

Per capire la “*Misfolded/Unfolded protein response*”

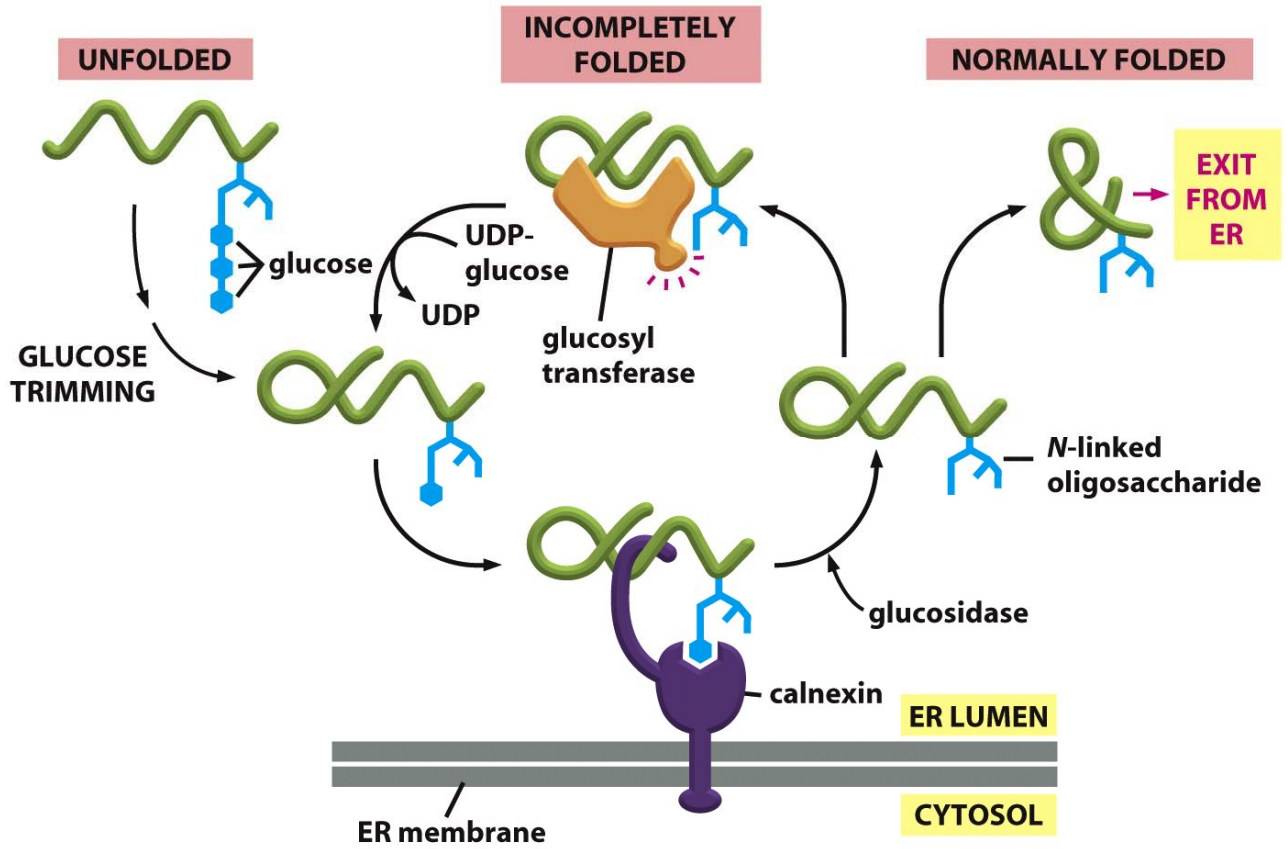
GLI OLIGOSACCARIDI SONO USATI COME ETICHETTE PER INDICARE LO STATO DI RIPIEGAMENTO DELLE PROTEINE

- E' stato a lungo dibattuto perché la **glicosilazione** sia una modificazione così comune nelle proteine che entrano nell'ER.
- Alcune proteine richiedono glicosilazione legata a N per il ripiegamento nell'ER, ma la posizione precisa degli oligosaccaridi attaccati alla superficie della proteina non sembra avere importanza.

Ruolo delle proteine chaperone dell'ER, **calnessina** e **calreticolina** (richiedono Ca^{2+} per la loro attività)

- Questi chaperoni sono **proteine** che **si legano in modo specifico a carboidrati** – “**lectine**” –
- **Si legano a oligosaccaridi su proteine non completamente ripiegate e le trattengono nell'ER.**
- Come altri chaperoni **impediscono alle proteine non completamente ripiegate di subire un'aggregazione irreversibile.**
- Sia la calnessina che la calreticolina promuovono anche l'associazione di proteine ripiegate in modo incompleto con un altro chaperone dell'ER che si lega alle cisteine che non hanno ancora formato legami disolfuro.
- La calnessina e la calreticolina **riconoscono oligosaccaridi** legati a N che contengono **un singolo glucosio terminale** e perciò **legano proteine soltanto dopo che due dei tre glucosidi che vengono inizialmente attaccati sono stati rimossi da glicosidasi dell'ER.**
- **Quando viene rimosso il 3° glucosio la proteina si dissocia dal suo chaperone e può lasciare l'ER per essere spedita all'apparato di Golgi.**
- Come fanno la calnessina e la calreticolina a distinguere fra proteine ripiegate e proteine non completamente ripiegate?
- La risposta si trova in un altro enzima, una glicosil transferasi che continua ad aggiungere un glucosio a quegli oligosaccaridi che hanno perso il loro ultimo glucosio ma lo fanno soltanto a oligosaccaridi che sono attaccati a proteine non ripiegate.
- Perciò **una proteina non ripiegata subisce cicli continui di taglio** (da parte della **glicosidasi**) e **aggiunta di glucosio** (da parte della **glicosil transferasi**) e mantiene un'affinità per la calnessina e la reticolina finché non raggiunge il suo stato completamente ripiegato.
- Le proteine ripiegate in modo inappropriato sono esportate dall'ER e degradate nel citosol.

- Nonostante l'aiuto da parte delle proteine chaperone, molte molecole proteiche (>80%) traslocate nel RE non riescono a raggiungere il loro corretto stato ripiegato od oligomerico.
- Queste proteine sono di nuovo esportate nel citosol, dove vengono degradate.
- Il meccanismo della retrodislocazione – dislocazione – è tuttora sconosciuto.
- La selezione delle proteine presenti nell'ER per la degradazione è un processo difficile.
- Le proteine ripiegate male o le subunità non assemblate devono essere degradate mentre non lo devono essere gli intermedi di ripiegamento delle proteine appena sintetizzate.
- **Un aiuto a fare questa distinzione deriva dagli oligosaccaridi legati ad N, che servono da timer per misurare quanto a lungo una proteina sia rimasta nel RE.**
- Si ritiene che la lenta rimozione di un particolare mannosio dall'albero del nucleo di oligosaccaridi da parte di un enzima (mannosidasi) nell'ER crei un nuovo oligosaccaride riconosciuto dall'apparato di retrotraslocazione.
- Le proteine che si ripiegano ed escono dall'ER più velocemente dell'azione della mannosidasi sfuggirebbero così alla degradazione.
- Una volta che la proteina ripiegata male è stata retrotraslocata nel citosol, i suoi oligosaccaridi sono rimossi in blocco da una N-glicosidasi.
- Il polipeptide deglicosilato è ubiquitinato rapidamente da enzimi legati all'ER che coniugano l'ubiquitina; viene quindi introdotto nei proteasomi, dove viene degradato.



● Figure 12-53 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

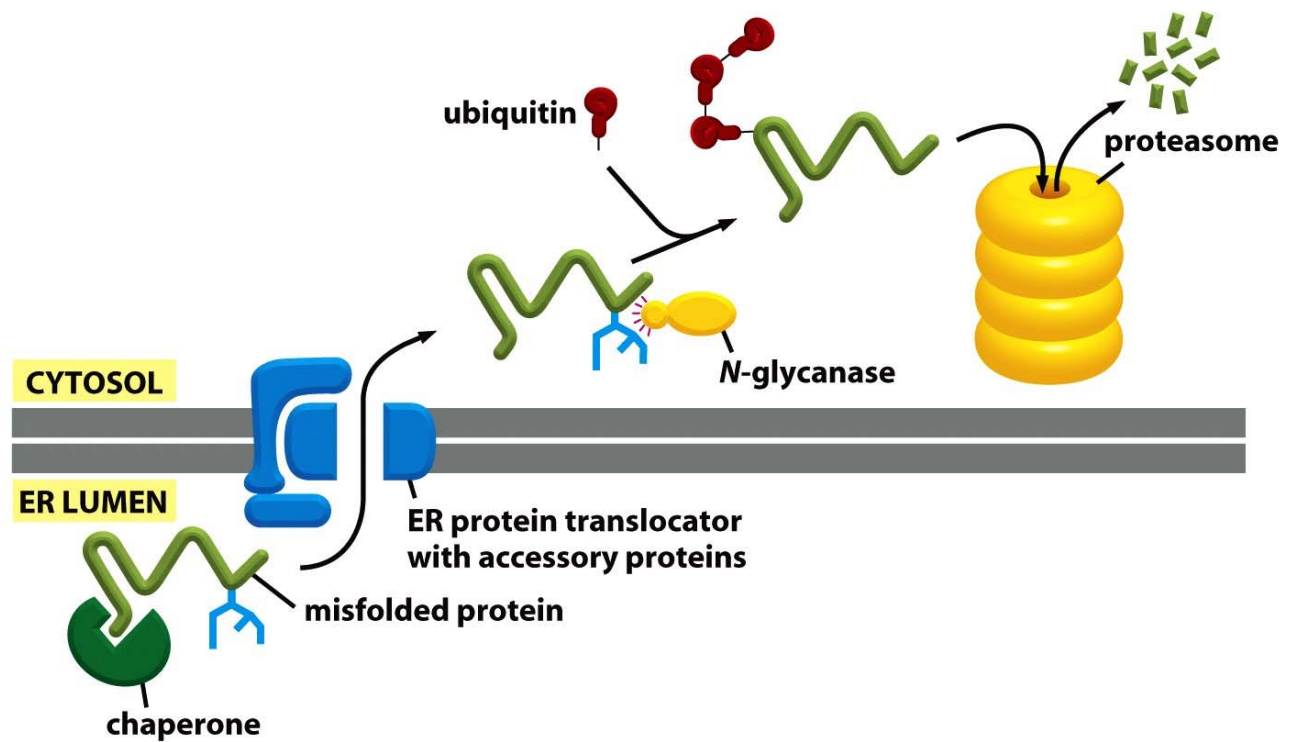
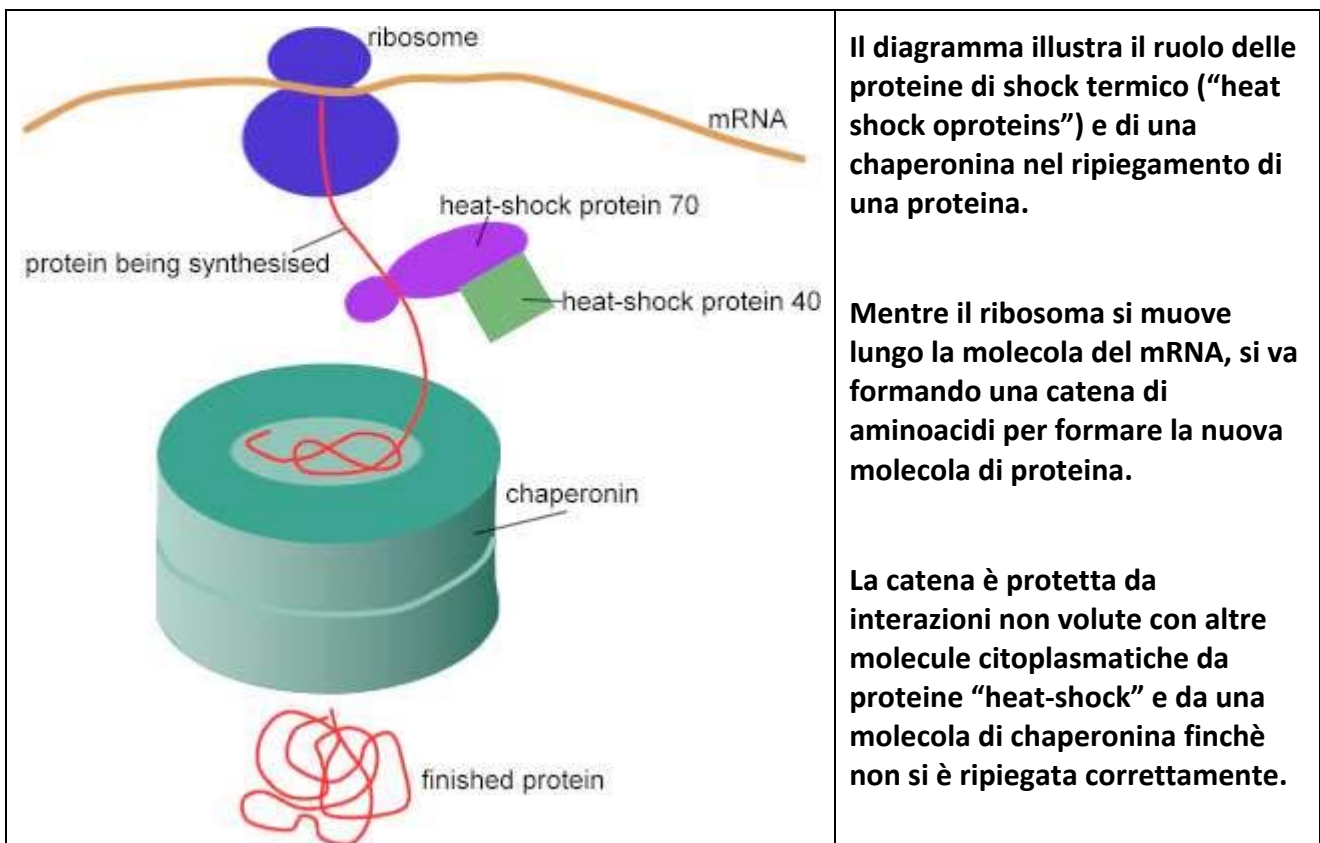


Figure 12-54 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Le proteine ripiegate male nell'ER attivano una risposta alle proteine non ripiegate ("Misfolded protein response"; "Unfolded protein response")

- Le cellule monitorano continuamente la quantità di proteine ripiegate male che contengono nei vari compartimenti.
- Un accumulo di proteine ripiegate male nel citosol, per esempio, scatena una **risposta da shock termico** ("**heat-shock response**"), che **stimola la trascrizione di geni codificanti molecole chaperone citosoliche che aiutano a ripiegare le proteine.**
-

<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/HSP/FUNCTION.HTML>



- In modo simile, un accumulo di **proteine male ripiegate** scatena una **risposta alle proteine non ripiegate**, che comprende un **aumento della trascrizione dei geni che codificano molecole chaperone dell'ER ed enzimi coinvolti nelle degradazione delle proteine dell'ER.**

Vie di segnalamento al nucleo su proteine ripiegate male nel citosol o nell'ER.

- Ci sono tre vie parallela che eseguono la risposta alle proteine non ripiegate correttamente:

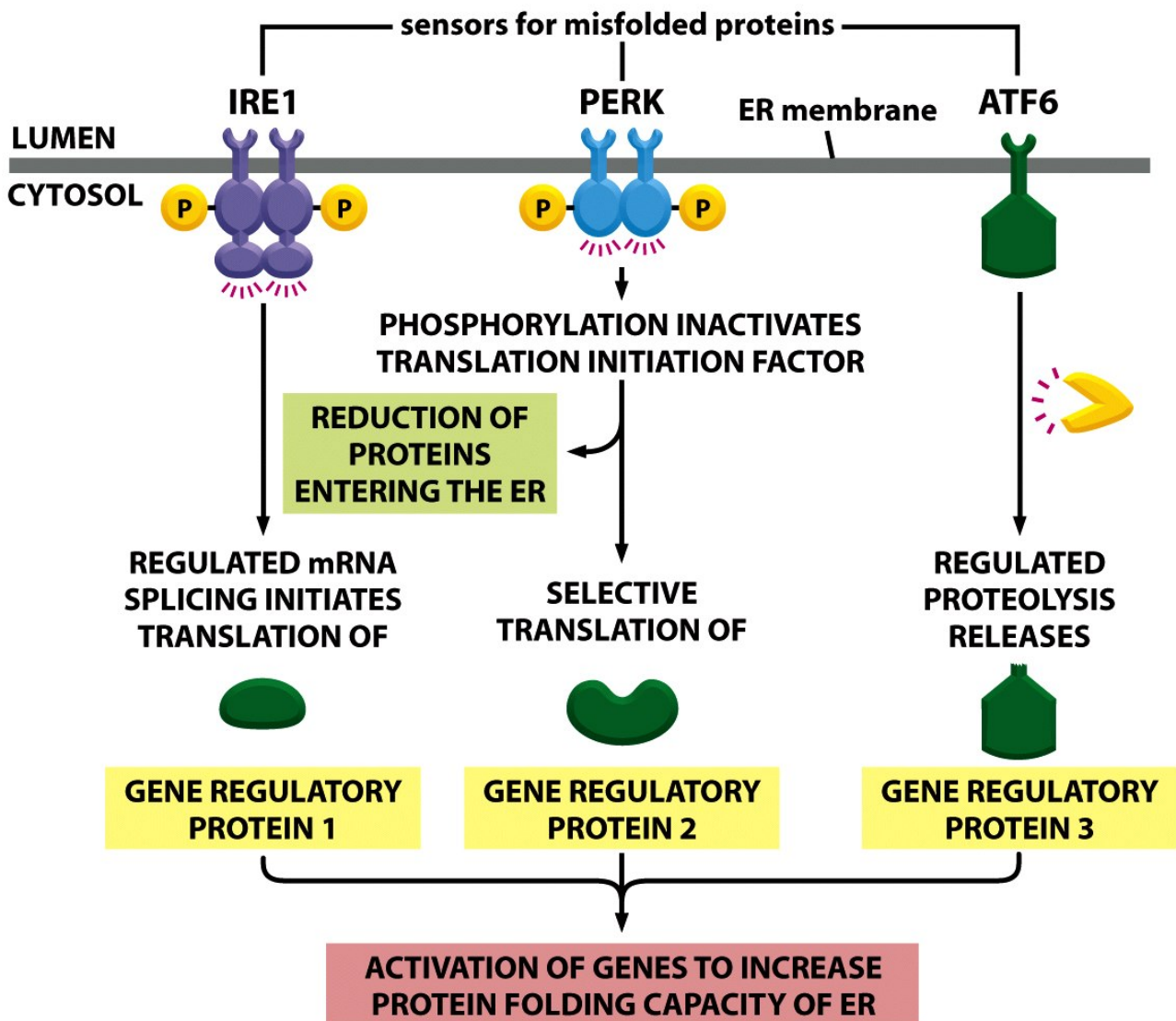


Figure 12-55a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

1. DATI SUL LIEVITO: Una proteina chinasi transmembrana nell'ER è attivata da proteine ripiegate male, che ne causano l'oligomerizzazione e l'autofosforilazione (come in alcuni recettori della membrana plasmatica).
 - a. L'oligomerizzazione e l'autofosforilazione portano all'attivazione di un dominio endoribonucleasico contenuto nella posizione citosolica della stessa molecola.
 - b. Questa nucleasi taglia una molecola specifica di RNA citosolico in due posizioni eliminando un introne.
 - c. Gli esoni separati sono quindi uniti da una RNA ligasi, generando un mRNA sottoposto a splicing che è tradotto per produrre una proteina attiva che regola geni.

- d. La proteina attiva la trascrizione di geni codificanti le proteine che mediano la risposta alle proteine non ripiegate.
2. Le proteine ripiegate male attivano anche una seconda chinasi transmembrana dell'ER che inibisce un fattore di inizio della traduzione fosforilandolo e riduce così la produzione di nuove proteine in tutta la cellula.
 - a. Una conseguenza di ciò è la riduzione del flusso di proteine nell'ER, che limita così il carico di proteine che vi devono essere ripiegate.
 - b. Alcune proteine però sono tradotte di preferenza quando i fattori di inizio della traduzione sono scarsi e una di queste è una proteina regolatrice dei geni che aiuta ad attivare la trascrizione dei geni che codificano proteine attive nella risposta alle proteine non ripiegate.
 3. Una 3^a proteina regolatrice dei geni è sintetizzata inizialmente come proteina integrale della membrana dell'ER.
 - a. Poiché è legata covalentemente alla membrana, non può attivare la trascrizione dei geni nel nucleo.
 - b. Quando nell'ER si accumulano proteine ripiegate male, la proteina transmembrana è trasportata nell'apparato di Golgi, dove incontra delle proteasi che staccano il dominio citosolico, che può adesso migrare nel nucleo ed aiutare ad attivare la trascrizione dei geni che codificano proteine coinvolte nella risposta alle proteine male ripiegate.

L'importanza relativa di ciascuna di queste vie differisce in tipi cellulari diversi, permettendo a ciascun tipo cellulare di adattare la risposta alla proteina non ripiegata secondo le proprie necessità.

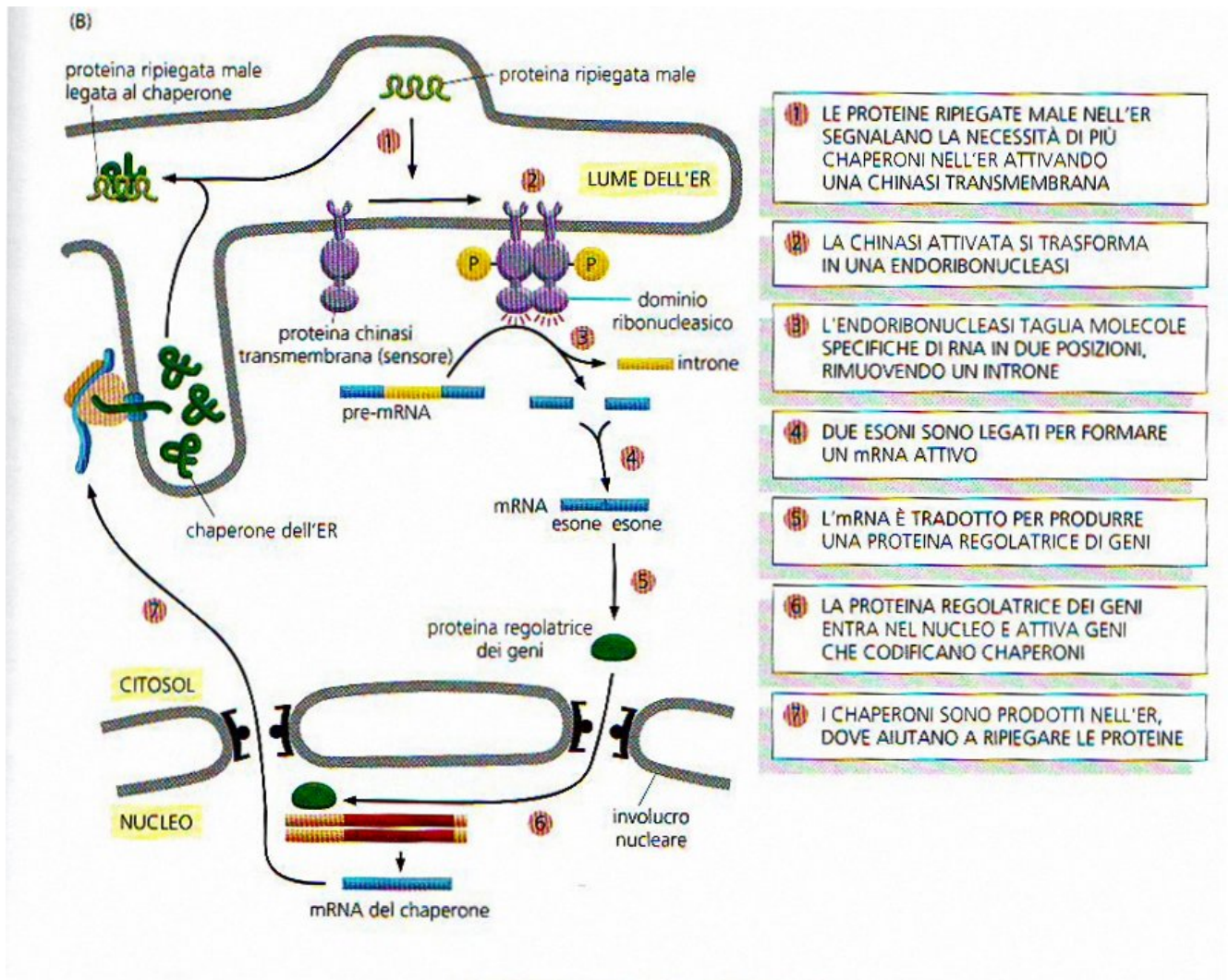
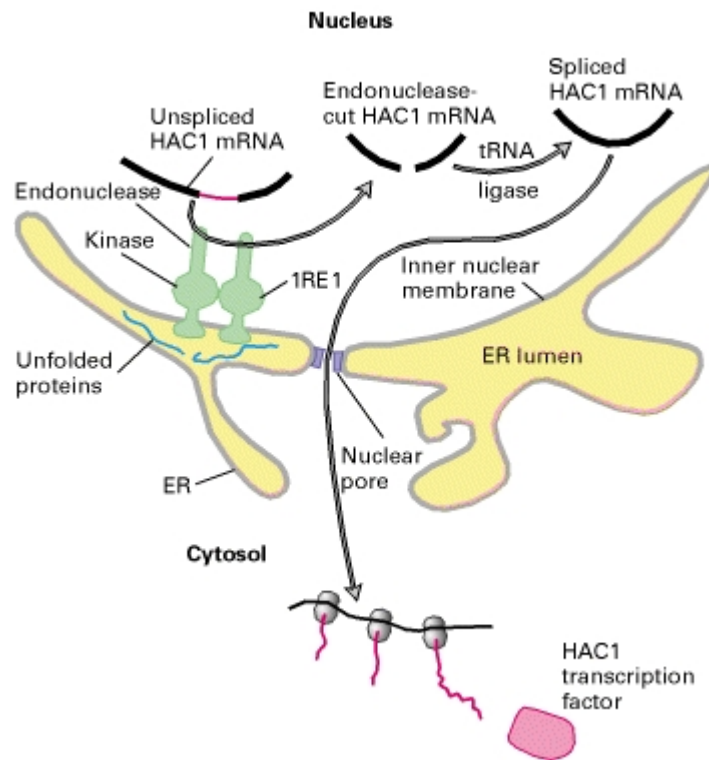


FIGURA 12.55 La risposta alle proteine non ripiegate.

(A) Tramite tre vie parallele di segnalazione intracellulare l'accumulo di proteine ripiegate male nel lume dell'ER segnala al nucleo di attivare la trascrizione di geni codificanti proteine che aiutano la cellula a far fronte all'abbondanza di proteine ripiegate male nell'ER. (B) Lo splicing regolato dell'mRNA è un interruttore cruciale di regolazione nella via 1 della risposta alle proteine non ripiegate.



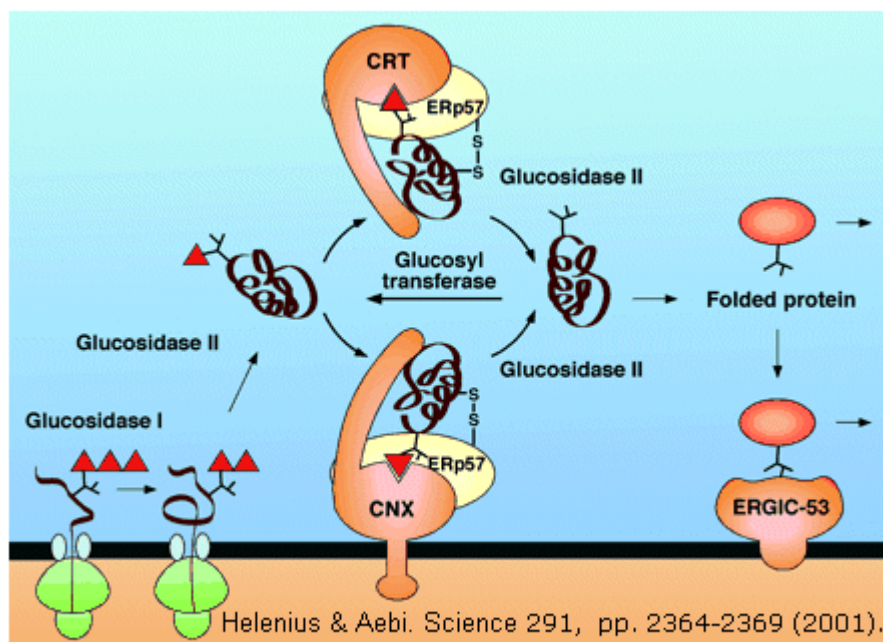
La “unfolded-protein response”

La IRE1 è una proteina transmembrana della membrane nucleare interna, una membrane che è in continuità con la membrana dell'ER. Questa proteina multifunzionale (verde) ha un sito di legame per le proteine mal ripiegate (blu) sulla sua superficie luminale; il suo dominio rivolto verso il nucleo contiene una protein chinasi di funzione ignota e una RNA endonucleasi specifica. Il legame della proteina mal ripiegata nel lume del ER dimirizza il recettore e in qualche modo attiva la endonucleasi che scinde il precursore del mRNA non sottoposto a splicing, che codifica per il fattore di trascrizione HAC1. I due esoni del HAC1 mRNA sono a questo punto collegati da una tRNA ligasi, che di solito fa lo “splicing” dei precursorsi degli tRNA, formando un composto HAC1 mRNA funzionale. In seguito alla sua sintesi nel citosol, la proteina HAC1 ritorna al nucleo e attiva la trascrizione di geni che codificano per diversi chaperoni e altre proteine che collaborano al ripiegamento di proteine non ripiegate nel lume dell'ER.

Funzione delle glicoproteine

Il ruolo dei carboidrati nella struttura/funzione delle glicoproteine sta emergendo lentamente. Il più importante sembra riguardare il loro ruolo nella **conduzione del ripiegamento corretto delle protein nel ER** che spiega le osservazioni che l'aggiunta di glicani alle proteine nell'ER sia un evento co-traduzionale. Se vengono somministrati alle cellule degli inibitori della glicosilazione nell'ER si osserva ripiegamento e aggregazione scorretti. L'entità dello scorretto ripiegamento dipende della particolare proteina e dei siti particolari di glicosilazione all'interno della proteina. **I residui polari di carboidrati aiutano a promuovere la solubilità dei prodotti intermediari di ripiegamento**, un effetto simile a quello indotto da molte proteine chaperone.

Le porzioni glucidiche delle glicoproteine in ripiegamento portano inoltre al legame della proteina con le lectine nel lume dell'ER, che fungono da chaperoni molecolari. Le più studiate di queste proteine sono coinvolte nel **ciclo calnessina-calreticolina** e facilitano la formazione corretta di legami disolfuro nella proteina. Dopo che due residui di glucosio vengono rimossi dalle glucosidasi I e II, la proteina monoglicosilata si lega alla calnessina (CNX) e/o alla calreticolina (CRT), due lectine dell'ER omologhe specifiche per le proteine monoglicosilate. Una volta legata, un'altra proteina, la Erp57, un chaperone molecolare con un legame disolfuro (illustrato nel diagramma) interagisce con la proteina. Questa proteina ha attività **disolfuro isomerasi**.



Copyright (2001) American Association for the Advancement of Science