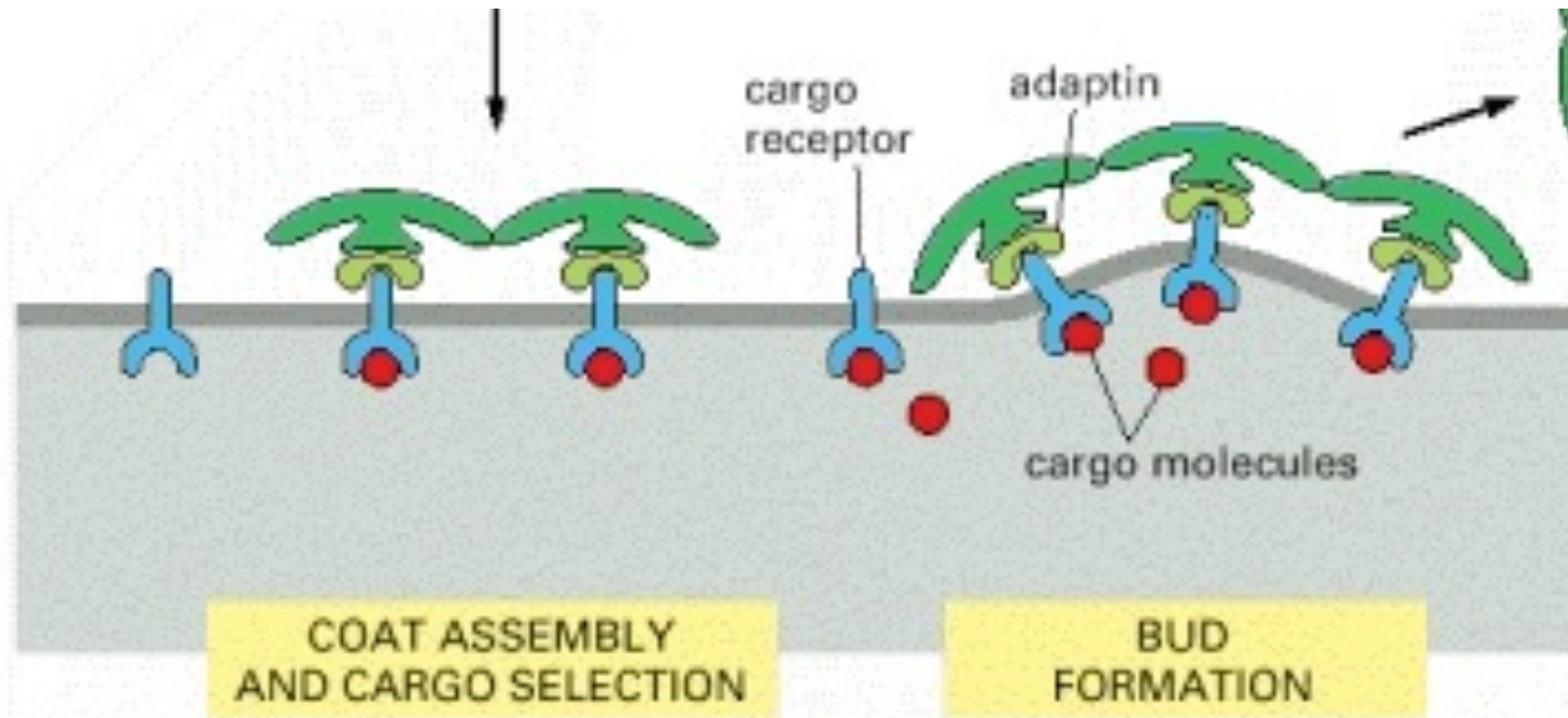
Come è possibile associare il contenuto della vescicola al rivestimento giusto?

Le proteine che devono essere trasportate (**cargo**) possiedono una sequenza segnale specifica per un tipo di proteina transmembrana (**recettore**). Il legame al cargo da un lato della membrana porta alla modificazione del recettore dal lato citosolico, tanto che questo viene riconosciuto da un complesso di proteine adattatrici.

Anche le proteine di membrana possono entrare nelle vescicole. In questo caso sono catturate direttamente dai complessi adattatori.

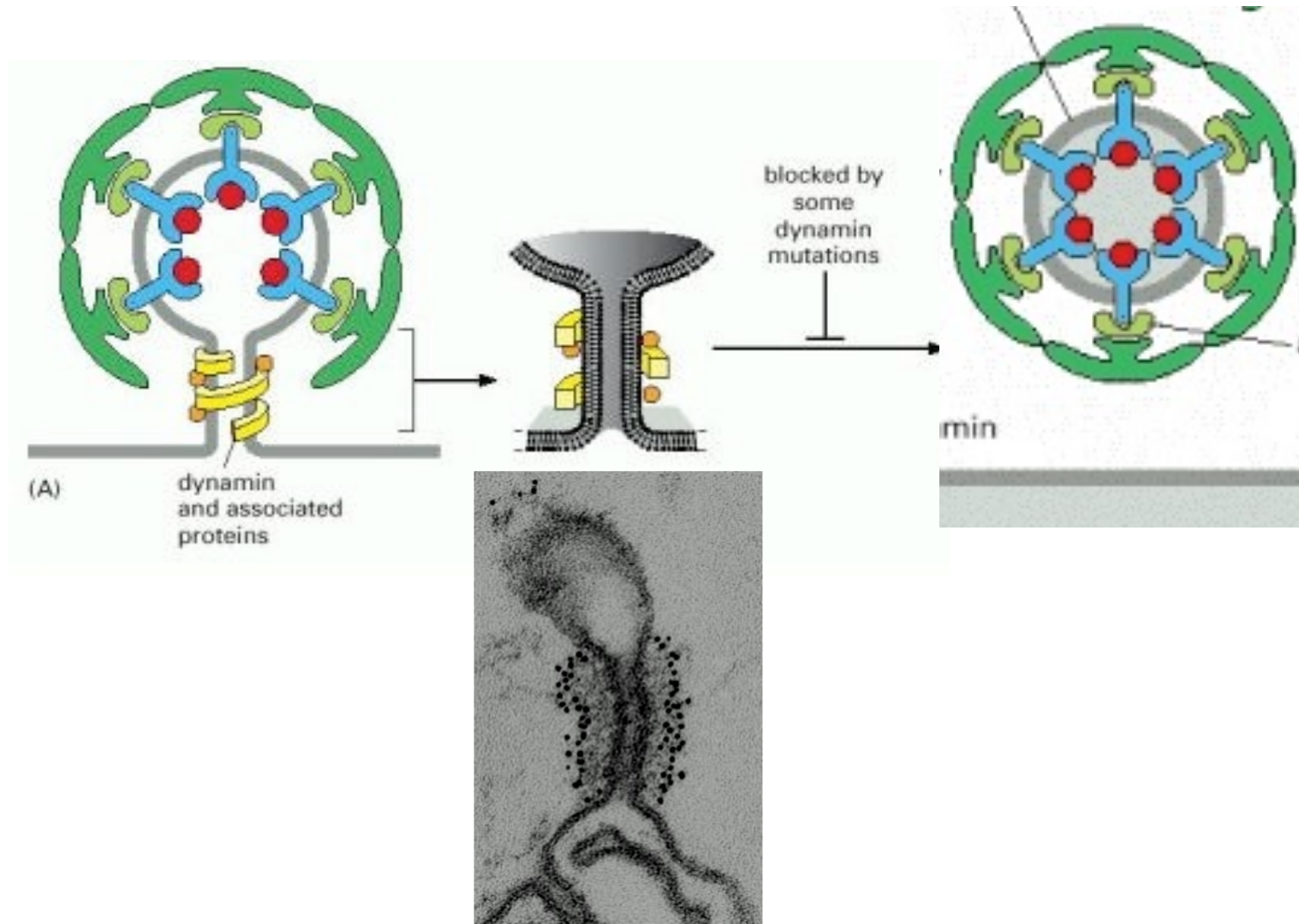


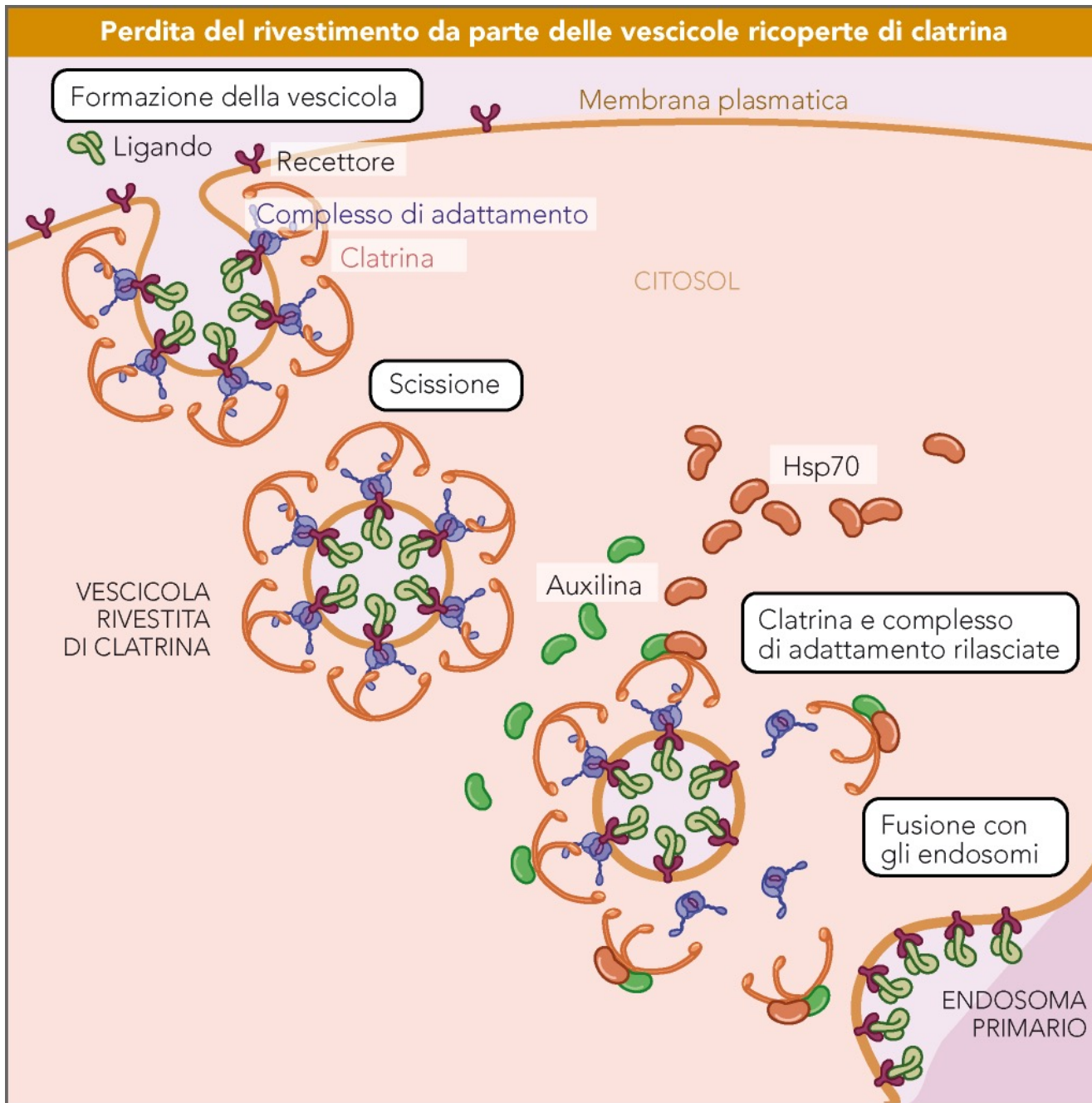
Formazione del rivestimento di clatrina



Una volta legate al complesso cargo-recettore, le proteine adattatrici reclutano un trischelio di clatrina. Trischeli di clatrina adiacenti si legheranno tra loro con legame cooperativo, cominciando a formare il rivestimento. Questo porta al piegamento della membrana e quindi alla formazione di una protrusione della stessa verso il citosol.

I trischeli si polimerizzano portando alla formazione di una vescicola legata da un breve tratto di membrana all'organello di partenza. La separazione da questo avviene ad opera della proteina **dinamina** che crea una spirale che, consumando ATP, si stringe attorno al tratto di membrana di collegamento. Questo porta al ravvicinamento delle membrane, scacciando l'acqua. Quando le membrane sono a ridosso si fondono, portando alla separazione della vescicola dall'organello. Successivamente a questo il rivestimento si completa avvolgendo l'intera vescicola.





Quando la vescicola si separa dall'organello, il rivestimento viene legato da alcune proteine (qui indicata è l'auxilina) che reclutano le proteine chaperon per rilasciare la clatrina e i complessi di adattamento dalle vescicole.

Le vescicole rimangono così scoperte (nude)

I trischeli e i complessi di adattamento vengono poi riutilizzati per formare nuovi rivestimenti di vescicole.

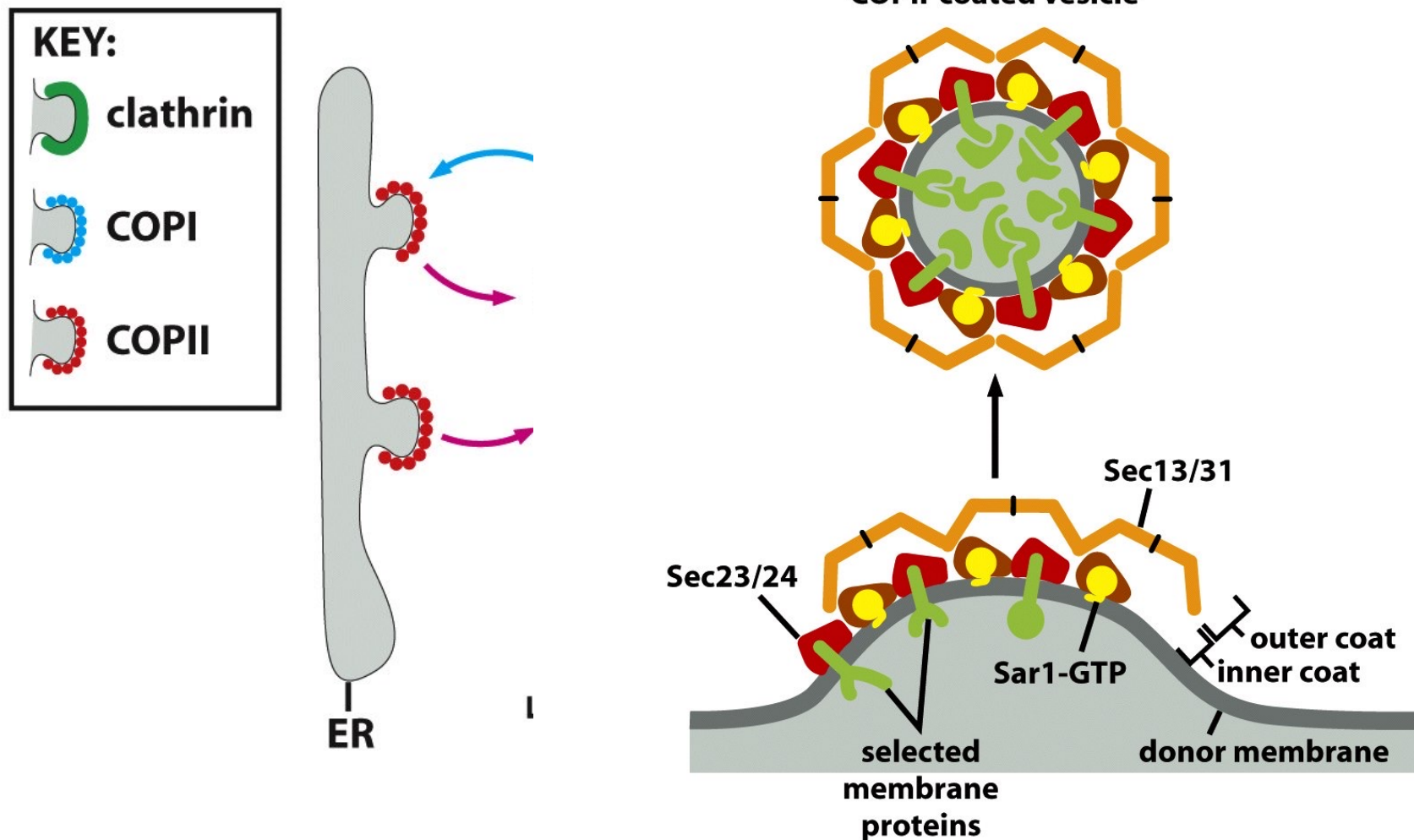
COPII

I rivestimenti di COPII si formano in modo simile a quelli formati da clatrina ma richiedono differenti complessi di adattamento (Sec23/24) e differenti proteine di rivestimento (Sec13/31).

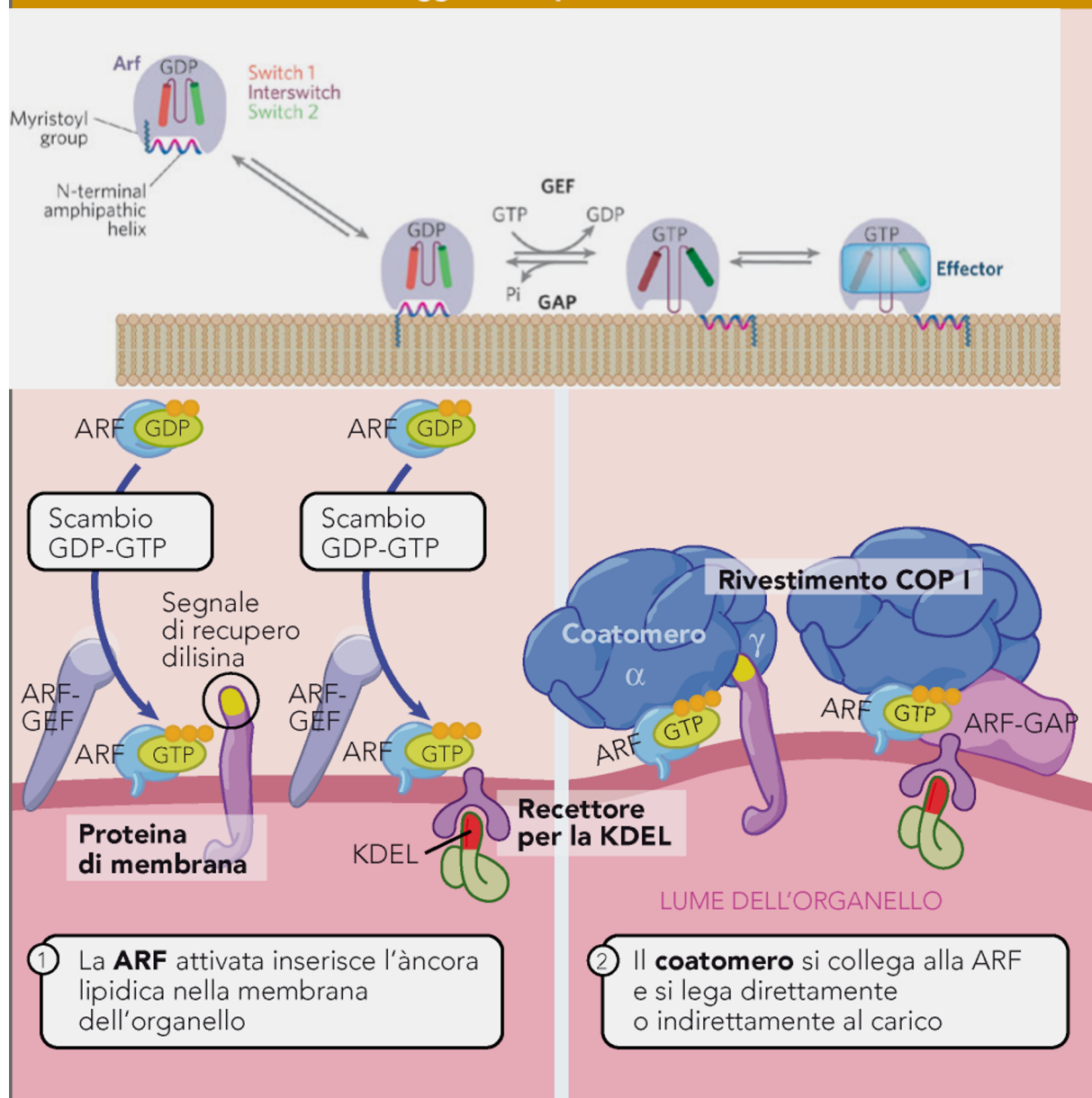
Inoltre richiedono una piccola proteina G, **Sar1**, che si lega al lato citosolico del RER solo quando lega il GTP. In questa conformazione Sar1 promuove la formazione del rivestimento.

La formazione del rivestimento di COPII richiede perciò energia per formarsi.

La separazione della vescicola avviene sempre ad opera della dinamina

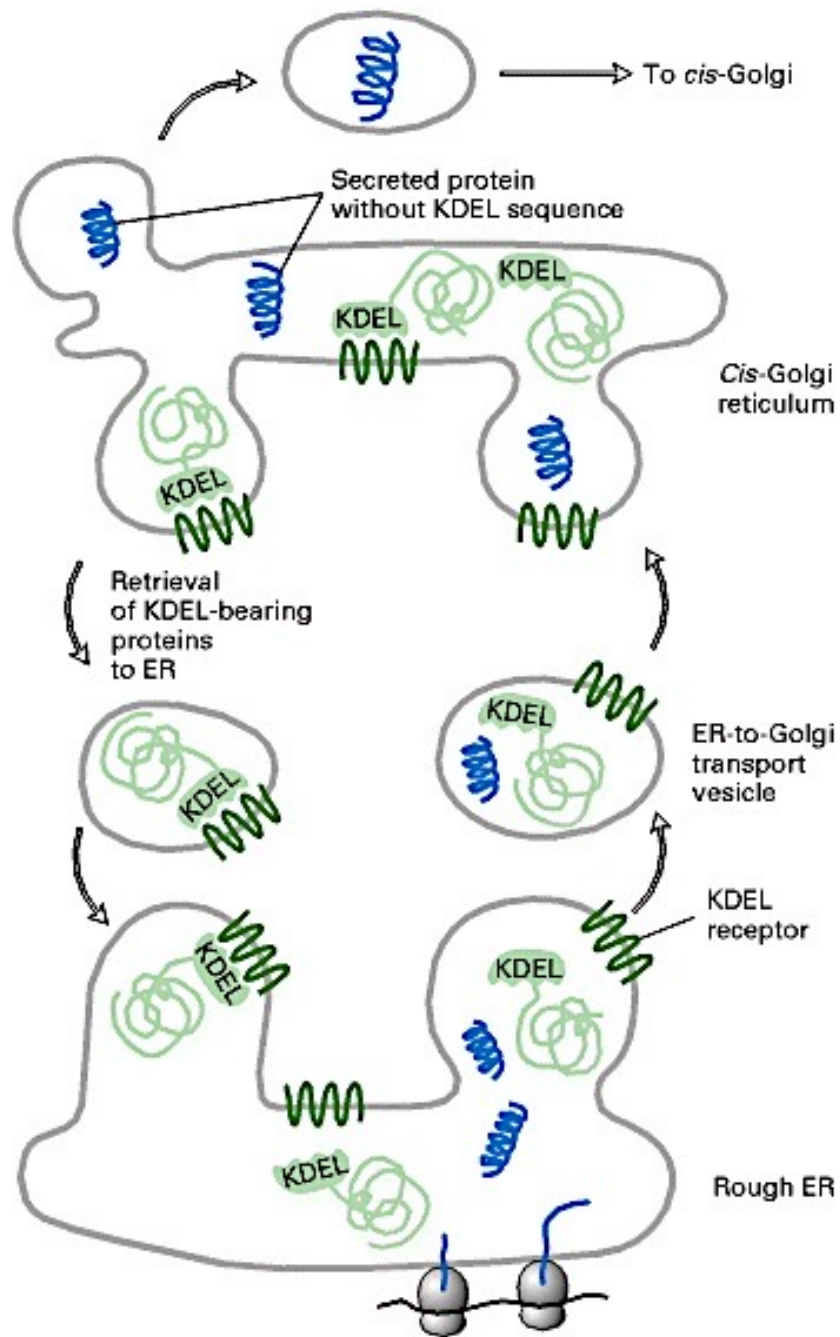


Modello di assemblaggio delle proteine di rivestimento COP I



COPI

Similmente alle vescicole ricoperte da COPII, il rivestimento di COPI richiede una piccola G-protein: ARF. Anche ARF è citosolica se legata al GDP. Quando entra in contatto con la sua GEF presente sulla membrana del Golgi, ARF si lega al GTP e cambia conformazione, rivelando la molecola di acido miristoilico ad essa legata. Questo determina il legame di ARF alla membrana, consentendo l'assemblaggio del rivestimento COPI.

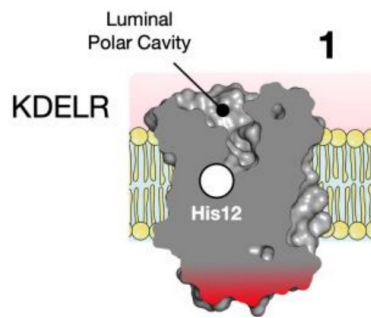


La sequenza segnale per il ritorno al RER è Lys-Asp-Glu-Leu (**KDEL**).

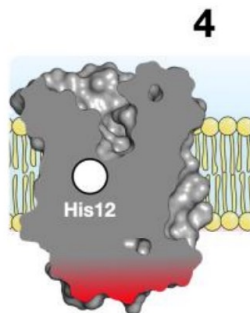
Le proteine dotate di questa sequenza vengono riconosciute da uno specifico recettore (KDELR) presente nel cis-Golgi network, e portate al RER con vescicole ricoperte da COPI

Le proteine residenti nel RER sono in realtà continuamente riportate indietro dal Golgi

Golgi lumen
pH ~ 6.2



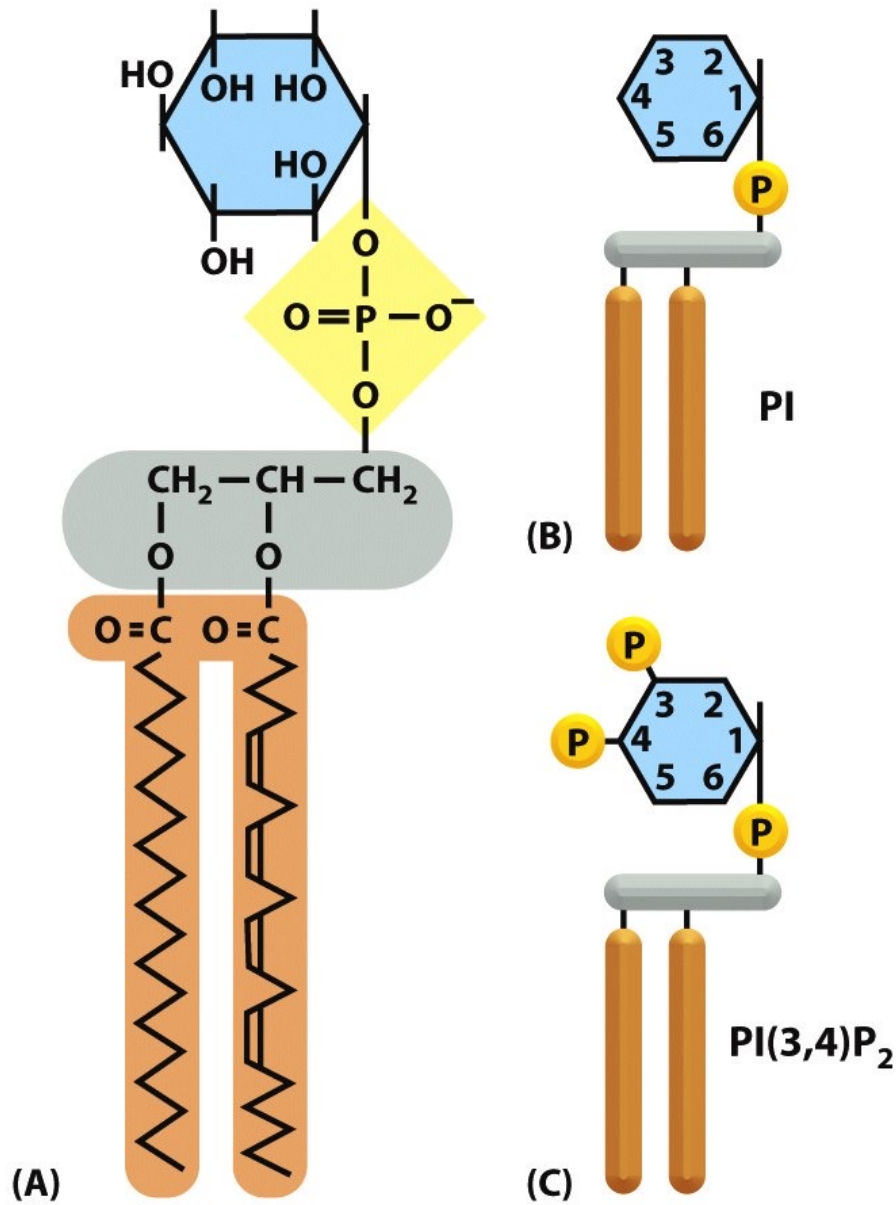
ER lumen
pH 7.4



Il sistema di riconoscimento e agganciamento funziona perchè le membrane di destinazione riconoscono delle molecole specifiche presenti sulle vescicole stesse

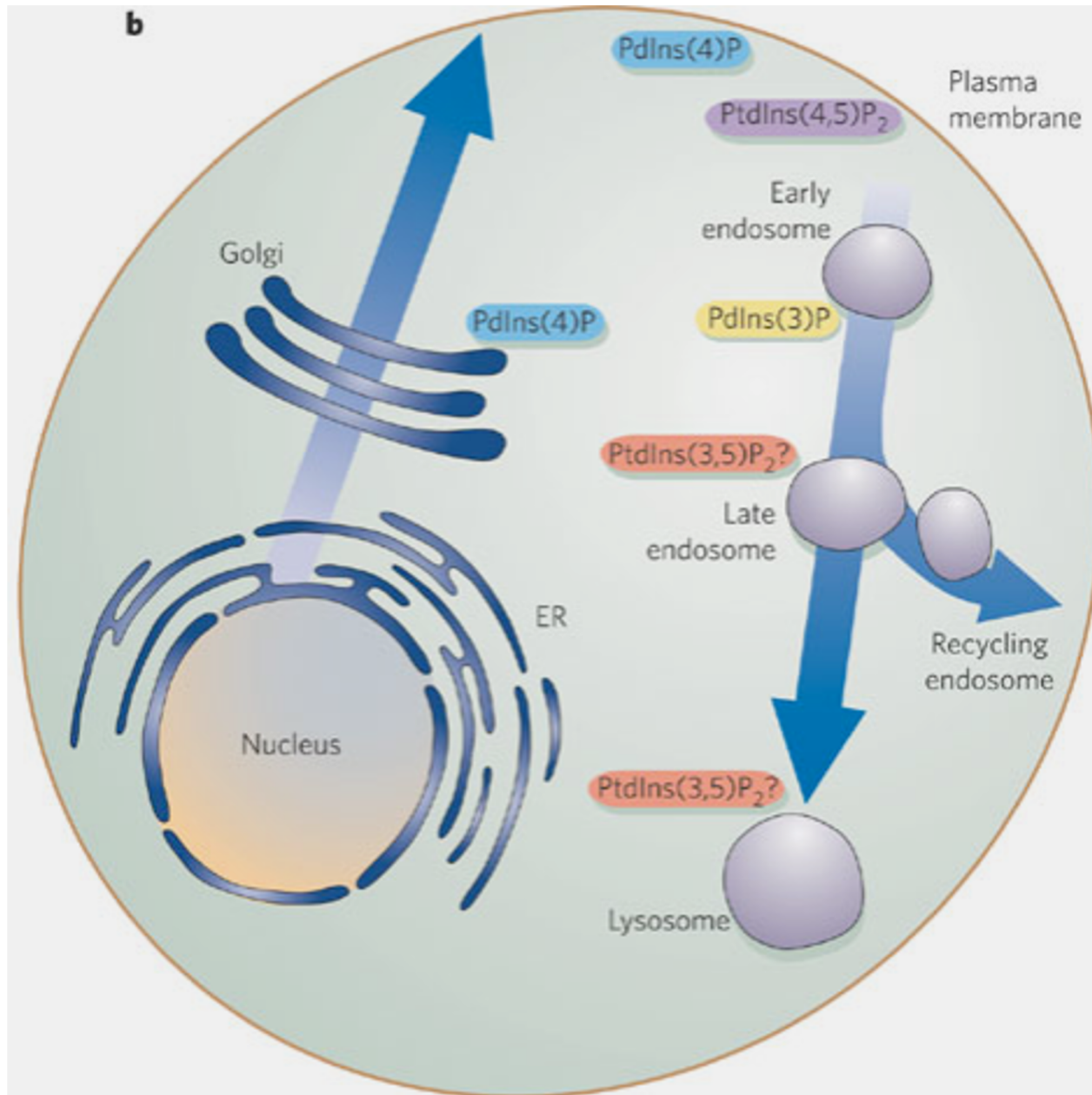
PROCESSO	EVENTI RICHIESTI	COMPONENTI MOLECOLARI
GEMMAZIONE	Assemblaggio dei complessi ligando-recettore e del rivestimento	<ul style="list-style-type: none"> • Rivestimento (COP I o II o Clatrina) • GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) • GTPasi (Sar-1, ARF, Rab) • Fosfoinositoli
TRASPORTO	Interazione con citoscheletro	Dineine, Chinesine, Microtubuli
RICONOSCIMENTO E AGGANCIAMENTO	Formazione complessi riconoscimento e trans-SNARE stabili	<ul style="list-style-type: none"> • Complessi di riconoscimento • Rab • Fosfoinositoli
FUSIONE	Formazione di complessi fusogeni	<ul style="list-style-type: none"> • SNARE • Altre proteine regolatrici (ad es. Complexina)

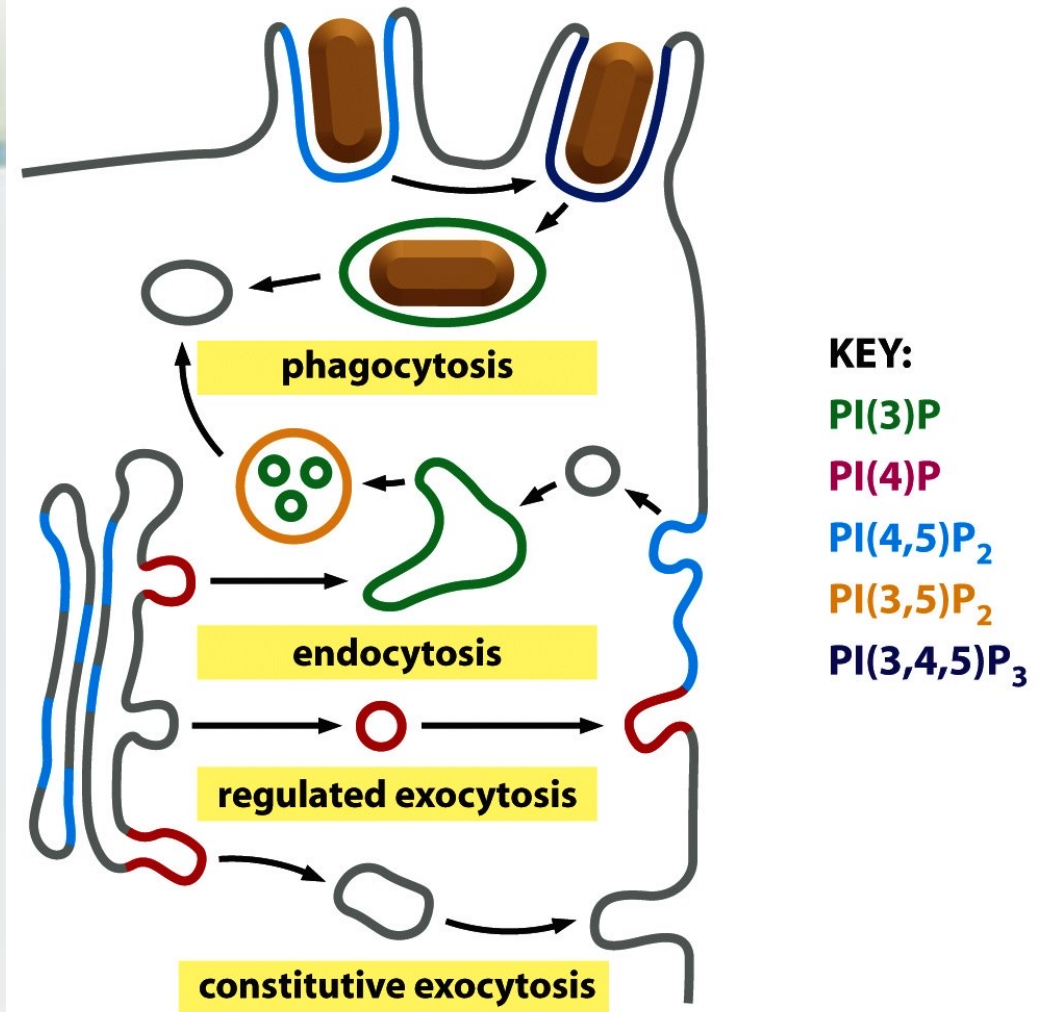
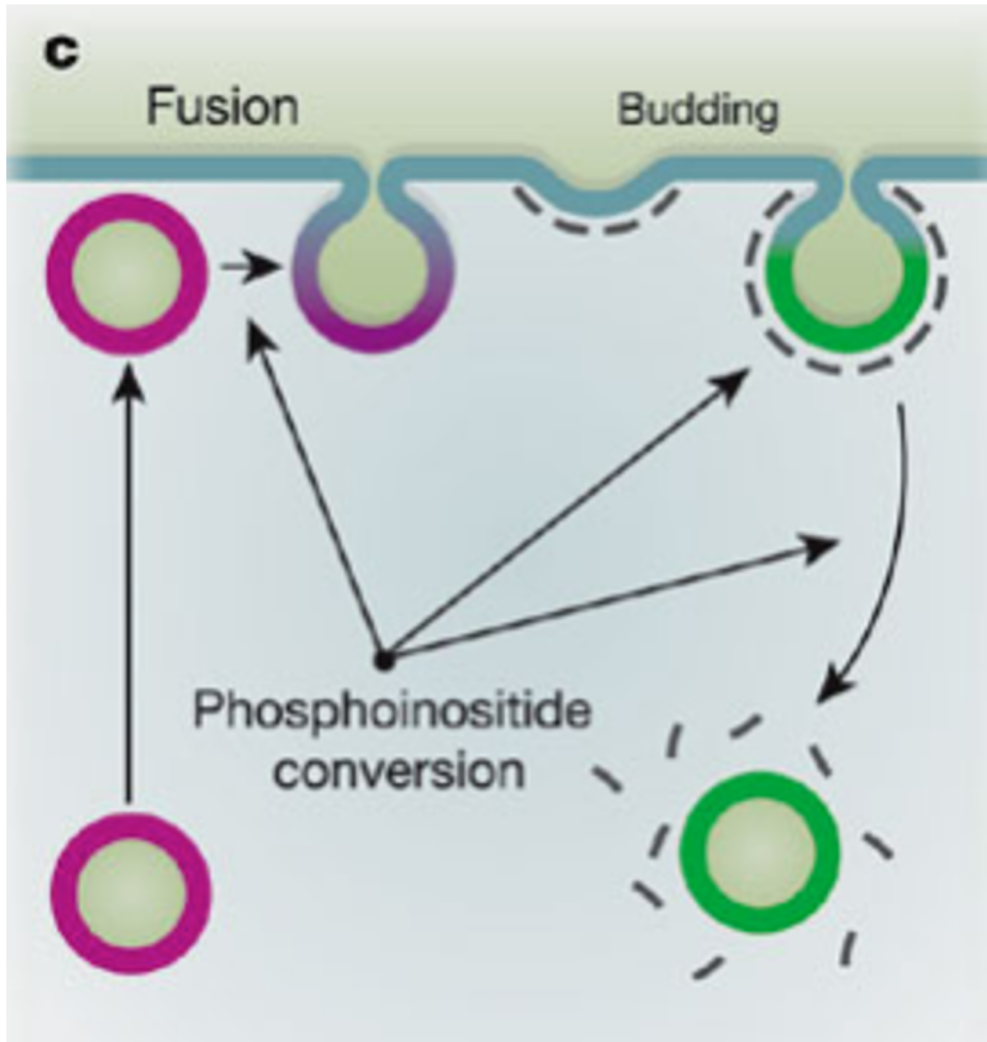
Fosfatidil-inositoli (PtdIns)



I fosfatidil-inositoli sono varianti del fosfatidil-inositolo che differiscono per la posizione dei fosfati legati all'inositolo

Le membrane dei diversi organelli differiscono per il diverso tipo di fosfatidil-inositoli presenti sul loro strato citosolico.



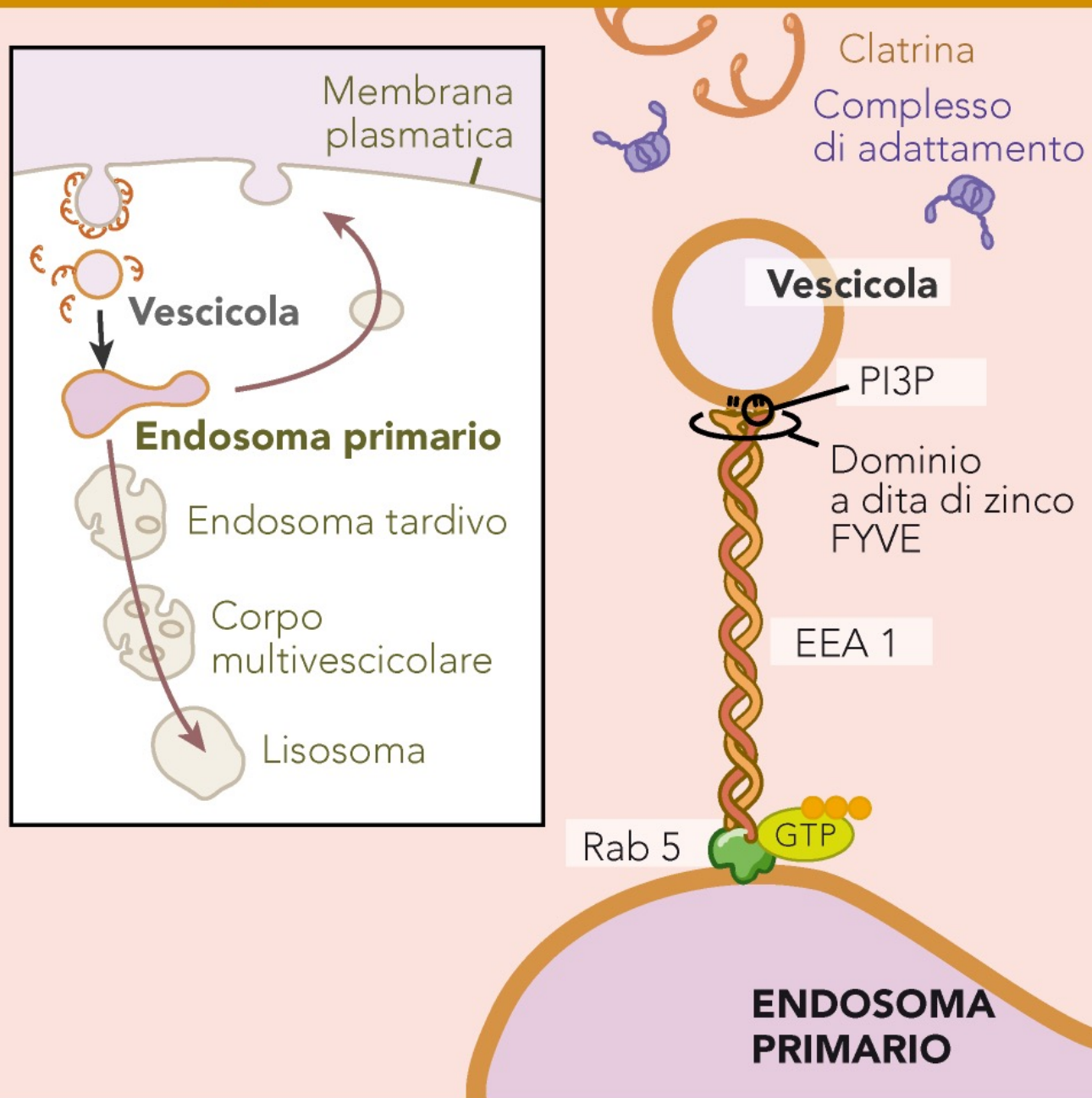


Le vescicole vengono marcate modificando I fosfoinositoli delle loro membrane durante la gemmazione o in seguito al distacco dall'organello che le ha generate.

Dopo la fusione con l'organello di destinazione, I fosfoinositoli delle vescicole vengono convertiti per diventare uguali a quelli della membrana di destinazione

Complessi di riconoscimento (o di cattura)

L'aggancio alle membrane endosomiali



I fosfatidil-inositoli vengono riconosciuti da dimeri proteici con domini coiled-coil chiamati **complessi antenna o di riconoscimento o di cattura**.

Essendo molto lunghi, questi complessi possono catturare le vescicole anche quando sono lontane dalla membrana di destinazione.

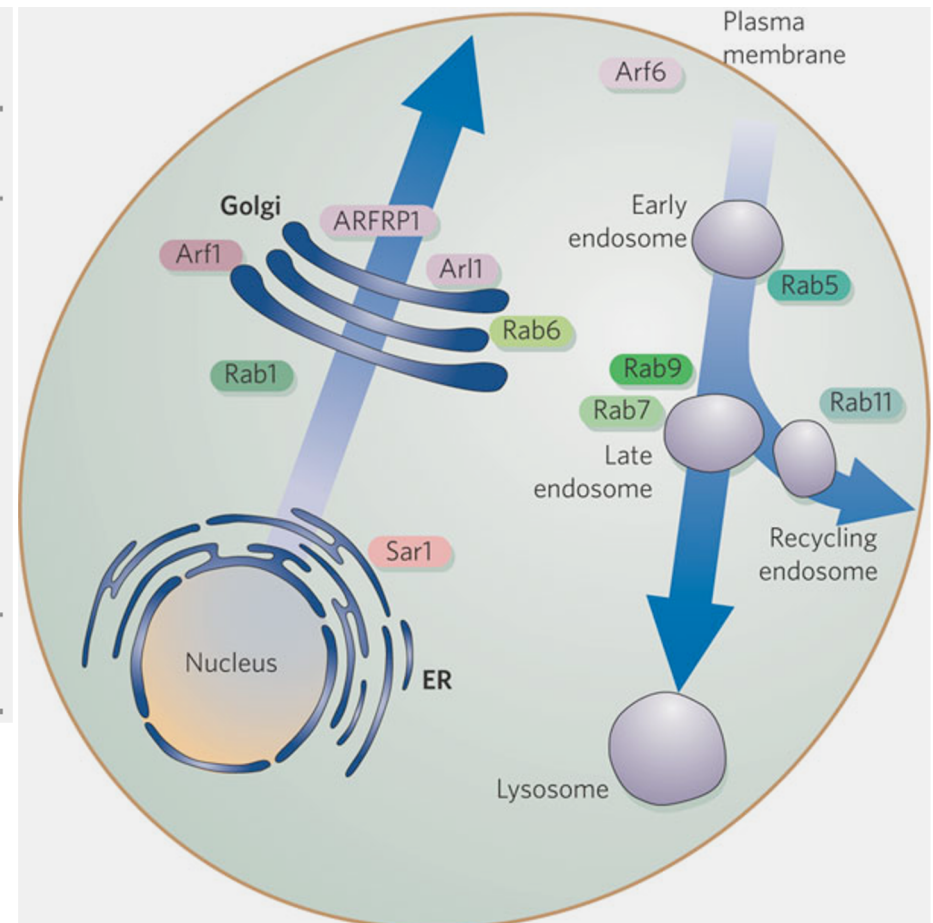
Piccole G-proteins Rab

Come I fosfo-inositoli, anche di Rab ne esistono di tipi diversi che sono specifici di organelli diversi

Table 13-1. Subcellular Locations of Some Rab Proteins

Protein	Organelle
Rab1 (YPT1)	ER and Golgi complex
Rab2	transitional ER, <i>cis</i> Golgi network
Rab3A	secretory vesicles
Rab4	early endosomes
Rab5	early endosomes, plasma membrane
Rab6	<i>medial</i> and <i>trans</i> Golgi cisternae
Rab7	late endosomes
Rab9	late endosomes, <i>trans</i> Golgi network
Sec4	secretory vesicles

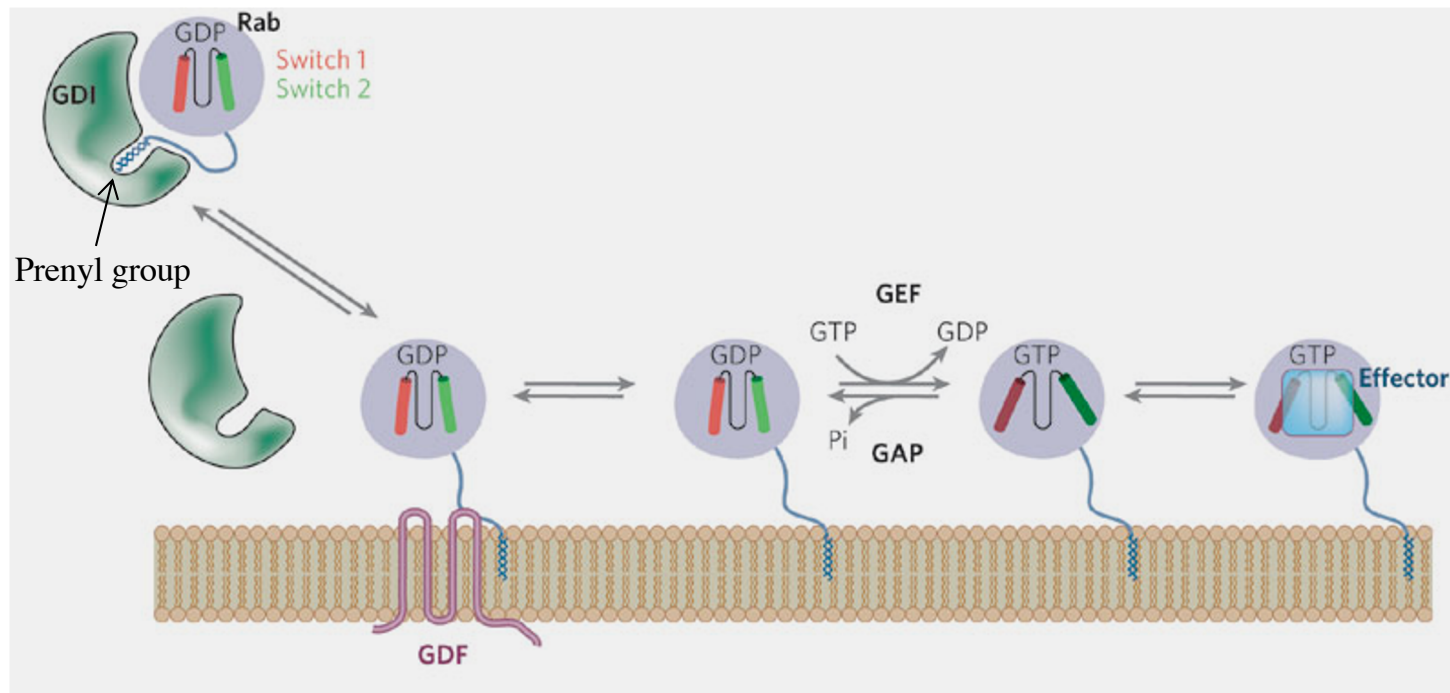
*. All of these proteins are found in mammalian cells except for Sec4 and YPT1, which are yeast proteins.



A differenza dei fosfatidil-inositoli, che distinguono le vescicole tra loro, le Rab distinguono le membrane da cui originano le vescicole

Piccole G-proteins Rab

Le Rab sono G-proteins prenilate che possono esistere nel citosol legate al GDP e ad una proteina (GDI) che maschera la molecola di prenila. La loro attivazione è in due fasi: sulla membrana dell'organello di cui sono specifiche è presente un GDF che, liberandole dal GDI, le permette di ancorarsi alla membrana. Una volta ancorate, incontrano la loro GEF che permette la sostituzione del GDP con il GTP, attivandole.



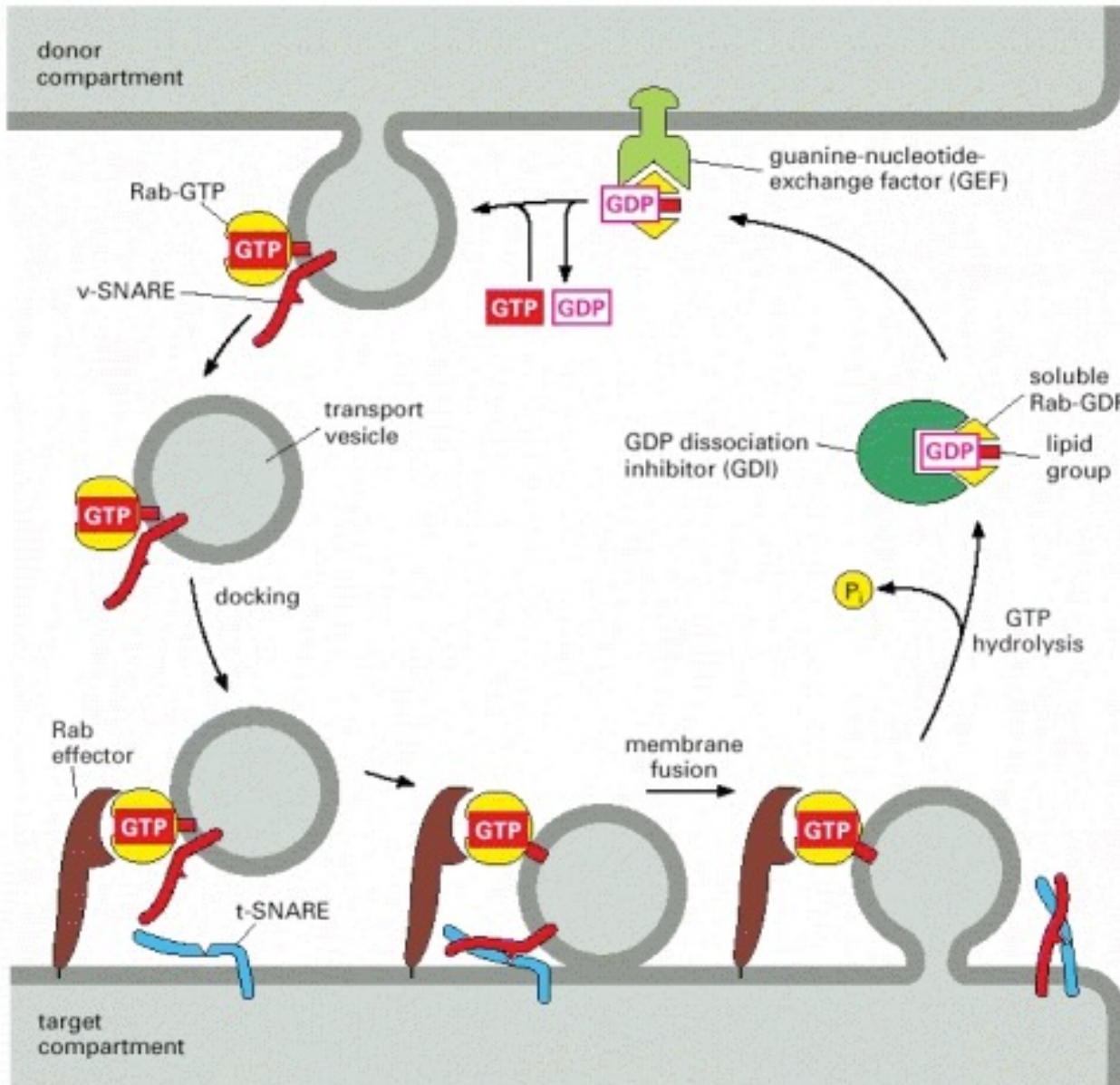
GDI: GDP dissociation inhibitor

GDF: GDI displacement factor

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GAP: GTPase activating protein

GEFs are peripheral membrane proteins, sometimes transmembrane (for some Arfs)



Quando le vescicole si distaccano dall'organello di partenza, le Rab vengono intrappolate nelle vescicole nel formato legato al GTP.

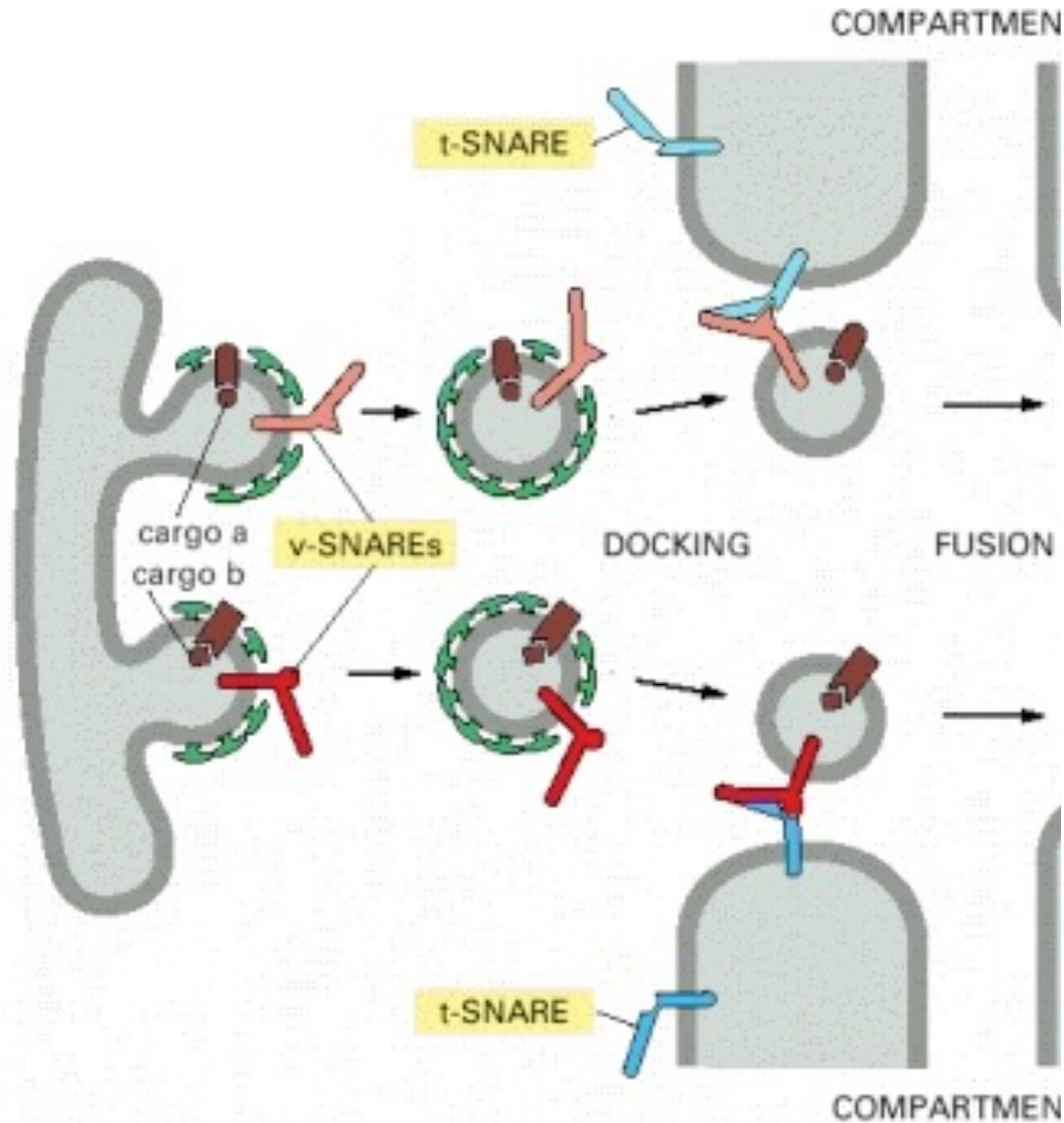
Quando la vescicola giunge in prossimità dell'organello di destinazione, la Rab viene riconosciuta da un suo recettore specifico, che permette alla vescicola di avvicinarsi ulteriormente e di fondersi alla membrana di destinazione.

A questo punto la Rab idrolizza il GTP in GDP, e si distacca dalla membrana, venendo di nuovo intrappolata nel citosol dalla GDI. Quindi, **la Rab non rimane associata alla membrana di destinazione**

Il sistema di riconoscimento e agganciamento funziona perchè le membrane di destinazione riconoscono delle molecole specifiche presenti sulle vescicole stesse

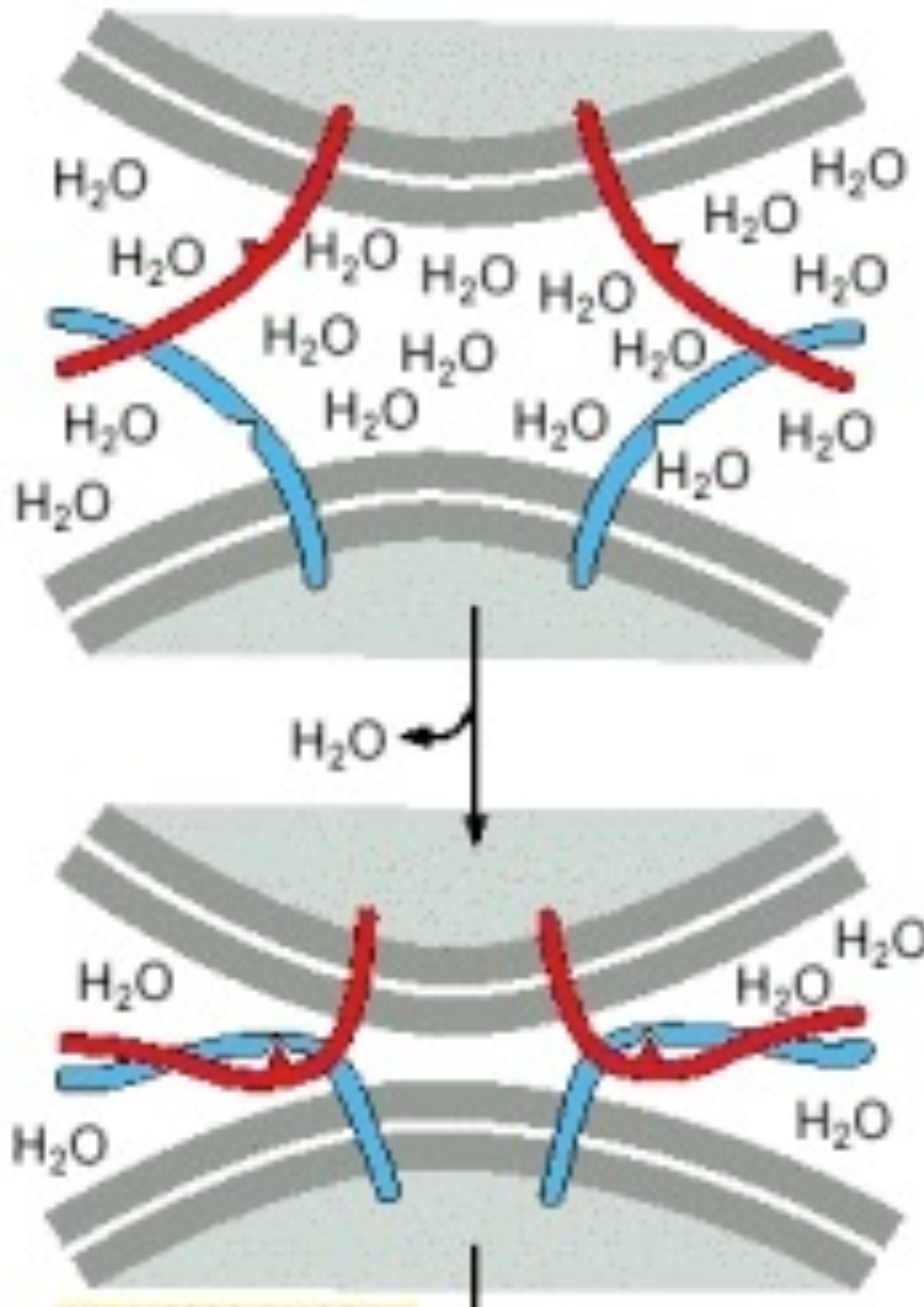
PROCESSO	EVENTI RICHIESTI	COMPONENTI MOLECOLARI
GEMMAZIONE	Assemblaggio dei complessi ligando-recettore e del rivestimento	<ul style="list-style-type: none"> • Rivestimento (COP I o II o Clatrina) • GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) • GTPasi (Sar-1, ARF, Rab) • Fosfoinositoli
TRASPORTO	Interazione con citoscheletro	Dineine, Chinesine, Microtubuli
RICONOSCIMENTO E AGGANCIAMENTO	Formazione complessi riconoscimento e trans-SNARE stabili	<ul style="list-style-type: none"> • Complessi di riconoscimento • Rab • Fosfoinositoli
FUSIONE	Formazione di complessi fusogeni	<ul style="list-style-type: none"> • SNARE • Altre proteine regolatrici (ad es. Complexina)

SNARE



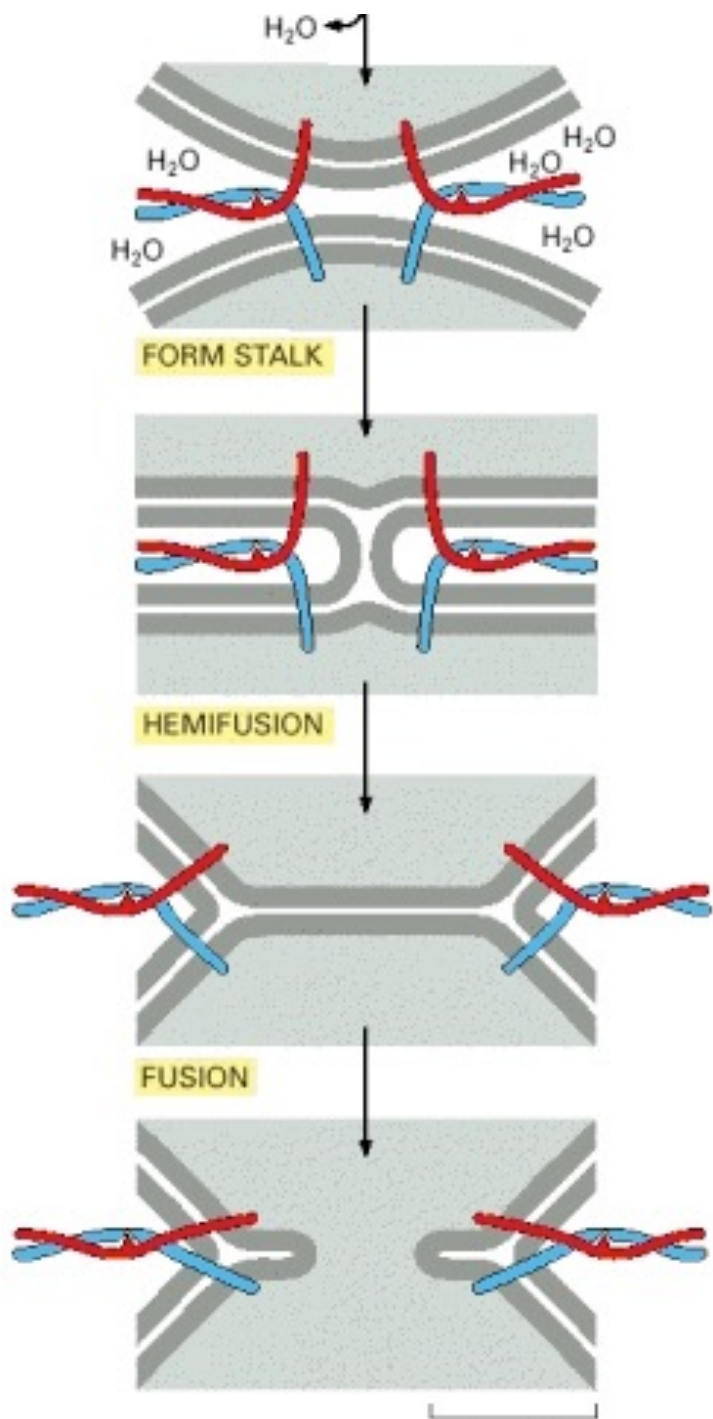
Le SNARE sono proteine transmembrana che consentono il riconoscimento dalla vescicola da parte dell'organello ricevente, nel contempo portando alla fusione delle due membrane.

Si conoscono più di 20 SNARE diverse, ciascuna associata ad organelli particolari. Si dividono in v-SNARE, presenti sulle vescicole, e t-SNARE che fungono da recettori delle v-SNARE sulla membrana ricevente. v-SNARE diverse si associano a vescicole destinate a organelli diversi, dove vengono riconosciute da specifiche t-SNARE

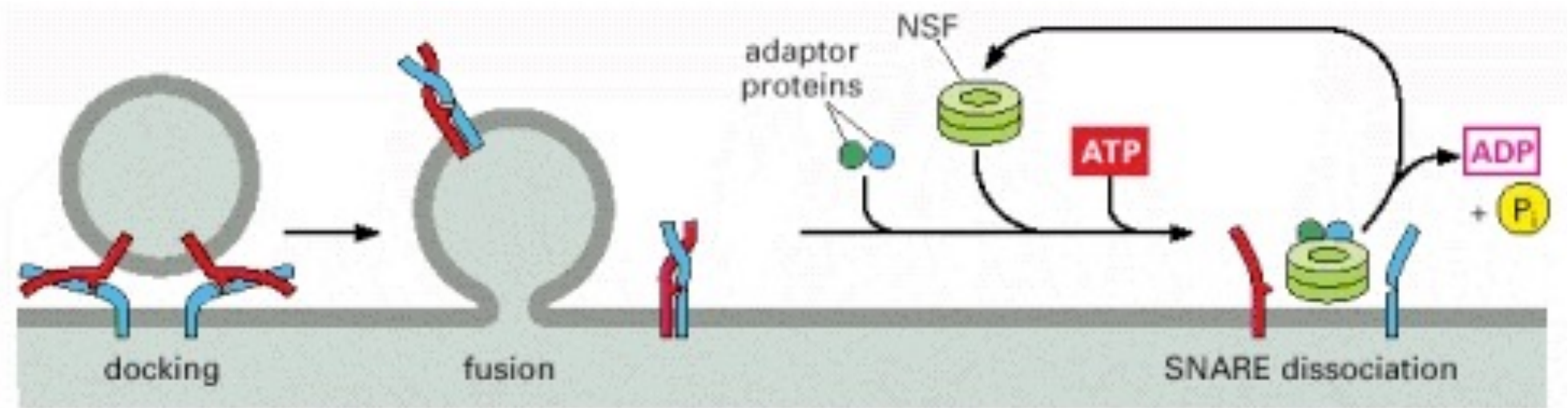


Quando le v- e le t-SNARE interagiscono, I loro domini citosolici si avvolgono uno con l'altro, generando una forza che porta l'avvicinamento delle membrane a cui sono legate

Nel far questo, v- e t-SNARE portano l'acqua presente tra le membrane ad allontanarsi, creando un ambiente scarsamente idrofilico tra le due membrane

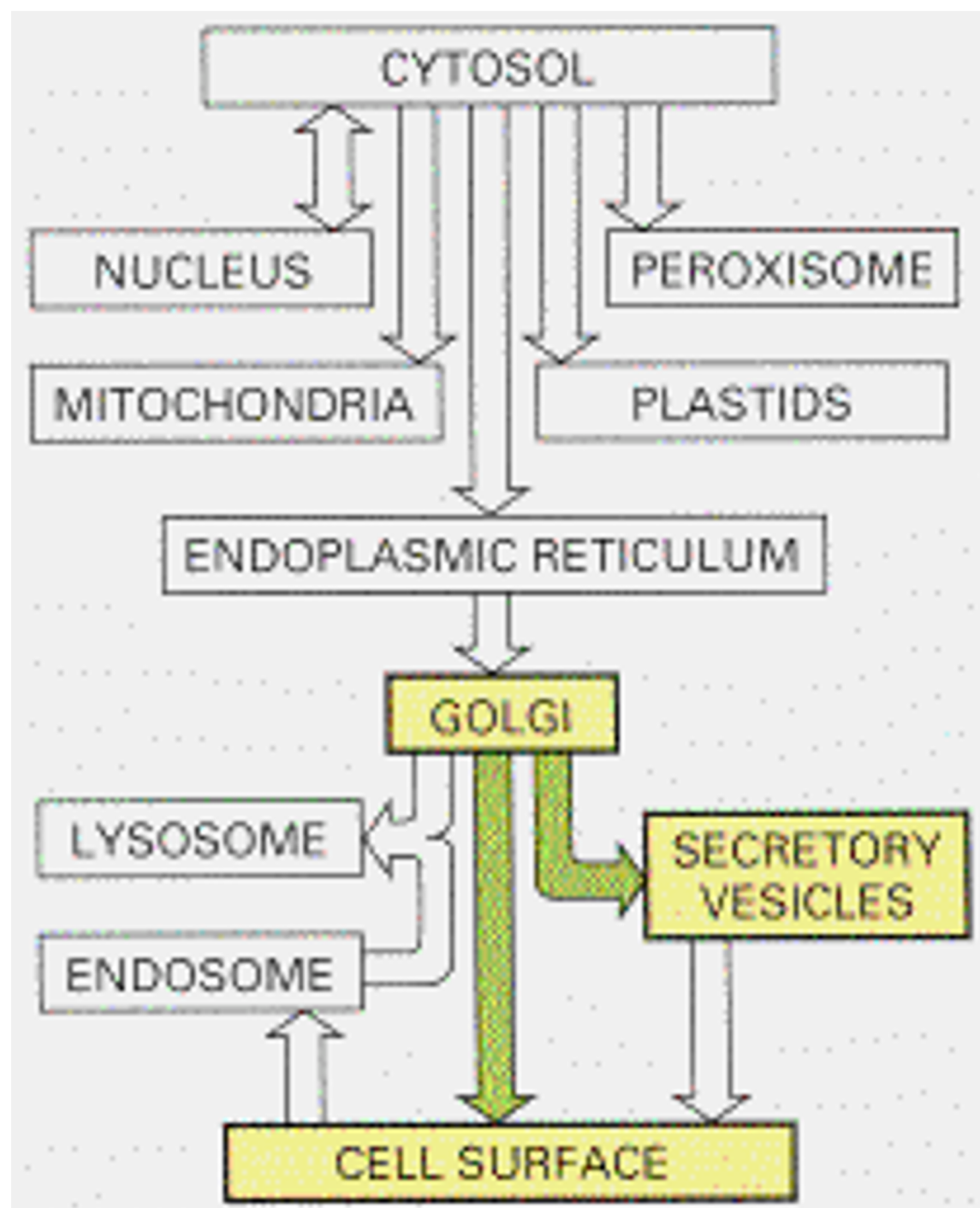


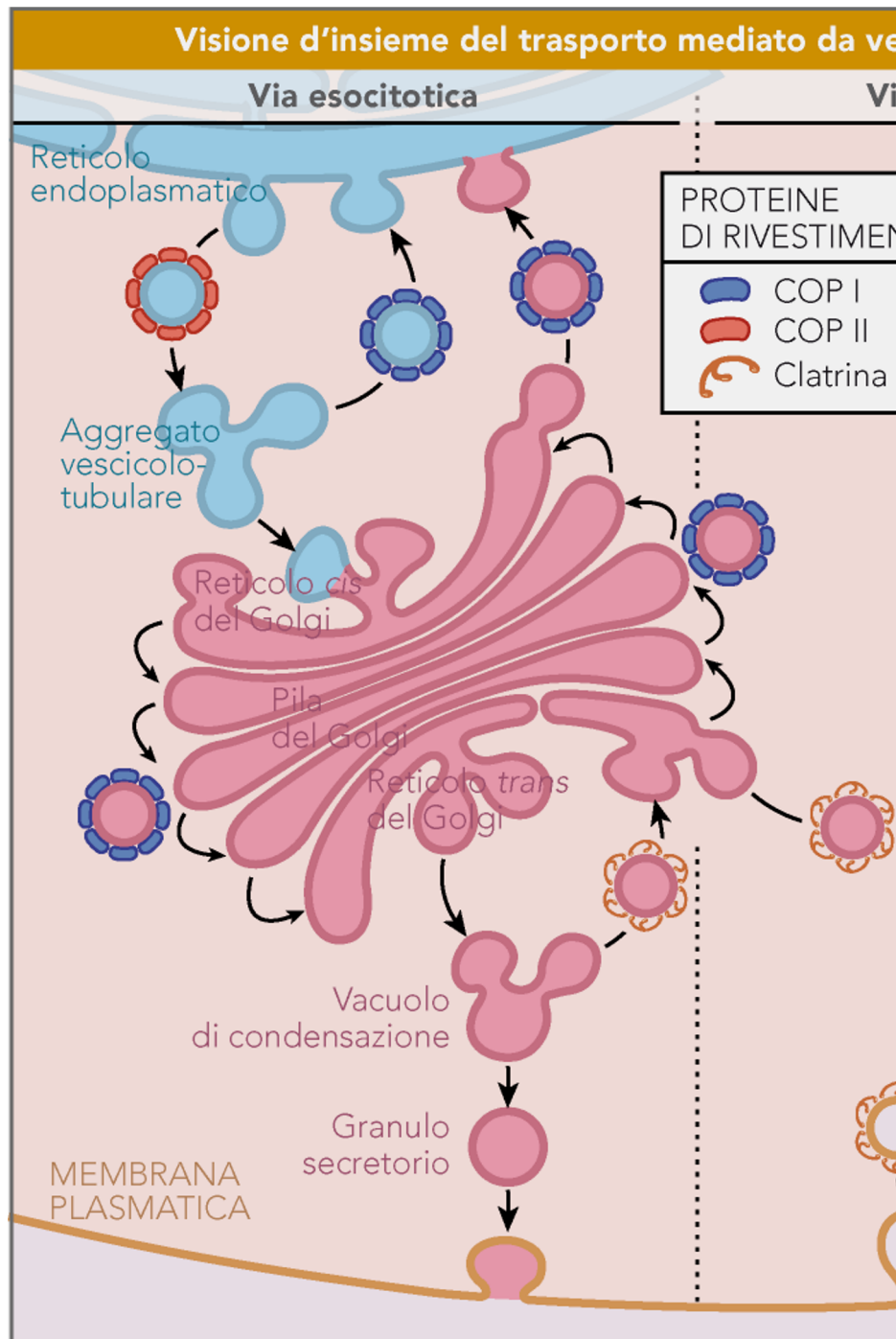
Portando alla fusione delle membrane



Le v- e t-SNARE vengono poi separate in un processo che consuma ATP

Le v-SNARE vengono poi incorporate in vescicole che le riportano all'organello di partenza





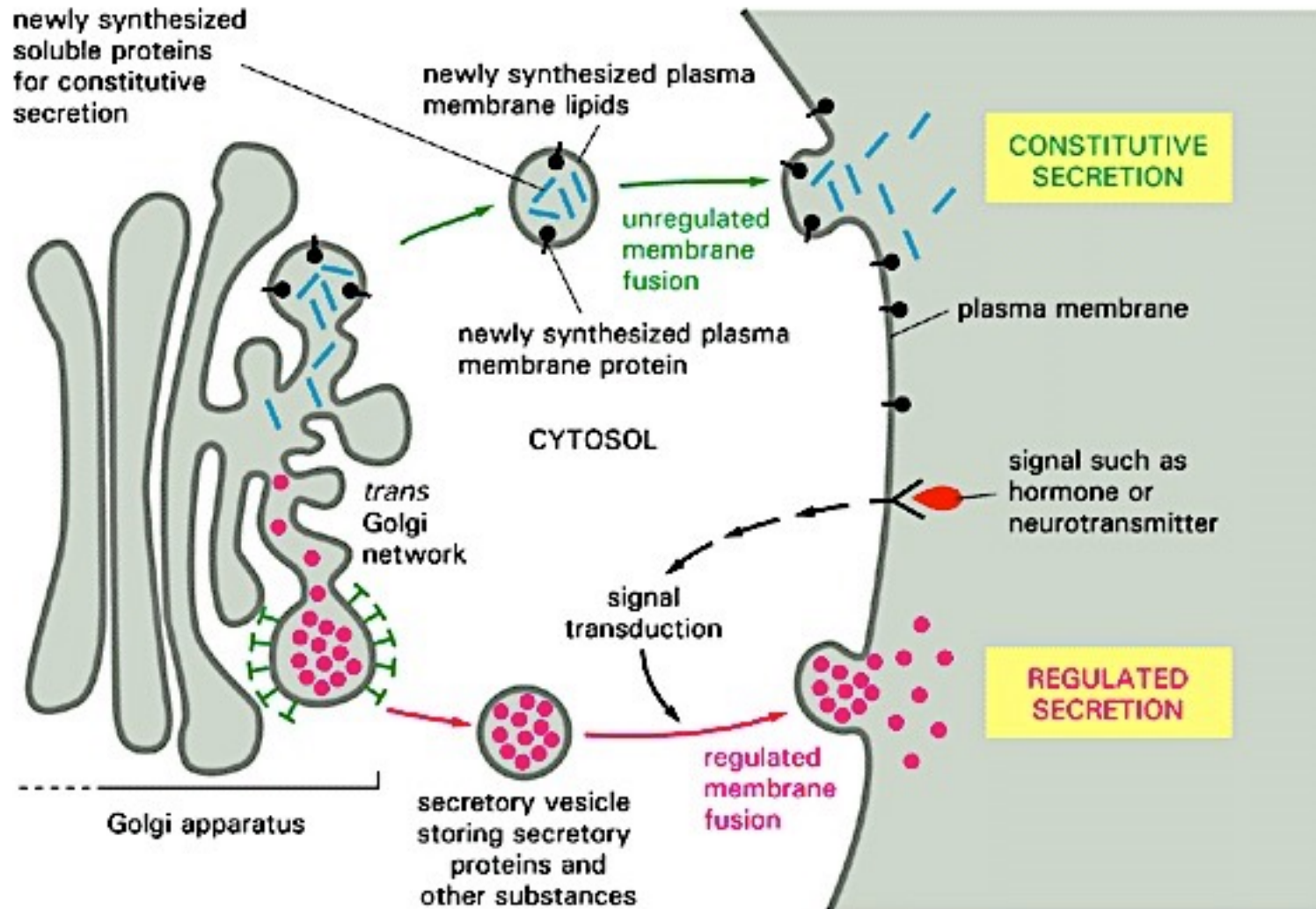
Le vescicole destinate alla membrana plasmatica originano dal trans-Golgi network

Queste andranno a formare le vescicole secretorie.

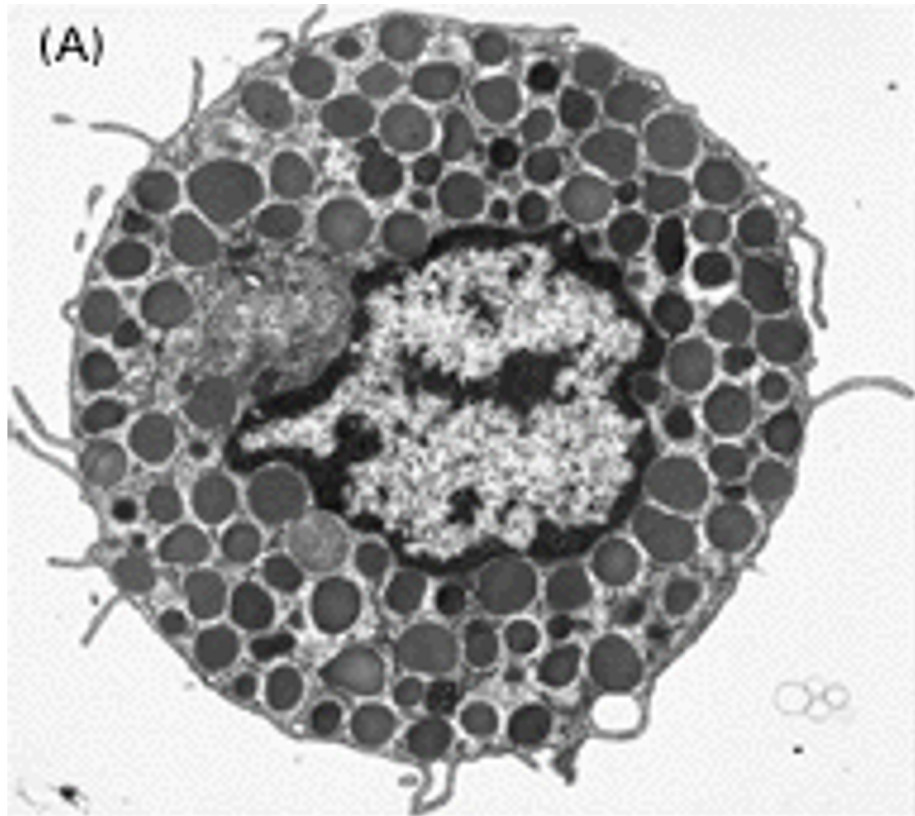
Il processo, nel suo complesso, si chiama esocitosi

Esistono due tipi di secrezione:

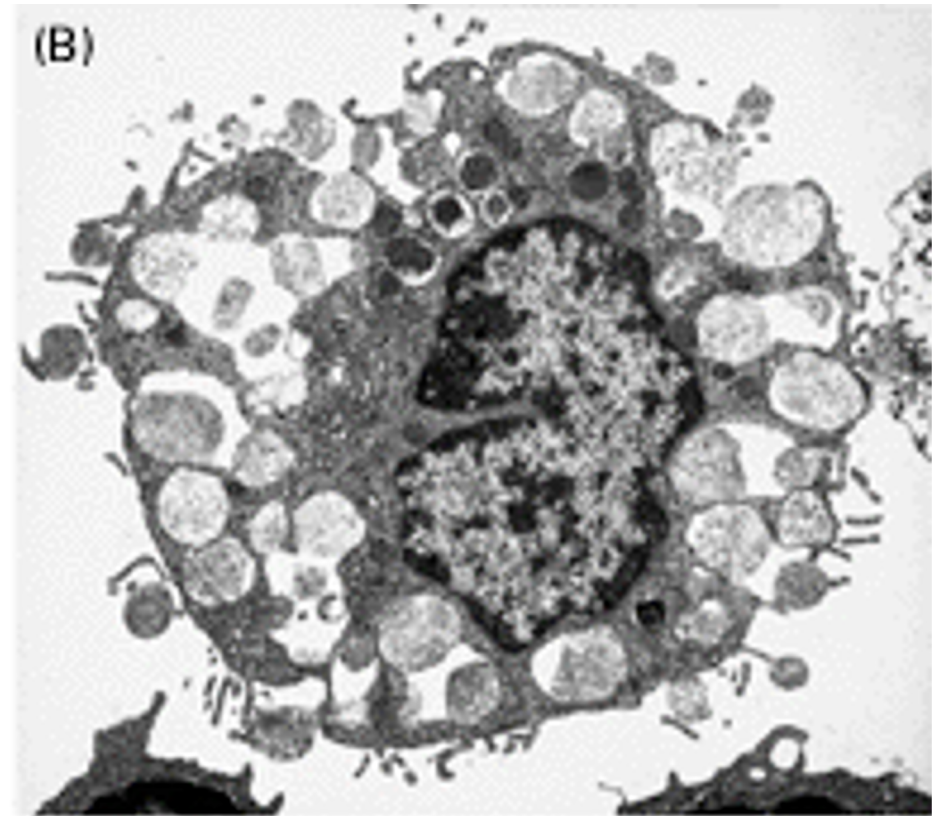
- **Costitutiva:** le vescicole formatesi dal Golgi riversano costantemente il loro contenuto nello spazio extracellulare
- **Regolata:** le vescicole si formano, ma rimangono nel citoplasma finché uno stimolo esterno non ne forza la fusione con il plasmalemma



Mastocito prima
dell'esocitosi

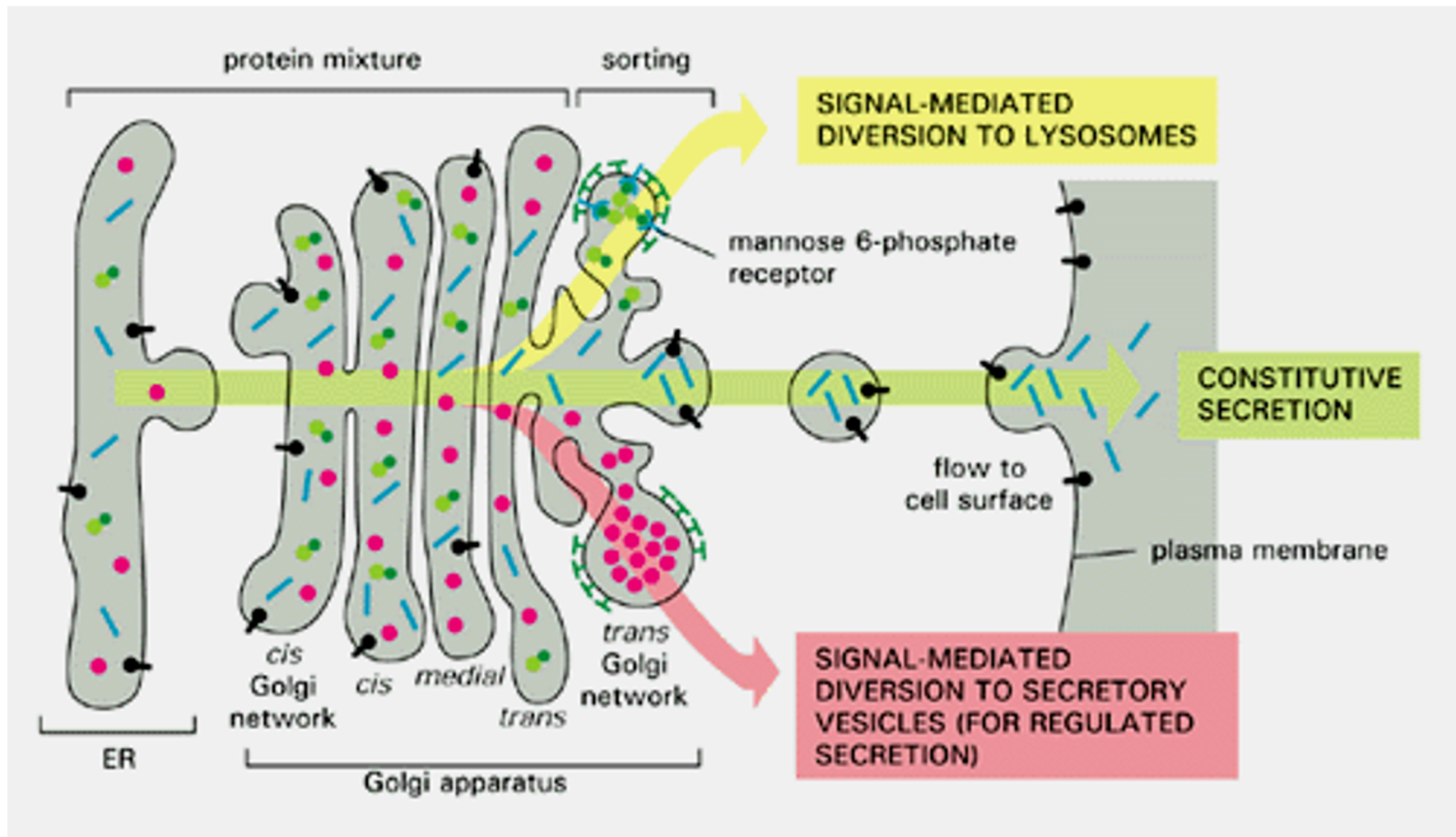


Mastocito dopo
l'esocitosi

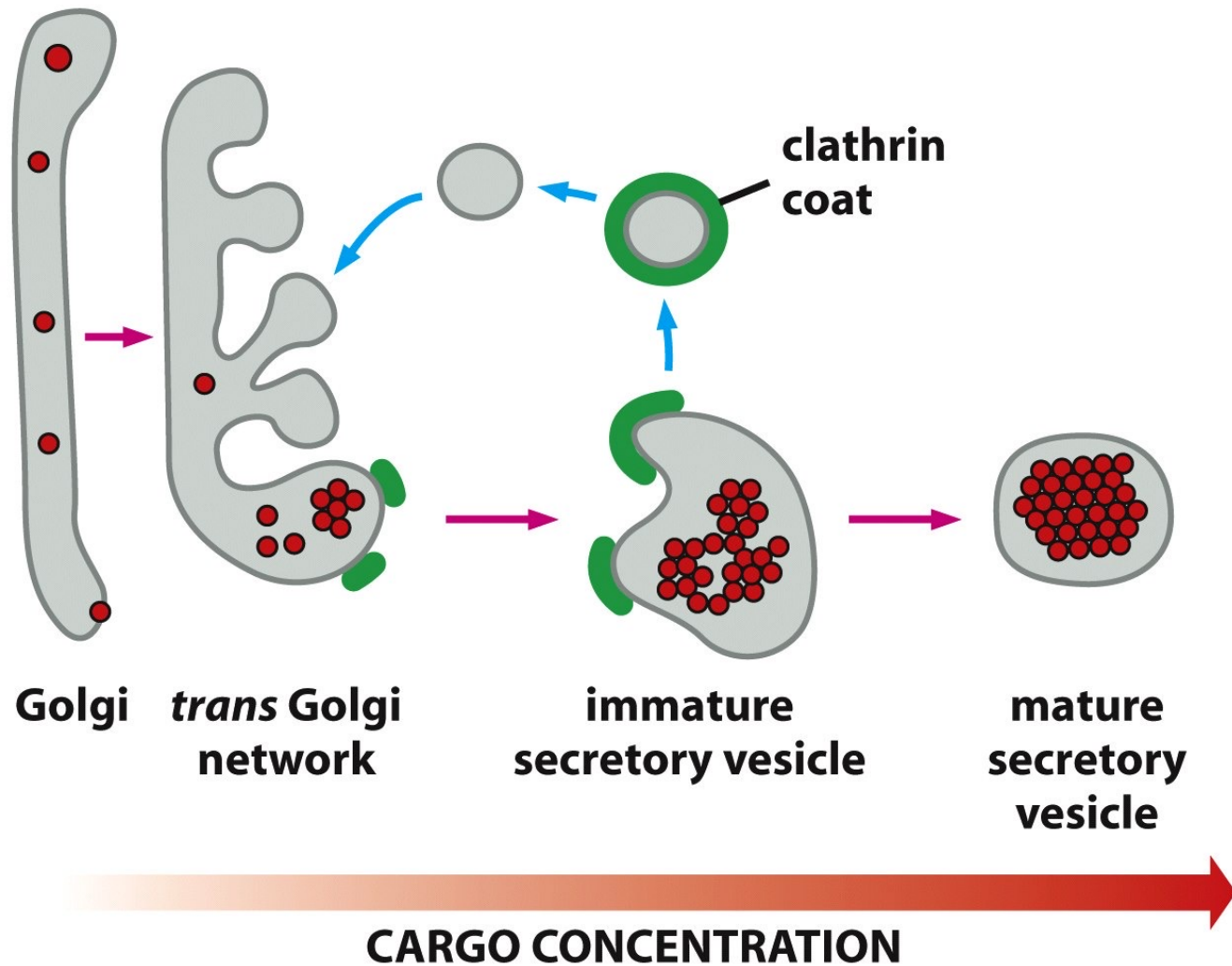


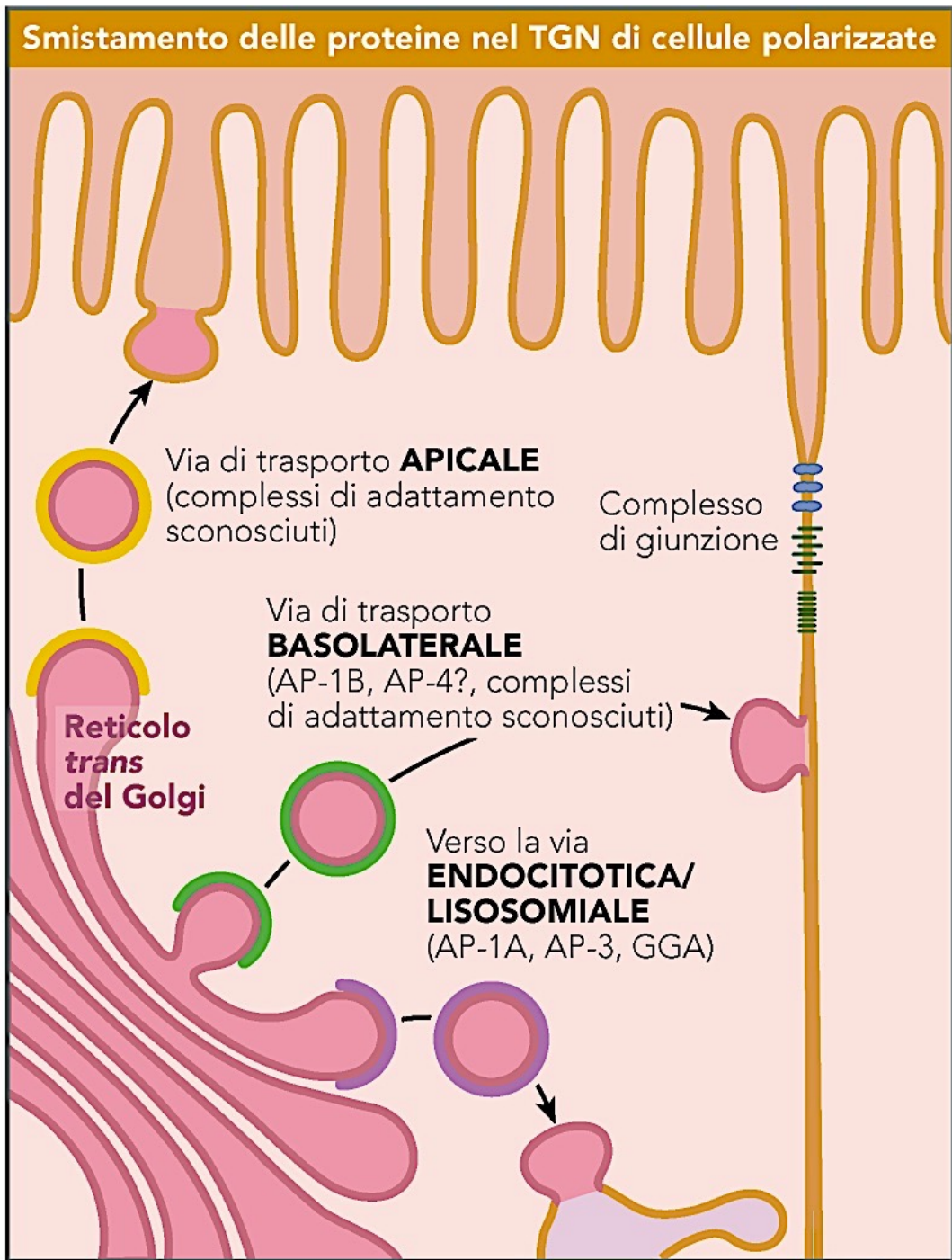
Segnali diversi presenti su proteine diverse ne comportano l'inclusione nei due tipi di vescicole:

- Nelle vescicole di secrezione costitutiva possono trovarsi proteine contenute nel lume, che saranno riversate nello spazio esterno alla cellula, e proteine di membrana
- Nelle vescicole di secrezione regolata sono contenute principalmente proteine non transmembrana

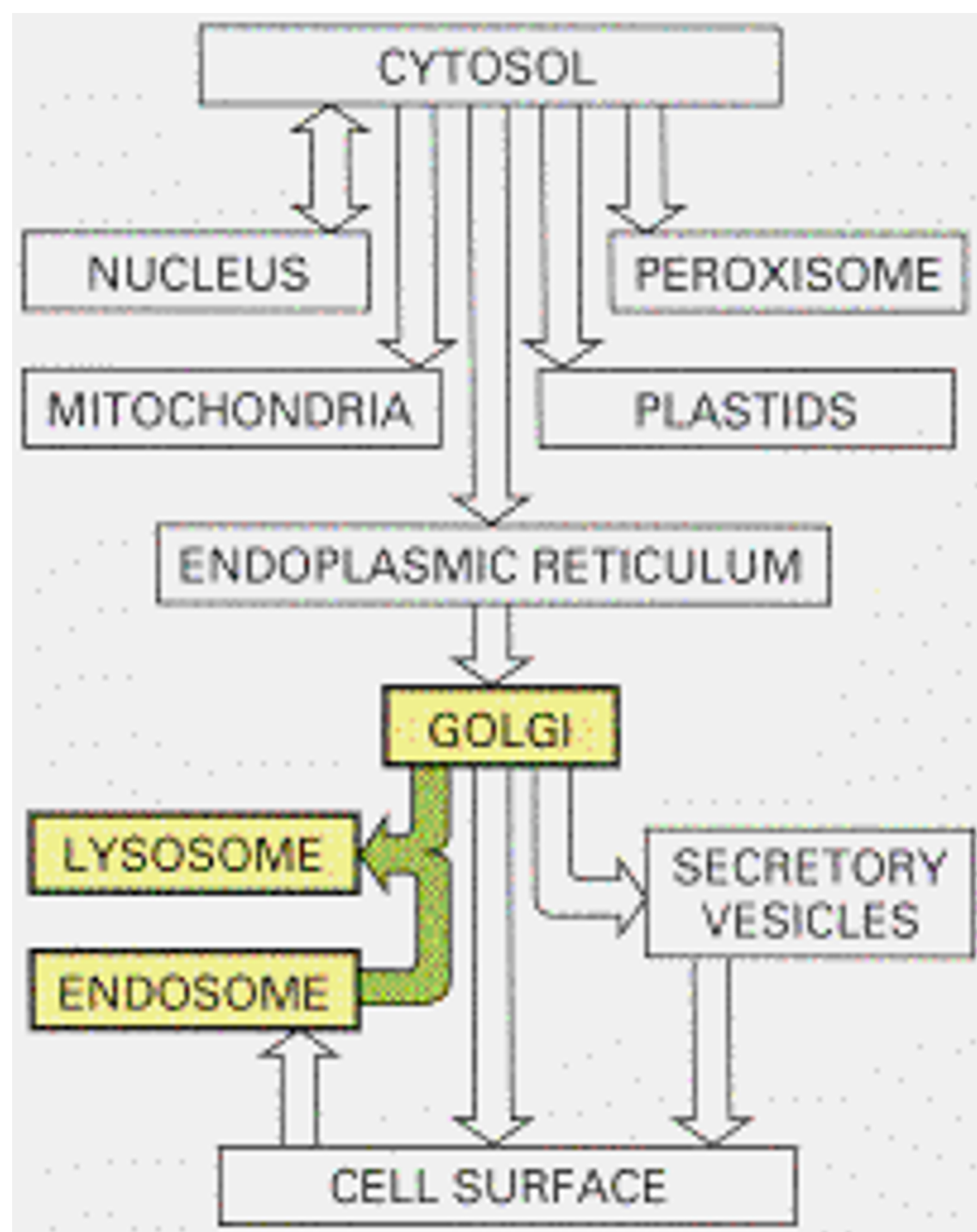


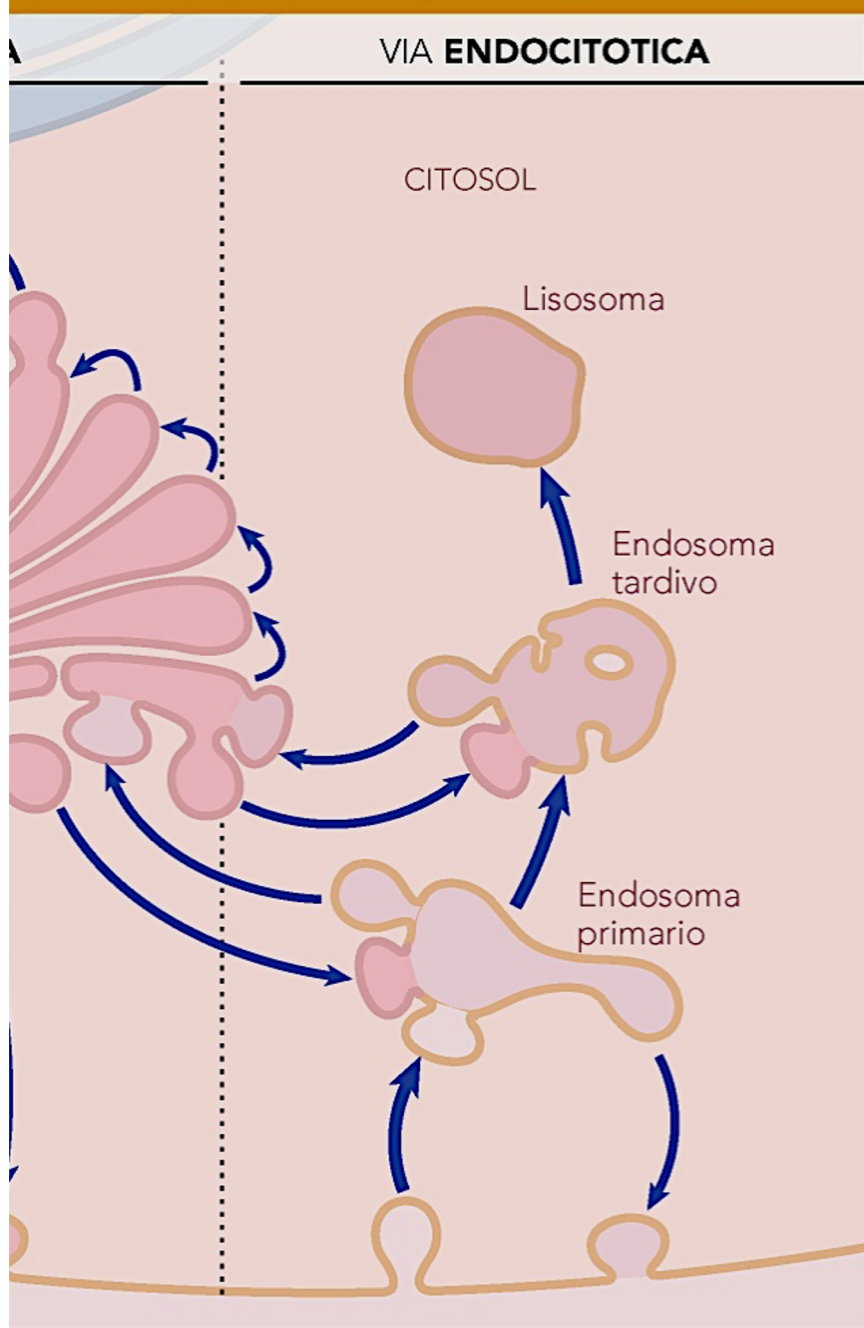
Le vescicole di secrezione si formano per maturazione delle vescicole che hanno lasciato il trans-Golgi-network. Questa maturazione consiste nella concentrazione delle proteine contenute nella vescicola in seguito al distacco di vescicole ricoperte di clatrina , che ritornano al Golgi.





In alcune cellule, la secrezione può essere polarizzata, ovvero avvenire solo da un lato della membrana plasmatica. In alcuni casi, vescicole con contenuti diversi possono essere destinate a fondersi con compartimenti diversi della membrana plasmatica.



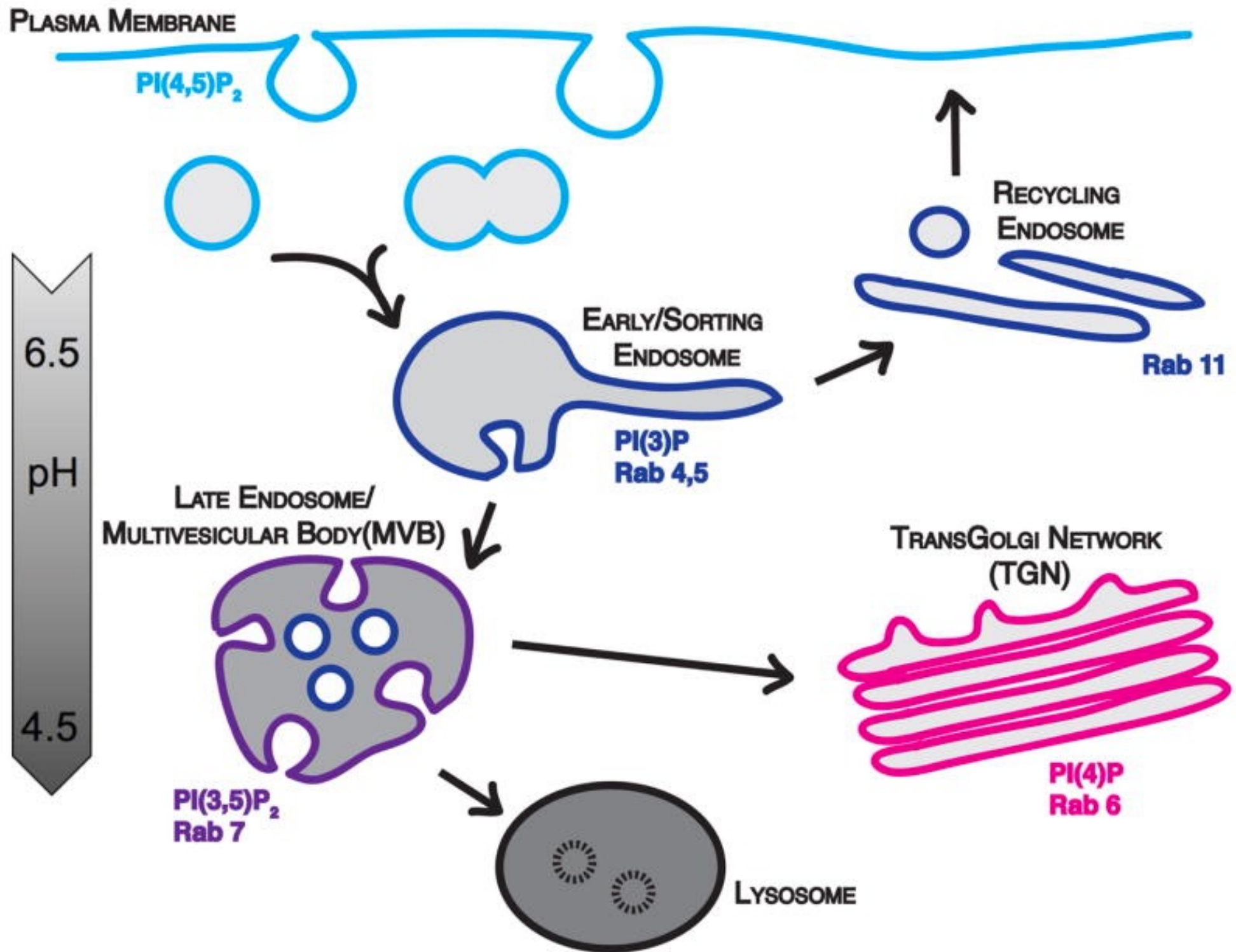


L'endocitosi porta alcune macromolecole introdotte dentro la cellula tramite vescicole ad essere digerite nelle loro parti fondamentali.

Per fare questo, le vescicole si fondono a degli organelli che sono la parte iniziale di uno stato maturativo, consistente in:

- Endosomi primari
- Endosomi tardivi
- Lisosomi

Gli endosomi ricevono il loro apporto

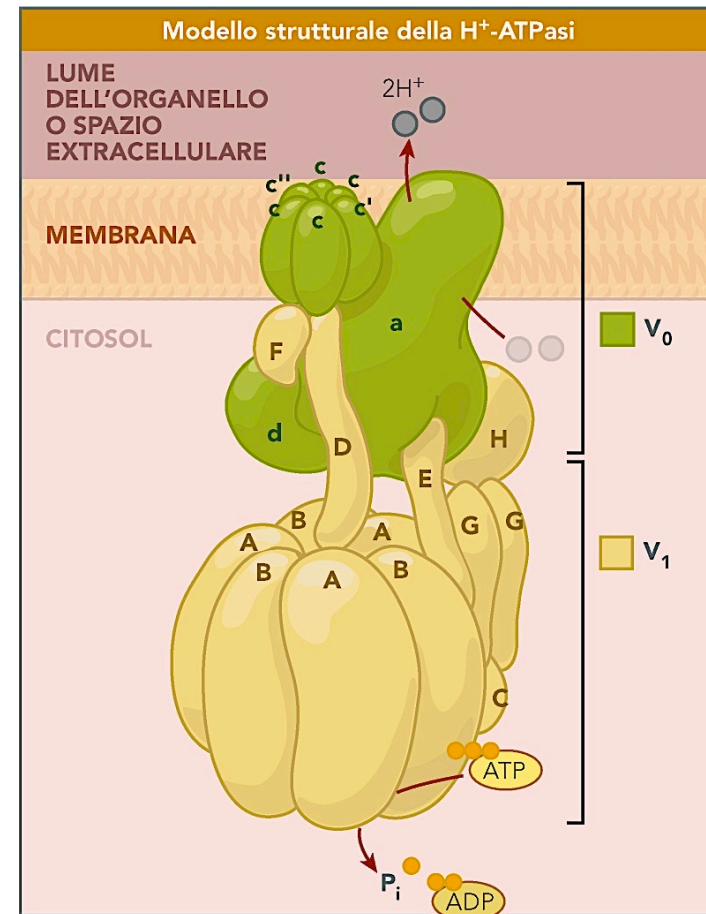
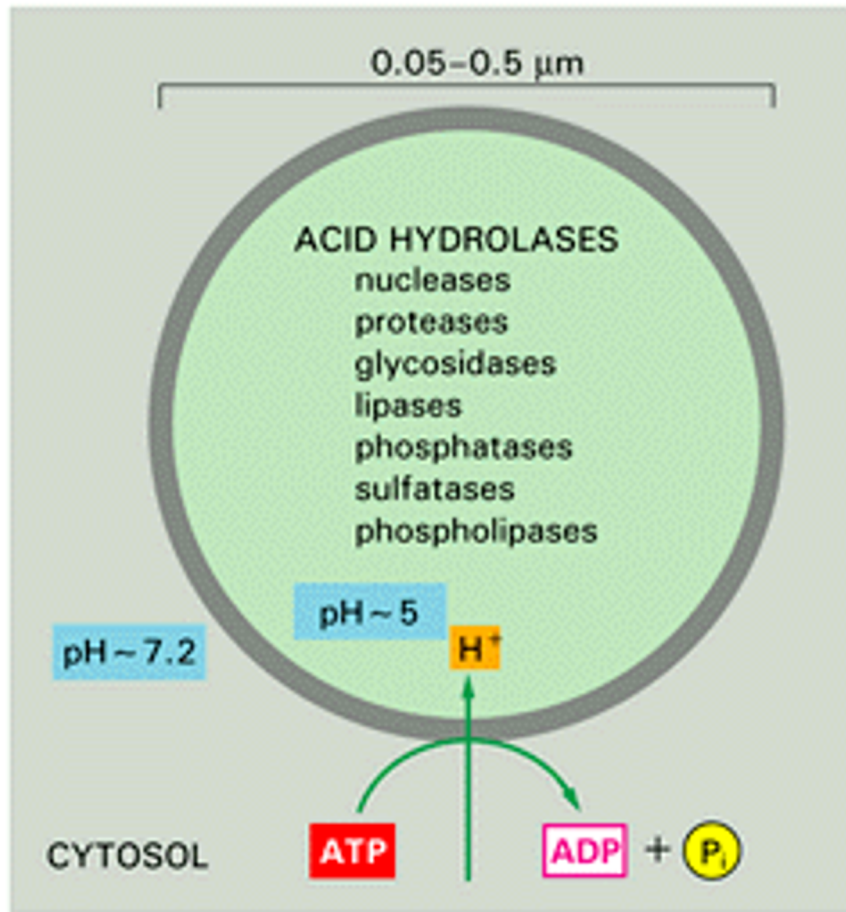


IL LISOSOMA

I lisosomi contengono enzimi litici: proteasi, glicosidasi, nucleasi, etc.

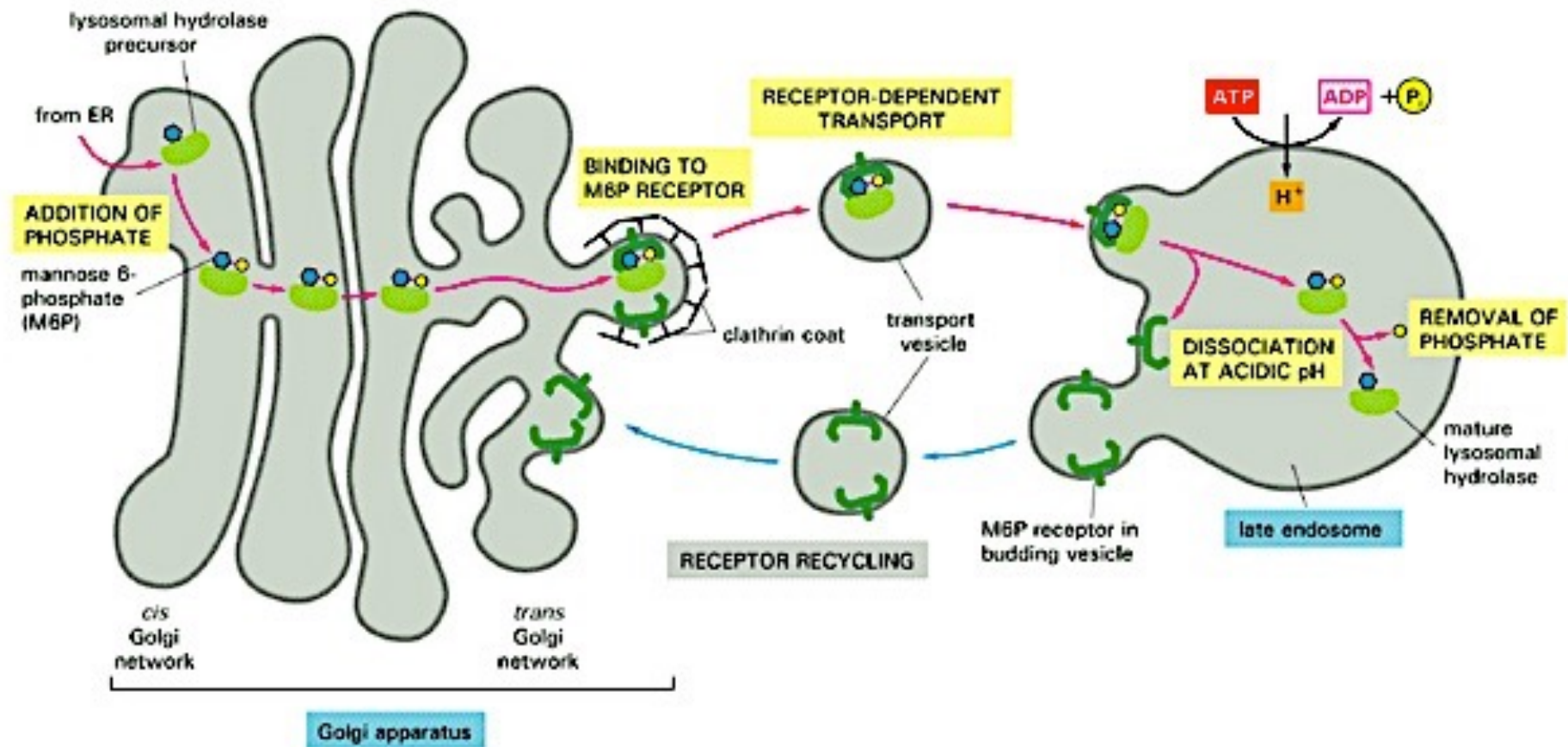
Per funzionare queste proteine richiedono che il pH sia acido

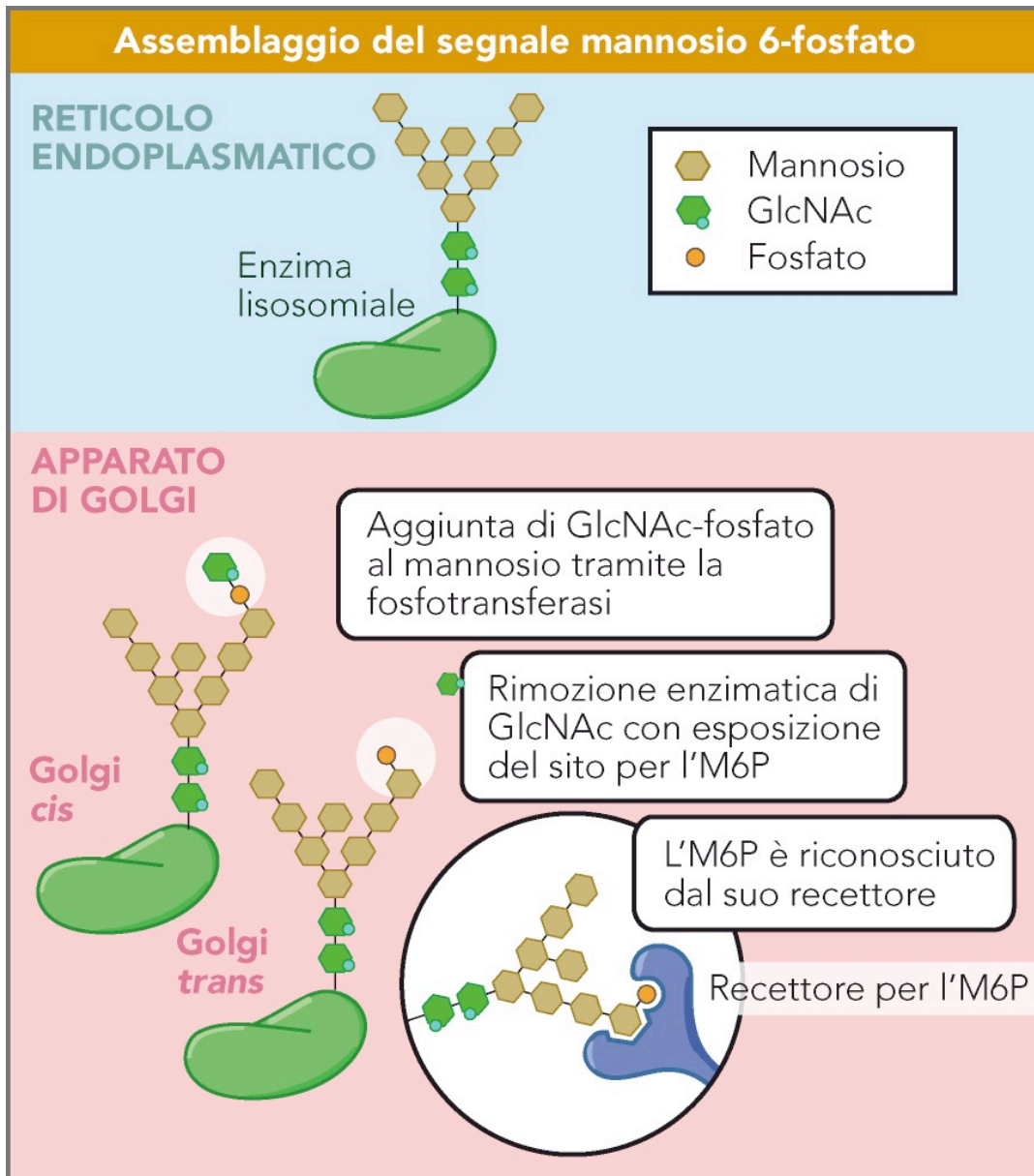
La diminuzione del pH nel lisosoma è principalmente opera di una pompa protonica di tipo V



Le proteine SOLUBILI che vengono inviate agli endosomi tardivi sono trasportate dal trans-Golgi network tramite vescicole rivestite da clatrina

Il segnale per l'entrata in queste vescicole è il **mannosio-6-fosfato (M6P)**





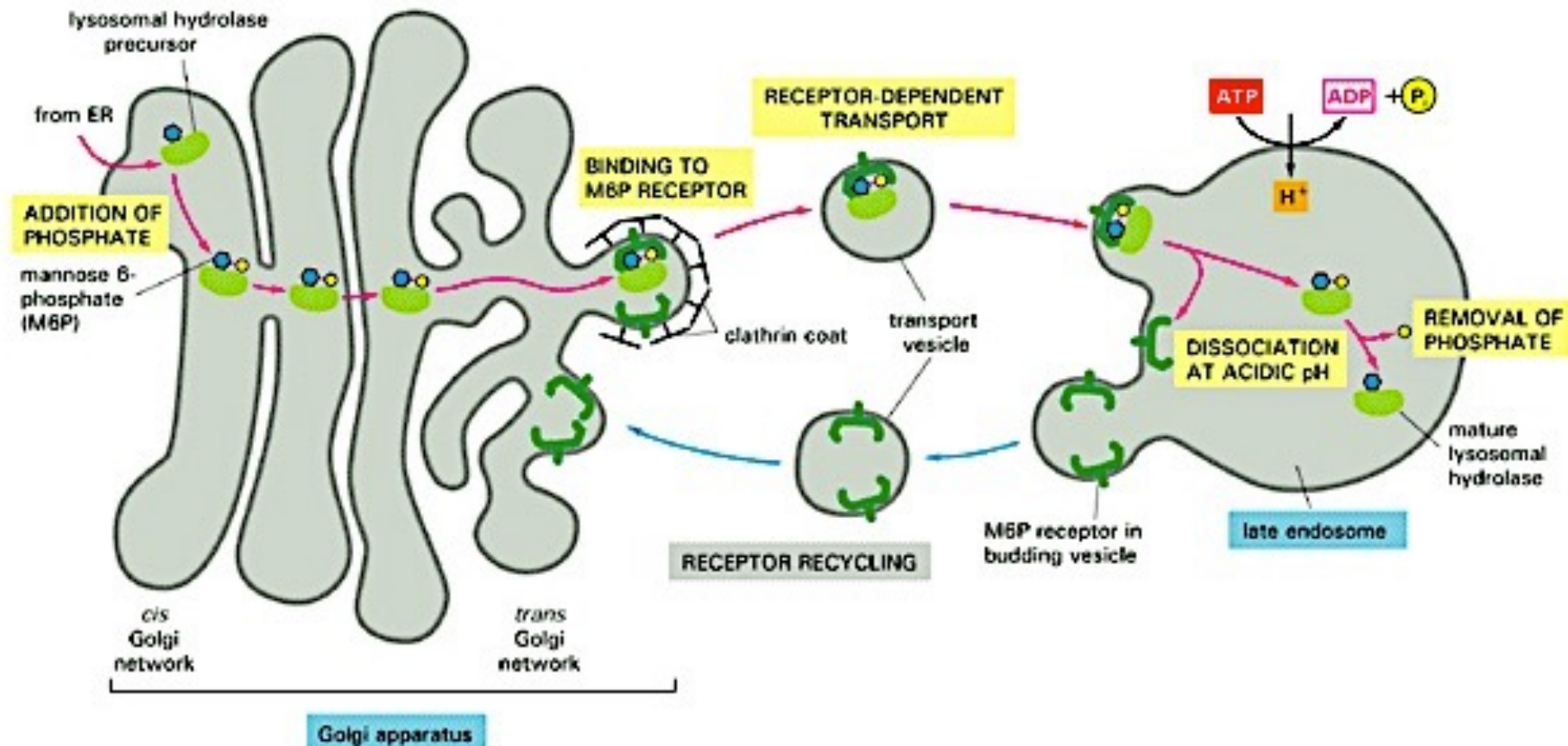
Il mannosio-6-fosfato si origina sugli zuccheri legati a N nel reticolo cis del Golgi.

Una delle estremità viene poi modificata, mediante il legame ad una molecola di N-acetilglucosamina-fosfato.

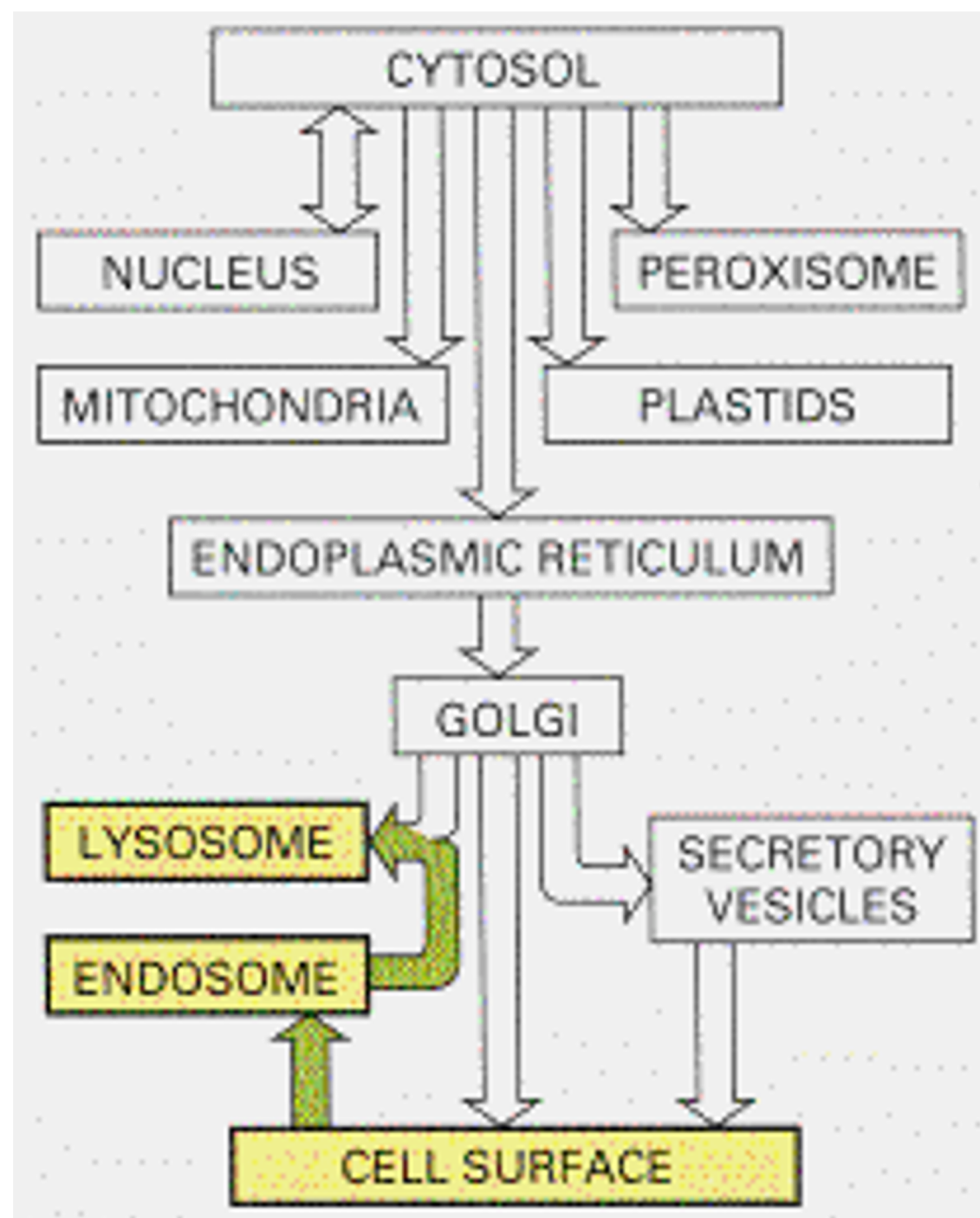
L'N-acetilglucosamina viene poi allontanata, e la catena di carboidrati rimane fosforilata ad una estremità.

Solo le idrolasi acide vengono modificate perchè l'enzima che aggiunge GlcNAc-P riconosce un segnale sterico (3D) sulla superficie delle proteine

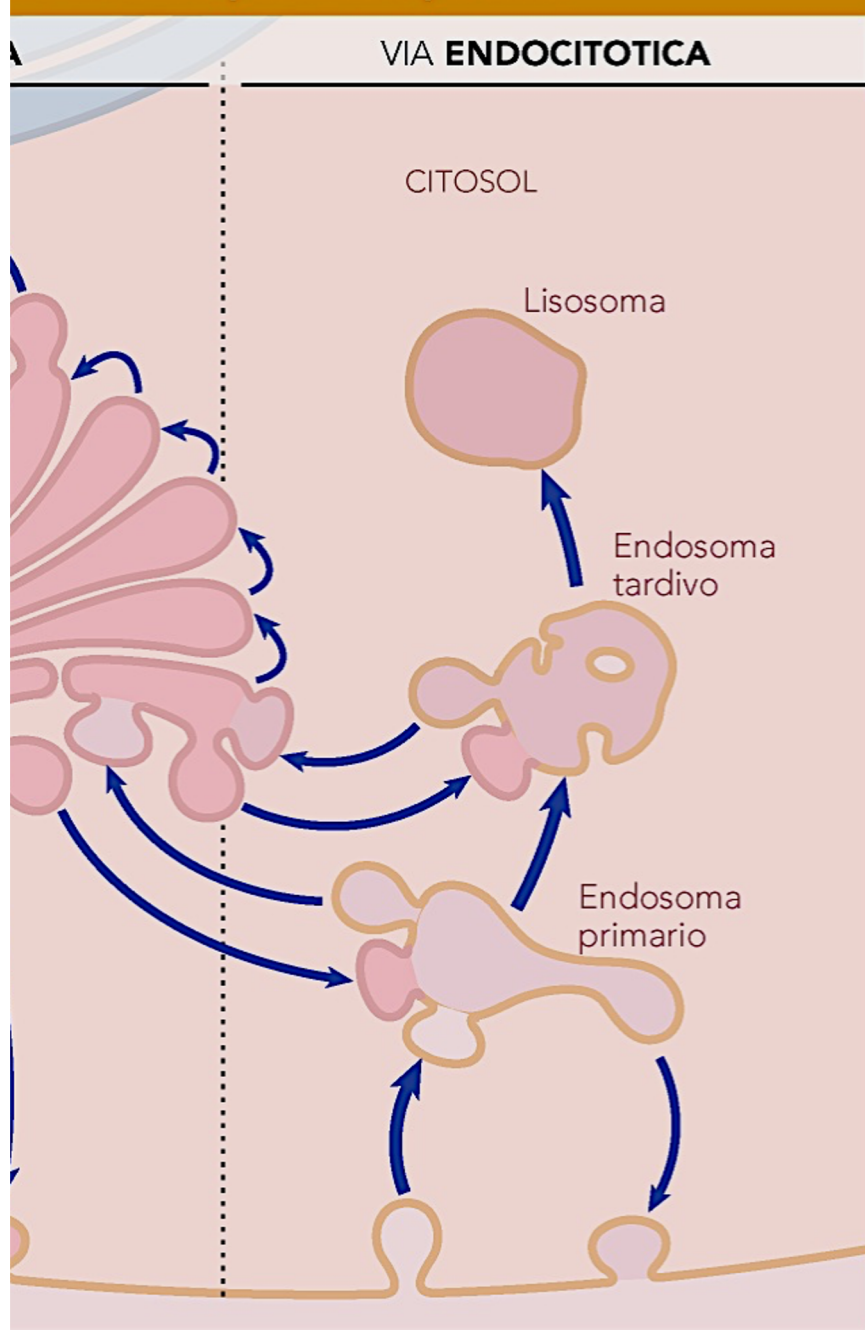
Il M6P viene aggiunto nel cis-Golgi network, ma gli enzimi litici legati ad esso non sono attivi perchè il pH è troppo poco acido. Quando la proteina raggiunge il trans-Golgi network il M6P si lega al suo recettore e la proteina viene incamerata in vescicole e portata all'endosoma. Lì il **basso pH permette il distacco della proteina e la sua attivazione come enzima litico**. Il recettore vuoto del M6P viene poi introdotto in vescicole e riportato al Golgi



Nota: il recettore per il M6P e le proteine transmembrana invece hanno dei segnali di indirizzamento codificate nella sequenza della proteina stessa (DxLL oppure YxxIdrofobico)



Le vie di trasporto delle proteine



Le macromolecole arrivano all'endosoma primario tramite vescicole che si formano dalla membrana plasmatica

ENDOCITOSI

Clathrin-mediated endocytosis
(~120 nm)

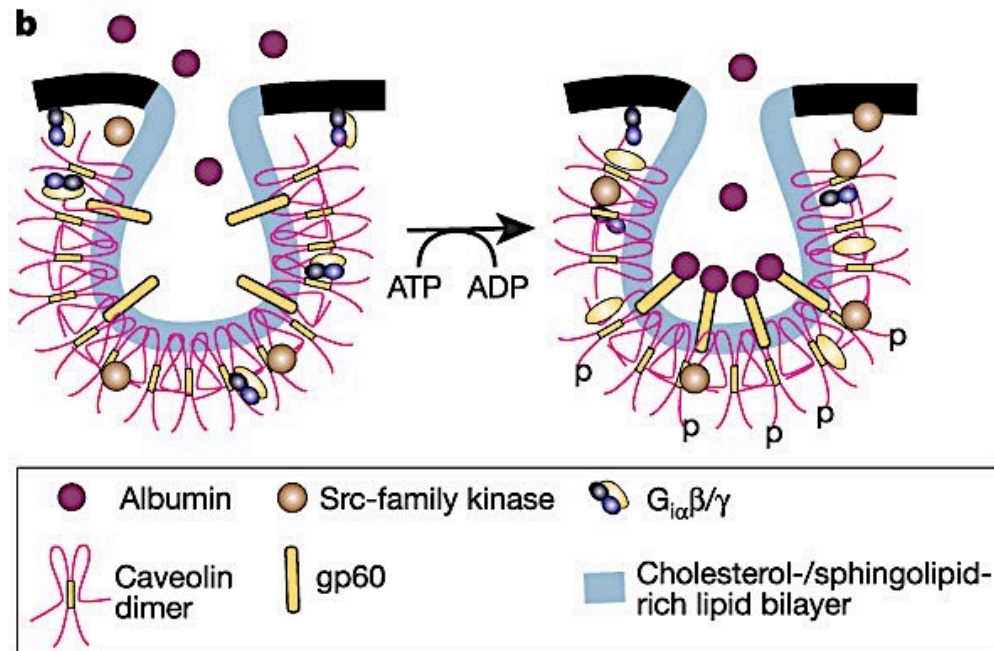
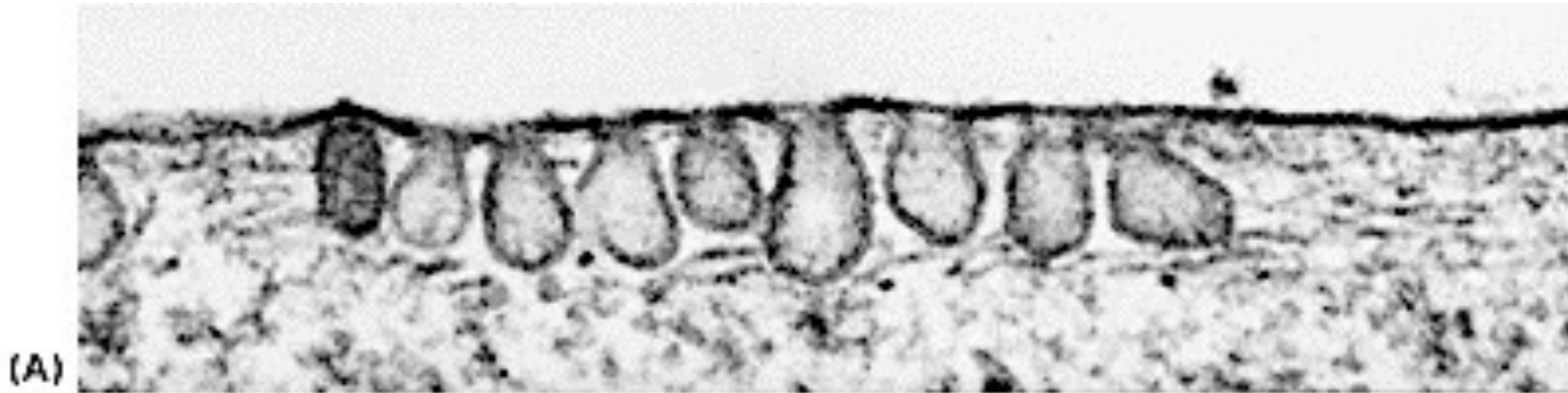
Caveolin-mediated endocytosis
(~60 nm)

Clathrin- and caveolin-independent endocytosis
(~90 nm)



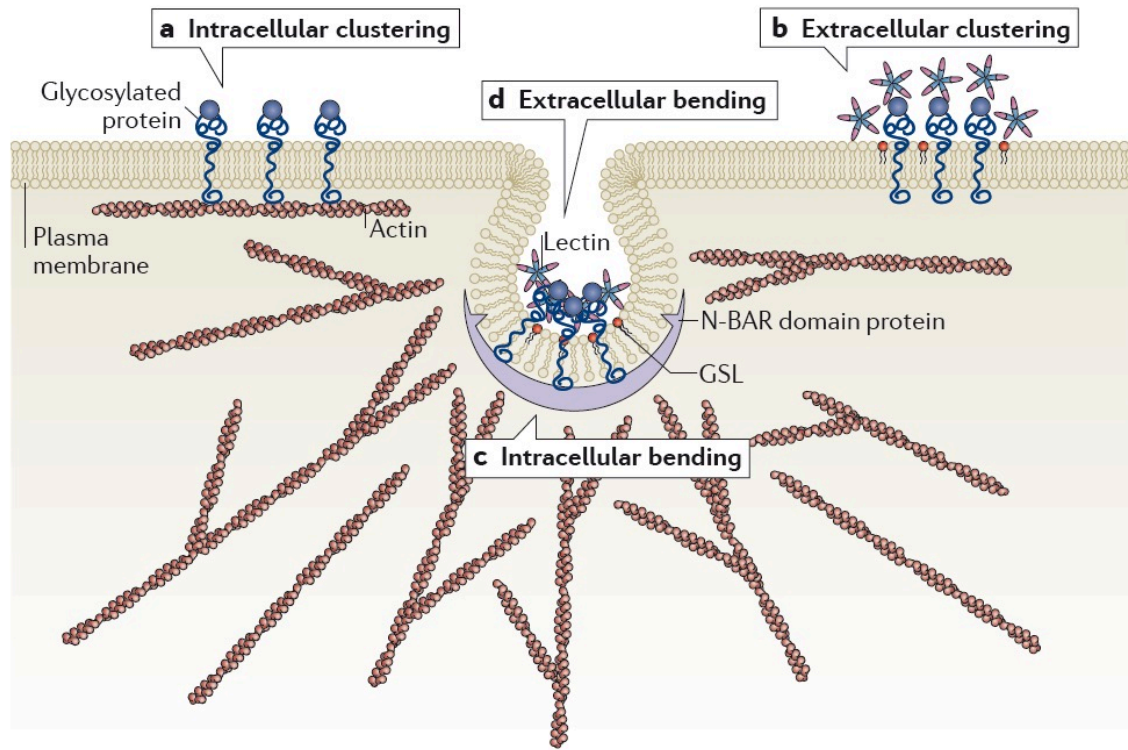
Sono uguali a quanto già
mostrato

CAVEOLE



Le caveole sono vescicole endocitiche che sono rivestite da **caveolina** e hanno la membrana ricca di colesterolo e sfingolipidi. La modalità di formazione è simile a quella delle vescicole ricoperte da clatrina, ma richiede ATP

Si formano unicamente dalla membrana plasmatica



Clathrin- and caveolin-independent endocytosis (~90 nm)

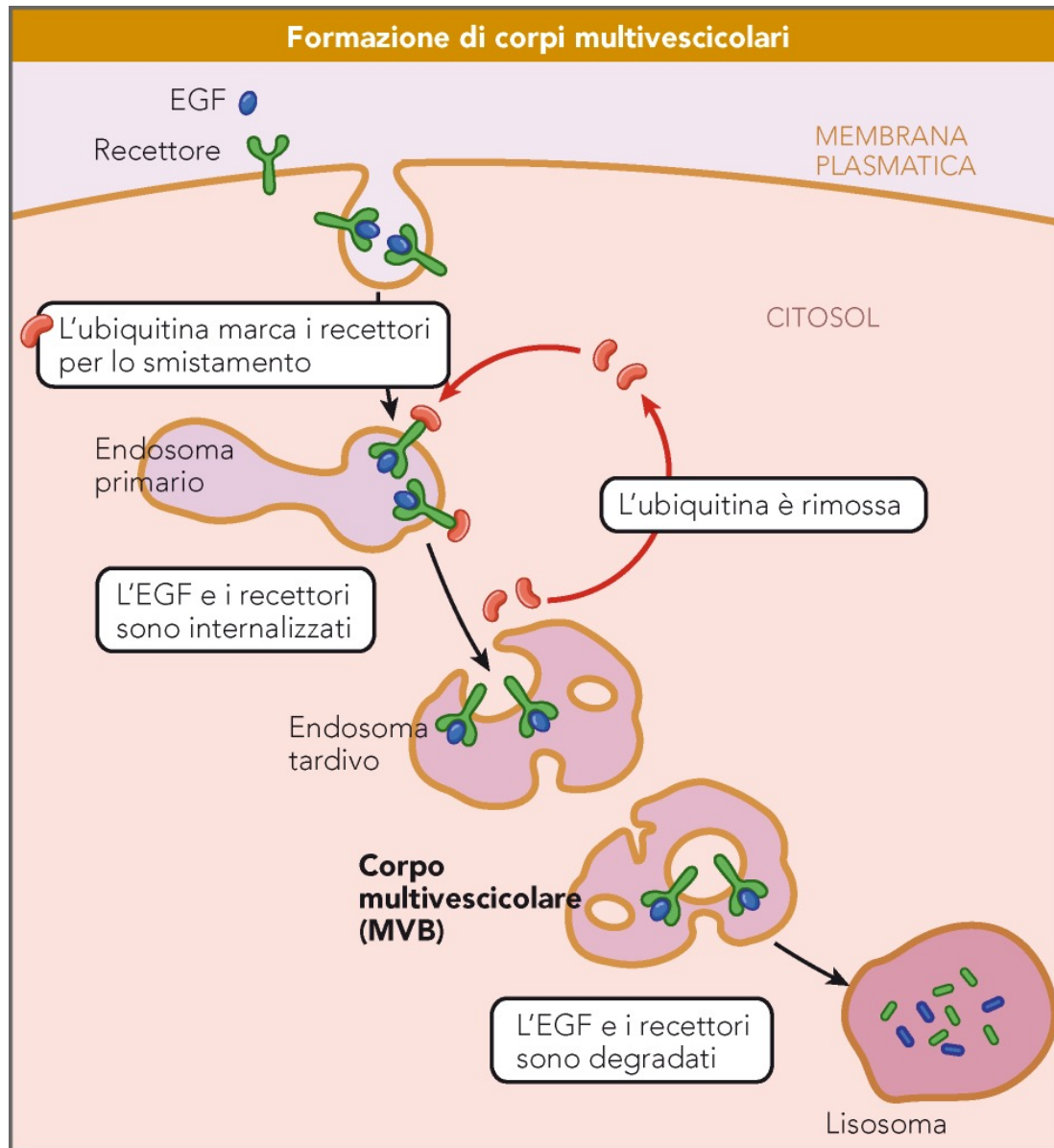


L'endocitosi indipendente da clatrina e caveolina può avvenire tramite meccanismi diversi tra loro.

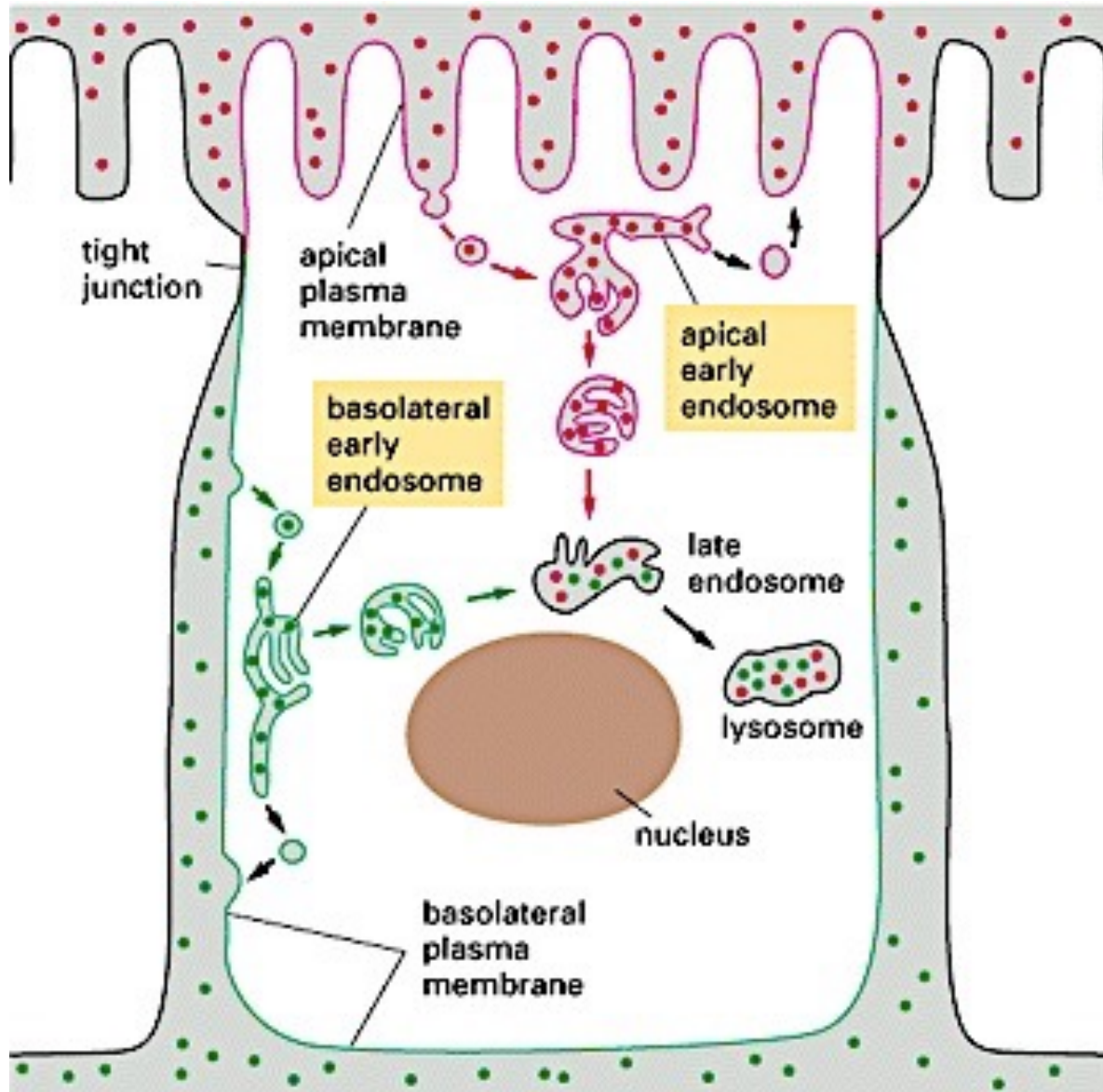
In genere dipende dalle proprietà dei recettori dei cargo che vengono trasportati.

In molti casi questi recettori possono associarsi tra loro portando al piegamento della membrana e alla formazione della vescicola.

La Dinamina è richiesta per tutti i tipi di endocitosi qui citati. Tuttavia, esiste anche una pinocitosi, poco caratterizzata, indipendente da Dinamina.



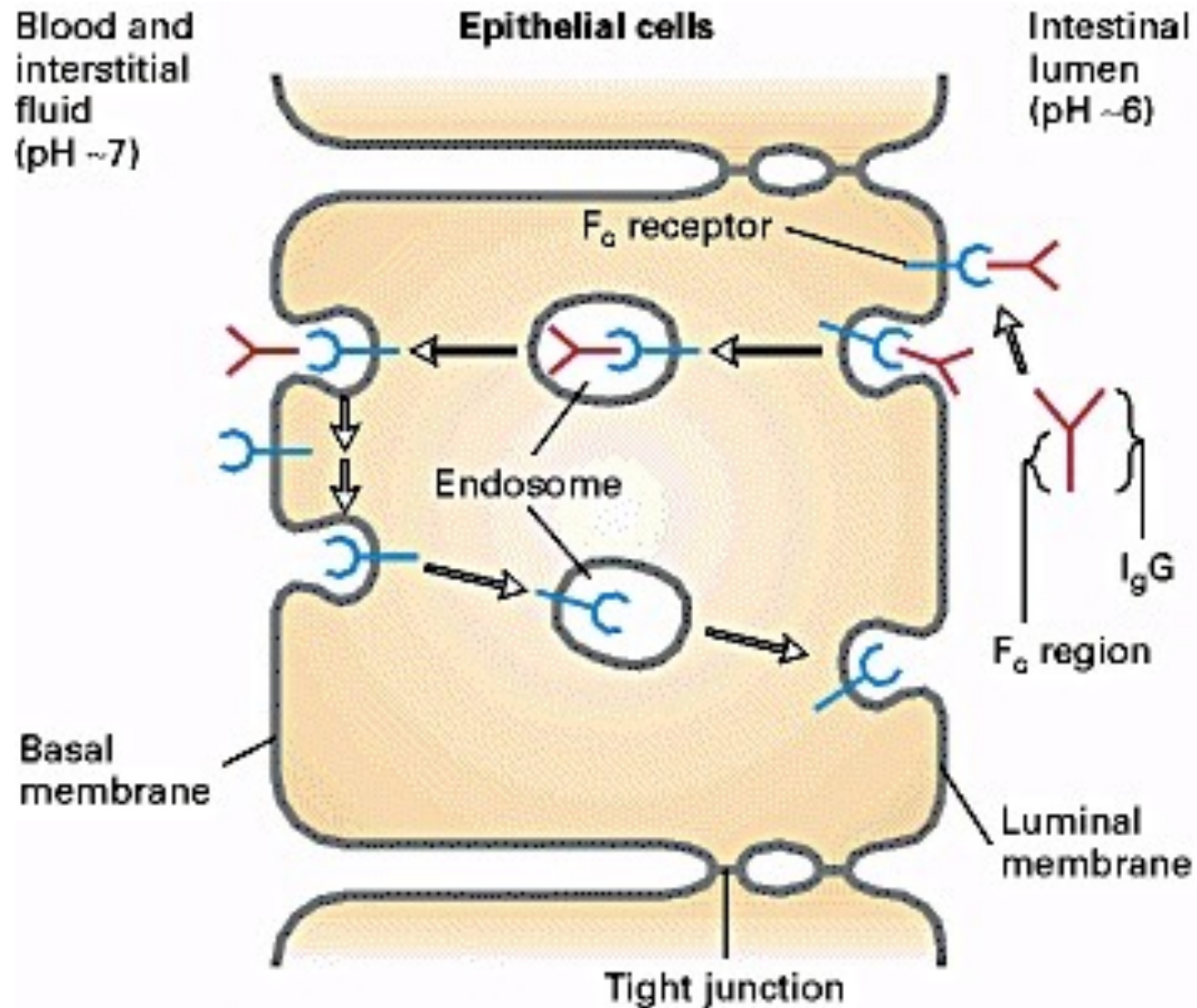
Le proteine di membrana che entrano con la via endocitica sono poi portate agli endosomi primari, dove tendono a formare delle vescicole all'interno dell'endosoma stesso. Questa tendenza si accentua nell'endosoma tardivo, che quindi evolve in corpo multivescicolare. Questo è un organello con una singola membrana, al cui interno sono contenute delle vescicole. Poi il corpo multivescicolare evolve in lisosoma.



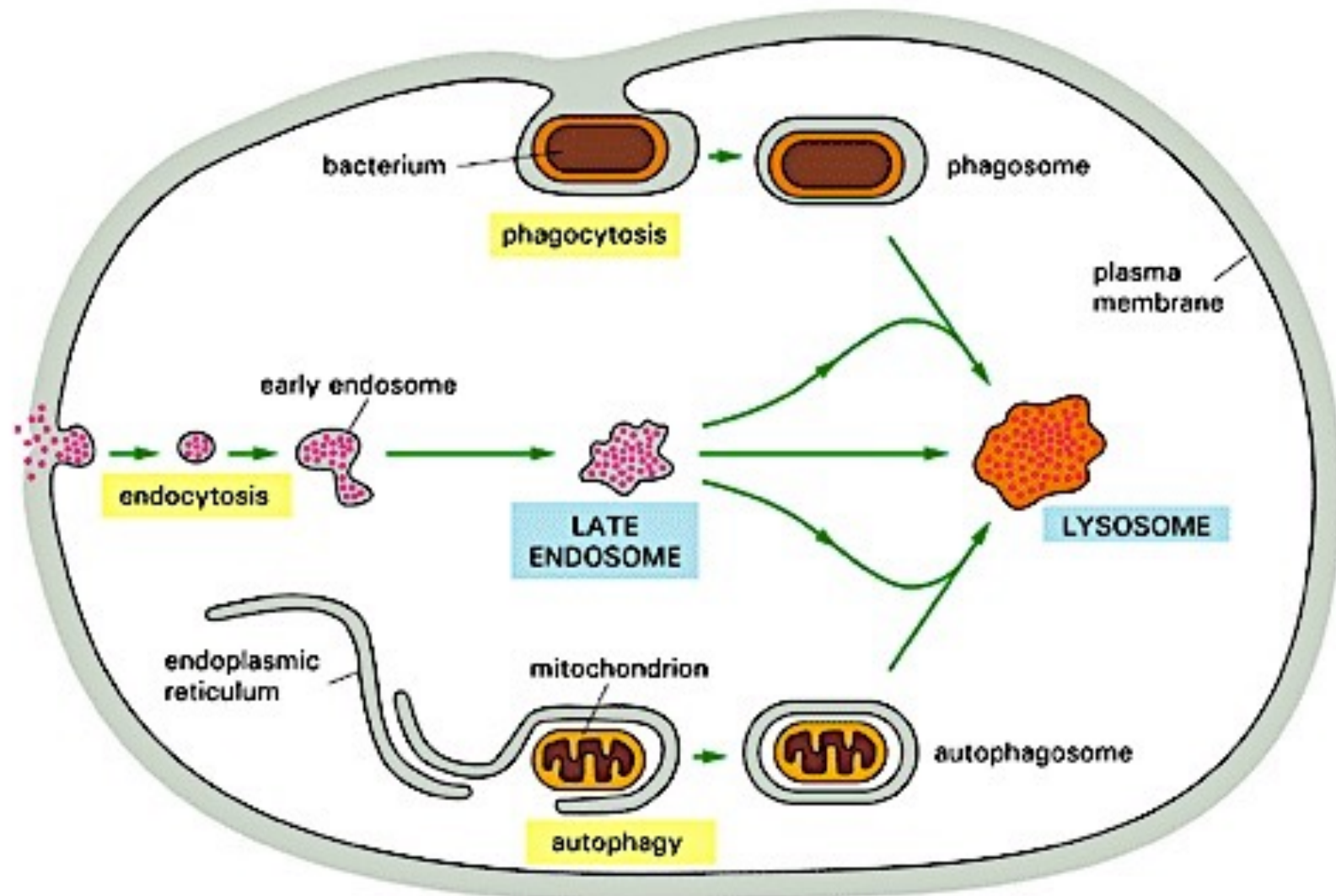
Come la secrezione, anche l'endocitosi può essere polarizzata, portando alla formazione di vescicole ed endosomi primari solo da alcuni comparti del plasmalemma.

Questo tipo di endocitosi può servire per eliminare componenti di membrana indesiderate da una porzione del plasmalemma

Alternativamente, le proteine entrate da un versante della membrana plasmatica possono essere secrete dal versante opposto. Si parla quindi di **transcitosi**. In questo caso gli endosomi primari non maturano mai in endosomi tardivi, ma diventano vescicole di secrezione

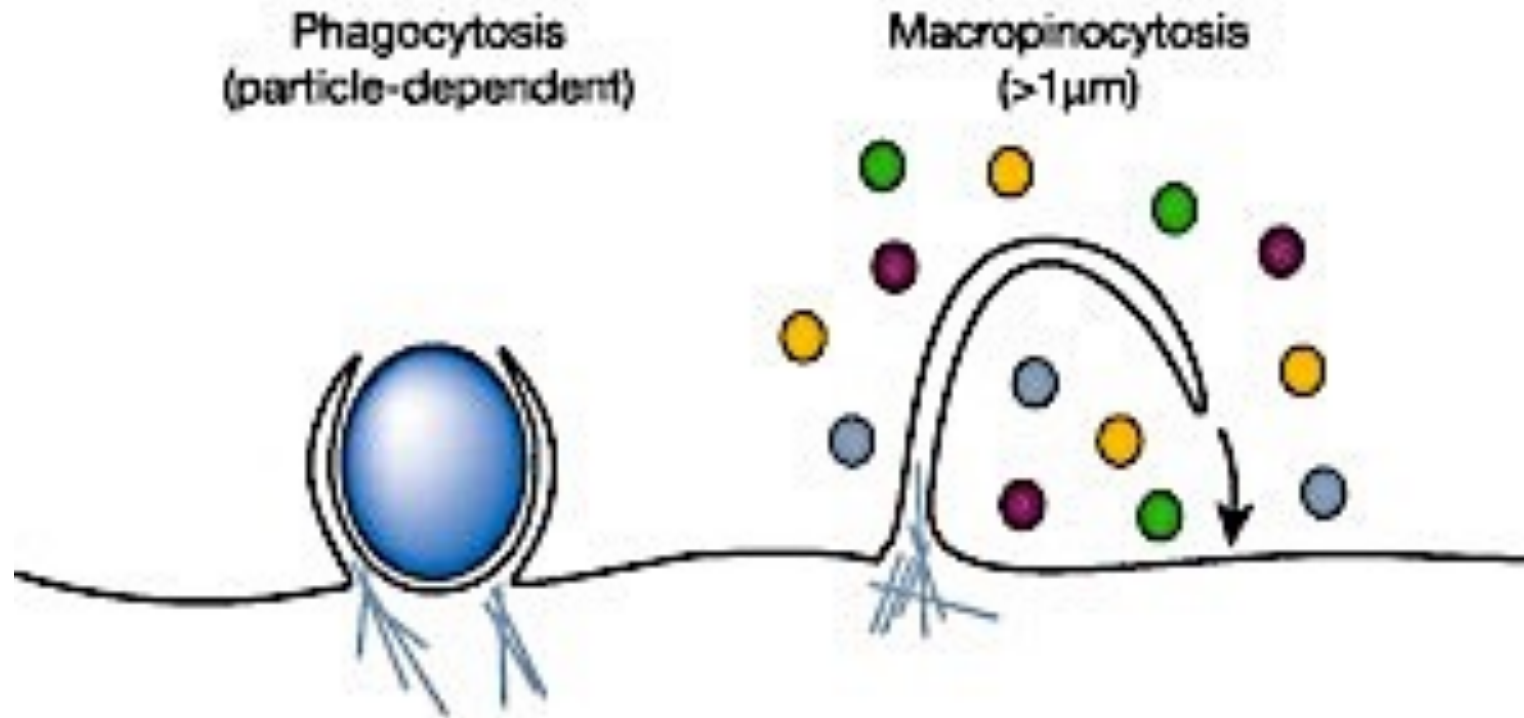


Oltre all'endocitosi, ci sono altre modalità con cui vengono a costituirsi i lisosomi



Fagocitosi: Strutture macroscopiche (come le cellule batteriche) vengono incamerate dalle cellule avvolgendole con delle estroflessioni del plasmalemma sorrette dal citoscheletro.

Pinocitosi: Parte dei fluidi extracellulari viene incamerata dalla cellula con un'estroflessione particolarmente allungata



Autofagia: una membrana detta fagoforo (sembrerebbe originarsi dal RE) avvolge uno o più organelli, creando una struttura con doppia membrana, detta autofagosoma. Questa poi si fonde con un lisosoma portando alla degradazione della membrana interna e del contenuto dell'autofagosoma.

