

TRASPORTO VESCICOLARE

Per muoversi da un compartimento ad un altro le proteine verranno caricate all'interno di vescicole che si muoveranno da un compartimento ad un altro attraverso **gemmazione e fusione**.

I segnali che dirigono le vescicole alla loro locazione subcellulare sono delle etichette specifiche in ogni vescicola, al fine di raggiungere la loro destinazione.

Gli organelli, per mantenere la loro identità sotto il flusso del riciclo di proteine e lipidi, vi è un flusso vescicolare retrogrado che permette a ciascun organello di mantenere la propria identità.

Una proteina che deve rimanere nel Golgi o nel RER e quindi non deve essere caricata in vescicole ma deve restare lì possiede dei segnali di trattenimento, costituiti da amminoacidi che fungono da etichette indicando che quella proteina deve rimanere nel Golgi o nel RER

Fasi del trasporto:

1. Reclutamento e smistamento
2. Formazione di vescicole e gemmazione del compartimento donatore
3. Indirizzamento
4. Fusione della vescicola con la membrana target
5. Rilascio del carico

Le vescicole si possono formare mediante:

- **Secrezione costitutiva:** dove le proteine man mano che vengono sintetizzate vengono esportate nelle vescicole, ad esempio esocitate all'esterno. Questo tipo di secrezione può avvenire senza segnali
- **Secrezione regolata:** in cui si avranno vescicole che gemmano dal Golgi e rimarranno confinate nel citoplasma in attesa di un segnale esterno che le permetta di essere esocitate, come un segnale ormonale.

Questo trasporto vescicolare si distingue in:

- **Via anterograda:** dove le proteine vengono sintetizzate nel RER, passano tra le cisterne del Golgi e vengono secrete
- **Via retrograda:** le proteine possono tornare indietro nei compartimenti dove erano state generate.

BASI DELLA SPECIFICITÀ DELLA SELEZIONE DEL CARICO

Alcune proteine, oltre alla sequenza di localizzazione, possono avere alcune sequenze di indirizzamento. Tutte le proteine che hanno questa sequenza amminoacidica chiamata **KDEL** (sequenza di ritenzione), nel caso dovessero essere trasportate in altri compartimenti, questi segnali permetterebbero loro di essere riaccompagnate indietro attraverso il trasporto retrogrado. Ad esempio le chaperonine, attraverso questa sequenza KDEL, dal Golgi vengono riaccompagnate al RER.

Anche se per sbaglio una proteina venga caricata in maniera sbagliata, torna al suo compartimento donatore **sequenze di ritenzione specifiche**.

La specificità è data da recettori specifici che riconoscono il carico dalle sequenze che una proteina ha e viene indirizzata in un compartimento specifico.

Le vescicole, oltre allo strato fosfolipidico contengono delle **proteine di rivestimento**, generate in siti specifici, che indirizzano la proteina al giusto target e questo dà **specificità all'indirizzamento vescicolare**.

Le tre classi di rivestimento proteico nel trasporto vescicolare sono le vescicole coperte di:

- **COP 1:** sono coinvolte nel rivestimento vescicolare di tipo retrogrado, dal Golgi al RER
- **COP 2:** sono coinvolte nel trasporto vescicolare anterogrado, dal RER al Golgi
- **Clatrina:** gemmano dal trans-Golgi-network e sono vescicole che possono essere secrete o sono vescicole che reindirizzeranno il loro carico proteico all'interno dei **lisosomi**, organelli deputati alla digestione delle proteine invecchiate.

Dopo che una vescicola viene gemmata, il rivestimento proteico viene disassemblato, rimanendo quindi *nuda*. Per raggiungere la membrana target allora ci sono delle *proteine filamentose*, le **Snare**, che permetteranno la fusione tra la vescicola e la membrana target, in modo tale che le vescicole possano essere comunque indirizzate perché non sono esposte le proteine del rivestimento ma le Snare.

- Le **v-SNARE:** sono le proteine associate alle vescicole
- Le **t-SNARE:** sono le proteine associate alla membrana target

Le Snare presentano dei domini ad alfa elica che si super avvolgono e consentire l'aggancio tra vescicola e membrana target. Ogni v-snare ha la sua t-snare specifica.

I rivestimenti proteici svolgono due ruoli:

- **Meccanico:** cioè l'assemblaggio dei **coatomeri** (insieme di proteine che forma il rivestimento proteico COP1 e COP2) all'esterno della vescicola fa in modo che il doppio strato possa ripiegarsi e formare una curvatura affinché la vescicola si possa formare e poi venire strozzata
- **Selezione del carico:** è grazie al rivestimento proteico che la v-SNARE può essere inglobata nella vescicola

Il rivestimento proteico è essenziale, all'inizio per la formazione della vescicola e alla fine per indirizzarla al suo compartimento.

In una vescicola che si sta formando, dove la membrana inizia a curvarsi, viene reclutato del materiale proteico e inizia ad essere assemblato un coatomero, la *vescicola si strozza*, creando una **fossetta**. La vescicola si chiuderà ulteriormente e le due membrane adiacenti si formano e la vescicola viene liberata attraverso endocitosi.

Tra i metodi di studio vi sono gli **esperimenti del lievito**, i lieviti inizialmente sono aploidi, quindi le mutazioni vengono subito manifestate. Dall'analisi morfologica dei **mutanti SEC** (mutanti di secrezione), si sono codificati i geni importanti nei processi di secrezione coinvolti nell'assemblaggio del rivestimento proteico.

FORMAZIONE VESCICOLA RICOPERTA DA COP2

1. Viene generata e gemmata una vescicola ricoperta da COP2 sul RER e si dirige verso il Golgi. Nel RER ci sono dei **recettori** del carico che deve essere trasportato dentro la vescicola, generalmente questi recettori sono proteine trans membrana.
2. I recettori e il carico si uniscono e l'inizio della formazione della vescicola avviene ad opera di una proteina che per il COP 2 si chiama **SAR1**, una proteina G cioè un interruttore molecolare che può attivare alternativamente GTP o GDP+. La proteina è attiva nella forma **SAR 1 GTP**. La transizione tra SAR 1 GTP e SAR 1 GDP è mediata da proteine **GAP**, che permette l'idrolisi di GTP in GDP+P e **GEF**, che scambia i nucleotidi da GDP a GTP. SAR1 inizia il *budding* della vescicola e l'assemblaggio del coatomero.

La GEF specifica di SAR1 è **SEC 12**, una proteina ancorata alla membrana. SAR 1 è una proteina complicata che quando ha GDP legato è una proteina solubile, mentre SAR 1 GTP è ancorato alla membrana. Lo

scambio del nucleotide da GDP a GTP cambia la sua conformazione e fa esporre un'alfa elica alla SAR1 che si affonda al doppio strato fosfolipidico del RER.

SAR1 affonda quest'elica perché SEC 12 è già ancorata alla membrana e quindi SAR 1 può essere attivata solo in questa localizzazione. Quindi la SEC scambia i nucleotidi e SAR 1, la proteina G va in membrana.

3. Quando SAR 1 è attiva riconosce da un lato il carico e i recettori, dall'altro assembla e recluta altre proteine SEC che formeranno il coatomero, in particolare recluta un *dimero* formato anche da **SEC 23** e **SEC 24**. Questo complesso è curvo e quando si lega a SAR 1 determina un'incurvatura della membrana
4. Queste due proteine reclutano su di loro altre due, **SEC 13** e **SEC 31**, con conformazione a **banana** che determinano un'ulteriore incurvatura e la polimerizzazione di questo complesso porta alla formazione di un *coatomero COP 2*. La **SEC 16** è quella proteina che fa avvicinare le membrane tra di loro
5. Quando la membrana si ripiega, **SEC 14** va a strozzare queste due membrane e fa gemmare, liberare la vescicola nel citoplasma.
6. Dopo la gemmazione, il complesso proteico viene disassemblato e la vescicola rimane nuda.

ASSEMBLAGGIO COP1

Mentre la proteina G inizia l'assemblaggio del COP 2, per il COP 1 la proteina **ARF** è fondamentale

Si trova in due conformazioni: **-ARF GTP** e **-ARF GDP** e anch'essa viene attivata da una GEF specifica

ASSEMBLAGGIO CLATRINA

Per l'assemblaggio della **clatrina**, intervengono una serie di proteine del coatomero che formano nello stesso modo della vescicola ricoperta da COP 1 e COP 2. Nel caso della strozzatura, è stata individuata la proteina **dinamina**. Dopo la gemmazione, anch'essa perde il rivestimento.

La clatrina ha una struttura a **triskelion**, definita dalle vescicole ricoperte da clatrina, dovuta all'assemblaggio specifico della proteina. Essa è stata identificata da tre catene pesanti e tre leggere e l'assemblaggio forma degli esagoni o pentagoni che formano il rivestimento proteico.

Sulle vescicole ricoperte col rivestimento, tra le proteine caricate in maniera specifica, sono state caricate anche le SNARE e tolto il rivestimento, è presente una v-SNARE avvicinata per interagire con la sua t-SNARE.

ORMEGGIO

Si ha quando vi è l'avvicinamento della vescicola gemmata con la proteina donatrice. Le proteine coinvolte in questo processo sono le proteine **RAB**, globulari o filamentose, che si riconoscono tra la membrana target e la vescicola, le RAB sono responsabili del **tethering** (avvicinamento della vescicola con la membrana target) Sono state caricate insieme alle SNARE L'ormeggio quindi avviene grazie al riconoscimento tra le RAB, le vescicole vengono avvicinate la membrana target e le SNARE interagiscono in modo che le due membrane si fondano (coding) e le vescicole rilascino il contenuto.

Al livello del tessuto nervoso, il viaggio dell'impulso nervoso avviene in vescicole dove dentro vi è il **neurotrasmettitore**. La v-SNARE delle cellule nervose è la **sinaptobrevina**.

PROTEINE DESTINATE AI LISOSOMI

Quando le vescicole emergono dal trans del Golgi, rivestite di clatrina, avranno come direzione l'esterno della cellula o i lisosomi. Gli enzimi lisosomiali, prima di essere caricati nelle vescicole, vengono etichettati attraverso un segnale dato dall'aggiunta di uno zucchero fosforilato, il **mannosio-6-fosfato**, aggiunto sulla glicoproteina e da un enzima specifico viene fosforilato in 6'. Le proteine che possiedono questo mannosio

fosforilato, vengono riconosciute dal **recettore 6 fosfato** e assembla un carico con le proteine destinate al lisosoma.

LISOSOMI

Sono organuli che provvedono alla digestione e degradazione di proteine e organelli invecchiati. Degradano microrganismi e agenti patogeni. Sono organelli **acidi idrolasi enzimi**, che degradano e acidificano qualunque cosa all'interno della cellula, grazie al pH acido conferito da pompe a idrogeno sulla membrana.. Contengono dentro principalmente *idrolasi acide, nucleasi, proteasi, lipasi, fosfatasi*.

I lisosomi non sono soltanto organelli che degradano materiale invecchiato ma permettono alla cellula di riciclare e degradare ciò che nella cellula non ci deve essere. I lisosomi fanno parte anche di un ciclo molto più complicato

L'organello è un mitocondrio, rivestito da membrane e forma un **vacuolo autofagico** che fonde con i lisosomi formando un **lisosoma autofagico**. Gli enzimi a volte non riescono a degradare integralmente l'organello e si accumulano dei granuli di **lipofuscina**

I lisosomi partecipano anche alla degradazione di proteine e materiale che entra attraverso l'**endocitosi**, l'accumulo di proteine o materiale esterno, in questo caso quando una vescicola di clatrina endocitica si forma, vi è la formazione di un **endosoma**.

Viene chiamato **precoce** se è vicino alla membrana plasmatica ed entrando nella cellula si fonde con i lisosomi per formare l'endosoma **tardivo** degradato e ciò che si può verrà riciclato.