

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).

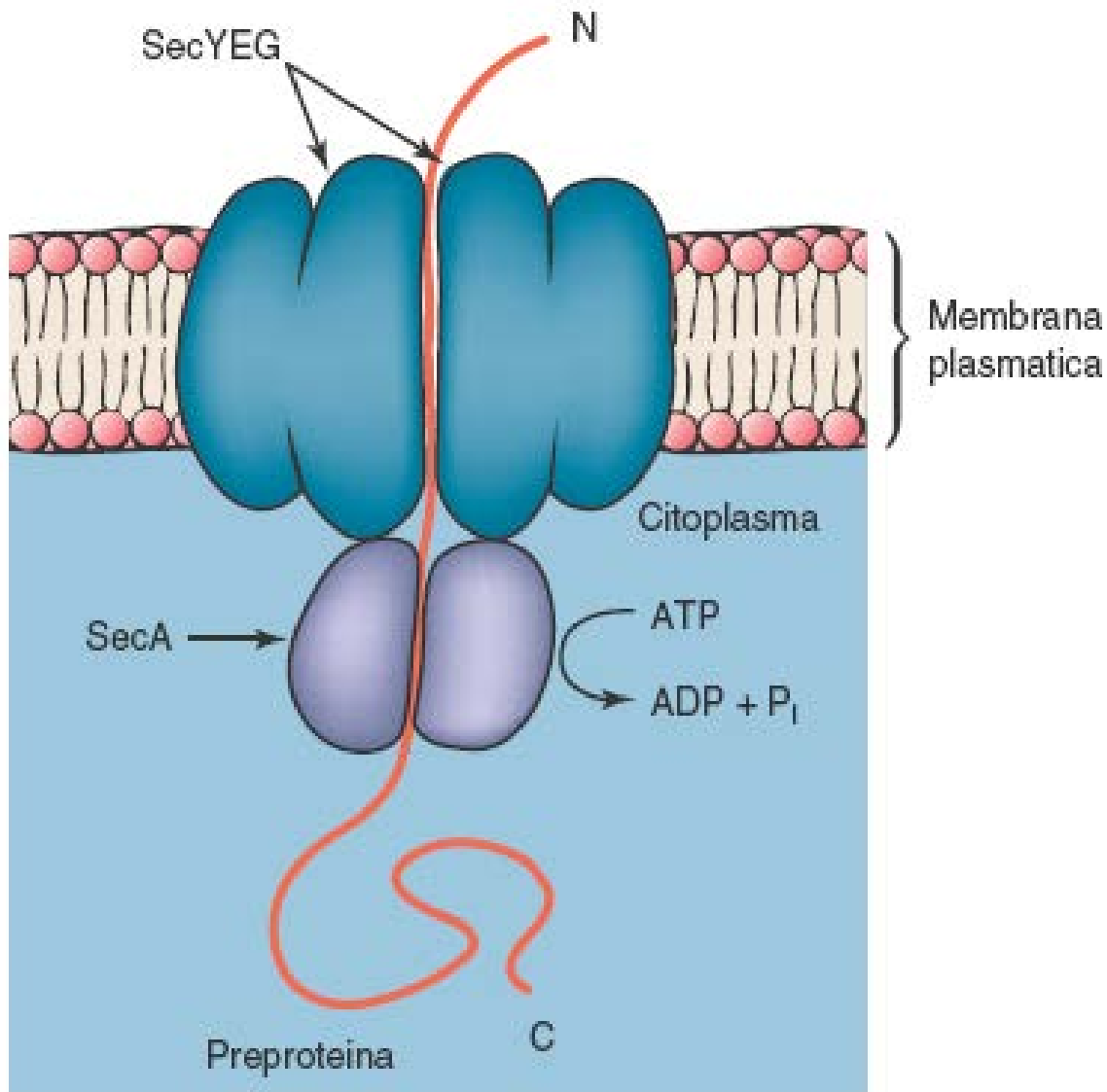
On il termine secrezione facciamo riferimento al trasporto di una proteina all'esterno della cellula.

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

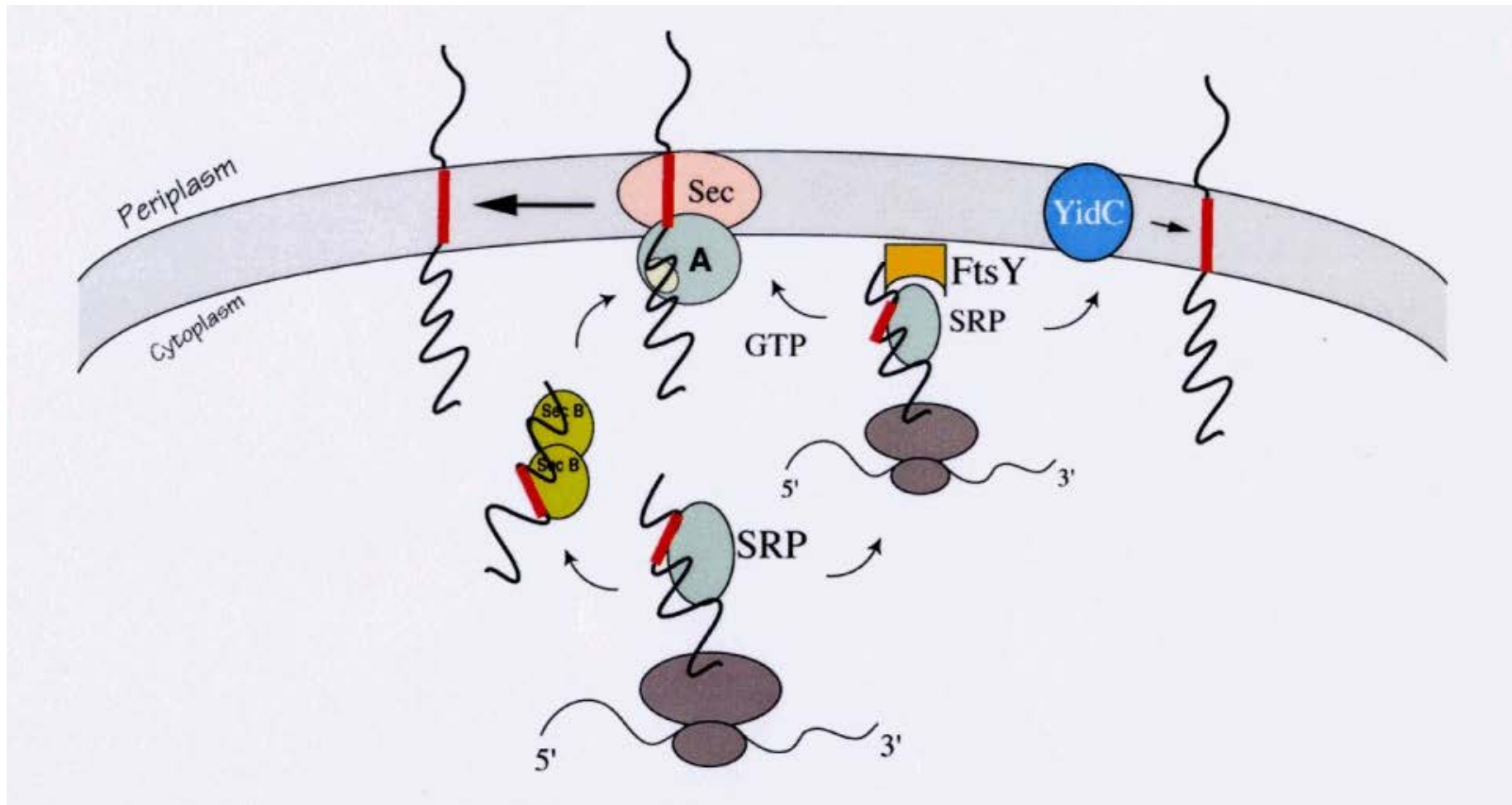
La via Sec dipendente
definita anche GSP
General Secretory
Pathway

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

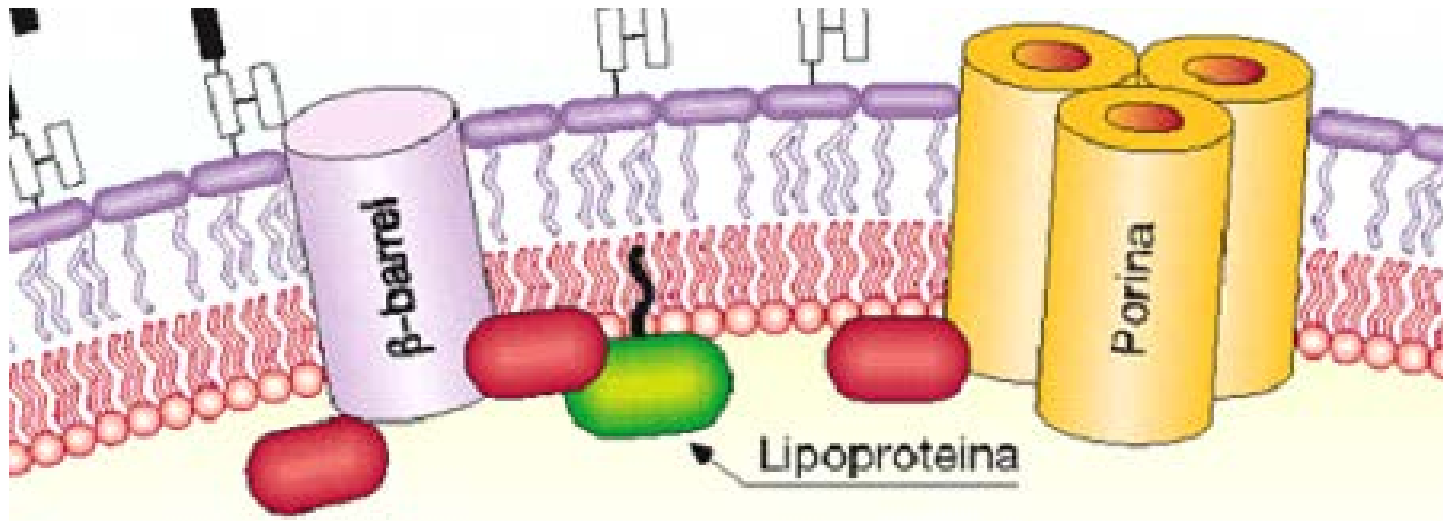
Le proteine sono
sintetizzate sotto
forma di preproteine.



Dal citoplasma verso la membrana interna: strategie diverse



Le proteine della membrana esterna



Le porine specifiche o aspecifiche
Proteine di membrana
lipoproteine

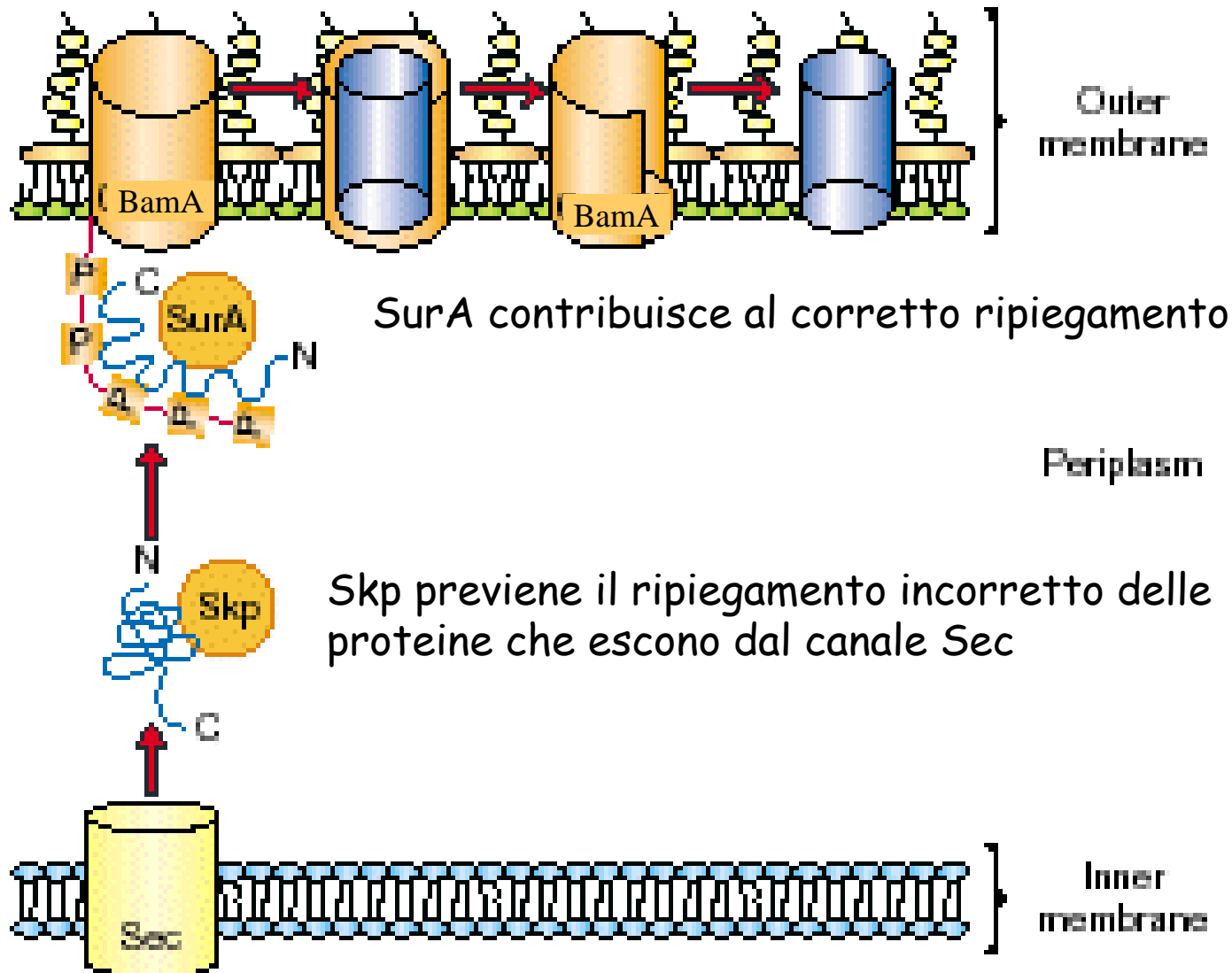
Come arrivano le proteine della OM (OMPs) alla loro destinazione finale?

Tutte le OMPs contengono un numero pari di foglietti β che si ripiegano in una struttura a β barrel con i residui idrofobici rivolti verso l'esterno.

Nello spazio periplasmatico si trovano:

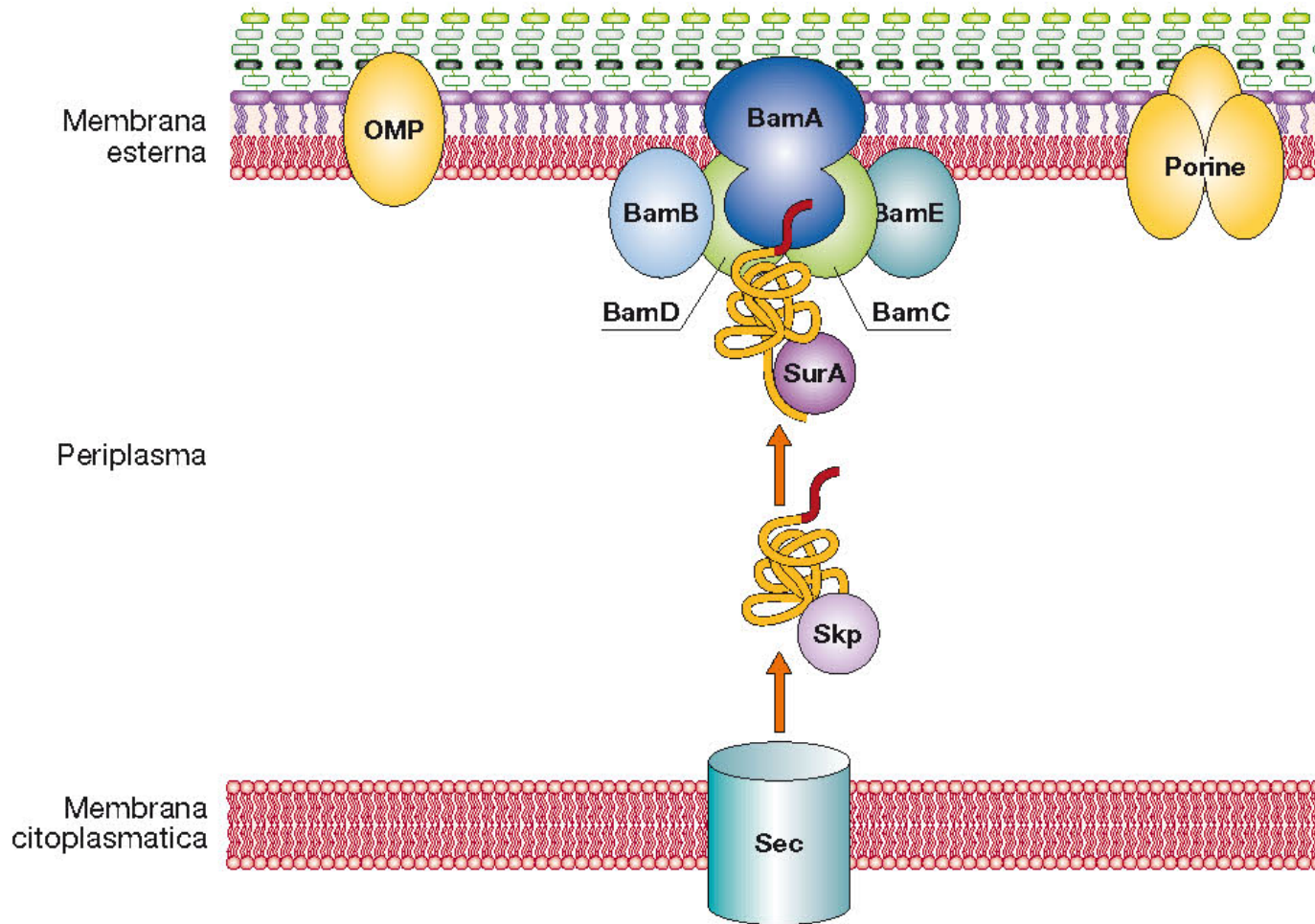
- **Skp** (17 kD protein): proteina che si lega alle OMPs non appena emergono dal canale SEC e prevengono il ripiegamento incorretto e l'aggregazione
- **SurA** proteina che contribuisce al corretto ripiegamento delle OMPs
- **DbpA** che induce la formazione dei ponti disolfuro nelle OMPs prima che siano inserite nella OM

Arrivo delle OMP nella OM: ruolo di BamA

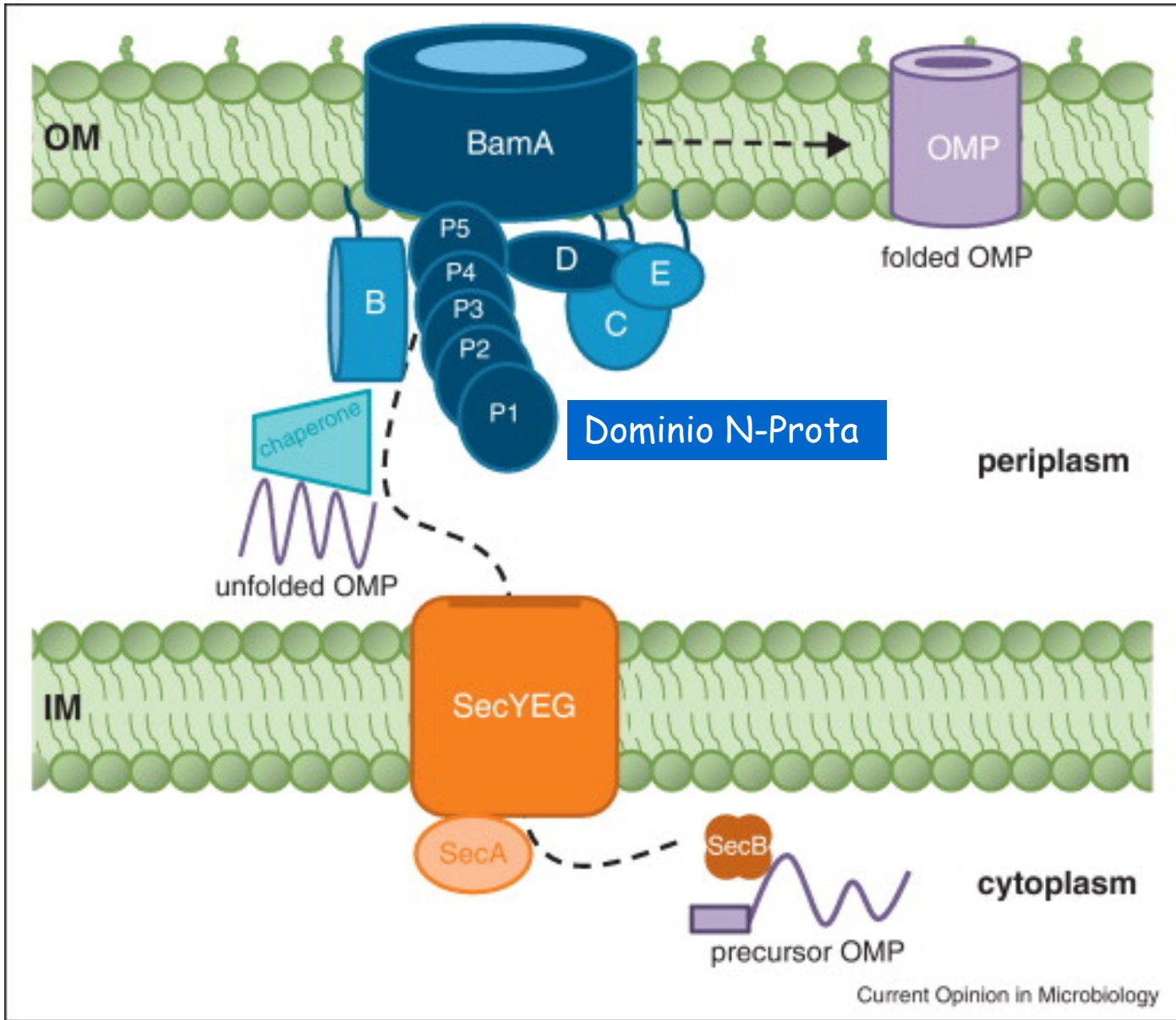


BamA (Omp85)

- BamA è una proteina conservata in tutti i batteri Gram- e nei mitocondri (Tob55).
- Identificata in Neisseria con il nome di OMP85
- BamA è costituita da 12 foglietti β disposti a β -barrel con una lunga estremità N terminale nello spazio periplasmatico (dominio POTRA).
- Il dominio N terminale di BamA riconosce sequenze specifiche caratteristiche dell'estremità C-terminale di molte OMP. Phe(o Trp) al C poi residui idrofobici in posizione 3-5-7-9 dal Cter.



In *E. coli* è stato identificato e parzialmente caratterizzato un complesso multiproteico (Bam, β -barrel assembly machine) che comprende una proteina integrale di membrana (BamA) e quattro lipoproteine, e che costituisce la “macchina proteica” preposta a questo processo.



Questo dominio N-POTRA è coinvolto nel legame con la OMP mantenendola ancora accessibile ad altre ciaperonine che contribuiscono al corretto ripiegamento.

La OMP successivamente si inserisce nel canale interno di BamA.

Il complesso BamA-OMP si apre lateralmente per permettere il corretto inserimento della OMP nella M.E.

Omp85 = BamA

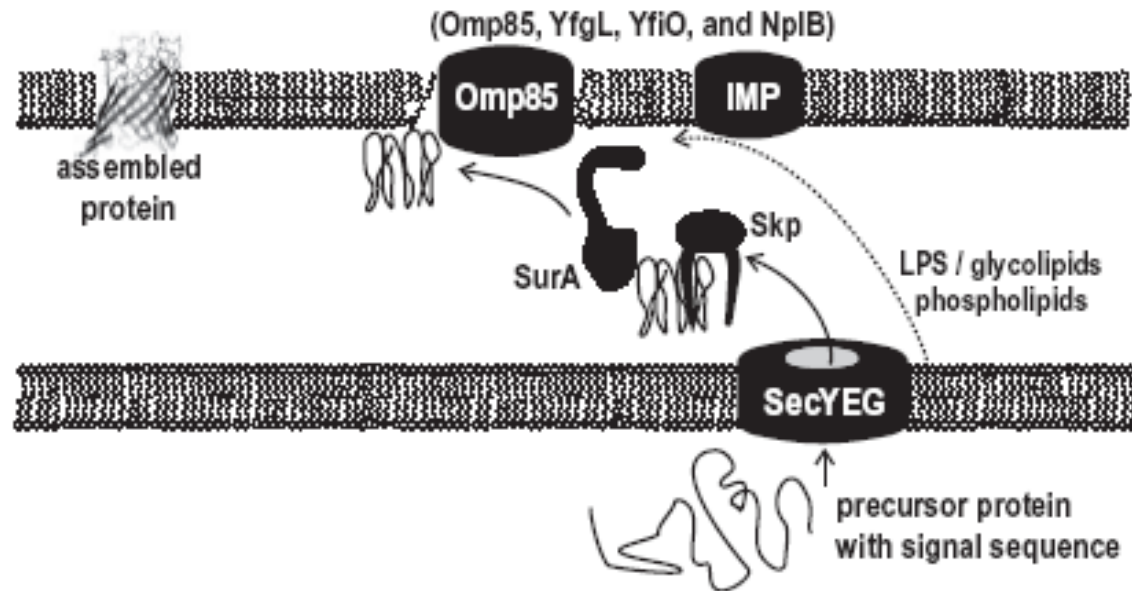
The Omp85 protein family

external milieu

periplasm

cytoplasmic membrane

cytoplasm



(A)



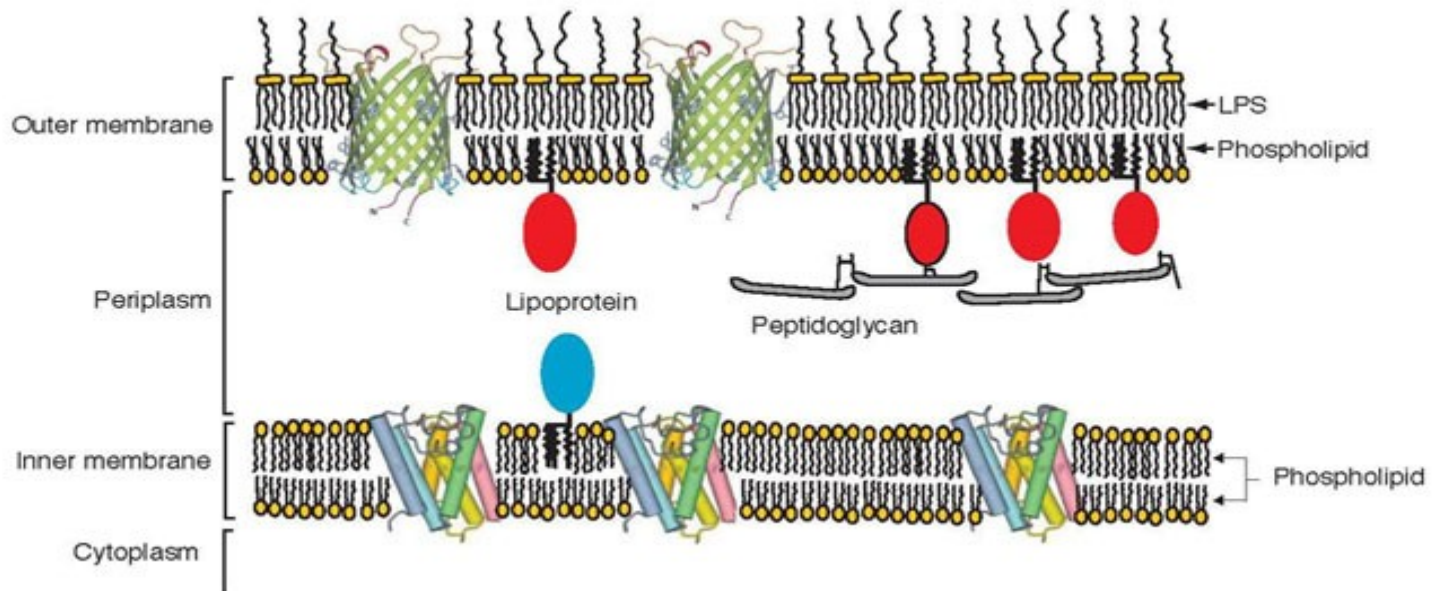
Potra domain: Polypeptide transport associated domain (

La lipoproteina

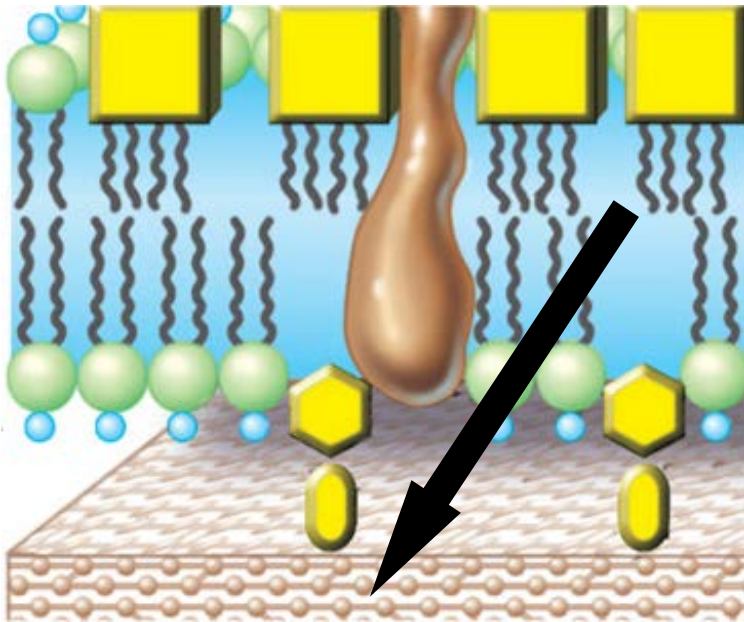
Sul lato interno della M.E. è presente un complesso lipoproteico costituito dalla

LIPOPROTEINA.

Questa proteina è una piccola proteina che svolge funzioni di ancoraggio tra M.E. e peptidoglicano



Le lipoproteine partecipano a numerose funzioni cellulari stabilizzazione delle strutture di superficie, resistenza ad antibiotici trasduzione del segnale. Sono noti circa 90 i tipi di lipoproteine diverse nella maggioranza associate all OM (in E.coli tutte sul lato interno in altri batteri anche sul lato esterno).



La lipoproteina di Braun

- è la più abbondante
- è una piccola proteina di 58 AA
- Con N terminale si ancora alla OM grazie alla modificazione lipidica della Cisteina al +1
- con la lisina al C terminale forma un legame peptidico con il DAP

LIPOPROTEINE

Le lipoproteine sono ancorate alla OM tramite l'estremità N-terminale della N-acyl diacylglyceril cisteina (cisteina lipidata).

Il processo di lipidazione e corretto ripiegamento ha luogo dopo che la lipoproteina ha attraversato la IM.

- Per attraversare lo spazio periplasmatico la lipoproteina ha bisogno del complesso LolCDE localizzato nella MI, che contiene un ATP binding cassette.
-
- L'energia derivante dall'idrolisi di LolD viene trasferita a LolC e LolE che la utilizzano per aprire la cavità di LolA in modo che possa legarsi la lipoproteina.

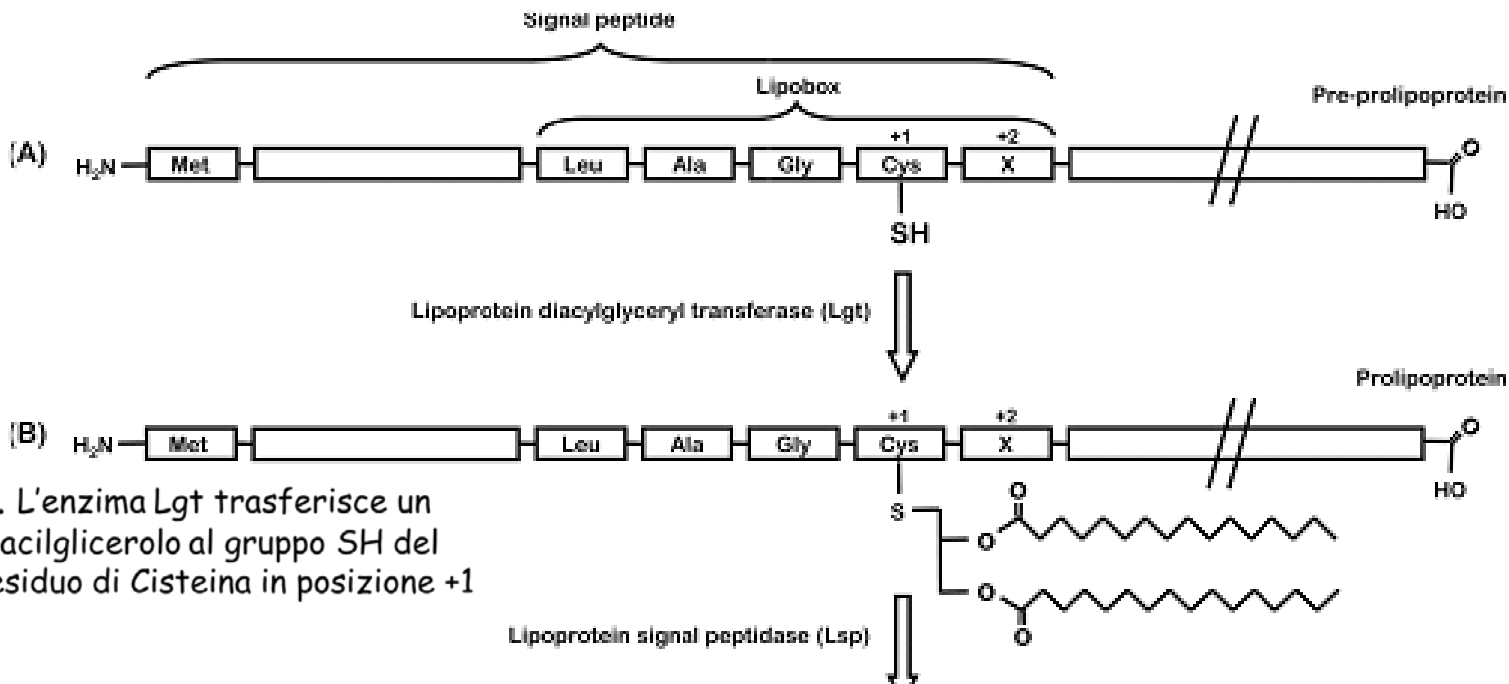
Maturazione delle lipoproteine

Tutte le lipoproteine contengono una breve sequenza chiamata LIPOBOX .

La LIPOBOX è costituita
-4 (leu, ala, val) -3 (leu) -2 (ala, ser) -1 (gly, ala) ↓ +1(cys)

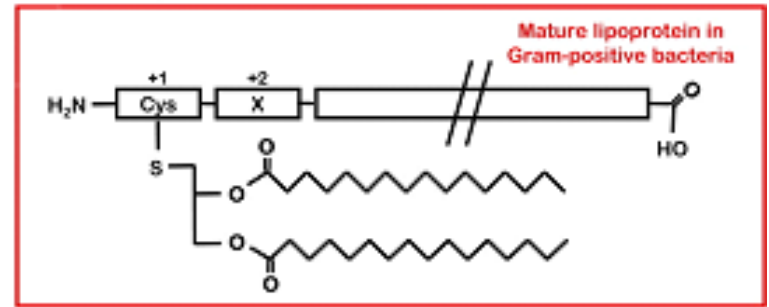
E. coli Braun's lipoprotein (OM)
MKATKLVLGAVILGSTLLAG↓CSSNA

...
E. coli lpp-28 (IM)
MKLTTHHLRTGAALLAGILLAG↓CD
QSS...



B. L'enzima Lgt trasferisce un diacilglicerolo al gruppo SH del residuo di Cisteina in posizione +1

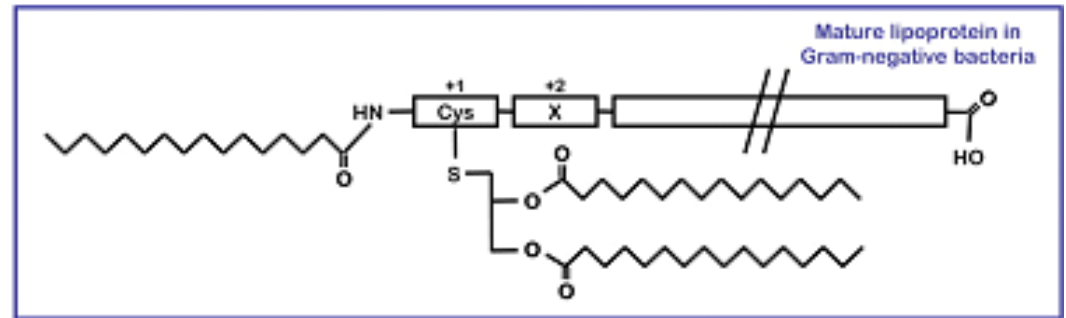
C)



Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt)

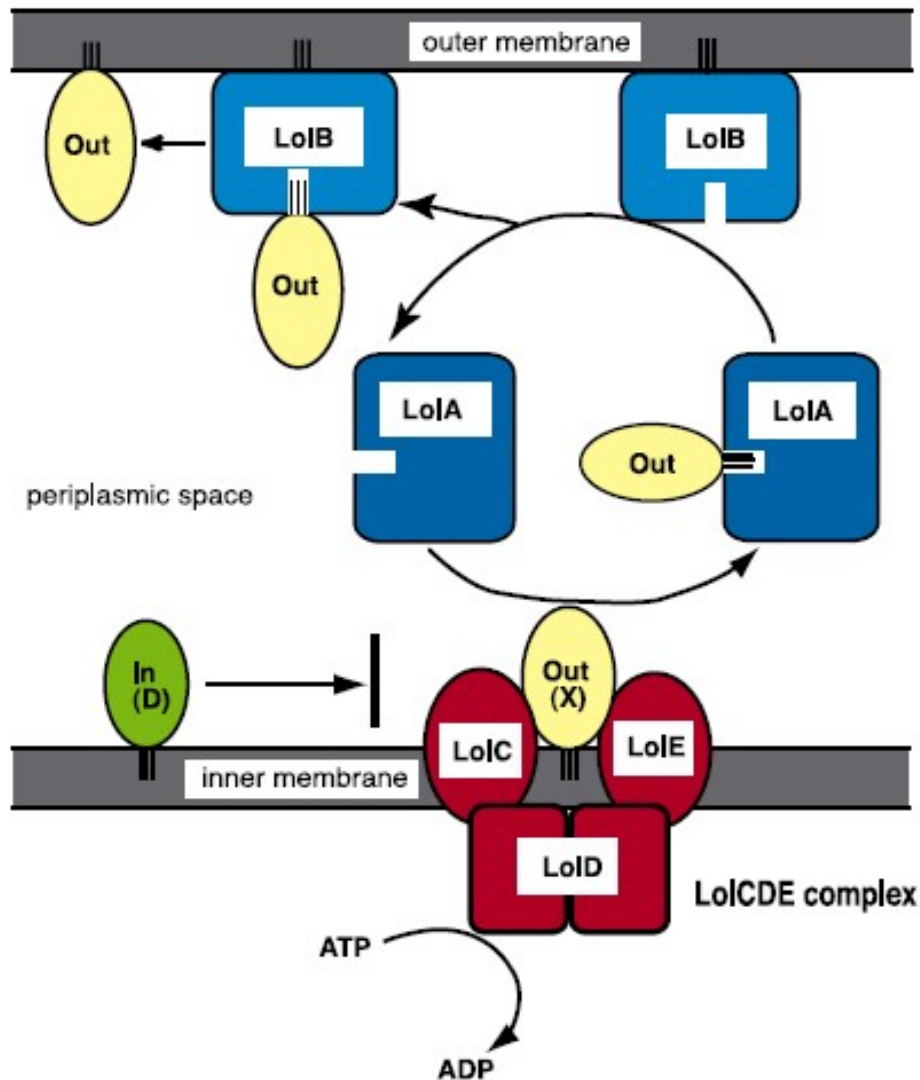


D)



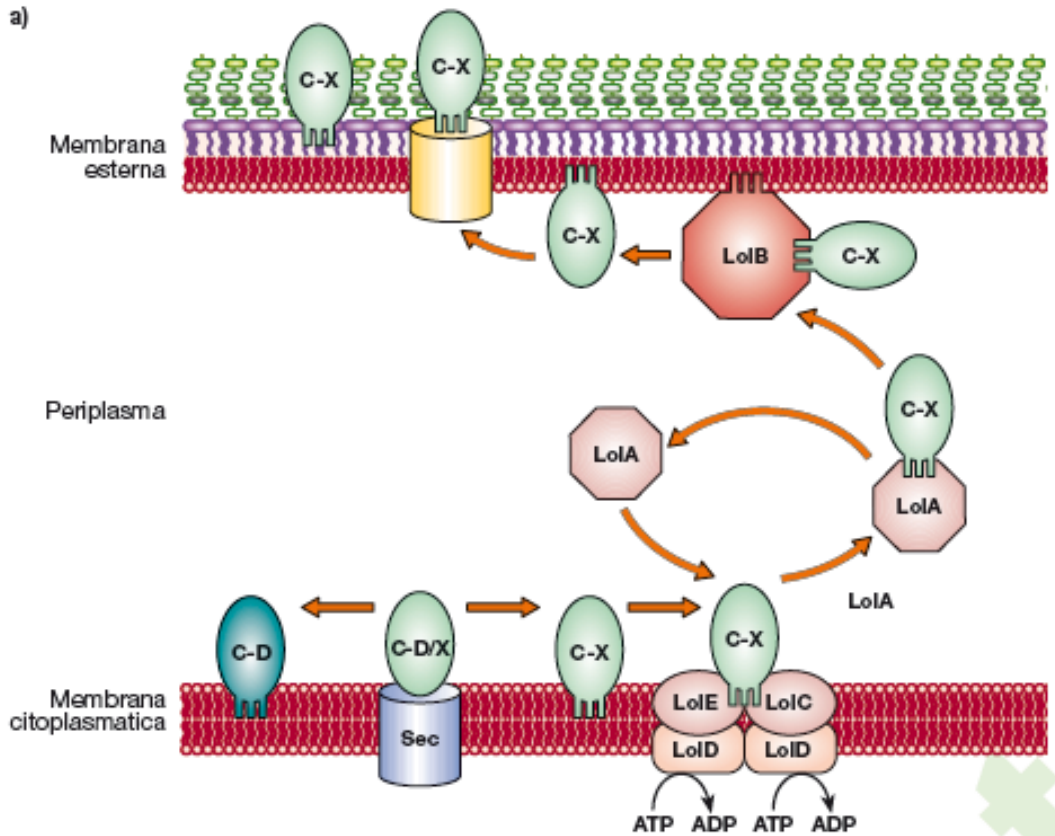
C. Una leader peptidasi specifica rimuove la sequenza segnale;

D. successivamente l'enzima Lnt lega un acido grasso alla cisteina (+1) nei Gram-



Le lipoproteine possono essere associate o alla membrana interna (IN) o a quella esterna (OUT).

Il sistema LOL trasferisce alla OM solo quelle lipoproteine che non possiedono un residuo di acido aspartico (D) in posizione +2.



Le lipoproteine attraversano la membrana plasmatica grazie al traslocone Sec e subiscono la modificazione lipidica a livello di un residuo di cisteina (C) all'N-terminale nel periplasma. Le lipoproteine che possiedono un residuo di aspartato (D) in posizione +2 restano nella membrana interna, mentre quelle che possiedono un altro residuo aminoacidico nella stessa posizione vengono indirizzate alla membrana esterna. L'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP viene utilizzata dal complesso LolCDE per trasferire la lipoproteina a LolA. Quando il complesso LolA-lipoproteina interagisce con il recettore LolB, la lipoproteina viene trasferita a LolB e inserita sul lato periplasmatico della membrana esterna.

- L'energia derivante dall'idrolisi di ATP mediata da LolD viene trasferita a LolC e LolE che la utilizzano per aprire la cavità di LolA in modo che possa legarsi la lipoproteina

- Il complesso LolA-lipoproteina attraversa il periplasma e raggiunge LolB, il recettore nella OM

- Grazie ad una maggiore affinità della lipoproteina per LolB, LolB lega la lipoproteina e la inserisce nella ME.

Percorso delle proteine della membrana esterna

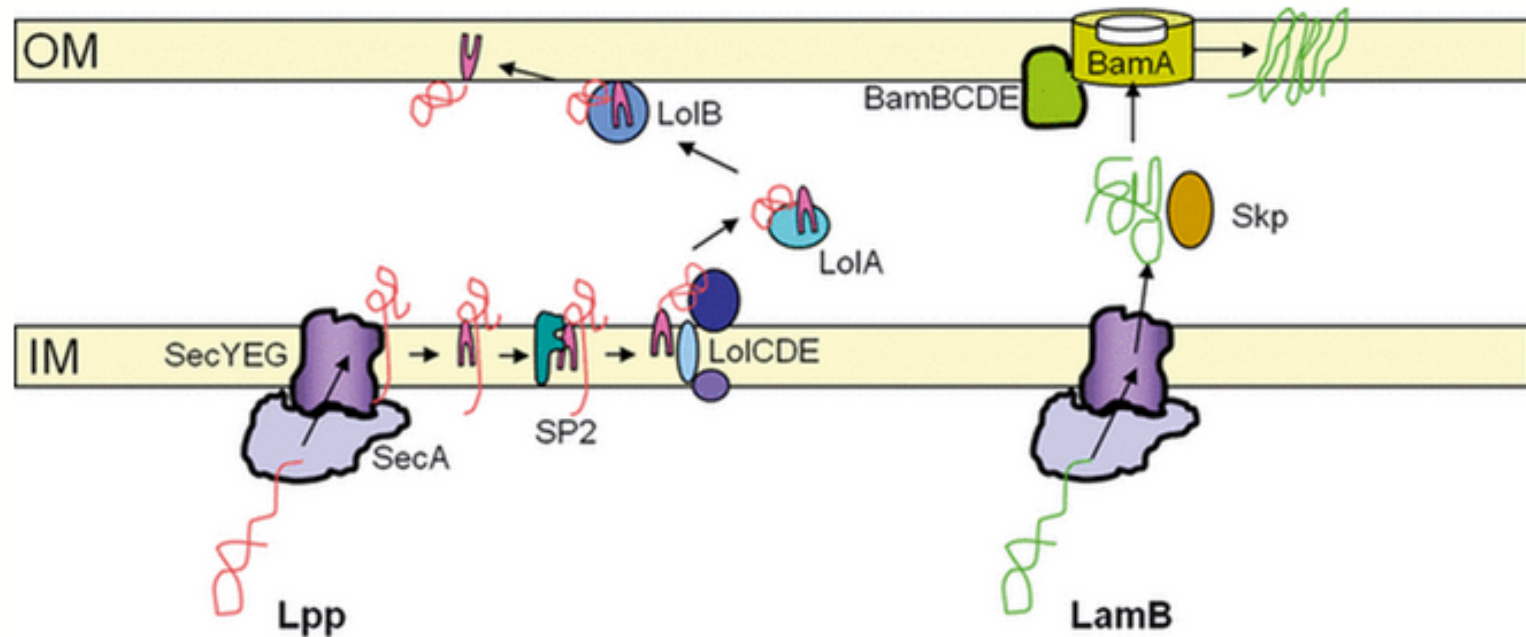
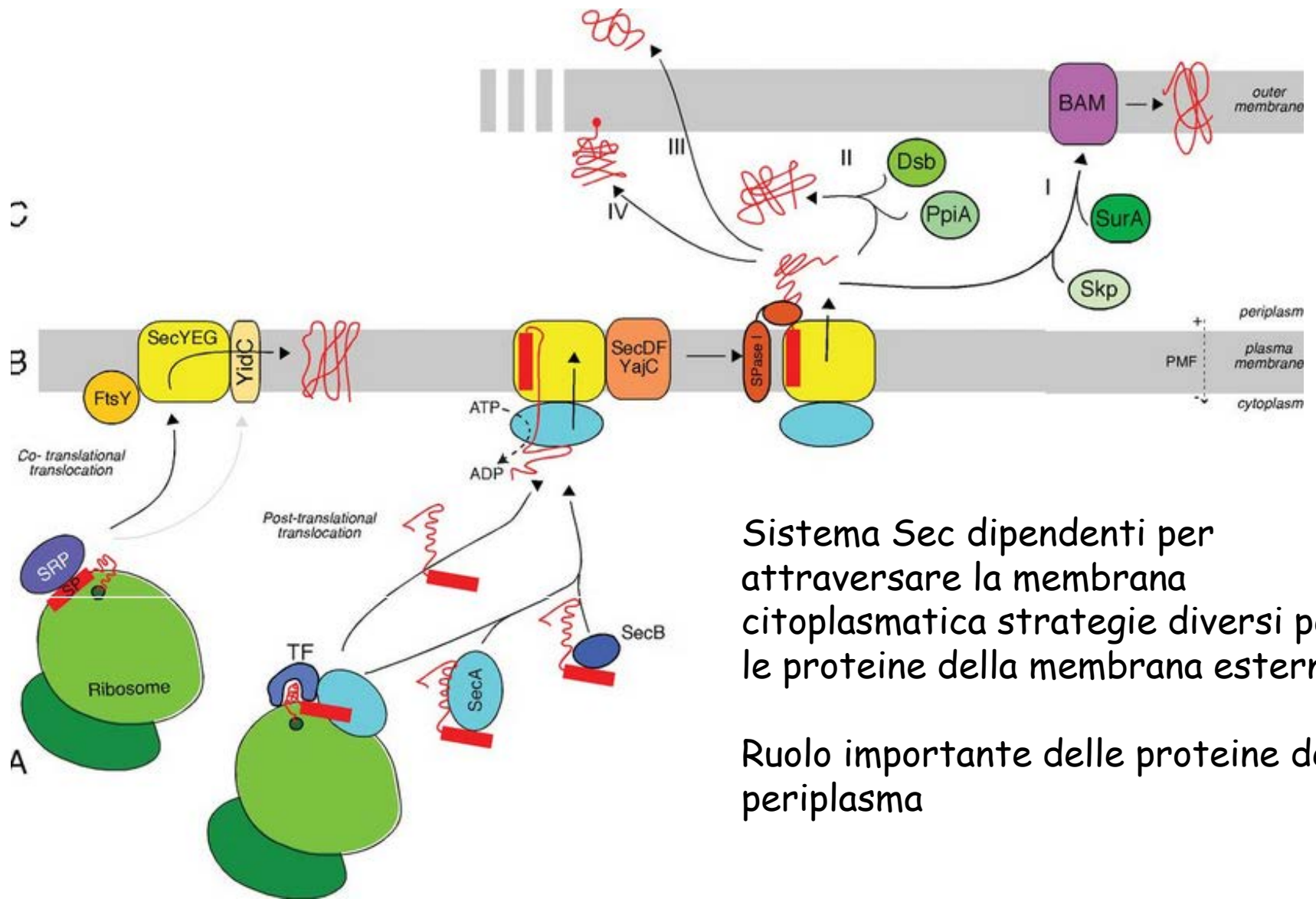


Figure 3

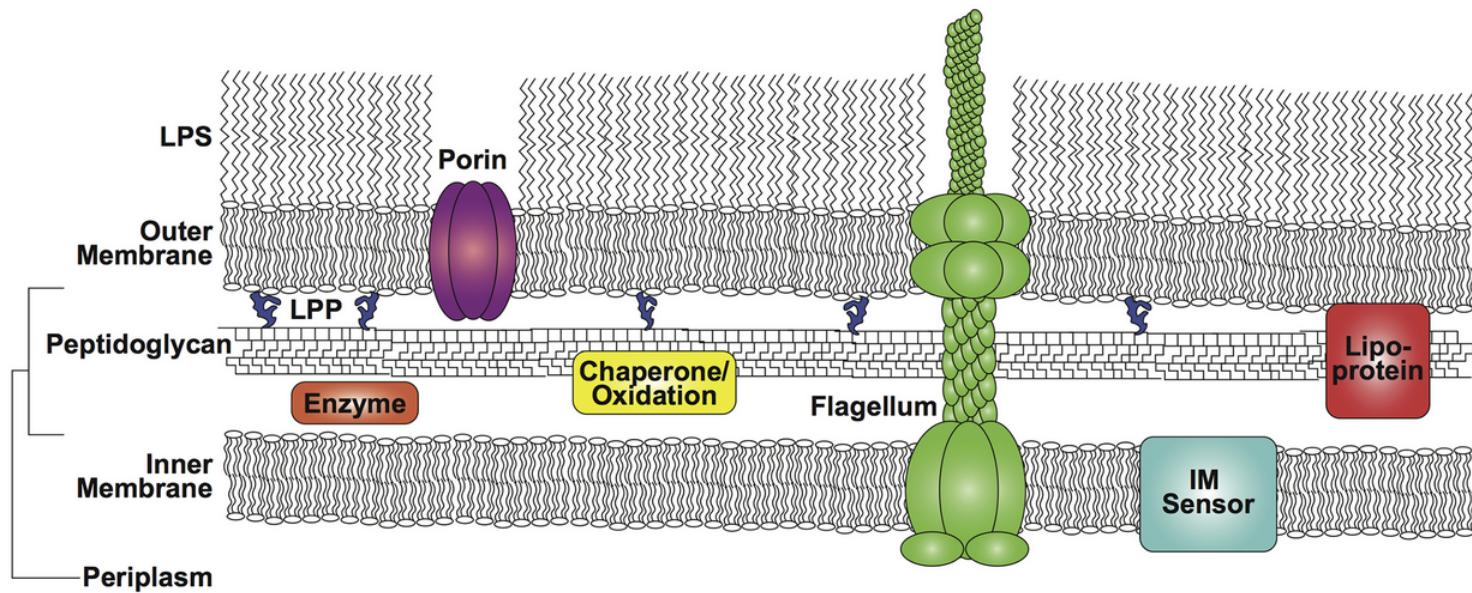
Assembly of outer membrane proteins. Lipoprotein (Lpp) is inserted into the inner membrane by the Sec translocase and modified by diacylglyceride before its processing by signal peptidase 2. Following signal peptide cleavage, the N-terminus of the mature protein is modified with an additional acyl chain. Lpp is released from the inner membrane by the ABC transporter LoICDE and binds to LoIA in the periplasm. At the outer membrane (left), it is transferred to LoIB and inserted into the outer membrane. SecA and SecYEG are also involved for protein transport of the maltoporin (LamB). The BAM complex catalyzes insertion of LamB into the outer membrane to form its β -barrel structure (right).



Sistema Sec dipendenti per attraversare la membrana citoplasmatica strategie diversi per le proteine della membrana esterna.

Ruolo importante delle proteine del periplasma

Veduta d'insieme della membrana esterna dei Batteri Gram negativi



Ma come vengono secrete le proteine al di fuori della cellula batterica ?

Esistono varie strategie che vengono suddivise in 6 Tipi da Tipo I a Tipo VI

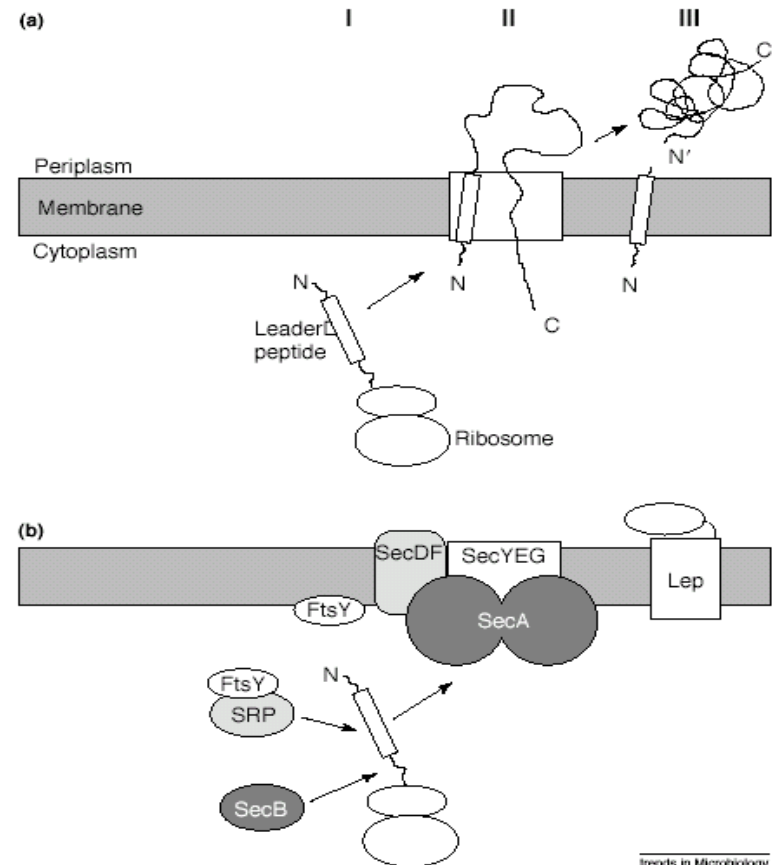
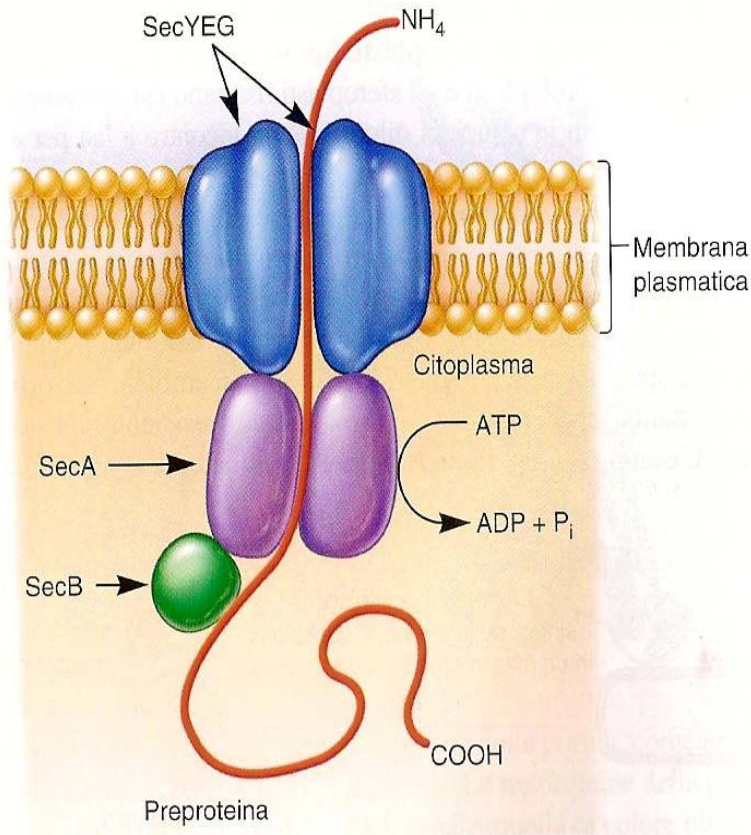
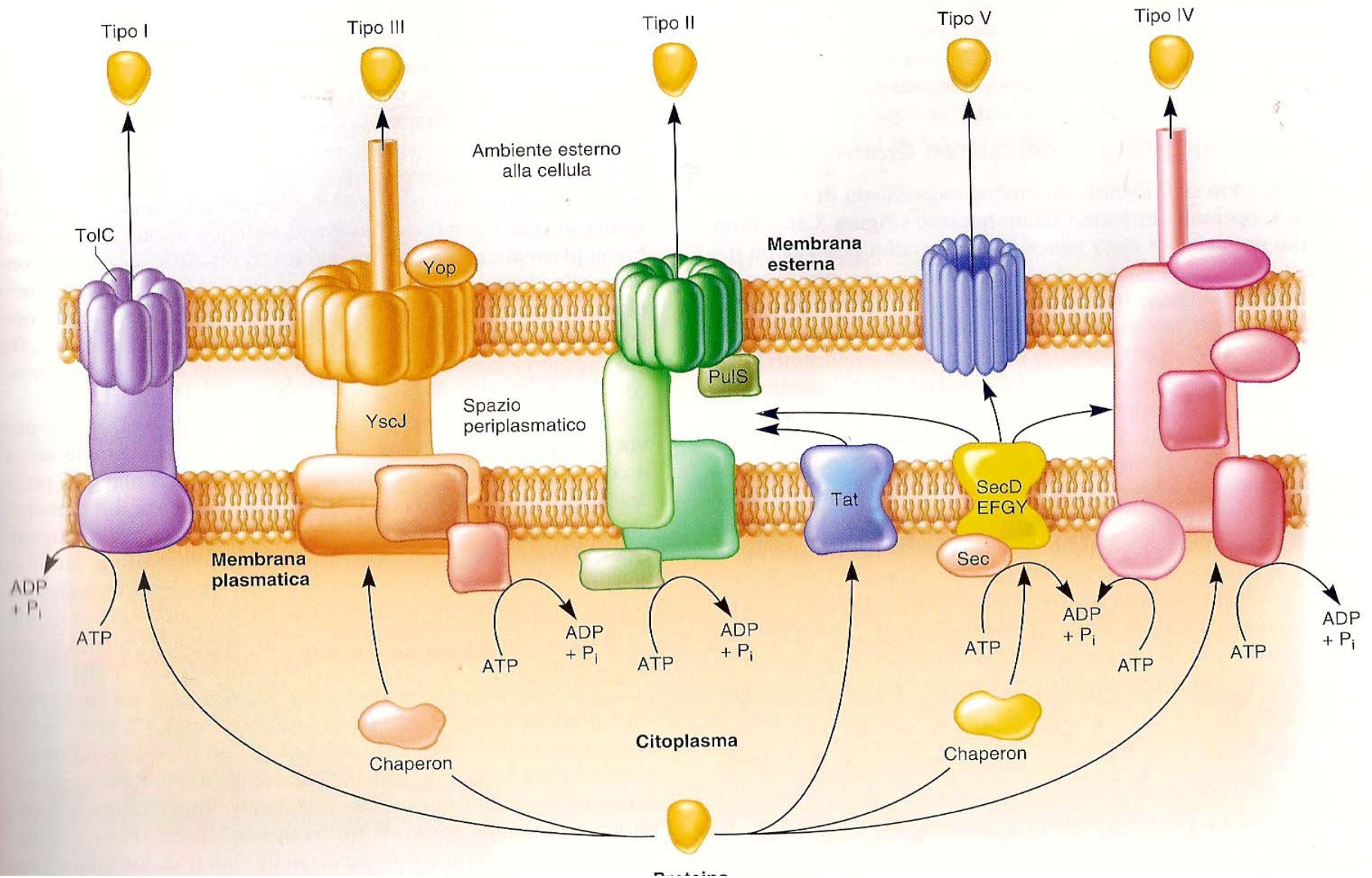
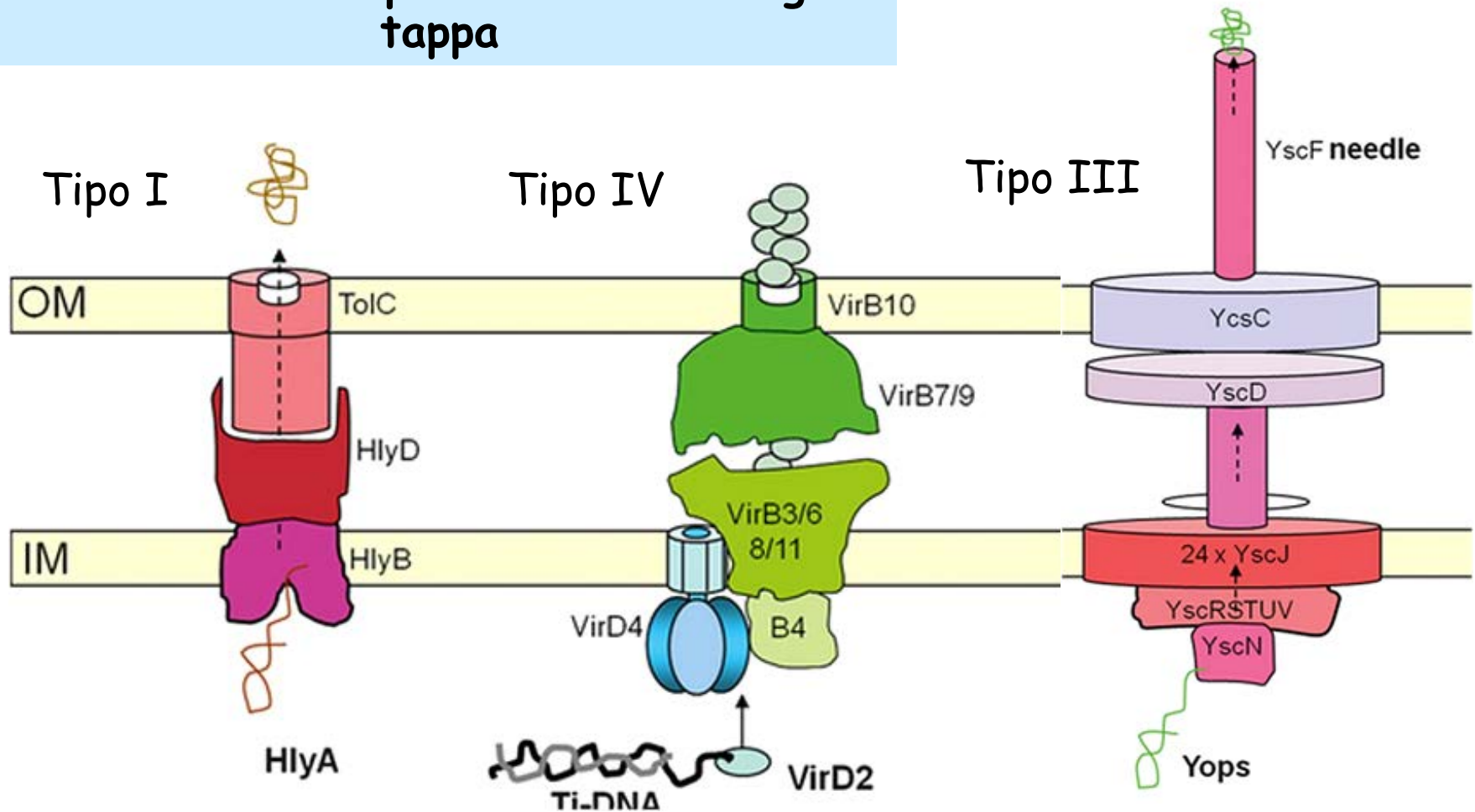


Figura 3.35 Via di traslocazione metabolica sec-dipendente. La via di traslocazione metabolica sec-dipendente di *E. coli*.

I diversi sistemi di secrezione

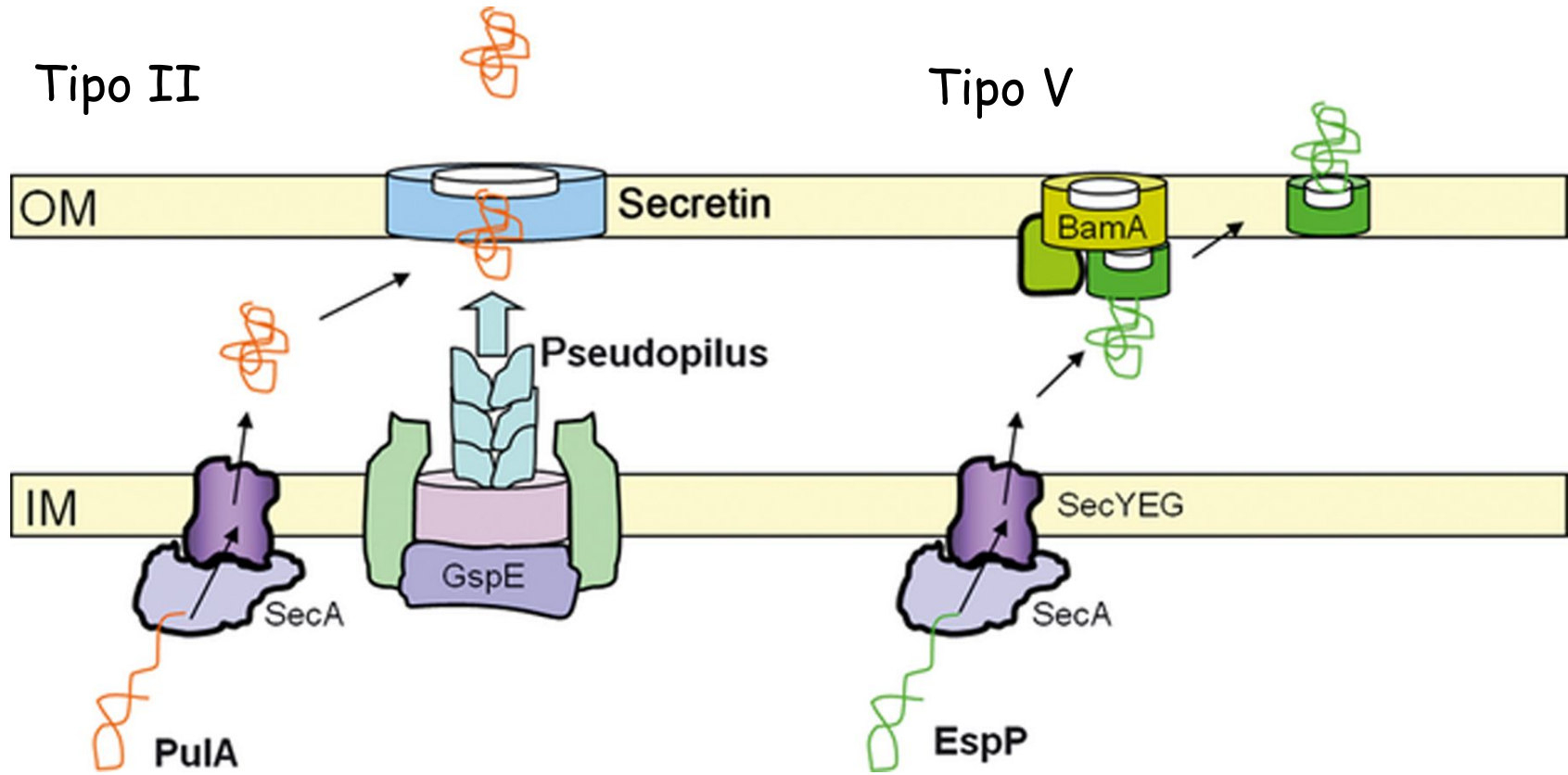


Secrezione delle proteine in una singola tappa



Protein secretion by the 1-step mechanism. The hemolysin system, a Type 1 secretion system, consists of the ABC transporter HlyB, the adaptor protein HlyD, and the outer membrane component TolC (left). The Ti-plasmid is a Type 4 secretion system of *Agrobacterium tumefaciens* (middle). Type3 Secretion System adopted by many pathogenic bacteria

Secrezione delle proteine in due tappe : la proteina viene rilasciata nel periplasma



Protein secretion by the 2-step mechanism. Pullulanase (Pu1A) of *Klebsiella oxytoca* is secreted by a Type 2 secretion system (left). After export to the periplasm, Pu1A is pushed by the pseudopilus through the secretion channel located in the outer membrane. The autotransporter EspP, a Type 5 secretion system substrate, is exported first to the periplasm. The secretion of the passenger domain across the outer membrane is catalyzed by the extracellular folding of the passenger domain outside the cell (right). The BAM complex most likely catalyzes the membrane translocation of the passenger domain, as well as the insertion of the translocation domain into the outer membrane.

I sistemi SEC dipendenti

Dal periplasma alla membrana esterna o al di fuori:

Una volta raggiunto il periplasma attraverso il sistema di secrezione generale (SEC) le proteine possono inserirsi nella membrana esterna o oltrepassarla tramite 4 diversi meccanismi

Il Sistema di Secrezione di tipo II (T2SS)

A. I complessi multiproteici tipo pullulonasi

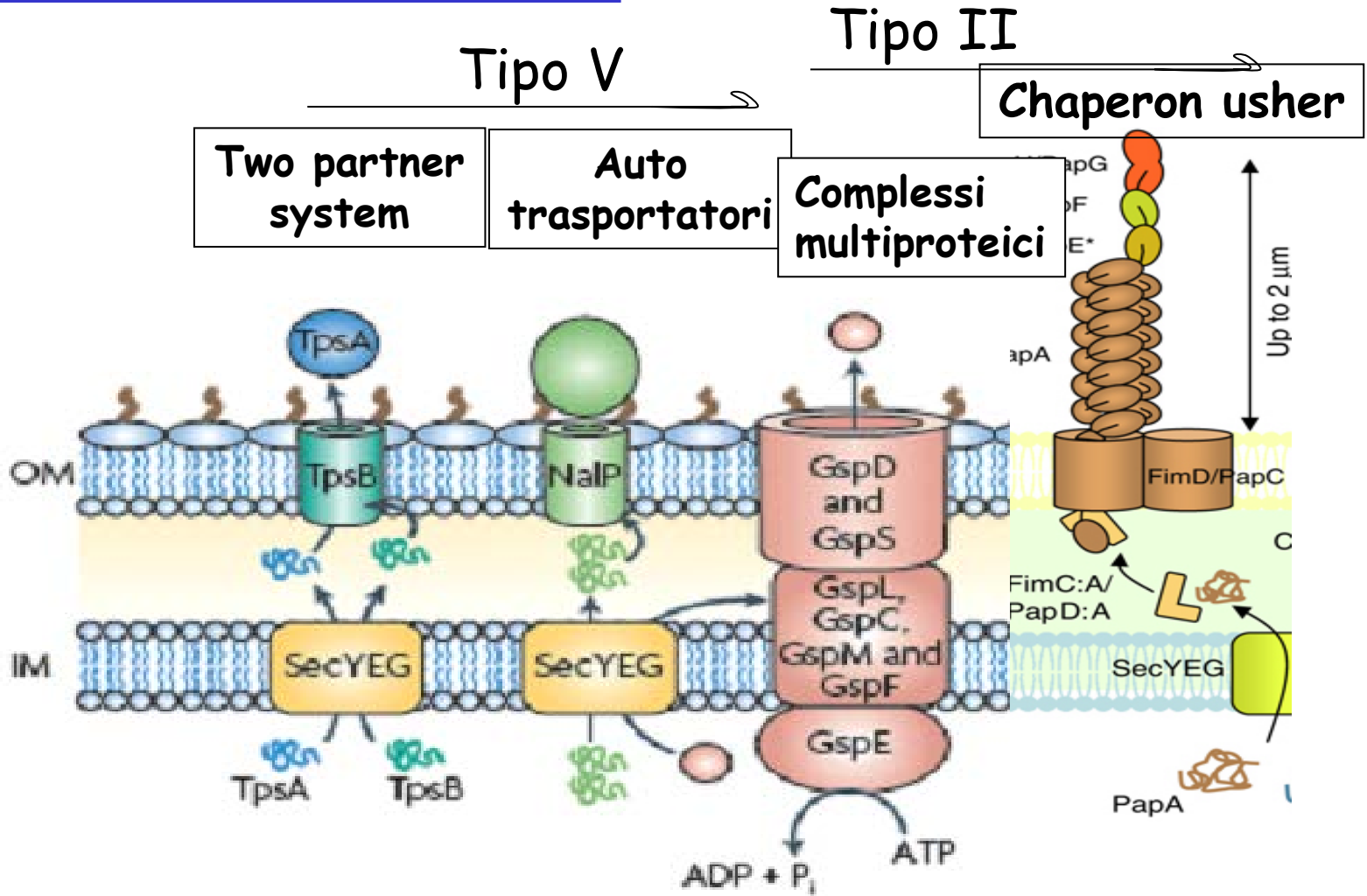
B. Il sistema Chaperon /Usher (usciere) dei pili .

Il Sistema di Secrezione di tipo V (T5SS)

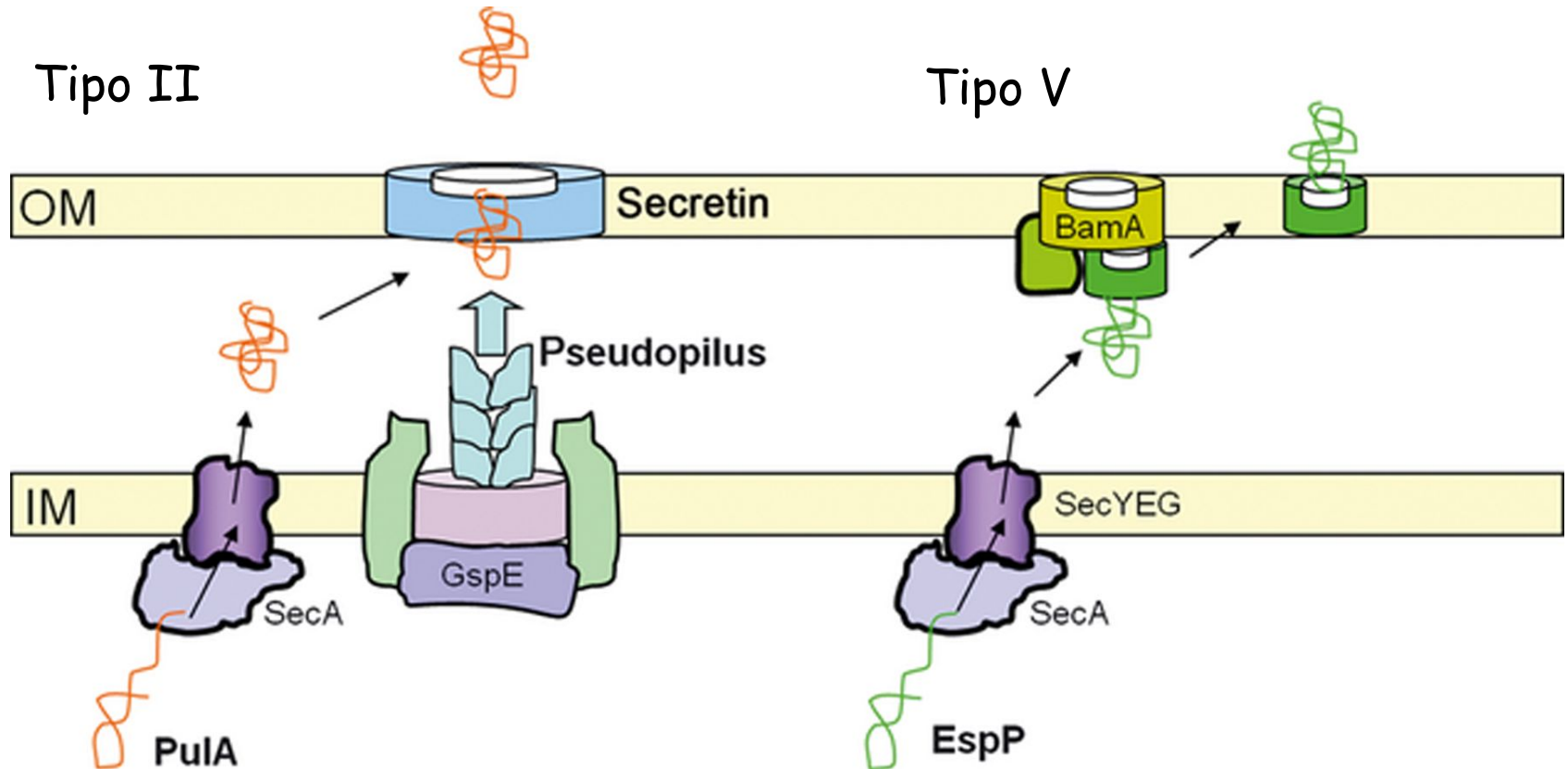
A. Gli autotrasportatori

B. Il Sistema a 2 partners (TPS)

I sistemi SEC-Dipendenti



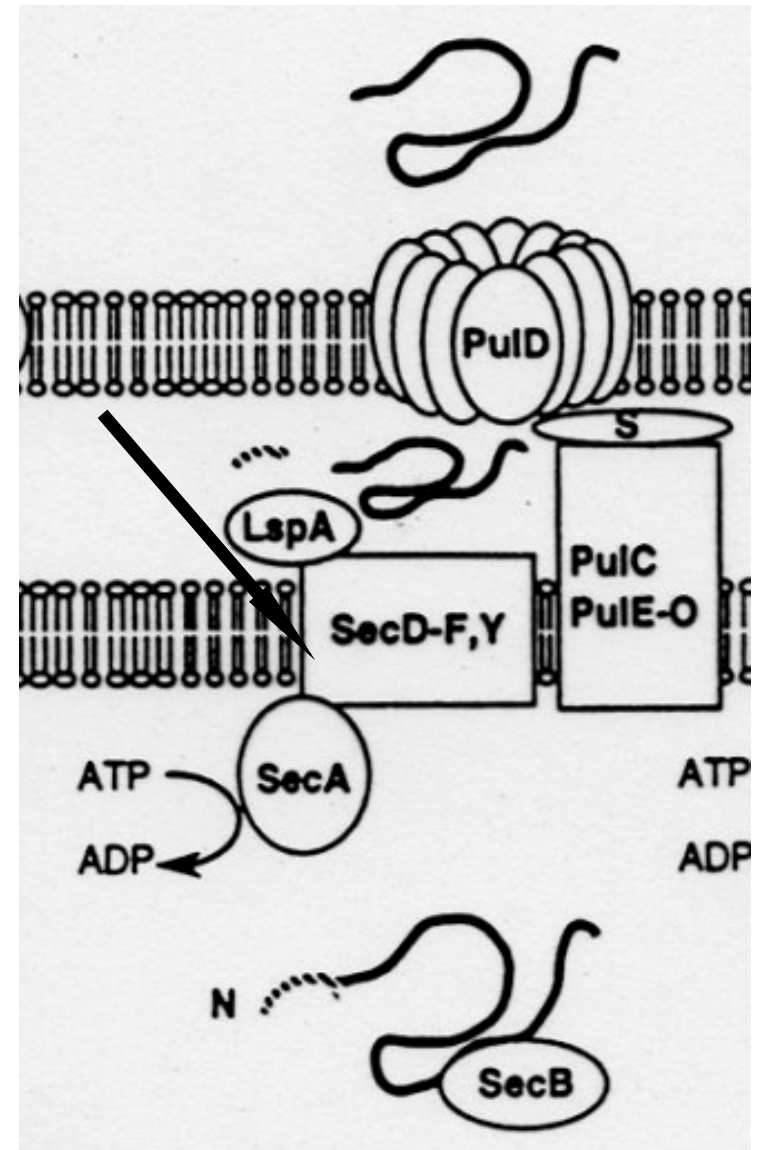
Secrezione delle proteine in due tappe : la proteina viene rilasciata nel periplasma



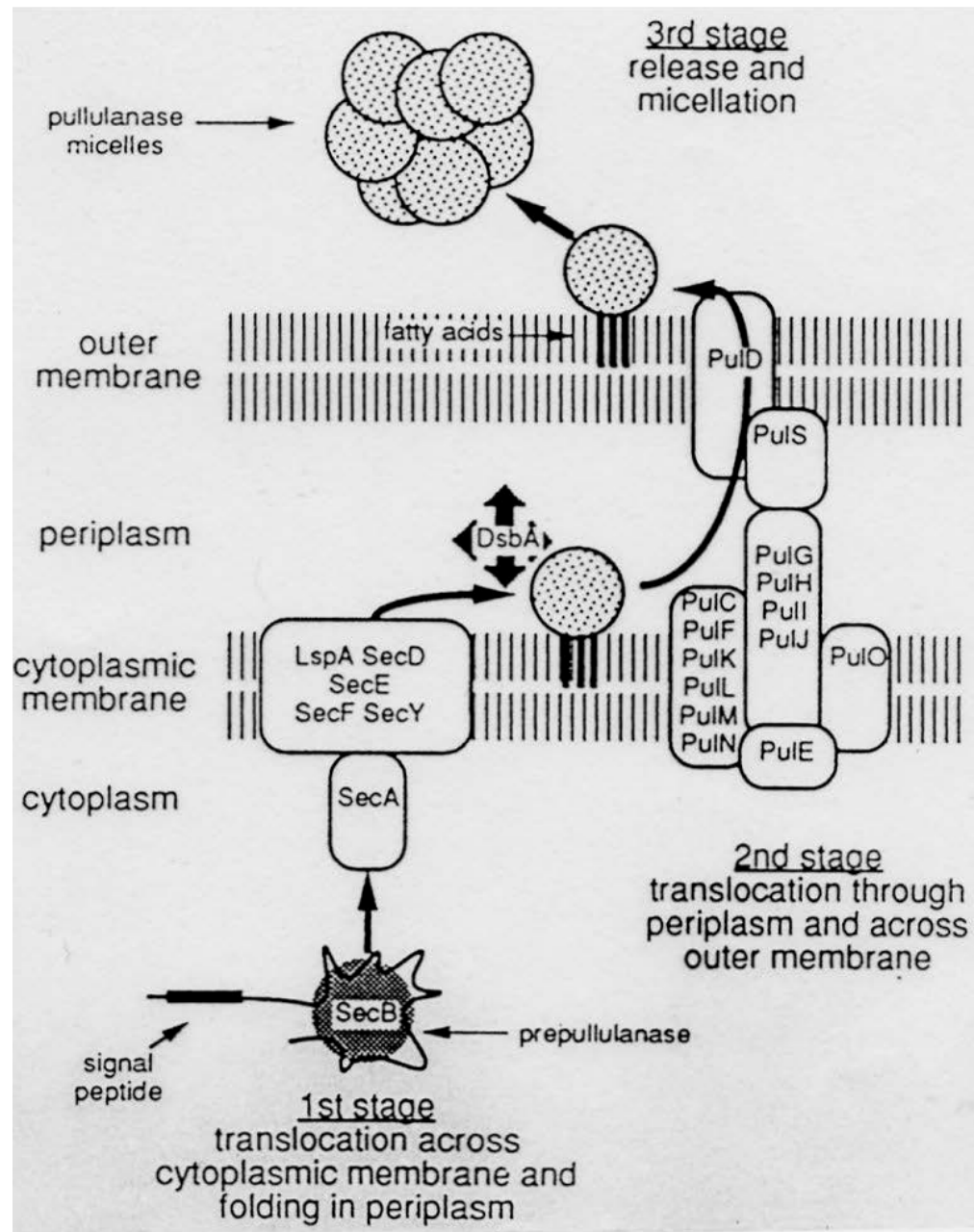
Protein secretion by the 2-step mechanism. Pullulanase (Pu1A) of *Klebsiella oxytoca* is secreted by a Type 2 secretion system (left). After export to the periplasm, Pu1A is pushed by the pseudopilus through the secretion channel located in the outer membrane. The autotransporter EspP, a Type 5 secretion system substrate, is exported first to the periplasm. The secretion of the passenger domain across the outer membrane is catalyzed by the extracellular folding of the passenger domain outside the cell (right). The BAM complex most likely catalyzes the membrane translocation of the passenger domain, as well as the insertion of the translocation domain into the outer membrane.

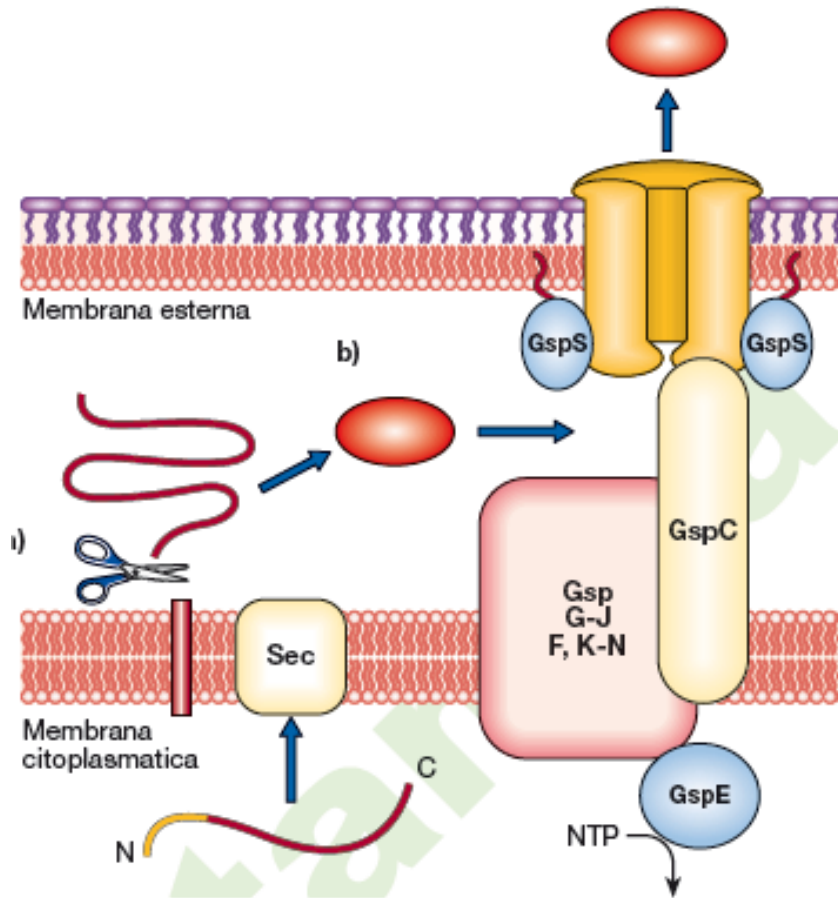
Il sistema di secrezione di tipo II

- La proteina viene dapprima traslocata attraverso la IM mediante il sistema Sec grazie alla presenza di sequenza segnale poi il sistema II completa il processo secretorio
- È impiegata da numerosi batteri i patogeni vegetali e animali
- Contribuisce alla secrezione di enzimi di degradazione cellulasi, pectinasi, proteasi e lipasi e di tossine (tossina colerica)
- Costituito da 12 -14 proteine alcune delle quali integrali della IM. Queste proteine pur localizzate nella IM contribuiscono solo al passaggio della O.M



Il sistema di esportazione di tipo II: numerose proteine sono necessarie per l'attraversamento della membrana esterna: specifiche per ogni proteina secreta.



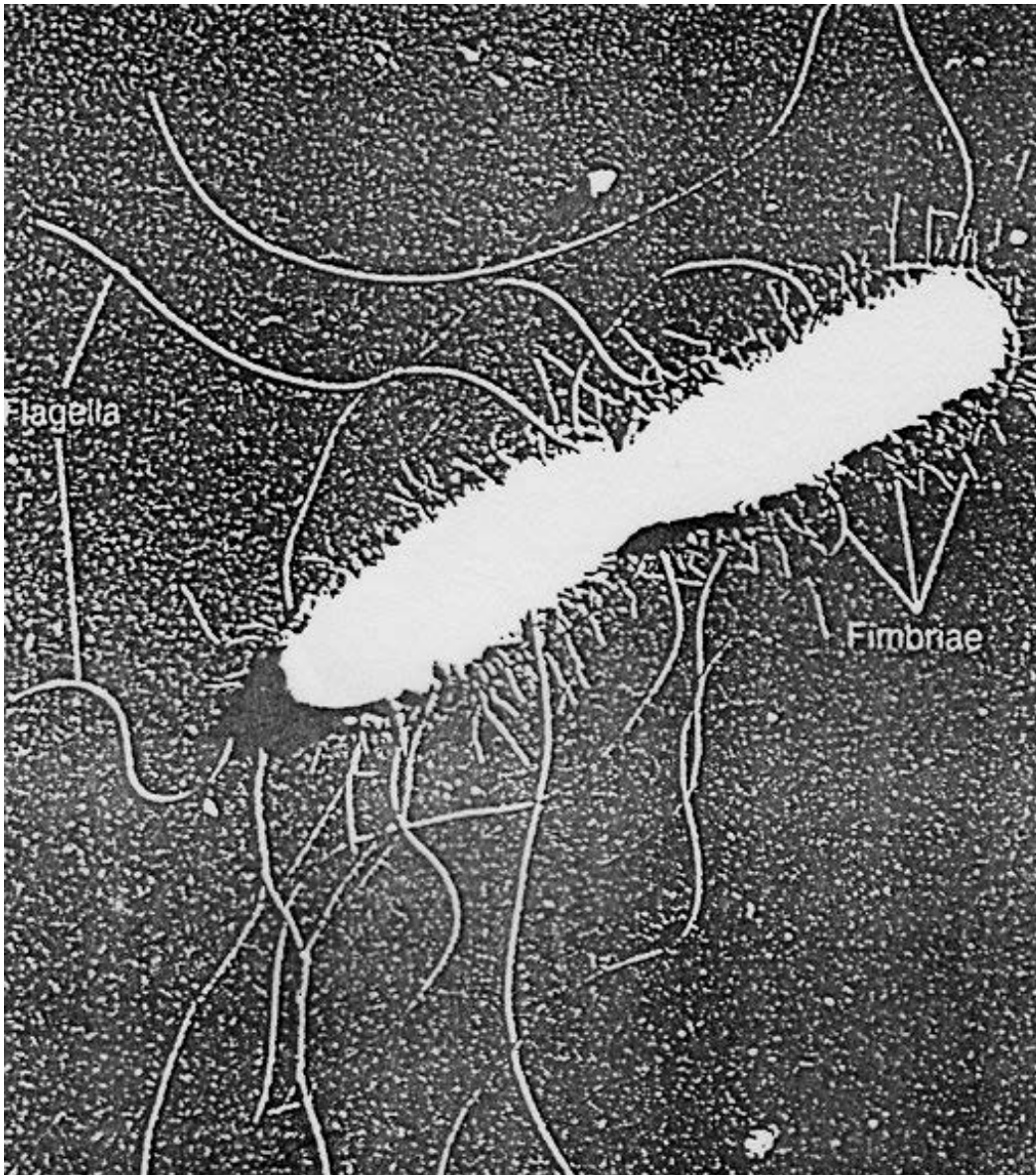


Sistemi di secrezione di tipo II sono molto specifici e dedicati al trasporto di 1 singolo substrato.

Esempi classici sono

Tossina colerica di *V.cholerae*
Pullulonasi di *Klebsiella*

Energia viene fornita dall'idrolisi di ATP o GTP



Pili o fimbrie sono

strutture proteiche
sottili che si ritrovano
in molti batteri .

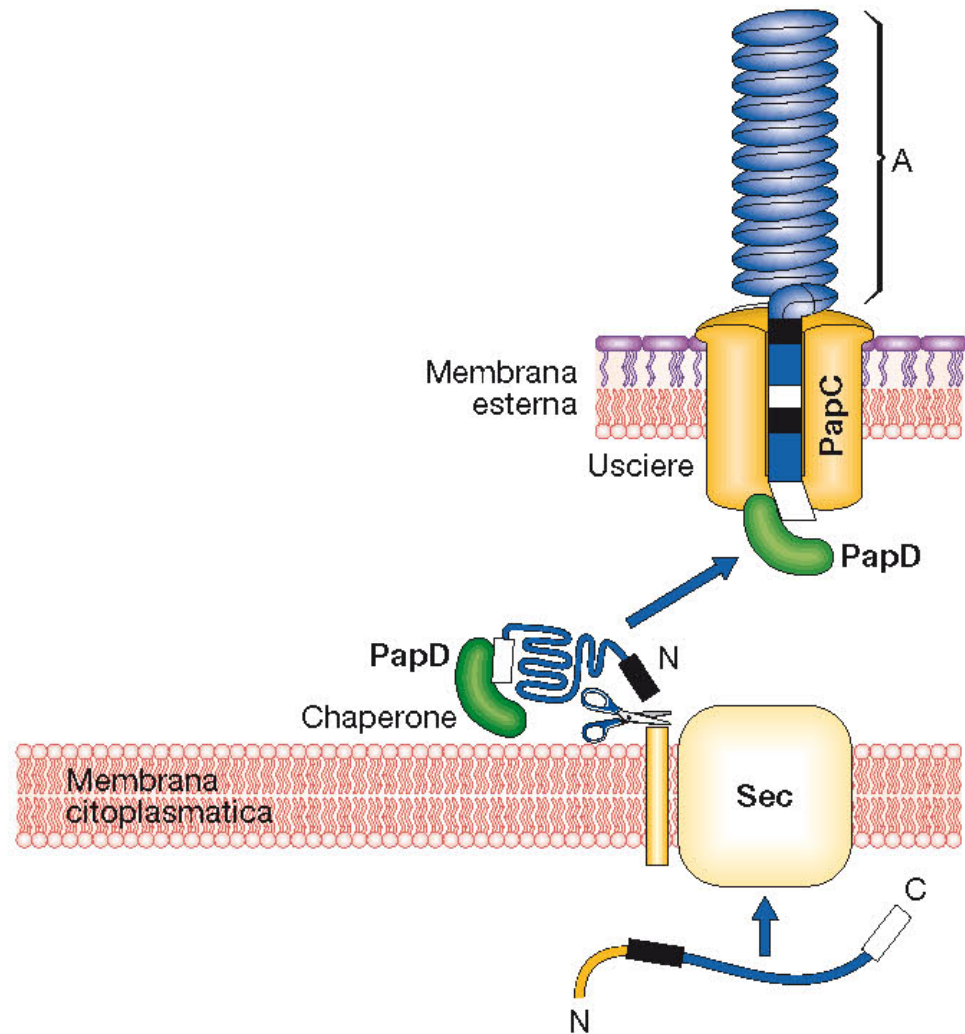
sono più numerose ma
più corte e sottili
rispetto ai flagelli e

sono in genere coinvolte
nei processi di adesione
dei batteri

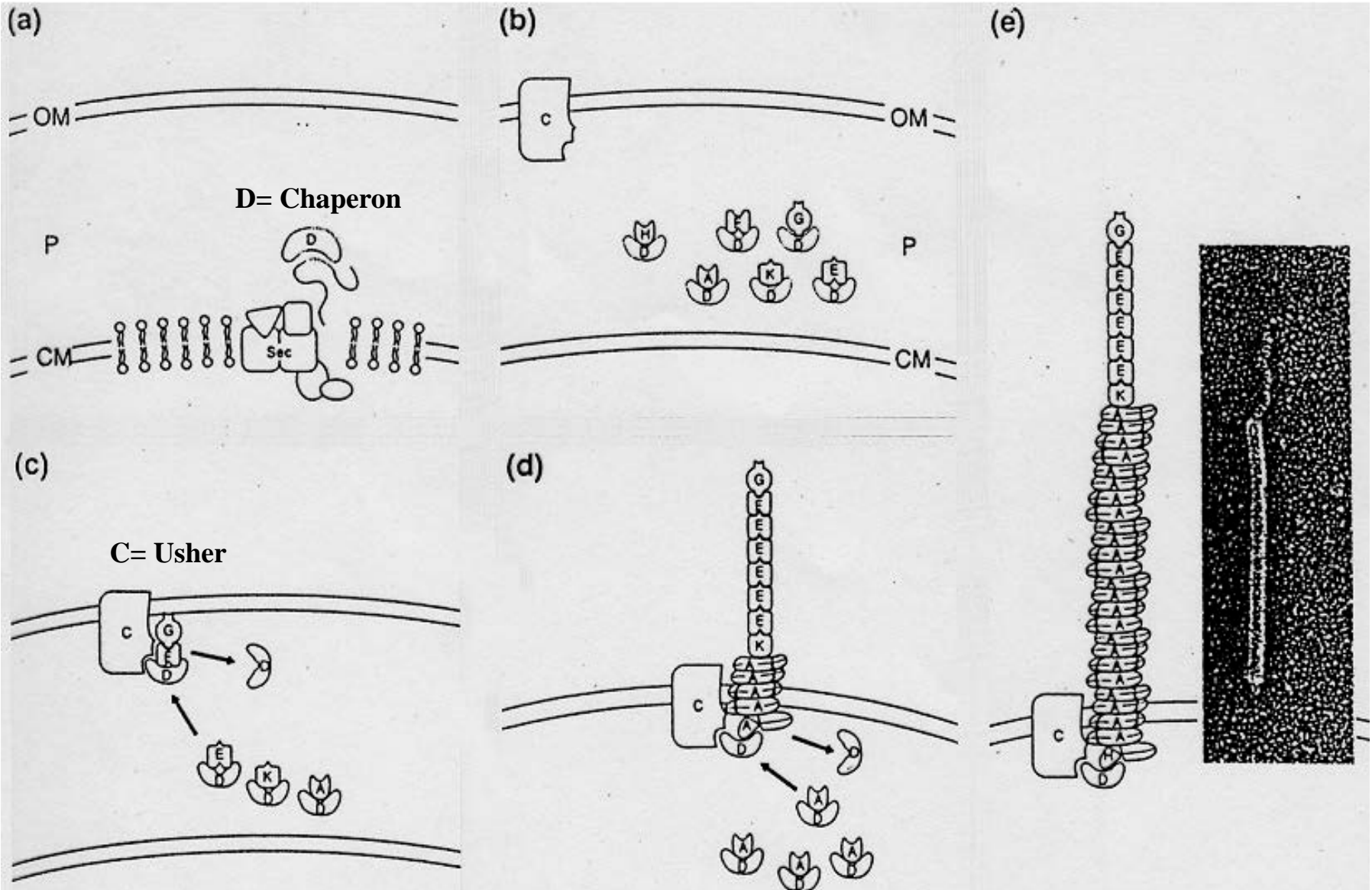
La via del Chaperon & USHER (usciere)

utilizza una proteina periplasmatica con funzione di Chaperone ed una proteina specifica nella OM con funzione di USCIERE

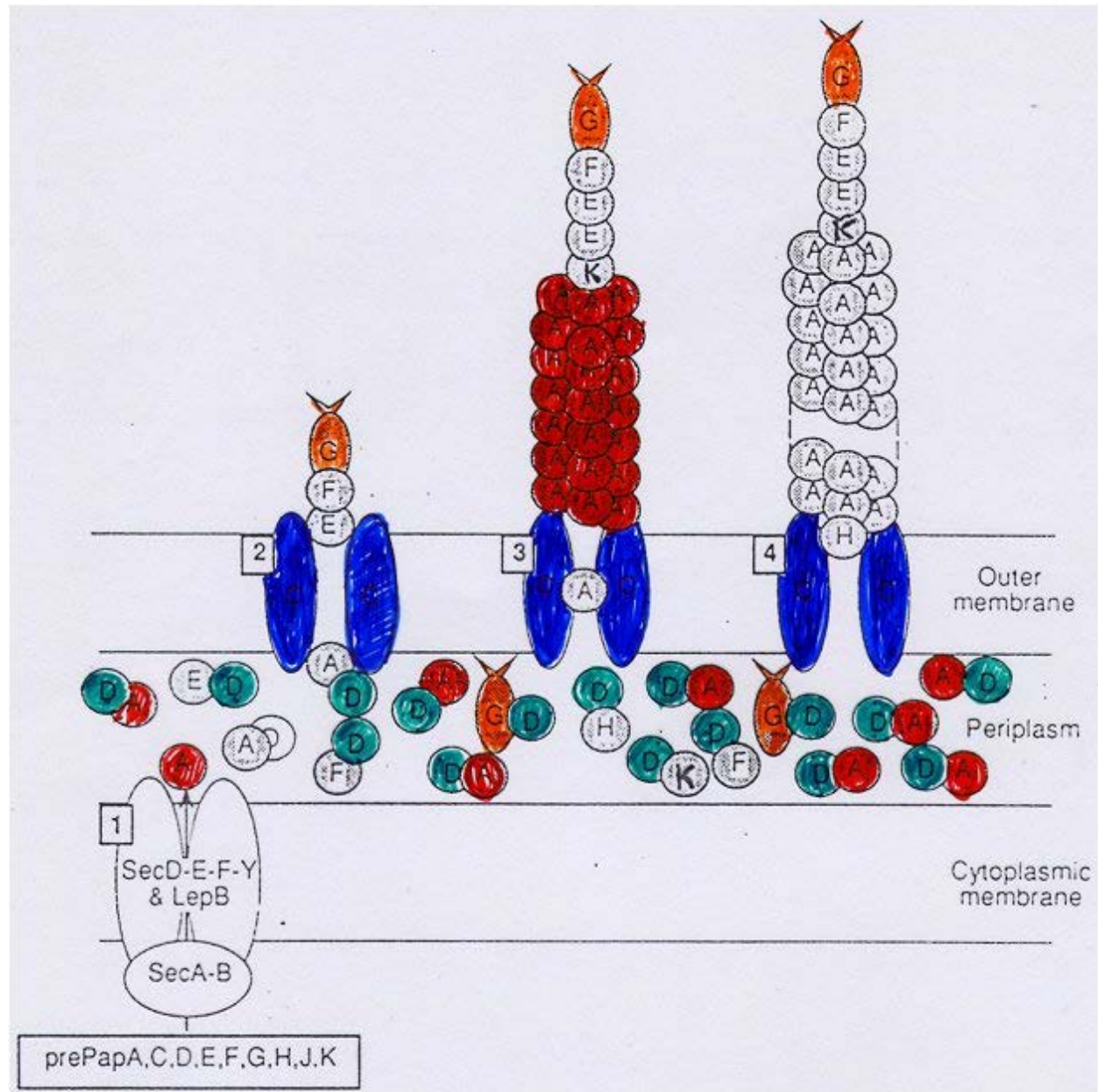
Modello basato sui
Pili di tipo I negli
E. coli patogeni



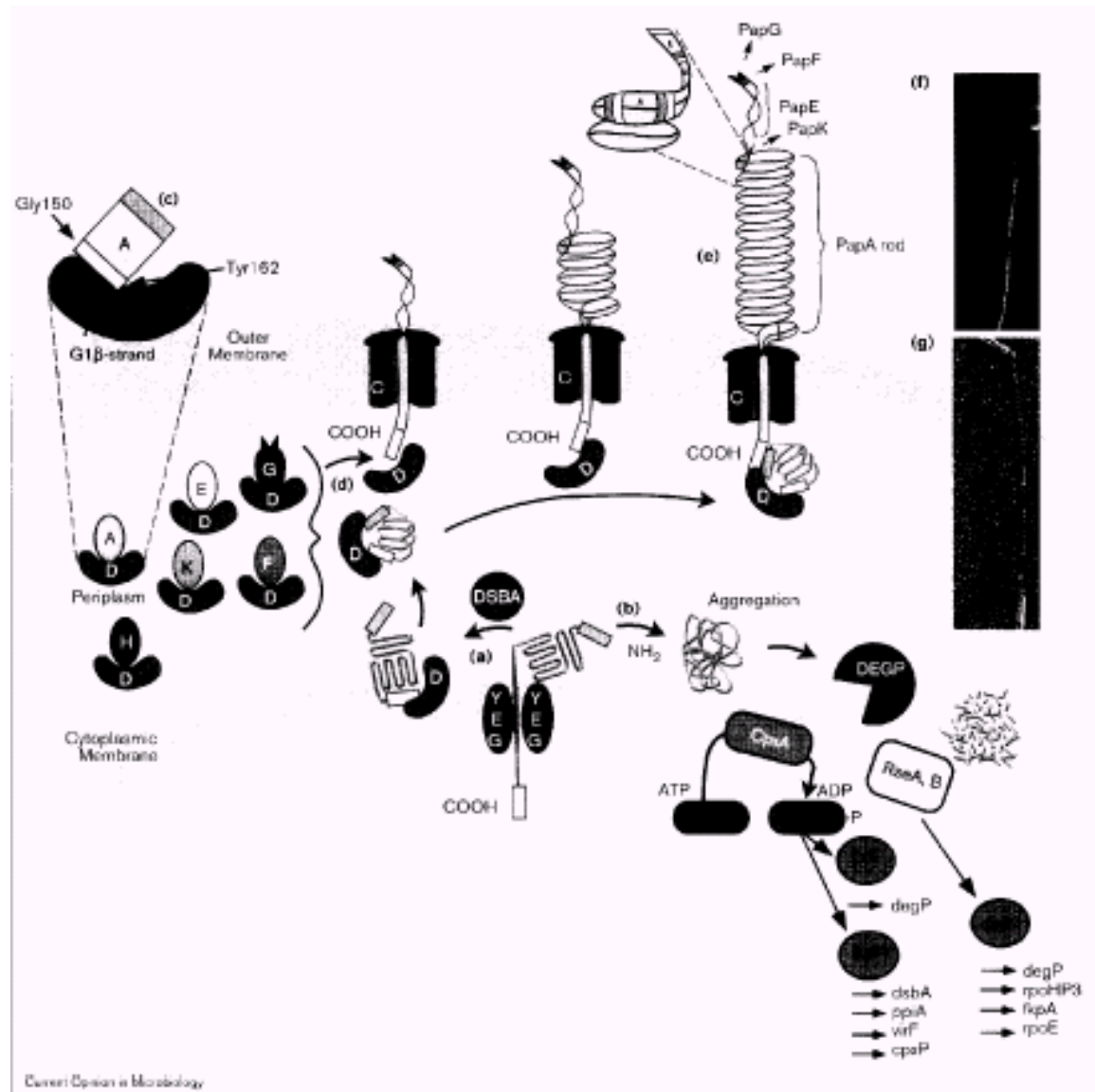
Sintesi del pilo tramite meccanismo Chaperon /Usher



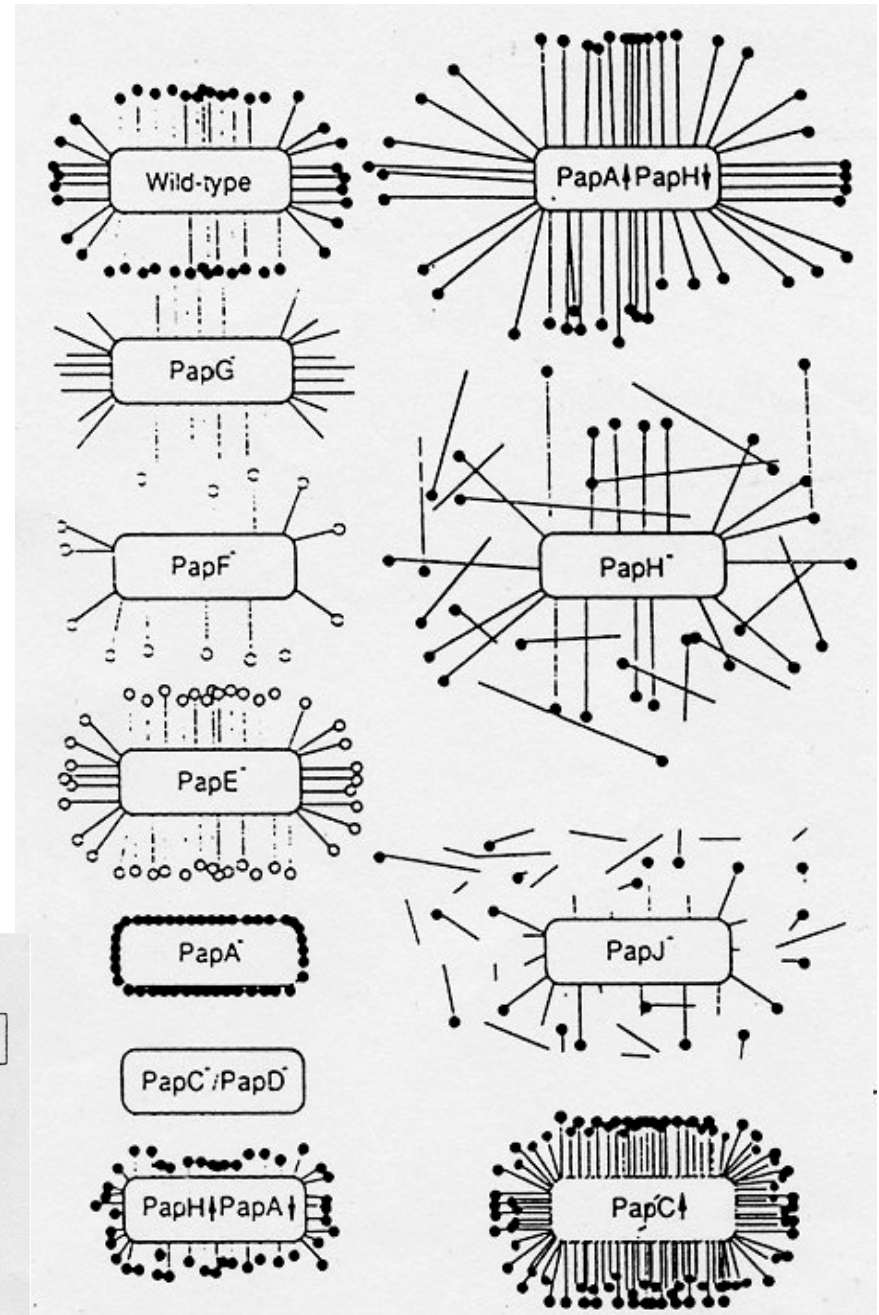
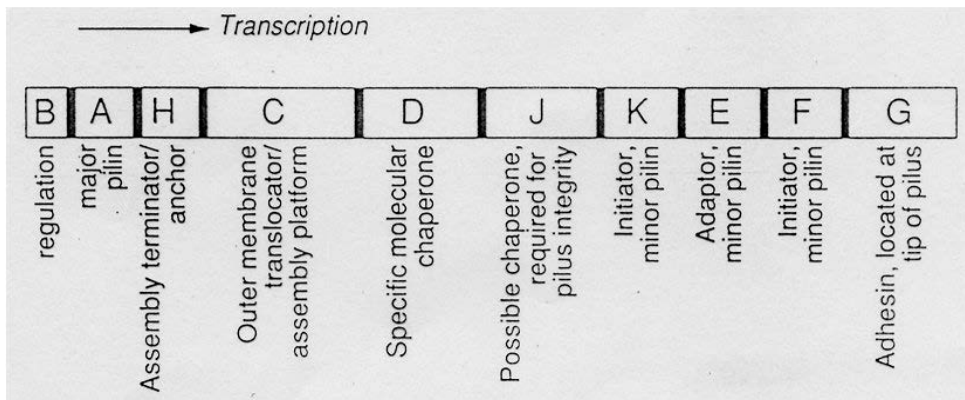
La proteina periplasmatica con funzione di Chaperon riconosce dapprima l'adesina G e poi via via le altre proteine con le quali ha un'affinità decrescente e le accompagna verso il canale di membrana esterna costituito dalla proteina Usher



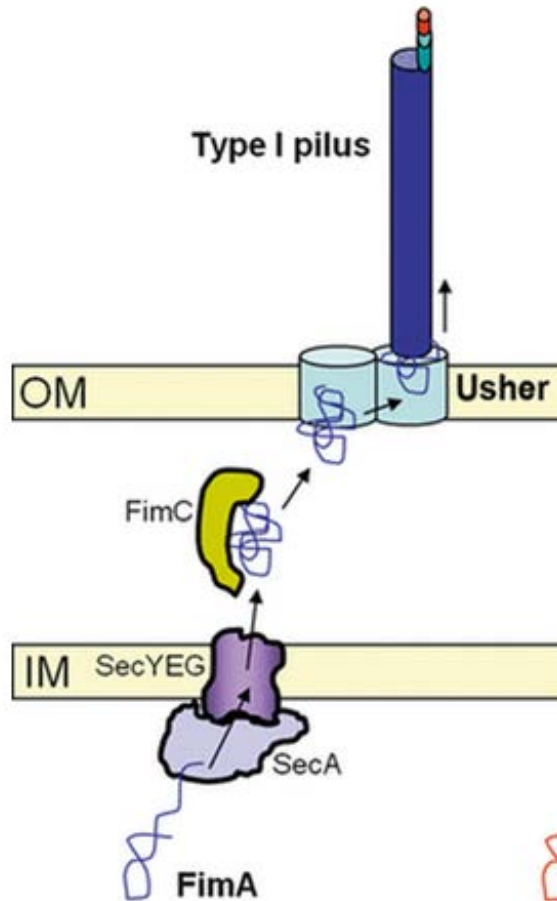
Tappe della sintesi dei pili



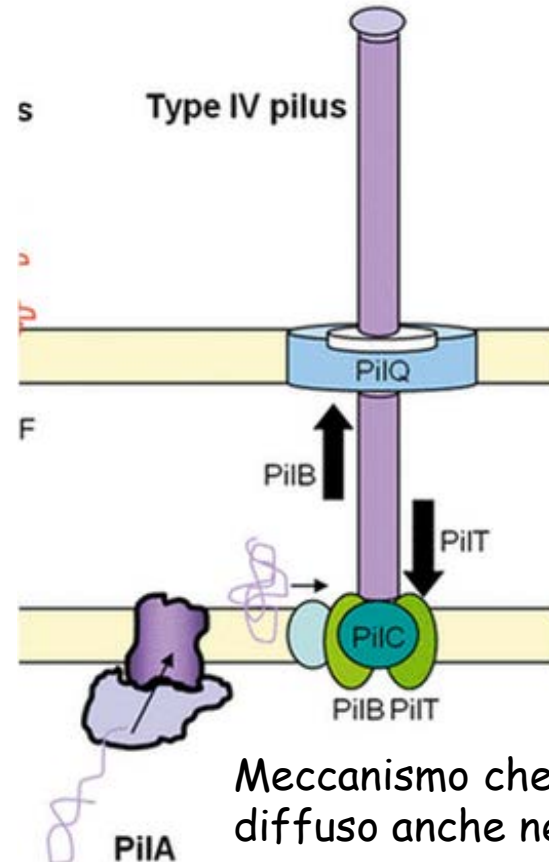
Osservando i vari fenotipi ottenuti dai mutanti nei diversi geni dell'operone Pap è stato possibile ricostruire la funzione dei diversi prodotti genici durante la formazione del pilo. In alcuni casi i geni sono stati overspressi o ne è stata alterato il rapporto.



Due tipi di assemblaggio dei pili

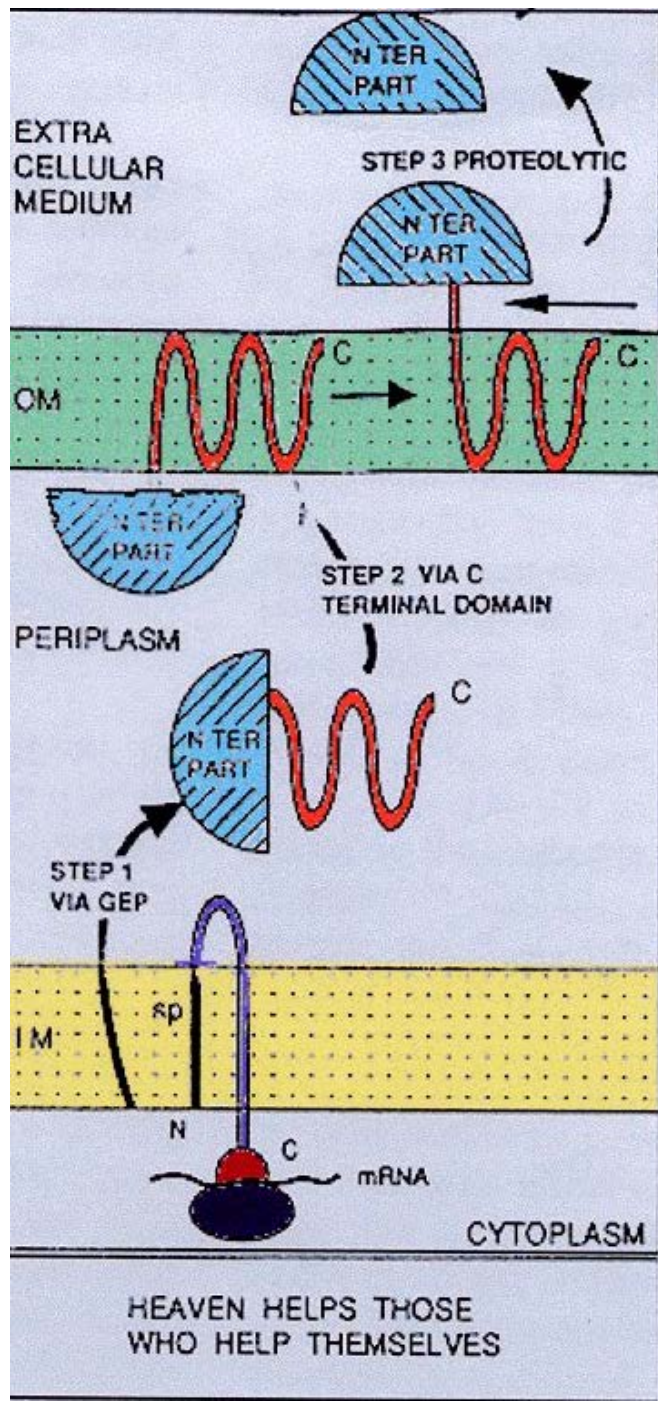


Classico meccanismo
chaperon usher



Meccanismo che vedremo più avanti
diffuso anche negli Archea.

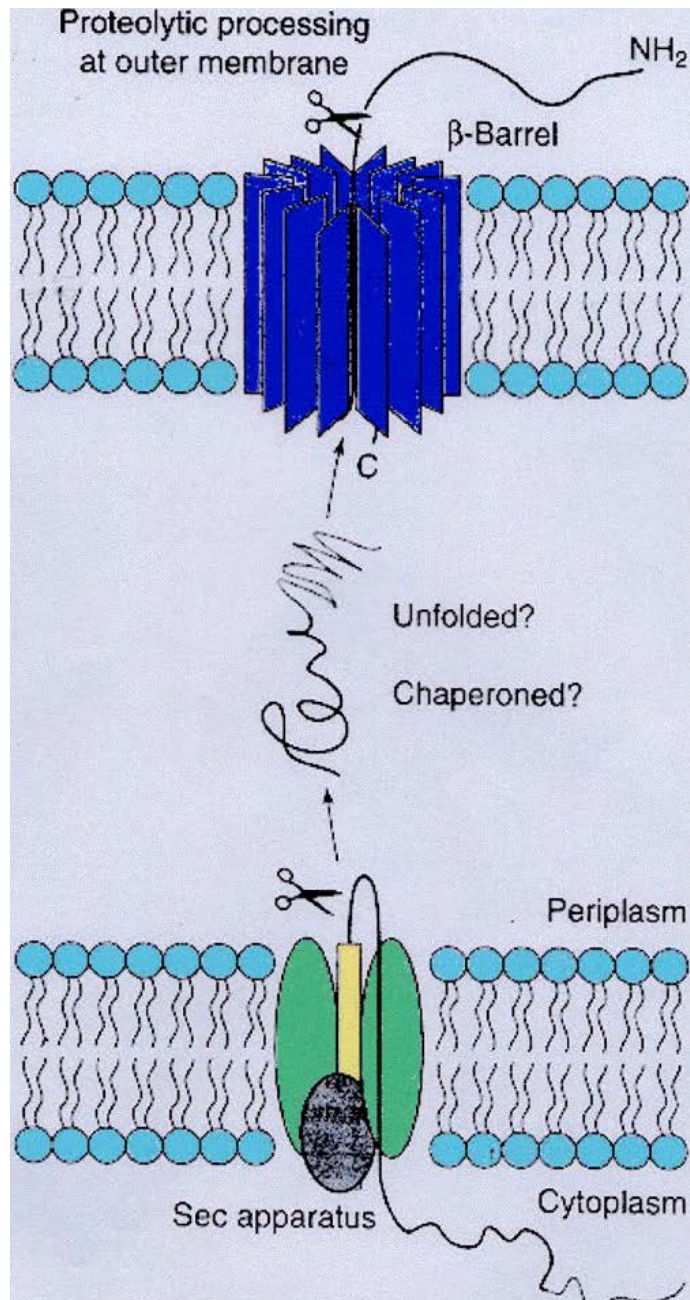
Non confondere il pilo di tipo IV (questo) con il pilo presente nel sistema di esportazione di tipo IV



Tipo V gli autotrasportatori

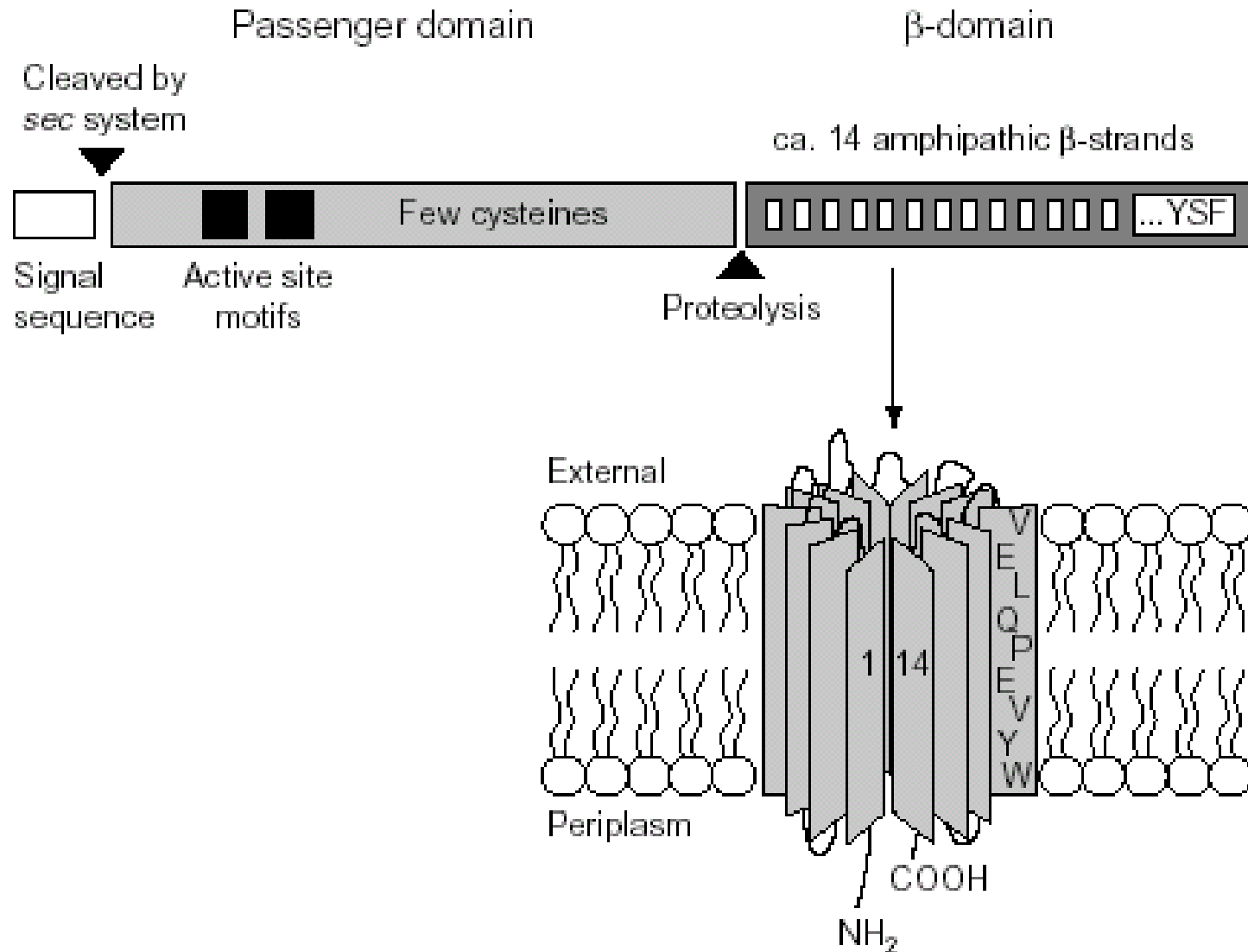
- Utilizzano il sistema Sec per attraversare la IM
- Grazie alla loro porzione C terminale idrofobica riescono ad inserirsi e fuoruscire dalla OM

Aiutati che Dio t'aiuta!



La porzione C terminale della proteina esportata si inserisce nella OM e subisce un taglio autocatalitico della porzione N terminale

Struttura di un autotrasportatore



Il sistema a due partners TPS Two Partners Secretion

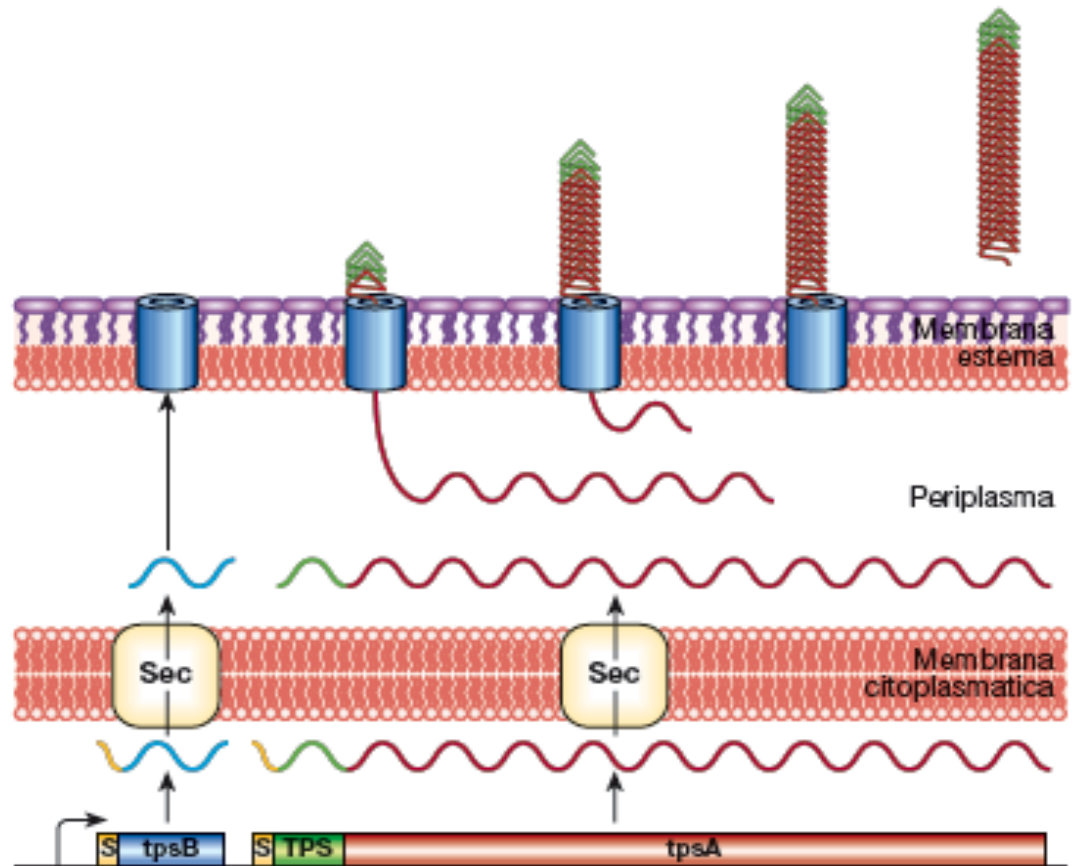
Alcune proteine una volta trasportate nel periplasma tramite il sistema Sec utilizzano per il sistema a due partner per attraversare la membrana esterna.

Il sistema è costituito

1. da una proteina che funge da canale localizzata nella membrana esterna
2. da una proteina trasportata che contiene un elemento di riconoscimento specifico

Le proteine trasportate sono di grandi dimensioni , proteasi, adesine invasive e contengono un dominio N-terminale di 300 AA (dominio TPS). Questo dominio potrebbe svolgere un ruolo importante per il riconoscimento da parte della specifica proteina canale.

I geni che codificano per le proteine TpsA e TpsB sono in genere organizzati in un operone.



La proteina TpsA si associa nel periplasma alla proteina TpsB che funge da canale, tramite il dominio N terminale. La proteina può rimanere associata alla OM o venir rilasciata nell' ambiente esterno. Tipico esempio la proteina BamA

Utilizzano questo sistema l'emoagglutinina filamentosa di *Bordetella pertussis*, le adesine di *Haemophilus influenzae* e l'emolisina di *Serratia marcescens*.

