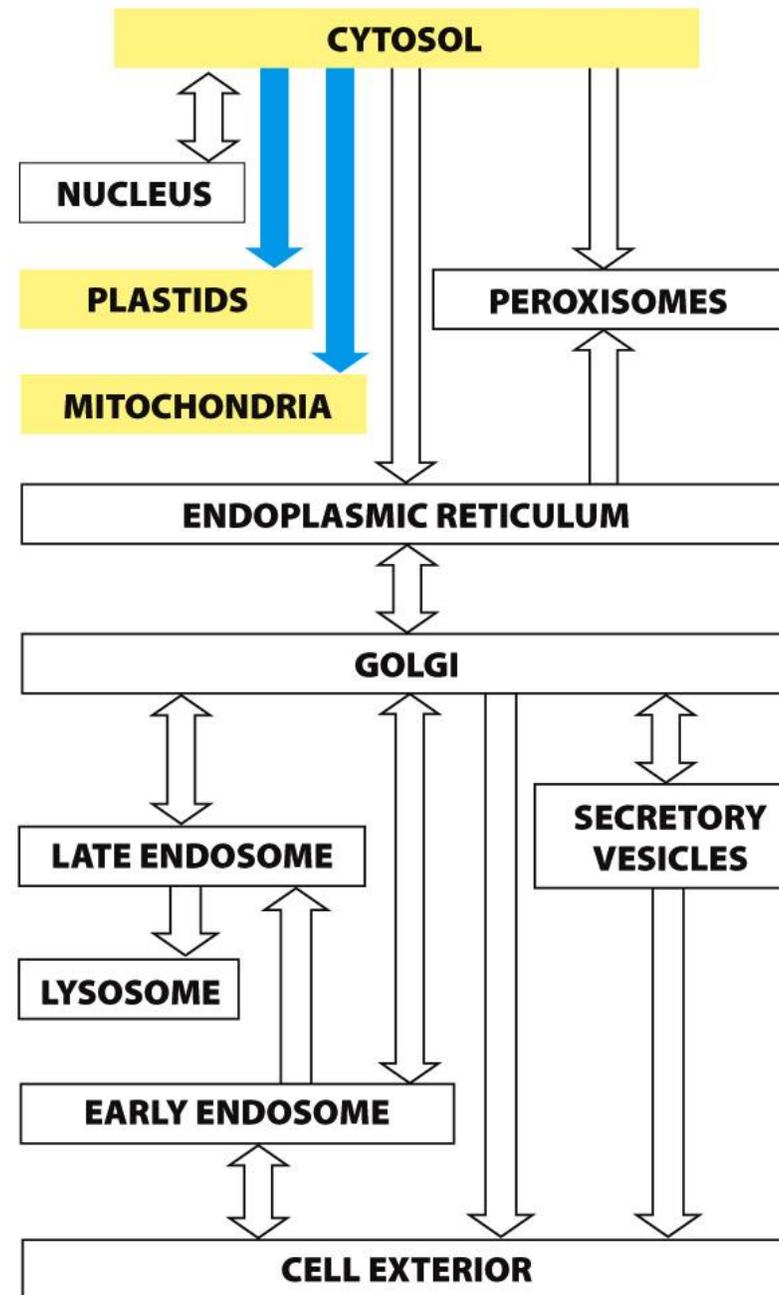


# **Trasporto a mitocondri e cloroplasti**

# Trasporto di proteine nei mitocondri e nei cloroplasti

La maggior parte delle proteine di mitocondri e cloroplasti è codificata dal genoma nucleare.

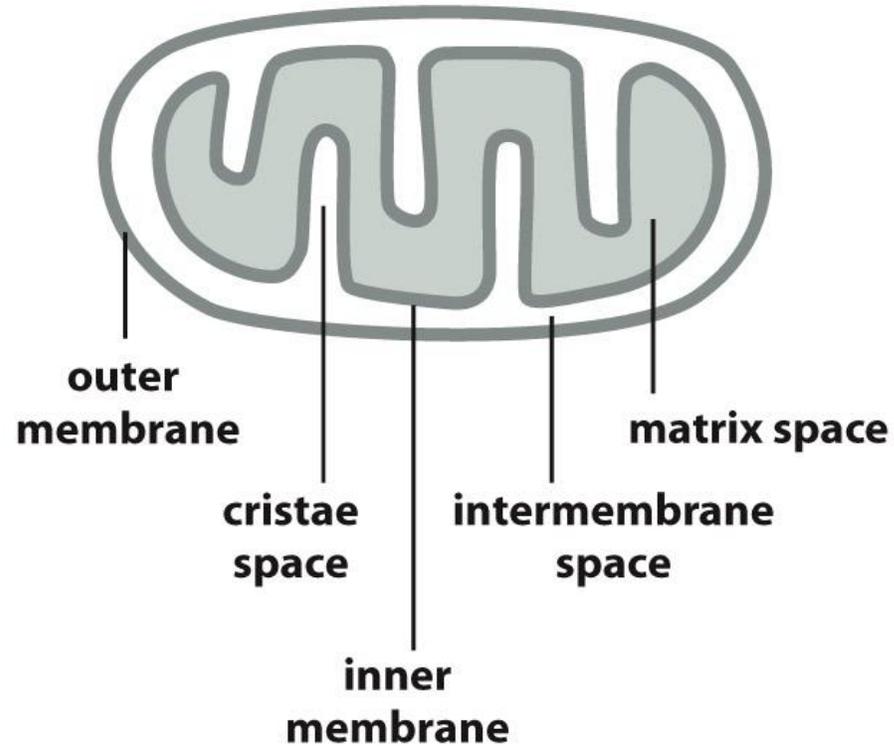
Esse vengono importate mediante un processo detto **traslocazione delle proteine**.



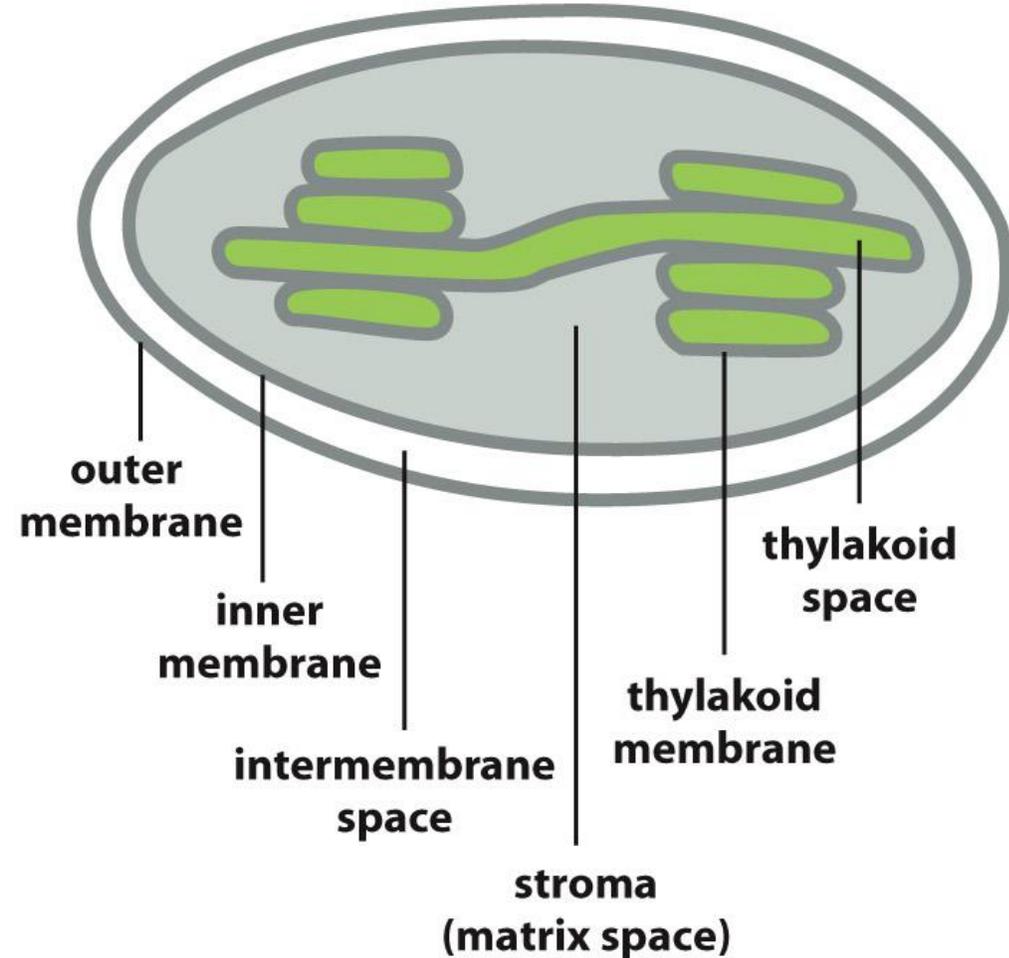
- Mitochondri e cloroplasti sono racchiusi da una **doppia membrana** e sono deputati alla sintesi di ATP (fosforilazione ossidativa nei mitocondri e fotosintesi nei cloroplasti)
- La maggior parte delle proteine di mitocondri e cloroplasti sono codificate dal genoma nucleare e quindi sono sintetizzate nel citosol
- L'import sfrutta diversi sistemi, in base al sotto-compartimento bersaglio (membrana interna o esterna, spazio intermembrana, matrice/stroma, membrana tilacoidale, spazio del tilacoide)
- Mitochondri e cloroplasti crescono per incorporazione di lipidi e proteine, i nuovi organelli si formano per divisione di organelli preesistenti. La loro crescita e divisione non è accoppiata alla divisione cellulare.

Mitocondri e cloroplasti contengono sotto-compartmenti separati, contenenti ciascuno una serie distinta di proteine

(A) MITOCHONDRION



(B) CHLOROPLAST



L'importazione delle proteine nei mitocondri e nei cloroplasti è **post-traduzionale** e richiede:

- **proteine unfolded**

Le proteine vengono mantenute unfolded dalle chaperonine citosoliche (Hsp70 e Hsp90) → è richiesto ATP.

Vengono importate come precursori delle proteine mitocondriali o dei cloroplasti, che poi possono subire tagli proteolitici.

- **mitocondri/cloroplasti funzionali ( $\Delta\psi$ )**

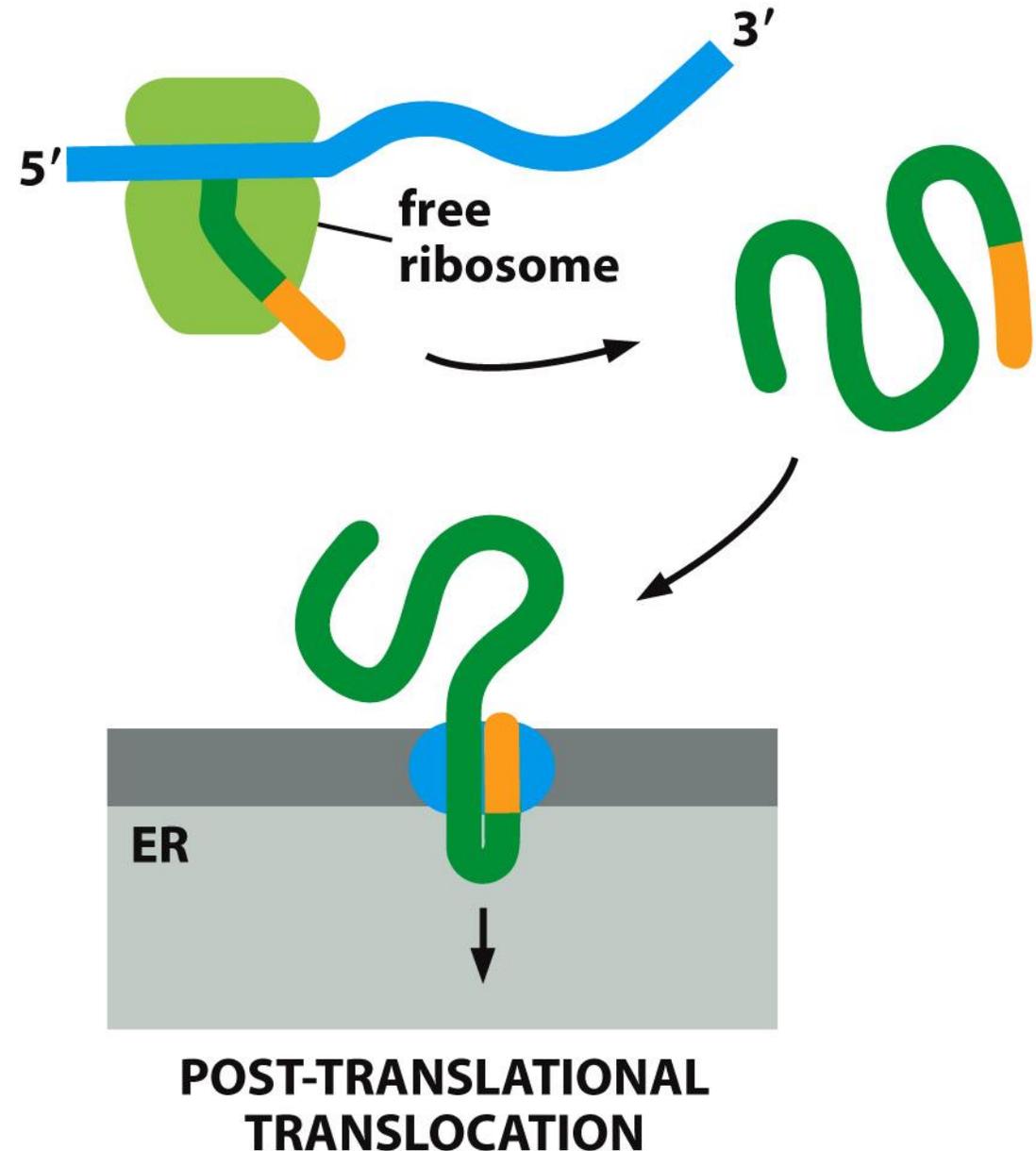
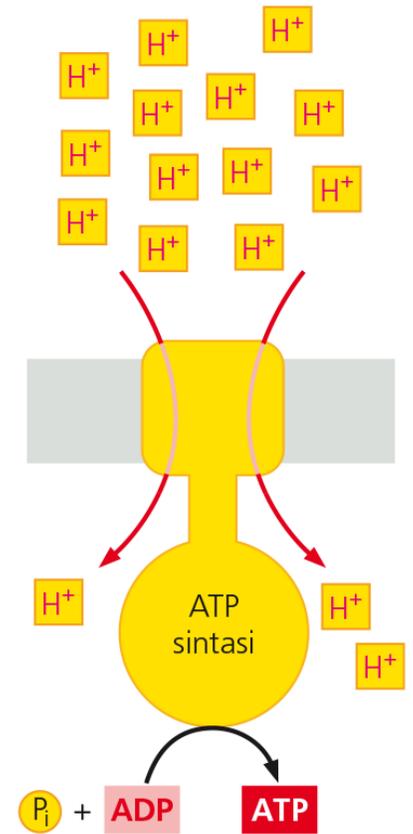
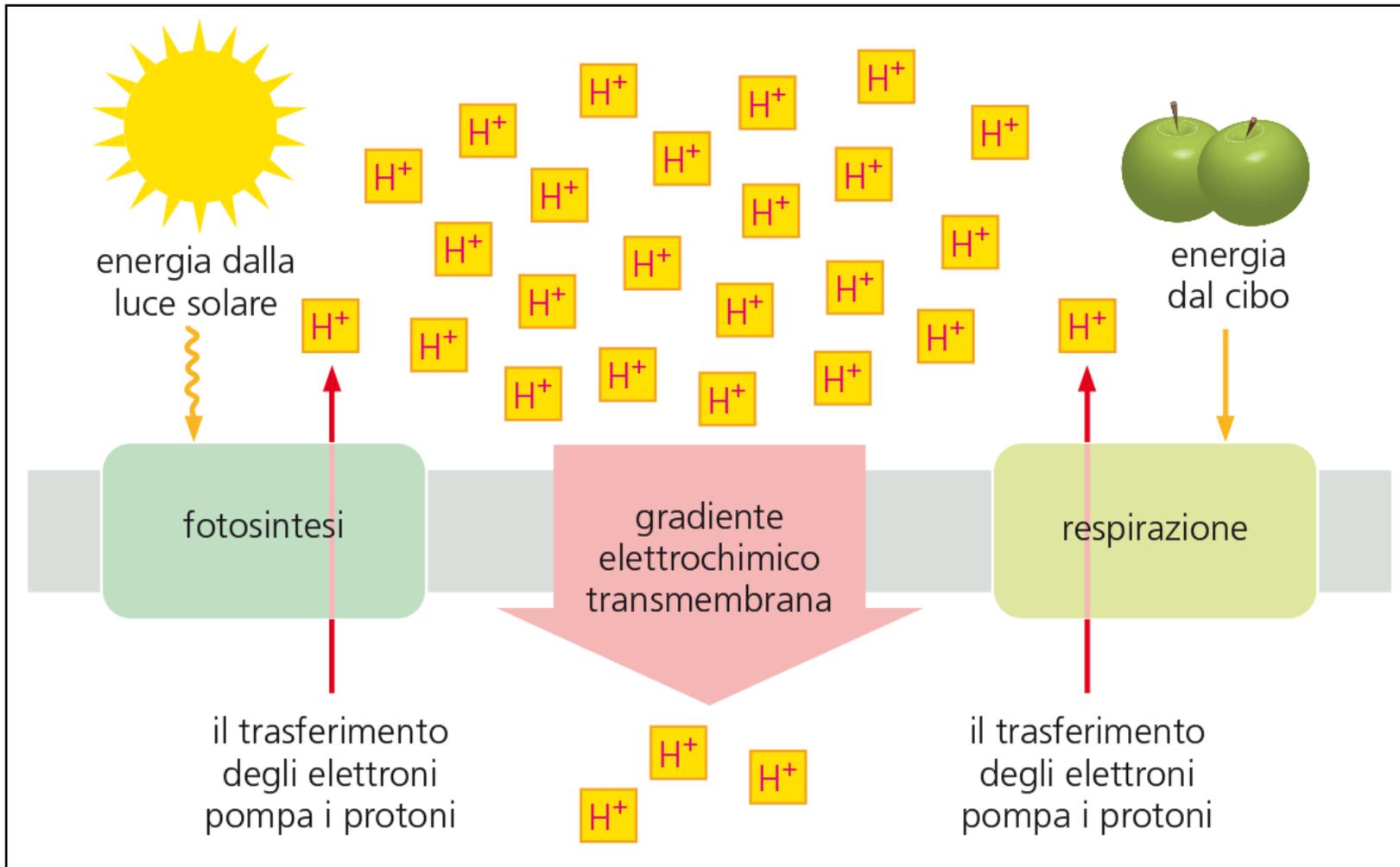


Figure 12-32b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

**Gradiente elettrochimico ( $\Delta\psi$ )** attraverso la membrana interna serve anche per spingere la traslocazione delle proteine.

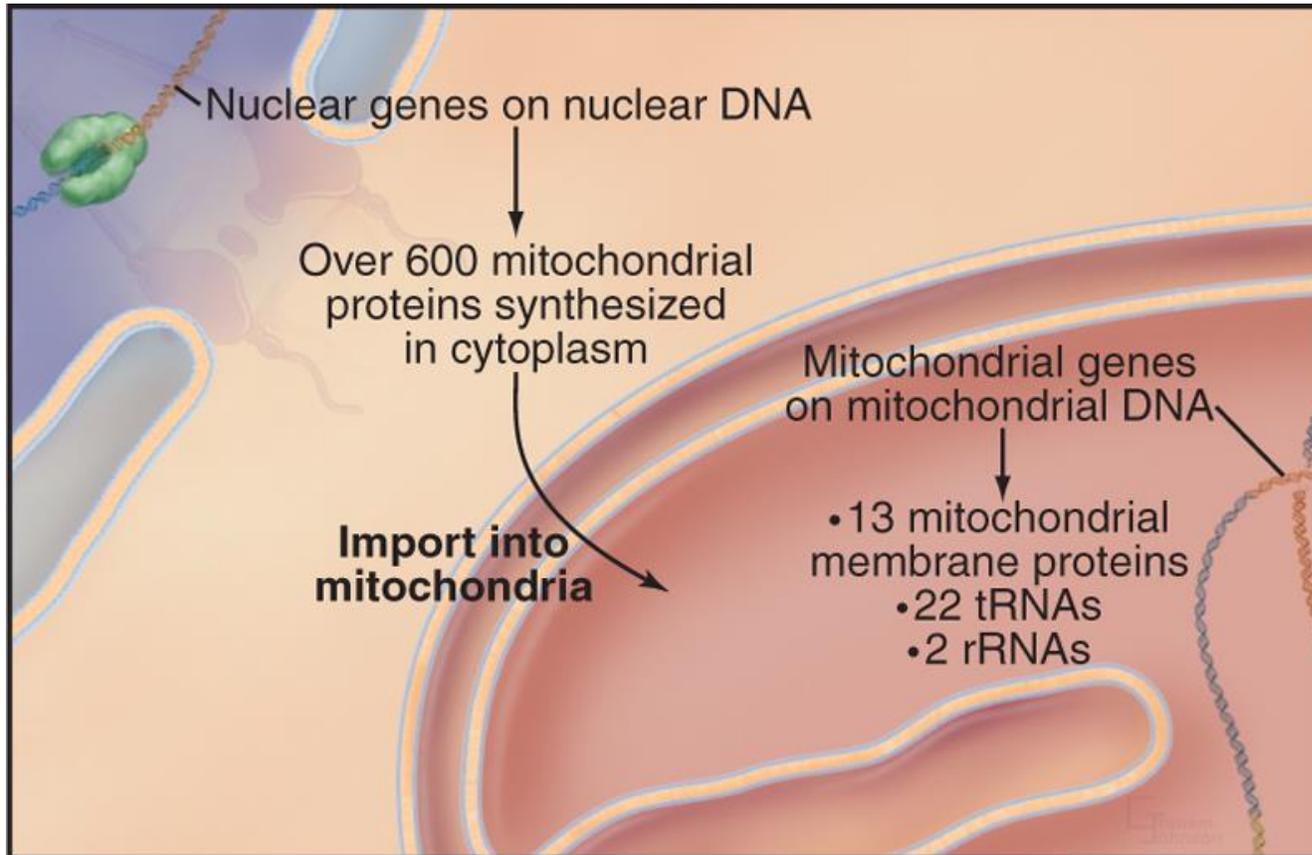


Il gradiente è sfruttato per generare ATP

La catena di trasporto degli elettroni genera un gradiente di H<sup>+</sup>

# **Traslocazione al mitocondrio**

# Mitocondri



© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

**Il genoma mitocondriale produce 13 proteine, 22 tRNA e 2 rRNA.**

Delle 92 subunità proteiche coinvolte nella fosforilazione ossidativa solo 13 sono codificate dall' mtDNA.

© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

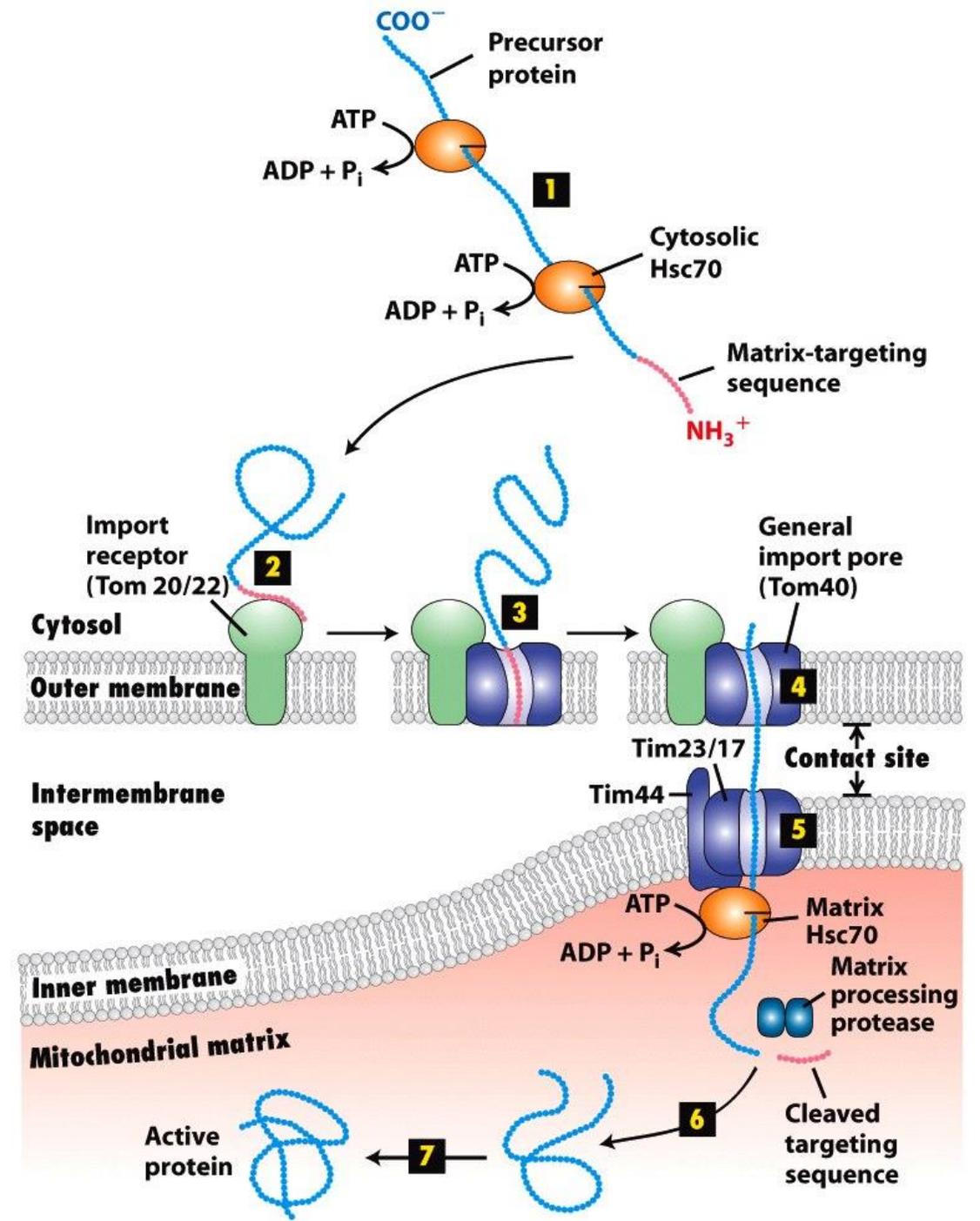
I mitocondri non servono solo per la sintesi di ATP, ma contengono anche molti enzimi metabolici. Quindi oltre alle proteine, anche i metaboliti devono essere trasportati attraverso la membrana del mitocondrio.

La **membrana esterna** contiene delle porine con struttura a  $\beta$ -barrel, che la rendono permeabile a ioni e metaboliti.

La **membrana interna** invece non possiede porine, ma trasportatori a multipli passaggi transmembrana specifici per i diversi metaboliti (ad esempio trasportatori di ATP, ADP e fosfato).

# IMPORT AL MITOCONDRIO

- Chaperoni citosolici per mantenere le proteine unfolded
- Sequenza segnale che poi verrà rimossa
- Recettore per l'import e canali su membrana esterna ed interna
- Punti di contatto



# Sequenze segnale per il mitocondrio

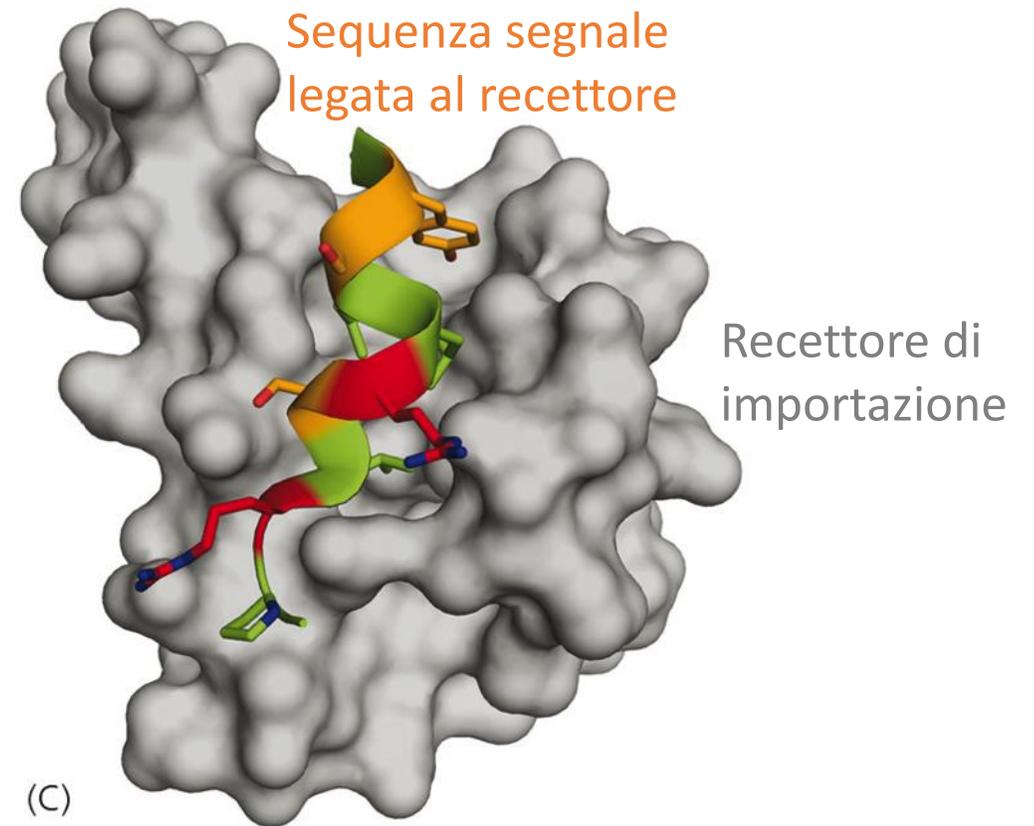
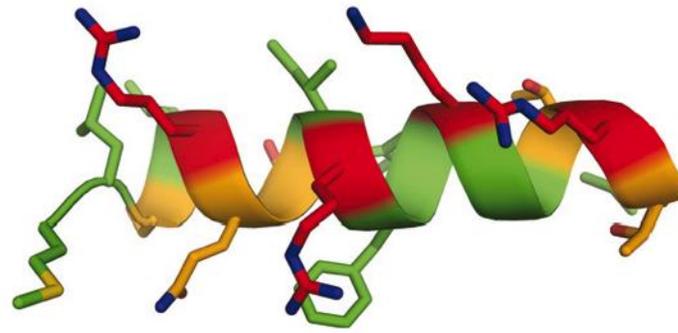
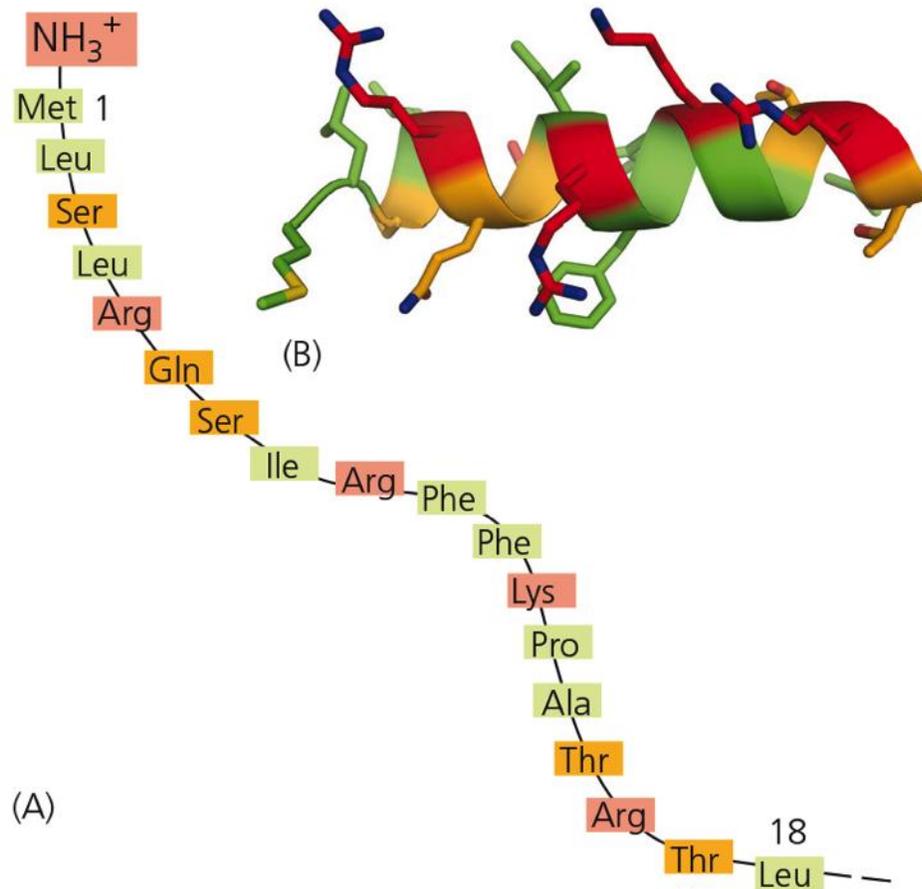
**TABLE 13-1** Targeting Sequences That Direct Proteins from the Cytosol to Organelles\*

Target Organelle	Location of Sequence Within Protein	Removal of Sequence	Nature of Sequence
Endoplasmic reticulum (lumen)	N-terminus	Yes	Core of 6–12 hydrophobic amino acids, often preceded by one or more basic amino acids (Arg, Lys)
Mitochondrion (matrix)	N-terminus	Yes	Amphipathic helix, 20–50 residues in length, with Arg and Lys residues on one side and hydrophobic residues on the other
Chloroplast (stroma)	N-terminus	Yes	No common motifs; generally rich in Ser, Thr, and small hydrophobic residues and poor in Glu and Asp
Peroxisome (matrix)	C-terminus (most proteins); N-terminus (few proteins)	No	PTS1 signal (Ser-Lys-Leu) at extreme C-terminus; PTS2 signal at N-terminus
Nucleus (nucleoplasm)	Varies	No	Multiple different kinds; a common motif includes a short segment rich in Lys and Arg residues

\*Different or additional sequences target proteins to organelle membranes and subcompartments.

Le proteine mitocondriali e dei cloroplasti possiedono sequenze segnale specifiche per ogni sotto-compartimento

- La sequenza segnale delle proteine della matrice mitocondriale viene rimossa
- Quella delle proteine delle membrane e dello spazio intermembrana no

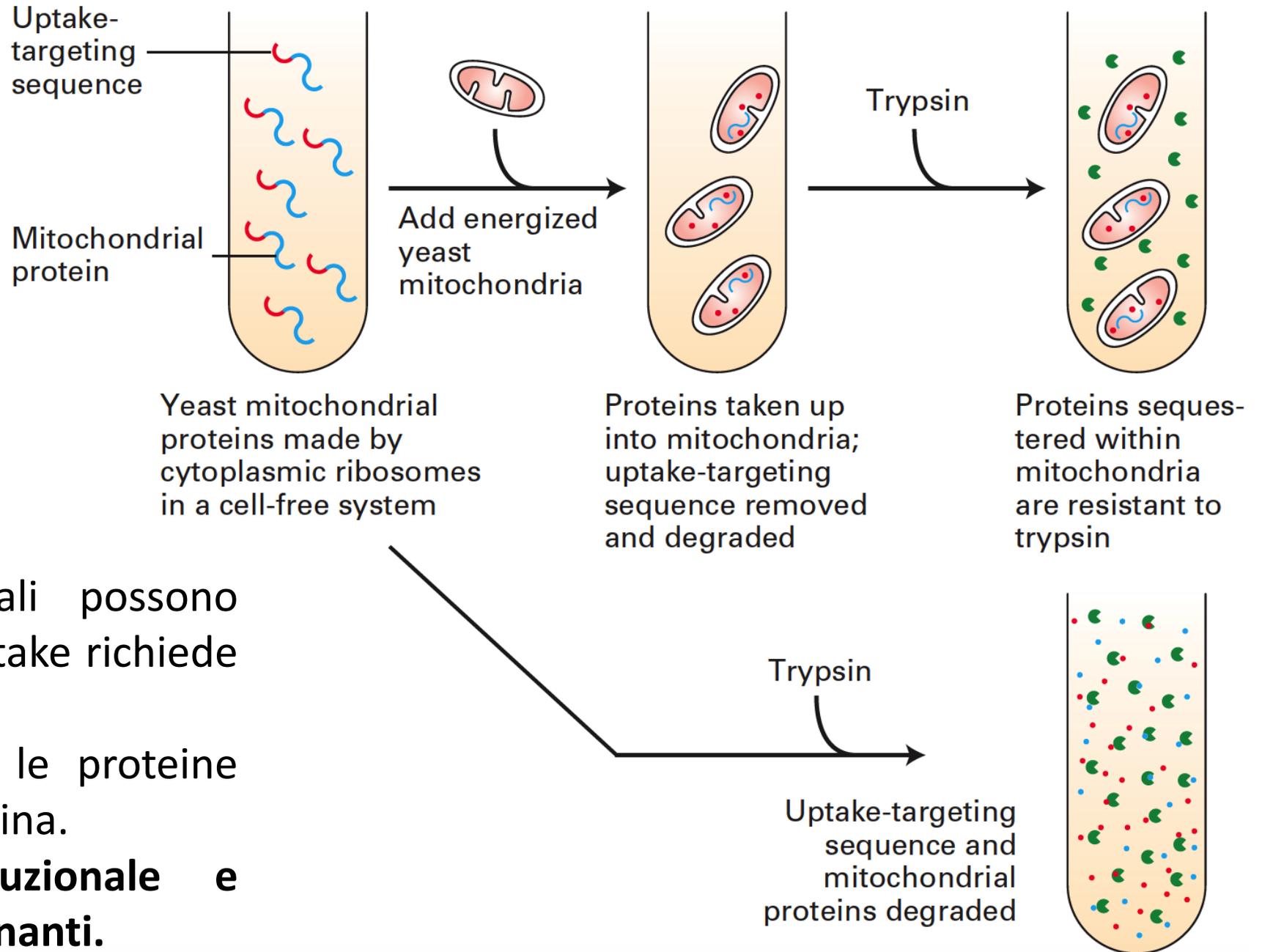


Le sequenze segnale per la matrice mitocondriale formano un'**elica anfipatica** (in rosso gli aa carichi, in verde i non polari, in arancione gli aa polari privi di carica). Di solito non ci sono aa carichi negativamente.

**E' questa configurazione, e non la sequenza primaria, che viene riconosciuta.**

Si ipotizza che le cariche positive della sequenza anfipatica vengano attratte elettroforeticamente nello spazio della matrice dal potenziale elettrochimico negativo all'interno.

## Sistema acellulare usato per studiare l'import al mitocondrio (in vitro)

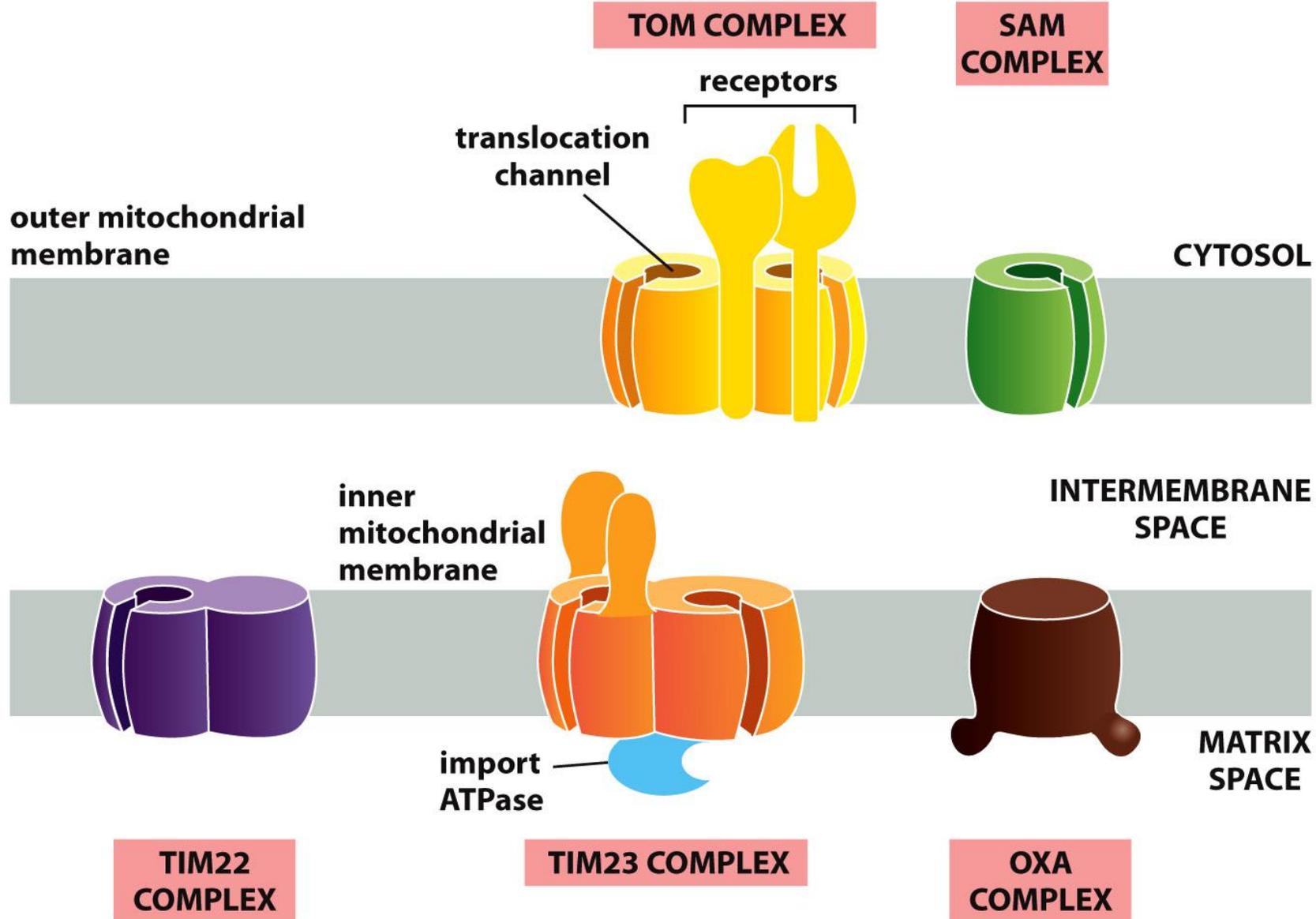


Solo mitocondri funzionali possono importare le proteine, l'uptake richiede ATP e chaperonine.

In assenza di mitocondri le proteine vengono digerite dalla tripsina.

→ L'import è post-traduzionale e richiede mitocondri funzionanti.

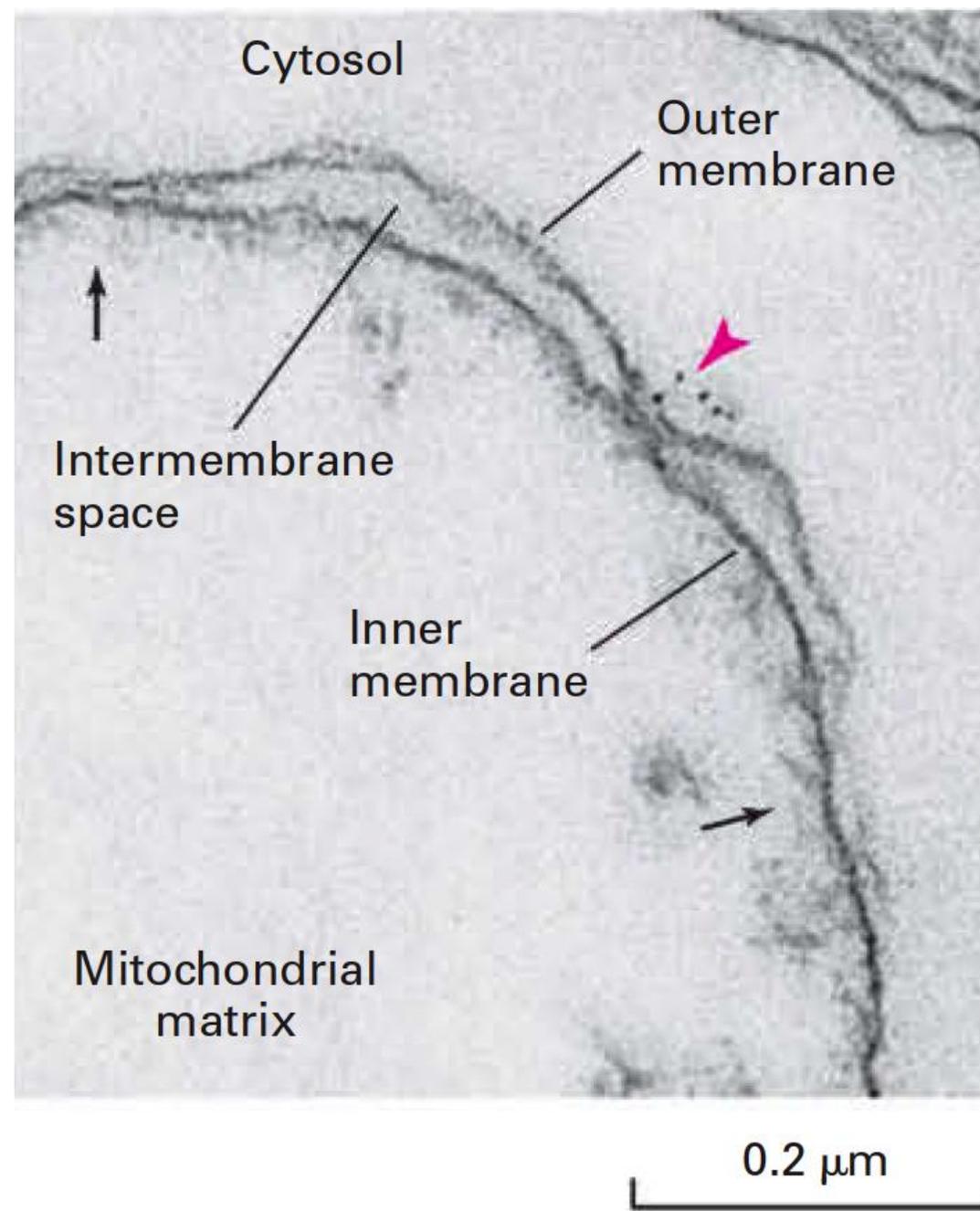
# Alcuni complessi proteici mediano il passaggio attraverso le membrane



Questi complessi multiproteici contengono alcune subunità che fungono da canale e altre che agiscono come recettori, interagendo con la proteina da importare.

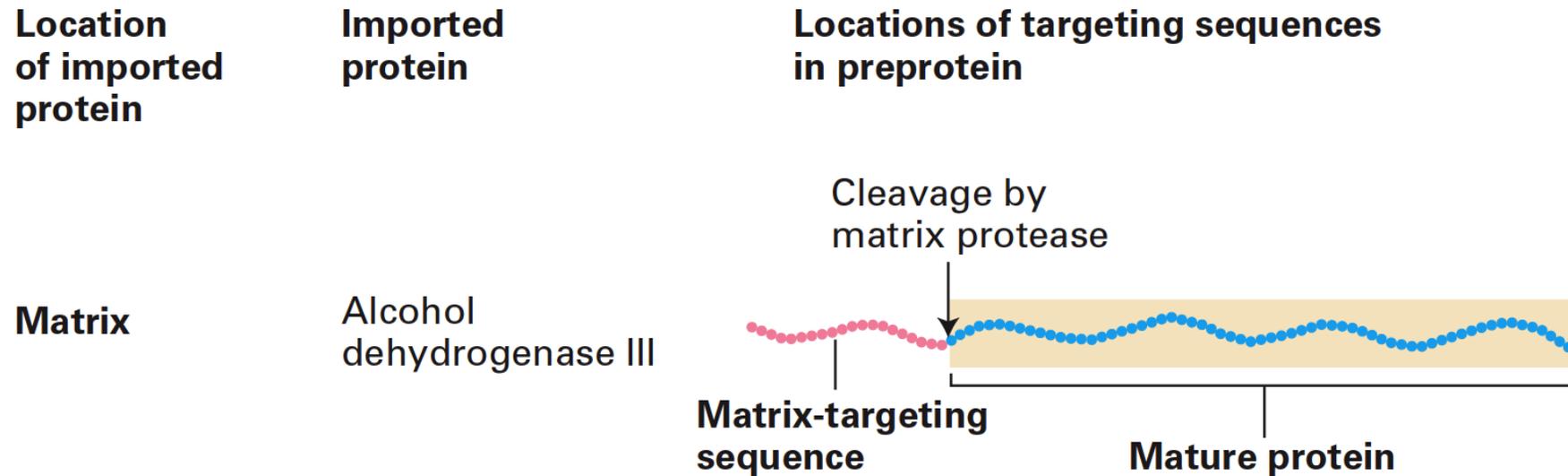
Le traslocazione avviene a livello dei **punti di contatto** tra la membrana esterna e la membrana interna.

I complessi TOM e TIM23 lavorano insieme per la traslocazione delle proteine nella matrice, ma possono anche lavorare indipendentemente.



Proteine visualizzate con Ab e proteinaA-oro

# Traslocazione alla matrice mitocondriale



I precursori delle proteine mitocondriali, una volta sintetizzati, vengono mantenuti unfolded grazie all'intervento di Hsp70 e altri chaperoni

Il **complesso TOM (Translocator of the Outer Membrane)** trasferisce le proteine NON ripiegate attraverso la membrana esterna.

Le proteine destinate alla matrice legano anche il **complesso TIM23** e attraversano la membrana interna.

Nella matrice, le **peptidasi MPP (Matrix Processing Protease)** rimuovono la sequenza segnale.

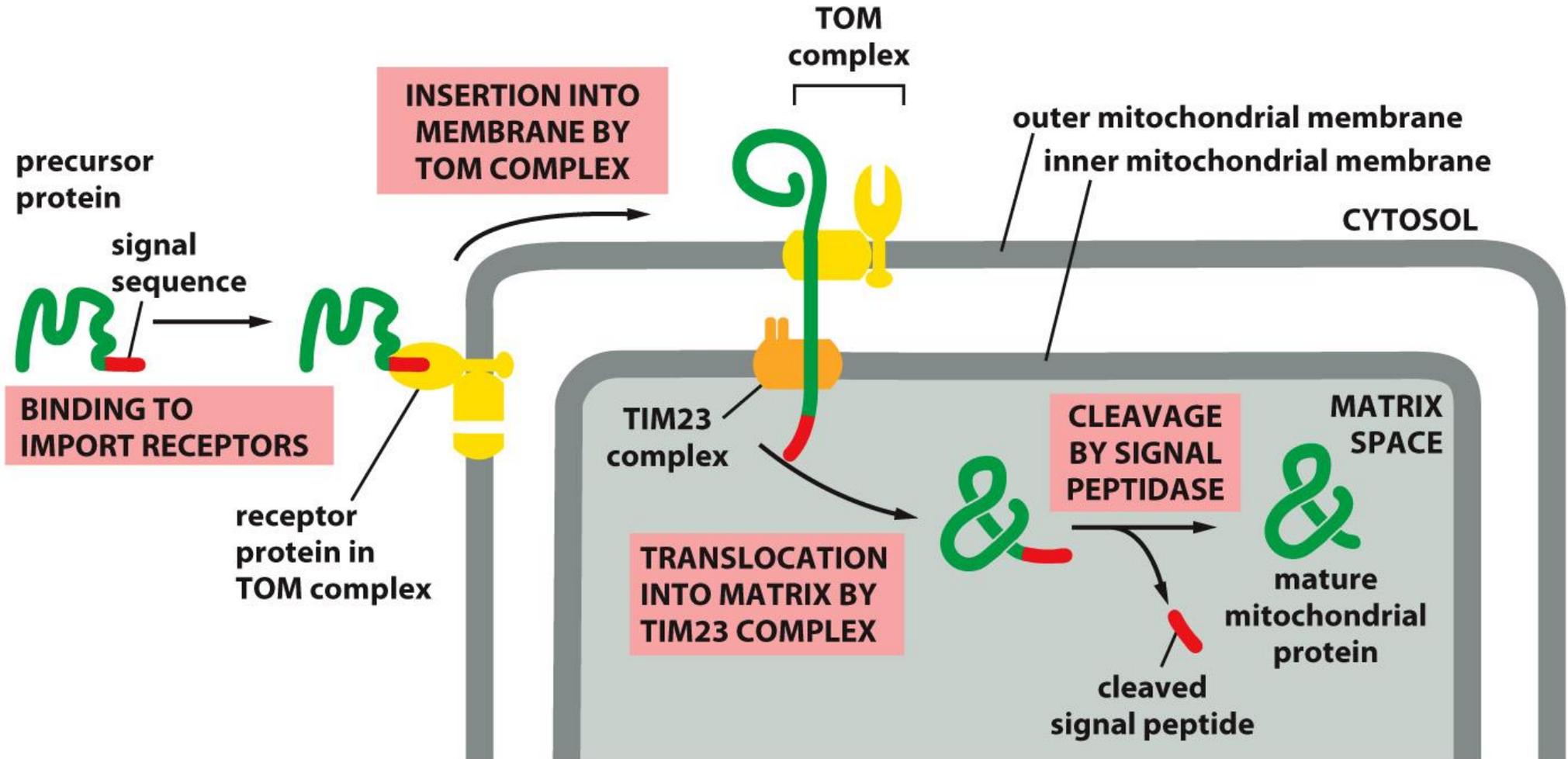
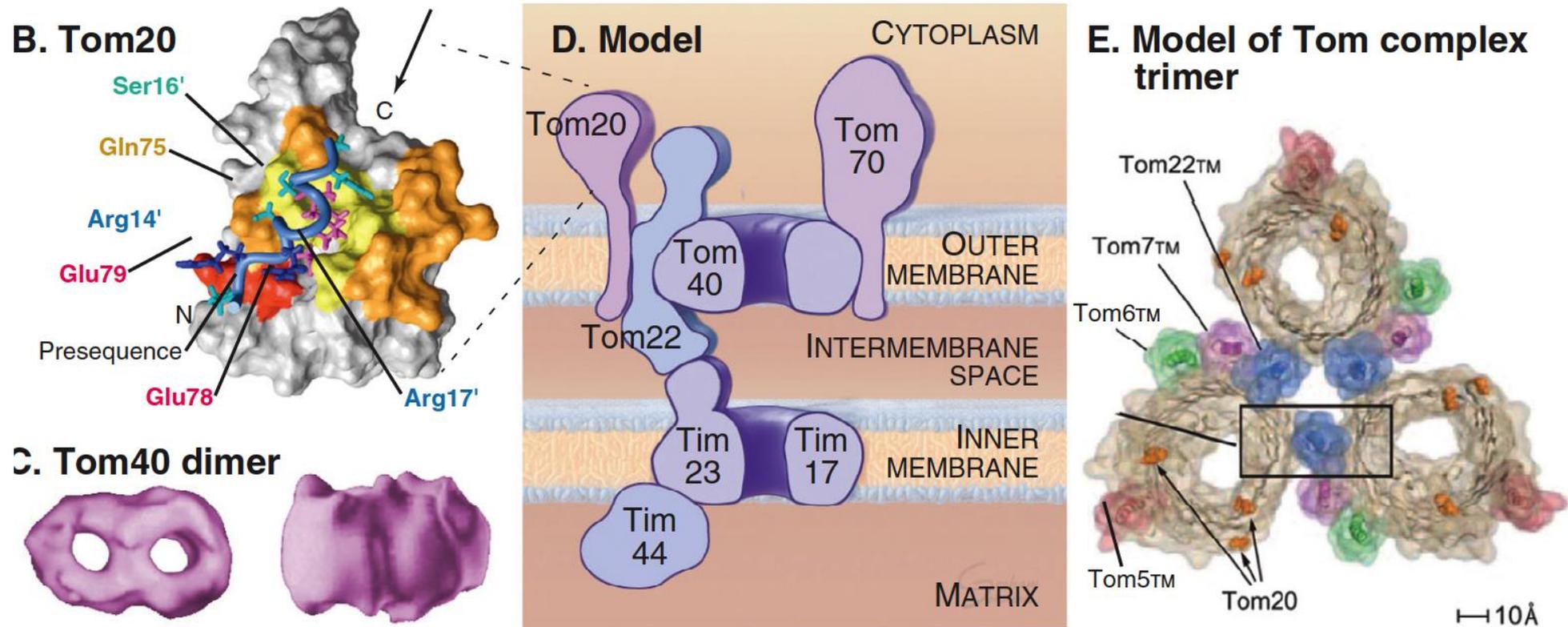
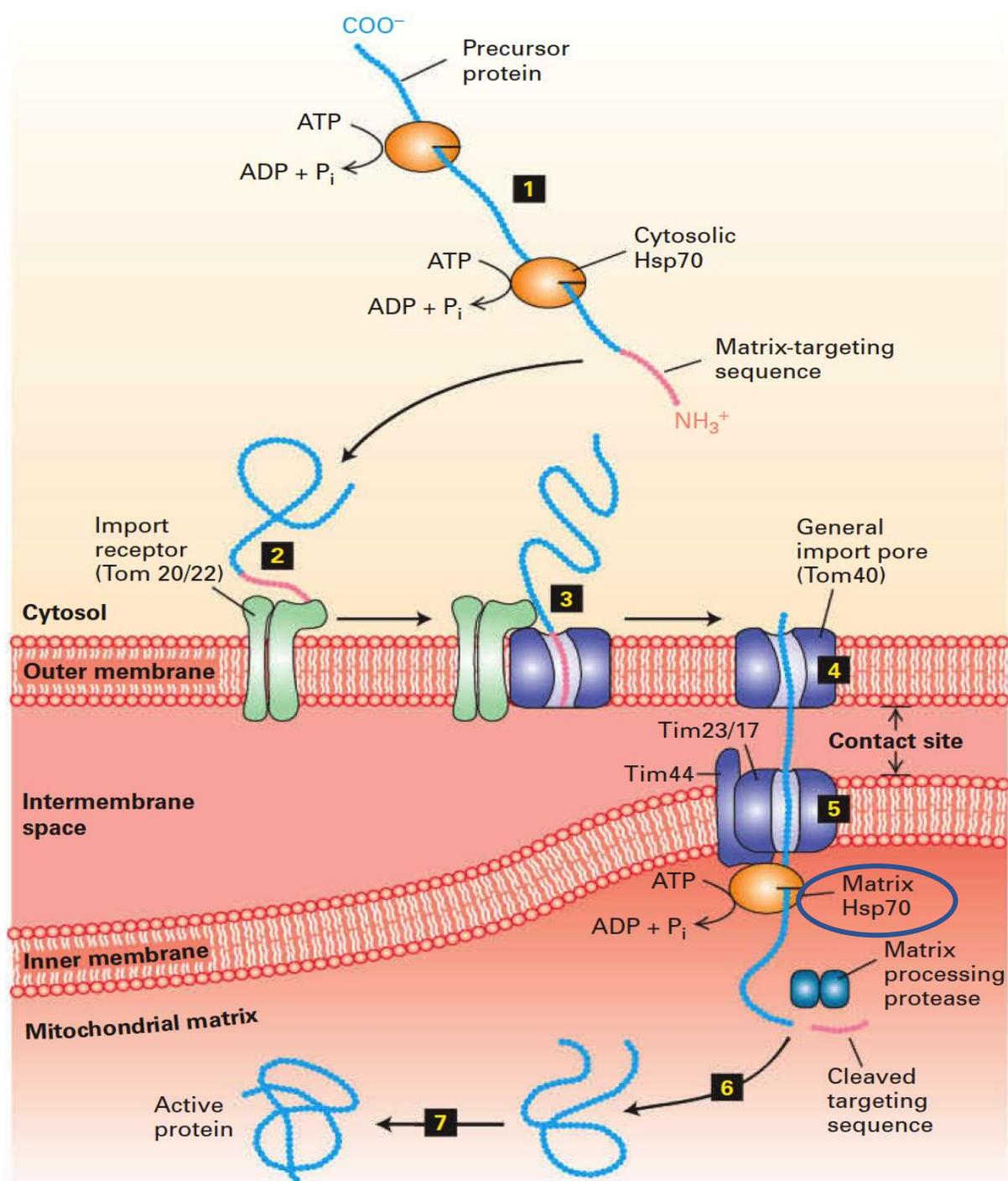


Figure 12-22 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

La sequenza segnale prende contatto con **Tom20** o **Tom70** (recettori) e successivamente con il canale **Tom40** (**general import pore**), un  $\beta$ -barrel simile alle porine che costituisce un canale di 2 nm di diametro.





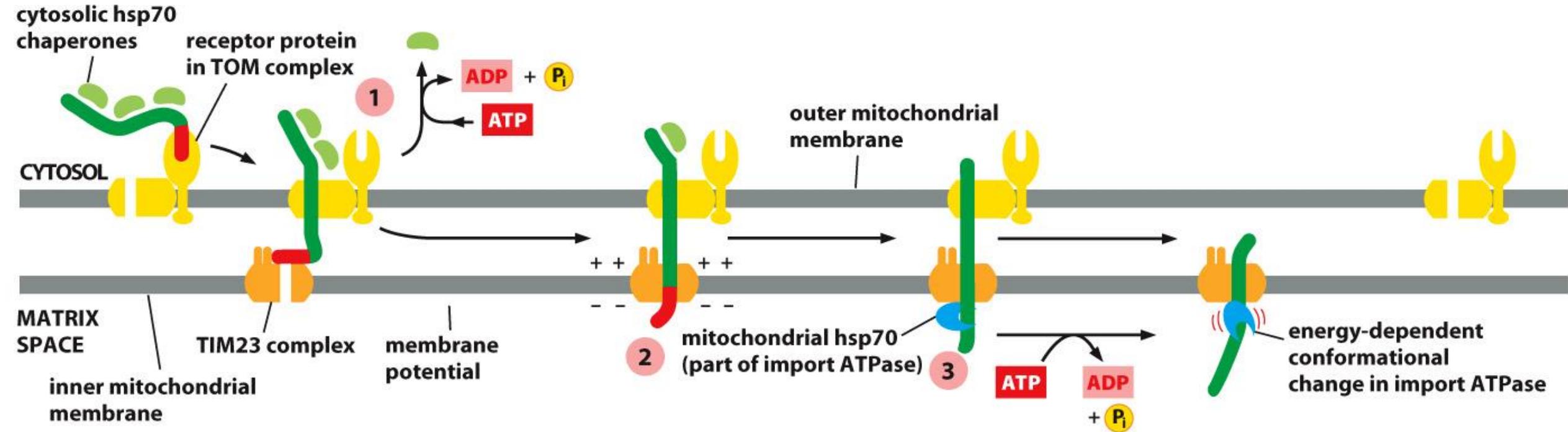
Il passaggio attraverso la membrana interna avviene grazie a **Tim23 e Tim17**, due proteine a 4  $\alpha$ -eliche transmembrana.

L'interazione della sequenza segnale con Tim50 e Tim23 guida le proteine nel canale.

Una Hsp70 della matrice interagisce con Tim44 e lega la proteina, agendo da motore molecolare della traslocazione.

Successivamente, in molti casi la proteina necessita del legame con una Hsp60 che ne assiste il folding.

**L'energia per l'importazione delle proteine mitocondriali è ottenuta dall'idrolisi dell'ATP e dal potenziale di membrana**



L'ATP è richiesto:

- Quando le Hsp70 citosoliche legano le proteine unfolded
- Quando le Hsp70 mitocondriali legano le proteine in uscita da TIM trascinandole nella matrice
- Quando le proteine nella matrice si legano alle chaperonine mitocondriali (Hsp60), che aiutano il folding

Il passaggio attraverso TIM richiede  $\Delta\psi$ . Se dissipiamo il potenziale le proteine non possono più entrare nella matrice mitocondriale, pur continuando a legarsi a TOM.

## Esperimento per studiare l'import al mitocondrio

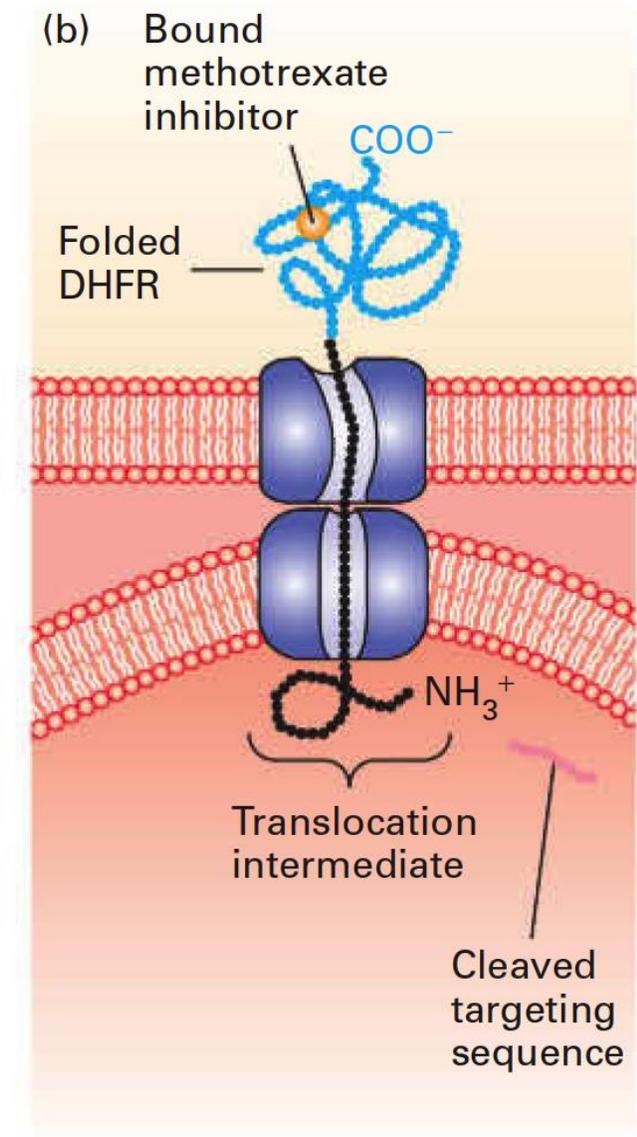
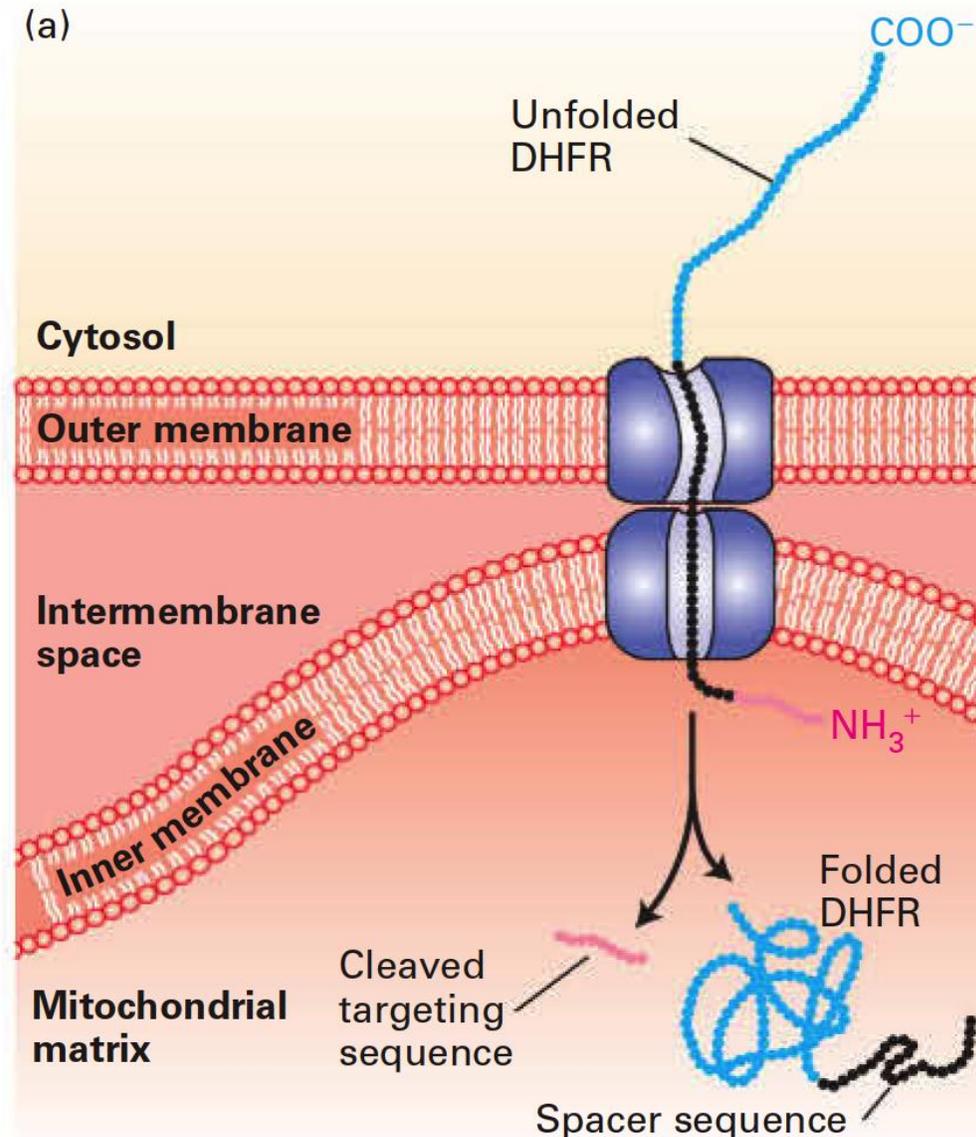
DHFR è un enzima citosolico. E' stato fuso alla sequenza segnale di import al mitocondrio dell'ADH (rosa) e una sequenza spaziatrice (nero).

Il metotrexato blocca DHFR nello stato ripiegato.

Se la sequenza spaziatrice è lunga almeno 50 aa (attraversa completamente le due membrane) si forma un intermedio stabile. Se lo spaziatore è di 35 aa non si forma invece un intermedio stabile, perché non attraversa entrambe le membrane.

La diidrofolato reduttasi (DHFR) ricombinante viene importata se è unfolded e presenta la sequenza segnale

Quando è mantenuta foldata dall'inibitore, entra solo la sequenza spacer

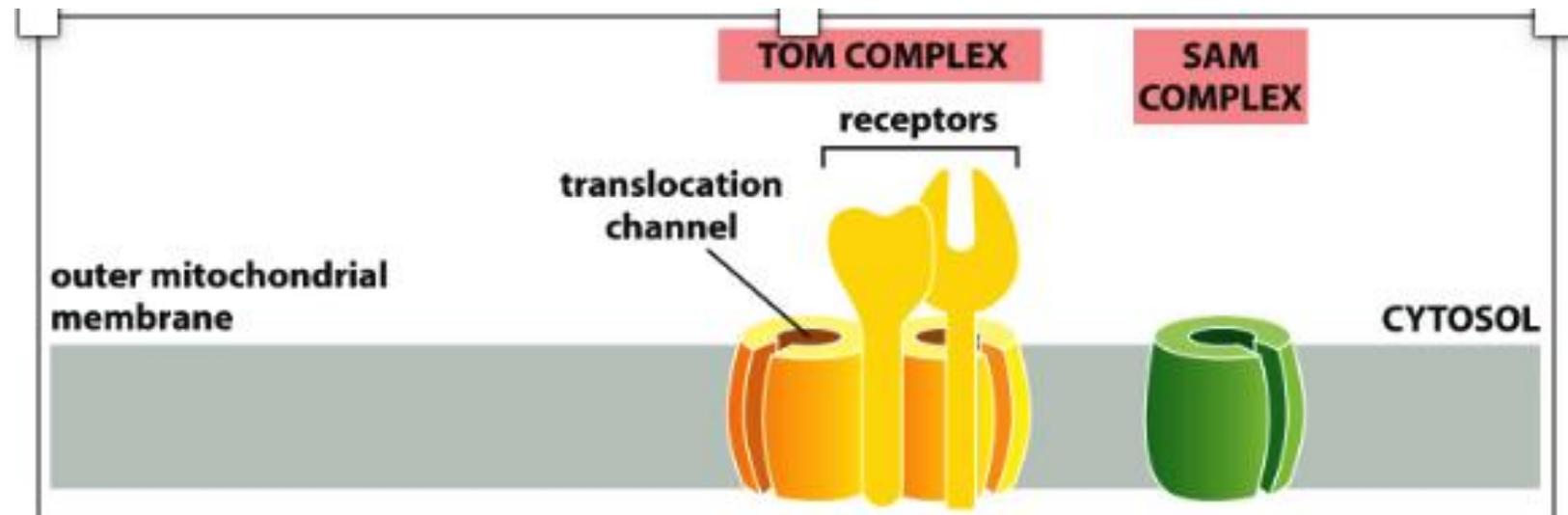


## Proteine della membrana mitocondriale esterna

Alla membrana esterna del mitocondrio localizzano le porine richieste per il trasporto di ioni e metaboliti.

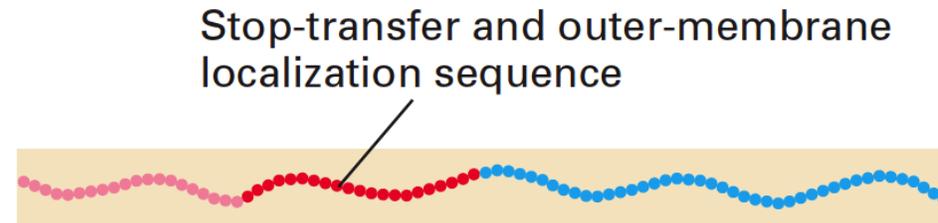
Il complesso TOM è il primo trasportatore coinvolto, necessario per la traslocazione di tutte le proteine mitocondriali (di qualsiasi compartimento).

Da **TOM** le proteine vengono trasferite al complesso **SAM**, che assiste il folding e aiuta l'inserimento in membrana.



**Outer  
membrane**

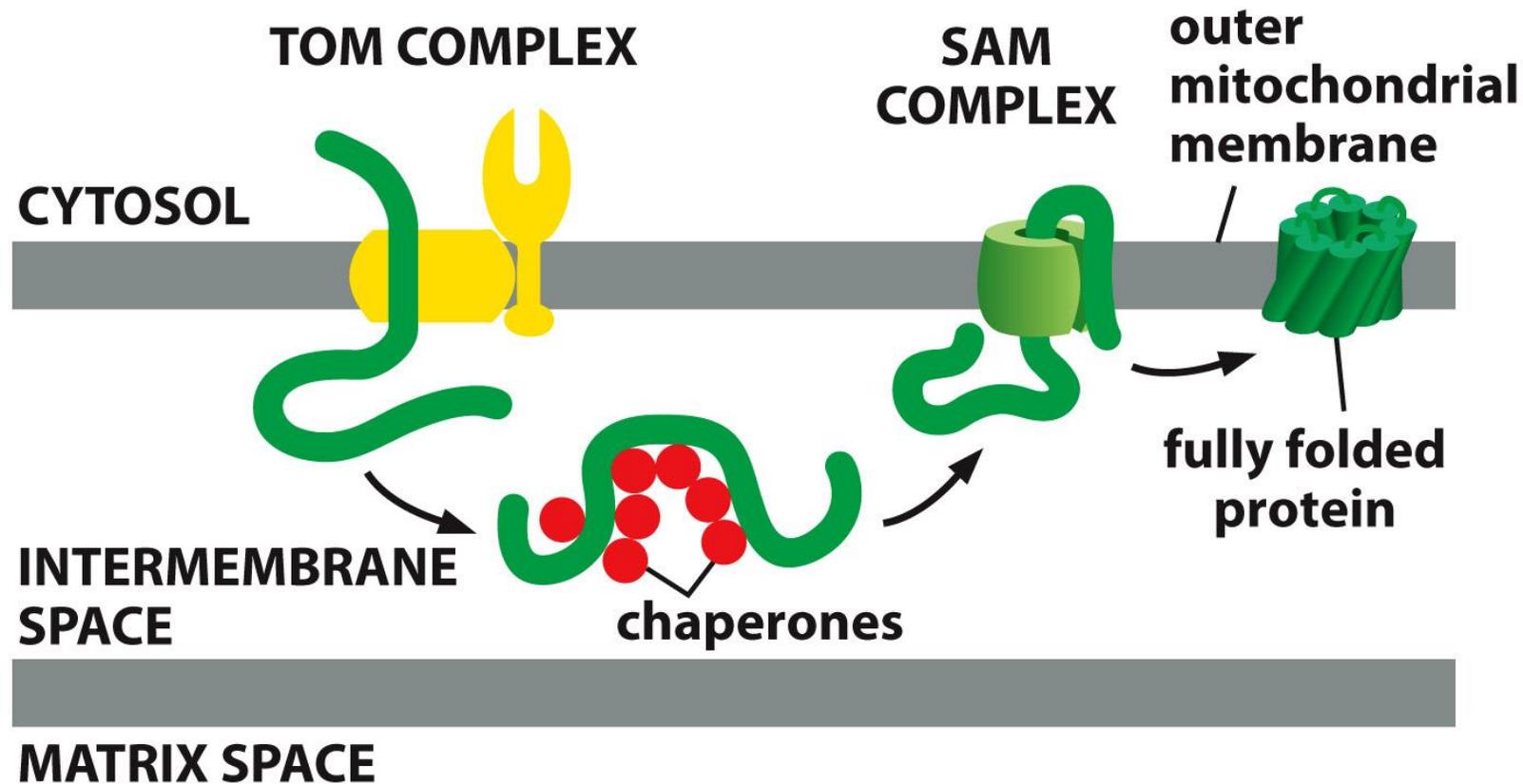
Porin (P70)



Le proteine della membrana mitocondriale esterna presentano una breve sequenza segnale N-terminale seguita da un **lungo tratto idrofobico**.

Questa sequenza funziona come **segnale di ancoraggio** nella membrana.

La membrana mitocondriale esterna contiene molte proteine a barile  $\beta$ , simili alle porine batteriche. Le porine servono per il passaggio di ioni inorganici e metaboliti. Le porine vengono traslocate in forma non ripiegata nello spazio intermembrana dove si legano a chaperoni. Si legano poi al **complesso SAM** (Sorting and Assembly Machinery) che media l'inserzione nella membrana e il folding.



Una delle proteine interne del complesso SAM è omologa ad una proteina del complesso BAM dei batteri gram negativi.

Un'ulteriore prova dell'origine endosimbiontica dei mitocondri.

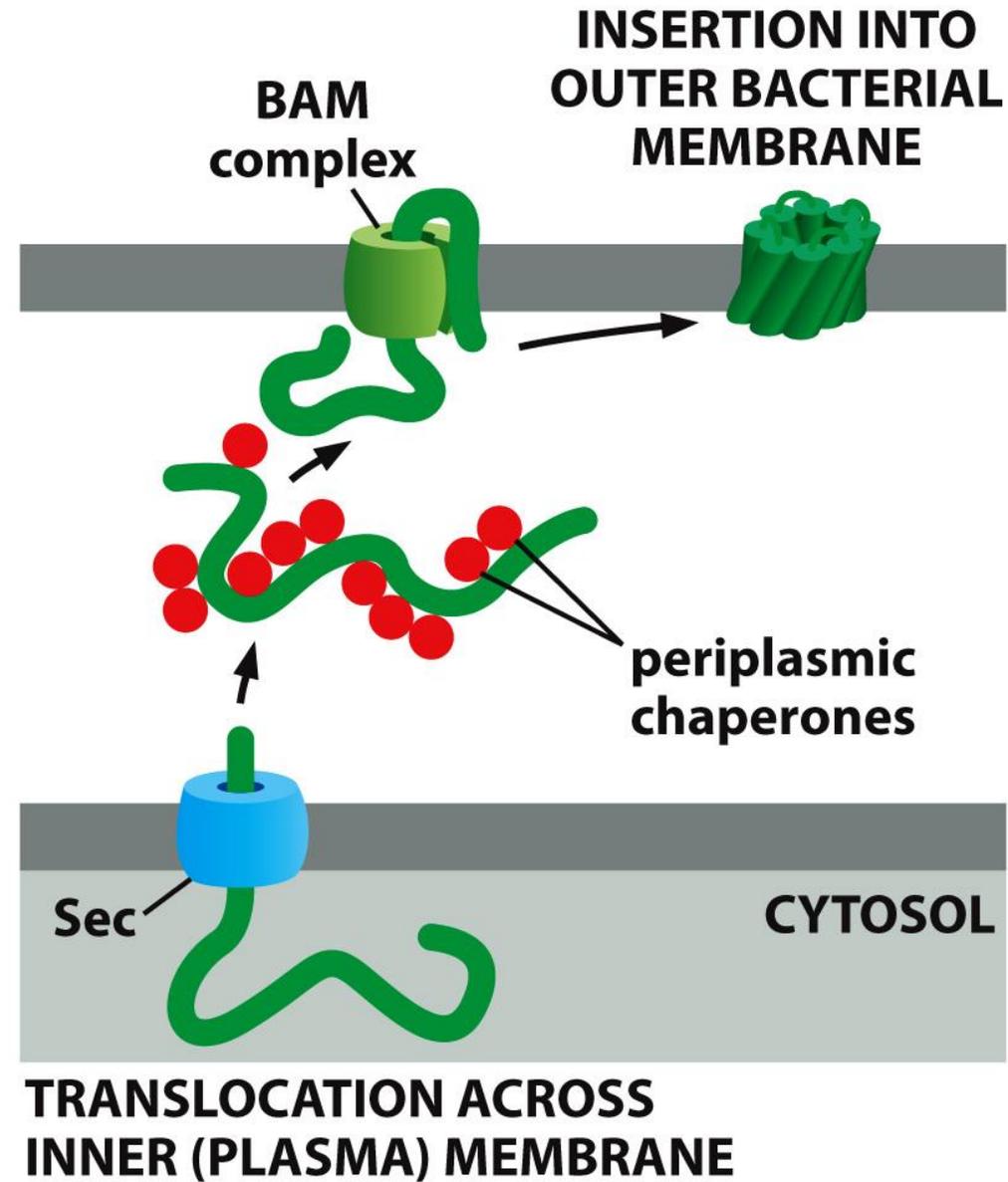
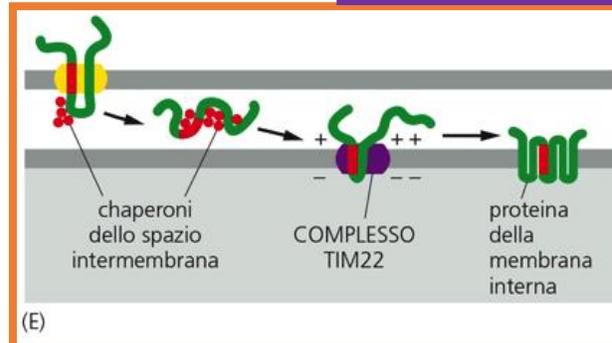
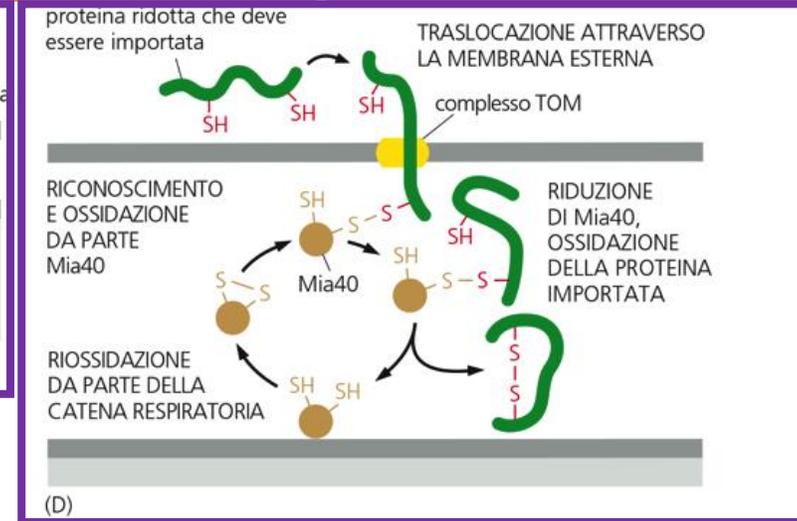
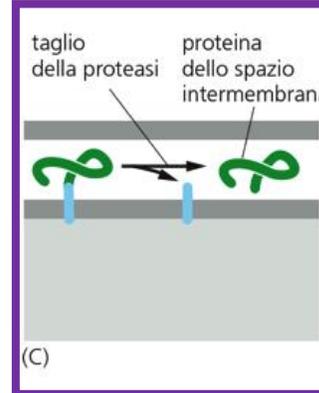
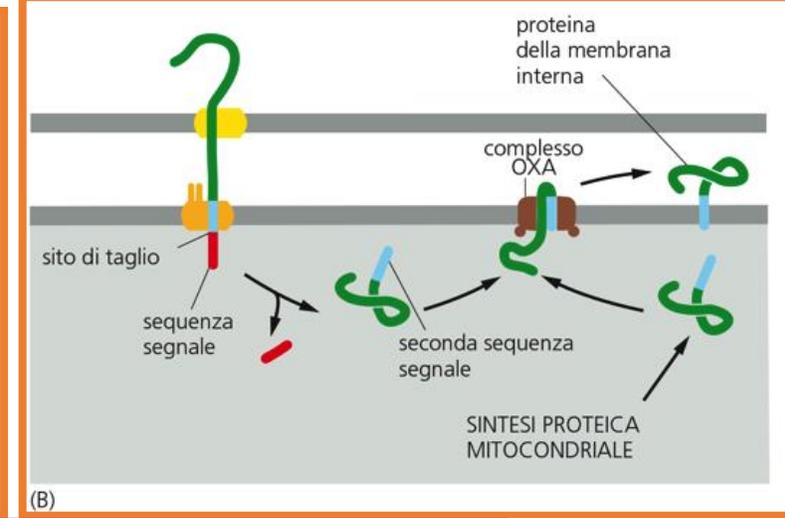
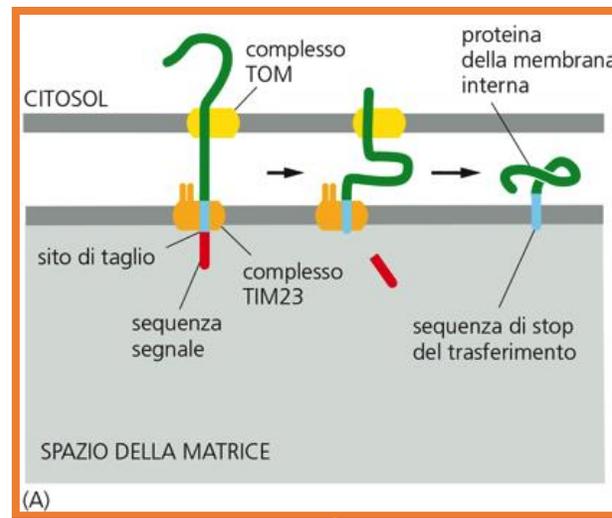


Figure 12-24b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Proteine dello spazio intermembrana e della membrana mitocondriale interna

Il trasporto delle proteine nello spazio intermembrana e nella membrana interna avviene attraverso diverse vie (3 per la membrana interna e 2 per lo spazio intermembrana).



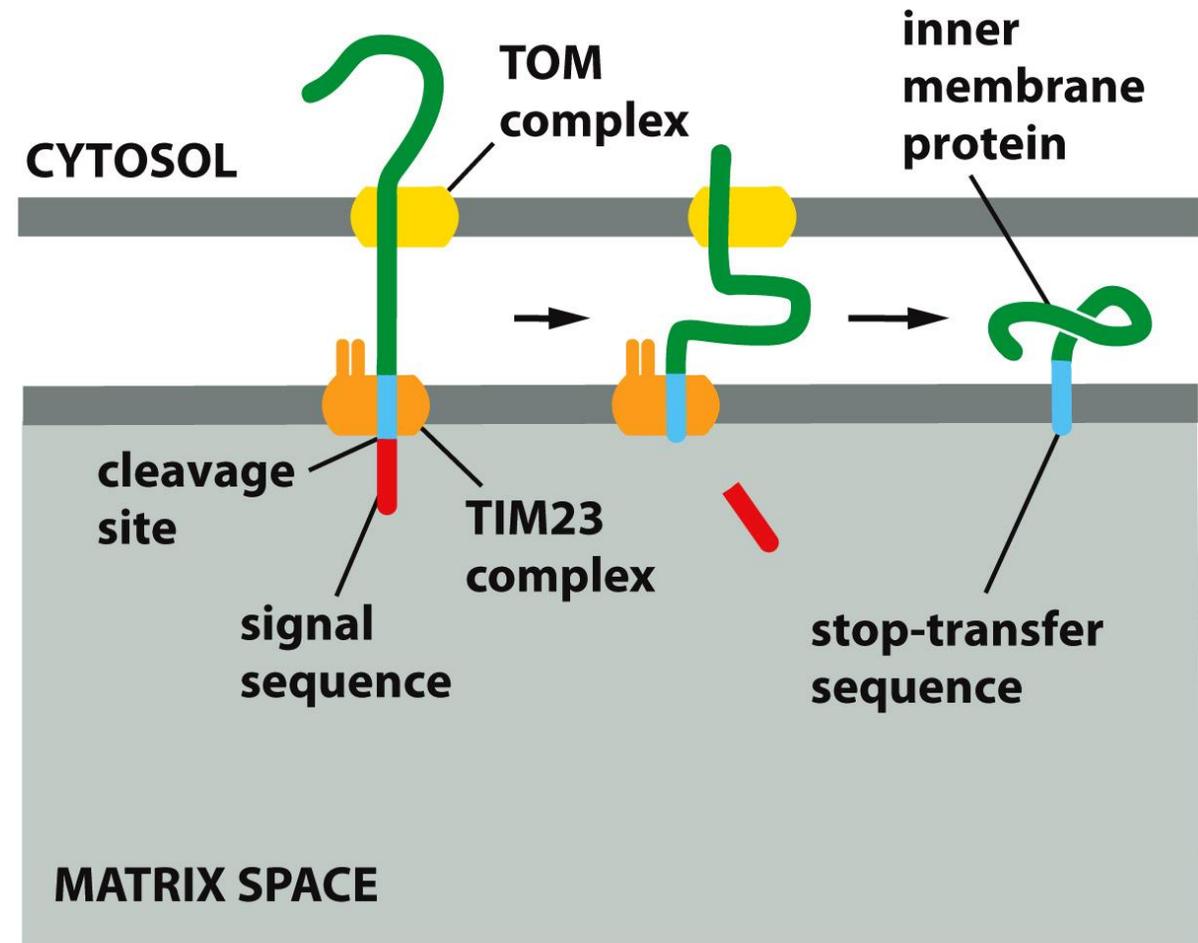
# Proteine destinate alla membrana interna

1. La maggior parte delle proteine destinate alla membrana interna lega **TOM** e **TIM23**; la sequenza segnale entra nella matrice dove viene tagliata

Una **sequenza idrofobica**, posta subito dopo, agisce come **stop al trasferimento**.

Questa sequenza, rilasciata da Tim23, rimane nella membrana.

Così viene inserita ad esempio CoxVa (subunità della citocromo ossidasi).



2. **TIM23** trasloca l'intera proteina nella matrice, dove viene tagliata la sequenza segnale.

La sequenza idrofobica che viene esposta guida la proteina al **complesso OXA** (Cytochrome Oxidase Activity), che la inserisce nella membrana interna.

OXA viene utilizzato soprattutto per le proteine codificate dal genoma mitocondriale.

Traslocatori simili al complesso OXA si trovano anche nella membrana plasmatica dei batteri e nella membrana tilacoide dei cloroplasti, dove lavorano con un meccanismo simile.

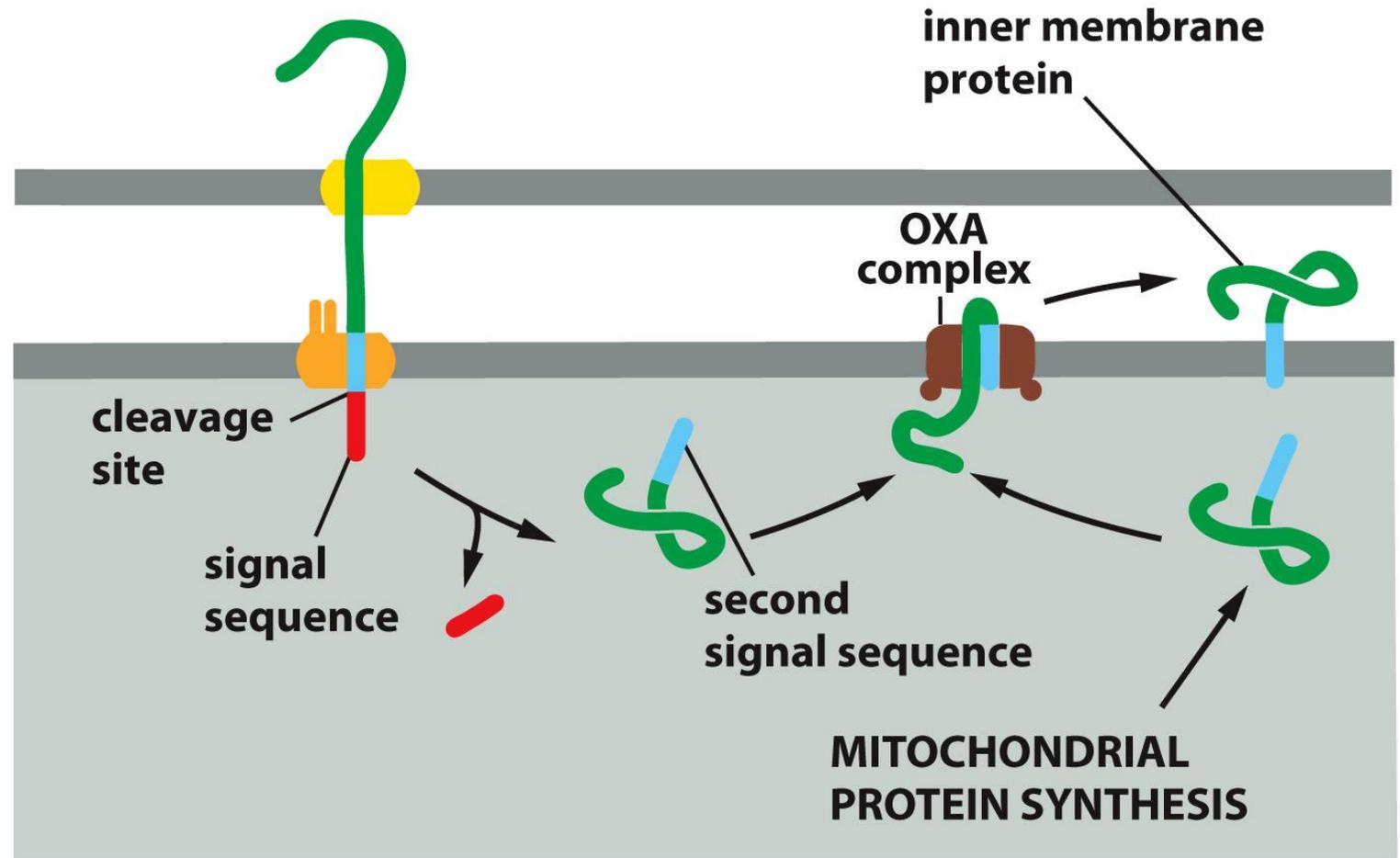
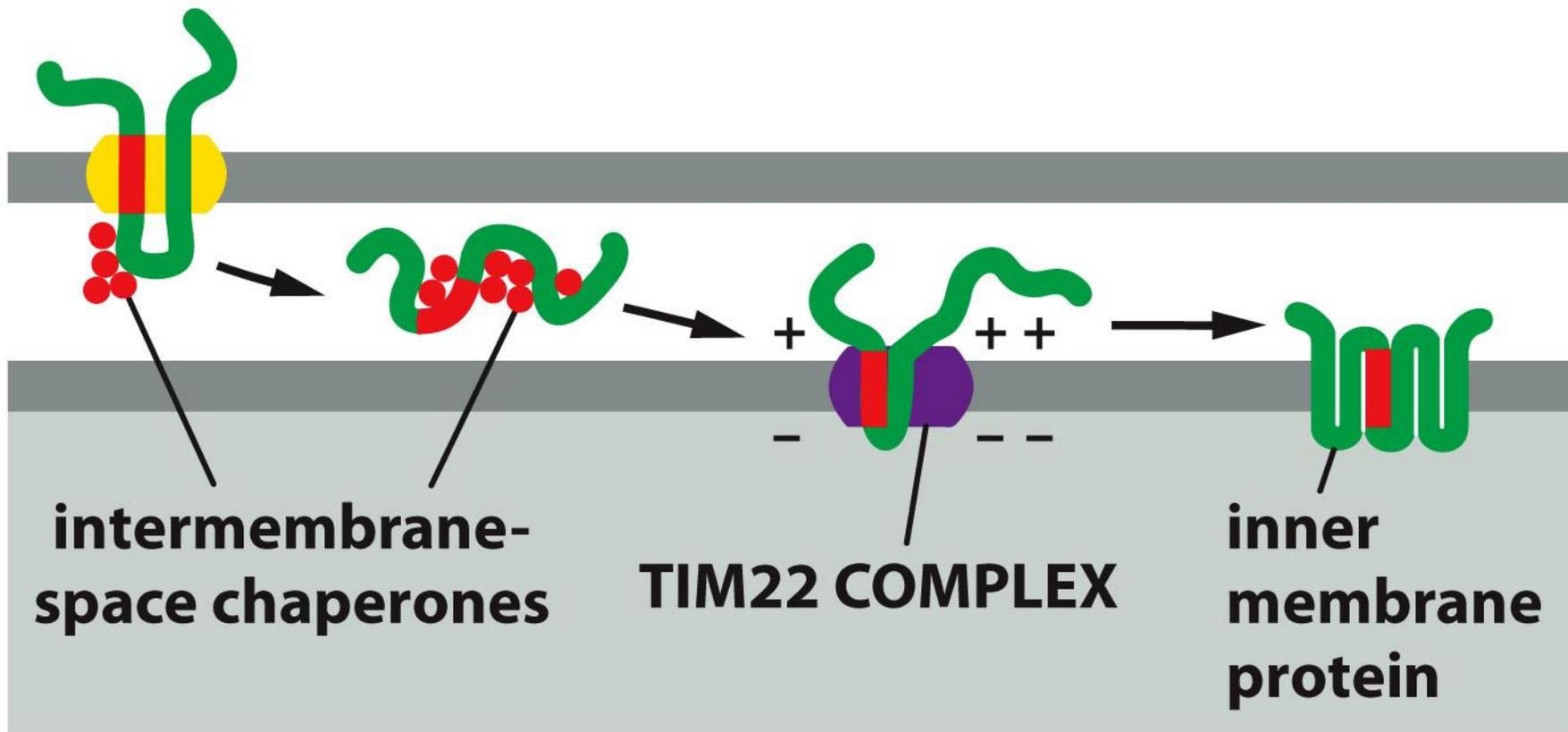


Figure 12-25b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

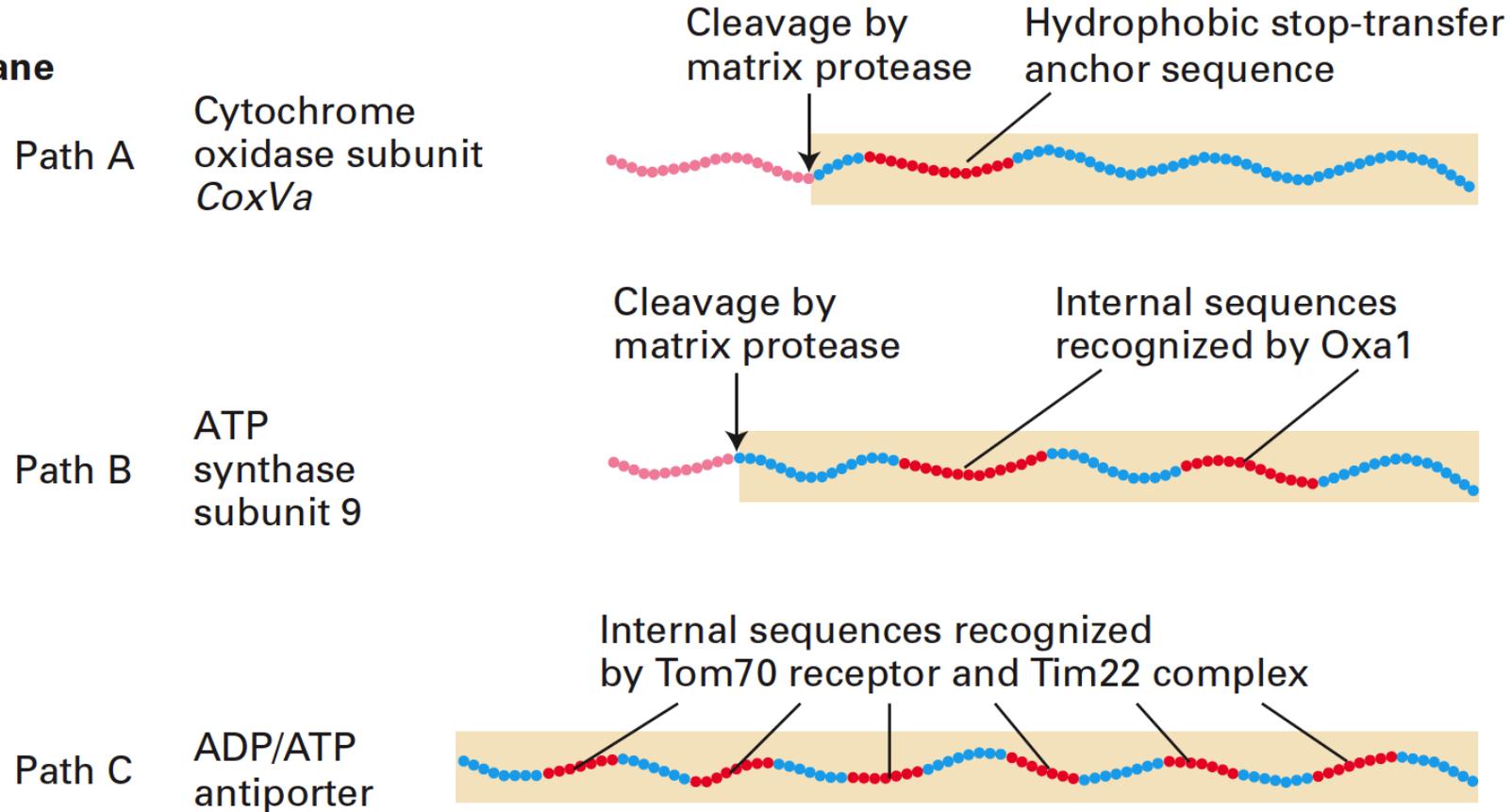
3. I traslocatori di metaboliti della membrana mitocondriale interna, che sono proteine transmembrana ad attraversamento multiplo, come lo scambiatore ATP/ADP, entrano grazie al complesso **TOM** e al complesso **TIM22** che le inserisce nella membrana interna. Queste proteine non hanno sequenza segnale in N-terminale ma interna. In questo processo è richiesto  $\Delta\psi$ , ma non ATP.



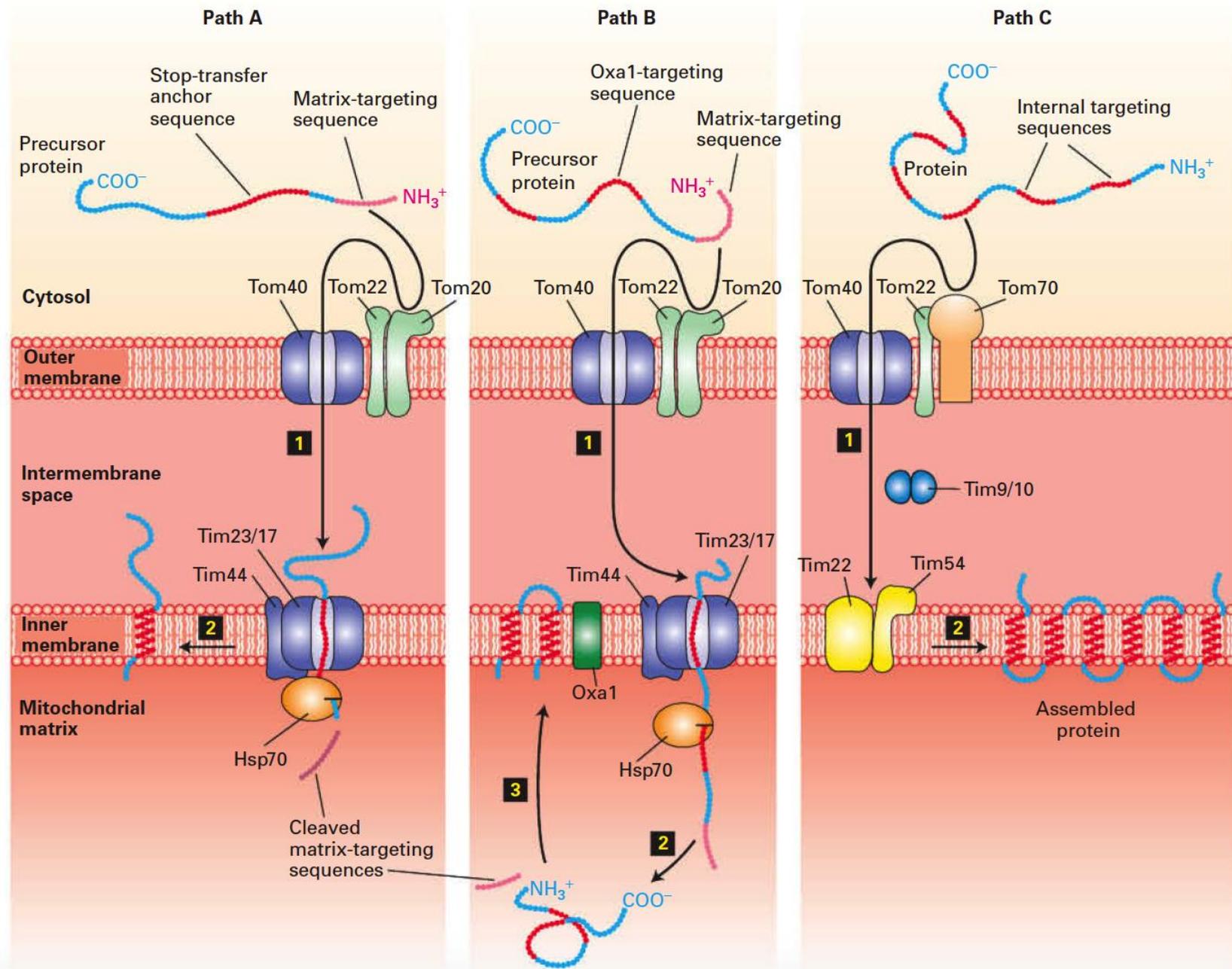
Due piccole proteine dello spazio intemembrana, **Tim9** e **Tim10**, riconoscono le proteine da trasferire al complesso Tim22. Essi potrebbero agire da chaperoni, legando le regioni idrofobiche della proteina in ingresso impedendo la formazione di aggregati.

# Sequenze segnale delle proteine della membrana mitocondriale interna

**Inner  
membrane**



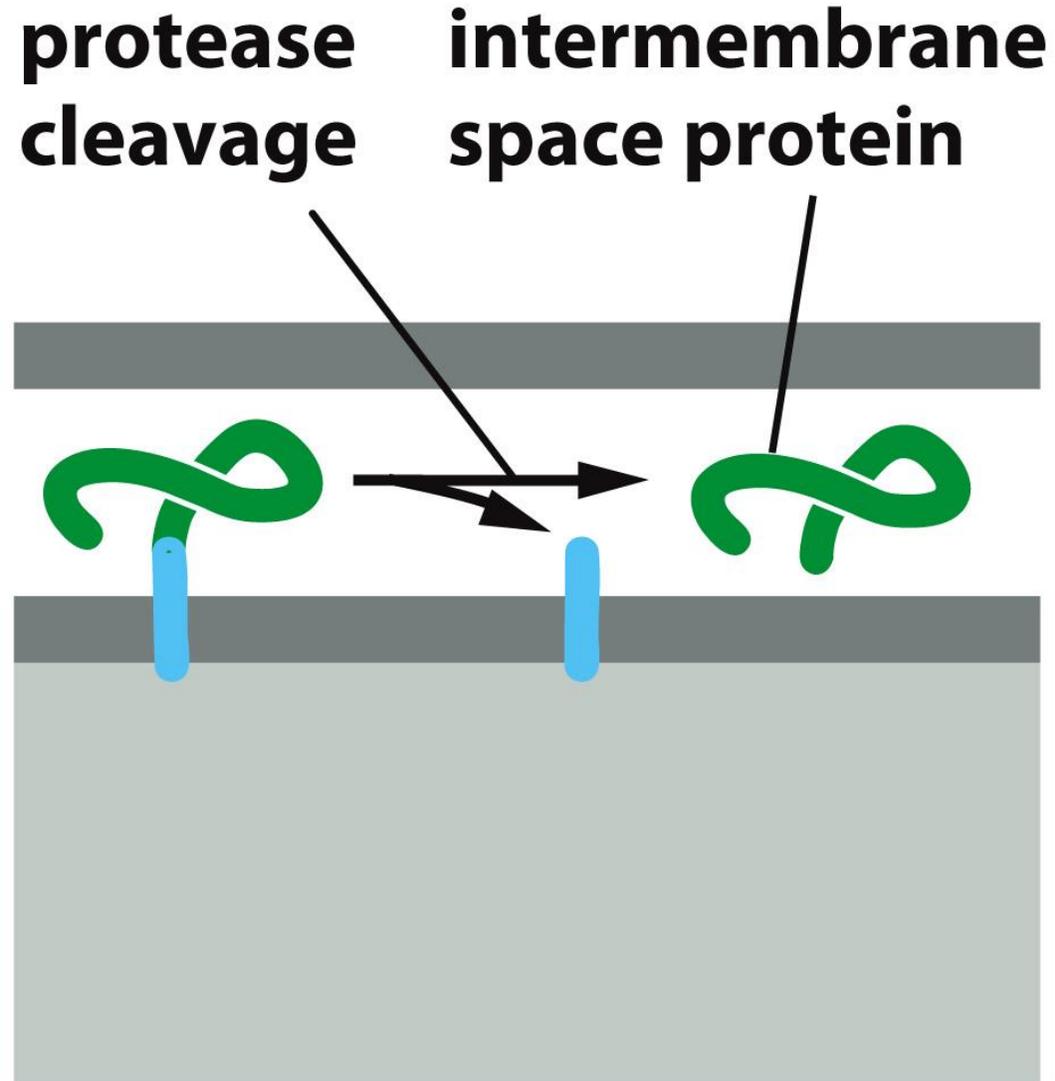
# Riassumendo per le proteine della membrana interna...



# Proteine dello spazio intermembrana

1. Alcune proteine vengono rilasciate nello spazio intermembrana da una proteasi che rimuove l'ancora di membrana.

Questa via è simile alla prima via usata per l'inserimento nella membrana interna, ma è poi seguita da un taglio proteolitico. Di solito sono subunità di complessi e legano ad altre proteine transmembrana.



2. L'importazione di **proteine ricche di Cys** segue un'altra via: esse formano un ponte disolfuro con la proteina **Mia40** (Mitochondrial Intermembrane space Assembly).

Le proteine vengono rilasciate in forma ossidata con ponti S-S intracatena.

Mia40 viene ridotta e poi riossidata dal trasferimento di elettroni alla catena respiratoria, sfruttando il  $\Delta\psi$ .

Questo processo non è accoppiato all'idrolisi di ATP o GTP.

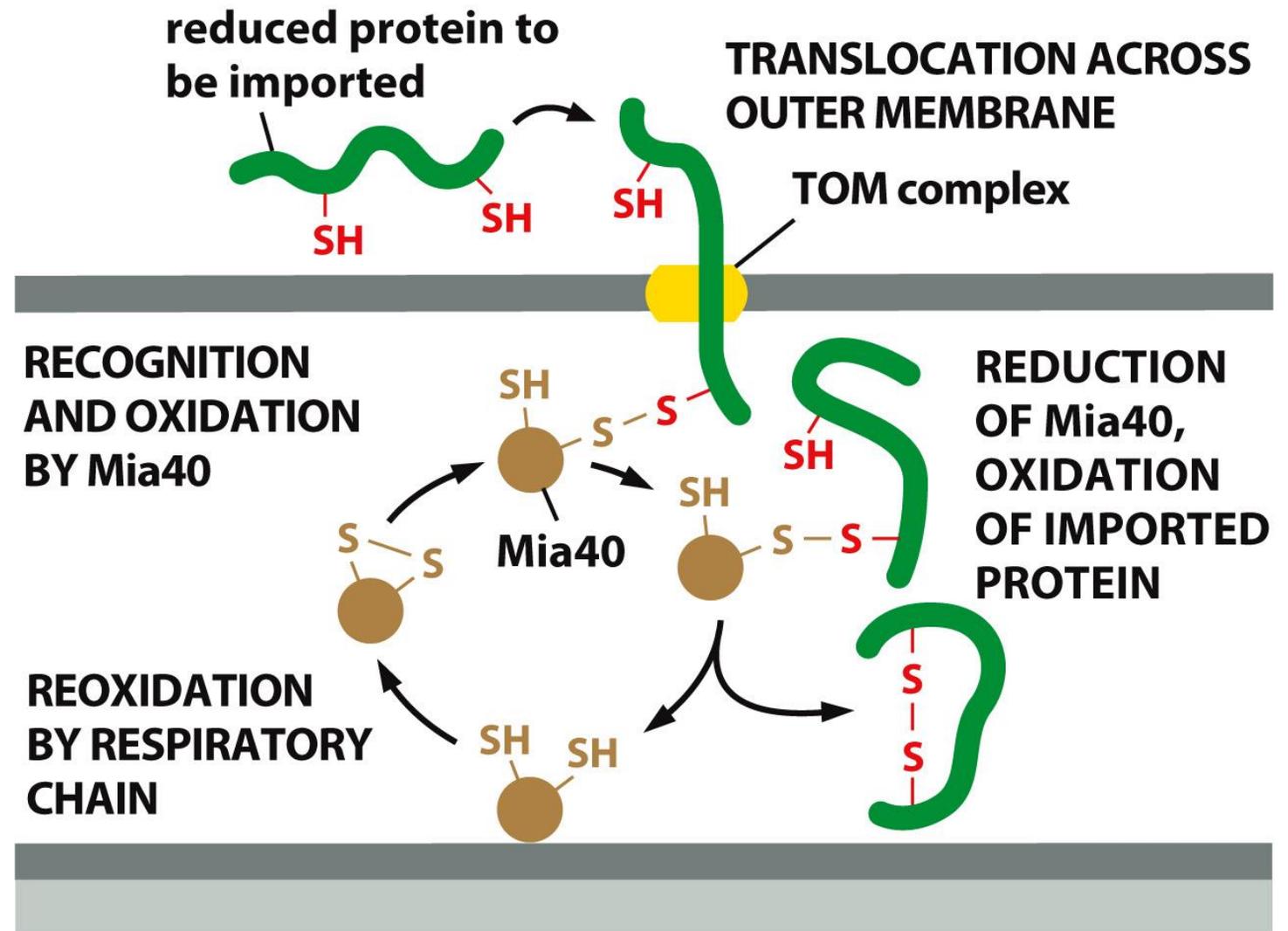
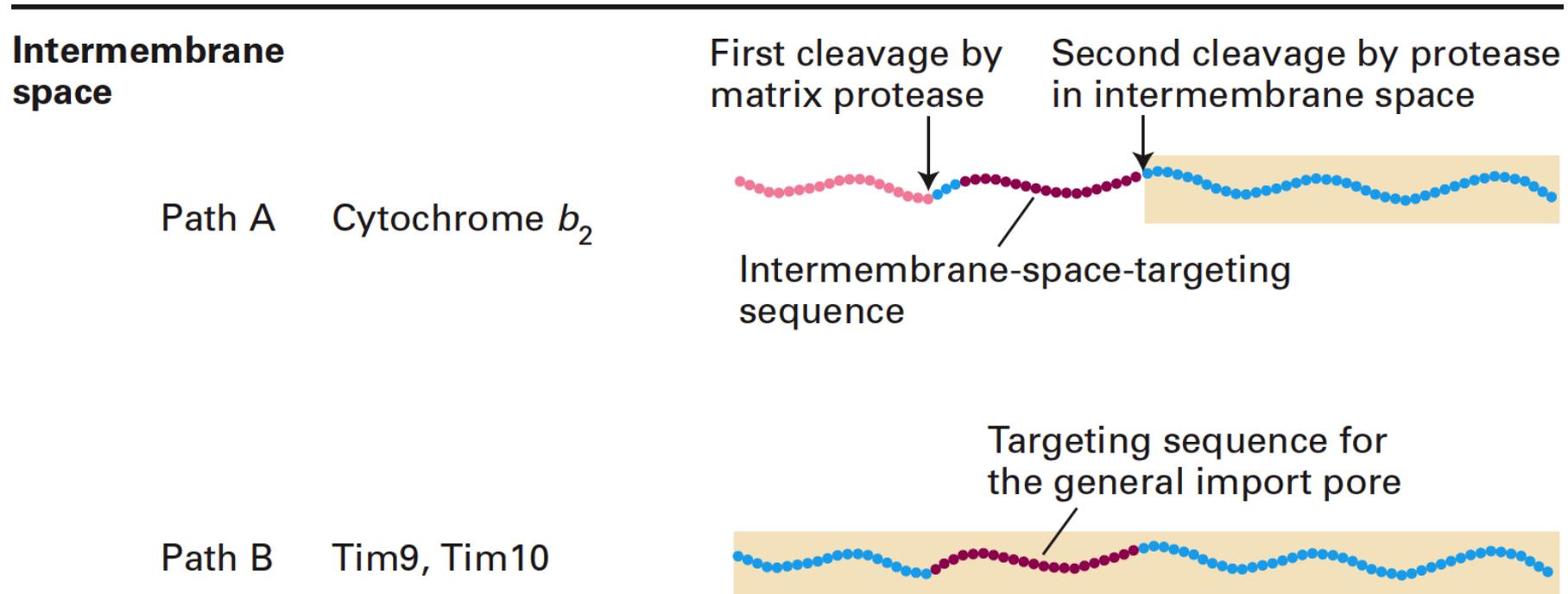


Figure 12-25d Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Sequenze segnale delle proteine dello spazio inter-membrana



# Riassumendo per le proteine dello spazio intermembrana...

