

TRAFFICO INTRACELLULARE DI MEMBRANA

Il controllo del passaggio di molecole è legato alle dimensioni.

I **canali ionici** sono canali selettivi, sono sempre aperti, si aprono in seguito a delle modificazioni, a degli stimoli. Essi sono specifici per alcuni ioni, sono composti da proteine i cui amminoacidi presentano dei gruppi con delle cariche o senza cariche, permettono il passaggio di alcuni ioni, ioni positivi, anche nell'ambito di ioni con lo stesso segno poiché lo ione si deve porre in una posizione precisa all'interno del canale per attraversarlo. Quindi lo ione più piccolo passerà in maniera veloce rispetto allo ione dello stesso segno.

L'apertura del canale ionico è sotto il controllo da voltaggio-dipendente, legando-dipendente o mecano-dipendente o stress-dipendente. Sono detti mecano-dipendenti poiché essi dipendono da uno stress meccanico quando praticamente c'è una forza che preme sulla membrana e fa aprire meccanicamente questo canale.

Un'altra caratteristica del passaggio degli ioni è che queste molecole passeranno in base:

- al loro **gradiente chimico** (differenza di concentrazione)
- risentiranno anche della loro carica elettrica

Quindi attraverseranno la membrana attraverso il loro **gradiente elettrochimico**.

Il sodio che è abbondante all'esterno grazie all'attività della pompa sodio-potassio tenderà a fluire verso l'interno (perché c'è una maggiore concentrazione all'interno piuttosto che all'esterno).

Inoltre è presente una separazione di carica a ridosso della membrana, negative all'interno e positive all'esterno per cui il sodio tenderà a fluire più velocemente verso l'interno non solo per la differenza di concentrazione ma anche per l'attrazione delle cariche negative presenti all'interno.

Il potassio è abbondante all'interno e poco all'esterno sempre grazie all'attività sodio potassio, esso quindi tenderà ad uscire per gradiente di concentrazione ma poiché è una carica positiva verrà rallentato dalla sua uscita dalle cariche negative che sono a ridosso della membrana.

Tutte le membrane presentano questa differenza di concentrazione a ridosso della membrana, negativa all'interno e positiva all'esterno ed il valore di questo **potenziale** (differenza di carica) arriva da -50mV a -60 -70 mV. Variazioni di questo potenziale legato alla quantità di cariche.

Le cellule muscolari e le cellule nervose che sono dei tessuti eccitabili, le variazioni determinano dei fenomeni dell'impulso elettrico e della contrazione muscolare.

I canali del sodio sono più veloci rispetto al canale del potassio.

Ioni cloruro tendono ad entrare, la membrana è permeabile a questi ioni.

La pompa sodio potassio mantiene costante il gradiente di sodio e potassio interno ed esterno all'interno della cellula. Ione cloruro tende ad entrare ma esso ha una carica negativa e si muoverà dall'esterno verso interno e risentire delle cariche dello stesso segno a livello citologico della membrana.

Il valore del potenziale di membrana in condizione di equilibrio si dice a riposo è -70mV, cioè cariche positive e negative si bilanciano. Se arriva un segnale dall'esterno e fa aprire un canale ionico che del solito è il canale del sodio, questo tenderà ad entrare, causando una variazione del potenziale di membrana, entrano cariche positive, diminuiscono le cariche negative e quindi si passa da -70mV a circa -58mV, l'intensità della depolarizzazione dipende dalla velocità in cui entra il sodio, di quanti canali sodio si aprono. Se questo stimolo è di bassa intensità si apre il canale del sodio, il sodio tende ad entrare poco dopo con più lentezza si apre il canale del potassio che fa uscire le cariche positive quindi si ha una variazione di potenziale minima che viene registrata dalla cellula e le cellule reagiranno alla variazione di questo potenziale ma dopo un po' verrà ristabilito il potenziale di membrana in condizioni di riposo.

Quando nel caso di una **cellula eccitabile** si ha uno stimolo intenso il sodio entra con velocità poiché si aprono canali passivi del sodio, il sodio entra in quantità maggiori e fa variare il potenziale di membrana, sale il valore **soglia** (-50mV), comincia ad essere trasmesso l'impulso elettrico, questa variazione del potenziale fa aprire i canali del sodio controllati dal potenziale.

Quindi i primi ad aprirsi sono i canali passivi del sodio, il sodio entra. Se questa entrata fa cambiare il valore soglia e lo fa aumentare, si aprono i canali del **sodio voltaggio-dipendenti** controllati dal potenziale di membrana. Entreranno altri ioni sodio aumenta la depolarizzazione e si arriva ad un valore positivo di +40mV. La cellula deve ritornare al suo valore iniziale quindi si deve abbassare il potenziale di membrana. Vengono inattivati i canali del sodio (NON chiuderli) ma si bloccano, una particella che blocca questo canale, pur rimanendo aperto non passano ioni sodio da questo canale.

In questo periodo di inattivazione esistono due stadi:

- 1) un periodo di *refrattarietà assoluta*
- 2) Un periodo di *refrattarietà relativa*

REFRATTARIETA ASSOLUTA: i canali del sodio non si aprono. La cellula non può più rispondere a questo stimolo.

REFRATTARIETA RELATIVA: uno stimolo maggiore di quello iniziale la cellula risponde.

Le cellule eccitabili svolgono un importante ruolo nell'impulso nervoso.

La cellula nervosa detta **neurone** presenta un corpo cellulare da cui si diramano delle ramificazioni brevi chiamate **dendriti**, dal corpo della cellula nervosa parte una lunga ramificazione chiamata **assone**, questo assone a sua volta si dirama in tante piccole ramificazioni che sono i **terminali nervosi**.

Il corpo riceve lo stimolo attraverso i dendriti, lo stimolo arriva attraverso variazioni di potenziale e questa variazione di potenziale viene trasmessa al corpo della cellula nervosa, a questo punto viene elaborato il segnale e viene trasmesso come depolarizzazione della membrana nell'assone e l'impulso elettrico passerà attraverso l'assone per arrivare poi alle terminazioni nervose.

Le terminazioni nervose sono in contatto o con altri corpi cellulari o con delle cellule muscolari come nel caso del muscolo cardiaco o il muscolo scheletrico. Nel caso del muscolo cardiaco e del muscolo scheletrico si hanno due comunicazioni diverse.

Inoltre i canali del sodio sono molto abbondanti nell'assone e la propagazione dell'impulso avviene molto più velocemente lungo l'assone rispetto al ritorno nel corpo cellulare.

La propagazione del potenziale lungo l'assone è *autoamplificante*.

Quando arriva l'impulso al corpo cellulare viene elaborato e viene trasmesso lungo l'assone (avviene la prima depolarizzazione voltaggio-dipendente). Se entra una quantità di sodio tale da far variare il potenziale di membrana oltre al valore soglia, si aprono i canali del sodio voltaggio dipendenti. Il sodio entra viene depolarizzato in modo bidirezionale.

Il sodio che entra fa aprire i canali voltaggio-dipendente, si inattivano e non sono più sensibili.

I canali sono pronti a ricevere un nuovo stimolo.

La **funzione principale della mielina** è quella di consentire la corretta conduzione degli impulsi nervosi, amplificandone la velocità di trasmissione attraverso la cosiddetta "conduzione saltatoria".

Nelle fibre mieliniche, infatti, la mielina non riveste gli assoni in modo uniforme, ma li ricopre a tratti, formando dei caratteristici strozzamenti che danno visivamente origine a tanti piccoli "salsicciotti"; in questo modo l'impulso nervoso, anziché percorrere la fibra per l'intera lunghezza, può procedere lungo l'assone saltando da un "salsicciotto" all'altro (in realtà non si propaga di nodo in nodo, ma ne salta qualcuno). Le interruzioni della guaina mielinica, tra un segmento e l'altro, sono definite nodi di Ranvier. Grazie alla conduzione saltatoria la velocità di trasmissione lungo l'assone passa da 0.5-2 m/s a circa 20-100 m/s.

Una funzione secondaria ma altrettanto importante della mielina è quella di protezione meccanica e sostentamento nutritivo nei confronti dell'assone che riveste.

La funzione isolante è invece importante perché in assenza di mielina i neuroni - specie a livello SNC dove le reti neuronali sono particolarmente fitte - essendo eccitabili, risponderebbero ai moltissimi segnali circostanti, così come un filo elettrico privo di copertura isolante disperderebbe la corrente senza portarla a destinazione.

Esaminando la composizione della mielina, si nota un contributo preponderante da parte dei lipidi, soprattutto colesterolo ed in minor misura fosfolipidi come lecitina e cefalina. L'80% delle proteine è invece costituito da una proteina basica e da una proteina proteolipidica; sono poi presenti proteine minori, tra cui spicca la cosiddetta proteina oligodendrocitaria.

Trattandosi di componenti propri dell'organismo, normalmente il sistema immunitario riconosce le proteine mieliniche come "self", quindi amiche e non pericolose; purtroppo in alcuni casi, i linfociti diventano "autoaggressivi" ed attaccano la mielina, distruggendola a poco a poco. Stiamo parlando della sclerosi multipla, una malattia che porta alla graduale perdita del rivestimento mielinico, fino alla morte della cellula nervosa. Quando la mielina è infiammata o distrutta, la conduzione lungo le fibre nervose viene danneggiata, rallentata o interrotta completamente. Il danno della mielina è, almeno nelle prime fasi di malattia, parzialmente reversibile, ma può comportare alla lunga un danno irreparabile delle fibre nervose sottostanti.

Per anni si è creduto che una volta danneggiata, la mielina non potesse essere rigenerata. Recentemente si è visto che il sistema nervoso centrale può remielinizzarsi, cioè formare nuova mielina, e ciò apre nuove prospettive terapeutiche nel trattamento della sclerosi multipla.

Come anticipato, la mielina è costituita dalla membrana plasmatica (plasmalemma) di cellule particolari, che si avvolge più volte attorno all'assone. A livello del sistema nervoso centrale, la mielina viene prodotta da cellule chiamate oligodendrociti, mentre a livello periferico la medesima funzione è ricoperta dalle cellule di Schwann. Entrambi i tipi cellulari appartengono alle cosiddette cellule gliali; la mielina si forma quando queste cellule gliali avvolgono un assone con le loro membrane plasmatiche, spremendo il citoplasma all'esterno in modo che ogni avvolgimento corrisponda all'aggiunta di due strati di membrana; per intenderci, il processo di mielinizzazione può essere paragonato all'avvolgimento di un palloncino sgonfio attorno ad una matita, o di una garza a doppio strato attorno ad un dito.

Poiché nel S.N.C. vi sono problemi di spazio, ogni singolo oligodendrocita fornisce la mielina per un solo segmento, ma di più assoni; quindi ogni assone è avvolto da segmenti mielinici formati da oligodendrociti diversi. A livello periferico, invece, ogni singola cellula di Schwann fornisce la mielina ad un singolo assone.

Oligodendrociti e cellule di Schwann sono indotti a produrre mielina dal diametro dell'assone: nel SNC questo avviene quando il diametro è di $0,3 \mu\text{m}$, mentre nel SNP inizia da diametri superiori ai $2 \mu\text{m}$.

Di solito lo spessore della guaina mielinica, quindi il numero degli avvolgimenti da cui è formata, è proporzionale al diametro dell'assone e questo a sua volta è proporzionale alla sua lunghezza.

Le cellule nervose possono essere:

- **Cellule Mieliniche**, presentano la guaina mielinica che trasmettono lungo gli assoni l'impulso nervoso. Grazie alla guaina mielinica, l'impulso non viene dissipato. La variazione del potenziale di membrana è saltatoria, salta da una zona sprovvista di mielina ad un'altra, questa zona è detta **Nodo di Ranvier**. Il potenziale non perde di forza saltando da nodo a nodo. Nella Sclerosi si perde la guaina mielinica per cui il potenziale di membrana viene dissipato e di conseguenza non arriva alle terminazioni nervose. Una volta che la variazione del potenziale si è propagata, il segnale viene trasmesso tramite le sinapsi, in modo che l'impulso venga trasmesso alla cellula bersaglio. Esistono due tipi di sinapsi:
 - **Sinapsi elettriche** sono quelle che si trovano nel muscolo cardiaco, si formano le Gap Junction che sono quelle giunzioni dei punti proteici fra membrana di cellule adiacenti formano un canale attraverso cui si mettono in contatto i due citoplasmi delle cellule adiacenti, l'impulso elettrico viene quindi trasmesso alle cellule comunicante.
 - **Sinapsi chimiche** si ha nella giunzione neuromuscolare, tra la cellula presinaptica e postsinaptica vi è uno spazio, uno spazio sinaptico, l'impulso elettrico non può attraversare questo spazio, quindi nella zona presinaptica (ci sono tante vescicole nella membrana della zona presinaptica) quando arriva l'impulso elettrico fa aprire i canali del calcio che inducono una fusione di queste vescicole con la membrana presinaptica. All'interno delle vescicole abbiamo delle molecole chiamate neurotrasmettitori che vengono rilasciate nello spazio sinaptico arrivano alla membrana postsinaptica, lì si legano a dei canali ligando-dipendenti, una volta che si aprono a questi canali ligando-dipendenti (che sono dei canali ionici) e ricomincia l'impulso elettrico. Questo succede nella zona terminale nel quale arriva il potenziale nei canali Calcio-dipendenti, questo fa entrare il calcio, nel momento in cui entra il calcio vi è un segnale che arriva alla cellula questo fa fondere le vescicole nella membrana presinaptica, viene rilasciato un neurotrasmettitore, si aprono i canali ligando-dipendenti, entra il flusso di ioni e viene trasformato in impulso elettrico. **Sinapsi eccitatorie**: il neurotrasmettitore che viene rilasciato al canale del sodio, si ha una variazione di potenziale e viene trasmesso un impulso. **Sinapsi inibitorie**: un ligando si lega ad un canale inibitorio
- **Cellule Amieliniche**, Le fibre amieliniche strutturalmente constano di piccoli fasci di assoni nudi: ciascun fascio è avvolto da una cellula di Schwann, che invia sottili propaggini citoplasmatiche a separare i singoli assoni. Nelle fibre amieliniche, quindi, numerosi assoni di piccolo diametro possono essere contenuti nelle introflessioni di una singola cellula di Schwann.

A livello periferico, la presenza di mielina prodotta dalle cellule di Schwann conferisce alle fibre nervose la possibilità di rigenerarsi, cosa fino a pochi anni fa considerata impossibile a livello del SNC. Al contrario delle cellule di Schwann, infatti, gli oligodendrociti non promuovono la rigenerazione della fibra nervosa in caso di lesione. Ricerche recenti, hanno tuttavia evidenziato che la rigenerazione è difficile ma possibile anche nel sistema nervoso centrale e che, potenzialmente, è addirittura possibile la "neurogenesi", ovvero la formazione di nuovi neuroni.

ENDOCITOSI

Per endocitosi si indica processo attraverso il quale la cellula internalizza materiale extracellulare, può avvenire in vari modi:

- **Fagocitosi** (condizione in cui la cellula mangia)
- **Pinocitosi** (condizione in cui la cellula beve)

Avviene la fagocitosi nel momento in cui la cellula deve far entrare del materiale che serve alla cellula o che debba essere digerito dall'ambiente extracellulare. I macrofagi attuano il processo di fagocitosi per eliminare batteri o macromolecole.

L'endocitosi generalizzata o clatrina indipendente è l'endocitosi mediata da *recettori*.

Attraverso l'endocitosi generalizzata viene ingerito materiale di piccole dimensioni che è contenuto nel fluido extracellulare, essa viene attuata per conservare intatta la superficie della membrana, cioè per maniere in modo corretto il rapporto che vi è fra la superficie e volume poiché deve essere conservato un determinato rapporto tra superficie e volume che sia circa di 3:1.

L'endocitosi mediata da recettori o clatrina dipendente è quando l'endocitosi attraverso questi recettori che sono proteine di membrana, fanno in modo che specifiche molecole extracellulari entrino nella cellula.

Quindi nell'endocitosi mediata da recettori, si ha un ingresso controllato e specifico, esso avviene proprio per aumentare la quantità di materiale che viene fatto entrare. I recettori sono quasi sempre proteine transmembrana che attraverso la parte che sporge nella zona cellulare dal sito di riconoscimento del ligando, una volta avvenuto il legame recettore avvengono modificazioni a livello della membrana che porterà la formazione di una vescicola che viene portata all'interno.

L'endocitosi mediata da recettore fornisce un mezzo selettivo ed efficiente di macromolecole che si trovano nella zona extracellulare, si possono trovarsi a concentrazioni basse e in questo modo aumenta la quantità che viene fatta entrare. I recettori soggetti ad endocitosi sono di due tipi:

- Recettori di mantenimento, chiamati anche *Housekeeping*, determinano l'assunzione di molecole che vengono servono alla cellula e che vengono utilizzate per le funzioni cellulari.
- Recettori di segnale, sono quelli che servono a traslocare i messaggi che servono a far cambiare l'attività della cellula.

Quando avviene l'endocitosi di questi recettori hanno due destini diversi:

- I **recettori di mantenimento** che servono ad inglobare del materiale di cui la molecola ha bisogno, come LDL (proteine a bassa densità), non vengono degradati, quindi la cellula fa entrare il materiale ma il recettore lo riutilizza.
- Il **recettore di segnale** che serve ad inglobare delle molecole che serve a far cambiare l'attività della cellula, non vengono riutilizzati ma vengono degradati. La cellula non li conserva ma li degrada insieme al segnale che viene internalizzato.

Praticamente tutte le cellule eucariotiche ingeriscono continuamente pezzi della loro membrana plasmatica sotto forma di piccole vescicole pinocitiche (endocitiche). La velocità alla quale la membrana plasmatica è internalizzata in questo processo di **pinocitosi** varia fra i tipi cellulari, ma è, in genere, sorprendentemente alta. Un macrofago, per esempio, ingerisce il 25% del proprio volume di fluido ogni ora. Ciò significa che deve ingerire il 3% della sua membrana plasmatica ogni minuto, o il 100% in circa mezz'ora. I fibroblasti endocitano a un ritmo un po' più lento (1% della loro membrana plasmatica al minuto), mentre alcune amebe ingeriscono la loro membrana plasmatica ancora più rapidamente. Poiché la superficie e il volume della cellula restano invariati durante questo processo, è chiaro che la stessa quantità di membrana che viene rimossa mediante endocitosi viene aggiunta sulla superficie della cellula per mezzo del processo inverso dell'*esocitosi*. In questo senso, endocitosi ed esocitosi sono processi interconnessi che possono essere considerati come costituenti di un *ciclo endocitico-esocitico*. L'accoppiamento fra esocitosi ed endocitosi è particolarmente stretto in strutture specializzate caratterizzate da un alto turnover di membrana, come le sinapsi dei neuroni.

La parte endocitica del ciclo spesso inizia nelle **fosse rivestite di clatrina**. Queste regioni specializzate occupano normalmente circa il 2% dell'area totale della membrana plasmatica. La vita di una fossa rivestita di clatrina è breve: nel giro di un minuto circa dopo la sua formazione essa si invagina nella cellula e si distacca, formando una vescicola rivestita di clatrina.

È stato stimato che ogni minuto circa 2500 vescicole rivestite di clatrina lascino la membrana plasmatica di un fibroblasto in coltura. Le vescicole rivestite sono ancora più transitorie delle fosse rivestite: nel giro di pochi secondi dalla loro formazione esse perdono il rivestimento e si fondono con gli endosomi precoci.

Sulla superficie della membrana il recettore si lega al suo ligando, questo fa avvenire una modificazione nella faccia citologica della membrana. A livello di questa faccia citologica comincia ad assemblarsi una proteina, un canestro, intorno a questa parte di membrana, questa proteina è detta **clatrina**. Si formano prima le fossette di clatrina, fossette poiché la membrana è spinta verso l'interno poiché essa è proprio un avvallamento della membrana, man mano questo pezzo di legame entra sempre di più dentro il citoplasma. Intorno ai bordi delle membrana si assembla una proteina, che si contrae e strozza la vescicola e essa viene rilasciata all'interno della membrana. La **Clatrina** entra in contatto con il recettore della membrana, si frappone un'altra proteina di membrana chiamata in generale **adaptine** (sono proteine che si adattano con il recettore e la clatrina). **Quindi la clatrina non prende contatto con il recettore ma l'adaptina**. La vescicola una volta inglobata, perde il rivestimento, la clatrina si stacca dalla vescicola e si dispone in membrana in alcune zone in maniera poi da essere riutilizzata.

L'endosoma precoce è ancora legato al suo ligando, si fonde con un altro endosoma, formando un **endosoma tardivo**. A livello di questo endosoma vi è una variazione di pH che fa staccare il recettore dal suo ligando. **Si staccano perché si rompono i legami deboli che ha legato il ligando con la proteina**.

Il recettore che si è staccato, viene riciclato. Quindi il recettore housekeeping ritorna in membrana, questo fenomeno che sposta il recettore in una zona diversa da quella apicale, ma subito ritorna poi nella zona apicale quando deve essere utilizzato, è detto **transitosi**. Invece il ligando si fonde con i lisosomi e verrà digerito. Nel caso del colesterolo, le particelle di LDL, il colesterolo è all'interno e viene protetto, i fosfolipidi formano la struttura di protezione per il colesterolo; arrivano al lisosoma grazie alle Idrolasi Acide che sono all'interno del lisosoma, queste proteine vengono scisse nei vari componenti che vengono poi utilizzati.

La **clatrina** è una molecola costituita da 3 catene polipeptidiche pesanti e da 3 leggere unite insieme a formare una struttura a tre raggi chiamata trischele. Dall'assemblaggio dei trischele la membrana si ripiega naturalmente, quando si vengono formare tra di loro le molecole di clatrina aiuta di conseguenza l'invalidazione della vescicola. La **dinamina** strozza la vescicola.

Il ferro viene internalizzato attraverso un meccanismo di endocitosi mediato da recettore, esiste sulla membrana delle cellule un recettore per la transferrina, una proteina che serve per trasportare il ferro, quindi si carica di ferro, la ferro-transferrina si lega al recettore della transferrina, avviene la endocitosi mediata da recettore, come nel caso del LDL, si perde un rivestimento di clatrina insieme alle adaptine, arriva ad un endosoma tardiva e qui arriva lo scambio con il ferro, la transferrina carica di ferro (ferro-transferrina) rilascia il ferro, mentre il recettore con l'apo-transferrina (*apo* significa che perde il ferro) ritorna in membrana, l'apo-transferrina si stacca dal recettore per andarsi di nuovo a caricare di ferro. Il ciclo ricomincia.

I lisosomi sono i siti principali di gestione intracellulare.

I **lisosomi** sono organelli racchiusi da membrana pieni di enzimi idrolitici solubili che digeriscono le macromolecole. I lisosomi contengono circa 40 tipi di enzimi idrolitici, comprese proteasi, nucleasi, glicosidasi, lipasi, fosfolipasi, fosfatasi e solfatasi. Questi enzimi sono tutti **idrolasi acide**, cioè idrolasi che lavorano al meglio a un pH acido. Per un'attività ottimale esse devono essere attivate da un taglio proteolitico che richiede a sua volta un ambiente acido. Il lisosoma fornisce questa acidità mantenendo un pH di circa 4,5-5,0 al suo interno. In questo modo il contenuto del citosol è doppiamente protetto dall'attacco da parte del sistema digestivo proprio della cellula: la membrana del lisosoma tiene gli enzimi digestivi fuori dal citosol e, anche se dovessero fuoriuscire, essi farebbero poco danno, essendo il pH citosolico di circa 7,2.

Come tutti gli altri organelli racchiusi da membrana, il lisosoma non contiene soltanto una serie specifica di enzimi, ma ha anche una peculiare membrana. Per la maggior parte le proteine di membrana dei lisosomi sono molto glicosilate e ciò aiuta a proteggerle dalle proteasi lisosomiali presenti nel lume. Le proteine di trasporto in questa membrana portano i prodotti finali della digestione delle macromolecole, come amminoacidi, zuccheri e nucleotidi nel citosol, dove possono essere secreti all'esterno o riutilizzati dalla cellula. Una H^+ ATPasi vacuolare nella membrana lisosomiale usa l'energia d'idrolisi di ATP per pompare H^+

nel lisosoma, mantenendo così il lume al suo pH acido. La pompa H^+ lisosomiale appartiene alla famiglia delle *ATPasi di tipo V* e ha un'architettura simile alle ATP sintasi del mitocondrio e del cloroplasto (ATPasi di tipo F), che convertono l'energia immagazzinata sotto forma di gradienti di ioni H^+ in ATP. Però, diversamente da questi enzimi, l'ATPasi H^+ vacuolare agisce esclusivamente in modo inverso, pompando gli ioni H^+ all'interno dell'organello. ATPasi di tipo V identiche o simili acidificano tutti gli organelli coinvolti nei processi di endocitosi e di esocitosi, compresi lisosomi, endosomi, alcuni compartimenti dell'apparato del Golgi e molte vescicole di trasporto e secretorie. Oltre a fornire un ambiente con basso pH adatto alle reazioni che avvengono nel lume dell'organello, il gradiente di ioni H^+ fornisce una fonte di energia che permette il trasporto di piccoli metaboliti attraverso la membrana dell'organello. I lisosomi si trovano in tutte le cellule eucariotiche: sono stati scoperti inizialmente mediante frazionamento biochimico di estratti cellulari; soltanto più tardi sono stati osservati chiaramente al microscopio elettronico. Sebbene straordinariamente diversificati per forma e dimensioni, possono essere identificati come membri di una singola famiglia di organelli colorandoli con anticorpi specifici. Essi possono essere identificati anche con tecniche istochimiche, che rilevano gli organelli che contengono un'idrolasi acida. L'eterogeneità della morfologia dei lisosomi contrasta con le strutture relativamente uniformi di molti altri organelli cellulari. La diversità riflette la grande varietà di funzioni digestive mediate dalle idrolasi acide, comprese la demolizione di detriti intra- ed extracellulari, la distruzione di microrganismi fagocitati e la produzione di nutrienti per la cellula. La loro diversità morfologica, tuttavia, riflette anche il modo in cui i lisosomi si formano. Gli endosomi tardivi contenenti materiale ricevuto sia dalla membrana plasmatica mediante endocitosi sia dalle idrolasi lisosomiali di nuova sintesi si fondono con lisosomi preesistenti per formare strutture che a volte sono chiamate *endolisosomi*, che poi si fondono una con l'altra. Quando la maggior parte del materiale endocitato all'interno di un endolisosoma è stata digerita e rimangono solamente residui resistenti o di lenta digestione, questi organelli diventano lisosomi "classici". Questi organelli sono relativamente densi, rotondi e piccoli, ma possono ricominciare il ciclo fondendosi nuovamente con lisosomi tardivi o endolisosomi. Perciò non c'è una vera distinzione tra endolisosomi e lisosomi: sono la stessa cosa, ma a differenti stadi di maturazione del ciclo. Per questa ragione i lisosomi sono talvolta considerati una serie eterogenea di organelli distinti, la cui caratteristica comune è un alto contenuto di enzimi idrolitici. È particolarmente difficile applicare una definizione più precisa di questa alle cellule vegetali, come vedremo adesso. I lisosomi sono in genere punti di incontro dove convergono vari flussi di traffico intracellulare. La maggior parte degli enzimi digestivi vi giunge tramite una via che parte dal RE e passa attraverso l'apparato del Golgi, mentre le sostanze da digerire arrivano da almeno quattro vie a partire da diverse fonti. La via meglio studiata è quella seguita dalle macromolecole assunte dal fluido extracellulare mediante *endocitosi*. Una via simile che si trova nelle cellule fagocitiche, come i macrofagi e i neutrofili nei vertebrati, è dedicata all'inghiottimento, o *fagocitosi*, di grandi particelle e di microrganismi per formare i *fagosomi*. Una terza via, chiamata *macropinocitosi*, è specializzata nell'assorbimento non specifico di fluidi, di membrane e di particelle attaccate alla membrana plasmatica. Discuteremo di nuovo queste vie più avanti in questo capitolo. Una quarta via, chiamata *autofagia*, ha origine nel citoplasma della cellula stessa ed è usata per digerire citosol e organelli obsoleti, come vedremo in seguito. Il trasporto nella cellula dalla membrana plasmatica: endocitosi. Le vie che portano dalla superficie cellulare verso l'interno della cellula iniziano con il processo dell'**endocitosi**, attraverso cui le cellule assumono componenti della membrana plasmatica, fluidi, soluti, macromolecole e sostanze particolate. Il carico endocitato comprende complessi recettore-ligando, vari nutrienti e i loro trasportatori, componenti della matrice extracellulare, detriti cellulari, batteri, virus e, in casi specifici, anche altre cellule. Attraverso l'endocitosi la cellula regola la composizione della sua membrana plasmatica in risposta a cambiamenti delle condizioni extracellulari. Nell'endocitosi il materiale da ingerire è progressivamente avvolto da una piccola porzione della membrana plasmatica, che prima si invagina e quindi si distacca formando una **vescicola endocitica** che contiene la sostanza o la particella ingerita. La maggior parte delle cellule eucariotiche forma continuamente delle vescicole endocitiche, un processo chiamato *pinocitosi* ("cellula che beve"); inoltre alcune cellule specializzate hanno delle apposite vie per l'assunzione su richiesta di grandi particelle, un processo chiamato *fagocitosi* ("cellula che mangia"). Le vescicole endocitiche si formano sulla membrana plasmatica attraverso vari meccanismi che differiscono sia per il meccanismo molecolare utilizzato sia per il modo in cui è regolato. Una volta generate sulla membrana plasmatica, la maggior parte delle vescicole endocitiche si fonde con un compartimento ricevente comune, l'*endosoma precoce*, dove il carico internalizzato viene smistato: alcune molecole car- go ritornano alla membrana plasmatica, direttamente o attraverso un *endosoma di recupero*, mentre altre sono

contrassegnate per la degradazione tramite l'inclusione in un *endosoma tardivo*. Gli endosomi tardivi si formano da una porzione vacuolare bulbosa dell'endosoma precoce mediante un processo detto *maturazione dell'endosoma*. Questo processo di conversione cambia la composizione proteica della membrana dell'endosoma; pezzi di questa membrana si invaginano e vengono incorporati negli organelli come *vescicole intraluminali*, mentre l'endosoma stesso si muove dalla periferia cellulare a una posizione vicina al nucleo. Mentre matura, l'endosoma smette di riciclare materiale alla membrana plasmatica e invia irreversibilmente il suo contenuto alla degradazione: gli endosomi tardivi si fondono tra loro e con i lisosomi per formare gli endolisosomi, che degradano il loro contenuto nel modo che abbiamo visto in precedenza. Tutti gli stadi di maturazione dell'endosoma, dall'endosoma precoce all'endolisosoma, sono connessi da vie di trasporto vescicolare bidirezionali al TGN. Queste vie permettono l'inserimento di materiali di nuova sintesi, come gli enzimi lisosomiali provenienti dal RE, e il recupero di componenti, come il recettore di M6P, verso le parti iniziali della via secretoria. In seguito descriveremo il modo in cui le cellule usano e controllano i vari aspetti del traffico endocitico.

FAGOCITOSI

La **fagocitosi** è una forma particolare di endocitosi in cui una cellula utilizza grandi vescicole endocitiche chiamate **fagosomi** per ingerire grosse particelle come microrganismi e cellule morte. La fagocitosi è distinta dalla macropinocitosi che abbiamo visto precedentemente, sia per lo scopo che per il meccanismo. Nei protozoi, la fagocitosi è una forma di nutrizione: grandi particelle assunte nei fagosomi finiscono nei lisosomi e i prodotti dei successivi processi digestivi passano nel citosol per essere utilizzati come cibo. Tuttavia poche cellule degli organismi pluricellulari sono capaci di ingerire in modo efficiente particelle così grandi. Nell'intestino degli animali, per esempio, le particelle di cibo sono demolite mediante processi extracellulari e le cellule importano i piccoli prodotti dell'idrolisi.

La fagocitosi è importante nella maggior parte degli animali per scopi diversi dalla nutrizione ed è attuata principalmente da cellule specializzate, i cosiddetti *fagociti professionisti*. Nei mammiferi due classi importanti di globuli bianchi agiscono da fagociti professionisti: i **macrofagi** e i **neutrofili**. Queste cellule si sviluppano da cellule staminali emopoietiche e ci difendono dalle infezioni ingerendo i microrganismi invasori. I macrofagi hanno anche un ruolo importante nella rimozione di cellule senescenti e di cellule che sono morte per apoptosi. In termini quantitativi l'eliminazione di cellule senescenti o morte è di gran lunga la più importante: per esempio, i nostri macrofagi fagocitano più di 10^{11} globuli rossi senescenti ogni giorno.

Il diametro di un fagosoma è determinato dalle dimensioni delle particelle ingerite; queste particelle possono essere grandi quasi quanto la stessa cellula fagocitica. I fagosomi si fondono con i lisosomi e il materiale ingerito viene quindi degradato. Tutte le sostanze indigeribili rimangono nei lisosomi, formando i *corpi residui*, che possono essere secreti dalla cellula mediante esocitosi, come abbiamo visto in precedenza. Alcuni dei componenti della membrana plasmatica internalizzata non raggiungono mai i lisosomi, perché sono recuperati dal fagosoma in vescicole di trasporto e riportati alla membrana plasmatica.

Alcuni batteri patogeni hanno evoluto meccanismi elaborati per evitare la fusione tra fagosoma e lisosoma. Il batterio *Legionella pneumophila*, per esempio, che causa la legionellosi, inietta nel suo sfortunato ospite un enzima che modifica Rab, il quale induce alcune proteine Rab a deviare il traffico di membrana, impedendo così la fusione fagosomalisosoma. Il batterio, così risparmiato dalla degradazione lisosomiale, rimane nel fagosoma modificato e cresce e si divide come un patogeno intracellulare, protetto dal sistema immunitario adattativo dell'ospite.

La fagocitosi è un processo indotto dal carico, cioè richiede l'attivazione di recettori sulla superficie cellulare che trasmettano segnali all'interno della cellula. Perciò, per essere fagocitate, le particelle devono prima legarsi alla superficie del fagocita (non tutte le particelle che si legano vengono però ingerite). I fagociti hanno vari recettori di superficie che sono collegati funzionalmente al macchinario fagocitico della cellula. I segnali di attivazione della fagocitosi meglio caratterizzati sono gli anticorpi, che ci proteggono legandosi alla superficie di microrganismi infettivi (patogeni) e iniziando una serie di eventi che culminano nella fagocitosi dell'invasore. Quando gli anticorpi inizialmente attaccano un patogeno, lo rivestono con molecole anticorpali che legano i *recettori dell'Fc* presenti sulla superficie dei macrofagi e dei neutrofili, attivando i recettori a indurre la cellula fagocitica a estendere pseudopodi, che avvolgono la particella e fondono le loro estremità

per formare un fagosoma. La polimerizzazione localizzata di actina, avviata da GTPasi della famiglia Rho e da Rho-GEF che le attivano (vedi Capitoli 15 e 16), modella gli pseudopodi. Le GTPasi Rho attivate, rendono operative a loro volta le PI chinasi locali per produrre $PI(4,5)P_2$ nella membrana, che stimola la polimerizzazione dell'actina.

Per sigillare il fagosoma e completare il suo avvolgimento, l'actina viene depolimerizzata da una PI 3-chinasi che converte il $PI(4,5)P_2$ in $PI(3,4,5)P_3$, che è necessario per la chiusura del fagosoma e può inoltre contribuire a rimodellare la rete di actina in modo da aiutare l'invaginazione del fagosoma in formazione (Figura 13.61B). In questo modo la generazione e l'utilizzo ordinati di specifici fosfoinositidi guidano i passaggi sequenziali nella formazione del fagosoma. Sono state caratterizzate parecchie altre classi di recettori che promuovono la fagocitosi. Alcuni recettori riconoscono componenti del *complemento*, che collaborano con gli anticorpi nel destinare i microbi alla distruzione. Altri riconoscono direttamente gli oligosaccaridi sulla superficie di certi patogeni. Altri ancora riconoscono le cellule morte per apoptosi. Le cellule apoptotiche perdono la distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi nella loro membrana plasmatica. Come conseguenza la fosfatidilserina carica negativamente, che è normalmente confinata nel foglietto citosolico del doppio strato lipidico, è ora esposta all'esterno della cellula, dove innesca la fagocitosi della cellula morta. È interessante il fatto che i macrofagi, nonostante siano in grado di fagocitare anche varie particelle inanimate – come vetro, granuli di latex o fibre di amianto – non fagocitano cellule animali vive, le quali mostrano dei segnali di “non mangiarmi” sotto forma di proteine di superficie che si legano a recettori inibitori sulla superficie dei macrofagi. I recettori inibitori reclutano tirosina fosfatasi che antagonizzano gli eventi di segnalazione intracellulare necessari per iniziare la fagocitosi, inibendo così localmente il processo fagocitico. Perciò la fagocitosi, come molti altri processi cellulari, dipende da un equilibrio fra segnali positivi che attivano il processo e segnali negativi che lo inibiscono. Si ritiene che le cellule apoptotiche da una parte acquisiscano segnali di “mangiarmi” (come la fosfatidilserina esposta all'esterno della cellula), dall'altra perdano i loro segnali di “non mangiarmi”, in modo da essere rapidamente fagocitate dai macrofagi.