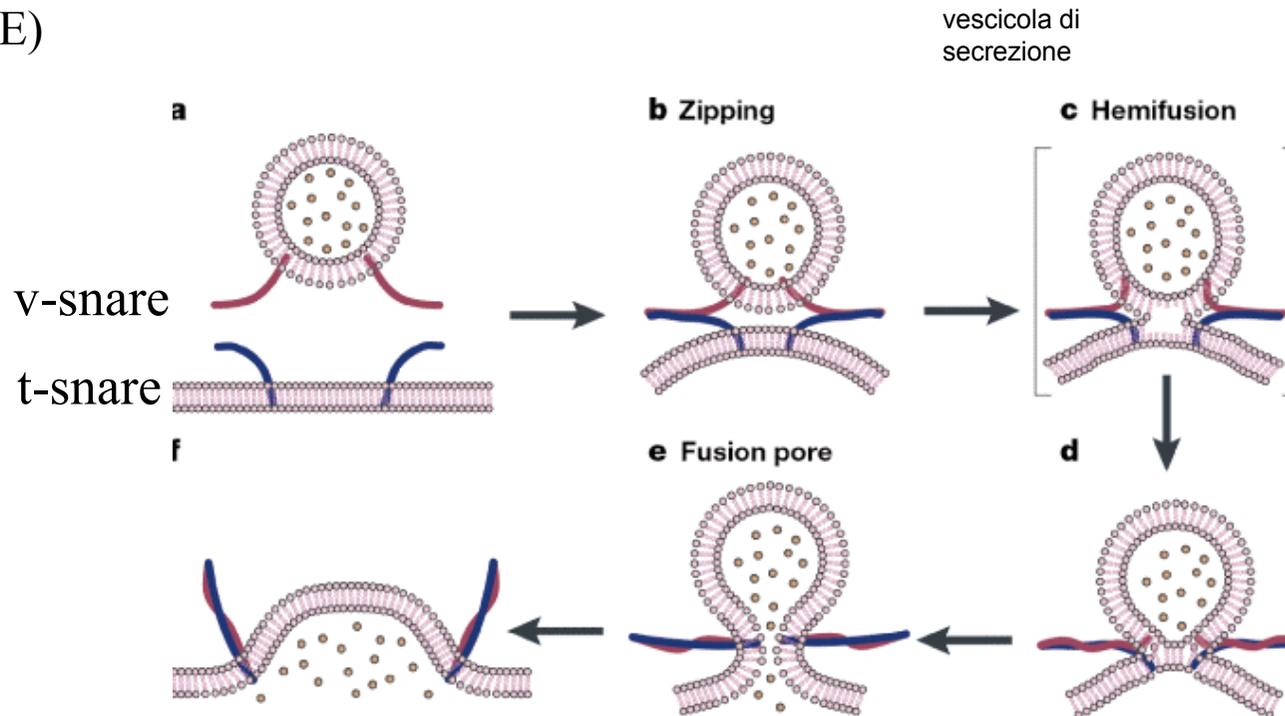
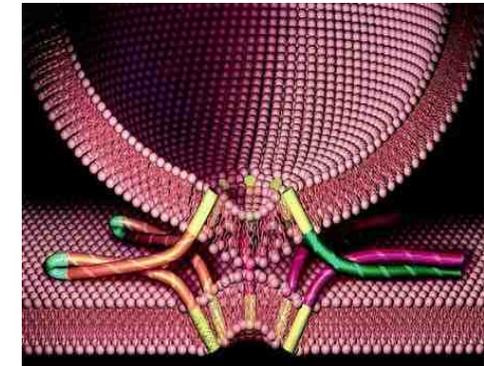
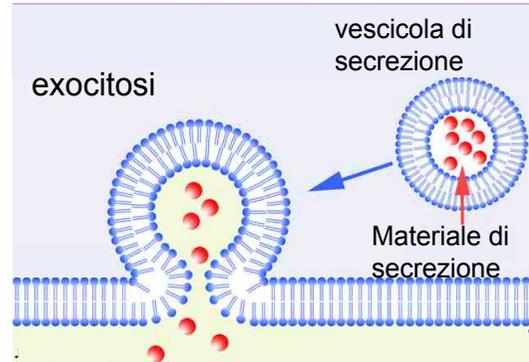




# Exocitosi

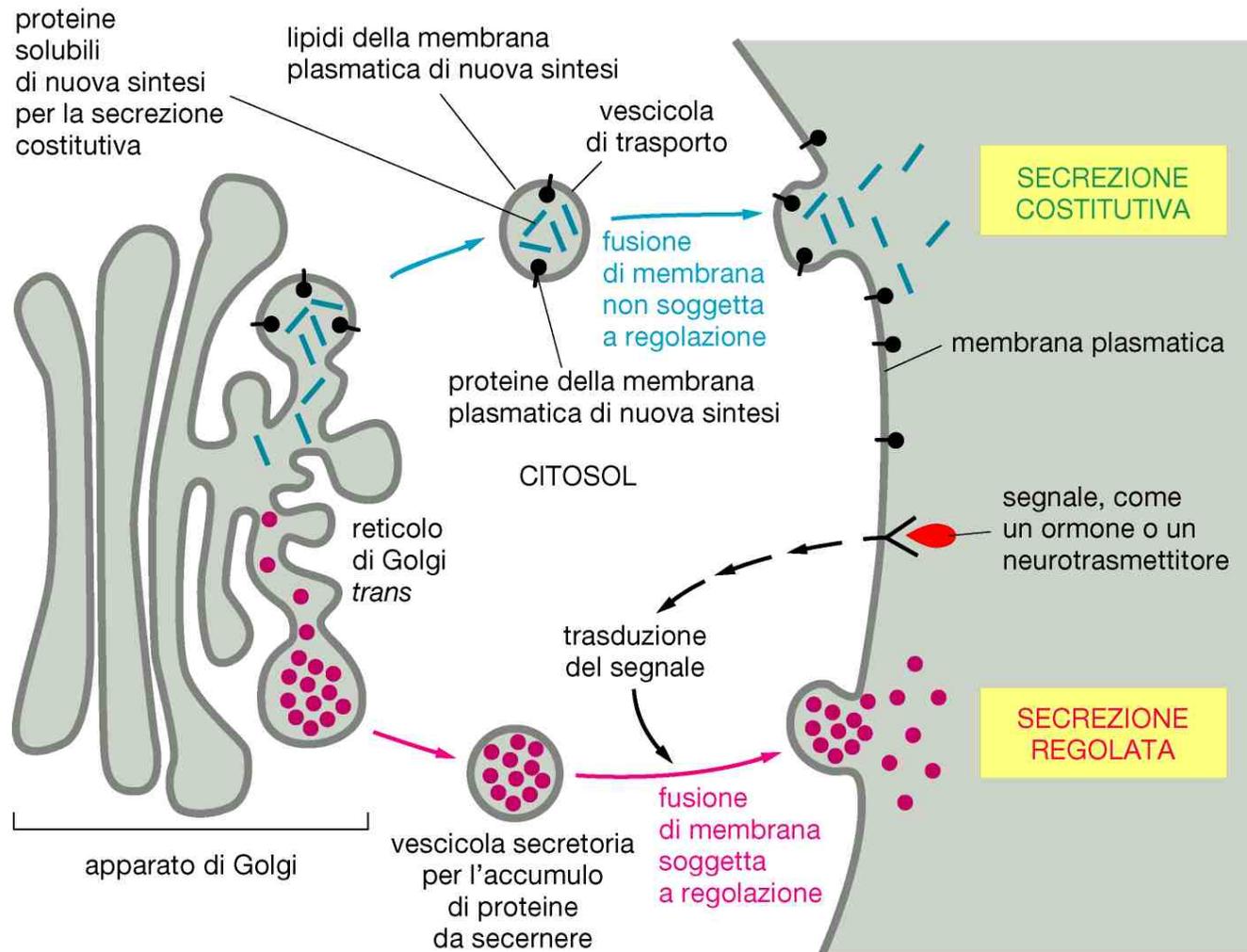
Interazione tra proteine SNARE vescicolari (v-SNARE) e proteine SNARE del compartimento target (t-SNARE)



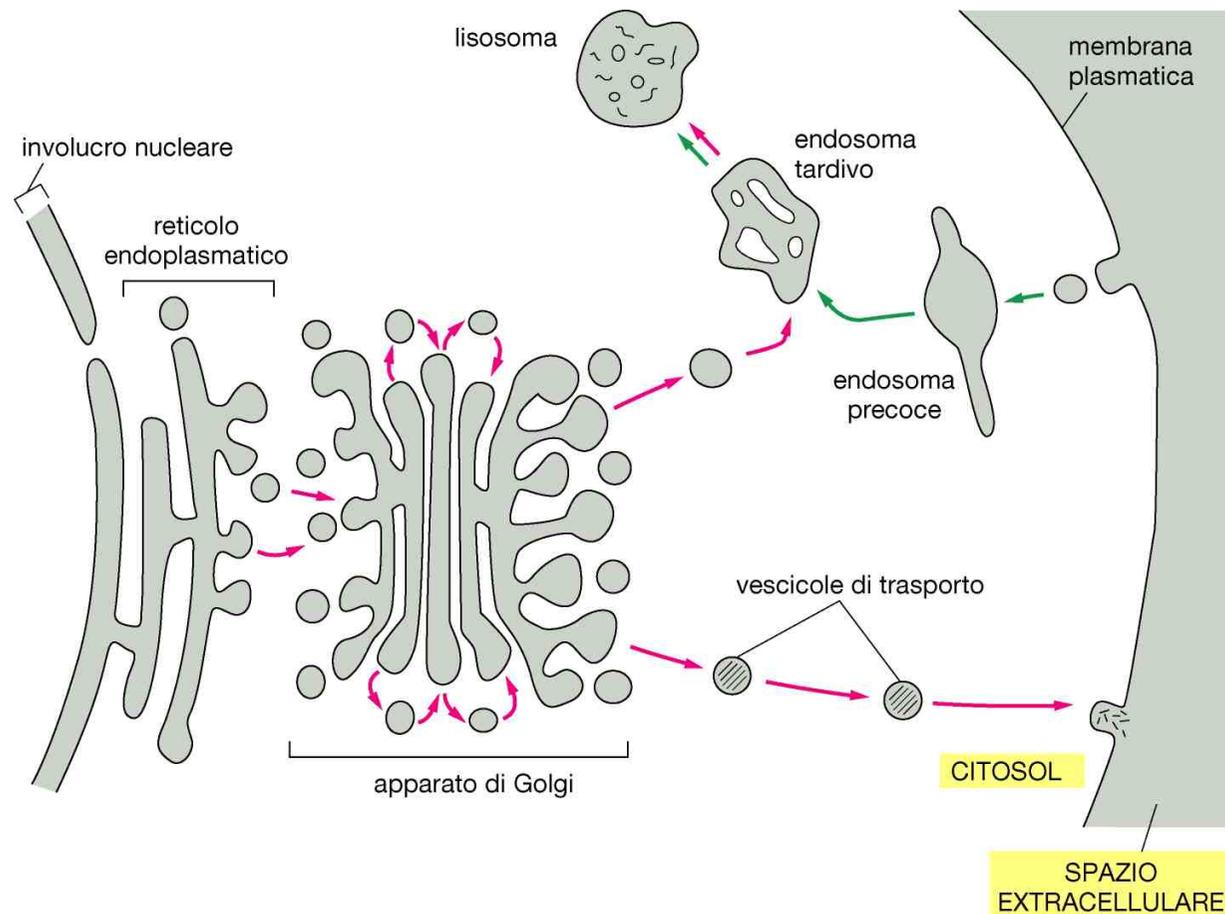
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

13\_bct\_2011

Se la fusione della vescicola con la membrana plasmatica non richiede ulteriori segnali regolativi, la secrezione è detta “costitutiva”; negli altri casi, le vescicole sono stoccate nella cellula e la fusione con la membrana plasmatica avviene soltanto in risposta a segnali di comunicazione cellulare.



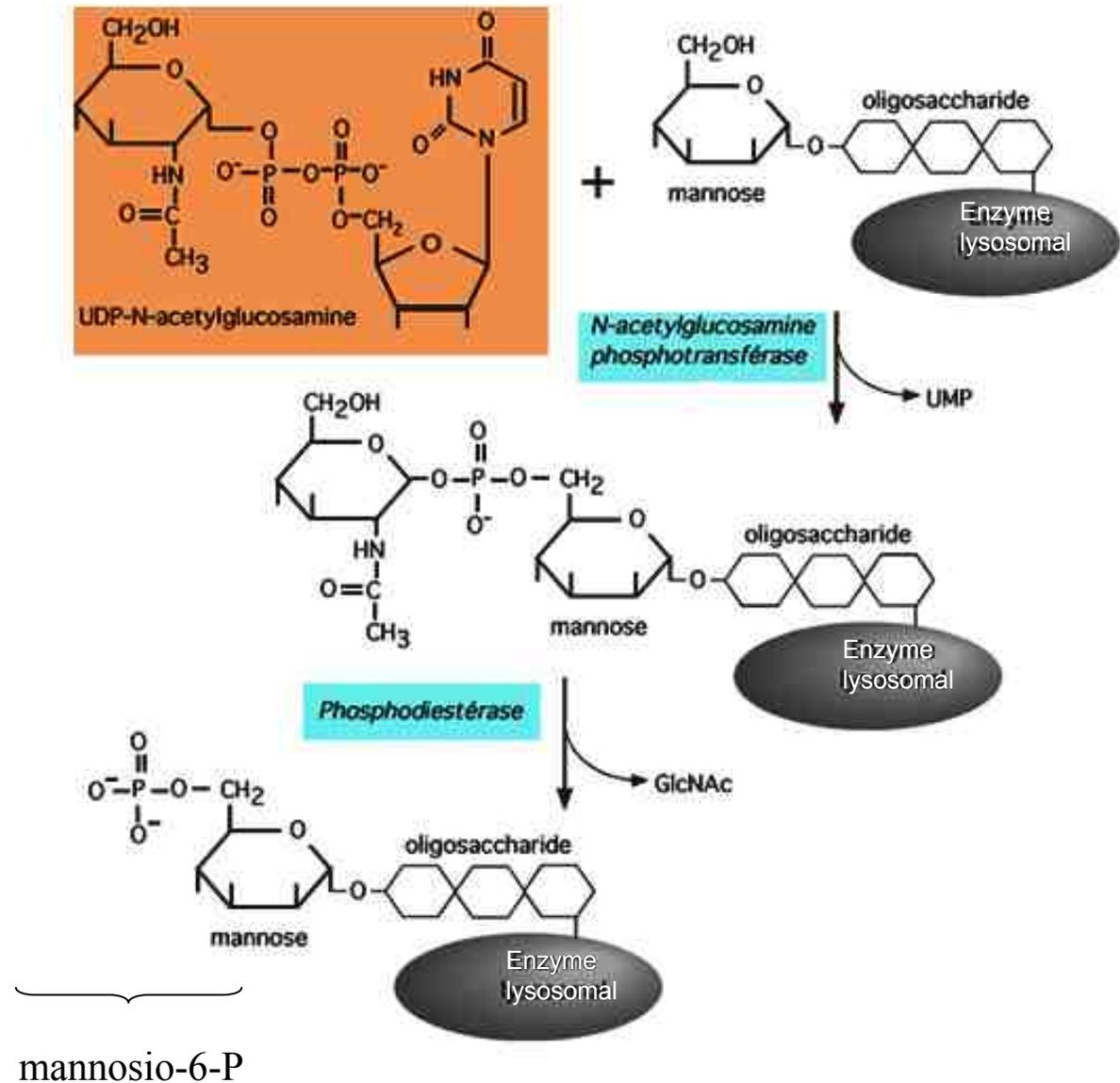
Oltre alle vescicole di secrezioni sono prodotte dal TGN vescicole precursori dei lisosomi: queste vescicole contengono specificamente gli enzimi lisosomali e sono rivestite di clatrina



## Smistamento degli enzimi lisosomali

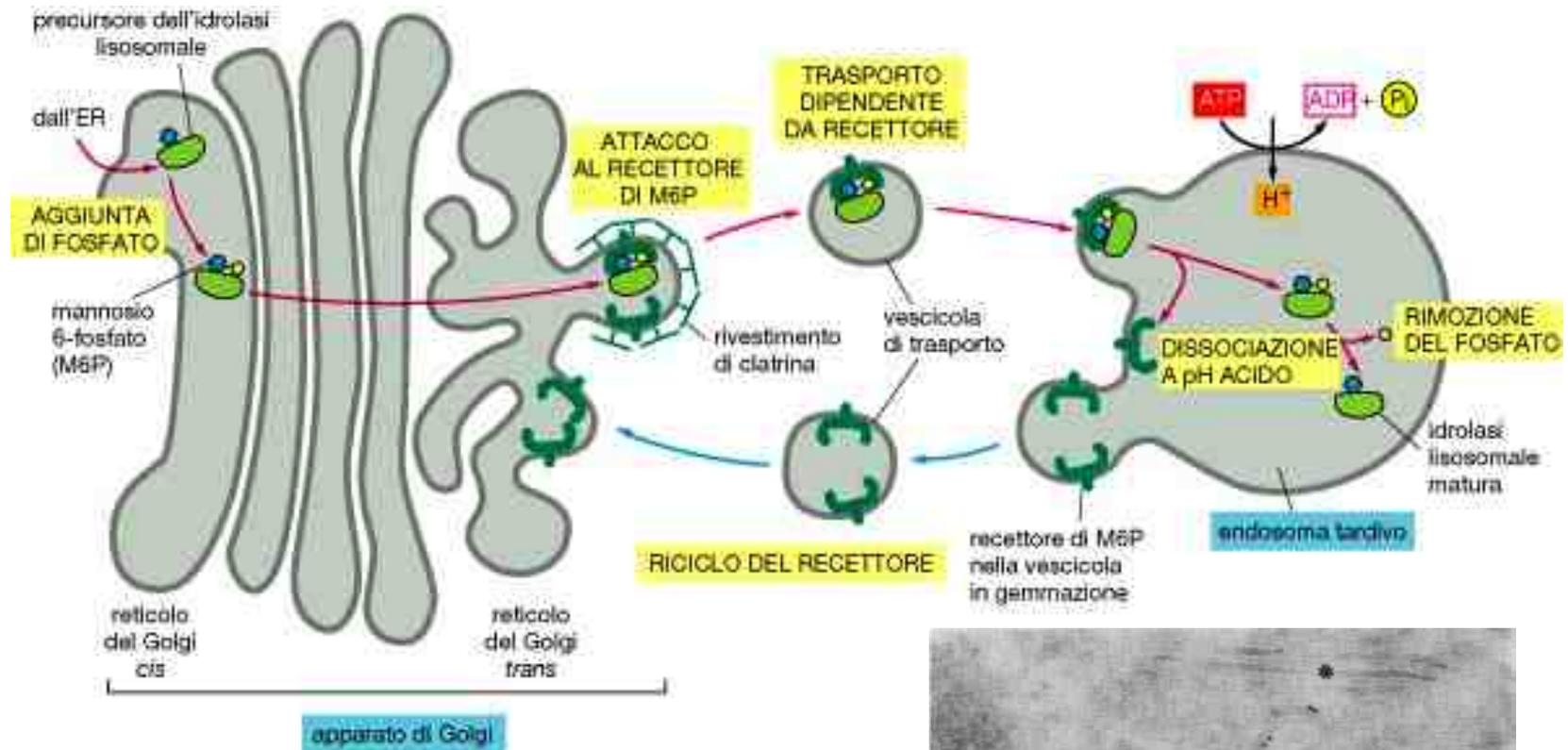
L'oligosaccaride legato a N del precursore dell'idrolasi lisosomiale, costruito nel RE, viene modificato nel reticolo del Golgi *cis*. Il segnale di smistamento degli enzimi lisosomali precursori consiste nell'aggiunta di un gruppo fosfato in corrispondenza del carbonio in posizione 6 del mannosio nel Golgi *Cis*.

Il mannosio-6-P sarà poi riconosciuto da specifici recettori transmembrana nel *Trans Golgi network* (TGN) che permetteranno l'indirizzamento degli enzimi lisosomali in specifiche vescicole.

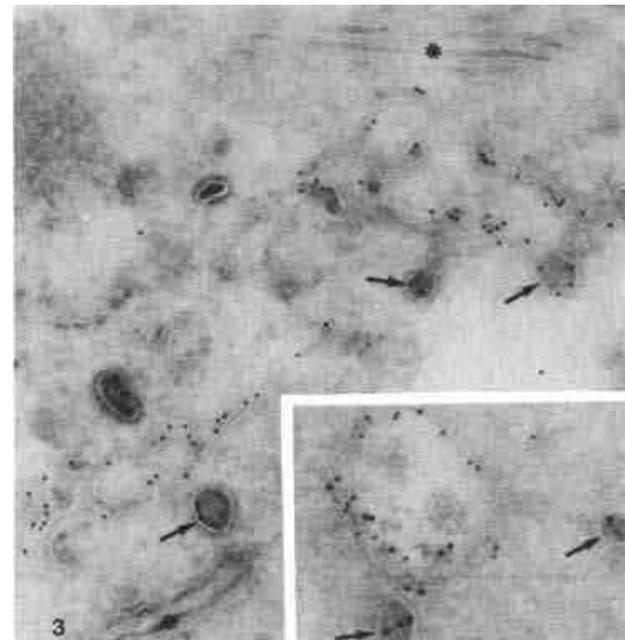


13\_bct\_2011

5



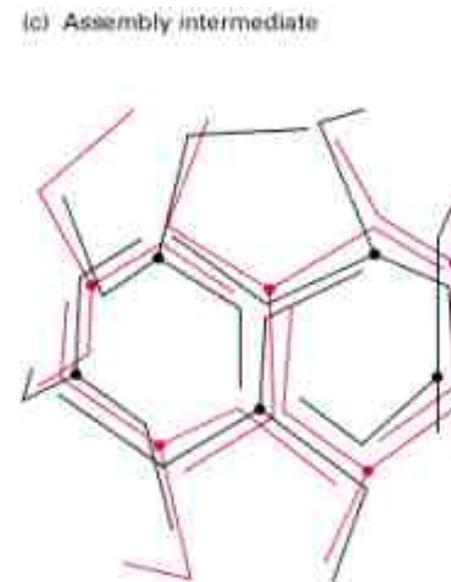
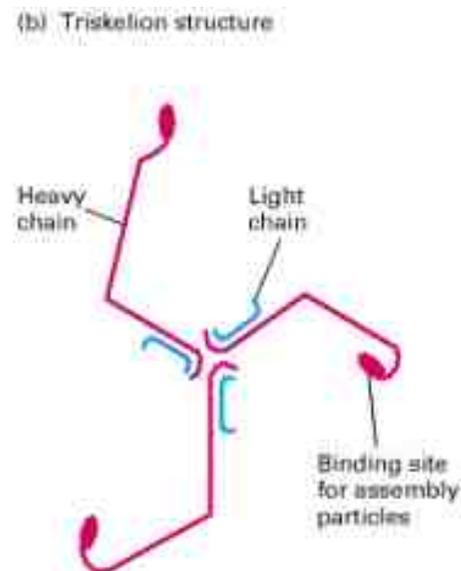
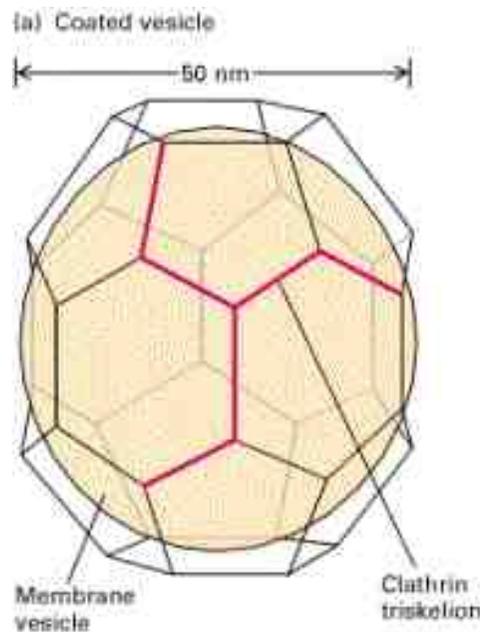
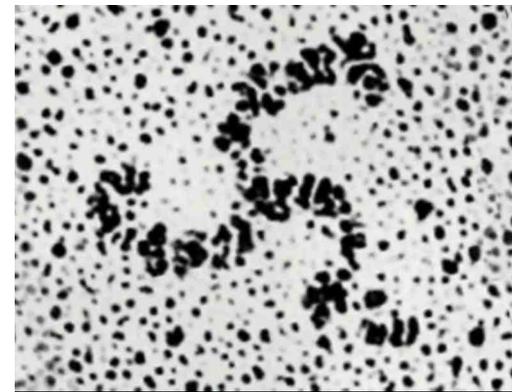
Immunogold con anticorpi anti mannosio-6-P



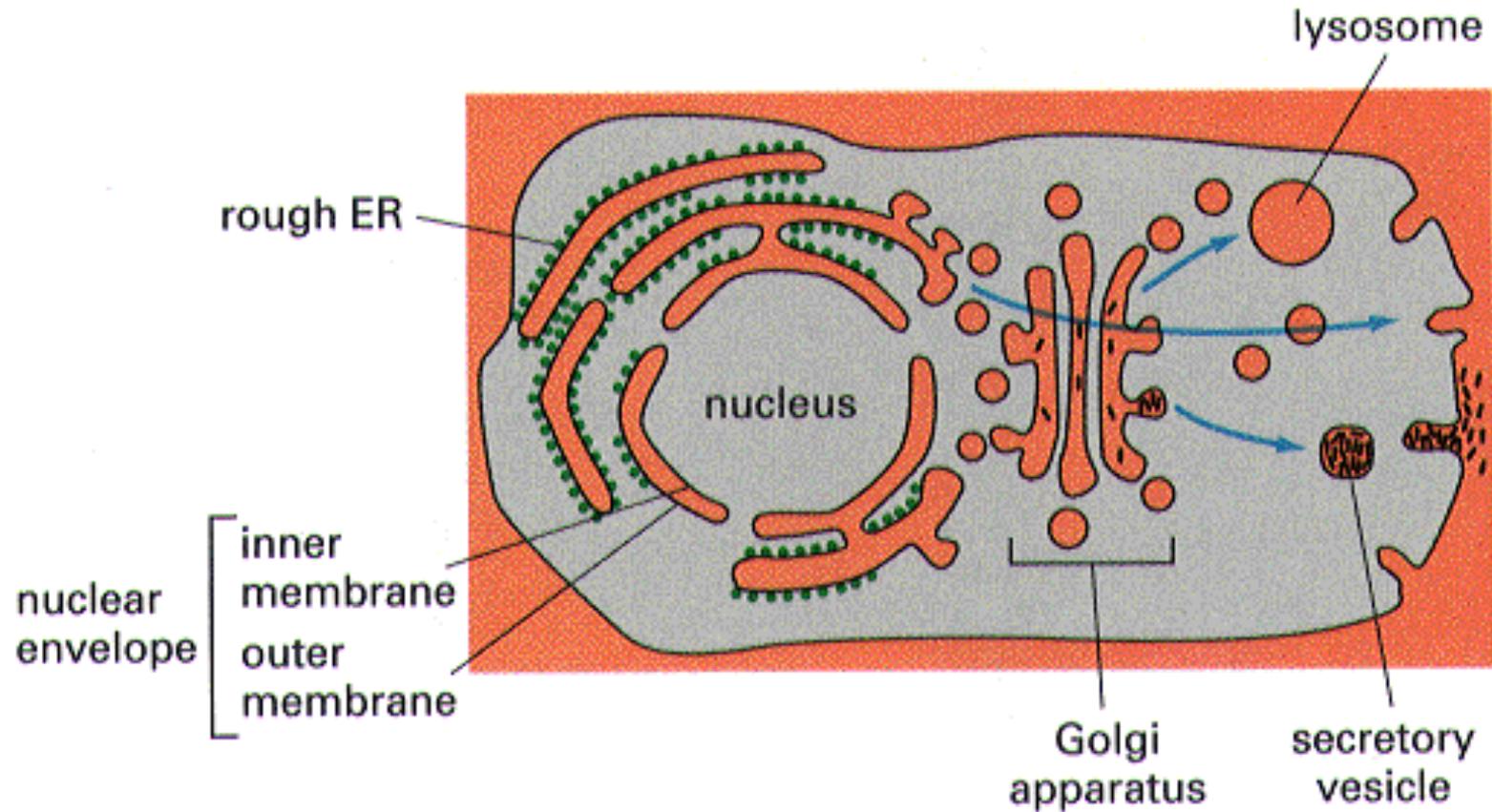
13\_bct\_2011

6

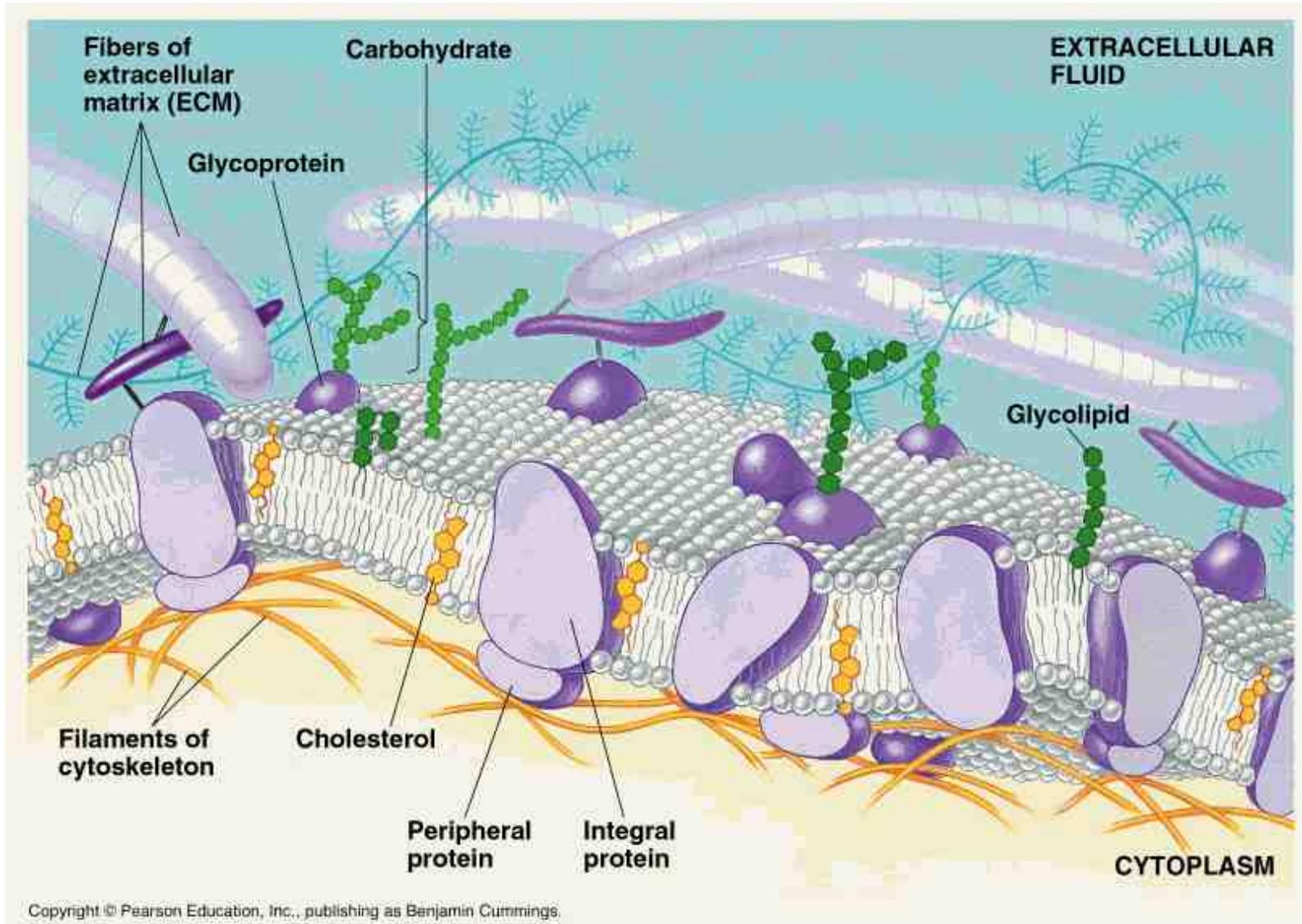
Il ruolo della clatrina è simile a quello dei coatomeri COP I e COP II  
L'associazione delle molecole di clatrina catalizzata dalla presenza di molecole ARF-GTP deforma la membrana del TGN e favorisce la formazione della vescicola. Una volta formata la vescicola ricoperta di clatrina, l'idrolisi del GTP permette il rilascio di ARF-GDP e della clatrina lasciando la vescicola "nuda"



## Continuità dei compartimenti intracellulari con lo spazio extracellulare

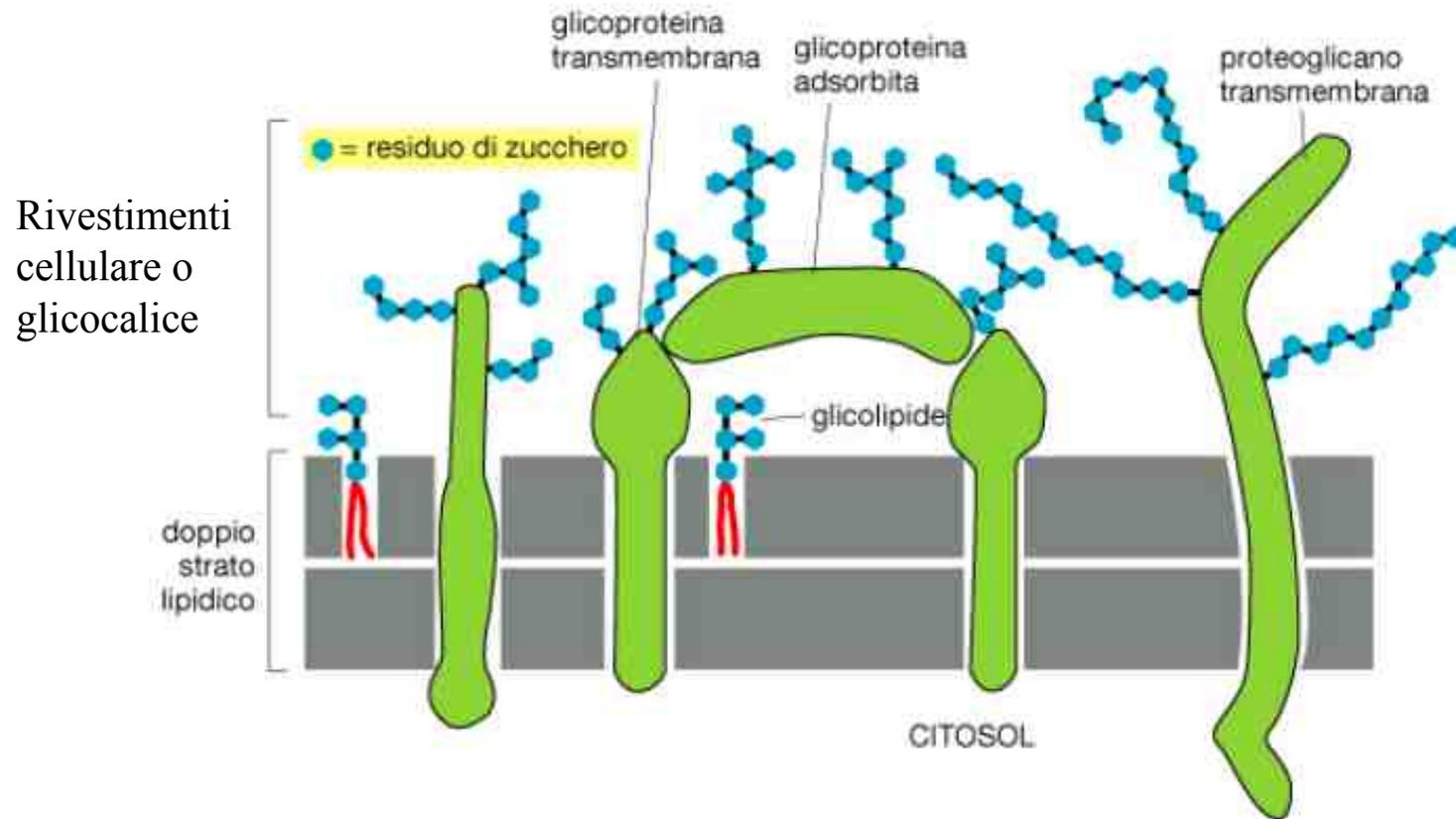


# La membrana plasmatica



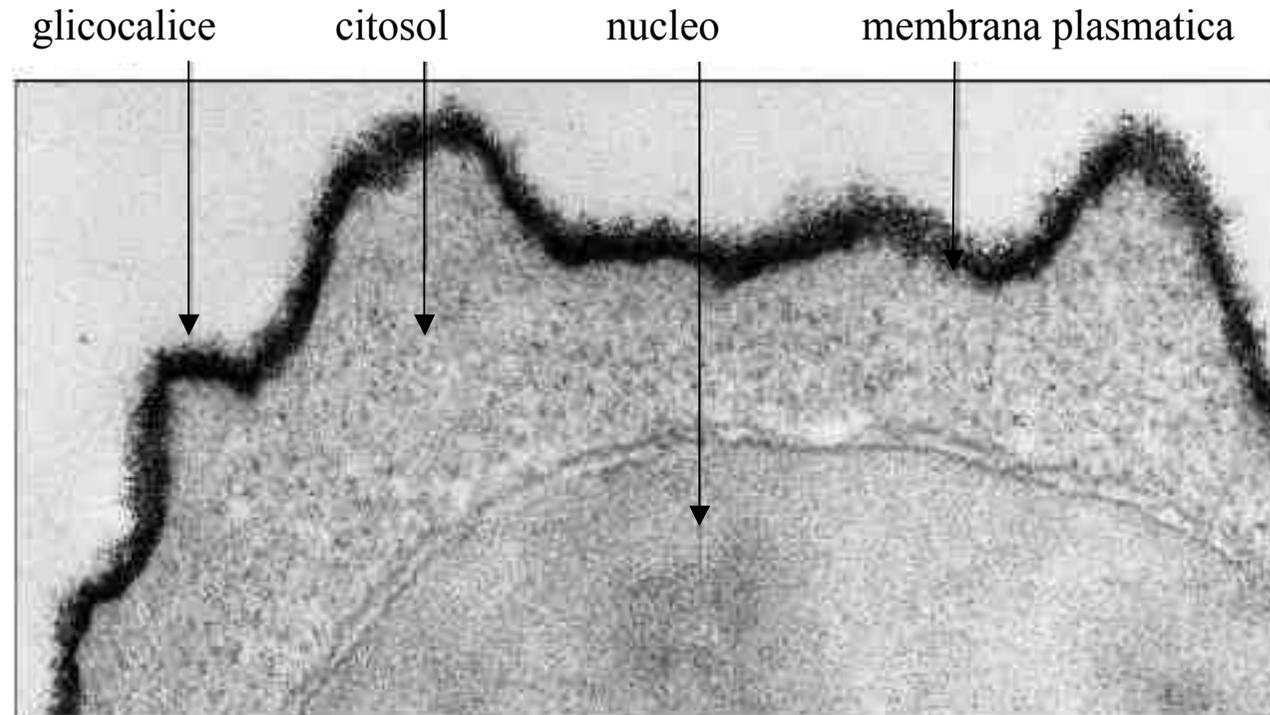
# il glicocalice

La superficie esterna della membrana è solitamente rivestita di numerose molecole di zucchero. La composizione e la quantità di zuccheri è estremamente variabile e dipende dal tipo di cellula



## Il rivestimento cellulare o glicocalice

Nella membrana plasmatica la maggior parte delle proteine esposte sulla superficie cellulare e i lipidi dello strato esterno hanno catene di oligosaccaridi legate covalentemente; le membrane plasmatiche contengono anche catene integrali di proteoglicani con catene polisaccaridiche esposte verso la superficie (I proteoglicani sono composti da catene di GAG, glicosamminoglicano, unite covalentemente ad una proteina)



Micrografia elettronica di un linfocita che evidenzia lo spesso strato di carboidrati che circonda la cellula. 200 nm

I carboidrati di membrana sono generalmente dei polimeri ramificati che comprendono galattosio, N-acetilgalattosamine, N-acetilglucosamine, fucosio, mannosio e acido sialico e sono covalentemente legati a proteine e lipidi di membrana esposti verso lo spazio extracellulare. La composizione esatta è sepecificia dei diversi tipi cellulari e può variare in funzione delle condizioni di differenziamento o in risposta a specifici segnali.

Alcune delle catene oligosaccaridiche sono riconosciute da proteine (lectine) che legano carboidrati di membrana che aiutano a mediare eventi di adesione cellulare.

**Mucine:** Mucoproteine ad elevato peso molecolare che formano un biofilm protettivo sulla superficie delle cellule epiteliali dove forniscono una barriera contro la materia particolata e i microorganismi. Le mucine ancorate alle membrana possono avere ruoli aggiuntivi che riguardano le interazioni proteiche che si svolgono sulla superficie cellulare

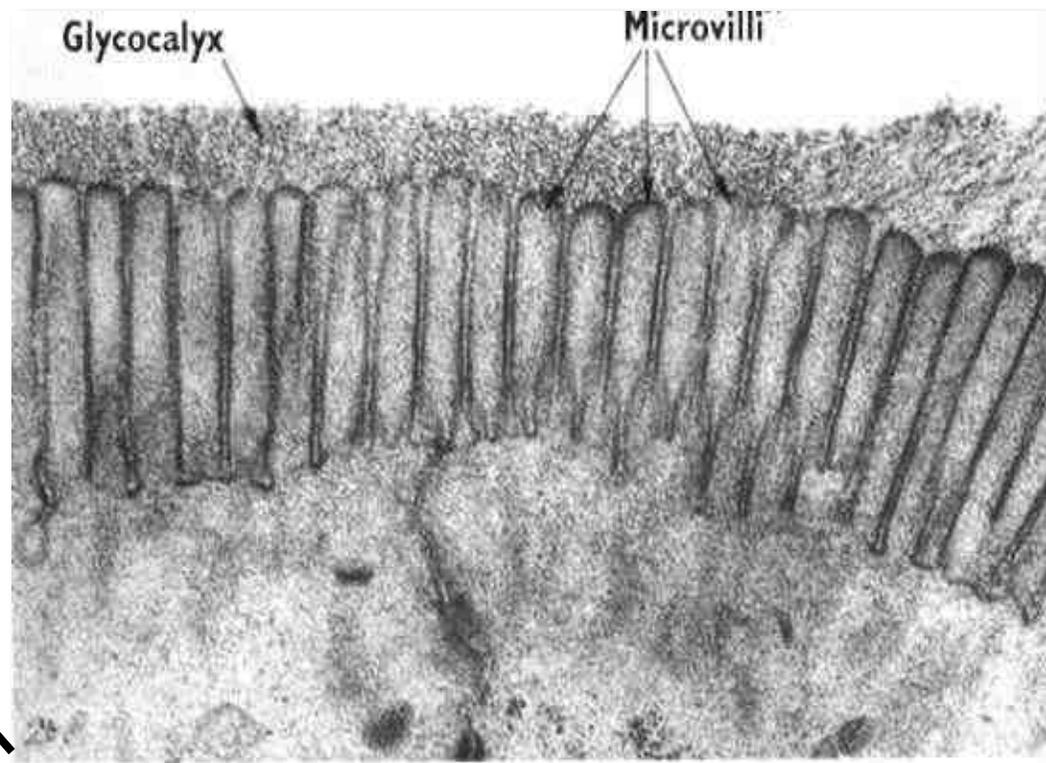
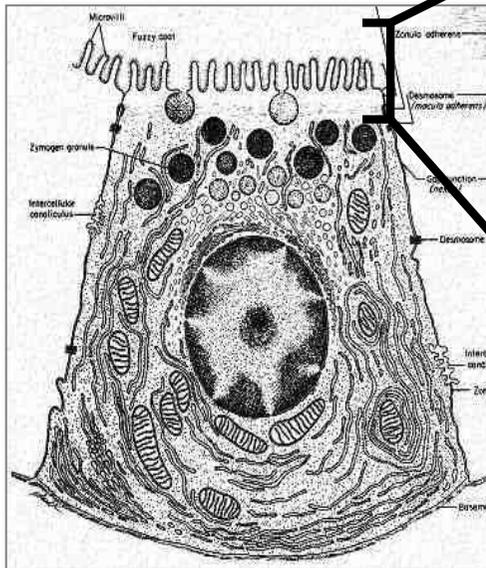
Epitelio intestinale bordato nella zona apicale degli enterociti dal glicocalice



Glicolalice che si affaccia sul lume intestinale 13\_bct\_2011

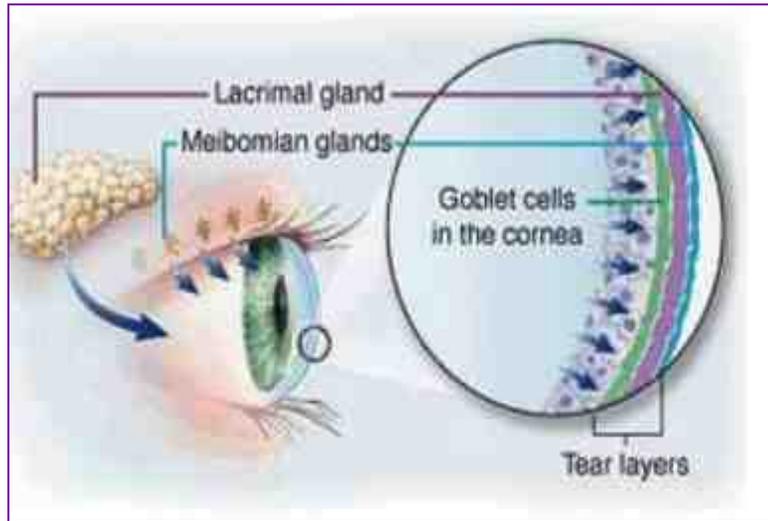


Questo rivestimento di zuccheri si pensa protegga la superficie cellulare da danni meccanici e chimici.





Ad esempio il glicocalice delle cellule epiteliali della cornea è fondamentale nel trattenere il film lacrimale acquoso



Strato lipidico

Umore acquoso  
Con mucine solubili

## Film lacrimale



Mucine solubili aderanti alle membrane

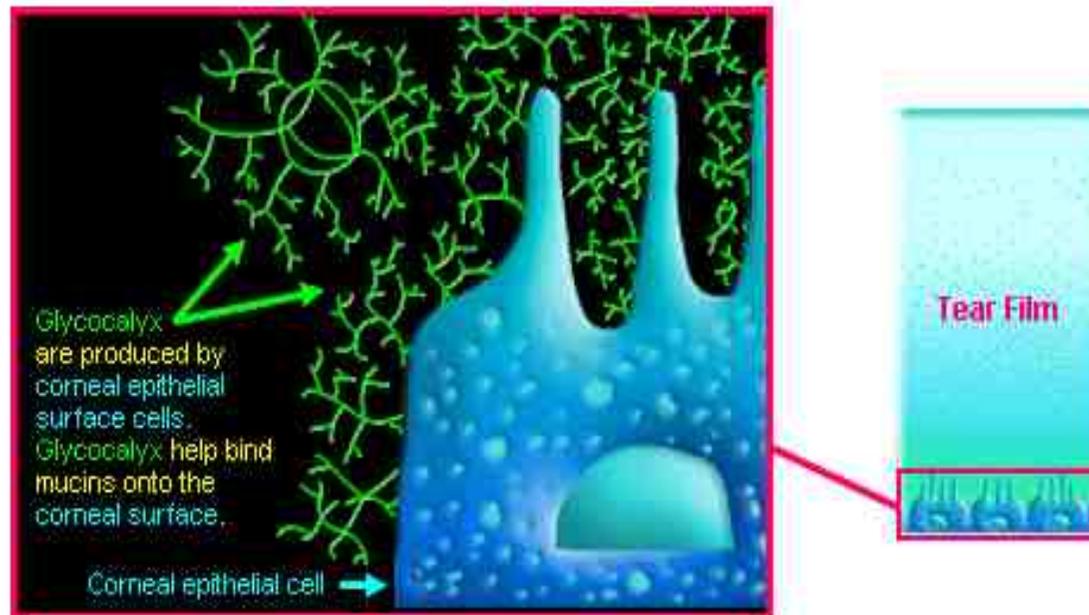
Cellule epiteliali della cornea

Il movimento palpebrale ripristina il film lacrimale acquoso della cornea



## The Role of the Epithelial Glycocalyx

**Glycocalyx** are long chain molecules formed by corneal cells that help hold mucin to the corneal surface. Holding mucin to the ocular surface creates a water attraction, as well as protection against bacterial pathogens.<sup>2</sup>



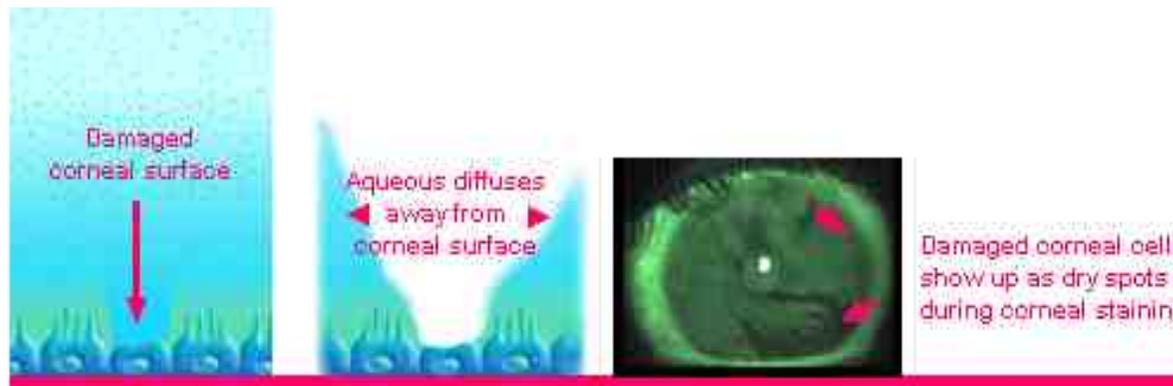
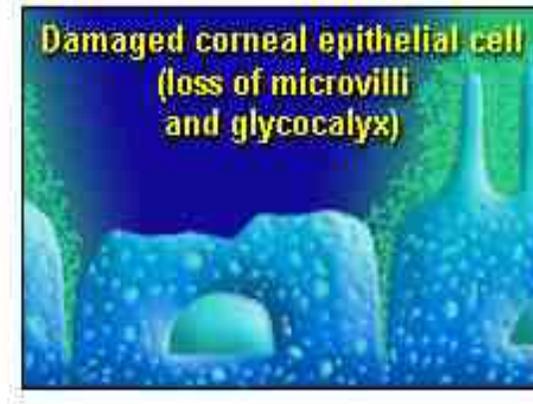
Since the corneal surface is naturally water repellent, damage to glycocalyx and corneal surface cells may be caused by insufficient mucin. This can cause the tear film to destabilize and break up before a blink can occur, exposing the injured cornea to the air and bacterial pathogens.

2. Korb DR, Craig J, Doughty M, Guillon J, Smith G, Tomlinson A. The Tear Film: Structure, Function and Clinical Examination. BCLA, 2002.



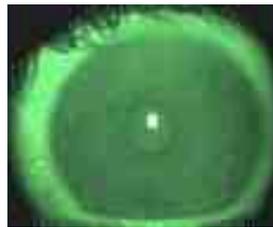
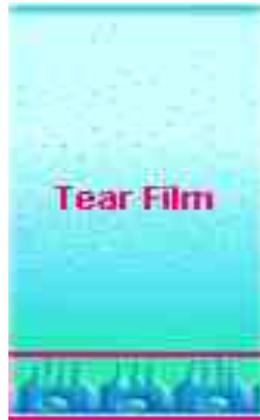
## Sindrome dell'occhio secco

Una conseguenza comune dell'instabilità del film lacrimale è l'essiccazione della superficie della cornea. Danni a carico delle cellule dell'epitelio corneale con perdita del glicocalice fa sì che le mucine del film lacrimale non sono trattenute e aumenta l'evaporazione delle molecole d'acqua provocando con l'interruzione del film lacrimale acquoso.





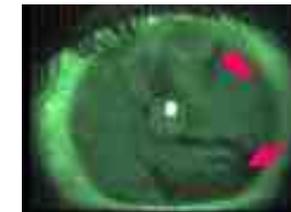
## Lacrimazione Normale



Danno alla  
superficie corneale



## Occhio secco

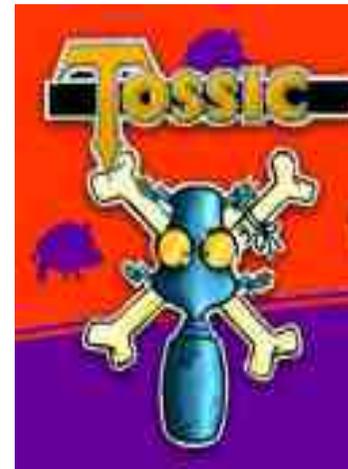




Un altro esempio del ruolo del glicocalice è rappresentato dal glicocalice dell'epitelio olfattivo che per motivi diversi può portare ad anosmia: raffreddore ed inalazione di sostanze tossiche.



# Anosmia

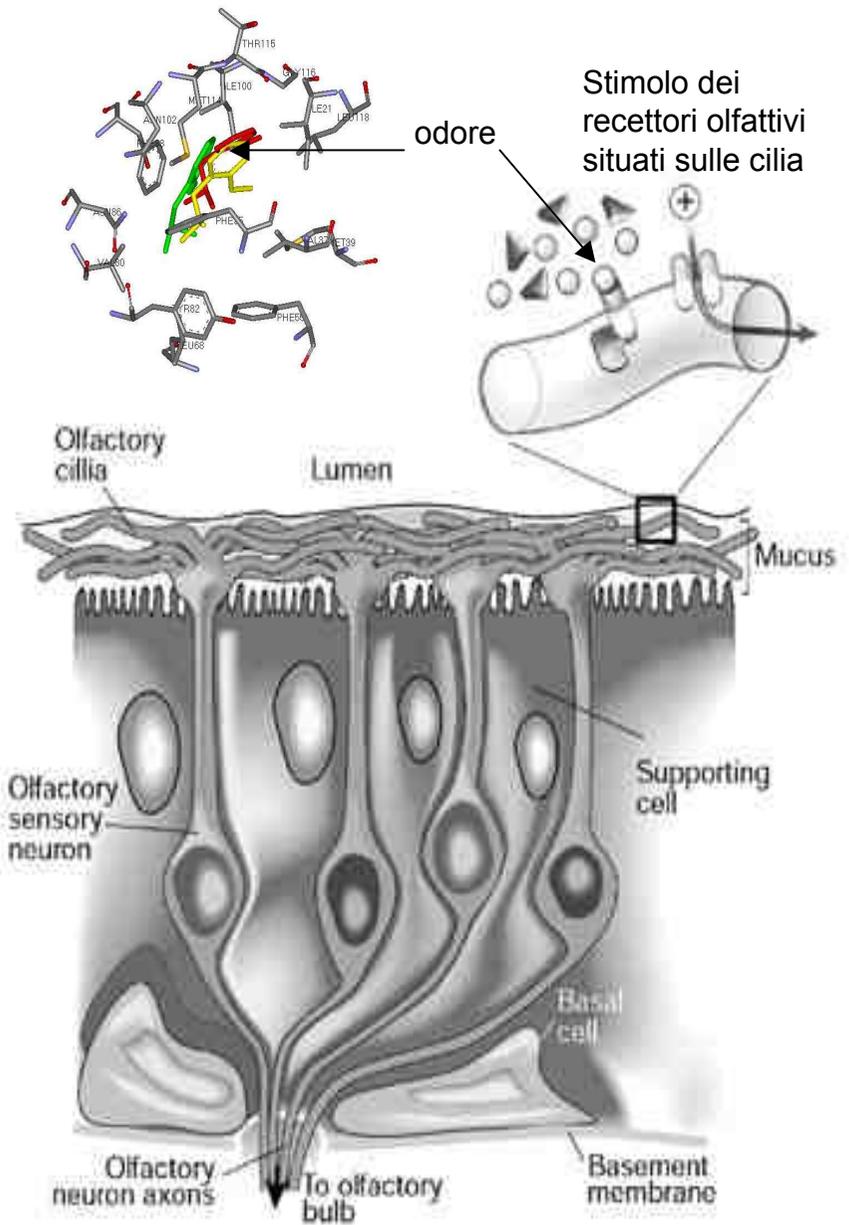
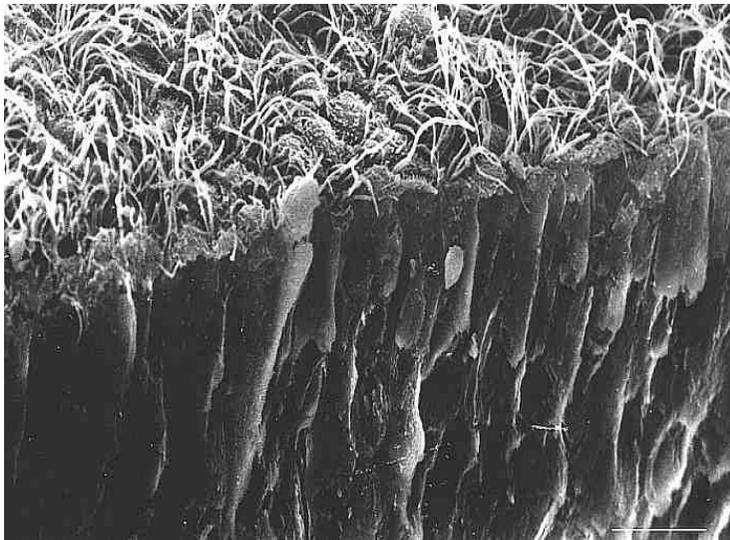


# Anosmia



Nella cavità nasale, le molecole odorose sono legate da proteine presenti nello strato mucoso e presentati ai recettori

recettori olfattivi presenti sulle cilia olfattive. La viscosità dello strato mucoso gioca un ruolo importante nell'efficacia con la quale le molecole odorose sono riconosciute dalle proteine che le legano.

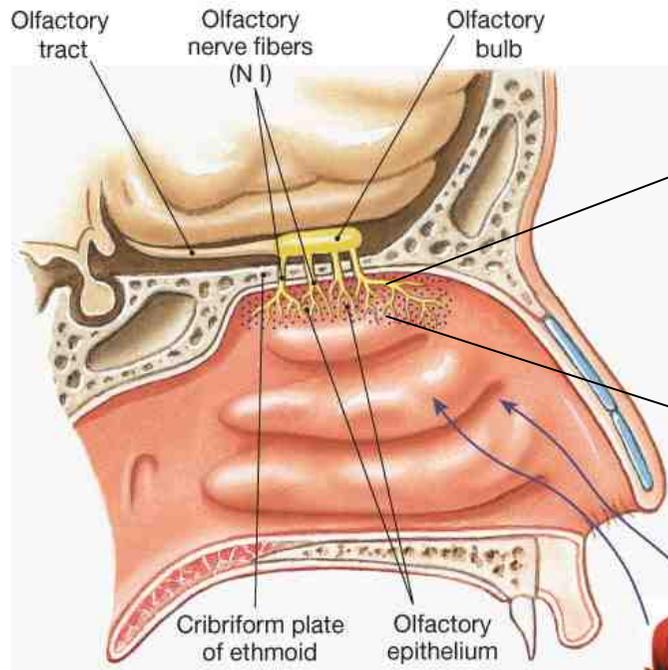




## Anosmia da raffreddore



In caso di raffreddore aumentano le secrezioni mucosali da parte delle ghiandole di Bowman e lo strato mucosale ispessito non permette più alle molecole odorose di raggiungere i recettori olfattivi. Ne consegue una temporanea anosmia.



(a) Nasal cavity



Aumento dello strato mucoso = anosmia

13\_bct\_2011

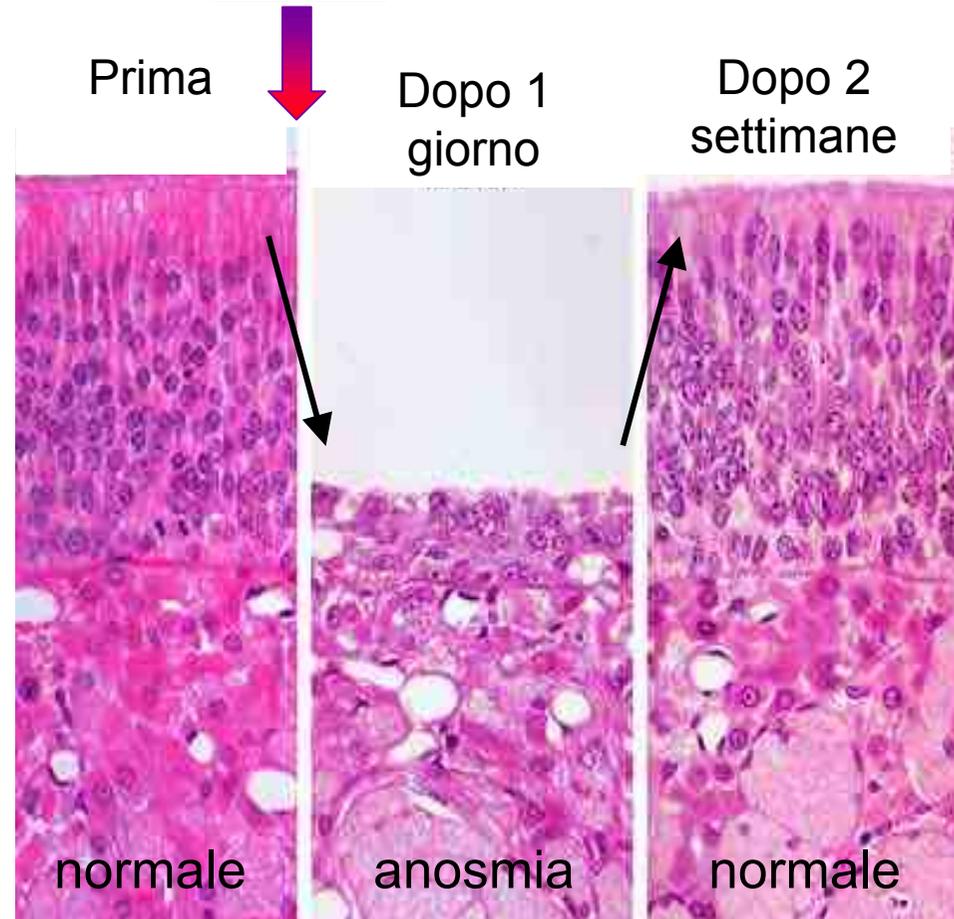
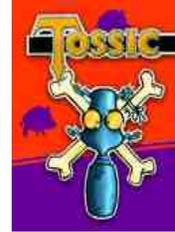
23



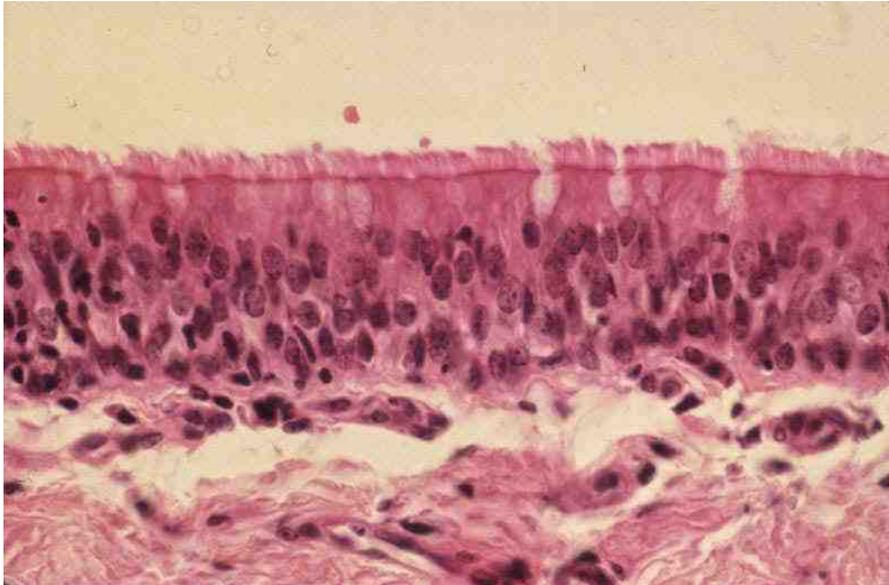
Anosmia,  
temporanea o  
definitiva, da  
inalazione di  
sostanze tossiche.

L'anosmia è definitiva se le cellule staminali situate alla base dell'epitelio olfattivo sono danneggiate. Negli altri casi l'anosmia è temporanea perché grazie proprio alle cellule staminali basali l'epitelio olfattivo potrà rigenerarsi e ripristinare lo strato mucoso necessario a trattenere e presentare le molecole odorose ai recettori olfattivi

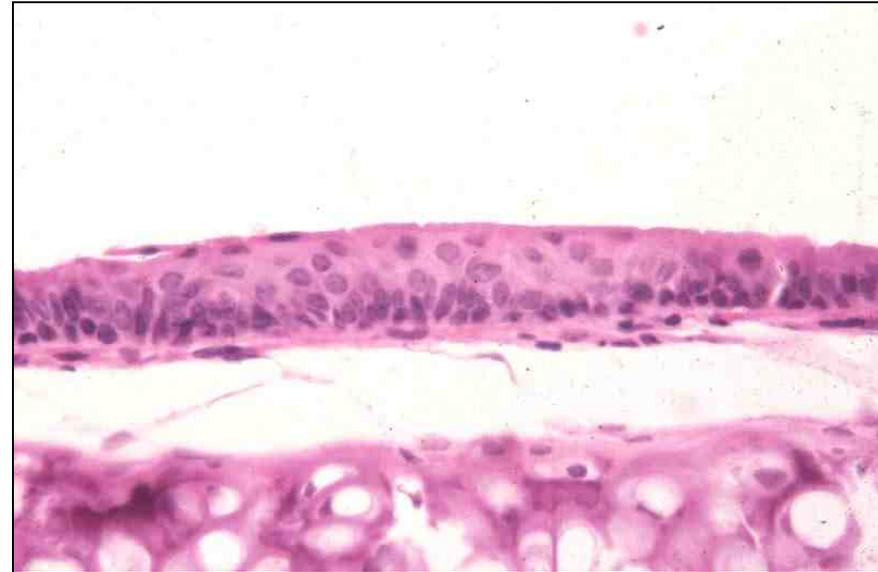
Inalazione di una sostanza tossica



Epitelio tracheale normale



Metaplasia squamosa dell'epitelio tracheale di un fumatore di sigarette.



13\_bct\_2011



25

# Proteine della membrana plasmatica

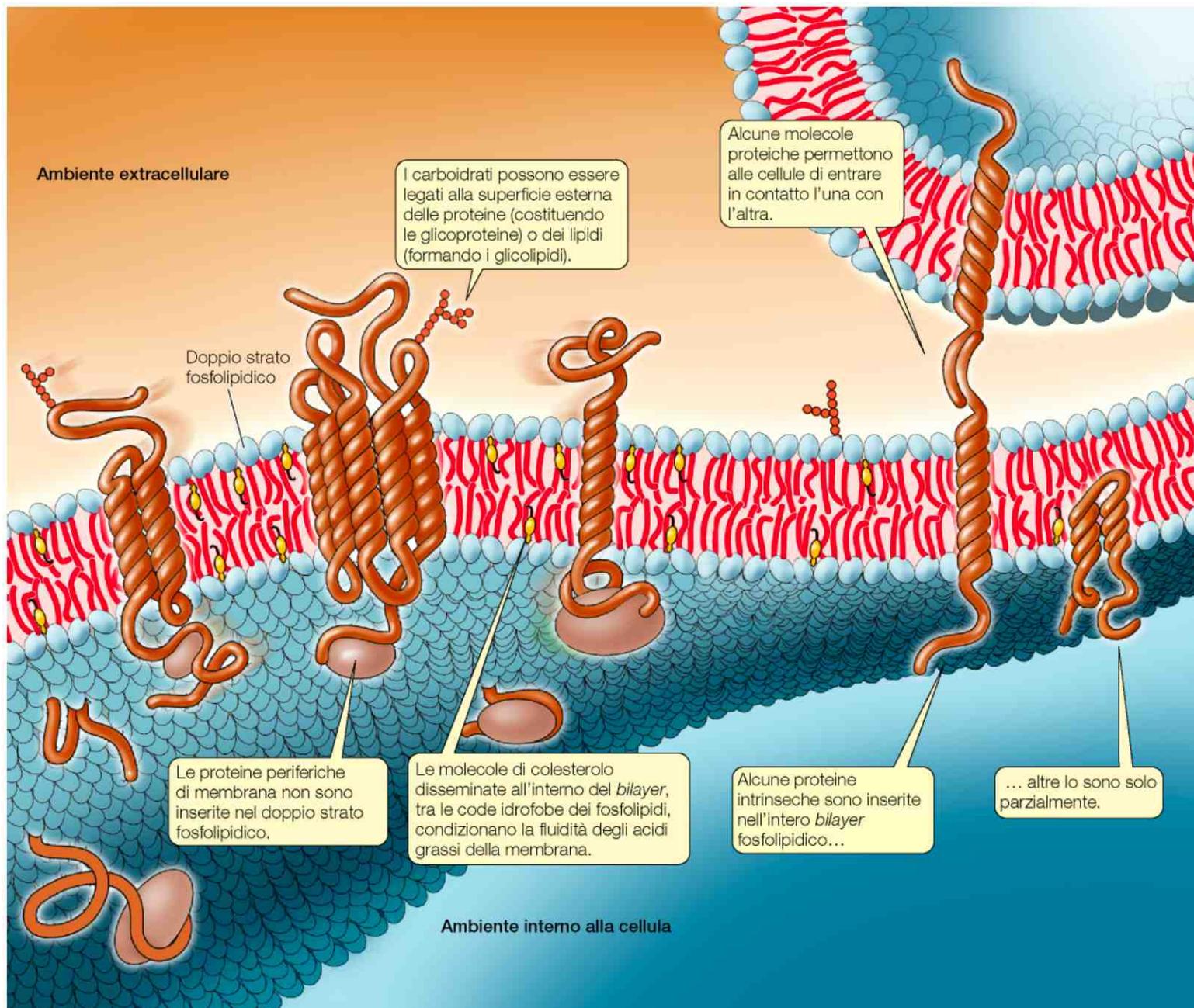
Le proteine di membrana operano le specifiche funzioni della membrana.

La quantità delle proteine di membrana varia a seconda del tipo di membrana e della sua funzione

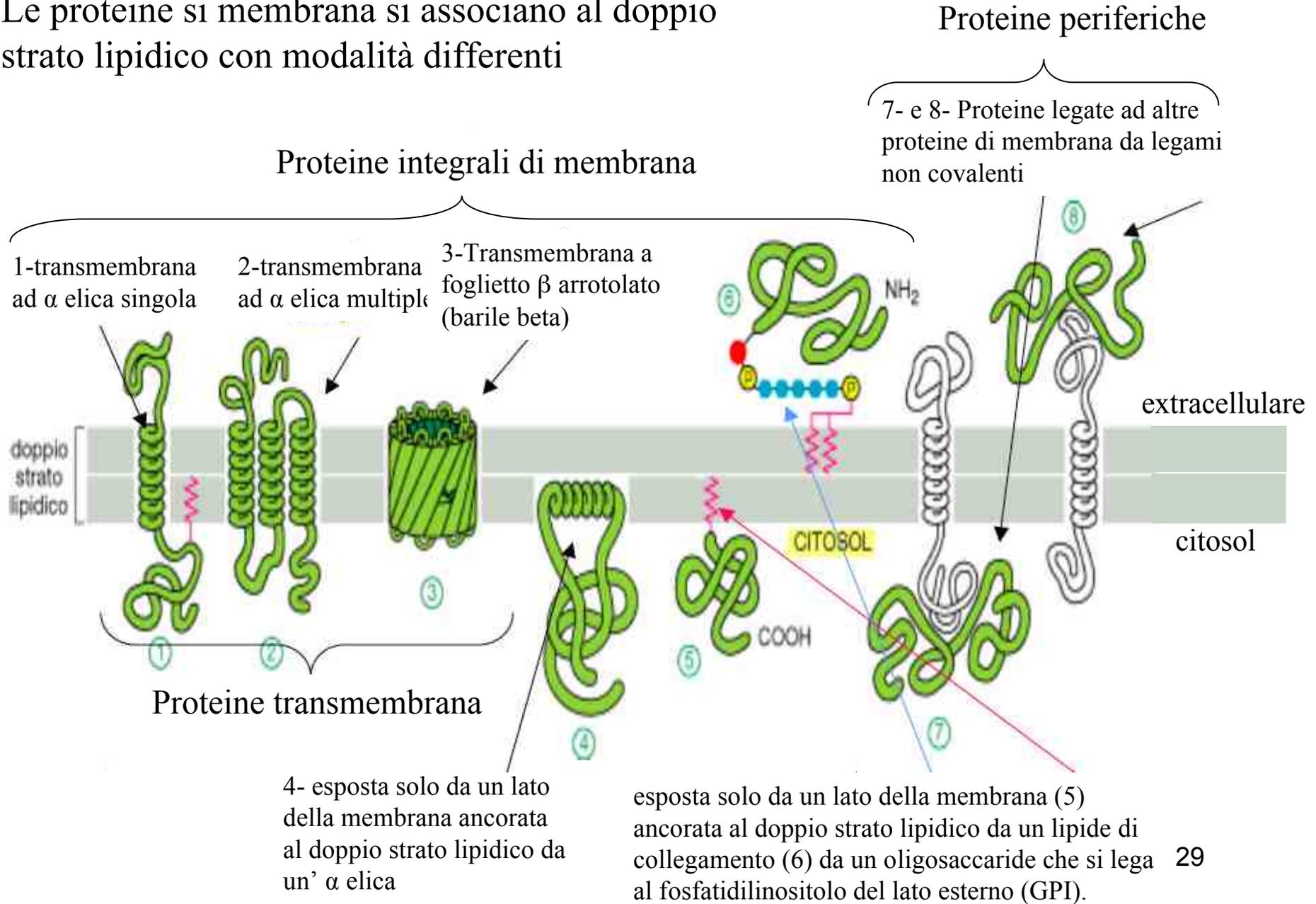
Mediamente una membrana contiene il 50% in proteine:

- Le cellule nervose hanno un 25% in peso in proteine
- Le membrane mitocondriali hanno il 75% in peso in proteine
- Mediamente 50 molecole di lipidi ogni proteina

Le proteine di membrana si associano al doppio strato lipidico con modalità differenti



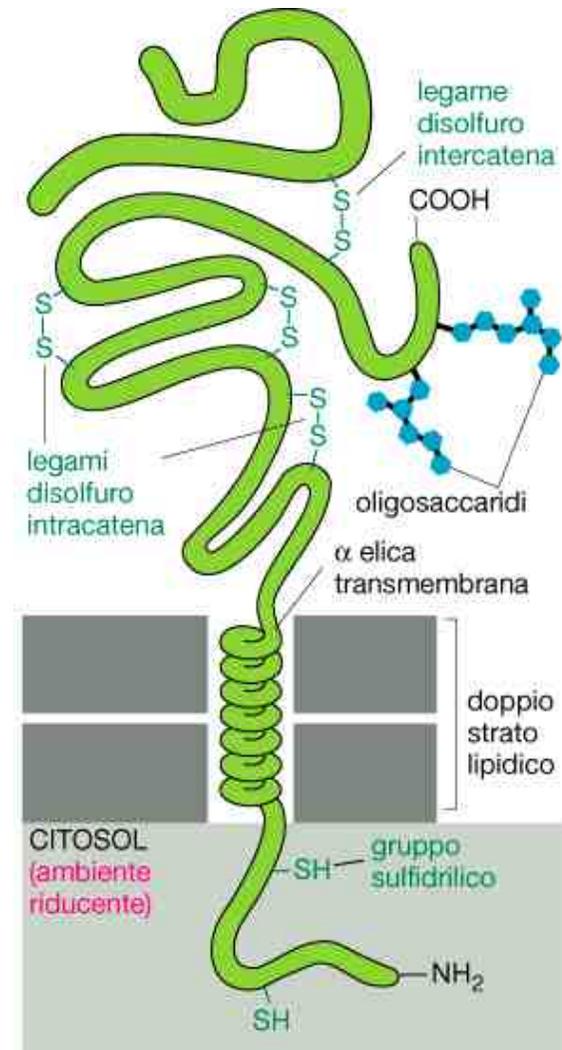
# Le proteine di membrana si associano al doppio strato lipidico con modalità differenti



La maggior parte delle proteine transmembrana sono glicosilate ed espongono i residui glicosilati nella superficie esterna

La catena polipeptidica attraversa il doppio strato lipidico sotto forma di un'  $\alpha$  elica destrogira e le catene di oligosaccaridi ed i ponti disolfuro (S-S) sono tutti sulla superficie non citosolica della membrana.

I gruppi sulfidrilici nel dominio citosolico della proteina non formano normalmente legami disolfuro, perché l'ambiente riducente del citosol mantiene questi gruppi nella forma ridotta (-SH).

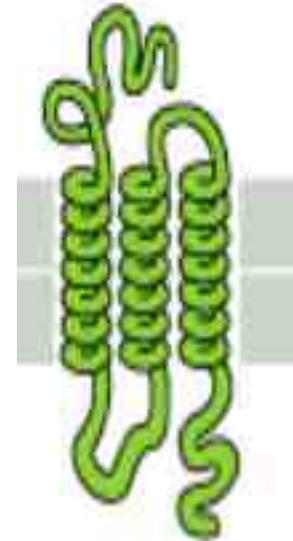


Nota: Le proteine di membrana possono essere solubilizzate e purificate per mezzo di detergenti. I detergenti più comunemente utilizzati sono SDS (sodium dodecil sulfato) e Triton X-100. I detergenti svolgono le proteine (denaturazione) e le rendono disponibile ad un'analisi SDS-poliacrilamide gel elettroforetica (vedi tecniche biochimiche)

## Proteine transmembrana a passaggi multipli

La grande maggioranza delle proteine transmembrana a passaggi multipli della cellula eucariote sono costituite da  $\alpha$  eliche transmembrana. Le eliche all'interno di queste proteine possono scivolare l'una sull'altra permettendo alla proteina di subire cambiamenti conformazionali che possono essere sfruttati per aprire o chiudere canali ionici, trasportare soluti, o trasdurre segnali extracellulari in segnali intracellulari.

Nelle proteine a barile  $\beta$ , invece, ciascun filamento  $\beta$  è legato rigidamente a quelli vicini da legami H, rendendo improbabili cambiamenti conformazionali del barile stesso.



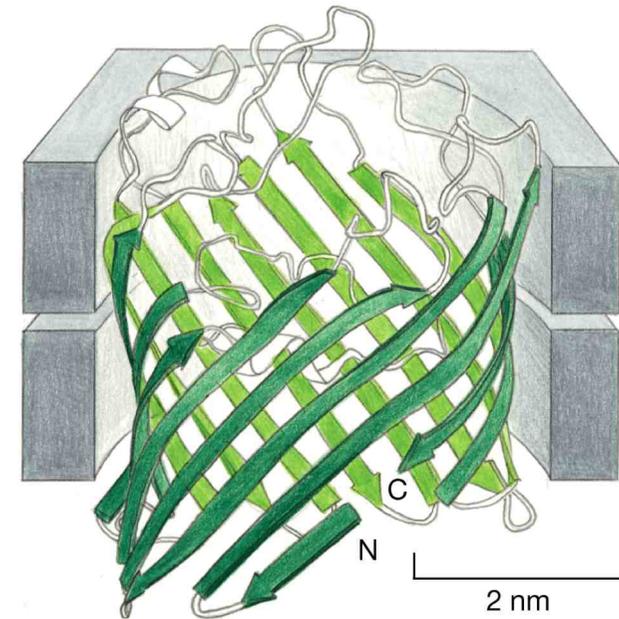


## Struttura a barile $\beta$

Un modo alternativo per i legami peptidici nel doppio strato lipidico di soddisfare le loro richieste di formazione di legami H è quello di disporre i filamenti multipli della catena polipeptidica come un foglietto beta sotto forma di un barile chiuso (struttura tipica delle proteine porine)

La struttura a barile  $\beta$  è tipica delle proteine canale o pori di membrana. Le porine sono proteine che generano canali pieni d'acqua e permettono a soluti idrofilici selezionati di attraversare il doppio strato lipidico.

Nota: Le proteine a barile  $\beta$  sono presenti nella membrana plasmatica ma anche molto abbondanti nella membrana esterna dei mitocondri, dei cloroplasti e di molti batteri.

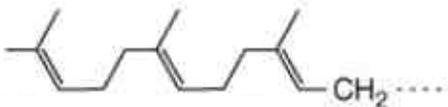


## Proteine citosoliche ancorate alla membrana plasmatica

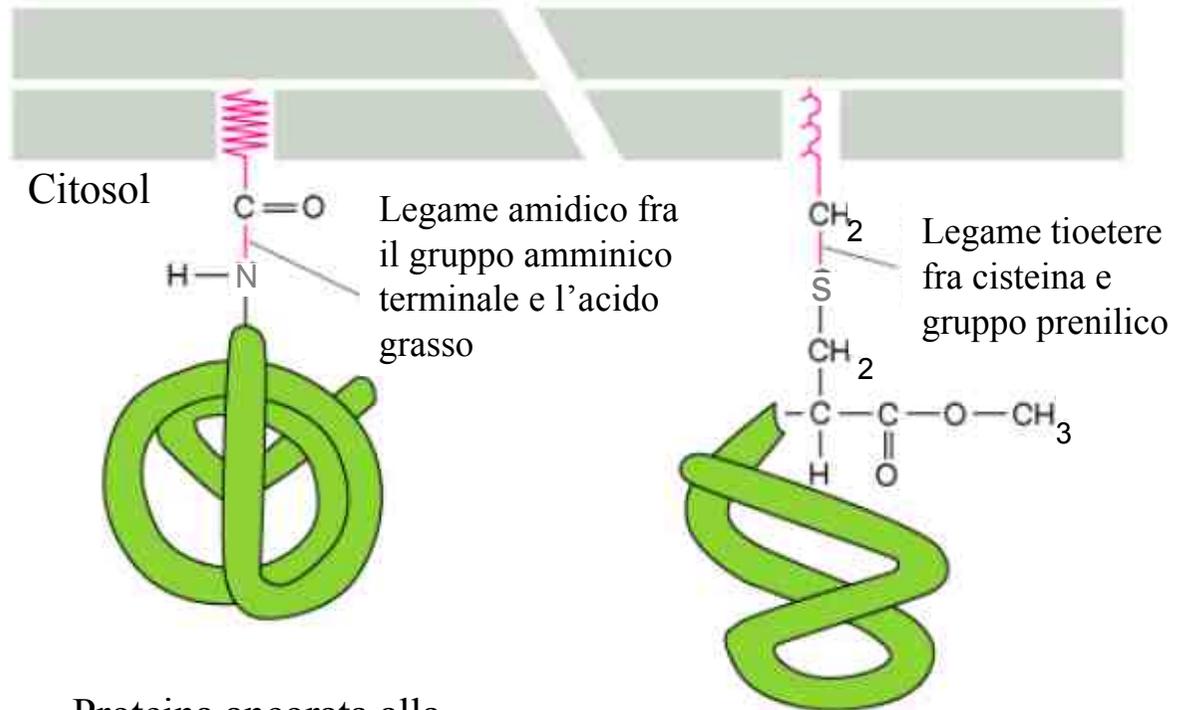
Proteine citosoliche ancorate alla membrana plasmatica da legame covalente con acidi grassi oppure da ancora prenilica, miristilica oppure farnesilica



Ancora miristilica



Ancora farnesilica

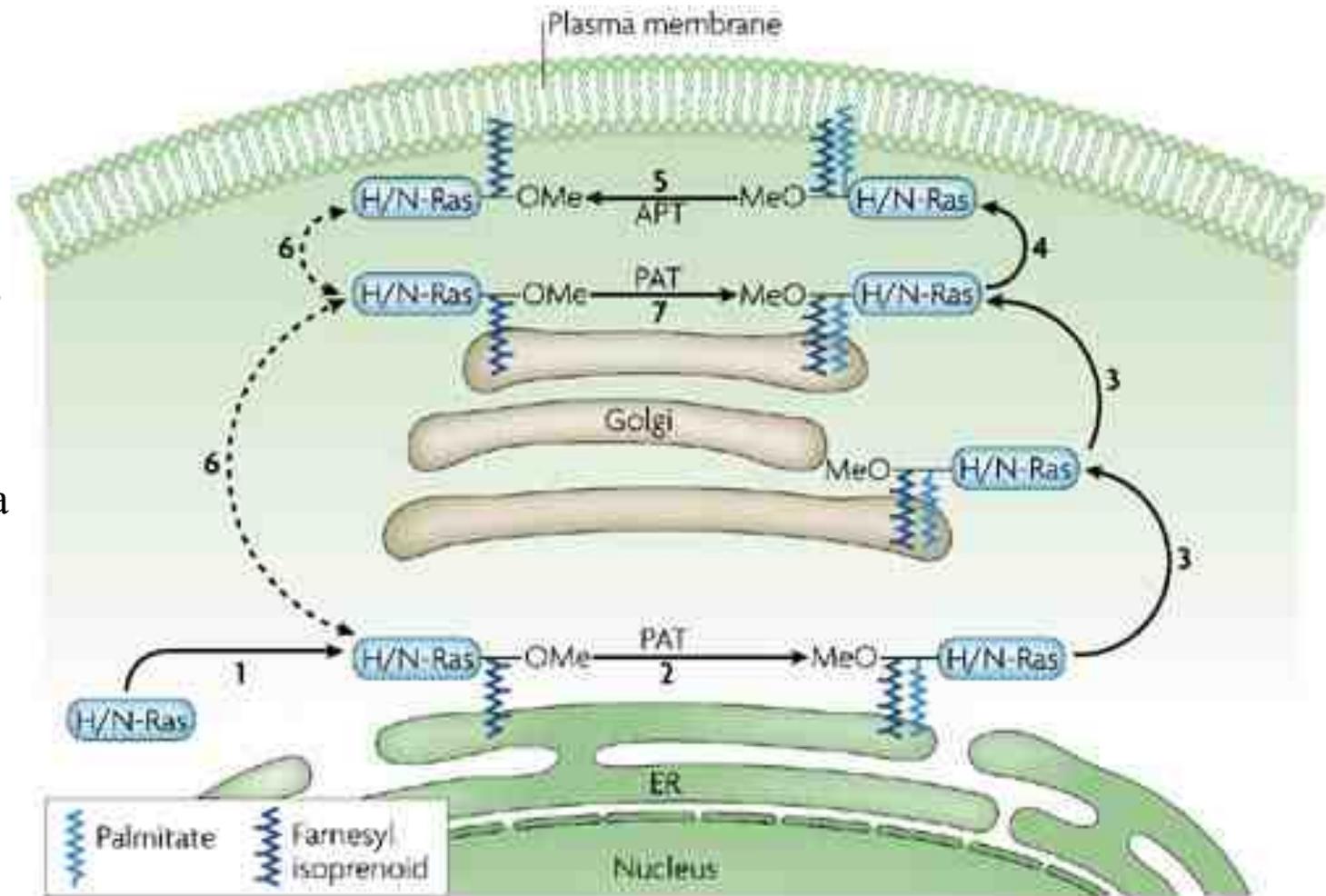


Proteina ancorata alla membrana da una catena di acido grasso

Proteina ancorata alla membrana da gruppo prenilico

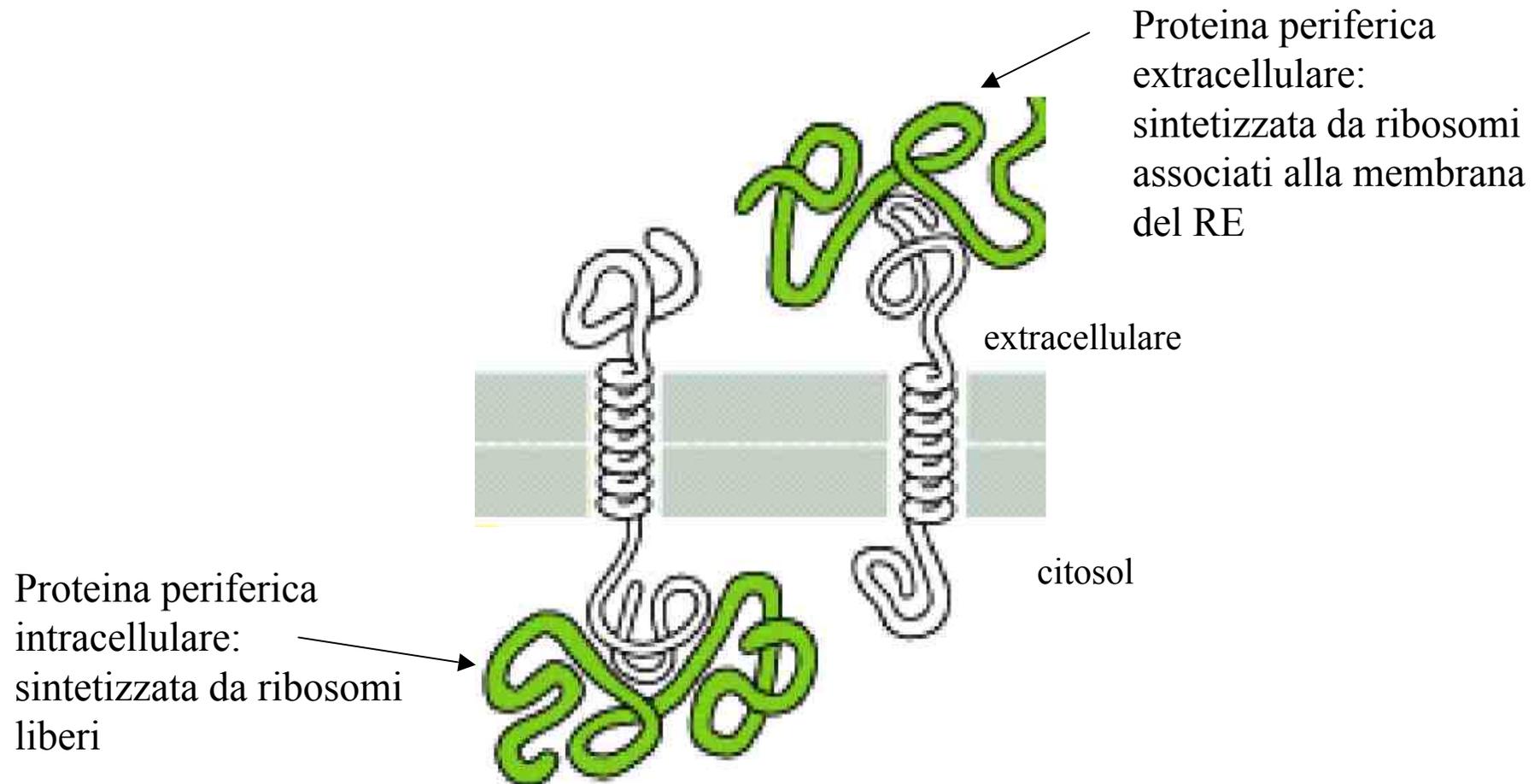
## H/N-Ras: Esempio di proteina ancorata alla membrana da ancora farnesilica.

La proteina H/N-Ras è sintetizzata da ribosomi liberi, ancorata al doppio strato fosfolipidico a livello del RE e trasportata da vescicole alla membrana plasmatica.



## Proteine periferiche

Una grandissima varietà di proteine sono associate alla membrana solo per mezzo di interazioni non covalenti con altre proteine di membrana.



## Le caratteristiche delle proteine di membrana

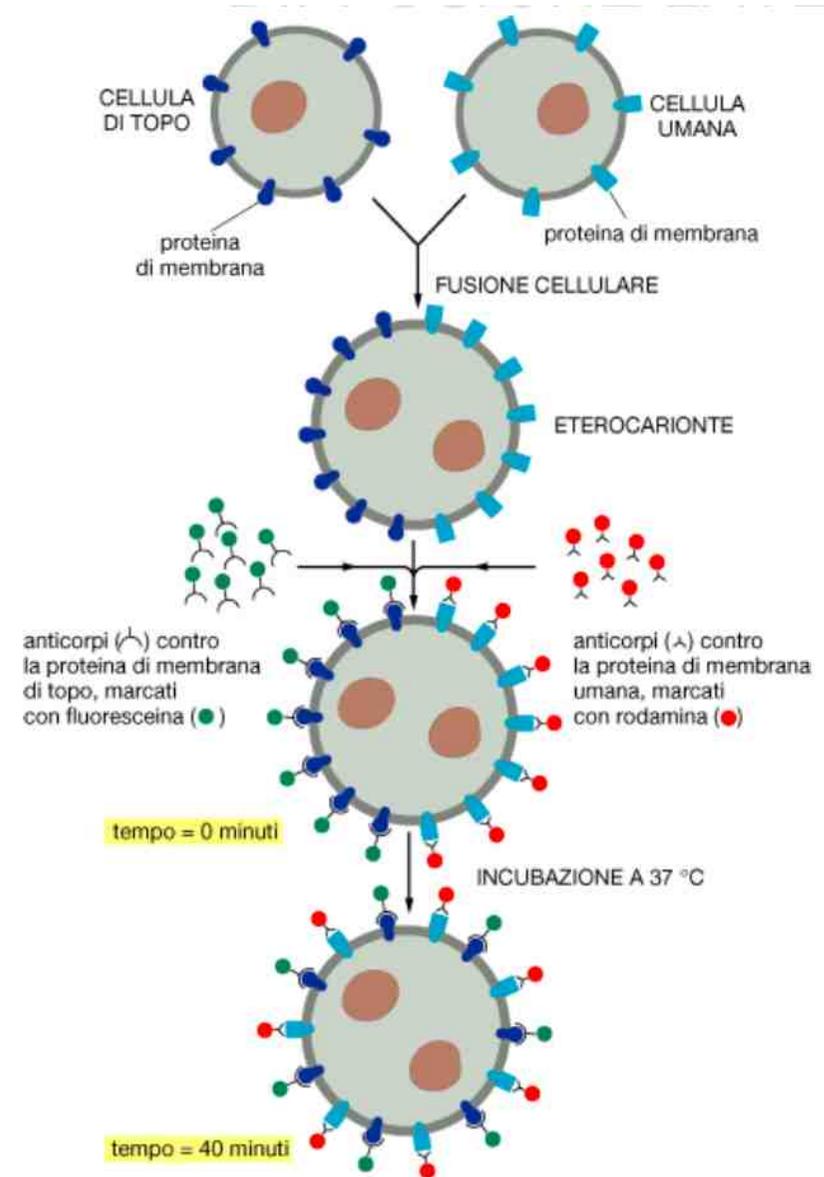
Caratteristica	Proteina integrale	Proteina periferica
Localizzazione nella membrana	Nascosta nella parte interna idrofobica della membrana	Legata in superficie
Requisiti per la estrazione	Estratta solo mediante agenti che disperdono il doppio strato, es. detergenti	Estratta mediante trattamenti che lasciano intatto il doppio strato, es. aumento della forza ionica
Associata con lipidi dopo estrazione	Di solito associata a lipidi	Non associata a lipidi
Solubilità	Di solito insolubile in solventi acquosi	Solitamente solubile in solventi acquosi

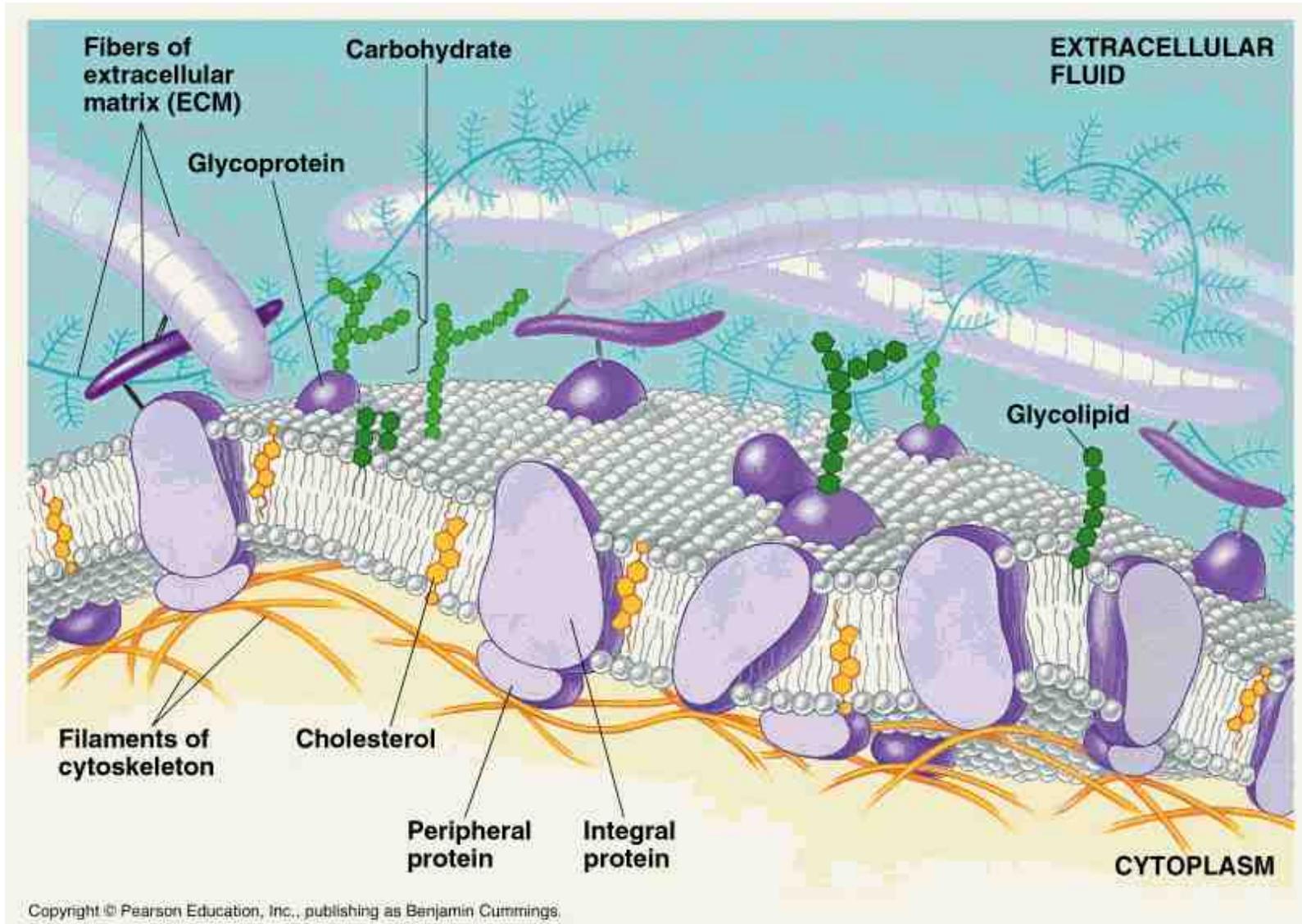
## Diffusione delle proteine all'interno del doppio strato fosfolipidico

Molte proteine possono diffondere all'interno del doppio strato lipidico. Non possono spostarsi per rotazioni flipflop, ma possono muoversi per:

- DIFFUSIONE ROTAZIONALE (le proteine diffondono ruotando lungo l'asse perpendicolare al piano)
- DIFFUSIONE LATERALE

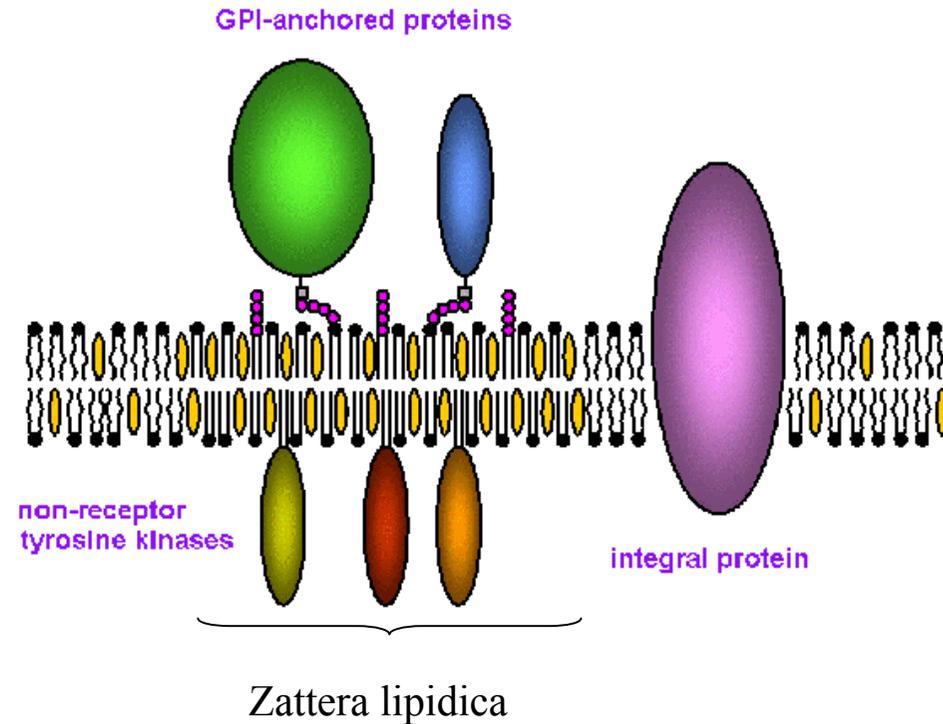
Lo schema a fianco illustra la dimostrazione sperimentale della diffusione delle proteine nel doppio strato fosfolipidico tramite esperimenti di fusione cellulare tra una cellula di topo e una cellula umana. Inizialmente le proteine sono confinate nella metà della membrana plasmatica di provenienza. L'utilizzo di anticorpi specifici per le proteine di membrana permette di verificare nel tempo il mescolamento delle stesse.



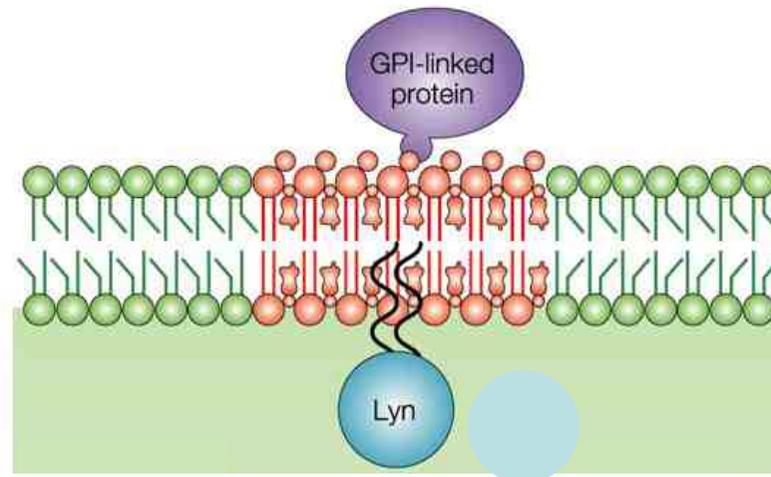
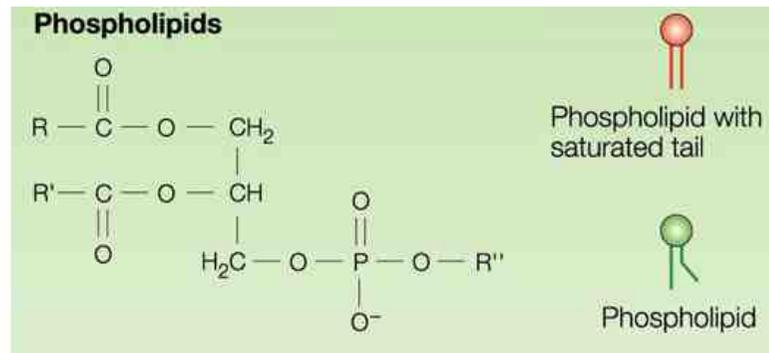


Alcune vescicole di endocitosi si formano in corrispondenza delle zattere lipidiche o *Lipid rafts*

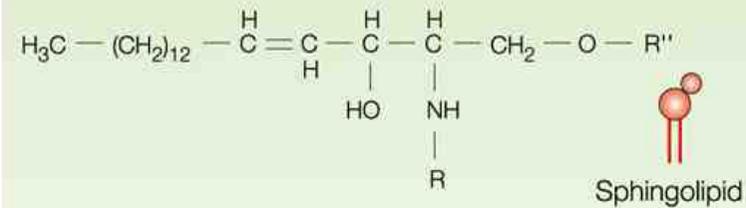
Nelle membrane biologiche si possono riconoscere delle strutture a “cluster” in cui si concentrano proteine o glicolipidi a costituire determinati distretti funzionali chiamati zattere lipidiche



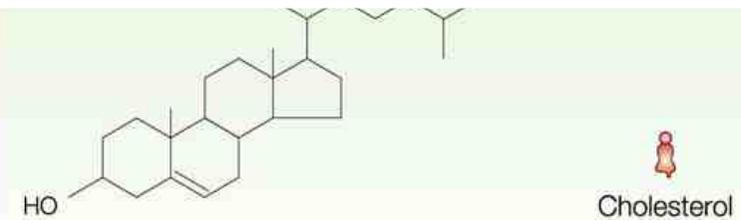
Le zattere lipidiche sono caratterizzate da un alto contenuto in colesterolo e sul lato citosolico dalla presenza di fosfolipidi saturi e di particolari enzimi (tirosine cinasi non recettoriali) e sul lato extracellulare da sfingolipidi e da proteine, da proteine legate alla membrana da GPI (glycosylinositol phospholipid)



**Sphingolipids**



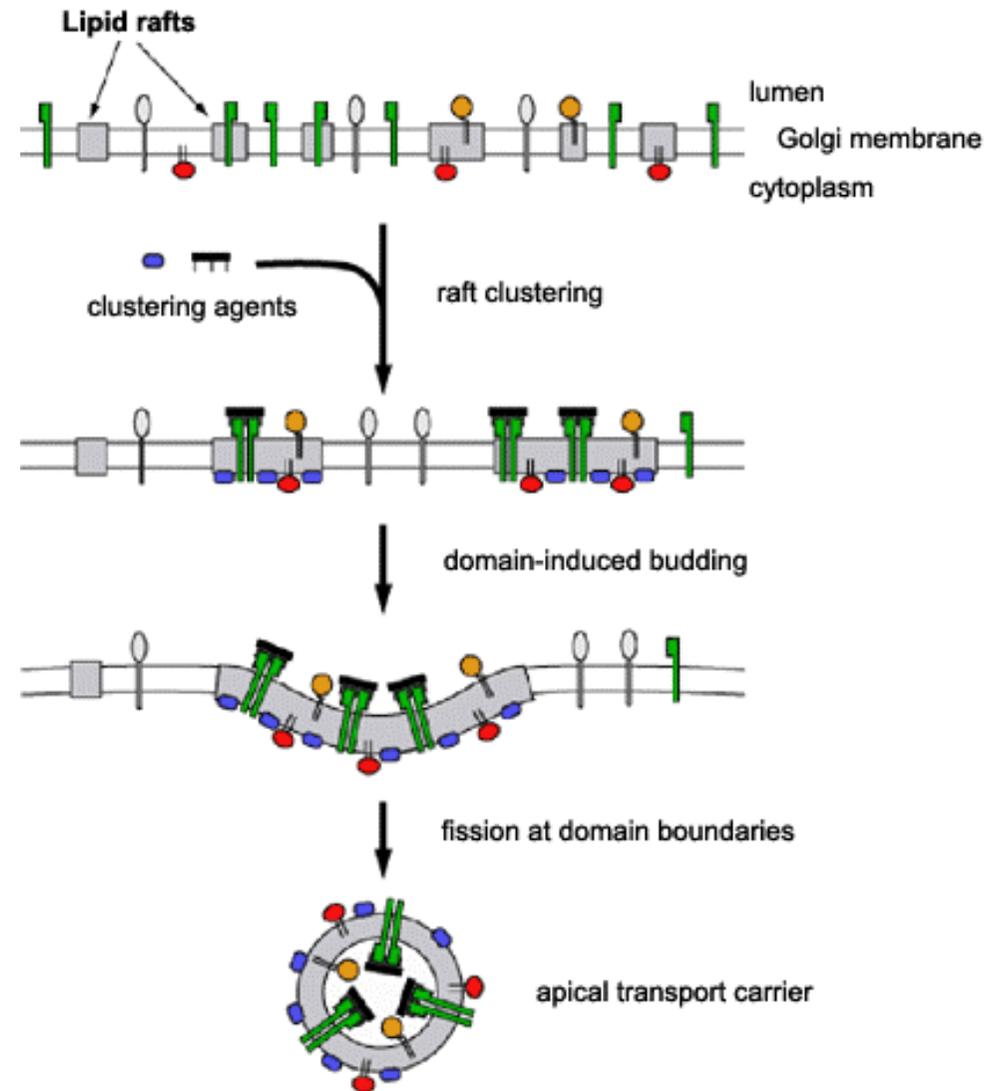
**Cholesterol**



R, R', Hydrocarbon chains of fatty acids  
 R'', Head group  
 GPI, glycosylphosphatidyl inositol

## Formazione delle zattere lipidiche

Fosfolipidi saturi, sfingolipidi, tirosine cinasi non recettoriali e proteine-GPI sono raggruppati (clustering) nel Golgi e sequestrati in particolari vescicole di secrezione che dopo fusione con la membrana plasmatica formano le zattere lipidiche.



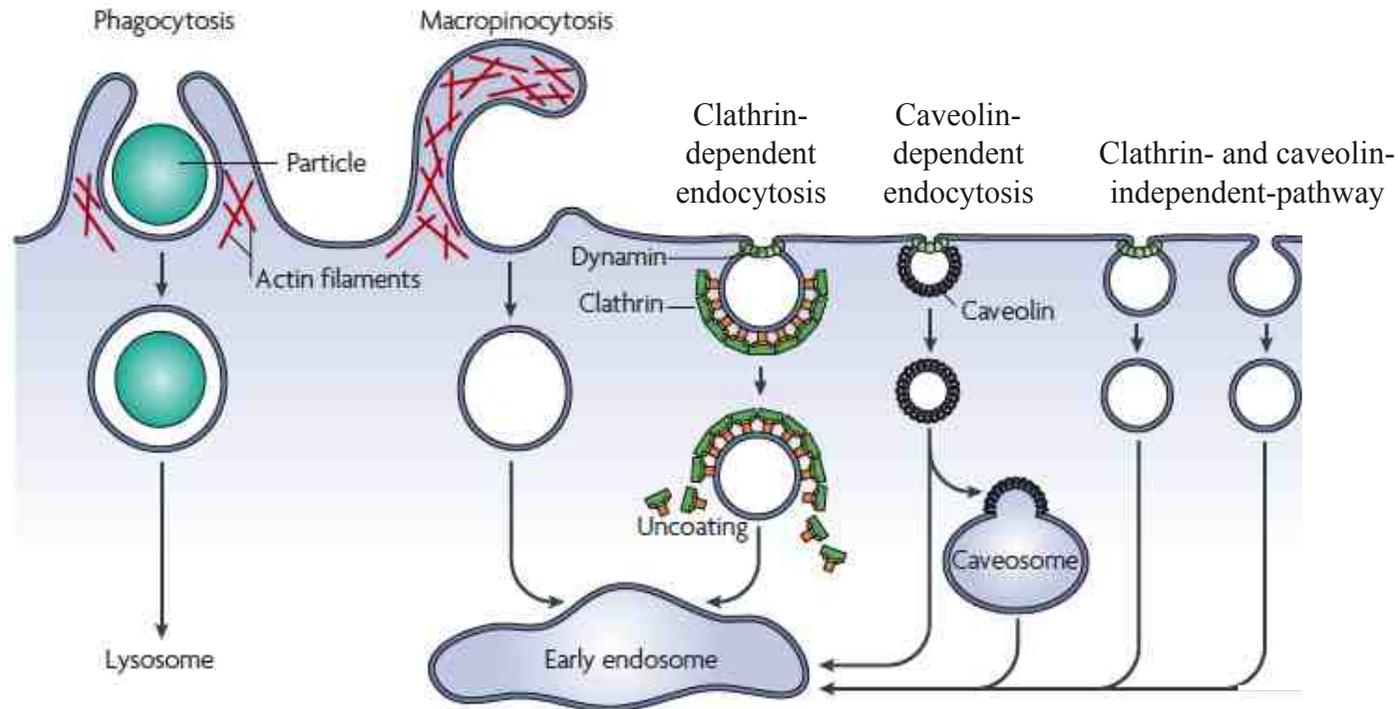
Membrana plasmatica:

trasporto di materiale  
all'interno della cellula

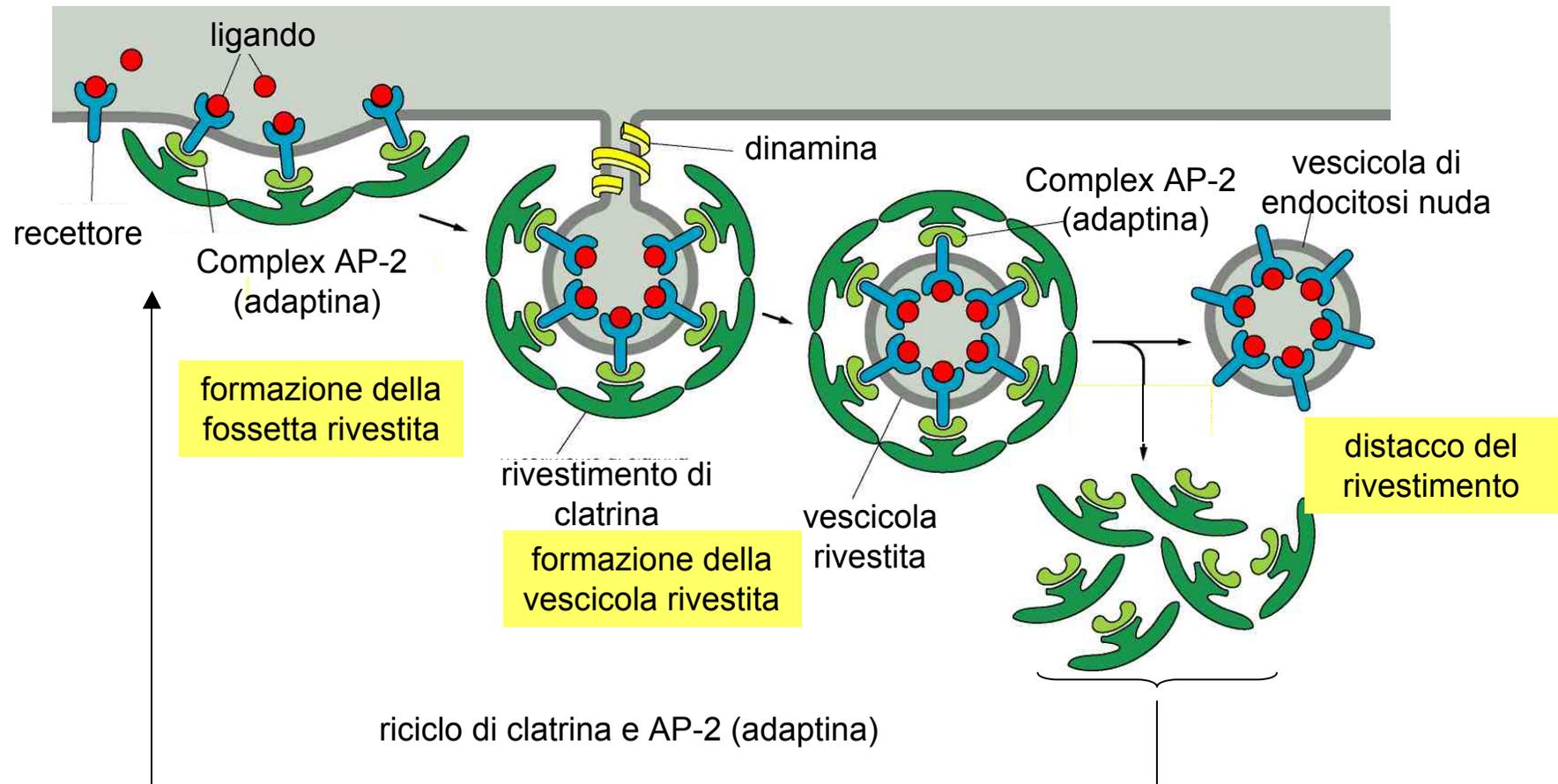
1 - endocitosi e fagocitosi

Meccanismi di entrata di materiale nelle cellule tramite strutture vescicolari.

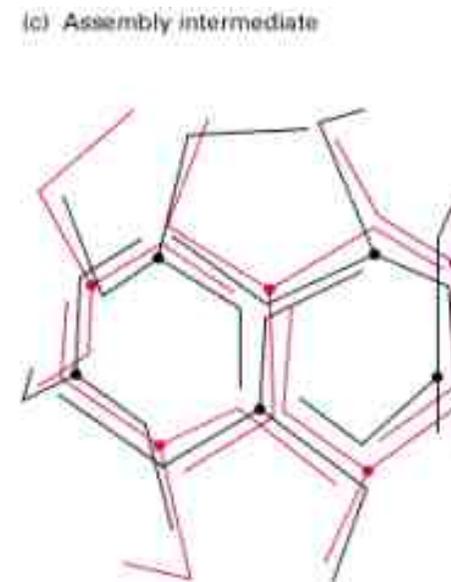
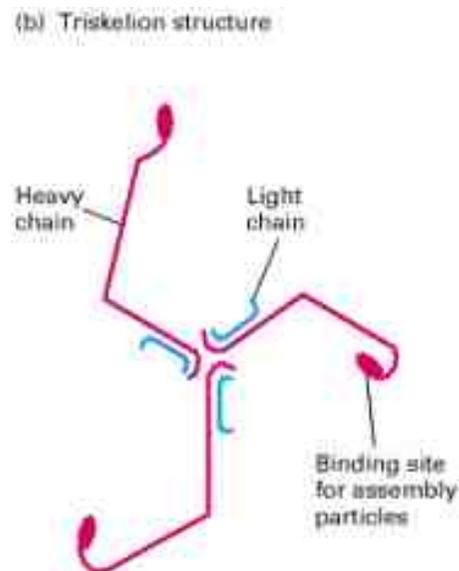
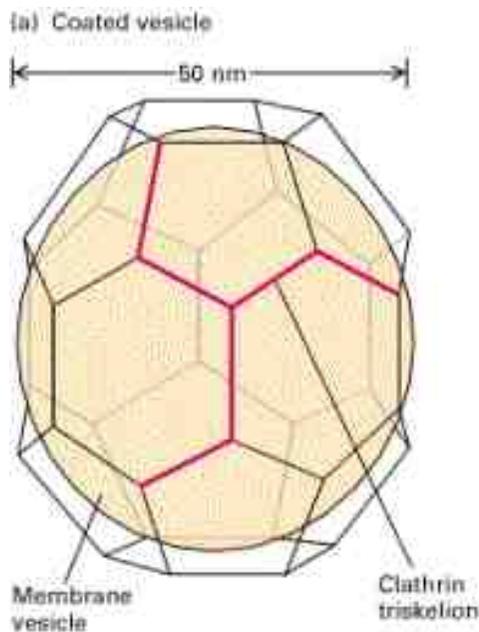
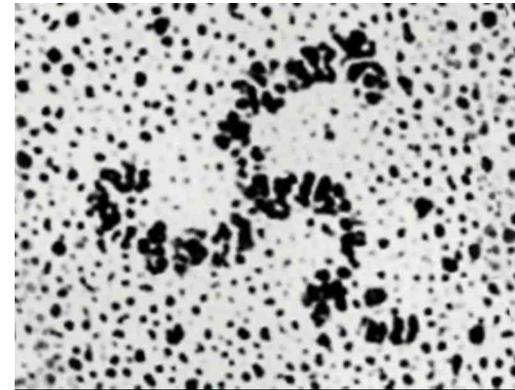
Particelle di grandi dimensioni entrano per fagocitosi mentre fluidi e molecole solubili entrano per macropinocitosi. Entrambi i procedimenti sono dipendenti dai filamenti di actina a sostegno delle forze di rimodellamento ampio della membrana plasmatica. Le vescicole frutto di fagocitosi e macropinocitosi sono molto più grandi delle vescicole di endocitosi. Le vescicole di endocitosi mediate da recettori sono formate da meccanismi dipendenti da clatrina, da caveolina oppure indipendenti da entrambi.



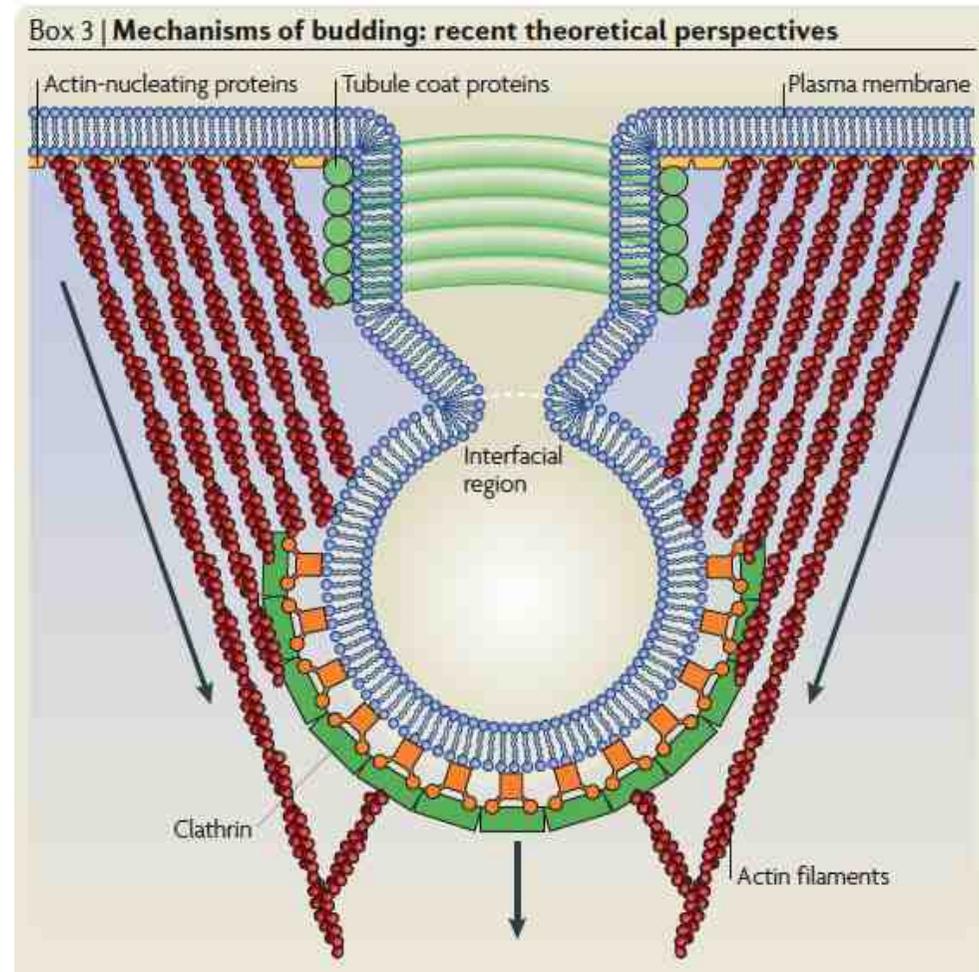
Formazione delle vescicole di endocitosi mediate da recettori e rivestite di clatrina.  
La chiusura della vescicola prima del distacco dalla membrana plasmatica dipende dalla presenza di dinamina



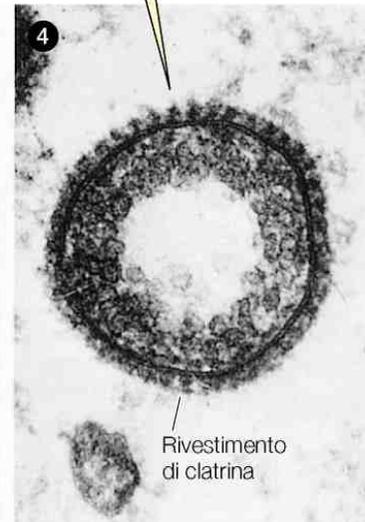
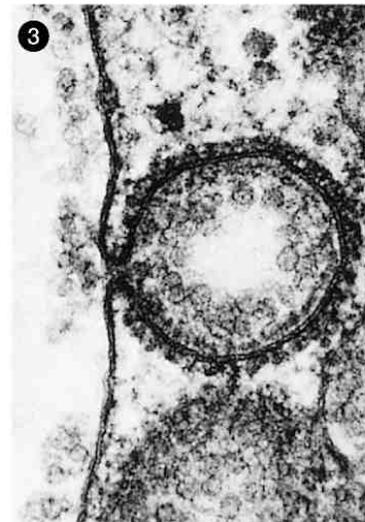
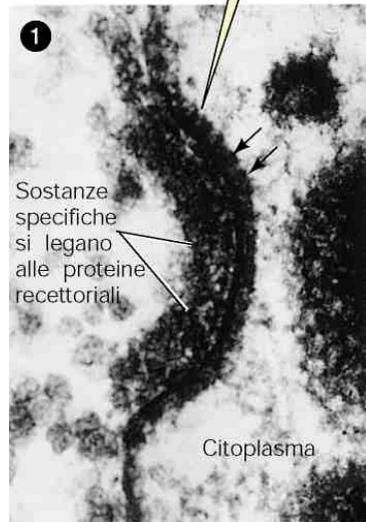
Il ruolo della clatrina è simile a quello dei coatomeri COP I e COP II  
L'associazione delle molecole di clatrina catalizzata dalla presenza di molecole ARF-GTP deforma la membrana del TGN e favorisce la formazione della vescicola. Una volta formata la vescicola ricoperta di clatrina, l'idrolisi del GTP permette il rilascio di ARF-GDP e della clatrina lasciando la vescicola "nuda"



Il citoscheletro e in particolare i filamenti di actina (microfilamenti) concorrono alla deformazione della membrana plasmatica e alla formazione della vescicola di endocitosi.

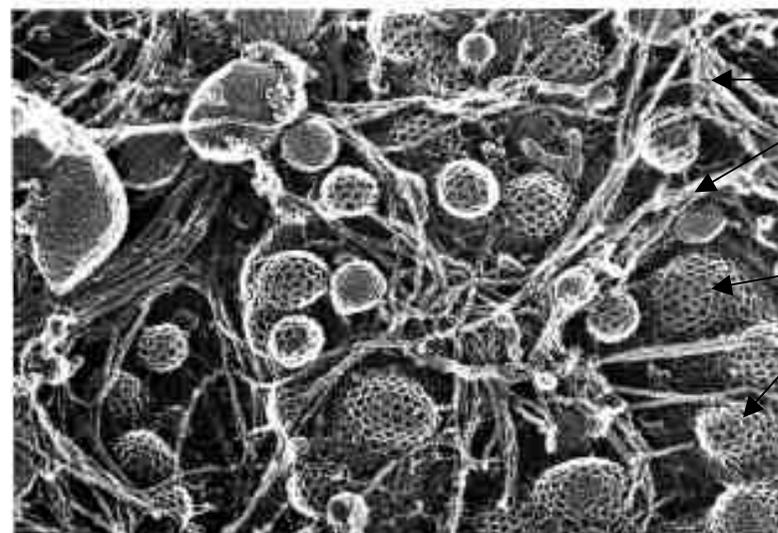


Le molecole di clatrina rivestono il versante citoplasmatico della membrana cellulare in corrispondenza delle *coated pit* (fossette rivestite o ammantate).



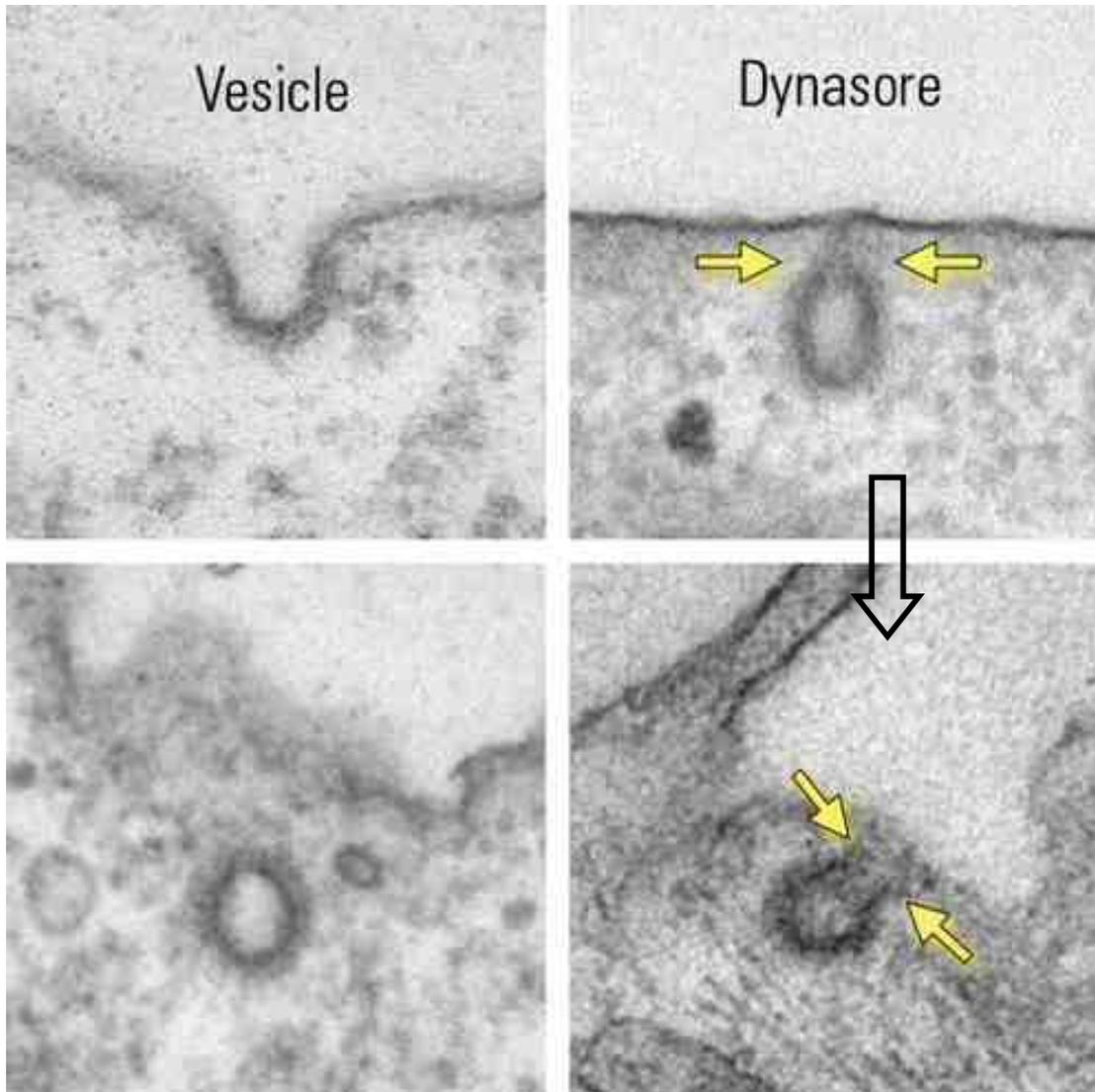
Le sostanze assunte dall'esterno sono contenute in una vescicola rivestita verso il citoplasma da molecole di clatrina.

Vista in SEM delle vescicole rivestite di clatrina sul lato citoplasmatico



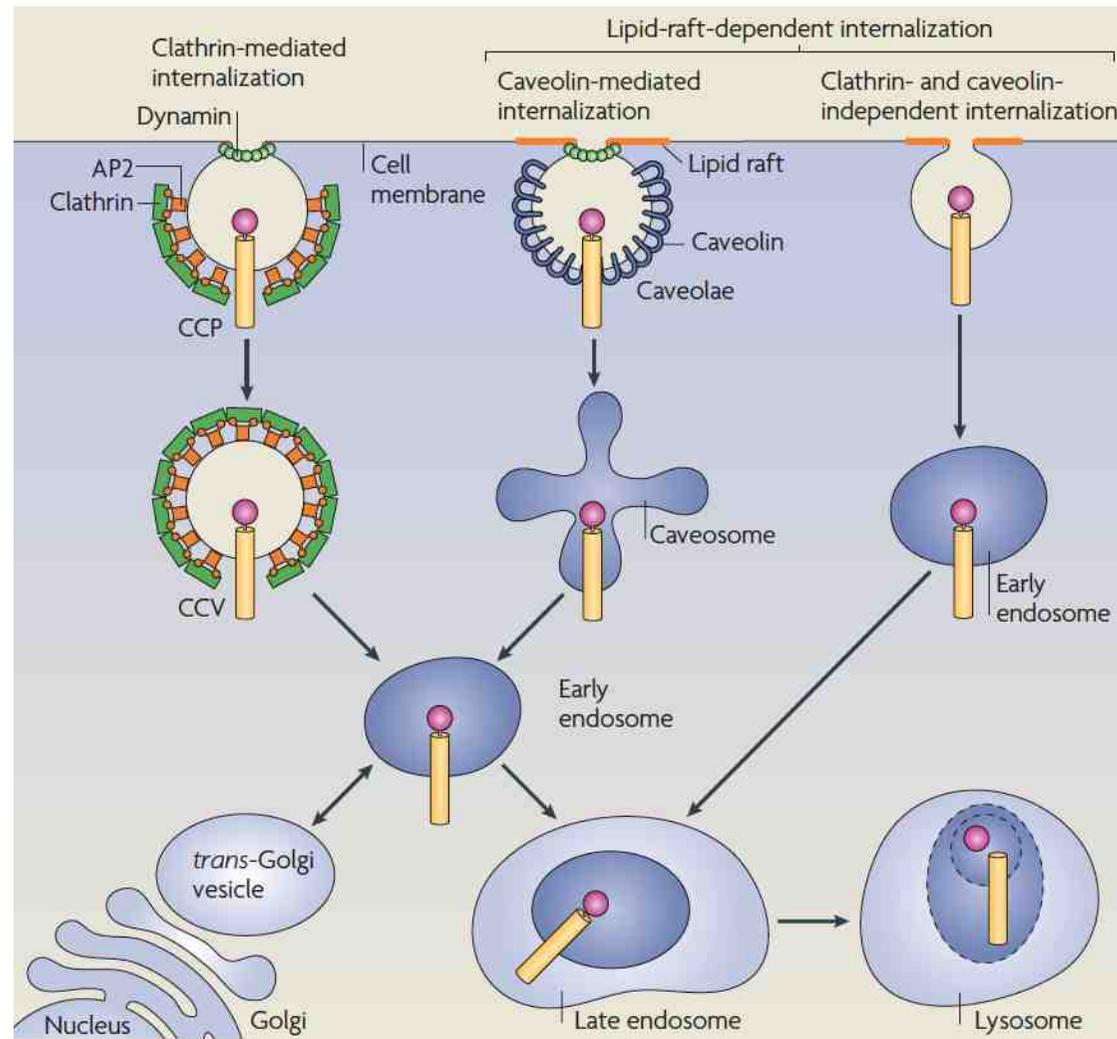
Cellula in condizioni di controllo

Cellula trattata con “dynasore”  
un inibitore della dinamina



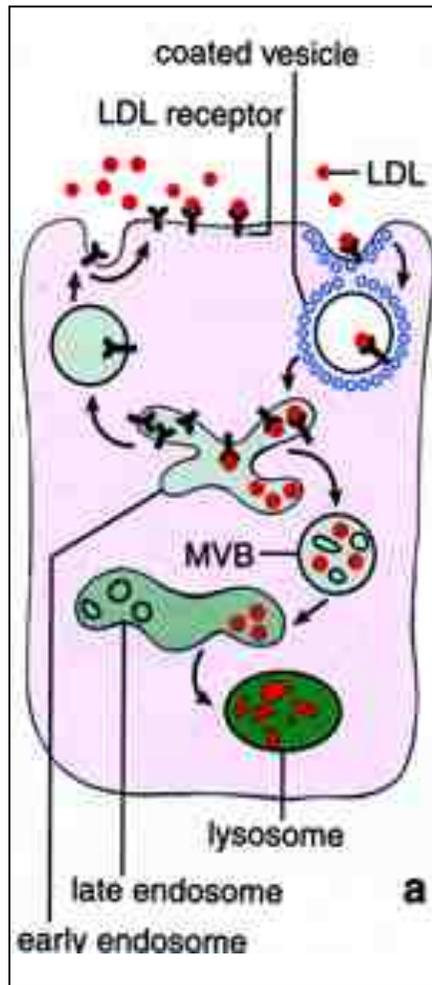
In assenza di  
funzionamento della  
dinamina la vescicola  
di endocitosi non si  
stacca dalla  
membrana plasmatica

Endocitosi mediata da recettori: Recettori e ligandi possono essere internalizzati dalla superficie della cellula in diversi modi: internalizzazione mediata da rivestimento di clatrina, da caveolina oppure in modo indipendente sia da clatrina che da caveolina. In questi ultimi due casi, l'internalizzazione avviene in corrispondenza di domini particolari chiamati "zattere lipidiche" (lipid raft).

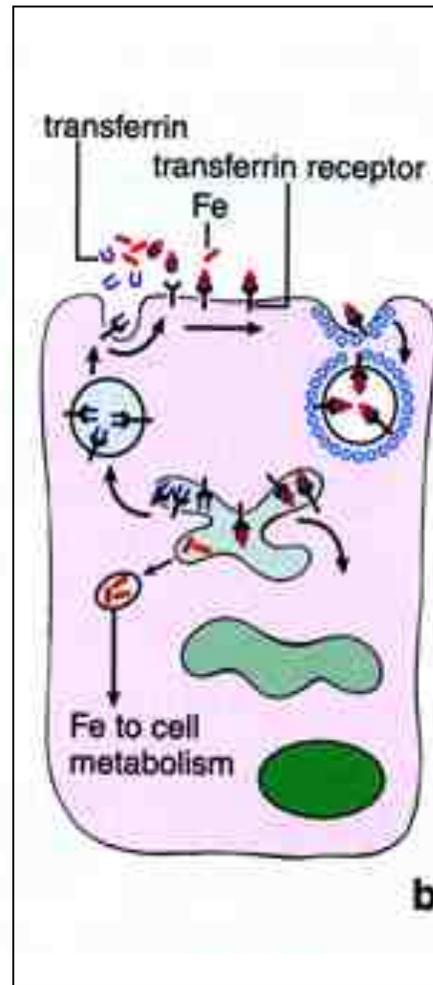


Il destino del contenuto endocitico può essere misto, ecco alcuni esempi:

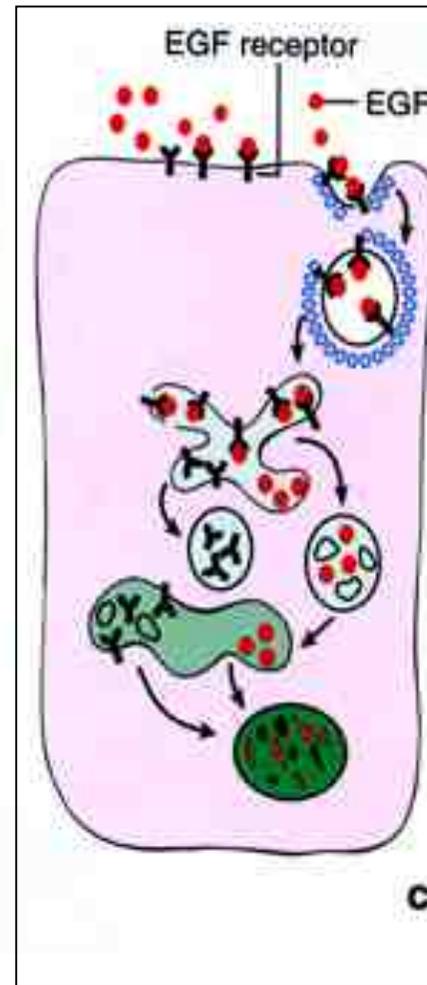
Recettore riciclato e  
ligando degradato



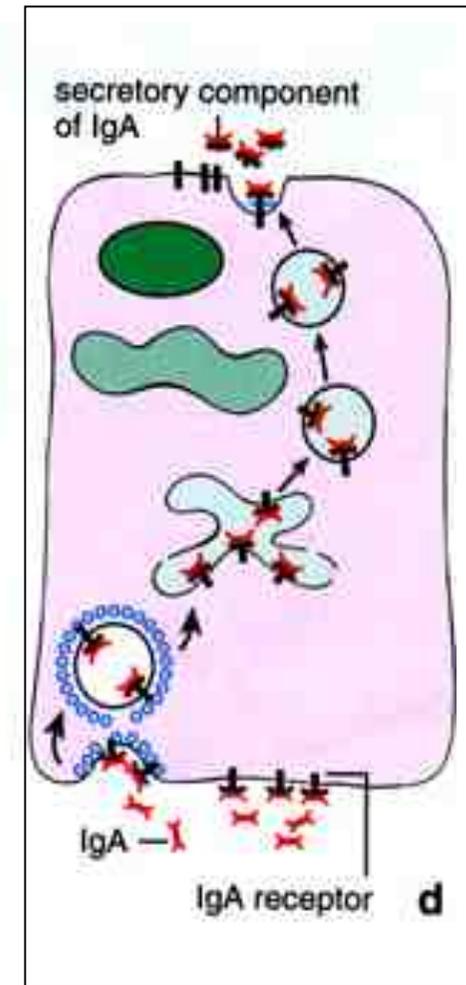
Recettore e ligando  
riciclati



Recettore e ligando  
degradati

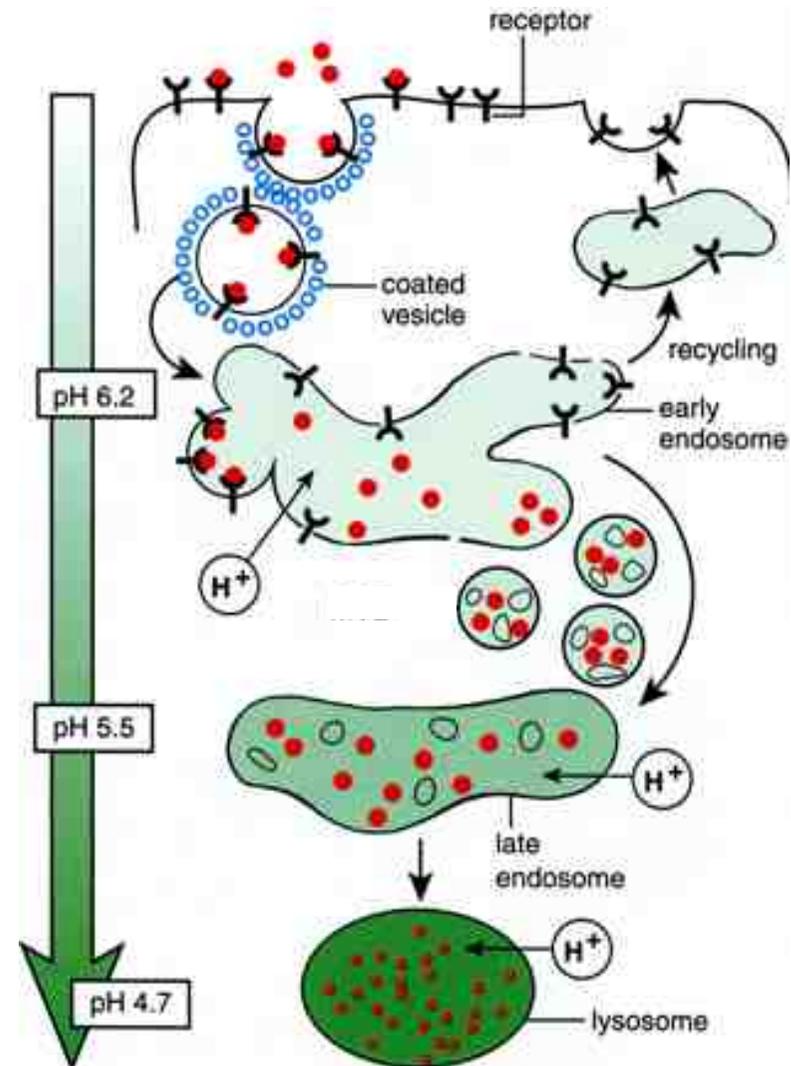
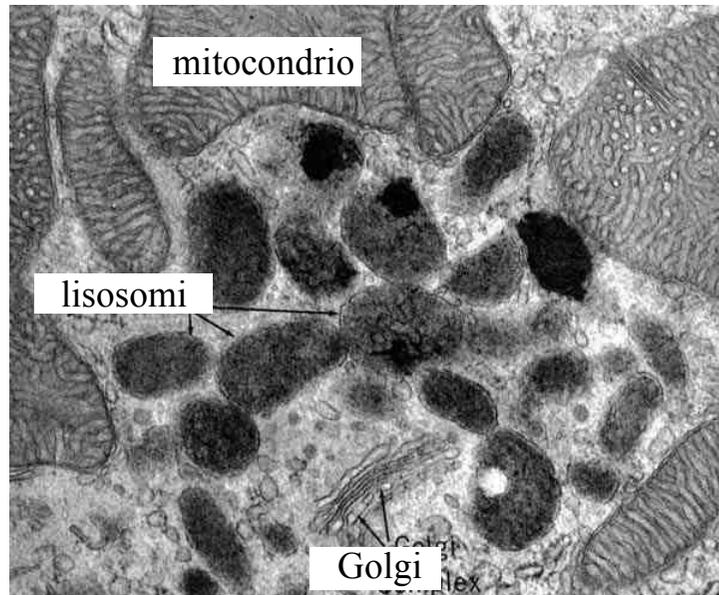


Recettore e ligando  
trasportati (transcitosi)



Vescicola di endocitosi---->endosoma precoce--->endosoma tardivo---->lisosoma

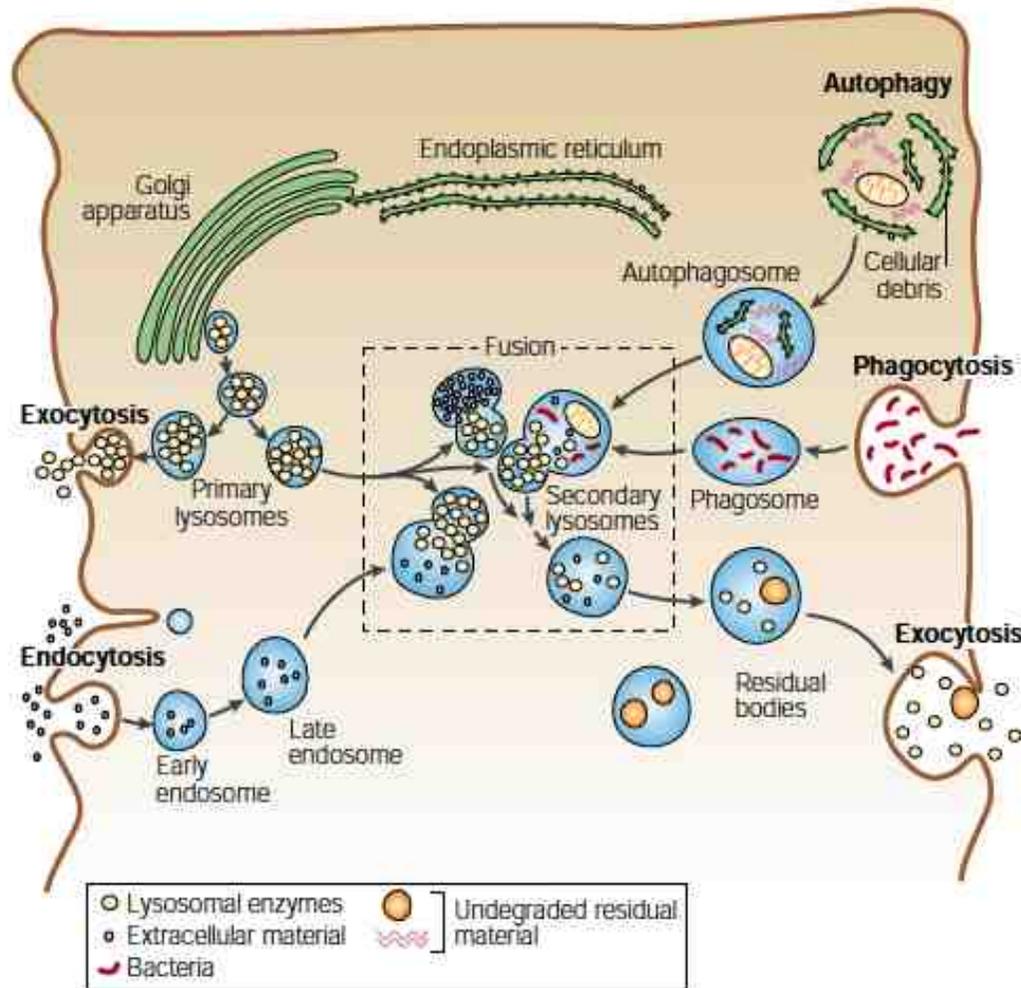
I lisosomi si formano dalla fusione di vescicole lisosomali con endosomi, caveosomi, fagosomi, autofagosomi.... La fusione delle vescicole di endocitosi con vescicole lisosomali porta al progressivo aumento del numero di pompe protoniche e al conseguente abbassamento del pH. L'abbassamento del pH favorisce il distacco tra ligando e recettore, la denaturazione delle molecole e infine la loro degradazione quando il pH raggiunge il valore di circa pH 5.0 al quale sono attivi gli idrossilasi acidi.



13\_bct\_2011

51

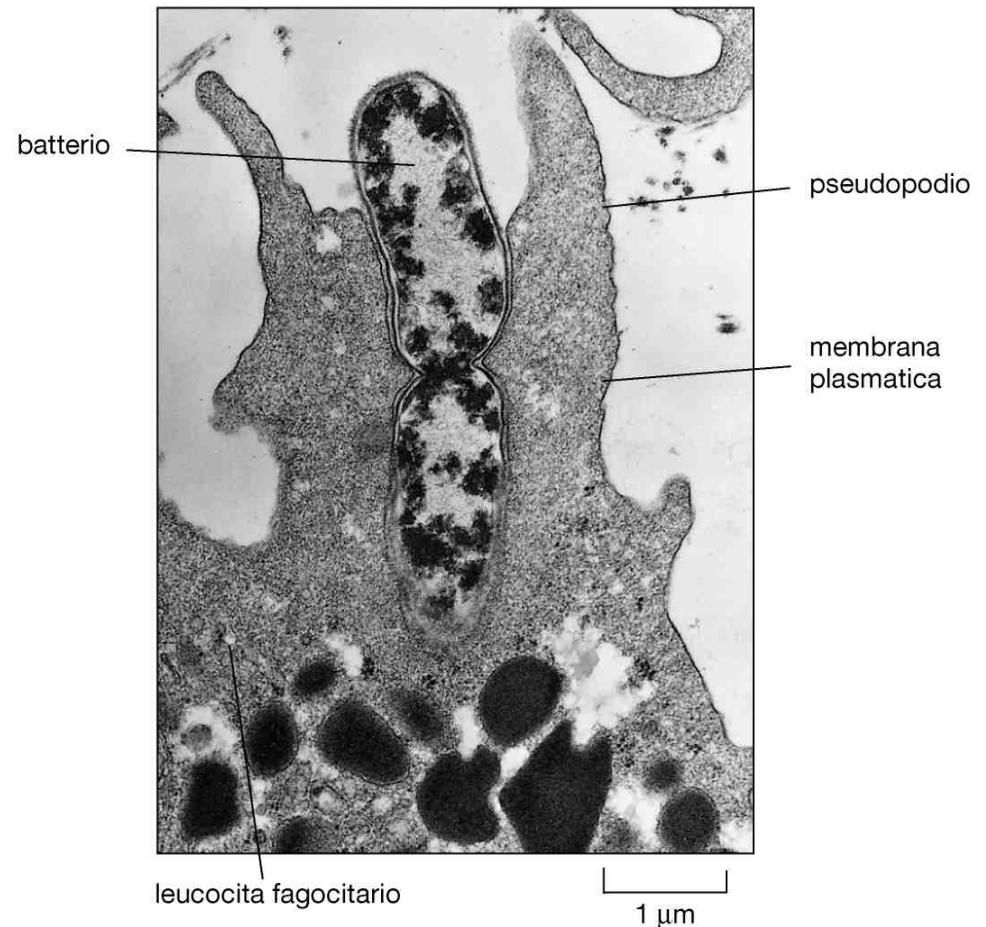
## corpi residuali



Il materiale residuo della degradazione idrolitica è concentrato in “corpi residuali” ed eliminato dalla cellula per esocitosi.

## fagocitosi

La fagocitosi è un'attività presente soprattutto in cellule specializzate, come per esempio i leucociti fagocitari (macrofagi o i granulociti) dei vertebrati ed è mirata all'ingestione a scopo di difesa di oggetti come batteri, cellule o frammenti cellulari. Dopo l'adesione con la particella da fagocitare, la membrana della cellula si solleva in pseudopodi che svolgono un'azione avvolgente, mentre la porzione di membrana sottostante alla particella si introflette, trascinando infine la preda verso l'interno contenuta in un fagosoma



*Nota : la membrana del fagosoma è singola mentre quella dell'autofagosoma è doppia.*

