

IL VACUOLO

La parola “**vacuolo**”, dal latino *vacuum* (*vuoto*), fu coniato verso la metà dell’800 dal francese Dujardin per indicare le vescicole trasparenti presenti in alcuni protozoi, successivamente si estese a identificare tutti gli spazi apparentemente vuoti e privi di citoplasma, particolarmente evidenti nelle cellule vegetali

Essi sono organelli dinamici in continuità sia strutturale che funzionale con il sistema di endomembrane o di secrezione.

Possono contenere enzimi idrolitici e funzionare come organelli digestivi simili ai lisosomi nelle cellule animali, possono accumulare metaboliti secondari come alcaloidi, glucosidi, derivati del glutatione, acidi organici e antocianidine, o accumulare proteine nei semi e in diversi tessuti per funzionare come compartimenti di riserva.

In passato, si riteneva che un singolo vacuolo svolgesse contemporaneamente diverse funzioni, è ormai chiaro che i **vacuoli di riserva (PSV, Protein Storage Vacuole)**, **contenenti proteine** di riserva tipiche del seme, ed il **vacuolo litico (LV, Lytic Vacuole)**, **caratterizzato dalla presenza di** proteasi attive, siano organelli separati.

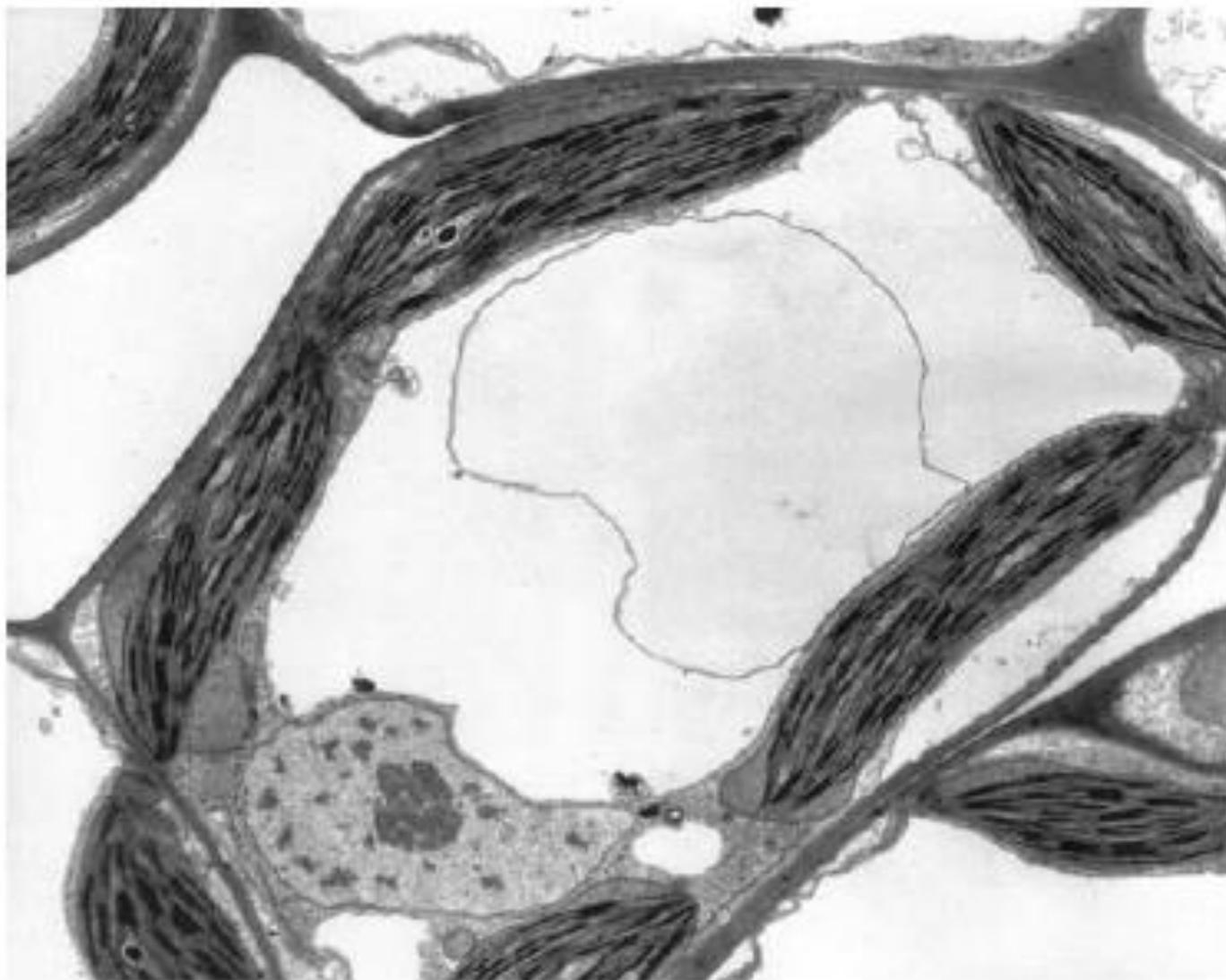


Figura 5.1

Vacuolo di epatica *Lunularia cruciata* (osservazione di A. Basile).

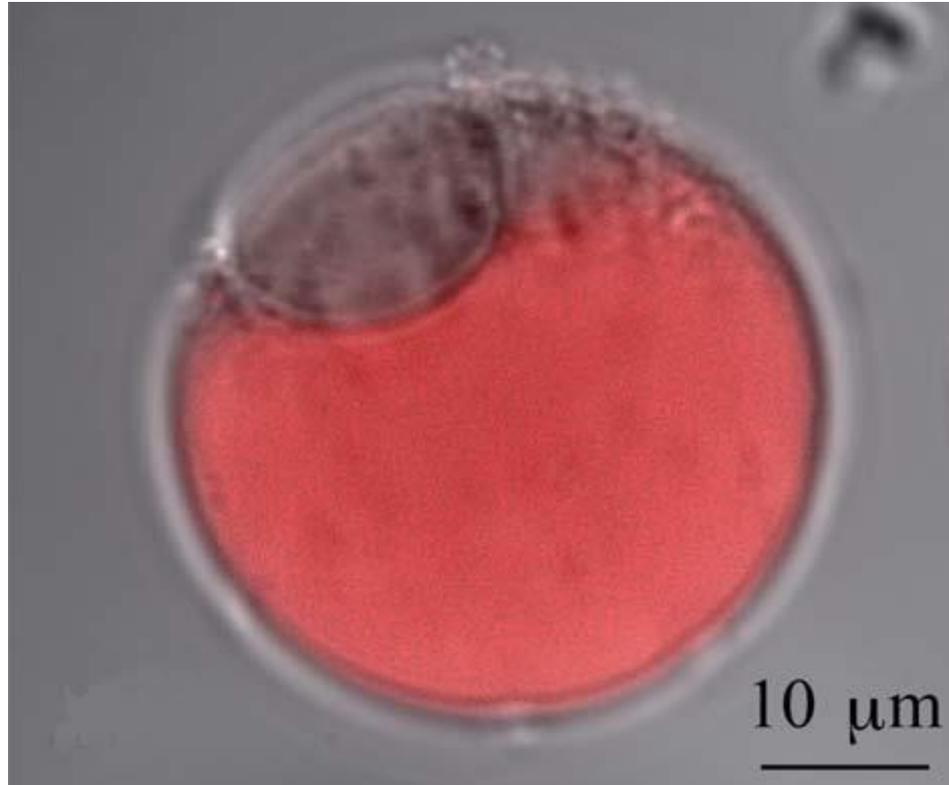


immagine al microscopio ottico di una cellula del mesofillo di *Mesembryanthemum crystallinum*, si distinguono 2 vacuoli di dimensioni differenti grazie alla marcatura di uno di essi con Rosso Neutro

LV e PSV si rendono evidenti in modo sequenziale durante l'embriogenesi. La prima divisione dello zigote porta alla formazione di due cellule asimmetriche, una cellula basale vacuolata ed una apicale non vacuolata. Grandi LV si sviluppano prima nelle cellule discendenti della **cellula basale e poi in quelle della cellula apicale**. Il LV potrebbe originarsi dalla fusione di vescicole preesistenti ma poiché può rigenerarsi anche in cellule artificialmente private del loro vacuolo pre-esistente, è probabilmente generato *ex novo*. Alcune proteine coinvolte nella biogenesi del vacuolo sono state identificate, tra queste VCL1, implicata nella regolazione di SNARE, essenziali per il traffico di membrana verso il tonoplasto (v-Snare presenti al livello della vescicola e t-Snare sulla membrana bersaglio).

Il LV potrebbe generarsi inizialmente dalla fusione di autofagosomi che intrappolano porzioni di citosol. Nelle cellule meristematiche vi sono comunque numerosi piccoli vacuoli che vengono distribuiti durante la divisione cellulare e sono quindi ereditati da ogni cellula figlia. Il ruolo dell'autofagia è collegato con l'aumento di volume delle cellule in via di differenziamento (**crescita per distensione**) piuttosto che con la biogenesi. Nelle fasi tardive dell'embriogenesi si forma il PSV. Si sviluppa come una struttura tubulare intorno al LV e può giungere ad inglobarlo tanto che nei semi di tabacco e pomodoro sopravvivono al suo interno compartimenti membranosi litici, detti **globoidi**, probabilmente corrispondenti ad un residuo di LV.

E' stato identificato anche un terzo tipo di vacuolo SAV (Senescence Associated Vacuole) in foglie senescenti di *Arabidopsis*. Questi vacuoli hanno un pH più acido e sono indipendenti dall'autofagia. **Nel tonoplasto non presentano la proteina gamma-Tip (sottofamiglia delle acquaporine), abbondante nei vacuoli litici.** Una famiglia di proteine intrinseche del tonoplasto dette **TIP (Tonoplast Intrinsic Proteins)** è stata particolarmente preziosa nello studio della biosintesi e dell'identità dei vacuoli. **Le TIP sono una sottofamiglia delle acquaporine. Esse costituiscono piccoli canali** che facilitano il passaggio attraverso le membrane di acqua e piccoli soluti privi di carica (glicerolo, urea, acido borico acido salicilico, perossido di idrogeno) e gas (ammonio e diossido di carbonio). Il genoma di *Arabidopsis* codifica per 10 isoforme classificate in cinque sottogruppi: tre gamma-TIP (TIP1), tre delta-TIP (TIP2), le alfa- e beta-TIP (TIP3;1 and TIP3;2) specifiche del seme, una epsilon-TIP (TIP4;1). Diversi compartimenti vacuolari sono contraddistinti da una specifica dotazione di TIP. Ad esempio **gamma-Tip è caratteristica del vacuolo litico mentre alfa e delta Tip del vacuolo di riserva.**

Il vacuolo è circondato dalla membrana del **tonoplasto** ricca di fosfolipidi e proteine. La permeabilità agli ioni è maggiore che nella membrana plasmatica, mentre il passaggio dei protoni risulta limitato la regolazione del contenuto e del volume dei vacuoli delle cellule vegetali dipende dalle attività coordinate di trasportatori e canali localizzati nel tonoplasto. Al microscopio elettronico il lume del vacuolo è di solito del tutto trasparente agli elettroni.

All'interno del vacuolo è presente una soluzione acquosa chiamata **succo vacuolare**, contenente sostanze di natura diverse, sciolte, allo stato cristallino o condensate. Il pH ha un valore medio tra 5,0 e 5,5, ma può scendere a 2,0 o arrivare a 7 nei vacuoli di riserva di proteine. Il succo vacuolare può comprendere Sali di acidi organici ed inorganici, carboidrati, aminoacidi e proteine, lipidi, metaboliti secondari, inclusi solidi: idioblasti cristallini, cellule ossalifere, rafidi, druse stiloidi. La formazione di questi cristalli può avvenire per un sistema di detossificazione, ad esempio l'eccesso di calcio assorbito dalle radici.

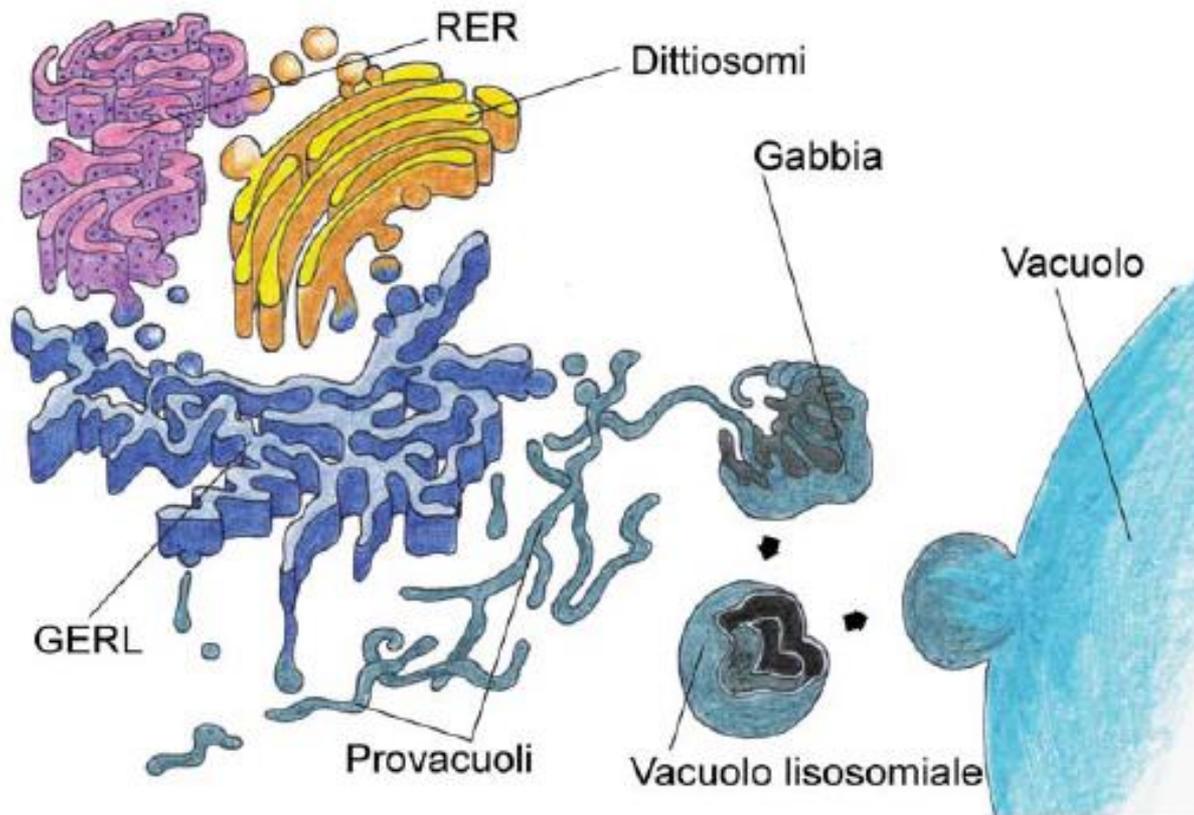


Figura 5.2

Processo di formazione del vacuolo secondo F. Marty (1978). I provacuoli tubulari si originano dal GERL (Golgi, reticolo endoplasmatico, lisosoma) formando vescicole che si ramificano estendendosi in tutta la cellula. I provacuoli si avvolgono intorno a porzioni di citoplasma formando una gabbia. Successivamente, i tubuli di ciascuna gabbia si fondono, isolando completamente il citoplasma inglobato (vacuolo lisosomiale). La membrana interna ed il citoplasma inglobato saranno poi digeriti da enzimi lisosomiali (disegno di R. Braglia).

TURGORE CELLULARE

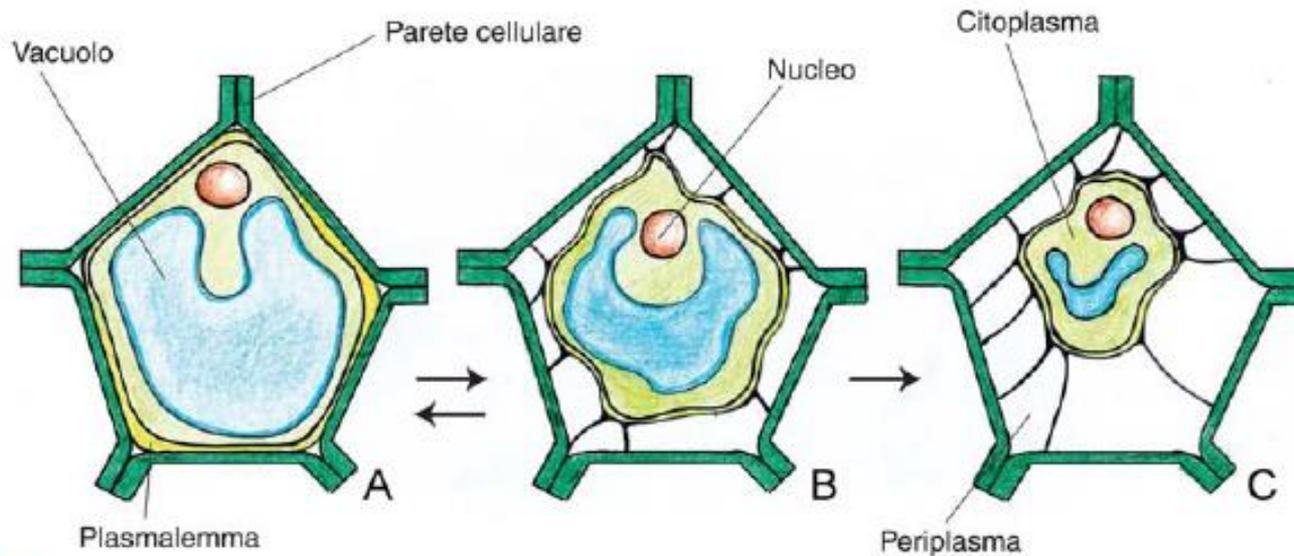


FIGURA 5.4

Plasmolisi in una cellula vegetale: **A.** cellula in condizione di turgore; **B.** cellula posta in soluzione lievemente ipertonica, plasmolisi reversibile se la cellula viene successivamente immersa in soluzione ipotonica; **C.** cellula posta in soluzione ipertonica.

L'acidità del vacuolo dipende oltre che da ATPasi anche da H⁺ pirofosfatasi, insieme costituiscono il 30% delle proteine del tonoplasto. Le H⁺ pirofosfatasi utilizzano l'energia del legame fosfoanidride del pirofosfato sempre abbondante. Mentre le ATPasi vacuolari si trovano solo sul tonoplasto e sul trans Golgi network, le V-PPasi oltre che nel tonoplasto si trovano anche nella membrana plasmatica, Golgi e corpi multivescicolari. Ma i vacuoli possono anche essere neutri quindi le pompe protoniche forse sono importanti anche per altri processi oltre che per l'acidificazione. Sembra che il ruolo delle pompe sia importante nel trasporto di membrane e nella regolazione della fusione delle membrane.

Trasporto delle proteine solubili verso i vacuoli

Le cellule vegetali devono generare diversi tipi di membrana vacuolare per mantenere l'identità di ciascun vacuolo. Devono inoltre essere attivi diversi sistemi di trasporto che terminano alternativamente nel vacuolo litico o di riserva con diversi tipi di vescicole implicate. Le proteine destinate al vacuolo sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico e trasportate da vescicole originatesi nell'apparato di Golgi, possono esistere però delle vie alternative ed essere trasportate direttamente dal RE al vacuolo senza passare per il Golgi passando attraverso un sistema di vacuoli minori.

Vari tipi di segnali fanno sì che le proteine lascino il Golgi alla volta dei vacuoli.

Questi segnali sono detti **Determinanti del Trasporto Vacuolare o VSD** (*Vacuolar Sorting Determinants*).

Sono stati identificati tre tipi di VSD delle proteine solubili:

1. ***ssVSD*** ovvero ***VSD sequenza specifici***;
2. ***ct-VSD*** ovvero ***VSD in posizione C-terminale***;
3. ***ps-VSD*** ovvero ***VSD influenzati dalla struttura fisica (physical structure) della proteina***.

I primi ssVSD sono stati identificati nella prosporamina di patata e nella proaleuraina d'orzo. La sporamina è una proteina di riserva abbondante nei tuberi di patata. Essa non forma corpi proteici, è accumulata in vacuoli con le caratteristiche sorprendentemente simili a quelle dei vacuoli litici, con vari enzimi attivi come per esempio le patatine. Dopo la rimozione del peptide segnale nel RE, la prosporamina espone 16 aa (N-terminali) che vengono rimossi solo quando la proteina raggiunge il vacuolo.

ctVSD: molte pro-forme di proteine vacuolari hanno dei peptidi C-terminali che sono poi rimossi nelle forme mature. I vacuoli di riserva sono i destinatari di questo tipo di segnale. I loro recettori sono proteine chiamate RMR. Studi di microscopia elettronica hanno evidenziato che queste proteine vacuolari vengono trasportate da vescicole dense.

Ps-VSD un terzo gruppo di proteine sembra non avere propeptidi necessari come segnali. Il segnale è probabilmente incluso nella sequenza della proteina. Sembra sia importante come la proteina si ripiega e si assembla. L'aggregazione di proteine sembra sia un possibile sistema di selezione e trasporto. Una forma di aggregazione si osserva nelle prolamine dei cereali che si aggregano in corpi proteici già nel RE.

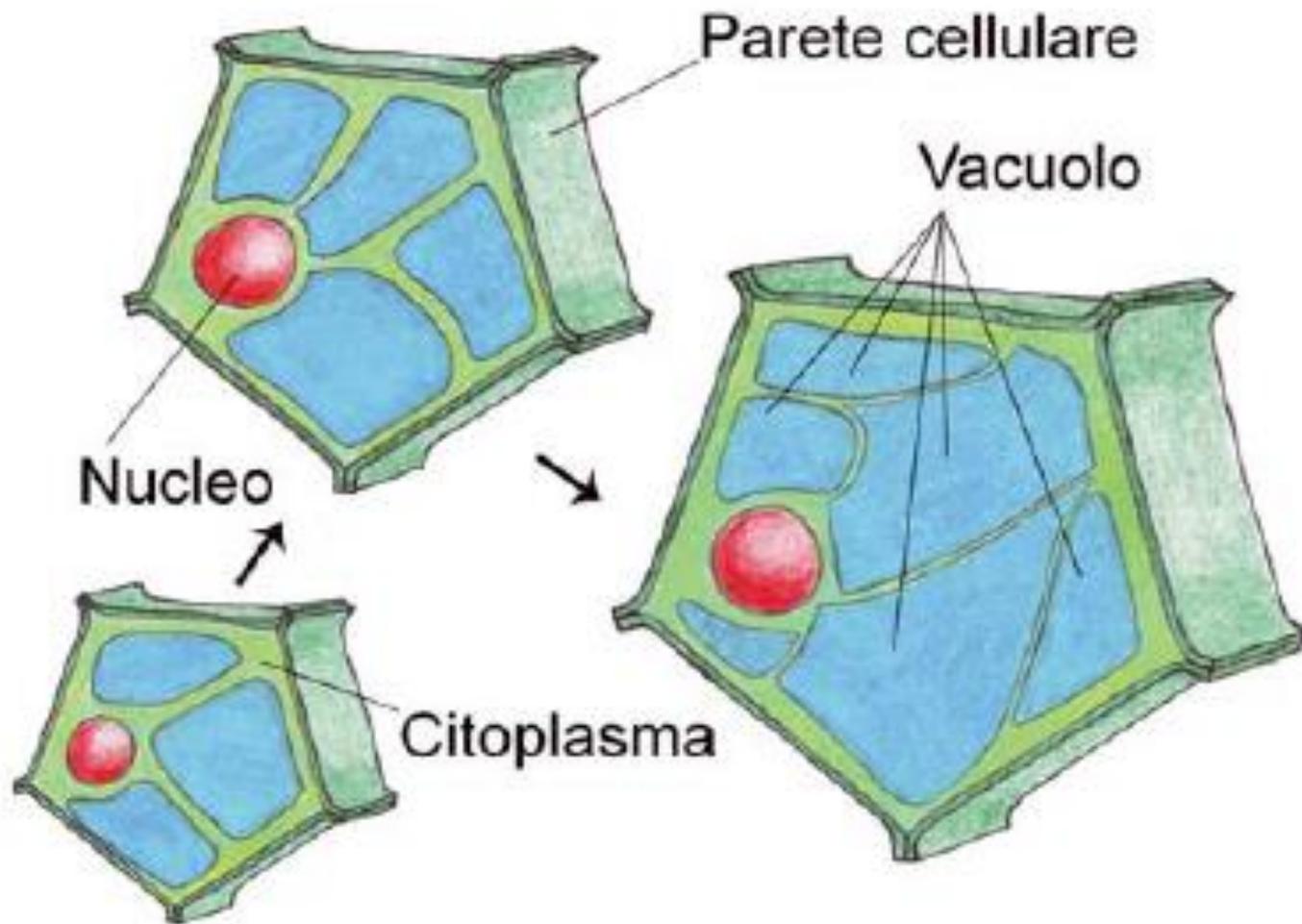


Figura 5.3

Crescita di una cellula vegetale ed ingrandimento dei vacuoli. Lo strato periferico del citoplasma può essere interconnesso attraverso il vacuolo con filamenti citoplasmatici (disegno di R. Braglia).

La presenza del vacuolo centrale che confina il citoplasma alla periferia della cellula aumenta notevolmente la superficie di scambio tra la cellula e l'ambiente esterno.

Il vacuolo ha il ruolo fondamentale di mantenere il turgore cellulare grazie al fatto che l'ambiente extracellulare è generalmente ipotonico rispetto al succo vacuolare.

Il turgore è determinato dall'accumulo intracellulare di ioni K^+ per la maggior parte delle piante ed Na^+ per le alofite, piante adattate a suoli salini. I soluti devono essere trasportati all'interno del vacuolo grazie ad un gradiente elettrochimico garantito dalle 2 pompe protoniche. Il movimento dell'acqua attraverso il tonoplasto è mediato dalle acquaporine (TIP).

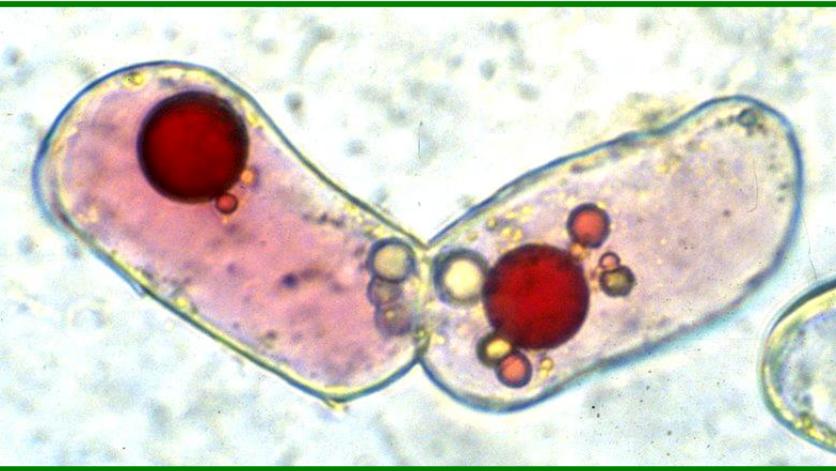


La grande variazione di volume dovuta al riempimento e svuotamento del vacuolo genera movimenti come apertura e chiusura degli stomi e come quelli anche bruschi della mimosa pudica o delle piante carnivore.



Figura 5.3

Fiori di *Petunia hybrida* il cui colore è determinato dagli antociani e dal pH del lume vacuolare: A. fiore con pH vacuolare $<5,5$; **B.** fiore in cui un elemento trasponibile ha inattivato un gene per il controllo del pH vacuolare, per questo il pH è >6 , (per gentile concessione di F. Quattrocchio; per un approfondimento vedi Verweij et al. 2008). In entrambe le linee la quantità di antociani è simile. La mutazione è instabile e lo spostamento del trasposone che ne è responsabile permette la reversione del colore originario (freccie in B).



I meccanismi di trasporto degli antociani sono ancora oggetto di studio. Tra i modelli esistenti vi è quello di un trasporto mediato, in alcuni suoi passaggi, da vescicole. L'ipotesi nasce dall'osservazione di piccoli compartimenti dispersi nel citoplasma e carichi di antociani, gli **antocianoplasti**. Benché essi possano essere associati anche alla biosintesi di queste molecole, essi nascono dalla fusione di vescicole e, essendo racchiusi da una membrana, sono assimilabili a piccoli vacuoli o pre-vacuoli (PVC). Vi sono anche studi che hanno associato gli antocianoplasti ai vacuoli di riserva (PSV) poiché hanno mostrato una modalità di trasporto indipendente dal TGN. Altre strutture note come *AVI (Anthocyanic Vacuolar Inclusion)* caratterizzate da una elevata concentrazione di antociani, sono spesso osservate in molti tipi cellulari. Gli AVI però, benché non se ne possa escludere un legame diretto con gli antocianoplasti, sono inclusioni interne al vacuolo centrale, privi essi stessi di membrana e quindi rappresentano piuttosto un meccanismo di accumulo di queste sostanze all'interno dei vacuoli. Si ipotizza che gli AVIs derivino da vescicole endocitiche che trasportano materiale proteico dal citoplasma al vacuolo, con successiva degradazione della matrice proteica e rilascio degli antociani nel vacuolo.

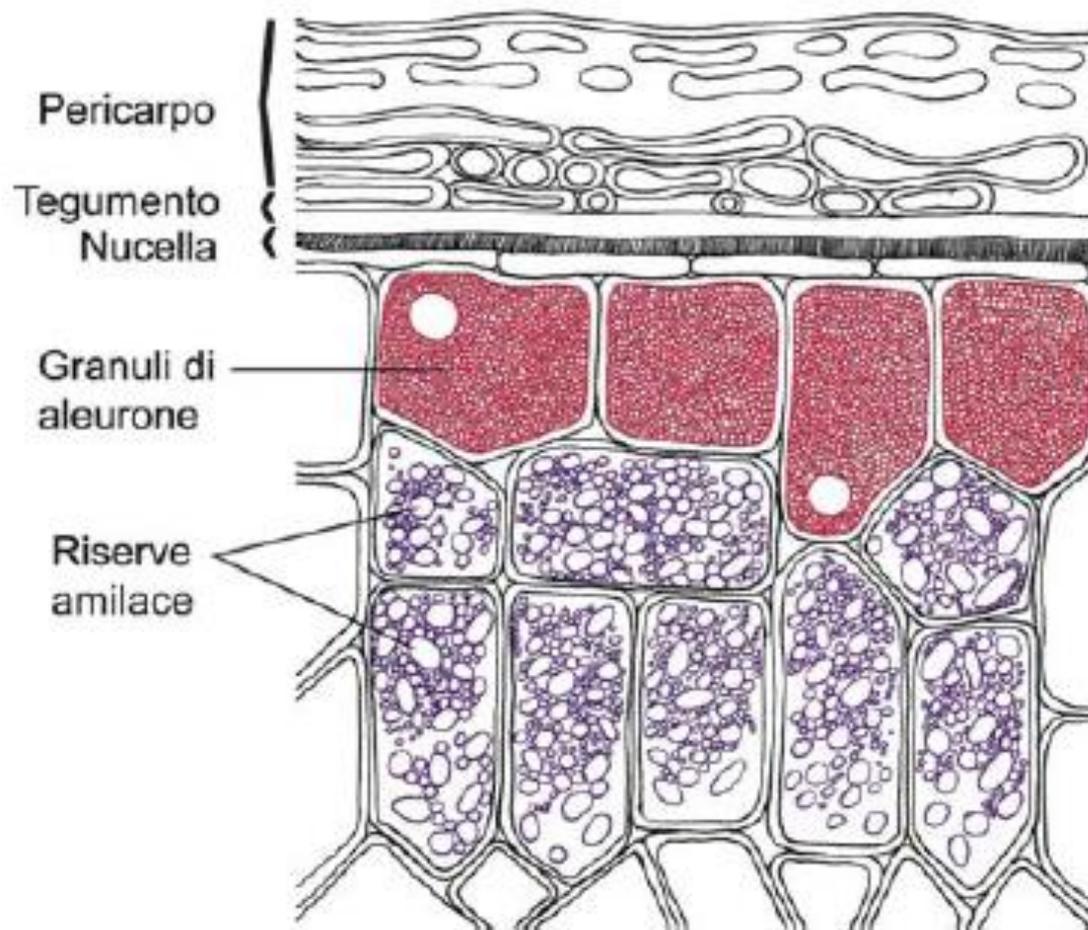


Figura 5.4

Granuli di aleurone in cariossidi di frumento. L'aleurone delle cariossidi di frumento è localizzato nei tessuti che sono tra i tegumenti del seme e le cellule amilifere, pertanto nel processo di macinazione resta attaccato alla crusca rimanendo assente nella farine "bianche" (da S. Tonzig, E. Marré, 1976, modificata).

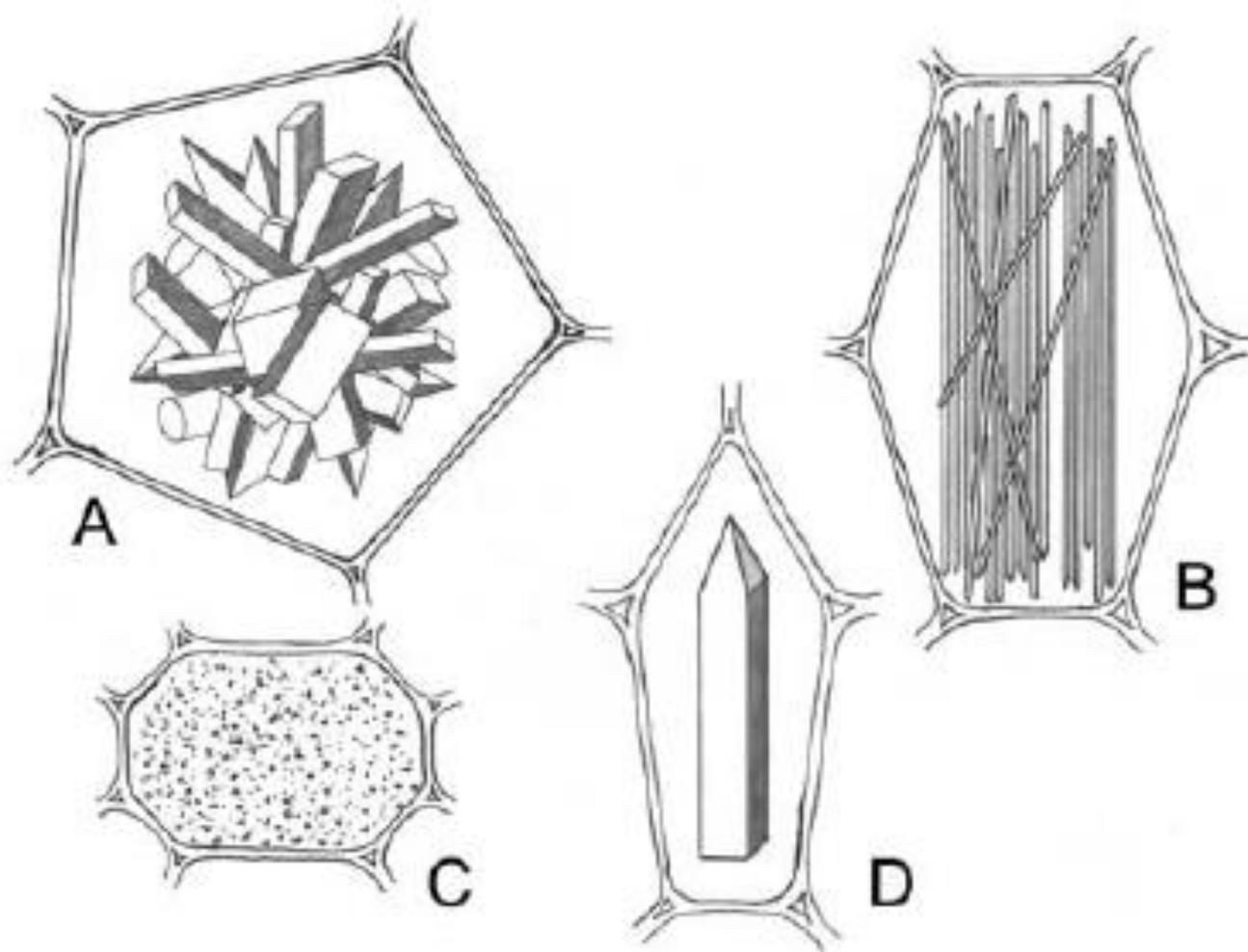


Figura 5.6

Cristalli di ossalato di calcio tra i più comuni nelle piante
A) drusa, B) fascio di rafidi, C) sabbia cristallina, D) sti-
loide (disegno di R. Braglia).

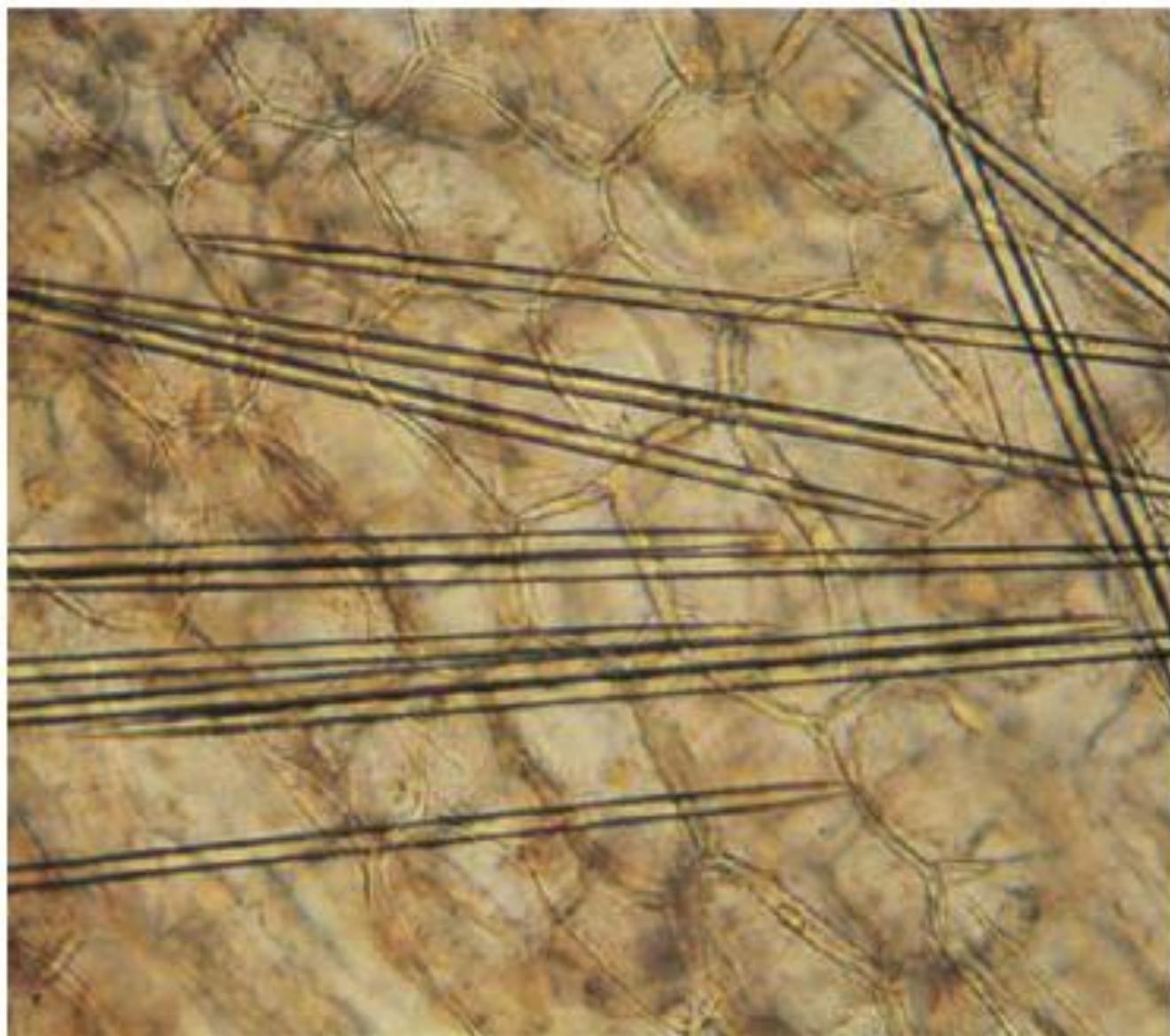


Figura 5.7

Rafidi nel rizoma di Iris (da M.L. Leporatti et al., 1997).

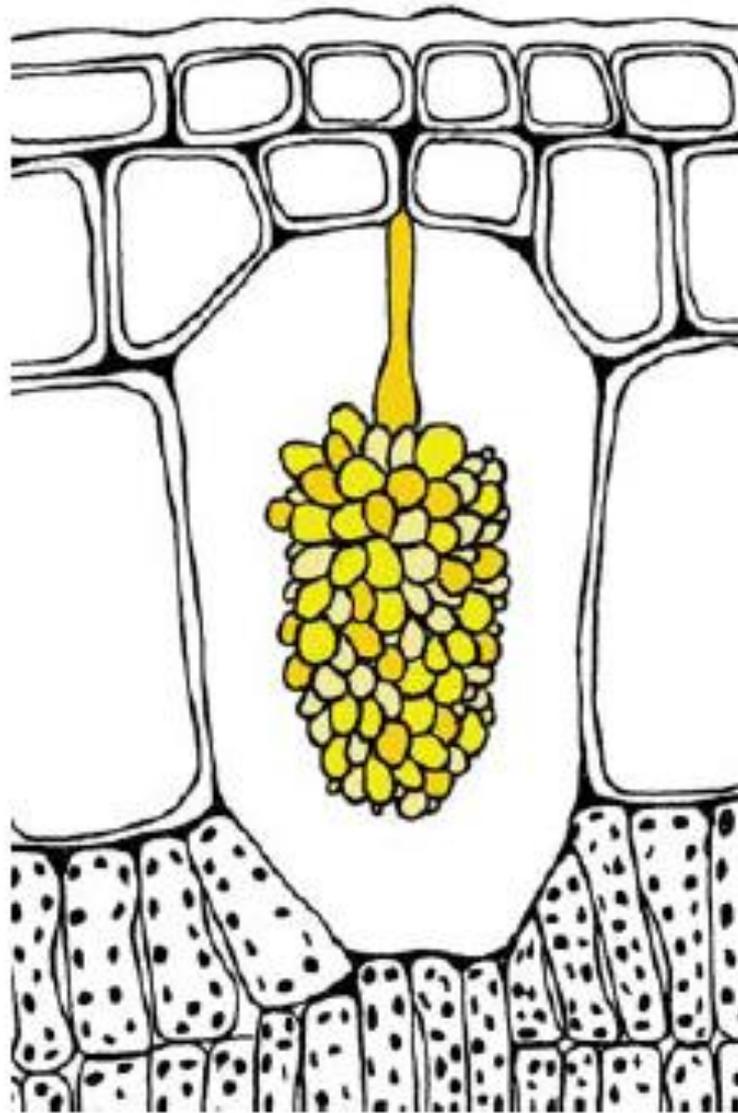


Figura 5.8

Litocisti di *Ficus elastica*, con formazione di carbonato di calcio chiamata cistolite.

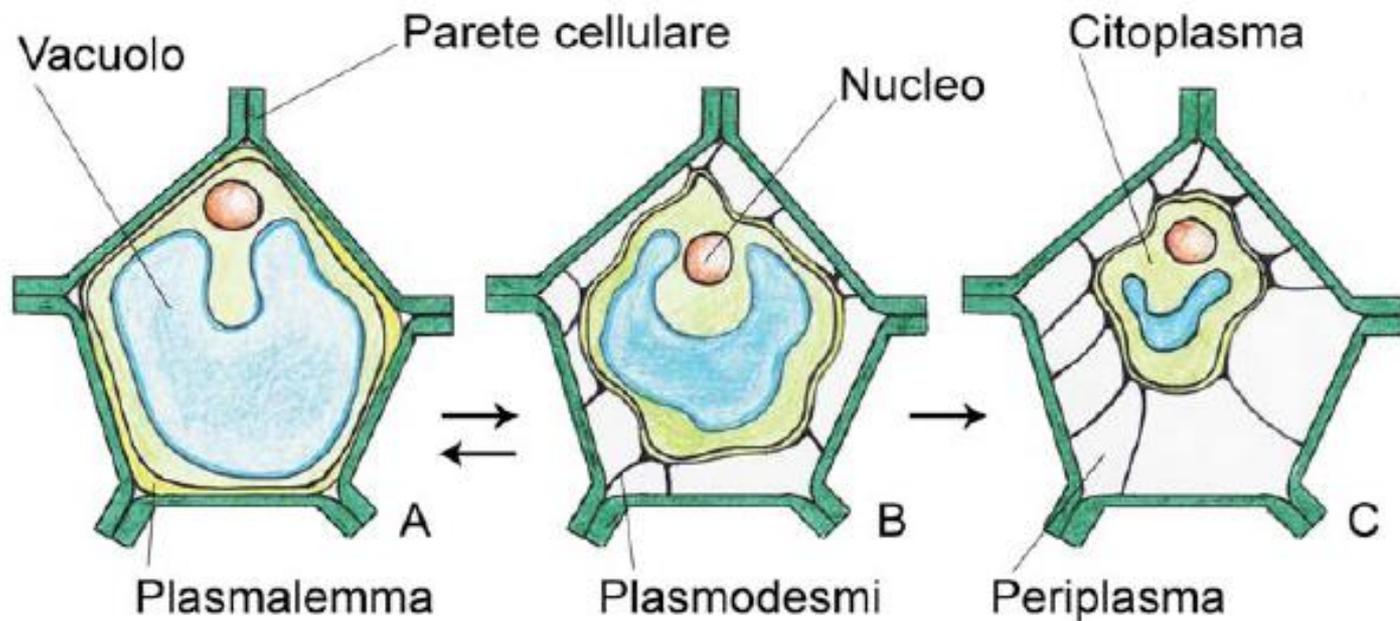


Figura 5.9

Plasmolisi in una cellula vegetale. A) Cellula in condizione di turgore; B) cellula posta in soluzione lievemente ipertonica; C) cellula posta in soluzione ipertonica.

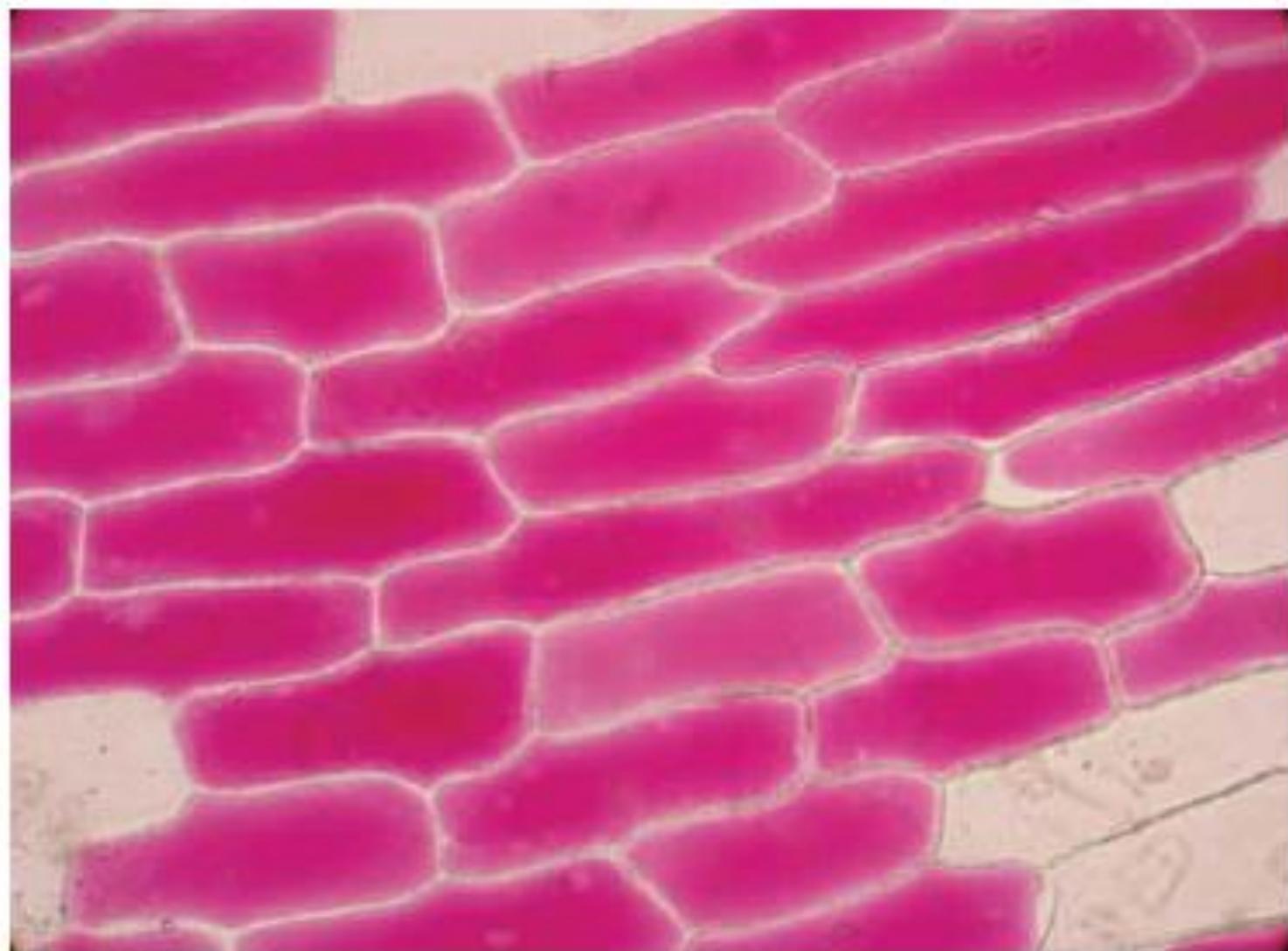


Figura 5.11

Antociani nei vacuoli delle cellule di epidermide di *Allium cepa* (osservazione di A. Valletta e G. Pasqua).



Figura 5.10

Fiori la cui colorazione è dovuta alla presenza di flavonoidi nei vacuoli (foto di R. Braglia).

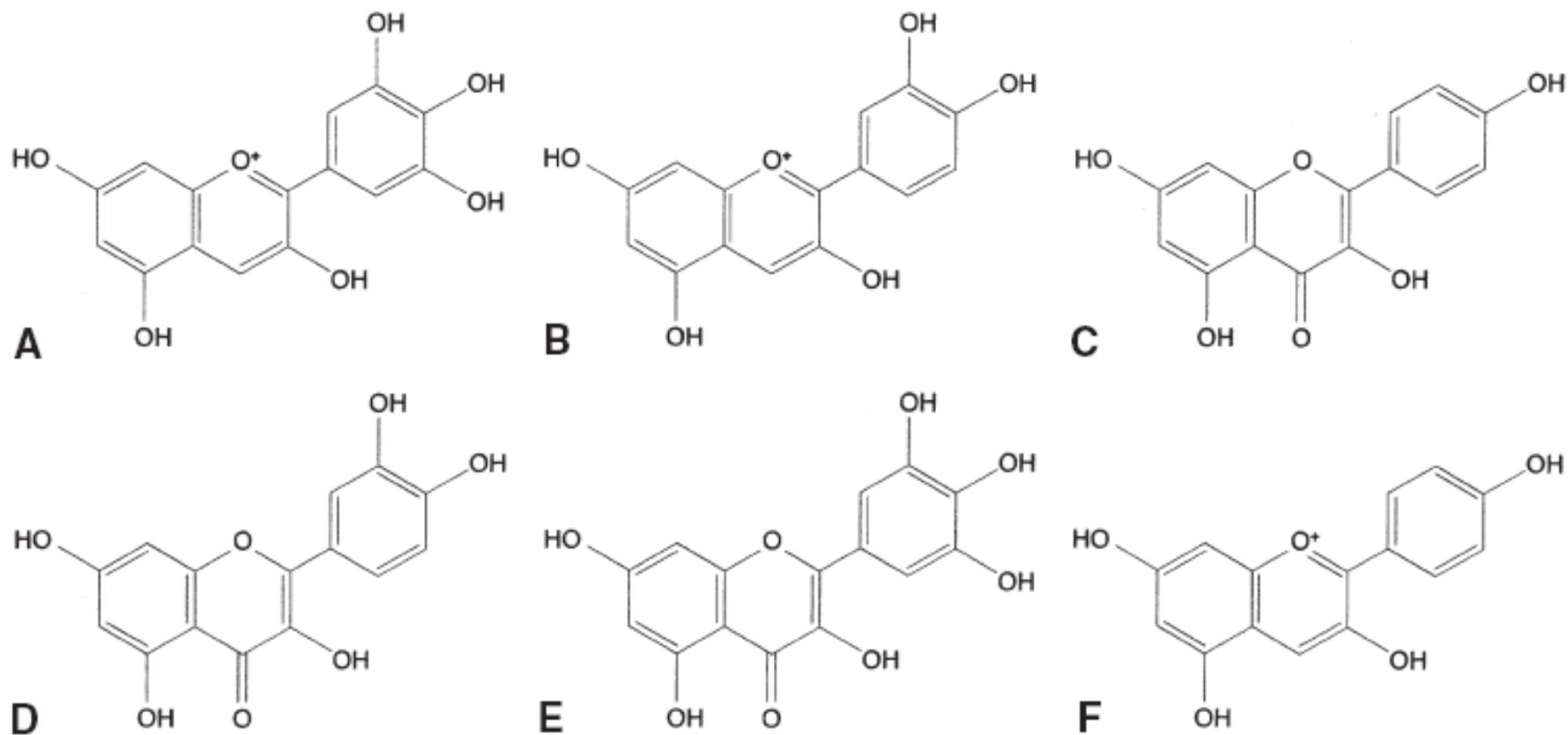


Figura 5.12

Flavonoidi: A) delphinidina; B) cianidina; C) campferolo; D) quercitina; E) miricetina; F) pelargonidina.

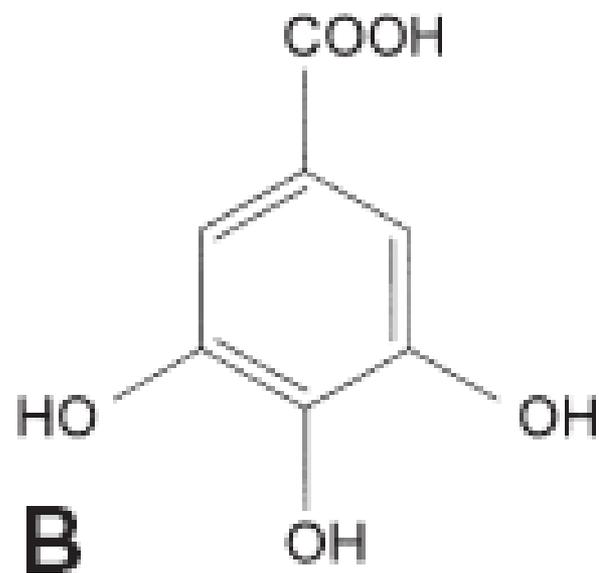
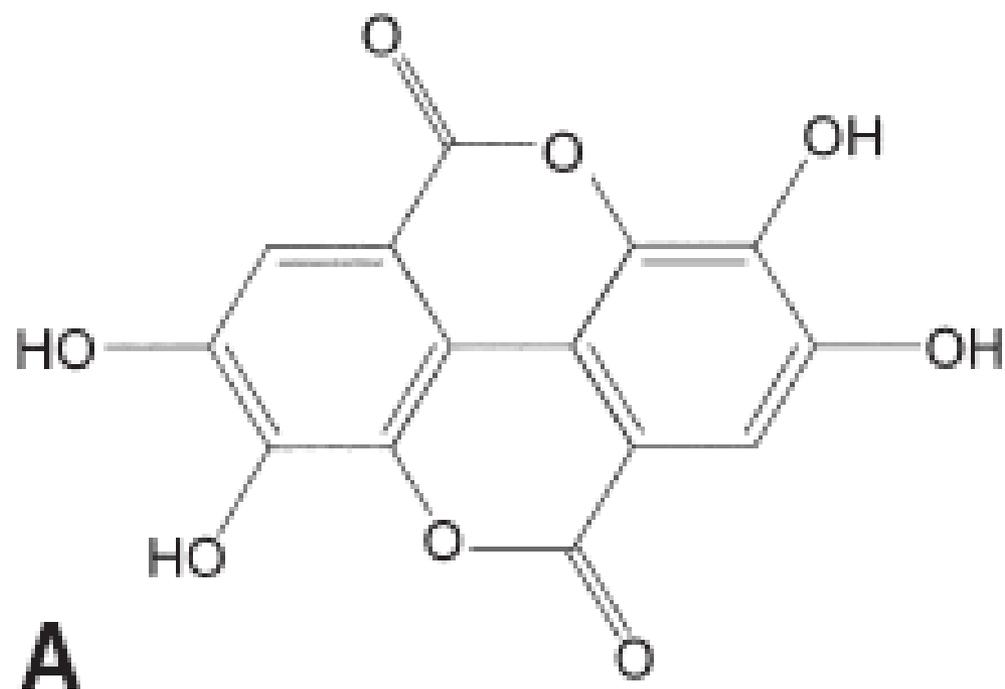


Figura 5.13

Prodotti di idrolisi dei tannini: A) acido ellagico; B) acido gallico.

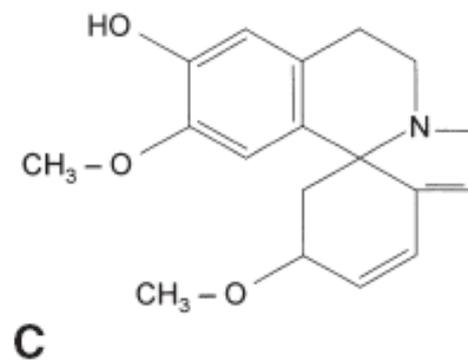
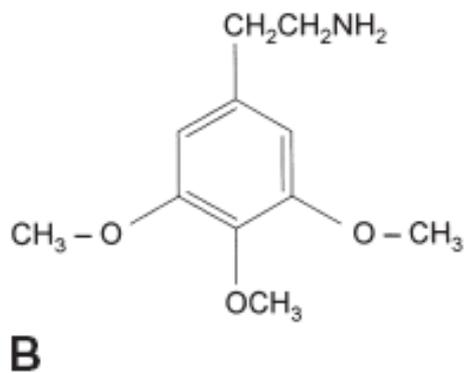
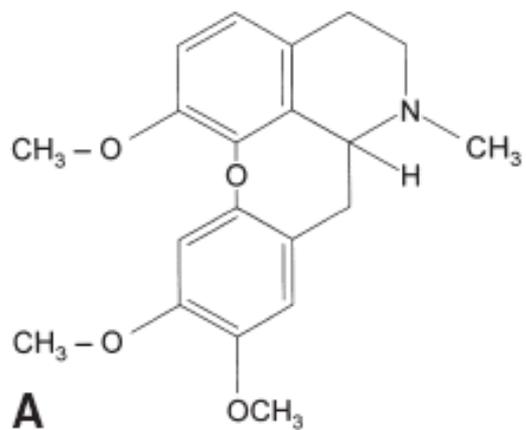


Figura 5.14

Alcaloidi: A) curarina; B) messalina; C) eritrina.