

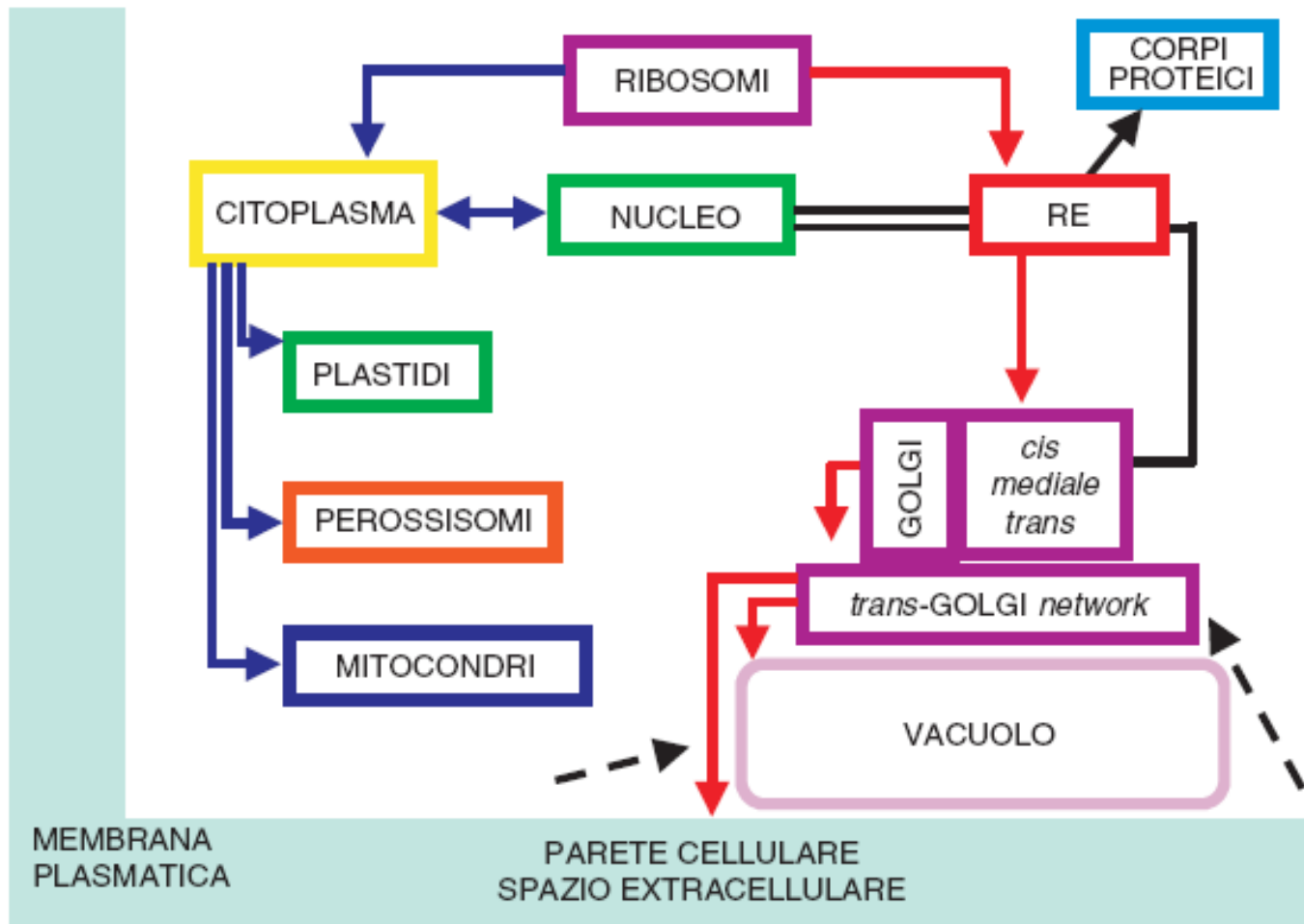
# IL SISTEMA DI ENDOMEMBRANE

**Tutte le membrane 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, 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.

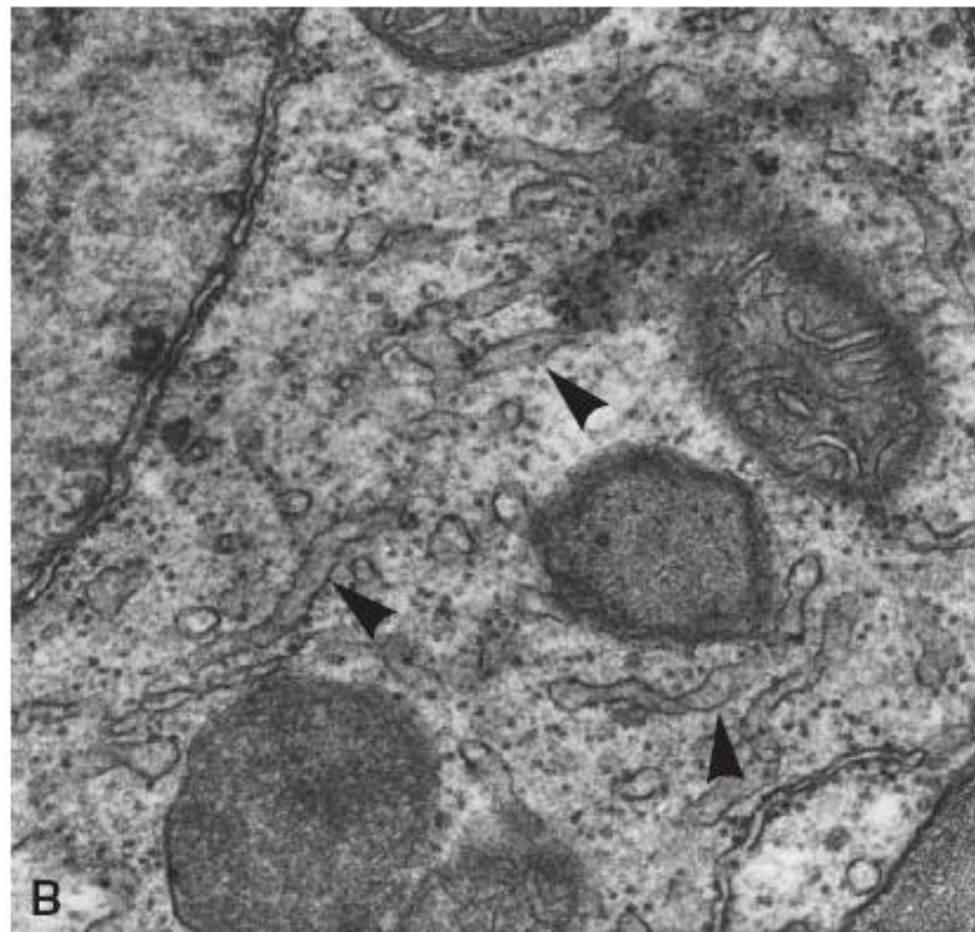
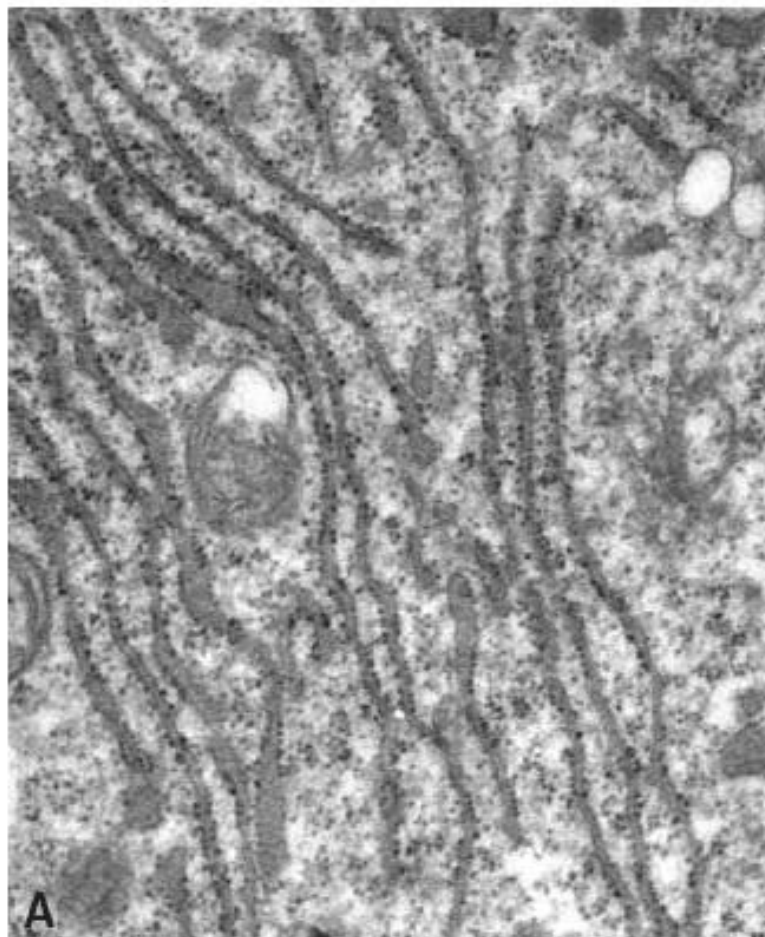
**TABELLA 4.1**

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

Compartimento	Sequenza aminoacidica
RE (direzionamento)	Peptide segnale
(ritenzione)	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

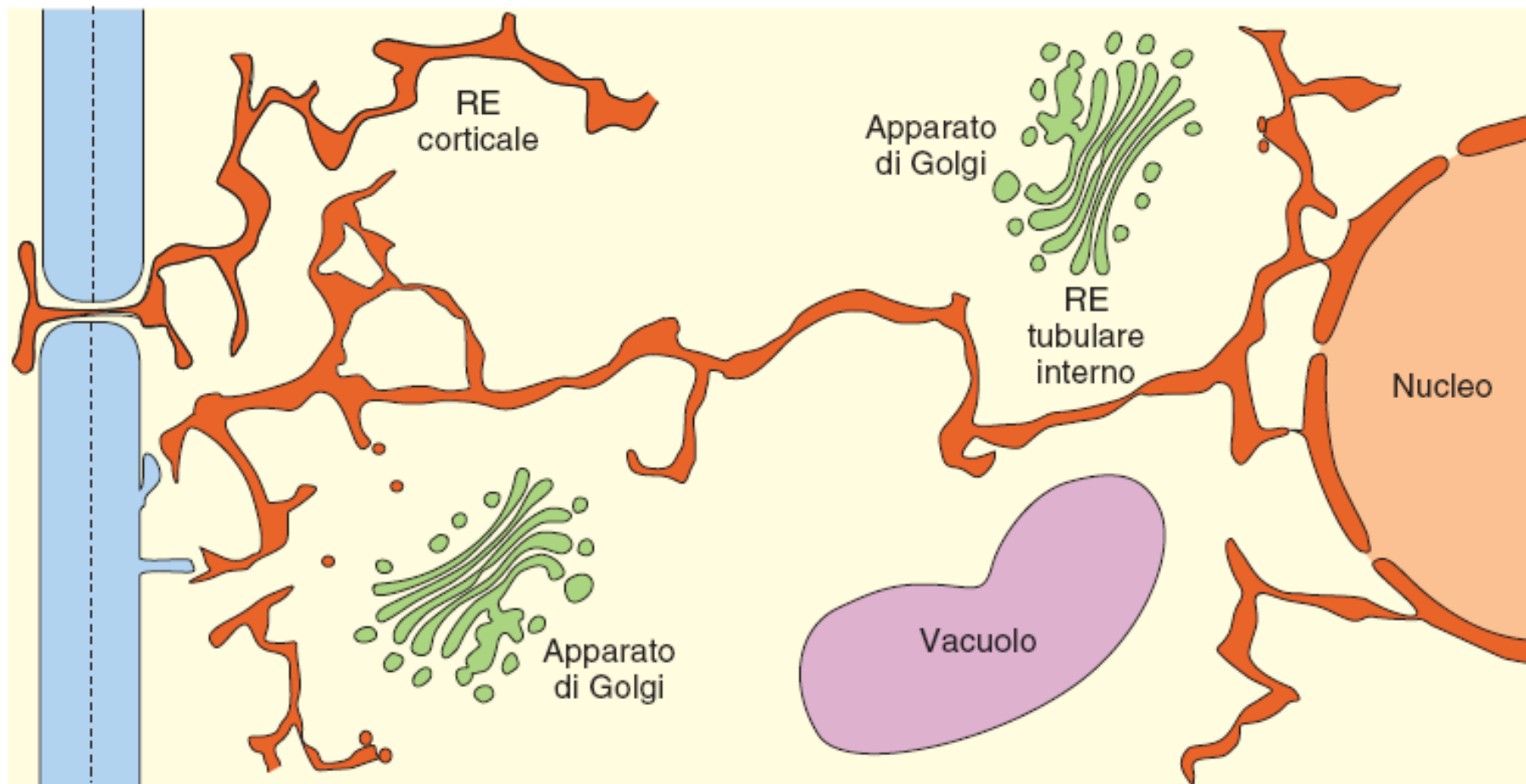
L'informazione per il direzionamento delle proteine risiede generalmente nella proteina stessa sotto forma di sequenze amminoacidiche brevi. Le sequenze segnale si possono trovare in qualunque punto della proteina più frequentemente nella posizione N-terminale, in forma di sequenze transitorie che spesso vengono rimosse nel compartimento di destinazione

Recentemente, nel sistema di endomembrane è stato aggiunto l'autofagosoma, vescicole, un compartimento a doppia membrana che include componenti intracellulari che vengono poi degradati nel vacuolo. L'autofagosoma media un processo degradativo, evolutivamente conservato, chiamato autofagia che permette il riciclo di macromolecole, contribuendo così all'omeostasi cellulare (capacità delle cellule di mantenere un ambiente interno stabile e costante: pH, temperatura, concentrazione di nutrienti, volume, rimozione di sostanze nocive o di scarto).



**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).



**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).

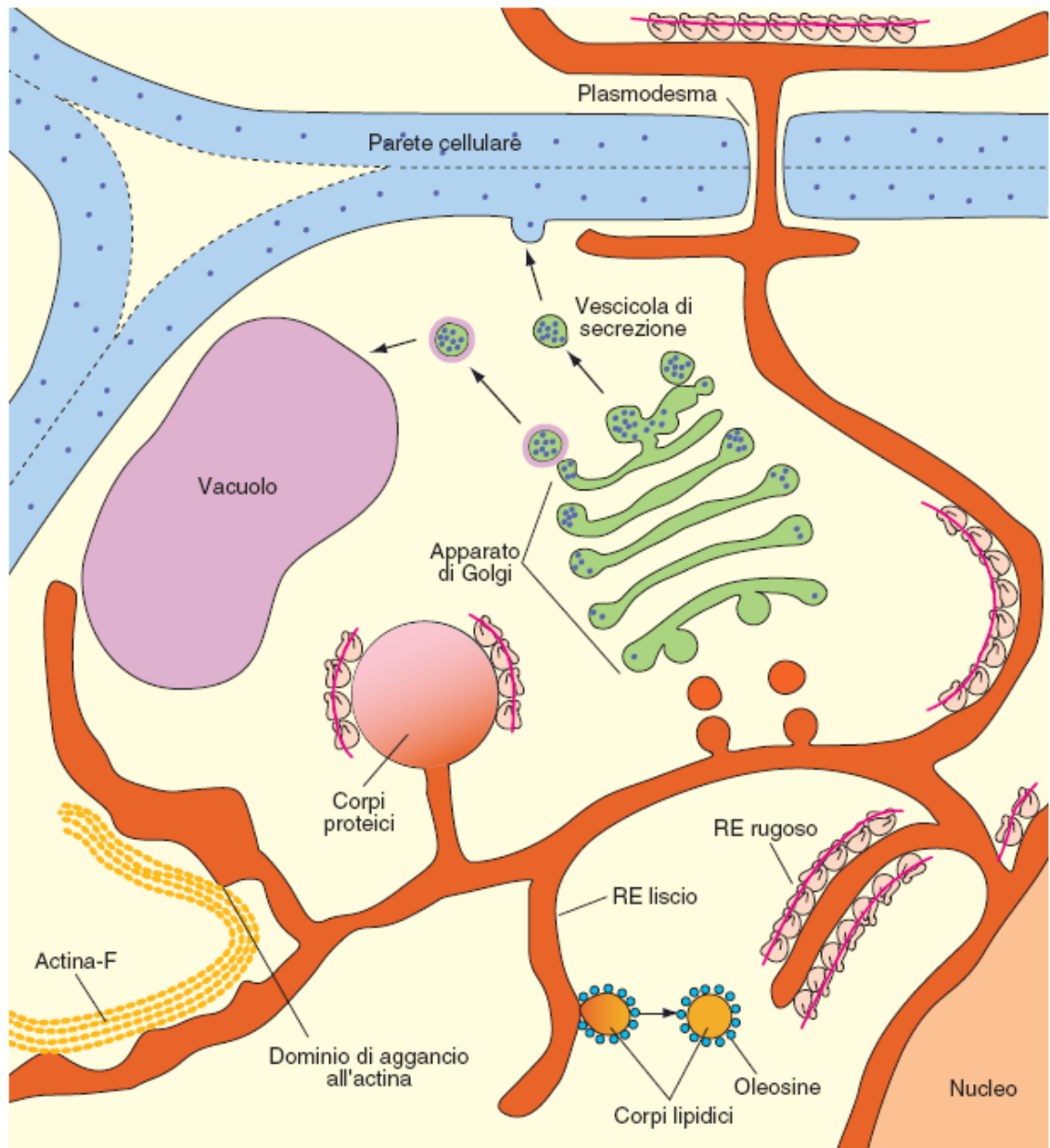
Il **reticolo endoplasmatico** è il compartimento più esteso ed adattabile delle cellule eucariotiche è sede della **sintesi ed accumulo di proteine di riserva, di lipidi di membrana e di trigliceridi di riserva.**

Nei cereali le proteine di riserva appartengono alla classe delle prolamine, insolubili nei solventi acquosi.

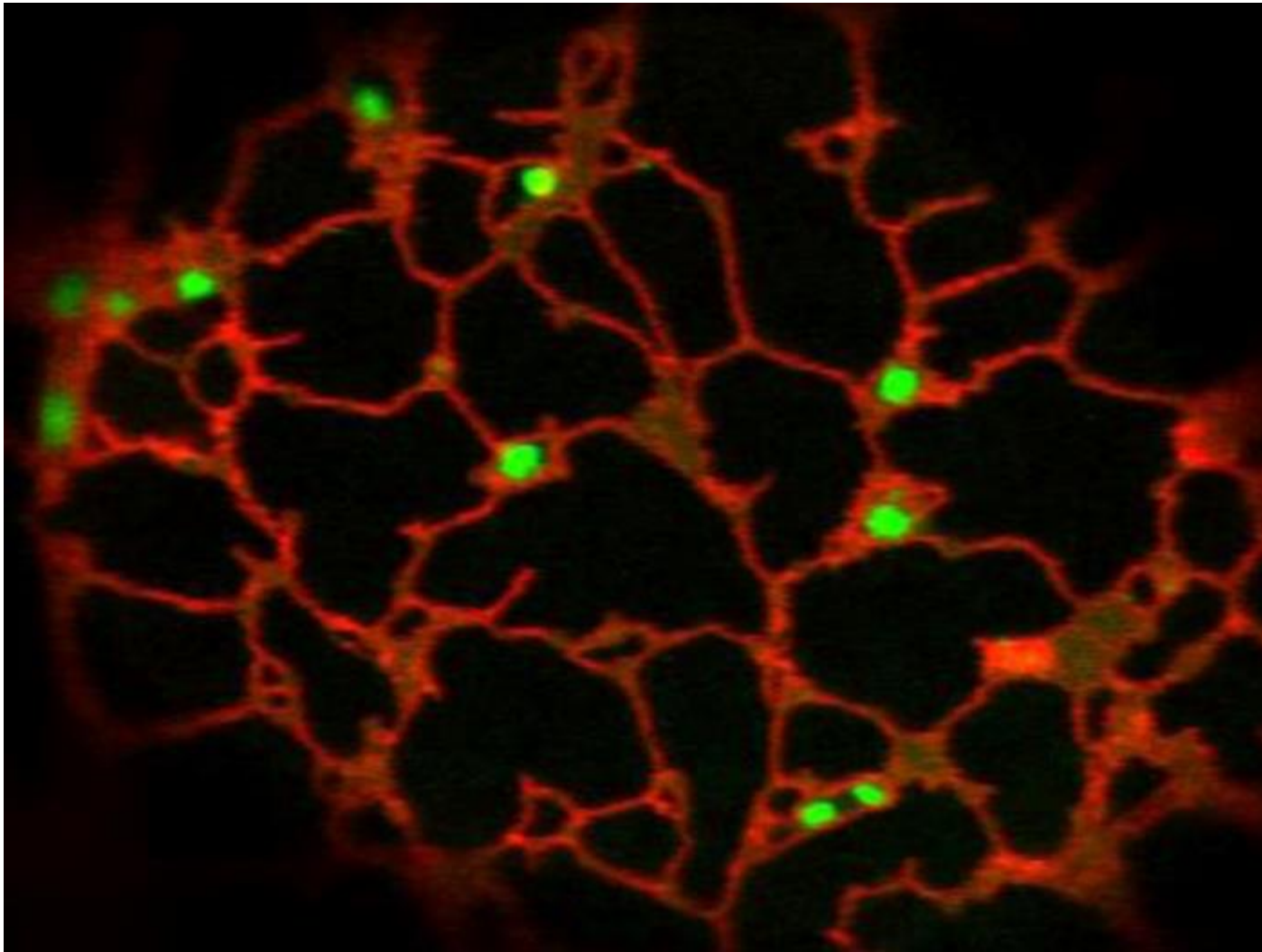
Sono sintetizzate nel RE e si accumulano in grossi aggregati, i **corpi proteici**, che vengono poi utilizzati come fonte di aminoacidi durante la germinazione.

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. Le **oleosine**, proteine integrali di membrana 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.



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).

Il RE 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 suggeriscono un'interazione diretta tra fasci di microfilamenti e RE corticale che si comporterebbe come una piattaforma di aggancio per i filamenti di actina nella generazione delle correnti citoplasmatiche

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.

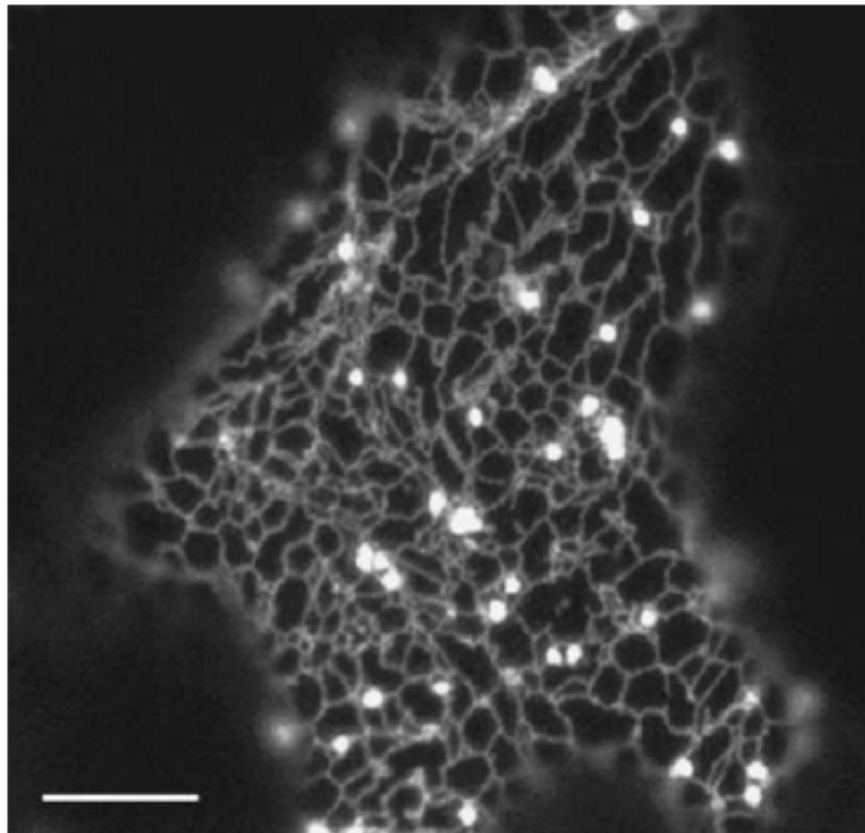
Nella cellula animale invece gli elementi dell'apparato di Golgi formano un unico complesso situato nella zona perinucleare.

**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.

**Nelle piante l'apparato di Golgi è 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 il traffico proteico, lipidico e la sintesi di polisaccaridi continuano durante la Mitosi ed il Golgi non si disassembla per formare la piastra cellulare. La duplicazione del Golgi avviene in fase G2 (interfase) mediante scissione delle cisterne preesistenti**



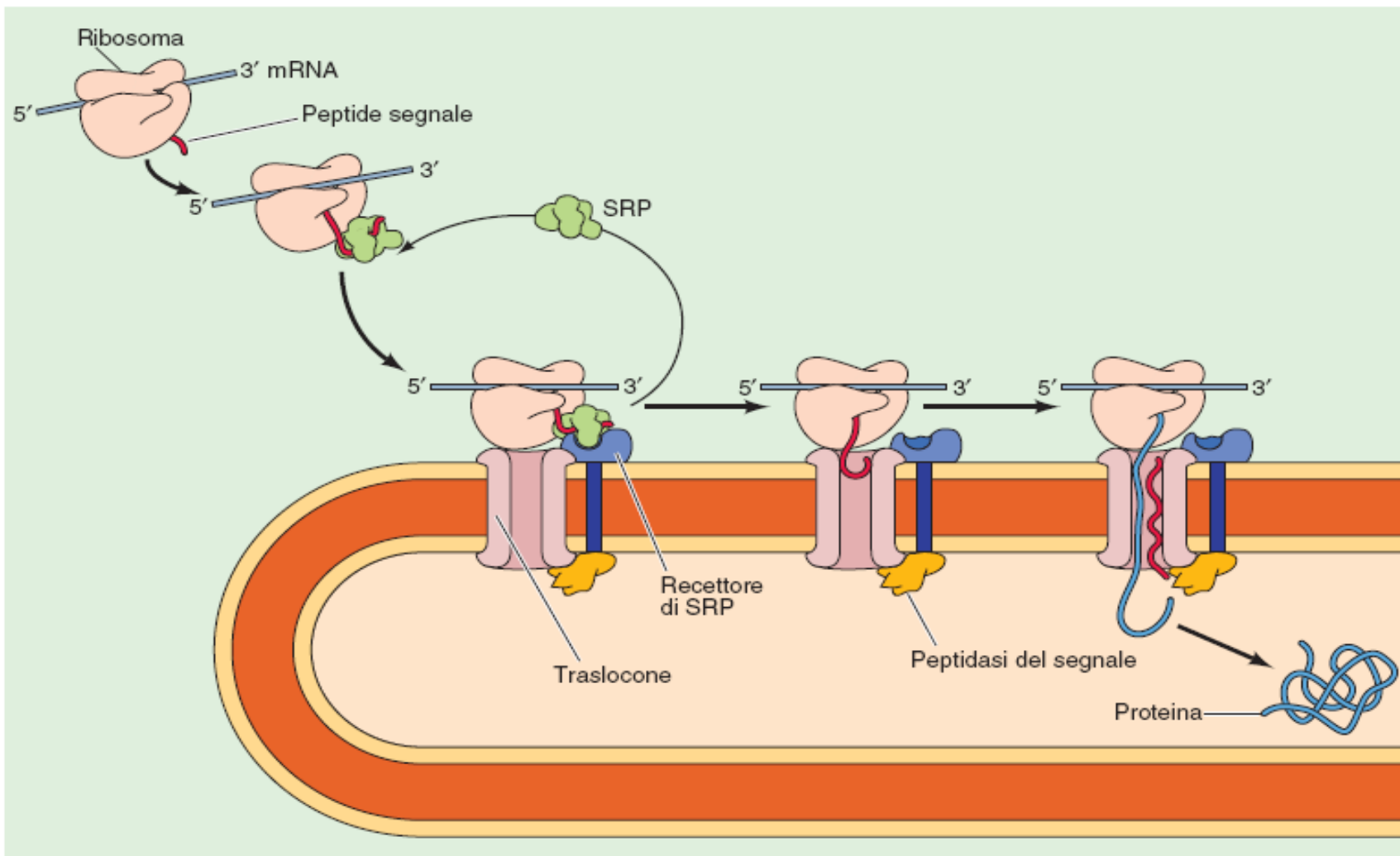
#### **Figura 4.7**

Distribuzione spaziale reciproca dell'apparato di Golgi e del reticolo endoplasmatico in una cellula dell'epidermide di foglie di tabacco, evidenziata dalla proteina fluorescente verde GFP. Le pile dell'apparato di Golgi distribuite nella zona corticale del citoplasma sono strettamente associate ai tubuli del reticolo endoplasmatico. Barra: 10  $\mu\text{m}$  (da C. Hawes et al., 1999, riprodotta con il permesso di Elsevier).

**Le pile di cisterne del Golgi si muovono rapidamente lungo i tubuli del RE corticale, questo potrebbe favorire il carico di proteine dal RE ai siti di uscita verso la membrana plasmatica**

## **Traslocazione e maturazione delle proteine nel reticolo endoplasmatico**

Il primo evento di indirizzamento di una proteina alla via di secrezione avviene quando i ribosomi liberi nel citoplasma, a sintesi proteica già iniziata, si associano alla membrana del RE. Tutte le proteine solubili o di membrana destinate alla via di secrezione possiedono all'estremità N-terminale una sequenza aminoacidica, definita peptide segnale, che le indirizza al lume o alla membrana del RE. Le proteine di membrana hanno anche una sequenza supplementare, detta sequenza di arresto del trasferimento, che le mantiene inserite nella membrana.



**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 aminotermine della proteina) e il recettore di membrana. Traslocone è un complesso di polipeptidi che si associano a formare un canale idrofilico per l'accesso delle proteine. Le proteine di membrana hanno una sequenza supplementare detta sequenza di arresto del trasferimento per cui la proteina rimane inserita nella membrana**

Nel RE la proteina viene modificata per svolgere la propria funzione.

L'evento più frequente è la N-glicosilazione, cioè il legame covalente di uno zucchero al gruppo amminico NH<sub>2</sub> della catena laterale di una asparagina ad opera di una glicosiltrasferasi.

Gli oligosaccaridi vengono modificati nel RE mediante rimozione di alcuni zuccheri portando alla formazione di catene ad alto mannosio.

Uno dei ruoli sembra quello di aiutare le proteine a raggiungere un ripiegamento appropriato (opera di chaperonine) e nella stabilizzazione.

Solo le proteine correttamente ripiegate proseguono per la via di secrezione verso l'apparato di Golgi. Le proteine difettose vengono inviate al citoplasma dove vengono degradate.

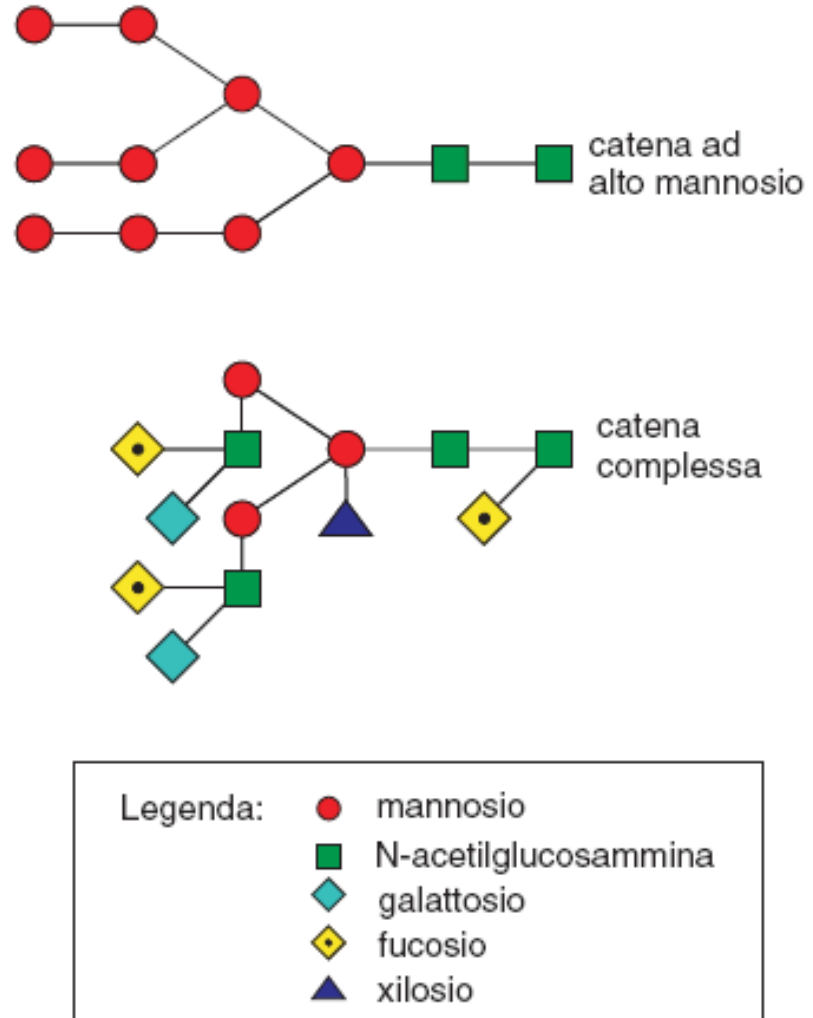


Figura 4.13

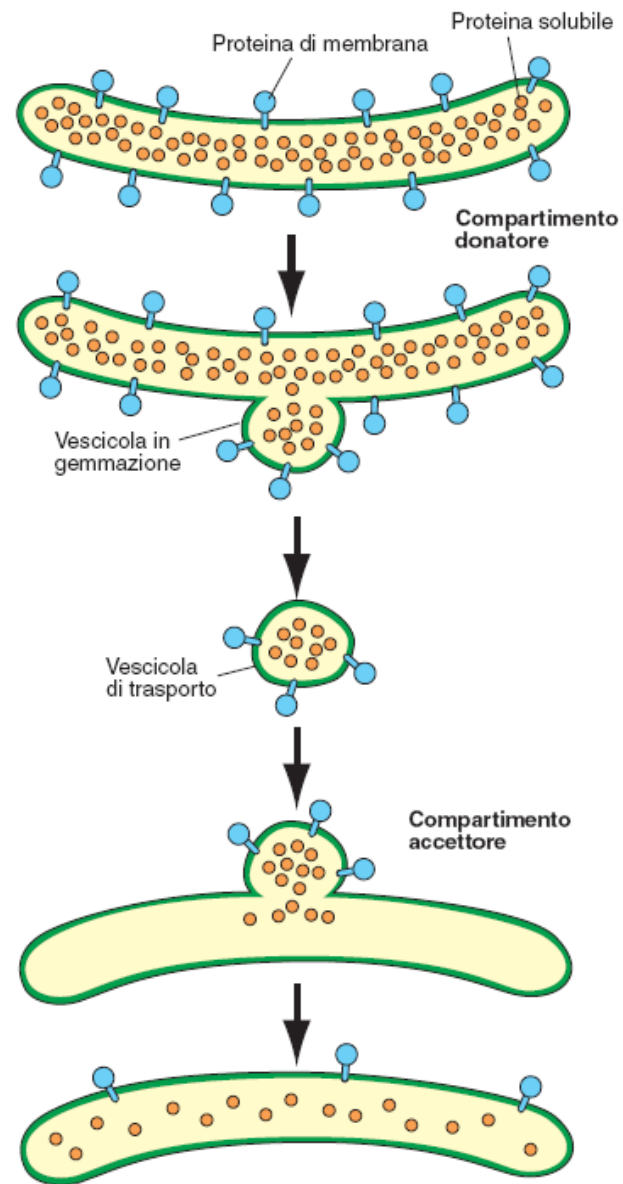
Esempi di oligosaccaridi N-legati alle proteine.

**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** (coat protein)

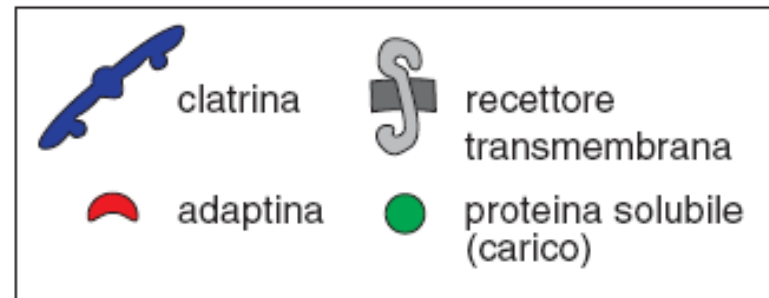
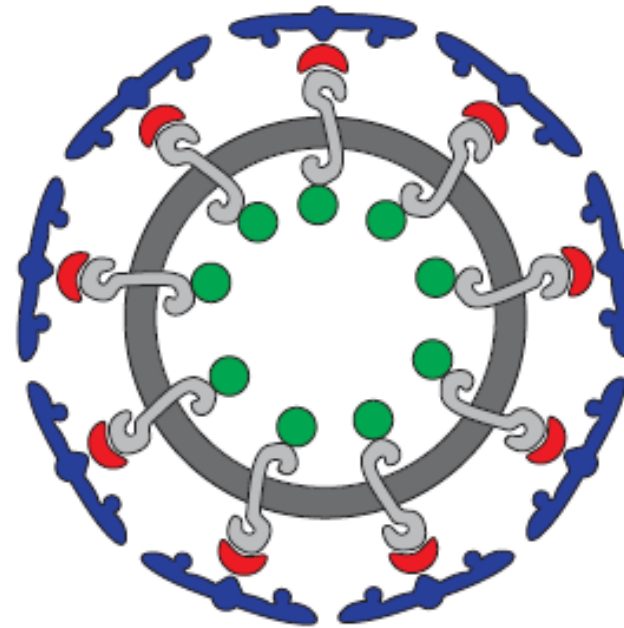
**Nel trasporto dal Golgi al RE le vescicole sono rivestite da COPI**



**Figura 4.9**

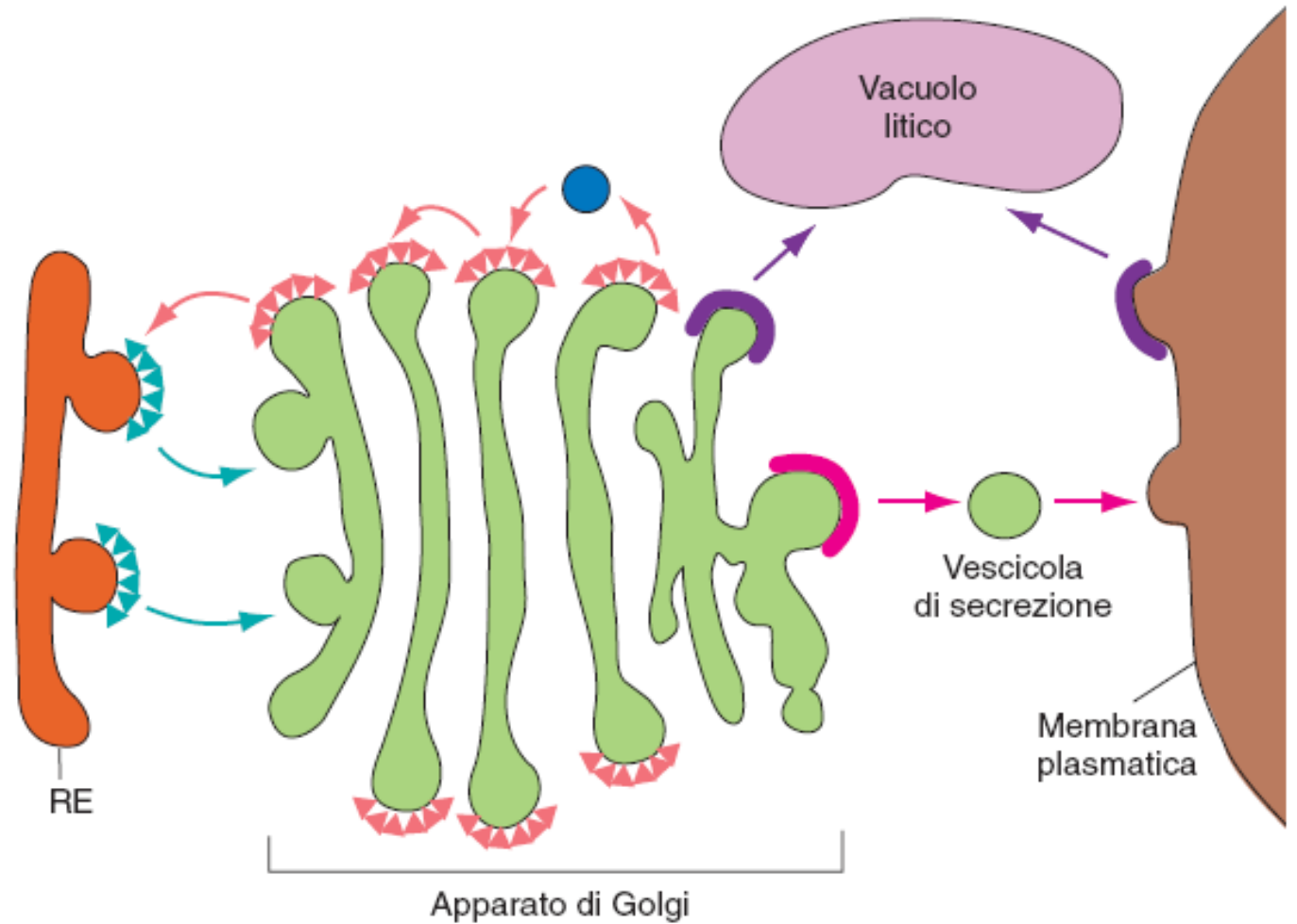
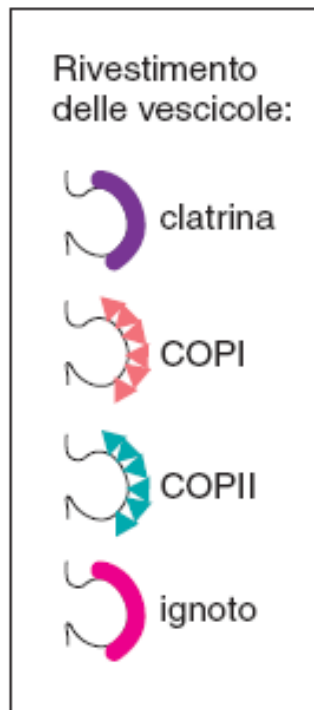
Formazione di una vescicola di trasporto a livello della membrana del compartimento donatore e fusione con la membrana del compartimento accettore. È da notare il mantenimento dell'orientamento topologico delle proteine di membrana.

Le vescicole che vanno dal Golgi al vacuolo litico sono rivestite di clatrina. La selezione dello specifico carico da trasportare viene svolto da proteine, adattine, facenti parte del rivestimento della vescicola, che legano da una parte la clatrina e dall'altro la proteina da caricare. 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. Nel caso di proteine rivestite di clatrina, ci sono altre proteine facenti parte del rivestimento, le adattine, che si associano temporaneamente alla faccia citosolica della membrana della vescicola in formazione legando da una parte le proteine transmembrana con funzioni di recettori di carico e dall'altra le molecole di clatrina. A gemmazione completa sia le adattine che le clatrine si staccano.



**Figura 4.11**

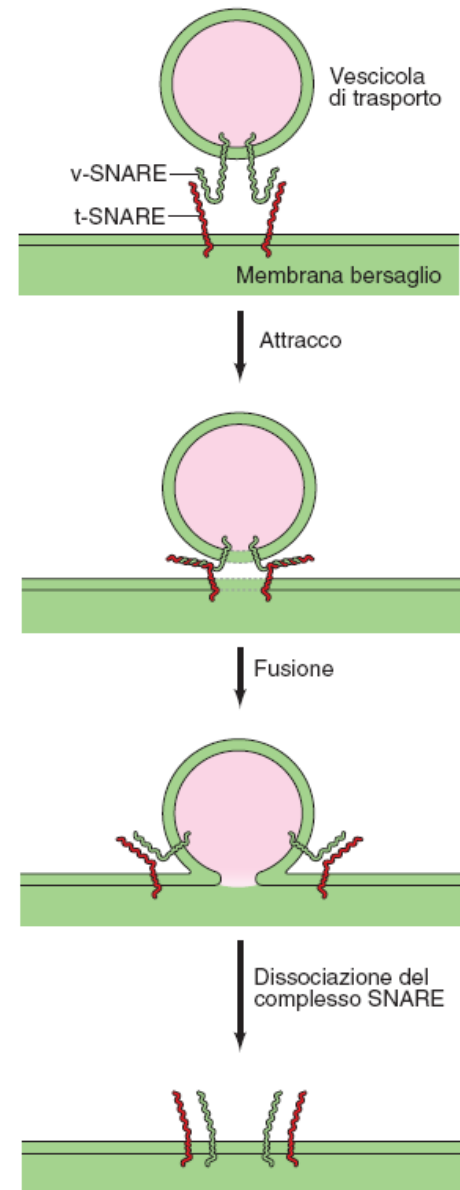
Rappresentazione schematica di una vescicola rivestita di clatrina (disegno di R. Mazzaro).



**Figura 4.10**

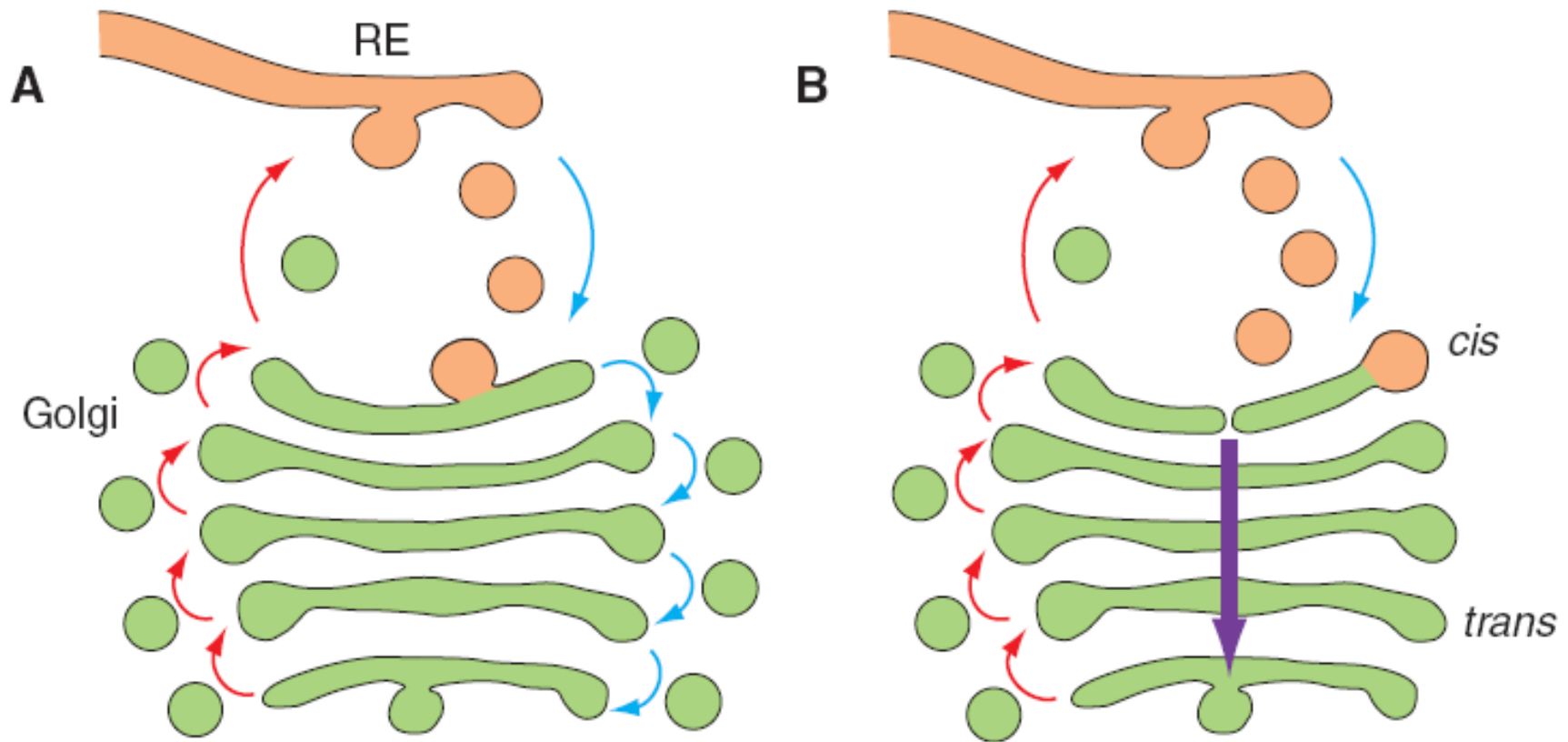
Rivestimenti proteici utilizzati nel trasporto vescicolare.

**Meccanismo di riconoscimento tra le vescicole di trasporto e il compartimento di destinazione, basato sull'interazione tra proteine transmembrana definite SNARE presenti al livello della vescicola (v) e sulla membrana bersaglio (t). Tali interazioni contribuiscono alla selettività dell'attracco e della fusione della vescicola di trasporto solo con il compartimento bersaglio appropriato**



**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).



**Figura 4.14**

Modelli di trasporto delle proteine tra le cisterne dell'apparato di Golgi: A) modello di trasporto vescicolare; B) modello di maturazione delle cisterne.

**Secondo il modello vescicolare le proteine si muovono da una cisterna all'altra del Golgi mediante traffico di vescicole. Il modello di maturazione delle cisterne prevede il movimento attraverso la pila, con formazione di cisterne dal lato cis e degradazione di vecchie cisterne dal lato trans**

## 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.

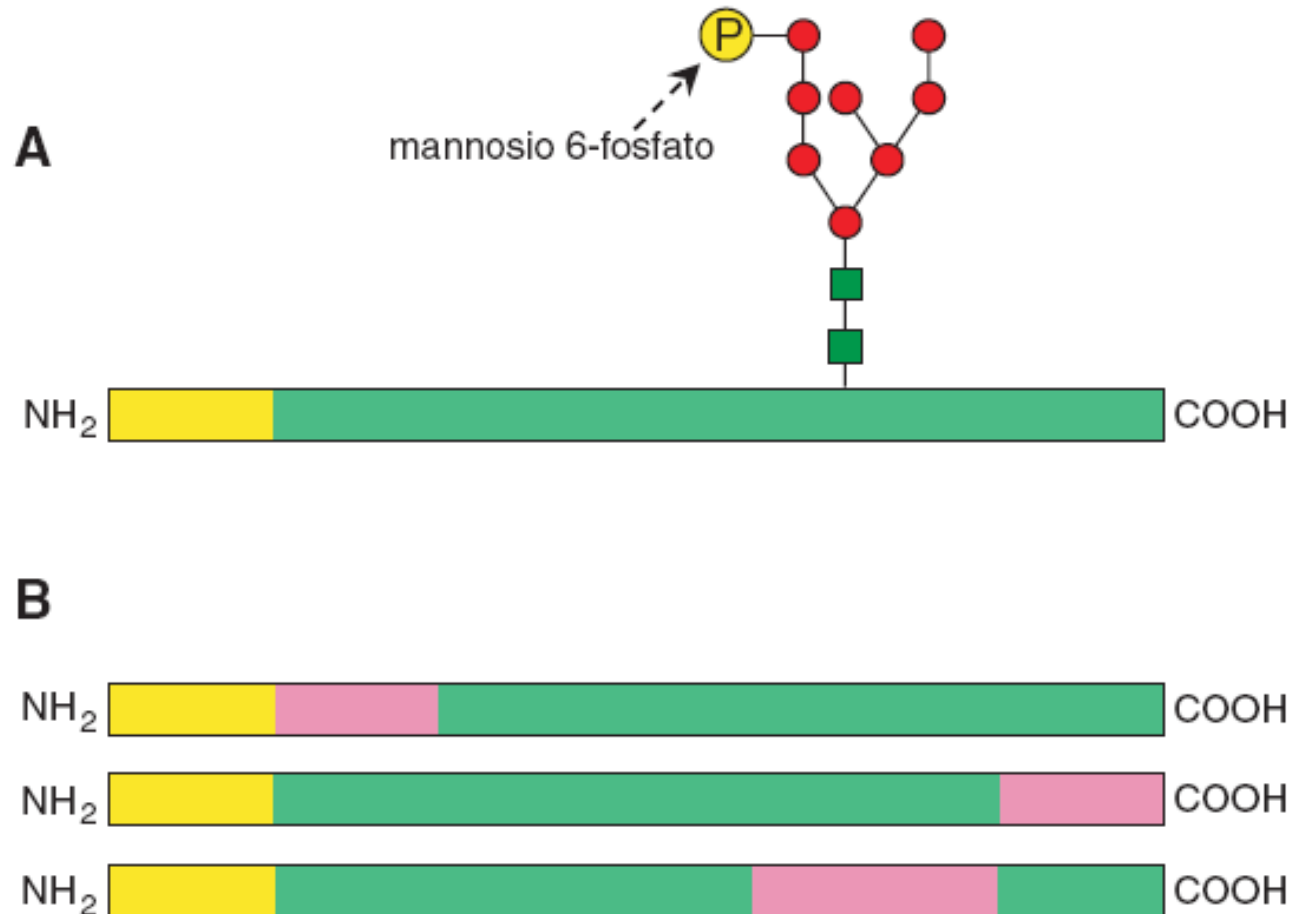
Nelle cellule animali il segnale di smistamento è dato da un residuo di mannosio 6-fosfato, cioè da uno zucchero della catena oligosaccaridica delle proteine che viene fosforilato nelle cisterne cis del Golgi.

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.

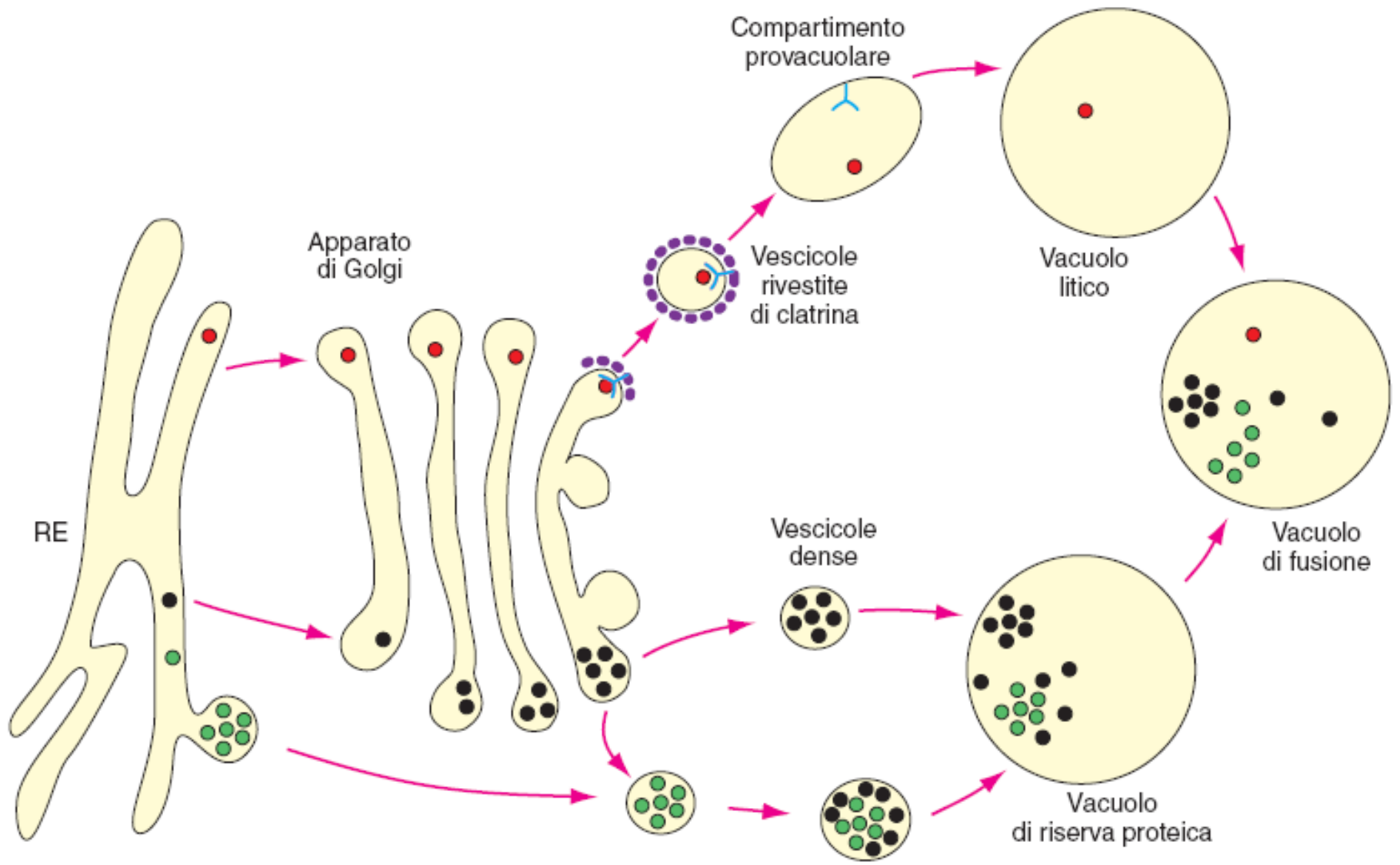
I propeptidi N-terminali dirigono le proteine ai vacuoli litici, mentre le sequenze C-terminali (vescicole rivestite di clatrina) o interne dirigono le proteine ai vacuoli di riserva (vescicole dense, rivestimento sconosciuto).

### Figura 4.15

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.



La possibile coesistenza nella stessa cellula di tipi diversi specializzati di vacuolo: un vacuolo litico ed un vacuolo di riserva. Durante la germinazione dei semi i due tipi di vacuoli possono fondersi tra loro dando origine ad un unico grande vacuolo centrale. La presenza di distinti vacuoli litici e di riserva nelle cellule in maturazione implica la necessità di meccanismi distinti per lo smistamento delle proteine al giusto compartimento, al fine di mantenere l'individualità e la specializzazione dei diversi comparti. Evidenze sperimentali dimostrano che i propeptidi N-terminali dirigono le proteine ai vacuoli litici (passando attraverso un compartimento intermedio definito compartimento provacuolare), mentre i propeptidi C-terminali e le sequenze interne dirigono le proteine ai vacuoli di riserva. La specificità dell'indirizzamento è conferita anche dal tipo di vescicole destinate al trasporto delle proteine vacuolari: vescicole rivestite di clatrina nel caso delle proteine destinate ai vacuoli litici e vescicole "dense", con contenuto elettrondenso e rivestimento non clatrinico per quanto riguarda le proteine destinate ai vacuoli di riserva.

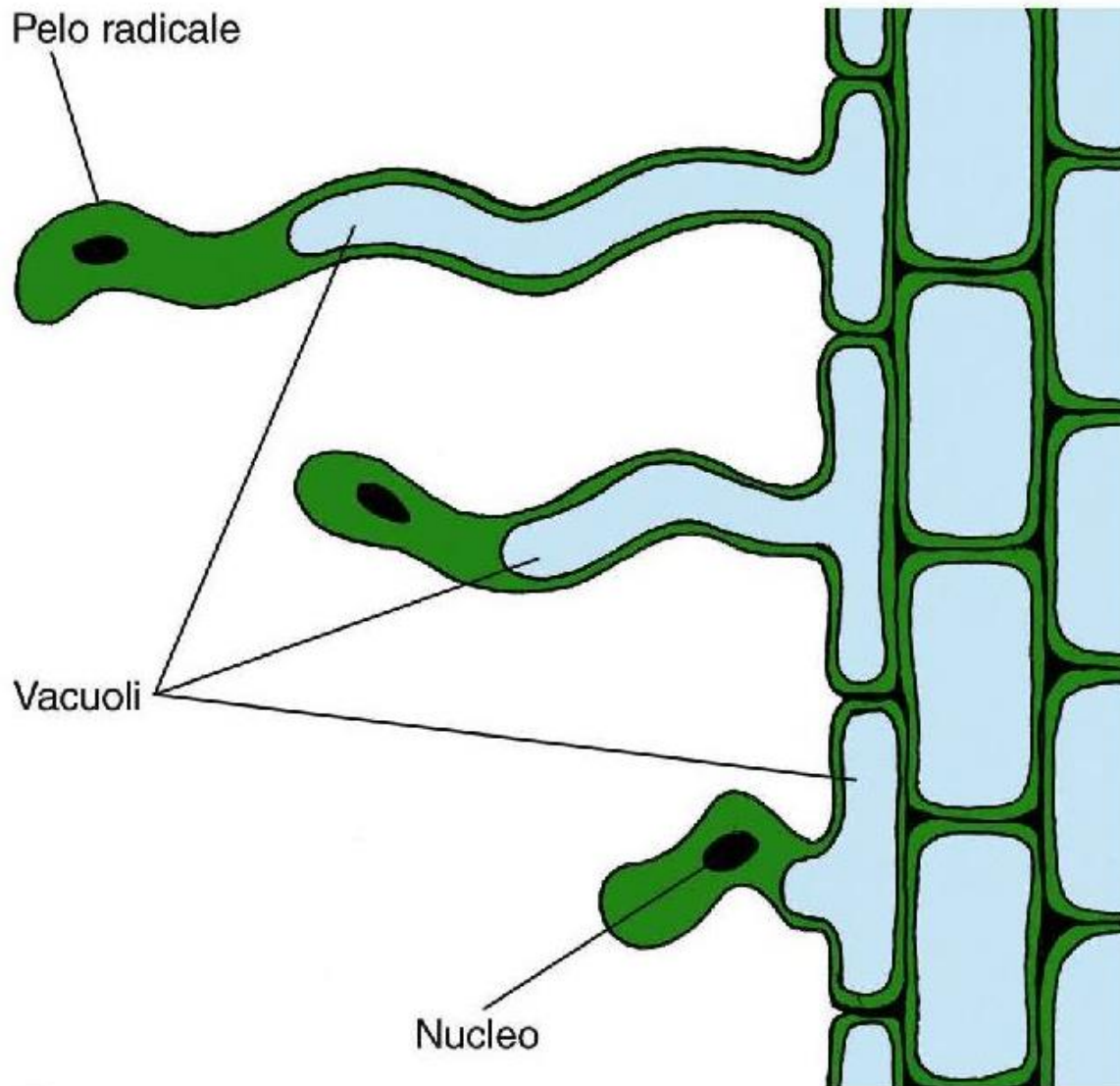


**Figura 4.16**

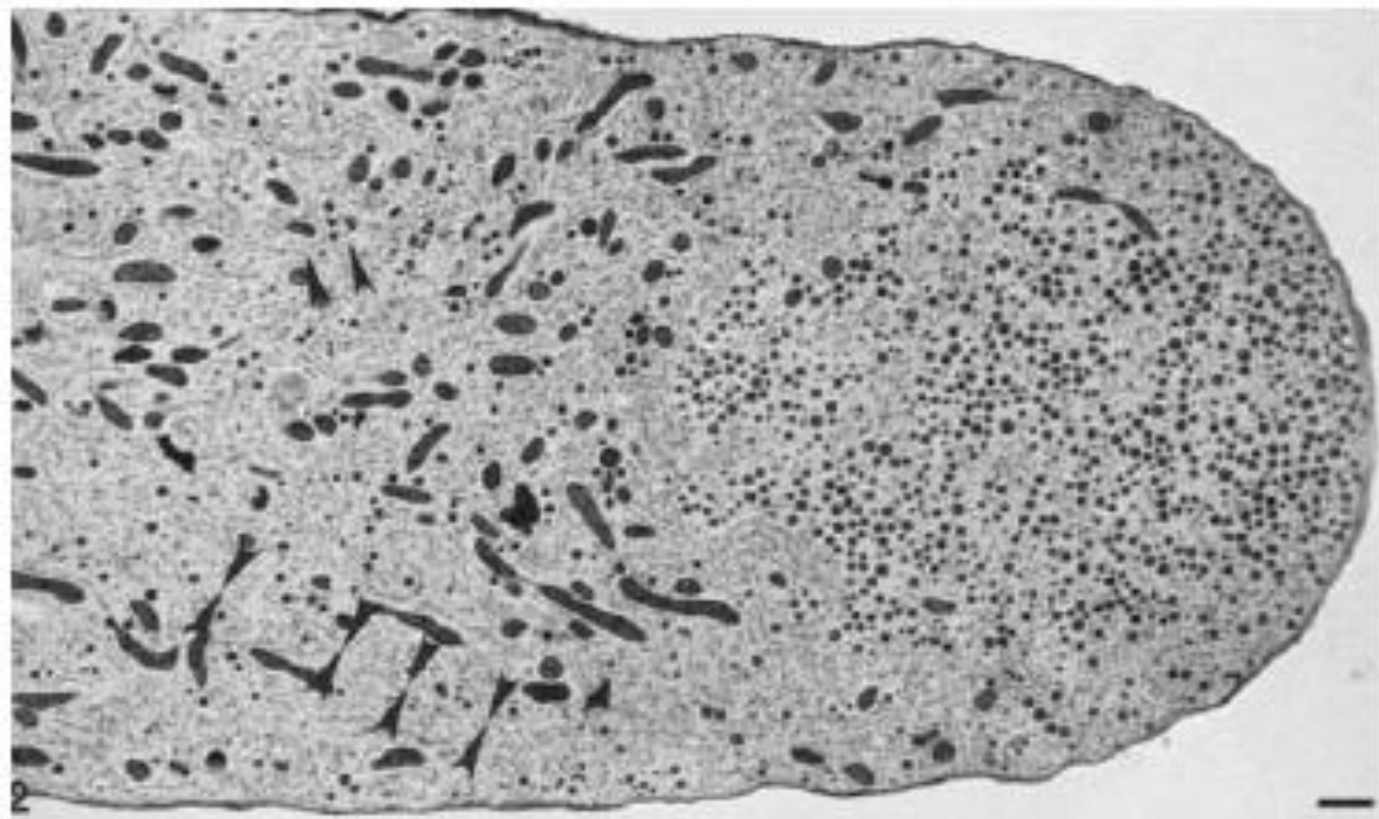
Schema rappresentativo delle vie di smistamento delle proteine ai differenti tipi di vacuoli. In rosso è indicata una proteina diretta al vacuolo litico; in nero e verde sono indicate due proteine dirette al vacuolo di riserva proteica, rispettivamente attraverso la via dipendente dal Golgi e indipendente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

# ESOCITOSI

Consiste in una 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. 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 8.12**  
Peli radicali (disegno di R. Braglia).



### **Figura 4.17**

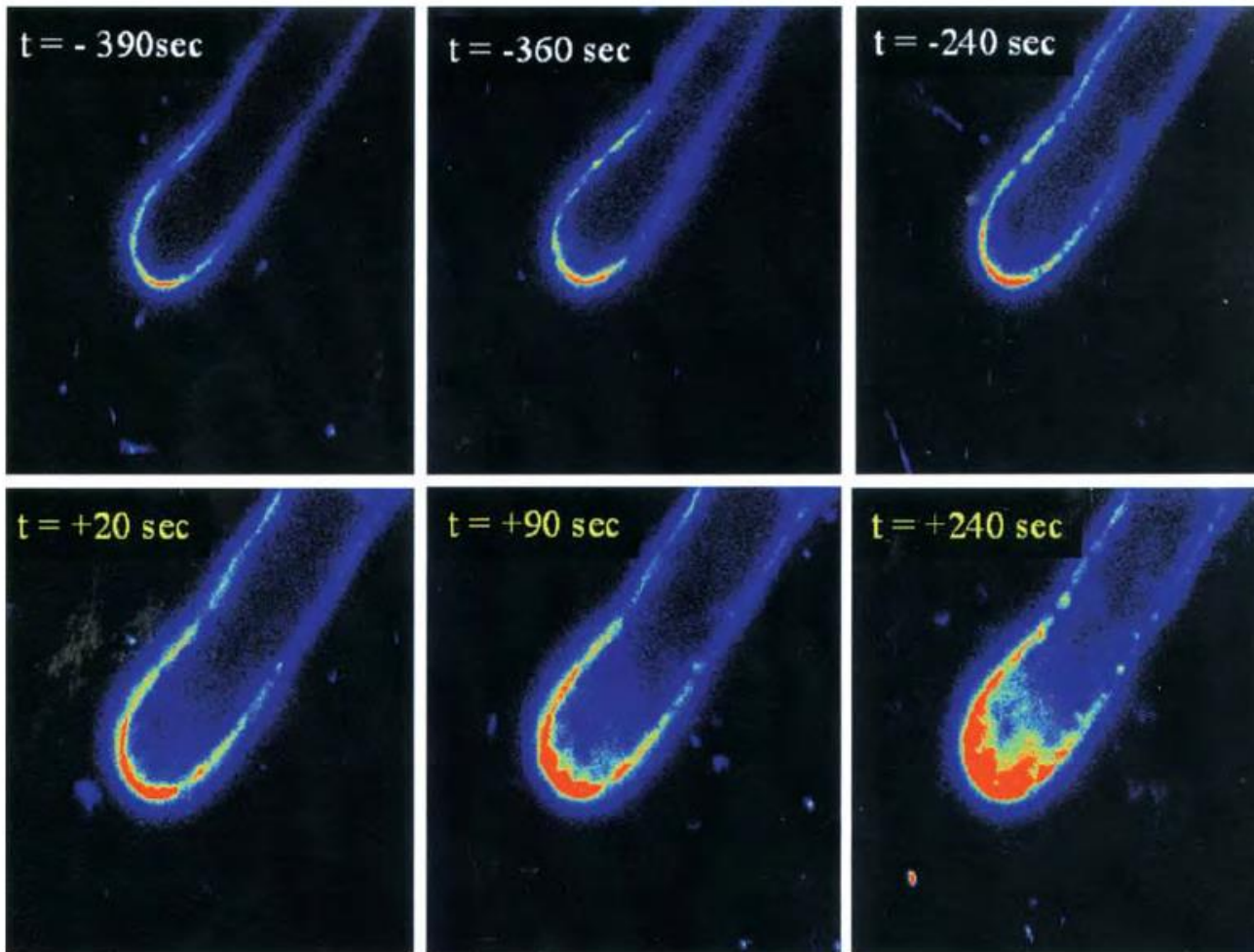
Esocitosi direzionale nel tubetto pollinico di giglio. Le vescicole provenienti dall'apparato di Golgi si accumulano all'apice prima di fondersi con la membrana plasmatica per fornire ulteriore superficie di membrana e materiale parietale durante la crescita polare (da S.A. Lancelle et al., 1997).

# **ENDOCITOSI**

**L'endocitosi nelle piante è ancora oggetto di studio. Si pensava che a causa del forte turgore cellulare non avvenisse.**

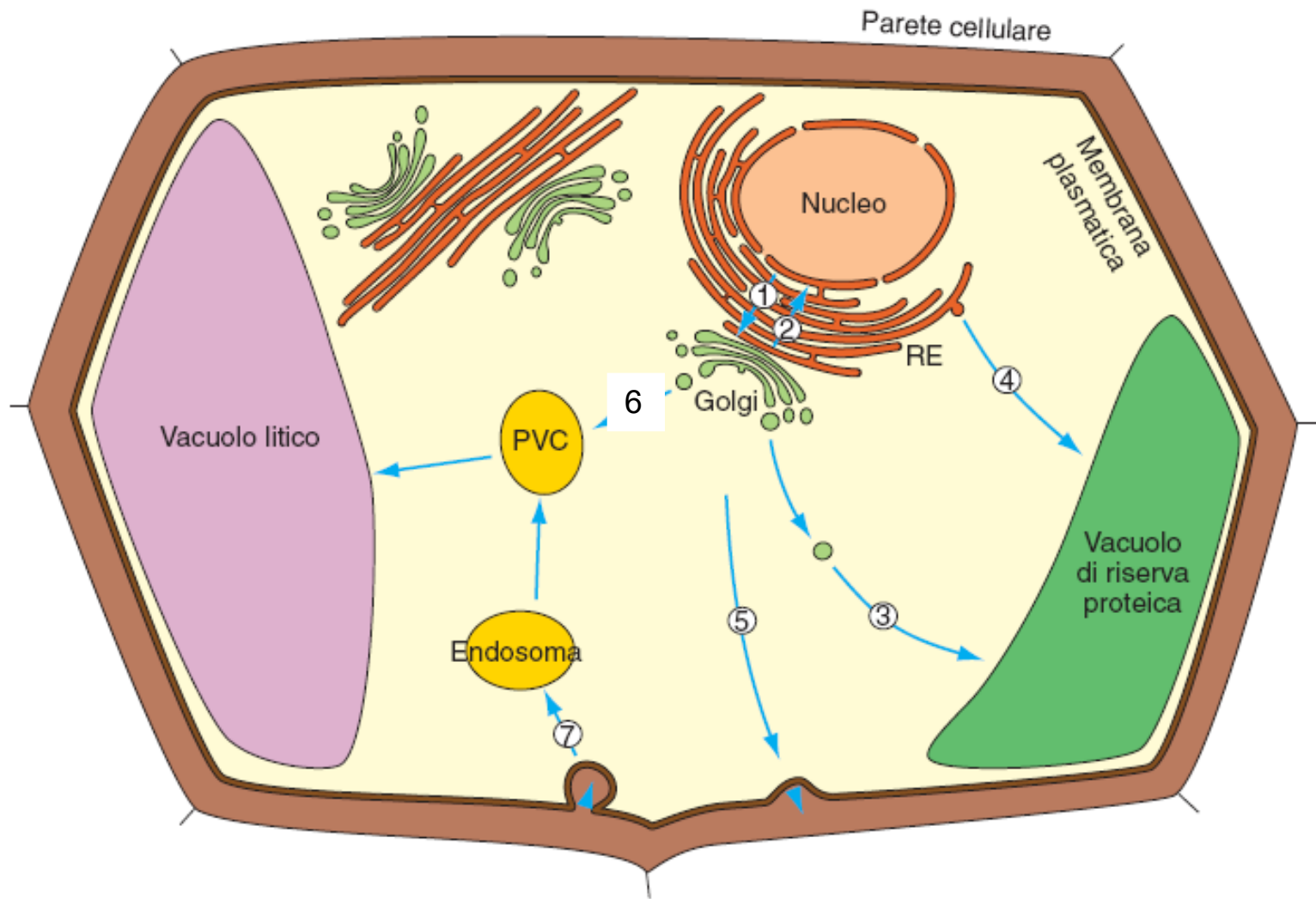
**Dati recenti dimostrano che anche nelle piante le proteine di membrana e solubili provenienti dall'esterno vengono indirizzate ai vacuoli con vescicole rivestite di clatrina.**

**E' possibile evidenziare l'endocitosi con coloranti fluorescenti che si legano alla membrana plasmatica. Sono stati osservati corpi vescicolari, endosomi.**



**FIGURA 4.18**

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



**Figura 4.19**

Vie di trasporto tra i compartimenti del sistema di endomembrane. 1. Trasporto di proteine dal reticolo endoplasmatico (RE) all'apparato di Golgi. 2. Recupero di proteine residenti nel RE. 3. Trasporto di proteine dall'apparato di Golgi al vacuolo di riserva proteica. 4. Trasporto diretto di alcune proteine dal RE al vacuolo di riserva proteica. 5. Trasporto di proteine di secrezione alla membrana plasmatica (esocitosi). 6. Trasporto di proteine dirette al vacuolo litico attraverso il compartimento provacuolare (PVC). 7. Internalizzazione di materiale extracellulare e proteine di membrana (endocitosi), che coinvolge un putativo endosoma, il PVC e il vacuolo litico (da F. Brandizzi, C. Hawes, 2004, modificata).

# Traditional method

## Pesticide administration



**Dissolution in water**  
nebulisation on plants of the water solution

Ossidation

Fotossidation

Biodegradation

Leaching

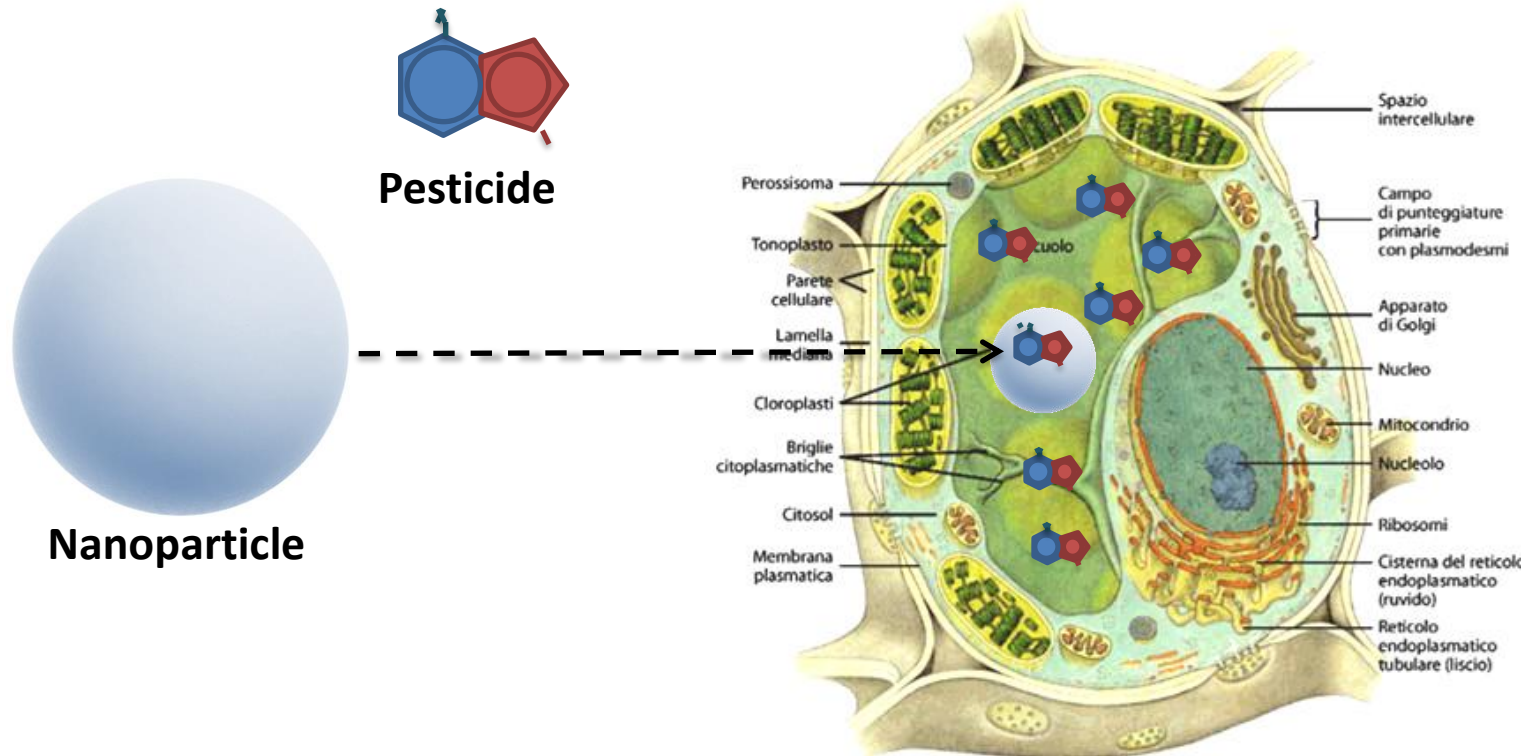


Soil  
pollution

Water  
pollution

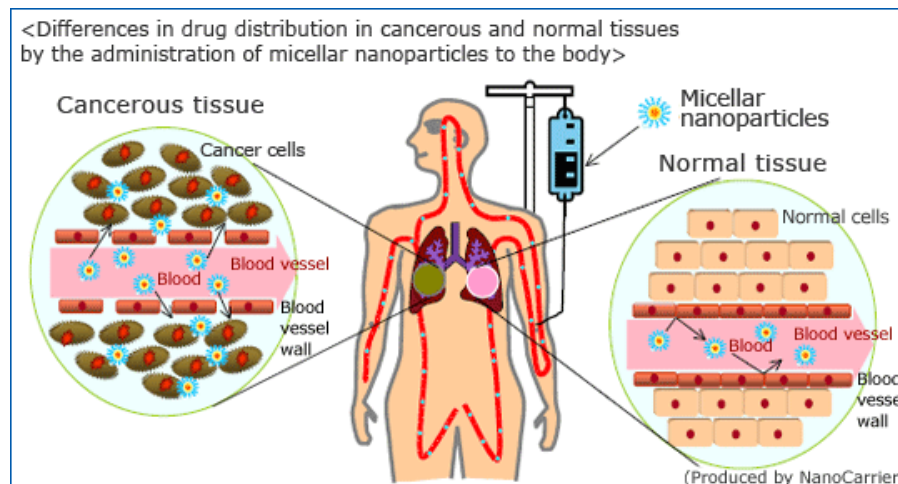
# Nanobiotechnology

## Pesticide administration through nanocarrier



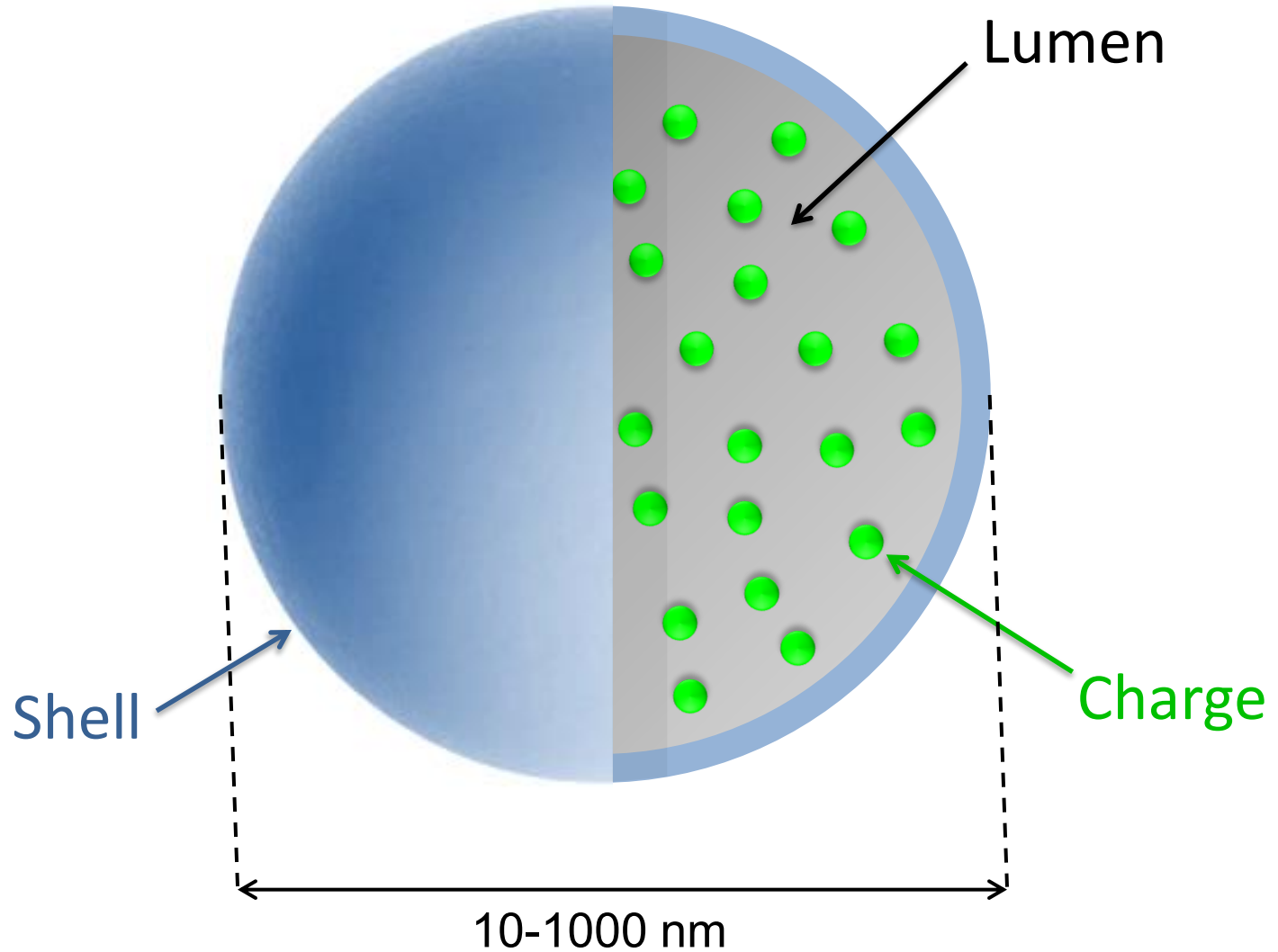
An important application of nanobiotechnology is the use of nanocarriers for the delivery of bioactive compounds

Up today, the nanobiotechnology has been studied mainly in biomedical field



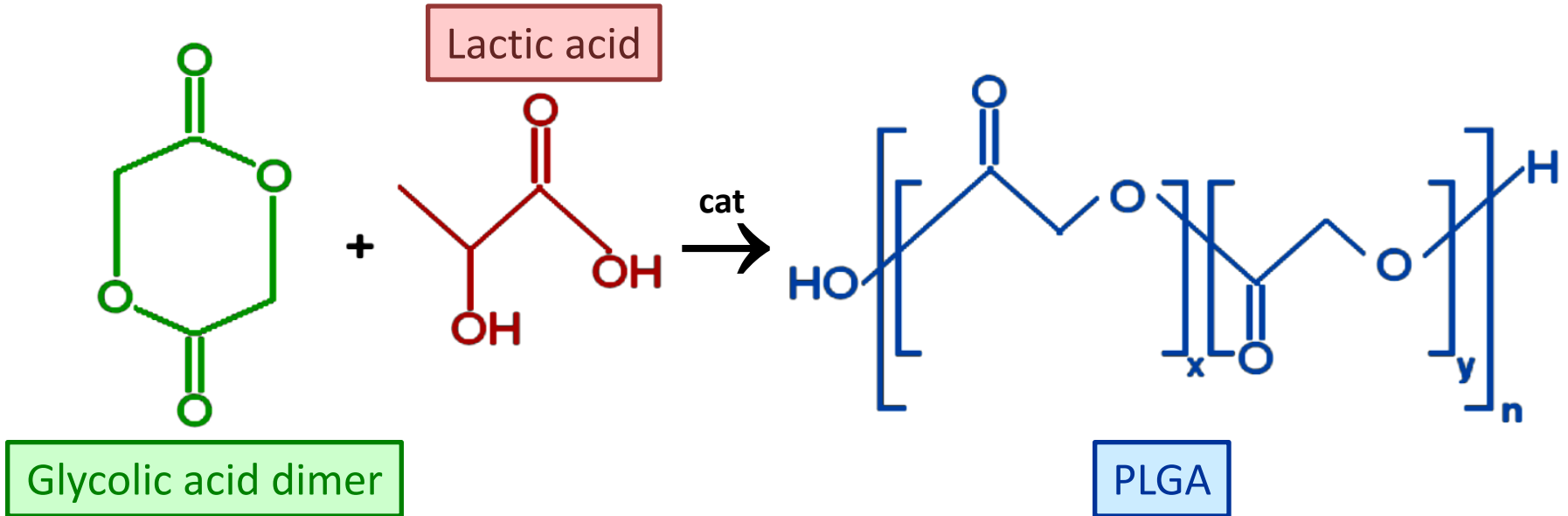
# Nanoparticles

## Polymeric nanocapsules



# The biopolymeric shell

## PLGA [Poly(Lactic-co-Glicol Acid)]



**Biocompatible**

**Approved by FDA for medical purpose**

**Biodegradable**

**Atoxic**

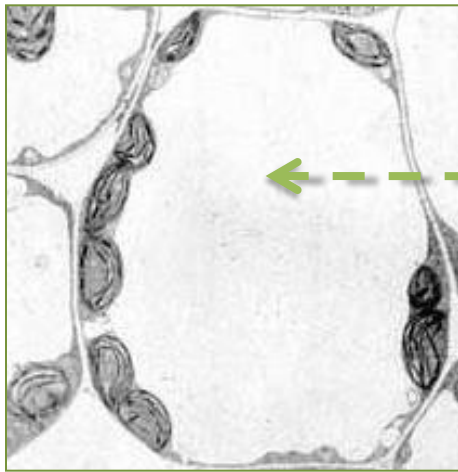
**Ecofriendly**

**Recognized as safe for humans by WHO**

# Cellular uptake

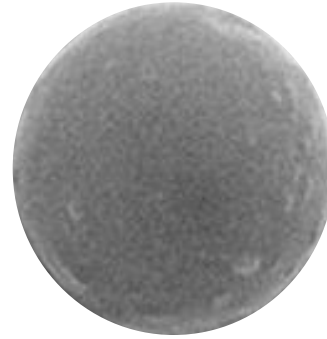


Are NPs able to cross the cell wall and the cell membrane?



Plant cell

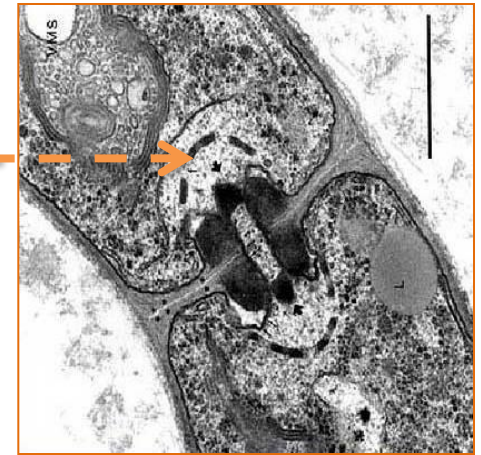
Schrade et al. 2013



?

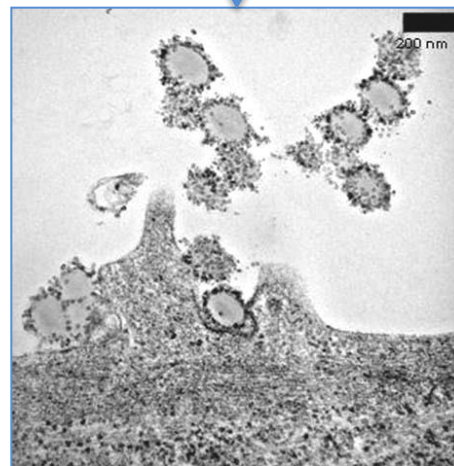


?



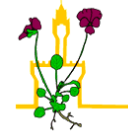
Fungal cell

Macromolecular Bioscience  
12: 1459-1471

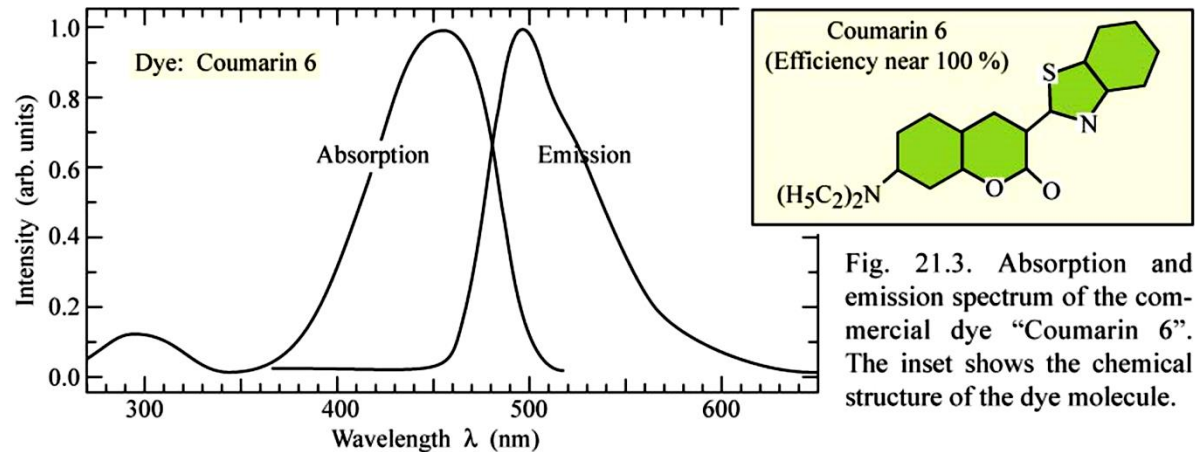
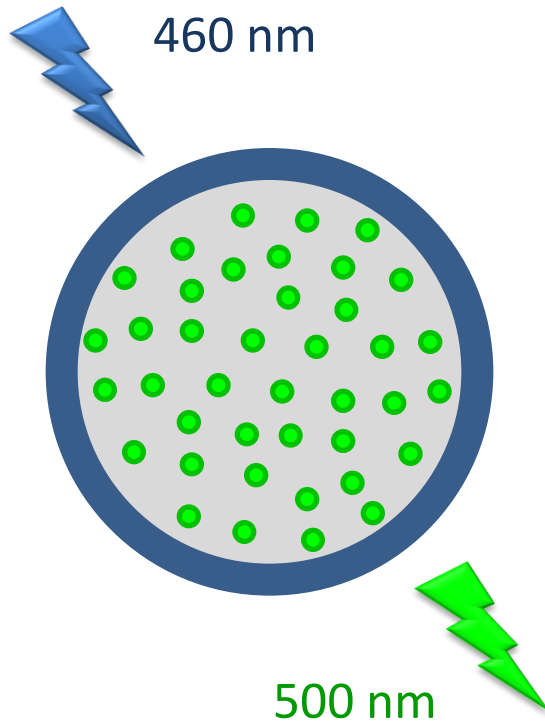


Animal cell

# Cellular uptake



Are NPs able to cross the cell wall and the cell membrane?

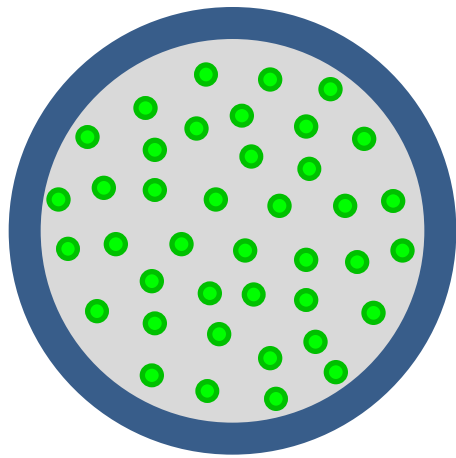


NP tagged with the high fluorescent probe coumarin-6

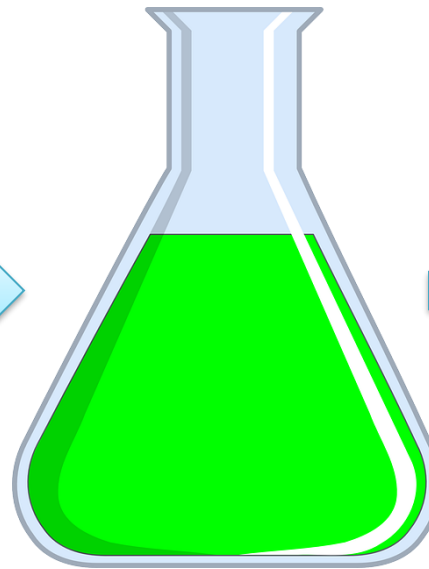
## Cellular uptake



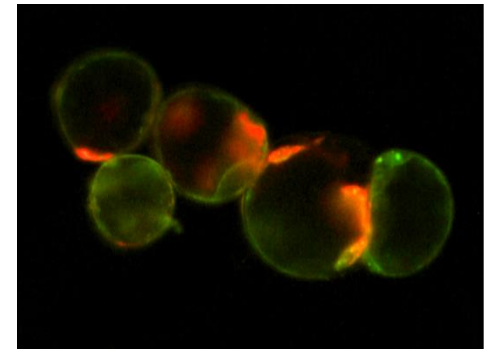
Are NPs able to cross the cell wall and the cell membrane?



NP tagged with a fluorescent probe

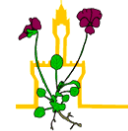


NP administration to grapevine cell cultures

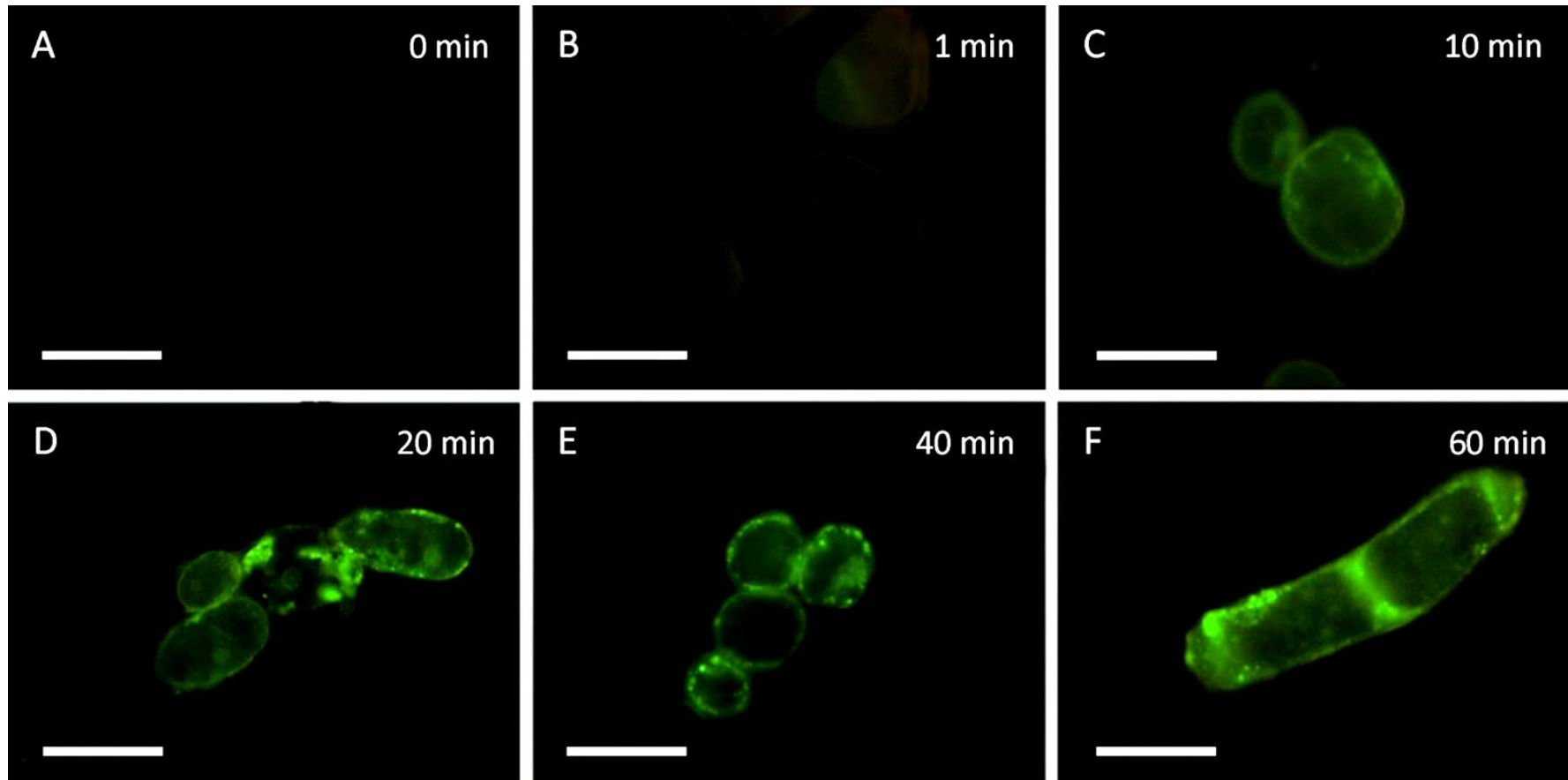


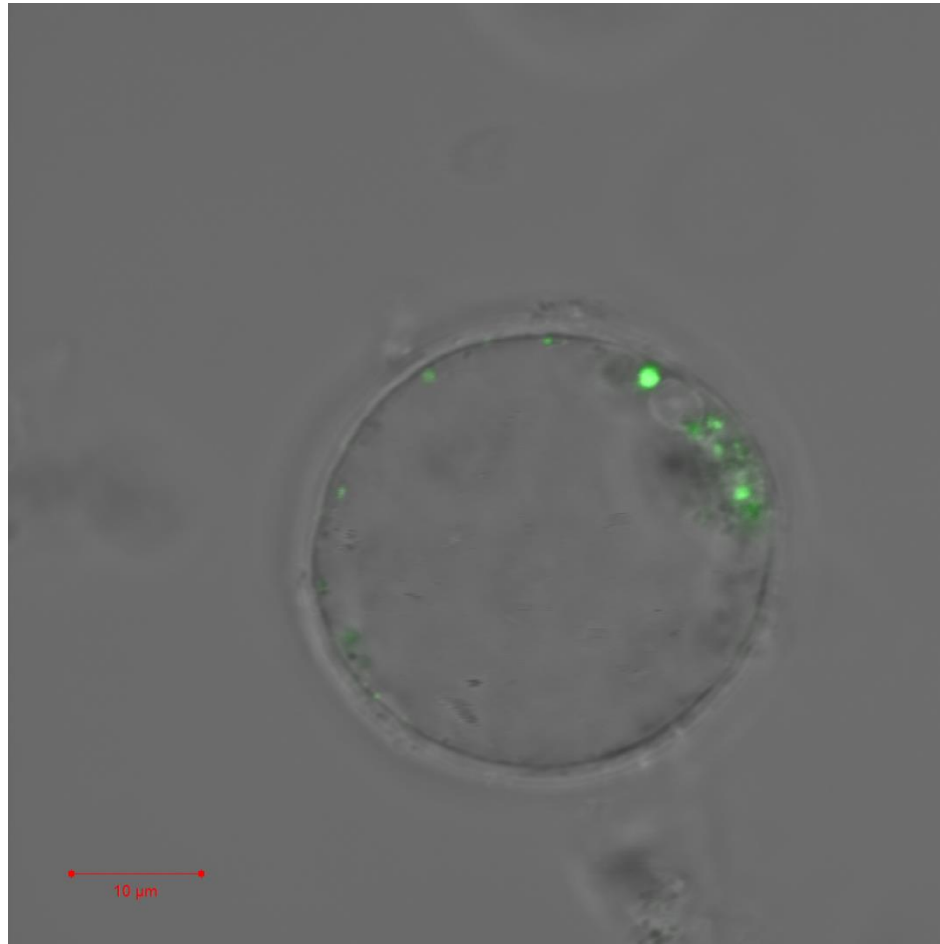
Fluorescence analysis

# PLGA-6-coumarin-NPs in grapevine cell suspension



- NPs cellular uptake starts few minutes after the administration
- Little fluorescent bodies begin to be visible after 5-10 minutes
- Later on, an increase in size of fluorescent bodies can be observed

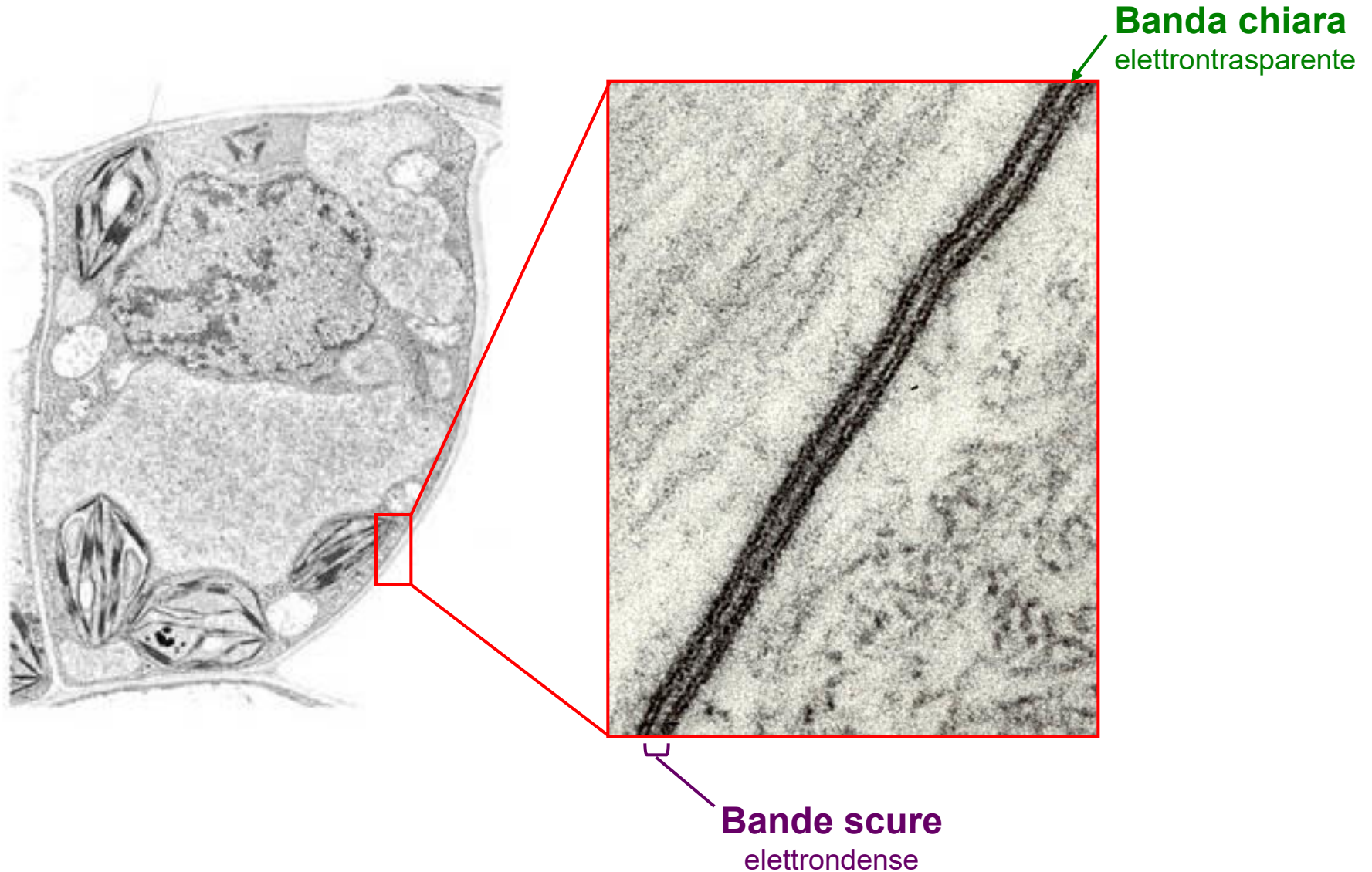


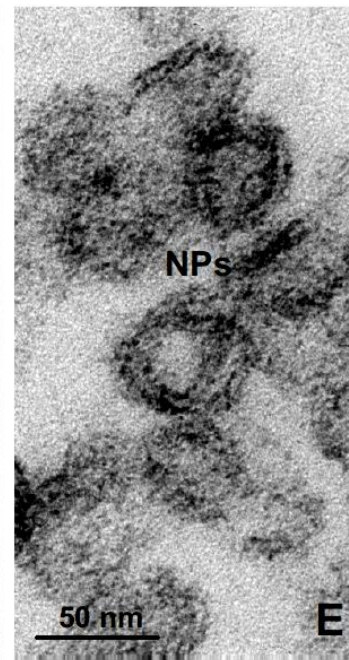
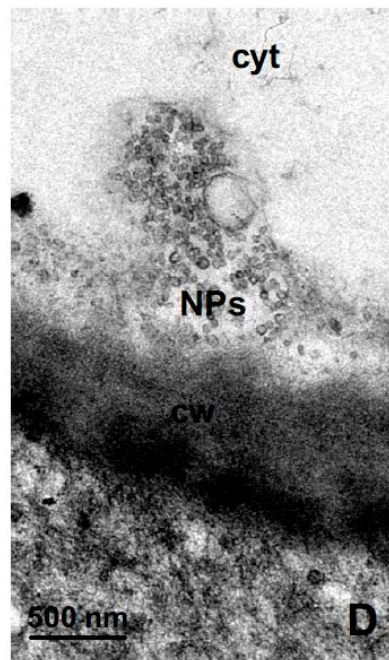
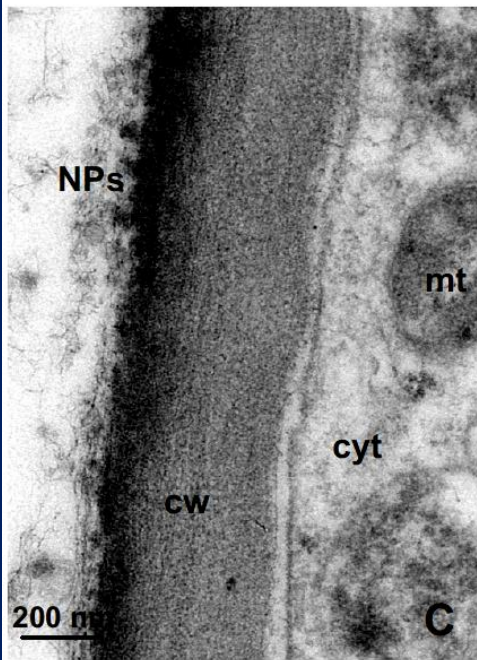
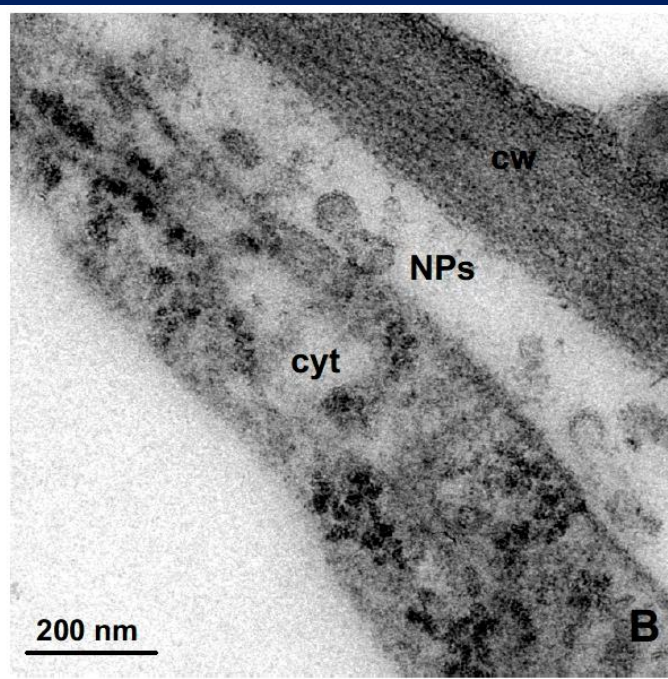
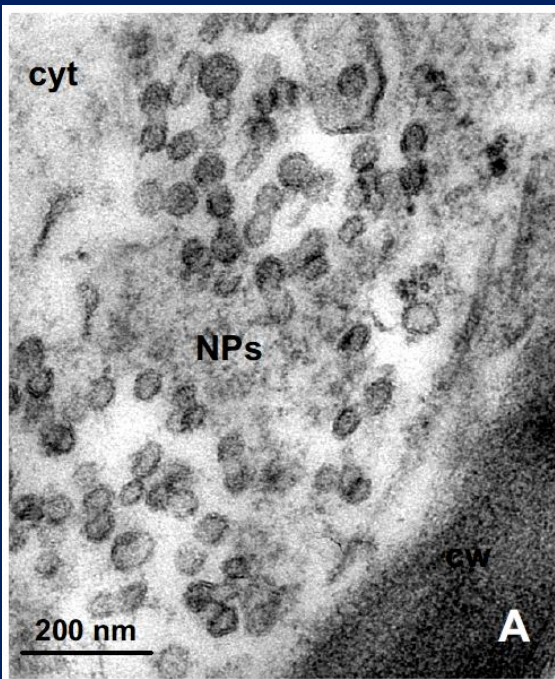


24 h dalla somministrazione delle NPs, le cellule sono state visualizzate al microscopio confocale e si è osservata la presenza di corpi sferici fluorescenti. Le NPs risultano stabili nel tempo (24 ore) nella cellula vegetale, non vengono degradate e non sono destinate al vacuolo litico.

# MEMBRANA CELLULARE

Al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)





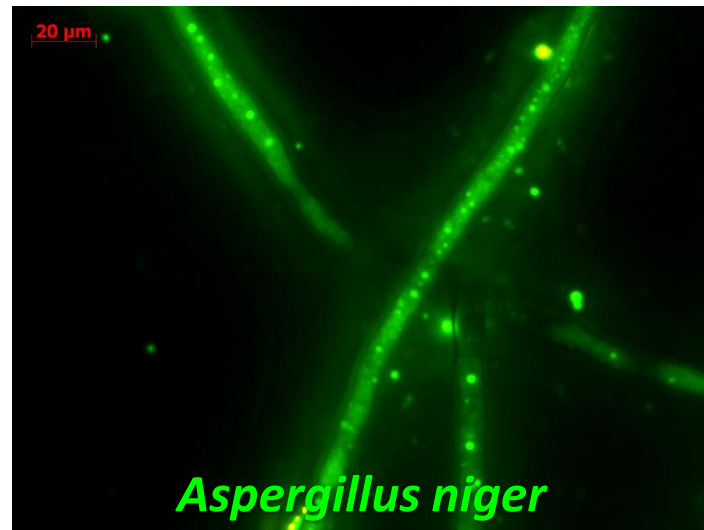
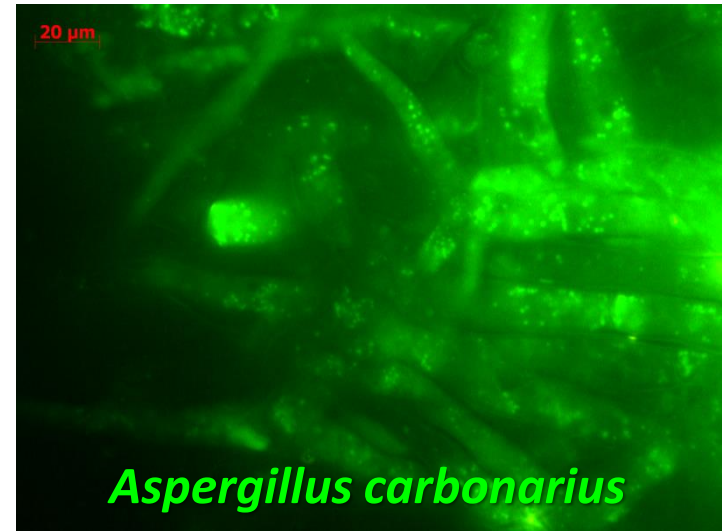
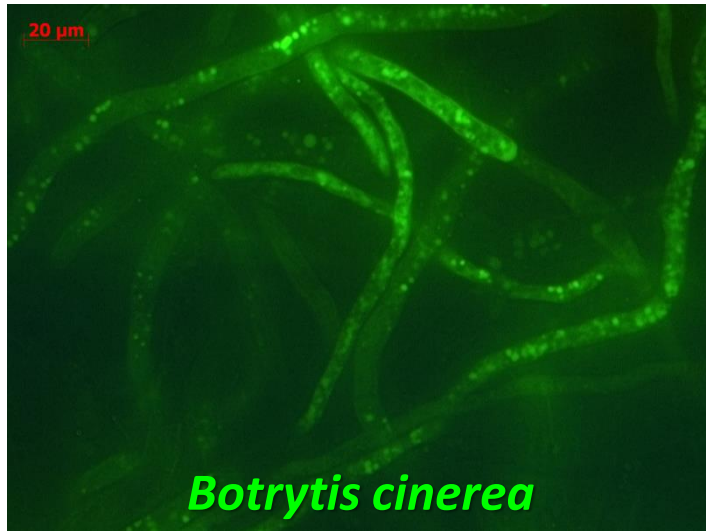
**Ultra-thin  
sections (TEM) of  
*Vitis vinifera* in  
vitro cultured  
cells**



# PLGA-6-coumarin-NPs uptake by fungal mycelia

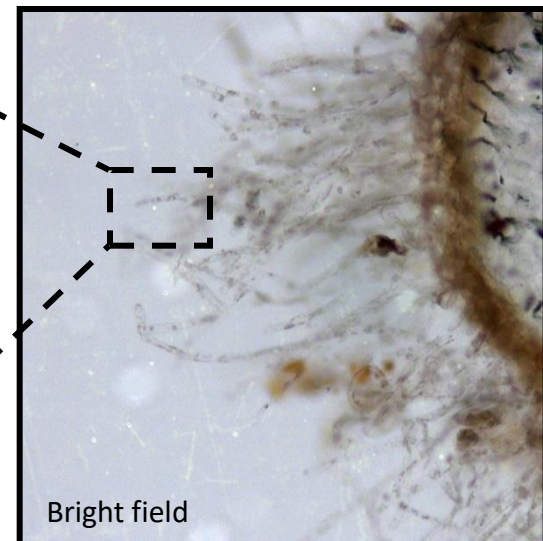
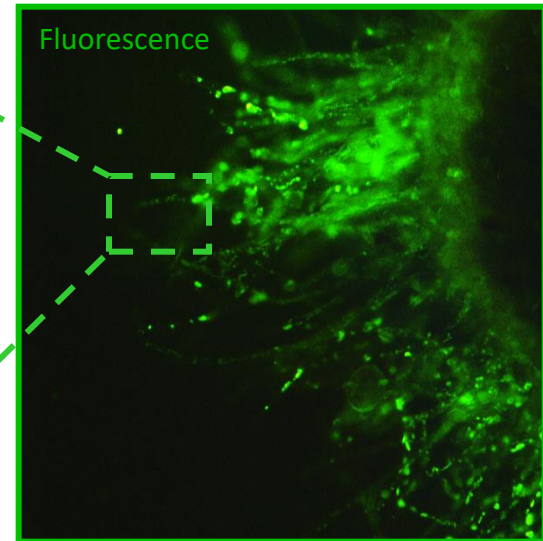
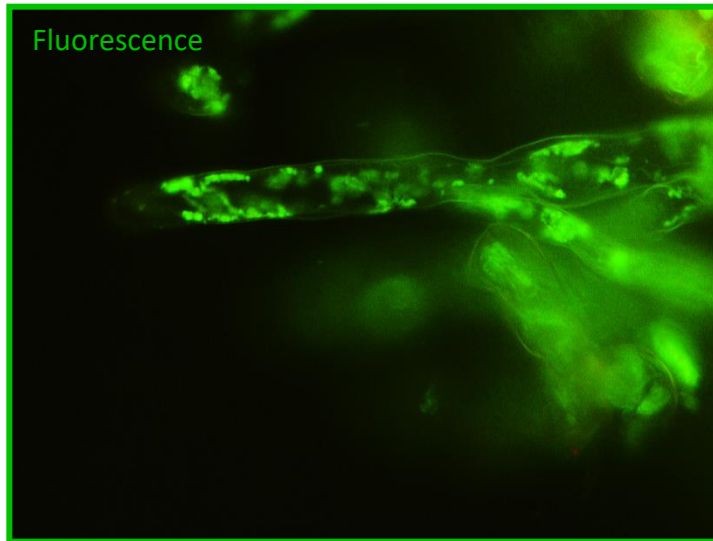


10 min - 2 h



# PLGA-6-coumarin-NPs in grapevine *in vitro* plantlets

Roots at 1-3 h





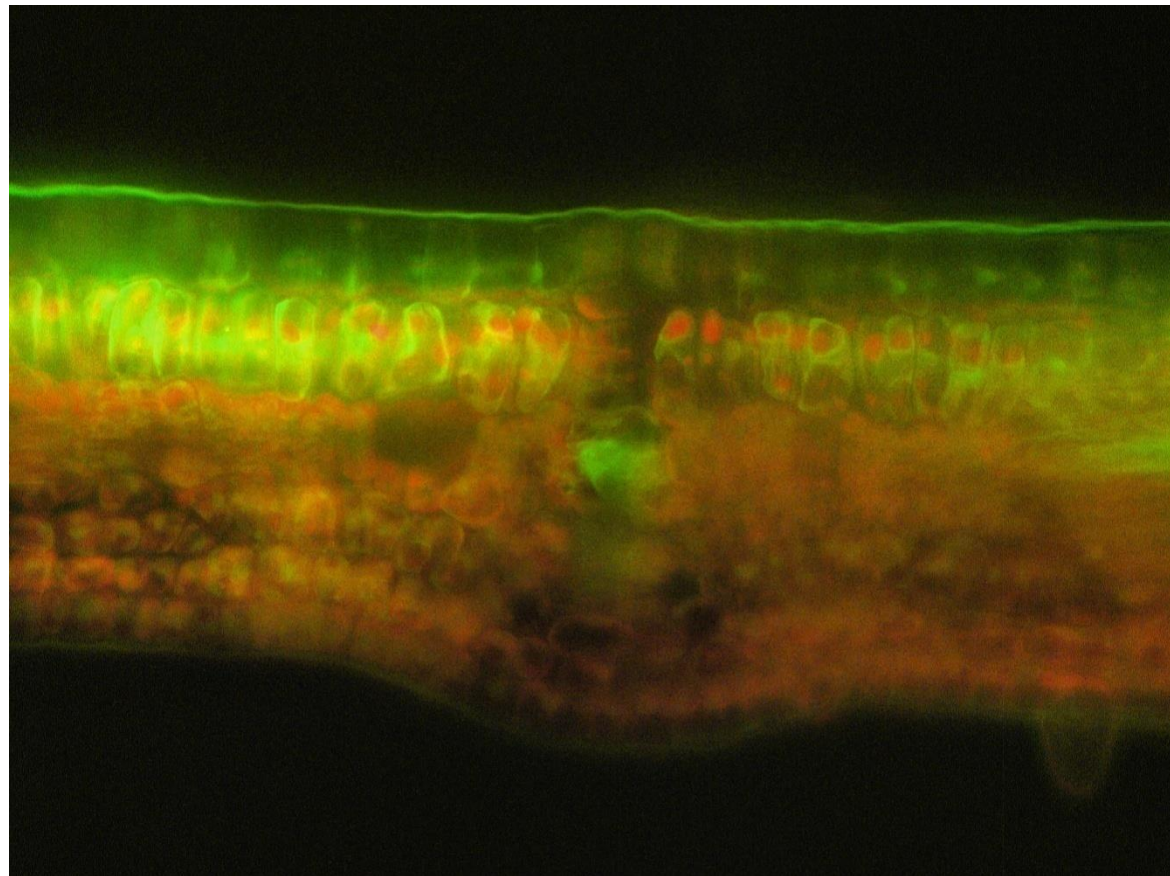
# PLGA-6-coumarin-NPs in grapevine *in vitro* plantlets



Leaf incubated in a solution containing NPs

After 24 hours NPs spread throughout the mesophyll and concentrate preferentially in the palisade parenchyma

-----  
Adaxial epidermis  
-----  
Palisade parenchyma  
-----  
Spongy parenchyma  
-----  
Abaxial epidermis  
-----





# PLGA-6-coumarin-NPs in grapevine *in vitro* plantlets



Roots at 48 h

