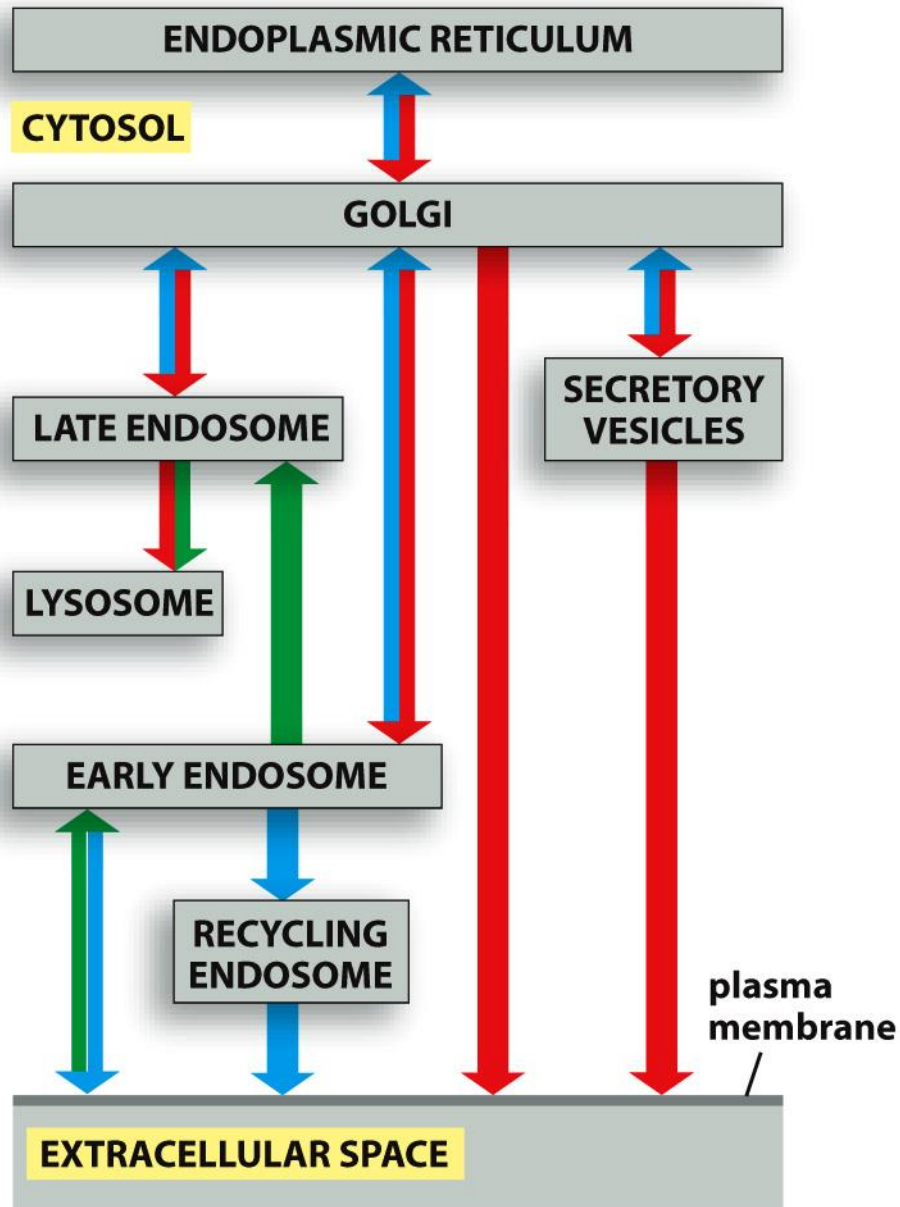


# **Il traffico vescicolare – principi generali**



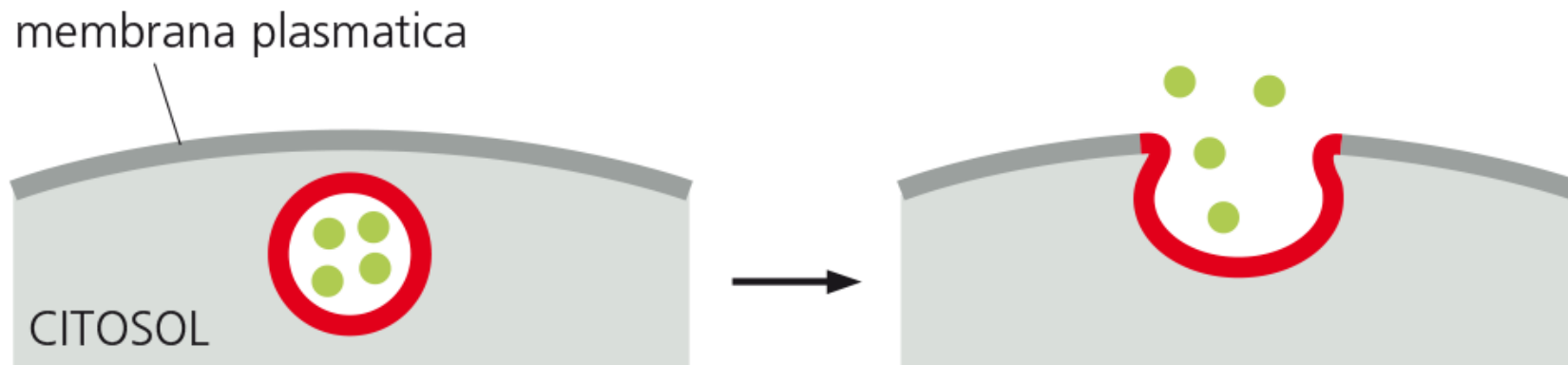
La **via secretoria** (verso l'esterno) e **endocitica** (verso l'interno)

Il trasporto vescicolare media uno scambio fra 10 compartimenti distinti; la combinazione dei marcatori di membrana preserva l'identità di ciascun compartimento.

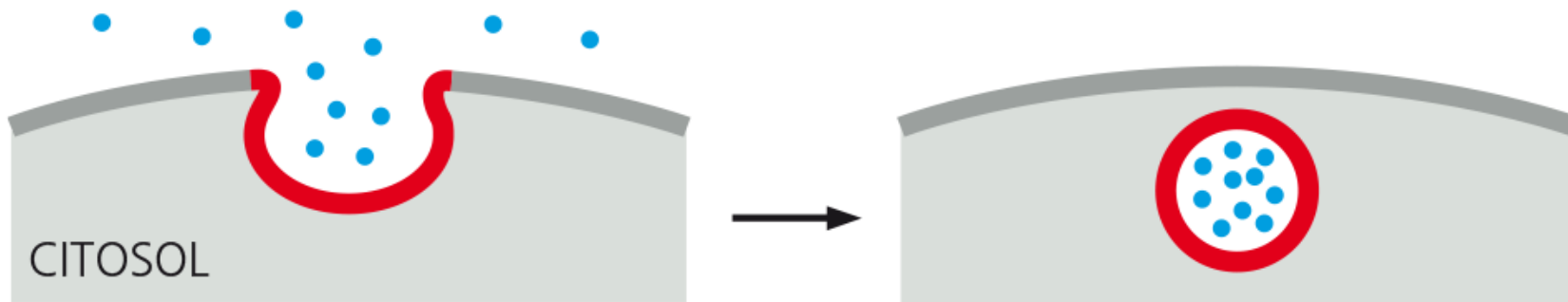
Le **vie di recupero** bilanciano il flusso di membrana fra i compartimenti nella direzione opposta.

La cellula usa l'**esocitosi** per inserire trasportatori, canali e recettori nella membrana plasmatica.

Mediante **endocitosi** vengono rimossi i componenti della membrana che vengono trasferiti agli endosomi e vengono assorbiti nutrienti.



(A) esocitosi



(B) endocitosi

**Frecce rosse - via secretoria**

**Frecce verdi – via endocitica**

**Frecce azzurre – vie di recupero**

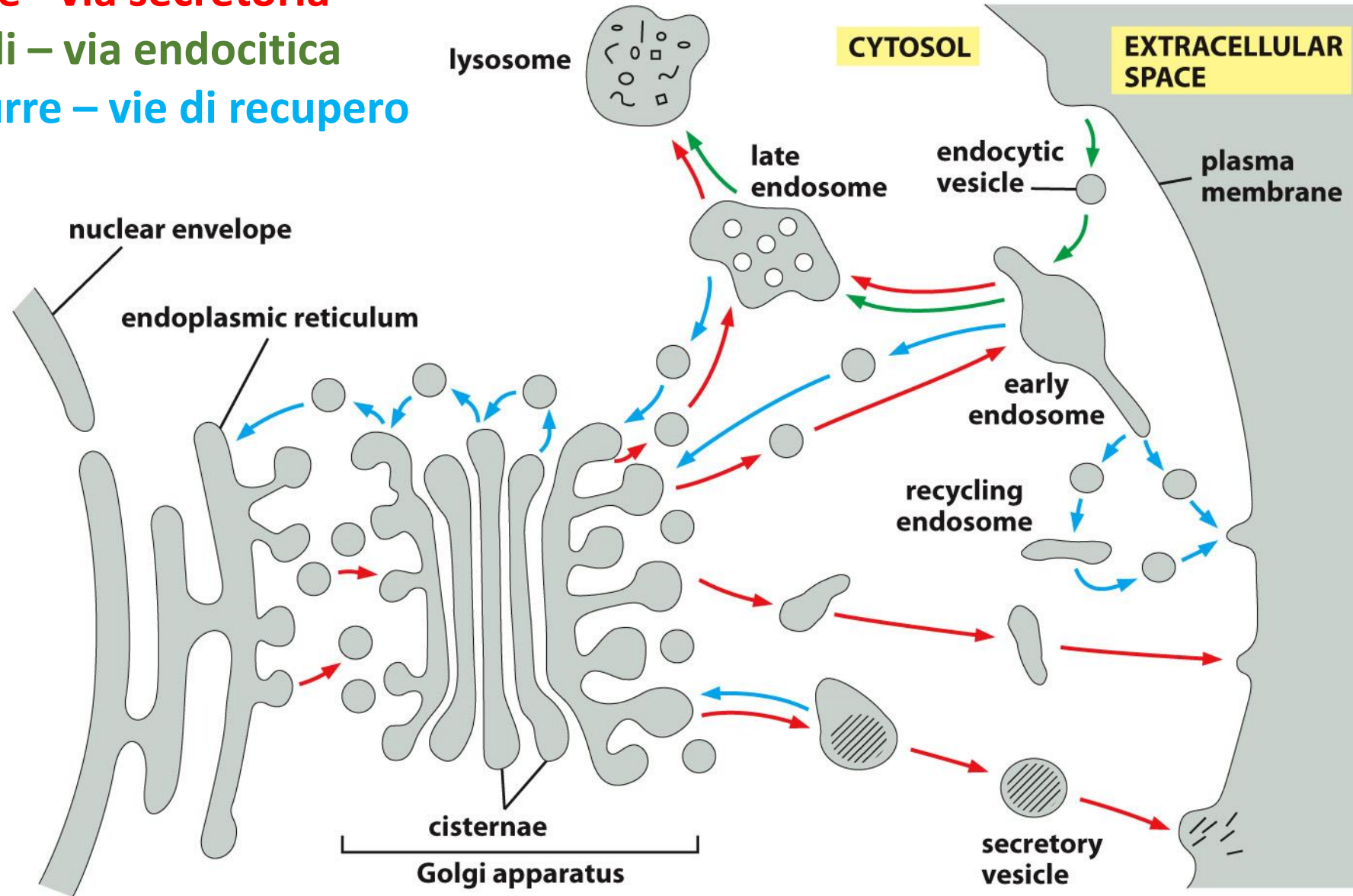
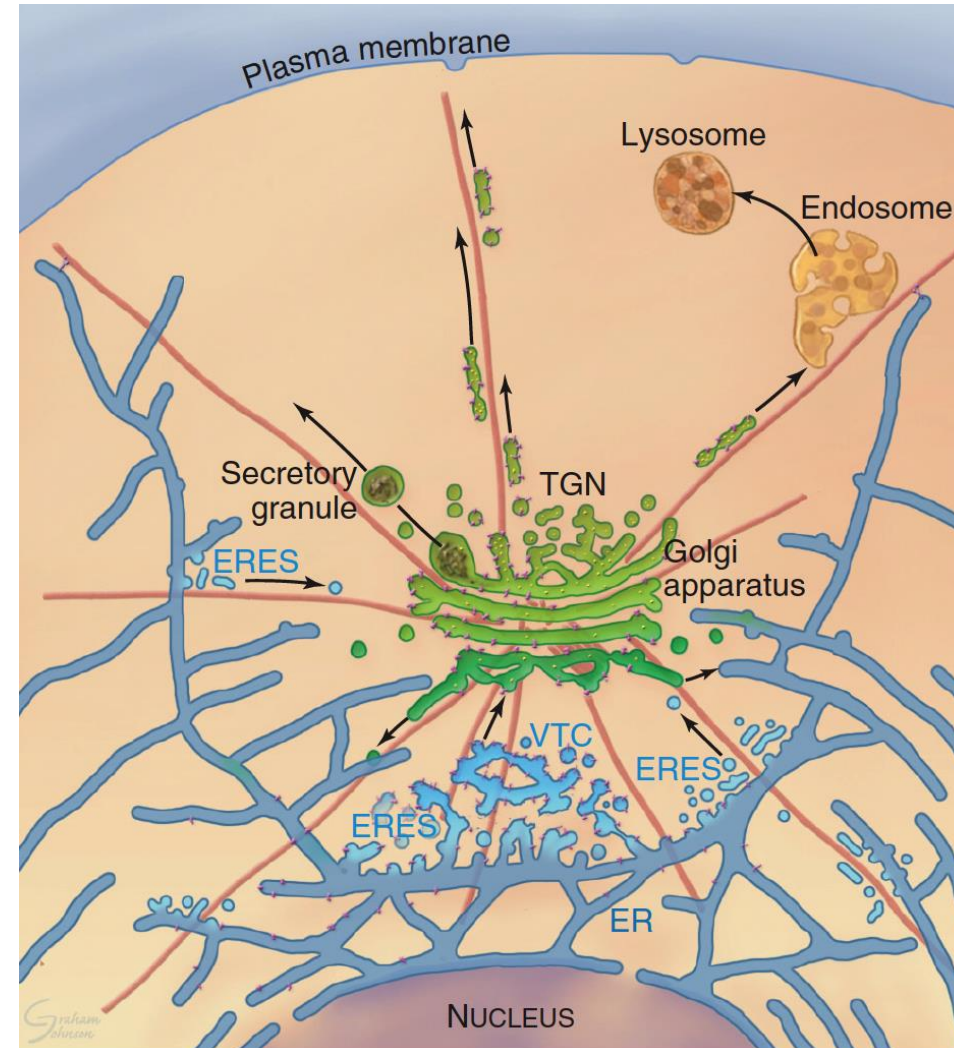


Figure 13-3b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Il traffico vescicolare ha 3 funzioni:

1. Distribuire proteine e lipidi sintetizzati sul RE
2. Modificare e immagazzinare proteine e lipidi
3. Mantenere l'identità dei diversi organelli



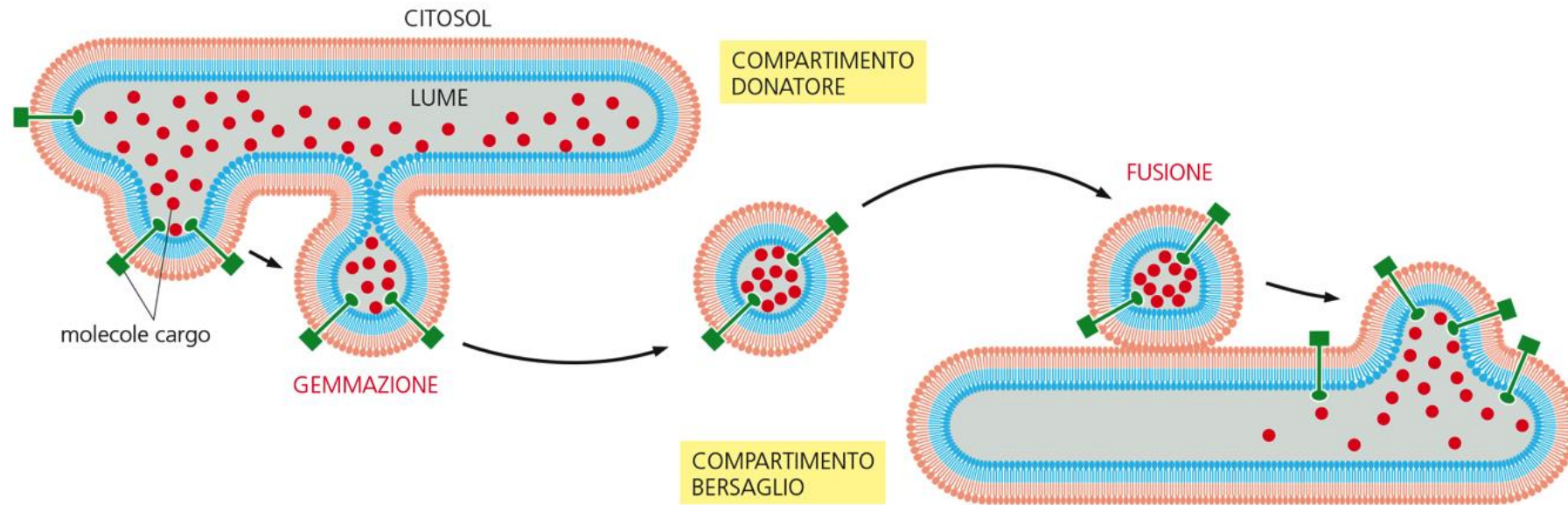
# SELETTIVITA'

In presenza di uno scambio massiccio di componenti tra 10 compartimenti diversi, come può ogni singolo componente mantenere la propria identità?

- Ciò è dovuto alla presenza di marcatori specifici e di combinazioni specifiche di marcatori su organelli e vescicole di trasporto
- Esiste un sistema di smistamento delle proteine sulla membrana, che crea regioni specializzate della membrana

Nelle cellule eucariotiche le **vescicole di trasporto** gemmano da una membrana e si fondono con un'altra.

L'insieme delle sostanze trasportate prende il nome di **cargo**.

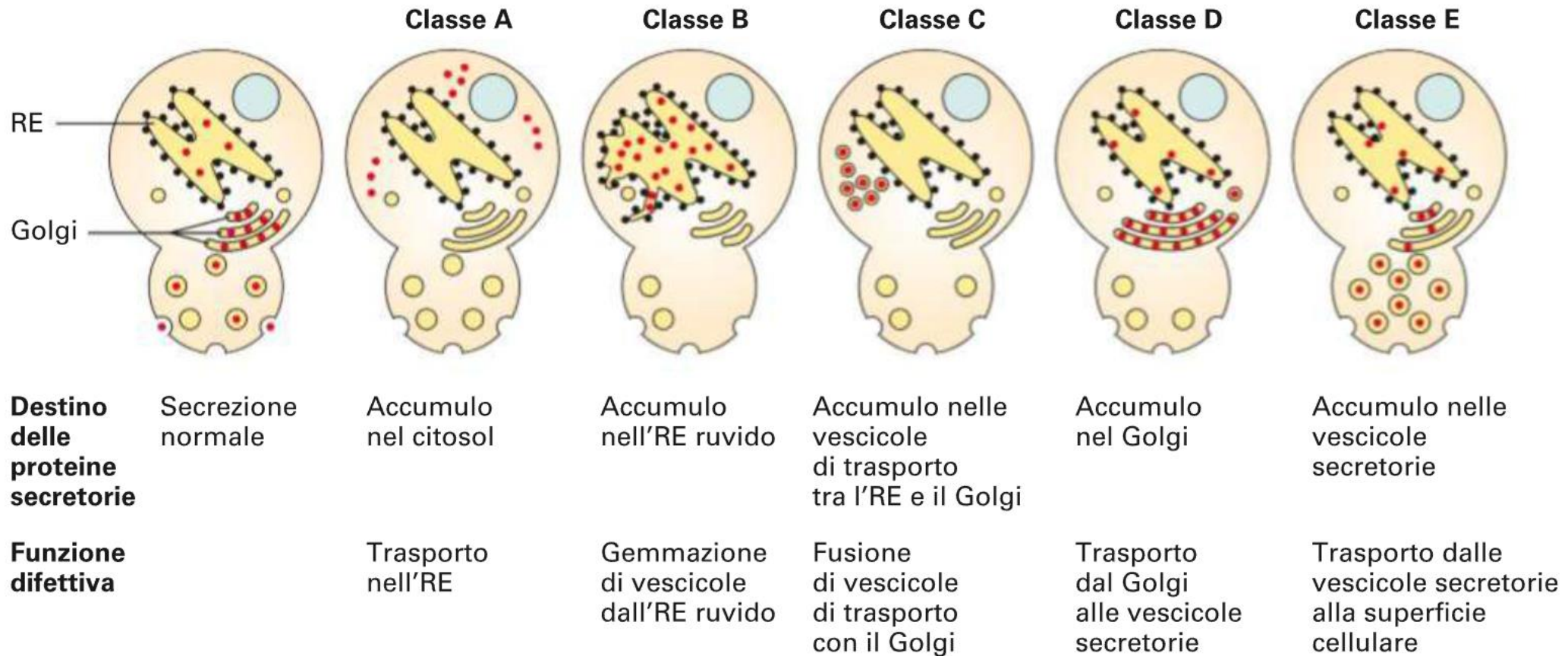


Il traffico vescicolare scorre lungo **percorsi direzionali**.

Le vescicole di trasporto sono **selettive**.

Il **lume** di ciascun compartimento è equivalente allo spazio extracellulare.

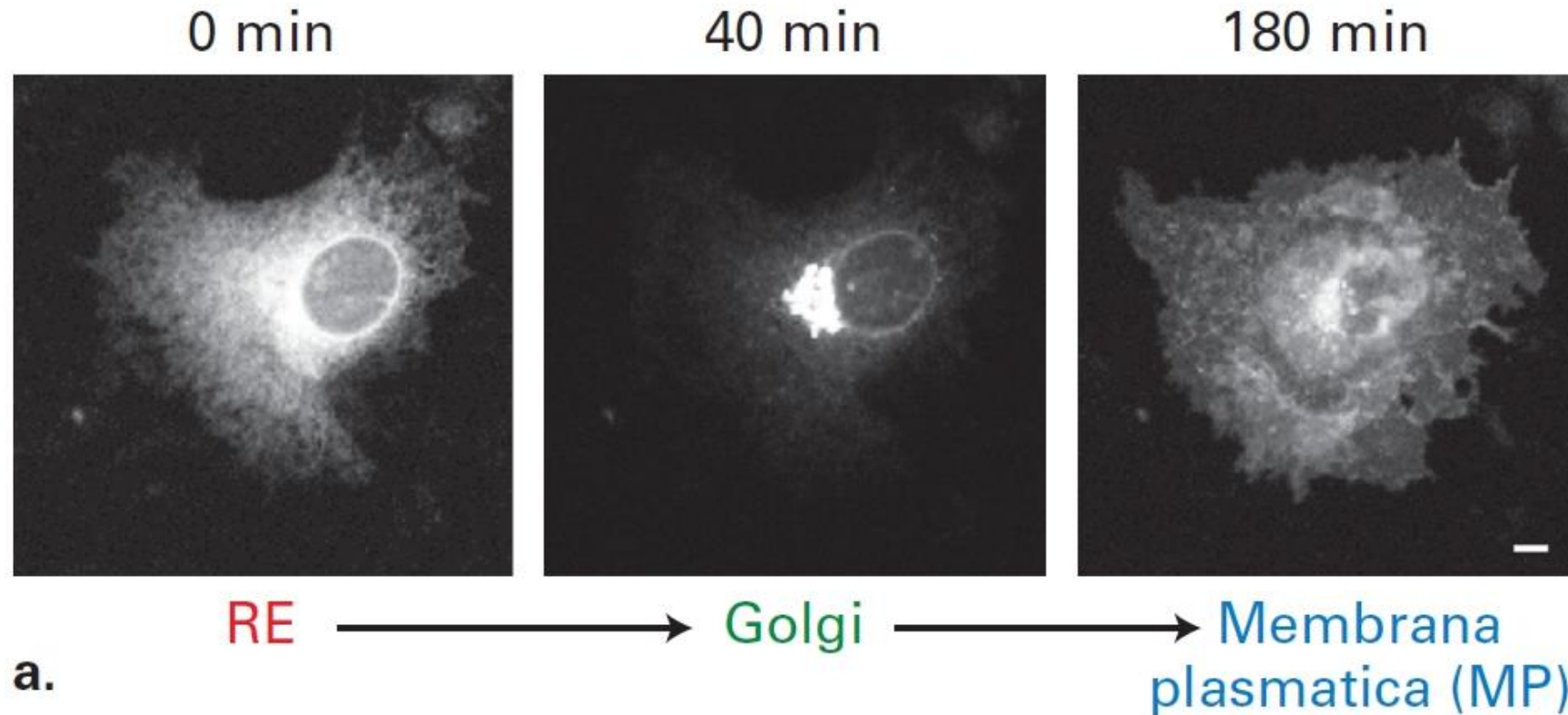
# Studi in lievito hanno chiarito molti aspetti del trasporto vescicolare



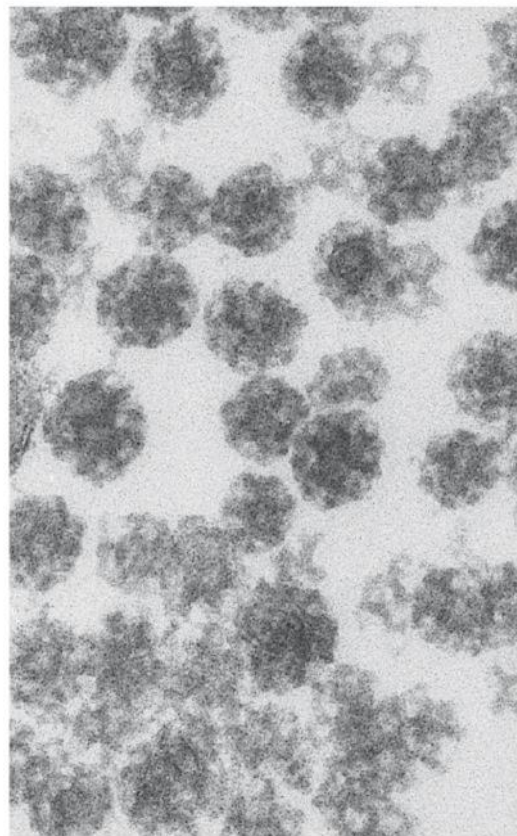
Mutanti temperatura sensibili (ts) in cui la secrezione è bloccata alla temperatura restrittiva in uno specifico punto → mutanti suddivisi in varie classi (A-E) a seconda di dove avveniva il blocco. L'utilizzo di doppi mutanti ha consentito di definire la sequenza degli eventi.



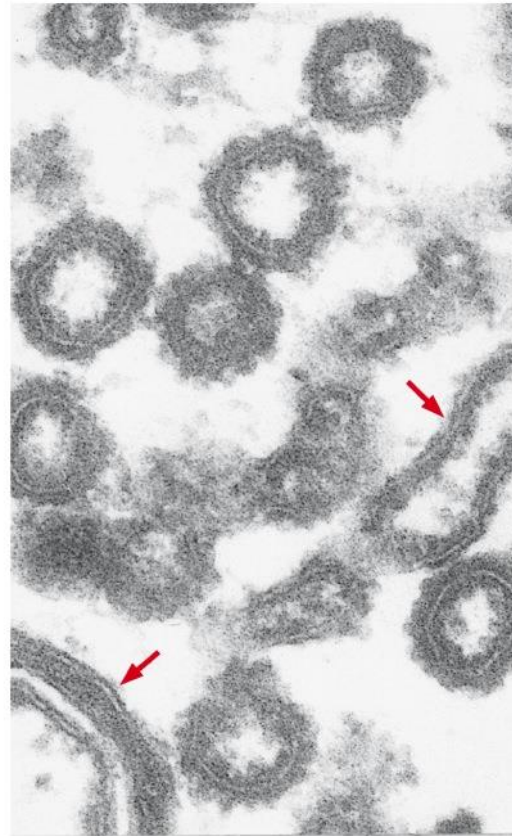
# Proteine di fusione con GFP per seguire il trasporto lungo la via secretoria



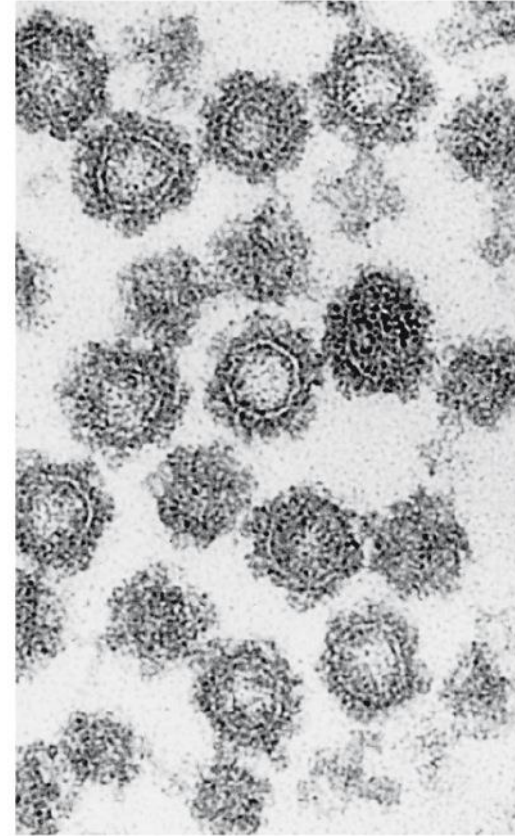
Il movimento di VSV-GFP dal reticolo endoplasmico alla membrana plasmatica richiede 180 minuti



(A) clatrina



(B) COPI



(C) COPII 100 nm

Le vescicole di trasporto gemmano come vescicole **rivestite** da una gabbia di proteine. Il rivestimento è diverso a seconda della direzione del trasporto.

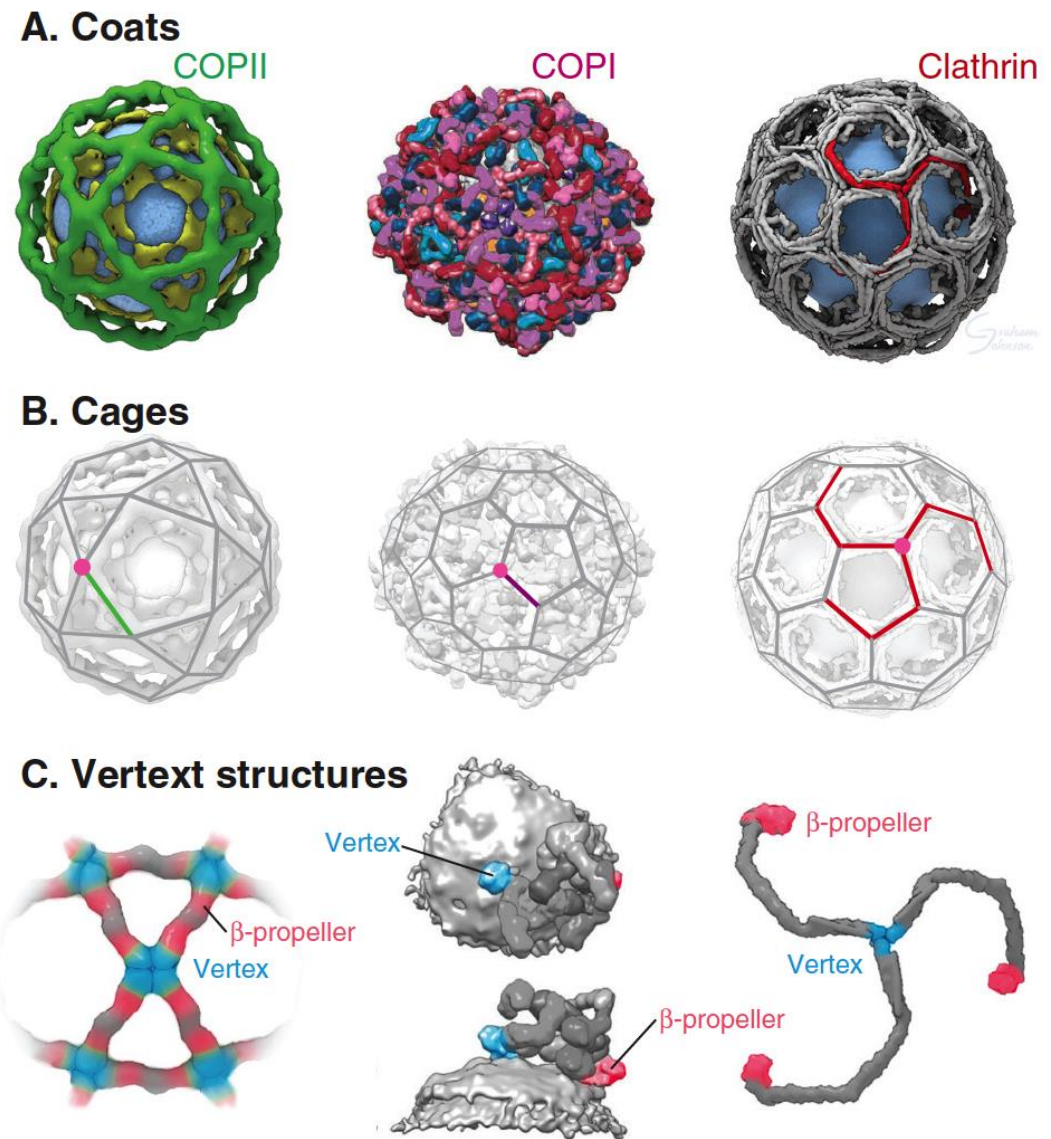
Il rivestimento viene scartato prima della fusione della vescicola con un'altra membrana.

Il rivestimento interno concentra proteine di membrana in una zona specializzata e seleziona le molecole che finiranno nella vescicola.

Lo strato esterno forma il reticolo a canestro modellando la vescicola.

Ci sono 3 tipi di vescicole rivestite:

1. Vescicole rivestite di **clatrina**
2. Vescicole rivestite di **COPI**
3. Vescicole rivestite di **COPII**



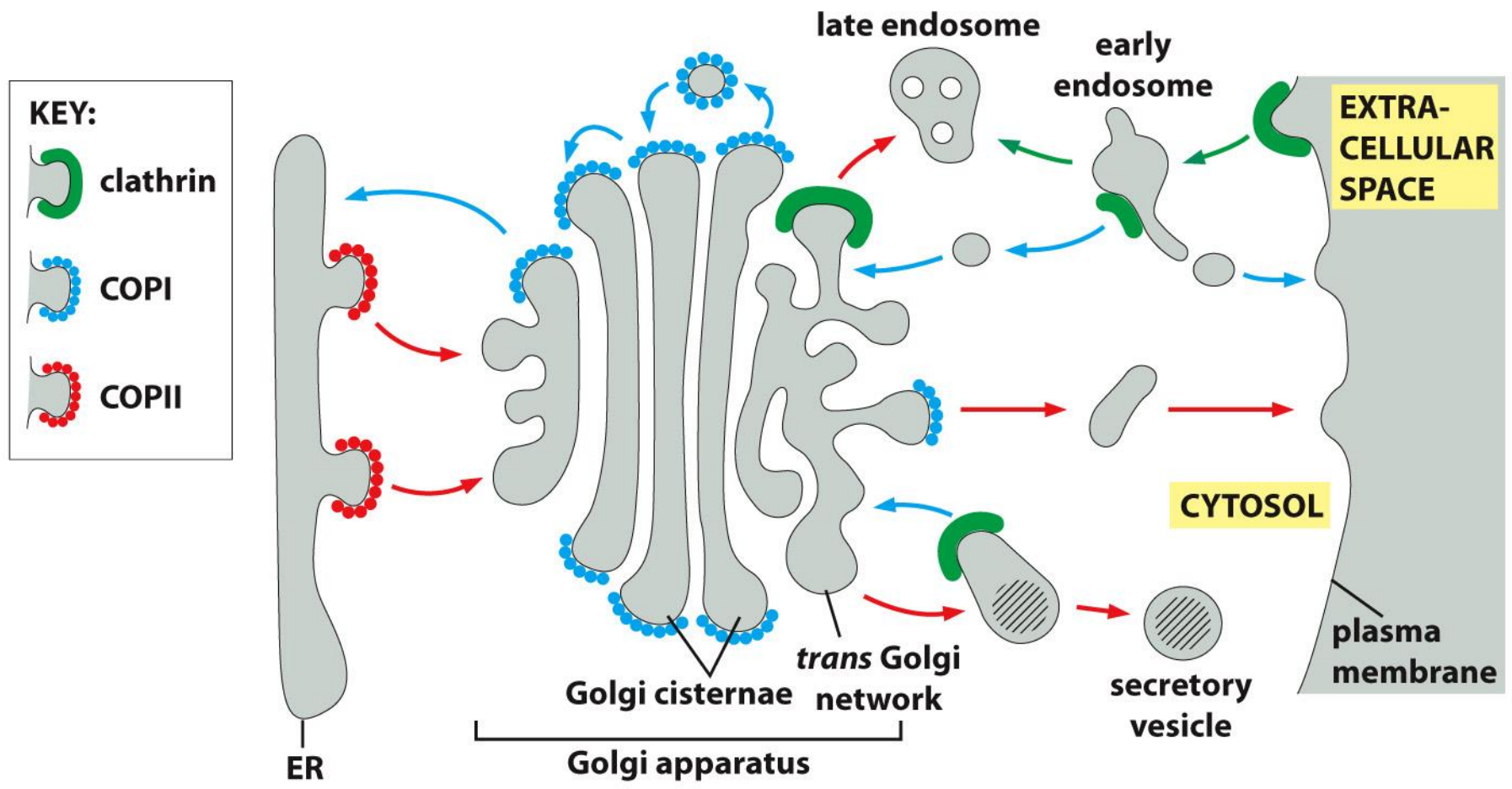


Figure 13-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

I 3 tipi di vescicole rivestite sono coinvolti in vie diverse:

Vescicole rivestite di **clatrina** – tra la membrana plasmatica, gli endosomi e il Golgi

Vescicole rivestite di **COPI**

Vescicole rivestite di **COPII**

} Tra RE e Golgi, nelle due diverse direzioni

# Vescicole rivestite di clatrina

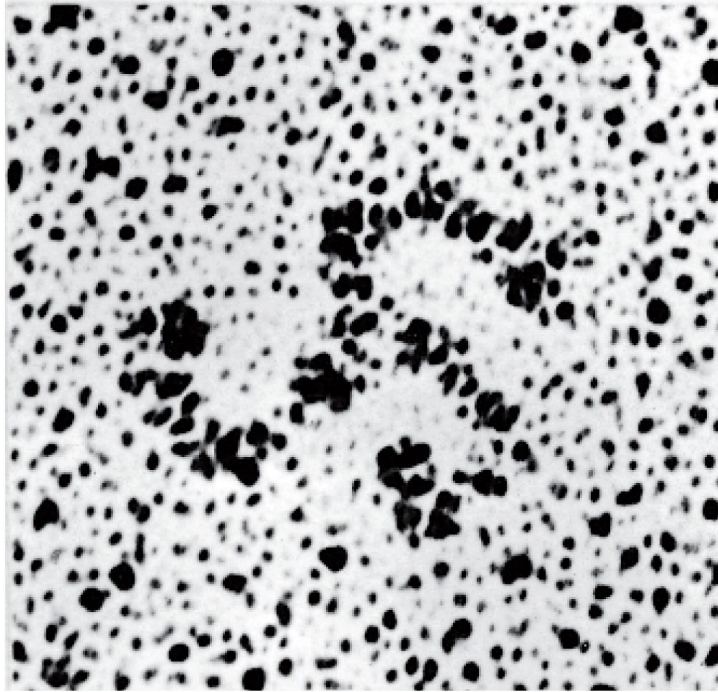


Figure 13-6a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

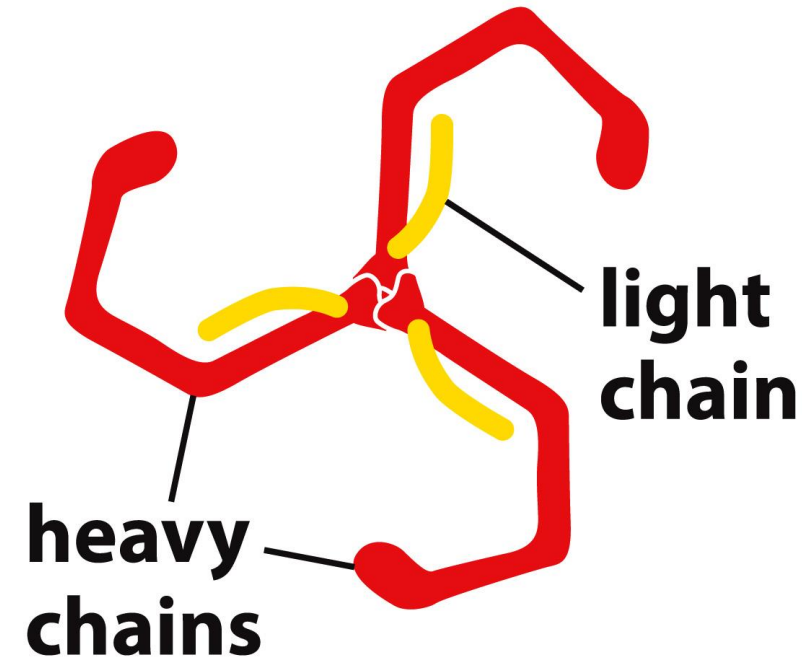


Figure 13-6b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

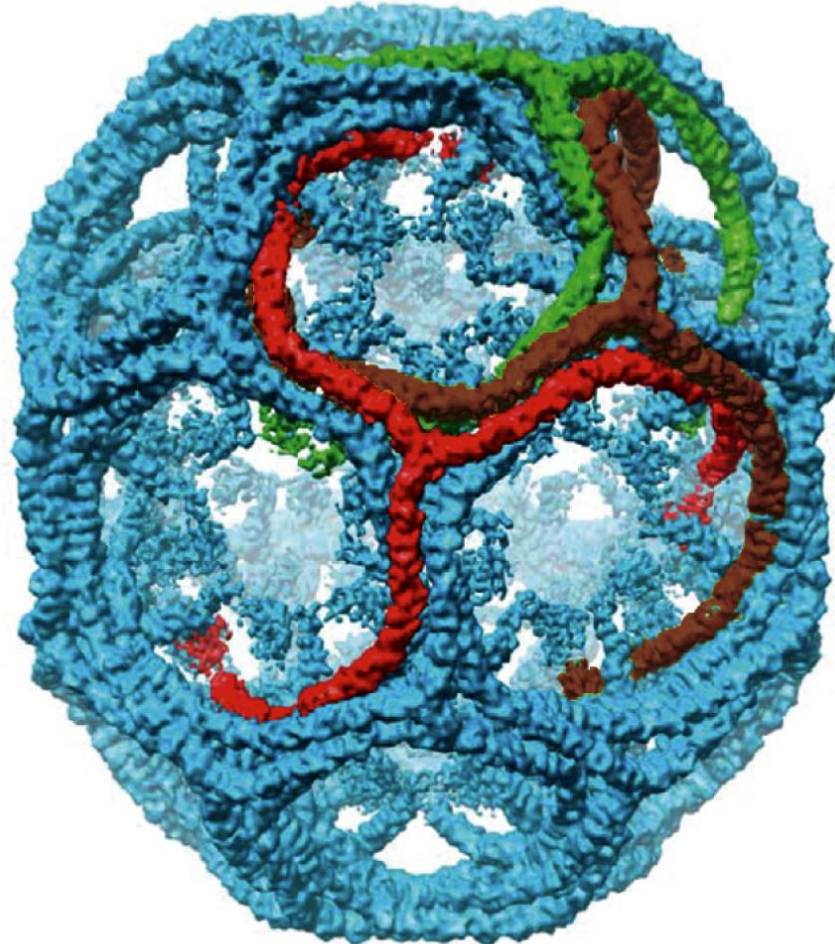
Sono le prime vescicole ricoperte ad essere state scoperte.

La proteina principale è la **clatrina**.

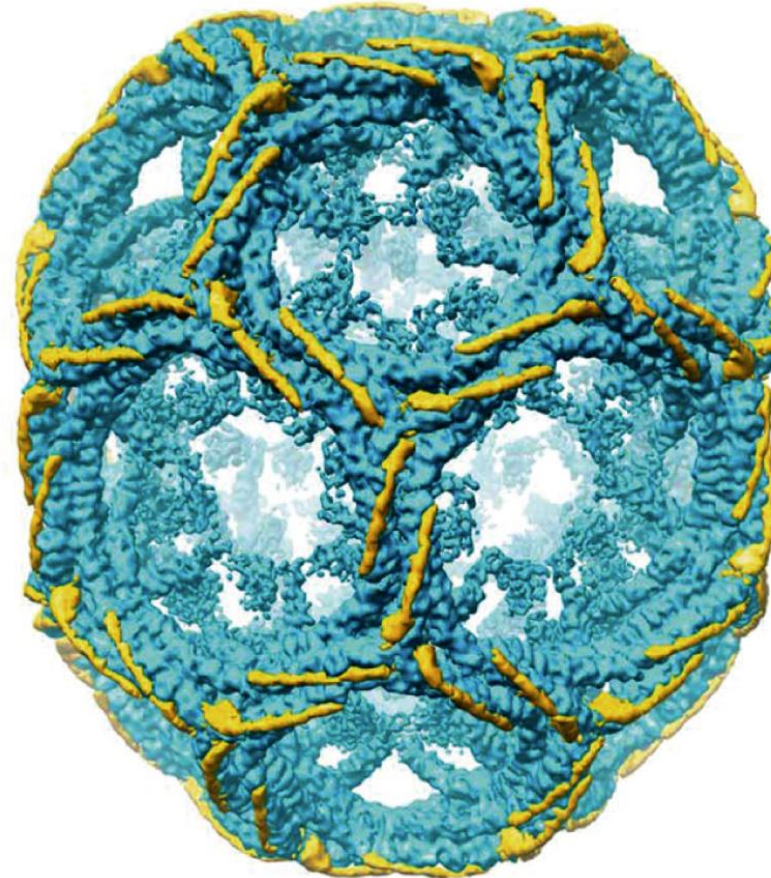
Ogni subunità è fatta da 3 catene polipeptidiche grandi (190 kDa) e 3 piccole (30 kDa), che formano una struttura a 3 gambe detta **trischelio**.

I trischeli si auto-assemblano in una struttura a canestro, costituita da pentagoni e esagoni, che dà origine a fosse/gemme rivestite, sulla membrana.

**Catene pesanti**

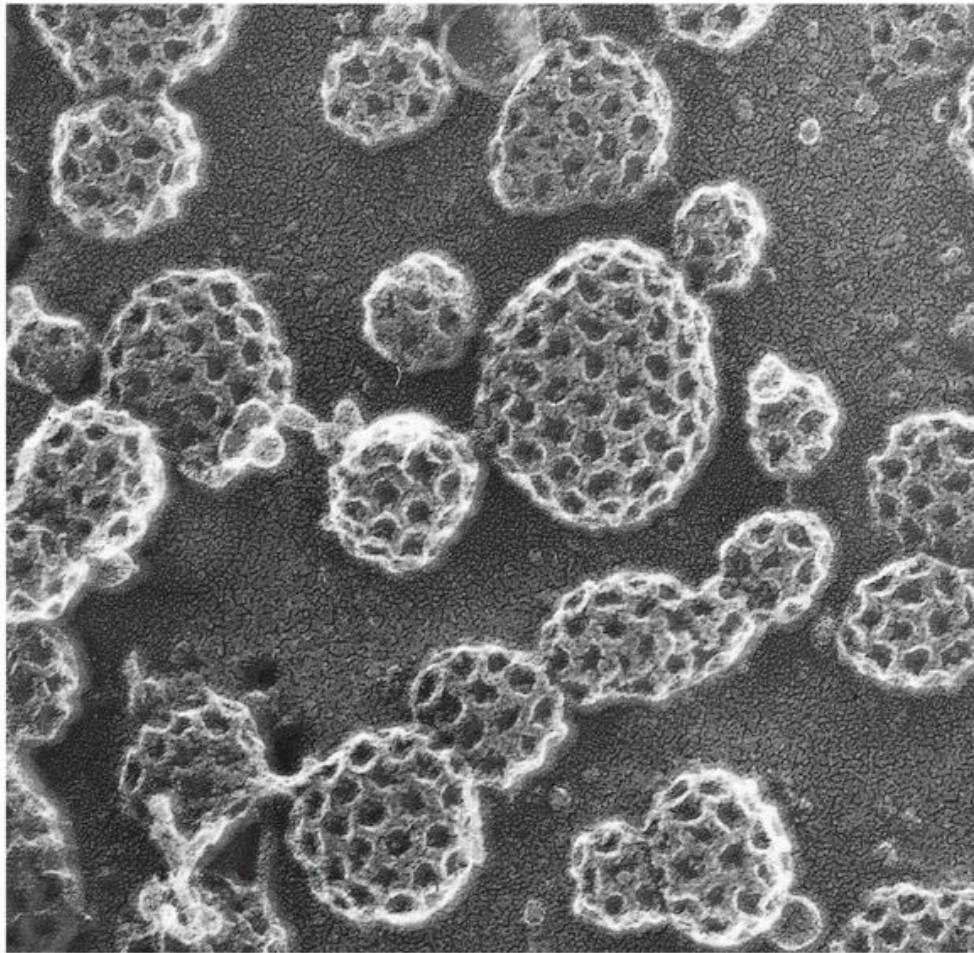


**Catene leggere**



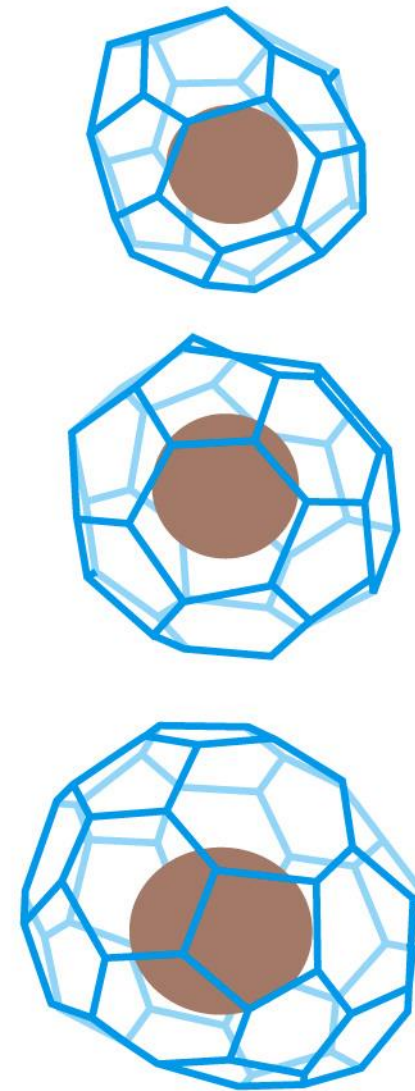
Le catene leggere legano il citoscheletro di actina e questo aiuta la gemmazione. La fosforilazione delle catene leggere regola l'assemblaggio del rivestimento di clatrina.

25 nm



0,2  $\mu\text{m}$

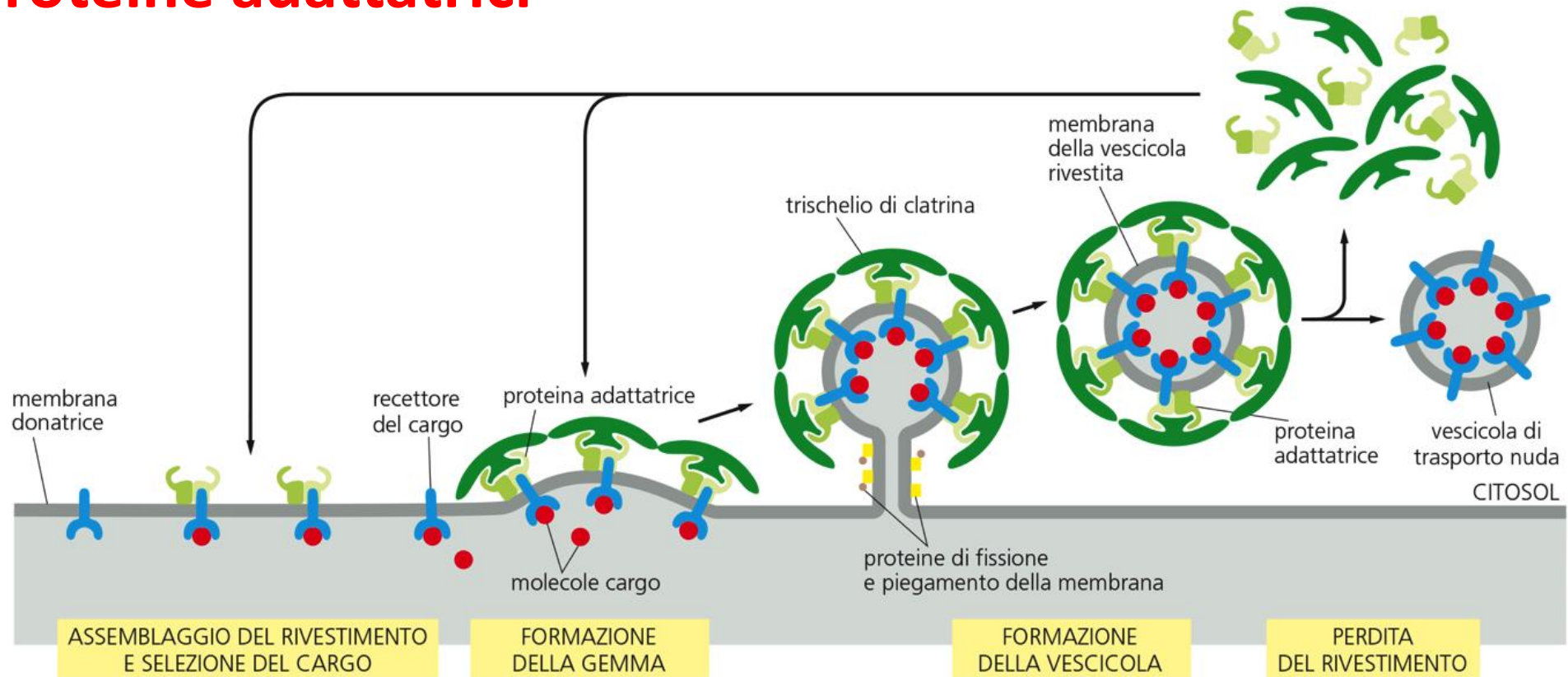
La geometria delle gabbie di clatrina è determinata solo dal trischelio.



50 nm

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

# Le proteine adattatrici



L'assemblaggio della clatrina induce curvatura della membrana.

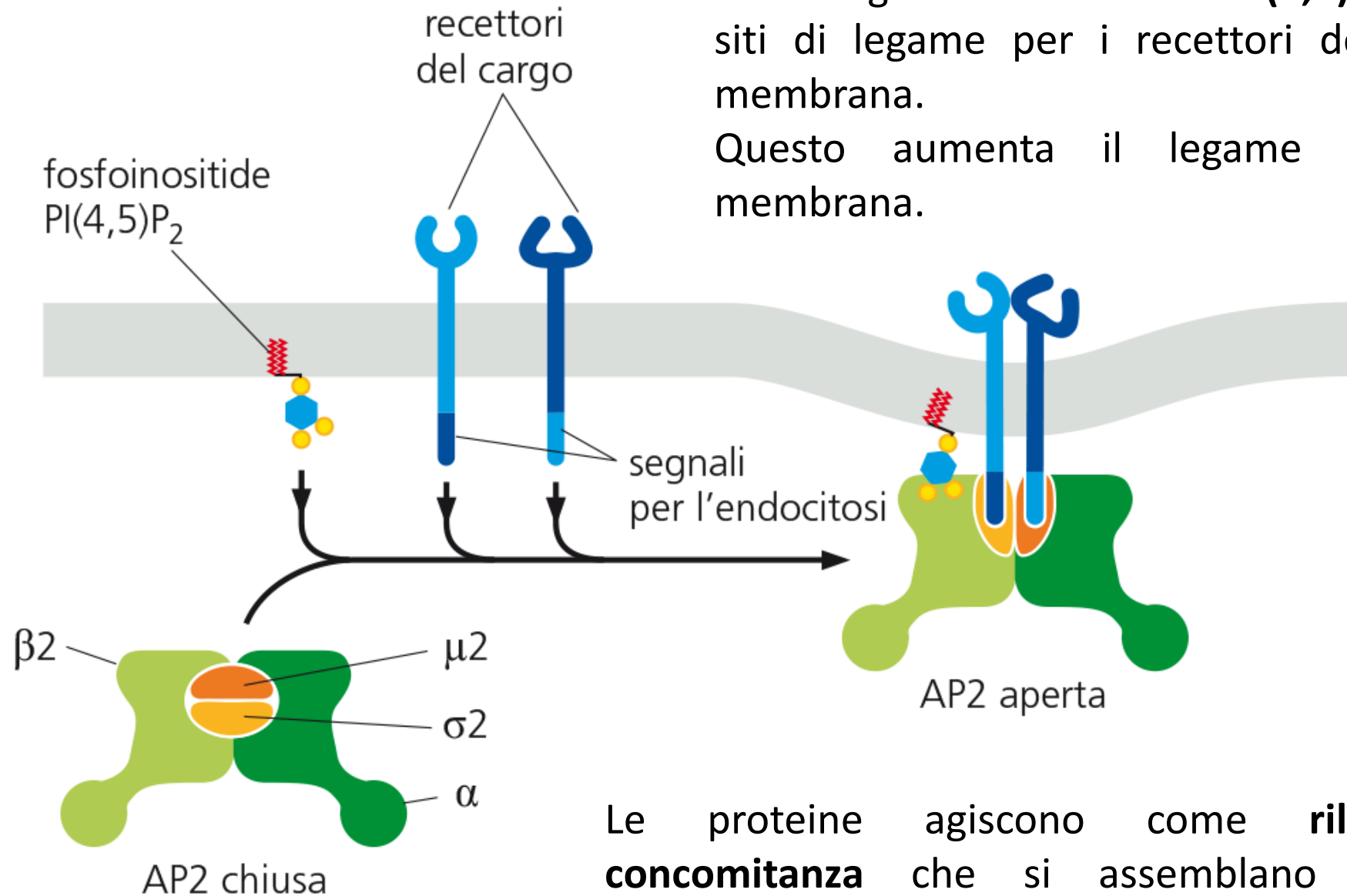
Le proteine adattatrici formano uno strato tra la gabbia di clatrina e la membrana.

Legano la clatrina alla membrana e intrappolano proteine transmembrana tra cui i **recettori del cargo**. Di fatto quindi selezionano i recettori e i loro cargo.

Esistono diverse proteine adattatrici, specifiche per diversi recettori del cargo.



## La proteina adattatrice AP2



AP2 si lega al **fosfoinositide PI(4,5)P<sub>2</sub>** ed espone i siti di legame per i recettori del cargo sulla membrana.

Questo aumenta il legame di AP2 alla membrana.

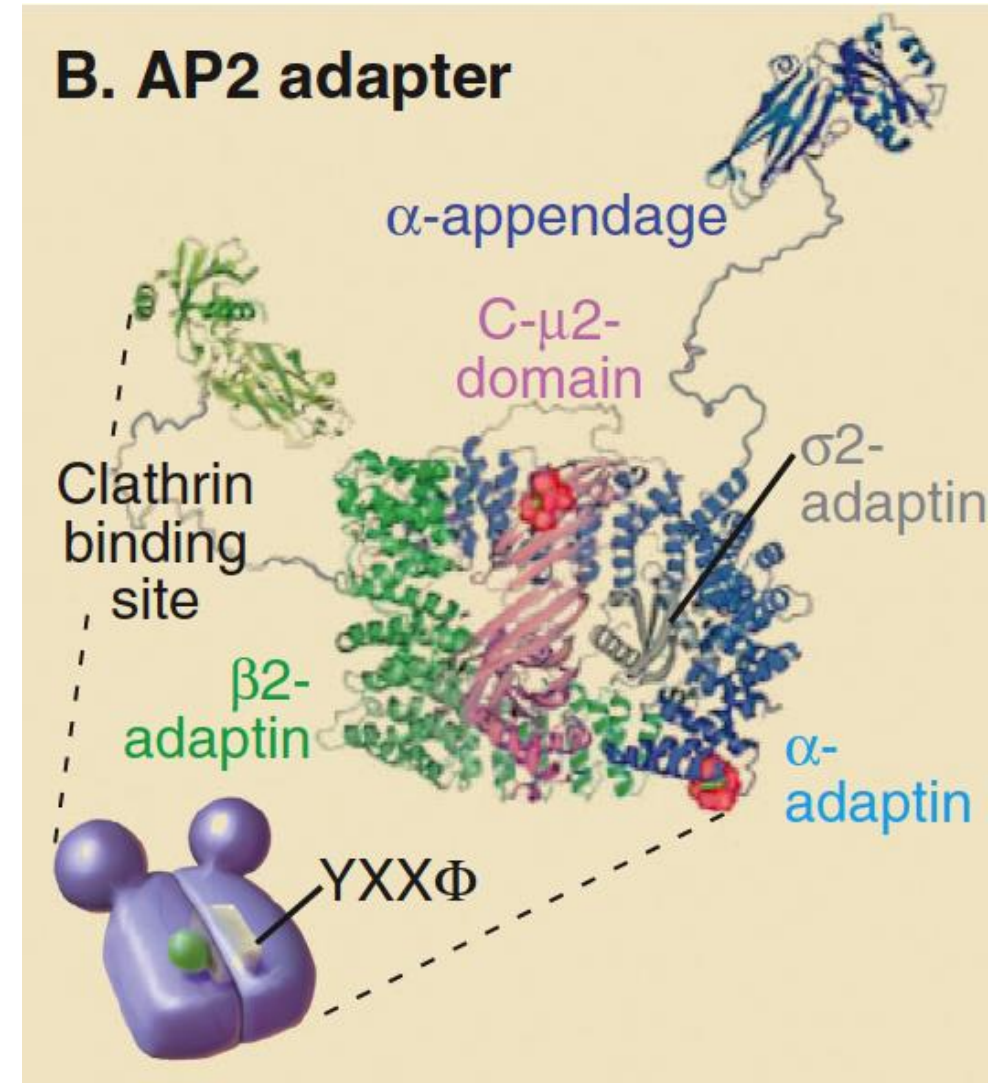
Le proteine agiscono come **rilevatori di concomitanza** che si assemblano solo nella posizione e nel momento opportuno.

AP2 è un complesso tetramerico le cui subunità hanno funzioni diverse:

La subunità  $\alpha$  (adaptina) lega il PI(4,5)P<sub>2</sub> e coopera con la subunità  $\sigma$  nel legame al **motivo di internalizzazione D/EXXXLL** sulla coda citoplasmatica dei recettori transmembrana.

La subunità  $\beta$ 2 lega la clatrina.

La subunità  $\mu$ 2 lega un altro motivo di internalizzazione sui recettori transmembrana.



# I fosfoinositidi (PIP)

I fosfoinositidi rappresentano <10% dei lipidi di membrana e hanno importanti funzioni regolatorie. Essi infatti agiscono come marcatori di organelli e domini di membrana.

Possono subire fosforilazioni e defosforilazioni nelle posizioni 3, 4 e 5 sulla testa dello zucchero inositolo.

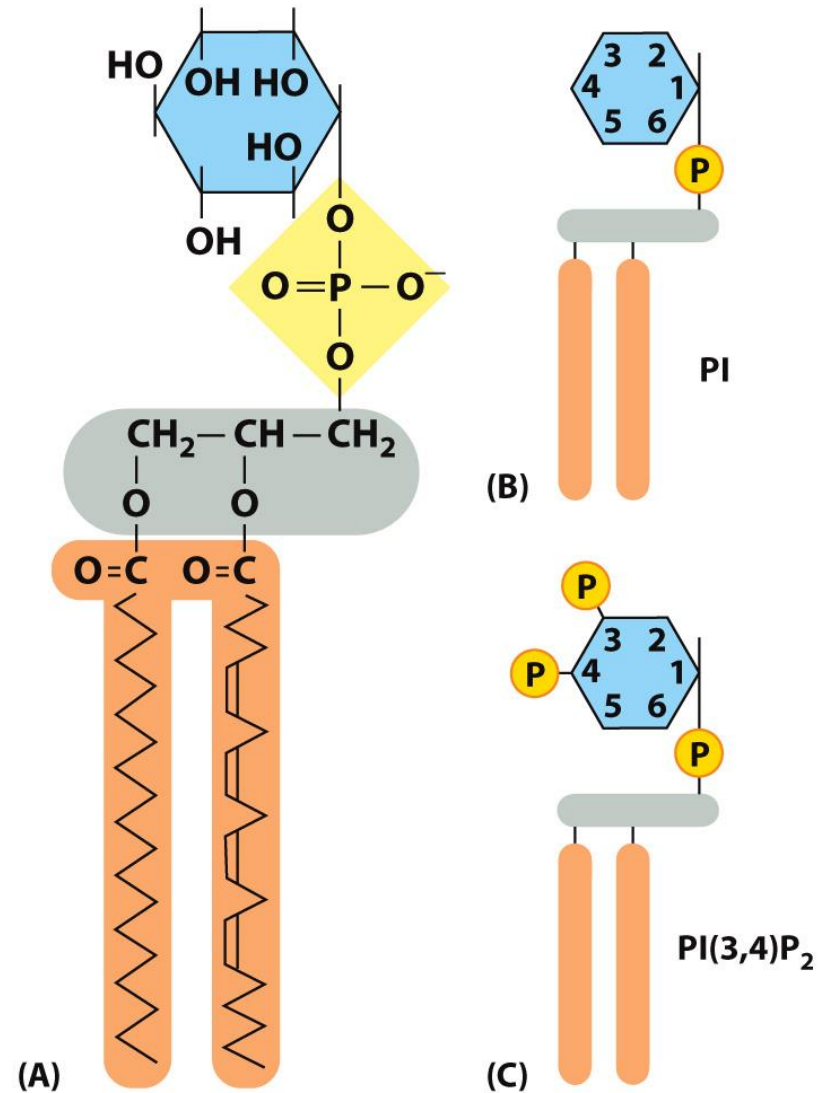


Figure 13-10 (part 1 of 3) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

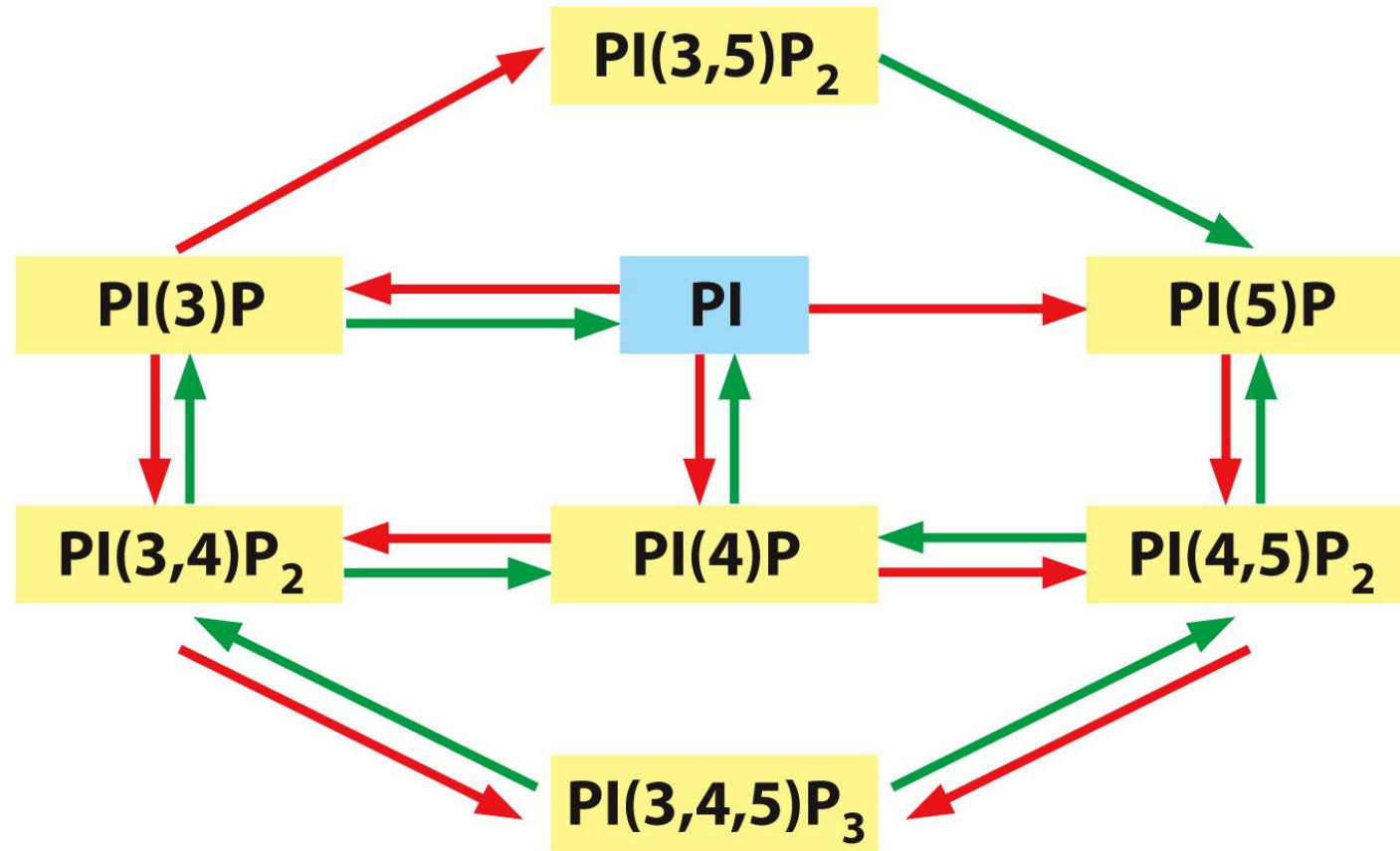
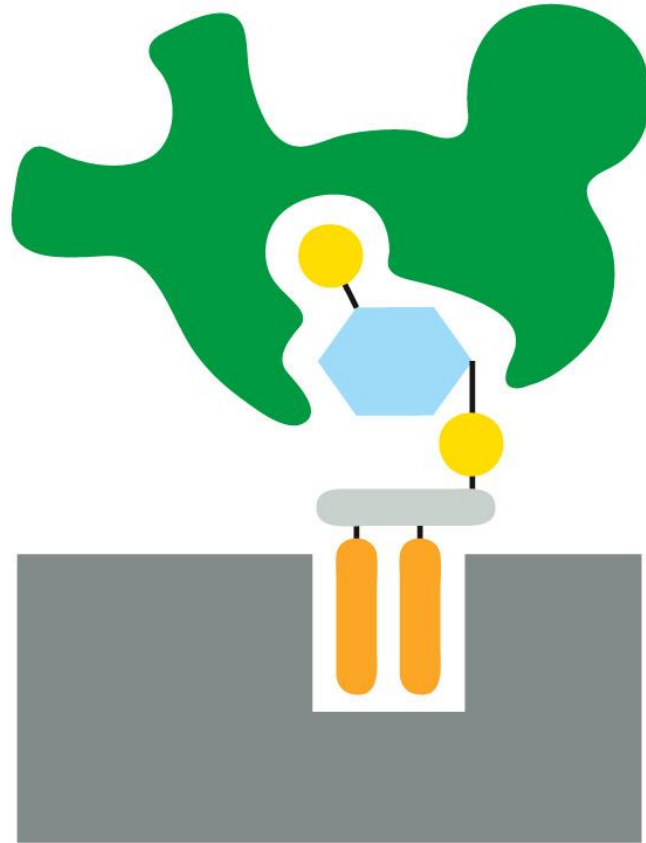


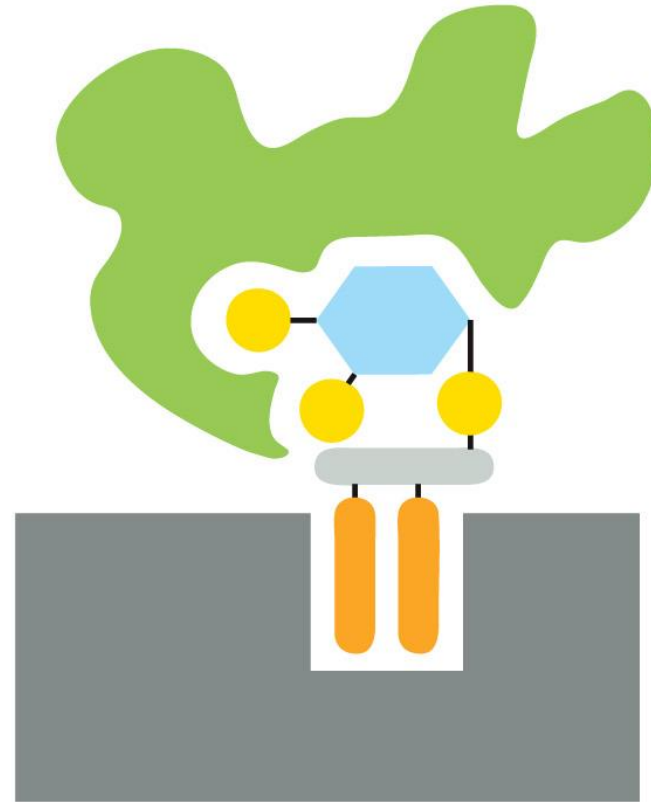
Figure 13-10 (part 2 of 3) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Le diverse forme sono compartimentalizzate in diversi organelli, in quanto lo sono le rispettive chinasi e fosfatasi

Le teste polari fosforilate dei fosfoinositidi sono riconosciute da domini proteici che distinguono le diverse forme (ex. AP2 lega PI(4,5)P2).



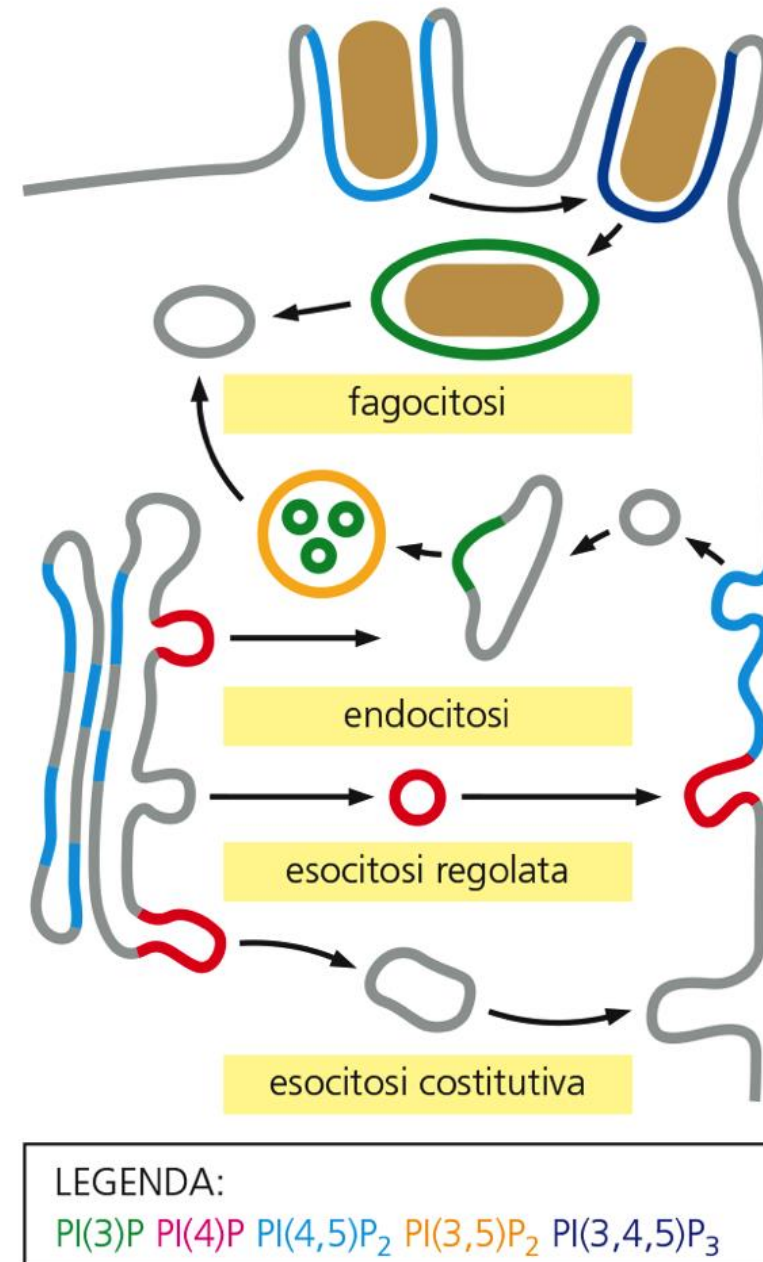
**(E)**



**(F)**

Le proteine che legano PIP contribuiscono alla regolazione della formazione di vescicole di trasporto e al trasporto vescicolare.

**Tipi diversi di PIP sono localizzati in membrane/domini diversi e associati a trasporti vescicolari specifici, contribuendo quindi alla specificità dei diversi tipi di trasporto vescicolare.**



# Proteine BAR:

## proteine che curvano la membrana

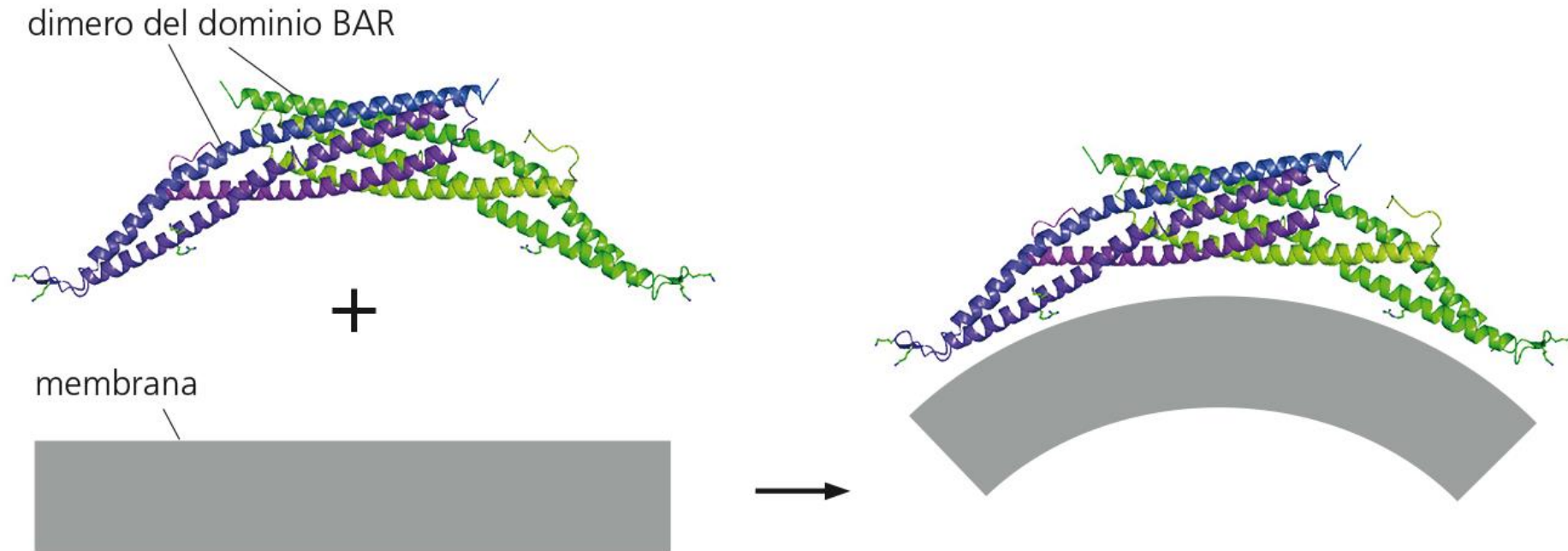
Alla gemmazione della vescicola dalla membrana contribuiscono le proteine che piegano la membrana, chiamate **proteine BAR**, che contengono domini BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs).

I domini BAR sono costituite da 3  $\alpha$ -eliche coiled-coil di 20 nm di lunghezza, che possono agire con due modalità:

1. La loro curvatura induce la curvatura della membrana
2. Sono eliche anfipatiche che si incuneano nella membrana curvandola

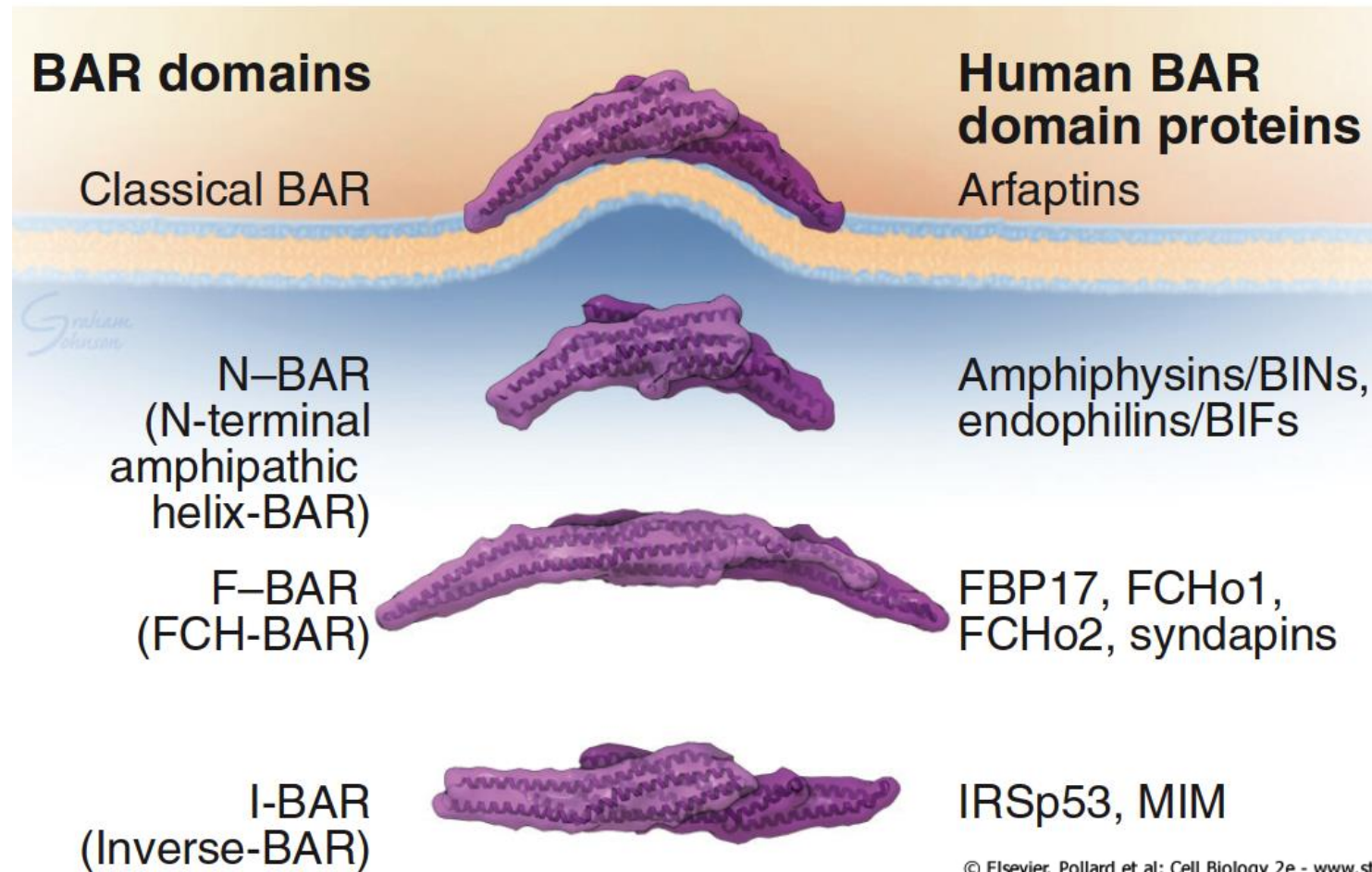
I 2 meccanismi non sono mutualmente esclusivi

1. Alcune proteine BAR si legano alla membrana e la curvano mediante interazioni elettrostatiche con la testa dei lipidi





2. Altre contengono delle eliche anfipatiche che si inseriscono come cuneo nel foglietto citoplasmatico della membrana inducendo la curvatura.  
Alcune sono importanti per dare forma al collo della vescicola

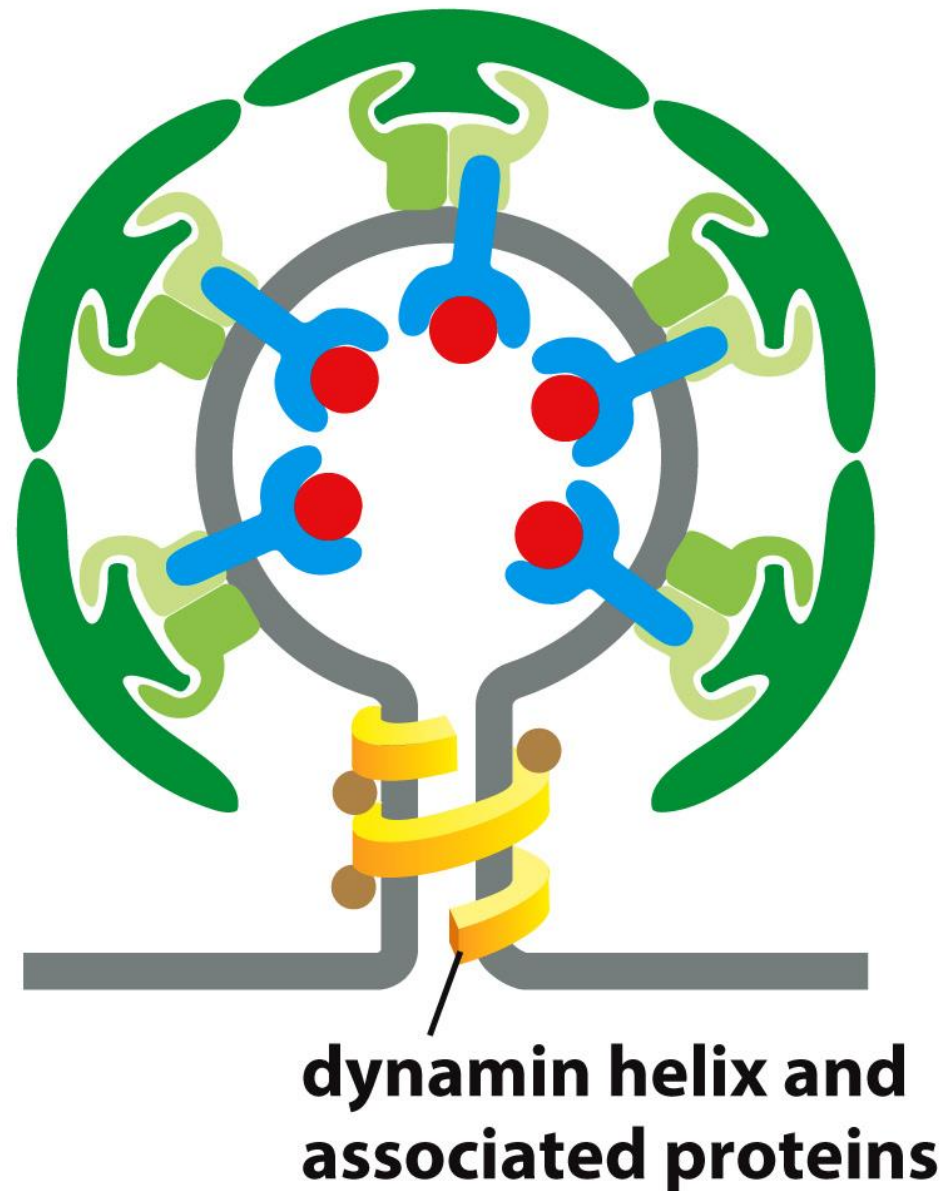


## La dinamina

Alcune proteine citoplasmatiche si assemblano attorno al **colletto della gemma**.

La dinamina si lega a spirale al colletto della gemma, promuovendo il rilascio della vescicola.

La dinamina lega il  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , legandosi così alla membrana, e ha attività GTPasica, che regola la velocità con cui le vescicole si distaccano dalla membrana.



# Un cambiamento conformazionale nel dominio GTPasico della dinamina permette il distacco della gemma

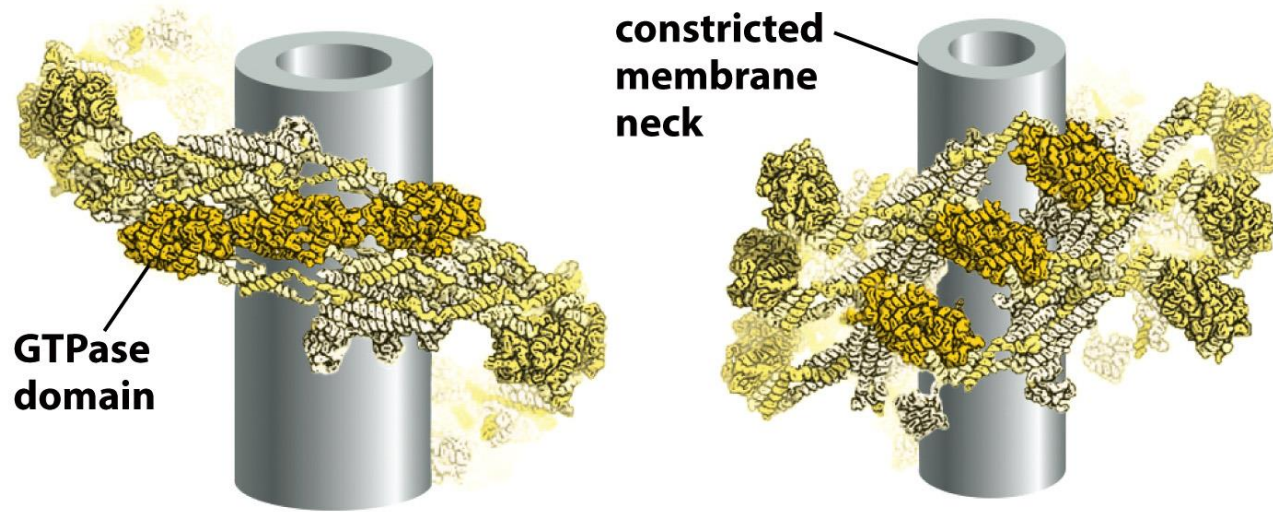


Figure 13-13c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

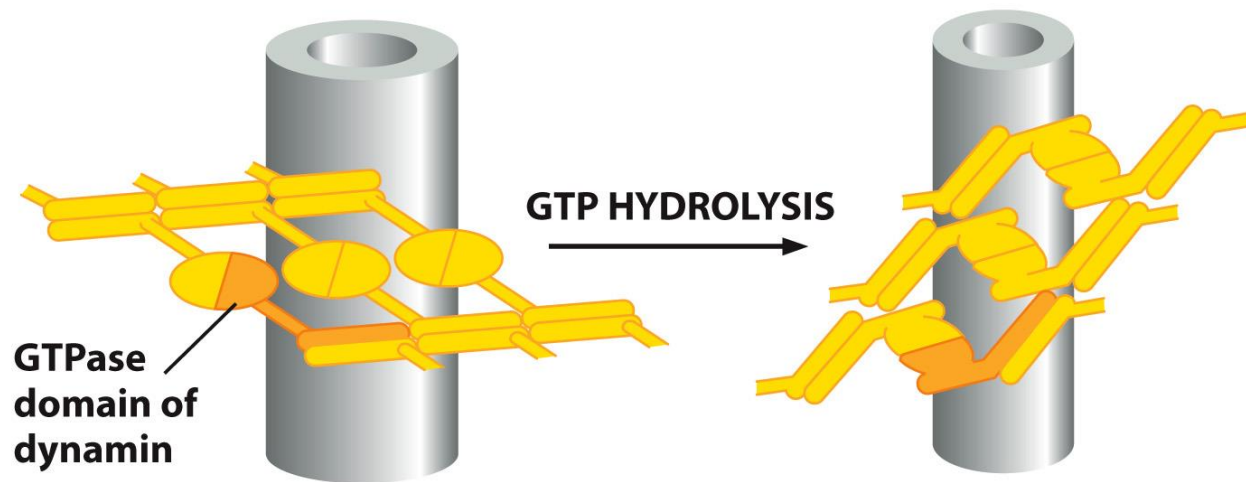


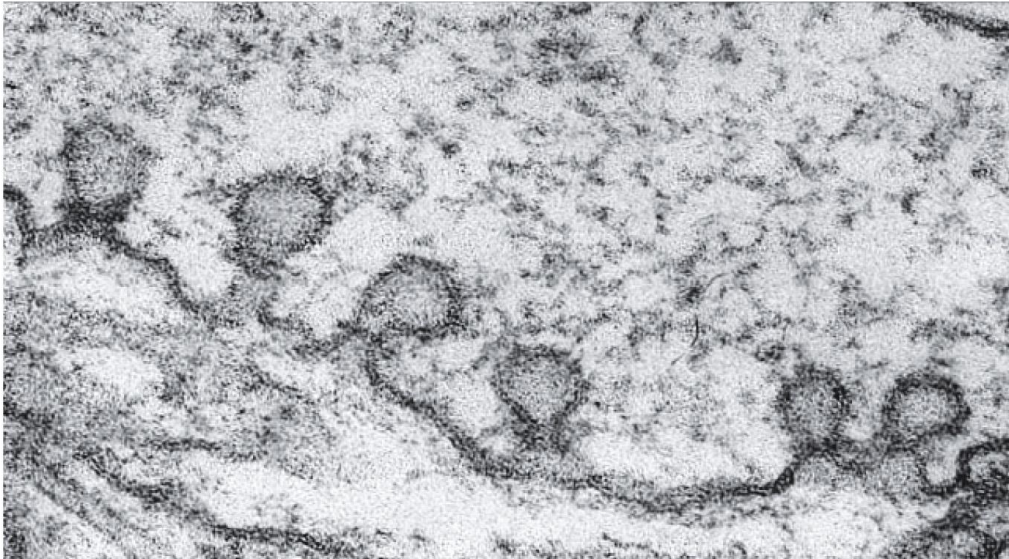
Figure 13-13d Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

La dinamina recluta altre proteine che distorcono il doppio strato lipidico o modificando i lipidi che lo compongono. Questo aiuta la curvatura nella membrana e permette ai foglietti non citosolici della membrana di avvicinarsi e fondersi, così da portare al rilascio della vescicola.

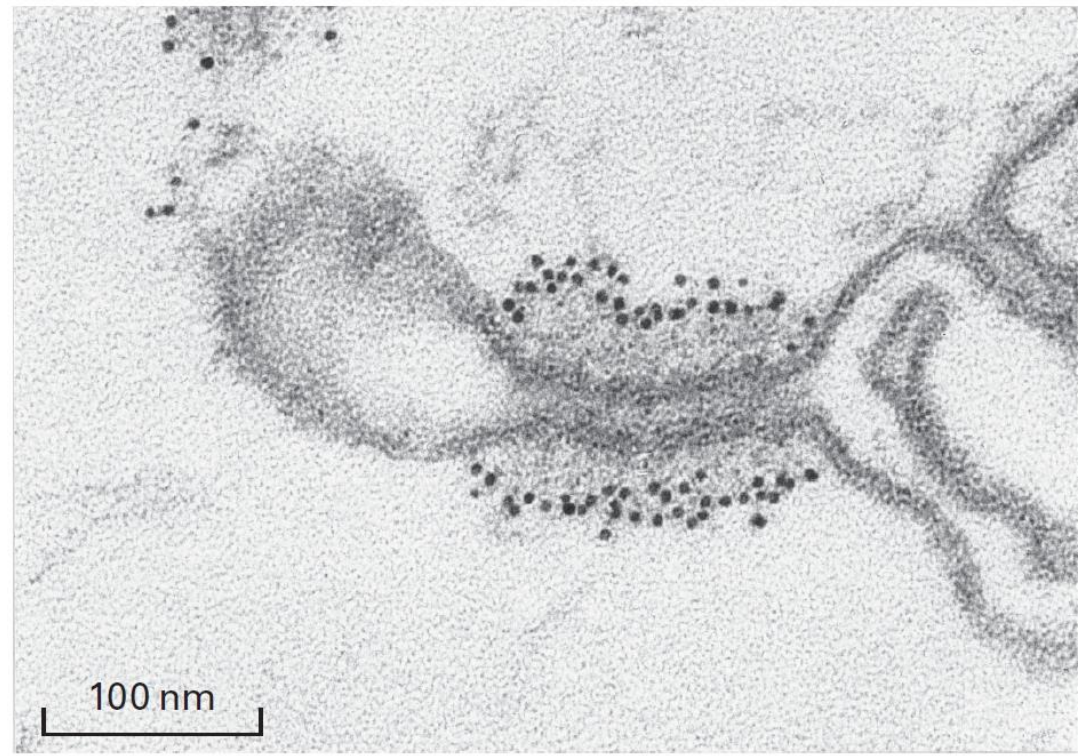
L'attività GTPasica della dinamina regola la velocità con cui le vescicole si distaccano dalla membrana.

## L'idrolisi del GTP è essenziale per il distacco della vescicola

In presenza di un analogo non idrolizzabile del GTP (GTP- $\gamma$ -S) si formano queste vescicole dal collo strozzato e molto lungo, circondato da dinamina, che però non riescono a staccarsi dalla membrana donatrice.



200 nm



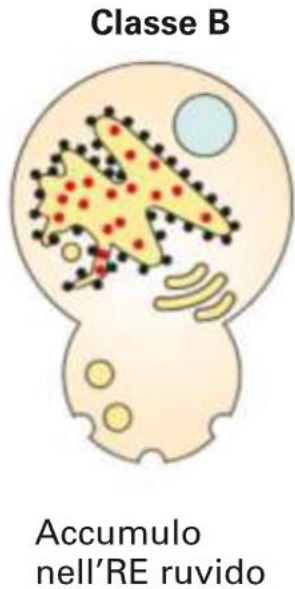
**Mutanti nella dinamina di *D. melanogaster***

## Perdita del rivestimento di clatrina

- Dopo il rilascio della vescicola il rivestimento di clatrina viene perso, grazie all'attività ATPasica di una **Hsp70** che distacca la clatrina, con consumo di ATP.
- Inoltre una **fosfatasi** elimina il PI(4,5)P2 dalla membrana, indebolendo il legame delle proteine adattatrici.
- La vescicola nuda potrà poi fondersi col compartimento bersaglio.

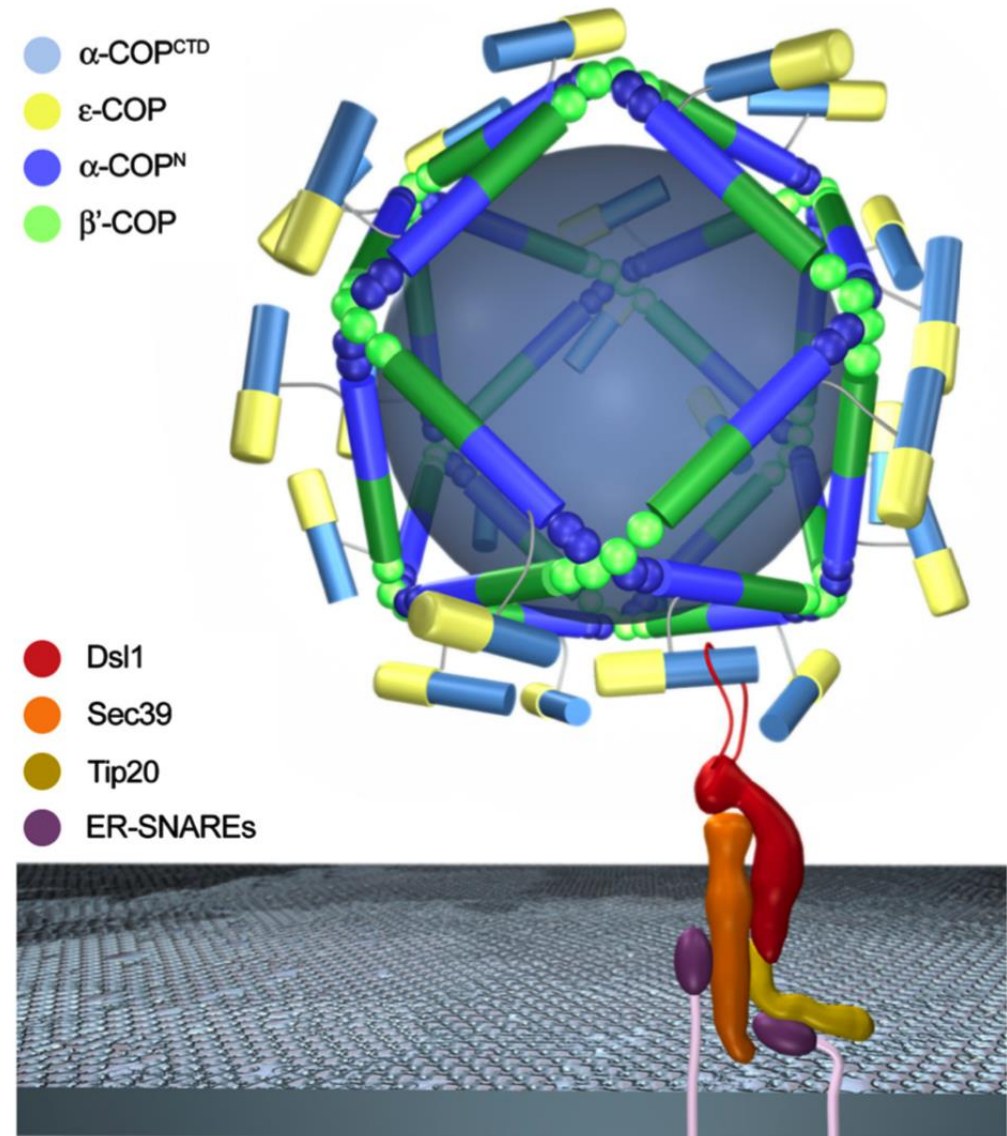
# Vescicole rivestite di COPI

Vescicole di COPI identificate in lievito come mutanti di classe B (accumulo di proteine nel RE). Inizialmente si pensava che servissero per trasportare le proteine dal RE al Golgi, poi si è scoperto che agiscono in senso anterogrado. In realtà bloccando COPI, il RE si impoverisce di proteine come le v-SNARE richieste per il trasporto anterogrado mediato da COPII, quindi l'effetto sembrava analogo (blocco di proteine nel RE).



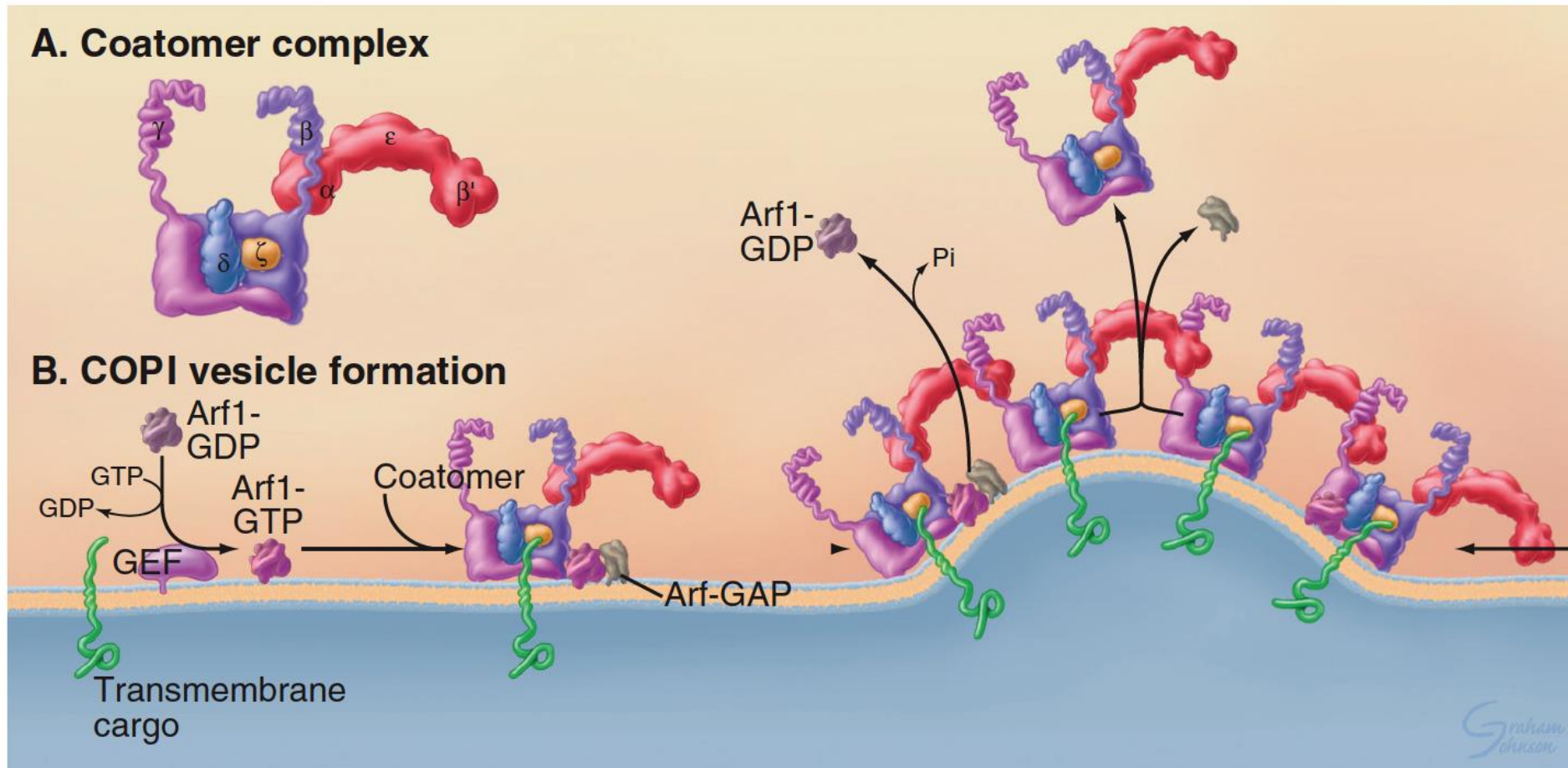
Le COPI (Coated Proteins I) sono costituite da **coatomeri**, grandi complessi polipeptidici che si assemblano in un complesso eterotrimerico a gabbia.

Coinvolte nel trasporto retrogrado Golgi → RE.



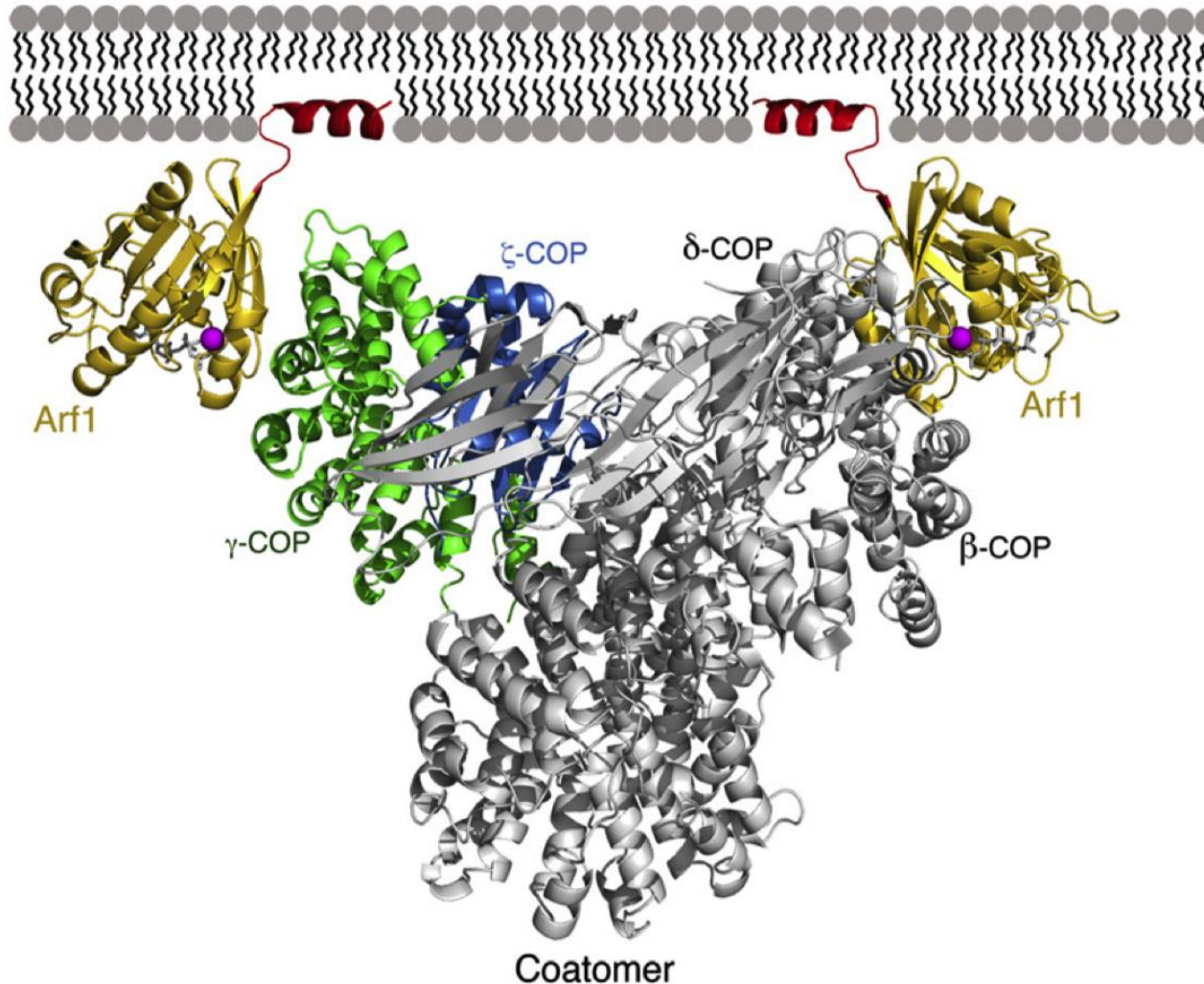
Il **coatmero** è un complesso di 7 subunità:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ .

I coatomeri vengono reclutati direttamente sulla membrana da **Arf1-GTP** e dalle proteine cargo; dopo l'aggiunta di Arf-GAP, il rivestimento piega la membrana, idrolizzando GTP.



## Modello dell'attacco dei coatomeri delle COPI alla membrana

Le proteine cargo vengono riconosciute da una sequenza segnale C-terminale contenente 2 lisine.



Le proteine Arf sono **GTPasi di reclutamento del rivestimento** che agiscono sulle vescicole di COPI e clatrina (così come le GTPasi Sar agiscono su COPII).

Esse sono importanti anche per il disassemblaggio del rivestimento.



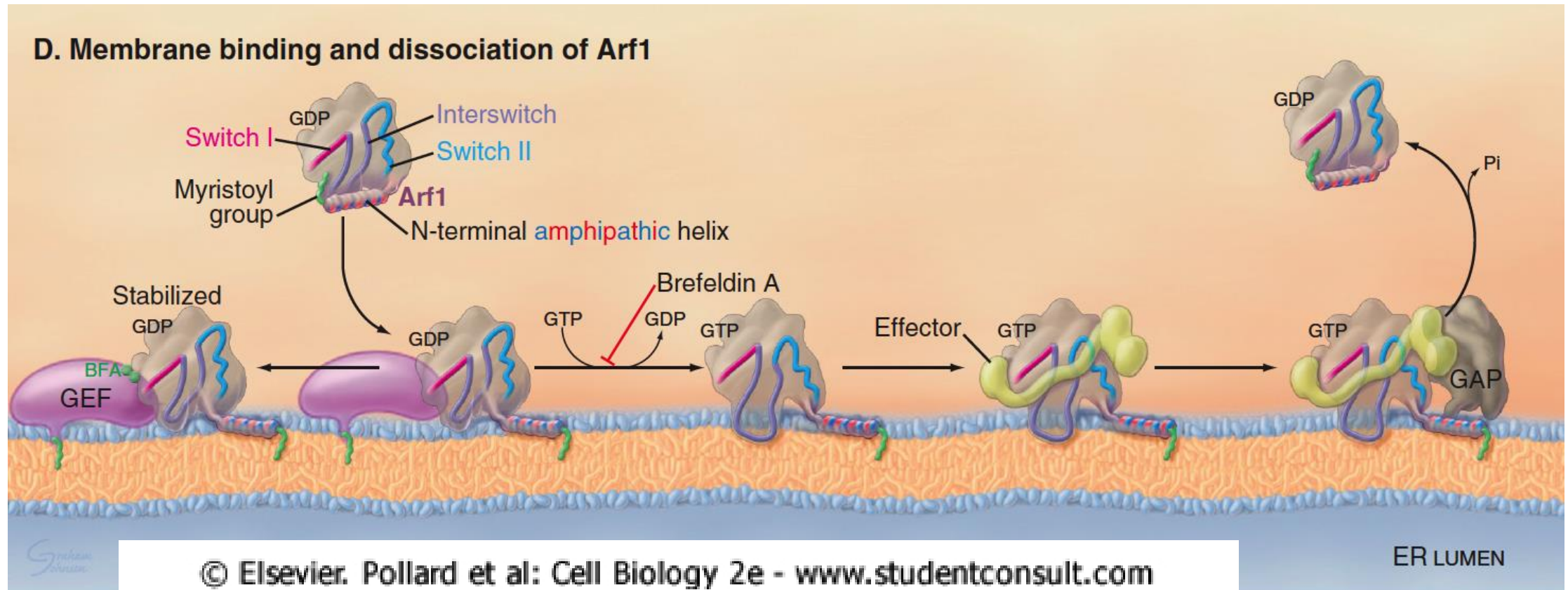
## Proteine Arf

Le proteine Arf (Arf1, Arf6 e Sar1) sono GTPasi di reclutamento del rivestimento.

Un'elica anfipatica N-terminale lega la membrana.

Diversi GEF reclutano specifiche Arf.

La brefeldina inibisce l'attivazione di Arf1 da parte del suo GEF, bloccando quindi la via secretoria.

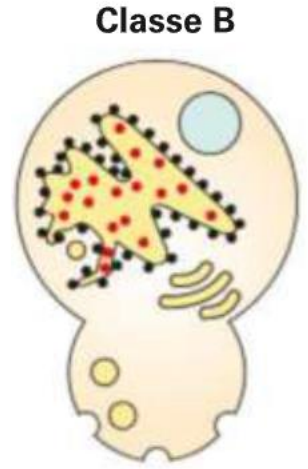


# Vescicole rivestite di COPII

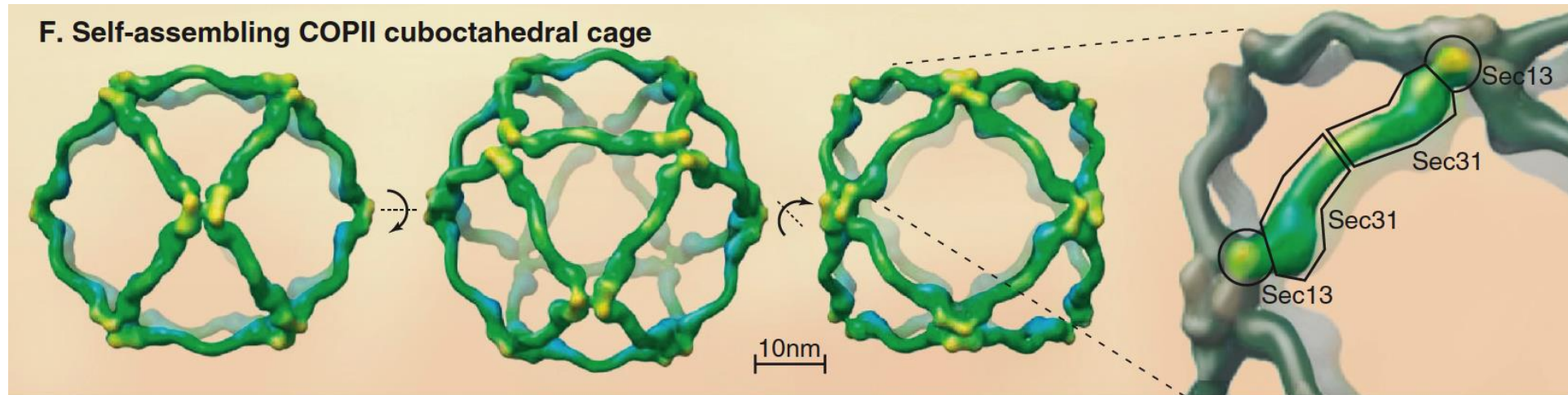
Le vescicole di COPII sono state individuate in lievito con mutanti di classe B.

L'involucro esterno del rivestimento di COPII è formato da 2 proteine chiamate **Sec13** e **Sec31**, che si auto-assemblano in gabbie simmetriche.

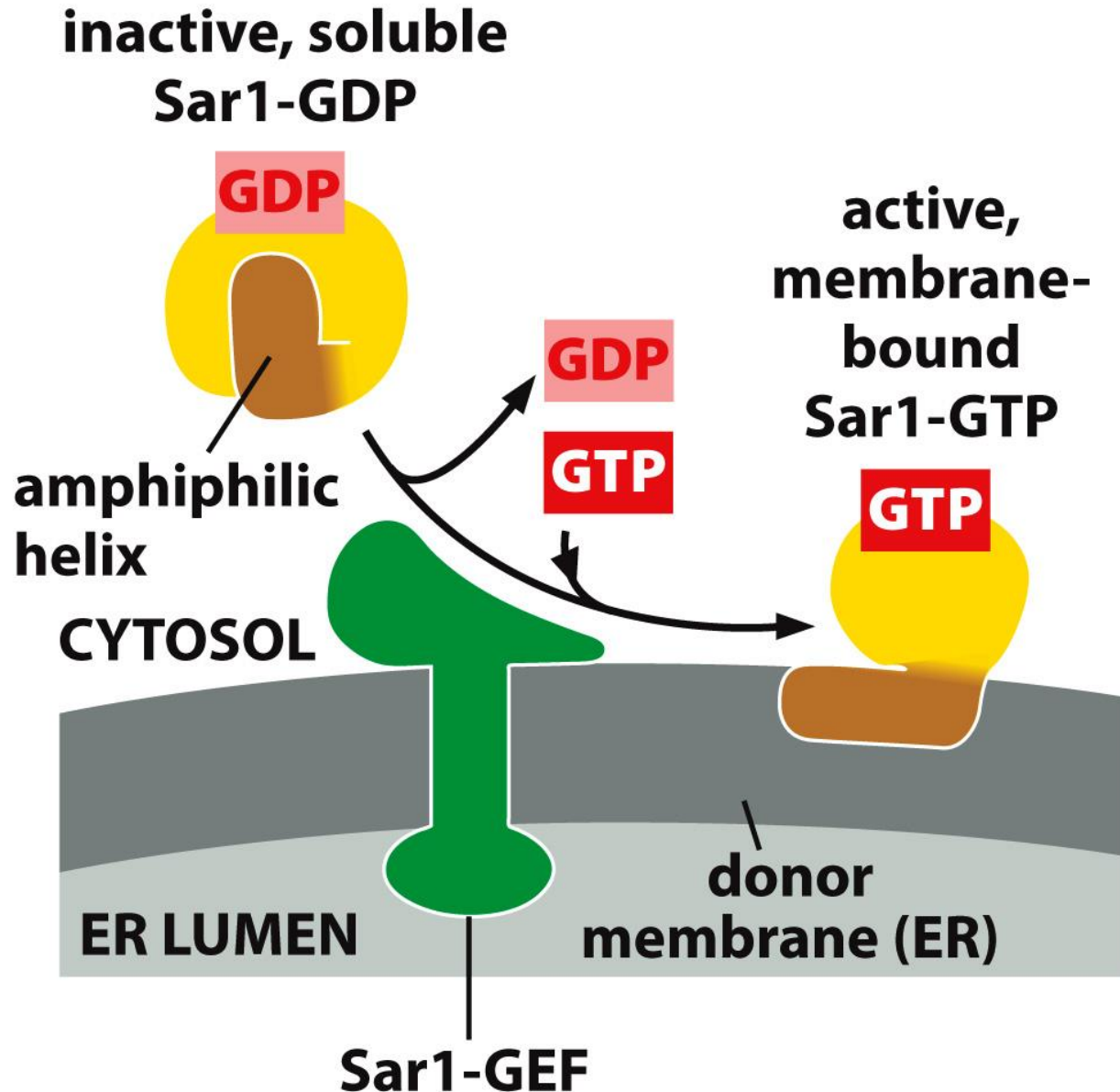
La curvatura del rivestimento promuove la formazione della vescicole.  
Coinvolte nel trasporto anterogrado RE → Golgi.



Accumulo nell'RE ruvido



## Proteine Sar



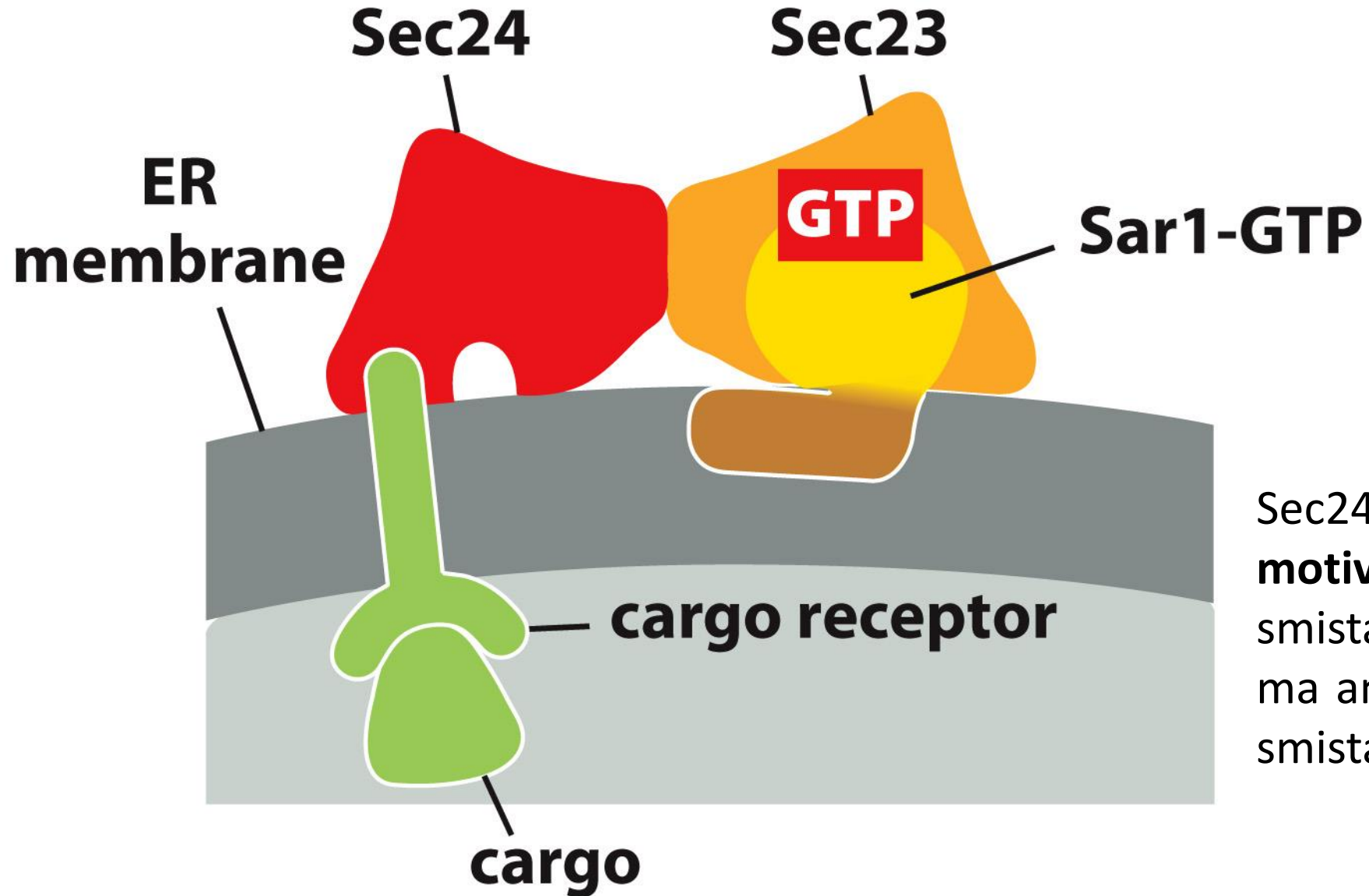
Sono **GTPasi monomeriche di reclutamento del rivestimento** specifiche per COPII (così come le proteine Arf lo sono per COPI e clatrina).

Si trovano nel citosol in elevate concentrazioni e in forma inattiva (legate a GDP).

Un GEF del RE specifico le attiva.

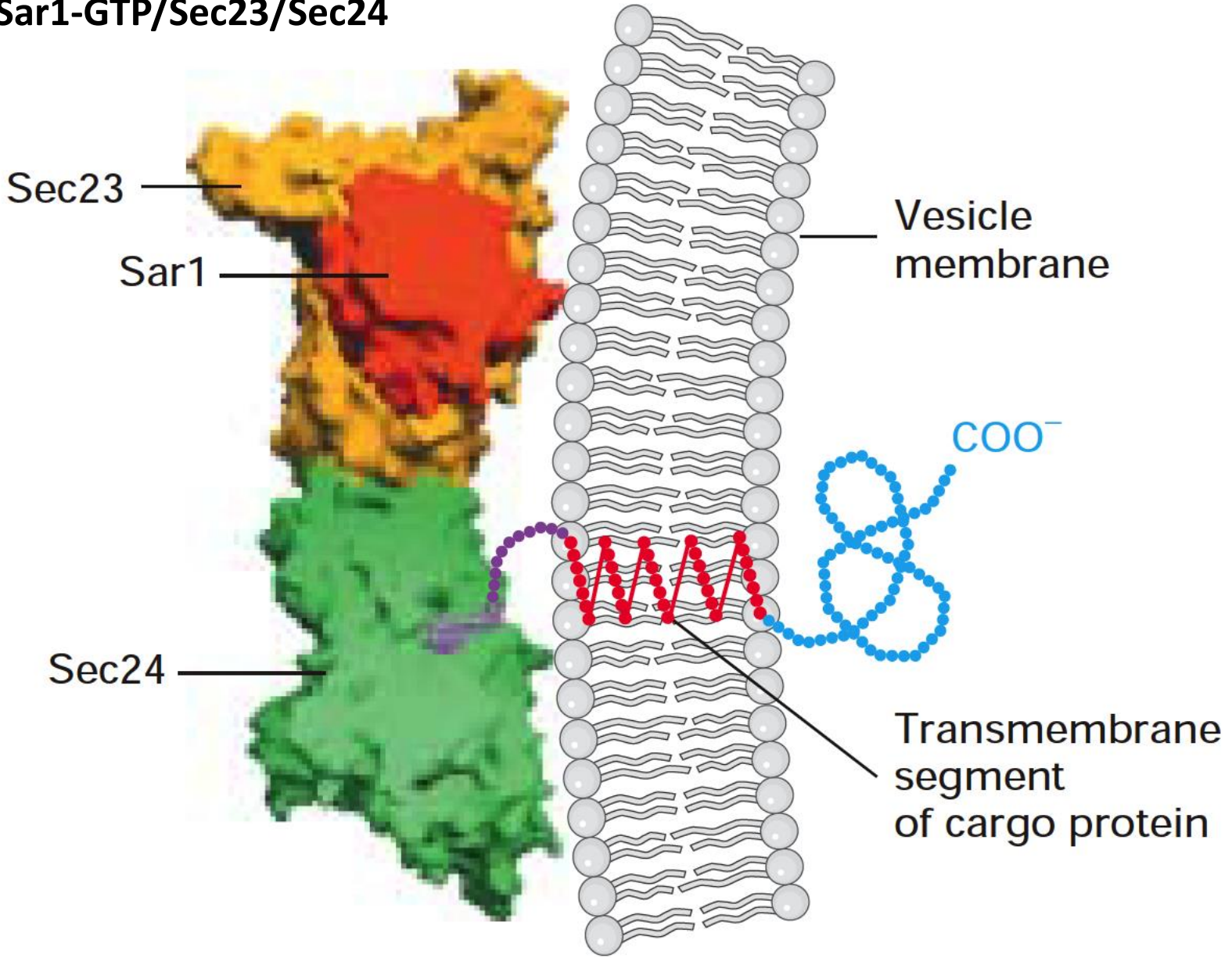
Sar1-GTP espone un'elica anfipatica che si inserisce nel foglietto citoplasmatico della membrana del RE, iniziando la curvatura della membrana. A questo punto recluta le proteine adattatrici.

Sar1-GTP legata alla membrana può reclutare le proteine adattatrici di rivestimento, Sec24 e Sec23.



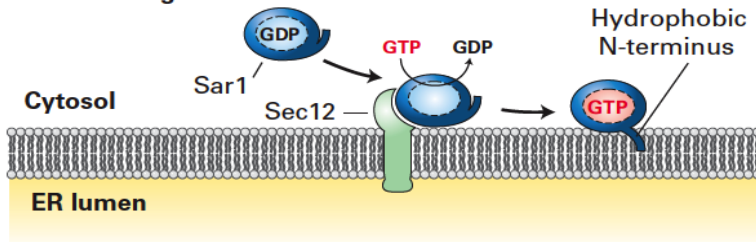
Sec24 riconosce il **motivo DXE** (segnale di smistamento di-acido), ma anche altri motivi di smistamento.

**Complesso Sar1-GTP/Sec23/Sec24**



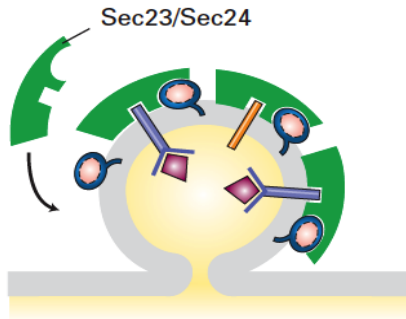
# Ciclo di assemblamento-disassemblamento di COPII

## 1 Sar1 membrane binding, GTP exchange



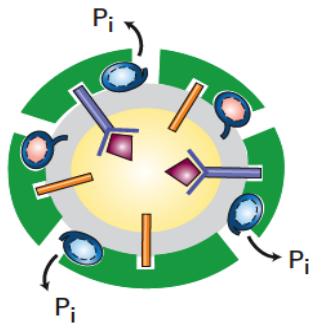
1. Interazione di Sar1-GDP con GEF e scambio GDP-GTP

## 2 COPII coat assembly



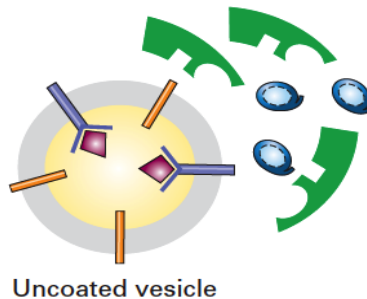
2. Sar1 attaccato alla membrana fa da attracco per Sec23 e Sec24 e l'interazione con le proteine del cargo. Il rivestimento di COPII è completato da Sec13 e Sec31

## 3 GTP hydrolysis



3. Sec23 promuove l'idrolisi del GTP. Il rilascio di Sar1-GDP innesca il disassemblamento del rivestimento. Per il disassemblaggio del rivestimento servono idrolisi del GTP a GDP da parte di Sar e una chinasi che fosforila le proteine del rivestimento.

## 4 Coat disassembly



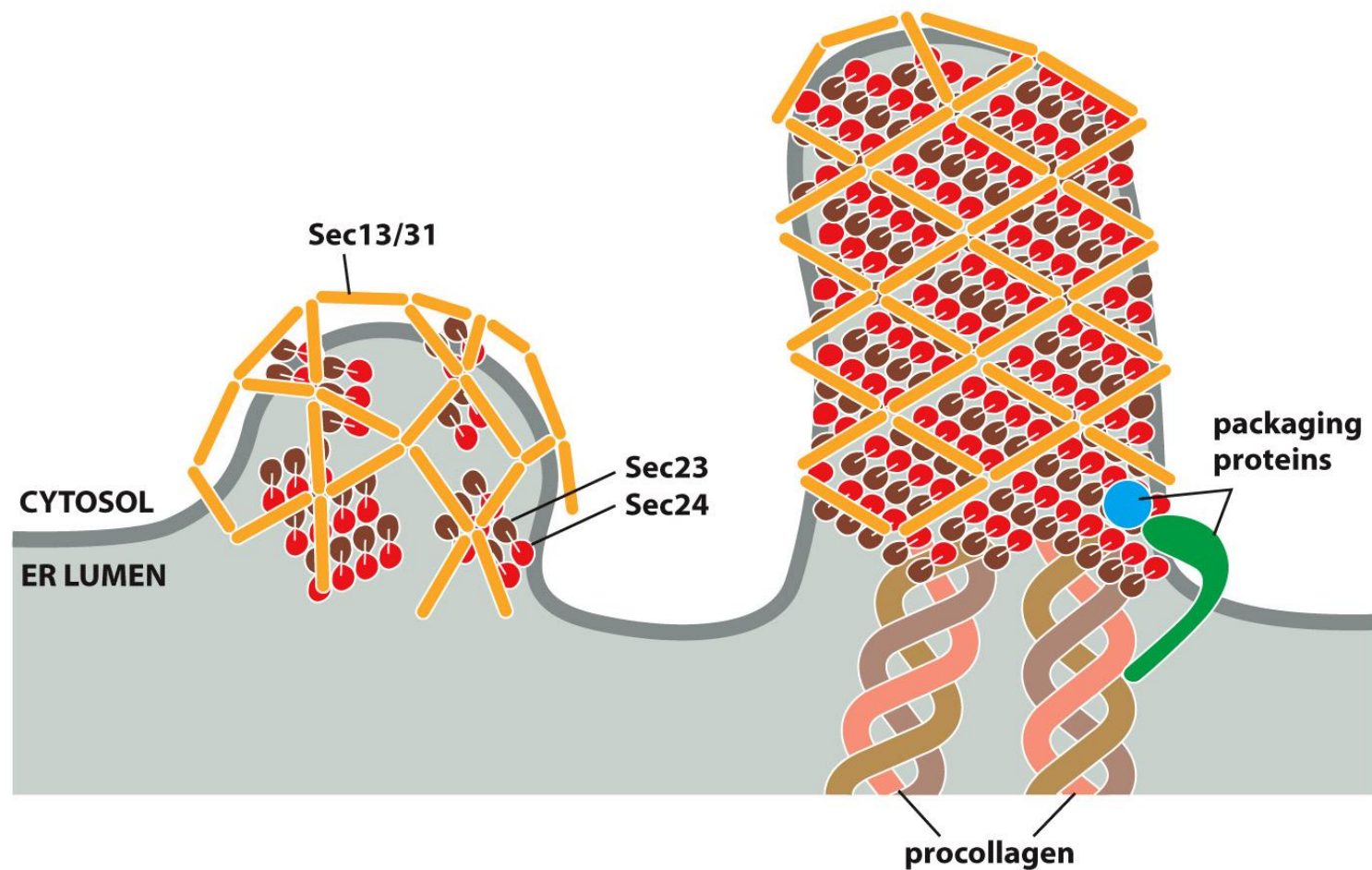
Il ciclo è analogo a quello delle proteine Arf.

## Non tutte le vescicole hanno la stessa forma

Le membrane hanno caratteristiche diverse (la membrana plasmatica è piatta e rigida, per la presenza di colesterolo e di actina legata).

Non tutte le vescicole sono sferiche: il collagene viene assemblato nel RE in bastoncini rigidi di procollagene che entrano in vescicole di COPII di dimensioni maggiori (si formano dei tubuli).

Nel caso delle vescicole contenenti procollagene intervengono delle specifiche proteine di impacchettamento del RE. Inoltre Sec31 viene mono-Ub per cambiarne le caratteristiche di assemblaggio e consentire la formazione di vescicole molto lunghe.



**TABLE 14-1 Coated Vesicles Involved in Protein Trafficking**

| Vesicle Type                   | Transport Step Mediated                                  | Coat Proteins                                     | Associated GTPase |
|--------------------------------|--|---|-------------------|
| COPII                          | ER to <i>cis</i> -Golgi                                  | Sec23/Sec24 and Sec13/Sec31 complexes, Sec16      | Sar1              |
| COPI                           | <i>cis</i> -Golgi to ER Later to earlier Golgi cisternae | Coatomers containing seven different COP subunits | ARF               |
| Clathrin and adapter proteins* | <i>trans</i> -Golgi to endosome                          | Clathrin + AP1 complexes                          | ARF               |
|                                | <i>trans</i> -Golgi to endosome                          | Clathrin + GGA                                    | ARF               |
|                                | Plasma membrane to endosome                              | Clathrin + AP2 complexes                          | ARF               |
|                                | Golgi to lysosome, melanosome, or platelet vesicles      | AP3 complexes                                     | ARF               |

\*Each type of AP complex consists of four different subunits. It is not known whether the coat of AP3 vesicles contains clathrin.

- ✓ L'assemblaggio dei rivestimenti di clatrina e di quelli formati da COPI e COPII è mediato da 2 tipi di **GTPasi di reclutamento del rivestimento (Sar e Arf)**
- ✓ Le proteine Arf sono coinvolte nel rivestimento delle vescicole di clatrina e COPI
- ✓ Le proteine Sar nelle vescicole COPII



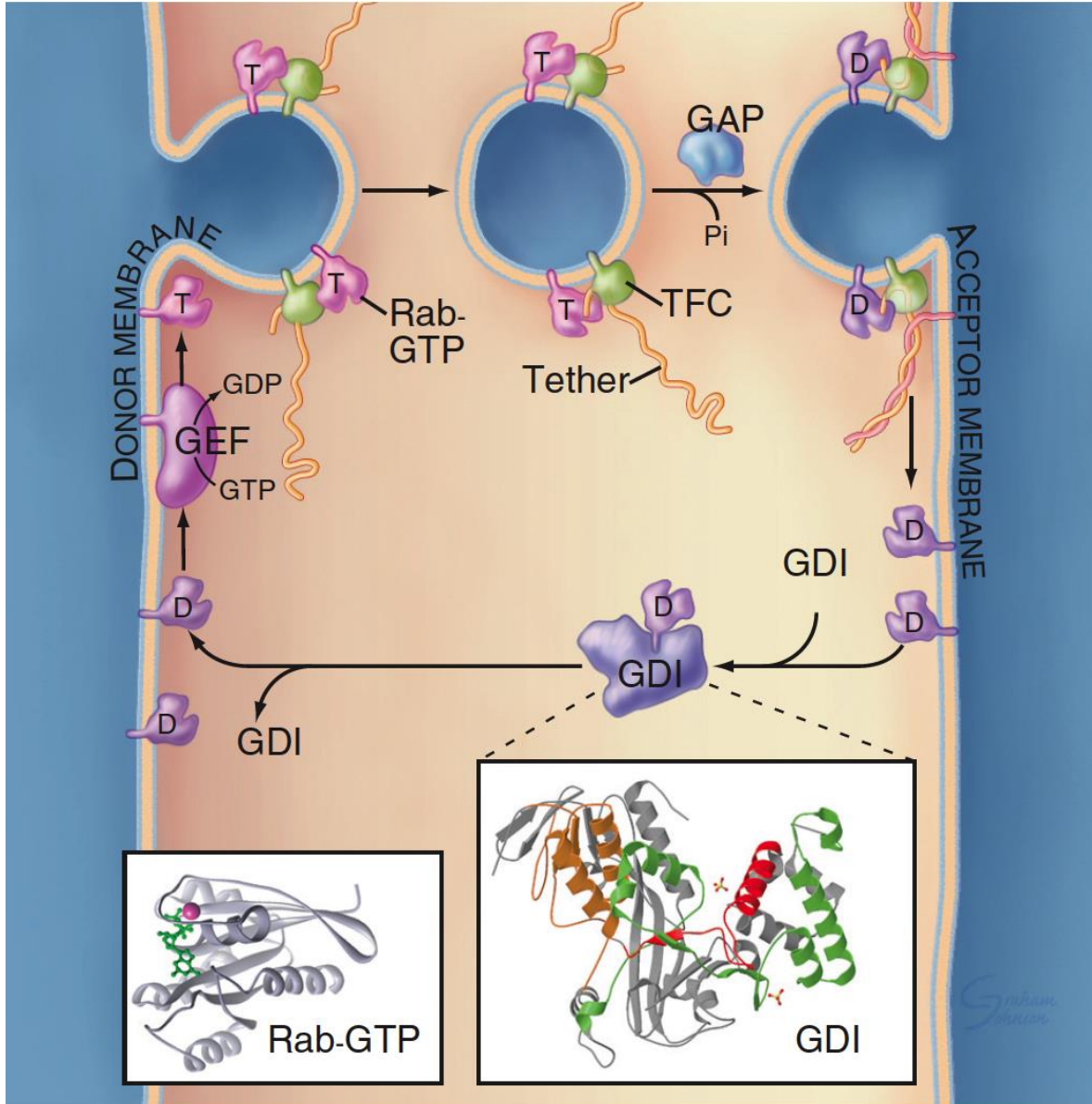
# L'attracco

Nella cellula il traffico vescicolare è molto «affollato» ed è necessario che venga assicurata la specificità di attracco.

Questo è possibile grazie alla presenza di **marcatori** sulle vescicole, che le identificano in base all'origine e al carico, e da marcatori sulle membrane bersaglio, con recettori specifici per questi marcatori.

- In questo processo intervengono le proteine **Rab** e gli effettori di Rab, che dirigono le vescicole alla membrana bersaglio corretta.
- Poi le proteine **SNARE** e i regolatori di SNARE mediano la fusione tra le membrane.

# Proteine Rab



Oltre alle Arf e alle Sar, altre GTPasi monomeriche coinvolte nel traffico vescicolare, sono le proteine Rab.

Le proteine Rab sono una famiglia di proteine che si trovano libere nel citosol quando inattive, associate a **GDI (inibitore di dissociazione)**. Un fattore di dissociazione le libera permettendo l'interazione con GEF e il legame alla membrana.

GEF diversi reclutano specifiche Rab sulle membrane.

Le Rab-GTP associate alle membrane interagiscono con numerosi **effettori Rab**, e reclutano le proteine di attracco necessarie per la fusione tra le membrane.

# Ogni organello ha Rab specifiche

→ sono marcatori specifici della vescicola e della membrana bersaglio

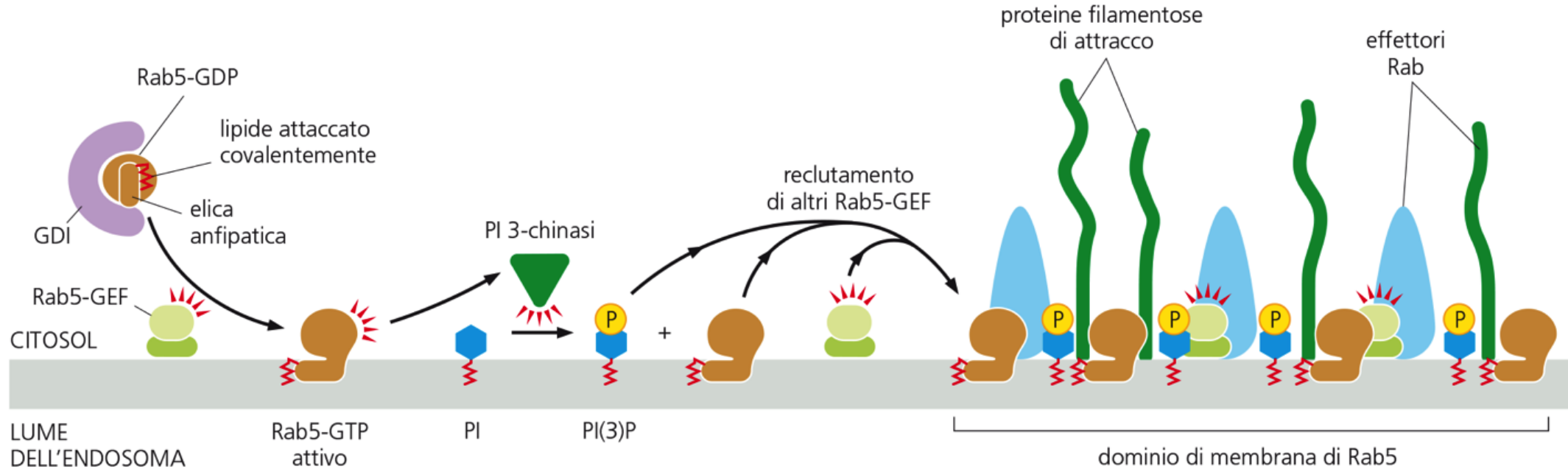
| <b>TABLE 13-1 Subcellular Locations of Some Rab Proteins</b> |   |
|--|---|
| <b>Protein</b>   | <b>Organelle</b>  |
| <b>Rab1</b>  | <b>ER and Golgi complex</b>                                       |
| <b>Rab2</b>  | <b><i>cis</i> Golgi network</b>                                   |
| <b>Rab3A</b>   | <b>Synaptic vesicles, secretory vesicles</b>                      |
| <b>Rab4/Rab11</b>  | <b>Recycling endosomes</b>  |
| <b>Rab5</b>  | <b>Early endosomes, plasma membrane, clathrin-coated vesicles</b> |
| <b>Rab6</b>  | <b>Medial and <i>trans</i> Golgi</b>                              |
| <b>Rab7</b>  | <b>Late endosomes</b>   |
| <b>Rab8</b>  | <b>Cilia</b>  |
| <b>Rab9</b>  | <b>Late endosomes, <i>trans</i> Golgi</b>                         |

Table 13-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Le proteine Rab dirigono le vescicole verso punti specifici della membrana, dove avviene la fusione (grazie alle proteine SNARE).

Sono la più grande sottofamiglia di GTPasi monomeriche, ne esistono più di 60 tipi diversi.

## Esempio: dominio Rab5 sulla membrana endosomale

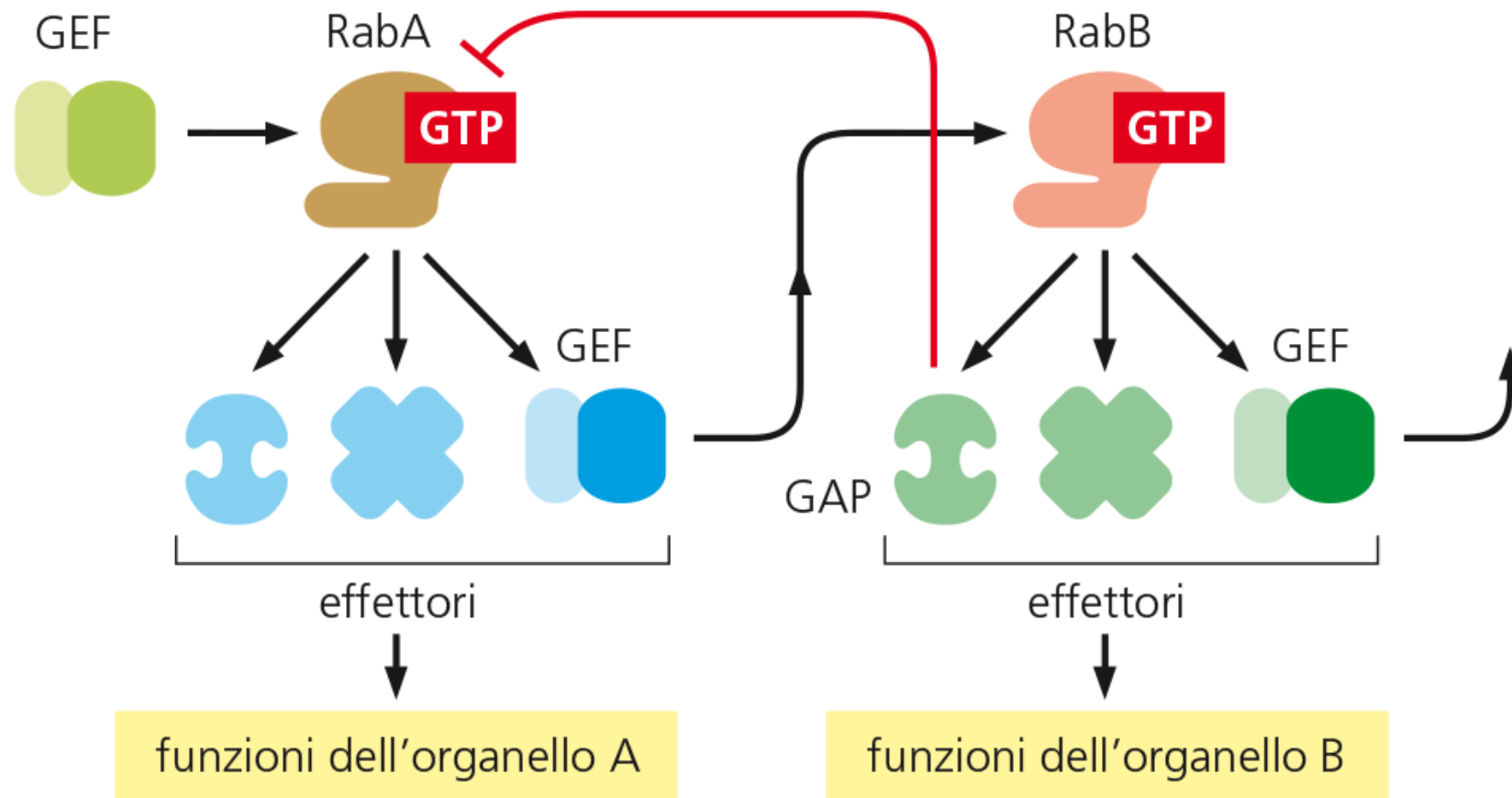


Un dominio di membrana di Rab5 concentra le proteine di attracco:

- Rab5-GDP/GDI incontra Rab-GEF, che la attiva e la ancora alla membrana dell'endosoma
- Rab5 attiva PI3K, che converte localmente PI a PI3P (che lega alcuni effettori di Rab)
- Rab5-GTP recluta altri GEF e quindi altri Rab5 sulla membrana
- Insieme legano vari effettori tra cui le proteine di attracco per le vescicole di clatrina

In questo modo si originano **regioni specializzate sulla membrana** endosomale per l'attracco delle vescicole di clatrina provenienti dalla membrana plasmatica. E così in altre zone si originano altri domini con differente specializzazione.

## La cascata di Rab può cambiare l'identità di un organello



Un dominio di Rab può essere disassemblato e sostituito. Questo consente la **maturazione degli endosomi**, ad esempio. Infatti, i domini Rab5 degli endosomi precoci vengono sostituiti da Rab7 sugli endosomi tardivi. Gli effettori sono diversi e questo rende irreversibile la maturazione degli endosomi.

## Proteine SNARE

- ✓ Le proteine SNARE (Soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor) sulle 2 membrane si appaiano a dare l'ormeggio.
- ✓ Esistono SNARE specifiche per i diversi organelli

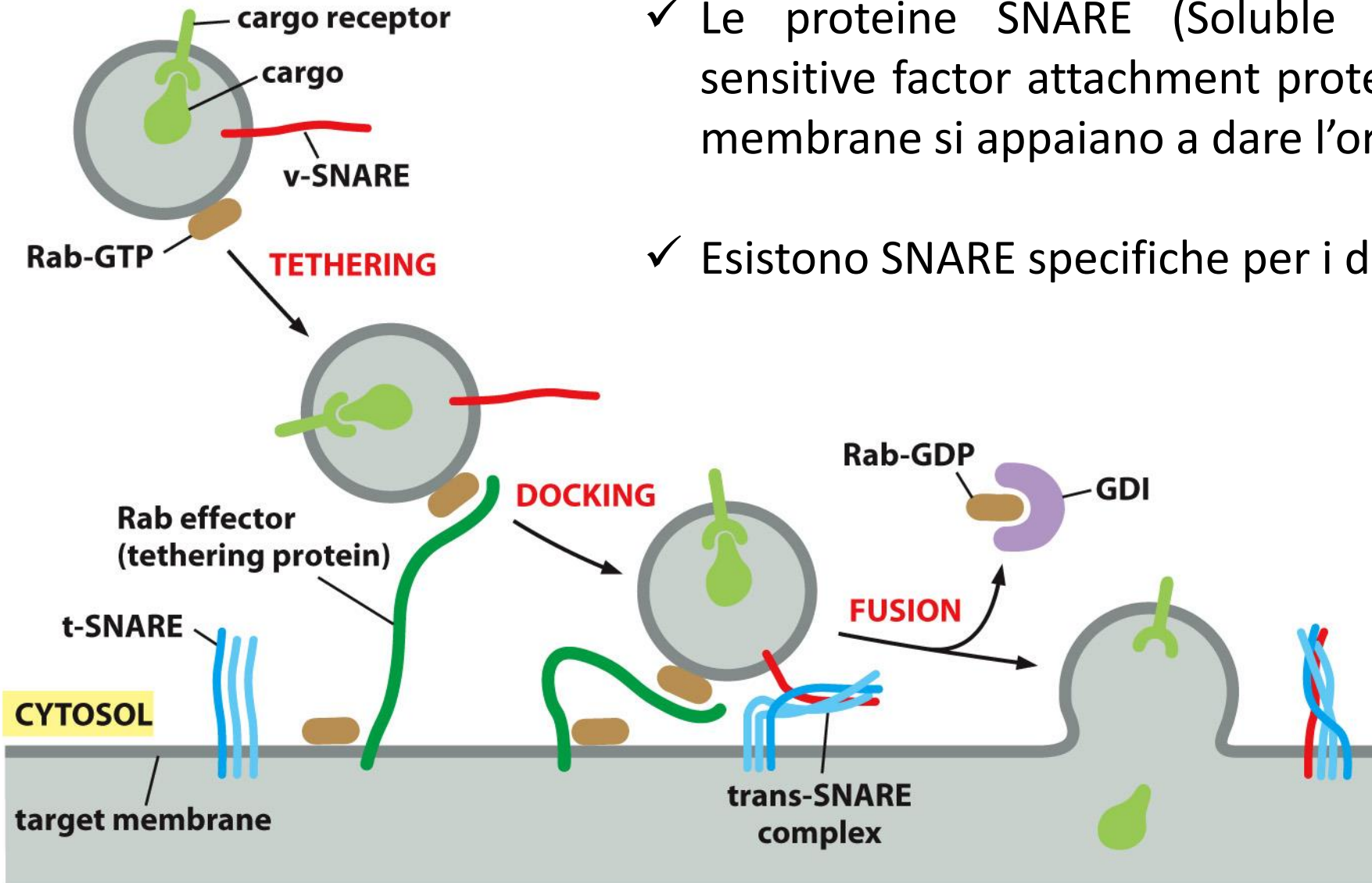
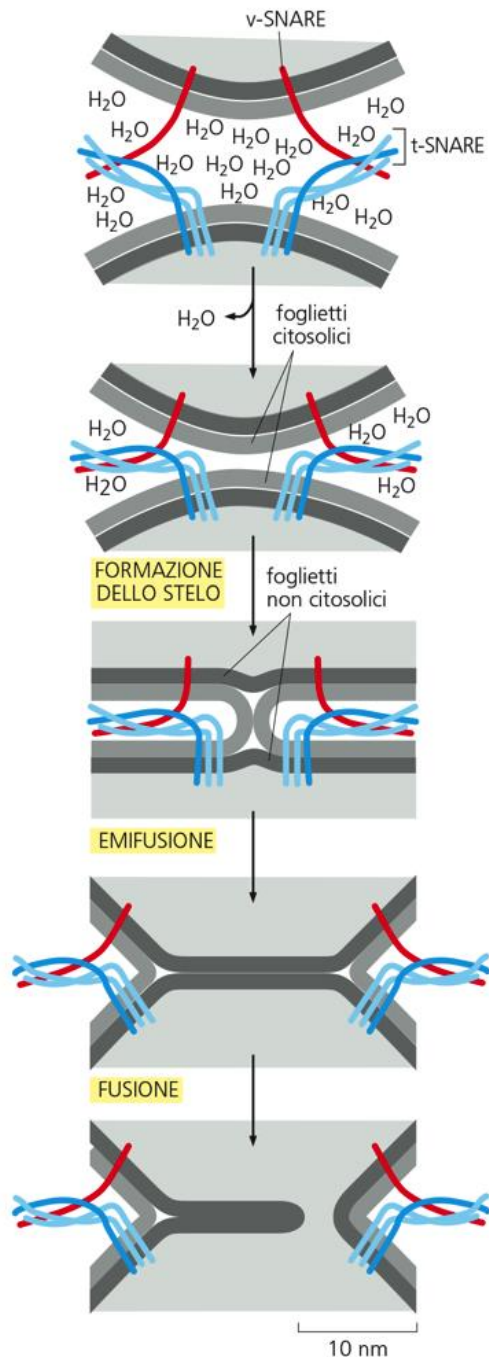


Figure 13-16 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



## Le proteine SNARE mediano la fusione tra le membrane

Perchè le vescicole possano fondersi con le membrane, gli strati lipidici devono avvicinarsi a meno di 1.5 nm.

L'acqua deve essere esclusa dalla superficie delle membrane, un processo termodinamicamente sfavorito.

**Le v-SNARE** si trovano sulle vescicole (1 sola catena)

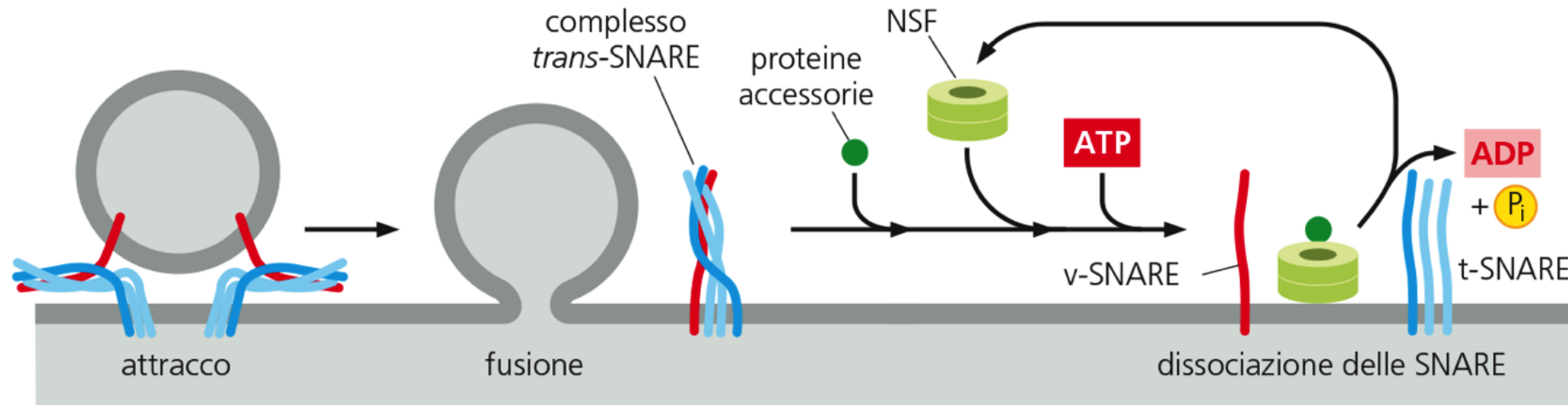
**Le t-SNARE** sulle membrane target (3 catene polipeptidiche)

L'appaiamento è altamente specifico.

Hanno domini elicoidali che si avvolgono formando il **complesso trans-SNARE**, che permette la fusione delle membrane, sono tail-anchored proteins. Così avvicinano le membrane escludendo le molecole d'acqua dell'interfaccia.

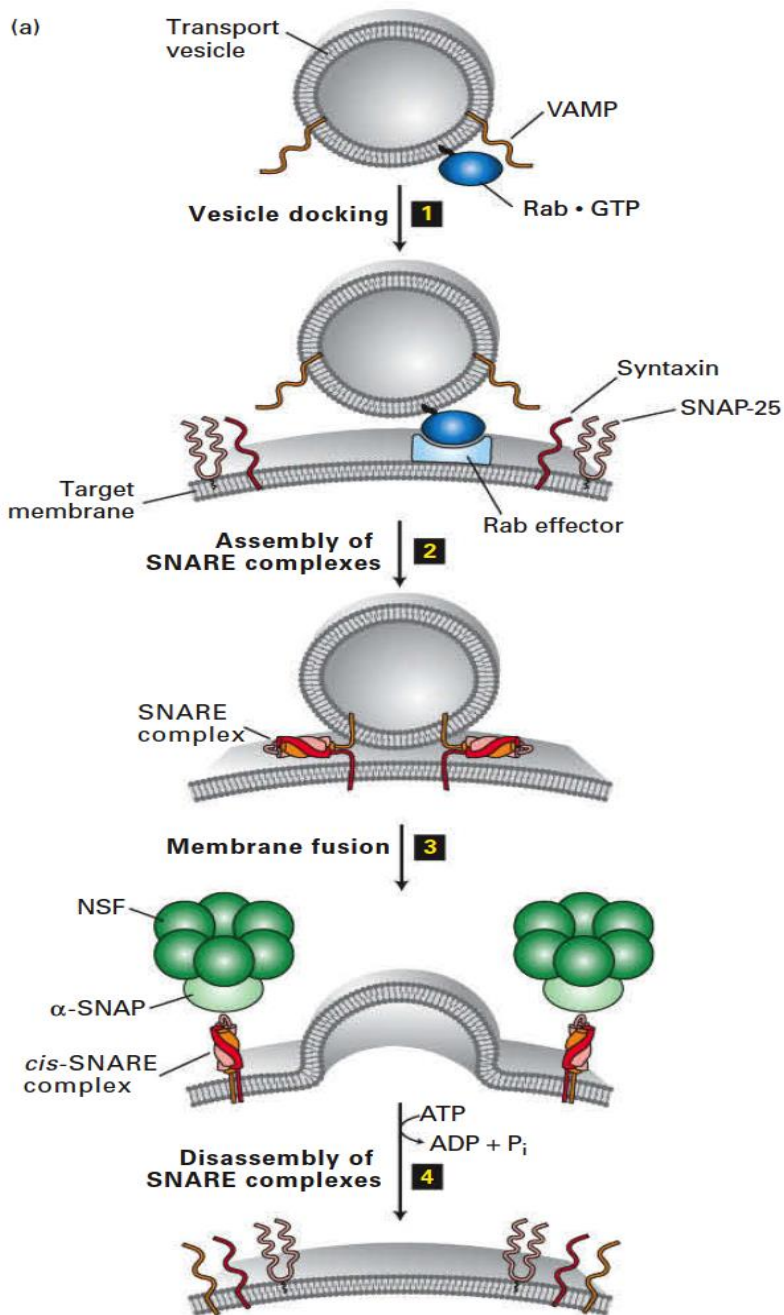
L'appaiamento tra le SNARE è altamente specifico e fornisce un ulteriore livello di specificità al traffico vescicolare.

# Le SNARE che interagiscono devono essere separate prima di funzionare nuovamente



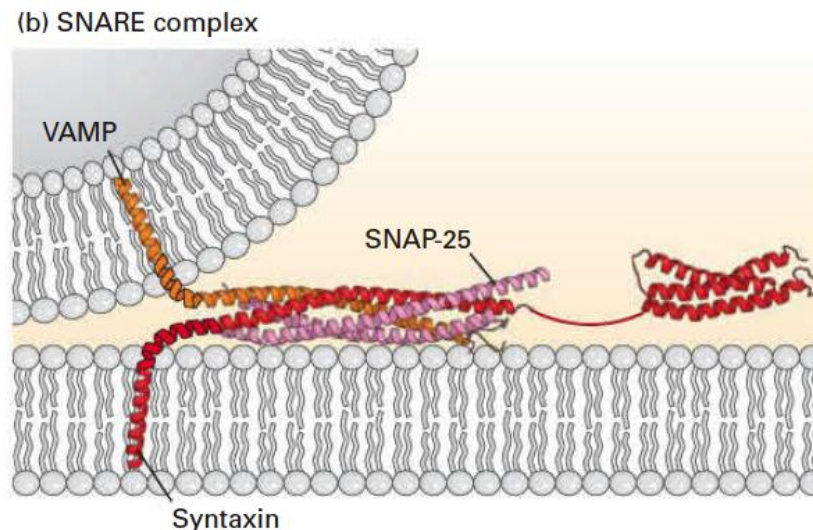
Il disassemblaggio delle SNARE è catalizzato da **NSF** (*N-ethyl-maleimide (NEM) Sensitive Factor*), un'ATPasi esamerica, che si lega al complesso SNARE grazie a  **$\alpha$ -SNAP** (*soluble NSF attachment protein*). L'energia data dall'idrolisi dell'ATP consente di districare le eliche delle SNARE e separarle. In questo modo le SNARE vengono riciclate e viene garantita la specificità.





Esempio: fusione delle vescicole sinaptiche:

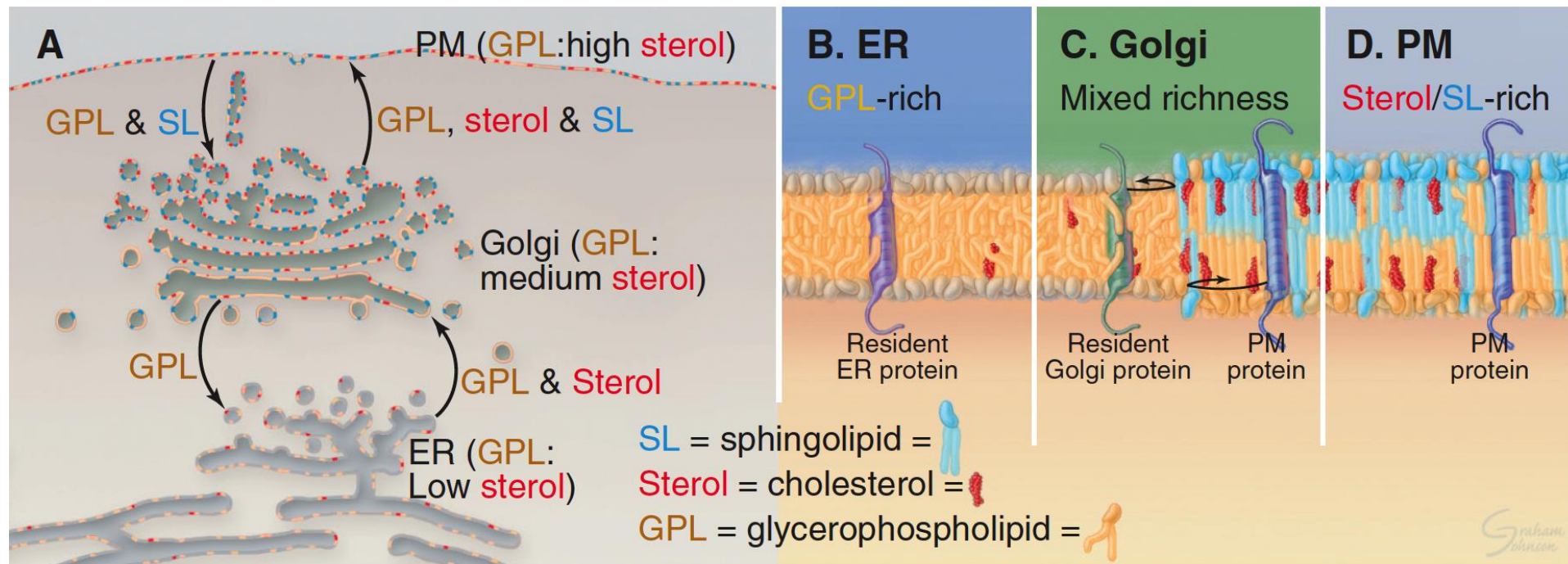
1. Una proteina Rab lega un effettore
2. Una v-SNARE (VAMP, *vesicle-associated membrane protein*) interagisce con la corrispondente t-SNARE (sintaxina e SNAP-25) formando il complesso coiled-coil
3. Fusione tra le due membrane
4. NSF lega il complesso, idrolizza ATP e lo dissocia; contemporaneamente Rab-GTP è convertita in Rab-GDP



# Le cellule mantengono un gradiente lipidico lungo la via secretoria

Le membrane del RE sono più sottili, la membrana plasmatica è più spessa

La diversa composizione lipidica facilita il sorting delle proteine



**Il gradiente lipidico** svolge 2 funzioni:

1. Genera ambienti lipidici diversi, funzionali ai singoli organelli
2. Dirige le proteine di transmembrana alla membrana che ha lo spessore adatto

Il movimento anterogrado dei lipidi è controbilanciato da un movimento retrogrado: verso l'ER per gli sfingolipidi e i glicerofosfolipidi, ai lisosomi per il colesterolo