

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.

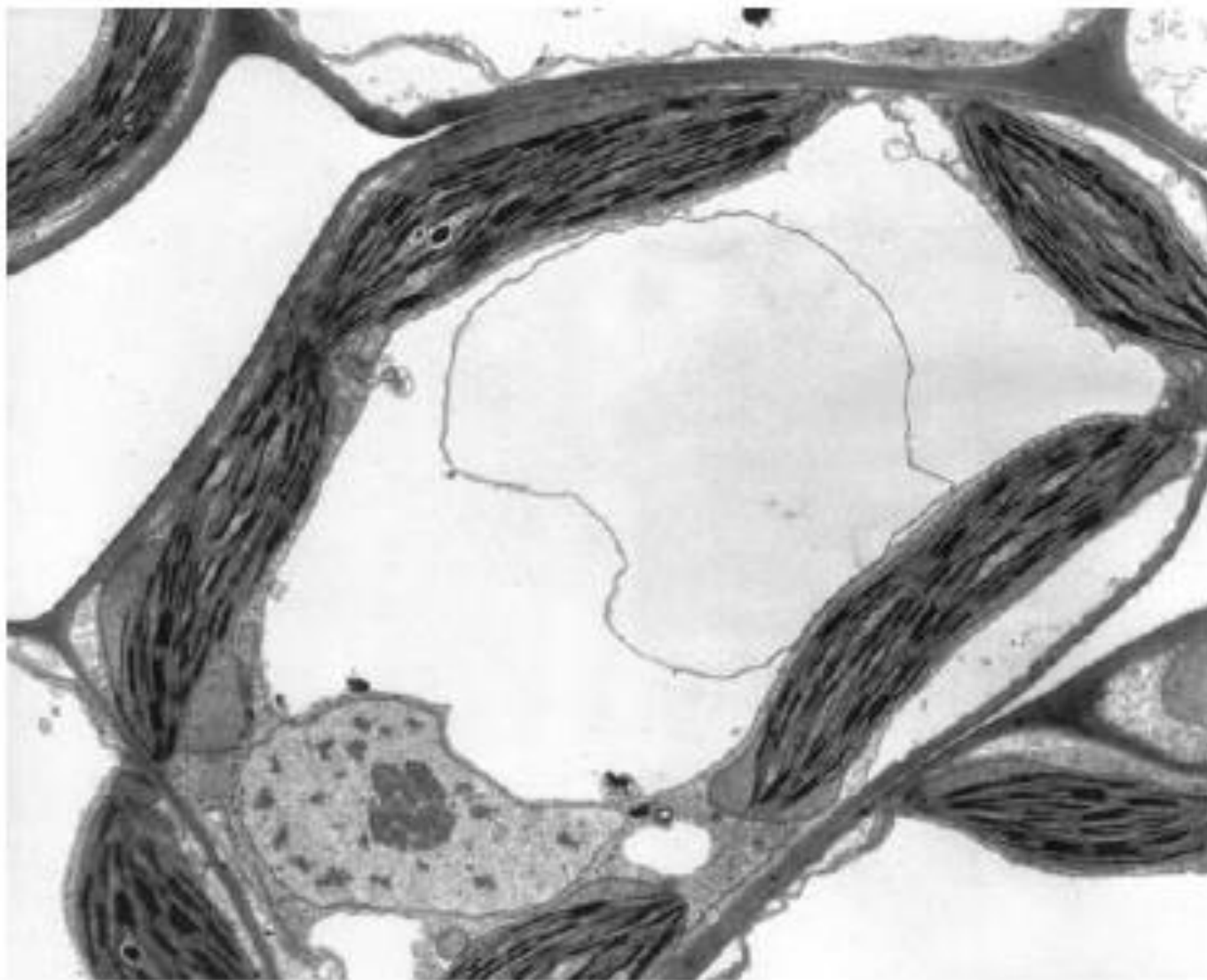


Figura 5.1

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.

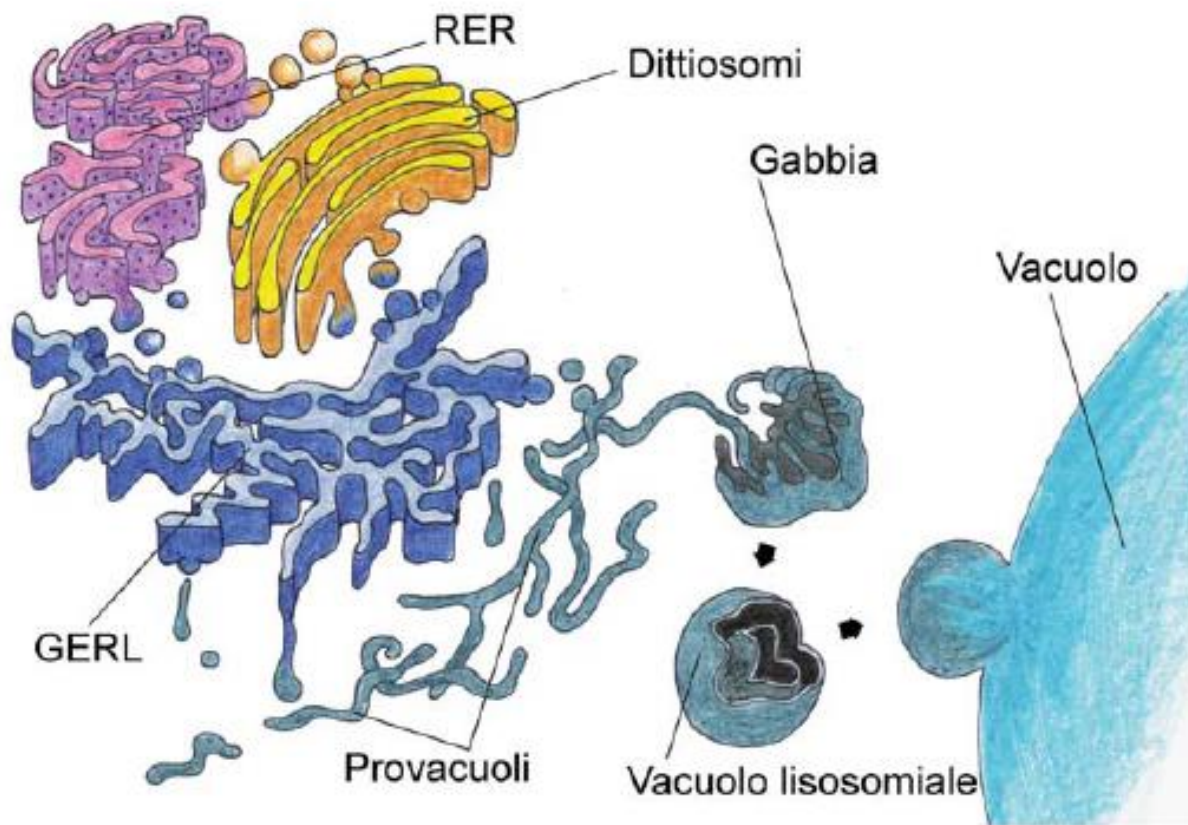


Figura 5.2

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

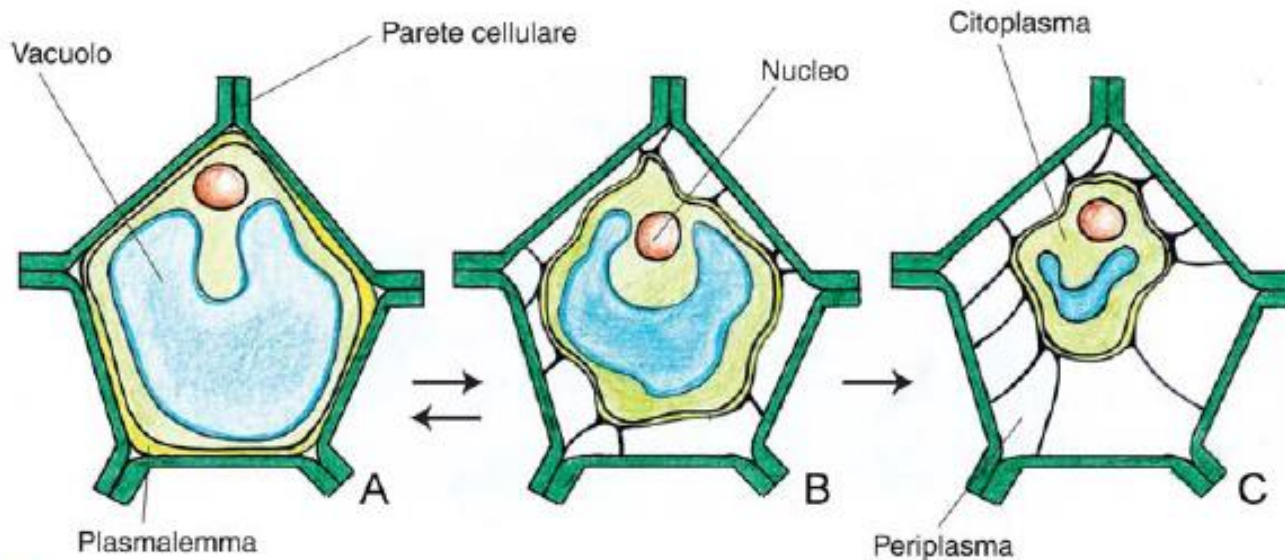


FIGURA 5.4

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'ambiente extracellulare è generalmente ipotonico (minore concentrazione di soluti) rispetto al citoplasma che a sua volta è ipotonico rispetto al succo vacuolare, quindi il flusso di acqua va dall'esterno al citoplasma e poi al vacuolo.

PLASMOLISI

In natura, questo fenomeno si verifica in condizioni di stress idrico, ad esempio in condizioni di siccità, quando la quantità di acqua persa dalle piante è maggiore rispetto a quella assorbita dalle radici

TURGORE CELLULARE

Quali soluti generano il turgore?

Risposta:

ioni K^+ per la maggior parte delle piante

ioni Na^+ per le piante alofite adattate a crescere in suoli salini

COME SI MANTIENE QUESTA OSMOLARITA'??

RISPOSTA:

Esiste un gradiente elettrochimico che attraverso il tonoplasto fornisce la forza per il trasporto dei soluti all'interno dei vacuoli
Il gradiente viene prodotto e mantenuto da 2 pompe protoniche

H^+ ATPasi

FUNZIONI DEL VACUOLO

- Turgore cellulare
- Processi di detossificazione
- Funzioni di riserva
- Autofagia
- Risposta della pianta agli stress biotici ed abiotici
- Omeostasi cellulare

Il vacuolo può subire dei cambiamenti morfologici e funzionali a seconda delle necessità metaboliche della cellula, in cui possono essere presenti vacuoli funzionalmente diversi.

Una cellula può avere vacuoli litici con pH acido, contenenti idrolasi e proteasi, e vacuoli di riserva con pH neutro contenenti proteine.

Talvolta questi vacuoli possono fondersi in un unico grande vacuolo.

Diversi segnali e vie metaboliche sono coinvolti per l'invio di proteine destinate ai vari tipi di vacuolo

RUOLO DEL VACUOLO NELL'AUTOFAGIA

L'autofagia è il processo con cui le cellule animali, vegetali e fungine utilizzano proteine ed organelli che non sono più utili all'organismo.

Rappresenta il principale meccanismo di regolazione del turnover dei componenti del citoplasma e di rimozione selettiva degli organelli danneggiati.

Queste componenti, che devono essere degradate, vengono indirizzate ai lisosomi nelle cellule animali ed ai vacuoli litici nelle cellule vegetali.

L'autofagia è prevista sia nella degradazione e riciclo delle componenti cellulari in condizioni normali, sia nella risposta agli stress abiotici, alle infezioni da patogeni e nella degradazione delle proteine durante la senescenza.

L'autofagia è utilizzata per il trasporto di materiale e vescicole prodotte dal RE. Alcune ricerche hanno dimostrato che il trans-Golgi network, i provacuoli e gli autofagosomi hanno un ambiente acido e contengono idrolasi acide lisosomiali.

1) macroautofagia, in cui si forma l'autofagosoma al di fuori del vacuolo. Quando la macroautofagia è indotta, il materiale che deve essere degradato (ad esempio RE, apparato di Golgi, mitocondri, plastidi e perossisomi) viene circondato da una doppia membrana con una struttura a forma di coppa, chiamata fagoforo, che formerà una vescicola circondata da doppia membrana, l'autofagosoma. Una volta consegnato al vacuolo litico, la membrana esterna dell'autofagosoma si fonderà con il tonoplasto, mentre la membrana interna e il contenuto della vescicola verrà degradato dalle idrolasi del succo vacuolare.

2) microautofagia, che prevede l'invaginazione o protrusione della membrana vacuolare che circonda e completa l'isolamento dei componenti cellulari da degradare nel vacuolo.

3) autofagia mediata da chaperoni è altamente selettiva, in quanto le proteine con una determinata sequenza peptidica (KFERQ) vengono riconosciute da un complesso chaperone/cochaperone che lega le proteine, e le rilascia nel compartimento litico.

L'autofagia non selettiva ha una funzione primaria nella risposta agli stress. Gli stress abiotici e biotici causano l'accumulo delle specie reattive dell'ossigeno che danneggiano le proteine, causando la loro parziale denaturazione e aggregazione. L'autofagia rappresenta un efficiente meccanismo per la degradazione delle proteine danneggiate

L'autofagia selettiva svolge un ruolo importante nella degradazione di macromolecole o organelli.

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.**

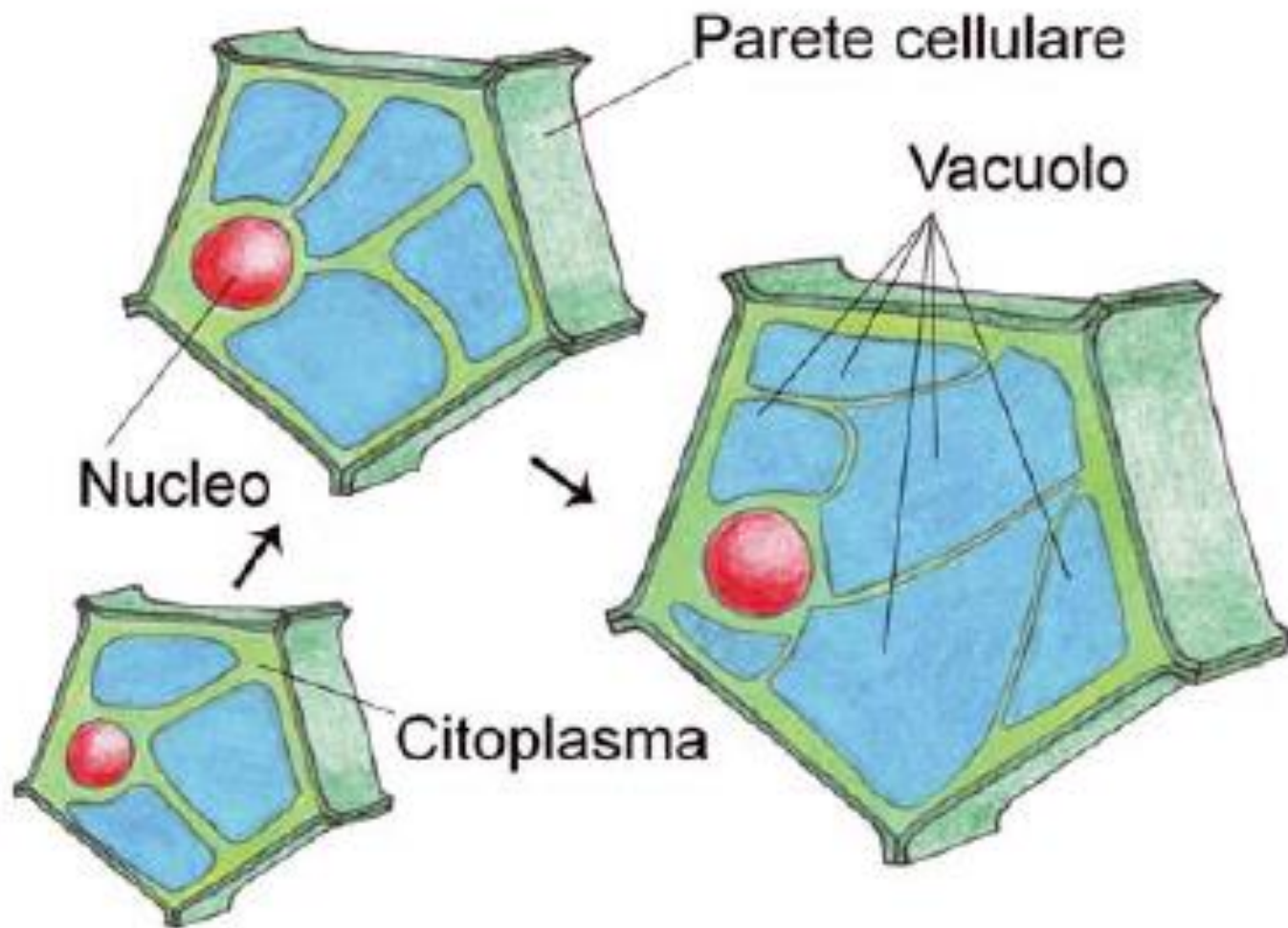


Figura 5.3

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).

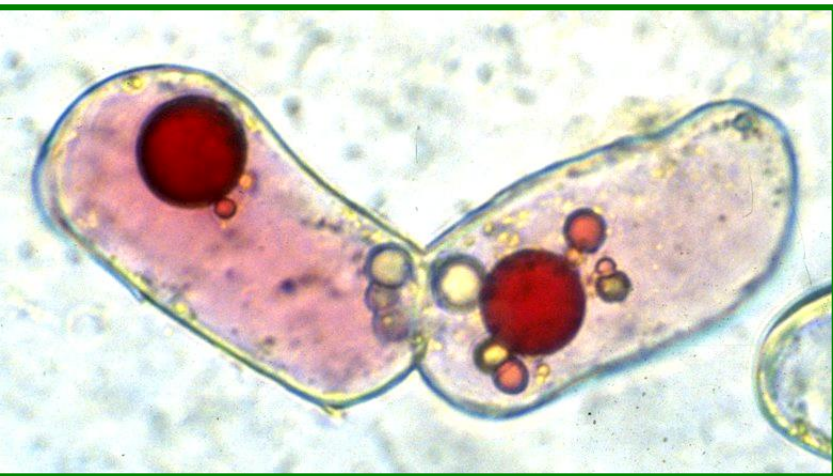


La grande variazione di volume dovuta al riempimento e svuotamento del vacuolo genera movimenti come apertura e chiusura degli stomi e come quelli anche bruschi della mimosa pudica o delle piante carnivore.



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.

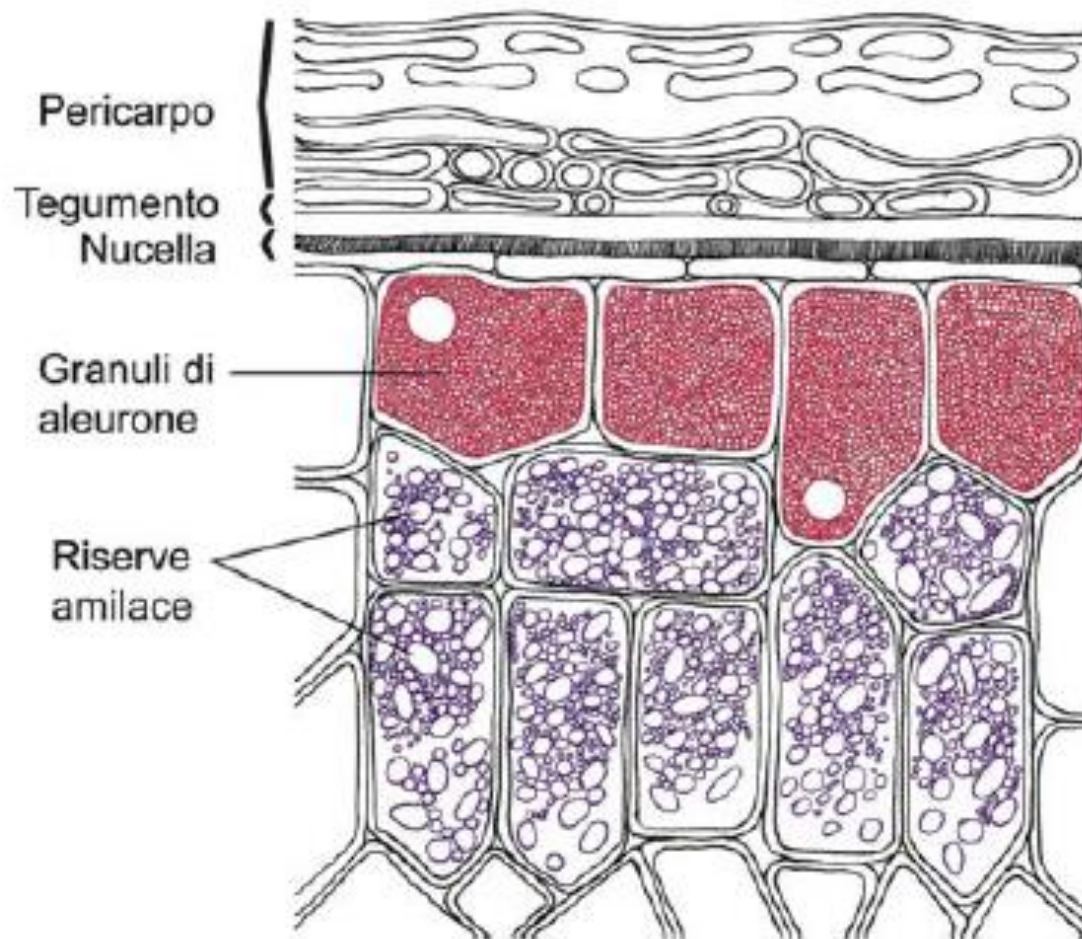


Figura 5.4

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).

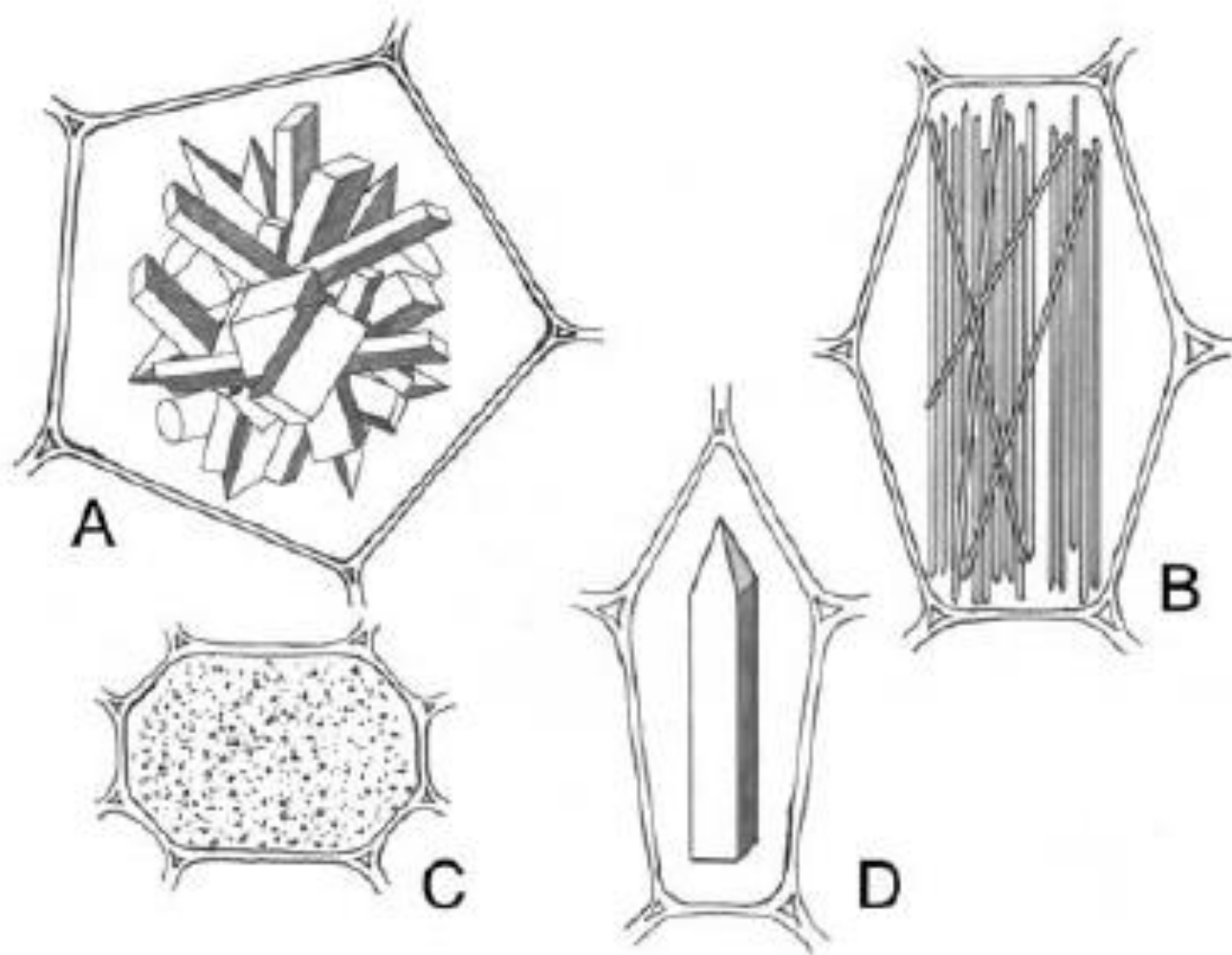


Figura 5.6

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).

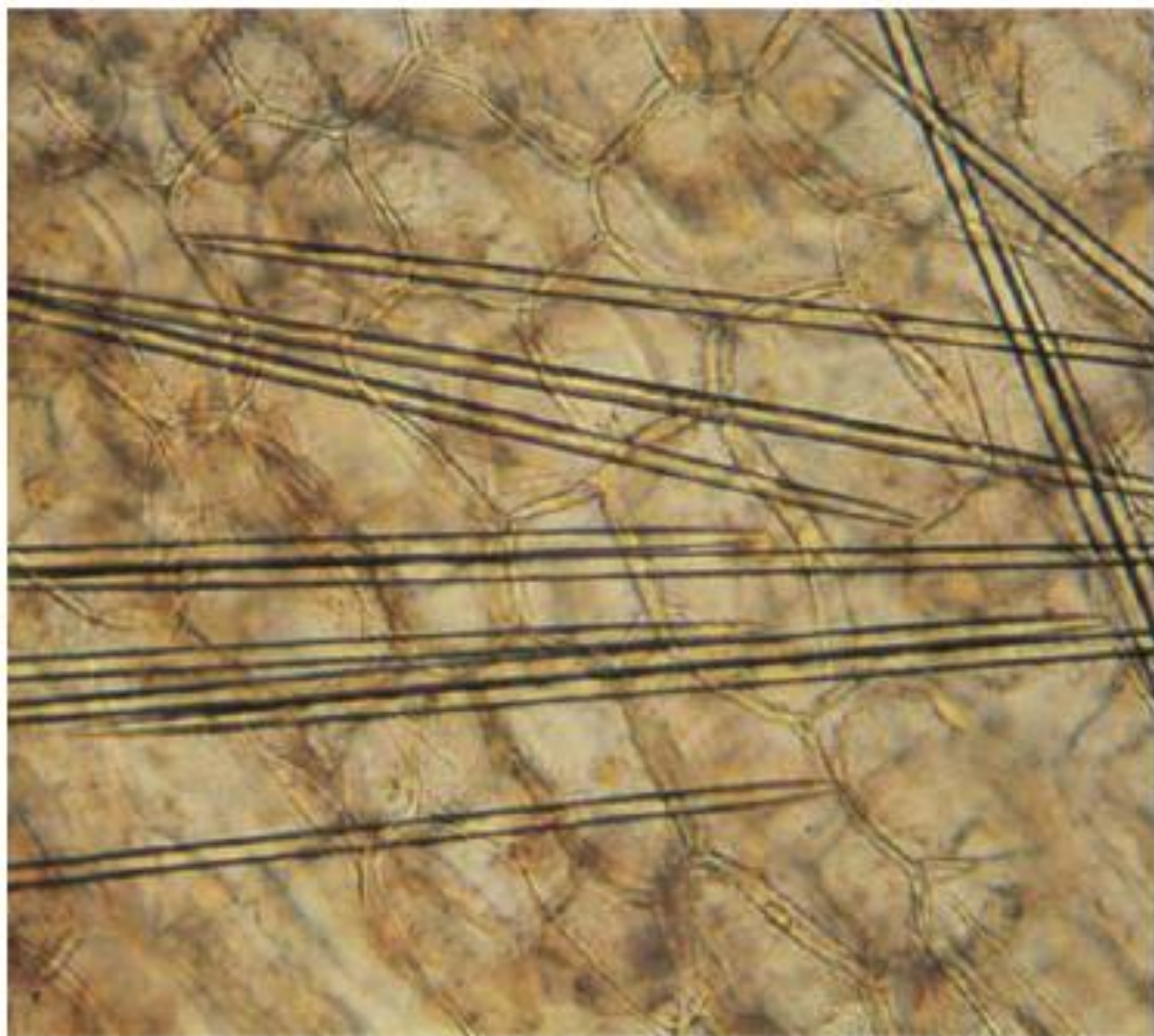


Figura 5.7

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

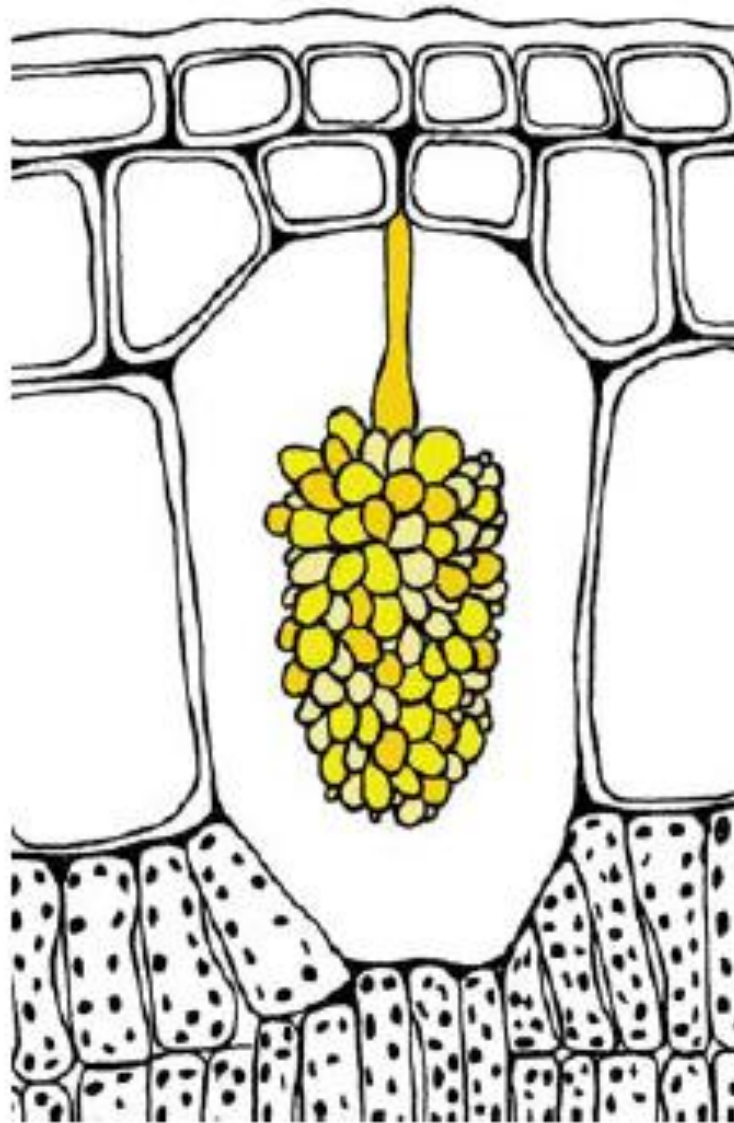


Figura 5.8

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

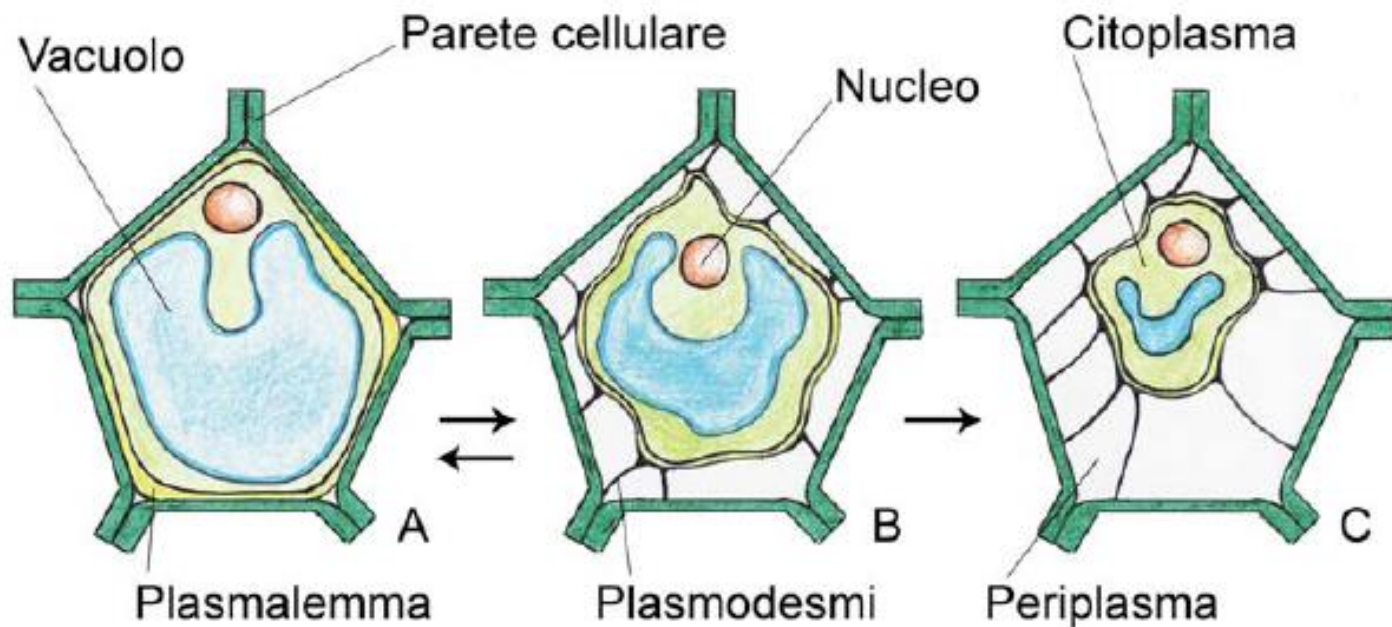


Figura 5.9

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

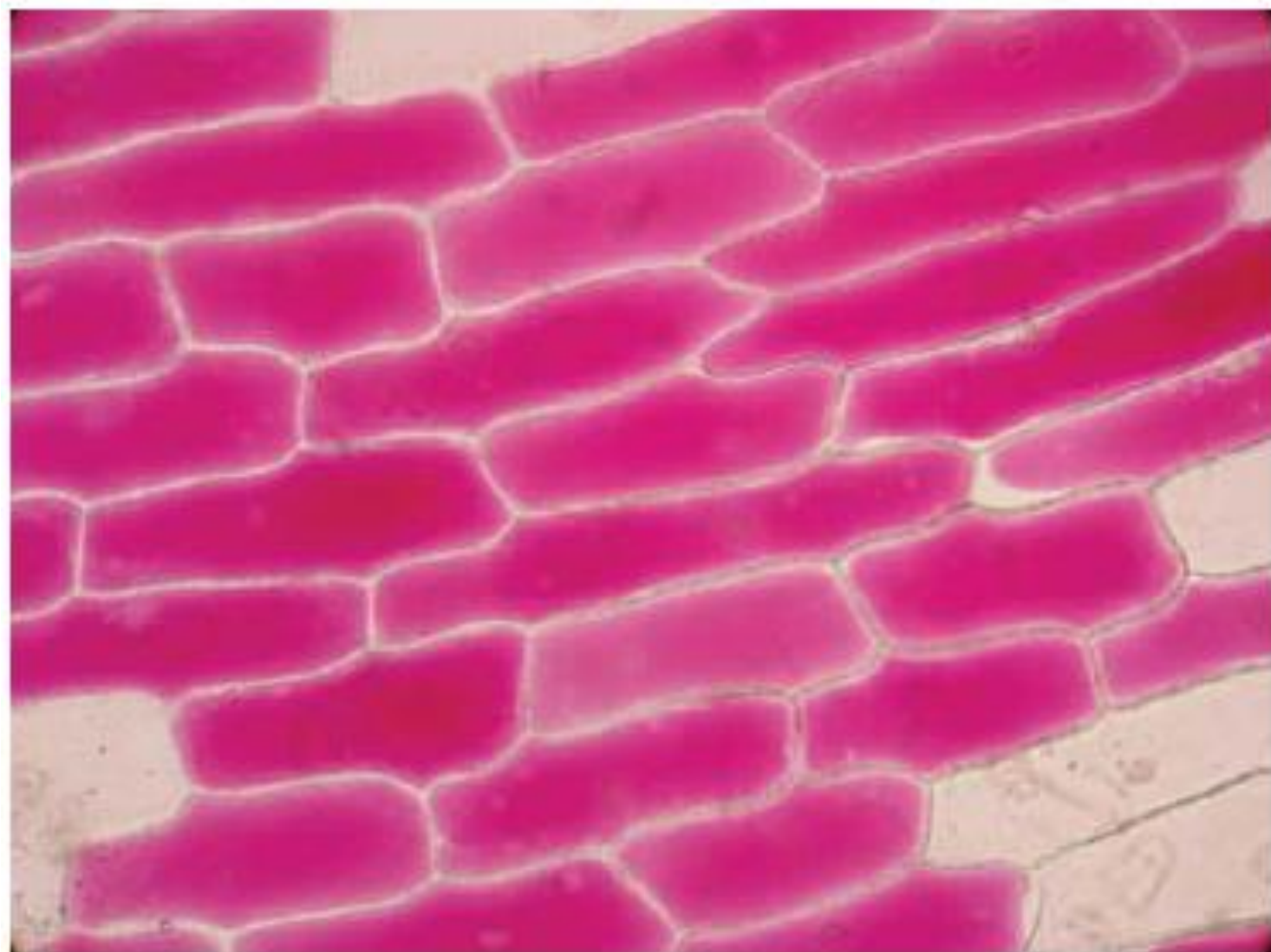


Figura 5.11

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).

MECCANISMI DI DIFESA

- **Fitochelatine** (contro metalli pesanti)
- **Fitoalessine** (contro organismi patogeni)
- **Glucosinolati** (contro erbivoria)
- **Alcaloidi** (contro organismi patogeni e fitofagi)
- **Tannini** (contro organismi patogeni e fitofagi)

RISPOSTA AGLI STRESS

- **Composti fenolici** (contro stress abiotici come siccità, salinità del suolo, temperature basse o elevate)

MECCANISMI DI RIPRODUZIONE

- **Flavonoidi** (esempio impollinazione, disseminazione)
- **Terpeni** (esempio profumo dei fiori)
- **Composti fenolici** (esempio allelopatia)

FIGURA 5.15

Alcune attività biologiche che prevedono il coinvolgimento dei composti del vacuolo.

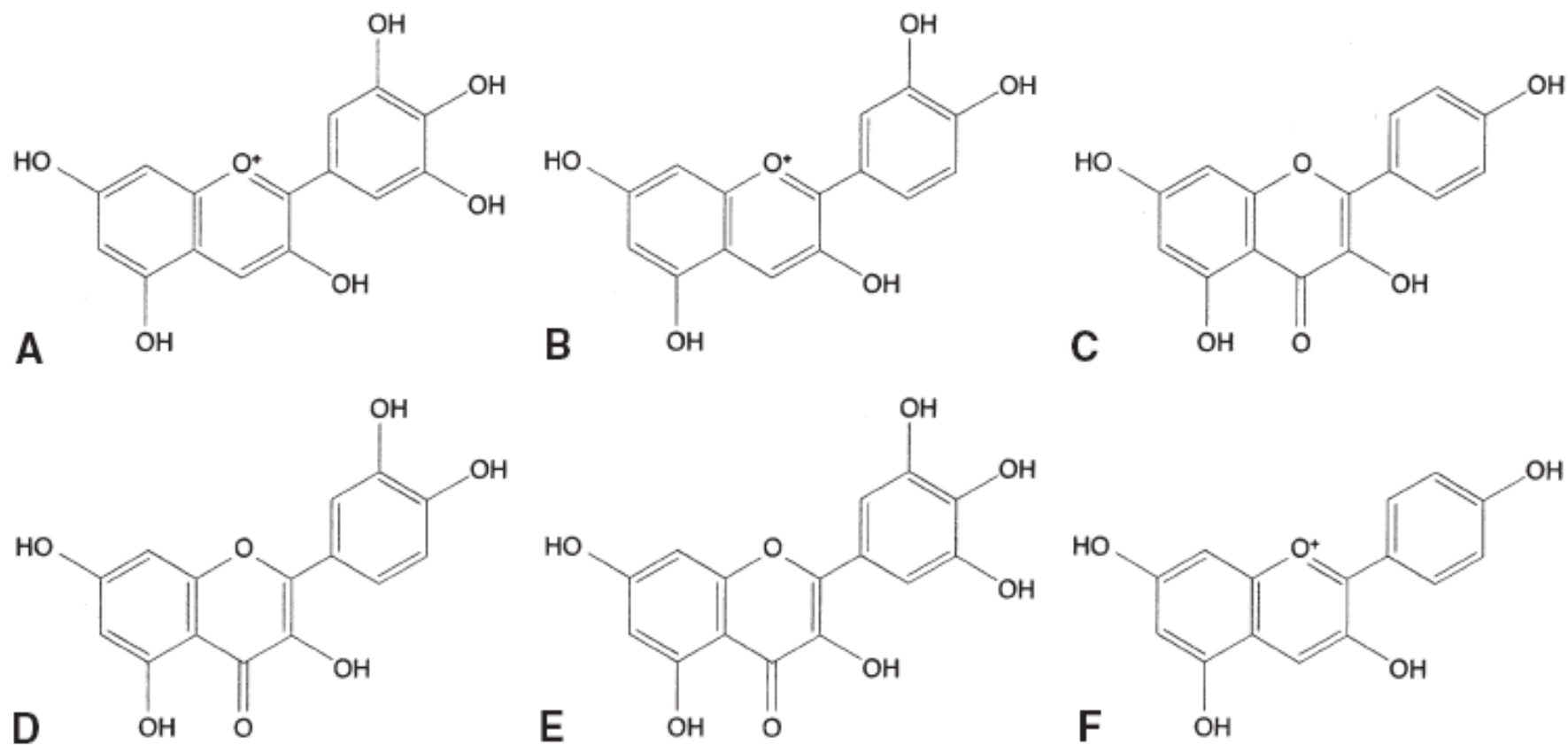


Figura 5.12

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

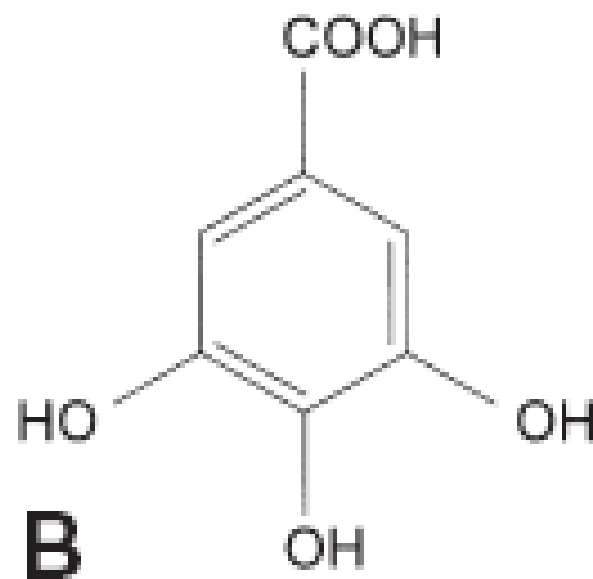
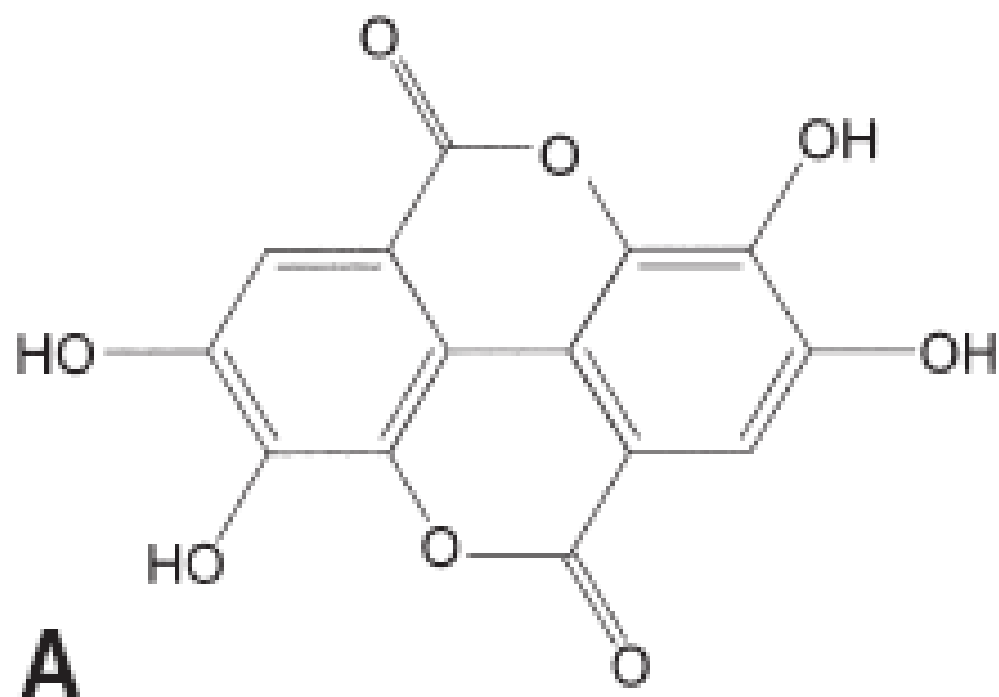


Figura 5.13

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

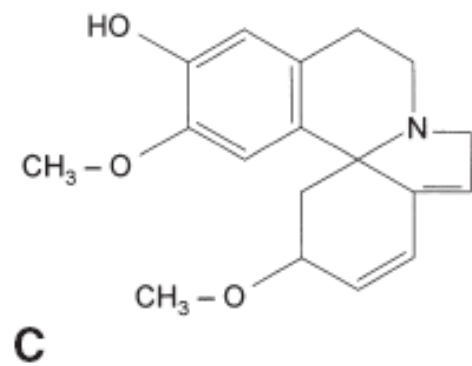
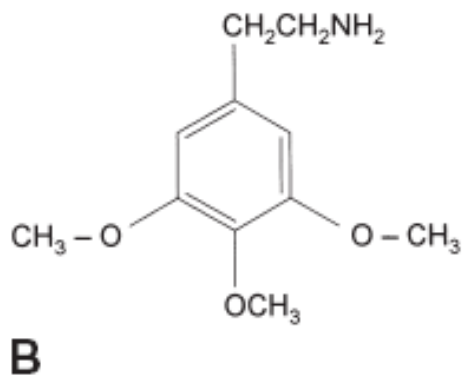
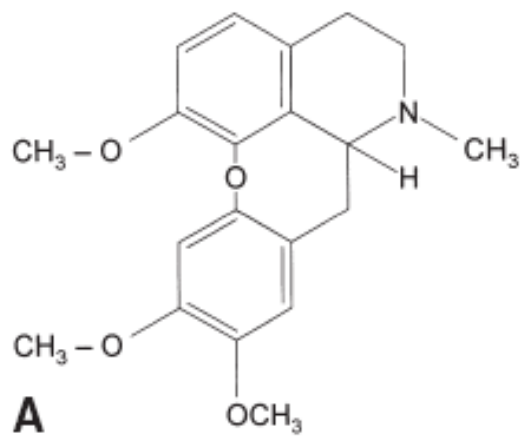


Figura 5.14

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