

Destino post-traduzionale delle proteine

(i processi spiegati sono stati studiati prima negli organismi eucarioti e poi negli eucarioti, poiché il meccanismo risulta essere più semplice .)

Una volta che le proteine sono state sintetizzate a livello dei ribosomi :

- La loro struttura è quella primaria che appunto corrisponde alla sequenza aminoacidica e per diventare funzionanti devono assumere la **struttura nativa**, **ripiegandosi** e andando poi a formare le strutture successive (secondarie, terziarie e poi eventualmente quaternarie);
- Devono essere **indirizzate e smistate** nei vari compartimenti della cellula, in base a dove sono destinate ad andare definitivamente e in base alla loro funzione;
- Alcune di queste proteine subiscono delle **maturazioni** e quindi delle **modificazioni post-traduzionali**, come per esempio l'aggiunta di gruppi chimici o la rimozione di parti della proteina stessa. Tali modifiche possono essere **temporanee**, e quindi **servire all'indirizzamento della proteina**, o **permanenti e trasformano la proteina nella proteina nativa funzionante**;
- Tutte le proteine hanno un tempo di vita per cui, ad un certo punto, necessitano di **essere degradate**. Per questo motivo esiste un continuo ricambio di proteine, detto **turnover**. Questo processo di degradazione può essere anche fatto nel caso di proteine che subiscono degli **errori**, soprattutto a livello di struttura nativa tridimensionale, detti **misfolding** e quindi, quando non possono essere riparate, vengono eliminate.

Tali passaggi non avvengono tutti nello stesso ordine, alcuni passaggi possono avvenire prima e altri dopo, oppure **alcune proteine possono addirittura evitare del tutto dei passaggi**.

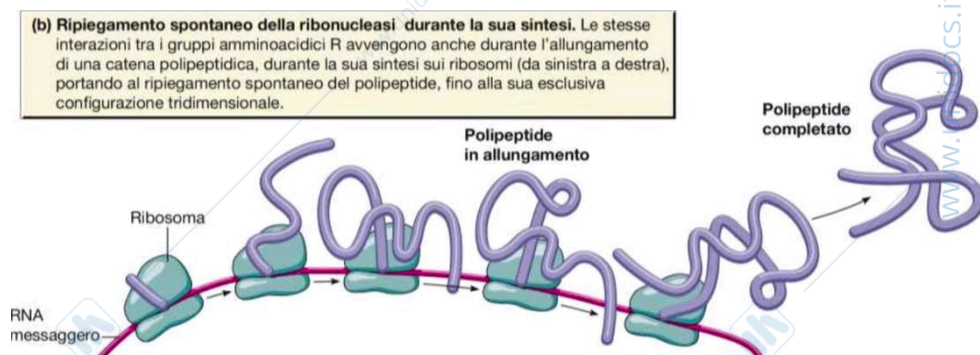
• **RIPIEGAMENTO**

Sia nei procarioti che negli eucarioti, la proteina per poter diventare funzionante si deve ripiegare assumendo la struttura nativa.

Le proteine di piccole dimensioni sono in grado di **ripiegarsi in maniera spontanea** grazie alla stabilità termodinamica della struttura terziaria, infatti la

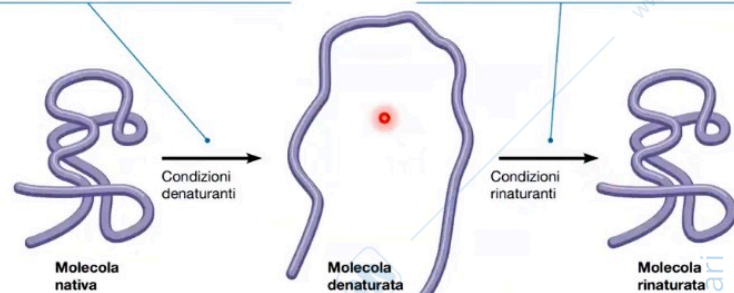
proteina ripiegata nella struttura nativa è più stabile dal punto di vista termodinamico.

In tale passaggio, i gruppi carbossilici e i gruppi amminici si avvicinano e si formano legami a idrogeno, formandosi di conseguenza le prime strutture secondarie α -elica e β -foglietto, le quali guidano successivamente le interazioni deboli tra le catene laterali degli aminoacidi e ripiegano la proteina che può finalmente andare a svolgere la sua funzione.



1 **Denaturazione.** Il polipeptide ripiegato fu esposto a condizioni denaturanti (riscaldamento) che rompevano le interazioni noncovalenti tra i gruppi aminoacidici R; ne risultava una molecola di ribonucleasi priva di forma definita e di attività enzimatica.

2 **Rinaturazione.** Il ritorno alle condizioni che permettono di ripristinare la struttura (raffreddamento) consentì di rinnovare le interazioni tra i gruppi aminoacidici R. Il polipeptide ritornò spontaneamente alla conformazione nativa, riacquistando attività enzimatica.



Nelle nostre cellule però sono presenti anche **proteine di grandi dimensioni** che non sono in grado da sole di ripiegarsi.

In questi casi devono quindi intervenire delle **proteine specializzate** per aiutare la proteina nascente a ripiegarsi e questo è fondamentale per il corretto funzionamento della cellula.

Se tale processo non avviene correttamente può predisporre all'insorgenza di **patologie molto gravi**, in particolare molte **malattie neurodegenerative**.

Dunque il corretto ripiegamento della proteina è fondamentale per la salute della cellula e dell'organismo stesso.

Per questo motivo sempre più gruppi di ricerca studiano il ripiegamento della proteina, detto **folding**, e quanto questo incida nell'insorgenza di patologie molto gravi.

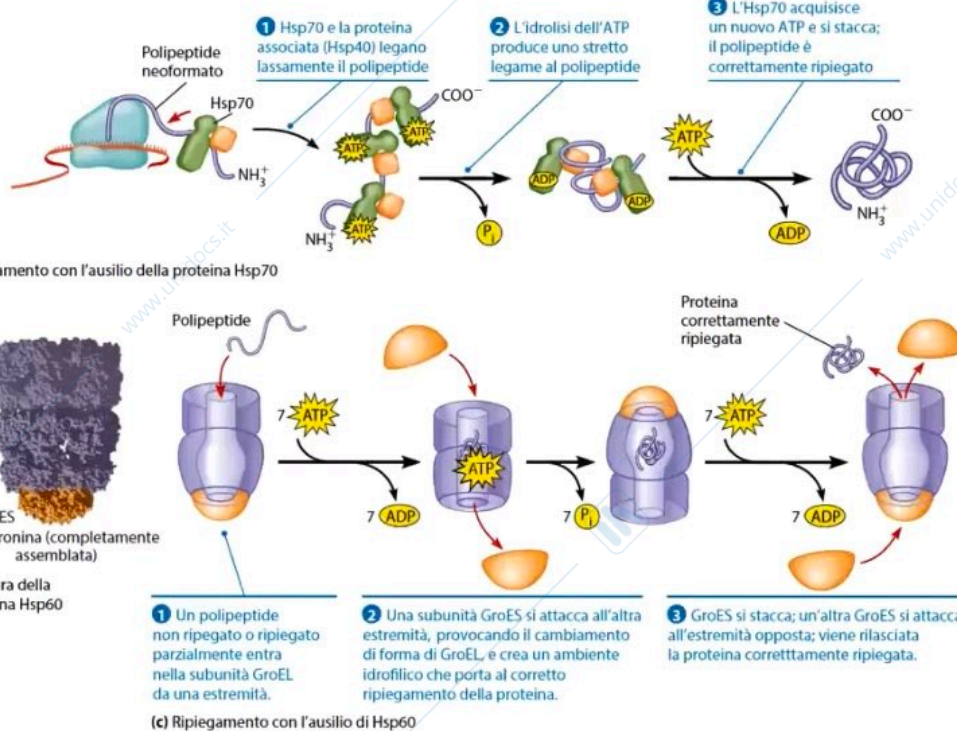
In particolare in questi studi si è scoperto che, sia nei procarioti che negli eucarioti, esistono delle proteine chiamate **chaperoni molecolari** che favoriscono il corretto ripiegamento tridimensionale di una **proteina di grandi dimensioni** che si è appena formata.

Queste proteine sono state identificate nei batteri quando questi venivano sottoposte a situazioni di stress, in particolare stress termico. L'innalzamento delle temperature sopra i 37 °C portano i procarioti a sintetizzare una serie di questo tipo di proteine (chaperoni molecolari) che vengono anche chiamate con il termine inglese **Hsp** e un numero accanto che indica il loro peso molecolare.

Le proteine **chaperoni molecolari** sono chiamate così perché **non sono enzimi, pur utilizzando energia sottoforma di ATP**; tali proteine prendono la proteina, che si è appena formata o che si sta formando a livello del ribosoma, e le creano

l'intorno chimico ideale per cui i gruppi chimici coinvolti nelle strutture tridimensionali si possono avvicinare per creare interazioni deboli: quindi accompagnano le proteine in questo **auto-assemblaggio**.

Non sono enzimi perché non hanno un sito attivo e non formano un complesso enzima-substrato pur interagendo con la proteina nascente.



eucarioti che nei procarioti. Nella figura si ha l'esempio di una **Hsp60 specifica dei procarioti** (in questo caso perché la nostra è diversa) e della **Hsp70 specifica sia degli eucarioti che dei procarioti**.

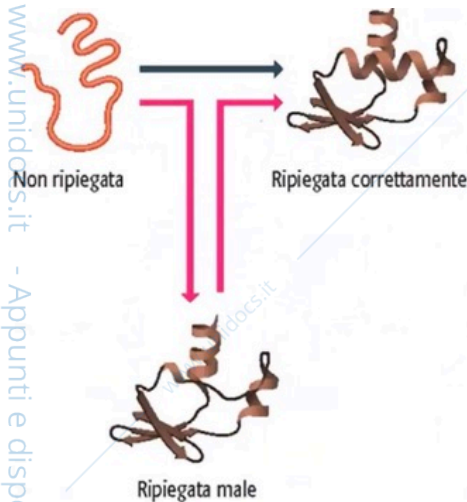
Queste proteine sono fondamentali e devono intervenire appena la proteina è stata sintetizzata.

Il ruolo delle proteine *chaperoni molecolari* non è solo quello di far ripiegare la proteina, **ma** intervengono anche nel caso in cui, per fattori di stress, all'interno della cellula una proteina va incontro ad una **denaturazione**.

Le proteine infatti sono in grado di perdere le interazioni deboli che la mantengono ripiegata nella struttura tridimensionale e quando si aprono, riassumendo semplicemente una struttura primaria, vengono dette **proteine denaturate**.

Nella maggior parte dei casi la **rinaturazione** è possibile ed è operata da queste proteine *chaperoni molecolari*, che riconoscono la proteina denaturata e fanno la stessa operazione coinvolta nel ripiegamento delle proteine appena sintetizzate.

Se questo non è possibile purtroppo la proteina non rimane in forma non ripiegata ma tende ad assumere una **struttura tridimensionale diversa da quella corretta**: questo ripiegamento sbagliato viene chiamato **missfolding**. Questo missfolding porta alla perdita, da parte della proteina, della sua funzione e tende a comportarsi in un modo che può mettere a rischio la salute della cellula (può così portare all'insorgenza di patologie come nel caso della anemia falciforme.)



• **INDIRIZZAMENTO DELLE PROTEINE**

Oltre al ripiegamento, l'altro aspetto fondamentale del destino delle proteine è quello dell'indirizzamento.

Non sempre il ripiegamento precede l'indirizzamento, in alcuni casi avviene prima il ripiegamento e dopo l'indirizzamento, mentre in altri casi si ha prima l'indirizzamento e dopo il ripiegamento, dipende dal destino della proteina.

Negli **eucarioti** se si considera la traduzione di geni nucleari, questa traduzione inizia sempre a livello dei ribosomi liberi nel citoplasma. Quindi l'RNA messaggero, dopo essere stato maturato, viene portato nel citoplasma dove incontra la subunità minore del ribosoma, si forma il complesso d'inizio con la subunità maggiore e si ha l'inizio della traduzione.

Se la proteina è destinata a diventare **una proteina del sistema di endomembrane** (RER, apparato del Golgi, membrana plasmatica o proteine di secrezione o proteine vescicolari), la proteina subisce un arresto, la sua sintesi si interrompe e il ribosoma, con tutto il complesso di traduzione, si sposta sulla membrana del RER: si ha quindi l'**indirizzamento co-traduzionale**, ovvero **la proteina viene indirizzata contemporaneamente alla sua traduzione**. (dunque la proteina si sposta prima di essere completamente formata).

Se **la proteina è destinata a rimanere nel citoplasma** (nel nucleoplasma, nel mitocondrio o nel cloroplasto) queste proteine vengono indirizzate in maniera **post-traduzionale**. **Dunque la loro sintesi viene completata nel citoplasma e soltanto in seguito le proteine vengono smistate** in alcuni casi prima di assumere la loro struttura terziaria (o quaternaria), in altri casi vengono indirizzate con struttura primaria e poi ripiegate nel compartimento cellulare in cui andranno a svolgere la loro funzione.

Il **fattore che determina l'indirizzamento della proteina** è un **segnale**: tutte le proteine infatti al loro interno hanno un **segnale che le etichetta per il loro destino**, alcuni di questi sono noti e caratterizzati e vengono anche utilizzati in laboratorio per veicolare una proteina in un compartimento dove normalmente non è presente, altri segnali invece non sono ancora del tutto noti.

Tale segnale per lo smistamento risiede in **una singola e ristretta sequenza lineare di aminoacidi** nella parte N-terminale, detta **peptide segnale**, che indica proprio l'indirizzamento della proteina.

Si conoscono diversi peptidi segnale specifici per l'indirizzamento della proteina nella cellula: Tutte le proteine hanno quindi un segnale al loro interno che le smista. Altri segnali sono in realtà delle modificazioni che vengono aggiunte dopo la sintesi delle proteine.

Funzione della sequenza segnale	Esempio di sequenza segnale
Importazione nel nucleo	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Esportazione dal nucleo	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
Importazione nei mitocondri	*H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Importazione nei plastidi	*H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Importazione nei perossisomi	-Ser-Lys-Leu-COO ^o
Importazione nel RE	*H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Ritorno al RE	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻

—> IMPORTAZIONE CO-TRADUZIONALE

Tale importazione è l'importazione delle **proteine destinate al sistema di endomembrana** (*in realtà, con questo meccanismo, si ha anche l'importazione delle proteine che andranno a far parte dell'involucro nucleare*).

Soltanto quando il ribosoma ha cominciato a tradurre la proteina e nell'estremità N-terminale della proteina è comparso il peptide segnale, si ha l'arresto della traduzione e la **traslocazione di tutto l'apparato di traduzione dal citoplasma alla membrana del RER**.

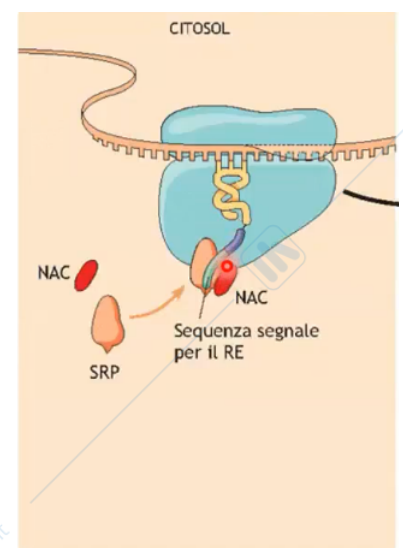
Quindi quando, durante un'osservazione al microscopio ottico o elettronico, si trovano i ribosomi sul RER, tali ribosomi sono in attiva sintesi proteica.

MECCANISMO

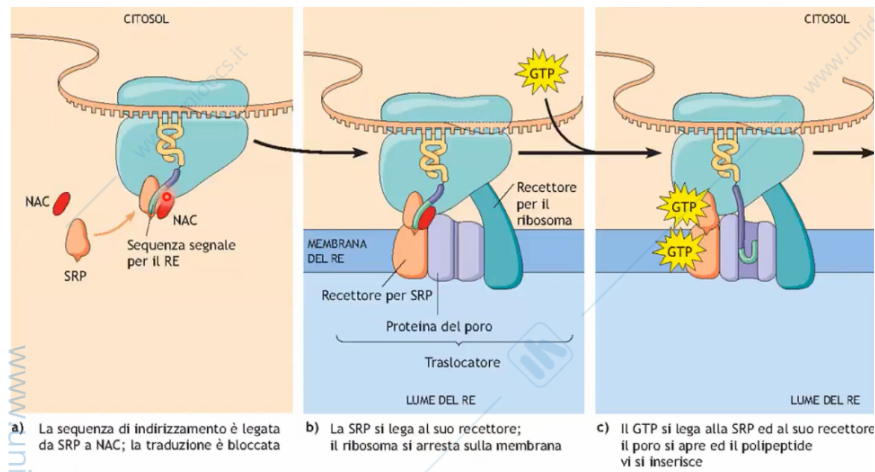
Quindi sporge il peptide segnale che viene riconosciuto da una **ribonucleoproteina**, chiamata **particella di riconoscimento del segnale (SRP)**, che si lega alla parte proteica del ribosoma, con interazioni deboli, mentre la parte di RNA interno va ad interagire con l'RNA presente nella subunità maggiore del ribosoma.

Una volta stabilito questo contatto, arriva una seconda proteina, chiamata **NAC**, un complesso proteico che si associa al complesso di traduzione *per fare in modo che la proteina nascente mantenga la struttura primaria e non si ripieghi*.

A questo punto, tutto questo complesso trasloca poi nel **RER** dove è presente un complesso proteico, detto **traslocatore**, formato da un recettore che riconosce la subunità maggiore del ribosoma e da un recettore che invece riconosce in maniera specifica la proteina SRP.



a) La sequenza di indirizzamento è legata da SRP a NAC; la traduzione è bloccata



Tra i due recettori transmembrana è presente un **canale transmembrana** attraverso il quale verrà fatta passare la proteina nascente.

A questo punto, mentre il recettore per il ribosoma tiene saldamente legato tutto l'apparato di traduzione sulla membrana del RER, **il recettore della proteina SRP farà da segnale per andare ad aprire il canale transmembrana**, infatti i canali specifici possono essere aperti soltanto da

segnali : in questo caso il segnale è rappresentato dal legame dell'GTP al recettore per la SRP, e la SRP stessa.

Una volta aperto il canale, la proteina **NAC** si libera, liberandosi anche la proteina SRP, poiché una volta aperto il canale e staccato il NAC si idrolizza l'GDP, mentre il legame fra il recettore e la subunità maggiore rimane per tutto il processo, poiché altrimenti tutto il processo di traduzione non rimarrebbe nella membrana del RER. Quello che invece ha svolto un processo di segnale per l'apertura del canale, una volta che il canale è stato aperto, non è più necessario e quindi viene eliminato.

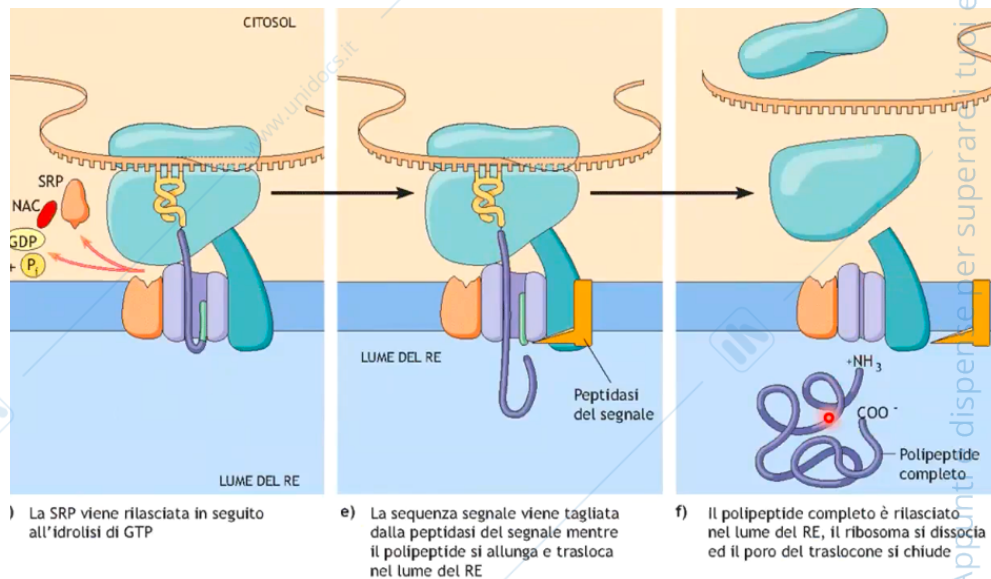
A questo punto il canale rimane aperto e la **sintesi proteica ricomincia** perché nel momento in cui la proteina SRP, non vi è più il suo legame con la subunità maggiore del ribosoma, e quindi il ribosoma comincia a scorrere e fa tutto il processo di traduzione.

A causa del modo in cui è posizionato il ribosoma, la proteina quando viene allungata dall'estremità N terminale alla C terminale, invece di allungarsi nel citoplasma, comincia a passare all'interno del canale.

Vicino al complesso traslocatore, è presente un enzima chiamato **peptidasi del segnale** in grado di idrolizzare il legame peptidico che, nel momento in cui il peptide segnale è passato a livello del canale e la sintesi proteica è ricominciata, taglia la sequenza segnale la quale viene eliminata; questo perché se permangono questi segnali possono anche permettere il movimento contrario della proteina cioè la proteina potrebbe essere portata fuori.

La proteina quindi viene prodotta e, una volta che la sintesi proteica ha raggiunto un codone di stop, tutto il processo di traduzione viene **disassemblato**.

Il legame fra il tRNA e il peptide viene rimosso e alla fine, quando la subunità maggiore si è staccata dal suo recettore, il traslocatore si richiude (o meglio il canale che fa parte del traslocatore) quindi **la proteina rimane intrappolata nel RER**.



Se la proteina è destinata a rimanere nel RER, deve andare incontro a dei ripiegamenti per formare la struttura nativa: in questi processi di ripiegamento intervengono lo chaperone molecolare della famiglia **Hsp70**, detto **Bip** (binding protein), anche queste consumano ATP e ripiegano la proteina.

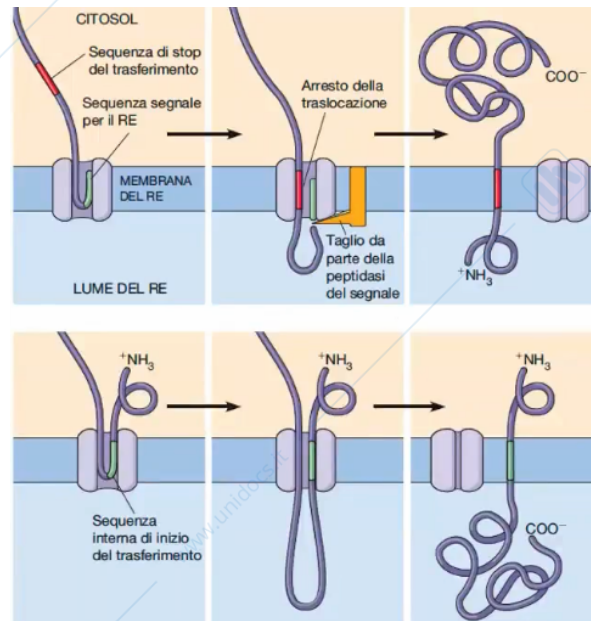
Se la proteina è destinata a diventare una proteina della membrana del RER, come il traslocatore, la proteina segue lo stesso processo spiegato precedentemente; tuttavia le

proteine destinate alle membrane del RER hanno un altro segnale, che è sempre costituito dalla sequenza aminoacidica che si trova nella proteina internamente, nella posizione successiva al peptide segnale iniziale. Dunque se la proteina deve rimanere all'interno della membrana, si avrà un **segnale** che ad un certo punto, quando si ha il canale aperto e la sintesi è ripresa, **passa attraverso il**

canale, segnalando al canale stesso di fermarsi: non si ferma la sintesi proteica ma ciò che si arresta, grazie a questo segnale interno, è la traslocazione dal citoplasma verso il lume. Il canale, cambiando conformazione, spinge la proteina a spostarsi lateralmente; la proteina dunque si sposta lateralmente, si toglie il peptide segnale di indirizzamento al reticolo, mentre la sequenza aminoacidica che ha determinato questo processo di spostamento laterale rimane e diventa la porzione transmembrana della proteina (sicuramente questa è costituita da aminoacidi fortemente idrofobici).

Quindi la proteina sarà **una proteina transmembrana che avrà l'estremità C terminale nel citoplasma e quella N terminale nel lume**, tuttavia se si ha bisogno di avere proteine **con orientamento opposto** si ha un unico segnale che non si trova nell'estremità N-terminale bensì è interno: tale segnale induce sia l'indirizzamento per il RER, sia lo spostamento laterale nella membrana. Questa sequenza segnale interna, in questo caso, non viene eliminata e si avrà quindi una **proteina transmembrana con orientamento opposto: l'estremità C terminale nel lume e quella N terminale nel citoplasma.**

Inoltre si può avere anche **una proteina multipasso transmembrana** e in questo caso, all'interno della proteina, si ha una sequenza segnale N terminale per il reticolo e una serie di sequenze aminoacidiche che fungono da segnali che permettono il passaggio della sequenza più volte nella membrana del RER (passaggio attraverso il canale e l'arresto attraverso la membrana e via di nuovo).



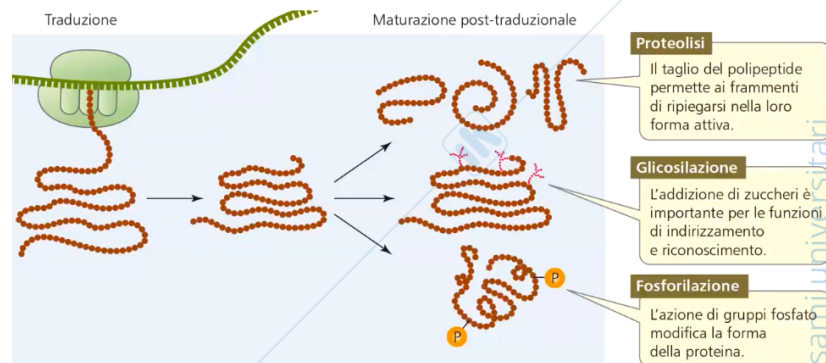
(a) Polipeptide con una sequenza segnale terminale per il RE e con una sequenza interna di stop del trasferimento. La sequenza di stop del trasferimento arresta la traslocazione e ancora il polipeptide alla membrana, dando origine a una proteina transmembrana con l'N-terminale nel lume del RE e il C-terminale nel citosol.

(b) Polipeptide con una singola sequenza interna di inizio del trasferimento. Questa singola sequenza di inizio del trasferimento avvia il trasferimento del polipeptide e quindi si muove attraverso un lato aperto nel traslocatore per ancorarsi alla membrana. (Se il polipeptide illustrato possedesse anche una sequenza di stop del trasferimento che ne impedisse il trasferimento completo attraverso il traslocatore, ne risulterebbe una proteina transmembrana con entrambe le estremità, N-terminale e C-terminale, nel citosol.)

• **MATURAZIONI**

Spesso la proteina viene indirizzata ad altri punti della cellula e quindi deve subire delle modificazioni chimiche dette **maturazioni**. Queste modifiche chimiche possono essere di due tipologie :

1) o **modificazioni che sono fondamentali per ottenere una proteina correttamente funzionante** come per esempio la **glicosilazione** . Generalmente le proteine glicosilate sono proteine spesso indirizzate poi alla membrana plasmatica e presentano la porzione oligosaccaridica verso l'esterno della cellula e hanno una funzione recettoriale o di segnalazione. (ci possono essere anche aggiunte di ponti disolfuro piuttosto che l'idrossilazione che permettono di rendere la proteina funzionante).



2) **Altre modifiche chimiche possono essere transitorie**; le stesse glicosilazioni, i stessi ponti disolfuro o la fosforilazione, possono essere modifiche transitorie che servono a smistare ulteriormente la proteina affinché questa possa continuare il suo percorso di indirizzamento e quindi sono dei **segnali aggiuntivi**. In realtà ,a parte la glicosilazione, per esempio la **fosforilazione** è una modificazione post-traduzionale delle proteine che può avere uno scopo di indirizzamento ma in altre proteine, come per esempio un enzima già prodotto e funzionante, queste modificazioni possono avere ruolo di regolazione dell'attività enzimatica.

Alcuni esempi di modificazioni fatte nelle proteine :

- **Glicosilazione**
- **Formazione di ponti bisolfuro S-S**
- **Aggiunta di lipidi di ancoraggio alla membrana**
- **Legame con gruppi che regolano la funzione delle proteine**, come la **fosforilazione** e la **ubiquitinazione**.

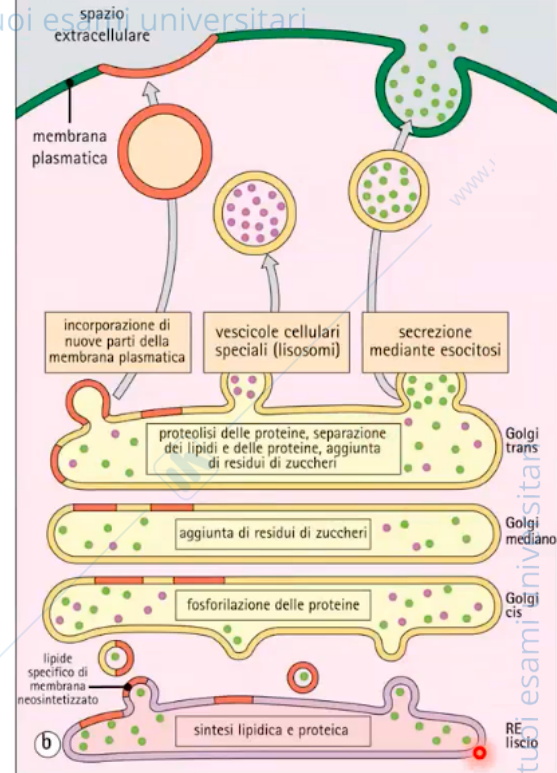
In particolare **alcune delle modifiche che si possono trovare nel sistema di endomembrane** sono:

- la **glicosilazione**, che inizia sempre nel RER e continua nell'apparato del Golgi.
- la **formazione di ponti bisolfuro S-S**, nel RER
- L'**idrossilazione della lisina e della prolina**, sempre nel RER

Per quanto riguarda l'**apparato del Golgi** si ricordi che questo è formato da una serie di cisterne appiattite l'una impilata sull'altra, dove si distingue :

- la porzione del **Golgi cis**, che guarda verso il RER e il REL
- la porzione del **Golgi mediano**
- la porzione del **Golgi trans**, che invece guarda verso la membrana plasmatica.

Tutti i movimenti dal RER e dal REL al Golgi, fino alla membrana, è mediato da vescicole : si ha quindi un **trasporto vescicolare specializzato** che può essere **anterogrado** (dal RER all'apparato del Golgi e poi alla membrana) o **retrogrado** (dalla faccia trans alla faccia cis del Golgi, opposto a quello di prima). Inoltre questi indirizzamenti possono interessare anche i lipidi formati nel REL.



-> GLICOSILAZIONE

Noi abbiamo 2 tipologie di glicosilazione :

- 1) la **O-glicosilazione** quando si aggiungono delle catene oligosaccaridiche formando un legame glicosidico con un gruppo ossidrilico presente nella catena laterale di un amminoacido che possiede i suoi gruppi ossidrilici (**serina, treonina, idrossilisina e idrossiprolina**).
- 2) La **N-glicosilazione** : è l'aggiunta di catene oligosaccaridiche , legandole ad un gruppo amminico della catena laterale di un amminoacido, in particolar modo **l'asparagina** (la più frequente che si trova al livello del RER). Questo esempio di maturazione della proteina, che è anche un segnale per il suo smistamento nell'apparato del Golgi, è un esempio di **modificazione co-traduzionale**, quindi questa modifica avviene prima della traduzione e prima del ripiegamento.

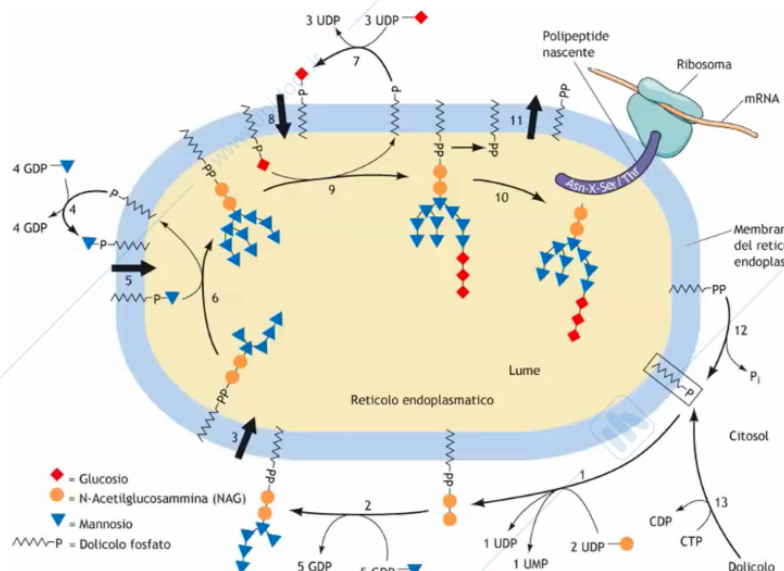
MECCANISMO N-GLICOSILAZIONE

La modifica di N-glicosilazione è un meccanismo molto complesso.

Siamo sempre sul RER, nella fase in cui il ribosoma si è legato al suo traslocatore, ha ripreso la traduzione, la proteina che si sta allungando con l'estremità N terminale è passata attraverso il canale del traslocatore e il peptide segnale è stato tagliato; quando la proteina sporge nel lume presenta **un'asparagina**.

Esiste sulla membrana del RER un lipide di membrana chiamato **dolicolo** capace di trasferire delle catene oligosaccaridiche preformate alla proteina nascente.

I passaggi che vengono fatti, hanno tutti il compito di trasformare questo lipide in un lipide che presenta una catena oligosaccaridica (**glicolipide**).



Ad un certo punto il dolicolo, grazie ad un enzima specifico, trasferisce la sua catena oligosaccaridica alla proteina nascente. La proteina viene formata completamente e, una volta terminata la sintesi proteica, **questa glicoproteina subisce il ripiegamento, aiutata dalle chaperonine presenti nel lume del RER.**

Il **dolicolo** è un lipide di membrana formato **da unità isopreniche**, appartiene quindi alla famiglia dei **terpeni**, e presenta un gruppo OH in grado di subire la **glicosilazione**, quindi l'aggiunta di catene oligosaccaridiche. Questo legame non avviene direttamente con gli zuccheri, ma richiede inizialmente l'aggiunta di gruppi fosfato.

Una volta trasferito con le proteine, viene indirizzato con delle proteine di trasporto all'apparato del Golgi dove vengono modificate (**il movimento vescicolare è sempre mediato dai microtubuli e dalle proteine dineine e chinesine**).

Altri esempi

di modificazione sono la **proteolisi** e la **formazione di ponti disolfuro**: un esempio di queste modificazioni è la molecola di **insulina**, un ormone proteico di piccole dimensioni prodotto da un gene che si trova nel DNA nucleare e che porta alla formazione in prima istanza di una sola catena polipeptidica.

MECCANISMO

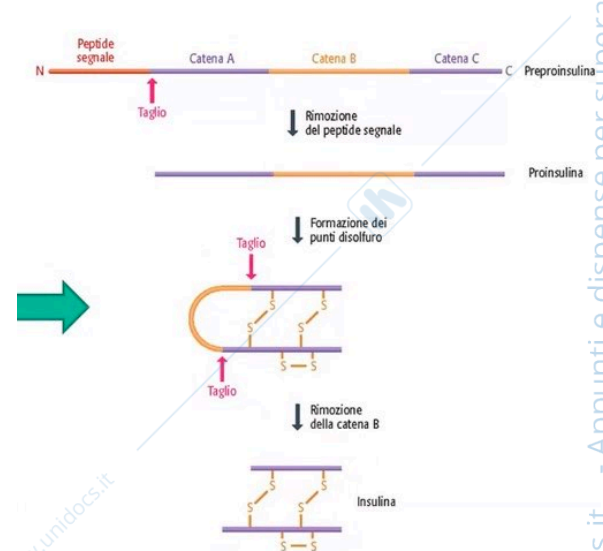
L'insulina è una proteina piena di una serie di **segnali**, uno in particolare che le permette di fare **l'indirizzamento co-traduzionale nel RER**, il quale verrà poi eliminato dalla peptidasi del segnale.

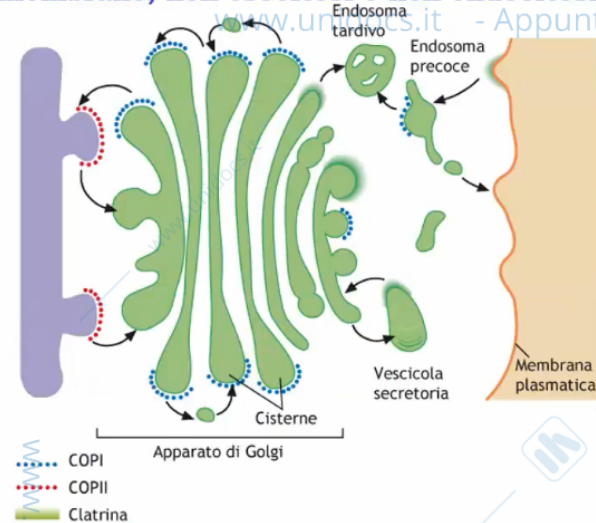
Una volta passata nel RER, la catena polipeptidica subisce un **ripiegamento**, viene portata, attraverso vescicole di trasporto, all'apparato del Golgi dove, sotto forma di **pro-insulina** deve subire la **formazione dei ponti disolfuro**. Esistono degli enzimi che riconoscono gli aminoacidi **cisteina**, che sono posizionati in punti strategici della catena aminoacidica della proinsulina, e danno luogo ad una **reazione di ossidazione** in cui si libera idrogeno e si forma un legame covalente fra due atomi di zolfo: **legame ponte di solfuro**.

La proteina quindi si ripiega per formare i ponti disolfuro, facendole assumere una struttura del tipo rappresentato in figura. Questo è il segnale per far riconoscere la proteina da delle peptidasi specifiche che eliminano la porzione chiamata **catena B** grazie all'idrolisi del legame peptidico. **Rimane quindi l'insulina finale formata da due catene polipeptidiche legate insieme da due ponti disolfuro inter-catena e un ponte disolfuro intra-catena.**

Quindi

quando si considera **l'insulina finale** questo è un **ormone formato da due catene polipeptidiche ma in realtà nasce inizialmente come un'unica catena polipeptidica**: diventano due catene polipeptidiche a seguito di modificazioni post traduzionali che coinvolgono sia il RER sia l'apparato del Golgi. In seguito, dal Golgi, grazie a delle vescicole di secrezione guidate dai microtubuli e dalle proteine motrici, verrà portata alla membrana che provvederà a portarla all'esterno della cellula per poi svolgere la sua funzione all'interno dell'organismo.





Come già detto, il movimento di queste vescicole è guidato dai **microtubuli** e dalle **proteine motrici dineine e chinesine**, ma per riconoscere il tipo di vescicola e capire il tipo di movimento che questa deve fare c'è sempre un **meccanismo di segnali e di riconoscimento**.

Così come l'indirizzamento della proteina, anche il movimento delle vescicole è guidato da una serie di segnali; affinché la vescicola venga riconosciuta dalle chinesine e dalle dineine e venga guidata lungo il binario dei microtubuli, è fondamentale che queste vescicole siano **rivestite**.

Le vescicole sono rivestite da 3 diverse tipologie di proteine. Le proteine di rivestimento più studiate sono le **clatrine** (esempio di endocitosi mediata da recettori) e si trovano nelle **vescicole che si formano per endocitosi** e sono vescicole destinate ad andare **verso i lisosomi** con un **movimento retrogrado**.

Le proteine di rivestimento **COP I** mediano il **movimento retrogrado dall'apparato del Golgi al RER**, mentre le proteine di rivestimento **COP II** riversano le vescicole che dal RER vanno all'apparato del Golgi; quindi per esempio l'insulina verrà trasportata dal RER verso l'apparato del Golgi da vescicole rivestite da proteine COPII.

Le **caveoline** sono state le ultime proteine di rivestimento scoperte ma sono ancora oggetto di studio.

ESEMPIO : una glicoproteina (che si è formata da N - glicosilazione nel RER, destinata alla secrezione)

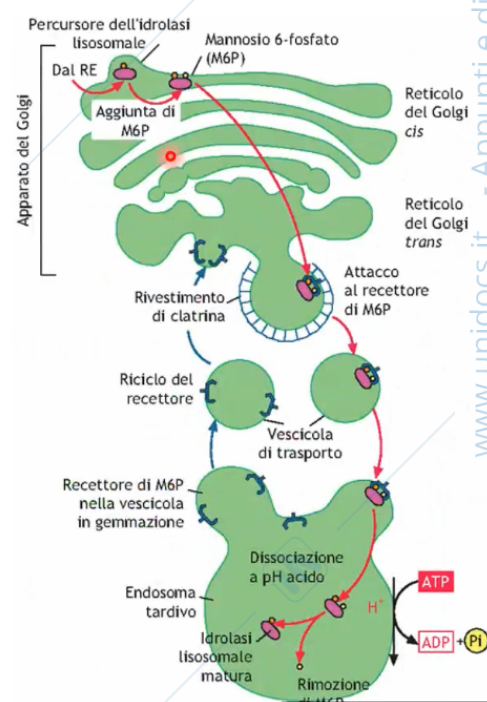
Questa glicoproteina, con la sua parte oligosaccaridica, sarà in grado di riconoscere una proteina recettoriale presente sulla membrana del RER.

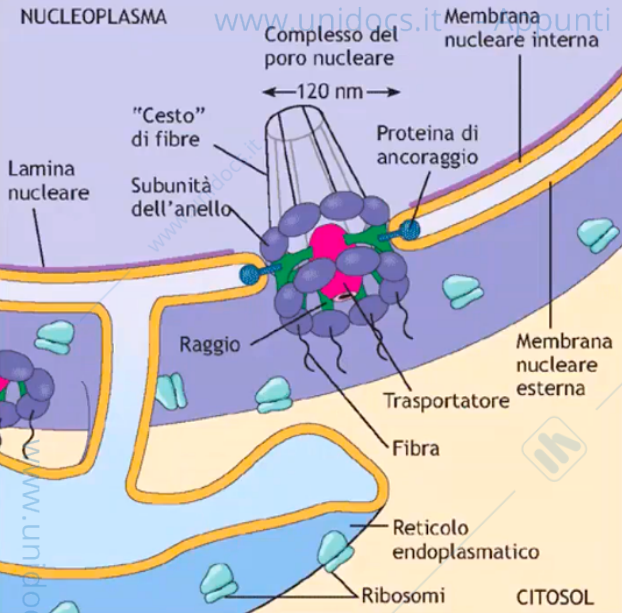
Quando questa proteina si è legata al recettore, si attiva un segnale che porta le **COPII** a rivestire questa parte della membrana e a favorire la formazione della vescicola, con un meccanismo simile a quello nell'endocitosi mediata da recettori con le clatrine.

Una volta formata la struttura, questa viene riconosciuta dalle proteine motrici che, camminando sul microtubulo, portano la vescicola rivestita all'apparato del Golgi, nel quale vi è un riconoscimento del segnale e la fusione con la vescicola e la membrana dell'apparato del Golgi.

Una volta che c'è stata la fusione, quello che è interno al lume della vescicola diventerà parte del lume dell'apparato del Golgi e quindi la **glicoproteina formata nel RER entra nel lume dove continua il suo percorso di modificazioni**.

Il **recettore** invece **deve essere riportato al RER** con un **movimento retrogrado**: c'è infatti un segnale che fa riconoscere questo recettore a proteine specifiche, le proteine di rivestimento **COP I**, le quali favoriscono la formazione di una vescicola del Golgi, rivestita appunto da COPI, la quale, riconosciuta dalle proteine motrici, viene portata, attraverso i microtubuli al RER, dove si fonde con la membrana e si ricicla il recettore. **Tutto il movimento è guidato da dei segnali**.





Le proteine che hanno sede nel reticolo endoplasmatico e che devono essere riciclate hanno sempre un peptide segnale del tipo **KDEL**. Avvengono modifiche chimiche che si verificano nel sistema di endomembrane, ma che non hanno lo scopo di formare la proteina funzionante definitiva: **sono modificazioni post-traduzionali che hanno solo funzione di indirizzamento**.

Un **esempio**

è l'indirizzamento degli enzimi lisosomiali, chiamati **idrolasi acide**, che hanno come destino quello di formare il lisosoma. Tali enzimi si formano con l'indirizzamento co-traduzionale, quindi con il meccanismo visto per le proteine sul RER. Una volta che

si sono formate sul RER, vengono portate all'interno, viene aggiunta una piccola catena oligosaccaridica con l'**N-glicosilazione** e vengono trasportate, grazie a delle vescicole rivestite dalla proteina COP I, nell'apparato del Golgi.

Nell'apparato del Golgi, questa catena oligosaccaridica viene modificata: si eliminano tutte le catene oligosaccaridiche e si aggiunge soltanto **un'unità di mannosio**, che viene ulteriormente fosforilato formando il **mannosio 6-fosfato**.

In questo caso **la modifica chimica serve solo per indirizzare l'enzima** che diventerà poi idrolasi acida in presenza di un pH acido a quello che sarà il lisosoma.

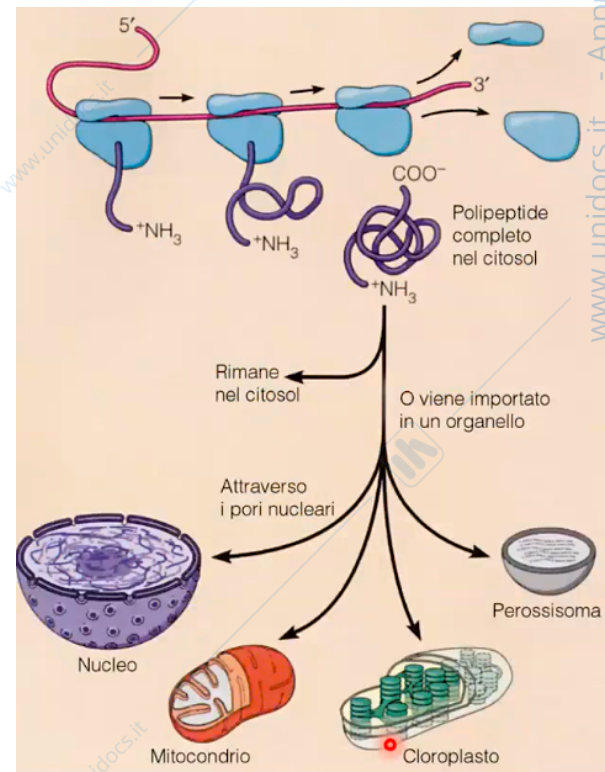
A livello dell'apparato del Golgi si ha un recettore specifico, sulla membrana, che riconosce il mannosio 6-fosfato, si ha la formazione della vescicola rivestita, il cui rivestimento è fatto in questo caso dalle **clatrine** (se le proteine sono destinate a diventare parte del lisosoma, anche se questo è un movimento di tipo anterogrado intervengono le clatrine).

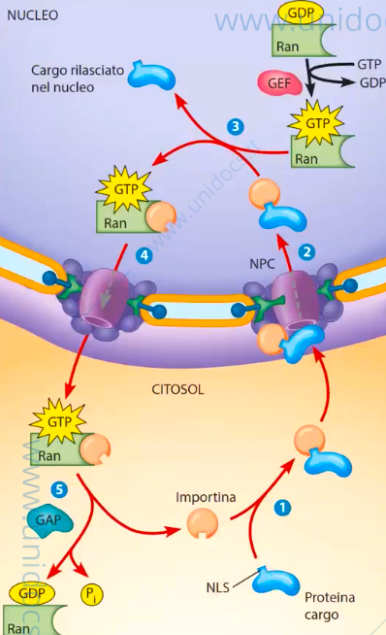
A questo punto la vescicola si stacca ed è destinata a fondersi con un endosoma tardivo, che si è formato per un meccanismo di endocitosi. **La fusione tra la vescicola e l'endosoma formerà il lisosoma funzionante**:

una volta entrato all'interno, il pH acido fa dissociare l'enzima con la modificazione dal suo recettore, la membrana, che contiene il recettore, viene aiutata a formare una vescicola che verrà riportata verso l'apparato del Golgi per riciclare il recettore.

L'enzima invece prima di diventare funzionante deve vedere la rimozione del mannosio 6-fosfato, a questo punto diventa una proteina matura e può, grazie al pH acido, iniziare a svolgere la sua funzione.

L'**indirizzamento post-traduzionale** invece vede le proteine sintetizzate completamente nel citoplasma, quindi i ribosomi cominciano e finiscono la sintesi proteica nel citoplasma e si ha poi un indirizzamento, attraverso diversi segnali, negli organelli come il nucleoplasma, i perossisomi, il mitocondrio, il cloroplasto e anche le proteine che rimangono proteine del citoplasma.



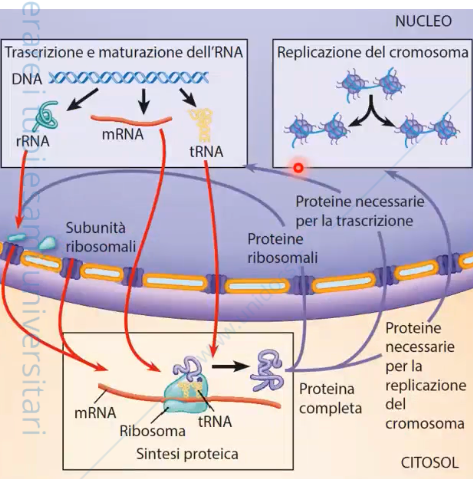
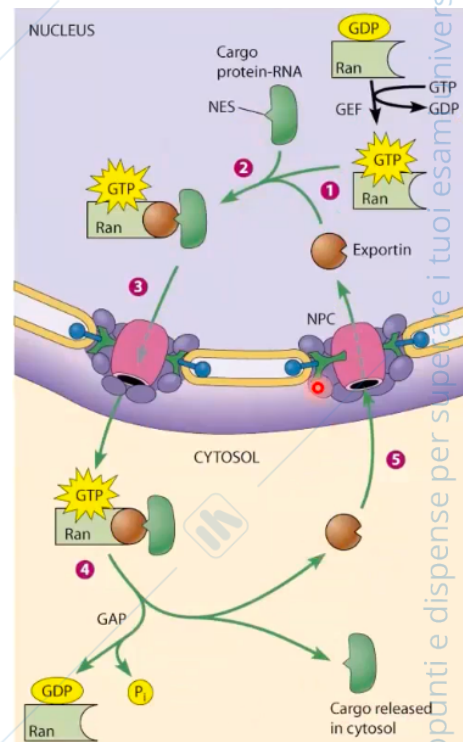


Per quanto riguarda il **nucleoplasma**, il trasporto della proteina avviene attraverso i **pori nucleari**, strutture transmembrana molto complesse. La **sequenza segnale** presente nella proteina all'interno è **specifico per il nucleoplasma**.

Quindi la proteina, dopo essere stata tradotta e dopo aver assunto la sua struttura nativa, viene riconosciuta mediante il segnale di riconoscimento (che rimane nella forma di struttura primaria per poter essere riconosciuta) da una proteina del citoplasma si chiama **importina**. Questa importina riconosce il segnale e si formano quindi delle interazioni deboli tra l'importina e la proteina da trasportare, chiamata proteina **CARGO**.

Questa associazione porta il complesso a muoversi verso il poro nucleare che, con un **trasporto attivo**, fa passare il complesso nel nucleoplasma, dove l'importina si dissocia dalla proteina CARGO, grazie all'intervento di un'ulteriore proteina chiamata **Ran**.

Questa proteina Ran è in grado di legare la **GTP**, che permetterà poi di riciclare l'importina e liberare la proteina CARGO nel citoplasma. La proteina Ran va a legare la proteina importina e in questo modo favorisce il distacco della **CARGO**, la quale **rimane nel nucleoplasma** mentre il **complesso importina-Ran-GTP** passano attraverso il poro nucleare e **si ritrovano nel citoplasma**. Nel **citoplasma** si attiva l'attività idrolitica della Ran, infatti la GTP viene idrolizzata a GDP e l'importina viene liberata, in questo modo si può rifare il ciclo.



Si può avere anche un traffico che va dal nucleoplasma al citoplasma, (già visto per esempio nella formazione dei ribosomi) le **proteine dei ribosomi** infatti vengono prodotte con questo meccanismo. Queste proteine, una volta prodotte, passano con la proteina Ran, il GTP e l'importina nel nucleoplasma, vengono portate a **livello del nucleolo**, dove trovano la componente di **RNA ribosomiale** a cui si associano per formare la subunità maggior e minore.

Tuttavia queste subunità devono fare la traduzione nel **citoplasma** e quindi **devono essere esportate fuori**, attraverso un meccanismo del tutto simile a quello appena descritto dell'importazione,

utilizzando un segnale presente nel complesso ribonucleoproteico della subunità maggior e minore del ribosoma (ma che è presente in ogni proteina che deve essere portata fuori dal nucleoplasma).

MECCANISMO DI TRASPORTO DELLE MACROMOLECOLE FUORI DAL NUCLEO

Si ha una **sequenza segnale di esportazione** riconosciuta in questo caso da una proteina chiamata **esportina**. Il legame fra la proteina CARGO da esportare e l'esportina è favorito dalla proteina **Ran-GTP**, la quale appunto forma il complesso **esportina - proteina CARGO**. Questo è il segnale che permette il passaggio del complesso, attraverso i pori nucleari, verso il **citoplasma**, dove si attiva l'attività idrolitica della proteina Ran per cui si forma **GDP** e si libera il **gruppo fosfato**. Questo è il segnale per il distacco di tutti i complessi; in seguito la Ran e l'esportina verranno riciclate all'interno del nucleoplasma.

Oltre ai ribosomi, altro esempi di proteine che sono importate nel nucleoplasma con questo meccanismo sono gli **istoni**.

Le proteine invece destinate a far parte dei mitocondri (quelle di origine nucleare) sono prodotte interamente dai ribosomi liberi nel citoplasma e trasportata al mitocondrio (come anche al cloroplasto) con una struttura primaria non ripiegata, poiché il canale, attraverso il quale le proteine mitocondriali (e anche quelle del cloroplasto) devono passare, è un canale molto piccolo e non grande come il poro nucleare (che permette il passaggio anche di proteine ripiegate).

Sulla membrana del mitocondrio e del cloroplasto si trova un **canale specifico** in grado di far passare la proteina e un **recettore** che riconosce la proteina che deve essere fatta entrare all'interno dell'organello.

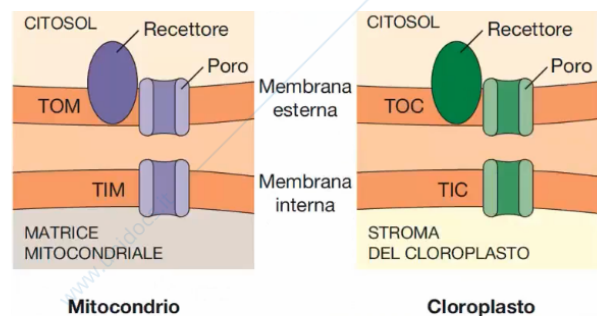
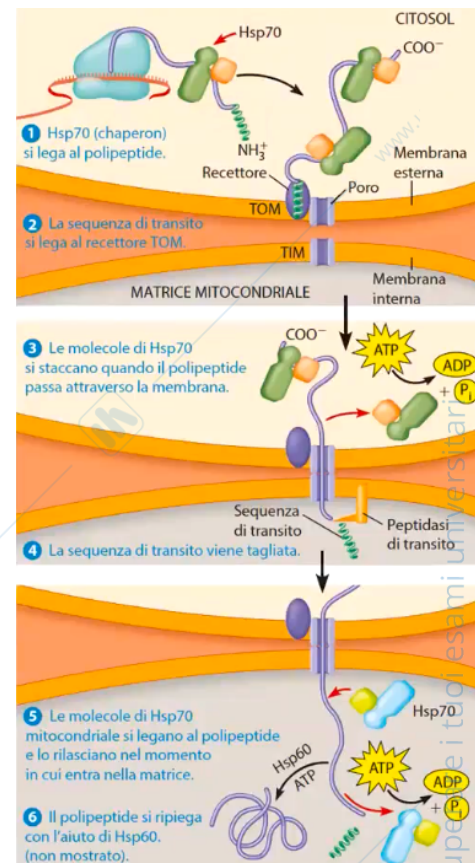
Il recettore presente sulla membrana esterna del mitocondrio viene chiamato **TOM** che sta per **traslocatore della membrana esterna mitocondriale**; si ha poi nella membrana interna un altro traslocatore mitocondriale interno chiamato **TIM**.

Il **complesso TOM - TIM** nel mitocondrio è responsabile dell'indirizzamento delle proteine all'interno del mitocondrio; per analogia si ha il **complesso TOC-TIC** nel cloroplasto.

Si ha la sintesi definitiva della proteina nel citoplasma e in questo caso, quando si ha il peptide segnale di riconoscimento per il mitocondrio (come per il cloroplasto), interviene una chaperonina chiamata **Hsp 70 (hit shock protein)** che riconosce il peptide segnale e fa sì che la proteina mantenga la **struttura primaria lineare** (al contrario di tutte le altre chaperonine che invece aiutano la proteina a ripiegarsi).

La proteina viene portata a livello della membrana esterna mitocondriale e il riconoscimento tra la proteina e il recettore di membrana è dato dal **peptide segnale**. In questo caso è proprio il peptide segnale che riconosce la proteina TOM sulla membrana esterna del mitocondrio, il segnale permette un **riarrangiamento** della proteina TOM e l'apertura del poro.

Una volta che il peptide segnale ha riconosciuto il suo recettore, c'è un riarrangiamento della struttura della membrana interna mitocondriale e della membrana esterna, le due membrane si avvicinano e mettono in comunicazione i due canali, **creando un unico canale tra le due**

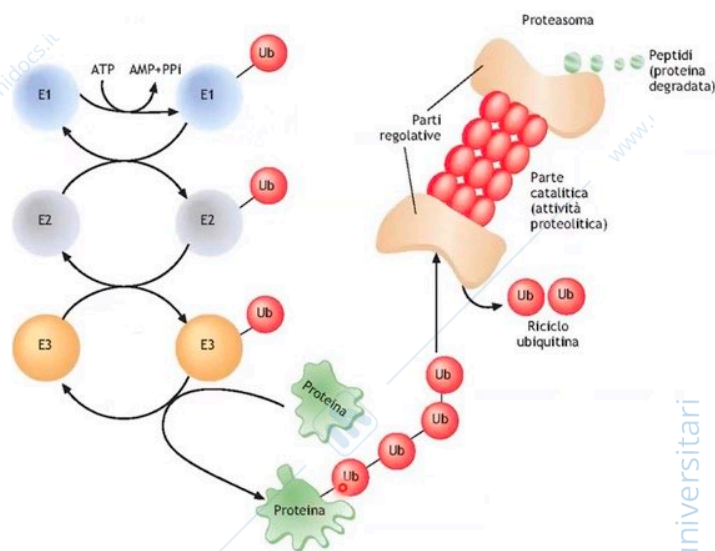


membrane che mette in comunicazione la proteina che si è legata a livello del TOM direttamente con la matrice mitocondriale.

L'avvicinamento delle due membrane permette alla proteina, con l'ausilio delle **Hsp70**, di passare a livello del canale e raggiungere la matrice mitocondriale. In questo punto si ha una **peptidasi** del segnale che rimuove il peptide segnale, bloccando quindi la proteina all'interno della matrice mitocondriale; mentre a livello della parte citoplasmatica, le Hsp70 si distaccano dalla proteina, con l'ausilio dell'idrolisi dell'ATP.

Nella parte interna, invece, una volta che la proteina è passata completamente, questa deve assumere la sua **struttura nativa** (terziaria o quaternaria), grazie all'intervento della famiglia delle Hsp mitocondriali, in questo caso le proteine 70, che con l'idrolisi dell'ATP aiutano il ripiegamento della proteina, e la proteina può andare incontro al suo destino.

Se però la proteina è destinata a diventare una componente della membrana mitocondriale, c'è un meccanismo analogo a quello delle proteine transmembrana del RER, che permette alla proteina di rimanere all'interno della membrana mitocondriale. Esiste un ulteriore segnale che permette non l'avvicinamento del complesso TIM-TOM, ma che fa spostare la proteina, una volta raggiunto il canale TIM, lateralmente all'interno della membrana. Queste proteine comunque vada passano nel mitocondrio in forma denaturata, altrimenti sarebbero troppo grandi per passare nel complesso TIM-TOM.



•DEGRADAZIONE

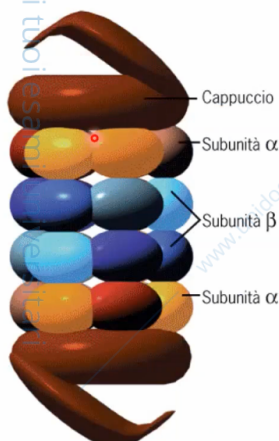
Il **destino finale della proteina** è quello di essere **degradata**; tutte le proteine hanno un ricambio e per ogni famiglia di proteine è possibile calcolare il **tempo di emivita**, ovvero il tempo necessario durante il quale si può avere un rinnovamento del 50% di tutto il quadro proteico di quella famiglia all'interno della cellula.

Tale ricambio è necessario perché le proteine **invecchiano** o possono essere **danneggiate**.

Nel nostro organismo abbiamo diversi meccanismi per eliminare le proteine invecchiate o danneggiate: uno di quelli principali è quello che prevede l'intervento di una **struttura sovra molecolare** così tanto complessa da poter essere **paragonata ad un organello** chiamata **proteasoma**. È composto da molte proteine:

- alcuni enzimi **responsabili della degradazione della proteina**, che si ottiene andando a idrolizzare i legami peptidici tra gli amminoacidi e liberando quindi i vari monomeri del polimero,
- una parte di proteine con **funzione strutturale** che formano appunto proprio alla struttura del proteasoma.

La struttura del proteasoma ha una forma di un cilindro cavo, all'interno del quale viene fatta passare la proteina destinata alla degradazione. Durante il passaggio incontra le varie subunità con attività catalitica di peptidasi che idrolizzano i legami peptidici riconoscendoli a livello di specifici amminoacidi.



Cappuccio
Subunità α
Subunità β
Subunità α

MECCANISMO DI DEGRADAZIONE

Per poter essere degradata all'interno del proteasoma, la proteina deve essere **etichettata**, quindi di nuovo ricorre un segnale che indica che la proteina in questione è destinata alla degradazione.

Per fare questo le proteine devono essere **ubiquitinate**. Con un meccanismo, si ha una serie di enzimi in grado di prendere una proteina piccola chiamata **ubiquitina** (perché presente in tutti gli esseri viventi, eucarioti e procarioti) e legarla alla proteina destinata alla degradazione. La proteina da degradare quindi risulterà **poliubiquitinata**, avrà quindi una lunga etichetta , formata da tante ubiquitine tutte in fila che la indirizzerà verso il proteasoma.

All'interno del proteasoma poi verranno idrolizzati tutti i legami peptidici, rimossa l'ubiquitina (che può essere riciclata) e **ciò che si ottiene sono i singoli amminoacidi**.

Le

proteine vengono degradate quando sono danneggiate, quando subiscono un mal ripiegamento che le chaperonine non sono in grado di sistemare, quindi in questo caso le proteine ,dette **missfoldate** , **vengono veicolate nel citoplasma, vengono poliubiquitinate e poi degradate a livello del proteasoma**.

Ovviamente questo non è l'unico modo per degradare le proteine ma di sicuro è uno dei più importanti.

Una **proteina mal ripiegata** che **non** viene **né aiutata dalle chaperonine né degradata con il proteasoma**, è destinata generalmente a **precipitare nella cellula** perché diventa una **proteina insolubile** che si aggrega ad altre proteine insolubili formando delle **placche proteiche** chiamate **fibrille**, che non possono essere più risolubilizzate.

Queste fibrille **non** vengono riconosciute dagli enzimi per attaccare l'ubiquitina e quindi non vengono degradate con il complesso del proteasoma.

Quando si formano queste placche proteiche, la cellula, se è in grado, può decidere di **andare incontro a morte cellulare programmata** e quindi , attivando il mitocondrio, è in grado di suicidarsi : questo è un vantaggio enorme (soprattutto per gli eucarioti pluricellulari) poiché **la cellula danneggiata viene eliminata non creando danni ai tessuti circostanti**.

Se invece

questo non è possibile la placca di proteine missfoldate può portare all'insorgenza di patologie ,soprattutto neurodegenerative, come per esempio la **SLA**, il **Parkinson** e **l'Alzheimer**, che oggi si sa essere patologie legate proprio a questo processo.

La ricerca in questi ultimi anni ha fatto molti passi avanti grazie a questa scoperta, proprio perché si è riuscito a identificare le proteine responsabili ; ciò che si deve capire è come poter risolvere questo danno poiché le cellule, una volta che si è formato questo precipitato, **sono insensibili all'attivazione del processo di apoptosi**. L'unico modo per queste cellule di andare incontro alla morte è quello di **necrosi** che tuttavia è un processo dannoso per l'organismo poiché questo induce infiammazione, quindi tutto il tessuto che presenta cellule morte per necrosi va incontro ad un grosso danno, infatti il problema di queste patologie è il fatto che il tessuto va incontro progressivamente alla distruzione.

