

## PROTEOLISI INTRACELLULARE

### Funzioni biologiche:

- Rimozione di proteine anormali o danneggiate (sintetizzate con errori, mal ripiegate, ossidate, denaturate) il cui accumulo potrebbe rivelarsi tossico per la cellula;
- Rimozione altamente specifica di proteine regolatorie (es. fattori di trascrizione, proteine che regolano il ciclo cellulare, proteine coinvolte nella trasduzione del segnale) per far terminare o proseguire determinati processi cellulari e quindi permettere alla cellula di adattarsi a mutate condizioni fisiologiche;
- Produzione di amino acidi utilizzati nella gluconeogenesi o nella produzione di energia in stati di digiuno prolungato o di malattie cataboliche (cachessia a seguito di cancro, diabete insulino-dipendente, sepsi, insufficienza renale cronica);
- Attivazione di enzimi mediante proteolisi parziale (es. NF-kB, caspasi).

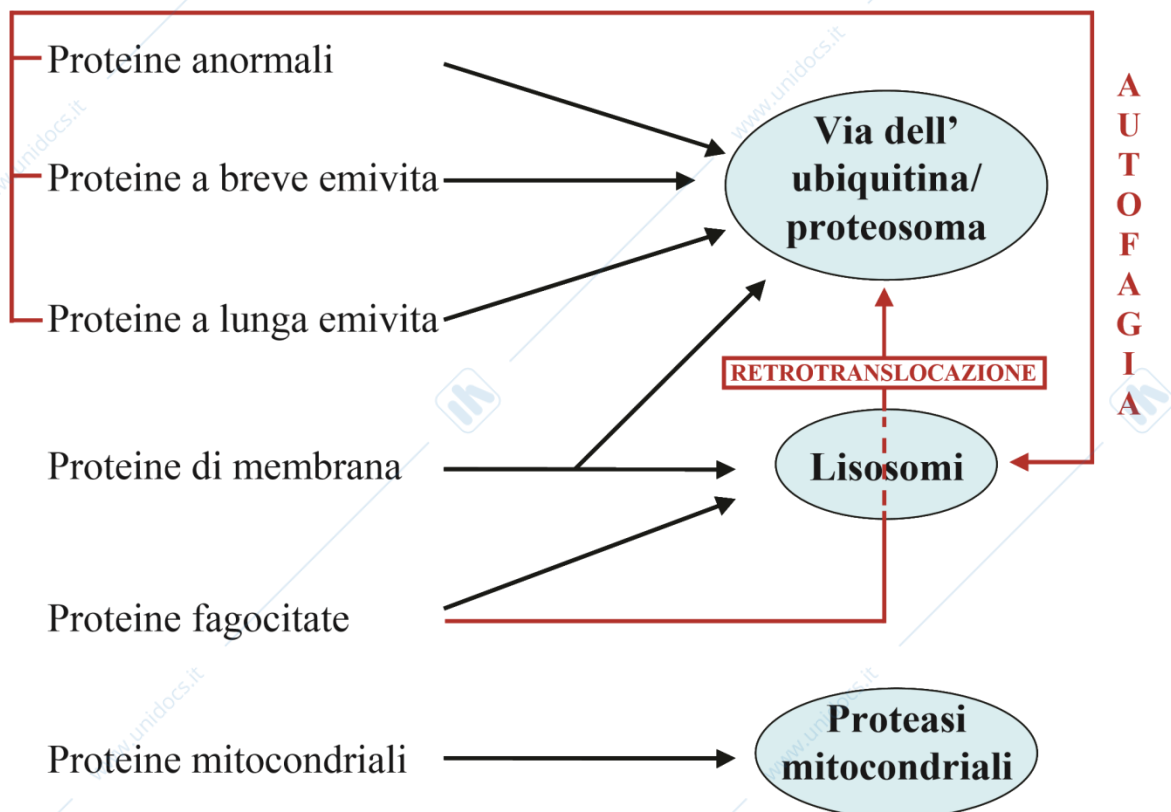
### Emivita di una proteina:

Tempo necessario affinché venga degradata la metà della quantità di proteina sintetizzata in un determinato momento.

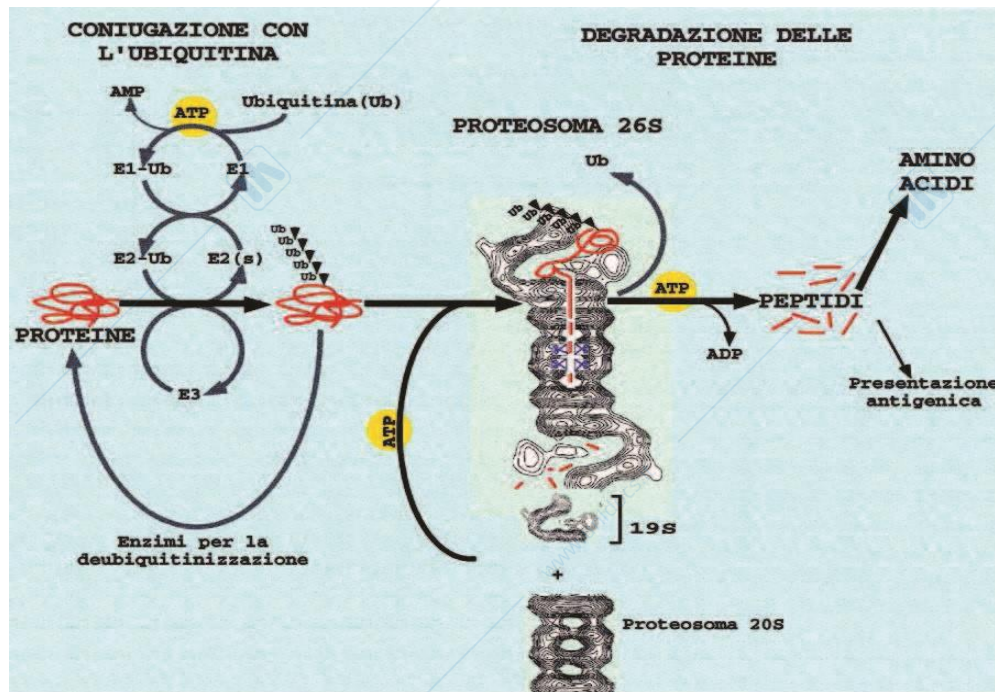
L'emivita delle proteine cellulari varia da:

Pochi minuti	es. Proteine regolatorie
Giorni o settimane	es. Actina e Miosina
Mesi	es. Emoglobina
Anni	es. Cristallina

## Sistemi proteolitici cellulari

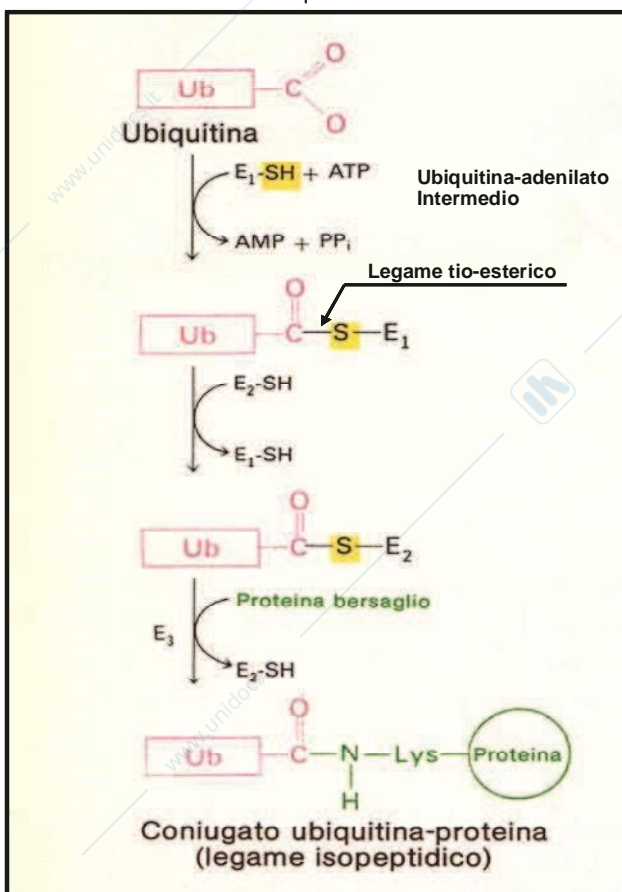


La necessità di idrolizzare l'ATP per degradare le proteine è un fenomeno difficile da spiegare poiché l'idrolisi del legame peptidico è un processo termodinamicamente favorevole (esoergonico, che libera cioè energia).



## Ubiquitina

- 76 residui aminoacidici
- Residuo C terminale: Glicina
- Presente in tutti gli Eucarioti ma non nei Procarioti
- E' la proteina conosciuta più conservata: solo 3 residui differenti tra quella dell'uomo e quella del lievito



E1: Ub-activating enzyme

E2: Ub-conjugating enzymes

E3: Ub-protein ligases

Di questi enzimi ne esistono:

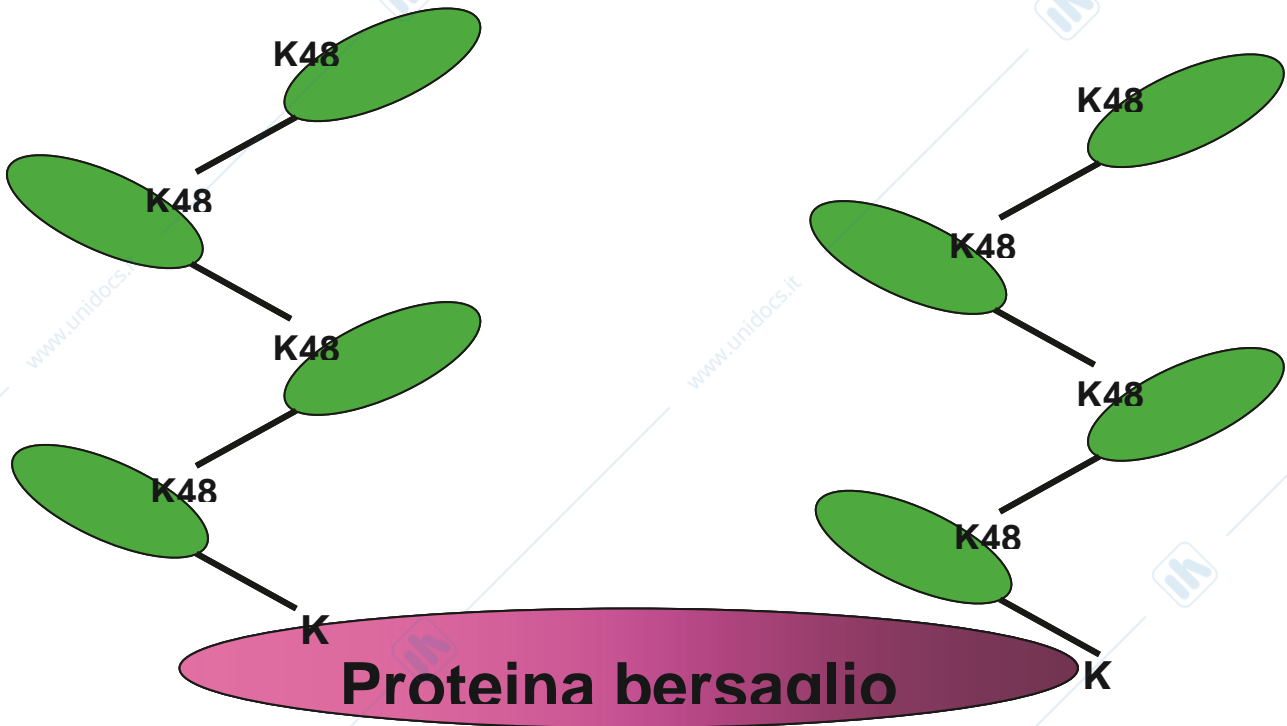
E1 Un solo tipo

E2 Parecchie centinaia di tipi diversi

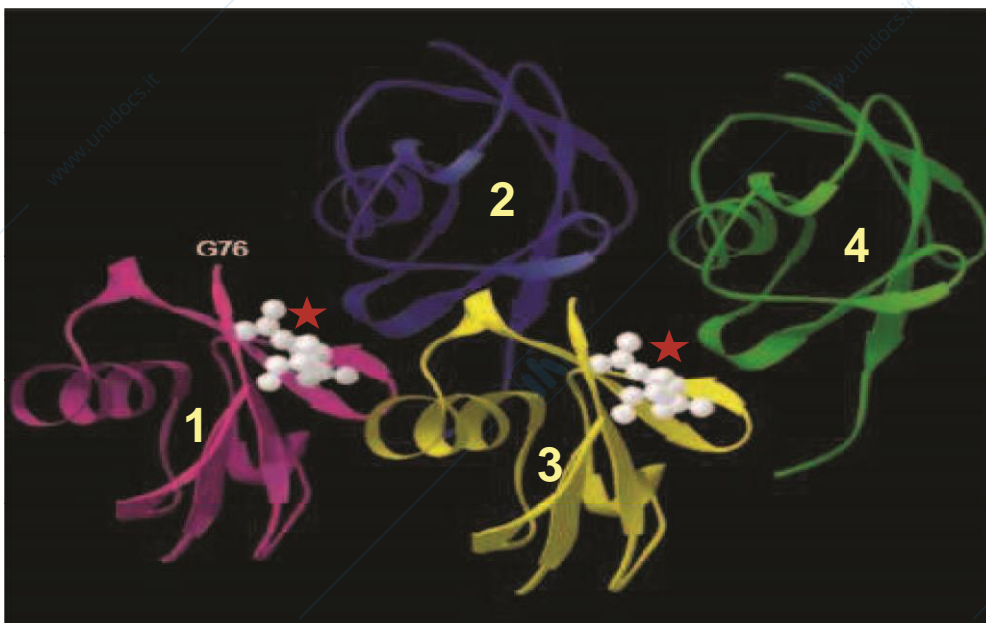
E3 Parecchie migliaia di tipi diversi

La reazione di ubiquitinizzazione è estremamente selettiva (viene, cioè, ubiquitinata specificatamente una determinata proteina e non tutte le altre) poiché E1 trasferisce l'Ub ad uno delle varie centinaia di E2 e questo E2 si associa con uno solo delle parecchie migliaia di E3.

Esistono perciò tantissime combinazioni di E2-E3 ciascuna specifica per una determinata proteina che deve essere ubiquitinata.

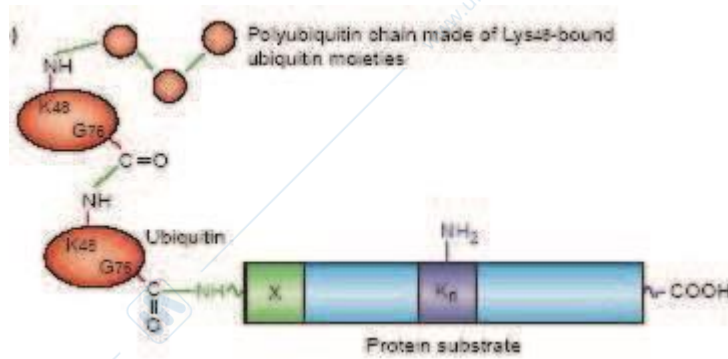


### Structure of UB4



★ = L8, I44, V70

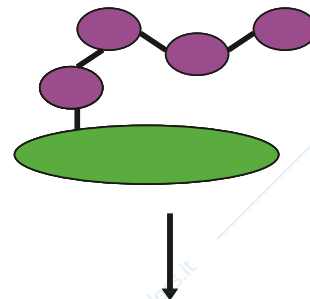
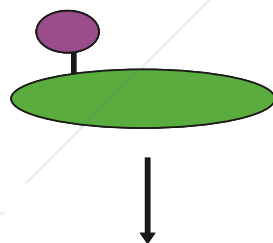
## N-terminal ubiquitination



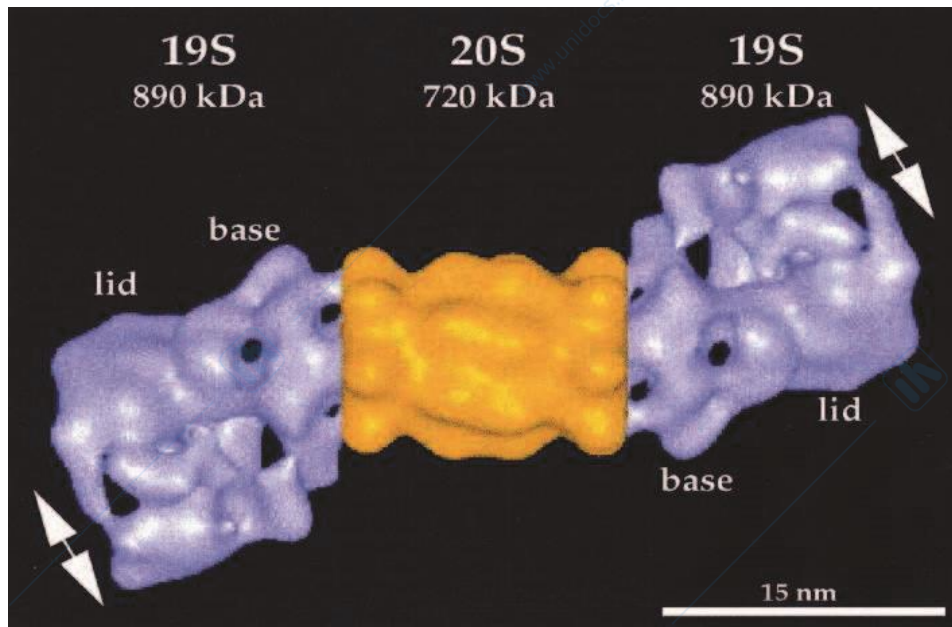
## N-end rule

Residuo Emivita N-terminale

Residuo	Emivita N-terminale
<b>Stabilizzante</b>	
Met	>20h
Ser	
Ala	
Thr	
Val	
Gly	
<b>Destabilizzante</b>	
Ile	~30min
Glu	
Tyr	~10min
Gln	
<b>Altamente destabilizzante</b>	
Phe	~3min
Leu	
Asp	
Lys	
Arg	~2min

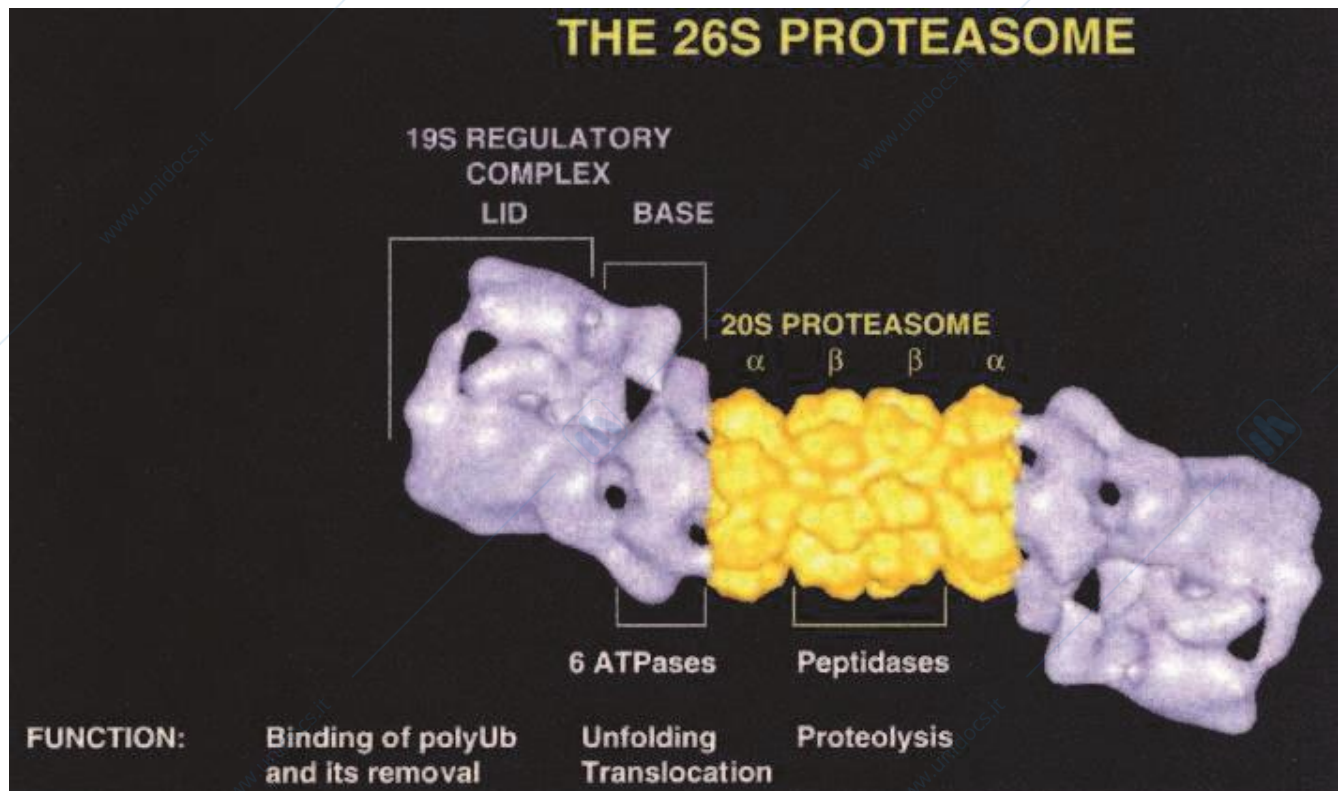


STRUTTURA CROMATINA  
 ENDOCITOSI RECETTORI  
 ATTIVAZIONE FATTORI DI TRASCRIZIONE RIPARAZIONE DNA



## PROTEASOMA 26S

- Estremamente abbondante (costituisce l'1-2% di tutte le proteine cellulari);
- Presente sia nel nucleo che nel citoplasma;
- Molto grande: Peso Molecolare 2.4 MDa, formato da almeno 30 subunità diverse.

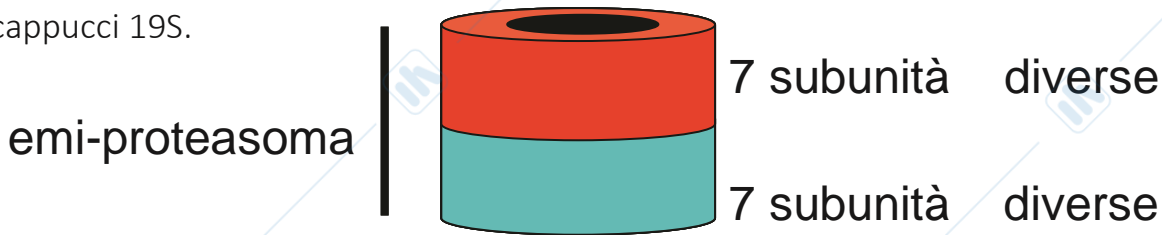


Il proteasoma 26S risulta a sua volta costituito da un core centrale detto *proteasoma 20S* alle cui estremità sono associati 2 cappucci 19S.

Il proteasoma 20S ha una struttura a cilindro cavo internamente, formato dall'unione di 4 anelli di 7 subunità ciascuno (in totale 28 subunità di 14 tipi diversi).

I due anelli centrali (costituiti da subunità ) contengono i siti proteolitici.

I due anelli esterni (costituiti da subunità ) connettono la "camera proteolitica" centrale ai cappucci 19S.



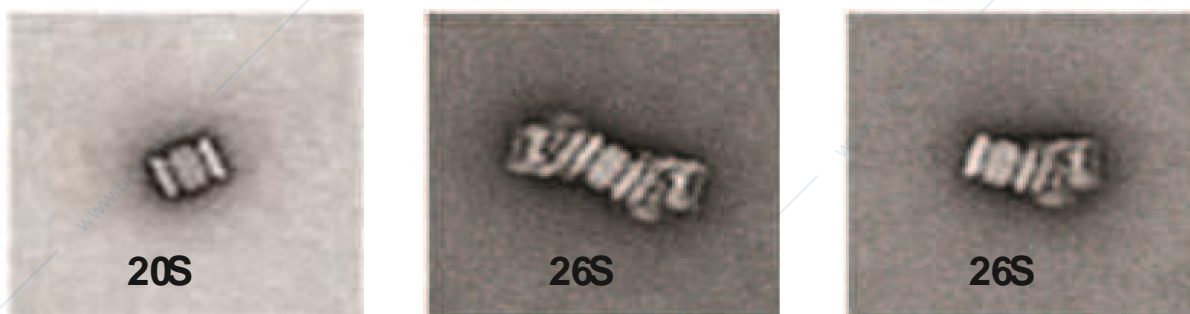
L'unione di 2 emi-proteasomi porta alla formazione di un proteasoma 20S maturo.

I cappucci 19S sono costituiti da un anello di subunità aventi attività ATPasica (Base) e da una struttura più esterna formata anch'essa da molte subunità (Lid o Coperchio).

L'idrolisi dell'ATP ad opera delle subunità della Base fornisce l'energia per riconoscere le proteine ubiquitinate, denaturarle (in modo che possano entrare all'interno del 20S) e permetterne l'ingresso nel 20S (aprendo il gate che normalmente chiude le estremità del 20S).

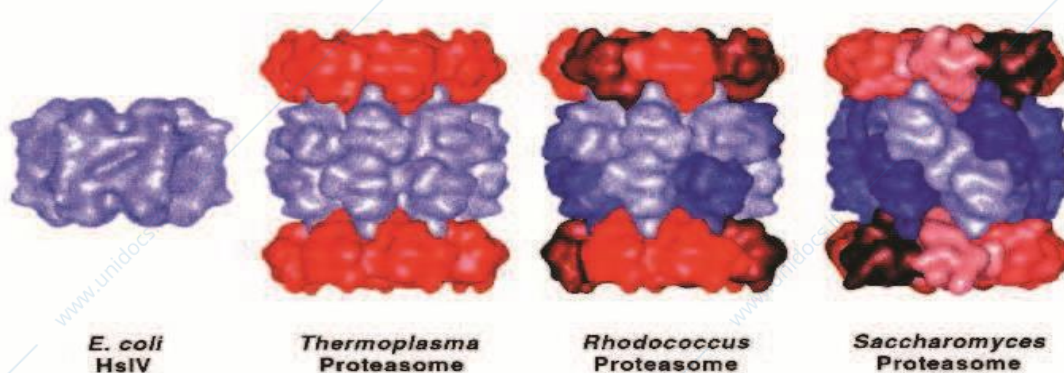
Le proteine del Lid staccano l'albero poliubiquitinico in modo che le molecole di Ub possano venire riciclate.

**Different forms of Proteasomes** (average images of electron micrographs)

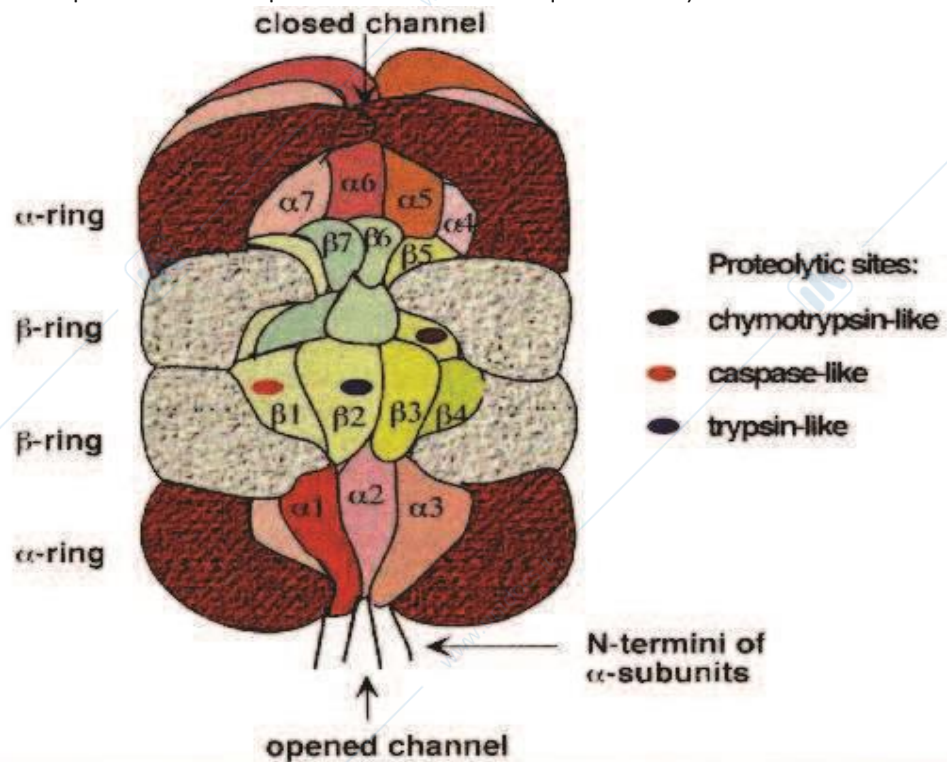


Questa

struttura compartimentalizzata del proteasoma si è conservata durante l'evoluzione perché essendo i siti proteoliticamente attivi racchiusi all'interno della proteasi (quindi isolati dal citosol) si evita la degradazione aspecifica delle proteine cellulari.



Il proteasoma è presente nelle cellule eucariotiche e in alcuni batteri (non in *E. Coli* che presenta, invece, altre proteasi compartmentalizzate quali HslV).



Il proteasoma degli eucarioti presenta 6 subunità cataliticamente attive di 3 tipi diversi. Tali subunità vengono classificate in base alla specificità di taglio, vale a dire al tipo di aminoacido a livello del quale preferenzialmente idrolizzano il legame peptidico.

2 subunità presentano attività *Chimotripsino-simile* = idrolizzano il legame peptidico dopo aminoacidi idrofobici;

2 subunità presentano attività *Trispino-simile* = idrolizzano il legame peptidico dopo aminoacidi basici;

2 subunità presentano attività *Caspasi-simile* = idrolizzano il legame peptidico dopo aminoacidi acidi.

Come risultato complessivo la proteina viene idrolizzata con un meccanismo progressivo in peptidi di lunghezza compresa tra 2 e circa 20 aminoacidi.

Tali peptidi vengono poi rapidamente idrolizzati ad aminoacidi dalle numerose amino ed endo peptidasi presenti nella cellula.

### Ruolo della via dell'Ubiquitina-Proteasoma nella patogenesi di alcune malattie

- CANCRO
- MALATTIE NEURODEGENERATIVE
- FIBROSI CISTICA
- RISPOSTA INFIAMMATORIA
- PERDITA DI MASSA MUSCOLARE

MECCANISMI PRINCIPALI:

- ALTERAZIONI CHE PORTANO AD UNA RIDOTTA DEGRADAZIONE (STABILIZZAZIONE) DI DETERMINATE PROTEINE;
- ALTERAZIONI CHE PORTANO AD UNA ACCRESCIUTA DEGRADAZIONE DI DETERMINATE PROTEINE.

## CANCRO

Molte forme di tumori sono causate dalla presenza di prodotti di **Oncogeni** o dalla ridotta presenza di **Oncosoppressori**.

### Oncogene

Gene che codifica per una proteina in grado di indurre il cancro.

Normalmente oncogene da solo non è in grado di determinare il cancro, ma deve agire in concomitanza con mutazioni in altri geni o fattori ambientali (es. infezione virale).

Gli oncogeni quasi sempre derivano da normali geni cellulari chiamati **Protooncogeni**.

I **proto-oncogeni** codificano per normali proteine cellulari che di solito regolano la crescita o il differenziamento cellulare (es. proteine coinvolte nella trasduzione del segnale o nella regolazione della mitosi, fattori di crescita o loro recettori).

Un proto-oncogene può trasformarsi in un oncogene (attivazione del protooncogene).

L'attivazione può essere il risultato di:

- Mutazione puntiforme nel proto-oncogene con conseguente sintesi di una proteina alterata caratterizzata o da un'accresciuta attività enzimatica o dall'insensibilità a normali meccanismi di controllo.
- Aumento della concentrazione intracellulare della proteina codificata dal protooncogene a seguito di un'accresciuta sintesi (causata, ad esempio, da una duplicazione genica o da una traslocazione cromosomica, per cui il protooncogene viene a trovarsi sotto il controllo di un promotore molto più forte) o di una ridotta degradazione (stabilizzazione dell'onco-proteina).

Nel primo caso l'onco-proteina è una proteina modificata mentre nel secondo caso è una proteina normale ma presente in quantità eccessiva.

### Antioncogeni

Geni la cui inattivazione contribuisce all'insorgenza dei tumori.

Codificano per proteine (**Oncosoppressori**) che:

- Rallentano o inibiscono la progressione attraverso una specifica fase del ciclo cellulare;
- Impediscono il proseguimento del ciclo cellulare se il DNA è danneggiato o se sono presenti anomalie cromosomiche;
- Promuovono l'apoptosi (Morte cellulare programmata);
- Riparano il DNA;
- Sono recettori per ormoni che inibiscono la moltiplicazione cellulare.

Molte forme tumorali sono caratterizzate da alterazioni della via dell'Ubiquitina Proteasoma che causano:

- Stabilizzazione (= ridotta degradazione) di oncoproteine;
- Destabilizzazione (= accresciuta degradazione) di oncosoppressori.

### Oncoproteina v-Jun

c-Jun Fattore di trascrizione a *serratura di leucina* che è attivo in forma di omodimeri o di eterodimeri (legato a c-Fos).

Attiva la trascrizione di geni che codificano per proteine che promuovono la crescita cellulare e inibisce la trascrizione di geni che codificano per proteine che invece la bloccano.

Normalmente c-Jun viene rapidamente ubiquitinato e degradato dal proteasoma 26S (Questo meccanismo ne limita l'attività). c-Jun è un proto-oncogene che si può trasformare nell'oncogene v-Jun.

v-Jun: a seguito di una mutazione manca dei residui aminoacidici 31-57 che sono quelli indispensabili per la rapida ubiquitinazione della proteina. v-Jun viene perciò scarsamente degradato e svolge in continuazione la sua attività.

L'azione persistente di v-jun è una delle concause che inducono la trasformazione neoplastica in certi tipi di tumore.

### P53

- Oncosoppressore le cui mutazioni sono quelle più frequentemente osservate nei tumori maligni umani;
- E' un fattore di trascrizione attivo in forma tetramericata;
- Normalmente la sua concentrazione è molto bassa ma aumenta se il DNA cellulare viene danneggiato;
- Controlla la trascrizione di geni che causano l'arresto del ciclo cellulare in G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub> fino a quando il danno del DNA non viene riparato;
- Se il danno del DNA è irreparabile induce la trascrizione di geni che causano apoptosi.

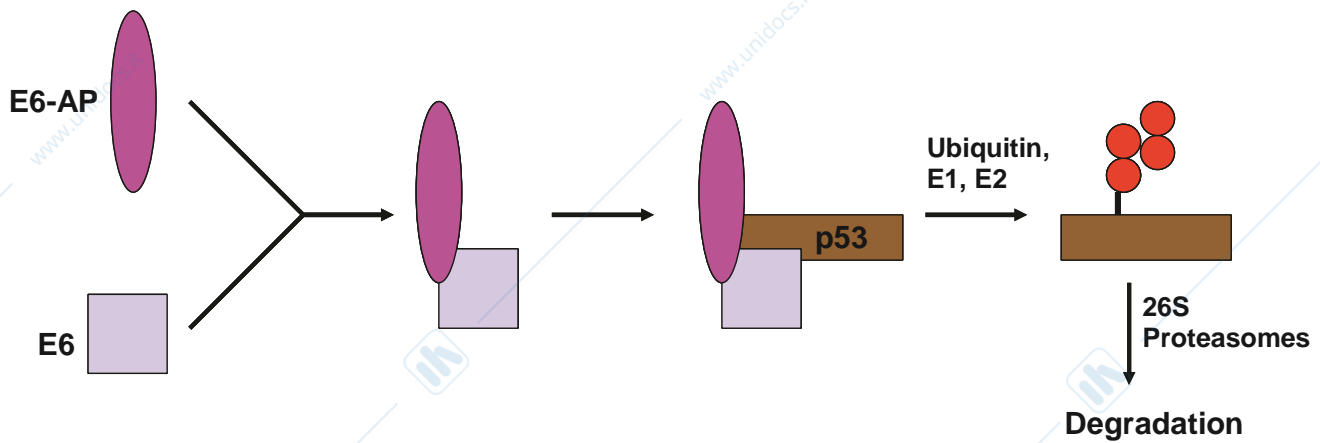
P53 viene normalmente degradato dal proteasoma 26S dopo essere stato ubiquitinato da un enzima E3 specifico chiamato MDM2.

A seguito di danni del DNA si attivano delle cinasi specifiche che fosforilano P53 proteggendolo dall'azione di MDM2. P53 viene meno degradato e può pertanto svolgere la sua azione di oncosoppressore. →

In molte forme tumorali i livelli di MDM2 sono notevolmente aumentati e questo provoca una degradazione eccessiva di P53.

Alcuni genotipi del Papillomavirus umano (HPV) sono in grado di provocare la comparsa di tumori (es. Carcinoma della cervice dell'utero) alterando i normali meccanismi di degradazione proteasomale di P53.

Recentemente è stato messo in commercio un vaccino contro i tipi di HPV ad alto rischio che si è dimostrato estremamente efficace nel prevenire l'insorgenza del carcinoma della cervice dell'utero. Si tratta del primo vaccino anti-tumorale che viene commercializzato.



Meccanismo dell'ubiquitinazione e degradazione di P53 indotto dalla proteina E6 del Papillomavirus umano.

E6-AP: normale proteina cellulare avente funzione di E3

E6: oncoproteina virale

In cellule non infettate da HPV E6-AP induce l'ubiquitinazione di alcune proteine cellulari ma non di P53.

I genotipi di HPV a basso rischio presentano una proteina E6 leggermente diversa che non consente la degradazione di P53.

### Malattie Neurodegenerative

Malattie caratterizzate da una progressiva perdita dei neuroni del Sistema Nervoso Centrale.

Tutte le principali malattie neurodegenerative sono caratterizzate dall'accumulo nei neuroni di aggregati di proteine denaturate spesso associate con componenti della via degradativa dell'ubiquitina-proteasoma.

Malattia	Corpi Inclusi	Principali costituenti
Malattia di Alzheimer	Aggregati Neurofibrillari	proteina Tau
Parkinson	Corpi di Lewy	-sinucleina, parkina
Demenza a corpi di Lewy	Corpi di Lewy	-sinucleina
Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)	Corpi di Bunina	Superossidodismutasi (SOD), neurofilamenti
Malattia di Huntington	Inclusioni nucleari e citoplasmatiche	Huntingtina mutata (con ripetizioni di Glutamina – Poly Q)
Atassia Spinocerebellare	Inclusioni nucleari e citoplasmatiche	atassina mutata (con ripetizioni di Glutamina – Poly Q)

Nella patogenesi di tutte queste malattie neurodegenerative si ipotizza un ruolo importante della via dell'ubiquitina-proteasoma sulla base delle seguenti considerazioni:

- Le proteine denaturate normalmente vengono eliminate dalla via dell'ubiquitina-proteasoma;
- La presenza di componenti della via dell'ubiquitina-proteasoma nei corpi

inclusi tipici di queste malattie.

Nel caso delle malattie neurodegenerative tuttavia è più difficile stabilire una correlazione diretta di causa-effetto tra l'insorgenza della malattia e le alterazioni della via dell'ubiquitina-proteasoma.

Non è infatti ancora ben chiaro se gli aggregati proteici si formano perché:

- Mutazioni nelle proteine le rendono resistenti all'azione degradativa del proteasoma e quindi precipitano formando gli aggregati;

Oppure

- Alterazioni nella via dell'ubiquitina-proteasoma rendono incapace la cellula di eliminare delle proteine che altrimenti verrebbero facilmente degradate;

Oppure

- Le proteine mutate agiscono esse stesse inibendo il proteasoma.

Non è neppure ben chiaro se la formazione degli aggregati proteici è una causa o una conseguenza della malattia stessa e se tali aggregati svolgano una funzione tossica o se rappresentino invece un tentativo della cellula di concentrare e accumulare in pochi punti delle proteine denaturate altrimenti tossiche (funzione protettiva).

## **FIBROSI CISTICA O MUCOVISCIDOSI**

Malattia genetica che colpisce la componente esocrina delle vie respiratorie, dell'intestino, del pancreas e il fegato;

È la malattia genetica mortale più comune nella popolazione caucasica;

Le ghiandole secernono un muco denso e viscoso che ostruisce i dotti degli organi interessati compromettendone il normale funzionamento.

La fibrosi cistica è causata da una mutazione del gene che codifica per una proteina chiamata CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

CFTR è un canale di membrana che trasporta il cloro dall'interno all'esterno della cellula. All'esterno della cellula il cloro si lega con il sodio e il cloruro di sodio risultante richiama acqua che fluidifica il muco.

Se viene a mancare l'azione di CFTR il cloro rimane all'interno della cellula, qui si forma il cloruro di sodio (perché  $\text{Cl}^-$  richiama  $\text{Na}^+$ ) e l'acqua si accumula all'interno della cellula. Il muco risulta poco idratato e quindi molto viscoso.

Esistono molte mutazioni di CFTR che causano la fibrosi cistica, ma la più comune porta alla formazione di una proteina che potenzialmente sarebbe attiva ma in pratica non riesce a svolgere la propria funzione perché la mutazione la rende estremamente sensibile alla degradazione ad opera del proteasoma 26S.

In pratica il 100% della proteina viene degradato prima di riuscire a raggiungere la membrana citoplasmatica.

## **RISPOSTA INFIAMMATORIA**

L'infiammazione o flogosi è un meccanismo di difesa non specifico innato, che costituisce una risposta protettiva, seguente all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici.

Clinicamente i segni cardini dell'infiammazione sono:

- Arrossamento,
- Tumefazione,

- Calore,
- Dolore,
- Alterazione funzionale.

### NF-kB

NF-kB (nuclear factor-kappa B) è un fattore di trascrizione che gioca un ruolo fondamentale nella regolazione delle risposte infiammatorie.

Un'attivazione eccessiva della via di NF-kB è spesso associata a malattie infiammatorie quali:

Artrite Reumatoide;

Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD - Inflammatory bowel disease);

Sclerosi Multipla (MS);

Asma;

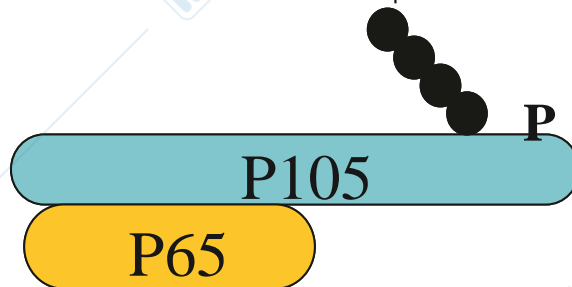
Psoriasi.

L'attivazione di NF-kB è controllata dal proteasoma 26S a due livelli differenti.

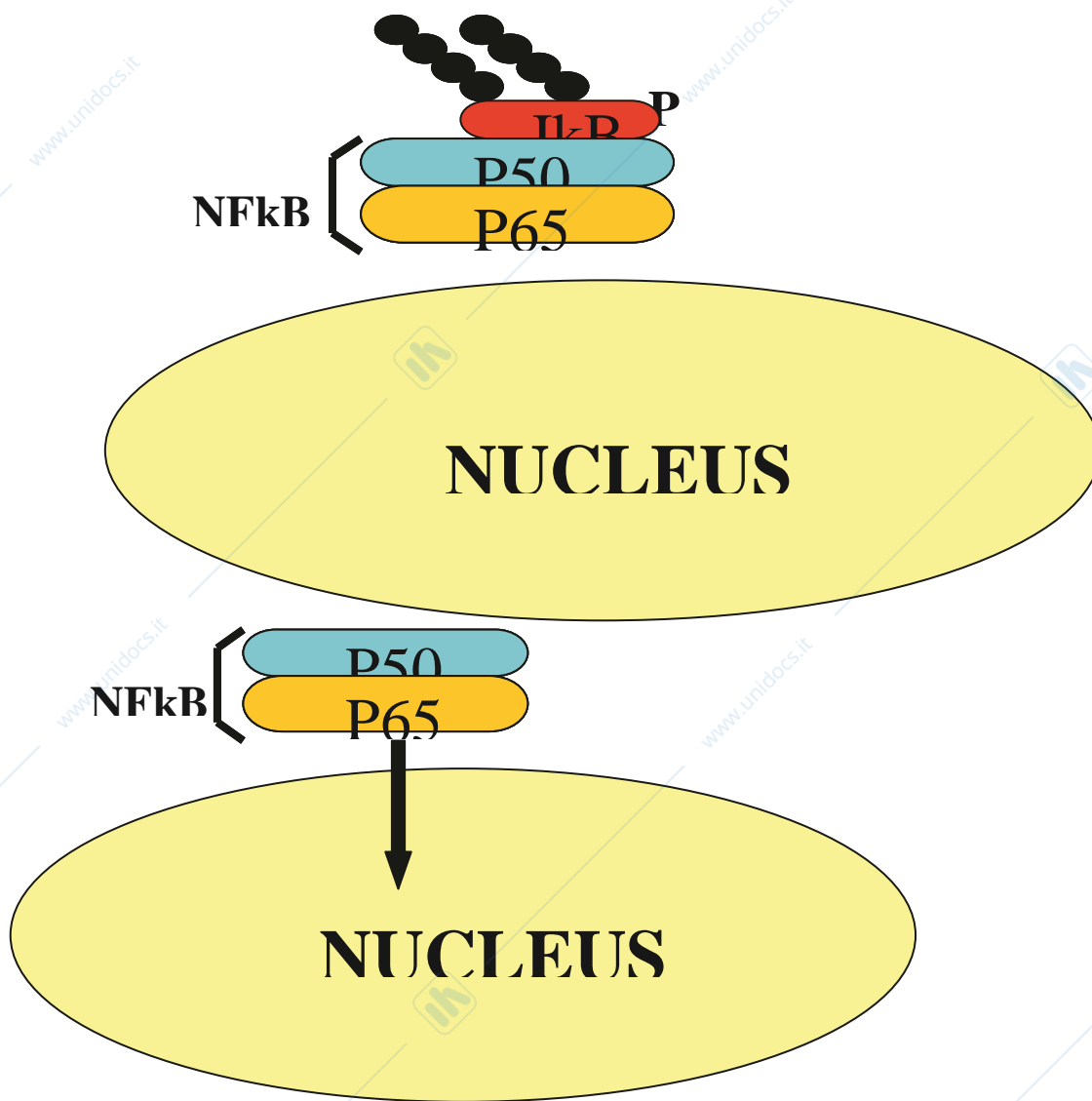


NF-kB attivo è un dimero formato da due subunità: P50 e P65

La subunità P50 viene sintetizzata come un precursore inattivo più grande (P105).



P105 viene prima fosforilato, quindi ubiquitinato e a questo punto il proteasoma 26S lo degrada parzialmente fino a originare P50.



IκB è un inibitore di NF-κB che si lega ad esso e gli impedisce di spostarsi nel nucleo. Quando però NF-κB deve svolgere la sua funzione, IκB viene fosforilato, ubiquitinato e degradato dal proteasoma in modo tale che NF-κB possa spostarsi nel nucleo e attivare la trascrizione dei geni sotto il suo controllo.

Perdita di massa muscolare

Una forte perdita di massa muscolare è spesso associata a varie condizioni o stati patologici quali:

Immobilità prolungata;

Denervazione;

Stati catabolici quali: infezioni acute o croniche, cancro, diabete mellito non controllato, cirrosi epatica, malattie renali e polmonari.

In tutte queste condizioni patologiche si osserva spesso una progressiva perdita di massa muscolare anche in presenza di un adeguato apporto calorico con l'alimentazione.

In molti casi la massiccia degradazione delle proteine muscolari sembra essere causata da un'attivazione abnorme della via dell'ubiquitina-proteasoma.