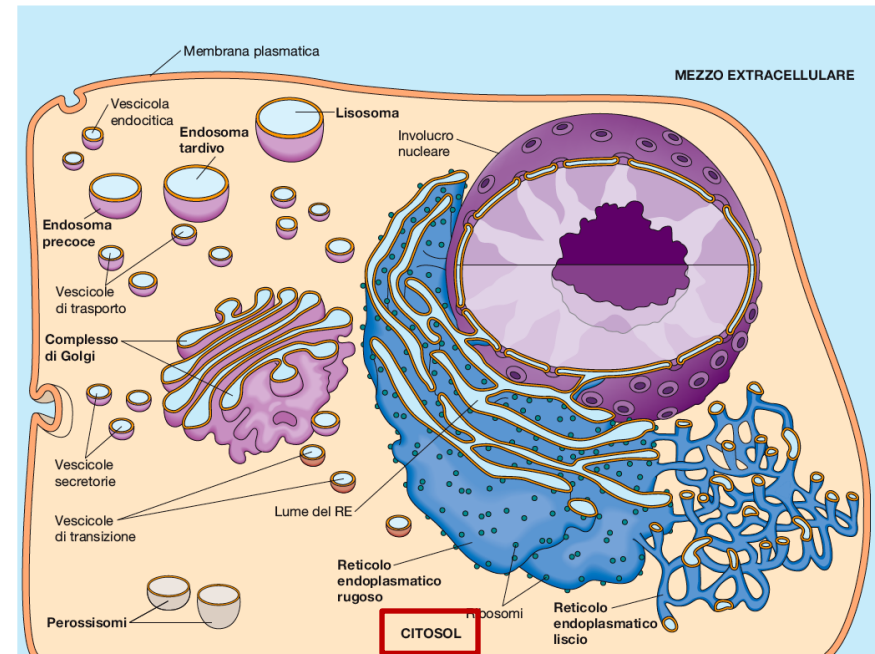
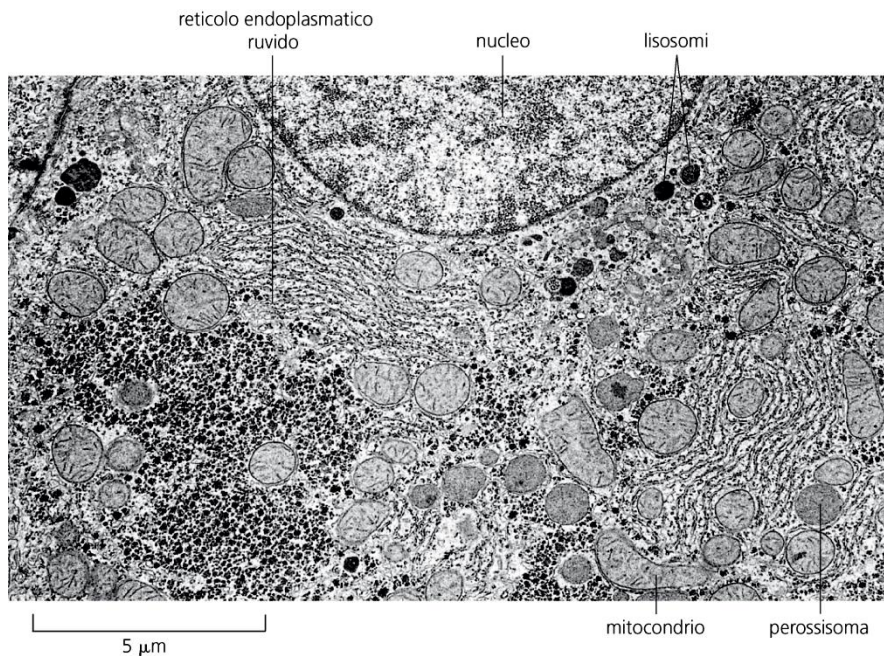


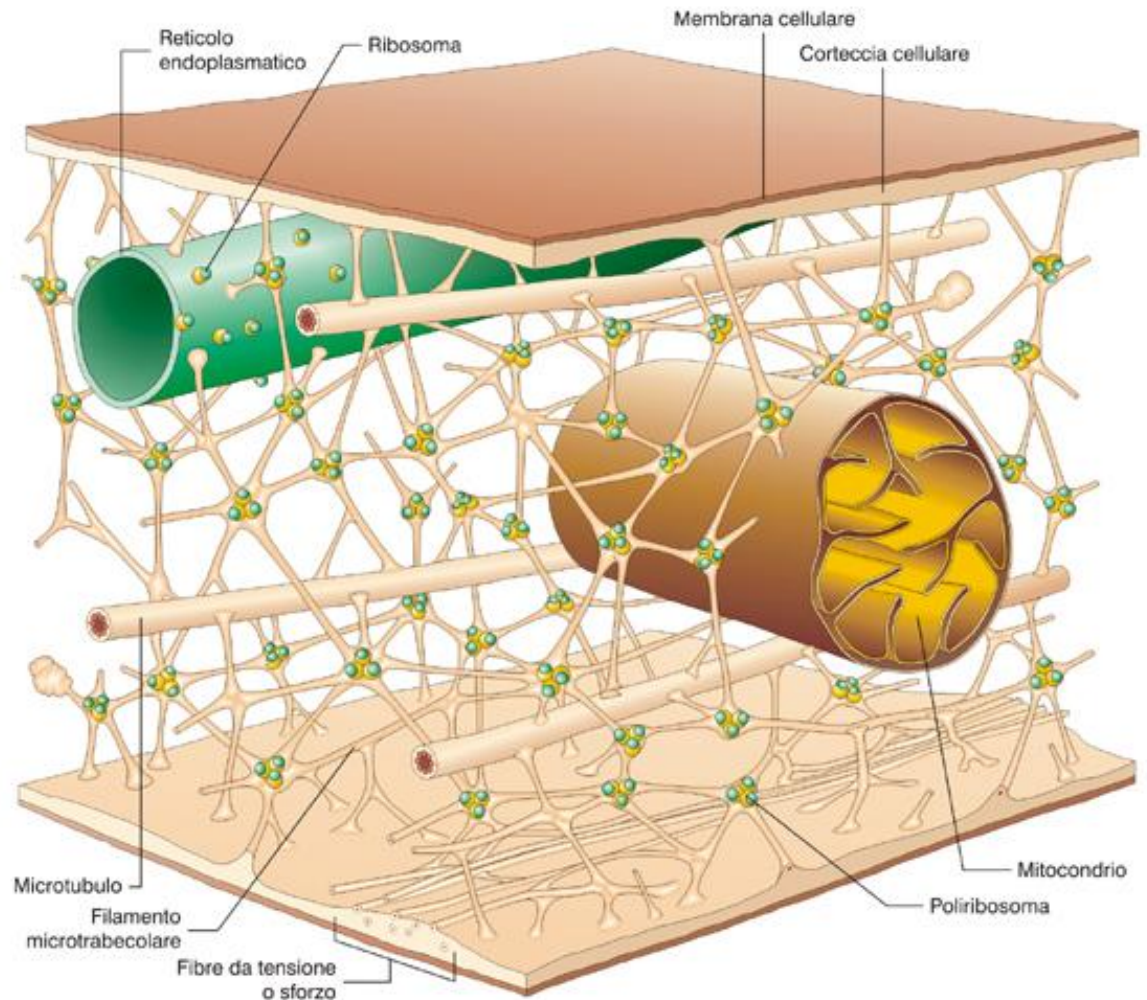
I compartimenti intracellulari e gli organelli citoplasmatici

Con lo sviluppo della microscopia elettronica (anni '40) si scoprì che nel citoplasma delle cellule eucariote è presente un complesso sistema di membrane. Dalle ricerche biochimiche che seguirono si capì che le membrane intracellulari delimitano compartimenti cellulari distinti.

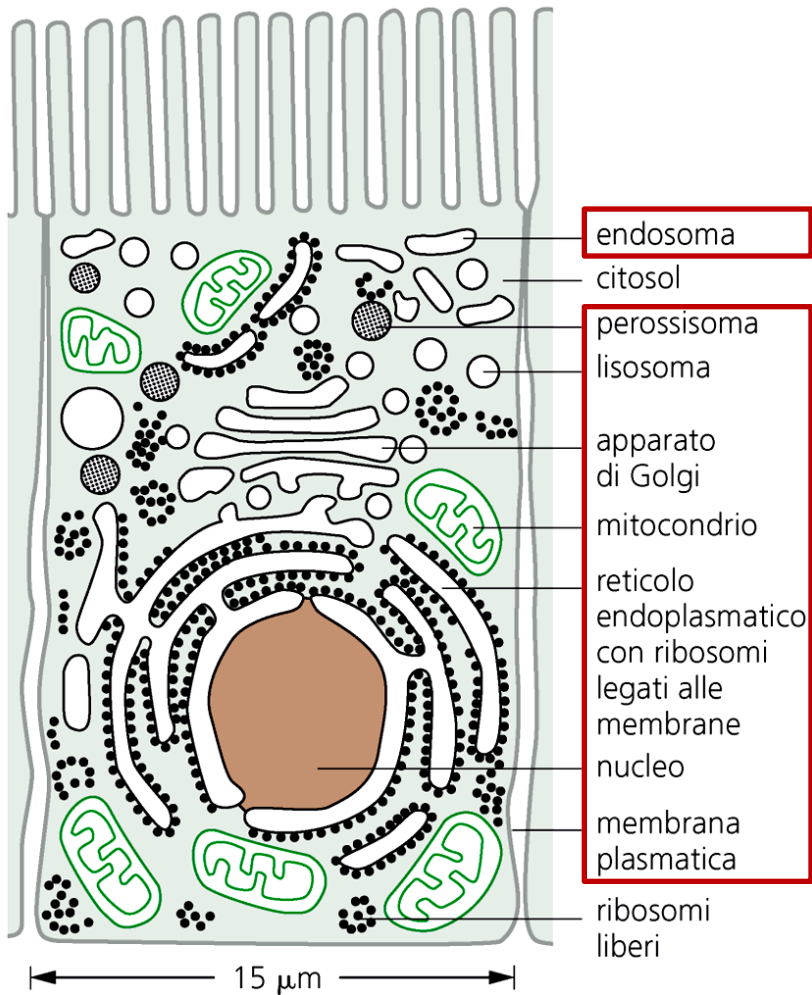


Il citosol

Secondo le teorie più recenti la componente solubile del citoplasma (citosol) non è una semplice soluzione acquosa, più o meno densa, in cui sono disciolte molecole organiche di piccole e grandi dimensioni. E' invece fortemente strutturata, contiene una complessa rete tridimensionale di filamenti proteici (citoscheletro) sfuggenti alle tecniche morfologiche classiche a causa delle esili dimensioni e dell'instabilità



Gli organelli delimitati da membrana in una cellula animale:



Cellule dell'epitelio intestinale

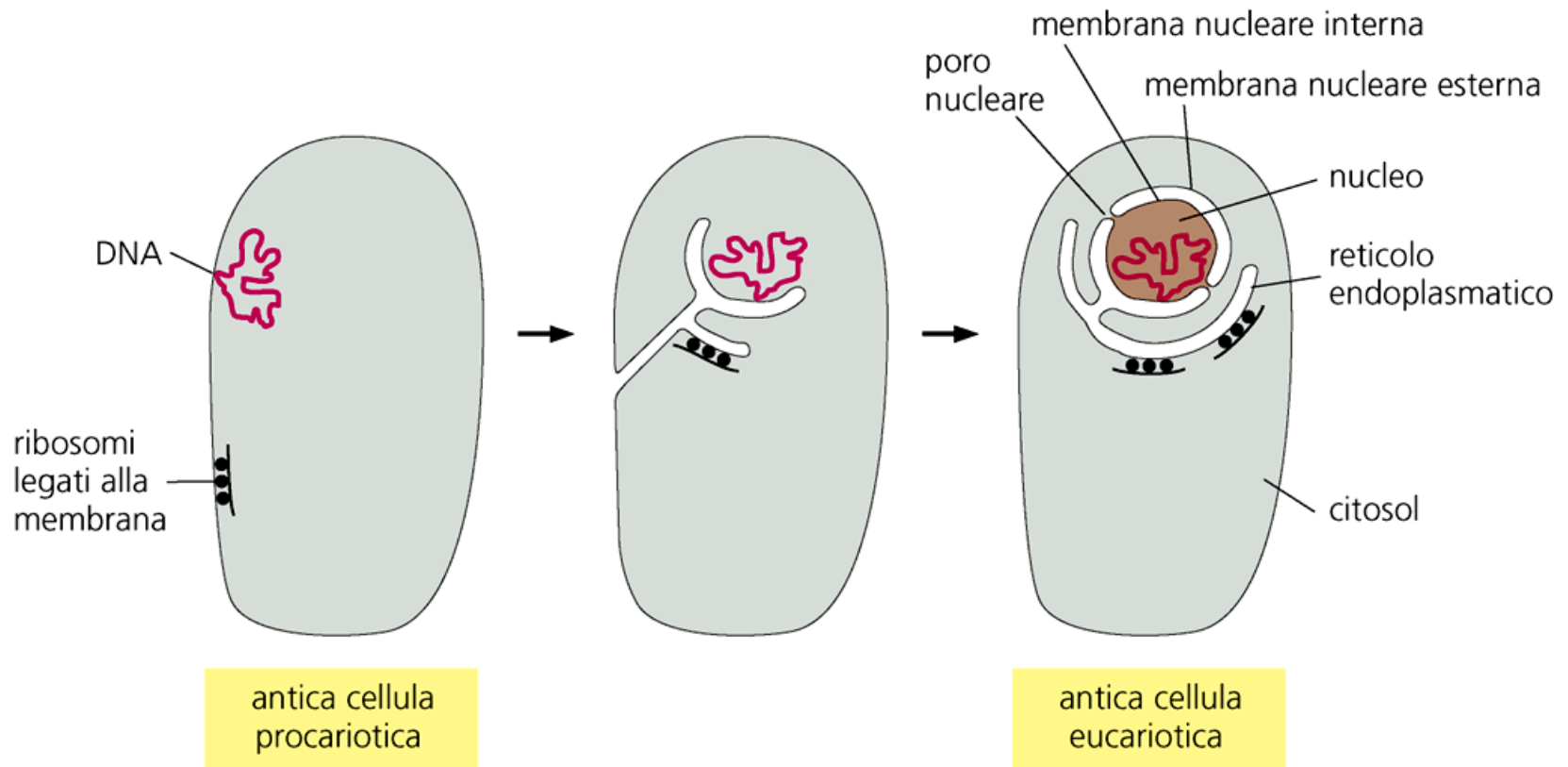
Compartimento	Funzioni principali
citosol	Vie metaboliche, sintesi proteica
nucleo	Contiene DNA, sintesi DNA e RNA
Reticolo endoplasmatico	Sintesi di lipidi e di proteine destinate alla via secretoria
Apparato di Golgi	Modificazione e smistamento di proteine
lisosomi	Degradazione intracellulare
perossisomi	Ossidazione molecole tossiche
endosomi	Smistamento materiale assunto per endocitosi
mitocondri	Sintesi di ATP

TABLE 15-2 THE RELATIVE VOLUMES OCCUPIED BY THE MAJOR MEMBRANE-ENCLOSED ORGANELLES IN A LIVER CELL (HEPATOCYTE)

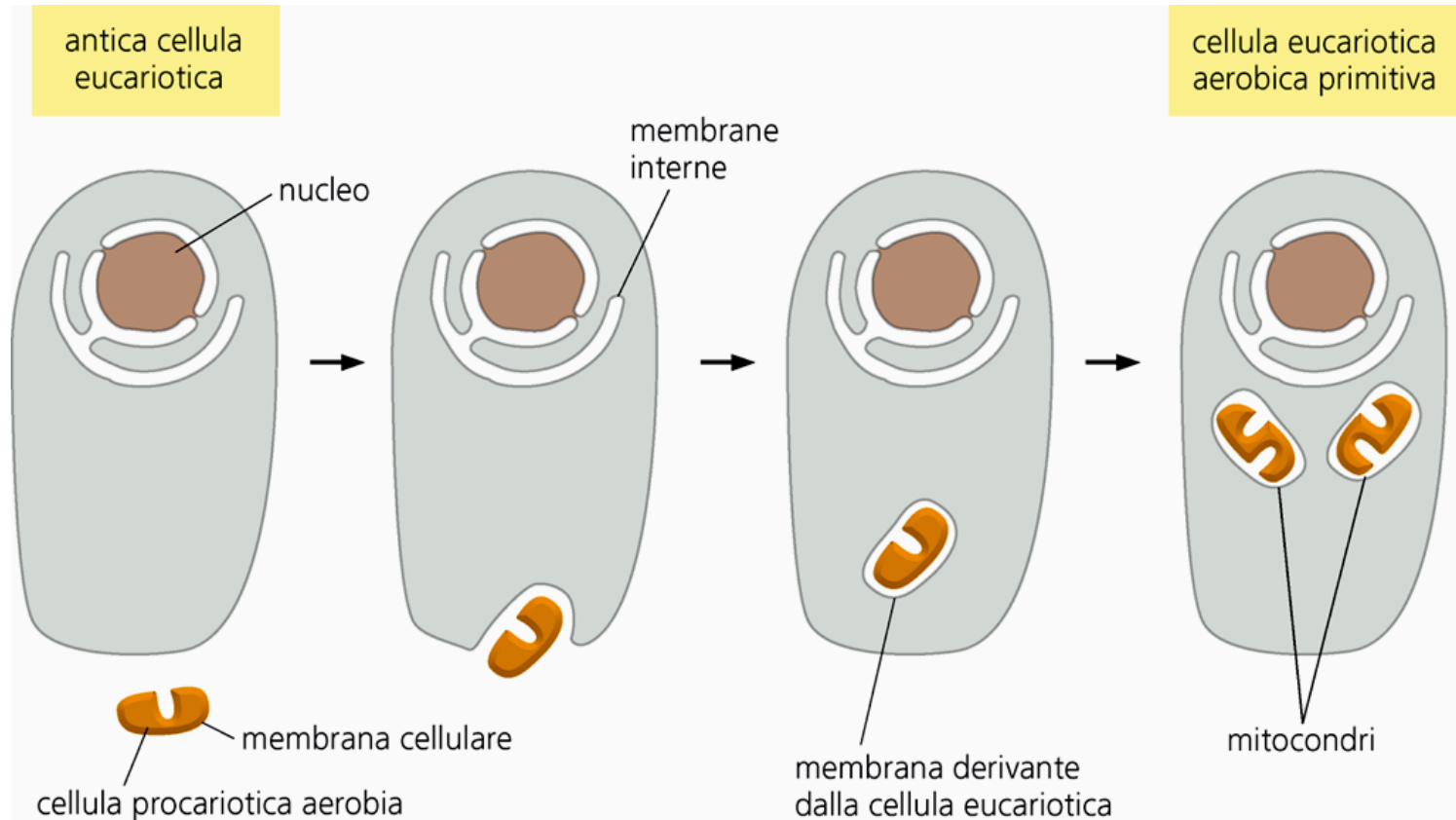
INTRACELLULAR COMPARTMENT	PERCENTAGE OF TOTAL CELL VOLUME	APPROXIMATE NUMBER PER CELL
Cytosol	54	1
Mitochondria	22	1700
Endoplasmic reticulum	12	1
Nucleus	6	1
Golgi apparatus	3	1
Peroxisomes	1	400
Lysosomes	1	300
Endosomes	1	200

Qual è l'origine degli organelli cellulari?

Le membrane nucleari e il RE potrebbero essere derivati da un processo di **invaginazione della membrana plasmatica** avvenuto durante l'evoluzione delle cellule eucariotiche

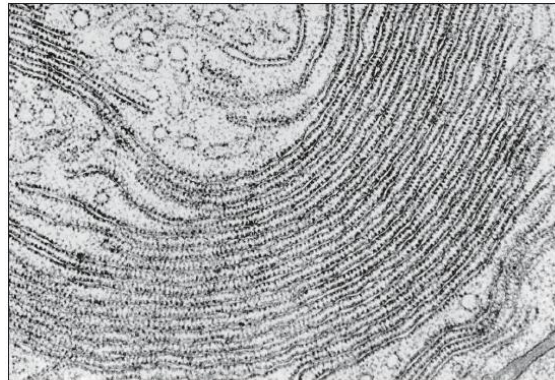


I **mitocondri** invece potrebbero aver avuto origine da un procariote inglobato da una cellula eucariotica di maggiori dimensioni



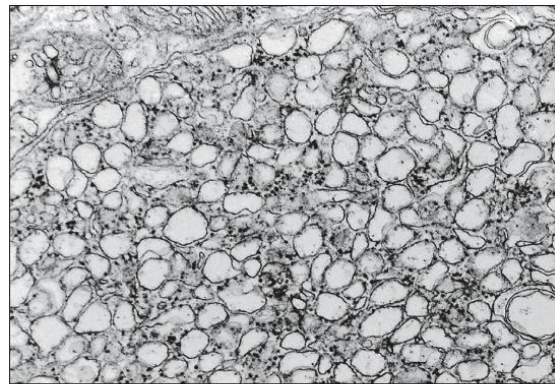
Come si studiano gli organelli intracellulari?

Morfologia funzionale: ME, incorporazione isotopi radioattivi, proteine legate a GFP



(a) Reticolo endoplasmatico rugoso

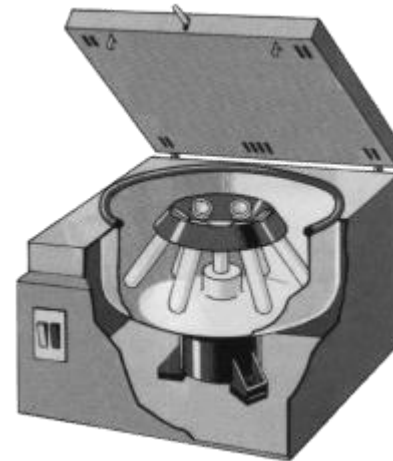
0,5 μm



(b) Reticolo endoplasmatico liscio

0,5 μm

Caratteristiche biochimiche e molecolari: centrifugazione di un omogenato cellulare per separare i singoli organelli (frazionamento subcellulare) + studi funzionali



L'uso degli **aminoacidi radioattivi** e dell'autoradiografia ha permesso di visualizzare gli organelli coinvolti nella sintesi, maturazione e trasporto delle proteine destinate alla secrezione

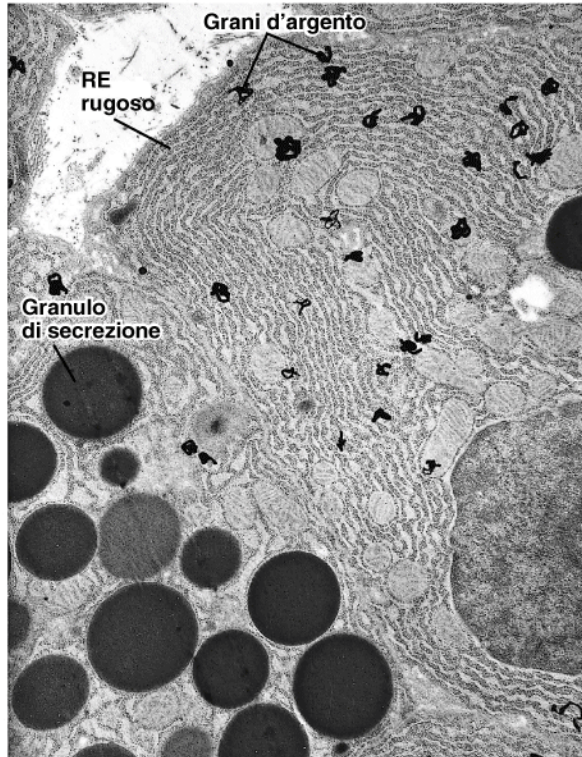
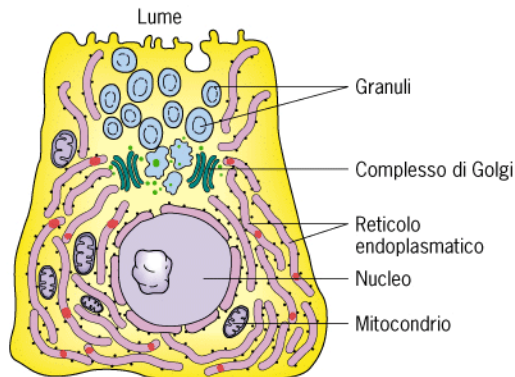


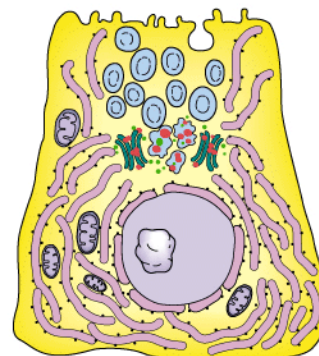
FIGURA 8.3 L'uso dell'autoradiografia per mettere in evidenza i siti di sintesi ed il successivo trasporto delle proteine di secrezione. (a) Micrografia elettronica di una sezione di una cellula acinosa del pancreas che è stata incubata per tre minuti con aminoacidi radioattivi e poi fissata immediatamente e preparata per l'autoradiografia (vedi Paragrafo 18.4 per la discussione sulla tecnica). I grani di argento che compaiono in nero nell'emulsione dopo lo sviluppo sono localizzati sul reticolo endoplasmatico. (b-d) Diagrammi di una sequenza di autoradiografie che mostrano il movimento di proteine di secrezione marcate (rappresentate dai grani di argento in rosso) attraverso una cellula acinosa del pancreas. Quando la cellula è esposta ai precursori radioattivi per tre minuti e poi immediatamente fissata (come mostrato in a), la radioattività si localizza nel reticolo endoplasmatico (b). Dopo tre minuti di marcatura e 17 minuti di somministrazione di materiale non marcato, la marcatura si concentra nel complesso di Golgi e nelle vescicole adiacenti (c). Dopo tre minuti di marcatura e 117 minuti di somministrazione di materiale non marcato, la radioattività è concentrata nei granuli di secrezione e comincia ad essere rilasciata nei dotti pancreatici (d). (A: PER GENT. CONC. DI JAMES D. JAMIESON E GEORGE PALADE).

(a)



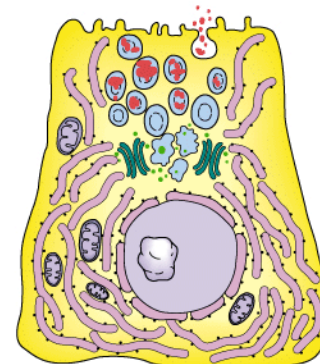
3 min

(b)



20 min

(c)



120 min

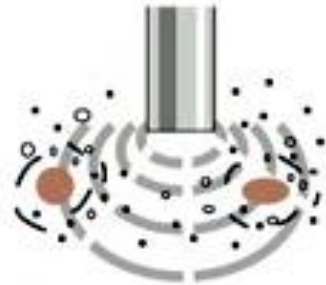
(d)

Produzione di un “omogenato” cellulare

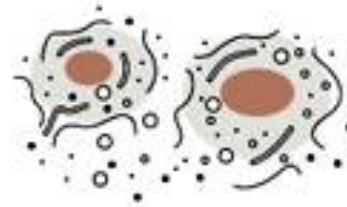
Il primo passo per solubilizzare gli organelli consiste nel rompere i tessuti e le cellule in maniera controllata



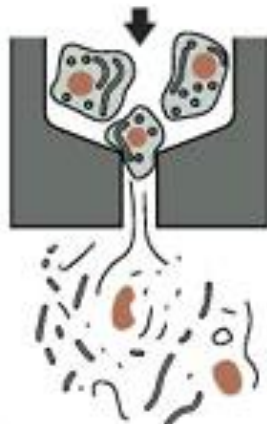
Sospensione cellulare o tessuto



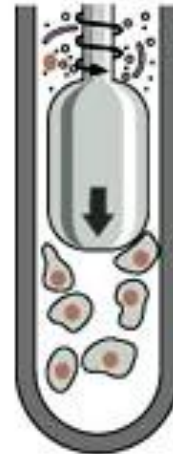
① Rottura delle cellule con ultrasuoni



② Trattamento con un detergente blando per fare buchi nella membrana plasmatica



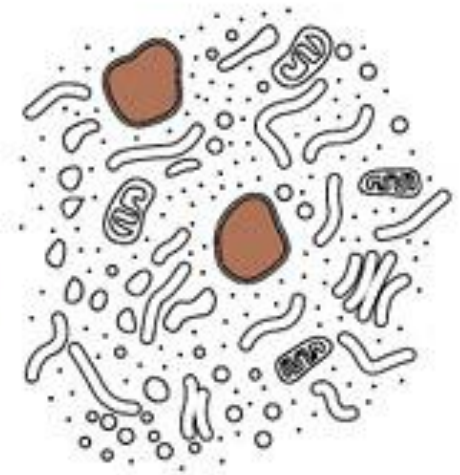
③ Passaggio forzato delle cellule attraverso un foro stretto mediante alta pressione



④ Tritatura delle cellule con un pistone rotante dentro un cilindro di vetro

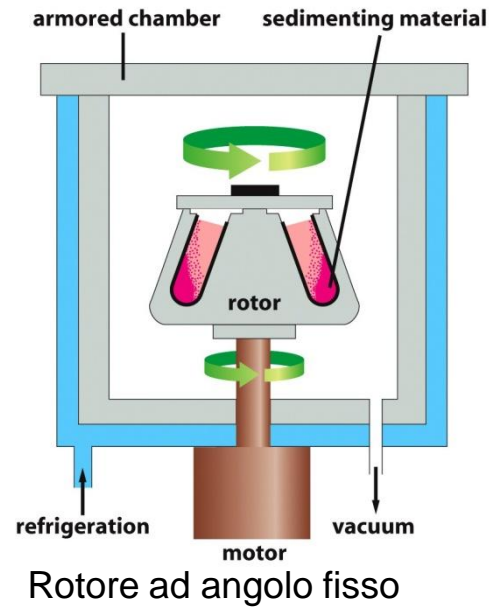
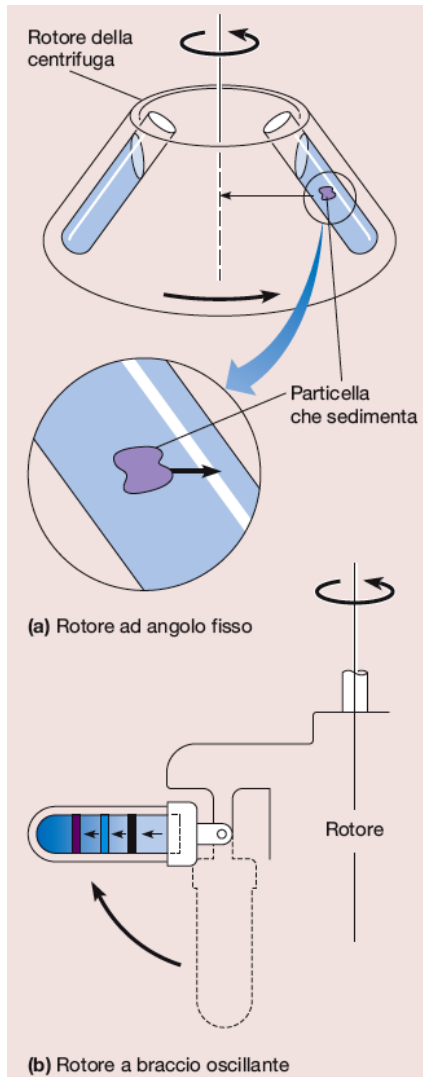


L'omogenato, o estratto, contiene molecole grandi e piccole del citosol (enzimi, ribosomi, metaboliti, etc.), oltre agli organelli circondati da membrana



Se fatta con cura, l'omogenizzazione lascia intatta gran parte degli organelli avvolti da membrana

L'omogenizzazione produce una sospensione contenente le diverse frazioni cellulari, che possono essere separate per CENTRIFUGAZIONE



Rotore a braccio oscillante (o basculante)

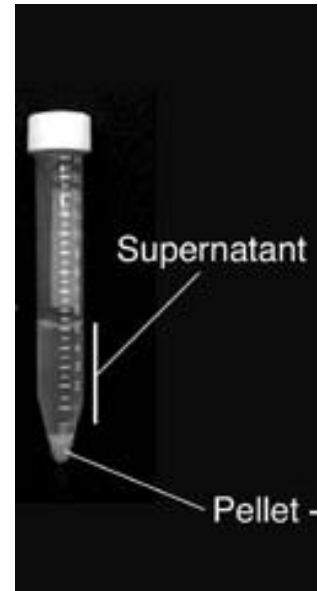
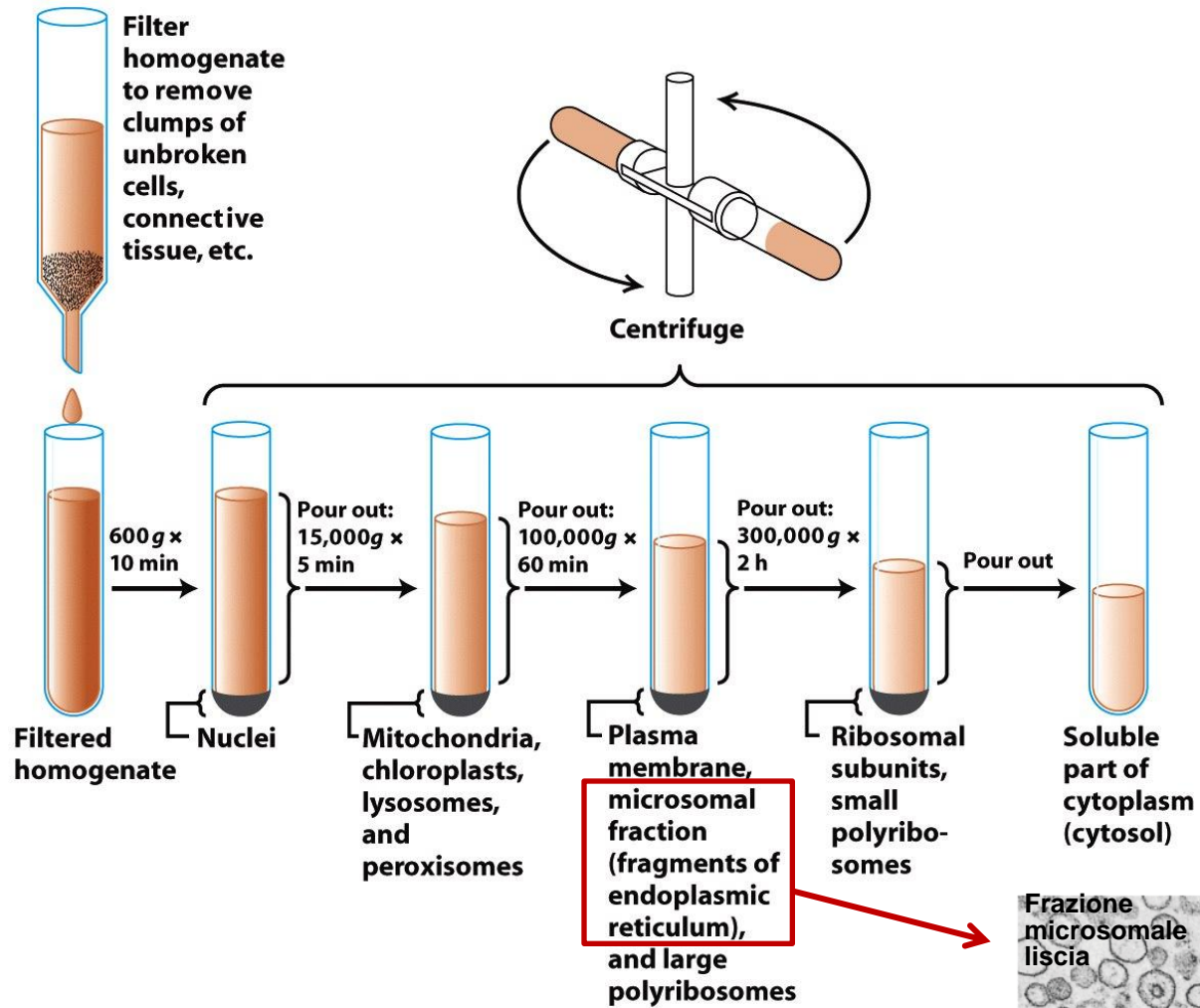


Centrifuga da banco (max 18 000 giri al min (rpm))



Le ultracentrifughe moderne raggiungono la velocità di 100 000 giri al min (rpm)

Centrifugazioni ripetute a velocità progressivamente più alte frazionano l'omogenato cellulare nei suoi componenti sulla base delle dimensioni e della densità



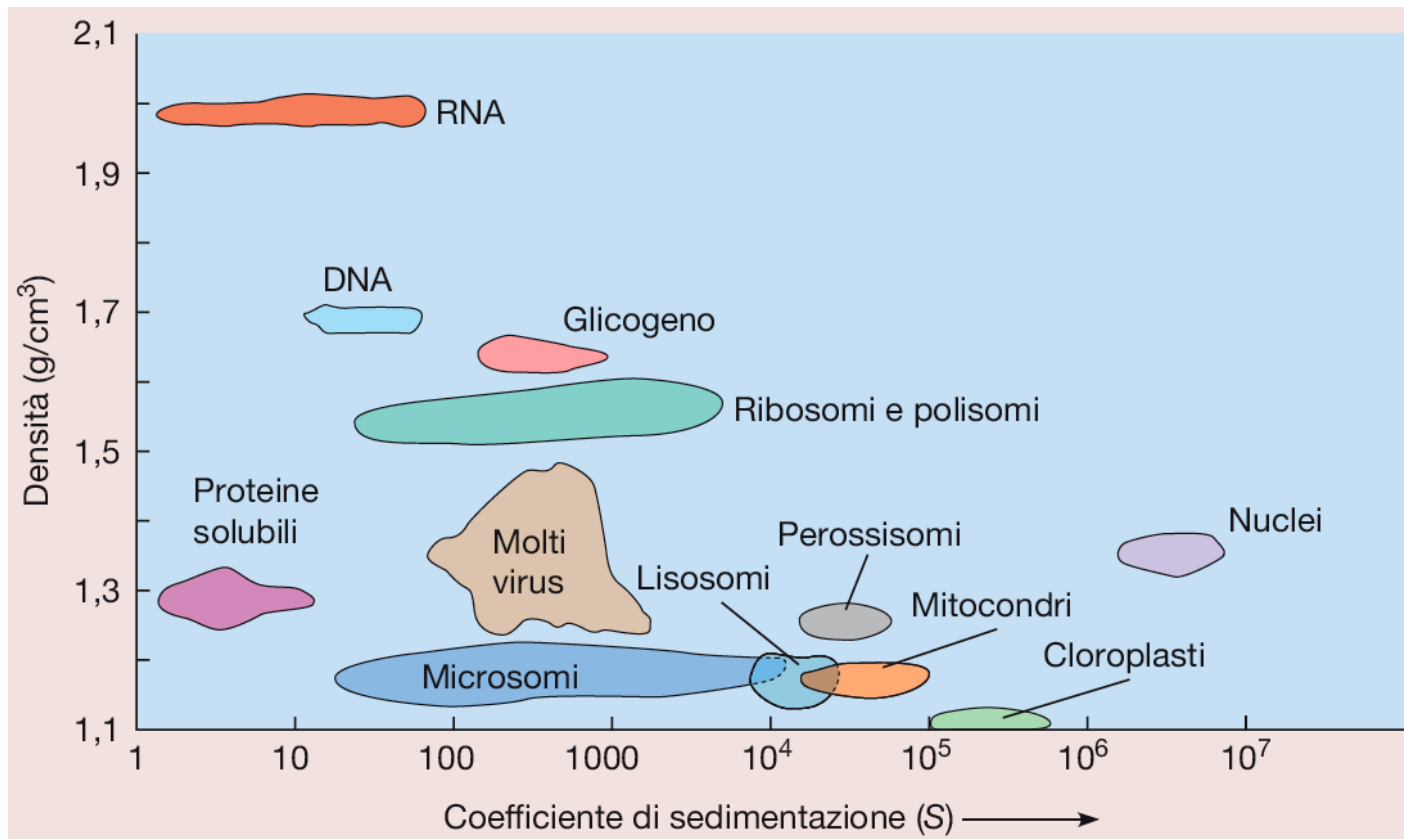
Frazione microsomale liscia
Frazione microsomale rugosa



0,3 μm

Figure 9-25
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Il coefficiente di sedimentazione di un organello (espresso in unità Svedberg = S) indica quanto rapidamente esso sedimenta quando è sottoposto a forza centrifuga



I RIBOSOMI: LE MACCHINE DELLA SINTESI PROTEICA

I ribosomi sono costituiti da due subunità (MAGGIORE e MINORE), che si uniscono soltanto quando il ribosoma è impegnato nella traduzione

I complessi ribosomi-mRNA-proteina nascente possono rimanere liberi nel citoplasma o legarsi al RE

Al termine della sintesi della proteina le due subunità si separano e si staccano dal mRNA

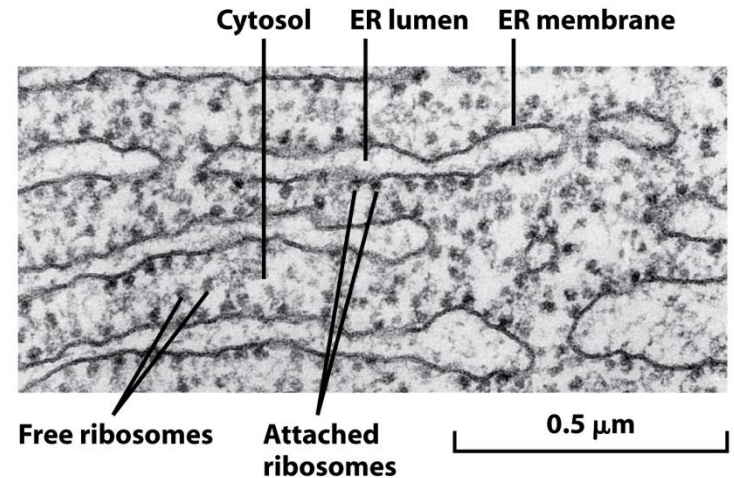
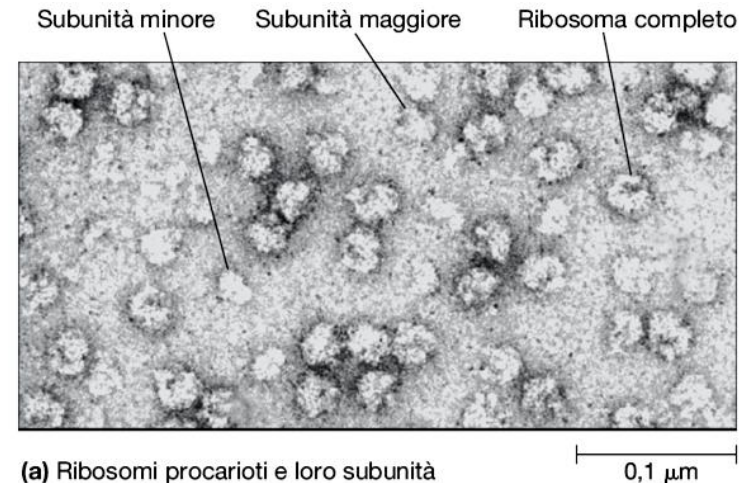
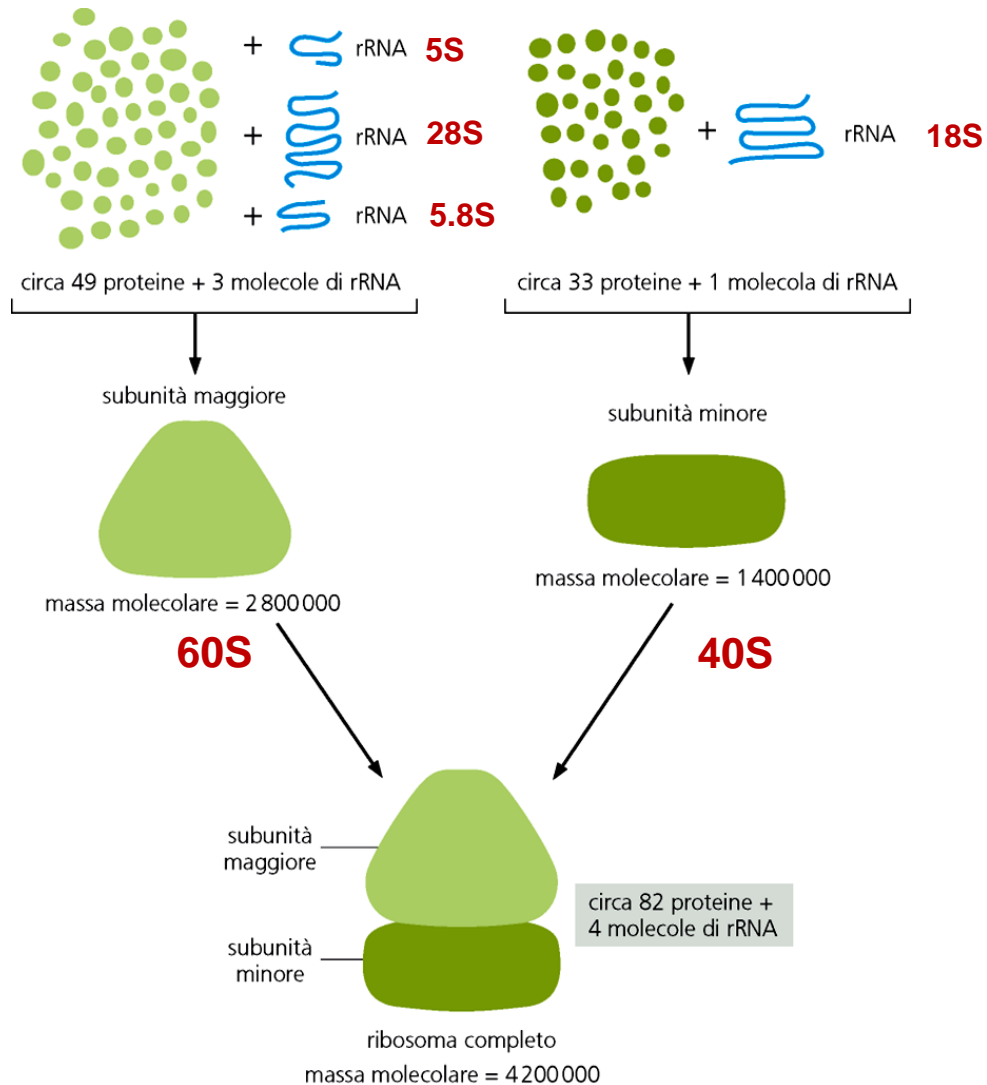


Figure 13-2a
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



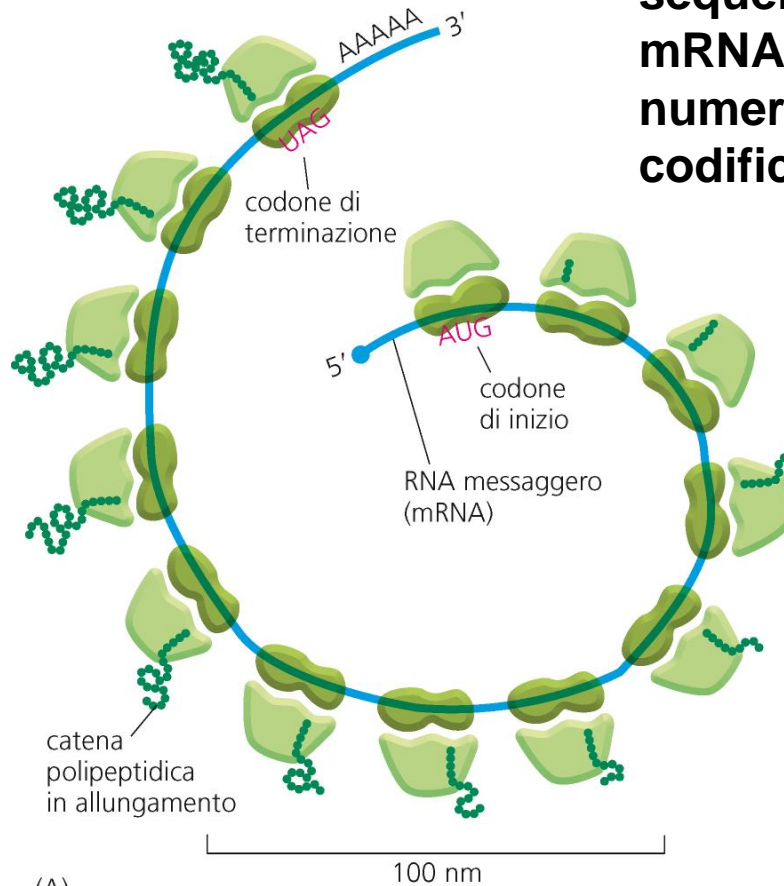
(a) Ribosomi procarioti e loro subunità

Le due subunità ribosomali sono formate nel nucleolo dall'associazione tra rRNA e proteine

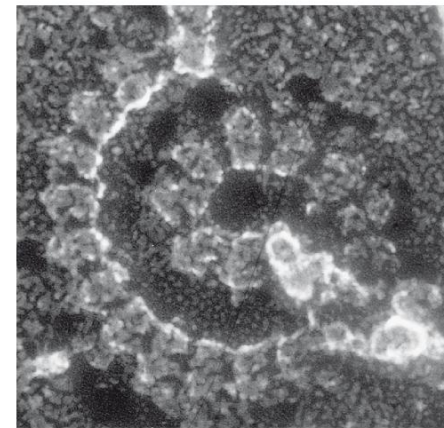


I poliribosomi

Numerosi ribosomi possono legarsi in sequenza su una stessa molecola di mRNA e tradurre simultaneamente numerose copie della proteina codificata



(A)



(B)