

ORGANELLI E LORO BIOGENESI

Diego L. Medina, PhD

*Associate Professor of Biology, Department of Translational Medicine,
University of Naples "Federico II". Assistant Investigator, Head, High Content
Screening Facility, TIGEM, Pozzuoli (NA)*

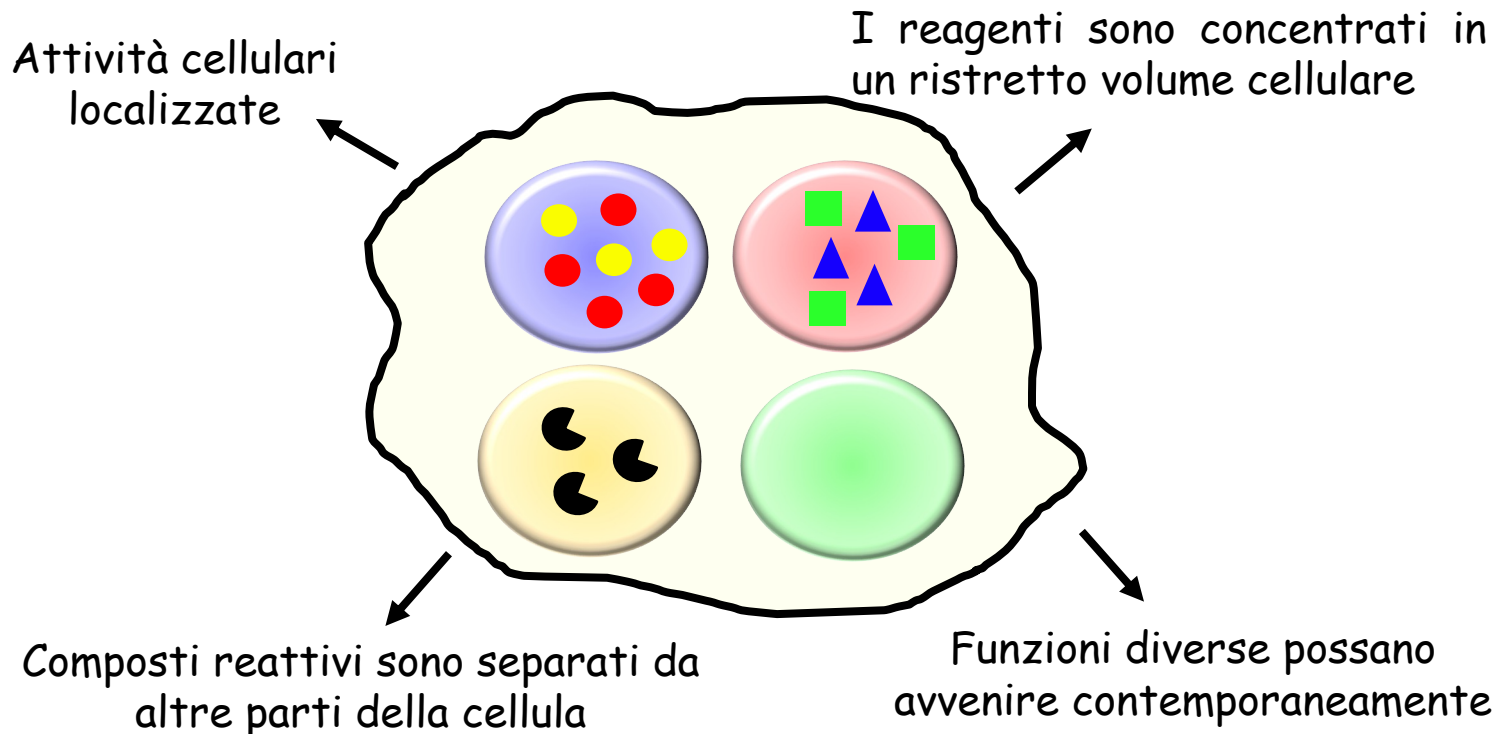
medina@tigem.it

diegoluis.medinasanabria@unina.it

UNA CELLULA EUCARIOTICA E' SUDDIVISA IN COMPARTIMENTI/ORGANELLI

Cellula eucariotica 10-30 volte piu grande/1000-10000 volte piu volume vs batteri, quindi la MP da sola sarebbe in proporzione troppo piccola per supportare tutte le funzioni vitali

→ **Sistema di membrana interni, compartimentazione**
Vantaggi?



???????

QUANTI E QUALI SONO I COMPARTIMENTI IN UNA CELLULA?
CHE FUNZIONE HANNO?

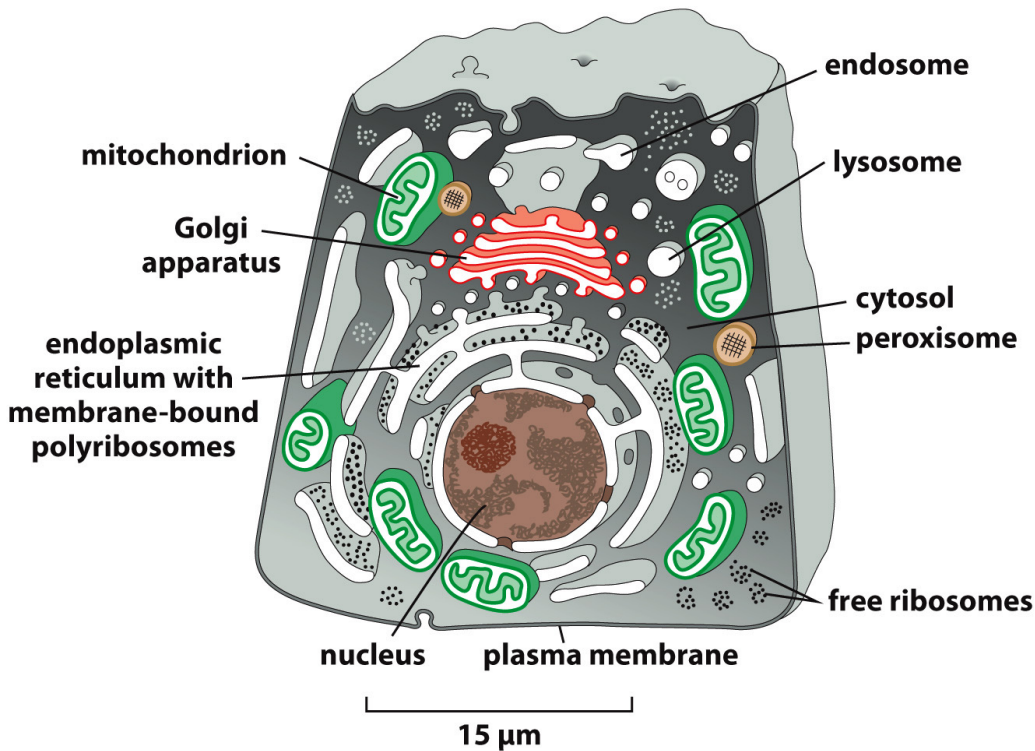
COME È FATTO UN COMPARTIMENTO?

COME SI FORMA? COME SI STABILISCE E MANTIENE LA SUA
COMPOSIZIONE MOLECOLARE E LA SUA STRUTTURA?

COME È REGOLATA LA SUA ABBONDANZA?

???????

TUTTE LE CELLULE HANNO UN NUMERO LIMITATO DI ORGANELLI/COMPARTIMENTI



Il modello evolutivo delle membrane della cellula eucariotica raggruppa i compartimenti cellulari in 4 famiglie:

- 1) Nucleo e citosol_topologicamente continui e se comunicano attraverso i pori nucleari.
- 2) RE, Golgi, endosome, lisosomi, vesicole di trasporto e peroxisome
- 3) I mitocondri
- 4) I plastid (vegetali)

CIASCUN COMPARTIMENTO OCCUPA UN DETERMINATO VOLUME DELLA CELLULA E HA UNA RELATIVA ABBONDANZA

✓ L'abbondanza di ogni organello può variare

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)

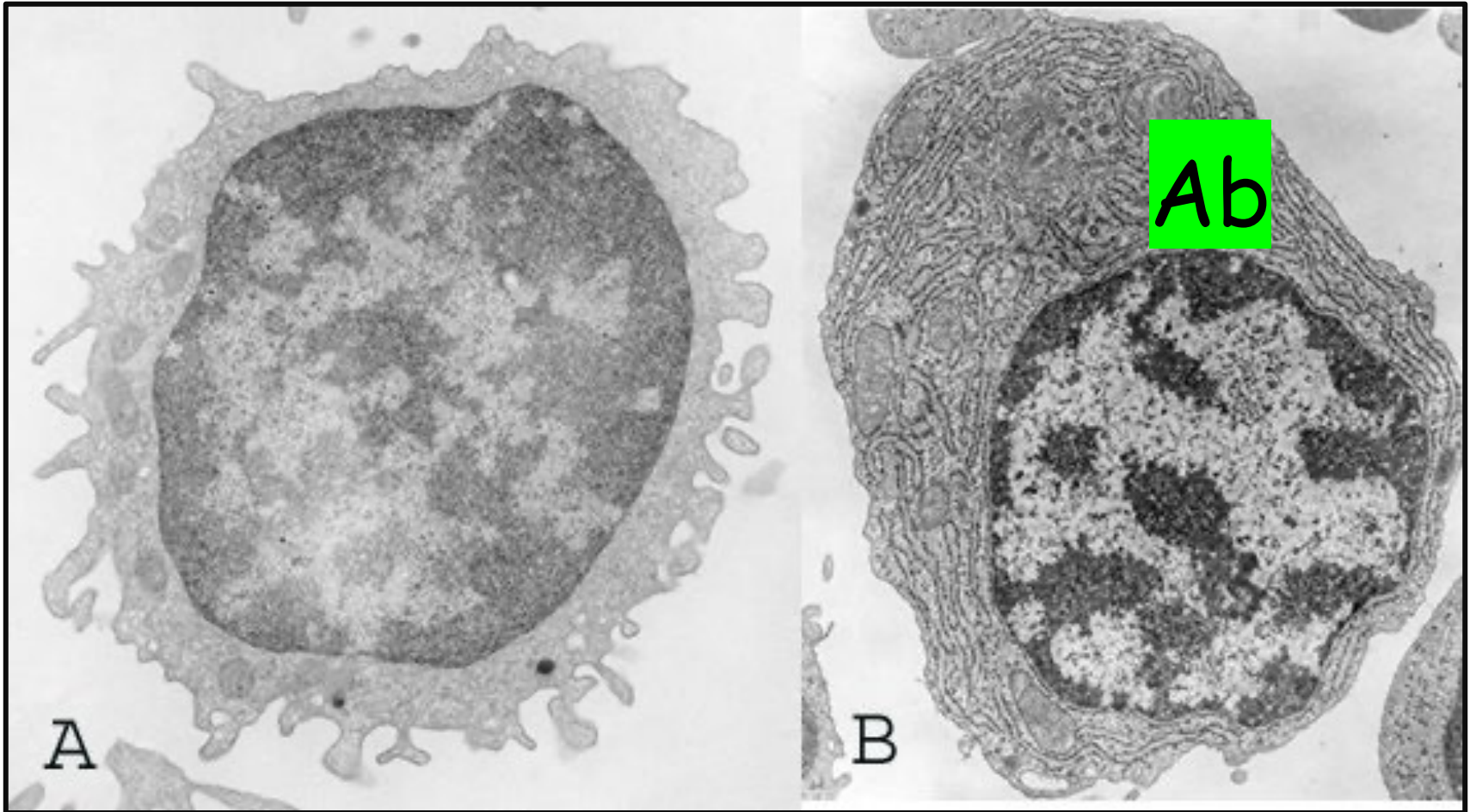
TABLE 12-2 Relative Amounts of Membrane Types in Two Kinds of Eukaryotic Cells.

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 Inner membrane	7 32	4 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.

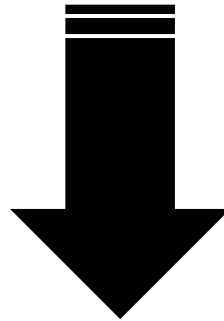
Table 12-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

LE PLASMACELLULE O LINFOCITI B ATTIVATI
HANNO UN RER MOLTO VOLUMINOSO



TAKE HOME-MESSAGES

- ✓ CIASCUN ORGANELLO HA SUA CARATTERISTICA STRUTTURA E DIMENSIONI
- ✓ L'ABBONDANZA DI CIASCUN ORGANELLO PUÒ VARIARE TRA TIPI CELLULARI DIVERSI
- ✓ L'ABBONDANZA DI CIASCUN ORGANELLO PUÒ VARIARE SECONDO LE ESIGENZE METABOLICHE DI CIASCUN TIPO CELLULARE



L'OMEOSTASI DEI COMPARTIMENTI È CRUCIALE PER LA LORO FUNZIONE

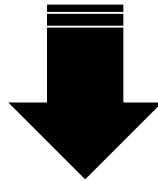
COME E' FATTO CIASCUN ORGANELLO?

MEMBRANA —————> BILAYER LIPIDICO + PROTEINE

CONTENUTO/
LUME —————> PROTEINE ED ALTRE MOLECOLE

COME VIENE "ASSEMBLATO" CIASCUN ORGANELLO?

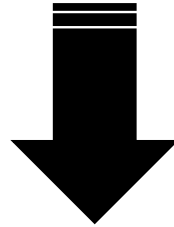
LE MOLECOLE CHE LO COMPONGONO DEVONO ESSERE
TRASPORTATE DAL SITO DI SINTESI AL SITO DI
DESTINAZIONE!



TRAFFICO DI PROTEINE E DI LIPIDI

TAKE HOME-MESSAGES

- ✓ LA GRANDEZZA, LA FORMA, LA COMPOSIZIONE DI CIASCUN ORGANELLO SONO IMPORTANTI CARATTERISTICHE DEI COMPARTIMENTI CHE DETERMINANO LA LORO FUNZIONE

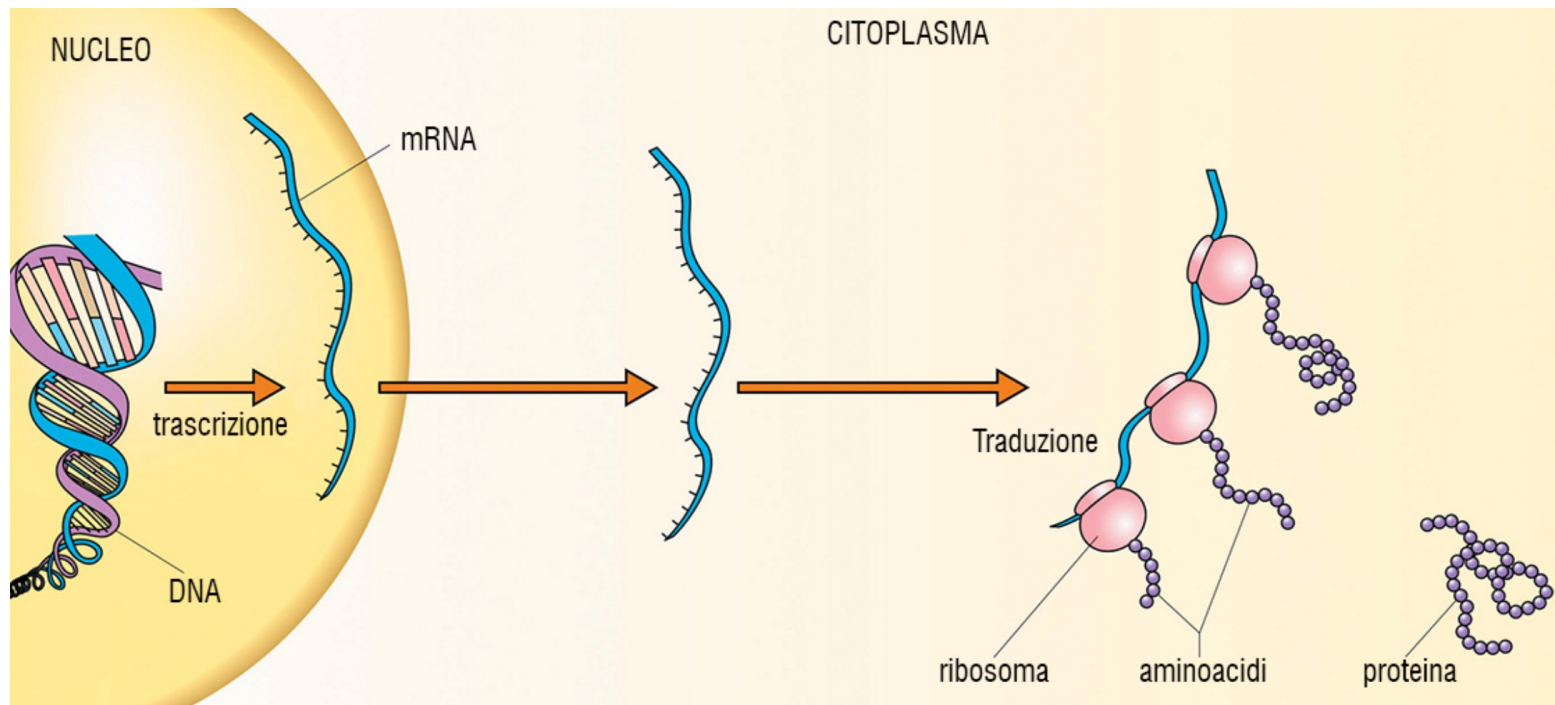


L'OMEOSTASI DEI COMPARTIMENTI ' È CRUCIALE PER
L'OMEOSTASI CELLULARE!

REGOLAZIONE!!!!

NEGLI EUCARIOTI LA SINTESI PROTEICA HA INIZIO SEMPRE NEL CITOSOL

La sintesi proteica inizia da un filamento di mRNA, prodotto a partire da un gene sul DNA attraverso il processo di trascrizione. Questo filamento nel ribosoma è usato come stampo per la produzione di una specifica proteina.



QUINDI DAL CITOSOL DEVONO RAGGIUNGERE IL LORO SITO DI RESIDENZA FINALE. IN CHE MODO? COME LA CELLULA RICONOSCE LE VARIE PROTEINE?

LE PROTEINE RAGGIUNGONO IL SITO DI DESTINAZIONE FINALE TRAMITE IL RICONOSCIMENTO DI SEGNALI

SEGNALI DI SMISTAMENTO

CHE COSA E' UN SEGNALE?
COME E' FATTO UN SEGNALE?
COME FUNZIONA? COME SI FORMA?
COME VIENE RICONOSCIUTO?

1. SEQUENZE DI AMMINOACIDI
2. MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI
3. STRUTTURE SECONDARIE
4. PATCHES

I SEGNALI POSSONO ESSERE SEQUENZE O STRUTTURE

PROTEINA NON RIPIEGATA

PROTEINA RIPIEGATA



PEPTIDE
SEGNALE



PATCH

REGIONI CHE CONTRIBUISCONO AL SEGNALE

LA DIMOSTRAZIONE CHE UNA SEQUENZA E' UN SEGNALE PREVEDE ESPERIMENTI DI:

1. RIMOZIONE DELLA SEQUENZA
2. MUTAZIONE DELLA SEQUENZA
3. TRASFERIMENTO DELLA SEQUENZA SU UN'ALTRA PROTEINA

PREVISIONE!!!!

COME VENGONO RICONOSCIUTI I SEGNALI?

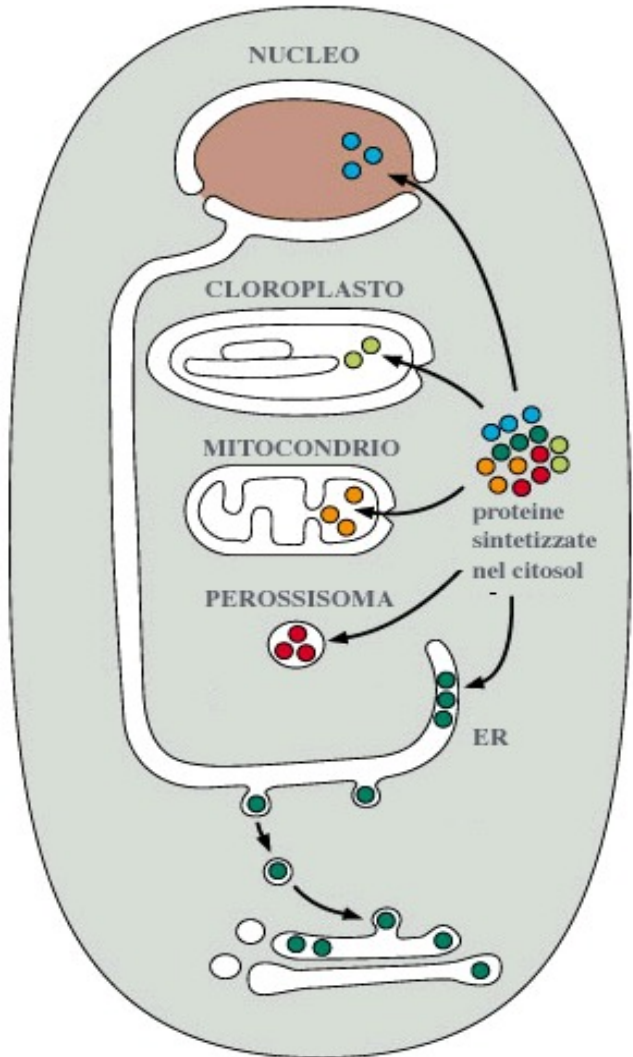
SPECIFICI RECETTORI:

UN SEGNALE UN RECETTORE

COME AVVIENE IL TRASPORTO DELLE PROTEINE
DAL SITO DI SINTESI AL SITO DI DESTINAZIONE?

MECCANISMI DI TRASPORTO

TRE SONO I MECCANISMI DI TRASPORTO DI PROTEINE NEGLI ORGANELLI



DIFFUSIONE-
TRASPORTO
REGOLATO

→ Attraverso i pori

TRASPORTO
ATTRAVERSO
MEMBRANE
(TRASLOCAZIONE)

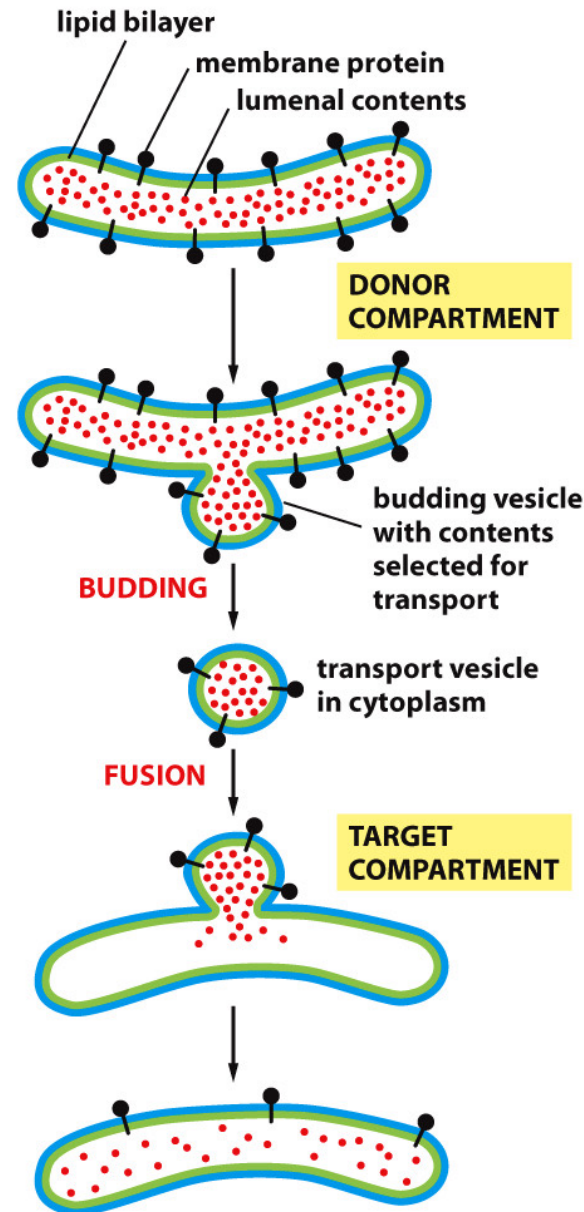
POST-TRADUZIONALE
dopo la sintesi

CO-TRADUZIONALE
durante la sintesi

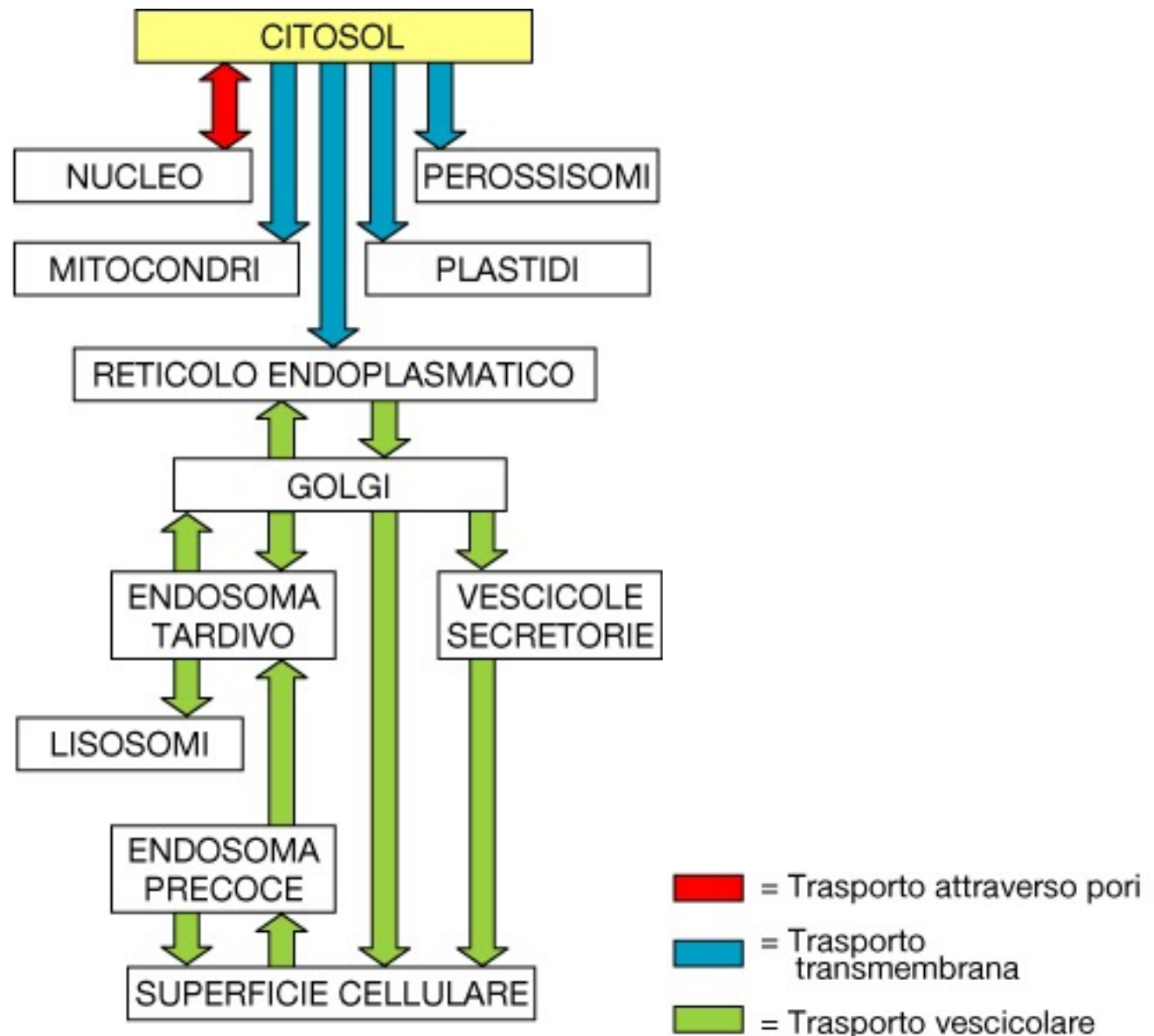
TRASPORTO
VESCICOLARE

→ Tramite vescicole

PROTEINE SONO TRASFERITE DA UN COMPARTIMENTO AD UN ALTRO MEDIANTE TRASPORTO VESICOLARE



TRE DIVERSI MECCANISMI DI TRASPORTO GUIDANO LE PROTEINE AI VARI ORGANELLI



CITOPLASMA: IL CITOSOL+ORGANELLI

IL CITOSOL È UN COMPARTIMENTO PLASTICO E DINAMICO

PROTEINE = 20%

DEPOSITI (glicogeno - lipidi)

PICCOLE MOLECOLE

METABOLITI

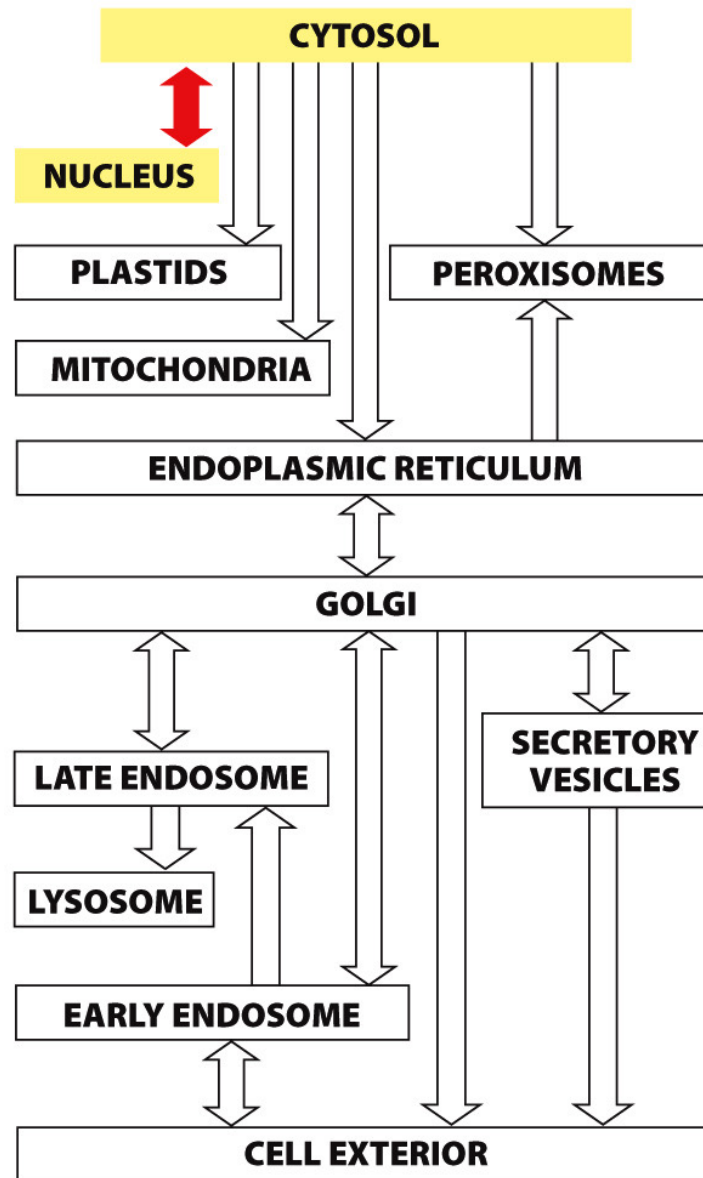
CITOSCHELETRO

RIBOSOMI

TRADUZIONE

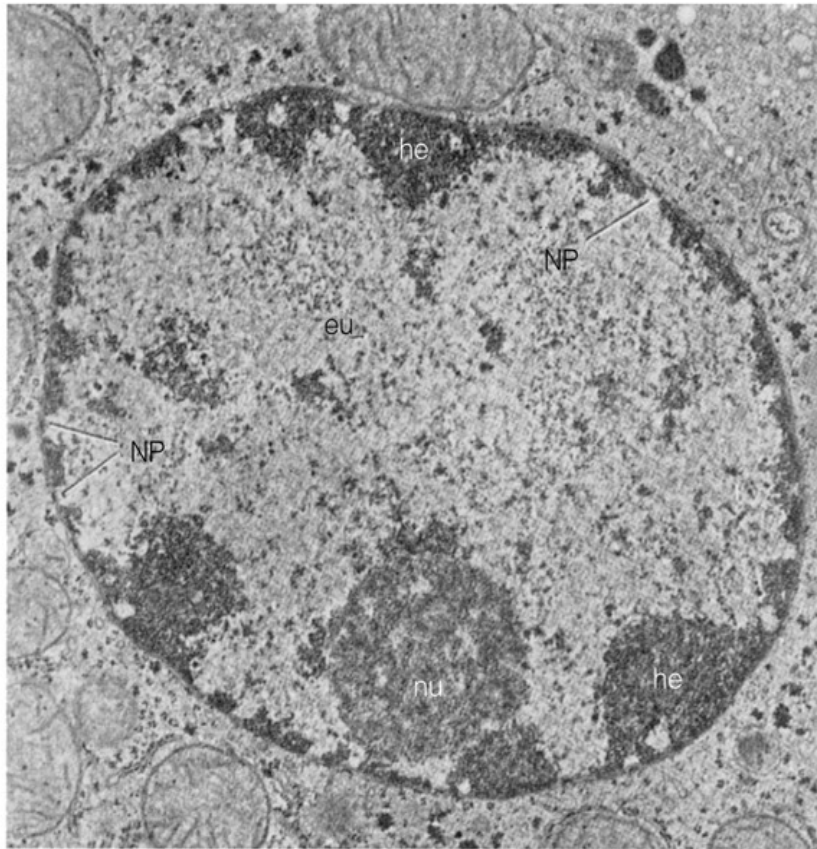
REAZIONI METABOLICHE

IL CITOSOL È IN STRETTA CONNESSIONE CON IL NUCLEO



IL NUCLEO È IL COMPARTIMENTO CHE RACCHIUDE IL DNA

Forma sferica nelle cellule isodiametriche (sferiche o cubiche) oppure ellittica nelle cellule allungate.



(a)

1 μm

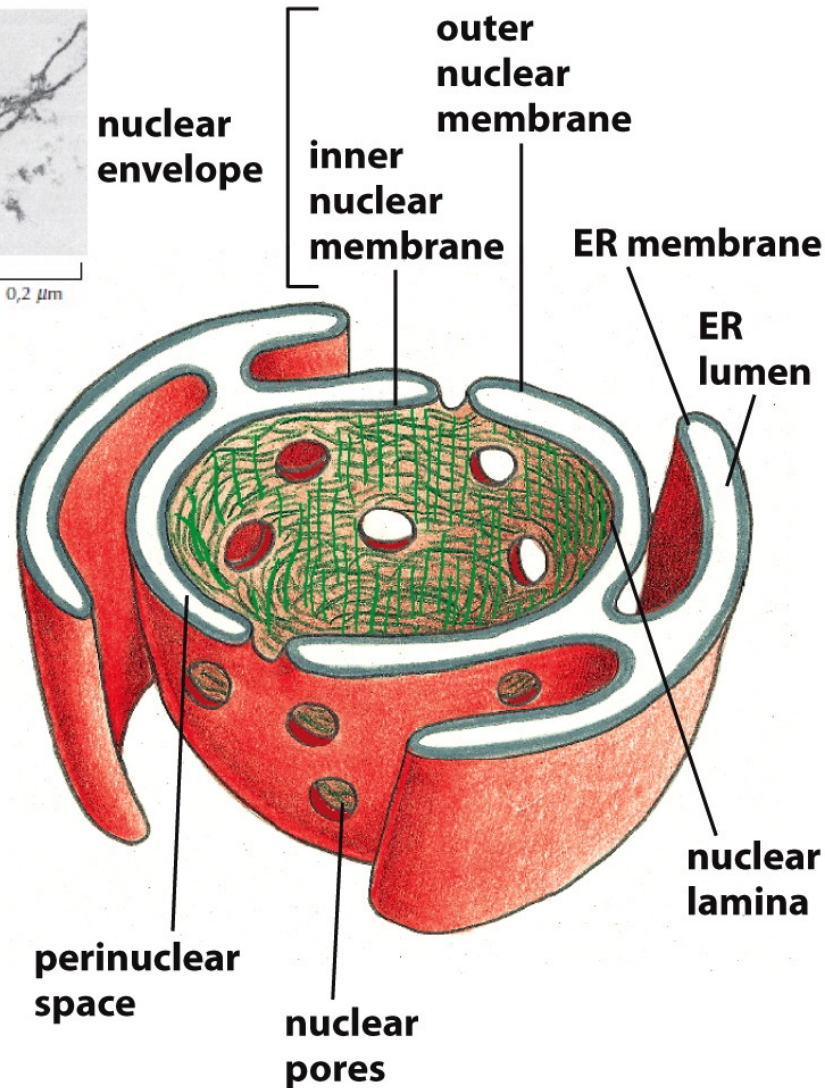
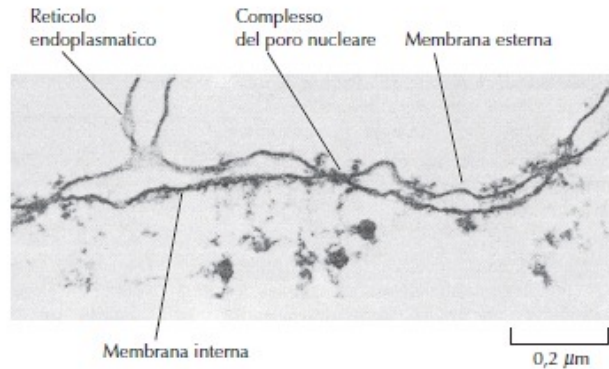
Il DNA è associato con proteine formando la Cromatina:

Eucromatina ("meno colorabile"): DNA in forma più rilassata

Eterocromatina (più densa agli elettroni): DNA in forma condensata

✓ È la sede dei processi di duplicazione e trascrizione

L'INVOLUCRO NUCLEARE DEFINISCE IL COMPARTIMENTO NUCLEARE ED È IN INTIMA CONNESSIONE CON IL RETICOLO ENDOPLASMICO

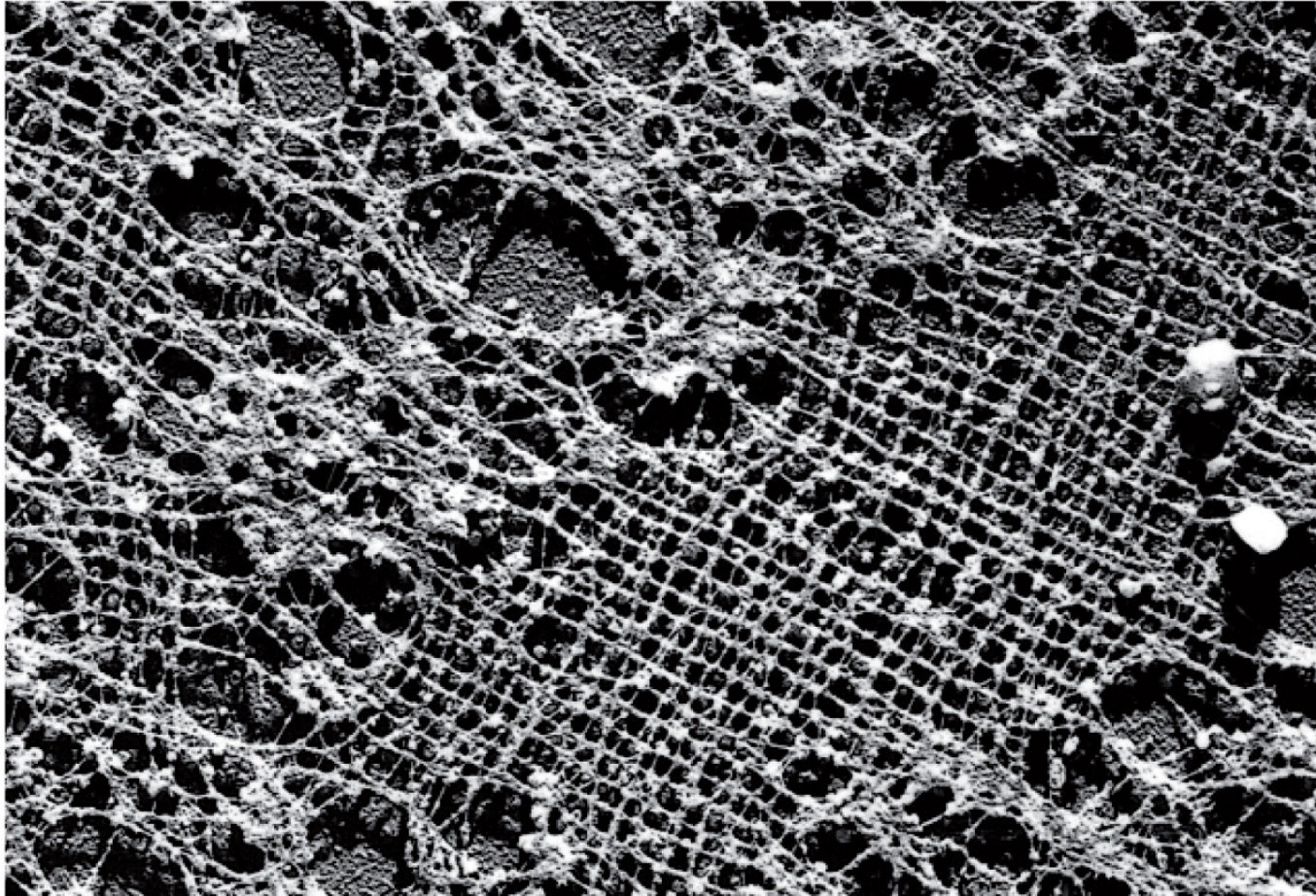


✓ L'involucro nucleare è costituito da una doppia membrana

✓ L'involucro nucleare presenta delle interruzioni: i PORI NUCLEARI

✓ La lamina nucleare costituita da proteine dette lamine, sostiene la struttura dell'involucro nucleare mediante legame alle proteine dei pori e a quelle della mb interna

LA LAMINA NUCLEARE FORMA UN RETICOLO FIBROSO

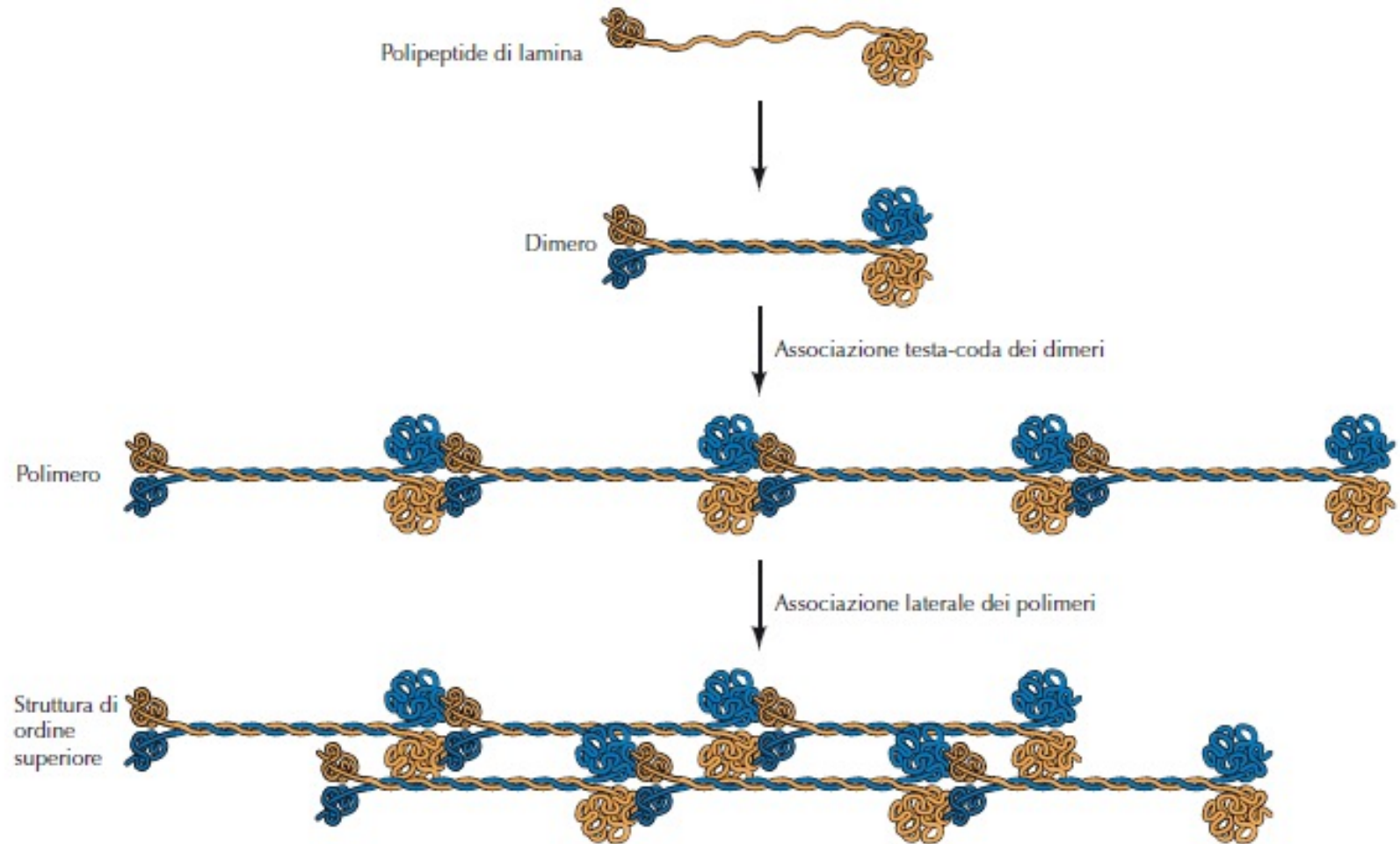


1 μ m

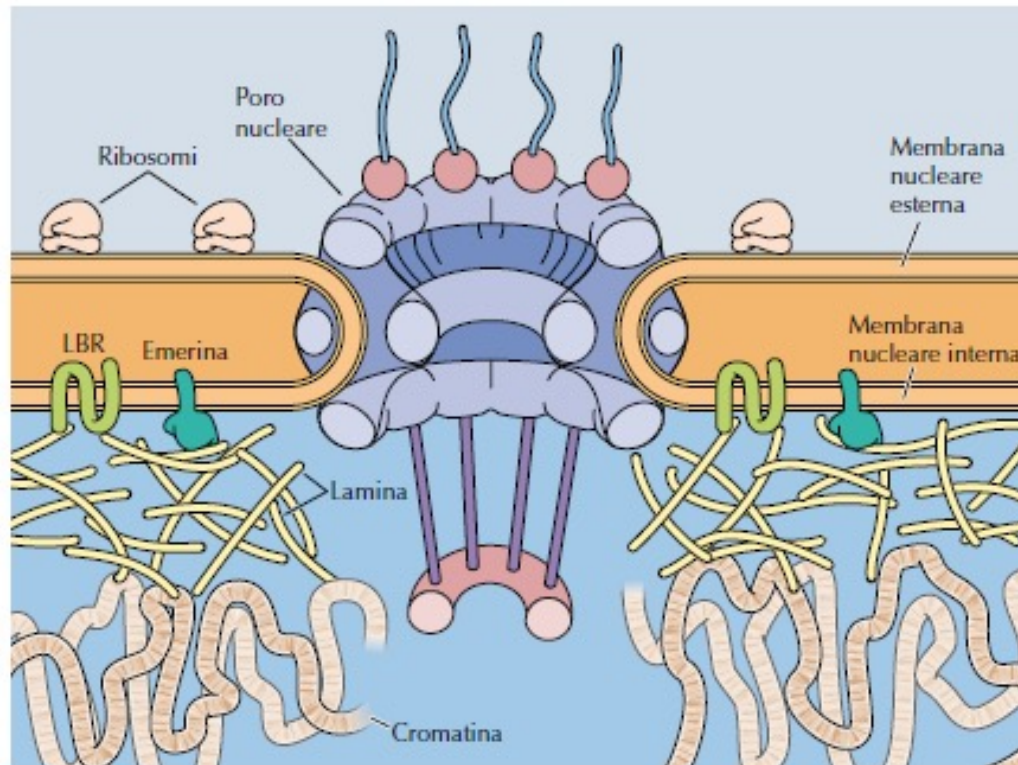
Proteine fibrose di 60-80 kDa: lamine

Nei mammiferi tre geni per le lamine: A, B, C

LE LAMINE SI ASSOCIANO A FORMARE STRUTTURE DI ORDINE SUPERIORE



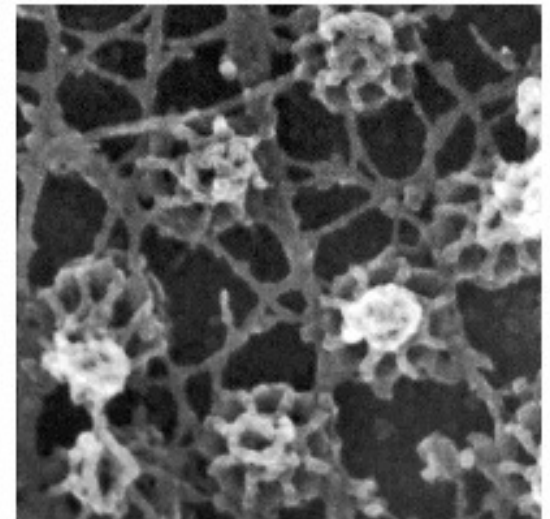
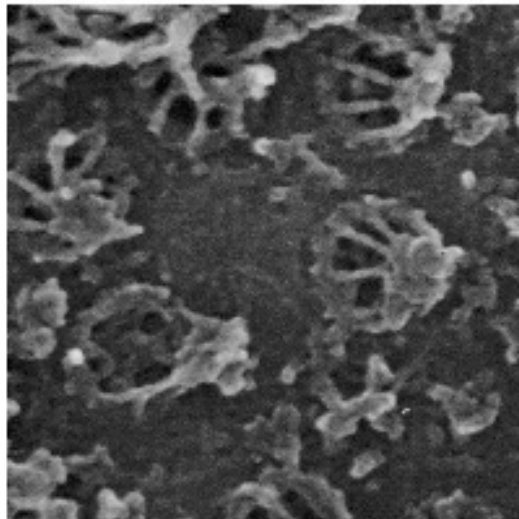
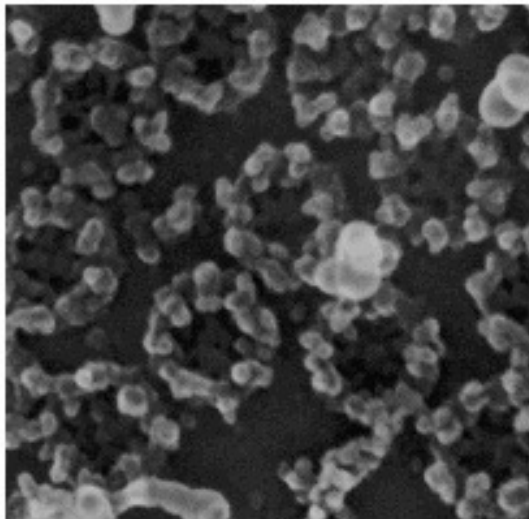
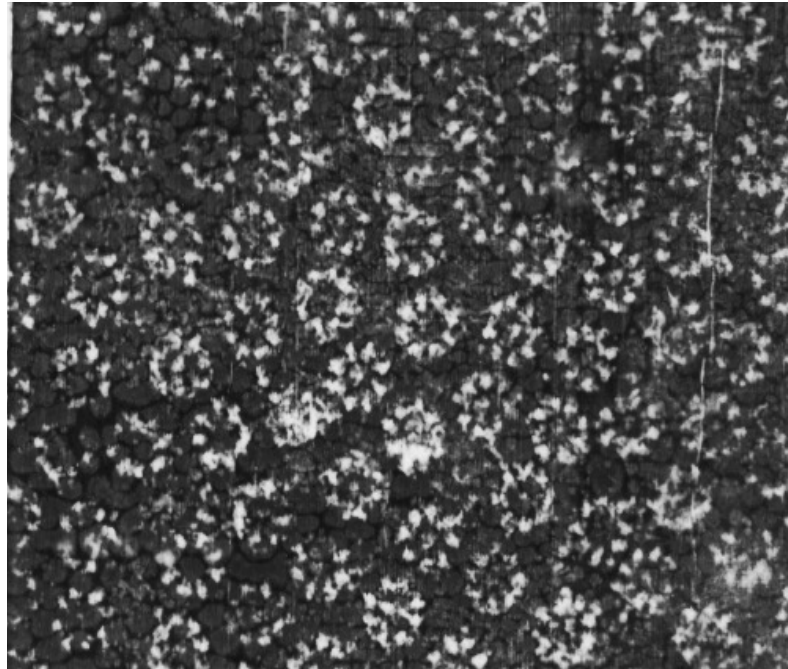
LA LAMINA NUCLEARE SI LEGA ALL'INVOLUCRO TRAMITE PROTEINE PRESENTI NELLA MEMBRANA INTERNA



Distrofia muscolare di Emery-Dreyfuss associata al cromosoma X:
mutazioni in **emerina**
Progeria di Hutchinson-Gilfords: mutazioni in **lamina A**

IL NUCLEO E' TAPEZZATO DI PORI CHE HANNO UNA STRUTTURA ALTAMENTE ORDINATA

AI PORI NUCLEARI
HANNO UNA
DEFINITA
STRUTTURA, DIVERSA
AI DUE LATI



I PORI NON SONO COMPLETAMENTE LIBERI

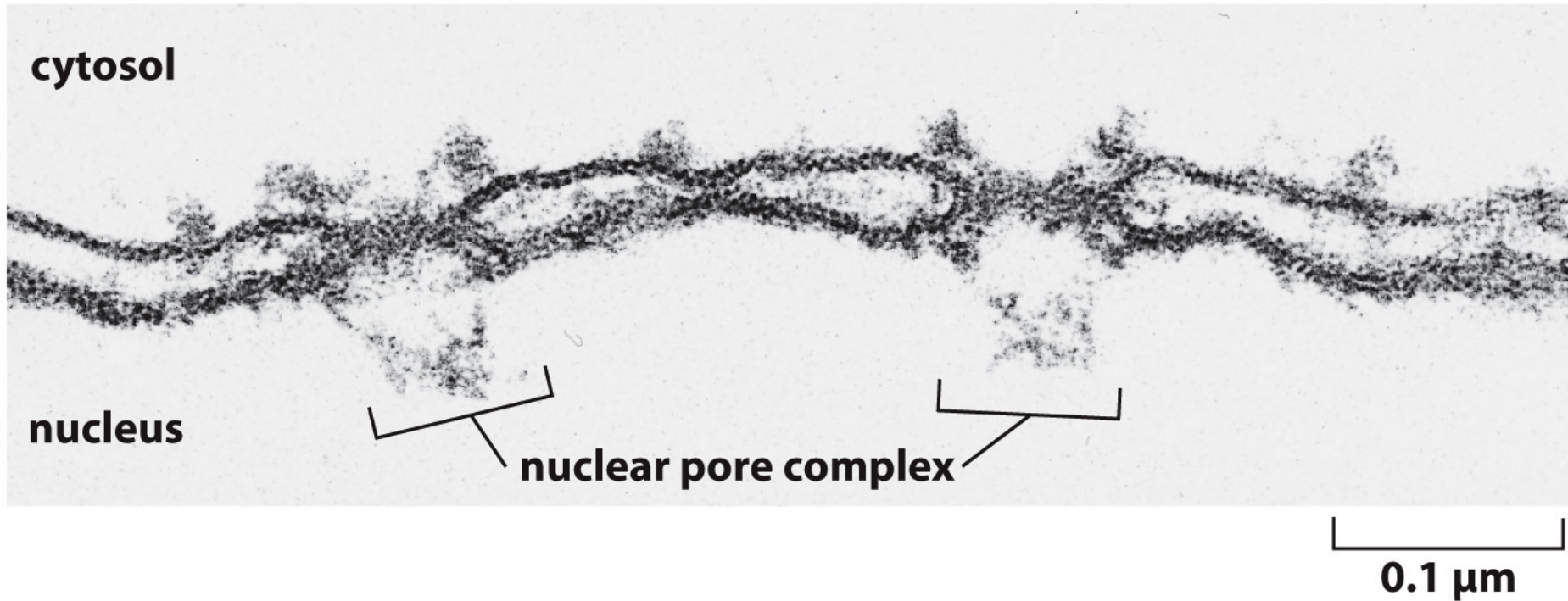
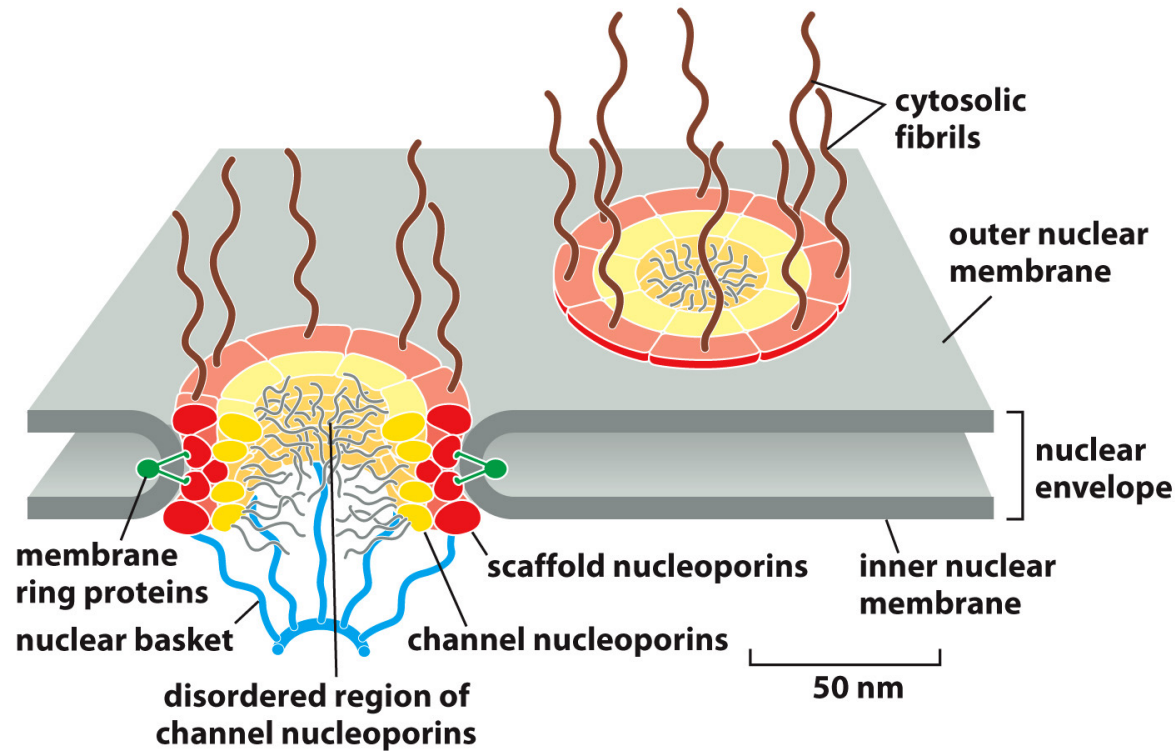


Figure 12-8c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

⌘ I pori nucleari hanno un diametro di circa 9 nm

REGIONI DISORDINATE DELLE NUCLEOPORINE OSTRUISCONO IL PORO



I pori nucleari sono costituiti da più di **30 proteine diverse** disposte secondo una simmetria ottagonale, hanno una struttura altamente organizzata collegata al citoscheletro da ambo i lati.

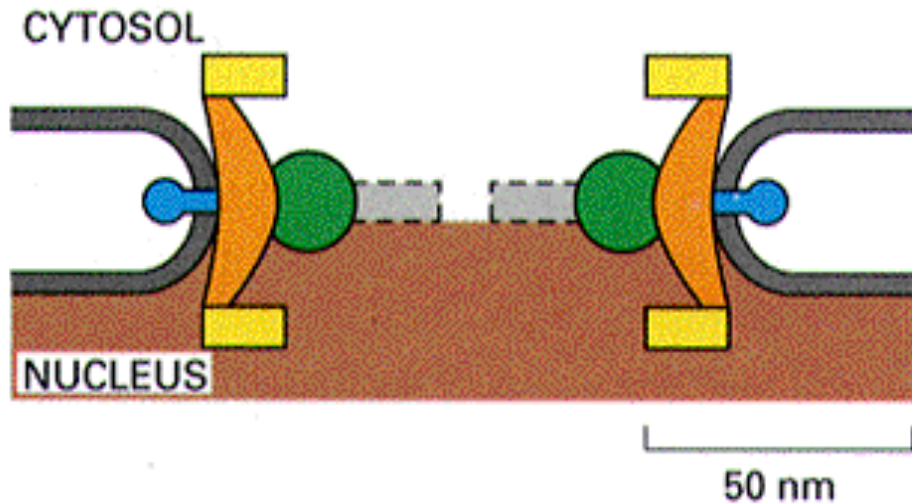
Scaffold nucleoporins (rosse): a Colonna formano la massa principale del poro

Channel nucleoporins (gialle): la cavità del poro, sono zone proteiche disordinate che bloccano il poro

Membrane ring proteins (verde): protein TM perpendicolari al poro

Proteine del nuclear basket e filamnetose del citosol face

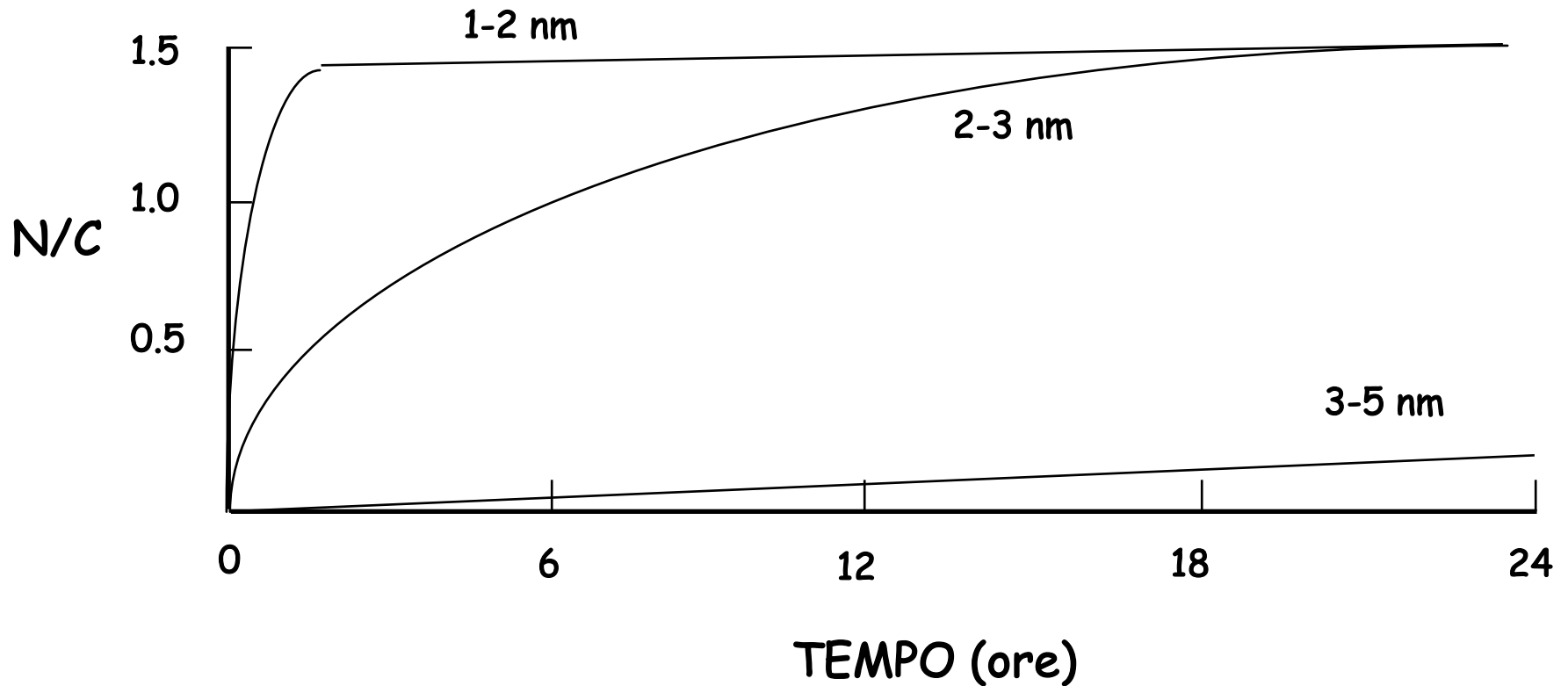
ALCUNE MOLECOLE PICCOLE DIFFONDONO LIBERAMENTE ATTRAVERSO I PORI



$< 9 \text{ nm}$

SI

LA VELOCITA' DI INGRESSO DI DESTRANO IN OOCITI DI RANA DIPENDE DAL PESO MOLECOLARE



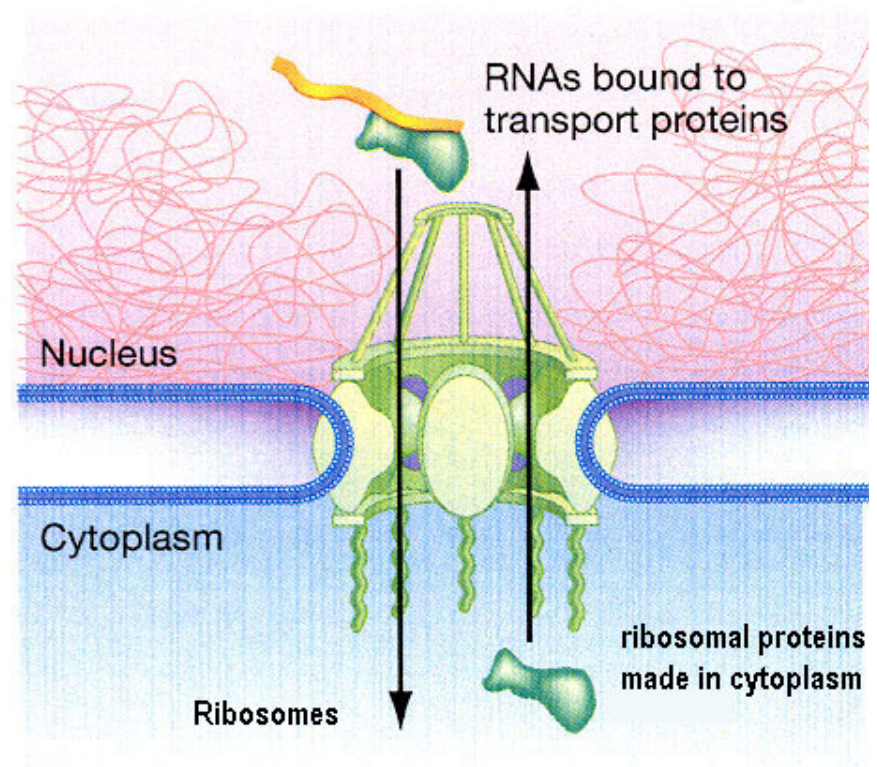
IL TRASPORTO ATTRAVERSO IL PORO E' BIDIREZIONALE

COSA ENTRA

Proteine: polimerasi, istoni, fattori di trascrizione, p. ribosomali, etc.
Nucleotidi, etc.

COSA ESCE

rRNA, tRNA, mRNA, ribosomi, etc.



COME AVVIENE L'IMPORTAZIONE DELLE PROTEINE NEL NUCLEO?

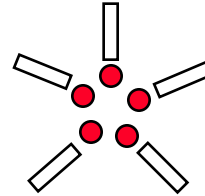
ESISTONO SEGNALI DI TRASPORTO DI PROTEINE NEL NUCLEO?

COME SONO FATTI QUESTI SEGNALI?

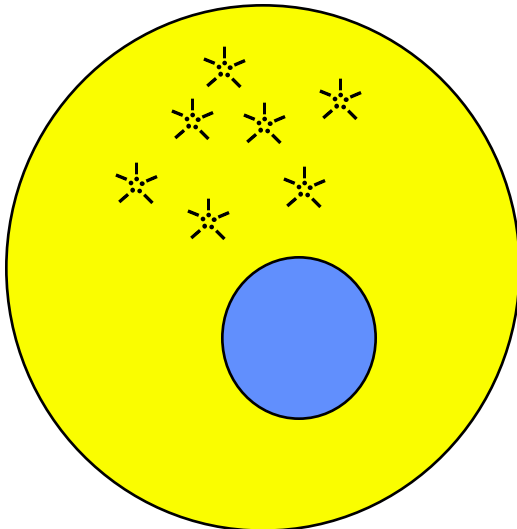
COME SI DIMOSTRA L'ESISTENZA DI QUESTI
SEGNALI?

NUCLEOPLASMINA CONTIENE SEGNALI NUCLEARI

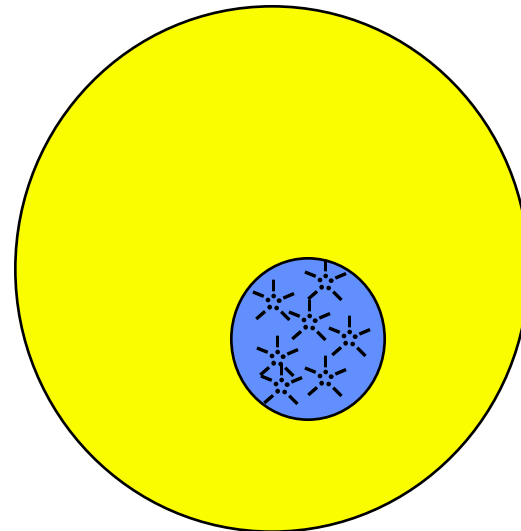
NUCLEOPLASMINA
RADIOATTIVA



INIEZIONE NEL
CITOPLASMA



LOCALIZZAZIONE
NEL NUCLEO

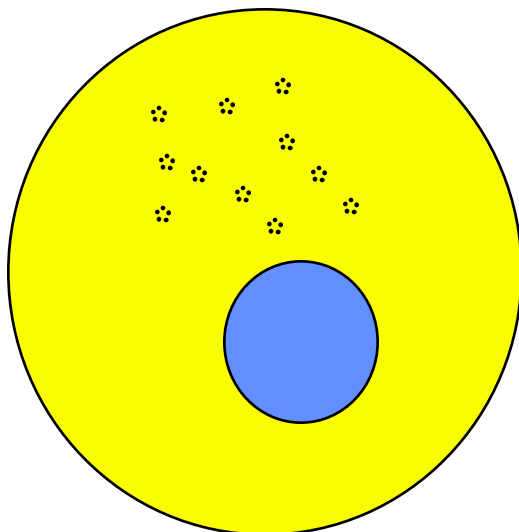


LE TESTE DELLA NUCLEOPLASMINA NON SI LOCALIZZANO NEL NUCLEO

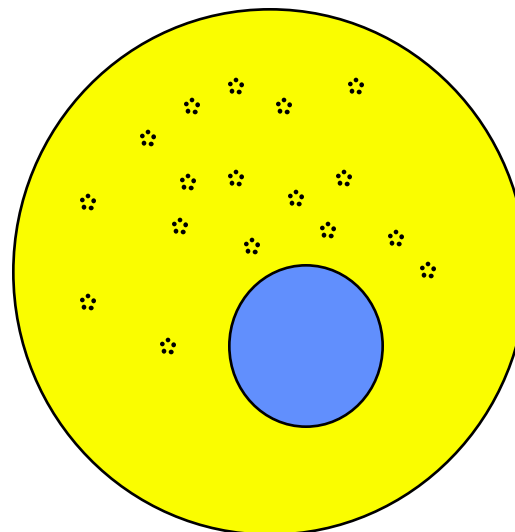
TESTE
RADIOATTIVE



INIEZIONE NEL
CITOPLASMA

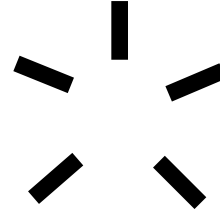


LOCALIZZAZIONE
NEL CITOPLASMA

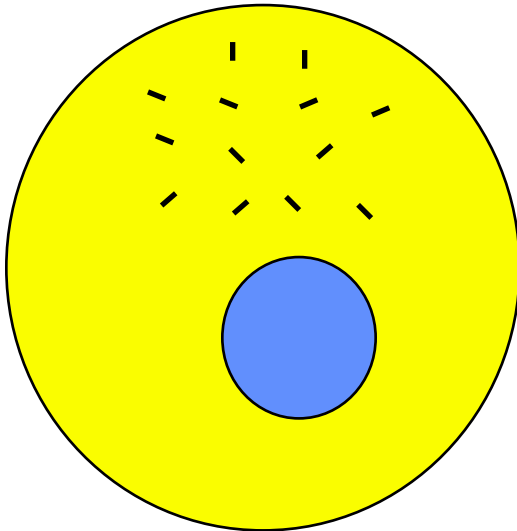


LE CODE DELLA NUCLEOPLASMINA SI LOCALIZZANO NEL NUCLEO

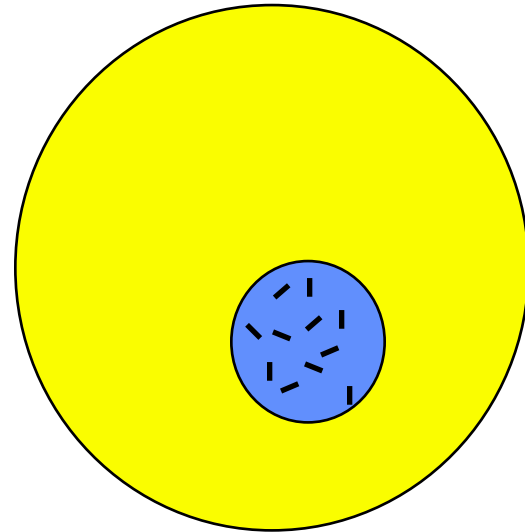
CODE
RADIOATTIVE



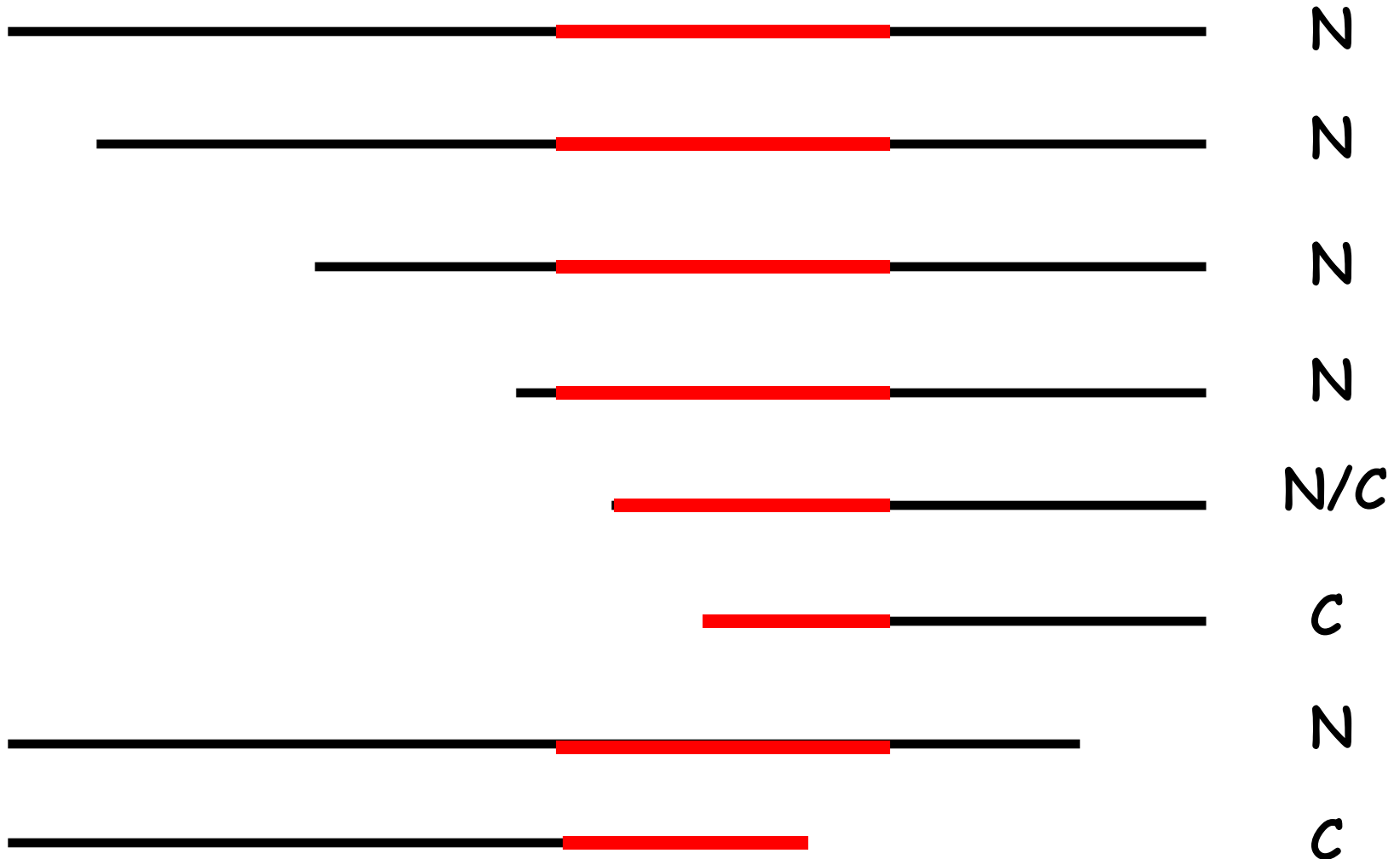
INIEZIONE NEL
CITOPLASMA



LOCALIZZAZIONE
NEL NUCLEO

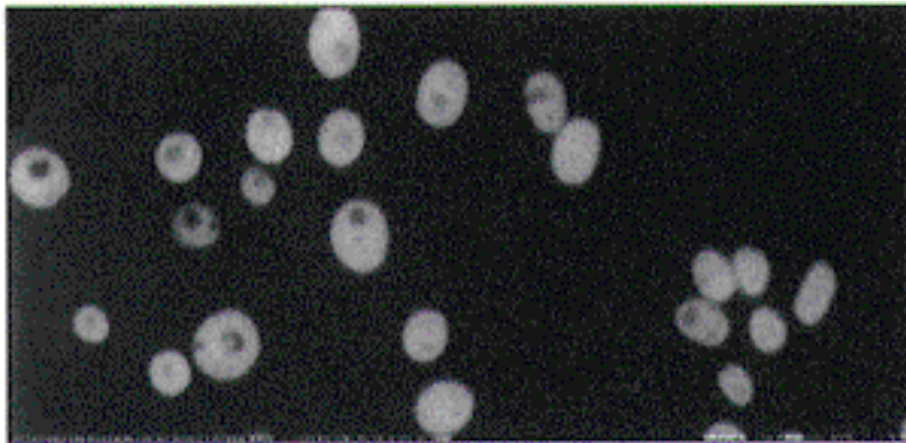


LA SEQUENZA SEGNALE DELL'ANTIGENE T È STATA INDIVIDUATA MEDIANTE DELEZIONI



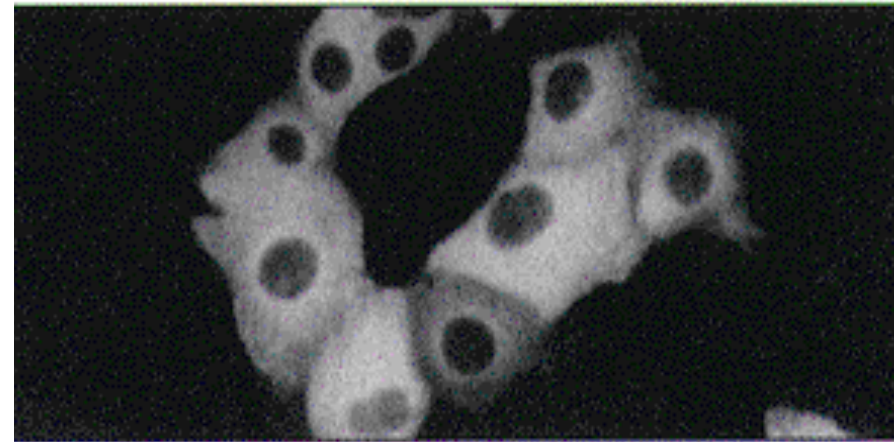
LA LISINA IN POSIZIONE 128 HA UN RUOLO CRITICO NELLA LOCALIZZAZIONE NUCLEARE DELL'ANTIGENE T

Pro — Pro — Lys — Lys — Lys — Arg — Lys — Val —
128



L'ANTIGENE-T SI LOCALIZZA NEL NUCLEO

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



L'ANTIGENE-T MUTATO NEL
SEGNALE SI LOCALIZZA NEL
CITOPLASMA

LE SEQUENZE SEGNALE DI LOCALIZZAZIONE NUCLEARE (NLS) HANNO CARATTERISTICHE IN COMUNE

PROTEINA

SEQUENZA

ANTIGENE T
(SV40)

Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

PROTEINA 72k Da
(adenovirus)

Pro-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg

VP2/3
(polioma)

Gln-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu

70k Da
(drosophila)

Lys-Arg-Gly-Lys-Arg-Lys-Lys

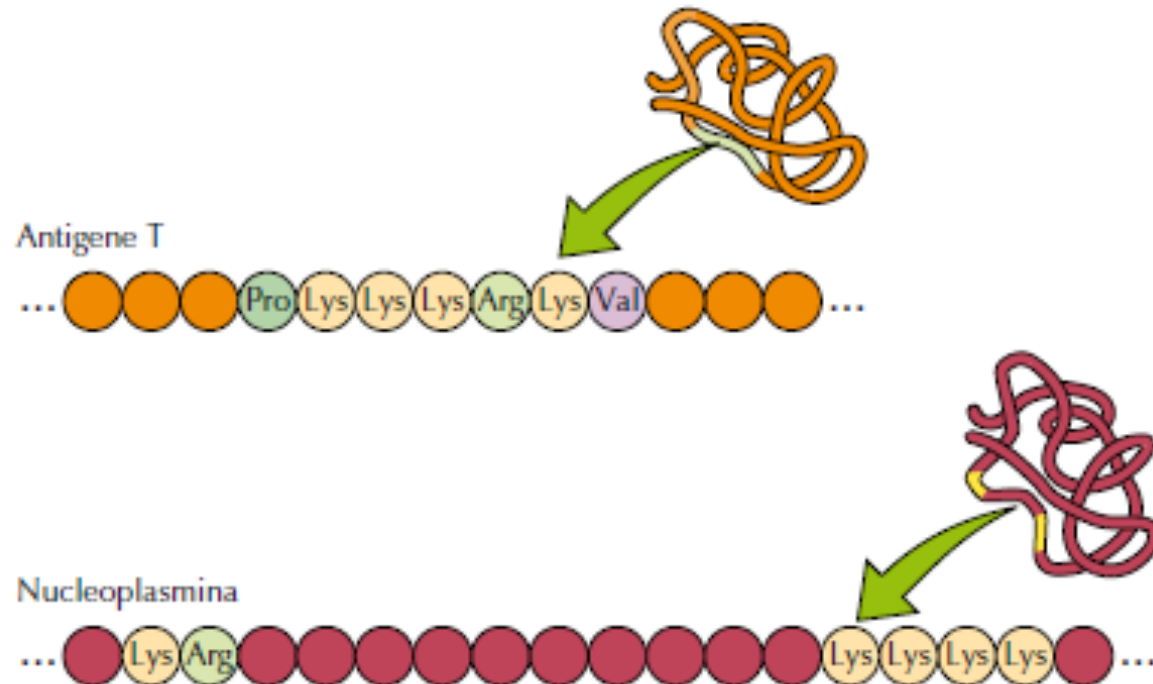
c-myc
(pollo)

Glu-Gln-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg

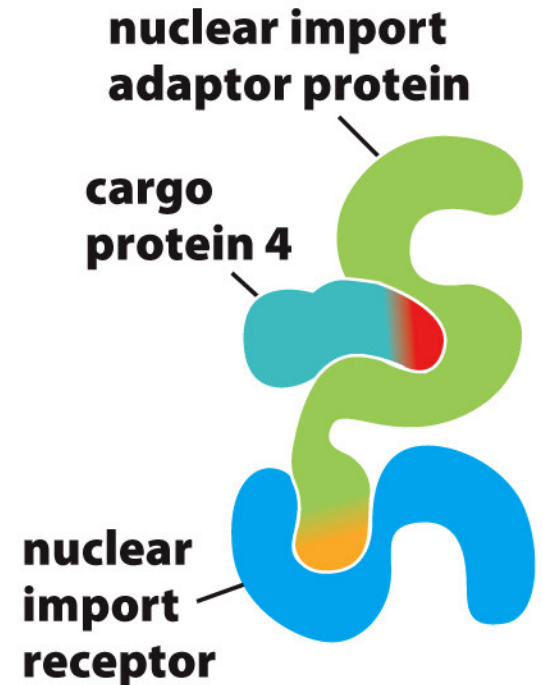
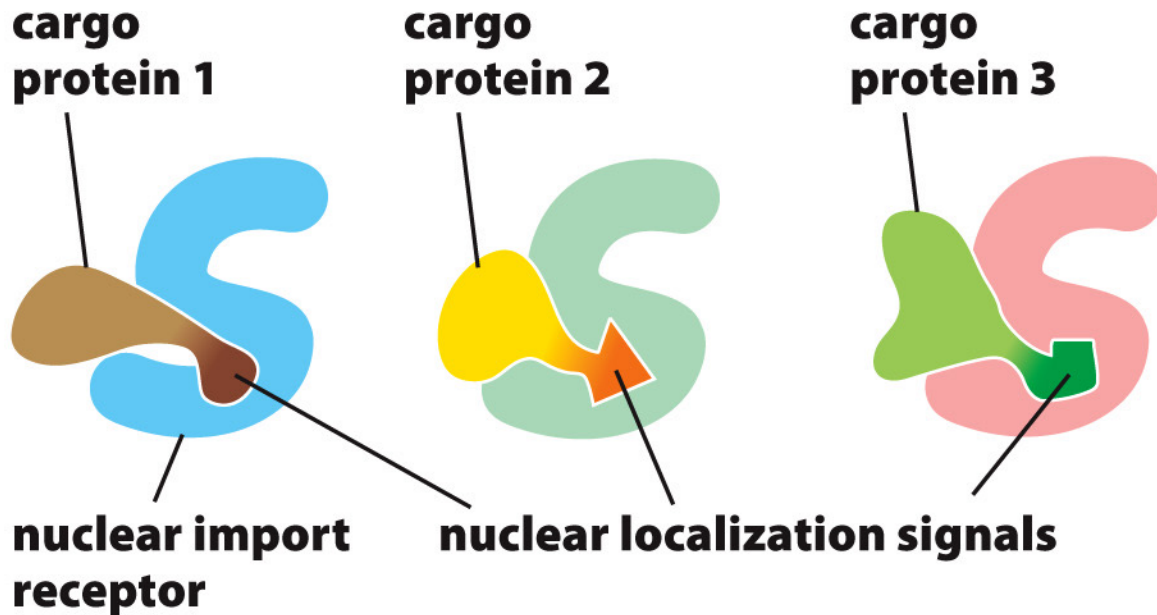
LE SEQUENZE SEGNALE DI LOCALIZZAZIONE NUCLEARE HANNO CARATTERISTICHE IN COMUNE

NLS: NUCLEAR LOCALIZATION SIGNALS

1. SEQUENZE RICCHE IN AA BASICI PKKKRKV
2. ALL'INTERNO DELLA PROTEINA!
3. FREQUENTEMENTE BIPARTITE!!



LE SEQUENZE SEGNALE VENGONO RICONOSCIUTE DA RECETTORI SPECIFICI: **LE IMPORTINE**



IL COMPLESSO CARGO-IMPORTINA COMPLEX PASSA ATTRAVERSO I PORI

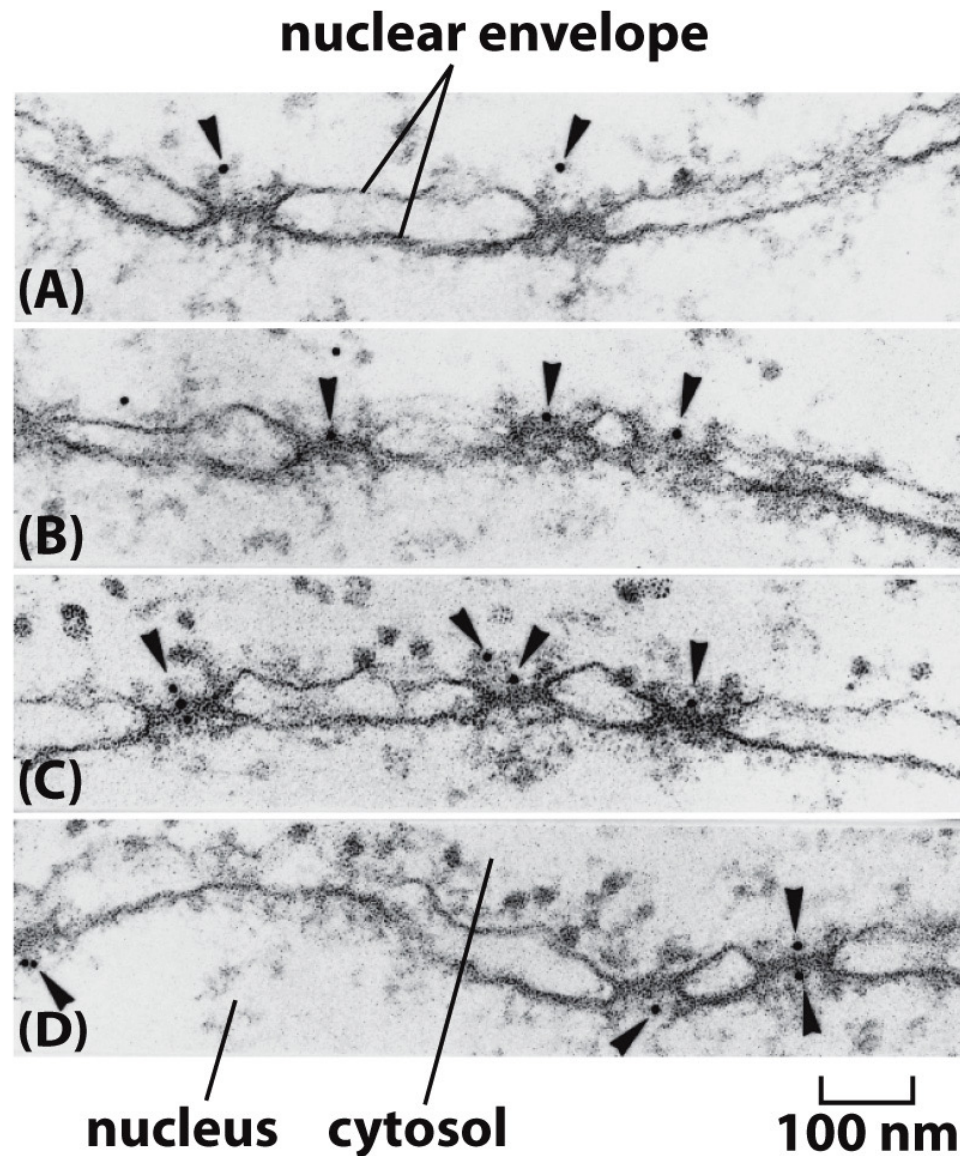
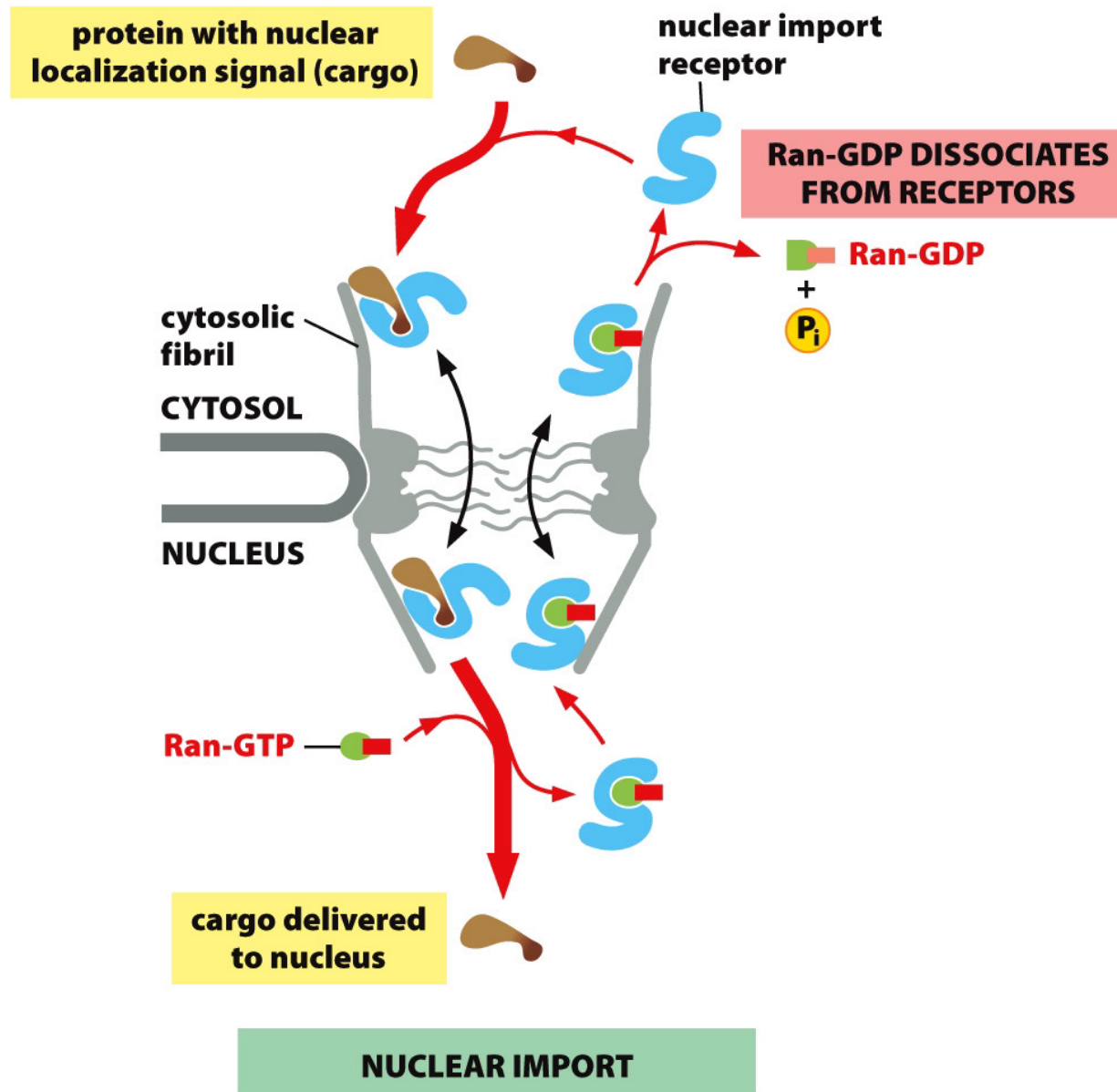


Figure 12-10 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

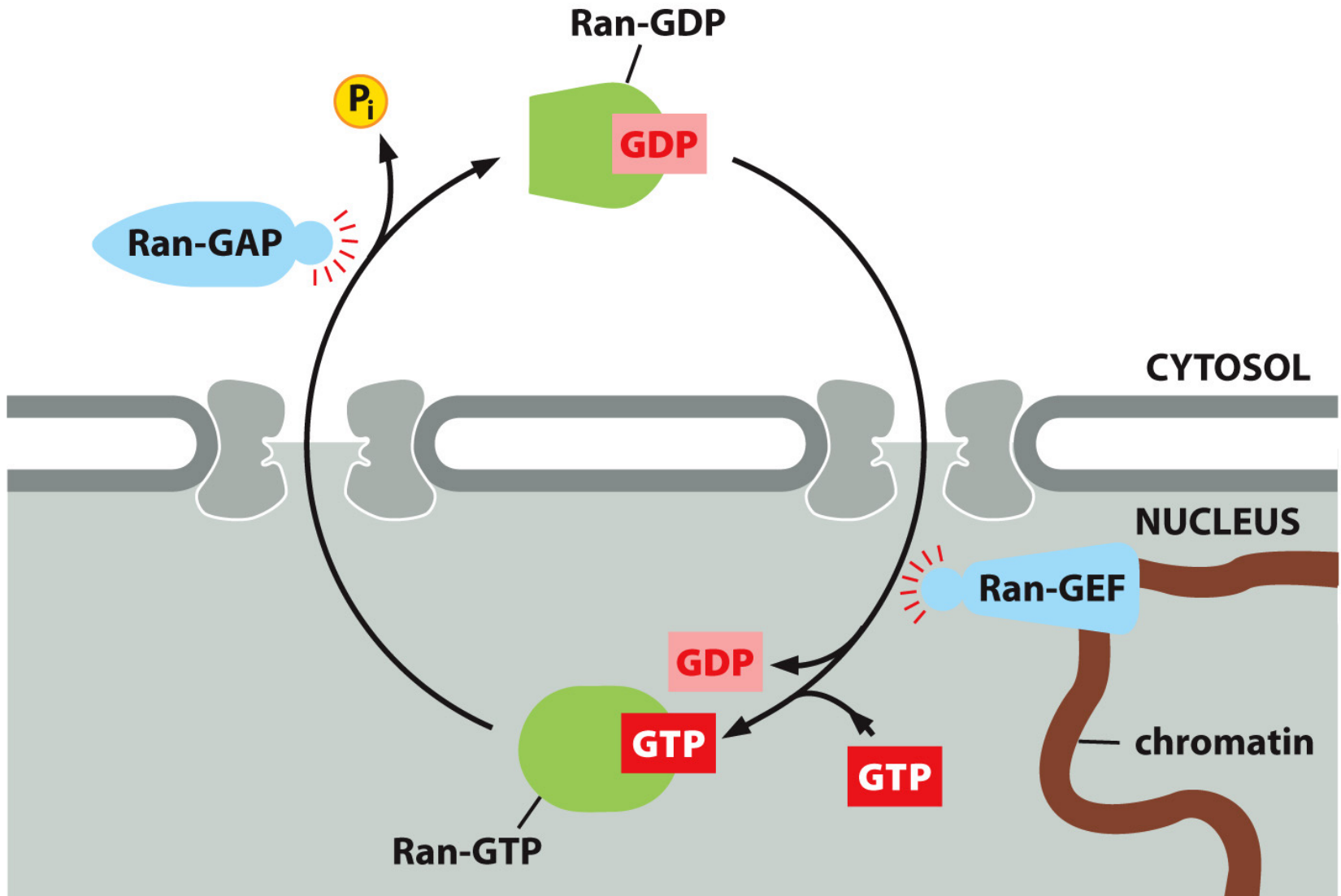
L'INGRESSO DELLE PROTEINE NEL NUCLEO AVVIENE IN DIVERSI STEP



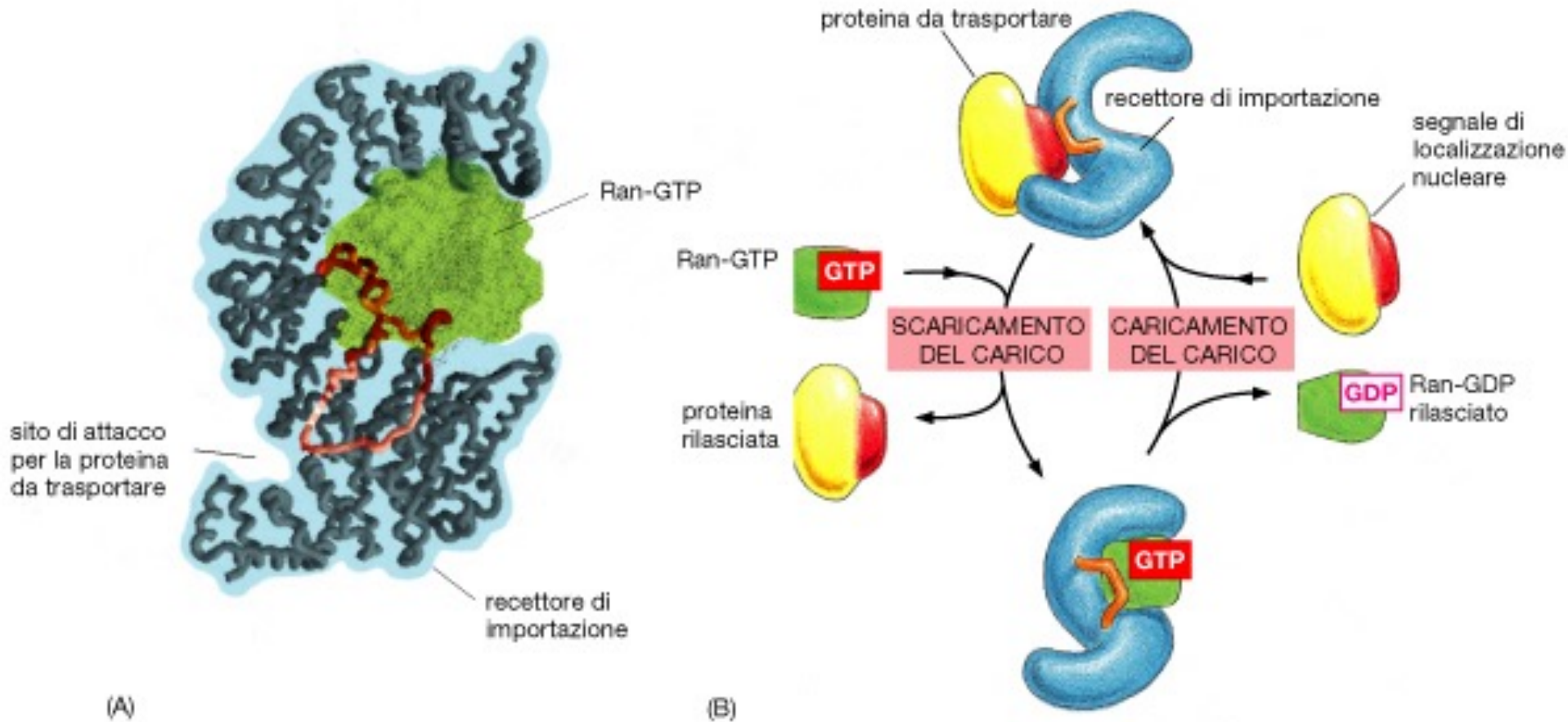
LA PROTEINA RAN E' UN REGOLATORE CHIAVE DEL TRASPORTO NUCLEARE



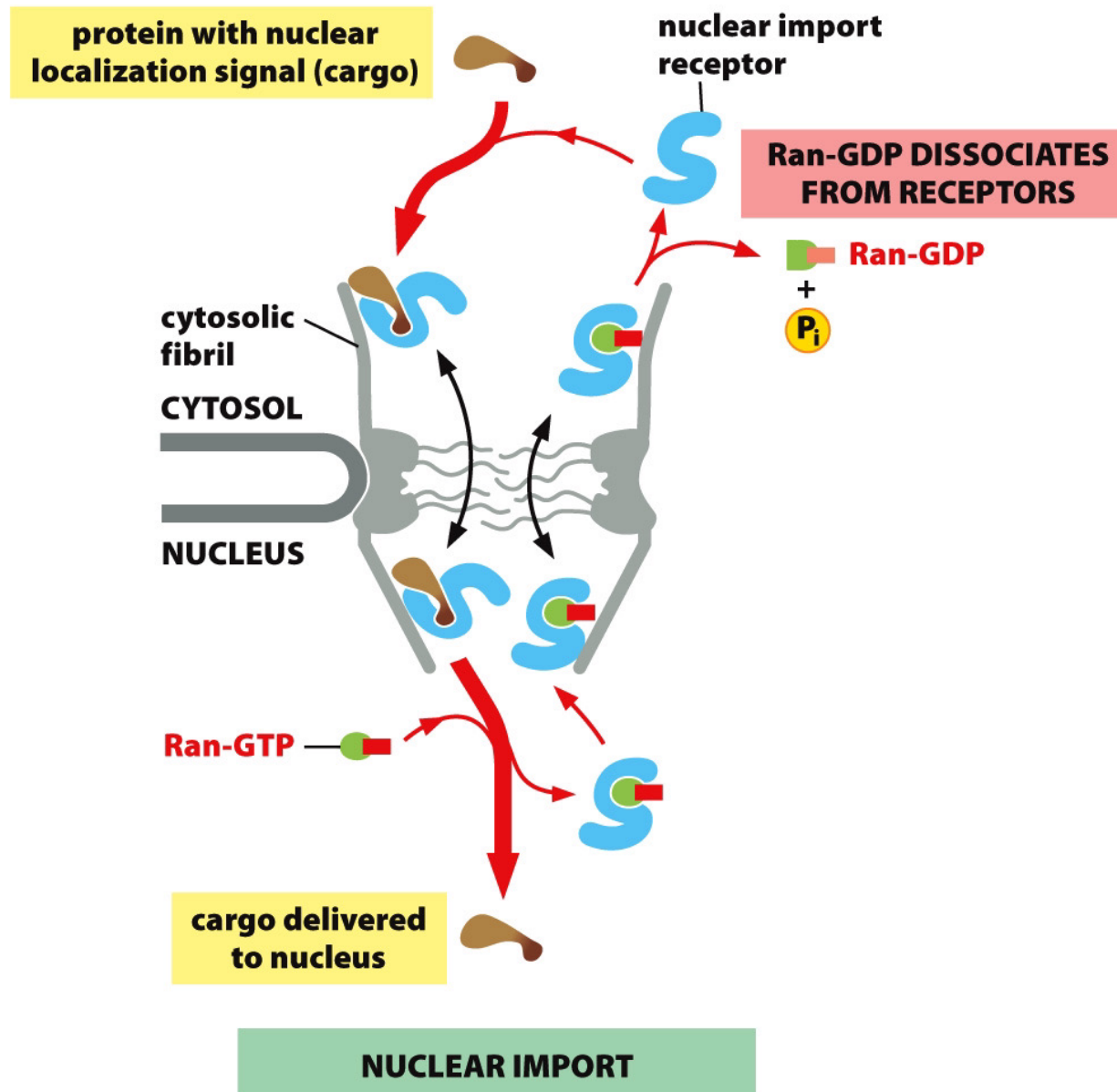
LA PROTEINA RAN-GAP E RAN-GEF SONO DIFFERENTEMENTE LOCALIZZATE



RAN-GTP CAUSA IL RILASCIO DEL CARGO!



L'INGRESSO DELLE PROTEINE NEL NUCLEO AVVIENE IN DIVERSI STEP



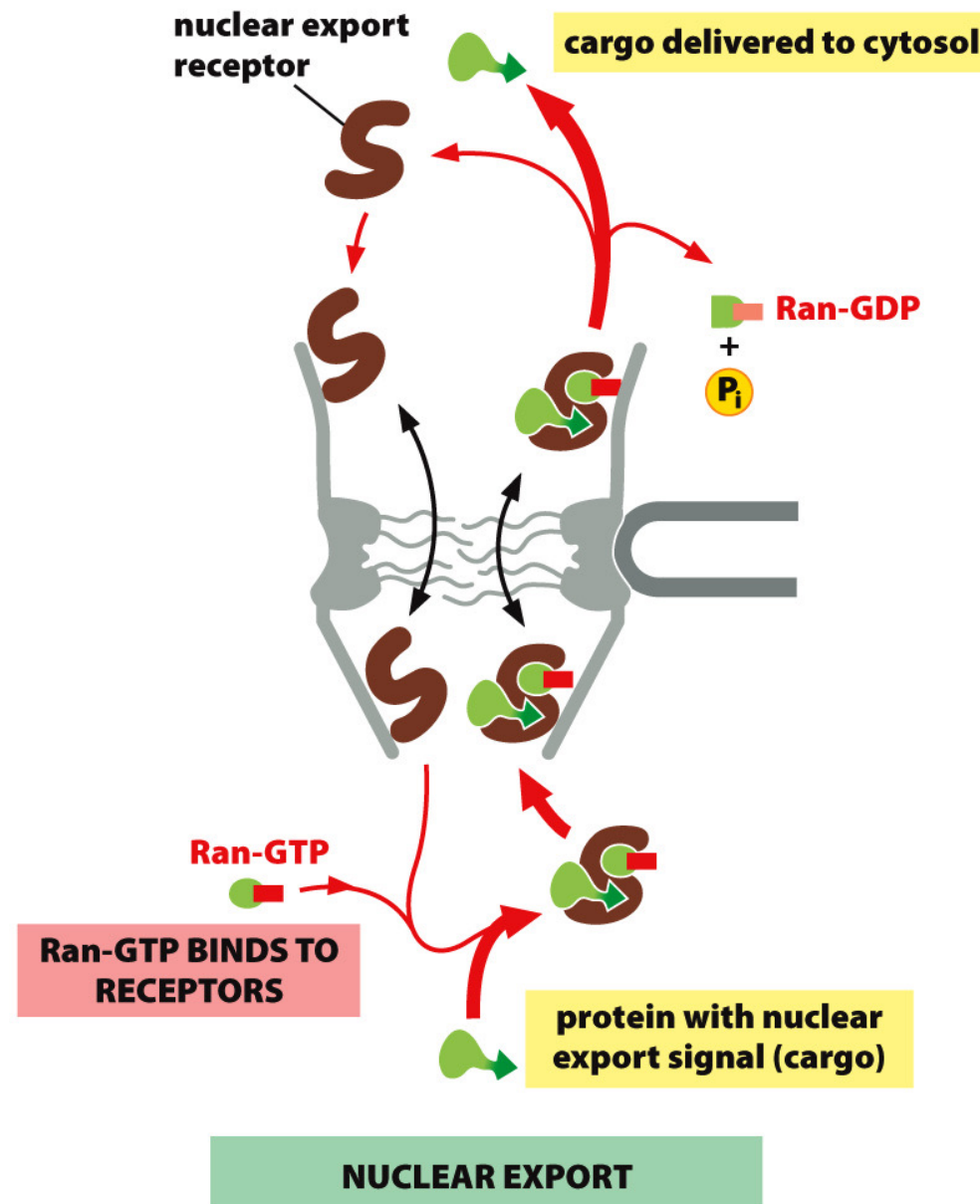
L'ESPORTAZIONE DI PROTEINE DAL NUCLEO RICHIEDE SEGNALI

NES:NUCLEAR EXPORT SIGNALS

1. hnRNP A1 (38 RESIDUI AMMINOACIDICI)
2. hnRNP (K)
3. PK1 e Rev (RICCHE DI LEUCINA)

ESPORTINE

ANCHE L'USCITA DI PROTEINE DAL NUCLEO AVVIENE IN DIVERSI STEP



IMPORTINE ED ESPORTINE FORMANO LA CLASSE DELLE CARIOFERINE

TABELLA 9.1 Le carioferine e i substrati conosciuti

Carioferina	Substrato
Dal citoplasma al nucleo	
Dimero Kap α /Kap β 1	Proteine con un segnale amminoacidico di localizzazione nucleare basico (es. nucleoplasmina)
Snurportin/Kap β 1	snRNPs (U1, U2, U4, U5)
Kap β 1 da solo	Complessi Cdk/ciclina
Kap β 2 (trasportina)	Proteine leganti l'mRNA, proteine ribosomiali
Dimero Importina/Kap β 1	Istone H1, proteine ribosomiali
Dal nucleo al citoplasma	
Crm1	Proteine con un segnale di esportazione nucleare ricco di leucine, snurportina
CAS	Kap α
Esportina t	tRNA
Esportina 4	Fattore di allungamento 5A

IL TRASPORTO ATTRAVERSO IL PORO È BIDIREZIONALE

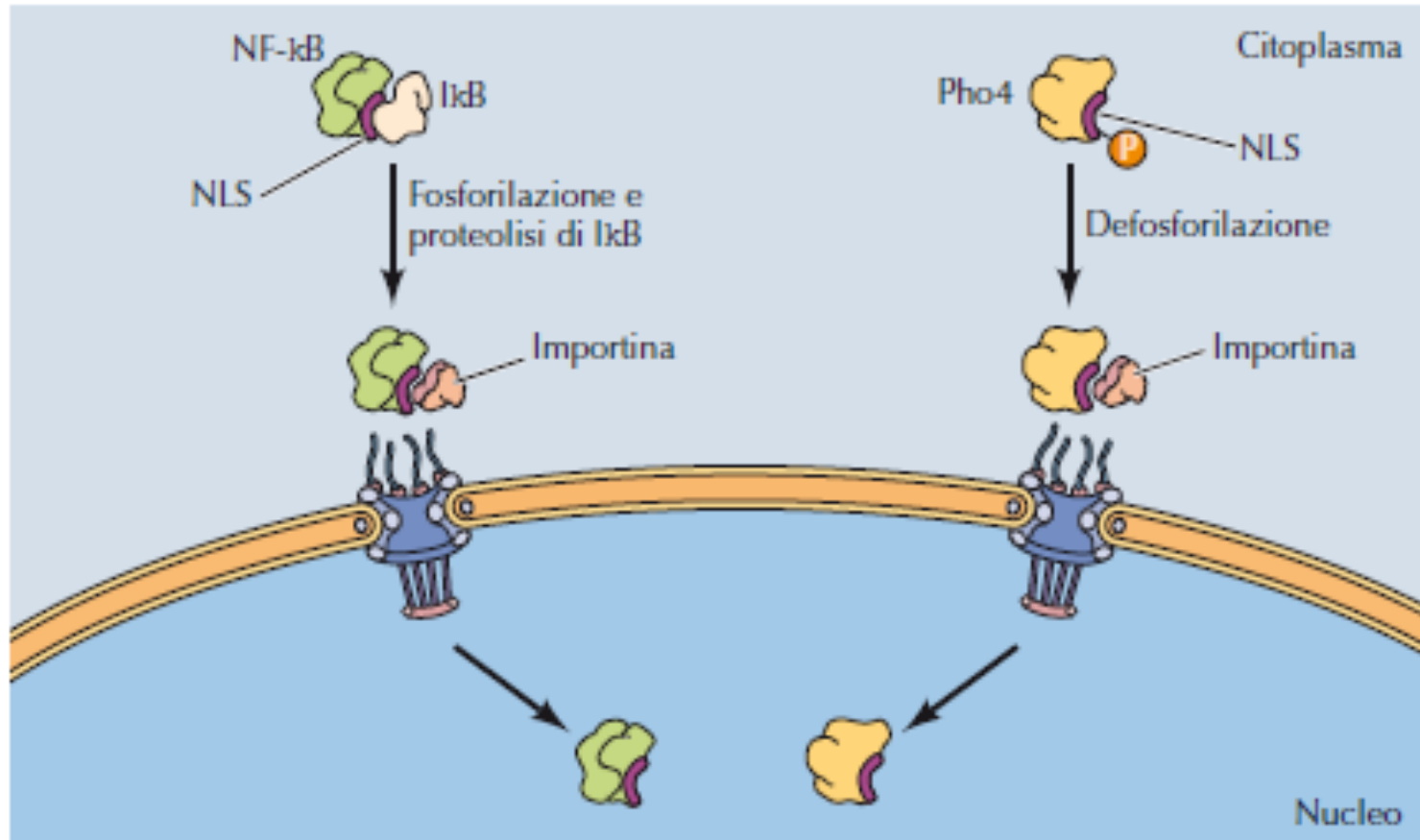


Il trasporto può essere regolato controllando l'accesso al
macchinario di trasporto:

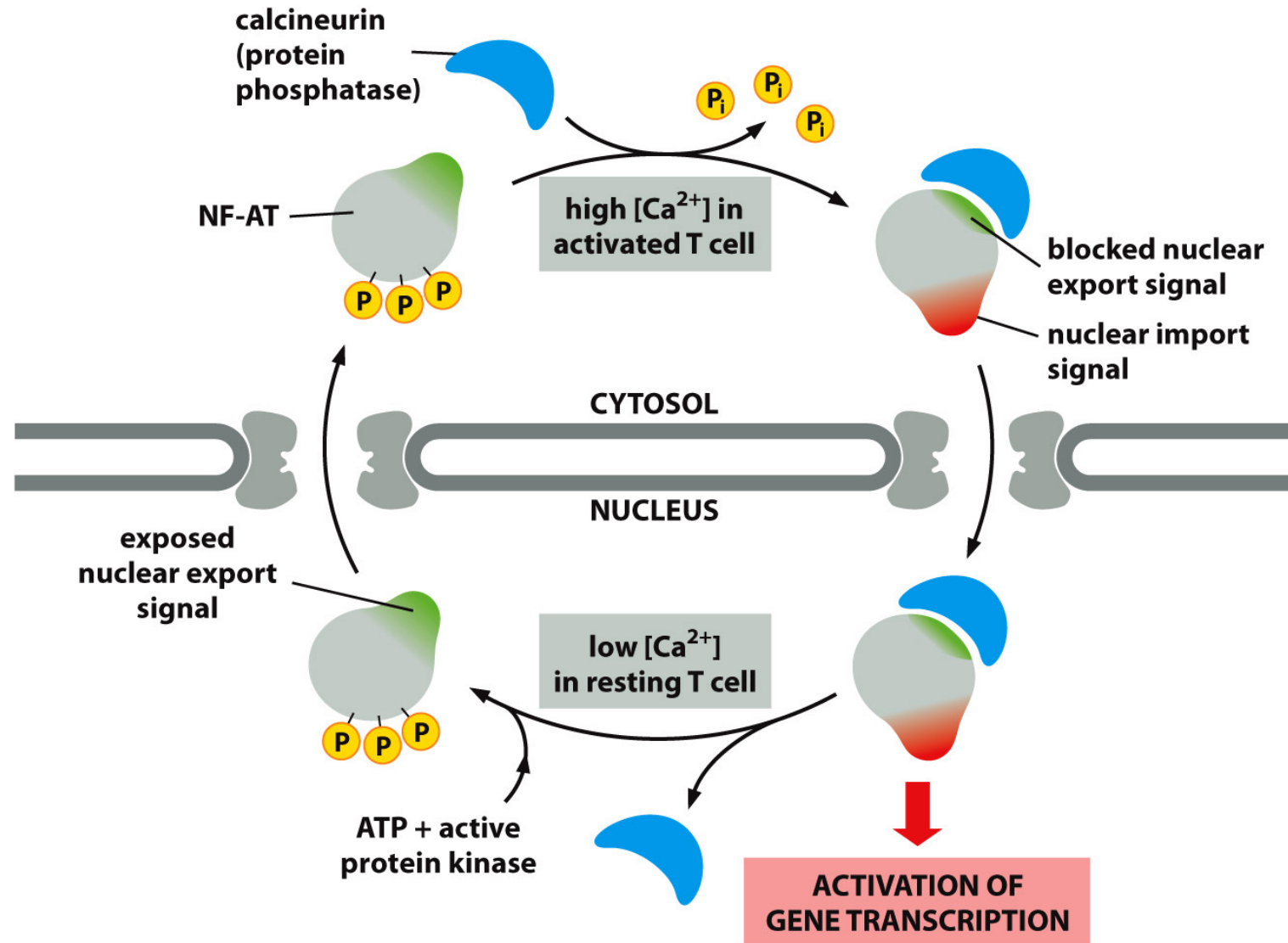
MASCHERANDO IL SEGNALE

Legame con proteine inibitrici
Fosforilazione

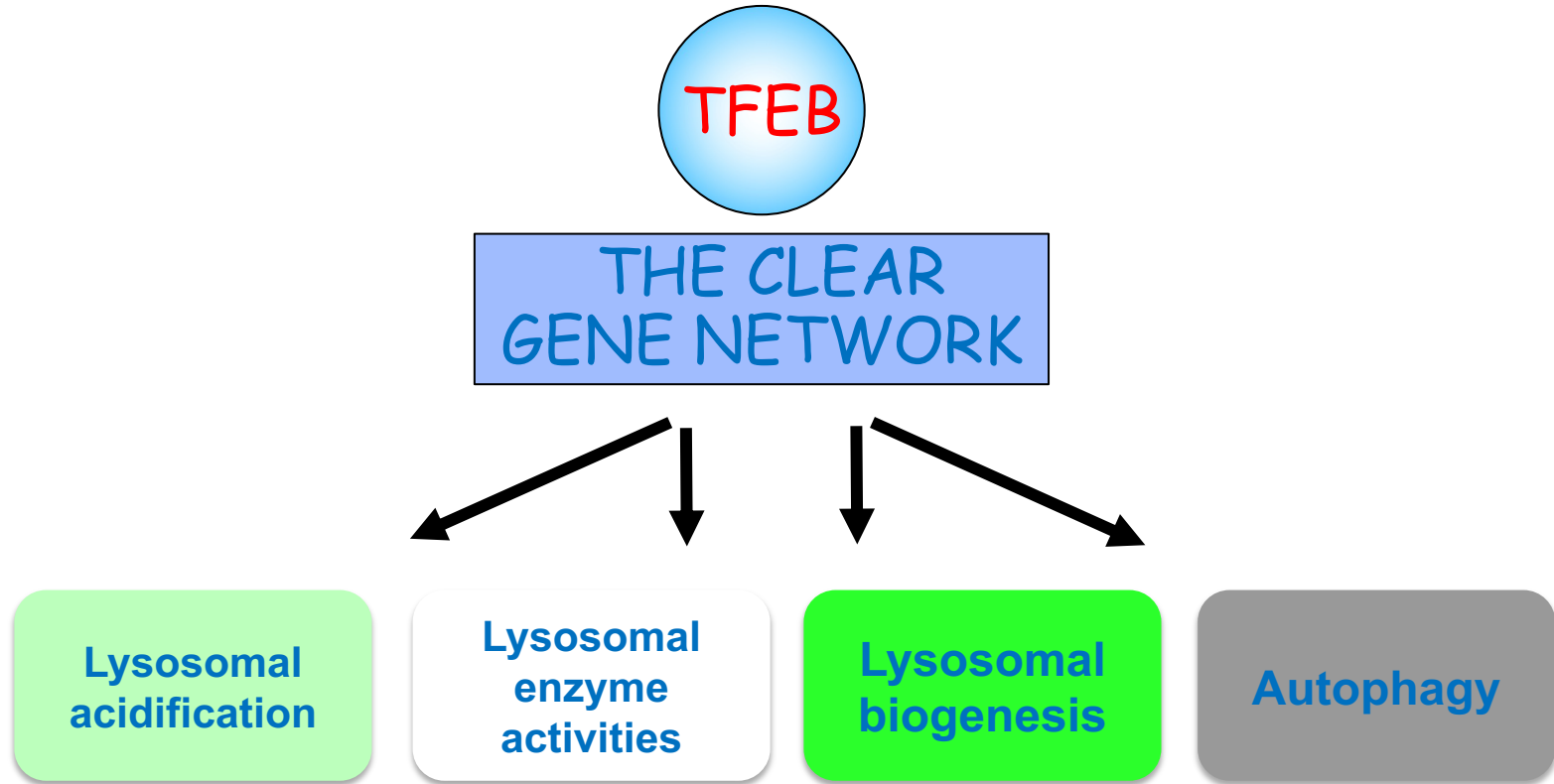
L'INGRESSO DI FATTORI TRASCRIZIONALI NEL NUCLEO È FINEMENTE REGOLATO



DURANTE L'ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI T, LA DEFOSFORILAZIONE COMPORTA LO SMASCHERAMENTO DEL SEGNALE DI IMPORTAZIONE NUCLEARE



TFEB: leucine zipper basic HLH TF.
It belongs to MiT/TFE subfamily together with MITF, **TFE3**
and **TFEC**



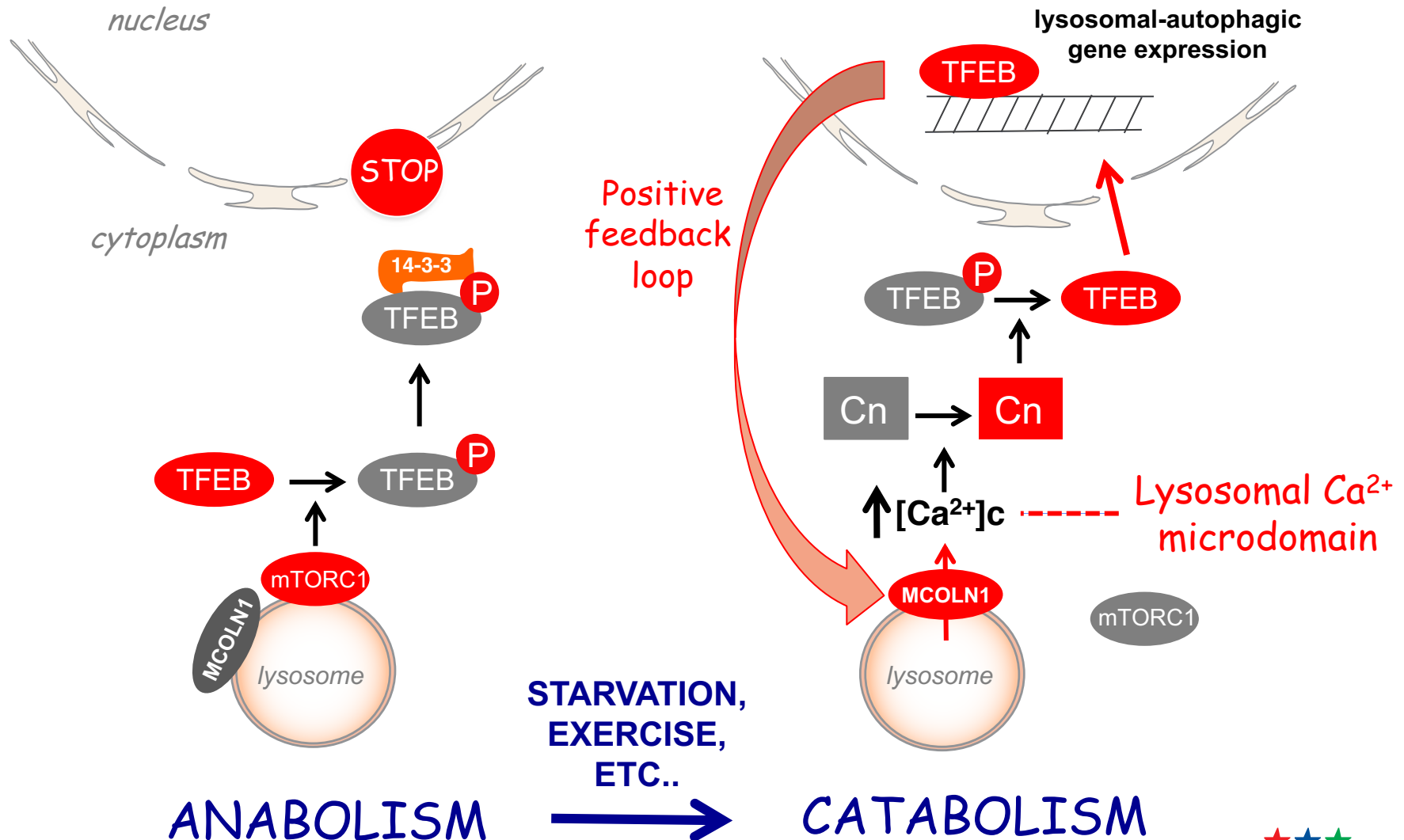
*Settembre C & Medina DL. 2015. *Methods Cell Biol*.*

*Settembre C, et al. 2013 *Nat Rev Mol Cell Biol*.*

*Settembre C, et al. 2011. *Science**

*Sardiello M, et al. 2009. *Science*.*

Summary II: A lysosome-to-nucleus signaling mechanism



DIVERSI MECCANISMI POSSONO SMASCHERARE IL SEGNALE

