

SMISTAMENTO DELLE PROTEINE

Le cellule eucariotiche sono numerosi compartimenti tutte le proteine una volta sintetizzata vengono poi convogliate nei specifici organuli. Esistono dei meccanismi detti smistamenti fatto dai ribosomi che si possono trovare all'interno della cellula: o nel citoplasma (sintesi proteine dei mitocondri cloroplasti nucleo e perossisomi) o nei ribosomi che si trovano sul RER. Le proteine devono avere un segnale che indica alla cellula dove devono essere condotte, sono detti segnali di smistamento. In base al meccanismo che usano le proteine possiamo distinguere compartimenti topologicamente equivalenti, se una proteina riesce a passare da una parte all'altra senza attraversare fisicamente la membrana attraverso all'intervento di intermediari di trasporto che circondano la proteina e possono gemmare formando una vescicola che si fonde nella membrana rilasciando la proteina all'interno. Altri compartimenti non topologicamente equivalenti passano la membrana fisicamente ad esempio i mitocondri non possono ricevere delle vescicole.

Abbiamo 3 tipologie di trasporto

- 1) Trasporto regolato
- 2) Traslocazione proteica Passaggio di proteine in cui le membrane passano fisicamente alla membrana es mitocondri
- 3) Trasporto vescicolare trasporto regolato avviene tra strutture polinucleari delle vere e proprie fori che permettono il passaggio delle proteine

Il segnale di smistamento è un segnale all'interno della proteina sotto forma di una sequenza di amminoacidi che si trova al terminale della proteina ovvero la prima parte che viene sintetizzata e corrisponde al segnale. Una volta "usata" viene eliminata da un enzima detto peptidasi del segnale. Possiamo trovare sequenze differenti a seconda del compartimento. Quello che differenzia la sequenza amminoacido è il tipo di amminoacido che troviamo all'interno della sequenza segnale, es amminoacidi carichi positivamente andrà nel nucleo, se non carica allora sarà destinata al RER. Esperimento che osserva due proteine all'interno della cellula, una con all'interno del ret con all'interno una sequenza segnale e hanno ipotizzato fosse quella la causatrice della destinazione, provarono con l'ingegneria genetica ad eliminare quella parte caratteristica e notarono che la proteina non si trovava più nel ret ma nel citoplasma della cellula.

TRAFFICO DELLE PROTEINE FUORI E DENTRO DAL NUCLEO

Il nucleo è avvolto da due membrane una interna e una esterna con due composizioni differenti, questi due involucri hanno dei pori nucleari sufficientemente grandi da permettere il passaggio attraverso una soluzione delle macromolecole (ad es escono macromolecole come RNA o le proteine ed entrano ...). Questi pori hanno delle pareti rivestite da proteine dette nucleoporine aventi un gancio e un groviglio centrale di catene peptidiche, si tratta di una regione che costituisce il filtro che permette il passaggio di alcune molecole e altre no. Il segnale di localizzazione è caratterizzato da una catena amminoacido carica positivamente. Come è stato scoperto questo segnale? Con una proteina non umana ma virale. Questa

proteina virale una volta entrata nella cellula umana infetta in modo da potersi duplicare. Hanno fatto sì che la proteina risultasse fluorescente in modo da indicare che questa proteina si trovava al centro del nucleo delle cellule, però non garantisce la sequenza. Perciò cambiano la sequenza e vedono che la fluorescenza si trova al di fuori del nucleo quindi il virus si trova nel citoplasma perché non è riuscito ad attraversare le proteine attraverso il nucleo. La microscopia elettronica ci viene in aiuto perché ci permette di visualizzare gli spostamenti all'interno della cellula.

Come queste proteine possono cambiare la loro localizzazione molto velocemente. Nel citoplasma dal momento che viene aggiunto calcio la proteina rimane nel nucleo, se rimosso calcio esce e se si rimette calcio rientra immediatamente.

Chi riconosce il segnale? Recettore di importazione nucleare detti "importine" che riconoscono le proteine che devono essere importate. Una volta riconosciuta lega da una parte la proteina che deve essere importata e dall'altra parte le nucleoporine in corrispondenza della glicina e fenilalanina. Non strutturati delle nucleoporine che rivestono il poro. Secondo un modello di trasporto nucleare, i complessi recettore-carico si muovono lungo la via legandosi, dissociandosi e quindi rilegandosi

ripetutamente a sequenze. L'energia necessaria per il trasporto nucleare è immagazzinata nella forma

legata al GTP della GTPasi RAN

Le GTPasi sono degli interruttori molecolari che possono transire tra due stati

molecolari. L'energia è fornita da gtpasi una proteina che può ciclare tra due stati: uno attivo e uno inattivo a seconda del tipo. Quando un gtpasi idrolizza il gtp passa in una forma inattiva. Si tratta di uno stato reversibile perché può rilegare

Sono favorite da due proteine, una GAP che attiva l'attività idrolitica della gtpasi e torna nella forma attiva. La seconda proteina che promuove lo scambio del nucleotide guaninico è il GEF e fa sì che la nostra gtpasi torna attiva. Quando la gtpasi controlla il traffico nucleare è detta RAN. Questa si trova dentro e fuori al nucleo nella sua conformazione attiva AGTP dentro il nucleo (entra in gioco il gef) quella inattiva si trova fuori dal nucleo perché si trova con la GAP. Come interagisce la RAN con le importine? all'interno del nucleo fa sì che l'importina si stacchi dalla proteina trasportata e poi può uscire dal nucleo e può essere riciclato. La RAN gtp promuove il distacco tra la proteina e l'importina nonostante ci voglia energia. Stesso meccanismo per trasformare le proteine al di fuori della proteina grazie a recettori detti esportine in questo caso GAP ha il ruolo di promuovere l'attacco dell'esportina alla proteina e favorire il suo trasferimento verso l'esterno.

TRASLOCAZIONE PROTEICA trasporto delle proteine all'interno dei mitocondri. Le proteine che entrano nei mitocondri attraversano due membrane e si trattano di proteine sintetizzate

all'esterno dei mitocondri. La sequenza di localizzazione mitocondriale è caratterizzata da presenza di amminiacidi polari e apolari (idrofobica) che costituiscono una struttura α -elica-anfipatica. In questo caso non ci sono pori ma ci sono traslocatori che trasportano all'interno delle due membrane, passano per due traslocatori: TOM sulla membrana esterna e TIM sulla membrana interna. Una porzione funziona da recettore e l'altra da canale, un foro che permette alla proteina di inserirsi e permette all'interno del mitocondrio. La proteina viene sintetizzata, riconosciuta da TOM, QUESTO SI MUOVE SULLA MEMBRANA FINO AD ANDARSI a trovare sulla membrana interna e qui incontra la membrana interna e incontra TIM. Una volta raggiunto la matrice il trasportatore viene eliminato. Una proteina linearizzata viene trasportata dai trasportatori. Intervengono le proteine chaperonine, come hsp70, che mantengono le proteine srotolate. L'idrolisi dell'ATP viene usata per staccare l'hsp70 e fornire energia motrice per importare la proteina attraverso il traslocatore. La Hsp70 citoplasmatica mantiene le proteine da traslocare nei mitocondri in uno stato non ripiegato. La proteina viene riconosciuta da un trasportatore sulla membrana mitocondriale esterna (TOM) e trasferita al trasportatore sulla membrana interna (TIM). Una proteasi della matrice taglia la sequenza segnale e la Hsp70 mitocondriale lega la catena polipeptidica appena entra nella matrice, guidandone la traslocazione. La Hsp60 mitocondriale interviene nel ripiegare correttamente la proteina importata. Ad un certo punto TOM e TIM vengono bloccate quando incontrano una porzione della proteina idrofobica. Può accadere sia al livello di TOM e quindi avremmo una proteina localizzata all'interno sia al livello di TIM e localizza la proteina all'esterno. Le proteine che devono localizzarsi nello spazio inter-membrana hanno diverse possibilità:

1-traslocazione attraverso il complesso TOM e rilascio nello spazio inter-membrana.

2-Traslocazione attraverso il complesso TOM e TIM, ma possedendo la sequenza di blocco vengono inserite nella membrana interna e successivamente rilasciate per taglio proteolitico

3- Traslocazione attraverso il complesso TOM e TIM, entrata nella matrice, taglio proteolitico della sequenza segnale, esposizione di un segnale idrofobico che dirige la proteina nello spazio inter-membrana.

TRASPORTO NEL RER REL

Le proteine sono attaccate perciò il trasporto avviene non appena il ribosoma sintetizza la prima parte che corrisponde alla sequenza segnale. Traslocazione co-traduzionale, mentre viene tradotta viene anche trasportata. (nei mitocondri invece viene prima completamente tradotta e poi riconosciuta dai recettori). Esistono due popolazioni differenti di ribosomi all'interno del citosol uno attaccati alla membrana e l'altro libero e si distinguono solamente per il tipo di proteina che stanno sintetizzando non per la struttura. Ci sono due tipi di proteine che vengono traslocate nel ER

1) Proteine idrosolubili che attraversano la membrana di ER e sono liberate nel lume o sono destinate alla secrezione.

2) Proteine destinate alla localizzazione transmembrana che attraversano la membrana per un tratto e poi vi restano inserite (alcune rimangono nella membrana del ER, altre sono destinate alla membrana plasmatica o di qualche altro organello)

Tutte queste proteine sono indirizzate al ER da una sequenza segnale, costituita da 8 o più aa idrofobici, che poi partecipa al processo di traslocazione (trasferimento) attraverso la membrana di ER. Il ER non è mai la destinazione finale ma poi avviene il passaggio al Golgi o altri compartimenti. Il ER rappresenta una tappa intermedia per la maggior parte delle proteine.

Servono due elementi particella del riconoscimento del segnale che riconosce la sequenza segnale sulla proteina che deve essere trasportata e si trova sul reticolo endoplasmatico. Il punto di partenza il ribosoma sintetizza la proteina a partire dalla sequenza segnale che viene subito legata e riconosciuta da un recettore SRP e grazie a questo riconoscimento il ribosoma viene legato alla membrana vicino o ad un traslocatore che viene trasportato per poi essere rilasciato. Viene poi riconosciuta dal canale di traslocazione in modo da aprire il canale e spostata quando l'intera proteina viene traslocata avviene il taglio e poi la proteina viene lasciata. Come facciamo ad inserire delle proteine all'interno della membrana del ER? molte delle nostre proteine attraversano la membrana più volte. Es proteina a doppio passaggio può passare la membrana due volte o le proteine a 7 passaggi trans membrana. Perché nella loro sequenza amminoacidi hanno tante sequenze idrofobiche che fanno sì che le proteine attraversano il traslocatore e poi viene riconosciuta un'altra sequenza traslocatore e allora riprende il ciclo.

Le proteine che devono rimanere nel ER hanno un segnale di ritenzione e perché se non escono e possono seguire le vie di scompartimento. Quali proteine rimangono? Enzimi che si assicurano che le proteine che arrivano possano avere la giusta conformazione tridimensionale (senno non potrà essere trasportata) si chiamano BIP. Il BiP legata impedisce alla proteina di aggregarsi e aiuta a mantenerla nel RE (e quindi fuori dall'apparato del Golgi e da parti successive della via secretoria). Se supera controllo di qualità allora può uscire. Nonostante ci sia la BIP che permette il superamento del controllo di qualità esistono casi in cui avviene un accumulo di proteine malformate nel ER si crea uno stress nel ER e si attiva una risposta a proteine mal foldate in modo da riconoscere un accumulo esagerato di proteine malformate per poi attivare un regolatore di trascrizione che può entrare nel nucleo e controllare la trascrizione e cerca di risolvere il problema aumentando il numero di chaperon. Se non funziona le proteine mal foldate vengono poi eliminate dal proteasoma una volta trasportate nel citoplasma.

GLICOSILAZIONE aggiunta di glicidi e zuccheri alle proteine all'interno del ER in modo che raggiungano la loro forma tridimensionale e continuare il viaggio. I carboidrati vengono aggiunte in corrispondenza delle asparagine (detta glicosilazione sull'N perché è caratterizzata dal gruppo NH) grazie ad un enzima detto oligosaccaride transferasi. Questi zuccheri indicano se questa proteina è stata ripiegata correttamente o no. Nonostante tutto l'aiuto da parte di molecole chaperone, molte molecole proteiche (più dell'80% per alcune

proteine) traslocate nel RE non riescono a raggiungere il loro corretto stato ripiegato od oligomerico. Queste proteine sono di nuovo esportate dal RE nel citosol, dove vengono degradate nei proteasomi. Un accumulo di proteine ripiegate male nel RE scatena una risposta alle proteine non ripiegate, che comprende un aumento della trascrizione di geni che codificano proteine coinvolte nella retro-traslocazione e nella degradazione proteica nel citosol, molecole chaperone del RE e molte altre proteine che contribuiscono ad aumentare la capacità di ripiegamento delle proteine del RE.

Il RE è la sede principale di smistamento dei lipidi e la maggior parte della sintesi dei lipidi avviene al livello della membrana del ER e sull'emistrato rivolto verso il citosol e riceve tutti i componenti.

Le code di acido grasso vengono portate nella membrana rivolta verso la membrana esterna e dopo di che essendo idrofobiche....

I lipidi essendo sintetizzati solo nello strato più esterno si crea una crescita asimmetrica vsullo strato citosolico rispetto alla membrana rivolta verso l'interno. ci vuole un equilibrio della membrana del ER. Per questo interviene il traslocatore di fosfolipidi favorito dall'enzima scramblasi. La scramblasi inoltre permette di ottenere una membrana asimmetrica perché trasporta da una membrana all'altra quindi così facendo va a ristabilire l'eq al livello dell'ER. *differenza della scramblasi e flippasi, può scambiare tutti i lipidi da uno strato all'altro della membrana mentre la flippasi sono specifici lipidi*