

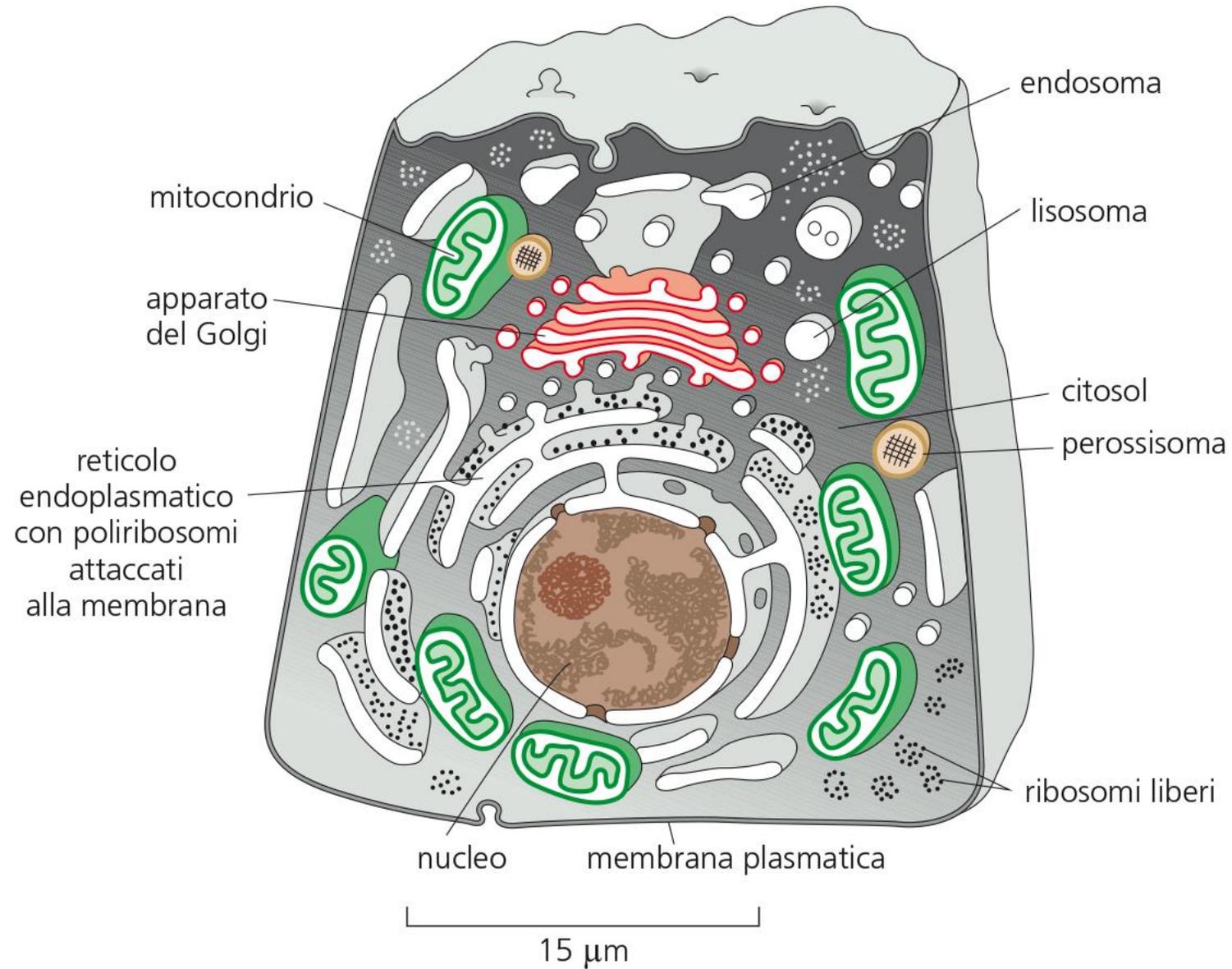
**Compartimenti intracellulari e**

**Principi generali del sorting**

# SORTING

- Le cellule eucariotiche, a differenza dei procarioti, sono suddivise in numerosi compartimenti subcellulari distinti, racchiusi da membrane, gli ORGANELLI.
  - Ogni organello contiene uno specifico set di proteine specializzate, quindi è richiesto un sistema complesso di smistamento
  - Le cellule animali contengono circa 10 miliardi di proteine di 10 000 tipi diversi
- In che modo una proteina viene indirizzata esclusivamente ad un organello?
- Come fanno le proteine grandi ad essere traslocate senza danneggiare le membrane che attraversano?

# Le cellule eucariotiche comprendono un sistema continuo di membrane interconnesse



Circa metà del volume cellulare è occupato da membrane

**TABLE 12-1 Relative Volumes Occupied by the Major Intracellular Compartments in a Liver Cell (Hepatocyte)**

Intracellular compartment	Percentage of total cell volume
Cytosol	54
Mitochondria	22
Rough ER cisternae	9
Smooth ER cisternae plus Golgi cisternae	6
Nucleus	6
Peroxisomes	1
Lysosomes	1
Endosomes	1

Table 12-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

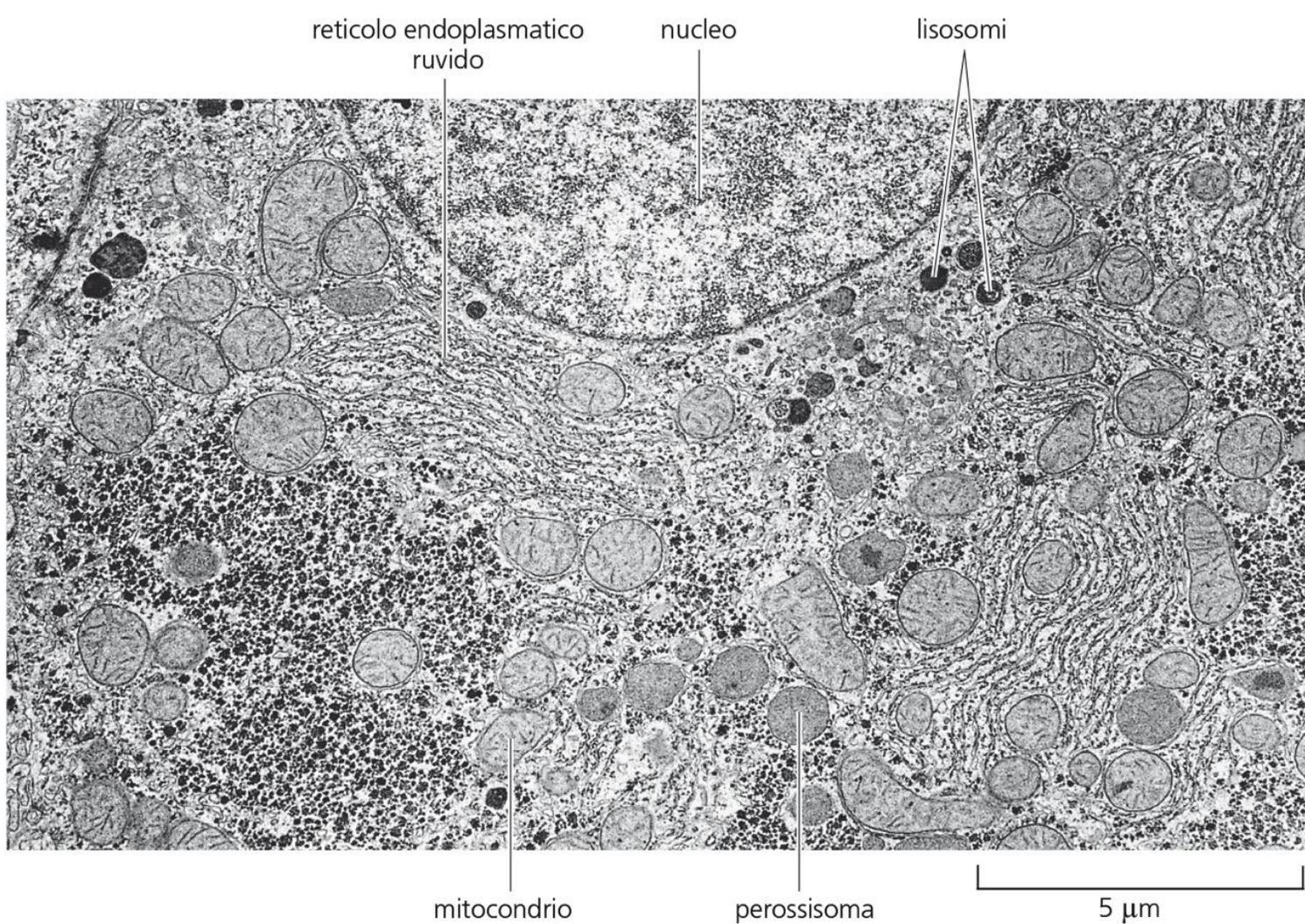
Circa metà dell'area totale delle membrane è rappresentata dalle membrane del RE

La quantità, la forma e la disposizione degli organelli sono diverse a seconda dei tipi cellulari, in base alle specifiche funzioni richieste

**TABLE 12-2 Relative Amounts of Membrane Types in Two Kinds of Eukaryotic Cells.**

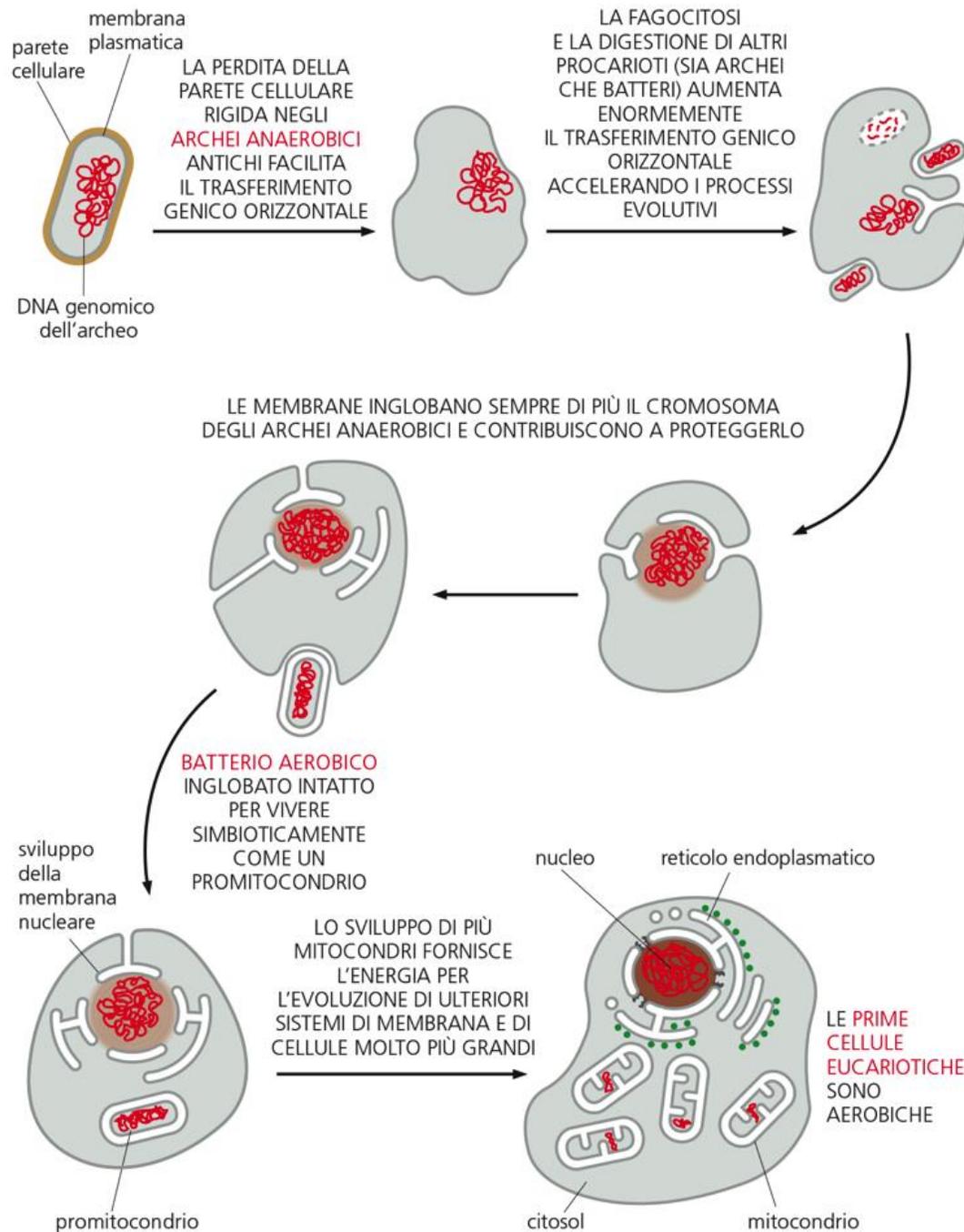
Membrane Type	Percentage of total cell membrane	
	Liver hepatocyte*	Pancreatic exocrine cell*
Plasma membrane	2	5
Rough ER membrane	35	60
Smooth ER membrane	16	<1
Golgi apparatus membrane	7	10
Mitochondria		
Outer membrane	7	4
Inner membrane	32	17
Nucleus		
Inner membrane	0.2	0.7
Secretory vesicle membrane	Not determined	3
Lysosome membrane	0.4	Not determined
Peroxisome membrane	0.4	Not determined
Endosome membrane	0.4	Not determined

\*These two cells are of very different sizes: the average hepatocyte has a volume of about 5000  $\mu\text{m}^3$  compared with 1000  $\mu\text{m}^3$  for the pancreatic exocrine cell. Total cell membrane areas are estimated at about 110,000  $\mu\text{m}^2$  and 13,000  $\mu\text{m}^2$ , respectively.



Negli eucarioti la superficie della membrana plasmatica è troppo ridotta (rispetto al volume di una cellula eucariotica) per svolgere tutte le funzioni che ha nei procarioti

Molte di queste funzioni sono svolte dal sistema di membrane interne



## Origine evolutiva degli organelli

Le membrane interne si sono originate mediante **invaginazione** e distacco dalla membrana plasmatica di una cellula ancestrale.

Il **LUME** degli organelli è topologicamente equivalente all'esterno della cellula.

Gli spazi interni di tutti gli organelli sono in continua comunicazione.

# Cloroplasti e mitocondri

- Sono circondati da una doppia membrana e sono isolati dal traffico vescicolare che connette gli altri organelli
- Lynn Margulis ne ha reso nota **l'origine endosimbiontica**

*J. Theoret. Biol.* (1967) 14, 225-274

## On the Origin of Mitosing Cells

LYNN SAGAN

*Department of Biology, Boston University  
Boston, Massachusetts, U.S.A.*

*(Received 8 June 1966)*

A theory of the origin of eukaryotic cells ("higher" cells which divide by classical mitosis) is presented. By hypothesis, three fundamental organelles: the mitochondria, the photosynthetic plastids and the (9+2) basal bodies of flagella were themselves once free-living (prokaryotic) cells. The evolution of photosynthesis under the anaerobic conditions of the early atmosphere to form anaerobic bacteria, photosynthetic bacteria and eventually blue-green algae (and protoplastids) is described. The subsequent evolution



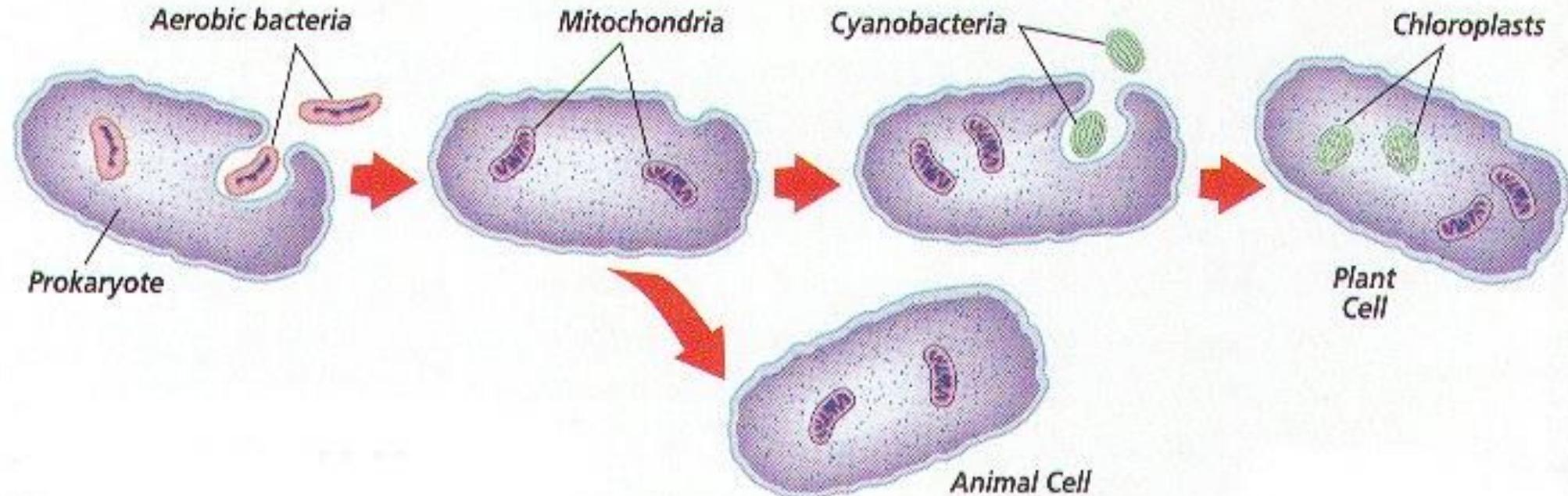
# La teoria endosimbiontica

**A** A prokaryote ingested some aerobic bacteria. The aerobes were protected and produced energy for the prokaryote.

**B** Over a long time, the aerobes become mitochondria, no longer able to live on their own.

**C** Some primitive prokaryotes also ingested cyanobacteria, which contain photosynthetic pigments.

**D** The cyanobacteria become chloroplasts, no longer able to live on their own.



# Le origini evolutive spiegano le relazioni topologiche tra gli organelli

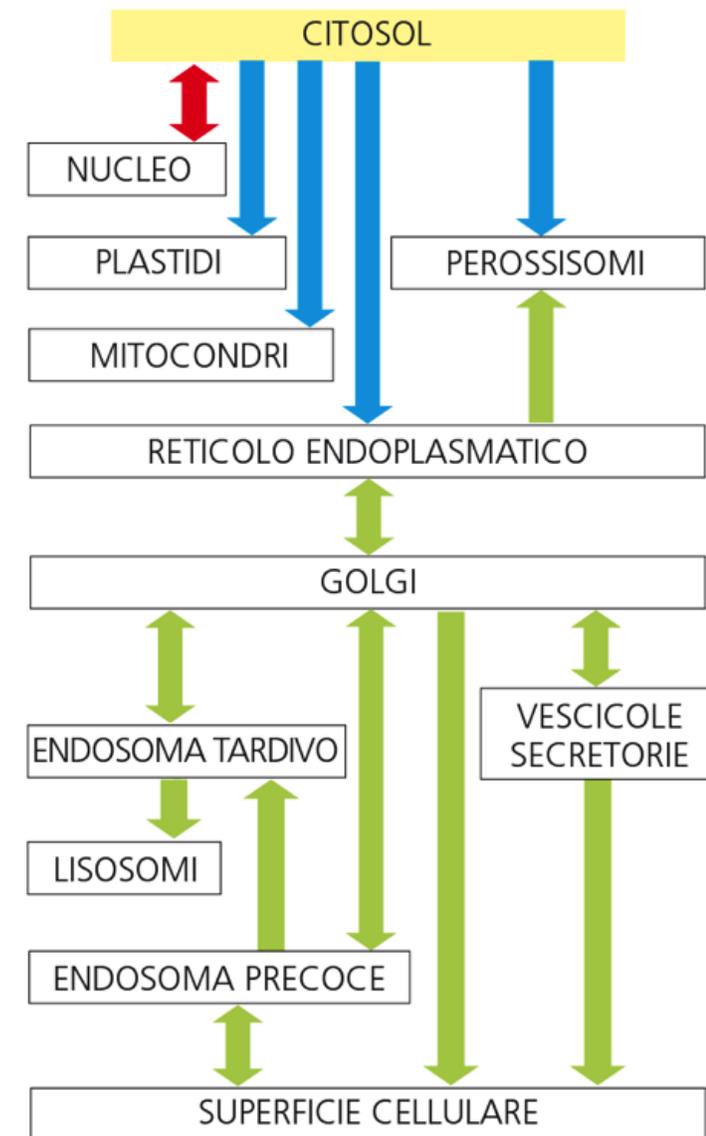
I compartimenti subcellulari sono raggruppabili in 4 famiglie distinte:

1. **nucleo e citosol** – topologicamente continui (grazie ai pori nucleari), ma funzionalmente distinti
2. **gli organelli della via endocitica e secretoria**: RE, Golgi, endosomi, lisosomi, vescicole di trasporto, perossisomi
3. **i mitocondri**
4. **i plastidi** (cloroplasti) nelle cellule vegetali

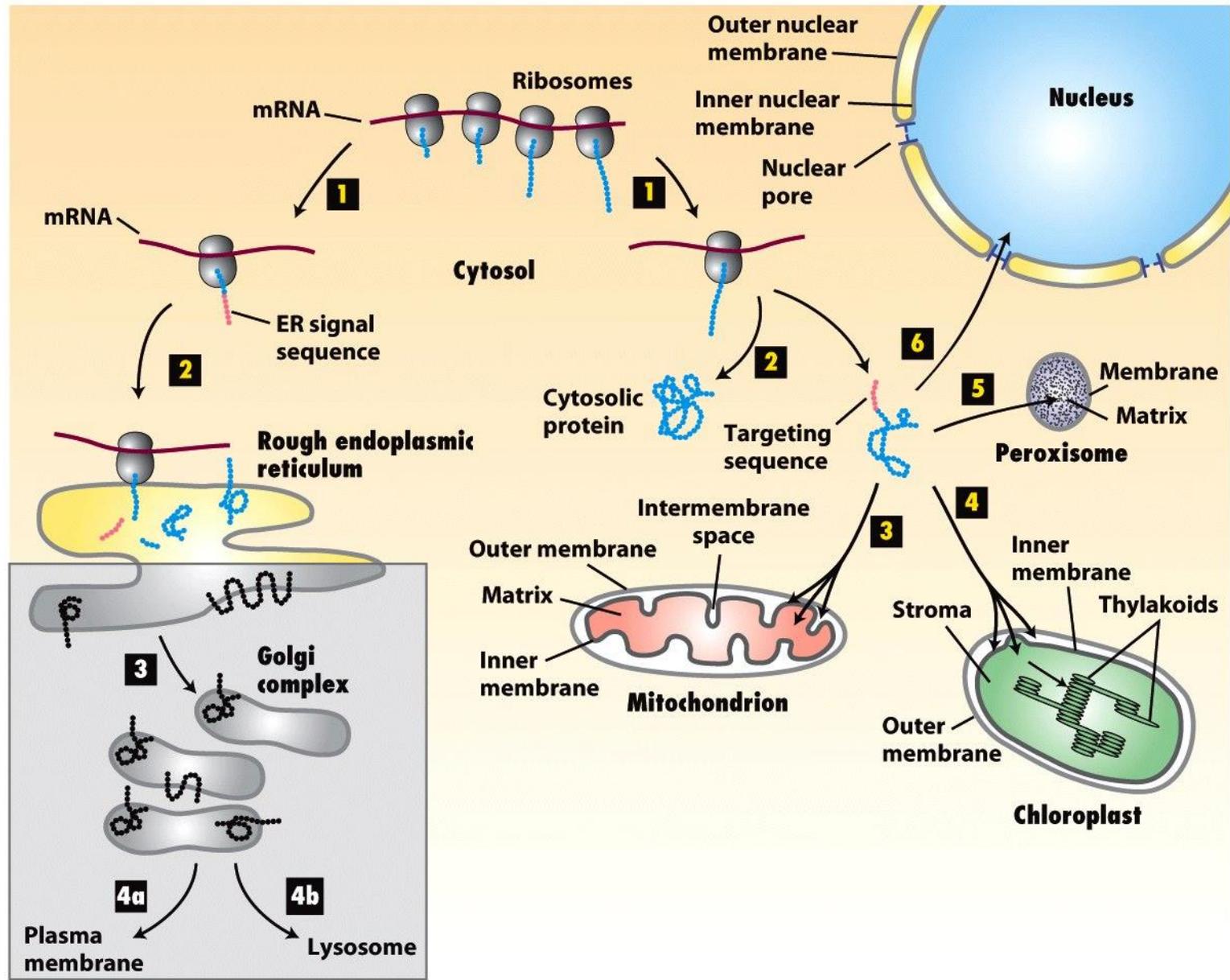
# Come si ripartiscono gli organelli durante la replicazione cellulare?

- Una cellula deve duplicare anche i suoi organelli, oltre al suo patrimonio genetico
- Questi durante il ciclo cellulare si ingrandiscono e incorporano nuove molecole
- Poi si dividono e si ripartiscono, in modo che ogni cellula figlia erediti dalla cellula madre un set completo di organelli
- L'informazione necessaria per costruire un organello non risiede solo nel DNA, ma anche nella forma dell'organello stesso

- La sintesi delle proteine inizia sui ribosomi nel citosol (eccezione: le proteine codificate dal genoma di mitocondri e cloroplasti)
- Il loro destino dipende dalla presenza di **segnali di smistamento**
- Se questi segnali non sono presenti le proteine rimangono nel citosol, altrimenti vengono smistate con 3 possibili modalità:
  - 1. Trasporto regolato** – tra nucleo e citosol, attraverso i pori nucleari, cancelli selettivi
  - 2. Traslocazione proteica** – utilizza proteine traslocatrici transmembrana
  - 3. Trasporto vescicolare** – le proteine vengono trasportate attraverso intermedi di trasporto racchiusi in vescicole



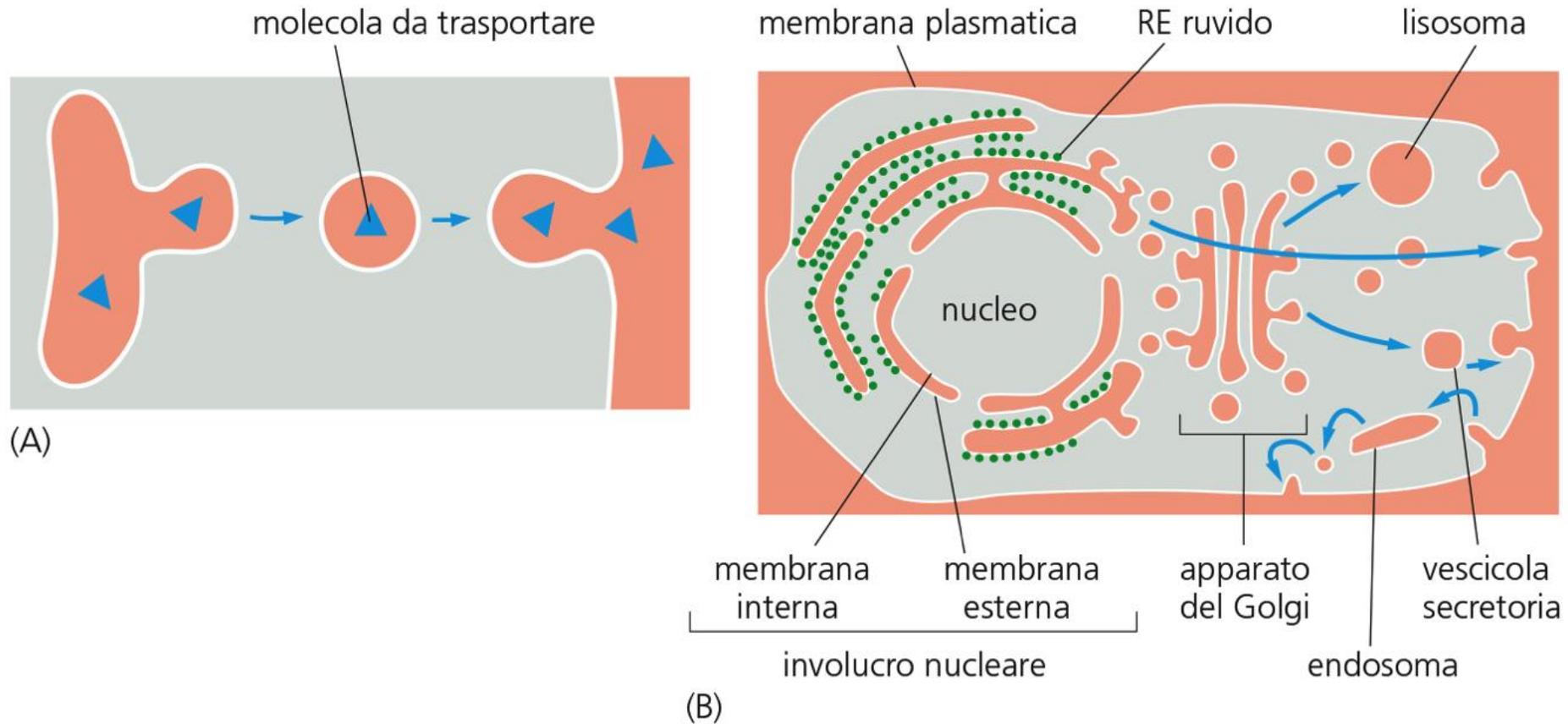
LEGENDA: █ = trasporto regolato  
█ = trasporto transmembrana  
█ = trasporto vescicolare



**SECRETORY PATHWAY**

Figure 13-1  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

# Organelli della via endocitica e secretoria

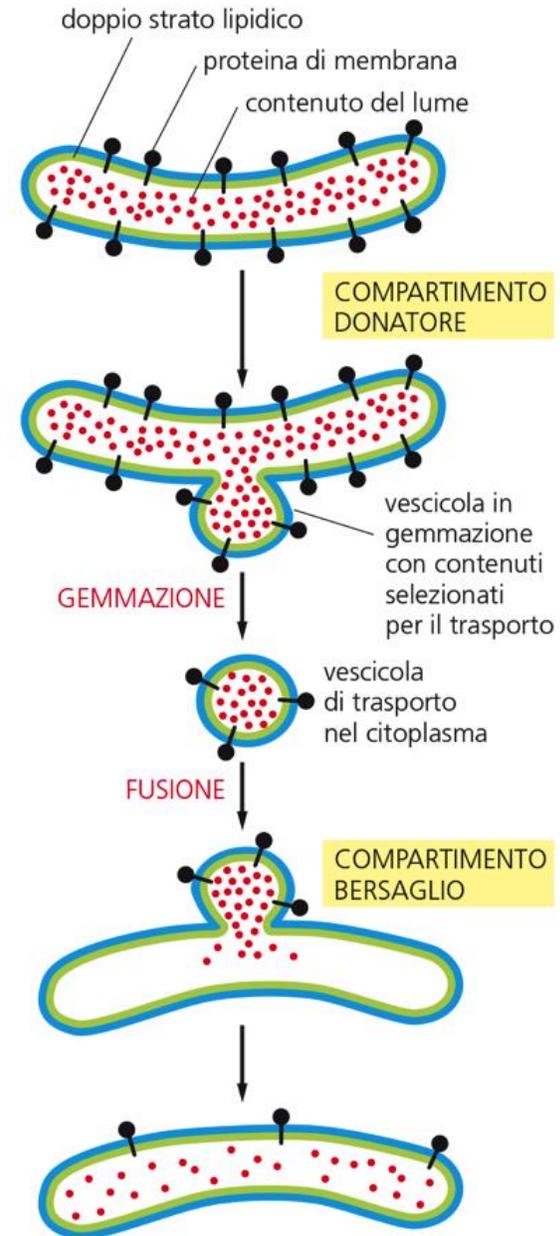


A. Le molecole possono essere trasportate da vescicole che gemmano in compartimenti topologicamente equivalenti

B. Cicli di gemmazione e fusione permettono al lume di ciascun organello di comunicare con il lume degli altri organelli

# TRASPORTO VESCICOLARE

- Le vescicole di trasporto gemmano da un **compartimento donatore** e si fondono con un compartimento **bersaglio**, topologicamente equivalente
- Le componenti solubili vengono trasferite da lume a lume
- L'orientamento originario di proteine e lipidi nella membrana viene mantenuto



# SEQUENZE SEGNALE

- Indirizzano la proteina all'organello di destinazione
- A volte non sono facilmente predicibili sulla base della sola sequenza primaria
- La maggior parte delle sequenze segnale è costituita da circa 15 aminoacidi (ma possono essere anche di più)
- Spesso, ma non sempre, si trovano all'**N-terminale** e vengono tagliate da peptidasi specifiche
- A volte sono sequenze interne, anche multiple che formano zone segnale nella **struttura 3D**
- Sono riconosciute da recettori di smistamento (a volte, per il riconoscimento, l'**idrofobicità** è più importante della sequenza!)

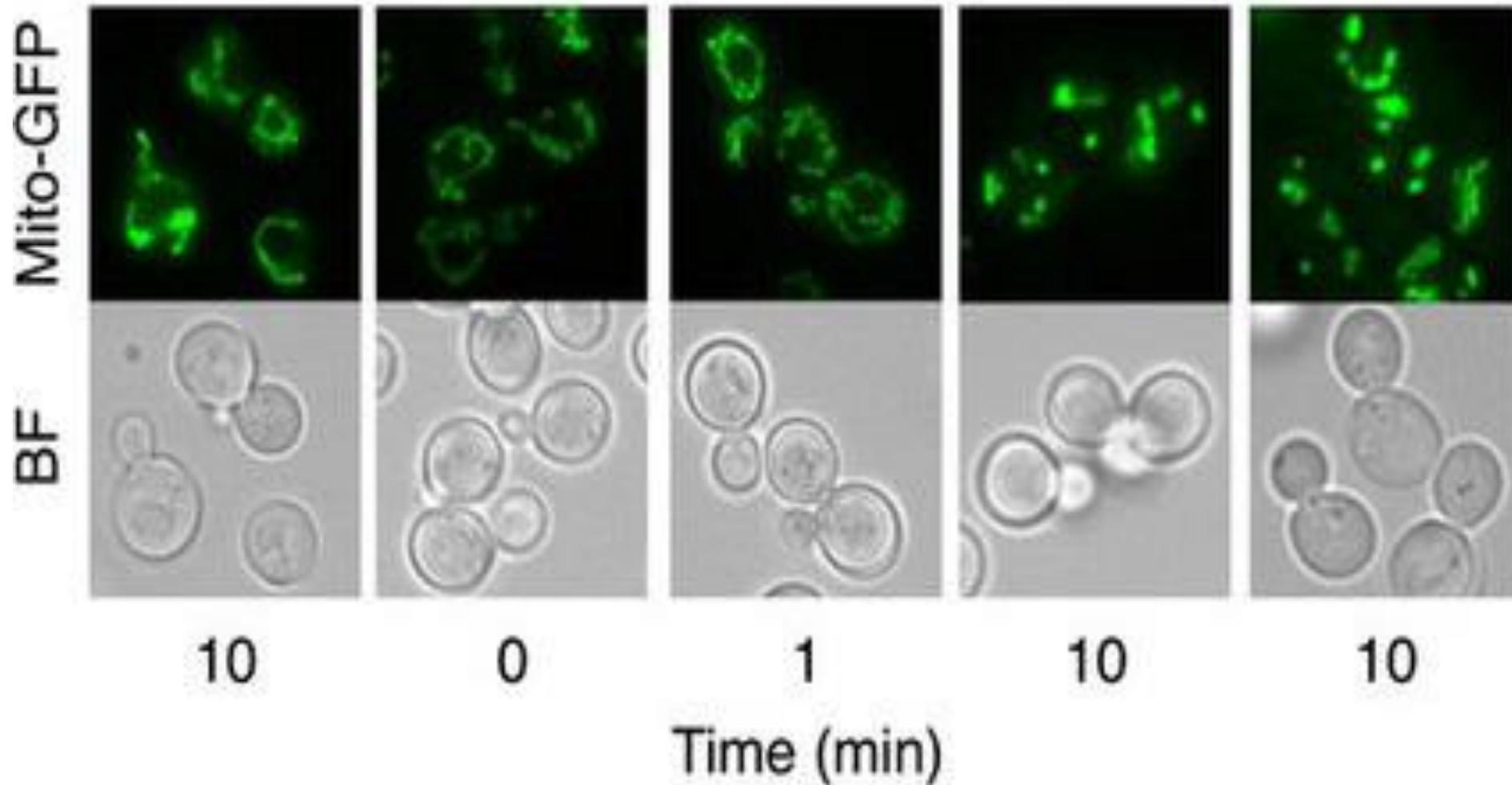
# Sequenze segnale di proteine secrete

		Signal peptidase cleavage site
Bovine growth hormone	M M A A G P <b>R</b> T S <b>L L L A F A L L C L P</b> W T Q V V G	A F P
Bovine proalbumin	M <b>K</b> W V T <b>F I S L L L L F</b> S S A Y S	R G V
Human proinsulin	M A L W M <b>R</b> L L P L L A L L A L W G P D P A A A	F V N
Human interferon- $\gamma$	M <b>K</b> Y T S Y <b>I L A F Q L C I Y L</b> G S L G	C Y C
Human $\alpha$ -fibrinogen	M F S M <b>R</b> I V C L V L S V V G T A W T	A D S
Human IgG heavy chain	M E F G L S W <b>L F L V A I L</b> K G V Q C	E V Q
Rat amylase	M <b>K</b> F V L L L S L I G F C W A	Q Y D
Murine $\alpha$ -fetoprotein	M <b>K</b> W I T P A S <b>L I L L L L</b> H F A A S K	A L H
Chicken lysozyme	M <b>R</b> S <b>L L I L V L C F L P L A A L</b> G	K V F
<i>Zea mays</i> rein protein 22.1	M A T <b>K</b> I L A L L A L L A L L V S A T N A	F I I

N-Terminal sequences of some eukaryotic secretory pre-proteins

Le sequenze segnale sono necessarie e sufficienti a determinare la localizzazione delle proteine.

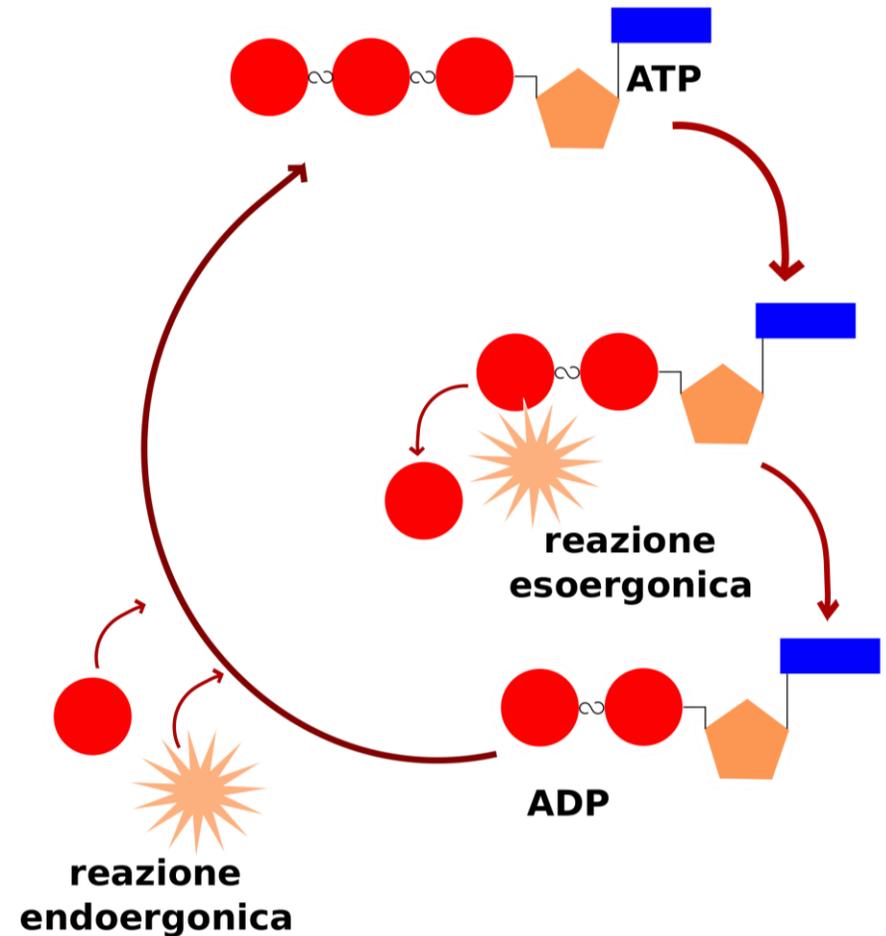
La **GFP** (green fluorescent protein) è una proteina fluorescente spesso usata negli studi di localizzazione.



# Trasporto unidirezionale richiede energia

L'unidirezionalità del trasporto ad uno specifico organello è garantita accoppiando il trasporto ad un processo che consuma energia, come l'idrolisi dell'ATP (non sempre)

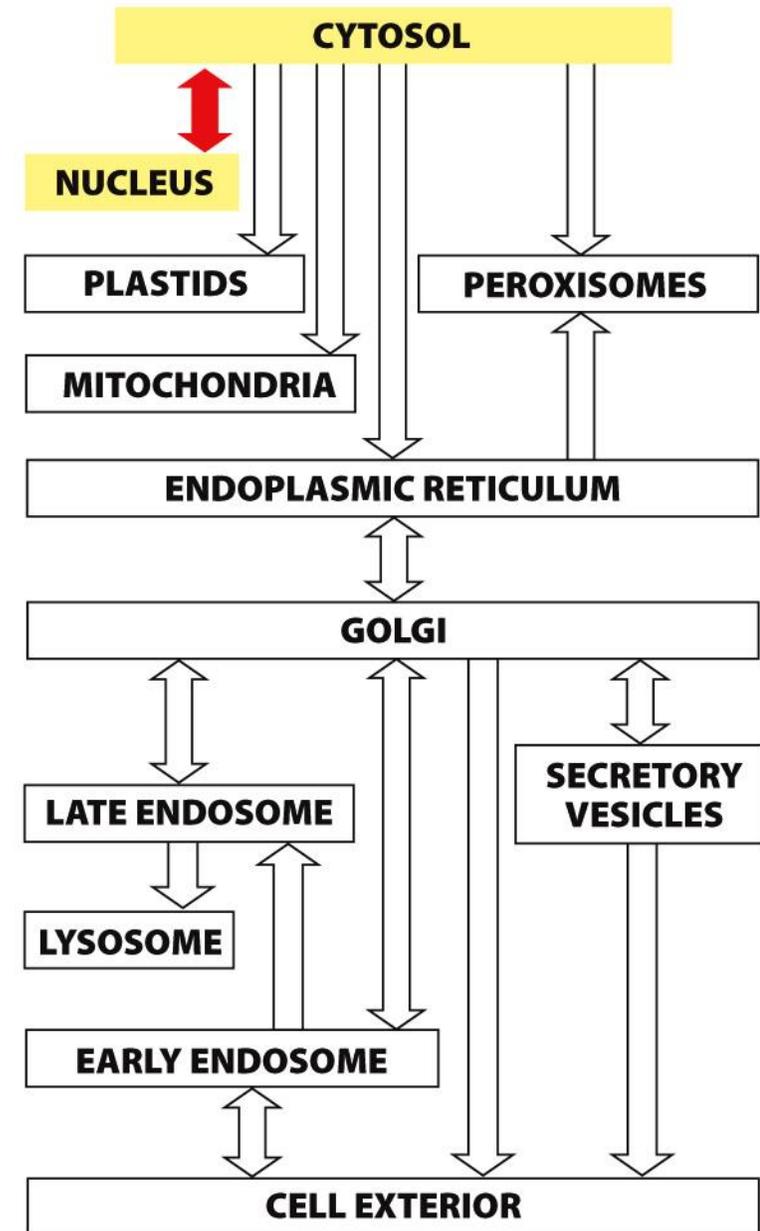
Quindi in ogni trasporto bisogna individuare la fonte di energia che viene consumata.



# **Trasporto regolato nucleo-citoplasma**

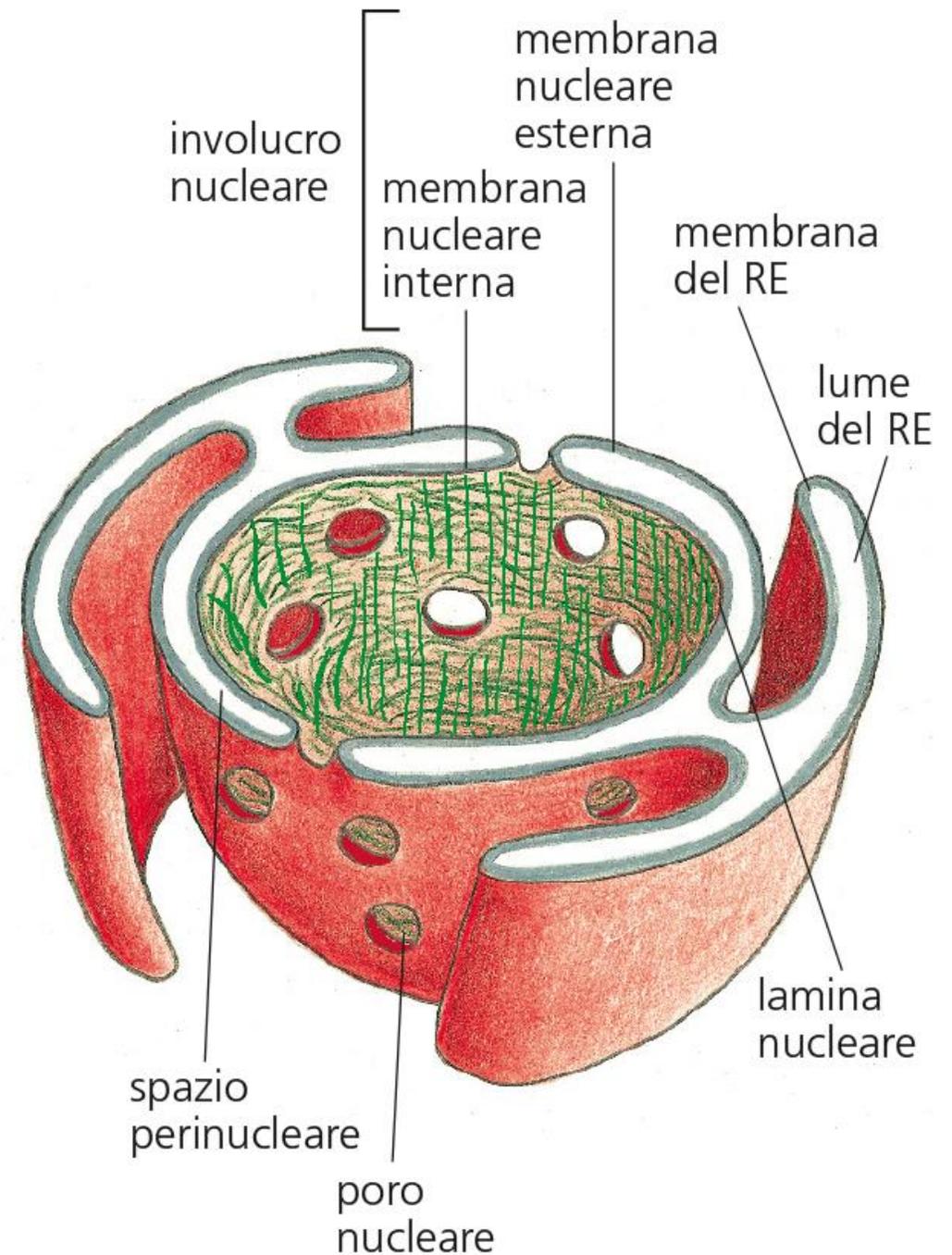
# Trasporto nucleo-citosol

- Fra nucleo e citosol c'è un traffico **bidirezionale e continuo** di materiale: proteine ed RNA
- Si tratta di un **trasporto REGOLATO**  
Importazione e esportazione sono processi selettivi
- Le proteine vengono importate nel nucleo in forma ripiegata



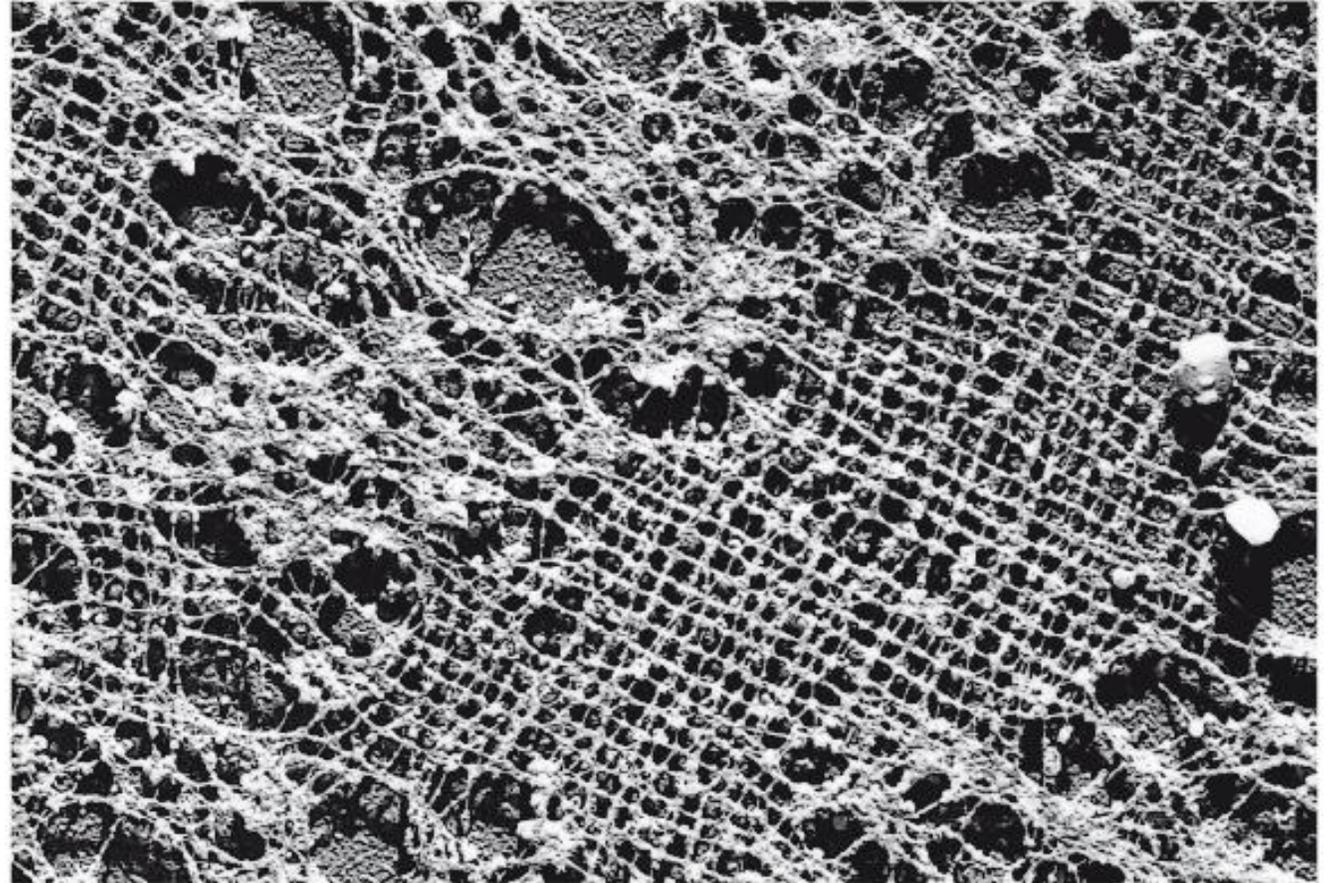
L'involucro nucleare è fatto da due membrane:

- 1. Membrana nucleare interna** – contiene proteine che servono per l'ancoraggio per i cromosomi e per la lamina nucleare (un reticolo di proteine che conferisce supporto strutturale al nucleo)
- 2. Membrana nucleare esterna** – in continuità con la membrana del RE, porta attaccati dei ribosomi



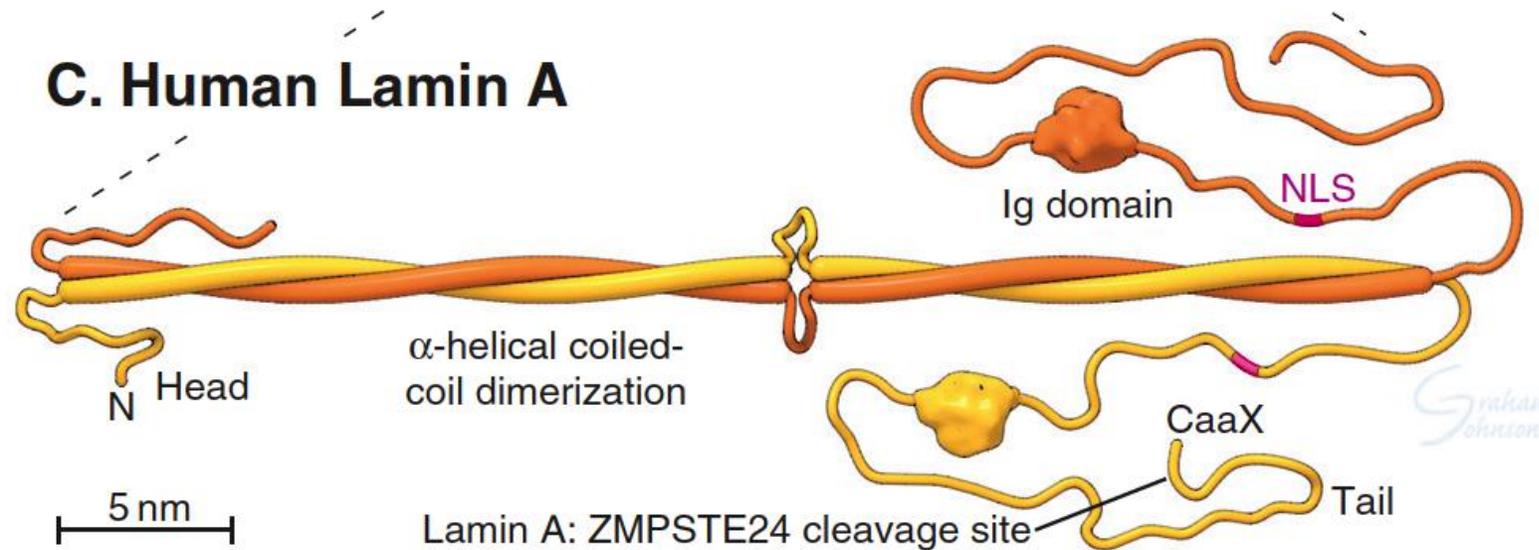
# Lamina nucleare

La **LAMINA NUCLEARE** si trova dal lato nucleare della membrana nucleare interna, conferisce stabilità all'involucro nucleare e permette l'ancoraggio degli NPC (nuclear pore complexes) e dei cromosomi



1  $\mu\text{m}$

La lamina nucleare è costituita da filamenti intermedi di **laminina**



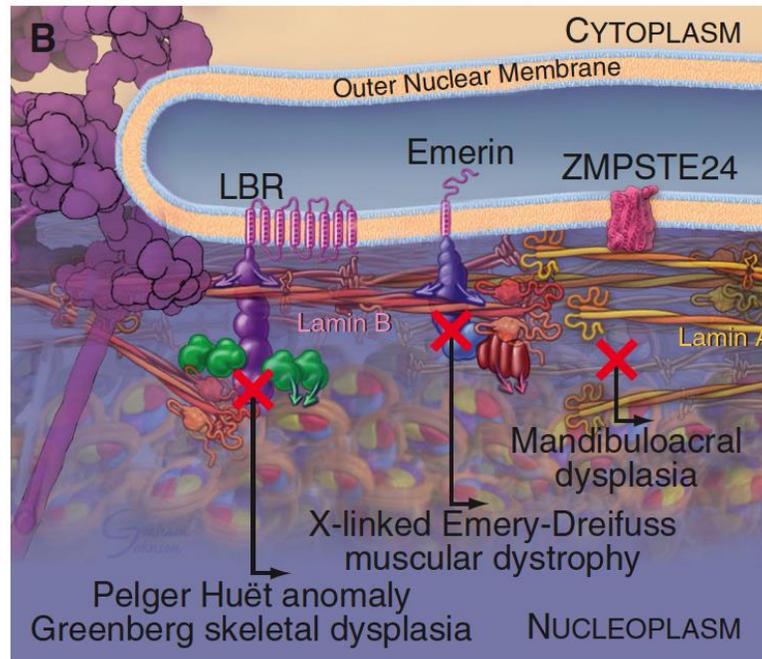
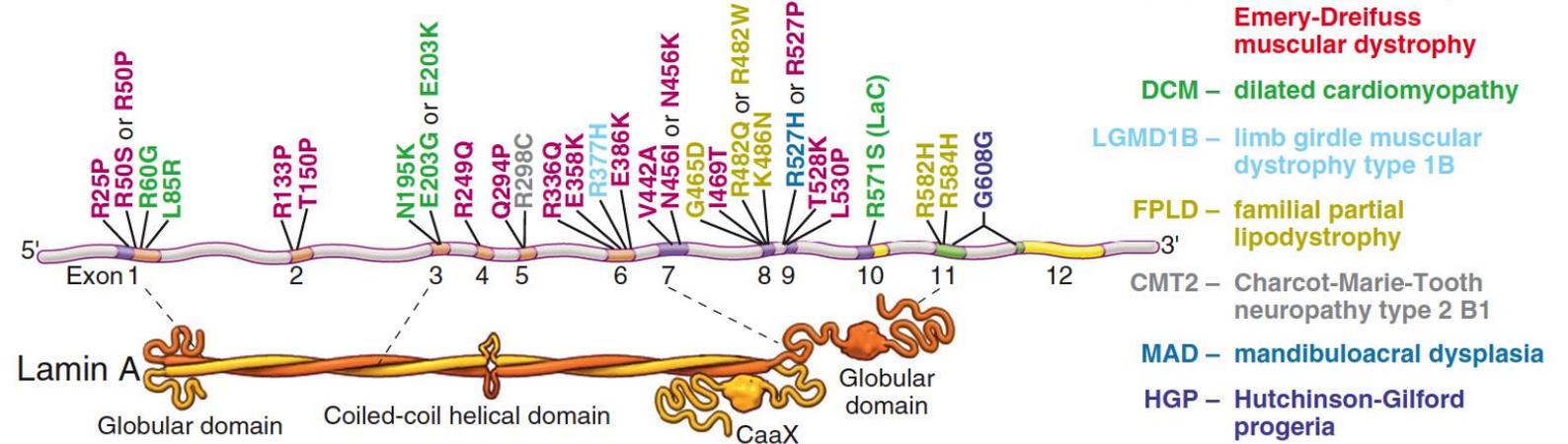
Le laminine sono **dimeri** le cui regioni centrali ad  $\alpha$ -elica si avvolgono una sull'altra (coiled-coil)

Il dominio C-terminale ha una parte centrale globulare, che contiene l'NLS e porta un gruppo farnesilico

Diverse centinaia di proteine sono associate alla membrana interna.

Più di 500 mutazioni nel gene della laminina A/C causano 15 malattie, tra cui la sindrome di Hutchinson – Gilford (Progeria)

### A. Selected laminin mutations and the diseases they cause



# NPC (nuclear pore complex)

L'involucro nucleare è attraversato dai **complessi dei pori nucleari (Nuclear Pore Complex, NPC)** (circa 3000).

L'NPC ha massa pari a 60 000 - 120 000 kDa  
E' costituito da 30 **nucleoporine** diverse.

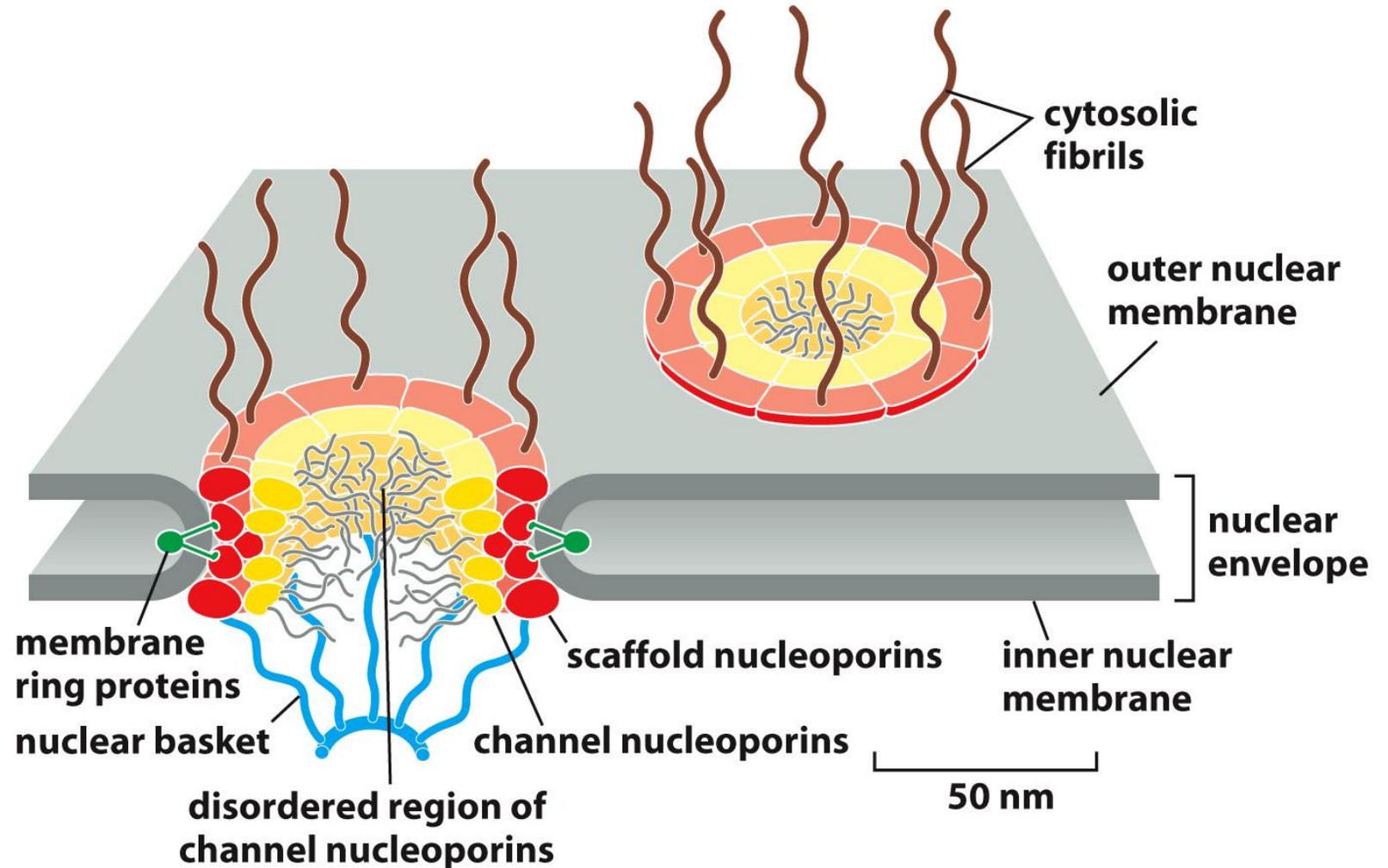
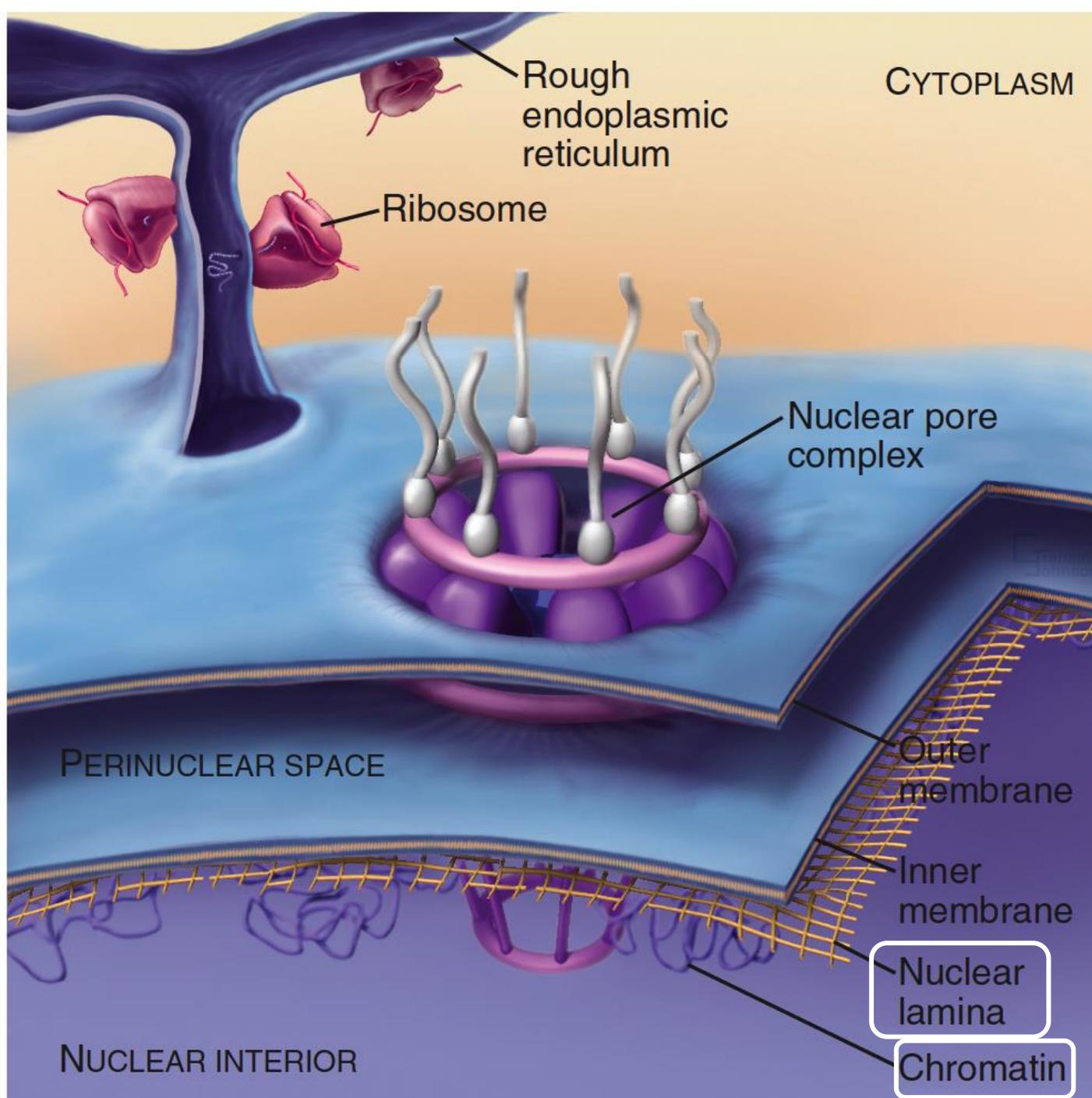


Figure 12-8a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

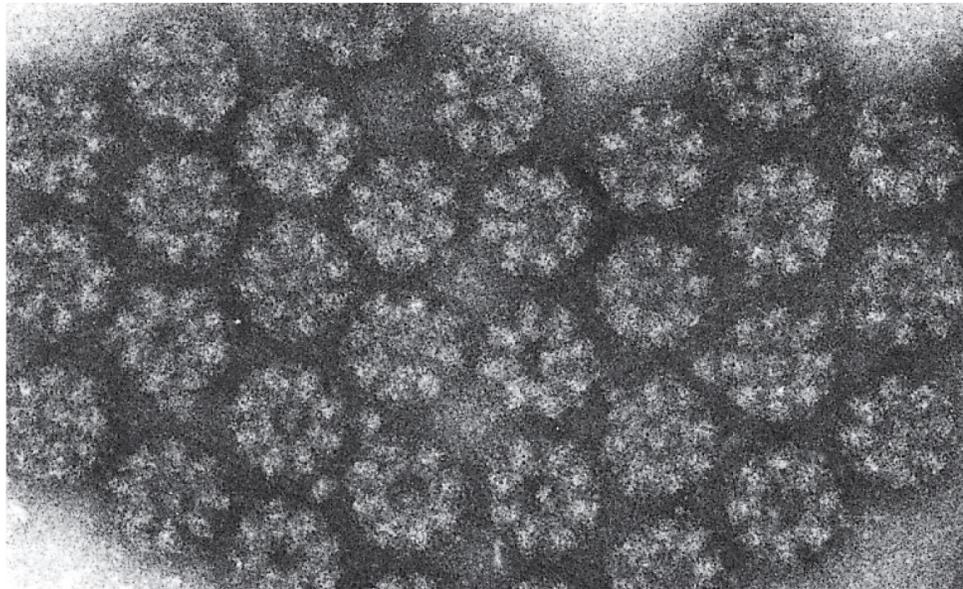


Sul lato nucleare  
l'NPC prende  
contatto con la  
lamina nucleare.

L'involucro nucleare contiene circa 3000-4000 NPC (varia da cellula a cellula). Ogni NPC è fatto da circa 30 tipi di **nucleoporine** (500-1000 proteine/NPC), presenti in multipli di 8.

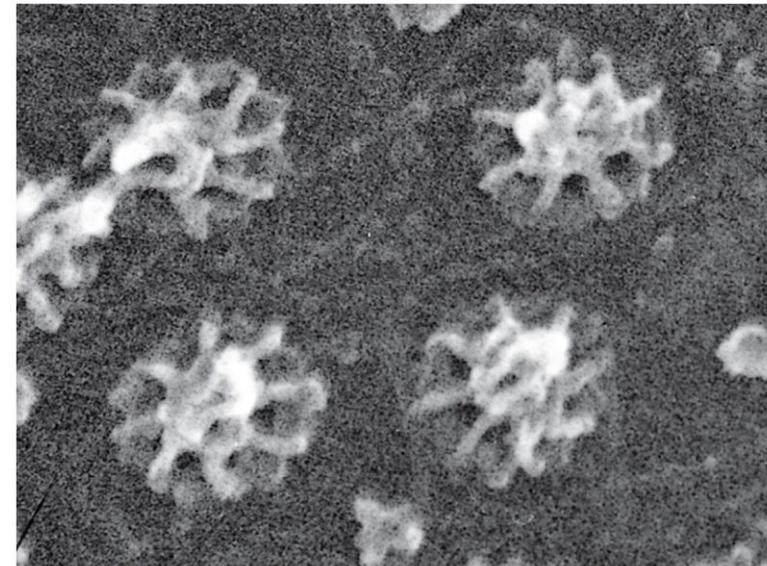
Gli NPC trasportano fino a 1000 molecole/sec nei due sensi.

**Proteine con massa <40 kDa, ioni e metaboliti diffondono liberamente.**  
**Per le altre sono richieste proteine adattatrici.**



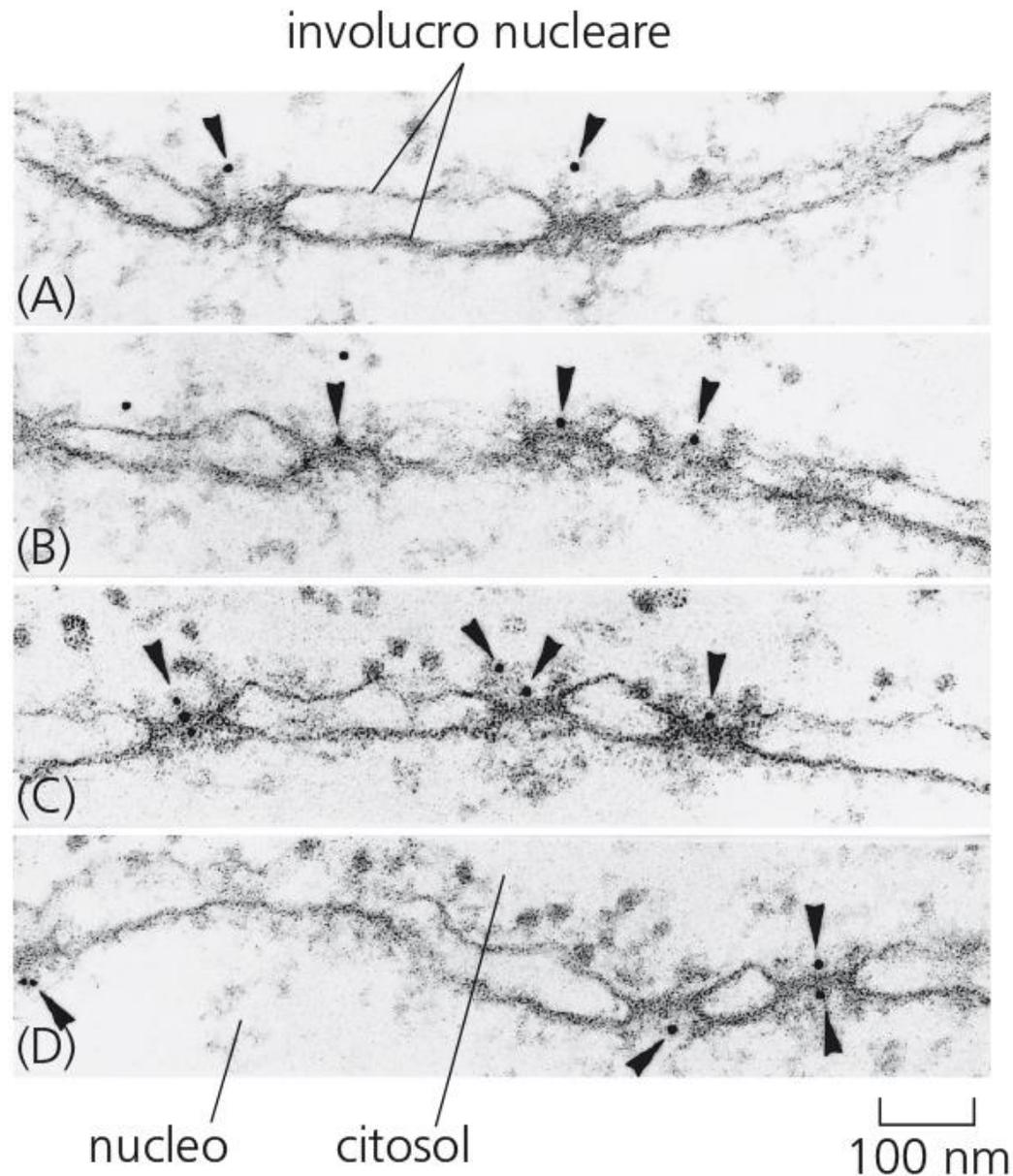
0.1  $\mu\text{m}$

Figure 12-8d Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



0.1  $\mu\text{m}$

Figure 12-8b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



## Visualizzazione del trasporto attraverso gli NPC

Particelle di oro legate a peptidi contenuti NLS entrano nei pori, legandosi alle fibrille degli NPC.

# Sequenze segnale, le NLS

**TABLE 12-3 Some Typical Signal Sequences**

Function of signal sequence	Example of signal sequence
Import into nucleus	-Pro-Pro- <b>Lys-Lys-Lys-Arg-Lys</b> -Val-
Export from nucleus	- <b>Met</b> -Glu-Glu- <b>Leu</b> -Ser-Gln-Ala- <b>Leu</b> -Ala-Ser-Ser- <b>Phe</b> -
Import into mitochondria	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Met-Leu-Ser-Leu- <b>Arg</b> -Gln-Ser-Ile- <b>Arg</b> -Phe-Phe- <b>Lys</b> -Pro-Ala-Thr- <b>Arg</b> -Thr-Leu-Cys-Ser-Ser- <b>Arg</b> -Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala- <b>Ser</b> -Leu-Gln- <b>Ser-Ser</b> -Met- <b>Ser-Ser</b> -Leu- <b>Ser</b> -Leu- <b>Ser-Ser</b> -Asn- <b>Ser</b> -Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu- <b>Ser</b> -Pro-Ile- <b>Thr</b> -Leu- <b>Ser</b> -Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	- <b>Ser-Lys-Leu</b> -COO <sup>-</sup>
Import into ER	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser- <b>Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala</b> -Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr- <b>Lys</b> -Cys- <b>Glu</b> -Val-Phe-Gln-
Return to ER	- <b>Lys-Asp-Glu-Leu</b> -COO <sup>-</sup>

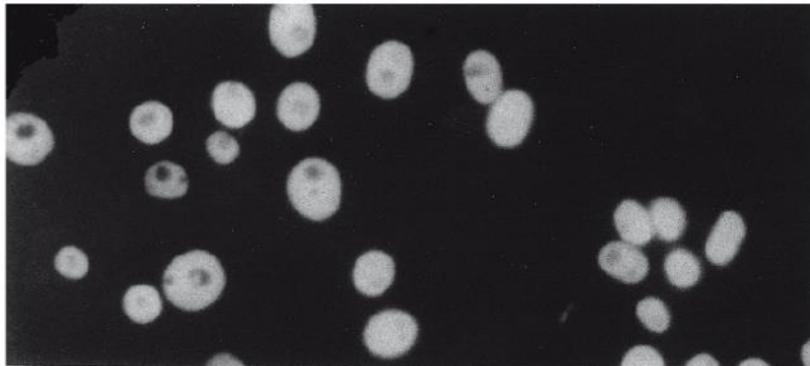
Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in *red* and negatively charged amino acids are shown in *green*. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in *orange* and important hydroxylated amino acids are shown in *blue*. <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N indicates the N-terminus of a protein; COO<sup>-</sup> indicates the C-terminus.

# Segnali di localizzazione nucleare (NLS)

- Sono sequenze **ricche di Lys e Arg**, come PKKKRKV (vicino a C-terminale)
- ma possono essere anche sequenze diverse (ad esempio sequenze idrofobiche) → non sempre è facile predirne la presenza

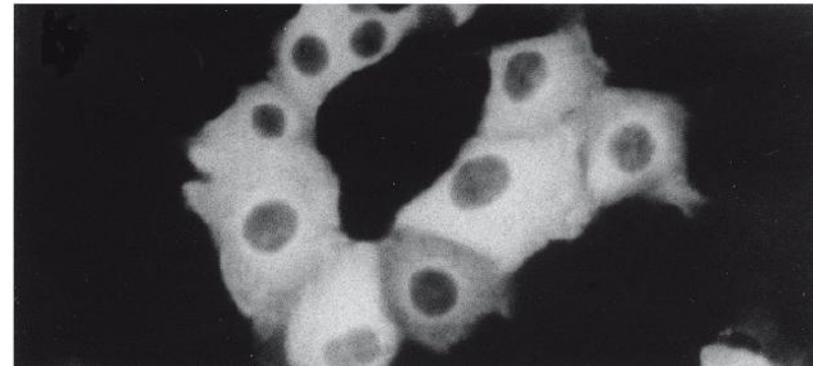
(A) LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE T  
CONTENENTE IL SUO NORMALE SEGNALE  
DI IMPORTAZIONE NUCLEARE

Pro — Pro — Lys — Lys — Lys — Arg — Lys — Val —



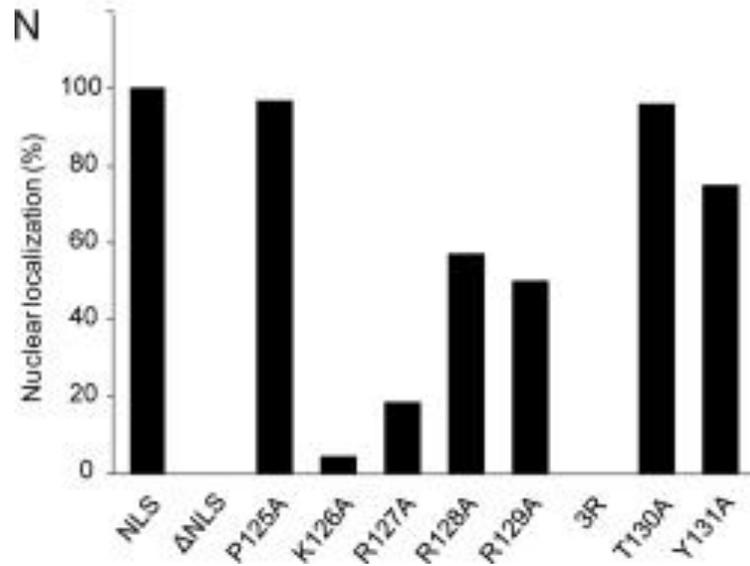
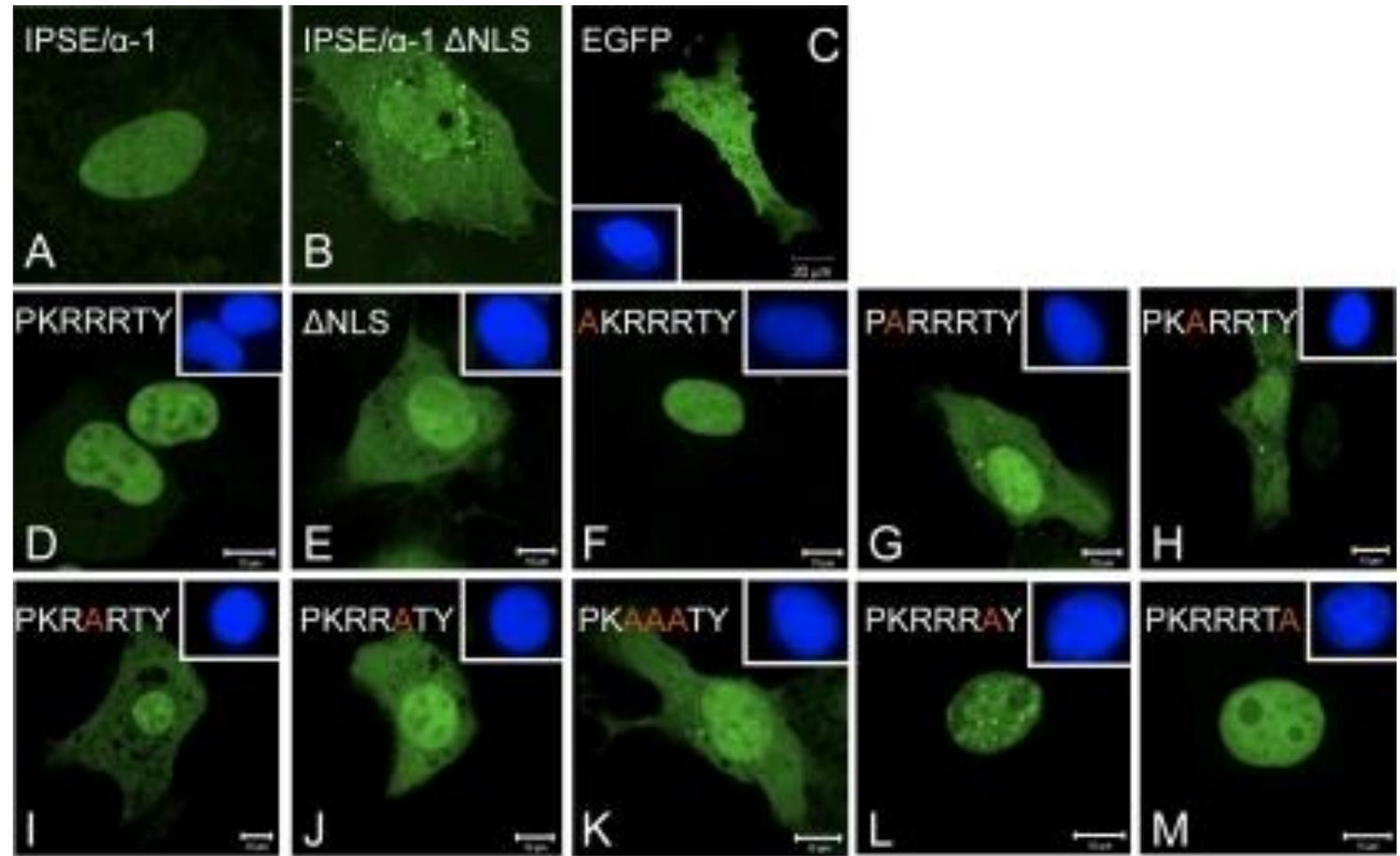
(B) LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE T  
CONTENENTE UN SEGNALE  
DI IMPORTAZIONE NUCLEARE MUTATO

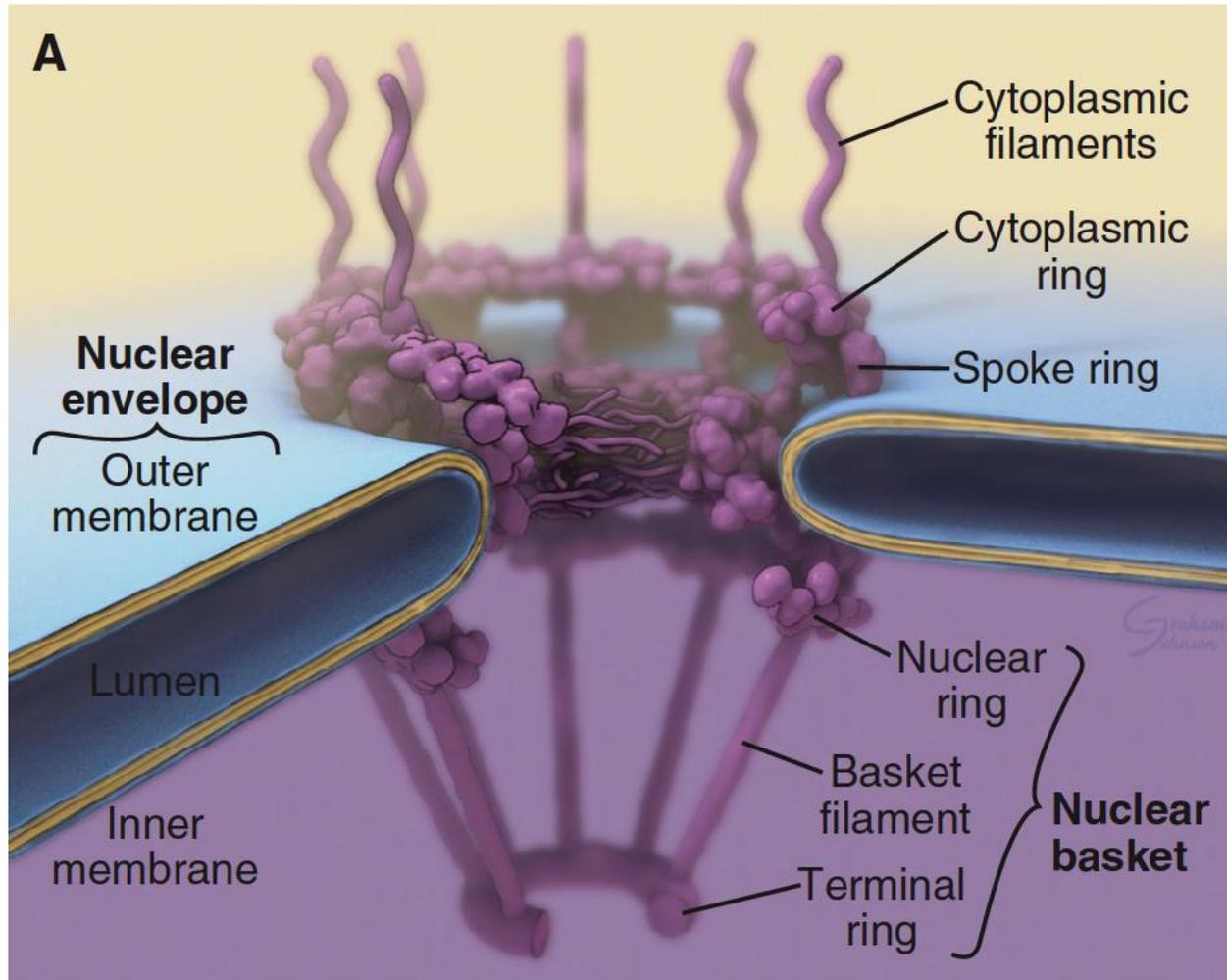
Pro — Pro — Lys — Thr — Lys — Arg — Lys — Val —



**Possono essere posizionate ovunque nella proteina, in quanto formano anse sulla sua superficie**

Le sequenze segnale si possono studiare attraverso esperimenti di mutagenesi e analisi della localizzazione con microscopia a fluorescenza (ad esempio per fusione con GFP)



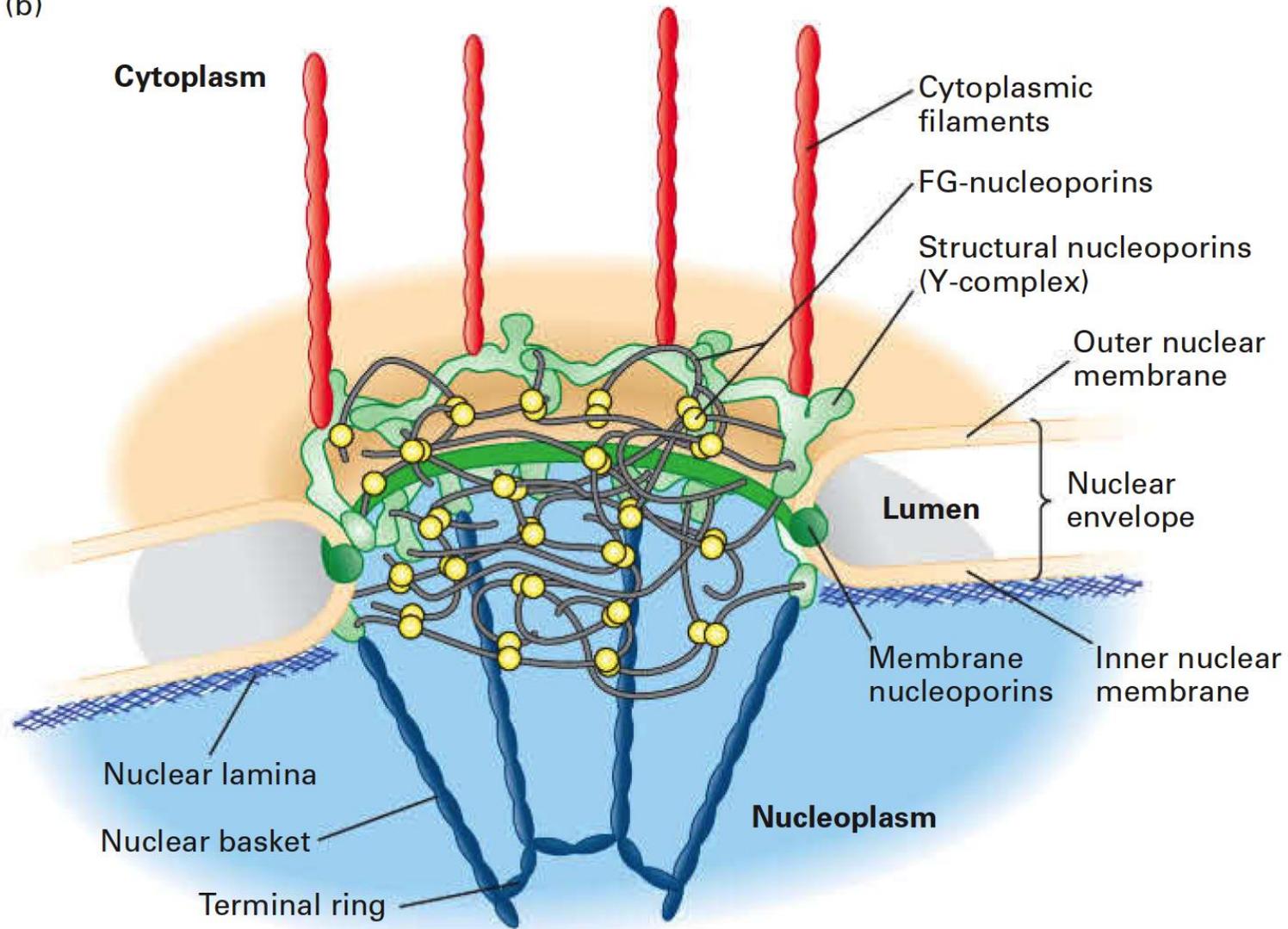


Il poro nucleare è fatto da 3 anelli impilati, ciascuno con una **simmetria ottuplice**:

1. **Anello citoplasmatico**
2. **Spoke ring**
3. **Anello nucleare**

8 filamenti protrudono sia dal lato citoplasmatico che da quello nucleare

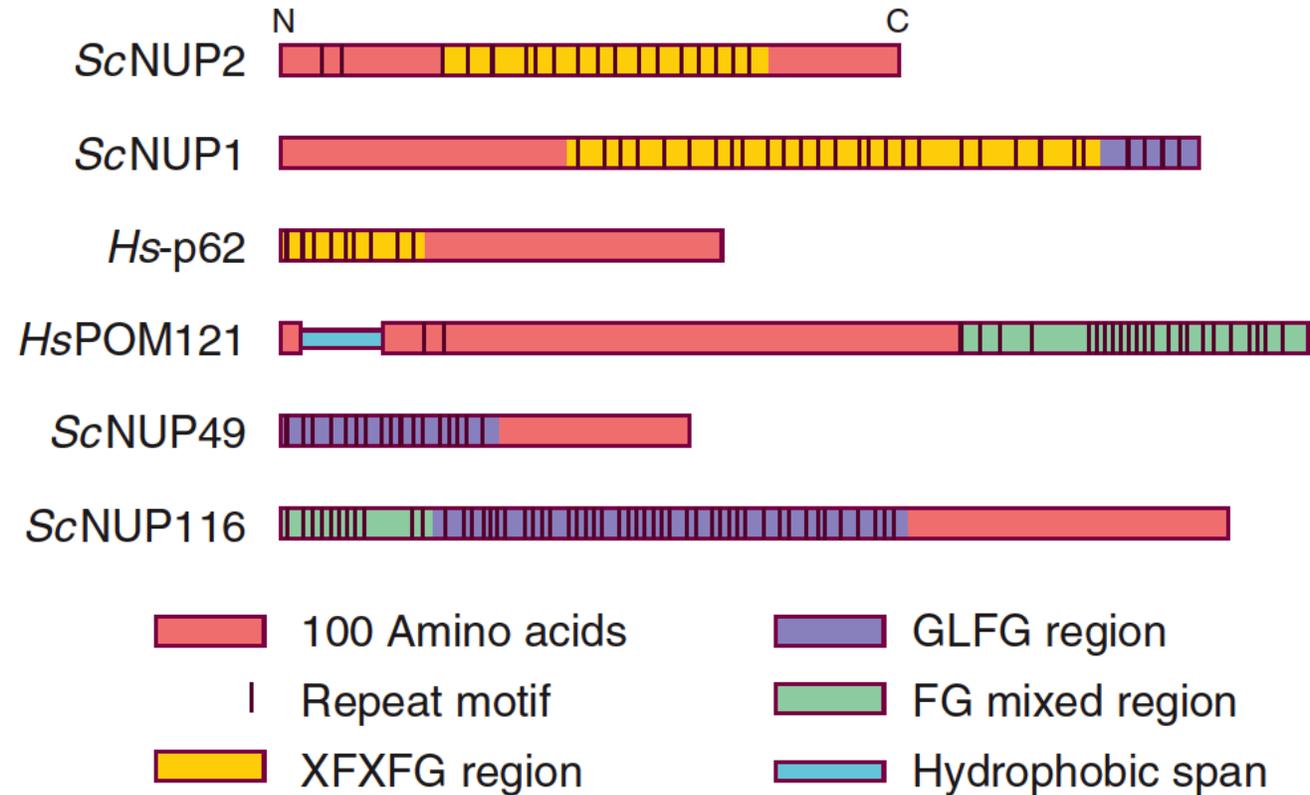
(b)



Ci sono 3 tipi di **nucleoporine**:

- ❖ strutturali (Y)
- ❖ di membrana (Nup)
- ❖ nucleoporine FG

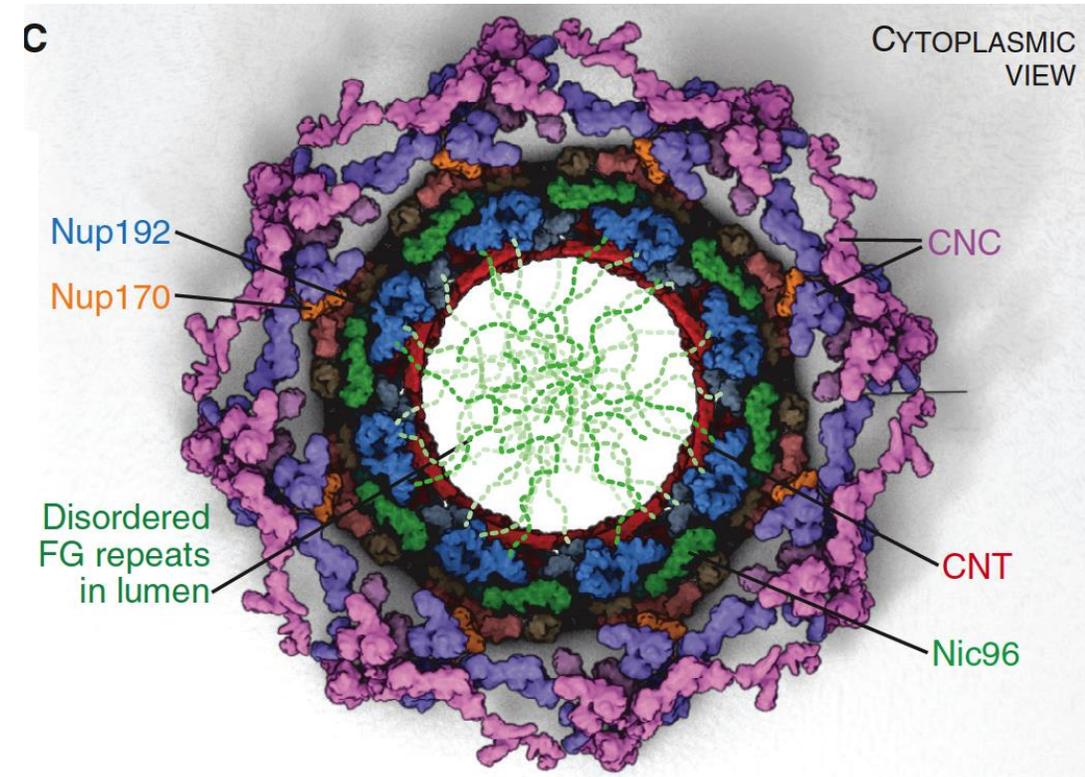
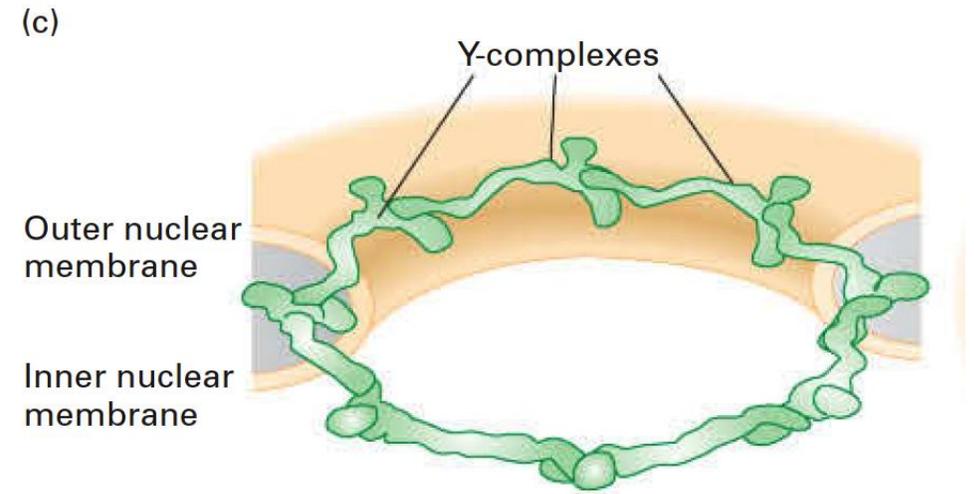
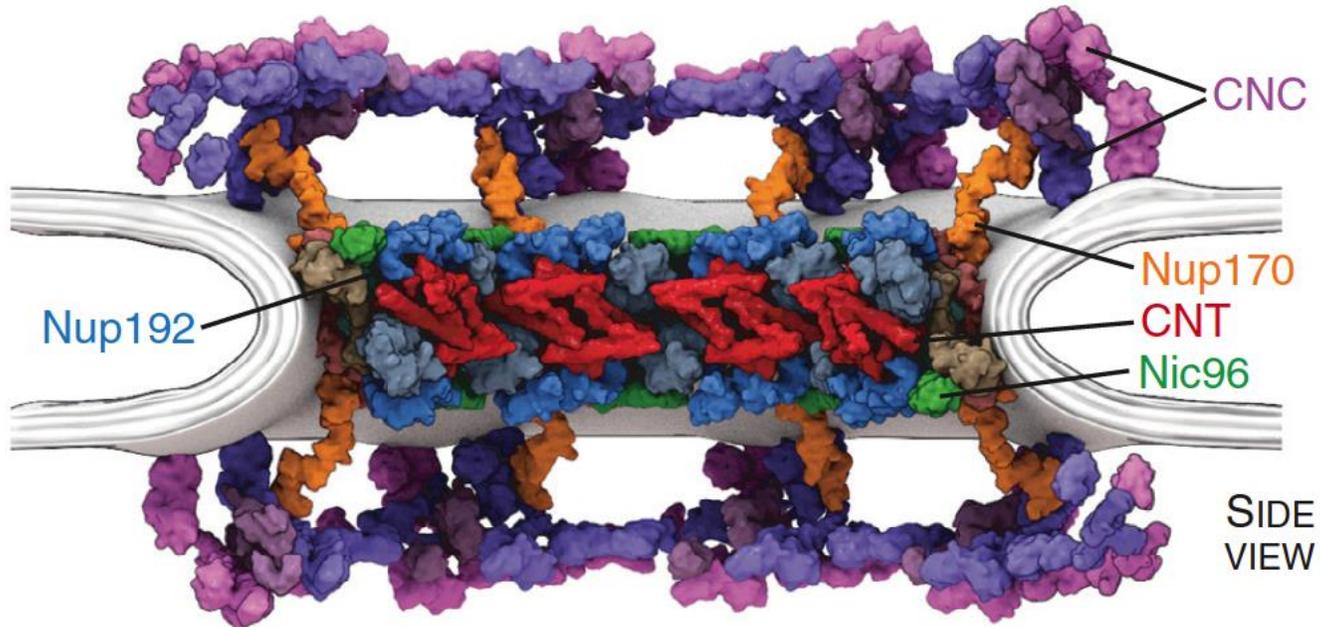
Dal lato nucleare 8 filamenti di 100 nm sono unito da un anello a formare un canestro nucleare (**nuclear basket**)



**FIGURE 9.12 SEQUENCE ORGANIZATION OF SEVERAL NUCLEOPORINS, THE STRUCTURAL COMPONENTS OF THE NUCLEAR PORES.** Nucleoporins contain combinations of repeated sequences as shown. Letters refer to the amino acids (see Fig. 3.2). The hydrophobic FG (phenylalanine-glycine) repeats facilitate nuclear trafficking through the pores by interacting specifically with transport factors carrying cargo.

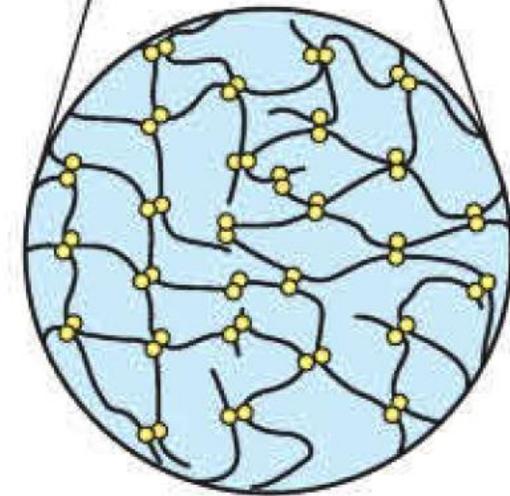
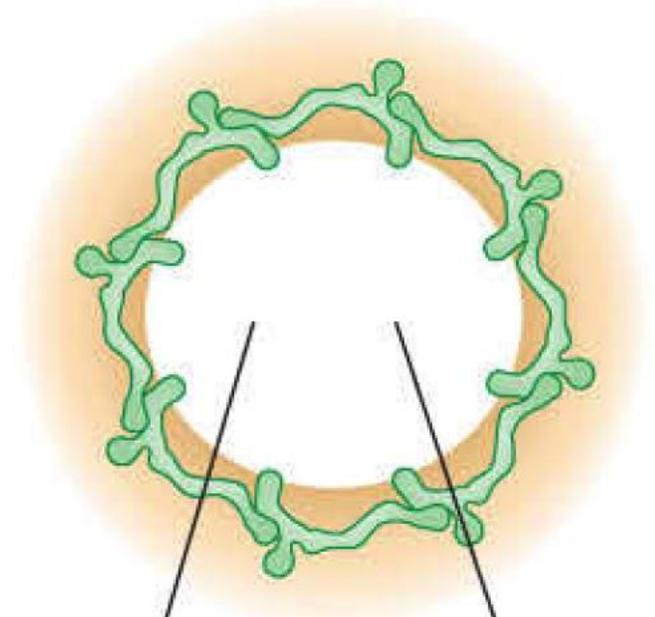
Le nucleoporine Y e Nup costituiscono l'impalcatura del poro:

- 8 nucleoporine Y formano una struttura a forma di Y detta **complesso Y**
- Le nucleoporine Nup costituiscono lo spoke ring



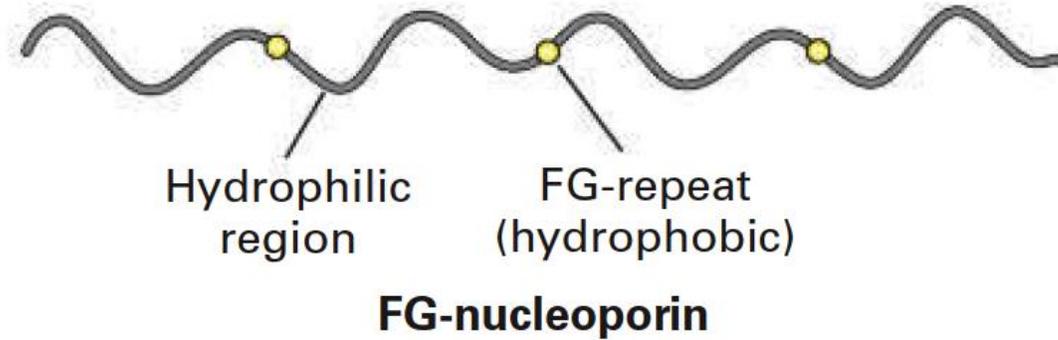
Le **nucleoporine FG** tappezzano il canale del poro, sono associate anche al canestro nucleare e ai filamenti citoplasmatici.

Formano una matrice gelatinosa che intrappola le molecole più grosse.



Matrix of FG-repeats  
in central channel of pore

(d)

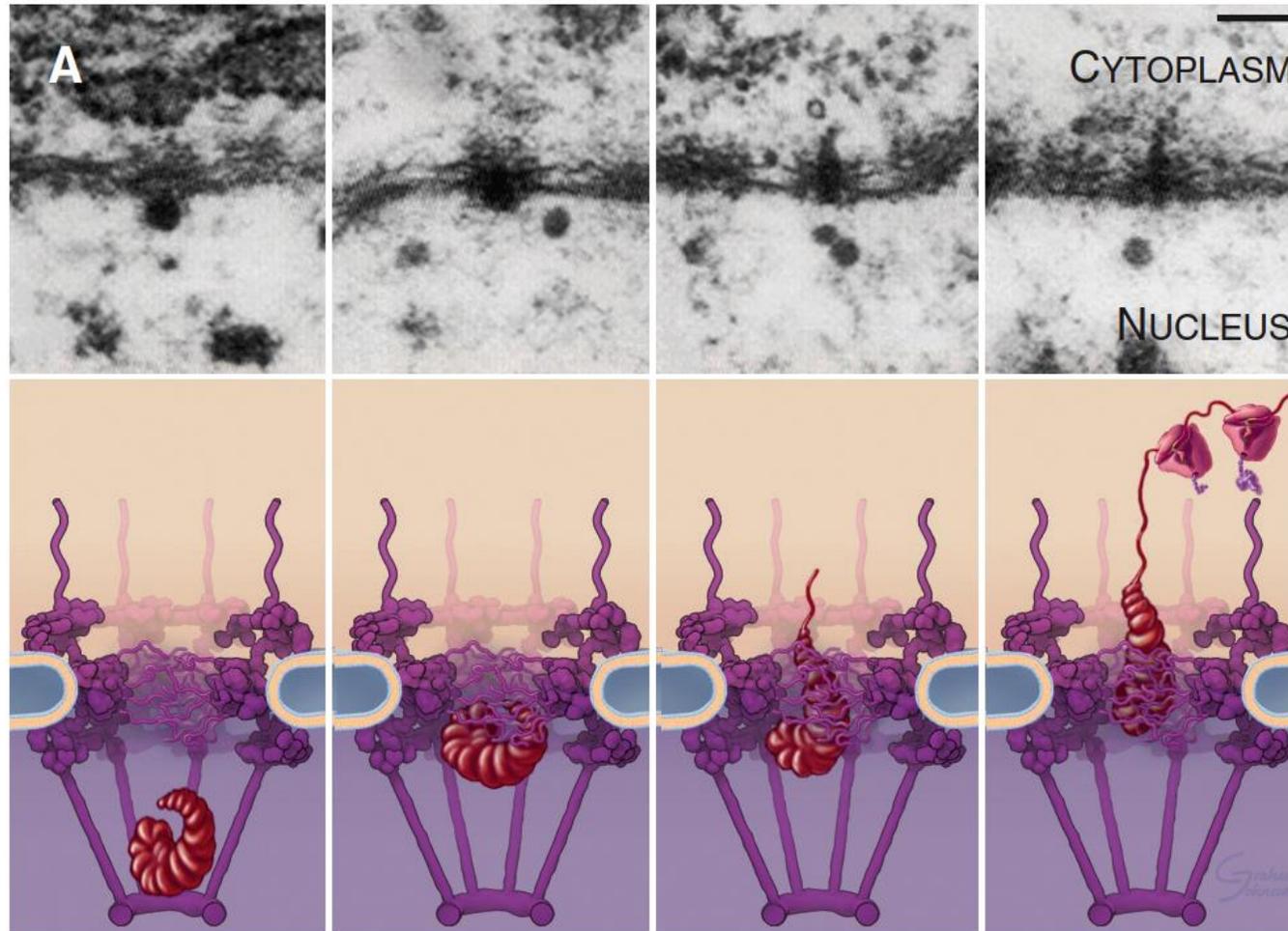


Contengono ripetizioni multiple di brevi sequenze idrofobiche, ricche di **fenilalanina e glicina (FG)**, che tappezzano il canale. Queste interagendo tra loro creano una sorta di barriera per il passaggio delle grandi molecole. Sono però anche essenziali per il legame con i recettori per il trasporto (importine/esportine).

Video NPC

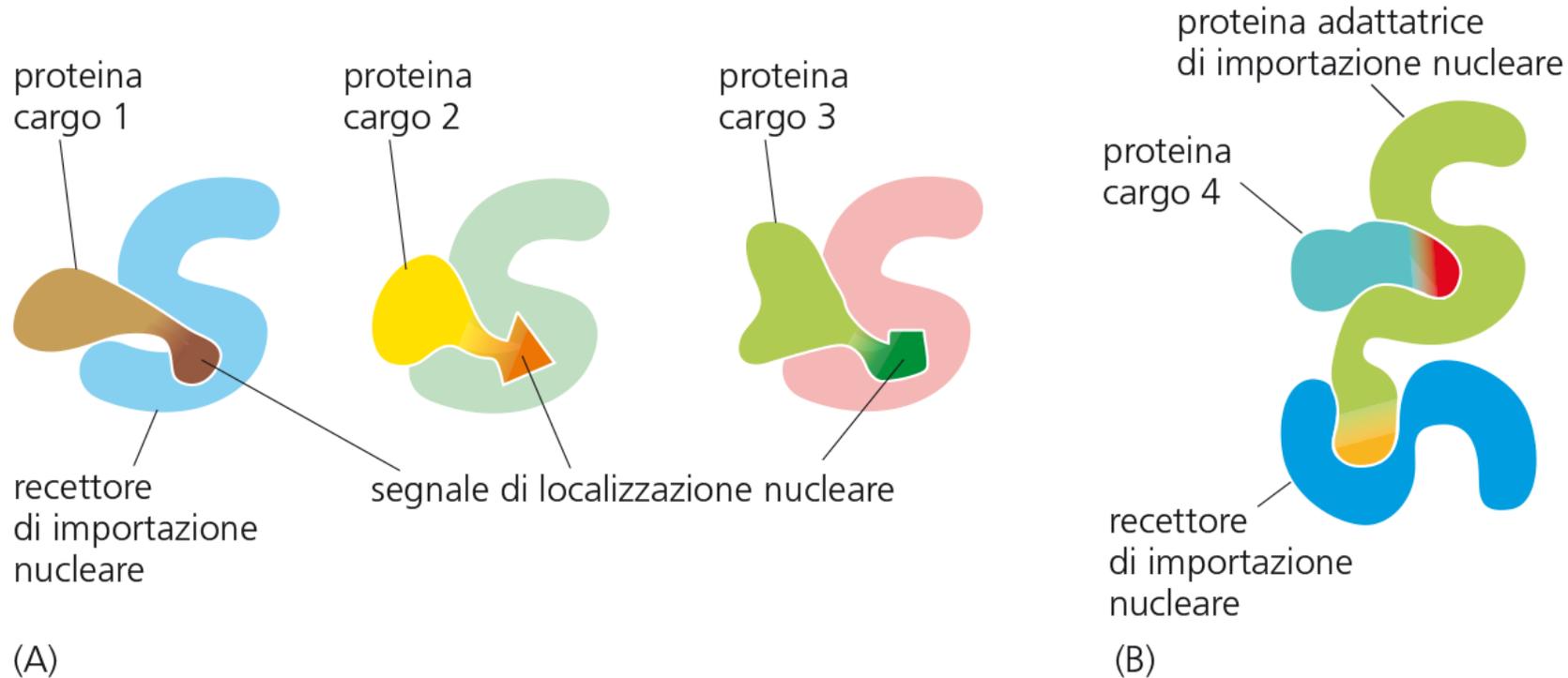
<https://www.youtube.com/watch?v=UyhqLpjicZg>

L'apertura massima del poro è di 40 nm, ma particelle più grosse possono attraversarlo purché siano deformabili, come alcune grosse RNP



**FIGURE 9.13** Electron micrographs (*upper panels*) and an artist's rendition (*lower panels*) show deformation of a large RNP particle as it passes through the nuclear pore complex (cytoplasm [*top*]; nucleus [*bottom*]). This RNA encodes a secreted protein, with a molecular weight of about 1 million Da, from the salivary gland of the fly *Chironomus tentans*. Once in the cytoplasm, the 5' end of the RNA docks with ribosomes and begins synthesis of its protein even before the passage of the remainder of the RNP through the pore has been completed. (From Mehlin H, Daneholt B, Skoglund U. Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell*. 1992;69:605–613.)

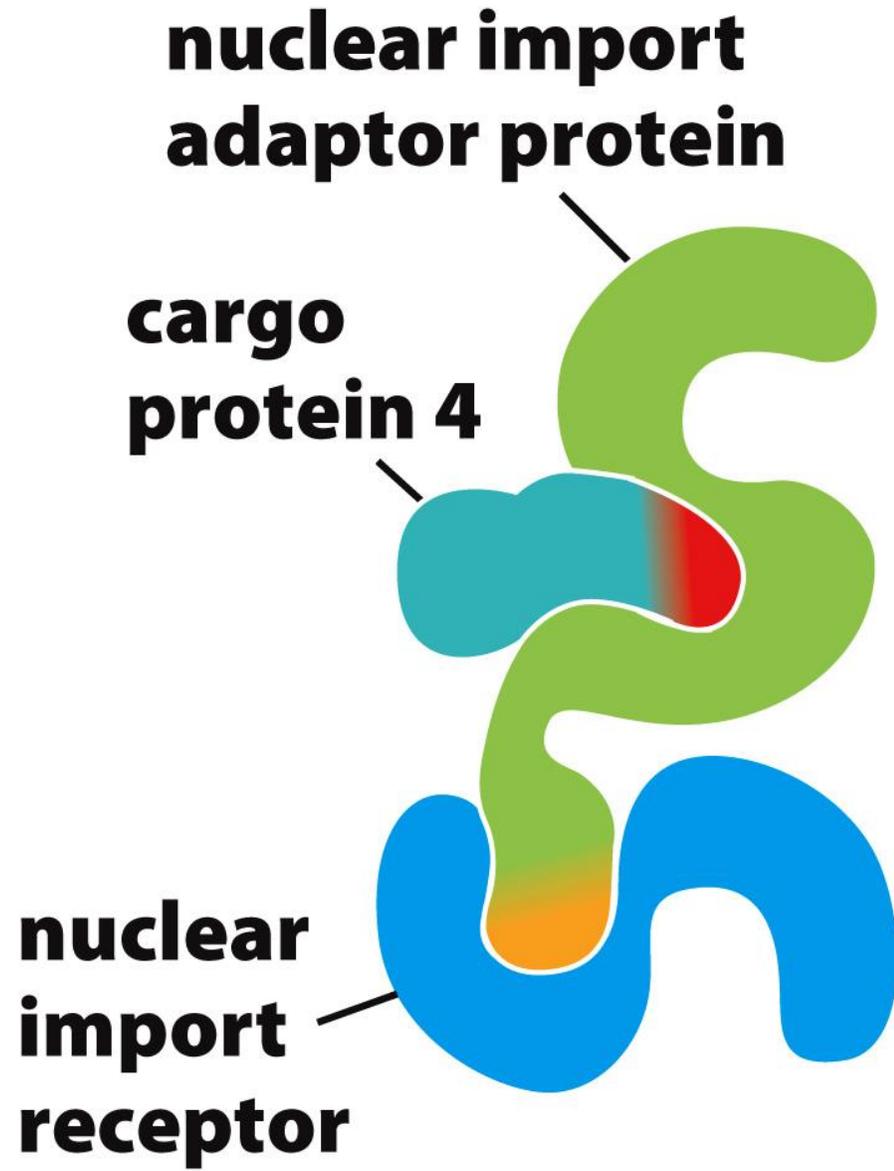
# Importazione nel nucleo



Gli NLS devono essere riconosciuti dai recettori di importazione nucleare, detti **importine**.

Le importine sono proteine citosoliche che legano sia l'NLS che le ripetizioni Phe-Gly sulle nucleoporine FG.

Ogni importina può trasportare diverse proteine con la stessa NLS.

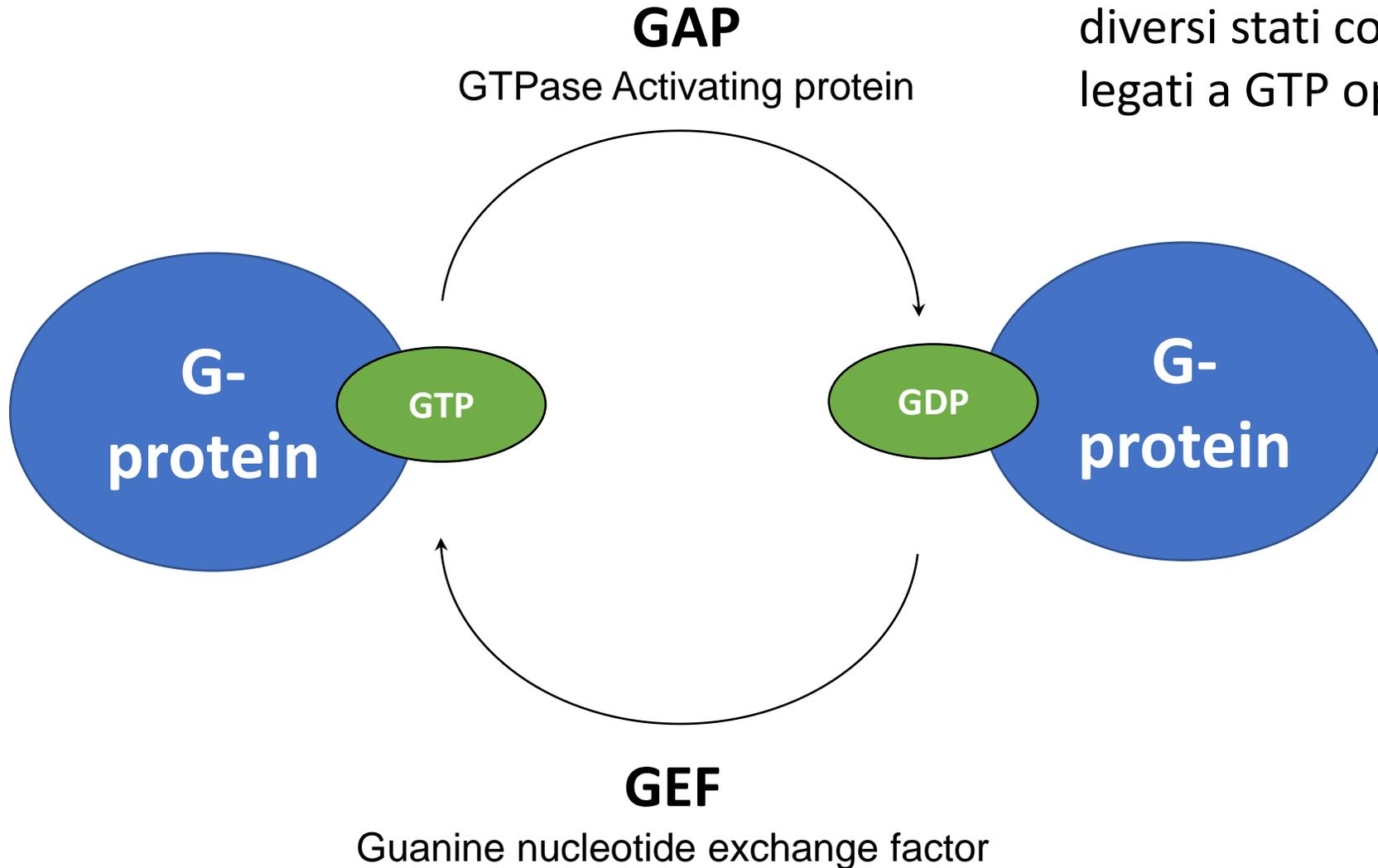


A volte è necessaria una **proteina adattatrice** (ad es. l'importina  $\alpha$ ) che riconosce la NLS del cargo e l'importina stessa (alcune sono correlate strutturalmente alle importine)

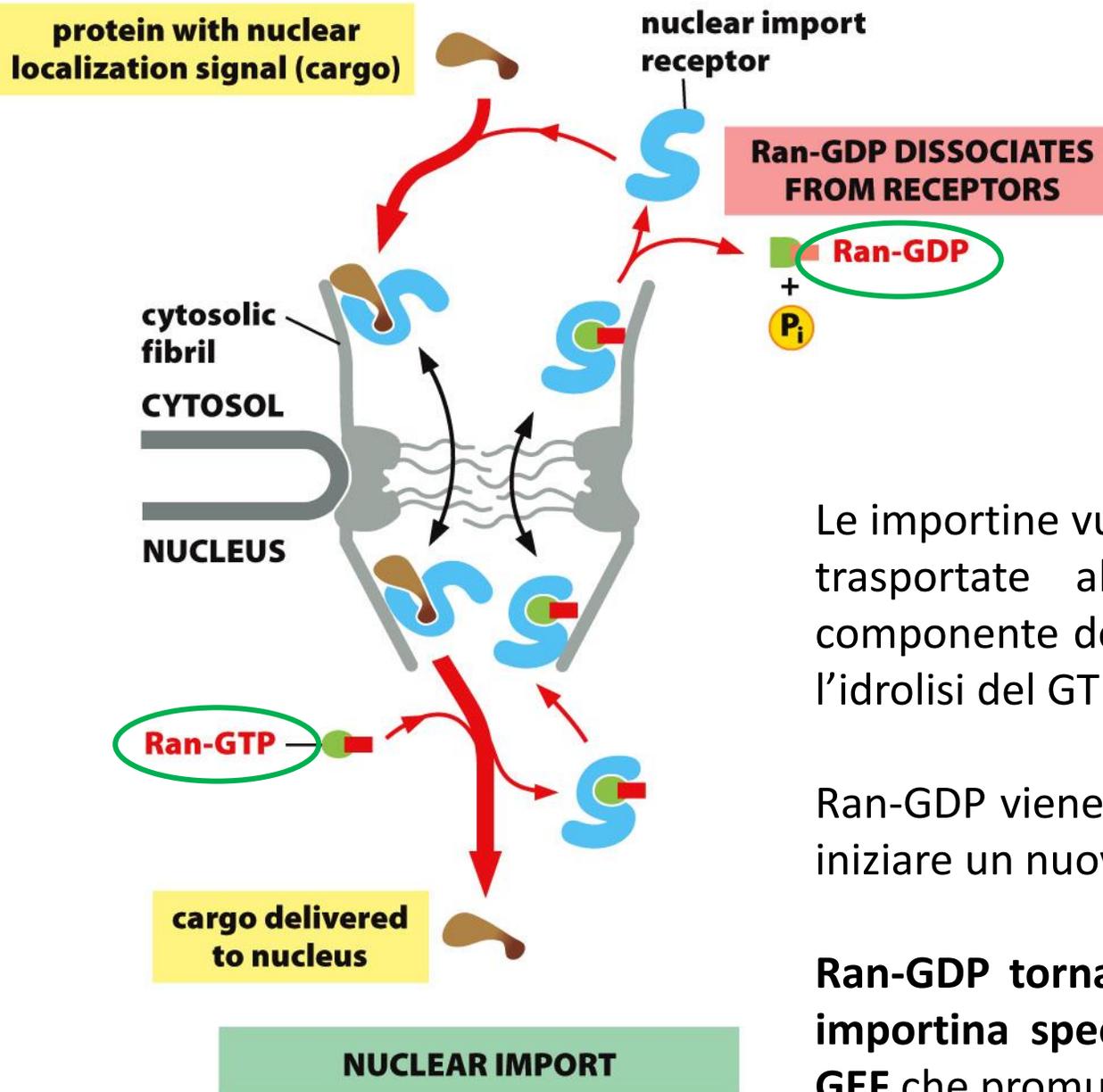
Nel trasporto intervengono anche le proteine **Ran**, G-proteins monomeriche che legano sia le NLS che le ripetizioni FG.

# G-Proteins

Sono interruttori molecolari che possono esistere in due diversi stati conformazionali: legati a GTP oppure a GDP.



Le **importine** legano le NLS nel citosol formando il complesso cargo che attraversa il poro grazie all'interazione con le nucleoporine FG.



Se raggiungono il lato nucleare, Ran-GTP si attacca ad esse, provocando il rilascio del cargo

Le importine vuote attaccate a Ran-GTP vengono trasportate al citosol, dove **Ran-GAP** (un componente dei filamenti citoplasmatici) induce l'idrolisi del GTP

Ran-GDP viene rilasciato e le importine possono iniziare un nuovo ciclo

**Ran-GDP torna nel nucleo, attraverso una sua importina specifica, dove interagisce con Ran-GEF che promuove lo scambio GDP-GTP**

Figure 12-13a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# L'esportazione dal nucleo

- Funziona come l'importazione nel nucleo, ma al contrario
- Si basa su segnali di esportazione nucleare (**Nuclear Export Sequences, NES**)
- e su recettori di trasporto nucleari, detti **esportine**, strutturalmente correlati alle importine
- **La direzionalità del trasporto è data dalla GTPasi Ran**

# Sequenze segnale, le NES

**TABLE 12-3 Some Typical Signal Sequences**

Function of signal sequence	Example of signal sequence
Import into nucleus	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Export from nucleus	-Met-Glu-Glu-Leu-Ser-Gln-Ala-Leu-Ala-Ser-Ser-Phe-
Import into mitochondria	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	-Ser-Lys-Leu-COO <sup>-</sup>
Import into ER	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Return to ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO <sup>-</sup>

Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in *red* and negatively charged amino acids are shown in *green*. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in *orange* and important hydroxylated amino acids are shown in *blue*. <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N indicates the N-terminus of a protein; COO<sup>-</sup> indicates the C-terminus.

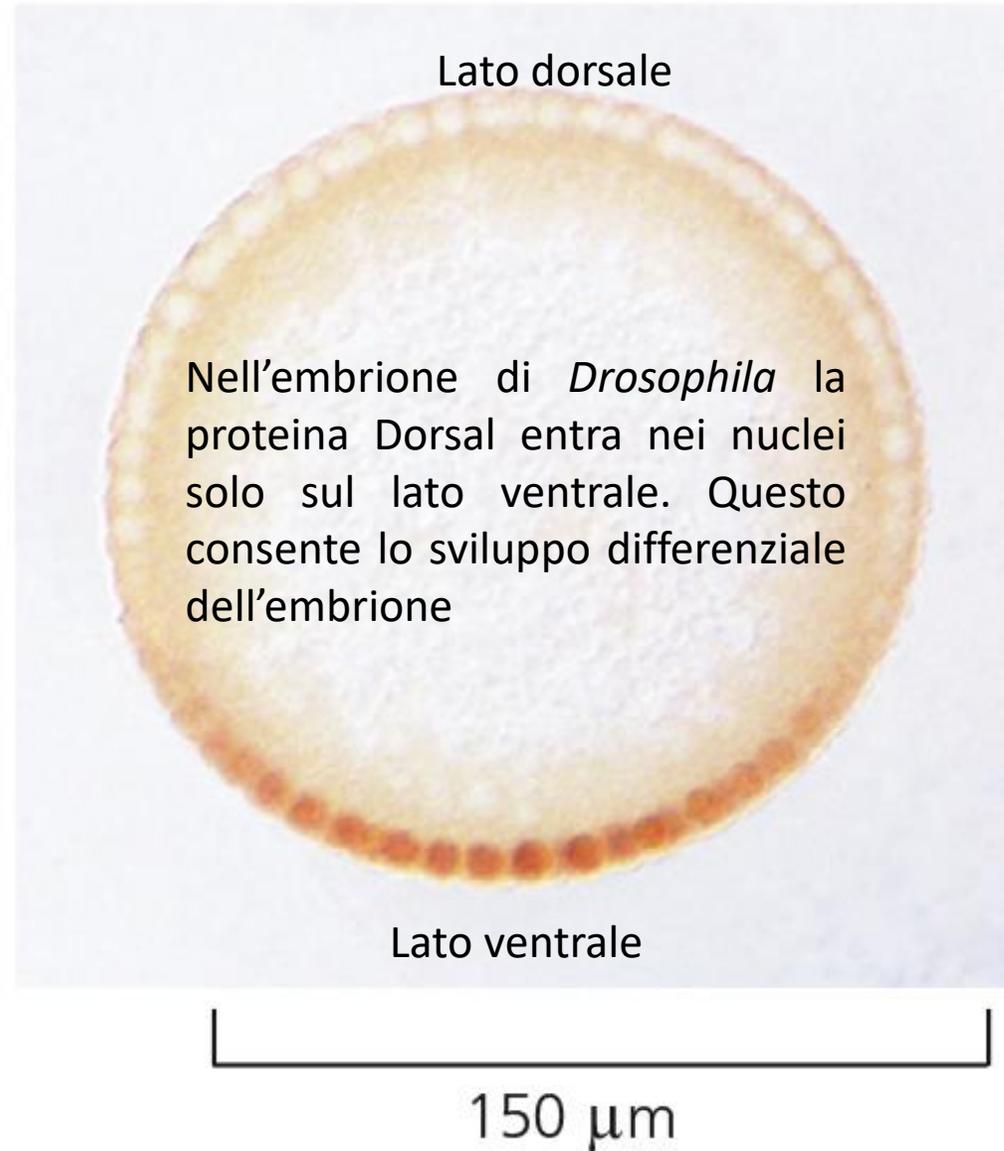
# NES (nuclear export signals)

Consenso poco conservate, in generale meno note delle NES.

Esempi:

- sequenze ricca in Leu (es.: in PKI, un inibitore della PKA)
- sequenza di 38 amminoacidi (es. in hnRNP A1)
- **NLS**: proteine che permangono nel nucleo (es.: DNA e RNA polimerasi, istoni)
- **NLS + NES**: proteine che vanno avanti e indietro da nucleo a citosol (shuttling) (es.: proteine associate a mRNA)

- Molte proteine (proteine navetta o shuttle) contengono sia NES che NLS
- La loro localizzazione dipende dalle velocità relative di importazione ed esportazione
- Alcune proteine sono mantenute al di fuori del nucleo fino a che non sono necessarie



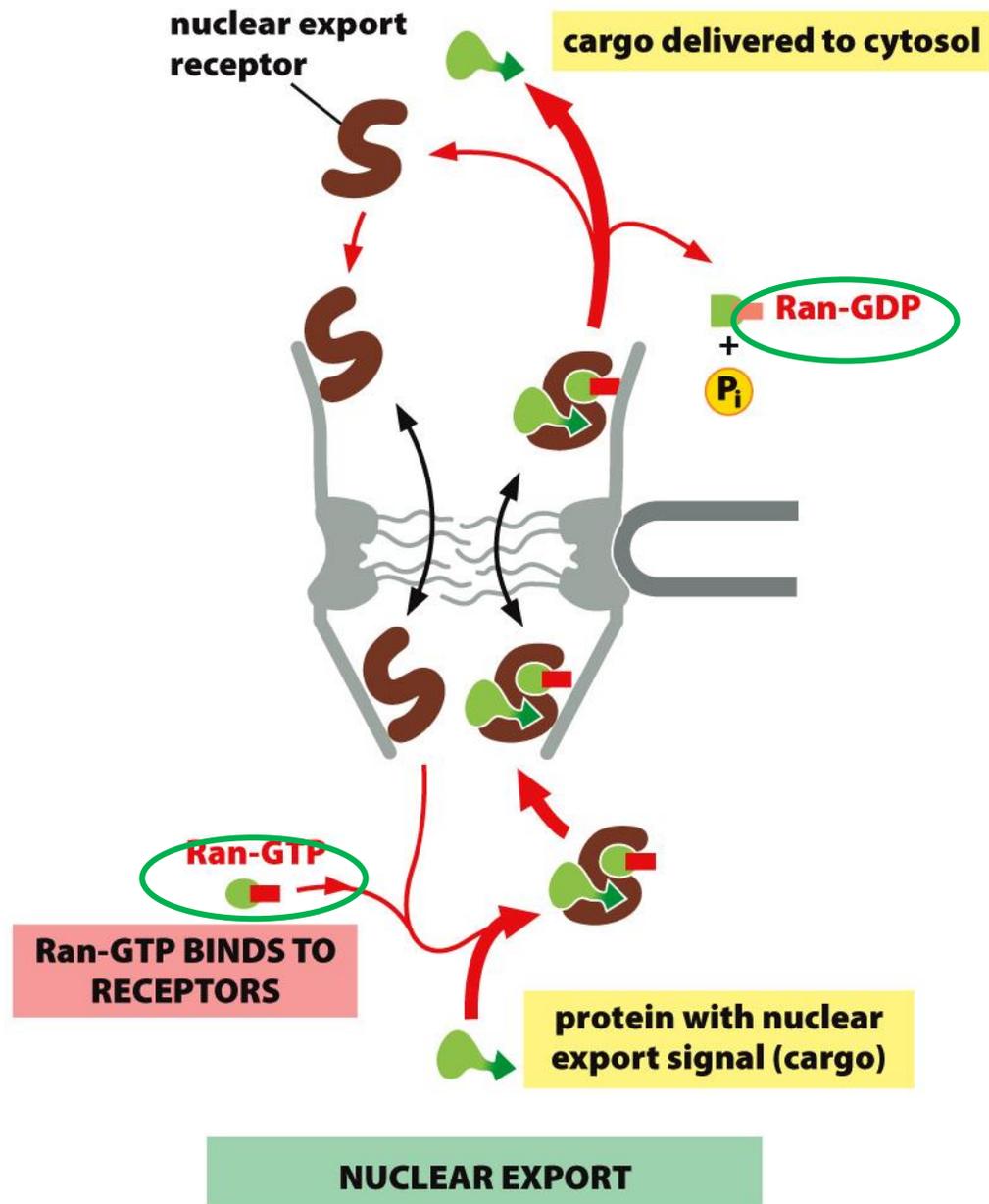


Figure 12-13b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

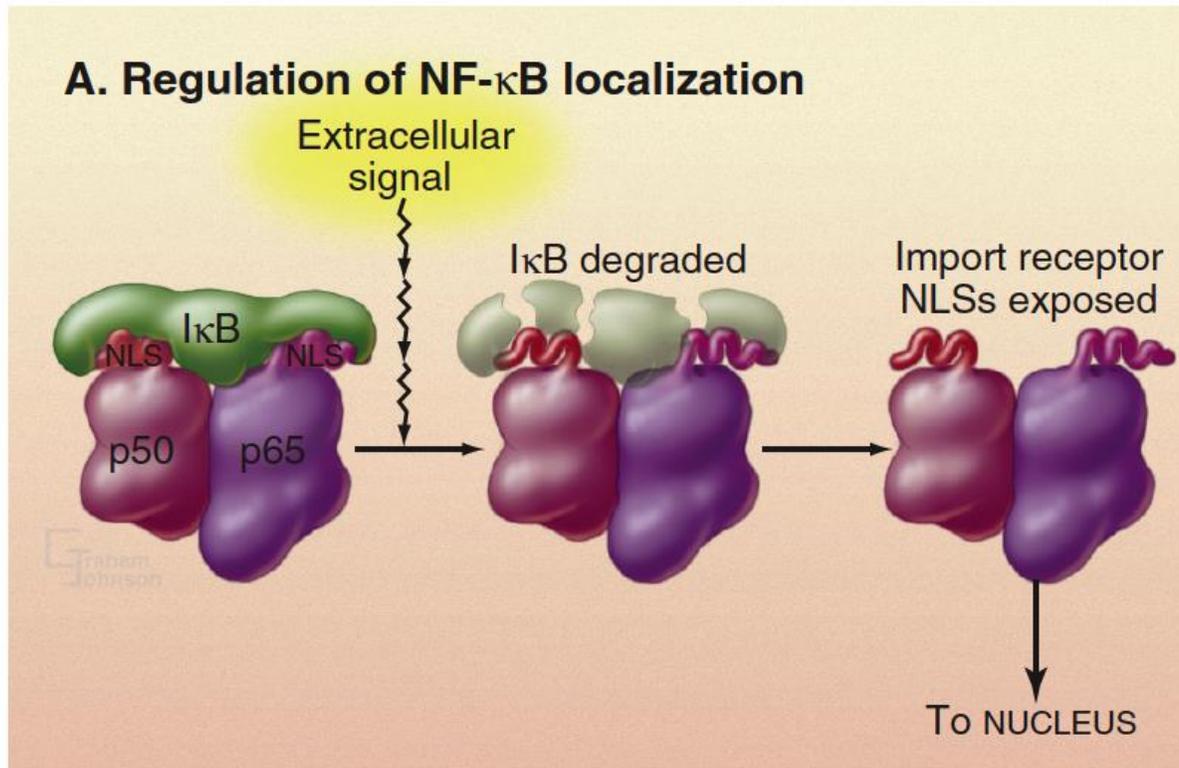
Nell'esportazione Ran-GTP nel nucleo promuove l'attacco del carico alle esportine

Quando le esportine cariche hanno attraversato l'NPC, arrivano nel citosol dove Ran-GAP induce l'idrolisi del GTP

L'esportina rilascia sia il carico che Ran-GAP nel citosol e ritorna nel nucleo per un nuovo ciclo (associandosi ad una proteina Nup).

Il trasporto dal e al nucleo è regolato:

1. Variando il numero dei pori nucleari
2. Mascherando e smascherando le NLS e NES (ad esempio mediante interazione o fosforilazione)

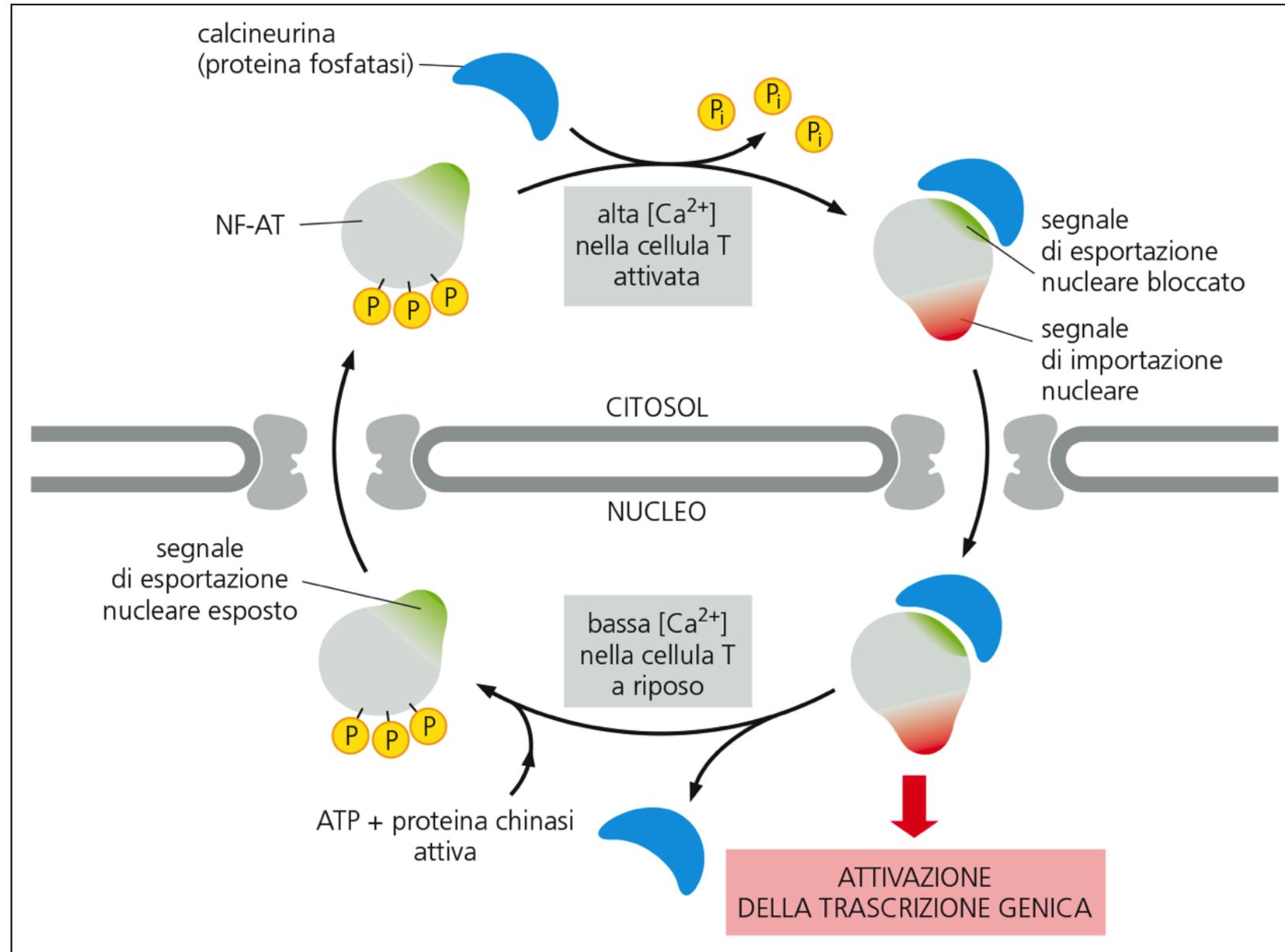


Esempio di NLS mascherata da interazione:

NF- $\kappa$ B viene importato nel nucleo quando la degradazione di I $\kappa$ B espone le NLS

Esempio di NLS mascherata da interazione e fosforilazione:

Nel caso di NF-AT il trasporto è regolato mediante fosforilazione di aminoacidi adiacenti, che maschera le sequenze segnale

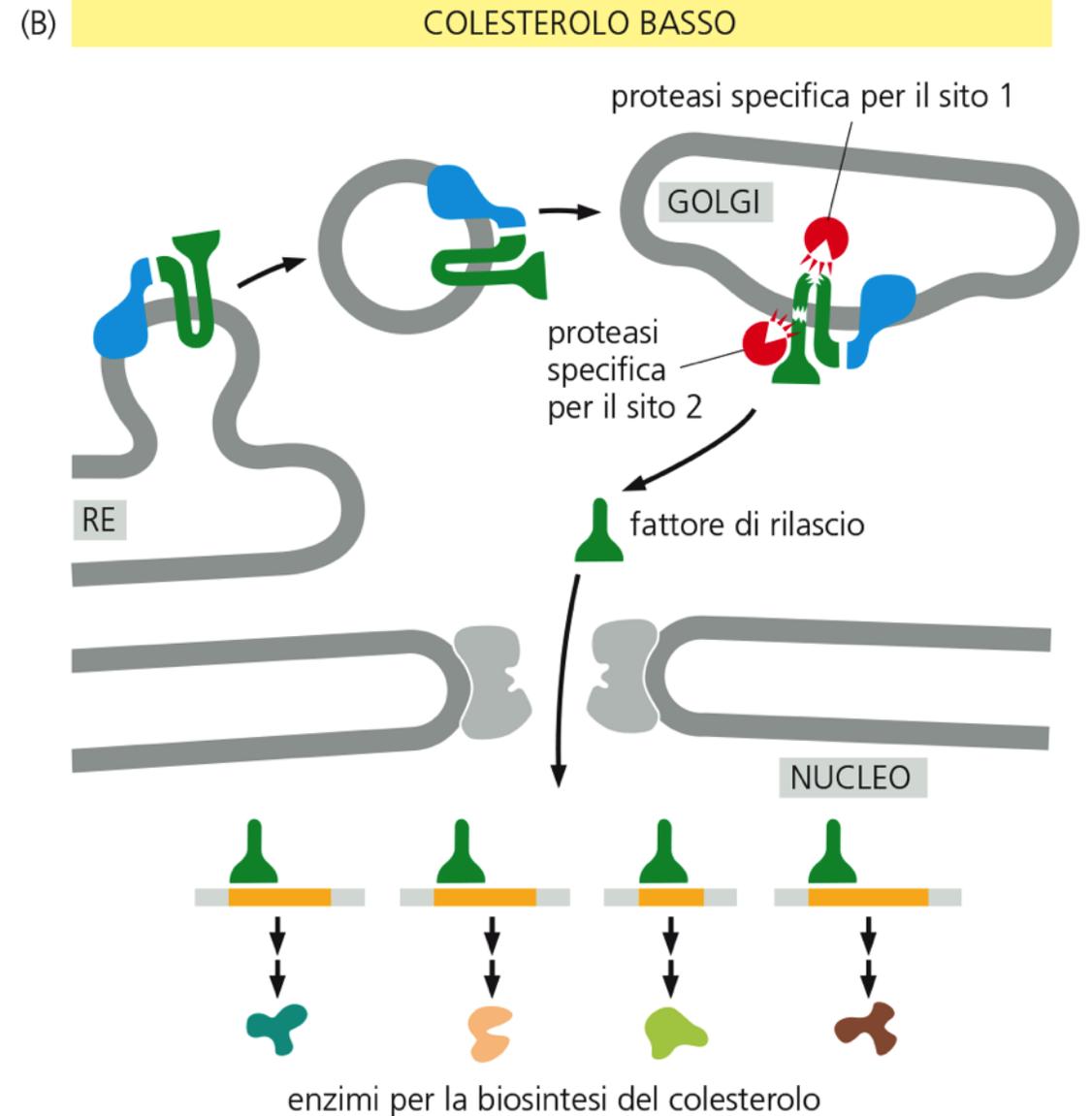
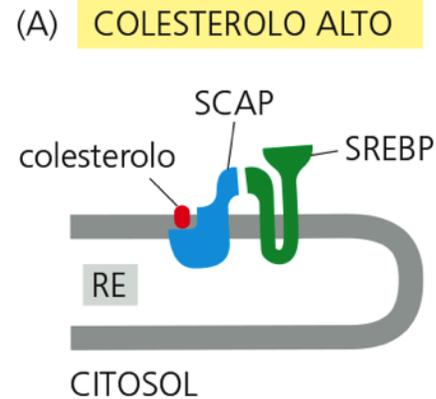


# La regolazione di SREBP

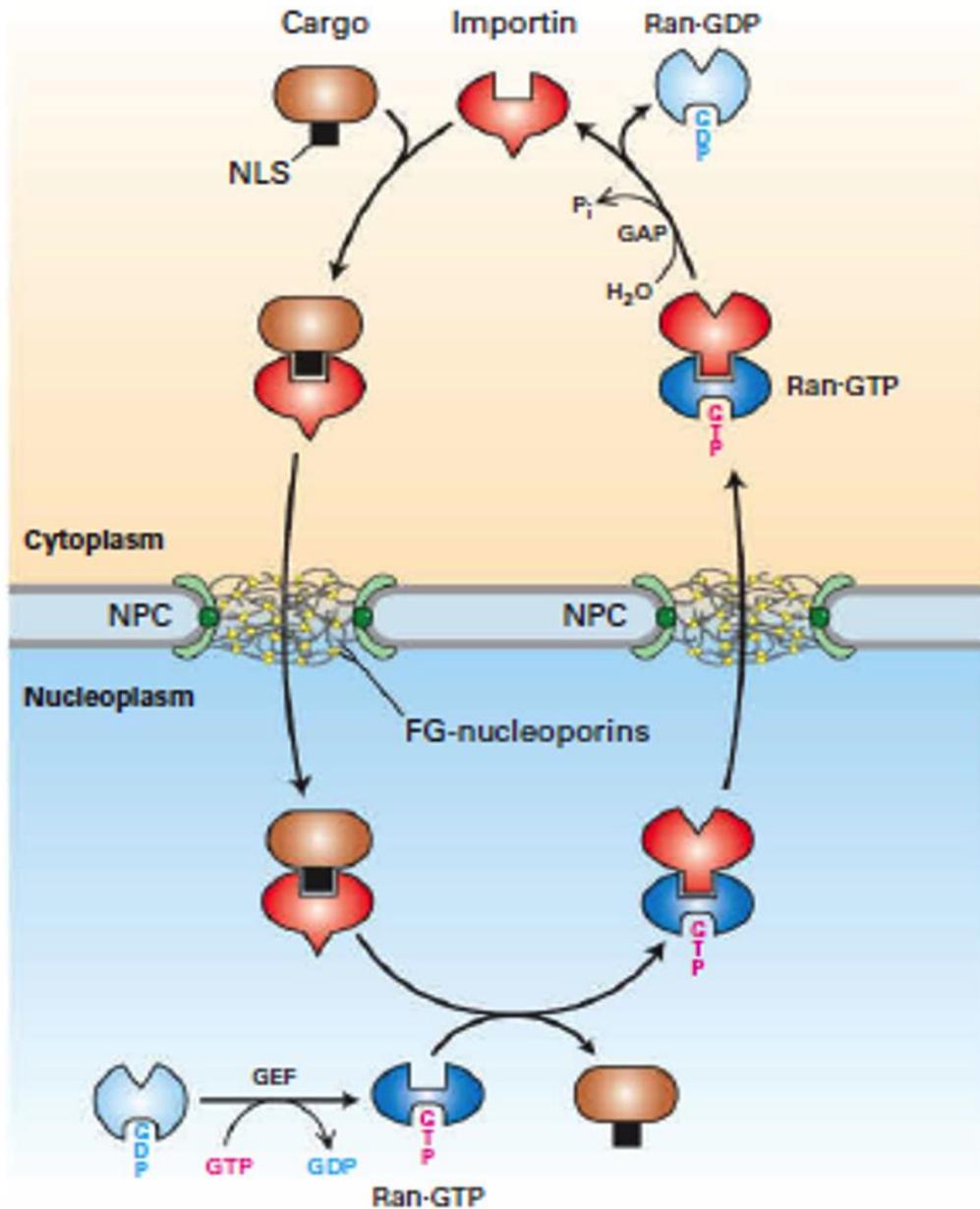
**SREBP=sterol response element binding protein**

**SCAP= SREBP cleavage activation protein**

SREBP è mantenuta legata alla RE (associata a SCAP); quando il colesterolo è basso trasloca al Golgi dove due proteasi la rilasciano, rendendo accessibile la NLS e permettendole di entrare nel nucleo.



# Nuclear Import



**Come viene garantita la direzionalità del trasporto?**

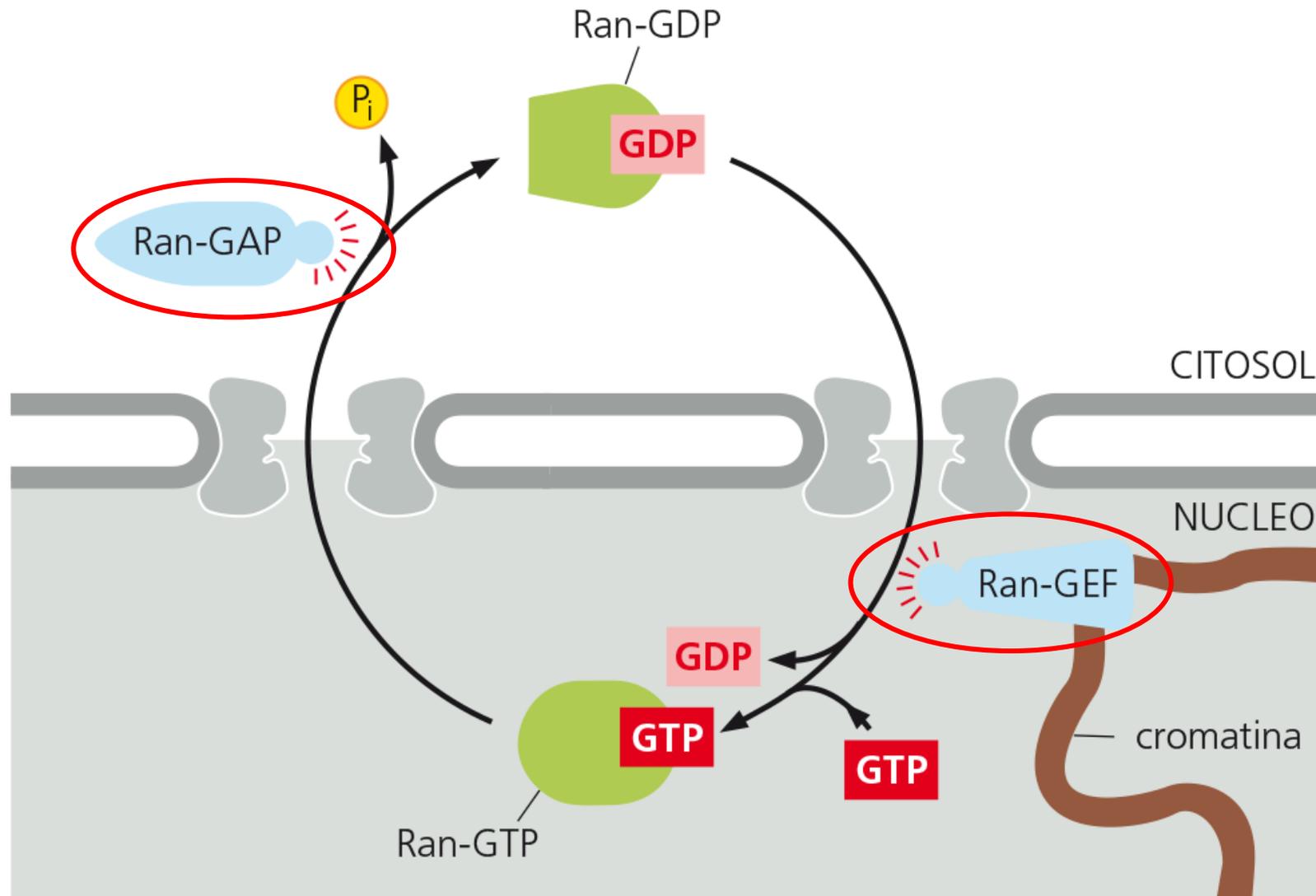
Il trasporto nucleo-citosol e viceversa è vettoriale

- Diversa localizzazione di GEF e GAP
- Ran-GTP partecipa solo all'export

Video import-export

<https://www.youtube.com/watch?v=ZGPpKk-6-K0>

Ran-GAP (che attiva la GTPasi) si trova nel citosol  
Ran-GEF nel nucleo; questo spinge il trasporto nella giusta direzione



Il rilascio avviene solo dal lato nucleare perché Ran-GDP nel citosol non lega le importine

# Import e export a confronto

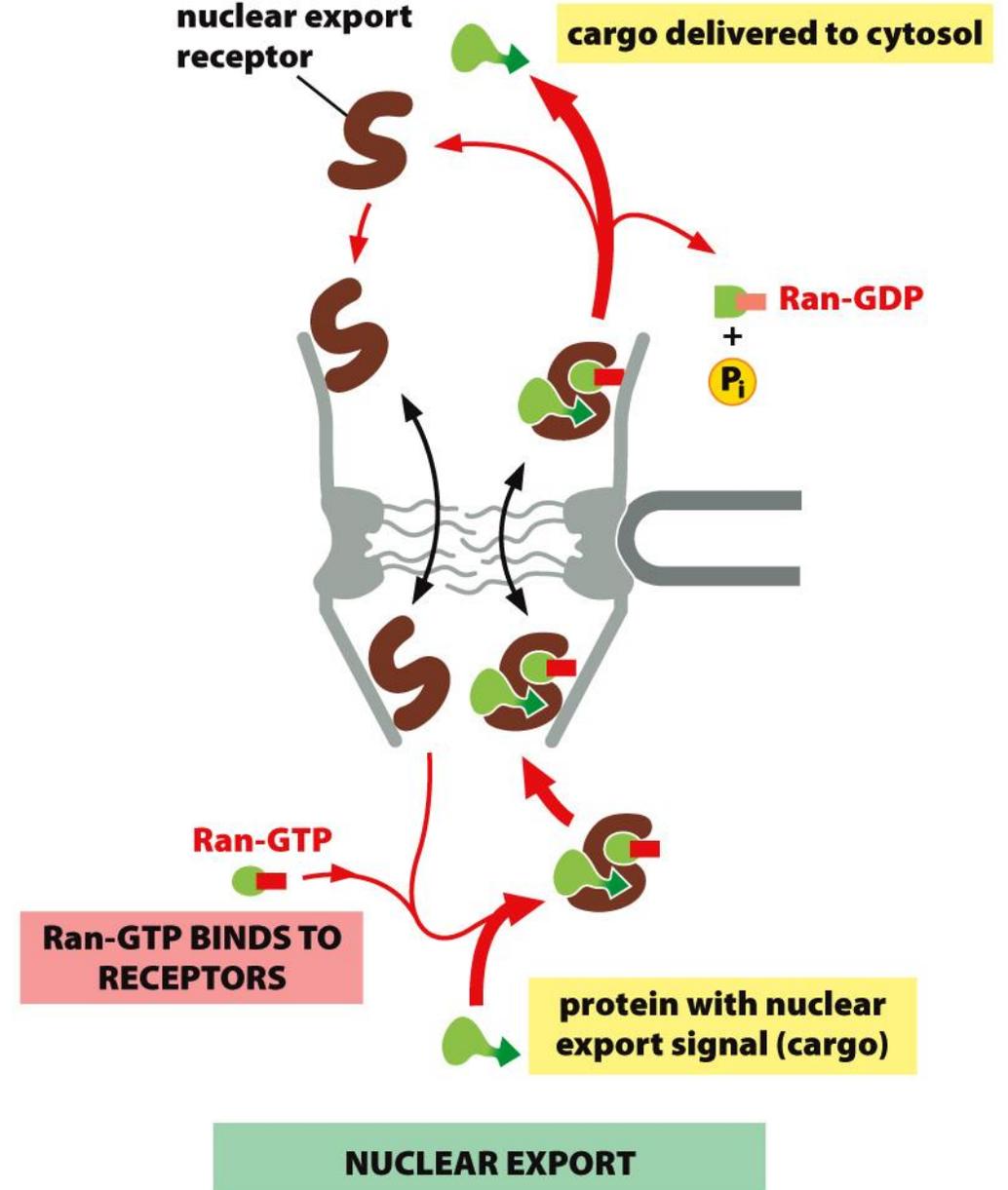
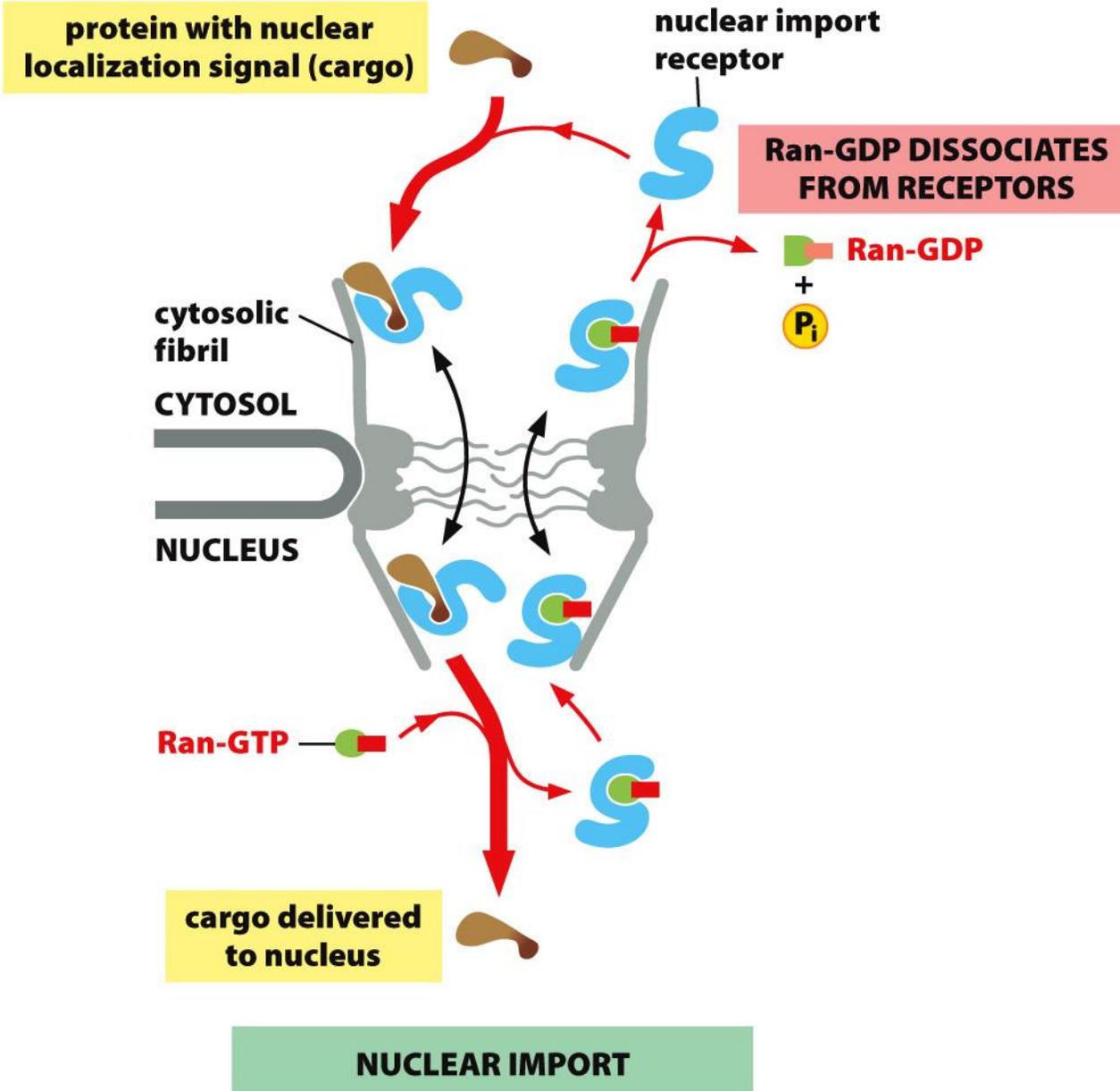


Figure 12-13a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Figure 12-13b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

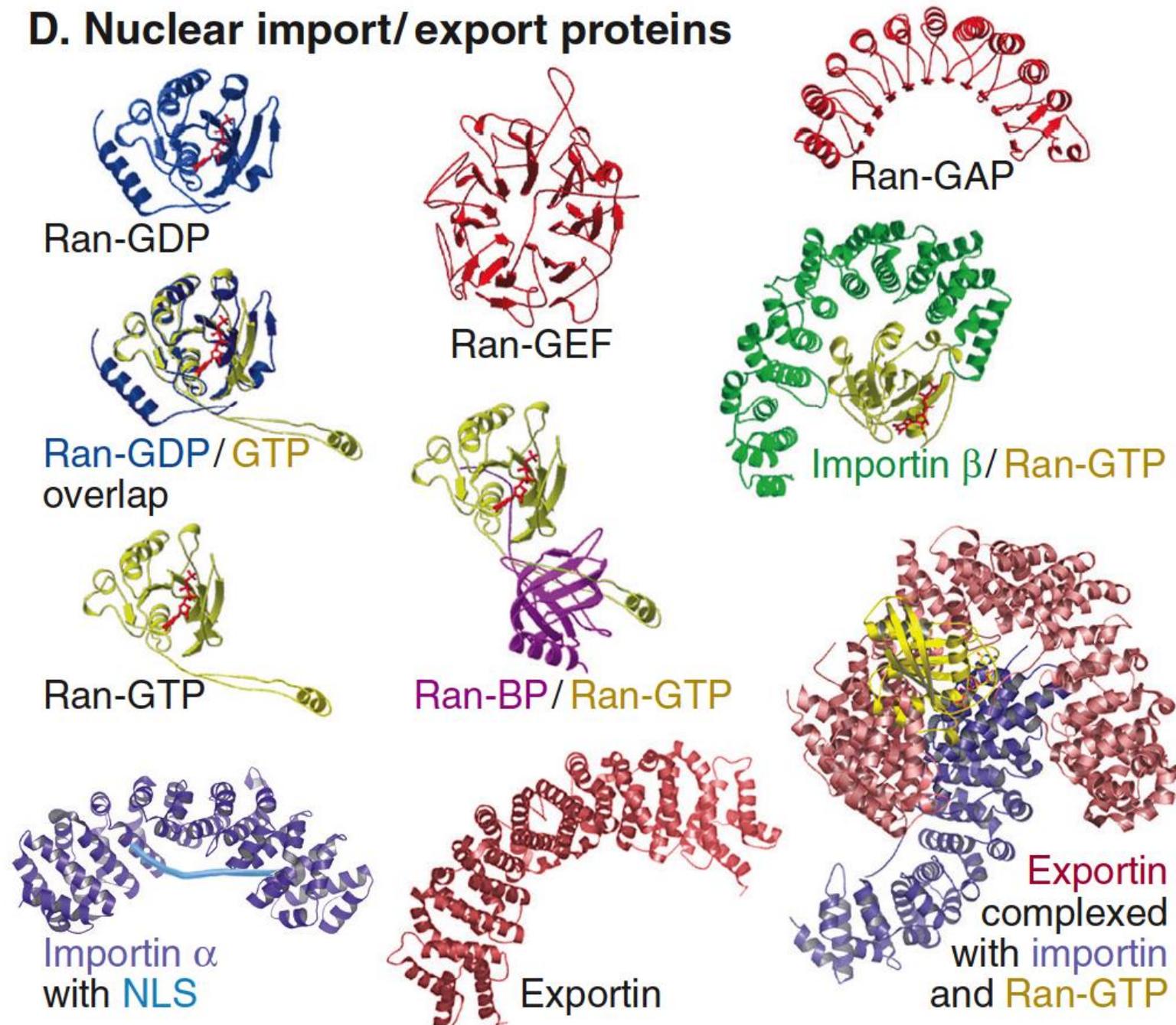
## Le **CARIOFERINE**

Importine ed esportine fanno parte della stessa famiglia, la famiglia delle **Carioferine**.

Sono 14 in lievito e più di 20 nelle cellule di mammifero, anche se sono state identificate solo alcune delle sequenze NLS ed NES a cui si legano.

Importine ed esportine sono molto simili strutturalmente, alcune di esse hanno **doppia funzione** (agiscono sia come importine che come esportine).

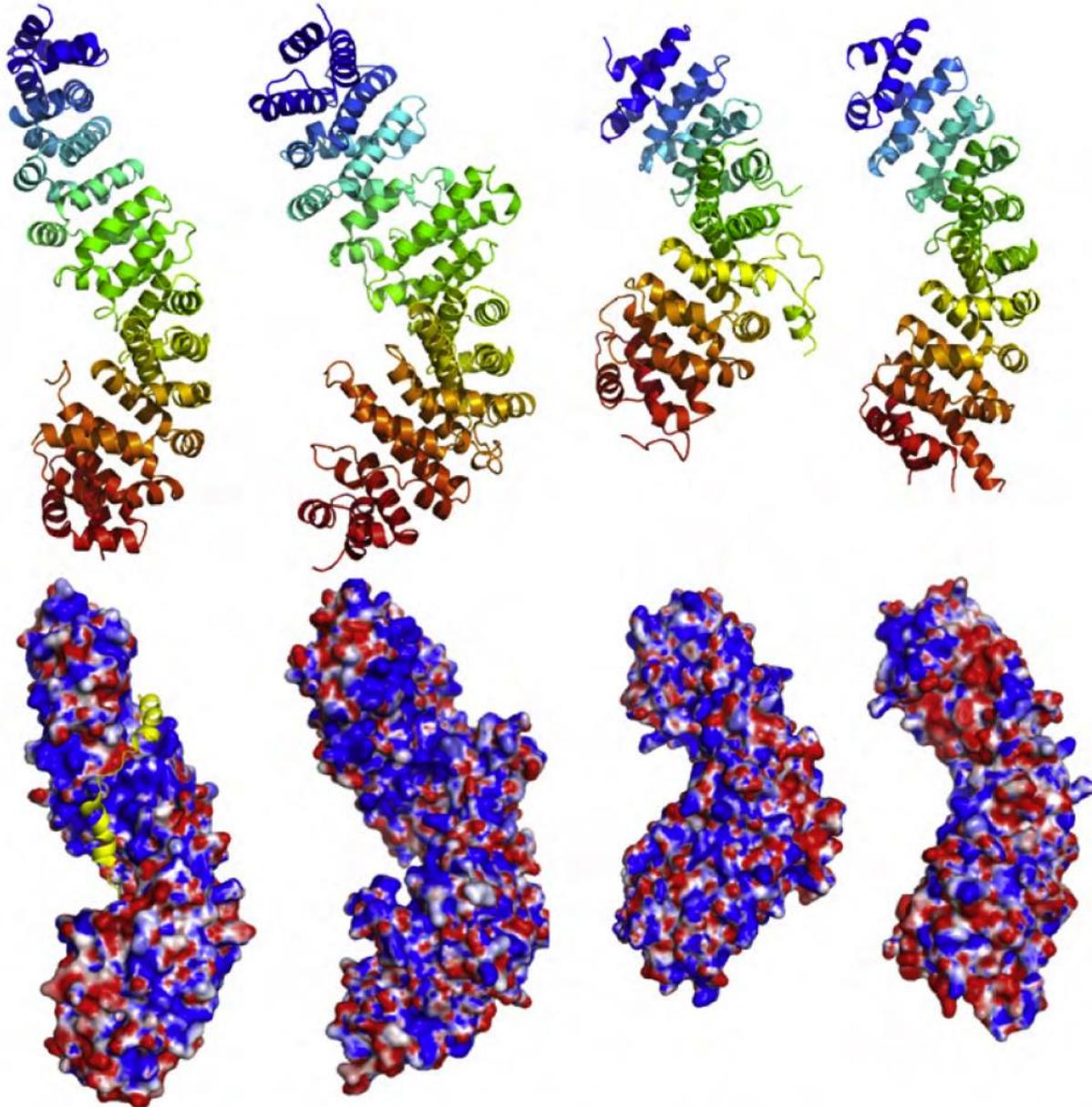
## D. Nuclear import/export proteins



L'importina  $\alpha$  contiene 10 ripetizioni della sequenza **Armadio**.

L'importina  $\beta$  contiene 19 ripetizioni della sequenza **HEAT**.

(b)



$\beta$ -catenin

SYS-1

Plakophilin 1

Importin- $\alpha$

## Le sequenze Armadillo

Le sequenze Armadillo sono costituite da 40 aa organizzati in due eliche a hairpin.

Ripetizioni di sequenze Armadillo danno strutture a solenoide.



## Sequenze HEAT

Le sequenze HEAT (acronimo per Hungtintin, EF3, PP2A, TOR) formano 2 a eliche legate da un breve loop.

Le ripetizioni HEAT formano un solenoide.

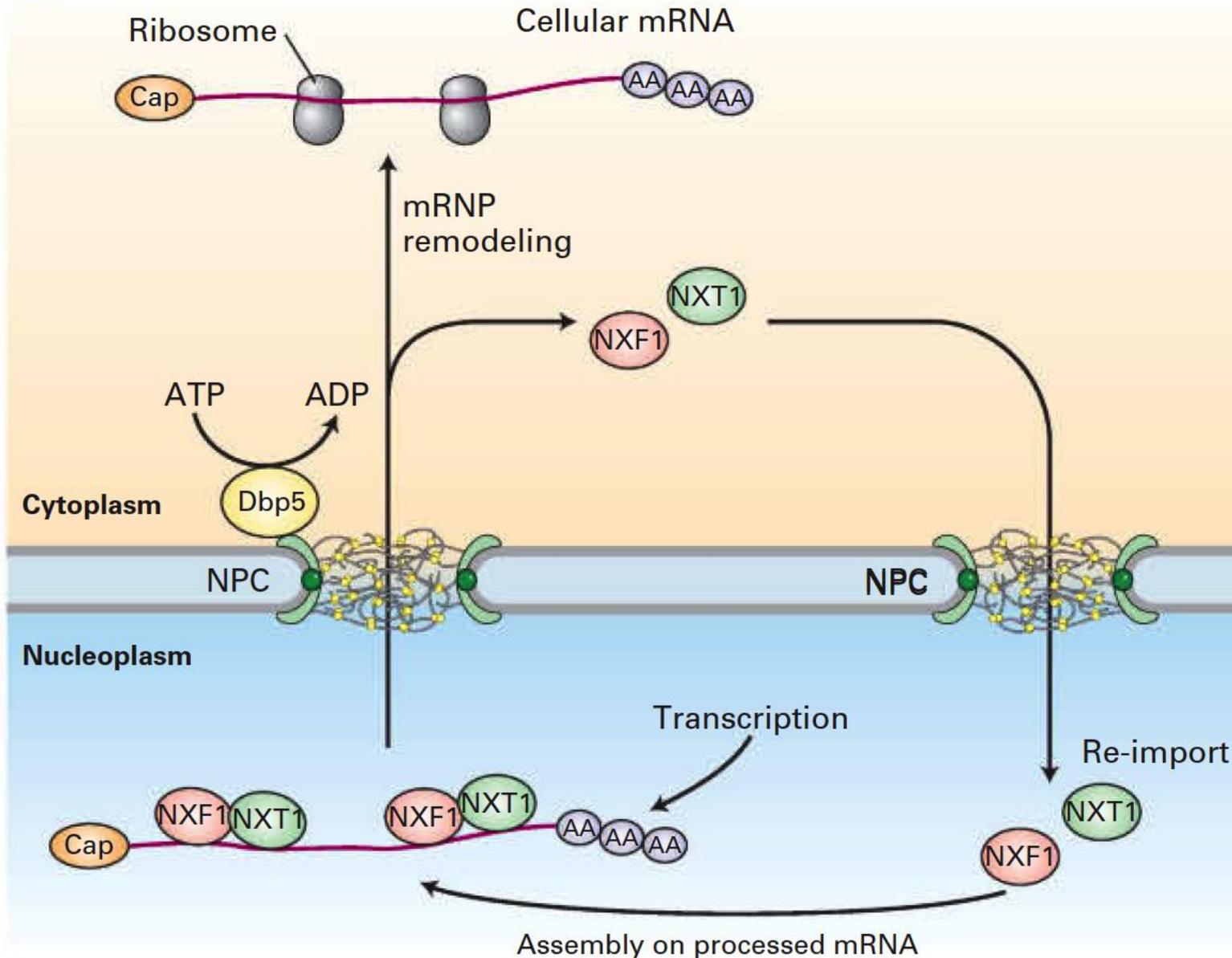
# Trasporto di RNA e ribonucleoproteine

- **snRNA, miRNA e tRNA** si legano alle esportine e sfruttano il gradiente di Ran-GTP per essere esportati.
- Una volta trascritti, gli **mRNA** restano legati a proteine hnRNP nel **complesso mRNP** (complesso ribonucleoproteico del messaggero).

Gli mRNA sono esportati come ribonucleoproteine ( $10^6$  Da) dagli **mRNP exporters** → un dimerico costituito da **NXF1** (nuclear export factor 1) e **NXT1** (nuclear export transport 1); vengono rimodellati all'interno degli NPC; l'energia per il loro trasporto deriva dall'idrolisi dell'**ATP**, anche se il meccanismo di direzionalità non è chiaro.

Le proteine di trasporto vengono riportate al nucleo mediante le importine.

(b)



## RNP exporter

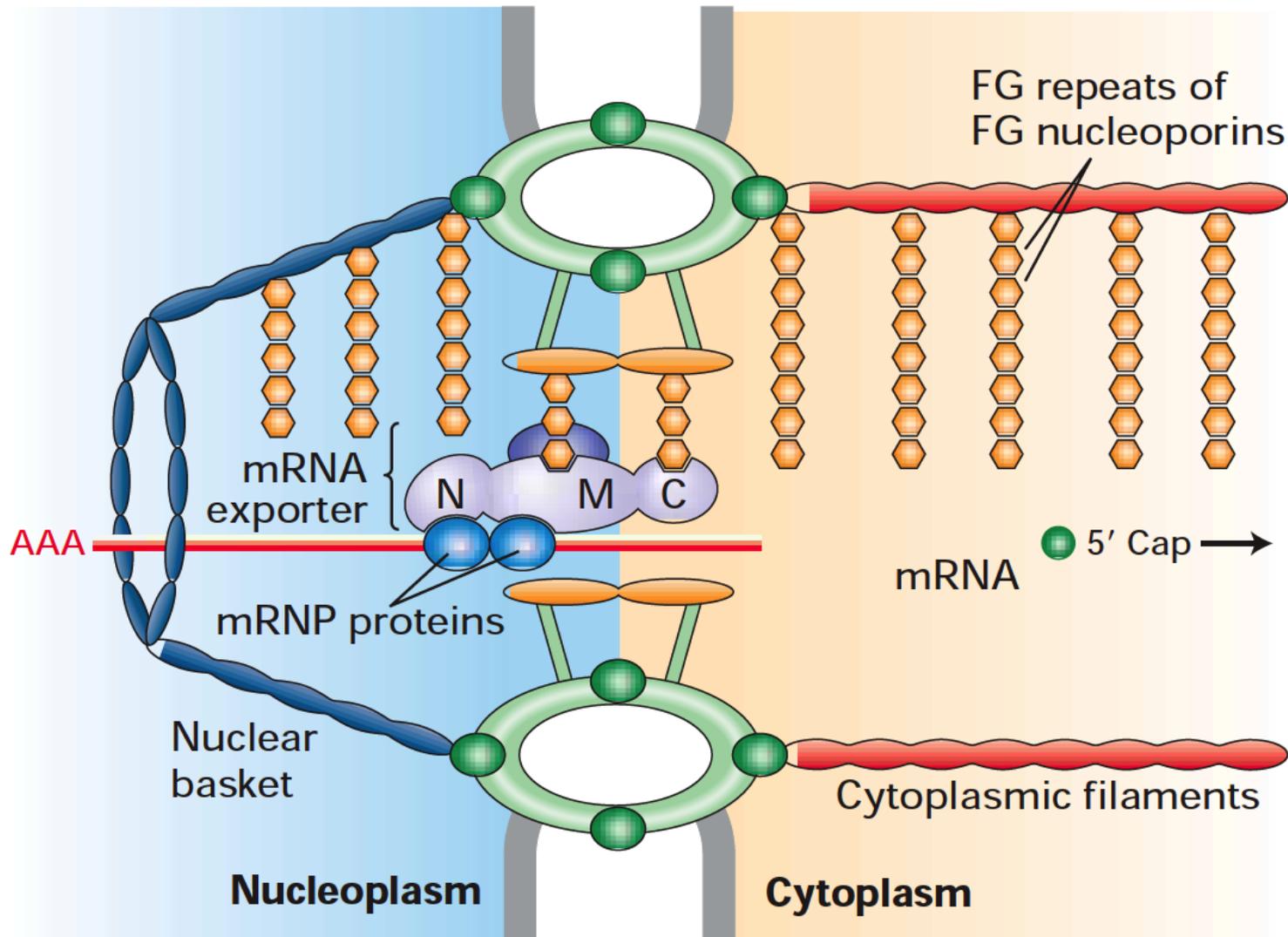
RNP exporter = NXF1/NXT1

NXF1/NXT1 lega anche le FG permettendo il trasporto attraverso l'NPC.

Nxf1 e Nxt1 non sembrano interagire con Ran.

**Nel citosol NXF1/NXT1 si dissocia con l'aiuto dell'elicasi Dbp5** (associata ai filamenti citoplasmatici dell'NPC) che idrolizza ATP.

NXF1/NXT1 rientrano nel nucleo per essere riutilizzati.



**NXF1** presenta 3 domini:  
 N terminale – lega l'mRNA  
 M (middle) e C terminale –  
 legano le ripetizioni FG.

**NXT1** lega il dominio M  
 formando una superficie di  
 interazione con le  
 ripetizioni FG.

## Durante la mitosi...

- Negli eucarioti superiori la membrana nucleare si disassembla (**mitosi aperta**, in opposizione alla **mitosi chiusa** in altri organismi, ad es. lievito)
- Il disassemblaggio dipende almeno in parte da fosforilazioni Cdk-dipendenti di nucleoporine e laminine nucleari
- La proteina motrice dineina partecipa al distacco dei cromosomi dall'involucro nucleare. Alcune proteine degli NPC restano legate alle importine.
- Alla fine della mitosi l'involucro nucleare si riassembla, e qui riveste un ruolo chiave Ran-GEF, che resta ancorato ai cromosomi

la Ran-GTPasi agisce da marcatore posizionale per la cromatina:

Poichè Ran-GEF resta attaccata ai cromosomi, le molecole di Ran vicine sono legate al GTP.

**Ran-GTP rilascia le proteine degli NPC dalle importine vicino ai cromosomi e riassemblano gli NPC.**

La membrana del RE ricostituisce la membrana nucleare.

