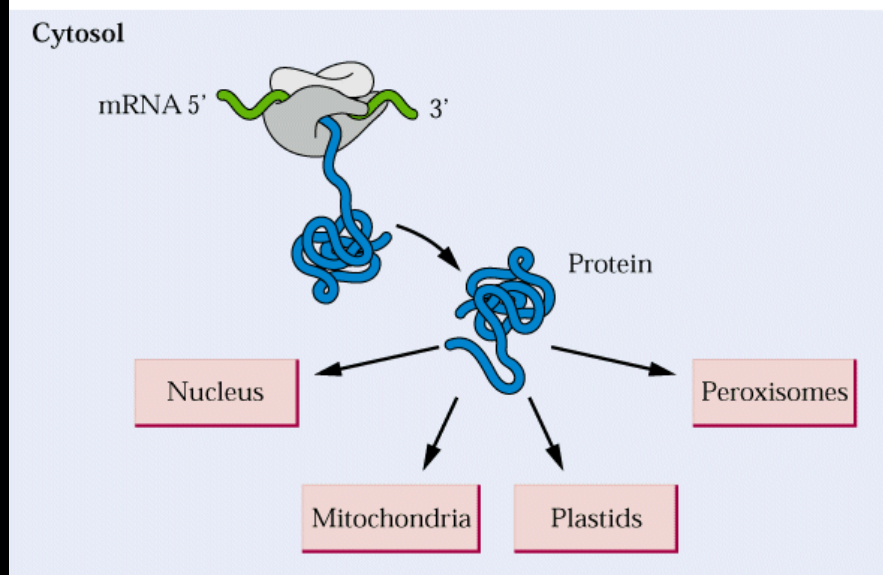


Clase 4

Distribución de proteínas y transporte vesicular

Las destinaciones intracelulares de proteínas vegetales

(A) Free ribosomes in cytosol



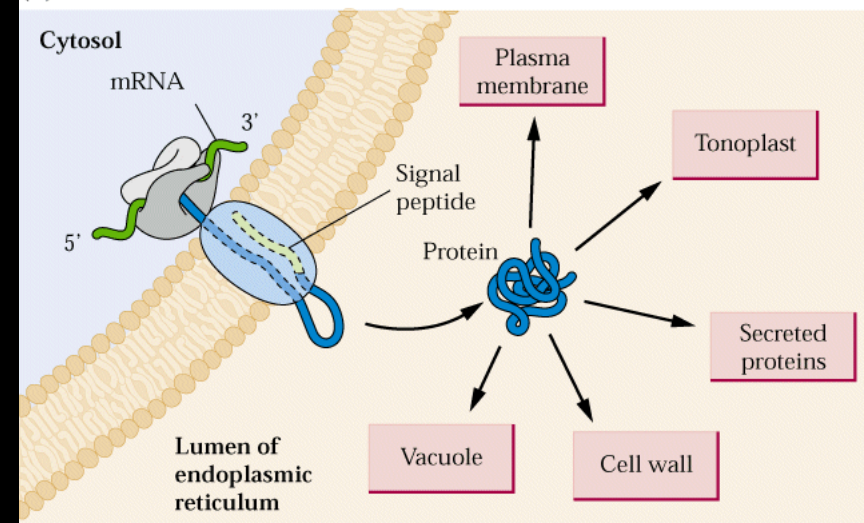
Ribosomas del RE

Aparato de Golgi
Vacuola
Membrana plasmática
Pared celular y secretada

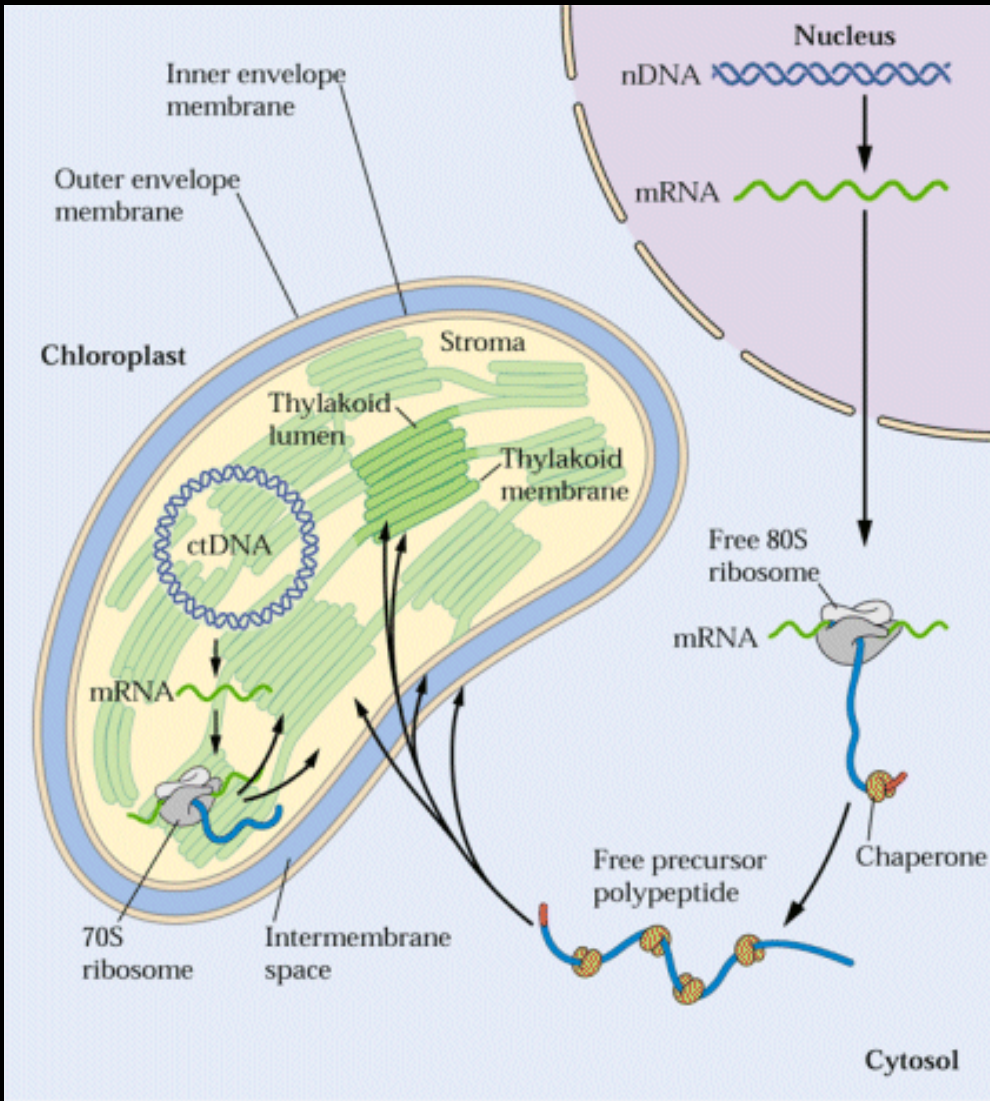
Ribosomas citosólicos

Núcleo
Mitocondria
Plastidios
Peroxisomas y glioxisomas

(B) Membrane-bound ribosomes



Proteínas de los plastidios

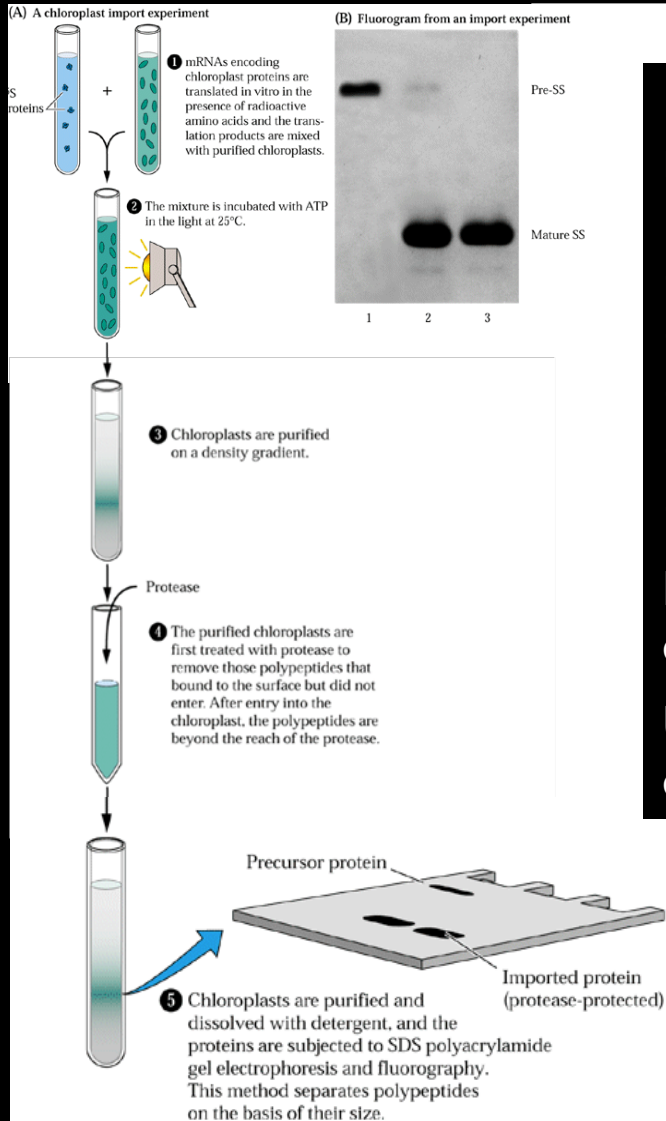


Proviene de distintos genomas (rbcL y S)

Múltiples destinos dentro del mismo organelo

- Membrana externa
- Membrana interna
- Membrana del tilacoide
- Lumen del tilacoide
- Estroma

Ensayo de importación a los cloroplastos



Ensayo de traducción *in vitro* con mRNA de *RubiscoS* formando ^{35}S RubiscoS

- Incubar cloroplastos + ^{35}S RubiscoS
- Centrifugar
- Tratamiento con/sin proteasa
- Centrifugar
- Romper y separar las proteínas en un gel SDS

El tamaño de las proteínas en el citosol es mayor que los dentro del organelo

Un péptido señal (PS) fue cortado en el proceso de entrar

Carril

1- ^{35}S RubiscoS inicial

2- ^{35}S RubiscoS + cloroplasto, sin proteasa

3- ^{35}S RubiscoS + cloroplasto, con proteasa

Importación a los cloroplastos 1

Péptido señal

N-terminal 20-200 aa

"Necesario y suficiente"

Baja conservación de 1ª y 2ª estructura

Difícil predecir número de proteínas

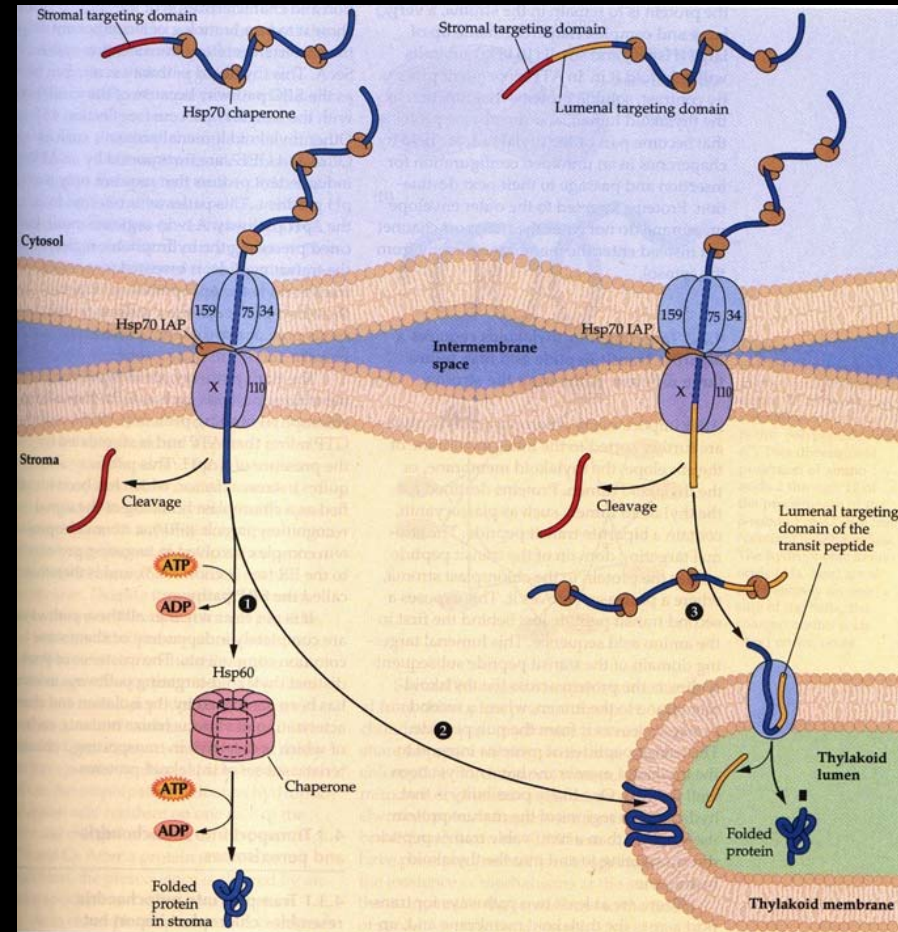
pero hasta 3000 importadas

Complejos TOC / TIC

Unión - E indep

Translocación - ATP dep, fmp indep

Peptidasa del estroma expone señal secundaria



Importación a los cloroplastos 2

Destinos internos

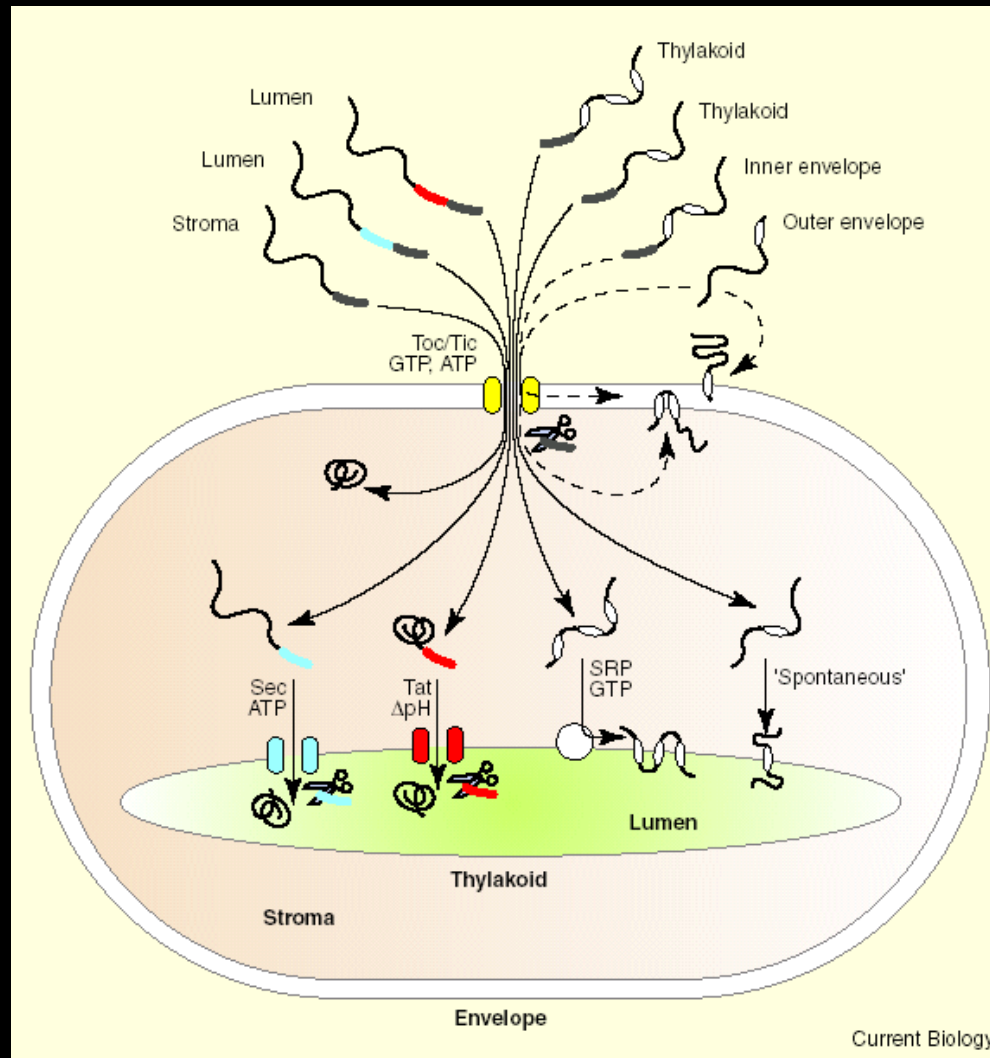
-Membrana del tilacoide

GTP, pH y SRP dep
ej. Light Harvesting Complex Pr
Otro sistema?

-Lumen del tilacoide

Sec – pH, ATP dep
ej. OE33 (complejo evolución de
oxígeno), PC

Tat – 2 Arg, pH dep
ej. OE23



Current Biology

Jarvis and Robinson 2004

Importación a las mitocondrias

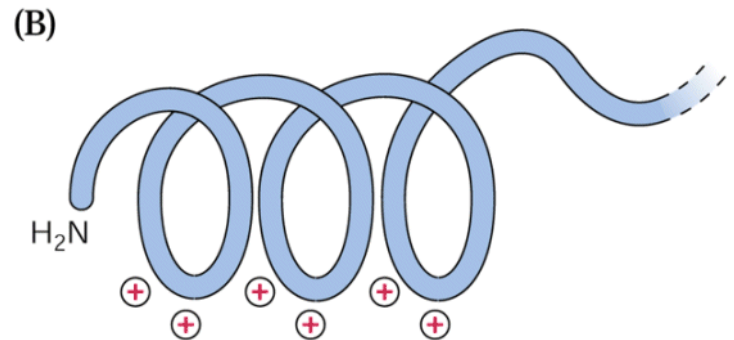
Pre-secuencia (*equivalente al péptido señal*)

N-terminal

Bien conservada entre eucariontes

Secuencia 1^a - Arg cada 3 o 4 residuos

Secuencia 2^a - Hélice anfipática



Complejos TOM / TIM (no tiene similitud de secuencia con TOC / TIC)

Unión - mediante helice y chaperonas

Traslocación - ATP y fmp dep

Peptidasa del matriz expone señal secundaria para llegar a membrana interna

Importación a los peroxisomas

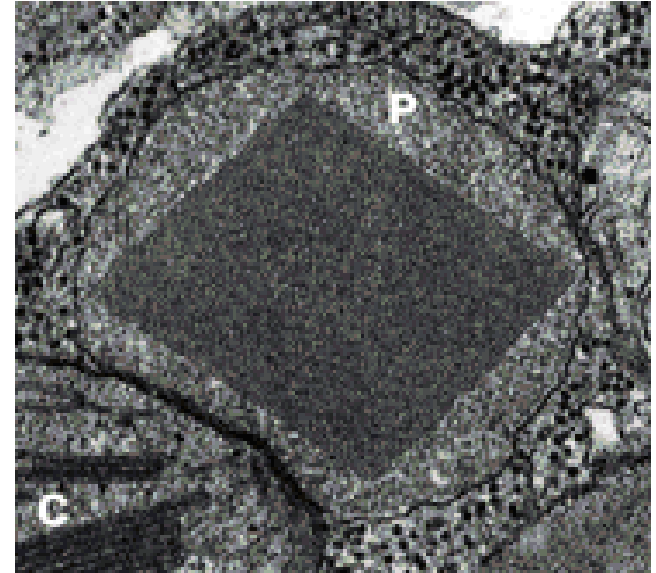
- Todas las proteínas importadas.
- Una membrana para cruzar.
- Fotorespiración (peroxisomas) y degradación de ácidos lipídicos (glioxisomas)

Señales

PTS1 - C-terminal Ser-Lys-Leu. No se corta

PTS2 - N-terminal, cortada

ATP dep, chaperonas/receptores = ?



Importación al núcleo

Mucho tráfico

N → Cito = mARN, tARN

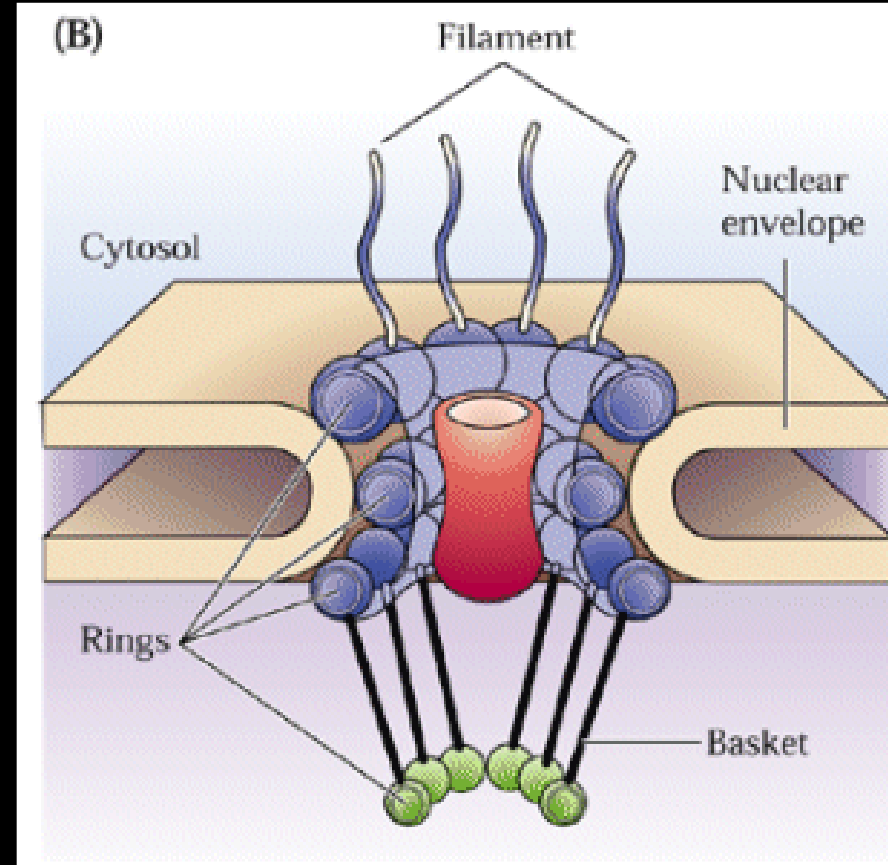
Cito → N = FT, histonas, polimerasas, ARN y ADN de patógenos

Cito → N → cito = ribosomas

Complejo poro nuclear

124 MDa, >100 proteínas

40 kDa limite (iones, metabolitos, proteínas chicas)



Importación al núcleo

Señal localización al núcleo (NLS)

Sin consenso, típicamente básico (Lys, Leu), mas de una por proteína, interno, no están cortadas

Mecanismo

Unión con factores citosólicos (importinas α y β) y poro (GTP dep)
Translocación (GTP dep)

Control de expresión de genes

FT quedan en citosol... - enmascaramiento de NLS
- Fos. o defos.
- factores del medioambiente (luz)
...hasta que se necesita en el núcleo

Mamíferos - importación se detiene a 4°C

Plantas - continua hasta 0°C

Sistema secretor

Formado por RE, Golgi, MP, endosoma (ruta endocítica) y vacuola, mediado por vesículas

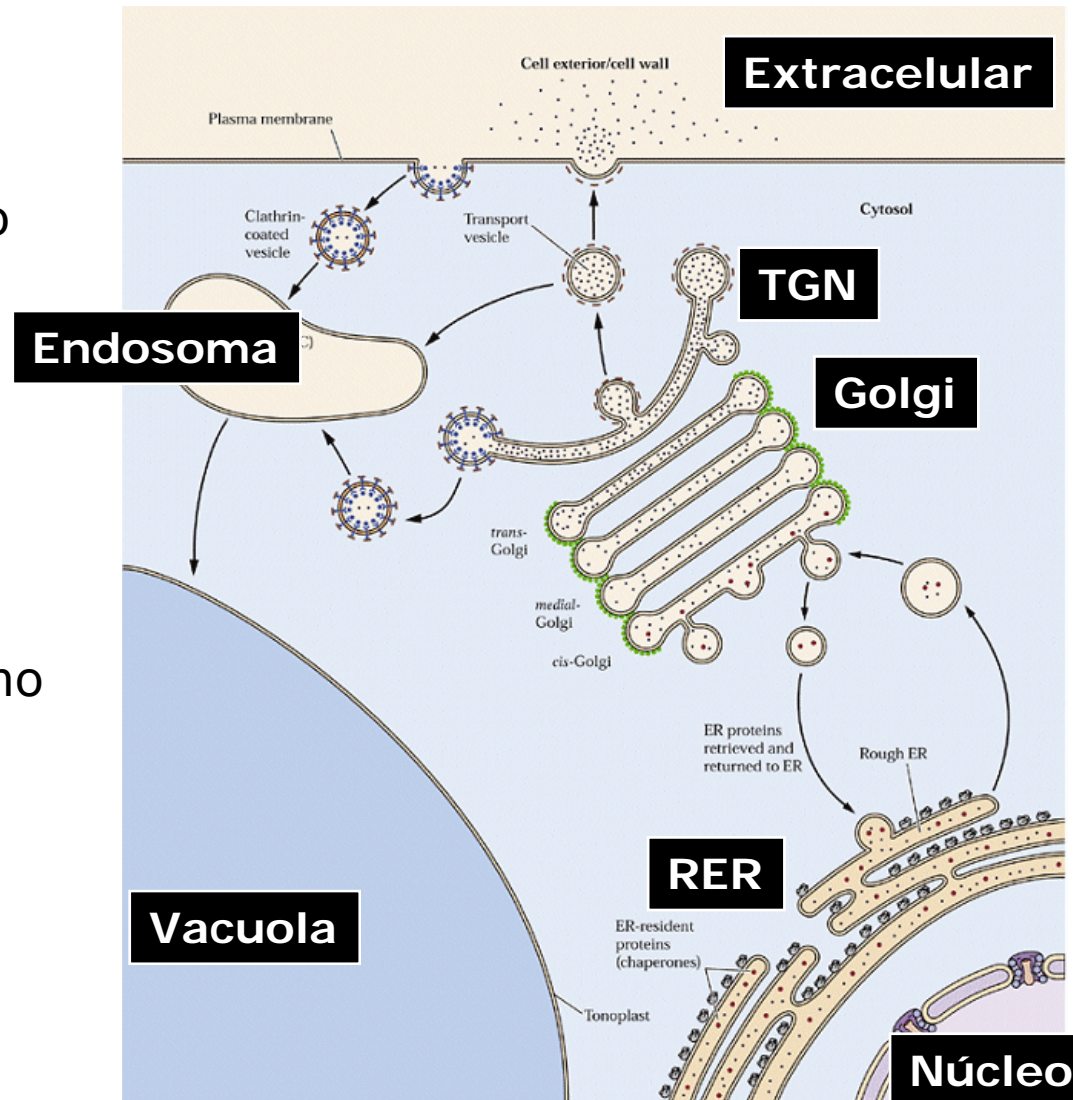
Todos tienen una membrana externa

Objetivo

Dirigir las proteínas a su destino correcto

También:

- Modificación de proteínas
- Síntesis de polisacáridos no-celulósicos y lípidos
- Almacenamiento de Ca^{2+}



Vesículas

Formación requiere

- Proteínas citosólicas, formando una capa externa a la vesícula, que depende de la ruta a seguir, y proteínas asesoras
- Energía GTP

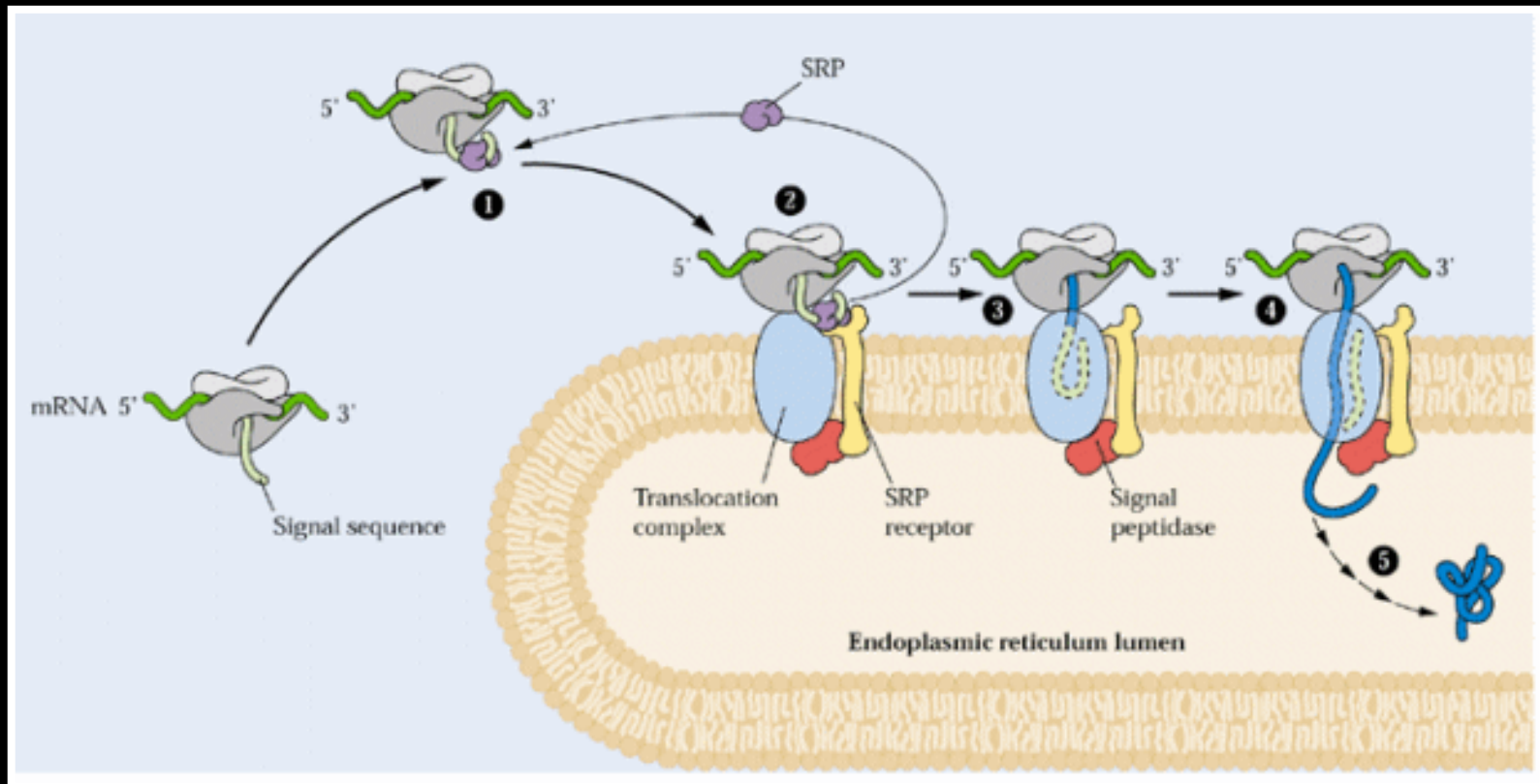
Fusión requiere

- Energía GTP
- Proteínas asesoras y disociación de la capa, exponiendo proteínas integrales de la vesícula que interactúan específicamente con las de la membrana blanca

Se necesita transporte **anterógrado y retrógrado**

Proteínas solubles

Péptido señal N-terminal – aa básico mas 6-12 hidrofóbicos.
"Necesario y suficiente" para dirigir a una ribosoma libre a fusionar con el SRP (Partícula de Reconocimiento de Señales) que detenga traducción antes de unir con el RE.
Translocación requiere energía y chaperonas luminales, señal cortado



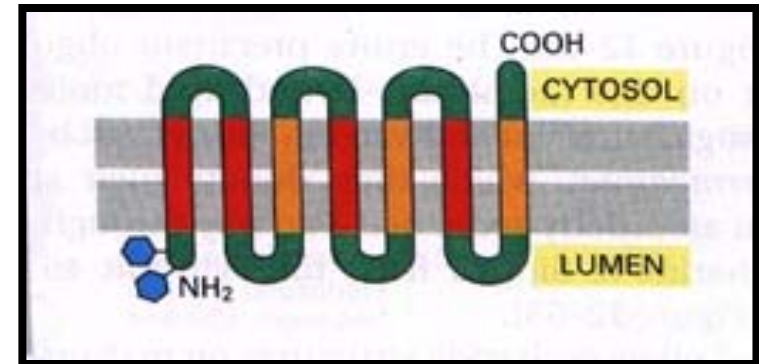
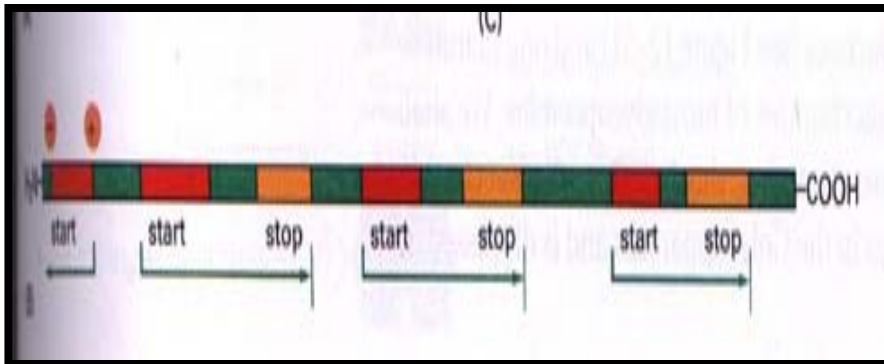
Proteínas integrales

Un paso

- Se corta el péptido señal. Se transloca la proteína hasta que se encuentra una secuencia de terminación de translocar – una α -hélice

Multi-paso

- Tiene múltiples señales para iniciar la translocación, interespaciada con secuencias α -hélice paso membrana.
- Casi siempre tiene N y C terminal dando hacia el citosol
- Residuos (básicos) en el citosol, el cual posee una carga negativa versus otros compartimentos - útil para tratar de predecir la ubicación de una proteína desconocida



Roles del retículo endoplasmático

Plegamiento

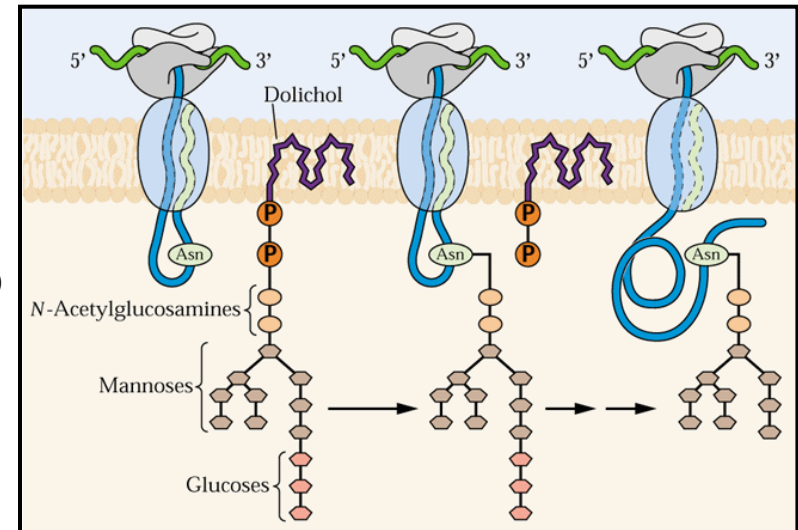
BiP – chaperona que une con partes hidrofóbicas, para que no formen agregaciones, y además es una ATPasa, ayudando al plegamiento correcto. Solo las que han sido plegadas correctamente pueden continuar al Golgi.

Modificaciones mayores

- Enlaces disulfídicas
- Pro a hidroxipro (HGRP)

Adición de N-glicanos

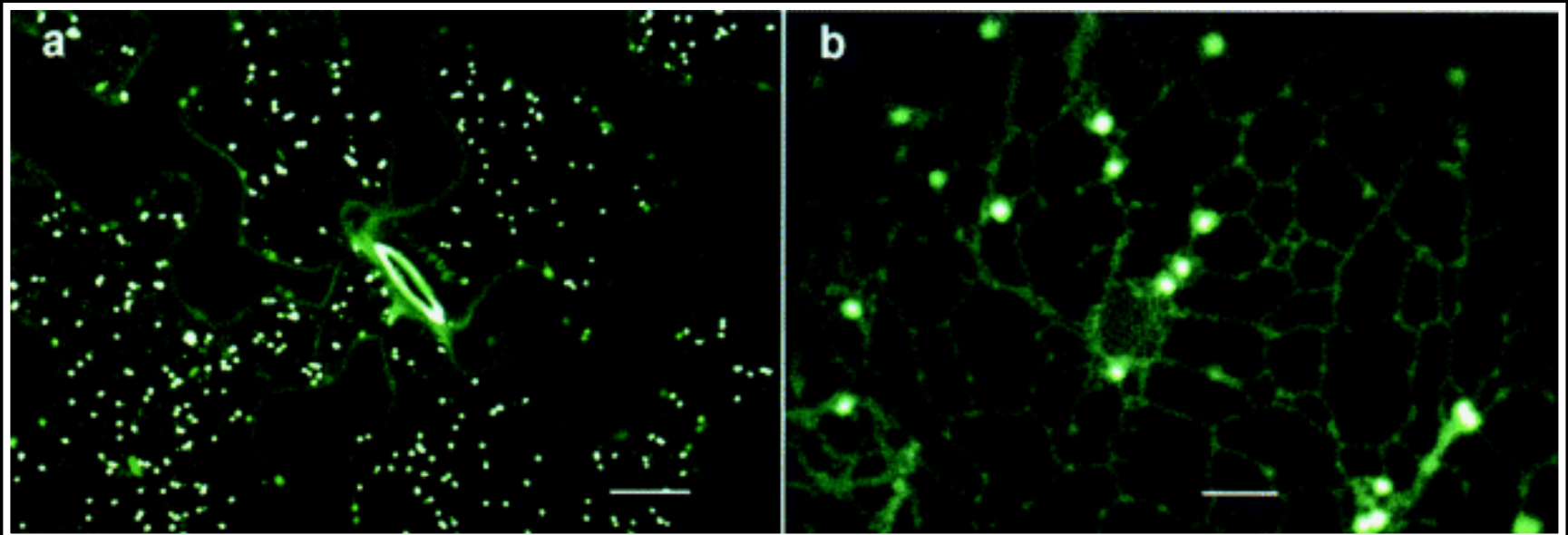
- Agregada a algunos NXS/T en proteínas integrales y secretadas
- Modificación preliminar para plegamiento y control de calidad mediada por otras chaperonas – calnexina y calreticulina



Retención de proteínas en el RE - rescate desde del Golgi

Solubles (por ej. chaperonas)

- Poseen C-terminal KDEL. Reconocido en Golgi por receptor ERD para su próximo embalaje en vesículas tipo COPI hacia el RE
- KDEL es necesaria y suficiente
- Identificación de AtERD2 – un EST con similitud a ERD de levadura y complementación funcional de *erd* mutante – Genética reversa



Boevink et al 1998 Hoja tabaco (A, STGFP – Golgi. B, AtERD2 (HDEL receptor) RE y Golgi)

Retención de proteínas en el RE - rescate desde del Golgi

Integrales (por ej. complejo de translocación)

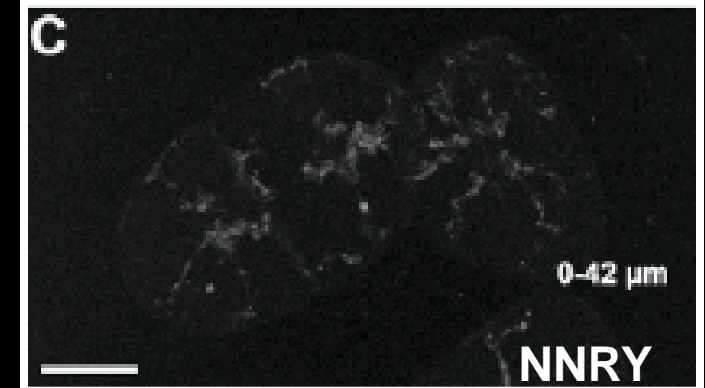
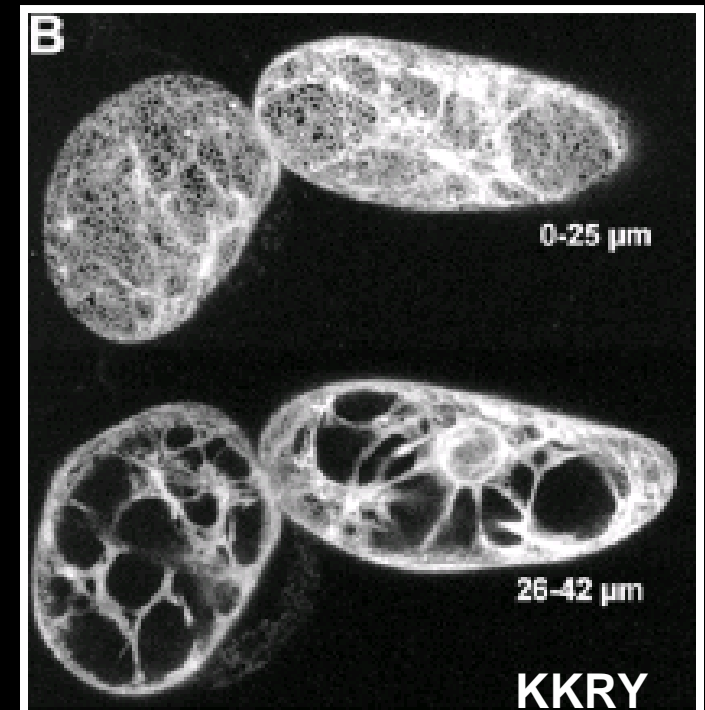
-C-terminal KKXX

-Necesario y suficiente

NNXX – proteínas mutadas de plantas están secretadas (PTM cortada)

Mamíferos - NNXX - MP

Levadura - NNXX - vacuola



Movimiento RE-Golgi-RE

Proteínas integrales

Interactúan directamente con la capa

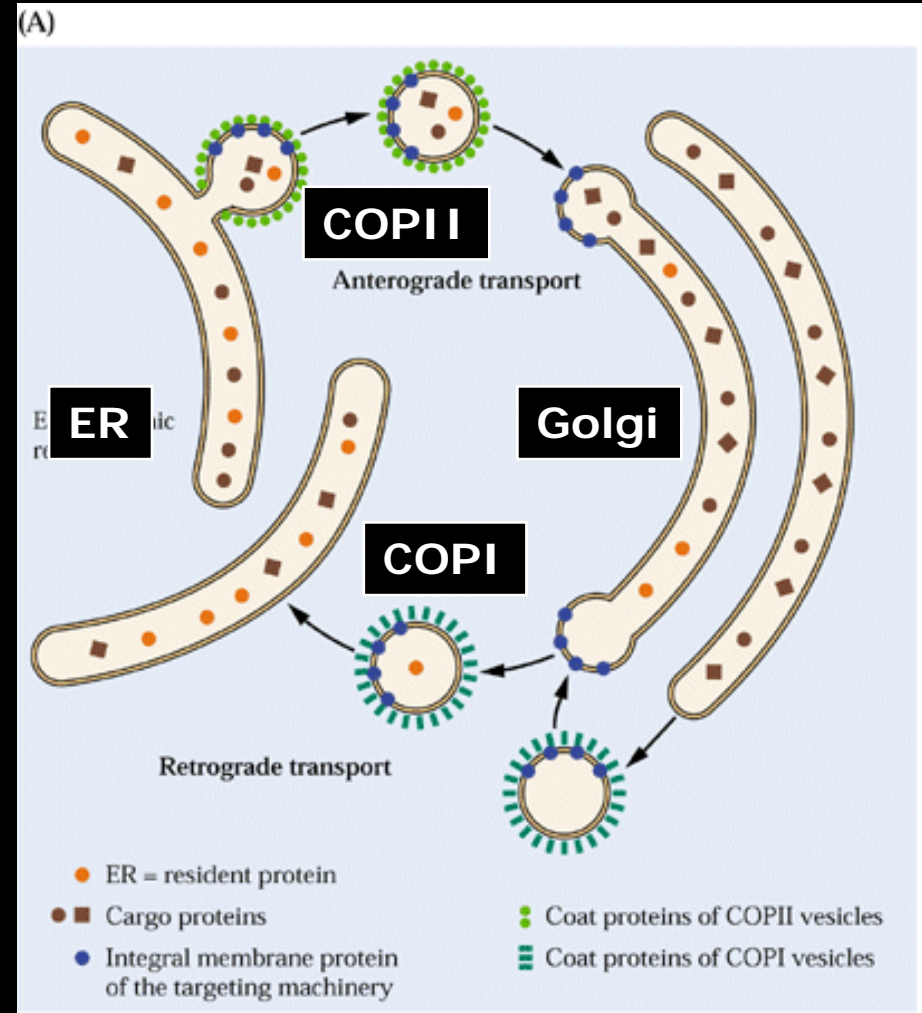
Proteínas solubles

Interactúan con la capa mediante receptores en la membrana de la vesícula

Capas

RE – Golgi = secreción con capa de COPII

Golgi – RE = recaptura con capa de COPI (ej. KDEL)

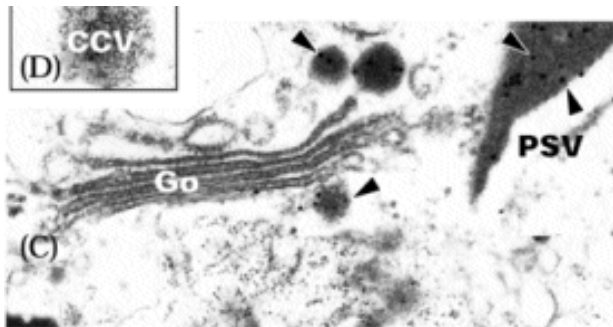


Movimiento Golgi - vacuola

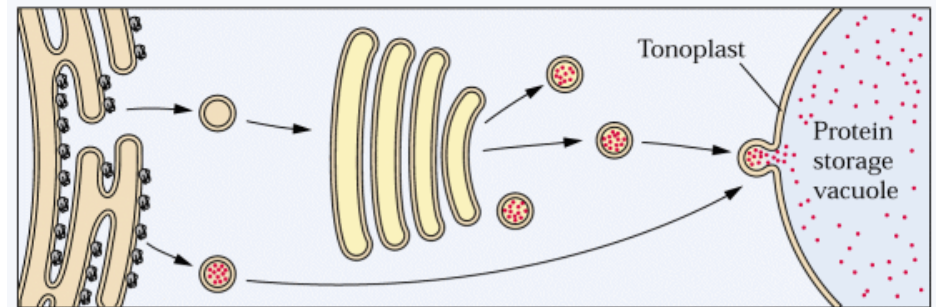
1. Vacuola de almacenamiento de proteínas

Ej. Prolaminas en monocot, globulinas en dicot en endosperma

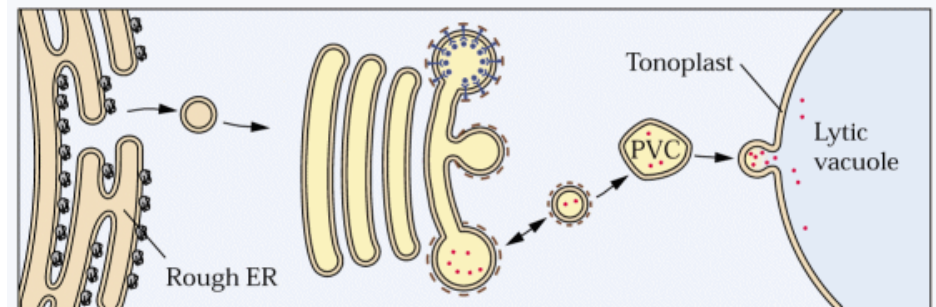
Vía **vesículas densas** (vicilin en arveja) del TGN o, a veces RE. Sin clatrina



(A) Transport to PSV in dense vesicles



(B) Transport in CCV to lytic vacuoles



2. Vacuola 'lítica'

Proteínas del tonoplasto, enzimas hidrolíticas

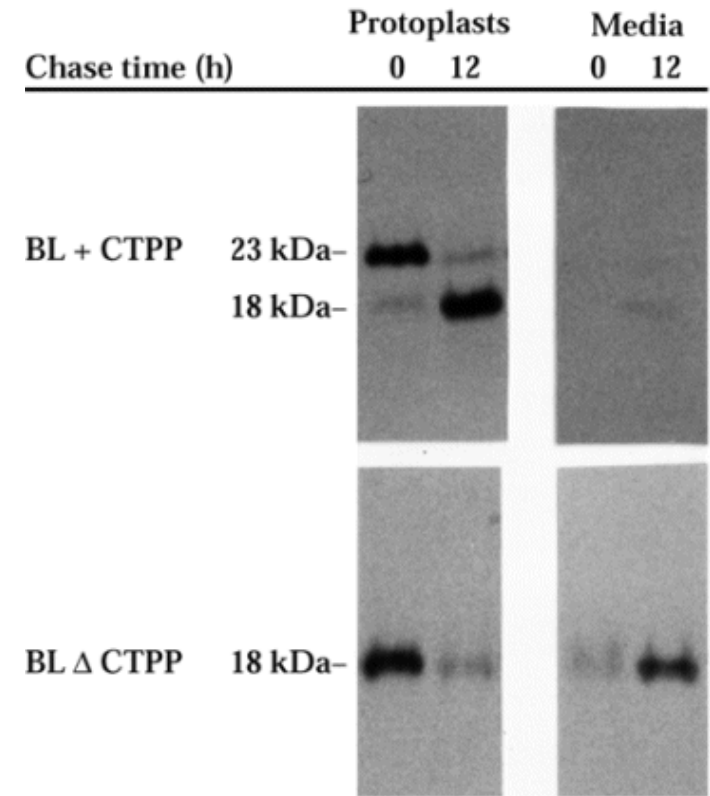
Vía **compartimento pre vacuolar** (PVC) en vesículas con clatrina

Movimiento Golgi a la vacuola y membrana plasmática

Péptidos señales

N-, C-terminal (cortados) o interno
Si no hay – la proteína está secretada

En mamíferos –
Manosa 6-fosfato dirige las
proteínas a los lisosomas



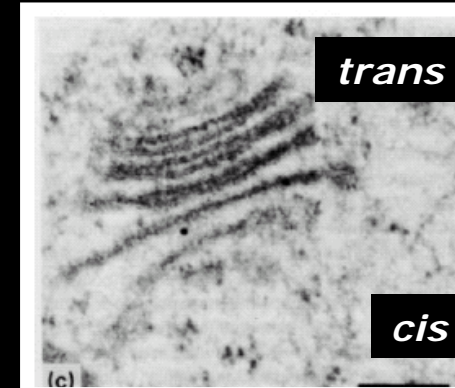
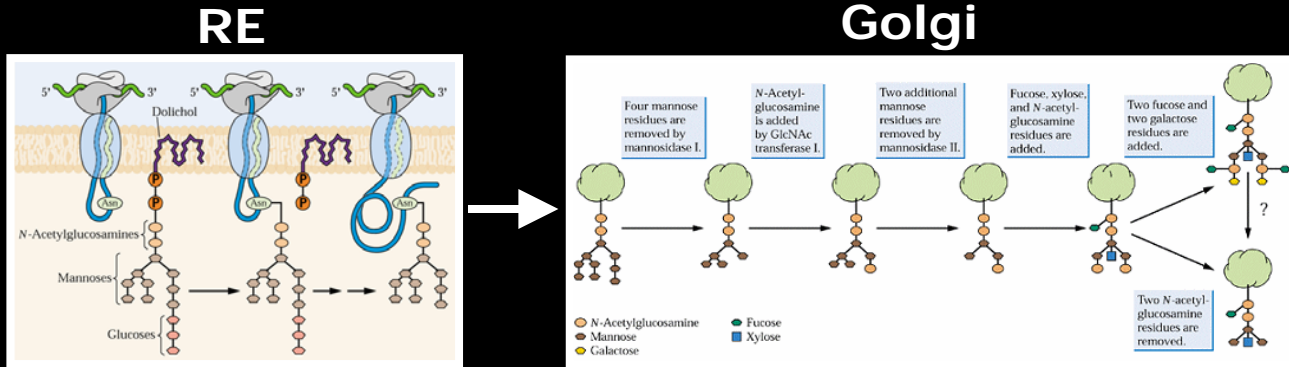
BL = Lectina de cebada, C-terminal
péptido señal
Experimento de pulsa y caza

MP

Por defecto si no hay señal al contrario (KDEL, KKXX, Vac)

Modificaciones en el aparato de Golgi

Reacciones de glicosilación están compartimentalizadas

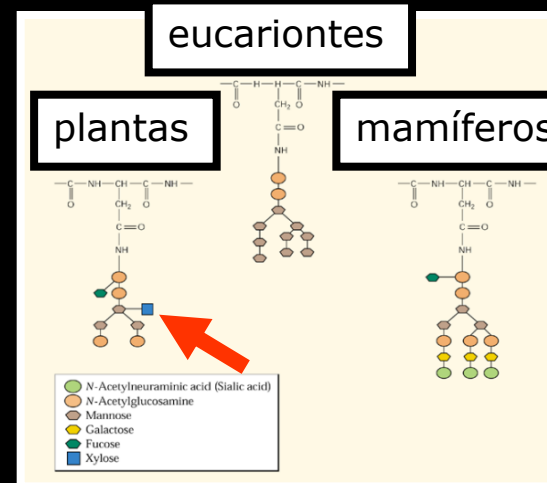


anti-fucosa; 150nm

Table 2. Number of immunogold particles counted in the different Golgi compartments over 50 Golgi stacks treated either with anti-xylose or anti-fucose antibodies ($\chi^2 = 36.2$, $df = 6$, $P < 0.001$)

Golgi compartments	Xylose	Fucose
Cis	8 (9.3)	8 (11.6)
Median	36 (41.9)	11 (15.9)
Trans	24 (27.9)	30 (43.5)
TGN	18 (20.9)	20 (29.0)
Total of gold particles	86 (100)	69 (100)

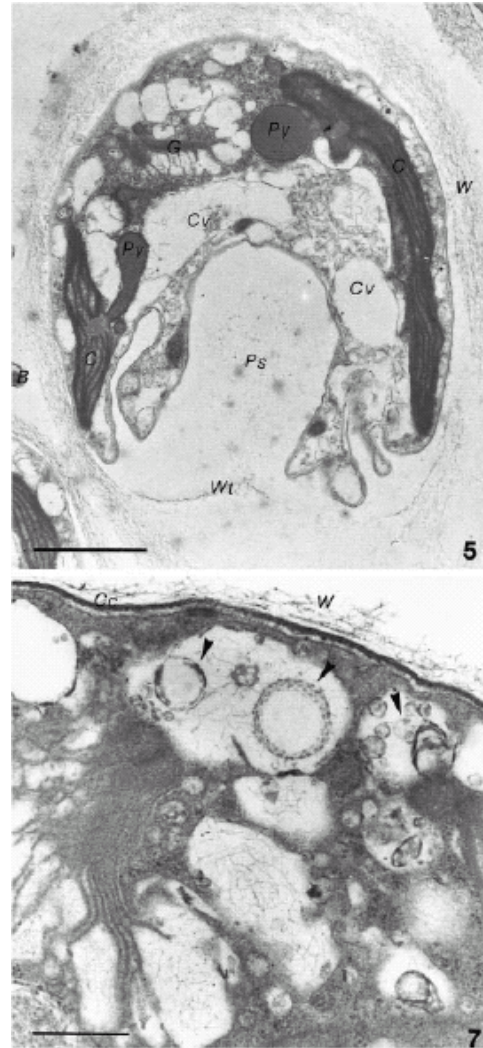
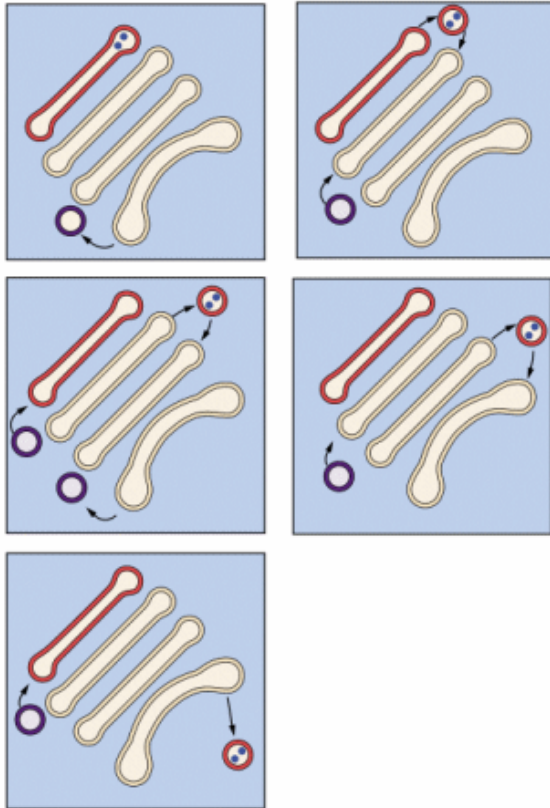
Parentheses: percentage of gold particles found in each type of cisternae with respect to the total labeling encountered over all the Golgi stacks.



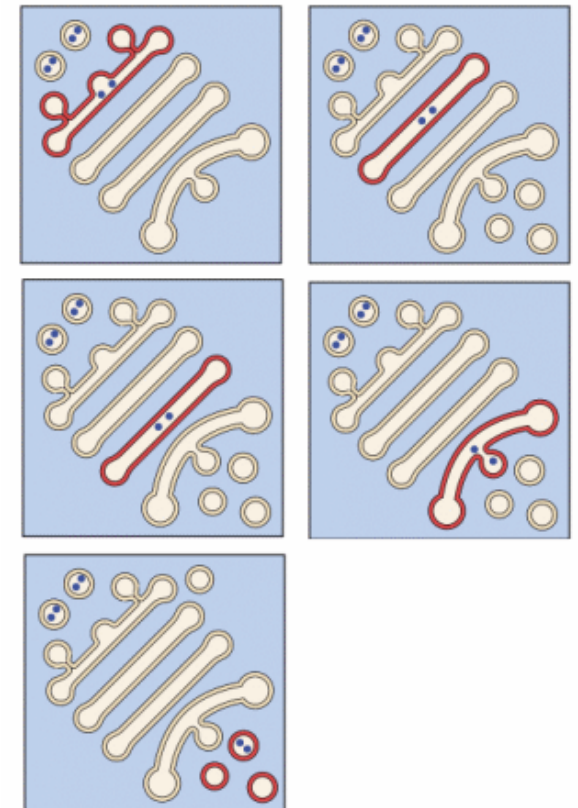
y HGRP

Progresión de material entre cisterna del Golgi

(A) Vesicle shuttle hypothesis



(B) Cisternal progression hypothesis

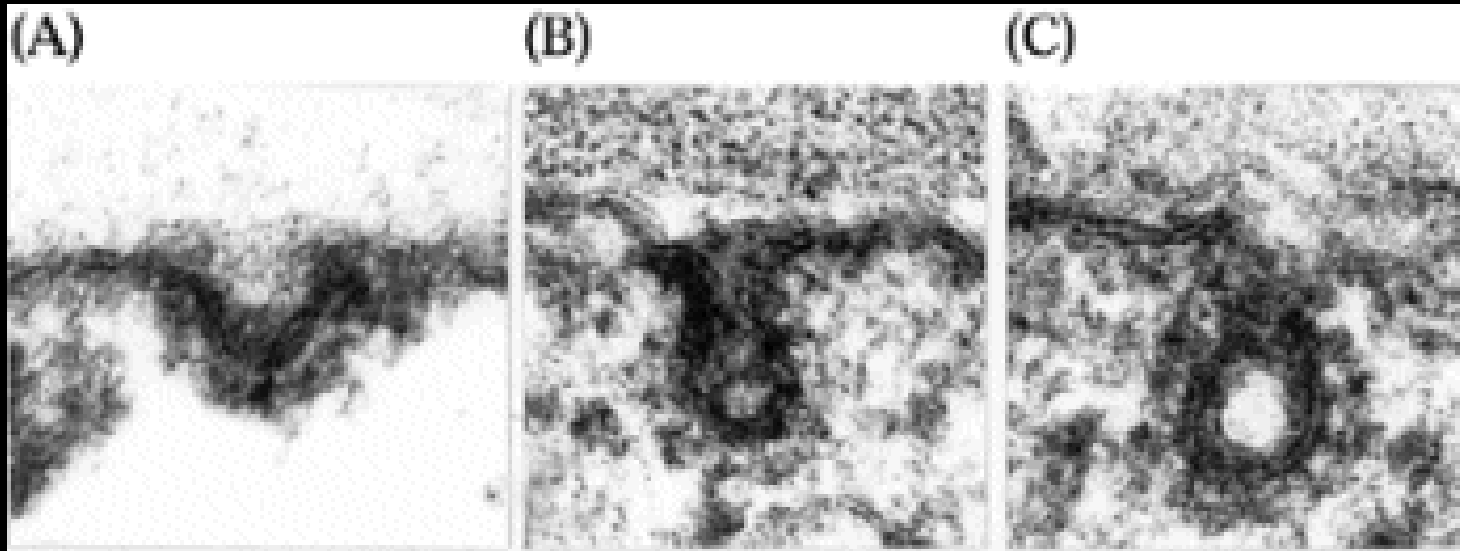


Massimo et al 1999 algal plate in distal vesicles (arrow in 7) derived from Golgi (in 5)

Endocitosis

Endocitosis

Vía vesículas con capa de clatrina y adaptinas
(igual a Golgi a compartimento pre vacuolar)

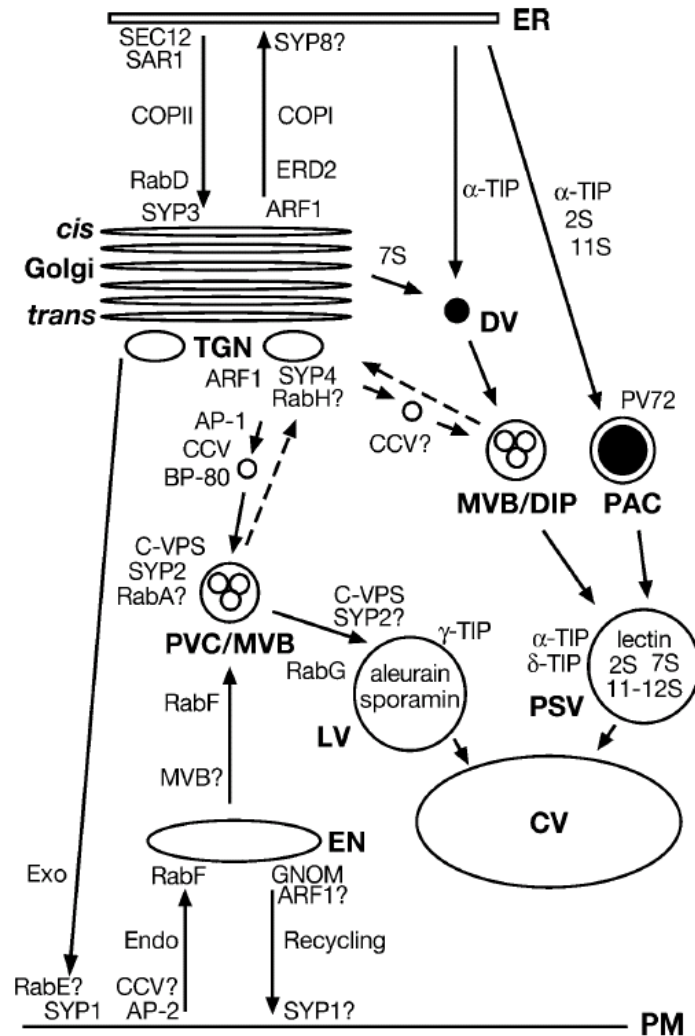


Coliflor x200,000

Plasmodesmo

Moléculas hasta 800 Da, pero puede aumentar el diámetro hasta 10 kDa

La complejidad y familias de genes



Resumen

Clase 4

- Múltiples destinos de proteínas en plantas y en organelos – refleja la compartimentalización de metabolismo
- Presencia de péptidos señal/pre-secuencias dirige el movimiento correcto
- Presencia de mecanismos de control de calidad/plegamiento en el RE
- Reconocimiento de secuencias específicas por receptores específicos – tanto para el cargo como para proteínas que hay que recapturar
- Las capas y proteínas asesoras identifican el tipo de vesícula

Además...

- La proteómica es una herramienta precisa y poderosa en el análisis global de la localización subcelular de proteínas o para seguir cambios en su acumulación bajo condiciones definidas.