

TRAFFICO VESCICOLARE

Il trasporto mediante vescicole costituisce la via mediante la quale si diffondono le proteine raggiungono i loro compartimenti bersaglio. Due compartimenti possono essere uniti da traffico vescicolare essi quindi devono essere in continuità topologica fra di loro. Le vescicole approdano sulla membrane specifiche grazie a dei marcatori molecolari posti sulle membrane bersaglio. Il rivestimento della membrana dalla quale parte la vescicola compie due operazioni per favorire la formazione di una vescicola: innanzitutto concentra le proteine specifiche che la vescicola deve trasportare in una zona specializzata della membrana, che darà poi origine alla vescicola, in un secondo luogo deforma la membrana della vescicola in via di formazione, mediante interazione con un complesso proteico che ha come scopo l'unione della membrana della vescicola con il rivestimento. Il rivestimento è specifico delle vescicole, come della destinazione alla quale queste vescicole devono arrivare e della membrana di partenza. Tutti i tipi di rivestimento hanno un'interazione con le proteine cargo cioè quelle che devono essere trasportate ed è mediata da altre proteine, quali ad esempio e recettori del carico che sono proteine integrali di membrana. La clatrina È una proteina formata da tre catene pesanti e tre catene leggere la sua forma particolare è detta *trischelio* che le conferisce la curvatura necessaria a piegare la membrana. La clatrina riveste le vescicole assemblandosi con altri trischeli a formare strutture chiamate canestri. La clatrina riveste le vescicole che dal TGN vanno verso tutti gli altri compartimenti, esclusi reticolo endoplasmatico e altre cisterne del Golgi. Il secondo rivestimento, il COPI, riveste le vescicole che dal TGN o da altre cisterne del Golgi tornano verso il reticolo endoplasmatico seguendo la via della correzione. Il terzo rivestimento, il COPII, riveste le vescicole che dal reticolo endoplasmatico vanno verso il Golgi. L'assemblaggio di proteine può avvenire grazie all'assemblaggio di PIP nelle varie sue forme fosforilate, in modo che agisce da recettore e da segnale di richiamo per le proteine. Quindi scopriamo anche che le proteine sono ammassate nella zona di formazione della vescicola grazie a PIP. Per completare il processo di distacco di una vescicola servono altre proteine, la Dynamin, che si arrotolano attorno alla strozzatura della vescicola e la stacca dalla membrana. Una famiglia di recettori è data dalle GTPasi di reclutamento, che controllano l'assemblaggio dei rivestimenti di Clatrina, COPI e COPII. La maggior parte dell'assemblaggio, però, è regolato da diverse proteine che legano il GTP. Due famiglie di questi recettori sono la 'guanosine-exchange-factor', la GEF, e la GTPasi-activation-protein, la GAP. L'attivazione da GDP a GTP provoca l'assemblaggio del rivestimento, mentre la disattivazione porta al distaccarsi del rivestimento. Un flusso ordinato di vescicole prevede che le membrane siano molto selettive nell'accettare vescicole provenienti da altre membrane. La specificità del trasporto vescicolare è data da una particolare famiglia di proteine, dette proteine RAB. Ve ne è una diversa per ogni compartimento. Vediamo, prima di osservare il processo di attracco, un altro ceppo di proteine, che pure collabora al processo di attracco delle vescicole alla membrana bersaglio. Tali proteine sono le **SNARE**. Esistono due tipi di SNARE, a seconda che si trovino sulla membrana bersaglio (t-SNARE), o sulla vescicola (v-SNARE). Per regolare la formazione del rivestimento abbiamo anche delle **GTPasi del reclutamento del rivestimento** (su endosomi e su rivestimenti formati da COPI e COPII). **GEF** (da GDP a GTP) **GAP** (da GTP a GDP), queste GTPasi sono GTPasi monomeriche:

- **Arf** (COPI e clatrina su Golgi)
- **Sar1** (COPII su RE)

Essi si trovano nel citosol prima in stato inattivo con GDP poi GTP grazie a GEF.

Il processo si articola in tre fasi, prima di tutto un effettore RAB, localizzato sulla membrana bersaglio, riconosce la RAB specifica di quel compartimento, e la lega. In secondo luogo le proteine SNARE agganciano da entrambi i lati il proprio corrispettivo sull'altra membrana e si legano in maniera elicoidale. Successivamente le proteine SNARE stringono il loro contatto, con fuoriuscita di acqua, per permettere alle due membrane di entrare in contatto e diffondere il loro doppio strato fosfolipidico. Tutte le SNARE devono essere viste assemblate per funzionare di nuovo. Questo deve essere perché altrimenti si avrebbe una fusione indiscriminata delle membrane. Il processo assemblaggio è catalizzato da un'altra proteina, detta NSF, una proteina che viaggia tra membrana e citosol. Quindi la SNARE è dissociata dal NSF (ATPasi esamerica che usa l'idrolisi dell'ATP per separare le eliche).

Le vescicole rivestite di COPII dal RE gemmano da siti di uscita dal RE (privi di ribosomi) E alcuni recettori del cargo sono lectine. Per lasciare il RE, le proteine devono essere ben ripiegate.

Sennò esse restano nel lume attaccate a chaperon come BiP o calnessina. Però questo controllo qualità è deleterio volte come per la fibrosi cistica, trasportatore Cloro leggermente mal ripiegato che viene degradato e non raggiunge la membrana. Dopo la gemmazione delle vescicole, vi è la fusione omotipica mediata dal SNARE, che porta gruppi vescicolari tubulari. Da qui gemmano altre vescicole di trasporto rivestite da COPI (complesso preassemblato, **coatomero**) che fanno parte della via di recupero, mentre i gruppi vescicolari tubulari si dirigono al Golgi. Per la via di recupero vi sono dei **segnali di recupero** al reticolo endoplasmico.

L'**Apparato del Golgi** è costituito da una serie di cisterne (pile golgiane o, nelle cellule vegetali, dittiosomi) ciascuna contenente enzimi, in maggioranza glicosidasi. Le cisterne sono presenti in periferia, impilate l'una sull'altra e non intercomunicanti tra loro.

Nelle pile golgiane si distinguono: faccia *cis* o prossimale, contigua al Reticolo endoplasmatico, da cui riceve le microvescicole, le quali fondono tra a costituire una rete di vescicole interconnesse detta CIS Golgi Network (CGN), e la faccia *trans* o distale, lontana dal reticolo endoplasmatico.

Dalla cisterna si staccano vescicole, interconnesse tra loro a costituire il Trans Golgi Network (TGN), da cui si staccano vescicole che diventano lisosomi, oppure vescicole di secrezione, o che si fondono con la membrana plasmatica cisterne mediane, cisterne interposte tra le *cis* e *trans*.

Si forma zone di stazionamento temporaneo, sono centri di smistamento:

- CGN Cis-Golgi-Network
- TGN Tans-Golgi-Network
- **Reticolo cis:** Fosforilazione di oligosaccaridi
- **Cisterna cis:** Rimozione del mannosio
- **Cisterna mediana:** Rimozione di mannosio, aggiunta N-acetilglucosammina
- **Cisterna trans:** Aggiunta di galattosio ed acido sialico
- **Reticolo trans:** Aggiunta di solfati a glicosamminoglicani

Il materiale non deve necessariamente fermarsi in tutte le sezioni del Golgi, bensì il movimento può avvenire in seguito a destinazioni e modificazioni.

Le proteine residenti sono attaccate alla membrana. Gli oligosaccaridi subiscono modificazioni. Le membrane, presentano una differente composizione lipidica e proteica che rendono ciascuna cisterna funzionalmente differenziata dalle altre. La componente proteica è costituita particolarmente da enzimi, glicosidasi e glicotrasferasi, che modificano l' oligosaccaride, costituito da 10 residui zuccherini legati alle asparagine, che il Golgi riceve dal RE. Gli enzimi contenuti nelle cisterne conducono a due tipi due tipi di oligosaccaridi: oligosaccaridi complessi o oligosaccaridi ad alto contenuto di mannosio. L'apparato del Golgi riceve, elabora e smista ad altri compartimenti il materiale (le glicoproteine) che riceve dal Reticolo endoplasmatico tramite microvescicole di trasporto. Nel Golgi l'elaborazione del materiale può avvenire secondo due modalità:

1. progressione delle vescicole
2. progressione delle cisterne

Secondo il modello della *progressione delle vescicole* il materiale, elaborato in un cisterna, viene incluso in microvescicole di trasporto che gemmano lateralmente dai margini della cisterna per fondersi con la membrana della cisterna immediatamente successiva. Il processo continua fino alla cisterna *trans*. Dal *trans* si staccano vescicole che possono costituire i lisosomi primari oppure le vescicole di secrezione o anche fondersi con la membrana plasmatica. Nel modello della *progressione delle vescicole* si ha il movimento delle vescicole in direzione *cis-trans*. Tale movimento costituisce il "flusso vescicolare anterogrado". Il modello della *progressione delle cisterne*, valido soprattutto per le molecole di notevole dimensioni (quali ad esempio la cellulosa, la latte-albumina), troppo grandi per essere contenute nelle microvescicole di trasporto, prevede che il materiale permanga nelle cisterne le quali avanzano maturando progressivamente in *cis*, *mediana* e *trans*. Lateralmente, dalle cisterne gemmano delle microvescicole che trasportano nella cisterna precedente gli enzimi caratteristici di quella cisterna.

Il materiale lascia il Golgi tramite vescicole si staccano dal TGN per formare i lisosomi, oppure le vescicole di secrezione o anche fendersi con la membrana plasmatica. Secondo tale modello le cisterne, progredendo in direzione cis-trans, realizzerebbero il flusso delle cisterne anterogrado, mentre le vescicole, scorrendo nella direzione opposta trans-cis, darebbero origine al flusso vescicolare retrogrado. Proteine, lipidi e carboidrati neosintetizzati, sono smistati ai vari distretti cellulari da vescicole di Trasporto. Le vescicole di trasporto presentano sulla membrana un particolare recettore per il materiale da trasportare. A ciascuno di tale recettore è associato dal lato citosolico una specifica proteina v-SNARE (vesicular-SNARE) che ne segnala il compartimento di destinazione. Su tale compartimento è presente una t-SNARE, che interagisce con la v-SNARE. Coppie specifiche di proteine transmembrana v-SNARE e t-SNARE determinano la destinazione delle vescicole.

La specifica segnalazione e fusione delle vescicole è mediata dall'interazione di coppie complementari di proteine SNAREs: v-SNAREs (nella membrana della vescicola) e t-SNARE (nella membrana del comparto bersaglio). L'adesione delle vescicole al comparto di destinazione è mediato dal legame tra le SNAREs, mentre la fusione delle vescicole e lo scarico del materiale nel comparto di destinazione è mediato da specifiche proteine di fusione (Rab e SNAPs,). Le proteine Rab assicurano la specificità dell'ancoraggio. Si tratta di una famiglia di GTPasi monomeriche la cui funzione è di verificare che l'adattamento tra una v-SNARE e una t-SNARE sia corretto. Quando una vescicola incontra la membrana bersaglio corretta il legame v-SNARE a t-SNARE fa rimanere la vescicola legata abbastanza a lungo in maniera che Rab possa idrolizzare il GTP legato e bloccare la vescicola. La gemmazione delle vescicole dal Reticolo endoplasmatico è mediato da specifiche proteine di rivestimento le COP-II, COat Proteins type II. Una volta che la vescicola si stacca dal RE le COP-II ritornano al RE. Le vescicole arrivano al CIS- Golgi e scaricano il materiale. Dal CIS vengono riciclate al RE le vescicole che presentano sulla membrana una proteina con il segnale di ritenzione al RE. Tale segnale è costituito da 4 a.a. lisina, asparagina, glucina, leucina (K,D,E, L), il cui recettore è presente sulla membrana del RE. La gemmazione di tali vescicole è mediata dalle proteine di rivestimento del tipo COPI.

Il trasporto dal reticolo endoplasmatico attraverso l'apparato di Golgi

All'interno del reticolo endoplasmatico avvengono quattro principali modifiche:

- N glicosilazione
- O glicosilazione
- Fosforilazione
- Solfatazione

Il rivestimento di COPII che riveste le membrane delle vescicole che vanno dal reticolo verso il Golgi, possiede delle interazioni con i recettori delle proteine. Ciò avviene per far attaccare ai recettori sono le proteine che possiedono dei segnali l'indirizzo ben precisi. Le proteine ripiegate male, che quindi possiedono il segnale di indirizzo all'esterno, sono trattenute all'interno del reticolo dalle proteine chaperone, e poi successivamente degradate. Vi sono proteine che senza segnale migrano dal reticolo verso il Golgi. Queste proteine sono rispediti al reticolo mediante il trasporto retrogrado. Vi è un altro caso che è per le proteine secretori, che non hanno bisogno di segnali e migrano da sole dal reticolo, secondo un processo chiamato Bulk Flow. Il processo di degradazione è un segnale per le cellule vicine di allarme immediato questo indica che la cellula infettata deve essere indotta in apoptosi. Nel processo di riconoscimento delle proteine mal ripiegate agiscono delle particolari proteine dette chaperonine. Mediante loro avviene il passaggio di controllo della qualità. I contenuti delle varie cisterne del Golgi, non sono uguali, e si identifica che cosa si verifica all'interno di una particolare cisterna con metodi istochimici. La glicosilazione all'interno del reticolo è un controllo di qualità delle proteine.

Una volta che le proteine sono uscite dal reticolo, sono libere di essere rimodellate nella loro struttura oligosaccaridica per nuove funzioni. La glicosilazione delle proteine corrisponde ad un segnale di smistamento da parte del Golgi. Mentre nel lume del reticolo le proteine sono sparse ovunque, nell'apparato di Golgi sono tutte quante legate alla membrana. Infatti le reazioni enzimatiche avvengono tutte sulla membrana del Golgi.

L'oligosaccaride viene trasferito sul gruppo amminico (NH₂) dell'amminoacido asparagina, tale glicosilazione prende il nome di N-glicosilazione. Vi sono due tipi di oligosaccaridi: gli oligosaccaridi complessi e gli oligosaccaridi ad alto mannosio. Gli oligosaccaridi complessi consistono in una regione centrale e una regione terminale, che contiene un numero variabili di N-acetilglucosamina, galattosio, acido sialico, unito alla regione centrale. Gli oligosaccaridi ad alto mannosio contengono ulteriori residui di mannosio oltre alla regione centrale. L'acido sialico è particolarmente importante perché è l'unico zucchero che possiede una carica parziale negativa.

All'inizio l'oligosaccaride che si trova sulla proteina è composto da due N-acetilglucosamina nove mannosio e tre glucosio. I primi tre glucosio vengono mossi da due enzimi specifici all'interno del lume del reticolo per iniziare il processamento della proteina, vale a dire che la rimozione di tre glucosio è un segnale che la proteina può essere esportata al Golgi. Una volta all'interno del Golgi avvengono passaggi rimanenti della glicosilazione, ovvero la rimozione di tre dei restanti otto mannosio e l'interazione con un enzima specifico chiamato endo H. Questo enzima è usato per distinguere l'oligosaccaride complesso da quello ad alto mannosio. Cioè a seconda che l'oligosaccaride sia sensibile o resistente ad endo H.

La glicosilazione determina la forma e la funzione della proteina. Poi è un segnale l'indirizzo per la proteina stessa e soprattutto la protegge da enzimi litici. Un'altra funzione importante è che la N glicosilazione promuove il ripiegamento di proteine in modo che si realizzino due tipi di condizioni: solo utilizzazione in acqua che ne prevenga l'aggregazione. Realizzazione di un segnale cioè interpretato secondo un codice glucidico, dica a che stadio del ripiegamento si trova la proteina. Alcune catene di zuccheri sono rigide, in modo da prevenire l'avvicinamento di altre proteine.

Per trasporto attraverso il goal G si intende come le proteine raggiungano il TGN partendo dal CGN.

Il modello di trasporto vescicolare afferma che le vescicole che si muovono in avanti e quelle che si muovono all'indietro sono rivestite entrambe da COPI.

Mentre il modello di maturazione delle cisterne afferma che il Golgi sia dinamico, e le cisterne si muovano in continuazione in avanti, così quella trans si sfalda per costruire nuove vescicole mentre la cis si forma dalle vescicole che provengono dal reticolo.

LISOSOMI

Sono una serie eterogenea di organelli, essi sono compartimenti racchiusi da membrane pieni di enzimi Idrolitici, usati per la digestione intracellulare controllata. Contiene **idrolasi acide**, un H⁺ ATPasi vacillare usa idrolisi di ATP per pompare H⁺ all'interno. Queste idrolasi acide richiedono un pH di circa 4,5-5 all'interno dei lisosomi. Il pH all'esterno dei lisosomi è di circa 7,2. L'ambiente acido dei lisosomi è mantenuto da una pompa H⁺ che introduce ioni positivi all'interno dei lisosomi con consumo di ATP. Questi enzimi lavorano a pH acido, utile per la cellula, poiché qualora il lisosoma si rompesse, gli enzimi idrolitici non sarebbero in grado di operare una demolizione incontrollata della cellula, perché il pH del citosol non lo permetterebbe.

Il processo di formazione di un lisosoma parte da un endosoma, che progressivamente assume tutti gli enzimi Idrolitici di un lisosoma. Quando ha accumulato abbastanza enzimi Idrolitici esso si definisce endosoma tardivo. A questo punto l'endosoma tardivo si fonde con il lisosoma per generare due lisosomi. Tutto ciò che rimane dell'endosoma viene digerito fino a lasciare solo gli enzimi idrolitici all'interno della vescicola. La fusione del lisosoma dell'endosoma genera un endolisosoma e successivamente due lisosomi. L'endocitosi è una via in cui le vescicole endocitate sono inizialmente portate in vescicole fino a piccole organelli di forma irregolare chiamati endosomi precoci.

Una via di degradazione nei lisosomi usata per l'eliminazione di parti della cellula è definita *autofagia*. Il processo inizia con un organello viene racchiuso da membrane di origine sconosciuta creando un autofagosoma. Questo si fonde con il lisosoma dando origine all'autofagia. L'autofagocitosi ha 3 modi di essere utile alla cellula:

1. I metaboliti ottenuti dalla demolizione sono riutilizzabili dalla cellula, e possono fungere da risorse energetiche anche quando gli elementi sono insufficienti
2. Durante il differenziamento della cellula aiutano a demolire gli organelli che non servono più
3. È adatta alla demolizione di aggregati proteici non digeribili dal proteasoma e da altri meccanismi.

Il modello proposto per la maturazione e smistamento delle proteine lisosomiali prevede che esse siano sintetizzate e traslocate nel lume del RER, dove avviene la glicosilazione delle asparagine. Le glicoproteine poi passano nella cisterna Cis dell'apparato del Golgi. In tale cisterna si ha la fosforilazione dei residui del mannosio (M-6-P).

Le proteine così marcate, senza subire altre modifiche, arrivano al TGN, dove sono riconosciute dal recettore del M-6-P ed incluse in vescicole rivestite da clatrina. Le vescicole successivamente trasportano le proteine lisosomiali ad un endosoma tardivo da cui gemmano le vescicole che riciclano al TGN i recettori del M-6-P.

Le idrolasi sono racchiuse in vescicole che gemmano dal TGN e arrivano prima ad endosomi precoci e poi ad endolisosomi i lisosomi. Esse vengono riconosciute nel momento in cui il mannosio-6-fosfato (M6P) viene aggiunto nel cis-Golgi, vengono riconosciuti da recettori proteici M6P transmembrana nel TGN. Sono poi recuperati da vescicole rivestite di **retromero** che partono dagli endosomi. Alcune idrolasi sfuggono e arrivano nel fluido extracellulare ma anche alcuni recettori sfuggono e li ricatturano, le riportano mediante *endocitosi mediata da recettore*. Le idrolasi hanno una *zona segnale* come segnale di riconoscimento per farsi mettere M6P.

Le **idrolasi lisosomiali** sono caratterizzate dalla presenza di un gruppo specifico, il mannosio- 6-fosfato (M6P), che serve a farle riconoscere da un recettore specifico presente sul trans- Golgi.

L'M6P è aggiunto agli oligosaccaridi legati all'asparagina, nel reticolo cis del Golgi.

Il recettore è una proteina transmembrana localizzata sul trans Golgi. L'unione con l'idrolasi inizia la formazione di vescicole e si verifica a pH 7. Le idrolasi si dissociano dai recettori negli endosomi tardivi a pH 6.

I recettori sono riciclati verso il trans Golgi.

La **GlcNAc-fosfotransferasi** (*N-acetilglucosammina fosfotransferasi*), l'enzima che "marca" gli enzimi lisosomiali nel Golgi.

MALATTIE:

- **Malattia da deposito lisosomiale** accumulo di substrati ingeriti nei lisosomi, mutazione in gene che codifica una singola idrolasi.
- **Malattia di Hurler** non vi è la demolizione di glicosamminoglicani
- **Malattia da inclusioni cellulari** errato smistamento dovuto a *N-acetilglucosammina fosfotransferasi* difettosa.

VIA SECRETORIA

Gli enzimi lisosomiali vengono sintetizzati sui ribosomi adesi al RE, avviene la N-glicosilazione e nelle cisterne cis del Golgi viene fosforilato uno dei mannosio che vanno a costituire l'oligosaccaride ad alto tenore di mannosio. Questa fosforilazione del mannosio è il segnale che questa proteina è destinata al lisosoma. A livello del trans Golgi ci saranno dei recettori che riconoscono il mannosio-6-fosfato e legano specificamente questa proteina. Verranno gemmate delle vescicole rivestite di clatrina, essa è la stessa per ogni tipo di vescicola, quello che differenzia tutte le vescicole rivestite di clatrina è l'adaptina, questa proteina fa da ponte tra il recettore per il ligando specifico e la clatrina determina il destino di questa vescicola. L'adaptina riconoscerà il carico e lo riporterà al lisosoma. Nell'endocitosi mediata da recettore sia della clatrina sia di COPI e COPII, una volta che è gemmata la vescicola il rivestimento viene perso, in questo modo, al di sotto del rivestimento della clatrina di COPI e COPII, ci saranno altre proteine che faranno in modo che la vescicola possa arrivare alla membrana bersaglio e possa quindi fondersi con la membrana e rilasciare quindi all'interno del lume dell'organello o all'esterno della cellula (in caso di esocitosi) il contenuto. Per errore può succedere che delle proteine destinate al lisosoma vengano secrete all'esterno, per cui si possono trovare dei recettori del mannosio-6-fosfato sulla membrana plasmatica che serviranno a recuperare questi enzimi lisosomiali che vengono rilasciati all'esterno della cellula ed essere portati quindi all'interno del lisosoma. Ed essere utilizzati lì dove avranno attività.

Come avviene il movimento della vescicola?

La vescicola viene presa dalle proteine motrici del citoscheletro che utilizzando i microtubuli come binari la portano fino al lisosoma.

FUSIONE CON LA MEMBRANA BERSAGLIO

La vescicola deve arrivare alla membrana bersaglio:

- Movimento della vescicola verso il compartimento bersaglio specifico
- Ormeaggio delle vescicole al compartimento bersaglio
- Attracco delle vescicole al compartimento bersaglio
- Fusione fra la vescicola e la membrana bersaglio

Le proteine che risiedono nel RE, sia quelle del lume che quelle della membrana, contengono alla loro estremità carbossi-terminale corte sequenze di amminoacidi che servono da *segnali di recupero*, assicurando il loro ritorno al RE se dovessero essere accidentalmente trasportate in avanti verso l'ERGIC o il complesso di Golgi. Il recupero delle proteine del RE sfuggite da questi comparti viene effettuato da recettori specifici che catturano le molecole e le restituiscono al RE in vescicole rivestite di COPI. Le proteine solubili del lume del RE possiedono tipicamente il segnale di recupero "lys-asp-glu-leu". Queste proteine sono riconosciute e riportate al RE dai *recettori KDEL*, proteine integrali di membrana che si spostano dalla posizione *cis* del Golgi ai compartimenti del RE. Se da una proteina del RE viene eliminata la sequenza KDEL, la proteina non è restituita al RE ma trasportata in avanti attraverso il complesso di Golgi. Al contrario, quando una cellula viene geneticamente modificata per esprimere una proteina lisosomiale o di secrezione contenente un segnale KDEL aggiunto all'estremità C-terminale, quella proteina viene ricondotta al RE invece di essere indirizzata alla sua giusta destinazione. Anche le proteine della membrana del RE hanno un segnale di recupero all'estremità C-terminale che si lega al rivestimento di COPI, facilitando il loro ritorno al RE. Ogni compartimento di membrana nella via biosintetica può avere il suo proprio e unico segnale di recupero.

Una data proteina sintetizzata nel RE viene indirizzata verso una particolare destinazione cellulare, ed è importante che una cellula sia capace di distinguere fra le varie proteine che produce. La cellula smista le proteine destinate a luoghi differenti in differenti carrier rivestiti da membrana.

Lo smistamento delle proteine ha luogo nell'ultimo dei compartimenti del Golgi, la rete *trans* Golgi (TGN) che funziona come stazione per il trasporto di materiali lungo il percorso di secrezione. Il trasporto post-Golgi meglio conosciuto è quello deputato al trasporto degli enzimi lisosomiali.

Le proteine lisosomiali sono sintetizzate sui ribosomi legati alla membrana del RE e trasportate al complesso del Golgi insieme ad altri tipi di proteine. Una volta entrate nelle cisterne del Golgi, le proteine solubili lisosomiali vengono riconosciute da enzimi che catalizzano l'aggiunta di un gruppo fosfato a zuccheri mannosio delle catene di carboidrati N-linked. Gli enzimi lisosomiali possiedono residui di mannosio fosforilati che funzionano come segnali di riconoscimento. Gli enzimi lisosomiali che portano questo segnale di mannosio-6-fosfato sono riconosciuti e catturati dai *recettori per il mannosio 6 fosfato (MPR)*, che sono proteine integrali di membrana che attraversano le membrane del TGN. Gli enzimi lisosomiali sono trasportati dal TGN in vescicole rivestite da Clatrina.

I rivestimenti di queste vescicole contengono: una gabbia esterna composta dalla proteina clatrina che forma un'impalcatura strutturale e un guscio interno composto da complessi proteici detti adattatori che coprono la superficie della membrana vescicolare che si affaccia sul citosol. Il termine *adattatore* descrive una molecola che si lega a due tipologie di materiale. Gli enzimi lisosomiali sono scortati dal TGN da adattatori proteici detti **GGA**. Una molecola di GGA presenta diversi domini, ognuno capace di agganciare una proteina diversa coinvolta nella formazione delle vescicole. Le estremità esterne degli adattatori GGA si legano ad una molecola di clatrina, arrestando l'impalcatura sulla superficie della vescicola.

Sulla superficie interna, gli adattatori GGA si legano ad un segnale di smistamento nelle code citosoliche dei recettori per il mannosio-6-fosfato. I MPR si legano agli enzimi lisosomiali solubili all'interno del lume della vescicola. Come risultato di queste interazioni con gli adattatori GGA, i MPR della membrana del TGN e gli enzimi lisosomiali del lume del TGN si concentrano nelle vescicole rivestite da Clatrina.

La formazione delle vescicole rivestite da clatrina comincia con il reclutamento sulla membrana di una piccola proteina che lega il GTP (in questo caso ARF1) che si prepara per il legame di altre proteine di rivestimento. Dopo che la vescicola è gemmata dal TGN, perde il rivestimento di clatrina e la vescicola priva di rivestimento procede verso la sua destinazione, che può essere un endosoma precoce, un endosoma tardivo o un vacuolo vegetale. Prima che raggiungano uno di questi organelli, i MPR si dissociano dagli enzimi lisosomiali e ritornano al TGN per effettuare un altro ciclo di trasporto di enzimi lisosomiali.

Le proteine destinate alla membrana plasmatica o all'esportazione dalla cellula vengono trasportate dal TGN. I trasportatori membranosi sono prodotti quando il TGN si frammenta in vescicole e tubuli di diverse dimensioni. Le proteine sono esportate dalla cellula mediante un processo di secrezione regolata, come nel caso degli enzimi digestivi, dell'insulina e di altri ormoni, che formano aggregati che poi vengono accumulati in granuli secretori densamente impacchettati. Questi aggregati sono trattenuti come granuli secretori gemmati dai margini della regione *trans* delle cisterne del Golgi e dal TGN. In alcune cellule, sono osservabili tubuli che lasciano il TGN mediante proteine motrici che operano lungo i binari dei microtubuli. Questi tubuli si suddividono in una serie di vescicole o granuli per fissione delle membrane. Una volta lasciato il TGN, il contenuto dei granuli secretori diviene più concentrato. I granuli secretori sono poi immagazzinati nel citoplasma finché i loro contenuti sono rilasciati in seguito a stimolazione della cellula da parte di un ormone o di un impulso nervoso.

Il trasporto delle proteine integrali di membrana verso la membrana plasmatica dipende da segnali di smistamento nei domini citoplasmatici delle proteine di membrana.

In queste cellule, le proteine di membrana destinate a risiedere nella porzione apicale della membrana plasmatica contengono segnali di smistamento diversi rispetto a quelle destinate alla porzione basale o laterale. Le proteine della membrana plasmatica di cellule non polarizzate, quali i fibroblasti o i globuli bianchi, possono non richiedere particolari segnali di smistamento. Tali proteine possono semplicemente essere trasportate dal TGN alla superficie cellulare in vescicole della via secretoria costitutiva.

Le vescicole rivestite da COPI ritornano al reticolo attraverso un movimento retrogrado mentre quello che va in avanti dal reticolo al Golgi *cis*, da *cis* al *trans* Golgi è un movimento anterograde. Il mannosio-6-fosfato destina le proteine al lisosoma, il rivestimento sarà quindi di clatrina e adaptina, essa è di due tipi: AP1 e AP2.

Altri segnali di smistamento sono residenti all'interno della membrana del reticolo. Si hanno vescicole rivestite di clatrina con diversi tipi di adaptina, mentre quelle che si spostano nel reticolo sono rivestite da COPI e quelle che vanno in avanti dal reticolo verso il Golgi sono rivestite di COPII. Vengono riconosciute varie proteine segnale dai recettori, verranno poi assemblate queste vescicole ricoperte da proteine di rivestimento. Lo scopo finale è quello di far arrivare la vescicola alla membrana bersaglio.

Viene quindi perso il rivestimento di proteina e vengono esposte altre proteine che sporgono dalla membrana della vescicola, che servono per il riconoscimento sulla membrana plasmatica. Il processo di fusione tra la membrana bersaglio la vescicola è possibile dividerlo in quattro fasi:

- 1. Movimento della vescicola verso il compartimento bersaglio specifico.** In molti casi, le vescicole di membrana devono spostarsi per distanze considerevoli attraverso il citoplasma prima di raggiungere il loro obiettivo finale. Questi tipi di movimenti sono diretti dai microtubuli che si comportano come dei binari capaci di trasportare carichi lungo un percorso definito che si conclude in una determinata destinazione.
- 2. Ormeaggio e ancoraggio delle vescicole al compartimento bersaglio.** Il contatto iniziale tra la vescicola di trasporto e la sua membrana bersaglio, come una cisterna del Golgi, sia mediato da proteine di ormeaggio e ancoraggio. Ci sono due gruppi di proteine: quelle con forma a bacchetta, proteine fibrose in grado di formare un ponte molecolare tra due membrane poste a distanza considerevole, e grandi complessi multi proteici che mantengono le due membrane in più stretta vicinanza tra loro. Un altro gruppo di proteine di ormeaggio dà inizio alla fusione tra due membrane adiacenti. Alcune proteine fibrose, chiamate "golgine" operano nell'apparato del Golgi. Le golgine sono capaci di riconoscere e catturare vescicole dirette al Golgi. Si suppone che l'ormeaggio sia la fase iniziale del processo di fusione della vescicola, e che esso richieda specificità fra la *cis*, e il compartimento bersaglio. Parte di questa specificità può essere conferita da una grande famiglia di proteine G dette **Rab**. Queste proteine passano dallo stato attivo, quando esse sono legate a GTP a quello inattivo in cui sono legate a GDP. Se legate a GTP, esse si associano alle membrane attraverso un'ancora lipidica. Le rab nel loro stato legato a GTP reclutano specifiche proteine citosoliche di ormeaggio sulle superfici delle membrane specifiche. Le proteine Rab giocano anche un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività di numerose proteine coinvolte in altri aspetti del traffico di membrana incluse le proteine motrici che muovono le vescicole attraverso il citoplasma.
- 3. Attracco delle vescicole al compartimento bersaglio.** Le membrane e del compartimento bersaglio si avvicinano e si giustappongono l'una all'altra, in seguito all'interazione fra le regioni citosoliche di alcune proteine integrali delle due membrane. Le proteine che mediano queste interazioni sono dette **SNARE**. Esse costituiscono una famiglia di proteine integrali di membrana con più di 35 membri, localizzati in specifici comparti subcellulari. Le SNARE variano in struttura e dimensioni. Tutte contengono nel loro dominio citosolico un *motivo SNARE*, che consiste di 60-70 amminoacidi capaci di formare un complesso con un altro motivo SNARE. Le SNARE sono divise in due catene **v-SNARE** che sono incorporate nelle membrane delle vescicole di trasporto durante la gemmazione, e **t-SNARE** che sono situate nelle membrane dei compartimenti bersaglio. Le SNARE che mediano l'attracco delle vescicole sinaptiche alla membrana presinaptica durante il rilascio dei neurotrasmettitori. La membrana plasmatica della cellula nervosa contiene due t-SNARE, la syntaxina e la SNAP-25, mentre la membrana della vescicola sintetica contiene una singola v-SNARE, la sinaptobrevina. Appena la vescicola sinaptica e la membrana presinaptica si avvicinano l'una all'altra, le molecole t-SNARE e v-SNARE delle membrane giustapposte interagiscono tra loro per formare dei fasci a quattro filamenti. Ogni fascio consiste di due alfa-eliche donate dalla SNAP-25, una alfa-elica donata dalla syntaxina ed una dalla sinaptobrevina. Insieme queste alfa-eliche parallele formano un fascio strettamente intrecciato che forza i due doppi strati lipidici adiacenti in un'associazione molto stretta.

4. Fusione fra la vescicola e la membrana bersaglio. Quando le vescicole lipidiche (liposomi), contenenti t-SNARE purificate, sono incubate con liposomi contenenti il corrispondente v-SNARE, i due tipi di vescicole si fondono l'uno con l'altro. Le vescicole in questo stadio restano attraccate alla membrana e sono pronte a riversare i loro contenuti quando ricevono un segnale di attivazione, quale un aumento della concentrazione di Ca^{2+} . A prescindere dalla modalità di regolazione, quando il doppio strato lipidico delle due membrane si fonde, le SNARE che prima sporgevano dalle due membrane si fonde, le SNARE che prima sporgevano dalle membrane separate si trovano nella stessa membrana. La dissociazione del complesso di SNARE quattro filamenti è opera di una proteina citosolica detta NSF, che si attorciglia attorno al fascio di SNARE e lo spezza in due utilizzando energia fornita dall'idrolisi di ATP.

Una volta rimosso il rivestimento viene messo sui binari, grazie a proteine motrici, alla chineina e alla chinesina, a seconda di dove si muove questa vescicola. I binari per potersi muovere sono caratterizzati dai microtubuli. Una volta avvicinato alla membrana bersaglio, sulla vescicola che sta trasportando il materiale, al di sotto del rivestimento di clatrina o COPII ci sono delle "fibre di ormeggio" (proteine lunghe filamentose), si allungano e riconoscono sulla membrana bersaglio delle proteine a cui si legano. Sulla vescicola di trasporto ci sono delle proteine, le SNARE che hanno il corrispettivo sulla membrana bersaglio. Sulla vescicola che trasporta il materiale sono chiamate v-SNARE mentre sulla membrana bersaglio sono dette t-SNARE (target). Quando le proteine fibrose di ormeggio hanno avvicinato la vescicola alla membrana bersaglio, v-SNARE e t-SNARE si avvicinano. Quando la distanza tra le due membrane sarà molto ridotto le due membrane entreranno in contatto, esse si fondono e il contenuto della vescicola verrà riversato all'interno della membrana bersaglio. v-SNARE e t-SNARE sono delle proteine di membrana della vescicola. t-SNARE sulla membrana bersaglio o target. Quando si avvicina la distanza tra questa vescicola di trasporto e la membrana bersaglio, si è ridotta grazie alle proteine fibrose dell'ormeggio, t-SNARE e v-SNARE entrano in contatto tra di loro poiché avviene un riconoscimento. Man mano che si avvicinano, il riconoscimento diviene sempre più importante. Quando la distanza tra le membrane si è ridotta di molto, esse si fondono e la membrana della vescicola entrerà a far parte della membrana bersaglio. Il contenuto all'interno della vescicola verrà rilasciato o nel lume dell'organello o nel Reticolo o nel Golgi e la membrana entrerà a far parte della membrana target. La vescicola quando si fonde con la membrana target, aumentano le dimensioni della superficie cellulare e per riportare alle dimensioni ottimali avverrà un'endocitosi costitutiva, cioè la cellula formerà delle invaginazioni e queste vescicole verranno internalizzate, questo processo ha lo scopo principale di ridurre le dimensioni della membrana.

ENDOCITOSI processo attraverso il quale la cellula internalizza recettori di superficie e ligandi extracellulari.

Fagocitosi assunzione del materiale corpuscolare. Prevede una modificazione importante al di sotto della membrana plasmatica dove viene coinvolta l'actina, attraverso la polimerizzazione dei filamenti di actina che avvolgono il materiale extracellulare e la fanno entrare all'interno.

Pinocitosi, è la condizione in cui la cellula beve, assunzione non specifica di fluidi extracellulari è detta **endocitosi generalizzata**. Specializza l'ingresso e aumenta la quantità di materiale che viene inglobato. Il legame ligando-recettore fa in modo che quel ligando entri nelle cellule appropriate, solo quelle cellule che presentano quei recettori sulla membrana e ne aumenta l'ingresso, attraverso l'endocitosi generalizzata. Quindi essa fornisce un mezzo per l'assunzione selettiva ed efficiente di macromolecole.

Endocitosi mediata da recettori è caratterizzata dall'assunzione di specifiche molecole extracellulari (ligandi) dopo che si sono legati ai recettori sulla faccia esterna della membrana plasmatica. Fornisce un mezzo per l'assunzione selettiva ed efficiente di macromolecole che possono essere presenti a concentrazioni relativamente basse. La funzione delle proteine del coatomero (clatrina, COPI, COPII) è quella di aiutare l'invalidazione della membrana.

L'endocitosi mediata da recettore prevede la formazione di vescicole rivestite di clatrina. La clatrina è uguale per tutti i processi mentre l'adapina cambia, ci sarà un mappatore diverso a seconda della destinazione del contenuto all'interno della vescicola.

La funzione della clatrina, come COPI è quella di aiutare l'invaginazione della membrana poiché data la loro struttura a trischelion dall'assemblaggio di questi trischelion si curva. Più si assembla di clatrina più la fossetta diventa più profonda nella membrana e si stacca grazie alla *dinamina*, si assembla intorno alla periferia della fossetta e man mano stringendosi, strozzerà questo anello di dinamina e strozzerà la vescicola. Viene poi rilasciata.

Esistono due tipi di recettori soggetti ad endocitosi:

- **Recettori di mantenimento** (housekeeping) deputati all'assunzione di materiale che verranno utilizzati dalla cellula, come transferrina e LDL.
- **Recettore segnale** deputati a traslocare i messaggi che cambiano l'attività della cellula, come insulina e fattori di crescita. Servono ad internalizzare il segnale e non vengono riciclati ma vengono degradati.

Recettori segnale servono a traslocare i messaggi. La cellula percepisce un segnale esterno, lo lega al recettore e questo determinerà un cambiamento dell'attività della cellula. I recettori di mantenimento sono utilizzati dalla cellula per assumere materiale che serve per poter svolgere la propria attività. Essi non vengono degradati se non dopo che sono stati utilizzati molte volte. Una volta che il ligando si è legato al recettore, tutto viene endocitato ma il recettore ritornerà alla membrana per essere riciclato, se serve in quel determinato momento, altrimenti si sposterà in un punto della membrana diverso e quando servirà ad internalizzare il materiale, esso si sposterà nella membrana. Questo processo è detto **transitosi** cioè lo spostamento in un punto diverso dalla membrana da dove deve essere utilizzato e poi se serve ancora, si muoverà grazie alle zattere lipidiche, alla fluidità della membrana, e si posizionerà nella parte di membrana dove avviene l'endocitosi. I recettori segnale poiché sereno ad internalizzare un segnale per far reagire la cellula in quel momento, non vengono riciclati ma vengono degradati insieme al segnale, questo è un segnale temporaneo. Arriva questo segnale, il recettore viene internalizzato insieme al segnale ed il recettore viene eliminato. Verrà prodotto di nuovo quando la cellula si trova in queste condizioni.

ENDOCITOSI MEDIATA DA RECETTORE IN SINTESI:

- La clatrina con l'adaptina è legata al recettore.
- Si assembla la clatrina e si forma la fossetta rivestita che diventa sempre più profonda.
- La dinamina stacca la vescicola.
- Si perde il rivestimento perché una volta che è stata indirizzata, grazie all'adaptina sui binari giusti, serviranno gli altri segnali che sono presenti sulla membrana, SNARE e proteine dell'ormeggio, tutte quelle proteine che serviranno a far fondere questa vescicola con la membrana bersaglio.

Due tipi importanti di endocitosi mediata da recettore sono:

LDL -> Colesterolo

Ferrotransferrina -> Ferro

Come entra il colesterolo nelle cellule?

Il *colesterolo* è un lipide che viaggia nel circolo sanguigno legato ad una struttura che lo rende solubile in ambiente acquoso. Sulla membrana delle cellule bersaglio è presente il recettore per LDL. Quando avviene il legame tra recettore e LDL, comincerà ad assemblarsi la fossetta rivestita di clatrina, man mano si invagina e viene staccata. La clatrina e l'adattatore vanno via e si forma l'endosoma precoce.

Come avviene la trasformazione da endosoma precoce ad endosoma tardivo?

Dal Golgi arrivano delle vescicole che hanno un contenuto particolare, a pH particolare.

È presente la pompa di tipo V che trasforma l'endosoma precoce in endosoma tardivo e poi successivamente in lisosoma, poiché arriveranno le vescicole contenenti le idrolasi acide. Il cambiamento di pH tra la vescicola rivestita e la vescicola nuda e l'endosoma precoce e l'endosoma tardivo, c'è un lieve cambiamento di pH perché comincia ad azionarsi la pompa di tipo V, questa variazione di Ph determina il distacco del recettore dal suo carico. Il recettore viene quindi riciclato per essere riutilizzato mentre le LDL arriveranno al lisosoma, endosoma tardivo che si trasformerà in lisosoma e all'interno avverrà la degradazione degli LDL, negli amminoacidi, nel colesterolo e negli acidi grassi che verranno riutilizzati dalla cellula.

ENDOCITOSI MEDIATA DA RECETTORE: FERRO

Sulla membrana plasmatica è presente il recettore per la **transferrina**. Il ferro non circola liberamente bensì è associato alla transferrina che diventa **ferrotransferrina**. La ferro-transferrina viene riconosciuta dal recettore, si ha l'*endocitosi mediata da recettore*, si forma una vescicola rivestita, viene perso il rivestimento di clatrina e di adaptina fino ad arrivare all'endosoma precoce che diventa tardivo. A questo punto la transferrina perde il ferro ed il recettore e l'*apotrasferrina* (poiché la transferrina perde il ferro) verrà riciclato. Il recettore con l'*apotrasferrina* verrà riportata in membrana. La variazione di pH fa staccare l'apotrasferrina che andrà a caricarsi di altro ferro ed il recettore risiede in membrana in attesa di essere riutilizzato.