

IL SISTEMA DI ENDOMEMBRANE

Tutte le membrane del sistema sono connesse da un traffico vescicolare anterogrado e retrogrado denominato via di secrezione. Questo sistema di membrane sintetizza le proteine che sono destinate alla secrezione o ad alcuni compartimenti interni alla via stessa, le assembla, le modifica, le smista, le direziona alle diverse destinazioni. Alcune proteine di membrana possono essere trattenute in diversi punti del sistema di endomembrane. Quindi meccanismi di smistamento, indirizzamento e recupero regolano il traffico tra i differenti compartimenti, assicurando la consegna delle molecole ed il mantenimento dell'identità specifica del compartimento. I compartimenti che costituiscono il sistema di endomembrane sono il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi, Trans Golgi network, i vacuoli e la membrana plasmatica, diversi tipi di vescicole di trasporto e compartimenti membranosi associati alla via endocitica.

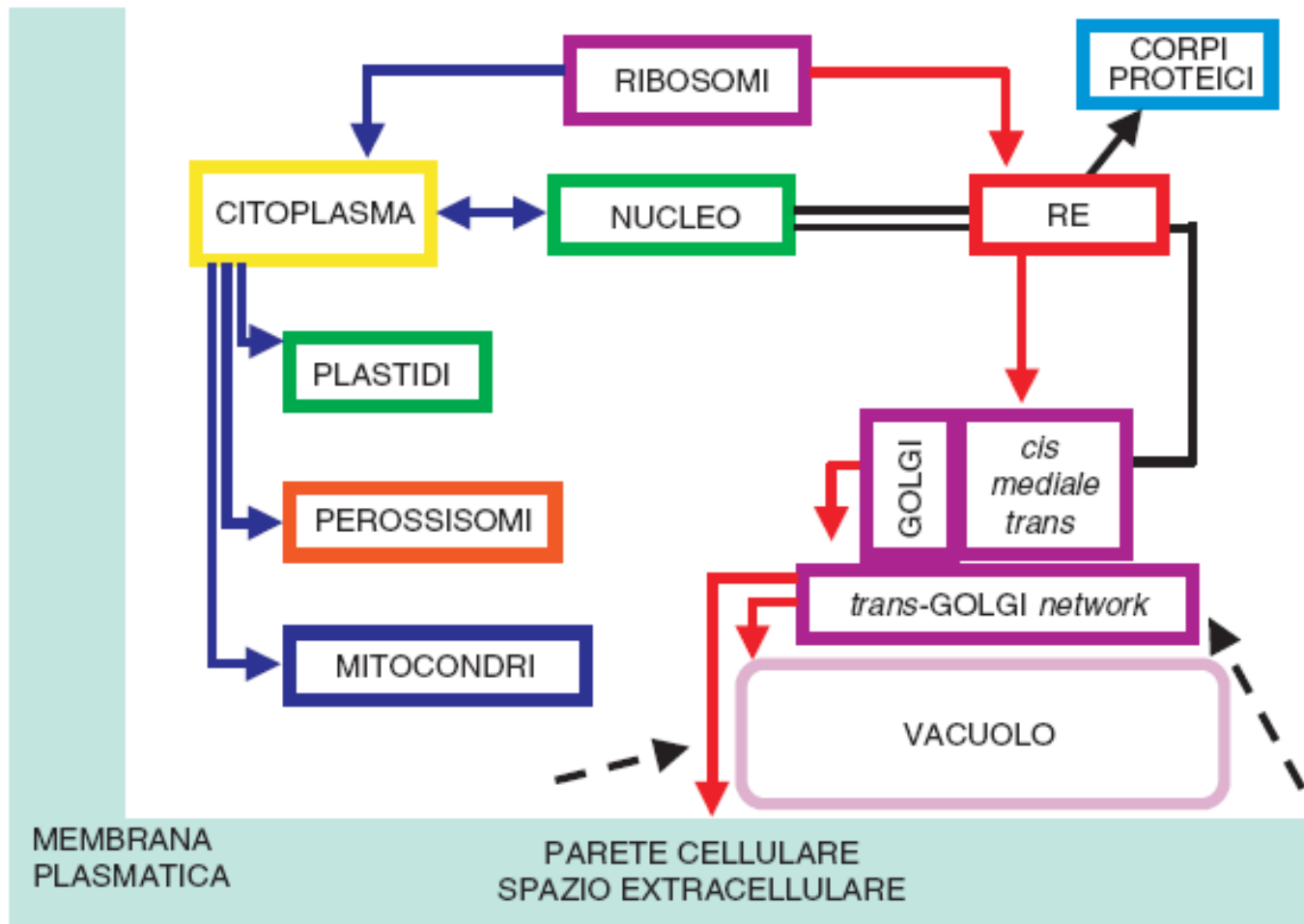


Figura 4.1

Rappresentazione schematica dei compartimenti coinvolti nello smistamento intracellulare di proteine nella cellula vegetale. Frecche rosse: via di secrezione; frecche blu: smistamento al citoplasma, nucleo, plastidi, mitocondri, perossisomi; frecche tratteggiate: endocitosi; RE: reticolo endoplasmatico.

Tabella 4.1 Sequenze segnale di indirizzamento e smistamento delle proteine ai diversi compartimenti cellulari

Compartimento	Sequenza aminoacidica
RE (direzionamento) (ritenzione)	Peptide segnale Sequenza ritenzione/ recupero
Nucleo	Segnale di localizzazione nucleare
Mitocondri	Presequenza mitocondriale
Plastidi	Peptide di transito
Perossisomi	Segnale di indirizzo ai perossisomi
Vacuolo	Segnale di smistamento al vacuolo

I segnali mediante i quali le proteine vengono smistate e dirette verso tali bersagli sono segmenti della catena polipeptidica di lunghezza variabile, da pochi a 70 amminoacidi (aa), che possono essere localizzati in una o più posizioni.

Il reticolo endoplasmatico è la porta di entrata delle proteine nel sistema di endomembrane. E' il compartimento più esteso ed adattabile delle cellule eucariotiche. Consiste di una rete tridimensionale di sacchi appiattiti (cisterne prevalenti nelle cellule meristematiche ed in via di differenziamento) e di tubuli (più abbondanti nelle cellule differenziate e molto vacuolizzate) che decorrono sotto la membrana plasmatica (reticolo corticale) attraversano il citoplasma e si connettono all'involucro nucleare. La versatilità di questo compartimento è dovuta alla vasta area superficiale di membrana disponibile per l'incorporazione di proteine ed alla facilità con cui questo sistema può espandersi, ridursi, riorganizzarsi e differenziarsi durante lo sviluppo della cellula.

Il continuo rimodellamento del RE richiede i “reticuloni”, proteine con due lunghi domini transmembrana che si inseriscono nelle membrane inducendo la formazione di un angolo di curvatura ed influenzando così la forma del compartimento. Nel genoma delle piante superiori vi è un gran numero di geni che codificano reticuloni (21 geni in *Arabidopsis thaliana*), nettamente superiore a quello degli organismi unicellulari (1 singolo gene in *Chlamydomonas reinhardtii*) o semplici (9 geni nel muschio *Physcomitrella patens*) e anche superiore a quello dei mammiferi (solo 4 geni in *Homo sapiens*). Il loro numero rispecchia di fatto la maggiore complessità e dinamicità dell'organello nelle cellule vegetali.

Il Reticolo tubulare interno è molto mobile rispetto al RE corticale che è in stretta associazione con la membrana plasmatica e con la componente actinica del citoscheletro. Numerose evidenze dimostrano che un'interazione diretta tra fasci di microfilamenti e RE corticale sia una piattaforma di aggancio per i filamenti di actina nel generare le correnti citoplasmatiche.

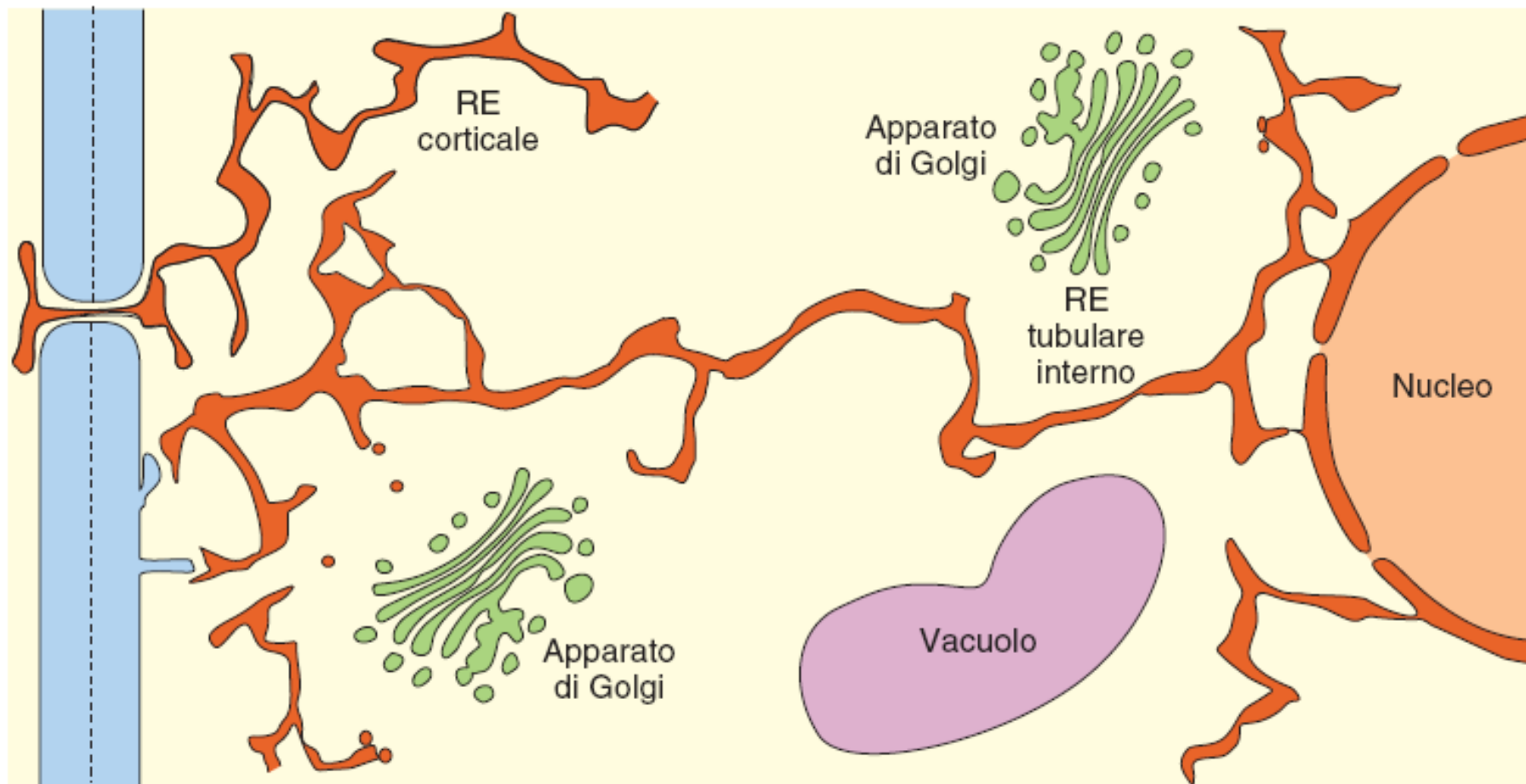


Figura 4.2

Distribuzione del reticolo endoplasmatico (RE) nella cellula vegetale: nella zona periferica è presente una rete poligonale di RE corticale, mentre nel citoplasma più interno si localizzano tubuli di RE (RE tubulare interno).

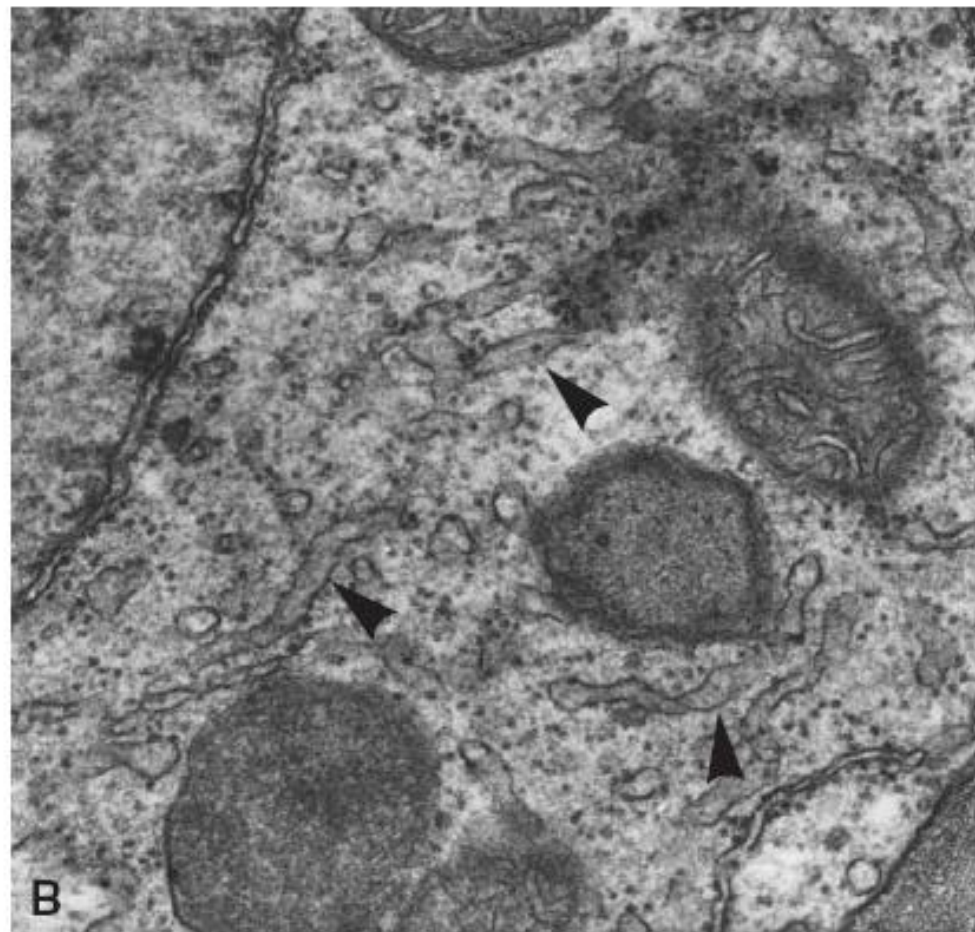
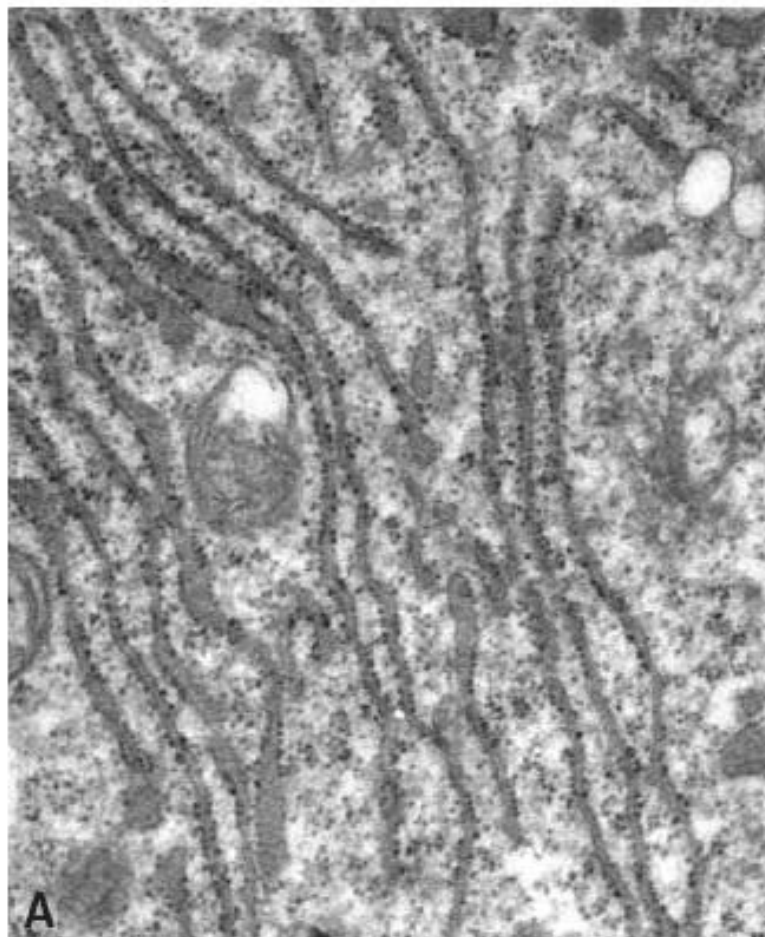
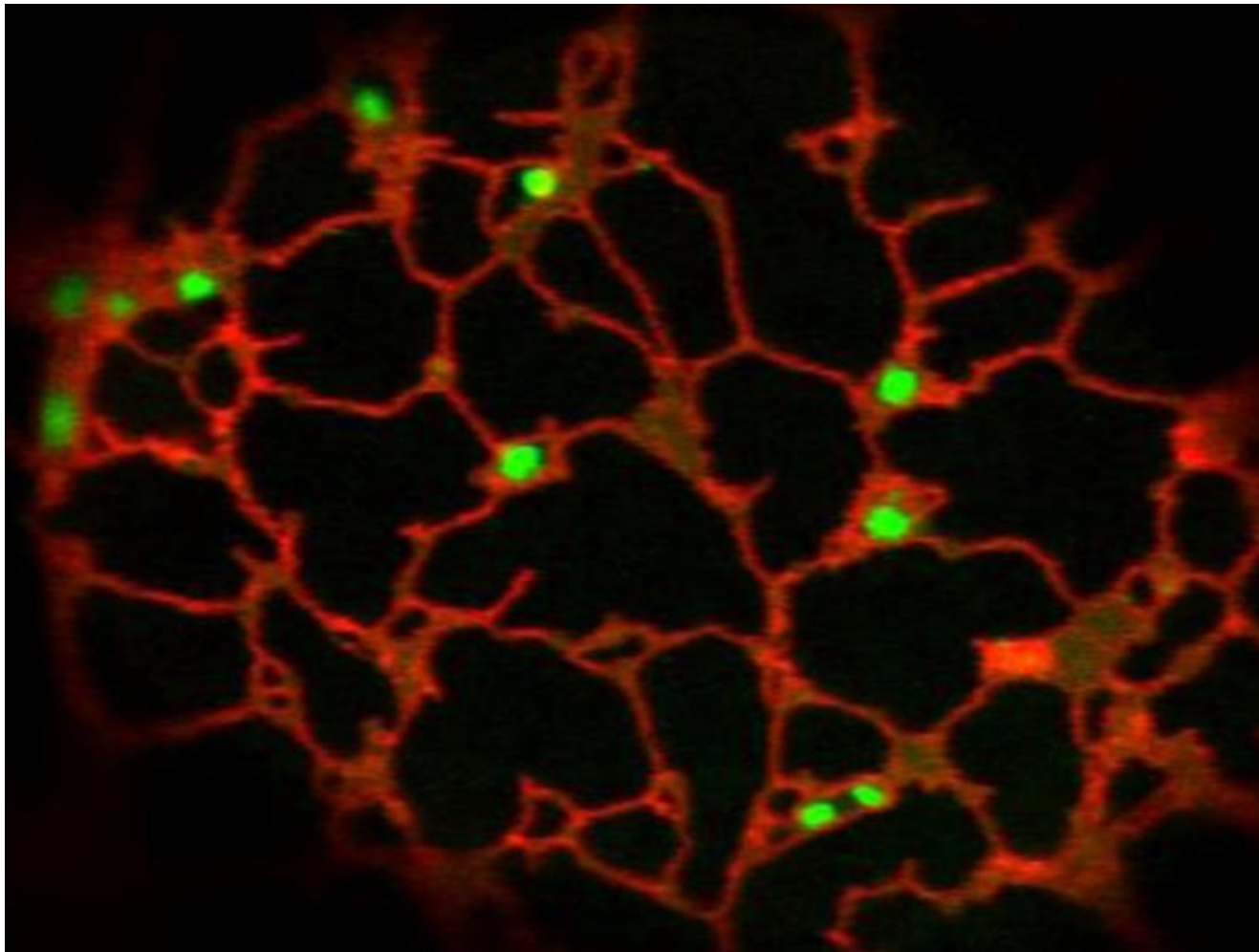


Figura 4.3

A) Profili di reticolo endoplasmatico ruvido in cellule del tappeto di antere di soia (osservazione di P. Mariani). B) Profili di reticolo endoplasmatico liscio (teste di freccia) in cellule in coltura di ippocastano (osservazione di N. Rascio).



Confocal image of a tobacco leaf epidermal cell co-expressing a fluorescent Golgi marker (colored green) and a fluorescent marker that labels the endoplasmic reticulum (colored red).

Per raggiungere la massima efficienza, l'ER assume un'architettura caratterizzata da una rete di tubuli e foglietti di membrana interconnessi a formare poligoni chiusi. Parte dell'ER corticale è fisicamente collegata direttamente sotto la membrana plasmatica, mentre altre parti sono mobili e subiscono un rapido rimodellamento attraverso la continua ramificazione dei tubuli, la crescita delle punte polari e specifici eventi di fusione. I difetti nell'architettura dell'ER causano gravi difetti di crescita e morte cellulare

Il RE è la sede della sintesi di fosfolipidi di membrana e di trigliceridi di riserva, parte della glicosilazione delle proteine, il ripiegamento e la maturazione ed il controllo di qualità, l'accumulo di proteine e lipidi di riserva. Nei cereali e in molte piante erbacee, le proteine di riserva appartengono alla classe delle prolamine, insolubili nei solventi acquosi. Si accumulano in grossi aggregati, i corpi proteici, che vengono poi utilizzati come fonte di aminoacidi durante la germinazione.

RER e REL sono 2 regioni interconnesse che svolgono funzioni diverse grazie alla presenza o no dei ribosomi.

Il REL è deputato alla sintesi dei lipidi. Nei semi oleosi sono presenti i corpi lipidici in cui vengono accumulati i trigliceridi. La biogenesi dei corpi lipidici prevede la deposizione dei trigliceridi tra i due foglietti di membrana ed il successivo distacco dell'aggregato circondato dalla mezza unità di membrana. I siti di accumulo nel RE sono definiti dalla presenza di proteine integrali di membrana, le oleosine che rimangono inserite nel corpo lipidico quando si distacca dal RE. Queste proteine oltre ad essere responsabili della stabilizzazione del corpo lipidico ne eviterebbero la fusione con altri corpi lipidici.

Il RE è coinvolto nella biogenesi dei vacuoli.

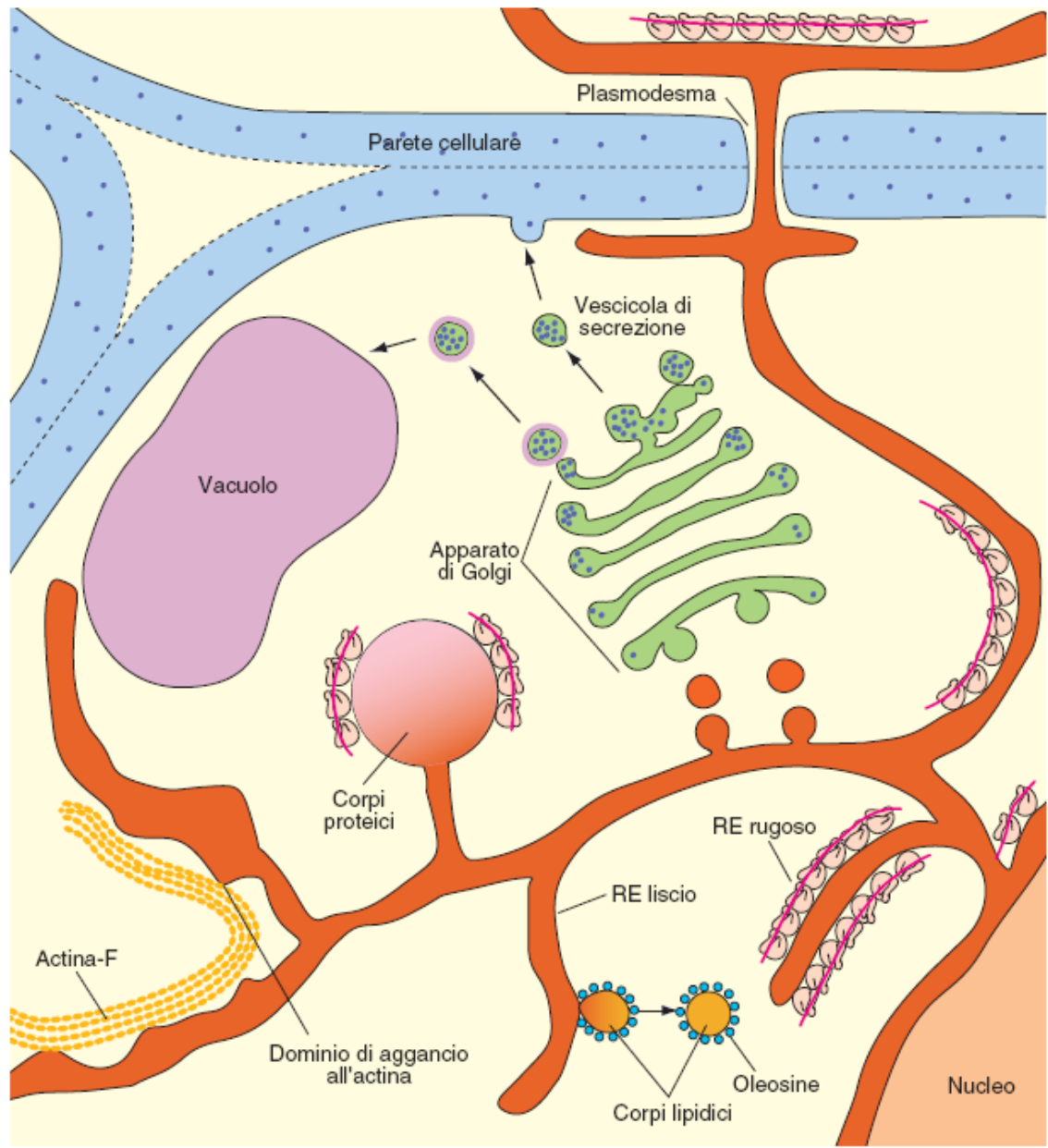


Figura 4.4
Alcuni dei domini funzionali attribuiti al reticolo endoplasmatico della cellula vegetale.

Sintesi delle proteine destinate ad entrare nel RE inizia sui ribosomi liberi. Una particella proteica Signal Recognition Particle **SRP**, riconosce un segnale peptidico sulla proteina in corso di sintesi e guida l'avvicinamento al RE e la successiva traslocazione.

Traslocazione: la proteina entra nel lume del RE attraverso un canale formato da diverse proteine (traslocone).

Una proteina solubile subirà la rimozione del peptide segnale oppure interromperà il processo e rimarrà inserita nella membrana come proteina integrale.

Nel RE avviene anche la glicosilazione. Le chaperonine poi accompagnano il processo di maturazione e svolgono il «controllo di qualità». Se la maturazione ed il ripiegamento non procedono regolarmente la proteina malformata è retrotraslocata e degradata nel citosol dal complesso del proteasoma.

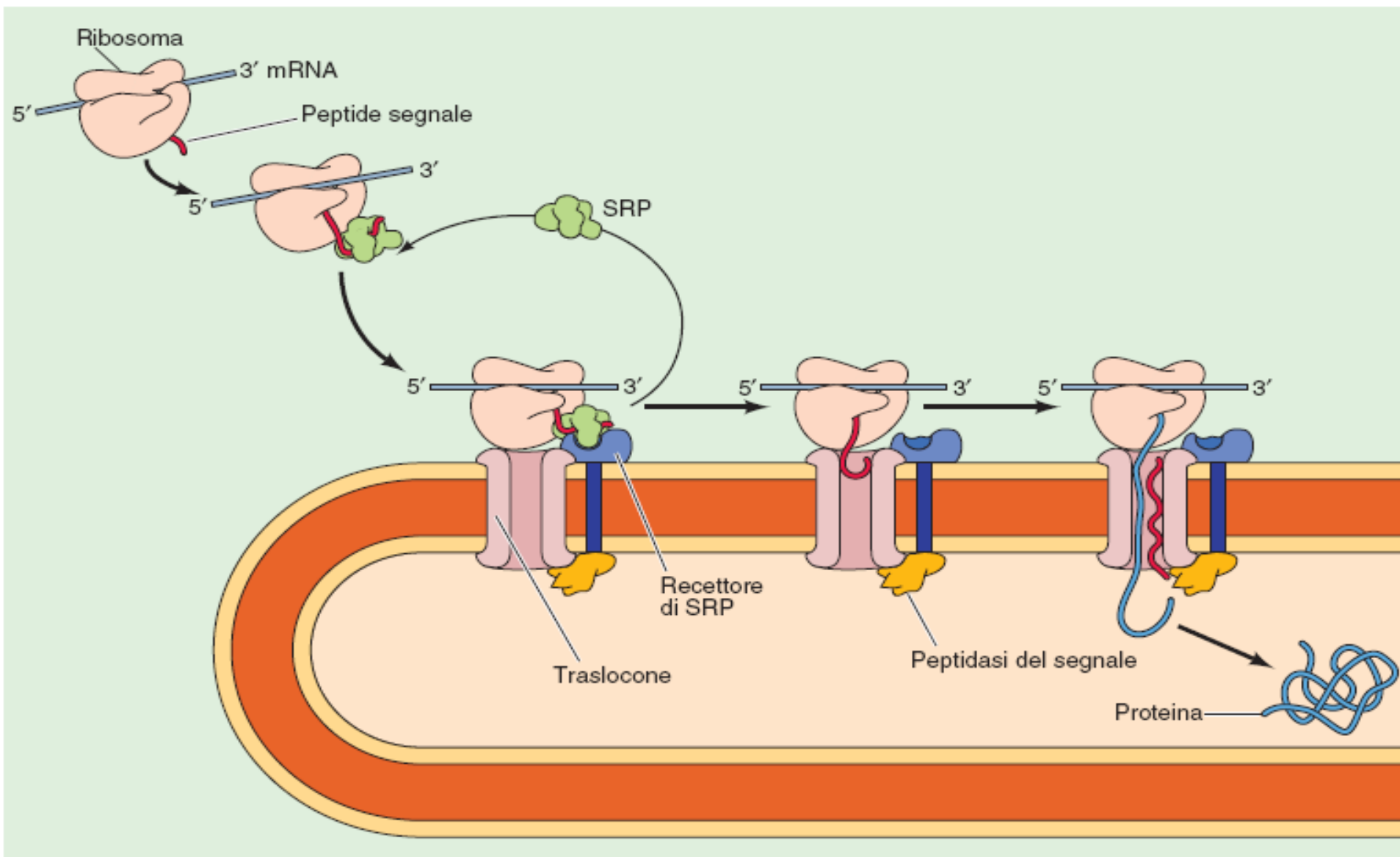


Figura 4.8

Traslocazione delle proteine nel reticolo endoplasmatico (da G.M. Cooper e R.E. Hausman, modificata).

SRP: particella citosolica che riconosce il peptide segnale (sequenza aminoacidica all'estremità aminoterminale della proteina) e il recettore di membrana del RE. Traslocone è un complesso di polipeptidi che si associano a formare un canale idrofilico per l'accesso delle proteine.

I perossisomi hanno forma sferica ma hanno anche propaggini allungate che si allineano con il RE. Le proteine della loro matrice non sono originate dal RE perché sono state sintetizzate da ribosomi liberi nel citosol e poi inserite direttamente nel perossisoma.

Questo organello si duplica per divisione indipendente. E' stato visto che eliminando da una cellula tutti i perossisomi, essi possono rigenerarsi ex novo, proprio dal RE sul quale sono state scoperte alcune delle proteine della membrana dei perossisomi.

Le funzioni dei perossisomi nelle piante sono legate prevalentemente all'ossidazione degli acidi grassi (più di 70 enzimi sui circa 300 noti); tra le altre proteine più abbondanti si trovano quelle legate al metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno (circa 20 enzimi) e alla fotorespirazione. I perossisomi contengono delle ossidoreduttasi legate a flavine, che trasferiscono elettroni da molecole fortemente riducenti direttamente all'ossigeno molecolare (O_2), ottenendo perossido di idrogeno (H_2O_2); le catalasi, a loro volta, degradano il perossido di idrogeno liberando acqua e ossigeno. Diverse popolazioni di perossisomi svolgono funzioni specializzate, come ad esempio la fotorespirazione, caratteristica dei vegetali.

Nelle piante **l'apparato di Golgi** è formato da numerose pile, formate da 5-10 cisterne, appiattite al centro e dilatate ai margini, distribuite in tutto il citoplasma. Ad esse sono associate numerose vescicole. Nella cellula animale invece gli elementi dell'apparato di Golgi formano un unico complesso situato nella zona perinucleare. Nella cellula vegetale il numero delle pile varia in relazione al tipo cellulare, allo stadio di sviluppo ed alla specie a cui appartiene. All'interno di ogni pila le cisterne mostrano una spiccata polarità: *cis* verso il RE da cui ricevono tramite vescicole i prodotti di sintesi che devono proseguire verso la via di secrezione. Seguono le cisterne *mediali* e le cisterne *trans*. Associata al lato *trans* si localizza la regione *trans Golgi network* caratterizzata da strutture tubulari da cui prendono origine strutture vescicolari. Esso è il punto di biforcazione per lo smistamento delle proteine al vacuolo e di quelle secrete.



Figura 4.5

Micrografia al microscopio elettronico dell'apparato di Golgi, costituito da più pile di cisterne disperse nel citoplasma, in cellule in coltura di *Arabidopsis thaliana* (osservazione di B. Baldan).

Nelle piante l'apparato di Golgi è inoltre coinvolto nella sintesi dei glicolipidi di membrana plasmatica e vacuolare e nella sintesi e assemblaggio dei polisaccaridi della matrice della parete. Nelle cellule animali, durante la Mitosi l'apparato di Golgi si frammenta in gruppi di vescicole e la secrezione si arresta. I nuovi apparati di Golgi si formano da gruppi di vescicole smistati nelle cellule figlie. Nelle cellule vegetali invece il traffico proteico, lipidico e la sintesi di polisaccaridi continuano durante la Mitosi ed il Golgi non si disassembla. La duplicazione del Golgi avviene in fase G2. Le pile di cisterne del Golgi sono in grado di spostarsi rapidamente lungo i tubuli del RE corticale basandosi sull'interazione con la componente actinica del citoscheletro sovrapposta alla rete di tubi del RE che funge da guida per le cisterne. L'alta mobilità delle cisterne potrebbe favorire il carico delle proteine nel RE e/o la secrezione verso la membrana plasmatica.

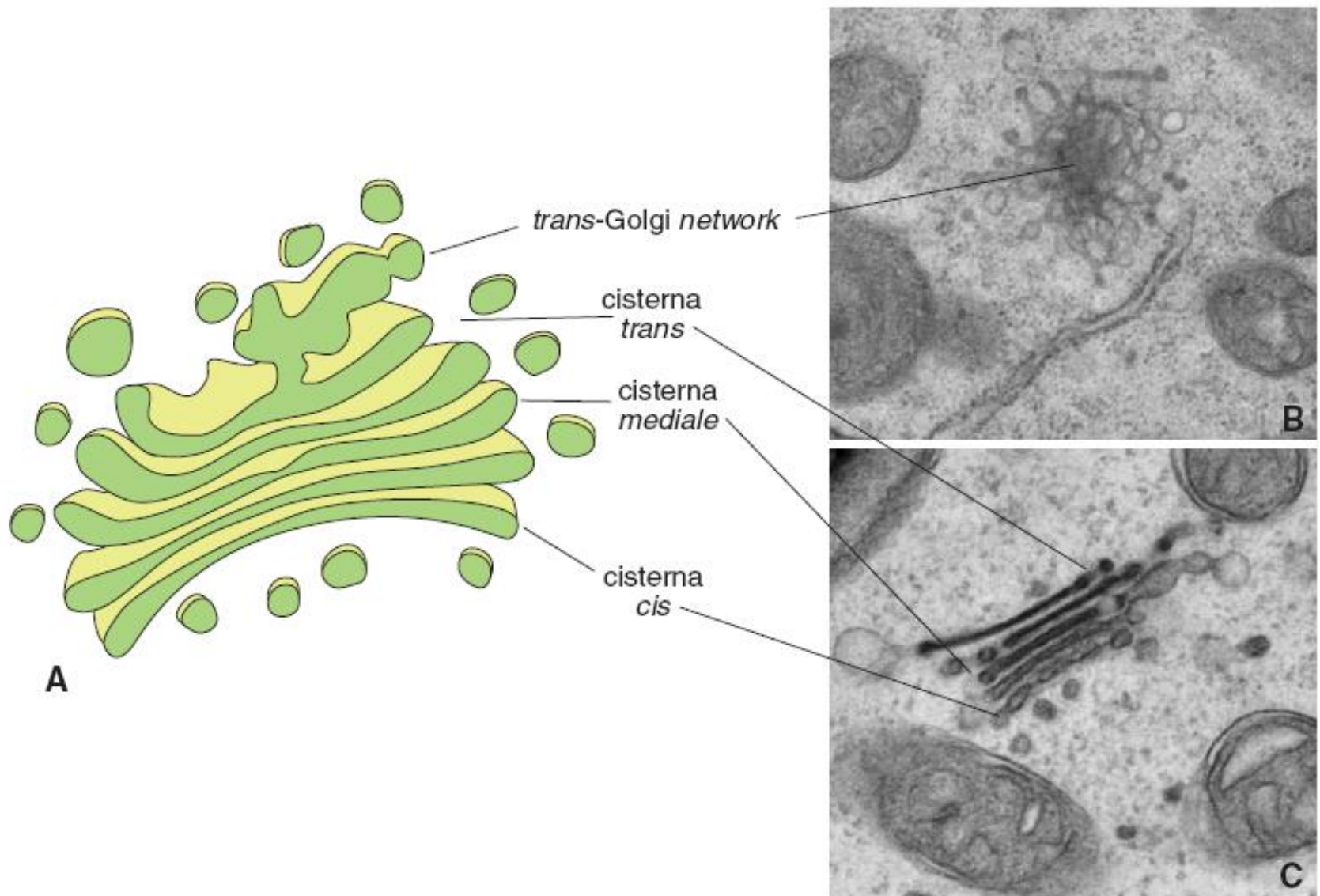


Figura 4.6

A) Visione schematica dell'organizzazione e della posizione reciproca delle cisterne all'interno di una pila dell'apparato di Golgi. B) Micrografia al microscopio elettronico delle cisterne *trans* e del *trans-Golgi network* in sezione tangenziale. Sono ben visibili le vescicole in formazione e quelle libere nel citoplasma dopo essersi staccate dalla membrana delle cisterne. C) Micrografia al microscopio elettronico di una pila di cisterne disposte come nello schema in A (osservazioni di B. Balzan).

Il trasporto delle proteine dal Re all'apparato di Golgi e dal Golgi al vacuolo e alla membrana plasmatica avviene mediante trasporto vescicolare lungo la via di secrezione. Il trasporto vescicolare è mediato da vescicole che gemmano dalla membrana di un compartimento donatore e si fondono con la membrana del compartimento accettore. Per una distribuzione specifica è necessario che ogni vescicola trasporti solo le proteine destinate al compartimento bersaglio questo avviene grazie al rivestimento proteico peculiare della superficie delle vescicole.

Nel trasporto dal RE al Golgi le vescicole sono rivestite di COPII, nel trasporto dal Golgi al RE le vescicole sono rivestite da COPI. Le vescicole che vanno dal Golgi al vacuolo sono rivestite di clatrina. Il rivestimento svolge un ruolo importante nella fase di gemmazione della vescicola inducendo nella membrana donatrice la giusta curvatura e contribuisce ad inglobare le proteine da trasportare.

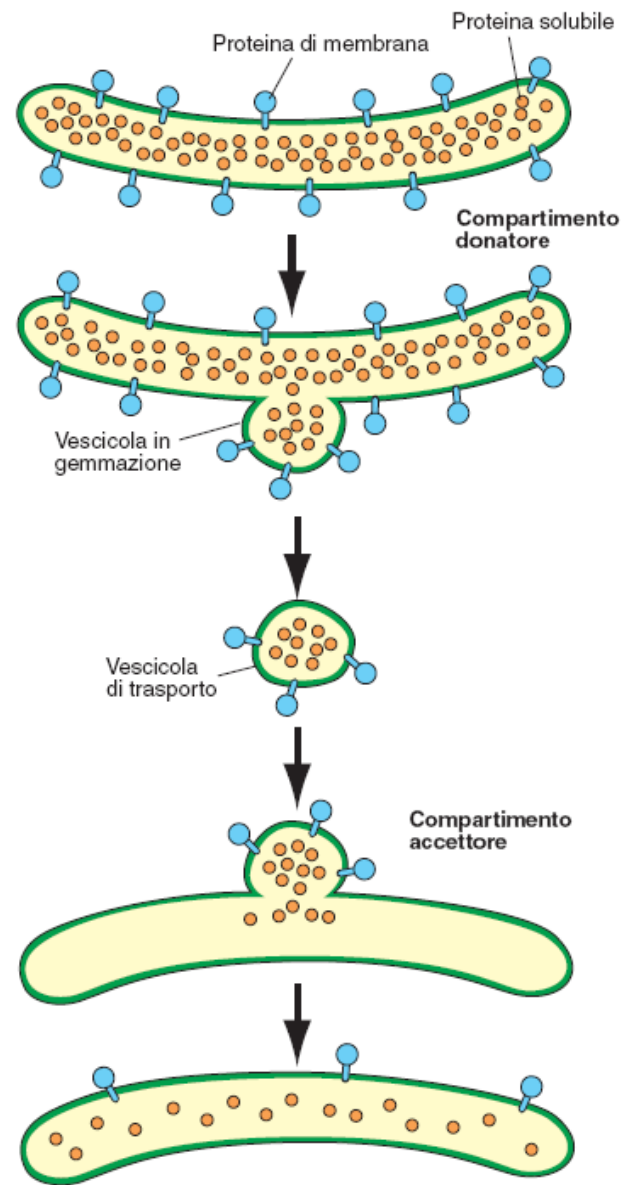


Figura 4.9

Formazione di una vescicola di trasporto a livello della membrana del compartimento donatore e fusione con la membrana del compartimento accettore. È da notare il mantenimento dell'orientamento topologico delle proteine di membrana.

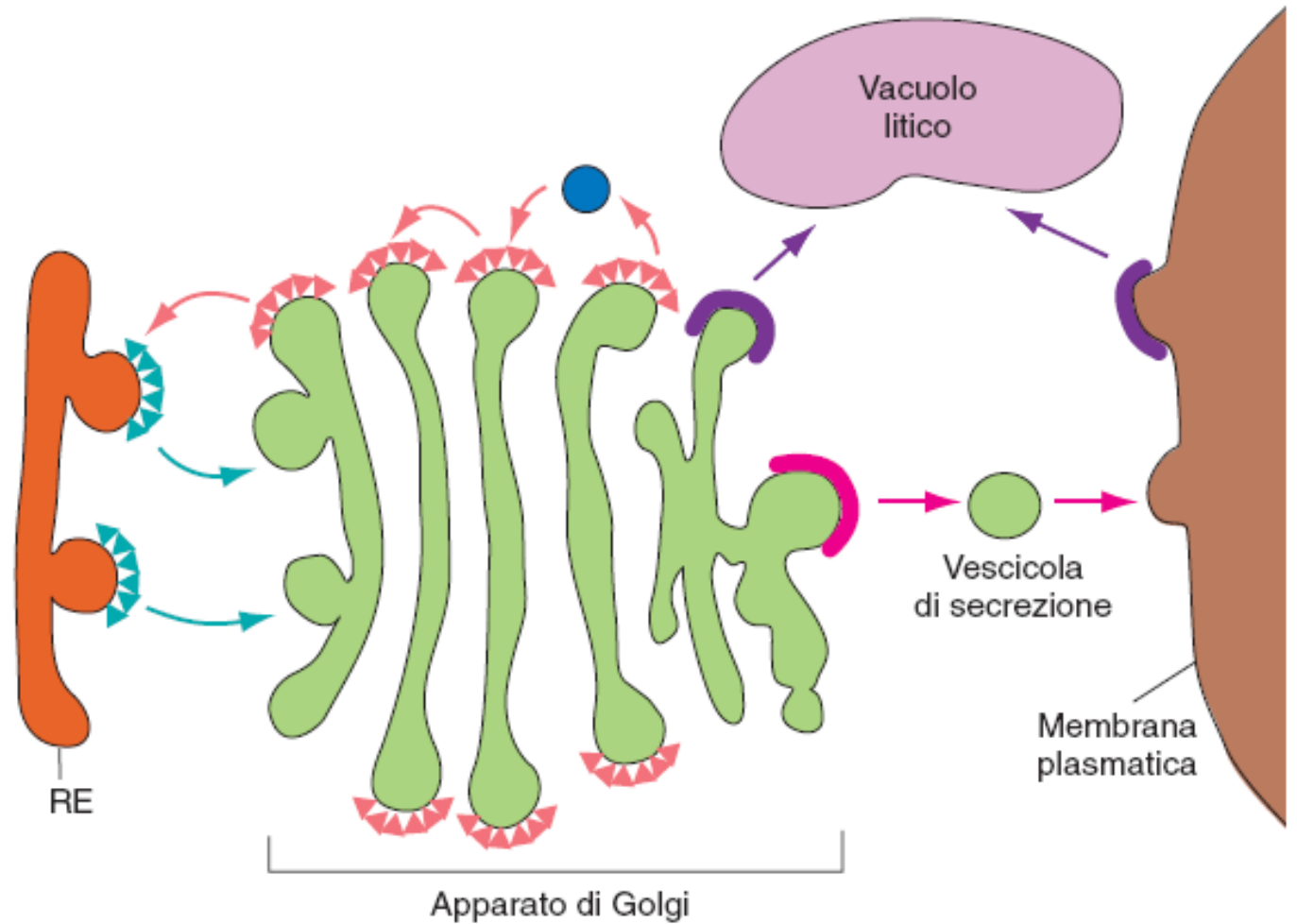
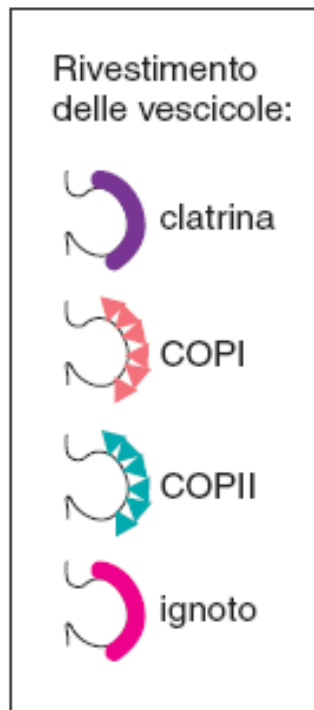
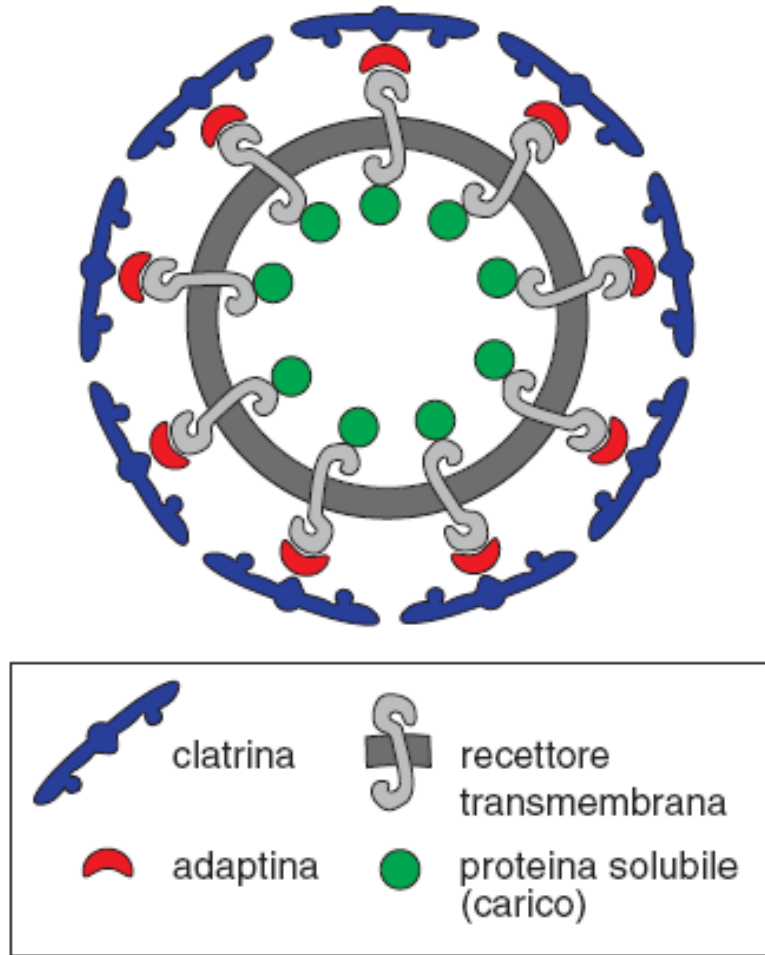


Figura 4.10

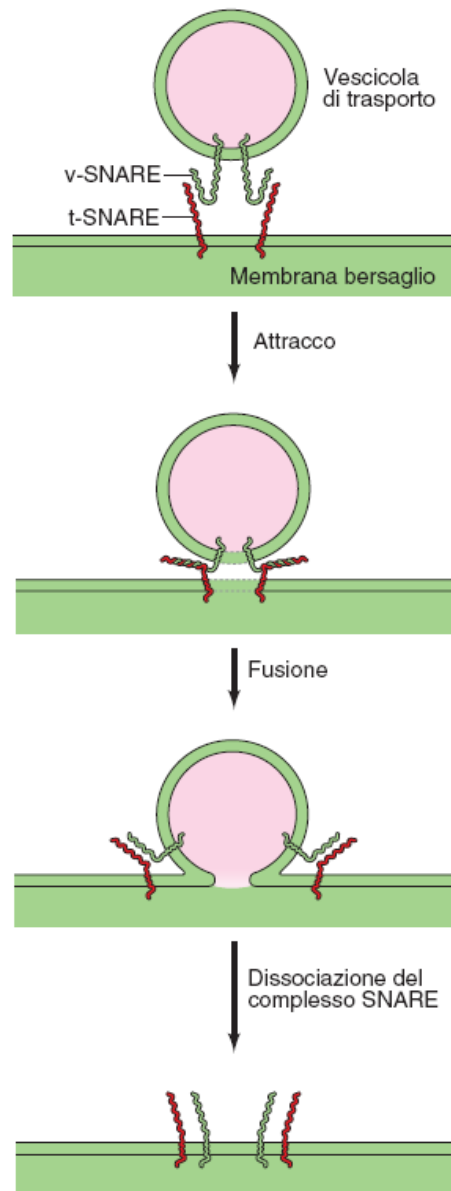
Rivestimenti proteici utilizzati nel trasporto vescicolare.



Nel caso di vescicole rivestite di clatrina questa funzione è svolta da un gruppo di proteine chiamate adaptine, facenti parte del rivestimento, che si associano temporaneamente alla faccia citosolica della membrana della vescicola in formazione legando da una parte le proteine transmembrana con funzione di recettori di carico e dall'altra le molecole di clatrina. A gemmazione completata sia le adaptine che le molecole di clatrina si distaccano.

Figura 4.11

Rappresentazione schematica di una vescicola rivestita di clatrina (disegno di R. Mazzaro).



Il corretto trasporto di una molecola da un organello all'altro è mediato da vescicole di trasporto che si formano dall'organello donatore e si fondono con l'organello accettore. Le proteine SNARE sono implicate in questo processo. Le v-SNARE sono localizzate sulle vescicole mentre le t-SNARE sulla membrana di destinazione del trasporto vescicolare. L'interazione tra le 2 SNARE è permessa grazie all'idrolisi del GTP ad opera di una proteina Rab. Il complesso SNARE che è venuto a formarsi verrà poi dissociato da alcuni fattori proteici attraverso idrolisi dell'ATP.

Figura 4.12

Ruolo delle proteine SNARE nel riconoscimento e fine tra la membrana della vescicola e quella del compartimento bersaglio (da G.M. Cooper e R.E. Hausr modificata).

SMISTAMENTO DELLE PROTEINE AL VACUOLO

I segnali molecolari che assicurano il corretto smistamento delle proteine dal trans Golgi network ai compartimenti idrolitici sono di diversa natura nelle cellule animali e vegetali. Nelle cellule animali il segnale di smistamento è dato da un residuo di mannosio 6-fosfato, cioè da uno zucchero della catena oligosaccaridica delle proteine che viene fosforilato nelle cisterne cis del Golgi. Nelle cellule vegetali invece, i segnali per lo smistamento delle proteine al vacuolo sono contenuti nelle proteine stesse. Possono essere costituiti da una corta sequenza aminoacidica detta propeptide, localizzata all'estremità N-terminale o C-terminale, oppure da una sequenza interna.

I propeptidi N-terminali dirigono le proteine ai vacuoli litici, mentre le sequenze C-terminali (vescicole rivestite di clatrina) o interne dirigono le proteine ai vacuoli di riserva (vescicole dense, rivestimento sconosciuto).

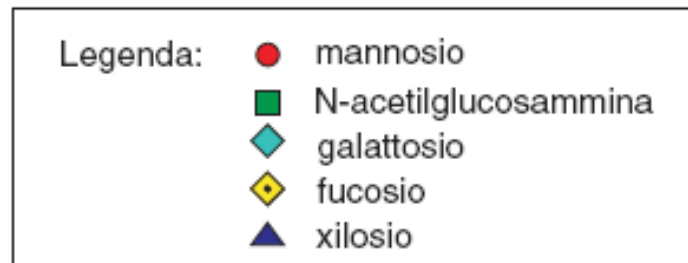
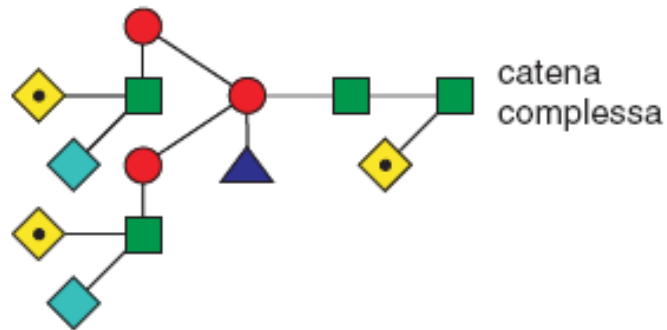
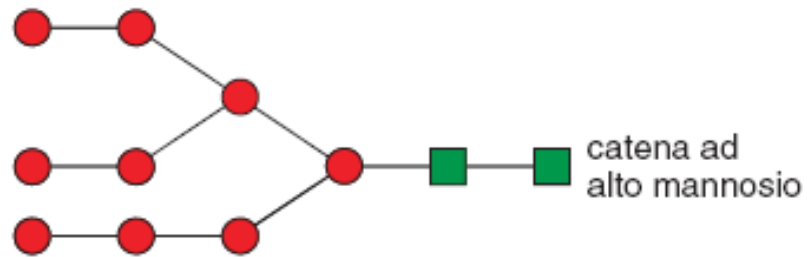
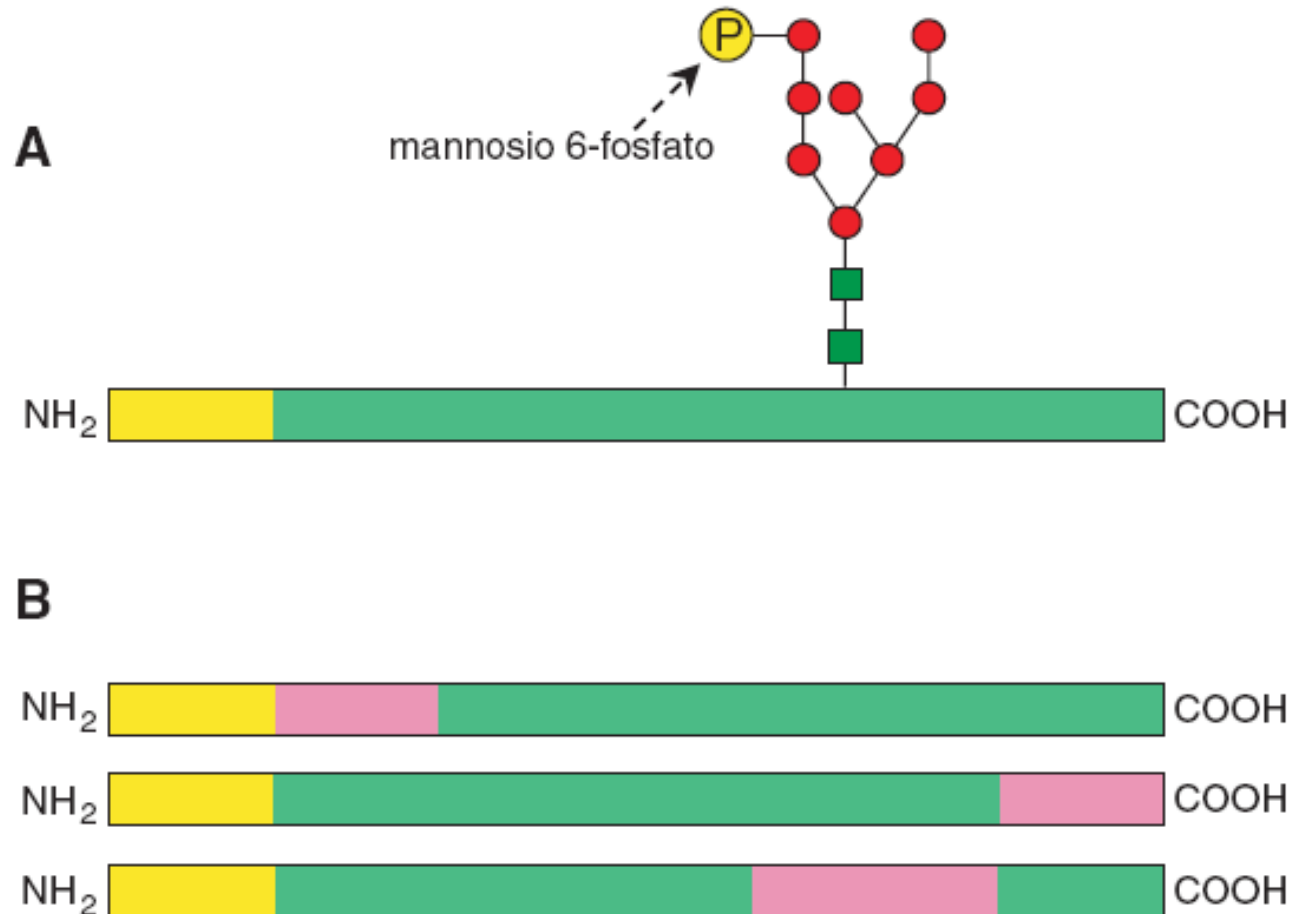


Figura 4.13

Esempi di oligosaccaridi N-legati alle proteine.

Figura 4.15

Segnali di smistamento al lisosoma in cellule animali (A) e al vacuolo in cellule vegetali (B). In giallo è rappresentato il peptide segnale di indirizzamento al reticolo endoplasmatico, in rosa la sequenza segnale di smistamento al vacuolo (propeptide N-terminale, propeptide C-terminale e sequenza interna). I simboli utilizzati per gli zuccheri della catena oligosaccaridica sono come in Fig. 4.13.



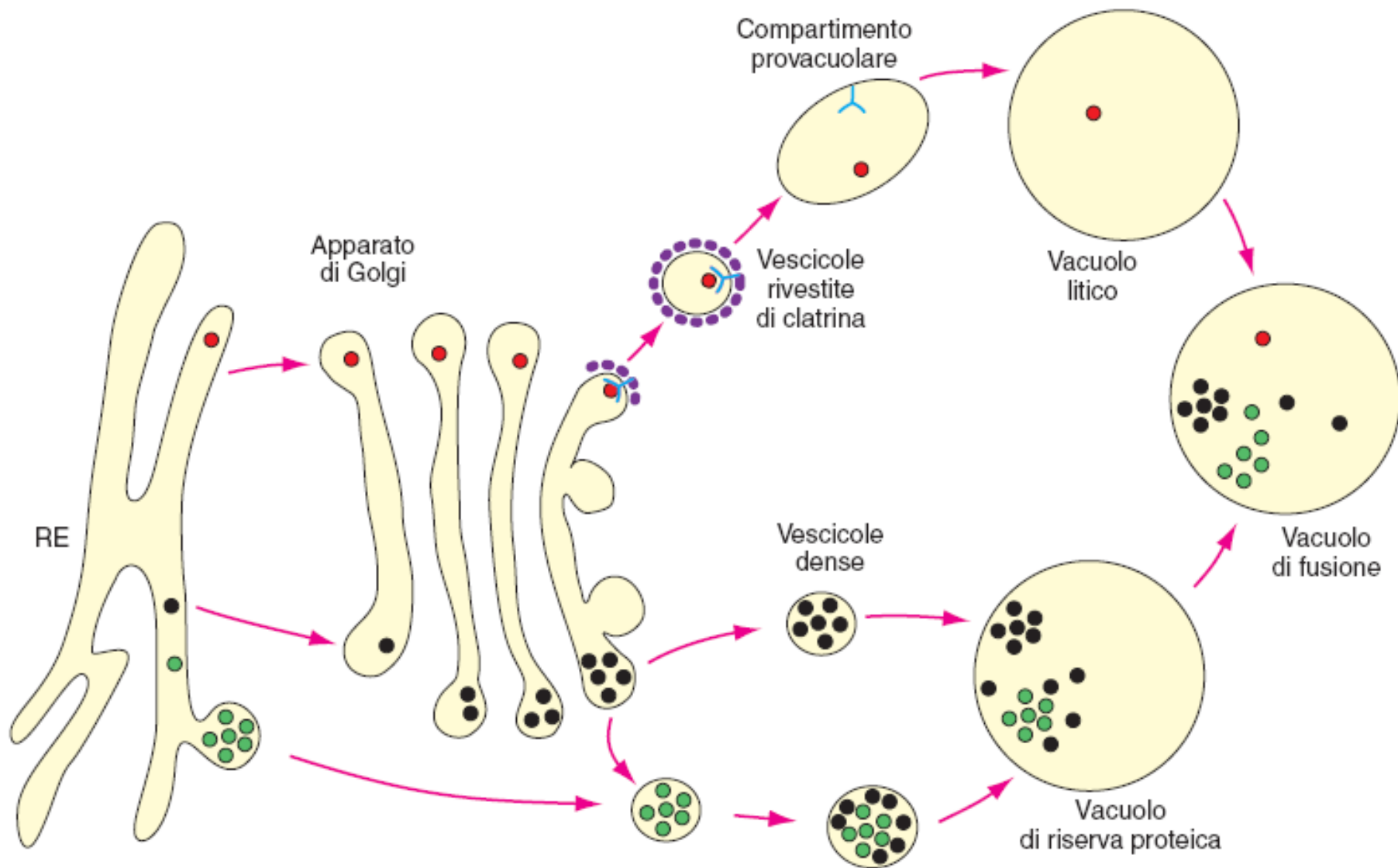


Figura 4.16

Schema rappresentativo delle vie di smistamento delle proteine ai differenti tipi di vacuoli. In rosso è indicata una proteina diretta al vacuolo litico; in nero e verde sono indicate due proteine dirette al vacuolo di riserva proteica, rispettivamente attraverso la via dipendente dal Golgi e indipendente dal Golgi (da A. Vitale, N.V. Raikhel, 1999, modificata).

ESOCITOSI: serie di eventi che permette alle vescicole, provenienti dal trans Golgi di fondersi con la membrana plasmatica e di riversare il proprio contenuto all'esterno. Mentre lo smistamento al vacuolo richiede la presenza di specifici segnali molecolari lo smistamento alla membrana plasmatica avviene senza che sia richiesta alcuna informazione addizionale oltre al peptide segnale per l'indirizzamento al RE. Le vescicole che arrivano alla membrana plasmatica hanno rivestimento ancora non identificato. L'esocitosi è essenziale in molti aspetti della vita delle piante: crescita apicale del tubetto pollinico, la crescita dei peli radicali, permette l'accumulo in regioni specializzate degli organi, di sostanze quali il nettare, le mucillagini, polisaccaridi. Assicura il ricambio dei componenti della membrana plasmatica. L'aumento di superficie della membrana è continuamente controbilanciato da eventi di **endocitosi**, un processo coinvolto nell'internalizzazione di molecole dal compartimento extracellulare e dalla membrana plasmatica mediante la formazione di vescicole. Ciò garantisce il riciclo all'indietro dei componenti di membrana e il mantenimento nelle cellule adulte delle dimensioni della superficie cellulare.

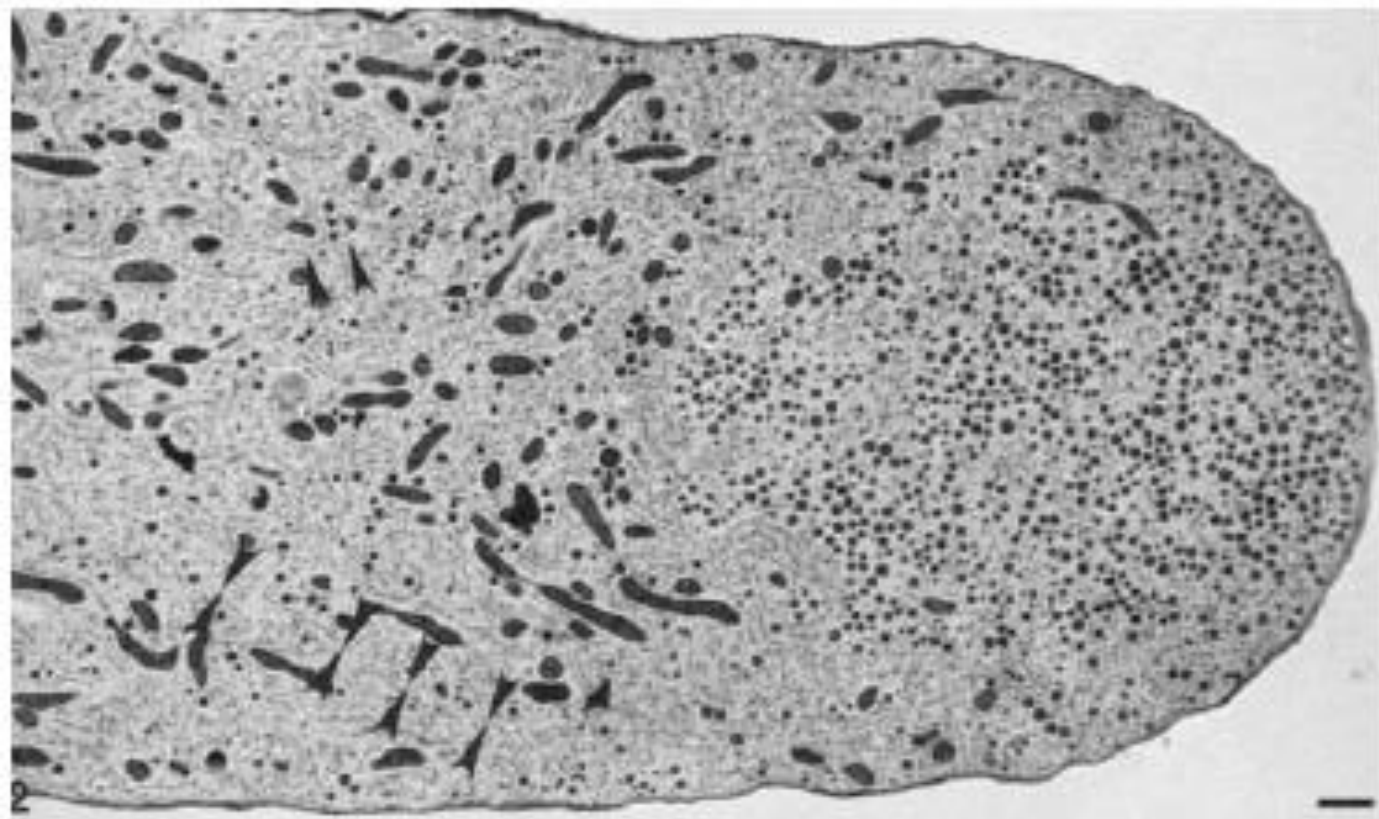


Figura 4.17

Esocitosi direzionale nel tubetto pollinico di giglio. Le vescicole provenienti dall'apparato di Golgi si accumulano all'apice prima di fondersi con la membrana plasmatica per fornire ulteriore superficie di membrana e materiale parietale durante la crescita polare (da S.A. Lancelle et al., 1997).

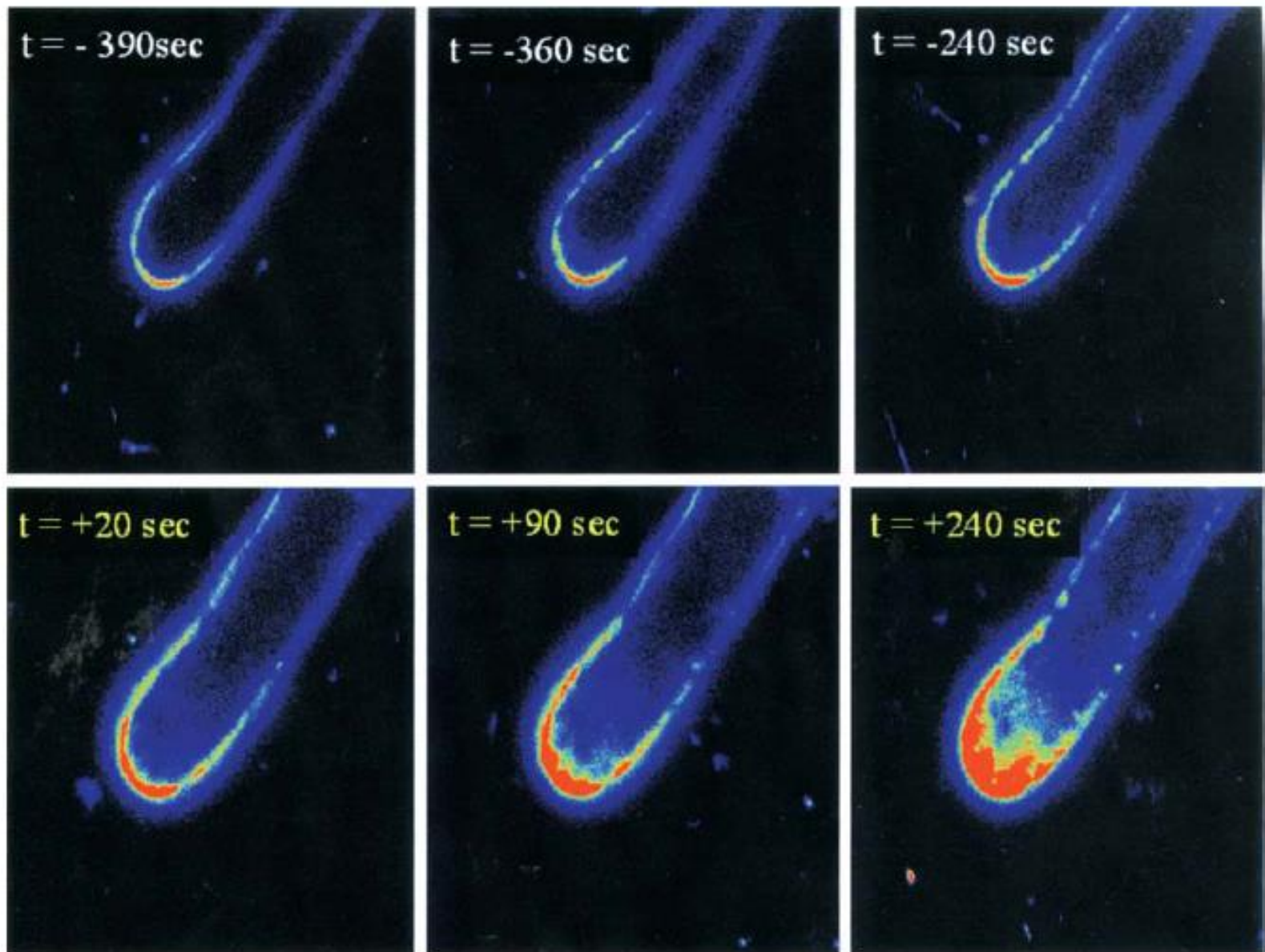


Figura 4.18

Immagini al microscopio confocale della sequenza temporale di eventi che portano all'internalizzazione di un colorete fluorescente di membrana in una cellula rizoidale di *Fucus serratus* (da N.H. Battey et al., 1999).