

Traslocazione al cloroplasto

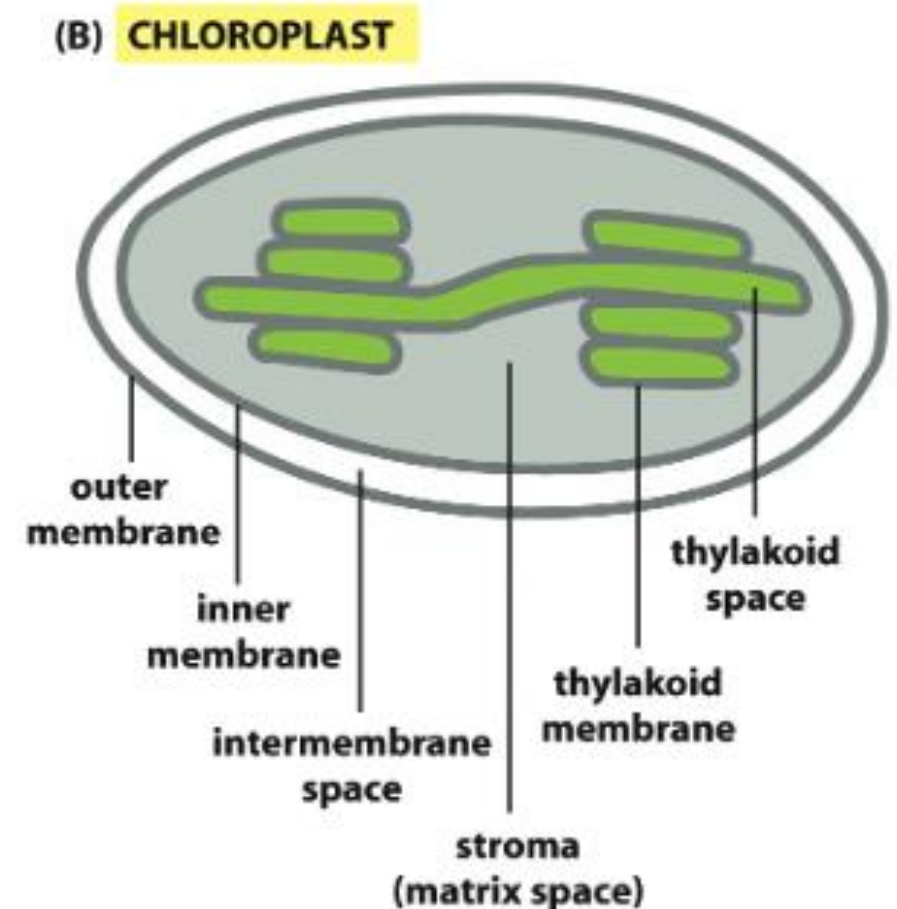
Traslocazione proteica nei cloroplasti

Come la traslocazione al mitocondrio, anche la traslocazione al cloroplasto è un processo **post-traduzionale** che utilizza complessi di traslocazione e richiede **ATP** (o **GTP**).

Solo le proteine sintetizzate nel cloroplasto sono inserite nei tilacoidi in modo co-traduzionale. Il cloroplasto codifica solo per 37 proteine della membrana dei tilacoidi.

La subunità maggiore della Rubisco è codificata dal DNA del cloroplasto. Più di 3000 proteine del cloroplasto sono sintetizzate nel nucleo, come la subunità minore della RUBISCO e tutti gli enzimi del ciclo di Calvin.

I sistemi di traslocazione di mitocondrio e cloroplasto possono apparire simili, ma la cellula è in grado di distinguerli molto bene.



Sequenze segnale per i cloroplasti

TABLE 12-3 Some Typical Signal Sequences	
Function of signal sequence	Example of signal sequence
Import into nucleus	-Pro-Pro- Lys-Lys-Lys-Arg-Lys -Val-
Export from nucleus	- Met -Glu-Glu- Leu -Ser-Gln-Ala- Leu -Ala-Ser-Ser- Phe -
Import into mitochondria	⁺ H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu- Arg -Gln-Ser-Ile- Arg -Phe-Phe- Lys -Pro-Ala-Thr- Arg -Thr-Leu-Cys-Ser-Ser- Arg -Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	⁺ H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala- Ser -Leu-Gln- Ser-Ser -Met- Ser-Ser -Leu- Ser-Leu-Ser-Ser -Asn- Ser -Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu- Ser -Pro-Ile- Thr -Leu- Ser -Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	- Ser-Lys-Leu -COO ⁻
Import into ER	⁺ H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser- Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala -Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr- Lys-Cys-Glu -Val-Phe-Gln-
Return to ER	- Lys-Asp-Glu-Leu -COO ⁻
<p>Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in <i>red</i> and negatively charged amino acids are shown in <i>green</i>. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in <i>orange</i> and important hydroxylated amino acids are shown in <i>blue</i>. ⁺H₃N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.</p>	

Table 12-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Le sequenze segnale per i cloroplasti hanno dai 13 ai 146 residui senza consenso

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 dei cloroplasti hanno 6 possibili destinazioni e possiedono sequenze segnale specifiche per ogni sotto-compartimento

Proteine dello stroma del cloroplasto

Le sequenze segnale per lo stroma formano **eliche anfipatiche**, che vengono rimosse nello stroma, dove le proteine interagiscono con delle Hsp70 e Hsp60.

Il processo richiede l'interazione con almeno 2 proteine della membrana esterna (**TOC**) e 5 della membrana interna (**TIC**) e dipende solo dall'ATP.

I complessi TOC e TIC non presentano omologie con quelli mitocondriali.

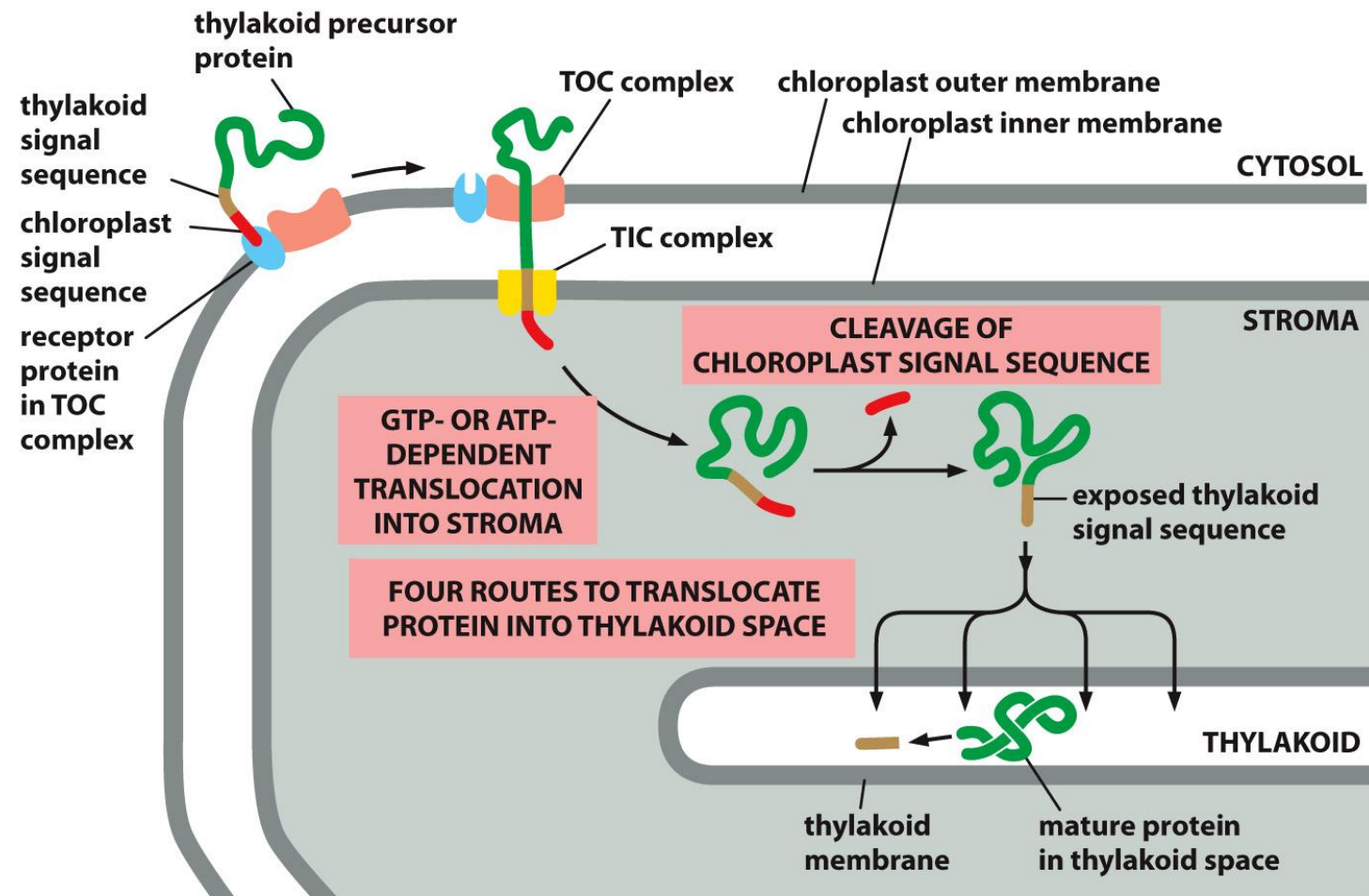
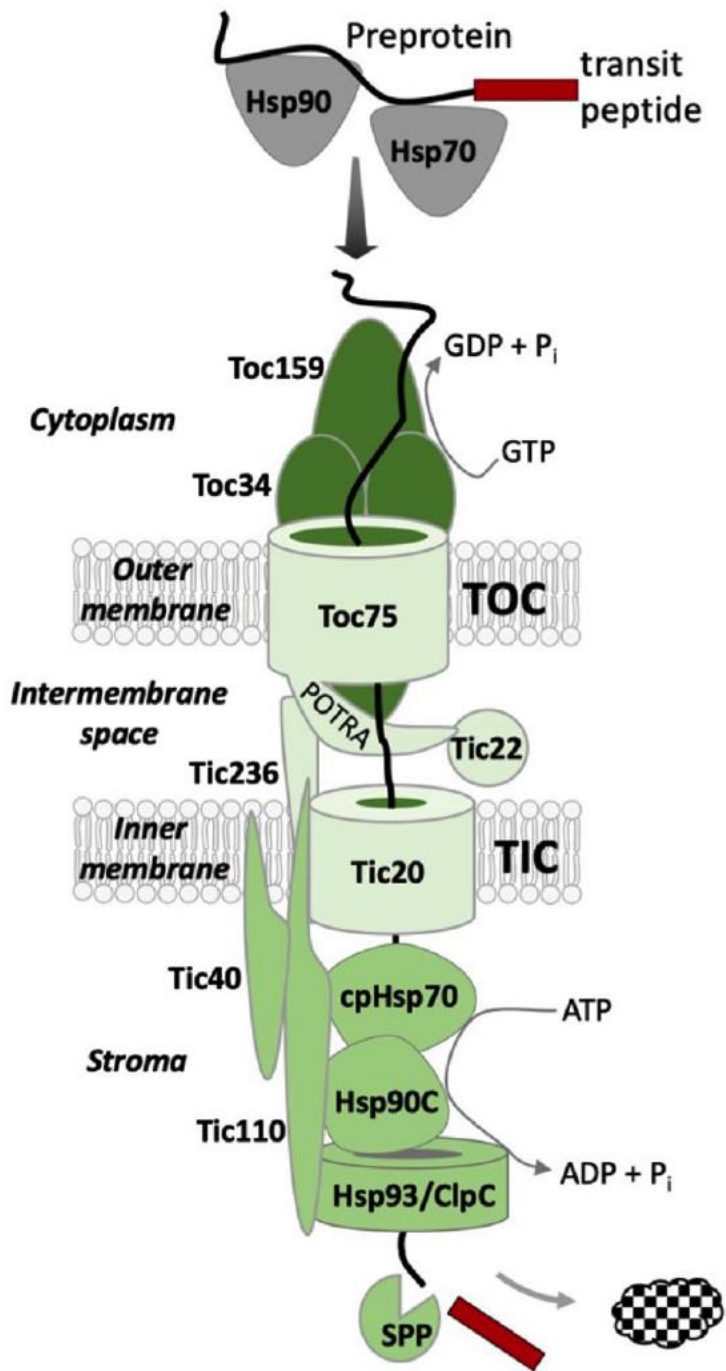


Figure 12-26a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



I complessi TOC e TIC

I complessi TOC e TIC sono costituiti da diverse subunità: Toc75 e Tic20 sono canali.

Le proteine da importare sono mantenute unfolded dalle Hsp70 e 90 citosoliche.

Vengono riconosciute da Toc34 e Toc159, che hanno un dominio GTPasico verso il citosol.

Nello stroma un'Hsp70 idrolizza ATP e trascina la proteina attraverso TOC e TIC.

La sequenza segnale viene rimossa.

Proteine dei tilacoidi

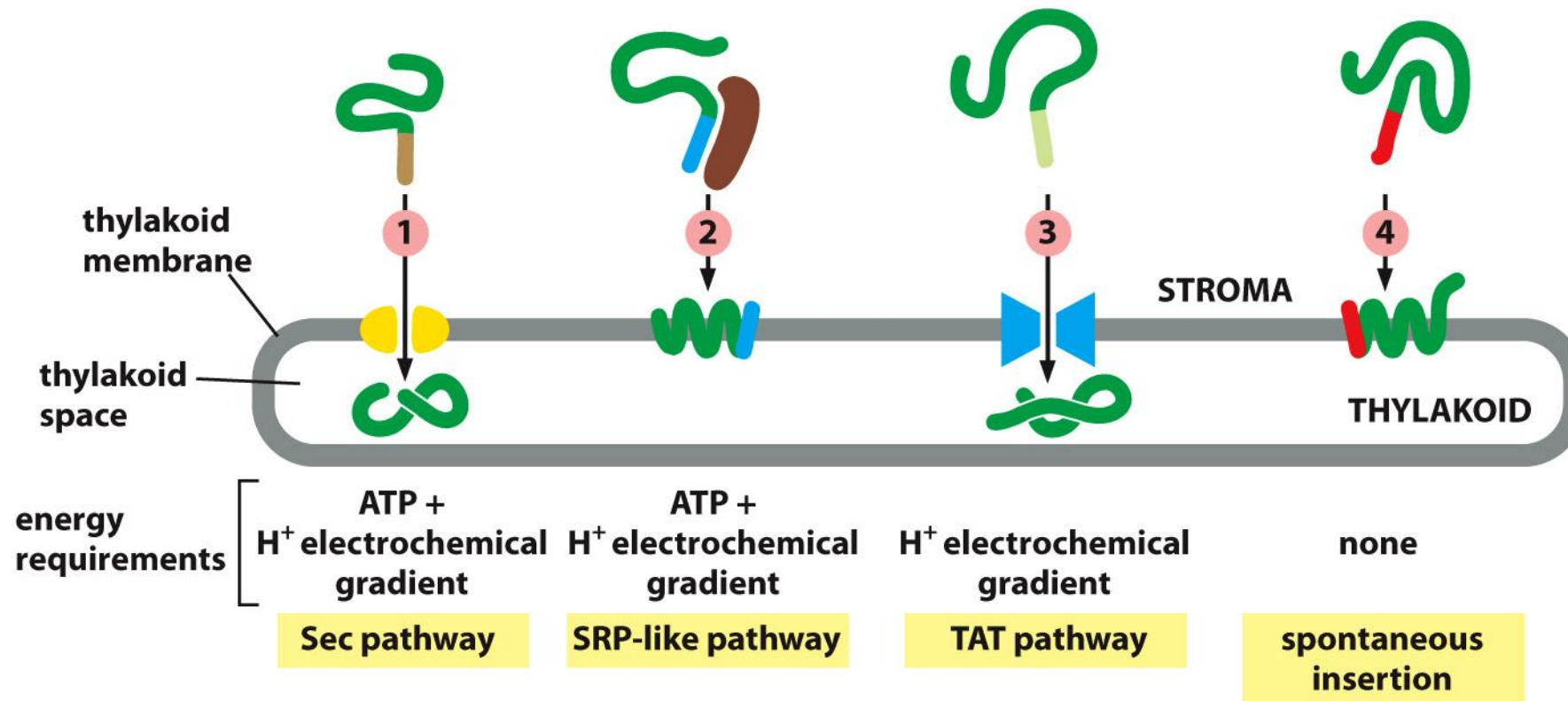


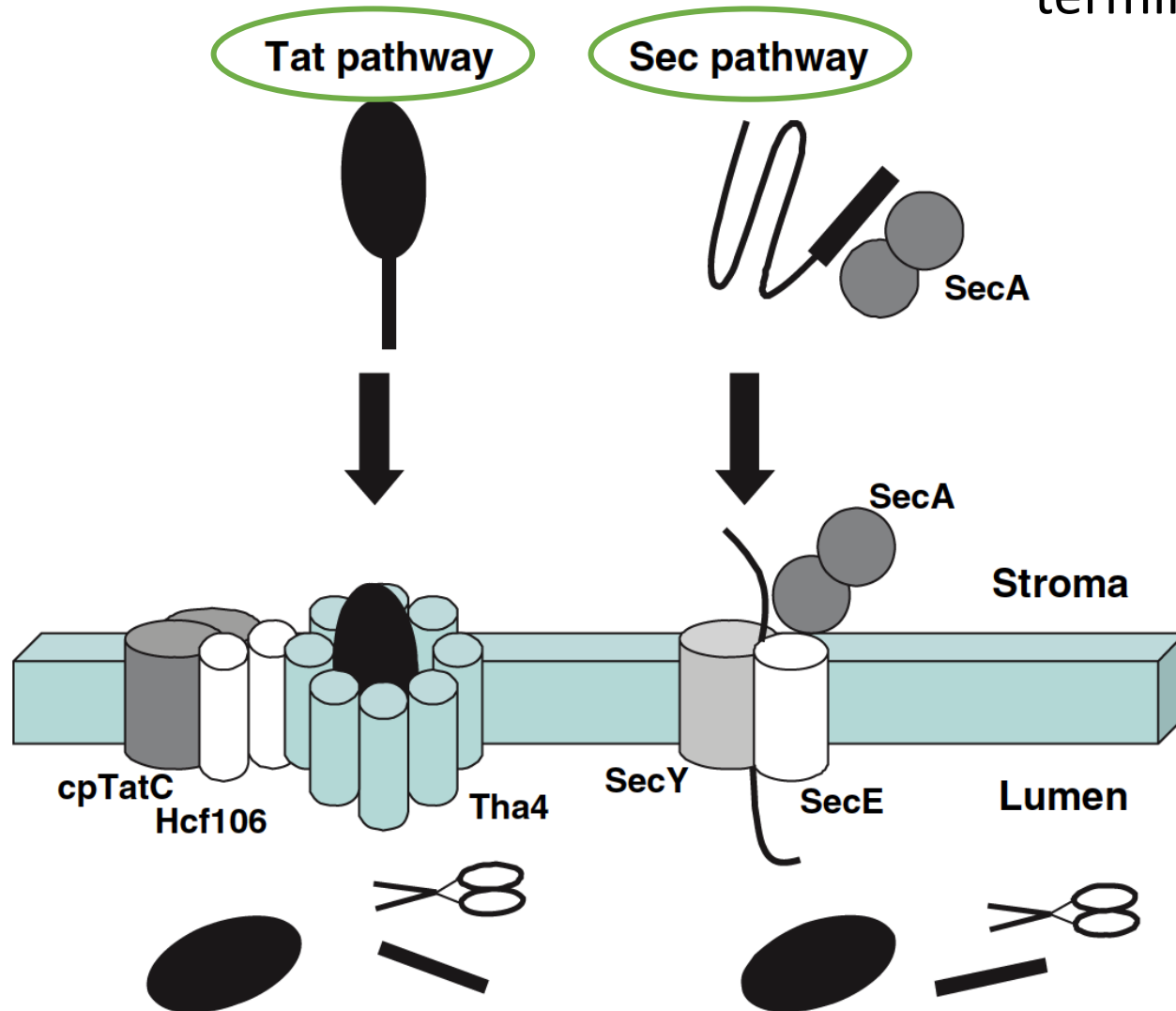
Figure 12-26b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Le proteine dei tilacoidi vengono importate con 4 diverse modalità:

1. **La via Sec** – utilizza proteine omologhe alle proteine Sec batteriche
2. **La via SRP-like** – utilizza un omologo di SRP
3. **La via TAT** – o traslocazione delle Arg gemelle
4. **La via di inserzione spontanea** – non richiede traslocatori

Proteine dello spazio tilacoide

Le **sequenze segnale** per la via di Tat e quella di Sec sono simili: un tratto N-terminale basico, un core idrofobico e un tratto C-terminale che termina con A-X-A

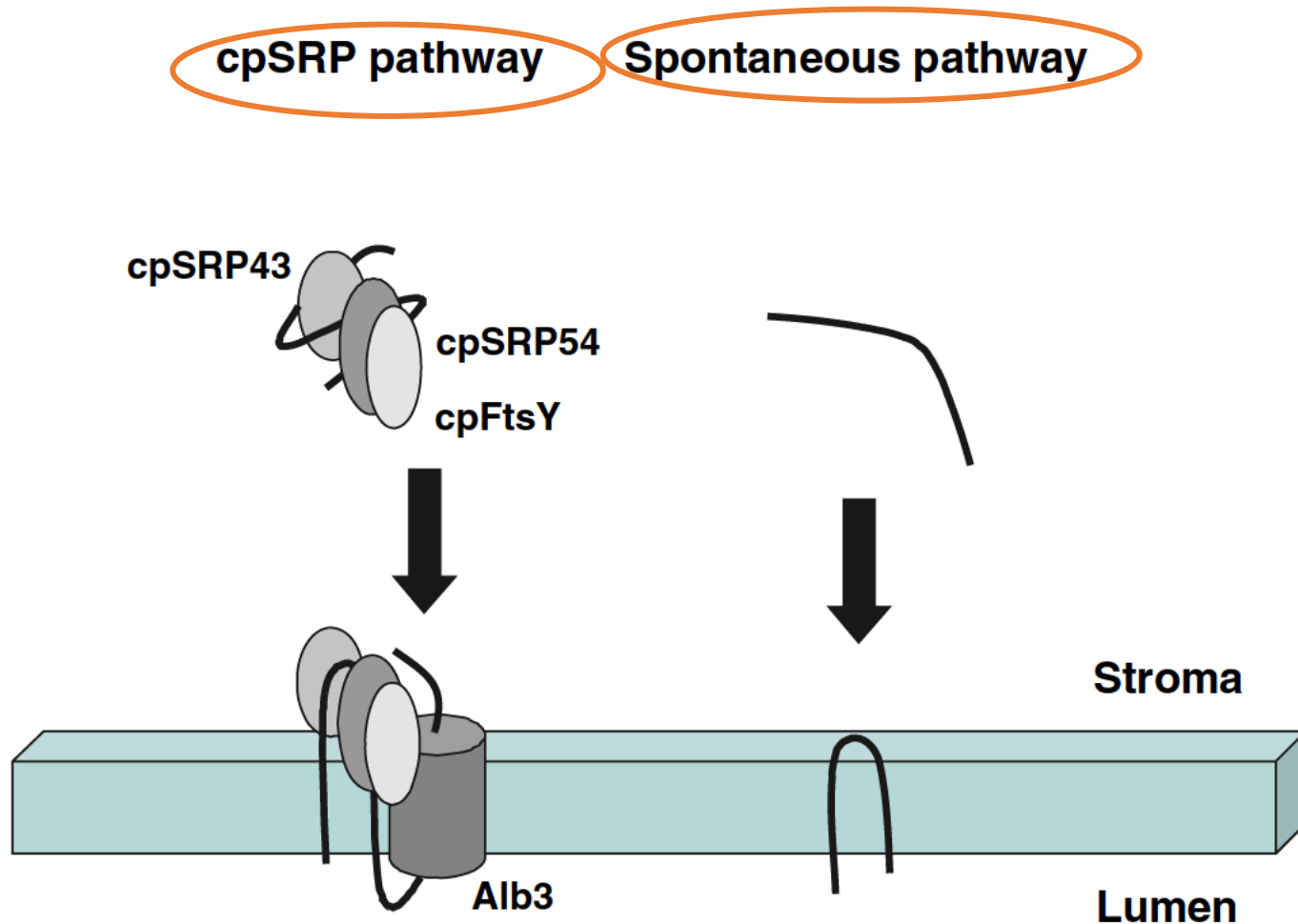


Il **traslocone Sec** è costituito da tre subunità: SecA è un'ATPasi che spinge la proteina nel canale.

La **via di Tat** non richiede ATP, ma dipende dal gradiente di H^+ attraverso la membrana del tilacoide.

All'interno del tilacoide la sequenza segnale viene rimossa da una peptidasi.

Proteine della membrana tilacoide



La via SRP-like e la via di inserzione spontanea permettono l'inserimento delle proteine nella membrana dei tilacoidi.

La **via SRP-like** trasporta le subunità dell'LHCP (complessi antenna della fotosintesi) in un processo che non richiede l'RNA (l'SRP coinvolta nel trasporto al RE utilizza invece RNA).

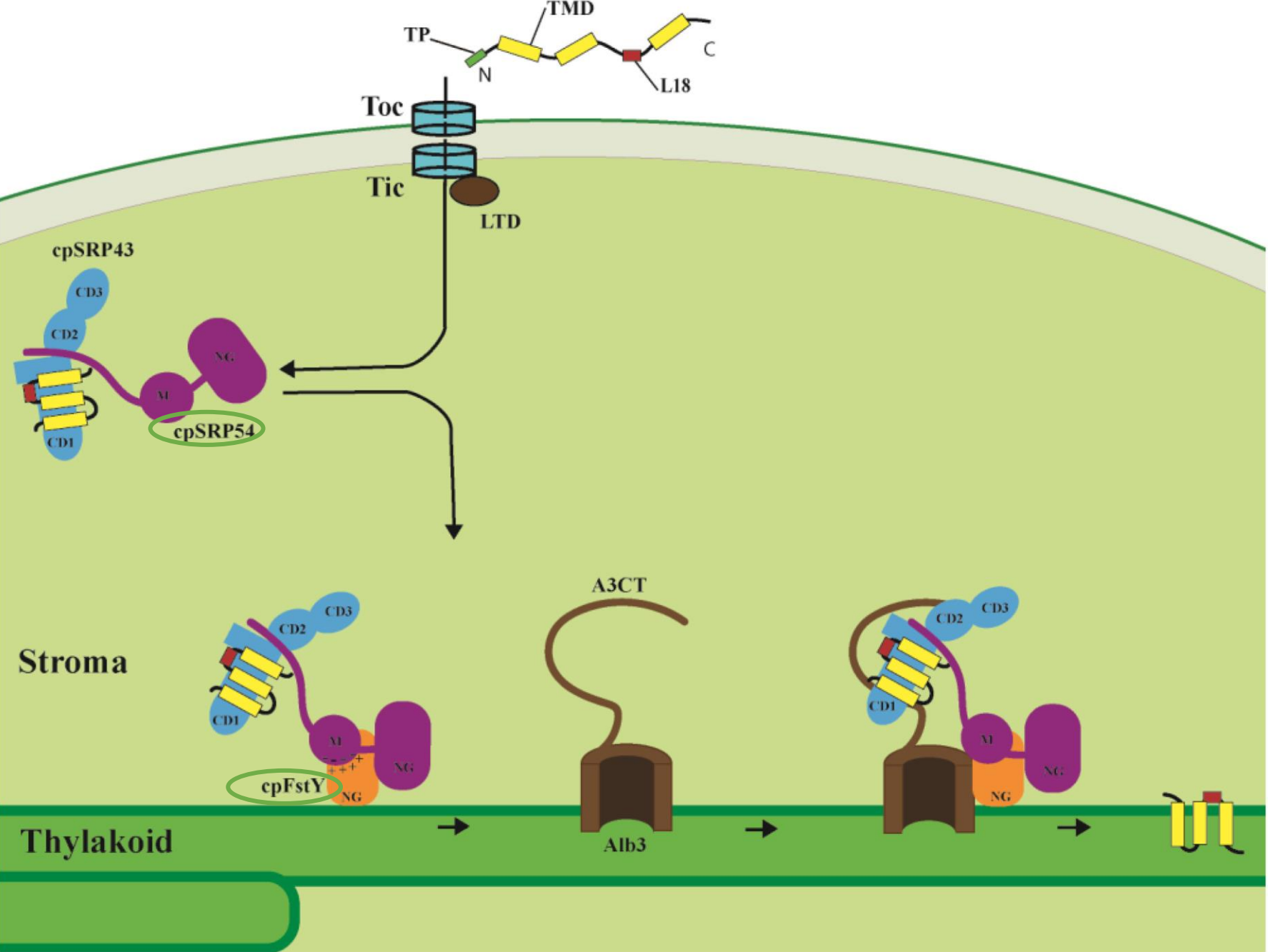
La sequenza segnale è all'interno della proteina matura.

La **via spontanea** media l'inserzione di diverse subunità dei fotosistemi, sembra non richiedere un traslocatore.

La via di SRP-like

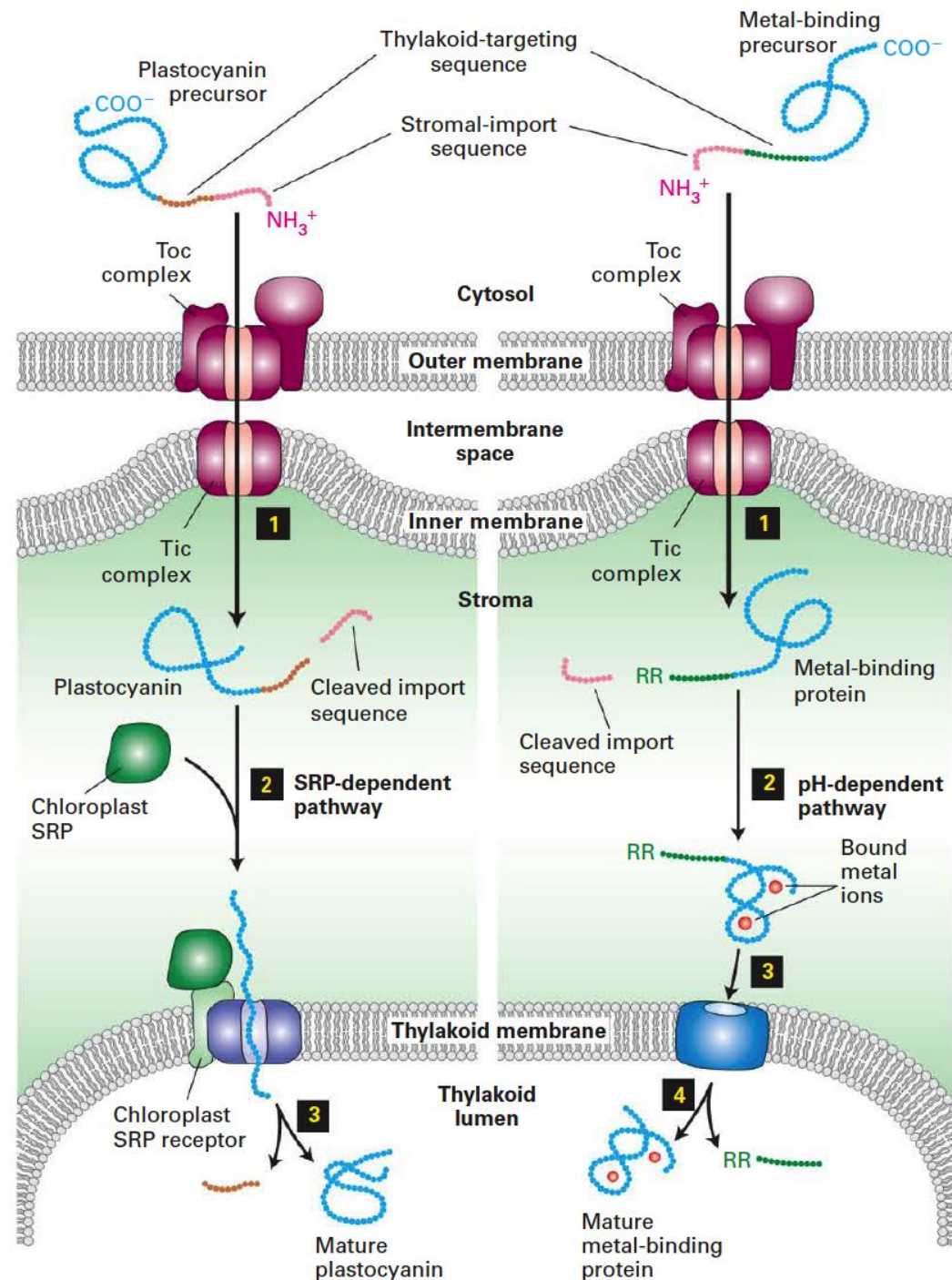
cpSRP54 è una GTPasi, cpSRP43 interagisce con i domini transmembrana di **LHCP** (proteina del complesso antenna della fotosintesi) e con il recettore cpFtsY (un'altra GTPasi) della membrana dei tilacoidi.

La traslocasi Alb3 media l'inserzione di LHCP nella membrana.



ALCUNI ESEMPI

Anche la **plastocianina** (lume tilacoide) viene importata attraverso la **via SRP-like**, ma non va alla membrana del tilacoide e finisce invece nel lume del tilacoide.



Le **proteine che legano metalli** sono importate unfolded nello stroma, dove la sequenza segnale viene tagliata e le proteine si foldano legando il cofattore. Le proteine di trasporto della membrana tilacoide riconoscono la proteina da importare mediante 2 Arg vicine, analogo alla via batterica **Tat (twin-Arg translocation)** e formano un poro. E' un processo pH-dipendente, ancora oggetto di studio.

Trasporto ai perossisomi

Perossisomi

- I perossisomi hanno una sola membrana (a differenza di mitocondri e cloroplasti) e hanno solo un comparto luminale.
- Non hanno DNA, quindi tutte le proteine perossisomali arrivano dal citosol.
- Aumentano di volume incorporando proteine e lipidi e si dividono come i mitocondri e i cloroplasti.
- I perossisomi contengono **enzimi ossidativi** e fanno **β -ossidazione**: sono diversificati e si adattano alle condizioni ambientali.
- Abbondanti soprattutto nelle cellule epatiche.
- **Nei perossisomi si genera H_2O_2 che è estremamente reattiva e pericolosa, quindi va detossificata.**

Un'ipotesi evolutiva affascinante

Si ipotizza che i perossisomi derivino da un antico organello in cui si svolgevano tutte le reazioni di ossidazione negli antenati delle cellule eucariotiche.

Quando ha iniziato ad accumularsi ossigeno nell'atmosfera, estremamente tossico per le cellule, si sarebbero evoluti questi organelli allo scopo di **ridurre il livello intracellulare di O₂** e allo stesso tempo sfruttarlo per alcune reazioni ossidative utili.

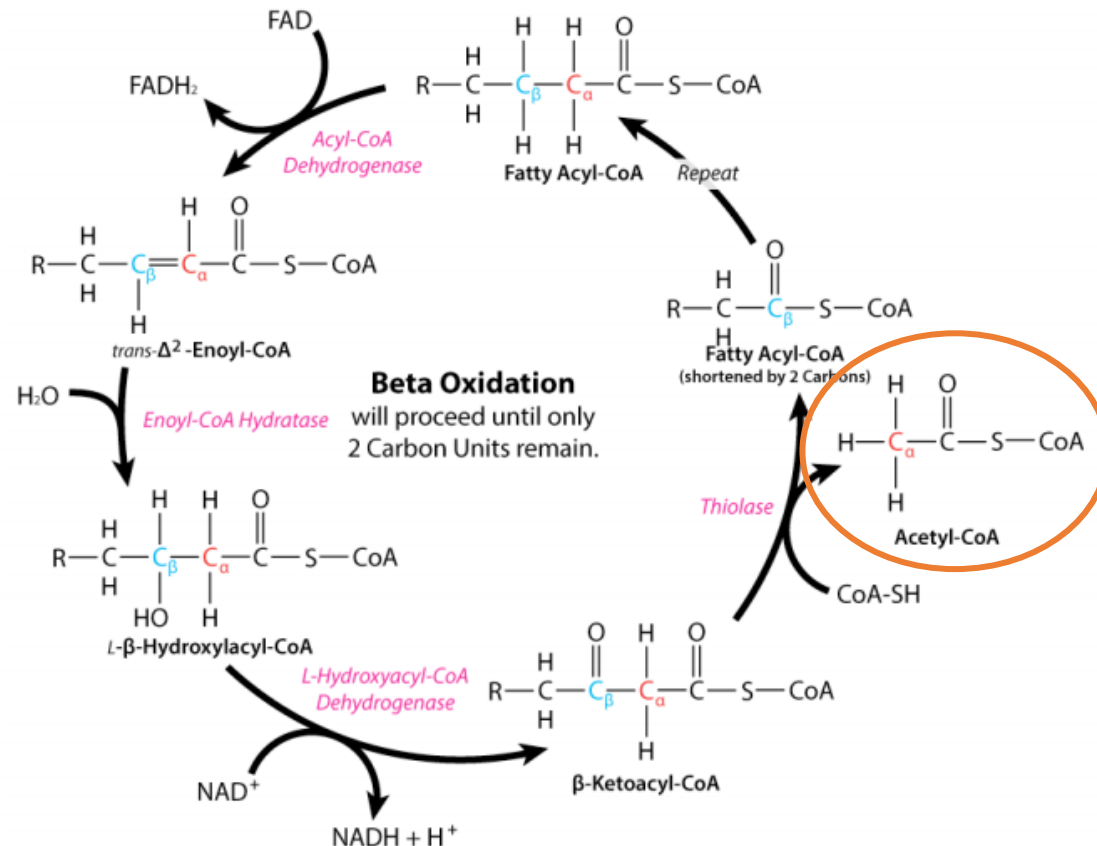
Lo sviluppo successivo dei mitocondri ha reso i perossisomi «meno utili» perché nel mitocondrio il consumo di ossigeno è stato accoppiato alla produzione di ATP.

Le funzioni rimaste nei perossisomi sarebbero quindi quelle che non sono state assunte dai mitocondri.

La β -ossidazione converte gli acidi grassi in unità di acetil-CoA.

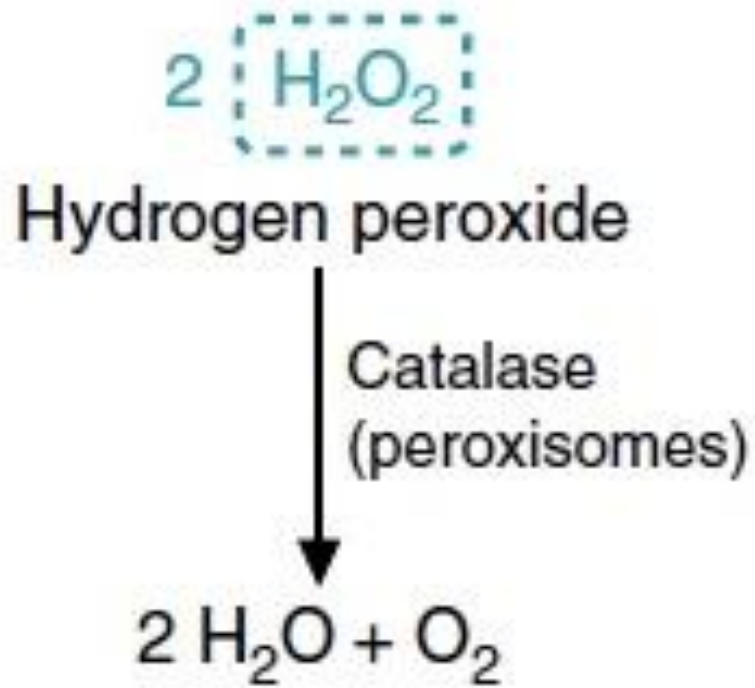
Nelle cellule di mammifero la β -ossidazione avviene sia nei mitocondri che nei perossisomi.

Invece nelle cellule vegetali e di lievito avviene esclusivamente nei perossisomi.

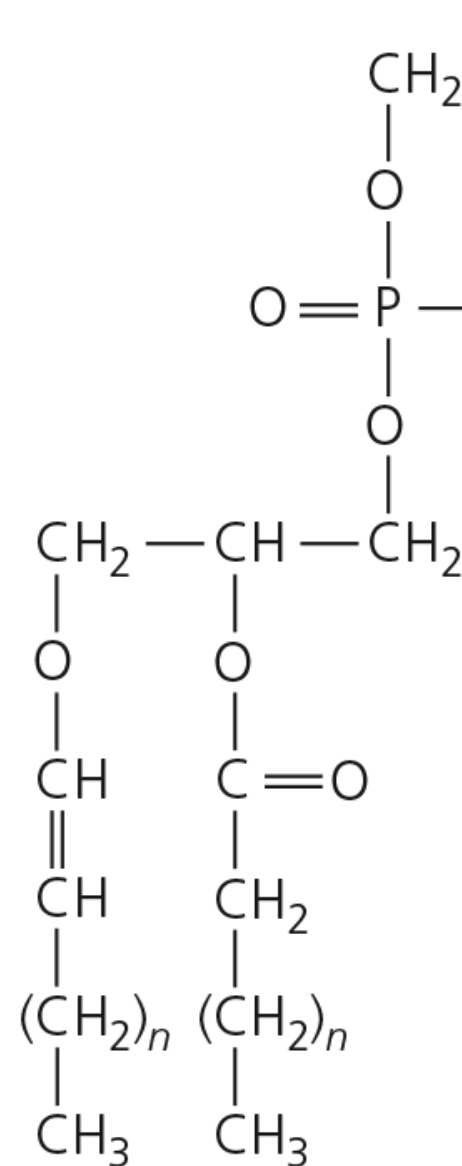


Nelle cellule di lievito, in base alla fonte di carbonio presente nel terreno, i perossisomi si adattano (diventano piccoli o molto grandi a seconda se serve o meno la loro funzione metabolica).

I perossisomi contengono le **catalasi** che detossificano l'acqua ossigenata.



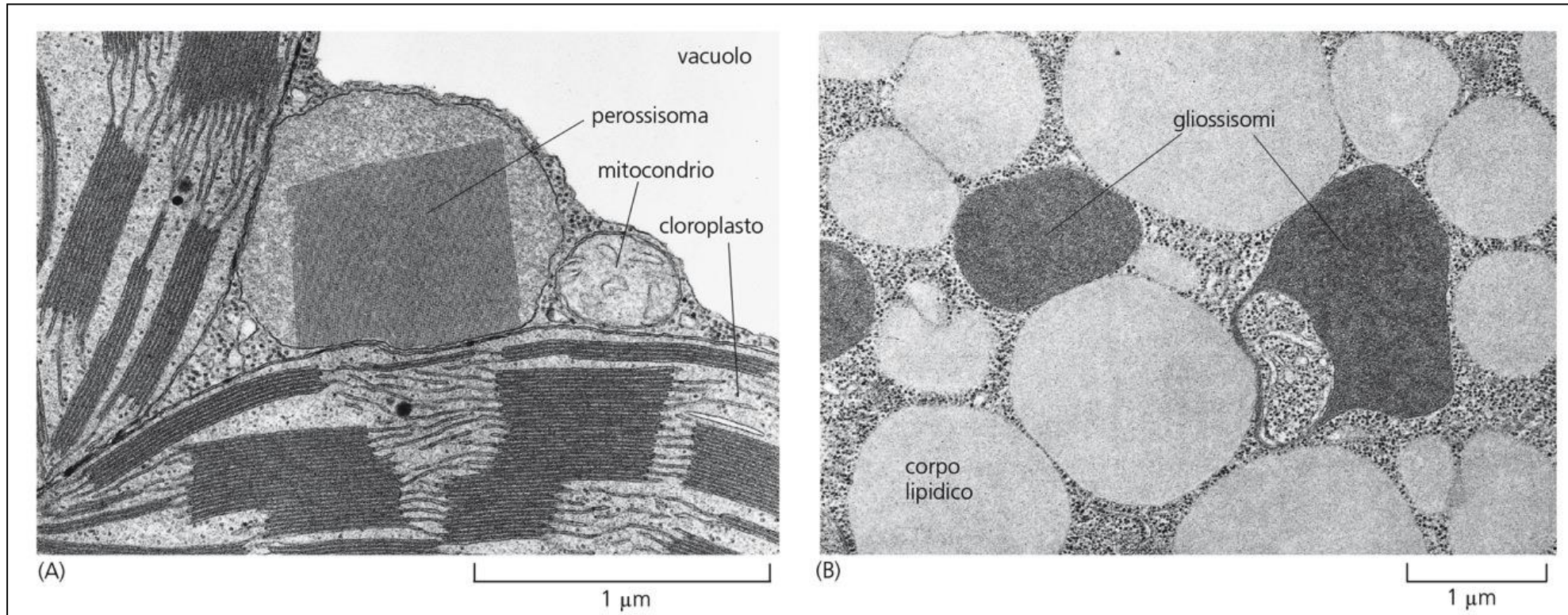
Il 25% circa dell'etanolo che beviamo è ossidato ad acetaldeide nei perossisomi.



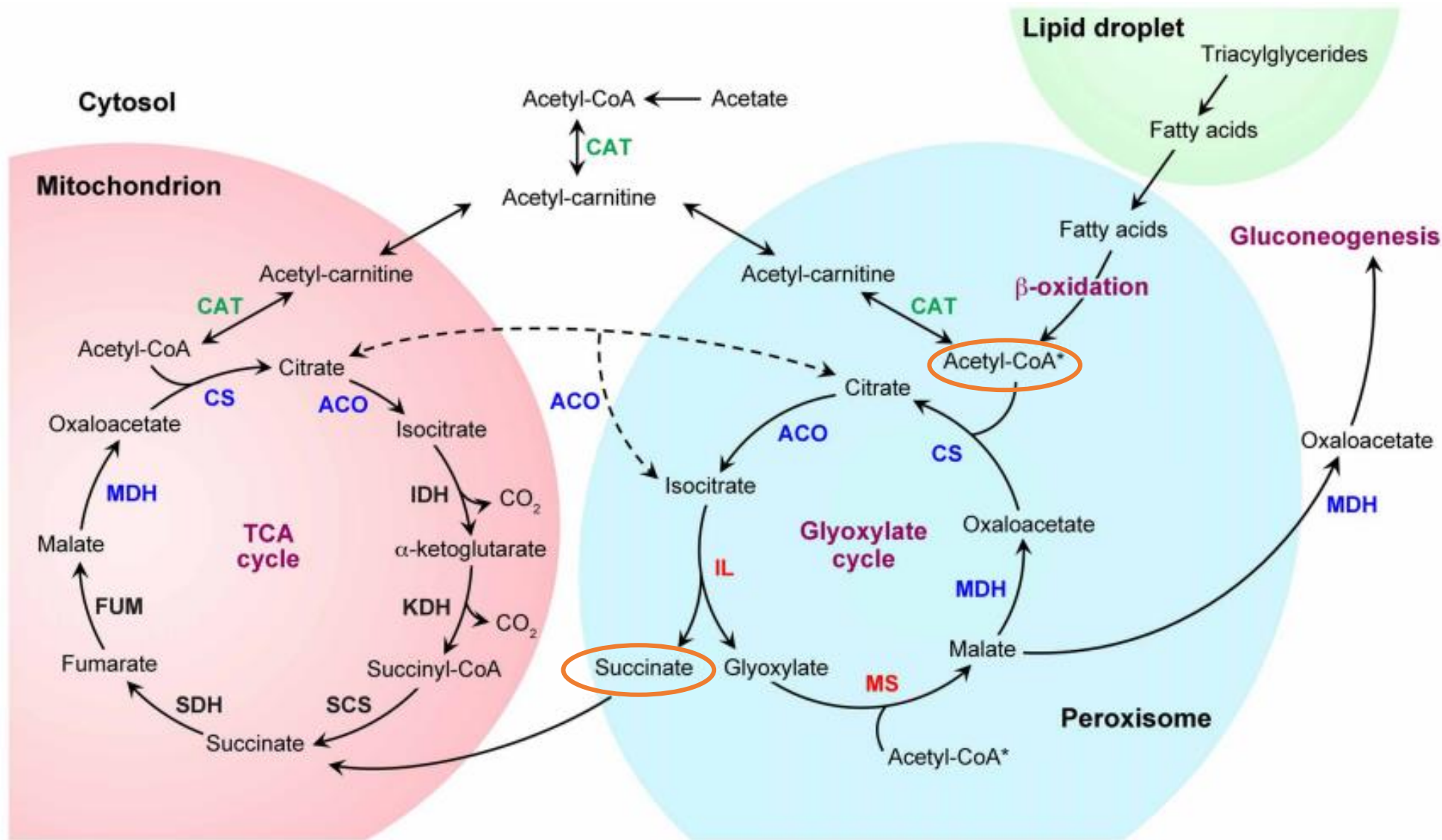
Nei perossisomi animali avvengono le prime reazioni della **sintesi dei plasmalogeni**, fosfolipidi importanti per la mielinizzazione → per questa ragione molte patologie legate ai perossisomi portano a problemi neurologici.

Nelle cellule vegetali ci sono due tipi di perossisomi:

- Uno è presente **nelle foglie** dove partecipa alla fotorespirazione
- L'altro si trova **nei semi** in germinazione dove partecipa alla conversione di acidi grassi in zuccheri nel ciclo del gliossilato; per questa ragione questo tipo di perossisoma si chiama anche **gliossisoma**



Il ciclo del gliossilato (non avviene nelle cellule animali)

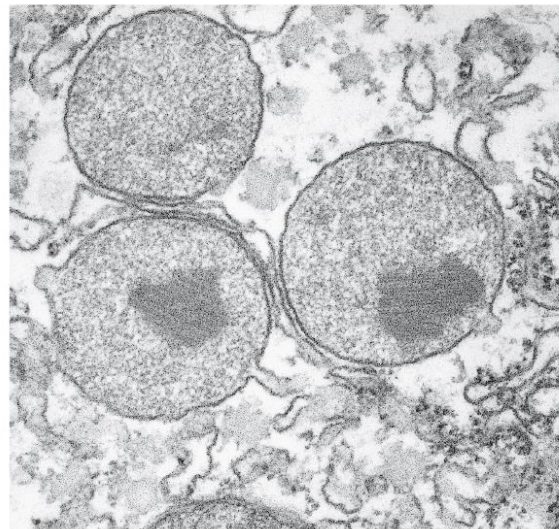


2 molecole di Acetil-CoA derivante dalla β-ossidazione entrano nel ciclo e formano una molecola di succinato, che poi esce dai perossisomi.

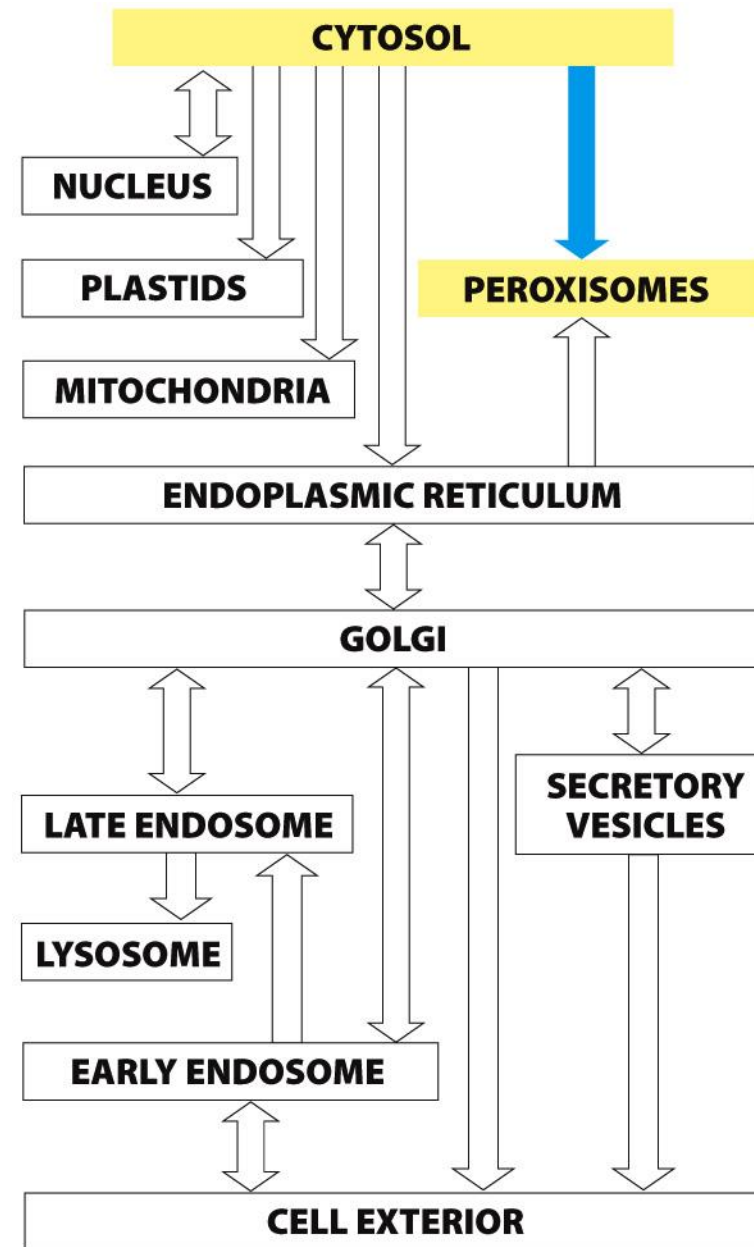
Traslocazione proteica nei perossisomi

Le proteine dei perossisomi arrivano per la maggior parte dal citosol (in piccola parte dal RE).

Le proteine vengono importate in forma ripiegata.



200 nm



Unnumbered 12 p666 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Sequenze segnale per il perossisoma

Esistono 2 tipi di sequenze segnale (peroxisomal-targeting sequences, o PTS):

1. **PTS1** - **Ser-Lys-Leu (SKL)** posta al C-terminale
2. **PTS2** - **RLXXXXH/QL** all'N-terminale

Le **Perossine** (proteine Pex) partecipano all'import delle proteine in **forma foldata** al perossisoma, in un processo che consuma **ATP**.

Possono essere trasportati grandi complessi macromolecolari, ma non sono noti grandi pori (tipo i NPC del nucleo). Si ipotizza che alcune proteine Pex possano formare dei complessi oligomerici immersi nella membrana per formare degli ampi canali transmembrana.

Import al perossisoma

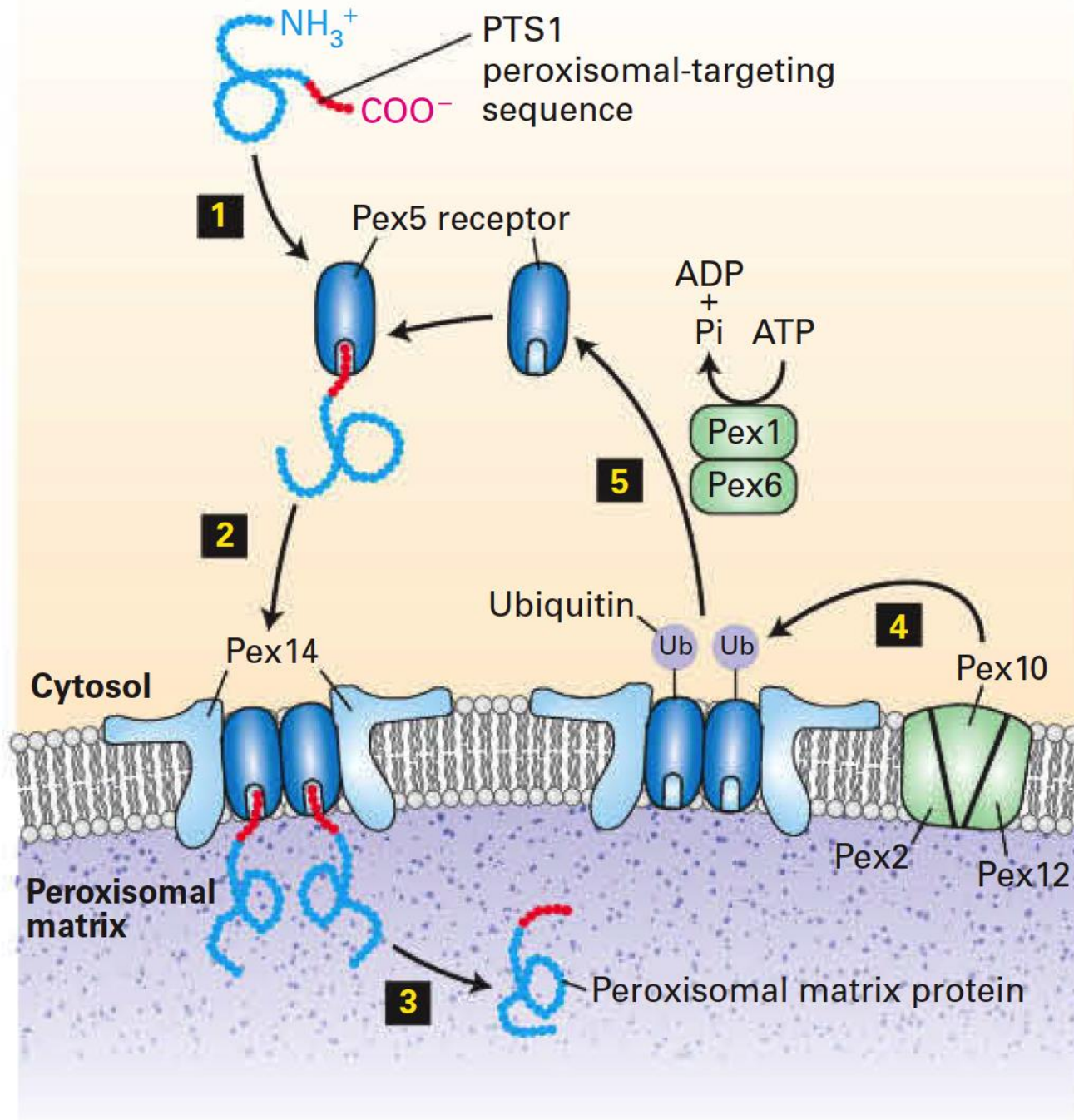
Le proteine vengono importate in forma **foldata** e il trasporto è mediato dalle **perossine (Pex)**.

1. Nel citosol, le proteine PTS1 legano **Pex5**, che si converte in un oligomero che si inserisce nella membrana, interagendo con **Pex14**. La proteina viene rilasciata all'interno del perossisoma. **La sequenza segnale NON viene rimossa.**

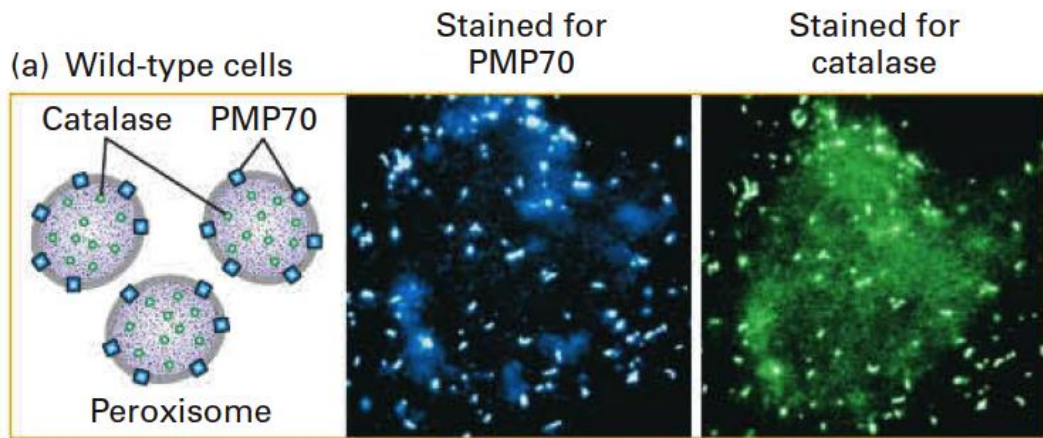
Pex5 torna al citosol grazie all'ubiquitinazione mediata da Pex2, Pex10 e Pex 12.

Pex1 e Pex6 la riportano nel citosol, idrolizzando ATP.

2. Le proteine PTS2 interagiscono con Pex7 e vengono importate in maniera analoga.



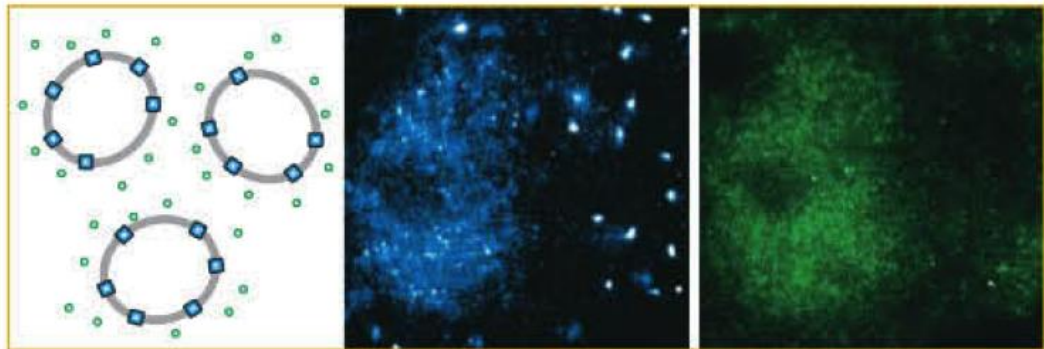
- L'import di proteine nel lume del perossisoma non richiede ATP, che è richiesto solo per riportare Pex5 nel citosol.
- L'idrolisi di ATP garantisce la direzionalità del trasporto.
- Si ipotizza che si possano formare canali transmembrana molto ampi, in grado di trasportare proteine ripiegate e grandi complessi macromolecolari.
- Le proteine della membrana perossisomiale utilizzano **sequenze segnale basiche (mPTS)** e legano proteine Pex completamente diverse: Pex19 come recettore citoplasmatico, che le trasferisce a Pex3 e Pex16 per l'inserimento in membrana.



Cellule wt:

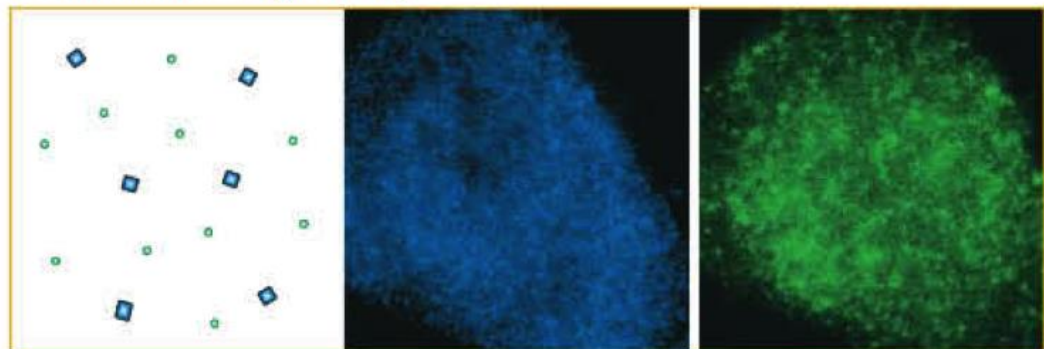
PMP70 (azzurro) proteina di membrana perossisomale.
Catalasi (verde) nella matrice perossisomale.

(b) Pex12 mutants (deficient in matrix protein import)



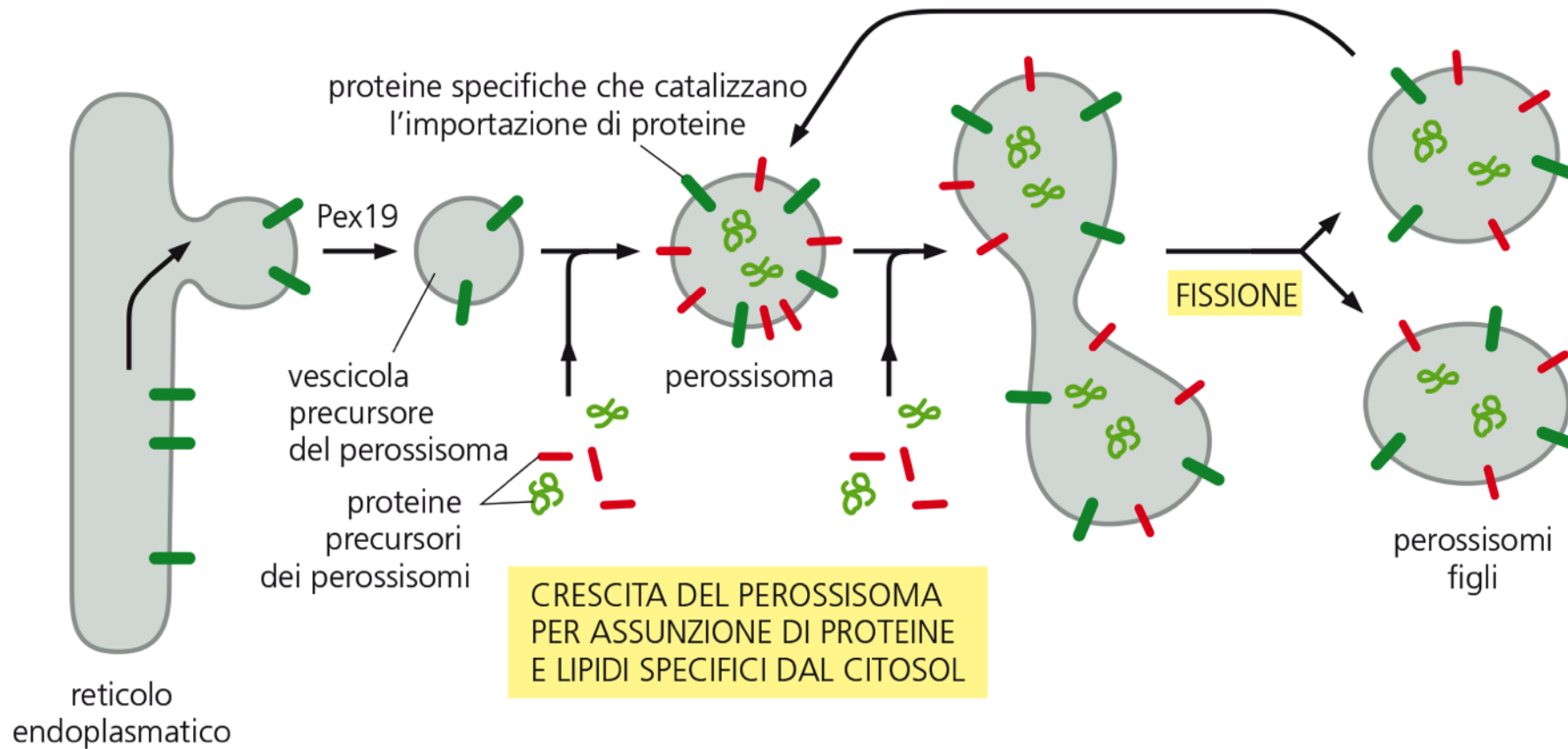
Mutazioni del gene Pex12 impediscono l'import delle proteine all'interno della matrice dei perossisomi
→ la catalasi resta nel citosol. Tuttavia questi mutanti incorporano correttamente le proteine nella membrana dei perossisomi.

(c) Pex3 mutants (deficient in membrane biogenesis)

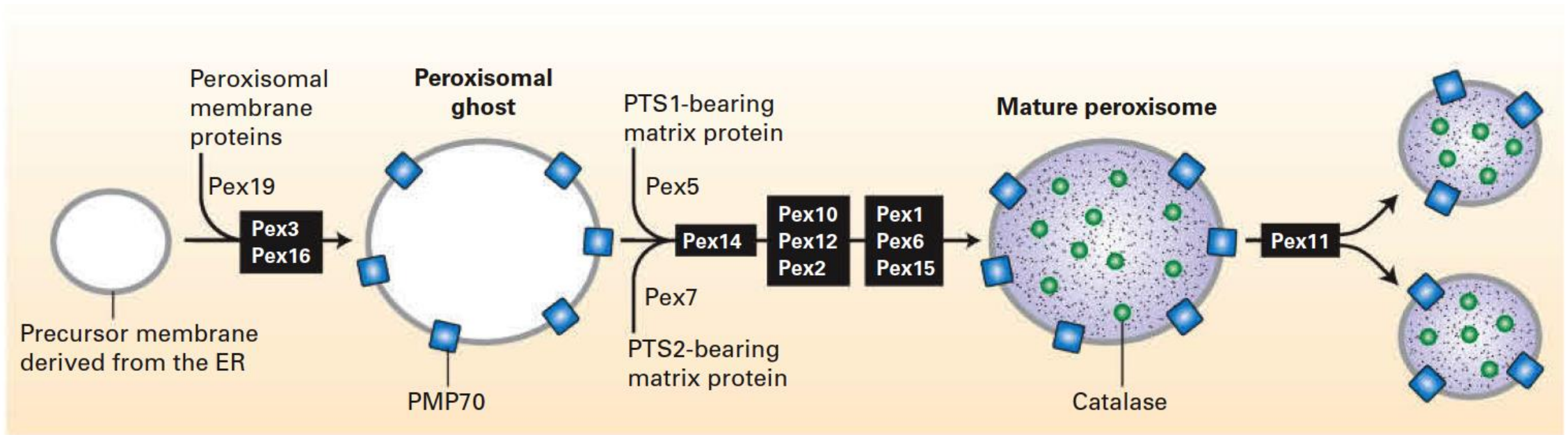


Mutazioni del gene Pex3 impediscono la formazione della membrana perossisomale → non si formano proprio i perossisomi.

Biogenesi dei perossisomi



- **La maggior parte dei perossisomi deriva da divisione di organelli pre-esistenti, mediata da Pex11. Man mano che proteine e lipidi si accumulano si ha crescita del perossisoma fino ad arrivare alla **fissione**, che dipende dalla dinamina.**



- **I perossisomi possono formarsi anche ex novo da vescicole del RE:**

- Pex3 e Pex16 vengono reclutate nelle membrane del RE.

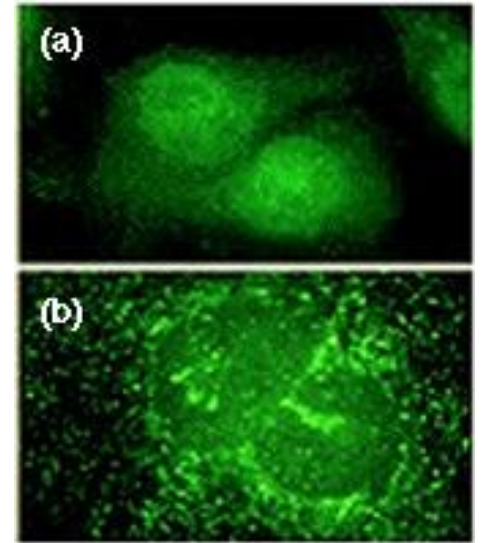
- A loro volta reclutano altre proteine perossisomali, come Pex19, formando una regione specializzata sul RE che porta alla gemmazione della vescicola e la maturazione del perossisoma.

Sindrome di Zellweger

- E' una malattia autosomica recessiva, nella quale **non avviene l'import di tutte o molte proteine perossisomali** (che rimangono quindi nel citosol e sono poi degradate) → perossisomi «vuoti»
- Più di 20 geni sono coinvolti, tra cui il recettori per PTS1 PEX5 e per PTS2 PEX7 (forma più lieve)



L'esordio dei sintomi è di solito subito dopo la nascita o nell'infanzia e comprende convulsioni neonatali, ipotonia, segni craniofacciali caratteristici (facies appiattita, radice del naso larga, suture beanti, fontanella anteriore grande), disfunzione epatica e, nei bambini più grandi, sordità neurosensoriale progressiva, distrofia retinica e ritardo dello sviluppo psicomotorio



Peroxisomes are not detected in Zellweger syndrome fibroblasts (a), but can be reconstituted by transfection with PXR1 gene (b). [Image credit: Nancy Braverman, Gabrielle Dodt, Hugo Moser, Stephen Gould and David Valle, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.]