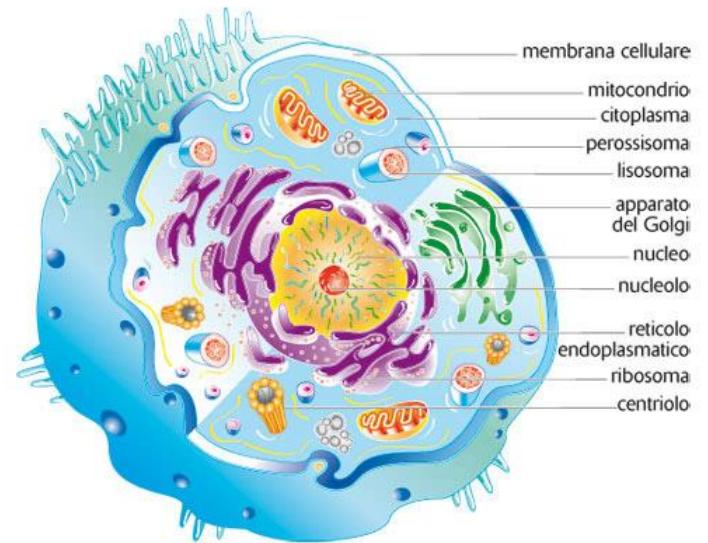
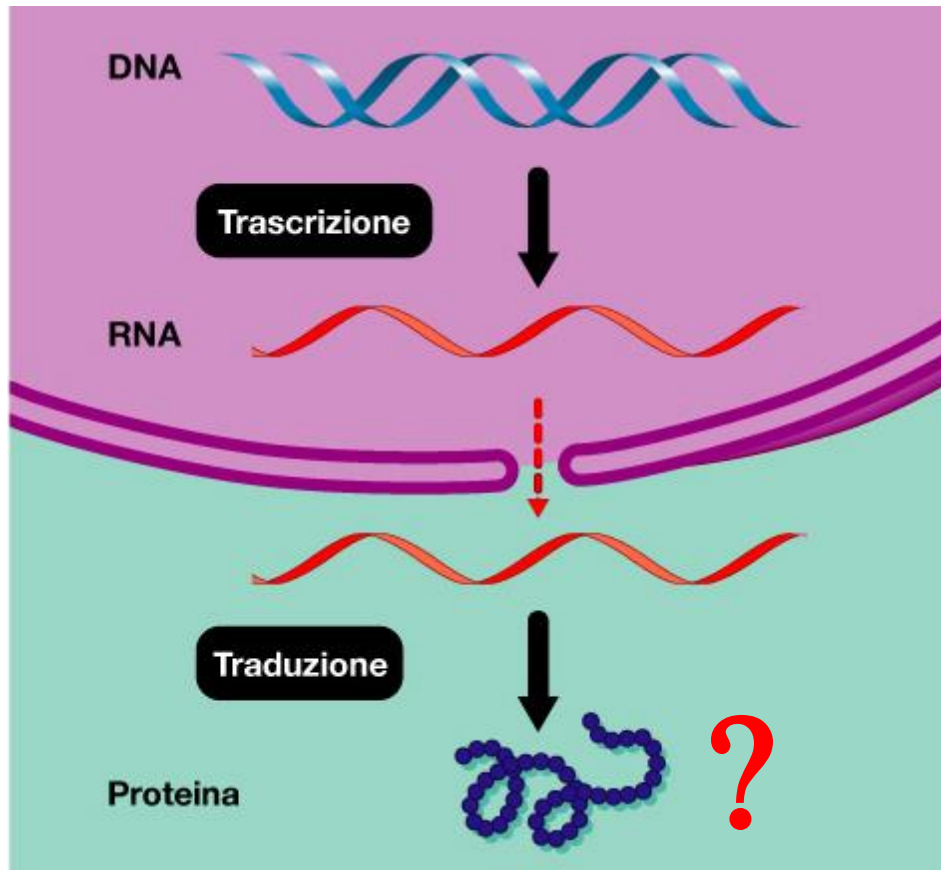
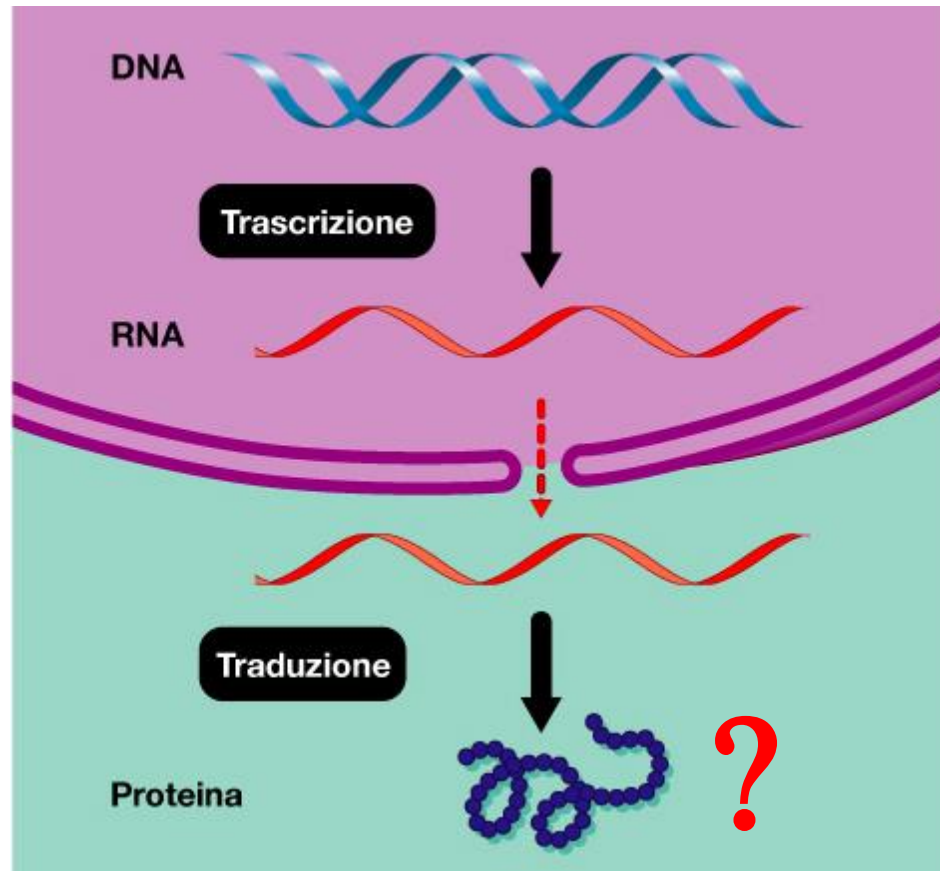


IL DESTINO DELLE PROTEINE

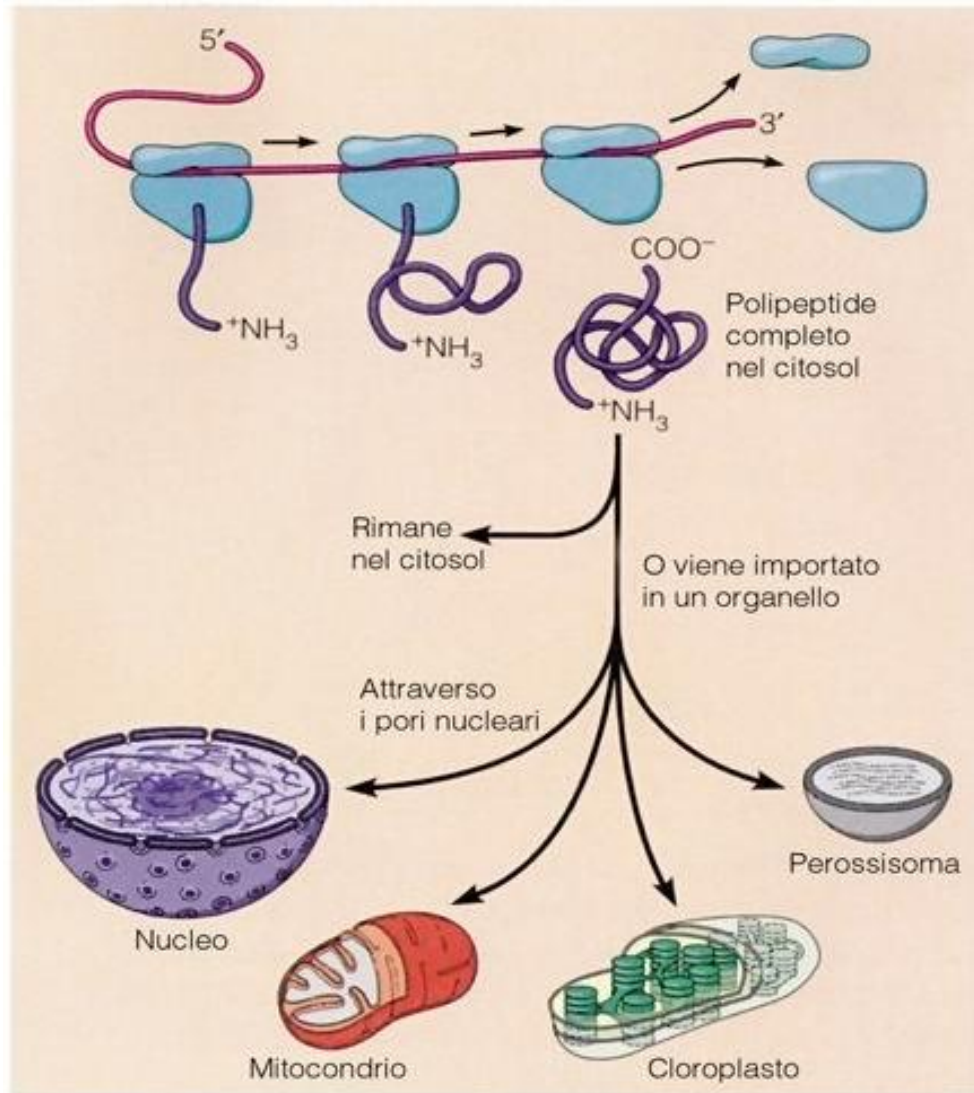


IL DESTINO DELLE PROTEINE



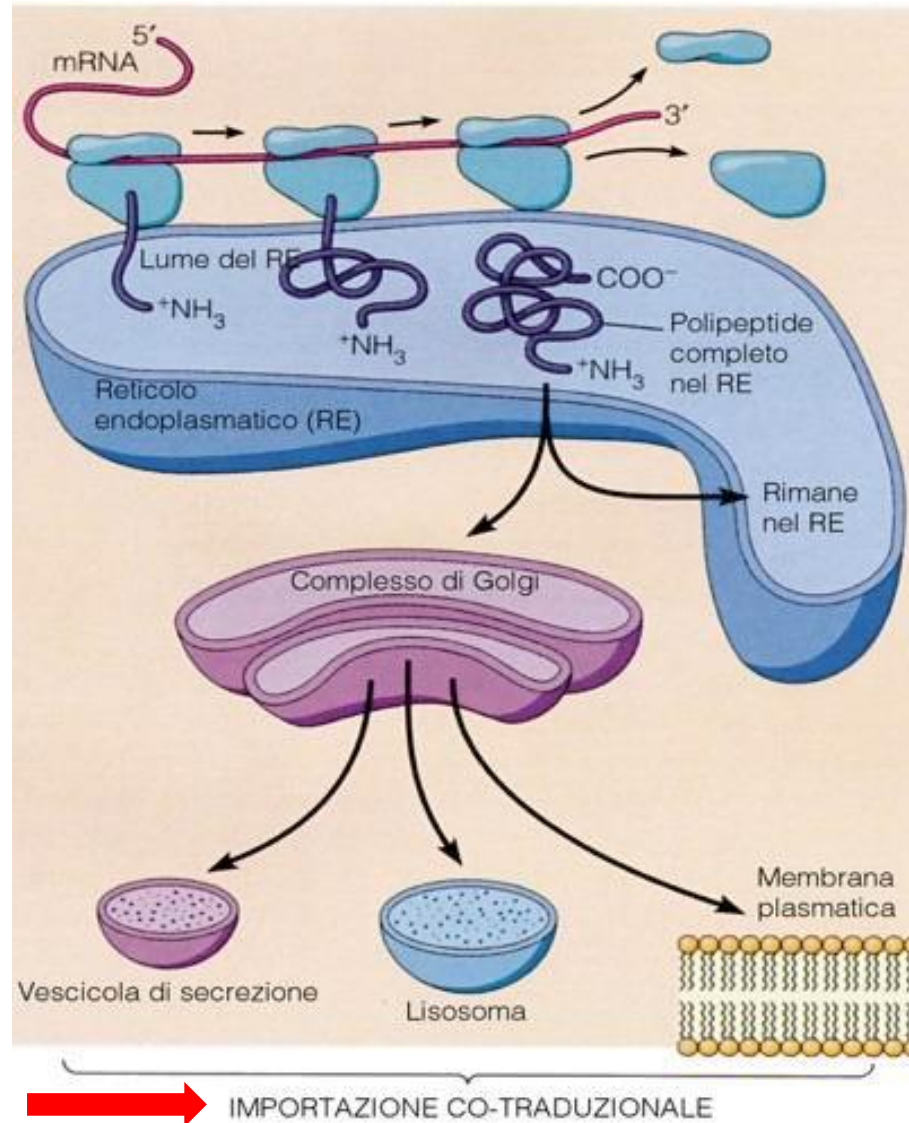
1. Via citoplasmatica
2. Via secretoria o vescicolare

La via citoplasmatica delle proteine



 **IMPORTAZIONE POST-TRADUZIONALE**
in diversi organelli

La via secretoria o vescicolare delle proteine



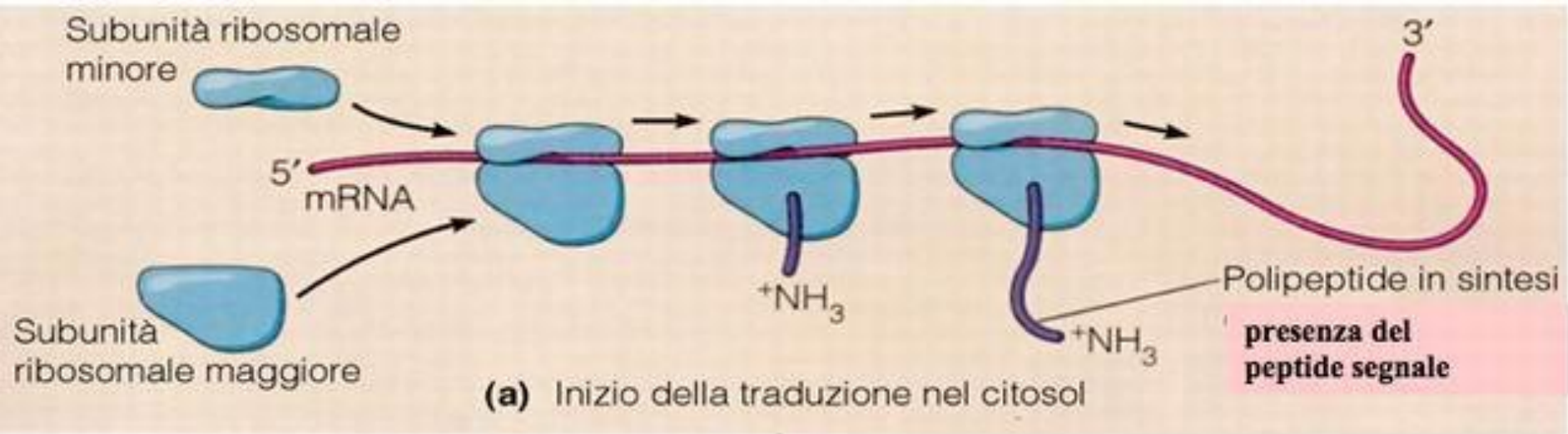
Come vengono indirizzate le proteine nei vari distretti?

Il peptide segnale

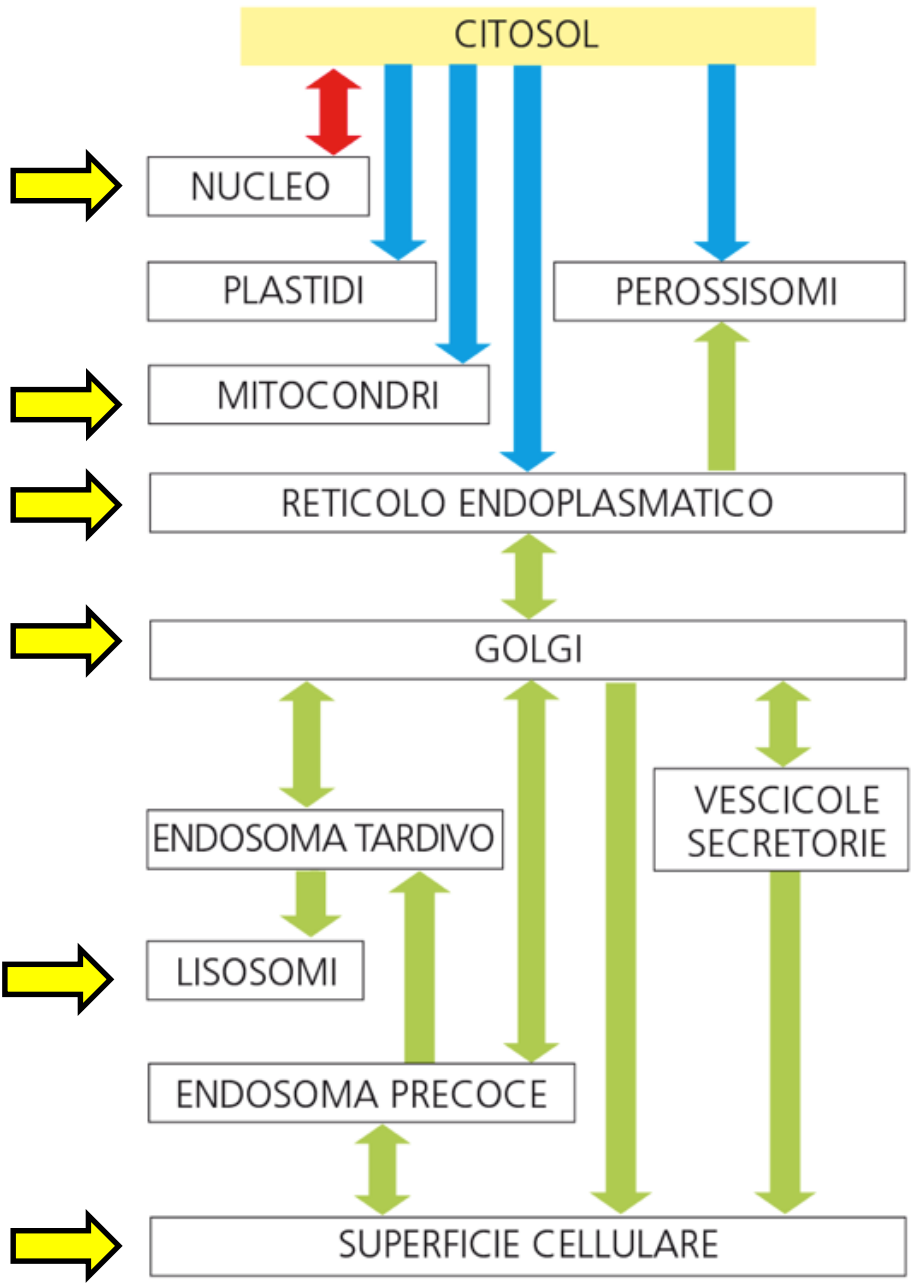
Sono sequenze aminoacidiche che indirizzano le proteine nei vari distretti cellulari. Tali sequenze sono idrolizzate (tagliate) soltanto quando sono presenti all'estremità N-terminale.

Target Organelle	Usual Signal Location within Protein	Signal Removal*	Nature of Signal
Endoplasmic reticulum	N-terminal	(+)	"Core" of 6-12 mostly hydrophobic amino acids, often preceded by one or more basic amino acids
Mitochondrion	N-terminal	(+)	3-5 nonconsecutive Arg or Lys residues, often with Ser and Thr; no Glu or Asp residues
Chloroplast	N-terminal	(+)	No common sequence motifs; generally rich in Ser, Thr, and small hydrophobic amino acid residues and poor in Glu and Asp residues
Peroxisome	C-terminal	(-)	Usually Ser-Lys-Leu at extreme C-terminus
Nucleus	Internal	(-)	One cluster of 5 basic amino acids, or two smaller clusters of basic residues separated by ≈10 amino acids

Lo smistamento delle proteine

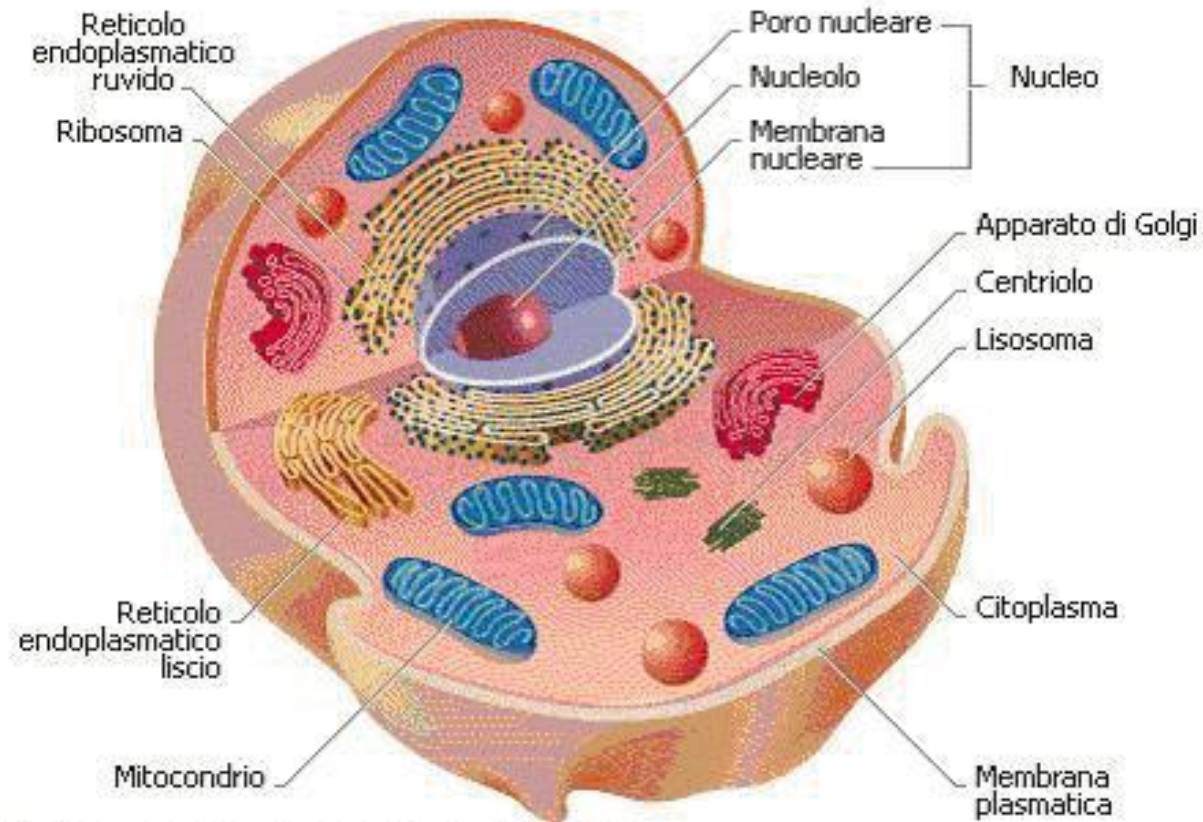


Peptide segnale: è costituito da una sequenza di aminoacidi che indica il destino della proteina

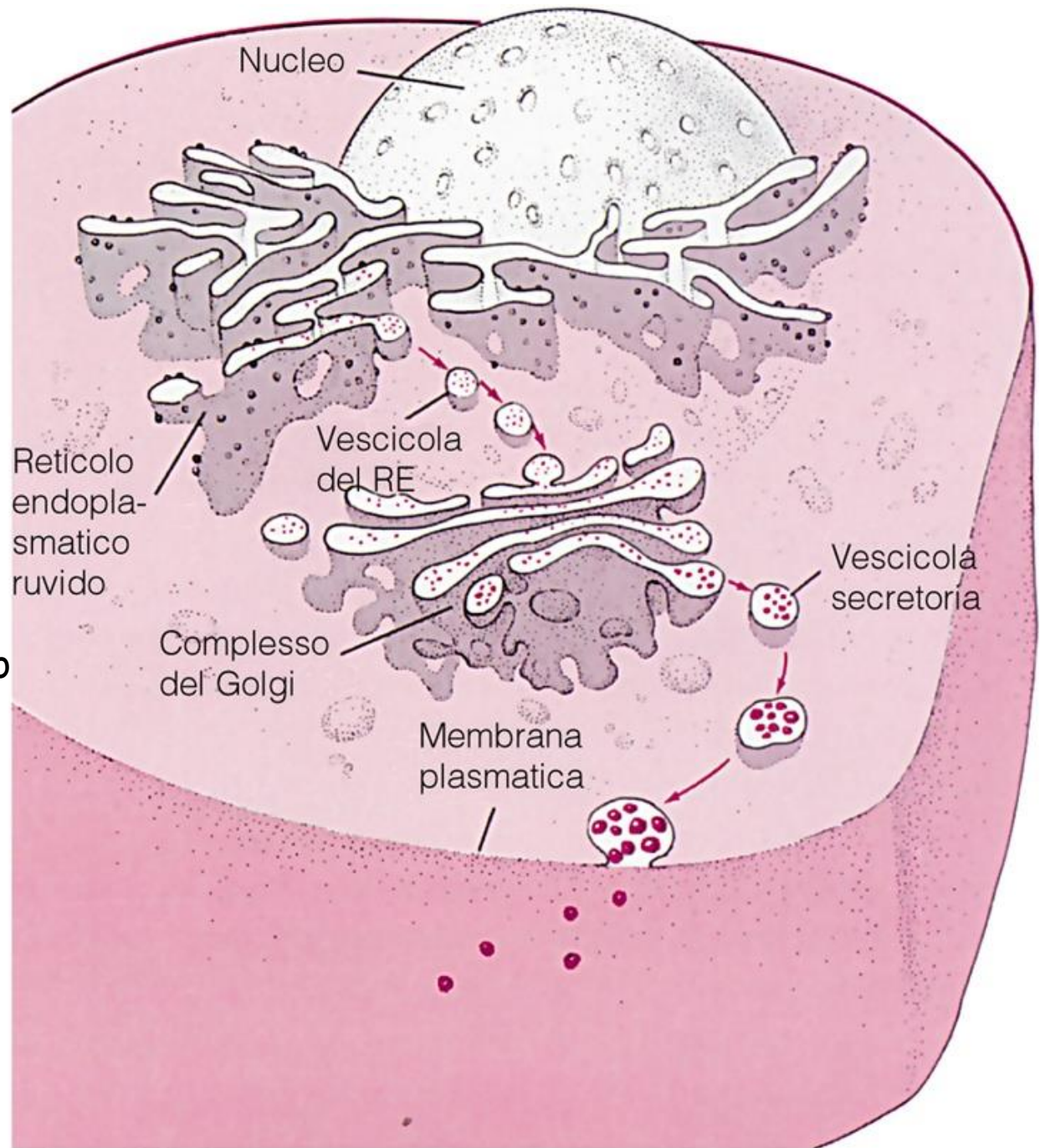


LEGENDA:
█ = trasporto regolato
█ = trasporto transmembrana
█ = trasporto vescicolare

Perché è necessario il trasporto vescicolare

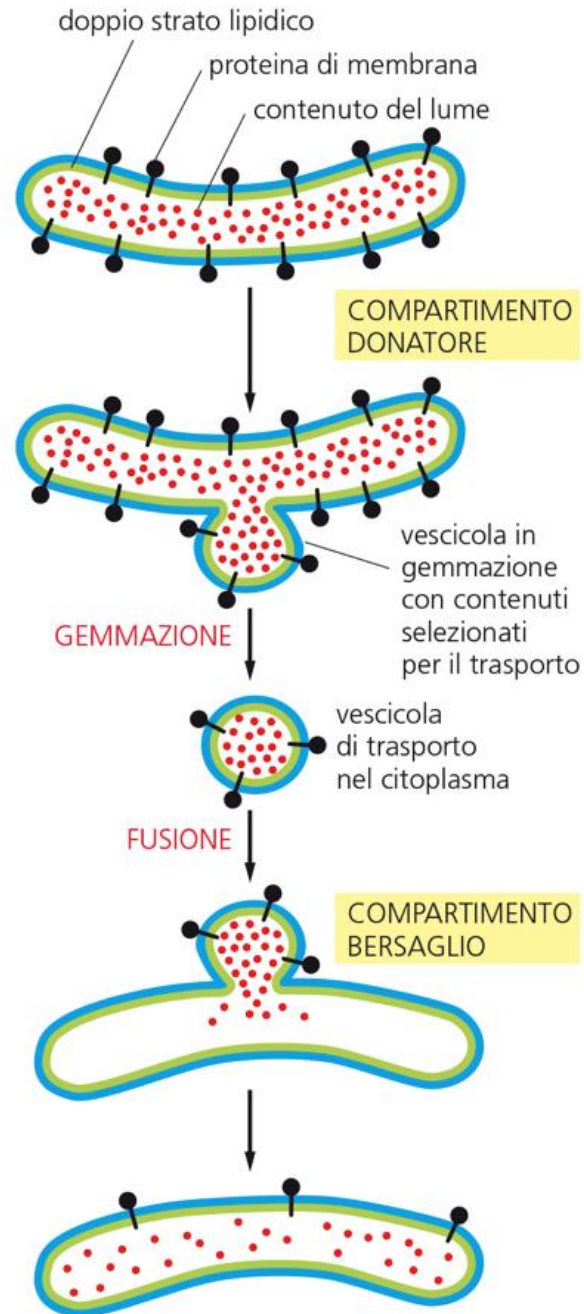


Nella cellula eucariotica c'è un sistema intracellulare di membrane scollegate tra loro

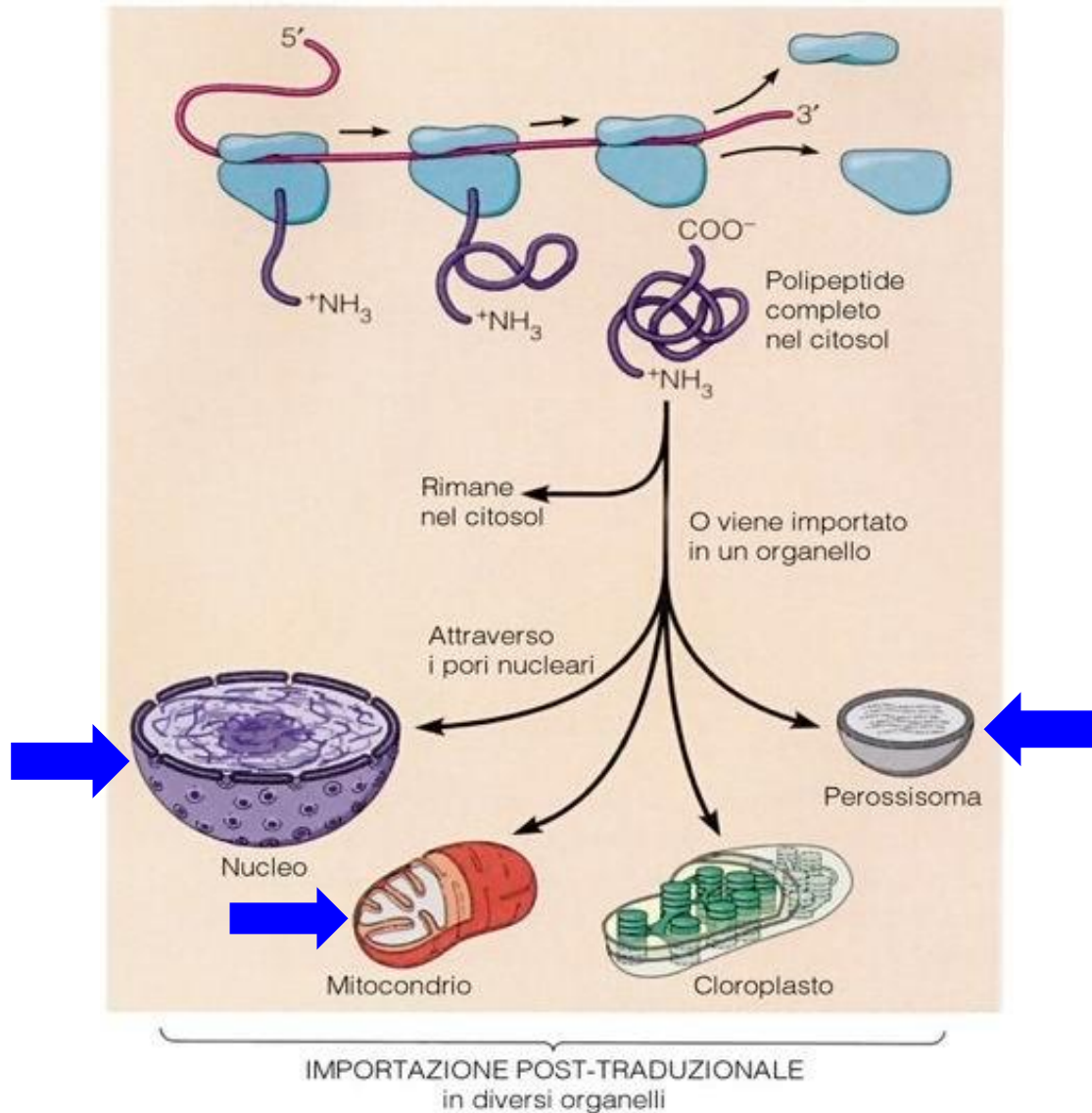


- Reticolo endoplasmatico
- Apparato di Golgi
- Membrana plasmatica

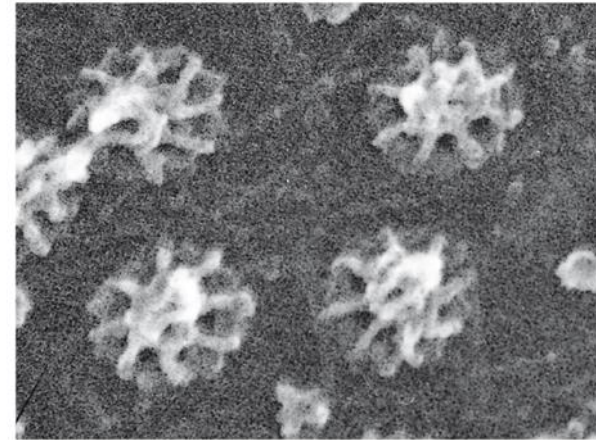
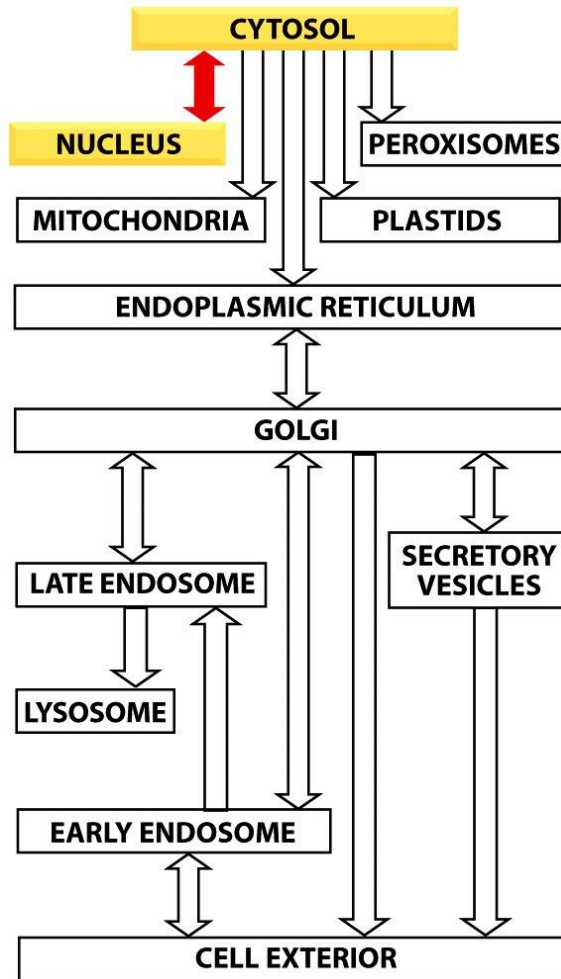
Il trasporto vescicolare avviene grazie alla gemmazione e fusione di vescicole. Le vescicole mettono in contatto strutture membranarie separate tra loro.



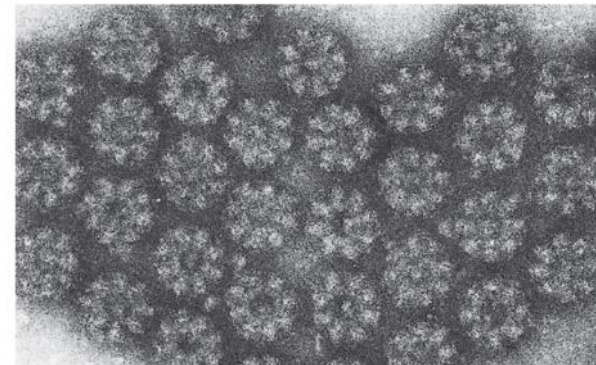
Trasporto delle proteine nella via citoplasmatica



Il trasporto nucleo-citoplasma



(B) 0,1 μm



(D) 0,1 μm

Sono necessari i segnali di importazione o esportazione nucleare

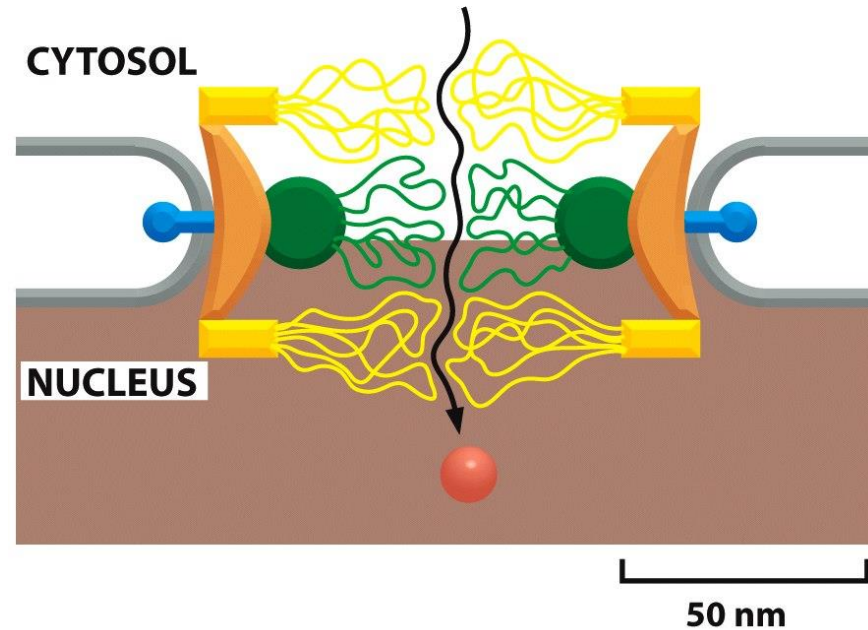
L'involucro nucleare è liberamente permeabile a piccole molecole (circa 5 kDa) per **diffusione passiva**.

Se aumentano le dimensioni della proteina, la velocità di diffusione si riduce a causa di una rete di proteine non strutturate che forma un groviglio all'interno del poro (**barriera di diffusione**). Il limite per la diffusione libera è circa 60kDa. Proteine più grandi sfruttano un **trasporto attivo attraverso i pori nucleari**.

istoni, DNA e
RNA polimerasi,
proteine
regolatorie



tRNA, mRNA

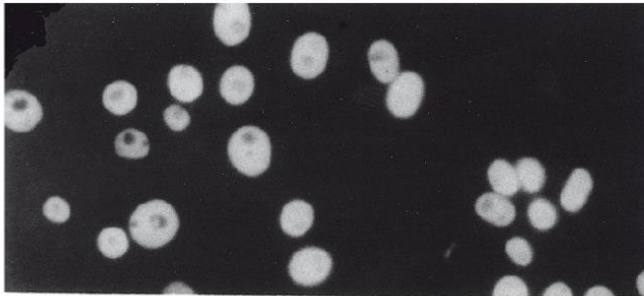


Trasporto attivo attraverso gli NPC

Per essere trasportata nel nucleo una proteina deve possedere un **segnale di localizzazione nucleare (NLS)**: sequenze ricche di **Lys e Arg** che definiscono una **zona segnale**. La NLS può essere all'N-terminale o in una regione centrale della proteina e non viene eliminata dopo il trasporto.

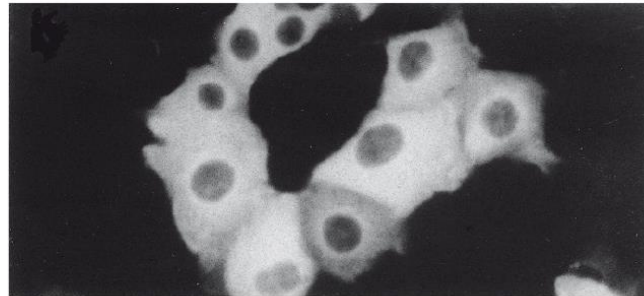
(A) LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE T
CONTENENTE IL SUO NORMALE SEGNALE
DI IMPORTAZIONE NUCLEARE

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



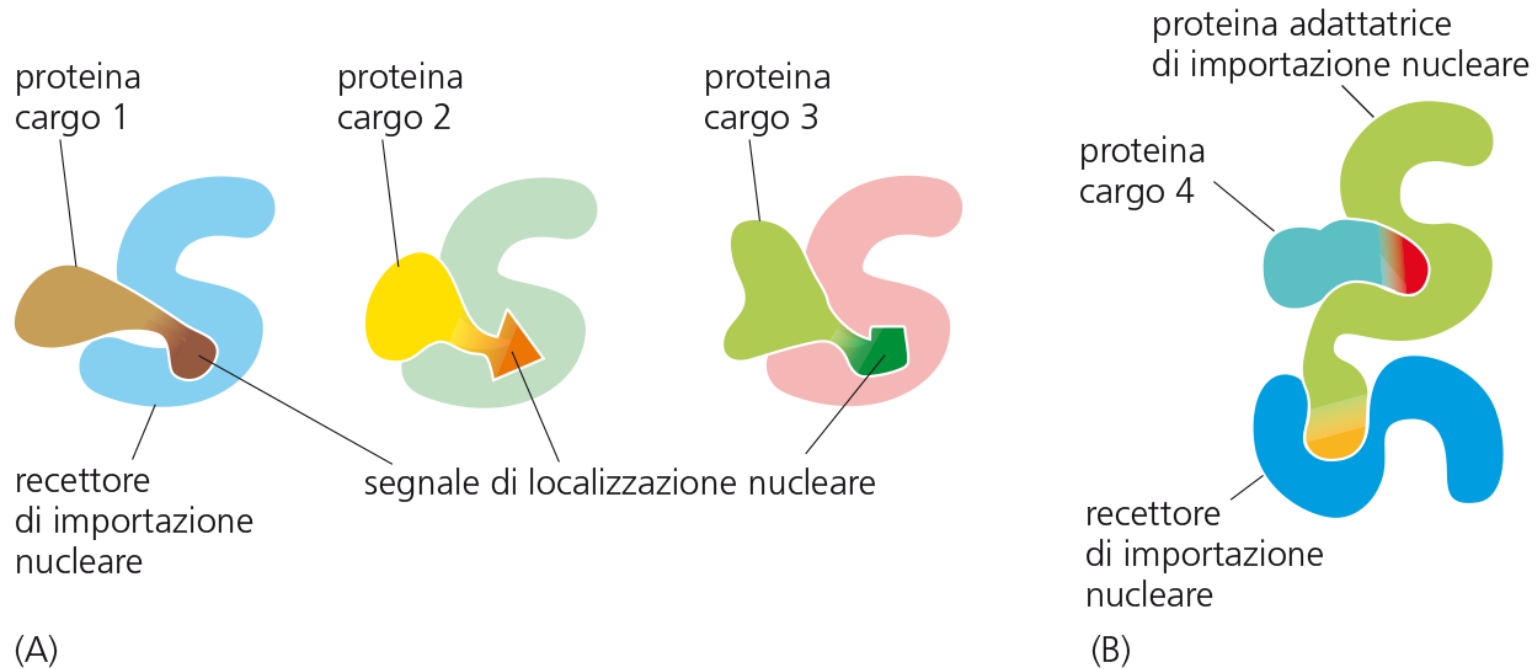
(B) LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE T
CONTENENTE UN SEGNALE
DI IMPORTAZIONE NUCLEARE MUTATO

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



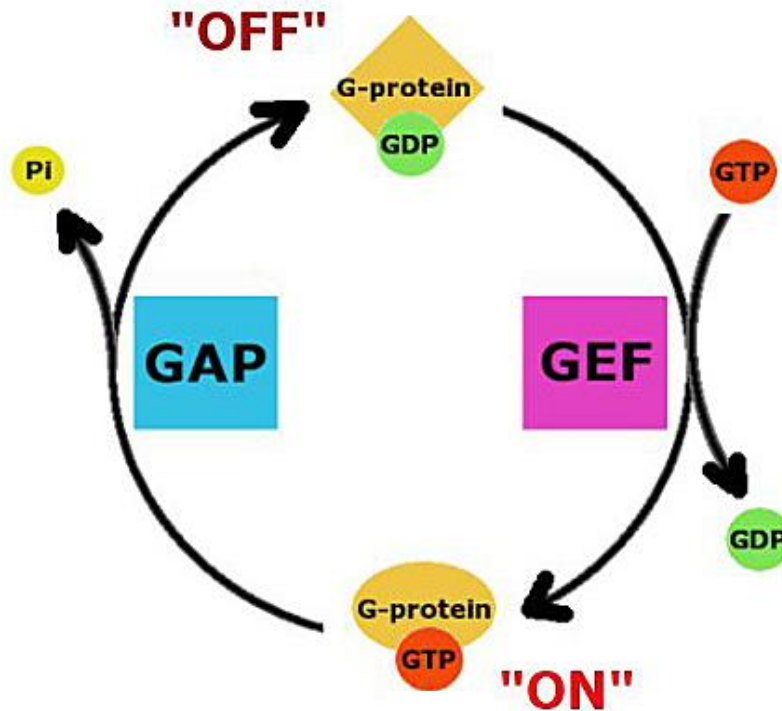
La proteina può passare dal poro mantenendo la sua conformazione nativa: **trasporto post-traduzionale**.

Il segnale di localizzazione nucleare (NLS) deve essere riconosciuto da **recettori di importazione nucleare**: proteine citosoliche che si legano da un lato alle NLS e dall'altro a proteine del poro nucleare che si estendono come tentacoli all'esterno. Il legame alle proteine del poro può essere diretto o mediato da proteine adattatrici.



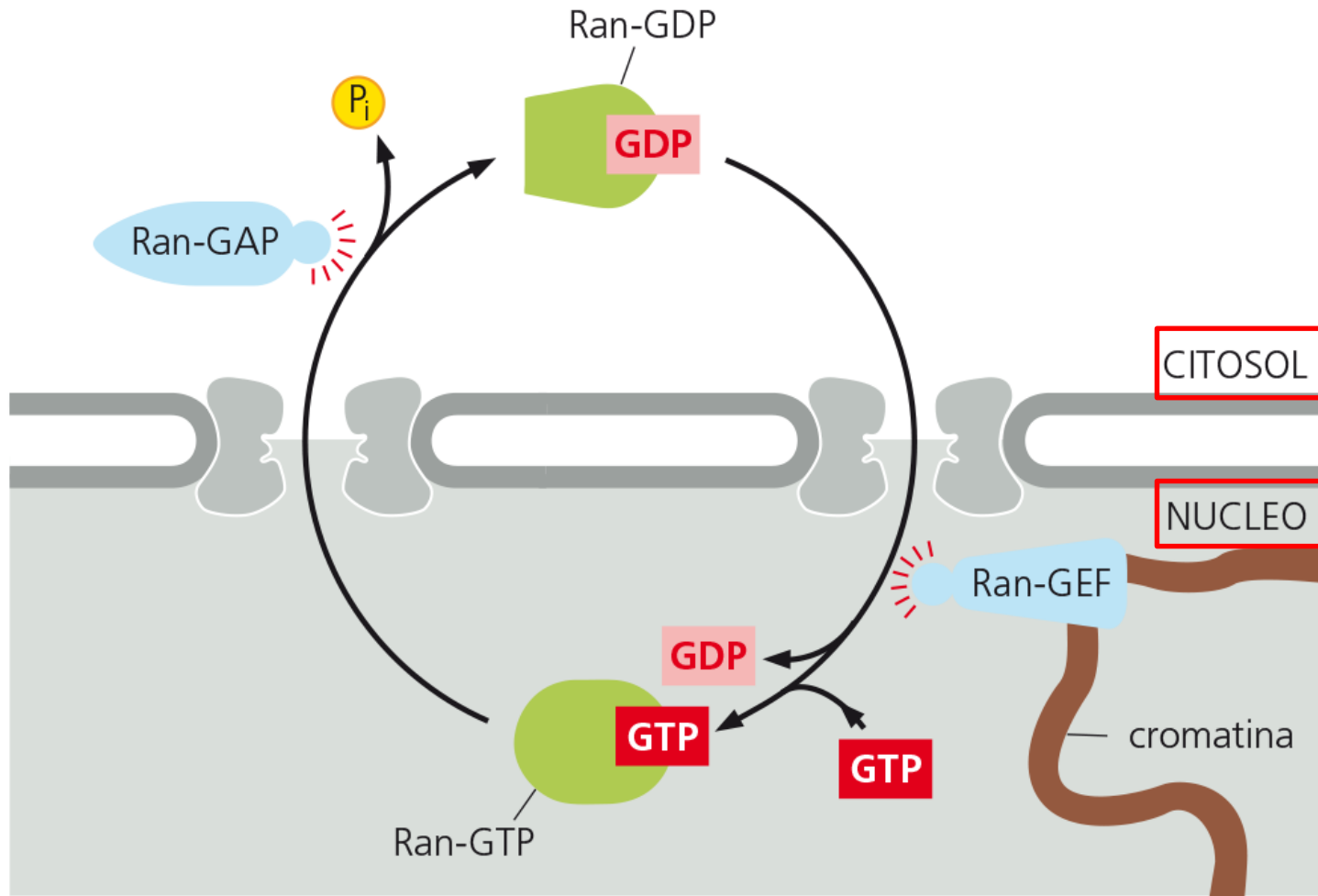
L'esportazione dal nucleo avviene in modo analogo ma è mediata da **segnali di esportazione nucleare** e da **recettori di esportazione nucleare**.

Il trasporto nucleare di una proteina necessita di energia ed è mediato dalla **Ran GTPasi** .
Ran è una proteina **G monomerica**



- **RanGEF** (GTPase exchange factor) promuove lo scambio GDP\GTP attivando la proteina G
- **RanGAP** (GTPase activating protein) promuove l'attività GTPasica della proteina G, ne determina il legame a GDP e dunque la inattiva

Ran-GTP e Ran-GDP si trovano in due compartimenti diversi e questo dipende dalla localizzazione di **Ran-GAP** e **Ran-GEF**

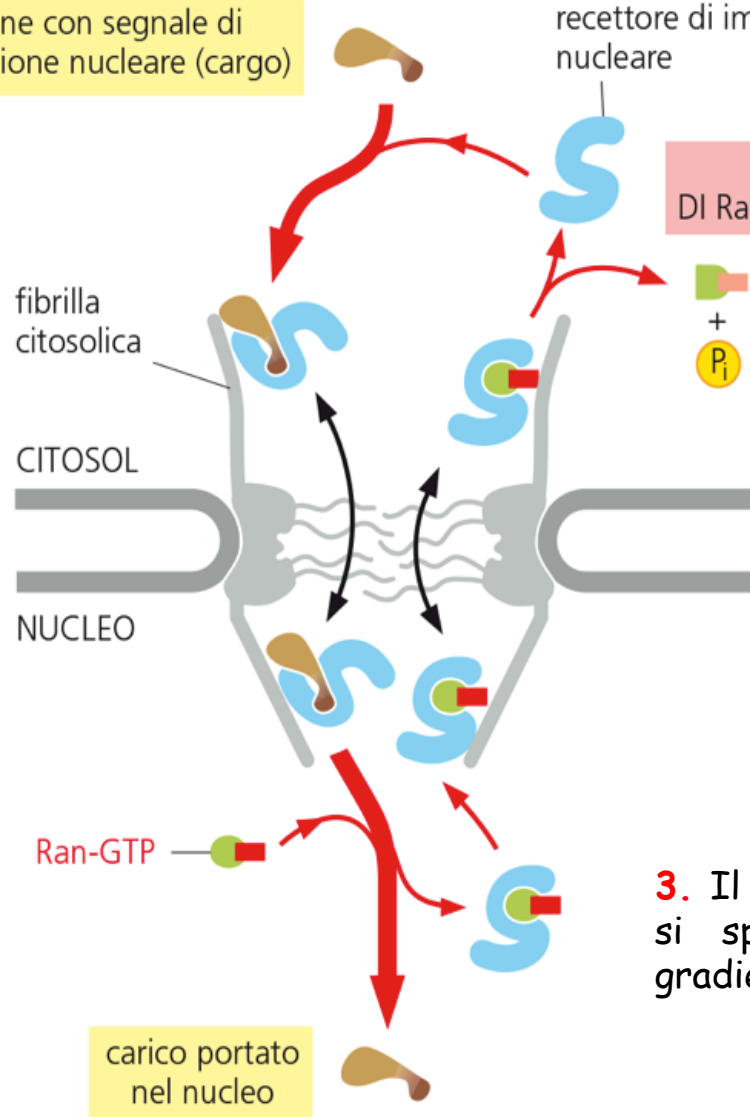


Importazione nucleare

proteine con segnale di localizzazione nucleare (carga)

recettore di importazione nucleare

1. Il complesso cargo-recettore entra nel nucleo attraverso gli NPC.



DISSOCIAZIONE DI Ran-GDP DAI RECETTORI

Ran-GDP + P_i

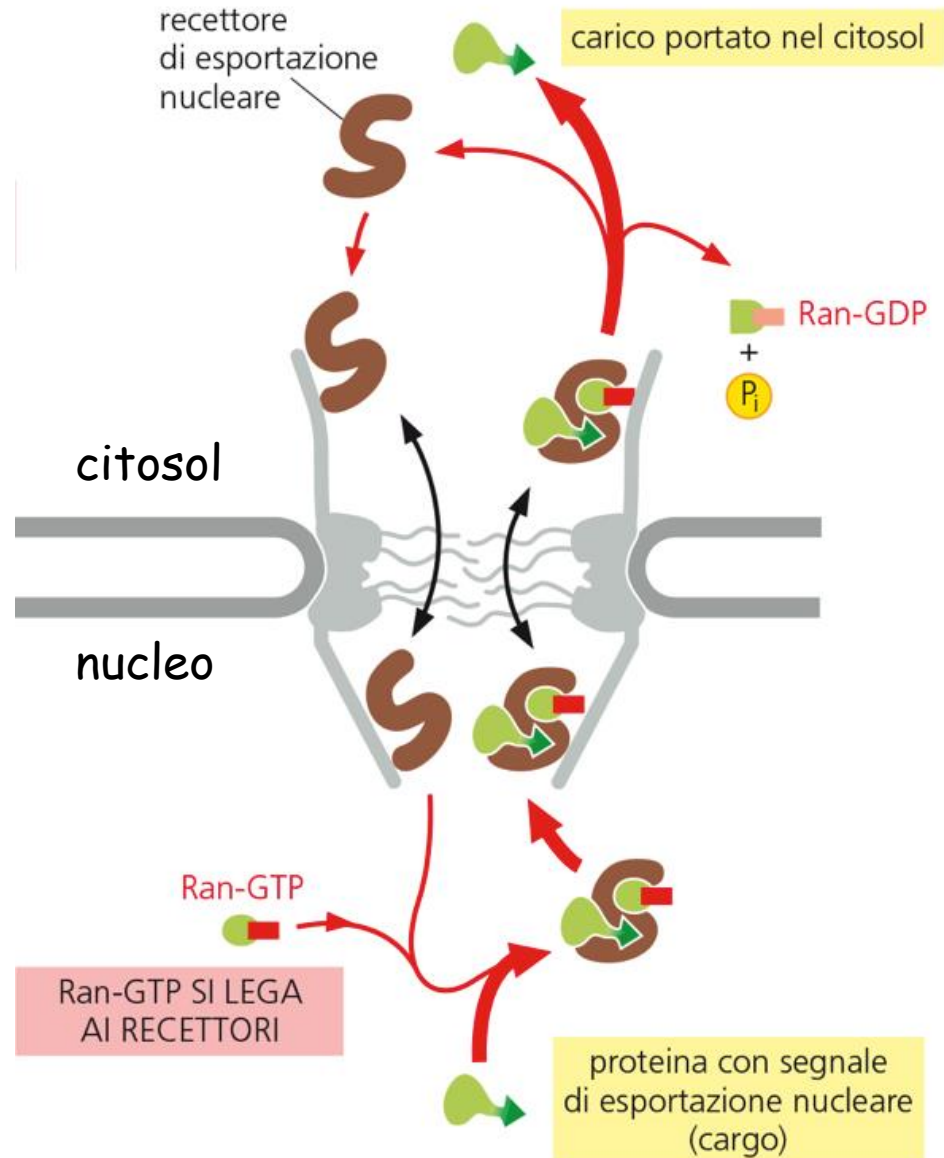
4. Nel citosol RanGTP è convertita da RanGAP a RanGDP e così si dissocia dal recettore. Il recettore può ora iniziare un nuovo ciclo.

2. Nel nucleo il complesso cargo-recettore lega RanGTP (abbondante in questa sede) che promuove il rilascio del cargo.

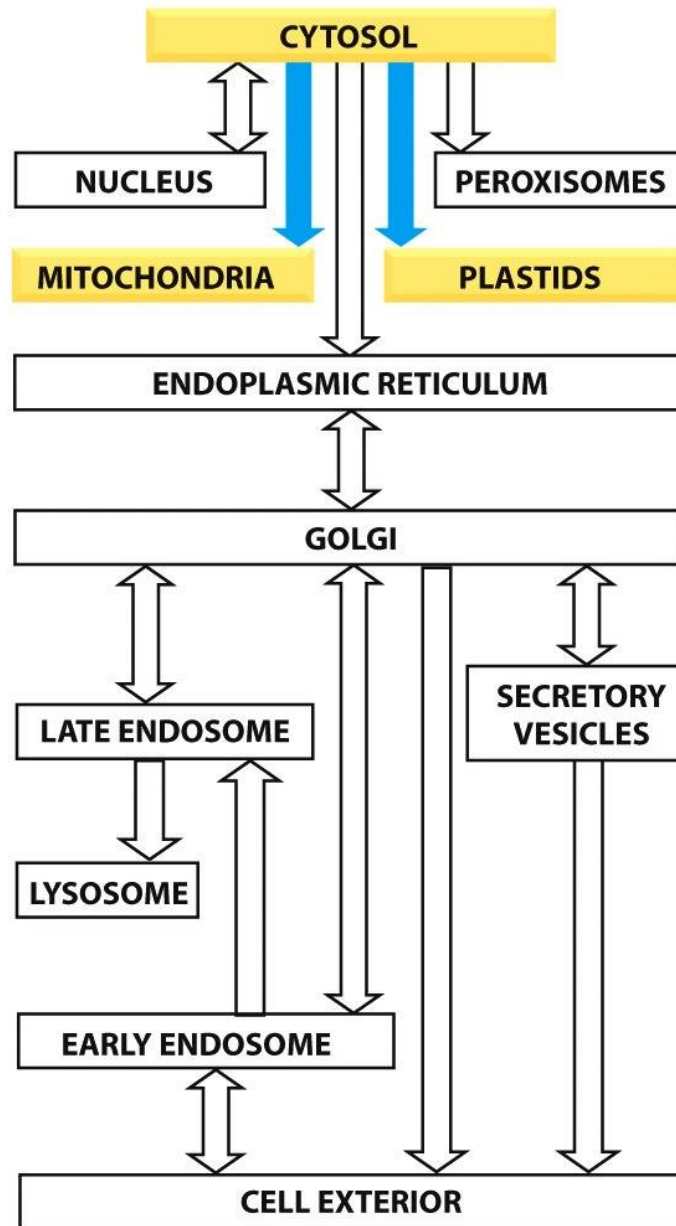
carico portato nel nucleo

3. Il complesso recettore-RanGTP si sposta nel citosol, secondo gradiente di concentrazione.

Esportazione nucleare



Il trasporto di proteine nei mitocondri



Trasporto di proteine nel mitocondrio

Una proteina viene trasportata nel mitocondrio subito dopo la sua sintesi nel citoplasma: **trasporto post-traduzionale**.

Ci sono **sequenze segnale** specifiche per direzionare una proteina nel sottocompartimento mitocondriale opportuno:

- **matrice mitocondriale** → **seq. N-terminale** rimossa da una peptidasi del segnale dopo l'importazione

FUNCTION OF SIGNAL SEQUENCE	EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE
Import into mitochondria	^+H_3N -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-

- **membrana esterna, membrana interna e spazio intermembrana** → **seq. interna** non rimossa.

Trasporto di proteine nel mitocondrio

È mediato da complessi proteici multisubunità che funzionano da traslocatori di proteine: contengono il recettore per la proteina cargo e i componenti del canale di traslocazione.

I complessi TOM e SAM si trovano sulla membrana esterna.

I complessi TIM (TIM22 e TIM23) e il complesso OXA si trovano sulla membrana interna.

Trasporto di proteine nel mitocondrio

Complesso TOM: trasferisce proteine attraverso la membrana esterna

COMPLESSO TOM

COMPLESSO SAM

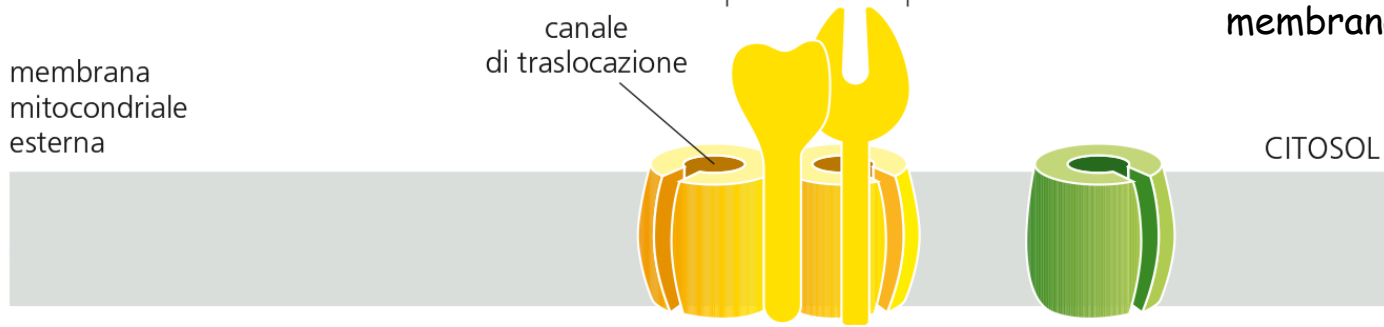
Complesso SAM: aiuta le proteine a ripiegarsi correttamente nella membrana esterna

membrana mitocondriale esterna

canale di traslocazione

recettori

CITOSOL



membrana mitocondriale interna

SPAZIO INTERMEMBRANA

ATPasi di importazione

SPAZIO DELLA MATRICE

COMPLESSO TIM22

COMPLESSO TIM23

COMPLESSO OXA

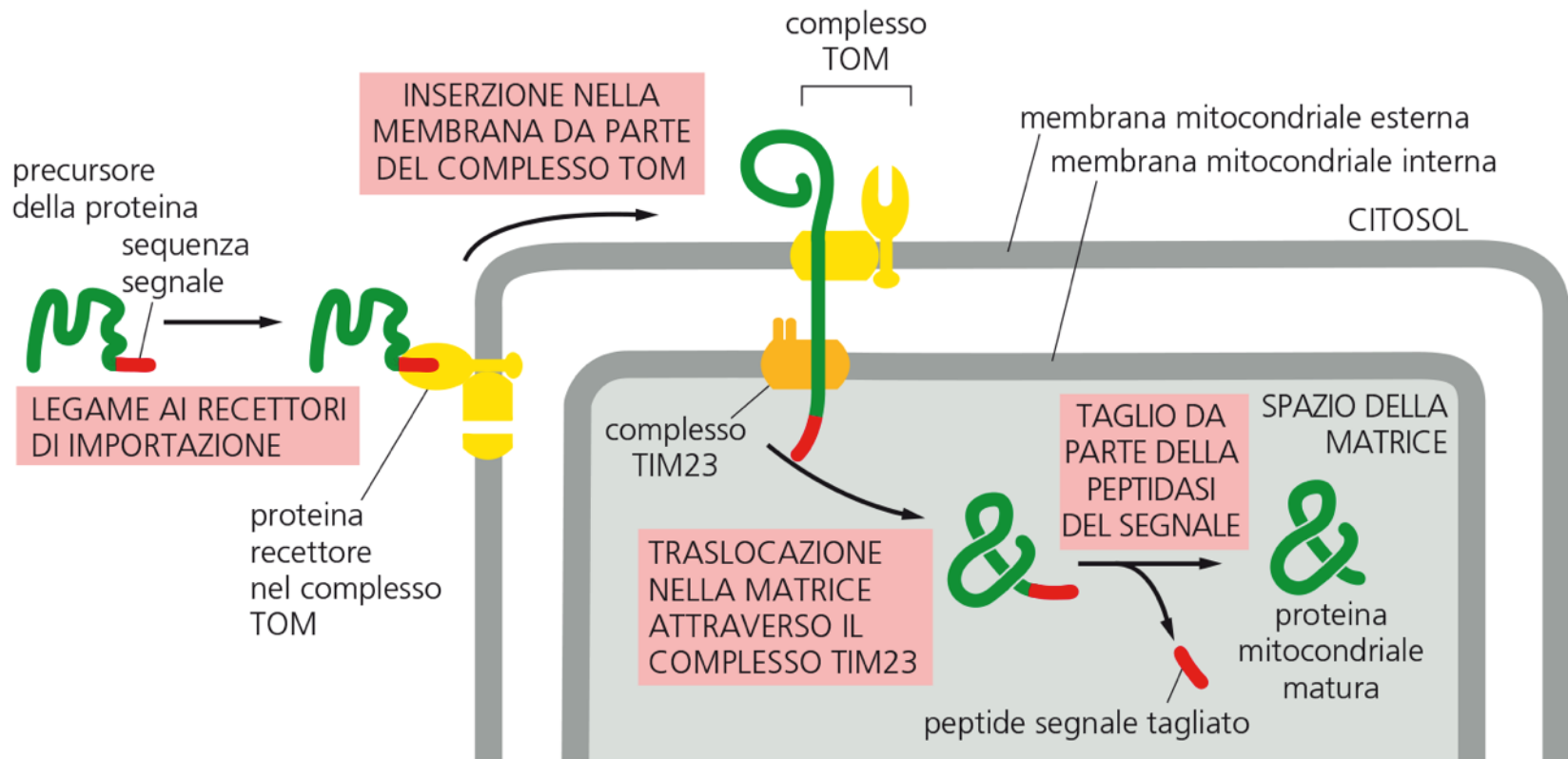
Complessi TIM: trasferiscono proteine attraverso la membrana interna

Complesso OXA: media l'inserzione di proteine nella membrana interna (proteine provenienti dal citosol o dalla matrice)



1. Traslocazione delle proteine nella matrice mitocondriale

È mediata da **TOM** e da **TIM23**. Le proteine dopo la sintesi nel citosol non acquisiscono la conformazione nativa, ma traslocano attraverso le membrane mitocondriali nello stato non ripiegato. Questa conformazione "svolta" viene mantenuta dal legame nel citosol e nel mitocondrio con **proteine chaperone** (famiglia **Hsp70**). Solo dopo aver raggiunto la corretta collocazione, la proteina acquisisce la conformazione nativa.

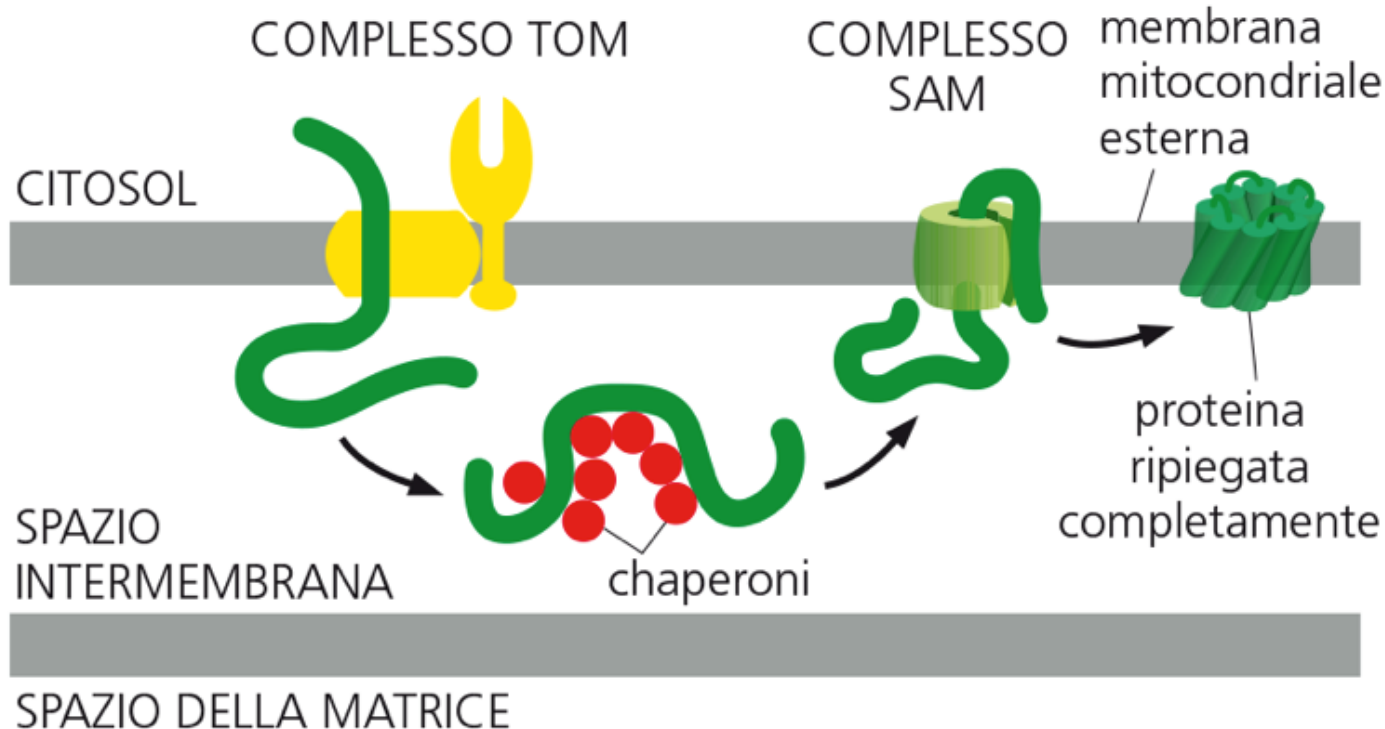


2. Inserzione delle proteine nella membrana mitocondriale esterna

È mediata da **TOM** e da **SAM**: consentono il corretto trasporto e assemblaggio di proteine transmembrana come le **porine**, pori che rendono la membrana mitocondriale esterna liberamente permeabile a ioni inorganici e piccoli metaboliti.

1. Complesso TOM trasporta inizialmente la proteina nello spazio intermembrana, dove la proteina si lega a chaperoni per permanere nel suo stato non avvolto.

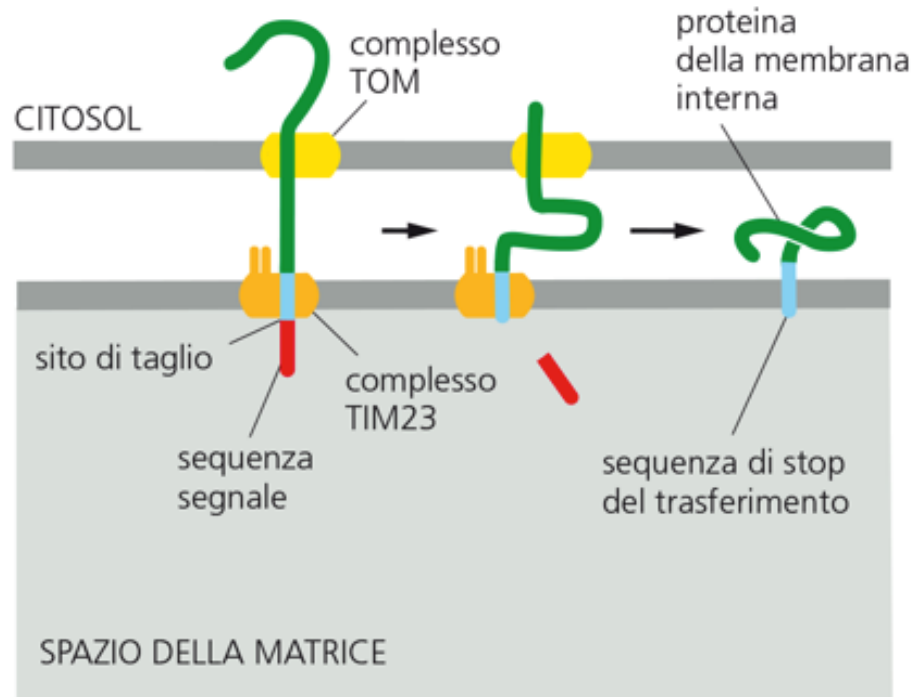
2. Complesso SAM inserisce poi la proteina nella membrana e la aiuta a ripiegarsi correttamente.



3. Inserzione delle proteine nella membrana mitocondriale interna

È mediata dai complessi TOM e TIM23.

- solo la sequenza segnale N-terminale entra nella matrice attraverso TIM23
- una sequenza idrofobica successiva fornisce uno STOP al trasferimento
- TOM tira la proteina nello spazio intermembrana
- la sequenza segnale viene rimossa
- TIM23 rilascia la proteina nella membrana mitocondriale interna



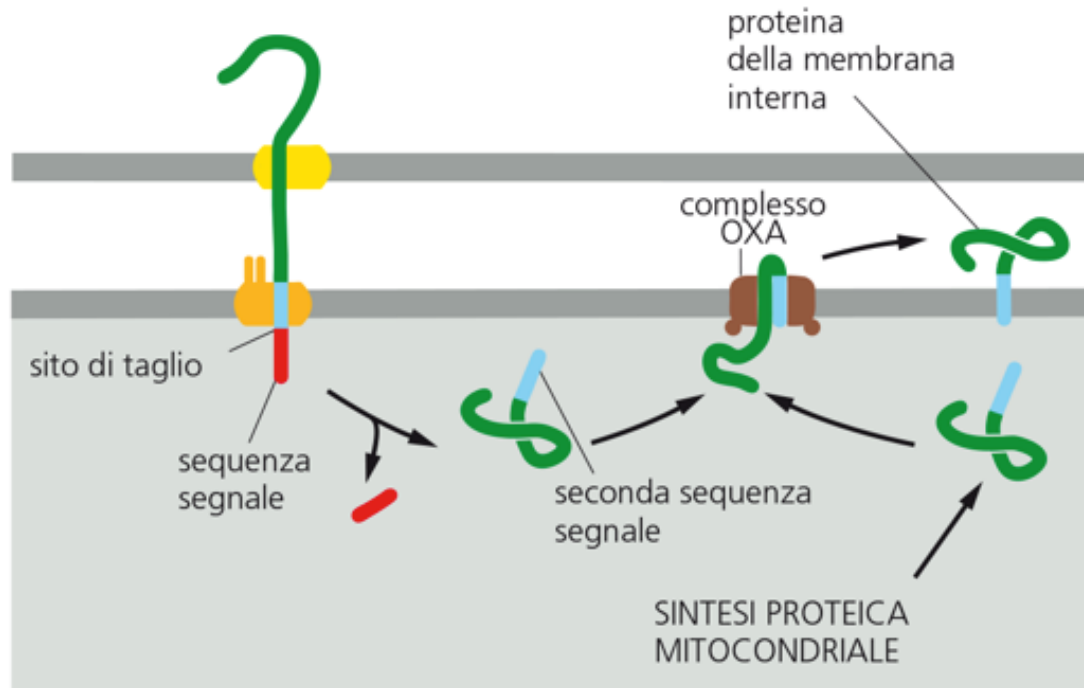
3. Inserzione delle proteine nella membrana mitocondriale interna

È mediata da **TOM**, da **TIM23** e da **OXA**.

-TOM e TIM23 traslocano l'intera proteina nella matrice

- la sequenza segnale viene rimossa dall'N-term, esponendo una seq. idrofobica che funziona da nuovo segnale per l'inserzione nella membr. mitoc. interna.

-OXA riconosce la seq. idrofobica e trasloca la proteina nello spazio intermembrana, lasciandola ancorata alla membrana interna.

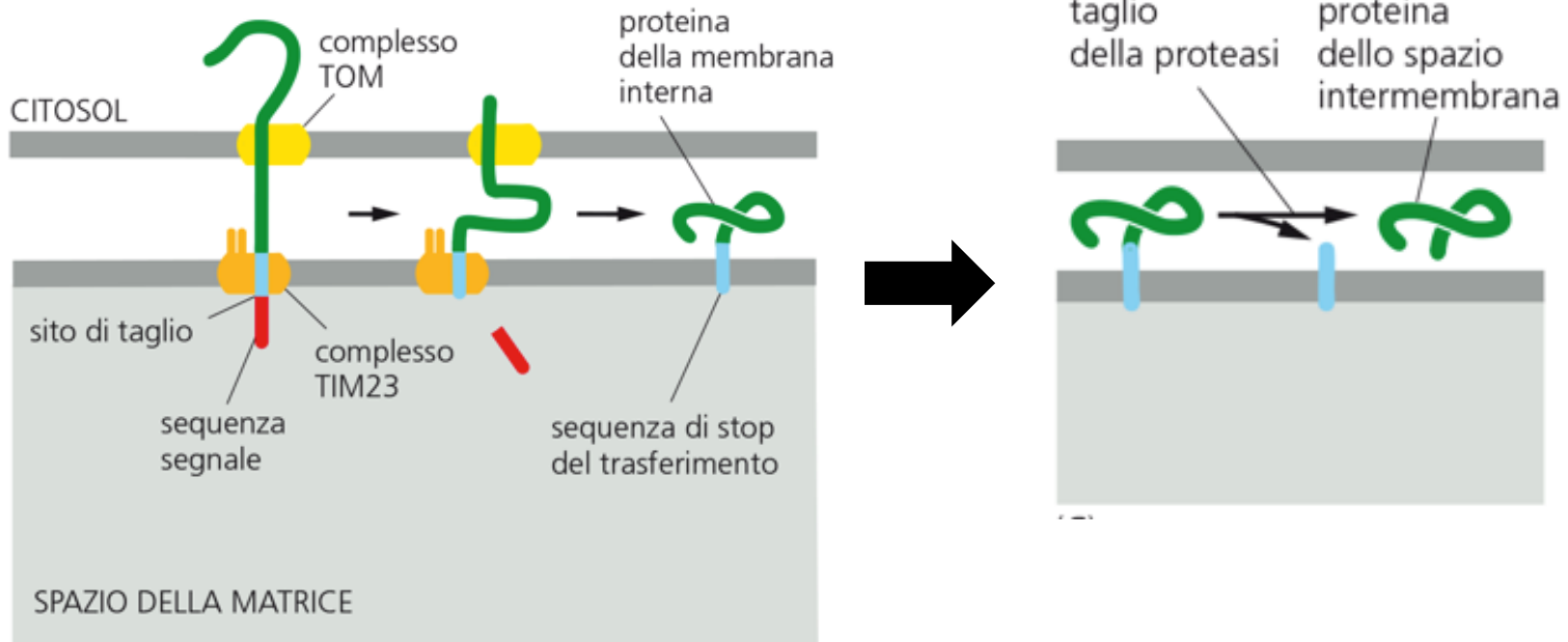


Il complesso OXA serve soprattutto per trasferire alla membrana interna proteine sintetizzate nel mitocondrio.

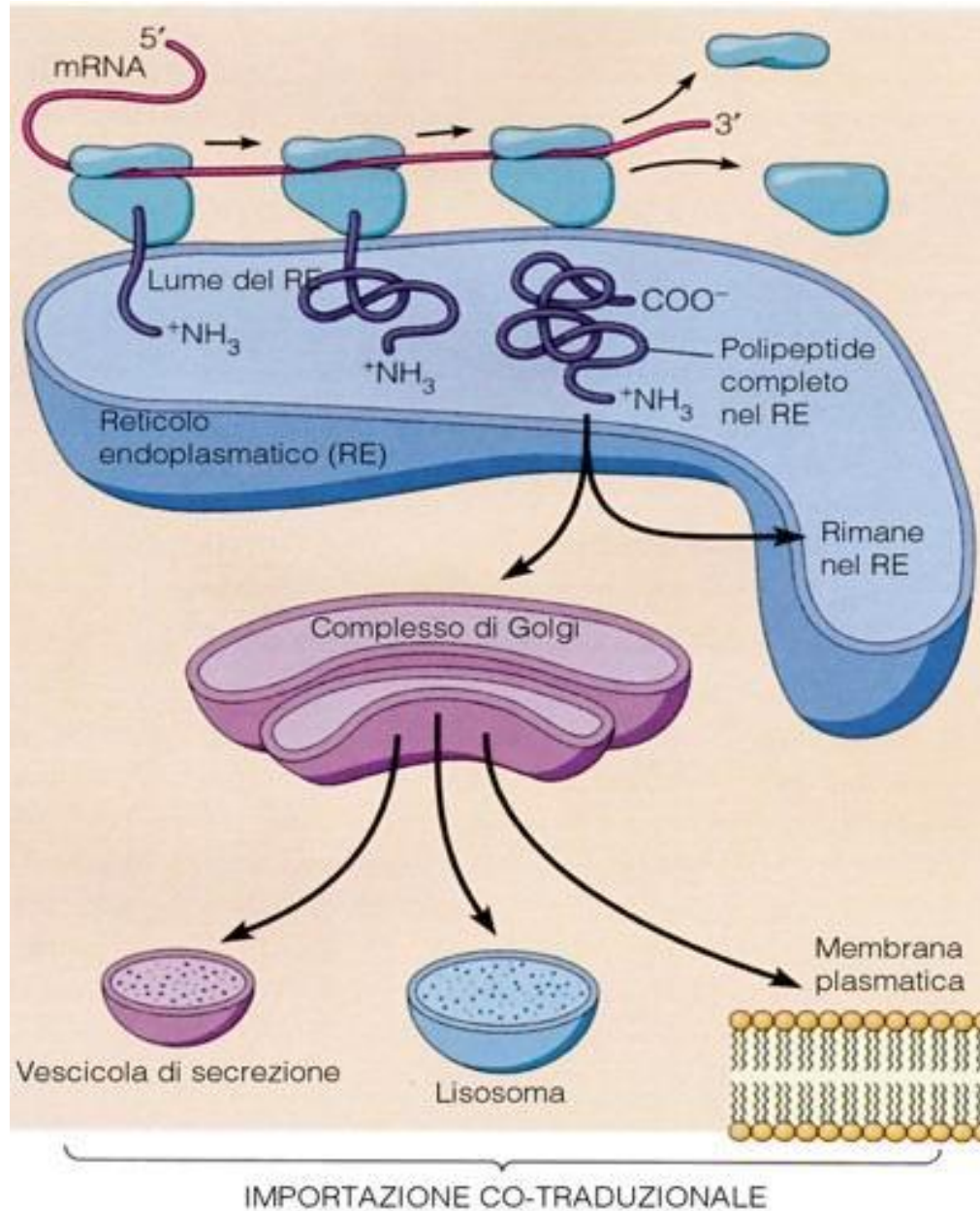
4. Traslocazione delle proteine nello spazio intermembrana

È mediata da **TOM** e da **TIM23**.

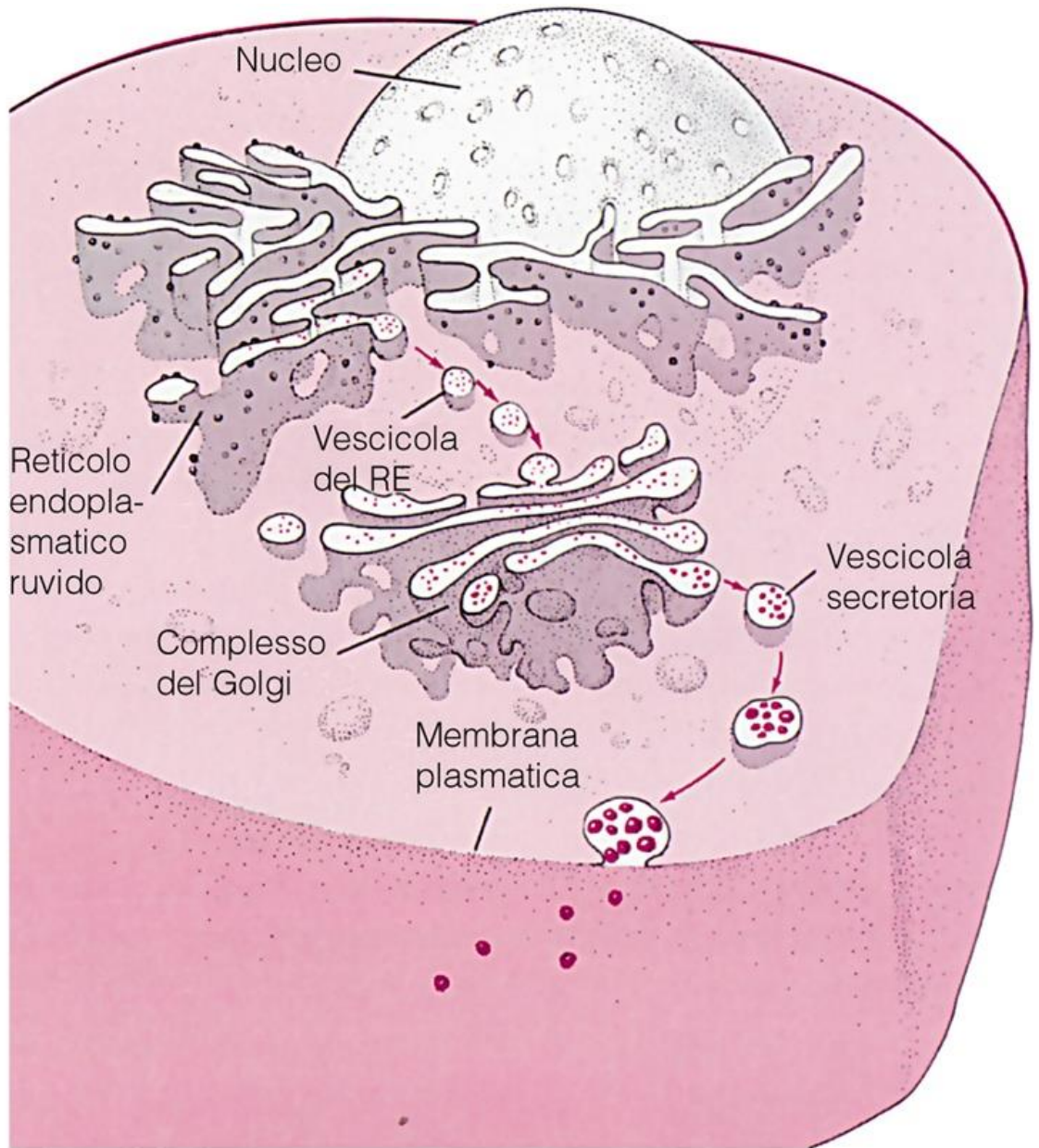
- il trasferimento inizialmente è identico alla prima strategia di inserzione di proteine nella memb. mitoc. interna.
- la sequenza idrofobica viene però tagliata e la proteina viene rilasciata nello spazio intermembrana.



La via secretoria o vescicolare delle proteine



Nella cellula eucariotica c'è un sistema intracellulare di membrane strettamente in connessione fra loro



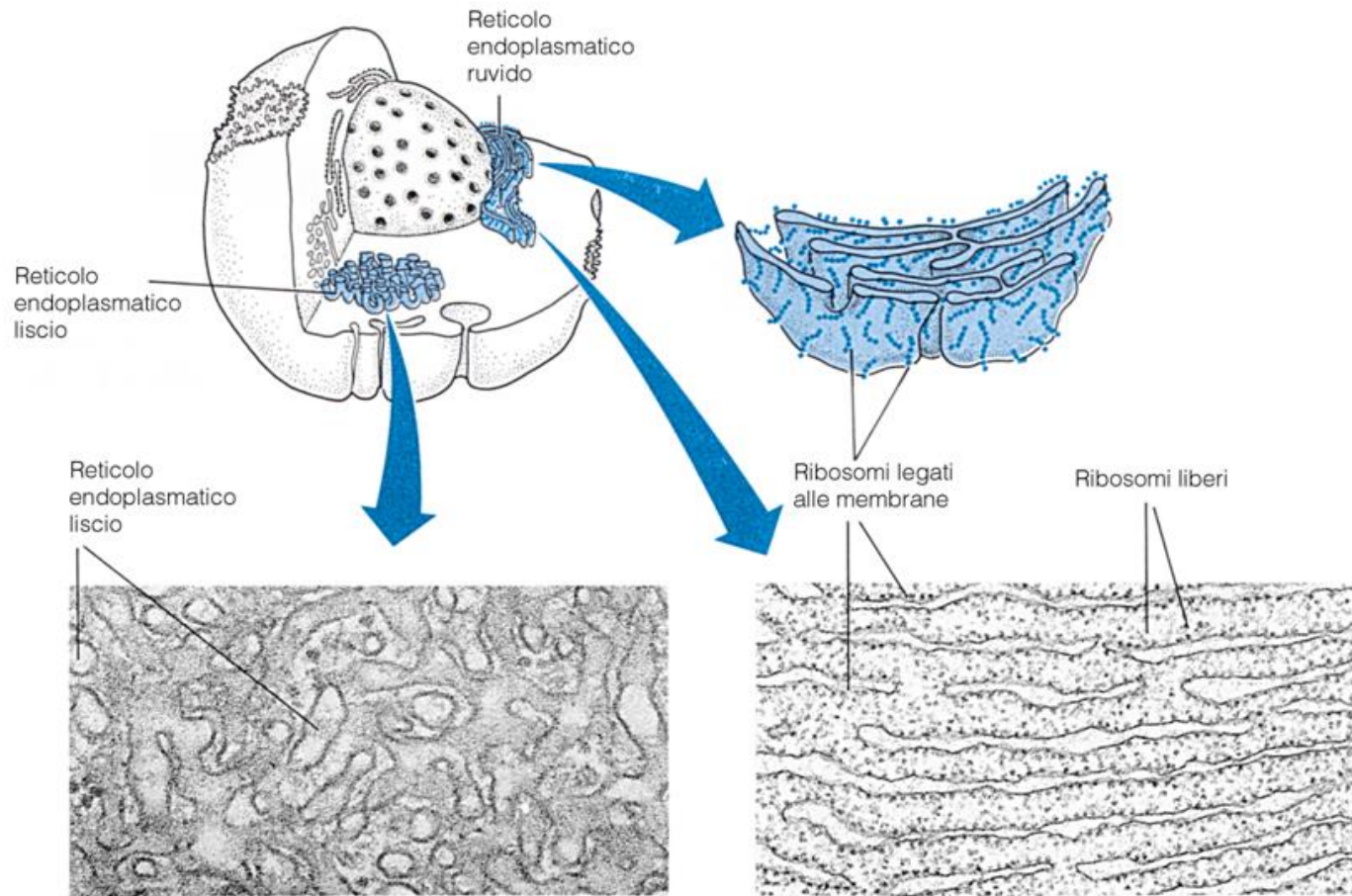
- Reticolo endoplasmatico
- Apparato di Golgi
- Membrana plasmatica

Il reticolo endoplasmatico (ER)

E' un insieme di membrane all'interno del citoplasma in cui si ritrovano vari tipi di strutture come tubuli, vescicole, cisterne, piccoli canali. Ogni struttura presenta al suo interno uno spazio che costituisce il **lume** della struttura.

Si distinguono:

- il reticolo endoplasmatico liscio (E.R. liscio)
- il reticolo endoplasmatico rugoso (E.R. rugoso)



R.E. liscio: presenta membrane prive di ribosomi

R.E. rugoso: presenta ribosomi legati alle membrane

Funzioni del R. E. liscio:

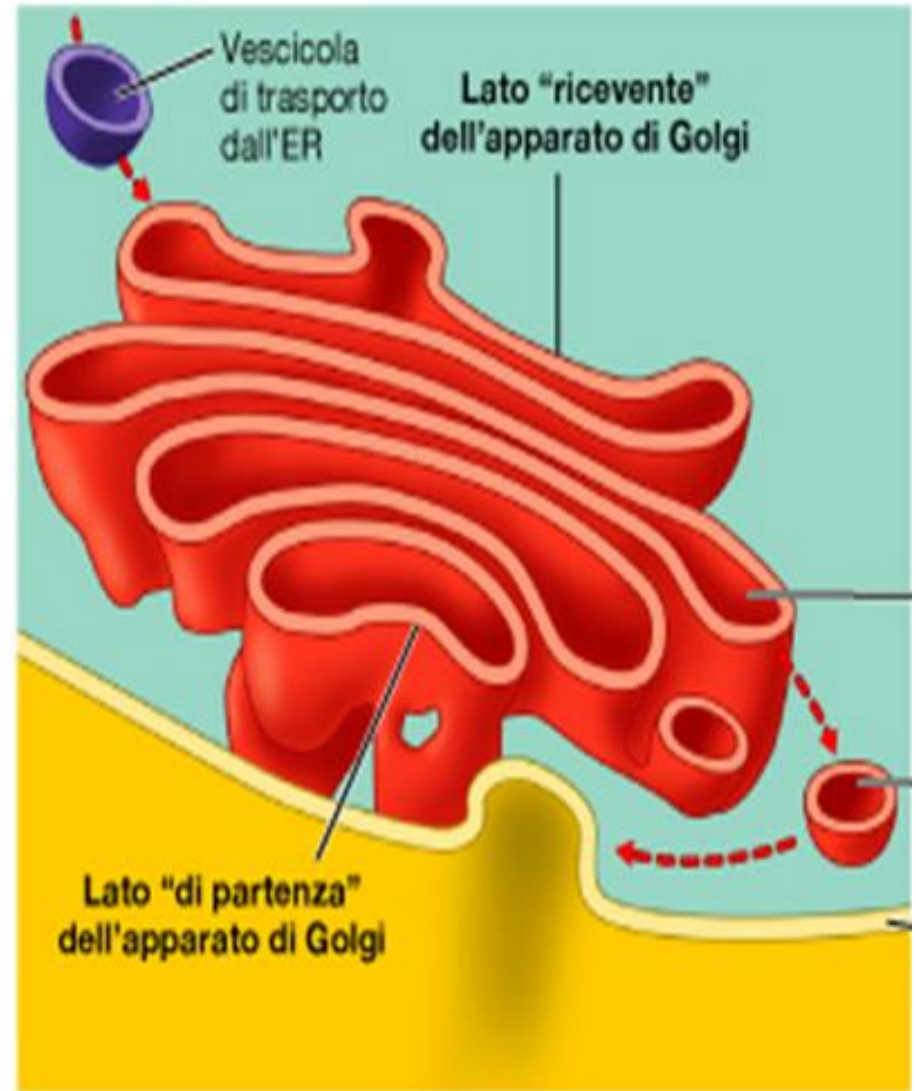
- sintesi di lipidi (trigliceridi e fosfolipidi)
- detossificazione da sostanze estranee (farmaci) (avviene nel fegato): avvengono reazioni di idrossilazione che rendono la molecola piu' solubile in acqua e piu' facilmente trasportabile al rene per l'escrezione
- viene sequestrato il Ca^{2+} dal citoplasma e viene rilasciato in seguito a stimoli extracellulari (per esempio nel muscolo scheletrico)

Funzioni del R. E. rugoso:

- sintesi delle proteine destinate alla membrana plasmatica, ai lisosomi e alla secrezione. Le proteine sintetizzate vanno incontro a modificazioni post-traduzionali:
- **N-glicosilazione**: aggiunta di zuccheri all'estremità N-terminale delle proteine
- **modifiche per assumere la loro conformazione definitiva**

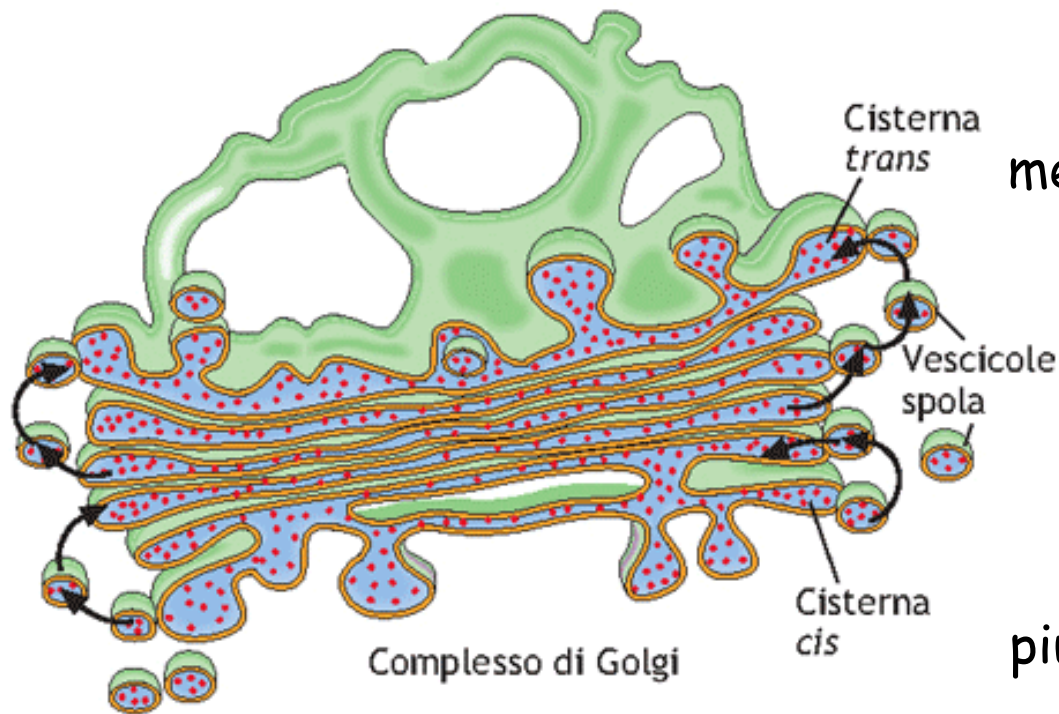
Il reticolo endoplasmatico è collegato all'apparato del Golgi

Le proteine di secrezione si allontanano dal reticolo endoplasmatico attraverso vescicole membranose definite **vescicole di trasporto** che raggiungono l'apparato del Golgi



Il complesso del Golgi

E' formato da una serie di compartimenti membranosi impilati che formano una pila ricurva e sono circondati da vescicole e tubuli.

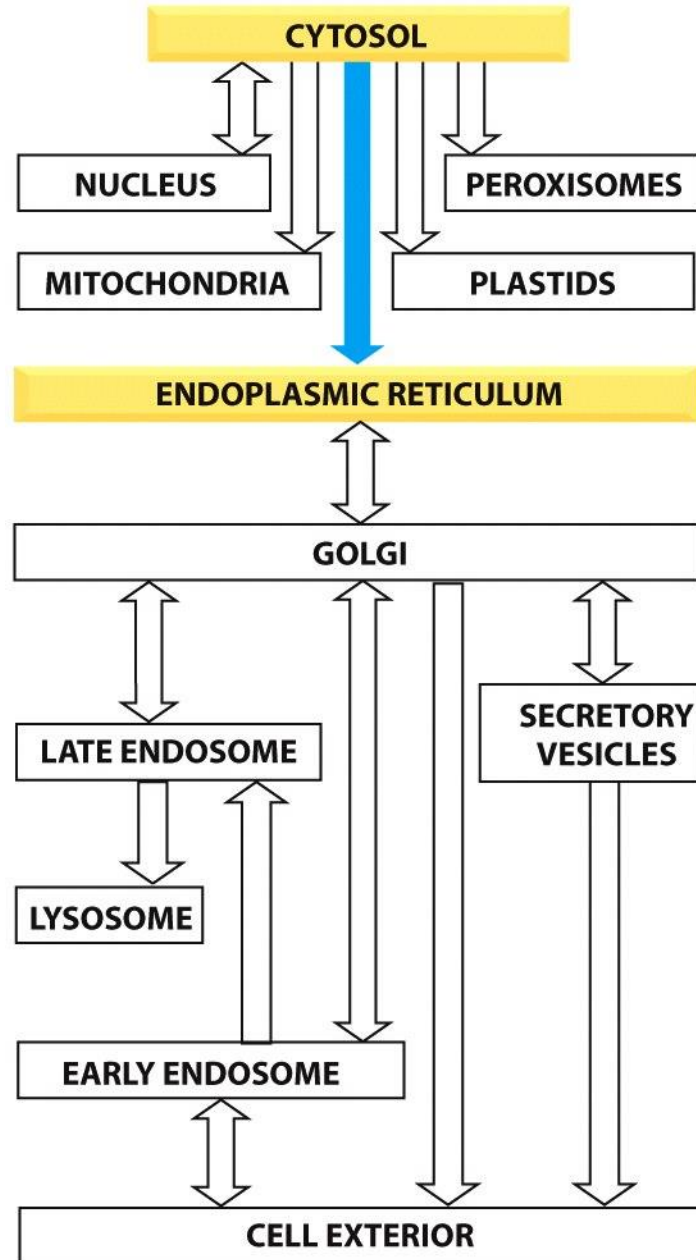


area trans:
piu' vicina alla
membrana plasmatica

area cis:
piu' vicina al nucleo

■ **Figura 2.81** Le vescicole spola nell'apparato del Golgi effettuano il trasporto del materiale da una cisterna all'altra del sistema del Golgi attraverso un percorso dalla faccia *cis* alla faccia *trans*.

Il trasporto di proteine nel reticolo endoplasmatico



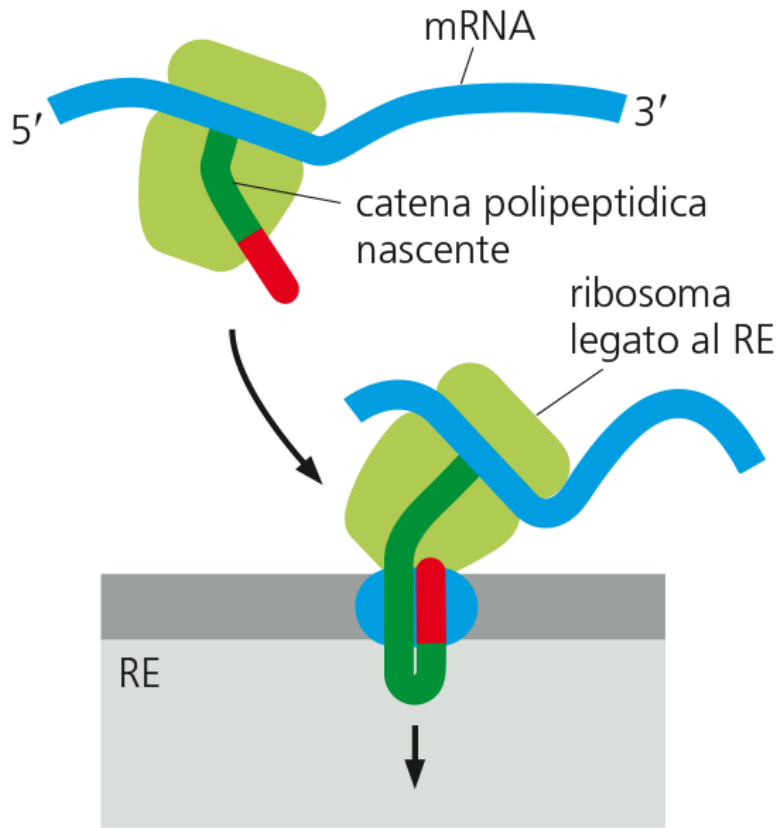
Importazione di proteine nel reticolo endoplasmatico

Le proteine importate nel reticolo endoplasmatico sono di 2 tipi:

-**proteine transmembrana** → sono inserite nella membrana del RE

-**proteine solubili** → traslocate completamente attraverso la membrana dell'RE e rilasciate nel lume

Indipendentemente dal destino (proteine transmembrana o solubili), tutte le proteine che devono essere importate nell'RE hanno una **sequenza segnale** che dà il via all'importazione: **peptide leader N-terminale** con seq. ricca di AA idrofobici. Prima del completamento dell'importazione il leader è tagliato e rimosso da una **peptidasi del segnale**.



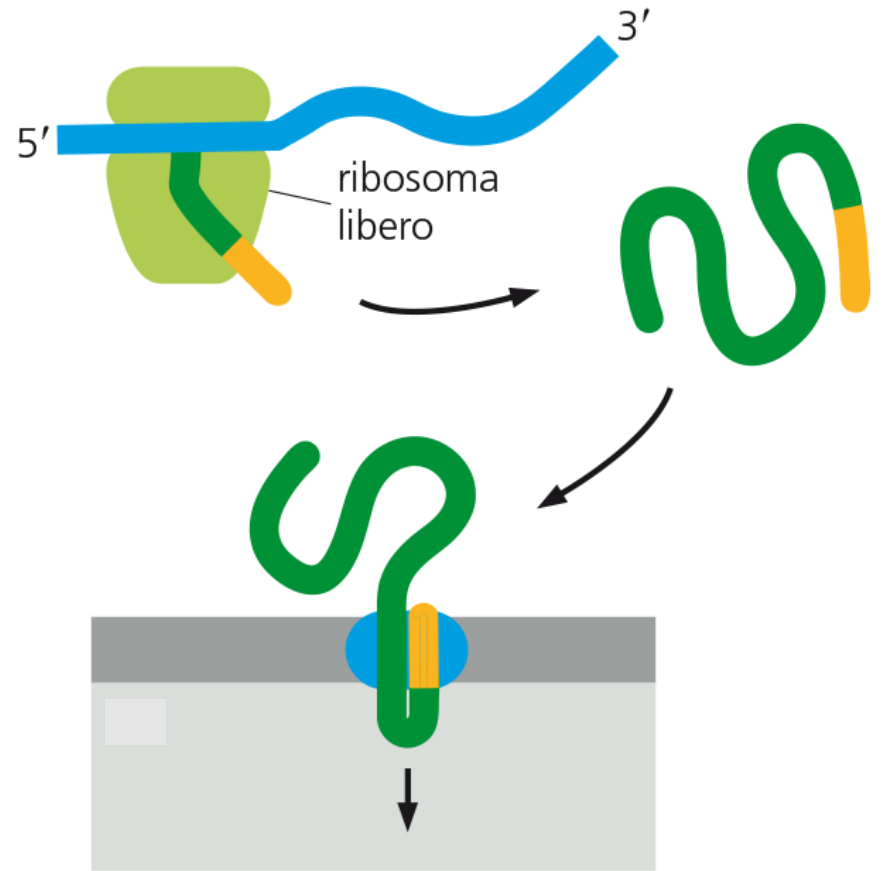
(A)

TRASLOCAZIONE
COTRADUZIONALE

Reticolo endoplasmatico



via secretoria



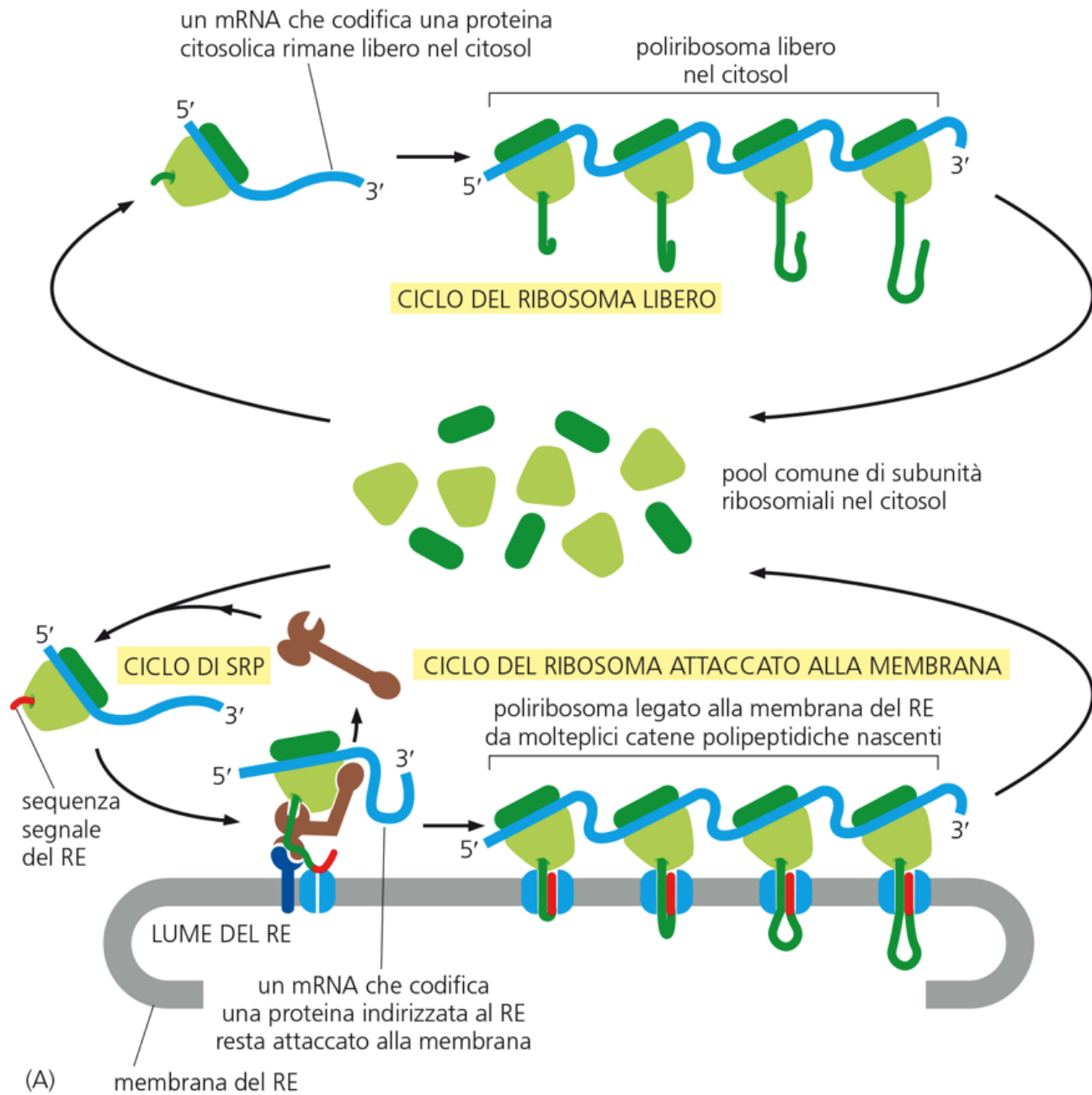
(B)

TRASLOCAZIONE
POST-TRADUZIONALE

Nucleo, mitocondri



via citoplasmatica



un mRNA che codifica una proteina citosolica rimane libero nel citosol

poliribosoma libero nel citosol

CICLO DEL RIBOSOMA LIBERO

pool comune di subunità ribosomiali nel citosol

CICLO DI SRP

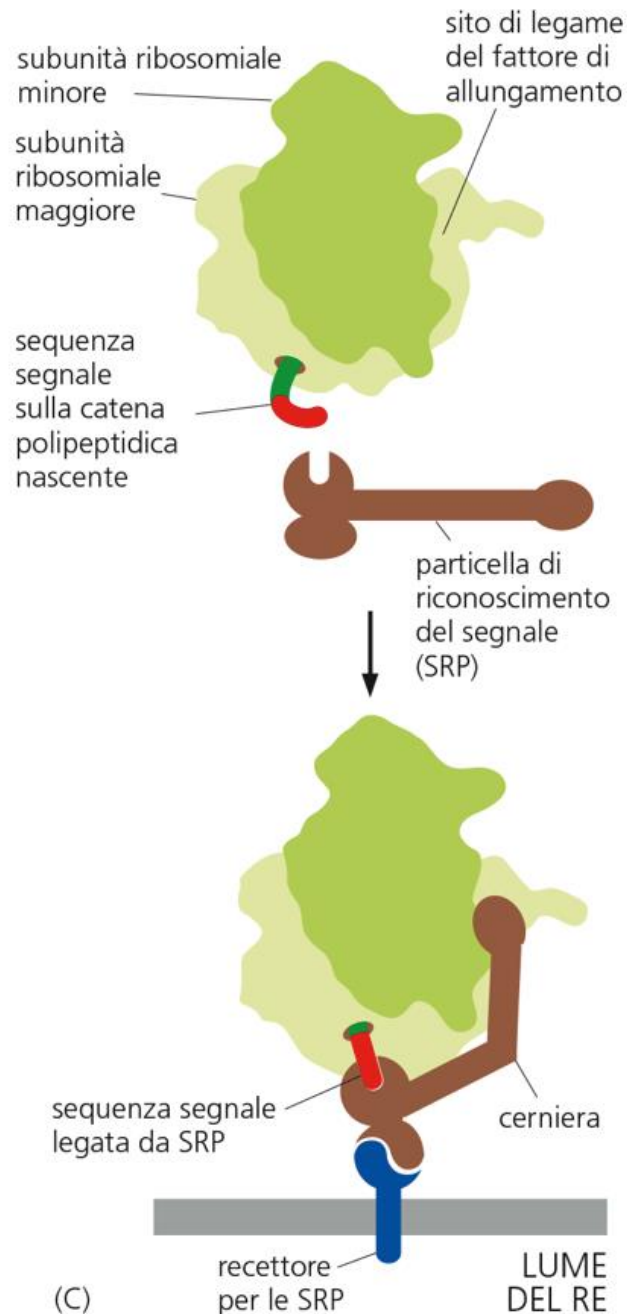
CICLO DEL RIBOSOMA ATTACCATO ALLA MEMBRANA

poliribosoma legato alla membrana del RE da molteplici catene polipeptidiche nascenti

LUME DEL RE

un mRNA che codifica una proteina indirizzata al RE resta attaccato alla membrana

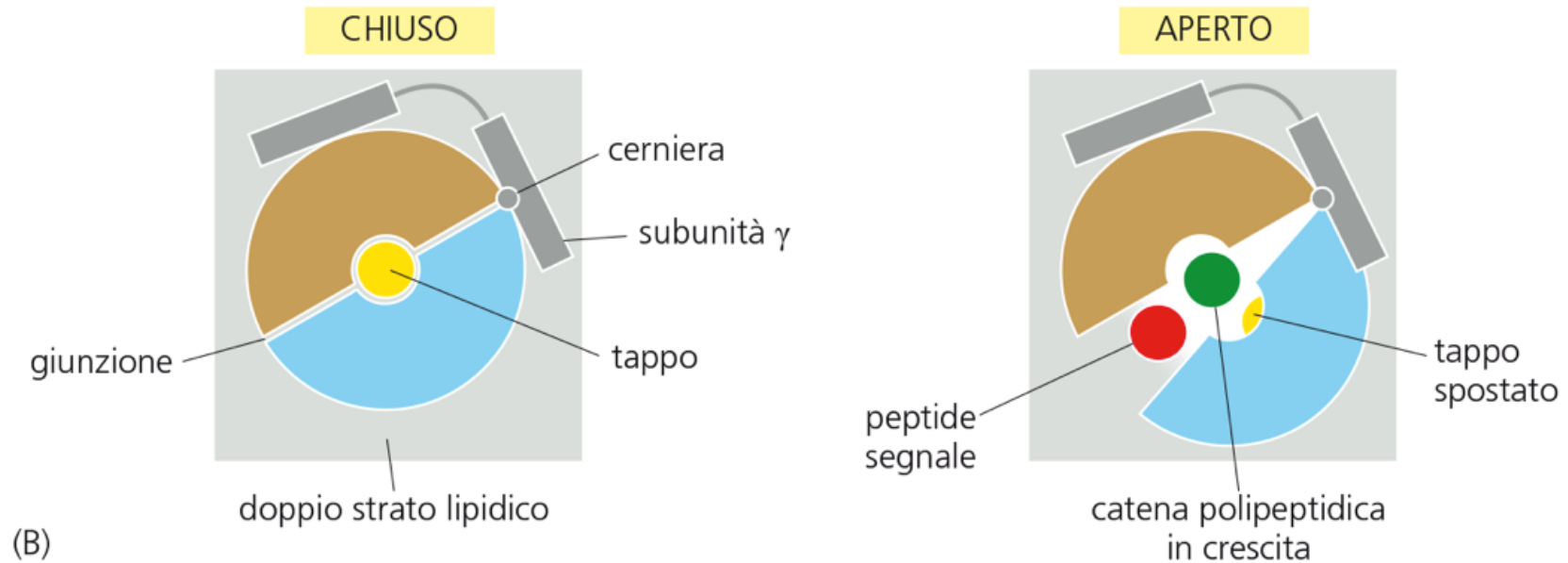
(A) membrana del RE



1. Una particella di riconoscimento del segnale (SRP) si lega alla sequenza segnale presente sul polipeptide in accrescimento.

2. Il legame tra la sequenza segnale e SRP provoca un cambiamento conformazionale di SRP esponendo un sito di legame per il recettore di SRP localizzato sulla membrane del RE

Le proteine vengono inserite nel RE passando attraverso un **traslocatore** avente una parte centrale definita **complesso Sec61**

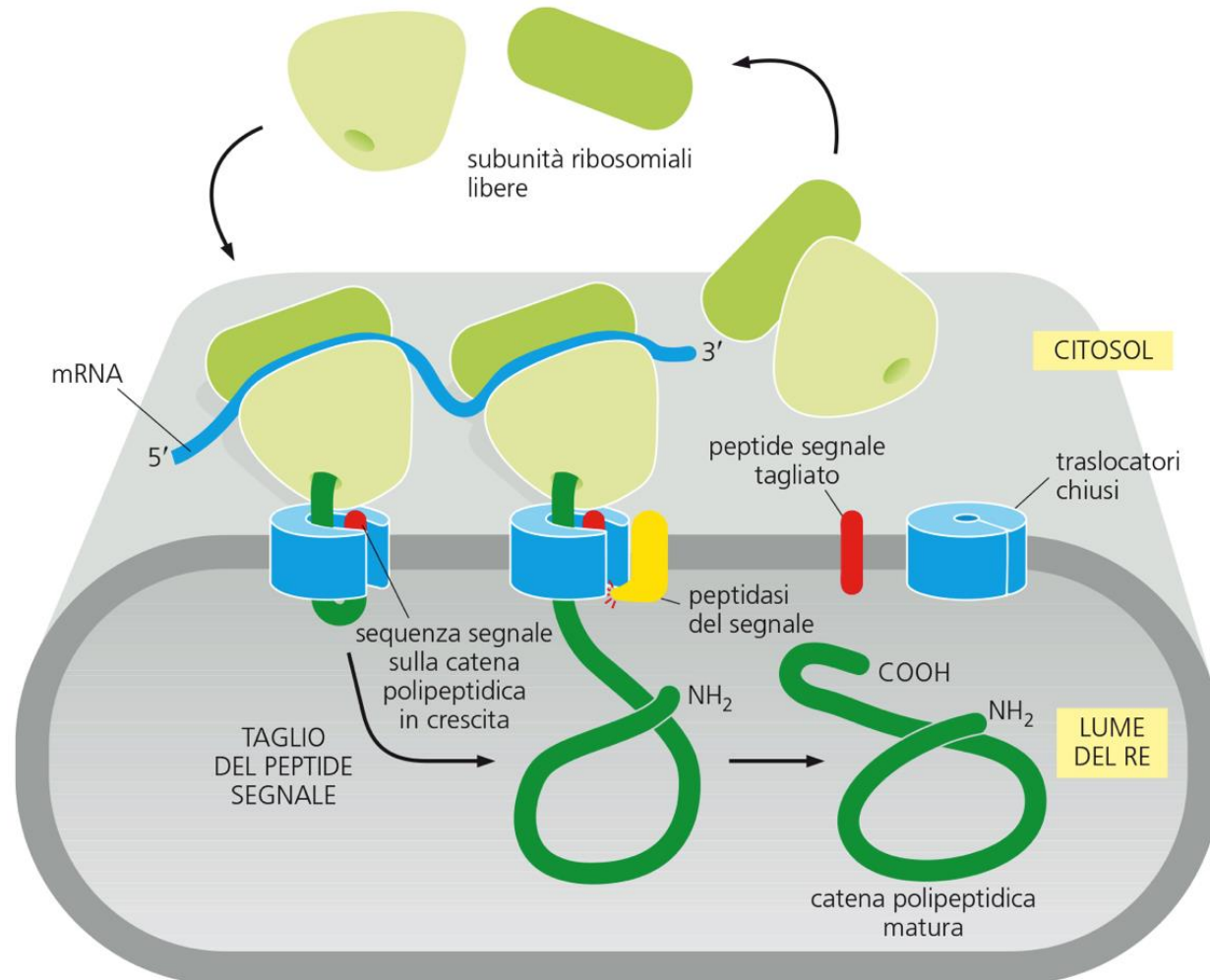


Il poro viene mantenuto chiuso da un elica detta **tappo** che si apre solo quando la sequenza segnale si lega al poro.

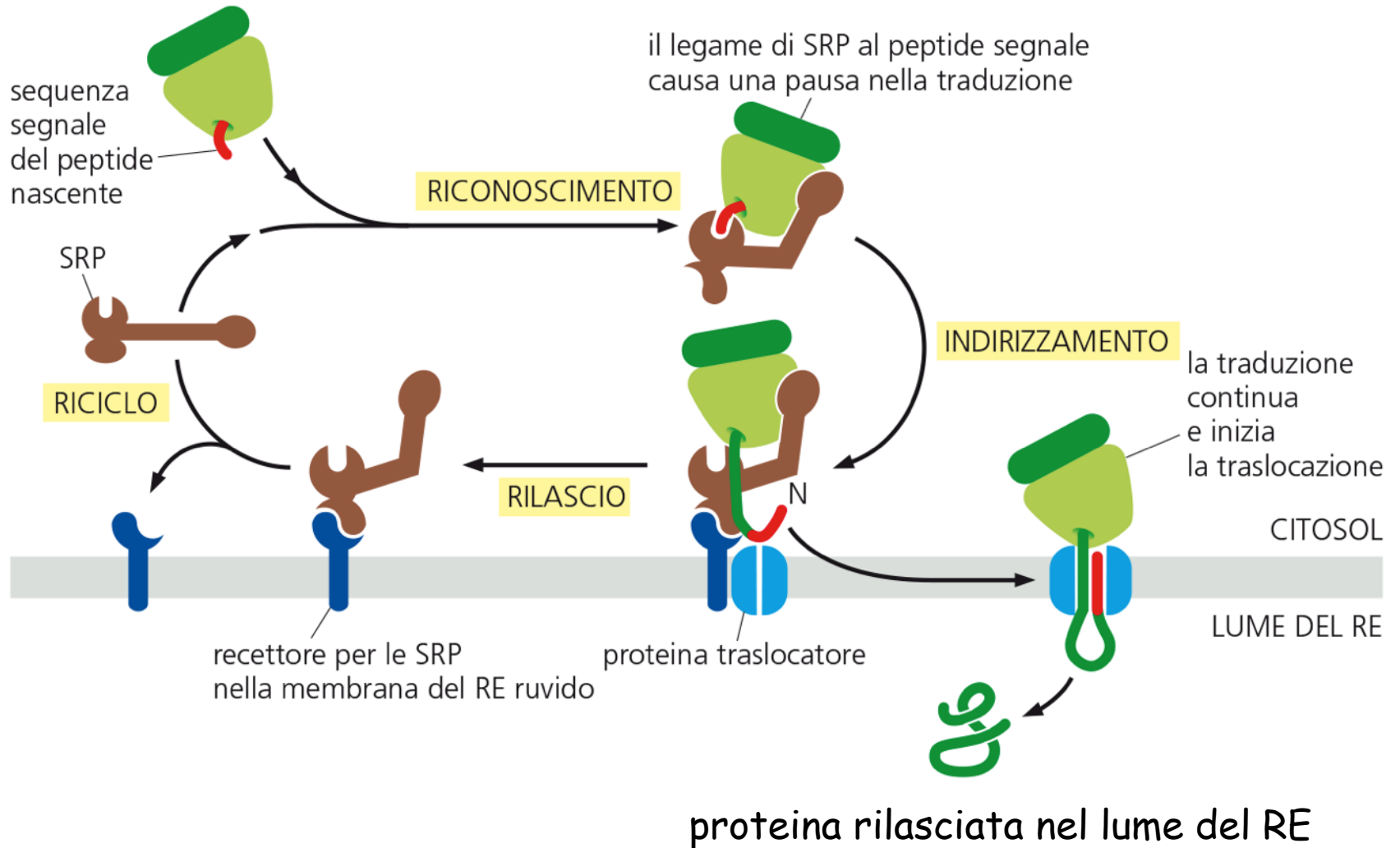
Il poro può aprirsi sia **centralmente** (permettendo il passaggio di una proteina solubile nel lume dell'ER) che **lateralmente** (essenziale per la localizzazione di proteine transmembrana sulla membrana dell'ER)

La sequenza segnale, appena viene sintetizzata, dirige il ribosoma a livello di un trasportatore sulla membrana dell'ER: solo a questo punto il traslocatore si apre.

Dopo che la proteina è completamente sintetizzata e rilasciata nel lume, il traslocatore si chiude.



Meccanismo con cui la sequenza segnale del RE e la SRP dirigono i ribosomi alla membrana del RE

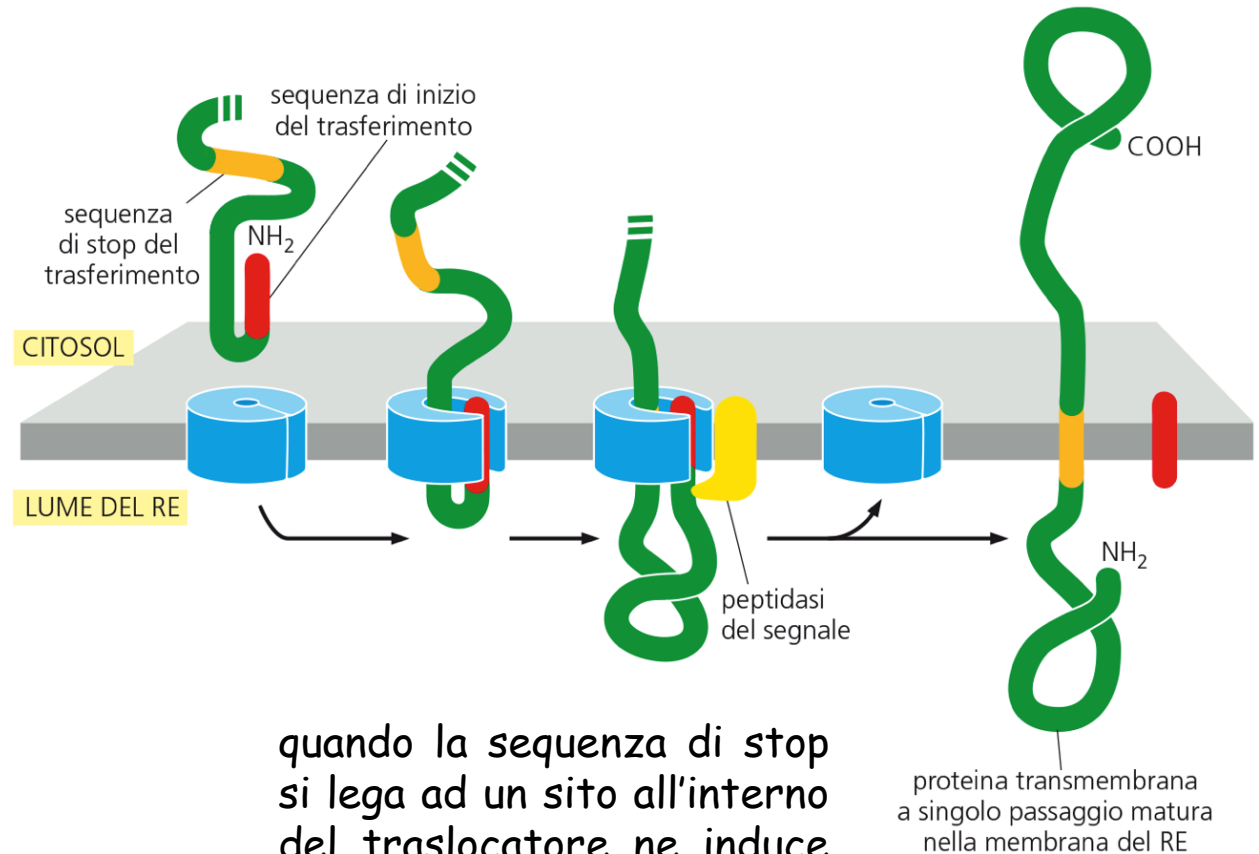


Inserzione di proteine nella membrana del RE

La proteina non deve essere rilasciata nel lume ma rimanere associata alla membrana del RE.

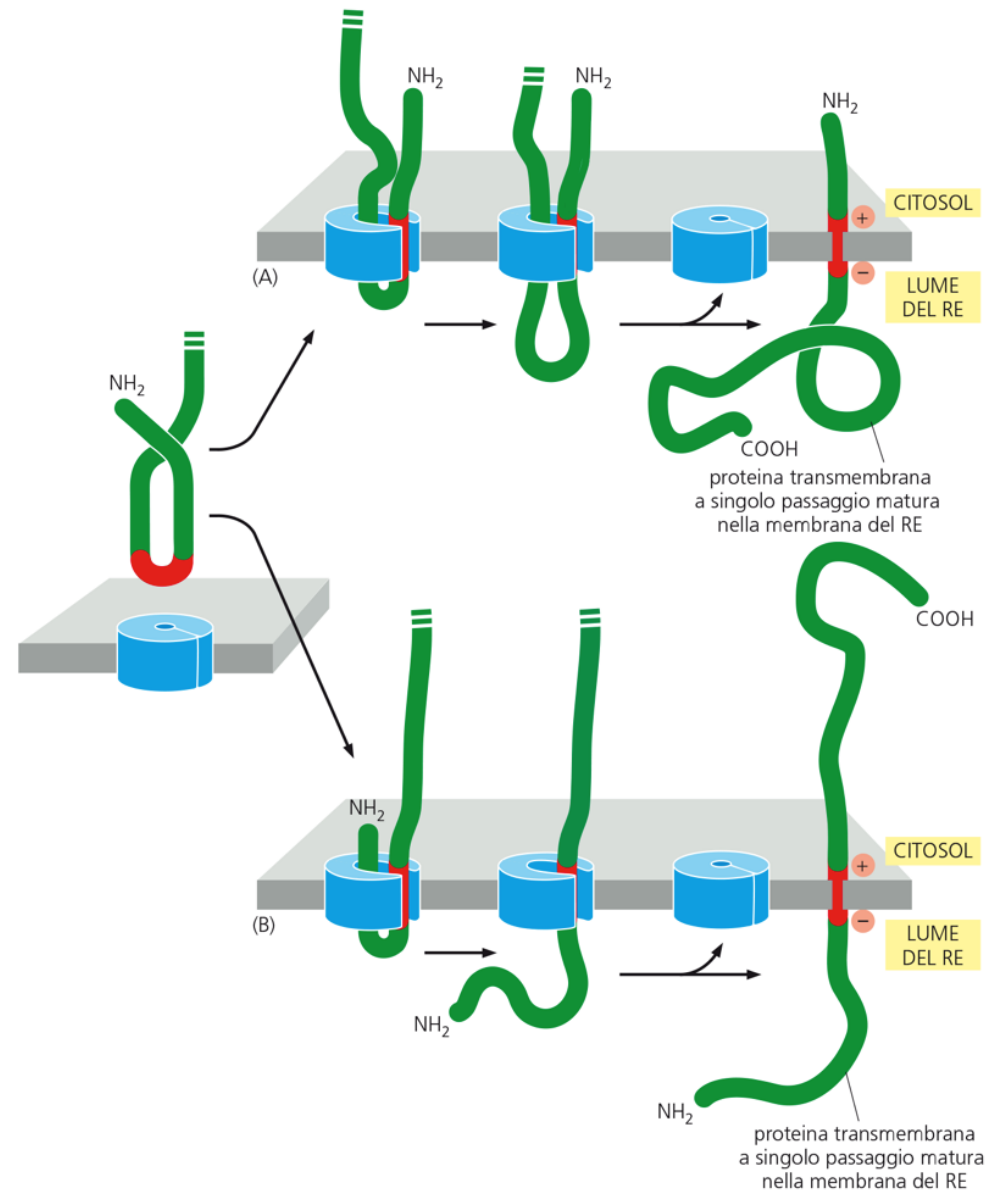
Proteine transmembrana a singolo passo: I° meccanismo

La sequenza segnale è all'**N-terminale** della proteina. Una seq. idrofobica successiva ferma il processo di traslocazione (segnale di stop del trasferimento) e ancora la proteina sulla membrana.



Proteine transmembrana a singolo passo: II° meccanismo

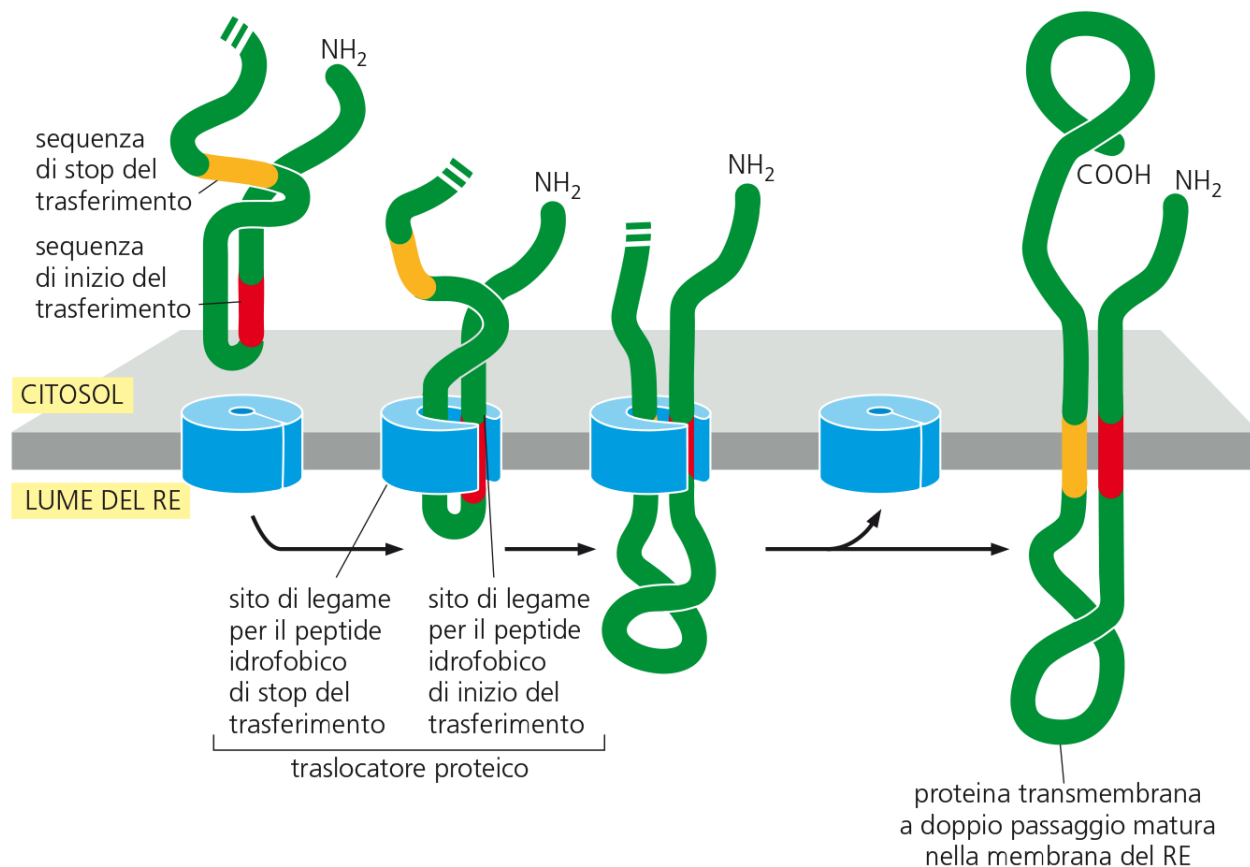
La sequenza segnale è interna alla proteina. Essendo anch'essa idrofobica ancora la proteina sulla membrana. La proteina può inserirsi con 2 direzionalità diverse.



Inserzione di proteine nella membrana dell'ER

Proteine transmembrana a doppio passo

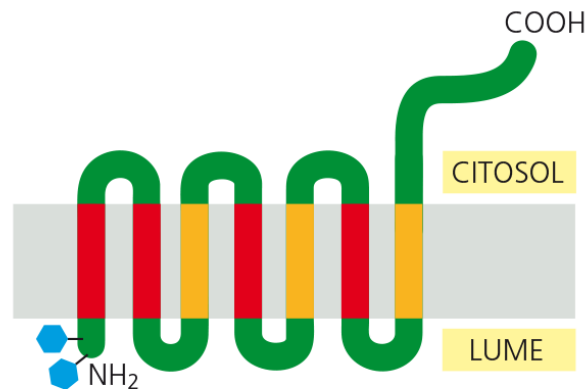
La sequenza segnale è interna alla proteina. Essendo anch'essa idrofobica ancora la proteina sulla membrana. Dopo la seq. segnale c'è una seq. idrofobica di stop del trasferimento che rilascia la proteina dal traslocatore.



Inserzione di proteine nella membrana dell'ER

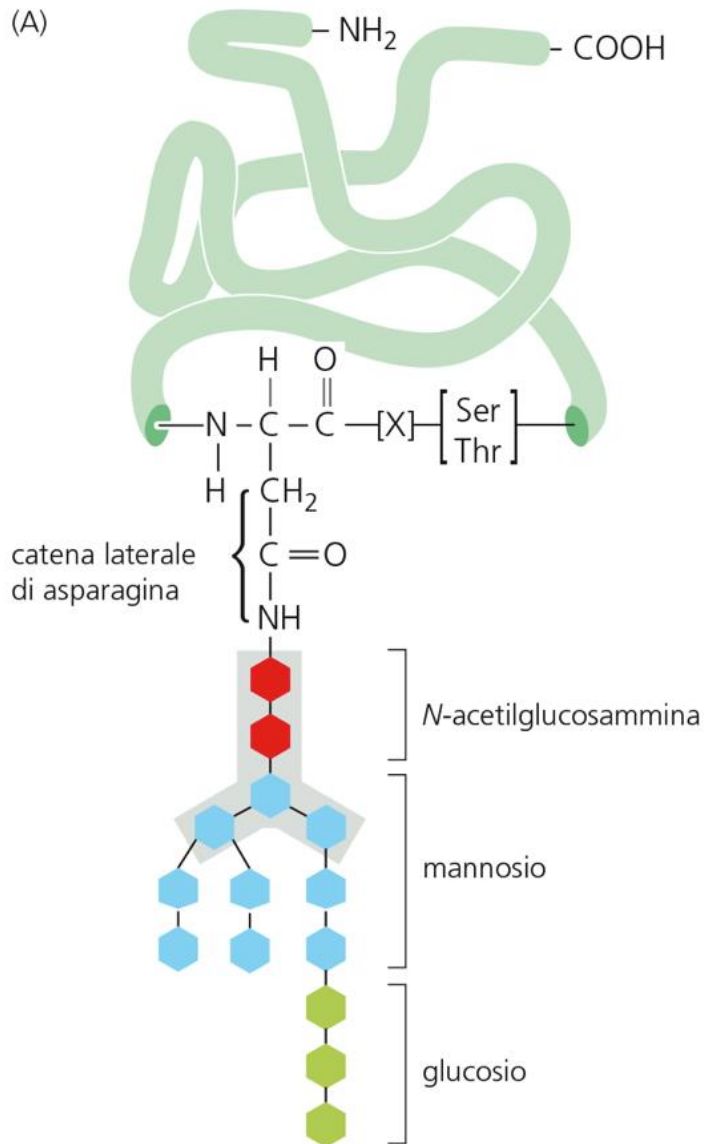
Proteine transmembrana a passo multiplo

Ci sono più seq. segnale (**inizio trasferimento**) e seq. idrofobiche (**stop del trasferimento**) **interne** alla proteina. Questo fa sì che la proteina venga ancorata molteplici volte alla membrana.



La maggior parte delle proteine sintetizzate nel RE sono glicosilate

(A)



La **glicosilazione delle proteine** (aggiunta di una catena oligosaccaridica) è una delle funzioni dell'ER. La maggior parte delle proteine sintetizzate nell'ER sono **glicoproteine**.

N-glicosilazione: avviene nel RE per aggiunta di un oligosaccaride precursore composto da 14 zuccheri ad un residuo di **Asn**. L'oligosaccaride precursore si attacca solo alle Asn appartenenti alle sequenze:

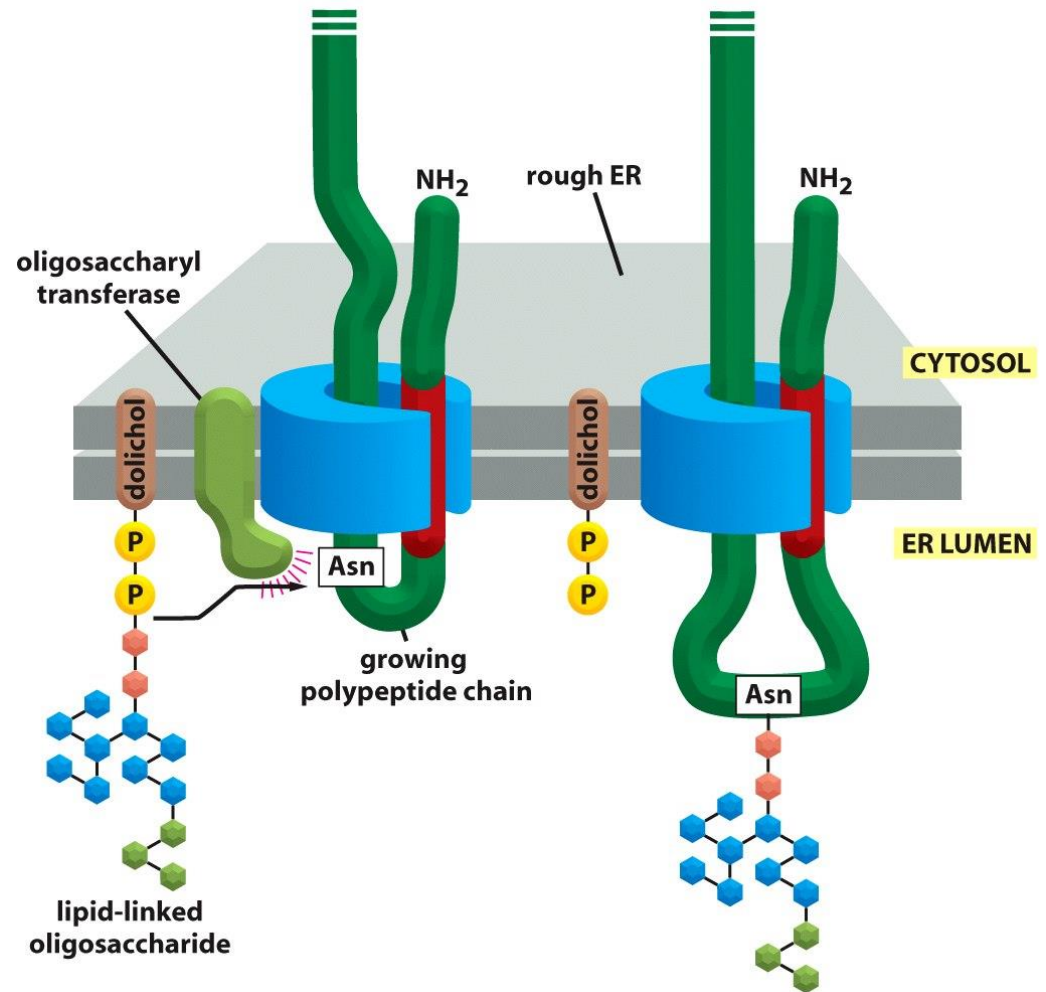
Asn-X-Ser

Asn-X-Thr

N-glicosilazione delle proteine nel RE

L'oligosaccaride precursore viene trasferito su un **Asn** della proteina in crescita, sul lato luminale dell'ER, da una **oligosaccaride transferasi**.

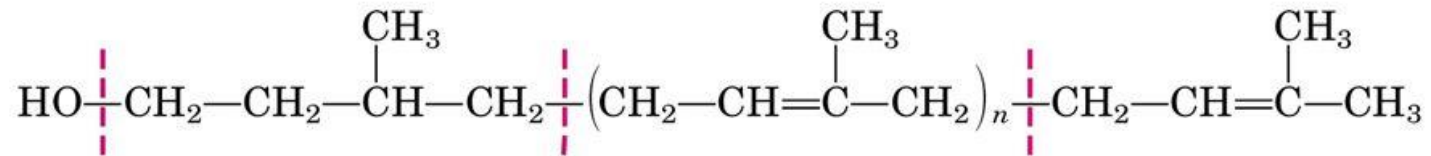
L'oligosaccaride viene formato e mantenuto sulla membrana mediante il legame con una molecola lipidica, il **dolicolo**.
L'oligosaccaride transferasi è associata al traslocatore, così da glicosilare l'Asn della proteina non appena esce dal poro.



N-glicosilazione delle proteine nel RE

L'oligosaccaride precursore è costruito zucchero dopo zucchero sul **dolicolo**, prima di essere trasferito sulla proteina in un'unica tappa.

Dolicolo 17-21 unità isopreniche



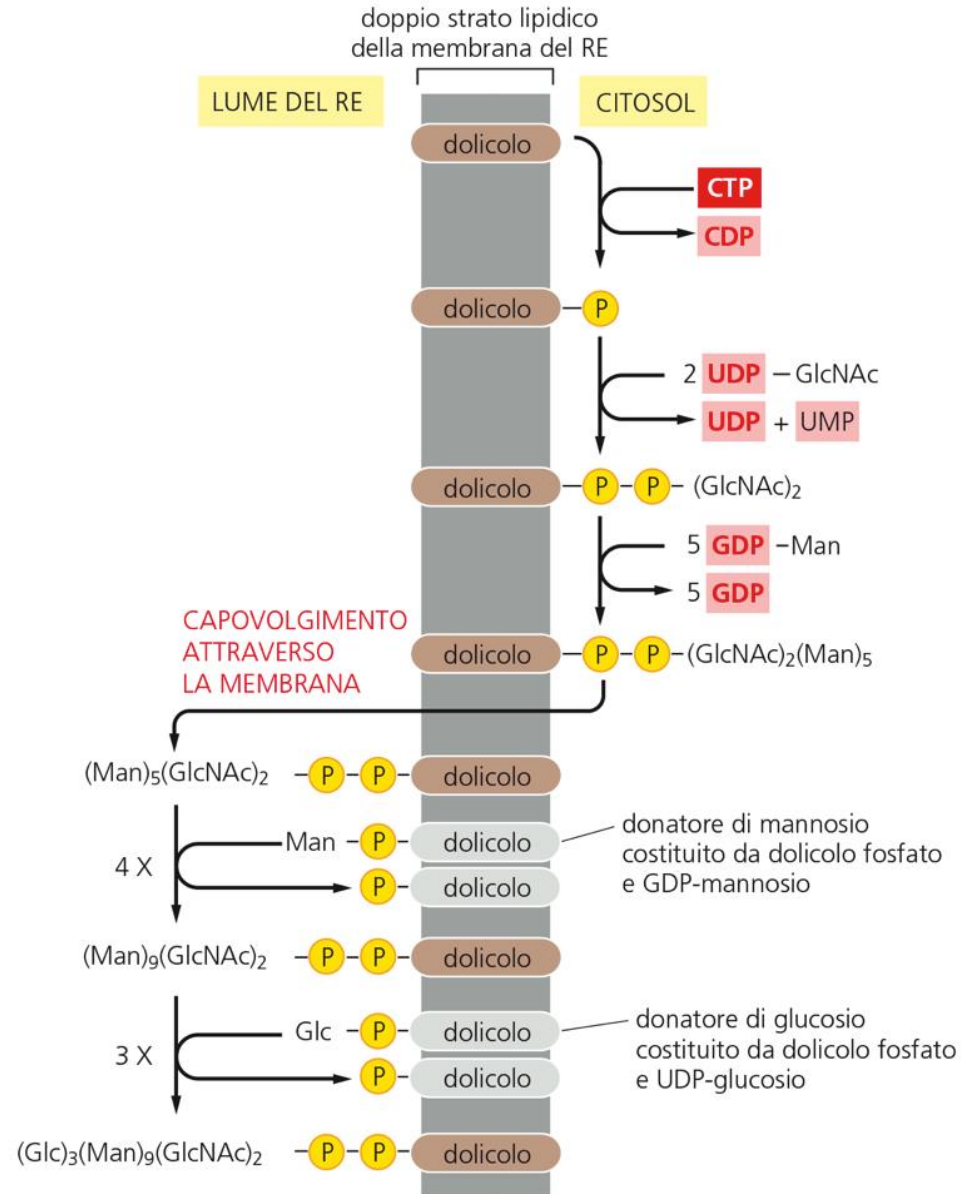
Il primo zucchero si lega al dolicolo con un ponte difosfato

N-glicosilazione delle proteine nel RE

La sintesi dell'oligosaccaride inizia nel citosol e termina nel lume dell'ER (**flipping sulla membrana dell'ER**).

Gli zuccheri nel citosol sono inizialmente **legati a nucleotidi**, prima di essere trasferiti con un ordine preciso sul dolicolo.

L'oligosaccaride è legato al dolicolo con un ponte di pirofosfato, la cui rottura dà l'energia necessaria per formare il legame N-glicosidico con l'Asn della proteina.



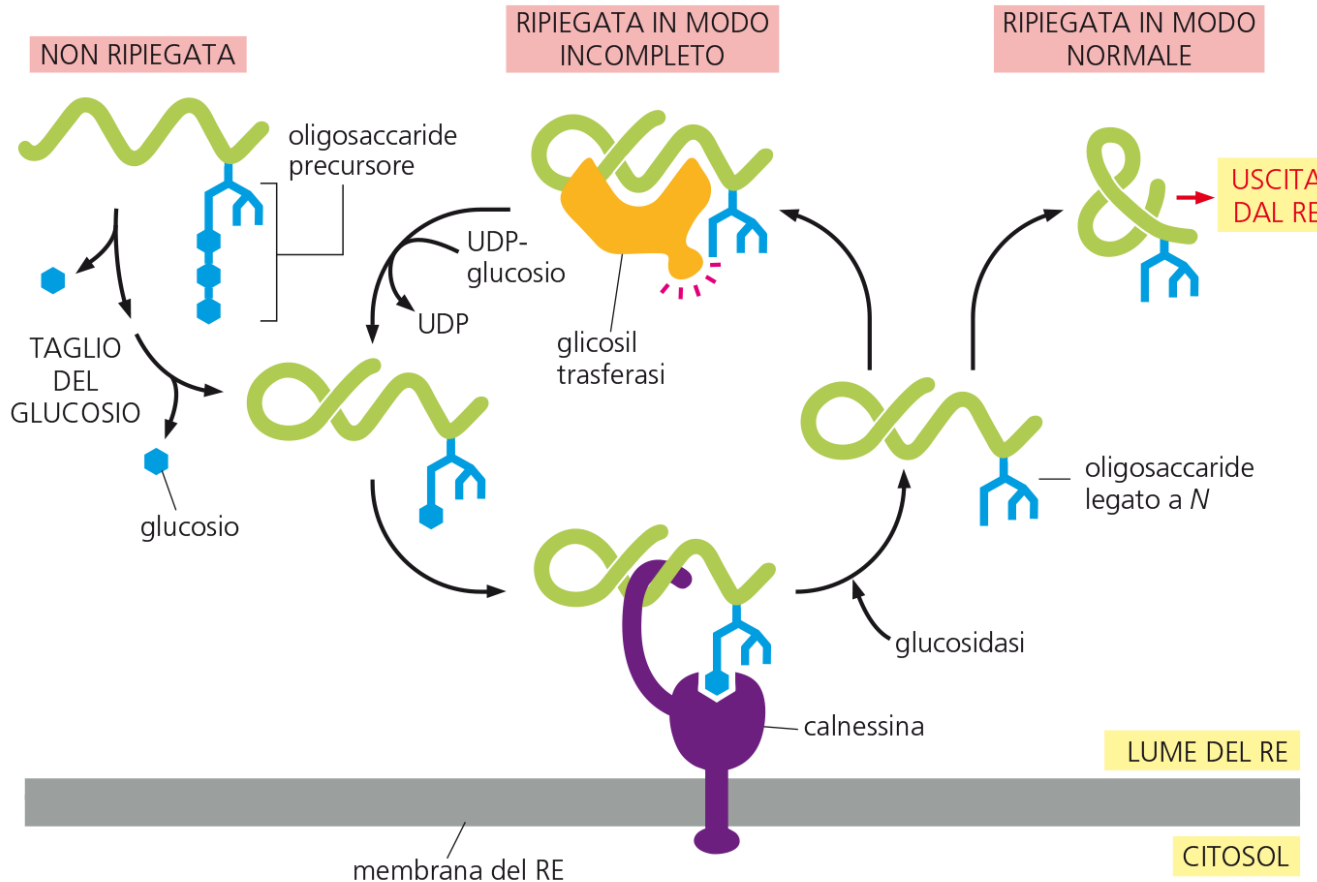
Controllo di qualità delle proteine nel RE

1. La calnessina riconosce la glicoproteina solo se 2 dei residui di glucosio terminali sono stati rimossi.

2. Una glucosidasi rimuove anche l'ultimo glucosio dalla catena e promuove la dissociazione dalla calnessina.

3. Se la proteina è correttamente ripiegata può uscire dall'ER.

Altrimenti viene riaggiunto un glucosio da una glucosil transferasi, si lega nuovamente alla calnessina e il ciclo continua fino a che la proteina non ha acquisito la conformazione corretta.



Le proteine che non riescono a ripiegarsi nel RE vengono trasportate nel citosol e degradate

Le proteine unfolded dopo alcuni cicli di "tentato folding" supportato dagli chaperoni, vengono trasferite nel citosol (dislocazione). La catena oligosaccaridica viene rimossa da una N-glicosidasi e la proteina viene ubiquitinata e degradata nel proteasoma.

