

# Lezioni 0

Le prime forme autotrofe operavano una fotosintesi/chemiosintesi anaerobia, simile a quella operata dai moderni solfobatteri; più tardi si originarono i primi procarioti aerobi e la fotosintesi aerobia (simili agli attuali cianobatteri, 3,5 mld di anni fa, con l'accumulazione di ossigeno nell'atmosfera, che passa con ciò ad ossidante). Per quanto riguarda l'origine dei composti della vita, nota: è dimostrato sperimentalmente che il calore e la vaporizzazione dell'acqua su opportuni substrati inducono la spontanea aggregazione di monomeri in polimeri.

## Lezione I

Le cellule vegetali presentano alcune peculiarità, tra cui spicca la parete pectocellulosica. Il vacuolo è molto ampio soprattutto nelle cellule vegetali differenziate.

Il passaggio dalla cellula procariotica a quella eucariotica include una serie di step:

- 1) RE e (forse) nucleo (sistema endomembranoso) si formarono per **invaginazione** del plasmalemma.
- 2) Inglobamento di un procariote aerobio eterotrofo (protobatteri aerobi -> mitocondrio) e di uno autotrofo (plastidi, tra cui cianobatteri -> cloroplasti, non negli animali, successivo): **endosimbiosi**, dovuta a fagocitosi di un procariote che non viene digerito e stabilisce una simbiosi stabile dall'interno. Ne deriva un protoeucariote, cioè un eucariote ancestrale, fotosintetico. Gli eventi di endosimbiosi vengono collocati circa 1mld di anni fa. Ciò rese possibile la vita in presenza di ossigeno e lo sfruttamento dello stesso, a fine energetico, con la via aerobia. Le cellule in grado di acquisire cianobatteri senza digerirli poterono approdare all'autotrofia. I dati a favore dell'ipotesi includono le dimensioni di cloroplasti e mitocondri, la presenza al loro interno di DNA circolare e la replicazione per scissione binaria, anche se gli organelli non sono più autosufficienti. Anche i flagelli si pensa derivino da endosimbiosi e successiva specializzazione.

**Ipotesi endosimbiontica del nucleo.** Una protocellula con superficie rigida ed alta mobilità, basata su tubulina (*raptor guest*, ospite rapace) penetra in una cellula più statica, con protezione non troppo rigida e sistema citoscheletrico basato su actina (*receptive host*). La cellula *raptor guest* sarebbe divenuta poi il nucleo della nascente cellula eucariotica. L'evento precederebbe l'endosimbiosi da cui derivano plastidi e mitocondri.

Il passo successivo e cruciale per l'evoluzione della vita fu l'affermarsi della pluricellularità.

Caposaldo delle scienze biologiche è la costituzione cellulare dei viventi. La cellula è l'unità fondamentale, un modulo autonomo ed indipendente dagli altri.

Schwann e Schleiden:

- 1) Ogni essere vivente è costituito da cellule.
- 2) La cellula è la più piccola unità di vita indipendente.
- 3)

I vegetali vengono compiutamente definiti non pluricellulari, bensì **sovracellulari**: le cellule non sono separate, ma formano strutture continue grazie ai plasmodesmi, che mettono in comunicazione citoplasma e sistema di endomembrane. Il desmotubulo è un RE ornato da proteine che passa attraverso il **plasmodesma**. Quindi, il sistema di endomembrane nelle cellule vegetali è continuo fra cellule diverse, che formano perciò una sorta di sincizio. L'unità fondamentale può essere considerato il **cell body**, che include il nucleo, il suo involucro ed i microtubuli associati. Esso rappresenta le vestigia della protocellula ancestrale *raptor guest*, basata sulla tubulina, che si è specializzata per trascrizione, conservazione e compartimentazione (attraverso l'organizzazione dei microtubuli) del DNA. Il **peripheral apparatus** fa invece riferimento ai reticoli endoplasmatici, in assemblaggi sovracellulari, circondato da membrana; è basato sull'actina, deriva dalla cellula host, per protezione del cell body, controllo della forma, scambio actina-dipendente (), comunicazione attraverso il plasmalemma.

Le cellule vegetali rappresentano un'alta espressione della complessità degli eucarioti. Il modello è funzionale per la **vita immobile**: le cellule e gli organismi vegetali non si muovono, sebbene qualche popolazione di cellule sia in grado di migrare. ()

Le singole cellule non possono muoversi. Si sono sviluppate, con ciò, strutture altamente dinamiche, tra cui la parete (accrescimento acido). L'intero organismo ha una complessità inferiore rispetto ai metazoi e non presenta veri e propri sistemi, anche se il vegetale ha organi, seppur di pochi tipi. I vegetali hanno maggior capacità di **adattamenti fisiologici**, presentano una rilevante **fantasia chimica** necessaria per la vita di relazione, modalità di difesa sul posto, crescita mediante attività dei **meristemi** durante tutto il ciclo vitale. Ad esempio, al fine di crescere verso la luce, le piante possono formare per tutta la vita nuove radici, nuovi rami e nuove foglie: l'accrescimento è aperto, indeterminato. Nello sviluppo ontogenetico animale, la migrazione di cellule è cruciale, mentre nelle piante questo non avviene: dallo zigote si formano per mitosi dei settori differenziativi, coinvolti nella differenziazione degli organi. Mediamente, le cellule vegetali raggiungono maggiori dimensioni di quelle animali. Le cellule meristematiche sono più piccole (lato di un cubo ipotetico: 25 micrometri). Quelle epidermiche hanno lato di 70-100, le parenchimatiche 150; le cellule dei vasi xilematici raggiungono un diametro di 300. Le fibre sclerenchimatiche (da cui ricaviamo cotone, lino, canapa) arrivano a presentare una lunghezza di centimetri, e a differenziazione ultimata sono morte: l'apoptosi ha un ruolo di primo piano nello sviluppo, animale quanto vegetale.

## Lezione II

L'**apparato di Golgi** (GA, Golgi Apparatus) è parte integrante del sistema di endomembrane, presenta variabilità dinamica ed ha un ruolo chiave nella via di secrezione e nella maturazione di proteine e lipidi (eg glicosilazione). Nelle piante, in particolare, il Golgi sintetizza i glicolipidi di membrana per plasmalemma e vacuolo (membrana: tonoplasto) e dirige sintesi ed **assemblaggio dei polisaccaridi non cellulosici** della matrice parietale. L'apparato di Golgi nelle piante è costituito da una serie di complessi funzionali, i **dittiosomi**, formati da pile o cisterne (5-10 sovrapposte), appiattite al centro e più dilatate ai margini, distribuite in tutto il citoplasma. Il Golgi è associato a molte vescicole e presenta una polarità (cis-trans). Le porzioni membranose cis guardano verso il RE. Seguono le cisterne mediali, poi le trans. Il dittiosoma è infatti collegato strettamente con il RE. Il **TGN** (*Trans Golgi Network*) include le cisterne più lontane dal RE e le numerose vescicole associate, derivanti da vari sistemi endomembranosi. Esso interagisce con l'actina, la quale contribuisce a stabilizzazione e movimento dello streaming citoplasmatico. Questo è ben diverso rispetto alle cellule animali, in cui il Golgi è in relazione con la tubulina. Molte proteine portano marcatori specifici ed esclusivi delle cisterne cis, mediali e trans, poiché la glicosilazione avviene a step: la suddivisione è dettata dal fatto che i passaggi avvengono in cisterne ben definite ed in un ordine preciso. Le cellule vegetali muovono grandi quantità di citoplasma, inclusi gli organelli, e devono amplificare lo **streaming citoplasmatico**, nelle zone dove esso ha luogo, considerando che nelle cellule differenziate il vacuolo di riserva occupa buona parte del volume cellulare. Questo spiega la distribuzione del GA in dittiosomi. La distribuzione dei dittiosomi su tutto il citoplasma riduce le distanze percorse dalle vescicole ed abbrevia i tempi. La **via anterograda** va dal RE al Golgi, quella **retrograda** al contrario. Il Golgi accoglie vescicole endocitotiche e provenienti dagli organuli. Durante la mitosi, negli animali il Golgi si frammenta in vescicole e la secrezione s'arresta. I nuovi GA si originano dai gruppi di vescicole smistati nelle due cellule figlie. Nelle cellule vegetali, invece, il Golgi rimane attivo ed è implicato nella formazione del **setto di separazione** (*Golgi belt*) e nella produzione dei composti non cellulosici della parete. Nelle cellule vegetali, il traffico di proteine e lipidi e la sintesi di polisaccaridi parietali continuano, soprattutto durante la formazione della nuova parete. La duplicazione del Golgi ha luogo in G<sub>2</sub>, per fissione delle cisterne.

## Lezione III

Il trasporto vescicolare va da un compartimento donatore verso uno bersaglio o accettore. Il riconoscimento vescicola-target è mediato da interazioni specifiche v-SNARE/t-SNARE. Due modelli sono stati proposti per il trasporto delle vescicole contenenti proteine nel Golgi. Il **modello di trasporto**

**vescicolare** prevede la via anterograda (cis-mediale-trans) e la retrograda (trans-mediale-cis). Il modello di **maturazione delle cisterne** prevede per la via anterograda, invece, uno shift fra cisterne: le vescicole del RE costituiscono nel loro insieme il Golgi cis, in maniera continuata, facendo spostare le cis a mediali e le mediali a trans, mentre le trans si spezzettano in vescicole. Le vescicole sono ricoperte da proteine diverse a seconda del comparto bersaglio. Le vescicole dal trans al RE sono rivestite da COP-I. Le vescicole ornamentate di clatrina sono dirette al vacuolo litico. In vicinanza del comparto bersaglio viene perso il *coating* e le SNARE *proteins* e altre, tra cui le Rab, guidano riconoscimento e fusione. Una vescicola si stacca dal comparto donatore grazie alla **dinamina**, che avvolge parzialmente la membrana e stacca la vescicola, scindendo il GTP in GDP e Pi. Si forma una vescicola membranosa con recettori transmembrana legati al cargo specifico. La membrana è rivestita da un mantello proteico, grazie all'azione dell'**adaptina** sulle porzioni interne dei recettori. Al bersaglio, la vescicola perde il *coating* (disassemblaggio), e proteine prima nascoste vengono esposte e guidano l'interazione con il target (SNARE, Rab, ...).

**Lo smistamento delle proteine ai vacuoli.** Le proteine contengono segnali importanti, che le caratterizzano. Negli animali, il segnale per il lisosoma è interno alla sequenza ed è un residuo di mannosio-6-fosfato (glicosidico). Nelle piante, invece, il segnale è costituito dal **propeptide**, sequenza aminoacidica tipica. **Se è interna o al C-terminale dirige al vacuolo di riserva proteica, se è all'N-terminale dirige invece verso i vacuoli litici.** Il segnale per il vacuolo, anche se all'N-terminale, è preceduto dal segnale per il RE, in genere condiviso da moltissime proteine. Le vescicole destinate al vacuolo litico sono rivestite di clatrina e raggiungono un compartimento provacuolare, prima di giungere al vacuolo litico. Le vescicole dense si staccano dal Golgi e contengono proteine per il vacuolo di riserva; non hanno *coating* specifico. Possono fondersi con altre vescicole, tipo quelle del RE, che contengono perciò proteine non glicosilate (se passi nel Golgi, non ci scappi dalla glicosilazione), per poi dirigersi al vacuolo di riserva proteica. Vacuoli di fusione si formano per unione di uno litico ed uno di riserva.

**L'esocitosi. La via di default delle proteine è RE -> TGN -> plasmalemma.** Non sono noti alcuno specifico propeptide e alcun *coating* tipici per questa via. L'esocitosi nei vegetali è molto importante:

- 1) **Crescita apicale e del tubetto pollinico** (esocitosi direzionale: le vescicole golgiane si accumulano all'apice, prima di fondersi con la membrana. Grazie alla fusione aumenta la membrana e viene rilasciato materiale parietale per la crescita polare.).
- 2) **Formazione di nuova parete** durante la citodieresi.
- 3) **Accumulo in regioni specializzate di sostanze per la vita di relazione:** mucillagini (crescita porzione radicale e penetrazione nel terreno), nettari, polisaccaridi, proteine.
- 4) **Ricambio di componenti della membrana** plasmatica.

**L'endocitosi** permette il riciclo all'indietro dei componenti di membrana, il mantenimento delle dimensioni cellulari, **l'internalizzazione dei segnali della comunicazione e di componenti di parete**, per esempio dei composti prodotti dalla degradazione della parete per via d'un attacco patogeno.

Il **citoscheletro** è un insieme di proteine fibrose, le quali, interagendo in maniera peculiare, forniscono un'impalcatura tridimensionale che funge da scheletro della cellula: il citosol è ben organizzato. Il citoscheletro fornisce un'organizzazione spaziale agli organelli e contribuisce al loro movimento nel citosol; è fondamentale per gestire il traffico vescicolare, ha un ruolo cruciale nella meiosi e nella mitosi, come nella citochinesi, nella deposizione della parete, nel mantenimento della forma cellulare, nel differenziamento e nella morfogenesi. Le classi principali di proteine fibrose sono tre: microtubuli (diametro 25 nm), microfilamenti (5-9 nm), filamenti intermedi (10 nm).

I **filamenti intermedi** sono strutture poco dinamiche, più stabili e durature degli altri filamenti citoscheletrici, caratterizzate da elevata **resistenza meccanica contro lo stiramento**. Hanno un ruolo strutturale di resistenza alla trazione e stabilità meccanica. Nelle cellule animali, sono costituiti da una classe eterogenea di proteine (cheratine, vimentina, desmina, lamina), ma spesso caratterizzate da un epitopo comune riconosciuto da un monoclonale **ANTI-IFA**. **Esistono analoghi nei vegetali?** Mediante esperimenti immunochimici (simile a *western blotting*), prodotti anticorpi in grado di riconoscere alcuni epitopi dei filamenti intermedi, come cheratine e lamina, si è visto che nelle cellule vegetali questi anticorpi legano qualcosa. Nota: in genere si attaccano più anticorpi secondari ad un anticorpo primario, cosicché il

segnale (eg fluorescenza) è fortemente amplificato, tanto che a volte per migliorare l'amplificazione si usano anche tre serie di anticorpi una dopo l'altra. Usando nelle cellule vegetali anticorpi ANTI-IFA o anti-desmina, un segnale positivo si rileva in zone associate ai microtubuli o in zone fibrillari paracrystalline nel citoplasma. Con anticorpi anti-lamina, si evidenzia materiale positivo a ridosso dell'involucro nucleare.

I **microfilamenti** sono costituiti da actina. Sono corti e flessibili e sono strutture polari, formate da **monomeri di G-actina**, che polimerizzano a dare un filamento di F-actina. La G-actina pesa 45kDa, esiste sotto forma di diversi isotipi, differenzialmente espressi durante lo sviluppo. Al polo – vengono persi monomeri, al + aggiunti: la struttura actinica è altamente **dinamica**. Il fenomeno del mulinello, noto come **trademilling dei microfilamenti**, osservato grazie a G-actina radio-marcata, consiste nel fatto che i monomeri aggiunti ad un'estremità fluiscono lungo il polimero e vengono rilasciati all'altra estremità. Il processo consuma energia ed avviene in maniera massiccia in una cellula standard. La F-actina può nucleare spontaneamente a partire dai monomeri di G-actina, ma spesso la nucleazione è innescata da molecole della classe delle **formine**, catalizzatrici di processi altrimenti estremamente rari. Le formine sono una grande famiglia di proteine dimeriche. Ogni subunità presenta un sito di legame per il monomero di actina, che viene catturato ed aiutato a nucleare. Man mano che i filamenti nucleati crescono, il dimerico di formina rimane associato all'estremità + in rapida crescita, continuando a legare nuove subunità che allungano il filamento. Altre **actin-binding proteins** intervengono nella formazione di ramificazioni, nell'impacchettamento, nella frammentazione. I microfilamenti sono sempre in equilibrio. Actina-ATP lega la F-actina e Actina-ADP vi è legata. ( )

Le **miosine** sono *actin-binding proteins* motorie. Dirigono il **movimento dal – al +** per il trasporto intracellulare ATP-dipendente (meccanismi actino-miosinici, anche negli animali). Le miosine vegetali della classe XI somigliano a quelle della classe V di mammiferi e lieviti. In *Arabidopsis*, se ne conoscono almeno 13 membri. Ogni miosina sposta cargo specifici, come vescicole ed organelli. A livello del plasmalemma, altre miosine di classe XIII interagiscono con l'actina per regolare la dimensione dei plasmodesmi. ( ).

La F-actina coordina il movimento citoplasmatico, dirige i materiali di crescita nelle zone esocitotiche.

**Nelle piante, il traffico vescicolare è prettamente actino-dipendente.** I cloroplasti si possono spostare e vengono disposti ed orientati al fine di catturare al meglio l'energia luminosa. Nelle cellule epidermiche, attorno agli stomi, le vescicole sono in stretta relazione con i filamenti actinici. Le cellule del tubetto pollinico usano filamenti di actina per dirigere la secrezione verso la direzione di crescita. Le cellule dei peli radicali presentano un comportamento simile. I peli radicali maturi hanno filamenti di actina e actina corticale, quelli in crescita ne hanno grandi quantità in punta.

## Lezione IV

I **microtubuli** si sono evoluti dalle *FtsZ proteins* (*Filamentous temperature-sensitive*) procariotiche. Sono strutture cave ad impalcatura bastoncellare, formati da  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, che formano un dimerico di  $\alpha$ - $\beta$ -tubulina; i dimeri si associano in protofilamenti. Tredici protofilamenti formano un microtubulo; i dimeri sono sfalsati di 0,9 nm in un'elica sinistrorsa. L'estremità – termina con  $\alpha$ -tubulina, l'estremità + con  $\beta$ -tubulina; rispetto a quelli animali, i microtubuli vegetali portano epitopi diversi, hanno diversa sensibilità ai farmaci, maggiore instabilità dinamica, diverse modalità di nucleazione. Sono i principali determinanti della forma della cellula vegetale, orientano l'accrescimento per distensione, sono implicati nel differenziamento, consentono la segregazione di cromosomi e cromatidi durante meiosi e mitosi (il fuso mitotico è formato essenzialmente da microtubuli). I microtubuli cooperano strettamente con le altre componenti del citoscheletro nella movimentazione delle vescicole e degli organuli. Permettono la funzionalità ed il movimento dei flagelli dei granuli pollinici (apparati cinetici). I microtubuli si arrangiano in maniera particolare a seconda delle **fasi del ciclo cellulare**. Anche i microtubuli, al pari dei microfilamenti, esibiscono *trademilling*. La tubulina lega GTP quando unita al microtubulo; quando il GTP è scisso in GDP+Pi, gli eterodimeri di tubulina si destabilizzano e si staccano dal microtubulo. A differenza degli animali, in cui la nucleazione è guidata da centrioli perinucleari, nelle piante il processo è acentriolare, seppure buona parte dei vari centri di nucleazione siano anche per i vegetali perinucleari. Spesso, la nucleazione avviene ad innesco su microtubuli preesistenti. Come per gli animali, entra in gioco il

monomero gamma-tubulina, che polimerizza a ring, fungendo da innesco per il legame della tubulina. Quando la gamma-tubulina lega un microtubulo preesistente, la polimerizzazione si completa se l'angolo è piccolo. ()

Le **MAPs** (*Microtubule-associated proteins*) hanno funzione di stabilizzazione e sono coinvolte nella funzionalità dei microtubuli nel ciclo cellulare, nell'interazione con i microfilamenti, nello scivolamento dei microtubuli, nella loro destabilizzazione. Le MAPs motorie animali includono chinesine e dineine; i vegetali hanno analoghe dette **kinesine-like** (- -> +) e **dineine-like** (+ -> -). La direzione di trasporto è determinata dalla coda. Le *kinesine-like* posseggono un dominio motorio al C-terminale, hanno una regione globulare, una testa ed un collo. La struttura delle *dineine-like* non è molto diversa. () La regione globulare può legare ATP.

Il citoscheletro cambia la sua organizzazione grazie ad array di proteine fibrose. In interfase, in una cellula in differenziamento e distensione i microtubuli si dispongono in maniera corticale, subito al di sotto del plasmalemma. Da una cellula meristemica, schematizzabile con un cubo, si origina una cellula che può distendersi secondo piani diversi. La distensione lungo una certa direzione è dettata dalla deposizione di fibrille di cellulosa ortogonalmente rispetto a quella direzione. Questa disposizione è anticipata pari pari da quella dei microtubuli corticali. Completata la distensione, i microtubuli corticali organizzati scompaiono e la disposizione torna ad essere random. Se la formazione dei microtubuli viene inibita sperimentalmente, le fibrille di cellulosa vengono anch'esse disposte male. Prima della profase, i microtubuli si organizzano attorno al nucleo in una banda pre-profascica, che forma una sorta di disco, come una sezione della cellula, considerata sferica. La posizione della banda anticipa quella del setto di separazione. È stato studiato se sia presente una correlazione tra la presenza del nucleo e la **banda pre-profascica**. Le cellule sono centrifugate; il nucleo si trova dunque in posizione eccentrica. Questo viene fatto appena prima della mitosi, e, pur spostandosi il nucleo, la banda pre-profascica è centrale, oppure non tardivamente, e la banda in tal caso si forma eccentricamente, attorno al nucleo. Si ritiene perciò che il nucleo dia un segnale molecolare che specifica dove formare la banda, ma non sia esso stesso un landmark. Il segnale sarebbe l'assenza di actina (*actin-free zone*).

Il **fragmoplasto** consiste in un'associazione di microtubuli, microfilamenti, *actin-binding proteins* e MAPs, fondamentale per il traffico vescicolare specifico dal Golgi per la formazione del setto di separazione. Il fragmoplasto si forma nella tarda anafase a partire dai microtubuli residui del fuso mitotico e da altri di sintesi *ex novo*. Le vescicole riversano all'esterno il loro contenuto per esocitosi e questo forma nuova parete. In membrana sono presenti complessi enzimatici volti alla sintesi d'altre componenti della membrana. La formazione del setto di separazione inizia al centro e prosegue verso l'esterno. La fusione delle vescicole lascia fenestrazioni, spazi vuoti dove si formano i plasmodesmi. La formazione di nuova parete a livello del setto include quattro fasi, che coesistono in aree diverse: *Fusion Tube-generated Network*, *Tubulo-vesicular Network*, *Tubular Network*, *Fenestrated Shut*.

## Lezione V

Nelle piante, la nucleazione è acentriolare ed i microtubuli iniziano a crescere da vari centri piccoli e dispersi, spesso su microtubuli già esistenti, sulla corteccia sottostante il plasmalemma e sulla superficie nucleare. La polimerizzazione parte su un ring proteico comprendente varie molecole come la gamma-tubulina. Come per i microfilamenti, così i microtubuli scorrono secondo *trademilling*. L'incontro con microtubuli con angoli stretti implica coallineamento e stabilizzazione, originando una configurazione altamente ordinata dei fasci; un incontro per angoli ampi causa depolimerizzazione. Man mano che si aggiungono file di dimeri di tubulina (porzione +), i più vecchi perdono un gruppo fosfato e rimangono provvisti di GDP. Questa condizione energetica inferiore facilita il disassemblarsi del microtubulo. (*Vedi appunti di citologia*)

Le MAPs (*Microtubule Associated Proteins*) sono in grado di leggere la polarità dei microtubuli, ne aumentano la versatilità e la complessità architettonica.

Le **MAPs strutturali** includono:

- MAP-65 kDa: crosslinka i microtubuli, presente in tutti gli array (banda pre-profascica, MTC, fuso, fragmoplasto) e senza omologia con MAPs animali.

- MAP-190kDa: relaziona nucleo e citoplasma, è importante per coordinare gli elementi citoscheletrici durante la divisione (collegamenti con l'actina e, forse, con il RE).
- MOR1: unica a presentare omologia di sequenza con MAPs animali, ha funzione di stabilizzazione dei microtubuli ed è importante per la dinamicità del citoscheletro.

Le **MAPs motorie** convertono l'energia chimica in lavoro meccanico. Hanno una testa globulare con siti di legame per microtubuli ed ATP, un collo variabile e specifico per i vari cargo, ed una coda che specifica la direzione del moto.

- *Kinesin-like*: hanno un dominio motorio all'N-terminale, si spostano verso il + e sono coinvolte nella formazione del fragmoplasto e nel targeting dei precursori verso la piastra cellulare nella corretta maniera spazio-temporale. Causano lo scivolamento laterale dei microtubuli.
- *Dyneine-like*: hanno un dominio motorio al C-terminale e si dirigono verso il -, possono destabilizzare i microtubuli, intervengono nella funzione mitotica e forse nella convergenza polare dei cromatidi.

## Lezione VI

**Dinamica del citoscheletro durante l'interfase e la divisione cellulare.** Le cellule vegetali non possono muoversi; la coordinazione tra attività di divisione e di espansione produce un "flusso di cellule emergenti" dai centri meristemati, che settorializzano e possono differenziarsi.

**Sistema interfascico dei microtubuli corticali (MTC) nelle meristematiche.** Microtubuli disposti secondo un sistema elicoidale, con orientazione prevalente ortogonale rispetto alla direzione di crescita. Presentano connessioni laterali trasversali a ridosso del plasmalemma. Nelle cellule differenziate, questa organizzazione svanisce. L'orientazione dei MTC è strettamente correlata all'orientazione delle microfibrille di cellulosa della parete. Numerose osservazioni supportano questo: i MTC sono presenti nelle pareti in via di sviluppo e scompaiono a sviluppo ultimato; laddove la crescita della parete è localizzata solo in certe aree, i MTC sono associati alle stesse aree; l'orientazione anticipa il diverso orientamento delle microfibrille. Secondo una prima teoria, i MTC sono legati mediante una proteina linker al complesso della cellulosa sintasi. Il complesso porta diverse subunità ed ha forma a rosetta. Esso orienterebbe il microtubulo e dirigerebbe la deposizione di cellulosa sintetizzandola nella stessa direzione. Secondo un'altra teoria, invece, due MTC circoscriverebbero la posizione sul plasmalemma del CESA.

**Banda pre-profascia.** Consiste in un sistema di microtubuli e microfilamenti, compatti attorno alla regione perinucleare, che si forma al termine della fase G2. Essi sono coallineati e si addensano formando un anello subito al di sotto del plasmalemma.

**Fuso mitotico.** Formato da microtubuli, controversa l'associazione con microfilamenti. Non presenti centrosomi e fibre dell'*aster* (irradiano in tutte le direzioni dai centrosomi, respingendo ciò che si avvicina troppo ai poli e contribuisce a segregare i due cromatidi fratelli ai lati opposti della cellula), come negli animali, ma solo microtubuli interpolarli (collegano i due poli) e del cinetocore (partono dal centromero e si dirigono verso i poli). Siti di nucleazione si trovano in genere nella regione perinucleare.

**Importanza del citoscheletro per differenziamento e morfogenesi.** Il citoscheletro definisce una polarità cellulare, alla base delle divisioni asimmetriche da cui originano cellule con programmi di espressione genica differenti, da cui derivano tipi cellulari altamente specializzati. Ad esempio, lo zigote forma alla prima divisione la cellula basale (da cui origina l'effimero sospensore) e quella apicale (origina il vero embrione); atricoblasti e tricoblasti si formano da divisioni asimmetriche.

**Espansione e comunicazione cellulare.** Il tipo di crescita è diretto dall'orientazione dei MTC. Anche i microfilamenti sono importanti per l'espansione, dal momento che la depolimerizzazione dell'actina provoca una deposizione anomala di cellulosa. I microfilamenti regolano le dimensioni del plasmodesma: la depolimerizzazione di actina determina un passaggio incontrollato di macromolecole.

La parete cellulare è un complesso network, costituito perlopiù da polisaccaridi ad alto PM e proteine glicosilate, che forma un involucro dinamico della cellula. È presente nelle cellule di tutte le piante:

- Forma definita.

- Controllo dell'espansione.
- Protezione da shock omeostatici (eg disidratazione).
- Resistenza e protezione ("scatola rigida").
- Primo contatto della cellula con l'esterno.
- Controllo del trasporto intercellulare (simplasto/apoplasto).
- Barriera fisica contro i batteri e i funghi patogeni.
- Rilascio di sostanze dovute all'attacco di patogeni (-> apoptosi, lesione necrotica).
- Riconoscimento del self, sorgente di segnali per il riconoscimento nello stesso individuo e fra diversi individui.
- Immagazzinamento di sostanze di riserva (emicellulose, eg nell'endosperma dei semi di dattero e caffè).
- La produzione di fitoalessine è stimolata da prodotti della degradazione di composti pectici (tipici delle sole cellule vive!) di parete in conseguenza al rilascio di pectinasi da parte del fungo, e da prodotti della degradazione della parete del fungo per effetto dell'azione di gluconasi e chitinasi della pianta.

## Lezione VII

**La lamella mediana.** Comune fra due cellule adiacenti, è costituita da **composti pectici**, acqua, proteine strutturali ed enzimatiche e manca di cellulosa. Ha funzione cementificante: forma gel reversibili e soluzioni viscosi. Le lamelle mediane sono usate nell'industria alimentare (eg caramelle) e cosmetica. I principali zuccheri monomerici presenti nei composti pectici includono acido galatturonico (zucchero acido derivato ossidato del galattosio), ramnosio, galattosio, arabinosio (zuccheri neutri) ed altri.

Il composto pectico più semplice è l'**acido poligalatturonico**, un omogalatturonano: catena lineare di acido galatturonico con legami  $\alpha 1,4$ . L'acido pectico porta gruppi COOH. Alcuni gruppi acidi COO- sono esterificati con metili (pectina). Quelli non esterificati possono complessarsi con gli ioni bivalenti  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , che creano connessioni fra catene individuali (eg pectato di calcio).

Il **ramnogalatturonano II** (RG II) è anch'esso un omogalatturonano, ma porta numerose catene laterali. La complessità strutturale e la presenza in tutte le angiosperme fanno supporre che abbia ulteriori funzioni rispetto a quella strutturale.

Il **ramnogalatturonano I** è formato da catene lineari di acido galatturonico alternato a residui di ramnosio, secondo lo schema AG 1,4 R 1,2 AG, ... Arabani, galattani e arabino-galattani modificano la struttura lineare con ramificazioni.

L'**arabinano** porta uno scheletro di residui di arabinosio 1,5 e ramificazioni laterali. I **rabinogalattani** hanno uno scheletro di galattosio e ramificazioni di arabinosio.

I composti pectici hanno funzione strutturale, regolano la porosità della lamella mediana e della parete primaria, forniscono cariche che modulano il pH ed il bilanciamento ionico, collaborano alla regolazione della distensione cellulare, hanno un ruolo di molecole segnale per il riconoscimento, anche a lunga distanza, stoccano cationi e ne regolano il flusso in/out.

La **parete secondaria**, interposta fra plasmalemma e parete primaria, è tipica di cellule che hanno completato la distensione ed è formata da più strati di materiale fibrillare. È presente nelle cellule morte (eg canali). Può portare cutina, suberina e lignina.

**La parete primaria.** È sottile e plastica, tipica di cellule in crescita. Il materiale fibrillare fa riferimento alla cellulosa, la matrice include acqua (70% del peso fresco), emicellulose, sostanze pectiche, proteine glicosilate. Le microfibrille di cellulosa sono collegate da emicellulose di lunghezza variabile, che fanno da ponte.

La **cellulosa** è un polimero lineare del glucosio, con legami  $\beta 1,4$ ,  $\beta$  nel senso che un monomero di glucosio ed il successivo sono ruotati di  $180^\circ$  ( $\alpha$  non lo sono). I disaccaridi di glucosio legati  $\beta 1,4$  sono nomenclati cellobiosio. Il polimero lineare di cellobiosio ripetuto n volte si dice poliglucano; le catene lineari instaurano ponti H intra- ed intermolecolari, associandosi strettamente in strutture coriacee. 30-100 poliglucani si legano in una microfibrilla di cellulosa, dal diametro di 5-15 nm (allineamento parallelo di singole catene). Se il coallineamento non è perfetto si formano zone amorfe, meno organizzate di quelle cristalline. La cellulosa viene sintetizzata dal complesso multienzimatico della **cellulosa sintasi**, inserito nel plasmalemma. I complessi a rosetta sono stati osservati grazie a **freeze-etching** (o criodecapaggio o *freeze fracture*): congelamento sottovuoto a temperature bassissime (attenzione! Durante il congelamento si formano cristalli di ghiaccio bastardi che possono ingannare l'osservazione), preparazione di fessure ultrasottili, replica della superficie depositando su essa un sottile strato di carbone, platino od oro, osservazione al microscopio elettronico a trasmissione della replica. La frattura extraplasmatica rivela globuli terminali, quella plasmatica rosette. Ogni rosetta ha sei subunità, ciascuna contenente sei polipeptidi **CESA** (tot. 36). Da ogni CESA viene sintetizzato un poliglucano, che si associa ad altri per formare una microfibrilla di cellulosa, perciò in genere una microfibrilla porta 36 catene. La cellulosa sintasi pesca glucosio dalla scissione del saccarosio che avviene in sua corrispondenza sul lato citoplasmatico. I polipeptidi CESA sono fondamentali: in *Arabidopsis thaliana*, l'isoxabene, inibitore del CESA, trasforma radicalmente il profilo d'espressione, downregolando più di 900 geni ed upregolandone altrettanti. *Arabidopsis thaliana* possiede almeno dieci isoforme diverse di CESA (3 per la parete primaria, 3 per la secondaria, 4 per situazioni particolari). La sintesi di cellulosa riguarda per lo più le cellule in espansione, ma l'espressione dei geni per la CESA sembra essere presente in tutte le cellule della pianta: i messaggeri sono sempre pronti per essere espressi in caso di bisogno, la regolazione è posttrascrizionale. Tra parete e citoscheletro è presente un feedback positivo: inibitori della sintesi di microtubuli (colchicina) portano a deposizione alterata della cellulosa, inibitori della sintesi di cellulosa (isoxabene) prevengono la regolare disposizione microtubulare.

## Lezione VIII

La parete può presentare tessitura diversa: a spirale, anulare, fibrosa. Sulla superficie esterna, la cellulosa, in cooperazione con la matrice (riempie gli spazi tra le microfibrille), forma un reticolo rigido, appiattito e resistente. La composizione della parete varia considerevolmente fra specie diverse, tra cellule della stessa pianta e nella singola cellula durante la crescita ed il differenziamento.

Le **emicellulose** sono un gruppo eterogeneo di polisaccaridi ad alto PM, che formano ponti H con microfibrille di cellulosa stabilendo un assetto ordinato.

Xiloglucani	Dicotiledoni	Lineare glucosio $\beta 1-4$	Sul C6, residui di xilosio, galattosio, fucosio.
Xilani	Monocotiledoni e secondaria tutte	Lineare xilosio $\beta 1-4$	Varie catene laterali
Betaglucani	Monocotiledoni, graminacee ++	Glucosio $\beta 1-4$ e $1-3$	

Le quantità relative sono variabili e influenzano la rigidità della parete. Ciò è influenzato anche dalla formazione di ponti di  $\text{Ca}^{2+}$  fra pectine.

Le proteine di parete sono difficili da studiare a causa dell'alto grado di glicosilazione (*folding* per ingombro sterico e cariche, difficili da isolare, ...) ed instaurano legami complessi nel network della parete.

**Proteine strutturali di parete.** Le **estensine** sono ricche di idrossiprolina (Hyp) ed aminoacidi basici ed hanno struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica levogira. I residui di Hyp e Ser sono glicosilati con arabinosio e galattosio. Le estensine portano residui di tirosina e possono venire ossidate e rese progressivamente insolubili formando dimeri di isotirosina inter- o intramolecolari. Tali glicoproteine hanno porosità



definita ma variabile e tengono in assetto le microfibrille di cellulosa. I **ponti isoditirosinici** si possono formare e distruggere facilmente, permettendo alle microfibrille di spostarsi e seguire l'andamento della distensione. Le perossidasi formano i ponti, staccando due idrogeni dalle tirosine e creando un ponte con un ossigeno (ossidazione), riducendo contestualmente  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . La formazione di ponti isoditirosinici coinvolge anche altri tipi di proteine di parete. Le estensine hanno un ruolo strutturale, nella crescita acida e nella difesa.

Gli ormoni vegetali sono piccole molecole regolatrici di crescita, attive a basse concentrazioni e prodotte in modo decentralizzato. L'**auxina** è responsabile, fra l'altro, della crescita acida: lega il recettore ABP1 (*Auxin Binding Protein 1*) e stimola la **crescita acida**: induce l'attivazione di pompe  $H^+$  ATPasiche di membrana. L'abbassamento di pH nella parete attiva le espansine, che distruggono i legami  $H^+$  tra microfibrille di cellulosa, attiva enzimi idrolitici e glicoproteine enzimatiche, distrugge i legami isoditirosinici, ostacola la formazione di ponti H, gli  $H^+$  si sostituiscono ai bivalenti che connettono sostanze pectiche e la parete viene nel complesso allentata, permettendo l'elongazione cellulare.

Le **AGP** (Proteine Arabinogalattaniche) hanno un contenuto di zucchero fino al 90% (galattosio, arabinosio), sono ricche in Pro, Hyp, Ala, Ser; Thr e portano catene acide. Possono legare la funzione pectica e costituiscono un centro organizzativo per i *cross-linking*, regolando la porosità della parete. Spesso sono legate al plasmalemma mediante specifiche ancore. Sono presenti anche al di fuori della parete nella linfa xilematica e nei **tessuti stilari** (stilo e stimma, ruolo di riconoscimento fra granulo di polline e gineceo, guida per la crescita del tubetto). Hanno vari ruoli nel riconoscimento, nella comunicazione, nell'adesione, nel differenziamento e nella morfogenesi. Mediano **segnali prodotti dalla radice per la rizosfera**, vale a dire la nicchia di microorganismi con i quali la radice comunica.

Altre proteine sono quelle ricche in glicina (**GRP**, 70% glicina, foglietti  $\beta$  antiparalleli) e prolina (PRP, unità Pro-Pro-X-X-Lys). Appena secrete sono relativamente solubili e diventano insolubili durante la crescita cellulare od a seguito di ferite ed attacchi patogeni. Si ritiene che l'impermeabilizzazione abbia luogo per formazioni di ponti isoditirosinici, intra- o intermolecolari, anche con le estensine. Tra le **PRP** si annoverano le **noduline**, per la formazione di noduli radicali con azotofissatori.

Le proteine **non strutturali** includono:

- **Enzimi ossidativi**: perossidasi, ossidoreduttasi – implicata nella sintesi della lignina, legami interferenolici, difesa contro patogeni, riparazione di ferite.
- **Enzimi idrolitici**: cellulasi (abscissione), pectinasi (maturazione del frutto), emicellulasi, glicosil-idrolasi.
- **Enzimi per l'espansione cellulare** (*wall loosening*): transglicosilasi.
- **Proteine per l'espansione**: espansine.

La **XET** (Xiloglucano Endo-Transglicosilasi) catalizza la ricombinazione fra due xiloglucani, con una endo-trans-glicosilazione, favorendo il *wall loosening*, tagliando e ricombinando le emicellulose possono allontanarsi.

Le **espansine  $\alpha$**  sono attive nella distensione (ben diverse dalle beta, rappresentate nei tubetti pollinici, causa di molte allergie da polline). Esse inducono l'estensione di pareti isolate pH-dipendente, l'applicazione di espansine esogene a cellule in vivo stimola l'espansione, i geni per le espansine hanno un'espressione stadio-specifica per il controllo di crescita e sviluppo, la riduzione della loro espressione inibisce la crescita. Le espansine  $\alpha$  agiscono distruggendo le interazioni non covalenti fra i polimeri di parete e rendono indirettamente più accessibili i glucani alle cellulasi ed alla XET. Rompono in particolare i ponti H.

Le proteine di adesione fanno da linker parete-citoscheletro e sono talvolta immunologicamente correlate alle proteine animali che collegano ECM e citoscheletro (i.e. caderine ed integrine). Vi rientrano miosine specifiche vegetali (classe VIII), fosfolipasi D (possibile linker microtubuli-plasmalemma-cellulosa sintasi), AGP, **WAKs** (chinasi associate alla parete, con proprietà anche di

segnale; sono transmembrana). L'ipotesi del signalisoma prevede che pectine possano essere endocitate e portate nel nucleo a dirigere operazioni culminanti nella disposizione dei microtubuli corticali. Le WAKs associano GRP e pectine; hanno un dominio parietale con *EGF-like domains*, uno transmembrana ed un terzo citoplasmatico ad attività chinasi, che attiva cascate trasduzionali culminanti nell'espansione. (OSCURO \_???)

La cellulosa è sintetizzata in loco. Emicellulose e pectiche sono biosintetizzate nel Golgi da specifiche glicosiltransferasi di membrana e raggiungono la parete per trasporto vescicolare specifico. Le proteine di parete passano per il Golgi, vengono ivi glicosilate, sono secrete da vescicole.

Le componenti della parete si assemblano con varie modalità:

- 1) **Autoassemblaggio**: dipende dalle proprietà chimiche intrinseche, le emicellulose tendono a legarsi alla cellulosa, i composti pectici formano gel.
- 2) **Assemblaggio enzima-mediato**: perossidasi ed altri enzimi decretano l'organizzazione.
- 3) Uno **scaffold di estensina carica** reagisce con pectine acide per formare **pectato di estensina**, che funziona da stampo per un assemblaggio ordinato della matrice pectica e della parete.

## Lezione IX

La crescita della parete e l'espansione cellulare dipendono dall'orientamento delle microfibrille di cellulosa più interne: una tessitura dispersa foliata dirige una crescita isodiametrica, perché la resistenza all'espansione è la medesima in ogni direzione. Se la maggior parte delle microfibrille presenta, invece, un orientamento preferenziale, ovvero la tessitura è dispersa tubulare, allora la crescita è longitudinale, ortogonale alla direzione della cellulosa, perché la resistenza in questa direzione è minore.

La **parete secondaria** si forma dopo l'accrescimento per distensione, a ridosso della primaria, in senso centripeto, per apposizione successiva di lamelle sovrapposte. Il materiale è prevalentemente fibrillare (matrice molto scarsa) e comprende fibre di cellulosa (95%) strettamente impacchettate, parallele, con strati successivi con orientazione diversa. La parete secondaria si ritrova in cellule con ruolo meccanico o di sostegno, cioè che devono essere resistenti. In tali cellule, gli strati sono molti e concentrici, sempre ad orientamento diverso. Pareti secondarie ispessite sono tipiche di cellule morte.

La parete cellulare può assumere nuove caratteristiche funzionali durante la vita cellulare, in conseguenza al fine funzionale.

Varie modificazioni interessano la parete:

- A) **Incrostazione**: infiltrazione di materiali tra gli spazi interfibrillari di cellulosa.
  - 1) **Lignificazione**: deposizione di lignina nella matrice, a livello di emicellulose e sostanze pectiche. La lignina è un polimero che si ottiene per polimerizzazione di monomeri di varie molecole aromatiche (eg alcool cumarilico, alcool coniferilico, alcool sinapilico). Cellule lignificate sono morte: legno, sclerenchima, parenchima midollare del legno, endoderma. La lignificazione conferisce rigidità, impermeabilità e resistenza ai microorganismi. La deposizione comincia nella parete secondaria adiacente al plasmalemma e prosegue in tutta la parete. La lignina si colora con la fluoroglucina acida.
  - 2) **Pigmentazione**: impregnazione della parete ad opera di sostanze più o meno colorate (bruno rossastre) come tannini e polifenoli, con proprietà antisettiche (i.e. contro microorganismi). Spesso accompagna la lignificazione. Si vede nei semi di ricino, nel legno di ebano, nelle cotecce, nelle foglie morte.
  - 3) **Mineralizzazione**: deposizione di  $\text{CaCO}_3$  (calcificazione: peli di zucca, certe alghe), ossalato di Ca,  $\text{SiO}_2$  (silice). Molte alghe impregnate di carbonato di calcio contribuiscono a formare rocce calcaree (eg. *Chara*), altre formano barriere coralline, insieme ai coralli, ed atolli. Il pelo urticante di ortica (*Urtica dioica*) ha un ago di silice nella porzione apicale e  $\text{CaCO}_3$  in quella basale.
- B) **Apposizione**: aggiunta di materiali sulla parete, che ne aumentano l'impermeabilizzazione.

- 1) **Cutinizzazione:** le cellule epidermiche di foglie e rami sono protette sulla faccia esterna da una pellicola di un polimero di acidi grassi (cutina), la cuticola, che è apolare e conferisce impermeabilità nei confronti di acqua e gas atmosferici. Le cellule ricoperte dalla cuticola sono vive e ricevono acqua e nutrimento dalle cellule accanto.
  - 2) **Cerificazione:** le cere sono molecole molto idrofobiche, formate da acidi grassi combinati con alcoli a lunga catena e con un solo gruppo OH. Si trovano nello strato più esterno della cuticola, nei rivestimenti di frutti e foglie e limitano le perdite di acqua, impediscono il ristagno dell'acqua meteorica, i cristalli diffrangono la luce. Le strutture epicuticolari sono importanti per la protezione da stress biotici.
  - 3) **Suberificazione:** modificazione della secondaria per aggiunta di suberina (acidi grassi a catena molto lunga – 18/24 C, alcoli coniugati, sostanze fenoliche, che danno colorazione bruna). Coinvolge tutta la parete. Nelle piante che si accrescono in spessore avviene massivamente, con deposizione di lamelle di suberina alternate a lamelle di cellulosa a partire dalla lamella mediana. Impermeabilizza ed isola (funzione di coibente). Le cellule suberificate sono morte e presentano un lume cellulare ridotto. Le cellule del sughero sono allineate radialmente con stile ordinato, sono colorate bruno per presenza di derivati tannici, che, originati nei vacuoli, migrano e vengono inseriti in parete.
- C) **Gelificazione:** formazione di mucillagini dovuta ad un aumento delle sostanze pectiche. In tal caso, la parete assume effetto mucillaginoso e si rigonfia se è presente acqua. Cellule a mucillagine si ritrovano nei fiori, nelle radici, nelle foglie e nel tallo di alcune alghe rosse agarofite, dalle quali si ricava il mitico agar.

I **plasmodesmi** sono ponti citoplasmatici, attraversati dal desmotubulo, da componenti citoscheletriche, proteine strutturali e di trasporto, che formano un network intercellulare utile per il trasporto simplastico. Possono essere **primari** (incompleta separazione dei citoplasmi durante la citochinesi: connessione di cellule dalla stessa madre) o **secondari** (non di origine clonale, eg durante la fusione dei carpelli nel fiore, le cellule epidermiche che vengono a contatto si fondono, differenziano in parenchimatiche interne e formano plasmodesmi secondari, anche inducibili artificialmente, eg innesti). I due tipi possono essere chiusi e non sono distinguibili in quanto a struttura. I plasmodesmi presentano vari morfotipi. Ramificati si possono formare durante un ispessimento della parete; a X e H per fusione di plasmodesmi semplici adiacenti. Attraverso i plasmodesmi passano molecole a basso pm, come regolatori di crescita, nutrienti di derivazione fotosintetica e non, molecole segnale) e ad alto pm (proteine, come attivatori trascrizionali, mRNA, segnali per il gene silencing). Le molecole a basso pm passano per movimento passivo non selettivo, basato sulla libera diffusione e dipendente dalla larghezza del plasmodesma, o **SEL** (*Size Exclusion Limit*), quelle ad alto pm possono essere anche sottoposte a movimento attivo selettivo, il quale è energia-dipendente e richiede un aumento del SEL. Il SEL specifica il limite superiore di taglia per le molecole che passano. Esso è regolato temporalmente, spazialmente e fisiologicamente durante lo sviluppo; si creano domini e subdomini di cellule che condividono lo stesso SEL e quindi pattern di sviluppo comuni grazie all'informazione posizionale. Il plasmodesma si apre e si chiude soprattutto a livello della regione del collo, uno sfintere contrattile basato su actina e miosina. Anche il desmotubulo si allarga e si stringe. Esperimenti sono stati condotti con GFP sotto un promotore costitutivo e specifico dei meristemi apicali. L'embrione presenta quattro subdomini, corrispondenti alle quattro principali regioni morfologiche. Una molecola piccola si muove fra tutte le cellule, una media solo nell'ipocotile, nella radice, ma non nei cotiledoni, un'ultima presenta movimento limitato solo alle cellule circostanti le meristematiche: la regolazione del SEL è in stretta correlazione con il *cell fate* individuale, dettato dalla posizione.

## Lezione X

I **plastidi** sono fondamentali per fotosintesi, biosintesi amido, biosintesi acidi grassi, riserva. Si rinvengono solamente nei vegetali. Posseggono un involucro a due membrane lipidiche doppie, fra le quali è interposto il fluido matriciale dello stroma, che porta disciolti in acqua ioni, metaboliti, intermedi di reazione, proteine, enzimi, ribosomi, DNA. Il sistema lamellare è un terzo componente membranaceo, il quale può assumere diversi morfotipi nel corso dello sviluppo.

Per quanto riguarda il differenziamento, **proplastidi** si trovano immaturi nelle meristematiche e sono piccoli, con un sistema d'endomembrane poco sviluppato (corpo prolamellare), con DNA, RNA, gocce lipidiche, ribosomi. Il differenziamento può dipendere da fattori esterni, come la luce, o meccanismi di regolazione interni, legati a certi pattern.

I **cromoplasti** possono derivare da proplastidi, da amiloplasti o da cloroplasti senescenti. In questo secondo caso, essi si dicono **geroncoplasti**, perdono i pigmenti clorofilliani verdi e mantengono pigmentazioni accessorie con colorazione rosso-arancio (carotenoidi, xantofille, licopene, delta-carotene). Non sono fotosintetici. La colorazione data ai fiori attrae animali impollinatori (uccelli) e dà il colore alle foglie autunnali. I cromoplasti sono più appiattiti dei cloroplasti ed hanno un sistema di endomembrane più ridotto. Portano pigmenti in cristalli (*Sterlitzia reginae*), corpi filamentosi o goccioline (*Capsicum annum*). Non hanno grana. I pigmenti sono coinvolti in reazioni antiossidanti. Si trovano anche in radici tuberizzate, come la carota.

I **leucoplasti** sono di riserva, sono plastidi incolori e si trovano in cellule non esposte alla luce, come quelle del midollo, dei frutti e dei semi. Includono **elaioplasti** (lipidi), **proteinoplasti** (proteine) ed **amiloplasti** (amido), fra i quali gli **statoliti**, che a livello della caliptra (cuffia radicale) sono responsabili del **geotropismo** positivo). Gli amiloplasti possono derivare da cloroplasti o da proplastidi. Gli amiloplasti stoccano amido secondario, che presenta le due forme di amilosio (soprattutto) ed amilopectina, sintetizzato a partire dal saccarosio ricevuto da queste cellule, a differenza dell'amido primario che si forma nello stroma dei cloroplasti ed è solo amilopectina, più solubile. Questi plastidi hanno un sistema di endomembrane abbastanza ridotto. La polimerizzazione dell'amido secondario avviene su un centro proteico (ILO) e si possono formare granuli semplici (eg, patata) o composti (eg, riso). Forma e modalità di deposizione sono tipici delle diverse specie e forniscono un'utile segnale di discriminazione (eg, triticale/farro). Nella cuffia radicale, gli statociti contengono statoliti, amiloplasti specializzati, che premono sul RE, esercitando una certa pressione. In cellule orientate lungo la direzione della forza di gravità, la pressione è uniforme, mentre un orientamento diverso implica una pressione disuniforme e questo funge da segnale, trasmesso innanzitutto al sistema citoscheletrico. Gli elaioplasti portano goccioline di lipidi, elettrodenso (ad esempio, nel mesocarpo dell'avocado). I proteoplasti accumulano proteine; le inclusioni possono essere sottoforma cristallina o di corpi proteici. Sono molto rappresentati nei semi per nutrire l'embrione (eg, arachidi, noci del Brasile, legumi).

I plastidi derivano da **endosimbiosi** (L. Margulis). Il primo evento endosimbiontico che condusse all'introduzione stabile e trasmissibile è quello dei mitocondri, tra un protoeucariote fagotrofo ed un protobatterio aerobio. Il secondo evento endosimbiontico riguarda invece l'inglobazione di un cianobatterio ancestrale fotosintetizzante in un protoeucariote fagotrofo. Il cianobatterio non è stato digerito: si pensa che possa essere sfuggito dal vacuolo o che l'eucariote non avesse i mezzi chimici per degradarlo. L'endosimbionte ha perso la parete batterica ed il 90% del genoma, trasferito al nucleo dell'ospite (orizzontale). Si è stabilito un traffico molecolare fra nucleo dell'ospite e cloroplasto di prodotti genici (peptidi in transito) e di conseguenza un macchinario di reimporto nel plastidio.

Data la varietà strutturale dei cloroplasti, si ritiene che ci siano stati episodi di **endosimbiosi secondaria**, molte volte ed in maniera indipendente, tra un eucariote eterotrofo ed un'alga eucariotica unicellulare verde o rossa. Questo spiega la presenza in certi taxa di plastidi con tre o quattro membrane (citosimbiosi algale, successiva perdita di nucleo ed organelli dell'alga).

Numerose prove supportano la teoria endosimbiontica: membrana interna simile a quella procariotica (eg, solfolipidi, galattolipidi), piccolo DNA circolare in più d'una copia, ribosomi 70S (tipici dei batteri), inibizione della sintesi proteica con cloramfenicolo e rifampicina (come nei cianobatteri), scissione binaria e indipendente dalle mitosi dell'ospite, organizzazione del carbonio come nei cianobatteri.

La membrana esterna dell'involucro del cloroplasto sembrava derivare dalla cellula protoeucariote, dal plasmalemma o dal vacuolo digestivo del fagotrofo, ma recentemente è stata assimilata allo strato lipopolisaccaridico della originale parete del cianobatterio, poi trasformata e modificata, per la presenza del complesso Toc75.

Il **DNA plastidiale** è superavvolto, circolare, a doppia elica, senza istoni. È più lungo del mtDNA, ha dimensioni molto variabili (200kb ca nelle angiosperme), avendo sequenze non codificanti ed addirittura introni, o, meglio, sequenze non codificanti che non vengono trascritte, non a che vedere con lo splicing, che non avviene nei plastidi. Un tipico genoma di cloroplasto codifica per rRNA ribosomiale (solite copie multiple), 30-35 geni codificano per proteine ribosomiali e tRNA, altre proteine controllano la sintesi delle proteine implicate nella fotosintesi. Il DNA circolare ha organizzazione policistronica (più geni per promotore, rudimentale, tipico dei procarioti): l'espressione genica non è finemente regolabile.

## Lezione XI

Il numero di proteine codificate nel genoma plastidiale non è elevato, a fronte del numero di proteine presenti in tali organelli, poiché la gran parte delle proteine plastidiali sono codificate nel genoma nucleare. Molti enzimi plastidiali codificati nel nucleo hanno una natura procariote, indice del trasferimento genetico orizzontale. Questo processo sembra essersi svolto per duplicazione dei geni del DNA plastidiale e loro inserimento in quello nucleare, con successiva perdita della copia plastidiale. Il processo è ancora in atto e se ne trova testimonianza in geni presenti sia nel DNA plastidiale che in quello nucleare. La **RuBisCO** è formata da otto identiche subunità grandi e altrettante piccole, le prime codificate dal plastidiale e le seconde del nucleare.

I **cloroplasti** hanno un diametro di 4-10 micron e forma generalmente lenticolare. Posseggono due membrane separate da un lumen, uno stroma interiore, con tilacoidi interdiagonali o stromatici (lamelle distribuite secondo l'asse maggiore) e tilacoidi dei grana, impilati. I cloroplasti portano varie molecole di DNA e granuli di amido primario, ovvero di derivazione diretta dalla fotosintesi. I tilacoidi sono un complesso sistema di cisterne e sacculi, disposti parallelamente, orientati secondo l'asse maggiore dell'organulo, nello stroma, interconnessi, anche lateralmente. La frazione lipidica delle membrane tilacoidali presenta steroli, solfolipidi e galattolipidi, gli ultimi due nella membrana interna. Questi due gruppi di lipidi sono tipicamente procariotici. La membrana lega anche i pigmenti. La frazione proteica è variegata ed include proteine enzimatiche, strutturali, trasportatori per la fase luminosa, inserite nella membrana tilacoidale, non solubili. Il 40-60% del peso secco plastidiale è rappresentato dalle proteine solubili con localizzazione stromatica: enzimi per il ciclo di Calvin, per la produzione di clorofille, di lipidi, di carboidrati ed acidi nucleici.

I **plastoglobuli** (PG) sono particelle lipoproteiche prodotte dai cloroplasti, associate ai tilacoidi, il cui numero varia con lo sviluppo, in base al metabolismo lipidico del plastidio in risposta allo stress ossidativo, alla fase di sviluppo e durante la senescenza (transizione da cloroplasti a cromoplasti). I plastoglobuli sono un subcomparto per la sintesi e lo stoccaggio dei lipidi, sono una riserva di proteine, contengono carotenoidi, tocofenolo, clorofille. I pigmenti secondari proteggono dai raggi UV. I plastoglobuli sono formati da un singolo strato lipidico, ripiegato in modo da rivolgere le porzioni polari all'esterno. Il doppio strato di un tilacoide si prolunga solo nella sua porzione più esterna in uno strato singolo del plastoglobulo. Nella membrana plastoglobulare si trovano proteine e carotenoidi.

I cloroplasti posseggono un **plastoscheletro** che mantiene la forma ed interviene nella divisione. Esso è costituito da proteine fibrose, come **FtsZ**, che nei batteri sono in pratica i precursori della tubulina eucariotica. La divisione plastidiale è coordinata e coinvolge meccanismi cellulari del plastidio e della cellula: la divisione richiede il contributo del genoma nucleare, con il coinvolgimento della dinamina, associata alla gemmazione, codificata nel nucleo. Essa avanza lungo le FtsZ sul piano di divisione, dall'esterno verso il centro, e progredendo sgancia due organelli individuali. Esperimenti di immunolocalizzazione hanno evidenziato l'associazione dell'anello di Dmn2 con l'anello di FtsZ2.

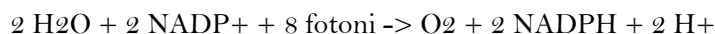
Tecniche di immunogold, ovvero fondate sull'uso di anticorpi legati a particelle d'oro, metallo elettron-denso che non si lascia attraversare da fasci elettronici, hanno permesso di rilevare i movimenti delle proteine, incluso il loro ingresso nel cloroplasto. Si è visto che le proteine entrano nel plastidio in corrispondenza di aree dove la membrana esterna e quella interna si fondono. L'importo delle proteine nei cloroplasti avviene secondo il sistema **TOC-TIC**. TOC (Translocon at the Outer envelope of

Chloroplast) è un sistema traslocone nella membrana esterna, che svolge funzioni cruciali per l'importo: riconoscimento specifico della sequenza di transito della pre-proteina, inizio della traslocazione, formazione dei siti di contatto fra membrana esterna ed interna. TIC (Translocon at the Inner envelope of Chloroplast) ha proteine che si associano a TOC, formando un supercomplex TOC-TIC, che permette la strutturazione di una sorta di canale, che funge da via d'ingresso.

La **preproteina**, non ripiegata, viene riconosciuta ed agganciata a TOC159; con consumo di 1 ATP e 1 GTP, la preproteina passa lo spazio del lumen e si aggancia al TIC; con consumo di 1 ATP, si formano un sito di contatto ed un canale che permette l'importazione. Alcune proteine del supercomplex sono Heat-shock, che tutelano il corretto ripiegamento e sciolgono eventuali ripiegamenti erronei che si sono venuti a formare durante l'importazione.

Un proplastidio destinato a diventare cloroplasto in una cellula al buio può diventare ezioplasto. L'esposizione successiva alla luce costituisce lo stimolo induttivo per il differenziamento, così l'**ezioplasto**, passando per uno stato intermedio, può divenire cloroplasto. Così, i cloroplasti di una pianta tenuta al buio per alcuni giorni si trasformano in ezioplasti.

La **fotosintesi clorofilliana** consiste in fase dipendente dalla luce e fase indipendente dalla luce. Le reazioni luminose hanno luogo sulla membrana dei tilacoidi, quelle indipendenti dalla luce nello stroma. Lo stroma è la sede del fotosistema I e contiene DNA plastidiale e ribosomi. La clorofilla b, rispetto alla a, ha un carbonilico al posto di un metilico. I carotenoidi captano le lunghezze d'onda attorno al blu-verde, quindi appaiono di colore giallo intenso; le ficobiline sono presenti nelle alghe rosse e nei cianobatteri e assorbono lunghezze d'onda corrispondenti a giallo-verde ed arancione. Nel sistema antenna di un fotosistema, i pigmenti sono stipati uno vicino all'altro, in modo tale che l'energia ricavata da un fotone assorbito proceda lungo il sistema, passando da una molecola di pigmento all'altra. L'eccitazione parte da una molecola di pigmento che assorbe radiazione a bassa lunghezza d'onda, ovvero ad alta energia, e converge sulla molecola del sistema antenna che assorbe le lunghezze d'onda maggiori, cioè a minore energia. Tale molecola si trova nel centro di reazione: qui, una molecola di clorofilla a assorbe una quantità di energia sufficiente a farle cedere un elettrone eccitato, cioè ad ossidarsi, acquistando una carica positiva, riducendo così una molecola di accettore primario. Le molecole di Chl dei due fotosistemi sono identiche, ma diversamente associate in membrana, risultando in un picco di assorbimento a lunghezze d'onda diverse, 700 nm per il PI e 680 nm per il PII. La fase luminosa viene rappresentata con lo schema Z: il PII assorbe fotoni e li trasferisce al centro di reazione. La clorofilla P680 passa dallo stato fondamentale a quello eccitato. P680 cede un elettrone all'accettore primario. Le molecole di P680 reintegrano gli elettroni persi ossidando molecole di H<sub>2</sub>O (fotolisi dell'acqua). Si libera O<sub>2</sub> (ossigeno ossidato). Gli elettroni scorrono nella catena di trasporto ed un'ATP sintasi sintetizza ATP per chemiosmosi. Un fotone eccita il PI, che riduce la ferredossina (Fd), la quale a sua volta riduce NADP<sup>+</sup> a NADPH, grazie alla NADP<sup>+</sup> reduttasi. Gli elettroni del PI sono rimpiazzati da quelli in uscita dalla catena di trasporto. La reazione complessiva è:



La fotofosforilazione avviene grazie al gradiente protonico creato dalla catena di trasporto degli elettroni, che interna nel lume H<sup>+</sup> dall'esterno dello stroma ("inverso" rispetto al mitocondrio).

Il **ciclo di Calvin** consiste in tre fasi:

- 1) Fissazione del carbonio, catalizzata da RuBisCO, che lega CO<sub>2</sub> a RuBP, formando due molecole di 3-fosfoglicerato.
- 2) Riduzione di 3-PG a G-3-P: fosforilazione (consumo di 1 ATP, passa a 1,3-BPG) e riduzione (consumo NADPH, che cede 2 H che riducono 1,3-BPG a G-3-P).
- 3) Rigenerazione del RuBP (con consumo di ATP).

Il prodotto è la gliceraldeide-3-fosfato, che viene usata per la sintesi di zuccheri, essenzialmente glucosio, poi polimerizzato in amido. Si producono anche piruvato, saccarosio (trasportato, scisso), basi per la sintesi di aminoacidi, acidi nucleici e lipidi.

La **fotorespirazione** consiste nell'aggiunta di  $O_2$  al RuBP, che forma fosfoglicolato (trasformato in glicerato e  $CO_2$ ) e 3-PG, per via dell'attività di ossigenasi della RuBisCO. Il processo consuma  $O_2$  e libera  $CO_2$ . Utilizza ATP e NADPH ed ha un rendimento inferiore del 25% rispetto al ciclo di Calvin. L'attività di carbossilasi o di ossigenasi dipende da affinità, temperatura e concentrazione relativa. La fotorespirazione è un fenomeno frequente alle alte temperature quando, chiusi gli stomi,  $CO_2$  viene consumata e  $O_2$  fotosintetico si accumula.

Esiste una via alternativa alla Z per gli elettroni che arrivano al centro di reazione P700 del PI, che aumenta la versatilità della fotosintesi (**via ciclica**). L'elettrone ad alto potenziale della Fd (ferredossina) può essere trasferito al citocromo b<sub>6</sub> invece che a NADP<sup>+</sup> e ritornare alla forma ossidata del P700 attraverso la plastocianina PC. Il flusso di elettroni determina solo il trasferimento di H<sup>+</sup> nello spazio interno al tilacoide, grazie al citocromo. In questo processo viene generato ATP, senza la formazione di NADPH. Il PII non partecipa alla fotofosforilazione ciclica, questa avviene quando non c'è più NADP per accettare elettroni dalla Fd ridotta.

La sensibilità della clorofilla alla luce dipende dalla sua struttura, con lo ione  $Mg^{2+}$  complessato da anelli benzenici. Il trasferimento di energia avviene per risonanza induttiva: l'energia passa da un pigmento all'altro fino a convergere sul centro di reazione. Al centro avviene la fotolisi dell'acqua.

Il PSI si trova nei margini dei tilacoidi granali e stromatici, il PSII nelle partizioni, assieme al sistema di fotolisi.

## Lezione XII

I **vacuoli** sono organelli multifunzionali, tipici dei vegetali. Hanno funzioni fisiche e metaboliche:

- Mantenimento del turgore, in concerto con il comparto della parete.
- Omeostasi protoplasmatica (regolazione della concentrazione composti organici e non e pH)
- Riserva ed accumulo di ioni e piccole molecole organiche.
- Accumulo di vari metaboliti.
- Sequestro di sostanze tossiche.
- Digestione di costituenti citoplasmatici (funzione del vacuolo digestivo amalgamabile al lisosoma animale).

Il **tonoplasto**, membrana lipidica del vacuolo, è singola ed è ricca di proteine intermembrana, tra cui quelle per la mobilitazione delle sostanze stoccate all'interno. La membrana contiene il succo vacuolare, acquoso, una funzione proteica, zuccheri a basso pm, sali minerali, pigmenti (eg, antociani), metaboliti vari (tra cui quelli tossici). La membrana è lipoproteica, bistratificata ed asimmetrica. La superficie rivolta verso l'esterno è più ricca di proteine intermembrana. Il doppio strato lipidico è solo per minima parte fosfolipidico: predominanti sono i glicolipidi, specialmente i galattolipidi. I lipidi del tonoplasto sono un supporto fisico per il sistema proteico del tonoplasto, hanno un ruolo nel traffico vescicolare durante la biogenesi del vacuolo, nei meccanismi di riconoscimento vescicolare, nell'indirizzamento delle proteine al tonoplasto e al succo vacuolare, nell'attività enzimatica, nelle cascate trasduzionali culminanti spesso in pattern d'espressione genica specifici. Le **TIPs** (*Tonoplast Intrinsic Proteins*) costituiscono buona parte delle intermembrana. Sono glicoproteine, spesso complessate con **residui oligosaccaridici rivolti verso il succo vacuolare**. Sono canali, pompe, trasportatori, enzimi. Pompe protoniche ( $H^+/ATPasi$  e  $H^+/PPasi$ , che fa  $Ppi \rightarrow 2Pi$ ) importano  $H^+$ . Il pH del succo vacuolare è acido; gli  $H^+$  sono anche sfruttati per sistemi di **cotrasporto** per molecole da muovere contro gradiente, eg antiporto di  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , saccarosio e simporto degli anioni.  $Cl^-$  e  $NO_3^-$  invece si muovono in canali per uniporto.

Il vacuolo non è statico. Ha una vita propria, che inizia a livello di meristemica. **Forma e dimensione variano**. Mentre le cellule crescono e si differenziano, nel citoplasma compaiono numerosi piccoli vacuoli, che aumentano sempre più di volume; dimensioni e forma variano durante il differenziamento e la divisione, come in conseguenza alle attività stagionali. Ad esempio, i meristemi secondari, responsabili dell'accrescimento diametrico della pianta, come le cellule del cambio cribrovascolare,

presentano vacuolizzazione diffusa in inverno e grossi vacuoli a primavera, quando le cellule sono attive metabolicamente e l'acqua è disponibile. Anche stimoli ambientali, come i movimenti nastici (cerca!) modificano la forma e le dimensioni del vacuolo. Quando il girasole si orienta, muove il capolino in direzione del sole, grazie ad una variazione del comparto vacuolare alla base del capolino. Nelle cellule guardiane il cambiamento del turgore vacuolare implica l'apertura e la chiusura dello stoma. Il vacuolo è presente in quasi tutte le cellule vegetali, ma alcune non lo posseggono, come quelle morte di cui rimane solo la parete, gli elementi cribrosi differenziati, le gametiche maschili di pteridofite e briofite.

**Genesi e differenziamento del vacuolo.** Le cellule non differenziate normalmente posseggono **provacuoli**; il processo di formazione del vacuolo normalmente inizia dalle prime fasi del differenziamento, da una zona del RER in prossimità del Golgi, costituita da un sistema tubulare membranoso interconnesso a cisterne appiattite, porzione del RE identificata con la sigla **GERL** (*Golgi Endoplasmatic Reticulum, Lysosome*, termine che fa riferimento a somiglianze strutturali con il lisosoma animale, per la secrezione di enzimi idrolitici poi accumulati nel provacuolo esistente).

- 1) **I tubuli si allungano, poi si appiattiscono:** il GERL si allunga in tubuli ramificati. Strutture ramificate e tubulari s'allungano, si avvicinano, si fondono.
- 2) I tubuli tendono a forme sferiche, che vanno a **racchiudere porzioni di citoplasma** ed enzimi, tra cui idrolasi acide (negli animali sono nei lisosomi), vengono inclusi. I tubuli sono i provacuoli nascenti.
- 3) I provacuoli intraprendono **fenomeni d'autofagia e digeriscono la membrana interna** e la porzione di citoplasma che non dev'essere presente nel vacuolo maturo.
- 4) Differenziamento, piccoli vacuoli si ingrandiscono, si fondono, inglobano **vescicole golgiane** e del RE, si **fondono** e formano il grande vacuolo.

In altre cellule, i vacuoli si formano in modo diverso. Nei semi dei cereali, le cellule specializzate nell'accumulo di riserve proteiche vacuolari formano vacuoli direttamente dal RE, mentre nei semi di alcune leguminose si formano per via diretta da Golgi e RE.

## Lezione XIII

Tra le **TIPs** (*Tonoplast Intrinsic Proteins*) spiccano le **acquaporine**. Il tonoplasto è altamente permeabile all'acqua. L'espressione delle Aqps dipende dalla cellula e dal vacuolo. Altre TIPs sono trasportatori specifici, ad esempio importano il **glicerolo**, che può essere accumulato prima della stagione fredda nei vacuoli di tessuti particolari, come adattamento alle basse temperature.

Il succo vacuolare contiene acqua, ioni inorganici ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{2-}$ ), acidi organici (citrico, succinico, fumarico, malico, ossalico, ...), carboidrati (monosaccaridi, disaccaridi, polisaccaridi non amilacei quali fruttani, mannani, mucilagini), aminoacidi, enzimi idrolitici, proteine di riserva (prolamine, globuline), metaboliti secondari (glicosidi, glucosinolati, alcaloidi, tannini, terpeni, flavoni, flavonoidi, antocianine).

I vacuoli svolgono numerosi compiti funzionali:

- 1) **Ruolo osmotico**, ovvero accumulo di molecole osmoticamente attive. Esse trainano acqua all'interno. Il vacuolo, insieme con la parete rigida, svolge perciò un ruolo di supporto meccanico. Il **turgore** di una cellula consiste nell'equilibrio fra il potenziale osmotico, dovuto ai soluti disciolti, ed il potenziale di pressione, dovuto alla parete. La pressione di turgore è motore per la distensione cellulare, è fondamentale per la rigidità di tessuti non lignificati (eg, foglie, giovani fusti), i quali, quando la pressione di turgore cala, avvizziscono. Una cellula che cresce rilassa la parete, porta acqua nel vacuolo e si espande, sintetizza nuovi strati di parete verso l'interno e ripristina la concentrazione iniziale dei soluti nel vacuolo. L'**aumento del volume cellulare** ha un basso impatto energetico grazie al vacuolo. Il turgore è cruciale anche per l'apertura degli stomi e per il **pulvino motore** che regola apertura/chiusura d'una foglia: la foglia è aperta quando le cellule motrici ventrali sono turgide e quelle dorsali sono flaccide. Ioni  $Cl^-$  e  $K^+$  lasciano le dorsali per le



ventrali. La foglia si chiude quando le cellule motore ventrali sono flaccide e quelle dorsale sono turgide. K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> vi fanno ritorno.

- 2) **Riserva di acqua.**
- 3) **Tampone:** pH acido tra 4 e 5 nel succo vacuolare, neutro nel citoplasma. Ciò avviene grazie al trasporto selettivo di metaboliti.
- 4) **Equilibrio e riserva di ioni:** nel vacuolo si accumulano molti ioni inorganici, la cui natura e quantità dipende dal terreno. Se non immediatamente utilizzati, gli ioni sono stoccati grazie a trasporto attivo nel vacuolo e vi possono rimanere liberi o come Sali e cristalli con gli acidi organici (eg, ossalato di calcio da acido ossalico e bivalente calcio). I cristalli di ossalato di calcio formano degli inclusi solidi insolubili di varie forme (rafidi, prismi o stiloidi, druse, sabbia cristallina).
- 5) **Riserva di metaboliti:** aa, proteine, monosaccaridi (ad esempio il glucosio nell'uva), disaccaridi (saccarosio nella barbabietola e nella canna da zucchero), pigmenti (colori a fiori, frutta ecc), acidi organici (rimossi dal citoplasma quando presenti in eccesso: citrico, malico, ossalico). Nelle cellule di tessuti di riserva dei semi i vacuoli sono fortemente modificati per immagazzinare proteine (corpi proteici o granuli di aleurone). Essi possiedono una membrana che delimita una matrice proteica che include un cristalloide proteico di globuline, dei globoidi, corpi sferoidali di fitina, sale di calcio e magnesio dell'estere esafosforico del mioinositolo. Le riserve sono mobilitate durante la germinazione e i granuli aleuronici si dilatano per formare vacuoli pressoché normali.
- 6) **Segregazione di molecole tossiche:** esse possono anche svolgere un'azione protettiva nei confronti dei fitofagi e deterrente verso gli erbivori. Metalli pesanti possono altresì venire accumulati (Pb, Zn, Cu, Ni). L'omeostasi è mantenuta grazie alla produzione di fitochelatine. *Pteris vittata*, una Pteridacea, è risultata essere una pianta utilissima nel **fitorisanamento** dei suoli contaminati da arsenico, del quale è iperaccumulatrice, nel senso che lo concentra fino oltre 10 volte la concentrazione del suolo.
- 7) **Attività litica grazie a idrolasi acide** (peptidasi, glicosidasi, esterasi, ...), eg per turnover componenti cellulari, morte ipersensibile e PCD.

I **metaboliti secondari** vengono riversati nel vacuolo come sostanze di rifiuto, anche se vengono poi utilizzati in altre vie metaboliche. Le piante mancano di un sistema efficace di smaltimento delle sostanze di rifiuto e quindi i prodotti del catabolismo devono essere accumulati ed isolati. Le piante non possono muoversi ed utilizzano la varietà di fitocostituenti per la vita di relazione: appetibilità e repellenza per impollinatori e predatori, difesa e resistenza contro patogeni, successo competitivo (inter/intraspecifico).

- 1) **Alcaloidi** (12000 tipi): sostanze organiche contenenti azoto, di norma in anelli eterociclici, basici, inodori in genere. Nel vacuolo sono protonati e solubili in acqua. In genere sono veleni e agiscono a piccole dosi. Sono anche sfruttati come importanti principi attivi di piante medicinali.
  - **Nicotina:** causa paralisi respiratoria ed è un insetticida;
  - **Colchicina, vinblastina;** bloccano il ciclo cellulare;
  - **Cocaina:** anestetico locale, stimola SNC;
  - **Lupinina:** tossico per gli animali da pascolo;
  - **Atropina, scopolamina, caffeina, papaverina, morfina:** agiscono a livello di SNC e SNP;
  - **Stricnina:** potente veleno tetanico.
- 2) **Glicosidi:** formati da zucchero (più comune il glucosio) complessato ad un aglicone, molecola non zuccherina. Diventano tossici quando vengono degradati. Le molecole che li degradano sono diversamente compartimentate.
  - **Glucosidi cianogenetici:** in legumi, graminacee, rosacee, mandorle amare, mele, pesche, susine (amigdalina), sambuco, granoturco e sorgo (durrina). Se il glucoside contatta l'enzima degradativo, si libera per idrolisi HCN, che blocca la respirazione cellulare.
  - **Glucosinolati:** per lo più nei vacuoli delle crucifere, responsabili dell'odore e sapore pungente di alcuni ortaggi. Quando l'aglicone viene liberato, esso rilascia isotiocianati, tiocianati e nitrili che sono tossici per molti erbivori.

- **Terpenoidi** (25000 tipi): liposolubili, incolori. Via biosintetica dell'acetil-CoA o da intermedi glicolitici. Le unità di isoprene a 5C sono i monomeri. Quelli a basso pm sono volatili, profumati, insolubili.

#### **Monoterpeni** (2x5C)

- Olii essenziali:** conferiscono alle piante un profumo ed un aroma spesso gradevole. Gli olii essenziali sono presenti nei fiori, nelle foglie e nei frutti, ad esempio nelle Labiate, come basilico e salvia, finocchio, sedano, prezzemolo.
- Piretrine:** estratte da *Chrysanthemum*, hanno una potente azione insetticida.
- Sesquiterpeni** (3x5C): molti olii essenziali, mescolati con monoterpeni.
- Fitoalessine:** antibiotici naturali prodotti dalla pianta in seguito all'attacco di un patogeno.
- Agenti anti-erbivori.

**Diterpeni** (4x5C) composti tossici per gli erbivori, spesso contenuti nelle resine.

- Fitoalessine; Taxolo** (agente anti-cancro).

**Triterpeni**, tra cui gli steroidi.

- Fitoecdisoni**, simili agli ormoni della muta degli insetti, sono in grado di alterarne lo sviluppo meccanismi di difesa.

- Le larve della farfalla monarca hanno imparato a concentrare nei loro tessuti i **cardenolidi** senza effetti tossici neppure per l'individuo adulto, difendendosi a loro volta da predatori quali gli uccelli.

- Saponine** (copresenza di elementi idro-e lipo-solubili), proprietà anti-erbivore.

**Digitossina**, estratta dalla Digitale, azione farmacologica come cardiotonico.

- Tetraterpeni** (8x5C) e **carotenoidi**.

**Politerpeni** (nx5C) e gomme, presenti nel lattice di alcune piante. Funzione anti-erbivori e per riparare le ferite - *Hevea brasiliensis*; gommo-resine (mirra e incenso) *Commiphora*, *Pinus*

- Composti fenolici** (più di 8000): molto eterogenei, in parte idro e in parte liposolubili, tutti con un gruppo fenolico. Derivano dagli aminoacidi tirosina e fenilalanina. Solo una minima parte hanno localizzazione vacuolare. Hanno un ruolo strutturale (lignina, lignani) e possono funzionare come molecole di difesa, vessillari, agenti allelopatici.

- Flavonoidi:** assorbono la luce, funzioni di difesa, alcuni funzionano da fitoalessine, schermo contro UV, comunicazione rizosferica.
- Cumarine:** deterrenti alimentari in semi, frutti e fiori. Proprietà anticoagulanti.
- Tannini:** polimeri di composti fenolici, dannosi per gli erbivori (riducono crescita e sopravvivenza), sensazione astringente.

## Lezione XIV

I **perossisomi** sono piccoli organelli citoplasmatici, in tutti gli eucarioti, a singola membrana, che non portano DNA al loro interno. Sono compartimenti metabolici diversamente specializzati, la cui funzione generale è la rapida ossidazione dei substrati. Si originano per vescicolazione dal reticolo perissosomale, una porzione del RE. Le piccole vescicole sono pre-perossisomi, che confluiscono in perossisomi intermedi, di grandi dimensioni. Questi ultimi accumulano enzimi e proteine e si dividono in numerosi perossisomi maturi, di diametro minore.

A maturità, la forma è per lo più sferica, anche se in alcuni casi sono allungati o irregolari. A maturità, la matrice contiene regioni dense, amorfe, cristalline o fibrillari (eg, cristalli di catalasi). I perossisomi possono proliferare per accrescimento e scissione semi-indipendenti, in funzione del contesto in cui la cellula si trova. Nello *stream* citoplasmatico si muovono su canali acto-miosinici, come tipico degli organuli vegetali. I perossisomi sono altamente dinamici e possono cambiare funzione grazie all'accumulo differenziale di sostanze al loro interno.

La membrana perossisomale porta specifici recettori, della classe delle perossine, che riconoscono peptidi segnale delle proteine da importare:

- **PTS1** (*Peroxisomal Targeting Signal*): classe di tripeptidi al C-terminale, evolutivamente molto conservati, comprendono anche un pentapeptide più *upstream* e un altro pentapeptide con proprietà polari ancora più *upstream*;
- **PTS2**: classe di nonapeptidi, all'N-terminale, meno comuni, rimossi una volta che l'importazione è andata a buon fine.

Altre proteine entrano con segnali target ignoti.

I perossisomi vegetali svolgono varie funzioni, variabili a seconda di specie, tipo cellulare, fase di sviluppo, condizioni ambientali e quant'altro:

- **Metabolismo ossidativo, compartimentalizzato**, e connessione delle vie metaboliche. Passaggi metabolici potenzialmente tossici sono compartimentalizzati, ad esempio la formazione di ROS e radicali liberi:  $\text{RH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow (\text{perossidasi}) \rightarrow \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2 / 2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 4 \text{HO}^- \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ .
- I **gliossisomi ossidano gli acidi grassi**, ad esempio nei tessuti di riserva. Hanno un ruolo di primo piano nella conversione di lipidi in saccarosio, prerogativa delle piante, via metabolica inesistente negli animali.
- **Catabolismo e riciclo degli aminoacidi a catena ramificata**.
- Attività nella fotorespirazione (che elimina  $\text{O}_2$  in eccesso): i perossisomi **riciclano il P-glicolato** prodotto dall'attività ossigenica della RuBisCO.
- **Metabolismo dell'azoto fissato nei noduli radicali**.
- Produzione di **molecole segnale**: jasmonato (regolatore di crescita e sviluppo derivato da ciclopentanone, biosintetizzato da acidi grassi, come l'acido linolenico), auxine, salicinato, molecole di difesa contro funghi patogeni.

Un **tessuto vegetale** è costituito da cellule con morfologia e funzione simili, in cui gli aggregati cellulari della medesima origine si dividono secondo le tre direzioni spaziali. I fotosintetici algali non formano veri tessuti in questo contesto, in quanto si dividono su un solo piano con la forma a tallo e non presentano particolare differenziazione: l'ambiente acquatico è omogeneo, i nutrienti omogeneamente distribuiti; non servono tessuti specializzati e per l'acquisto di acqua. **L'ambiente terrestre ha spinto evolutivamente la differenziazione tissutale**, ad esempio per il sostegno ed il trasporto di acqua e nutrienti. I tessuti vegetali sono uniti tra loro: ogni citodieresi forma un fragmoplasto; la presenza di lamella mediana e plasmodesmi mantiene in comunicazione il tessuto. Tutti i tessuti adulti derivano da cellule che hanno mantenuto o riacquisito la capacità di dividersi e nel loro insieme formano i tessuti meristemati o embrionali, presenti per tutta la vita, che possono differenziare e formare tessuti adulti.

La pianta è organizzata su **base cilindrica** (fusto, radice), cilindro-appiattita per le foglie si osservano tre zone concentriche: tegumento esterno di protezione, parenchima o tessuto fondamentale intermedio, tessuto interno conduttore e di sostegno con anche parenchimi. Il corpo della pianta deriva dall'attività dei tessuti meristemati. I **meristemi** possono essere embrionali, primari o secondari in base all'origine, apicali, laterali o **avventizi** (che non fanno parte del programma di crescita e si osservano ad esempio in caso di lesioni) a seconda della localizzazione.

I **meristemi primari** si trovano a livello di radici e germogli del fusto (**apicali**) e sono responsabili della crescita primaria, cioè in lunghezza, indefinita. Cellule indifferenziate mantengono o riacquistano la capacità di divisione. I meristemi intercalari, nei nodi fanno riferimento ai punti d'inserzione delle foglie nel fusto e sono attivi per tutta la vita della pianta nel bambù: osservando la lunghezza di un ramo la mattina ed il pomeriggio si rileva visibilmente la crescita. Questo avviene anche in altre famiglie, come nelle graminacee. Il significato evolutivo è di **adattamento al pascolo**: piante costantemente sottoposte al pascolamento da parte di erbivori devono rinnovare costantemente le proprie strutture. Le meristematiche embrionali e primarie sono piccole (15-20 micrometri di diametro), isodiametriche, hanno un elevato rapporto nucleoplasmatico, una parete pectocellulosica sottile (poco più del setto di separazione), piccoli provacuoli, plastidi allo stadio di proplastidi e non presentano spazi fra le cellule.

I **meristemi secondari**, laterali o cambi, producono accrescimento in spessore di fusti e radici nelle piante legnose di gimnosperme e dicotiledoni. Questi meristemi si formano per sdifferenziamento di cellule già differenziate, cioè dopo lo sviluppo. Le foglie non vanno incontro ad accrescimento secondario. I tessuti meristemati secondari condividono con i primari la capacità di moltiplicazione cellulare per mitosi e di produzione di cellule destinate a diventare adulte, ma hanno forma, dimensioni e proprietà citologiche diverse, poiché formatesi per sdifferenziamento. Le dimensioni sono decisamente maggiori, fino a qualche centinaio di micrometri, sono più allungate, più differenziate e più o meno vacuolate. Il cambio cribrovascolare depone xilema verso l'interno e floema verso l'esterno (**XIFE**). Il cambio suberofellodermico forma, invece, sughero e felloderma.