

SEMINARIO

Reticolo endoplasmatico

UNFOLDED PROTEIN RESPONSE

Chaperones molecolari

- Il termine anglosassone di **chaperone**, mutuato dal francese chaperon, indica una persona, e un ruolo, della buona società tra l'ottocento ed il novecento. Ogni fanciulla, in viaggio o in pubblico, doveva essere accompagnata da un'affidabile persona anziana, lo chaperon (in genere un'altra donna vedova o single) che la sorvegliava discretamente e ne assicurava il corretto comportamento. **Se la funzione dello chaperon falliva la configurazione morale e talora anche fisica della fanciulla ne era gravemente compromessa.**
- Il concetto di chaperon è stato quindi trasferito alla **regolazione della configurazione delle proteine**, sia di quelle nascenti, che devono assumere il corretto stato di ripiegamento dopo il termine della loro sintesi e della loro collocazione intracellulare, sia di quelle che dopo aver assunto la conformazione definitiva vanno incontro ad alterazioni strutturali per eventi accidentali.

<http://flipper.diff.org/app/items/info/1166>

Chaperones e altre proteine dell'ER facilitano il ripiegamento e l'assemblaggio delle proteine (1)

- Il rapido ripiegamento delle proteine di nuova sintesi nell'ER dipende dall'azione sequenziale di diverse proteine presenti nel lume dell'ER.
- Il chaperone molecolare **BiP** (che funziona anche nel citosolo) si lega transitoriamente alle catene nascenti mentre esse entrano nell'ER durante la traslocazione co-traduzionale.
- Si ritiene che il legame con la BiP impedisca che segmenti di una catena nascente prendano un ripiegamento sbagliato («misfolding») o formino aggregati, in questo modo promuovendo il ripiegamento del peptide intero nella conformazione corretta.
- Anche la proteina **disulfuro isomerasi (PDI)** collabora al ripiegamento giusto, dato che questo è **stabilizzato da legami disolfuro in molte proteine.**

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Chaperones e altre proteine dell'ER facilitano il ripiegamento e l'assemblaggio delle proteine (2)

- Due altre proteine dell'ER, le lectine (proteine che si legano a carboidrati) **calnexina** e **calreticolina** si legano selettivamente ad alcuni oligosaccaridi N-linked sulle catene crescenti.
- Il ligando per queste lectine, che somiglia al precursore oligosaccaridico N-linked ma ha soltanto **un singolo residuo di glucosio** [Glc₁Man₅(GlcNAc)₂], è generato da una glucosiltransferasi nel lume dell'ER.
- Questo enzima funziona soltanto **su catene polipeptidiche che o non sono ripiegate («unfolded») o sono piegate male («misfolded»)**, e in questo aspetto, l'enzima funziona come un **meccanismo primario di sorveglianza che assicura il controllo di qualità del ripiegamento delle proteine nell'ER.**
- Il meccanismo tramite il quale la glucosil transferasi riconosce le proteine non ripiegate o male ripiegate è sconosciuto.

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Modes of substrate binding by chaperones

Modalità di legame al substrato delle proteine chaperones

Unfolded or misfolded proteins
 Aggregation-prone
 Protease-sensitive
 Bind chaperones
 Non functional

Globular soluble protein
 Stable and soluble
 Protease resistant
 No chaperone binding
 Functional

<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg16s/hsp1ec.html>

Chaperones e altre proteine dell'ER facilitano il ripiegamento e l'assemblaggio delle proteine (3)

- Il legame della calnexina e della calreticolina alle catene nascenti marcate con gli oligosaccaridi N-linked **impedisce l'aggregazione dei segmenti adiacenti di una proteina.**
- Perciò la calnexina e la calreticolina, come la BiP, **impediscono il ripiegamento prematuro, sbagliato, di segmenti della nuova proteina.**

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Hemagglutinin folding and assembly.

(a) Mechanism of (HAo) trimer assembly. Transient binding of the chaperone BiP (step Ie) to the nascent chain and of two lectins, calnexin and calreticulin, to certain oligosaccharide chains (step fii) promotes proper folding of adjacent segments. A total of seven N-linked oligosaccharide chains are added to the luminal portion of the nascent chain during cotranslational translocation, and PDI catalyzes the formation of six disulfide bonds per monomer. Completed HA6 monomers are anchored in the membrane by a single membrane-spanning α helix with the N-terminus in the lumen (step E). Interaction of three HA6 chains with one another, initially via their transmembrane α helices, apparently triggers formation of a long stem containing one α helix from the luminal part of each HAE polypeptide. Finally, interactions occur among the three globular heads, generating a stable HAo trimer (step B).

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Le proteine ripiegate in modo sbagliato nell'ER inducono l'espressione di catalizzatori con il compito di ripiegare le proteine (1)

- Le proteine sintetizzate nel RER non possono uscire da questo compartimento finché non raggiungono una conformazione totalmente ripiegata.
- Il meccanismo per **trattenere le proteine non ripiegate o ripiegate in modo incompleto nell'ER** probabilmente aumenta l'efficacia globale di ripiegamento trattenendo le forme intermedie vicino a catalizzatori del ripiegamento, molto abbondanti nell'ER.
- Sono state viste proteine ripiegate in modo sbagliato vicino agli chaperones del ER BiP e calnexina.
- Perciò, questi catalizzatori del ripiegamento nel lume svolgono due funzioni correlate:
 - Collaborano al ripiegamento delle proteine normali impedendo la loro aggregazione**
 - Si legano alle proteine mal ripiegate per trattenerle nell'ER.**

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Le proteine ripiegate in modo sbagliato nell'ER inducono l'espressione di catalizzatori con il compito di ripiegare le proteine (2)

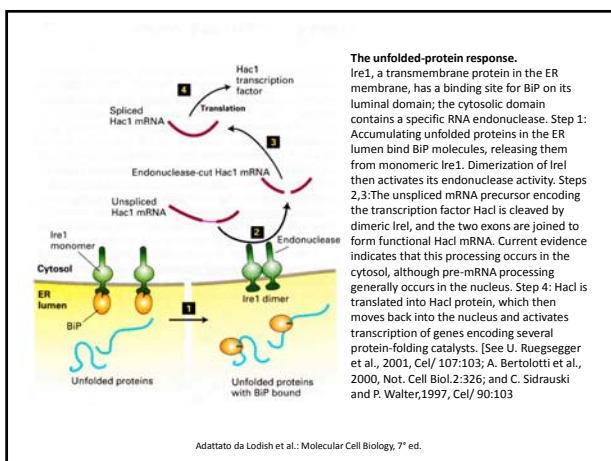
- ♣ Sia le cellule dei mammiferi che dei lieviti (eucarioti unicellulari) rispondono alla presenza di proteine mal ripiegate nell'ER aumentando la trascrizione di diversi geni che codificano per i chaperones dell'ER e altri catalizzatori del ripiegamento.
- ♣ Un partecipante fondamentale di questa «**unfolded protein response, UPR**» (risposta alle proteine non ripiegate) è **Ire 1**, una proteina di membrana dell'ER che esiste sotto forma sia di monomero che di dimero.
- ♣ La forma dimerica, ma non la monomerica, promuove la **formazione di Hac1**, un **fattore di trascrizione dei lieviti che attivano l'espressione dei geni indotti nella UPR**.

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Le proteine ripiegate in modo sbagliato nell'ER inducono l'espressione di catalizzatori con il compito di ripiegare le proteine (3)

- ♣ La quantità di BiP nel lume dell'ER determina la proporzione relativa delle forme monomeriche e dimeriche di Ire1.
- ♣ L'accumulo di proteine non piegate nel lume dell'ER sequestra le molecole di BiP, non le rendendo disponibili a legare Ire1.
- ♣ I livelli di Ire1 dimerico aumentano portando ad un aumento del livello di Hac1 e della produzione di proteine che collaborano al ripiegamento delle proteine.
- ♣ Le cellule dei mammiferi contengono un meccanismo aggiuntivo:
 - ♣ L'accumulo di proteine non piegate provoca la proteolisi di ATF6, una proteina transmembrana della membrana dell'ER in un sito all'interno del dominio di attraversamento delle membrana.
 - ♣ Il dominio citosolico rilasciato di ATF6 si sposta al nucleo dove stimola la trascrizione dei geni per i chaperones dell'ER.

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.



Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

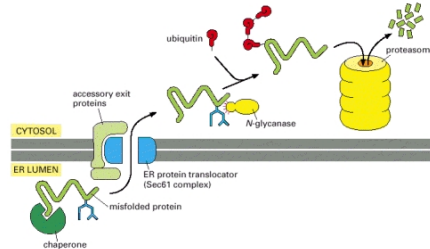
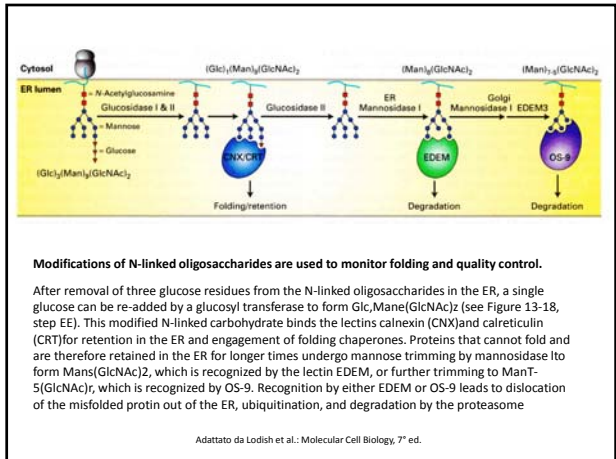
Le proteine non assemblate o assemblate in modo sbagliato nell'ER vengono spesso trasportate al citosol per degradazione (1)

- ♣ Le **proteine di secrezione mal ripiegate sono riconosciute da proteine di membrana specifiche dell'ER e indirizzate per trasporto dal lume dell'ER al citosol mediante un processo di traslocazione**.
- ♣ Un meccanismo di riconoscimento di proteine non ripiegate coinvolge l'enzima α -mannosidasi.
- ♣ I glicani spuntati dalla mannosidasi vengono riconosciuti da proteine simili a lectine (EDEM, OS-9) che indirizzano la glicoproteina spuntata al complesso di dislocazione per la degradazione (di cui fanno parte 4 proteine integrali di membrana che formano il «ER-associated degradation (ERAD) complex»).
- ♣ Nel citosol intervengono proteine che idrolizzando l'ATP ricavano energia per tirare le proteine mal ripiegate dalla membrana dell'ER al citosol.

Adattato da Lodish et al.: Molecular Cell Biology, 7^a ed.

Le proteine non assemblate o assemblate in modo sbagliato nell'ER vengono spesso trasportate al citosolo per degradazione (2)

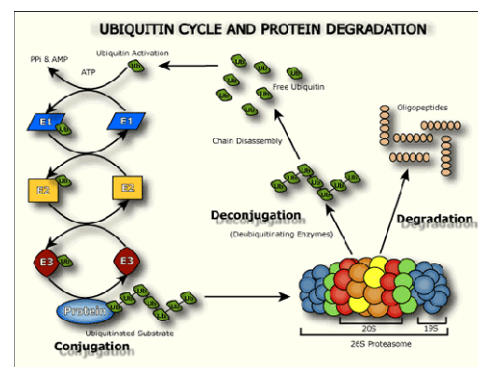
- Quando le proteine mal ripiegate entrano nel citosol, degli enzimi della membrana dell'ER chiamati ubiquitina ligasi aggiungono residui di peptide dislocato ubiquitina in un processo associato all'idrolisi dell'ATP.
- Le proteine ubiquitinate nel citosol vengono rimosse dalla cellula mediante degradazione nel proteasoma.



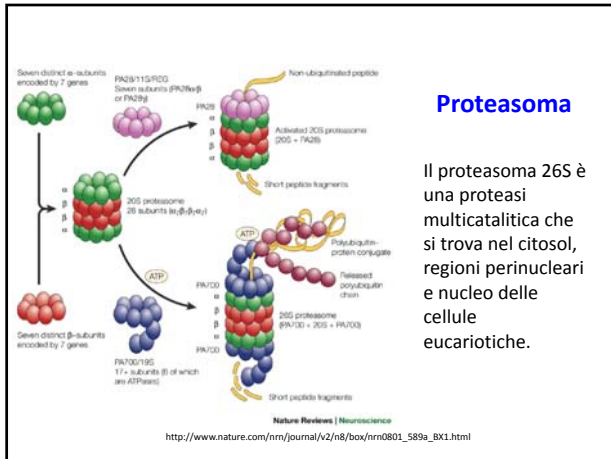
Esportazione e degradazione delle proteine male ripiegate nel ER

Le proteine solubili male ripiegate nel lume dell'ER sono traslocate in dietro nel citosol dove sono deglicosilate, ubiquitinate e degradate in proteasomi. Le proteine male ripiegate delle membrane sono esportate in modo simile. Le proteine male ripiegate sono esportate mediante lo stesso tipo di traslocatori che mediano la loro importazione; proteine accessorie che sono associate con il traslocatore gli permettono di funzionare come esportatore.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26841/figure/A2237?report=objectonly>



http://www.biomol.de/images/1p/UPP_525.gif



Proteasoma

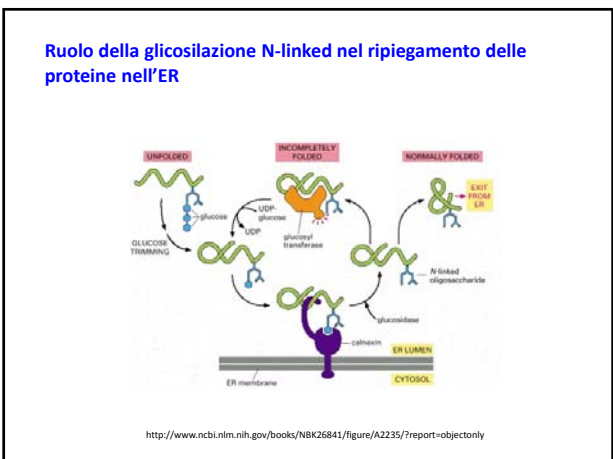
Il proteasoma 26S è una proteasi multicatalitica che si trova nel citosol, regioni perinucleari e nucleo delle cellule eucariotiche.

Unfolded protein response nei mammiferi (UPR) (1)

- La UPR è una risposta allo stress cellulare correlata al funzionamento del reticolo endoplasmatico. E' una riposte allo stress che si è conservata in tutte le specie dei mammiferi, così come nei lieviti e in organismi multicellulari semplici come la *Caenorhabditis elegans*.
- La UPR viene attivata in risposta all'accumulo di proteine non ripiegate o piegate male nel lume del reticolo endoplasmatico.
- In questo scenario la UPR ha due scopi principali: inizialmente ripristinare la funzione normale della cellula fermando la traduzione delle protein e attivando vie di segnalamento che portano all'aumento della produzione di chaperones molecolari coinvolti nel ripiegamento delle proteine.

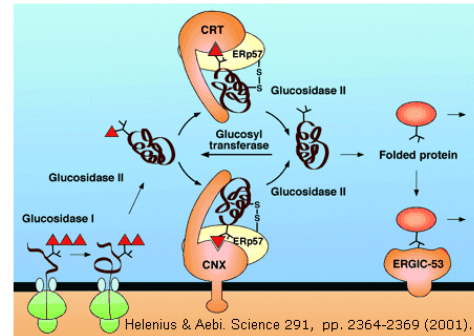
Unfolded protein response nei mammiferi (UPR) (2)

- Se questi scopi non vengono raggiunti entro un certo periodo di tempo, o se il danno è prolungato, la UPR mira ad indurre la morte cellular per apoptosis.
- E' stato visto che la prolungata sovraattivazione della UPR è coinvolta nelle **malattie prioniche** e in diverse altre **malattie neurodegenerative**, e l'inibizione della UPR potrebbe diventare un trattamento per queste malattie.
- Patologie teoricamente sottoponibili all'inibizione della UPR includono la malattia di Creutzfeldt-Jakob disease, la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson e la malattia di Huntington.



Ruolo della glicosilazione N-linked nel ripiegamento delle proteine nell'ER

- La proteina chaperone legata alla membrana dell'ER calnexina si lega alle proteine ripiegate in modo incompleto contenenti un glucosio terminale negli oligosaccaridi N-linked, intrappolando le proteine nell'ER.
- La rimozione del N-terminale da parte di glicosidasi rilascia la proteina dalla calnexina.
- Una glucosil transferasi è l'enzima cruciale che determina se una proteina è ripiegata come si deve o no: se la proteina non è completamente ripiegata, l'enzima trasferisce un nuovo glucosio dall'UDP-glucosio all'oligosaccaride N-linked, rinnovando l'affinità della proteina per la calnexina e trattenendola nell'ER.
- Il ciclo si ripete finché la proteina è ripiegata completamente.
- La calreticolina funziona in modo simile, tranne che è una proteina solubile residente nel lume dell'ER.
- Un altro chaperone, la ERp57 (not mostrato) collabora con la calnexina e con la calreticolina per trattenere le proteine incompletamente ripiegate nell'ER.



Unfolded protein response

