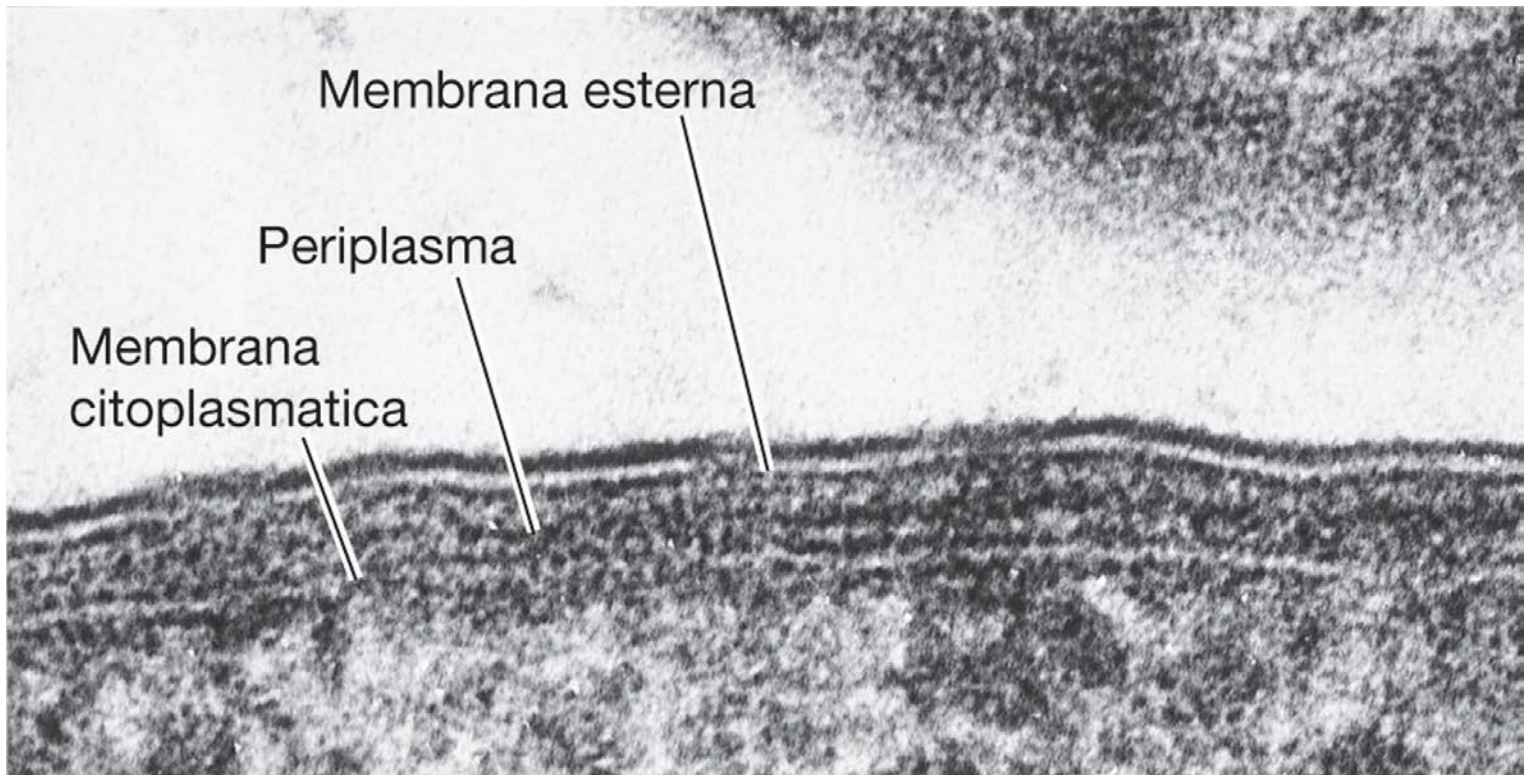
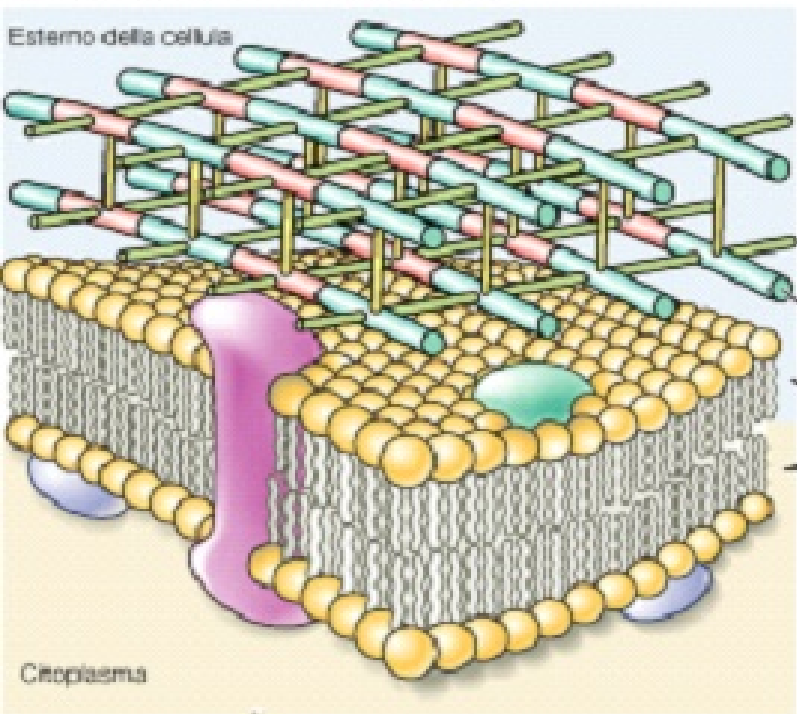


*La parete cellulare di un batterio Gram negativo :
E.coli*

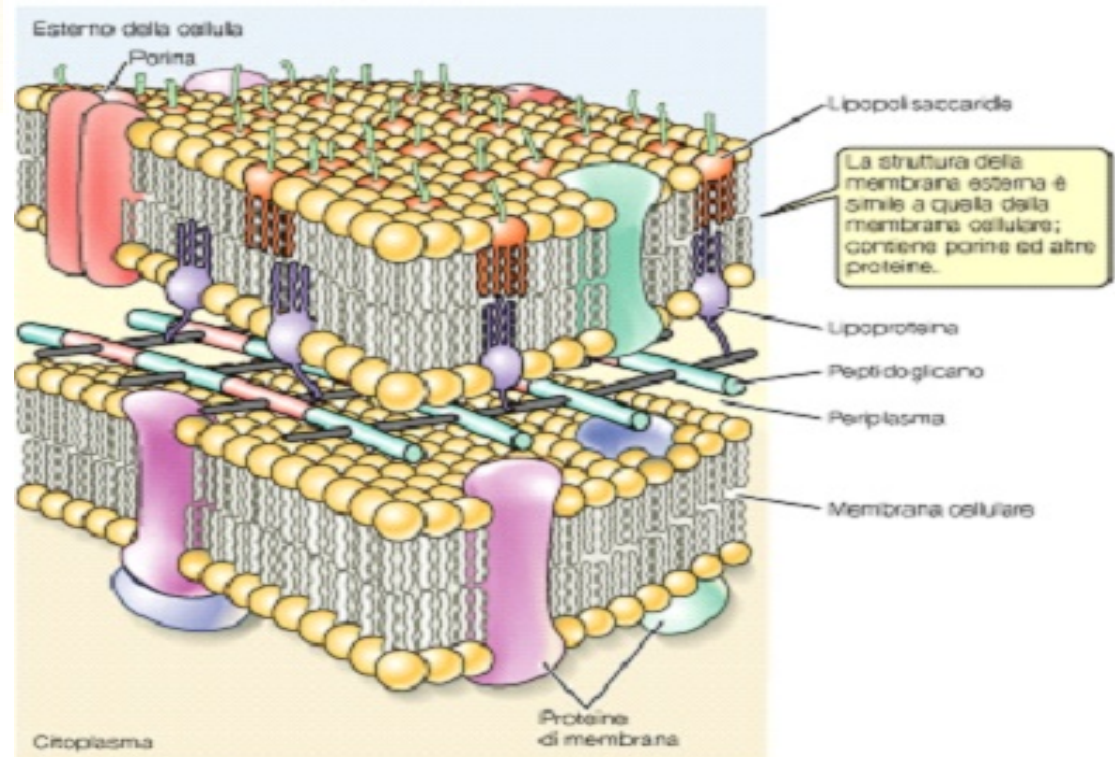


(A) Rivestimento di una cellula gram-positiva



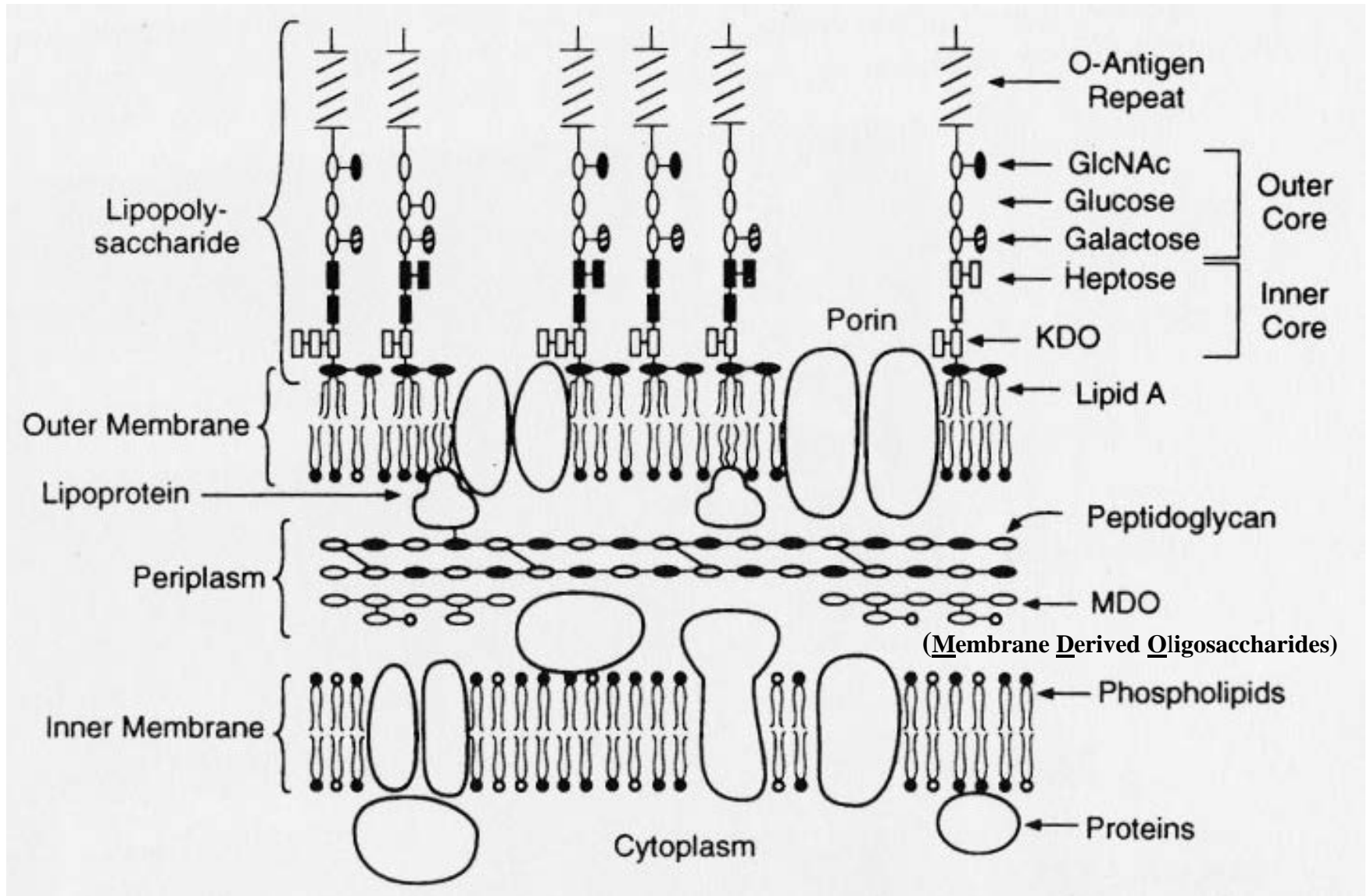
GRAM⁺

(B) Rivestimento di una cellula gram-negativa

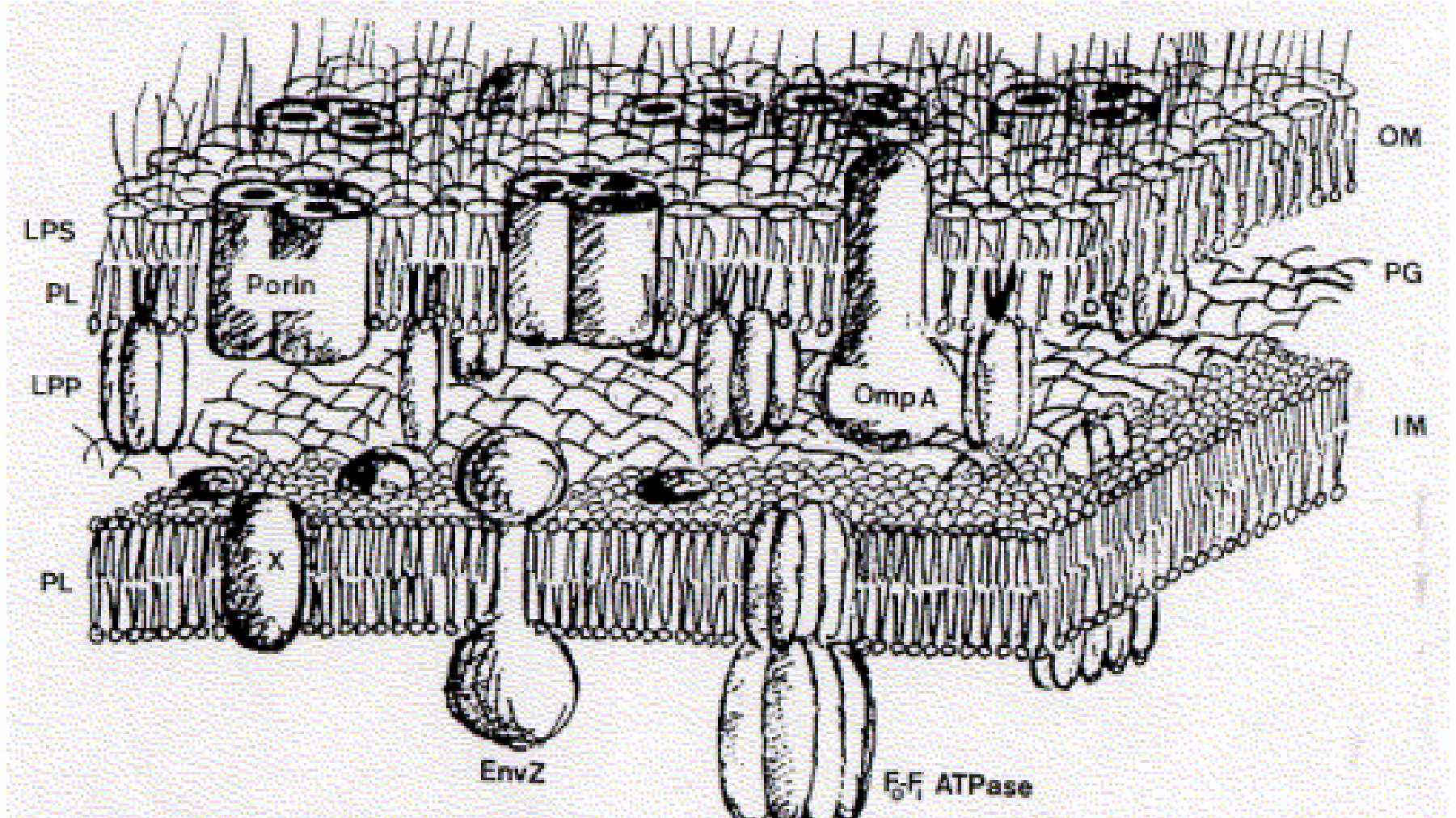


GRAM⁻

Membrana interna e membrana esterna a confronto



I costituenti fondamentali della membrana esterna

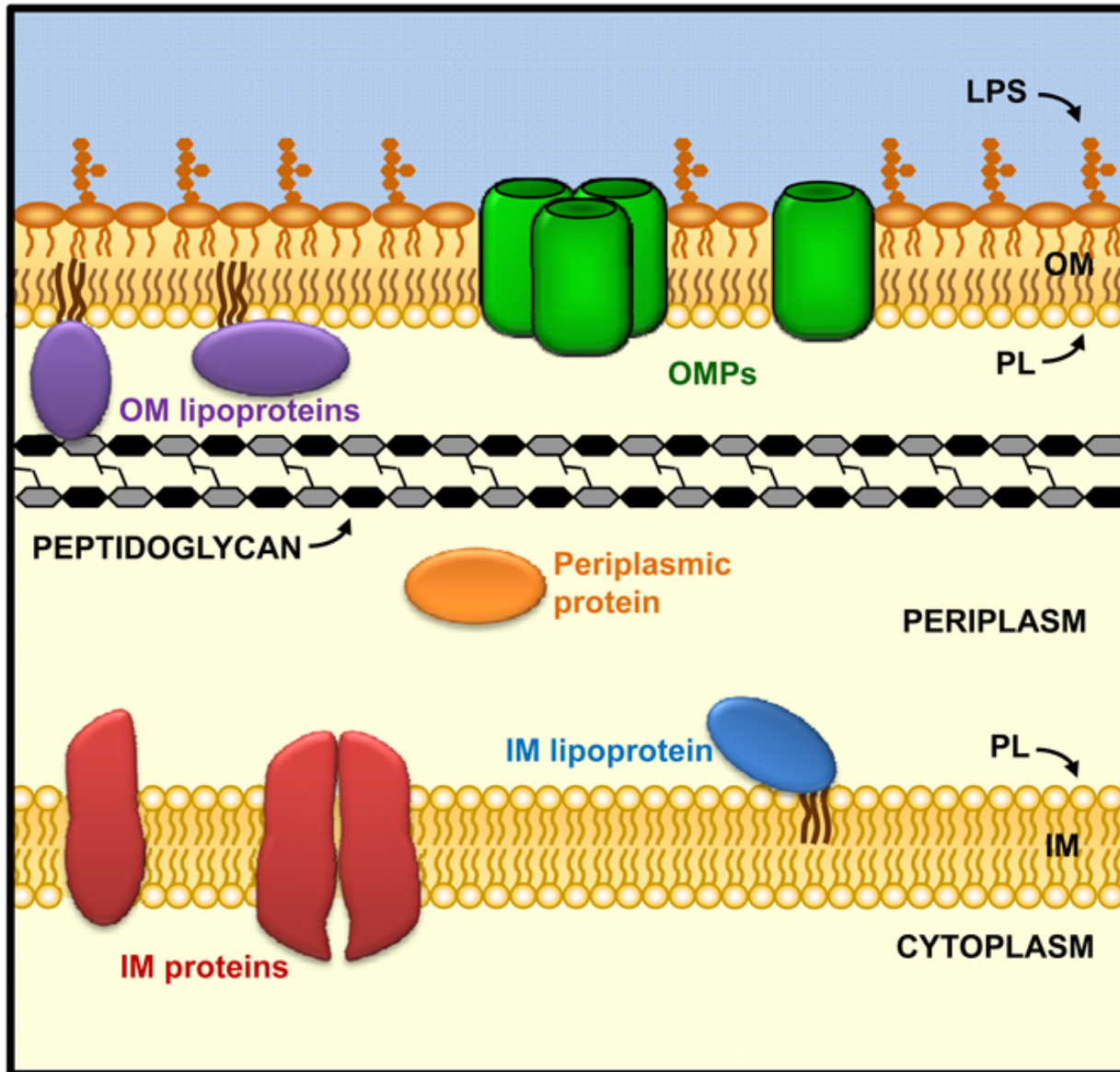


Periplasma

- situato tra la IM e la OM
- ha uno spessore di 12-15 nm (IM ha uno spessore di 8nm)
- ha una consistenza gelatinosa.
- costituisce dal 20 al 40% volume totale

Molto ricco in proteine:

1. **enzimi idrolitici che hanno la funzione di avviare la degradazione di sostanze nutritive e di sostanze tossiche (β -lattamasi)**
2. **proteine di legame che innescano processi di trasporto di substrati (p.e nei sistemi ABC)**
3. **chemiorecettori proteine coinvolte nella risposta chemiotattica**
4. **proteine per la sintesi del peptidoglicano (transglicosilasi transpeptidasi)**
5. **Proteine coinvolte nel trasporto dei componenti della OM, dei pili , e dei flagelli**

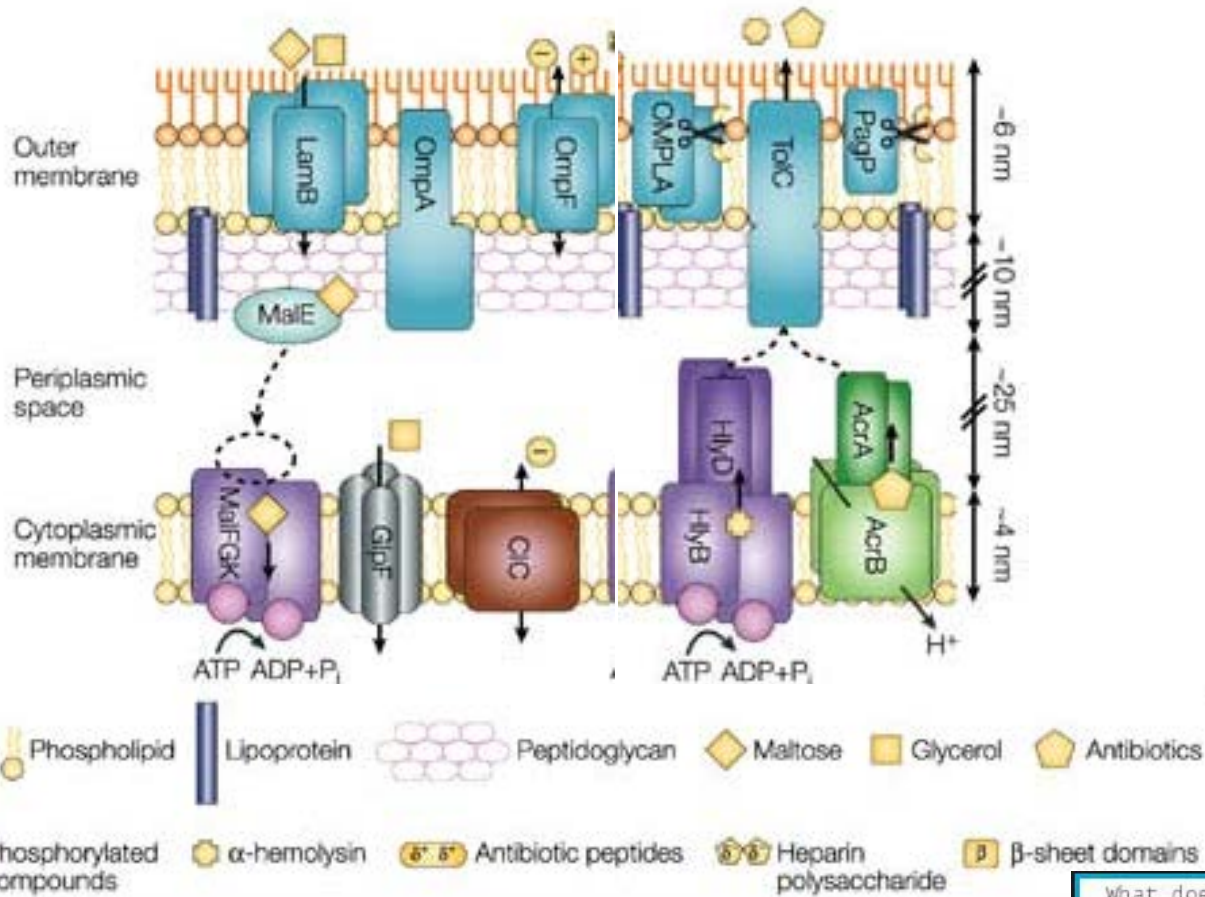


Organizzazione della parete nei Gram-

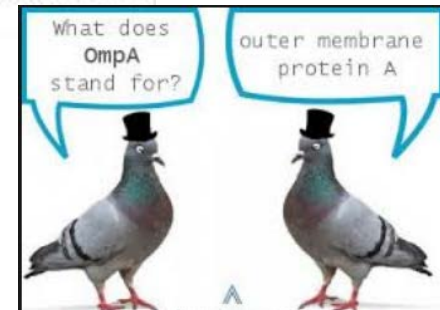
Nello spazio periplasmatico sono contenute numerose proteine ed enzimi.

La lipoproteina di Braun collega il PPG con la membrana esterna

Le proteine della membrana esterna



Porine, proteine strutturali, canali di trasporto

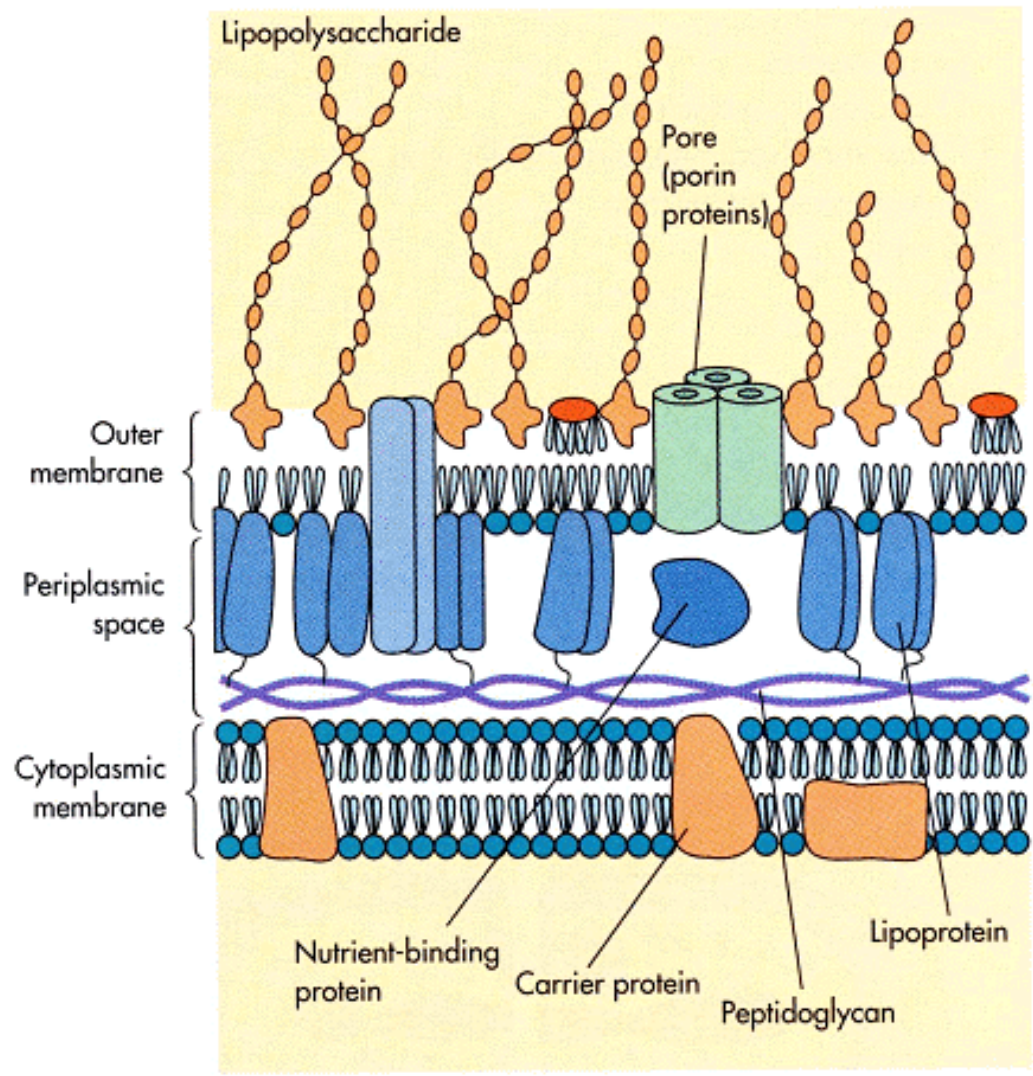


Proteine presenti nella Membrana esterna (OM) definite **OMP** (**O**uter **M**embrane **P**rotein) sono di due tipi:

LIPOPROTEINE che sono ancorate alla OM con una coda lipidica N-terminale

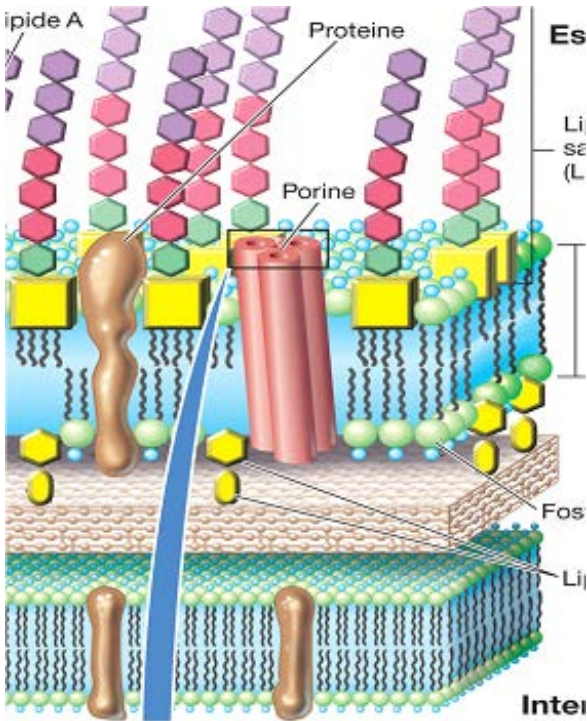
PROTEINE INTEGRALI DI MEMBRANA che sono contengono diversi domini necessari per l'inserimento all'interno della OM

Tutte le proteine della OM sono sintetizzate nel citoplasma come precursori con la sequenza segnale all'estremità N-terminale e sono trasportate attraverso la IM tramite il sistema Sec.



Struttura della parete cellulare dei Gram negativi con le proteine dei vari compartimenti

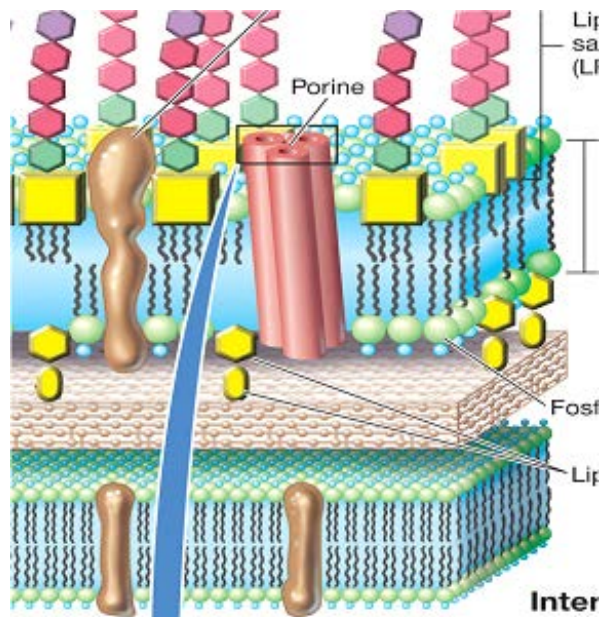
Le PORINE



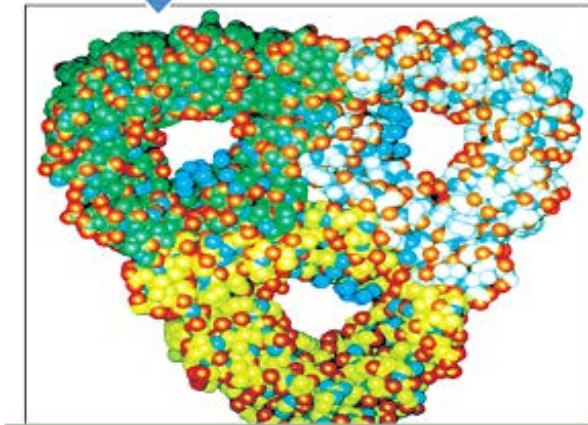
A differenza della MI, la ME dei Gram⁻ è parzialmente permeabile alle piccole molecole

Grazie alla presenza di proteine della membrana esterna **PORINE** che svolgono la funzione di canali per entrata/uscita di sostanze idrofiliche a basso PM

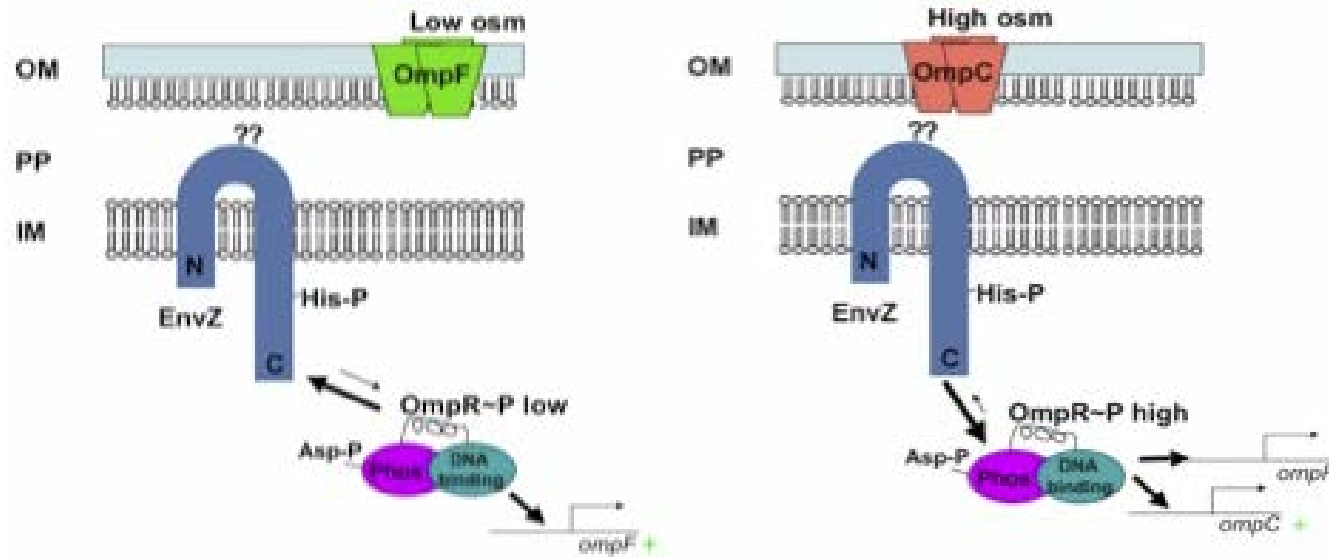
PORINE aspecifiche formano canali acquosi per il passaggio di piccole molecole
PORINE specifiche per il passaggio di uno o un piccolo gruppo di composti



Porine sono proteine transmembrana costituite da 3 subunità identiche associate a formare pori di circa 1nm di diametro



L'alternanza tra le porine OmpF e OmpC



Se la pressione osmotica è bassa viene sintetizzata **OmpF** una porina dotata di un poro più ampio ○

Se la pressione osmotica è più elevata viene sintetizzata **OmpC** una porina con un poro di dimensione ridotte. ○

Il regolatore è la proteina **OmpR** che quando viene fosforitata **OmpR-P** agisce come

* **Attivatore** del gene *ompC* * **Repressore** del gene *ompF*

EnvZ è il sensore del sistema tipico esempio di sistema a due componenti

Esportazione e secrezione delle proteine

Si calcola che i due terzi delle proteine sintetizzate da un microrganismo unicellulare vengono secrete o esportate

Per esportazione si fa riferimento al trasferimento di una proteina da un compartimento cellulare ad un altro (dal citoplasma allo spazio periplasmatico).

Con il termine secrezione facciamo riferimento al trasporto di una proteina all'esterno della cellula.

Infine, per traslocazione si intende il trasferimento di una proteina da una cellula ad un'altra.

La secrezione differisce nei batteri Gram+ e Gram-

Nei batteri Gram positivi la proteina:

1. È trasportata da un complesso proteico attraverso I.M.
2. transita attraverso lo strato poroso di PG
3. È versata verso l'esterno o inclusa o ancorata nel PG

Nei batteri Gram negativi la proteina :

1. È trasportata da un complesso proteico attraverso I.M.
2. Deve resistere alla degradazione nello periplasma
3. Deve attraversare la membrana esterna

In entrambi i casi il meccanismo principale per attraversare la I.M. è la traslocazione SEC -dipendente

L'energia viene generalmente ricavata dall'idrolisi di molecole ad alta energia (ATP e GTP) e talvolta dalla forza protonmotrice

IM=membrana citoplasmatica
PG=Peptidoglicano

ESPORTAZIONE NEI GRAM-NEGATIVI

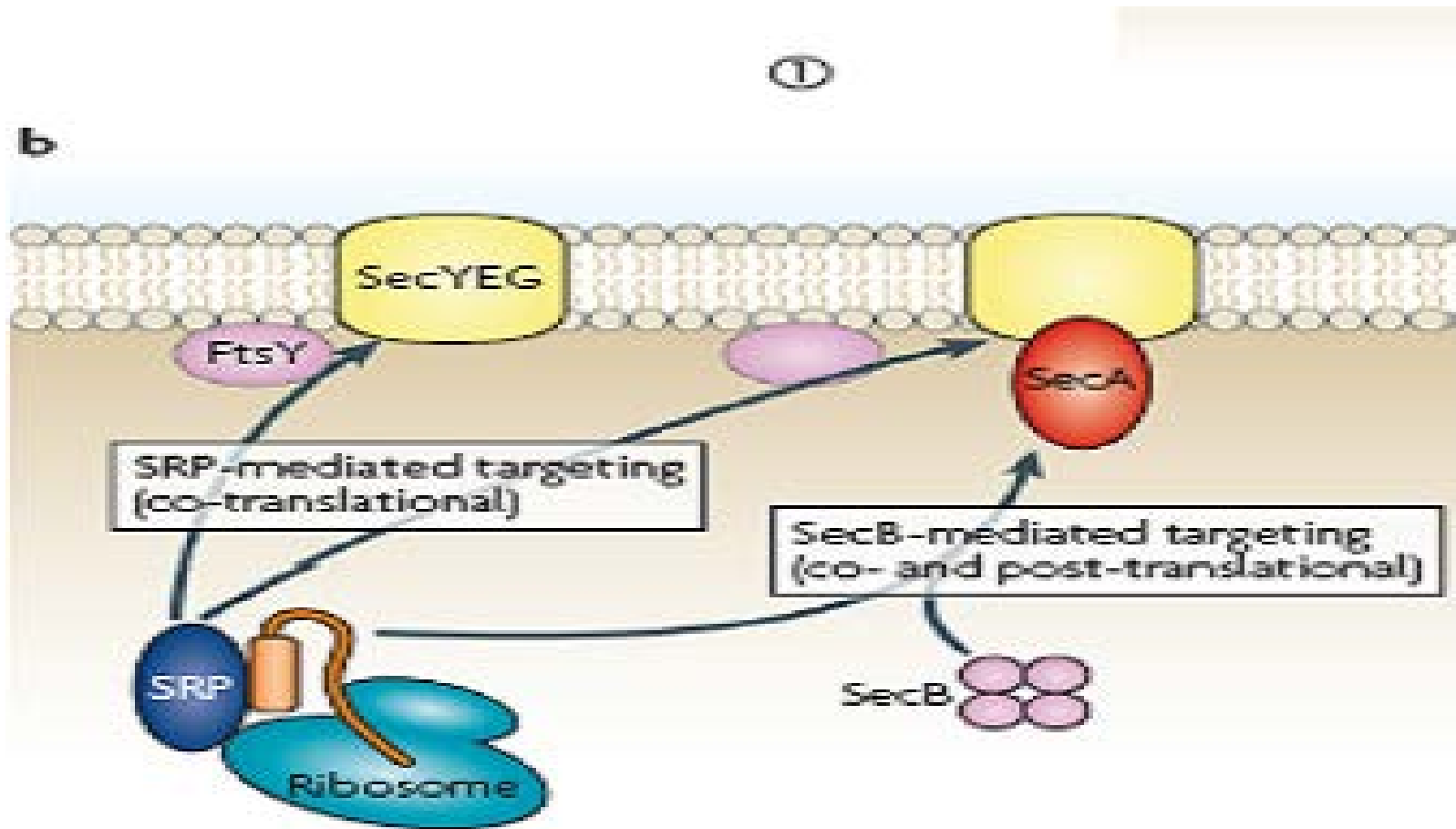
Nei Gram negativi sono stati individuati due sistemi di esportazione delle proteine fuori dal citoplasma

sistema *secA/B* e quello SRP

In entrambi i casi si tratta di sistemi di esportazione generali che sfruttano la presenza di un segnale aminoacidico all' NH_2 terminale della proteina. Questo segnale, dopo l'esportazione, viene eliminato da una peptidasi anch'essa non specifica ...

I due sistemi utilizzano un canale trans-membranario comune per l'esportazione della proteina attraverso la IM, ma si distinguono per il fattore che interagisce ed indirizza la proteina da esportare a questo complesso membranario.

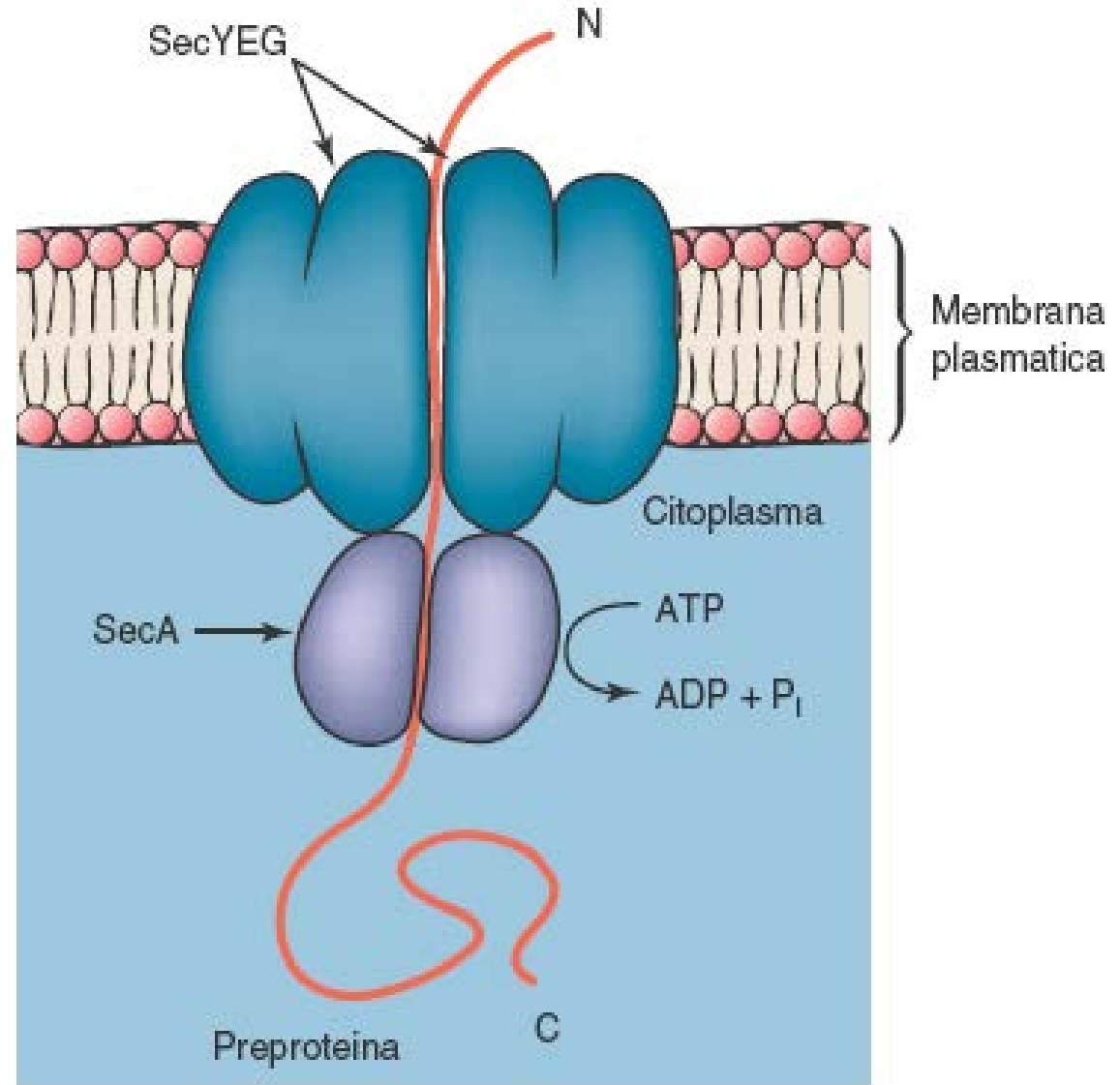
Il riconoscimento avviene tramite il complesso SRP o la proteina SecB



La via Sec dipendente definita anche GSP General Secretory Pathway

È la più diffusa e media
o il passaggio delle
proteine attraverso la
membrana plasmatica o
la loro integrazione
nella membrana.

Le proteine sono
sintetizzate sotto
forma di preproteine.



(a)

Sistemi di trasporto degli zuccheri a confronto

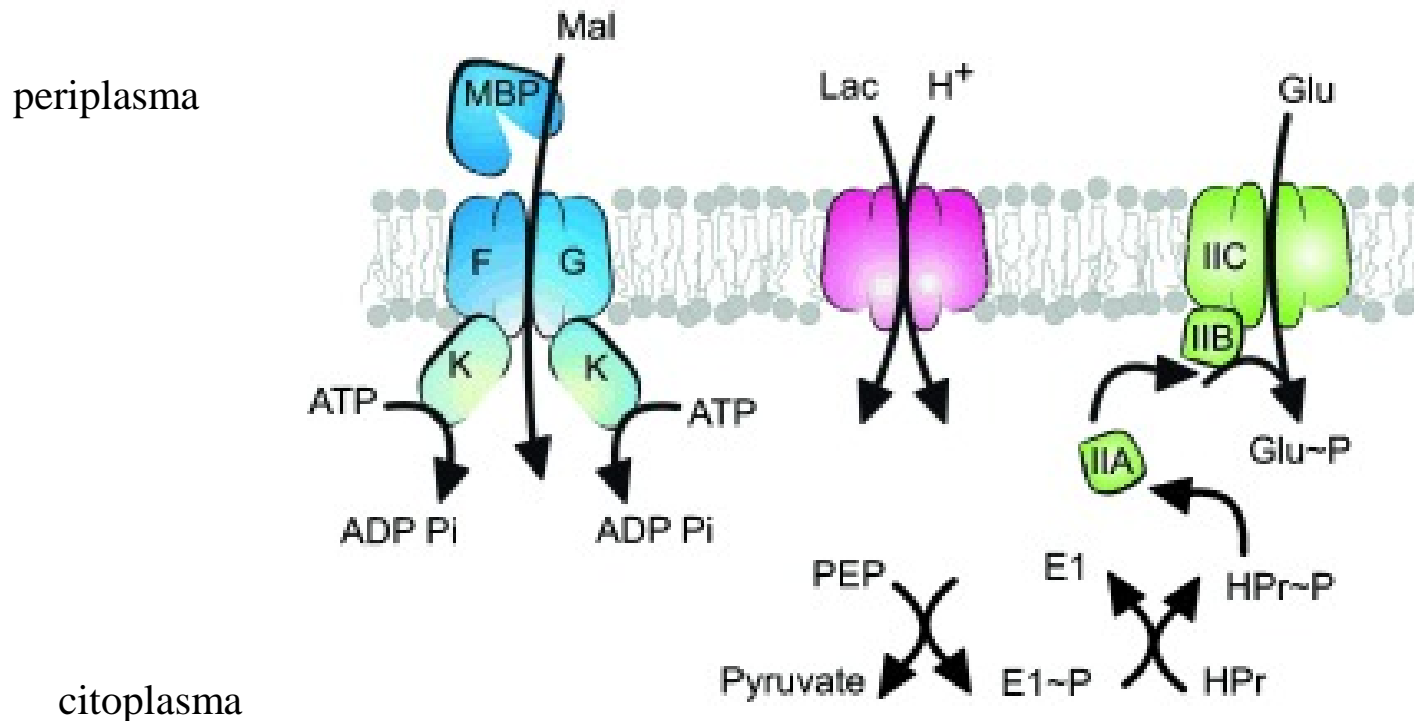
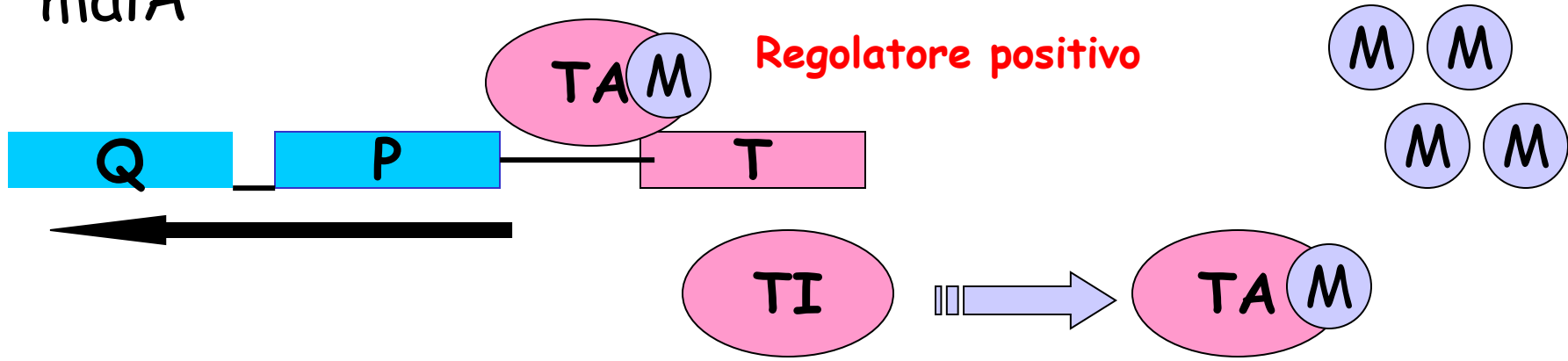
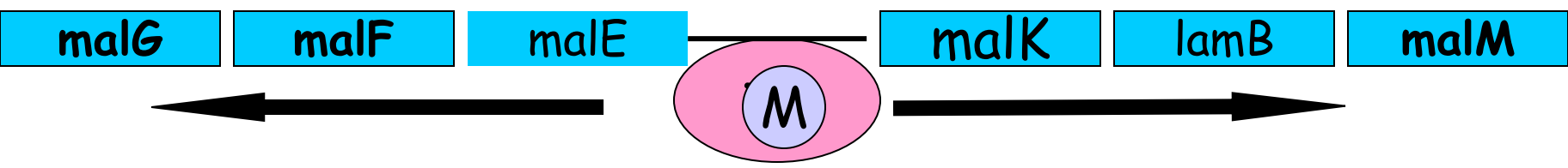


Figure 1: Examples of the structural organization of primary (the *E. coli* maltose transporter MalFGK, blue), secondary (the *E. coli* lactose transporter LacY, pink), and PTS transporters (the *E. coli* glucose transporter PtsG, green). The *E. coli* maltose transporter consists of a maltose-binding protein (MBP), two transmembrane domains (MalF and MalG), and the nucleotide-binding domain (MalK). The *E. coli* glucose transporter system comprises the general phosphocarrier proteins, HPr and Enzyme I, the cytosolic IIA domain, and the fused IIB and IIC domains.

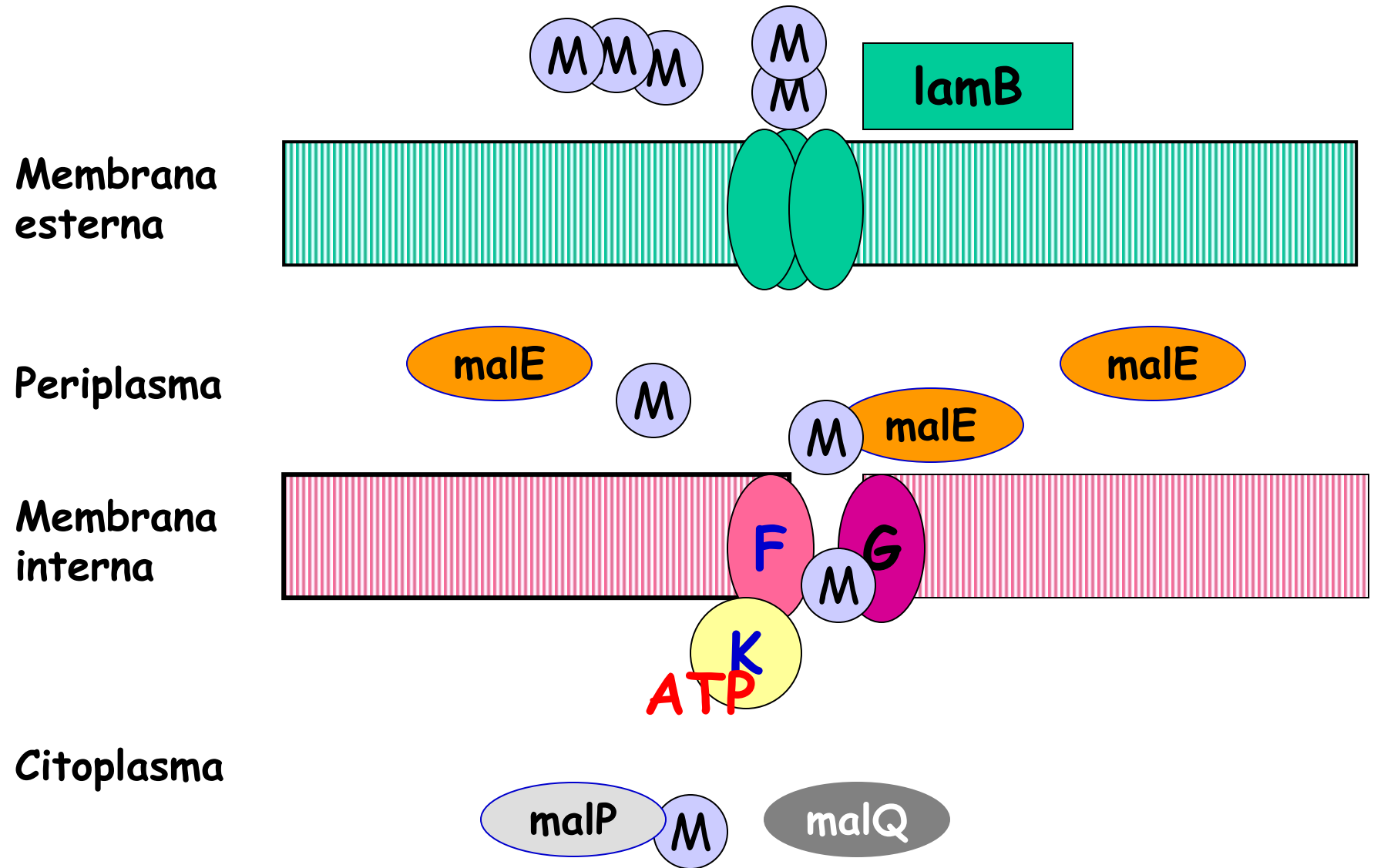
malA



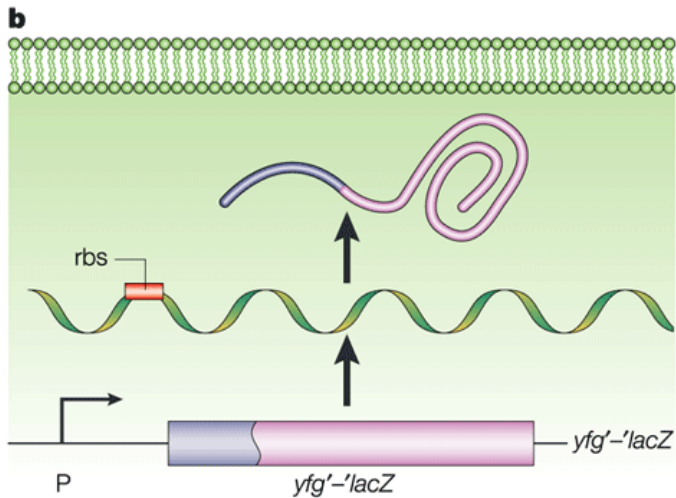
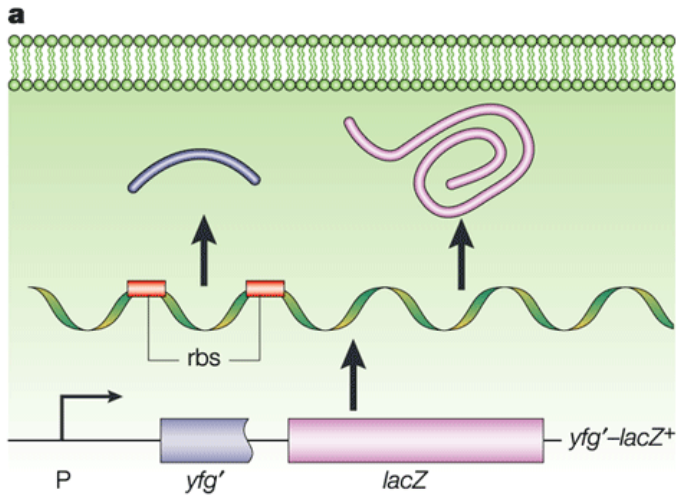
malB



Il sistema maltosio come sistema modello



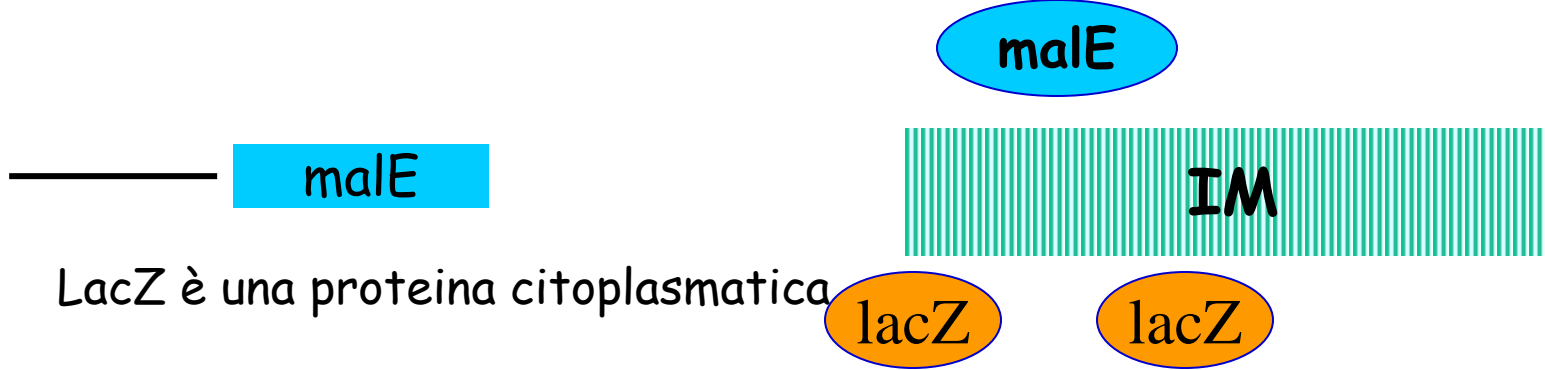
Le fusioni con il gene *lacZ*.



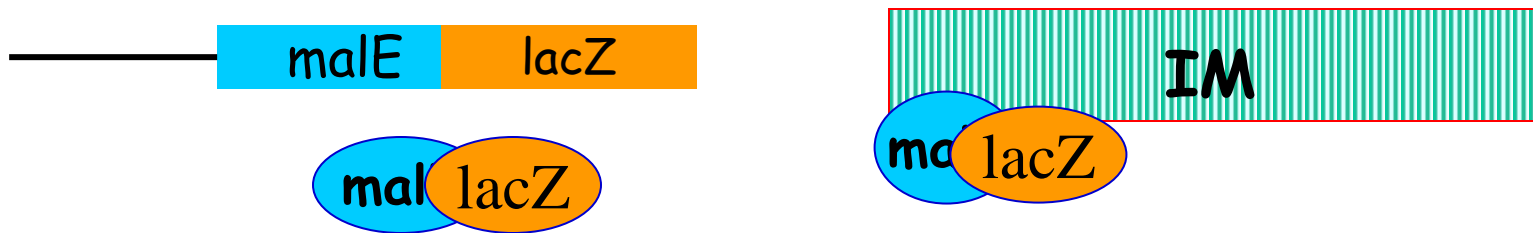
Fusione trascrizionale: il gene *lacZ* viene posto sotto controllo del promotore del gene in esame (*yfg* in questo caso)

Fusione traduzionale: il gene *lacZ* viene unito alla porzione del gene in esame e si viene a creare una proteina ibrida sotto controllo del promotore del gene in esame. La proteina LacZ sarà funzionale anche se non completa

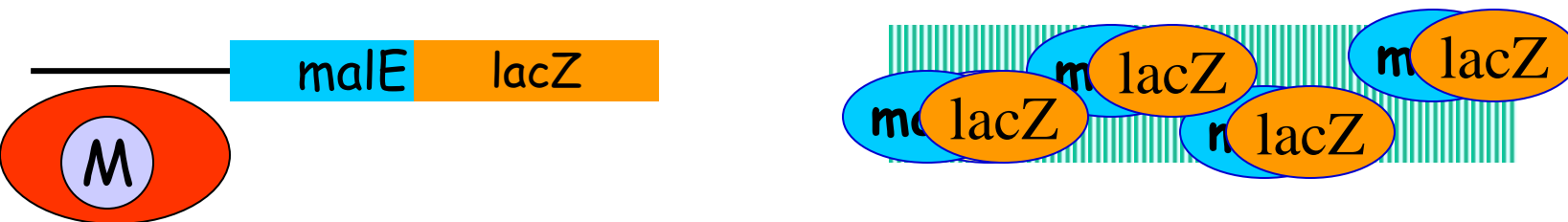
The target gene *yfg* ('your favourite gene') is transcribed from its promoter (P). **a** | a 5' fragment of the target gene (*yfg'*) is fused to a wild-type *lacZ*⁺ gene to make a transcriptional fusion. In this construct, the transcription of *lacZ*⁺ is driven by the *yfg* promoter. The polycistronic mRNA that is produced is translated by ribosomes that bind independently to the ribosome-binding sites (rbs) that are located immediately upstream of each open reading frame to produce an amino-terminal fragment of Yfg and wild-type β -galactosidase. **b** | a 5' fragment of the target gene (*yfg'*) is fused in the correct translational reading frame to a large 3' fragment of *lacZ* (*'lacZ*) to produce a translational fusion. Transcription of this hybrid gene is driven by the *yfg* promoter (P), and the mRNA that is produced is translated from the *yfg* rbs to produce a hybrid protein with amino-terminal sequences of Yfg and a large functional carboxy-terminal fragment of β -galactosidase.



Esperimento della fusione malE-LacZ

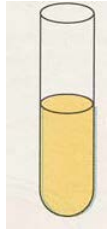
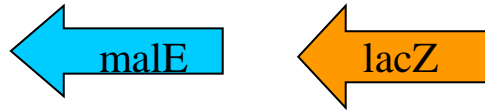


La fusione malE lacZ dal citoplasma si dirige verso la membrana interna



In presenza di maltosio si ha una produzione elevata della fusione malE-lacZ che porta a morte la cellula perché la proteina di fusione non riesce ad arrivare al periplasma . Si possono quindi selezionare Maltosio resistenti

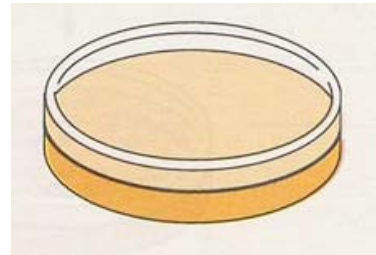
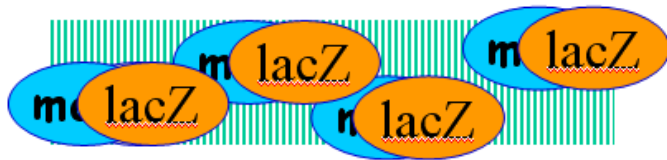
Come si sono identificate le regioni indispensabili per l'esportazione?



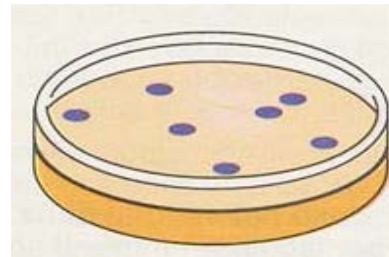
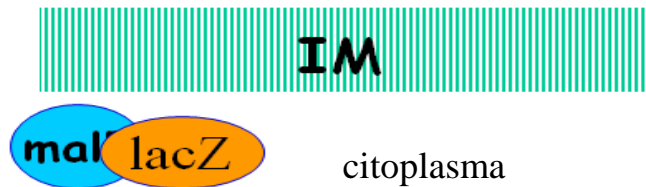
Un ceppo di E.coli contenente la fusione malE-lacZ viene fatto crescere e piastrato poi in presenza di maltosio



La presenza dell'estremità N terminale della proteina MalE fornisce il segnale alla proteina citoplasmatica LacZ per dirigersi verso la IM



In seguito ad induzione con Maltosio, la presenza di tante proteine ibride MalE-LacZ nella membrana interna porta a morte le cellule

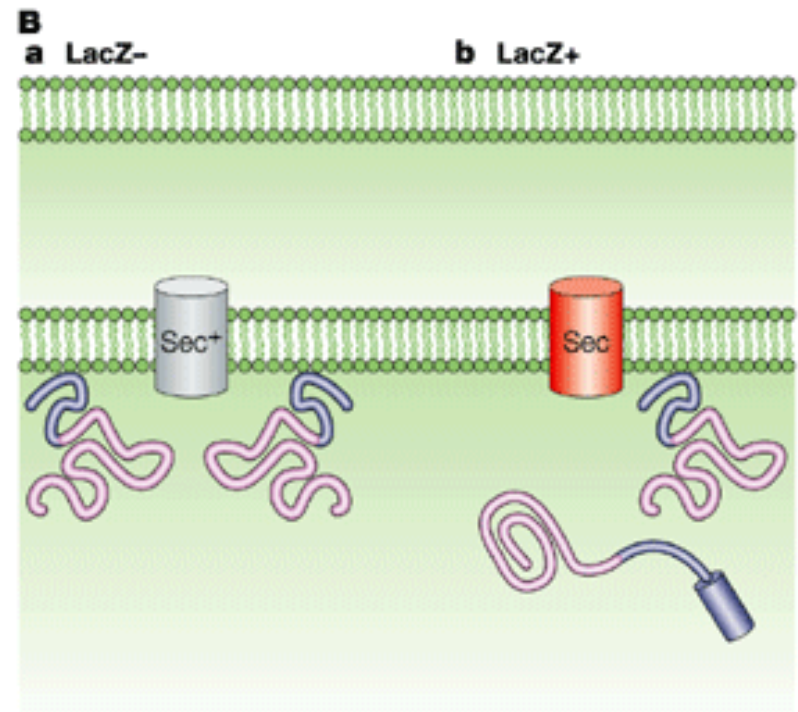
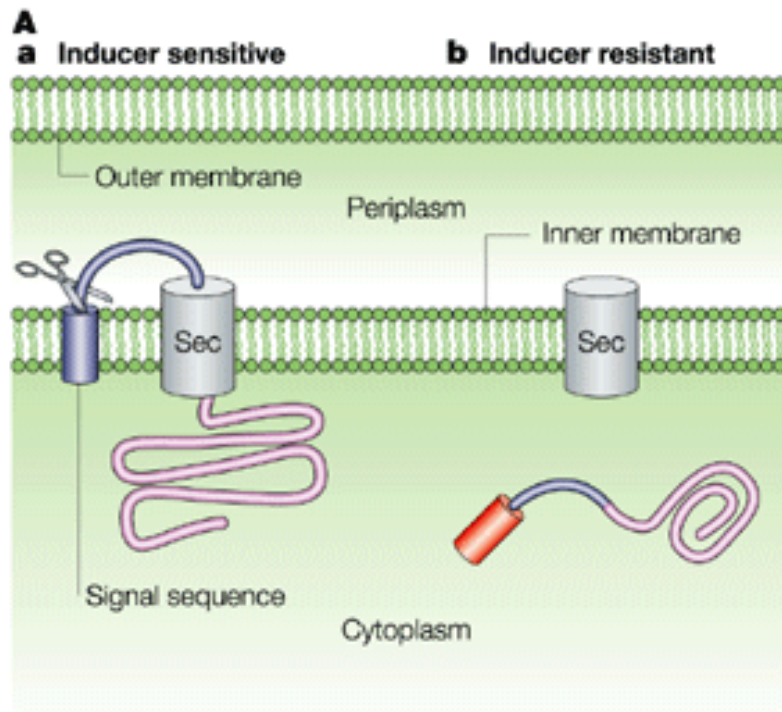


I mutanti che riescono a crescere contengono mutazioni che impediscono alle proteine ibride MalE-LacZ di dirigersi verso la membrana.

Dove sono localizzate le mutazioni che permettono ai ceppi contenenti una fusione malE-lacZ di poter sopravvivere?

1. All'interno di una sequenza che ne impedisce l'esportazione rendendo la proteina citoplasmatica

2. All'interno dei geni che sintetizzano proteine coinvolte nell'esportazione

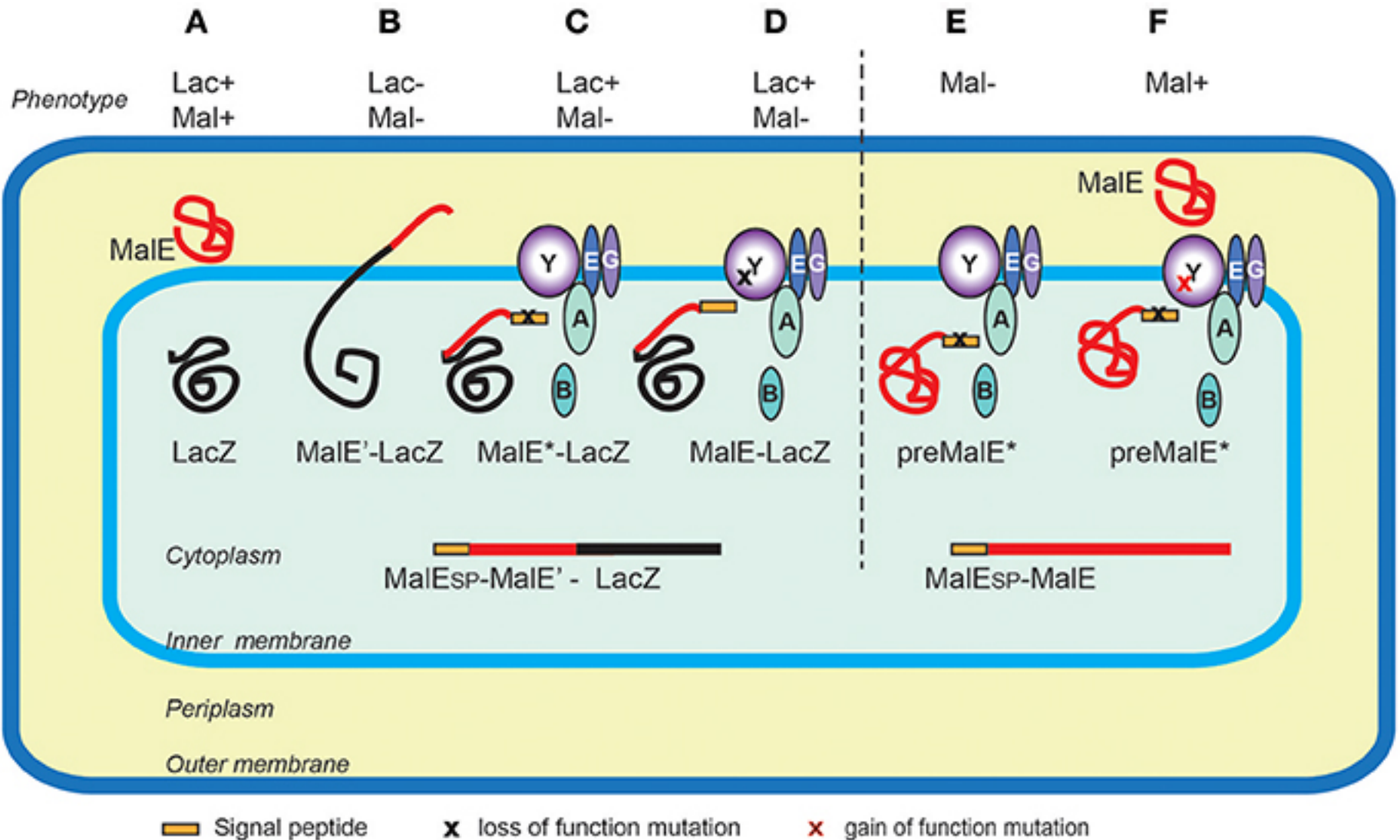


I mutanti resistenti all'induttore avranno una mutazione nella sequenza segnale o...

nel macchinario che controlla l'esportazione della proteina ibrida

Aa | LacZ-hybrid proteins that have a functional signal sequence at the amino terminus are directed to the secretion machinery (Sec) in the cytoplasmic membrane for translocation from the cytoplasm. Amino-terminal sequences are translocated, and the signal sequence can be processed. However, β -galactosidase folds in the cytoplasm faster than it can be translocated and this results in a lethal jamming of the secretion machinery if hybrid-protein synthesis is induced to high levels. **Ab** | Signal-sequence mutations (mutant proteins are shown in red) relieve jamming because they prevent targeting of the hybrid protein to the Sec machinery. The β -galactosidase that accumulates in the cytoplasm folds normally and is fully active. **Ba** | Under non-inducing conditions, the low levels of LacZ hybrid protein that are produced are targeted to the cell envelope (designated here as hybrid protein that is associated with the membrane) in which β -galactosidase misfolds and is inactive (LacZ⁻). **Bb** | Mutations that compromise the Sec machinery interfere with hybrid-protein secretion, allowing a fraction of the molecules to remain in the cytoplasm where β -galactosidase folds properly and is fully active (LacZ⁺). **Ca** | Targeting of LacZ-hybrid proteins

L'identificazione del Sistema Sec.



LamB λ receptor

met met ile thr leu arg lys leu pro leu ala val ala val al ala gly val met ser ala gln ala met ala val asp
+ + asp glu glu arg



MalE maltose binding protein

met lys ile lys thr gly ala arg ile leu ala leu ser ala leu thr thr met met phe ser ala ser ala leu ala lys
+ + + glu lys arg arg



Lipoprotein

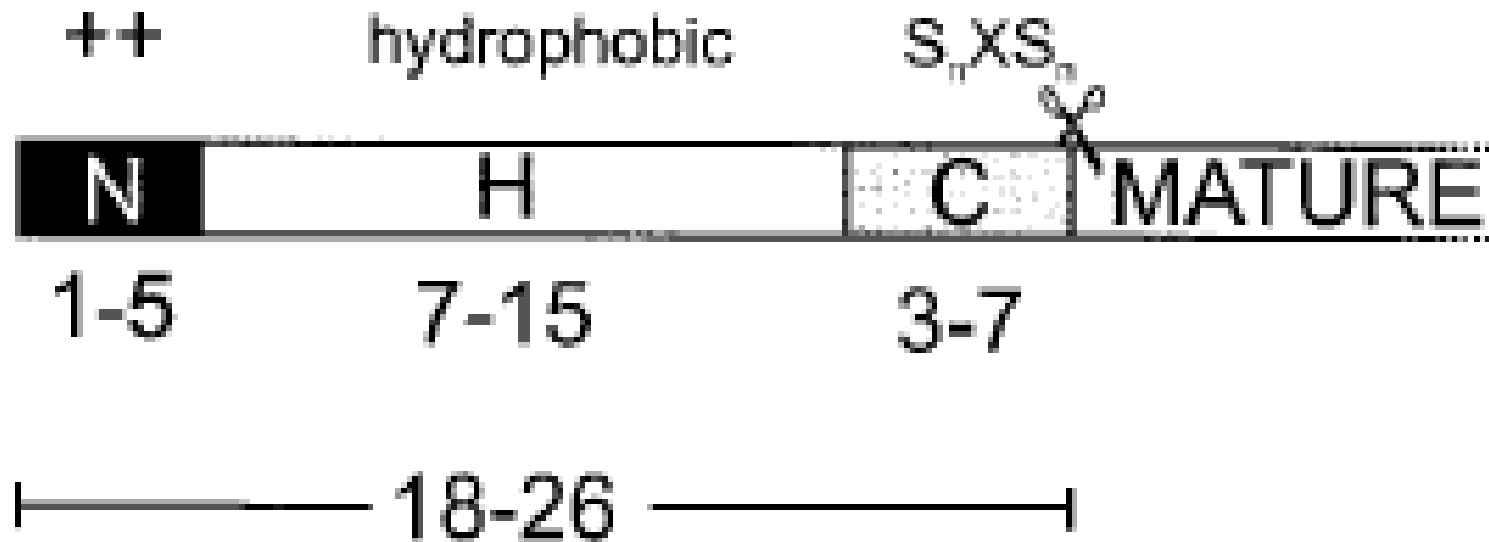
met lys ala thr lys leu val leu gly ala val ile leu gly ser thr leu leu ala gly cys ser ser
+ + asp



Idrofilica

Regione idrofobica

La tipica sequenza segnale per il sistema sec e/o SRP è caratterizzata da una regione NH2 terminale con una forte carica netta positiva, seguita da una regione idrofobica e una regione contenente il sito di tagli della Leader peptidasi

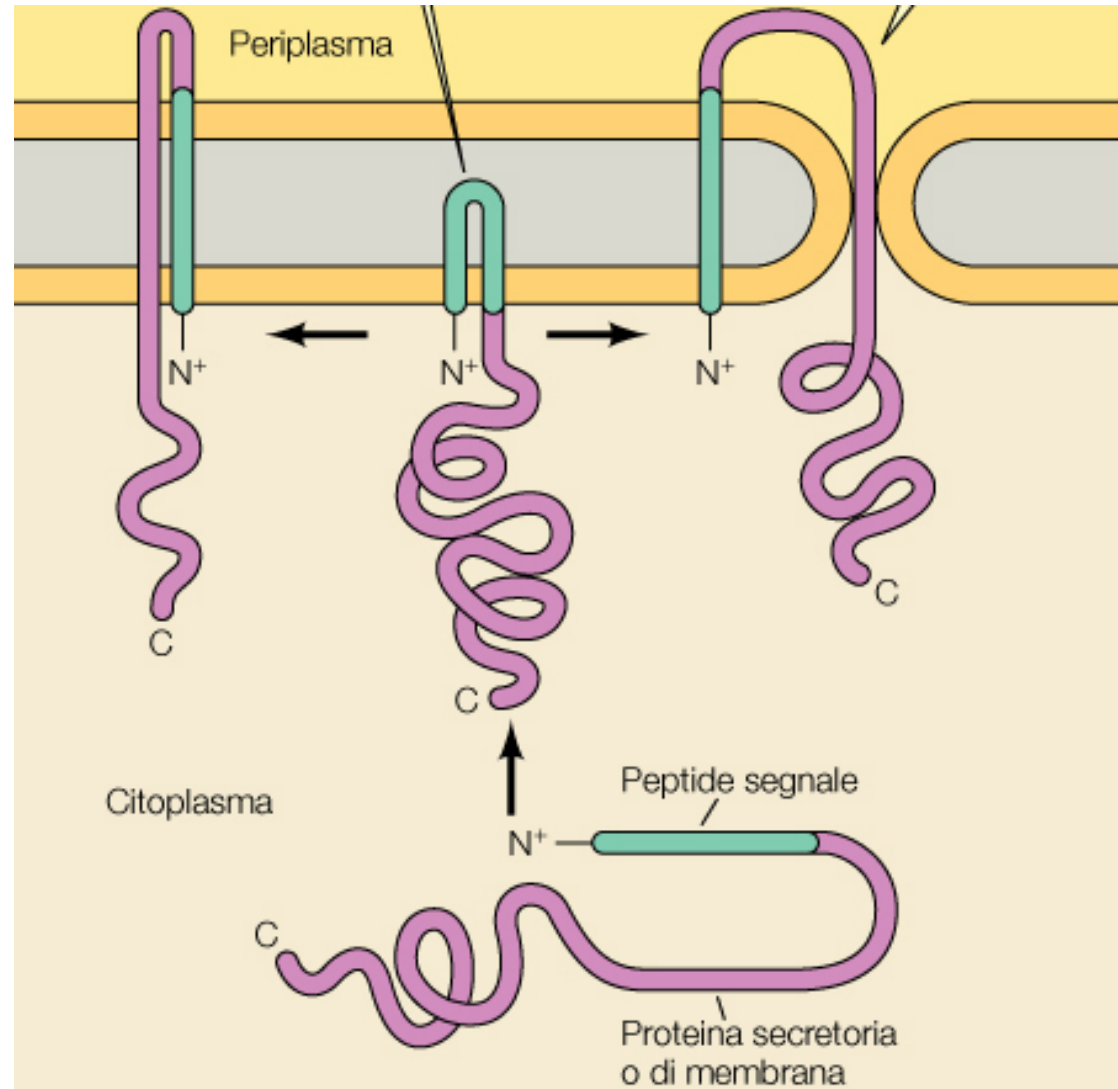


Una proteina esportata contiene una sequenza segnale

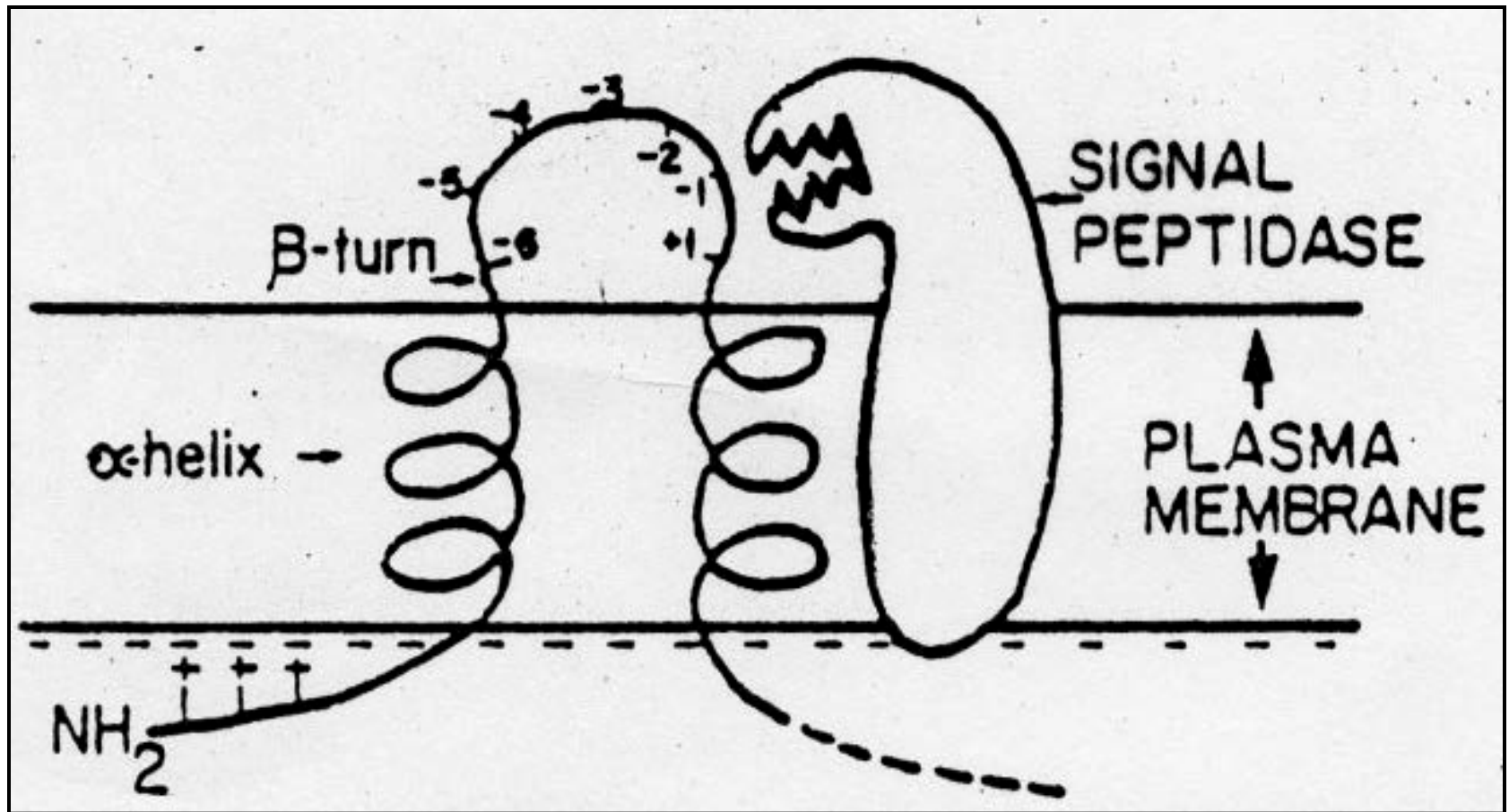
- N terminale con 1-2 AA carichi +

- 15-20 AA idrofobici (core idrofobico)

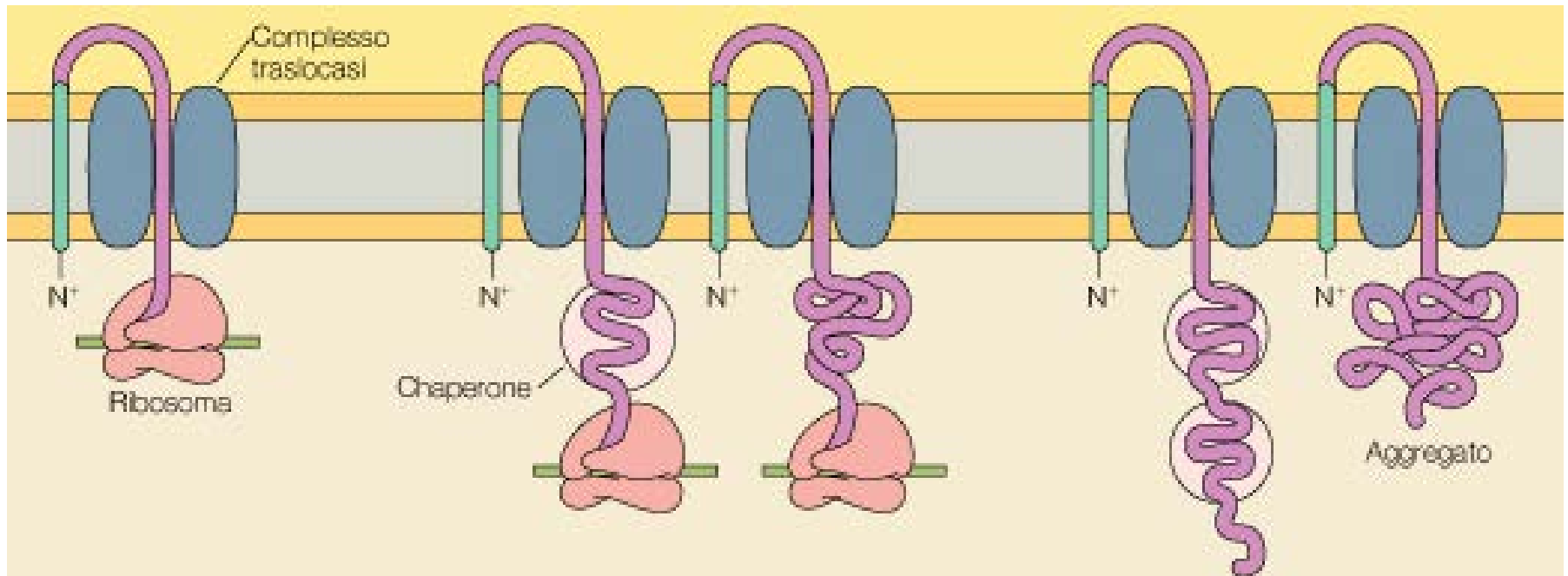
- sequenza riconosciuta dalla leader peptidasi (ultimo AA gli, ala ser)



La leader (or signal) peptidase riconosce alcuni AA localizzati circa 6AA dopo il core idrofobico con struttura A XB con A= alanina, leucina, glicina, valina , isoleucina, serina
B= alanina glicina o serina

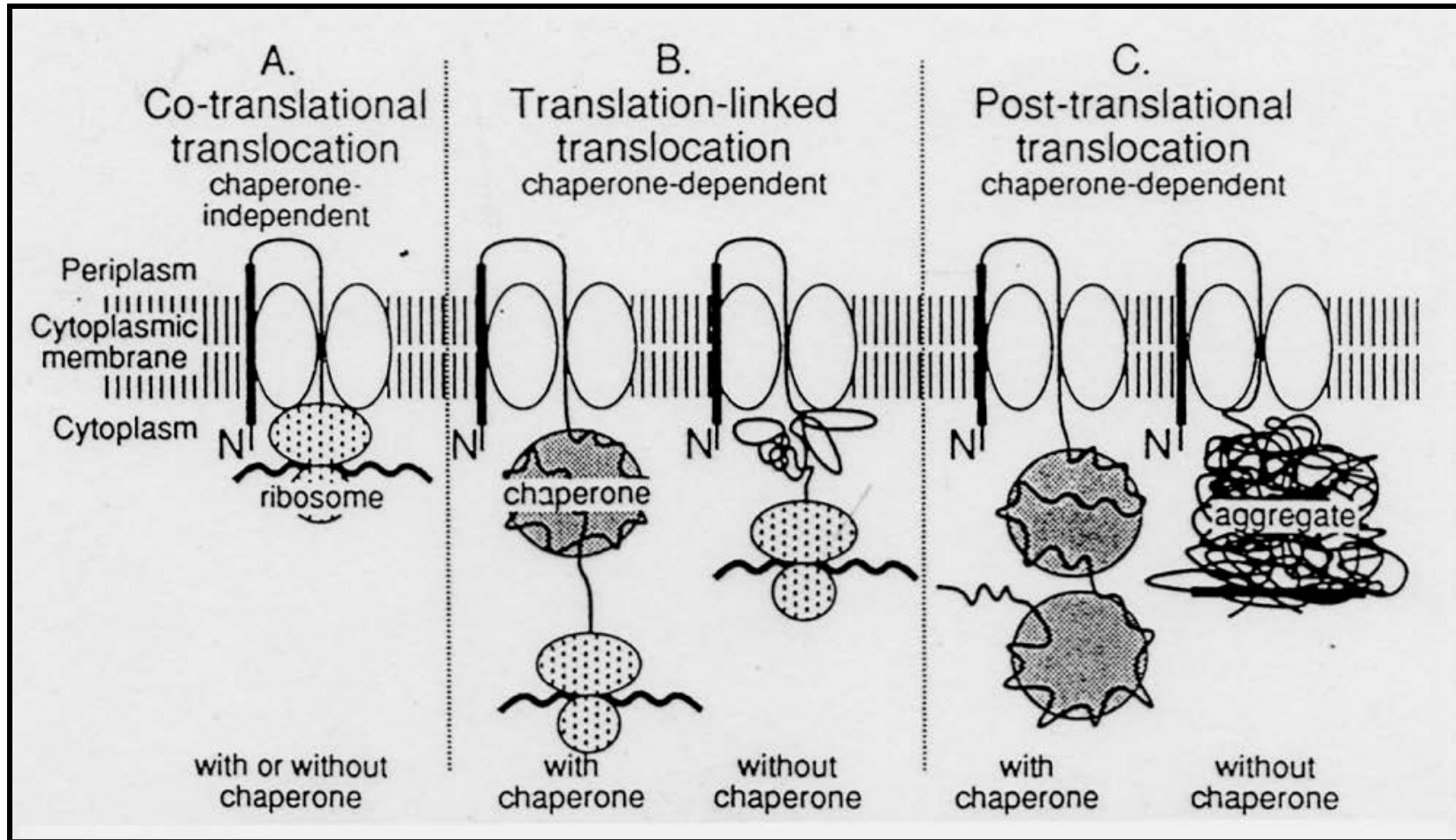


Il processo di esportazione è cotraduzionale o postraduzionale?

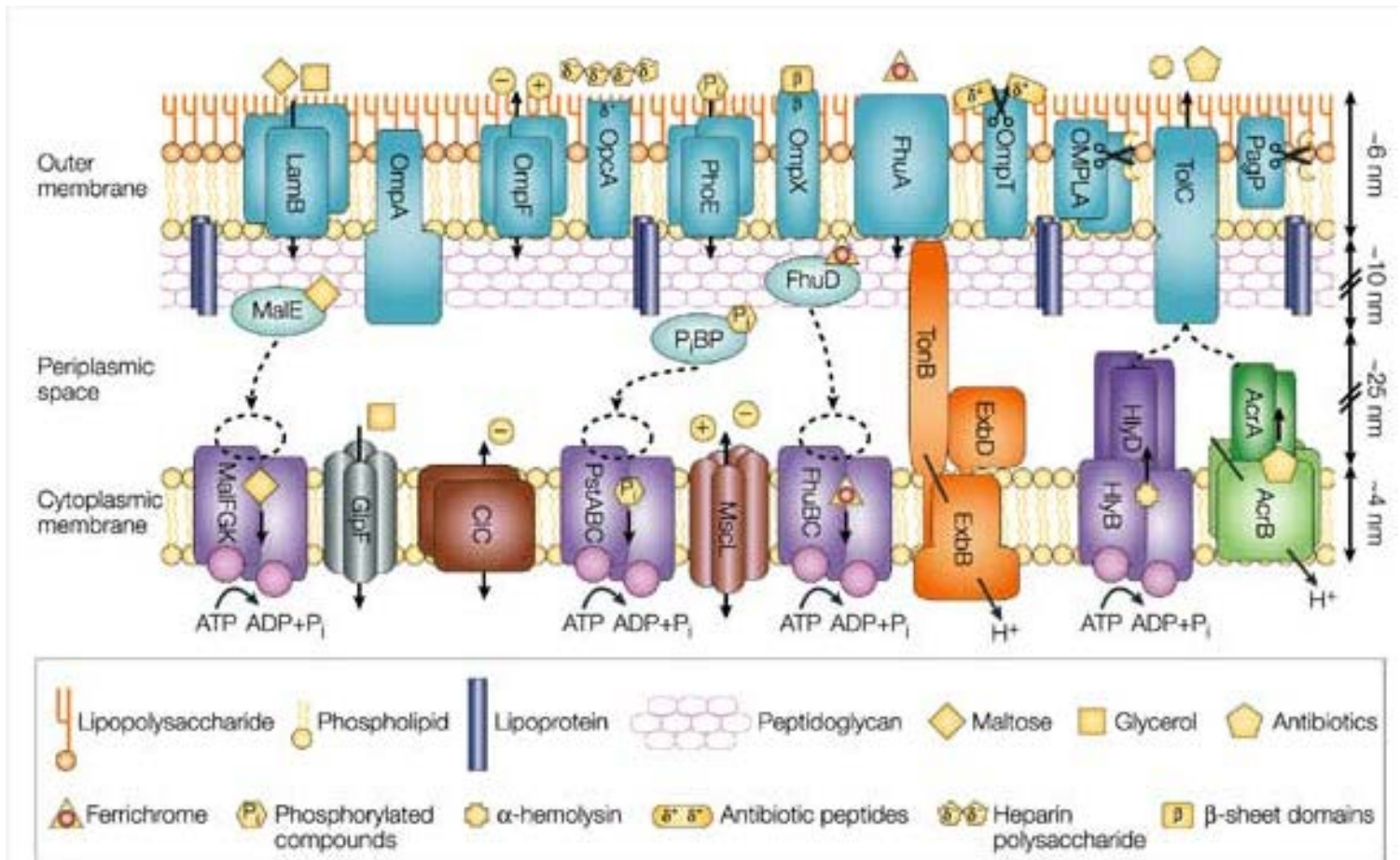


Possibili entrambi i meccanismi

L'esportazione delle proteine può essere cotraduzionale o post traduzionale , con o senza l'intervento di una ciaperonina citoplasmatica.



Le principali proteine della OM e i sistemi di trasporto



L'esportazione delle proteine verso i compartimenti esterni

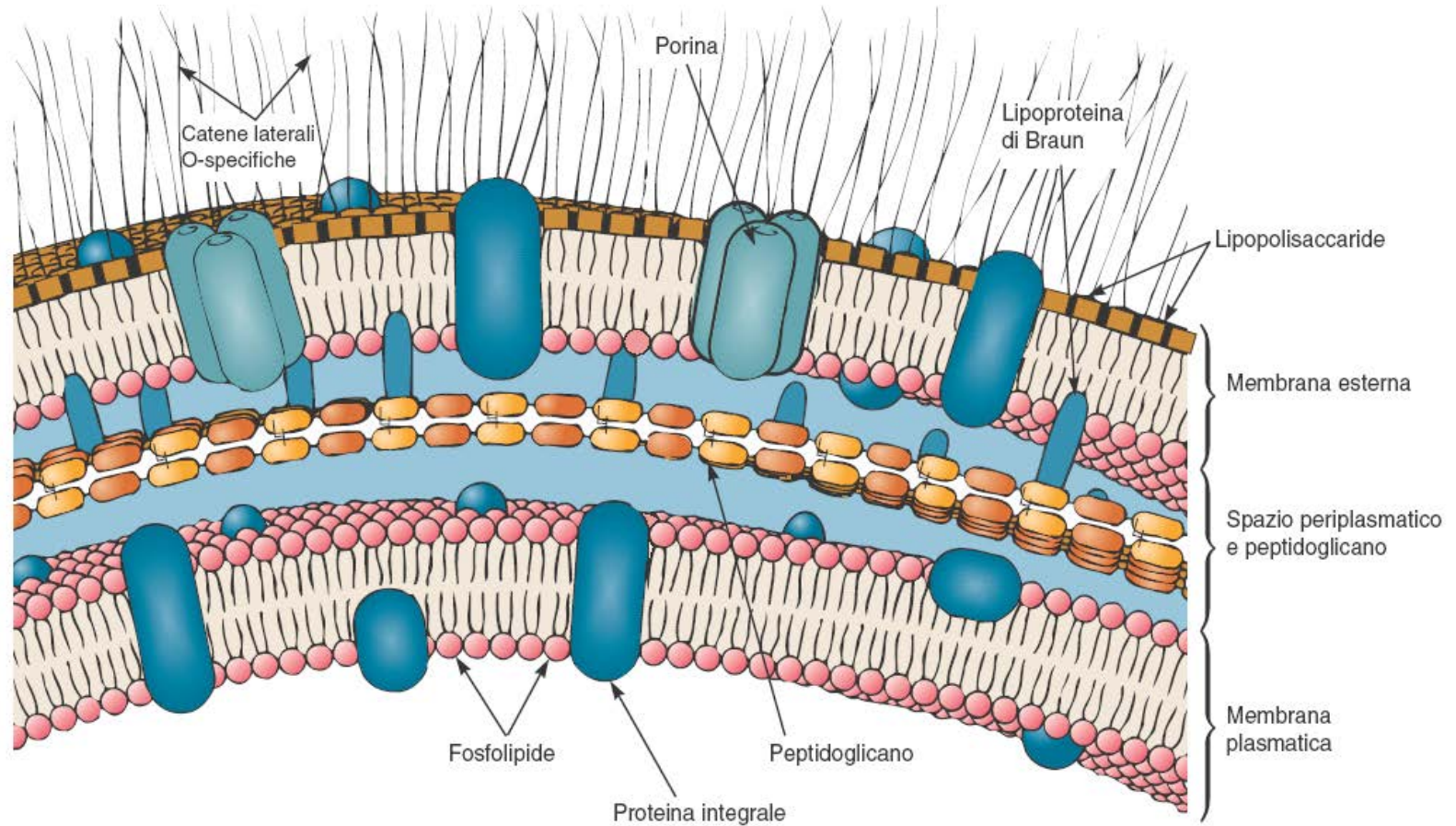
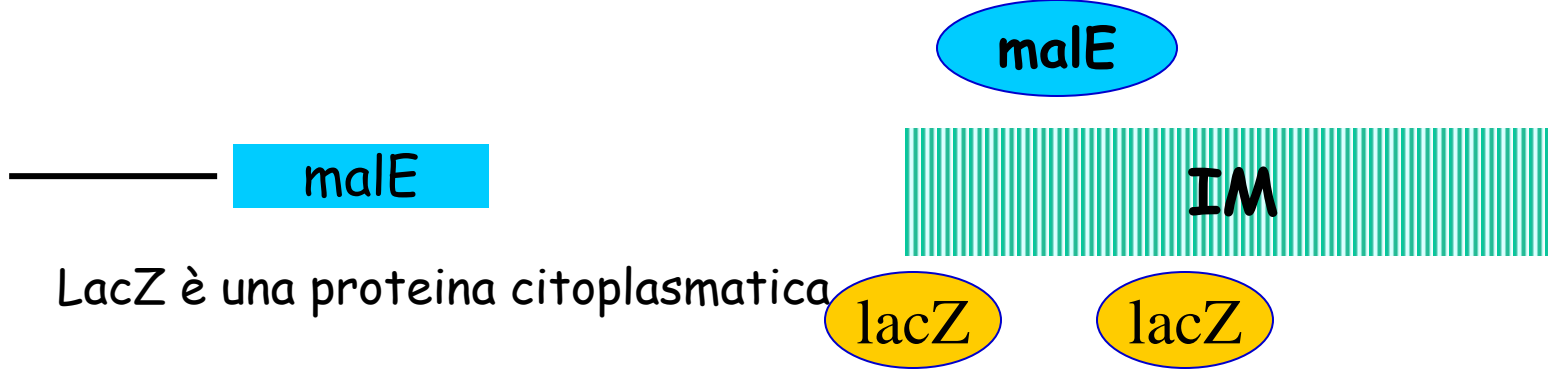
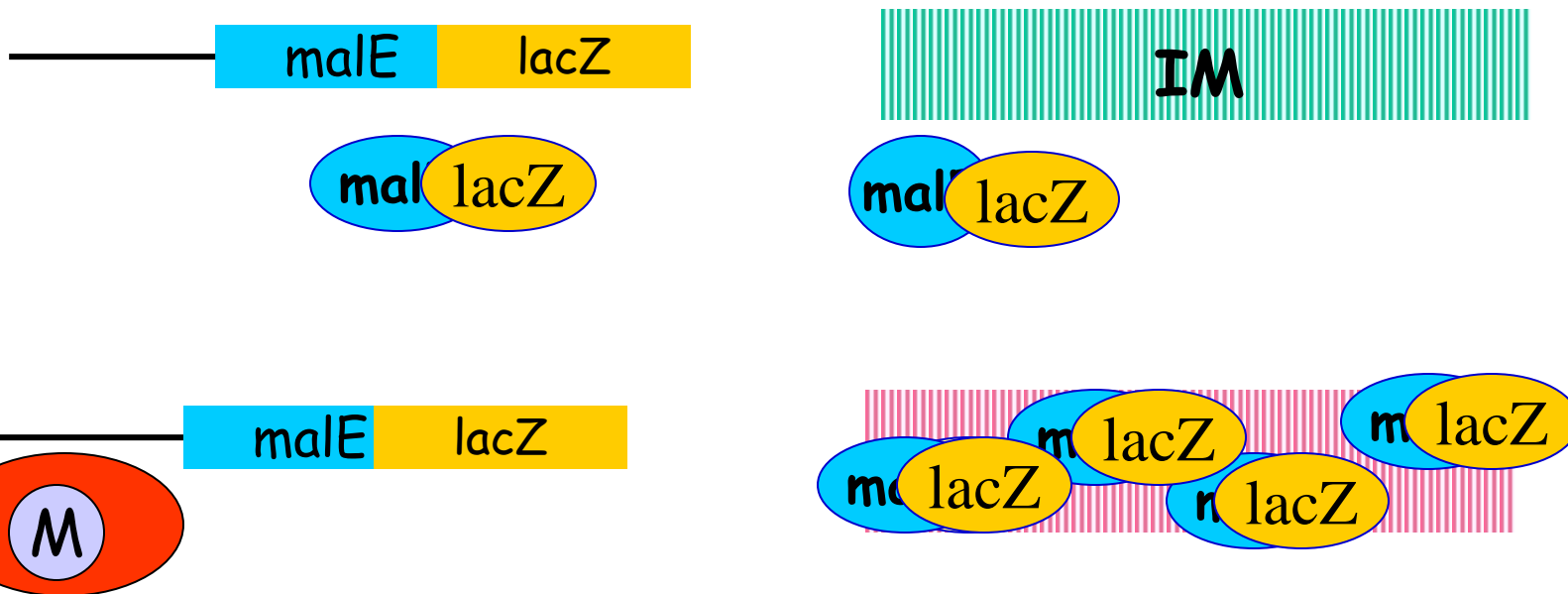


Figura 3.23 L'involucro della cellula Gram-negativa.

Genetic selections of export-defective mutants based on MalE-LacZ fusions. In wild type *E. coli* the correct localization of LacZ (cytoplasmic) and MalE (periplasmic) allows lactose catabolism and maltose uptake, respectively, conferring the ability to ferment these sugars, and the red colony phenotype on MacConkey indicator plates (**A**). The MalE-LacZ fusion proteins directed to the periplasm confer a Lac⁻ phenotype (**B**), which served as a basis for selection of spontaneous Lac⁺ mutants on lactose tetrazolium plates. These strains either contained mutations in MalE signal sequence (MalE*) (**C**), or the loss-of-function mutations in the *sec* genes encoding export factors, five of which, (SecA, B, Y, E and G) are depicted (**D**). Bacteria producing the full-length MalE precursor with a signal sequence mutation are export defective and Mal⁻ (**E**), allowing for selection of Mal⁺ suppressor mutations (gain-of-function *prl* alleles) mapping in several *sec* genes, (e.g., *secY*) that promote export of MalE* variants with signal sequence mutations (**F**). Note that the MalE signal sequence (yellow rectangle) is absent from periplasmic MalE-LacZ or MalE, as it is cleaved and degraded upon export across the IM.



Esperimento della fusione malE-LacZ



In presenza di maltosio si ha una produzione elevata della fusione malE-lacZ che porta a morte la cellula . Si possono quindi selezionare i Mal resistenti

Gli attori del sistema Sec

- SecB è una chaperonina, ovvero interagisce con la sequenza segnale della proteina nella fase di traduzione mantenendola in uno stato strutturale non corretto.
- SecA è una proteina con attività ATPasica e che è in grado di interagire con SecB quando questa ha catturato una proteina
- SecYEG formano un complesso trans-membrana che permette l'esportazione della proteina attraverso la membrana interna (YEG sono proteine transmembrana)
- SecDFYaiC coinvolte nel rilascio della proteina esportato e nella regolazione delle interazioni di SecA con la membrana (D e F sono proteina della membrana interna ma rivolte verso lo spazio periplasmatico)

I componenti del sistema SEC

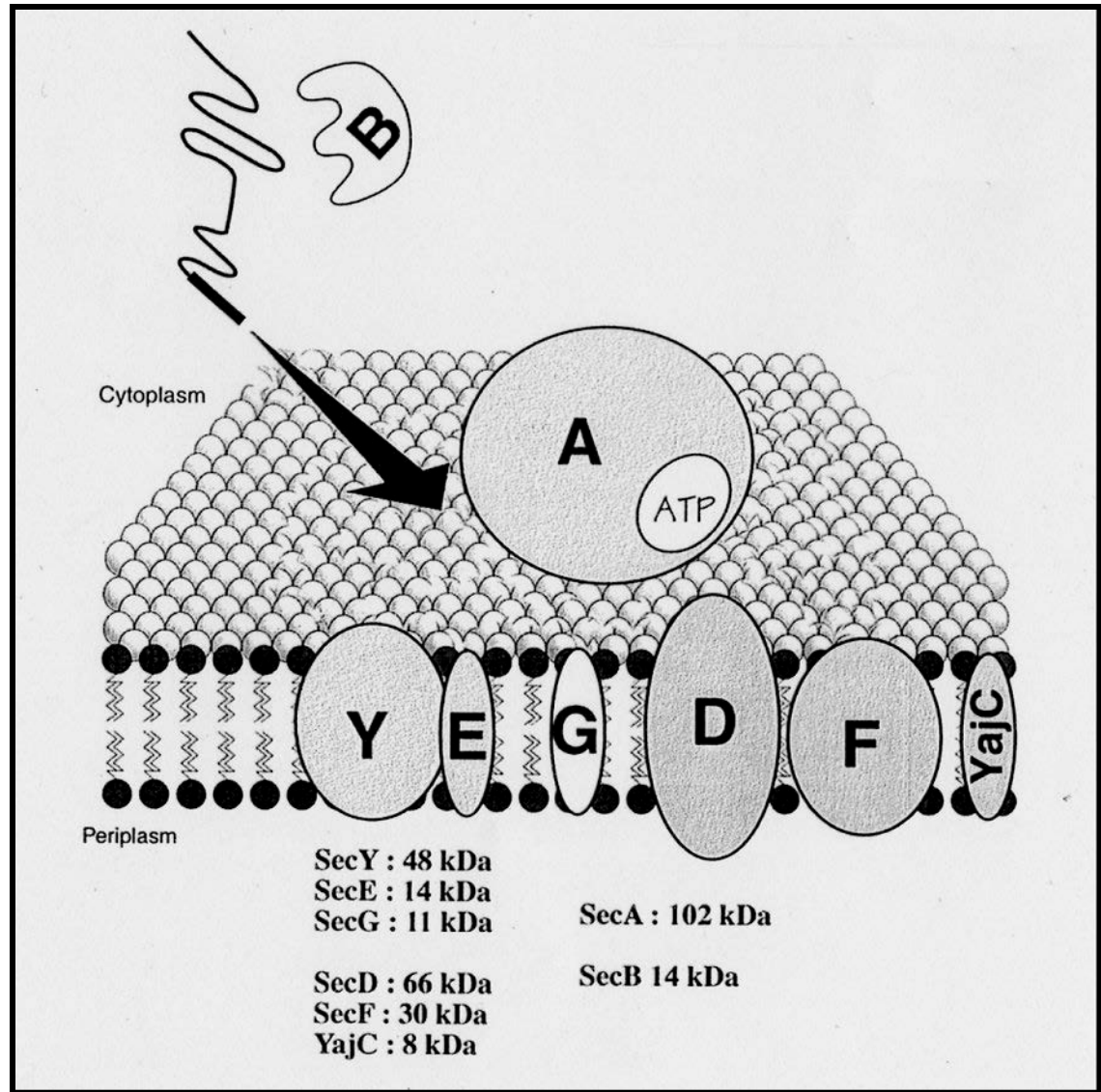
Proteine
citoplasmatiche

- * *Sec A*
- * *Sec B*

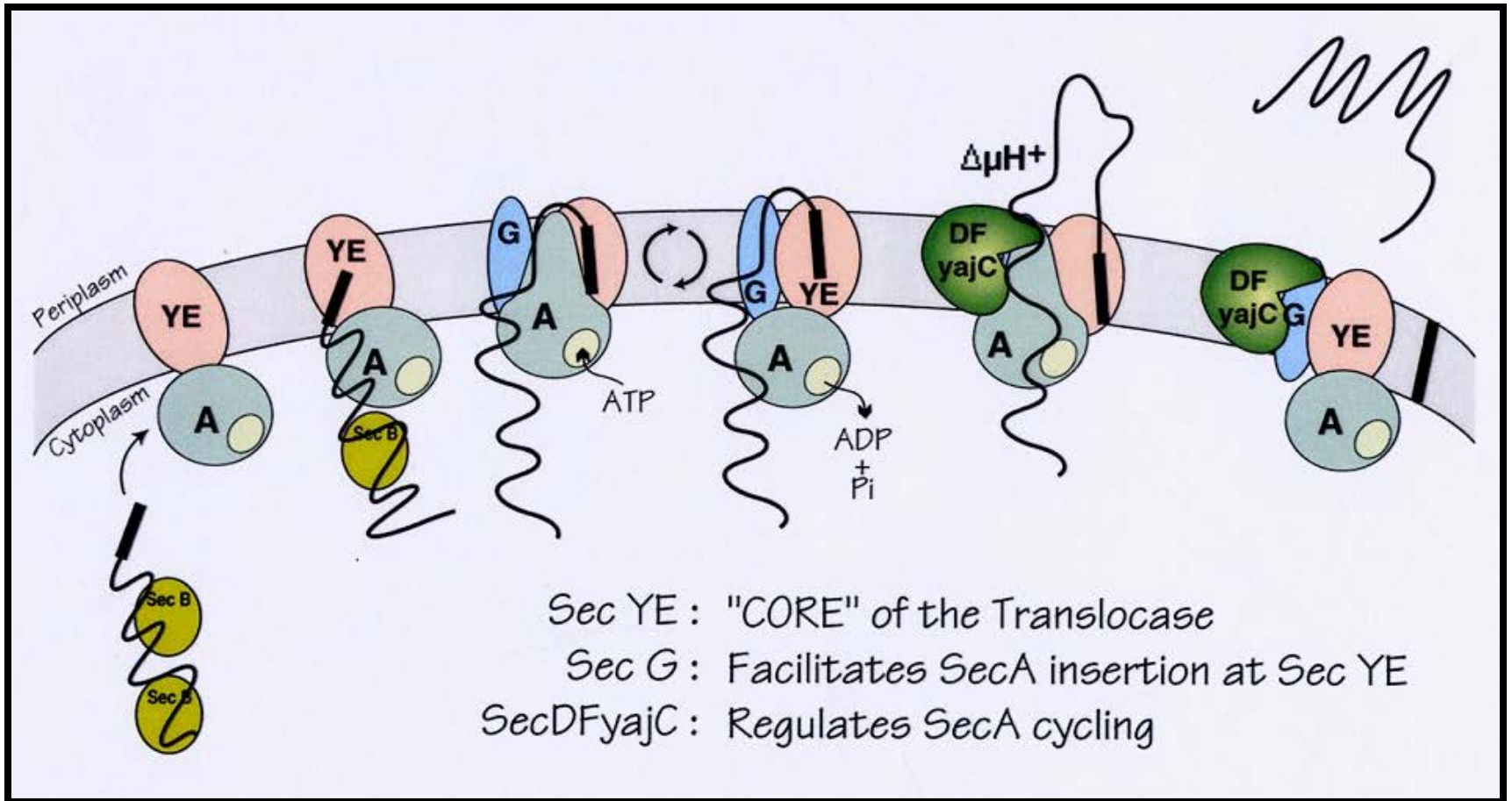
Proteine della
membrana interna:

* *SecYEG* formano il
canale attraverso il
quale passerà la
proteina da esportare

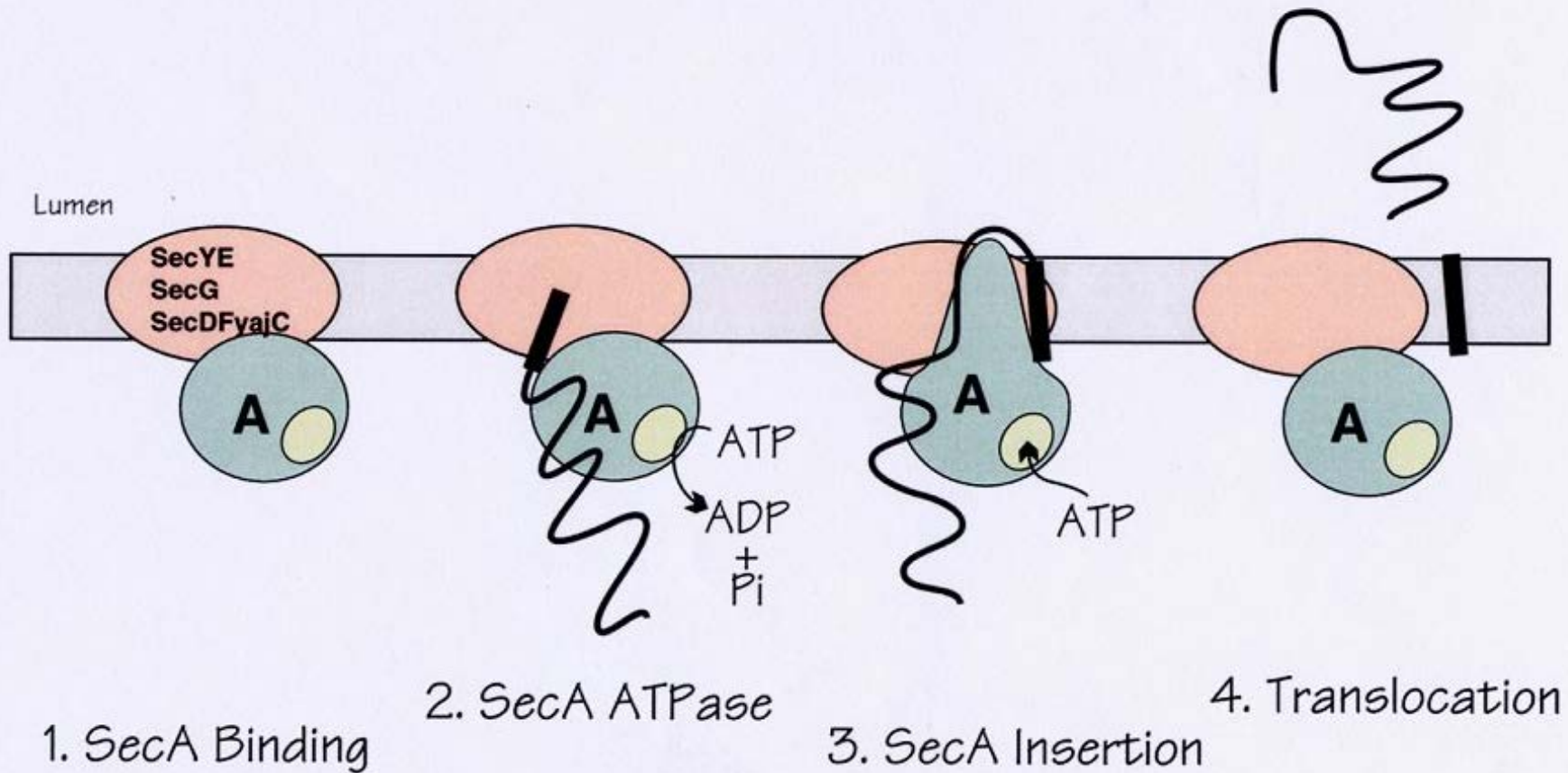
* *SecDFYajC* si
associano a *SecYEG* e
sono coinvolte nel
rilascio delle proteine
esportate dalla
membrana e nel riciclo
di *SecA*



Il sistema SEC : General Export Pathway (GEP)

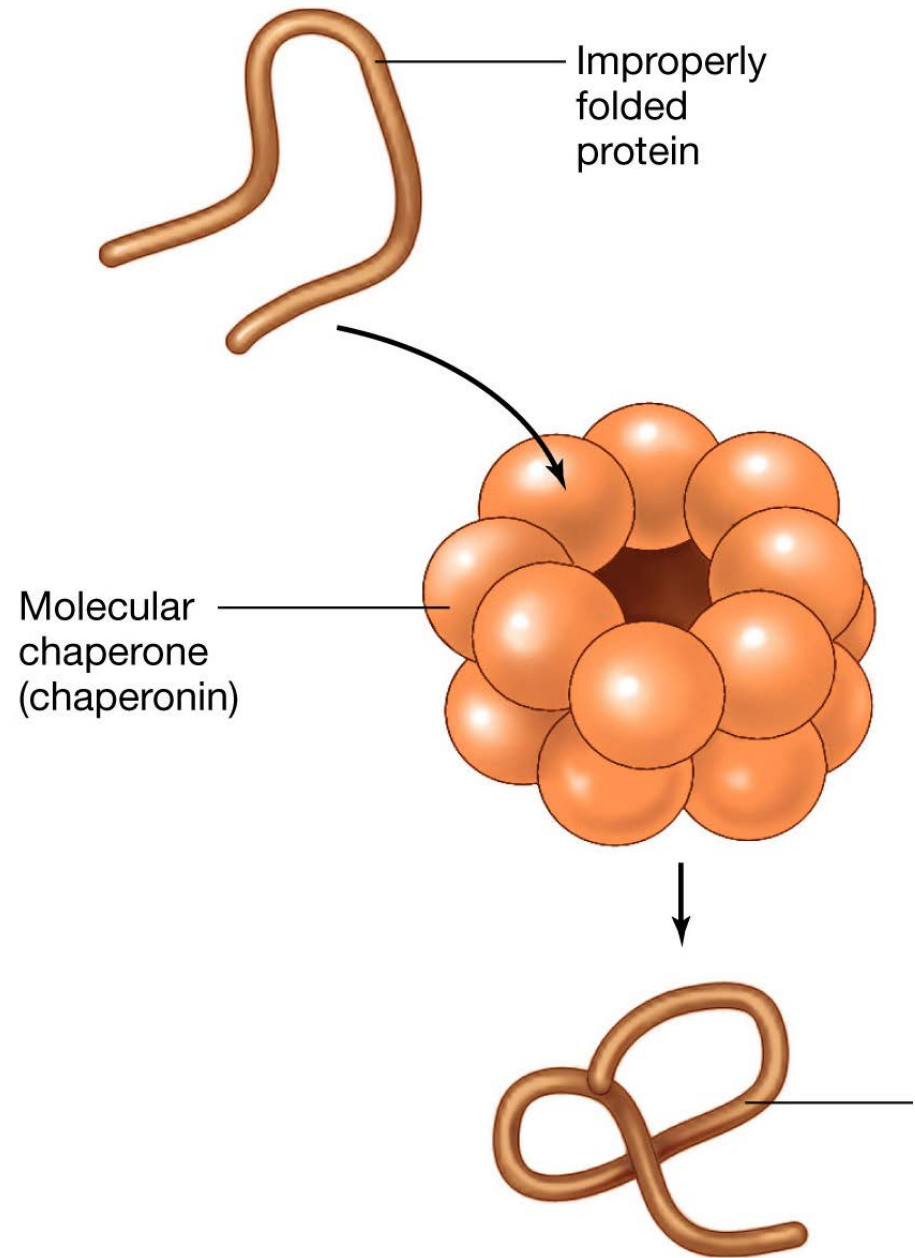


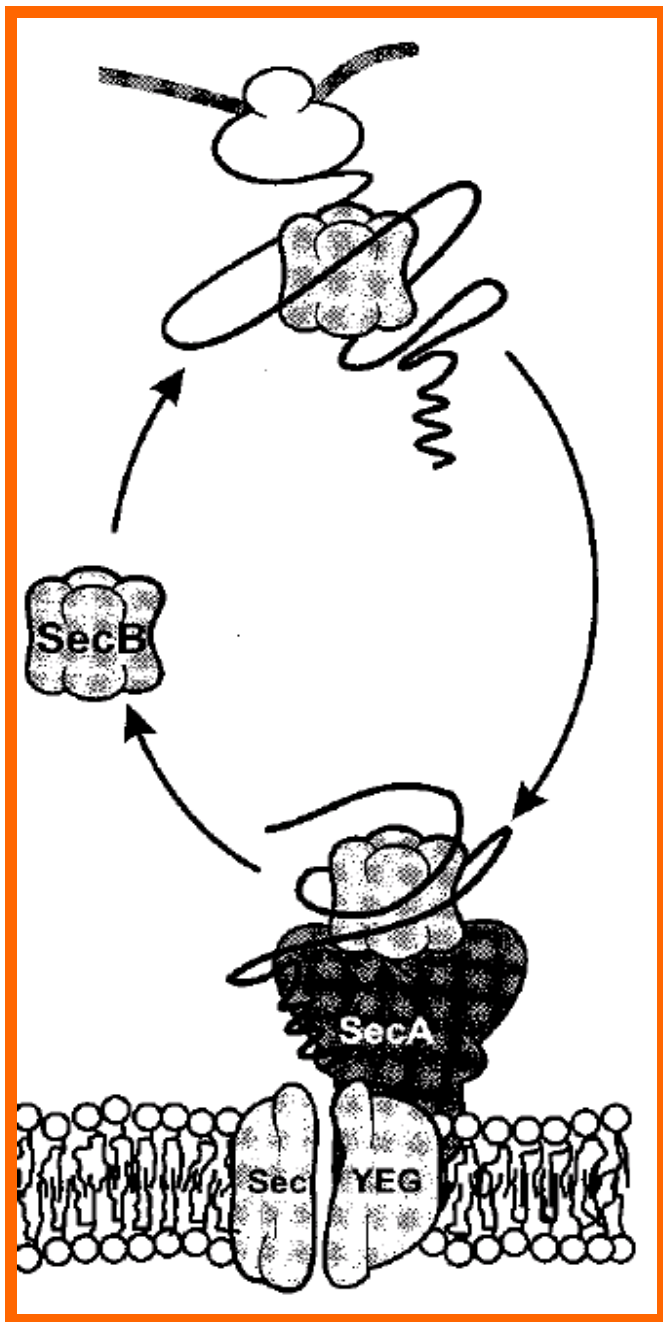
La proteina SecA è un ATP binding protein (dotata di un motivo ABC) che fornisce l'energia per il passaggio attraverso la membrana consumando ATP



SecB è una ciaperonina citoplasmatica che entra in contatto con la proteina da esportare in modo che questa non assuma una conformazione inadatta all'esportazione.

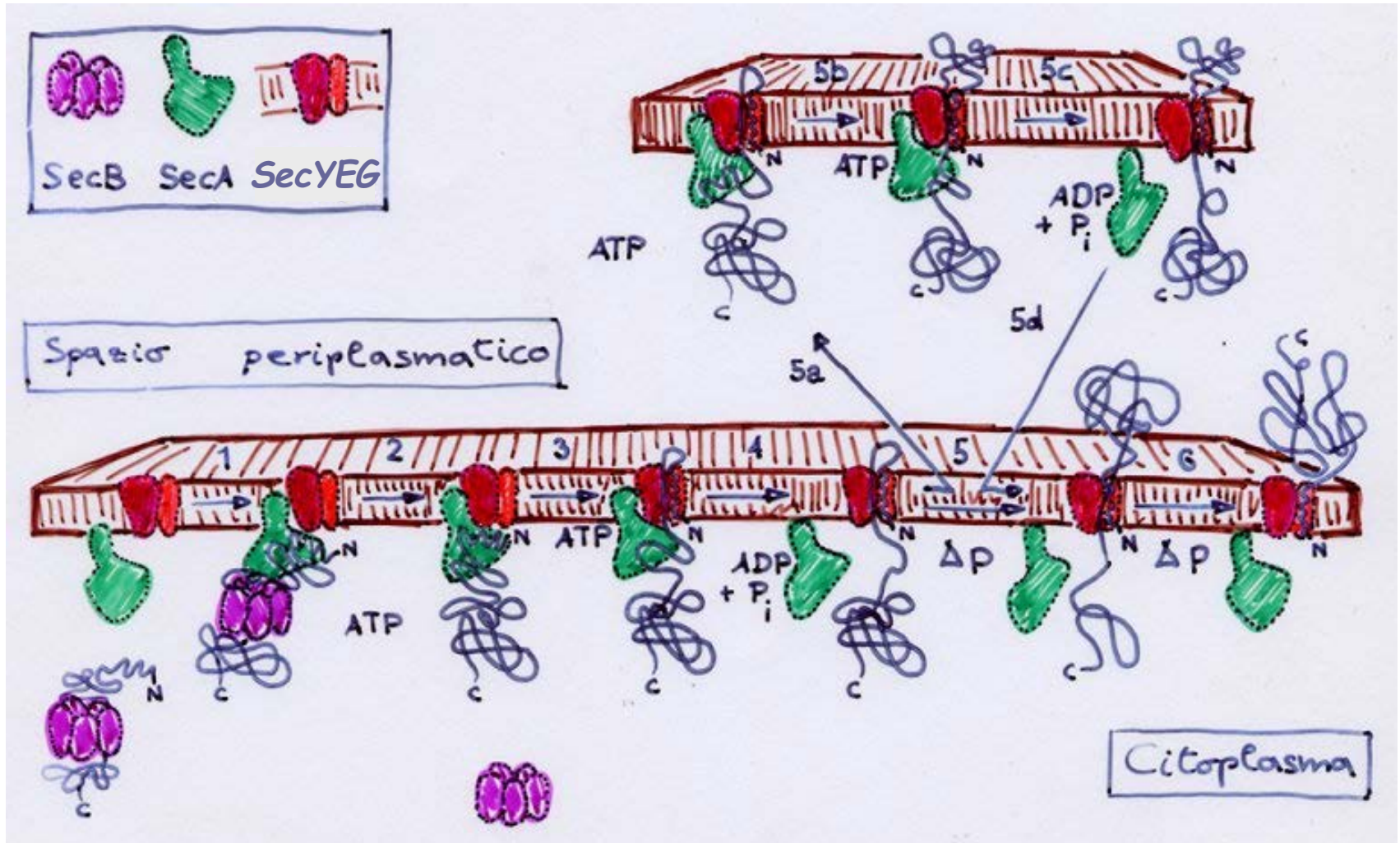
E' cruciale che la sequenza segnale rimanga esposta in modo che possa interagire con il complesso di esportazione



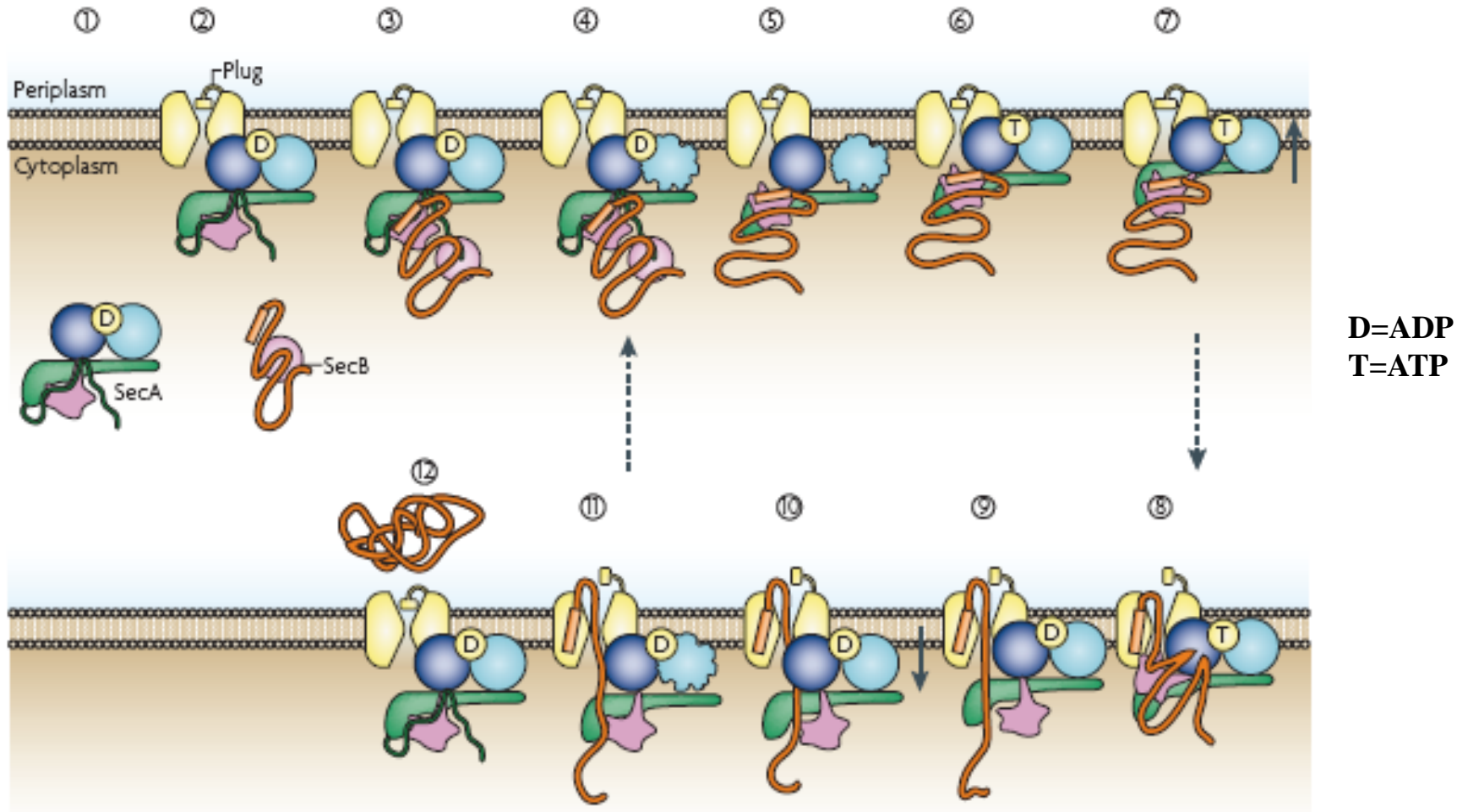


1. La proteina **SecB** interagisce con il segnale peptide della proteina da esportare durante la sua traduzione.
2. La trasporta al complesso **SecA+SecYEG** e l'affida a SecA.
3. **SecA**, attraverso il consumo di ATP inserisce e spinge la proteina attraverso il complesso **SecYEG**.
4. Appena superato questo complesso una peptidasi (**Lep**) proteolizza il segnale dal resto del peptide attivando la proteina

Dal citoplasma allo spazio periplasmatico: il sistema Sec



Modello per l'attraversamento Sec dipendente delle proteine



- 4. La perdita di ADP da parte di SecA favorisce l'entrata di SecA nella membrana
- 8. L'entrata della sequenza segnale nel canale di SecY apre il tappo lasciando il canale disponibile alla fuoriuscita della proteina
- 4-11. Questo ciclo deve essere ripetute perché ogni volta passano circa 30 AA della preproteina

Il sistema SRP (Signal Recognition Particle)

Questo sistema indirizza le proteine verso la membrana citoplasmatica

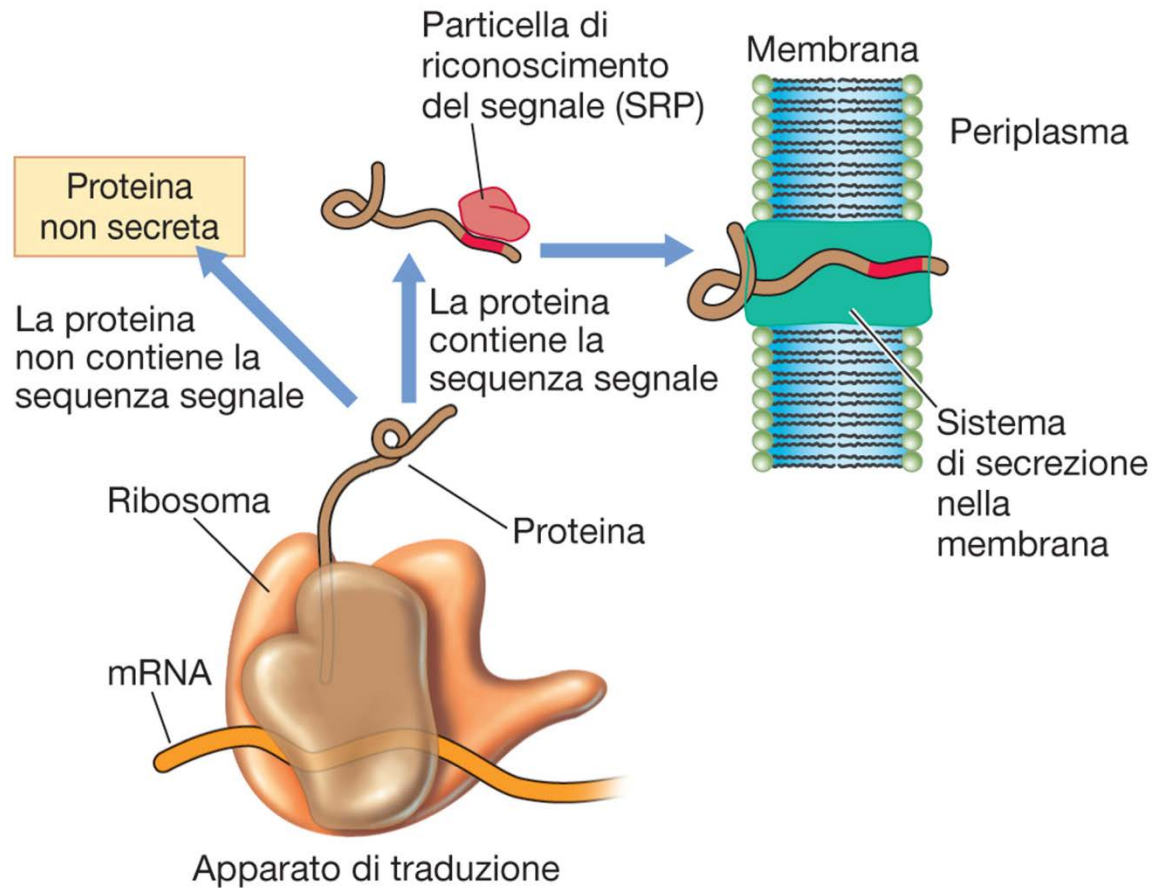
Nel caso del sistema SRP il processo è molto simile a SEC ma cambiano gli "attori".

In questo caso non abbiamo più le proteine SecB ma una piccola **nucleoproteina (SRP)** composta da una proteina (codificata dal gene *ffh*) e un piccolo frammento di RNA (4.5S).

Questo RNA non appartiene a nessuna delle classiche classi di RNA (tRNA, mRNA o rRNA)

Questo complesso sostituisce funzionalmente (pur non agendo da chaperonina) la proteina SecB.

Ruolo di SRP



Il meccanismo ricalca sostanzialmente quello visto per il sistema SecA/B

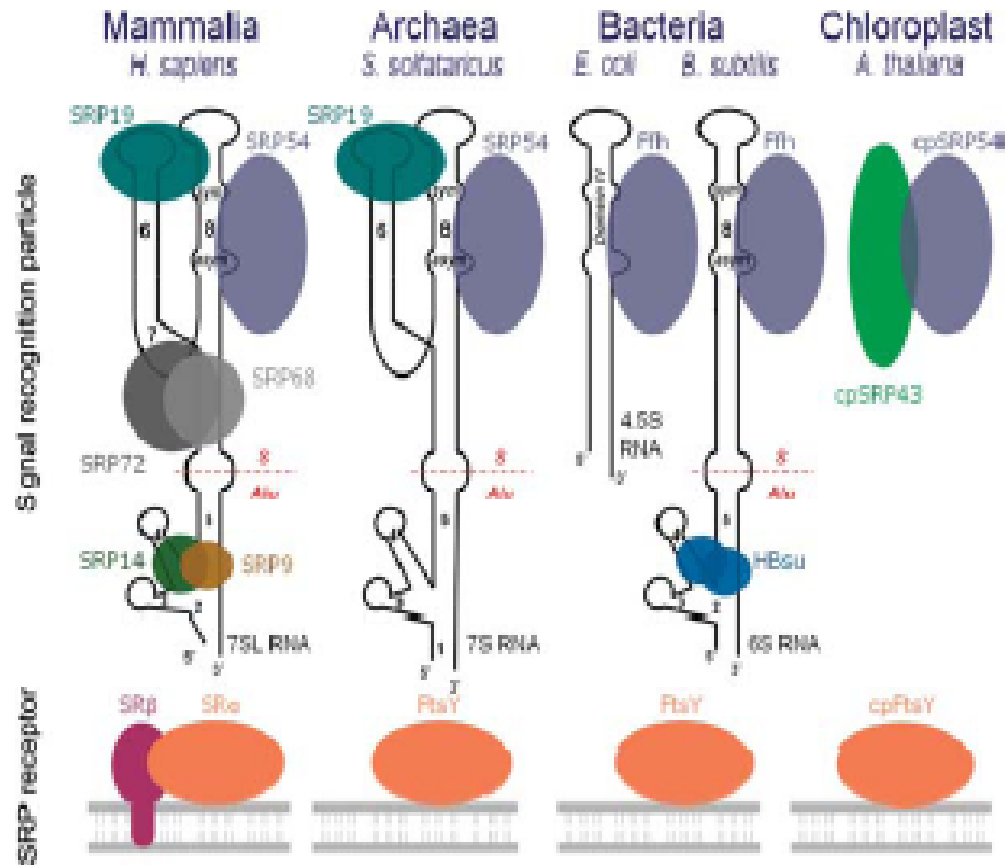
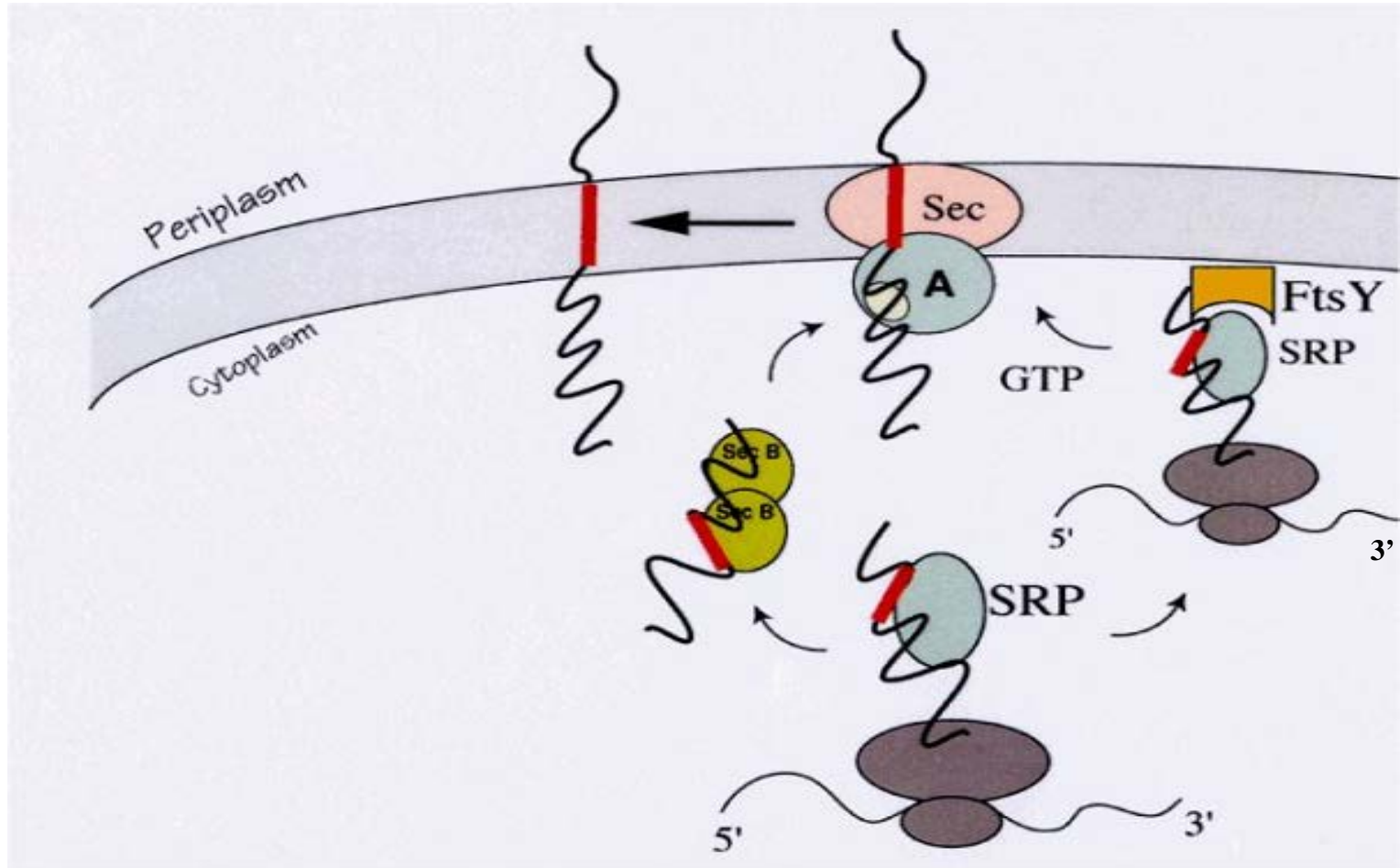


Figure 1 Schematic representation of SRP and SR components in the three kingdoms of life: from SRP of higher eukaryotes (left) to chloroplast SRP (right).

The SRP core is universally conserved and consists of SRP54 (violet), helix 8 of the SRP RNA (black) and the membrane bound SRP receptor FtsY (SR α ; orange). The chloroplast SRP does not contain an SRP RNA, but a negatively charged protein (cpSRP43; green) consisting of protein-protein interaction domains.

In E. coli SRP RNA è costituito da 114 nucleotides

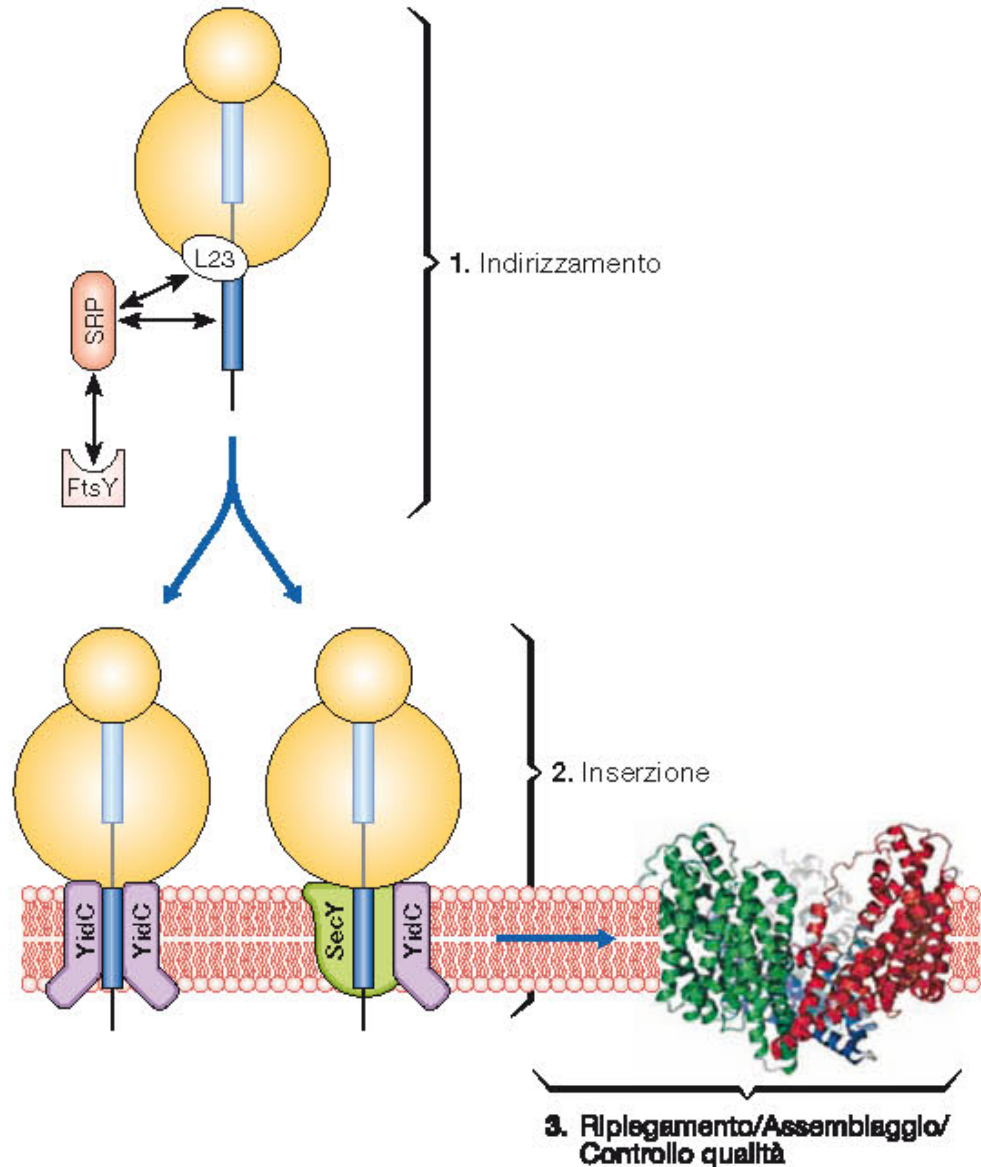
Dal citoplasma verso la membrana interna: strategie diverse verso il sistema Sec



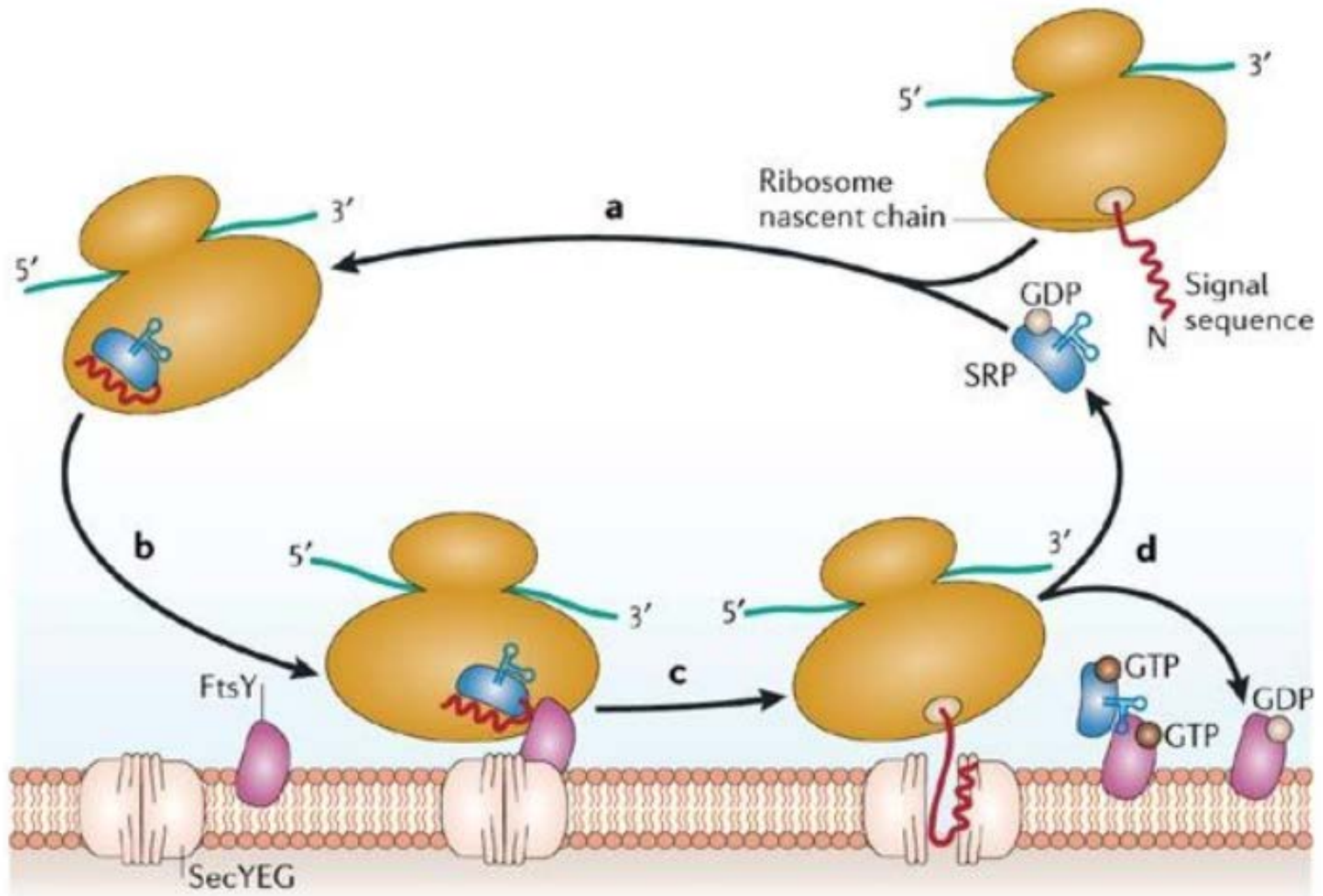
Le proteine che utilizzano il sistema SRP per inserirsi nella IM hanno una regione N terminale che è in genere il primo segmento transmembrana con funzione di ancoraggio delle proteina.

Questa sequenza viene riconosciuta appena sintetizzata e favorisce il legame del complesso di traduzione con la proteina FtsY.

Per l'inserzione il complesso necessita della proteina YidC che richiama SecY per completare l'inserzione. YidC è implicata nel corretto ripiegamento delle proteine che si muovono nella membrana per raggiungere corretta conformazione.



Nel caso del sistema SRP il processo di inserimento delle proteine nella IM è cotraduzionale



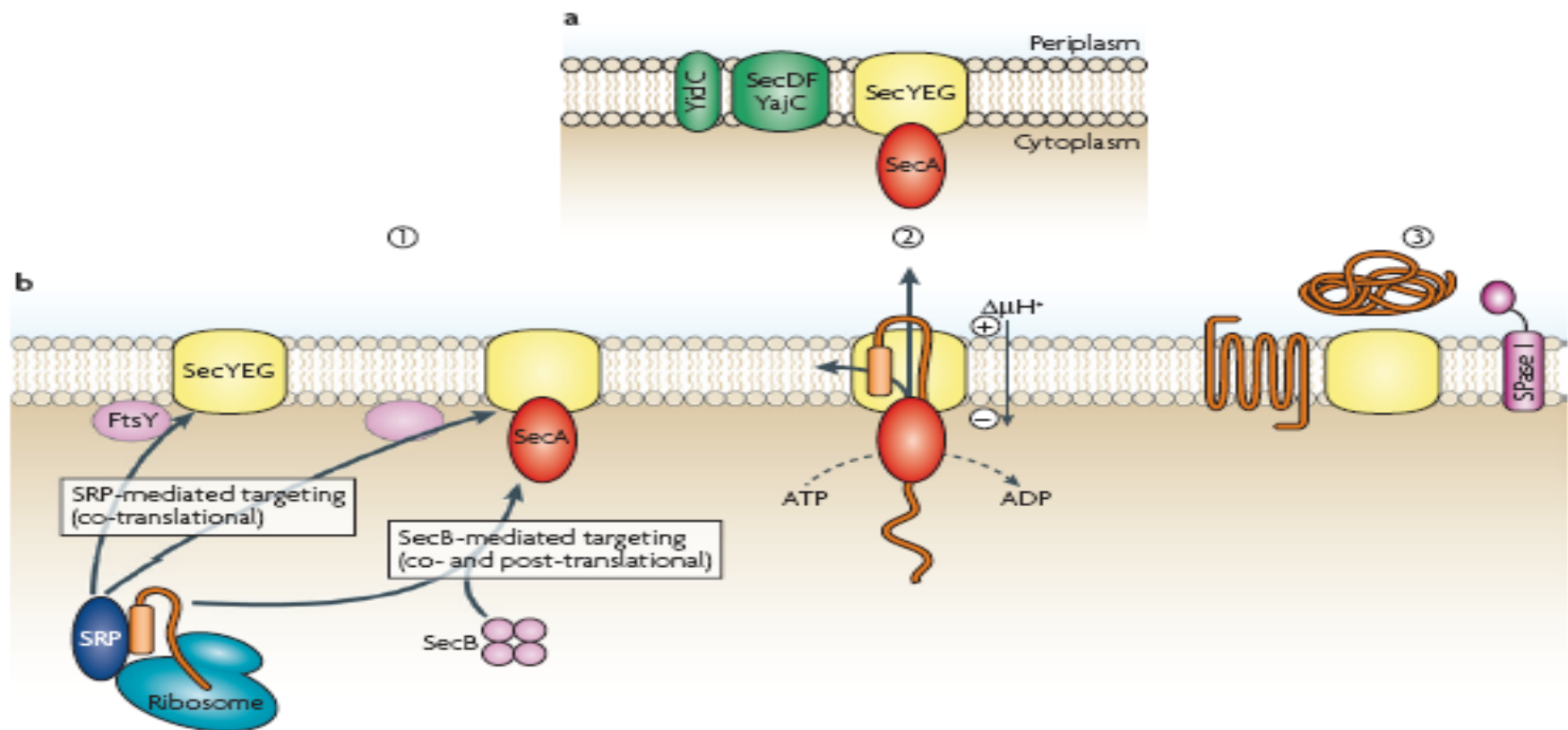
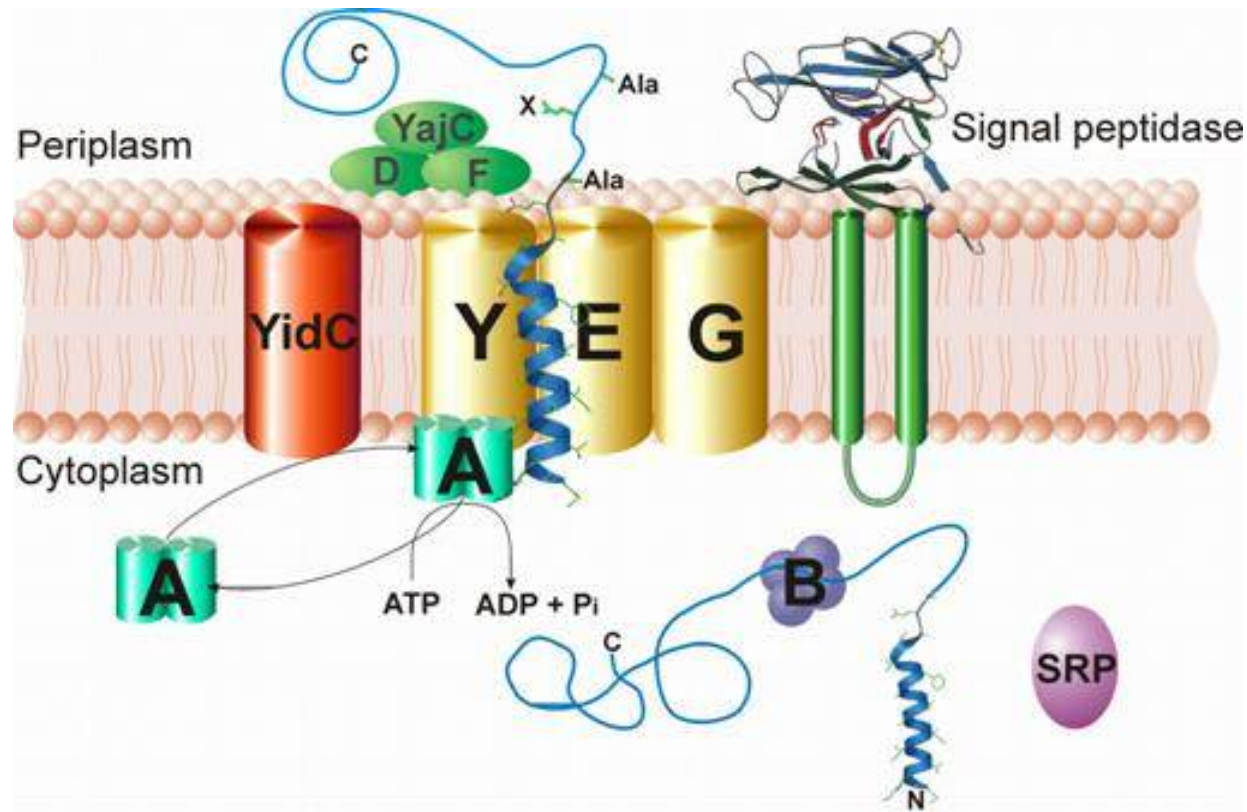


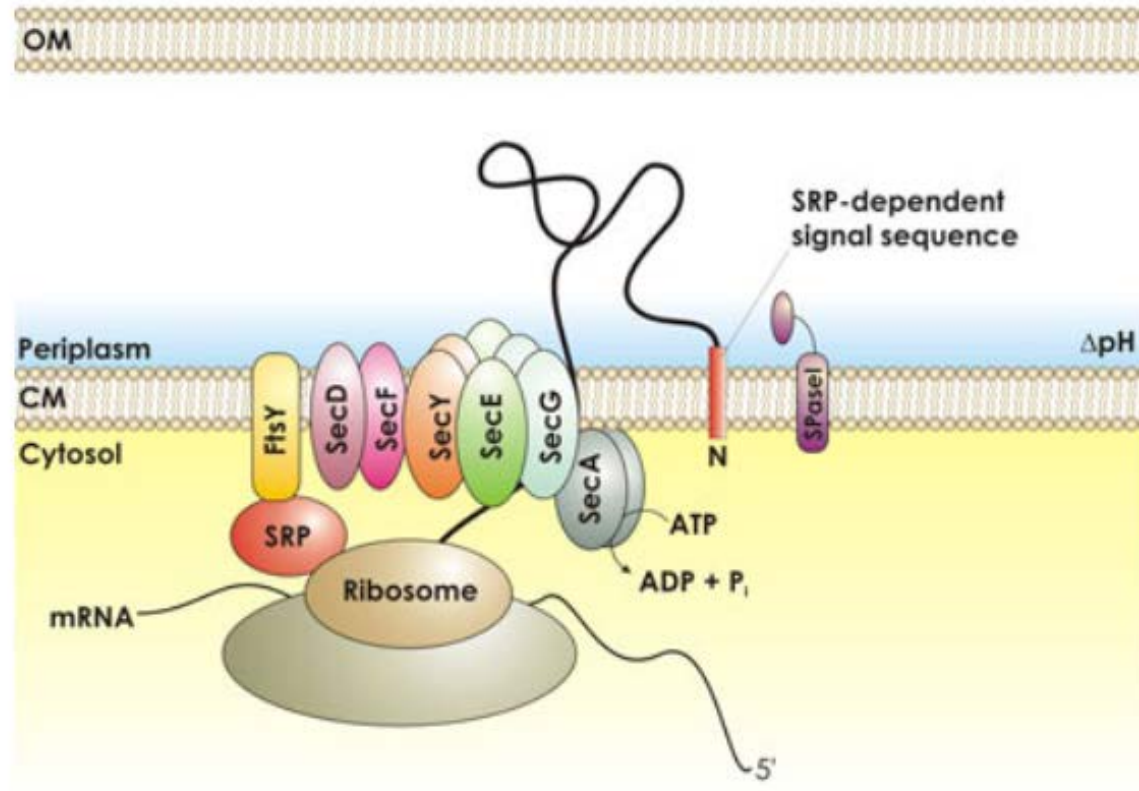
Figure 1 | Bacterial protein secretion. **a** | A schematic representation of the bacterial pre-protein translocase subunits. The translocase consists of the SecYEG pre-protein-conducting channel (yellow) and the ATPase motor SecA (red). SecYEG can associate with the auxiliary proteins SecDFYajC and YidC (green)^{95,98}. SecA, SecY and SecDFYajC are known to form higher-order oligomers, but their actual oligomeric state in the functional holoenzyme has not been conclusively determined. **b** | A general scheme for the secretion process. Secretory pre-proteins (thick orange line) are synthesized with amino-terminal signal peptides (orange rectangle) and are targeted to the translocase either by the ribosome-bound signal-recognition particle (SRP; blue) as soon as they emerge from the ribosome exit tunnel (this is co-translational translocation, which occurs mainly with membrane proteins and proteins with extremely hydrophobic signal peptides) or by the tetrameric SecB chaperone (pink) after translation has largely been completed (this is co- and post-translational translocation, which occurs mainly with secretory proteins) (stage 1). Both targeting routes merge at the membrane at SecYEG or SecYEG complexed with SecA. Some pre-proteins are targeted by SRP to SecYEG, but if they have substantial hydrophilic stretches SecA is also required²⁶. FtsY (pink) and SecA act as receptors for SRP and SecB, respectively. For simplicity, SecYEG is presented without any auxiliary subunits. Pre-proteins are translocated through SecYEG (stage 2) and they fold at the trans side of the membrane or integrate into the lipid bilayer after signal-peptide cleavage by the signal peptidase²⁷ (SPase I; magenta) (stage 3). Signal peptides of lipoproteins require cleavage by SPase II (not shown). Energy is provided by ATP binding and hydrolysis by the SecA ATPase and the proton-motive force ($\Delta\mu\text{H}^+$). The components are not drawn to scale.

I componenti del sistema Sec di *E.coli*



https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=YvVIUp_AKjs

SRP-mediated co-translational protein export in *E. coli*



Il Sistema TAT

Twin Arginine Traslocase

Le proteine trasportate dal sistema Sec sono ripiegate dopo aver raggiunto lo spazio periplasmatico.

Vi sono proteine che contengono nella loro struttura cofattori e sono correttamente assemblate nel citoplasma. Quindi vengono trasferite assieme al cofattore da un sistema diverso da Sec.

- Proteine ferro-zolfo
- Proteine del sistema redox
- Proteine coinvolte nella biosintesi della OM (membrane esterna)

Le proteine sono dotate di una breve sequenza segnale contenente una coppia di residui d'arginina.

- La sequenza segnale sulla proteina è riconosciuta dalla proteina TatBC che conducono la proteina al trasportatore di membrana TatA.
- L'energia viene fornita dalla forza proton motrice.

Come sono riconosciute le proteine del sistema TAT?

Anche in questo caso le proteine esportate dal sistema TAT posseggono una sequenza segnale localizzata al N terminale e caratterizzata da 3 domini:

1. Un dominio N terminale carico positivamente
2. Un dominio centrale idrofobico
3. Un dominio C terminale

La sequenza segnale rimossa da Signal Peptidase SPI family

Differenze tra sequenza segnale TAT e SEC

TAT: Contengono la sequenza Ser/Thr-**Arg-Arg**-X-Phe Leu-Lys

La regione idrofobica è meno idrofobica rispetto a SEC

La sequenza segnale TAT è più lunga (38 vs 26 SEC)

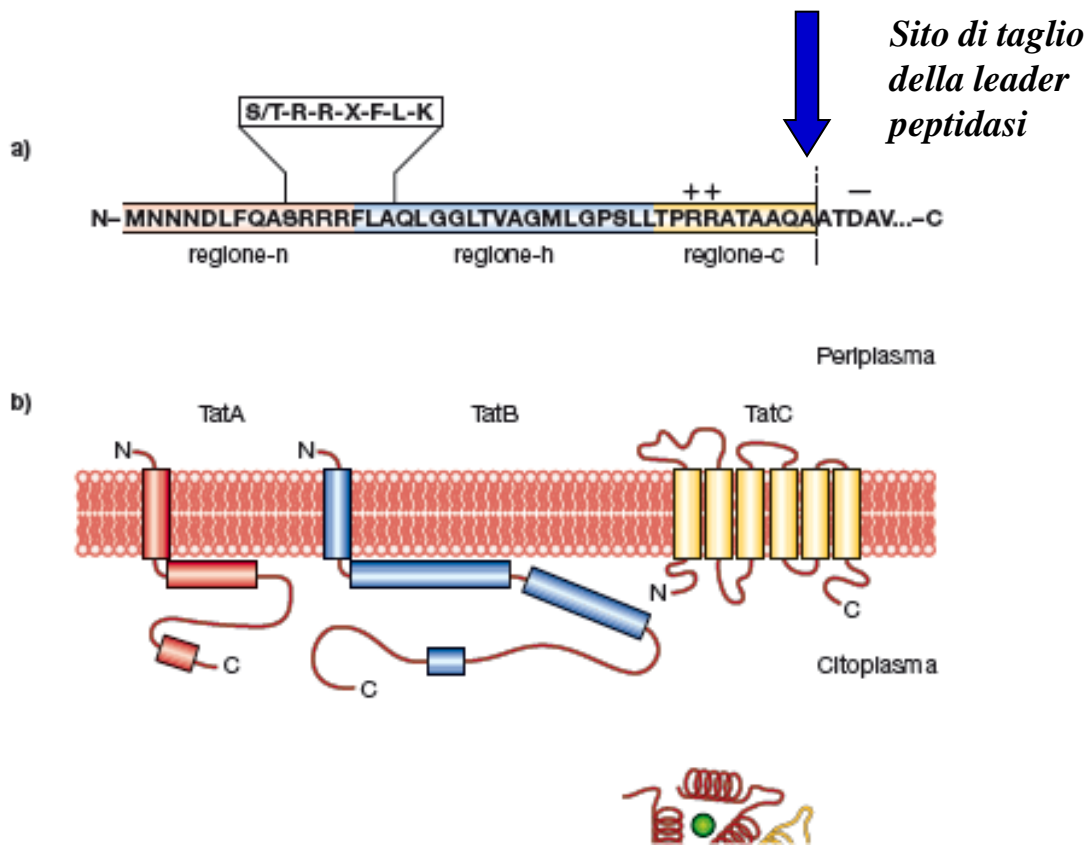
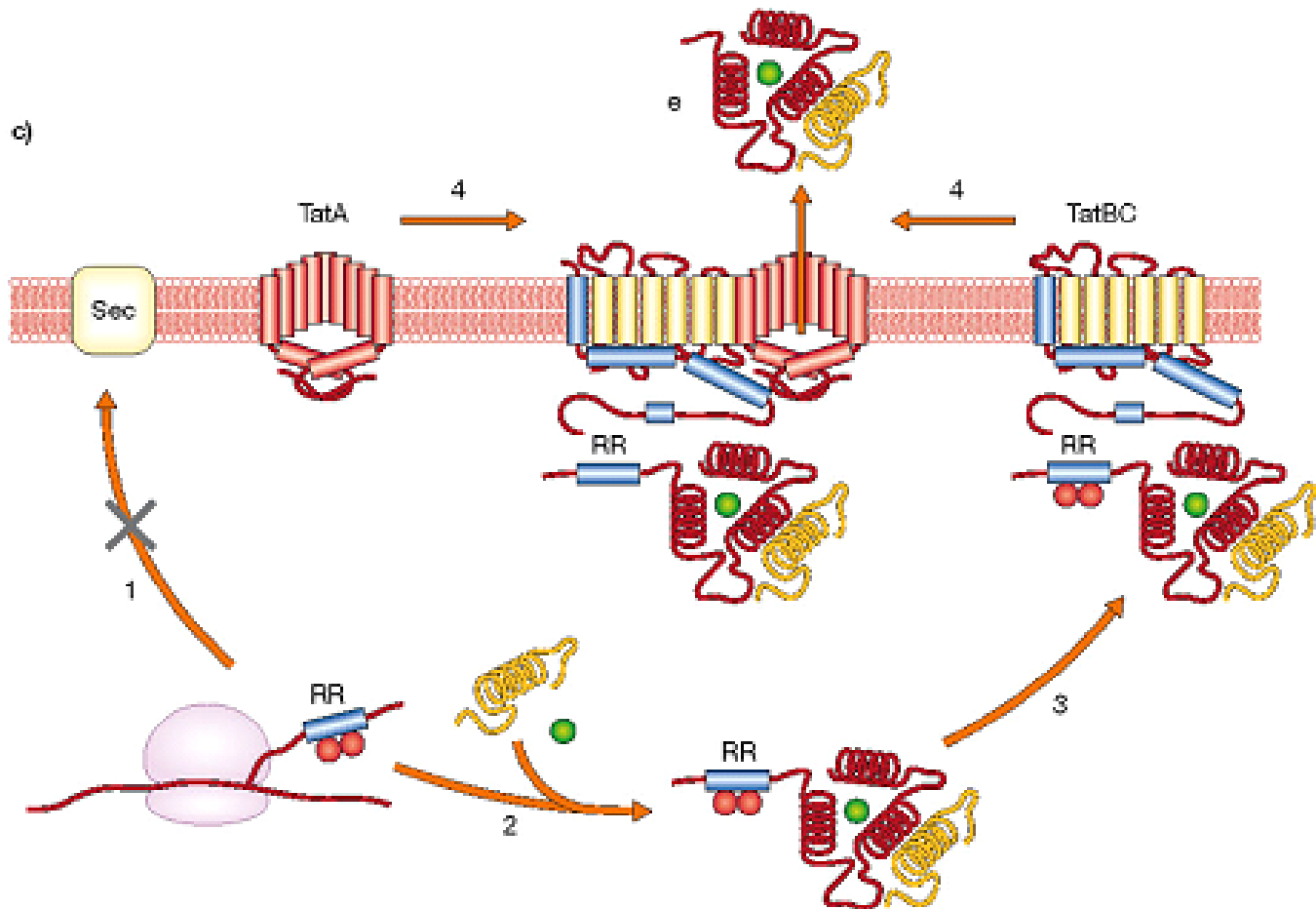
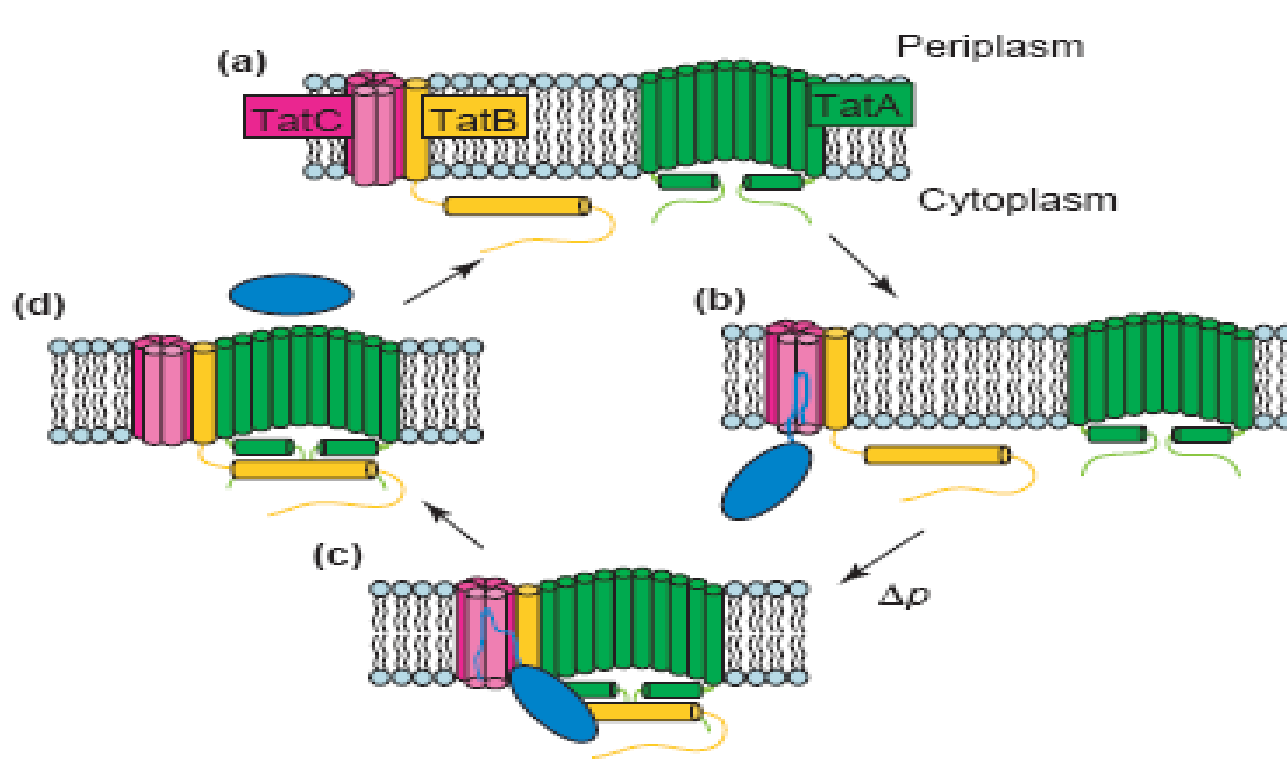


Figura 2.55 REGIONI CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA SEGNALE TAT DIPENDENTE DI *E. COLI*. (a) La sequenza consenso contenente la coppia di arginine è evidenziata nel rettangolo in alto. La linea verticale tratteggiata indica la sequenza del sito di taglio ad opera della peptidasi segnale I. (b) Predizione della struttura e topologia delle proteine TatA, TatB e TatC di *E. coli*. (c) Modello di trasporto del sistema Tat: 1. la pre-proteina nascente evita l'indirizzamento ad altre vie di secrezione (es. traslocone Sec) grazie alla presenza della sequenza segnale Tat-dipendente; 2. la proteina è ripiegata nel citoplasma grazie all'intervento di chaperonine Tat-specifiche (cerchi rossi) e, se richiesti, vengono aggiunti cofattori (cerchietto verde); 3. la proteina ripiegata è indirizzata al complesso TatBC; 4. il canale di trasporto formato da TatA si associa al complesso TatBC e consente il passaggio della proteina attraverso la membrana citoplasmatica. L'energia per il trasporto proviene dalla forza proton-motrice.



La proteina TAT dipendente viene riconosciuta da ciaperonine specifiche che evitano l'avvicinamento al sistema SEC . In seguito vengono aggiunti cofattori (verde) o altre subunità proteiche (giallo) e la proteina grazie a specifiche ciaperonine citoplasmatiche viene ripiegata correttamente.



- Il ciclo inizia quando la sequenza segnale contenente le 2 arginine si lega al complesso di membrana **TatBC**.

Il motivo RR è riconosciuto da TatC .Sfruttando la forza proton motrice **TatA** si dirige verso TatBC quando la preproteina è già legata a TatBC.

La proteina a questo punto viene traslocata attraverso il poro formato da TatA. Alla fine TatBC si dissociano da TatA.

The Twin Arginine Translocation (tat) System

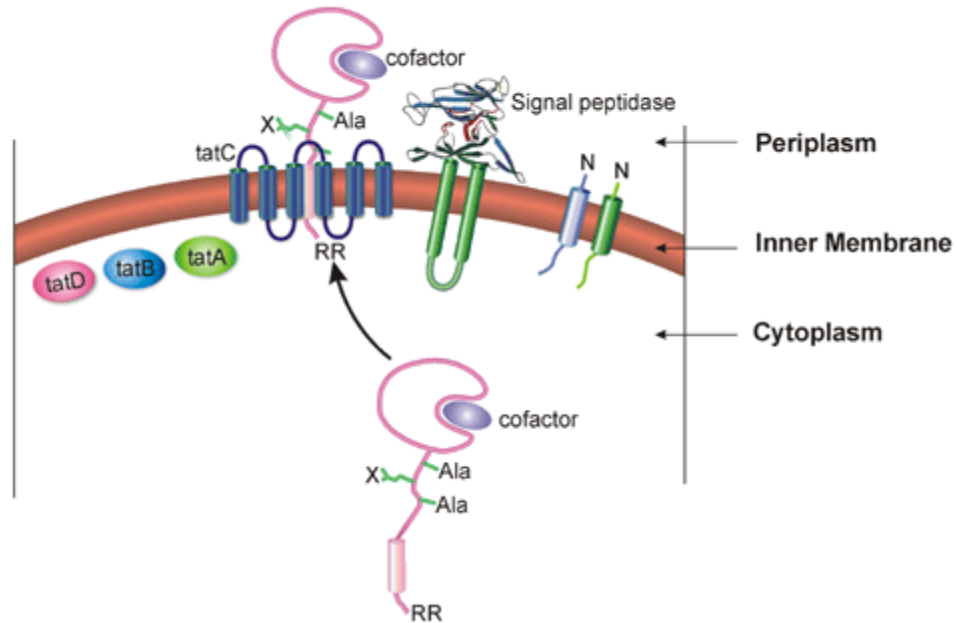


Figure 2. A model for the Tat transport cycle. This model is based on complementary biochemical studies on the *Escherichia coli* and plant thylakoid systems. For clarity, arbitrary numbers of TatA protomers (green) and single copies of the TatB (gold) and TatC (red) proteins are shown. Under resting (non-translocating) conditions, TatA and TatBC form separate high-molecular-mass complexes within the membrane [23,26,27]. (a) A depiction of the *E. coli* inner membrane is shown with the relative positions of the periplasm and cell cytoplasm shown. (b) The cycle is initiated when the twin-arginine signal peptide of a Tat substrate protein (blue) binds the TatBC complex in the membrane. The twin-arginine motif is recognized directly by TatC [25,28]. (c) In a proton-motive force (Δp)-dependent manner, the TatA complex then associates with the substrate-bound TatBC module [25,28,29]. (d) The TatABC complex is now fully assembled, and the substrate protein is translocated across the membrane through a channel formed by multiple TatA protomers. Protein transport is probably driven by the transport of protons across the membrane. Following transport, the TatA and TatBC complexes dissociate and return to the resting state (a) [29]. Reproduced, with permission, from Ref. [47].

Proteine di membrana e spazio periplasmatico

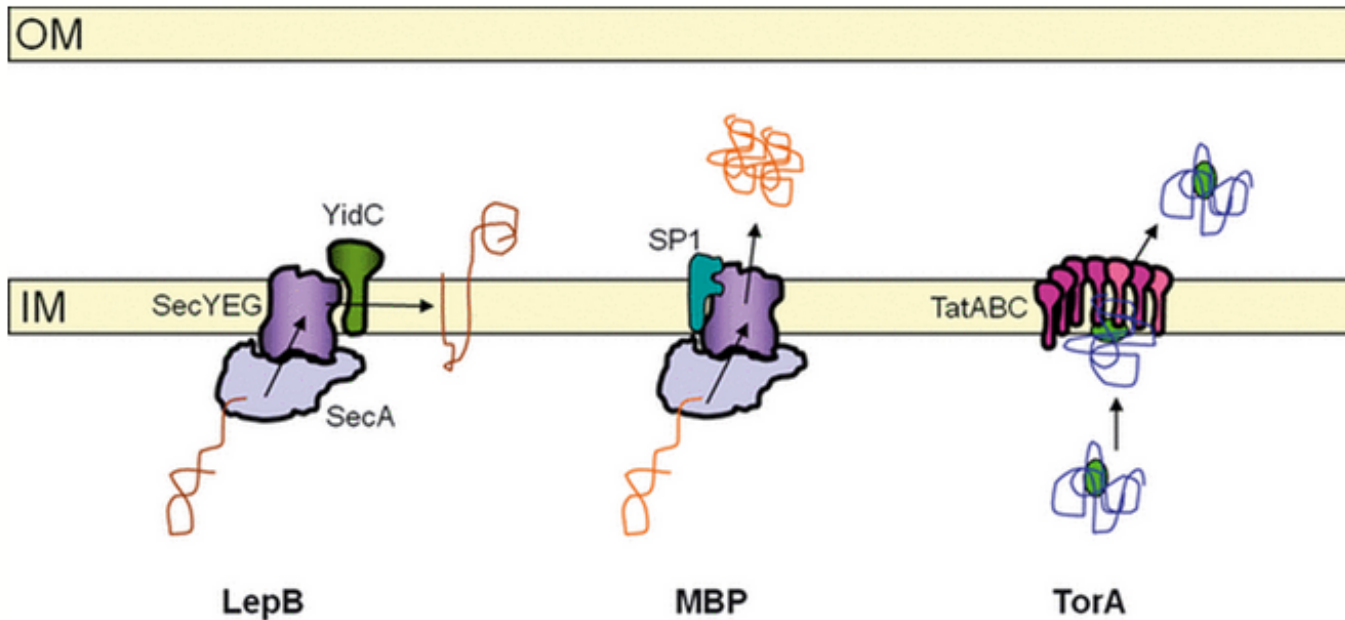


Figure 2

Insertion of proteins into the cell membranes and protein translocation to the periplasmic space.

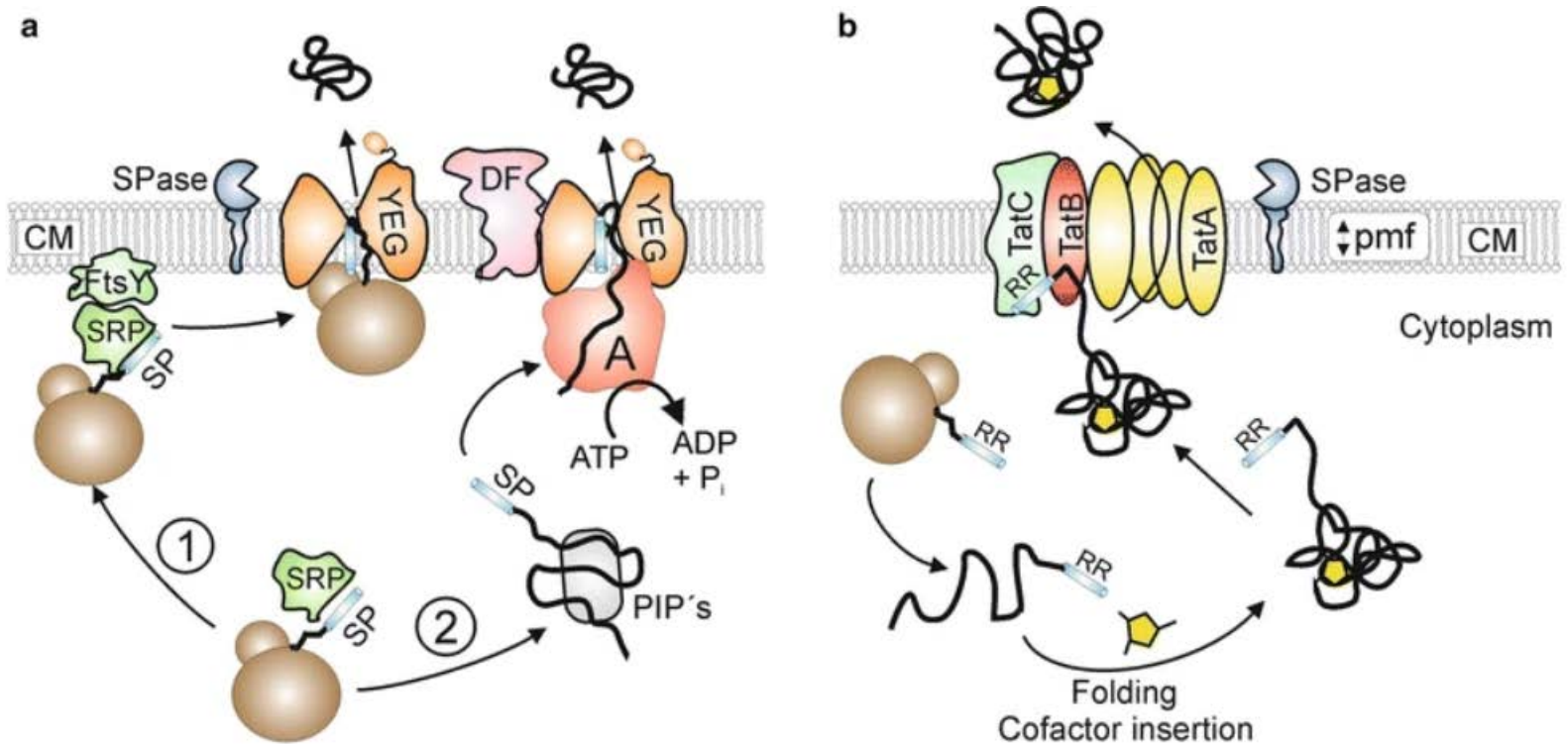
Sec/YidC mediated protein transport into the inner membrane and the periplasm (left). YidC (green) participates in the membrane insertion of Lep. SecA (light blue) and SecYEG (purple) are also involved in the insertion and membrane translocation of the large periplasmic domain of Lep as well as the export of the MBP (middle). The Tat complex is capable of translocating folded proteins such as the cofactor-containing TorA protein (right).

**SP1= Signal (o Leader)
Peptidase 1**

Lep B è
la Leaderpeptidasi

MBP è
È la Maltose Binding protein

TorA(trimetilamina ossido
reduttasi) cofattore
Molibdeno



Two major bacterial export pathways: Sec and Tat. **a** The general secretion (Sec) protein export pathway. In the cotranslational mode (1), Sec substrates possessing highly hydrophobic signal peptides (SP) are recognized at the ribosome by the signal recognition particle (SRP). Subsequently, the ribosome-nascent chain (RNC)-SRP complex docks to the SRP-receptor FtsY and the RNC is then further transferred to the SecYEG translocation pore such that ribosomal exit site is in close proximity to SecYEG. The energy for translocation in the cotranslational export mode is provided by further elongation of the substrate at the ribosome. In the posttranslational mode (2), Sec-dependent precursor proteins are kept in an export-competent state by posttranslationally interacting proteins (PIP's) such as SecB, the general chaperones GroELS/DnaK–DnaJ–GrpE or the soluble form of SecA. The signal peptide (SP) is recognized by the SecA protein which pushes the protein through the SecYEG protein conducting channel in a stepwise and ATP-dependent manner. In addition, SecDF exerts a proton motive force (pmf)-dependent pulling force on the substrate from the trans-side of the cytoplasmic membrane (CM). During or shortly after translocation, the signal peptide is removed by signal peptidase (SPase) and the mature protein is released on the trans-side of the CM. **b** The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. After folding and, if required (as shown here), cofactor insertion, preproteins containing a signal peptide with a twin-arginine motif (RR) are recognized by a receptor complex consisting of TatC and TatB. Subsequently, homooligomeric complexes of Tata are recruited to the substrate-loaded receptor complex in a proton motive force (pmf)-dependent manner, followed by the translocation of the substrate across the cytoplasmic membrane (CM). Following to substrate translocation, the signal peptide is cleaved by signal peptidase (SPase) and the mature protein is released on the trans-side of the membrane