

Nelle scorse lezioni:

La struttura generale della cellula

Le membrane biologiche

Il trasporto attraverso le membrane biologiche

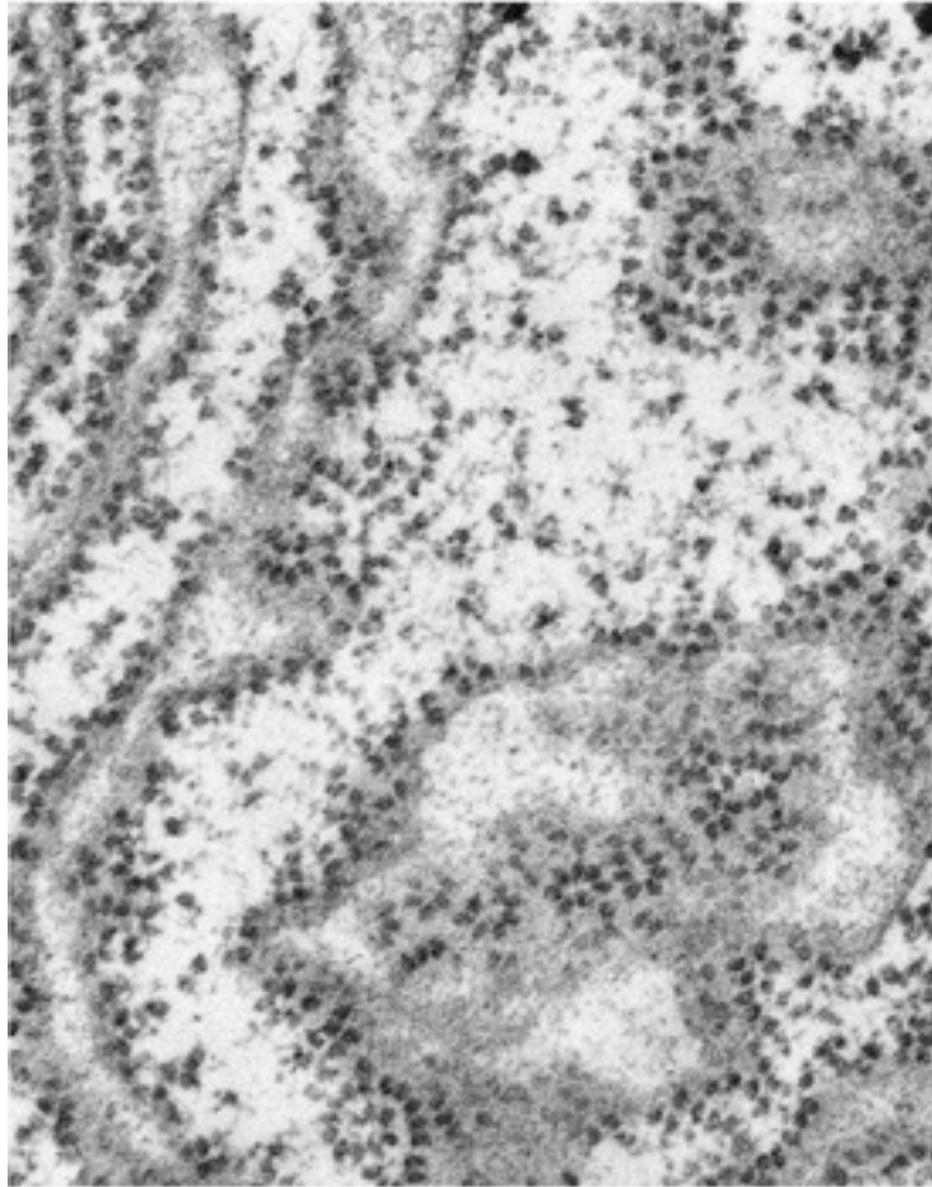
Come fanno le proteine transmembrana (e le proteine che sono residenti nel lume degli organelli) a raggiungere il compartimento cellulare appropriato?

RIBOSOMI E SINTESI PROTEICA

Maraldi-Tacchetti, cap. 5

Alberts, cap. 6

Karp, cap. 11



(B)

400 nm

La sintesi proteica (traduzione) avviene nei ribosomi.

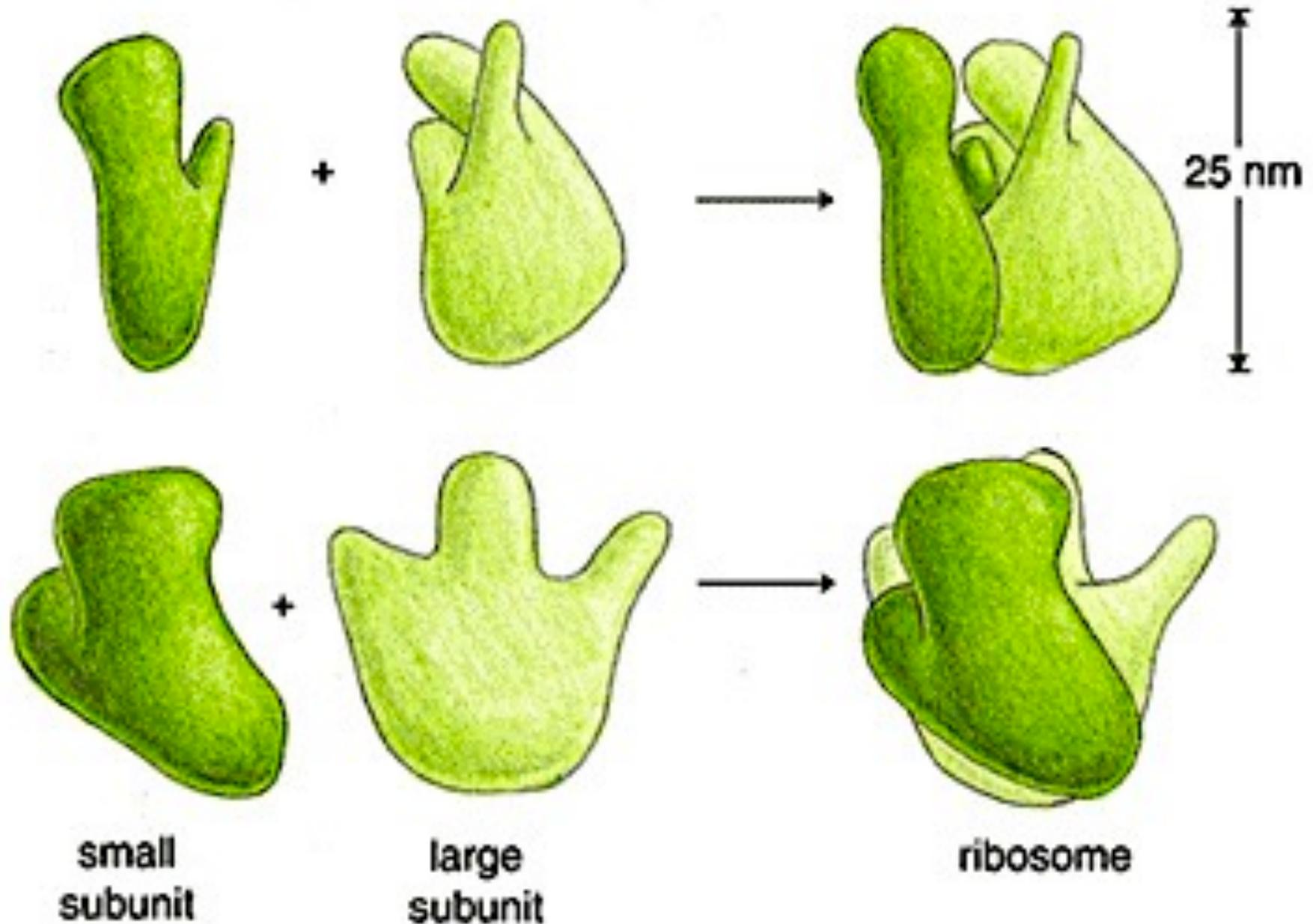
I ribosomi sono complessi macromolecolari composti da RNA e da proteine

I ribosomi citosolici (liberi) sono considerati organelli non membranosi

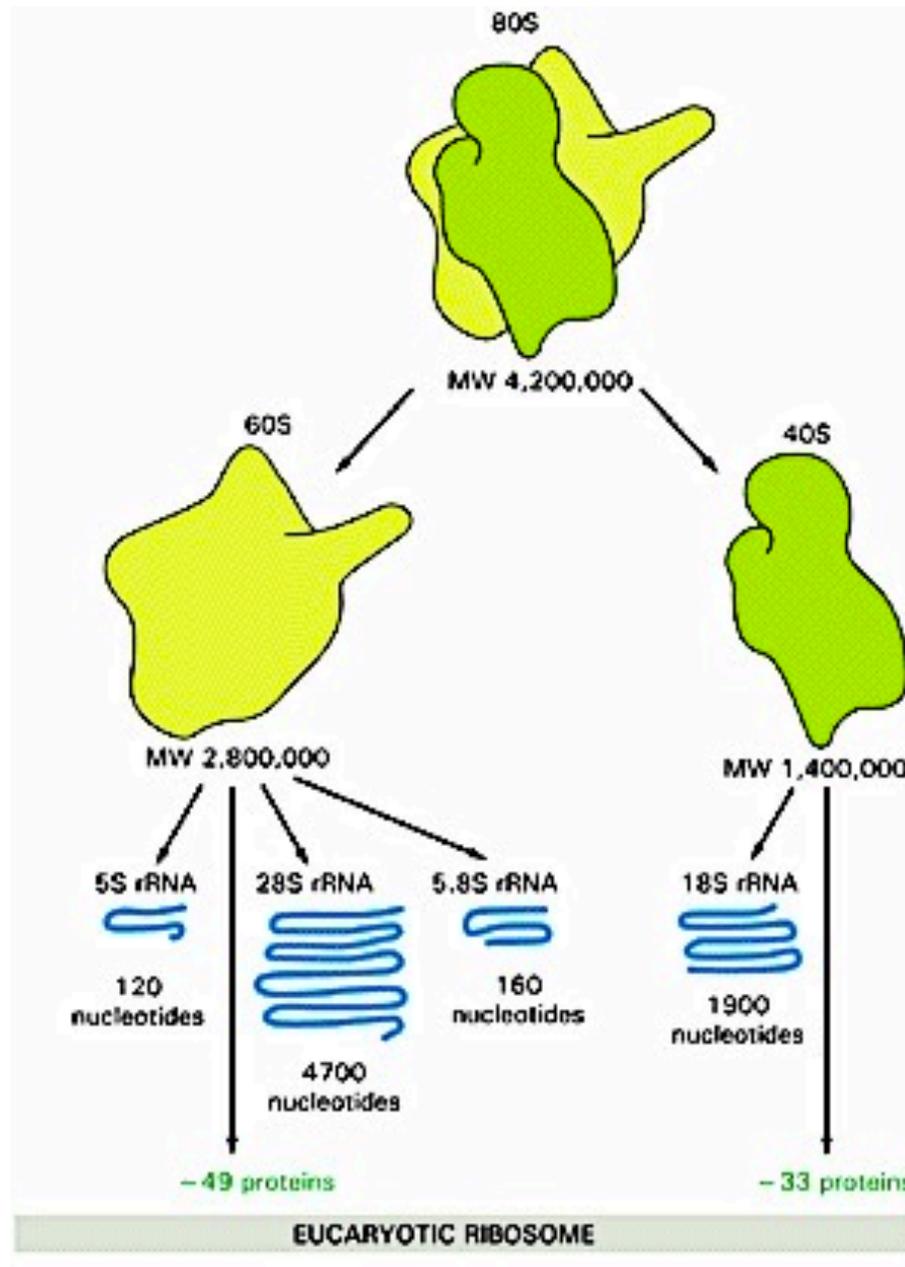
I ribosomi si possono trovare anche sul lato citosolico del RER e dell'involucro nucleare esterno

La matrice mitocondriale contiene ribosomi diversi dal resto della cellula

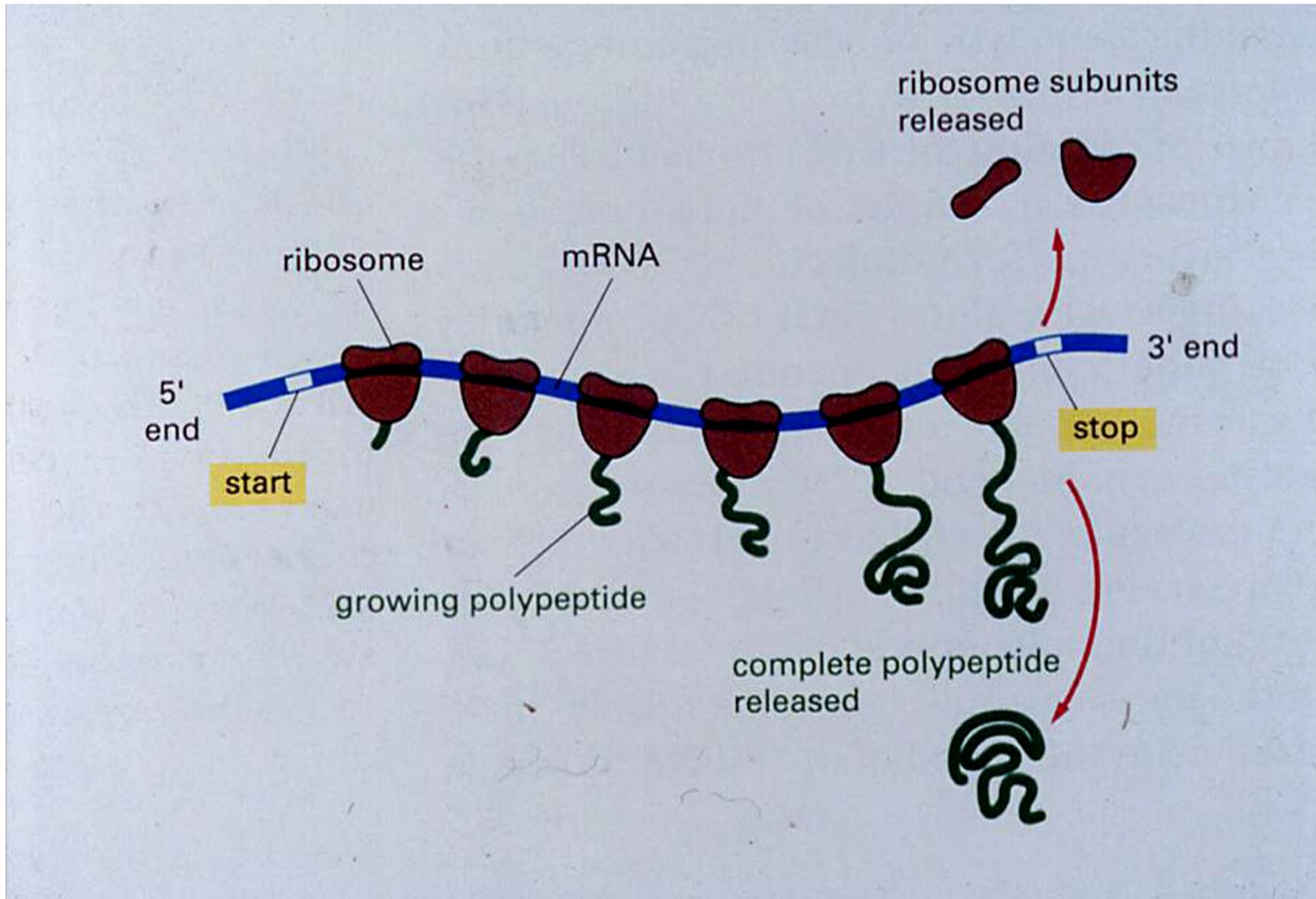
I ribosomi sono costituiti da due subunità



I ribosomi sono riboproteine



La sintesi proteica

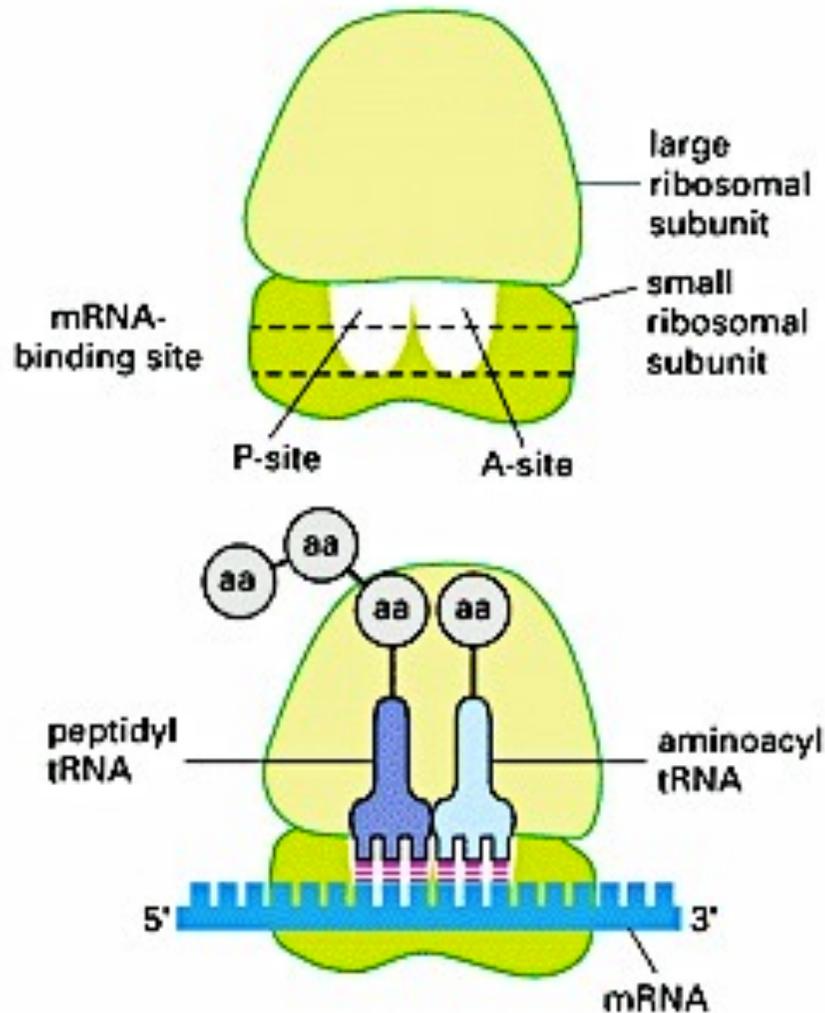


Gli aminoacidi sono portati al ribosoma dai tRNA

Molecole diverse di tRNA portano aminoacidi diversi

E' il mRNA a selezionare il tRNA (codone/anticodone)

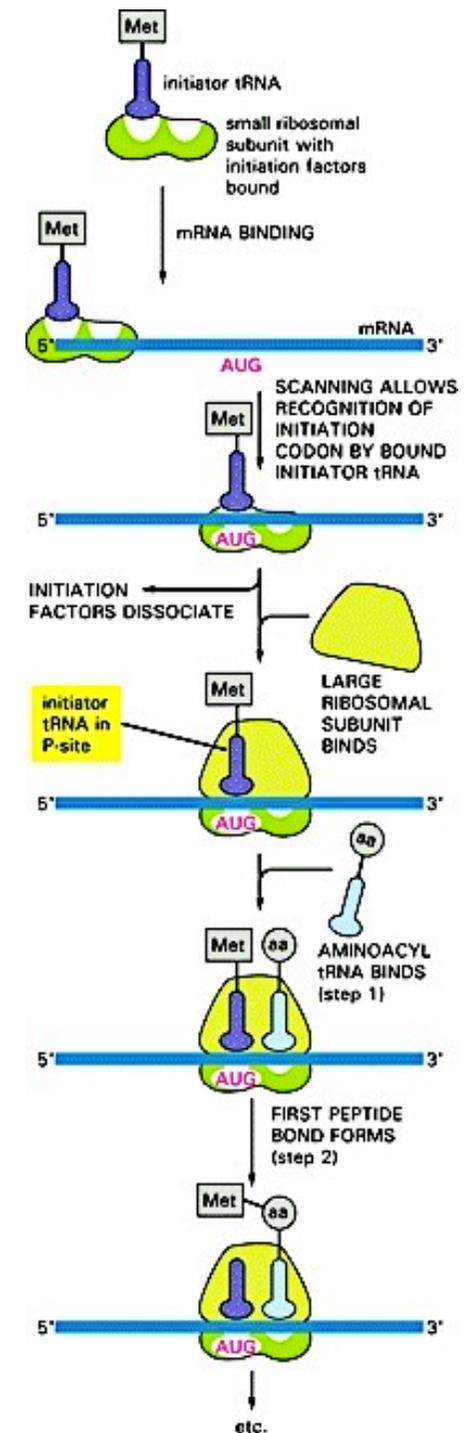
Il ribosoma catalizza la formazione del legame peptidico tra la catena proteica nascente (legata al tRNA "vecchio") e l'aminoacido (legato al "nuovo" tRNA)



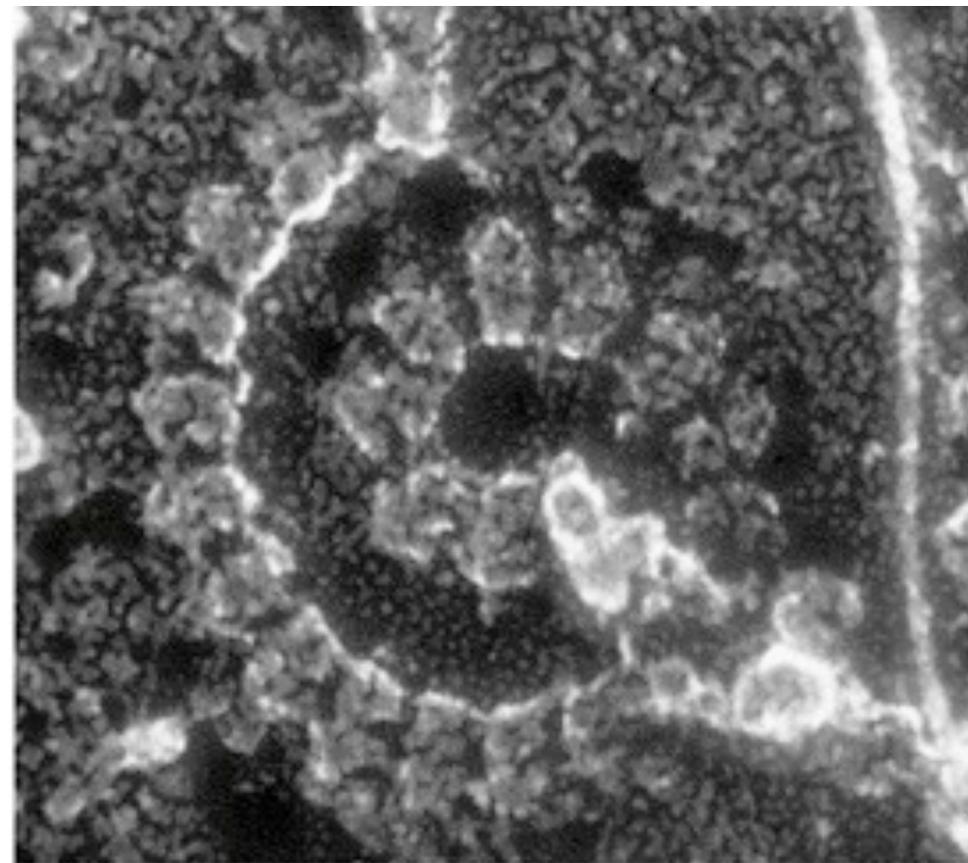
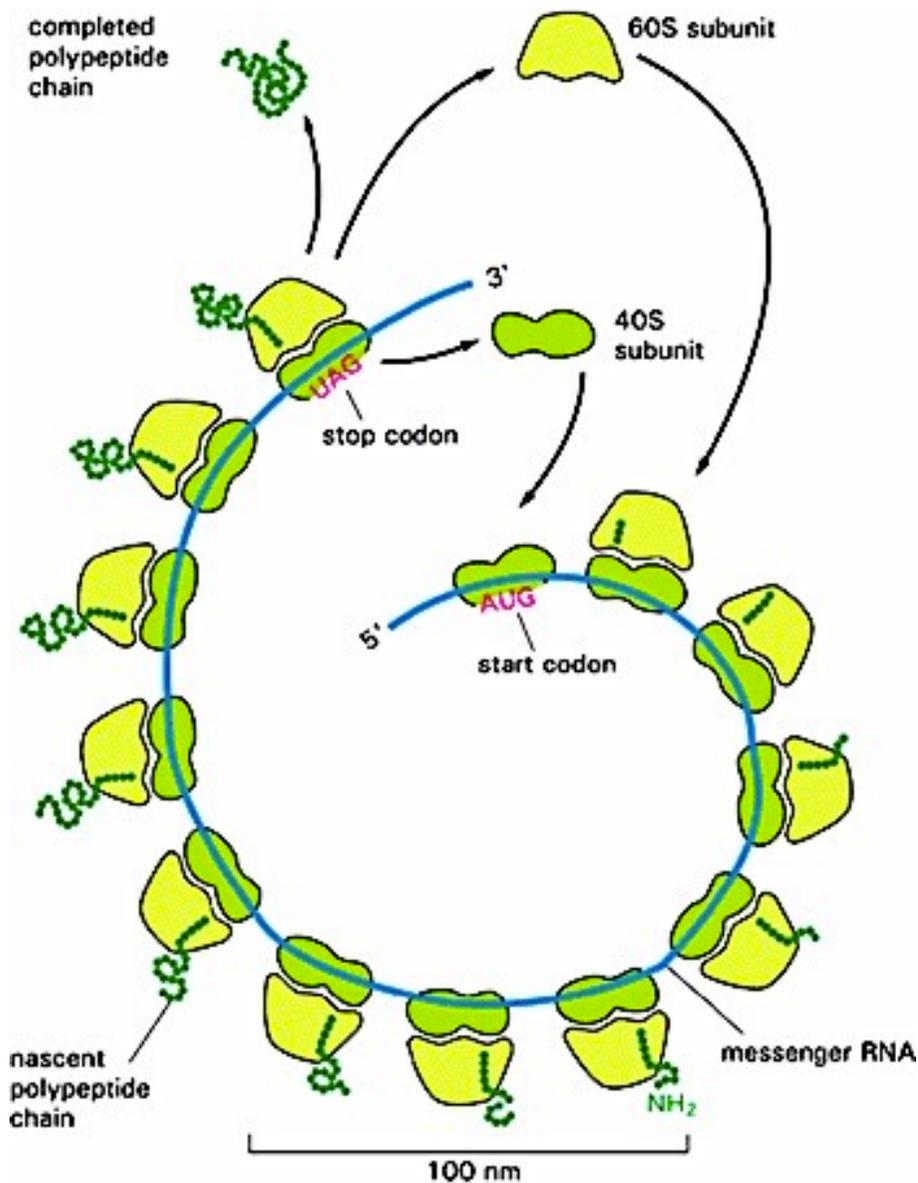
In assenza del tRNA in posizione A la sintesi proteica si blocca e la catena nascente rimane legata covalentemente al tRNA in posizione P

Si parla di **stallo della sintesi proteica**

La terminazione della traduzione avviene per riconoscimento di specifiche sequenze dell'RNA messaggero (codoni di STOP) da parte di proteine terminatrici che si legano al sito A "mimando" un tRNA. Quando questo succede, il ribosoma catalizza il legame della catena proteica nascente all'acqua, determinandone il rilascio.



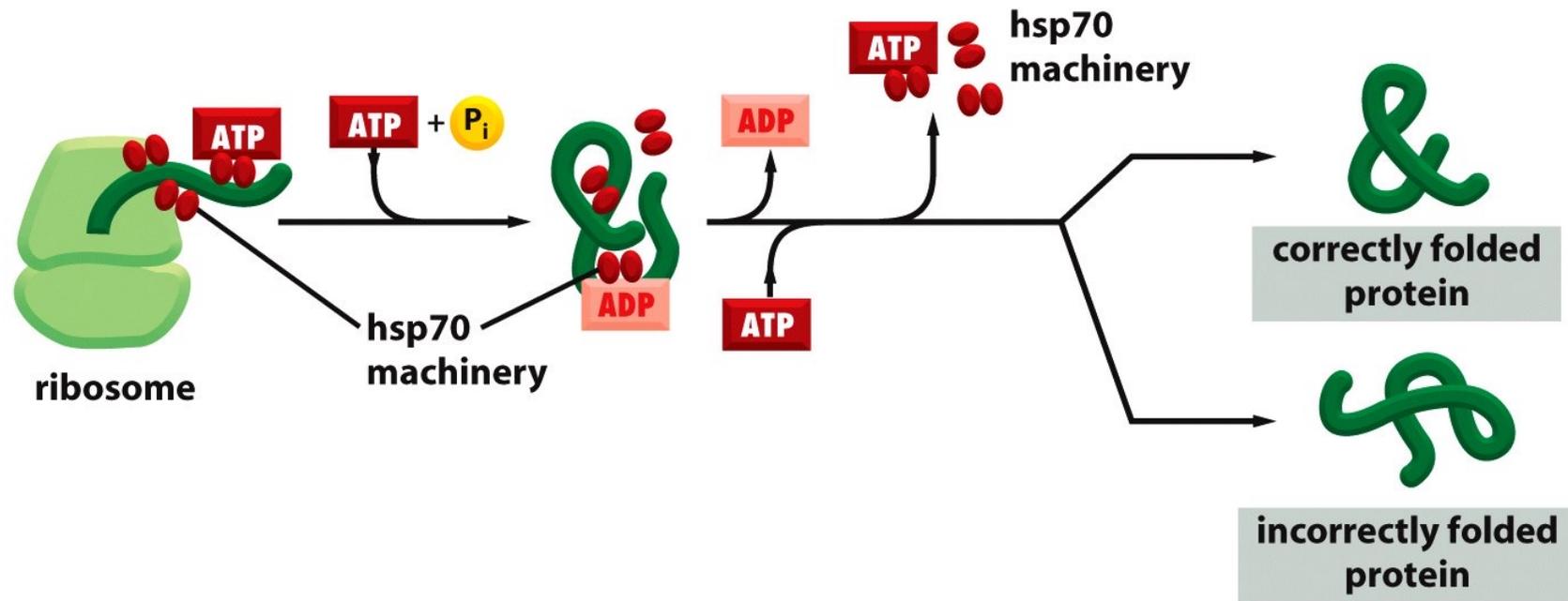
Nel citosol, una stessa molecola di mRNA può essere usata da diversi ribosomi. Si crea così un **polisoma**.



(A)

100 nm

Spesso il ripiegamento delle proteine viene favorito da proteine note come **chaperonine**. Questo processo richiede energia sotto forma di ATP.



Le chaperonine della famiglia HSP70 si legano alle catene nascenti *impedendone* il ripiegamento, e possono rimanere legate alla proteina rilasciata dai ribosomi. Una volta rimosse, la proteina può ripiegarsi.

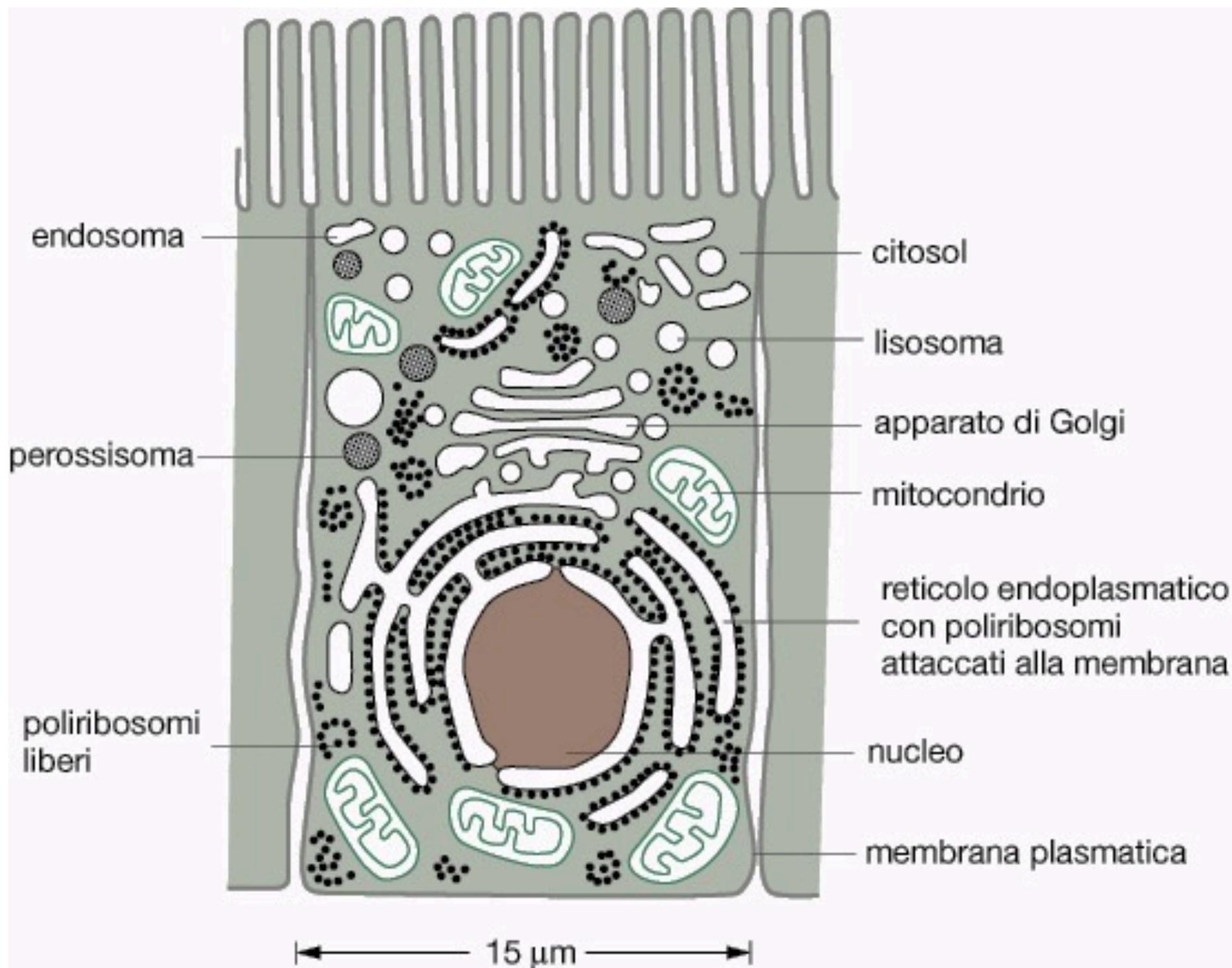
SMISTAMENTO DELLE PROTEINE NELLA CELLULA

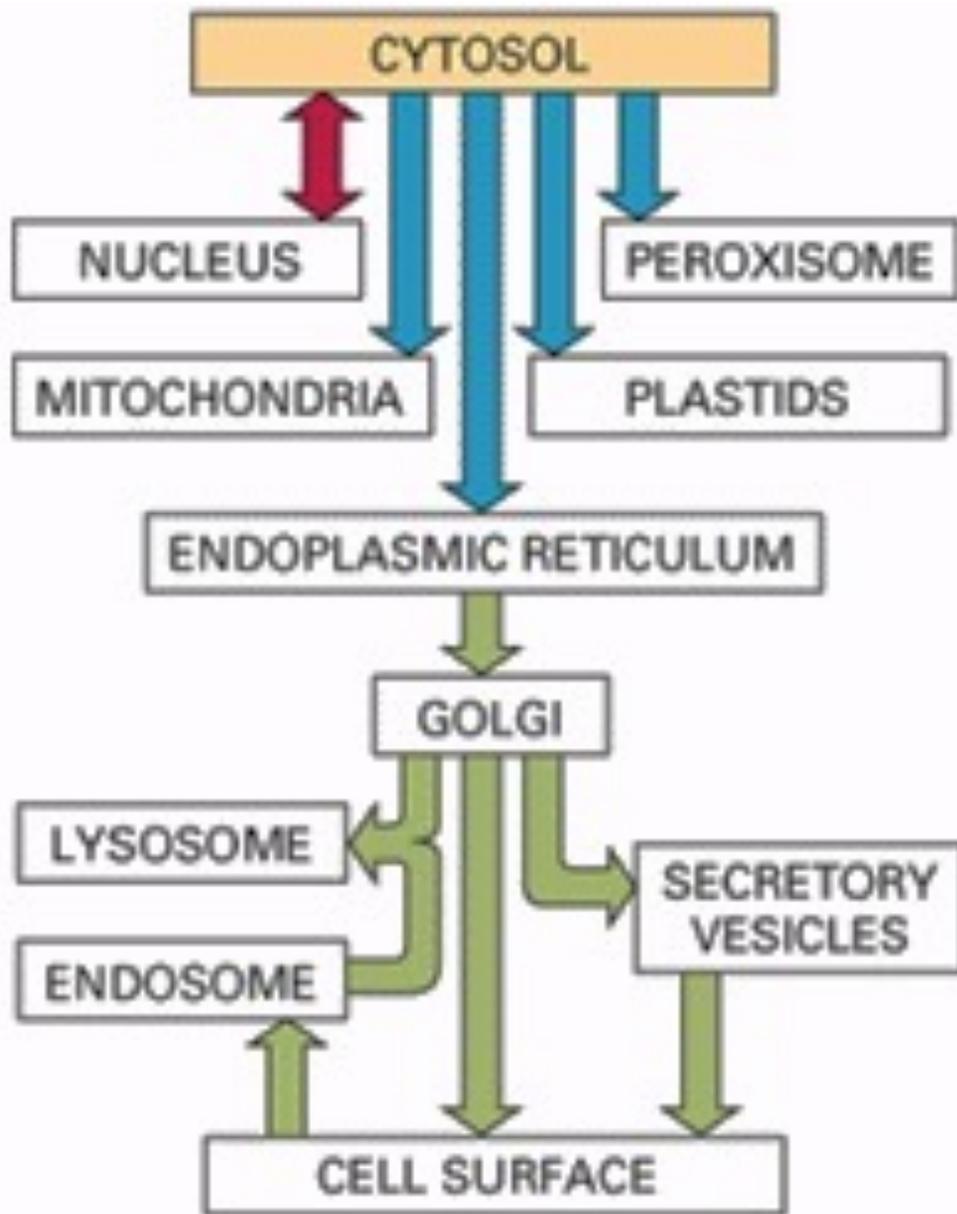
Maraldi-Tacchetti, cap. 6

Alberts, cap. 12

Lewin, cap. 3

Karp, cap. 8





KEY: █ = gated transport
█ = transmembrane transport
█ = vesicular transport

La maggior parte delle proteine comincia la propria sintesi nel citosol (fanno eccezione alcune proteine mitocondriali)

Da lì vengono **smistate** nei vari organelli

Lo smistamento delle proteine agli organelli è garantito da corte sequenze aminoacidiche delle proteine stesse, dette **peptidi segnale**

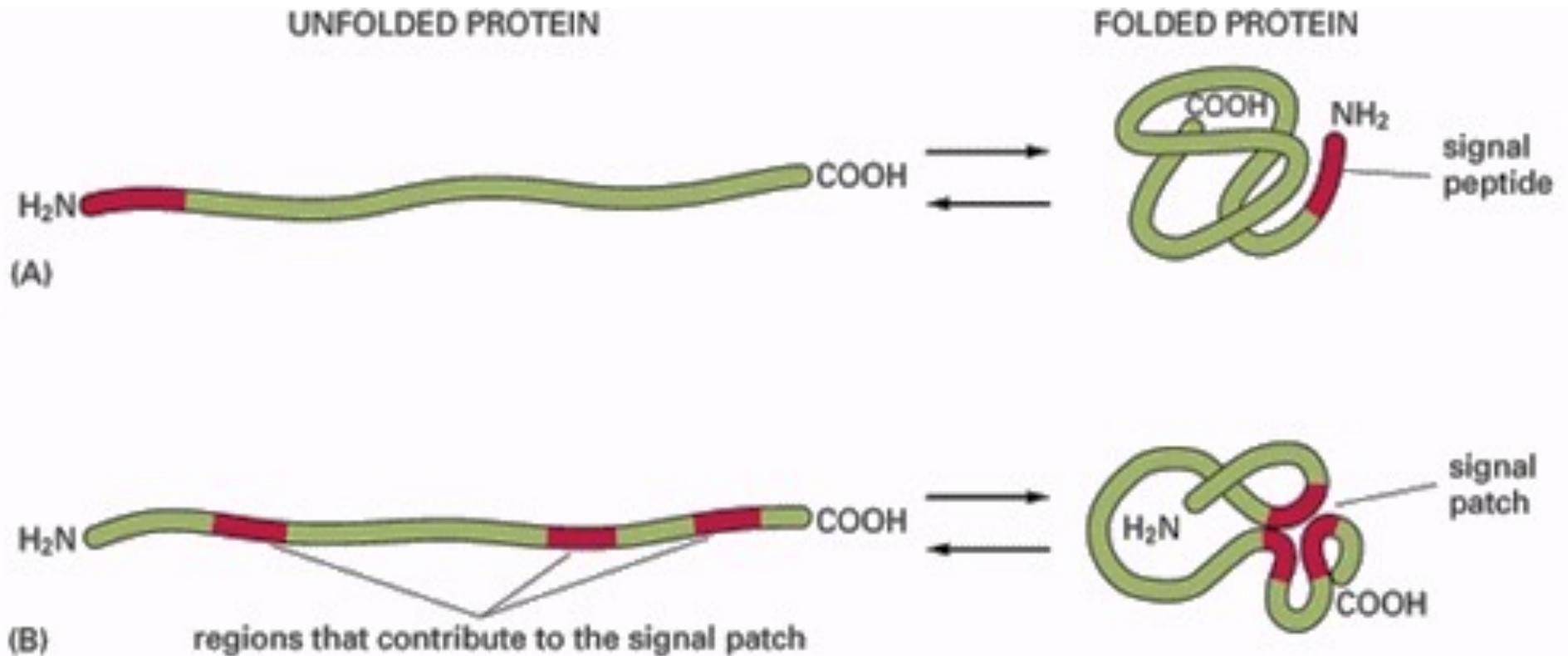


Table 17-1. Properties of Uptake-Targeting Signal Sequences That Direct Proteins from the Cytosol to Organelles

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

* Indicates whether signal sequence usually is (+) or is not (-) removed after a protein enters its target organelle.

[†] These signals direct the protein from the cytosol into the matrix space of the mitochondrion or the corresponding stroma of the chloroplast; other signals discussed in the text redirect proteins into other subcompartments of these organelles.

FUNCTION OF SIGNAL SEQUENCE	EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE
Import into nucleus	-Pro-Pro-lys-lys-lys-Arg-lys-Val-
Export from nucleus	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
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 ⁻

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 *red* and negatively charged amino acids are shown in *green*. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in *yellow* and hydroxylated amino acids are shown in *blue*. *H₃N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.

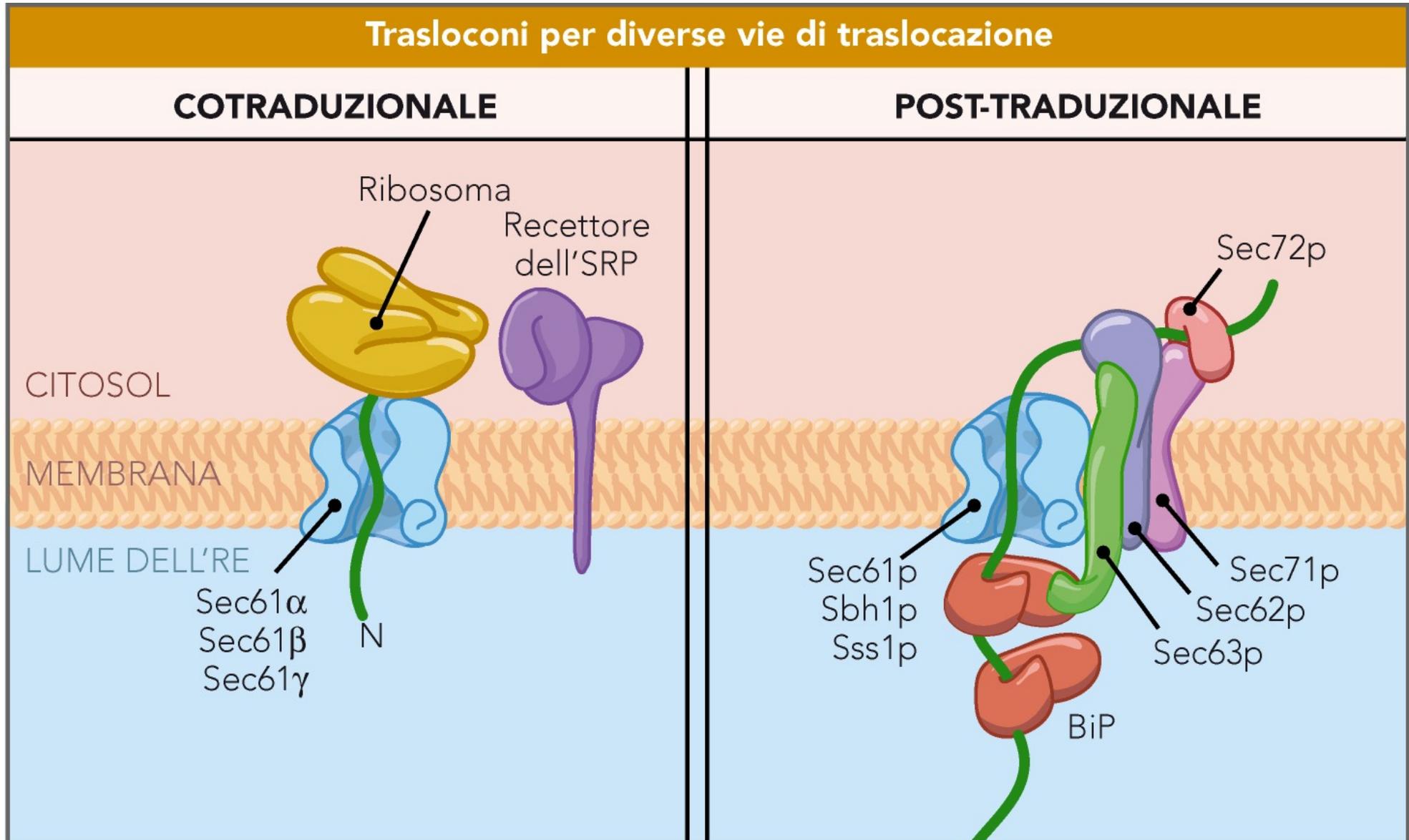
Segnali di trasferimento per i vari organelli

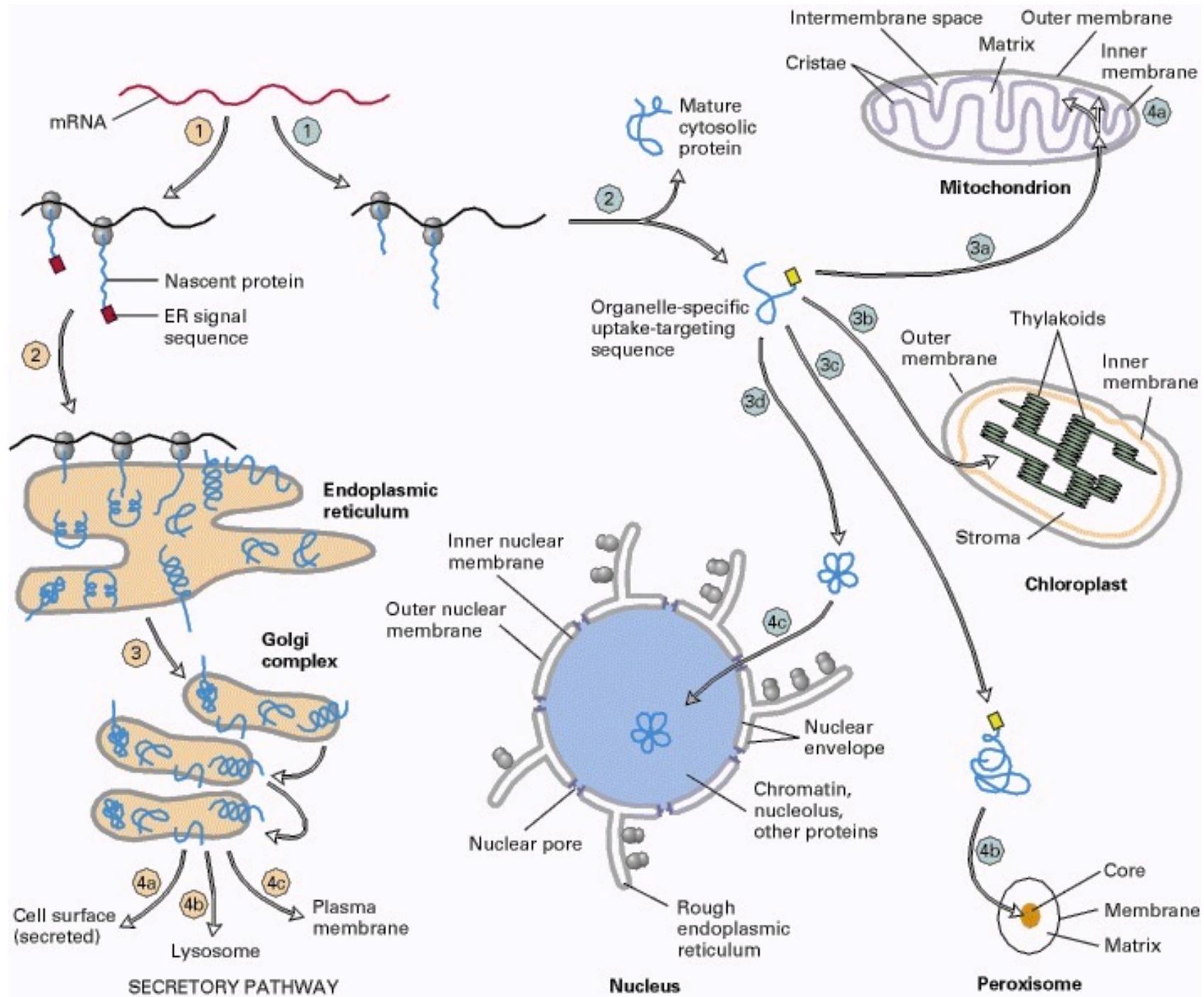
ORGANELLO	SEGNALE	LOCALIZZAZIONE DEL SEGNALE
RE	MDPPRPALLALPALLLLLLLAGARA...	N-terminale
Nucleo	... LAEADRKRRGEFRKE...	Interno
Mitochondri	MLSNLRILLNKAALRKAHTSMVRNFRYGGKPVQ...	N-terminale
Cloroplasto	MRTRAGAFFGKQRSTSPSGSSTSASRQWLRSSPGRTQRPAHRVLA...	N-terminale
Perossisoma-PTS1	...VVVGGGTPSRL	C-terminale
Perossisoma-PTS2	MNLTRAGARLQVLLGHLGRP...	N-terminale

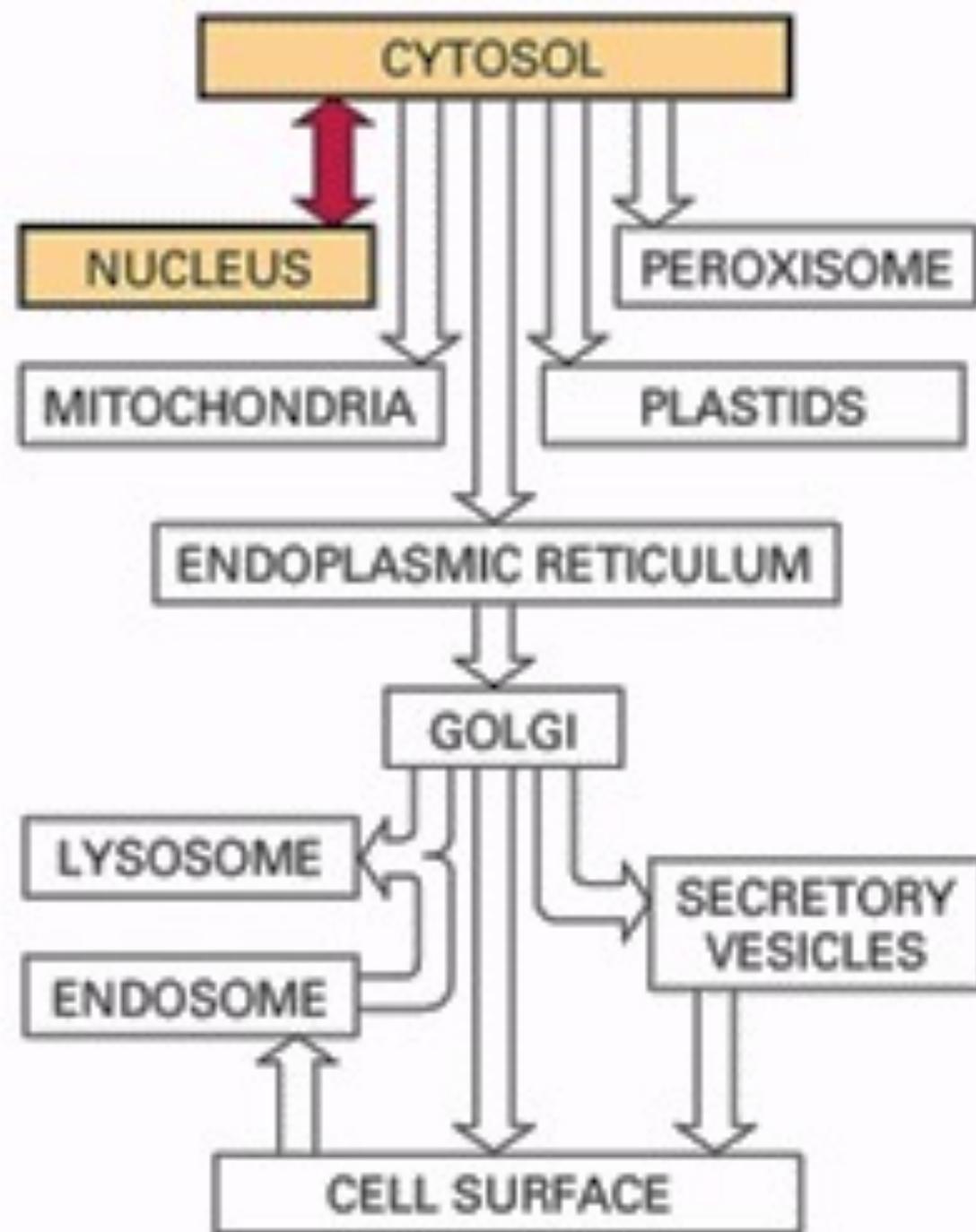
.....

Idrofobico
 Acido
 Basico

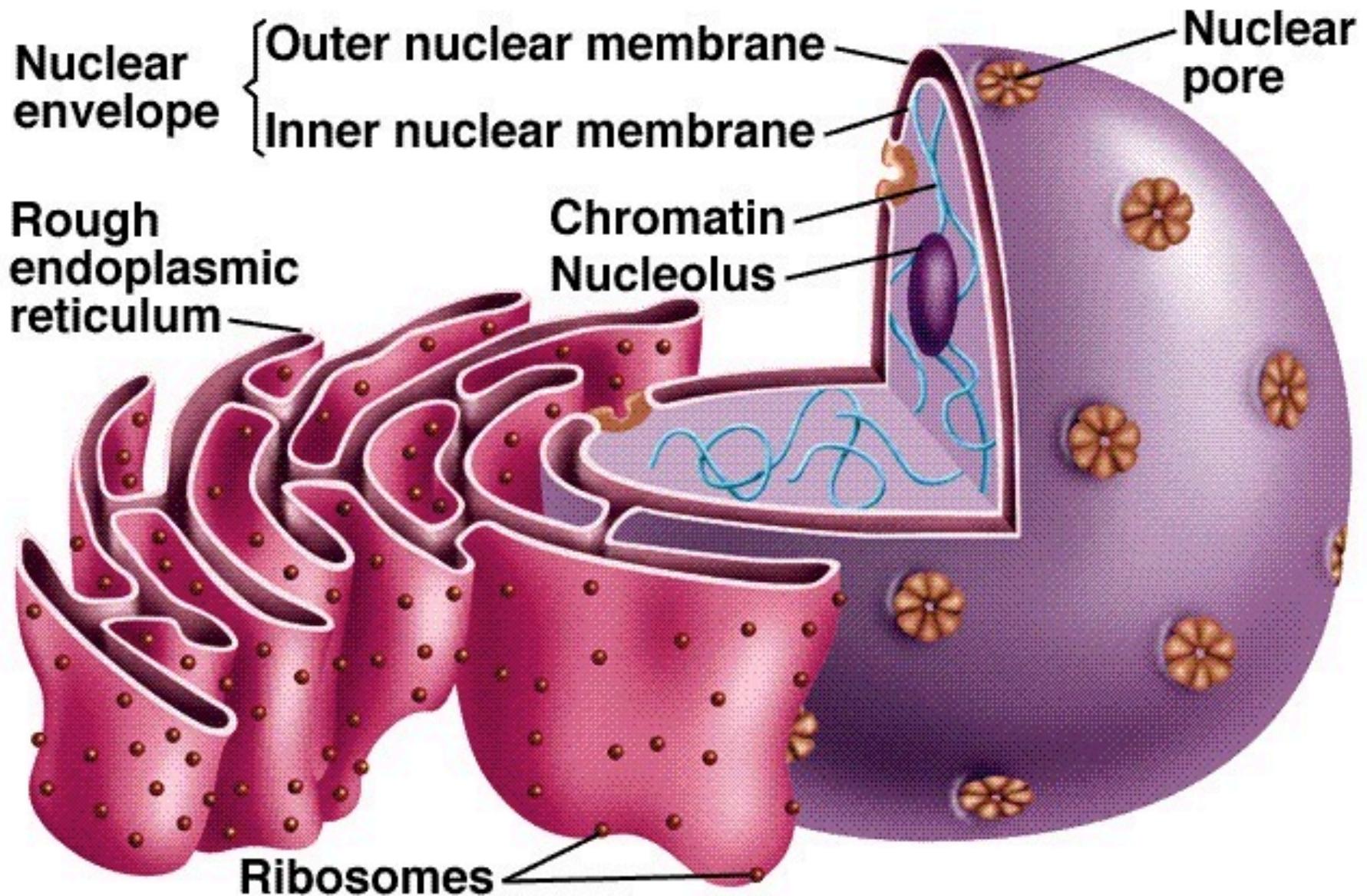
Le proteine attraversano la membrana degli organelli tramite dei complessi di proteine integrali di membrana detti **trasloconi**



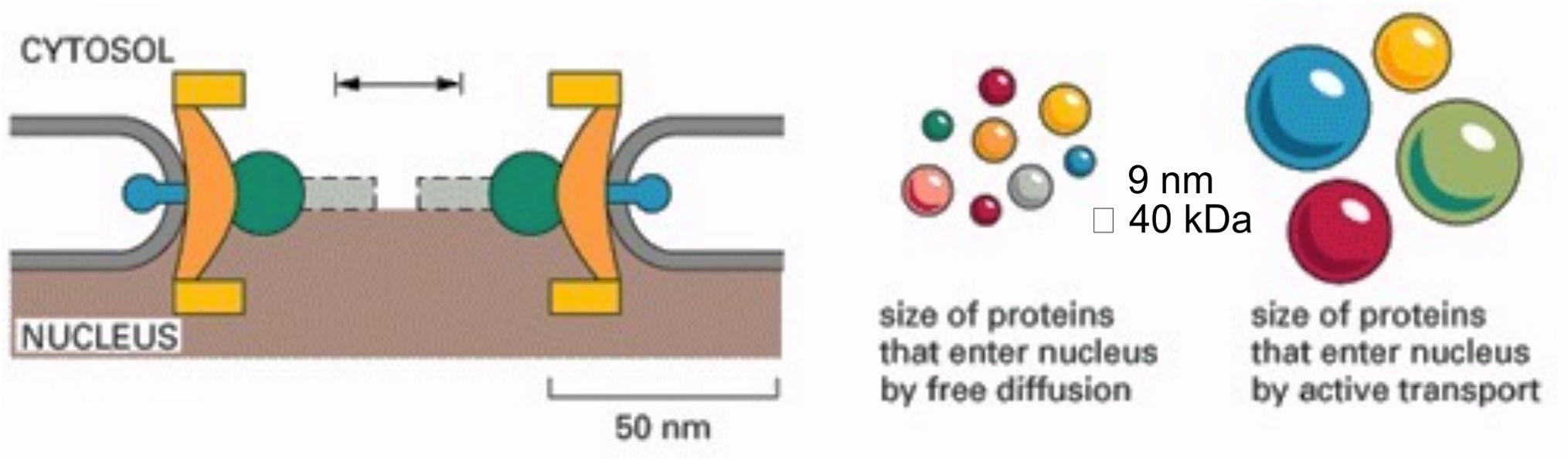




Nuclear Envelope

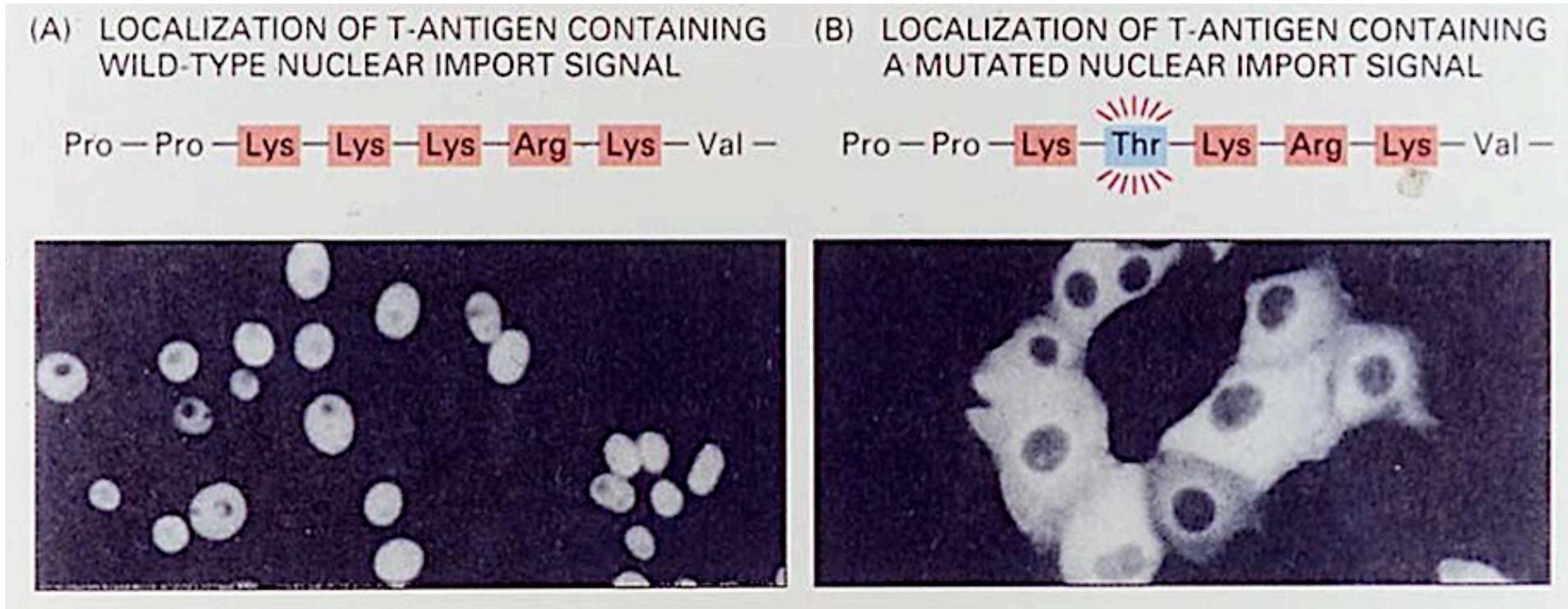


I pori nucleari sono i trasloconi delle proteine nucleari

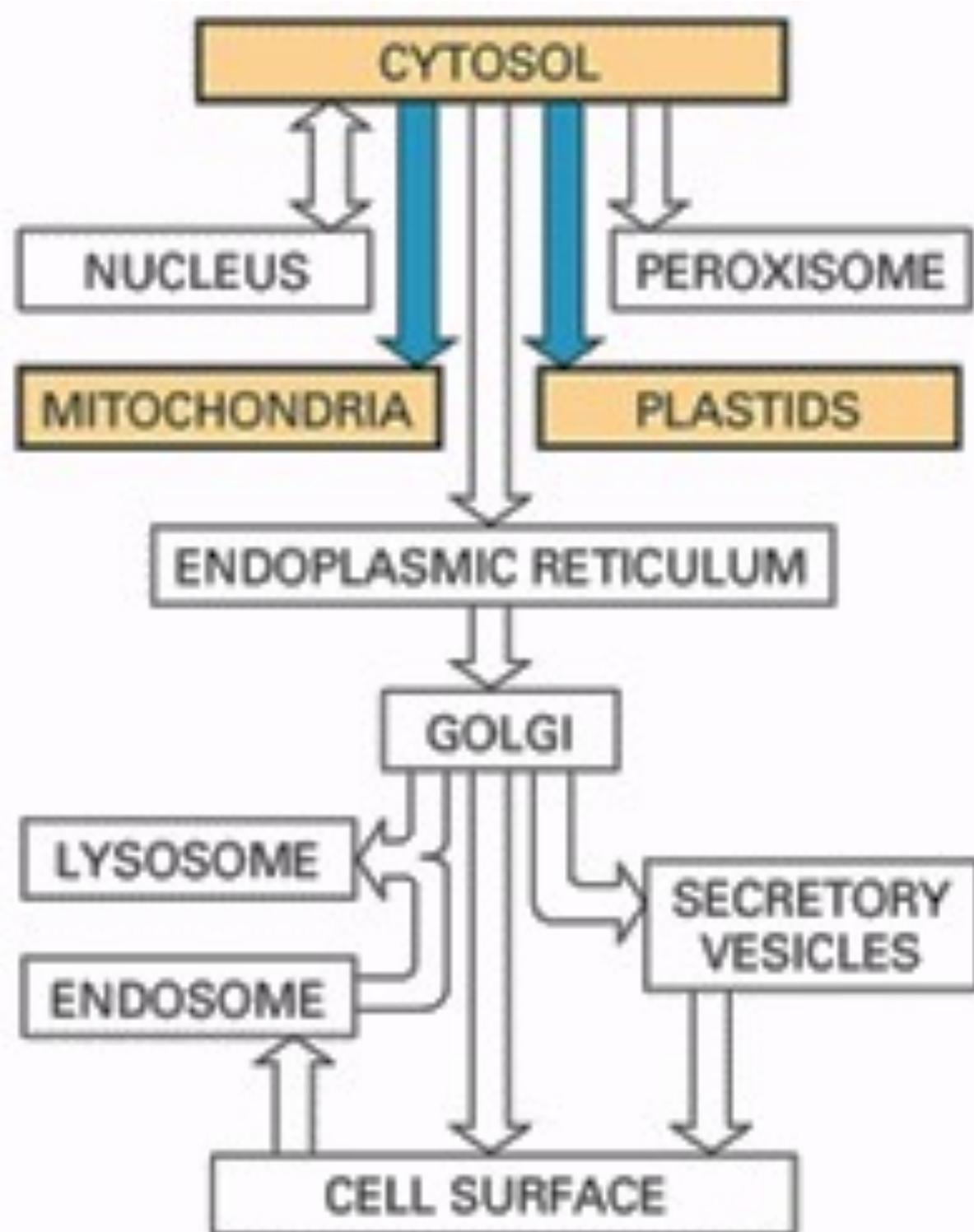


Il segnale di localizzazione nucleare è costituito da un corto peptide composto da 4-5 aminoacidi basici.

Può essere presente in qualsiasi punto della proteina.



IL DETTAGLIO SARÀ SPIEGATO IN BIOLOGIA



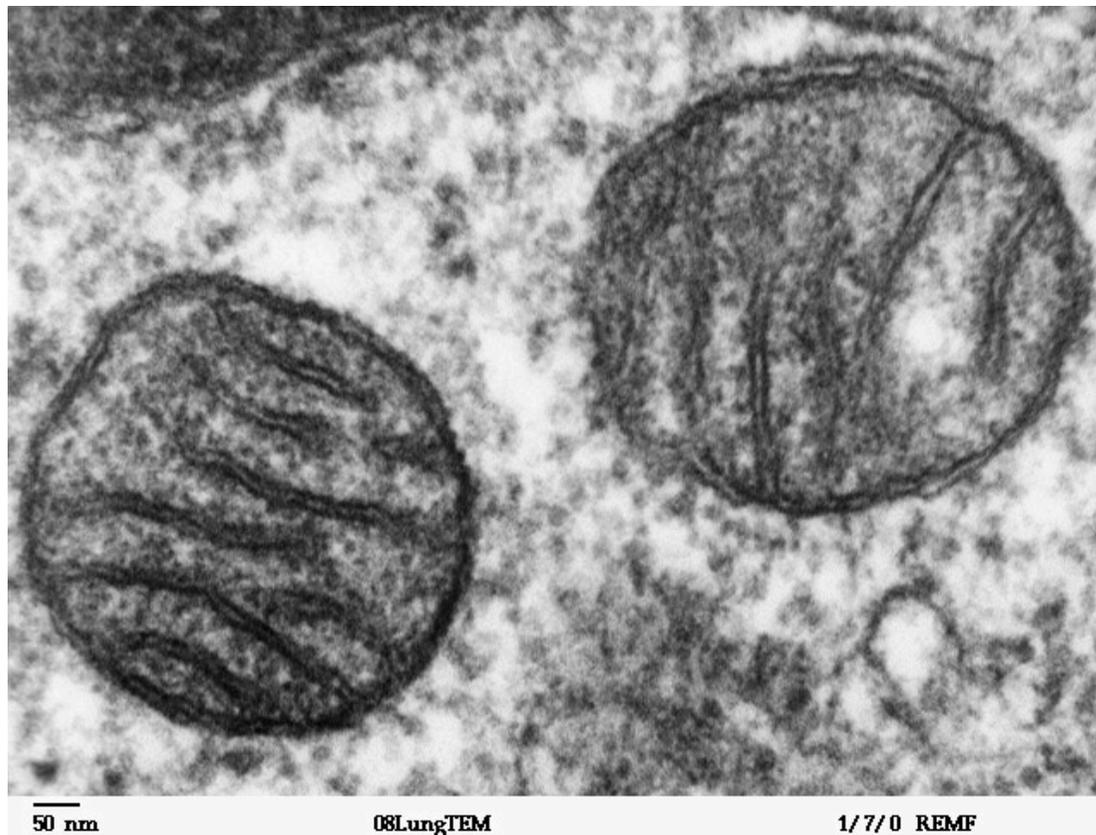
I Mitochondri

Maraldi-Tacchetti, cap. 9

Alberts, cap. 14

Karp, cap. 5

Mitocondri: organelli citoplasmici tubulari con diametro tra 0,5 e 1 μm . Hanno due membrane. Nello spazio contenuto dentro la membrana interna (matrice) sono situate diverse molecole di DNA costituenti il genoma mitocondriale, nonché i ribosomi mitocondriali



Funzioni:

Metabolismo energetico:

ciclo di Krebs

Catena respiratoria

Beta-ossidazione degli acidi grassi

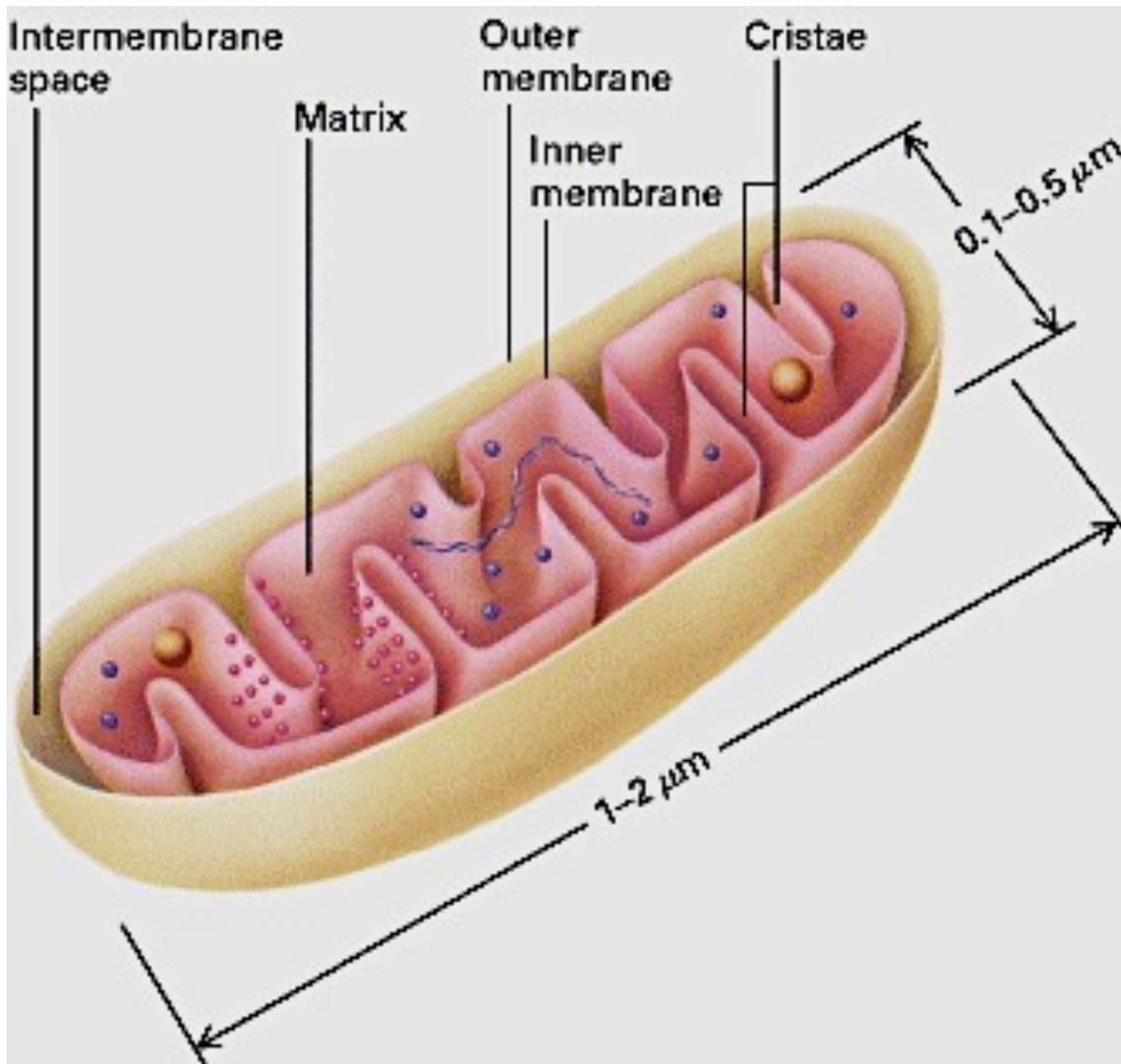
Sintesi degli steroidi a partire dal colesterolo

Produzione di ROS e radicali liberi

Deposito di ioni Ca^{2+}

Morte cellulare programmata (apoptosi)

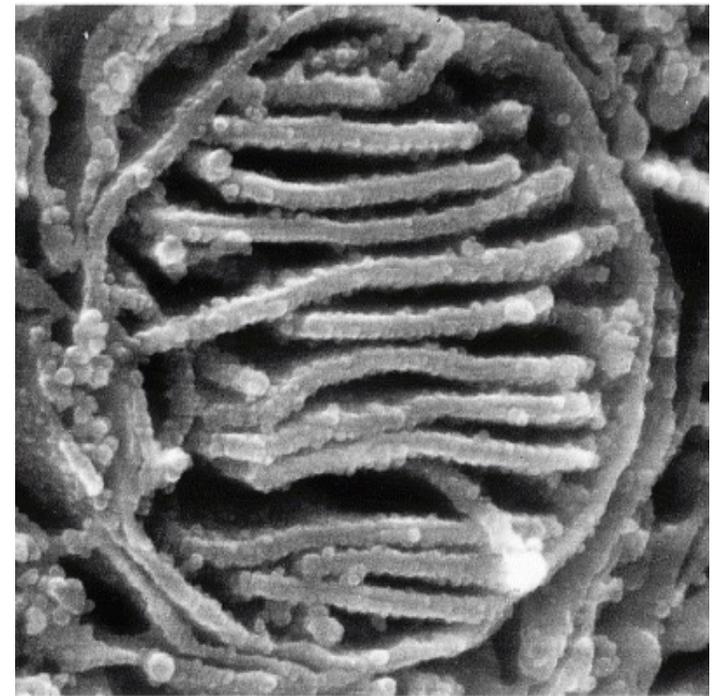
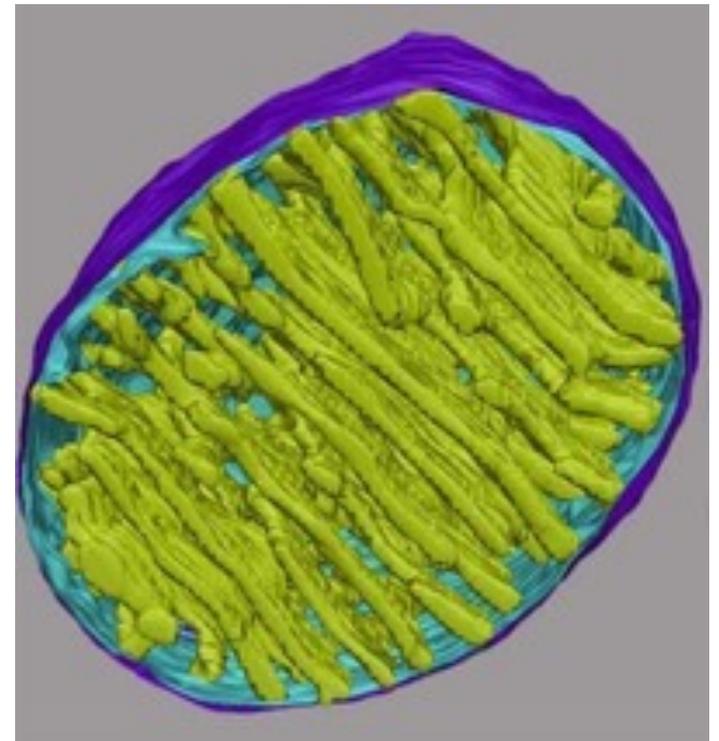
Modello di Palade

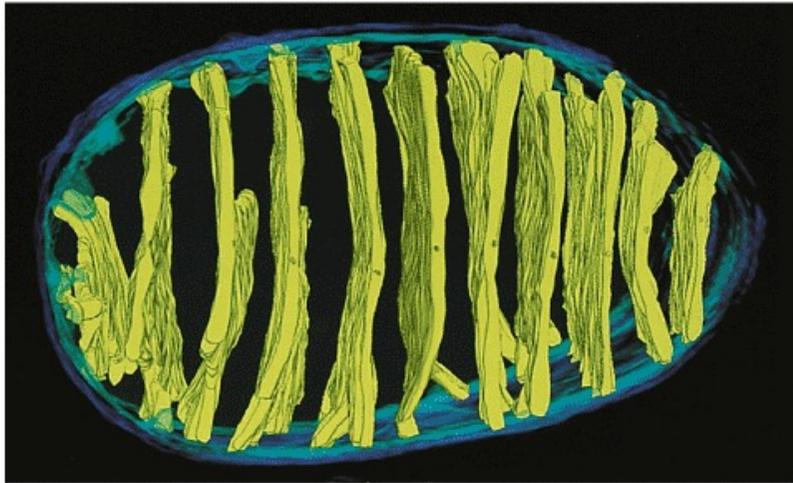


- La membrana esterna e quella interna sono separate da uno spazio consistente
- La matrice occupa uno spazio relativamente piccolo del mitocondrio
- La membrana interna forma delle ondulazioni dette creste che penetrano verso la matrice.
- Lo spazio contenuto nelle creste è contiguo con lo spazio tra la membrana esterna e quella interna
- Ogni cellula ha più di un mitocondrio. I mitocondri sono organelli separati a forma bastoncellare (lunghezza 1-2 μm)

La vera struttura dei mitocondri

- Lo spazio tra le membrane esterna ed interna è molto ridotto.
- Gran parte dello spazio interno al mitocondrio è occupato dalla matrice
- Le creste mitocondriali sono strutture molto allungate che sorgono da un lato della membrana interna per penetrare nella matrice fino a quasi toccare l'altro lato della membrana.
- Creste diverse sono fuse fra di loro formando una sorta di rete di cisterne
- Lo spazio contenuto nelle creste è solo parzialmente in continuità con lo spazio tra le membrane

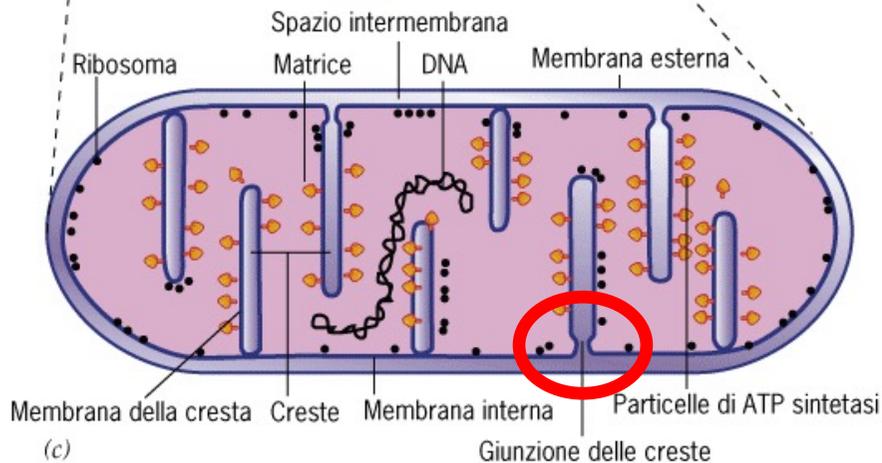
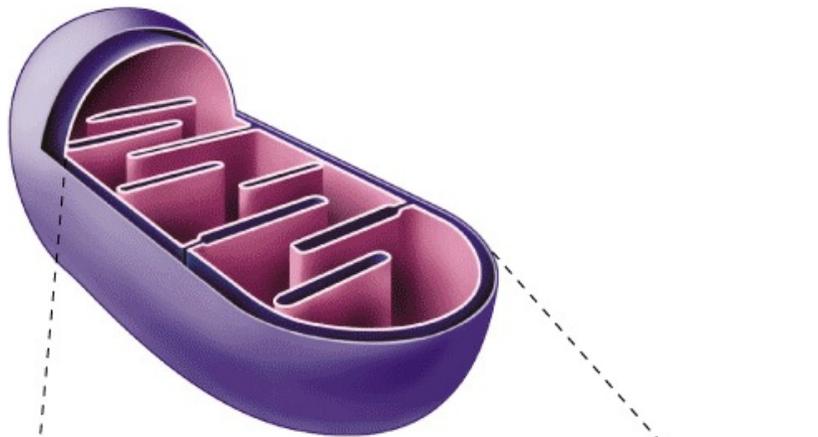




(b)

1 μ m

La comunicazione tra la membrana interna delle creste la membrana interna affacciata sullo spazio intermembrana è limitata

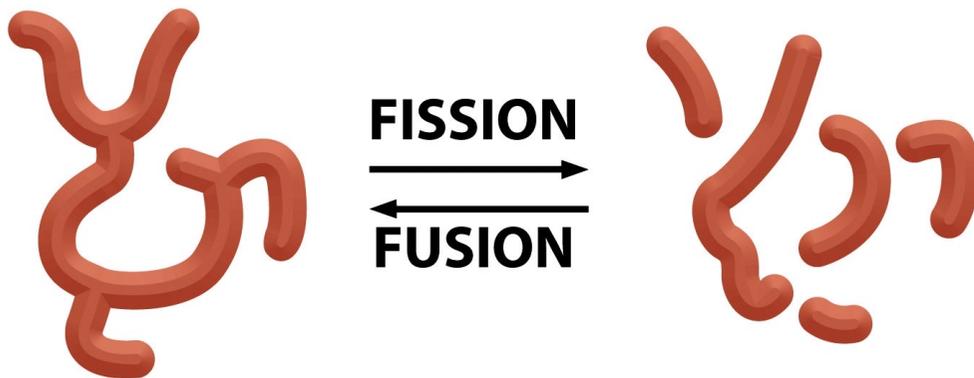
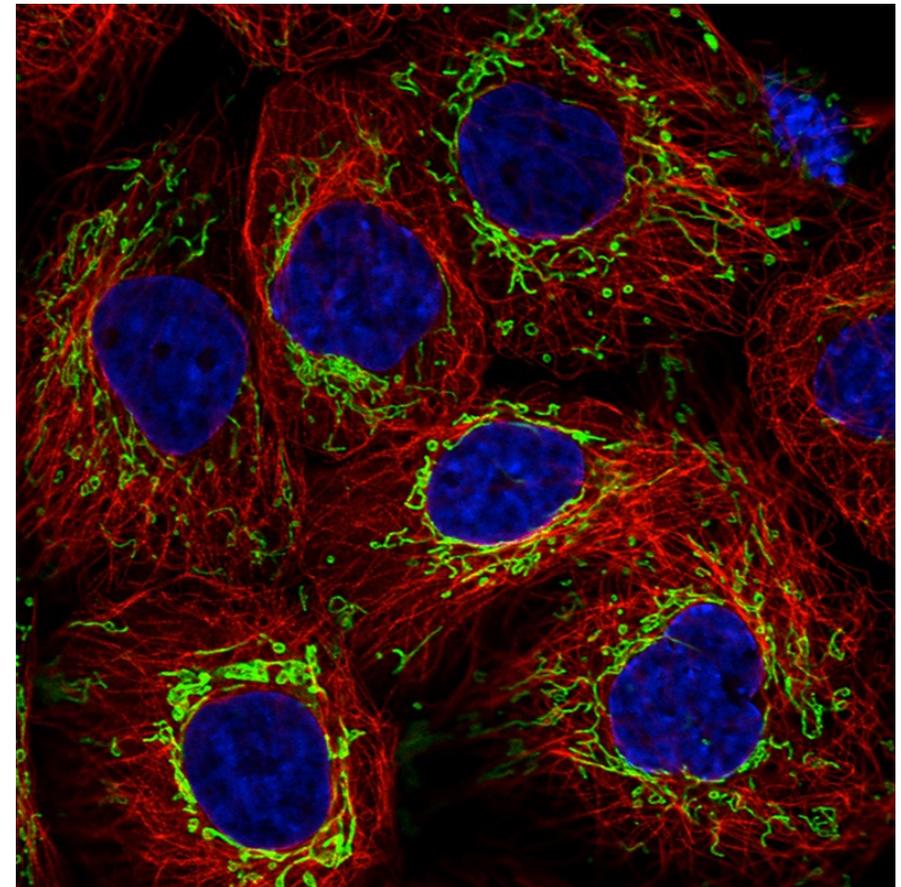
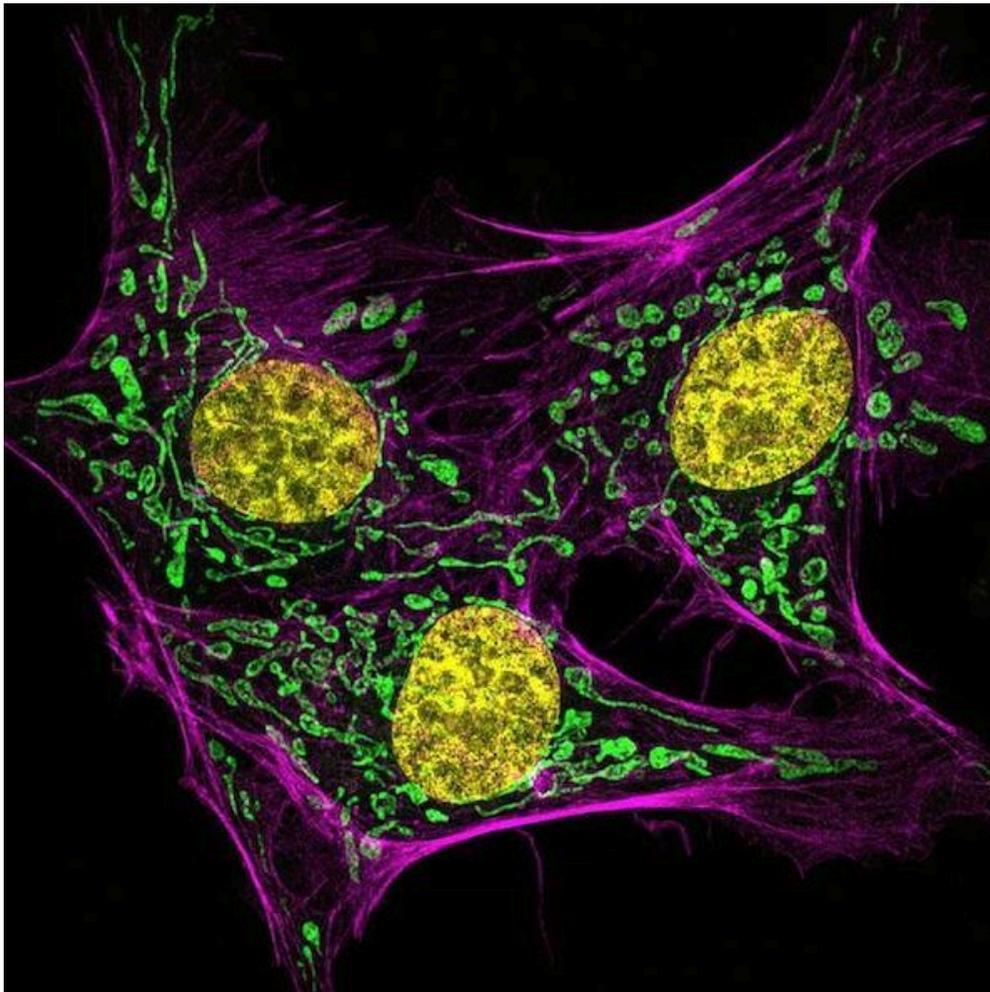


(c)

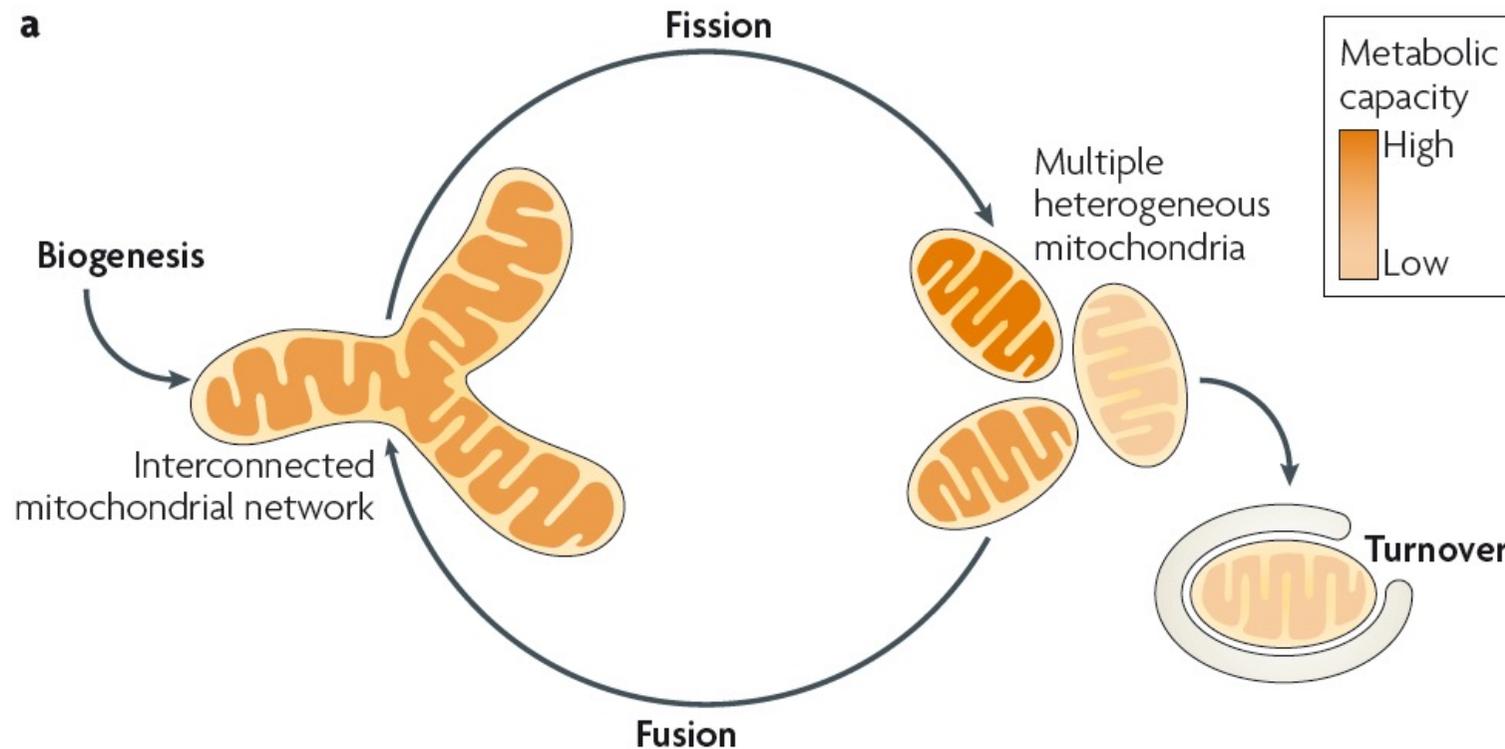
limite alla diffusione laterale di proteine transmembrana (es: F ATPasi)

limite alla diffusione di proteine dalle cisterne delle creste allo spazio i.m. (es. citocromo c)

I mitocondri appaiono come organelli allungati che possono fondersi tra loro in una sorta di rete di mitocondri (**in verde** nella foto al confocale), dalla quale possono rigenerarsi organelli singoli nel processo di fissione



Il ciclo vitale dei mitocondri

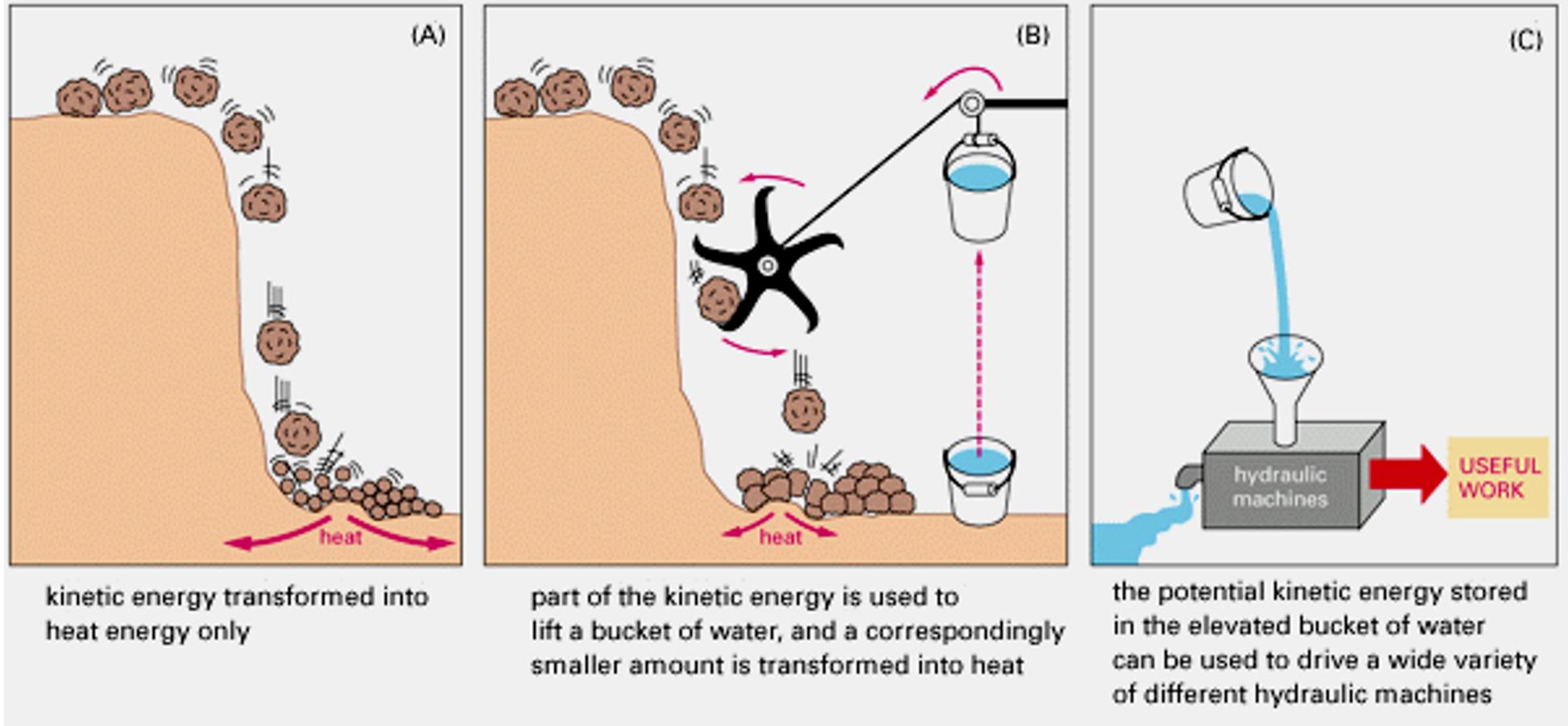


Nella maggior parte delle cellule i mitocondri esistono sia come rete che come organelli separati. L'equilibrio tra le due è garantito da molteplici fenomeni di fusione e fissione dei mitocondri.

Difetti nella dinamica di fusione/fissione è causa di malattie.

I mitocondri isolati che diventano poco efficienti nello svolgere le loro funzioni metaboliche vengono digeriti dalla cellula (autofagia) e i loro componenti molecolari recuperati per generare nuove strutture.

Le funzioni metaboliche dei mitocondri



rottura di legami covalenti ad alta energia

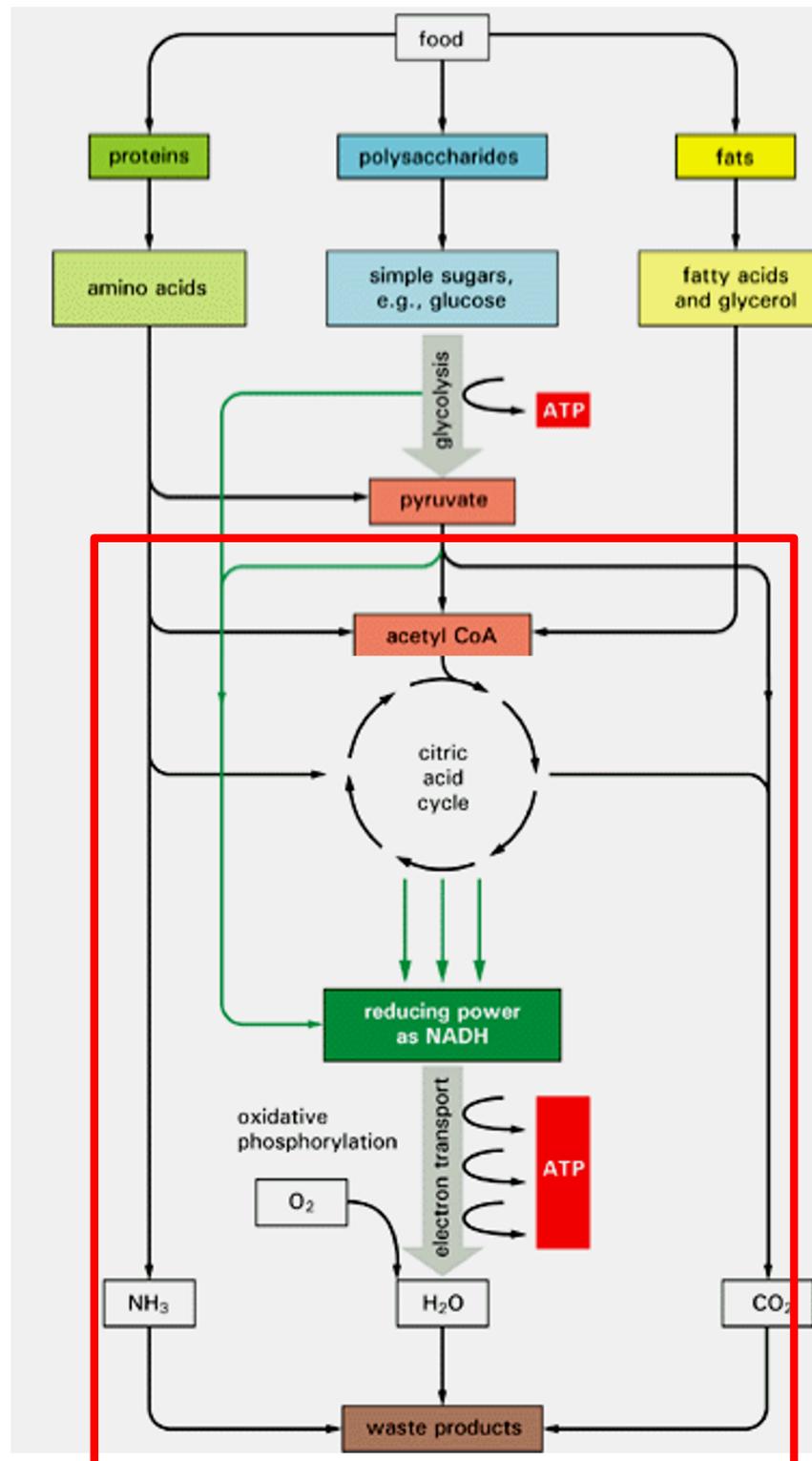
accoppiamento con la produzione di ATP

ATP come “carburante” per le reazioni cellulari

STAGE 1:
breakdown of large macromolecules to simple subunits

STAGE 2:
breakdown of simple subunits to acetyl CoA accompanied by production of limited amounts of ATP and NADH

STAGE 3:
complete oxidation of acetyl CoA to H_2O and CO_2 accompanied by production of large amounts of NADH and ATP





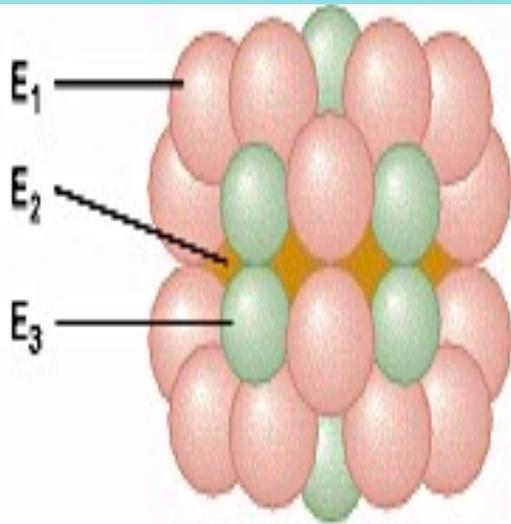
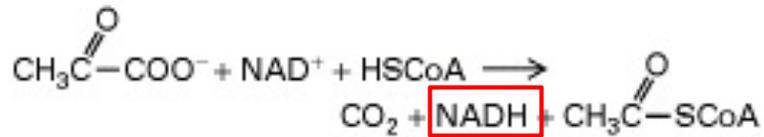
glucose

pyruvate

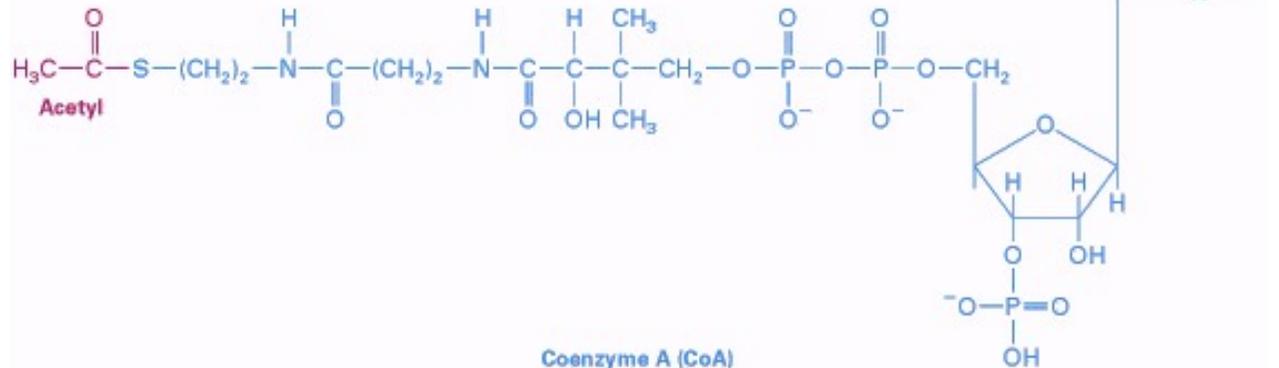
Citosol

Matrice
mitocondriale

pyruvate dehydrogenase

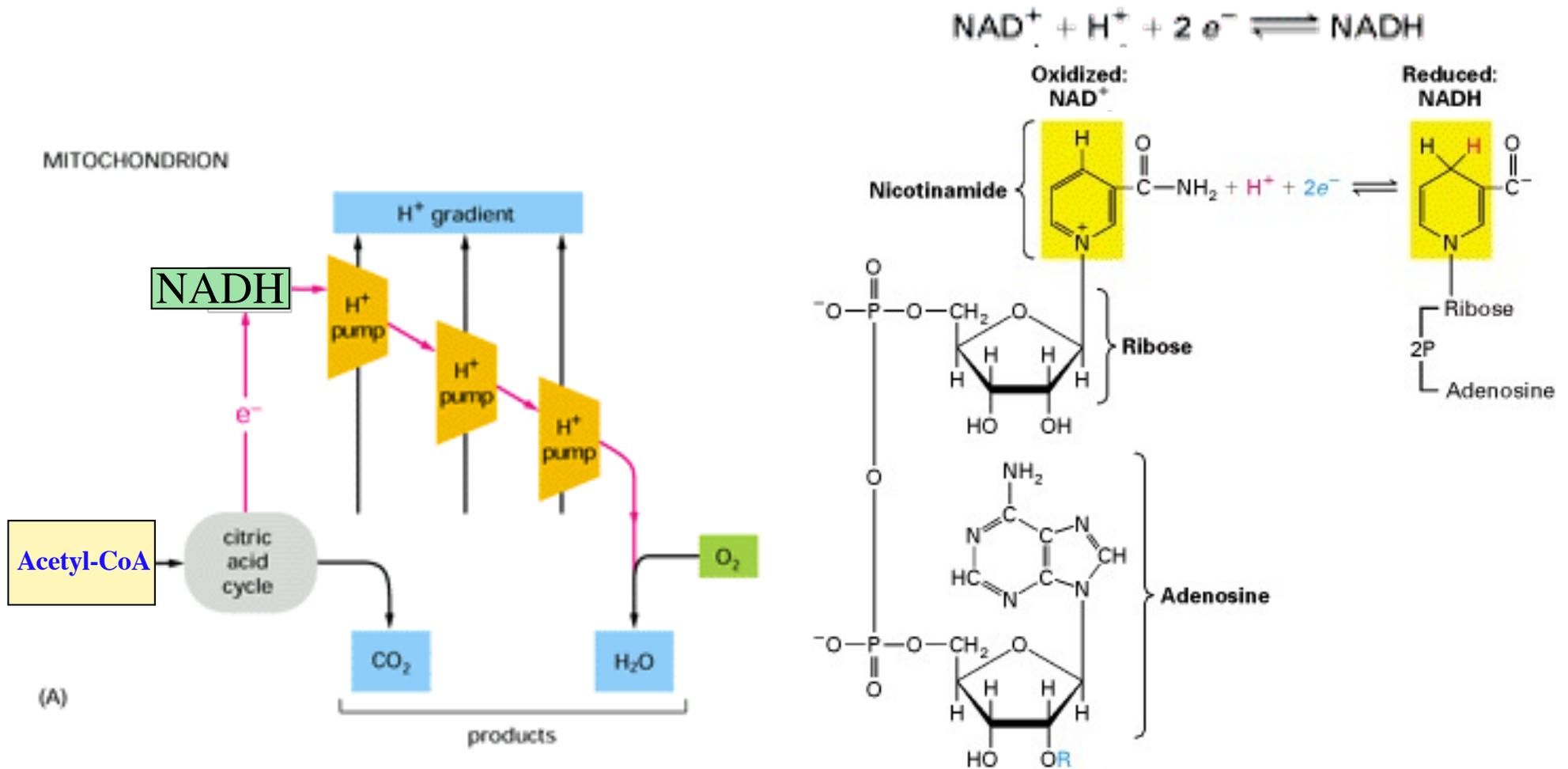


in mitochondrial matrix



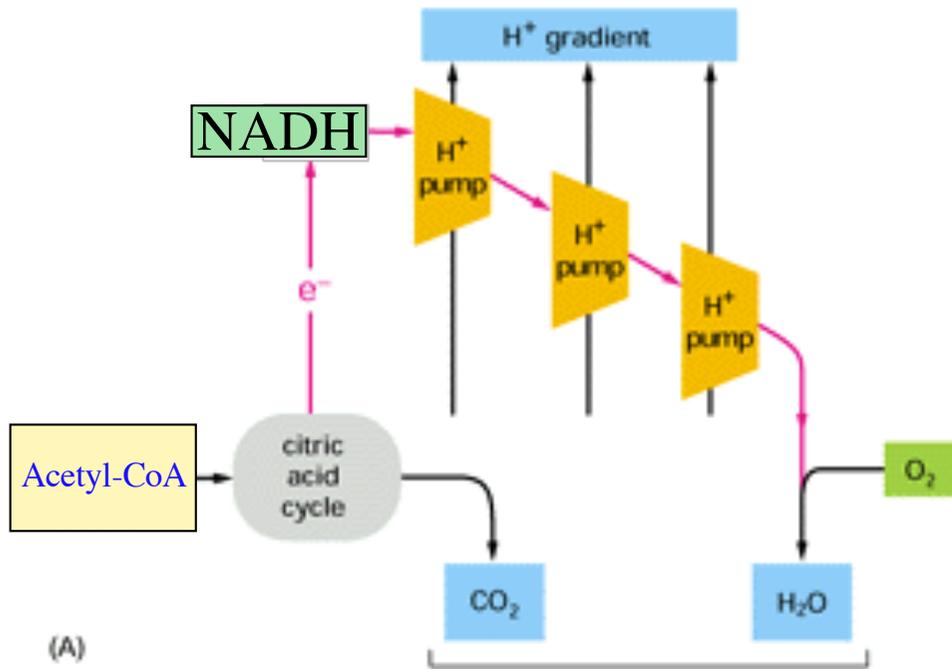
IL DETTAGLIO VERRÀ SPIEGATO IN BIOCHIMICA

Le reazioni biochimiche che avvengono all'interno della matrice mitocondriale portano alla formazione del NADH a partire dal NAD⁺ e H⁺



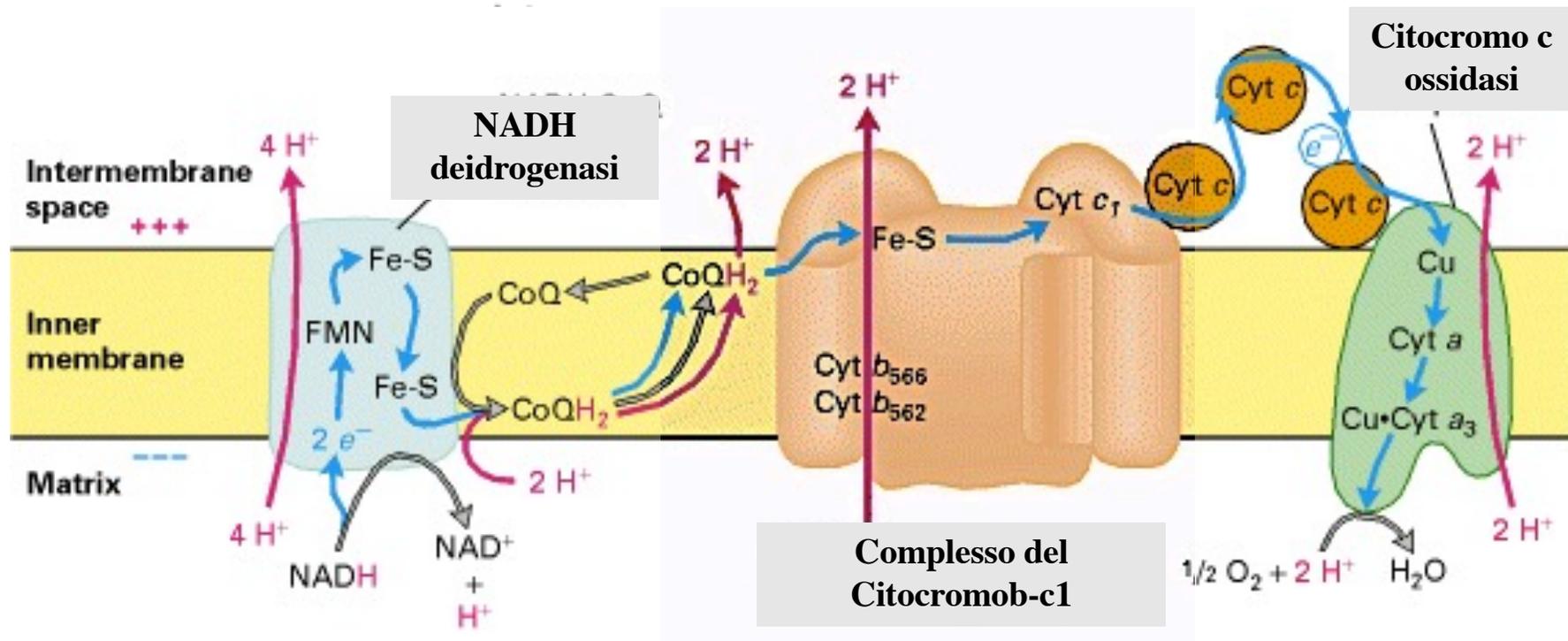
IL DETTAGLIO VERRÀ SPIEGATO IN BIOCHIMICA

MITOCHONDRION

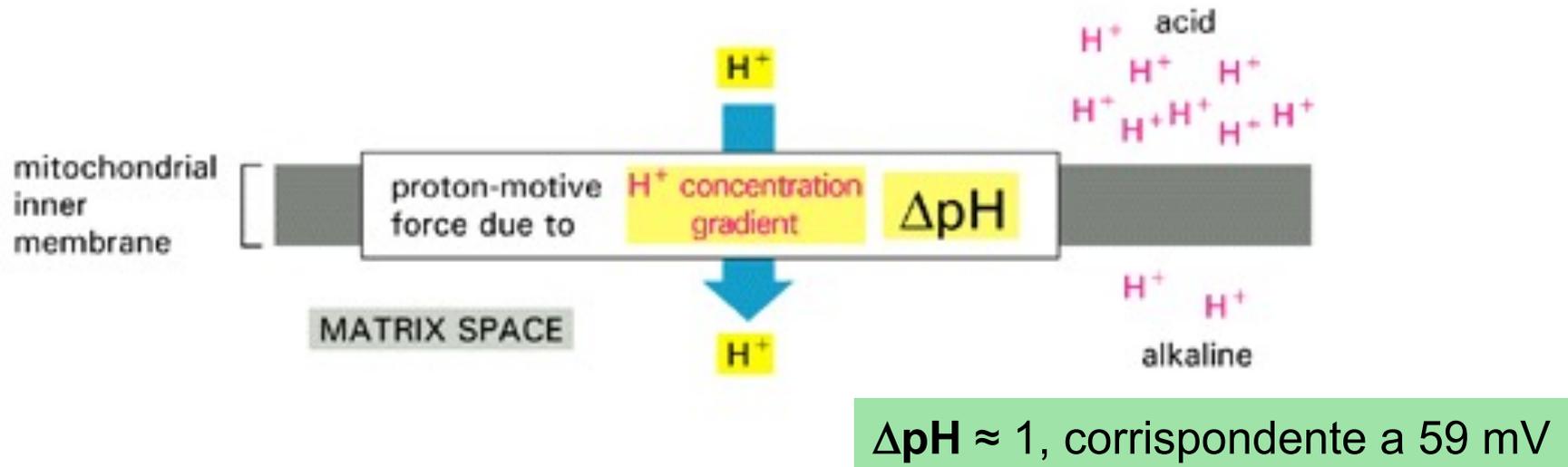
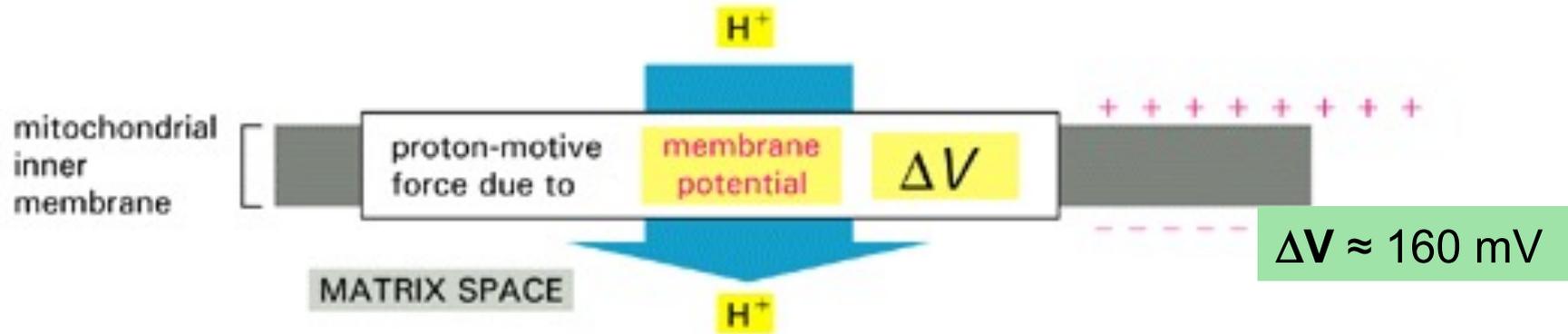


Il NADH viene usato da una serie di complessi presenti sulla membrana interna del mitocondrio (catena respiratoria) per pompare H⁺ all'interno delle creste mitocondriali e nello spazio intermembrana

(A)

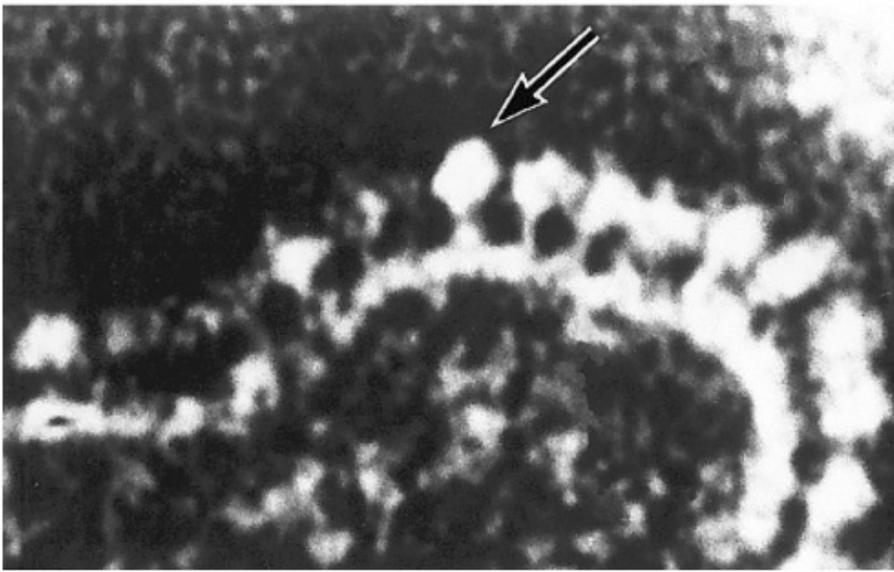


Il potenziale della membrana interna del mitocondrio



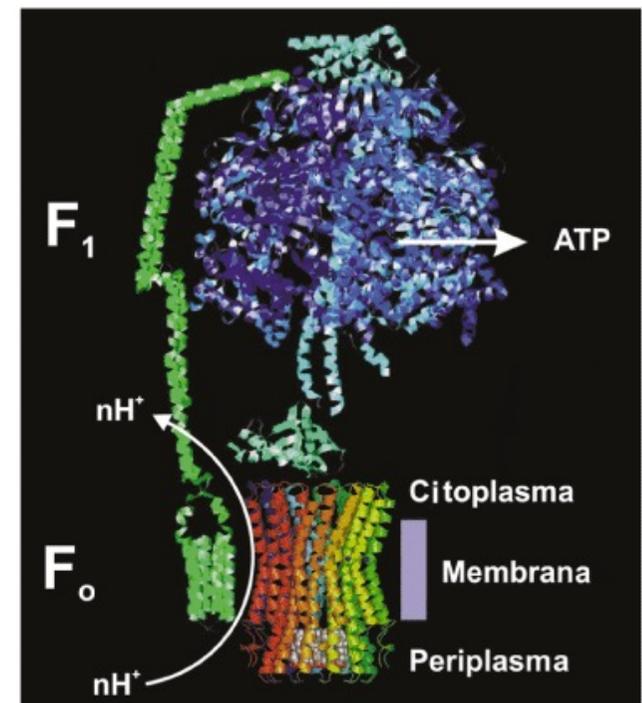
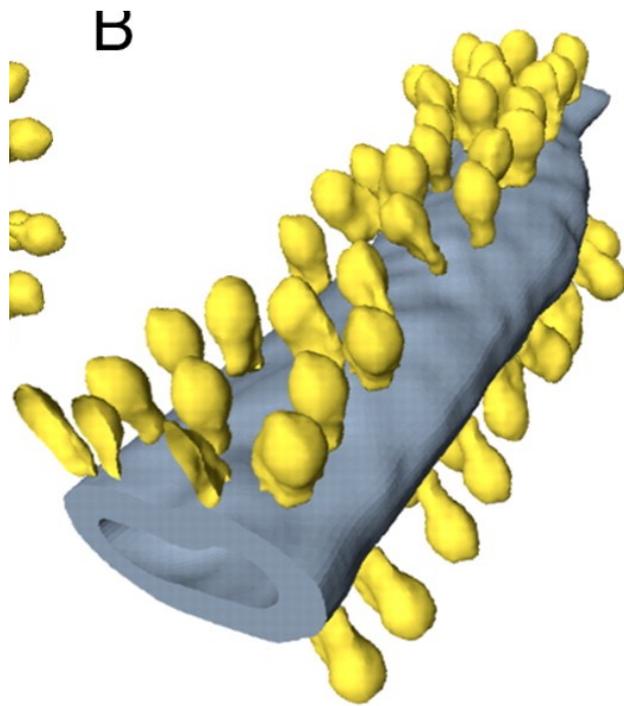
$$\text{pmf} = \Delta V - \frac{RT}{F} \times \Delta \text{pH}$$

$$\text{pmf} \approx 160 \text{ mV} + 59 \text{ mV} \approx 220 \text{ mV}$$

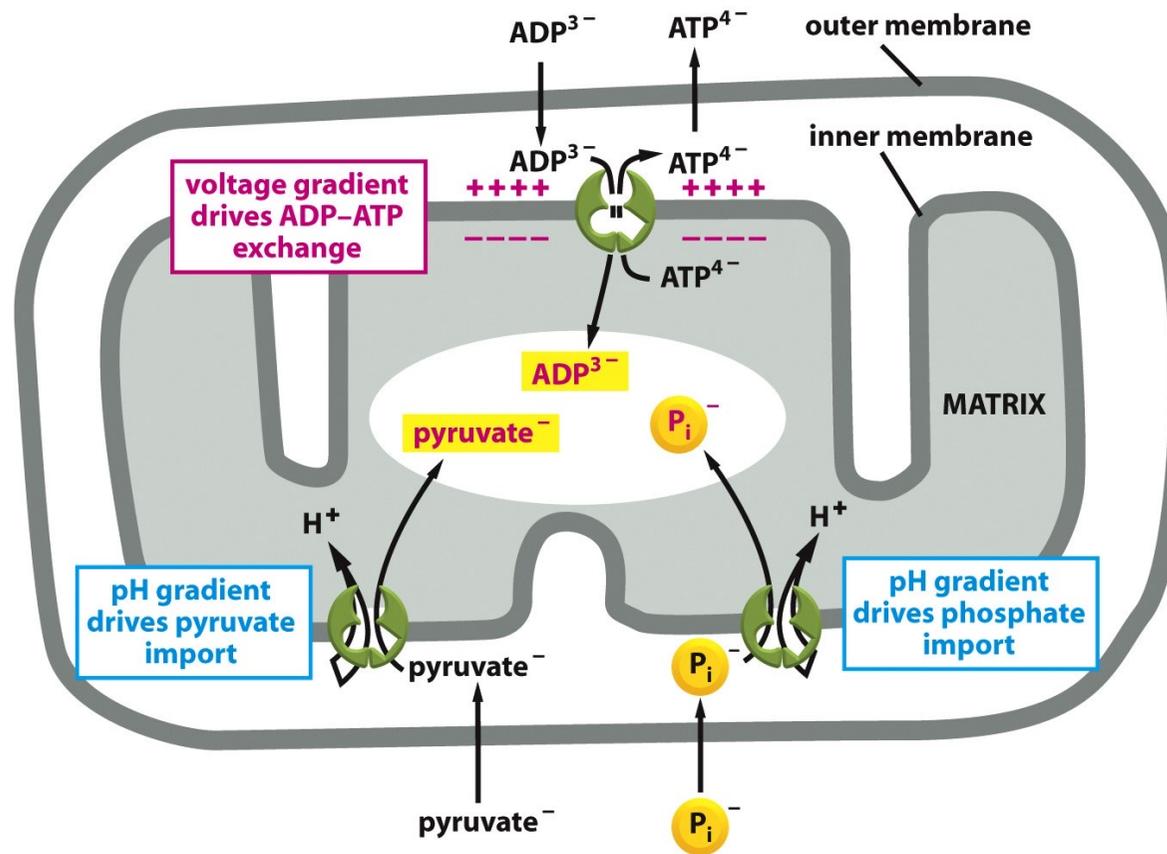


L'ATP-sintasi

Pompa di tipo F **principalmente** localizzata sulle creste mitocondriali. Funziona al contrario delle altre pompe: utilizza il gradiente elettrochimico dello ione idrogeno per generare ATP a partire dall'ADP e il fosfato.



Il trasporto attraverso le membrane del mitocondrio

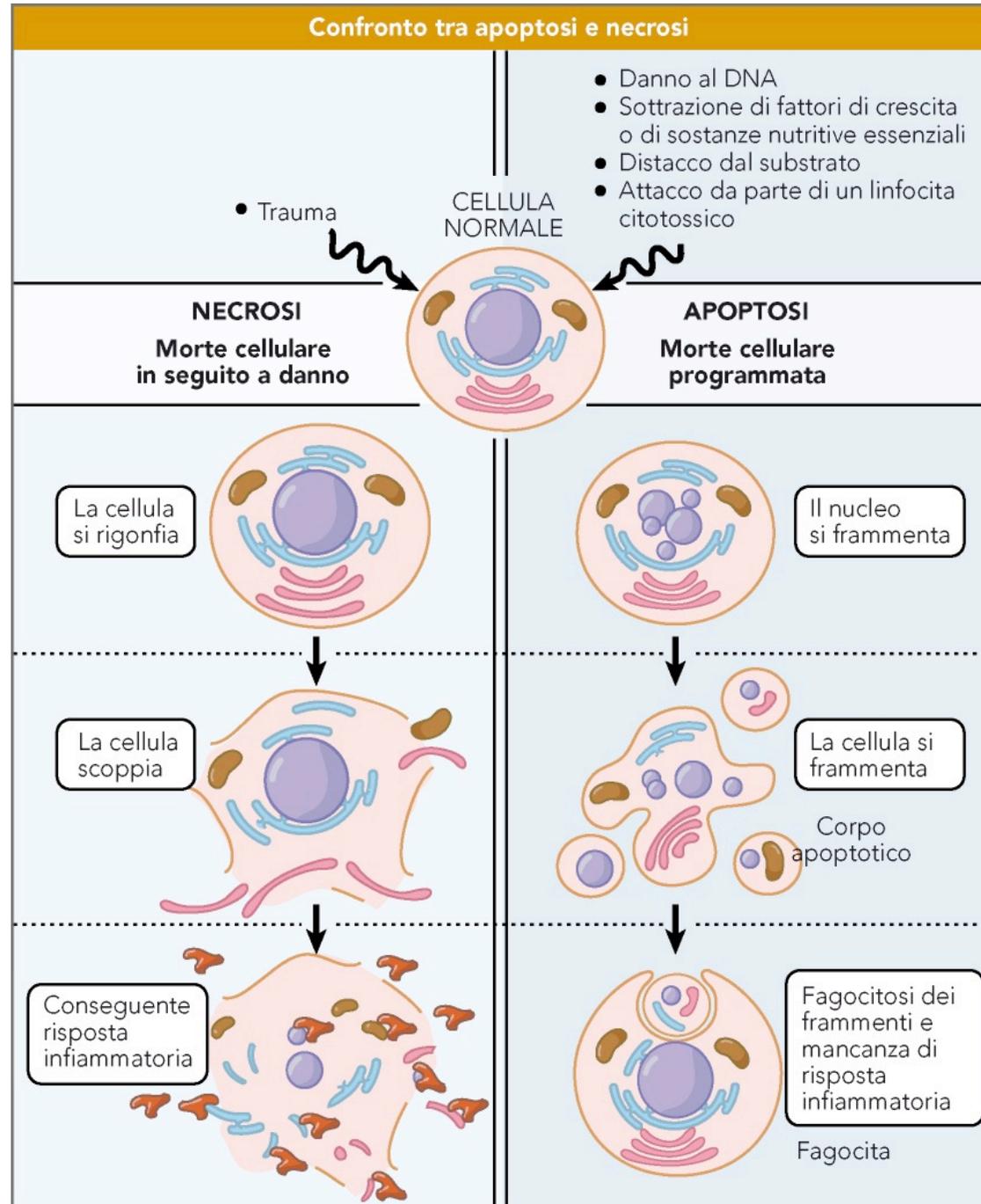


La membrana esterna del mitocondrio è attraversata da porine = non esiste barriera al passaggio di ioni e piccole molecole

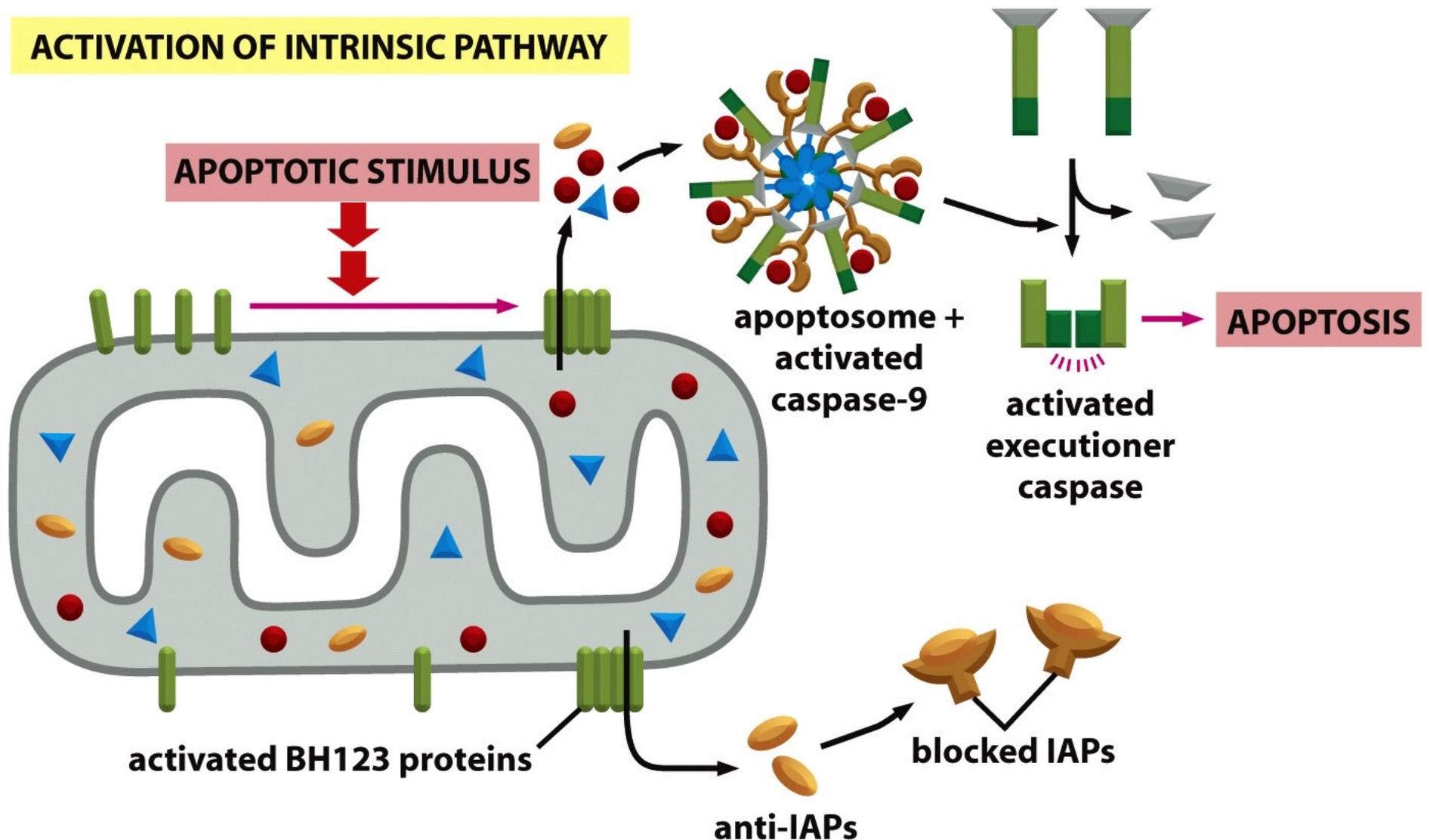
Il trasporto attraverso la membrana interna utilizza il gradiente elettrochimico dello ione H⁺

- L'ATP viene scambiato in trasporto con l'ADP, e questo è favorito dalla loro differenza di carica elettrica
- Il piruvato entra in sinporto con H⁺
- Lo ione fosfato entra in sinporto con H⁺

MORTE CELLULARE



Sulla membrana esterna del mitocondrio sono presenti delle proteine che, sotto stimoli adeguati possono combinarsi per formare un canale che porta all'uscita del citocromo C. Una volta nel citoplasma il citocromo C interagisce con complessi proteici ad attività proteolitica (**caspsi**) che portano alla degradazione delle strutture cellulari.



Proteine necessarie alle funzioni del mitocondrio:

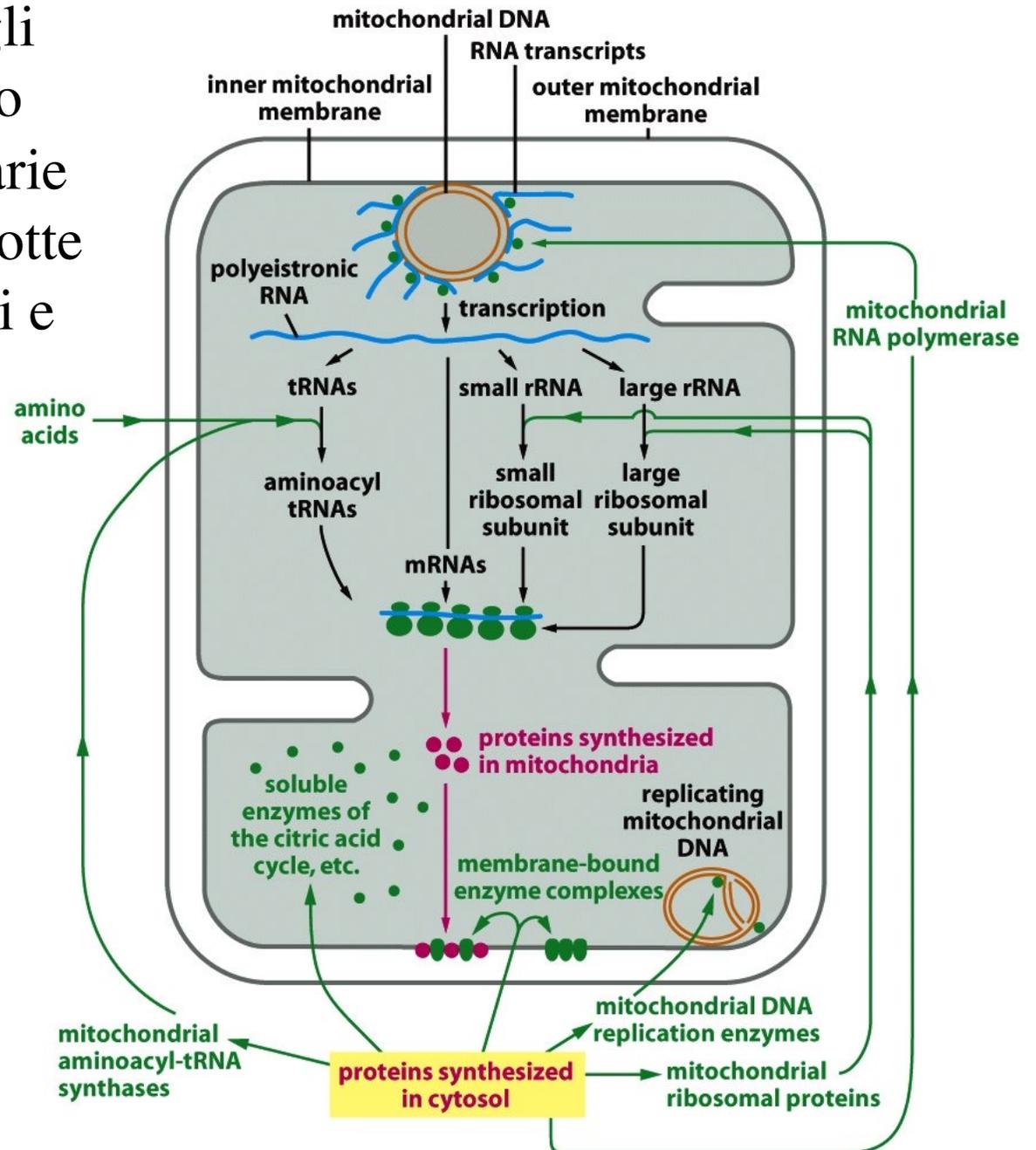
Matrice: Piruvato deidrogenasi, enzimi del ciclo di Krebs

Membrana mitocondriale interna: NADH deidrogenasi, complesso del citocromo B1, Citocromo C ossidasi, ATP sintasi, trasportatori dell'ATP/ADP, del piruvato e del fosfato

Spazio intermembrana/interno delle creste mitocondriali:
citocromo C

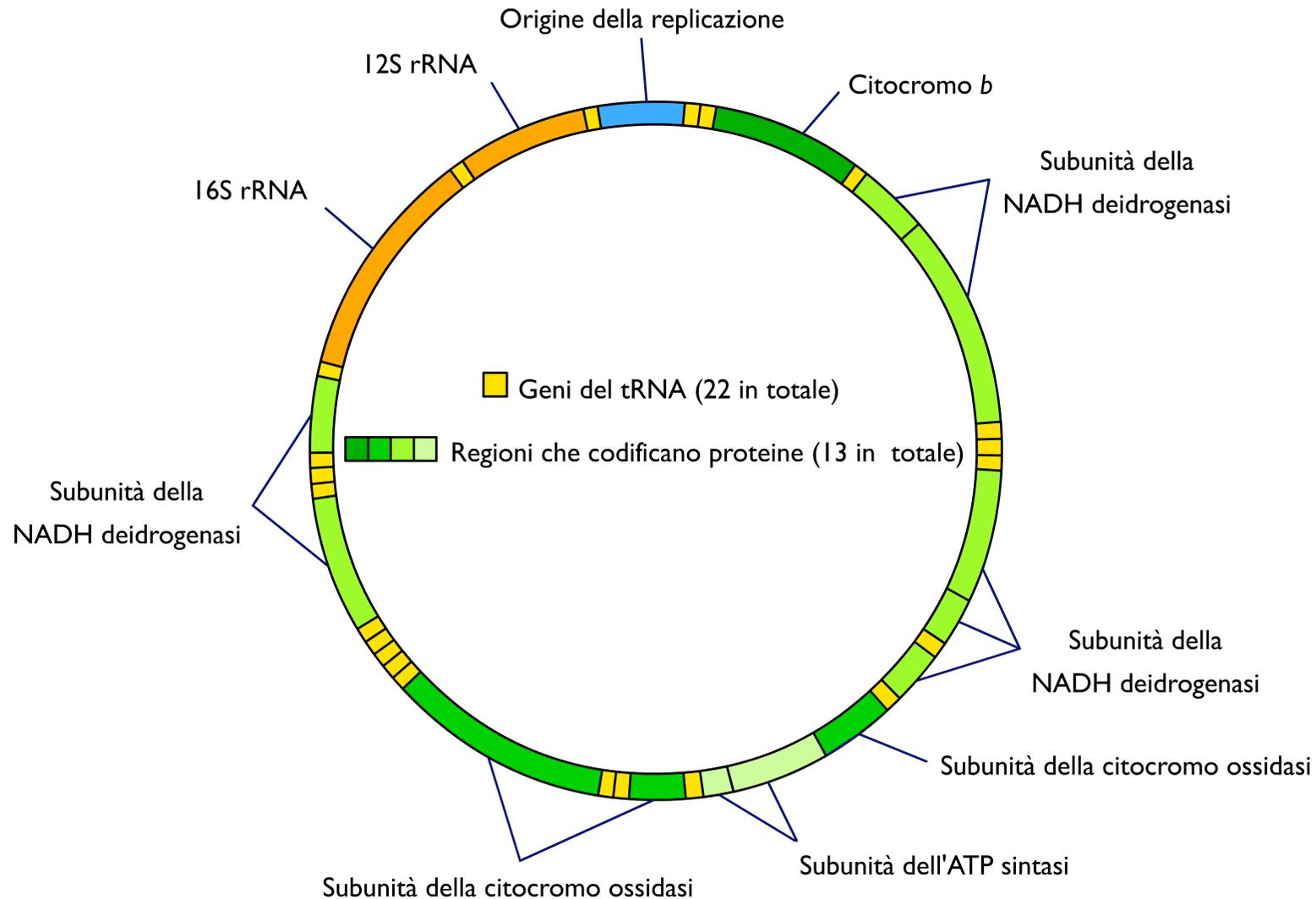
Membrana mitocondriale esterna: porine, componenti del canale per il citocromo C (apoptosi)

Il mitocondrio è unico tra gli organelli cellulari, in quanto parte delle proteine necessarie alle sue funzioni sono prodotte a partire da mRNA trascritti e tradotti all'interno dell'organulo stesso.



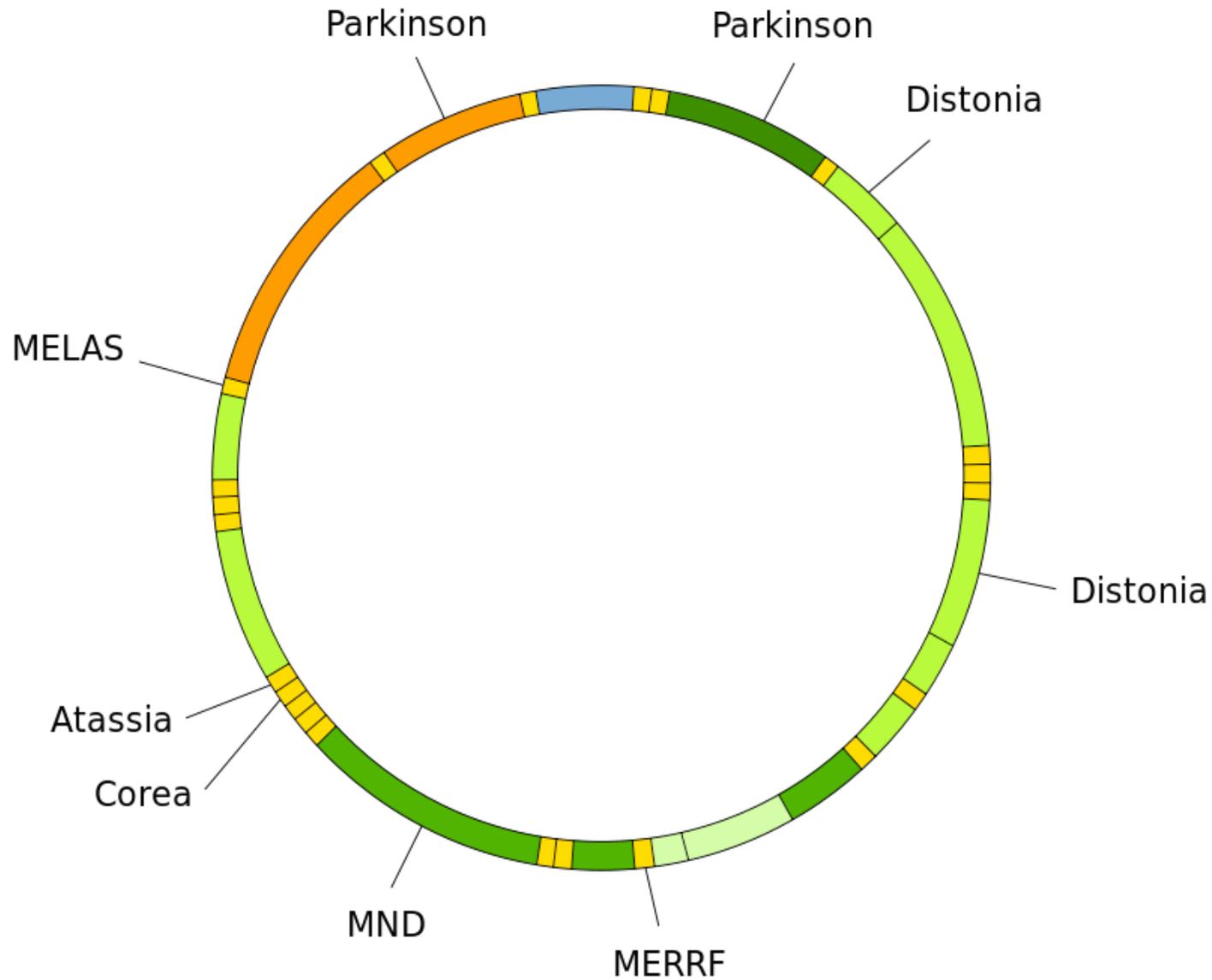
Informazione codificata nel nucleo

Il genoma mitocondriale codifica per i tRNA mitocondriali, gli rRNA mitocondriali e per componenti dei complessi della catena respiratoria e dell'ATP-sintasi

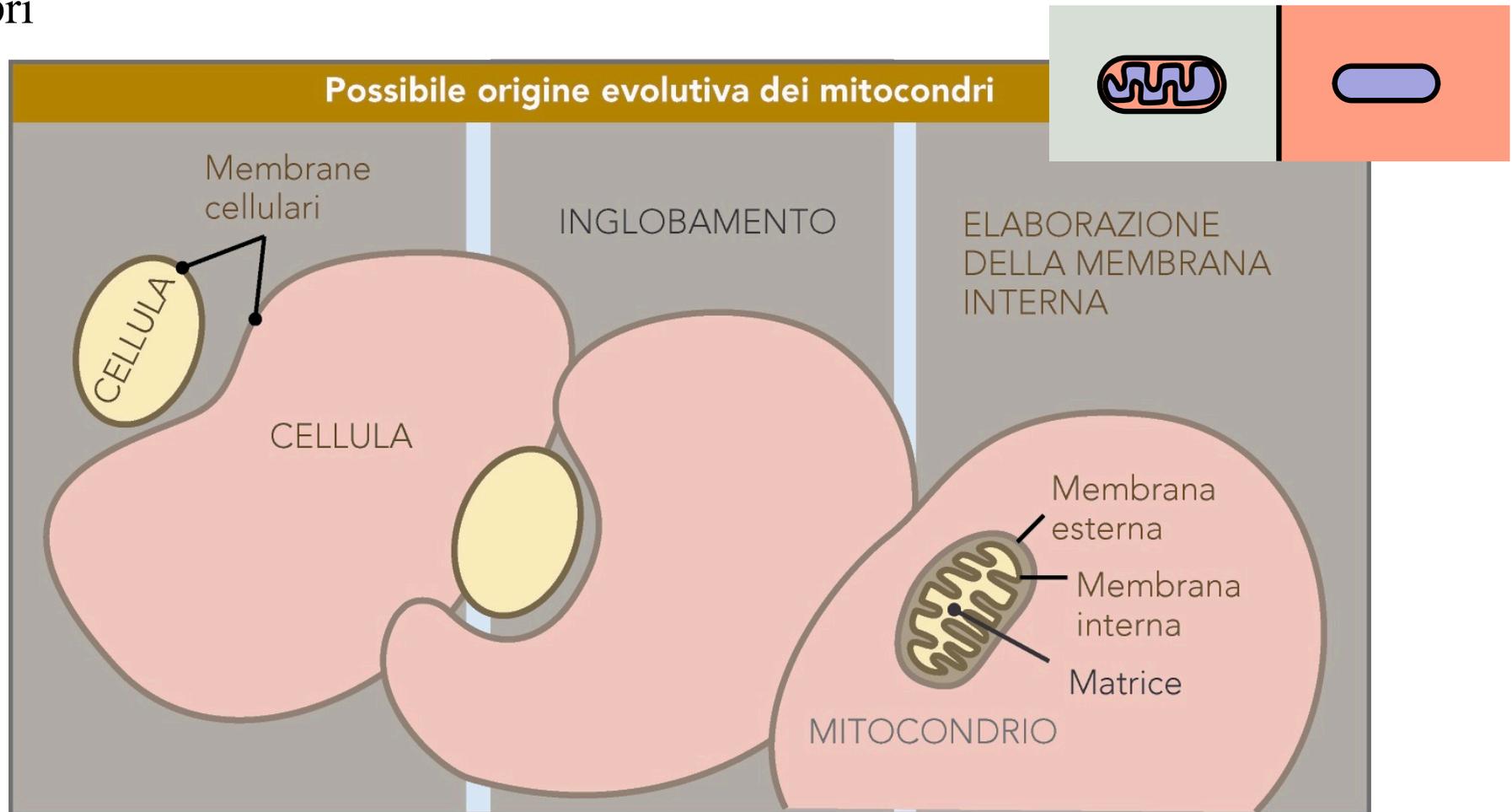


Tutte le altre proteine mitocondriali sono codificate dal genoma nucleare e prodotte dai ribosomi citoplasmici, comprese la DNA polimerasi mitocondriale, l'RNA polimerasi mitocondriale e le proteine dei ribosomi mitocondriali

Alcune malattie genetiche umane sono collegate a mutazioni del DNA mitocondriale



Sui pensa che i mitocondri derivino da batteri simbiotici: questa è la ragione per cui i mitocondri sono gli unici organelli animali dotati di un genoma e di ribosomi propri



Durante l'evoluzione delle cellule eucariote i mitocondri hanno perso gran parte dei loro geni che sono stati incamerati nel nucleo.

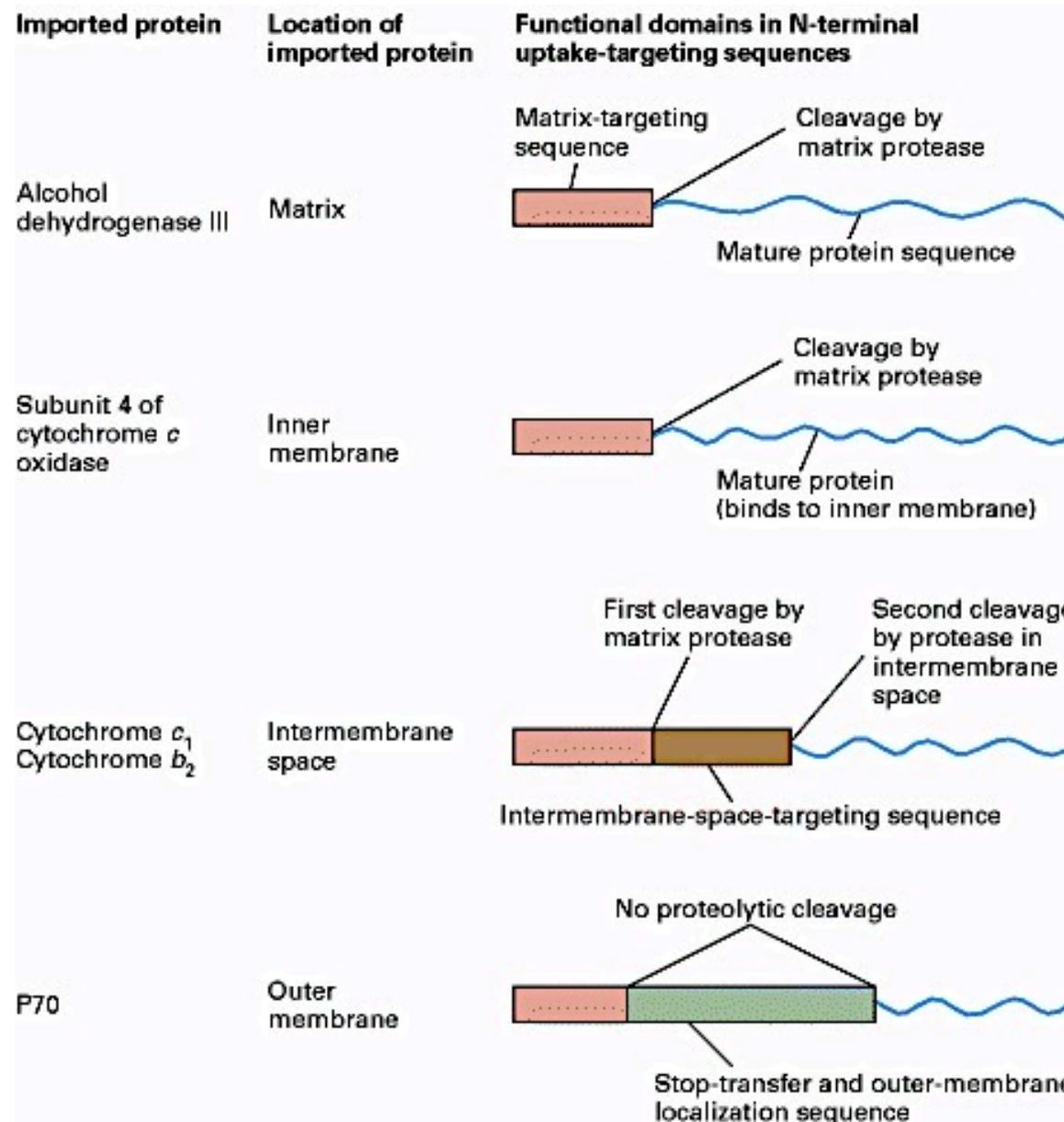
É possibile che i geni rimasti servano a produrre proteine che richiedono un rapido ricambio, per cui è più produttivo produrre la proteina nell'organello dove viene utilizzata

La maggior parte delle proteine mitocondriali sono prodotte da ribosomi citoplasmici a partire da mRNA trascritti nel nucleo

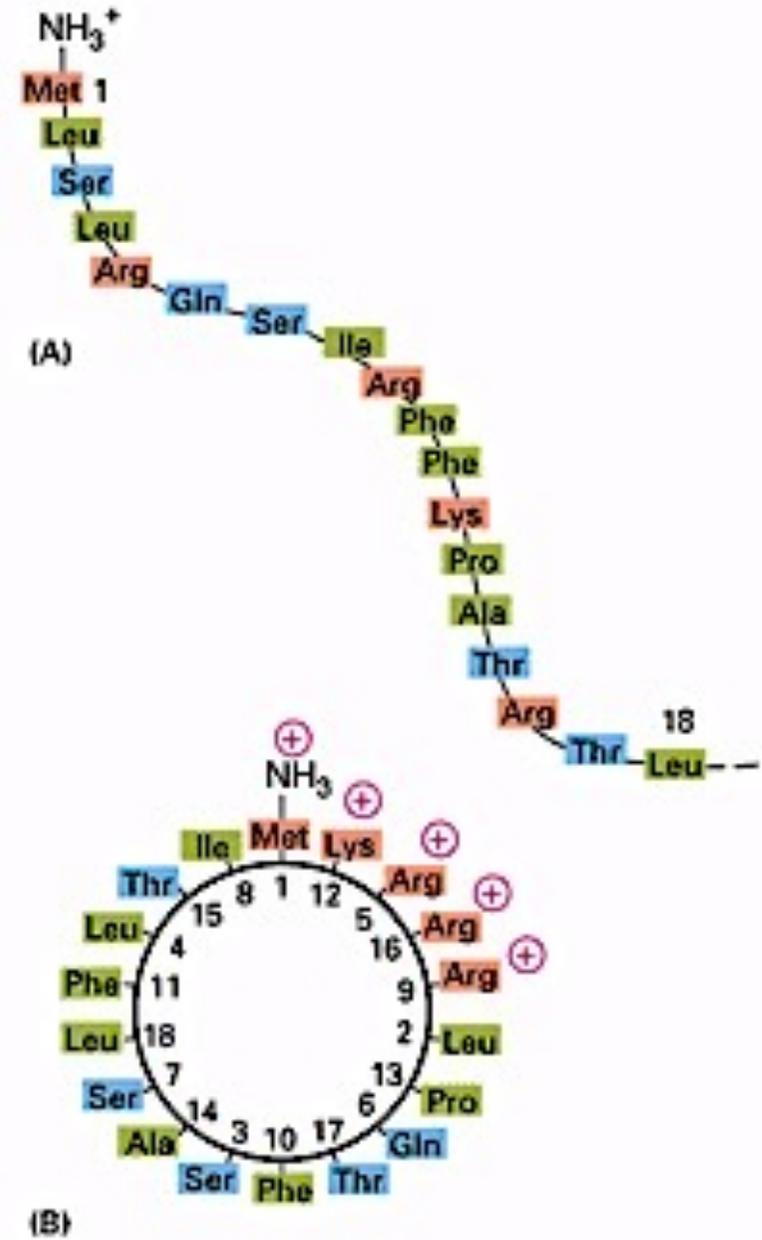
Mitochondrial Location	Protein*
Matrix	Alcohol dehydrogenase (yeast) Carbamoyl phosphate synthase (mammals) Citrate synthase and other citric acid enzymes DNA polymerase F ₁ ATPase subunits α (except in plants), β , γ , and δ (in certain fungi) Mn ²⁺ -superoxide dismutase Ornithine aminotransferase (mammals) Ornithine transcarbamoylase (mammals) Ribosomal proteins RNA polymerase
Inner membrane	ADP/ATP antiporter CoQH ₂ -cytochrome <i>c</i> reductase complex: subunits 1, 2, 5 (Fe-S protein), 6, 7, and 8 Cytochrome <i>c</i> oxidase subunits 4, 5, 6, and 7 Phosphate/OH ⁻ antiporter Proteolipid of F ₀ ATPase Thermogenin (brown fat)
Intermembrane space	Cytochrome <i>c</i> Cytochrome <i>c</i> peroxidase Cytochrome <i>b</i> ₂ and <i>c</i> ₁ (subunits of CoQH ₂ -cytochrome <i>c</i> reductase complex)
Outer membrane	Mitochondrial porin (P70)

* Most proteins (except the ADP-ATP antiporter, cytochrome *c*, and porin) are fabricated as longer precursors.

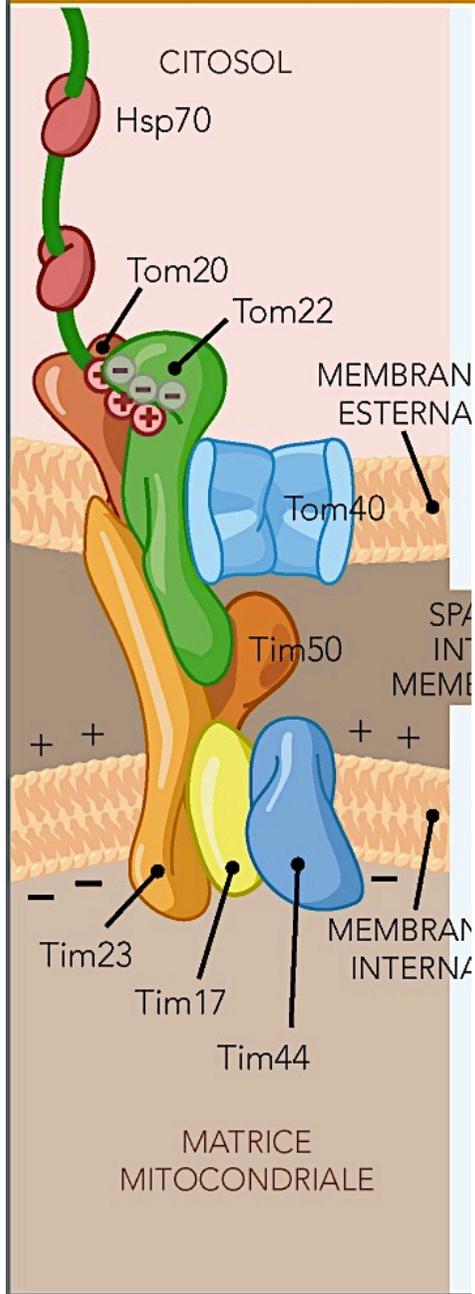
La localizzazione delle proteine nei vari comparti mitocondriali è resa possibile da un **peptide segnale N-terminale**, che le dirige alla matrice, e altri **segnali accessori** che dirigono la proteina ad altre destinazioni se diverse dalla matrice



Il segnale per la localizzazione delle proteine alla matrice mitocondriale: alfa-elica anfipatica all'estremità N-terminale



Trasporto delle proteine attraverso le membrane mitocondriali

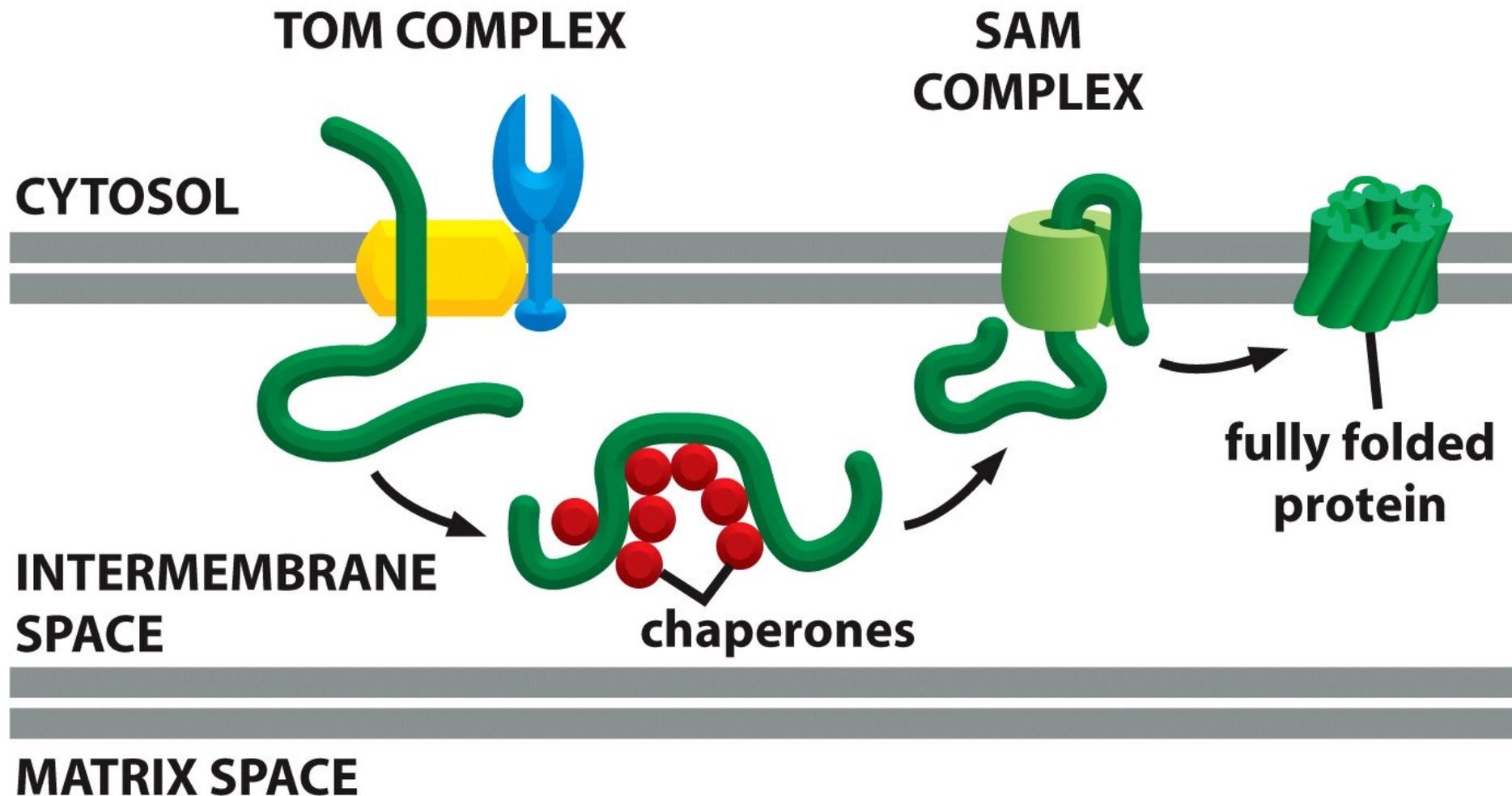


La proteina completa la sua sintesi nel citoplasma e viene legata dalle chaperonine che ne impediscono il ripiegamento = la proteina non diventa funzionale finchè non entra nel mitocondrio

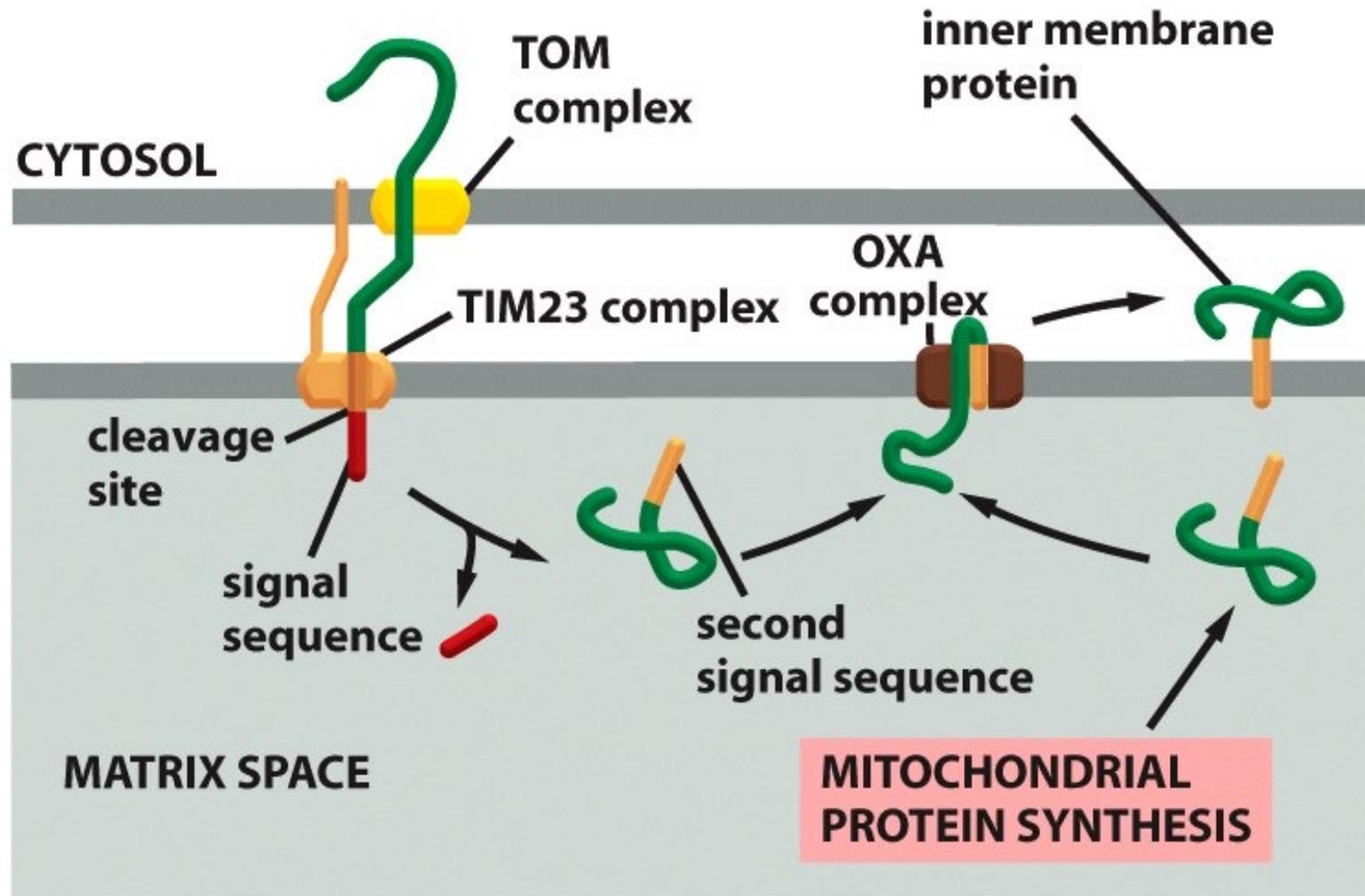
La sequenza segnale lega il complesso TOM

Le proteine della membrana mitocondriale esterna non vengono traslocate nella matrice, ma nello spazio tra le membrane dove vengono intercettate dalle chaperonine presenti nello spazio tra le membrane.

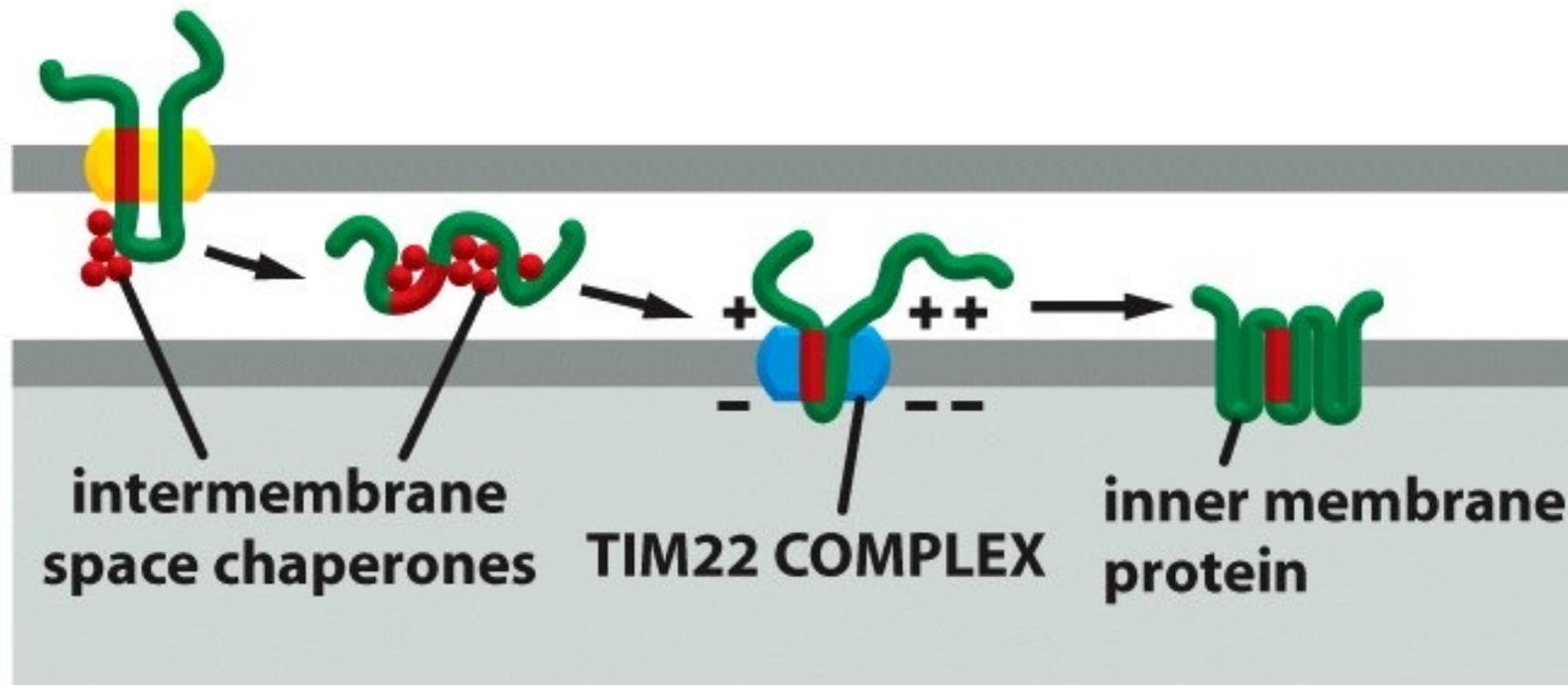
Da lì, le proteine vengono catturate dal **complesso SAM** presente sulla membrana esterna da cui possono inserirsi sulla membrana assumendo la conformazione appropriata



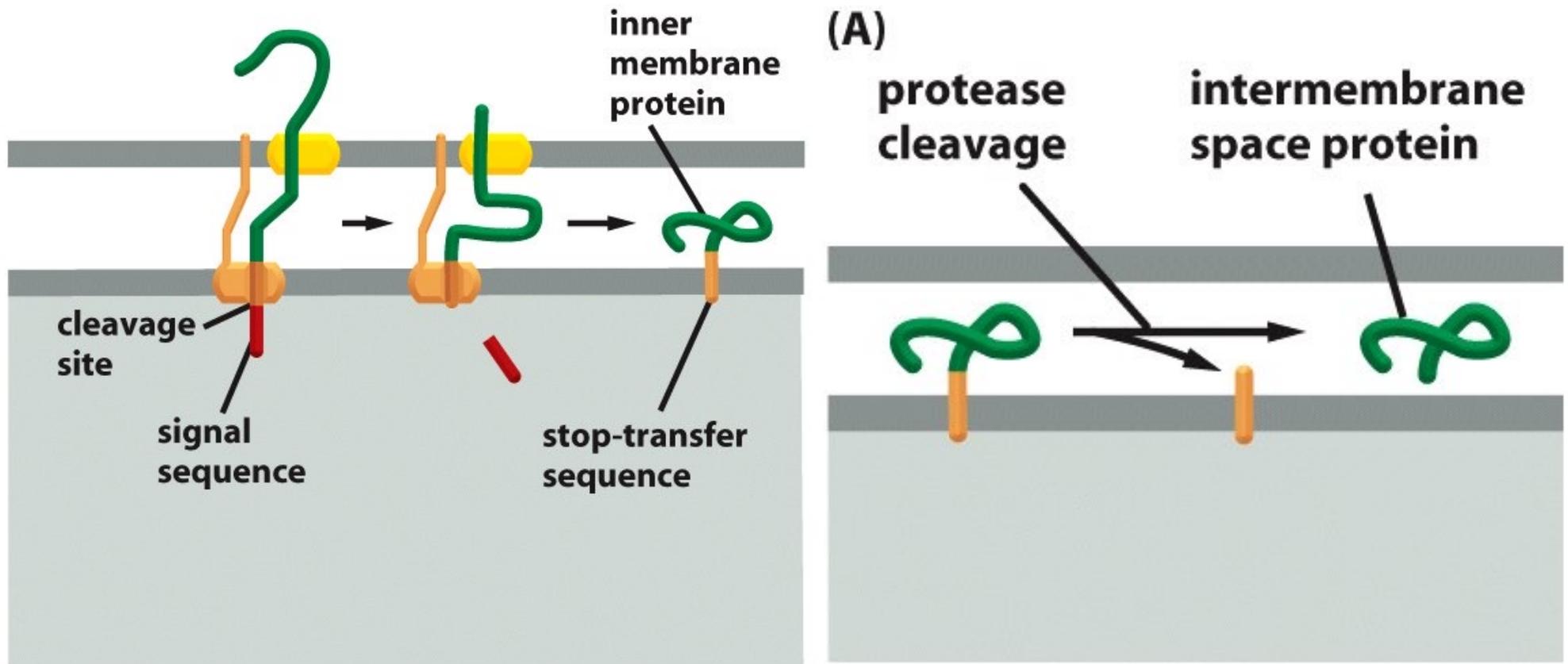
La maggior parte delle proteine della membrana mitocondriale interna vengono riconosciute, una volta all'interno della matrice, dal **complesso OXA** posto sulla membrana interna, e di lì almeno un dominio viene traslocato nel doppio strato lipidico.



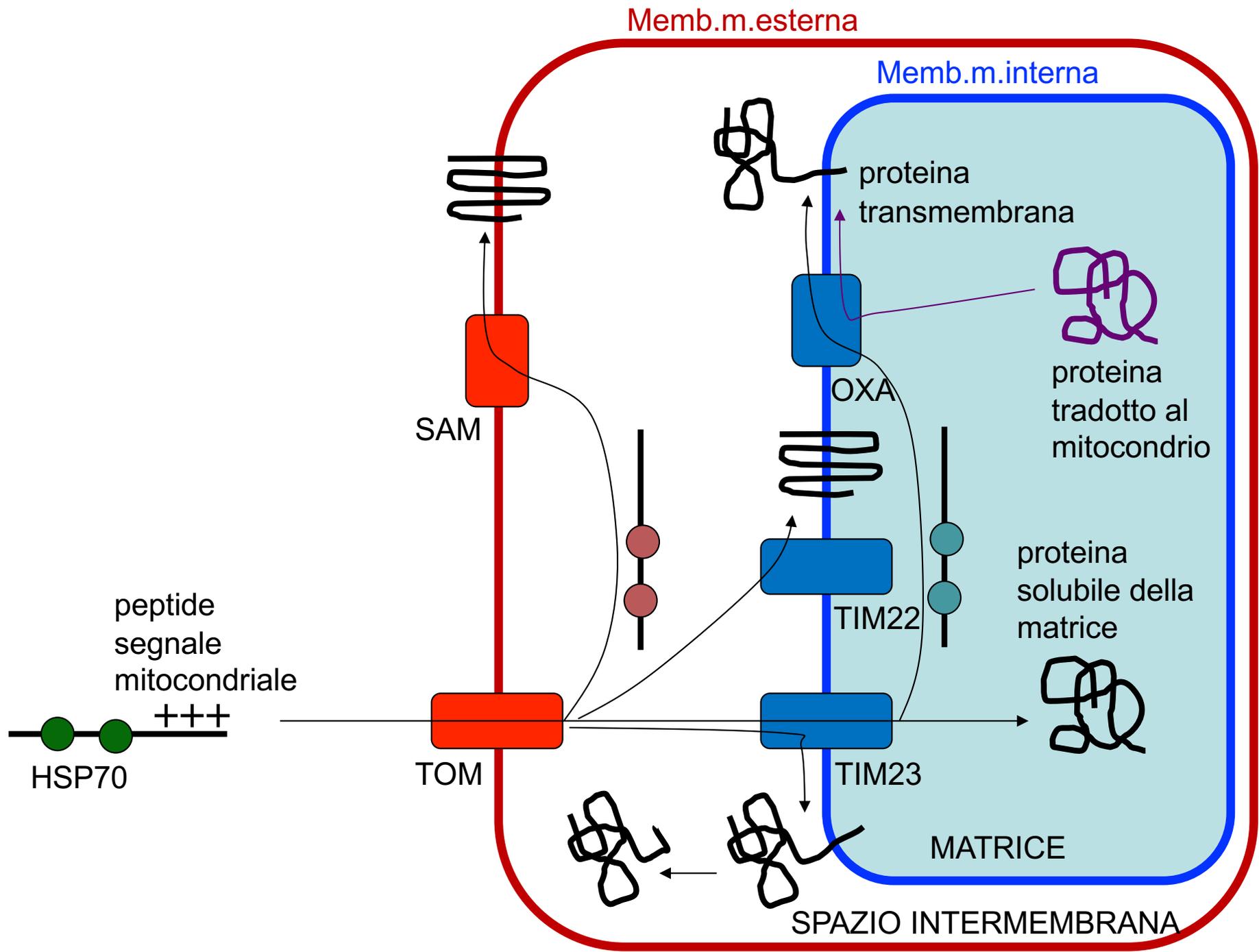
Alcune proteine della membrana mitocondriale interna proteine dotate di più domini transmembrana vengono traslocate nello spazio tra le membrane dove legano le chaperonine. Di lì vengono riconosciute dal **complesso TIM22** che ne permette l'inserimento graduale sulla membrana interna

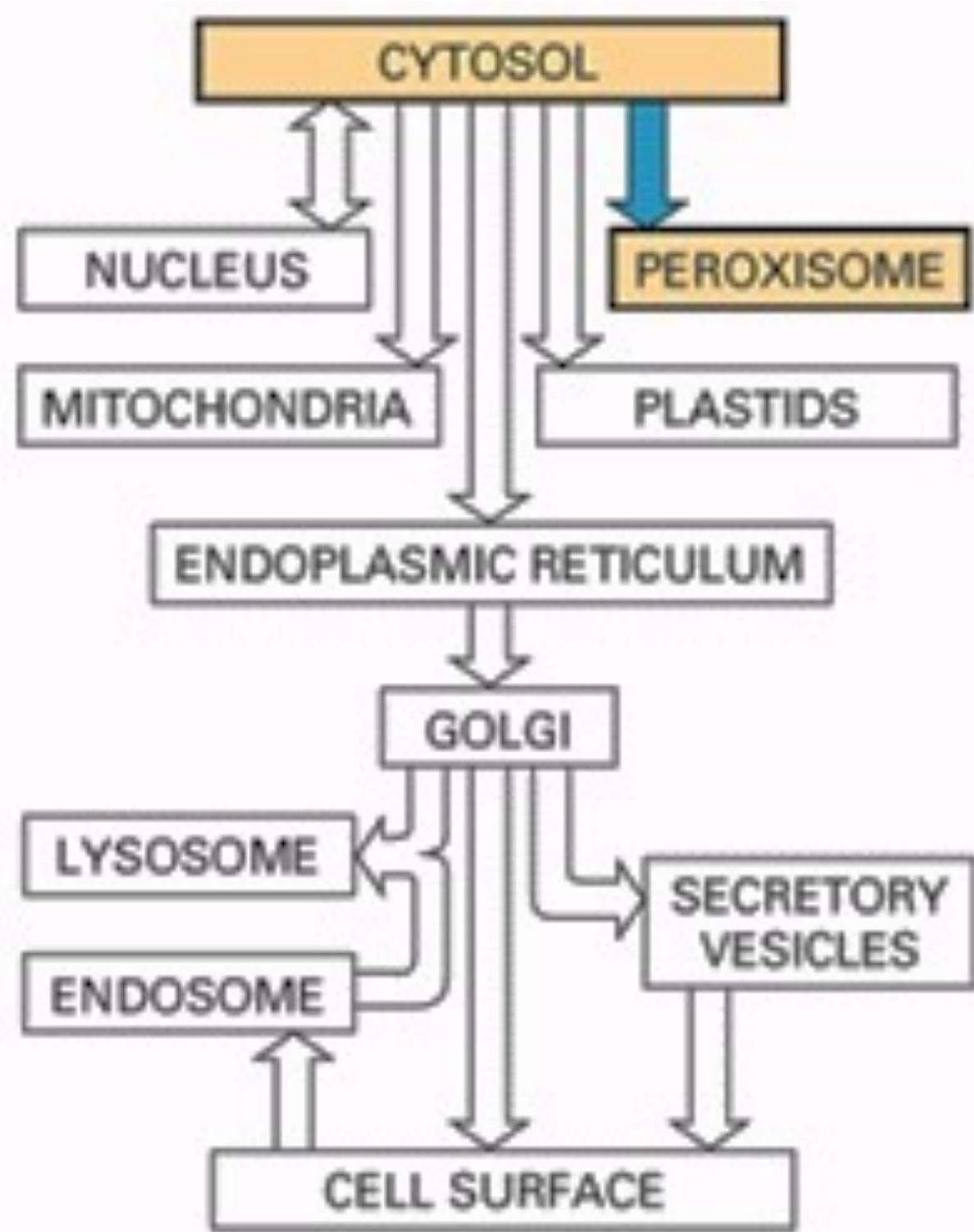


Una parte delle proteine della membrana mitocondriale interna incominciano ad essere traslocate nella matrice, ma interrompono il loro passaggio in presenza di un'altra sequenza segnale, che le porta ad uscire dal complesso TIM verso il doppio strato lipidico. La proteina in questione completerà la sua traslocazione attraverso la membrana mitocondriale esterna, finendo ad avere un dominio transmembrana legato al resto della proteina localizzato nello spazio intramembrane

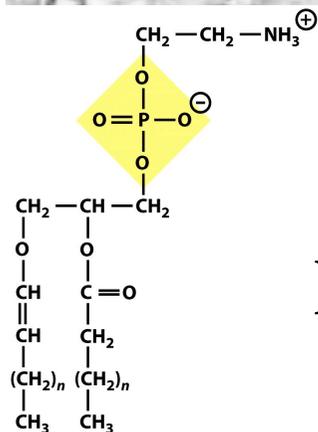
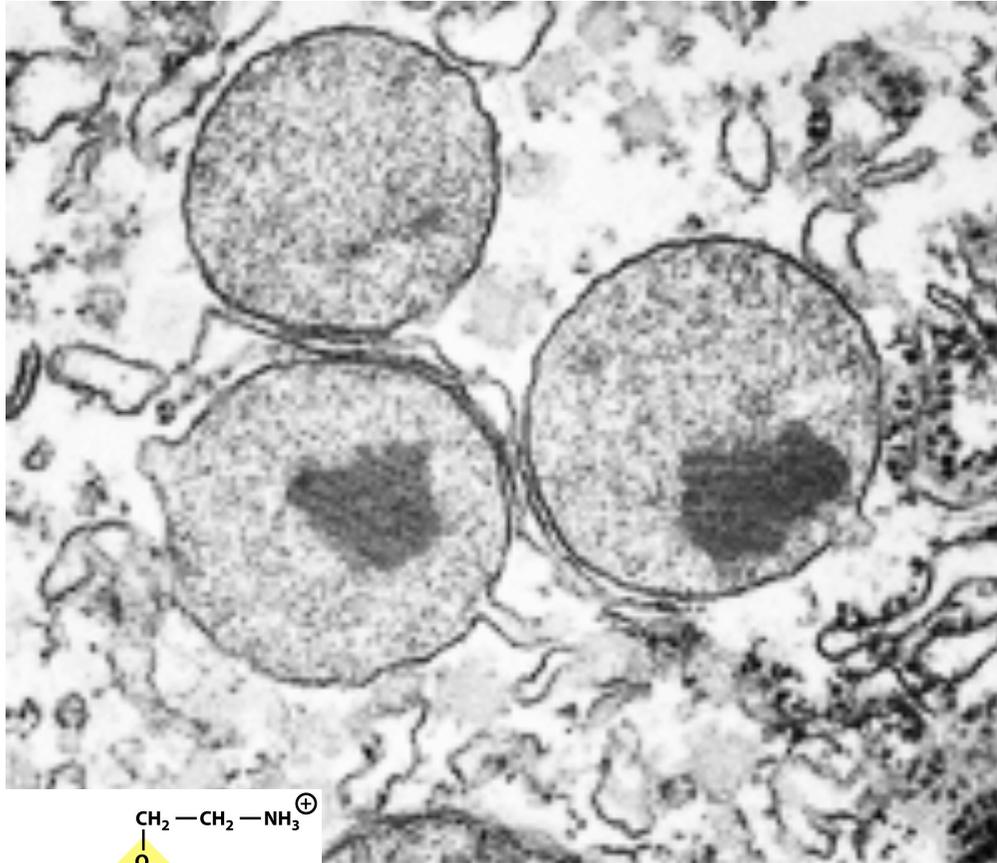


Le proteine presenti nello spazio tra le membrane e nelle creste mitocondriali nascono come proteine della membrana interna, e poi subiscono un taglio proteolitico





Perossisomi: organelli citoplasmici vescicolari con diametro tra 0,5 e 1 μm . Sono delimitati da una singola membrana. Spesso contengono al loro interno un aggregato cristallino di enzimi, detto cristalloide.



plasmalogeno

Funzioni:

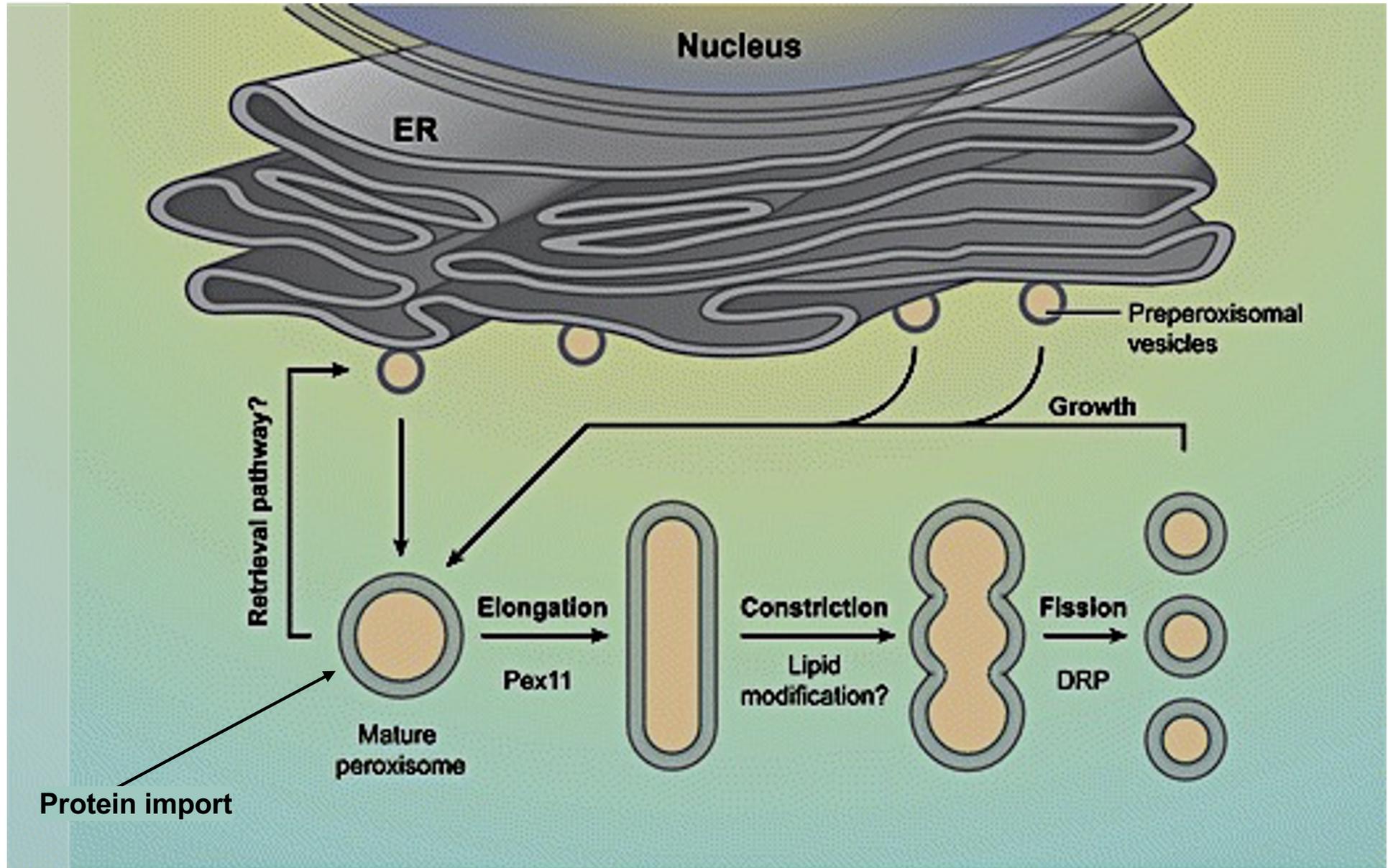
- Perossidazione



- Ossidazione di acidi grassi a catena lunga o ramificati (recupero acetil-coA; no ATP = generazione precursori biosintetici dalla dieta)
- Detossificazione
- Sintesi di plasmalogeni
- Sintesi di acidi biliari
- Rimozione di ROS e radicali liberi

I perossisomi nascono come vescicole originatesi dal RE e crescono incamerando proteine prodotte nel citoplasma

Perossisomi di grandi dimensioni possono subire fissione e generare nuovi perossisomi





Perossisoma-PTS1 ...VVVGGGTPSRLL C-terminale

Perossisoma-PTS2 MNLTRAGARLQVLLGHLGRP... N-terminale

Esistono due tipi di sequenze segnale per l'entrata delle proteine citosoliche nei perossisomi: PTS1 (C-terminale) e PTS2 (N-terminale).

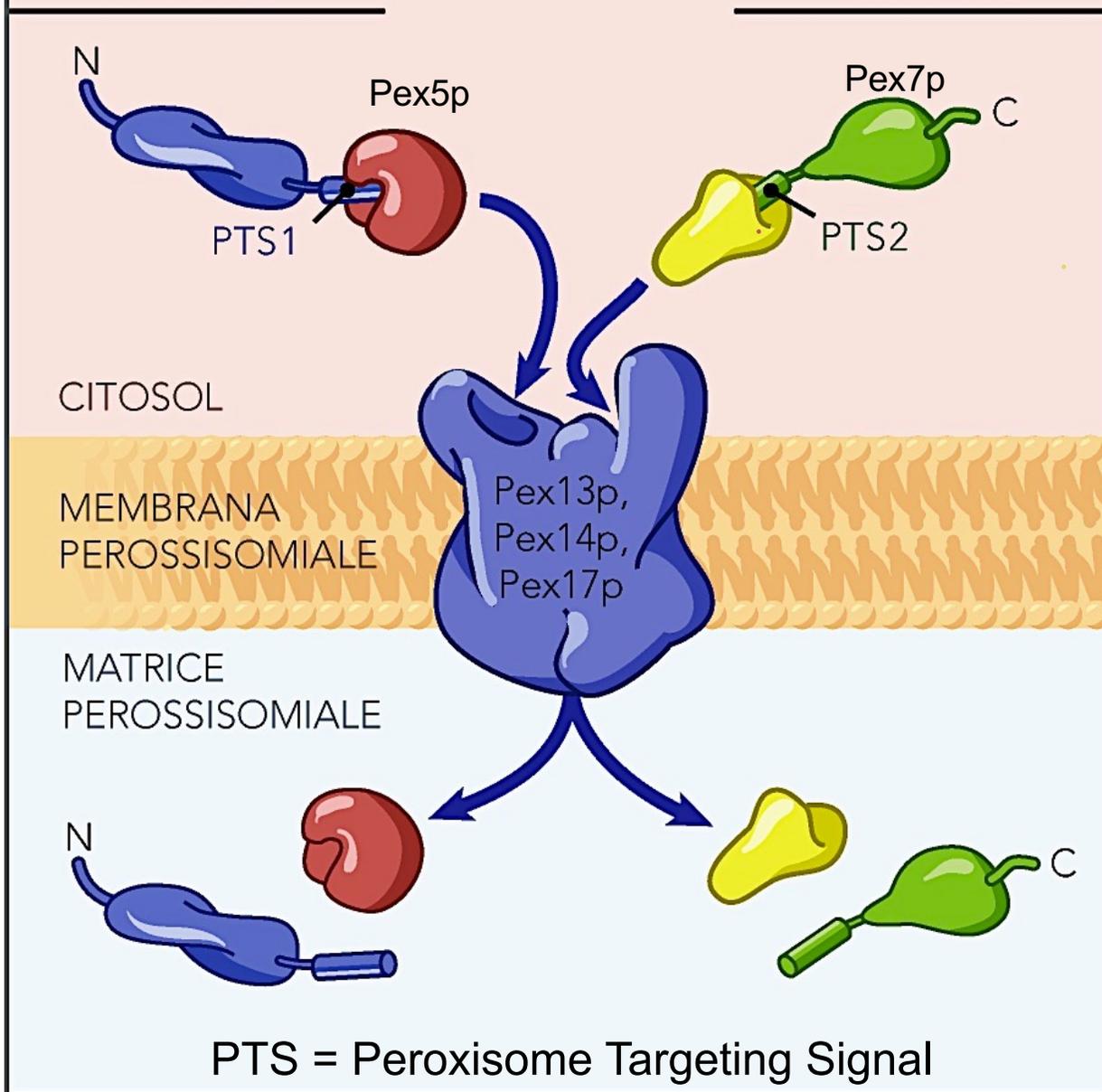
Possiedono **recettori citoplasmici** diversi tra loro:
Pex5p (per PTS1) e Pex7p (per PTS2)

Pex5p è indicato anche con l'abbreviazione PTSIR (PTS1 Receptor)

Ingresso di proteine nei perossisomi

VIA PTS1

VIA PTS2



Lo stesso complesso traslocatore è responsabile della traslocazione del complesso Pex5p/PTS1 e del complesso Pex7p/PTS2

Il legame tra le sequenze segnale e i loro recettori viene revertito all'interno del prerossisoma. I recettori vengono poi traslocati nel citosol

Perossisoma-PTS1

...VVVGGGTPSRL C-terminale

Perossisoma-PTS2

MNLTRAGARLQVLLGHLGRP.. N-terminale