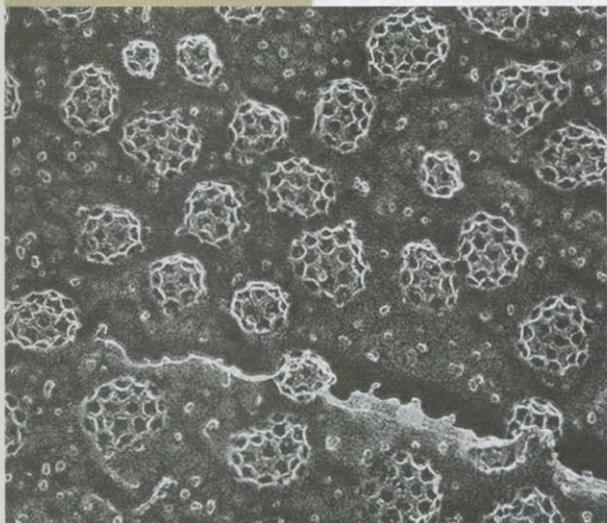


TRAFFICO VESCICOLARE, SECREZIONE ED ENDOCITOSI

- 14.1 Tecniche per lo studio della via secretoria
- 14.2 Meccanismi molecolari del traffico vescicolare
- 14.3 Stadi precoci della via secretoria
- 14.4 Stadi tardivi della via secretoria
- 14.5 Endocitosi mediata da recettore
- 14.6 Smistamento delle proteine di membrana e di materiale citosolico ai lisosomi



Fotografia al microscopio elettronico a scansione che mostra la formazione di vescicole rivestite di clatrina sul lato citosolico della membrana plasmatica. [John Heuser, Washington University School of Medicine.]

Nel precedente capitolo abbiamo esaminato il modo in cui le proteine sono indirizzate e trasportate attraverso le membrane dei diversi organelli intracellulari, come il reticolo endoplasmatico, i mitocondri e i cloroplasti, i perossisomi e il nucleo. In questo capitolo concentreremo la nostra attenzione sulla **via secretoria** e sui meccanismi che permettono alle proteine solubili e di membrana di essere recapitate alla membrana plasmatica e ai lisosomi. Ci occuperemo anche dei processi correlati all'endocitosi e all'autofagia, meccanismi attraverso i quali proteine e piccole molecole vengono trasferite, sia dall'esterno della cellula sia dal citoplasma, all'interno dei lisosomi per essere degradate.

Le proteine solubili e di membrana prodotte per funzionare nei lisosomi o sulla superficie della membrana sono trasferite alla loro destinazione definitiva attraverso la via secretoria. Le proteine destinate alla membrana plasmatica comprendono i recettori della superficie cellulare, i trasportatori per l'assunzione dei nutrienti e i canali ionici che mantengono l'appropriato bilancio ionico ed elettrochimico attraverso la membrana plasmatica. Le proteine secrete solubili seguono lo stesso percorso delle proteine destinate alla superficie della membrana plasmatica, ma invece di rimanere immerse nella membrana sono rilasciate in forma solubile nell'ambiente acquoso extracellulare. Esempi di proteine secrete sono gli enzimi digestivi, gli ormoni peptidici, le proteine del siero e il collagene. Come descritto nel Capitolo 9, il lisosoma è un organello con un ambiente interno acido che è generalmente utilizzato per la degradazione di proteine indesiderate e per l'accumulo di piccole molecole come gli aminoacidi. Di conseguenza, i tipi di proteine recapitate alla membrana lisosomiale sono subunità della pompa protonica della classe V che trasporta H^+ dal citosol all'interno del lume acido del lisosoma, nonché trasportatori che rilasciano nel citoplasma piccole molecole accumulate nei lisosomi. Le proteine solubili recapitate attraverso questa via comprendono enzimi digestivi lisosomiali come le proteasi, le glicosidasi, le fosfatasi e le lipasi.

A differenza della via secretoria, che è utilizzata per recapitare proteine di membrana neosintetizzate alla loro corretta destinazione, la **via endocitotica** è utilizzata per assumere sostanze dalla superficie cellu-

lare all'interno della cellula. La via endocitotica è utilizzata per assumere certi nutrienti che sono troppo grandi per essere trasportati attraverso la membrana plasmatica da uno dei meccanismi di trasporto discussi nel Capitolo 11. Per esempio, la via endocitotica è utilizzata per l'assunzione del colesterolo trasportato nelle particelle LDL e degli atomi di ferro trasportati dalla proteina transferrina che lega il ferro. Inoltre, la via endocitotica può essere utilizzata per allontanare recettori proteici dalla superficie cellulare come meccanismo per ridurre la loro attività.

Il traffico proteico nelle vie secretoria ed endocitotica è governato da un principio unico: il trasporto delle proteine di membrana e delle proteine solubili da un compartimento delimitato da membrana a un altro è mediato da **vescicole di trasporto** che raccolgono le *proteine di "carico"* in gemme che sporgono dalla membrana di un compartimento e poi recapitano queste proteine di carico al compartimento successivo attraverso la fusione con la membrana di quel compartimento. È interessante sottolineare che, non appena le vescicole di trasporto gemmano da una membrana e si fondono con la successiva, lo stesso lato della membrana rimane orientato verso il citosol. Quindi una volta che una proteina è stata inserita nella membrana o nel lume dell'RE, essa può essere convogliata lungo la via secretoria, spostandosi da un organello al successivo senza essere traslocata attraverso un'altra membrana e senza modificare il suo orientamento all'interno della membrana. In modo analogo, la via endocitotica utilizza il traffico vescicolare per trasportare proteine dalla membrana plasmatica all'endosoma e al lisosoma, e quindi conservando il loro orientamento all'interno della membrana di questi organelli. La Figura 14.1 schematizza le principali vie del traffico proteico nella cellula.

Nelle sue componenti più semplici, la via secretoria per trasferire le proteine neosintetizzate alla membrana plasmatica o al lisosoma si realizza in due fasi. La prima fase avviene nel reticolo endoplasmatico (RE) ruvido, come descritto nel Capitolo 13. Le proteine solubili e di membrana neosintetizzate sono traslocate nell'RE, dove si ripiegano nella loro conformazione appropriata e vengono modificate covalentemente con carboidrati *N*-legati o *O*-legati e legami disolfuro. Una volta che si sono ripiegate in modo corretto e sono state modificate adeguatamente nel lume dell'RE, le proteine neosintetizzate accedono alla seconda fase della via secretoria, il trasporto attraverso l'apparato di Golgi. Nell'RE, le proteine secretorie sono impaccate in vescicole di trasporto anterogrado (in avanti). Queste vescicole si fondono l'una con l'altra per formare un compartimento delimitato da membrane appiattite, noto come **cisterna *cis*** del Golgi. Alcune proteine, soprattutto quelle localizzate nell'RE, sono recuperate all'RE dal *cis* del Golgi attraverso una serie di vescicole di trasporto retrogrado (indietro). Una nuova cisterna *cis* del Golgi con il suo carico di proteine si sposta fisicamente dalla posizione *cis* (la più vicina all'RE) alla posizione *trans* (la più lontana dall'RE) diventando successivamente prima una cisterna *intermedia* e poi una cisterna *trans* del Golgi.

Questo processo, noto come *maturazione delle cisterne*, non coinvolge la gemmazione e la fusione delle vescicole di trasporto anterogrado. Durante la maturazione delle cisterne, gli enzimi e altre proteine residenti nel Golgi sono continuamente riportate dalle cisterne tardive del Golgi a quelle primarie attraverso vescicole di trasporto retrogrado, rimanendo così localizzate nelle cisterne *cis*, *intermedia* o *trans* del Golgi. Durante lo spostamento attraverso l'apparato di Golgi, le proteine secretorie possono subire ulteriori modificazioni nei carboidrati legati da parte di specifiche glicosil trasferasi che sono contenute nei diversi compartimenti del Golgi.

Le proteine della via secretoria che sono destinate alla membrana plasmatica o ai lisosomi alla fine raggiungono una complessa rete di membrane e vescicole chiamata **reticolo *trans* del Golgi (TGN)**. Il TGN costituisce uno dei principali punti di ramificazione nella via secretoria e, attraverso un processo noto come *smistamento delle proteine*, una proteina può essere collocata in uno degli almeno tre diversi tipi di vescicole che gemmano dal TGN. Dopo la gemmazione dal reticolo *trans* del Golgi, il primo tipo di vescicole si sposta verso la membrana plasmatica con la quale si fonde, un processo definito **esocitosi**, rilasciando quindi il suo contenuto all'esterno della cellula, mentre le proteine di membrana presenti nella vescicola vengono incorporate nella membrana plasmatica. In tutti i tipi di cellule, almeno alcune proteine sono assunte in questo tipo di vescicole e sono secrete continuamente in questo modo. Il secondo tipo di vescicole che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi, note come **vescicole secretorie**, sono accumulate all'interno della cellula fino a quando una molecola segnale per l'esocitosi causa il rilascio del loro contenuto nella membrana plasmatica. Tra le proteine rilasciate attraverso questa secrezione regolata sono da ricordare gli ormoni peptidici (per esempio, l'insulina, il glucagone, l'ACTH) rilasciati da varie cellule endocrine, i precursori degli enzimi digestivi secreti dalle cellule acinose del pancreas, le proteine del latte secrete dalla ghiandola mammaria e i neurotrasmettitori liberati dai neuroni. Il terzo tipo di vescicole che gemma dal reticolo *trans* del Golgi è diretto ai **lisosomi**, gli organelli responsabili della degradazione intracellulare delle macromolecole, e a organelli di accumulo di tipo lisosomiale presenti in alcuni tipi cellulari. Le proteine secretorie destinate ai lisosomi sono prima trasportate mediante vescicole dal reticolo *trans* del Golgi a un compartimento solitamente chiamato **endosoma tardivo**; le proteine sono poi trasferite ai lisosomi per fusione diretta dell'endosoma con la membrana lisosomiale.

Dal punto di vista del meccanismo l'**endocitosi** è correlata alla via secretoria. Nella via endocitotica, le vescicole gemmano dalla membrana plasmatica, trasferendo le proteine di membrana e i loro **ligandi** all'interno della cellula (Figura 14.1). Dopo la loro internalizzazione per endocitosi, alcune proteine sono trasferite ai lisosomi attraverso l'endosoma tardivo, mentre altre sono riportate indietro verso la superficie cellulare.

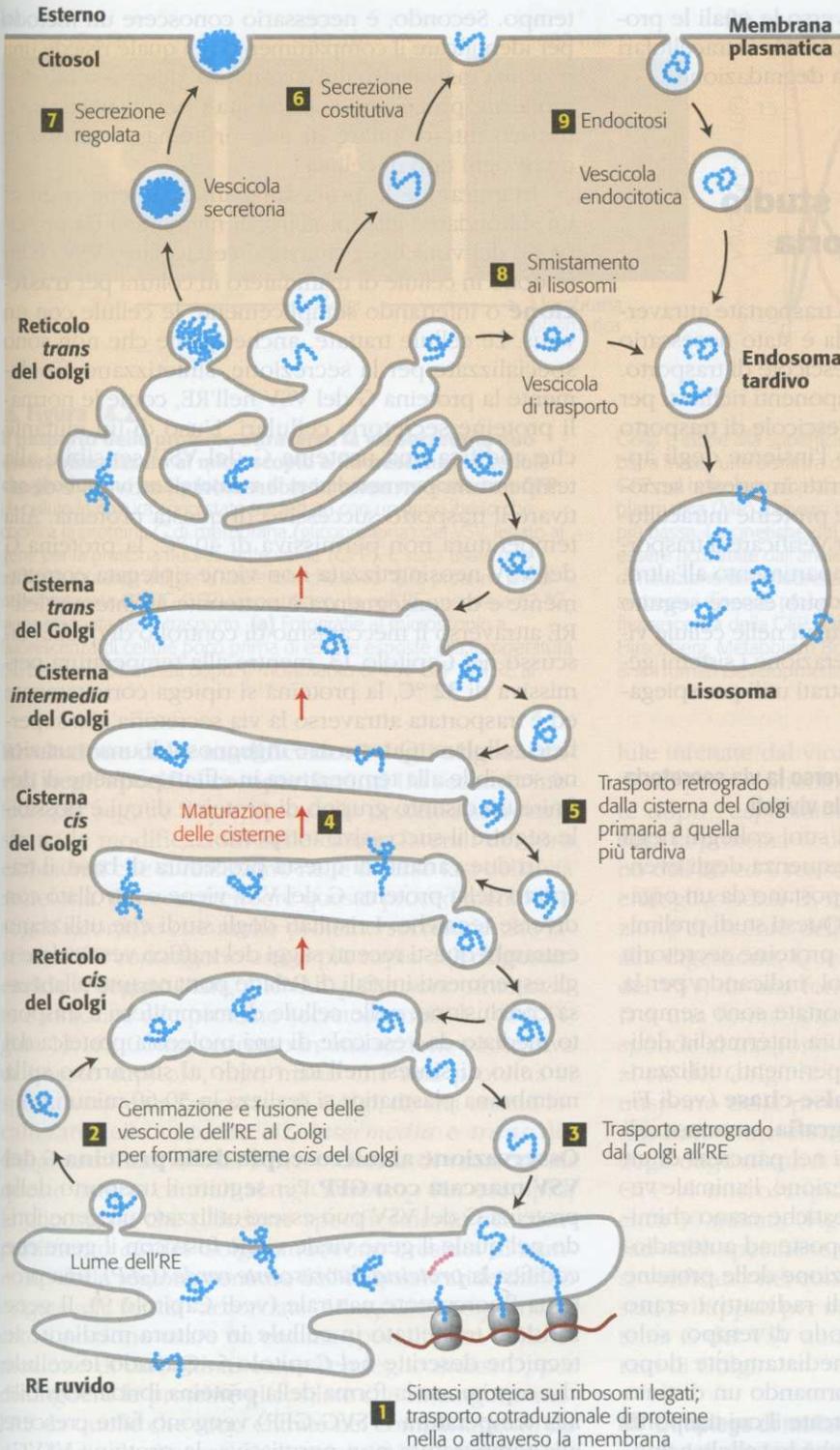


Figura 14.1
Visione d'insieme della via secretoria e della via endocitica per lo smistamento delle proteine.

Via secretoria: la sintesi delle proteine che hanno una sequenza segnale per l'RE viene completata sull'RE ruvido **1**, e le catene polipeptidiche neosintetizzate sono inserite nella membrana dell'RE o, attraverso essa, nel lume (Capitolo 13). Alcune proteine (per esempio, gli enzimi dell'RE o le proteine strutturali) rimangono stabilmente all'interno dell'RE. Il resto delle proteine viene impaccato nelle vescicole di trasporto **2** che gemmano dall'RE e si fondono per formare nuove cisterne *cis* del Golgi. Le proteine residenti nell'RE smistate erroneamente e le proteine di membrana delle vescicole che possono essere riutilizzate sono riportate all'RE da vescicole **3** che gemmano dal *cis* del Golgi e si fondono con l'RE. Ognuna di queste cisterne *cis* del Golgi, con il suo contenuto proteico, si sposta fisicamente dal lato *cis* al lato *trans* dell'apparato di Golgi **4** attraverso un processo non vescicolare chiamato maturazione delle cisterne. Le vescicole di trasporto retrogrado **5** trasferiscono le proteine residenti nel Golgi all'appropriato compartimento del Golgi. In tutte le cellule, alcune proteine solubili vengono trasferite alla superficie cellulare in vescicole di trasporto **6** e sono secrete di continuo (secrezione costitutiva). In certi tipi di cellule, alcune proteine solubili sono accumulate in vescicole secretorie **7** e sono rilasciate solo quando la cellula riceve un appropriato segnale nervoso o ormonale (secrezione regolata). Le proteine solubili e di membrana destinate ai lisosomi, che sono trasportate in vescicole che gemmano dal *trans* del Golgi **8**, prima si spostano verso l'endosoma tardivo e poi verso il lisosoma. *Via endocitica:* anche le proteine extracellulari solubili e di membrana assunte dalle vescicole che gemmano per invaginazione della membrana plasmatica **9** possono confluire nell'endosoma tardivo e poi nel lisosoma.

All'inizio di questo capitolo commenteremo come le nostre conoscenze della via secretoria e dell'endocitosi si sono ampliate attraverso l'utilizzo di tecniche sperimentali, e poi ci concentreremo sui meccanismi generali della gemmazione e della fusione di membrana. Verificheremo che, sebbene i diversi tipi di vescicole di trasporto utilizzino specifici gruppi di proteine per la loro formazione e fusione, tutte le vescicole utilizzano lo stesso meccanismo generale per la gemma-

zione, per la selezione di particolari molecole di carico, e per la fusione con la membrana bersaglio appropriata. Nelle sezioni successive sarà mostrato come la coordinazione tra le particolari tappe del traffico vescicolare possono conservare l'identità (cioè, una serie stabile di proteine residenti) dei diversi compartimenti lungo la via secretoria e come la selezione del carico da parte delle vescicole è utilizzata per smistare le proteine ai diversi compartimenti intracellulari. Infine,

analizzeremo le diverse vie attraverso le quali le proteine di membrana e le macromolecole intracellulari sono trasportate ai lisosomi per la degradazione.

14.1 Tecniche per lo studio della via secretoria

Per capire come le proteine sono trasportate attraverso gli organelli della via secretoria è stato necessario comprendere la funzione delle vescicole di trasporto. Nello scorso decennio, molti componenti richiesti per la formazione e la fusione delle vescicole di trasporto sono stati identificati utilizzando l'insieme degli approcci genetici e biochimici descritti in questa sezione. Tutti gli studi sul traffico delle proteine intracellulari utilizzano qualche metodo per verificare il trasporto di una data proteina da un compartimento all'altro. Cominceremo descrivendo come può essere seguito il trasporto delle proteine intracellulari nelle cellule viventi e poi prenderemo in considerazione i sistemi genetici e *in vitro* che si sono dimostrati utili per spiegare la via secretoria.

■ Il trasporto di una proteina attraverso la via secretoria può essere analizzato nelle cellule viventi

Gli studi classici di G. Palade e i suoi colleghi negli anni '60 stabilirono per primi la sequenza degli eventi attraverso i quali le proteine si spostano da un organello all'altro nella via secretoria. Questi studi preliminari inoltre dimostrarono che le proteine secretorie non sono mai rilasciate nel citosol, indicando per la prima volta che le proteine trasportate sono sempre associate a qualche tipo di struttura intermedia delimitata da membrana. In questi esperimenti, utilizzando la tecnica di marcatura del **pulse-chase** (vedi Figura 3.39) associata all'**autoradiografia**, aminoacidi marcati (radioattivi) erano iniettati nel pancreas di un criceto. A tempi diversi dopo l'iniezione, l'animale veniva sacrificato e le cellule pancreatiche erano chimicamente fissate, sezionate e sottoposte ad autoradiografia per visualizzare la localizzazione delle proteine marcate. Poiché gli aminoacidi radioattivi erano somministrati per un breve periodo di tempo, solo quelle proteine sintetizzate immediatamente dopo l'iniezione risultavano marcate, formando un distinto gruppo, o schiera, di proteine marcate il cui trasporto poteva essere seguito. Inoltre, poiché le cellule acinose pancreatiche sono cellule secretorie specializzate, quasi tutti gli aminoacidi marcati in queste cellule sono incorporati nelle proteine secretorie, facilitando l'osservazione delle proteine trasportate.

Sebbene oggi l'autoradiografia sia utilizzata raramente per localizzare le proteine all'interno delle cellule, questi esperimenti iniziali illustrano i due requisiti fondamentali per qualsiasi saggio di trasporto tra i compartimenti subcellulari. Primo, è necessario marcare un sostenuto gruppo di proteine in un compartimento iniziale in modo che il loro trasferimento ai compartimenti successivi possa essere seguito nel

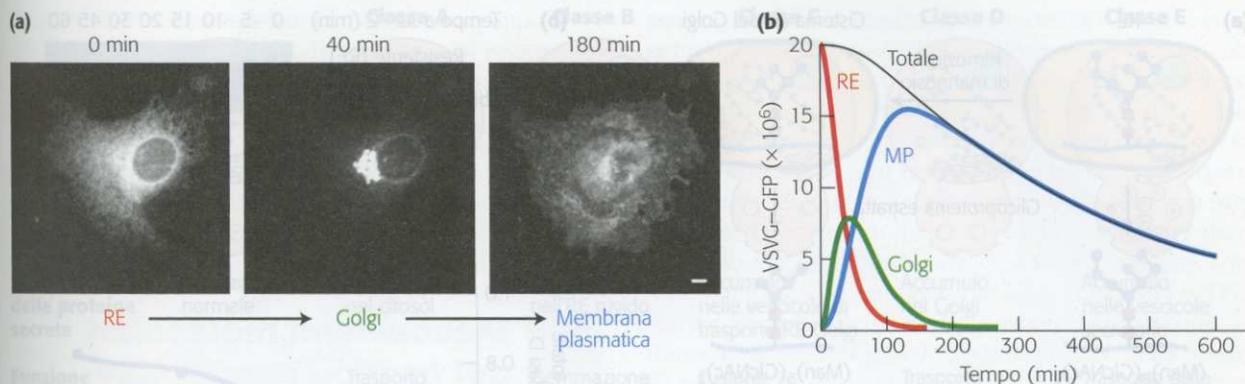
tempo. Secondo, è necessario conoscere un metodo per identificare il compartimento nel quale risiede una proteina marcata. In questo ambito, descriveremo due moderne procedure sperimentali per visualizzare il traffico intracellulare di una proteina secretoria in quasi ogni tipo di cellula.

In entrambe le procedure, un gene che codifica un'abbondante glicoproteina di membrana (la proteina G) del virus della stomatite vescicolare (VSV) è introdotto in cellule di mammifero in coltura per **trasfezione** o infettando semplicemente le cellule con un virus. Le cellule trattate, anche quelle che non sono specializzate per la secrezione, sintetizzano rapidamente la proteina G del VSV nell'RE, come le normali proteine secretorie cellulari. L'uso di un mutante che codifica una proteina G del VSV sensibile alla temperatura permette ai ricercatori di attivare e disattivare il trasporto successivo di questa proteina. Alla temperatura non permissiva di 40 °C, la proteina G del VSV neosintetizzata non viene ripiegata correttamente e di conseguenza è trattenuta all'interno dell'RE attraverso il meccanismo di controllo di qualità discusso nel Capitolo 13, mentre alla temperatura permissiva di 32 °C, la proteina si ripiega correttamente ed è trasportata attraverso la via secretoria alla superficie cellulare. Questo uso ingegnoso di una mutazione sensibile alla temperatura in effetti permette di definire un distinto gruppo di proteine di cui è possibile seguire il successivo trasporto.

In due varianti di questa procedura di base, il trasporto della proteina G del VSV viene controllato con diverse tecniche. I risultati degli studi che utilizzano entrambi questi recenti saggi del traffico vescicolare e gli esperimenti iniziali di Palade portano tutti alla stessa conclusione: nelle cellule di mammifero il trasporto mediato da vescicole di una molecola proteica dal suo sito di sintesi nell'RE ruvido al suo arrivo sulla membrana plasmatica si realizza in 30-60 minuti.

■ Osservazione al microscopio della proteina G del VSV marcata con GFP

Per seguire il trasporto della proteina G del VSV può essere utilizzato un gene ibrido nel quale il gene virale viene fuso con il gene che codifica la **proteina fluorescente verde (GFP)**, una proteina fluorescente naturale (vedi Capitolo 9). Il gene ibrido è trasfettato in cellule in coltura mediante le tecniche descritte nel Capitolo 5. Quando le cellule che esprimono la forma della proteina ibrida sensibile alla temperatura (VSVG-GFP) vengono fatte crescere alla temperatura non permissiva, la proteina VSVG-GFP si accumula nell'RE e, all'osservazione al microscopio a fluorescenza, appare come un reticolo di membrane frastagliate. Quando le cellule sono successivamente esposte a una temperatura permissiva, si osserva che la VSV-GFP si sposta prima verso le membrane dell'apparato di Golgi, che sono molto concentrate ai bordi del nucleo, e poi sulla superficie cellulare (Figura 14.2a). Analizzando la distribuzione di VSV-GFP in tempi diversi dopo l'esposizione delle cellule alla temperatura permissiva, i ricercatori hanno determinato il tempo di residenza della VSV-GFP in ogni organello della via secretoria (Figura 14.2b).



▲ Figura 14.2

Il trasporto delle proteine attraverso la via secretoria può essere visualizzato al microscopio a fluorescenza in cellule che producono una proteina di membrana marcata con GFP.

Le cellule in coltura sono state trasfettate con un gene ibrido che codifica la proteina G di membrana (glicoproteina) del VSV, legato al gene per la proteina fluorescente verde (GFP). È stata usata una versione mutante del gene virale tale che a 40 °C la proteina ibrida neosintetizzata (VSVG-GFP) viene trattenuta nell'RE, mentre a 32 °C viene rilasciata per il trasporto. (a) Fotografie al microscopio a fluorescenza di cellule poco prima di essere esposte alla temperatura più bassa e due minuti dopo. Il movimento di VSV-GFP dall'RE al

Rivelazione delle modificazioni degli oligosaccaridi negli specifici compartimenti

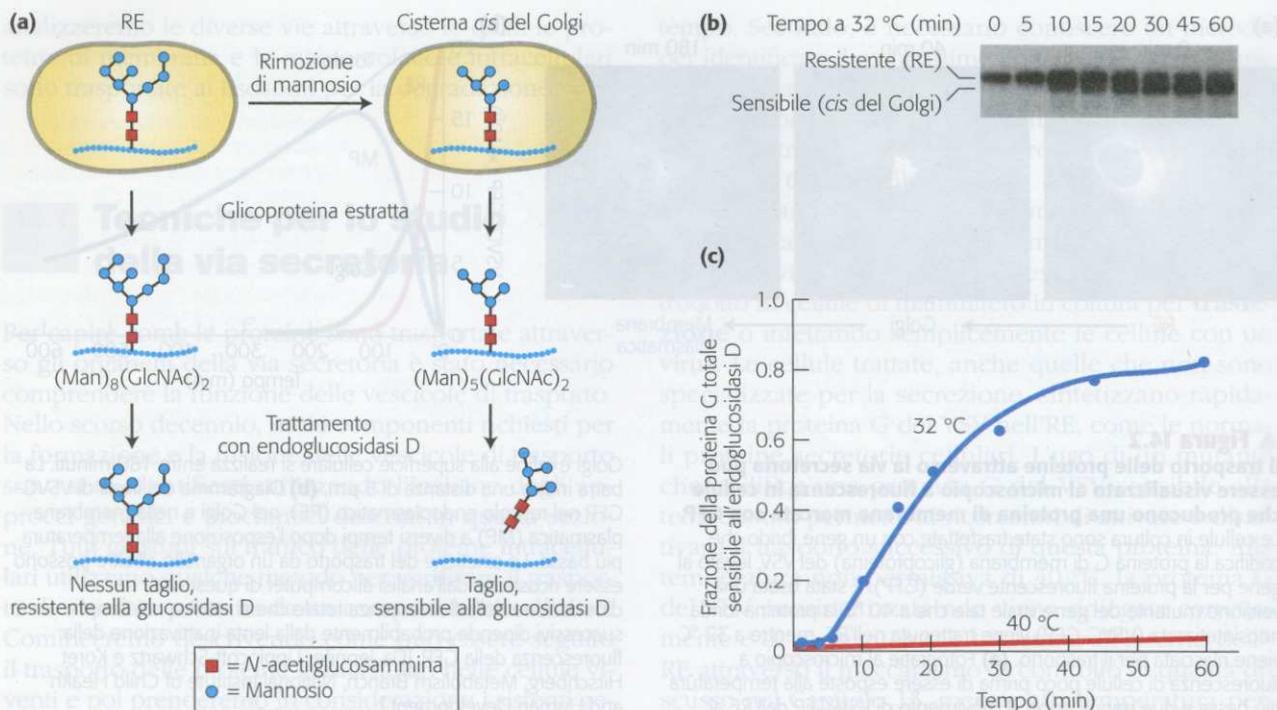
Un secondo metodo per seguire il trasporto delle proteine secretorie sfrutta le modificazioni sulle catene laterali dei loro carboidrati che si realizzano nelle diverse fasi della via secretoria. Per comprendere questo procedimento, bisogna ricordare che molte proteine secretorie che lasciano l'RE contengono una o più copie dell'**oligosaccaride N-legato** $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$, che sono sintetizzate e attaccate alle proteine secretorie nell'RE (vedi Figura 13.18). Come vedremo in una sezione successiva di questo capitolo, man mano che una proteina si sposta attraverso l'apparato di Golgi, diversi enzimi localizzati nelle cisterne *cis*, *intermedia* e *trans* del Golgi catalizzano una serie ordinata di reazioni su queste catene centrali $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$. Per esempio, le glicosidasi che risiedono specificamente nel compartimento *cis* del Golgi rimuovono i residui di mannosio dalla regione centrale dell'oligosaccaride dando origine alla forma "accorciata" $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$. I ricercatori possono usare un enzima specializzato nella rimozione di carboidrati come l'endoglicosidasi D, per distinguere le proteine glicosilate che rimangono nell'RE da quelle che sono entrate nel compartimento *cis* del Golgi: gli oligosaccaridi accorciati specifici del *cis* del Golgi sono rimossi dalle proteine dalla endoglicosidasi D, mentre le catene oligosaccaridiche interne (non accorciate) delle proteine secretorie all'interno dell'RE non subiscono alcuna rimozione da parte di questo enzima (Figura 14.3a). Poiché una proteina deglicosilata ottenuta per digestione da parte della endoglicosidasi D si muove su un gel in presenza di SDS più velocemente della corrispondente proteina glicosilata, queste proteine possono essere facilmente distinte (Figura 14.3b).

Questo tipo di saggio può essere utilizzato per delineare il movimento della proteina G del VSV in cel-

lule infettate dal virus, marcate per un breve periodo di tempo con aminoacidi radioattivi. Immediatamente dopo l'esposizione agli aminoacidi radioattivi, tutta la proteina G del VSV marcata è ancora all'interno dell'RE ed è resistente alla digestione da parte della endoglicosidasi D, ma col passare del tempo una frazione crescente della glicoproteina diventa sensibile alla digestione. Questa conversione della proteina G del VSV, da una forma resistente alla endoglicosidasi D a una forma sensibile all'endoglicosidasi D, corrisponde al trasporto vescicolare della proteina dall'RE al *cis* del Golgi. Si noti che il tempo impiegato per il trasporto della proteina G del VSV dall'RE al Golgi, misurato attraverso i saggi basati sulla elaborazione degli oligosaccaridi o con l'osservazione della VSVG-GFP al microscopio a fluorescenza, corrisponde a circa 30 minuti, (Figura 14.3c). Una serie di saggi basati sulle specifiche modificazioni dei carboidrati che si verificano nei compartimenti tardivi del Golgi sono stati sviluppati per misurare la progressione della proteina G del VSV attraverso ciascuno stadio dell'apparato di Golgi.

■ L'impiego di mutanti di lievito ha permesso di definire le principali tappe del trasporto vescicolare e molti componenti coinvolti

L'organizzazione generale della via secretoria e molte delle componenti molecolari richieste per il traffico vescicolare sono simili in tutte le cellule eucariotiche. A causa di queste caratteristiche conservate, gli studi genetici con cellule di lievito sono stati utili per confermare la sequenza delle tappe nella via secretoria e per identificare molte delle proteine coinvolte nel traffico vescicolare. Anche se le cellule di lievito secernono poche proteine nel mezzo di crescita, esse secernono continuamente un certo numero di enzimi che rimangono localizzati nello stretto spazio compreso



▲ Figura 14.3

Il trasporto di una glicoproteina di membrane dall'RE al Golgi può essere saggiato sulla base della sensibilità al taglio da parte dell'endoglicosidasi D.

Le cellule che esprimono una proteina G del VSV (VSVG) sensibile alla temperatura sono state esposte per un breve periodo di tempo con aminoacidi radioattivi alla temperatura non permissiva, in modo che la proteina marcata fosse trattenuta nell'RE. A intervalli di tempo, dopo il ritorno alla temperatura permissiva di 32 °C, la VSVG è stata estratta dalle cellule e digerita con la endoglicosidasi D. **(a)** Man mano che la proteina si sposta dall'RE verso il *cis* del Golgi, l'oligosaccaride centrale $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$ è ridotto a $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ da enzimi presenti nel compartimento *cis* del Golgi. L'endoglicosidasi D rimuove le catene oligosaccaridiche dalle proteine elaborate nel *cis* del Golgi ma non da quelle presenti nell'RE. **(b)** L'elettroforesi su gel

di poliaccrilamide in SDS delle miscele di digestione separa le forme di VSVG marcate resistenti alla temperatura, non tagliate (migrazione più lenta) da quelle sensibili alla temperatura, tagliate (migrazione più veloce). Come mostra questo gel elettroforetico, inizialmente tutte le molecole di VSVG risultavano resistenti alla digestione, ma con il tempo un frazione progressivamente in aumento risultava sensibile alla digestione, in conseguenza delle proteine trasportate dall'RE al Golgi dove vengono elaborate. Nelle cellule di controllo tenute a 40 °C, dopo 60 minuti sono state rilevate solo molecole di VSVG resistenti alla digestione e dotate di movimento lento (non mostrato). **(c)** Il diagramma della percentuale di VSVG che è sensibile alla digestione, ricavato dai dati elettroforetici, rivela l'andamento nel tempo del trasporto RE → Golgi. [Da C.J. Beckers et al., 1987, *Cell* 50:523.]

tra la membrana plasmatica e la parete cellulare. Il più studiato di questi enzimi, l'invertasi, idrolizza il disaccaride saccarosio a glucosio e fruttosio.

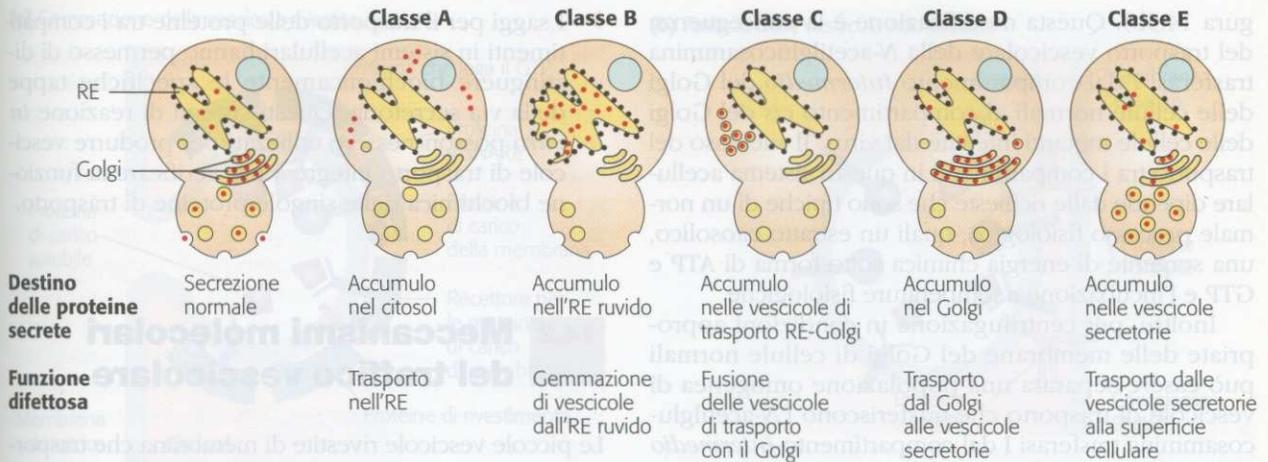
Sono stati identificati numerosi ceppi mutanti di lievito sensibili alla temperatura, la cui secrezione delle proteine è normale ad una temperatura ma risulta bloccata ad una temperatura più elevata, definita temperatura non permissiva. Quando questi *mutanti della secrezione (sec)* sensibili alla temperatura sono trasferiti da una temperatura più bassa a una temperatura più alta, accumulano proteine secretorie nel punto della via secretoria bloccata dalla mutazione. L'analisi di questi mutanti ha portato all'identificazione di cinque classi (A-E) caratterizzate dall'accumulo di proteine nel citosol, nell'RE ruvido, nelle piccole vescicole di trasferimento dall'RE al complesso di Golgi, nelle cisterne del Golgi o nelle vescicole secretorie costitutive (Figura 14.4). La successiva caratterizzazione dei mutanti *sec* nelle varie classi ha permesso di identificare i componenti fondamentali e i meccanismi molecolari del traffico vescicolare che verranno affrontati nella sezione seguente.

Per stabilire l'ordine delle tappe coinvolte in questa via, i ricercatori hanno analizzato doppi mutanti

di poliacrilamide in SDS delle miscele di digestione separa le forme di VSVG marcate resistenti alla temperatura, non tagliate (migrazione più lenta) da quelle sensibili alla temperatura, tagliate (migrazione più veloce). Come mostra questo gel elettroforetico, inizialmente tutte le molecole di VSVG risultavano resistenti alla digestione, ma con il tempo un frazione progressivamente in aumento risultava sensibile alla digestione, in conseguenza delle proteine trasportate dall'RE al Golgi dove vengono elaborate. Nelle cellule di controllo tenute a 40 °C, dopo 60 minuti sono state rilevate solo molecole di VSVG resistenti alla digestione e dotate di movimento lento (non mostrato). **(c)** Il diagramma della percentuale di VSVG che è sensibile alla digestione, ricavato dai dati elettroforetici, rivela l'andamento nel tempo del trasporto RE → Golgi. [Da C.J. Beckers et al., 1987, *Cell* 50:523.]

sec. Per esempio, quando le cellule di lievito contengono mutazioni a carico di entrambe le funzioni di classi B e D, le proteine si accumulano nell'RE ruvido e non nelle cisterne del Golgi. Poiché le proteine si accumulano nella tappa che è bloccata per prima, questa scoperta indica che le mutazioni di classe B devono agire in un punto della via di maturazione che precede la tappa bloccata dalle mutazioni D. Questi studi confermano che durante i processi di sintesi e di maturazione, una proteina secretoria passa in successione dal citosol → all'RE ruvido → alle vescicole di trasporto dall'RE al Golgi → alle cisterne del Golgi → alle vescicole secretorie, e infine viene secreta per esocitosi.

I tre metodi discussi in questa sezione hanno delineato le principali tappe della via secretoria ed hanno contribuito all'identificazione di molte delle proteine coinvolte nella gemmazione delle vescicole e nella fusione. Attualmente, ognuna delle singole tappe della via secretoria viene studiata nei minimi dettagli e sono in costante aumento i saggi biochimici e gli studi di genetica molecolare utilizzati per chiarire la funzione delle singole proteine in ognuna di queste tappe.



▲ **Figura 14.4**

Fenotipi di mutanti sec di lievito hanno permesso l'identificazione dei vari stadi della via secretoria.

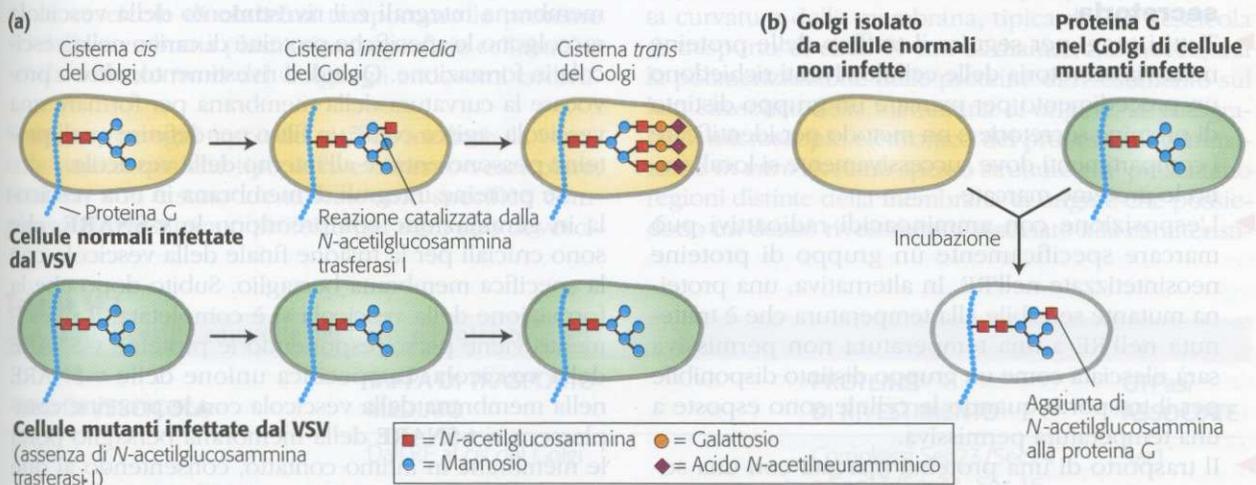
Questi mutanti sensibili alla temperatura possono essere raggruppati in cinque classi, corrispondenti ai siti dove le proteine secretorie neosintetizzate (puntini rossi) si accumulano quando le cellule sono

■ **Gli studi del trasporto in sistemi acellulari consentono di distinguere le singole tappe del trasporto vescicolare**

I saggi *in vitro* per il trasporto tra i compartimenti sono validi approcci, complementari agli studi con i mutanti *sec* di lievito utilizzati per identificare e analizzare i componenti cellulari responsabili del traffico vescicolare. In una applicazione di questo approccio, cellule mutanti in coltura che mancano di uno degli enzimi che modificano le catene oligosaccaridiche *N*-legate nel Golgi sono infettate con il virus della stomatite ve-

trasferite da temperature permissive a temperature più elevate, non permissive. L'analisi di doppi mutanti ha permesso di stabilire l'ordine di queste tappe. [Vedi P. Novick et al., 1981, *Cell* **25**:461, e C.A. Kaiser e R. Schekman, 1990, *Cell* **61**:723.]

scicolare (VSV). Per esempio, se le cellule infettate mancano di *N*-acetilglucosammina transferasi I, esse producono notevoli quantità di proteina G del VSV ma non possono aggiungere residui di *N*-acetilglucosammina alle catene oligosaccaridiche nel compartimento *intermedio* del Golgi come le cellule normali (Figura 14.5a). Quando le membrane dell'apparato di Golgi isolate da queste cellule mutanti sono mescolate con le membrane del Golgi di cellule normali, non infettate, viene recuperata la capacità di aggiungere residui di *N*-acetilglucosammina alla proteina G del VSV (Fi-



▲ **Figura 14.5**

Un saggio in un sistema acellulare dimostra il trasporto delle proteine da una cisterna del Golgi a un'altra.

(a) Per questo tipo di saggio è fondamentale una linea mutante di fibroblasti in coltura. In questo esempio, le cellule sono prive dell'enzima *N*-acetilglucosammina transferasi I (tappa 2 nella Figura 14.14). Nelle cellule normali, questo enzima è localizzato nella cisterna *intermedia* del Golgi e modifica gli oligosaccaridi *N*-legati attraverso l'aggiunta di una molecola di *N*-acetilglucosammina. Nelle cellule normali infettate dal VSV, l'oligosaccaride sulla proteina G virale viene modificato in un tipico oligosaccaride complesso, come mostrato nel disegno della cisterna *trans* del Golgi. Nelle cellule mutanti infettate, tuttavia, la

proteina G raggiunge la superficie cellulare con un oligosaccaride ricco di mannosio meno complesso, contenente solo due residui di *N*-acetilglucosammina e cinque residui di mannosio. **(b)** Quando le cisterne del Golgi isolate dalle cellule mutanti infettate sono incubate con cisterne del Golgi di cellule normali, non infette, la proteina VSVG prodotta *in vitro* contiene l'*N*-acetilglucosammina aggiunta. Questa modificazione è operata dall'enzima transferasi che è trasferito mediante vescicole di trasporto dalle cisterne *intermedie* del Golgi delle cellule normali alle cisterne *cis* del Golgi nella miscela di reazione. [Vedi W.E. Balch et al., 1984, *Cell* **39**:405 e 525; W.A. Braell et al., 1984, *Cell* **39**:511; J.E. Rothman e T. Söllner, 1997, *Science* **276**:1212.]

gura 14.5b). Questa modificazione è la conseguenza del trasporto vescicolare della *N*-acetilglucosamina trasferasi I dal compartimento *intermedio* del Golgi delle cellule normali al compartimento *cis* del Golgi delle cellule mutanti infettate dal virus. Il successo del trasporto tra i compartimenti in questo sistema acellulare dipende dalle richieste che sono tipiche di un normale processo fisiologico, quali un estratto citosolico, una sorgente di energia chimica sotto forma di ATP e GTP e l'incubazione a temperature fisiologiche.

Inoltre, per centrifugazione in condizioni appropriate delle membrane del Golgi di cellule normali può essere separata una popolazione omogenea di vescicole di trasporto che trasferiscono l'*N*-acetilglucosamina trasferasi I dal compartimento *intermedio* del Golgi al compartimento *cis*. Esaminando le proteine di cui sono ricche queste vescicole, i ricercatori sono riusciti ad identificare molte proteine integrali di membrana e proteine di rivestimento delle vescicole periferiche che costituiscono i componenti strutturali di questo tipo di vescicole. Infine, il frazionamento dell'estratto citosolico necessario per il trasporto in miscele di reazione acellulare ha permesso di isolare varie proteine necessarie per la formazione delle vescicole di trasporto e proteine deputate all'indirizzamento e alla fusione delle vescicole con membrane bersaglio appropriate. Saggi *in vitro* simili negli aspetti generali a quello mostrato nella Figura 14.5 sono stati utilizzati per studiare le varie tappe di trasporto della via secretoria.

■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 14.1

Tecniche per lo studio della via secretoria

- ▶ Tutti i saggi per seguire il traffico delle proteine nella via secretoria delle cellule viventi richiedono un procedimento per marcare un gruppo distinto di proteine secretorie e un metodo per identificare i compartimenti dove successivamente si localizzano le proteine marcate.
- ▶ L'esposizione con aminoacidi radioattivi può marcare specificamente un gruppo di proteine neosintetizzate nell'RE. In alternativa, una proteina mutante sensibile alla temperatura che è trattata nell'RE a una temperatura non permissiva sarà rilasciata come un gruppo distinto disponibile per il trasporto quando le cellule sono esposte a una temperatura permissiva.
- ▶ Il trasporto di una proteina marcata con una sostanza fluorescente lungo la via secretoria può essere seguito al microscopio (vedi Figura 14.2). Il trasporto di una proteina marcata con aminoacidi radioattivi viene seguito comunemente seguendo le modificazioni covalenti che la proteina subisce negli specifici compartimenti.
- ▶ Molti componenti richiesti per il traffico delle proteine intracellulari sono stati identificati nel lievito attraverso l'analisi di mutanti *sec* sensibili alla temperatura, che presentano difetti nella secrezione di proteine alla temperatura non permissiva (vedi Figura 14.4).

- ▶ I saggi per il trasporto delle proteine tra i compartimenti in sistemi acellari hanno permesso di distinguere biochimicamente le specifiche tappe della via secretoria. Questi sistemi di reazione *in vitro* possono essere utilizzati per produrre vescicole di trasporto integre e per verificare la funzione biochimica delle singole proteine di trasporto.

14.2 Meccanismi molecolari del traffico vescicolare

Le piccole vescicole rivestite di membrana che trasportano le proteine da un organello all'altro sono elementi comuni nelle vie secretorie ed endocitotiche (vedi Figura 14.1). Queste vescicole si originano per gemmazione della membrana di un particolare organello "genitore" (o *donatore*) e si fondono con la membrana di un particolare organello "bersaglio" (o di *destinazione*). Sebbene ogni tappa delle vie secretorie e endocitotiche impieghi un diverso tipo di vescicola, gli studi genetici e biochimici hanno rivelato che ognuna delle diverse tappe di trasporto vescicolare è semplicemente una variante di un tema comune. In questa sezione analizzeremo i meccanismi fondamentali che sono alla base della gemmazione e della fusione delle vescicole, comuni a tutti i tipi di vescicole.

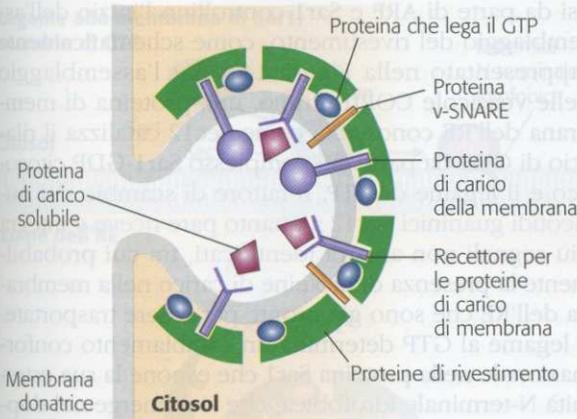
La gemmazione delle vescicole dalla loro membrana di origine è avviata dalla polimerizzazione di complessi proteici solubili sulla membrana per formare una vescicola proteica di rivestimento (Figura 14.6a). Le interazioni tra le porzioni citosoliche delle proteine di membrana integrali e il rivestimento della vescicola raccolgono le specifiche proteine di carico nella vescicola in formazione. Quindi il rivestimento, oltre a provocare la curvatura della membrana per formare una vescicola, agisce come un filtro per definire quali proteine possono entrare all'interno della vescicola.

Le proteine integrali di membrana in una vescicola in gemmazione comprendono le **v-SNARE**, che sono cruciali per la fusione finale della vescicola con la specifica membrana bersaglio. Subito dopo che la formazione della vescicola si è completata, il rivestimento viene perso, esponendo le proteine v-SNARE della vescicola. La specifica unione delle v-SNARE nella membrana della vescicola con le proteine complementari **t-SNARE** della membrana bersaglio porta le membrane in intimo contatto, consentendo ai due doppi strati di fondersi (Figura 14.6b). Prima di affrontare le caratteristiche delle vie secretorie e endocitotiche, esamineremo in maggiore dettaglio i meccanismi di gemmazione, aggancio e fusione.

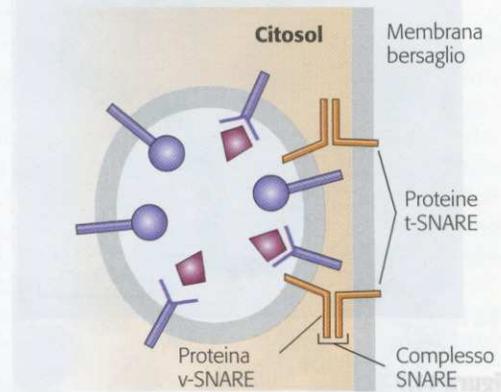
■ L'assemblaggio di un rivestimento proteico promuove la formazione della vescicola e la scelta delle molecole di carico

Sono stati caratterizzati tre tipi di vescicole rivestite, ognuno dei quali con un diverso tipo di rivestimento proteico derivato dalla polimerizzazione reversibile di un particolare gruppo di subunità proteiche (Tabella

(a) Gemmazione della vescicola rivestita



(b) Fusione della vescicola non rivestita



▲ **Figura 14.6**

Visione d'insieme della gemmazione della vescicola e fusione con una membrana bersaglio.

(a) Il processo di gemmazione è avviato dal reclutamento di una piccola proteina che lega il GTP a una piccola porzione della membrana donatrice. In seguito, i complessi di proteine di rivestimento nel citosol si legano al dominio citosolico delle proteine di carico della membrana, alcune

delle quali funzionano come recettori che si legano alle proteine solubili nel lume, convogliando in questo modo le proteine di carico luminali nella vescicola in formazione. (b) Dopo essere stata rilasciata ed aver perso il suo rivestimento, una vescicola si fonde con la sua membrana bersaglio attraverso un processo che coinvolge l'interazione di proteine SNARE complementari.

14.1). Ogni tipo di vescicola, definito sulla base delle sue proteine di rivestimento principali, trasporta le proteine di carico da un particolare organello d'origine ad un particolare organello di destinazione:

- le vescicole **COPII** trasportano le proteine dall'RE ruvido all'apparato di Golgi;
- le vescicole **COPI** trasportano le proteine principalmente in direzione retrograda tra le cisterne del Golgi e dal *cis* del Golgi indietro all'RE ruvido;
- le vescicole di **clatrina** trasportano le proteine dalla membrana plasmatica (superficie cellulare) e dal reticolo *trans* del Golgi agli endosomi tardivi.

cola. Per esempio, i ricercatori non sono ancora riusciti ad identificare le proteine di rivestimento che delimitano le vescicole che trasferiscono le proteine dal *trans* del Golgi alla membrana plasmatica durante la secrezione costitutiva o regolata.

Lo schema generale della gemmazione delle vescicole mostrato nella Figura 14.6a si applica a tutti e tre i tipi di vescicole rivestite conosciute. Esperimenti con membrane isolate o artificiali e proteine di rivestimento purificate hanno mostrato che per produrre l'elevata curvatura della membrana, tipica di una vescicola di trasporto di circa 50 nm di diametro, è necessaria la polimerizzazione delle proteine di rivestimento sul lato citosolico della membrana di origine. Le fotografie al microscopio elettronico del processo di gemmazione *in vitro* rivelano spesso strutture che presentano regioni distinte della membrana di origine che possiedono un denso rivestimento associato alla caratteristi-

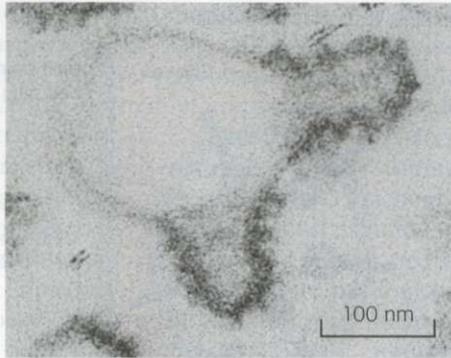
Si ritiene che ogni tappa del traffico mediato da vescicole utilizzi qualche tipo di rivestimento vescicolare; tuttavia, non è stato identificato uno specifico complesso di rivestimento proteico per ogni tipo di vescicola.

Tabella 14.1

Vescicole rivestite coinvolte nel traffico proteico

| TIPO DI VESICOLA | TAPPA DI TRASPORTO MEDIATO | PROTEINE DI RIVESTIMENTO | GTPasi ASSOCIATE |
|---------------------------------------|---|---|------------------|
| COPII | Dall'RE al <i>cis</i> del Golgi | Complessi Sec23/Sec24 e Sec13/Sec31, Sec 16 | Sar1 |
| COPI | Dal <i>cis</i> del Golgi all'RE Dalle cisterne del Golgi tardive a quelle primarie | Coatomeri contenenti sette diverse subunità COP | ARF |
| Clatrina e proteine adattatrici (AP)* | Dal <i>trans</i> del Golgi all'endosoma | Clatrina + complessi AP1 | ARF |
| | Dal <i>trans</i> del Golgi all'endosoma | Clatrina + GGA | ARF |
| | Dalla membrana plasmatica all'endosoma | Clatrina + complessi AP2 | ARF |
| | Dal Golgi ai lisosomi, ai melanosomi o alle vescicole delle piastrine | Complessi AP3 | ARF |

*Ogni tipo di complesso AP è costituito da quattro subunità differenti. Non è noto se il rivestimento delle vescicole AP3 contenga clatrina.



▲ Figura 14.7

Le gemme vescicolari possono essere visualizzate durante il processo di gemmazione *in vitro*. Quando i componenti purificati del rivestimento COPII sono incubati con vescicole dell'RE isolate o vescicole di fosfolipidi artificiali (liposomi), la polimerizzazione delle proteine di rivestimento sulla superficie della vescicola induce la comparsa di gemme molto ricurve. In questa fotografia al microscopio elettronico di un processo di gemmazione si nota il rivestimento specifico della membrana presente sulle gemme vescicolari, visibile come uno strato proteico scuro. [Da K. Matsuo et al., 1988, *Cell* **93** (2):263.]

ca curvatura di una vescicola definitiva (Figura 14.7). Queste strutture, chiamate solitamente *gemme vescicolari*, sembrano essere forme intermedie che sono visibili dopo che il rivestimento ha cominciato a polimerizzare, ma prima che la vescicola completata si separi dalla membrana di origine. Si ritiene che le proteine di rivestimento polimerizzate formino qualche tipo di reticolo curvo che indirizza la formazione di una gemma vescicolare attraverso l'adesione al lato citosolico della membrana.

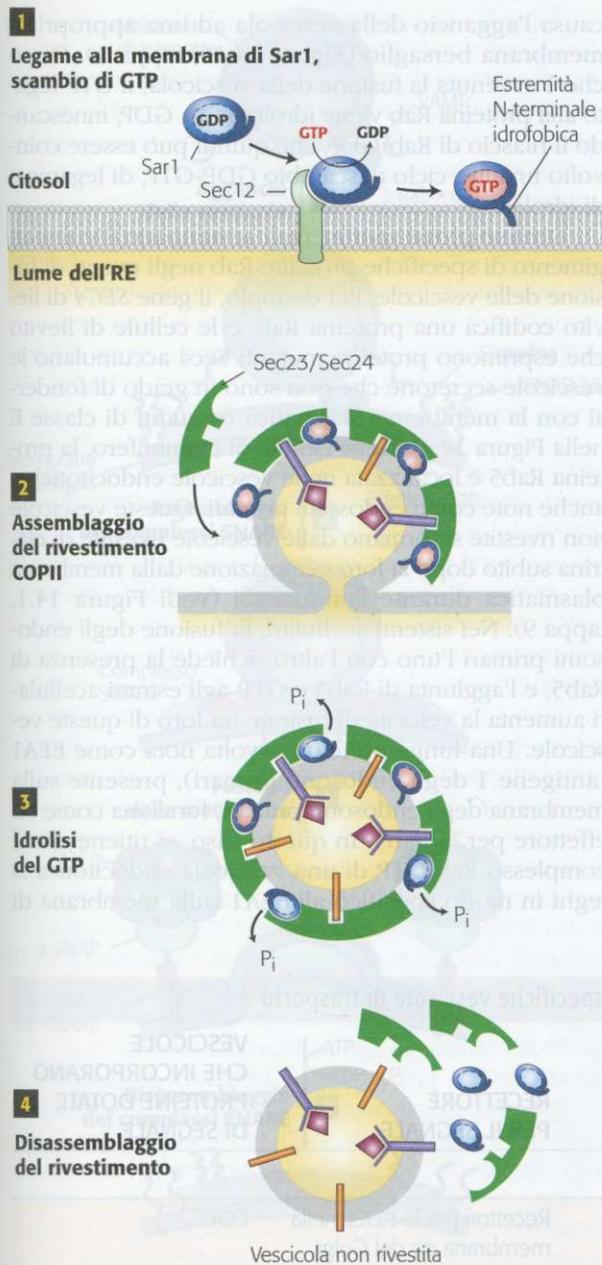
■ Un gruppo conservato di proteine interruttore GTPasiche controlla l'assemblaggio di diversi rivestimenti vescicolari

Sulla base di reazioni di gemmazione delle vescicole *in vitro* con membrane isolate e proteine di rivestimento purificate, i ricercatori hanno determinato la serie minima di componenti richiesti per formare ognuno dei tre principali tipi di vescicole. Sebbene la maggior parte delle proteine di rivestimento differisca considerevolmente da un tipo di vescicola a un'altra, i rivestimenti di tutti e tre i tipi di vescicole contengono una piccola proteina che lega il GTP che agisce come una subunità regolatrice per controllare l'assemblaggio del rivestimento (vedi Figura 14.6a). Per le vescicole COPI e clatrina, la proteina che lega il GTP è nota come *proteina ARF*. Una proteina diversa, ma analoga alla proteina che lega il GTP, nota come *proteina Sar1*, è presente nel rivestimento delle vescicole COPII. Sia ARF sia Sar1 sono proteine monomeriche con una struttura complessivamente simile a quella della Ras, una importante proteina di trasduzione del segnale intracellulare (vedi Figura 16.24). Le proteine ARF e Sar1, come la Ras, appartengono alla **superfamiglia delle GTPasi**, proteine interruttore che oscillano tra forme legate al GDP inattive e forme legate al GTP attive (vedi Figura 3.32).

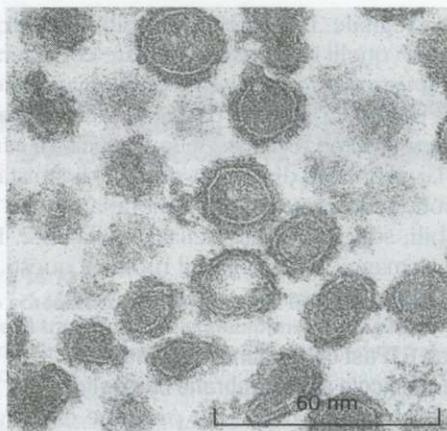
Si pensa che il ciclo di legame al GTP e la sua idrolisi da parte di ARF e Sar1 controllino l'inizio dell'assemblaggio del rivestimento, come schematicamente rappresentato nella Figura 14.8 per l'assemblaggio delle vescicole COPII. Primo, una proteina di membrana dell'RE conosciuta come Sec12 catalizza il rilascio di GDP da parte del complesso Sar1-GDP citosolico e il legame di GTP. Il fattore di scambio dei nucleotidi guaninici Sec12 a quanto pare riceve e integra più segnali non ancora identificati, tra cui probabilmente la presenza di proteine di carico nella membrana dell'RE che sono già pronte per essere trasportate. Il legame al GTP determina un cambiamento conformazionale nella proteina Sar1 che espone la sua estremità N-terminale idrofobica, che si immerge nel doppio strato fosfolipidico e attacca Sar1·GTP alla membrana dell'RE. Il complesso Sar1·GTP attaccato alla membrana innesca la polimerizzazione dei complessi citosolici delle subunità COPII sulla membrana, determinando alla fine la formazione di gemme vescicolari. Una volta che le vescicole COPII sono rilasciate dalla membrana donatrice, l'attività della GTPasi idrolizza Sar1·GTP a Sar1·GDP nella membrana vescicolare con l'aiuto di una delle subunità di rivestimento. L'idrolisi del GTP innesca il disassemblaggio del rivestimento COPII. Quindi la Sar1 accoppia un ciclo di legame e idrolisi del GTP alla formazione e poi al disassemblaggio del rivestimento COPII.

La proteina ARF favorisce un analogo ciclo di scambio di nucleotidi e idrolisi accoppiato all'assemblaggio di rivestimenti vescicolari, costituiti sia di COPI sia di clatrina e altre proteine di rivestimento (complessi AP) di cui discuteremo più avanti. Una modificazione proteica covalente, nota come un'ancora di miristato sull'estremità N-terminale della proteina ARF, lega debolmente ARF-GDP alla membrana del Golgi. Quando il GTP viene scambiato con il GDP legato attraverso un fattore di scambio nucleotidico attaccato alla membrana del Golgi, il conseguente cambiamento conformazionale nella proteina ARF permette ai residui idrofobici del suo segmento N-terminale di inserirsi nel doppio strato della membrana. La conseguente stretta associazione del complesso ARF-GTP con la membrana serve come base per l'ulteriore assemblaggio del rivestimento.

Sulla base delle analogie strutturali di Sar1 e ARF con altre piccole proteine interruttore GTPasiche, i ricercatori hanno realizzato geni che codificano versioni mutanti delle due proteine, che hanno probabili effetti sul traffico vescicolare quando vengono trasfettati in cellule in coltura. Per esempio, nelle cellule che esprimono versioni mutanti di Sar1 o ARF che non sono capaci di idrolizzare il GTP, si formano i rivestimenti delle vescicole e le gemme vescicolari si staccano. Tuttavia, poiché le proteine mutanti non sono in grado di innescare il disassemblaggio del rivestimento, tutte le subunità di rivestimento alla fine risultano stabilmente assemblate nelle vescicole rivestite che non sono capaci di fondersi con le membrane bersaglio. L'aggiunta di un analogo non idrolizzabile del GTP nei sistemi *in vitro* di gemmazione vescicolare causa un blocco simile del disassemblaggio del rive-



▲ Figura 14.8
Modello descrittivo del ruolo della Sar1 nell'assemblaggio e nel disassemblaggio dei rivestimenti COPII. Tappa 1: l'interazione della proteina solubile Sar1 legata al GDP con il fattore di scambio Sec12, una proteina integrale della membrana dell'RE, catalizza lo scambio del GTP con il GDP sulla Sar1. Nella forma della Sar1 legata al GTP, la sua estremità N-terminale idrofobica si estende all'esterno della superficie della proteina ed ancora la Sar1 alla membrana dell'RE. Tappa 2: la Sar1 attaccata alla membrana agisce come un sito di legame per il complesso proteico di rivestimento Sec23/Sec24. Le proteine di carico della membrana sono convogliate alla gemma vescicolare in formazione attraverso il legame di corte sequenze specifiche (segnali di smistamento) delle loro regioni citosoliche a siti presenti sul complesso Sec23/Sec24. Alcune proteine di carico della membrana funzionano anche come recettori che si legano alle proteine solubili presenti nel lume. Il rivestimento viene completato per assemblaggio di un secondo tipo di complesso di rivestimento costituito da Sec13 e Sec31 (non mostrato). Tappa 3: dopo che la vescicola è stata completata, la subunità del rivestimento Sec23 promuove l'idrolisi di GTP da parte della Sar1. Tappa 4: il rilascio di Sar1-GDP dalla membrana della vescicola causa il disassemblaggio del rivestimento. [Vedi S. Springer et al., 1999 *Cell* 97:145.]



▲ Figura 14.9
Le vescicole rivestite si accumulano durante il processo di gemmazione in vitro in presenza di un analogo non idrolizzabile del GTP. Quando le membrane del Golgi purificate sono incubate con un estratto citosolico contenente proteine di rivestimento COPI, si formano vescicole e gemmano dalle membrane. L'inserimento di un analogo non idrolizzabile del GTP nel mezzo di incubazione impedisce il disassemblaggio del rivestimento dopo il distacco della vescicola. Questa fotografia al microscopio elettronico mostra vescicole COPI generate in tale mezzo di reazione e separate dalle membrane per centrifugazione. Le vescicole rivestite preparate in questo modo possono essere analizzate per determinare i loro componenti e conoscere le loro caratteristiche. [Per gentile concessione di L. Orci.]

stimento. Le vescicole che si formano in queste condizioni hanno rivestimenti che rimangono sempre aggregati, e ciò consente di analizzare più facilmente la loro composizione e la loro struttura. Le vescicole purificate COPI, mostrate nella Figura 14.9, erano prodotte con questo sistema di gemmazione.

■ Le sequenze di indirizzamento nelle proteine di carico stabiliscono specifici contatti molecolari con le proteine di rivestimento

Affinché le vescicole di trasporto spostino specifiche proteine da un compartimento a quello successivo, le gemme vescicolari devono essere capaci di distinguere le potenziali proteine di carico destinate alla membrana dalle proteine solubili, accettando solo quelle proteine di carico che dovrebbero progredire verso il compartimento successivo ed escludendo quelle che dovrebbero rimanere come residenti nel compartimento donatore. Oltre a determinare la curvatura della membrana donatrice, il rivestimento della vescicola ha la funzione di selezionare le proteine di carico specifiche. Il principale meccanismo attraverso il quale il rivestimento vescicolare seleziona le molecole di carico, si attua attraverso il legame diretto a sequenze specifiche, o **segnali di smistamento**, presenti nella porzione citosolica delle proteine di carico della membrana (vedi Figura 14.6a). Il rivestimento polimerizzato quindi agisce come una matrice di affinità per raggruppare specifiche proteine di carico della membrana nelle gemme vescicolari in formazione. Poiché le proteine solubili all'interno del lume degli organelli di origine non possono entrare direttamente in contatto con il rivestimento, esse hanno bisogno di un diverso tipo di

sequenza segnale. Le proteine solubili luminali spesso contengono quelli che possono essere considerati i *segnali di smistamento luminali*, che si legano ai domini luminali di certe proteine di carico della membrana che agiscono come recettori delle proteine di carico luminali. Le proprietà di diversi segnali di smistamento conosciuti, nelle proteine di membrana e nelle proteine solubili, sono riassunte nella Tabella 14.2. Descriveremo in maggiore dettaglio il ruolo di questi segnali nelle sezioni successive.

Le Rab GTPasi controllano l'aggancio delle vescicole alle membrane bersaglio

Una seconda serie di piccole proteine che legano il GTP, note come *proteine Rab*, partecipano all'indirizzamento delle vescicole verso la specifica membrana bersaglio. Analogamente alle proteine Sar1 e ARF, le proteine Rab appartengono alla superfamiglia delle proteine interruttore GTPasiche. La conversione del complesso Rab•GDP a Rab•GTP, catalizzata da uno specifico fattore di scambio dei nucleotidi guaninici, induce un cambiamento conformazionale della proteina Rab che le consente di interagire con una proteina di superficie su una particolare vescicola di trasporto e di inserire la sua ancora isoprenoide nella membrana della vescicola. Si ritiene che una volta che il complesso Rab•GTP si è attaccato alla superficie vescicolare interagisca con una tra le diverse grosse proteine, note come effettori Rab, attaccate alla membrana bersaglio. Il legame di Rab•GTP a un effettore Rab

causa l'aggancio della vescicola ad una appropriata membrana bersaglio (Figura 14.10, tappa 1). Dopo che è avvenuta la fusione della vescicola, il GTP legato alla proteina Rab viene idrolizzato a GDP, innescando il rilascio di Rab•GDP, che quindi può essere coinvolto un altro ciclo di scambio GDP-GTP, di legame e di idrolisi.

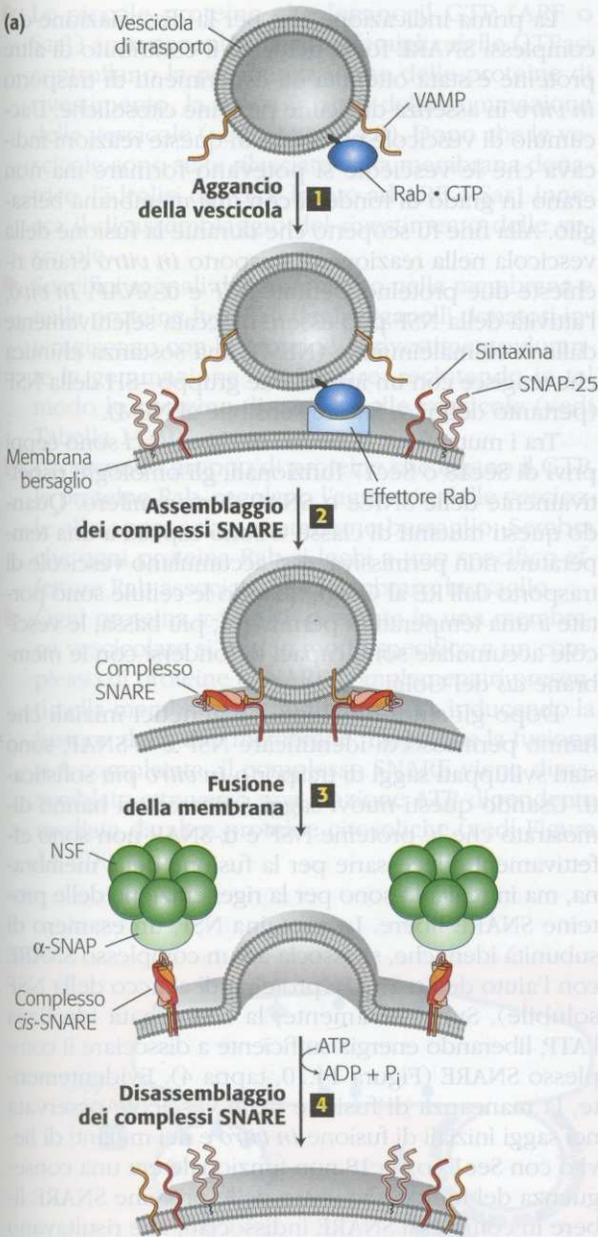
Diverse prove sperimentali sostengono il coinvolgimento di specifiche proteine Rab negli eventi di fusione delle vescicole. Per esempio, il gene *SEC4* di lievito codifica una proteina Rab, e le cellule di lievito che esprimono proteine mutanti *Sec4* accumulano le vescicole secretorie che non sono in grado di fondersi con la membrana plasmatica (mutanti di classe E nella Figura 14.4). Nelle cellule di mammifero, la proteina Rab5 è localizzata nelle vescicole endocitotiche, anche note come endosomi primari. Queste vescicole non rivestite si formano dalle vescicole rivestite di clatrina subito dopo la loro gemmazione dalla membrana plasmatica durante l'endocitosi (vedi Figura 14.1, tappa 9). Nei sistemi acellulari, la fusione degli endosomi primari l'uno con l'altro richiede la presenza di Rab5, e l'aggiunta di Rab5 e GTP agli estratti acellulari aumenta la velocità di fusione tra loro di queste vescicole. Una lunga proteina avvolta nota come EEA1 (antigene 1 degli endosomi primari), presente sulla membrana degli endosomi primari, funziona come un effettore per la Rab5. In questo caso, si ritiene che il complesso Rab•GTP di una vescicola endocitotica si leghi in modo specifico all'EEA1 sulla membrana di

Tabella 14.2

Segnali di smistamento noti che indirizzano le proteine alle specifiche vescicole di trasporto

| SEQUENZA SEGNALE* | PROTEINE CON SEGNALE | RECETTORE PER IL SEGNALE | VESCICOLE CHE INCORPORANO PROTEINE DOTATE DI SEGNALE |
|--|--|---|--|
| SEGNALI DI SMISTAMENTO LUMINALI | | | |
| Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) | Proteine solubili residenti nell'RE | Recettori per le KDEL nella membrana <i>cis</i> del Golgi | COPI |
| Mannosio 6-fosfato (M6P) | Enzimi lisosomiali solubili dopo l'elaborazione nel <i>cis</i> del Golgi | Recettore per l'M6P nella membrana <i>trans</i> del Golgi | Clatrina/AP1 |
| | Enzimi lisosomiali secreti | Recettore per l'M6P nella membrana plasmatica | Clatrina/AP2 |
| SEGNALI DI SMISTAMENTO CITOPLASMATICI | | | |
| Lys-Lys-X-X (KKXX) | Proteine di membrana residenti nell'RE | Subunità α e β di COPI | COPI |
| Due residui acidi (per esempio, Asp-X-Glu) | Proteine di carico della membrana nell'RE | Subunità Sec24 di COPII | COPII |
| Asn-Pro-X-Tyr (NPXY) | Recettore per le LDL nella membrana plasmatica | Complesso AP2 | Clatrina/AP2 |
| Tyr-X-X- Φ (YXX Φ) | Proteine di membrana nel <i>trans</i> del Golgi | AP1 (subunità μ 1) | Clatrina/AP1 |
| | Proteine della membrana plasmatica | AP2 (subunità μ 2) | Clatrina/AP2 |
| Leu-Leu (LL) | Proteine della membrana plasmatica | Complessi AP2 | Clatrina/AP2 |

*X = qualsiasi amminoacido; Φ = amminoacido idrofobico. In parentesi, ci sono le abbreviazioni degli amminoacidi in codice a una sola lettera.



un'altra vescicola endocitotica, determinando le condizioni per la fusione delle due vescicole.

Si ritiene che per ogni tipo di vescicola e per ogni tappa della via secretoria sia coinvolto un tipo di effettore Rab differente. Rimane ancora molto da scoprire sul modo in cui le proteine Rab sono indirizzate alla membrana appropriata e come si formano i complessi specifici tra le diverse proteine Rab e i loro corrispondenti effettori proteici.

■ Serie complementari di proteine SNARE mediano la fusione delle vescicole con le membrane bersaglio

Come sottolineato in precedenza, subito dopo che una vescicola è gemmata dalla membrana donatrice, il suo rivestimento si disassembla evidenziando una specifica proteina della membrana vescicolare, una v-SNARE (vedi Figura 14.6b). Allo stesso modo, ogni tipo di membrana bersaglio in una cellula contiene le proteine di membrana t-SNARE. Dopo l'aggancio me-

(b) Complesso SNARE



▲ **Figura 14.10**

Modello schematico per l'aggancio e la fusione delle vescicole di trasporto con le membrane bersaglio.

(a) Le proteine mostrate in questo esempio partecipano alla fusione delle vescicole secretorie con la membrana plasmatica, ma proteine analoghe sono coinvolte in tutti gli eventi di fusione delle vescicole. Tappa 1: una proteina Rab attaccata mediante un'ancora lipidica a una vescicola secretoria si lega a un complesso proteico effettore sulla membrana plasmatica, agganciando in questo modo la vescicola di trasporto alla appropriata membrana bersaglio. Tappa 2: la proteina v-SNARE (in questo caso, VAMP) interagisce con i domini citosolici delle t-SNARE complementari (in questo caso, syntaxina e SNAP-25). I complessi SNARE superavvolti molto stabili che si formano mantengono la vescicola vicina alla membrana bersaglio. Tappa 3: la formazione dei complessi SNARE è seguita dalla fusione immediata delle due membrane, ma come questo avvenga non è noto. Tappa 4: a seguito della fusione della membrana, la NSF associata alla proteina α-SNAP si lega ai complessi SNARE. L'idrolisi di ATP catalizzata dalla proteina NSF alimenta la dissociazione dei complessi SNARE, liberando i complessi SNARE che si rendono disponibili per un altro ciclo di fusione vescicolare. Nello stesso tempo, anche il complesso Rab·GTP è idrolizzato a Rab·GDP e si dissocia dall'effettore Rab (non mostrato). (b) Il complesso SNARE. Numerose interazioni non covalenti tra le quattro lunghe α-eliche, due di SNAP-25, una di syntaxina e una di VAMP, stabilizzano la struttura superavvolta. [Vedi J.E. Rotham e T. Söllner, 1997, *Science* 276:1212, e W. Weis e R. Scheller, 1998, *Nature* 395:328. Parte (b) da Y.A. Chen e R.H. Scheller, 2001, *Nat. Rev. Moll. Cell Biol.* 2 (2):98.]

diato da Rab di una vescicola sulla sua membrana bersaglio (destinazione), l'interazione delle SNARE complementari porta le due membrane sufficientemente vicine da potersi fondere.

Uno degli esempi più chiari di fusione mediata da proteine SNARE è quello che si verifica durante l'esocitosi delle proteine secrete (Figura 14.10, tappe 2 e 3). In questo caso, la v-SNARE, nota come VAMP (*vesicle-associated membrane protein*, proteina di membrana associata alla vescicola), è incorporata nelle vescicole secretorie appena queste gemmano dal reticolo *trans* del Golgi. Le t-SNARE sono *syntaxina*, una proteina integrale di membrana della membrana plasmatica, e *SNAP-25*, che è attaccata alla membrana plasmatica mediante un'ancora lipidica idrofobica presente nella parte centrale della proteina. La regione citosolica di ognuna di queste tre proteine SNARE contiene una sequenza di ripetizione eptadica che permette a quattro α-eliche – una dalla VAMP, una dalla syntaxina, e due dalla SNAP-25 – di avvolgersi l'una con l'altra a formare un fascio di quattro eliche. L'inusitata stabilità di questo complesso aggregato di SNARE dipende dalla disposizione dei residui amminoacidici idrofobici e carichi nelle ripetizioni eptadiche. Gli amminoacidi idrofobici sono immersi nella regione centrale del fascio, e gli amminoacidi di carica opposta sono allineati in modo da formare interazioni elettrostatiche adeguate tra le eliche. Appena si formano i fasci costituiti dalle quattro eliche, la vescicola e le

membrane bersaglio sono portati in intimo contatto dai domini transmembrana di VAMP e syntaxina.

In esperimenti *in vitro* è stato dimostrato che quando i **liposomi** che contengono VAMP purificata sono incubati con altri liposomi che contengono syntaxina e SNAP-25, i due tipi di membrane si fondono, anche se lentamente. Questa scoperta accredita fortemente l'ipotesi che lo stretto contatto delle membrane, come conseguenza della formazione dei complessi SNARE, è sufficiente a causare la fusione delle membrane. La fusione di una vescicola con la membrana bersaglio avviene più rapidamente ed efficacemente nella cellula che negli esperimenti con i liposomi, nei quali la fusione è catalizzata solo dalle proteine SNARE. Questa differenza probabilmente dipende dal fatto che nella cellula ci sono altre proteine, come le proteine Rab e i loro effettori, coinvolte nello smistamento delle vescicole alla membrana appropriata.

Le cellule di lievito, come tutte le cellule eucariotiche, esprimono più di 20 diverse proteine analoghe alle v-SNARE e t-SNARE. Le analisi di mutanti di lievito difettosi per ognuno dei geni SNARE hanno permesso di identificare gli eventi specifici di fusione della membrana ai quali partecipa ogni proteina SNARE. In tutti gli eventi di fusione esaminati, le SNARE formano complessi costituiti da fasci di quattro eliche, simili ai complessi VAMP/syntaxina/SNAP25 che mediano la fusione delle vescicole secretorie con la membrana plasmatica. Tuttavia, in altri eventi di fusione (per esempio, la fusione delle vescicole COPII con il reticolo *cis* del Golgi), ogni proteina SNARE coinvolta contribuisce solo con una α -elica al fascio (a differenza della SNAP-25, che contribuisce con due eliche); in questi casi, i complessi SNARE sono costituiti da una molecola di v-SNARE e tre molecole di t-SNARE.

Usando il saggio di fusione *in vitro* con i liposomi, i ricercatori hanno verificato la capacità di varie combinazioni di singole proteine v-SNARE e t-SNARE di mediare la fusione della membrana di un donatore con la membrana bersaglio. Dalle numerose e diverse combinazioni provate, solo una piccola parte si è dimostrata capace di mediare efficacemente la fusione delle membrane. Con buona approssimazione, le combinazioni funzionali di v-SNARE e t-SNARE identificate in questi esperimenti *in vitro* corrispondono alle reali interazioni delle proteine SNARE che mediano gli eventi di fusione della membrana nelle cellule di lievito. Quindi, la specificità dell'interazione tra le proteine SNARE può giustificare ampiamente la specificità della fusione tra un particolare tipo di vescicola e la membrana bersaglio.

■ La dissociazione dei complessi SNARE dopo la fusione della membrana è alimentata dall'idrolisi di ATP

Dopo che una vescicola si è fusa con la sua membrana bersaglio, i complessi SNARE si devono dissociare per rendere le singole proteine SNARE disponibili per ulteriori eventi di fusione. A causa della stabilità dei complessi SNARE, che sono tenuti insieme da numerose interazioni non covalenti tra le molecole, la loro dissociazione è condizionata da proteine aggiuntive e da immissione di energia.

La prima indicazione che per la dissociazione dei complessi SNARE fosse richiesto il contributo di altre proteine è stata ottenuta da esperimenti di trasporto *in vitro* in assenza di alcune proteine citosoliche. L'accumulo di vescicole osservato in queste reazioni indicava che le vescicole si potevano formare ma non erano in grado di fondersi con una membrana bersaglio. Alla fine fu scoperto che durante la fusione della vescicola nella reazione di trasporto *in vitro* erano richieste due proteine, definite NSF e α -SNAP. *In vivo*, l'attività della NSF può essere bloccata selettivamente dalla N-etilmaleimmide (NEM), una sostanza chimica che reagisce con un importante gruppo -SH della NSF (pertanto definito, fattore sensibile al NEM).

Tra i mutanti *sec* di lievito di classe C ci sono ceppi privi di Sec18 o Sec17 funzionali, gli omologhi rispettivamente delle SNF e α -SNAP di mammifero. Quando questi mutanti di classe C sono esposti a una temperatura non permissiva, essi accumulano vescicole di trasporto dall'RE al Golgi; quando le cellule sono portate a una temperatura permissiva, più bassa, le vescicole accumulate sono capaci di fondersi con le membrane *cis* del Golgi.

Dopo gli studi biochimici e genetici iniziali che hanno permesso di identificare NSF e α -SNAP, sono stati sviluppati saggi di trasporto *in vitro* più sofisticati. Usando questi nuovi saggi, i ricercatori hanno dimostrato che le proteine NSF e α -SNAP non sono effettivamente necessarie per la fusione della membrana, ma in realtà lo sono per la rigenerazione delle proteine SNARE libere. La proteina NSF, un esamero di subunità identiche, si associa ad un complesso SNARE con l'aiuto dell' α -SNAP (proteina di attacco della NSF solubile). Successivamente, la NSF legata idrolizza l'ATP, liberando energia sufficiente a dissociare il complesso SNARE (Figura 14.10, tappa 4). Evidentemente, la mancanza di fusione delle vescicole osservata nei saggi iniziali di fusione *in vitro* e nei mutanti di lievito con Sec17 o Sec18 non funzionale era una conseguenza del rapido sequestro delle proteine SNARE libere in complessi SNARE indissociati, che risultavano quindi non disponibili per mediare la fusione della membrana.

■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 14.2

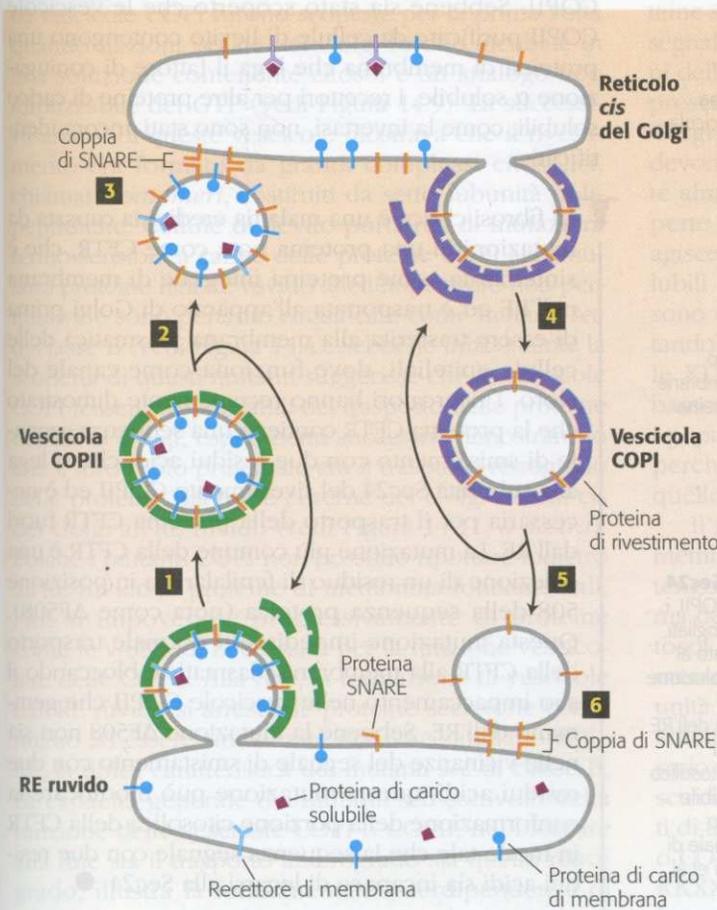
Meccanismi molecolari del traffico vescicolare

- ▶ Le tre vescicole di trasporto meglio caratterizzate – COPI, COPII e vescicole di clatrina – si distinguono sulla base delle proteine che formano i loro rivestimenti e le vie di trasporto in cui sono coinvolte (vedi Tabella 14.1).
- ▶ Tutti i tipi di vescicole rivestite si formano per polimerizzazione di proteine di rivestimento citosoliche su una membrana donatrice (genitore) per formare gemme vescicolari che alla fine si staccano dalla membrana per dare origine a una vescicola completa. Subito dopo il rilascio della vescicola, il rivestimento viene abbandonato, esponendo le proteine richieste per la fusione con la membrana bersaglio (vedi Figura 14.6).

- ▶ Le piccole proteine che legano il GTP (ARF o Sar1) appartenenti alla superfamiglia delle GTPasi controllano la polimerizzazione delle proteine di rivestimento, la tappa iniziale della gemmazione delle vescicole (vedi Figura 14.8). Dopo che le vescicole sono state rilasciate dalla membrana donatrice, l'idrolisi del GTP legato ad ARF o Sar1 innescia il disassemblaggio del rivestimento delle vescicole.
- ▶ Specifici segnali di smistamento nella membrana e nelle proteine luminali degli organelli donatori interagiscono con le proteine di rivestimento durante la gemmazione vescicolare, reclutando in tal modo le proteine di carico nelle vescicole (vedi Tabella 14.2).
- ▶ Un secondo gruppo di proteine che legano il GTP, le proteine Rab, regolano l'aggancio delle vescicole alle appropriate membrane bersaglio. Sembra che ogni proteina Rab si leghi a uno specifico effettore Rab associato alla membrana bersaglio.
- ▶ Ogni proteina v-SNARE presente in una membrana vescicolare si lega in modo specifico a un complesso di proteine t-SNARE complementari presenti nella membrana bersaglio (*target*), inducendo la fusione delle due membrane. Dopo che la fusione si è completata, il complesso SNARE viene disassemblato attraverso una reazione ATP-dipendente mediata da altre proteine citosoliche (vedi Figura 14.10).

14.3 Stadi precoci della via secretoria

In questa sezione ci occuperemo più dettagliatamente del traffico vescicolare attraverso gli stadi che coinvolgono l'RE e il Golgi della via secretoria e di alcuni aspetti noti che confermano i meccanismi generali discussi nella precedente sezione. Dobbiamo ricordare che il *trasporto anterogrado* dall'RE al Golgi, la prima tappa della via secretoria, è mediato da vescicole COPII. Queste vescicole contengono proteine neosintetizzate destinate all'apparato di Golgi, alla superficie cellulare o ai lisosomi, oltre che ai componenti vescicolari come le v-SNARE che sono necessarie per indirizzare le vescicole alle membrane *cis* del Golgi. Per l'appropriato smistamento delle proteine tra l'RE e il Golgi è richiesto anche il *trasporto retrogrado* in direzione opposta dal *cis* del Golgi all'RE, che è mediato dalle vescicole COPI (Figura 14.11). Questo trasporto vescicolare retrogrado ha la funzione di riportare le proteine v-SNARE e la stessa membrana all'RE, in modo da fornire a questo compartimento il materiale necessario per ulteriori cicli di gemmazione delle vescicole. Il trasporto retrogrado mediato da COPI ha anche la funzione di recuperare le proteine erroneamente smistate residenti nell'RE dal *cis* del Golgi, correggendo gli errori di smistamento. Le proteine che sono state correttamente recapitate al Golgi proseguono



◀ **Figura 14.11**

Traffico proteico mediato da vescicole tra l'RE e il *cis* del Golgi.

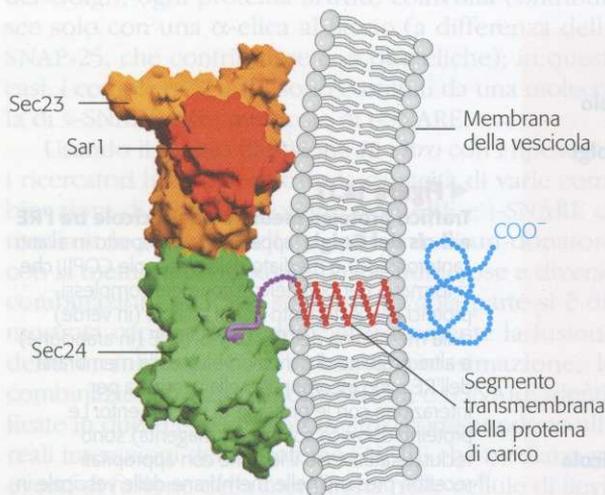
Tappe **1-3**: il trasporto in avanti (anterogrado) è mediato dalle vescicole COPII, che si formano per polimerizzazione dei complessi proteici di rivestimento COPII solubili (in verde) sulla membrana dell'RE. Le v-SNARE (in arancione) e altre proteine di carico (in blu) della membrana dell'RE sono incorporate nella vescicola per interazione con le proteine di rivestimento. Le proteine di carico solubili (in magenta) sono reclutate attraverso il legame con appropriati recettori presenti nelle membrane delle vescicole in formazione. La dissociazione del rivestimento rende disponibili i complessi di rivestimento liberi ed espone le proteine v-SNARE sulla superficie della vescicola. Dopo che la vescicola priva di rivestimento si è attaccata alla membrana *cis* del Golgi attraverso un processo mediato da una proteina Rab, l'accoppiamento tra le v-SNARE esposte e le t-SNARE complementari nella membrana del Golgi determina la fusione della vescicola, liberando il suo contenuto all'interno del compartimento *cis* del Golgi (vedi Figura 14.10). Tappe **4-6**: il trasporto inverso (retrogrado), mediato dalle vescicole rivestite con proteine COPI (in viola), ricicla il doppio strato della membrana e certe proteine, come le v-SNARE e le proteine erroneamente smistate residenti nell'RE (non mostrate), dal *cis* del Golgi all'RE. Tutte le proteine SNARE sono evidenziate in arancione, sebbene v-SNARE e t-SNARE siano proteine distinte.

no attraverso i compartimenti successivi del Golgi per maturazione delle cisterne.

■ Le vescicole COPII mediano il trasporto di proteine dall'RE all'apparato di Golgi

Le vescicole COPII furono inizialmente individuate in esperimenti in cui estratti acellulari di membrane dell'RE ruvido di lievito erano incubati con un analogo non idrolizzabile del GTP. Le vescicole che si formavano dalle membrane dell'RE, oltre ad avere uno specifico rivestimento simile a quello delle vescicole COPI, erano costituite da proteine differenti chiamate COPII. Le cellule di lievito con mutazioni nei geni per le proteine COPII sono mutanti *sec* della classe B ed accumulano proteine nell'RE ruvido (vedi Figura 14.4). L'analisi di questi mutanti ha rivelato che per la formazione delle vescicole COPII sono richieste diverse proteine.

Come descritto in precedenza, la formazione delle vescicole COPII è avviata quando la Sec12, un fattore di scambio dei nucleotidi guaninici presente nella membrana dell'RE, catalizza lo scambio del GDP legato con il GTP sulla Sar1 citosolica. Questo scambio induce il legame della Sar1 alla membrana dell'RE, seguito dal legame di un complesso di proteine Sec23 e Sec24 (vedi Figura 14.8). Il risultante complesso ternario formato da Sar1•GTP, Sec23 e Sec24 è mostrato nella Figura 14.12. Una volta che sulla membrana dell'RE si è formato questo complesso, la struttura del ri-



▲ Figura 14.12

Struttura tridimensionale del complesso ternario che comprende le proteine di rivestimento COPII Sec23 e Sec24 e Sar1•GTP. Subito dopo la formazione del rivestimento di COPII, i complessi Sec23 (in arancione)/Sec24 (in verde) sono convogliati alla membrana dell'RE dalla Sar1 (in rosso) nel suo stato legato al GTP. Allo scopo di formare un complesso ternario stabile in soluzione per studi strutturali, è stato utilizzato l'analogo del GTP non idrolizzabile GppNhp. Una proteina di carico nella membrana dell'RE può essere trasferita alle vescicole COPII per interazione di un segnale diacido (in viola) tripeptidico presente nel dominio citosolico della proteina da trasferire con la Sec24. Sono indicati la possibile posizione della membrana della vescicola COPII e il segmento transmembrana della proteina di carico. Il segmento N-terminale di Sar1 che lo attacca alla membrana non è mostrato. [Vedi X. Bi et al., 2002, *Nature* 419:271; l'interazione con il peptide è stata gentilmente concessa da J. Goldberg.]

vestimento viene completata dal legame di un secondo complesso che comprende le proteine Sec13 e Sec31. Le proteine Sec13 e Sec31 purificate si possono assemblare spontaneamente in una sorta di gabbie reticolari. Si ritiene che Sec13 e Sec31 possano costituire l'impalcatura strutturale per le vescicole COPII. Infine una grossa proteina fibrosa, chiamata Sec16, che è legata alla superficie citosolica dell'RE, interagisce con i complessi Sar1•GTP, Sec13/31, e Sec23/24, ed agisce organizzando le altre proteine di rivestimento, aumentando in questo modo l'efficacia delle polimerizzazione del rivestimento. Analogamente alla Sec13/31, anche la clatrina esprime questa capacità di assemblarsi in una struttura di rivestimento, come sarà discusso nella Sezione 14.4.

Alcune proteine integrali della membrana dell'RE sono specificamente reclutate nelle vescicole COPII per essere trasportate all'apparato di Golgi. I segmenti citosolici di molte di queste proteine contengono un segnale di smistamento con due residui acidi (i residui fondamentali di questa sequenza sono Asp-X-Glu, o DXE usando il codice a una sola lettera) (vedi Tabella 14.2). Questo segnale di smistamento si lega alla subunità Sec24 del rivestimento COPII ed è essenziale per l'esportazione selettiva di certe proteine di membrana dall'RE (Figura 14.12). Al momento sono in corso studi biochimici e genetici per identificare ulteriori segnali che indirizzano le proteine di carico della membrana nelle vescicole COPII. Altri studi in corso si occupano di determinare come le proteine di carico solubili sono collocate selettivamente nelle vescicole COPII. Sebbene sia stato scoperto che le vescicole COPII purificate da cellule di lievito contengono una proteina di membrana che lega il fattore di coniugazione α solubile, i recettori per altre proteine di carico solubili, come la invertasi, non sono stati ancora identificati.

La fibrosi cistica è una malattia ereditaria causata da mutazioni in una proteina nota come CFTR, che è sintetizzata come proteina integrale di membrana nell'RE ed è trasportata all'apparato di Golgi prima di essere trasferita alla membrana plasmatica delle cellule epiteliali, dove funziona come canale del cloro. I ricercatori hanno recentemente dimostrato che la proteina CFTR contiene una sequenza segnale di smistamento con due residui acidi che si lega alla subunità Sec24 del rivestimento COPII ed è necessaria per il trasporto della proteina CFTR fuori dall'RE. La mutazione più comune della CFTR è una delezione di un residuo di fenilalanina in posizione 508 della sequenza proteica (nota come $\Delta F508$). Questa mutazione impedisce il normale trasporto della CFTR alla membrana plasmatica, bloccando il suo impaccamento nelle vescicole COPII che gemmano dall'RE. Sebbene la mutazione $\Delta F508$ non sia nelle vicinanze del segnale di smistamento con due residui acidi, questa mutazione può modificare la conformazione della porzione citosolica della CFTR in modo tale che la sequenza segnale con due residui acidi sia incapace di legarsi alla Sec24. ●

Gli esperimenti descritti in precedenza nei quali il trasporto del complesso VSVG-GFP nelle cellule di mammifero in coltura poteva essere seguito con il microscopio a fluorescenza (vedi Figura 14.2) hanno fornito chiarimenti sulle strutture intermedie coinvolte nel trasporto dall'RE all'apparato di Golgi. In alcune cellule, si potevano osservare piccole vescicole fluorescenti contenenti VSVG-GFP che si formavano dall'RE, si spostavano meno di 1 μm e poi si fondevano direttamente con il *cis* del Golgi. In altre cellule, nelle quali l'RE era localizzato a diversi micrometri dall'apparato di Golgi, si potevano osservare numerose vescicole derivate dall'RE che si fondevano l'una con l'altra subito dopo la loro formazione, dando origine al cosiddetto *compartimento intermedio tra l'RE e il Golgi*. Queste strutture di maggiori dimensioni erano poi trasportate lungo i microtubuli al *cis* del Golgi, in un modo simile a quello in cui alcune vescicole delle cellule nervose sono trasportate dal corpo cellulare, dove si formano, lungo l'assone fino alla terminazione sinaptica (vedi Capitolo 18). I microtubuli funzionano come "binari ferroviari" che permettono a questi grossi aggregati vescicolari di trasporto di percorrere distanze relativamente lunghe fino alla loro destinazione nel *cis* del Golgi. Dopo che il compartimento intermedio tra l'RE e il Golgi si è formato, alcune vescicole COPI gemmano da esso, riportando indietro all'RE una parte delle proteine.

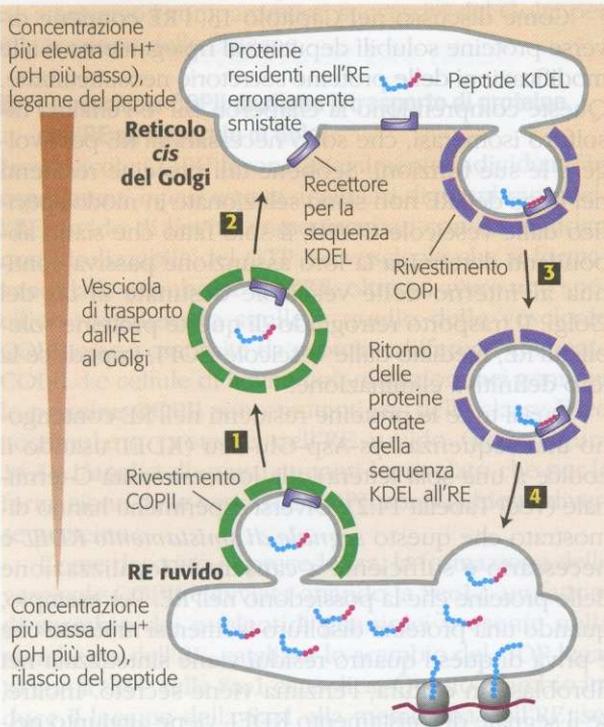
■ Le vescicole COPI mediano il trasporto retrogrado all'interno del Golgi e da questo indietro all'RE

Le vescicole COPI furono scoperte per la prima volta quando frazioni isolate del Golgi furono incubate in una soluzione contenente citosol e un analogo non idrolizzabile del GTP (vedi Figura 14.9). La successiva analisi di queste vescicole mostrava che il rivestimento era formato da grandi complessi citosolici, chiamati *coatomeri*, costituiti da sette subunità polipeptidiche. Cellule di lievito portatrici di mutazioni termo-sensibili a carico delle proteine COPI accumulano proteine nell'RE ruvido alle temperature non permissive e sono pertanto classificate come mutanti *sec* di classe B (vedi Figura 14.4). Sebbene inizialmente la scoperta di questi mutanti suggerisse che le vescicole COPI fossero responsabili del trasporto delle proteine dall'RE al Golgi, esperimenti successivi dimostrarono che il loro ruolo principale era il trasporto retrogrado delle proteine, sia tra le cisterne del Golgi sia dal *cis* del Golgi all'RE ruvido (vedi Figura 14.11, *a destra*). Poiché i mutanti COPI non possono riportare indietro all'RE ruvido le proteine di membrana fondamentali, l'RE si impoverisce progressivamente di proteine come le v-SNARE necessarie per la funzione vescicolare delle COPII. Alla fine, la formazione di vescicole dall'RE ruvido si arresta; le proteine secretorie continuano ad essere sintetizzate ma si accumulano nell'RE, la tipica caratteristica dei mutanti *sec* di classe B. La capacità generale dei mutanti *sec* coinvolti nella funzione delle vescicole COPI o COPII, nel bloccare alla fine sia il trasporto anterogrado sia quello retrogrado, illustra la fondamentale interdipendenza di questi due processi di trasporto.

Come discusso nel Capitolo 13, l'RE contiene diverse proteine solubili deputate al ripiegamento e alle modificazioni delle proteine secretorie neosintetizzate. Queste comprendono la chaperon BiP e l'enzima disolfuro isomerasi, che sono necessari all'RE per svolgere le sue funzioni. Sebbene tali proteine residenti nel lume dell'RE non siano selezionate in modo specifico dalle vescicole COPII, il solo fatto che siano abbondanti determina la loro assunzione passiva continua all'interno delle vescicole destinate al *cis* del Golgi. Il trasporto retrogrado di queste proteine solubili all'RE, mediato dalle vescicole COPI, impedisce la loro definitiva eliminazione.

Quasi tutte le proteine residenti nell'RE contengono una sequenza Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL usando il codice a una sola lettera) alla loro estremità C-terminale (vedi Tabella 14.2). Diversi esperimenti hanno dimostrato che questo *segnale di smistamento KDEL* è necessario e sufficiente a causare la localizzazione delle proteine che la possiedono nell'RE. Per esempio, quando una proteina disolfuro isomerasi mutante che è priva di questi quattro residui viene sintetizzata nei fibroblasti in coltura, l'enzima viene secreto. Inoltre, se il segnale di smistamento KDEL viene aggiunto nell'estremità N-terminale di una proteina che normalmente deve essere secreta, la proteina si posiziona nell'RE. Il segnale di smistamento KDEL è riconosciuto e legato dal *recettore del segnale KDEL*, una proteina transmembrana presente soprattutto su piccole vescicole di trasporto che fanno la spola tra l'RE e il *cis* del Golgi e sul reticolo *cis* del Golgi. Inoltre, le proteine solubili residenti nell'RE che hanno la sequenza segnale di smistamento KDEL presentano modificazioni delle catene oligosaccaridiche catalizzate da enzimi presenti solo nel *cis* del Golgi o nel reticolo *cis* del Golgi; quindi in qualche momento queste proteine devono aver abbandonato l'RE e sono state trasportate almeno fino al reticolo *cis* del Golgi. Queste scoperte indicano che il recettore per il segnale KDEL agisce principalmente nel recupero delle proteine solubili contenenti il segnale di smistamento KDEL che sono state confinate nel reticolo *cis* del Golgi, riportandole all'RE (Figura 14.13). Il recettore per il segnale KDEL si lega più strettamente al ligando a pH basso, e si ritiene che il recettore sia capace di legare i peptidi KDEL nel *cis* del Golgi e di rilasciarli nell'RE perché il pH del Golgi è leggermente più basso di quello dell'RE.

Il recettore per il segnale KDEL e altre proteine di membrana che sono trasportate dal Golgi all'RE contengono una sequenza Lys-Lys-X-X nella parte estrema del loro segmento C-terminale esposto verso il citosol (vedi Tabella 14.2). Questo segnale di smistamento *KKXX*, che si lega a un complesso delle subunità α e β di COPI (due delle sette subunità polipeptidiche nel coatomero di COPI), è sufficiente e necessario per incorporare proteine di membrana nelle vescicole COPI per il trasporto retrogrado all'RE. Mutanti di lievito termo-sensibili privi delle subunità COPI α o COPI β , non sono solo incapaci di legare il segnale *KKXX* ma non sono neanche in grado di recuperare le proteine dotate di questa sequenza e di riportarle

▲ **Figura 14.13**

Ruolo del recettore per la sequenza KDEL nel recupero delle proteine residenti nel lume dell'RE dal Golgi. Le proteine residenti nel lume dell'RE, in particolare quelle presenti ad una concentrazione elevata, possono essere incorporate passivamente nelle vescicole COPII e trasportate al Golgi (tappe 1 e 2). Molte di queste proteine sono dotate di una sequenza KDEL C-terminale (Lys-Asp-Glu-Leu) (in rosso) che permette il loro recupero. Il recettore per la KDEL, localizzato principalmente nel reticolo *cis* del Golgi e in entrambe le vescicole COPI e COPII, si lega alle proteine che presentano il segnale di smistamento KDEL e le riporta all'RE (tappe 3 e 4). Questo sistema di recupero impedisce l'esaurimento delle proteine del lume dell'RE come quelle necessarie per il corretto ripiegamento delle proteine secretorie neosintetizzate. L'affinità di legame del recettore per la KDEL è molto sensibile al pH. La piccola differenza di pH tra l'RE e il Golgi favorisce il legame delle proteine provviste di KDEL al recettore nelle vescicole derivate dal Golgi e il loro rilascio nell'RE. [Adattata da J. Semenza et al., 1990, *Cell* 61:1349.]

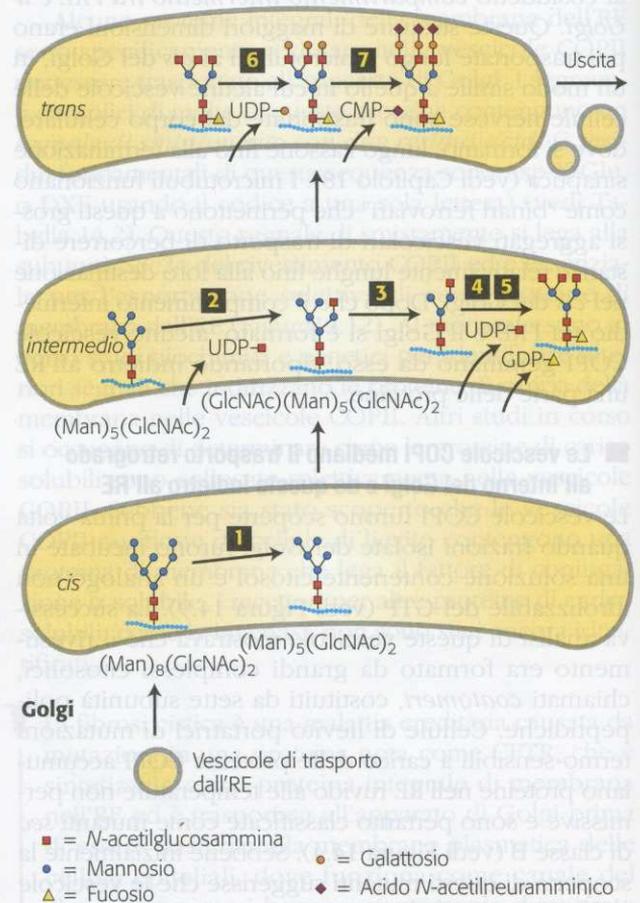
all'RE, confermando che le vescicole COPI mediano il trasporto retrogrado dal Golgi all'RE.

Chiaramente, la ripartizione delle proteine tra l'RE e il complesso di Golgi è un processo estremamente selettivo e regolato, controllato in definitiva dalla specificità del carico proteico sia nelle vescicole COPII (trasporto anterogrado) sia nelle vescicole COPI (trasporto retrogrado). L'ingresso selettivo delle proteine all'interno di vescicole di trasporto delimitate da membrana, il riciclaggio dei fosfolipidi e delle proteine di membrana tra i due compartimenti e il riciclaggio delle proteine solubili luminali sono caratteristiche fondamentali del traffico vescicolare delle proteine che si verifica anche negli stadi tardivi della via secretoria.

■ Il trasporto anterogrado attraverso il Golgi si realizza tramite la maturazione delle cisterne

Il complesso di Golgi è organizzato in tre o quattro subcompartimenti, che sono spesso disposti in una

serie impilata di sacchi appiattiti, o cisterne. I subcompartimenti del Golgi si diversificano l'uno dall'altro sulla base degli enzimi che contengono. Molti enzimi sono glicosidasi e glicosil trasferasi coinvolte nelle modificazioni dei carboidrati *N*-legati o *O*-legati che vengono attaccati alle proteine secretorie man mano che esse passano nella pila di Golgi. In genere, l'apparato di Golgi funziona come una catena di montaggio in cui le proteine si spostano in sequenza attraverso la pila di Golgi, e le catene di carboidrati modificati fungono da substrati per gli enzimi del compartimento successivo (una sequenza caratteristica delle tappe di modificazione è riportata nella Figura 14.14).

▲ **Figura 14.14**

Elaborazione delle catene oligosaccaridiche sulle glicoproteine all'interno delle cisterne *cis*, *intermedie* e *trans* del Golgi nelle cellule dei vertebrati.

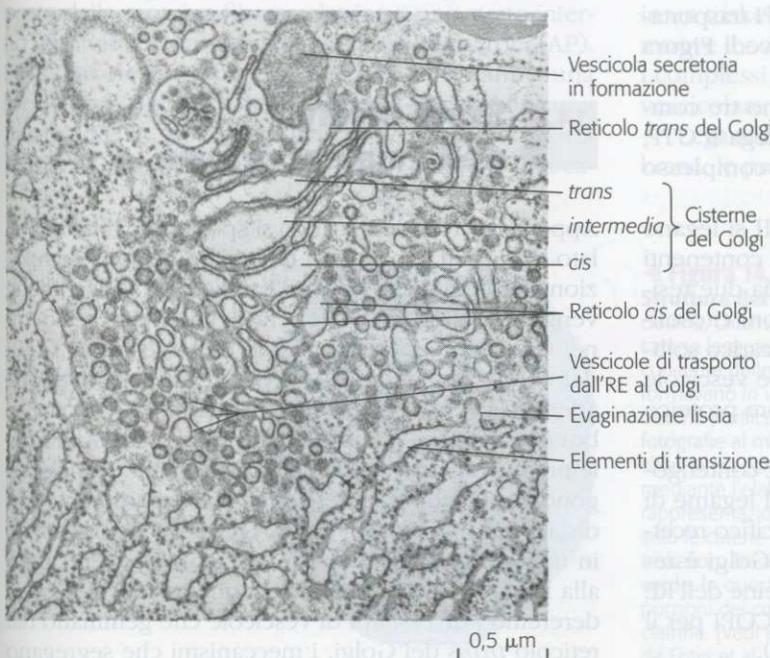
Gli enzimi che catalizzano ogni tappa sono localizzati nei compartimenti indicati. Dopo la rimozione di tre residui di mannosio nel *cis* del Golgi (tappa 1), la proteina si trasferisce per maturazione delle cisterne all'*intermedio* del Golgi. Qui vengono aggiunti tre residui di *N*-acetylglucosamina (GlcNAc) (tappe 2 e 4), sono rimossi altri due residui di mannosio (tappa 3) e viene aggiunto un residuo di fucosio (tappa 5). L'elaborazione viene completata nel *trans* del Golgi per aggiunta di tre residui di galattosio (tappa 6) e infine dal legame di un residuo dell'acido *N*-acetylneuramminico a ognuno dei residui di galattosio (tappa 7). Specifiche trasferasi aggiungono zuccheri all'oligosaccaride, uno alla volta, da precursori nucleotidici assunti dal citosol. Questa via illustra gli eventi di elaborazione di una tipica glicoproteina di mammifero nell'apparato di Golgi. Variazioni nella struttura degli oligosaccaridi *N*-legati possono dipendere da differenze nelle tappe di elaborazione nel Golgi. [Vedi R. Kornfeld e S. Kornfeld, 1985, *Ann. Rev. Biochem.* 45:631.]

Per molti anni si è ritenuto che l'apparato di Golgi fosse fondamentalmente costituito da una serie statica di compartimenti, con piccole vescicole che trasportano le proteine secretorie in avanti, dal *cis* del Golgi all'*intermedio* e dall'*intermedio* al *trans* del Golgi. In realtà, la microscopia elettronica ha rivelato la presenza di numerose piccole vescicole associate all'apparato di Golgi, che trasferiscono le proteine da un compartimento del Golgi all'altro (Figura 14.15). Tuttavia, queste vescicole molto probabilmente mediano il trasporto retrogrado, recuperando gli enzimi dell'RE o del Golgi da un compartimento tardivo e trasportandoli a un compartimento primario nella via secretoria. L'apparato di Golgi, quindi, sembra avere una organizzazione molto dinamica. Per verificare l'effetto di questo trasporto retrogrado sull'organizzazione dell'apparato di Golgi, consideriamo l'effetto netto sul compartimento *intermedio* del Golgi quando gli enzimi si spostano dal *trans* all'*intermedio*, mentre gli enzimi sono trasportati dall'*intermedio* al *cis* del Golgi. Man mano che questo processo continua, l'*intermedio* acquista enzimi dal *trans* e perde enzimi dall'*intermedio* del Golgi e quindi diventa gradualmente un nuovo compartimento *trans* del Golgi. In questo modo, le proteine secretorie di carico possono subire modificazioni a carico dei carboidrati nell'ordine sequenziale appropriato senza essere spostate da una cisterna all'altra attraverso il trasporto vescicolare anterogrado.

La prima prova che il trasporto unidirezionale delle proteine di carico dal *cis* al *trans* del Golgi si realizza attraverso un meccanismo non vescicolare, definito *maturazione delle cisterne*, è stata ottenuta dalla fine analisi microscopica della sintesi delle scaglie delle alghe. Queste glicoproteine della parete cellulare sono assemblate nel *cis* del Golgi in grossi complessi visibili al microscopio elettronico. Come altre proteine secretorie, le scaglie di recente formazione si

spostano dal *cis* al *trans* del Golgi ma essere possono avere dimensioni 20 volte maggiori del diametro delle normali vescicole di trasporto che gemmano dalle cisterne del Golgi. In modo analogo, nella sintesi del collagene da parte dei fibroblasti, nel lume del *cis* del Golgi si formano spesso voluminosi aggregati del precursore procollagene (vedi Figura 19.24). Gli aggregati di procollagene sono troppo grandi per essere incorporati nelle piccole vescicole di trasporto, e i ricercatori non riuscivano mai a scoprire tali aggregati nelle vescicole di trasporto. Queste osservazioni suggeriscono che il movimento unidirezionale di queste e forse di tutte le proteine secretorie da un compartimento del Golgi a un altro non avviene tramite le piccole vescicole.

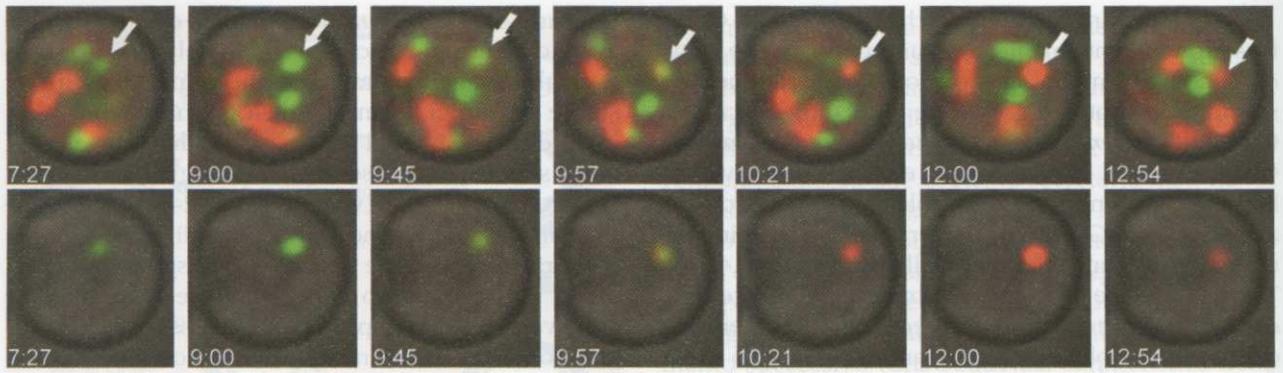
Una dimostrazione particolarmente elegante della maturazione delle cisterne nelle cellule di lievito sfrutta le varianti diversamente colorate della GFP per evidenziare simultaneamente due diverse proteine del Golgi. La Figura 14.16 mostra come si comportano una proteina residente nel *cis* del Golgi marcata con una proteina fluorescente verde e una proteina presente nel *trans* del Golgi marcata con una proteina fluorescente rossa, nella stessa cellula di lievito. In ogni dato momento le singole cisterne del Golgi sembrano avere una distinta identità di compartimento, nel senso che possono contenere sia le proteine del *cis* che del *trans* del Golgi, ma raramente contengono entrambe le proteine. Tuttavia, nel tempo si può osservare che una singola cisterna marcata con la proteina del *cis* può rilasciare progressivamente questa proteina e acquisire la proteina del *trans* del Golgi. Questo comportamento è esattamente quello previsto dal modello di maturazione delle cisterne, nel quale la composizione di una singola cisterna cambia man mano che le proteine residenti nel Golgi si spostano dai compartimenti tardivi ai compartimenti primari del Golgi.



◀ **Figura 14.15**

La fotografia al microscopio elettronico dell'apparato di Golgi in una cellula pancreatica esocrina rivela le vescicole di trasporto sia anterogrado sia retrogrado.

È evidente una grossa vescicola secretoria che si sta formando dal reticolo *trans* del Golgi. In basso e a sinistra di questa fotografia si possono osservare elementi dell'RE ruvido. Adiacenti all'RE sono presenti elementi di transizione da cui emergono evaginazioni lisce. Queste gemme formano le piccole vescicole che trasportano le proteine secretorie dall'RE ruvido all'apparato di Golgi. Disperse tra le cisterne del Golgi, ci sono altre piccole vescicole che sono coinvolte nel trasporto retrogrado, ma non in quello anterogrado. [Per gentile concessione di G. Palade.]



▲ **Figura 14.16**

Proteine di fusione marcate con molecole fluorescenti evidenziano la maturazione delle cisterne del Golgi in una cellula vivente di lievito.

Le cellule di lievito che esprimono la proteina Vrg4 del Golgi primario fusa con la GFP (fluorescenza verde) e la proteina Sec7 del Golgi tardivo fusa con la DsRed (fluorescenza rossa) sono evidenziate con la microscopia a intervalli di tempo. Le immagini della serie in alto, prese approssimativamente a distanza di 1 minuto, mostrano un insieme di cisterne del Golgi che in ogni dato periodo di tempo sono marcate con Vrg4 o con Sec7. Nella serie di immagini in basso è presente solo una cisterna

Numerosi aspetti controversi relativi al flusso di membrana all'interno della pila del Golgi rimangono irrisolti. Per esempio, sebbene la maggior parte del traffico proteico sembra realizzarsi attraverso il complesso di Golgi con un meccanismo di maturazione delle cisterne, è stato accertato che almeno alcune delle vescicole di trasporto COPI che gemmano dalle membrane del Golgi contengono proteine di carico (piuttosto che enzimi del Golgi) e si spostano in direzione anterograda (piuttosto che retrograda).

■ **CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 14.3**
Stadi precoci della via secretoria

- ▶ Le vescicole COPII trasportano le proteine dall'RE ruvido al *cis* del Golgi; le vescicole COPI trasportano le proteine in direzione opposta (vedi Figura 14.11).
- ▶ I rivestimenti delle COPII comprendono tre componenti: la piccola proteina Sar1 che lega il GTP, un complesso Sec23/Sec24 e un complesso Sec13/Sec31.
- ▶ I componenti del rivestimento di COPII si legano alle proteine di carico della membrana contenenti un segnale di smistamento, costituito da due residui acidi o altri segnali nelle loro regioni citosoliche (vedi Figura 14.12). Le proteine di carico solubili sono probabilmente indirizzate alle vescicole COPII attraverso il legame a un recettore proteico di membrana.
- ▶ Molte proteine solubili residenti nell'RE contengono un segnale di smistamento KDEL. Il legame di questo segnale di recupero ad uno specifico recettore proteico nella membrana *cis* del Golgi è responsabile del reclutamento delle proteine dell'RE erroneamente smistate nelle vescicole COPI per il trasporto retrogrado (vedi Figura 14.13).

del Golgi, isolata attraverso l'elaborazione digitale dell'immagine. Nella cisterna isolata inizialmente compare solo la proteina Vrg4-GFP, a cui segue un breve periodo in cui entrambe le proteine appaiono colocalizzate in questo compartimento, e successivamente compare solo la Sec7-DsRed. Questo esperimento è una dimostrazione diretta dell'ipotesi della maturazione delle cisterne, in cui viene evidenziato che la composizione delle singole cisterne segue un processo di maturazione caratterizzato dalla perdita delle proteine del Golgi primario e l'acquisizione di proteine del Golgi tardivo. [Da Losev et al., 2006, *Nature* **441**:1002].

- ▶ Le proteine di membrana richieste per formare le vescicole COPII possono essere recuperate dal *cis* del Golgi dalle vescicole COPI. Uno dei segnali di smistamento che indirizza le proteine di membrana nelle vescicole COPI è una sequenza KKXX, che si lega alle subunità del rivestimento di COPI.
- ▶ Le vescicole COPI trasportano anche le proteine residenti nel Golgi dai compartimenti tardivi a quelli primari nella pila di Golgi.
- ▶ Le proteine di membrana e solubili proseguono attraverso l'apparato di Golgi mediante la maturazione delle cisterne, un processo di trasporto anterogrado che dipende dagli enzimi residenti nel Golgi che, attraverso il trasporto mediato dalle vescicole COPI, si spostano in direzione retrograda.

14.4 Stadi tardivi della via secretoria

Appena le proteine di carico si spostano dal lato *cis* al lato *trans* dell'apparato di Golgi attraverso la maturazione delle cisterne, le loro catene oligosaccaridiche vengono modificate ad opera degli enzimi residenti nel Golgi. Il traffico retrogrado delle vescicole COPI dai compartimenti tardivi a quelli primari mantiene adeguati livelli di questi enzimi che modificano i carboidrati nei loro compartimenti funzionali. Alla fine, le proteine di carico adeguatamente maturate raggiungono il reticolo *trans* del Golgi, il compartimento più distale dell'apparato di Golgi. Qui, esse sono smistate in uno dei numerosi tipi di vescicole per il recapito alla loro destinazione finale. In questa sezione considereremo i diversi tipi di vescicole che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi, i meccanismi che segregano

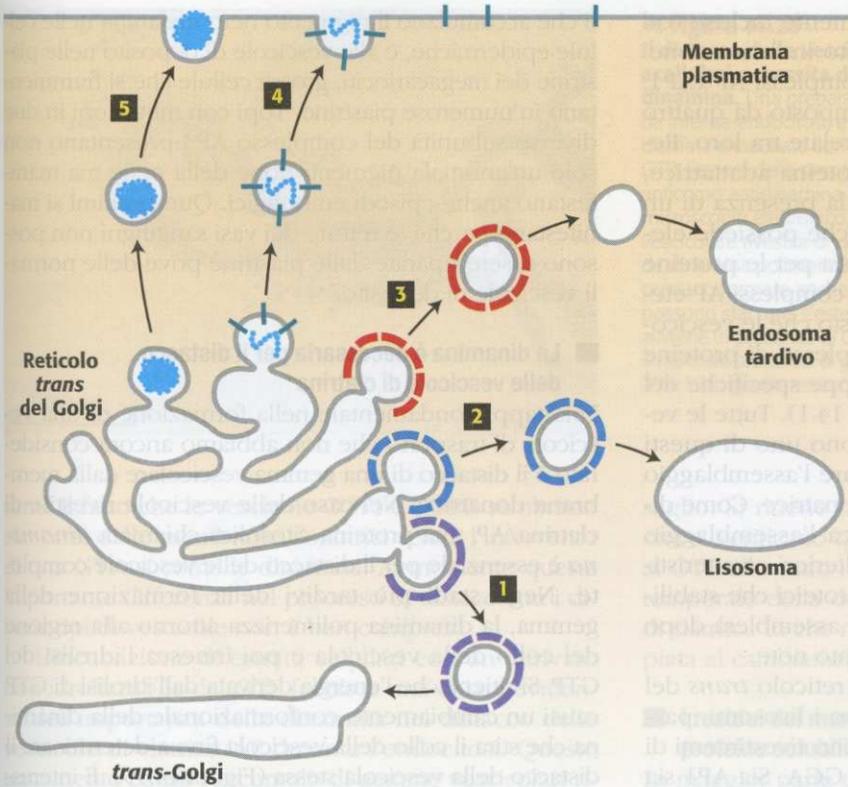


Figura 14.17
Trasferimento delle proteine mediato da vescicole dal reticolo trans del Golgi. Le vescicole COPI (in viola) (1) mediano il trasporto retrogrado all'interno del Golgi. Le proteine che operano nel lume o nella membrana del lisosoma sono trasportate dal reticolo trans del Golgi attraverso vescicole rivestite di clatrina (in rosso) (3). Dopo la perdita del rivestimento, queste vescicole si fondono con gli endosomi tardivi che recapitano il loro contenuto al lisosoma. Il rivestimento di molte vescicole di clatrina contiene proteine supplementari (complessi AP) che qui non sono mostrate. Alcune vescicole provenienti dal trans del Golgi che trasportano il carico proteico destinato ai lisosomi si fondono direttamente con il lisosoma (2), evitando l'endosoma. Queste vescicole sono rivestite con un complesso di tipo AP (in blu); non si sa se queste vescicole contengono anche clatrina. Le proteine di rivestimento che delimitano le vescicole di trasporto delle proteine secretorie costitutive (4) e quelle regolate (5) non sono state ancora caratterizzate; queste vescicole trasportano le proteine di secrezione e le proteine della membrana plasmatica dal reticolo trans del Golgi alla superficie cellulare.

le proteine di carico tra le varie vescicole, e gli eventi fondamentali di elaborazione che si verificano tardivamente nella via secretoria. I vari tipi di vescicole che gemmano dal trans del Golgi sono riassunti nella Figura 14.17.

Le vescicole rivestite di clatrina e/o le proteine adattatrici mediano diverse tappe del trasporto

Le vescicole meglio caratterizzate che gemmano dal reticolo trans del Golgi (TGN) hanno un rivestimento formato da un doppio strato: uno strato esterno composto dalla proteina fibrosa clatrina e uno strato interno costituito da complessi di proteine adattatrici (AP). Le molecole purificate di clatrina, che hanno una forma a tre elementi, sono chiamate *triskelion*, una parola che in greco significa "a tre gambe" (Figura 14.18a). Ogni elemento del triskelion contiene una ca-

tena pesante di clatrina (PM 180 000) e una catena leggera (PM 35 000-40 000). I triskelion polimerizzano formando un reticolo poligonale dotato di una curvatura intrinseca (Figura 14.18b). Quando la clatrina polimerizza su una membrana donatrice, lo fa in associazione con i complessi AP (proteine adattatrici) che si assemblano tra il reticolo di clatrina e la membrana. Ogni complesso AP (PM 340 000) contiene una copia ciascuna di quattro diverse subunità di proteine adattatrici. Una specifica associazione tra il dominio globulare all'estremità di ogni catena pesante di clatrina in un triskelion e una subunità del complesso AP promuove il coassemblaggio dei triskelion di clatrina con i complessi AP e aumenta la stabilità del rivestimento vescicolare completo.

Legandosi al lato citosolico delle proteine di membrana, le proteine adattatrici stabiliscono quali proteine

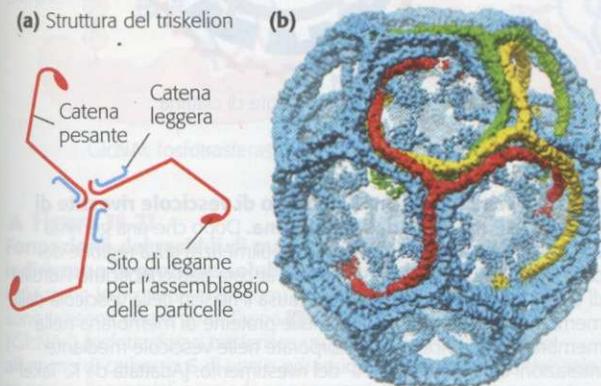


Figura 14.18
Struttura dei rivestimenti di clatrina. (a) Una molecola di clatrina, chiamata triskelion, è costituita da tre catene pesanti e tre catene leggere. Presenta una curvatura intrinseca dovuta alla curvatura delle catene pesanti. (b) I rivestimenti di clatrina si formavano *in vitro*, mescolando le catene leggere e pesanti di clatrina purificate con i complessi AP2 in assenza di membrane. Le fotografie al microscopio crioelettronico di più di 1000 particelle di clatrina esagonali assemblate a forma di barile furono analizzate mediante l'elaborazione digitale delle immagini per generare una rappresentazione strutturale media. L'immagine elaborata mostra solo le catene pesanti di clatrina in una struttura composta da 36 triskelion. Tre tipici triskelion sono evidenziati in rosso, giallo e verde. In questa ricostruzione al computer sono visibili anche porzioni dei complessi AP2 impaccati all'interno della gabbia di clatrina. [Vedi B. Pishvae e G. Payne, 1998, *Cell* 95:443. Parte (b) da Fotin et al., 2004, *Nature* 432:573.]

di carico devono essere specificamente incluse (od escluse) nella vescicola di trasporto in formazione. Sono stati identificati tre diversi complessi AP (AP1, AP2, AP3), ognuno dei quali è composto da quattro subunità proteiche diverse ma correlate tra loro. Recentemente, in un altro tipo di proteina adattatrice, nota come GGA, è stata accertata la presenza di un singolo polipeptide di PM 70 000 che possiede elementi di legame sia per la clatrina sia per le proteine di carico simili a quelli presenti nei complessi AP eterotrimerici molto più grandi. Si è visto che le vescicole che contengono un tipo di complesso di proteine adattatrici (AP o GGA) mediano tappe specifiche del processo di trasporto (vedi Tabella 14.1). Tutte le vescicole i cui rivestimenti contengono uno di questi complessi utilizzano ARF per iniziare l'assemblaggio del rivestimento sulla membrana donatrice. Come discusso in precedenza, ARF innesca l'assemblaggio anche dei rivestimenti COPII. Le ulteriori caratteristiche della membrana o dei fattori proteici che stabiliscono quale tipo di rivestimento si assemblerà dopo l'attacco di ARF non sono al momento note.

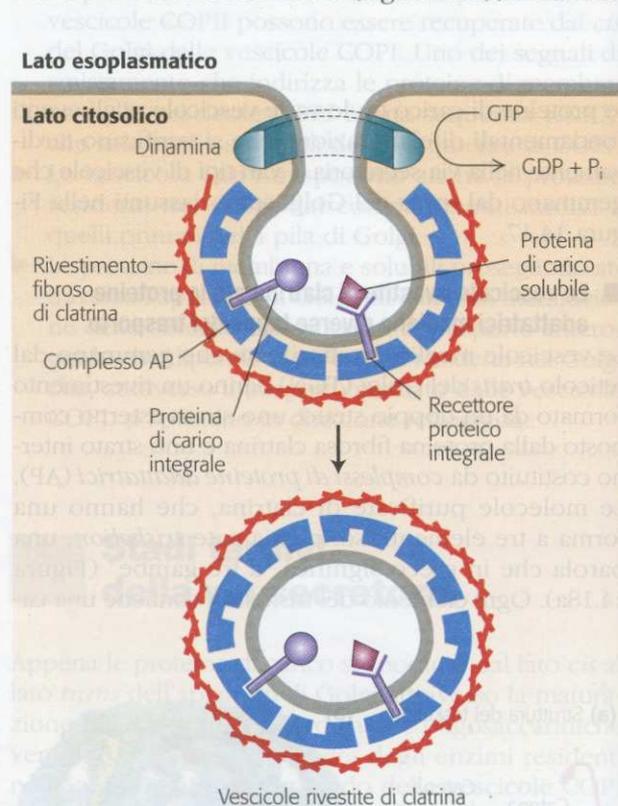
Le vescicole che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi durante lo spostamento verso i lisosomi, passando per gli endosomi tardivi, hanno rivestimenti di clatrina associata o con AP1 o con GGA. Sia AP1 sia GGA si legano al dominio citosolico delle proteine di carico nella membrana donatrice. Studi recenti hanno mostrato che le proteine di membrana che contengono una sequenza Tyr-X-X- Φ (dove X rappresenta qualunque amminoacido e Φ è un amminoacido idrofobico di grandi dimensioni) sono reclutate nelle vescicole di clatrina/AP1 che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi. Questo *segnale di smistamento* YXX Φ interagisce con una delle subunità AP1 del rivestimento vescicolare. Come vedremo nella prossima sezione, le vescicole con rivestimenti di clatrina/AP2, che gemmano dalla membrana plasmatica durante l'esocitosi, possono riconoscere anche il segnale di smistamento YXX Φ . Le vescicole rivestite con proteine GGA e clatrina si legano a molecole di carico con un diverso tipo di sequenza di smistamento. I segnali di smistamento citosolici che si legano specificamente alle proteine adattatrici GGA comprendono le sequenze Asp-X-Leu-Leu e Asp-Phe-Gly-X- Φ (X e Φ sono stati definiti sopra).

Alcune vescicole che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi hanno rivestimenti costituiti dal complesso AP3. Sebbene il complesso AP3 non contenga un sito di legame per la clatrina simile ai complessi AP1 e AP2, non è chiaro se la clatrina sia necessaria per la funzione delle vescicole che contengono AP3, dal momento che proteine AP3 mutanti prive del sito di legame per la clatrina sembrano essere assolutamente funzionali. Le vescicole rivestite di AP3 mediano il traffico proteico diretto ai lisosomi, ma esse sembrano oltrepassare gli endosomi tardivi e fondersi direttamente con la membrana lisosomiale. In certi tipi di cellule, queste vescicole che contengono AP3 mediano il trasporto delle proteine ai compartimenti di deposito specializzati analoghi al lisosoma. Per esempio, AP3 è coinvolta nel recapito di proteine ai melanosomi, gli organelli

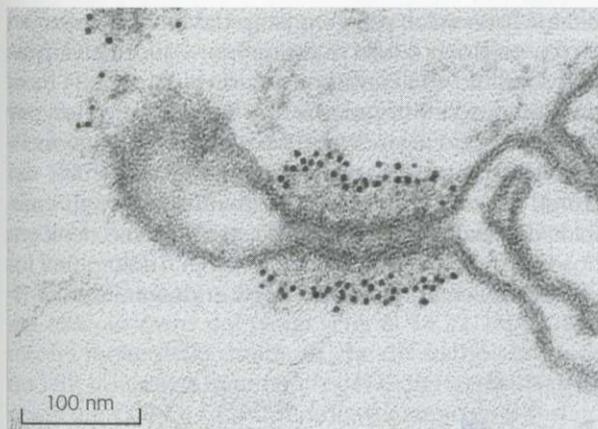
li che accumulano il pigmento nero melanina nelle cellule epidermiche, e alle vescicole di deposito nelle piastrine dei megacariociti, grosse cellule che si frammentano in numerose piastrine. Topi con mutazioni in due diverse subunità del complesso AP3 presentano non solo un'anomala pigmentazione della pelle ma manifestano anche episodi emorragici. Questi ultimi si manifestano perché le rotture dei vasi sanguigni non possono essere riparate dalle piastrine prive delle normali vescicole di deposito.

■ La dinamina è necessaria per il distacco delle vescicole di clatrina

Una tappa fondamentale nella formazione di una vescicola di trasporto che non abbiamo ancora considerato è il distacco di una gemma vescicolare dalla membrana donatrice. Nel caso delle vescicole rivestite di clatrina/AP, una proteina citosolica chiamata *dinamina* è essenziale per il distacco delle vescicole complete. Negli stadi più tardivi della formazione della gemma, la dinamina polimerizza attorno alla regione del collo della vescicola e poi innesca l'idrolisi del GTP. Si ritiene che l'energia derivata dall'idrolisi di GTP causi un cambiamento conformazionale della dinamina che stira il collo della vescicola fino a determinare il distacco della vescicola stessa (Figura 14.19). È interes-



▲ **Figura 14.19**
Modello schematico per il distacco di vescicole rivestite di clatrina/AP mediato dalla dinamina. Dopo che una gemma vescicolare si è formata, la dinamina polimerizza sulla regione del collo. Attraverso un meccanismo non ancora ben conosciuto l'idrolisi di GTP, catalizzata dalla dinamina, causa il rilascio della vescicola dalla membrana donatrice. Si noti come le proteine di membrana nella membrana donatrice siano incorporate nelle vescicole mediante interazioni con i complessi AP del rivestimento. [Adattata da K. Takel et al., 1995, *Nature* **374**:186.]



sante il fatto che le vescicole COPI e COPII sembrano staccarsi dalle membrane donatrici senza l'intervento di una GTPasi come le dinamina. Al momento questa importante differenza nel processo di distacco tra i diversi tipi di vescicole non è ben compresa.

L'incubazione di estratti cellulari con un derivato non idrolizzabile del GTP fornisce una chiara evidenza dell'importanza della dinamina nel distacco delle vescicole di clatrina/AP durante l'endocitosi. Questo trattamento causa l'accumulo di gemme vescicolari rivestite di clatrina con colli eccessivamente lunghi circondati da polimeri di dinamina, che tuttavia non si staccano (Figura 14.20). In modo analogo, le cellule che esprimono forme mutanti di dinamina che non possono legare il GTP non formano vescicole rivestite di clatrina, mentre accumulano gemme vescicolari con lunghi colli ricoperti di dinamina polimerizzata.

Come le vescicole COPI e COPII, le vescicole di clatrina/AP perdono normalmente il loro rivestimento subito dopo la loro formazione. L'Hsc70, una proteina chaperon citosolica costitutiva presente in tutte le cellule eucariotiche, sembra utilizzare l'energia liberata dall'idrolisi di ATP per alimentare la depolimerizzazione del rivestimento di clatrina in elementi di triskelion. La depolimerizzazione del rivestimento, oltre a rendere disponibili i triskelion da riutilizzare nella formazione di ulteriori vescicole, espone anche le proteine v-SNARE coinvolte nella fusione con le membrane ber-

Figura 14.20

Il distacco delle vescicole rivestite di clatrina in estratti cellulari necessita dell'idrolisi di GTP da parte della dinamina. Una preparazione di terminazioni nervose, caratterizzata da intensa endocitosi, è stata sottoposta a lisi osmotica con acqua distillata e incubata con GTP- γ -S, un derivato non idrolizzabile del GTP. Sezioni della preparazione sono state poi trattate con un anticorpo antidinamina marcato con particelle d'oro e osservate al microscopio elettronico. Questa immagine, che mostra una gemma vescicolare rivestita di clatrina/AP dotata di un lungo collo circondato da dinamina polimerizzata rivela che, sebbene le vescicole si possano formare anche in assenza di idrolisi di GTP, esse non si possono staccare. L'estesa polimerizzazione della dinamina che avviene in presenza di GTP- γ -S probabilmente non si verifica durante il normale processo di gemmazione. [Da K. Takel et al., 1995, *Nature* 374:186; gentilmente concessa da Pietro De Camilli.]

taglio. Si ritiene che i cambiamenti conformazionali che si verificano quando ARF passa dallo stato legato al GTP allo stato legato al GDP regolino l'andamento temporale della depolimerizzazione del rivestimento di clatrina. In che modo l'attività della Hsc70 sia accoppiata al cambiamento della ARF non è noto.

I residui del mannosio 6-fosfato indirizzano le proteine solubili ai lisosomi

La maggior parte dei segnali di smistamento coinvolti nel traffico vescicolare è costituita da corte sequenze amminoacidiche nelle proteine marcate. Diversamente, il segnale di smistamento che dirige gli enzimi lisosomiali solubili dal reticolo *trans* del Golgi all'endosoma tardivo è un residuo glucidico, il *mannosio 6-fosfato* (M6P), che si forma nel *cis* del Golgi. L'aggiunta e l'iniziale elaborazione di uno o più precursori oligosaccaridici *N*-legati preformati nell'*RE* ruvido sono gli stessi sia negli enzimi lisosomiali sia nelle proteine secrete e di membrana, e portano alla formazione di catene di $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$ nella regione centrale (vedi Figura 13.18). Nel *cis* del Golgi, gli oligosaccaridi *N*-legati presenti sulla maggior parte degli enzimi lisosomiali sono sottoposti a una serie di reazioni a due tappe che danno origine a residui M6P (Figura 14.21). L'aggiunta di residui M6P alle catene oligosaccaridiche degli enzimi lisosomiali solubili impedisce che queste proteine subiscano ulteriori reazioni di maturazione

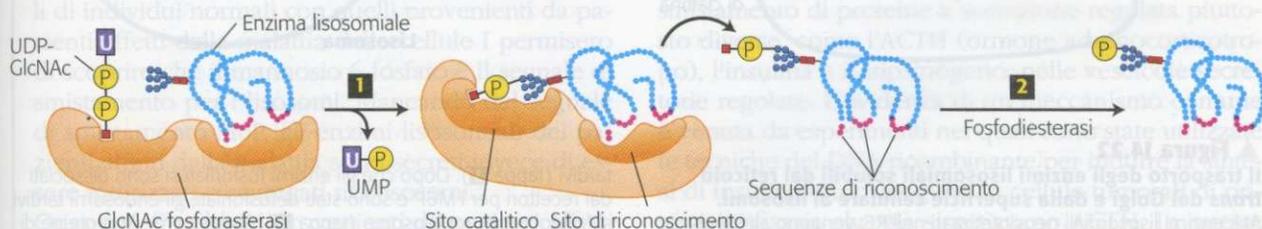


Figura 14.21

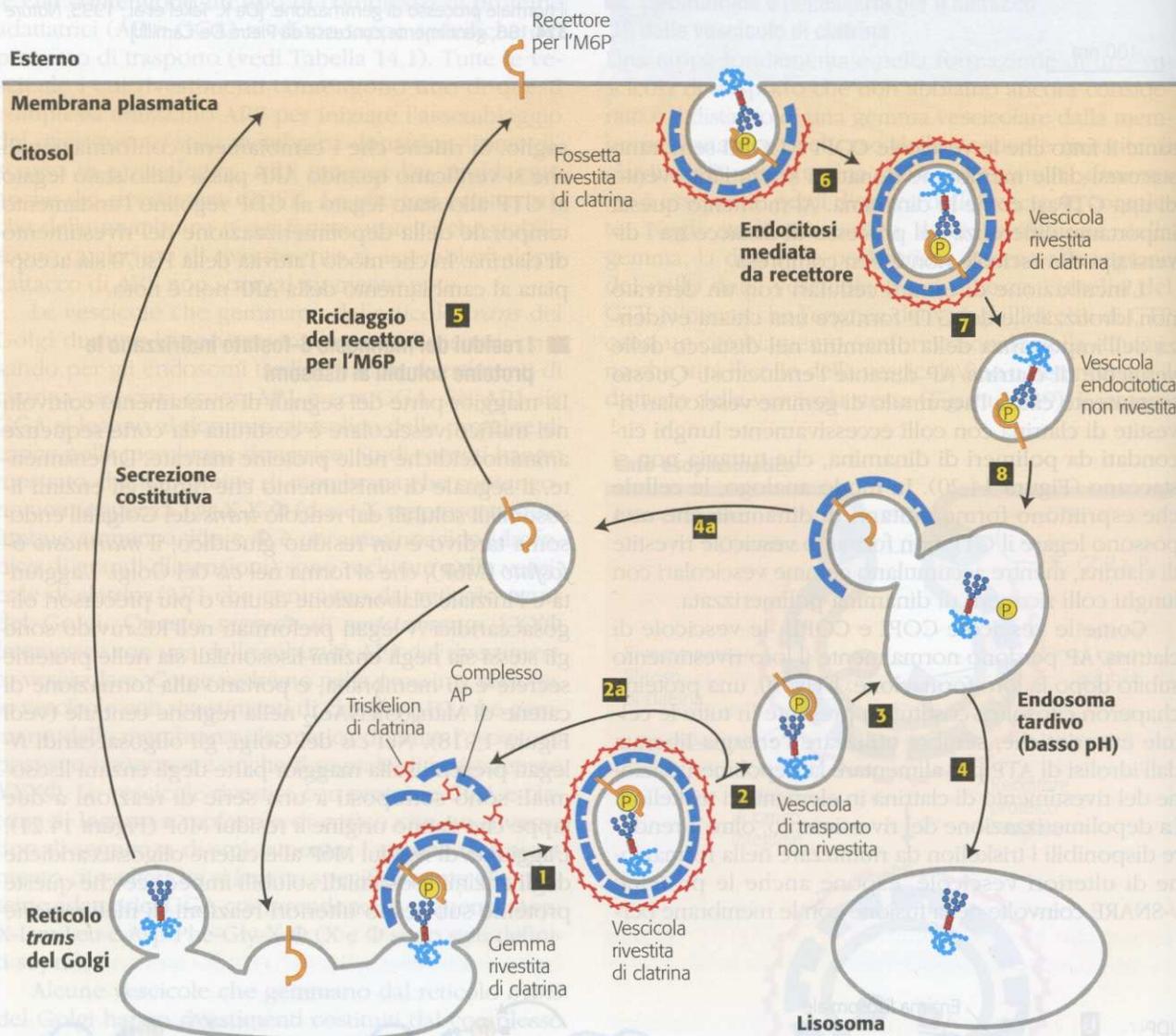
Formazione dei residui di mannosio 6-fosfato (M6P) che indirizzano le proteine solubili ai lisosomi. I residui di M6P che indirizzano le proteine ai lisosomi si formano nel *cis* del Golgi, dove sono presenti due enzimi. Tappa **1**: una *N*-acetilglucosammina (GlcNAc) fosfotrasferasi trasferisce un gruppo GlcNAc fosforilato all'atomo di carbonio 6 di uno o più residui di mannosio. Poiché solo gli enzimi lisosomiali possiedono sequenze (in rosso) che sono

riconosciute e legate da questo enzima, i gruppi GlcNAc fosforilati sono aggiunti in modo specifico agli enzimi lisosomiali. Tappa **2**: dopo il rilascio di una proteina modificata dalla fosfotrasferasi, una fosfodiesterasi rimuove il gruppo GlcNAc, lasciando un residuo di mannosio fosforilato sull'enzima lisosomiale. [Vedi A.B. Cantor et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:23349, e S. Kornfeld, 1987, *FASEB J.* 1:462.]

caratteristiche delle proteine secrete e di membrana (vedi Figura 14.14).

Come mostrato nella Figura 14.22, la segregazione degli enzimi lisosomiali provvisti di M6P dalle proteine secrete e di membrana avviene nel reticolo *trans* del Golgi. Qui, i *recettori per il mannosio 6-fosfato* transmembrana si legano molto stabilmente e specificamente ai residui dell'M6P presenti sulle proteine destinate ai lisosomi. Le vescicole di clatrina/AP1 che contengono i recettori per l'M6P e a cui sono legati gli

enzimi lisosomiali poi gemmano dal reticolo *trans* del Golgi, perdono il loro rivestimento, e successivamente si fondono con l'endosoma tardivo attraverso i meccanismi descritti in precedenza. Poiché i recettori per l'M6P possono legare l'M6P ai valori di pH leggermente acidi (circa 6,5) presenti nel reticolo *trans* del Golgi, ma non a valori di pH inferiori a 6,0, gli enzimi lisosomiali legati sono rilasciati all'interno degli endosomi tardivi, dove il pH è di 5,0-5,5. Inoltre, una fosfatasi presente all'interno degli endosomi tardivi ri-



▲ **Figura 14.22**

Il trasporto degli enzimi lisosomiali solubili dal reticolo *trans* del Golgi e dalla superficie cellulare ai lisosomi.

Agli enzimi lisosomiali neosintetizzati nell'RE, vengono aggiunti residui di mannosio 6-fosfato (M6P) nel *cis* del Golgi (vedi Figura 14.21). Per semplicità, è stata inserita nello schema solo una catena di oligosaccaride fosforilato, sebbene gli enzimi lisosomiali abbiano di norma molte di queste catene. Nel reticolo *trans* del Golgi, le proteine dotate di segnali di smistamento M6P interagiscono con i recettori per l'M6P presenti nella membrana e come risultato vengono convogliate verso le vescicole di clatrina/AP1 (tappa 1). Il rivestimento che delimita le vescicole staccate viene depolimerizzato rapidamente (tappa 2), e le vescicole di trasporto non rivestite si fondono con gli endosomi

tardivi (tappa 3). Dopo che gli enzimi fosforilati si sono dissociati dai recettori per l'M6P e sono stati defosforilati, gli endosomi tardivi si fondono con un lisosoma (tappa 4). Si noti come le proteine di rivestimento e i recettori per l'M6P siano riciclati (tappe 2a e 4a), e alcuni recettori siano recapitati alla superficie cellulare (tappa 5). A volte, gli enzimi lisosomiali fosforilati sono smistati dal *trans* del Golgi alla superficie cellulare e quindi secreti. Questi enzimi secreti possono essere recuperati per endocitosi mediata da recettore (tappe 6+8), un processo che corrisponde strettamente al trasferimento degli enzimi lisosomiali dal reticolo *trans* del Golgi ai lisosomi. [Vedi G. Griffiths et al., 1988, *Cell* 52:329; S. Kornfeld, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:307, e G. Griffiths e J. Gruenberg, 1991, *Trends Cell Biol.* 1:5.]

muove solitamente il gruppo fosfato dai residui M6P sugli enzimi lisosomiali, impedendo che il recettore per l'M6P si leghi di nuovo nonostante il basso pH presente negli endosomi. Le vescicole che gemmano dagli endosomi tardivi riportano indietro il recettore per l'M6P al reticolo *trans* del Golgi o, saltuariamente, alla superficie cellulare. Alla fine, gli endosomi tardivi maturi si fondono con i lisosomi, recapitando gli enzimi lisosomiali alla loro destinazione finale.

Lo smistamento degli enzimi lisosomiali solubili nel reticolo *trans* del Golgi (Figura 14.22, tappe 1-4) mostra molte delle caratteristiche del traffico proteico tra l'RE e i compartimenti *cis* del Golgi mediato dalle vescicole COPI e COPII. Primo, il mannosio 6-fosfato agisce come un segnale di smistamento interagendo con il dominio luminale di un recettore proteico nella membrana donatrice. Secondo, i recettori immersi nella membrana con i loro ligandi sono incorporati in appropriate vescicole – in questo caso, vescicole di clatrina contenenti sia GGA sia AP1 – interagendo con il rivestimento vescicolare. Terzo, queste vescicole di trasporto si fondono solo con uno specifico organello, in questo caso con l'endosoma tardivo, in seguito alle interazioni tra v-SNARE e t-SNARE specifiche. Infine, dopo la dissociazione dal loro ligando, i recettori per il trasporto intracellulare vengono riciclati.

■ Lo studio delle malattie di deposito lisosomiale ha permesso di identificare i componenti fondamentali della via di smistamento lisosomiale

Un gruppo di malattie genetiche, definite *malattie di deposito lisosomiale*, è causato dalla mancanza di uno o più enzimi lisosomiali. Di conseguenza, i glicolipidi e i componenti extracellulari che sono normalmente degradati dagli enzimi lisosomiali non possono essere digeriti e si accumulano nei lisosomi sotto forma di grosse inclusioni. La *malattia delle cellule I*, un esempio particolarmente grave di questo tipo di patologia, è provocata dalla mancanza di numerosi enzimi lisosomiali. Le cellule dei pazienti che ne sono affetti sono prive della *N*-acetilglucosammina fosfotrasferasi, l'enzima necessario per la formazione dei residui M6P sugli enzimi lisosomiali nel *cis* del Golgi (vedi Figura 14.21). Analisi biochimiche in cui erano confrontati gli enzimi lisosomiali di individui normali con quelli provenienti da pazienti affetti dalla malattia delle cellule I permisero di scoprire che il mannosio 6-fosfato è il segnale di smistamento per i lisosomi. Mancando del segnale di smistamento M6P, gli enzimi lisosomiali dei pazienti affetti dalla malattia sono secreti invece di essere indirizzati e segregati nei lisosomi.

Quando i fibroblasti provenienti da pazienti affetti dalla malattia delle cellule I sono fatti crescere in un mezzo contenente enzimi lisosomiali dotati di residui M6P, il contenuto intracellulare di enzimi lisosomiali nelle cellule malate risulta quasi normale. Questa scoperta indica che la membrana plasmatica di queste cellule contiene recettori per i residui M6P, che possono internalizzare gli enzimi lisosomiali fosforilati extracellulari tramite un processo di

endocitosi mediata da recettore. Questo processo, utilizzato da molti recettori della superficie cellulare per trasferire proteine legate o particelle all'interno della cellula, sarà analizzato dettagliatamente nella prossima sezione. Al momento sappiamo che anche nelle cellule normali alcuni recettori per l'M6P sono trasportati alla membrana plasmatica e alcuni enzimi lisosomiali fosforilati sono secreti (vedi Figura 14.22). Questa via quindi permette di recuperare tutti gli enzimi lisosomiali che sfuggono alla normale via di smistamento dell'M6P.

Gli epatociti di pazienti con la malattia delle cellule I contengono una normale dotazione di enzimi lisosomiali e non presentano le tipiche inclusioni nei lisosomi, sebbene manifestino una insufficiente fosforilazione del mannosio. Questo aspetto suggerisce che gli epatociti (il tipo cellulare più abbondante nel fegato) utilizzino una via per lo smistamento degli enzimi lisosomiali indipendente dall'M6P. La natura di questa via, che probabilmente funziona in altri tipi di cellule, non è al momento conosciuta. ●

■ L'aggregazione delle proteine nel reticolo *trans* del Golgi potrebbe avere una funzione nel processo di smistamento delle proteine alle vescicole secretorie regolate

Come sottolineato nell'introduzione del capitolo, tutte le cellule eucariotiche secernono continuamente alcuni tipi di proteine, un processo comunemente definito *secrezione costitutiva*. Le cellule secretorie specializzate accumulano altri tipi di proteine nelle vescicole e le secernono solo quando sono attivate da uno stimolo specifico. Un esempio di questa *secrezione regolata* è quello delle cellule β del pancreas, che accumulano insulina neosintetizzata in speciali vescicole secretorie e la liberano in risposta ad un aumento della concentrazione ematica di glucosio (vedi Figura 15.33). Queste ed altre cellule secretorie utilizzano simultaneamente due diversi tipi di vescicole per trasferire le proteine dal reticolo *trans* del Golgi alla superficie cellulare: le vescicole di trasporto regolato, spesso chiamate semplicemente vescicole secretorie, e le vescicole di trasporto non regolato, chiamate anche vescicole secretorie costitutive.

Sembra che un meccanismo comune presieda allo smistamento di proteine a secrezione regolata piuttosto diverse, come l'ACTH (ormone adrenocorticotropo), l'insulina e il tripsinogeno, nelle vescicole secretorie regolate. L'evidenza di un meccanismo comune è venuta da esperimenti nei quali sono state utilizzate le tecniche del DNA ricombinante per indurre la sintesi di insulina e tripsinogeno in cellule tumorali di origine ipofisaria che già sintetizzano ACTH. In queste cellule, che normalmente non esprimono insulina e tripsinogeno, tutte e tre le proteine si accumulano nelle stesse vescicole secretorie regolate e sono secrete insieme quando un ormone si lega a un recettore presente sulle cellule ipofisarie e causa un aumento citosolico degli ioni Ca^{2+} . Sebbene queste tre proteine non abbiano sequenze amminoacidiche identiche che possono funzionare come una sequenza di smi-

stamento, devono comunque avere qualche caratteristica comune che segnala la loro incorporazione nelle vescicole secretorie regolate.

Osservazioni di tipo morfologico suggeriscono che lo smistamento nella via di secrezione regolata sia controllato tramite un meccanismo di aggregazione proteica selettiva. Per esempio, le vescicole immature in questa via – quelle che si sono appena staccate per gemmazione dal reticolo *trans* del Golgi – possiedono al loro interno diffusi aggregati di proteine secrete che sono visibili al microscopio elettronico. Questi aggregati sono presenti anche nelle vescicole che sono in procinto di gemmare, indicando che le proteine destinate alle vescicole secretorie regolate si aggregano assieme selettivamente prima ancora della loro incorporazione nelle vescicole.

Altri studi hanno mostrato che vescicole secretorie regolate isolate da cellule secretorie di mammifero contengono tre proteine, la *cromogranina A*, la *cromogranina B* e la *secretogranina II*, che insieme formano aggregati quando sono incubate alle condizioni ioniche (pH circa 6,5 e Ca^{2+} 1 mM) che si ritiene siano presenti nel reticolo *trans* del Golgi; di fatto questi aggregati non si formano nelle condizioni di pH neutro presenti nell'RE. L'aggregazione selettiva delle proteine a secrezione regolata con la cromogranina A, la cromogranina B o la secretogranina II potrebbe essere la base del meccanismo di smistamento di queste proteine nelle vescicole secretorie regolate. Le proteine secretorie che non si associano con queste proteine, e quindi non formano aggregati, sarebbero smistate nelle vescicole di trasporto non regolate per default.

■ Alcune proteine subiscono elaborazioni proteolitiche dopo aver lasciato il *trans* del Golgi

Per alcune proteine secretorie (per esempio, l'ormone della crescita) e per certe proteine di membrana virali (per esempio, la glicoproteina del VSV), la rimozione della sequenza segnale per l'RE all'estremità N-terminale dalla catena nascente è la sola modificazione conosciuta richiesta per convertire il precursore polipeptidico in una specie proteica matura e attiva (vedi Figura 13.6). Tuttavia, alcune proteine di membrana e molte proteine secretorie solubili sono sintetizzate inizialmente sotto forma di precursori inattivi, di durata relativamente lunga, definiti *proproteine*, che devono subire ulteriori elaborazioni proteolitiche per dare origine a proteine attive, mature. Esempi di proteine che vanno incontro a queste elaborazioni sono gli enzimi lisosomiali solubili, molte proteine di membrana come l'emoagglutinina (HA) del virus dell'influenza e proteine secrete come la sieralbumina, l'insulina, il glucagone e il fattore di coniugazione α del lievito. In generale, la conversione proteolitica di una proproteina nella corrispondente proteina matura si verifica dopo che la proproteina è stata smistata nel reticolo *trans* del Golgi in opportune vescicole.

Nel caso di enzimi lisosomiali solubili, le proproteine sono definite *proenzimi*, che sono smistati dal recettore M6P come enzimi cataliticamente inattivi.

Nell'endosoma tardivo o nel lisosoma un proenzima subisce una scissione proteolitica che dà origine a un polipeptide più piccolo ma enzimaticamente attivo. Il ritardo nell'attivazione dei proenzimi lisosomiali fino al raggiungimento del lisosoma impedisce che essi digeriscano le macromolecole presenti nei compartimenti primari della via secretoria.

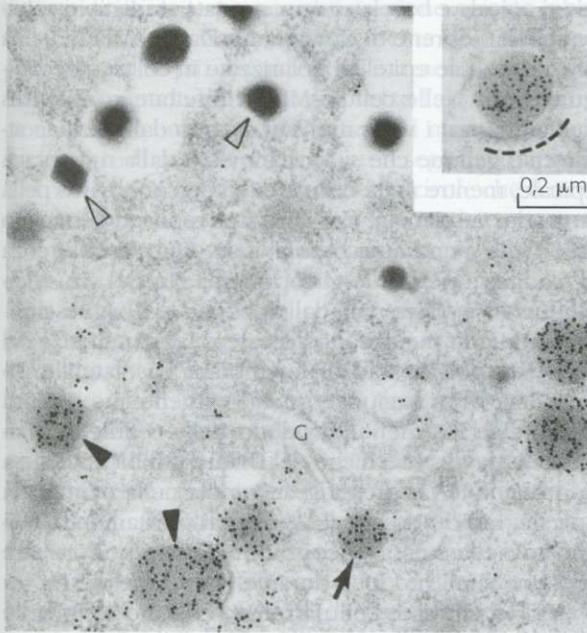
Normalmente, le vescicole mature che trasportano le proteine secrete alla superficie cellulare si formano per fusione di diverse vescicole immature contenenti proproteine. La scissione proteolitica delle proproteine, come la proinsulina, avviene all'interno delle vescicole man mano che queste si allontanano dal reticolo *trans* del Golgi (Figura 14.23). Le proproteine della maggior parte delle proteine secrete attraverso la via costitutiva (per esempio, l'albumina) subiscono un unico taglio nel punto C-terminale di una sequenza di riconoscimento costituita da due amminoacidi basici come Arg-Arg o Lys-Arg (Figura 14.24a). L'elaborazione proteolitica delle proteine la cui secrezione è regolata in genere comporta altre scissioni. Nel caso della proinsulina, più scissioni della singola catena polipeptidica portano alla formazione della catena B N-terminale e della catena A C-terminale dell'insulina matura, che sono legate tra loro da legami disolfuro, e del peptide C centrale, che viene abbandonato e successivamente degradato (Figura 14.24b).

La svolta decisiva negli studi per identificare le proteasi responsabili della maturazione delle proteine secrete è venuta dall'analisi di cellule di lievito con una mutazione nel gene *KEX2*. Queste cellule mutanti sintetizzavano il precursore del fattore di coniugazione α ma non riuscivano a trasformarlo proteoliticamente nella forma funzionale e quindi non erano in grado di accoppiarsi con cellule di tipo di coniugazione opposto (vedi Figura 21.19). Il gene *KEX2* normale codifica una endoproteasi che scinde il precursore del fattore α in corrispondenza di un sito C-terminale rispetto ai residui Arg-Arg o Lys-Arg. Usando il gene *KEX2* come una sonda di DNA, i ricercatori furono in grado di clonare una famiglia di endoproteasi di mammifero, ognuna delle quali taglia una catena polipeptidica sul lato C-terminale di una sequenza Arg-Arg o Lys-Arg. Una di queste endoproteasi, chiamata *furina*, è presente in tutte le cellule dei mammiferi; essa interviene nella maturazione di proteine come l'albumina, che sono secrete attraverso la via costitutiva. Diversamente, le *endoproteasi PC2* e *PC3* sono presenti solo in cellule che utilizzano la secrezione regolata; questi enzimi sono localizzati nelle vescicole di secrezione regolata e scindono proteoliticamente i precursori di molti ormoni in corrispondenza di siti di taglio specifici.

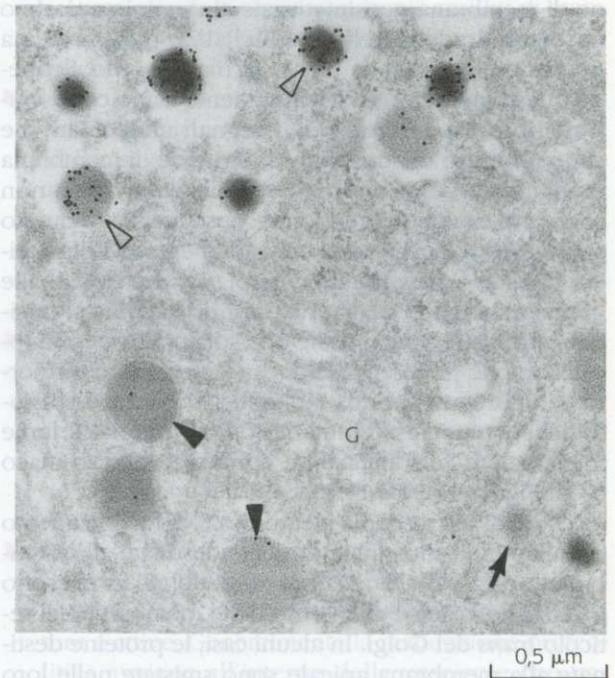
■ Nelle cellule polarizzate le proteine di membrana sono smistate alla regione apicale o basolaterale attraverso diverse vie

La membrana plasmatica delle cellule epiteliali polarizzate è distinta in due domini, **apicale** e **basolaterale**; le giunzioni strette localizzate tra i due domini impediscono il movimento delle proteine della membrana plasmatica tra i domini (vedi Figura 19.9).

(a) Anticorpo contro la proinsulina



(b) Anticorpo contro l'insulina

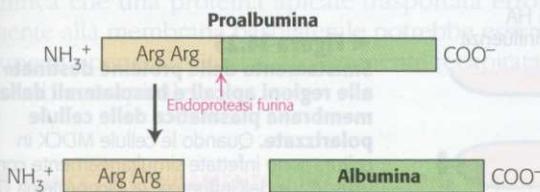


▲ Figura 14.23

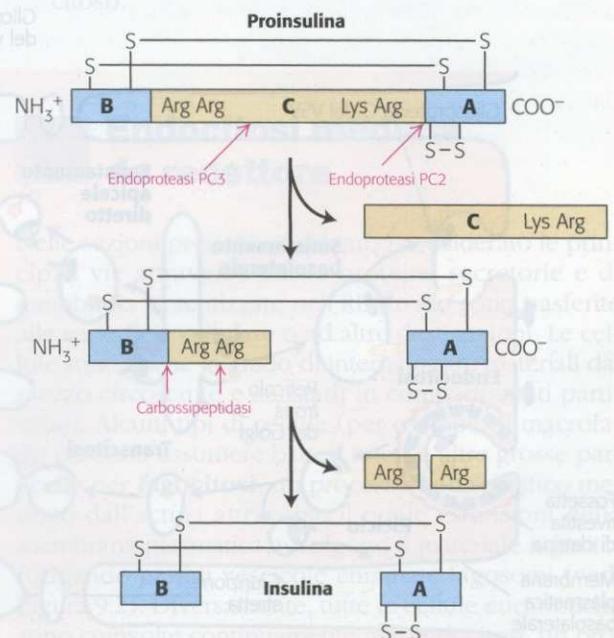
Il taglio proteolitico della proinsulina avviene nelle vescicole secretorie dopo che queste sono gemmate dal reticolo trans del Golgi. Sezioni seriali della regione del Golgi di una cellula che secreta insulina sono state colorate con (a) un anticorpo monoclonale che riconosce la proinsulina o (b) un diverso anticorpo che riconosce l'insulina ma non la proinsulina. Gli anticorpi legati alle particelle d'oro dense agli elettroni, appaiono come puntini scuri in queste fotografie al microscopio elettronico (vedi Figura 9.21). Le vescicole secretorie immature (punte di freccia piene) e le vescicole che gemmano dal trans del Golgi (freccie) si colorano con l'anticorpo della proinsulina ma non con quello dell'insulina. Queste vescicole contengono aggregati proteici diffusi che comprendono la

proinsulina e altre proteine secrete in modo regolato. Le vescicole mature (punte di freccia vuote) si colorano con l'anticorpo dell'insulina ma non con l'anticorpo della proinsulina ed hanno un nucleo denso di insulina quasi allo stato cristallino. Poiché le vescicole secretorie gemmanti e immature contengono la proinsulina (e non l'insulina), la conversione proteolitica della proinsulina a insulina deve avvenire in queste vescicole dopo la loro gemmazione dal reticolo trans del Golgi. Il riquadro in (a) mostra una vescicola secretoria piena di proinsulina circondata da un rivestimento proteico (linea tratteggiata). [Da L. Orci et al., 1987, *Cell* **49**:865; foto per gentile concessione di L. Orci.]

(a) Proteine secrete in modo costitutivo



(b) Proteine secrete in modo regolato



▲ Figura 14.24

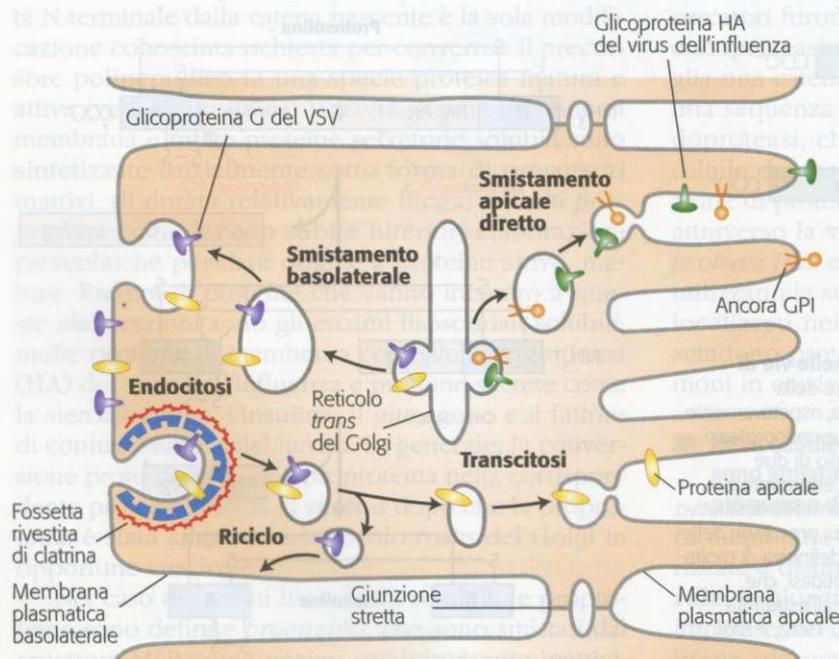
Elaborazione proteolitica delle proproteine nelle vie di secrezione costitutiva e regolata. L'elaborazione della proalbumina e quella della proinsulina sono tipiche, rispettivamente, della via secretoria costitutiva e della via regolata. Le endoproteasi responsabili di tale elaborazione producono un taglio di due aminoacidi consecutivi sul lato C-terminale. (a) L'endoproteasi furina agisce sui precursori delle proteine secrete in modo costitutivo. (b) Due endoproteasi, la PC2 e la PC3, agiscono sui precursori delle proteine secrete in modo regolato. L'elaborazione definitiva di molte di queste proteine è catalizzata da una carbossipeptidasi, che rimuove sequenzialmente due aminoacidi basici all'estremità C-terminale di un polipeptide. [Vedi D.Steiner et al., 1992, *J. Biol. Chem.* **267**:23435.]

Diversi meccanismi di smistamento dirigono le proteine di membrana neosintetizzate al dominio apicale o basolaterale delle cellule epiteliali, e ogni proteina può essere smistata da più di un meccanismo. Sebbene questi meccanismi di smistamento siano conosciuti nei loro aspetti generali, i segnali molecolari che sono alla base del trasporto di proteine di membrana mediato da vescicole nelle cellule polarizzate non sono ancora conosciuti. Come conseguenza di questo smistamento e per i limiti nel movimento delle proteine all'interno della membrana plasmatica dovuti alle giunzioni strette, specifici gruppi di proteine si posizionano nei domini apicale o basolaterale. Questa localizzazione preferenziale di certe proteine di trasporto è importante per una molteplicità di funzioni fisiologiche, come l'assorbimento dei nutrienti dal lume intestinale e l'acidificazione del lume dello stomaco (vedi Figure 11.29 e 11.30).

Studi di microscopia elettronica e di frazionamento cellulare indicano che le proteine destinate alla membrana apicale o a quella basolaterale, all'inizio sono localizzate insieme all'interno delle membrane del reticolo *trans* del Golgi. In alcuni casi, le proteine destinate alla membrana apicale sono smistate nelle loro specifiche vescicole di trasporto che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi e poi si spostano verso la regione apicale, mentre le proteine destinate alla membrana basolaterale sono smistate attraverso altre vescicole che si spostano verso la regione basolaterale. I diversi tipi di vescicole si possono distinguere sulla base dei loro costituenti proteici, comprese specifiche proteine Rab e v-SNARE, che sembrano indirizzarle verso l'appropriata regione della membrana plasmatica. In questo meccanismo, la separazione delle proteine destinate alla membrana apicale da quelle assegnate alla membrana basolaterale si verifica appena le proteine sono incorporate in particolari tipi di vescicole che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi.

Queste modalità di smistamento diretto verso le regioni apicale e basolaterale sono state studiate in colture cellulari di rene di cane Madin-Darby (MDCK), una linea di cellule epiteliali polarizzate in coltura (vedi Figura 9.34). Nelle cellule MDCK infettate con il virus dell'influenza, i virus replicati escono dalle cellule attraverso gemme che si formano solo dalla membrana apicale, mentre nelle cellule infettate con il virus della stomatite vescicolare (VSV), i virus replicati gemmano solo dalla membrana basolaterale. Questa differenza si manifesta perché la glicoproteina HA del virus dell'influenza è trasportata dall'apparato di Golgi esclusivamente alla membrana apicale e la proteina G del VSV è trasportata solo alla membrana basolaterale (Figura 14.25). In aggiunta, quando il gene che codifica la proteina HA viene introdotto nelle cellule non infettate attraverso tecniche del DNA ricombinante, tutta la proteina HA espressa si accumula nella membrana apicale, indicando che il segnale di smistamento è disposto nella stessa glicoproteina HA e non in altre proteine virali prodotte durante l'infezione virale.

Tra le proteine cellulari che vengono indirizzate alle regioni apicali e basolaterali a livello del Golgi, vi sono quelle legate a un'ancora di membrana glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Nelle cellule MDCK e nella maggior parte degli altri tipi di cellule epiteliali, le proteine con ancora GPI sono indirizzate alla membrana apicale. Nelle membrane le proteine ancorate al GPI sono raggruppate nelle "zattere lipidiche" (*lipid raft*), che sono ricche di sfingolipidi (vedi Capitolo 10). Questa scoperta suggerisce che le zattere lipidiche siano localizzate nella membrana apicale insieme a proteine che preferenzialmente le ripartiscono in molte cellule. Tuttavia, l'ancora GPI non è un segnale di smistamento per la membrana apicale in tutte le cellule polarizzate; nelle cellule della tiroide, per esempio, le proteine ancorate al GPI sono indirizzate alla membrana basolaterale. Tranne le ancore GPI, non sono state identifica-



◀ **Figura 14.25**

Smistamento delle proteine destinate alle regioni apicali e basolaterali della membrana plasmatica delle cellule polarizzate.

Quando le cellule MDCK in coltura sono infettate simultaneamente con il virus VSV e dell'influenza, la glicoproteina G del VSV (in viola) si localizza solo sulla membrana basolaterale, mentre la glicoproteina HA del virus dell'influenza (in verde) si localizza solo sulla membrana apicale. Alcune proteine cellulari (cerchi arancioni), in particolare quelle dotate di un'ancora GPI, sono probabilmente trasportate direttamente alla membrana apicale ed altre alla membrana basolaterale (non mostrate) attraverso specifiche vescicole di trasporto che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi. In certe cellule polarizzate, alcune proteine apicali e basolaterali sono trasportate tutte insieme alla superficie basolaterale; le proteine apicali (ovali gialli) passano poi selettivamente, per endocitosi e transitosi, alla membrana apicale. [Da K. Simons e A. Wandinger-Ness, 1990, *Cell* **62**:207, e K. Mostov et al., 1992, *J. Cell Biol.* **116**:577.]

te altre sequenze che sono sia necessarie sia sufficienti per indirizzare le proteine alla regione apicale o basolaterale. Al contrario, ogni proteina di membrana può contenere più segnali di smistamento, ciascuno dei quali in grado di indirizzarla verso l'appropriata regione della membrana plasmatica. Al momento sono in corso studi per identificare questi segnali complessi e le proteine di rivestimento delle vescicole che li riconoscono su una serie di proteine diverse che sono smistate verso domini specifici della membrana plasmatica delle cellule epiteliali polarizzate.

Un altro meccanismo per lo smistamento delle proteine verso le regioni apicale e basolaterale, anche esso illustrato nella Figura 14.25, si realizza negli epatociti. Le membrane basolaterali degli epatociti sono rivolte verso i capillari sanguigni (come nelle cellule epiteliali dell'intestino) e le membrane apicali delimitano i piccoli canali intercellulari nei quali viene secreta la bile. Negli epatociti, le proteine apicali e basolaterali neosintetizzate sono inizialmente trasferite in vescicole dal reticolo *trans* del Golgi alla regione basolaterale e incorporate nella membrana per esocitosi (cioè, per fusione della membrana vescicolare con la membrana plasmatica). Da questa sede provvisoria, entrambi i tipi di proteine sono riassunti per endocitosi nelle stesse vescicole, ma poi le loro strade divergono. Le proteine basolaterali internalizzate per endocitosi sono smistate in vescicole di trasporto che le riportano sulla membrana basolaterale. Al contrario, le proteine assunte per endocitosi destinate alla regione apicale sono smistate in vescicole di trasporto che attraversano la cellula e si fondono con la membrana apicale, un processo chiamato **transcitosi**. Questo processo è utilizzato anche per trasportare materiali extracellulari da un lato all'altro dell'epitelio. Anche nelle cellule epiteliali, come nelle cellule MDCK, nelle quali lo smistamento delle proteine apicali e basolaterali avviene nel complesso di Golgi, la transcitosi potrebbe costituire un meccanismo di trasferimento dotato di "sistema di sicurezza". Questo significa che una proteina apicale trasportata erroneamente alla membrana basolaterale potrebbe essere recuperata per endocitosi e correttamente recapitata alla membrana apicale.

■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 14.4 Stadi tardivi della via secretoria

- ▶ Il reticolo *trans* del Golgi è il principale punto di ramificazione della via secretoria dove le proteine solubili secrete, le proteine lisosomiali e, in alcune cellule, le proteine di membrana destinate alla membrana plasmatica basolaterale o apicale sono segregate in vescicole di trasporto differenti.
- ▶ Molte vescicole che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi, come le vescicole endocitotiche, hanno un rivestimento costituito da complessi AP (proteina adattatrice) e clatrina (vedi Figura 14.18).
- ▶ Per il distacco delle vescicole rivestite di clatrina è necessaria la dinamina, che forma un collare attorno al collo della gemma vescicolare e idrolizza il GTP (vedi Figura 14.19).

- ▶ Gli enzimi solubili destinati ai lisosomi sono modificati nel *cis* del Golgi, creando più residui di mannosio 6-fosfato (M6P) sulle loro catene oligosaccaridiche.
- ▶ I recettori M6P sulle membrane del reticolo *trans* del Golgi legano proteine che possiedono residui M6P e regolano il loro trasferimento agli endosomi tardivi, dove i recettori e le loro proteine di legame si dissociano. I recettori vengono poi riportati all'apparato di Golgi o alla membrana plasmatica e gli enzimi lisosomiali sono recapitati ai lisosomi (vedi Figura 14.22).
- ▶ Le proteine secrete con meccanismo regolato sono concentrate e accumulate nelle vescicole secretorie in attesa di un segnale nervoso o ormonale per l'esocitosi. L'aggregazione delle proteine all'interno del reticolo *trans* del Golgi può avere un ruolo nello smistamento delle proteine secrete attraverso la via regolata.
- ▶ Molte proteine trasportate attraverso la via secretoria subiscono scissioni proteolitiche dopo aver lasciato il Golgi, che le trasformano in proteine mature e attive. Generalmente la maturazione proteolitica avviene all'interno delle vescicole che trasportano le proteine dal reticolo *trans* del Golgi alla superficie cellulare, agli endosomi tardivi o ai lisosomi.
- ▶ Nelle cellule epiteliali polarizzate, le proteine di membrana destinate alle regioni apicale o basolaterale della membrana plasmatica sono smistate nel *trans* del Golgi in differenti vescicole di trasporto (vedi Figura 14.25). L'ancora GPI è l'unico segnale di smistamento apicale-basolaterale fino ad ora identificato.
- ▶ Negli epatociti e in alcune altre cellule polarizzate, tutte le proteine della membrana plasmatica sono inizialmente indirizzate alla membrana basolaterale. Le proteine destinate alla membrana apicale sono internalizzate per endocitosi e trasportate attraverso la cellula alla membrana apicale (transcitosi).

14.5 Endocitosi mediata da recettore

Nelle sezioni precedenti abbiamo considerato le principali vie attraverso cui le proteine secretorie e di membrana sintetizzate nell'RE ruvido sono trasferite alla superficie cellulare o ad altre destinazioni. Le cellule sono anche in grado di internalizzare materiali dal mezzo circostante e smistarli in compartimenti particolari. Alcuni tipi di cellule (per esempio, i macrofagi) possono assumere batteri interi e altre grosse particelle per **fagocitosi**, un processo non specifico mediato dall'actina attraverso il quale estensioni della membrana plasmatica avvolgono il materiale ingerito, formando grandi vescicole chiamate fagosomi (vedi Figura 9.2). Diversamente, tutte le cellule eucariotiche sono coinvolte continuamente nell'endocitosi, un pro-

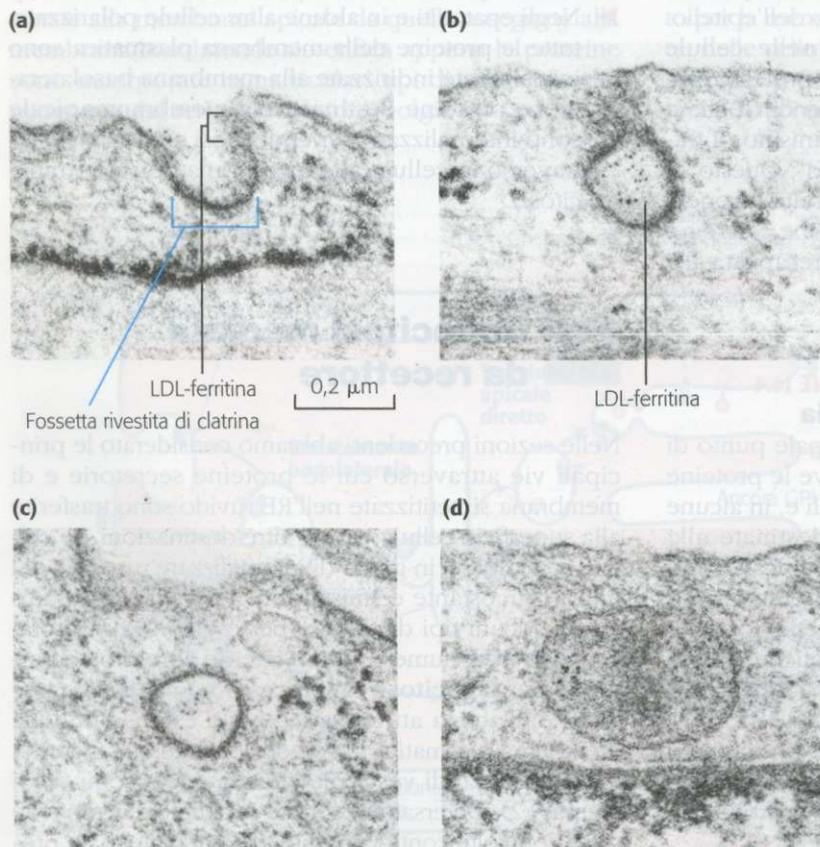
cesso attraverso il quale una piccola regione della membrana plasmatica si invagina per formare una vescicola delimitata da membrana con un diametro di circa 0,05-0,1 μm .

La fagocitosi viene effettuata da un numero relativamente ristretto di tipi cellulari, mentre l'endocitosi è un meccanismo di trasporto in cui sono impegnate continuamente gran parte delle cellule eucariotiche. In una forma di endocitosi, chiamata *pinocitosi*, piccole goccioline di fluido extracellulare e qualsiasi materiale che si trovi disciolto in esse sono assunti in modo aspecifico. Il nostro interesse in questa sezione, tuttavia, è rivolto principalmente all'**endocitosi mediata da recettore**, nella quale uno specifico recettore localizzato sulla superficie cellulare si lega saldamente a una macromolecola extracellulare (il ligando) che riconosce specificamente; la regione della membrana plasmatica che contiene il complesso ligando-recettore si invagina per endocitosi e si stacca diventando una vescicola di trasporto.

Tra le comuni macromolecole che le cellule dei vertebrati internalizzano attraverso l'endocitosi mediata da recettore vi sono le particelle contenenti colesterolo, chiamate lipoproteine a bassa densità (LDL), la proteina che lega il ferro transferrina, molti ormoni proteici (per esempio, l'insulina) e diverse glicoproteine. L'endocitosi mediata da recettore di questi ligandi avviene generalmente tramite le fossette e le vescicole rivestite di clatrina/AP2, con un processo simile al reclutamento degli enzimi lisosomiali attraverso il mannosio 6-fosfato (M6P) nel reticolo *trans* del Golgi

(vedi Figura 14.22). Come notato in precedenza, alcuni recettori per l'M6P sono presenti sulla superficie cellulare, e questi recettori partecipano all'endocitosi mediata da recettore di enzimi lisosomiali che sono secreti erroneamente. In generale, i recettori proteici transmembrana coinvolti nell'assunzione di ligandi extracellulari sono internalizzati dalla superficie cellulare durante l'endocitosi e sono poi smistati e riportati indietro alla superficie cellulare, in modo analogo al riciclaggio dei recettori M6P alla membrana plasmatica e al reticolo *trans* del Golgi. La velocità alla quale un determinato ligando è internalizzato è limitata dalla quantità del recettore corrispondente sulla superficie cellulare.

Le fossette rivestite di clatrina/AP2 costituiscono circa il 2% della superficie di cellule quali gli epatociti e i fibroblasti. In queste fossette e vescicole sono stati osservati molti ligandi internalizzati, che si ritiene funzionino come intermedi nell'endocitosi della maggior parte (sebbene non tutte) delle molecole legate ai recettori della superficie cellulare (Figura 14.26). Alcuni recettori sono raggruppati sulle fossette rivestite di clatrina anche in assenza del ligando. Altri recettori diffondono liberamente nel piano della membrana plasmatica, ma in seguito all'attacco del ligando subiscono un cambiamento conformazionale, tale che quando il complesso ligando-recettore raggiunge per diffusione una fossetta rivestita di clatrina, vi resta bloccato. Due o più tipi di ligandi legati al relativo recettore, come le LDL e la transferrina, possono essere presenti nella stessa fossetta o vescicola rivestita.



◀ **Figura 14.26**

Le fasi iniziali dell'endocitosi mediata da recettore delle particelle di lipoproteina a bassa densità (LDL) sono rivelate dalla microscopia elettronica.

I fibroblasti umani in coltura sono stati incubati in un mezzo contenente particelle LDL legate covalentemente alla proteina densa agli elettroni ferritina, una proteina contenente ferro; ogni piccola particella di ferro della ferritina è visibile al microscopio elettronico come un puntino. Le cellule inizialmente sono state incubate a 4 °C; a questa temperatura la LDL si può legare al suo recettore ma l'internalizzazione non si verifica. Subito dopo, le LDL in eccesso non legate alle cellule venivano rimosse, le cellule portate a 37 °C e poi preparate per l'osservazione al microscopio a intervalli di tempo regolari.

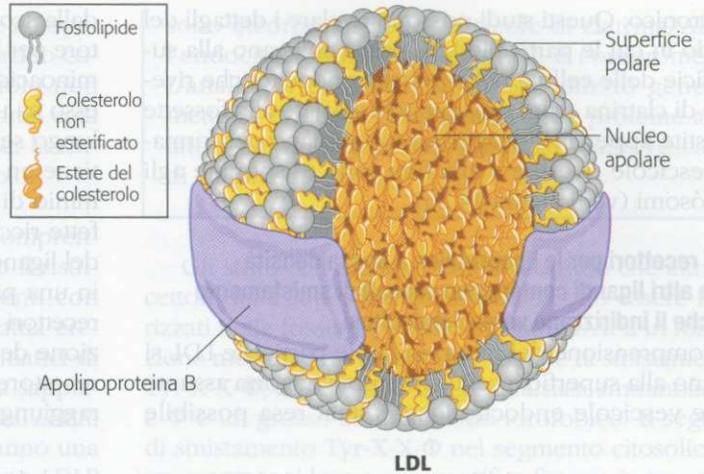
(a) Una fossetta rivestita, con il rivestimento di clatrina sulla sua superficie interna (citoplasmica), subito dopo che la temperatura era stata aumentata. (b) Una fossetta contenente LDL che si sta evidentemente chiudendo su se stessa per formare una vescicola rivestita.

(c) Una vescicola rivestita contenente le particelle LDL marcate con ferritina.

(d) Particelle LDL marcate con ferritina all'interno di un endosoma primario privo di rivestimento, 6 minuti dopo che è iniziata l'internalizzazione. [Fotografie per gentile concessione di R. Anderson. Riproduzione autorizzata da J. Goldstein et al., *Nature* **279**:679. Copyright 1979, Macmillan Journals Limited. Vedi anche M.S. Brown e J. Goldstein, 1986, *Science* **232**:34.]

Figura 14.27

Modello di una lipoproteina a bassa densità (LDL). Questa ed altre classi di lipoproteine hanno la stessa struttura generale: un guscio anfipatico costituito da un monostrato fosfolipidico (non un doppio strato), colesterolo, proteine e un nucleo idrofobico costituito principalmente di esteri del colesterolo o trigliceridi, o entrambi ma con minori quantità di altri lipidi neutri (per esempio, alcune vitamine). Questo modello di LDL si basa su foto al microscopio elettronico ed altri metodi biofisici a bassa risoluzione. La struttura della LDL è singolare, dal momento che contiene una sola molecola di un tipo di apolipoproteina (apoB) che sembra avvolgere l'esterno della particella come una fascia proteica. Le altre lipoproteine contengono più molecole di apolipoproteina, spesso di diversi tipi. [Adattata da M. Krieger, 1995, in E. Haber, (a cura di), *Molecular Cardiovascular Medicine*, Scientific American Medicine, pp. 31-47.]



Le cellule assumono i lipidi dal sangue sotto forma di grandi e ben definiti complessi lipoproteici

I lipidi della dieta assorbiti nell'intestino o accumulati nel tessuto adiposo possono essere distribuiti a tutte le cellule del corpo. Per favorire il trasporto di massa dei lipidi tra le cellule, gli animali hanno evoluto un meccanismo molto efficace di accumulo di centinaia fino a migliaia di molecole lipidiche in trasportatori macromolecolari idrosolubili, chiamati **lipoproteine**, che le cellule possono assumere come un unico complesso dal sistema circolatorio. Una lipoproteina è una particella con un guscio costituito da proteine (*apolipoproteine*) e un monostrato fosfolipidico contenente colesterolo. Il guscio è **anfipatico** perché la sua superficie esterna è idrofila, rendendo queste particelle idrosolubili, e la sua superficie interna è idrofobica. In prossimità della superficie interna idrofobica del guscio è presente un nucleo di lipidi neutri contenenti prevalentemente esteri del colesterolo, trigliceridi o entrambi. Le lipoproteine di mammifero vengono distinte in due classi differenti, definite sulla base della loro densità. La classe di cui ci occuperemo in questo paragrafo è quella delle **lipoproteine a bassa densità (LDL)**. Una tipica particella LDL, schematizzata nella Figura 14.27, è una sfera con un diametro di 20-25 nm. Il guscio esterno anfipatico è costituito da un monostrato fosfolipidico e una singola molecola di

una grossa proteina nota come *apoB-100*; il nucleo di una particella è ripieno di colesterolo sotto forma di esteri del colesterolo.

Per capire in che modo le particelle LDL entrano nelle cellule sono stati utilizzati due approcci sperimentali. Il primo metodo utilizza particelle LDL che sono state marcate con iodio radioattivo ^{125}I legato covalentemente alle catene laterali dei residui di tirosina della proteina apoB-100 che riveste la superficie delle particelle LDL. Dopo diverse ore di incubazione di cellule in coltura con la LDL marcata, è possibile determinare quanta LDL si è legata alla superficie delle cellule, quanta ne è stata internalizzata e quanta della componente di apoB-100 della LDL è stata degradata per idrolisi enzimatica nei singoli amminoacidi. La degradazione dell'apoB-100 può essere rivelata attraverso il rilascio di tirosina marcata con ^{125}I nel mezzo di coltura. La Figura 14.28 mostra l'andamento nel tempo degli eventi di elaborazione della LDL cellulare mediata da recettore ottenuto attraverso esperimenti di pulse-chase con una determinata concentrazione di LDL marcata con ^{125}I . Questi esperimenti dimostrano chiaramente la sequenza degli eventi: il legame alla superficie della LDL → l'internalizzazione → la degradazione. Il secondo approccio coinvolge la marcatura delle particelle LDL con una sostanza densa agli elettroni che può essere rivelata con il microscopio

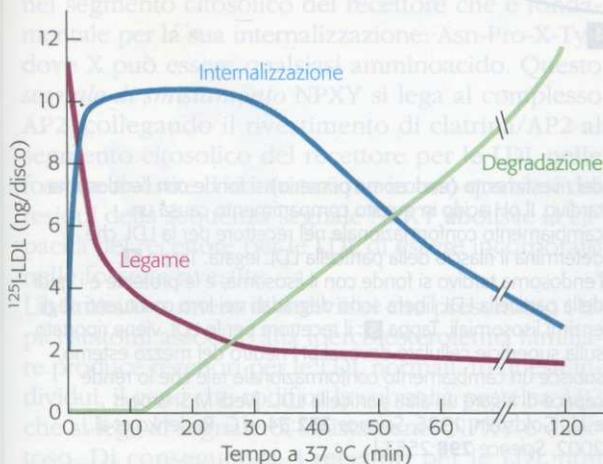


Figura 14.28

L'esperimento di pulse-chase dimostra le relazioni precursore-prodotto nell'assunzione cellulare della LDL.

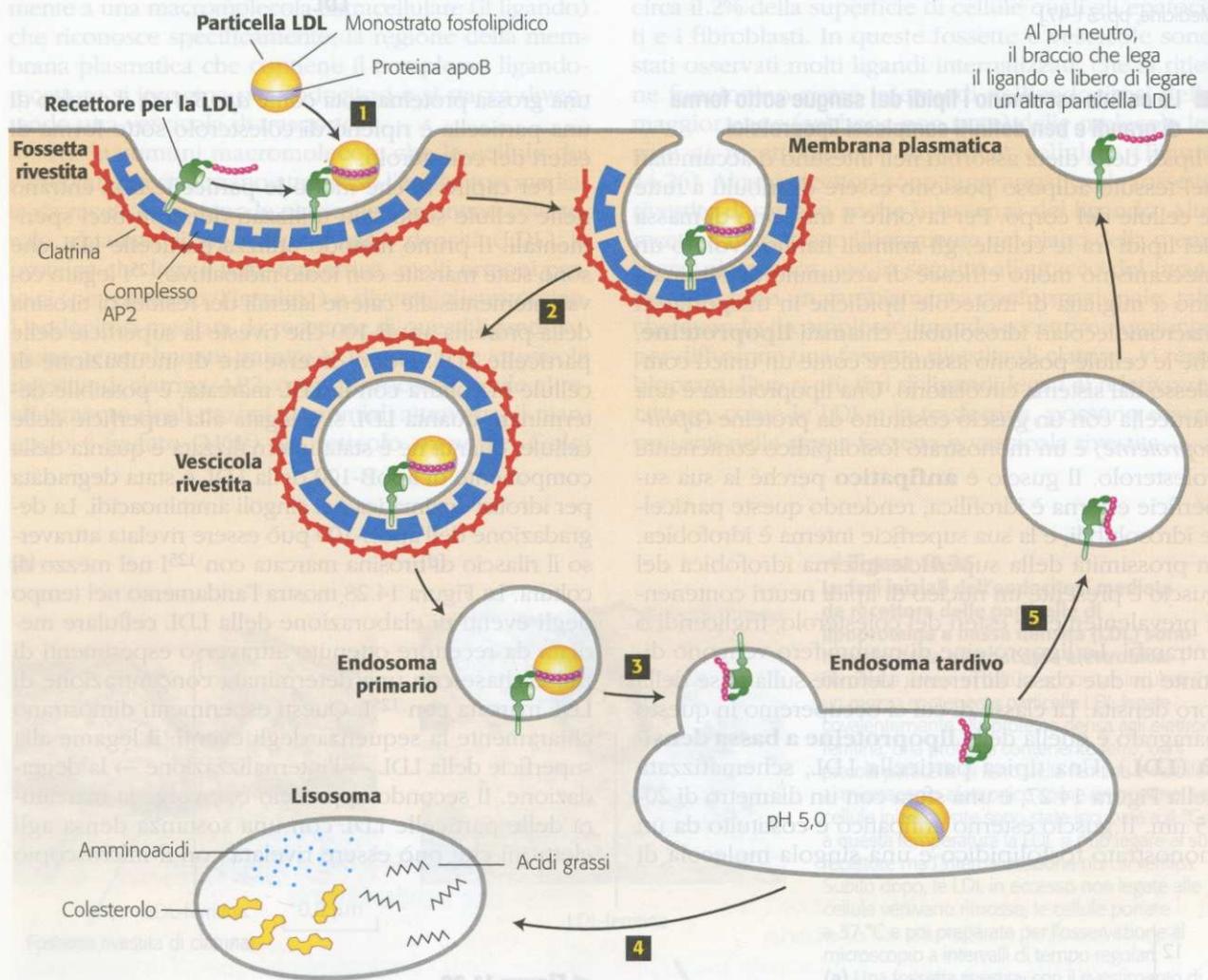
I fibroblasti di pelle umana normali in coltura sono stati incubati in un mezzo contenente ^{125}I -LDL per 2 ore a 4 °C (fase di *pulse*). Successivamente l' ^{125}I -LDL in eccesso non legato alle cellule è stato rimosso, le cellule sono state incubate a 37 °C per la quantità di tempo indicata in assenza di LDL esterna (la fase di *chase*). Sono state poi misurate le quantità di ^{125}I -LDL legato alla superficie, quello internalizzato e quello degradato (idrolizzato). Durante la fase di *pulse* a 4 °C la LDL apoB-100 si lega alla superficie ma non viene né internalizzata né idrolizzata. I dati mostrano la scomparsa molto rapida dell' ^{125}I -LDL legato dalla superficie appena è internalizzato dopo che le cellule sono state riscaldate per permettere i movimenti di membrana. Dopo un ritardo di 15-20 minuti inizia la degradazione lisosomiale della ^{125}I -LDL internalizzata. [Vedi M. S. Brown e J. L. Goldstein, 1976, *Cell* **9**: 663.]

elettronico. Questi studi possono rivelare i dettagli del modo in cui le particelle LDL prima si legano alla superficie delle cellule nelle fossette endocitotiche rivestite di clatrina e poi rimangono associate alle fossette rivestite appena si invaginano e gemmano per formare vescicole rivestite e alla fine sono trasportate agli endosomi (vedi Figura 14.26).

■ I recettori per le lipoproteine a bassa densità e altri ligandi contengono segnali di smistamento che li indirizzano verso l'endocitosi

La comprensione del modo in cui le particelle LDL si legano alla superficie cellulare e poi vengono assunte nelle vescicole endocitotiche è stata resa possibile

dalla scoperta dei *recettori per le LDL* (LDLR). Il recettore per le LDL è una glicoproteina di 839 residui aminoacidici con un singolo segmento transmembrana; esso ha un corto segmento citosolico C-terminale e un lungo segmento esoplasmatico N-terminale che contiene un dominio propulsore β (β -propeller) e un dominio di attacco del ligando. Sette ripetizioni imperfette ricche di cisteina formano il dominio di attacco del ligando, che interagisce con la molecola apoB-100 in una particella LDL. La Figura 14.29 mostra come i recettori proteici per le LDL favoriscono l'internalizzazione delle particelle LDL per endocitosi mediata da recettore. Una volta internalizzate le particelle LDL raggiungono i lisosomi, le proteasi lisosomiali idrolizzano



▲ Figura 14.29

Via endocitotica per internalizzare la lipoproteina a bassa densità (LDL). Tappa **1**: i recettori per le LDL della superficie cellulare si legano a una proteina apoB immersa nello strato fosfolipidico esterno delle particelle LDL. L'interazione tra il segnale di smistamento NPXY nella coda citosolica del recettore per le LDL e il complesso AP2 causa l'incorporazione del complesso recettore-ligando nelle vescicole endocitotiche in formazione. Tappa **2**: le fossette rivestite di clatrina (o gemme) che contengono i complessi recettore-LDL si staccano con lo stesso meccanismo mediato dalla dinamina, utilizzato per formare le vescicole di clatrina/AP1 sul reticolo *trans* del Golgi (vedi Figura 14.19). Tappa **3**: dopo il distacco del rivestimento vescicolare, la vescicola endocitotica priva

del rivestimento (endosoma primario) si fonde con l'endosoma tardivo. Il pH acido in questo compartimento causa un cambiamento conformazionale nel recettore per la LDL che determina il rilascio della particella LDL legata. Tappa **4**: l'endosoma tardivo si fonde con il lisosoma, e le proteine e i lipidi della particella LDL libera sono degradati nei loro costituenti dagli enzimi lisosomiali. Tappa **5**: il recettore per le LDL viene riportato sulla superficie cellulare dove, al pH neutro del mezzo esterno, subisce un cambiamento conformazionale tale che lo rende capace di legare un'altra particella LDL. [Vedi M.S. Brown e J.L. Goldstein, 1986, *Science* **232**:34; e G. Rudenko et al., 2002, *Science* **298**:2553.]

zano le loro apolipoproteine di superficie e le colesterolo esterasi lisosomiali idrolizzano il loro nucleo costituito da esteri del colesterolo. Il colesterolo non esterificato è quindi libero di lasciare il lisosoma e, al bisogno, può essere utilizzato dalla cellula per la sintesi di membrane o vari derivati del colesterolo.

La scoperta dei recettori per le LDL e la comprensione del loro meccanismo di azione sono il risultato di studi compiuti su cellule di pazienti con *ipercolesterolemia familiare* (IF), una malattia ereditaria caratterizzata da elevati livelli plasmatici di particelle LDL ricche di colesterolo, che ora sappiamo essere causata da mutazioni nel gene dell'*LDLR*, il recettore per le LDL. Nei pazienti che hanno una copia normale e una copia difettosa del gene *LDLR* (eterozigoti), il livello ematico delle LDL è circa due volte superiore a quello dei soggetti normali. I pazienti con due geni *LDLR* difettosi (omozigoti) hanno un livello di LDL da quattro a sei volte superiore a quello dei soggetti normali. I soggetti con una forma eterozigote di IF sviluppano comunemente malattie cardiovascolari dieci anni prima degli individui normali, e quelli con una forma omozigote di solito muoiono per attacchi cardiaci prima di raggiungere i 30 anni di età.

L'ipercolesterolemia familiare può essere causata da numerose mutazioni nel gene che codifica il recettore per le LDL. Alcune mutazioni impediscono la sintesi della proteina *LDLR*; altre impediscono il ripiegamento del recettore proteico nell'RE, determinando la sua precoce degradazione (vedi Capitolo 13); altre mutazioni, inoltre, riducono l'affinità di legame del recettore per le LDL. I componenti di un gruppo particolarmente interessante di recettori mutanti espressi sulla superficie cellulare si legano normalmente alle LDL, ma non riescono ad avviare l'internalizzazione delle LDL legate. Negli individui con questo tipo di mutazione, i recettori della membrana plasmatica per altri ligandi sono internalizzati normalmente, ma il recettore mutante per le LDL non è reclutato all'interno delle fossette rivestite. L'analisi di questa e altre forme mutanti del recettore per le LDL e di altri recettori mutanti generati sperimentalmente e fatti esprimere nei fibroblasti ha consentito di identificare un motivo di quattro residui presente nel segmento citosolico del recettore che è fondamentale per la sua internalizzazione: Asn-Pro-X-Tyr, dove X può essere qualsiasi amminoacido. Questo segnale di smistamento NPXY si lega al complesso AP2, collegando il rivestimento di clatrina/AP2 al segmento citosolico del recettore per le LDL nelle fossette rivestite. Una mutazione in uno qualsiasi dei residui della sequenza segnale NPXY abolisce la capacità del recettore per le LDL di essere incorporato nelle fossette rivestite.

Un limitato numero di individui che presentano i tipici sintomi associati alla ipercolesterolemia familiare produce recettori per le LDL normali. In questi individui, il gene che codifica la subunità proteica AP2 che si lega al segnale di smistamento NPXY è difettoso. Di conseguenza, i recettori per le LDL non

sono incorporati nelle vescicole di clatrina/AP2 e l'endocitosi delle particelle LDL è compromessa. L'analisi di pazienti con questo difetto genetico mette in evidenza l'importanza delle proteine adattatrici nel traffico proteico mediato dalle vescicole di clatrina. ●

Gli studi con mutanti hanno mostrato che altri recettori della superficie cellulare possono essere indirizzati nelle fossette rivestite di clatrina/AP2 in formazione mediante un diverso segnale di smistamento, Tyr-X-X-Φ, dove X può essere qualsiasi amminoacido e Φ è un grosso amminoacido idrofobico. Il segnale di smistamento Tyr-X-X-Φ nel segmento citosolico di un recettore si lega a una specifica fessura in una delle subunità proteiche del complesso AP2. Poiché i residui di tirosina e Φ mediano questo legame, una mutazione in uno qualsiasi dei due residui riduce o annulla la capacità del recettore di essere incorporato nelle fossette rivestite di clatrina/AP2. Inoltre, se la proteina HA del virus dell'influenza, che normalmente non subisce il processo di endocitosi, viene modificata geneticamente in modo da avere questa sequenza di quattro residui nel suo dominio citosolico, l'HA mutante viene internalizzata. Nelle nostre precedenti discussioni abbiamo visto come questo stesso tipo di segnale di smistamento medi il reclutamento delle proteine di membrana nelle vescicole di clatrina/AP1 che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi, legandosi a una subunità del complesso AP1 (vedi Tabella 14.1). Tutte queste osservazioni indicano che la sequenza Tyr-X-X-Φ è un segnale ampiamente utilizzato per lo smistamento delle proteine di membrana alle vescicole rivestite di clatrina.

L'endocitosi di alcune proteine della superficie cellulare, tuttavia, viene innescata da altre sequenze (per esempio, Leu-Leu) o da molecole di ubiquitina legate covalentemente. Tra le proteine associate alle vescicole di clatrina/AP2, diverse contengono domini che si legano in modo specifico all'ubiquitina, ed è stato ipotizzato che queste proteine associate alle vescicole mediano l'incorporazione selettiva delle proteine di membrana ubiquitinate nelle vescicole endocitotiche. Come vedremo più avanti, la marcatura di ubiquitina sulle proteine di membrana internalizzate, è riconosciuta anche in uno stadio tardivo nella via endocitotica e svolge un ruolo nel recapito di queste proteine all'interno del lisosoma, dove sono degradate.

■ Il pH acido degli endosomi tardivi provoca la dissociazione della maggior parte dei complessi recettore-ligando

La membrana plasmatica viene internalizzata per endocitosi ad un tasso piuttosto elevato; i fibroblasti in coltura internalizzano normalmente il 50% delle loro proteine e dei loro fosfolipidi di superficie ogni ora. La maggior parte dei recettori della superficie cellulare che vanno incontro a endocitosi depositano ripetutamente i loro ligandi all'interno della cellula e poi li riportano indietro sulla membrana plasmatica, per mediare di nuovo l'internalizzazione di altri ligandi. Per

esempio, il recettore per le LDL compie un percorso ciclico dentro e fuori della cellula ogni 20 minuti, per un totale di diverse centinaia di cicli nelle sue 20 ore di vita media.

I complessi recettore-ligando internalizzati seguono comunemente la via descritta per il recettore dell'M6P nella Figura 14.29. I recettori della superficie cellulare internalizzati per endocitosi si dissociano di norma dai relativi ligandi all'interno degli endosomi tardivi, che appaiono come vescicole sferiche con prolungamenti tubulari della loro membrana, localizzate a pochi micrometri dalla superficie cellulare. I primi esperimenti che permisero di definire il ruolo delle vescicole di smistamento dell'endosoma tardivo utilizzavano il recettore per l'asialoglicoproteina. Questa proteina specifica del fegato media il legame e l'internalizzazione di glicoproteine anomale, i cui oligosaccaridi terminano con un residuo di galattosio invece del normale acido sialico, da cui il nome *asialoglicoproteina*. L'esame al microscopio elettronico di cellule epatiche perfuse con asialoglicoproteina rivela che 5-10 minuti dopo l'internalizzazione, le molecole di ligando si accumulano all'interno degli endosomi tardivi, mentre le estensioni tubulari della membrana risultano ricche di recettori e raramente contengono il ligando. Queste scoperte indicano che l'endosoma tardivo è l'organello all'interno del quale recettori e ligandi sono dissociati.

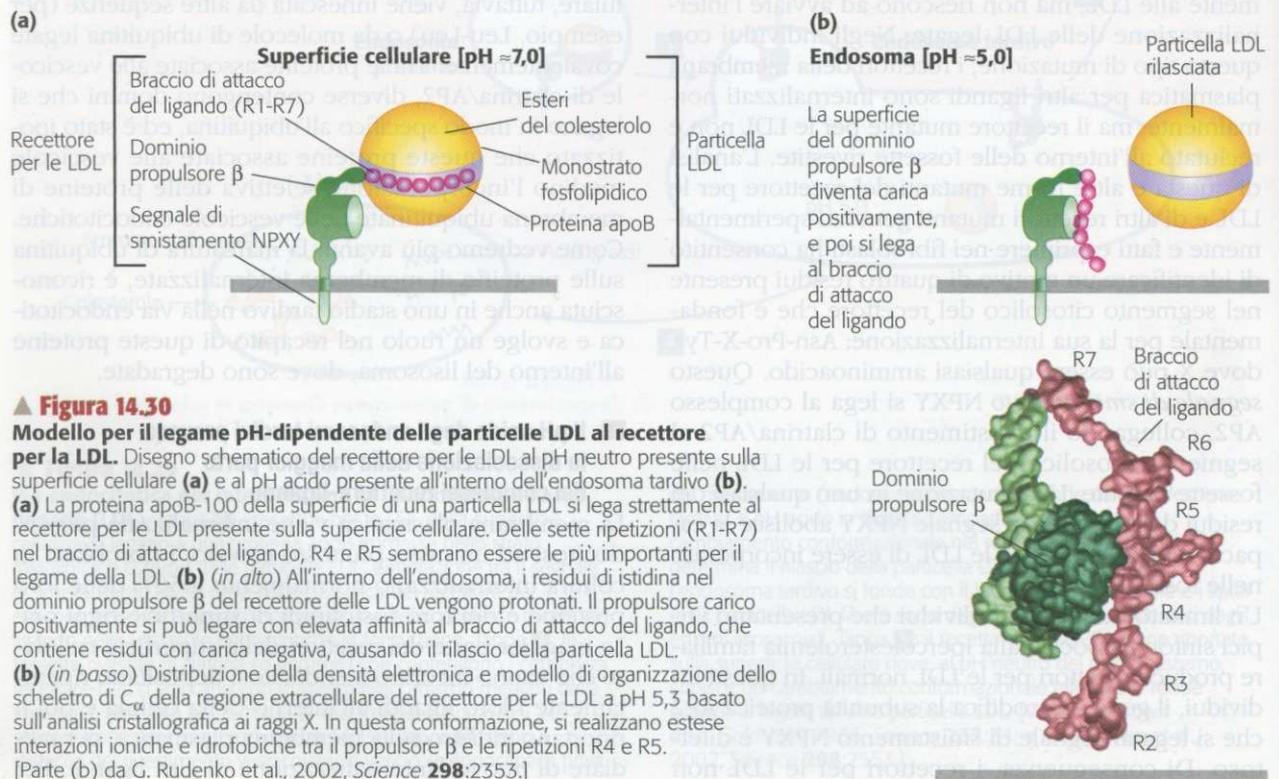
La dissociazione dei complessi recettore-ligando negli endosomi tardivi si realizza non solo nella via endocitotica ma anche nel recapito degli enzimi solubili lisosomiali attraverso la via secretoria (vedi Figura 14.22). Come discusso nel Capitolo 11, le membrane degli endosomi tardivi e dei lisosomi contengono pompe protoniche della classe V che agiscono

insieme ai canali del Cl^- per acidificare il lume della vescicola (vedi Figura 11.13). Molti recettori, compreso il recettore per l'M6P e i recettori della superficie cellulare per le particelle LDL e per l'asialoglicoproteina, si legano saldamente ai loro ligandi a pH neutro ma si staccano dai loro ligandi al valore di pH 6 o più basso. L'endosoma tardivo è la prima vescicola incontrata dai complessi recettore-ligando il cui pH luminale è sufficientemente acido da promuovere la dissociazione della maggior parte dei recettori internalizzati per endocitosi dai loro ligandi strettamente associati.

Il meccanismo attraverso il quale il recettore per le LDL rilascia le particelle LDL legate è ora conosciuto nei minimi dettagli (Figura 14.30). Al valore del pH endosomiale di 5-5,5, i residui di istidina nel dominio propulsore β vengono protonati, formando un sito che si può legare con elevata affinità alle ripetizioni con carica negativa nel dominio di attacco del ligando. Questa interazione intramolecolare blocca le ripetizioni in una conformazione che non consente il legame simultaneo all'apoB-100, causando di conseguenza il rilascio della particella di LDL legata.

La via endocitotica fornisce il ferro alle cellule senza dissociare il complesso recettore-trasferrina negli endosomi

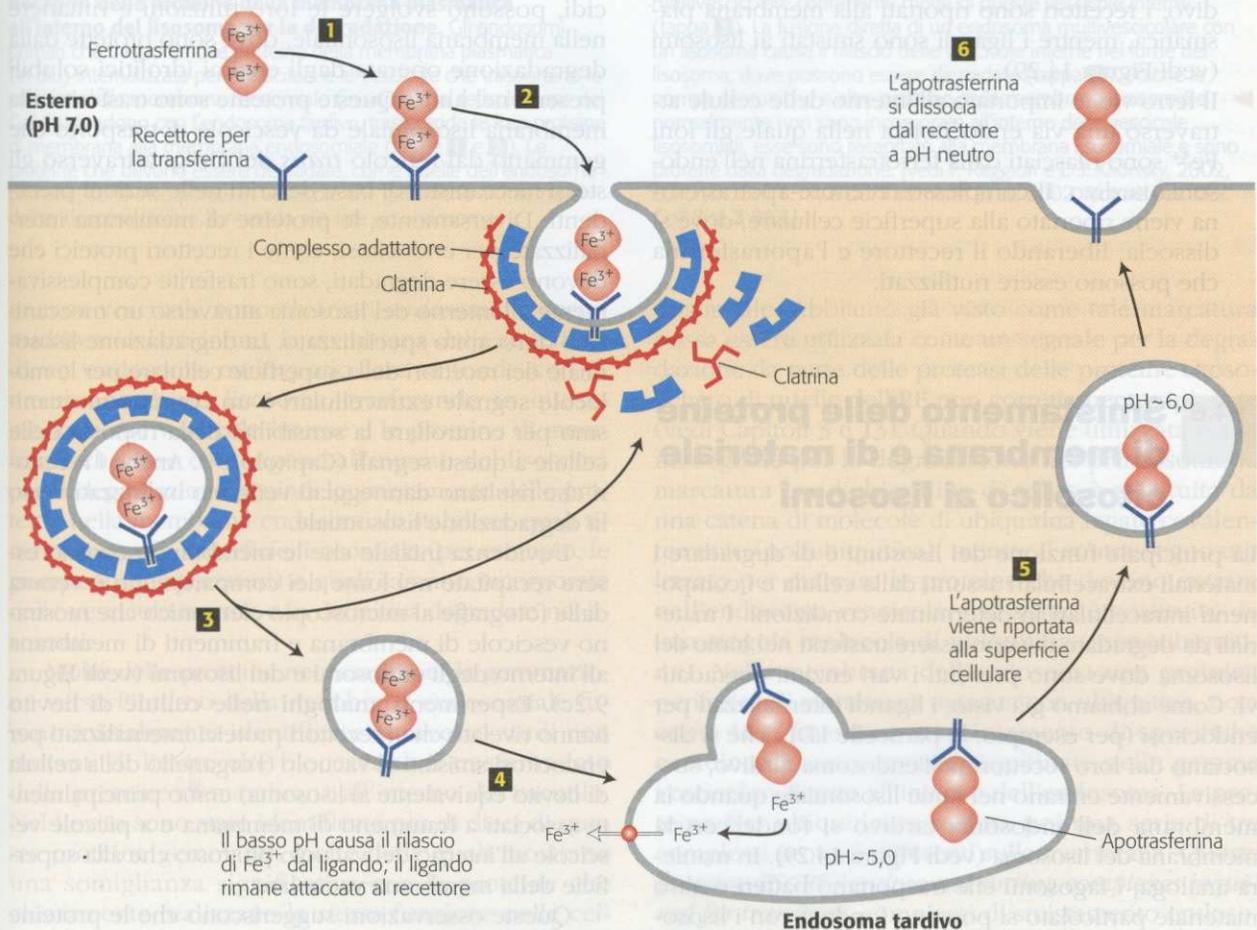
La via endocitotica seguita dal recettore per la transferrina e dal suo ligando si distingue dalla via seguita dalle LDL in quanto il complesso ligando-recettore non si dissocia all'interno degli endosomi tardivi. Ciononostante, anche nella via della transferrina, che ha la funzione di rifornire di ferro le cellule, i cambiamenti di pH mediano lo smistamento di recettori e ligandi.



La transferrina, una delle più importanti glicoproteine del sangue, trasporta il ferro dal fegato (il principale deposito di ferro dell'organismo) e dall'intestino (la sede di assorbimento del ferro) a tutte le cellule dei tessuti. La forma senza ferro, l'apotrasferrina, si lega saldamente a due ioni Fe^{3+} per formare la *ferrotrasferrina*. Tutte le cellule di mammifero contengono sulla loro superficie recettori per la transferrina che, in condizioni di pH neutro, si legano con elevata affinità a questa proteina, dopo che la ferrotrasferrina legata al recettore subisce il processo di endocitosi. Analogamente ai costituenti delle particelle LDL, i due atomi di Fe^{3+} legati rimangono nella cellula ma la porzione di apotrasferrina del ligando non si dissocia dal recettore e, dopo pochi minuti dall'internalizzazione, l'apotrasferrina viene secreta dalla cellula.

Come descritto nella Figura 14.31, la spiegazione del comportamento del complesso ligando-recettore per la transferrina risiede nella particolare capacità dell'apotrasferrina di rimanere legata al recettore per la tra-

sferina nelle condizioni di pH acido (5-5,5) degli endosomi tardivi. Ad un pH inferiore a 6, i due atomi di Fe^{3+} si dissociano dalla ferrotrasferrina, sono ridotti a Fe^{2+} da un meccanismo tuttora sconosciuto e quindi sono trasportati dall'endosoma tardivo nel citosol da uno specifico trasportatore di ioni metallici bivalenti. Il complesso recettore-apotrasferrina che rimane in seguito alla dissociazione degli atomi di ferro, viene riportato sulla superficie della cellula. Sebbene l'apotrasferrina si leghi saldamente al suo recettore a pH 5 o 6, essa non si lega in condizioni di pH neutro. Di conseguenza, l'apotrasferrina legata si dissocia dal recettore per la transferrina quando le vescicole di riciclaggio si fondono con la membrana plasmatica ed il complesso recettore-ligando viene a contatto con il pH neutro del fluido interstiziale o del mezzo di coltura. A questo punto, il recettore è libero di legarsi a un'altra molecola di ferro-trasferrina e l'apotrasferrina secreta dalla cellula viene trasportata dal circolo sanguigno al fegato o all'intestino per essere ricaricata con il ferro.



▲ Figura 14.31
Il ciclo della transferrina, attivo in tutte le cellule dei mammiferi in accrescimento. Tappa **1**: il dimerico della transferrina a cui sono legati due atomi di Fe^{3+} , chiamato ferrotrasferrina, si lega al recettore della transferrina sulla superficie cellulare. Tappa **2**: l'interazione tra la porzione terminale del recettore per la transferrina e il complesso adattatore AP2 avvia l'incorporazione del complesso recettore-ligando nelle vescicole endocitotiche rivestite di clatrina. Tappe **3** e **4**: il rivestimento

vescicolare viene perso e le vescicole endocitotiche si fondono con la membrana dell'endosoma. Fe^{3+} è liberato dal complesso recettore-ferrotrasferrina nell'endosoma tardivo acido. Tappa **5**: a questo valore di pH, la proteina apotrasferrina rimane legata al suo recettore, e questo complesso viene riportato sulla superficie cellulare. Tappa **6**: il pH neutro del mezzo esterno causa il rilascio dell'apotrasferrina priva di ferro. [Vedi A. Ciechanover et al., 1983. *J. Biol. Chem.* **258**: 9681.]

■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 14.5

Endocitosi mediata da recettore

- ▶ Alcuni ligandi extracellulari che si legano a specifici recettori della superficie cellulare sono internalizzati, insieme ai loro recettori, all'interno di vescicole rivestite di clatrina i cui rivestimenti contengono anche complessi AP2.
- ▶ I segnali di smistamento nel dominio citosolico dei recettori della superficie cellulare indirizzano i recettori nelle fossette rivestite di clatrina/AP2 per essere internalizzati. I segnali conosciuti comprendono le sequenze Asp-Pro-X-Tyr, Tyr-X-X-Φ e Leu-Leu (vedi Tabella 14.2).
- ▶ La via endocitotica recapita alcuni ligandi (per esempio, la particelle LDL) ai lisosomi, dove sono degradati. Le vescicole di trasporto provenienti dalla superficie cellulare si fondono prima con gli endosomi tardivi, che successivamente si fondono con il lisosoma.
- ▶ La maggior parte dei complessi recettore-ligando si dissocia nell'ambiente acido dell'endosoma tardivo; i recettori sono riportati alla membrana plasmatica, mentre i ligandi sono smistati ai lisosomi (vedi Figura 14.29).
- ▶ Il ferro viene importato all'interno delle cellule attraverso una via endocitotica nella quale gli ioni Fe^{3+} sono rilasciati dalla ferrottrasferrina nell'endosoma tardivo. Il complesso recettore-apotrasferrina viene riportato alla superficie cellulare, dove si dissocia, liberando il recettore e l'apotrasferrina che possono essere riutilizzati.

14.6 Smistamento delle proteine di membrana e di materiale citosolico ai lisosomi

La principale funzione dei lisosomi è di degradare i materiali extracellulari assunti dalla cellula e i componenti intracellulari in determinate condizioni. I materiali da degradare devono essere trasferiti nel lume del lisosoma dove sono presenti i vari enzimi degradativi. Come abbiamo già visto, i ligandi internalizzati per endocitosi (per esempio, le particelle LDL) che si dissociano dai loro recettori nell'endosoma tardivo, successivamente entrano nel lume lisosomiale quando la membrana dell'endosoma tardivo si fonde con la membrana del lisosoma (vedi Figura 14.29). In maniera analoga, i fagosomi che trasportano batteri o altro materiale particolato si possono fondere con i lisosomi, rilasciando il loro contenuto nel lume per la degradazione.

È chiaro che il meccanismo generale del traffico vescicolare discusso in questo capitolo può essere utilizzato per recapitare il contenuto luminale di un endosoma al lume del lisosoma per la degradazione. Tuttavia, il traffico vescicolare non permette di recapitare le proteine di membrana o il materiale citosolico nel lume lisosomiale. Come vedremo in questa sezione, la cellula può utilizzare due vie specifiche diffe-

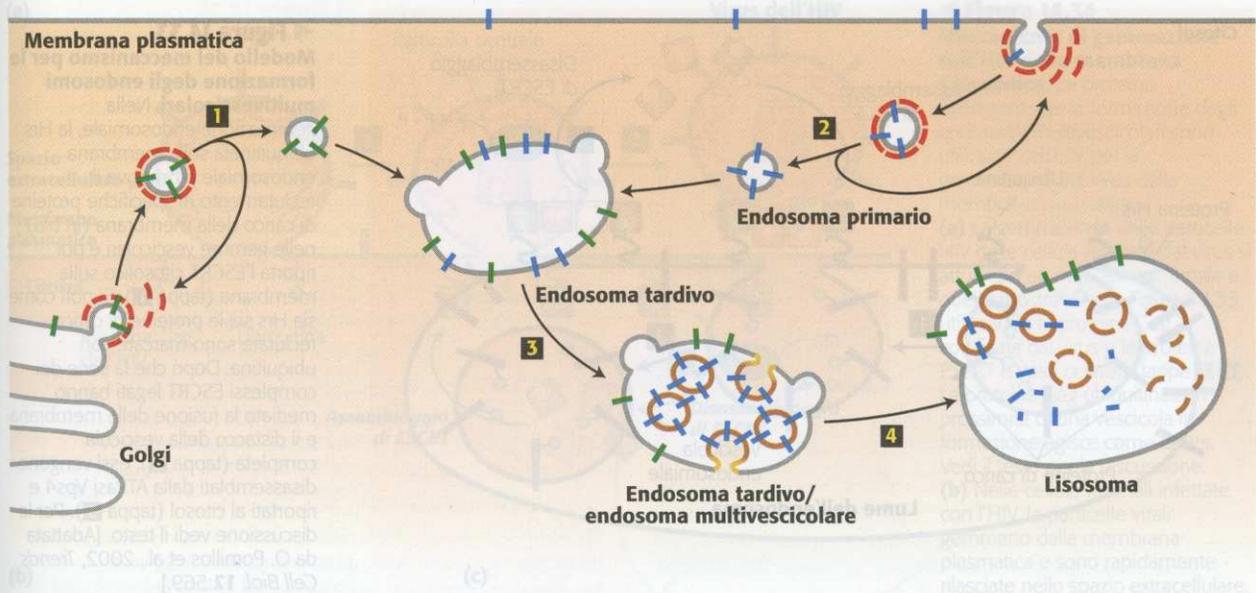
renti per trasferire queste molecole all'interno del lisosoma per la loro degradazione. La prima via è utilizzata per degradare le proteine di membrana internalizzate e si avvale di un particolare tipo di vescicola che gemma nel lume dell'endosoma producendo un endosoma multivescicolare. La seconda via, nota come autofagia, coinvolge le formazioni *de novo* di un organello provvisto di una doppia membrana, noto come autofagosoma, che avvolge il materiale citosolico, come le proteine citosoliche solubili e qualche volta organelli come i perossisomi o i mitocondri. Entrambe queste vie comportano la fusione dell'endosoma multivescicolare o dell'autofagosoma con il lisosoma, e il deposito del contenuto di questi organelli nel lume lisosomiale per la degradazione.

■ Gli endosomi multivescicolari segregano le proteine di membrana destinate alla membrana lisosomiale dalle proteine destinate alla degradazione lisosomiale

Le proteine residenti nei lisosomi, come le pompe protoniche della classe V e i trasportatori di amminoacidi, possono svolgere le loro funzioni e rimanere nella membrana lisosomiale, dove sono protette dalla degradazione operata dagli enzimi idrolitici solubili presenti nel lume. Queste proteine sono trasferite alla membrana lisosomiale da vescicole di trasporto che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi attraverso gli stessi meccanismi di base descritti nelle sezioni precedenti. Diversamente, le proteine di membrana internalizzate per endocitosi, come i recettori proteici che devono essere degradati, sono trasferite complessivamente all'interno del lisosoma attraverso un meccanismo di recapito specializzato. La degradazione lisosomiale dei recettori della superficie cellulare per le molecole segnale extracellulari è un comune meccanismo per controllare la sensibilità della risposta delle cellule a questi segnali (Capitolo 15). Anche i recettori che risultano danneggiati vengono indirizzati verso la degradazione lisosomiale.

L'evidenza iniziale che le membrane possono essere recapitate nel lume dei compartimenti è venuta dalle fotografie al microscopio elettronico che mostrano vescicole di membrana e frammenti di membrana all'interno degli endosomi e dei lisosomi (vedi Figura 9.2c). Esperimenti analoghi nelle cellule di lievito hanno rivelato che i recettori proteici internalizzati per endocitosi smistati al vacuolo (l'organello della cellula di lievito equivalente al lisosoma) erano principalmente associati a frammenti di membrana e a piccole vescicole all'interno del vacuolo piuttosto che alla superficie della membrana vacuolare.

Queste osservazioni suggeriscono che le proteine di membrana internalizzate possono essere incorporate in vescicole specializzate che si formano sulla membrana endosomiale (Figura 14.32). Sebbene queste vescicole siano simili in forma e grandezza alle vescicole di trasporto, esse sono topologicamente differenti. Le vescicole di trasporto gemmano dalla superficie *esterna* di un organello donatore, mentre le vescicole all'interno dell'endosoma gemmano dalla superficie *interna* verso il lume (lontano dal citosol). Gli endosomi maturi che al loro interno contengono nu-



▲ Figura 14.32

Recapito delle proteine della membrana plasmatica all'interno del lisosoma per la degradazione.

Gli endosomi primari che trasportano le proteine della membrana plasmatica (in blu) internalizzata per endocitosi e le vescicole che trasportano le proteine della membrana lisosomiale (in verde) dal reticolo *trans* del Golgi si fondono con l'endosoma tardivo, trasferendo le loro proteine di membrana alla membrana endosomiale (tappe 1 e 2). Le proteine che devono essere degradate, come quelle dell'endosoma primario, sono incorporate in vescicole che gemmano all'interno dell'endosoma tardivo, formando alla fine un endosoma

multivescicolare contenente molte di queste vescicole interne (tappa 3). La fusione diretta di un endosoma multivescicolare con un lisosoma causa il rilascio delle vescicole interne nel lume del lisosoma, dove possono essere degradate (tappa 4). Poiché le pompe protoniche e altre proteine della membrana lisosomiale normalmente non sono incorporate all'interno delle vescicole lisosomiali, esse sono recapitate alla membrana lisosomiale e sono protette dalla degradazione. [Vedi F. Reggiori e D.J. Klionsky, 2002, *Eukaryot. Cell* 1:11, e D.J. Katzmann et al., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:893.]

merose vescicole sono chiamati *endosomi* (o corpi) *multivescicolari*. Infine, la membrana della superficie di un endosoma multivescicolare si fonde con la membrana di un lisosoma, trasferendo in questo modo le sue vescicole interne e le proteine di membrana che esse contengono all'interno del lisosoma per la degradazione. Quindi lo smistamento delle proteine nella membrana endosomiale stabilisce quali rimarranno sulla superficie lisosomiale (per esempio, le pompe e i trasportatori) e quali saranno incorporate nelle vescicole interne e in definitiva degradate nei lisosomi.

Molte delle proteine necessarie per la gemmazione verso l'interno della membrana endosomiale furono inizialmente identificate attraverso studi con mutanti di lievito che bloccavano il trasferimento delle proteine di membrana all'interno del vacuolo. Nel lievito sono state identificate più di dieci di queste proteine gemmanti, molte delle quali mostrano una somiglianza significativa con le proteine che chiaramente realizzano la stessa funzione nelle cellule di mammifero. L'attuale modello di gemmazione endosomiale per la formazione degli endosomi multivescicolari nelle cellule di mammifero si basa soprattutto sugli studi effettuati nel lievito (Figura 14.33). La maggior parte delle proteine di carico che entrano negli endosomi multivescicolari sono marcate con l'ubiquitina. Le proteine di carico destinate ad entrare nell'endosoma vescicolare ricevono la loro marcatura con l'ubiquitina sulla membrana plasmatica, sulla membrana del TGN o sulla membrana en-

dosomiale. Abbiamo già visto come tale marcatura possa essere utilizzata come un segnale per la degradazione da parte delle proteasi delle proteine citosoliche o di quelle dell'RE non correttamente ripiegate (vedi Capitoli 3 e 13). Quando viene utilizzata come un segnale per la degradazione nei proteasomi, la marcatura con l'ubiquitina di solito è costituita da una catena di molecole di ubiquitina legate covalentemente (poliubiquitina), mentre il contrassegno utilizzato per marcare le proteine che devono entrare nell'endosoma vescicolare di solito è costituito da una singola molecola di ubiquitina (monoubiquitina). Nella membrana dell'endosoma una proteina periferica di membrana marcata con ubiquitina, nota come Hrs, favorisce il reclutamento di specifiche proteine di carico monoubiquitinate nelle gemme vescicolari dirette all'interno dell'endosoma. La proteina Hrs ubiquitinata recluta poi una serie di tre complessi proteici differenti sulla membrana. Queste *proteine ESCRT* (*endosomal sorting complexes required for transport*, complessi di smistamento endosomiale richiesti per il trasporto) comprendono la proteina che lega l'ubiquitina Tsg101. Le proteine ESCRT associate alla membrana completano la formazione delle vescicole in gemmazione, determinando il rilascio di una vescicola che trasporta lo specifico carico di membrana all'interno dell'endosoma. Infine, una ATPasi, nota come Vps4, utilizza l'energia derivata dall'idrolisi di ATP per disassemblare le proteine ESCRT, rilasciandole nel citosol e rendendole quindi disponibili per un altro ciclo di gemmazione. Nel-

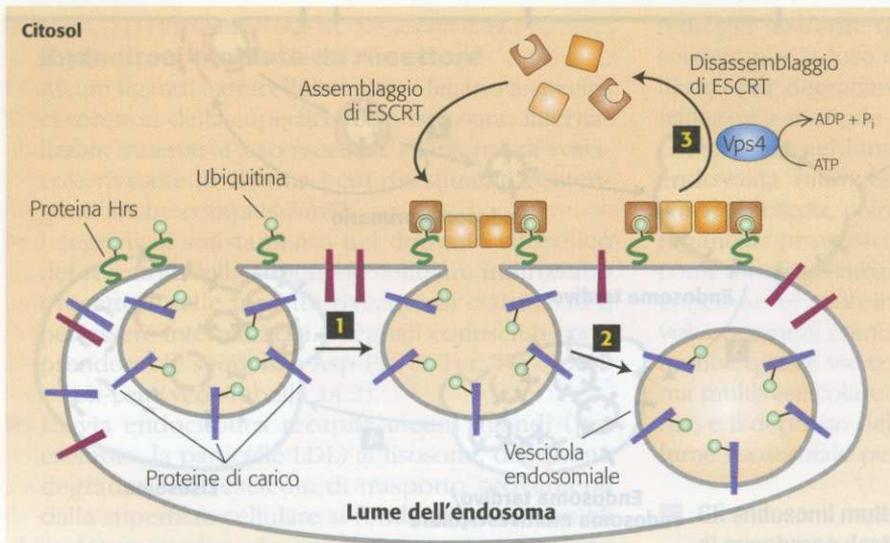


Figura 14.33
Modello del meccanismo per la formazione degli endosomi multivescicolari.

Nella gemmazione endosomiale, la Hrs ubiquitinata sulla membrana endosomiale promuove il reclutamento di specifiche proteine di carico della membrana (in blu) nelle gemme vescicolari e poi riporta l'ESCRT citosolico sulla membrana (tappa **1**). Si noti come sia Hrs sia le proteine di carico reclutate sono marcate con ubiquitina. Dopo che la serie dei complessi ESCRT legati hanno mediato la fusione della membrana e il distacco della vescicola completa (tappa **2**), essi vengono disassemblati dalla ATPasi Vps4 e riportati al citosol (tappa **3**). Per la discussione vedi il testo. [Adattata da O. Pornillos et al., 2002, *Trends Cell Biol.* **12**:569.]

l'evento di fusione deputato al distacco di una vescicola endosomiale completata, le proteine ESCRT e la Vps4 possono funzionare, rispettivamente, come le proteine SNARE e NSF nel classico processo di fusione della membrana discusso in precedenza (vedi Figura 14.10).

■ I retrovirus gemmano dalla membrana plasmatica attraverso un processo simile alla formazione degli endosomi multivescicolari

Le vescicole che gemmano all'interno degli endosomi hanno una topologia simile a quella delle particelle virali con involucri che gemmano dalla membrana plasmatica delle cellule infettate da virus. Inoltre, recenti esperimenti hanno dimostrato che per entrambi i tipi di gemmazione della membrana è richiesto un gruppo comune di proteine. Di fatto, i due processi sono così strettamente simili nei dettagli da suggerire che i virus con involucro abbiano sviluppato meccanismi per reclutare le proteine cellulari utilizzate nella gemmazione endosomiale verso l'interno per i propri scopi.

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è un **retrovirus** con involucro che gemma dalla membrana plasmatica delle cellule infettate in un processo promosso dalla proteina virale Gag, la principale componente strutturale delle particelle virali complete. La proteina Gag si lega alla membrana di una cellula infettata e circa 4000 molecole di Gag polimerizzano in un guscio sferico, producendo una struttura che assomiglia ad una gemma vescicolare che protrude all'esterno della membrana plasmatica. Studi con mutanti dell'HIV hanno rivelato che il segmento N-terminale della proteina Gag è necessario per l'associazione del virus alla membrana plasmatica, mentre il segmento C-terminale è essenziale per il distacco delle particelle HIV completate. Per esempio, se la porzione del genoma virale che codifica l'estremità C-terminale della Gag è rimosso, nella cellula infettata si formeranno le gemme di HIV, ma il distacco non si verifica, e

quindi non viene rilasciata alcuna particella virale libera.

La prima indicazione che la gemmazione dell'HIV coinvolgesse lo stesso apparato molecolare per la gemmazione delle vescicole negli endosomi è stata ottenuta dall'osservazione che Tsg101, una proteina ESCRT, si lega all'estremità C-terminale della proteina Gag. Le ricerche successive hanno chiaramente stabilito le analogie nei meccanismi tra i due processi. Per esempio, Gag è ubiquitinata come parte del processo di gemmazione virale, e nelle cellule con mutazioni nelle proteine Tsg101 o Vst4, le gemme virali dell'HIV si accumulano ma non si possono staccare dalla membrana (Figura 14.34). Inoltre, quando un segmento della proteina cellulare Hrs è aggiunto a una proteina Gag troncata, la normale gemmazione e il rilascio vengono ripristinati. Nel loro insieme questi risultati indicano che la proteina Gag simula la funzione della Hrs, reindirizzando ESCRT alla membrana plasmatica, dove può intervenire nella gemmazione delle particelle virali.

È stato dimostrato che anche altri retrovirus con involucro, come il virus della leucemia murina e il virus del sarcoma di Rous, richiedono i complessi ESCRT per la loro gemmazione, sebbene ogni virus sembra aver evoluto un meccanismo in qualche modo diverso per reclutare i complessi ESCRT nel sito di gemmazione del virus.

La via autofagica recapita le proteine citosoliche o interi organelli ai lisosomi

Quando le cellule sono sottoposte a condizioni stressanti come la carenza di nutrienti, esse hanno la capacità di riciclare le macromolecole per utilizzarle come nutrienti attraverso un processo di degradazione lisosomiale noto come **autofagia** (l'atto di mangiare se stessi). La via autofagica coinvolge la formazione di una struttura a doppia membrana a forma di coppa che avvolge una regione del citosol o un intero organello (per esempio un mitocondrio), formando un **autofagosoma** o

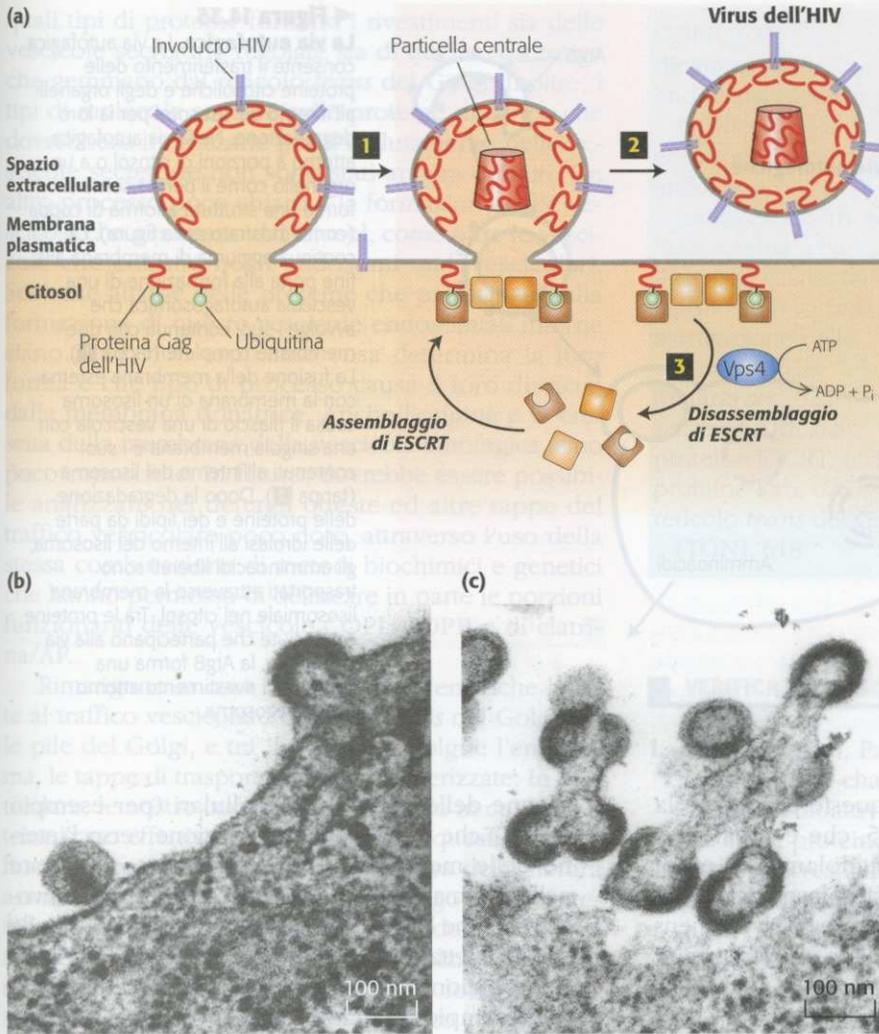


Figura 14.34
Meccanismo di gemmazione dell'HIV dalla membrana plasmatica. Le proteine necessarie per la formazione degli endosomi multivescicolari sono utilizzate dall'HIV per la gemmazione del virus dalla membrana plasmatica.
(a) La gemmazione delle particelle HIV dalle cellule infettate dal virus si attua con un meccanismo simile a quello mostrato nella Figura 14.33, utilizzando la proteina Gag codificata dal virus e le proteine ESCRT e Vps4 cellulari (tappe 1-3). La proteina Gag ubiquitinata in prossimità di una vescicola in formazione agisce come la Hrs. Vedi il testo per la discussione.
(b) Nelle cellule normali infettate con l'HIV, le particelle virali gemmano dalla membrana plasmatica e sono rapidamente rilasciate nello spazio extracellulare.
(c) Nelle cellule prive della proteina ESCRT funzionale Tsg101, la proteina Gag virale forma dense strutture di tipo virale, ma la gemmazione di queste strutture dalla membrana plasmatica non può essere completata e si verifica un accumulo di catene di gemme virali incomplete ancora attaccate alla membrana plasmatica.
 [Wes Sundquist, University of Utah.]

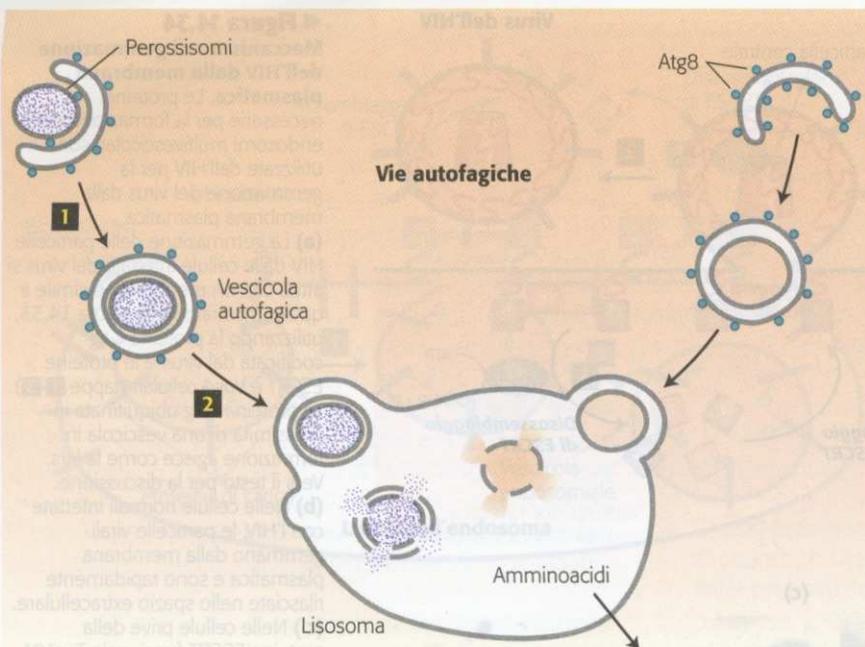
vescicola autofagica (Figura 14.35). La membrana esterna di una vescicola autofagica si può fondere con il lisosoma, dando origine a una grossa vescicola, delimitata da un singolo doppio strato della membrana, all'interno del lisosoma. In modo analogo alla situazione che si verifica quando gli endosomi multivescicolari sono recapitati ai lisosomi, le lipasi e proteasi all'interno del lisosoma degraderanno la vescicola autofagica e il suo contenuto nei loro costituenti molecolari. Le permeasi degli amminoacidi nella membrana lisosomiale consentono poi che gli amminoacidi vengano trasportati nel citosol per essere utilizzati nella sintesi di nuove proteine.

Sembra che la formazione e la fusione delle vescicole autofagiche si realizzi in tre tappe fondamentali. Sebbene i meccanismi alla base di ognuna di queste tre tappe siano poco conosciuti, si ritiene che essi siano correlati ai meccanismi utilizzati nel traffico vescicolare discusso in questo capitolo.

Nucleazione della vescicola autofagica Si ritiene che la vescicola autofagica abbia origine da un frammento di un organello delimitato da membrana. Sebbene l'origine di questa membrana non sia conosciuta, molti studi suggeriscono che la vescicola autofagica derivi inizialmente da un frammento dell'RE. Spes-

so l'autofagia appare come un processo non specifico nel quale una porzione casuale del citoplasma viene inglobata da un autofagosoma. In questi casi il sito di nucleazione è probabilmente casuale. In altri casi, l'autofagosoma può circondare organelli particolari. Per esempio, quando i perossisomi non sono necessari, sono inglobati e degradati attraverso un processo noto come *pexofagia*. In questi casi di autofagia di specifici organelli, qualche tipo di segnale o sito di legame deve essere presente sulla superficie dell'organello per indirizzare la nucleazione della vescicola autofagica.

Crescita e completamento della vescicola autofagica Per far crescere un autofagosoma, a questo organello a forma di coppa deve essere recapitata nuova membrana. Questa crescita presumibilmente si realizza per fusione di alcune vescicole di trasporto con la membrana dell'autofagosoma. Sebbene l'origine di queste vescicole non sia conosciuta, si ritiene che un probabile candidato sia l'endosoma. Alcune delle proteine che partecipano alla formazione degli autofagosomi sono state identificate attraverso la ricerca genetica di mutanti di lievito che sono incapaci di realizzare l'autofagia. Una sottoclasse di queste proteine sembra formare una struttura di rivestimento sulla superfi-



◀ **Figura 14.35**

La via autofagica. La via autofagica consente il trasferimento delle proteine citosoliche e degli organelli all'interno dei lisosomi per la loro degradazione. Nella via autofagica, attorno a porzioni di citosol o a un organello come il perossisoma si forma una struttura a forma di coppa (come mostrato nella figura). La continua aggiunta di membrana alla fine porta alla formazione di una vescicola autofagosomica che avvolge i suoi contenuti con due membrane complete (tappa 1). La fusione della membrana esterna con la membrana di un lisosoma causa il rilascio di una vescicola con una singola membrana e i suoi contenuti all'interno del lisosoma (tappa 2). Dopo la degradazione delle proteine e dei lipidi da parte delle idrolasi all'interno del lisosoma, gli amminoacidi liberati sono trasportati attraverso la membrana lisosomiale nel citosol. Tra le proteine conosciute che partecipano alla via autofagica, la Atg8 forma una struttura di rivestimento attorno all'autofagosoma.

cie di un autofagosoma. Una di queste proteine è la Atg8, mostrata nella Figura 14.35, che è covalentemente legata al lipide fosfatidiletanolamina e poi stabilisce un legame con il lato citoplasmatico della vescicola autofagica. Si ritiene che questo rivestimento possa conferire all'autofagosoma la sua struttura a forma di coppa.

Indirizzamento e fusione della vescicola autofagica Si ritiene che la membrana esterna dell'autofagosoma completato contenga un gruppo di proteine che dirigono la fusione con la membrana del lisosoma. È stato scoperto che per la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma sono richieste due proteine di attacco della vescicola, ma proteine analoghe alle SNARE non sono state identificate. La fusione dell'autofagosoma con il lisosoma si verifica dopo che la proteina Atg8 è stata staccata dalla membrana da una proteasi, e questa tappa proteolitica si verifica solo quando la vescicola autofagica ha completato la formazione di un sistema di doppia membrana sigillata. Quindi la proteina Atg8 sembra mascherare le proteine di fusione e impedire la fusione prematura dell'autofagosoma con il lisosoma.

■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 14.6

Smistamento delle proteine di membrana e di materiale citosolico ai lisosomi

- ▶ Le proteine di membrana internalizzate per endocitosi destinate alla degradazione nel lisosoma sono incorporate in vescicole che gemmano verso l'interno dell'endosoma. Gli endosomi multivescicolari, che contengono molte di queste vescicole interne, si possono fondere con il lisosoma per trasferire le vescicole all'interno del lisosoma (vedi Figura 14.32).

- ▶ Alcune delle componenti cellulari (per esempio ESCRT) che mediano la gemmazione verso l'interno delle membrane endosomiali sono utilizzate nella gemmazione e nel distacco dei virus con involucro, come l'HIV, dalla membrana plasmatica delle cellule infettate dal virus (vedi Figure 14.33 e 14.34).
- ▶ Una porzione di citoplasma o un intero organello (per esempio un perossisoma) possono essere avvolti in una membrana appiattita ed infine incorporati in una vescicola autofagica con doppia membrana. La fusione della membrana esterna della vescicola con il lisosoma trasferisce i contenuti inglobati all'interno del lisosoma per la degradazione (vedi Figura 14.35).

■ Prospettive future

I dati biochimici, genetici e strutturali presentati in questo capitolo dimostrano che ora abbiamo una conoscenza di base del traffico delle proteine da un compartimento delimitato da membrana a un altro. La conoscenza di questi processi è stata ottenuta prevalentemente dalla sperimentazione sulla funzione dei vari tipi di vescicole di trasporto. Questi studi hanno permesso di identificare molti componenti delle vescicole e di scoprire come questi componenti agiscono insieme per dirigere la gemmazione delle vescicole, incorporare gli appropriati gruppi di molecole di carico dall'organello donatore e infine per mediare la fusione di una vescicola completa con la membrana di un organello bersaglio.

Nonostante questi progressi, di importanti stadi della via secretoria e dell'endocitosi sappiamo relativamente poco. Per esempio, non sappiamo ancora

quali tipi di proteine formino i rivestimenti sia delle vescicole secretorie regolate sia di quelle costitutive che gemmano dal reticolo *trans* del Golgi. Inoltre, i tipi di molecole segnale sulle proteine di carico che dovrebbero indirizzarle per il reclutamento nelle vescicole secretorie non sono stati ancora definiti. Un altro processo poco chiaro è la formazione delle vescicole che gemmano dal citosol, come pure le vescicole che entrano negli endosomi multivescicolari. Sebbene alcune delle proteine che partecipano alla formazione di queste vescicole endosomiali interne siano note, non sappiamo cosa determina la loro forma e che tipo di processo causa il loro distacco dalla membrana donatrice. Anche l'origine e la crescita della membrana della vescicola autofagica sono poco conosciute. In futuro, dovrebbe essere possibile analizzare nei dettagli queste ed altre tappe del traffico vescicolare poco note, attraverso l'uso della stessa combinazione di metodi biochimici e genetici che hanno permesso di delineare in parte le porzioni funzionanti delle vescicole COPI, COPII e di clatrina/AP.

Rimangono ancora aperte le problematiche legate al traffico vescicolare tra l'RE e il *cis* del Golgi, tra le pile del Golgi, e tra il *trans* del Golgi e l'endosoma, le tappe di trasporto meglio caratterizzate. In particolare, le nostre conoscenze sul modo in cui le proteine sono effettivamente smistate tra questi organelli sono incomplete soprattutto a causa della natura assai dinamica di tutti gli organelli lungo la via secretoria. Nonostante si conoscano molti dei dettagli sul funzionamento di componenti vescicolari particolari, non riusciamo a spiegare perché le loro funzioni siano limitate a specifici stadi del traffico complessivo delle tappe di trasporto anterogrado e retrogrado. Per esempio, non riusciamo a spiegare perché le vescicole COPII si fondono l'una con l'altra per formare una nuova pila di *cis* del Golgi, mentre le vescicole COPI si fondono con la membrana dell'RE, dal momento che entrambi i tipi di vescicole sembrano contenere gruppi analoghi di proteine v-SNARE. Allo stesso modo, non conosciamo quale sia in realtà la caratteristica della membrana del Golgi che distingue una gemma vescicolare rivestita di COPI da una gemma rivestita di clatrina/AP. In entrambi i casi, sembra che il legame della proteina ARF alla membrana del Golgi inneschi la gemmazione della vescicola. La soluzione di questi problemi richiederà una conoscenza più integrata dello sviluppo del traffico vescicolare nell'ambito dell'intera via secretoria. I recenti avanzamenti nelle nostre capacità di visualizzare il trasporto vescicolare delle proteine di carico nelle cellule viventi ci fa sperare che alcuni degli aspetti più sottili della funzione vescicolare possano essere chiariti nell'immediato futuro.

PAROLE CHIAVE

| | |
|---|--|
| AP (complessi di proteine adattatrici), 637 | autofagia, 654 clatrina, 625 COPI, 625 |
|---|--|

| | |
|---|-----------------------------|
| COPII, 625 | secrezione costitutiva, 640 |
| dinamina, 638 | secrezione regolata, 640 |
| endocitosi mediata da recettore, 646 | segnali di smistamento, 627 |
| endosoma tardivo, 618 | transitosi, 645 |
| endosomi multivescicolari, 653 | trasporto anterogrado, 631 |
| lipoproteina a bassa densità (LDL), 647 | trasporto retrogrado, 631 |
| mannosio 6-fosfato, 639 | t-SNARE, 624 |
| maturazione delle cisterne, 618 | vescicole di trasporto, 618 |
| mutanti <i>sec</i> , 622 | via endocitotica, 617 |
| proteina ARF, 626 | via secretoria, 617 |
| proteine ESCRT, 653 | v-SNARE, 624 |
| proteine Rab, 628 | |
| reticolo <i>trans</i> del Golgi (TG), 618 | |

VERIFICA DEI CONCETTI

1. Nei loro studi, Palade e colleghi fecero uso della tecnica pulse-chase con amminoacidi marcati con isotopi radioattivi e dell'autoradiografia per localizzare le proteine neosintetizzate nelle cellule acinose pancreatiche. Questi esperimenti iniziali fornirono informazioni preziose sulla sintesi proteica e sul trasporto tra i compartimenti. Sebbene siano stati sviluppati nuovi metodi, sono ancora necessari due requisiti per studiare questo tipo di trasporto proteico. Quali sono i due requisiti che devono essere soddisfatti? Descrivete brevemente gli approcci sperimentali necessari per soddisfarli.
2. *Sec18* è un gene di lievito che codifica la NSF. Esso è un mutante di classe C nella via secretoria del lievito. Qual è il ruolo della NSF nel processo del traffico di membrana? Come indicato dal suo fenotipo di classe C, perché una mutazione della NSF causa accumulo di vescicole in corrispondenza di quello che sembra essere solo uno stadio della via secretoria?
3. La gemmazione delle vescicole è collegata alle proteine di rivestimento. Qual è il ruolo delle proteine di rivestimento nella gemmazione delle vescicole? Come sono trasferite le proteine di rivestimento alle membrane? Quali tipi di molecole possono essere potenzialmente incluse o escluse dalle vescicole neofornate? Qual è l'esempio più noto di una probabile proteina coinvolta nel distacco vescicolare?
4. Il trattamento delle cellule con il farmaco brefeldina A (BFA) provoca il distacco del rivestimento delle membrane dell'apparato di Golgi, con il risultato che in una cellula quasi tutte le proteine del Golgi si trovano nell'RE. Quali deduzioni si possono fare da questa osservazione relative ai ruoli delle proteine di rivestimento oltre al fatto di promuovere la formazione delle vescicole? Prevedete quale tipo di mutazione in Arf1 potrebbe

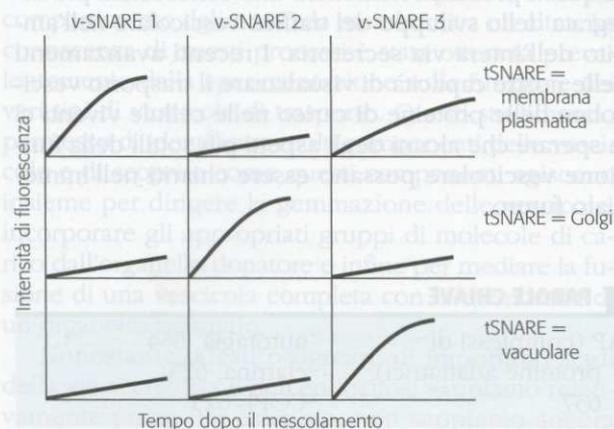
avere lo stesso effetto del trattamento delle cellule con il BFA.

5. Quando un anticorpo per una regione "cerniera" esposta della subunità β di COPI nota come EAGE viene microiniettata nelle cellule HeLa, questo blocca la funzione della subunità β di COPI. Prevedete quali potrebbero essere le conseguenze di questo blocco funzionale nel trasporto anterogrado dall'RE alla membrana plasmatica. Proponete un esperimento per verificare se l'effetto della microiniezione di EAGE è inizialmente sul trasporto anterogrado o sul trasporto retrogrado.
6. La specificità della fusione tra vescicole coinvolge due processi distinti e sequenziali. Descrivete il primo dei due processi e la sua regolazione da parte delle proteine interruttore GTPasiche. Quale effetto potrebbe avere la sovraespressione di una forma mutata di Rab5, che è bloccata nello stato legato al GTP, sulle dimensioni degli endosomi primari?
7. I segnali di smistamento che causano il trasporto retrogrado di una proteina nella via secretoria sono a volte conosciuti come sequenze di recupero. Citate i due esempi conosciuti di sequenze di recupero per le proteine solubili e di membrana dell'RE. In che modo la presenza di una sequenza di recupero su una proteina solubile dell'RE determina il suo recupero dal complesso *cis* di Golgi? Descrivete come il concetto di una sequenza di recupero sia essenziale per il modello di maturazione delle cisterne.
8. I complessi delle proteine adattatrici (AP) della clatrina si legano direttamente al segmento citosolico delle proteine di membrana e interagiscono anche con la clatrina. Quali sono i quattro complessi di proteine adattatrici conosciuti? Perché la clatrina può essere considerata una proteina accessoria in un rivestimento centrale composto di proteine adattatrici?
9. La malattia delle cellule I è un classico esempio di un difetto umano ereditario nell'indirizzamento delle proteine che influenza un'intera classe di proteine, gli enzimi solubili del lisosoma. Qual è il difetto molecolare nella malattia delle cellule I? Perché influenza lo smistamento di una intera classe di proteine? Quali altri tipi di mutazioni potrebbero produrre lo stesso fenotipo?
10. Il TGN, il reticolo *trans* del Golgi, è la sede di numerosi processi di smistamento non appena le proteine e i lipidi escono dal complesso di Golgi. Confrontate lo smistamento delle proteine ai lisosomi con l'immagazzinamento delle proteine nei granuli secretori regolati come quelli contenenti insulina. Confrontate lo smistamento delle proteine alla superficie basolaterale rispetto a quella apicale nelle cellule MDCK rispetto agli epatociti.
11. Descrivete il ruolo chiave svolto dal pH nella regolazione delle interazioni tra il mannosio 6-fosfato e il recettore del mannosio 6-fosfato. Perché l'aumento del pH endosomiale determina la secrezione di enzimi lisosomiali neosintetizzati nel mezzo extracellulare?

12. Quali caratteristiche meccaniche sono condivise (a) dalla formazione di endosomi multivescicolari per gemmazione all'interno dell'endosoma e (b) dalla gemmazione all'esterno della superficie cellulare del virus dell'HIV? Volete creare un inibitore/competitore peptidico della gemmazione dell'HIV e decidete di imitare in un peptide sintetico una porzione della proteina Gag dell'HIV. Quale porzione della proteina Gag dell'HIV sarebbe una scelta logica? Quali dei normali processi cellulari normali potrebbe bloccare questo inibitore?
13. Le vie fagocitiche e autofagiche svolgono due ruoli fondamentali, ma entrambe recapitano le loro vescicole al lisosoma. Quali sono le differenze fondamentali tra le due vie? Descrivete le tre tappe di base nella formazione e fusione delle vescicole autofagiche.

ANALISI DEI DATI

Allo scopo di esaminare la specificità della fusione della membrana conferita da specifiche v-SNARE e t-SNARE (vedi MacNew et al., 2000, *Nature* 407:153-159) furono ricostruiti liposomi (membrane lipidiche artificiali) con specifici complessi t-SNARE o v-SNARE. Per valutare la fusione, i liposomi con v-SNARE contenevano anche un lipide fluorescente ad una concentrazione piuttosto elevata tale che la sua fluorescenza fosse spenta. (Per spegnimento, o *quenching*, si intende la riduzione di fluorescenza rispetto a quella attesa. In questo caso, lo spegnimento avviene perché i lipidi fluorescenti sono troppo concentrati e interferiscono con la capacità di eccitarsi l'uno con l'altro.) Dalla fusione di questi liposomi con quelli privi di lipidi fluorescenti, i lipidi fluorescenti subiscono una diluizione, e lo spegnimento è attenuato. Utilizzando i complessi t-SNARE di lievito, furono preparate tre serie di liposomi: quelli contenenti le t-SNARE della membrana plasmatica, le t-SNARE del Golgi o le t-SNARE vacuolari. Ognuno di questi tipi di liposomi fu mescolato con liposomi fluorescenti contenenti uno dei tre diversi complessi v-SNARE di lievito. Furono ottenuti i seguenti risultati.



- a. Che cosa si può dedurre da questi dati sulla specificità degli eventi di fusione della membrana?
- b. Dove vi aspettereste di scoprire i complessi v-SNARE 1, 2 e 3 nel lievito?
- c. Che tipo di esperimento potrebbe essere progettato per determinare dove è richiesta *in vivo* nella via secretoria una data v-SNARE?
- d. Il dominio citoplasmatico della v-SNARE 2 è stato espresso e purificato da *E. coli*. Varie quantità di questo dominio sono incubate sia con i liposomi t-SNARE sia con i liposomi v-SNARE del Golgi. I liposomi sono quindi lavati per eliminare la proteina non legata. I vari liposomi sono poi mescolati, come indicato sotto, e viene misurata la fluorescenza di ogni campione un'ora dopo il mescolamento. Come possono essere spiegati i risultati? Come sarebbe il risultato se il lievito avesse sovraespresso il dominio citoplasmatico della v-SNARE 2?



BIBLIOGRAFIA

Tecniche per lo studio della via secretoria

Beckers, C. J., et al. 1987. Semi-intact cells permeable to macromolecules: use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* **50**:523-534.

Kaiser, C. A. e R. Schekman. 1990. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* **61**:723-733.

Novick, P., et al. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**:461-469.

Lippincott-Schwartz, J., et al. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:444-456.

Orci, L., et al. 1989. Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell* **56**:357-368.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**:347-358.

Meccanismi molecolari del traffico vescicolare

Bonifacino, J. S. e B. S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**:153-66.

Grosshans, B. L., D. Ortiz e P. Novick. 2006. Rab proteins and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:11821-11827.

Jahn, R., et al. 2003. Membrane fusion. *Cell* **112**:519-533.

Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:187-198.

McNew, J. A., et al. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**:153-159.

Ostermann, J., et al. 1993. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* **75**:1015-1025.

Schimmöller, F., I. Simon e S. Pfeffer. 1998. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* **273**:22161-22164.

Weber, T., et al. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**:759-772.

Wickner, W. e A. Haas. 2000. Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.* **69**:247-275.

Zerial, M. e H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:107-117.

Stadi precoci della via secretoria

Barlowe, C. 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* **13**:295-300.

Behnia, R. e S. Munro. 2005. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**:597-604.

Bi, X., et al. 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 prebudding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419**:271-277.

Gurkan, C., et al. 2006. The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:727-738.

Lee, M. C., et al. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:87-123.

Letourneur, F., et al. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**:1199-1207.

Losev, E., et al. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**:1002-1006.

Pelham, H. R. 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:530-535.

Stadi tardivi della via secretoria

Bonifacino, J. S. 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:23-32.

Bonifacino, J. S. e E. C. Dell'Angelica. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* **145**:923-926.

Edeling, M. A., C. Smith e D. Owen. 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:32-44.

- Fotin, A., et al. 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**:573-579.
- Ghosh, P., et al. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Rev. Mol. Cell Bio.* **4**:202-213.
- Mostov, K. E., M. Verges e Y. Altschuler. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:483-490.
- Schmid, S. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Ann. Rev. Biochem.* **66**:511-548.
- Simons, K. e E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
- Song, B. D. e S. L. Schmid. 2003. A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* **42**:1369-1376.
- Steiner, D. F., et al. 1996. The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* **22**:94-104.
- Tooze, S. A., et al. 2001. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* **11**:116-122.

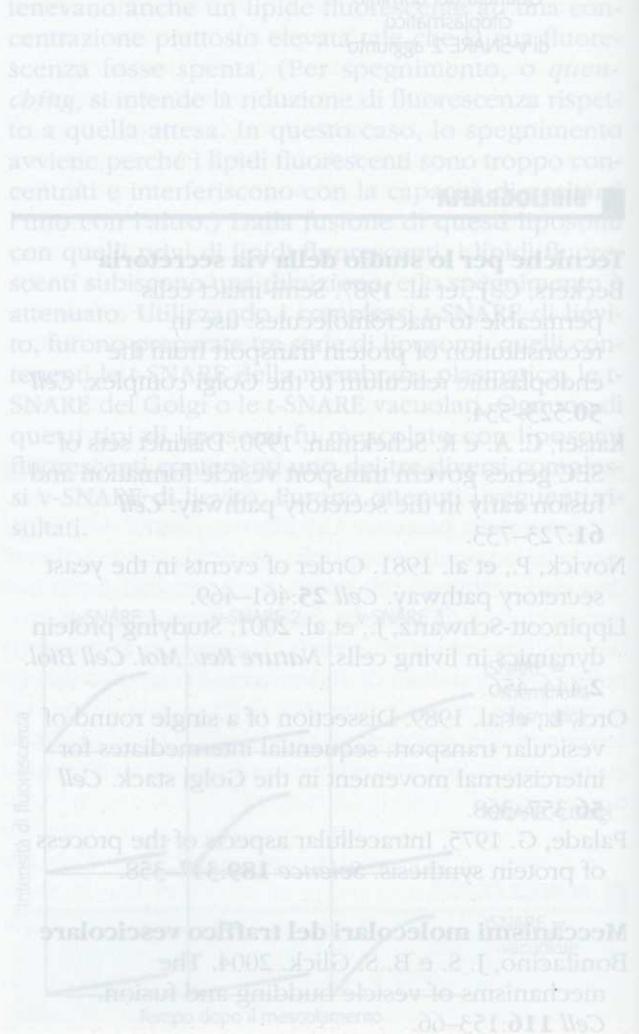
Endocitosi mediata da recettore

- Brown, M. S. e J. L. Goldstein. 1986. Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Conferenza per il premio Nobel. *Science* **232**:34-47.

- Kaksonen, M., C. P. Toret e D. G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:404-414.
- Rudenko, G., et al. 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* **298**:2353-2358.

Smistamento delle proteine di membrana e di materiale citosolico ai lisosomi

- Hurley, J. H. e S. D. Emr. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**:277-298.
- Katzmann, D. J., et al. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:893-905.
- Khalfan, W. A. e D. J. Klionsky. 2002. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:468-475.
- Lemmon, S. K. e L. M. Traub. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:457-466.
- Pornillos, O., et al. 2002. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* **12**:569-579.
- Shintani, T. e D. J. Klionsky. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**:990-995.





SEGUIRE UNA PROTEINA FUORI DALLA CELLULA

J. Jamieson e G. Palade, 1966, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **55**(2): 424-431

L'avvento della microscopia elettronica ha permesso ai ricercatori di visualizzare la cellula e le sue strutture con un livello di dettagli impensabile in precedenza. George Palade ha utilizzato questo strumento per osservare nei minimi dettagli le strutture cellulari ma anche per analizzare il processo della secrezione. Combinando la microscopia elettronica con esperimenti di pulse-chase, Palade è riuscito a scoprire il percorso seguito dalle proteine per lasciare la cellula.

■ Presupposti

Oltre a sintetizzare le proteine per sostenere le funzioni cellulari, molte cellule devono anche produrre e secerne altre proteine che svolgono la loro funzione fuori dalla cellula. I biologi cellulari, compreso Palade, si chiedevano in che modo le proteine secrete riuscissero a passare dall'interno all'esterno della cellula. Negli esperimenti preliminari, che suggerivano che le proteine destinate alla secrezione sono sintetizzate in una particolare regione intracellulare e poi seguono una via sulla superficie cellulare, venivano utilizzati metodi per rompere le cellule che sintetizzavano una particolare proteina secreta e separare i loro vari organelli per centrifugazione. Questi studi di frazionamento cellulare mostravano che le proteine secrete si trovavano in vescicole rivestite di membrana derivate dal reticolo endoplasmatico (RE), dove esse venivano sintetizzate, e associate con granuli di zimogeno, dalle quali esse erano alla fine rilasciate dalla cellula. Sfortunatamente, i risultati di questi studi erano difficili da interpretare per le difficoltà di ottenere una chiara separazione di tutti i diversi organelli che contengono le proteine secretorie. Per chiarire ulteriormente la via, Palade si affidò a una nuova tecnica da poco sviluppata, l'autoradiografia ad alta risoluzione, che gli permetteva di rivelare la posizione di proteine marcate con traccianti radioattivi in sezioni cellulari sottili che erano state preparate per la microscopia elettronica degli organelli intracellulari. Questo lavoro portò all'importante scoperta che le proteine secrete viaggiano all'interno di vescicole dall'RE al complesso di Golgi e poi alla membrana plasmatica.

■ L'esperimento

Palade voleva identificare quali strutture e organelli cellulari fossero coinvolti nella secrezione proteica. Per studiare questo complesso processo, egli scelse attentamente un modello sperimentale particolarmente idoneo per questi studi, la cellula esocrina pancreatica, che è responsabile della produzione e secrezione

di grandi quantità di enzimi digestivi. Poiché queste cellule hanno l'atipica proprietà di esprimere solo proteine secretorie, una marcatura generale della proteina neosintetizzata, come quella con la leucina radioattiva, sarà incorporata solo nelle molecole proteiche che procedono lungo la via secretoria.

Inizialmente Palade esaminò la via secretoria delle proteine *in vivo*, iniettando nelle cavie [^3H]-leucina, che era incorporata nelle proteine neosintetizzate, marcandole radioattivamente. A partire da 4 minuti dopo l'iniezione fino a 15 ore dopo, gli animali erano sacrificati e il tessuto pancreatico veniva fissato. Sotponendo i campioni ad autoradiografia e osservandoli al microscopio elettronico, Palade riuscì a definire il percorso delle proteine nelle cellule nel corso del tempo. Come previsto, immediatamente dopo l'iniezione di [^3H]-leucina, la radioattività era localizzata nelle vescicole a livello dell'RE, mentre in tempi più lunghi compariva sulla membrana plasmatica. La sorpresa veniva dai periodi di tempo intermedi. Piuttosto che spostarsi direttamente dall'RE alla membrana plasmatica, le proteine marcate con l'amminoacido radioattivo sembravano accumularsi nel complesso di Golgi a metà del loro percorso. Inoltre, non c'era mai un periodo di tempo in cui le proteine marcate non erano confinate nelle vescicole.

L'osservazione che l'apparato di Golgi era coinvolto nella secrezione delle proteine era da una parte sorprendente e dall'altra interessante. Per comprendere nel complesso il ruolo di questo organello nella secrezione proteica, Palade approntò esperimenti di pulse-chase *in vitro*, che consentivano un monitoraggio più accurato del destino delle proteine marcate. In queste tecniche di marcatura, le cellule sono esposte ai precursori marcati, in questo caso [^3H]-leucina, per un breve periodo di tempo, noto come *pulse*. Il precursore radioattivo viene poi sostituito con una forma non marcata del precursore per un successivo periodo, noto come *chase*. Le proteine sintetizzate durante il periodo di pulse saranno marcate e rivelate attraverso l'autoradiografia, mentre quelle sintetizzate durante il periodo di chase, che non sono marcate, non saranno rivelate. Palade tagliò il pancreas di cavia in fettine spesse, incubandole per 3 minuti in mezzi contenenti [^3H]-leucina. Alla fine del pulse egli aggiungeva una quantità in eccesso di leucina non marcata. Le fettine di tessuto erano fissate per l'autoradiografia o utilizzate per il frazionamento cellulare. Per assicurarsi che i suoi risultati fossero un indice corretto della secrezione proteica *in vivo*, Palade caratterizzò meticolosamente la cellula di cavia in verde e la TP47 in rosso. Per gentile concessione di

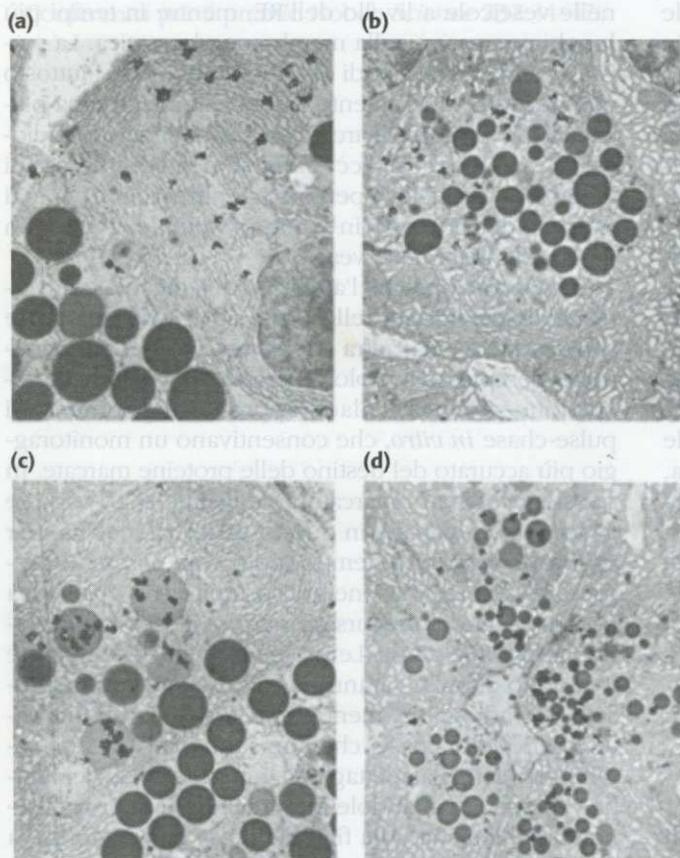
losamente il sistema. Una volta convinto che il suo sistema *in vitro* simulava esattamente la secrezione proteica *in vivo*, passò all'esperimento decisivo. Egli trattò le fettine di tessuto per 3 minuti con $[^3\text{H}]$ -leucina, poi dopo il lavaggio le incubò per 7, 17, 37, 57 e 117 minuti con leucina non marcata. La radioattività, ancora confinata nelle vescicole, iniziava nell'RE, quindi raggiungeva attraverso le vescicole l'apparato di Golgi e rimaneva nelle vescicole quando esse passavano attraverso il Golgi e sulla membrana plasmatica (vedi Figura 1). Mentre procedevano ulteriormente lungo la via, le vescicole diventavano più densamente impaccate con la proteina radioattiva. Dalla sua numerosa serie di autoradiogrammi a diversi tempi di esposizione alla $[^3\text{H}]$ -leucina, Palade concluse che le proteine secrete viaggiano in vescicole dall'RE al Golgi e sulla membrana plasmatica e che durante tutto il processo, le proteine rimanevano nelle vescicole e non si mescolavano con il resto della cellula.

■ Discussione

Gli esperimenti di Palade hanno fornito ai biologi la prima chiara visione degli stadi della via secretoria. Dai suoi studi sulle cellule esocrine pancreatiche

emersero due considerazioni fondamentali. Primo, che le proteine secrete passano attraverso il complesso di Golgi. Secondo, le proteine secrete non si mischiano mai con le proteine del citosol; esse sono segregate nelle vescicole durante tutto il percorso. Queste scoperte furono sostenute da due importanti aspetti del progetto sperimentale. L'uso attento da parte di Palade della microscopia elettronica e dell'autoradiografia gli permise di osservare i fini dettagli della via. Di uguale importanza fu la scelta del tipo di cellula preposta alla secrezione, la cellula esocrina del pancreas, come modello sperimentale. In un diverso tipo di cellula, quantità significative di proteine non secrete sarebbero state prodotte anche durante la marcatura, confondendo in particolare il destino delle proteine secretorie.

Il lavoro di Palade creò i presupposti per studi più dettagliati. Una volta che la via secretoria era stata delineata con chiarezza, furono aperti interi campi di ricerca per analizzare la sintesi e il movimento sia delle proteine secrete sia delle proteine di membrana. Per queste ricerche innovative, nel 1974 a Palade fu assegnato il premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina. ●



◀ **Figura 1**

La sintesi e il trasferimento delle proteine secretorie pancreatiche rivelate con autoradiografia al microscopio elettronico.

Dopo un periodo di esposizione con $[^3\text{H}]$ -leucina, il tessuto è fissato, sezionato per la microscopia elettronica e sottoposto ad autoradiografia. Il decadimento radioattivo di $[^3\text{H}]$ nelle proteine neosintetizzate produce grani autoradiografici su una emulsione posta sopra la sezione cellulare (che nella fotografia appaiono come granuli densi vermiformi) che marcano la posizione delle proteine neosintetizzate. **(a)** Al termine dei 3 minuti di marcatura i grani autoradiografici sono sull'RE ruvido. **(b)** Dopo 7 minuti di chase (esposizione con la leucina non marcata), la maggior parte delle proteine marcate si è spostata nelle vescicole del Golgi. **(c)** Dopo 37 minuti di chase la maggior parte delle proteine è sulle vescicole secretorie immature. **(d)** Dopo 117 minuti di chase la maggior parte delle proteine è sui granuli di zimogeno maturi [Per gentile concessione di J. Jamieson e G. Palade.]