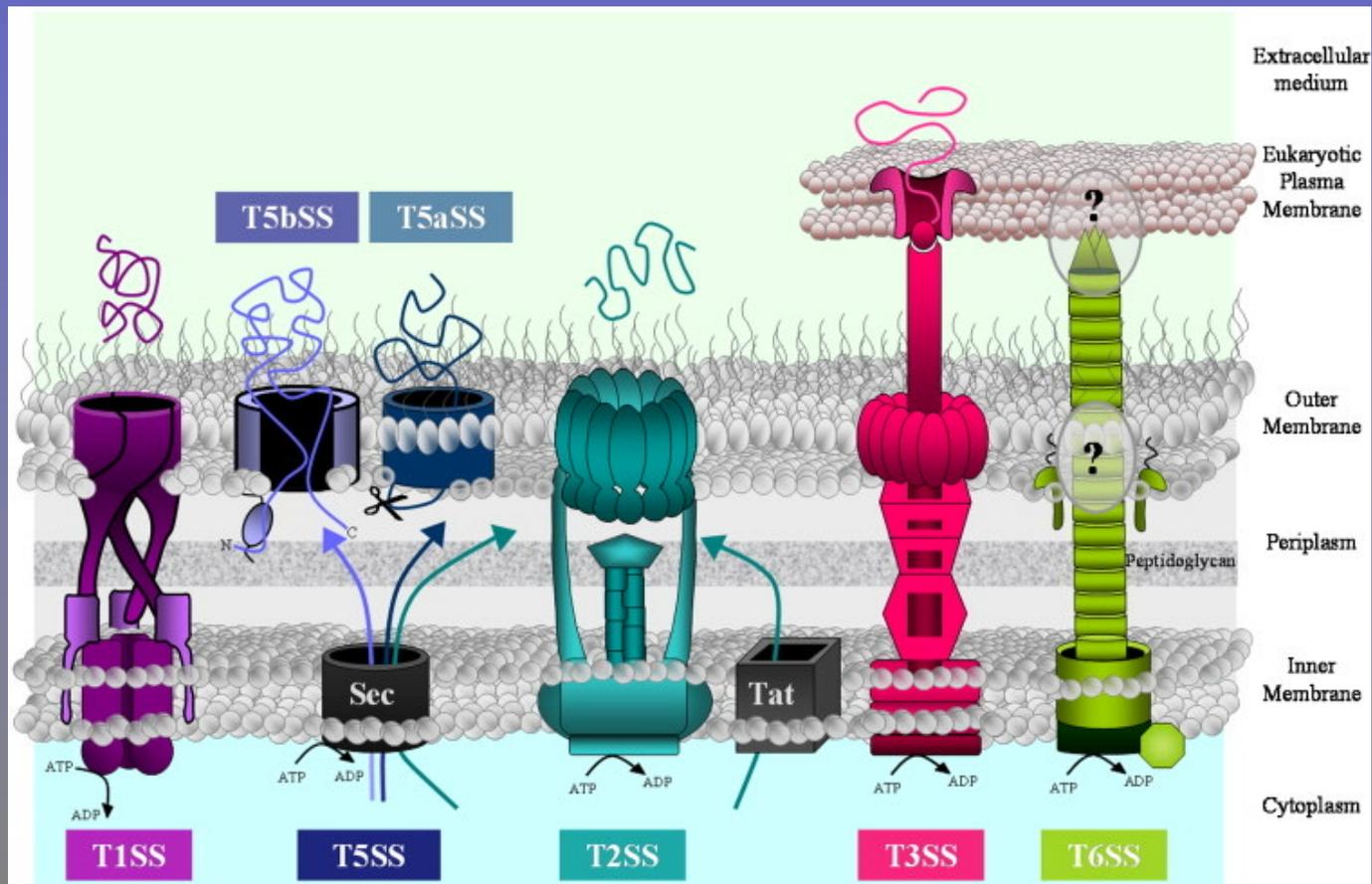


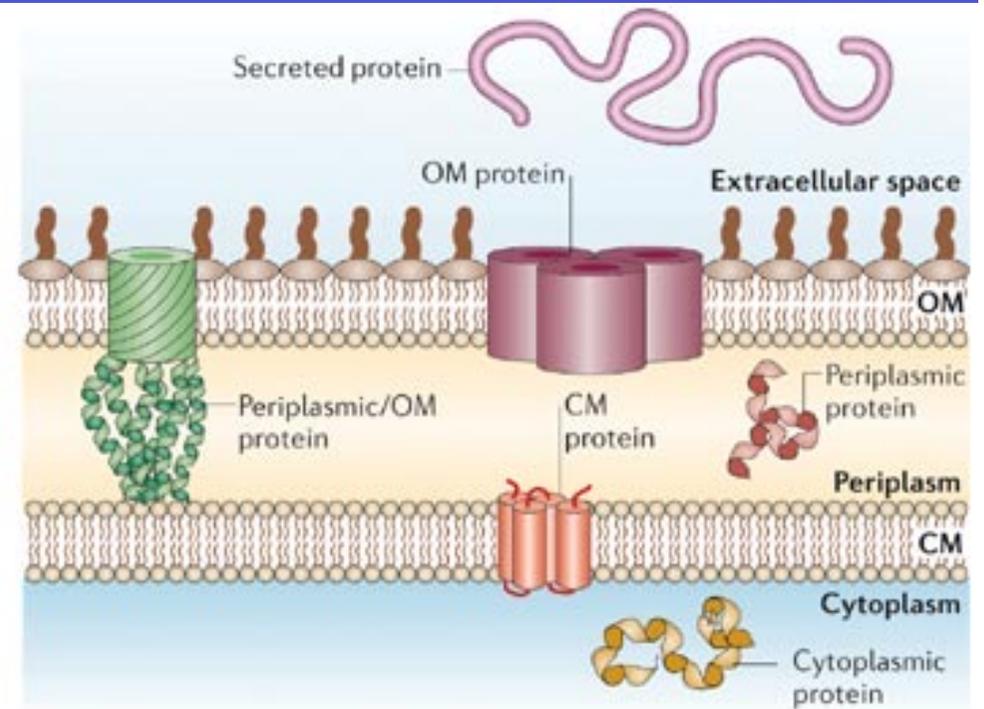
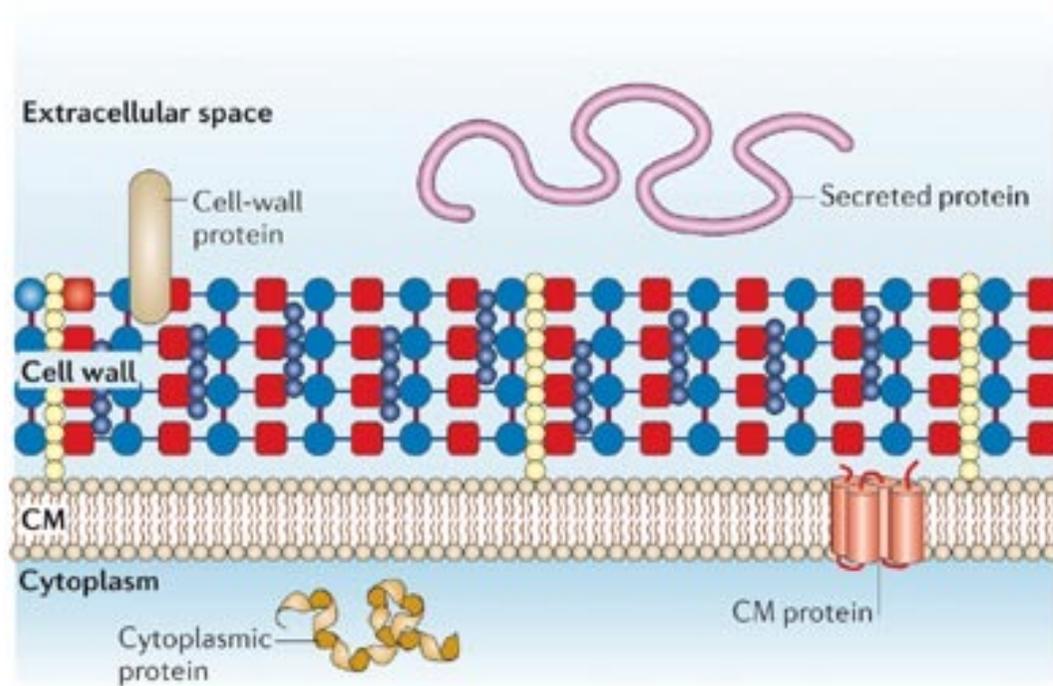
# Lezione di Microbiologia e Virologia

## I sistemi di secrezione (1)



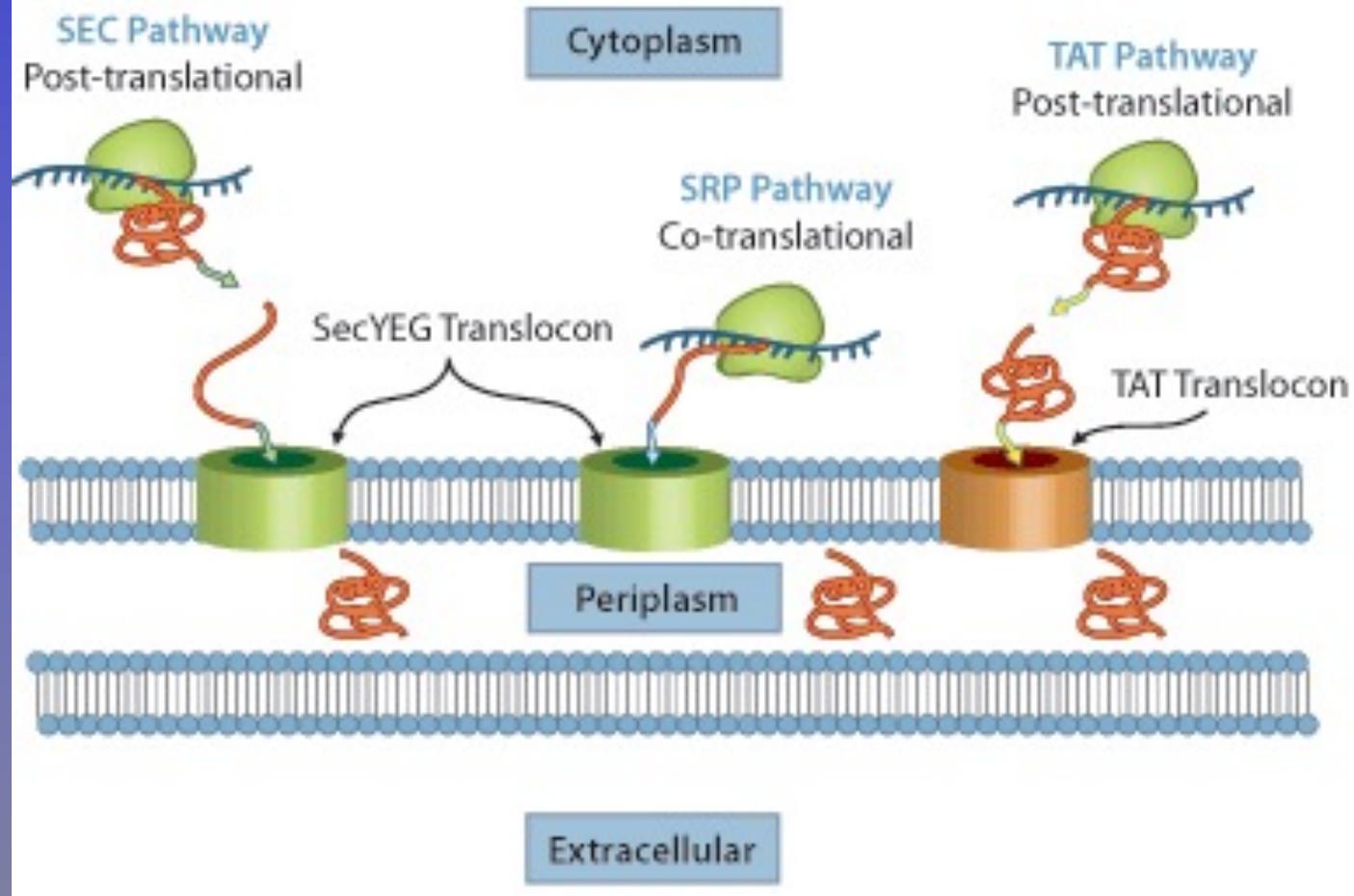
# I SISTEMI DI SECREZIONE

- Gli enzimi extracellulari, le strutture proteinacee che costituiranno le appendici sulla superficie della cellula, le proteine associate alla membrana citoplasmatica e quelle al peptidoglicano sono tutte proteine che devono essere esportate al di là della membrana citoplasmatica.
- Nei gram-negativi tutte questi polipeptidi devono oltrepassare diversi compartimenti prima di raggiungere il sito dove svolgere la loro attività biologica.
- Affinchè questo avvenga le cellule batteriche sono dotate di sistemi di secrezione che guidano i polipeptidi in questo percorso.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
 Nature Reviews | Microbiology

# Protein Secretion Pathways



# IL SISTEMA SEC

I polipeptidi che vengono trasportati tramite il sistema Sec hanno una caratteristica sequenza-segnale alla estremità N-terminale, chiamata anche peptide-leader, che è assente nella proteina matura.

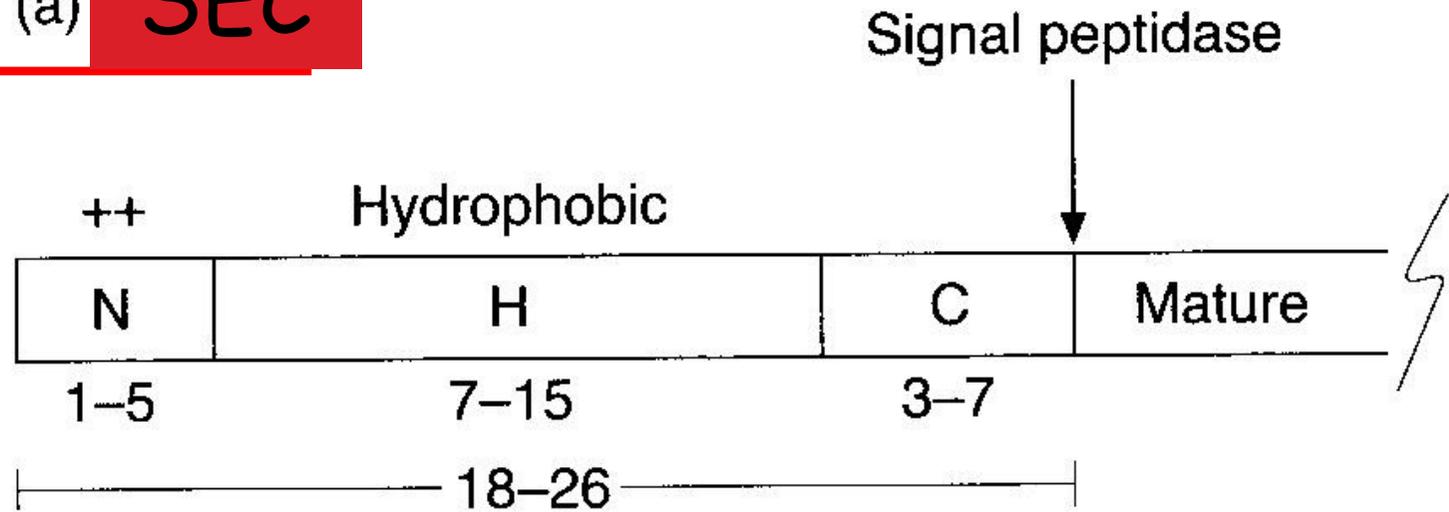
Questa sequenza è costituita da 18-26 aa come un modulo  
Costituito da differenti sottodomini.

La porzione idrofobica centrale è importante in quanto  
Contiene il sito di taglio da parte della peptidasi-segnale.

Solo per alcune proteine periplasmatiche la sequenza-segnale è assente e questo significa che la sequenza della proteina matura ha di per sé tutte le informazioni necessarie al trasporto.

Il sistema Sec è costituito da un complesso di translocazione e da uno o più chaperones.

(a) SEC





## Il complesso di traslocazione

- Il traslocone Sec contiene almeno 5 proteine integrali di membrana, **SecD**, **SecE**, **SecF**, **SecG** e **SecY**.
- **SecA** è una proteina periferica di membrana che si lega come omodimero al traslocone **SecD**, **SecE**, **SecF**, **SecG** e **SecY**.
- Il secretone in senso stretto viene indicato come **SecYEG**
- **SecB** è il componente citoplasmatico del sistema che si lega come tetramero ai pre-polipeptidi da esportare e li mantiene in uno stato “unfolded” compatibile con la traslocazione attraverso la MC.

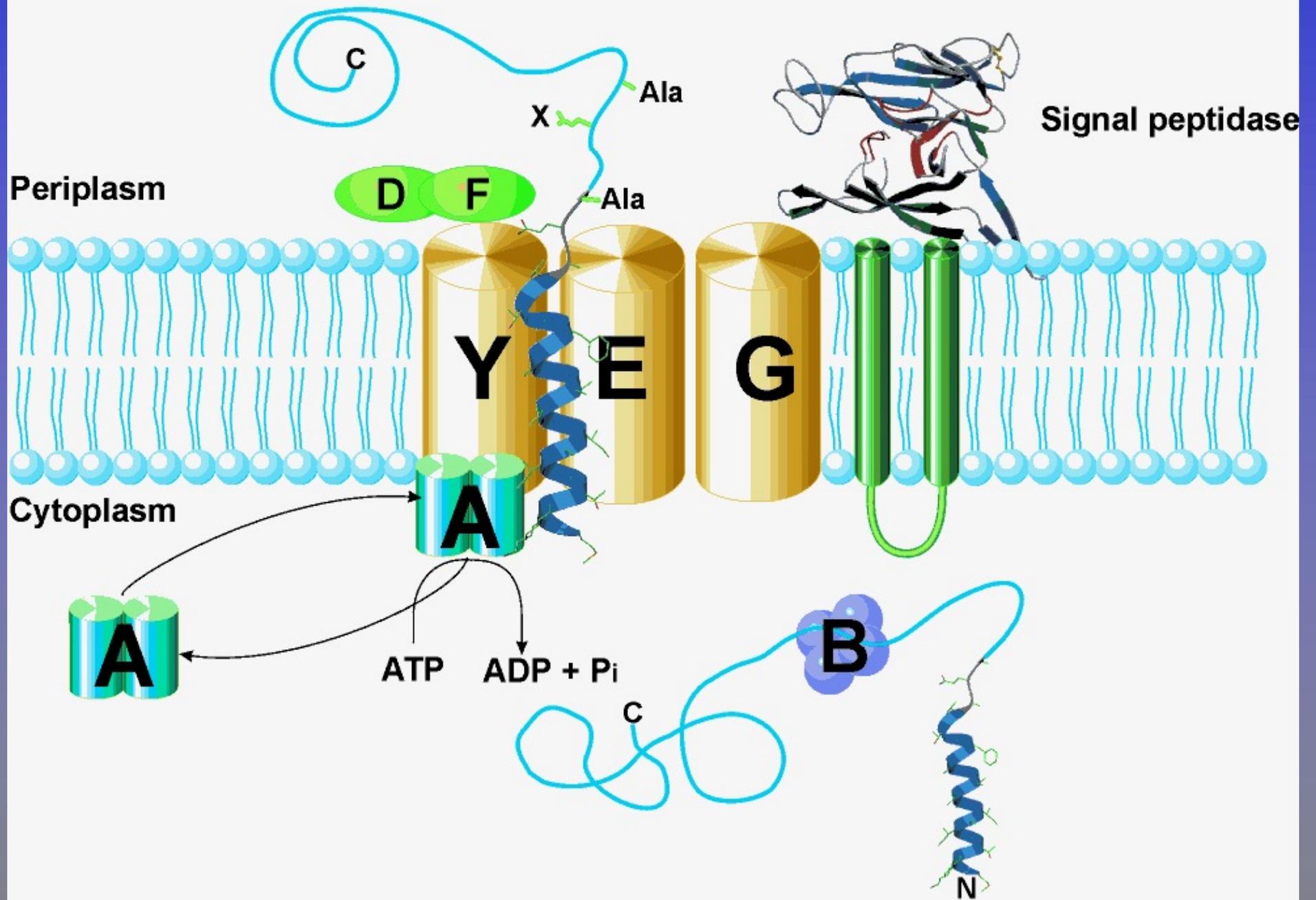
## Come funziona il processo di traslocazione

SecB interagisce con una regione di circa 180 aa della proteina da traslocare e la trasporta su secA.

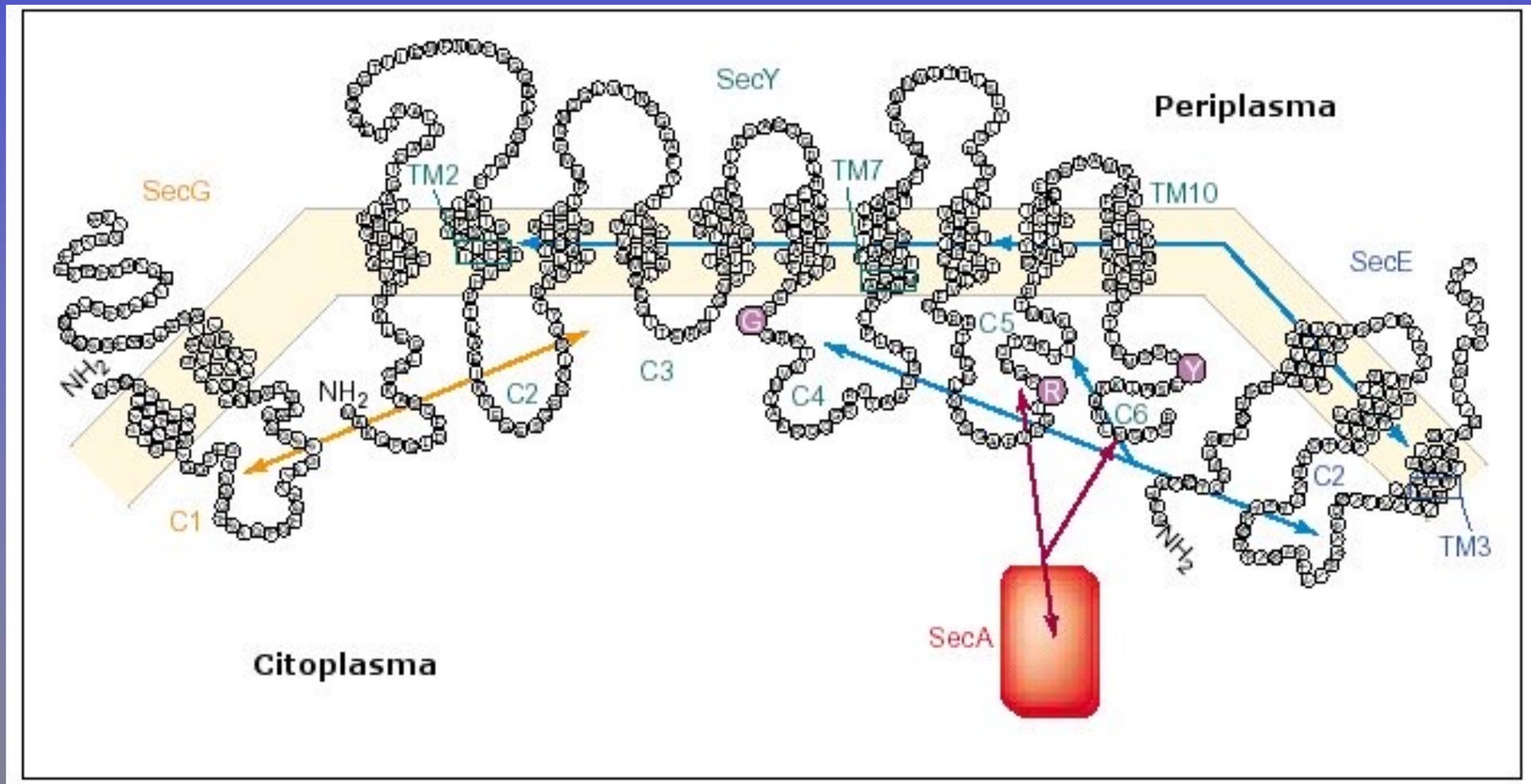
Il processo funziona in differenti fasi in cui SecA trasloca circa 2,5 kDa alla volta.

Il ruolo di SecD e SecF potrebbe essere quello di tenere aperto il passaggio nella MC e garantire la fuoriuscita del pre-polipeptide che sarà poi processato in peptide.

# Sec Dependent Bacterial Protein Secretion System

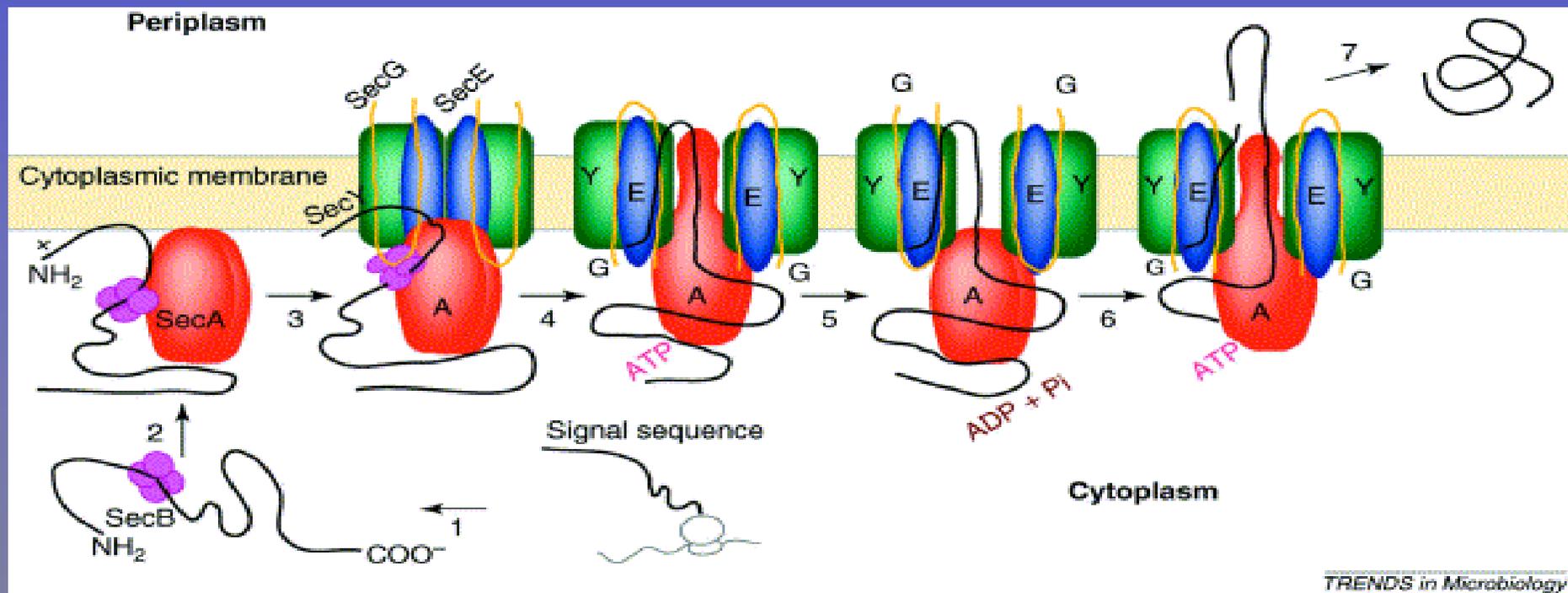


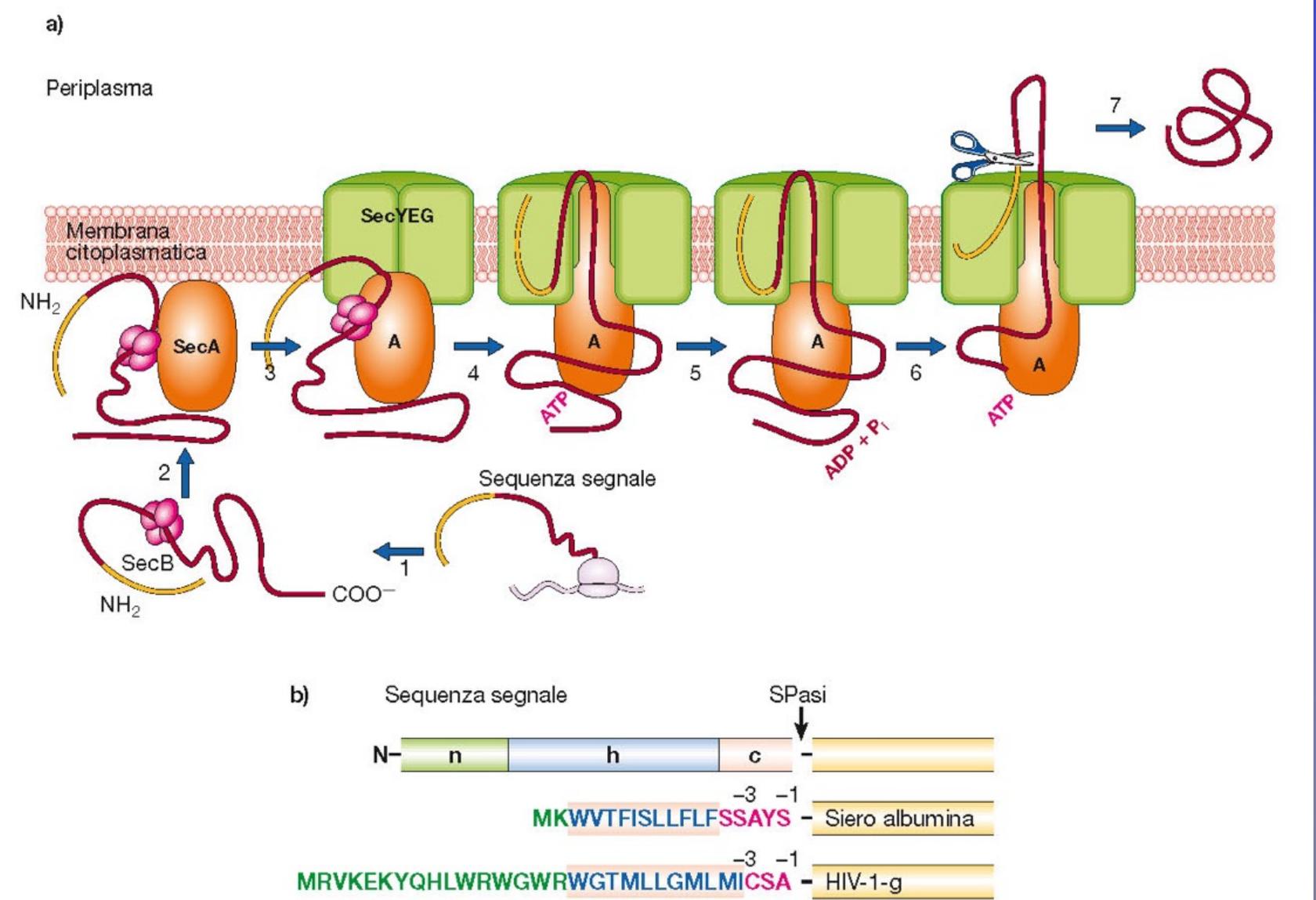
# La topologia nella membrana



Il canale ha lato di 10,5 nm e una cavità centrale di circa 5 nm

# Il sistema SEC





# IL SISTEMA SRP

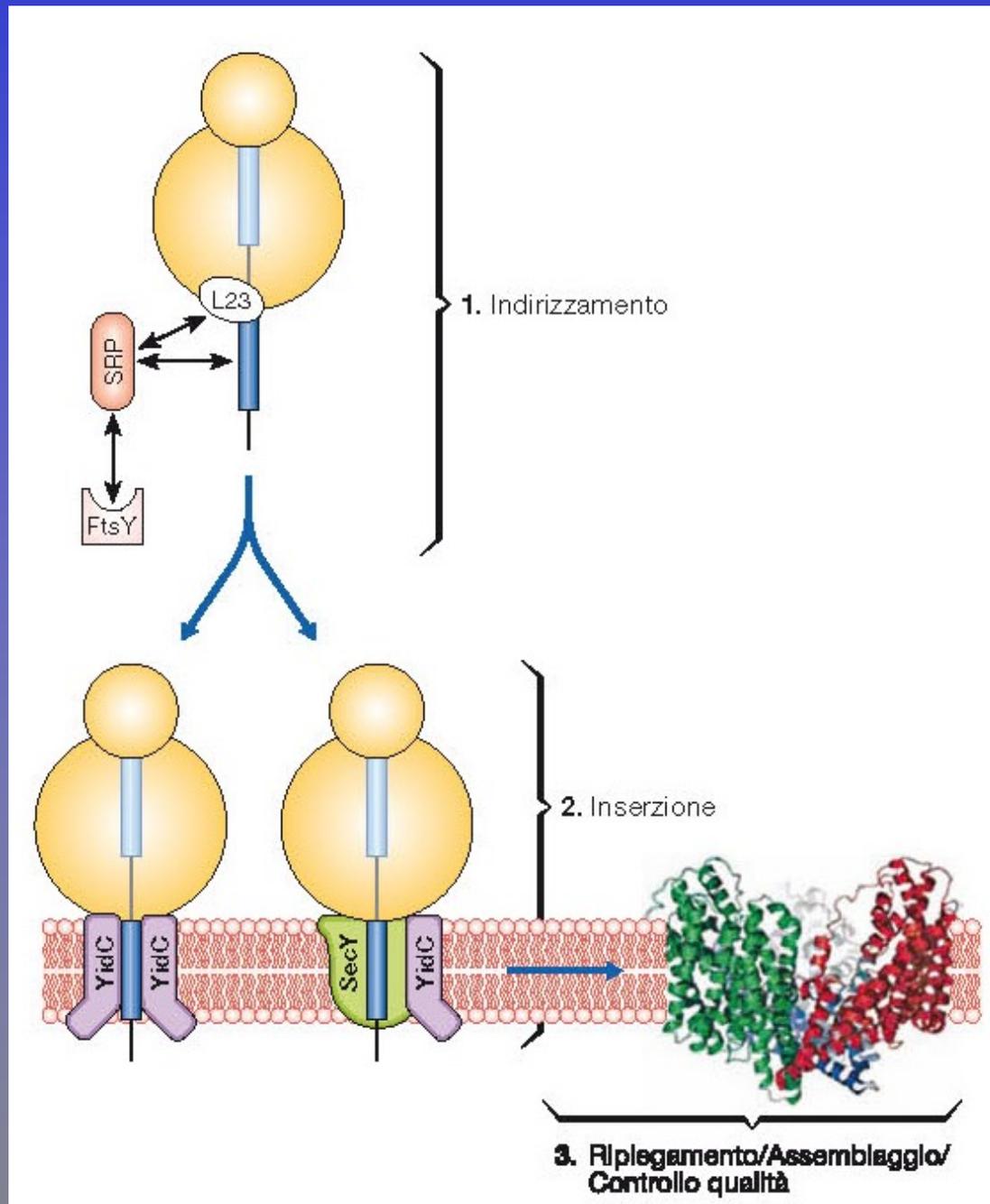
In analogia con il sistema SRP eucariotico- composto dall' RNA 7S e da 6 differenti polipeptidi- che riconosce e guida i peptidi-segnali in *Escherichia coli* un sistema SRP comprende un RNA 4,5S **FtsY** (una GTPase di 48 Kda omologa a al SRP54 degli eucarioti) e **Ffh** (omologa al recettore del SRP-subunità alfa-degli eucarioti).

La differenza con il sistema Sec è che in questo caso il complesso SRP ed in particolare la proteina **Ffh** interagisce con il pre-polipeptide-da 70 a 150 aa-*durante* la traduzione.

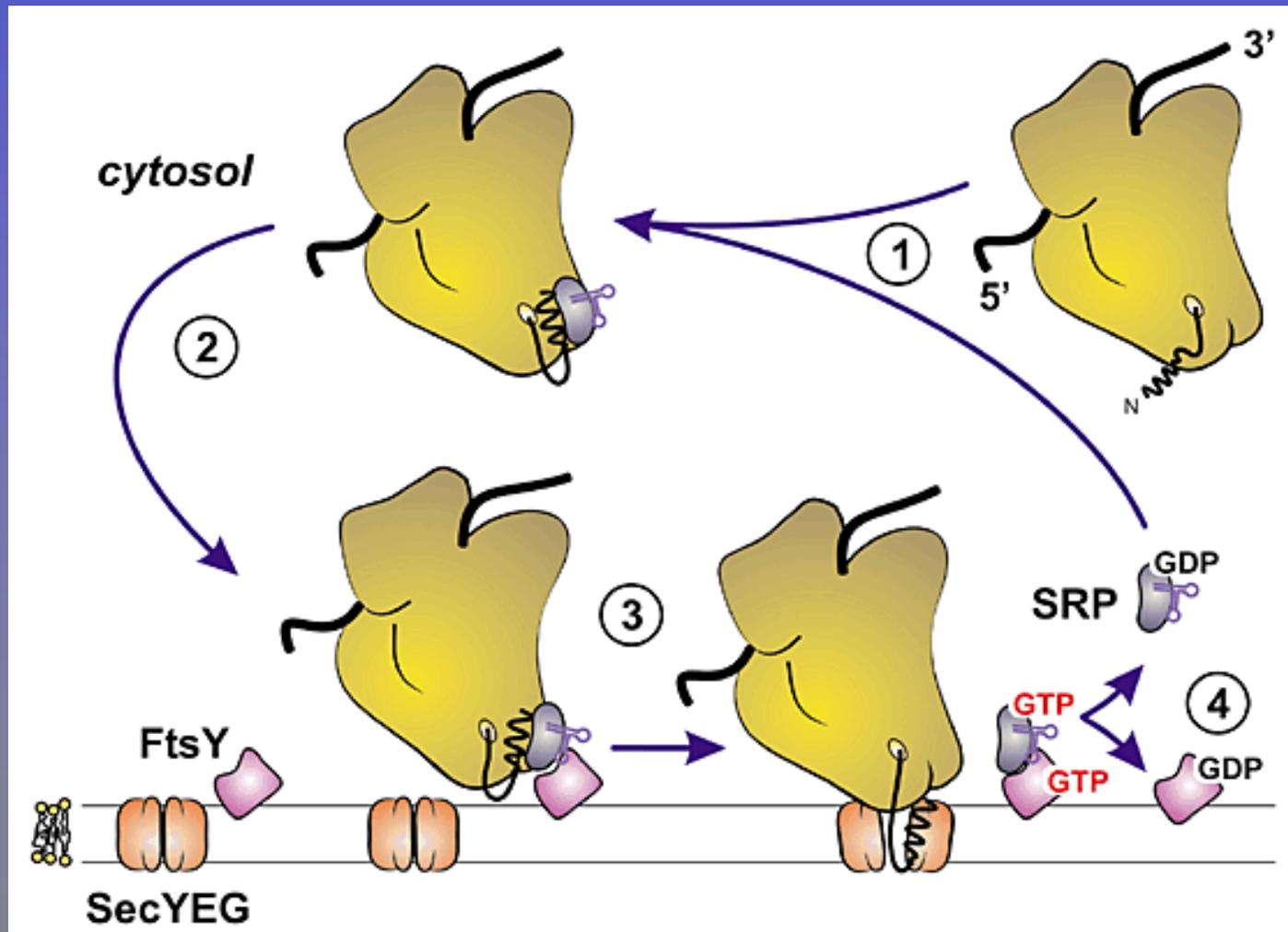
Questa sequenza è caratterizzata da aa idrofobi.

Questa interazione blocca la traduzione che riprenderà dopo l'associazione del complesso proteina-nascente PRP con la proteina **FtsY** legata alla membrana. Questa interazione rilascia il complesso **SRP** dalla proteina, la traduzione continua e man mano il polipeptide si associa al sistema Sec e viene trasportato.

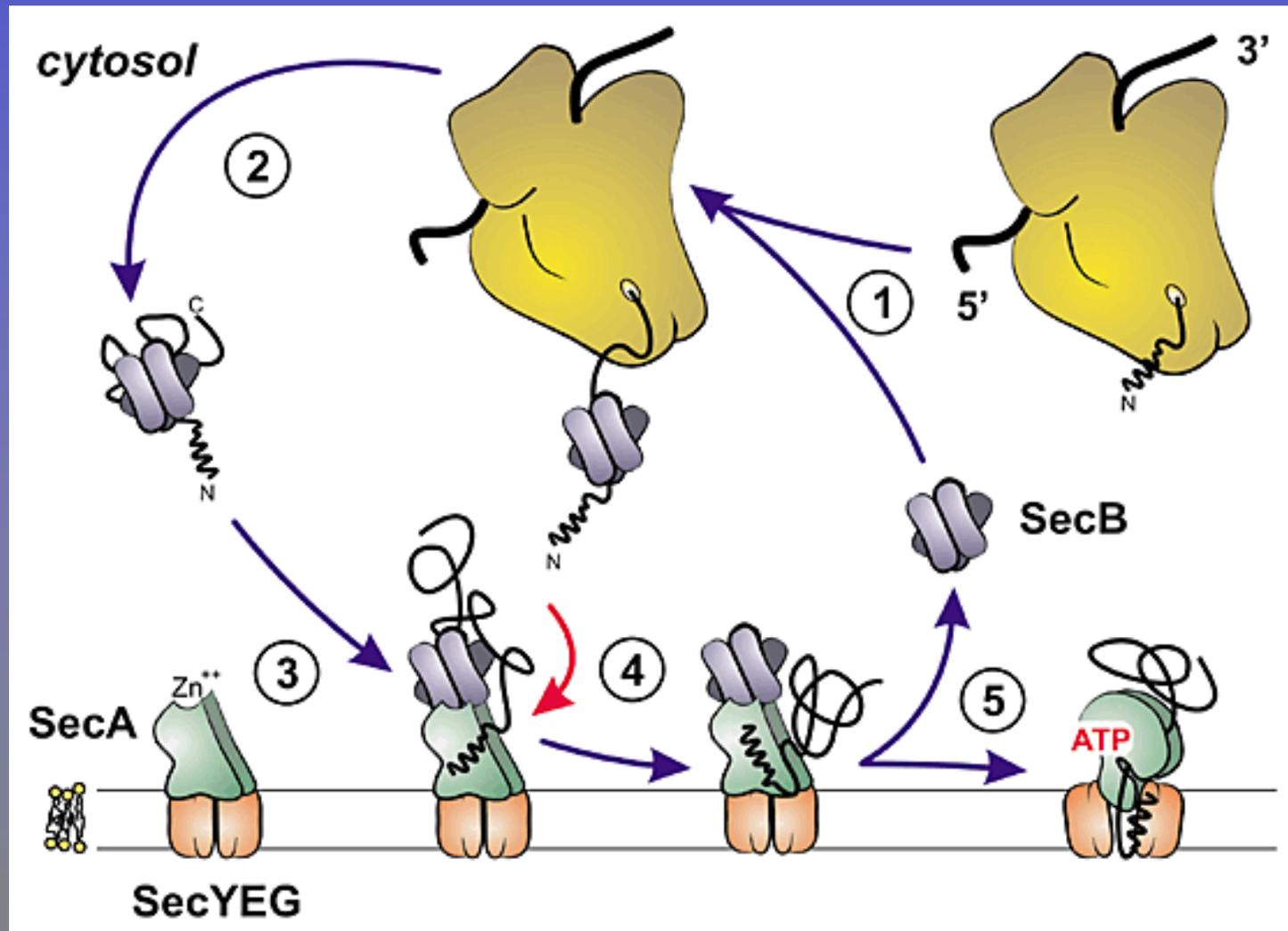
Questo sistema è prevalentemente usato per il posizionamento nelle membrane delle proteine integrali di membrana

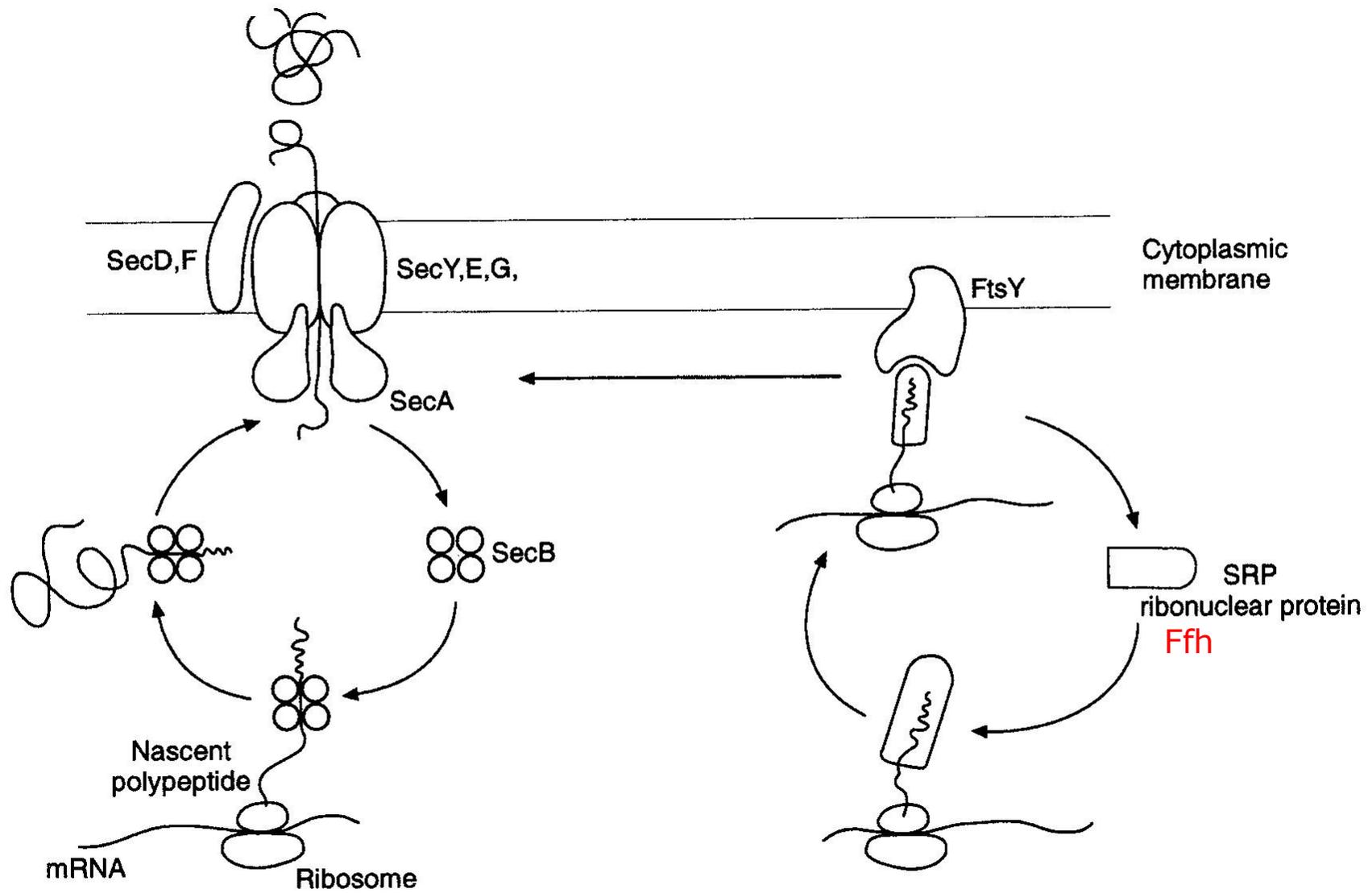


# Il sistema SRP



# Il sistema SRP-SEC





## IL SISTEMA TAT E ALTRO....

Il sistema Tat-twin-arginine translocation agisce su quelle proteine che hanno un caratteristico motivo aminoacidico che include almeno due residui contigui di arginina nella sequenza segnale. Questo rende la sequenza segnale meno riconoscibile dal sistema Sec. Queste proteine sono capaci di un ripiegamento “corretto”.

- Il sistema TAT è stato identificato nei *Bacteria*, *Archea* e negli organelli delle cellule eucariotiche, mitocondri e cloroplasti.
- Nei cloroplasti il sistema TAT agisce nella membrana dei tilacoidi.

Questo sistema si occupa specificamente di proteine che si legano ad altri partners per formare complessi che vengono poi traslocati.

In *E.coli* più di 30 polipeptidi vengono traslocati dal sistema Tat che consta di 4 proteine integrali di membrana: TatA, B, C ed E. i.

*E. coli*

DmsA	MKTKIPDAVLAAEVSRRLVKTAAIGGLAMASSALTLPFSRIAHA	DMSO reductase
FdnG	MDVSRROFFKICAGGMAGTTVAALGFAPKQALA	Formate dehydrogenase
FdoG	MQVSRROFFKICAGGMAGTTAAALGFAPSVALA	Formate dehydrogenase
HyaA	MNNEETFYQAMRRQGVTRRSFLKYCSLAATSLGLGAGMAPKIAWA	Hydrogenase-1, small subunit
HybA	MNRRNPIKAASCAGALLTGALPSVSHA	Hydrogenase-2, small subunit
NapA	MKLSRRSFMKANAVAAAAAAGLSVPGVARA	Nitrate reductase
NrfC	MTWSRRQFLTGVGVLAAVSGTAGRVVA	Nitrite reductase
PccA	MLLKTSRRTFLKGLTLGSGVAGSLGVWSFNARS	Copper resistance protein
SufI	MSLSRRQFIQASGIALCAGAVPLKASA	Suppressor of <i>ftsI</i> mutant
TorA	MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATAAQA	TMAO reductase
YnfE	MSKNERMVGISRRTLVKSTAIGSLALAAGGFSLPPTLRNAAA	DMSO reductase
YnfF	MKIHTTREALMKAEISRRSLMKTSALGSLALASSAFTLPFSQMVRA	DMSO reductase

*Halobacterium* sp. NRC-1

Aph	MPTPHTTESPSVDRRTFLAGLSGAVAGGAVA	Alkaline phosphatase
Chi	MPHRRSYLRTSSAVIASLLAASPTPTSA	Chitinase
DmsA	MSDIDLNATRRDVLKSGAVAAVGLSGGGLLST	DMSO reductase
HcpB	MTRLDDTALSRRGVLRAAAGTATAVAAGTAATGAAAAQA	Halocyanin-like protein
HcpD	MTDSDSAVTRRRVLOGSAGAGAAAAGIGGFAAGGAAQS	Halocyanin-like protein
Hly	MADNTNVTRRSPLTATGAAAGSVLVGVSA	Halolysin
Sub	MRQTRRTFMKTA AAAIGGLSATTQPVTA	Subtilisin
Vng0818	MPHRRSYLRTSSAVIASLLAASPTPTSA	Chitinase
Vng0819	MNRRTYIQGALTVGALLGASASATAA	Chitin-binding protein
BasB	MHSTTRREWLGAI GATAATGLAG	Amino acid BP (put. lipoprotein)
HtrA	MPSRRDVLRLGAGVLAAGTAG	Protease (put. lipoprotein)
PhoX	MPADDAERTTRTRRQVLGAGMGTGAALAG	Phosphate BP (put. Lipoprotein)
Thb	MTSRRRFVAAVGSATAASLGLAG	Thiamin BP (put. Lipoprotein)

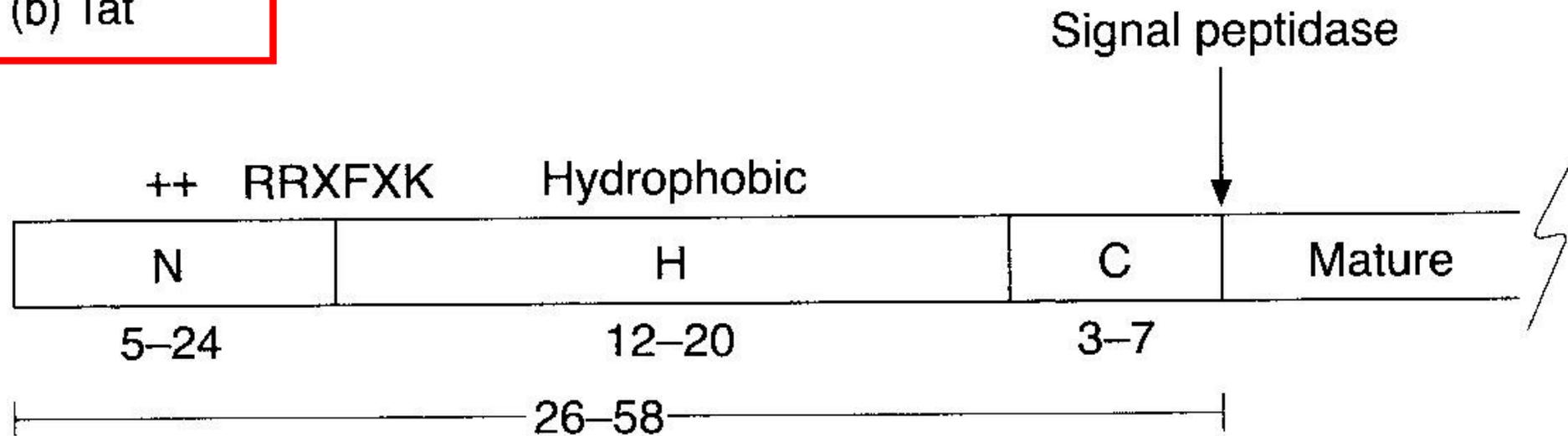
*Synechocystis*

sll1306	MQRRDLFKYGLATGAGAIASYALMGNKPLLA	Hypothetical protein
slr0447	MTNPFGRKFLLYGSATLIGASLLLLKA	Amidase regulator
sll1314	MKHSRRNPLALAGASSLLAIAAPKLLA	c4-dicarboxylate binding protein
slr2005	MKRRKFIRTAGAGLLAVAGVQIGDRLRPATAQA	Hypothetical protein
sll0051	MAKIPTIDRRQLIQYGGAF LGTSLMATILGNQMAGNPAAQA	Carbonic anhydrase
sll1358	MVNSVIGWLRRLRFLVGLSVLLITFLGIFTPTIA	Oxalate decarboxylase

*Higher plant chloroplast*

--NVLNSGVSRRLALTVLIGAAVGSKVSPADA	Spinach PsbP
--SDAAVVTSRRAALSLLAGAAATAVKVS PAAA	Wheat PsbP
--GDAVAQAGRRRAVIGLVATGIVGGALSQAARA	Maize PsbQ
--AQQSEETSRRSVIGLVAAGLAGGSFVQAVLA	Arabidopsis PsbQ1
--NVSVPBSSRRSVIGLVAAGLAGGSFVKAVFA	Arabidopsis PsbQ2
--VQVAPAKDRRSALLGLAAVFAATAASAGSARA	Barley PsaN
--RKTEGNNGRREMMFAAAAAICSVAGVATA	Cotton PsbT
--KEQSSTTWRRDLMFTA AAAAVCSLAKVAMA	Arabidopsis PsbT
--QDETNSVDRNVLGLGLGYVANAIPLAASA	Tomato polyphenol oxidase
--SGESLAFHRRDVLKLAGTAVGMELIGNGFINNVGDAKA	Arabidopsis P29
--SSSLSFSRRELLYQSAAVLSLSSIVGPARA	Arabidopsis Hcf136
--TSSSLLWKRRELSLGFMSLVAIGLVSNDRRRHDANA	Arabidopsis P16

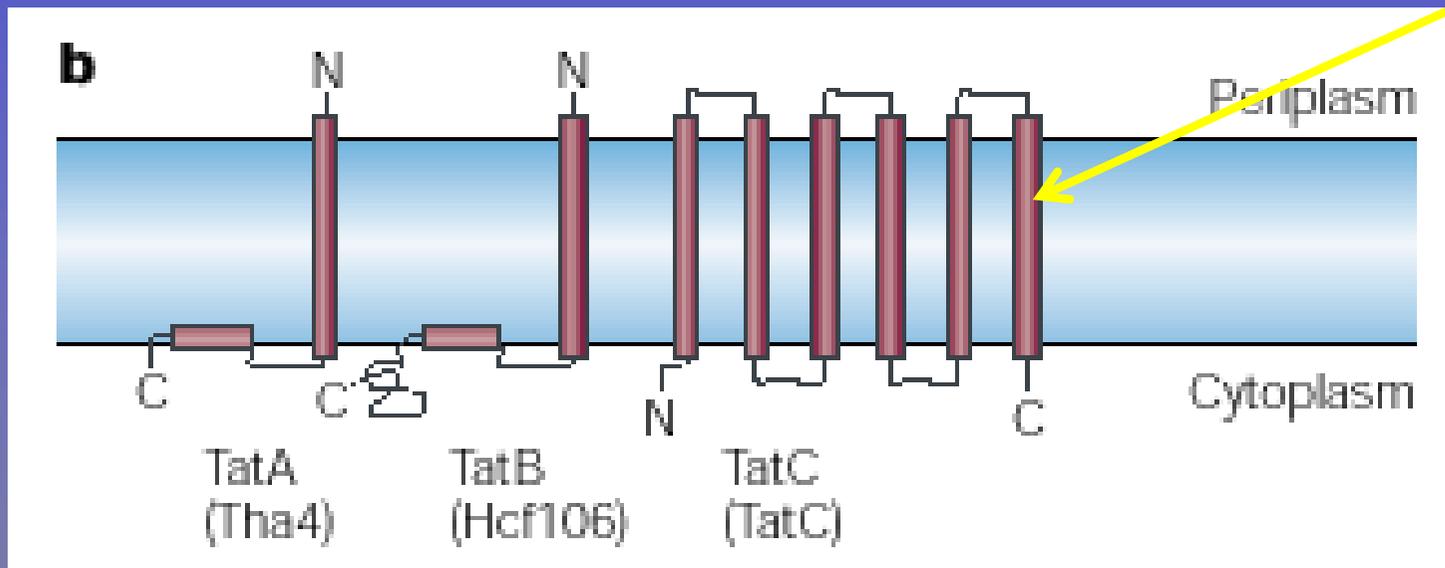
(b) Tat



Le proteine indirizzate al sistema TAT hanno una sequenza consenso Ser/Thr-Arg-Arg-X-Phe-Leu-Lys. X è un aa polare.

- In *E.coli* solo il 10% delle proteine esportate utilizza il sistema TAT, mentre in *Halobacterium* circa il 90% delle proteine secrete utilizza TAT.
- In *E. coli* le proteine TAT sono spesso proteine di MI o sono proteine implicate nel processo di respirazione o di ossido-riduzione, associate a cofattori.

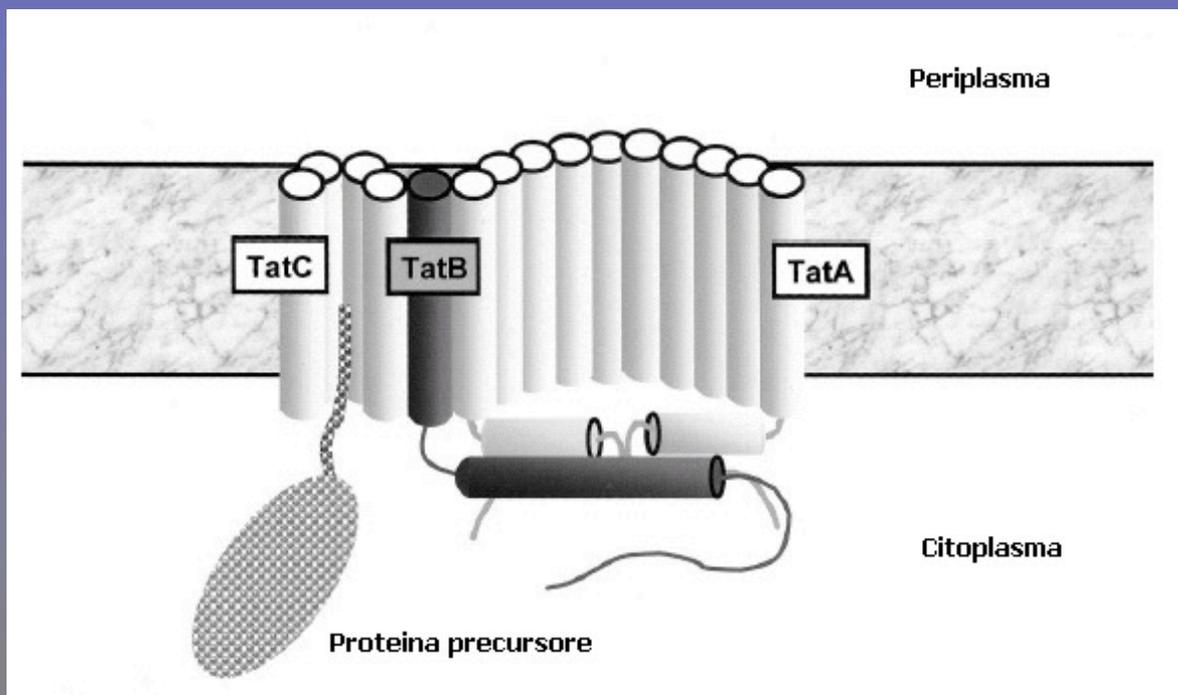
## Il sistema TAT



La proteina TatC mostra sei domini transmembranari, mentre le estremità C- e N- sporgono nel citoplasma.

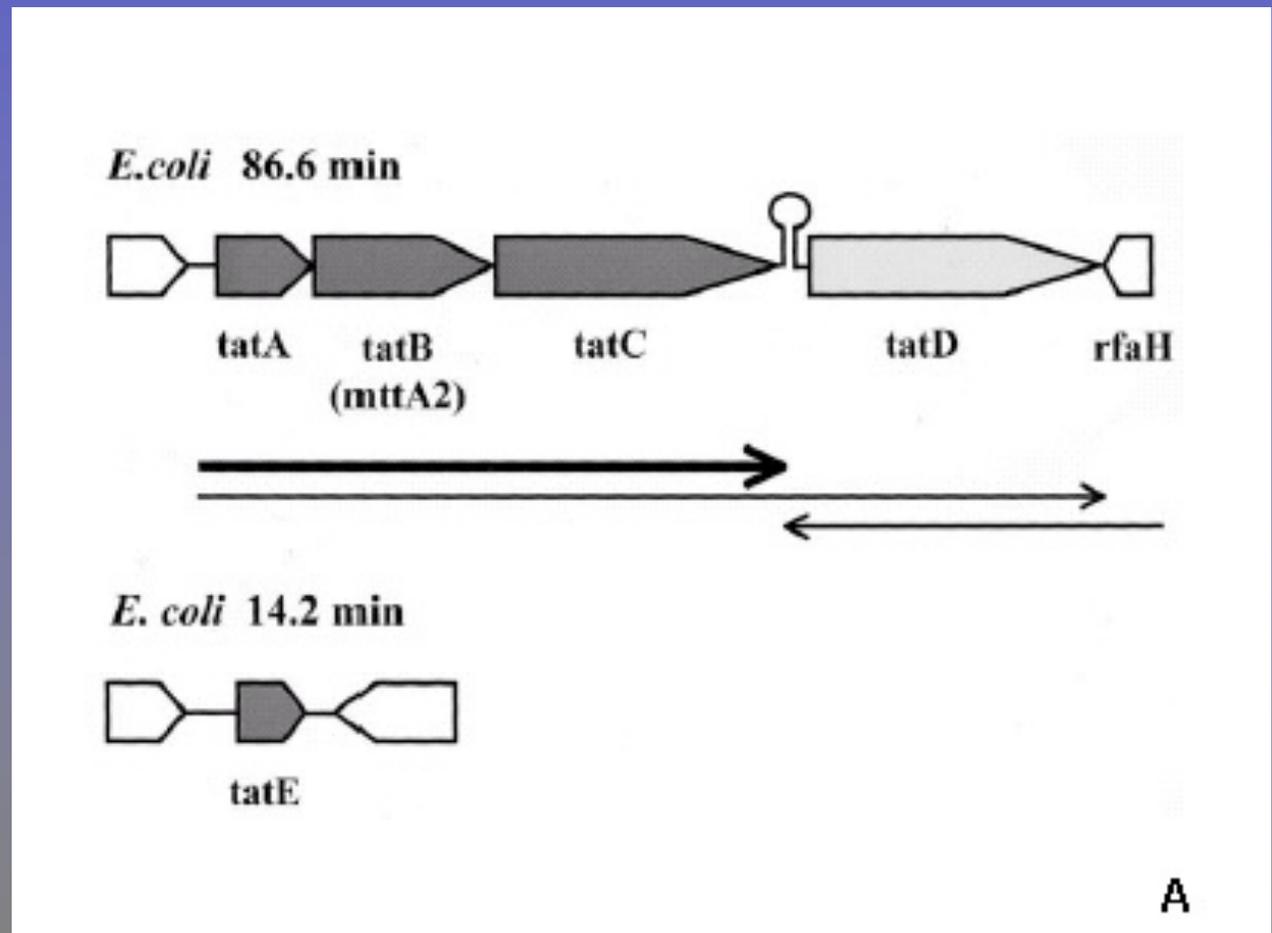
La componente evolutivamente più conservata è la proteina TatC che è anche la proteina di maggiori dimensioni

- La proteina TatC sembra che sia deputata al riconoscimento della sequenza contenente le 2 Arg.
- La proteina TatB, possiede 1 segmento transmembrana all' N-terminale, seguito da una regione a cerniera e da 2 due regioni ad alfa elica , anfipatiche, che si trovano sul lato citoplasmatico. TatB dovrebbe interagire con TatC e prendere contatto con la sequenza segnale della proteina da trasportare.

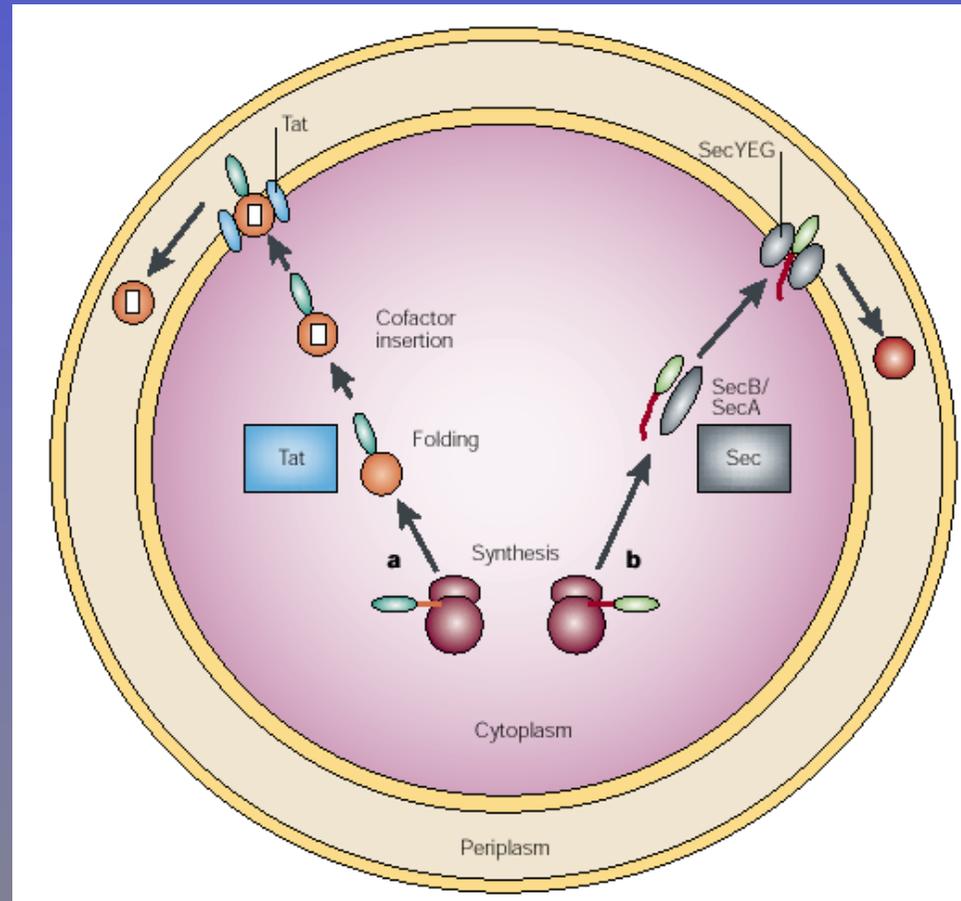


TatA è la proteina più abbondante del complesso ed ha una struttura simile a TatB, cioè segmento transmembrana, regione cerniera e  $\alpha$ -elica anfipatica.

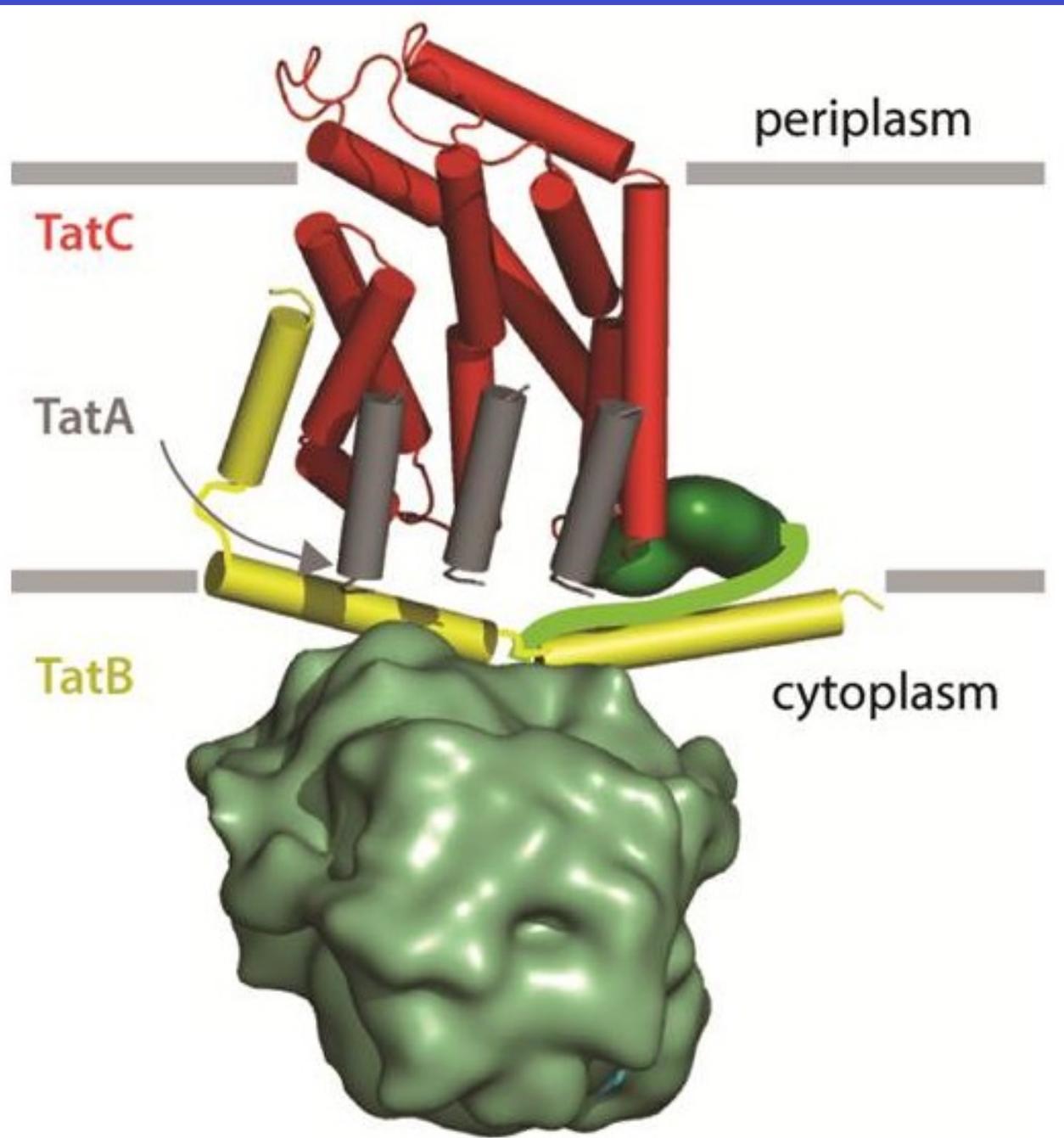
- Il rapporto TatC: TatB: TatA è di 1:1:20
- La proteina TatA forma il canale del sistema attraverso il quale passano le proteine da trasportare,
- L'energia del sistema viene fornita dalla forza proton-motrice.



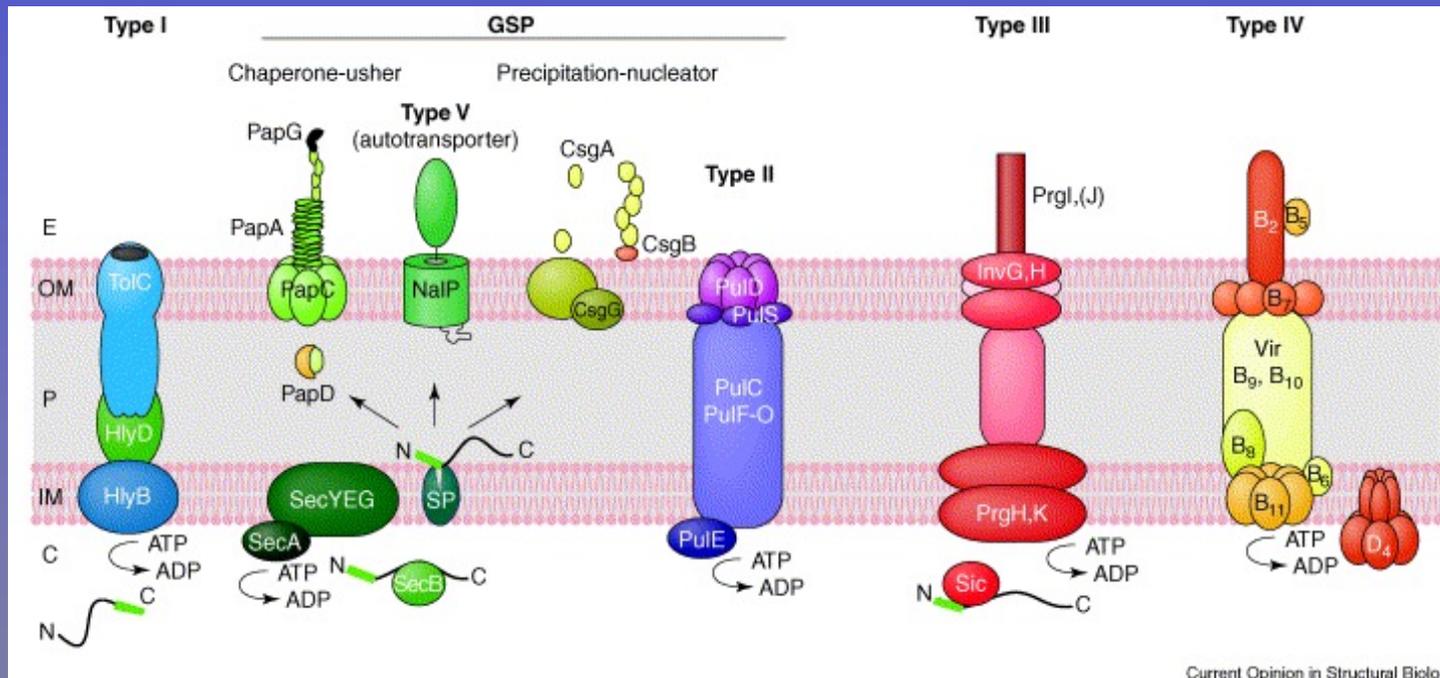
TAT esporta le proteine che si ripiegano  
“correttamente” nel citoplasma

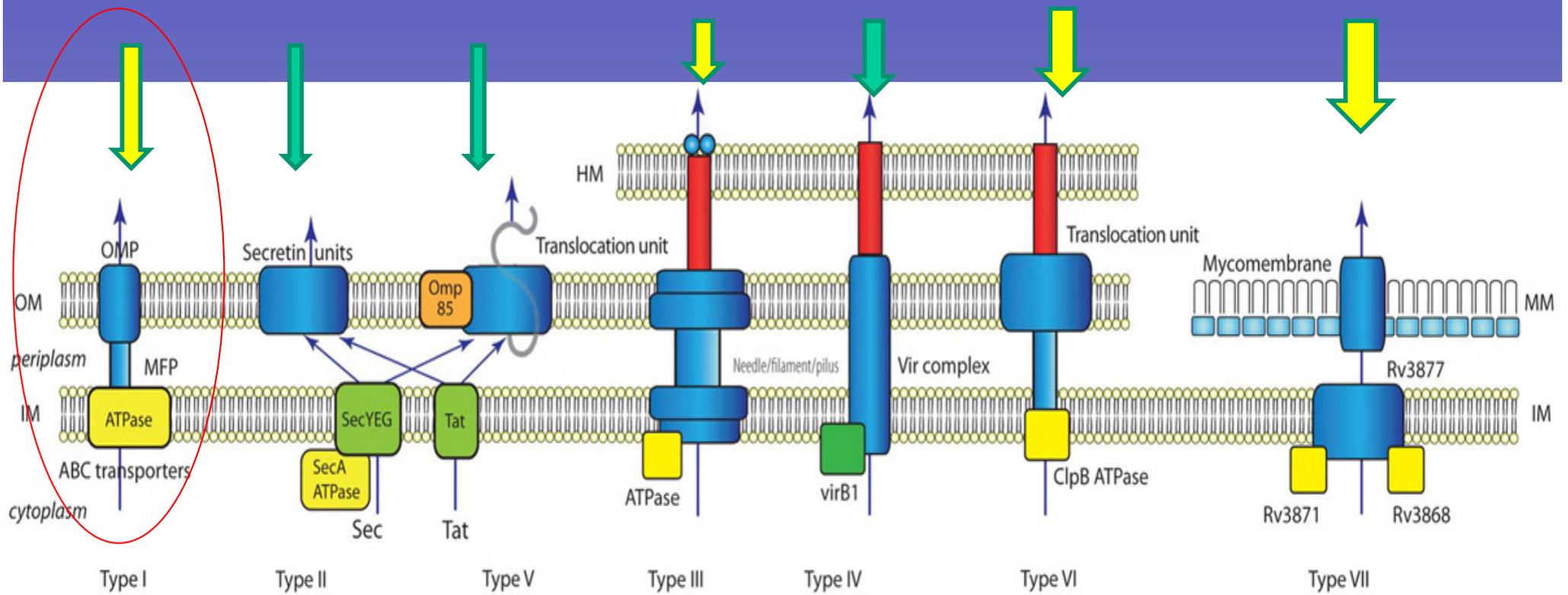






# SISTEMI DI SECREZIONE





(Tseng et al., 2009)

# I SISTEMI DI SECREZIONE SEC-DIPENDENTI

- Il sistema di secrezione II
- Il sistema di secrezione a due partners (TPS)
- Il sistema di secrezione V
- Il sistema di secrezione IV (?)
- Il sistema di secrezione-usher

# IL SISTEMA DI SECREZIONE DI TIPO V

- Sono presenti 5 sottoclassi di questo sistema (da **a** ad **e**):
- **Va**: il sistema degli autotransporter
- **Vb**: il sistema di secrezione a 2 partners
- **Vc**: il sistema degli autotrasportatori trimerici
- **Vd**: il sistema a 2 partners fusi in un'unica proteina
- **Ve**: il sistema degli autotransporter classico ma a polarità invertita.

Esempi: IgA  
proteasi di  
*N.gonorrhoeae*.

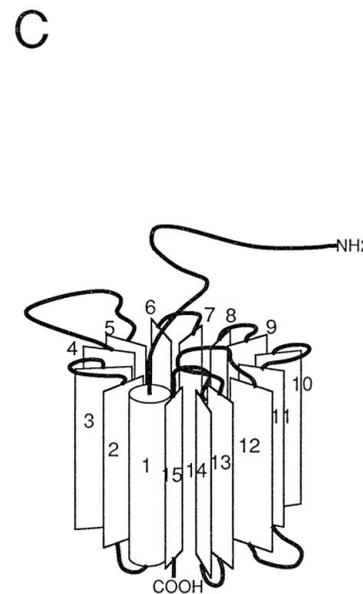
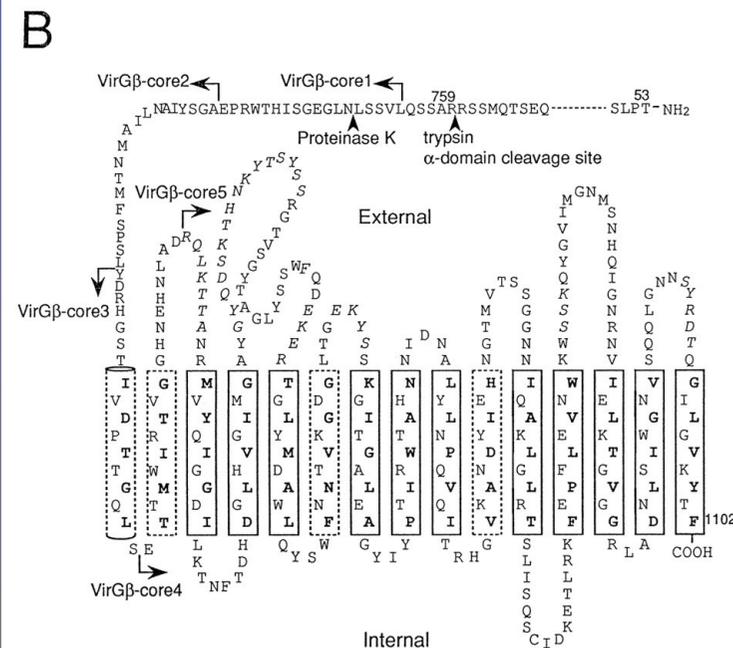
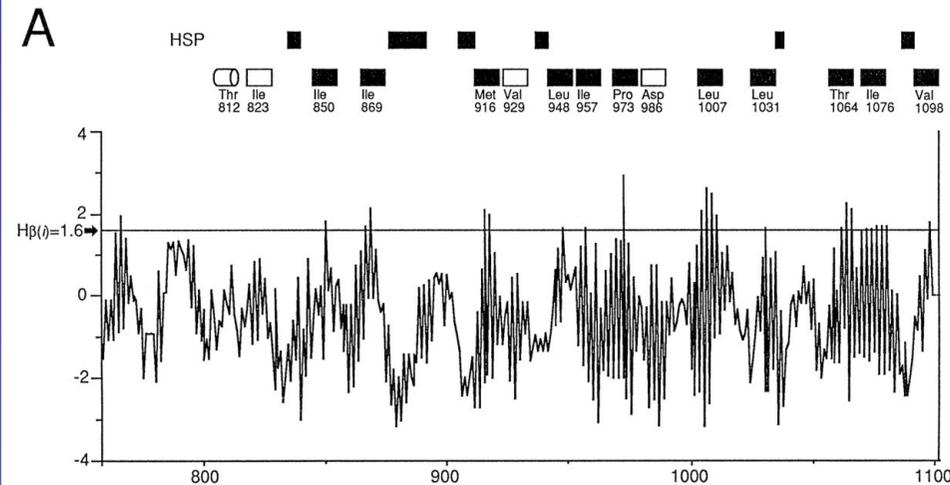
L' emolisina A di  
*Serratia  
marcesens*

VirG-IcsA di  
*S.flexneri*

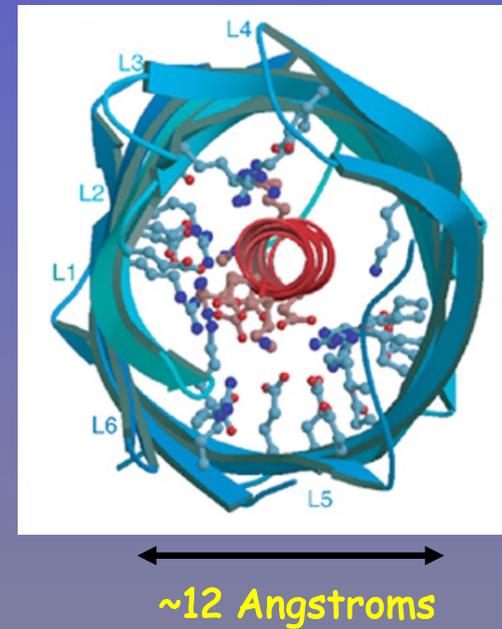
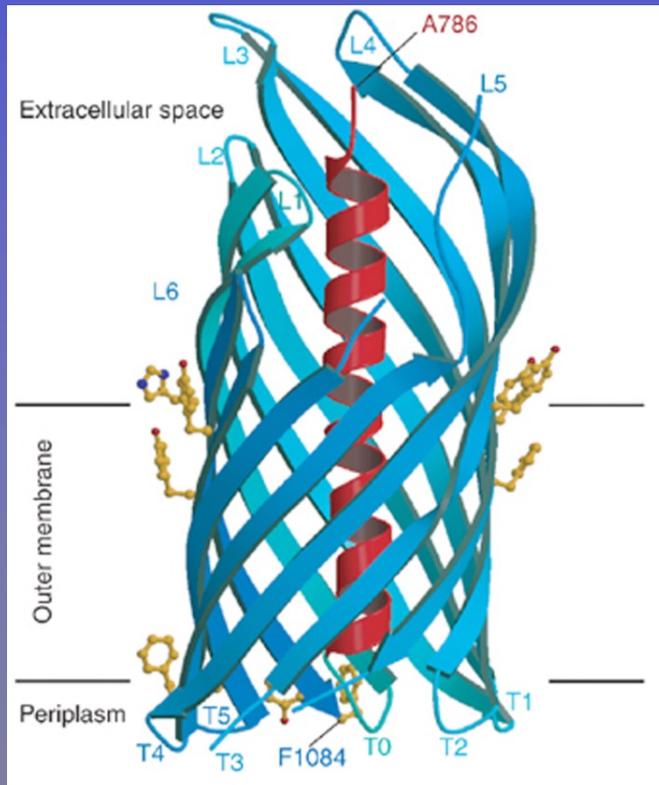
SepA di  
*S.flexneri*

EspC degli EPEC

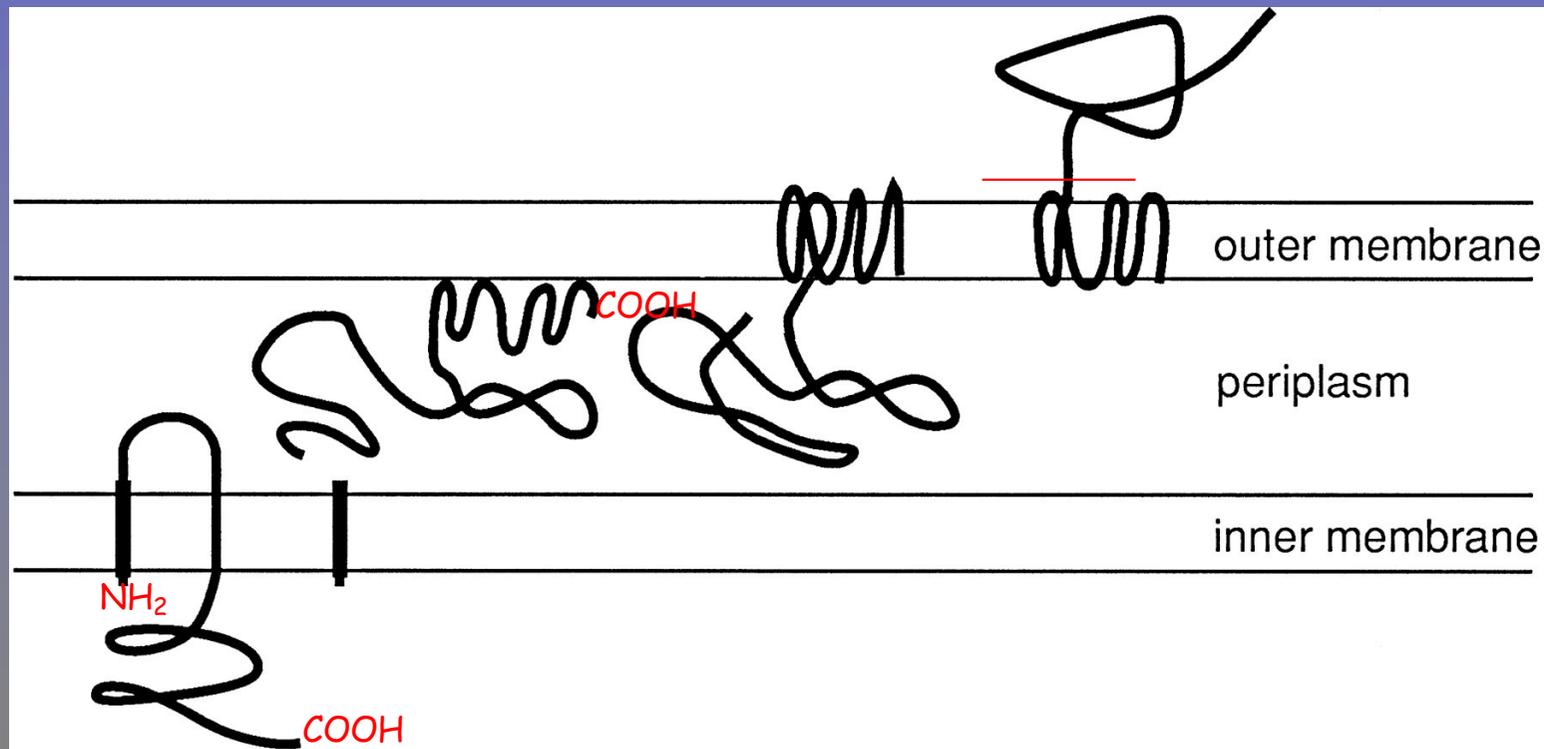
VacA di *H.pylori*

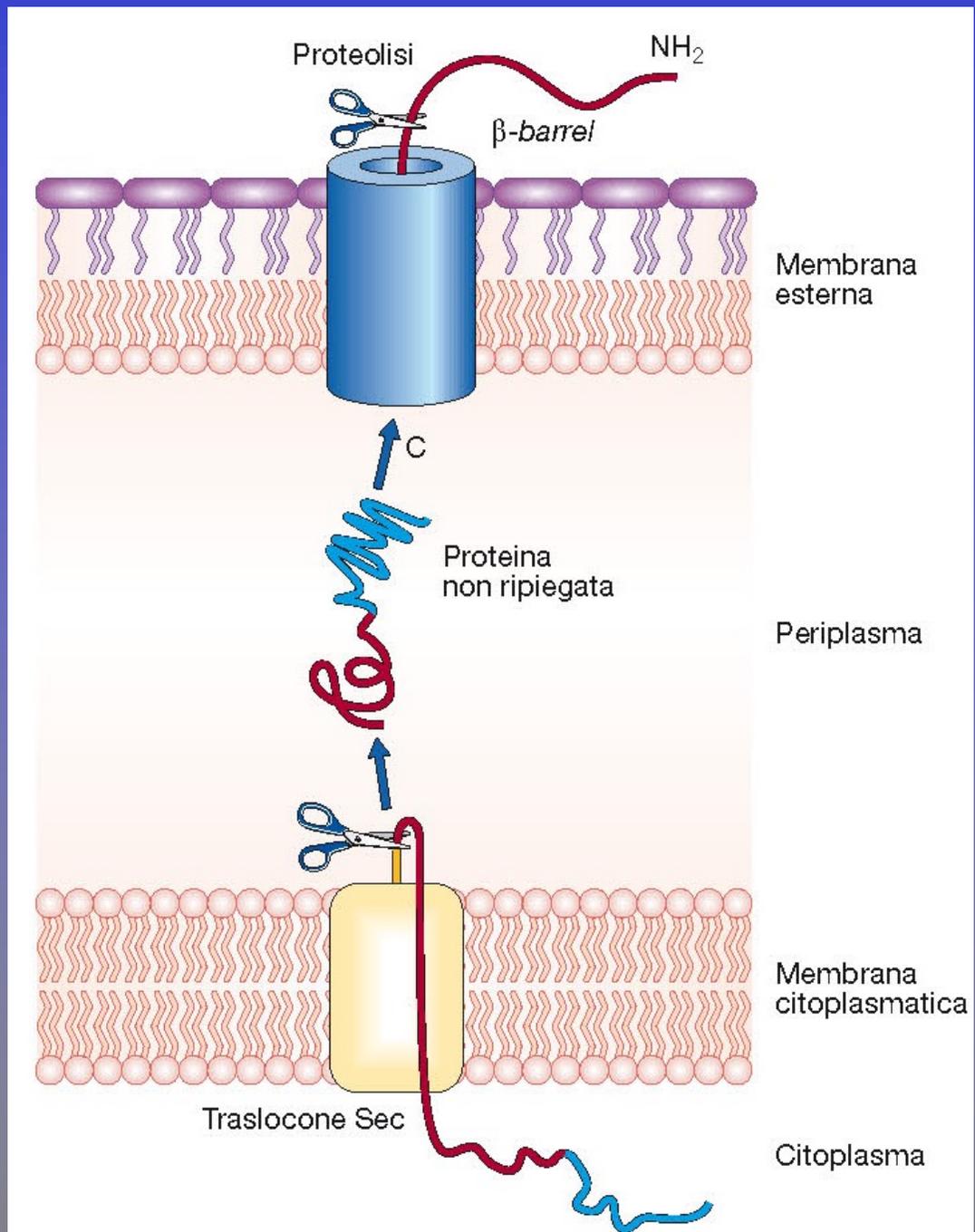


# Gli autotransporters (Va) formano un poro



I domini interessati delle proteine autotrasporter comprendono la sequenza all' N-terminale che viene usata per l' inserzione nella MC tramite il sistema Sec, una sequenza centrale-il dominio alfa- usualmente esposta nella proteina matura ed un dominio C-terminale-dominio beta- che è responsabile della traslocazione della proteina nella ME. L' inserzione del dominio beta nella ME provoca la formazione di un poro attraverso il quale passa il dominio alfa. La proteina è autocatalitica e perde il dominio beta, essendo o rilasciata o rimanendo legata alla ME.

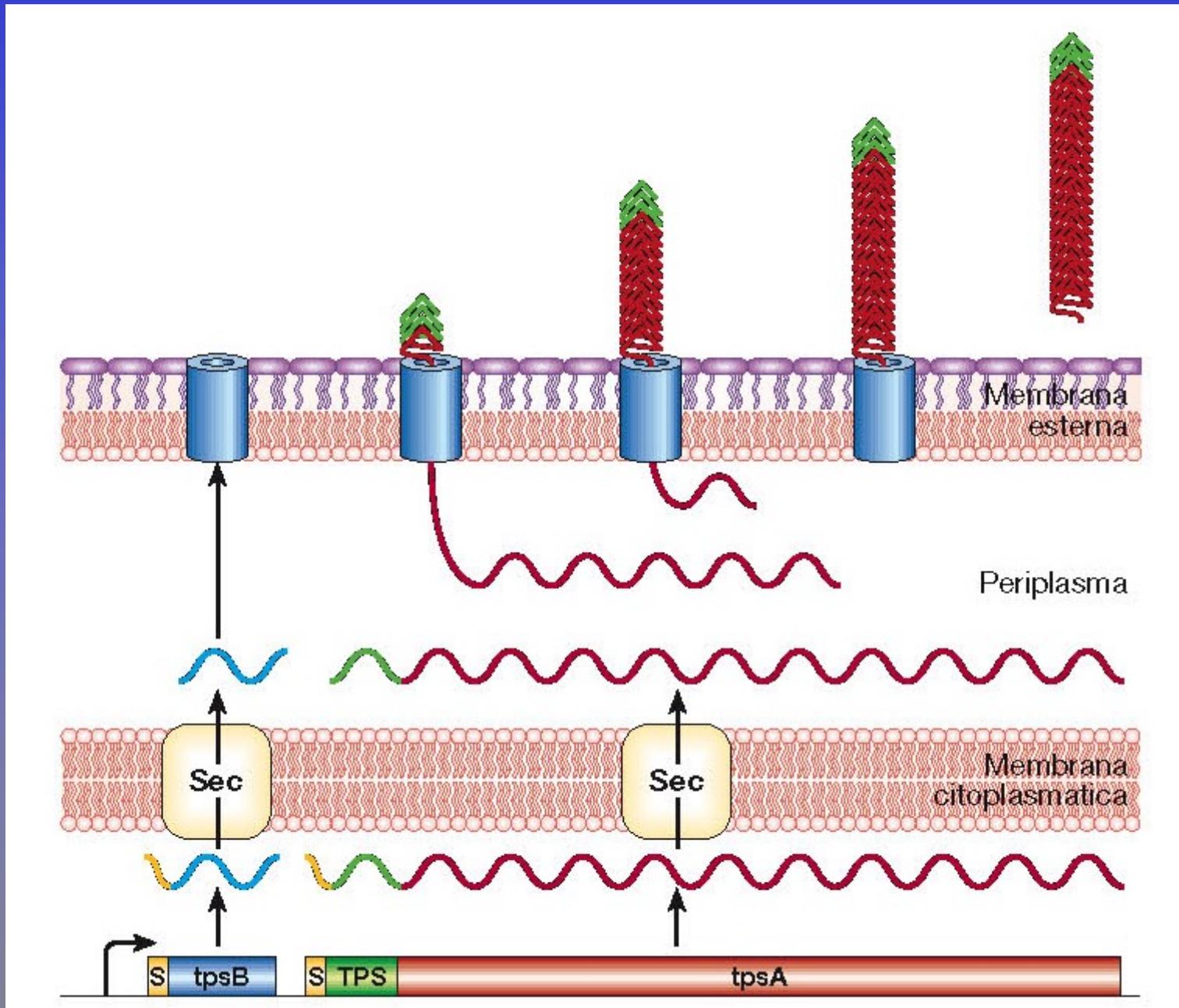




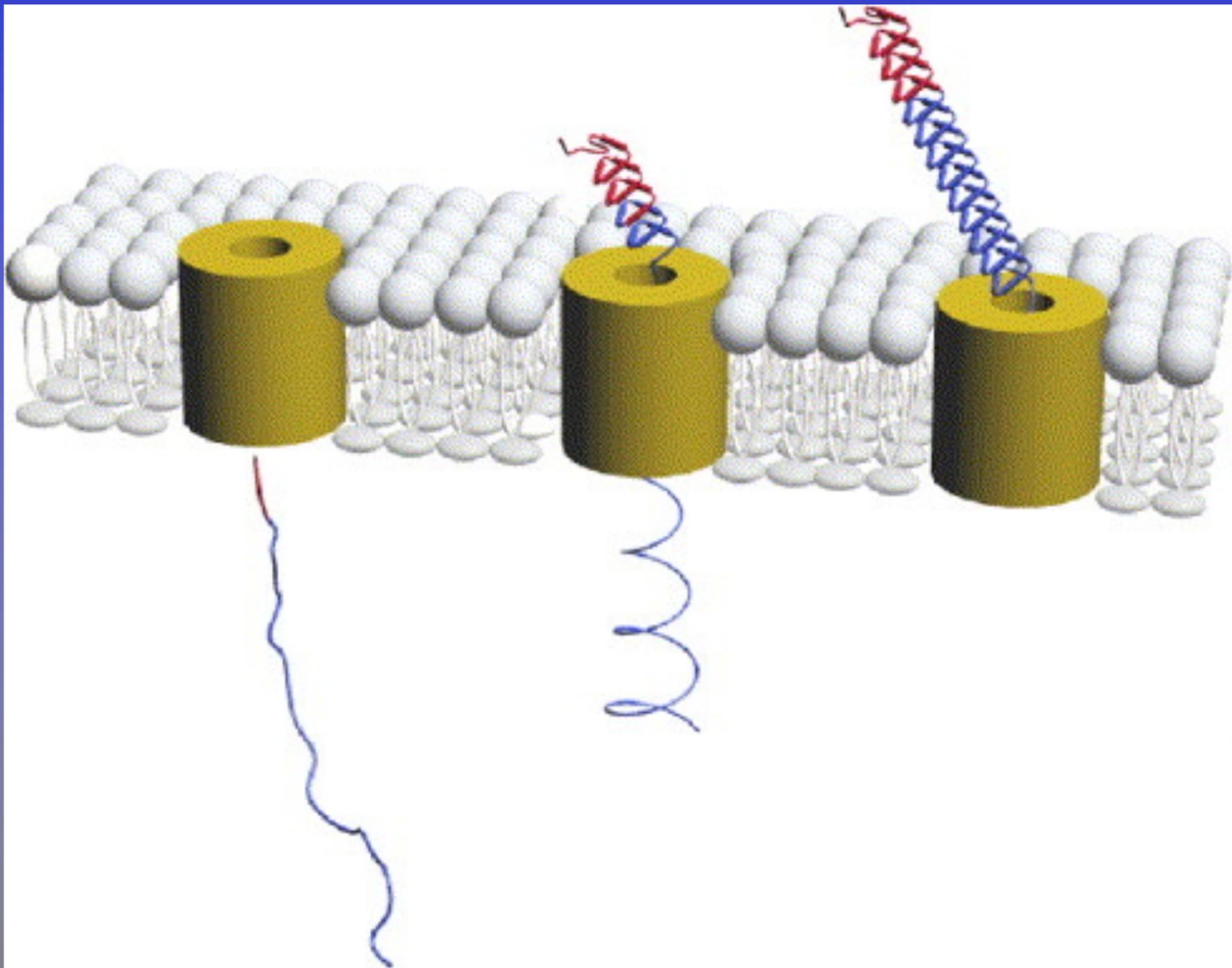
# TWO PARTNERS SECRETION (TPS)

- Questo sistema è costituito da un elemento, una proteina che funge da trasportatore, cioè che costituisce un poro grazie alla sua struttura a botte ( $\beta$ -barrel). Questa proteina formerà il canale nella ME
- L'altro partner del sistema è costituito da uno specifico elemento nella molecola trasportata (substrato)
- La funzione dei substrati è varia: tossine, invasive, adesine etc..

- Le proteine trasportate (substrati) sono di grandi dimensioni
- I substrati portano all' N-terminale 300 aa che servono come segnale di riconoscimento da parte dell' altro partner del sistema e caratterizza la famiglia delle proteine (dominio TPS, superfamiglia delle proteine TPSA)
- Il dominio N-terminale serve anche per indirizzare il ripiegamento della proteina una volta fuoriuscita dalla membrana



- Alcune proteine secrete attraverso questo sistema , una volta fuoriuscite dalla ME, rimangono ancorate a questa mentre altre vengono rilasciate nell' ambiente.
- Le proteine a botte del canale della ME costituiscono la famiglia delle proteine TpsB.
- Le proteine TpsA e TpsB sono molto diffuse fra i batteri Gram-negativi (ad esempio la proteina BamA -una TpsB- che è implicata nella biogenesi delle proteine di ME)



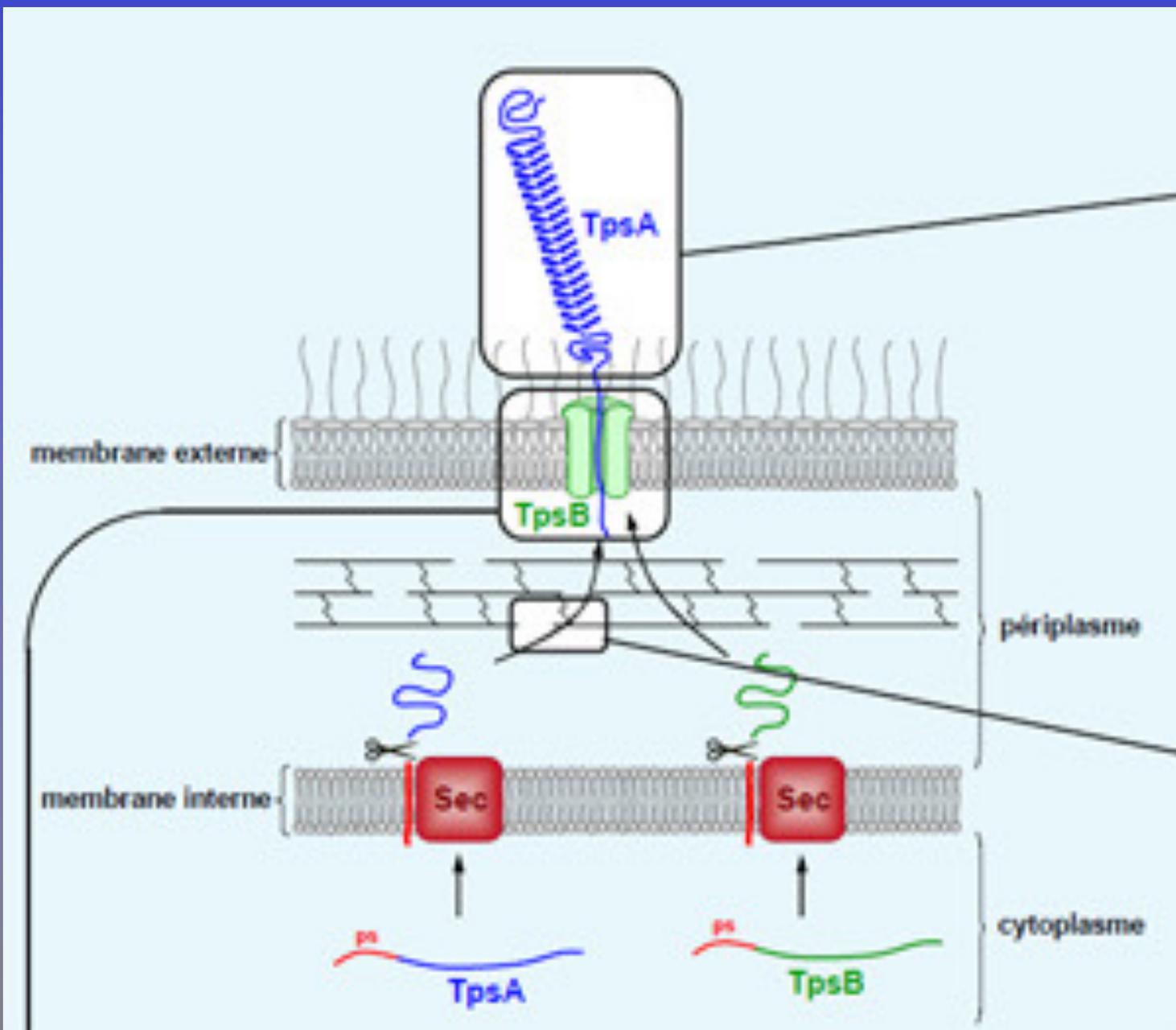
- Esempi del sistema TPS:

Emoagglutinina filamentosa (FHA) di  
*Bordetella pertussis*

Adesine ad alto peso molecolare (HMW1,  
HMW1B) di *Haemophilus influenzae*

Emolisina (SlhA) di *Serratia marcescens*

- I geni che codificano per TpsA e TpsB sono in genere associati in un operone.
- Proteine del tipo TpsA e TpsB, sono state identificate anche nei mitocondri e nei cloroplasti



# IL SISTEMA DI SECREZIONE DI TIPO II

E' un sistema Sec-dipendente molto diffuso nel mondo batterico originato da un antico sistema deputato all'assemblamento di fibrille a partire da subunità sulla MI.

Negli Archea questo sistema è alla base della sintesi degli "archella" cioè dei flagelli e i pili degli Archea.

Il sistema del T2SS è anche associato alla sintesi dei pili di tipo IV. La caratteristica simile di questi sistemi è quella di costruire fibrille elicoidali.

E' stato dapprima caratterizzato in *Klebsiella oxytoca* che codifica per la secrezione della pullulanasi un enzima coinvolto nella degradazione delle maltodestrine.

Il sistema richiede 14-16 componenti di cui molti sono proteine integrali di membrana.

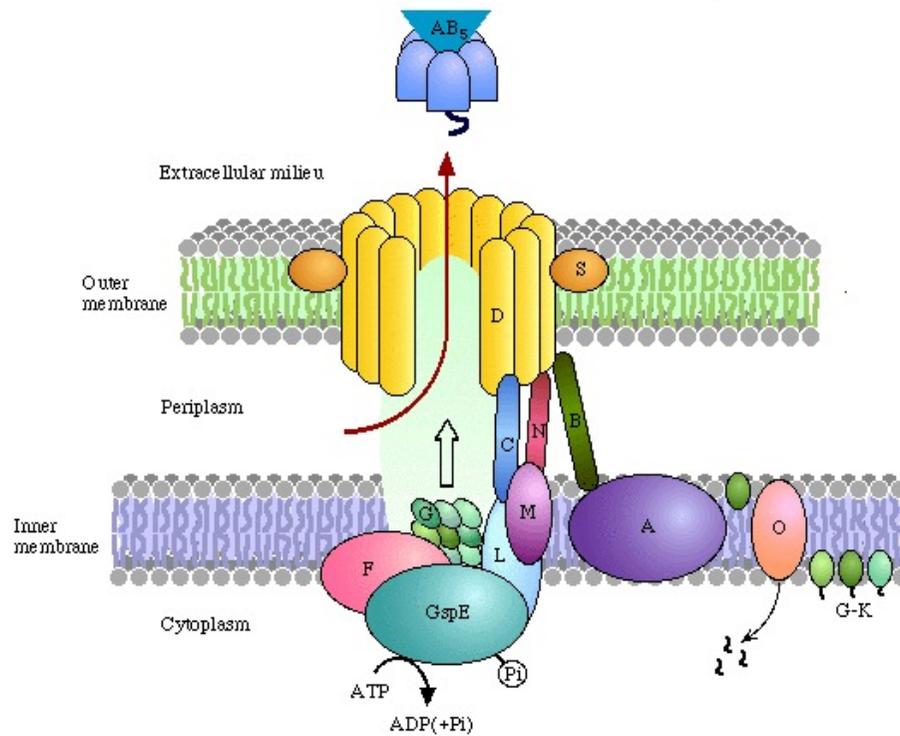
Il T2SS è stato poi ritrovato in *Xanthomonas*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, e sugli ETEC.

Oggi si sa che è anche presente in *Chlamydia*, nelle Spirochete o nei Cianobatteri.

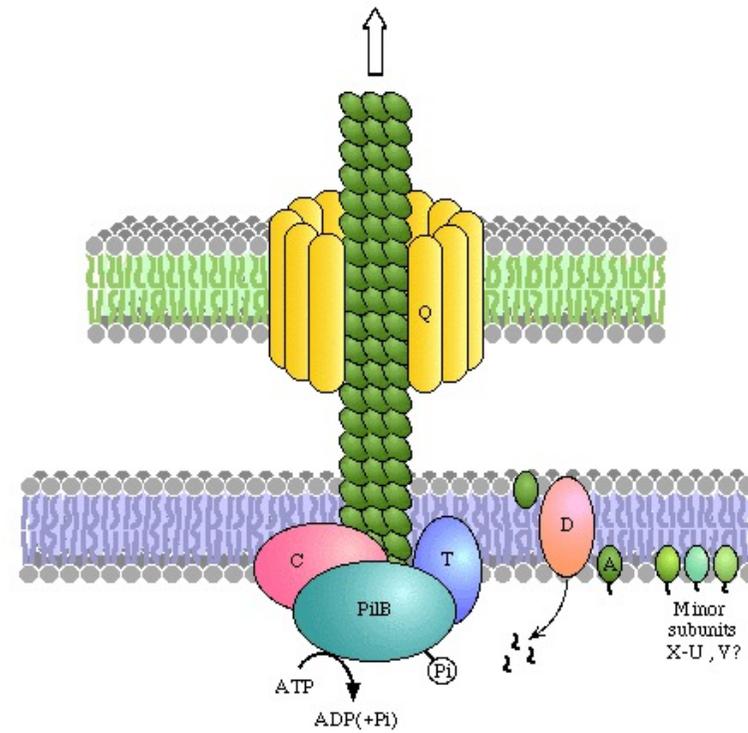
# I geni del T2SS vengono designati con l'acronimo *gsp* (da general secretory pathway).

LTies

## TYPE II SECRETION SYSTEM



Type II secretion



Type IV pilus

### Conserved subunits

General secretion pathway proteins

GspD	GspE	GspF	GspG	GspO
------	------	------	------	------

Prepilin peptidase dependent proteins / Protein transport proteins

HofQ	HofB	HofC	PpdD	HofD
------	------	------	------	------

Type IV pilus assembly proteins

PilQ	PilB	PilC	PilA	PilD
------	------	------	------	------

Pilus assembly proteins

CpaC	CpaF	CpaA
------	------	------

Competence proteins

ComGA	ComGB	ComGC	ComC
-------	-------	-------	------

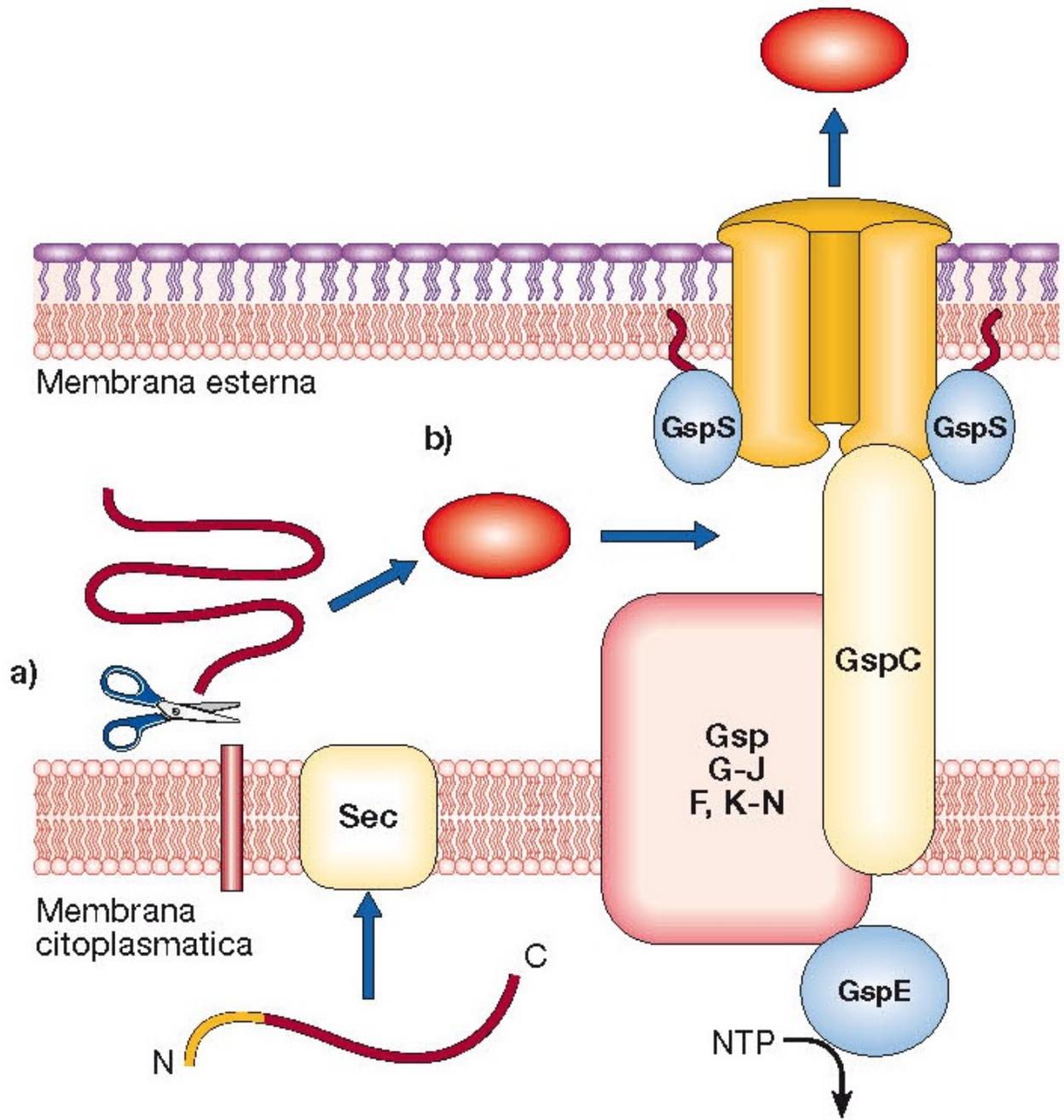
GspA	GspB	GspC	GspH	GspI	GspJ	GspK	GspL	GspM	GspN	GspS
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

PpdA	PpdB	PpdC
------	------	------

PilF	PilG	PilH	PilI	PilJ	PilK	PilP	PilO	PilN	PilM	
PilT	PilU	PilZ	PilS	PilR	PilV	PilW	PilX	PilY1	PilY2	PilE

PilA	CpaB	CpaD	CpaE
------	------	------	------

ComA	ComP	ComX	ComQ	ComER	ComEA	ComEB	ComEC	ComFA	ComFB	ComFC
ComGD	ComGE	ComGF	ComGG	ComK	ComS	ComZ				



## SS di tipo II

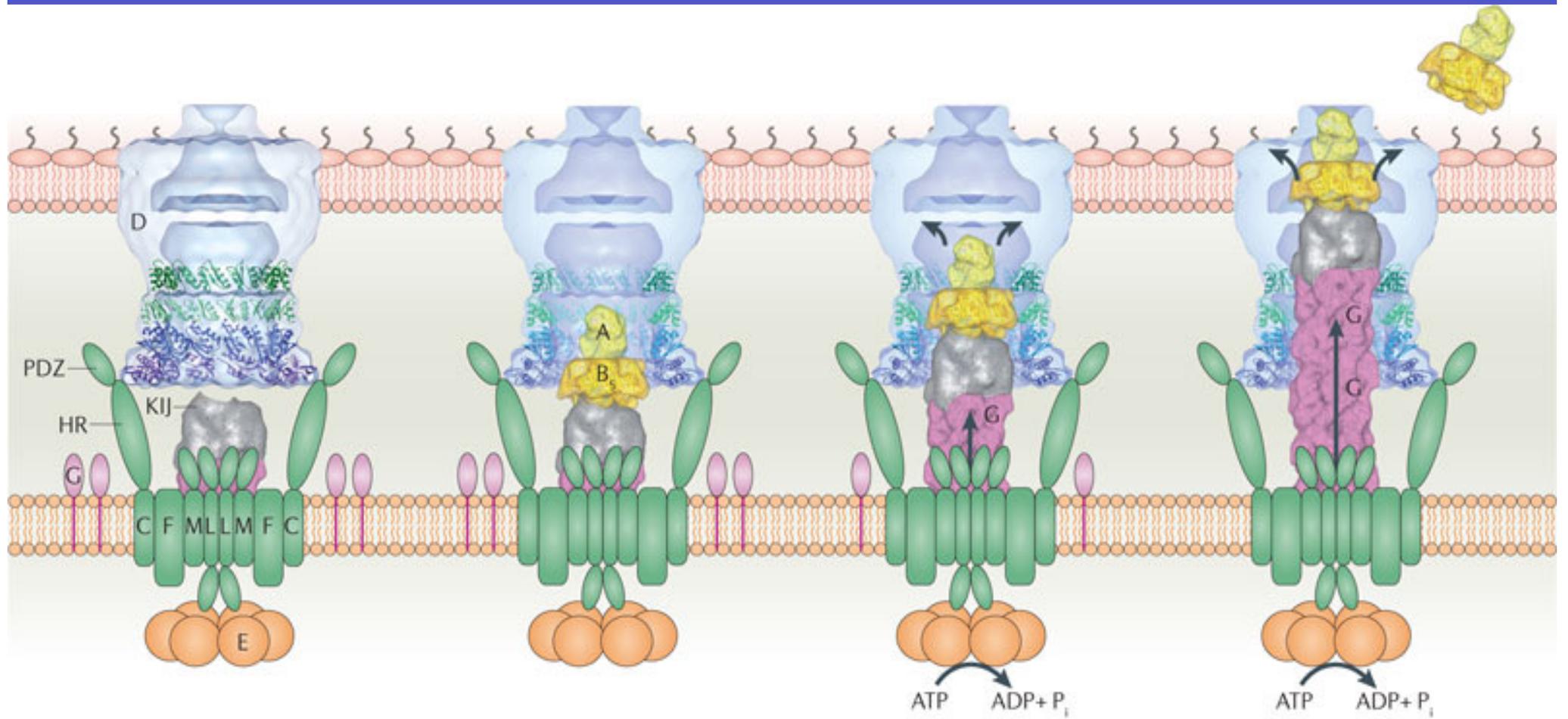
Di questo SS fanno parte alcune proteine di ME, le *secretine*, che partecipano anche ai sistemi di assemblamento dei pili di tipo IV del SS di tipo III e dell'estrusione dei fagi filamentosi.

Queste proteine hanno come caratteristica quella di essere ricche di foglietti beta che favoriscono la multimerizzazione. Multimeri delle secretine formano i pori-9 nm- attraverso i quali passano le proteine nello stato ripiegato o le strutture quali i pili ed i fagi filamentosi.

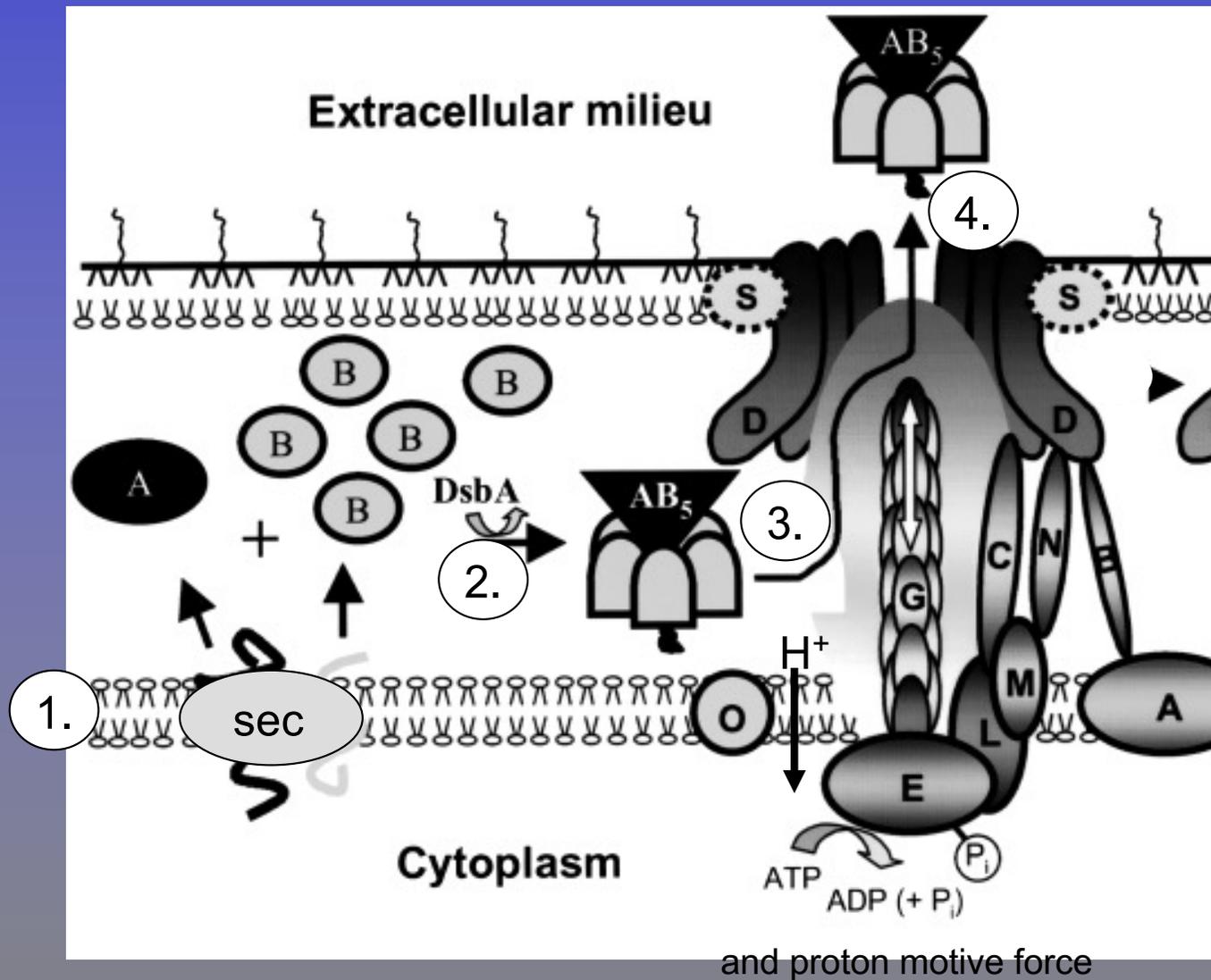
Il modello prevede che le proteine da traslocare siano poste nella forma compatibile con il trasporto attraverso l'interazione con le secretine che formerebbero le pareti del poro attraverso cui sono traslocate all'esterno.



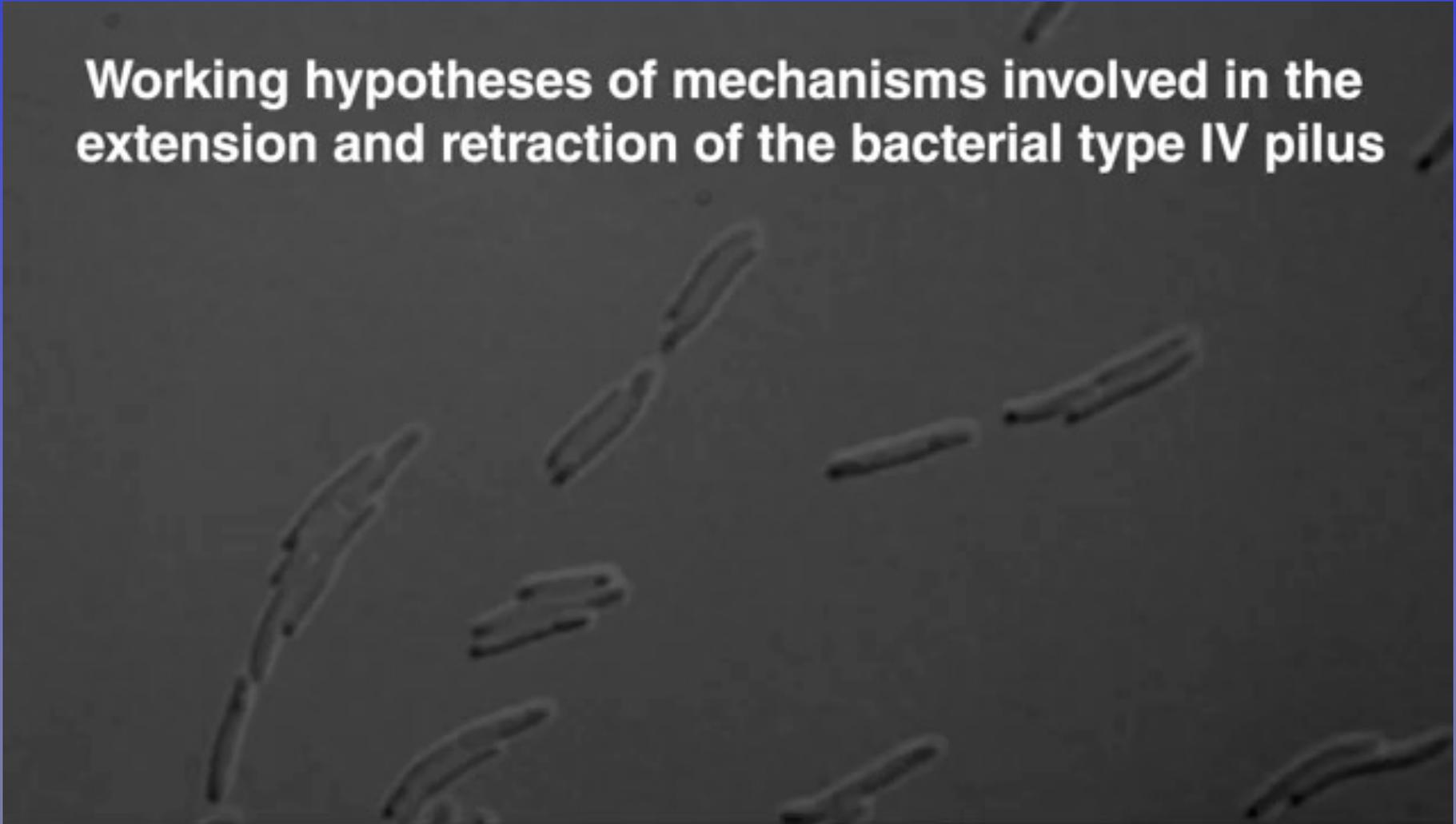
- La caratteristica strutturale di questo sistema è l'assemblamento di strutture tipo pili, chiamate pseudopili che si estendono nel periplasma. Gli pseudopili sono indispensabili per il trasporto del substrato al vero canale sulla ME.
- I substrati trasportati hanno molteplici funzioni, dagli enzimi metabolici per la degradazione di zuccheri, acidi nucleotidici, lipidi etcc o anche tossine, adesine, proteine necessarie alla formazione del biofilm etcc.
- Una volta nel periplasma- trasportate attraverso il sistema Sec o Tat- le eso-proteine si ripiegano nella struttura secondaria, e terziaria (da sole o mediante cofattori o interagendo con ioni), vengono riconosciute e quindi trasportate attraverso la membrana. Questo è quanto accade per la tossina colerica; il cui trasporto richiede l'assemblaggio di 5 unità B in un pentamero e l'associazione con la subunità A.



# Secrezione della tossina colerica attraverso il SS di tipo type II



**Working hypotheses of mechanisms involved in the extension and retraction of the bacterial type IV pilus**



<https://www.youtube.com/watch?v=HGvnrWrudpA>

# IL SISTEMA CHAPERONE-USHER

Questo sistema viene utilizzato per il trasporto e l'assemblamento di più di 30 organelli adesivi, pili e fimbrie, sulla superficie dei batteri Gram-negativi, compresi i pili di tipo I ampiamente diffusi.

Il prototipo è quello dei pili P degli *E.coli* uropatogeni.

La struttura è complessa formata da una corta fibrilla finale composta da PapE alla cui estremità è presente la "vera" adesina PapG. PapK lega la core fibrilla al tronco principale composto da PapA. PapH connette il tronco principale alla ME.

Il sistema implica l'uso di due proteine lo chaperone, PapD e l'usher, PapC.

Il modello propone che una volta rilasciate nel periplasma dal sistema Sec le subunità si associno con PapD che ne impedisce il ripiegamento illegittimo e l'associazione con i partners. Una volta raggiunta la piattaforma di assemblamento PapD rilascia il componente e PapC guida il trasporto della molecola.

PapC appartiene alla famiglia delle secretine

