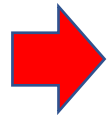


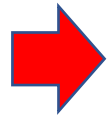
La degradazione delle proteine

1. **Rinnovamento del corredo proteico:** le proteine “invecchiano” perché subiscono modificazioni chimiche, per lo più di tipo ossidativo, che si accumulano progressivamente nel tempo.



Mantenimento di un efficiente corredo proteico.

2. **Regolazione metabolica:** degradazione estremamente selettiva di determinate proteine la cui funzione, in un certo scenario fisiologico-metabolico, può risultare inutile o addirittura dannosa per le funzioni cellulari.



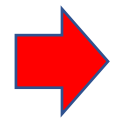
Degradazione proteica anche se le proteine sono perfettamente funzionali.

- 3. Eliminazione di proteine scorrettamente ripiegate:** quando i sistemi di controllo di qualità delle proteine non hanno successo, le proteine vengono destinate alla degradazione.



Eliminazione di proteine tossiche.

- 4. Produzione di aminoacidi per nuova sintesi proteica:** in condizioni di deprivazione di nutrienti, le cellule degradano le proprie proteine per ottenere aminoacidi che degradano completamente per estrarre energia e/o per sintetizzare nuove proteine (autofagia).



Esigenze energetiche.

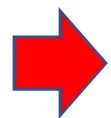
- 5. Attivazione da parte di proteasi:** taglio selettivo e mirato di determinate proteine (proteolisi limitata) con conseguente attivazione di processi cellulari di primaria importanza (es.: coagulazione del sangue; apoptosi).

I sistemi proteolitici negli eucarioti

Due sistemi proteolitici negli eucarioti:

- 1. Lisosoma:** proteasi acide (**catepsine**) appartenenti alla famiglia delle endopetidasi, responsabili della degradazione aspecifica e a lento turnover delle proteine.
- 2. Proteasoma:** proteasi neutre che degradano in modo specifico, in risposta a molteplici segnali regolatori.

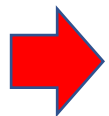
Gli organismi attuano un imponente investimento di energia per garantire il ricambio del corredo proteico (sia la sintesi sia la degradazione delle proteine hanno un costo energetico elevato).



Importanza del ricambio proteico per la vitalità di un organismo.

La concentrazione intracellulare di una proteina è funzione di sintesi e degradazione

- La scoperta nei primi anni '60 del XX secolo dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica nei procarioti da parte di Jacob e Monod portò a considerare che il livello di una proteina fosse regolato principalmente dalla sua velocità di sintesi.
- Le scoperte successive, soprattutto negli anni '80, hanno portato all'identificazione anche di un altro sistema finemente regolato (il **proteasoma**).



Ruolo della degradazione nel controllo del livello delle proteine.

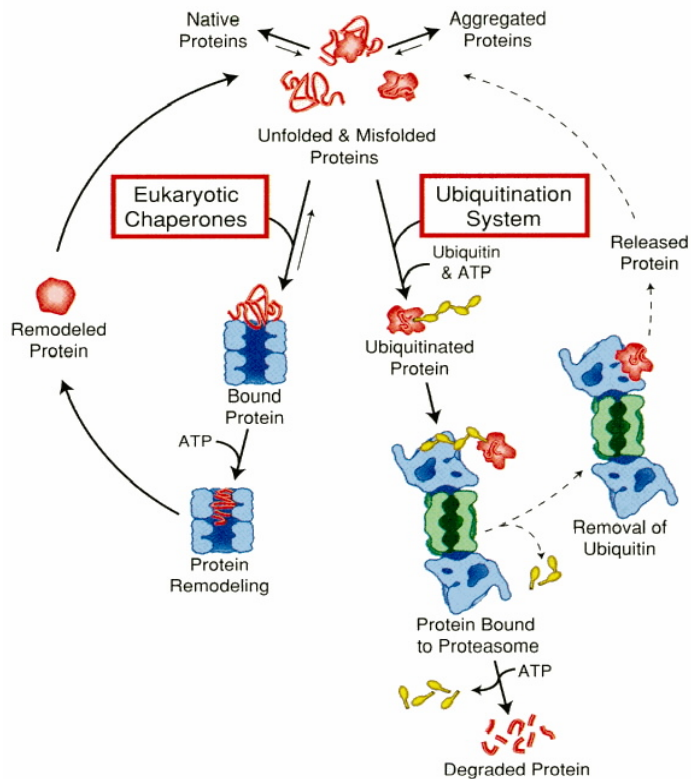
Classificazione delle proteasi

Raggruppamento	Residui del sito catalitico	Attacco proteolitico	pH
Serina proteasi	Ser, His, Asp	Endopeptidasi Carbossipeptidasi	Neutralità
Cisteina (o tiolo-) proteasi	Cys, His	Endopeptidasi	Neutralità
Metalloproteasi	Catione bivalente (tipicamente Zn^{2+})	Endopeptidasi Carbossipeptidasi Aminopeptidasi	Neutralità
Aspartico proteasi	2 Asp	Endopeptidasi	Acidità (2-5)

Classificazione delle proteasi

- La classificazione delle proteasi viene effettuata sia in base alla specificità sia al meccanismo catalitico.
- La classificazione in base alla **specificità** prevede un criterio basato sull'ubicazione del sito di attacco a livello della sequenza della proteina substrato (all'interno della catena polipeptidica o alle estremità N-terminale o C-terminale):
 1. **Endopeptidasi**: attaccano il legame peptidico in posizione distante dall'N- e dal C-terminale (sinonimo di proteinasi).
 2. **Esopeptidasi**: attaccano il legame peptidico rimuovendo sequenzialmente residui dall'N- (**aminopeptidasi**) o dal C-terminale (**carbossipeptidasi**).

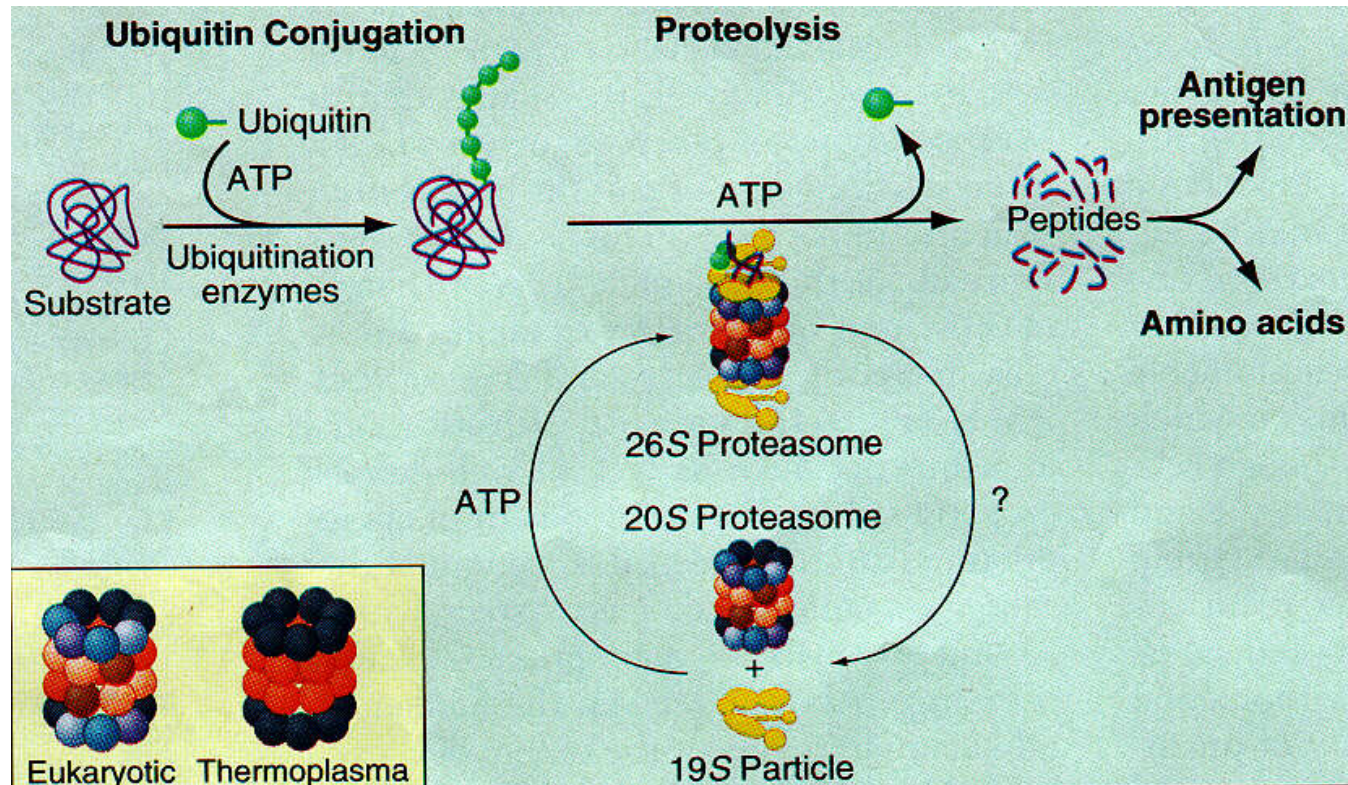
Il controllo di qualità delle proteine (protein triage)



Wickner, Science (1999) 286: 1888-1893

- Nel controllo di qualità delle proteine, quelle che presentano un ripiegamento errato sono dapprima destinate ai sistemi di chaperoni nel tentativo di riportarle alla conformazione nativa.
- Se gli chaperoni falliscono, le proteine sono destinate alla degradazione proteolitica mediata dal proteasoma.
- Il **sistema di controllo di qualità** previene così l'accumulo di proteine ripiegate scorrettamente e che pertanto espongono superfici idrofobiche, estremamente citotossiche.

Il sistema di degradazione delle proteine ubiquitina-proteasoma-dipendente



La degradazione delle proteine consuma ATP

- Il proteasoma 26S è responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine citosoliche.
- Nel proteasoma 26S il complesso 20S porta legati due complessi 19S ciascuno in corrispondenza di una delle due aperture.
- Nel citosol il proteasoma 20S si trova sia legato a 19S (formando il proteasoma 26S), sia isolato.
- Si ritiene che il 20S isolato degradi proteine denaturate (possono entrare nella cavità centrale anche senza uno specifico meccanismo di controllo).
- Il 26S degrada proteine in forma nativa dopo che sono state ubiquitinate.

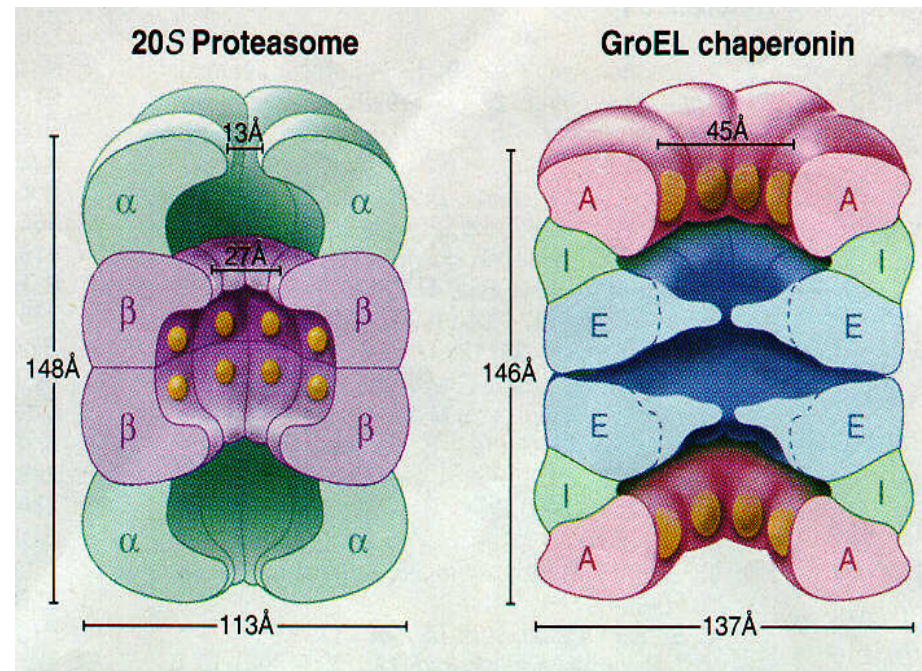
Il proteasoma eucariotico

Complesso 19S	Complesso 20S
<ul style="list-style-type: none">- massa molecolare complessiva di circa 500 kDa- consiste di parecchie subunità. 17 sono omologhe in tutti gli organismi e tessuti, altre specifiche per organismi e addirittura tessuti- in relazione alla loro disposizione spaziale, si dice che le subunità interagenti con il proteasoma 20S formano la base; quelle più distanti il coperchio- a livello della base sono localizzate subunità con attività ATPasica (probabilmente associate con attività simile a quella dei chaperoni, ma che in realtà srotolano proteine ripiegate)- altre importantissime attività sono quelle isopeptidasiche, che rimuovono l'ubiquitina dalle proteine substrato	<ul style="list-style-type: none">- 2 anelli esterni ciascuno di 7 subunità α- 2 anelli centrali ciascuno di 7 subunità β, alcune delle quali (tipicamente 6 su 14) hanno attività catalitica. Le specificità sono di diverso tipo (verso residui basici, acidi, idrofobici), così che tutte le proteine che entrano nel proteasoma vengono frammentate- le subunità hanno una massa molecolare compresa tra 21 e 31 kDa; nell'insieme il complesso ha una massa di circa 700 kDa- le subunità catalitiche sono $\beta_1, \beta_2, \beta_5$- la degradazione delle proteine è processiva, vale a dire che esse sono degradate in una serie di eventi proteolitici successivi durante i quali la catena polipeptidica rimane legata al proteasoma.- la dimensione dei peptidi che si formano è relativamente omogenea (attorno a 7-10 residui); questo fa pensare che la catena polipeptidica "scorra" nella cavità centrale del proteasoma e che venga tagliata in frammenti la cui lunghezza è approssimativamente quella che separa una fila di siti catalitici (sita in uno dei due anelli β) dall'altra (sita nell'altro anello)

La struttura del proteasoma 20S confrontata con quella della chaperonina eucariotica

Il proteasoma 20S è composto da quattro anelli impilati ciascuno costituito da sette subunità.

Nel proteasoma 20S i due anelli esterni comprendono sette copie di una subunità α e i due anelli interni comprendono sette copie di una subunità β . Questi anelli formano un canale centrale con tre camere: due anticamere fiancheggiano una camera interna che ospita i siti catalitici (sfere gialle)



Weissman: Science (1995) 268, 523-524

La chaperonina di GroEL è formato da due anelli costituiti da sette subunità di 57 kDa.

Gli anelli GroEL formano un ampio canale aperto alle estremità del cilindro.

GroEL è composta da una regione apicale (A), intermedia (I) ed equatoriale (E).

I siti putativi di legame polipeptidico (ovali gialli) sono patch idrofobici situati sulla faccia interna di ciascun dominio apicale.

Le attività del proteasoma 19S

Le attività riscontrate nel proteasoma 19S sono:

- 1) srotolamento del substrato e apertura del poro di ingresso del 20S in modo dipendente da ATP;
- 2) legame delle catene di ubiquitina;
- 3) taglio dell'ubiquitina;
- 4) ruoli strutturali e regolativi.

Nel proteasoma 20S le subunità cataliticamente attive sono β_1 , β_2 e β_5 , rispettivamente con attività caspasi-simile (attacca la catena polipeptidica a valle di residui acidi), tripsino-simile (basici) e chimotripsino-simile (idrofobici).

Proteolisi selettiva mediata dall'ubiquitina

L'ubiquitina coniugata alle proteine substrato costituisce un marcatore specifico per avviarle alla degradazione mediata dal proteasoma. Il legame dell'ubiquitina al substrato bersaglio prevede l'intervento sequenziale di tre attività enzimatiche:

- 1: E₁ Enzima attivante l'ubiquitina (Ubiquitin Activating Enzyme)
- 2: E₂ Enzima che coniuga l'ubiquitina (Ubiquitin Conjugating Enzyme)
- 3: E₃ Enzima che lega l'ubiquitina (Ubiquitin Protein Ligase)

Il substrato multi-ubiquitinato viene riconosciuto dal complesso proteolitico del PROTEASOMA 26S che degrada la proteina e rilascia la catena di ubiquitina che viene successivamente riciclata dopo il taglio in singoli monomeri.

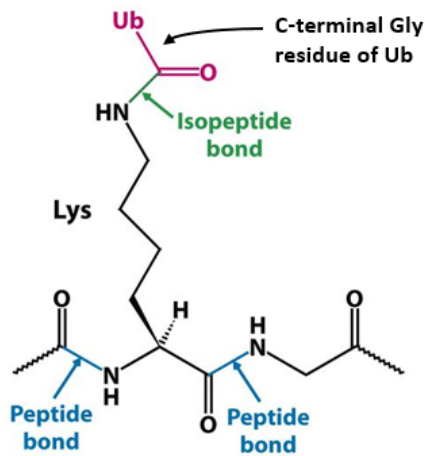


Ubiquitina

Ubiquitin on Lysine

Attachment of a lysine in the target protein to the C-term glycine of ubiquitin via an isopeptide bond.

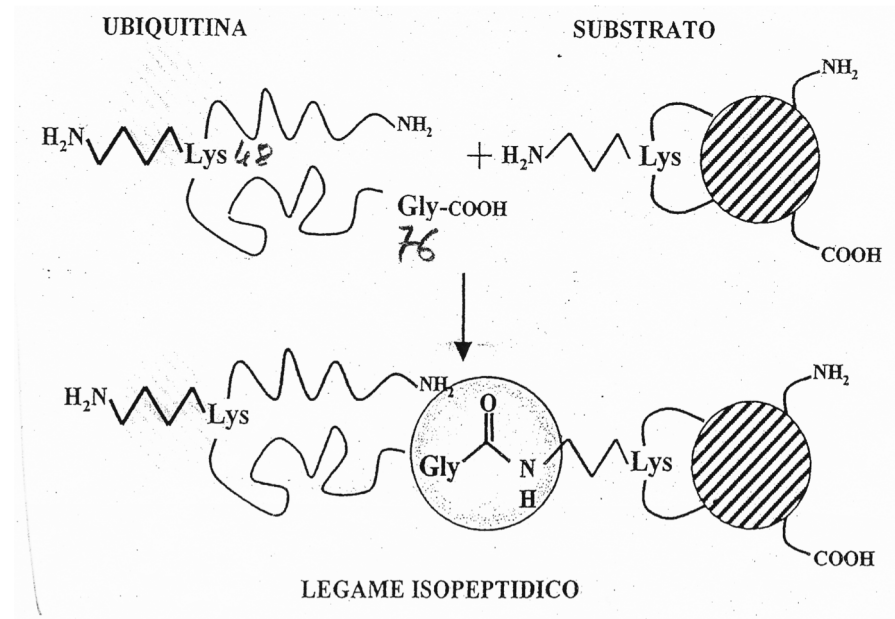
THE SIGNAL FOR PROTEIN DEATH.



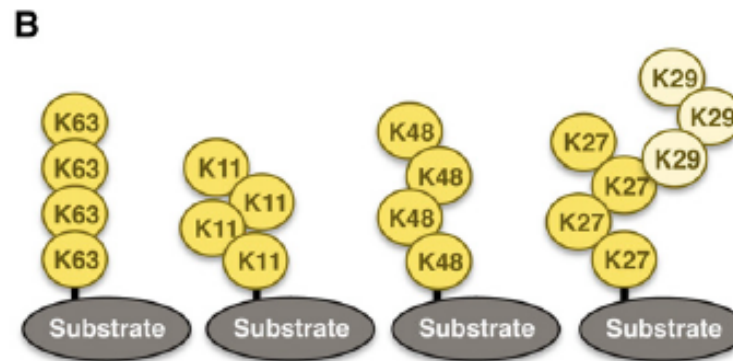
Unnumbered figure pg 651
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

- L'ubiquitina è una proteina ubiquitaria di 76 residui.
- Viene sintetizzata come catena multipla oppure fusa con altre proteine.
- La maturazione dei precursori prevede l'idrolisi della glicina 76.
- Il gruppo carbossilico della glicina 76 dell'ubiquitina è impegnato nella formazione del legame isopeptidico con il gruppo amminico di un residuo di lisina della proteina substrato.

Il gruppo carbossilico della Glicina 76 di Ubiquitina è impegnato nella formazione del legame isopeptidico con il gruppo amminico di una lisina di substrato



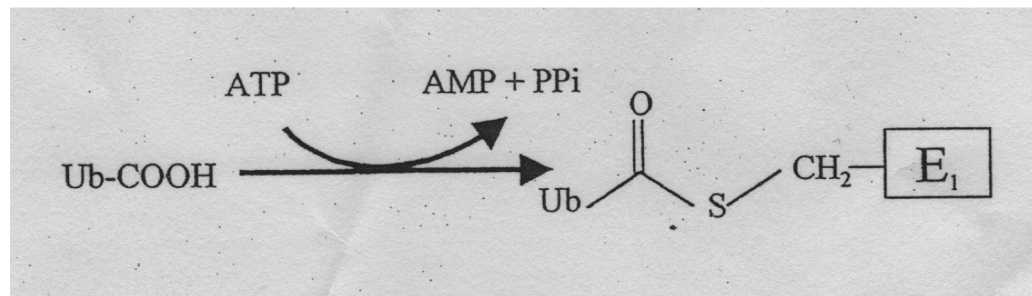
Nella formazione delle catene di poliubiquitina intervengono diversi residui di lisina dell' Ubiquitina (K63, K48, K11, K27)



E1: Enzima attivante l'ubiquitina

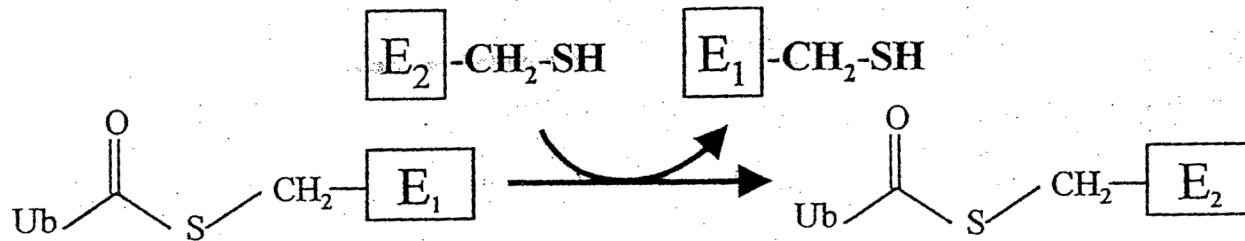
E1 attiva una molecola di ubiquitina mediante la formazione di un legame tioestere tra il gruppo sulfidrilico SH di un residuo di Cys presente nel sito attivo dell'enzima ed il gruppo carbossilico dell'ubiquitina.

Tale reazione prevede la formazione di un intermedio ubiquitina-adenilato, si ha il consumo di una molecola di ATP per l'attivazione di ogni molecola di ubiquitina



E2: Enzima coniugante l'ubiquitina

E2 riceve la molecola di ubiquitina attivata da E1 e la trasferisce sulla proteina bersaglio, direttamente o mediante l'intervento di E3.



E3: Enzima ligasi

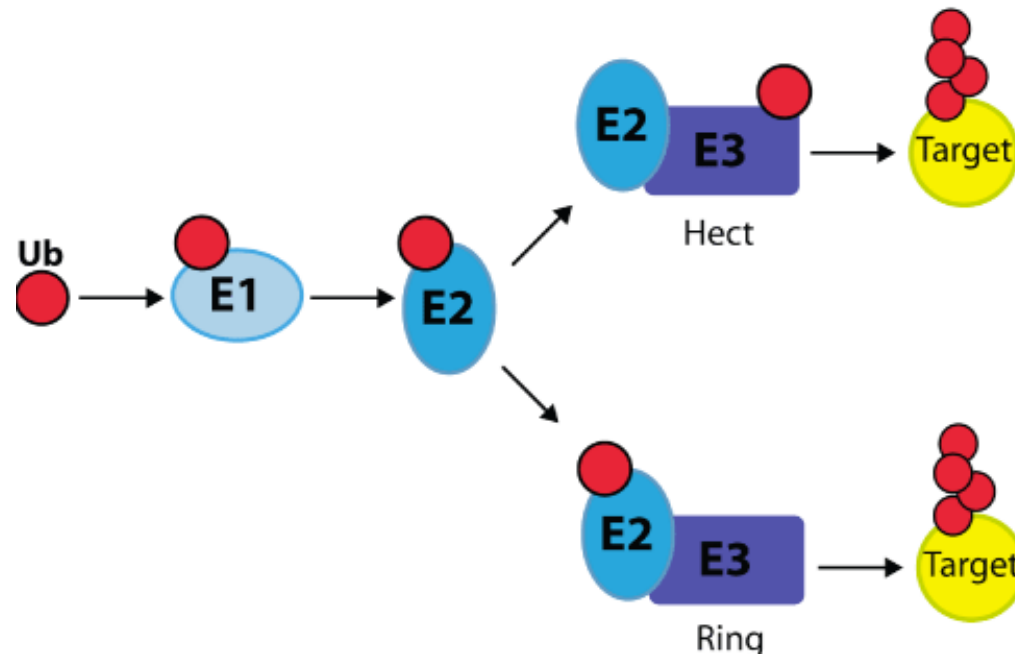
E_3 coopera con E_2 per il trasferimento di Ubiquitina attivata al substrato. Il trasferimento può avvenire con due modalità distinte:

1) direttamente da E_2 sulla proteina substrato ed in questo caso l'Ubiquitina non si lega a E_3

2) l'Ubiquitina viene prima trasferita da E_2 ad E_3 e poi alla proteina bersaglio passando attraverso una serie di intermedi tioesteri

E_3 ha la funzione di conferire alla reazione elevata specificità rispetto al substrato e promuove la multi-ubiquitinazione necessaria per indirizzare la proteina al proteasoma

E3: Enzima ligasi



Enzimi E3 contenenti il dominio HECT: l'ubiquitina è trasferita da E2 a E3, e quindi da E3 alla proteina substrato.

Enzimi E3 contenenti il dominio RING: l'ubiquitina è trasferita direttamente da E2 alla proteina substrato, mentre E3 riconosce quest'ultima e fa da ponte con E2.

