

Il pathway dell'ubiquitina

E1-Ub

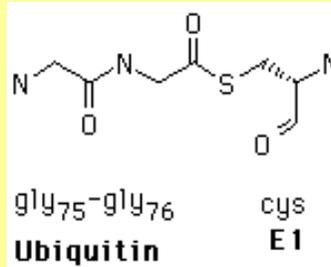
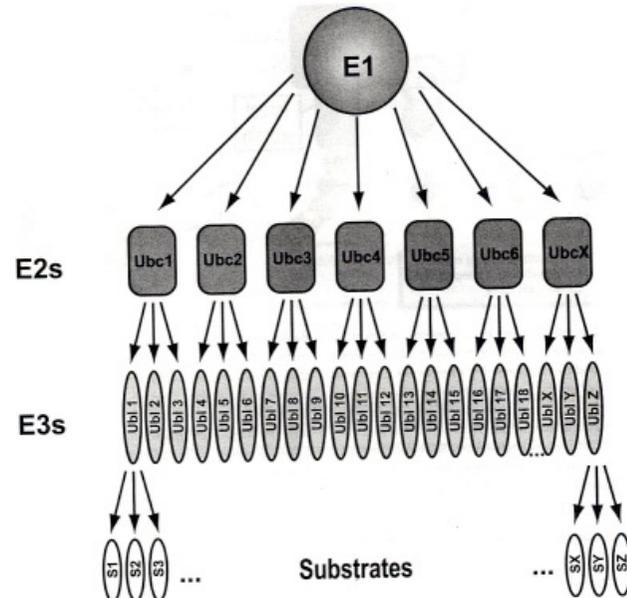
~1000 aa, Cysteine-636
Ub attachment site

E2: Transfer Ub Conj

Conserved cysteine
Active "thio ester"

E3: Ligase Specific w/E2

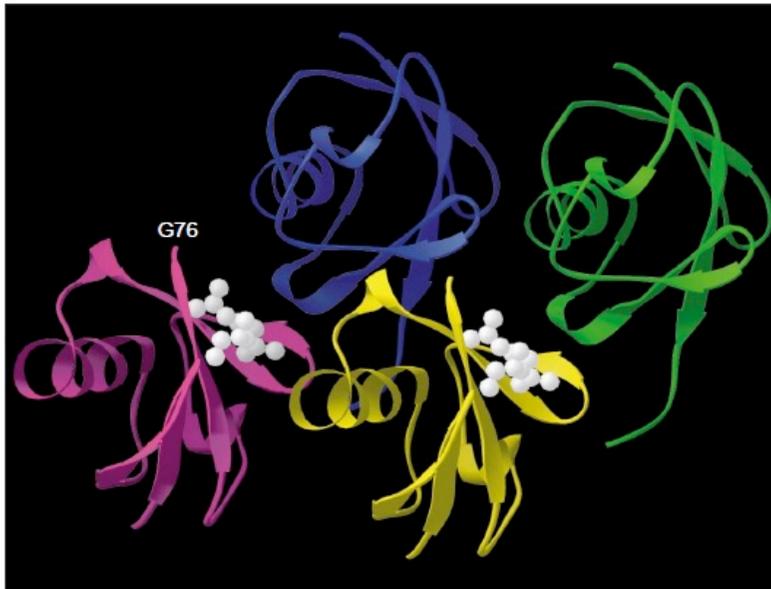
Usually do not conjugate
Hold complex together



I geni dell'UPS (Ubiquitin-Proteasome System) rappresentano circa il 5% del genoma.

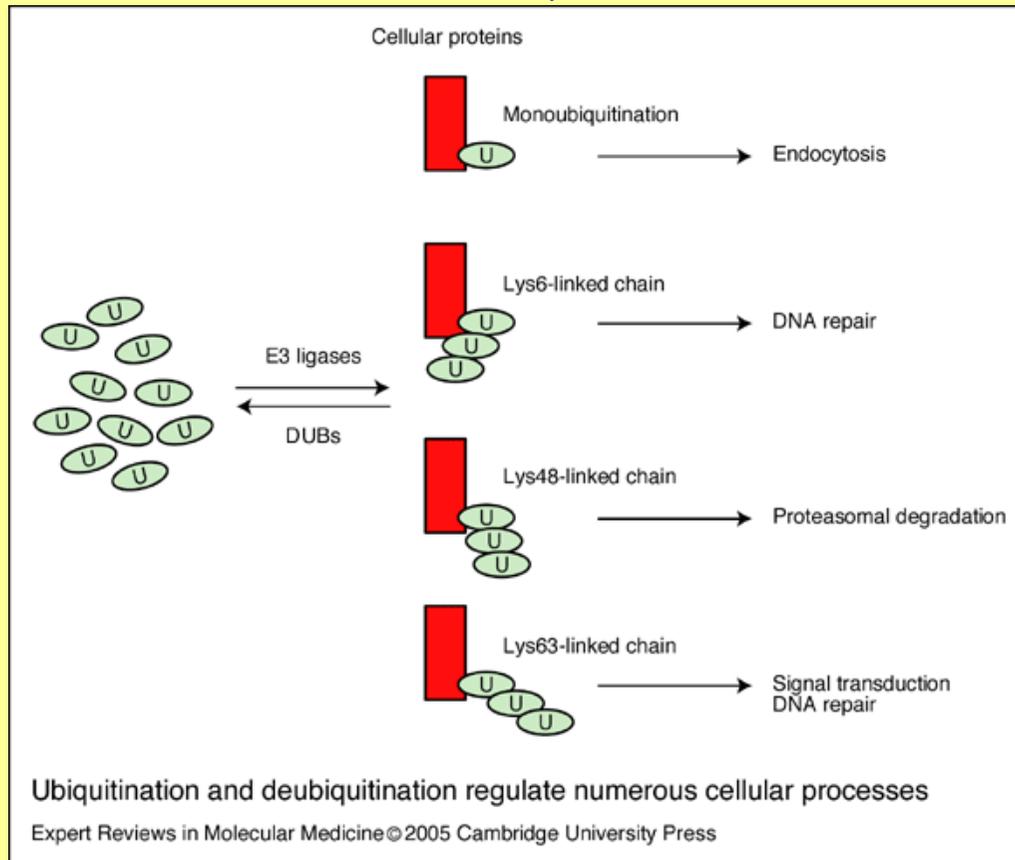
- E1: 1-2 enzimi.
- E2: 10-20 enzimi.
- E3: 500-800 enzimi, responsabili della specificità di substrato.

- Il segnale specificamente riconosciuto dal complesso 19S del proteasoma è la **tetraubiquitina, nella quale le quattro unità di ubiquitina sono legate tra loro a livello della Lys 48**. Tale tetraubiquitina è riconosciuta con alta affinità (ca. 30 nM) dal 19S.
- Associazioni di più di 4 ubiquitine non comportano maggiore affinità; catene più brevi (3 o meno) hanno un'affinità drasticamente ridotta. Ciò dimostra che il segnale fisiologico di destinazione al proteasoma è la tetraubiquitina.



- L'analisi della struttura, risolta ai raggi X, ha aiutato a mettere in evidenza che nel loro insieme **le quattro unità di ubiquitina che compongono la tetraubiquitina generano una superficie idrofobica, che è quella responsabile della specificità di riconoscimento da parte del proteasoma 19S** (i residui idrofobici implicati sono evidenziati in bianco nella figura).

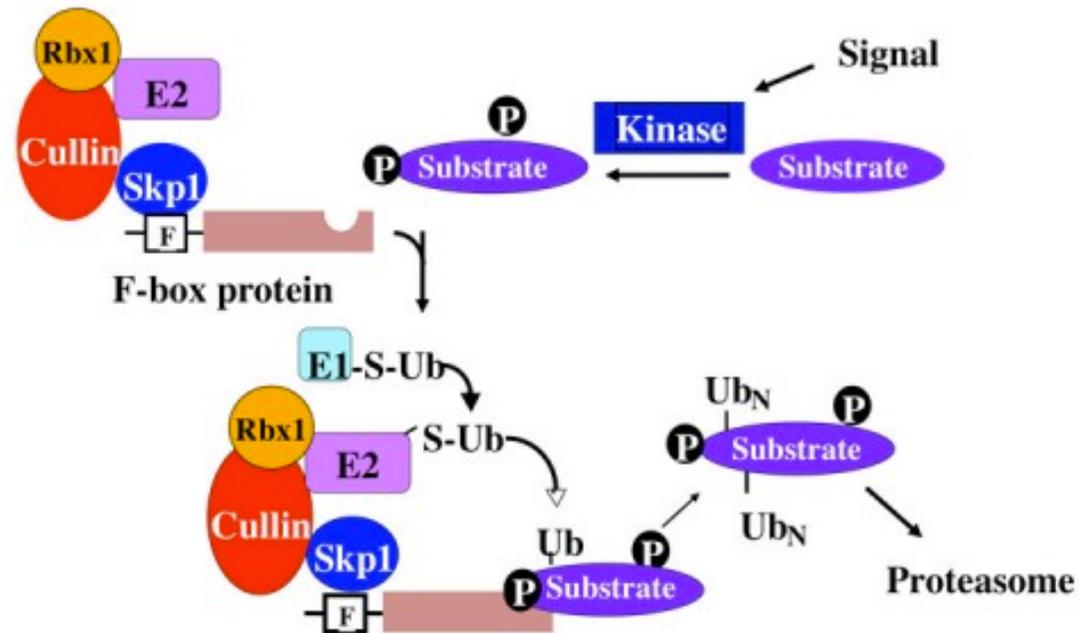
Roles of Ubiquitination



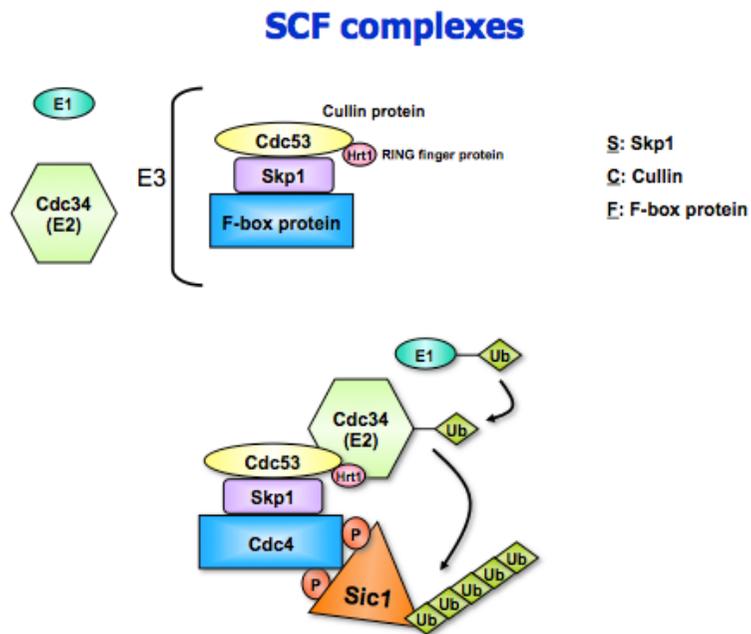
- Oltre alla ubiquitinazione che destina le proteine alla degradazione mediata dal proteasoma (tetraubiquitina K48), esistono diverse altre modalità di ubiquitinazione, che indirizzano le proteine substrato ad altri destini.
- Quindi l'indirizzamento al proteasoma è soltanto una tra le tante destinazioni (anche se comunque di primaria importanza).

La degradazione SCF-dipendente richiede la fosforilazione delle proteine substrato

S: Skp1
C: Cullin
E: F-box protein



Il complesso E3 SCF in *S. cerevisiae*



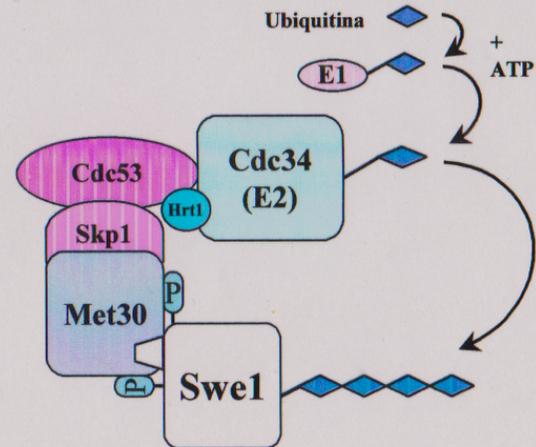
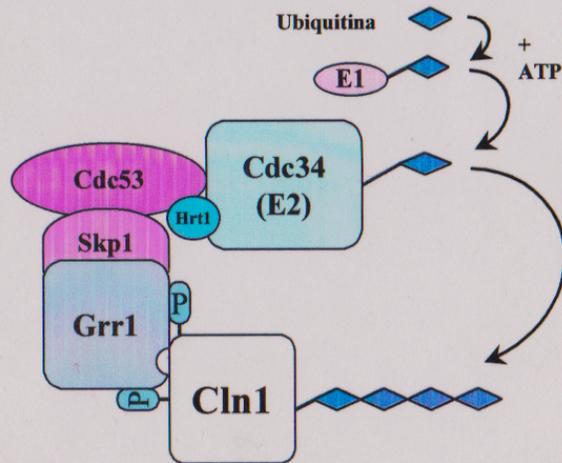
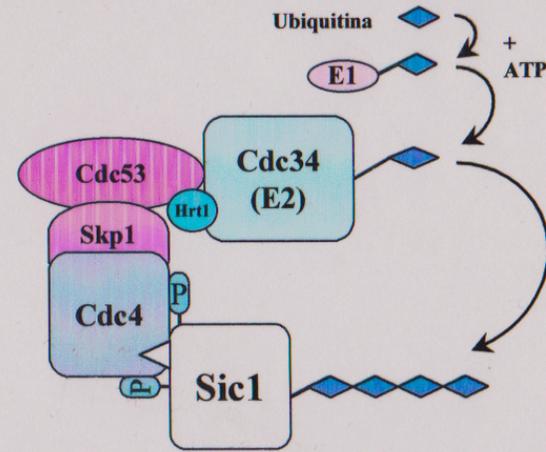
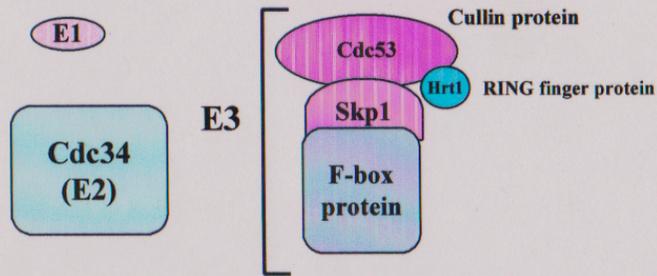
Skp1 lega l' estremità N-terminale di Cdc53, omologo delle "cullin protein" dei metazoi

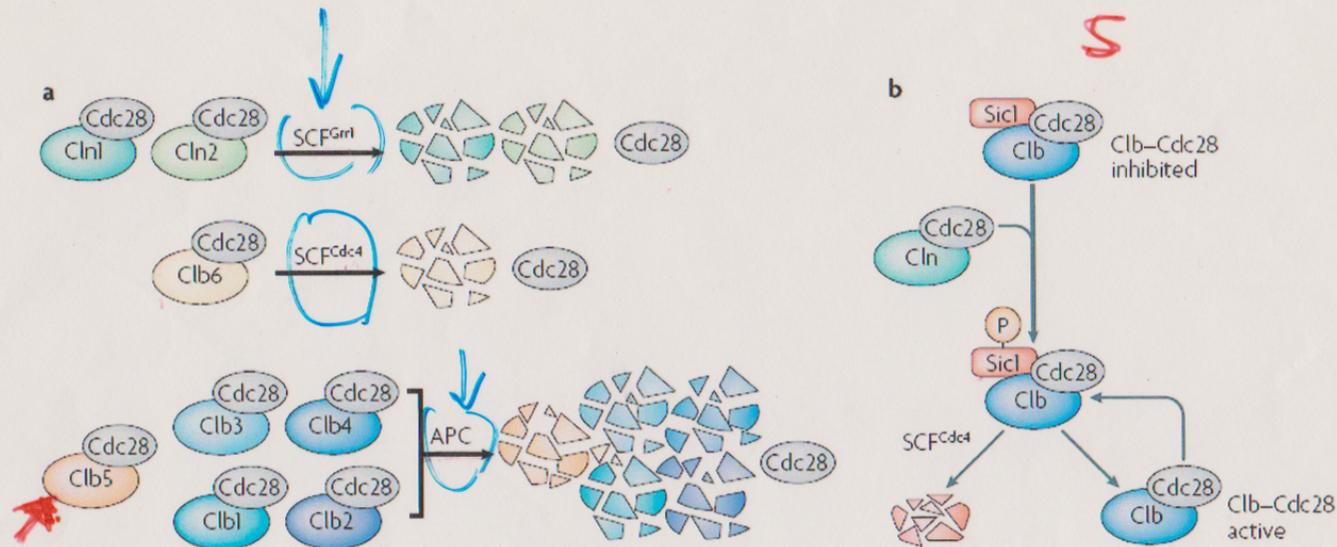
Cdc53 funge da scaffold del complesso legando oltre a Skp1 anche la proteina E₂ Cdc34

F-box conferisce la specificità dei substrati. La variazione dell'elemento F-box consente l'adattamento di un unico complesso E₃ a differenti substrati garantendo la massima specificità

COMPLESSI SCF IN *S.cerevisiae*

S: Skp1
C: Cullin
E: F-box protein



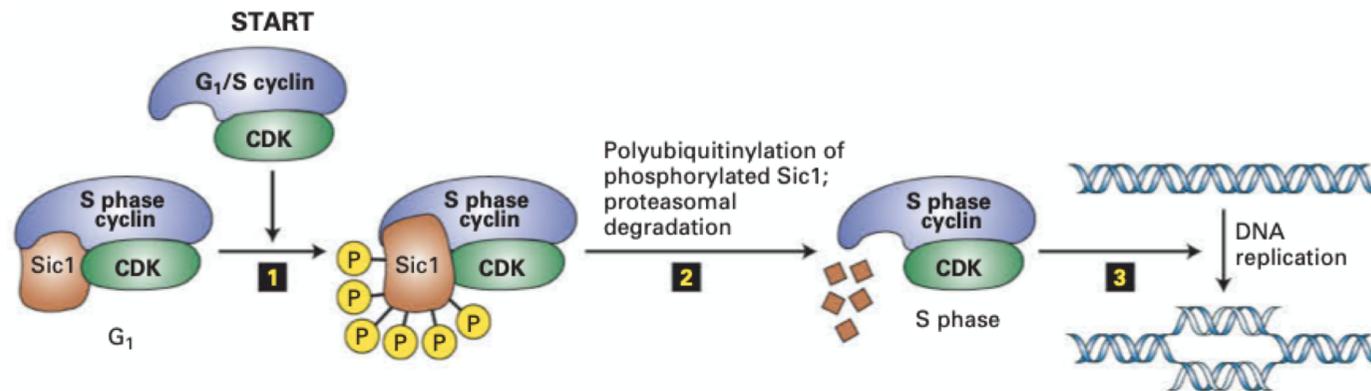


Degradation and inhibition of cyclins.

a | Cyclins are ubiquitinated by different ubiquitin ligases and degraded by 26S proteasomes. The G1-phase cyclins (Cln1 and Cln2) are ubiquitinated by SCFGrr1, Clb6 is ubiquitinated by SCFCdc4, and the other B-type cyclins (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4 and Clb5) are ubiquitinated by the anaphase promoting complex (APC).

b | Sic1 inhibits the activity of Clb-Cdc28 complexes. Cln-Cdc28 phosphorylates Sic1, which promotes SCFCdc4-mediated ubiquitination and subsequent degradation of Sic1, allowing for Clb-Cdc28 activation and S-phase entry. Clb-Cdc28 complexes also phosphorylate Sic1 to induce its proteolysis. P, phosphate.

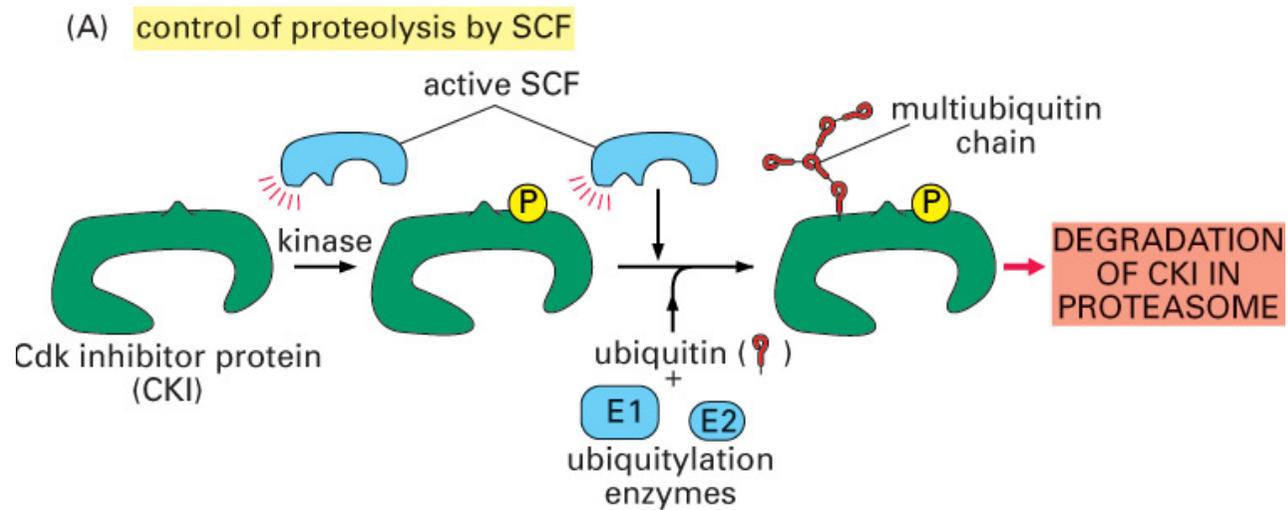
L'ingresso in fase S è regolato dalla degradazione ubiquitina-dipendente



From Lodish Molecular and Cellular Biology Eight Edition

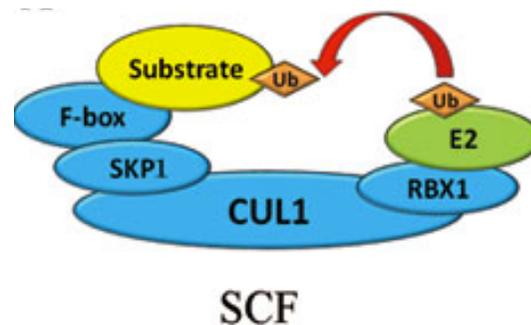
- Sic1 è l'inibitore dei complessi ciclina-CDK nel lievito *S. cerevisiae* (CKI: inibitori dei complessi ciclina-CDK).
- In fase G₁ inibisce i complessi ciclina-CDK di S, garantendo il completamento della fase G₁ prima dell'inizio della replicazione del DNA.
- Agisce quindi in G₁ come inibitore di fase S.
- L'inizio della replicazione del DNA avviene successivamente alla degradazione di Sic1 mediata dal complesso E3 ligasi SCF, previa fosforilazione dell'inibitore.

La ligase E3 SCF regola l'ingresso in fase S



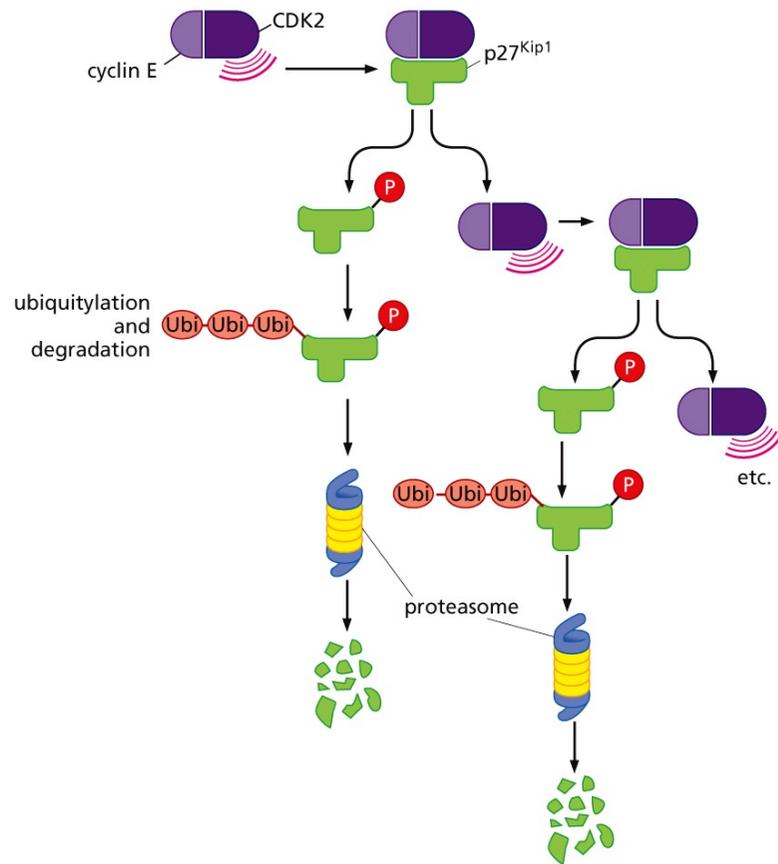
CKI: inibitori dei complessi ciclina-CDK (cyclin-dependent kinase inhibitor)

- I complessi Skp1/cullina/proteina F-box (SCF) funzionano come E3 ligasi e svolgono un ruolo cruciale nella coordinazione degli eventi del ciclo cellulare.
- Gli inibitori dei complessi ciclina-CDK che vengono ubiquitinati e successivamente degradati sono, oltre a p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, and p57^{Kip2}.
- I diversi complessi SCF contengono le stesse subunità Skp1, CUL1 (Cdc53 in lievito), la proteina RBX1 (RING box protein-1), mentre la parte variabile è rappresentata dalla proteina F-box che conferisce specificità .

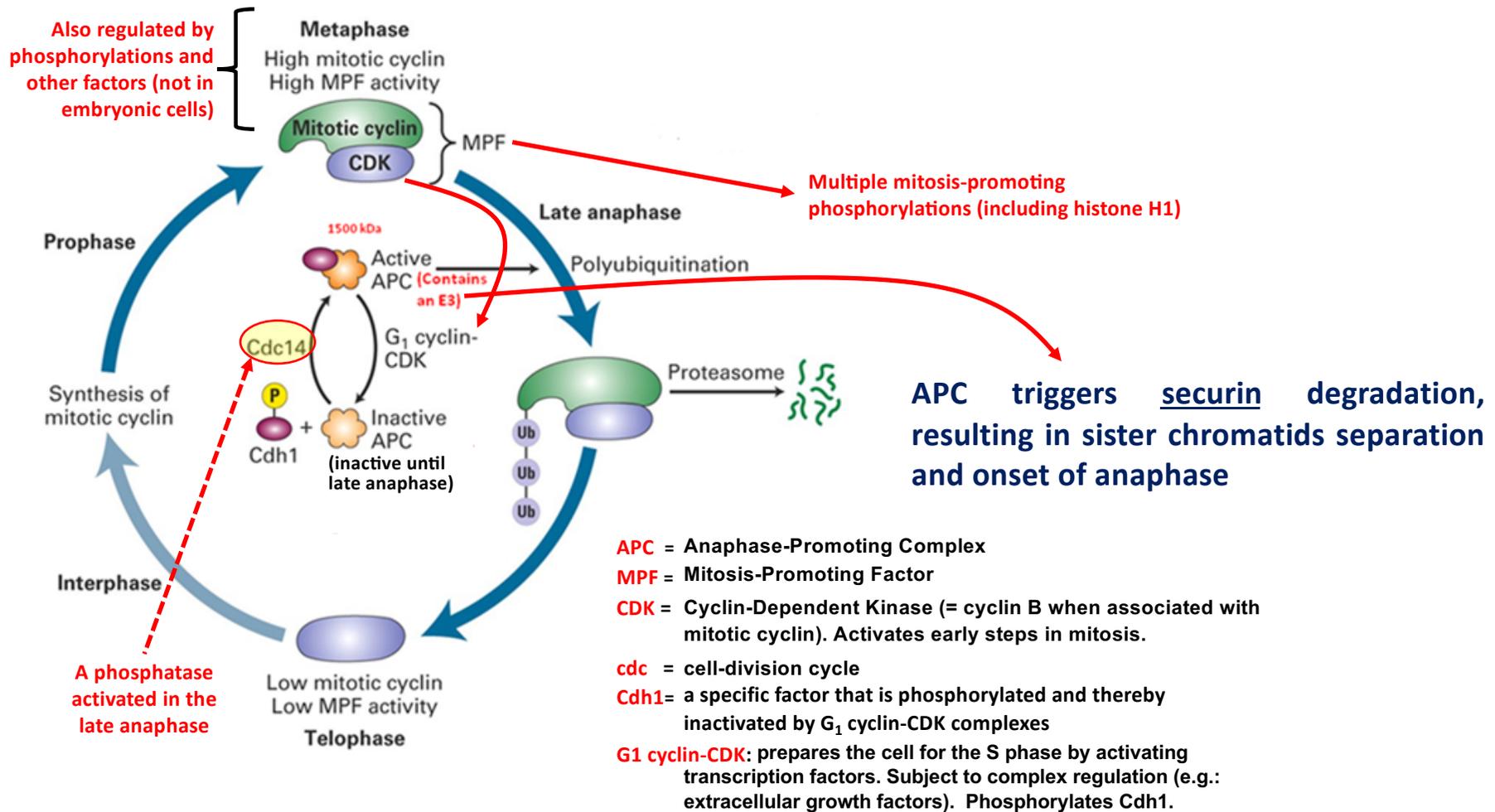


69 F-box proteine codicate dal genoma umano

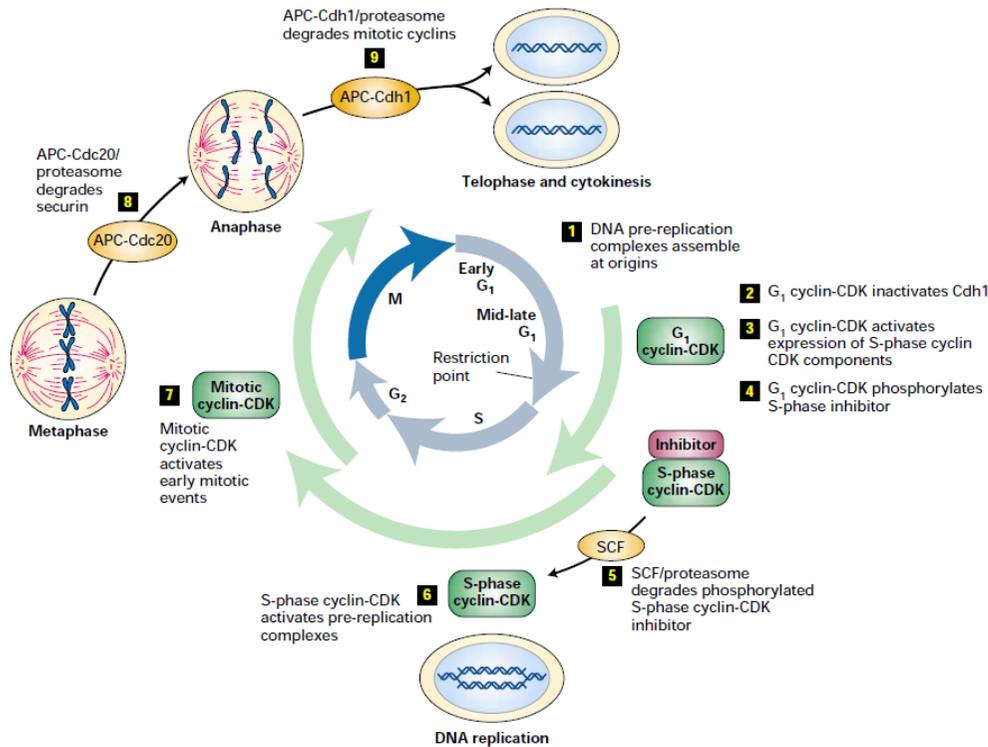
L'ingresso in fase S è conservato nei metazoi



- Come l'inibitore Sic1 anche l'omologo funzionale **p27^{Kip1}** **previene la prematura attivazione dei complessi ciclina-CDK di fase S in G1.**
- p27^{Kip1} è degradato in seguito ad eventi di fosforilazione e successiva ubiquitinazione.
- La sua degradazione è mediata da SCF, responsabile della sua ubiquitinazione.
- La degradazione di p27^{Kip1} nel proteasoma consente la transizione G1/S e la replicazione del DNA.



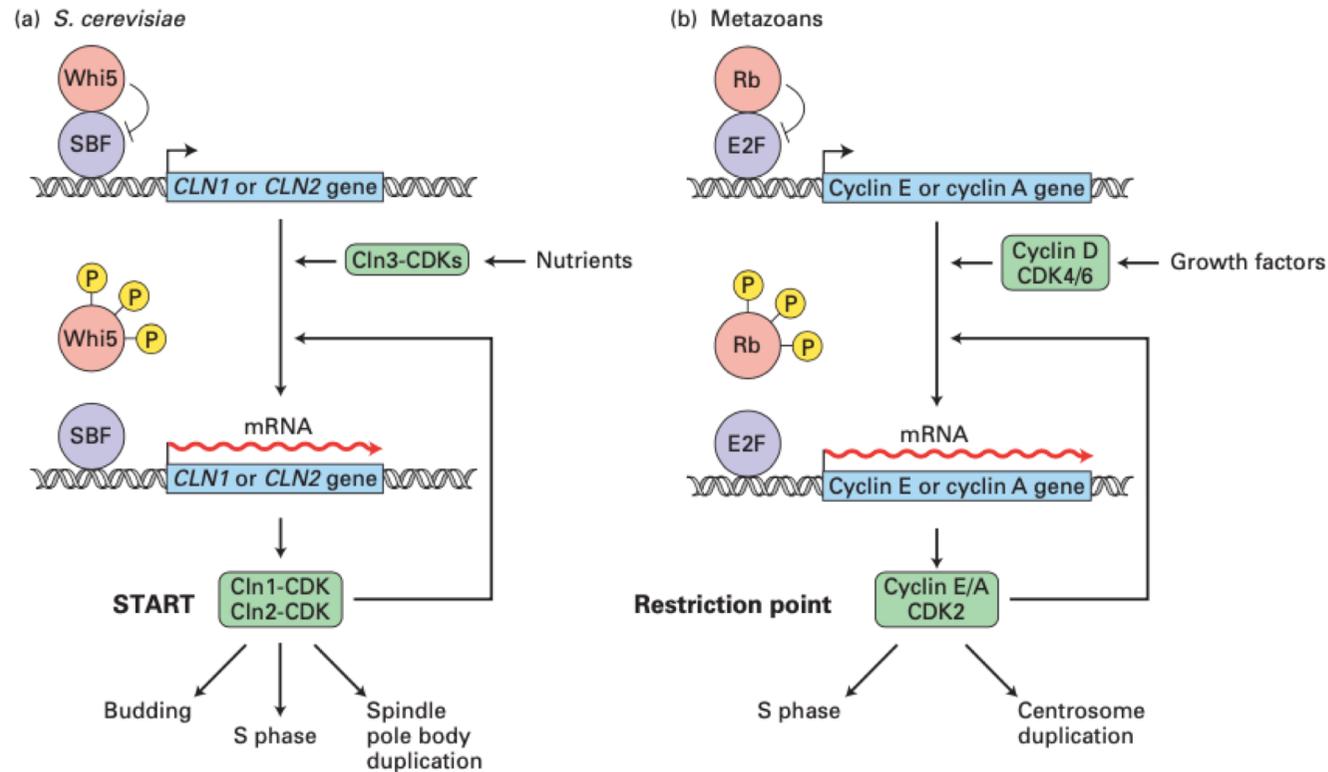
Regolazione delle transizioni del ciclo cellulare



From Lodish Molecular and Cellular Biology Eight Edition

- Le chinasi ciclina-CDK regolano la progressione del ciclo cellulare.
- Differenti tipi di complessi ciclina-CDK sono responsabili dei differenti eventi del ciclo cellulare.
- I complessi di **G1** regolano la fase G1 (G1 cyclin-CDK), i complessi di fase **S** regolano la replicazione del DNA (S-phase cyclin-CDK), mentre gli eventi della **mitosi** sono attivati dai complessi M-CDK (mitotic cyclin-CDK)
- Molteplici meccanismi assicurano che differenti CDK siano attive soltanto nelle fasi del ciclo in cui è richiesta la loro attività.

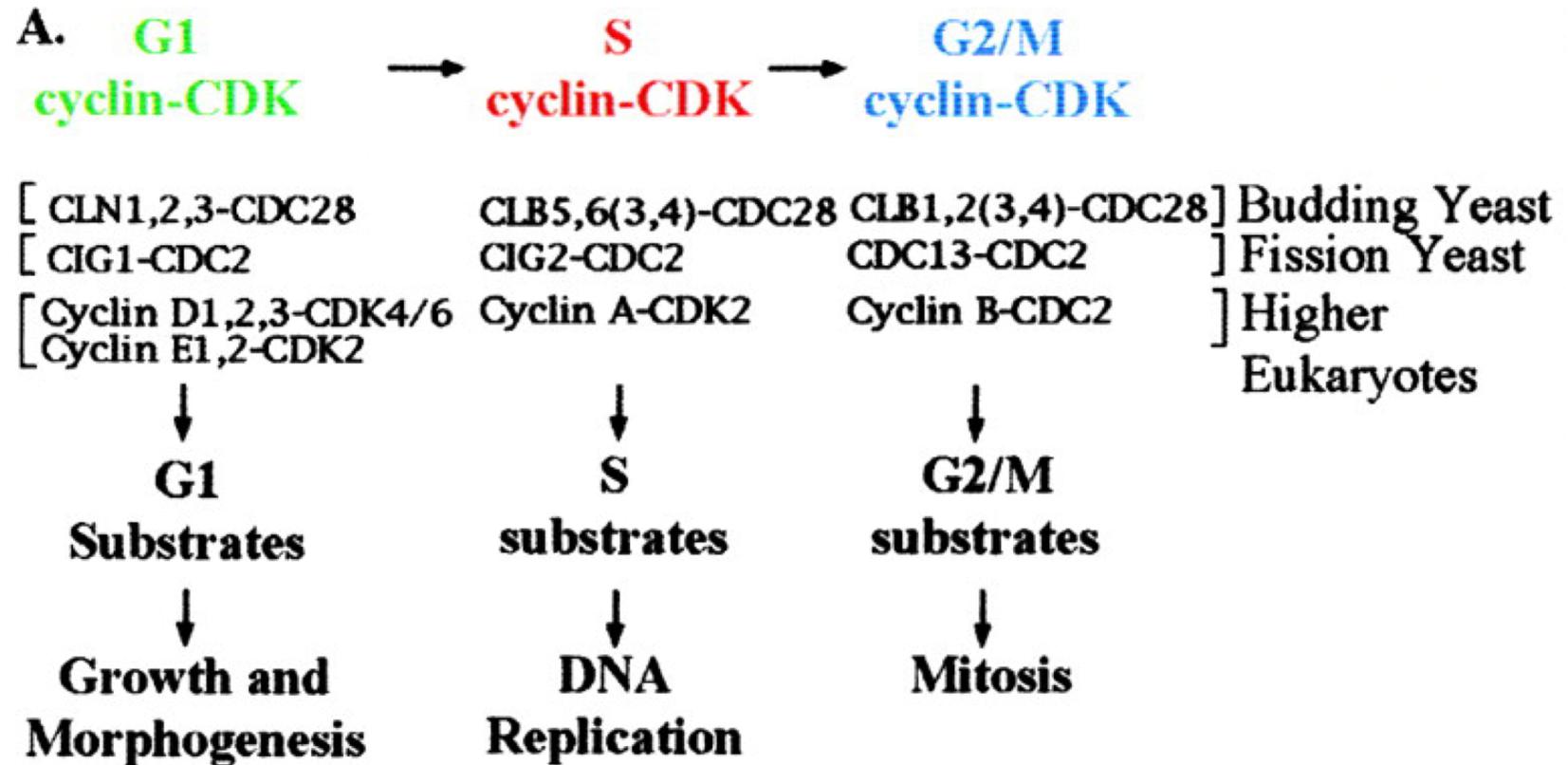
Le funzioni dei complessi ciclina-CDK di fase G1 sono conservate



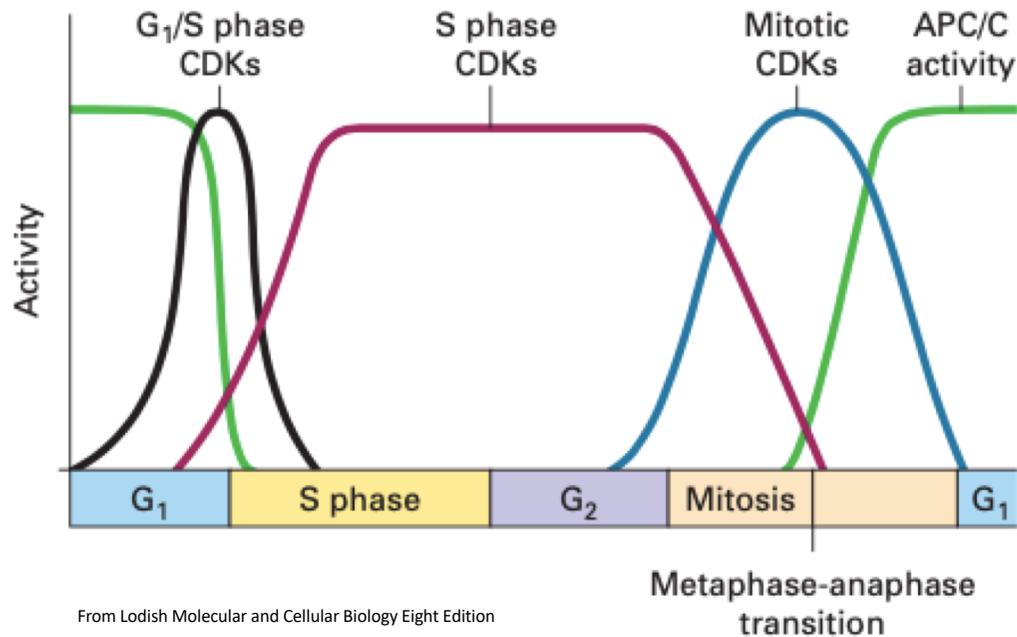
From Lodish Molecular and Cellular Biology Eight Edition

I meccanismi molecolari che governano l'ingresso in fase S (transizione G1/S) sono conservati

Le funzioni dei complessi ciclina-CDK sono conservate



I complessi ciclina-CDK regolano la progressione del ciclo cellulare



- I complessi ciclina-CDK sono responsabili solo degli eventi del ciclo cellulare che regolano perché sono attivi solo in specifiche fasi.
- Importante: i complessi ciclina-CDK di fase G₁ non sono attivi in fase S e nelle fasi successive alla G₁.
- Allo stesso modo i complessi ciclina-CDK di fase S non sono attivi né in G₁ né in M.
- I complessi ciclina-CDK di fase M sono attivi solo durante la mitosi.
- Il complesso APC/C (anaphase-promoting complex or cyclosome) è un'ubiquitina ligasi E3, responsabile della degradazione di specifiche proteine del ciclo cellulare, responsabile della transizione metafase/anafase.

Le proteine chinasi CDK richiedono le subunità regolatorie cicline per la loro attività durante il ciclo cellulare

- Le chinasi ciclina-dipendenti sono una famiglia di serine/treonine chinasi di piccole dimensioni (30-40 kDa). Come monomeri (non associate a cicline) non sono attive ma richiedono l'associazione con le cicline per essere attive come chinasi.
- In lievito una singola CDK controlla le fasi del ciclo cellulare (Cdc28).
- In cellule di mammifero sono presenti 9 CDKs, quattro di queste (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) regolano la progressione del ciclo cellulare.
- CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 si associano a differenti tipi di cicline ed i complessi ciclina/CDK che si generano promuovono le differenti transizioni del ciclo cellulare.
- CDK4 e CDK6 sono CDKs di fase G1, CDK2 funziona nella transizione G1/S e in fase S, mentre CDK1 è responsabile degli eventi della mitosi.

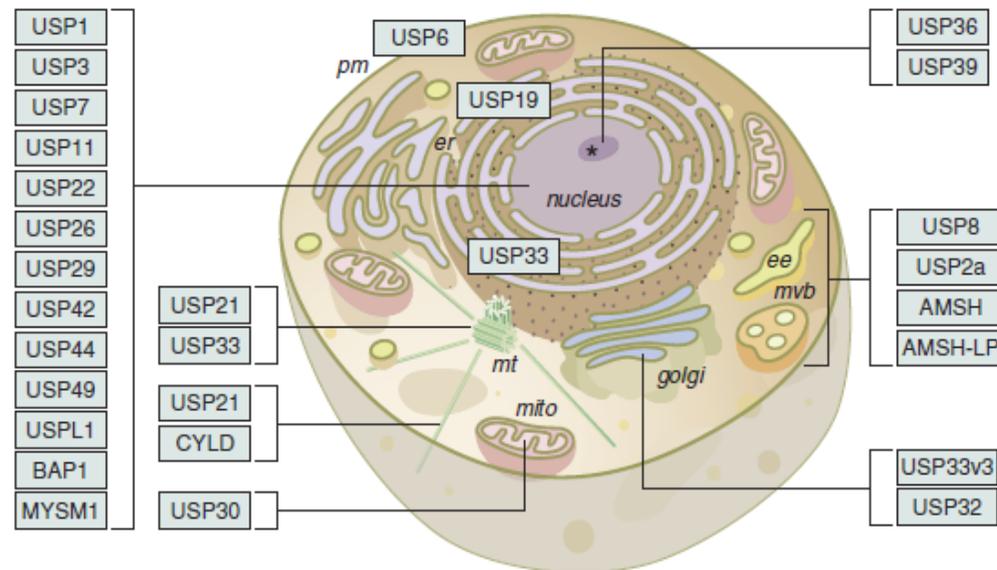
I complessi ciclina-CDK ed il loro ruolo nel ciclo cellulare

TABLE 19-1 Cyclins and CDKs: Nomenclature and Their Roles in the Mammalian Cell Cycle

CDK	Cyclin	Function	General Name
CDK1	Cyclin A, cyclin B	Mitosis	Mitotic CDKs
CDK2	Cyclin E, cyclin A	Entry into the cell cycle S phase	G ₁ /S phase CDKs S phase CDKs
CDK4	Cyclin D	G ₁ Entry into the cell cycle	G ₁ CDKs
CDK6	Cyclin D	G ₁ Entry into the cell cycle	G ₁ CDKs

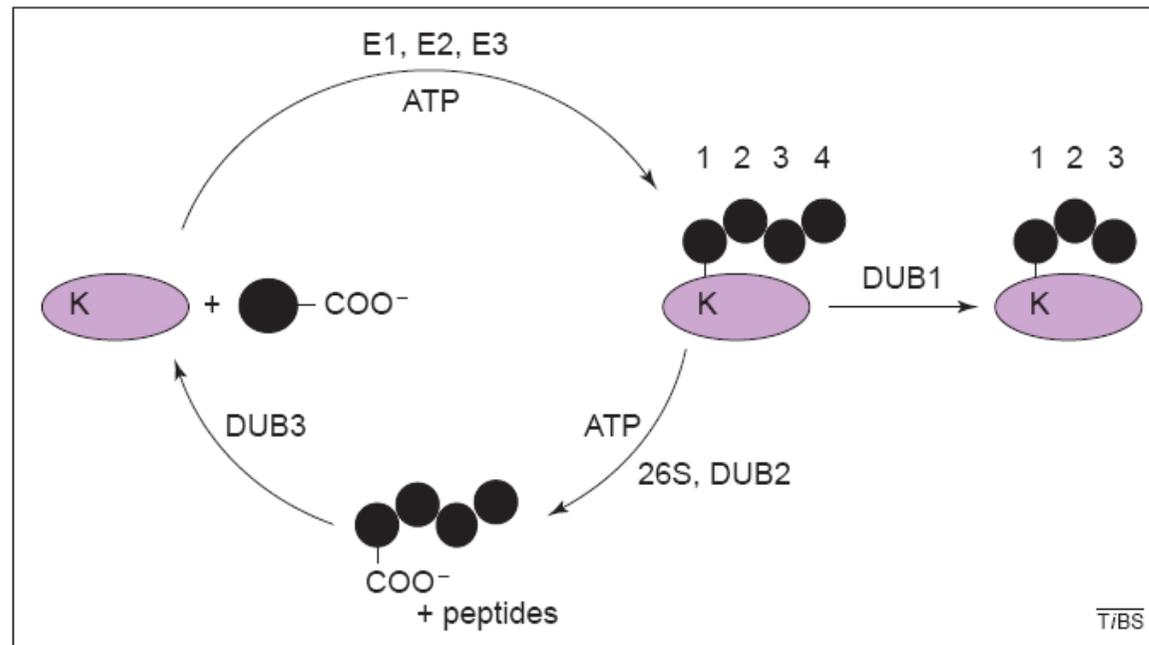
Gli enzimi deubiquitinanti (ubiquitina idrolasi)

- Negli eucarioti esistono parecchie decine di enzimi deubiquitinanti. Alcuni sono associati al proteasoma, mentre altri sono liberi nel citosol o associati ad altri compartimenti cellulari.
- Tale complessità si spiega anche con il fatto che esistono diversi tipi di ubiquitinazione (non solo K48 per la degradazione proteasomale, ma anche K63, ecc.), e di conseguenza deve necessariamente esistere una batteria molto diversificata di enzimi deubiquitinanti.



Le deubiquitinasi riconoscono le poliubiquitine K48 e le rimuovono secondo tre diverse modalità:

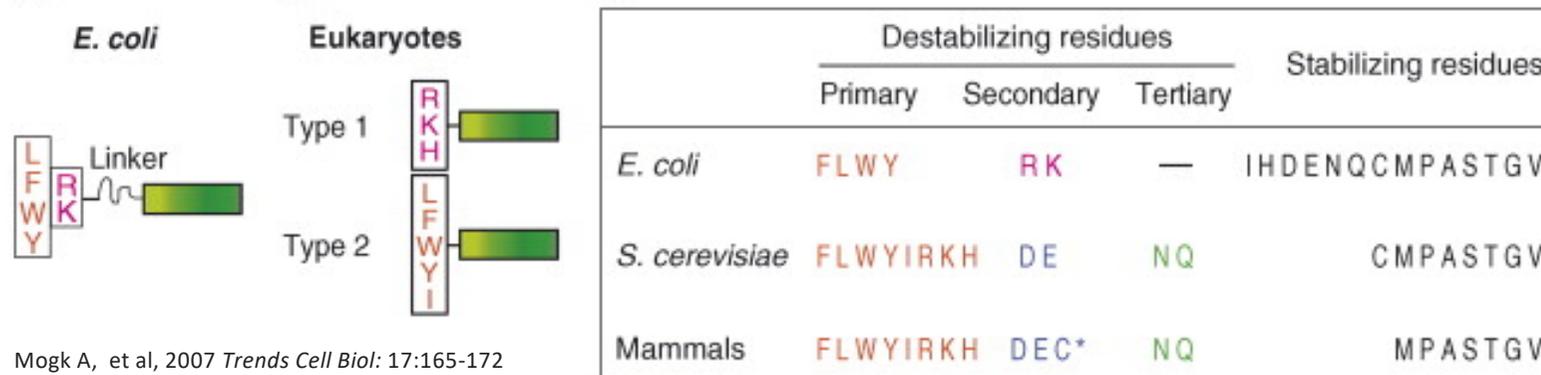
- 1) sequenzialmente dal residuo distale (DUB1);
- 2) direttamente a livello del legame isopeptidico instaurato con la proteina substrato e conseguente *rimozione in blocco* della tetraubiquitina (DUB2);
- 3) la tetraubiquitina isolata, dopo che è stata distaccata da una proteina substrato, viene disassemblata da DUB3.



La regola dell'N-terminale

- Sia in procarioti sia in eucarioti la velocità di degradazione delle proteine è determinata dal tipo di residuo all'N-terminale.
- Nel 1986, Varshavsky e colleghi riferirono che diversi costrutti genetici delle proteine della β -galattosidasi di *E. coli* esibivano emivite molto diverse quando prodotti in *S. cerevisiae*, con tempi di emivita che andavano da 20 ore a meno di 3 minuti.
- La stabilità delle proteine modello dipendeva dalla natura dei loro residui N-terminali, il che consentiva una classificazione degli amminoacidi come **residui stabilizzanti** o **destabilizzanti**.
- Negli eucarioti, alcuni residui N-terminali sono riconosciuti dal sistema ubiquitina-proteasoma, determinando la degradazione delle proteine.
- Un tratto strutturale presente su una proteina che destina la proteina stessa alla degradazione è detto **degrone**.
- N-terminale che destina alla degradazione è detto **N-degrone**.
- Le emivite delle proteine sono definite in base alla natura dei loro residui N-terminali.

La regola dell'N-terminale



- La regola dell'estremità N-terminale è presente in *E. coli*, lievito *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* e nelle cellule di mammifero.
- I segnali per la degradazione del substrato tramite la regola dell'estremità N-terminale sono simili in questi organismi, ma mostrano anche differenze distinte.
- Nelle cellule di mammifero e nei lieviti, l'N-degrone comprende **un residuo destabilizzante di tipo 1** (**Arg, Lys, His**) o **di tipo 2** (**Phe, Leu, Trp, Ile, Tyr**) e una lisina accessibile per l'ubiquitinazione.
- Nelle piante, la regola dell'estremità N-terminale include i **residui basici** e **aromatici**.
- In *E. coli*, solo gli **amminoacidi aromatici** e **Leu** rappresentano i residui destabilizzanti.

Sequenze PEST

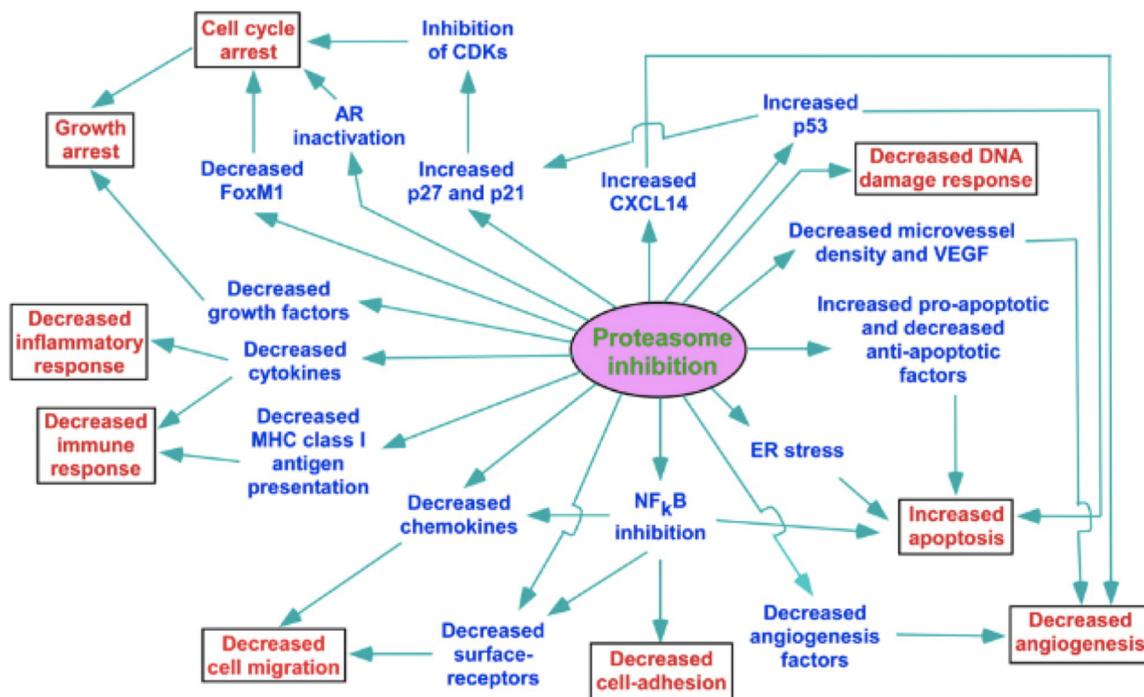
- Sono sequenze statisticamente più ricche della media di prolina, glutammato, serina, treonina (PEST) e NON sono sequenze consenso.
- La presenza di una sequenza PEST comporta un elevato turnover per la proteina che la contiene.
- È ormai evidente che diverse sequenze PEST stimolino la degradazione mediante meccanismi ubiquitina-dipendenti.
- Esistono anche evidenze che alcune proteine con sequenze PEST siano substrati di **calpaine**, un tipo di proteasi citosoliche attivate da calcio.
- Ci si chiede se le sequenze PEST siano un segnale *costitutivo* di degradazione (vale a dire, destinano permanentemente la proteina implicata alla degradazione) o *condizionale* (vale a dire, sono attivati solo in determinate condizioni metaboliche). Si ritiene che per lo più si tratti di segnali condizionali. Ad esempio la fruttosio bisfosfatasi di lievito ha una sequenza PEST che viene fosforilata su una serina, e solo a seguito di ciò la proteina viene indirizzata al proteasoma.

- Numerosi dati suggeriscono che le sequenze PEST siano molto frequentemente fosforilate generando il segnale per la loro degradazione nel proteasoma.
- Le sequenze PEST, in considerazione degli amminoacidi che contengono, sono sequenze polari e disordinate; quindi devono essere esposte al solvente. Sono perciò facilmente riconoscibili e/o modificabili dai sistemi intracellulari (contengono in particolare serina e treonina, amminoacidi fosforilabili). Osservazioni recenti indicano che molte proteine con sequenze PEST sono intrinsecamente disordinate e quindi completamente esposte.
- I dati disponibili suggeriscono che le sequenze PEST non rappresentino un unico segnale di degradazione, ma che l'abbondanza dei 4 amminoacidi (PEST) generi sequenze particolarmente adatte a **farne dei degroni poiché sono sequenze esposte e fosforilabili.**

La degradazione delle cicline è essenziale per la progressione del ciclo cellulare

- I domini C-terminali delle cicline di fase G1 contengono sequenze PEST.
- Le sequenze PEST (prolina, acido glutammico, serina, treonina) che sono anche dei siti consenso per i complessi ciclina/CDK.
- **[S/T*]PX[K/R]**, S/T*, P (prolina), X (qualsiasi amminoacido), K (lisina), R (arginina): sito consenso di fosforilazione per i complessi ciclina-CDK.
- La fosforilazione delle cicline di G1 da parte dei complessi ciclina-CDK è essenziale per la loro degradazione ubiquitina-dipendente.
- Queste sequenze fosforilate vengono riconosciute dall'ubiquitina ligasi E3 SCF.
- I domini N-terminali delle cicline mitotiche presentano delle sequenze essenziali per la loro degradazione (destruction box, o D-box).
- Il motivo consenso è: **RXALGXIXN**, i cui arginina (**R**) in posizione 1 e leucina (**L**) in posizione 4 sono altamente conservate.
- Queste sequenze sono riconosciute dall'ubiquitina ligasi E3 APC/C, con conseguente ubiquitinazione.
- Mutazioni nel D-box stabilizzano le cicline mitotiche ed aboliscono la loro ubiquitinazione.

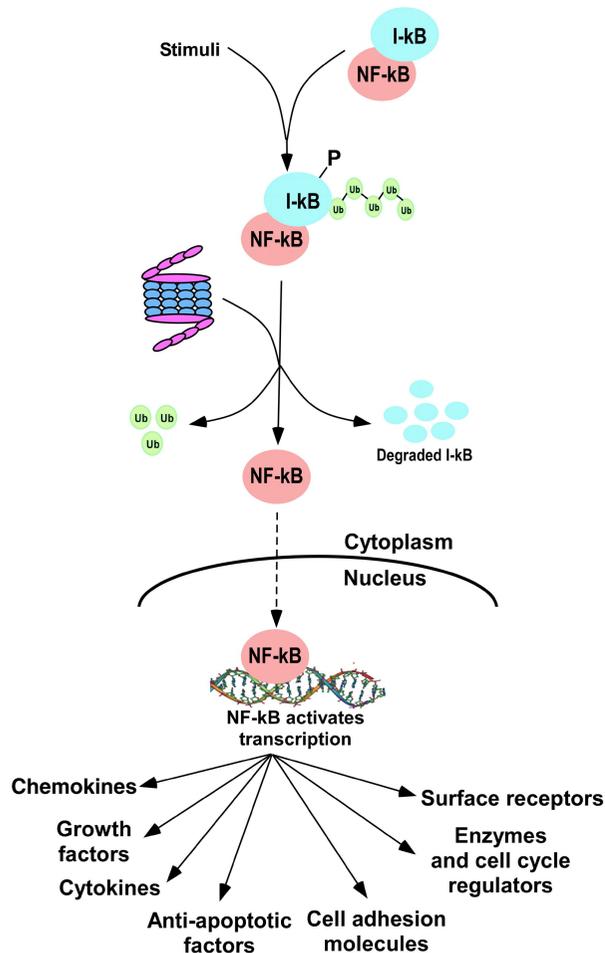
Il proteasoma come bersaglio per la terapia tumorale



Frankland-Searby S, Bhaumik SR. (2012) BBA 1825:64-76

- Il proteasoma 26S degrada parecchie oncoproteine, fattori di trascrizione, cicline e inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, e altre importanti proteine regolatorie.
- L'alterata regolazione degli eventi cellulari legati a queste proteine può portare allo sviluppo del cancro. Pertanto il proteasoma è diventato un bersaglio interessante per il trattamento di numerosi tumori.
- Diversi inibitori delle attività proteolitiche del proteasoma 26S sono stati sviluppati e testati per la loro attività antitumorale. Questi inibitori hanno dimostrato notevoli effetti antitumorali **inducendo apoptosi** in diversi tipi di tumore. Inoltre si sono dimostrati capaci di indurre **l'arresto del ciclo cellulare, di inibire l'angiogenesi, l'adesione cellulare, la migrazione cellulare, le risposte infiammatorie, e la risposta di riparazione del DNA.**
- Un certo numero di inibitori del proteasoma sono ora in sperimentazione clinica per il trattamento del mieloma multiplo e di tumori solidi. Il bortezomib è un inibitore del proteasoma già utilizzato in clinica per il trattamento del mieloma multiplo e per certi tipi di linfoma.

La regolazione della trascrizione mediata da NF-κB

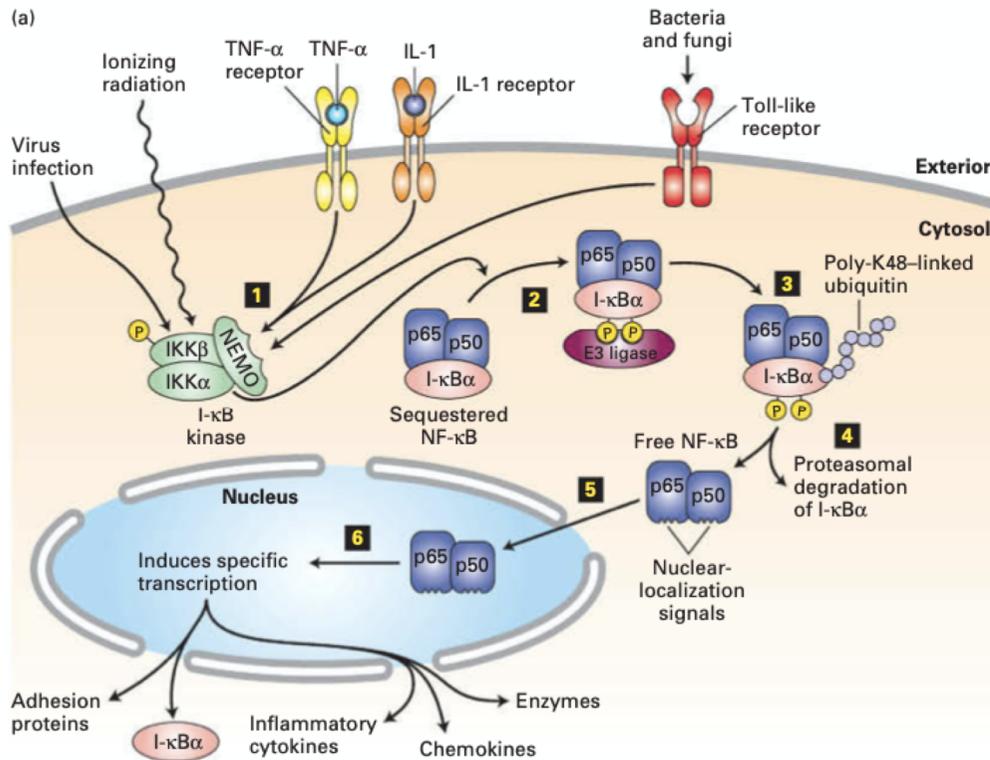


- NF-κB (Nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cells) è stato originariamente scoperto come regolatore dell'espressione del gene della catena leggera kappa delle immunoglobuline nei linfociti B murini.
- Successivamente, NF-κB è stato trovato in quasi tutti i tipi di cellule animali.
- NF-κB è un fattore di trascrizione ed è coinvolto nell'attivazione dei geni che codificano per citochine, chemochine, fattori di crescita, molecole di adesione cellulare e recettori di superficie.
- Attraverso la regolazione trascrizionale di numerosi geni, NF-κB controlla varie risposte immunitarie e infiammatorie.
- NF-κB sopprime l'apoptosi e induce angiogenesi, proliferazione cellulare e migrazione, svolgendo quindi un ruolo cruciale anche nella tumorigenesi.

La trascrizione dipendente da NF-κB

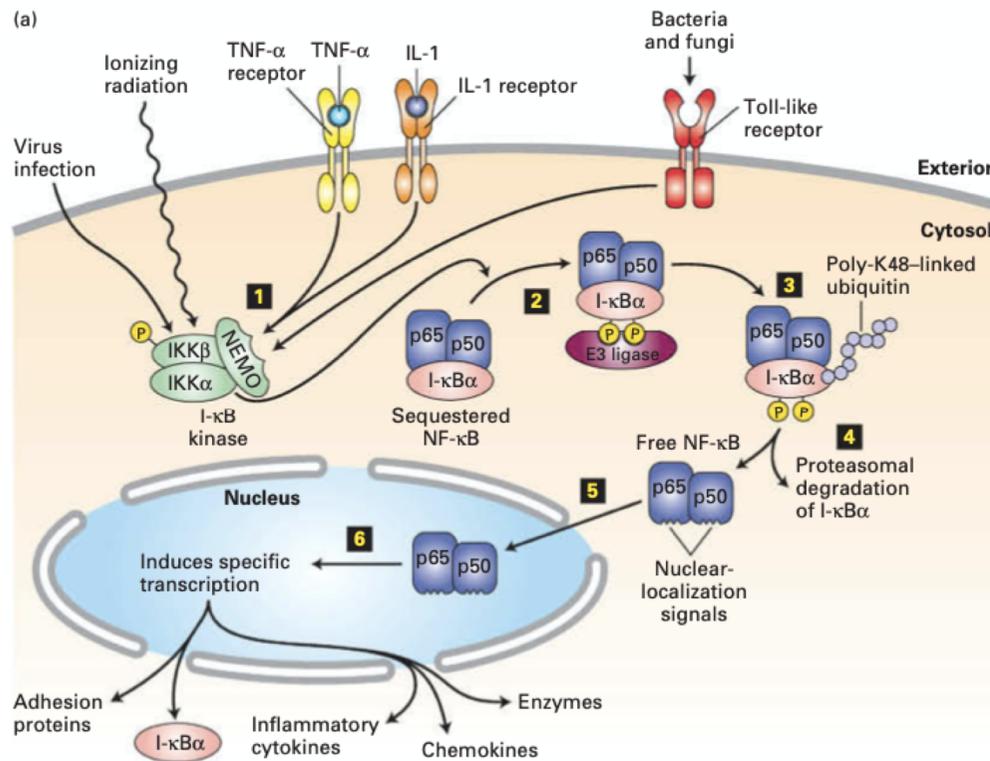
- In molte cellule del sistema immunitario, NF-κB stimola la trascrizione di oltre 150 geni, compresi quelli che codificano citochine e chemochine; questi ultimi attirano altre cellule del sistema immunitario e fibroblasti verso i siti di infezione.
- NF-κB promuove anche l'espressione di recettori che consentono ai neutrofili di migrare dal sangue nel tessuto sottostante.
- Il pathway di NF-κB è attivato in cellule del sistema immunitario in seguito a stimoli esterni (radiazioni ionizzanti e ultravioletti, agenti patogeni, stress, radicali liberi e citochine).
- Inoltre, NF-κB stimola l'espressione di diverse proteine anti-apoptotiche, che prevengono la morte cellulare.
- **Quindi questo singolo fattore di trascrizione coordina e attiva la difesa del corpo, sia rispondendo direttamente ai patogeni e allo stress, sia indirettamente rispondendo alle molecole di segnalazione rilasciate da altri tessuti e cellule infetti.**
- **Il meccanismo di degradazione ubiquitina-proteasoma-dipendente svolge un ruolo chiave nella regolazione della trascrizione di NF-κB**

Attivazione del pathway di NF- κ B



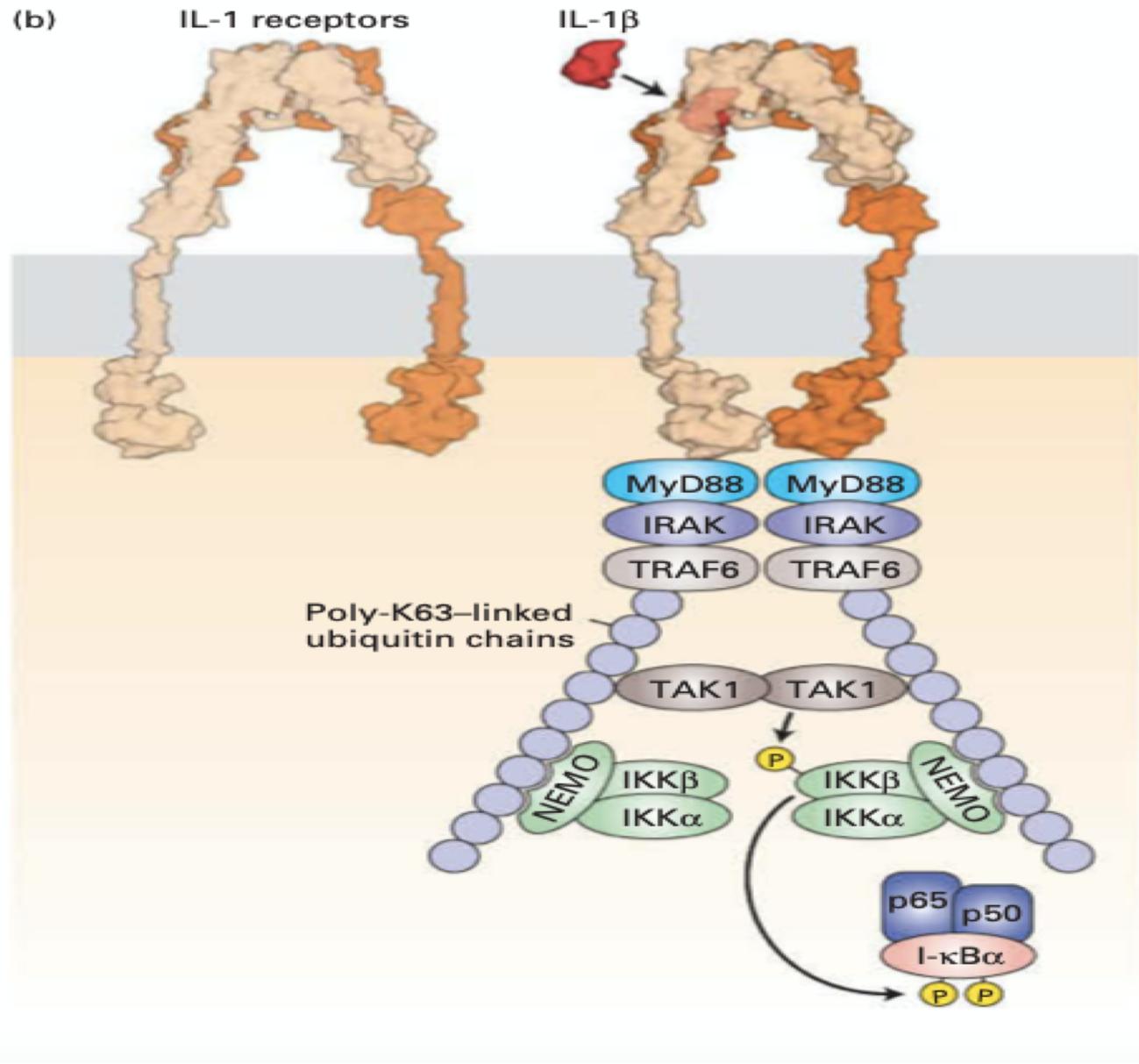
- La via di segnalazione di NF- κ B è attivata in alcune cellule del sistema immunitario quando i componenti delle pareti cellulari batteriche o fungine si legano a determinati recettori *Toll-like* sulla superficie cellulare.
- Questa via è attivata anche dalle citochine infiammatorie, come TNF α (tumor necrosis factor) e interleuchina 1 (IL-1), che vengono rilasciate dalle cellule vicine in risposta all'infezione.
- NF- κ B è un eterodimero costituito da due proteine di 50 e 65 kDa (p50 e p65).
- Le due subunità (p65 e p50) di NF- κ B condividono una regione di omologia alle loro estremità N-terminali necessaria per la dimerizzazione e il legame con il DNA.
- Nelle cellule che non stanno subendo stress o infezione, il legame diretto con l'inibitore I- κ B α sequestra NF- κ B in uno stato inattivo nel citosol.
- Una singola molecola di I- κ B α si lega ai domini N-terminali accoppiati delle subunità p50-p65, mascherando così i loro segnali di localizzazione nucleare.

Attivazione del pathway di NF-κB

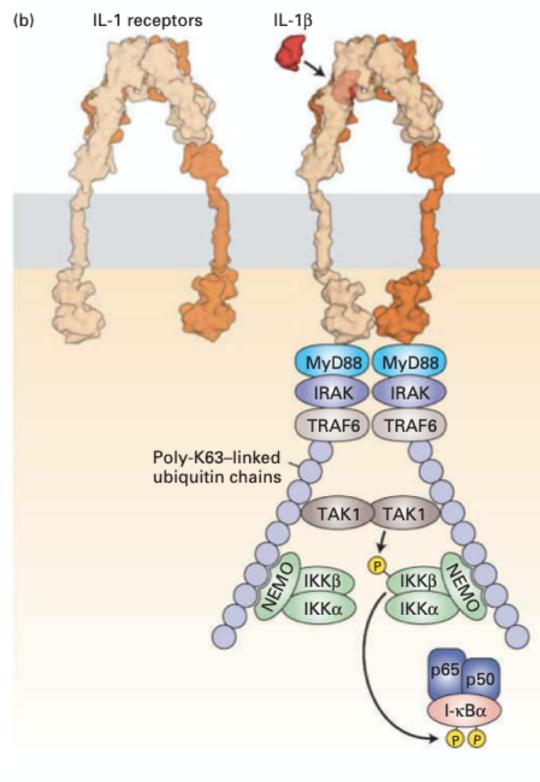


- Un complesso di tre proteine chiamato chinasi I-κB (IKKβ, IKKα e NEMO) agisce a monte di NF-κB ed è responsabile del rilascio del fattore trascrizionale da parte del suo inibitore.
- La subunità β della chinasi I-κB è il punto di convergenza di tutti i segnali extracellulari che attivano NF-κB.
- Entro pochi minuti dalla stimolazione della cellula da parte di un agente infettivo o citochina infiammatoria, la subunità β della chinasi I-κB si attiva per fosforilazione e fosforila a sua volta due residui di serina su I-κBα.
- Una ubiquitina ligasi E3 si lega quindi a queste fosforesine con conseguente poli-ubiquitinilazione di I-κBα, innescando la sua immediata degradazione dal proteasoma.
- La degradazione di I-κBα espone i segnali di localizzazione nucleare su NF-κB, che quindi trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione di una moltitudine di geni bersaglio.
- La segnalazione di NF-κB viene infine disattivata da un circuito di feedback negativo perché uno dei geni la cui trascrizione è immediatamente indotta da NF-κB codifica per l'inibitore I-κBα.

R. Khush et al., 2001, Trends Immunol. 22:260; J-L Luo et al., 2005, J. Clin. Invest. 115:2625.

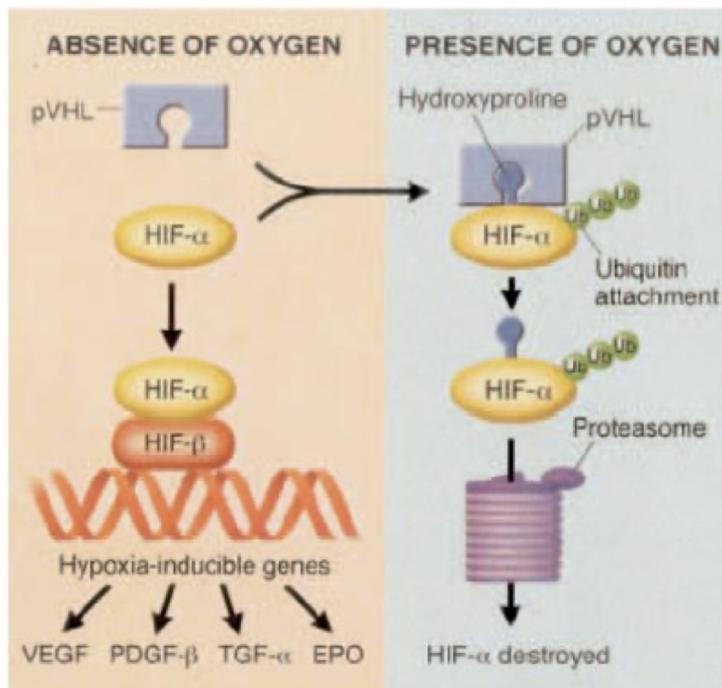


Le catene di poliubiquitina sono impalcature che collegano i recettori alle proteine a valle nella via NF- κ B



- Mentre l'ubiquitina ligasi E3 che ubiquitina I- κ B α determina la degradazione al proteasoma della proteina (K48), un'altra ligasi E3 TRAF6 è coinvolta nel trasferimento di catene di poliubiquitina (K63).
- La risultante catena di ubiquitina (indicata in figura come poli-K63) non causa la degradazione delle proteine; piuttosto, queste catene di poli-ubiquitina agiscono come impalcature che legano le proteine che hanno un dominio legante l'ubiquitina poli-K63.
- Una di queste proteine è la proteina chinasi TAK1, che si attiva legandosi alla catena della poliubiquitina; un'altra è la subunità NEMO della chinasi I- κ B.
- Il legame con l'ubiquitina poli-K63 porta così la chinasi TAK1 e il suo bersaglio, la subunità β della chinasi I- κ B, in prossimità, in modo che TAK1 possa fosforilare e quindi attivare questa chinasi a valle.

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1- α)



Mani A, Gelmann EP (2005) J Clin Oncol. 23, 4776-89.

- Il fattore trascrizionale dell'HIF1- α è attivato a basse concentrazioni di ossigeno (ipossia: pressione parziale di ossigeno minore di 7 mmHg).
- In presenza di ossigeno, una prolina del fattore trascrizionale HIF- α è idrossilata da parte dell'enzima prolil-idrossilasi che invece è inattivo in deprivazione di ossigeno.
- L'idrossilazione di HIF1- α causa la sua ubiquitinazione e degradazione da parte di pVHL (una ubiquitina ligasi che la riconosce come degrone).
- In scarsità di ossigeno HIF1- α non è degradata dalla ubiquitina ligasi. Di conseguenza essa può attivamente promuovere la trascrizione di un repertorio di proteine che fronteggiano lo stress da ipossia.

Degradazione proteasomale ubiquitina-indipendente

- Esistono proteine che sono degradate dal proteasoma 20S (quindi il solo complesso proteolitico). È evidente che in questo caso **la degradazione è indipendente da ATP**. Deve quindi trattarsi necessariamente di proteine in conformazione estesa.
- Esistono evidenze che proteine destinate a questa via degradativa siano quelle naturalmente prive di struttura globulare.
- Altre proteine che seguono questa via sono quelle che hanno subito un danno ossidativo, quelle che non si ripiegano correttamente a causa di mutazioni, come pure quelle che sono andate incontro a «misfolding» per ragioni di diversa natura.

Degradazione proteasomale ubiquitina-indipendente

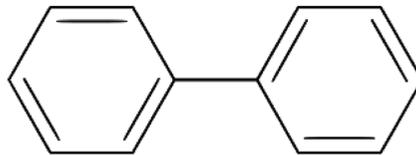
- Non è chiaro quale sia il segnale che destina le proteine alla degradazione operata dal proteasoma 20S. Sembra che una aumentata idrofobicità di superficie (che la stessa ossidazione delle proteine può provocare) possa essere un segnale di riconoscimento. Probabilmente esistono però anche altri meccanismi, basati ad esempio sulla interazione con ulteriori fattori proteici accessori, non associati al proteasoma, che legano la proteina substrato e la destinano al proteasoma medesimo.
- **Sembra che alcune proteine vengano ubiquitinate e destinate alla degradazione a seguito della loro denaturazione.** In questo caso il segnale della ubiquitinazione è dato da sequenze interne esposte a seguito della denaturazione.

Degradazione di proteine modificate ossidativamente

- Esiste un repertorio ampio e complesso di modificazioni chimiche delle proteine indotte da ROS (specie reattive dell'ossigeno). Tali fenomeni interessano molti amminoacidi.
- Sono interessati in particolare triptofano, tirosina, istidina e cisteina e metionina (la cisteina va incontro a ossidazione del gruppo $-SH$, che può diventare $-SO_3^-$; lo zolfo della metionina può aggiungere un ossigeno, diventando metionina sulfone).
- Il processo ossidativo può anche portare alla frammentazione delle proteine, che quindi comporta rotture a livello della catena principale.

Degradazione di proteine modificate ossidativamente

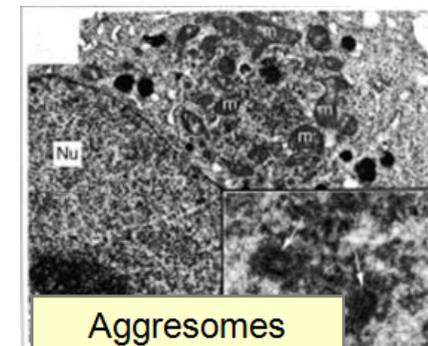
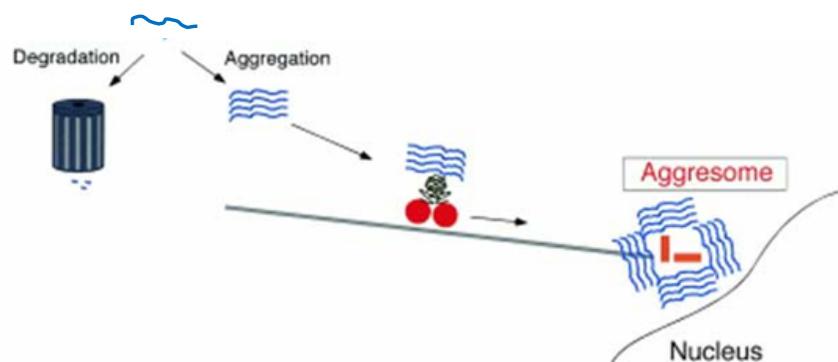
- La tirosina può dimerizzare producendo il bifenile, una struttura in cui due anelli aromatici di due tirosine si legano covalentemente.
- Se le tirosine appartengono a catene polipeptidiche differenti, le proteine possono produrre oligomeri (dimeri, trimeri, tetrameri, ecc.) che, dato il meccanismo di formazione, sono strutture ramificate.
- Anche altre reazioni causate dai ROS portano alla formazione di “cross-links”.



BIFENILE

Degradazione di proteine modificate ossidativamente

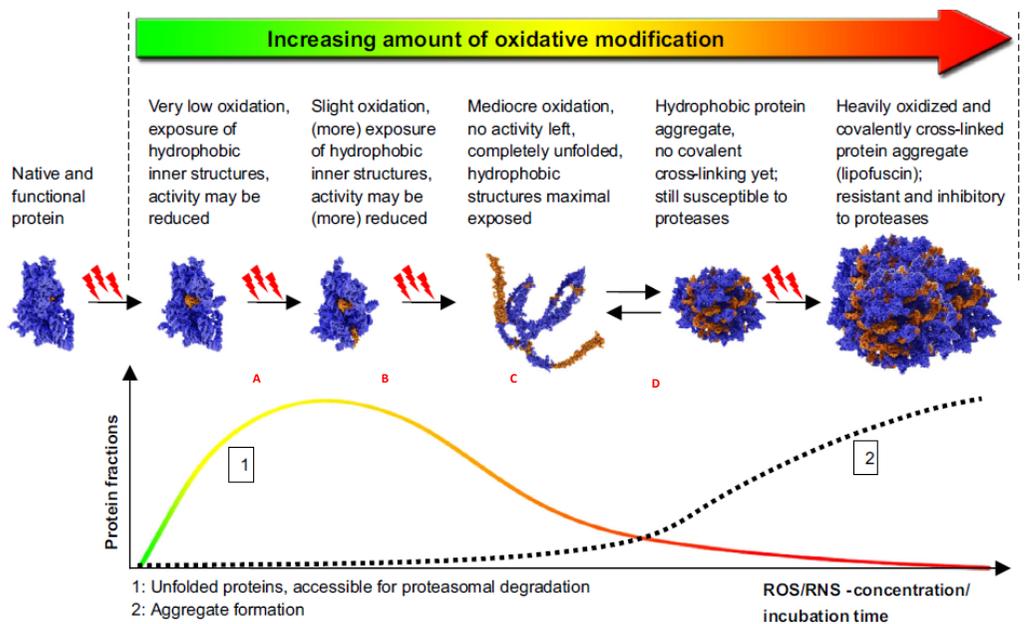
- Nel caso in cui lo stress ossidativo sia particolarmente intenso, le proteine non possono essere più prese tutte in carico dal proteasoma, probabilmente perché si formano grossi aggregati in cui le singole catene sono legate l'un l'altra attraverso cross links, generando strutture ramificate.
- In questo caso esse vengono trasportate agli *aggresomi*, dove si accumulano, e che contribuiscono a formare.
- Gli aggresomi sono raccolte di aggregati proteici, che si trovano presso l'**MTOC (microtubule organizing center, centro organizzatore dei microtubuli, centrosoma)**.
- Il trasferimento agli aggresomi di proteine aggregate avviene lungo i microtubuli, grazie a un apparato proteico specializzato per questo.
- Gli aggresomi sono poi inglobati dal lisosoma mediante autofagia e proteolizzati. Un'altra condizione in cui le proteine vengono convogliate agli aggresomi è quando il sistema del proteasoma è sovraccarico (ad es. a causa di stress termico) e non è più in grado di smaltire interamente il carico di proteine destinate alla degradazione.



Degradazione di proteine modificate ossidativamente

- Un'ossidazione blanda delle proteine può portare alla loro denaturazione con conseguente esposizione del nocciolo idrofobico. Sembra che proteine in queste condizioni siano degradate almeno in buona parte dal proteasoma 20S (senza consumo di ATP), come avviene per le proteine denaturate.
- La degradazione delle proteine ossidate sembrerebbe essere un caso particolare della strategia più generale di rimozione delle proteine denaturate e di controllo qualità del proteoma cellulare.

L'aumento dei livelli di danno proteico ossidativo influisce sulla degradazione proteasoma-dipendente



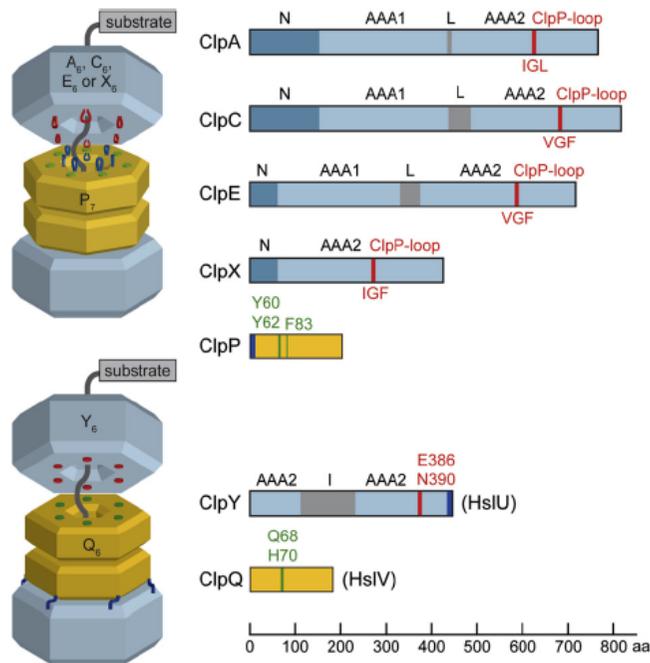
Jung T, Höhn A, Grune T (2014) *Redox Biol.* 2:99-104.

- L'ossidazione di una proteina è un processo continuo che produce una gamma molto ampia di danni che aumentano successivamente.
- Una proteina non danneggiata, nel suo stato nativo di solito non viene riconosciuta come substrato dal proteasoma 20S (**A**).
- Dopo un leggero danno ossidativo, una proteina potrebbe mostrare solo cambiamenti insignificanti nel folding o nell'attività (**B**).
- Dopo ulteriori danni ossidativi, le sequenze idrofobiche, normalmente sepolte all'interno della proteina, sono sempre più esposte sulla superficie (**C**).
- Il cambiamento conformazionale indotto dal danno provoca una significativa perdita di attività fino a quando la proteina non è completamente sfoldata (**D**). Tali proteine sono substrati ideali per la degradazione mediata dal proteasoma e la maggior parte di quelle proteine sono effettivamente riconosciute e rimosse attraverso il proteasoma 20S.

Chaperoni-proteasi Clp batterici

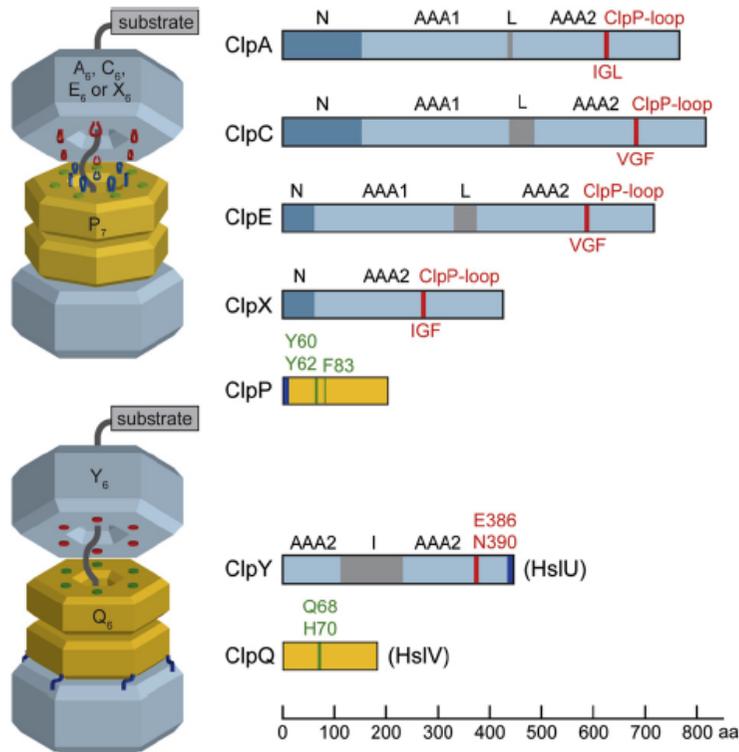
- Nei batteri non esiste il proteasoma.
- La sua funzione è quasi interamente sostenuta dai membri della famiglia delle **proteasi Clp** (**ClpAP**, **ClpCP**, **ClpEP**, **ClpXP**, **HslV**).
- Tutti i complessi Clp hanno un'architettura ad anelli sovrapposti e consistono di due elementi funzionali: 1) **un nucleo centrale proteolitico cilindrico**; 2) **anelli periferici ad attività chaperonica e ATPasica**.
- Gli anelli periferici sono responsabili del riconoscimento del substrato, srotolamento e introduzione della catena polipeptidica estesa attraverso uno stretto poro nel compartimento centrale proteasico, in cui i siti attivi proteolitici sono segregati dal mezzo esterno.

La struttura



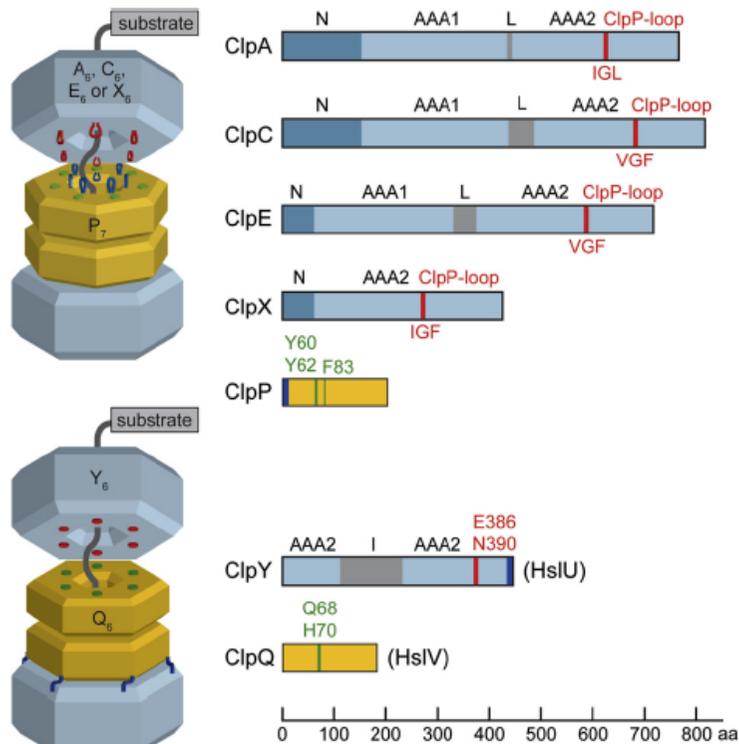
- Le subunità che compongono gli anelli ad attività chaperonica sono alquanto eterogenee in dimensione
- **Tutte le subunità oligomerizzano a dare strutture ad anello omoesameriche** toroidali con un poro centrale attraverso cui le molecole di substrato vengono traslocate per arrivare ai siti proteolitici.
- Le subunità ad attività chaperonica sono assegnate, in base alla loro similarità di sequenza, alla grande famiglia AAA di ATPasi (**ATPases Associated with various cellular Activities**). Solo 3-4 molecole di ATP si legano agli chaperoni esamerici.

La struttura



- Il cilindro proteolitico centrale possiede diversi siti attivi con serine catalitiche, che frammentano le proteine in peptidi di 5-10 aminoacidi. L'esatto meccanismo che porta ad una tale distribuzione delle dimensioni dei peptidi uscenti non è ancora chiara. In ogni caso, come per il proteasoma, si tratta di una degradazione *processiva*.
- L'architettura a due componenti proteasi-chaperone di Clp, l'esistenza di due diversi tipi di complessi proteolitici (**ClpP** e **ClpQ**; masse molecolari delle singole subunità rispettivamente di 23 e 19 kDa) e di molteplici chaperoni, si traduce in un ampio repertorio di complessi proteasi-chaperone.
- In particolare, ClpP può interagire con diversi chaperoni, quali **ClpA**, **ClpC**, **ClpE**, e **ClpX**, formando i rispettivi complessi.

La struttura



- ClpQ interagisce esclusivamente con lo chaperone **ClpY** formando **ClpYQ** (noto anche come **HslV**).
- Tra gli chaperoni-ATPasi esistono due classi distinte: la **classe I** contiene due tipi di moduli AAA per protomero, vale a dire AAA1 e AAA2. Si tratta di moduli distinti anche se evolutivamente correlati. Nella classe I rientrano ClpA, ClpC e ClpE.
- La **classe II** contiene un solo tipo di modulo AAA (in questa classe rientrano ClpX e ClpY).
- I moduli AAA sono domini di legame e idrolisi dell'ATP, un processo associato allo srotolamento delle proteine da degradare.
- Quasi tutti i batteri contengono il ClpXP . Inoltre quasi tutte le specie batteriche ospitano o ClpA o ClpC ma non entrambi. Queste due varianti di Clp sono dunque ortologhe.

La classificazione

Table 1
Clp chaperone–proteases in prokaryotes

Chaperone–protease	Occurrence	Cellular function (substrate example)
Class I		
ClpAP	<i>Proteobacteria</i>	Protein quality control (N-end rule, SsrA-tagged)
ClpCP	<i>Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria</i>	Competence development and sporulation (ComK), transcription (SpoIIAB) and regulation of stress response (CtsR)
ClpEP	<i>Firmicutes</i>	Thermotolerance (CtsR), cell division and virulence
Class II		
ClpXP	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, Spirochaetes, Aquificae, Thermatogae</i>	Protein quality control (SsrA-tagged), cell division (FtsZ, CtrA), transposition (MuA), virulence (Spx)
ClpYQ	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Spirochaetes, Aquificae, Thermatogae</i>	Cell division (SulA), heat shock response (RpoH) and capsule transcription (RcsA)

- Il riconoscimento di molti substrati proteici sembra non specifico.
- Il riconoscimento è determinato dalla presenza di proteine parzialmente o totalmente denaturate che si possono formare in condizioni di stress.
- Tuttavia, esistono anche altri segnali di riconoscimento delle proteine bersaglio, che si basano su caratteristiche intrinseche delle proteine stesse.
- Il più noto di questi è l'N-degrone, che viene tipicamente destinato al complesso ClpAP.
- Dopo che il substrato è stato preso in carico dallo chaperone, deve essere srotolato per passare attraverso lo stretto canale di entrata del complesso. Ci sono tre elementi strutturali fondamentali che permettono questo processo: uno stretto foro di entrata che impedisce il passaggio di proteine strutturate; un lungo canale centrale e dei loop posizionati lungo questo canale, la cui conformazione viene modificata dall'idrolisi di ATP; essi entrano in contatto con la catena del substrato.
- Un altro membro procariotico delle Clp di classe I è **ClpB**, che ha un'attività disaggregasica, cioè scompone gli aggregati nelle singole molecole proteiche e le destina al refolding con il concorso del sistema dell'Hsp70, *ma non si associa ai sistemi proteolitici ClpP o ClpQ.*
- *In lievito esiste un omologo eucariotico di ClpB, denominato **Hsp104**, con ruolo disaggregasico ed è quindi coinvolto nella prevenzione dell'aggregazione proteica.*

Confronti tra il proteasoma degli eucarioti e gli chaperoni- proteasi batterici

1) E' evidente che il proteasoma rappresenta la migliore razionalizzazione dei meccanismi di controllo della proteolisi. La ragione principale sta nel fatto che il complesso 19S da solo è capace di riconoscere tutti i substrati proteici da degradare. Al contrario, nei procarioti esistono molteplici sistemi di riconoscimento (ClpA, ClpC, ClpE, ClpX, ClpY), ognuno dei quali si fa carico di un diverso repertorio di proteine substrato.

2) Il sistema di riconoscimento procariotico delle proteine substrato è meno selettivo di quello eucariotico. La spinta evolutiva verso un incremento di selettività è verosimilmente derivata dall'incremento del numero di specie proteiche individuali (es.: circa 3000 in *Escherichia coli* contro circa 20000 in *Homo sapiens*). La minore selettività del sistema procariotico è attestata dal fatto che ciascun complesso Clp ad azione chaperonica e di riconoscimento delle proteine substrato può prendere in carico un repertorio specifico e relativamente ristretto di specie proteiche tra tutte quelle che compongono il proteoma dell'organismo. Naturalmente il drastico affinamento della capacità di riconoscere le proteine **in modo selettivo che si riscontra negli eucarioti è primariamente riconducibile all' invenzione del sistema dell'ubiquitina, che sposta al di fuori dei complessi proteolitici la funzione di riconoscimento delle proteine substrato.**

3) È interessante notare che almeno due caratteristiche riscontrate nel sistema procariotico si conservano in quello eucariotico: la presenza di domini AAA ad azione ATPasica per lo srotolamento di proteine substrato (riscontrati anche nelle subunità Rpt del complesso 19S del proteasoma) e la regola dell'N-terminale, attuata nei procarioti grazie alla capacità di ClpA di riconoscere gli N-degroni. Il successo evolutivo di questi due dispositivi attesta la loro efficienza nell'adempire le rispettive funzioni.

4) I batteri dispongono di una *disaggregasi*: si tratta di un chaperone della famiglia Clp (ClpB), che è in grado di scomporre grossi aggregati nelle singole proteine che li compongono. Non esiste la controparte eucariotica delle disaggregasi, probabilmente perché gli eucarioti hanno sviluppato allo scopo strategie alternative (come l'indirizzamento degli aggregati all'aggresoma e quindi al lisosoma). Il ruolo disaggregasico di ClpB mette in chiara evidenza che anche in una prospettiva evolutiva la funzione chaperonica e quella proteasica non sono altro che due aspetti dello stesso fenomeno. In effetti ClpB, in se stesso un chaperone, appartiene alla famiglia Clp che include le proteasi ClpP e ClpQ.

5) È infine degno di nota il fatto che il lievito possieda Hsp104, omologo eucariotico di ClpB, e quindi anch'esso dotato di funzione disaggregasica. In lievito convivono quindi il proteasoma, tipico sistema proteolitico eucariotico e Hsp104, chaperone di chiara provenienza procariotica.