

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**MEHANIZMI UNOSA PROTEINA KROZ OVOJNICU
KLOROPLASTA**

**MECHANISMS OF PROTEIN IMPORT ACROSS
CHLOROPLAST ENVELOPE**

SEMINARSKI RAD

Petra Krznar

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study of Molecular Biology

Mentor: doc. dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek

Zagreb, 2010

POPIS KRATICA

AKR - engl. ankyrin repeat-containing

ATP - adenzin trifosfat

CITO - citosol

CP - kloroplast

DEVD - sekvenca aspartat-glutamat-valin-aspartat

ER - endoplazmatski retikulum

FNR - feredoxin-NADP⁺-oksidoreduktaza

GAP - engl. GTPase Activating Proteins

GDP - gvanozin difosfat

GEF - engl. Guanine Exchange Factors

GTP - gvanozin trifosfat

HIP - konzervirani motiv Hsp70 šaperona

HOP - konzervirani motiv Hsp70/90 šaperona

HSP - protein(i) temperaturnog stresa, engl. heat shock protein(s)

IEP - engl. inner envelope protein

IMS - engl. inter membrane space

LHCP - engl. light-harvesting chlorophyll a/b binding protein

NADP(H) – nikotin amid dinukleotid fosfat

N_{IMS}-C_{CITO} - topologija proteina, N-terminalni dio je u IMS, a C-terminalni u citosolu

OEP - engl. outer envelope protein

OMP - engl. outer membrane protein

POTRA - engl. polypeptide-transport-associated domain

PRO - prolin

SEC - engl. Sec system

SER - serin

SPP - engl. stromal processing peptidase

SRP - engl. signal recognition particle

TAT - engl. Tat system

TD - engl. targeting domain

TIC - engl. Translocon of the Inner membranes of the Chloroplast

TOC - engl. Translocon of the Outer membranes of the Chloroplast

TP - tranzitni peptid

TPP - engl. thylakoidal processing peptidase

TPR - engl. tetratricopeptide motif

TRX - tioredoksin

SADRŽAJ

1. UVOD	6
2. VANJSKA MEMBRANA OVOJNICE KLOROPLASTA.....	9
2.1. Ugradnja proteina u vanjsku membranu ovojnice kloroplasta	9
2.1.1. Proteini s transmembranskom domenom strukture jednostruke α -zavojnice	9
2.1.2. Proteini s transmembranskom domenom strukturnog oblika β -bave	10
2.1.3. Proteini s transmembranskom domenom strukturnog oblika α -zavojnice i β -plo e	10
2.1.4. Proteini s terminalnom presekvencom	10
2.2. Prijenos proteina preko kompleksa TOC	11
2.2.1. Dijelovi kompleksa TOC.....	11
2.2.1.1. Receptori proteina: Toc159 i Toc34.....	11
2.2.1.2. Membranski kanal Toc75	12
2.2.1.3. Toc12 i Toc64 – interakcija s IMS	13
2.2.2. Mehanizam prijenosa proteina preko kompleksa TOC	13
2.2.2.1. Prepoznavanje i vezanje	14
2.2.2.2. Prijenos.....	14
2.2.3. Regulacija prijenosa preko kompleksa TOC.....	15
3. ME UMEMBRANSKI PROSTOR OVOJNICE KLOROPLASTA.....	17
3.1. Proteini lokalizirani u me umembranskom (IMS) prostoru.....	17
3.2. Kompleks IMS kao dio generalnog puta	17
4. UNUTARNJA MEMBRANA OVOJNICE KLOROPLASTA	19
4.1. Ugradnja proteina u unutarnju membranu kloroplasta	19
4.2. Prijenos proteina preko kompleksa TIC	19
4.2.1. Dijelovi kompleksa TIC	20
4.2.1.2. Tic22 – poveznica s kompleksom IMS	20
4.2.1.3. Kanalni proteini Tic110, Tic20 i Tic21	20

4.2.1.4. Tic40 – „motor“ kompleksa	21
4.2.1.4. Regulatorni proteini Tic62, Tic32, Tic55	21
4.2.2. Mehanizam prijenosa proteina preko kompleksa TIC.....	22
4.2.3. Regulacija prijenosa preko kompleksa TIC.....	22
5. STROMA KLOROPLASTA	24
6. TILAKOIDI KLOROPLASTA.....	25
6.1. Tat sistem u tilakoidima kloroplasta (cpTat).....	25
6.1.1. Dijelovi cpTat sistema.....	26
6.1.2. Mehanizam prijenosa preko tilakoidne membrane cpTat sistemom	26
6.2. Sec sistem u tilakoidima kloroplasta (cpSec).....	26
6.2.1. Dijelovi cpSec sistema	27
6.2.2. Mehanizam prijenosa preko tilakoidne membrane cpSec sistemom	27
6.3. SRP sistem u tilakoidima kloroplasta (cpSRP)	27
6.3.1. Dijelovi cpSRP sistema	28
6.3.2. Mehanizam prijenosa preko tilakoidne membrane cpSRP sistemom.....	28
6.4. Spontana ugradnja kao mehanizam unosa u tilakoide.....	28
7. ALTERNATIVNI MEHANIZMI UNOSA PROTEINA.....	30
8. LITERATURA	31
9. SAŽETAK.....	33
10. SUMMARY	33

1. UVOD

Proteini su esencijalne organske makromolekule, linearnog ili globularnog oblika, sastavljene od niza aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Gen, dio molekule DNA se pomoću jezgrinih enzima prevodi u molekulu mRNA (engl. messenger ribonucleotide acid) koja se na ribosomima „ita“ i kodira proteine. Proteini u stanici imaju različite uloge: strukturne, mehaničke, enzimatske i druge poput staničnih signaliziranja i imunološkog odgovora. Gotovo svaki protein svoju ulogu pritom obnaša u nekom drugom dijelu stanice te ih je stoga potrebno pravilno usmjeriti uz pomoć staničnih mehanizama i proteinskih „pomocnika“ (http://en.wikipedia.org/wiki/Protein#Cellular_localization).

Tipična biljna stanica sadrži nekoliko tisuća DNA sekvenci koje kodiraju nekoliko milijuna proteina. Za pravilnu funkciju stanice mora postojati dobra regulacija usmjeravanja proteina kako bi proteini bili smješteni u pravilne odjeljke. Pravilno sortiranje proteina neprekidno je prisutno u stanici, od početka formiranja strukture samog proteina, a i stanice, pa sve do razgradnje i zamjene proteina istovrsnim nosivim proteinom. Enzimi, membranski proteini i strukturalni proteini su samo neki od proteina presudnih za funkcionalnost pojedinog dijela stanice, bilo da se radi npr. o mitohondriju s membranama koje imaju različiti sadržaj proteina ili jezgri koja nosi genetsku informaciju organizma. Proteini pritom mogu biti specifični za pojedinu strukturu ili pak imati sličnu aminokiselinsku sekvencu u različitim funkcionalnim cjelinama.

Većina proteina je hidrofилne prirode što onemogućuje njihov slobodan prijelaz preko membrane, već se za to koriste određeni kanali ili crpke. Pritom sudjeluju šaperoni, proteini koji potpomažu prijenos i ostvarivanje pravilne konformacije drugih proteina. Odmah po završetku sinteze proteina, dok se još nisu formirali pravilnu konformaciju, vežu se šaperoni i održavaju ih u nesmotanom stanju i prenose do njihovog ciljnog mjesta.

Svi proteini koji ne ostaju na mjestu sinteze, imaju jednu ili više tzv. ciljnih domena u svrhu usmjeravanja do pojedinog kompartimenta. Takve domene su većinom kratki peptidi smješteni na N-terminalnom kraju proteina koje prepoznaju šaperoni Hsp70 i Hsp90 (slika 1). Oni se interagiraju tj. povezuju sa TD proteina, „itaju“ dalju uputu i dalje preusmjeruju proteine do ciljanog organela. S obzirom da neki membranski sustavi prepoznaju različite TD, u stanici postoje i različiti mehanizmi sortiranja proteina. Unatoč činjenici da je takva domena esencijalna za prijenos proteina, dokazano je da ne mora biti dijelom aktivnog proteina. No, kako bi protein stigao na pravilno mjesto, razne proteaze razgrađuju TD proteina upravo u mjestu inkorporacije proteina. Tako nastali zreli protein se smatra u pravilnu konformaciju i postaje funkcionalnim (Buchanan *et al.*, 2002)

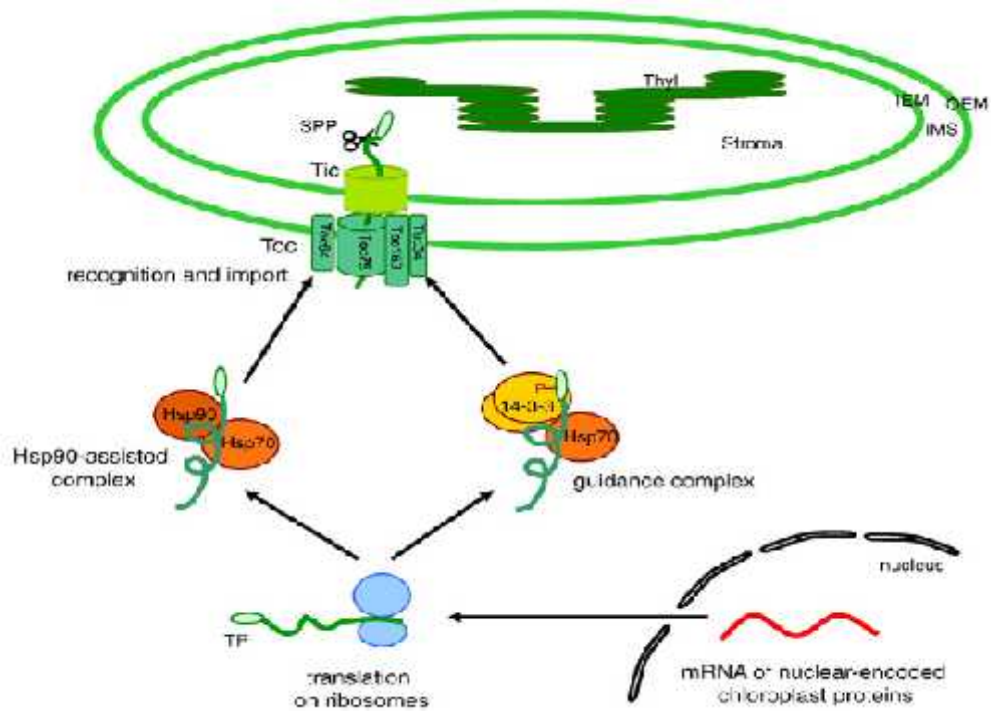
Većina proteina stanice kodirana je jezgrinim genima i prevedena u proteine na citosolnim ribosomima, bilo da su ribosomi vezani za endoplazmatski retikulum (ER) ili slobodni u citosolu. Početna faza sortiranja proteina događa se u citosolu – dio proteina se otpušta u citosol i usmjerava prema ciljanom organelu, dok ostali proteini sadrže tranzitni

peptid (TP) i odlaze u ER. Tako translacija TP uzrokuje prepoznavanje od strane ribosoma i njihovo vezanje na ER. Proteini ER sada se dalje prenose i ulaze u sekretorni put. To je put unutarstani nog sustava vezikula i cisterni gdje proteini mogu biti dodatno modificirani bilo smatanjem, glikozilacijom ili dodatnim modifikacijama. Takvi novo modificirani proteini nastavljaju svoj put do ciljanog organela.

Slobodni proteini citosola koji nisu prepoznati od strane ER i koji ne sadrže TP, sadrže sekvencu TD. Citosolni faktori poput šaperona prepoznaju TD proteina te ih prenose do specifi nog receptora membrane odre enog organela. Kontakt receptora i proteina ve inom uzrokuje otvaranje transmembranskog kanala te po etak unosa proteina. Transport pritom zahtijeva energiju dobivenu hidrolizom nukleozid trifosfata, tj. ulazak u organel zahtijeva adenozin trifosfat (ATP). Lokalizacija proteina unutar kompartimenta pak zahtijeva pravilnu konformaciju proteina, potpomognutu prisustvom šaperona. (Buchanan *et al.*, 2002)

Kloroplasti su zeleni fotosintetski aktivni plastidi, okruglasta oblika, specifi ni za biljke i neke alge. Semiautonomni su te poput mitohondrija sadrže vlastiti genom podrijetlom od cijanobakterije, zadržan prilikom endosimbioze prije više od 1,5 milijuna godina. (Andres *et al.*, 2010). Naime, biljna stanica je nastala stapanjem heterotrofne stanice i prete e cijanobakterija, uz masivan prijenos gena iz endosimbionta u jezgru nastale stanice. Danas kloroplasti sadrže oko 3000 proteina, od ega je samo 50-200 proteina kodirano vlastitim genomom (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010), odnosno ve ina je funkcionalnih kloroplastnih proteina kodirana jezgrinim genima i sintetizirana na ribosomima citosola pa posttranslacijski unesena u kloroplaste.

Za pravilno funkcioniranje kloroplasta važan je precizan mehanizam unosa proteina da bi proteini dospjeli na mjesto gdje e obavljali svoju ulogu. Kako bi bili uspješno uneseni u kloroplast, proteini moraju sadržavati odre eni signal te stoga sadrže N-terminalni tranzitni peptid (TP) odgovoran za specifi nost i ciljani unos. Prolazak kroz tri sustava membrana razli itog sastava preko proteinskih kanala ili multiproteinskih kompleksa govori o kompleksnosti unosa u kloroplaste, dok proteini bez takvog TP ukazuju na zagonetku prijenosa proteina u kloroplaste. Proteinski kompleksi TOC i TIC su istraženi u velikoj mjeri. Opisane su njihove strukturne komponente i uloga u unosu proteina u kloroplaste. Zato u put prijenosa proteina u kojima sudjeluju ti kompleksi zvati op im putem prijenosa kako bi se mogao razlikovati od drugog na ina prijenosa, tzv. alternativnog puta, u kojem ne sudjeluju TP o kojem za sada postoji puno manje informacija.



Slika 1. Shematski prikaz puta unosa proteina u kloroplaste: mRNA se prenosi u citoplazmu gdje dolazi do prevođenja proteina. Novonastale proteine prihvaća jedan od dva kompleksa za prijenos do membrane kloroplasta - kompleks šaperona Hsp90-Hsp70 ili kompleks proteina 14-3-3 s Hsp70. Protein se prenosi do površine kloroplasta gdje ga prepoznaju proteini kompleksa TOC, potom slijedi prijenos do kompleksa TIC te unos u stromu kloroplasta. U stromi dolazi do proteolitičke razgradnje TP pomoću SPP (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010).

2. VANJSKA MEMBRANA OVOJNICE KLOROPLASTA

Složenost kloroplasta kao organela pronalazimo u tri vrste membrana s ukupno šest različitih funkcionalnih cjelina – vanjska membrana, međumembranski prostor, unutarnja membrana, stroma, tilakoidna membrana i lumen tilakoida. Membrane pritom sadrže veće količine galaktolipida u usporedbi s ostalim dijelovima eukariotske stanice, a ujedno su i siromašne fosfolipidima.

Vanjska membrana ovojnice kloroplasta propusna je za mnoge biološki važne molekule biljne stanice. Većina molekula nije lipofilna i ne prelazi membranu spontano, već preko različitih proteinskih kanala poput porina. Porini nespecifično i neselektivno propuštaju vodu i ostale molekule do veličine 10 kDa, kao što su ioni i neki metaboliti. Iako se vanjska membrana kloroplasta smatra glatkom, prema teoriji tekućeg mozaika u njoj se nalaze razni proteini, bilo da su to enzimi (ponajprije oni zaduženi za metabolizam galaktolipida) ili specijalni multiproteinski kompleksi zaduženi za unos esencijalnih proteina kloroplasta lokaliziranih negdje unutar membrana kloroplasta (Buchanan *et al.*, 2002).

2.1. Ugradnja proteina u vanjsku membranu ovojnice kloroplasta

Proteini vanjske membrane kloroplasta (engl. outer envelope protein, OEP) većinom su sintetizirani bez N-terminalne presekvenice te je za njihovu inkorporaciju odgovorna njihova struktura. Otkriveno je da je upravo transmembranska domena ovakvih proteina važna za njihovu pravilnu orijentaciju. Iako se dugi niz godina smatralo da je njihovo smještanje spontano, noviji rezultati ukazuju da većina proteina OEP zahtijeva prisutnost energije u obliku trifosfata. Uz energiju, većina proteina stanice treba i određeni šaperon kako bi pomogao u njihovom smatanju (Soll and Tien, 1998). U slučaju ugradnje u vanjsku membranu, pronađen je protein AKR2 (engl. ankyrin repeat-containing) koji sintetizirane proteine u citosolu vodi do površine kloroplasta, a pritom je vezan za C-terminalni dio i budući u transmembransku domenu proteina (Balsera *et al.*, 2009).

Strukturne razlike transmembranske domene nam omogućuju razlikovanje i podjelu proteina u nekoliko kategorija. Prema tome, postoje proteini s jednostrukom α -zavojnicom, transmembranskim segmentima β -ba ve, α -zavojnicom i β -pločom u kombinaciji te proteini sintetizirani u obliku preproteina (Soll and Tien, 1998).

2.1.1. Proteini s transmembranskom domenom strukture jednostruke α -zavojnice

Proteini ove skupine većinom imaju transmembransku topologiju $N_{IMS}-C_{CITO}$, odnosno njihov N-terminalni dio „strši“ u međumembranski prostor dviju membrana kloroplasta dok je njihov C-terminalni kraj slobodan u citosolu. Prijenos tih proteina se može podijeliti u tri koraka – vezanje za vanjsku membranu preko specifičnih lipida ili polipeptida, ugradnja

hidrofobnog segmenta α -zavojnice uz translokaciju dijelova koji će kasnije biti smješteni u IMS te u konačnici smatanje proteina u pravilnu konformaciju.

Signal koji uzrokuje direktnu insertaciju najvjerojatnije je pozitivan naboj, a ujedno je i stop signal daljnjoj translokaciji. Prema tome, nastaju membranska „sidra“ ve inom s pozitivnim nabojem na obje strane (cis – citosolna strana membrane i trans – intermedijarna strana membrane). OEP7, OMP14 i OMP24 (engl. outer membrane protein, OMP) su proteini koji imaju ovakvu raspodjelu naboja pa tako protein OEP7 ima dva pozitivna naboja sa cis strane te jedan s trans strane. Protein OMP14 sadrži pozitivan naboj sa cis strane, negativni naboj unutar membrane koji neutralizira pozitivni naboj, te ponovnu pojavu pozitivnog naboja na trans strani. Protein OMP24 pak sa jednim pozitivnim nabojem na cis strani te prisustvom jednog negativnog naboja na trans strani malo iskače od ovog koncepta.

Još je jedan protein ove skupine poseban i po svojoj topologiji i raspodjeli naboja. TOC34 ima pozitivno nabijen C-terminalni dio koji je esencijalan za insertaciju, te uzrokuje promjenu u transmembranskoj topologiji i postaje $N_{CITO}-C_{IMS}$. N_{CITO} označava da je N-terminalni dio proteina okrenut prema citosolu, dok je C-terminalni dio „uronjen“ u IMS. Na taj je način ve ino pozitivnog naboja smještena s trans strane (Soll and Tien, 1998).

2.1.2. Proteini s transmembranskom domenom strukturnog oblika β -ba ve

Transmembranske domene u obliku β -ba ve sadrže i različit obrazac raspodjele pozitivnog i negativnog naboja što onemogućuje točno predviđanje topologije ovih proteina. Proteini OEP21 i OEP24 su u ovoj skupini proteina. Jedina pretpostavka vezana za proces njihove inkorporacije je spontanost - ne zahtijevaju energiju dobivenu hidrolizom trifosfata niti prisutnost nekog aparata za unos poput kompleksa TOC ili TIC (Soll and Tien, 1998).

2.1.3. Proteini s transmembranskom domenom strukturnog oblika α -zavojnice i β -plo e

Protein OEP16 je za sada jedini čija je terciarna struktura posljedica naizmjeničnog rasporeda α -zavojnica i β -plo e. Poznata je i topologija proteina: $N_{CITO}-C_{IMS}$. N-terminalni kraj ovog proteina stvara četiri β -plo e, dok njegov karboksilni kraj ima tri hidrofobne α -zavojnice. Pozitivan naboj C-kraja odgovoran je za insertaciju, pri čemu poput prethodne skupine ne treba trifosfate (Soll and Tien, 1998).

2.1.4. Proteini s terminalnom presekvencom

Posebnost ovih proteina je u njihovom individualnom putu unosa. Naime, oni sadrže N-terminalni bipartit, TP sastavljen od dva peptida, koji upućuje protein u stromu. C-kraj takvog TP uz informaciju o unosu u pravi organel sadrži i stop-transfer signal koja uzrokuje zaustavljanje i usidranje proteina u membrani (Balsera *et al.*, 2009).

Toc86 jedan je od proteina za kojeg se pretpostavlja da treba odrediti proteinski aparat za unos. Naime, on treba ATP kao energiju za unos, no nakon unosa mu je nepotrebna pa se samo smatranje u zrelu trodimenzionalnu strukturu odvija neovisno o energiji. Toc75 je tipičan protein ove skupine i njegova je translokacija zaustavljena prije nego što je u potpunosti prenesen u stromu uz posljedicu zadržavanja u vanjskoj membrani kloroplasta (Soll and Tien, 1998).

2.2. Prijenos proteina preko kompleksa TOC

Unos proteina u kloroplaste je posttranslacijski proces koji uključuje citosolne faktore koji vode preprotein do površine kloroplasta, bilo da se on ugradi u vanjsku membranu ili započet dulji put. Ako se protein treba unijeti u kloroplast, on se u postupnom translokacijom preko kompleksa TOC i TIC (TOC - engl. Translocon of the Outer membranes of the Chloroplasts; TIC - engl. Translocon of the Inner membranes of the Chloroplasts) za koje se smatra da su dio tzv. glavnog puta unosa proteina. Proteini su u ovom terminalnom presekvencom. Iako se dugi niz godina smatralo da je sekundarna struktura TP-a važna za prepoznavanje (Soll and Tien, 1998), danas se sa sigurnošću zna da TP stvara „perfektnu nasumičnu zavojnicu“ koja omogućuje interakciju sa šaperonima te inserciju kroz kanal TOC (Andres *et al.*, 2010).

Translokacija preko vanjske membrane kloroplasta složen je proces koji uključuje prepoznavanje i vezanje preproteina, prijenos te translokaciju preko membrane. Pritom su proteini kompleksa TOC najvažniji suradnici koji tvore multiproteinske agregate s osnovnim zadatkom prijenosa preko membrane. S obzirom na postojanje ogromnog broja proteina, pojavio se i zahtjev za reguliranim unosom proteina (Soll and Tien, 1998).

2.2.1. Dijelovi kompleksa TOC

Pokušaji izolacije kompleksa TOC sežu unatrag dvadesetak godina, s uspješnom karakterizacijom prve tri komponente. S vremenom su identificirani i ostali dijelovi, a kasnije i njihova struktura i funkcija. Prepoznavanje, prijenos kroz kanal i regulacija samo su neke od uloga ovog proteinskog kompleksa (Soll and Tien, 1998).

2.2.1.1. Receptori proteina: Toc159 i Toc34

Translokacija je energetski zahtjevan proces te početna faza zahtijeva energiju dobivenu hidrolizom GTP. GTP iskorištavaju Toc34 i Toc159 (slika 2), proteini s homolognom GTP-veznom G-domenom. Ova domena od 20 kDa sastoji se od kombinacije pet α -zavojnica i šest β -ploha smještenih s obje strane membrane. Strukturalne jedinice su organizirane u obliku tri motiva, s katalitičkom domenom koja funkcionira kao prekidač za promjenu konformacije (Vojta *et al.*, 2008).

G-domene ovih proteina se povezuju i smatra se da su važan element mehanizma unosa. Dimerizacija ovih receptora ne utječe na vezivanje preproteina već uzrokuje inicijaciju translokacije. Poznato je naime da GTP-vezni proteini djeluju kao „molekularni prekidači“ koji mijenjaju aktivno GTP-vezno stanje sa inaktivnim stanjem nastalim hidrolizom GTP-a i zamjenom sa nehidrolizabilnim GDP-om. Tako se proteini aktiviraju vezanjem GTP-a, odrade svoj „posao“ te se hidrolizom inaktiviraju. Većinom su oni stimulirani s GAP (GTPase Activating Proteins), obitelji regulatornih proteina koji se mogu vezati za aktivirane proteine i stimulirati njihovu GTPaznu aktivnost ili s GEF (Guanine Exchange Factors) proteinima slične funkcije. No u slučaju kompleksa TOC oni nisu prisutni, već sami supstrati djeluju kao stimulatori unosa.

C-terminalna domena tj. M-domena usidruje protein u vanjskoj membrani u obliku hidrofobnih transmembranskih zavojnica, G-domena je smještena centralno dok je N-terminalna jako kisela A-domena okrenuta prema citosolnoj strani Toc159 proteina. A-domena pritom može biti jako produljena u citosol. Po etničkim eksperimentima vezani uz kontakt preproteina s membranskim proteinima pomoću u kemijskog povezivanja (engl. crosslink) doveli su do zaključka da je upravo ovaj protein primarni receptor, no on veže samo nefosforilirane prekursore. Fotosintetski proteini koji se ne mogu akumulirati, unose se posebice pomoću u Toc159, dok u prijenosu ostalih važnijih „house-keeping“ proteina sudjeluju dodatni receptori.

Obitelj proteina Toc159 uključuje izoforme poput proteina Toc132 i Toc120. Razlikuju se u duljini i aminokiselinskoj sekvenci, no njihov ukupan naboj odgovara kiseloj A-domeni. Oni se većinom nalaze u kompleksima gdje nije prisutan sam protein Toc159, pogotovo u proplastidima. Toc86 je 86 kDa fragment nastao proteolitičkom razgradnjom većeg proteina te mu nedostaje A-domena. Istraživanja provedena upravo na ovom proteinu ukazala su da je on zapravo aktivni dio proteina Toc159, odnosno da je A-domena neesencijalna za prijenos proteina.

Homologna struktura proteina Toc34 sadrži citosolnu G-domenu usidrenu u membranu kratkom hidrofobnom sekvencijom blizu karboksilnog kraja. Receptorski protein Toc34 ima visoki afinitet za fosforilirane proteine. Prema tome, zajedno s mogućnošću u prepoznavanja nefosforiliranih proteina od strane proteina Toc159, ove dvije komponente omogućuju razlikovanje dva specifična puta za unos preproteina (Andres *et al.*, 2010).

Proteini atToc33 i atToc34 su izoforme proteina Toc34 dobivene u modelnoj biljci *A. thaliana*, pri čemu je protein atToc33 visoko eksprimiran u listovima te stimuliran fotosintetskim preproteinima, dok je atToc34 primarno smješten u korijenu i aktiviran nefotosintetskim proteinima (Vojta *et al.*, 2008).

2.2.1.2. Membranski kanal Toc75

N-terminalna domena tzv. domena POTRA (engl. polypeptide-transport-associated domain) te C-terminalna domena (translokacijska pora) u obliku β -ba već s 16-18 β -ploha,

osnovni su dijelovi strukture proteina Toc75. Domene POTRA sudjeluju u održavanju kompleksa TOC, prepoznavanju proteina te interakciji sa šaperonima. Zadržavanje Toc75 u vanjskoj membrani kloroplasta moguće je zbog postojanja poliglicinskog dijela (ponavljaju ih dijelova aminokiseline glicin) u C-terminalnom dijelu proteina. On naime onemogućuje asocijaciju s proteinom Hsp70, proteinom iz skupine temperaturno-inducibilnih proteina, prije ugradnje. Funkcija proteina Toc75 je stvaranje kanala veličine 1,4 nm koji stupa u interakciju s prekursorima proteina.

Protein Toc75 zajedno s receptorskim proteinima čini srž kompleksa TOC (slika 2). Ukupna masa varira od 500 kDa pa do 1 MDa što ukazuje na različite stehiometrijske odnose među komponentama srži kompleksa. Varijacije stehiometrijskih odnosa ovise o vrsti biljaka i razlikuju se i unutar same vrste, pa tako primjerice za grašak (*P. sativum*) odnosi su 4-5:4:1 ili 3:3:1 za proteine Toc34, Toc75 i Toc159. Dodatne varijacije se odnose na dinamični sastav srži i prisustvo izoformi (Andres *et al.*, 2010).

2.2.1.3. Toc12 i Toc64 – interakcija s IMS

Toc12 je jedan od dinamički asociiranih proteina s kompleksom TOC koji sudjeluje u povezivanju kompleksa TOC s kompleksom TIC (slika 2). Sadrži J-domenu (koja je slična DNA-vezujućem proteinu J) s unutrašnje strane vanjske membrane kloroplasta. On se povezuje s proteinima imHsp70 najvjerojatnije kako bi vezao nadolazeće preproteine i spriječio njihovo otpuštanje u citosol stimulirajući hidrolizu ATP. On je jedan od proteina koji stvaraju most s kompleksom TIC (Tic22), a ujedno je vezan s proteinom Toc64.

Protein Toc64 sastavljen je od tri funkcionalno različite regije – amino-terminalne domene s dijelom transmembranske regije, centralne domene homologne amidazama te C-terminalne domene s TPR motivima (engl. tetratricopeptide motifs). Slabo je vezan za kompleks TOC, a vjerojatno sudjeluje u ciljanom prevođenju citosolnih preproteina do kompleksa TOC te njihovo smještanje kod TPR domene kako bi daljnjom reakcijom sa Hsp90 bili prenešeni dalje (Andres *et al.*, 2010).

2.2.2. Mehanizam prijenosa proteina preko kompleksa TOC

Kako bi proteini uspješno započeli svoj prijenos preko vanjske membrane kloroplasta, trebaju se dovesti do kompleksa TOC. Takav protein potom treba biti prepoznat od istog kompleksa te interakcijom podjedinica kompleksa TOC, započeti prijenos. Promjena uvjeta u kojima se proces odvija, prisutnost energije ili dodatnih „pomognika“ uvjetuje sam prijenos proteina koji završava s uspješnom translokacijom (Andres *et al.*, 2010).

2.2.2.1. Prepoznavanje i vezanje

Prepoznavanje proteina od strane kompleksa TOC najvažniji je, ali reverzibilan i energetski neovisan korak za unos proteina. S obzirom na uvjete u stanici te ogroman promet raznovrsnih proteina, proteini za ulaz u kloroplaste moraju po etno biti dovedeni do površine kloroplasta. Osnovni zadatak pritom imaju šaperoni iz obitelji Hsp70. Oni održavaju polipeptid odmotanim i topljivim odnosno pravilno formiranim za unos (Vojta *et al.*, 2008). Trenutno postoje dva mehanizma predložena za dovo enje proteina, a razlikuju se po fosforiliranosti proteina, tj. jesu li proteini u fosforiliranom obliku ili nisu.

Heterooligomerni kompleks sastavljen od citosolnog Hsp70 šaperona, 14-3-3 proteina koji sudjeluju u prepoznavanju i samog fosforiliranog preproteina karakterizira prvi mehanizam ciljnog transporta do površine vanjske membrane (slika 1). U svrhu pravilnog usmjeravanja preproteina, oni moraju biti fosforilirani što omogu uje prepoznavanje od strane 14-3-3 proteina, stvaranje kompleksa s Hsp70 i dalji prijenos do proteinskog receptora Toc34 (Andres *et al.*, 2010).

Drugi mehanizam odnosi se na nefosforilirane preproteine. Oni naime vežu Hsp90 u citosolu te nastali kompleks vežu s koreceptorom Toc64 preko TPR domene, no ne direktno preko preproteina ve preko šaperona (slika 1). Posljedica ovakve interakcije je kratkotrajno me djelovanje s GTP-vezanom G-domenom proteina Toc34 koja sada prepoznaje TP i na sebe preuzima preprotein. Upravo u ovom koraku se povezuje put fosforiliranih i nefosforiliranih proteina, odnosno i jedni i drugi se povezuju s proteinom Toc34 i zapo inju prijenos (Vojta *et al.*, 2008).

2.2.2.2. Prijenos

Sljede i korak prijena proteina pomo u kompleksa TOC je energetski zahtjevna faza prijena. Ona uklju uje prijenos preproteina do Toc159, proteina zaduženog za prijenos preko membrane. Protein Toc34 je mjesto ulaska svakog proteina glavnog puta unosa proteina. U svrhu interakcije s prekursorom proteina, ovaj protein Toc mora biti energiziran, odnosno mora imati vezan GTP. Karboksilni kraj terminalnog peptida dio je preproteina kojeg protein Toc34_{GTP} prepoznaje i veže s visokim afinitetom. U isto vrijeme N-terminalni dio vezan je s Toc159, no tek nakon defosforilacije proteina. Hidroliza GTP-a u GDP proteina Toc34 uzrokovana je interakcijom s preproteinom te za posljedicu ima otpuštanje supstrata. Na taj na in C-terminalni kraj proteina postaje slobodan i veže se za protein Toc159_{GTP} te uzrokuje hidrolizu GTP-a (Vojta *et al.*, 2008).

Uz prethodni, model „motora“, postoji i još jedan model transfera proteina – ciljani model. Njihova osnovna razlika je u primarnom receptoru preproteina - protein Toc159 ima ulogu primarnog receptora. Kemijskim povezivanjem je dokazano da je u po etnoj fazi interakcije preprotein vezan za protein Toc159 koji potom dimerizira s proteinom Toc34 i unosi protein u kanalni protein Toc75 (Andres *et al.*, 2010).

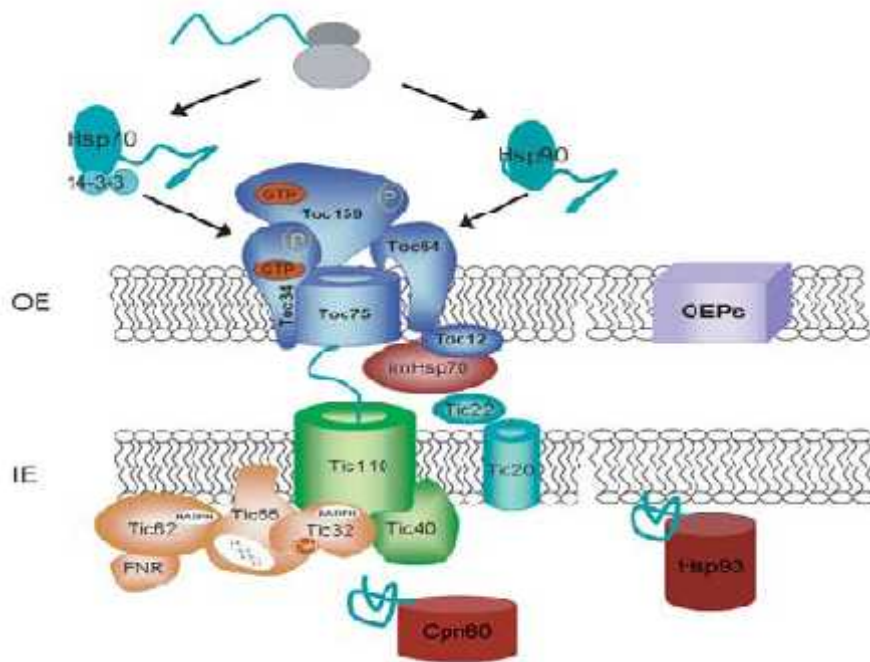
Translokacija je drugi dio prijenosa preko vanjske membrane kloroplasta uzrokovan GTPaznom aktivnošću proteina Toc159, pri čemu je hidroliza GTP-a jedini izvor energije. Konformacijska promjena proteina Toc159 uzrokovana hidrolizom sada uzrokuje proguravanje proteina kroz translokacijsku poru Toc75. Protein Toc75 naime sadrži vezno mjesto s unutrašnje strane vanjske membrane kloroplasta čime on provlači i preprotein kroz kompleks TOC. Dinamički komponenta ovog kompleksa, protein Toc64, aktivirana je za interakciju s Toc12 već pri transferu preproteina s Toc34. Ovako povezane komponente uzrokuju vezivanje proteina *imsHsp70* ovisnog o ATP preko J-domene (slika 2). Tako je šaperon me umembranskog prostora spreman na vezivanje i dalji prijenos proteina uz hidrolizu ATP (Vojta *et al.*, 2008).

2.2.3. Regulacija prijenosa preko kompleksa TOC

Kompleks TOC je većinom reguliran hidrolizom GTP-a u GDP i fosforilacijom komponenti kompleksa, osobito receptornih proteina Toc34 i Toc159. Neki supstrati ovog kompleksa mogu također biti fosforilirani u citosolu pomoću kinaza ovisnih o ATP. Takvi preproteini su potom vezani na proteine 14-3-3 te zajedno s *Hsp70* bivaju prenešeni do receptora. Iako specifičnost ciljanog dovođenja proteina nije pomijenjena, fosforilacija u citosolnoj fazi utječe na stopu translokacije. Prema tome, moguće je da je fosforilacija važan regulacijski mehanizam pod utjecajem nekih okolišnih čimbenika koji uzrokuju bolje vezivanje nekih proteina u usporedbi s drugim.

S druge strane, protein Toc34 može biti fosforiliran čime dolazi do inaktivacije receptora te on ne može niti prepoznati preprotein, niti vezati GTP. Odrasla fosfataza ovisna o ATPu uzrokuje njegovu reaktivaciju.

Izmjena GTP-GDP pridonosi regulaciji ovog procesa. Proteini Toc159 i Toc34 za svoju aktivnost trebaju GTP, odnosno njegovu hidrolizu, dok je GDP-vezni oblik inaktivan. Tako kaskada prijenosa započinje tek vezanjem GTP-a za protein Toc34 kako bi uopće moglo doći do prepoznavanja, odnosno vezanjem GTP-a za protein Toc159 može doći do vezanja preproteina prenešenog s proteina Toc34 koji paralelno mijenja GTP za GDP (Stengel *et al.*, 2007).



Slika 2. Model unosa proteina uz sudjelovanje proteinskih komponenti: novosintetizirani protein koristi jedan od dva puta prijenosa do vanjske membrane kloroplasta. Potom se veže na kompleks TOC sastavljen od proteina Toc159, Toc34, Toc64, Toc75 i Toc12. Uz kompleks TOC u vanjskoj membrani nalaze se i proteini OEP. Toc12 i Toc64 su u neposrednoj blizini proteina imsHsp70 i Tic22. Oni zajednički čine kompleks IMS. Nakon što proteini prođu kroz kompleks TOC i IMS, dolaze do unutarnje membrane kloroplasta i kompleksa TIC. Kompleks TIC se sastoji od proteina Tic110, Tic40, Tic32, Tic55, Tic62, Tic22 i Tic20 s pripadajućim šaperonima Cpn60 i Hsp93. Šaperoni potpomažu zauzimanje pravilne konformacije proteina koji su prenešeni u stromu kloroplasta. (Stengel *et al.*, 2007.)

3. ME UMEMBRANSKI PROSTOR OVOJNICE KLOROPLASTA

Vodeni medij me umembranskog prostora funkcionalna je poveznica između vanjske i unutarnje membrane kloroplasta. Eksperimentalno je slabo proučeno zbog otežane izolacije pa mu je nepoznat točan kemijski sastav i fiziološka svojstva. Unatoč tome, snimke elektronskim mikroskopom dokazale su prisutnost proteina koji poput mosta prolaze kroz ovaj prostor i povezuju dvije membrane ovojnice kloroplasta. Najveća važnost ovakvih translokacijskih kanala je upravo u potpomognutom prijenosu proteina kodiranih u jezgri u kloroplast i to u unaprijed određeno funkcionalno važan dio plastida (Buchanan *et al.*, 2002).

3.1. Proteini lokalizirani u me umembranskom (IMS) prostoru

Teško dostupan i nestabilan kompartiment kloroplasta čini IMS prostor. Prema dostupnim podacima pronađena su dva proteina smještena unutar ovog područja.

MGD1 je protein koji sadrži terminalnu presekvenču, no ona nije u potpunosti procesuirana. Ulazi u IMS preko kompleksa TOC te u me umembranskom prostoru ostaje određeno vrijeme te se prenosi dalje u kloroplast, bilo u stromu ili tilakoide.

Tic22 se razlikuje od proteina MGD1 i sa svojom strukturom i načinom prijenosa. Put prijenosa preko vanjske membrane nije točno određen te trenutno postoje samo rasprave prelazi li protein Tic22 membranu koristeći i kompleks TOC. Uz to, Tic22 nema nikakav TP i nije procesuiran peptidazom što ukazuje na njegovu lokaciju unutar IMS (Balsera *et al.*, 2009).

3.2. Kompleks IMS kao dio općeg puta

Posljednje dvije komponente kompleksa TOC su dinamički asocirani proteini Toc12 i Toc64. Ovi proteini zajedno s proteinima *imsHsp70* te Tic22 čine me umembranski kompleks (slika 2), lociran s trans strane vanjske membrane kloroplasta. Postoji jako malo podataka vezanih uz ovaj kompleks, a jedna od informacija je neovisnost kompleksa o energiji (hidrolizi GTP-a).

Protein Tic22 sudjeluje i u prepoznavanju TP preproteina te ga prenosi prema kompleksu TIC. Zajedno s Toc64 povezuje se s preproteinima unutar IMS. Protein Toc64 je pak najvažnija komponenta ovog kompleksa. To je protein dualističke prirode koji djeluje i unutar kompleksa TOC i kompleksa IMS. Pritom nije važna njegova citosolna komponenta već samo dio s unutrašnje strane membrane. To na domenu kojom sudjeluje u interakciji s preproteinom još nije utvrđeno, no sa sigurnošću se zna da ne prepoznaje TP već neke

specifične regije unutar proteina. Protein Toc64 katalizira i interakciju s proteinom Toc12 kao dio kompleksa TOC (Qbadou *et al.*, 2007).

Aktivirani Toc12 djeluje na ATPaznu aktivnost šaperona imsHsp70 koji se asocira s prekursorom. Takav protein u stanju prekursora je kompetentan za prijenos preko kompleksa TIC. Interakcijom proteina imsHsp70 s Tic22, završava se prijenos preproteina preko IMS. Preprotein je tako doveden do površine unutarnje membrane kloroplasta (Oreb *et al.*, 2007.).

4. UNUTARNJA MEMBRANA OVOJNICE KLOROPLASTA

Djelovanje poput molekularnog sita neizostavna je uloga svake membrane. Unutarnja membrana slobodno je propusna za male nenabijene molekule uz izuzetak kisika i amonijaka. Tako er, nedisocirane monokarboksilne kiseline manje molekularne mase ostvaruju prolaz kroz ovaj lipidni dvosloj. Esencijalni metaboliti stanice koji su pak uspješno prošli kroz vanjski omota , prolaze dalje u stromu korištenjem specijalnih transportera. Sli nost s vanjskom membranom je prisustvo enzima, sintaza lipida tilakoidne membrane (Buchanan *et al.*, 2002).

4.1. Ugradnja proteina u unutarnju membranu kloroplasta

Proteini IEP (engl. inner envelope protein, IEP) su proteini unutarnje membrane kloroplasta. Kako bi se uklopili u membranu nužna im je N-terminalna sekvenca koju proteini OEP ne trebaju. Uz to zahtijevaju prisutnost energije u obliku ATP te procesiraju u jedinicu u stromi. Ovi proteini su poveznica kompleksa TOC i TIC, oni ulaze preko kompleksa TOC, a samom inkorporacijom postaju dio kompleksa TIC.

Eksperimentalno zahtjevna istraživanja ponovo su otežana dostupnoš u i izolacijom unutarnje membrane kloroplasta. Unato tome, otkriveno je nekoliko mehanizama unosa ovakvih proteina, dok se naslu uje i postojanje potencijalno novog, alternativnog puta prijenosa i ugradnje ovakvih proteina.

Neki proteini poput Tic110 sintetizirani su kao preprotein s TD koja ga vodi u stromu. Proteoliti kom razgradnjom pomo u stromalne peptidaze, Tic110 gubi TD i kao zreli protein ugra uje se u membranu s jednim do dva membranski umetnuta segmenta.

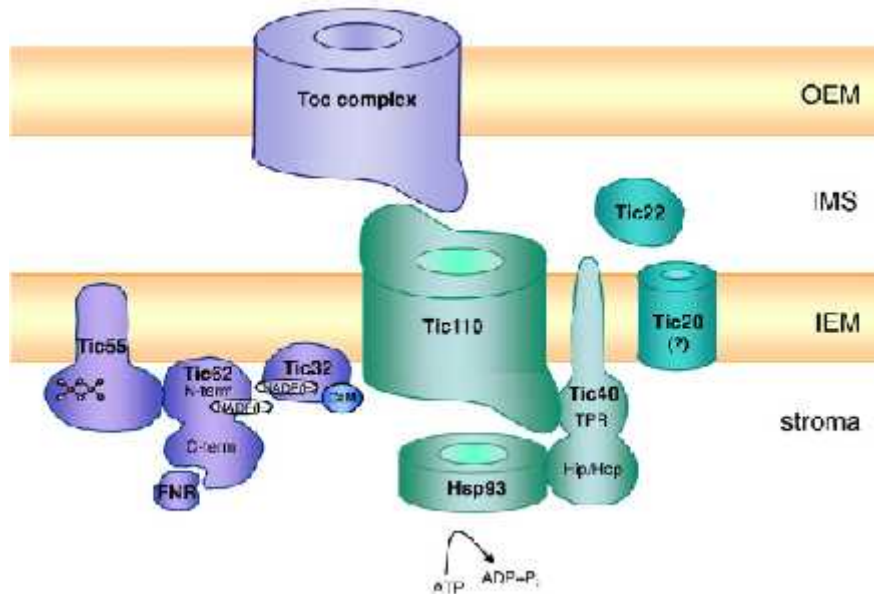
Nešto slabije je poznata stimulirana ugradnja za vrijeme translokacije kroz kompleks TIC (sli nost s proteinima OEP i stop signalom) te put prijenosa pomo u kompleksa TOC koji završava spontanom ugradnjom u membranu (Soll and Tien, 1998).

4.2. Prijenos proteina preko kompleksa TIC

Nakon prolaska kroz kompleks TOC i IMS, dalji prijenos proteina ide preko unutrašnjeg translokona - kompleksa TIC. Prolaskom kroz ova tri kompleksa proteini se procesuiraju kako bi mogli uspostaviti funkcionalnu konformaciju. Za to je zadužena stromalna procesuiraju a peptidaza (SPP) koja mi e TD i omogu uje smješavanje proteina u stromu ili nastavak puta preko tilakoidne membrane (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010).

4.2.1. Dijelovi kompleksa TIC

Potpuna identifikacija proteina ovog kompleksa nije poznata, no najnoviji podaci ukazuju na postojanje nekoliko proteina. Njihove funkcije su ekvivalentne Toc proteinima – prepoznavanje, translokacija i pokreta ka sila unosa proteina, a poznato je da neki proteini sudjeluju samo u redoks regulaciji translokacije (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010).



Slika 3. Dijelovi kompleksa TIC: u vanjskoj membrani kloroplasta nalazi se kompleks TOC, dok je u unutarnjoj membrani kompleks TIC. Tic22 je dio kompleksa IMS te najvjerojatnije predaje preprotein kanalnom proteinu Tic20. Tic110 glavna je pora kompleksa TIC, dok je Tic40 „motor“ zaslužen za generiranje energije prijenosa. Hsp93 pomaže u zauzimanju pravilne konformacije proteina, dok su proteini Tic55, Tic62 i Tic32 regulatori prijenosa preko kompleksa TIC. (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010)

4.2.1.2. Tic22 – poveznica s kompleksom IMS

Topljivi protein Tic22 u IMS prostoru preferira povezivanje s kompleksom IMS, dok je periferno asociran s glavninom kompleksa TIC. Sudjeluje u stvaranju superkompleksa TOC-TIC te je vezan uz kanalni protein Tic20 (slika 3) kojem predaje preprotein (Balsera *et al.*, 2009).

4.2.1.3. Kanalni proteini Tic110, Tic20 i Tic21

Gotovo polovica strukture proteina Tic110 ine transmembranske α -zavojnice na amino kraju s ulogom u prepoznavanju TP i ugradnjom proteina. Jedan hidrofilni dio proteina Tic110 smješten je u stromi gdje C terminalni kraj stvara globularnu domenu koja reagira s molekularnim šaperonima (Balsera *et al.*, 2009). Drugi dio pak ulazi u IMS prostor gdje stvara superkompleks s kompleksom TOC te uz etiri amfipati ne transmembranske α -zavojnice stvara kation-selektivni kanal.

Istraživanja vezana uz eksperimentaciju u tkivima te homozigotnim mutantama doprinijeli su zaključiti kako je upravo protein Tic110 glavna pora kompleksa TIC (slika 3). Moguće je da postoje dodatni kanali koji bi sudjelovali u translokaciji ili membranskoj inserciji (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010).

Postoji mogućnost da je protein Tic20 takav dodatni kanal u unutrašnjoj membrani kloroplasta u neposrednoj blizini Tic110. Naime, četiri transmembranske α -zavojnice hidrofobnog Tic20 ukazuju na strukturalnu sličnost s Tic110 zbog čega se smatra da oni dinamično asociraju i disociraju u svrhu stvaranja kanala (Benz *et al.*, 2008.). Unatož tome, Tic20 uz prisutnost proteina Tic21 čini megadaltonski proteinski kompleks u kojem nema prisutne glavne pore. Moguće je da je to kompleks koji prethodi translokaciji proteina do Tic110 ili je zaseban kompleks unosa proteina.

Tic21 je sličan proteinu Tic20 te postoji mogućnost da je i on kanalni protein. Važno je pritom napomenuti da niti proteinu Tic20 niti proteinu Tic21 nije dokazana kanalna aktivnost. S obzirom na težinu izvješaja ovakvih eksperimenata, zasada još ne postoji točno objašnjen translokacioni unutrašnje membrane. Funkcioniraju li oni zasebno ili su dio većeg kompleksa, jesu li odgovorni za unos različitih preproteina ili je pak njihova funkcija ograničena na određeno stanje razvoja, samo su neka od pitanja, za sada bez odgovora (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010).

4.2.1.4. Tic40 – „motor“ kompleksa

Proteini sintetizirani u citosolu za svoj unos trebaju energiju dobivenu hidrolizom ATP-a. Pritom energija, odnosno ATP, nije iskorišten za stvaranje membranskog potencijala već za aktivnost nekih šaperona ovisnih o ATP-u (Cpn60 i Hsp100). Tic40 je integralni membranski protein usidren u membranu transmembranskom regijom. N-terminalni dio proteina Tic40 je inkorporiran u membranu dok je C-terminalna domena okrenuta stromi. Stromalni dio sastavljen je od dva zasebna dijela – Hip (konzervirani motiv Hsp70 šaperona) i Hop (Hsp70/90 organiziraju ih proteina) domena te domena s TPR motivom važnim za proteinske interakcije (slika 3). Upravo je Hip/Hop domena zaslužna za točnost šaperon ATP ovisne aktivnosti u kombinaciji sa staničnim proteinom Hsp93, dok je TPR motiv mjesto interakcije s proteinom Tic110 (Benz *et al.*, 2008).

4.2.1.4. Regulatorni proteini Tic62, Tic32, Tic55

Tic62 i ostali proteini ove grupe sadrže NADP(H) ili Rieske željezo-sumporni centar u svrhu redoks regulacije. Centralni dio ovog proteina je uključen u povezivanje s kompleksom TIC, dok je njegova površina hidrofobna i omogućuje vezanje za lipide unutarnje membrane. C-terminalna domena sadrži nekoliko ponavljajućih sljedova Pro-Ser koji su uključeni u protein-protein interakcije. NADP(H) vezno mjesto proteina Tic62 nalazi se na N-terminalnom dijelu zbog čega ovaj protein pripada obitelji kratkolananih dehidrogenaza s

aktivnom enzimatskom funkcijom dehidrogenaze. Protein Tic62 u interakciji je s feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktazom (FNR) ime se uspostavlja poveznica s fotosintezom, te je ovaj protein ovisan o omjeru NADP⁺/NADPH (slika 3). Prema tome, u stromi je lokaliziran u reduciranom stanju, dok je povezan s kompleksom TIC u uvjetima više koncentracije NADP⁺.

Za protein Tic32 koji je usko vezan uz unutrašnju membranu kloroplasta smatra se da reagira s N-terminalnim dijelom proteina Tic110 (slika 3). Funkcionalno je sličan proteinu Tic62 zbog dehidrogenazne aktivnosti, no razlikuju se u redoks uvjetima – Tic32 je vrsto asociran za unutrašnju membranu u reduciranom stanju.

Treća komponenta sustava je protein Tic55 (slika 3), oksigenaza sa Rieske centrom. Umetnut je u membranu pomoću dvije transmembranske zavojnice na C-terminalnom kraju dok mu je amino domena izložena stromi u obliku β-ploče. Blizina proteina Tic62 te struktura Rieske žljezo-sumpornog centra govori o regulacijskoj ulozi, potencijalno u ulozi prijenosnika elektrona (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010).

4.2.2. Mehanizam prijenosa proteina preko kompleksa TIC

Put prijenosa proteina do unutrašnje membrane ide preko kompleksa TOC i IMS, preko proteina Toc te nekih proteina Tic među kojima je i protein Tic22. Tic22 je dio kompleksa IMS te poveznica s kompleksom TIC, preciznije, nalazi se u blizini kanalnog proteina Tic20. Slijedi li daljnji prijenos preko posebnog kanalnog proteina Tic20 u kombinaciji s proteinom Tic21 ili je pak taj protein intermedijer u prijenosu proteina do proteina Tic110, glavne pore unutrašnje membrane, pokazat će daljnja istraživanja.

Prilikom prolaska preproteina kroz protein Tic110 odnosno njegove TP, veže se protein Tic40 koji potpomaže postupnom smanjenju afiniteta preproteina za Tic110 i njegovo otpuštanje u stromu. Ta interakcija uzrokuje konformacijsku promjenu prilikom koje se otvara Hip/Hop domena i stimulira aktivnost „motora“ šaperona stani nog Hsp93 (slika 3) te povlači i protein u stromu. U stromi je potom procesuiran sa SPP te sklopljen u pravilnu konformaciju uz pomoć stani nog šaperona Hsp93 (Benz *et al.*, 2008.).

4.2.3. Regulacija prijenosa preko kompleksa TIC

Blizina fotosintetskog aparata uvjetuje proteinu Tic64 regulaciju redoks uvjeta sudjelovanjem u prijenosu elektrona u kloroplastu, isto kao i Tic32 te Tic55. Regulacija se pritom odvija asocijacijom, odnosno disocijacijom pojedinih proteina regulatora s kompleksa TIC.

Tioredoxini (Trx) bi tako i mogli sudjelovati u regulaciji unosa proteina. To su mali proteini s redoks aktivnim disulfidnim mostovima pomoću kojih se regulira enzimska aktivnost. Oksidacijom njihovih konzerviranih cisteinskih domena mogu se reverzibilno reducirati različiti tipovi proteina. Na taj se način modulira njihova konformacija ili aktivnost.

Postoji nekoliko tipova Trx zaslužnih za regulaciju, poput Trx F i Trx M koji sudjeluju u prijenosu redoks signala do ciljnih enzima.

Važnost prijenosa proteina preko unutarnje membrane ini se kao jedan od najzahtjevnijih regulacijskih sustava što je ukazano postojanjem i tre e vrste regulacije. Kalcij kao sekundarni glasnik važan je sudionik regulacije vezivanjem kalmodulina koji „osje a“ njegovu prisutnost. Kalmodulin pritom smanjuje afinitet za kalcij kod proteina translokona te je medijator prijenosa (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010). Protein Tic32 s NADP(H) veznom domenom te Ca²⁺-kalmodulin veznom domenom, esencijalan je protein koji modulira dva razli ita me usobno isklju uju a tipa regulacije (Benz *et al.*, 2008).

5. STROMA KLOROPLASTA

U gustom granuliranom fluidu unutar kloroplasta odvijaju se mnoge reakcije važne za život biljaka. Prema endosimbiotskoj teoriji, smatra se da je stroma kloroplasta po porijeklu citoplazma prokariota u kojoj se nalazi cirkularna DNA. Poput ostalih prokariota, u stromi se nalaze i ribosomi koji sudjeluju u sintezi kloroplastnih proteina (<http://plantphys.info/cell/chloroplast.html>).

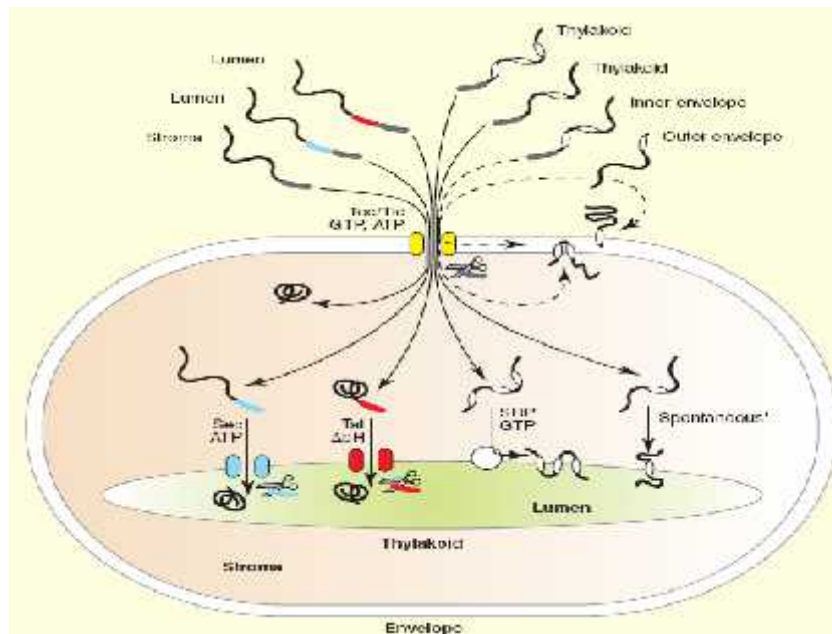
Kloroplastni proteom, odnosno stromalni proteom sadrži različite proteine uključene u biokemijske puteve poput sinteze i razgradnje trifosfata, Calvinov ciklus i druge. Nadalje, velik broj proteina je uključen u translokaciju, smatanje, procesiranje, modificiranje i proteolitičku razgradnju. Zanimljivo je da je SPP najaktivniji protein, ali ga ima manje nego šaperona Cpn60 ili Hsp93 (Zybailov *et al.*, 2008).

Nakon translokacije kroz komplekse TOC i TIC, N-terminalni TP se proteolitički razgrađuje. U tome sudjeluje energija u obliku ATP-a i SPP, veliki monomerni enzim koji svojom aktivnošću daje zrele proteine za stromu ili pak one koji se moraju preusmjeriti do tilakoida. Proteini koji su pronašli svoje konačno odredište u stromi, dalje su oblikovani u aktivnu konformaciju pomoću stromalnih šaperona, dok je većina proteina usmjerena prema tilakoidima uz pomoć bipartitnog signala (Stengel *et al.*, 2007).

6. TILAKOIDI KLOROPLASTA

Tilakoidi su mjesto fotosintetske aktivnosti biljaka. Oni se mogu smatrati „organelom unutar organela“ jer predstavljaju kompartiment okružen membranom. Tilakoidna membrana s uklopljenim proteinima te pigmentima - klorofilima i karotenoidima kao i drugim dijelovima fotosintetskog aparata, okružuje vre astu tvorbu – lumen tilakoida (<http://en.wikipedia.org/wiki/Thylakoid>).

Nakupine tilakoida nazivaju se grana-tilakoidi. Imaju inkorporiranu glavninu fotosistema II. Tilakoidi koji povezuju grana unutar strome nazivaju se stroma-tilakoidi. ATP sintaza i fotosistem I su uglavnom smješteni u tim tilakoidima (Buchanan *et al.*, 2002). Tako su upravo najvažniji događaji procesa fotosinteze smješteni duboko unutar kloroplasta, te proteini poput nekih enzima trebaju proći i komplicirani i dalek put od ribosoma citosola do same tilakoidne membrane odnosno lumena tilakoida.



Slika 4. Pregled mehanizama unosa proteina u tilakoide: proteini koji trebaju biti smješteni negdje unutar kloroplasta većinom ulaze kroz komplekse TOC i TIC. Potom su procesirani sa SPP te kreću dalje u tilakoide, bilo ATP ovisnim Sec putem, pH ovisnim Tat putem, spontano ili GTP ovisnim SRP putem. (Jarvis and Robinson, 2004.)

6.1. Tat sistem u tilakoidima kloroplasta (cpTat)

Tat sistem, odnosno mehanizam, označava arginin-arginin sustav prijenosa (engl. twin-arginine). Podrijetlom je iz cijanobakterija gdje izbacuje proteine veličine i do 100 kDa od kojih su neki zaduženi za prijenos kofaktora. Transport uključuje prijenos proteina uz korištenje energije protonskog gradijenta (slika 4) budući da je unutar tilakoida i do tisuć puta više protona u usporedbi s koncentracijom u stromi (Balsera *et al.*, 2009).

6.1.1. Dijelovi cpTat sistema

Proteini Tha4, Hcf106 i cpTatC sudjeluju u ovom prijenosu, a konzervirani su i u algi i biljaka. Njihovi homolozi su pronađeni u bakterijama gdje su imenovani proteinima TatA, TatB i TatC.

Hcf106 (19 kDa) i Tha4 (9 kDa) bitopni su proteini smješteni u tilakoidnoj membrani gdje njihove amfipatske zavojnice „strše“ u stromu. Hcf106 je u neposrednoj blizini cpTatC proteina (34 kDa) sastavljenog od šest transmembranskih zavojnica, pri čemu oni zajedno stvaraju stabilni kompleks zadužen za prvobitni dodir s proteinima iz strome (Balsera *et al.*, 2009).

6.1.2. Mehanizam prijenosa preko tilakoidne membrane cpTat sistemom

Stabilni kompleks Hcf106-cpTatC djeluje kao receptor proteina iz strome. Samo prepoznavanje omogućuje protein cpTat, koji prepoznaje proteinske specifične strukture. Naime, proteini moraju sadržavati N regiju, nabijenu N-terminalnu regiju, H regiju koja uključuje arginin-arginin motiv i hidrofobni dio te polarni C-terminalni dio (C regija) koji mora završavati A-X-A motivom (motiv s dvije aminokiseline alanina te nekom trećom aminokiselinom).

Vezivanje preproteina za proteinski kompleks uz prisutnost protonskog gradijenta aktivira protein Tha4 i stvara poru u membrani veličine supstrata. Sama translokacija nije dovoljno razjašnjena pa postoje dva potencijalna modela koji bi je objasnili. Prema prvom modelu, protein Tha4 u membrani polimerizira oko supstrata čime stvara poru za prijenos, dok druga hipoteza pretpostavlja konformacijsku promjenu proteina Tha4. Takvom konformacijskom promjenom dolazi do odmatanja amfipatskih zavojnica ili do destabiliziranja lipidnog dvosloja čime je omogućen prijenos.

Unešeni protein potom sa svojim A-X-A motivom stupaju u interakciju s TPP-om, enzimom iste funkcije kao i SPP samo lokaliziranom u tilakoidima. Tada dolazi do proteolitičke razgradnje dijela proteina. Nakon toga djelovanjem šaperona dolazi do uspostave funkcionalne konformacije te se protein može aktivno uključiti u rad kloroplasta (Balsera *et al.*, 2009).

6.2. Sec sistem u tilakoidima kloroplasta (cpSec)

Glavni sekretorni sistem u cijanobakterija sastavljen je od proteinskog kanala i periferno asociranog „motora“ (slika 4). U biljkama je nazvan cpSec (secretory) sistem i sastavljen je od svega nekoliko proteina. Sudjeluje u posttranslacijskom unosu luminalnih proteina poput plastocijanina i citokroma *f* te u kotranslacijskom prijenosu D1 podjedinice fotosistema II uz pomoć SRP sistema. Pritom su supstrati translocirani u nesmotanom stanju, dok se kofaktori postupno nakupljaju u lumenu (Balsera *et al.*, 2009).

6.2.1. Dijelovi cpSec sistema

Proteini SecY, SecE i cpSecA biljni su homolozi cijanobakterijskih proteina gdje su zaduženi za sekreciju. Kao dio biljnog proteoma, sudjeluju u unosu u tilakoide i to ponajviše proteina aktivnih u fotosintezi.

Protein SecY sastavljen je od nekoliko transmembranskih zavojnica koji zajedno s proteinom SecE stvara translokacijski kanal. Transmembranska zavojnica s karboksilnim krajem mjesto je interakcije proteina SecE sa SecY ime se stvara kompleks od 180 kDa. Protein cpSecA s DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) sekvencom i Walker B motivom (zaduženim za trifosfatno vezivanje) je ATPaza koja svojom helikaznom aktivnošću u stvara energiju potrebnu za translokaciju (Balsera *et al.*, 2009).

6.2.2. Mehanizam prijenosa preko tilakoidne membrane cpSec sistemom

Prvi protein koji sudjeluje u prepoznavanju supstrata je cpSecA. Prepoznaje SP prekursora u stromi, prekursora sli ne strukture kao i kod proteina cpTat, no bez arginin-arginin motiva. Prepoznavanje uzrokuje vezivanje proteina cpSecA za tilakoidnu membranu te hidrolizu ATP-a. Energija dobivena hidrolizom dostatna je za parcijalno propuštanje proteina kroz SecY-SecE kanal.

Me udjelovanje proteina SecY i SecE dodatno potiče hidrolizu ATP-a ime se dodatno stimulira otpuštanje preproteina kroz kanal. Kompletan prijenos dodatno potiče razlika u koncentraciji protona između dva kompartimenta. Po završetku translokacije, protein se procesira TPP-om, dok protein cpSecA izlazi iz membrane i započinje novi ciklus insertacije-deinsertacije u tilakoidnu membranu u kombinaciji s hidrolizom ATP-a (Balsera *et al.*, 2009).

6.3. SRP sistem u tilakoidima kloroplasta (cpSRP)

SRP je signalna prepoznavajuća čestica (signal recognition particle), dio proteina koji sudjeluje u staničnom mehanizmu transporta proteina u ER ili u membranu bakterija odnosno arheja. cpSRP sistem je heterodimer sastavljen od proteina cpSRP43 i cpSRP54, a sudjeluje u unosu proteina u tilakoide (slika 4). Pritom može sudjelovati u kombinaciji sa Sec sistemom kako bi se unijeli proteini kodirani kloroplastnim genomom ili samostalno, unosom proteina poput LHCP (Balsera *et al.*, 2009).

6.3.1. Dijelovi cpSRP sistema

Proteini cpSRP54 i cpSRP43 dijelovi su SRP-a, pri čemu je cpSRP43 specifičan za zelene biljke te djeluje posttranslacijski. FtsY i YidC su preteče u cijanobakterijama zelenih proteina cpFtsY i Alb3.

Proteinski receptor preproteina cpFtsY je inkorporiran u membranu, dok je Alb3 (Albino3) integralni membranski protein. Sastavljen je od pet transmembranskih zavojnica sa slobodnim amino krajem u lumenu tilakoida te karboksilnim krajem u stromi. Proteini cpSRP54 i cpFtsY su GTPaze koje se recipročno aktiviraju prilikom stvaranja kompleksa stabilnog samo ako su oba proteina u GTP-vezanom stanju. Upravo u tom stanju moguće je njihova interakcija s preproteinom (Balsera *et al.*, 2009).

6.3.2. Mehanizam prijenosa preko tilakoidne membrane cpSRP sistemom

Kotranslacijski put ugradnje proteina i posttranslacijski put, dva su puta prijenosa preko SRP sistema pri čemu je njihova osnovna razlika prisutnost odnosno odsutnost Sec puta.

U ranoj fazi elongacije, po kotranslacijskom modelu, dolazi do prividnog vezanja proteina cpSRP54 za protein u nastajanju. cpFtsY potom djeluje na protein cpSRP54 i uzrokuje hidrolizu GTP-a te prijenos na translokon Alb3/Sec.

Posttranslacijski put je neovisan o Sec sistemu te prijelazni kompleks nastaje vezivanjem preproteina za AKR regiju proteina cpSRP43. cpSRP54 ostvaruje kontakt s proteinom te nastaje kompleks cpSRP54-GTP/cpSRP43 preko samog supstrata. Takav kompleks je prepoznat od strane proteinskog receptora cpFtsY koji prebacuje konglomerat iz strome u tilakoide. Samo prebacivanje tj. reakcija između receptora i kompleksa uzrokuje hidrolizu GTP-a te odvajanje supstrata i prebacivanje do proteina Alb3 koji inkorporira supstrat u membranu tilakoida (Balsera *et al.*, 2009).

6.4. Spontana ugradnja kao mehanizam unosa u tilakoide

Ako unos proteina nije uvjetovan postojanjem stromalnih faktora, membranskih translokatora ili trifosfata, govorimo o spontanoj inserciji (slika 4). Unatoč tome, i u ovom slučaju ulogu imaju TP. TP-ove skupine pokazuju sličnost s ostalim TP odgovornim za unos u tilakoide, no uz pojedine razlike poput kiselih aminokiselina u području C regije.

Krucijalna strukturalna razlika koja uvjetuje upravo ovaj način unosa proteina jest u postojanju dvije hidrofobne zavojnice koje okružuju N-terminalni dio zrelog proteina. Naime, jednu zavojnicu čini TP, dok je druga zavojnica hidrofilna amino regija.

Prijenosom ovakva proteina kroz membranu pokušava se otkloniti N-terminalna hidrofilna regija i njene dvije zavojnice stvaraju i intermedijer u obliku transmembranske

om e. Kada se om a po ne unosi, TP nije prepoznat ili se proteoliti ki razgra uje, ovisno o proteinu i njegovoj budu oj ulozi (Balsera *et al.*, 2009).

7. ALTERNATIVNI MEHANIZMI UNOSA PROTEINA

U dosadašnjem prikazu unosa proteina opisala sam op i mehanizam unosa, a postoje naznake pronalaska i alternativnih mehanizama. Upravo taj op i mehanizam uklju uje energiju u obliku ATP nužno potrebnim za unos, supstrate osjetljive na proteaze, kompeticiju s preproteinima unešenim u stromu i prisutnost TP-a, koji su ujedno i kriteriji razlikovanja op eg i alternativnog mehanizma (Nada and Soll, 2004). Me utim, što ako TP ne postoji, a ipak su alternativni proteini prona eni u kloroplastima i moraju se tamo prenijeti? Proteom kloroplasta otkriva i do 30% proteina koji ne sadrže TP. Koji je mehanizam unosa u takvom slu aju?

Prije nekoliko godina po prvi puta su prona eni takvi proteini, proteini Tic32 i ceQORH. Njihovom analizom utvr eno je da ne postoji TP, da su lokalizirani unutar kloroplasta i da njihov mehanizam unosa ne obuhva a komplekse TOC i TIC, ali da za unos postoje energetske zahtjevi u obliku ATP-a (Balsera *et al.*, 2009).

Rezultati istraživanja vezani uz protein ceQORH govore o potencijalnom novom proteinskom mjestu unosa, konzerviranom u jednosupnica i dvosupnica, a neupitna je razlika naspram proteina op eg mehanizma unosa prisutnost velike koncentracije ATP-a. Upravo zbog ogromne koli ine ATP-a, smatra se da šaperoni ne sudjeluju u kona nom prolazu proteina kroz membranu (Miras *et al.*, 2007). Protein Tic32 naspram proteina ceQORH zahtijeva minimalnu koli inu ATP-a za unos, ne pokazuje kompeticiju niti s jednim preproteinom za stromu, a stimuliranje unosa se ne postiže proteazno-osjetljivim komponentama (Nada and Soll, 2004).

Novija otkri a govore i o nekolicini proteina (CAH1 i NPP1) koji sadrže signal za unos u ER, ali bez TP (Balsera *et al.*, 2009). Prona eno je da upravo ti proteini ulaze u kloroplaste prenešeni vezikulama ER-a i Golgijeva aparata, a postoji i hipoteza da se takvi proteini glikoziliraju (Stengel *et al.*, 2007). Je li to mehanizam kojima se unose proteini bez TP ili je to samo jedan od izuzetaka, nova je nepoznanica i novo podru je za budu a istraživanja (Balsera *et al.*, 2009).

8. LITERATURA

Andres, C., Agne, B., Kessler F. (2010). The TOC complex: Preprotein gateway to the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803, 715-723.

Balsera, M., Soll, J., Bölder B. (2009). Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 1903-1923.

Benz, J. P., Soll, J., Bölder B. (2008). Protein transport in organelles: The composition, function and regulation of the Tic complex in chloroplast protein import. *The FEBS Journal* 276, 1166-1176.

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley and Sons. USA.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Thylakoid>

http://en.wikipedia.org/wiki/Protein#Cellular_localization

<http://plantphys.info/cell/chloroplast.html>

Jarvis, P., Robinson, C. (2004). Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Current Biology* 14, 1064-1077.

Kovács-Bogdán, E., Soll J., Bölder B. (2010). Protein import into chloroplasts: The Tic complex and its regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803, 740-747.

Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Joyard, J., Reinbothe, S., Rolland, N. (2007). Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 282, 29482-29492.

Nada, A., Soll, J. (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *Journal of Cell Science* 117, 3975-3982.

Oreb, M., Tews, I., Schleiff, E. (2007). Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts. *Trends in Cell Biology* 18, 19-27.

Qbadou, S., Becker, B., Bionda, B., Reger, K., Ruprecht, M., Soll, J., Schleiff E. (2007). Toc64 - A preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *Journal of Molecular Biology* 367, 1330-1346.

Soll, J., Tien, R. (1998). Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Molecular Biology* 38, 191-207.

Stengel, A., Soll, J., Bölder B. (2007). Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Journal of Biological Chemistry* 388, 765-772

Vojta, A., Fulgosi, H., Schleiff, E. (2007). The molecular concept of protein translocation across the outer membrane of chloroplasts. *Croatica Chemica Acta* 81, 501-509.

Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., van Wijk, K. J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3(4): e1994

9. SAŽETAK

Endosimbioza kao zajednica dvaju jednostavnih organizama rezultirala je nastankom kloroplasta, organela složene građe. Dvostruka membrana koja okružuje kloroplast u kombinaciji s tilakoidnim membranama predstavlja zahtjevan sustav koji je zadržao vlastiti genom. Međutim, iz kloroplasta je tijekom evolucije velik broj gena prenesen u jezgru pa u ovaj plastid ulaze proteini sintetizirani na citosolnim ribosomima. Fotosinteza koja se odvija unutar kloroplasta, jedan je od najvažnijih procesa u živom svijetu. Za odvijanje tog procesa potrebni su strukturalno i funkcionalno raznoliki proteini. Fascinantno je njihov put i mehanizam unosa, koji uključuje vanjsku membranu ovojnice, međumembranski prostor, unutarnju membranu ovojnice te stromu i tilakoide. Put unosa uključuje komplekse Translocon of the Outer membranes of the Chloroplast (TOC) i Translocon of the Inner membranes of the Chloroplast (TIC), proteolitičku razgradnju tranzitnog peptida (TP) te formiranje konačne strukture pomoću šaperona. Nadalje, otkriveni su proteini koji ne prate takav obrazac unosa u kloroplast pa se postavlja pitanje jesu li to samo izuzeci ili pak postoje novi, alternativni načini unosa proteina koji će se otkriti u budućnosti.

10. SUMMARY

Endosymbiosis of two simple organisms has resulted in development of chloroplast, an organelle with complicated architecture. In addition to inner and outer envelope membranes, chloroplasts contain thylakoids - a system of membranes inside the organelle. Although chloroplasts possess own genome, during the evolution a great number of genes are transferred from the chloroplast genome to the nuclear genome. Therefore, a number of proteins needed for chloroplast function are encoded by nuclear genome and synthesized on cytosolic ribosomes. They have to be imported into the chloroplast. Photosynthesis is one of the most important processes in living world and it is placed in chloroplast. Structurally and functionally diverse proteins are acquired for that important process. Their pathway and mechanism of import is fascinating. It includes outer membrane, inter-membrane space, inner membrane, stroma and thylakoids. It involves complexes Translocon of the Outer membranes of the Chloroplast (TOC) and Translocon of the Inner membranes of the Chloroplast (TIC), proteolytic removal of transit peptide (TP) and chaperones which help to create final structure. On the other hand, new proteins are discovered and they do not show that kind of importing pattern, so there is remaining question to be solved – are those proteins just exception or there is a new, alternative pathway of importing proteins into chloroplast?