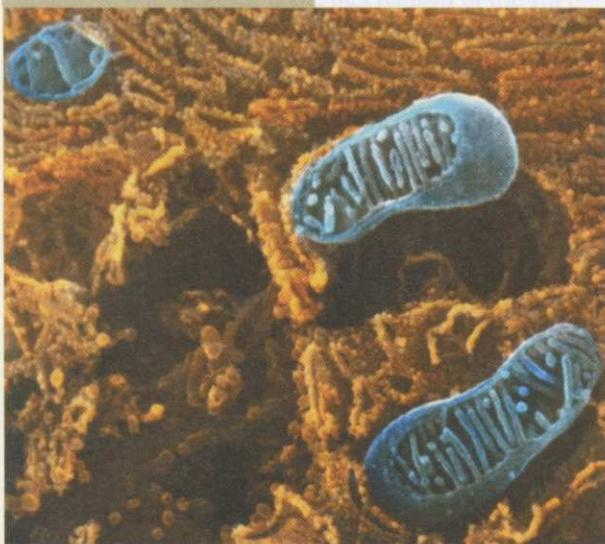


# TRASFERIMENTO DELLE PROTEINE NELLE MEMBRANE E NEGLI ORGANELLI

- 13.1** Traslocazione delle proteine secretorie attraverso la membrana dell'RE
- 13.2** Inserimento delle proteine nella membrana dell'RE
- 13.3** Modificazioni, ripiegamento e controllo di qualità delle proteine nell'RE
- 13.4** Smistamento delle proteine ai mitocondri e ai cloroplasti
- 13.5** Smistamento delle proteine perossisomiali
- 13.6** Trasporto all'interno e all'esterno del nucleo



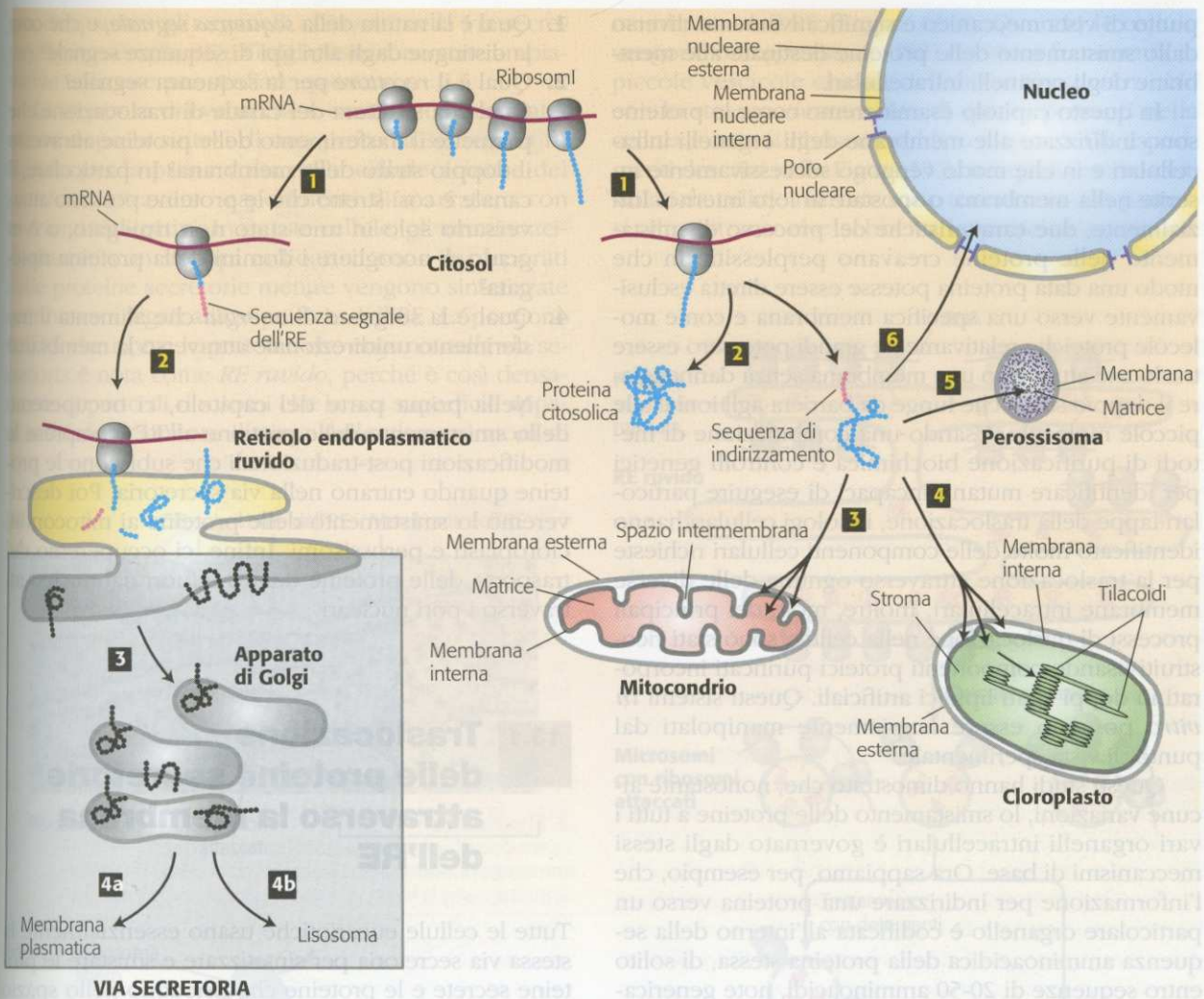
Fotografia al microscopio elettronico a scansione di una cellula che mostra due dei compartimenti intracellulari ai quali sono indirizzate le proteine neosintetizzate. Le membrane dell'RE ruvido ricevono le proteine secretorie e le proteine di membrana destinate alla superficie cellulare. Le proteine citosoliche coinvolte nella respirazione sono indirizzate ai vari compartimenti dei mitocondri, compresi la matrice, la membrana interna e lo spazio intermembrana. [Professori Pietro M. Motta e Tomonori Naguro/Photo Researchers, Inc.]

Una tipica cellula di mammifero contiene più di 10 000 diversi tipi di proteine, una cellula di lievito ne contiene circa 5000. La maggior parte di queste proteine è sintetizzata dai ribosomi citosolici, e molte rimangono all'interno del citosol. Tuttavia, più della metà dei diversi tipi di proteine prodotte in una tipica cellula sono recapitate ad un particolare organello intracellulare o alla superficie cellulare. Per esempio, molti recettori proteici per ormoni e proteine trasportatrici devono essere recapitati alla membrana plasmatica, alcuni enzimi idrosolubili come le RNA e DNA polimerasi devono essere indirizzati nel nucleo, mentre i componenti della matrice extracellulare nonché gli enzimi digestivi e le molecole segnale polipeptidiche devono essere mandate sulla superficie cellulare per essere secrete. Queste e tutte le altre proteine prodotte da una cellula devono raggiungere la loro corretta destinazione affinché la cellula funzioni in modo adeguato.

Il recapito delle proteine neosintetizzate alle loro opportune destinazioni nella cellula, di solito riferito come *indirizzamento o smistamento proteico*, comprende due tipi di processi molto diversi. Il primo processo generale comprende lo smistamento di una proteina alla membrana di un organello intracellulare, e può avvenire durante la traduzione o subito dopo che la sua sintesi si è completata. Per le proteine di membrana, lo smistamento determina l'inserimento della proteina nel doppio strato fosfolipidico della membrana, mentre per le proteine idrosolubili lo smistamento comporta la traslocazione dell'intera proteina attraverso la membrana nell'interno acquoso dell'organello. Attraverso questo processo generale, le proteine vengono indirizzate al reticolo endoplasmatico (RE), ai mitocondri, ai cloroplasti, ai perossisomi e al nucleo (Figura 13.1).

Un secondo processo generale di smistamento è noto come **via secretoria**. Questo processo inizia nell'RE; poi tutte le proteine che devono entrare nella via secretoria sono inizialmente indirizzate alla membrana dell'RE. Queste proteine comprendono non solo le proteine solubili e quelle di membrana che risiedono nello stesso RE, ma anche proteine che sono



▲ **Figura 13.1****Visione d'insieme delle principali vie di smistamento delle proteine negli eucarioti.**

Tutti gli mRNA codificati nel nucleo sono tradotti sui ribosomi citosolici. *Destra (via non secretoria)*: la sintesi delle proteine che mancano di una sequenza segnale per l'RE è completata sui ribosomi liberi (tappa 1). Quelle proteine che non contengono sequenze di indirizzamento sono rilasciate nel citosol dove rimangono (tappa 2). Le proteine con una sequenza di indirizzamento specifica per un organello (rosa) inizialmente sono rilasciate nel citosol (tappa 2) ma successivamente sono importate nei mitocondri, nei cloroplasti, nei perossisomi o nel nucleo (tappe 3-6). Le proteine destinate ai mitocondri e ai cloroplasti passano di norma attraverso la membrana esterna e interna per entrare, rispettivamente, nella matrice o nello stroma. Altre proteine

secrete dalla cellula, proteine residenti nel lume del complesso di Golgi e nei lisosomi e le proteine integrali delle membrane di questi organelli, come quelle della membrana plasmatica. L'indirizzamento all'RE coinvolge in genere le proteine nascenti che sono ancora in fase di sintesi. Una volta traslocate attraverso la membrana dell'RE, le proteine sono assemblate nella loro conformazione nativa da catalizzatori del ripiegamento proteico presenti nel lume dell'RE. Questo processo è controllato attentamente, e solo dopo che il loro ripiegamento e assemblaggio è stato completato, le proteine sono idonee per essere trasportate fuori dall'RE verso altri organelli. Le proteine vengo-

sono indirizzate verso altri compartimenti di questi organelli attraverso tappe di smistamento supplementari. Le proteine nucleari entrano ed escono attraverso pori visibili presenti sull'involucro nucleare. *Sinistra (via secretoria)*: i ribosomi che sintetizzano le proteine nascenti nella via secretoria sono diretti verso il reticolo endoplasmatico (RE) ruvido da una sequenza segnale per l'RE (rosa, tappe 1 e 2). Dopo che la traduzione si è completata nell'RE, queste proteine si possono spostare attraverso vescicole di trasporto al complesso di Golgi (tappa 3). Un ulteriore smistamento recapita le proteine alla membrana plasmatica e ai lisosomi (tappa 4a e 4b). I processi alla base della via secretoria (tappe 3, 4, riquadro ombreggiato) saranno discussi nel Capitolo 14.

no anche modificate in vari modi dopo la traslocazione all'interno dell'RE. Queste modificazioni possono comprendere l'aggiunta di gruppi di carboidrati, la stabilizzazione della struttura proteica attraverso la formazione di legami disolfuro e specifici tagli proteolitici. Le proteine la cui destinazione finale è l'apparato di Golgi, i lisosomi o la superficie cellulare sono trasportate lungo la via secretoria per azione di piccole vescicole che gemmano dalla membrana di un organello e poi si fondono con la membrana di un altro organello (Figura 13.1, riquadro ombreggiato). Discuteremo dello smistamento delle proteine mediato dalle vescicole nel prossimo capitolo, perché dal



punto di vista meccanico è significativamente diverso dallo smistamento delle proteine destinate alle membrane degli organelli intracellulari.

In questo capitolo esamineremo come le proteine sono indirizzate alle membrane degli organelli intracellulari e in che modo vengono successivamente inserite nella membrana o spostate al loro interno. Inizialmente, due caratteristiche del processo di smistamento delle proteine creavano perplessità: in che modo una data proteina potesse essere diretta esclusivamente verso una specifica membrana e come molecole proteiche relativamente grandi potessero essere traslocate attraverso una membrana senza danneggiare il doppio strato che funge da barriera agli ioni e alle piccole molecole. Usando una combinazione di metodi di purificazione biochimica e controlli genetici per identificare mutanti incapaci di eseguire particolari tappe della traslocazione, i biologi cellulari hanno identificato molte delle componenti cellulari richieste per la traslocazione attraverso ognuna delle diverse membrane intracellulari. Inoltre, molti dei principali processi di traslocazione nella cellula sono stati ricostruiti usando componenti proteici purificati incorporati in doppi strati lipidici artificiali. Questi sistemi *in vitro* possono essere ampiamente manipolati dal punto di vista sperimentale.

Questi studi hanno dimostrato che, nonostante alcune variazioni, lo smistamento delle proteine a tutti i vari organelli intracellulari è governato dagli stessi meccanismi di base. Ora sappiamo, per esempio, che l'informazione per indirizzare una proteina verso un particolare organello è codificata all'interno della sequenza amminoacidica della proteina stessa, di solito entro sequenze di 20-50 amminoacidi, note genericamente come **sequenze segnale** (vedi Figura 13.1); queste sono anche genericamente conosciute come *sequenze di captazione e indirizzamento* o *peptidi segnale*. Ogni organello possiede una serie di recettori proteici che si legano solo a specifici tipi di sequenze segnale, garantendo quindi che l'informazione codificata in una sequenza segnale governi la specificità dello smistamento. Una volta che una proteina contenente una sequenza segnale ha interagito con il recettore corrispondente, la catena proteica viene trasferita a una sorta di *canale di traslocazione* che permette alla proteina di passare attraverso il doppio strato della membrana. Il trasferimento unidirezionale di una proteina in un organello, senza che possa tornare indietro nel citoplasma, è di solito ottenuto accoppiando la traslocazione a un processo energeticamente favorevole come l'idrolisi di ATP. Successivamente, alcune proteine possono subire un ulteriore smistamento per raggiungere un sottocompartimento all'interno dell'organello bersaglio; questo smistamento dipende da altre sequenze segnale e da altri recettori proteici. Infine, una volta che la traslocazione attraverso la membrana si è completata, la sequenza segnale è spesso rimossa dalla proteina matura ad opera di specifiche proteasi.

Per ognuno degli eventi di smistamento delle proteine discussi in questo capitolo cercheremo di rispondere a quattro quesiti fondamentali.

1. Qual è la natura della *sequenza segnale*, e che cosa la distingue dagli altri tipi di sequenze segnale?
2. Qual è il *recettore* per la sequenza segnale?
3. Qual è la struttura del canale di traslocazione che permette il trasferimento delle proteine attraverso il doppio strato della membrana? In particolare, il canale è così stretto che le proteine possono attraversarlo solo in uno stato non ripiegato, o è in grado di accogliere i domini della proteina ripiegata?
4. Qual è la sorgente di *energia* che alimenta il trasferimento unidirezionale attraverso la membrana?

Nella prima parte del capitolo, ci occuperemo dello smistamento delle proteine all'RE, comprese le modificazioni post-traduzionali che subiscono le proteine quando entrano nella via secretoria. Poi descriveremo lo smistamento delle proteine ai mitocondri, cloroplasti e perossisomi. Infine, ci occuperemo del trasporto delle proteine dentro e fuori dal nucleo attraverso i pori nucleari.

### 13.1 Traslocazione delle proteine secretorie attraverso la membrana dell'RE

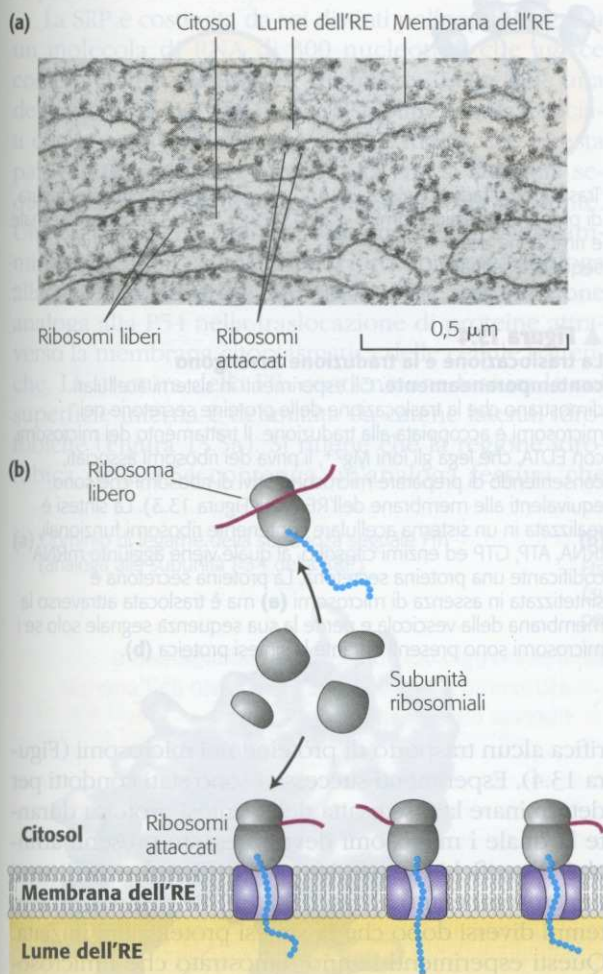
Tutte le cellule eucariotiche usano essenzialmente la stessa via secretoria per sintetizzare e smistare le proteine secrete e le proteine che risiedono nello spazio luminale acquoso o nella membrana dell'RE, del Golgi e dei lisosomi (Figura 13.1, *a sinistra*). Per semplificare, indicheremo collettivamente queste proteine col nome di *proteine secretorie*. Il meccanismo di base della via secretoria comporta tre tappe: (1) la sintesi proteica e la traslocazione attraverso la membrana dell'RE, (2) il ripiegamento e le modificazioni delle proteine all'interno del lume dell'RE e (3) il trasporto delle proteine all'apparato di Golgi, ai lisosomi o alla superficie cellulare attraverso la gemmazione e la fusione delle vescicole. Nelle prime due sezioni di questo capitolo vedremo come le proteine secretorie sono indirizzate all'RE e come alcune proteine possono essere inserite nella membrana dell'RE, perché questi processi sono meccanicamente simili al trasferimento delle proteine in altri organelli discussi in questo capitolo. In particolare nella Sezione 13.3 ci occuperemo anche di come le proteine si ripiegano e vengono modificate appena entrano nell'RE. Il processo del trasporto vescicolare sarà affrontato nel capitolo successivo.

Sebbene le cellule secernano una ampia varietà di proteine (per esempio le proteine della matrice extracellulare), certi tipi di cellule sono specializzate per secernere un grosso quantitativo di proteine specifiche. Le cellule acinose pancreatiche, per esempio, sintetizzano grandi quantità di enzimi digestivi diversi che sono secreti nei dotti che li convogliano all'intestino. Poiché queste cellule secretorie contengono in



grande quantità gli organelli coinvolti nella via secretoria (per esempio RE e Golgi), esse sono state ampiamente utilizzate per studiare questa via.

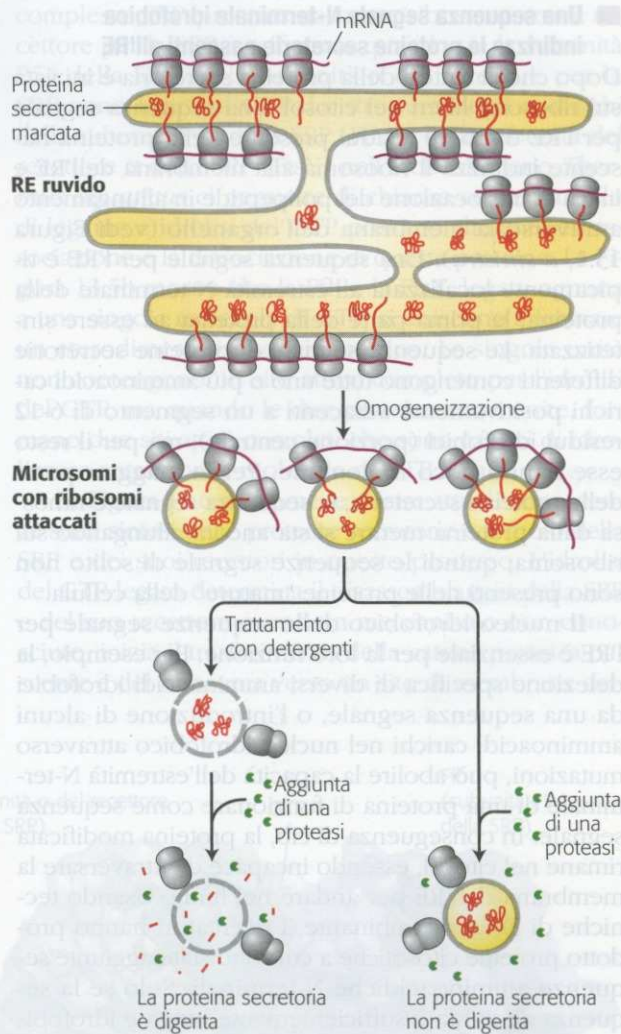
La sequenza di eventi che si verificano immediatamente dopo la sintesi di una proteina secretoria fu chiarita per la prima volta nelle cellule acinose del pancreas, attraverso esperimenti di marcatura con traccianti radioattivi. In queste cellule, gli aminoacidi marcati con isotopi radioattivi sono incorporati nelle proteine secretorie mentre vengono sintetizzate sui ribosomi legati alla superficie dell'RE. La porzione dell'RE che riceve le proteine che entrano nella via secretoria è nota come *RE ruvido*, perché è così densamente coperto di ribosomi che la sua superficie appare morfologicamente distinta dalle altre porzioni di



▲ **Figura 13.2**

**Struttura dell'RE ruvido.** (a) Fotografia al microscopio elettronico di ribosomi attaccati all'RE ruvido di una cellula acinosa pancreatica. La maggior parte delle proteine sintetizzate da questo tipo di cellula devono essere secrete e si formano sui ribosomi attaccati alla membrana. Sono visibili alcuni ribosomi non attaccati alla membrana (liberi); probabilmente questi stanno sintetizzando proteine citosoliche o altre proteine non secretorie. (b) Rappresentazione schematica della sintesi proteica sull'RE. Si noti come i ribosomi legati alla membrana e quelli liberi siano identici. I ribosomi legati alla membrana sono recapitati al reticolo endoplasmatico durante la sintesi proteica di un polipeptide che contiene una sequenza segnale dell'RE. [Parte (a) per gentile concessione di G. Palade.]

membrana dell'RE (Figura 13.2). Quando le cellule vengono omogeneizzate, l'RE ruvido si frammenta in piccole vescicole chiuse, definite *microsomi ruvidi*, con lo stesso orientamento di quelle presenti nella cellula intatta (i ribosomi sul lato esterno). Gli esperimenti descritti nella Figura 13.3, nei quali i microsomi isolati da cellule marcate sono trattati con una proteasi, dimostrano che sebbene le proteine secretorie



▲ **Figura 13.3**

**Le proteine secretorie entrano nell'RE.** Esperimenti con composti marcati dimostrano che le proteine secretorie sono localizzate nel lume dell'RE subito dopo la loro sintesi. Le cellule sono incubate per un breve periodo di tempo con aminoacidi marcati con isotopi radioattivi, in modo che risultino marcate solo le proteine neosintetizzate. Le cellule sono poi omogeneizzate, un processo che rompe la membrana plasmatica e frantuma l'RE ruvido in piccole vescicole chiamate *microsomi*. Poiché hanno i ribosomi legati, i microsomi hanno una densità molto maggiore degli altri organelli rivestiti di membrana e possono essere separati da questi attraverso una combinazione di centrifugazioni differenziali e in gradiente di densità di saccarosio (vedi Capitolo 9). I microsomi purificati sono trattati con una proteasi in presenza o assenza di un detergente. Le proteine secretorie marcate associate con i microsomi sono digerite dalla proteasi solo se la barriera di permeabilità della membrana microsomiale è stata danneggiata dal trattamento con il detergente. Questo risultato indica che le proteine neosintetizzate sono all'interno dei microsomi, che corrispondono al lume dell'RE ruvido.



siano sintetizzate sui ribosomi legati al lato citosolico della membrana dell'RE, i polipeptidi prodotti da questi ribosomi finiscono all'interno del lume delle vescicole dell'RE. Esperimenti come questo hanno sollevato il problema di capire in che modo i polipeptidi sono riconosciuti come proteine secretorie subito dopo l'inizio della loro sintesi e con quale meccanismo l'estremità N-terminale di una proteina secretoria nascente venga inserita nella membrana dell'RE.

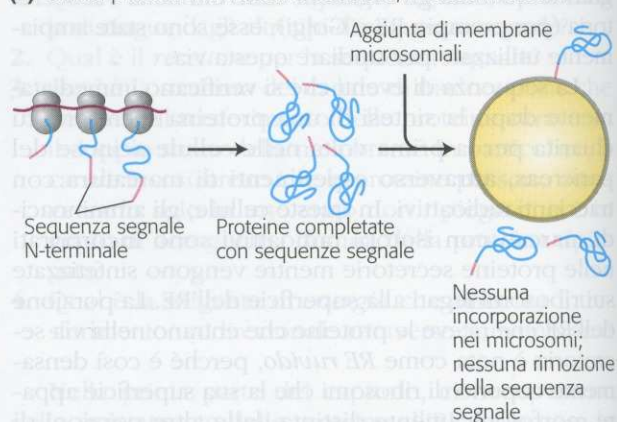
### ■ Una sequenza segnale N-terminale idrofobica indirizza le proteine secretorie nascenti all'RE

Dopo che la sintesi della proteina secretoria è iniziata sui ribosomi liberi nel citosol, una sequenza segnale per l'RE di 16-30 residui presente nella proteina nascente indirizza il ribosoma alla membrana dell'RE e inizia la traslocazione del polipeptide in allungamento attraverso la membrana dell'organello (vedi Figura 13.1, *a sinistra*). Una sequenza segnale per l'RE è tipicamente localizzata all'estremità N-terminale della proteina, la prima parte della proteina ad essere sintetizzata. Le sequenze segnale di proteine secretorie differenti contengono tutte uno o più amminoacidi carichi positivamente adiacenti a un segmento di 6-12 residui idrofobici (porzione centrale), ma per il resto esse hanno poco in comune. Per la maggior parte delle proteine secretorie, la sequenza segnale è rimossa dalla proteina mentre si sta ancora allungando sul ribosoma; quindi le sequenze segnale di solito non sono presenti nelle proteine "mature" della cellula.

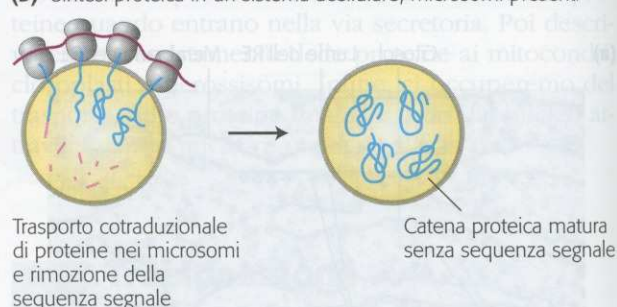
Il nucleo idrofobico delle sequenze segnale per l'RE è essenziale per la loro funzione. Per esempio, la delezione specifica di diversi amminoacidi idrofobici da una sequenza segnale, o l'introduzione di alcuni amminoacidi carichi nel nucleo idrofobico attraverso mutazioni, può abolire la capacità dell'estremità N-terminale di una proteina di funzionare come sequenza segnale. In conseguenza di ciò, la proteina modificata rimane nel citosol, essendo incapace di attraversare la membrana dell'RE per andare nel lume. Usando tecniche di DNA ricombinante, i ricercatori hanno prodotto proteine citosoliche a cui sono state aggiunte sequenze amminoacidiche N-terminali. Solo se la sequenza aggiunta è sufficientemente lunga e idrofobica, questa proteina citosolica modificata può essere traslocata nel lume dell'RE. In definitiva, i residui idrofobici presenti nel nucleo delle sequenze segnale per l'RE formano un sito di legame che è cruciale per l'interazione delle sequenze segnale con l'apparato responsabile dell'indirizzamento della proteina alla membrana dell'RE.

Studi biochimici che hanno utilizzato un sistema acellulare per la sintesi delle proteine, mRNA che codifica una proteina secretoria e microsomi purificati dai propri ribosomi hanno permesso di chiarire la funzione e il destino delle sequenze segnale per l'RE. Gli esperimenti iniziali con questo sistema hanno dimostrato che una tipica proteina secretoria è incorporata nei microsomi e viene privata della sua sequenza segnale solo se i microsomi sono presenti durante la sintesi proteica. Se i microsomi sono aggiunti al sistema dopo che la sintesi proteica si è completata, non si ve-

#### (a) Sintesi proteica in un sistema acellulare; microsomi assenti



#### (b) Sintesi proteica in un sistema acellulare; microsomi presenti



### ▲ Figura 13.4

#### La traslocazione e la traduzione avvengono contemporaneamente.

Gli esperimenti in sistemi acellulari dimostrano che la traslocazione delle proteine secretorie nei microsomi è accoppiata alla traduzione. Il trattamento dei microsomi con EDTA, che lega gli ioni  $Mg^{2+}$ , li priva dei ribosomi associati, consentendo di preparare microsomi privi di ribosomi che sono equivalenti alle membrane dell'RE (vedi Figura 13.3). La sintesi è realizzata in un sistema acellulare contenente ribosomi funzionali, tRNA, ATP, GTP ed enzimi citosolici, al quale viene aggiunto mRNA codificante una proteina secretoria. La proteina secretoria è sintetizzata in assenza di microsomi (a) ma è traslocata attraverso la membrana della vescicola e perde la sua sequenza segnale solo se i microsomi sono presenti durante la sintesi proteica (b).

ifica alcun trasporto di proteine nei microsomi (Figura 13.4). Esperimenti successivi sono stati condotti per determinare la fase esatta della sintesi proteica durante la quale i microsomi devono essere presenti affinché si verifichi il trasferimento. In questi esperimenti i microsomi erano aggiunti alle miscele di reazione in tempi diversi dopo che la sintesi proteica era iniziata. Questi esperimenti hanno dimostrato che i microsomi devono essere aggiunti prima che circa 70 amminoacidi si siano legati insieme, affinché la proteina secretoria completa possa essere localizzata nel lume dei microsomi. A questo punto, i primi 40 amminoacidi circa sporgono dal ribosoma, compresa la sequenza segnale che più avanti verrà rimossa, e i successivi 30 amminoacidi circa sono ancora inseriti all'interno di un canale nel ribosoma (vedi Figura 4.26). Quindi il trasporto della maggior parte delle proteine secretorie nel lume dell'RE inizia mentre la proteina non completamente sintetizzata (nascente) è ancora legata al ribosoma, un processo definito **traslocazione cotraduzionale**.



### La traslocazione cotraduzionale è innescata da due proteine che idrolizzano il GTP

Poiché le proteine secretorie sono sintetizzate in associazione con la membrana dell'RE ma con nessun'altra membrana cellulare, un meccanismo di riconoscimento della sequenza segnale deve indirizzarle in questa sede. Le due componenti fondamentali in questo indirizzamento sono la **particella di riconoscimento del segnale** (*signal-recognition particle*, **SRP**) e i suoi recettori localizzati sulla membrana dell'RE. La SRP è una particella ribonucleoproteica citosolica che si lega transitoriamente sia alla sequenza segnale dell'RE di una proteina nascente sia a grosse subunità ribosomiali, formando un grande complesso; la SRP quindi indirizza il complesso proteina nascente-ribosoma alle membrane dell'RE legandosi a uno specifico recettore presente sulla membrana.

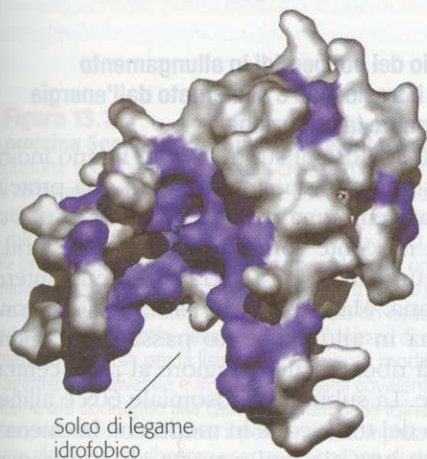
La SRP è costituita da sei distinti polipeptidi legati a una molecola di RNA di 300 nucleotidi, che agisce come una impalcatura per l'esamero. Il fatto che una delle proteine SRP (P54) possa stabilire legami crociati con le sequenze segnale dell'RE indica che questa particolare proteina è la subunità che si lega alla sequenza segnale in una proteina secretoria nascente. Una regione della P54 che contiene molti residui aminoacidici con catene laterali idrofobiche è omologa alla proteina batterica Ffh, che compie una funzione analoga alla P54 nella traslocazione di proteine attraverso la membrana citoplasmatica delle cellule batteriche. La struttura della Ffh contiene una fessura la cui superficie interna è delimitata da catene laterali idrofobiche (Figura 13.5a). Si ritiene che la regione idrofobica della P54 contenga un'analogia fessura che

interagisce con i segnali N-terminali idrofobici delle proteine secretorie nascenti e che le indirizzi selettivamente alla membrana dell'RE. Altri polipeptidi nella SRP interagiscono con il ribosoma o sono richiesti per la traslocazione delle proteine nel lume dell'RE.

La SRP recapita il complesso proteina nascente-ribosoma alla membrana dell'RE attraverso il legame con il recettore per la SRP, una proteina integrale della membrana dell'RE costituita da due subunità: una subunità  $\alpha$  e una subunità  $\beta$  più piccola. L'interazione del complesso SRP/proteina nascente/ribosoma con il recettore per la SRP è rafforzata quando sia la subunità P54 della SRP sia la subunità  $\alpha$  del recettore per la SRP sono legati al GTP. La struttura degli analoghi della subunità P54 della SRP (Ffh) e della subunità del recettore  $\alpha$  della SRP (FtsY) nell'archeobatterio *Thermus aquaticus* ci permette di chiarire come un ciclo di legame e idrolisi del GTP possano alimentare l'associazione e la dissociazione di queste proteine. La Figura 13.5b mostra che la Ffh e la FtsY, legate ognuna a una singola molecola di GTP, si uniscono a formare un eterodimero pseudosimmetrico. Le singole unità non contengono un sito attivo completo per l'idrolisi del GTP, ma quando le due proteine sono unite, formano due siti attivi completi che sono capaci di idrolizzare entrambe le molecole di GTP legate.

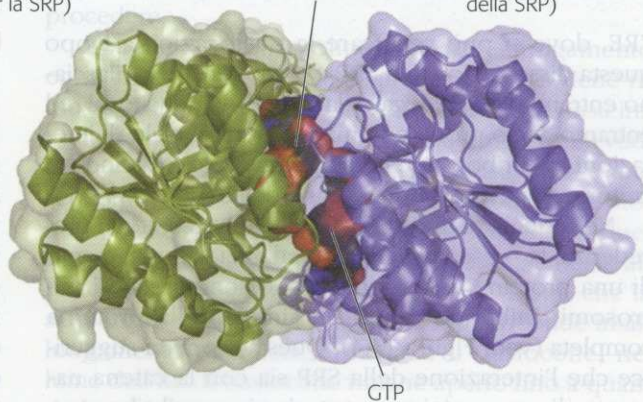
La Figura 13.6 riassume le nostre attuali conoscenze sulla sintesi delle proteine secretorie e il ruolo della SRP e dei suoi recettori in questo processo. L'idrolisi del GTP legato determina il disassemblaggio della SRP e del suo recettore e, con un meccanismo non conosciuto, inizia il trasferimento della catena proteica nascente e del ribosoma verso un sito di membrana del-

(a) Dominio di legame della sequenza segnale Ffh (analogo alla subunità P54 della SRP)



(b)

FtsY (subunità  $\alpha$  del recettore per la SRP)      GTP      Ffh (subunità P54 della SRP)



### Figura 13.5

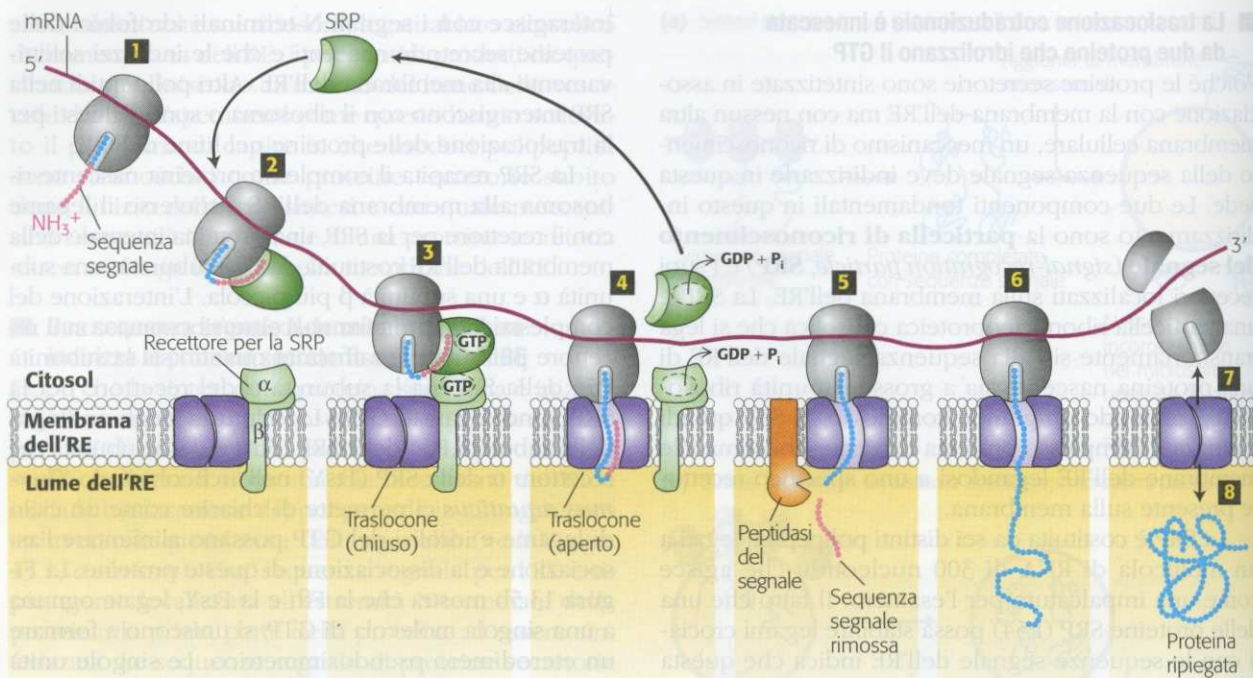
#### Struttura della particella di riconoscimento del segnale (SRP).

(a) La proteina Ffh batterica è omologa alla porzione della P54 che si lega alle sequenze segnale dell'RE. Questo modello di superficie mostra il dominio di legame nella Ffh, che contiene una grossa fessura delimitata da aminoacidi idrofobici (in viola) le cui catene laterali interagiscono con le sequenze segnale.

(b) La struttura del GTP legato alle proteine FtsY (l'omologo batterico della subunità  $\alpha$  del recettore della SRP) e Ffh evidenzia come l'interazione tra queste proteine è controllata dal legame e dall'idrolisi

del GTP. Ffh e FtsY si possono legare entrambe a una molecola di GTP, e quando Ffh e FtsY si legano tra loro, le due molecole di GTP legate si adattano nell'interfaccia tra le subunità proteiche e stabilizzano il dimero. L'assemblaggio del dimero semisimmetrico permette la formazione di due siti attivi per l'idrolisi di entrambe le molecole di GTP legate. L'idrolisi di GTP a GDP destabilizza l'interfaccia, causando il disassemblaggio del dimero. [Parte (a) adattata da R. J. Keenan et al., 1998, *Cell* **94**:181. Parte (b) adattata da P. J. Focia et al., 2004, *Science* **303**:373.]





### ▲ Figura 13.6

**Traslocazione cotraduzionale.** Tappe **1** e **2**: una volta che la sequenza segnale dell'ER emerge dal ribosoma si lega a una particella di riconoscimento del segnale (SRP). Tappa **3**: la SRP consegna il complesso ribosoma/polipeptide nascente al recettore per l'SRP nella membrana dell'ER. L'interazione è consolidata dal legame di GTP sia all'SRP sia al suo recettore. Tappa **4**: il trasferimento del complesso ribosoma/polipeptide nascente al traslocone determina l'apertura di questo canale di traslocazione e l'inserimento della sequenza segnale e del segmento adiacente del polipeptide in allungamento nel poro centrale. Una volta dissociati dal traslocone, la SRP e il suo recettore idrolizzano il loro GTP legato e quindi sono pronti per iniziare

l'inserimento di un'altra catena polipeptidica. Tappa **5**: man mano che la catena polipeptidica si allunga, passa attraverso il canale del traslocone nel lume dell'ER, dove la sequenza segnale viene rimossa dalla peptidasi del segnale e rapidamente degradata. Tappa **6**: la catena peptidica continua ad allungarsi mentre l'mRNA è tradotto verso l'estremità 3'. Poiché il ribosoma è attaccato al traslocone, la catena in accrescimento è estrusa attraverso il traslocone all'interno del lume dell'ER. Tappe **7** e **8**: una volta che la traduzione è stata completata, il ribosoma viene rilasciato, il residuo della proteina viene attirato nel lume dell'ER, il traslocone si chiude e la proteina assume la sua conformazione nativa ripiegata.

l'ER, dove si può verificare la traslocazione. Dopo questa dissociazione, la SRP e il suo recettore rilasciano entrambi il GDP legato, la SRP torna nel citosol, ed entrambi sono pronti per iniziare un altro ciclo di interazioni tra i ribosomi che sintetizzano le proteine secretorie nascenti e la membrana dell'ER.

Nel sistema di traduzione acellulare descritto in precedenza, la presenza della SRP rallenta l'allungamento di una proteina secretoria quando sono assenti i microsomi, inibendo quindi la sintesi della proteina completa (vedi Figura 13.4). Questa scoperta suggerisce che l'interazione della SRP sia con la catena nascente di una proteina secretoria sia con il ribosoma libero impedisca che la catena diventi troppo lunga per la traslocazione nell'ER. Solo dopo che il complesso SRP/catena nascente/ribosoma si è legato al recettore della SRP nella membrana dell'ER, la SRP rilascia la catena nascente, permettendo che l'allungamento prosegua ad una velocità normale. Quindi, oltre che facilitare l'interazione di una proteina secretoria nascente con la membrana dell'ER, la SRP e il suo recettore agiscono insieme per permettere l'allungamento e la sintesi completa delle proteine solo quando sono presenti le membrane dell'ER.

### ■ Il passaggio dei polipeptidi in allungamento attraverso il traslocone è alimentato dall'energia liberata durante la traduzione

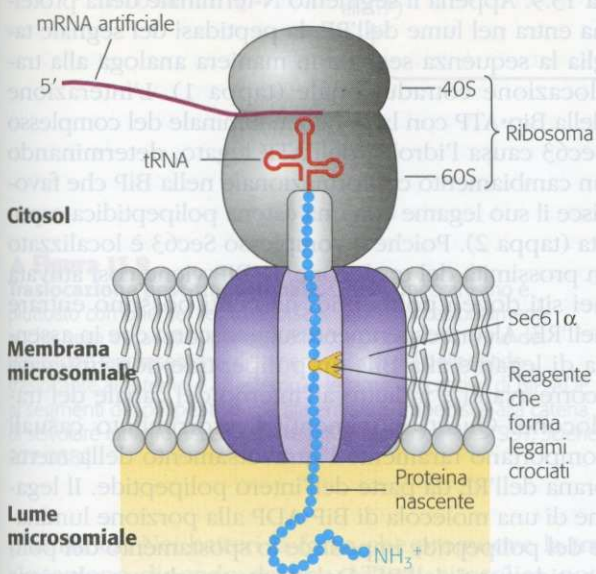
Una volta che la SRP e il suo recettore hanno indirizzato un ribosoma che sta sintetizzando una proteina secretoria alla membrana dell'ER, il ribosoma e la catena proteica nascente sono rapidamente trasferiti al **traslocone**, un canale proteico presente all'interno della membrana. Man mano che la traduzione continua, la catena in allungamento passa direttamente dalla subunità ribosomiale maggiore al poro centrale del traslocone. La subunità ribosomiale 60S è allineata con il poro del traslocone in modo che la catena in accrescimento non sia mai esposta al citoplasma e non si ripieghi fin quando non raggiunge il lume dell'ER (Figura 13.6).

Il traslocone fu identificato per la prima volta studiando le mutazioni nel gene delle cellule di lievito che codifica la Sec61 $\alpha$ , che causavano un blocco della traslocazione delle proteine secretorie nel lume dell'ER. Successivamente fu scoperto che il traslocone di mammifero era costituito da tre proteine chiamate **complesso Sec61**: la Sec61 $\alpha$ , una proteina integrale di membrana con 10  $\alpha$ -eliche transmembrana, e due



proteine più piccole, chiamate Sec61 $\beta$  e Sec61 $\gamma$ . L'induzione sperimentale della formazione di legami crociati ha dimostrato che la catena polipeptidica che deve essere traslocata entra in contatto con la proteina Sec61 $\alpha$  sia nelle cellule di lievito sia in quelle di mammifero, confermando che questa proteina è un componente del traslocone (Figura 13.7).

Quando in un sistema di traslocazione acellulare i microsomi venivano sostituiti con vescicole fosfolipidiche ricostituite contenenti solo il recettore della SRP e il complesso Sec61, la proteina secretoria nascente era trasferita dal suo complesso SRP/ribosoma all'interno delle vescicole. Questa scoperta indica che il recettore per la SRP e il complesso Sec61 sono le sole proteine della membrana dell'RE assolutamente necessarie per la traslocazione. Poiché nessuna di queste



### ▲ Figura 13.7

#### La proteina Sec61 $\alpha$ è un componente del traslocone.

L'induzione sperimentale di legami crociati mostra che la Sec61 $\alpha$  è una componente del traslocone che entra in contatto con le proteine secretorie nascenti appena queste si trasferiscono nel lume dell'RE. Un mRNA che codifica l'estremità N-terminale di 70 amminoacidi della proteina secreta prolattina è stato tradotto in un sistema acellulare contenente microsomi (vedi Figura 13.4b). L'mRNA era privo di un codone di stop e conteneva solo un codone per la lisina in prossimità del centro della sequenza. Il mezzo di reazione conteneva un tRNA per la lisina chimicamente modificato nel quale un agente fotoattivabile e in grado di legarsi covalentemente alle proteine era coniugato alla catena laterale della lisina. Sebbene l'intero mRNA fosse tradotto, il polipeptide completato non poteva essere rilasciato dal ribosoma senza un codone di stop e quindi si bloccava attraversando la membrana dell'RE. A questo punto la miscela del mezzo di reazione è stata esposta ad una luce intensa che rendeva la catena nascente capace di stabilire legami covalenti con qualsiasi proteina si trovasse nelle sue vicinanze all'interno del traslocone. Quando l'esperimento veniva effettuato utilizzando microsomi di cellule di mammifero, la catena nascente risultava covalentemente legata alla proteina Sec61 $\alpha$ . Sono state create diverse versioni di mRNA della prolattina in modo che il residuo di lisina modificato fosse posto a varie distanze dal ribosoma; il legame covalente alla Sec61 $\alpha$  si osservava solo quando la lisina modificata era posizionata all'interno del canale di traslocazione. [Adattata da T.A. Rapoport, 1992, *Science* **258**:931, e D. Görlich e T.A. Rapoport, 1993, *Cell* **75**:615.]

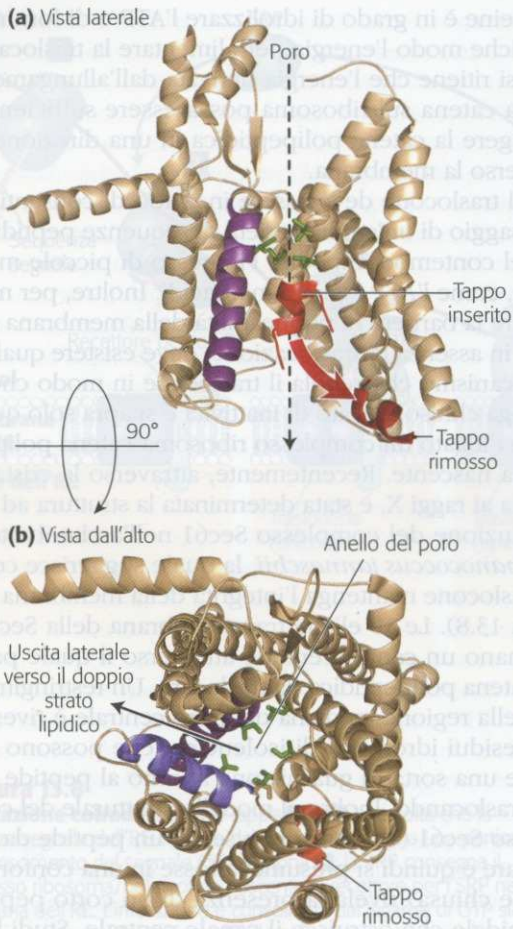
proteine è in grado di idrolizzare l'ATP o di fornire in qualche modo l'energia per alimentare la traslocazione, si ritiene che l'energia derivata dall'allungamento della catena sul ribosoma possa essere sufficiente a spingere la catena polipeptidica in una direzione attraverso la membrana.

Il traslocone deve essere in grado di consentire il passaggio di un'ampia varietà di sequenze peptidiche e nel contempo impedire l'ingresso di piccole molecole, come l'ATP e gli amminoacidi. Inoltre, per mantenere la barriera di permeabilità della membrana dell'RE in assenza di traslocazione, deve esistere qualche meccanismo che regola il traslocone in modo che rimanga chiuso in stato di inattività e si apra solo quando ha legato un complesso ribosoma-catena polipeptidica nascente. Recentemente, attraverso la cristallografia ai raggi X, è stata determinata la struttura ad alta risoluzione del complesso Sec61 nell'archeobatterio *Methanococcus jannaschii*, la quale suggerisce come il traslocone mantenga l'integrità della membrana (Figura 13.8). Le 10 eliche transmembrana della Sec61 $\alpha$  formano un canale centrale attraverso il quale passa la catena polipeptidica da traslocare. Un restringimento nella regione mediana del poro centrale è rivestito da residui idrofobici di isoleucina, che possono formare una sorta di guarnizione attorno al peptide che sta traslocando. Inoltre, il modello strutturale del complesso Sec61 (che fu isolato senza un peptide da traslocare e quindi si presumeva fosse in una conformazione chiusa) rivela la presenza di un corto peptide elicoidale che ostruisce il canale centrale. Studi biochimici sul complesso Sec61 hanno dimostrato che il peptide che costituisce il tappo subisce un cambiamento conformazionale significativo durante l'attività di traslocazione, e i ricercatori ritengono che una volta che un peptide da traslocare entra nel canale, il tappo peptidico si sposti permettendo alla traslocazione di procedere.

Appena la catena polipeptidica in allungamento entra nel lume dell'RE, la sequenza segnale viene rimossa dalla *peptidasi del segnale*, che è una proteina transmembrana dell'RE associata al traslocone (vedi Figura 13.6). La peptidasi del segnale riconosce una sequenza sull'estremità C-terminale del nucleo idrofobico del peptide segnale e taglia specificamente questa sequenza della catena una volta che è emersa all'interno dello spazio lumenale dell'RE. Dopo che la sequenza segnale è stata rimossa, il polipeptide in allungamento si sposta, attraverso il traslocone, nel lume dell'RE. Il traslocone rimane aperto fino a quando la traduzione si è completata e l'intera catena polipeptidica si è trasferita nel lume dell'RE.

La microscopia elettronica del complesso Sec61 isolato dall'RE delle cellule eucariotiche mostra che tre o quattro copie della Sec61 $\alpha$  si assemblano tra loro nel piano della membrana. Sebbene il significato funzionale di questa associazione tra i canali del traslocone non sia al momento noto, si ritiene che la oligomerizzazione dei canali del traslocone possa facilitare l'associazione tra il traslocone, la peptidasi del segnale e altri complessi proteici luminali che partecipano al processo di traslocazione.





### ▲ Figura 13.8

**Struttura di un complesso Sec61 batterico.** La struttura del complesso Sec61 solubilizzato con un detergente dall'archeobatterio *M. jannaschii* (noto anche come complesso SecY) determinata con la cristallografia ai raggi X. **(a)** Una vista laterale mostra il canale a forma di clessidra attraverso il centro del poro. Un anello di residui di isoleucina nella cintura ristretta del poro può formare una guarnizione che impedisce il passaggio di piccole molecole, anche quando un polipeptide da traslocare sta passando attraverso il canale. Quando non è presente alcun peptide da traslocare, il canale risulta chiuso da una sorta di tappo a forma di elica. Si ritiene che questo tappo si sposti fuori dal canale durante la traslocazione. In questa immagine, è stata rimossa la porzione frontale della proteina per evidenziare meglio il poro. **(b)** La vista attraverso il centro del canale mostra una regione (sul lato sinistro) dove le eliche si possono separare permettendo il passaggio laterale di un dominio transmembrana idrofobico all'interno del doppio strato lipidico. [Adattata da A.R. Osborne et al., 2005, *Ann. Rev. Cell. Dev. Biology* 21:529.]

### ■ L'idrolisi dell'ATP alimenta la traslocazione post-traduzionale di alcune proteine secretorie nel lievito

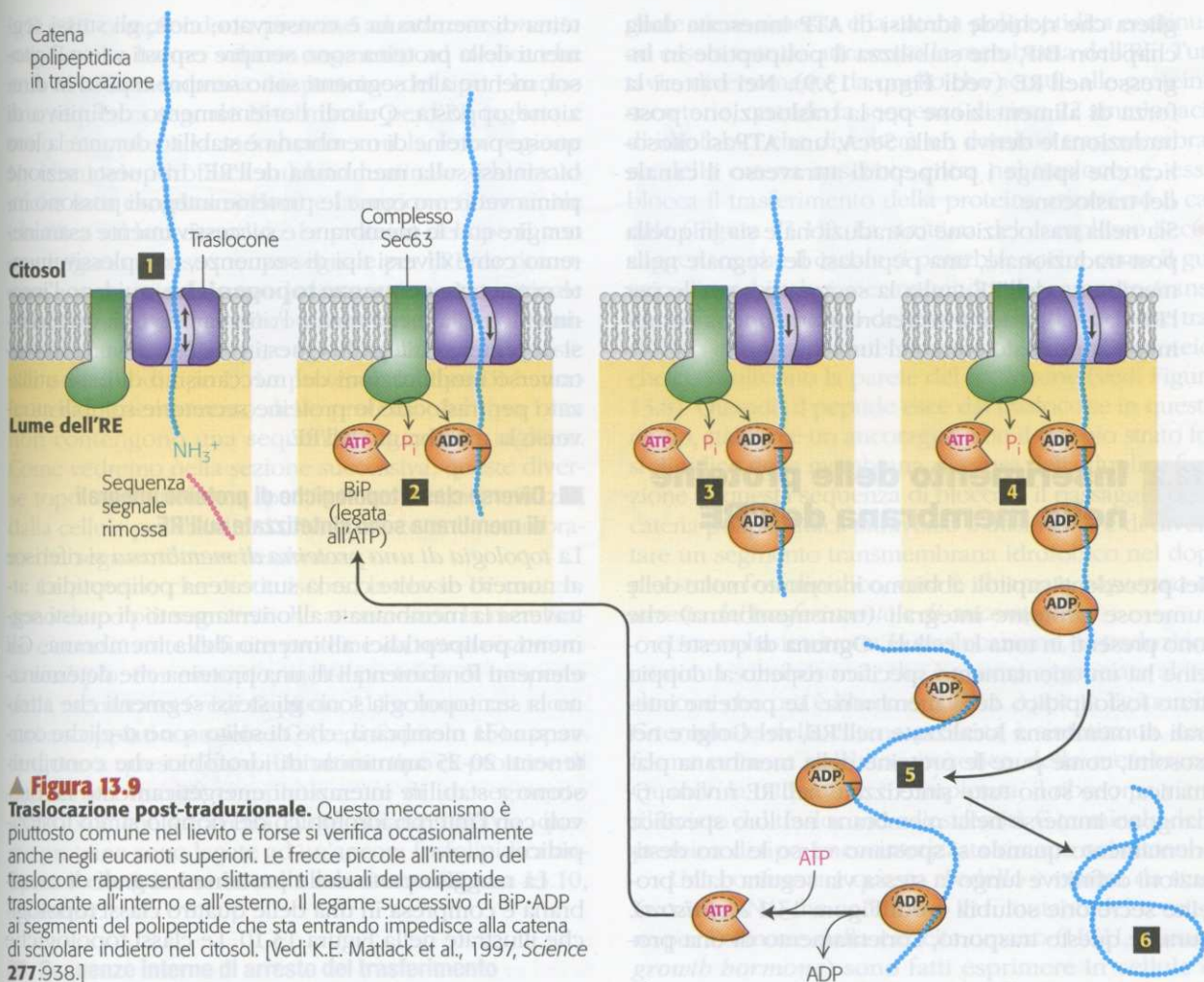
Nella maggior parte degli eucarioti le proteine secretorie entrano nell'RE per traslocazione cotraduzionale. Nelle cellule di lievito, tuttavia, alcune proteine secretorie entrano nel lume dell'RE dopo che si è completata la traduzione. In questa *traslocazione post-traduzionale*, la proteina da traslocare passa attraverso lo stesso traslocone Sec61 che è utilizzato nella traslocazione cotraduzionale. Tuttavia, la SRP e il suo recettore non sono coinvolti nella traslocazione post-traduzionale, e in questi casi per indirizzare la proteina

completata alla membrana dell'RE sembra essere sufficiente una diretta interazione tra il traslocone e la sequenza segnale. Inoltre, la forza per guidare la traslocazione unidirezionale attraverso la membrana dell'RE è fornita da un complesso proteico aggiuntivo noto come *complesso Sec63* e da un membro della famiglia delle Hsc70 delle **chaperon molecolari** noto come *BiP*. Il complesso tetramerico Sec63 è immerso nella membrana dell'RE in prossimità del traslocone, mentre la proteina BiP è all'interno del lume dell'RE. Come altri membri della famiglia delle Hsc70, la BiP ha un dominio di legame per il peptide e un dominio ATPasico. Queste chaperon legano e stabilizzano proteine non ripiegate o parzialmente ripiegate (vedi Figura 13.6).

L'attuale modello di traslocazione post-traduzionale di una proteina nell'RE è schematizzato nella Figura 13.9. Appena il segmento N-terminale della proteina entra nel lume dell'RE, la peptidasi del segnale taglia la sequenza segnale in maniera analoga alla traslocazione cotraduzionale (tappa 1). L'interazione della BiP•ATP con la porzione luminale del complesso Sec63 causa l'idrolisi dell'ATP legato, determinando un cambiamento conformazionale nella BiP che favorisce il suo legame con una catena polipeptidica esposta (tappa 2). Poiché il complesso Sec63 è localizzato in prossimità del traslocone, la BiP viene così attivata nei siti dove i polipeptidi nascenti possono entrare nell'RE. Alcuni esperimenti suggeriscono che in assenza di legame alla BiP, un polipeptide non ripiegato scorre avanti e indietro all'interno del canale del traslocone. Questi movimenti di scorrimento casuali comportano raramente l'attraversamento della membrana dell'RE da parte dell'intero polipeptide. Il legame di una molecola di BiP•ADP alla porzione luminale del polipeptide impedisce lo spostamento del polipeptide fuori dall'RE. Dal momento che un ulteriore scorrimento casuale espone una porzione maggiore del polipeptide verso il lato luminale della membrana dell'RE, il successivo legame delle molecole di BiP•ADP alla catena polipeptidica funziona come una cremagliera, dirigendo in definitiva l'intero polipeptide verso l'interno dell'RE in pochi secondi (tappe 3 e 4). In tempi più lunghi, le molecole di BiP scambiano spontaneamente l'ADP legato con ATP, determinando il rilascio del polipeptide, che può a questo punto ripiegarsi nella sua conformazione nativa (tappe 5 e 6). La molecola di BiP•ATP riciclata è quindi pronta per un'altra interazione con la Sec63. La BiP e il complesso Sec63 sono richieste anche nella traslocazione cotraduzionale. I dettagli sul loro ruolo in questo processo non sono noti, ma si ritiene che agiscano in uno stadio precoce del processo come quello dell'inserimento del peptide segnale all'interno del poro del traslocone.

L'intera reazione effettuata dalla BiP è un importante esempio di come l'energia chimica liberata dall'idrolisi di ATP possa alimentare il movimento meccanico di una proteina attraverso una membrana. Anche le cellule batteriche utilizzano un processo alimentato da ATP per traslocare proteine che hanno completato la loro traduzione attraverso la membrana





### ▲ Figura 13.9

**Traslocazione post-traduzionale.** Questo meccanismo è piuttosto comune nel lievito e forse si verifica occasionalmente anche negli eucarioti superiori. Le frecce piccole all'interno del traslocone rappresentano slittamenti casuali del polipeptide traslocante all'interno e all'esterno. Il legame successivo di BiP-ADP ai segmenti del polipeptide che sta entrando impedisce alla catena di scivolare indietro nel citosol. [Vedi K.E. Matlack et al., 1997, *Science* 277:938.]

plasmatica. Nei batteri la forza che promuove la traslocazione dipende da una ATPasi citosolica nota come proteina SecA. La SecA si lega al lato citoplasmatico del traslocone e idrolizza l'ATP citosolico. Attraverso un meccanismo non ben conosciuto, la proteina SecA spinge i segmenti di un polipeptide tramite la membrana con un ciclo meccanico accoppiato all'idrolisi di ATP.

### ■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 13.1

#### Traslocazione delle proteine secretorie attraverso la membrana dell'ER

- ▶ La sintesi delle proteine secrete, delle proteine integrali della membrana plasmatica e delle proteine destinate all'ER, all'apparato di Golgi o ai lisosomi inizia sui ribosomi citosolici, che risultano attaccati alla membrana dell'ER, formando l'ER ruvido (vedi Figura 13.1, *a sinistra*).
- ▶ La sequenza segnale per l'ER su una proteina secretoria nascente consiste in un segmento di aminoacidi idrofobici, solitamente localizzato all'estremità N-terminale.
- ▶ Nella traslocazione cotraduzionale la particella di riconoscimento del segnale (SRP) prima riconosce e si lega alla sequenza segnale per l'ER su una proteina secretoria nascente e a sua volta è legata da

un recettore della SRP sulla membrana dell'ER, indirizzando il complesso ribosoma/catena nascente all'ER.

- ▶ La SRP e il suo recettore poi mediano l'inserimento della proteina secretoria nascente nel traslocone (complesso Sec61). L'idrolisi di due molecole di GTP da parte della SRP e del suo recettore alimenta questo processo di ancoraggio e determina la dissociazione della SRP (vedi Figure 13.5 e 13.6). Mentre il ribosoma attaccato al traslocone continua la traduzione, la catena proteica non ripiegata viene estrusa all'interno del lume dell'ER. Per la traslocazione non è richiesta alcuna energia aggiuntiva.
- ▶ Il traslocone è provvisto di un canale centrale delimitato da residui idrofobici che permettono il transito di una catena proteica non ripiegata, mentre impedisce il passaggio di ioni e piccole molecole idrofiliche. Inoltre, il canale è regolato in modo che sia aperto solo quando si verifica la traslocazione di un polipeptide.
- ▶ Nella traslocazione post-traduzionale, una proteina secretoria che ha completato la sua traduzione è indirizzata alla membrana dell'ER mediante l'interazione della sequenza segnale con il traslocone. La catena polipeptidica viene quindi tirata all'interno dell'ER tramite un meccanismo a crema-



glieria che richiede idrolisi di ATP innescata dalla chaperon BiP, che stabilizza il polipeptide in ingresso nell'RE (vedi Figura 13.9). Nei batteri la forza di alimentazione per la traslocazione post-traduzionale deriva dalla SecA, una ATPasi citosolica che spinge i polipeptidi attraverso il canale del traslocone.

- Sia nella traslocazione cotraduzionale sia in quella post-traduzionale, una peptidasi del segnale nella membrana dell'RE taglia la sequenza segnale per l'RE da una proteina secretoria non appena l'estremità N-terminale entra nel lume.

### 13.2 Inserimento delle proteine nella membrana dell'RE

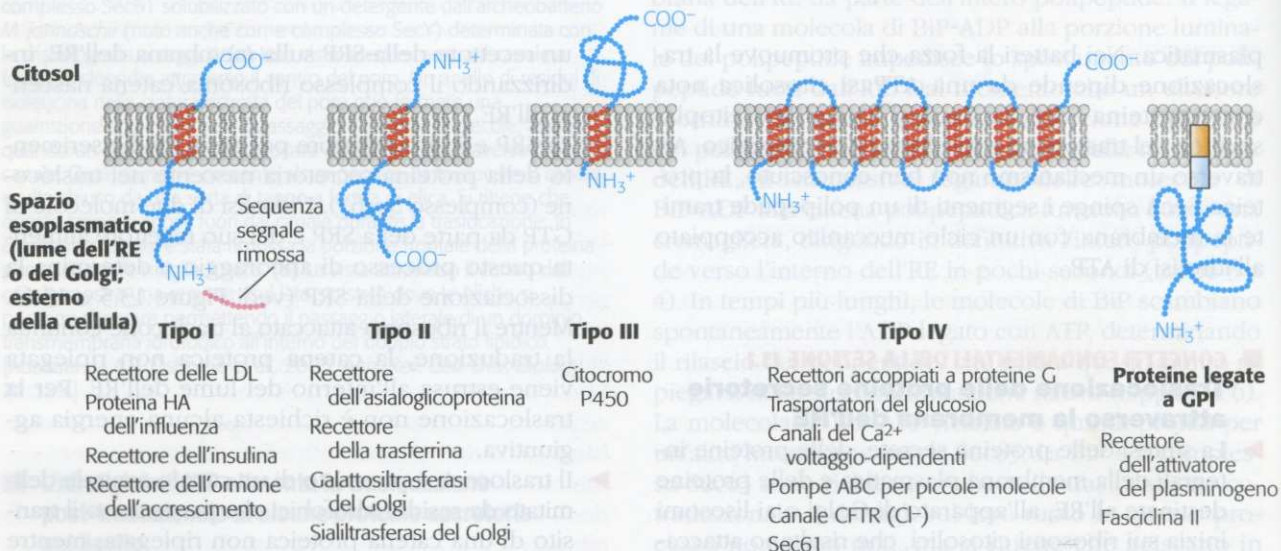
Nei precedenti capitoli abbiamo incontrato molte delle numerose proteine integrali (transmembrana) che sono presenti in tutta la cellula. Ognuna di queste proteine ha un orientamento specifico rispetto al doppio strato fosfolipidico della membrana. Le proteine integrali di membrana localizzate nell'RE, nel Golgi e nei lisosomi, come pure le proteine della membrana plasmatica, che sono tutte sintetizzate nell'RE ruvido, rimangono immerse nella membrana nel loro specifico orientamento quando si spostano verso le loro destinazioni definitive lungo la stessa via seguita dalle proteine secretorie solubili (vedi Figura 13.1 a sinistra). Durante questo trasporto, l'orientamento di una pro-

teina di membrana è conservato; cioè, gli stessi segmenti della proteina sono sempre esposti verso il citosol, mentre altri segmenti sono sempre esposti in direzione opposta. Quindi l'orientamento definitivo di queste proteine di membrana è stabilito durante la loro biosintesi sulla membrana dell'RE. In questa sezione prima vedremo come le proteine integrali possono interagire con le membrane e successivamente esamineremo come diversi tipi di sequenze, complessivamente note come **sequenze topogeniche**, guidano l'inserimento nella membrana e l'orientamento di varie classi di proteine integrali. Questi processi avvengono attraverso modificazioni del meccanismo di base utilizzato per traslocare le proteine secretorie solubili attraverso la membrana dell'RE.

#### ■ Diverse classi topologiche di proteine integrali di membrana sono sintetizzate sull'RE

La *topologia di una proteina di membrana* si riferisce al numero di volte che la sua catena polipeptidica attraversa la membrana e all'orientamento di questi segmenti polipeptidici all'interno della membrana. Gli elementi fondamentali di una proteina che determinano la sua topologia sono gli stessi segmenti che attraversano la membrana, che di solito sono  $\alpha$ -eliche contenenti 20-25 amminoacidi idrofobici che contribuiscono a stabilire interazioni energeticamente favorevoli con l'interno idrofobico del doppio strato fosfolipidico.

La maggior parte delle proteine integrali di membrana è compresa in una delle quattro classi topologiche illustrate nella Figura 13.10. Le classi topologiche



#### ▲ Figura 13.10

**Le proteine della membrana dell'RE.** Nell'RE ruvido sono sintetizzate quattro classi topologiche di proteine integrali di membrana, oltre a un quinto tipo attaccato alla membrana tramite un'ancora fosfolipidica. Le proteine di membrana sono classificate sulla base del loro orientamento nella membrana e in base ai tipi di segnali che le indirizzano alla membrana. Nelle classi I-IV, i segmenti idrofobici della catena proteica formano  $\alpha$ -eliche immerse nel doppio strato della membrana; le regioni fuori della membrana sono idrofiliche e si ripiegano in varie conformazioni. Tutte le proteine di

tipo IV hanno più  $\alpha$ -eliche transmembrana. La topologia di tipo IV qui descritta corrisponde a quella dei recettori accoppiati a proteine G: sette  $\alpha$ -eliche, l'estremità N-terminale sul lato esoplasmatico della membrana e l'estremità C-terminale sul lato citosolico. Altre proteine di tipo IV possono avere un numero diverso di eliche e vari orientamenti delle estremità N- e C-terminali. [Vedi E. Hartmann et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5786 e C.A. Brown e S.D. Black, 1989, *J. Biol. Chem.* **264**:4442.]



I, II e III comprendono proteine ad *attraversamento singolo*, che hanno solo un segmento ad  $\alpha$ -elica che attraversa la membrana. Le proteine del tipo I hanno una sequenza segnale N-terminale per l'RE tagliata e sono ancorate alla membrana con la loro regione N-terminale idrofilica sul lato luminale (chiamato anche **lato esoplasmatico**) e la regione C-terminale idrofilica sul lato citosolico. Le proteine del tipo II non contengono una sequenza segnale per l'RE da rimuovere e sono orientate con la loro regione N-terminale idrofilica sul lato citosolico e con la regione C-terminale sul lato esoplasmatico (cioè, in direzioni opposte alle proteine di tipo I). Le proteine del tipo III hanno lo stesso orientamento delle proteine del tipo I ma non contengono una sequenza segnale da tagliare. Come vedremo nella sezione successiva, queste diverse topologie riflettono specifici meccanismi utilizzati dalla cellula per stabilire l'orientamento nella membrana dei segmenti transmembrana.

Le proteine che costituiscono la classe IV contengono due o più segmenti che attraversano la membrana e sono a volte definite proteine *ad attraversamento multiplo*. Per esempio, molte proteine di trasporto della membrana (vedi Capitolo 11) e numerosi recettori accoppiati a proteine G (vedi Capitolo 15) appartengono a questa classe. Un ultimo tipo di proteine di membrana manca completamente di un segmento idrofobico che attraversa la membrana; tuttavia, queste proteine sono legate ad un'ancora fosfolipidica anfipatica che è immersa nella membrana (Figura 13.10, a destra).

### ■ Sequenze interne di arresto del trasferimento e sequenze del segnale di ancoraggio determinano la topologia delle proteine ad attraversamento singolo

Cominceremo la discussione sulla determinazione della topologia delle proteine di membrana con l'inserimento nella membrana di proteine integrali che contengono un singolo segmento di attraversamento idrofobico. Nell'indirizzamento e orientamento delle proteine di tipo I nella membrana dell'RE sono coinvolte due sequenze, mentre le proteine del tipo II e III contengono al loro interno una singola sequenza topogenica. Come vedremo, ci sono tre tipi principali di sequenze topogeniche che sono utilizzate per dirigere le proteine alla membrana dell'RE e per orientarle al suo interno. Una è stata già considerata, la sequenza segnale N-terminale per l'RE, le altre due, di cui parleremo ora, sono sequenze interne note come sequenze di arresto del trasferimento e sequenze del segnale di ancoraggio.

**Proteine di tipo I** Tutte le proteine transmembrana di tipo I possiedono una sequenza segnale N-terminale che le indirizza all'RE e una sequenza idrofobica interna che diventa l' $\alpha$ -elica transmembrana. La sequenza segnale N-terminale su una proteina nascente di tipo I, come quella di una proteina secretoria, inizia la traslocazione cotraduzionale della proteina attraverso l'azione combinata della SRP e del suo recettore. Una volta che l'estremità N-terminale del polipeptide in allungamento entra nel lume dell'RE, la sequenza se-

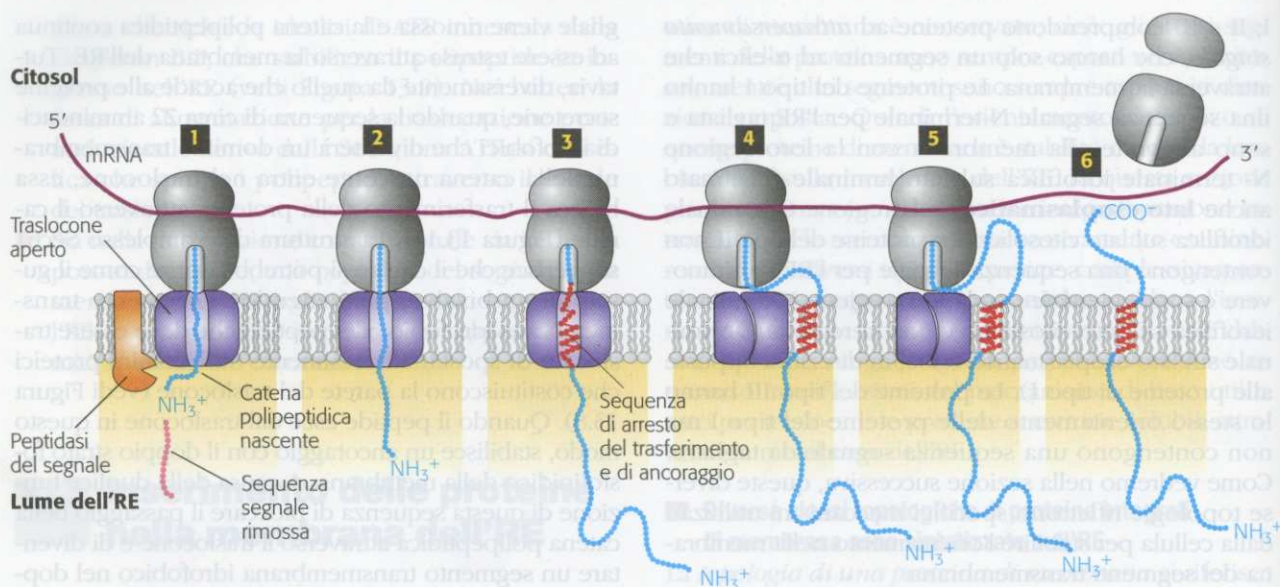
gnale viene rimossa e la catena polipeptidica continua ad essere estrusa attraverso la membrana dell'RE. Tuttavia, diversamente da quello che accade alle proteine secretorie, quando la sequenza di circa 22 amminoacidi idrofobici che diventerà un dominio transmembrana della catena nascente entra nel traslocone, essa blocca il trasferimento della proteina attraverso il canale (Figura 13.11). La struttura del complesso Sec61 suggerisce che il canale si potrebbe aprire come il guscio di un bivalve, permettendo al segmento transmembrana idrofobico del peptide che deve essere traslocato di spostarsi lateralmente tra i domini proteici che costituiscono la parete del traslocone (vedi Figura 13.8). Quando il peptide esce dal traslocone in questo modo, stabilisce un ancoraggio con il doppio strato fosfolipidico della membrana. A causa della duplice funzione di questa sequenza di bloccare il passaggio della catena polipeptidica attraverso il traslocone e di diventare un segmento transmembrana idrofobico nel doppio strato fosfolipidico, essa è chiamata *sequenza di arresto del trasferimento e di ancoraggio*.

Una volta interrotta la traslocazione, la traduzione continua sul ribosoma, che è ancora agganciato al traslocone che ora è libero e chiuso. Appena l'estremità C-terminale della catena proteica è sintetizzata, essa forma un'ansa sul lato citosolico della membrana. Quando la traduzione è completata, il ribosoma viene rilasciato dal traslocone e l'estremità C-terminale della proteina di tipo I neosintetizzata rimane nel citosol.

Una conferma a questo modello è venuta da studi in cui i cDNA che codificano vari mutanti del recettore per l'ormone della crescita umano (HGH, *human growth hormone*) sono fatti esprimere in cellule di mammifero in coltura. Il recettore per l'HGH di tipo selvatico, una tipica proteina di tipo I, è normalmente trasportato alla membrana plasmatica. Tuttavia, un recettore mutante con residui modificati inseriti nel singolo segmento transmembrana ad  $\alpha$ -elica, o mancante della maggior parte di questo segmento, viene trasportato esclusivamente nel lume dell'RE ed è infine secreto dalla cellula come proteina solubile. Questo tipo di esperimenti dimostra che l' $\alpha$ -elica transmembrana idrofobica del recettore per l'HGH e di altre proteine di tipo I funziona come una sequenza di arresto del trasferimento e come un'ancora di membrana che impedisce all'estremità C-terminale della proteina di attraversare la membrana dell'RE.

**Proteine di tipo II e di tipo III** A differenza delle proteine di tipo I, le proteine di tipo II e III non presentano una sequenza segnale N-terminale per l'RE da rimuovere. Al contrario, entrambi possiedono una singola *sequenza segnale di ancoraggio* interna idrofobica che funziona sia come sequenza segnale per l'RE sia come sequenza di ancoraggio alla membrana. Bisogna ricordare che le proteine del tipo II e III hanno orientamenti opposti nella membrana (vedi Figura 13.10); questa differenza dipende dall'orientamento che le rispettive sequenze segnale di ancoraggio assumono all'interno del traslocone. Nelle proteine di tipo II, la sequenza segnale di ancoraggio interna dirige l'inserimento della catena nascente nella membrana





### ▲ Figura 13.11

#### Posizionamento delle proteine di tipo I ad attraversamento singolo.

Tappa **1**: dopo che il complesso ribosoma/catena nascente si è associato al traslocone nella membrana dell'ER, la sequenza segnale N-terminale viene rimossa. Questo processo si realizza con lo stesso meccanismo utilizzato per le proteine secretorie solubili (vedi Figura 13.6). Tappe **2** e **3**: la catena si allunga fino al completamento della sintesi della sequenza di arresto del trasferimento e ancoraggio ed entra nel traslocone, dove impedisce che la catena nascente possa sporgere ulteriormente nel lume dell'ER. Tappa **4**: la sequenza di arresto del trasferimento

dell'ER in modo tale che l'estremità N-terminale della catena sia rivolta verso il citosol, usando lo stesso meccanismo SRP-dipendente descritto per le sequenze segnale (Figura 13.12a). Tuttavia, la sequenza segnale di ancoraggio interna *non* è rimossa e diffonde lateralmente tra i domini proteici della parete del traslocone nel doppio strato fosfolipidico, dove funziona come un'ancora di membrana. Man mano che l'allungamento continua, la regione C-terminale della catena che si allunga viene spostata attraverso il traslocone nel lume dell'ER per traslocazione cotraduzionale.

Nel caso delle proteine di tipo III, la sequenza segnale di ancoraggio, che è localizzata in prossimità dell'estremità N-terminale, inserisce la catena nascente nella membrana dell'ER con la sua estremità N-terminale rivolta verso il lume, con un orientamento del segnale di ancoraggio opposto a quello delle proteine di tipo II. La sequenza segnale di ancoraggio delle proteine di tipo III funziona anche come una sequenza di arresto del trasferimento e impedisce l'ulteriore estrusione della catena nascente nel lume dell'ER (Figura 13.12b). Il continuato allungamento della catena C-terminale fino alla sequenza segnale di ancoraggio/arresto del trasferimento procede in maniera analoga alle proteine di tipo I, con la sequenza idrofobica che si sposta lateralmente tra le subunità del traslocone per ancorare il polipeptide alla membrana dell'ER (vedi Figura 13.11).

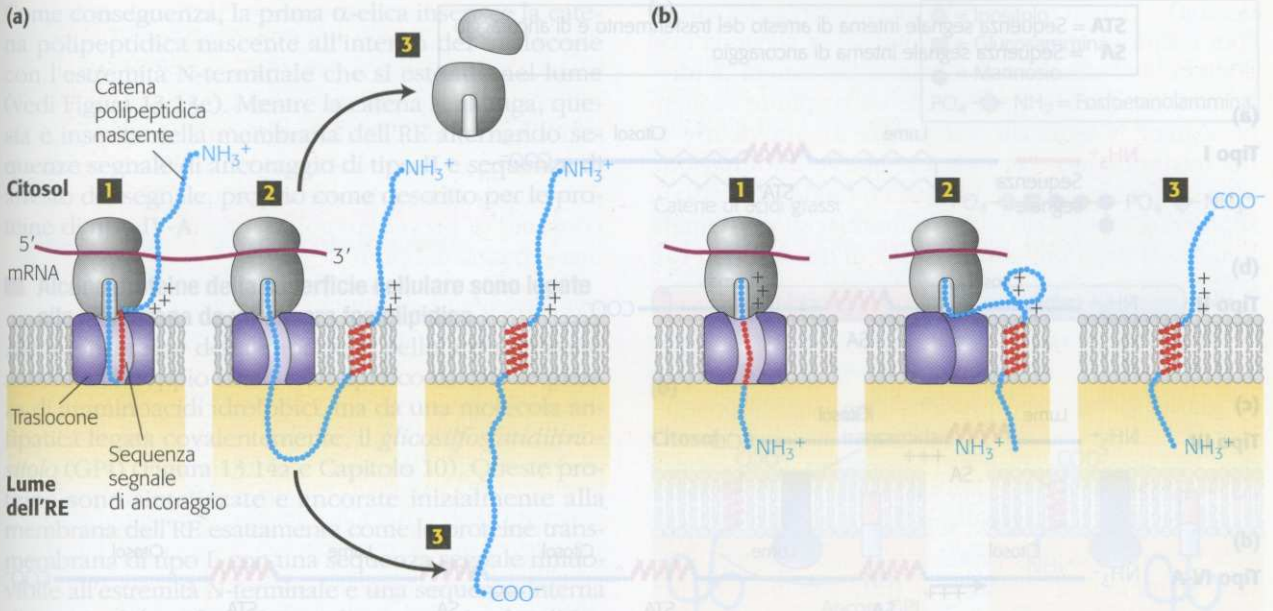
Una delle caratteristiche delle sequenze segnale di ancoraggio che sembra determinare l'orientamento per il loro inserimento è un'elevata densità di ammi-

e ancoraggio si sposta lateralmente tra le subunità del traslocone e si ancora nel doppio strato fosfolipidico. A questo punto, il traslocone probabilmente si chiude. Tappa **5**: man mano che la sintesi continua, la catena in allungamento può formare un'ansa diretta verso il citosol nello spazio minimo interposto tra il ribosoma e il traslocone. Tappa **6**: quando la sintesi è completata, le subunità ribosomiali vengono rilasciate nel citosol, lasciando la proteina libera di diffondere nella membrana. [Vedi H. Do et al., 1996, *Cell* **85**:369, e W. Mothes et al., 1997, *Cell* **89**:523.]

noacidi carichi positivamente adiacenti a una estremità del segmento idrofobico. Per ragioni che non sono ben conosciute, questi residui con carica positiva tendono a rimanere sul lato citosolico della membrana, e non entrano nel lume dell'ER attraverso la membrana. Quindi la posizione dei residui carichi impone l'orientamento della sequenza segnale di ancoraggio all'interno del traslocone e determina se il resto della catena polipeptidica debba continuare oppure no a passare nel lume dell'ER: le proteine di tipo II tendono ad avere residui carichi positivi sul lato N-terminale della loro sequenza segnale di ancoraggio, orientando l'estremità N-terminale nel citosol e permettendo il passaggio del lato C-terminale all'interno dell'ER (Figura 13.12a), mentre le proteine di tipo III tendono ad avere residui con cariche positive sul lato C-terminale sulla loro sequenza segnale di ancoraggio, inserendo l'estremità N-terminale nel traslocone e limitando l'estremità C-terminale al citosol (Figura 13.12b).

Una chiara dimostrazione sperimentale dell'importanza della carica adiacente nella determinazione dell'orientamento della proteina nella membrana è fornita dalla neuraminidasi, una proteina di tipo II localizzata sul rivestimento superficiale del virus dell'influenza. Nella neuraminidasi tre residui di arginina sono inseriti proprio all'estremità N-terminale della sequenza segnale di ancoraggio interna. La mutazione di questi tre residui carichi positivamente a residui di glutammato, carichi negativamente, induce nella neuraminidasi l'acquisizione di un orientamento opposto. Espe-



▲ **Figura 13.12****Posizionamento delle proteine di tipo II e di tipo III ad attraversamento singolo.**

(a) Proteine di tipo II. Tappa **1**: dopo che la sequenza segnale di ancoraggio interna è stata sintetizzata su un ribosoma citosolico, viene legata da una SRP (non mostrata), che dirige il complesso ribosoma/catena nascente alla membrana dell'RE. Questa tappa è simile all'indirizzamento delle proteine secretorie solubili tranne per il fatto che la sequenza segnale idrofobica non è localizzata all'estremità N-terminale e non è successivamente rimossa. La catena nascente si orienta nel traslocone con la porzione N-terminale verso il citosol. Si pensa che questo orientamento sia mediato da residui carichi positivamente dell'estremità N-terminale mostrati alla sequenza segnale di ancoraggio. Tappa **2**: man mano che la catena si allunga e sporge nel lume, la sequenza segnale di ancoraggio interna si sposta

lateralmente fuori dal traslocone e ancora la catena al doppio strato fosfolipidico. Tappa **3**: una volta che la sintesi della proteina si è completata, l'estremità C-terminale del polipeptide è rilasciata nel lume, e le subunità ribosomiali sono rilasciate nel citosol.

(b) Proteine di tipo III. Tappa **1**: l'assemblaggio si attua in un modo simile a quello delle proteine di tipo II, tranne per il fatto che i residui con carica positiva sul lato C-terminale della sequenza segnale di ancoraggio determinano l'orientamento del segmento transmembrana all'interno del traslocone con la sua porzione C-terminale orientata verso il citosol e il lato N-terminale della proteina nel lume dell'RE. Tappe **2** e **3**: l'allungamento della catena della porzione C-terminale della proteina viene completato nel citosol e le subunità ribosomiali sono rilasciate. [Vedi M. Spiess e H.F. Lodish, 1986, *Cell* **44**:177, e H. Do et al., 1996, *Cell* **85**:369.]

rimenti simili hanno mostrato che altre proteine, con orientamento sia del tipo II sia del tipo III, possono modificare il loro orientamento nella membrana dell'RE attraverso mutazioni dei residui carichi che fiancheggiano la sequenza interna del segnale di ancoraggio.

■ **Le proteine transmembrana ad attraversamento multiplo hanno più sequenze topogeniche interne**

La Figura 13.13 riassume le disposizioni delle sequenze topogeniche nelle proteine transmembrana ad attraversamento singolo e ad attraversamento multiplo. Nelle proteine ad attraversamento multiplo (di tipo IV), ogni  $\alpha$ -elica transmembrana agisce come una sequenza-topogenica nel modo che abbiamo già discusso: possono intervenire nel dirigere la proteina all'RE, nell'ancoraggio della proteina nella membrana dell'RE o nel bloccare il trasferimento della proteina attraverso la membrana. Le proteine ad attraversamento multiplo possono essere di due tipi a seconda se l'estremità N-terminale si proietta nel citosol o nello spazio esoplasmatico (per esempio, nel lume dell'RE o all'esterno della cellula). Questa topologia N-terminale di solito è determinata dal segmento idrofobico più vicino all'estremità N-terminale e dalla carica delle sequenze che lo fiancheggiano. Se una proteina di tipo IV ha un numero *p* di  $\alpha$ -eliche

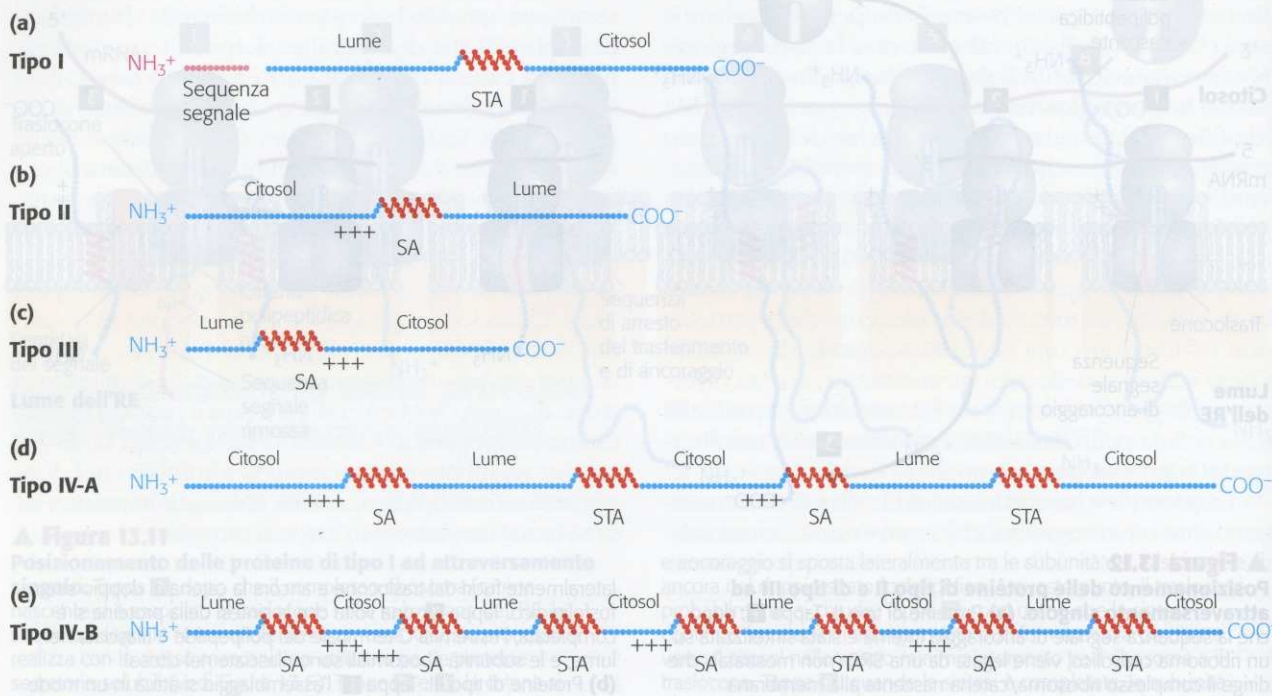
transmembrana, sia l'estremità N-terminale sia quella C-terminale saranno orientate verso lo stesso lato della membrana (Figura 13.13d). Diversamente, se una proteina di tipo IV ha un numero *dispari* di  $\alpha$ -eliche, le sue due estremità avranno orientamento opposto (Figura 13.13e).

**Proteine di tipo IV con estremità N-terminale nel citosol**

Tra le proteine ad attraversamento multiplo la cui estremità N-terminale si estende nel citosol sono compresi vari trasportatori del glucosio (GLUT) e la maggior parte dei canali ionici, discussi nel Capitolo 11. In queste proteine il segmento idrofobico più vicino all'estremità N-terminale inizia l'inserimento della catena proteica nascente nella membrana dell'RE con l'estremità N-terminale orientata verso il citosol; quindi questo segmento ad  $\alpha$ -elica funziona come la sequenza interna del segnale di ancoraggio delle proteine di tipo II (vedi Figura 13.12a). Man mano che la catena nascente che segue la prima  $\alpha$ -elica si allunga, essa si sposta attraverso il traslocone fino a quando si forma una seconda  $\alpha$ -elica idrofobica. Questa elica impedisce l'ulteriore fuoriuscita della catena nascente attraverso il traslocone; la sua funzione quindi è simile a quella della sequenza di arresto del trasferimento e di ancoraggio di una proteina di tipo I (vedi Figura 13.11).



**STA** = Sequenza segnale interna di arresto del trasferimento e di ancoraggio  
**SA** = Sequenza segnale interna di ancoraggio



▲ **Figura 13.11**

Posizionamento delle proteine di tipo I ad attraversamento

(a) Le proteine di tipo I contengono una sequenza segnale rimossa e una singola sequenza interna di arresto del trasferimento e di ancoraggio (STA). (b, c) Le proteine di tipo II e III contengono una singola sequenza interna di ancoraggio (SA). La differenza di orientamento di queste proteine dipende ampiamente dalla presenza di una elevata densità di amminoacidi carichi

▲ **Figura 13.13**

**Le sequenze topogeniche determinano l'orientamento delle proteine nella membrana dell'RE.** Le sequenze topogeniche sono mostrate in rosso; le porzioni idrofiliche solubili in blu. Le sequenze topogeniche interne formano  $\alpha$ -eliche transmembrana che ancorano le proteine o i segmenti delle proteine alla membrana.

(a) Le proteine di tipo I contengono una sequenza segnale rimossa e una singola sequenza interna di arresto del trasferimento e di ancoraggio (STA). (b, c) Le proteine di tipo II e III contengono una singola sequenza interna di ancoraggio (SA). La differenza di orientamento di queste proteine dipende ampiamente dalla presenza di una elevata densità di amminoacidi carichi

Dopo la sintesi delle prime due  $\alpha$ -eliche transmembrana, entrambe le estremità della catena polipeptidica nascente si orientano verso il citosol e l'ansa tra le due estremità sporge nel lume dell'RE. L'estremità C-terminale della catena continua poi ad allungarsi nel citosol, in maniera simile a quanto si verifica nella sintesi delle proteine di tipo I e III. Secondo questo meccanismo, la terza  $\alpha$ -elica costituisce un'altra sequenza segnale di ancoraggio delle proteine di tipo II, mentre la quarta è un'altra sequenza di arresto e di ancoraggio (Figura 13.13d). A quanto pare, una volta che la prima sequenza topogenica di un polipeptide ad attraversamento multiplo inizia ad associarsi al traslocone, il ribosoma rimane attaccato al traslocone, e le sequenze topogeniche che emergono successivamente dal ribosoma si inseriscono all'interno del traslocone senza che sia richiesta la presenza della SRP e del recettore per la SRP.

Esperimenti che utilizzano tecniche del DNA ricombinante per modificare le  $\alpha$ -eliche idrofobiche hanno fornito chiarimenti sul funzionamento delle sequenze topogeniche nelle proteine ad attraversamento multiplo di tipo IV-A. Questi esperimenti indicano

positivamente (++++) sul lato N-terminale della sequenza SA (tipo II), o sul lato C-terminale della sequenza SA (tipo III). (d, e) Quasi tutte le proteine ad attraversamento multiplo mancano di una sequenza segnale rimuovibile, come schematizzato negli esempi mostrati in figura. Le proteine di tipo IV-A, la cui estremità N-terminale si affaccia verso il citosol, contengono sequenze SA di tipo II alternate a sequenze STA. Le proteine di tipo IV-B, la cui estremità N-terminale si affaccia nel lume, iniziano con una sequenza SA di tipo III seguita da un'alternanza di sequenze SA di tipo II e sequenze STA. Sono mostrate proteine di ogni tipo con numeri diversi di  $\alpha$ -eliche (pari o dispari).

che l'ordine relativo delle  $\alpha$ -eliche idrofobiche nella catena in allungamento determina in larga misura se una data elica funziona come una sequenza segnale di ancoraggio o una sequenza di arresto del trasferimento e di ancoraggio. A parte la sua idrofobicità, la specifica sequenza amminoacidica di una particolare elica ha poca influenza sulla sua funzione. Quindi la prima  $\alpha$ -elica N-terminale e quelle successive con numerazione dispari funzionano come sequenze segnale di ancoraggio, mentre le interposte  $\alpha$ -eliche pari hanno la funzione di sequenze di arresto del trasferimento e di ancoraggio.

**Proteine di tipo IV con estremità N-terminale nello spazio esoplasmatico** La grande famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G, tutti costituiti da sette  $\alpha$ -eliche transmembrana, rappresenta il tipo più

numerose di proteine IV-B, la cui estremità N-terminale si estende nello spazio esoplasmatico. In queste proteine, l' $\alpha$ -elica più vicina all'estremità N-terminale è spesso seguita da un insieme di amminoacidi carichi positivamente, simile alla sequenza segnale di ancoraggio delle proteine di tipo III (vedi Figura 13.12b).



Come conseguenza, la prima  $\alpha$ -elica inserisce la catena polipeptidica nascente all'interno del traslocone con l'estremità N-terminale che si estende nel lume (vedi Figura 13.13e). Mentre la catena si allunga, questa è inserita nella membrana dell'RE alternando sequenze segnale di ancoraggio di tipo II e sequenze di arresto del segnale, proprio come descritto per le proteine di tipo IV-A.

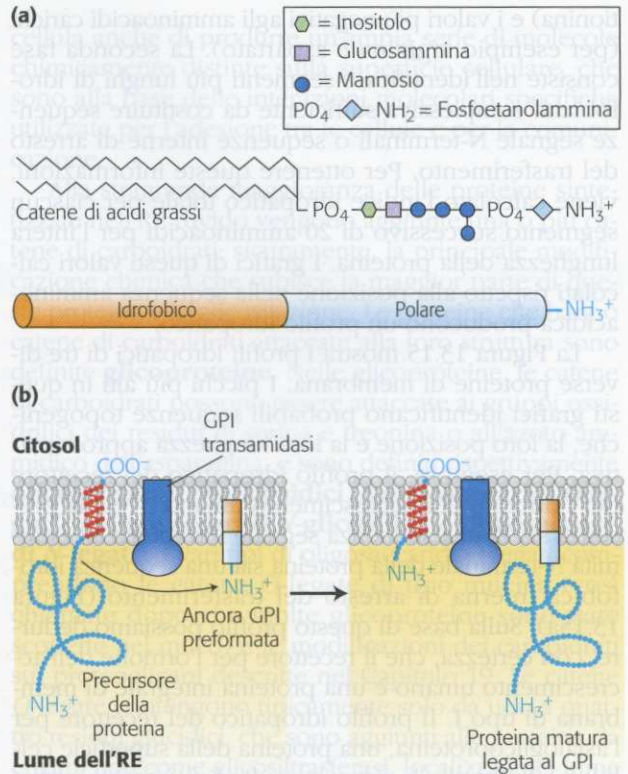
**Alcune proteine della superficie cellulare sono legate alla membrana da un'ancora fosfolipidica**

Alcune proteine della superficie cellulare non sono ancorate al doppio strato fosfolipidico da una sequenza di amminoacidi idrofobici, ma da una molecola anfipatica legata covalentemente, il *glicosilfosfatidilinositolo* (GPI) (Figura 13.14a e Capitolo 10). Queste proteine sono sintetizzate e ancorate inizialmente alla membrana dell'RE esattamente come le proteine transmembrana di tipo I, con una sequenza segnale rimovibile all'estremità N-terminale e una sequenza interna di arresto del trasferimento e di ancoraggio che dirige il processo (vedi Figura 13.11). Tuttavia, una corta sequenza di amminoacidi nel dominio luminale, adiacente al dominio transmembrana, è riconosciuta da una transamidasi localizzata all'interno della membrana dell'RE. Questo enzima rimuove simultaneamente la sequenza originale di arresto del trasferimento e di ancoraggio e trasferisce la porzione luminale della proteina su un'ancora preesistente di GPI nella membrana (Figura 13.14b).

Perché cambiare un tipo di ancoraggio alla membrana con un altro? L'attacco dell'ancora GPI, che provoca la rimozione del dominio idrofilico rivolto verso il citosol dalla proteina, può avere diverse conseguenze. Le proteine con ancore GPI, per esempio, possono diffondere piuttosto velocemente nel piano del doppio strato fosfolipidico della membrana, mentre molte proteine ancorate attraverso  $\alpha$ -eliche transmembrana non si possono spostare lateralmente nella membrana perché i loro segmenti sporgenti nel citosol interagiscono con il citoscheletro. Inoltre, in certe cellule epiteliali polarizzate, l'ancora di GPI indirizza la proteina legata verso il dominio apicale della membrana plasmatica, come vedremo nel Capitolo 14.

**La topologia di una proteina di membrana può essere spesso dedotta dalla sua sequenza**

Come abbiamo visto, varie sequenze topogeniche nelle proteine integrali di membrana sintetizzate nell'RE governano l'interazione del polipeptide nascente con il traslocone. Quando gli scienziati cominciano a studiare una proteina dalla funzione sconosciuta, l'identificazione di potenziali sequenze topogeniche all'interno della sequenza genica corrispondente può fornire importanti indizi sulla classe topologica e sulla funzione della proteina. Supponiamo per esempio, che il gene di una nota proteina, richiesta per una via di segnalazione tra cellula e cellula, contenga sequenze nucleotidiche che codificano una evidente sequenza segnale N-terminale e una sequenza idrofobica interna. Queste informazioni suggeriscono che la proteina è una proteina integrale di membrana di tipo I e



**▲ Figura 13.14**  
**Proteine ancorate tramite GPI.** (a) Struttura di un'ancora glicosilfosfatidilinositolo (GPI) di lievito. La porzione idrofobica della molecola è composta di catene di acidi grassi, mentre la porzione polare (idrofila) è costituita da residui di carboidrati e gruppi fosfato. In altri organismi, sia la lunghezza delle catene aciliche che la componente dei carboidrati possono in qualche modo variare rispetto alla struttura mostrata. (b) Formazione delle proteine ancorate tramite GPI alla membrana dell'RE. La proteina è sintetizzata e inizialmente inserita nella membrana dell'RE, come mostrato nella Figura 13.11. Una specifica transamidasi taglia il precursore della proteina all'interno del dominio che si affaccia verso la superficie esoplasmatica, in prossimità della sequenza di arresto del trasferimento e ancoraggio (in rosso), e contemporaneamente trasferisce il gruppo carbossilico della nuova estremità C-terminale al gruppo amminico terminale di un'ancora GPI preformata. [Vedi C. Abeijon e C.B. Hirschberg, 1992, *Trends Biochem. Sci.* **17**:32, e K. Kodukula et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4982.]

quindi potrebbe essere un recettore della superficie cellulare per un ligando extracellulare.

Per identificare le sequenze topogeniche è necessario esaminare le banche dati di sequenze per trovare segmenti che sono sufficientemente idrofobici da poter essere o una sequenza segnale o una sequenza di ancoraggio transmembrana. Spesso le sequenze topogeniche possono essere identificate con l'aiuto di programmi per computer che generano un *profilo idropatico* per la proteina di interesse. La prima fase consiste nell'assegnare un valore, noto come *indice idropatico*, a ogni amminoacido della proteina. Per convenzione, agli amminoacidi idrofobici sono assegnati valori positivi e agli amminoacidi idrofilici valori negativi. Sebbene esistano diverse scale di indice idropatico, tutte assegnano i valori più positivi agli amminoacidi con catene laterali costituite in prevalenza da residui idrocarburici (per esempio fenilalanina e me-



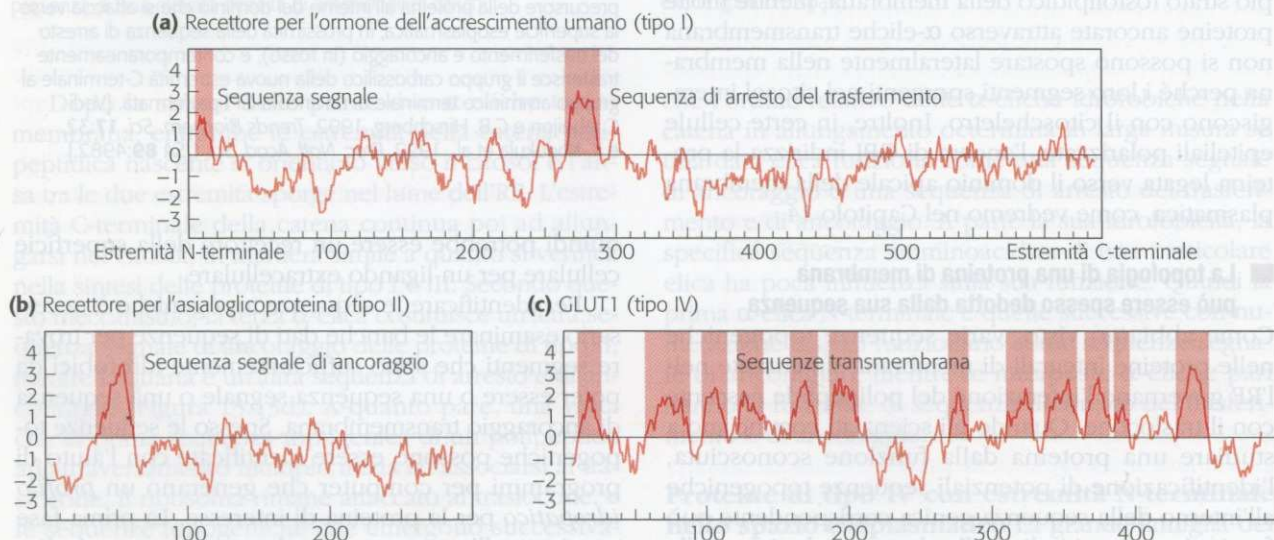
tionina) e i valori più negativi agli amminoacidi carichi (per esempio arginina e aspartato). La seconda fase consiste nell'identificare segmenti più lunghi di idrofobicità complessiva sufficiente da costituire sequenze segnale N-terminali o sequenze interne di arresto del trasferimento. Per ottenere queste informazioni, viene calcolato l'indice idropatico totale per ciascun segmento successivo di 20 amminoacidi per l'intera lunghezza della proteina. I grafici di questi valori calcolati rispetto alla posizione nella sequenza amminoacidica producono un profilo idropatico.

La Figura 13.15 mostra i profili idropatici di tre diverse proteine di membrana. I picchi più alti in questi grafici identificano probabili sequenze topogeniche, la loro posizione e la loro lunghezza approssimativa. Per esempio, il profilo idropatico del recettore per l'ormone dell'accrescimento umano rivela la presenza sia di una sequenza segnale idrofobica all'estremità N-terminale della proteina sia una sequenza idrofobica interna di arresto del trasferimento (Figura 13.15a). Sulla base di questo profilo possiamo dedurre, con certezza, che il recettore per l'ormone dell'accrescimento umano è una proteina integrale di membrana di tipo I. Il profilo idropatico del recettore per l'asialoglicoproteina, una proteina della superficie cellulare che media la rimozione di glicoproteine extracellulari anomale, rivela la presenza di una rilevante sequenza segnale di ancoraggio idrofobica interna, ma non evidenzia alcuna sequenza segnale idrofobica N-terminale (Figura 13.15b). Quindi possiamo presumere che il recettore per l'asialoglicoproteina sia una proteina di membrana di tipo II o III. La distribuzione dei residui carichi su entrambi i lati della sequenza segnale di ancoraggio spesso può consentire di distinguere tra queste possibilità, dal momento che gli am-

minoacidi carichi positivamente che fiancheggiano un segmento transmembrana di solito sono orientati verso il lato citosolico della membrana. Per esempio, nel caso del recettore per l'asialoglicoproteina, l'analisi dei residui che fiancheggiano la sequenza segnale di ancoraggio rivela che i residui sul lato N-terminale presentano una carica netta positiva, un indizio che consente di prevedere correttamente che si tratta di una proteina di tipo II.

Il profilo idropatico del trasportatore del glucosio GLUT1, una proteina di membrana ad attraversamento multiplo, mostra la presenza di molti segmenti che sono sufficientemente idrofobici da essere eliche transmembrana (Figura 13.15c). La complessità di questo profilo illustra la difficoltà sia nell'identificazione precisa di tutti i segmenti transmembrana di una proteina ad attraversamento multiplo sia nella previsione della tipologia delle singole sequenze segnale di ancoraggio e di arresto del trasferimento. Sono stati sviluppati algoritmi più sofisticati, che tengono conto della presenza di amminoacidi carichi positivamente adiacenti ai segmenti idrofobici come pure della lunghezza degli spazi tra i segmenti. Usando tutte queste informazioni, i migliori algoritmi possono prevedere la complessa topologia di proteine ad attraversamento multiplo con una precisione maggiore del 75%.

Infine, l'omologia di sequenza di una proteina conosciuta può permettere di prevedere con una certa precisione la topologia di una proteina ad attraversamento multiplo appena scoperta. Per esempio, i geni degli organismi pluricellulari codificano un numero molto elevato di proteine ad attraversamento multiplo con sette  $\alpha$ -eliche transmembrana. La somiglianza tra le sequenze di queste proteine suggerisce fortemente che tutte abbiano la stessa topologia dei



### ▲ Figura 13.15

**Profili idropatici.** I profili idropatici possono indicare la presenza di probabili sequenze topogeniche nelle proteine integrali della membrana. Essi sono originati dai diagrammi di idrofobicità totale ricavati da ogni segmento di 20 amminoacidi adiacenti per tutta la lunghezza della proteina. I valori positivi indicano porzioni relativamente idrofobiche della proteina e i valori negativi le porzioni

relativamente polari. Nei diagrammi sono marcate le probabili sequenze topogeniche. I complessi profili ottenuti dalle proteine ad attraversamento multiplo (di tipo IV), come GLUT1 nella parte (c), devono spesso essere integrati con altri dati per determinare la topologia di queste proteine.



ben noti recettori accoppiati alle proteine G, che hanno l'estremità N-terminale orientata verso il lato esoplasmatico della membrana e l'estremità C-terminale orientata verso il lato citosolico della membrana.

### ■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 13.2

#### Inserimento delle proteine nella membrana dell'RE

- ▶ Le proteine integrali di membrana sintetizzate sull'RE ruvido comprendono quattro classi topologiche e un tipo legato ai lipidi (vedi Figura 13.10).
- ▶ Le sequenze topogeniche – sequenze segnale N-terminali, sequenze interne di arresto del trasferimento e ancoraggio, sequenze interne del segnale di ancoraggio – guidano l'inserimento e l'orientamento delle proteine nascenti all'interno della membrana dell'RE. Questo orientamento è conservato durante il trasporto della proteina di membrana che ha completato la sua traduzione verso la sua destinazione finale.
- ▶ Le proteine di membrana a singolo attraversamento contengono una o due sequenze topogeniche. Nelle proteine di membrana ad attraversamento multiplo, ogni segmento ad  $\alpha$ -elica può funzionare come una sequenza topogenica interna, in relazione alla sua localizzazione nella catena polipeptidica e alla presenza di residui adiacenti carichi positivamente (vedi Figura 13.13).
- ▶ Alcune proteine della superficie cellulare sono inizialmente sintetizzate come proteine di tipo I sull'RE, e poi subiscono un taglio proteolitico e il loro dominio luminale è trasferito a un'ancora GPI (vedi Figura 13.14).
- ▶ La topologia delle proteine di membrana spesso può essere prevista con esattezza attraverso programmi al computer che identificano i segmenti topogenici idrofobici all'interno della sequenza aminoacidica e generano profili idropatici (vedi Figura 13.15).

### 13.3 Modificazioni, ripiegamento e controllo di qualità delle proteine nell'RE

Le proteine di membrana e le proteine secretorie solubili sintetizzate sull'RE subiscono quattro tipi di modificazioni principali prima di raggiungere la loro destinazione finale: (1) aggiunta covalente ed elaborazione di carboidrati (*glicosilazione*) nell'RE e nel Golgi, (2) formazione di legami disolfuro nell'RE, (3) appropriato ripiegamento delle catene polipeptidiche e assemblaggio delle proteine multimeriche nell'RE, e (4) tagli proteolitici specifici nell'RE, nel Golgi e nelle vescicole secretorie. In genere queste modificazioni promuovono il ripiegamento delle proteine secretorie nelle loro strutture native e aumentano la stabilità strutturale delle proteine esposte all'ambiente extracellulare. Modificazioni come la glicosilazione consentono alla

cellula anche di produrre un'ampia serie di molecole chimicamente distinte sulla superficie cellulare, che sono alla base delle interazioni molecolari specifiche utilizzate per l'adesione tra le cellule e per la comunicazione.

Alla stragrande maggioranza delle proteine sintetizzate nell'RE ruvido vengono aggiunte una o più catene di carboidrati; sicuramente, la principale modificazione chimica che subisce la maggior parte di queste proteine è la glicosilazione. Le proteine che hanno catene di carboidrati attaccate alla loro struttura sono definite **glicoproteine**. Nelle glicoproteine, le catene di carboidrati possono essere attaccate ai gruppi ossidrilici dei residui di serina e treonina o all'azoto amidico dell'asparagina, e sono definiti rispettivamente **oligosaccaridi O-glicosidici** (o **oligosaccaridi O-legati**) e **oligosaccaridi N-glicosilici** (o **oligosaccaridi N-legati**). I vari tipi di oligosaccaridi O-legati comprendono le catene O-legate di tipo mucina (così chiamate dopo che molte glicoproteine sono state scoperte nel muco) e le modificazioni dei carboidrati sui proteoglicani descritte nel Capitolo 19. Le catene O-legate contengono tipicamente solo da uno a quattro residui glucidici, che sono aggiunti alle proteine da enzimi noti come glicosiltrasferasi, localizzati nel lume dell'apparato di Golgi. Gli oligosaccaridi N-legati più comuni sono più grandi e più complessi, e quelli delle cellule di mammifero contengono diverse ramificazioni. In questa sezione ci occuperemo degli oligosaccaridi N-legati, la cui sintesi inizia nell'RE. Dopo l'iniziale N-glicosilazione di una proteina nell'RE, la catena oligosaccaridica viene modificata nell'RE e di solito anche nell'apparato di Golgi.

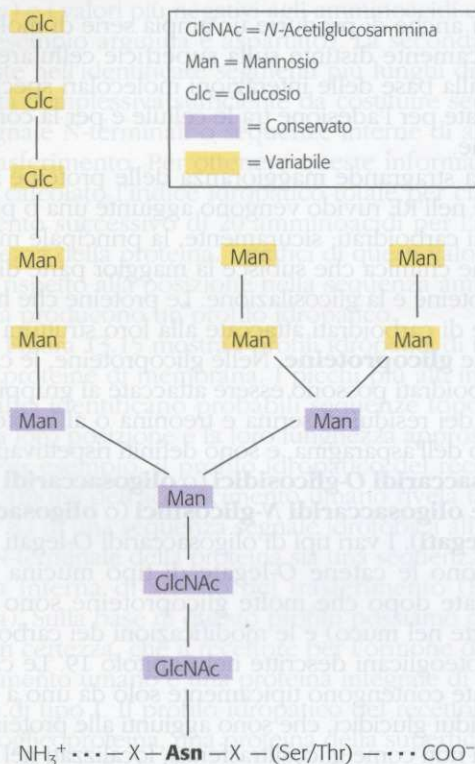
In questa sezione verrà considerata anche la formazione dei legami disolfuro, il ripiegamento delle proteine e l'assemblaggio di proteine multimeriche, processi che si realizzano esclusivamente nell'RE. Solo le proteine ripiegate ed assemblate correttamente saranno trasportate dall'RE all'apparato di Golgi e infine alla superficie cellulare o ad altra destinazione finale. Le proteine non ripiegate, mal ripiegate o ripiegate e assemblate solo in parte saranno specificamente trattate nell'RE ruvido. Considereremo diverse caratteristiche di questo "controllo di qualità" nell'ultima parte di questa sezione.

Come discusso in precedenza, le sequenze segnale N-terminali dell'RE sono rimosse dalle proteine secretorie e dalle proteine di membrana di tipo I nell'RE. Alcuni tipi di proteine subiscono altri specifici tagli proteolitici nell'apparato di Golgi o nelle vescicole secretorie. Ci occuperemo di questi tagli, oltre alle modificazioni dei carboidrati che si verificano principalmente o esclusivamente nell'apparato di Golgi, nel prossimo capitolo.

#### ■ Un oligosaccaride preformato N-legato viene aggiunto a molte proteine nell'RE ruvido

La biosintesi di tutti gli oligosaccaridi N-legati inizia nell'RE ruvido con l'aggiunta di un precursore oligosaccaridico preformato costituito da 14 residui (Figura 13.16). La struttura di questo precursore, che è la stessa nelle piante, negli animali e negli eucarioti unicellulari, è co-





### ▲ Figura 13.16

**Precursore comune degli oligosaccaridi N-legati.** Questo precursore di 14 residui degli oligosaccaridi N-legati è aggiunto alle proteine nascenti nell'RE ruvido. La successiva rimozione e in qualche caso l'aggiunta di specifici residui di carboidrati si verificano nell'RE e nell'apparato di Golgi. La regione centrale, costituita da cinque residui evidenziati in viola, è conservata in tutti gli oligosaccaridi N-legati. Il precursore può essere legato solo a residui di asparagina (Asn) che sono separati con un amminoacido (X) da un residuo di serina (Ser) o treonina (Thr) sul lato carbossilico.

stituita da un oligosaccaride ramificato contenente tre molecole di glucosio (Glc), nove di mannosio (Man) e due molecole di N-acetilglucosammina (GlcNAc), oligosaccaride chiamato  $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ . Una volta aggiunta alla proteina, questa struttura glucidica ramificata viene modificata per aggiunta o rimozione di monosaccaridi nell'RE e nei compartimenti del Golgi. Le modificazioni delle catene N-legate sono diverse da una glicoproteina all'altra e da un organismo all'altro, ma nelle strutture di tutti gli oligosaccaridi N-legati delle proteine secretorie e delle proteine di membrana è conservato un nucleo di 5 dei 14 residui.

Prima di essere trasferito ad una catena polipeptidica nascente nel lume dell'RE, il precursore oligosaccaridico è assemblato su un'ancora attaccata alla membrana chiamata *dolicolo fosfato*, un lipide poliisoprenoide con una lunga catena (Capitolo 10). Dopo che il primo zucchero (GlcNAc) si è legato al dolicolo fosfato attraverso un legame pirofosfato, gli altri zuccheri sono aggiunti attraverso legami glicosidici in una complessa serie di reazioni catalizzate da enzimi attaccati ai lati citosolico o luminale della membrana dell'RE ruvido (Figura 13.17). L'oligosaccaride dolicolo pirofosfato definitivo è orientato in modo che la porzione oligosaccaridica si affacci sul lume dell'RE.

L'intero precursore di 14 residui è trasferito dal trasportatore dolicolo a un residuo di asparagina su un polipeptide nascente, non appena questo emerge nel lume dell'RE (Figura 13.18, tappa 1). Solo i residui di asparagina nelle sequenze tripeptidiche Asn-X-Ser e Asn-X-Thr (dove X rappresenta un qualsiasi amminoacido tranne la prolina) fungono da substrati per la *oligosaccaride trasferasi*, l'enzima che catalizza questa reazione. Due delle tre subunità di questo enzima sono proteine della membrana dell'RE i cui domini che si affacciano verso il citosol si legano al ribosoma, posizionando una terza subunità della trasferasi, la subunità catalitica, in prossimità della catena polipeptidica in allungamento nel lume dell'RE. Non tutte le sequenze Asn-X-Ser/Thr vengono glicosilate, e non è possibile prevedere dalla sola sequenza aminoacidica quali potenziali siti di glicosilazione N-legati saranno modificati; per esempio, il rapido ripiegamento di un segmento di una proteina che contiene una sequenza Asn-X-Ser/Thr può impedire il trasferimento del precursore oligosaccaridico su di essa.

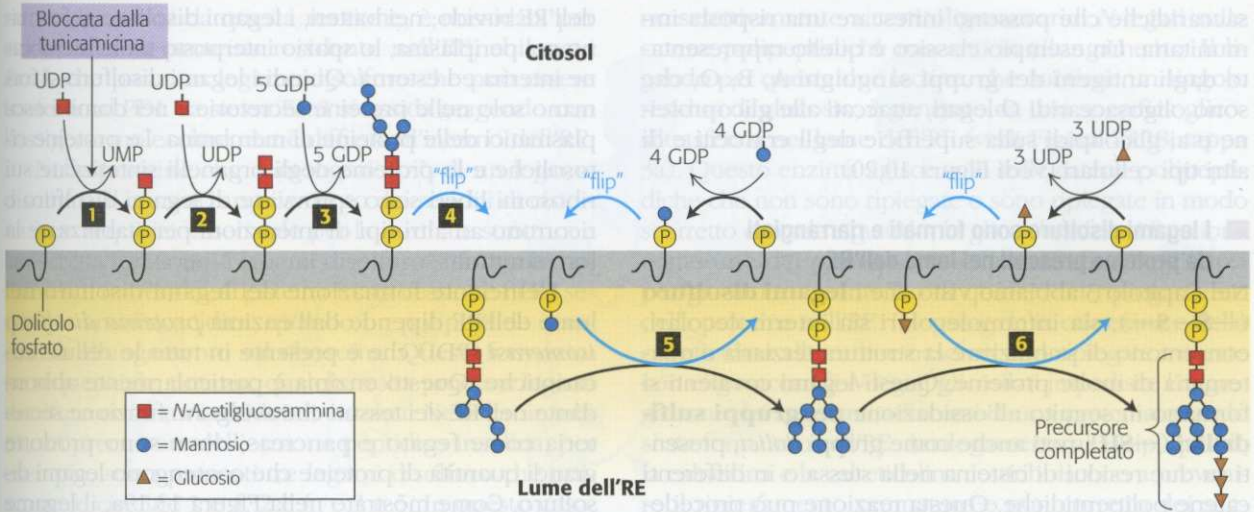
Immediatamente dopo che l'intero precursore,  $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ , è stato trasferito al polipeptide nascente, tutti e tre i residui di glucosio e un particolare residuo di mannosio sono rimossi da tre diversi enzimi chiamati glucosidasi (Figura 13.18, tappe 2 e 4). I tre residui di glucosio, gli ultimi ad essere stati aggiunti durante la sintesi del precursore sul trasportatore dolicolo, sembrano segnalare che l'oligosaccaride è completo e pronto per essere trasferito ad una proteina.

### ■ Le catene laterali degli oligosaccaridi possono favorire il ripiegamento e la stabilità delle glicoproteine

Gli oligosaccaridi attaccati alle glicoproteine svolgono diverse funzioni. Per esempio, alcune proteine si ripiegano correttamente nell'RE solo in presenza di oligosaccaridi N-legati. Questa funzione è stata dimostrata attraverso studi con l'antibiotico tunicamicina, che blocca la prima tappa di formazione del precursore oligosaccaridico legato al dolicolo e di conseguenza inibisce la sintesi di tutti gli oligosaccaridi N-legati nelle cellule (Figura 13.17). In presenza di tunicamicina, il precursore polipeptidico dell'emoagglutinina ( $\text{HA}_0$ ) viene sintetizzato, ma non può essere ripiegato adeguatamente e formare un normale trimero; in questo caso, la proteina non ripiegata in modo appropriato rimane nell'RE ruvido. Inoltre, la mutazione di un particolare residuo di asparagina nella sequenza dell'HA a un residuo di glutammina impedisce l'aggiunta di un oligosaccaride N-legato a quel sito e determina l'accumulo della proteina non ripiegata nell'RE.

Oltre a promuovere il corretto ripiegamento, gli oligosaccaridi N-legati stabilizzano molte glicoproteine secrete. Molte proteine secretorie si ripiegano in modo appropriato e vengono trasferite alla loro destinazione finale anche se l'aggiunta di oligosaccaridi N-legati è bloccata, per esempio, dalla tunicamicina. Tuttavia è stato dimostrato che queste proteine non glicosilate sono meno stabili delle loro forme glicosilate.

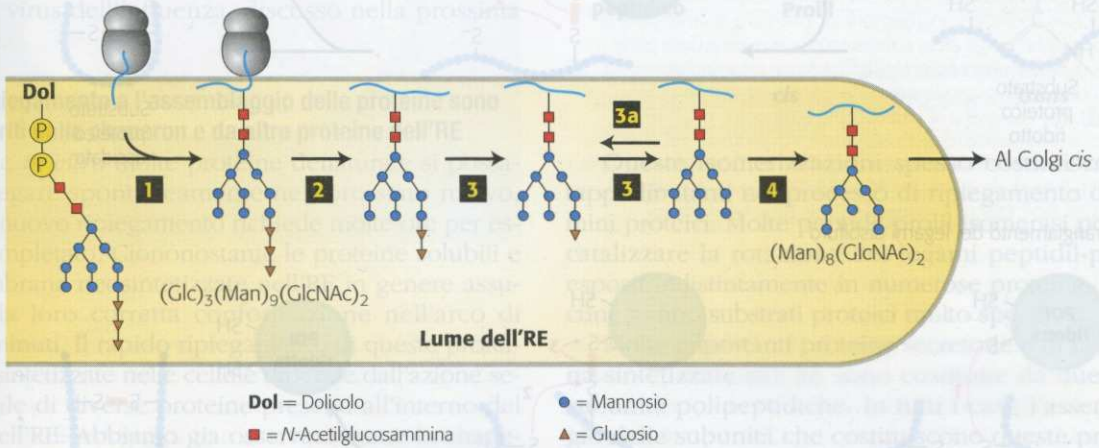




▲ **Figura 13.17**

**Biosintesi del precursore degli oligosaccaridi.** Il dolicolo fosfato è un lipide estremamente idrofobico, di 75-95 atomi di carbonio, che è immerso nella membrana dell'ER. Due molecole di N-acetilglucosammina (GlcNAc) e cinque residui di mannosio sono aggiunti uno alla volta a una molecola di dolicolo fosfato sul lato citosolico della membrana dell'ER (Tappe 1-3). I donatori nucleotide-zucchero in queste e nelle reazioni successive sono sintetizzati nel citosol. Si noti come il primo residuo glucidico sia attaccato al dolicolo tramite un legame pirofosfato ad alta energia. La tunicamicina, che blocca il primo enzima di questa via metabolica, inibisce la sintesi di tutti gli oligosaccaridi N-legati nella cellula.

Dopo che l'intermedio dolicolo pirofosforil di sette residui è passato sul lato luminale (Tappa 4), i quattro residui rimanenti di mannosio e tutti e tre i residui di glucosio sono aggiunti uno alla volta (Tappe 5 e 6). Nelle ultime reazioni, lo zucchero che deve essere aggiunto viene prima trasferito da un complesso nucleotide-zucchero ad un trasportatore dolicolo fosfato sul lato citosolico dell'ER; il trasportatore passa quindi nel lato luminale dove lo zucchero è trasferito all'oligosaccaride in corso di sintesi, dopodiché, il trasportatore "vuoto" torna indietro sul lato citosolico. [Da C. Abeijon e C.B. Hirschberg, 1992, *Trends Biochem. Sci.* 17:32.]



▲ **Figura 13.18**

**Aggiunta ed elaborazione iniziale degli oligosaccaridi N-legati.** Nell'ER ruvido delle cellule dei vertebrati, il precursore  $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$  è trasferito dal suo trasportatore dolicolo a un residuo reattivo di asparagine su una proteina nascente, non appena l'asparagina compare sul lato luminale dell'ER (tappa 1). In tre reazioni separate sono rimossi prima un residuo di glucosio

(tappa 2), poi due residui di glucosio (tappa 3) e infine un residuo di mannosio (tappa 4). Una nuova aggiunta di un residuo di glucosio (tappa 3a) svolge un ruolo nel corretto ripiegamento di molte proteine nell'ER, come vedremo più avanti. [Vedi R. Kornfeld e S. Kornfeld, 1985, *Ann. Rev. Biochem.* 43:631, e M. Sousa e A.J. Parodi, 1995, *EMBO J.* 14:4196.]

te. Per esempio la fibronectina glicosilata, un normale costituente della matrice extracellulare, è degradata molto più lentamente della fibronectina non glicosilata da parte delle proteasi tissutali.

Gli oligosaccaridi su certe glicoproteine della superficie cellulare svolgono anche una funzione nell'adesione tra cellula e cellula. Per esempio, la membrana plasmatica dei globuli bianchi del sangue (leucociti) contiene molecole di adesione cellulare (CAM)

che sono estesamente glicosilate. In queste molecole gli oligosaccaridi interagiscono con un dominio di legame dello zucchero in certe molecole CAM presenti sulle cellule endoteliali che delimitano i vasi sanguigni. Questo tipo di interazione aggancia i leucociti all'endotelio e li assiste nei loro movimenti all'interno dei tessuti durante una risposta infiammatoria ad una infezione (vedi Figura 19.36). Altre glicoproteine della superficie cellulare possiedono catene laterali oligo-



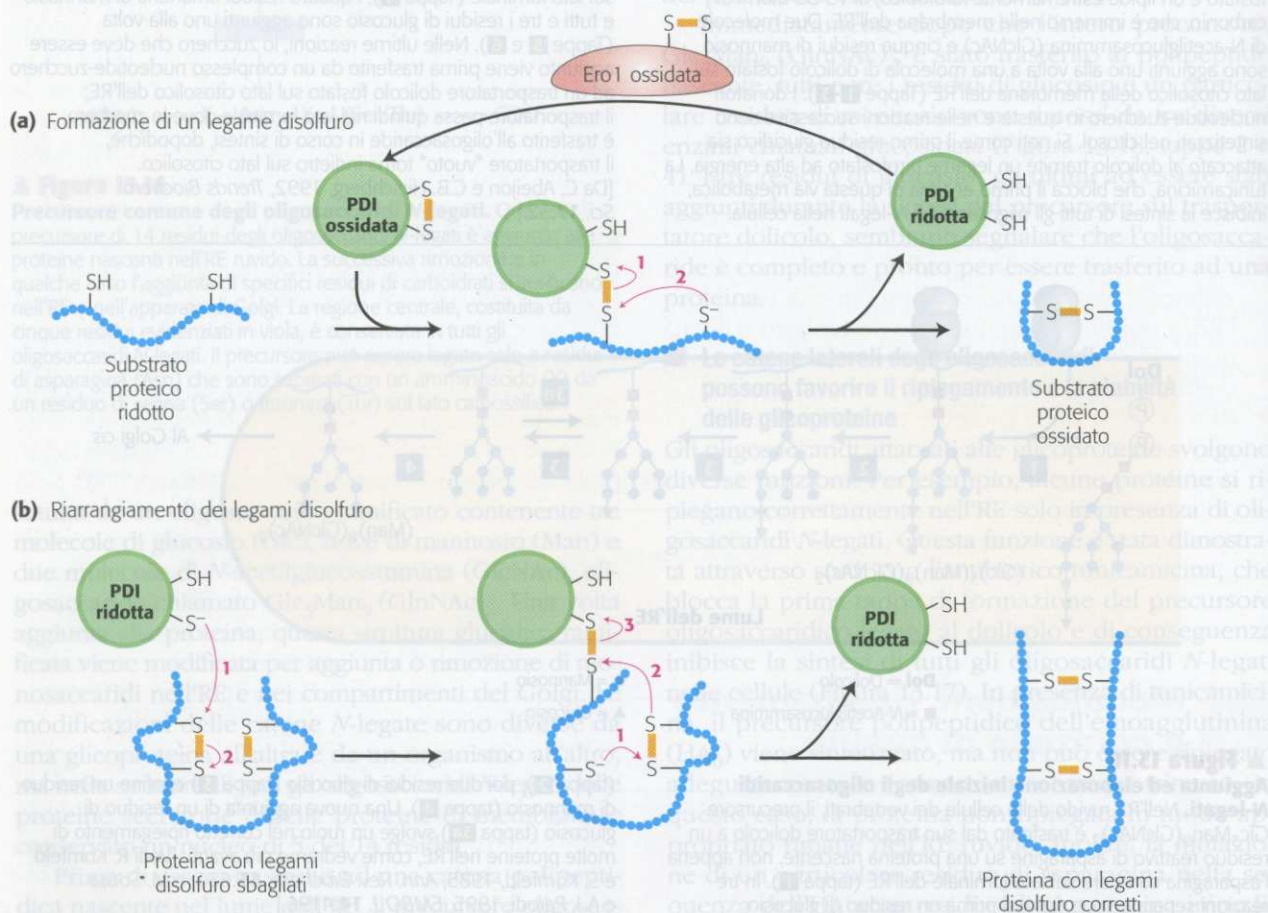
saccaridiche che possono innescare una risposta immunitaria. Un esempio classico è quello rappresentato dagli antigeni dei gruppi sanguigni A, B, O, che sono oligosaccaridi O-legati, attaccati alle glicoproteine e ai glicolipidi sulla superficie degli eritrociti e di altri tipi cellulari (vedi Figura 10.20).

### ■ I legami disolfuro sono formati e riarrangiati da proteine presenti nel lume dell'RE

Nel Capitolo 3 abbiamo visto che i **legami disolfuro** ( $-S-S-$ ), sia intramolecolari sia intermolecolari, consentono di stabilizzare la struttura terziaria e quaternaria di molte proteine. Questi legami covalenti si formano in seguito all'ossidazione dei **gruppi sulfidrilici** ( $-SH$ ), noti anche come gruppi *tiolici*, presenti su due residui di cisteina nella stessa o in differenti catene polipeptidiche. Questa reazione può procedere spontaneamente solo in presenza di una quantità sufficiente di un agente ossidante. Nelle cellule eucariotiche i legami disolfuro si formano solo nel lume

dell'RE ruvido; nei batteri, i legami disolfuro si formano nel periplasma, lo spazio interposto tra le membrane interna ed esterna. Quindi i legami disolfuro si formano solo nelle proteine secretorie e nei domini esoplasmatici delle proteine di membrana. Le proteine citosoliche e le proteine degli organelli sintetizzate sui ribosomi liberi sono sprovviste di legami disolfuro e ricorrono ad altri tipi di interazioni per stabilizzare la loro struttura.

L'efficiente formazione dei legami disolfuro nel lume dell'RE dipende dall'enzima *proteina disolfuro isomerasi* (PDI) che è presente in tutte le cellule eucariotiche. Questo enzima è particolarmente abbondante nell'RE dei tessuti che svolgono funzione secretoria come fegato e pancreas, dove sono prodotte grandi quantità di proteine che contengono legami disolfuro. Come mostrato nella Figura 13.19a, il legame disolfuro nel sito attivo della PDI può essere rapidamente trasferito a una proteina attraverso due reazioni sequenziali di trasferimento tiolo-disolfuro. La PDI



### ▲ Figura 13.19

**Azione della proteina disolfuro isomerasi (PDI).** La PDI forma e riarrangia i legami disolfuro attraverso un sito attivo con due residui di cisteina strettamente ravvicinati che sono facilmente interconvertiti dalla forma ditiole ridotta alla forma disolfuro ossidata. Le frecce rosse numerate indicano la sequenza degli elettroni trasferiti. Le barre gialle rappresentano i legami disolfuro. **(a)** Nella formazione dei legami disolfuro, la forma ionizzata di un tiolo ( $-S^-$ ) della cisteina nella proteina substrato reagisce con il legame disolfuro ( $S-S$ ) nella PDI ossidata per formare un substrato intermedio PDI-proteina tenuto assieme da un legame disolfuro. Successivamente, un secondo tiolo ionizzato nel substrato

reagisce con questo intermedio, causando la formazione di un legame disolfuro all'interno della proteina substrato e il distacco della PDI ridotta. La PDI, a sua volta, trasferisce gli elettroni a un legame disolfuro nella proteina lumenale Ero1, rigenerando quindi la sua forma ossidata. **(b)** La PDI ridotta può catalizzare il riarrangiamento di legami disolfuro formati non correttamente attraverso reazioni simili di trasferimento di tiolo-disolfuro. In questo caso, la PDI ridotta inizia il trasferimento ed è rigenerata nel mezzo di reazione. Queste reazioni si ripetono fino ad ottenere la conformazione più stabile della proteina. [Vedi M.M. Lyles e H.F. Gilbert, 1991, *Biochemistry* 30:619.]



ridotta, generata da questa reazione, è riossidata per azione di una proteina residente nell'RE, chiamata *Ero1*, che porta un legame disolfuro che può essere trasferito al PDI. La stessa *Ero1* si ossida reagendo con l'ossigeno molecolare che è diffuso all'interno dell'RE.

Nelle proteine che contengono più di un legame disolfuro, il corretto appaiamento dei residui di cisteina è un requisito essenziale per la normale struttura e la corretta funzione. I legami disolfuro si formano solitamente tra residui di cisteina in successione nella sequenza amminoacidica, quando un polipeptide è ancora in allungamento sul ribosoma. Questa formazione sequenziale, tuttavia, qualche volta produce legami disolfuro errati tra i residui di cisteina. Nella proinsulina, un precursore dell'ormone peptidico insulina, per esempio, sono presenti tre legami disolfuro che uniscono le cisteine 1 e 4, 2 e 6, e 3 e 5. In questo caso, un legame disolfuro che si era formato inizialmente in modo sequenziale (per esempio tra le cisteine 1 e 2) può dover subire un riarrangiamento per consentire che la proteina assuma la sua corretta conformazione ripiegata. Nelle cellule, il riarrangiamento dei legami disolfuro è accelerato anche dalla PDI, che agisce su una ampia gamma di substrati proteici, permettendo loro di acquisire la conformazione termodinamicamente più stabile (Figura 13.19b). I legami disolfuro in genere si formano secondo uno specifico ordine, stabilizzando prima i piccoli domini di un polipeptide e poi le interazioni di segmenti più distanti; questo fenomeno è illustrato dal ripiegamento della proteina HA del virus dell'influenza, discusso nella prossima sezione.

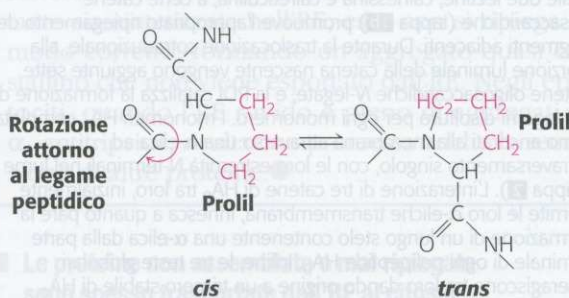
### Il ripiegamento e l'assemblaggio delle proteine sono favoriti dalle chaperon e da altre proteine dell'RE

Sebbene *in vitro* molte proteine denaturate si possano ripiegare spontaneamente nel loro stato nativo, questo nuovo ripiegamento richiede molte ore per essere completato. Ciononostante le proteine solubili e di membrana neosintetizzate nell'RE in genere assumono la loro corretta conformazione nell'arco di pochi minuti. Il rapido ripiegamento di queste proteine neosintetizzate nelle cellule dipende dall'azione sequenziale di diverse proteine presenti all'interno del lume dell'RE. Abbiamo già osservato come la chaperon molecolare Bip può guidare la traslocazione post-traduzionale nelle cellule di lievito legandosi a polipeptidi completamente sintetizzati appena entrano nell'RE (vedi Figura 13.9). La Bip si può anche legare transitoriamente alle catene nascenti appena entrano nell'RE durante la traslocazione cotraduzionale. Si ritiene che la Bip legata impedisca il ripiegamento scorretto dei segmenti di una catena nascente o la formazione di aggregati, promuovendo quindi il ripiegamento dell'intero polipeptide nella conformazione opportuna. Anche la proteina disolfuro isomerasi (PDI) contribuisce al corretto ripiegamento, perché in molte proteine la conformazione tridimensionale corretta è stabilizzata dai legami disolfuro.

Come illustrato nella Figura 13.20, altre due proteine dell'RE, gli omologhi delle **lectine** (proteine che legano i carboidrati) *calnexina* e *calreticulina*, si lega-

no selettivamente a certi oligosaccaridi *N*-legati sulle catene polipeptidiche nascenti in allungamento. Il ligando per queste due lectine, che contiene un singolo residuo di glucosio, è generato da una specifica glicosiltrasferasi nel lume dell'RE (vedi Figura 13.18, tappa 3a). Questo enzima agisce solo sulle catene polipeptidiche che non sono ripiegate o sono ripiegate in modo scorretto e, a tale riguardo, la glicosiltrasferasi funziona come uno dei principali meccanismi di sorveglianza per garantire il controllo di qualità del ripiegamento della proteina nell'RE. Il legame della calnexina e della calreticulina alle catene nascenti non ripiegate marcate con oligosaccaridi *N*-legati glicosilati impedisce l'aggregazione dei segmenti adiacenti di una proteina quando si sta formando sull'RE. Analogamente alla Bip, quindi, la calnexina e la calreticulina contribuiscono a prevenire il ripiegamento prematuro e non corretto dei segmenti di una proteina neoformata.

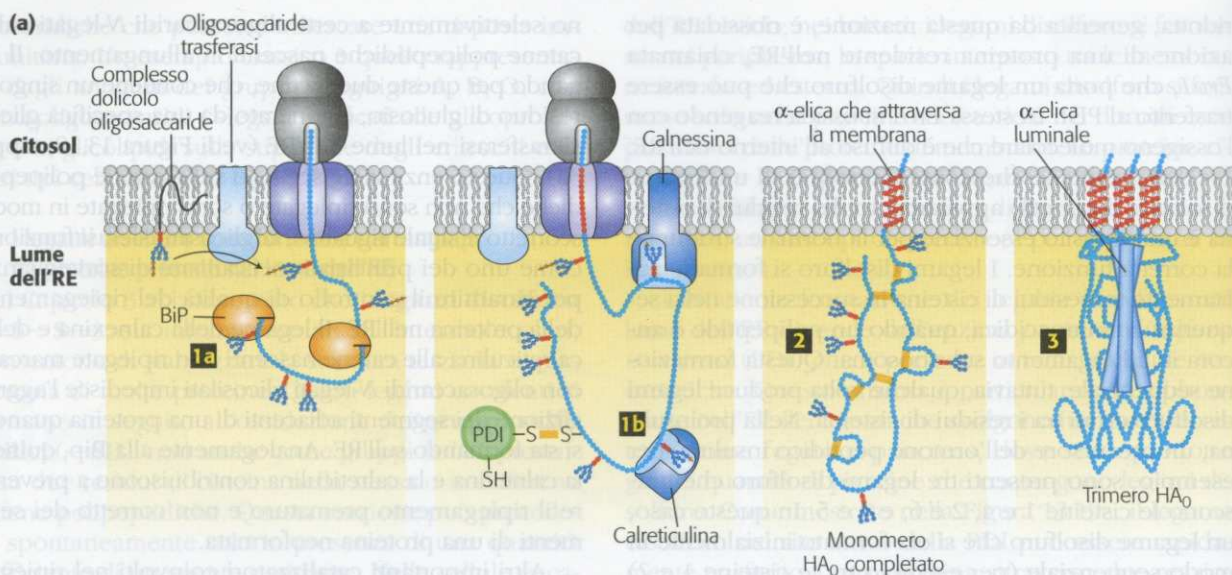
Altri importanti catalizzatori coinvolti nel ripiegamento delle proteine nel lume dell'RE sono le *peptidil-prolil isomerasi*, una famiglia di enzimi che accelera la rotazione attorno ai legami peptidil-prolina nei segmenti non ripiegati di un polipeptide:



Queste isomerizzazioni spesso costituiscono le tappe limitanti nel processo di ripiegamento dei domini proteici. Molte peptidil-prolil isomerasi possono catalizzare la rotazione dei legami peptidil-prolina esposti indistintamente in numerose proteine, ma alcune hanno substrati proteici molto specifici.

Molte importanti proteine secretorie e di membrana sintetizzate sull'RE sono costituite da due o più subunità polipeptidiche. In tutti i casi, l'assemblaggio delle subunità che costituiscono queste proteine **multimeriche** avviene nell'RE. Una importante classe di proteine multimeriche secrete è quella delle immunoglobuline, che contengono due catene pesanti (H) e due catene leggere (L), tutte legate da legami disolfuro intracatena. L'emoagglutinina (HA) è un'altra proteina multimerica che fornisce un valido esempio di ripiegamento e assemblaggio di subunità (Figura 13.20). Questa proteina trimerica forma le spine che emergono dalla superficie di una particella del virus dell'influenza. Il trimero HA si forma all'interno dell'RE di una cellula ospite infettata, a partire da tre copie di un precursore proteico definito  $HA_0$ , costituito da una singola  $\alpha$ -elica transmembrana. Nell'apparato di Golgi, ciascuna delle tre proteine  $HA_0$  subisce un taglio proteolitico e forma due polipeptidi,  $HA_1$  e  $HA_2$ ; quindi, ogni molecola di HA che alla fine risiede sulla superficie virale contiene tre copie di  $HA_1$  e



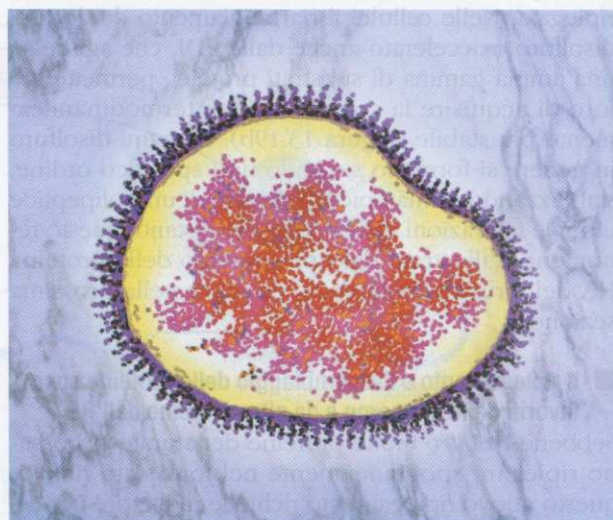


### ▲ Figura 13.20

#### Ripiegamento e assemblaggio dell'emoagglutina.

(a) Meccanismo di assemblaggio del trimero ( $HA_0$ ). Il legame transitorio della chaperon BiP (tappa 1a) alla catena nascente, e delle due lectine, calnessina e calreticulina, a certe catene oligosaccaridiche (tappa 1b) promuove l'appropriato ripiegamento dei segmenti adiacenti. Durante la traslocazione cotraduzionale, alla porzione luminale della catena nascente vengono aggiunte sette catene oligosaccaridiche *N*-legate, e la PDI catalizza la formazione di sei legami disolfuro per ogni monomero. I monomeri  $HA_0$  completati sono ancorati alla membrana attraverso una  $\alpha$ -elica ad attraversamento singolo, con le loro estremità N-terminali nel lume (tappa 2). L'interazione di tre catene di  $HA_0$  tra loro, inizialmente tramite le loro  $\alpha$ -eliche transmembrana, innesca a quanto pare la formazione di un lungo stelo contenente una  $\alpha$ -elica dalla parte luminale di ogni polipeptide  $HA_0$ . Infine, le tre teste globulari interagiscono tra loro dando origine a un trimero stabile di  $HA_0$  (tappa 3). (b) Fotografia al microscopio elettronico di un virus completo dell'influenza, che mostra trimeri di proteine HA che sporgono come spine dalla superficie della membrana virale. [Parte (a) vedi U. Tatu et al., 1995, *EMBO J.* **14**:1340, e D. Hebert et al., 1997, *J. Cell Biol.* **139**:613. Parte (b) Chris Bjornberg/Photo Researchers, inc.]

(b)



tre copie di  $HA_2$  (vedi Figura 3.10). Il trimero è stabilizzato da interazioni tra i grandi domini esoplasmatici dei polipeptidi i quali lo costituiscono che si estendono nel lume dell'RE; dopo che l'HA è stata trasportata sulla superficie cellulare, questi domini si estendono nello spazio extracellulare. Anche le interazioni tra la porzione citosolica più piccola e le porzioni transmembrana delle subunità dell'HA contribuiscono a stabilizzare la proteina trimerica. È stato dimostrato sperimentalmente che per il ripiegamento e l'assemblaggio dei polipeptidi  $HA_0$  nella loro conformazione trimerica appropriata, occorrono appena 10 minuti.

### ■ Le proteine non correttamente ripiegate nell'RE inducono l'espressione di catalizzatori del ripiegamento proteico

Le proteine normali che sono sintetizzate nell'RE ruvido non possono uscire da questo compartimento fin quando non hanno assunto una conformazione interamente ripiegata. Allo stesso modo, quasi tutte le mutazioni che impediscono il ripiegamento appropriato

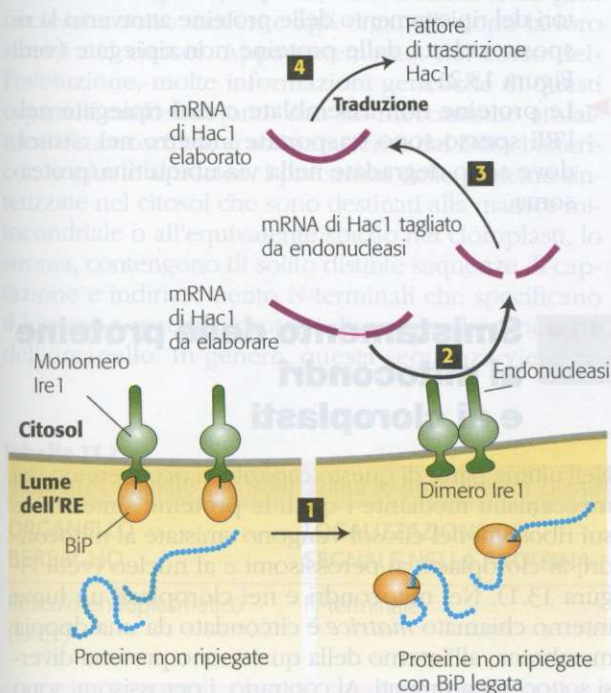
di una proteina nell'RE bloccano anche il trasferimento del polipeptide dal lume o dalla membrana dell'RE all'apparato di Golgi. I meccanismi per trattenere le proteine non ripiegate o mal ripiegate all'interno dell'RE aumentano probabilmente l'efficienza complessiva del ripiegamento, trattenendo le forme intermedie in prossimità di catalizzatori del ripiegamento, che sono presenti in abbondanza nell'RE. È stato osservato che le proteine non correttamente ripiegate trattenute all'interno dell'RE si legano in genere alle chaperon BiP e calnessina in questo organello. Pertanto questi catalizzatori luminali del ripiegamento proteico svolgono due funzioni correlate: promuovono il ripiegamento delle proteine normali impedendo la loro aggregazione e legano irreversibilmente le proteine mal ripiegate.

Le cellule di mammifero e di lievito reagiscono alla presenza di proteine non ripiegate nell'RE ruvido aumentando la trascrizione di diversi geni che codificano nell'RE le proteine chaperon e altri catalizzatori del processo di ripiegamento. Un elemento chiave in que-



sta risposta indotta dalle proteine non ripiegate è l'Ire1, una proteina della membrana dell'RE che esiste sia come monomero sia come dimero. La forma dimerica, ma non la monomeric, promuove la formazione di Hac1, un fattore di trascrizione del lievito che attiva l'espressione dei geni indotti nella risposta alle proteine non ripiegate. Come descritto nella Figura 13.21, il legame della BiP al dominio luminale della forma monomeric di Ire1 impedisce la formazione della forma dimerica di Ire1. Pertanto la quantità di BiP libera nel lume dell'RE determina probabilmente la quantità relativa di monomero e dimero Ire1. L'accumulo di proteine non ripiegate all'interno del lume dell'RE sequestra le molecole di BiP, rendendole non disponibili per legarsi all'Ire1. In conseguenza di ciò il livello della forma dimerica di Ire1 aumenta determinando un aumento dei livelli di Hac1 e la produzione di proteine che promuovono il ripiegamento proteico.

Le cellule di mammifero possiedono una ulteriore via di regolazione che funziona in risposta alla presenza di proteine non ripiegate nell'RE. In questa via,



**▲ Figura 13.21**

**La risposta alle proteine non ripiegate.** Ire1, una proteina transmembrana della membrana dell'RE, ha un sito di legame per la BiP sul suo dominio luminale, mentre il dominio citosolico contiene una specifica RNA endonucleasi. Tappa **1**: le proteine non ripiegate accumulate nel lume dell'RE si legano alle molecole di BiP, liberandole dai monomeri di Ire1. La dimerizzazione di Ire1 attiva poi in qualche modo l'endonucleasi. Tappe **2** e **3**: il precursore immaturo dell'mRNA che codifica il fattore di trascrizione Hac1 è tagliato dalla forma dimerica di Ire1, e i due esoni si uniscono per formare l'mRNA funzionale dell'Hac1. Risultati recenti indicano che questa maturazione si verifica nel citosol, sebbene la maturazione del pre-mRNA avvenga in genere nel nucleo. Tappa **4**: Hac1 è tradotta nella proteina Hac1, che poi si sposta nel nucleo e attiva la trascrizione di geni che codificano diversi catalizzatori del ripiegamento delle proteine. [Vedi U. Ruedgegger et al., 2001, *Cell* **107**:103; A. Bertolotti et al., 2000. *Nature Cell Biol.* **2**:326; e C. Sidrauski e P. Walter, 1997, *Cell* **90**:1031.]

l'accumulo nell'RE di proteine non ripiegate innesca la proteolisi di ATF6, una proteina transmembrana nella membrana dell'RE, in un sito all'interno del segmento transmembrana. Il dominio citosolico dell'ATF6 liberato per proteolisi si sposta poi verso il nucleo, dove stimola la trascrizione dei geni che codificano le chaperon dell'RE. L'attivazione di un fattore di trascrizione da parte di questa *proteolisi intramembrana regolata* avviene anche nella via di segnalazione di Notch e durante l'attivazione del fattore di trascrizione della risposta al colesterolo SREBP (vedi Figure 16.36 e 16.38).

Una forma ereditaria di enfisema illustra gli effetti dannosi che possono derivare dal ripiegamento non corretto delle proteine nell'RE. Questa malattia è causata da una mutazione puntiforme in un  $\alpha_1$ -antitripsina, che normalmente è secreta dagli epatociti e dai macrofagi. La proteina normale si lega alla tripsina, e anche alla proteasi ematica elastasi, inibendole. In assenza di  $\alpha_1$ -antitripsina, l'elastasi degrada il fine tessuto polmonare che partecipa all'assorbimento dell'ossigeno, causando in definitiva i sintomi dell'enfisema. Sebbene l' $\alpha_1$ -antitripsina mutante sia sintetizzata nell'RE, essa non si ripiega in modo corretto, formando un aggregato quasi cristallino che non viene esportato dall'RE. Negli epatociti, quando l'RE ruvido è pieno di aggregati di  $\alpha_1$ -antitripsina, risulta compromessa anche la secrezione di altre proteine. ●

### ■ Le proteine non assemblate o mal ripiegate sono spesso trasportate dall'RE al citosol per essere degradate

Le proteine secretorie e di membrana mal ripiegate, oltre alle subunità non assemblate delle proteine multimeriche, sono spesso degradate nell'arco di una o due ore dalla loro sintesi nell'RE ruvido. Per molti anni i ricercatori hanno pensato che gli enzimi proteolitici all'interno del lume dell'RE catalizzassero la degradazione delle proteine mal ripiegate o dei polipeptidi non assemblati, ma queste proteasi non sono state mai scoperte. Studi più recenti hanno dimostrato che le proteine secretorie e di membrana mal ripiegate sono riconosciute da specifiche proteine presenti nella membrana dell'RE e sono marcate per il trasporto dal lume dell'RE al citosol, attraverso un processo noto come *dislocazione* o *traslocazione retrograda*.

La dislocazione delle proteine mal ripiegate fuori dall'RE dipende da una serie di proteine localizzate nella membrana dell'RE e nel citosol che svolgono tre funzioni fondamentali. La prima funzione è il riconoscimento delle proteine mal ripiegate che saranno i substrati della reazione di dislocazione. Il riconoscimento avviene nel lume dell'RE e in alcuni casi può coinvolgere il legame della BiP alla proteina non ripiegata. Tuttavia, i dettagli sui meccanismi di riconoscimento delle proteine mal ripiegate non sono completamente conosciuti. In particolare non si sa in che modo le proteine che non si possono ripiegare correttamente, e che quindi costituiscono substrati idonei



per il processo di dislocazione, sono distinte dalle proteine normali che passano da stati transitori di parziale ripiegamento man mano che acquisiscono la loro conformazione completamente ripiegata.

Una volta che una proteina non ripiegata è stata identificata, viene indirizzata per la dislocazione attraverso la membrana dell'RE. Si riteneva che il traslocatore Sec61 partecipasse al processo di dislocazione, ma recenti evidenze suggeriscono che in realtà i polipeptidi dislocati non attraversano "a ritroso" la membrana utilizzando il canale del complesso Sec61.

Non appena i segmenti del polipeptide dislocato sono esposti verso il citosol, essi entrano in contatto con gli enzimi citosolici che governano la traslocazione retrograda. Uno di questi enzimi è una ATPasi chiamata p97, un membro di una famiglia di proteine conosciuta come **famiglia AAA ATPasi**. Sono noti altri membri della famiglia AAA ATPasi che accoppiano l'energia liberata dall'idrolisi di ATP al disassemblaggio di complessi proteici. Per esempio, nel Capitolo 14 vedremo che un membro della famiglia delle AAA ATPasi chiamato NSF, che è una importante componente della via secretoria, utilizza l'idrolisi di ATP per disassemblare complessi proteici generati durante la gemmazione e la fusione delle vescicole (vedi Figura 14.10). Nella traslocazione retrograda, l'idrolisi di ATP da parte di p97 fornisce la forza motrice per spingere le proteine mal ripiegate dalla membrana dell'RE all'interno del citosol. Non appena le proteine mal ripiegate rientrano nel citosol specifici enzimi ubiquitina ligasi presenti nella membrana dell'RE agiscono sui residui di ubiquitina al peptide dislocato. Analogamente all'azione della p97, la reazione di ubiquitinazione è accoppiata all'idrolisi di ATP; probabilmente, anche questa liberazione di energia contribuisce ad intrappolare le proteine nel citosol. I risultanti polipeptidi poliubiquitinati, ora localizzati completamente nel citosol, sono eliminati del tutto dalla cellula attraverso la degradazione nei proteasomi (vedi Figura 3.29).

### ■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 13.3

#### Modificazioni, ripiegamento e controllo di qualità delle proteine nell'RE

- ▶ Tutti gli oligosaccaridi *N*-legati, che sono legati ai residui di asparagina, contengono un nucleo costituito da tre molecole di mannosio e due residui di *N*-acetilglucosammina, e di solito presentano diverse ramificazioni (vedi Figura 13.16). Gli oligosaccaridi *O*-glicosidici, che sono legati ai residui di serina o treonina sono generalmente corti e spesso contengono solo da uno a quattro residui glucidici.
- ▶ La formazione degli oligosaccaridi *N*-legati inizia con l'assemblaggio di un precursore conservato di 14 residui ricco di mannosio sul dolicolo, un lipide presente nella membrana dell'RE ruvido (vedi Figura 13.17). Dopo che questo oligosaccaride preformato è stato trasferito su specifici residui di asparagina delle catene polipeptidiche nascenti nel lume dell'RE, vengono rimossi tre residui di glucosio e uno di mannosio (vedi Figura 13.18).

- ▶ Le catene laterali degli oligosaccaridi possono favorire l'appropriato ripiegamento delle proteine, proteggere le proteine mature dalla proteolisi, partecipare all'adesione tra cellula e cellula e funzionare come antigeni.
- ▶ I legami disolfuro si formano in molte proteine secretorie e nel dominio esoplasmatico delle proteine di membrana nell'RE. La proteina disolfuro isomerasi (PDI), presente nel lume dell'RE, catalizza sia la formazione sia il riarrangiamento dei legami disolfuro (vedi Figura 13.19).
- ▶ La chaperon BiP, le lectine calnexina e calreticulina e le peptidil-prolil isomerasi agiscono insieme per garantire l'appropriato ripiegamento nell'RE delle proteine secretorie e di membrana neosintetizzate. Nell'RE avviene anche l'assemblaggio delle subunità delle proteine multimeriche.
- ▶ Solo le proteine correttamente ripiegate e le subunità assemblate sono trasportate in vescicole dall'RE ruvido all'apparato di Golgi.
- ▶ L'accumulo di proteine non ripiegate correttamente e le subunità non assemblate nell'RE possono indurre un aumento dell'espressione dei catalizzatori del ripiegamento delle proteine attraverso la risposta indotta dalle proteine non ripiegate (vedi Figura 13.21).
- ▶ Le proteine non assemblate o mal ripiegate nell'RE spesso sono trasportate indietro nel citosol, dove sono degradate nella via ubiquitina/proteasoma.

## 13.4 Smistamento delle proteine ai mitocondri e ai cloroplasti

Nell'ultima parte di questo capitolo ci occuperemo dei meccanismi mediante i quali le proteine sintetizzate sui ribosomi del citosol vengono smistate ai mitocondri, ai cloroplasti, ai perossisomi e al nucleo (vedi Figura 13.1). Nei mitocondri e nei cloroplasti un lume interno chiamato *matrice* è circondato da una doppia membrana, all'interno della quale sono presenti diversi sottocompartimenti. Al contrario, i perossisomi sono delimitati da una membrana singola e hanno un unico compartimento luminale nella matrice. A causa di queste ed altre differenze, i perossisomi verranno considerati separatamente nella prossima sezione. Anche il meccanismo di trasporto delle proteine dentro e fuori dal nucleo è molto diverso dallo smistamento ai mitocondri e ai cloroplasti; questo aspetto verrà discusso nell'ultima sezione.

Oltre ad essere entrambi circondati da due membrane, i mitocondri e i cloroplasti esibiscono tipi simili di proteine di trasporto elettronico e usano ATPasi della classe F per sintetizzare ATP (vedi Figura 12.2). Da notare che queste caratteristiche sono presenti anche nei batteri gram-negativi. Analogamente ai batteri, anche mitocondri e cloroplasti contengono il loro proprio DNA che codifica gli rRNA e i tRNA degli or-



ganelli, oltre ad alcune proteine (vedi Capitolo 6). Inoltre, la crescita e la divisione di mitocondri e cloroplasti non sono accoppiate alla divisione cellulare. Piuttosto, questi organelli crescono per incorporazione di proteine e lipidi cellulari, e i nuovi organelli si formano per divisione di organelli preesistenti. Le numerose somiglianze tra batteri unicellulari e mitocondri e cloroplasti hanno portato gli scienziati ad ipotizzare che questi organelli si siano originati per incorporazione di batteri nelle cellule eucariotiche ancestrali, costituendo organelli endosimbionti (vedi Figura 6.20). Le analogie di sequenza di molte proteine di traslocazione della membrana presentate da mitocondri, cloroplasti e batteri forniscono la prova più evidente a favore di questo antico legame evolutivo. In questa sezione esamineremo in dettaglio queste proteine di traslocazione della membrana.

Le proteine codificate dal DNA mitocondriale o dal DNA dei cloroplasti sono sintetizzate sui ribosomi all'interno degli organelli e distribuite al giusto sottocompartimento immediatamente dopo la loro sintesi. La maggior parte delle proteine presenti nei mitocondri e nei cloroplasti, tuttavia, sono codificate da geni nucleari e sono trasferite agli organelli dopo la loro sintesi nel citosol. Apparentemente, nel corso dell'evoluzione, molte informazioni genetiche di questi organelli endosimbionti, con un meccanismo attualmente sconosciuto, si sono trasferite dal DNA batterico ancestrale al nucleo. I precursori delle proteine sintetizzate nel citosol che sono destinati alla matrice mitocondriale o all'equivalente spazio nei cloroplasti, lo stroma, contengono di solito distinte sequenze di captazione e indirizzamento N-terminali che specificano il legame a recettori proteici disposti sulla superficie dell'organello. In genere, questa sequenza viene ri-

mossa una volta che la proteina raggiunge la matrice o lo stroma. Chiaramente, queste sequenze di captazione e indirizzamento sono simili per posizione e funzione generale alle sequenze segnale che guidano le proteine nascenti verso il lume dell'RE. Sebbene i tre tipi di segnali abbiano qualche tratto di sequenza in comune, come è riassunto nella Tabella 13.1, le loro sequenze specifiche sono notevolmente diverse.

Sia nei mitocondri sia nei cloroplasti, l'ingresso delle proteine richiede energia e si verifica in punti dove le membrane interna ed esterna dell'organello sono in stretto contatto. Poiché i mitocondri e i cloroplasti contengono più tipi di membrane e spazi delimitati da membrane, il trasferimento di molte proteine fino alla loro giusta destinazione richiede l'intervento sequenziale di due sequenze di indirizzamento e due sistemi di traslocazione di membrana: una per dirigere la proteina nell'organello e l'altra per indirizzarla nello specifico compartimento dell'organello o della membrana. Come vedremo, i meccanismi per smistare varie proteine ai mitocondri e ai cloroplasti sono correlati ad alcuni meccanismi discussi in precedenza.

#### ■ Sequenze segnale anfipatiche N-terminali indirizzano le proteine alla matrice mitocondriale

Tutte le proteine che si trasferiscono dal citosol alla stessa destinazione mitocondriale hanno segnali di indirizzamento caratterizzati da motivi comuni, sebbene le sequenze segnale non siano generalmente identiche. Quindi i recettori che riconoscono tali segnali sono capaci di legarsi a un numero di sequenze diverse ma tra loro correlate. Le sequenze più studiate per indirizzare le proteine ai mitocondri sono le sequen-

**Tabella 13.1**

Sequenze segnale che indirizzano le proteine dal citosol agli organelli\*

ORGANELLO BERSAGLIO	LOCALIZZAZIONE DEL SEGNALE NELLA PROTEINA	RIMOZIONE DEL SEGNALE	NATURA DEL SEGNALE
Reticolo endoplasmatico (lume)	N-terminale	Sì	Nucleo di 6-12 amminoacidi idrofobici, spesso preceduti da uno o più amminoacidi basici (Arg, Lys)
Mitocondrio (matrice)	N-terminale	Sì	Elica anfipatica, di 20-50 residui, con residui Arg e Lys su un lato e residui idrofobici sull'altro
Cloroplasto (stroma)	N-terminale	Sì	Assenza di motivi con sequenza comune; abbondanza in genere di Ser e Thr e piccoli residui idrofobici, e carenza di Glu e Asp
Perossisoma (matrice)	C-terminale (la maggior parte delle proteine); N-terminale (poche proteine)	No	Segnale PTS1 (Ser-Lys-Leu) all'estremità C-terminale; segnale PTS2 all'estremità N-terminale
Nucleo (nucleoplasma)	Varie	No	Più tipi differenti; un motivo comune comprende un corto segmento ricco di residui Lys e Arg

\*Sequenze diverse o aggiuntive indirizzano le proteine alle membrane e ai sottocompartimenti degli organelli.



ze di indirizzamento per la matrice. Queste sequenze, localizzate all'estremità N-terminale, sono costituite da 20 a 50 amminoacidi. Sono ricche di amminoacidi idrofobici, di amminoacidi basici carichi positivamente (arginina e lisina) e amminoacidi idrossilati (serina e treonina), ma di solito sono privi di residui acidi carichi negativamente (aspartato e glutammato).

Si ritiene che le sequenze di indirizzamento per la matrice mitocondriale assumano una conformazione ad  $\alpha$ -elica nella quale gli amminoacidi con carica positiva predominano su un lato dell'elica e gli amminoacidi idrofobici predominano sull'altro lato. Questi tipi di sequenze che contengono sia regioni idrofobiche sia regioni idrofiliche sono definite **anfipatiche**. Le mutazioni che alterano il carattere anfipatico della sequenza di solito bloccano l'indirizzamento alla matrice, sebbene la sostituzione di molti altri amminoacidi non produca tale effetto. Queste scoperte indicano che il carattere anfipatico delle sequenze di indirizzamento per la matrice è fondamentale per la loro funzione.

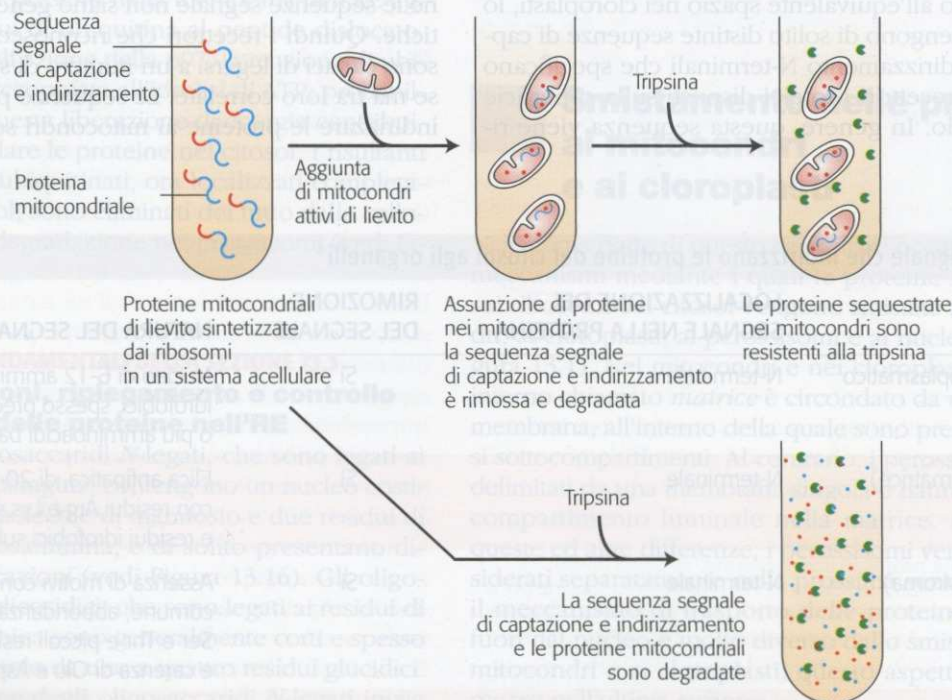
Il sistema acellulare schematizzato nella Figura 13.22 è stato ampiamente utilizzato per studiare l'ingresso di precursori proteici nei mitocondri. In questo sistema, i mitocondri attivi (che producono energia) estratti dalle cellule possono incorporare precursori di proteine mitocondriali dotati di sequenze segnale di captazione e di indirizzamento che sono stati sintetizzati in assenza di mitocondri. L'avvenuta incor-

porazione del precursore all'interno dell'organello può essere verificata sia attraverso la resistenza alla digestione da parte di una proteasi aggiunta, come la tripsina, sia, nella maggior parte dei casi, per rimozione delle sequenze di indirizzamento N-terminali tramite proteasi mitocondriali specifiche. La captazione da parte dell'organello di precursori di proteine mitocondriali completamente presintetizzate in questo sistema contrasta con la traslocazione cotraduzionale in un sistema acellulare di proteine secretorie nell'RE, che in genere si verifica solo quando le membrane microsomiali (derivate dall'RE) sono presenti durante la sintesi (vedi Figura 13.4).

### ■ Per l'importazione di proteine nei mitocondri sono necessari recettori sulla membrana esterna e trasloconi in entrambe le membrane

La Figura 13.23 presenta una panoramica relativa all'importazione delle proteine dal citosol all'interno della matrice mitocondriale, il percorso utilizzato dalla maggior parte delle proteine importate nei mitocondri. Affronteremo in dettaglio ogni tappa del trasporto delle proteine nella matrice e poi ci occuperemo di come alcune proteine sono successivamente indirizzate ad altri compartimenti mitocondriali.

Dopo la sintesi nel citosol, i precursori solubili delle proteine mitocondriali (comprese le proteine integrali di membrana idrofobiche) interagiscono direttamente con la membrana mitocondriale. In genere,



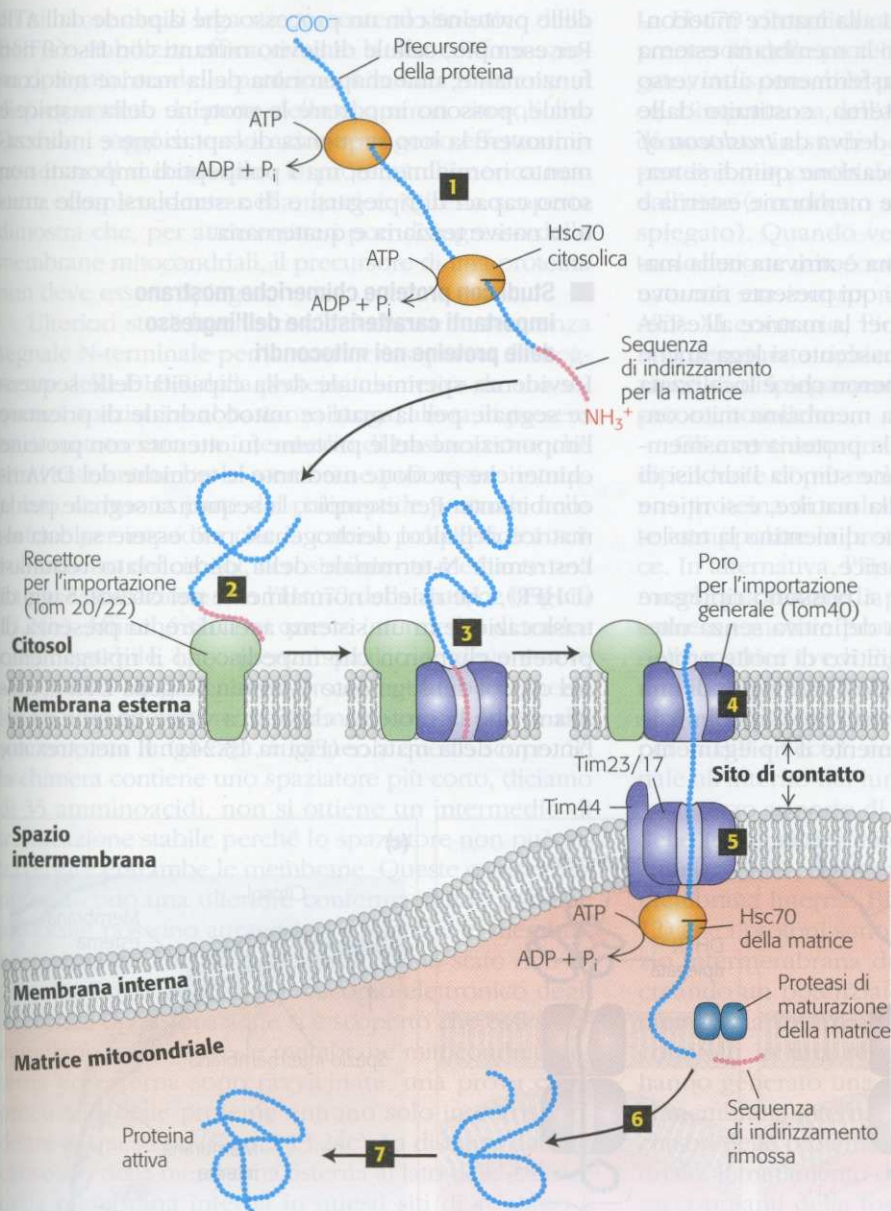
#### ▲ Figura 13.22

##### L'assunzione dei precursori delle proteine mitocondriali è saggiata in un sistema acellulare.

All'interno dei mitocondri, le proteine sono protette dall'azione di proteasi come la tripsina. Quando non sono presenti mitocondri, le proteine mitocondriali sintetizzate nel citosol sono degradate dalle proteasi aggiunte. La captazione delle proteine si verifica solo con mitocondri attivi (che producono energia), che hanno un gradiente protonico (forza proton-

motrice) attraverso la membrana interna. Le proteine importate devono contenere una specifica sequenza di captazione e indirizzamento. La captazione richiede anche ATP e un estratto citosolico contenente proteine chaperon che mantengono i precursori delle proteine in una conformazione non ripiegata. Questo saggio è stato utilizzato per studiare le sequenze di indirizzamento e altre caratteristiche del processo di traslocazione.





◀ **Figura 13.23**

**Trasferimento di proteine nella matrice mitocondriale.**

I precursori delle proteine sintetizzate nel citosol sono mantenuti in uno stato non ripiegato o parzialmente ripiegato dalle chaperon legate, come l'Hsc70 (tappa **1**). Dopo che un precursore proteico si è legato a un recettore per l'importazione in prossimità di un sito di contatto con la membrana interna (tappa **2**), viene trasferito in un poro per l'importazione generale (tappa **3**). La proteina traslocante si sposta attraverso questo canale e un canale adiacente nella membrana interna (tappe **4** e **5**). Si noti che la traslocazione avviene in corrispondenza di pochi "siti di contatto" in cui le membrane interna ed esterna apparentemente si toccano. Il legame della proteina traslocante alla chaperon Hsc70 della matrice e la successiva idrolisi di ATP da parte della Hsc70 favoriscono la sua importazione nella matrice. Una volta che la sequenza di captazione e indirizzamento è stata rimossa da una proteasi della matrice e la Hsc70 viene rilasciata dalla proteina neo importata (tappa **6**), essa si ripiega nella conformazione attiva (tappa **7**). Il ripiegamento di alcune proteine dipende dalle chaperonine della matrice. [Vedi G. Schatz, 1996, *J. Biol. Chem.* **271**:31763, e N. Pfanner et al., 1997, *Ann. Rev. Cell. Devel. Biol.* **13**:25.]

solo le proteine non ripiegate possono essere assunte dai mitocondri. Le proteine chaperon come la Hsc70 conservano le proteine nascenti e le proteine neosintetizzate in uno stato non ripiegato in modo che possano essere assunte dai mitocondri. Questo processo richiede energia liberata dall'idrolisi di ATP. L'importazione di un precursore mitocondriale non ripiegato è innescata dal legame di una sequenza di indirizzamento mitocondriale a un *recettore per l'importazione* presente nella membrana mitocondriale esterna. Questi recettori furono inizialmente identificati attraverso esperimenti nei quali anticorpi per specifiche proteine della membrana mitocondriale esterna inibivano l'importazione delle proteine in una preparazione di mitocondri isolati. Esperimenti genetici successivi, nei quali i geni di specifiche proteine della membrana mitocondriale esterna erano mutati, mostrarono che specifici recettori proteici erano responsabili dell'importazione di diverse classi di proteine mitocondriali. Per esempio, le sequenze di indirizzamento

N-terminali per la matrice sono riconosciute dai complessi Tom20 e Tom22. (Le proteine della membrana mitocondriale esterna coinvolte nell'indirizzamento e nell'importazione sono definite proteine Tom (*traslocan of the outer membrane*)).

I recettori di importazione trasferiscono successivamente i precursori proteici in un canale di importazione della membrana esterna. Questo canale, composto prevalentemente dalla proteina Tom40, è chiamato *poro per l'importazione generale* perché tutti i precursori delle proteine mitocondriali conosciute hanno accesso ai compartimenti interni del mitocondrio attraverso questo canale. Quando è purificata e inserita nei liposomi, la Tom40 forma un canale transmembrana con un poro abbastanza ampio da alloggiare una catena polipeptidica non ripiegata. Il poro generale di importazione forma un canale ampiamente passivo attraverso la membrana mitocondriale esterna, e la forza motrice per il trasporto unidirezionale nei mitocondri deriva dall'interno del mitocondrio.



Nel caso dei precursori destinati alla matrice mitocondriale, il trasferimento attraverso la membrana esterna avviene simultaneamente al trasferimento attraverso un canale della membrana interna, costituito dalle proteine Tim 23 e Tim 17 (Tim deriva da *traslocon of the inner membrane*). La traslocazione quindi si realizza in "siti di contatto" dove le membrane esterna e interna sono adiacenti.

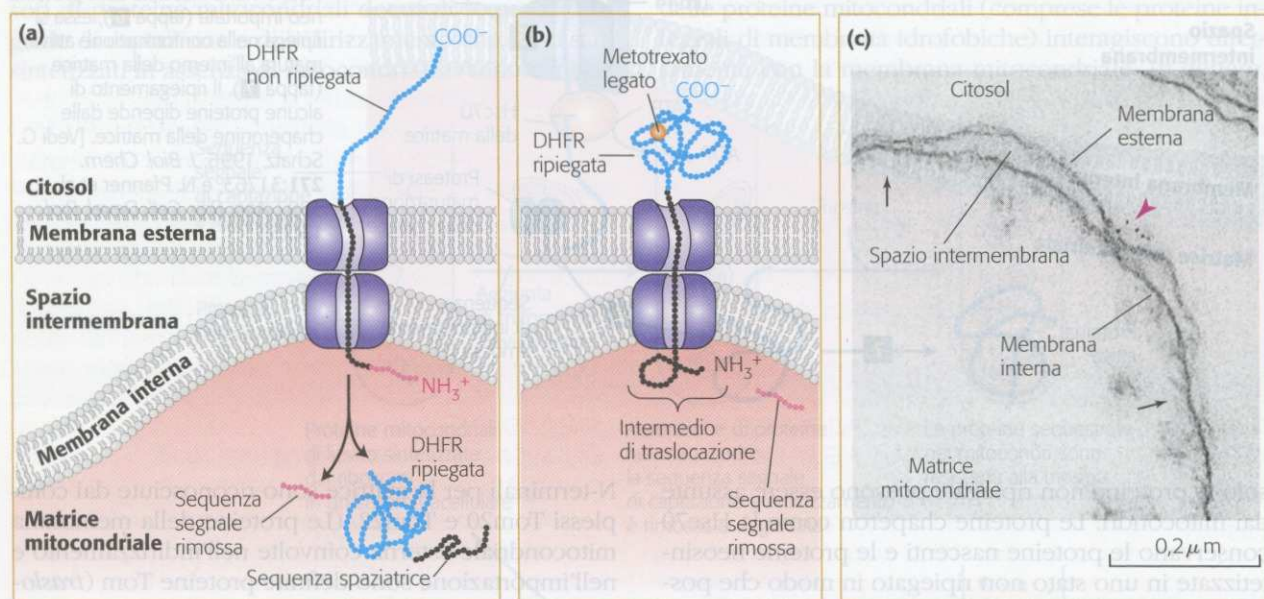
Subito dopo che una proteina è arrivata nella matrice mitocondriale, una proteasi qui presente rimuove la sequenza di indirizzamento per la matrice all'estremità N-terminale. La proteina nascente si lega anche alla Hsc della matrice, una chaperon che è localizzata nei canali di traslocazione nella membrana mitocondriale interna interagendo con la proteina transmembrana Tim 44. Questa interazione stimola l'idrolisi di ATP catalizzata dalla Hsc70 della matrice, e si ritiene che queste due proteine insieme alimentino la traslocazione delle proteine nella matrice.

Alcune proteine importate si possono ripiegare nella loro conformazione attiva definitiva senza ulteriore aiuto. Il ripiegamento definitivo di molte proteine della matrice, tuttavia, richiede l'intervento di una **chaperonina**. Come abbiamo visto nel Capitolo 3, le chaperonine favoriscono attivamente il ripiegamento

delle proteine con un processo che dipende dall'ATP. Per esempio, cellule di lievito mutanti con Hsc60 non funzionante, una chaperonina della matrice mitocondriale, possono importare le proteine della matrice e rimuovere la loro sequenza di captazione e indirizzamento normalmente, ma i polipeptidi importati non sono capaci di ripiegarsi e di assemblarsi nelle strutture native terziaria e quaternaria.

### ■ Studi con proteine chimeriche mostrano importanti caratteristiche dell'ingresso delle proteine nei mitocondri

L'evidenza sperimentale della capacità delle sequenze segnale per la matrice mitocondriale di orientare l'importazione delle proteine fu ottenuta con proteine chimeriche prodotte mediante le tecniche del DNA ricombinante. Per esempio, la sequenza segnale per la matrice dell'alcol deidrogenasi può essere saldata all'estremità N-terminale della diidrofolato reduttasi (DHFR), che risiede normalmente nel citosol. Saggi di traslocazione in un sistema acellulare, in presenza di proteine chaperon che impediscono il ripiegamento nel citosol del segmento C-terminale della DHFR, mostrano che la proteina chimerica viene trasportata all'interno della matrice (Figura 13.24a). Il metotrexato,



▲ **Figura 13.24**

#### Esperimenti con proteine chimeriche forniscono informazioni sul trasferimento delle proteine nei mitocondri.

Questi esperimenti mostrano che un'unica sequenza segnale per la matrice indirizza le proteine nella matrice mitocondriale e che solo le proteine non ripiegate sono traslocate attraverso entrambe le membrane. La proteina chimerica utilizzata in questi esperimenti conteneva alla sua estremità N-terminale una sequenza di indirizzamento per la matrice (in rosso), seguita da una sequenza spaziatrice priva di una particolare funzione (in nero) e poi dalla sequenza della diidrofolato reduttasi (DHFR, in blu), un enzima normalmente presente solo nel citosol. **(a)** Quando il segmento della DHFR non è ripiegato, la proteina chimerica si sposta attraverso entrambe le membrane, verso la matrice di mitocondri attivi, e la sequenza segnale per la matrice è quindi rimossa. **(b)** Quando l'estremità C-terminale della proteina chimerica è bloccata nello stato ripiegato dal legame con il metotrexato, la traslocazione è bloccata.

Se la sequenza spaziatrice è lunga abbastanza da estendersi attraverso entrambi i canali di trasporto, viene a formarsi, in presenza di metotrexato, un intermedio stabile di traslocazione con la sequenza di indirizzamento rimossa, come mostrato. **(c)** L'estremità C-terminale dell'intermedio di traslocazione in **(b)** può essere visualizzata incubando i mitocondri con anticorpi che si legano al segmento DHFR, e trattando poi il preparato con particelle d'oro rivestite con la proteina A, che si lega in modo aspecifico alle molecole di anticorpo (vedi Figura 9.21). Una fotografia al microscopio elettronico di un campione sezionato rivela le particelle d'oro (punta di freccia rossa) legate all'intermedio di traslocazione in un sito di contatto tra le membrane interna e esterna. Sono visibili anche altri siti di contatto (freccie nere). [Parti (a) e (b) adattate da J. Rassow et al., 1990, *FEBS Letters* **275**:190. Parte (c) da M. Schweiger et al., 1987, *J. Cell Biol.* **105**:235, per gentile concessione di W. Neupert.]



un inibitore che si lega strettamente al sito attivo della DHFR e stabilizza efficacemente la sua conformazione ripiegata, rende la proteina chimerica resistente al dispiegamento da parte delle chaperon citosoliche. Quando i saggi di traslocazione vengono effettuati in presenza di metotrexato, la proteina chimerica non entra completamente nella matrice. Questa scoperta dimostra che, per attraversare i pori di ingresso delle membrane mitocondriali, il precursore di una proteina non deve essere ripiegato.

Ulteriori studi hanno rivelato che se la sequenza segnale N-terminale per la matrice è separata dal segmento della DHFR della proteina chimerica da una sequenza spaziatrice abbastanza lunga, allora in presenza di metotrexato un intermedio di traslocazione che attraversa entrambe le membrane può essere intrappolato, se buona parte del polipeptide protrude nella matrice per impedire che la catena polipeptidica scivoli indietro nel citosol, verosimilmente mediante una stabile associazione con l'Hsc70 della matrice (Figura 13.24b). Affinché si formi questo intermedio di traslocazione stabile, la sequenza spaziatrice deve essere abbastanza lunga da attraversare entrambe le membrane; uno spaziatore di 50 amminoacidi, esteso alla sua massima lunghezza, è idoneo a questo scopo. Se la chimera contiene uno spaziatore più corto, diciamo di 35 amminoacidi, non si ottiene un intermedio di traslocazione stabile perché lo spaziatore non può attraversare entrambe le membrane. Queste osservazioni forniscono una ulteriore conferma che le proteine traslocate possono attraversare entrambe le membrane esterna ed interna e lo fanno in uno stato non ripiegato. Dagli studi al microscopio elettronico degli intermedi di traslocazione si è scoperto che essi si accumulano in siti dove le membrane mitocondriali interna ed esterna sono ravvicinate, una prova che i precursori delle proteine entrano solo in corrispondenza di questi siti (Figura 13.24c). La distanza dal lato citosolico della membrana esterna al lato della matrice della membrana interna in questi siti di contatto è compatibile con la lunghezza di una sequenza spaziatrice non ripiegata richiesta per la formazione di un intermedio di traslocazione stabile. Inoltre, gli intermedi di traslocazione stabili possono stabilire legami crociati con le subunità proteiche che costituiscono i canali di traslocazione, sia della membrana esterna sia della membrana interna. Questa scoperta dimostra che le proteine importate possono occupare simultaneamente canali sia nella membrana mitocondriale esterna sia di quella interna, come illustrato nella Figura 13.23. Dato che le proteine chimeriche fisse che si possono osservare in un tipico mitocondrio di lievito sono circa un migliaio, si ritiene che i mitocondri possiedano lo stesso numero di pori generali per l'assunzione delle proteine mitocondriali.

### ■ Per l'ingresso delle proteine nei mitocondri sono necessari tre apporti di energia

Come sottolineato in precedenza e illustrato nella Figura 13.23, per importare proteine nei mitocondri è necessaria l'idrolisi di ATP da parte delle chaperon Hsc70 sia nel citosol sia nella matrice mitocondriale.

La Hsc70 citosolica utilizza energia per mantenere i precursori delle proteine legati in uno stato non ripiegato, indispensabile per la traslocazione nella matrice. L'importanza dell'ATP per questa funzione è stata dimostrata in studi nei quali un precursore di una proteina mitocondriale veniva purificato e denaturato dall'urea (ricondotto al suo stato non ripiegato, o dispiegato). Quando veniva saggiata in un sistema di traslocazione mitocondriale acellulare, la proteina denaturata era incorporata nella matrice in assenza di ATP. Al contrario, l'ingresso del precursore nativo non denaturato richiedeva ATP per la necessaria funzione di dispiegamento da parte delle chaperon citosoliche.

Gli eventi sequenziali di legame e di rilascio ATP-dipendente di più molecole di Hsc70 della matrice ad una proteina di traslocazione possono semplicemente intrappolare la proteina non ripiegata nella matrice. In alternativa, l'Hsc70 della matrice, ancorata alla membrana tramite la proteina Tim44, potrebbe agire come un motore proteico per trascinare la proteina nella matrice (vedi Figura 13.23). In questo caso, le funzioni dell'Hsc70 e della Tim44 dovrebbero essere analoghe rispettivamente a quelle dei complessi chaperon BiP e Sec63, nella traslocazione post-traduzionale all'interno del lume dell'RE (vedi Figura 13.9).

Il terzo apporto di energia richiesto per l'ingresso delle proteine nei mitocondri è un gradiente elettrochimico di  $H^+$ , o **forza proton motrice**, attraverso la membrana interna. Bisogna ricordare (vedi Capitolo 12) che i protoni sono pompati dalla matrice allo spazio intermembrana durante il trasporto elettronico, creando un potenziale transmembrana attraverso la membrana interna. In generale, solo i mitocondri coinvolti in una respirazione attiva, e che quindi hanno generato una forza proton motrice attraverso la membrana interna, sono capaci di traslocare i precursori delle proteine dal citosol alla matrice mitocondriale. Il trattamento dei mitocondri con inibitori o disaccoppianti della fosforilazione ossidativa, come il cianuro o il dinitrofenolo, dissipa notoriamente questa forza proton motrice. Sebbene, in queste condizioni, i precursori delle proteine siano ancora in grado di legarsi strettamente ai recettori sui mitocondri inattivati, essi non possono essere trasportati all'interno, sia in cellule intatte sia in sistemi acellulari, anche in presenza di ATP e di proteine chaperon. I ricercatori non sanno ancora esattamente in che modo la forza proton motrice venga utilizzata per favorire l'ingresso di un precursore proteico nella matrice. Una volta che una proteina è inserita nella membrana interna, essa è soggetta a un potenziale transmembrana di 200 mV (interno della matrice negativo). Questa differenza di potenziale apparentemente piccola che si stabilisce attraverso lo spessore idrofobico molto sottile del doppio strato lipidico, genera un notevole gradiente elettrico che corrisponde a 400 000 V/cm. Un'ipotesi è che le cariche positive della sequenza segnale anfipatica per la matrice possano essere attratte "elettroforeticamente" nello spazio della matrice dal potenziale elettrico negativo all'interno.

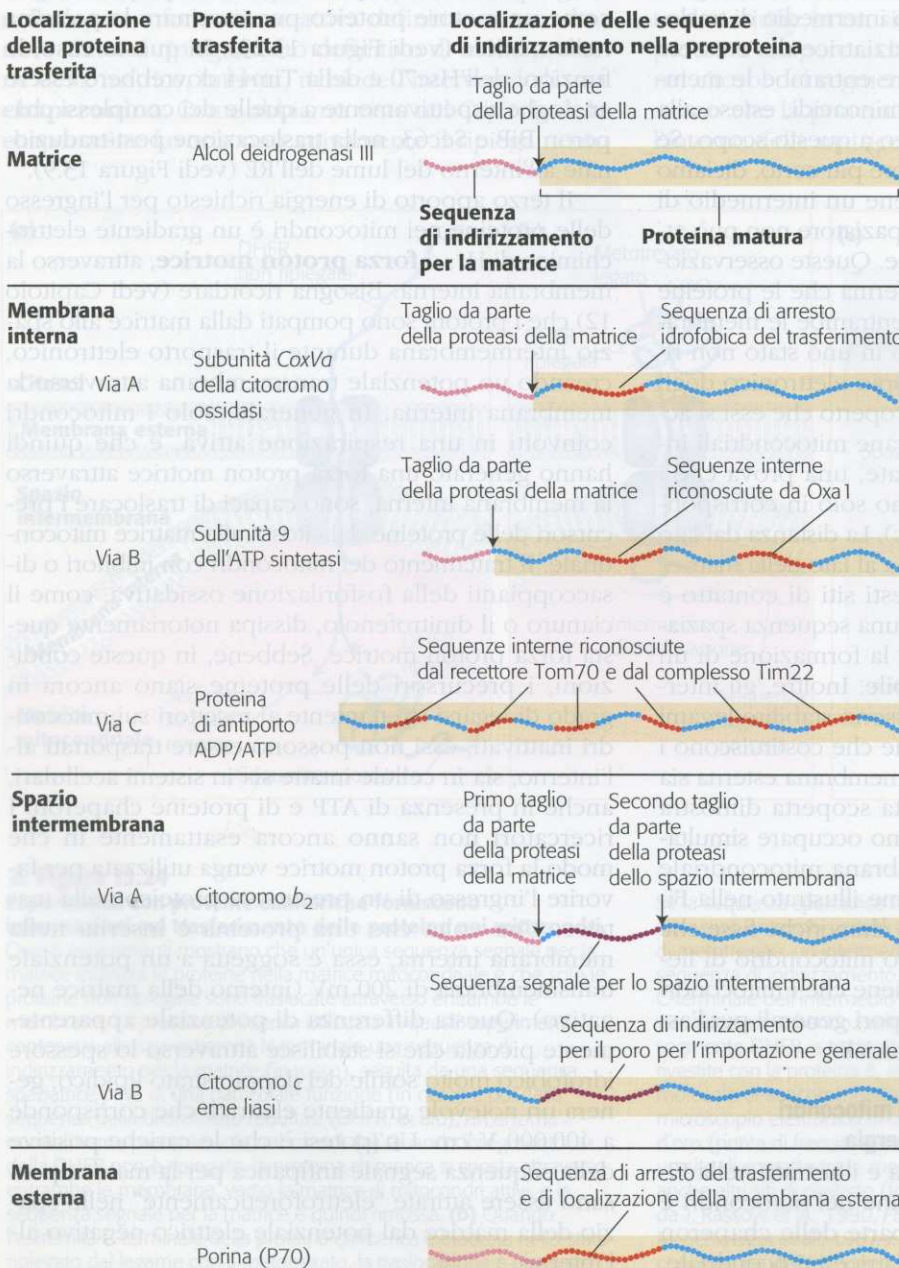


**Le proteine sono avviate ai compartimenti submitocondriali attraverso più tipi di segnali e vie**

A differenza dell'indirizzamento alla matrice, il trasferimento delle proteine nello spazio intermembrana, nella membrana interna e nella membrana esterna dei mitocondri richiede in genere più di una sequenza segnale e si realizza attraverso una o più vie. La Figura 13.25 riassume l'organizzazione delle sequenze segnale nelle proteine smistate alle diverse regioni mitocondriali.

**Proteine della membrana interna** L'indirizzamento delle proteine alla membrana mitocondriale interna si attua attraverso tre diverse vie conosciute. Una via utilizza lo stesso apparato utilizzato per l'indirizzamento delle proteine alla matrice (Figura 13.26, via A). Una proteina che è trasportata lungo questa via è una subunità della citocromo ossidasi chiamata

CoxVa. Il precursore della CoxVa, che contiene una sequenza di indirizzamento N-terminale per la matrice riconosciuta dal recettore di ingresso Tom20/22, viene trasferito attraverso il poro generale per l'ingresso della membrana esterna e il complesso di traslocazione Tim23/17 della membrana interna. Oltre alla sequenza segnale per la matrice, che è rimossa durante il trasferimento, la CoxVa contiene una sequenza idrofobica di arresto del trasferimento. Appena la proteina passa attraverso il canale Tim17/23, la sequenza di arresto del trasferimento blocca la traslocazione dell'estremità C-terminale attraverso la membrana interna. L'intermedio ancorato alla membrana viene poi trasferito lateralmente nel doppio strato della membrana interna in maniera pressoché analoga alle proteine integrali di membrana di tipo I incorporate nella membrana dell'RE (vedi Figura 13.11).

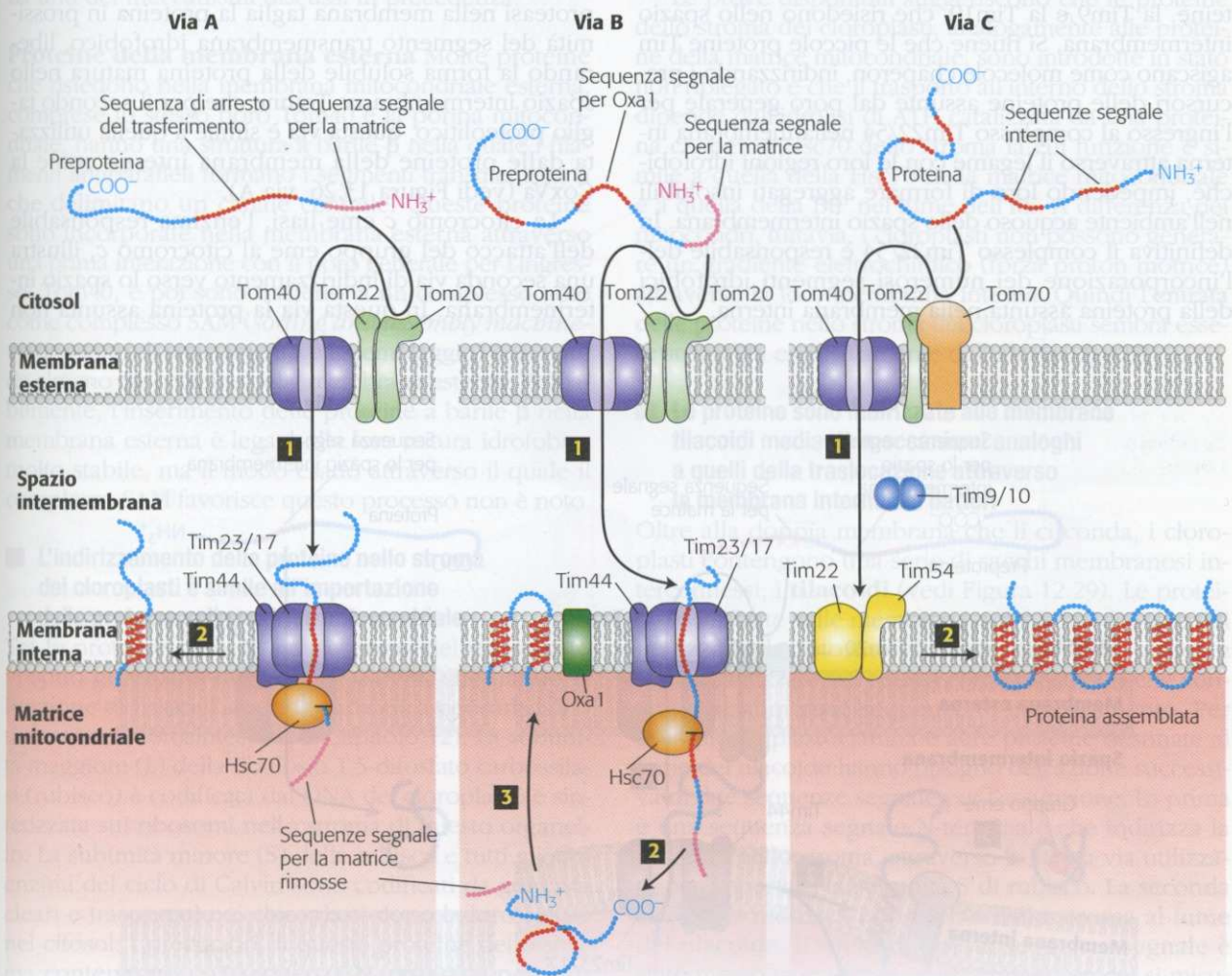


**Figura 13.25**  
**Sequenze segnale per l'ingresso delle proteine nei mitocondri.** La maggior parte delle proteine mitocondriali ha una sequenza segnale per la matrice all'estremità N-terminale (in rosa) che è simile ma non identica nelle diverse proteine. Le proteine destinate alla membrana interna, lo spazio intermembrana o la membrana esterna hanno una o più sequenze segnale supplementari che servono ad indirizzare le proteine verso questi diversi sottocompartimenti tramite più vie differenti. Le vie segnalate corrispondono a quelle illustrate nelle Figure 13.26 e 13.27. [Vedi W. Neupert, 1997, *Ann. Rev. Biochem.* **66**:863.]



Una seconda via di trasferimento alla membrana interna è utilizzata da proteine (per esempio la subunità 9 della ATP sintetasi), i cui precursori contengono sia una sequenza segnale per la matrice sia domini idrofobici interni riconosciuti da una proteina della membrana interna chiamata *Oxa1*. Si ritiene che questa via coinvolga la traslocazione di almeno una porzione del precursore nella matrice attraverso i canali Tom40 e Tim23/17. Dopo la rimozione della sequenza segnale per la matrice, la proteina è inserita nella membrana interna mediante un processo che richiede interazioni con *Oxa1* e forse altre proteine della membrana interna (Figura 13.26, via B). *Oxa1* è correlata a una proteina batterica coinvolta nell'inserimento di alcune proteine della membrana interna nei batteri. Questa correlazione suggerisce che *Oxa1* potrebbe essere derivata dall'apparato di traslocazione del batterio endosimbionte che alla fine è diventato mitocondrio. Tuttavia, le proteine che costituiscono i canali della membrana interna dei mitocondri non sono correlate alle proteine dei trasloconi batterici. *Oxa1* partecipa anche all'inserimento nella membrana interna di alcune proteine (per esempio la subunità II della citocromo ossidasi) che sono codificate dal DNA mitocondriale e sintetizzate nella matrice dai ribosomi mitocondriali.

L'ultima via di inserimento nella membrana mitocondriale interna è utilizzata da proteine ad attraverso



### ▲ Figura 13.26

#### Tre vie di trasferimento delle proteine dal citosol alla membrana mitocondriale interna.

Le proteine con sequenze segnale diverse sono indirizzate alla membrana interna tramite vie differenti. In tutte e tre le vie, le proteine attraversano la membrana esterna mediante il poro per l'importazione generale Tom40. Le proteine recapitate mediante le vie A e B contengono una sequenza segnale per la matrice all'estremità N-terminale che è riconosciuta dal recettore per l'importazione Tom20/22 nella membrana esterna. Sebbene entrambe queste vie utilizzino il canale della membrana interna Tim23/17, esse si differenziano per il fatto che l'intero precursore della proteina entra nella matrice e poi viene indirizzato

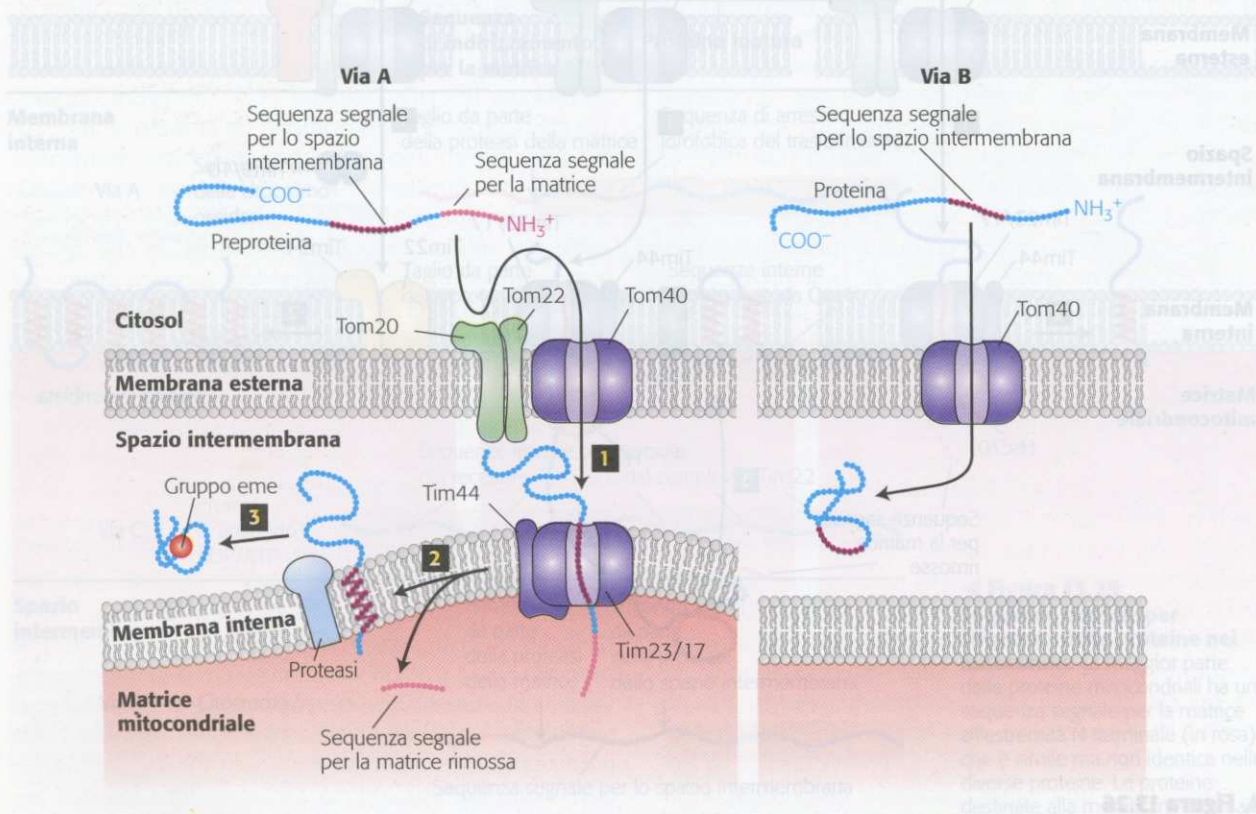
alla membrana interna tramite la via B. La proteina della matrice Hsc70 svolge un ruolo analogo a quello esercitato per l'assunzione delle proteine solubili della matrice (vedi Figura 13.23). Le proteine recapitate tramite la via C contengono sequenze interne che sono riconosciute dal recettore per l'importazione Tom70/Tom22; in questa via viene utilizzato un canale di traslocazione della membrana interna diverso (Tim22/54). Due proteine dello spazio intermembrana (Tim9 e Tim10) favoriscono il trasferimento tra i canali esterno e interno. Vedi il testo per la discussione. [Vedi R.E. Dalbey e A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell. Devel. Biol.* **16**:51, e N. Pfanner e A. Geissler, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:339.]



samento multiplo costituite da sei domini di attraversamento della membrana, come la proteina di antipor- to ATP/ADP. Queste proteine, che sono prive della consueta sequenza segnale N-terminale per la matrice, possiedono numerose sequenze segnale per la membrana mitocondriale interna. Dopo che le sequenze interne sono state riconosciute da un secondo recettore di ingresso, composto dalle proteine della membrana esterna Tom70 e Tom22, la proteina trasferita attraversa la membrana esterna tramite il poro generale per l'ingresso (Figura 13.26, via C). La proteina viene poi trasferita ad un secondo complesso di traslocazione costituito dalle proteine Tim22 e Tim54. Il trasferimento al complesso Tim22/54 dipende da un complesso multimerico di due piccole proteine, la Tim9 e la Tim10, che risiedono nello spazio intermembrana. Si ritiene che le piccole proteine Tim agiscano come molecole chaperon, indirizzando i precursori delle proteine assunte dal poro generale per l'ingresso al complesso Tim22/54 nella membrana interna attraverso il legame con le loro regioni idrofobiche, impedendo loro di formare aggregati insolubili nell'ambiente acquoso dello spazio intermembrana. In definitiva il complesso Tim22/54 è responsabile dell'incorporazione dei numerosi segmenti idrofobici della proteina assunta nella membrana interna.

**Proteine dello spazio intermembrana** Le proteine citosoliche sono trasferite nello spazio compreso tra le membrane mitocondriale interna ed esterna attraverso due vie. La via principale è utilizzata da proteine come il citocromo  $b_2$ , i cui precursori possiedono due diverse sequenze segnale all'estremità N-terminale che alla fine saranno rimosse. La sequenza più prossima all'estremità N-terminale è una sequenza segnale per la matrice, che è rimossa dalla proteasi della matrice. La seconda sequenza segnale è un segmento idrofobico che blocca la completa traslocazione della proteina attraverso la membrana interna (Figura 13.27, via A). Dopo che il risultante intermedio transmembrana si diffonde lateralmente allontanandosi dal canale di traslocazione Tim23/17, una proteasi nella membrana taglia la proteina in prossimità del segmento transmembrana idrofobico, liberando la forma solubile della proteina matura nello spazio intermembrana. Tranne che per il secondo taglio proteolitico, questa via è simile a quella utilizzata dalle proteine della membrana interna come la CoxVa (vedi Figura 13.26, via A).

La citocromo *c* eme liasi, l'enzima responsabile dell'attacco del gruppo eme al citocromo *c*, illustra una seconda via di indirizzamento verso lo spazio intermembrana. In questa via la proteina assunta non



▲ **Figura 13.27**

**Due vie di trasferimento delle proteine nello spazio intermembrana dei mitocondri.**

La via A, la principale via di trasferimento delle proteine dal citosol allo spazio intermembrana, è simile alla via A utilizzata per recapitare le proteine alla membrana interna (vedi Figura 13.26). La principale differenza sta nel fatto che la sequenza segnale interna in proteine come il citocromo  $b_2$ , destinate allo spazio intermembrana, è riconosciuta da una proteasi della membrana interna, che rimuove la proteina sul lato della

membrana rivolto verso lo spazio intermembrana. La proteina rilasciata poi si ripiega e si lega al suo cofattore (gruppo eme) all'interno dello spazio intermembrana. La via B consente il recapito diretto nello spazio intermembrana tramite il poro per l'importazione generale Tom40 localizzato nella membrana esterna. [Vedi R.E. Dalbey e A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell. Devel. Biol.* **16**:51; N. Pfanner e A. Geissler, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:339; K. Diekert et al., 1999, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**:11752.]



contiene una sequenza segnale N-terminale per la matrice ed è recapitata direttamente allo spazio intermembrana attraverso il poro generale per l'ingresso, senza il coinvolgimento di alcun fattore di traslocazione della membrana interna (Figura 13.27, via B). Dal momento che la traslocazione attraverso il poro generale per l'ingresso Tom40 non sembra essere accoppiata ad alcun processo energeticamente favorevole, come l'idrolisi di ATP o GTP, il meccanismo che promuove la traslocazione unidirezionale attraverso la membrana esterna non è definito. È possibile che la citocromo *c* eme liasi diffonda passivamente attraverso la membrana esterna e poi sia intrappolata all'interno dello spazio intermembrana da un legame con un'altra proteina che è recapitata in quella posizione da uno dei meccanismi discussi in precedenza.

**Proteine della membrana esterna** Molte proteine che risiedono nella membrana mitocondriale esterna, comprese lo stesso poro Tom40 e la porina mitocondriale, hanno una struttura a barile  $\beta$  nella quale i filamenti antiparalleli formano i segmenti transmembrana che delimitano un canale centrale. Queste proteine sono incorporate nella membrana esterna attraverso una prima interazione con il poro generale per l'ingresso, Tom40, e poi sono trasferite a un complesso noto come complesso SAM (*sorting and assembly machinery*, apparato di smistamento e assemblaggio) costituito da almeno tre proteine della membrana esterna. Probabilmente, l'inserimento delle proteine a barile  $\beta$  nella membrana esterna è legato alla loro natura idrofobica molto stabile, ma il modo esatto attraverso il quale il complesso SAM favorisce questo processo non è noto.

#### ■ L'indirizzamento delle proteine nello stroma dei cloroplasti è simile all'importazione delle proteine nella matrice mitocondriale

Tra le proteine presenti nello stroma del cloroplasto vi sono gli enzimi del ciclo di Calvin, che hanno la funzione di fissare l'anidride carbonica nei carboidrati durante la fotosintesi (vedi Capitolo 12). La subunità maggiore (L) della ribulosio 1,5-difosfato carbossilasi (rubisco) è codificata dal DNA del cloroplasto e sintetizzata sui ribosomi nello stroma di questo organello. La subunità minore (S) della rubisco e tutti gli altri enzimi del ciclo di Calvin sono codificati da geni nucleari e trasportati nei cloroplasti dopo la loro sintesi nel citosol. I precursori di queste proteine dello stroma contengono una sequenza N-terminale per l'ingresso nello stroma (vedi Tabella 13.1).

Esperimenti con preparazioni di cloroplasti isolati, simili a quelli con i mitocondri illustrati nella Figura 13.22, hanno dimostrato che questi organelli possono importare il precursore della subunità S dopo la sua sintesi. Dopo che il precursore è entrato in forma non ripiegata nello stroma, esso si lega transitoriamente a una proteina chaperon Hsc70 dello stroma e subisce il taglio della sequenza segnale N-terminale. In reazioni facilitate dalle chaperonine Hsc60 che risiedono all'interno dello spazio stromale, otto subunità S si combinano con le otto subunità L per formare l'enzima rubisco in forma attiva.

In generale, il processo di trasferimento delle proteine nello stroma sembra molto simile a quello per trasferire proteine nella matrice mitocondriale (vedi Figura 13.23). È noto che almeno tre proteine della membrana esterna del cloroplasto, tra cui un recettore che si lega alla sequenza segnale per lo stroma e un canale di traslocazione, e cinque proteine della membrana interna sono essenziali per indirizzare le proteine nello stroma. Sebbene queste proteine siano funzionalmente analoghe ai recettori e ai canali proteici presenti nella membrana mitocondriale, non sono strutturalmente omologhe. La mancanza di somiglianza nella sequenza di queste proteine dei cloroplasti e dei mitocondri suggerisce che esse possano essersi evolute indipendentemente.

Le prove disponibili suggeriscono che le proteine dello stroma dei cloroplasti, analogamente alle proteine della matrice mitocondriale, sono introdotte in stato non ripiegato e che il trasporto all'interno dello stroma dipende dall'idrolisi di ATP, catalizzata da una proteina chaperon Hsc70 dello stroma la cui funzione è simile a quella della Hsc70 nella matrice mitocondriale e a quella della BiP nel lume dell'RE. A differenza dei mitocondri, tuttavia, i cloroplasti non possono generare un gradiente elettrochimico (forza proton motrice) attraverso la loro membrana interna. Quindi l'entrata delle proteine nello stroma dei cloroplasti sembra essere sostenuta esclusivamente dall'idrolisi di ATP.

#### ■ Le proteine sono indirizzate alle membrane tilacoidi mediante meccanismi analoghi a quelli della traslocazione attraverso la membrana interna dei batteri

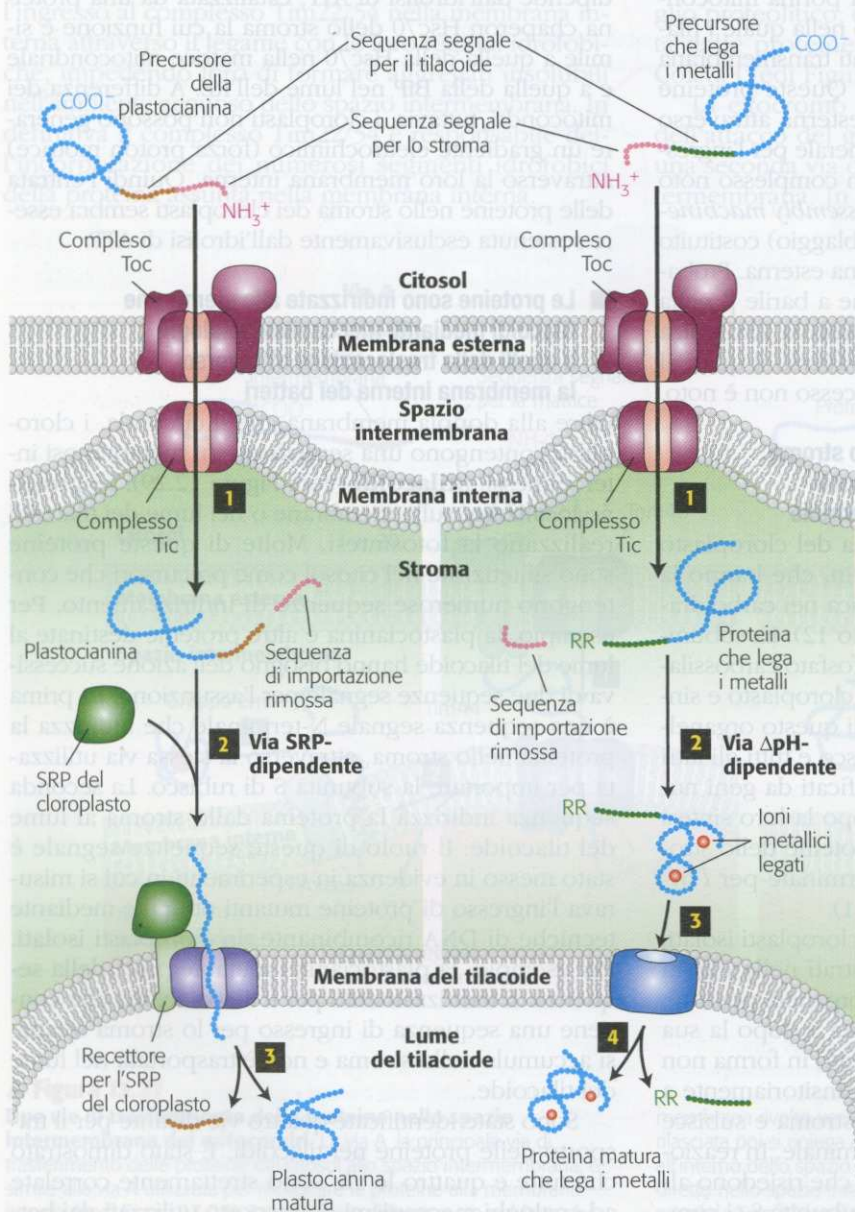
Oltre alla doppia membrana che li circonda, i cloroplasti contengono una serie di sacchi membranosi interconnessi, i **tilacoidi** (vedi Figura 12.29). Le proteine localizzate sulle membrane o nel lume dei tilacoidi realizzano la fotosintesi. Molte di queste proteine sono sintetizzate nel citosol come precursori che contengono numerose sequenze di indirizzamento. Per esempio, la plastocianina e altre proteine destinate al lume del tilacoide hanno bisogno dell'azione successiva di due sequenze segnale per l'assunzione. La prima è una sequenza segnale N-terminale che indirizza la proteina nello stroma, attraverso la stessa via utilizzata per importare la subunità S di rubisco. La seconda sequenza indirizza la proteina dallo stroma al lume del tilacoide. Il ruolo di queste sequenze segnale è stato messo in evidenza in esperimenti in cui si misurava l'ingresso di proteine mutanti ottenute mediante tecniche di DNA ricombinante, in cloroplasti isolati. Per esempio, la plastocianina mutante priva della sequenza di indirizzamento per il tilacoide, ma che contiene una sequenza di ingresso per lo stroma intatta, si accumula nello stroma e non è trasportata nel lume del tilacoide.

Sono state identificate quattro vie distinte per il trasporto delle proteine nei tilacoidi. È stato dimostrato che tutte e quattro le vie sono strettamente correlate ad analoghi meccanismi di trasporto utilizzati dai batteri, consolidando la stretta relazione evolutiva tra la membrana dello stroma e la membrana batterica in-



terna. Il trasporto della plastocianina e di proteine correlate nel lume del tilacoide dallo stroma si realizza attraverso una via SRP-dipendente nel cloroplasto, che utilizza un traslocone simile alla SecY, la versione batterica del complesso Sec61 (Figura 13.28, *a sinistra*). Una seconda via per il trasporto delle proteine nel lume del tilacoide coinvolge una proteina correlata alla proteina batterica SecA, che utilizza l'energia liberata dall'idrolisi di ATP per alimentare la traslocazione della proteina attraverso il traslocone SecY. La terza via, che indirizza le proteine alle membrane del tilacoide, dipende da una proteina correlata alla proteina mitocondriale Oxa1 e all'omologa proteina batterica (vedi Figura 13.26, via B). Alcune proteine codificate dal DNA dei cloroplasti e sintetizzate nello stroma o trasportate nello stroma dal citosol sono inserite nelle membrane del tilacoide attraverso questa via.

Infine, le proteine dei tilacoide che legano cofattori contenenti metalli utilizzano un'altra via per raggiungere il lume del tilacoide (Figura 13.28, *a destra*). I precursori non ripiegati di queste proteine sono inizialmente indirizzati allo stroma, dove la sequenza segnale N-terminale per lo stroma è rimossa e la proteina si ripiega e lega il suo cofattore. Una serie di proteine di membrana del tilacoide promuove la traslocazione della proteina ripiegata e del cofattore a questa legato nel lume del tilacoide, un processo alimentato dal gradiente di pH mantenuto normalmente attraverso la membrana del tilacoide. La sequenza segnale per il tilacoide, che indirizza una proteina verso questa via dipendente dal pH, comprende due residui di arginina strettamente appaiati che sono fondamentali per il riconoscimento. Anche le cellule batteriche utilizzano un meccanismo per traslocare proteine ripiegate attra-



◀ **Figura 13.28**

**Il trasporto delle proteine nel tilacoide dei cloroplasti.**

In questa figura sono mostrate due delle quattro vie di trasporto delle proteine dal citosol al lume del tilacoide. In queste vie, i precursori non ripiegati sono trasferiti allo stroma attraverso le stesse proteine della membrana esterna che importano le proteine localizzate nello stroma. Successivamente, la rimozione della sequenza segnale N-terminale di importazione per lo stroma da parte di una proteasi dello stroma mette in evidenza la sequenza di indirizzamento per il tilacoide (tappa 1). A questo punto, le due vie divergono. Nella via SRP-dipendente (*a sinistra*), la plastocianina e proteine simili sono mantenute in forma non ripiegata nello spazio stromale da una serie di chaperon (non mostrate) e, indirizzate dalla sequenza segnale per il tilacoide, si legano a proteine che sono analoghe alla SRP batterica, al recettore della SRP e al traslocone SecY che mediano il trasferimento all'interno del lume (tappa 2). Dopo la rimozione della sequenza segnale per il tilacoide, nel lume del tilacoide, ad opera di una specifica endoproteasi, la proteina si ripiega nella sua conformazione matura (tappa 3). Nella via dipendente dal pH (*a destra*), le proteine che legano metalli si ripiegano nello stroma e si associano a complessi cofattori redox (tappa 2). Per il trasporto delle proteine ripiegate nel lume del tilacoide sono richiesti due residui di arginina (RR) all'estremità N-terminale della sequenza segnale per il tilacoide e un gradiente di pH attraverso la membrana interna (tappa 3). Il traslocone nella membrana del tilacoide è composto di almeno quattro proteine analoghe alle proteine della membrana batterica interna. La sequenza segnale per il tilacoide contenente i due residui di arginina viene rimossa nel lume del tilacoide (tappa 4). [Vedi R. Dalbey e C. Robinson, 1999, *Trends Biochem. Sci.* **24**:17; R.E. Dalbey e A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **16**:51; C. Robinson e A. Bolhuis, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:350.]



verso la membrana interna con una sequenza simile contenente arginina. Il meccanismo molecolare mediante il quale queste voluminose proteine globulari ripiegate sono trasportate attraverso la membrana del tilacoide è attualmente oggetto di intensa ricerca.

#### ■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 13.4

##### Smistamento delle proteine ai mitocondri e ai cloroplasti

- ▶ La maggior parte delle proteine dei mitocondri e dei cloroplasti sono codificate da geni nucleari, sintetizzate sui ribosomi citosolici e traslocate con meccanismo post-traduzionale all'interno degli organelli.
- ▶ Tutte le informazioni richieste per indirizzare il precursore di una proteina dal citosol alla matrice mitocondriale o allo stroma dei cloroplasti sono contenute all'interno della sua sequenza di captazione e indirizzamento N-terminale. Dopo il trasferimento della proteina, la sequenza segnale di ingresso viene rimossa da proteasi presenti all'interno della matrice o dello stroma.
- ▶ Le chaperon citosoliche mantengono i precursori delle proteine mitocondriali e dei cloroplasti in stato non ripiegato. Solo le proteine non ripiegate possono essere traslocate all'interno degli organelli. La traslocazione nei mitocondri si verifica in corrispondenza di siti in cui le membrane esterna e interna degli organelli sono in contatto.
- ▶ Le proteine destinate alla matrice mitocondriale si legano ai recettori della membrana mitocondriale esterna e poi sono trasferite al poro generale per l'ingresso (Tom40) presente nella membrana esterna. La traslocazione avviene simultaneamente attraverso le membrane esterna e interna, alimentata dalla forza proton motrice attraverso la membrana interna e dall'idrolisi di ATP da parte della ATPasi Hsc70 presente nella matrice (vedi Figura 13.23).
- ▶ Le proteine smistate in posizioni diverse dalla matrice contengono di solito due o più sequenze segnale, una delle quali può essere una sequenza segnale N-terminale per la matrice (vedi Figura 13.25).
- ▶ Alcune proteine mitocondriali destinate allo spazio intermembrana o alla membrana interna sono prima trasferite nella matrice e poi rindirizzate; altre non entrano mai nella matrice ma raggiungono direttamente la loro destinazione finale.
- ▶ Il trasferimento delle proteine nello stroma del cloroplasto si realizza attraverso canali di traslocazione nella membrana interna e nella membrana esterna che sono funzionalmente analoghi ai canali mitocondriali, ma sono costituiti da proteine con sequenza non correlata alle proteine mitocondriali corrispondenti.
- ▶ Le proteine destinate al tilacoide hanno sequenze di indirizzamento secondarie. Dopo l'ingresso di queste proteine nello stroma, il taglio delle sequenze segnale per lo stroma smaschera le sequenze segnale per la membrana del tilacoide.

- ▶ Le quattro vie conosciute per trasferire le proteine dallo stroma del cloroplasto alla membrana del tilacoide è molto simile alla traslocazione attraverso la membrana batterica interna (vedi Figura 13.28). Uno di questi sistemi può traslocare le proteine ripiegate.

### 13.5 Smistamento delle proteine perossisomiali

I perossisomi sono piccoli organelli delimitati da una singola membrana. A differenza dei mitocondri e dei cloroplasti, i perossisomi non contengono DNA e ribosomi. Tutte le proteine perossisomiali sono quindi codificate da geni nucleari, sintetizzate su ribosomi liberi nel citosol e infine incorporate nei perossisomi preesistenti o di nuova formazione. Dato che i perossisomi aumentano di volume per aggiunta di proteine (e lipidi), essi alla fine si dividono generando nuovi organelli, in modo simile ai mitocondri e ai cloroplasti.

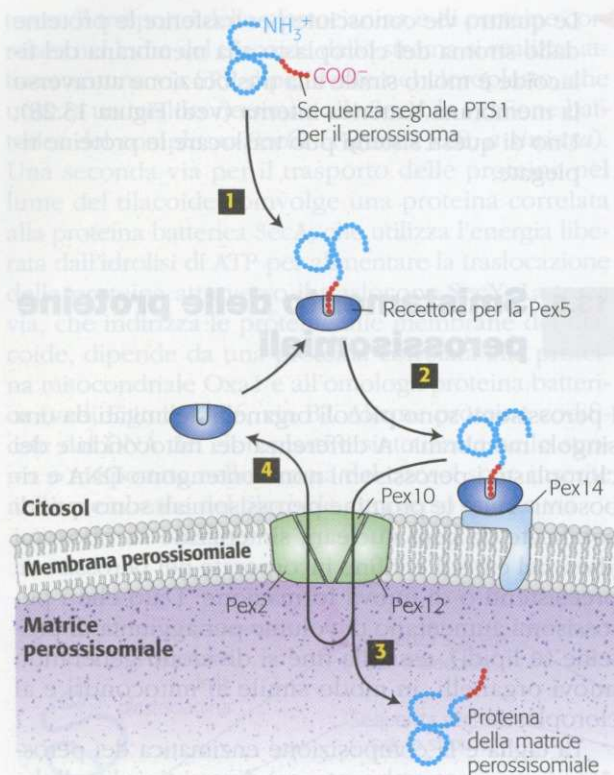
La taglia e la composizione enzimatica dei perossisomi varia notevolmente nei diversi tipi di cellule. Tuttavia, tutti i perossisomi contengono enzimi che utilizzano l'ossigeno molecolare per ossidare vari substrati, come amminoacidi e acidi grassi, demolendoli in componenti più piccoli da utilizzare nelle vie di biosintesi. Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) generato da queste reazioni di ossidazione è estremamente reattivo e pericoloso per i componenti cellulari; tuttavia, il perossisoma contiene anche enzimi, come la catalasi, che convertono efficacemente l' $H_2O_2$  in  $H_2O$ . Nei mammiferi, i perossisomi sono particolarmente abbondanti nelle cellule epatiche, dove costituiscono circa l'1-2% del volume cellulare.

#### ■ Recettori citosolici indirizzano le proteine con una sequenza SKL C-terminale all'interno della matrice perossisomiale

Il trasferimento della catalasi e di altre proteine nei perossisomi delle cellule epatiche di ratto può essere studiato in un sistema acellulare simile a quello utilizzato per studiare il trasporto delle proteine mitocondriali (vedi Figura 13.22). Saggiando in questo sistema varie proteine mutanti della catalasi, i ricercatori hanno scoperto che per indirizzare le proteine al perossisoma era necessaria la sequenza Ser-Lys-Leu (SKL, usando il codice a una lettera), o una analoga sequenza, all'estremità C-terminale. Inoltre, l'aggiunta della sequenza SKL all'estremità C-terminale di una normale proteina citosolica determina l'assunzione della proteina modificata da parte dei perossisomi di cellule in coltura. Quasi tutte le diverse proteine della matrice perossisomiale hanno una sequenza di questo tipo, nota come *sequenza segnale per il perossisoma 1*, o semplicemente *PTS1*.

La via di importazione della catalasi e di altre proteine provviste della PTS1 all'interno della matrice perossisomiale è schematizzata nella Figura 13.29. La



▲ **Figura 13.29****Trasferimento delle proteine nella matrice perossisomiale indirizzate da PTS1.**

Tappa **1**: la catalasi e molte altre proteine della matrice perossisomiale contengono una sequenza segnale di indirizzamento PTS1 all'estremità C-terminale (in rosso) che si lega al recettore citosolico Pex5. Tappa **2**: la Pex5 legata alla proteina della matrice interagisce con il recettore Pex14 localizzato sulla membrana perossisomiale. Tappa **3**: il complesso proteina della matrice-Pex5 viene poi trasferito a una serie di proteine di membrana (Pex10, Pex12 e Pex2) che sono necessarie per la traslocazione nella matrice perossisomiale attraverso un meccanismo sconosciuto. Tappa **4**: in alcune fasi, sia durante la traslocazione sia all'interno del lume, la Pex5 si dissocia dalla proteina della matrice e ritorna nel citosol, un processo che coinvolge il complesso Pex2/10/12 e altre proteine di membrana citosoliche non mostrate. Si noti come le proteine possono essere trasportate nei perossisomi in stato ripiegato e che la sequenza di indirizzamento non viene rimossa nella matrice. [Vedi P.E. Purdue e P. B. Lazarow, 2001, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **17**:701; S. Subramani et al., 2000, *Ann. Rev. Biochem.* **69**:399; V. Dammai e S. Subramani, 2001, *Cell* **105**:187.]

PTS1 si lega a una proteina trasportatrice solubile nel citosol (Pex5), che a sua volta si lega a un recettore sulla membrana perossisomiale (Pex14). I recettori per l'importazione perossisomiale solubili o associati alla membrana sembrano avere una funzione analoga a quelli dell'SRP e del suo recettore coinvolti nell'indirizzamento delle proteine nel lume dell'RE, tranne per il fatto che la proteina solubile che lega la PTS1 funziona con un meccanismo post-traduzionale. La proteina che deve essere assunta poi attraversa un canale di traslocazione multimerico mentre è ancora legata alla Pex5, una caratteristica diversa dalla via di importazione delle proteine nel lume dell'RE. A qualche stadio, sia durante sia dopo l'ingresso nella matrice, la Pex5 si dissocia dalla proteina della matrice perossisomiale ed è riportata nel citoplasma per essere riciclata. A differenza delle sequenze segnale N-termina-

li per la captazione presenti sulle proteine destinate al lume dell'RE, alla matrice mitocondriale e allo stroma dei cloroplasti, la sequenza segnale PTS1 non viene staccata dalle proteine dopo il loro ingresso nel perossisoma. L'ingresso delle proteine nel perossisoma richiede idrolisi di ATP, ma non è noto in che modo questa energia sia utilizzata per alimentare la traslocazione unidirezionale attraverso la membrana perossisomiale.

L'apparato di importazione nel perossisoma, a differenza della maggior parte dei sistemi che mediano l'assunzione delle proteine nell'RE, nei mitocondri e nei cloroplasti, può traslocare proteine ripiegate attraverso la membrana. Per esempio, la catalasi assume una conformazione ripiegata e si lega al gruppo eme nel citoplasma prima di attraversare la membrana perossisomiale. Studi con sistemi acellulari hanno mostrato che l'apparato di importazione dei perossisomi può trasportare grandi complessi macromolecolari, comprese particelle d'oro di circa 9 nm di diametro, purché essi abbiano attaccata una sequenza PTS1. Tuttavia, le membrane perossisomiali non sembrano contenere grandi pori stabili, come il poro nucleare descritto nella prossima sezione. Il meccanismo di base della traslocazione delle proteine nella matrice perossisomiale non è stato ancora chiarito ma è oggetto di numerosi studi. Alcuni dei meccanismi considerati comprendono l'idea che le proteine della membrana perossisomiale Pex10, Pex12 e Pex2 si possano assemblare per formare un ampio canale transmembrana con una apertura regolata di circa 10-15 nm (come riferimento, si ritiene che il canale formato dal complesso Sec61 abbia un massimo di apertura di circa 2 nm). In alternativa, la Pex5 legata alle molecole di carico che possiedono la PTS1 può formare complessi oligomerici immersi nella membrana perossisomiale. Secondo questa ipotesi, il disassemblaggio ATP-dipendente del complesso rilascerebbe le molecole di carico nella matrice perossisomiale e la Pex5 dovrebbe essere riportata nel citosol per completare un altro ciclo di trasferimento del carico.

Alcune proteine della matrice perossisomiale come la tiolasi sono sintetizzate come precursori con una sequenza segnale N-terminale per l'assunzione, chiamata PTS2. Queste proteine si legano a diversi recettori citosolici ma, a differenza dell'importazione, si ritiene che agiscano con lo stesso meccanismo utilizzato dalle proteine dotate della sequenza PTS1.

### ■ Le proteine della membrana e della matrice perossisomiale sono incorporate attraverso vie differenti

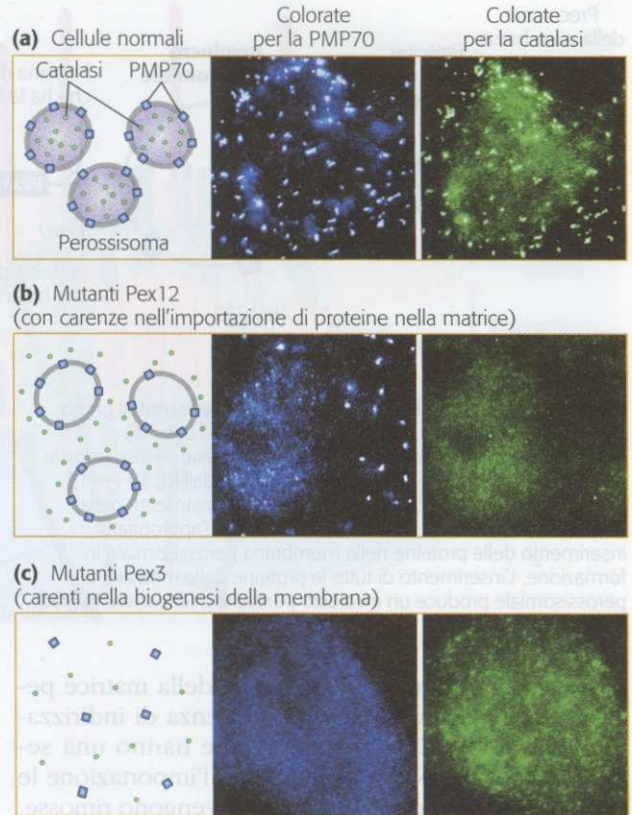
✚ Mutazioni autosomiche recessive che causano un assemblaggio difettoso dei perossisomi si verificano spontaneamente nella popolazione umana. Questi difetti possono portare a gravi anomalie dello sviluppo spesso associate a malformazioni craniofaciali. Nella *sindrome di Zellweger* e in altre malattie simili, per esempio, il trasporto di molte o tutte le proteine nella matrice perossisomiale risulta compromesso: gli enzimi perossisomiali neosintetizzati



rimangono nel citosol e alla fine sono degradati. Studi genetici condotti su cellule in coltura, provenienti da diversi pazienti affetti dalla sindrome di Zellweger e su cellule di lievito con mutazioni simili, hanno consentito di identificare più di 20 geni richiesti per la biogenesi dei perossisomi. ●

Studi con mutanti dell'assemblaggio dei perossisomi hanno mostrato che per l'importazione di proteine nella matrice perossisomiale sono utilizzate diverse vie, rispetto all'inserimento di proteine nella membrana perossisomiale. Per esempio, l'analisi della cellule di alcuni pazienti affetti dalla sindrome di Zellweger ha permesso di identificare i geni che codificano le probabili proteine Pex10, Pex12 e Pex2 del canale di traslocazione. Cellule mutanti con difetti in ognuna di queste proteine non possono incorporare le proteine nella matrice perossisomiale; nonostante le cellule contengano perossisomi vuoti, questi hanno una normale dotazione di proteine nella loro membrana (Figura 13.30b). È stato scoperto che mutazioni in ognuno dei tre geni bloccano l'inserimento delle proteine nella membrana perossisomiale come pure l'importazione delle proteine nella matrice (Figura 13.30c). Queste scoperte dimostrano che un gruppo di proteine ha la funzione di traslocare le proteine solubili nella matrice perossisomiale, ma per l'inserimento delle proteine nella membrana perossisomiale sono richieste proteine diverse. Questa condizione è molto diversa da quella osservata nell'RE, nei mitocondri e nei cloroplasti, per i quali, come abbiamo visto, le proteine di membrana e le proteine solubili condividono molti degli stessi componenti per il loro inserimento in questi organelli.

Sebbene la maggior parte dei perossisomi abbia origine per divisione di organelli preesistenti, essi possono essere formati *ex novo* attraverso il processo a tre stadi schematizzato nella Figura 13.31. In questo caso, l'assemblaggio dei perossisomi inizia nell'RE. Almeno due proteine della membrana perossisomiale, la Pex3 e la Pex16, sono inserite nella membrana dell'RE attraverso il meccanismo descritto nella Sezione 13.2. La Pex3 e la Pex16 reclutano proteine perossisomiali supplementari come la Pex19, costituendo una regione specializzata della membrana dell'RE dalla quale può gemmare per formare un precursore della membrana perossisomiale. L'analisi di cellule mutanti ha rivelato che la proteina Pex19 è il recettore responsabile dell'indirizzamento delle proteine della membrana perossisomiale, mentre la Pex3 e la Pex16 sono necessarie per il loro adeguato inserimento nella membrana. Si ritiene che queste tre proteine siano responsabili dell'assemblaggio delle proteine della membrana perossisomiale nei perossisomi maturi così come lo sono durante la formazione di nuovi perossisomi. L'inserimento delle proteine nella membrana perossisomiale dà origine a membrane che possiedono tutti i componenti necessari per l'importazione delle proteine nella matrice, portando alla formazione di perossisomi funzionali maturi. La divisione dei perossisomi maturi, dai quali dipende il numero



▲ **Figura 13.30**

**Gli studi rivelano vie differenti per l'incorporazione delle proteine nella membrana e nella matrice dei perossisomi.**

In questi esperimenti, le cellule sono state colorate con anticorpi fluorescenti per la PMP70, una proteina della membrana perossisomiale, o con anticorpi fluorescenti per la catalasi, una proteina della matrice perossisomiale, e quindi osservate con un microscopio a fluorescenza. (a) Nelle cellule normali, sia le proteine della membrana perossisomiale sia quelle della matrice sono visibili come punti luminosi in numerosi corpi perossisomiali. (b) Nelle cellule di un paziente che manca della Pex12, la catalasi è distribuita uniformemente per tutto il citosol, mentre la PMP70 è localizzata normalmente nei corpi perossisomiali. (c) Nelle cellule di un paziente carente di Pex3, le membrane perossisomiali non si possono assemblare e di conseguenza, i corpi perossisomiali non si formano. Quindi, sia la catalasi sia la PMP70 sono erroneamente localizzate nel citosol. [Per gentile concessione di Stephen Gould, Johns Hopkins University.]

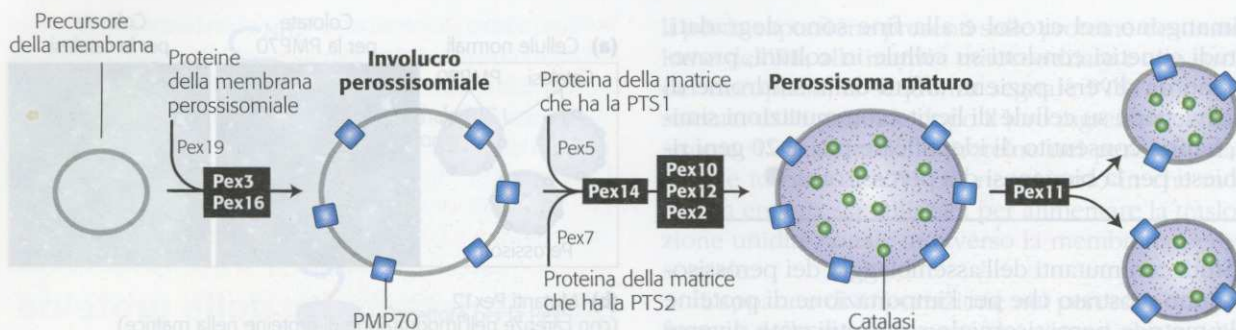
dei perossisomi presenti all'interno di una cellula, dipende da un'altra proteina ancora, la Pex11. La sovraespressione della proteina Pex11 causa un sensibile aumento del numero di perossisomi, suggerendo che questa proteina controlli il grado di divisione dei perossisomi. I piccoli perossisomi generati per divisione possono ingrandirsi per incorporazione di ulteriori proteine della matrice e di membrana attraverso le stesse vie descritte in precedenza.

■ **CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 13.5**

**Smistamento delle proteine perossisomiali**

- ▶ Tutte le proteine perossisomiali sono sintetizzate sui ribosomi del citosol e incorporate negli organelli con meccanismo post-traduzionale.





### ▲ Figura 13.31

**Modello di biogenesi e divisione dei perossisomi.** Il primo stadio della formazione *ex novo* dei perossisomi consiste nell'incorporazione delle proteine della membrana perossisomiale nelle membrane non differenziate provenienti dall'RE. La Pex19 agisce come recettore per le sequenze di indirizzamento della membrana. Pex3 e Pex16 sono necessarie per l'appropriato inserimento delle proteine nella membrana perossisomiale in formazione. L'inserimento di tutte le proteine della membrana perossisomiale produce un involucro perossisomiale, che è in grado

- ▶ La maggior parte delle proteine della matrice perossisomiale contiene una sequenza di indirizzamento PTS1 C-terminale; alcune hanno una sequenza PTS2 N-terminale. Dopo l'importazione le sequenze di indirizzamento non vengono rimosse.
- ▶ Tutte le proteine destinate alla matrice perossisomiale si legano a un trasportatore proteico citosolico, che è diverso per le proteine che hanno PTS1 e PTS2, e poi sono indirizzate al recettore di importazione comune e all'apparato di traslocazione sulla membrana perossisomiale (vedi Figura 13.29).
- ▶ La traslocazione delle proteine della matrice attraverso la membrana del perossisoma dipende dall'idrolisi di ATP. Molte proteine della matrice perossisomiale si ripiegano nel citosol e attraversano la membrana in una conformazione ripiegata, diversamente dall'importazione di proteine in organelli come l'RE, il mitocondrio e il cloroplasto.
- ▶ Le proteine destinate alla membrana perossisomiale contengono sequenze segnale diverse dalle proteine della matrice perossisomiale e sono importate attraverso una via diversa.
- ▶ A differenza dei mitocondri e dei cloroplasti, i perossisomi possono formarsi *ex novo* da precursori della membrana derivati con ogni probabilità dall'RE, come pure per divisione di organelli preesistenti (vedi Figura 13.31).

di trasferire le proteine destinate alla matrice. Le vie per importare le proteine per la matrice provviste di PTS1 e PTS2 differiscono solo nella specificità del recettore citosolico (rispettivamente, Pex5 e Pex7) che si lega alla sequenza segnale (vedi Figura 13.29). L'incorporazione completa delle proteine nella matrice porta alla formazione di un perossisoma maturo. La proliferazione dei perossisomi deriva dalla divisione di perossisomi maturi, un processo che dipende dalla proteina Pex11.

*nucleari*, che attraversano entrambe le membrane dell'involucro nucleare. Il trasferimento di proteine nel nucleo ha alcune caratteristiche fondamentali in comune con il trasferimento di proteine in altri organelli. Per esempio, le proteine nucleari importate possiedono specifiche sequenze segnale note come segnali di localizzazione nucleare, o NLS. Tuttavia, le proteine sono trasferite nel nucleo in uno stato ripiegato, e quindi l'importazione nucleare è fondamentalmente diversa dalla traslocazione proteica attraverso le membrane dell'RE, dei mitocondri e dei cloroplasti, durante la quale le proteine perdono il loro ripiegamento. In questa sezione parleremo del meccanismo principale attraverso il quale le proteine e alcune ribonucleoproteine come i ribosomi entrano ed escono dal nucleo. Vedremo anche come gli mRNA e altri complessi ribonucleoproteici sono esportati dal nucleo attraverso un processo meccanicamente diverso da quello utilizzato per l'importazione nucleare.

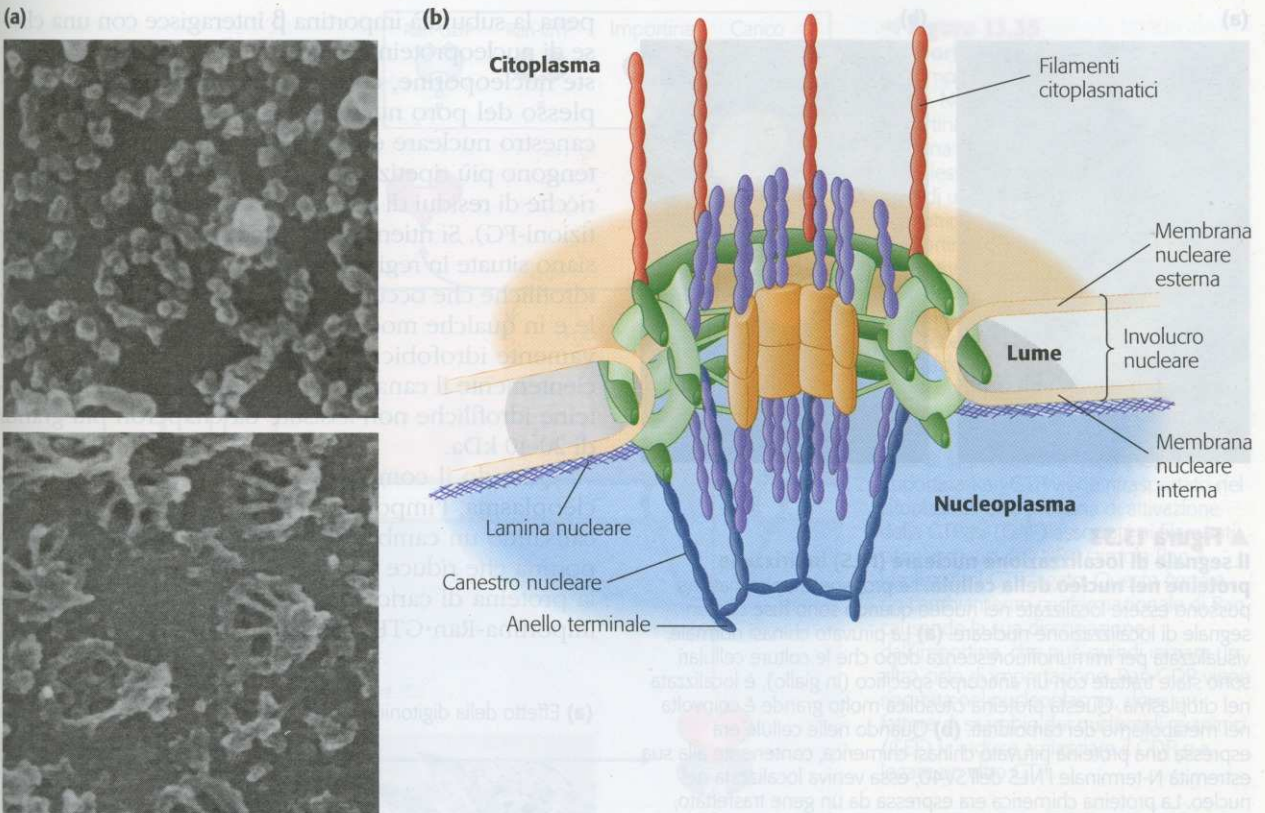
### ■ Molecole grandi e piccole entrano ed escono dal nucleo attraverso i complessi del poro nucleare

Numerosi pori perforano l'involucro nucleare di tutte le cellule eucariotiche. Ogni poro nucleare è formato da una elaborata struttura definita **complesso del poro nucleare (NPC)**. La massa complessiva della struttura del poro nucleare dei vertebrati è di 60-80 milioni di Da, un valore circa 16 volte più grande di un ribosoma. Un NPC è costituito da più copie di 30 proteine diverse chiamate **nucleoporine**. La microscopia elettronica del complesso del poro nucleare rivela una struttura immersa nella membrana di forma quasi ottagonale, dalla quale otto filamenti di circa 100 nm di lunghezza si estendono verso il nucleoplasma (Figura 13.32). Le estremità distali di questi filamenti sono unite da un anello terminale, formando una struttura denominata **canestro nucleare**. La porzione dell'NPC immersa nella membrana è anche attaccata direttamente alla **lamina nucleare**, una trama di filamenti intermedi di lamina che formano una rete che

## 13.6 Trasporto all'interno e all'esterno del nucleo

Il nucleo è separato dal citoplasma da due membrane che formano l'**involucro nucleare** (vedi Figura 9.1). L'involucro nucleare si continua con l'RE di cui forma una parte. Il trasporto delle proteine dal citoplasma all'interno del nucleo e il trasferimento delle macromolecole, compresi gli mRNA, i tRNA e le subunità ribosomiali, fuori dal nucleo si realizzano attraverso **pori**





▲ **Figura 13.32**

**Il complesso del poro nucleare.** (a) Involucri nucleari microdissezionati dai grossi nuclei degli ovociti di *Xenopus* visualizzati mediante microscopia elettronica a emissione di campo. *In alto*: la visione del lato citoplasmatico rivela la forma ottagonale della porzione immersa nella membrana dei complessi del poro nucleare. *In basso*: la vista del lato nucleoplasmatico

si estende lungo la superficie interna dell'involucro nucleare (vedi Figura 20.16). I filamenti citoplasmatici si estendono nel citosol dal lato citoplasmatico dell'NPC.

Ioni, piccoli metaboliti e proteine globulari delle dimensioni di 20-40 kDa possono diffondere passivamente attraverso la regione acquosa centrale del complesso del poro nucleare. Tuttavia, le grosse proteine e i complessi ribonucleoproteici non possono diffondere dentro e fuori dal nucleo. Piuttosto, queste macromolecole sono attivamente trasportate attraverso l'NPC con l'aiuto di proteine trasportatrici solubili che legano le macromolecole e interagiscono anche con le nucleoporine.

#### ■ Le importine trasportano nel nucleo le proteine che contengono segnali di localizzazione nucleare

Tutte le proteine presenti nel nucleo, come gli istoni, i fattori di trascrizione e le DNA e RNA polimerasi, sono sintetizzate nel citoplasma e importate nel nucleo attraverso i complessi del poro nucleare. Queste proteine contengono un *segnale di localizzazione nucleare* (NLS) che indirizza il loro trasporto selettivo all'interno del nucleo. Gli NLS sono stati scoperti per la prima volta studiando dei mutanti di un virus, il virus di scimmia 40 (*simian virus 40*, SV40), che pro-

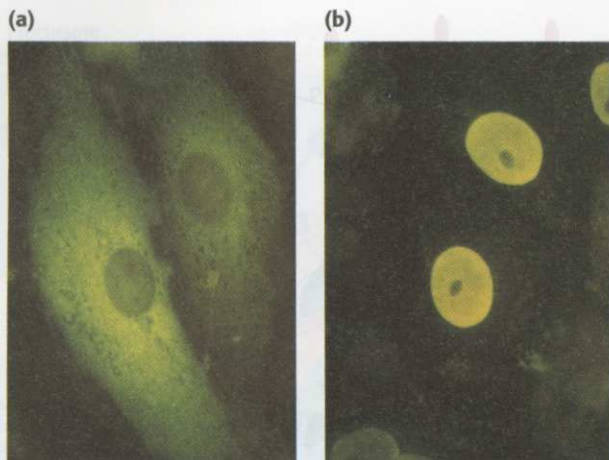
mostra il canestro nucleare che si estende dalla porzione della membrana. (b) Spaccato del complesso del poro nucleare.

[Parte (a) da V. Doye ed E. Hurt, 1997, *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:401; per gentile concessione di M.W. Goldberg e T. D. Allen. Parte (b) adattata da M.P. Rout e J.D. Atchison, 2001, *J. Biol. Chem.* **276**:16593.]

ducono una forma anomala della proteina virale denominata grande antigene T. La forma normale di questa proteina è localizzata nel nucleo delle cellule infettate dal virus, mentre alcune forme mutanti del grande antigene T si accumulano nel citoplasma. Le mutazioni responsabili di questa alterata localizzazione cellulare si verificano tutte all'interno di una specifica sequenza di sette residui ricca di amminoacidi basici in prossimità dell'estremità C-terminale della proteina: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Esperimenti con proteine ibride ingegnerizzate, nelle quali questa sequenza era fusa con una proteina citosolica, hanno dimostrato che essa dirige il trasporto nel nucleo e di conseguenza funziona come un NLS (Figura 13.33). Sequenze NLS sono state successivamente identificate in numerose altre proteine importate nel nucleo. Molte di queste sequenze sono risultate simili all'NLS basica del grande antigene T dell'SV40, mentre altri NLS risultano chimicamente piuttosto diversi. Per esempio un NLS presente nella proteina di legame dell'RNA, hnRNP A1, è idrofobico. Quindi ci devono essere più meccanismi per il riconoscimento di sequenze così diverse.

Inizialmente, gli studi sul meccanismo di importazione nucleare erano indirizzati su proteine che contengono un NLS basico, simile a quello del grande an-





### ▲ Figura 13.33

#### Il segnale di localizzazione nucleare (NLS) indirizza le proteine nel nucleo della cellula.

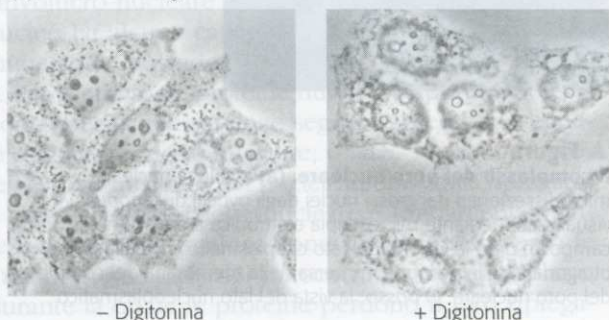
Le proteine citoplasmatiche possono essere localizzate nel nucleo quando sono fuse con un segnale di localizzazione nucleare. **(a)** La piruvato chinasi normale, visualizzata per immunofluorescenza dopo che le colture cellulari sono state trattate con un anticorpo specifico (in giallo), è localizzata nel citoplasma. Questa proteina citosolica molto grande è coinvolta nel metabolismo dei carboidrati. **(b)** Quando nelle cellule era espressa una proteina piruvato chinasi chimerica, contenente alla sua estremità N-terminale l'NLS dell'SV40, essa veniva localizzata nel nucleo. La proteina chimerica era espressa da un gene trasfettato, ottenuto per fusione di un frammento del gene virale codificante l'NLS dell'SV40 con il gene della piruvato chinasi. [Da D. Kalderon et al., 1984, *Cell* **39**: 499; per gentile concessione del Dr. Alan Smith.]

tigene T dell'SV40. Un sistema di cellule permeabilizzate con la digitonina ha fornito un utile saggio *in vitro* per individuare i componenti citosolici solubili richiesti per l'importazione nucleare (Figura 13.34). La digitonina è un detergente che permeabilizza la membrana plasmatica, permettendo ai componenti citoplasmatici di fluire fuori dalla cellula lasciando l'involucro nucleare e gli NPC intatti. Usando questo sistema di analisi, i ricercatori hanno isolato e caratterizzato tre proteine necessarie al processo di importazione: la Ran, l'importina  $\alpha$  e l'importina  $\beta$ . La Ran è una **proteina G** monomerica che può assumere una conformazione sia in complesso col GTP sia legata al GDP (vedi Figura 3.32). Le due **importine** possono formare un eterodimero con funzione di **recettore di importazione nucleare**: la subunità  $\alpha$  si lega a un NLS basilico in una proteina "di carico" che deve essere trasportata nel nucleo, mentre la subunità  $\beta$  interagisce con proteine nel poro nucleare per veicolare la proteina di carico attraverso di esso. La subunità importina  $\beta$  si può legare direttamente anche ad alcune sequenze NLS e quindi può agire da sola come un recettore di importazione nucleare per queste proteine. Nella Figura 13.35 è mostrato il meccanismo di importazione di proteine di carico citoplasmatiche mediato da un'importina (il meccanismo generale è lo stesso sia per l'importina monomerica sia per l'importina dimerica). Nel citoplasma l'importina libera si lega al suo NLS complementare in una proteina di carico, formando un **complesso di carico bimolecolare**. Il complesso di carico poi trasloca attraverso il canale dell'NPC ap-

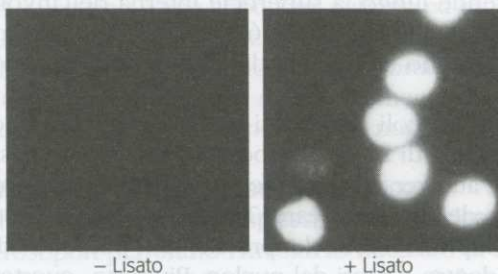
pena la subunità importina  $\beta$  interagisce con una classe di nucleoproteine chiamate **nucleoporine-FG**. Queste nucleoporine, che delimitano il canale del complesso del poro nucleare e sono presenti anche nel canestro nucleare e nei filamenti citoplasmatici, contengono più ripetizioni di corte sequenze idrofobiche ricche di residui di fenilalanina (F) e glicina (G) (ripetizioni-FG). Si ritiene che le ripetizioni-FG idrofobiche siano situate in regioni di estese catene polipeptidiche idrofiliche che occupano il canale di trasporto centrale e in qualche modo permettono ai complessi relativamente idrofobici di importina di attraversare efficientemente il canale, escludendo nel contempo proteine idrofiliche non assistite da chaperon più grandi di 20-40 kDa.

Quando il complesso di carico raggiunge il nucleoplasma, l'importina interagisce con la Ran•GTP, causando un cambiamento conformazionale nell'importina che riduce la sua affinità per l'NLS, liberando la proteina di carico nel nucleoplasma. Il complesso importina-Ran•GTP ritorna indietro attraverso l'NPC.

#### (a) Effetto della digitonina



#### (b) Assunzione da parte di cellule impermeabilizzate

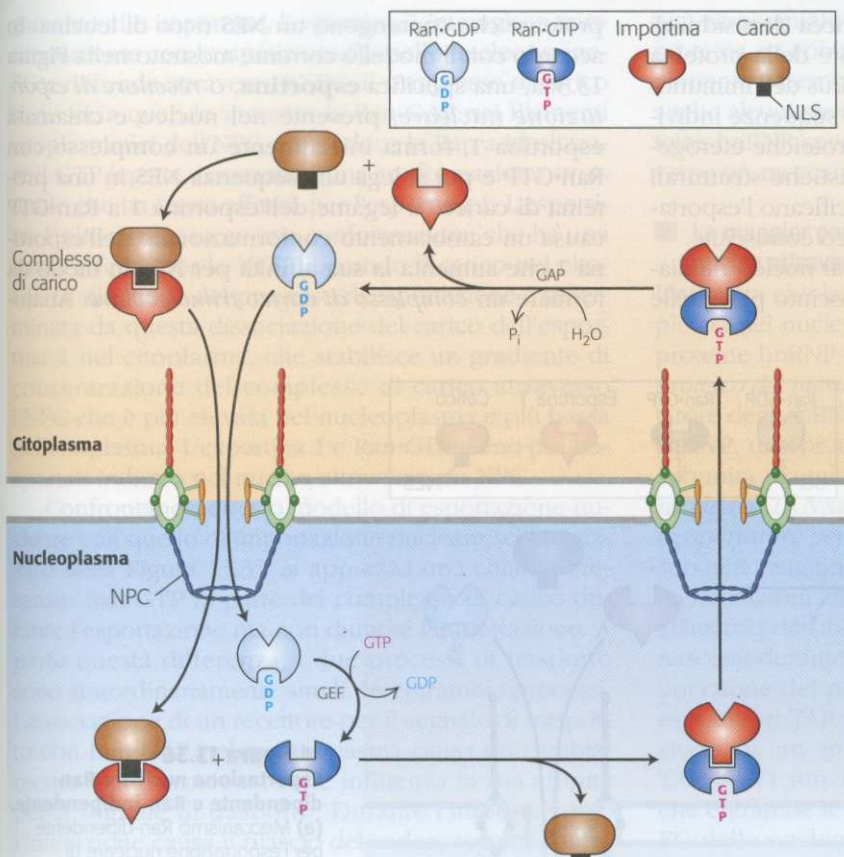


### ▲ Figura 13.34

#### Per il trasporto nucleare sono necessarie proteine citosoliche.

Il mancato trasporto nucleare che si verifica nelle cellule in coltura permeabilizzate in assenza di lisato dimostra che nel processo sono coinvolte componenti citosoliche solubili. **(a)** Fotografie al microscopio in contrasto di fase di cellule HeLa non trattate e permeabilizzate con digitonina. Il trattamento di un monostrato di cellule coltivate con il blando detergente non ionico digitonina permeabilizza la membrana plasmatica in modo che i costituenti citosolici diffondano verso l'esterno, mentre l'involucro nucleare e gli NPC restano intatti. **(b)** Fotografie al microscopio a fluorescenza di cellule HeLa permeabilizzate con digitonina e incubate con una proteina fluorescente chimicamente associata a un peptide sintetico NLS dell'antigene T del virus SV40 in presenza o assenza di citosol (lisato cellulare). L'accumulo di questo substrato di trasporto nel nucleo si verificava solo quando nel mezzo di incubazione era incluso il citosol (*destra*). [Da S. Adam et al., 1990, *J. Cell. Biol.* **111**:807; per gentile concessione del Dr. Larry Gerace.]





◀ **Figura 13.35**

**L'importazione nucleare.** Meccanismo per l'importazione nucleare di proteine di carico. Nel citoplasma (*in basso*), una importina libera si lega all'NLS di una proteina di carico, formando un complesso di carico bimolecolare. Nel caso di un NLS basico, la proteina adattatrice importina  $\alpha$  lega l'NLS e l'importina  $\beta$ , formando un complesso di carico trimolecolare (non mostrato). Il complesso di carico diffonde attraverso l'NPC interagendo con le nucleoporine-FG successive. Nel nucleoplasma l'interazione di Ran-GTP con l'importina causa un cambiamento conformazionale che riduce la sua affinità per l'NLS, rilasciando il carico. Per affrontare un altro ciclo di importazione, il complesso importina-Ran-GTP viene ritrasportato nel citoplasma. Una proteina di attivazione della GTPasi (GAP) associata ai filamenti citoplasmatici dell'NPC stimola Ran a idrolizzare il GTP legato. Questo genera un cambiamento conformazionale di Ran causando la sua dissociazione dall'importina, che può quindi iniziare un altro ciclo di importazione. Ran-GDP viene riportata nel nucleoplasma, dove un fattore di scambio dei nucleotidi guaninici (GEF) la induce a rilasciare il GDP e a legare un altro GTP.

Una volta che il complesso importina-Ran-GTP raggiunge il lato citoplasmatico dell'NPC, la Ran interagisce con una specifica *proteina di attivazione della GTPasi* (Ran-GAP) che è una componente dei filamenti citoplasmatici dell'NPC. Questa stimola la proteina Ran a idrolizzare il suo GTP legato a GDP, causando la sua conversione a una conformazione che ha bassa affinità per l'importina, in modo tale che l'importina libera sia rilasciata nel citoplasma dove può partecipare ad un altro ciclo di importazione. Il complesso Ran-GDP ritorna nel nucleoplasma attraverso il poro, dove è presente uno specifico *fattore di scambio dei nucleotidi guaninici* (Ran-GEF) che causa il rilascio di GDP in favore di GTP. Il risultato netto di questa serie di reazioni è l'accoppiamento dell'idrolisi di GTP al trasferimento di una proteina provvista di NLS dal citoplasma all'interno del nucleo, il che fornisce quindi la forza motrice per il trasporto nucleare.

Il complesso di importazione si sposta attraverso il poro per diffusione, secondo un processo casuale, e tuttavia il trasporto è unidirezionale. La direzione del trasporto è una conseguenza della rapida dissociazione del complesso di importazione quando esso raggiunge il nucleoplasma. Come conseguenza, c'è un gradiente di concentrazione del complesso importina-carico attraverso l'NPC: elevata nel citoplasma, dove il complesso si assembla e bassa nel nucleoplasma, dove esso si dissocia. Questo gradiente di concentrazione è responsabile della natura unidirezionale dell'importazione nucleare. Un gradiente di concentrazio-

ne simile è responsabile dell'indirizzamento dell'importina dal nucleo indietro nel citoplasma. La concentrazione del complesso importina-Ran-GTP è più elevata nel nucleoplasma, dove si assembla, rispetto al lato citoplasmatico dell'NPC, dove si dissocia. Infine, la direzione dei processi di trasporto dipende dalla distribuzione asimmetrica di Ran-GEF e di Ran-GAP. Nel nucleoplasma, Ran-GEF mantiene Ran nello stato Ran-GTP, dove promuove la dissociazione del complesso del carico. Ran-GAP sul lato citoplasmatico dell'NPC converte Ran-GTP in Ran-GDP, dissociando il complesso importina-Ran-GTP e rilasciando l'importina libera nel citosol.

■ **Le esportine trasportano fuori dal nucleo proteine contenenti segnali di esportazione nucleare**

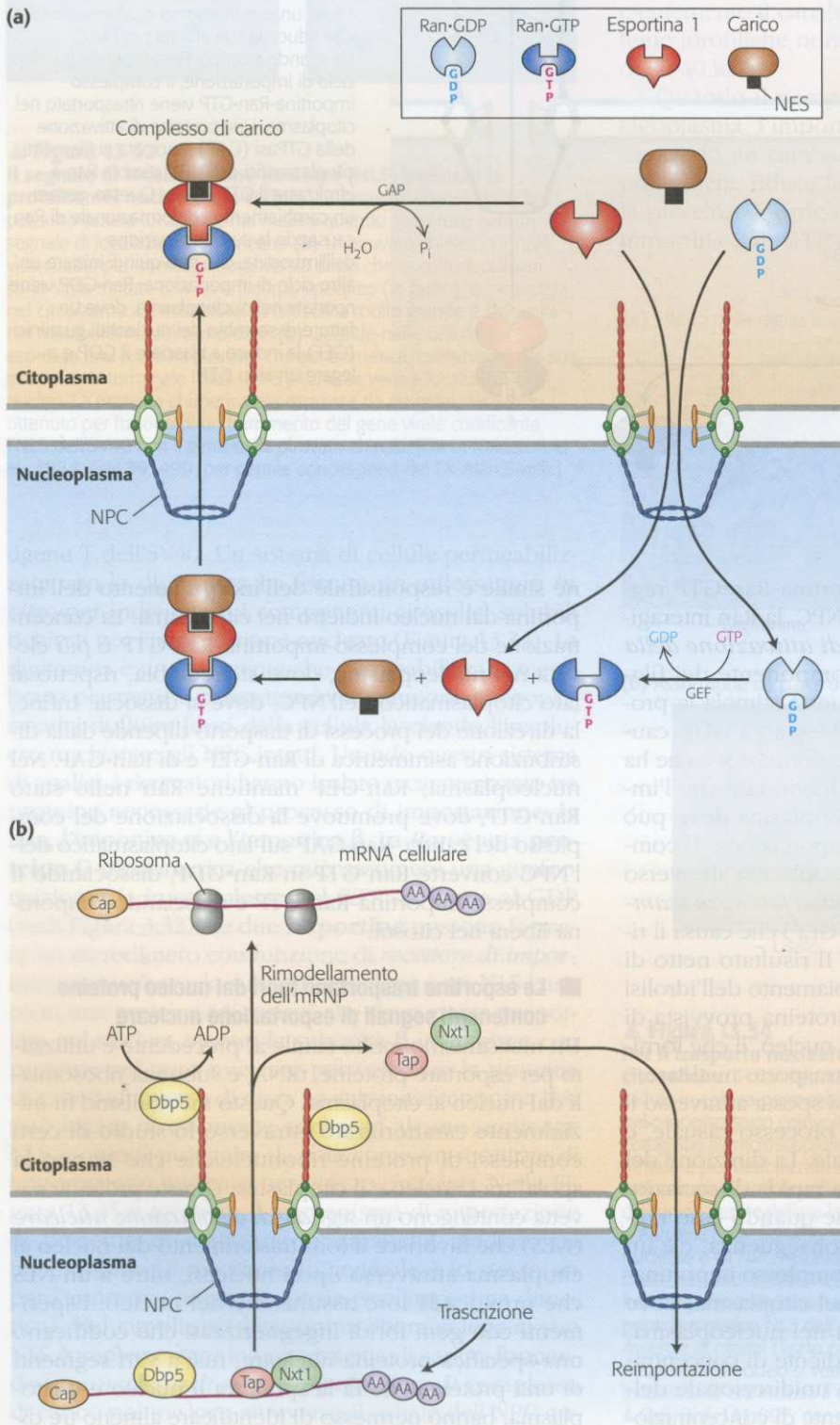
Un meccanismo molto simile al precedente è utilizzato per esportare proteine, tRNA, e subunità ribosomiali dal nucleo al citoplasma. Questo meccanismo fu inizialmente caratterizzato attraverso lo studio di certi complessi di proteine ribonucleiche che "fanno la spola" tra il nucleo e il citoplasma. Queste proteine navetta contengono un *segnale di esportazione nucleare* (NES) che favorisce il loro trasferimento dal nucleo al citoplasma attraverso i pori nucleari, oltre a un NLS che provoca la loro assunzione nel nucleo. Esperimenti con geni ibridi ingegnerizzati che codificano una specifica proteina nucleare, fusi a vari segmenti di una proteina che fa la spola tra il nucleo e il citoplasma, hanno permesso di identificare almeno tre di-



verse classi di NES: una sequenza ricca di residui di leucina presente nel PKI (un inibitore della proteina chinasi A) e nella proteina Rev del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), oltre a due sequenze individuate in due particelle ribonucleoproteiche eterogenee differenti (hnRPN). Le caratteristiche strutturali funzionalmente significative che specificano l'esportazione nucleare sono attualmente poco conosciute.

Il meccanismo di esportazione dal nucleo mediato dalle proteine navetta è ben conosciuto per quelle

proteine che contengono un NES ricco di leucina. In accordo con il modello corrente mostrato nella Figura 13.36a, una specifica **esportina**, o **recettore di esportazione nucleare**, presente nel nucleo e chiamata esportina 1, forma inizialmente un complesso con Ran-GTP e poi si lega alla sequenza NES in una proteina di carico. Il legame dell'esportina 1 a Ran-GTP causa un cambiamento conformazionale nell'esportina 1 che aumenta la sua affinità per NES in modo da formare un **complesso di carico trimolecolare**. Analo-



**Figura 13.36**  
**Esportazione nucleare Ran-dipendente e Ran-indipendente.**

(a) Meccanismo Ran-dipendente per l'esportazione nucleare di proteine di carico dotate di un segnale di esportazione nucleare (NES) ricco di leucina. Nel nucleoplasma, la proteina esportina 1 stabilisce un legame cooperativo con il NES della proteina di carico che deve essere trasportata e con Ran-GTP. Dopo che questo complesso di carico si è diffuso attraverso un NPC mediante interazioni transitorie con le ripetizioni FG delle nucleoporine-FG, la Ran-GAP associata ai filamenti citoplasmatici dell'NPC stimola la conversione di Ran-GTP a Ran-GDP. Il conseguente cambiamento conformazionale di Ran causa la dissociazione del complesso. La proteina di carico dotata di NES viene liberata nel citosol, mentre l'esportina 1 e Ran-GDP sono riportate indietro nel nucleo attraverso gli NPC. Nel citoplasma poi Ran-GEF stimola la conversione di Ran-GDP a Ran-GTP.

(b) Esportazione nucleare di mRNA Ran-indipendente. Nel nucleo, il complesso eterodimerico TAP/Nxt1 si lega ai complessi mRNA-proteina (mRNP). L'associazione di TAP/Nxt1 con componenti dell'NPC dirigono la proteina associata all'mRNP verso il canale centrale del poro. Si ritiene che una RNA elicasi (Dbp5) localizzata sul lato citoplasmatico dell'NPC fornisca la forza motrice (generata per idrolisi) per spostare l'mRNP attraverso il poro. L'elicasi libera anche l'mRNA dalle proteine TAP e Nxt1, che vengono riportate nel nucleo attraverso il processo Ran-dipendente descritto nella Figura 13.35.



gamente alle importine, l'esportina 1 interagisce transitoriamente con le ripetizioni-FG nelle nucleoporine-FG e diffonde attraverso l'NPC. Il complesso di carico si dissocia quando incontra la Ran-GAP nei filamenti citoplasmatici dell'NPC, che induce la Ran a idrolizzare il GTP legato, assumendo una conformazione strutturale che ha bassa affinità per l'esportina 1. L'esportina 1 rilasciata assume una conformazione che ha una bassa affinità per la NES, liberando il carico nel citosol. La direzione del processo di esportazione è determinata da questa dissociazione del carico dall'esportina 1 nel citoplasma, che stabilisce un gradiente di concentrazione del complesso di carico attraverso l'NPC che è più elevata nel nucleoplasma e più bassa nel citoplasma. L'esportina 1 e Ran•GDP sono poi trasportati indietro nel nucleo attraverso un NPC.

Confrontando questo modello di esportazione nucleare con quello di importazione nucleare schematizzato nella Figura 13.35, si apprezza una chiara differenza: Ran•GTP fa parte del complesso di carico durante l'esportazione ma non durante l'importazione. A parte questa differenza, i due processi di trasporto sono straordinariamente simili. In entrambi i processi, l'associazione di un recettore per il segnale di trasporto con Ran•GTP nel nucleoplasma causa un cambiamento conformazionale che influenza la sua affinità per il segnale di trasporto. Durante l'importazione, l'interazione causa il rilascio del carico, mentre durante l'esportazione l'interazione promuove l'associazione con il carico. Nell'esportazione e nell'importazione, la stimolazione dell'idrolisi di Ran•GTP nel citoplasma da parte di Ran-GAP determina un cambiamento conformazionale nella proteina Ran che rilascia il recettore per il segnale di trasporto. Durante l'esportazione nucleare, anche il carico viene rilasciato. Si ritiene che sia le importine sia le esportine diffondano attraverso il canale dell'NPC attraverso interazioni successive con le ripetizioni-FG nelle nucleoporine-FG. Il trasporto unidirezionale delle proteine di carico attraverso l'NPC dipende dalla localizzazione delle Ran-GAP e Ran-GEF, rispettivamente nel citoplasma e nel nucleo.

In accordo con la somiglianza funzionale delle importine e delle esportine, i due tipi di proteine di trasporto presentano una elevata omologia di sequenza e di struttura. L'intera famiglia è chiamata famiglia delle importine  $\beta$ , o **carioferine**. Sono note 14 carioferine nelle cellule di lievito e più di 20 carioferine nelle cellule di mammifero, sebbene siano stati identificati solo alcuni NES o NLS ai quali esse si legano. È interessante, tuttavia, come alcune specifiche carioferine funzionino sia come importine sia come esportine.

È stato dimostrato che un simile meccanismo a navetta esporta altre proteine di carico dal nucleo. Per esempio, l'esportina-t ha la funzione di esportare i tRNA. L'esportina-t lega i tRNA completamente maturi in un complesso con Ran•GTP che diffonde attraverso gli NPC e si dissocia quando interagisce con Ran-GAP nei filamenti citoplasmatici dell'NPC, rilasciando il tRNA nel citosol. Un processo Ran-dipendente è richiesto anche per l'esportazione nucleare delle subu-

nità ribosomiali attraverso gli NPC, una volta che la proteina e i componenti dell'RNA sono stati opportunamente assemblati nel nucleolo. Allo stesso modo, anche alcuni specifici mRNA che si associano con proteine hnRNP specifiche possono essere esportati attraverso un meccanismo Ran-dipendente.

### ■ La maggior parte degli mRNA sono esportati dal nucleo attraverso un meccanismo Ran-indipendente

Una volta che la elaborazione di un mRNA si è completata nel nucleo, esso rimane associato a specifiche proteine hnRNP in un *complesso proteico ribonucleo-proteico del messaggero*, o mRNP. Il principale trasportatore degli mRNP fuori dal nucleo è l'**esportatore di mRNP**, una proteina eterodimerica composta da una subunità maggiore chiamata *fattore di esportazione nucleare 1 (NXF1)* o TAP e una subunità minore, il *trasportatore per l'esportazione nucleare 1 (Nxt1)*. La subunità maggiore si lega agli mRNP nucleari attraverso interazioni cooperative con l'RNA e altre proteine adattatrici dell'mRNP che si associano con i pre-mRNA nascenti durante l'allungamento trascrizionale e l'elaborazione del pre-mRNA. Sembra probabile che più esportatori TAP/Nxt1 dell'mRNP legati lungo l'estensione di un mRNP medino la sua esportazione. TAP/NXT1 funziona come un carioferina nel senso che entrambe le subunità interagiscono con i domini-FG delle nucleoporine-FG, permettendo loro di diffondere attraverso il canale centrale dell'NPC. La TAP si lega reversibilmente anche alla proteina Gle2, che a sua volta si lega a una nucleoproteina del canestro nucleare, probabilmente mettendo in posizione l'mRNP per l'esportazione attraverso il poro nucleare. Per l'esportazione dell'mRNP è necessaria anche una nucleoporina nei filamenti citoplasmatici dell'NPC. Questa nucleoporina lega una RNA elicasi che si ritiene sia coinvolta nella dissociazione dell'esportatore dell'mRNP e altre proteine hnRNP dall'mRNP appena questo raggiunge il citoplasma.

Gli esportatori TAP/Nxt1 dell'mRNP non sembrano interagire con Ran, e quindi il trasporto unidirezionale dell'mRNA fuori dal nucleo richiede una fonte di energia diversa dall'idrolisi di GTP catalizzata da Ran. Appena il complesso mRNP è trasportato attraverso un NPC, le proteine ad esso associate sono scambiate con un'altra serie di proteine nel citoplasma, un processo chiamato rimodellamento dell'mRNP (Figura 13.36b). Diverse proteine mRNP nucleari si dissociano dall'mRNP prima che esso raggiunga il lato citoplasmatico dell'NPC. Queste rimangono nel nucleo, dove si legano al pre-mRNA nascente neosintetizzato. Altre proteine mRNP nucleari, compreso l'esportatore di mRNP TAP/Nxt1, sono esportate attraverso gli NPC nel citoplasma. Una volta raggiunto il lato citoplasmatico dell'NPC, esse si dissociano dall'mRNP con l'aiuto di una RNA elicasi, la Dbp5, che si associa con i filamenti citoplasmatici dell'NPC. Bisogna ricordare che le RNA elicasi utilizzano l'energia liberata dall'idrolisi di ATP per spostarsi lungo le molecole di RNA, separando le catene della doppia elica dell'RNA e dissociando i complessi RNA-proteina (Capitolo 4). Questo porta ad ipotizzare che la Dbp5, che si associa con il



lato citoplasmatico del complesso del poro nucleare, agisca come un motore alimentato da ATP per spostare i complessi di mRNP attraverso il poro nucleare.

Dopo che il rimodellamento si è completato, le proteine TAP e Nxt1 che sono state separate dall'mRNA per azione della elicasi Dbp5 sono riportate indietro nel nucleo, dove sono coinvolte nell'esportazione di un altro complesso mRNP. Di conseguenza, queste proteine mRNP nucleari fanno da spola tra nucleo e citoplasma, trasportando i complessi mRNP attraverso gli NPC (Figura 13.36b).

### ■ CONCETTI FONDAMENTALI DELLA SEZIONE 13.6

#### Trasporto all'interno e all'esterno del nucleo

► L'involucro nucleare contiene numerosi complessi del poro nucleare (NPC), strutture complesse di grandi dimensioni, costituite da più copie di 30 proteine chiamate *nucleoporine* (vedi Figura 13.32). Le nucleoporine-FG, che contengono più ripetizioni di corte sequenze idrofobiche (ripetizioni-FG), delimitano il canale trasportatore centrale e svolgono un ruolo nel trasporto di tutte le macromolecole attraverso i pori nucleari.

► Per il trasporto di macromolecole più grandi di 20-40 kDa attraverso i pori nucleari è necessario l'aiuto di proteine che interagiscono sia con le molecole trasportate sia con le ripetizioni-FG nelle nucleoporine-FG.

► Le proteine importate o esportate dal nucleo contengono una specifica sequenza amminoacidica che funziona come un segnale di localizzazione nucleare (NLS) o un segnale di esportazione nucleare (NES). Le proteine confinate nel nucleo contengono un NLS ma non un NES, mentre le proteine che fanno la spola tra il nucleo e il citoplasma contengono entrambi i segnali.

► Sono stati identificati diversi tipi di NES e NLS. Si ritiene che ogni tipo di segnale di trasporto nucleare interagisca con uno specifico recettore proteico (esportina o importina) appartenente a una famiglia di proteine omologhe definite *carioferine*.

► Una proteina di "carico" che porta un NES o un NLS trasloca attraverso i pori nucleari legata al suo recettore proteico complementare (carioferina), che interagisce anche con le nucleoporine-FG. Si ritiene che le importine e le esportine difondano attraverso il canale, riempito con una matrice idrofobica di ripetizioni-FG. Entrambi i processi di trasporto richiedono anche la partecipazione di Ran, una proteina G monomerica che assume configurazioni diverse quando è legata al GTP o al GDP.

► Dopo che un complesso di carico ha raggiunto la sua destinazione (il citoplasma durante l'esportazione e il nucleo durante l'importazione), si dissocia liberando la proteina di carico e altre componenti. Queste ultime sono poi trasportate attraverso i pori nucleari in direzione inversa per partecipare al trasporto di altre molecole di carico proteico (vedi Figure 13.35 e 13.36).

► La natura unidirezionale dell'esportazione e dell'importazione delle proteine attraverso i pori nucleari dipende dalla localizzazione del fattore di scambio dei nucleotidi guaninici di Ran (GEF) nel nucleo e della proteina di attivazione della GTPasi di Ran (GAP) nel citoplasma. L'interazione dei complessi del carico di importazione con la Ran-GTP nel nucleoplasma causa la dissociazione del complesso, liberando il carico nel nucleoplasma. (vedi Figura 13.35). I complessi del carico di esportazione si dissociano nel citoplasma quando interagiscono con Ran-GAP localizzata nei filamenti citoplasmatici dell'NPC (vedi Figura 13.36).

► La maggior parte degli mRNP sono esportati dal nucleo attraverso un esportatore di mRNP eterodimerico che interagisce con le ripetizioni-FG delle nucleoporine-FG. La direzione del trasporto (dal nucleo al citoplasma) può dipendere dall'azione di una RNA elicasi associata ai filamenti citoplasmatici dei complessi del poro nucleare.

### Prospettive future

Come abbiamo visto in questo capitolo, ora conosciamo molti aspetti dei processi di base responsabili del trasporto selettivo delle proteine nel reticolo endoplasmatico (RE), nei mitocondri, nei cloroplasti, nei perossisomi e nel nucleo. Studi biochimici e genetici, per esempio, hanno permesso di identificare le sequenze segnale *cis*-agenti responsabili dell'indirizzamento delle proteine nella membrana dell'organello appropriato e i recettori di membrana che riconoscono queste sequenze segnale. Abbiamo acquisito anche molte informazioni sui meccanismi che sono alla base della traslocazione delle proteine attraverso le membrane degli organelli e abbiamo precisato se l'energia è utilizzata per tirare o spingere le proteine in una direzione attraverso la membrana, il tipo di canale attraverso il quale passano le proteine e se le proteine sono trasferite in uno stato ripiegato o non ripiegato. Ciononostante, molte domande fondamentali relative a queste problematiche rimangono ancora senza risposta, compreso come le proteine completamente ripiegate si spostino attraverso una membrana e come venga determinata la topologia delle proteine di membrana ad attraversamento multiplo.

L'apparato di importazione perossisomiale rappresenta un esempio di traslocazione di proteine ripiegate. Esso non solo è capace di traslocare proteine completamente ripiegate a cui sono legati cofattori nella matrice perossisomiale, ma può anche governare l'importazione di una grossa particella d'oro legata a un peptide segnale per il perossisoma (PTS1). Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che il meccanismo di importazione perossisomiale possa essere analogo a quello nucleare, il tipo di traslocazione post-traduzionale di proteine ripiegate meglio caratterizzato. Entrambi gli apparati di importazione perossisomiale e nucleare possono trasportare molecole ripiegate di



grandezza diversa, ed entrambi sembrano coinvolgere una componente che fa la spola tra il citosol e l'interno dell'organello: il recettore Pex5 PTS1 nel caso dell'importazione perossisomiale e il complesso Ran-importina per l'importazione nucleare. Tuttavia, nonostante queste analogie, sembra che tra i due processi di traslocazione ci siano differenze sostanziali. Per esempio, nella membrana nucleare sono presenti pori costituiti da grossi aggregati macromolecolari stabili, facilmente osservabili al microscopio elettronico, mentre nella membrana perossisomiale non sono state osservate strutture analoghe. Attraverso i pori nucleari, inoltre, possono passare facilmente piccole molecole, mentre le membrane perossisomiali formano una barriera permanente alla diffusione di piccole molecole idrofiliche. Nel loro complesso queste osservazioni suggeriscono che per l'importazione perossisomiale sia necessario un tipo di meccanismo di traslocazione completamente nuovo.

Anche i meccanismi evolutivamente conservati per la traslocazione delle proteine ripiegate attraverso la membrana citoplasmatica delle cellule batteriche e attraverso la membrana del tilacoide dei cloroplasti sono poco conosciuti. Una migliore conoscenza di tutti questi processi di traslocazione delle proteine ripiegate attraverso la membrana dipenderà verosimilmente dallo sviluppo futuro di sistemi di traslocazione *in vitro*, che consentiranno ai ricercatori di definire i meccanismi biochimici che governano questo processo e di identificare le strutture degli intermedi di traslocazione intrappolati.

Rispetto alle nostre conoscenze sulla traslocazione delle proteine solubili nel lume dell'RE e nella matrice mitocondriale, la comprensione di come le sequenze segnale *cis*-agenti specificano la topologia delle proteine di membrana ad attraversamento multiplo è alquanto insufficiente. Per esempio, non sappiamo come il canale di traslocazione disponga i polipeptidi che sono orientati diversamente rispetto alla membrana, né sappiamo come le sequenze polipeptidiche locali interagiscano con il canale del traslocone, sia per disporre l'orientamento degli attraversamenti di membrana sia per segnalare il passaggio laterale nel doppio strato della membrana. Una migliore conoscenza di come le sequenze amminoacidiche delle proteine di membrana possano specificare la topologia della membrana sarà fondamentale per decodificare la enorme quantità di informazioni sulla struttura delle proteine di membrana contenute all'interno delle banche dati delle sequenze genomiche.

Una conoscenza più dettagliata di tutti i processi di traslocazione dovrebbe continuare ad emergere dagli studi genetici e biochimici, sia nei lieviti sia nei mammiferi. Questi studi riveleranno senza dubbio ulteriori proteine fondamentali coinvolte nel riconoscimento delle sequenze segnale e nella traslocazione di proteine attraverso il doppio strato fosfolipidico. Infine, gli studi strutturali futuri dei canali dei trasloconi saranno verosimilmente ampliati per rivelare con risoluzione su scala atomica gli stati conformazionali che sono associati ad ogni tappa del ciclo di traslocazione.

## PAROLE CHIAVE

carioferine, 611	profilo idropatico, 583
chaperon molecolari, 576	proteina Ran, 608
complesso di carico bimolecolare, 608	risposta indotta dalle proteine non ripiegate, 591
complesso del poro nucleare (NPC), 606	sequenza di arresto del trasferimento e di ancoraggio, 579
complesso di carico trimolecolare, 611	sequenze segnale (di captazione e indirizzamento), 570
dislocazione, 591	sequenze segnale di ancoraggio, 581
dolicolo fosfato, 586	sequenze topogeniche, 578
esportina, 610	topologia di una proteina di membrana, 578
importine, 608	traslocazione cotraduzionale, 572
nucleoporine-FG, 608	traslocazione post-traduzionale, 576
oligosaccaridi <i>N</i> -legati, 585	traslocone, 574
oligosaccaridi <i>O</i> -legati, 585	
particella di riconoscimento del segnale (SRP), 573	
poro per l'importazione generale, 595	

## VERIFICA DEI CONCETTI

1. Descrivete la fonte o le fonti di energia necessarie per la traslocazione unidirezionale attraverso la membrana (a) nella traslocazione cotraduzionale nel reticolo endoplasmatico (RE), (b) nella traslocazione post-traduzionale nell'RE, (c) nella traslocazione attraverso la membrana citoplasmatica batterica e (d) e nella traslocazione nella matrice mitocondriale.
2. La traslocazione nella maggior parte degli organelli coinvolge di solito l'attività di una o più proteine citosoliche. Descrivete la funzione di base dei tre diversi fattori citosolici richiesti per la traslocazione rispettivamente nell'RE, nei mitocondri e nei perossisomi.
3. Descrivete i principi tipici impiegati per identificare le sequenze topogeniche all'interno delle proteine e come queste possono essere usate per sviluppare algoritmi informatici. In che modo l'identificazione delle sequenze topogeniche permette di prevedere come una proteina ad attraversamento multiplo si dispone nella membrana? Qual è l'importanza della disposizione delle cariche positive rispetto all'orientamento nella membrana di una sequenza segnale di ancoraggio?
4. Il reticolo endoplasmatico (RE) è un importante sito di "controllo di qualità" delle proteine neosintetizzate. Che cosa si intende per "controllo di qualità" in questo contesto? Quali proteine accessorie sono di norma coinvolte nella maturazione delle proteine neosintetizzate all'interno dell'RE? Le cellule in genere degradano le proteine prive di se-



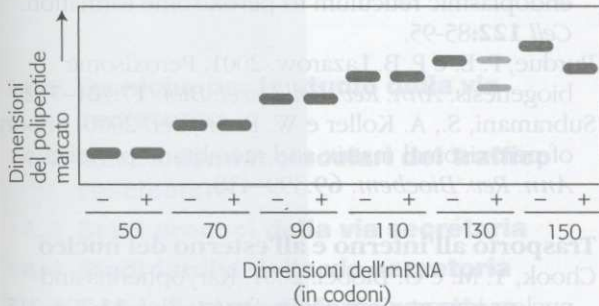
- gnali per l'uscita dall'RE. Dove si verifica tale degradazione all'interno della cellula e qual è la relazione tra la proteina del traslocone Sec61 e la p97 nel processo di degradazione?
5. Sono stati isolati lieviti mutanti sensibili alla temperatura che bloccano ognuna delle tappe enzimatiche nella sintesi del precursore del dolicolo-oligosaccaride per la glicosilazione *N*-legata (vedi Figura 13.17). Cercate di spiegare perché mutazioni che bloccano la sintesi dell'intermedio con la struttura del dolicolo-PP-(GlcNAc)<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> impediscono completamente l'aggiunta di catene oligosaccaridiche *N*-legate alle proteine secretorie, mentre mutazioni che bloccano la conversione di questo intermedio nel precursore completo, il dolicolo-PP-(GlcNAc)<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>, permettono l'aggiunta di catene oligosaccaridiche *N*-legate alle glicoproteine secretorie.
  6. Indicate quattro diverse proteine che favoriscono la modificazione e/o il ripiegamento delle proteine secretorie all'interno del lume dell'RE. Indicate quale tra queste proteine modifica covalentemente le proteine substrato e quale causa solo modificazioni conformazionali nelle proteine substrato.
  7. Dal momento che siete interessati a studiare come una particolare proteina secretoria si ripiega all'interno dell'RE, desiderate determinare se la BiP si lega alla proteina neosintetizzata negli estratti di RE. Scoprite che potete isolare un po' della proteina secretoria neosintetizzata legata alla BiP quando all'estratto cellulare viene aggiunto ADP, ma non quando viene aggiunto ATP. Spiegate questo risultato basato sul meccanismo di legame della BiP alle proteine substrato.
  8. Descrivete che cosa accadrebbe al precursore di una proteina della matrice mitocondriale nei seguenti tipi di mutazioni mitocondriali: (a) una mutazione nel recettore del segnale Tom22, (b) una mutazione nel recettore del segnale Tom70, (c) una mutazione nella Hsc70 della matrice e (d) una mutazione nella peptidasi del segnale della matrice.
  9. Descrivete le analogie e le differenze tra il meccanismo di importazione nella matrice mitocondriale e nello stroma del cloroplasto.
  10. Organizzate una serie di esperimenti con proteine chimeriche, composte da un precursore di una proteina mitocondriale fuso con la diidrofolato redattasi (DHFR), che potrebbero essere utilizzati per determinare quanta parte del precursore proteico deve emergere nella matrice mitocondriale affinché la sequenza di indirizzamento per la matrice sia rimossa dalla proteasi che elabora la matrice (vedi la Figura 13.24).
  11. L'indirizzamento delle proteine sia ai mitocondri sia ai cloroplasti coinvolge lo smistamento della proteina in più siti all'interno del rispettivo organello. Elencate brevemente questi siti. Prendendo come esempio il mitocondrio, e le proteine di antiporto ADP/ATP e il citocromo *b*<sub>2</sub> come casi specifici, indicate il grado e le differenze in cui un comune meccanismo è utilizzato per indirizzare in modo sito-specifico queste due proteine.
  12. I perossisomi contengono enzimi che usano ossigeno molecolare per ossidare vari substrati, ma nel processo si forma perossido di idrogeno che deve essere degradato. Qual è l'enzima responsabile della degradazione del perossido di idrogeno in acqua e quale meccanismo e quali proteine associate consentono la sua importazione nel perossisoma?
  13. Immaginate di aver identificato una nuova linea di cellule mutanti che mancano di perossisomi funzionali. Descrivete come potreste determinare sperimentalmente se il mutante presenta difetti prevalentemente nell'inserimento/assemblaggio delle proteine della membrana perossisomiale o delle proteine della matrice.
  14. Le prove presentate in tutto il Capitolo 13 rivelano che specifici motivi all'interno dei polipeptidi sono necessari per dirigere o indirizzare queste proteine attraverso le membrane e all'interno degli organelli. L'importazione nucleare di proteine che hanno una massa molecolare maggiore di circa 40 kDa non è diversa, ed esse devono essere attivamente importate attraverso i complessi dei pori nucleari. Come è definita la sequenza amminoacidica che permette il trasporto selettivo di complessi di carico macromolecolari all'interno del nucleo? Citate tre proteine che sono necessarie per questa importazione e descrivete brevemente come funzionano.
  15. Perché per il trasporto unidirezionale di proteine di carico contenenti un NES è necessario che Ran-GAP sia localizzata nel nucleo e Ran-GEF nel citoplasma?

### ANALISI DEI DATI

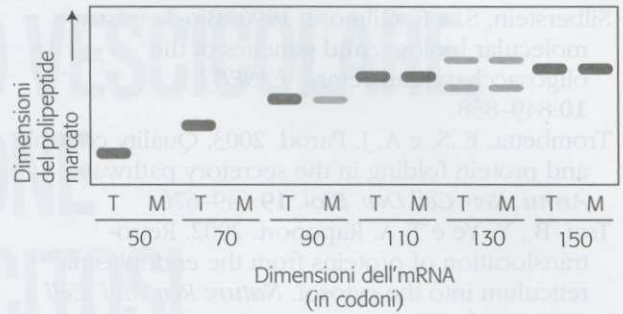
Immaginate di valutare le tappe iniziali della traslocazione e maturazione della proteina secretoria prolattina. Utilizzando un approccio sperimentale simile a quello mostrato nella Figura 13.7, si possono usare gli mRNA di prolattina troncati per controllare la lunghezza dei polipeptidi della prolattina nascente che sono sintetizzati. Quando l'mRNA della prolattina che manca di un codone di arresto della catena (codone di stop) è tradotto *in vitro*, l'estremità del polipeptide neosintetizzato che termina con l'ultimo codone incluso nell'mRNA rimarrà attaccato al ribosoma, permettendo quindi a un polipeptide di lunghezza definita di estendersi dal ribosoma. Avete generato una serie di mRNA che codificano segmenti dell'estremità N-terminale della prolattina di lunghezza crescente, e ogni mRNA può essere tradotto *in vitro* da un estratto citosolico di traduzione contenente ribosomi, tRNA, aminoacil-tRNA sintetasi, GTP e fattori di iniziazione e allungamento della traduzione. Quando nella miscela di traduzione vengono aggiunti aminoacidi marcati con isotopi radioattivi, solo il polipeptide codificato dall'mRNA aggiunto verrà marcato. Dopo il completamento della traduzione, ogni miscela del mezzo di reazione viene analizzata attraverso elettroforesi su gel di poliaccrilammide in SDS, e i polipeptidi marcati sono identificati per autoradiografia.



- a. L'autoradiogramma riprodotto sotto mostra i risultati di un esperimento nel quale ogni reazione di traduzione era effettuata sia in presenza (+) sia in assenza (-) di membrane microsomiali. Sulla base della mobilità del gel dei peptidi sintetizzati in presenza o assenza di microsomi, deducete quanto deve essere lunga la catena nascente di prolattina affinché il peptide segnale della prolattina entri nel lume dell'RE e sia tagliato dalla peptidasi del segnale. (Notate che i microsomi portano quantità significative di SRP legate debolmente alle membrane.)



- b. Data questa lunghezza, cosa potete concludere circa lo stato conformazionale del polipeptide prolattina nascente quando è tagliato dalla peptidasi del segnale? Per il conteggio possono essere utili le seguenti lunghezze: la sequenza segnale della prolattina è tagliata dopo l'amminoacido 31; il canale all'interno del ribosoma occupato da un polipeptide nascente è lungo circa 150 Å; lo spessore di un doppio strato di membrana è di circa 50 Å; nei polipeptidi con una conformazione ad  $\alpha$ -elica, ogni residuo si estende per 1,5 Å, mentre nei polipeptidi completamente distesi, un residuo si estende per circa 3,5 Å.
- c. L'esperimento è realizzato in una maniera identica a quello descritto nella parte (a) ad eccezione del fatto che le membrane microsomiali non sono presenti durante la traduzione, ma sono aggiunte dopo che la traduzione si è completata. In questo caso nessuno dei campioni mostra una differenza nella mobilità in presenza o assenza di microsomi. Cosa potete concludere sul fatto che la prolattina può essere traslocata nei microsomi isolati dopo la traduzione?
- d. In un altro esperimento, ogni reazione di traduzione era effettuata in presenza di microsomi, e poi le membrane microsomiali e i ribosomi legati erano separati dai ribosomi liberi e dalle proteine solubili per centrifugazione. Per ogni reazione di traduzione, sia la reazione totale (T) sia la frazione di membrana (M) erano separate in corsie di gel adiacenti. Sulla base delle quantità di polipeptide marcato nelle frazioni di membrana nell'autoradiogramma mostrato in alto a destra, deducete quanto lunga deve essere la catena nascente della prolattina affinché i ribosomi coinvolti nella traduzione reclutino la SRP e così risultino legati alle membrane microsomiali.



## BIBLIOGRAFIA

### Traslocazione delle proteine secretorie attraverso la membrana dell'RE

Egea, P. F., R. M. Stroud e P. Walter. 2005. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:213–220.

Osborne, A. R., T. A. Rapoport e B. van den Berg. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:529–550.

Wickner, W. e R. Schekman. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**:1452–1456.

### Inserimento delle proteine nella membrana dell'RE

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* **62**:121–138.

Goder, V. e M. Spiess. 2001. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* **504**:87–93.

Mothes, W., et al. 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**:523–533.

von Heijne, G. 1999. Recent advances in the understanding of membrane protein assembly and structure. *Q. Rev. Biophys.* **32**:285–307.

### Modificazioni, ripiegamento e controllo di qualità delle proteine nell'RE

Helenius, A. e M. Aebi. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:1019–1049.

Kornfeld, R. e S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **45**:631–664.

Patil, C. e P. Walter. 2001. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:349–355.

Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch e T. Sommer. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biol.* **7**:766–772.

Sevier, C. S. e C. A. Kaiser. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:836–847.



- Silberstein, S. e R. Gilmore. 1996. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* **10**:849–858.
- Trombetta, E. S. e A. J. Parod. 2003. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**:649–676.
- Tsai, B., Y. Ye e T. A. Rapoport. 2002. Retrotranslocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:246–255.

### Smistamento delle proteine ai mitocondri e ai cloroplasti

- Koehler, C. M. 2004. New developments in mitochondrial assembly. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:309–335.
- Dolezal, P., V. Likic, J. Tachezy e T. Lithgow. 2006. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**:314–318.
- Dalbey, R. E. e A. Kuhn. 2000. Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **16**:51–87.
- Matouschek, A., N. Pfanner e W. Voos. 2000. Protein unfolding by mitochondria: the Hsp70 import motor. *EMBO Rept.* **1**:404–410.
- Neupert, W. e M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:555–565.
- Rapaport, D. 2005. How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J. Cell Biol.* **171**:419–423.
- Robinson, C. e A. Bolhuis. 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:350–356.
- Soll, J. e E. Schleiff. 2003. Protein import into chloroplasts. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:198–208.
- Truscott, K. N., K. Brandner e N. Pfanner. 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* **13**:R326–R337.

### Smistamento delle proteine perossisomiali

- Dammai, V. e S. Subramani. 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* **105**:187–196.
- Gould, S. J. e C. S. Collins. 2002. Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:382–389.
- Gould, S. J. e D. Valle. 2000. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet.* **16**:340–345.
- Hoepfner, D., D. Schildknecht, I. Braakman, P. Philippsen e H. F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**:85–95.
- Purdue, P. E. e P. B. Lazarow. 2001. Peroxisome biogenesis. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **17**:701–752.
- Subramani, S., A. Koller e W. B. Snyder. 2000. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **69**:399–418.

### Trasporto all'interno e all'esterno del nucleo

- Chook, Y. M. e G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:703–715.
- Cole, C. N. e J. J. Scarcelli. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:299–306.
- Johnson, A. W., E. Lund e J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* **27**:580–585.
- Ribbeck, K. e D. Gorlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20**:1320–1330.
- Rout, M. P. e J. D. Aitchison. 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* **276**:16593–16596.
- Schwartz, T. U. 2005. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:221–226.
- Suntharalingam, M. e S. R. Wentz. 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell.* **4**:775–789.