



1

## Turn-over delle proteine

- Le proteine vengono regolarmente sintetizzate e degradate.
- La degradazione è necessaria per
  - impedire la formazione di proteine anomale,
  - temporizzare le funzioni enzimatiche,
  - permettere il riciclo di aminoacidi.
- Il turn-over delle proteine è più rapido della vita della cellula.
- Le proteine vengono degradate attraverso l'azione di proteasi e, negli eucarioti, vengono utilizzati diversi sistemi meccanismi.

2

# Turn-over delle proteine

- Ci sono tre principali sistemi di degradazione delle proteine:
  - Ubiquitina-proteosoma
    - Le proteine sono marcate per la degradazione da unità di ubiquitina.
    - I proteosoma 20S inattivo viene attivato da una proteina regolatrice diventando proteosoma 26S
    - Il proteosoma 26S rompe la proteina in peptidi
      - I peptidi sono scissi in aminoacidi liberi da altri processi nella cellula
  - Lisosomi
    - Le proteine entrano nei lisosomi via endocitosi
      - La catepsina e le proteasi degradano i legami peptidici.
  - Calpaina
    - Proteasi attivate da calcio nel citosol della cellula
      - I differenti isomeri sono attivati da differenti concentrazioni di calcio.

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 3 -

3

# Turn-over delle proteine

- In media il tempo di semi-vita di una proteina è correlato con il residuo N-terminale che rimane dopo la rimozione della Met1.
- La presenza di una sequenza PEST (Pro-Glu-Ser-Thr), sono degradate più rapidamente.
- Qualunque modificazione post-traduzionale sulla porzione N-terminale influisce sulla semivita di una proteina.
- Negli eucarioti il ciclo cellulare è controllato, alcuni enzimi regolatori del ciclo sono degradati in fasi particolari del ciclo cellulare in risposta a segnali intra o extra-cellulari.

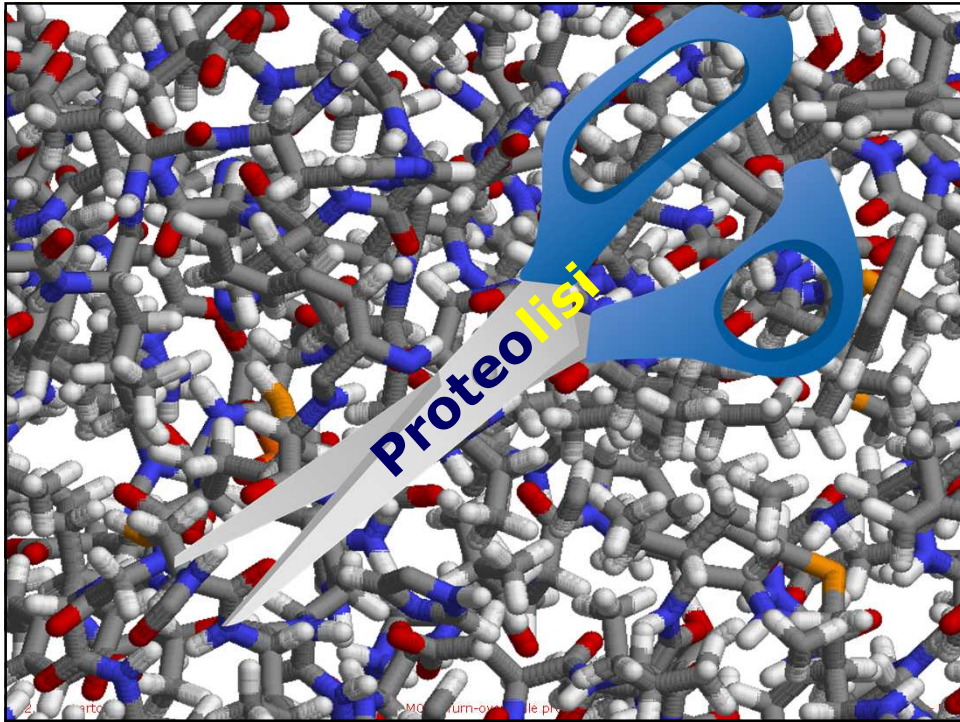
<b>Stabilizzanti</b>	
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	>20 h
<b>Destabilizzanti</b>	
Ile, Gln	~30 min
Tyr, Glu	~10 min
Pro	~7 min
Leu, Phe, Asp, Lys	~3 min
Arg	~2 min

v 2.5 © gsartor 2020

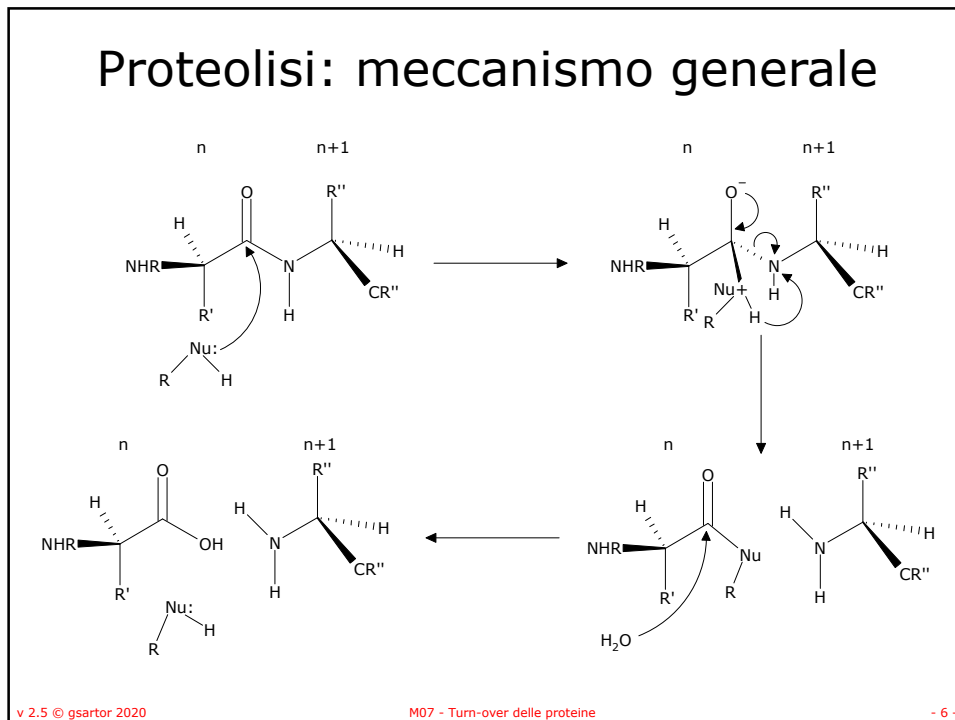
M07 - Turn-over delle proteine

- 4 -

4



5



6

# Enzimi proteolici

- Classi di enzimi proteolitici:
  - Proteasi a serina: enzimi digestivi come tripsina, chimotripsina, elastasi...
  - Differiscono nella specificità del substrato:
    - Chimotripsina: privilegia il taglio del legame peptidico nel quale l'AA che impegna il C=O ha una catena laterale.
    - Tripsina: preferisce un AA carico positivamente (Lys o Arg) nella stessa posizione.

v 2.5 © gsartor 2020

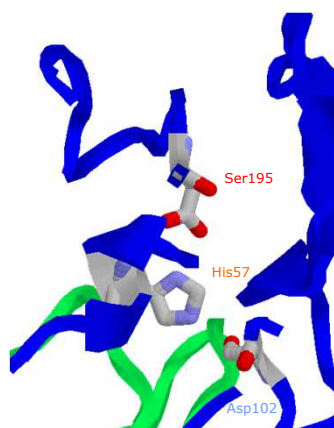
M07 - Turn-over delle proteine

- 7 -

7

## Enzimi proteolici: proteasi a serina

- Il sito attivo (tripsina bovina) è fatto da un residuo di serina (**Ser195**), uno di istidina (**His57**) e uno di aspartato (**Asp102**).
- Durante la catalisi vi è un attacco nucleofilo del OH della serina sul carbonio del carbonile del legame peptidico che deve essere tagliato.
- Durante la reazione un H<sup>+</sup> è trasferito dalla serina all'anello imidazolico dell'istidina, l'aspartato forma un legame H con l'istidina.



3BTK

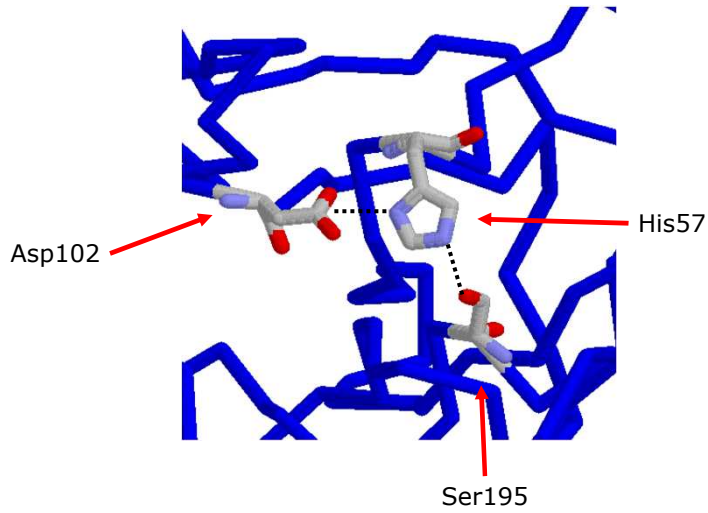
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 8 -

8

# Centro catalitico



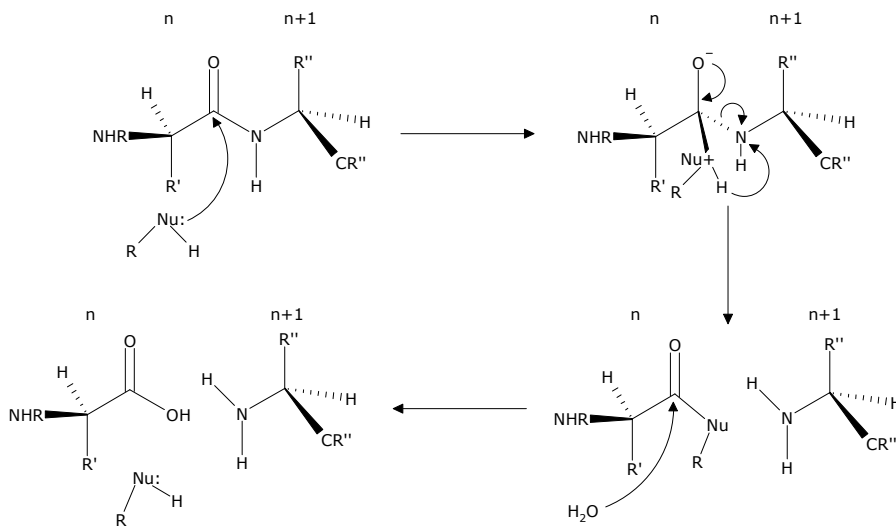
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 9 -

9

# Proteolisi: meccanismo generale



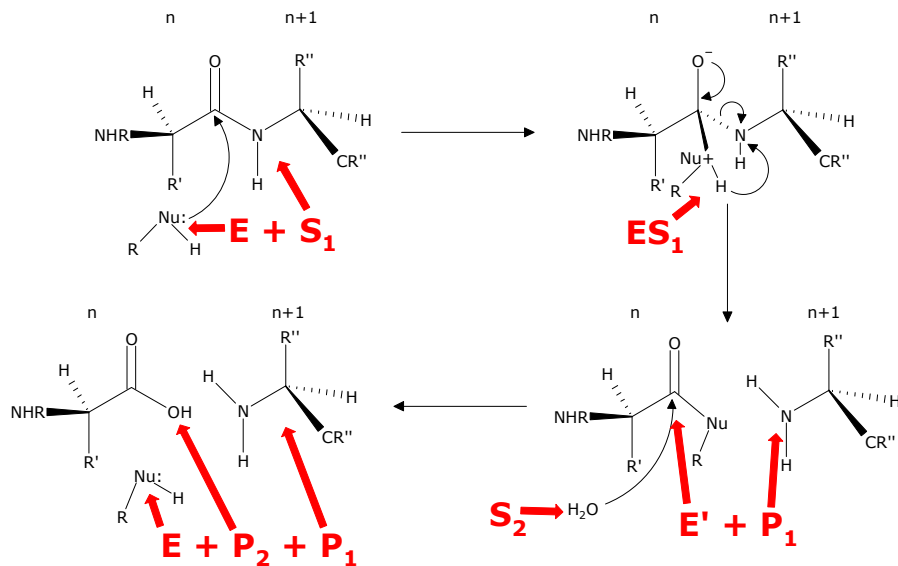
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 10 -

10

## Proteolisi: meccanismo generale



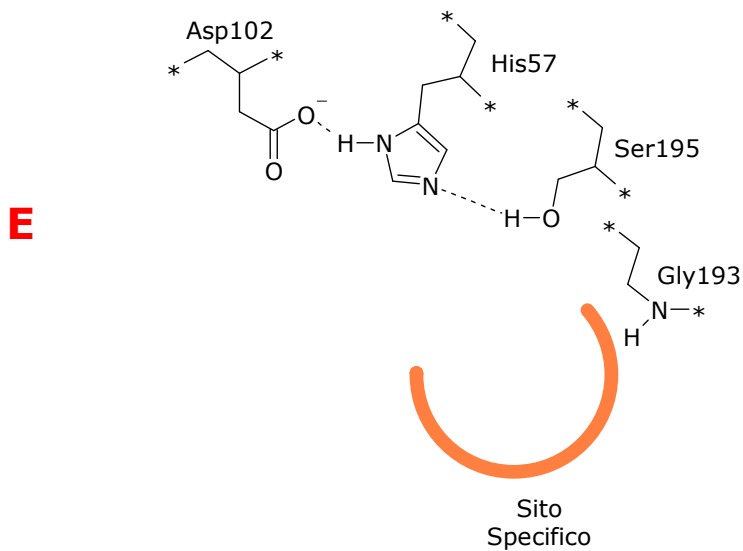
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 11 -

11

## Meccanismo delle proteasi a serina



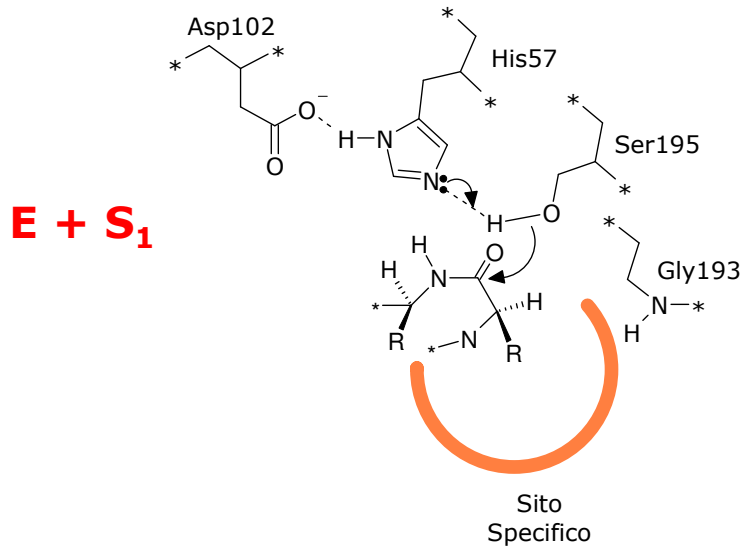
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 12 -

12

## Meccanismo delle proteasi a serina



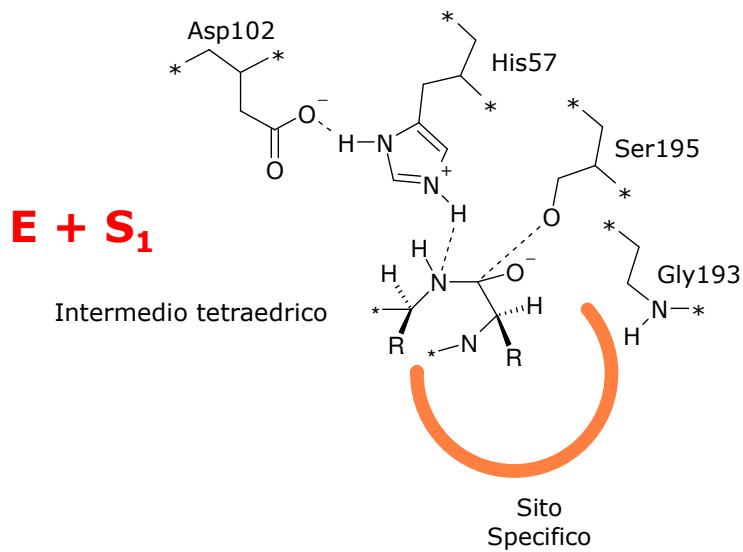
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 13 -

13

## Meccanismo delle proteasi a serina



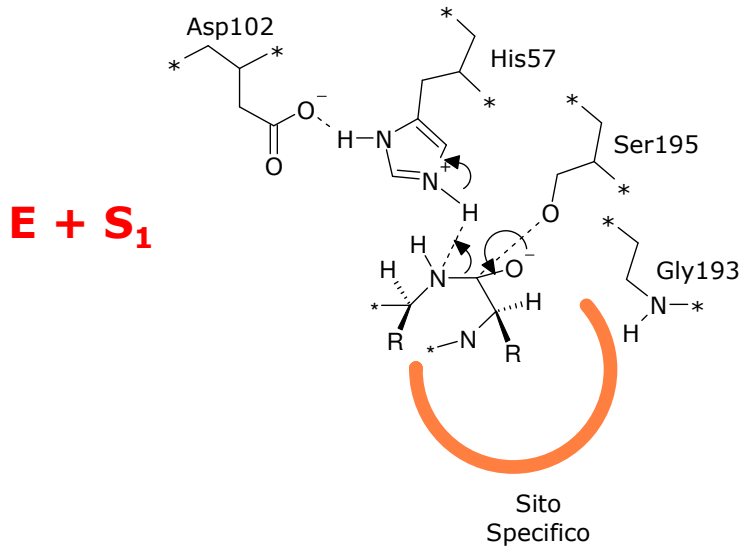
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 14 -

14

## Meccanismo delle proteasi a serina



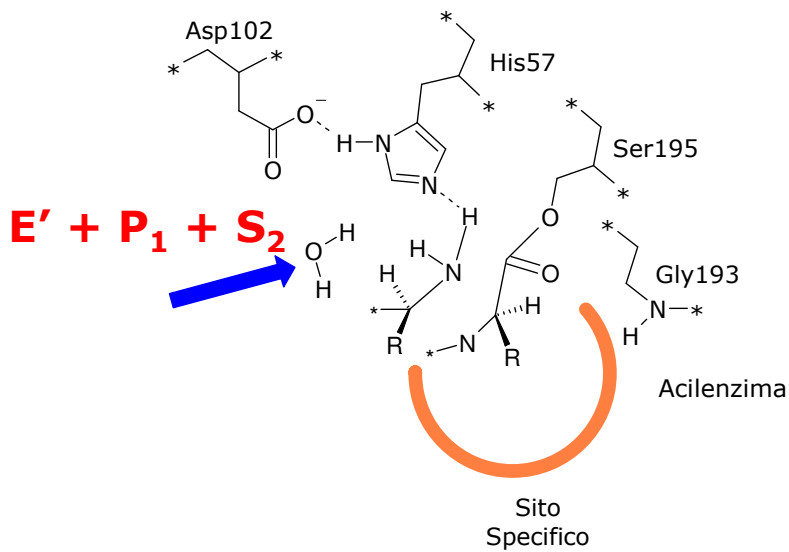
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 15 -

15

## Meccanismo delle proteasi a serina



v 2.5 © gsartor 2020

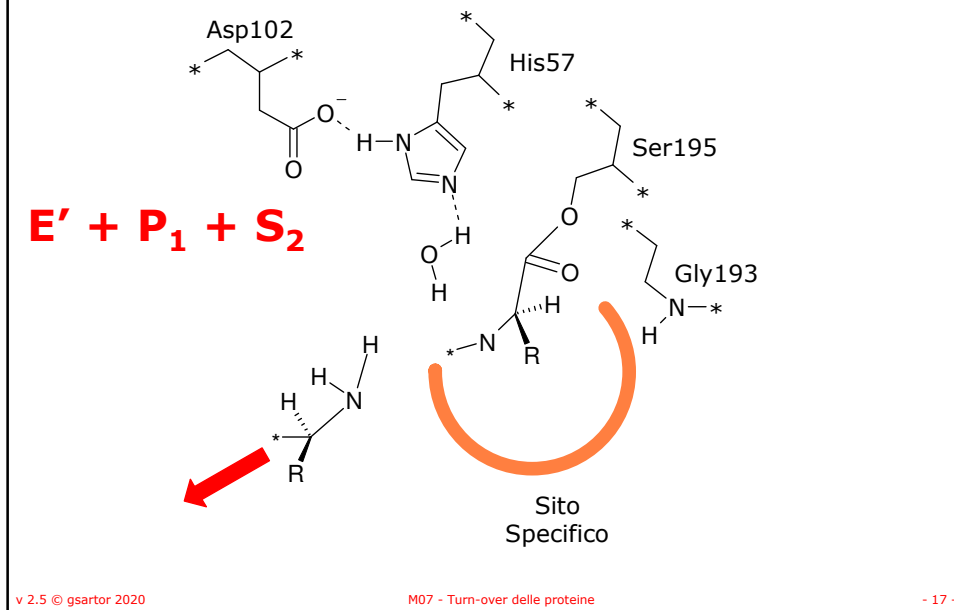
M07 - Turn-over delle proteine

- 16 -

16

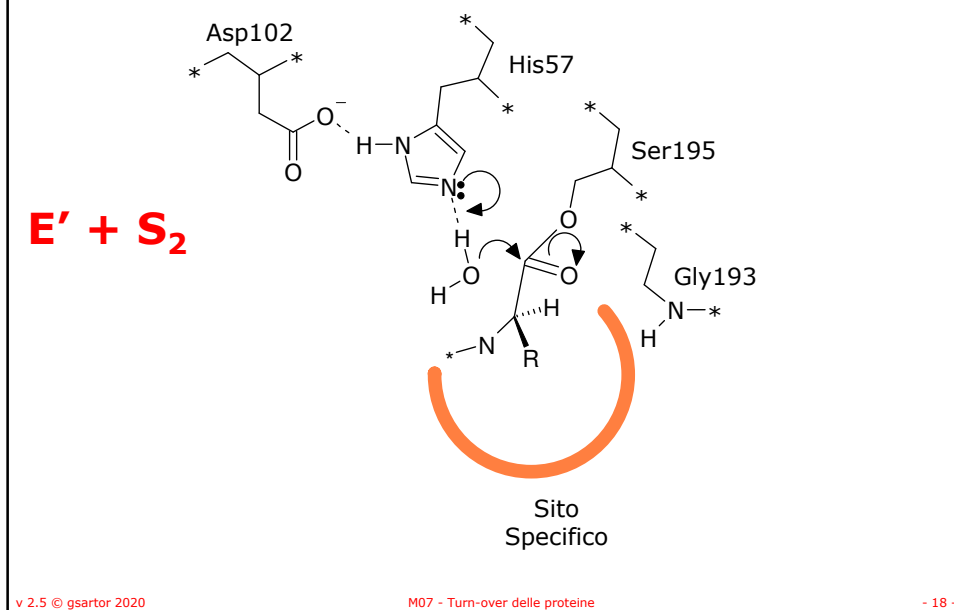


## Meccanismo delle proteasi a serina



17

## Meccanismo delle proteasi a serina

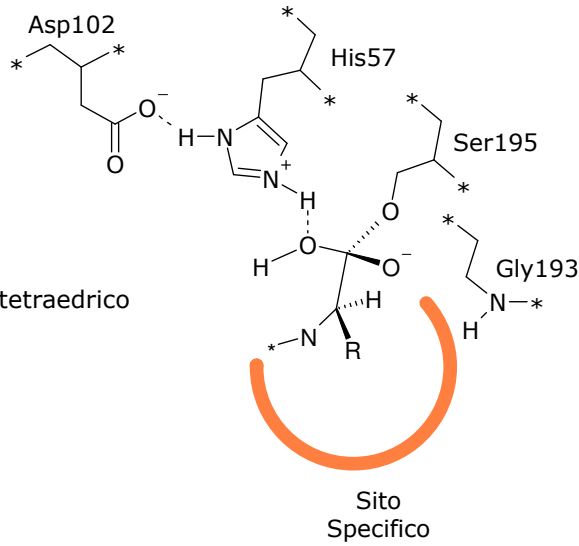


18

# Meccanismo delle proteasi a serina

**E'S<sub>2</sub>**

Intermedio tetraedrico



v 2.5 © gsartor 2020

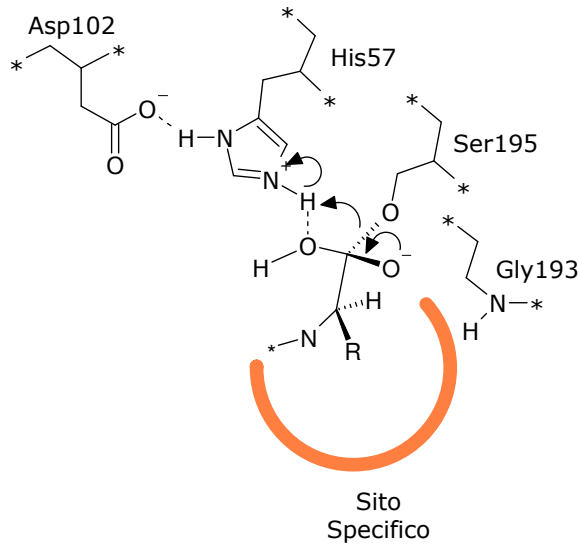
M07 - Turn-over delle proteine

- 19 -

19

# Meccanismo delle proteasi a serina

**E'S<sub>2</sub>**



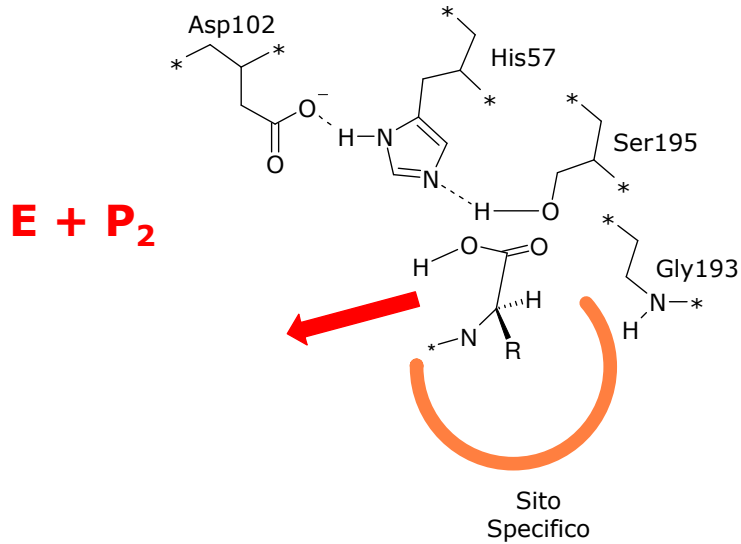
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 20 -

20

## Meccanismo delle proteasi a serina



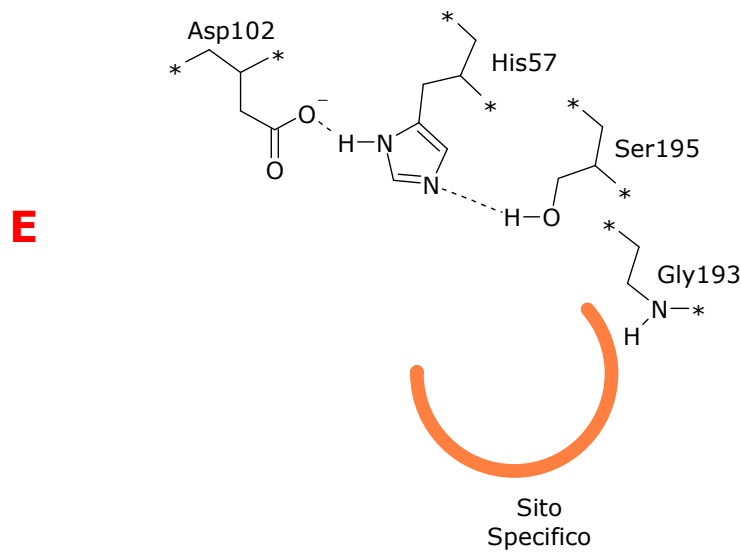
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 21 -

21

## Meccanismo delle proteasi a serina



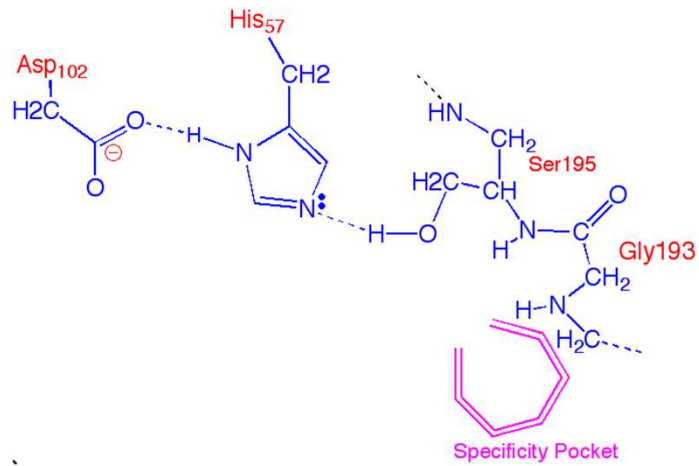
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 22 -

22

## Meccanismo delle proteasi a serina



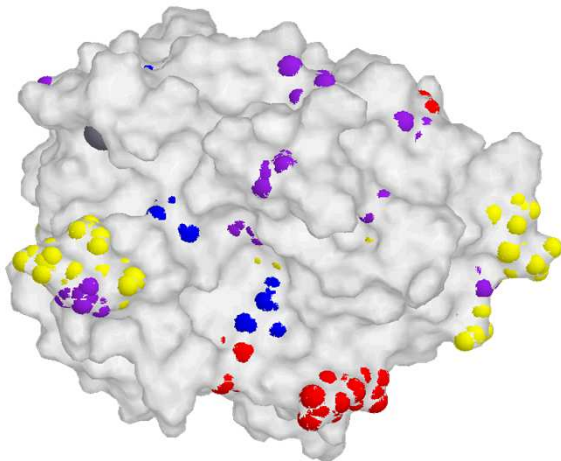
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 23 -

23

## Proteasi a serina



1HAX

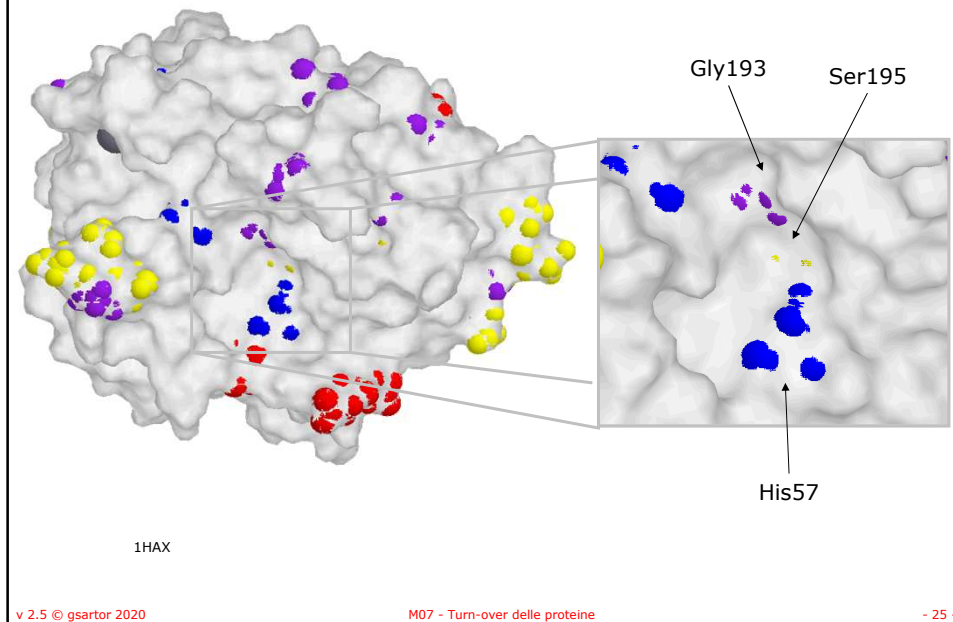
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 24 -

24

## Proteasi a serina



25

## Enzimi proteolitici: proteasi a aspartato

- Le proteasi ad aspartato comprendono:
  - La pepsina (enzima digestivo).
  - Alcune proteasi lisosomiali.
  - L'enzima renale renina.
  - Le proteasi dell'HIV.
- Due residui di aspartato sembra partecipino alla catalisi acido/base nel sito attivo.
- Un aspartato accetta  $H^+$  da una molecola di  $H_2O$  nel sito attivo che attacca il carbonio carbonilico del legame peptidico.
- Simultaneamente l'altro aspartato cede l' $H^+$  all'ossigeno del carbonile del legame peptidico.

v 2.5 © gsartor 2020

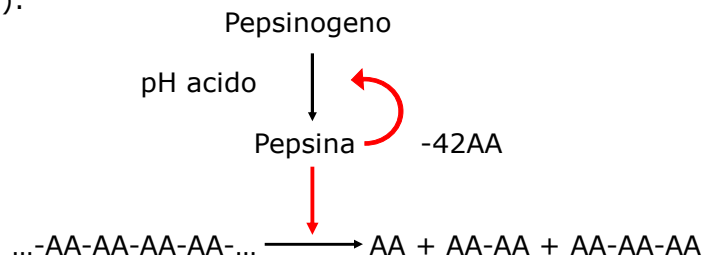
M07 - Turn-over delle proteine

- 26 -

26

# Pepsina

- Secreta dalle cellule della mucosa gastrica (che secernono anche HCl) come pepsinogeno inattivo (40 kD):



- Taglia con maggior frequenza legami tra aminoacidi aromatici, Met, Leu e produce peptidi e pochi aminoacidi liberi.

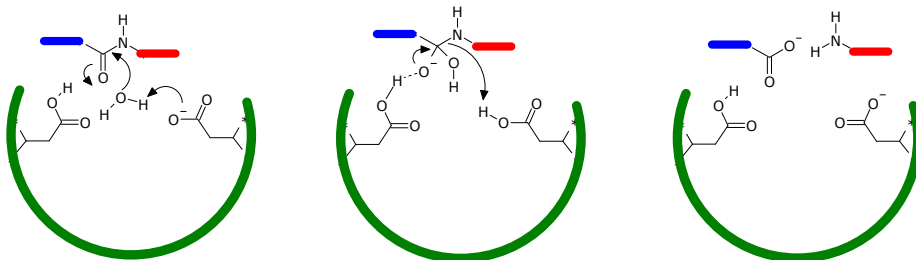
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 27 -

27

# Meccanismo delle proteasi ad aspartato



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 28 -

28

## Enzimi proteolici: metallo proteasi

- Appartengono alla classe delle proteasi a Zinco (metalloproteasi):
  - La carbossipeptidasi (enzima digestivo).
  - Le metalloproteasi della matrice (collagenasi), coinvolte nella degradazione della matrice extra cellulare durante la crescita dei tessuti.
  - Una proteasi lisosomiale.
- Nel sito attivo è presente uno *zinc binding motif*, con due residui di istidina il cui imidazolo complessa lo ione  $Zn^{++}$ .
- Nella catalisi lo  $Zn^{++}$  interagisce con l'ossigeno del  $C=O$  promuovendo l'attacco nucleofilo dell'ossigeno di una molecola di acqua nel sito attivo al carbonio del  $C=O$ .
- Nella carbossipeptidasi un residuo di glutamato facilita la reazione estraendo un  $H^+$  dall'acqua.

v 2.5 © gsartor 2020

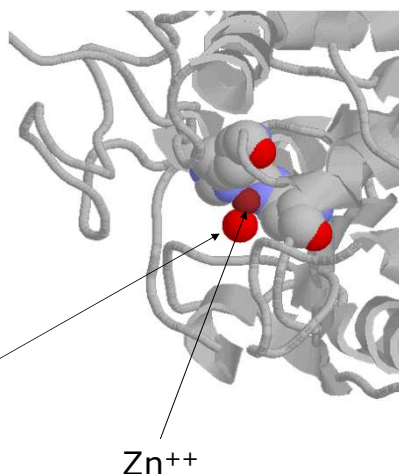
M07 - Turn-over delle proteine

- 29 -

29

## Metallo (zinco) proteasi

- Uno ione  $Zn^{++}$  è coordinato con due atomi di azoto di due His, il carbonile di un Glu e  $H_2O$
- Lo ione  $Zn^{++}$  promuove l'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico da parte dell'atomo di ossigeno dell'acqua legata nel sito attivo
- Il residuo di Glu agisce come base facilita la reazione estraendo un  $H^+$  dall' $H_2O$ .



v 2.5 © gsartor 2020

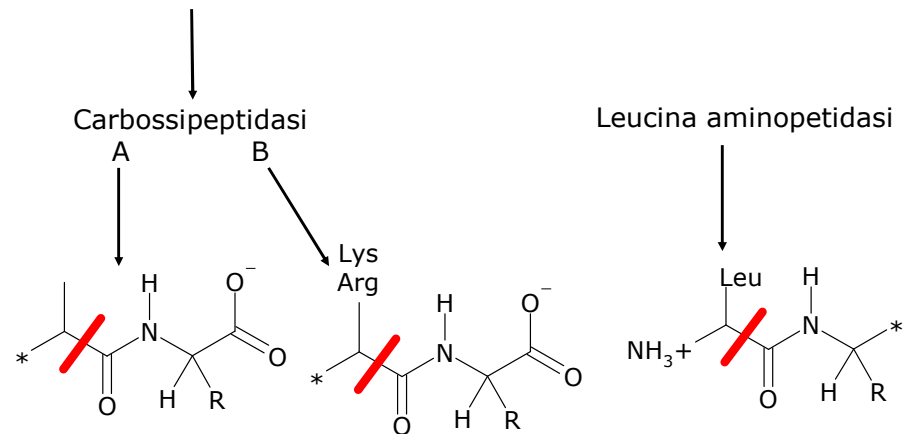
M07 - Turn-over delle proteine

- 30 -

30

## Peptidasi intestinali

Procarbossipeptidasi A e B



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 31 -

31

## Enzimi proteolitici: proteasi a cisteina

- Appartengono alla classe delle proteasi a Cisteina:
  - La papaina (della *Carica Papaya*).
  - Alcune proteasi lisosomiali (cathepsine).
  - Le caspasi che si occupano della degradazione delle proteine dell'apoptosi (morte cellulare programmata).
- Le proteasi lisosomiali a cisteina sono omologhe alla papaina. Sono una famiglia molto grande con svariata specificità di substrato.
- Le caspasi tagliano il lato carbossilico di un aspartato.
- Il meccanismo delle proteasi a cisteina coinvolge la deprotonazione del SH di una cisteina da parte di un residuo vicino di istidina seguito da un attacco nucleofilo dello zolfo al carbonio carbonilico.

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 32 -

32



# Attivazione delle proteasi

- Attivazione delle proteasi:
- La maggior parte delle proteasi sono sintetizzate come proenzimi di maggiori dimensioni.
- L'attivazione consiste nella rimozione di un segmento inibitorio nel proenzima.
- L'attivazione può avvenire dopo che la proteasi è stata secreta nell'apposito compartimento cellulare o nella matrice extracellulare.
- In alcuni casi (attivazione dell'apoptosi) l'attivazione può essere a cascata e portare all'attivazione di proteasi specifiche.

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 33 -

33



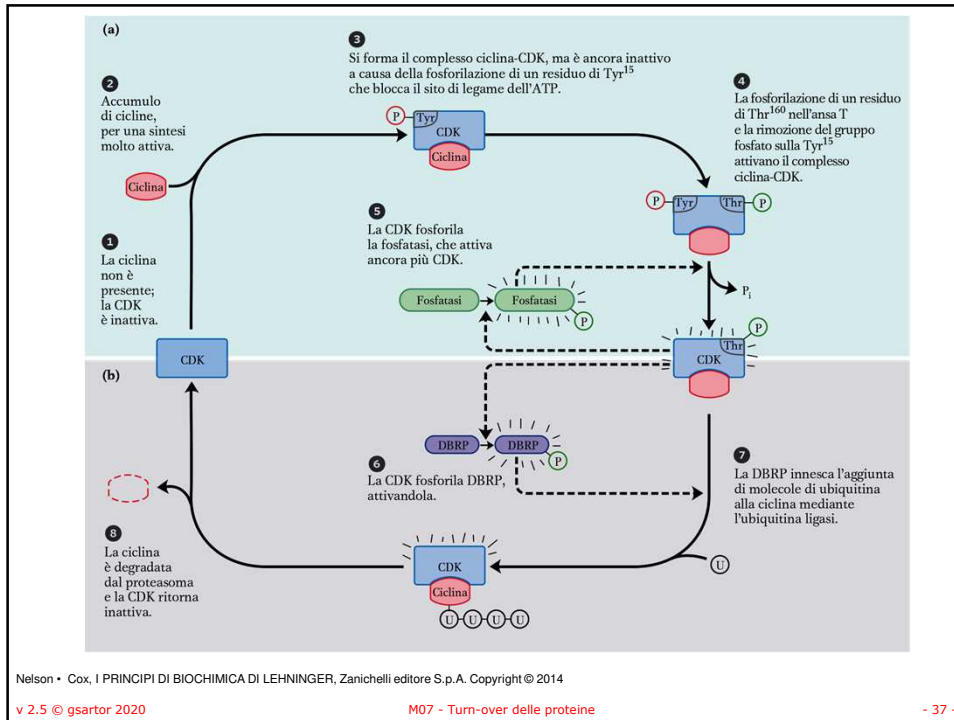
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 34 -

34





37

## DBRP

- DBRP è normalmente inattiva e viene attivata nell'anafase via fosforilazione da CDK-Ciclina B
  - Si lega alla destruction box;
  - Attiva la ubiquitina ligasi che lega l'ubiquitina alla Ciclina B;
  - La Ciclina B viene quindi etichettata per la degradazione via proteosoma.
- DBRP viene defosforilata da una fosforilasi costitutiva.

v 2.5 © gsartor 2020 M07 - Turn-over delle proteine - 38 -

38

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Ubiquitina:
  - Le proteine sono marcate per la proteolisi selettiva dall'ubiquitina, una proteina ubiquitaria altamente conservata.
  - Nel genoma umano ci sono quattro geni che codificano per l'ubiquitina: UBB, UBC, UBA52 e RPS27A
  - Si forma un legame isopeptidico tra il carbossiterminale (Gly) dell'ubiquitina e un gruppo NH<sub>2</sub> di una lisina della proteina da degradare.
    - Il processo è ATP dipendente.
    - Sono coinvolti tre enzimi (E1, E2 e E3).

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 39 -

39

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Inizialmente il carbossiterminale dell'ubiquitina è ATTIVATA tramite un legame tioestere al *Ubiquitin-Activating Enzyme* (E1) attraverso una reazione ATP dipendente (EC 6.2.1.45).
- L'ubiquitina viene quindi trasferita ad un gruppo sulfidrilico del *Ubiquitin-Conjugating Enzyme* (E2) (EC 2.3.2.23).
- Una *Ubiquitin-Protein Ligase* (E3) trasferisce l'ubiquitina attivata al gruppo ε-amino di una lisina formando un legame isopeptidico.
- Ci sono diverse ligasi dell'ubiquitina che differiscono per la specificità e per il meccanismo:
  - HECT: EC 2.3.2.26
  - RING e UBOX: EC 2.3.2.27.

v 2.5 © gsartor 2020

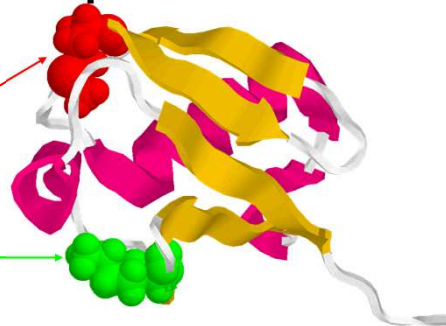
M07 - Turn-over delle proteine

- 40 -

40

# Ubiquitina - ubiquitinazione

- Più ubiquitine sono legate per formare una catena.
- Il **carbossiterminale** forma un legame con il gruppo  $\epsilon$ -amino della **Lys48** di una catena adiacente di ubiquitina.



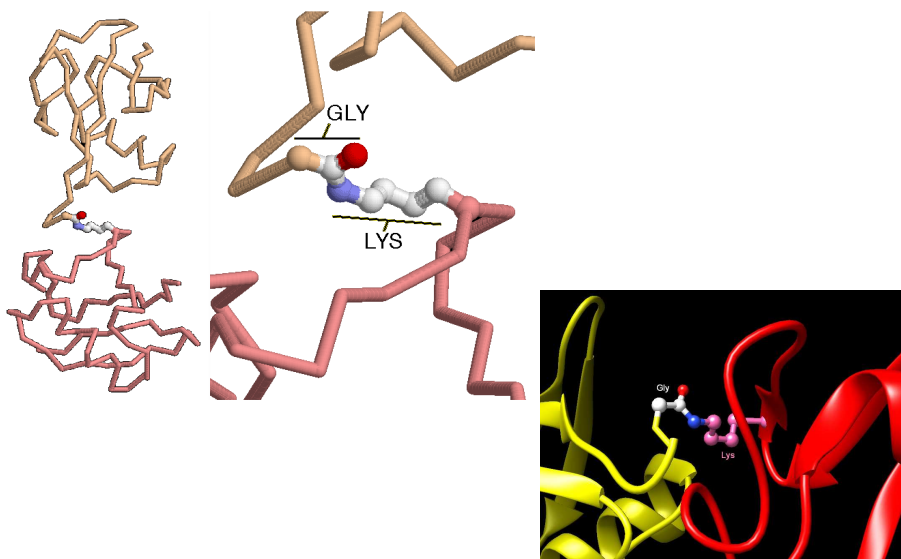
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 41 -

41

# Ubiquitina - ubiquitinazione



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 42 -

42



# E1-E2-E3

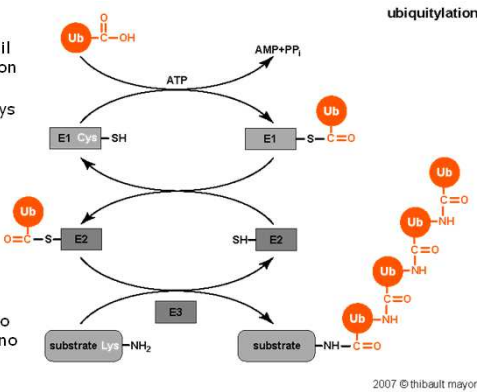
- Attivazione - **E1 ubiquitin-activating enzyme (EC 6.2.1.45)**

- Formazione di un intermedio ubiquitino-adenilato. E1 lega ATP e Ubiquitina e si forma il derivato acil adenilato al C-terminale dell'Uq con rilascio di PPi
- Trasferimento dell'ubiquitina a un residuo di Cys di E1 con rilascio di AMP e formazione di un legame tioestere. Il genoma umano contiene due geni che codificano per E1: UBA1 and UBA6.

- Coniugazione - **E2 ubiquitin-conjugating enzyme (EC 2.3.2.23)**

- Catalizza il trasferimento dell'Uq da E1 al Cys nel sito attivo di E2 attraverso una reazione trans(tio)esterificazione.
- E2 si lega sia a Uq attivata che a E1. Nell'uomo ci sono 35 diversi E2, negli altri eucarioti ci sono tra 16 e 35 diversi E2 che condividono il ubiquitin-conjugating catalytic (UBC) fold.

- Legame - **E3 ubiquitina ligasi** catalizza la formazione del legame isopeptidico tra la Lys bersaglio e la Gly C-terminale di Uq.

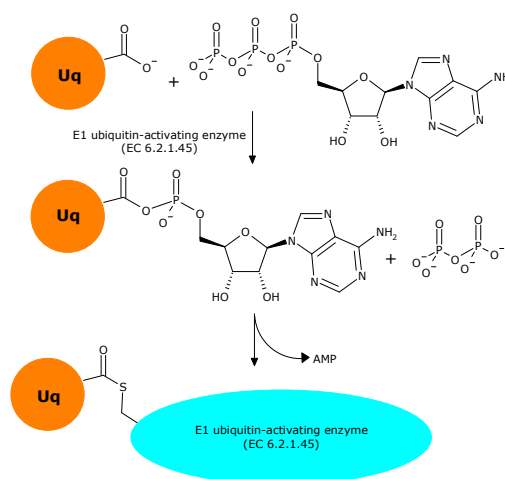


45

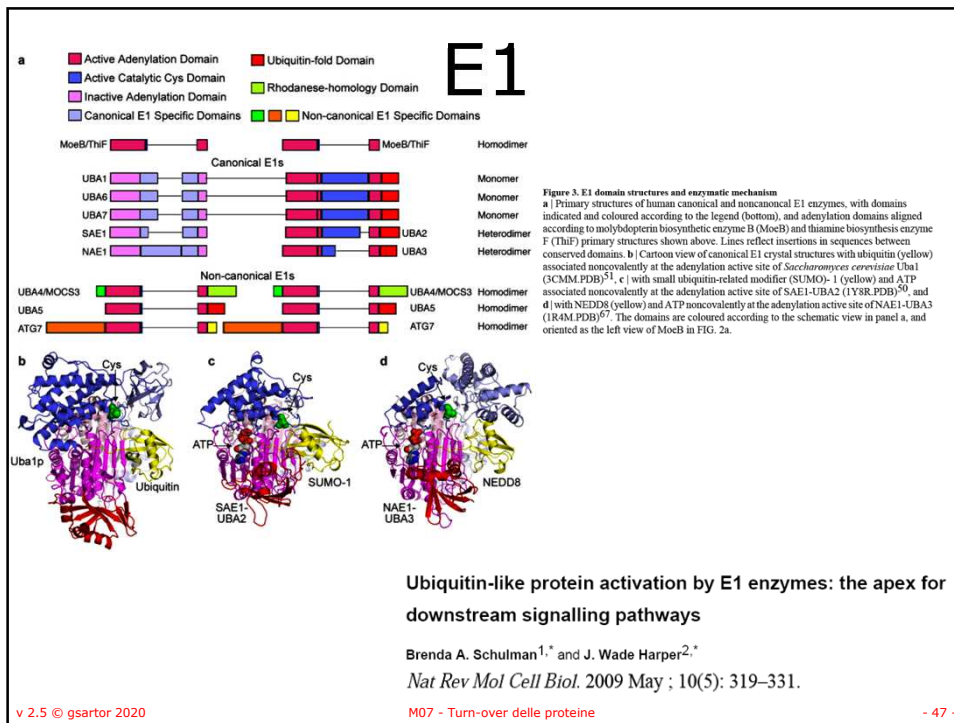
# EC 6.2.1.45

- E1 ubiquitin-activating enzyme**

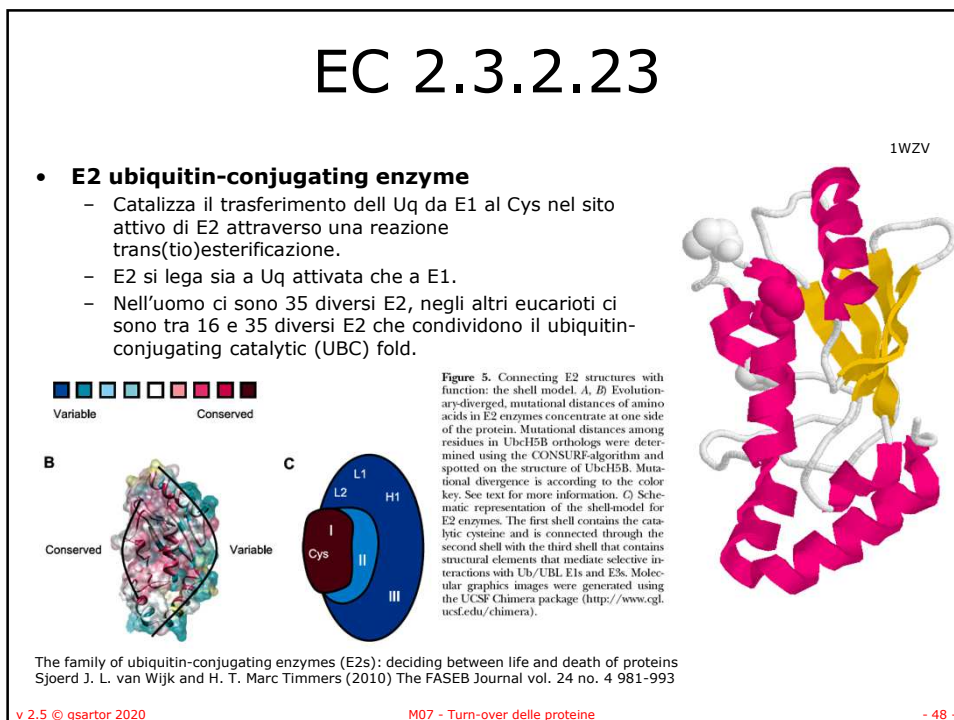
- Formazione di un intermedio ubiquitino-adenilato. E1 lega ATP e Ubiquitina e si forma il derivato acil adenilato al C-terminale dell'Uq con rilascio di PPi
- Trasferimento dell'ubiquitina a un residuo di Cys di E1 con rilascio di AMP e formazione di un legame tioestere. Il genoma umano contiene due geni che codificano per E1: UBA1 and UBA6.



46



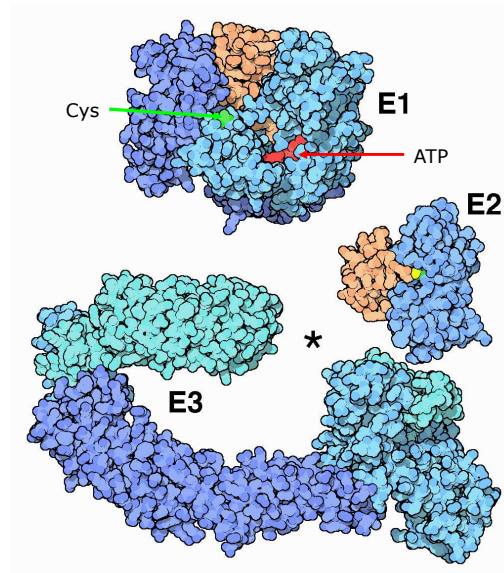
47



48



# E1-E2-E3



v 2.5 © gsartor 2020

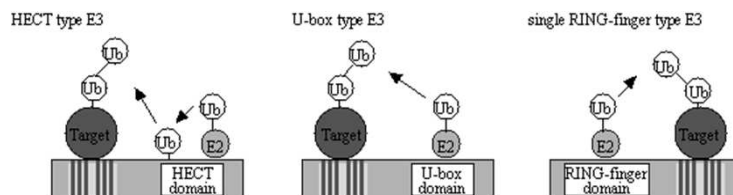
M07 - Turn-over delle proteine

- 49 -

49

# E3

- E3 funziona come sistema di riconoscimento del substrato e di E2
- Alcuni E3 sono attivati da E2
- Gli enzimi E3 possiedono uno o due domini:
  - Il dominio HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus) che lega in modo transiente Uq formando un tioestere
  - Il dominio RING (really interesting new gene) o un dominio molto simile (U-box) che catalizzano il trasferimento diretto di Uq da E2 al substrato

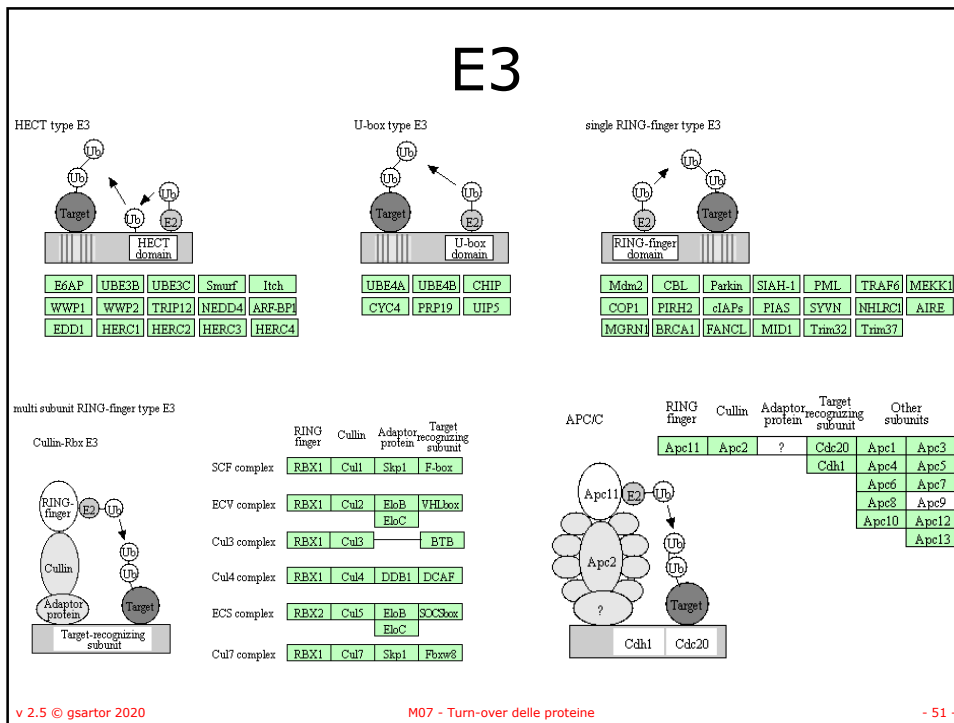


v 2.5 © gsartor 2020

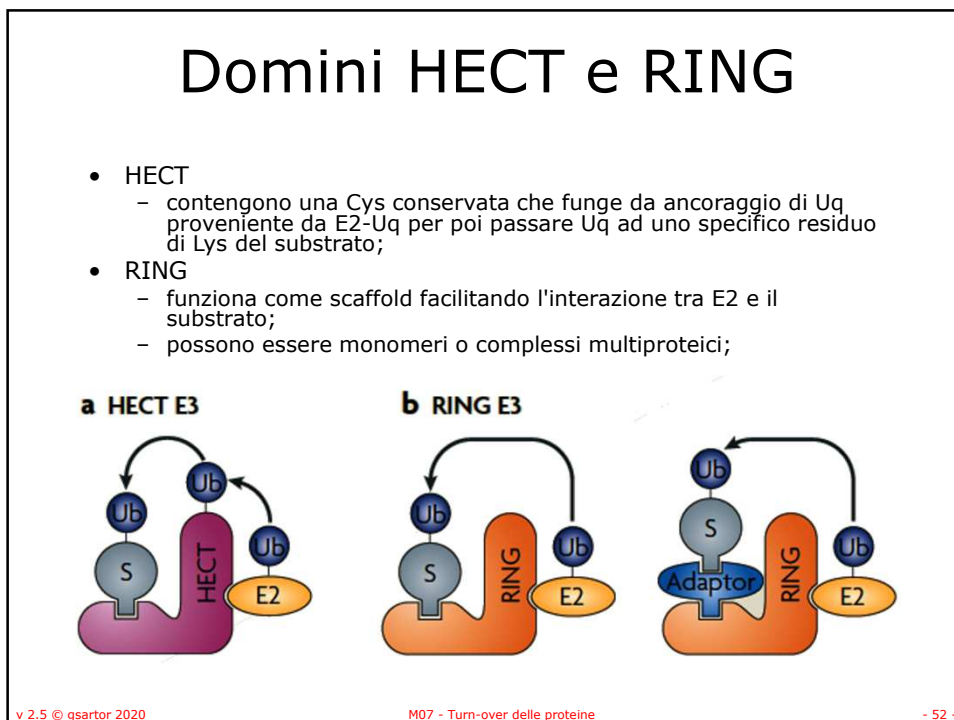
M07 - Turn-over delle proteine

- 50 -

50

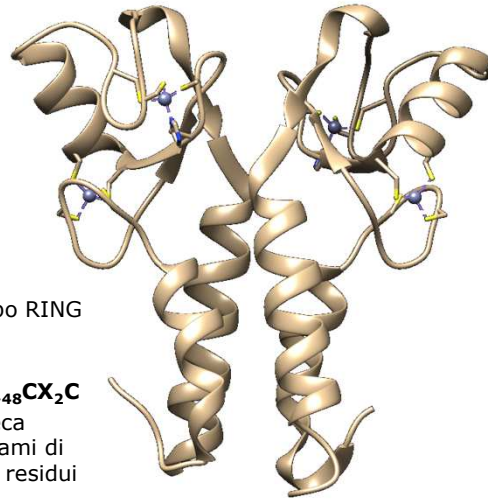
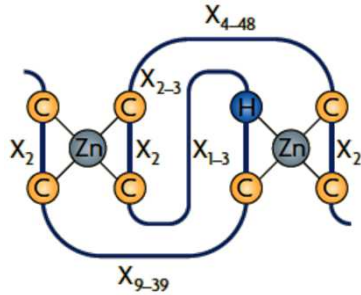


51



52

# Domini HECT e RING



- La maggior parte di E3 sono del tipo RING domain e sono caratterizzate dalla sequenza **CX<sub>2</sub>CX<sub>9-39</sub>CX<sub>1-3</sub>HX<sub>2-3</sub>(C/H)X<sub>2</sub>CX<sub>4-48</sub>CX<sub>2</sub>C** che produce un motivo a croce greca stabilizzato dalla formazione di legami di coordinazione di due ioni Zn<sup>++</sup> con residui di His e Cys.

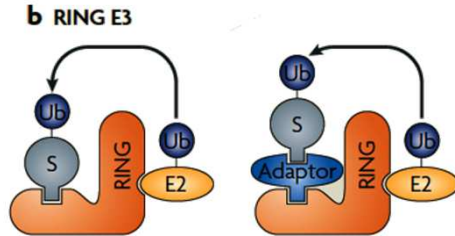
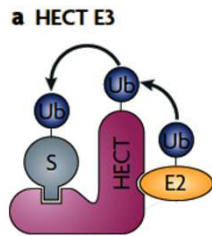
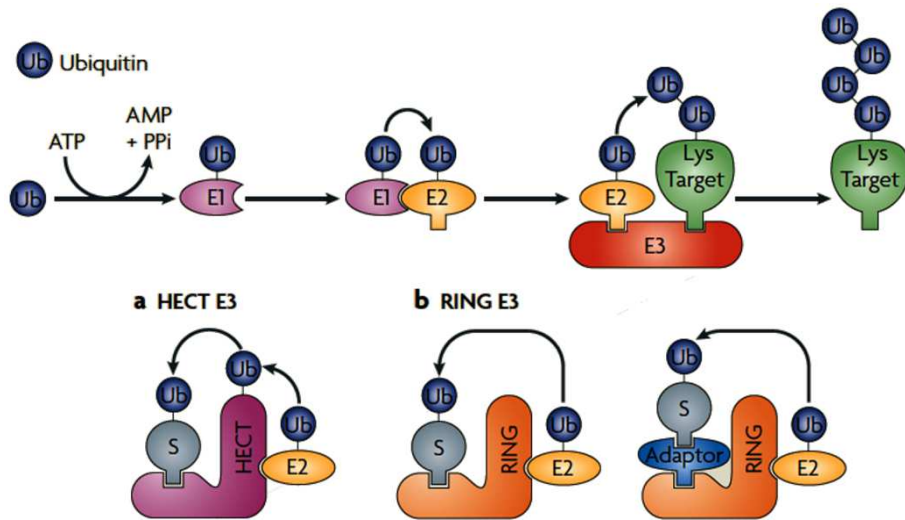
2y43

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 53 -

53



Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases

Daniela Rotin\* and Sharad Kumar\*  
400 | JUNE 2009 | VOLUME 10

www.nature.com/reviews/molcellbio

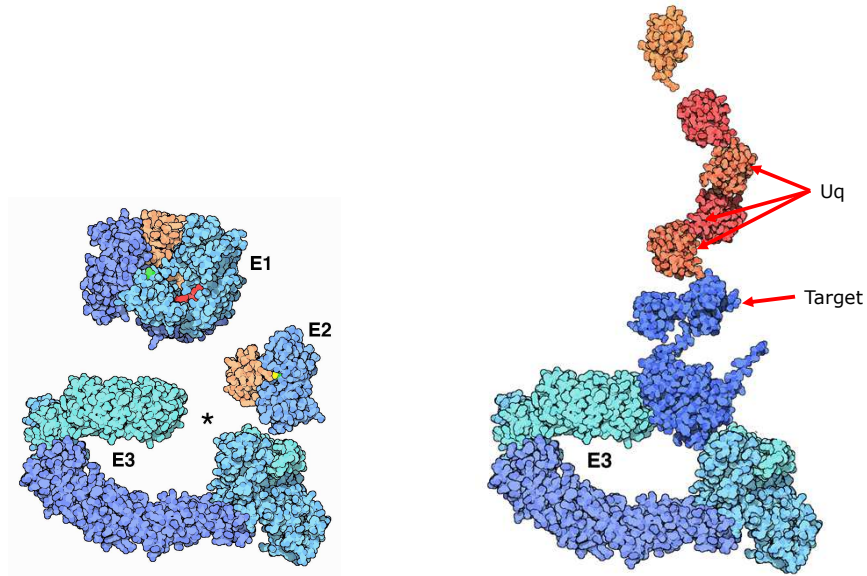
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 54 -

54

# E1-E2-E3

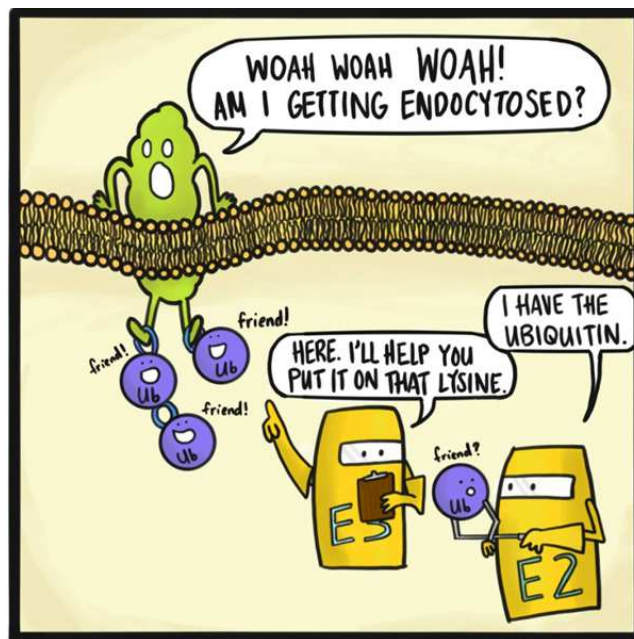


v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 55 -

55



v 2.5 © gsartor 2020

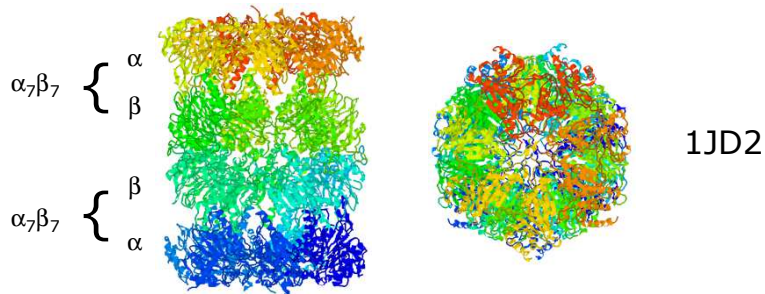
M07 - Turn-over delle proteine

- 56 -

56

# Proteasoma

- La degradazione selettiva di una proteina avviene nel proteasoma. Un complesso proteico presente nella cellula.
- Il *core complex* del proteasoma, ha un coefficiente di sedimentazione di 20S ed è costituito di 14 subunità di due tipi ( $\alpha_7\beta_7$ ).
  - Le sette subunità  $\alpha$  formano un anello a struttura cilindrica.
  - Le sette subunità  $\beta$  formano l'anello centrale.



v 2.5 © gsartor 2020

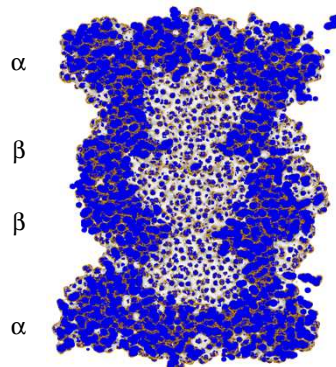
M07 - Turn-over delle proteine

- 57 -

57

# Proteasoma

- Il *core complex* del proteasoma racchiude una cavità fatta di tre compartimenti collegati da uno stretto passaggio.
- L'attività proteasica è associata a tre delle subunità  $\beta$  ognuna con differente specificità per il substrato.



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 58 -

58

# Sistema Ubiquitina-proteasoma

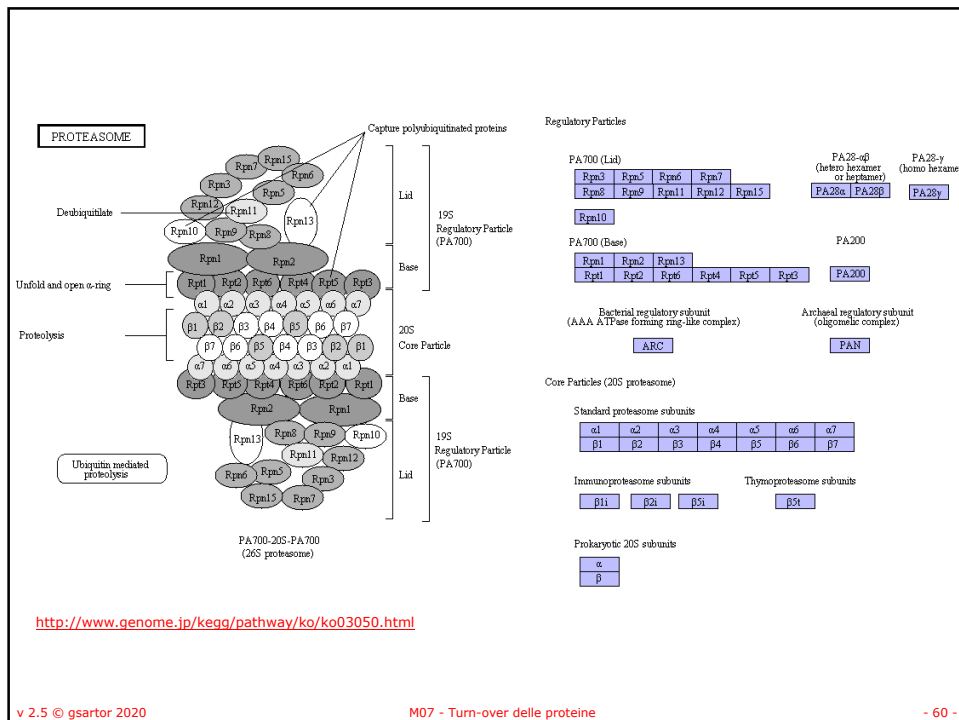
1. Una subunità  $\beta$  ha una attività simile alla chimotripsina con preferenza per Tyr o Phe come AA al carbonile del legame peptidico.
2. Una subunità  $\beta$  ha una attività simile alla tripsina con preferenza per Arg o Lys al carbonile del legame peptidico.
3. Una subunità  $\beta$  ha una attività post-glutamil con preferenza per glutamato o un altro residuo acido.
  - Non sono coinvolti residui di cisteina o serina.
  - L'attività idrolasica del proteasoma costituisce una famiglia di proteasi a treonina.

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 59 -

59



v 2.5 © gsartor 2020

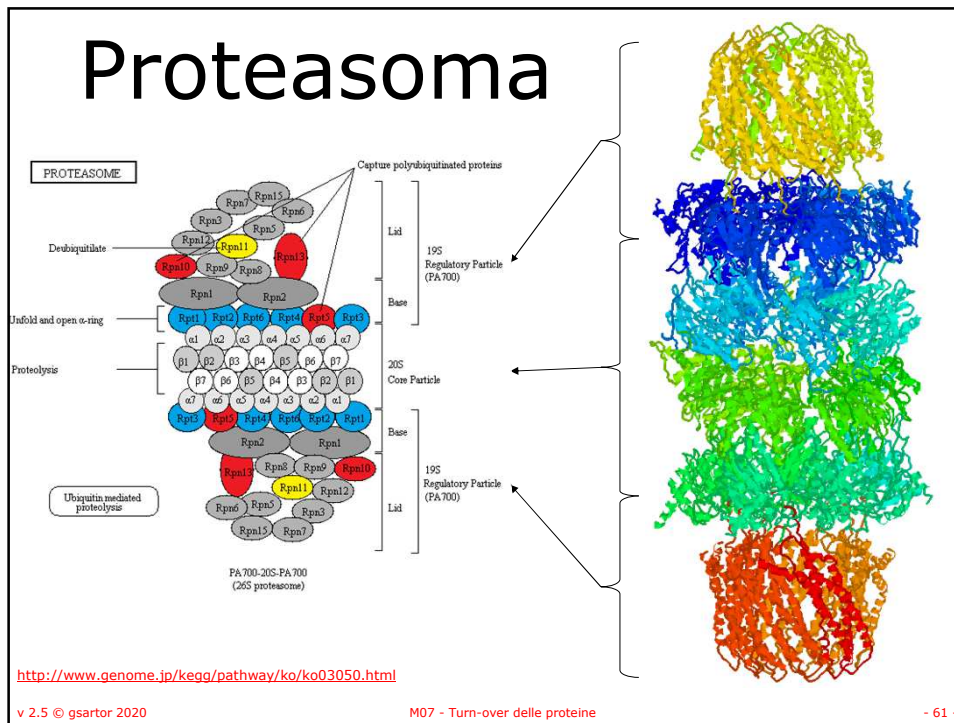
M07 - Turn-over delle proteine

- 60 -

60



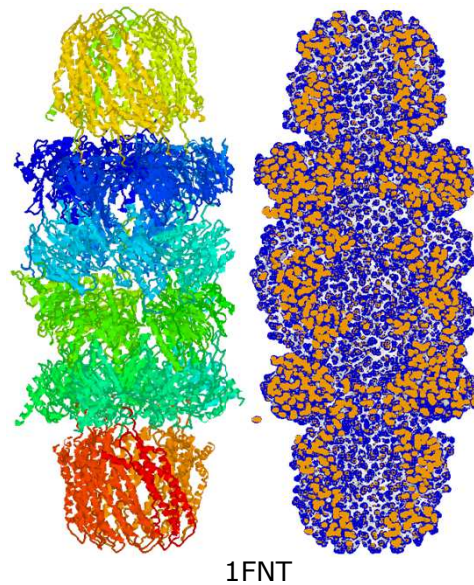
# Proteasoma



61

# Proteasoma

- Nella struttura del *core complex* del proteasoma non ci sono apparenti aperture verso l'esterno.
- Si è postulata l'interazione con un *cap complex* che apra il passaggio verso l'esterno.
- È stato cristallizzato il *core complex* 20S del proteasoma con il *cap complex* 11S.
- L'interazione del *cap complex* 11S altera la conformazione del dominio N-terminale delle subunità  $\alpha$  del *core complex* permettendo l'accesso dall'esterno.

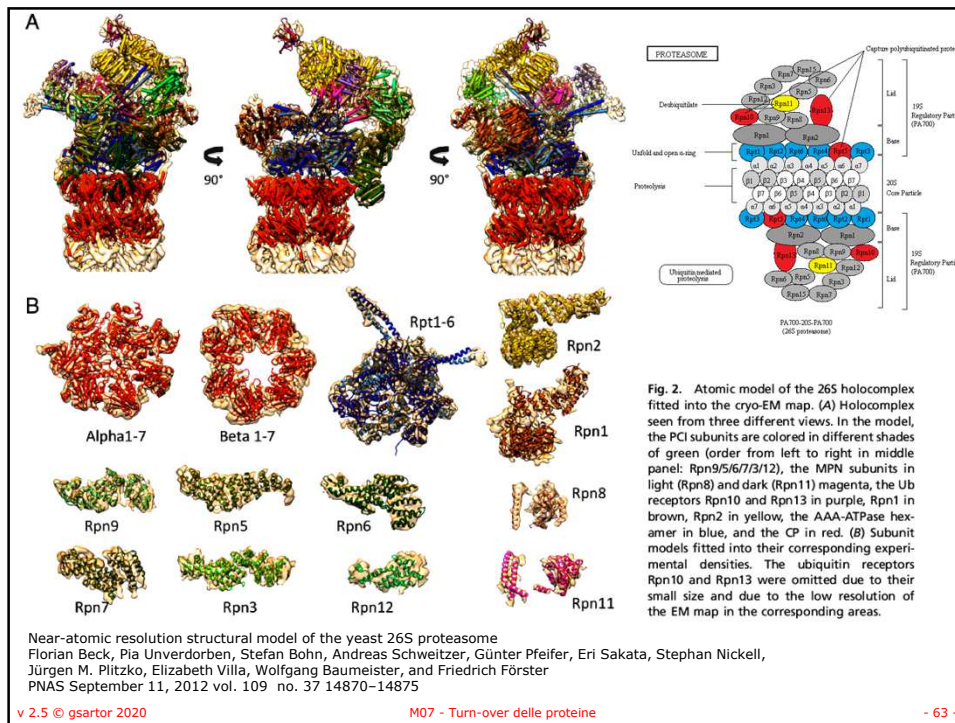


v 2.5 © gsartor 2020

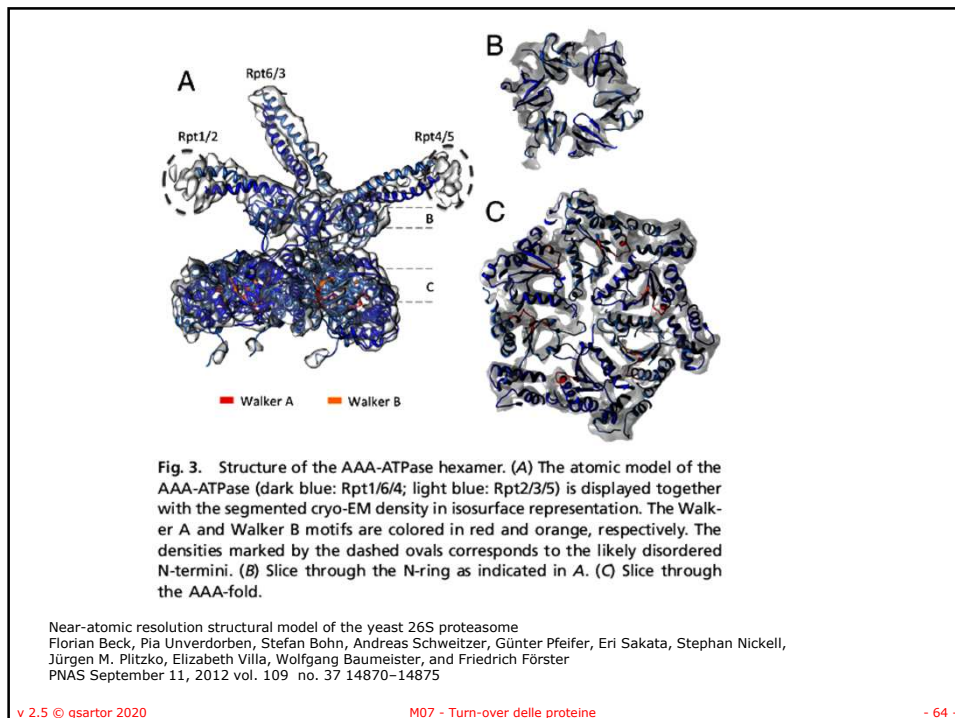
M07 - Turn-over delle proteine

- 62 -

62

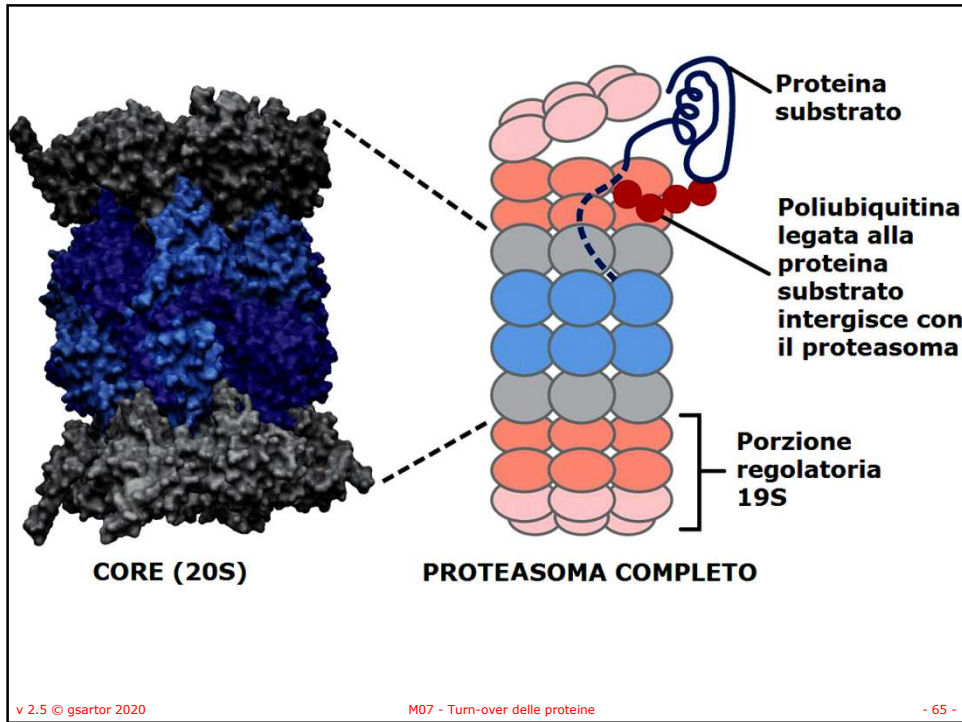


63

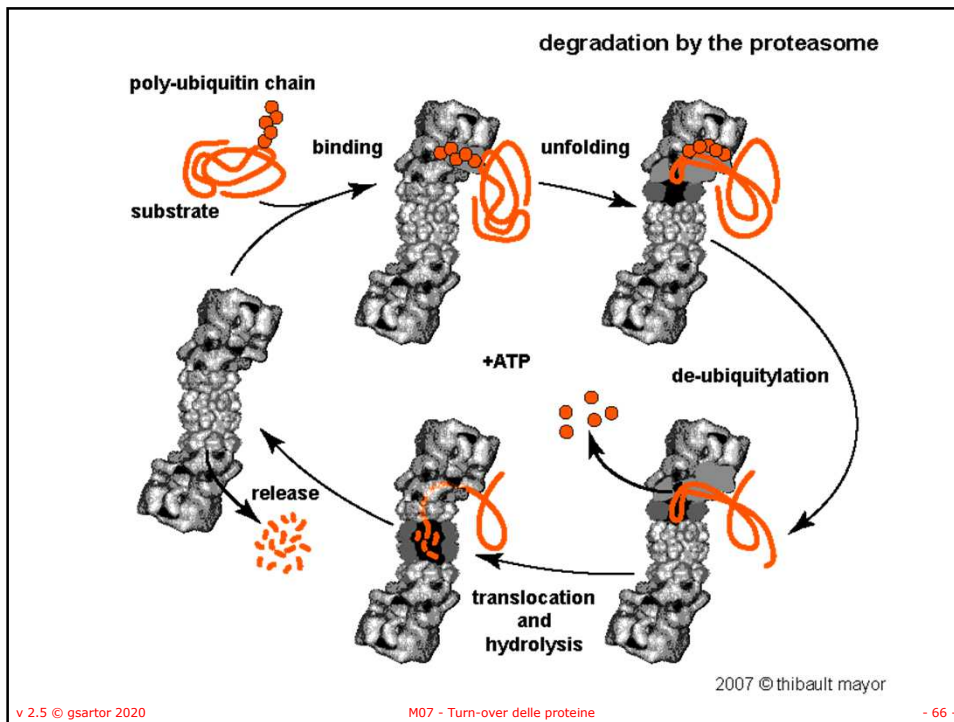


64

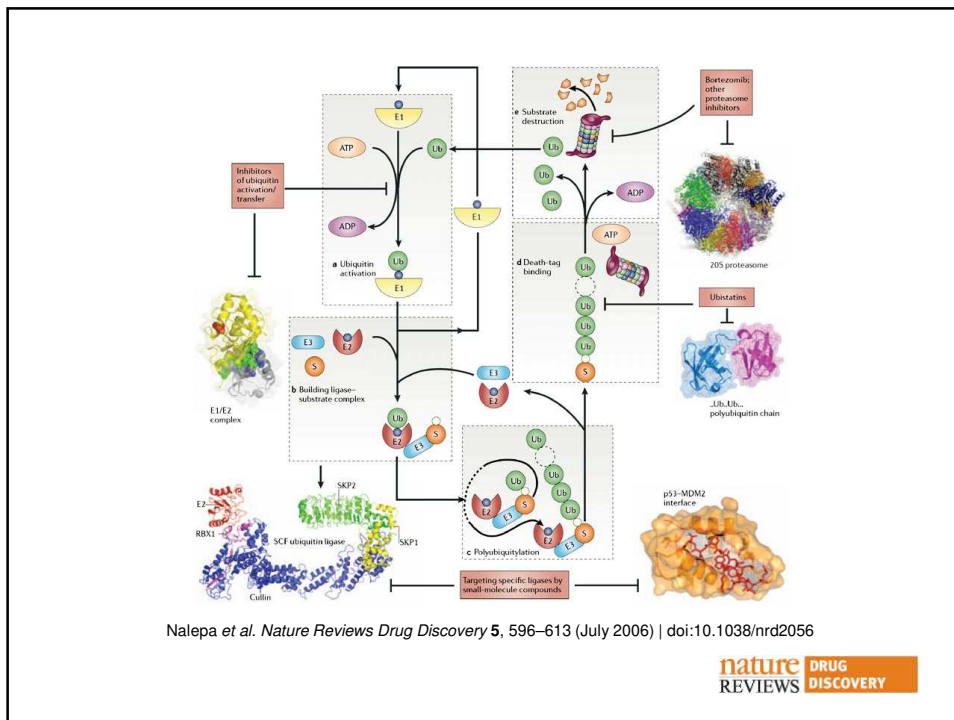




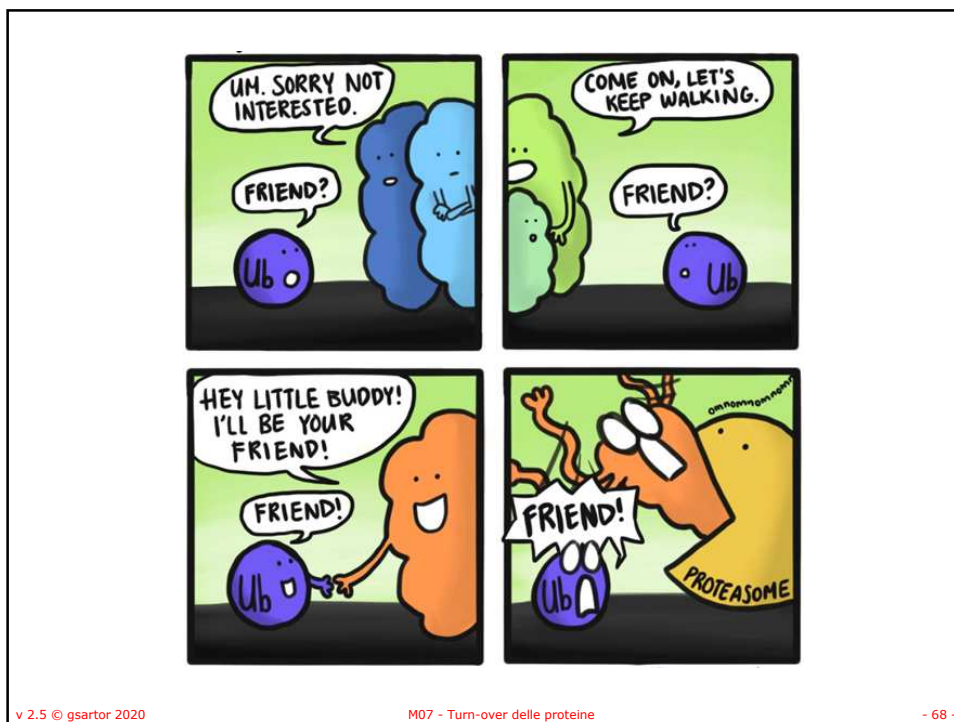
65



66

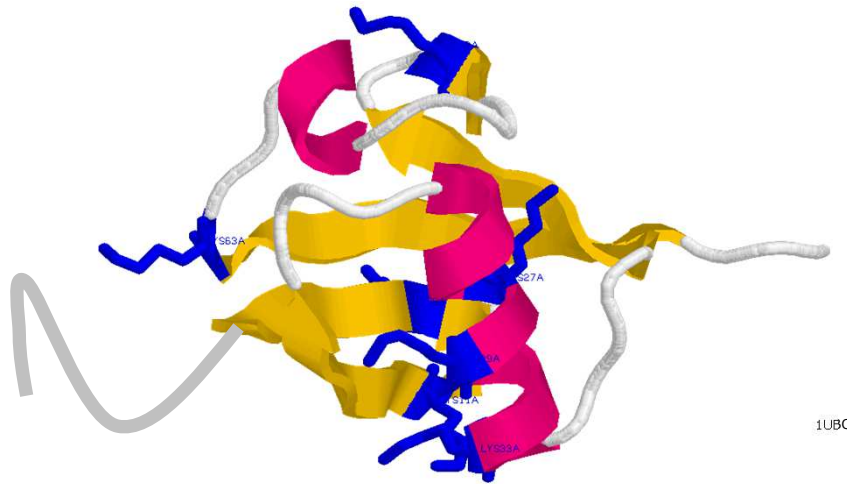


67



68

# Quante lisine!



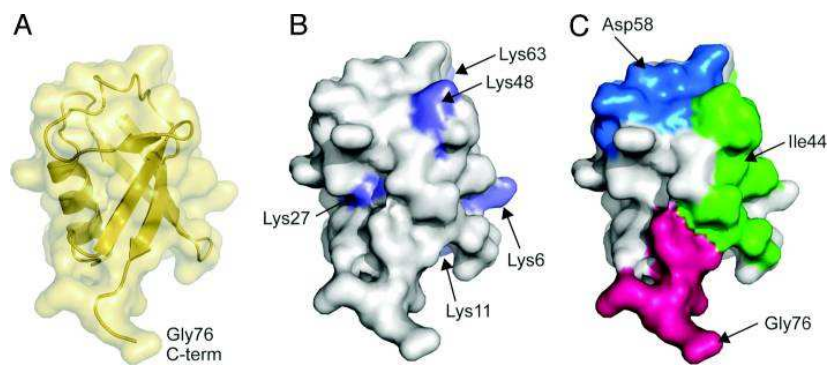
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 69 -

69

# Quante lisine!



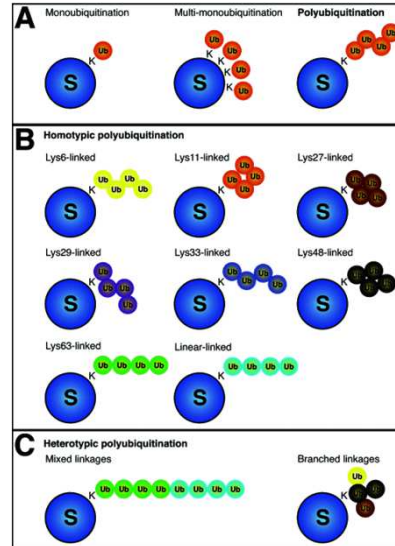
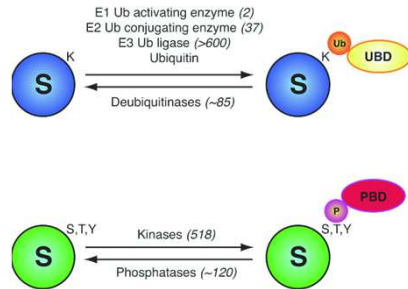
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 70 -

70

# Complessità



Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans.* 2009 Oct;37(Pt 5):937-53.

v 2.5 © gsartor 2020

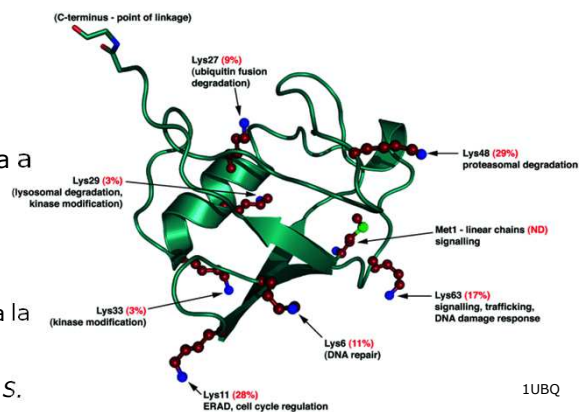
M07 - Turn-over delle proteine

- 71 -

71

# Quante lisine!

- Nell'ubiquitina ci sono sette Lys.
- La Met1 è il punto di collegamento per la formazione di catene lineari di Uq ed è vicina a Lys63.
- Il motivo C-terminale Gly75-Gly76 forma il legame isopeptidico.
  - NB In rosso è indicata la % di abbondanza relativa di ogni particolare legame in *S. cerevisiae* e sono indicati i ruoli dei singoli legami.



Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans.* 2009 Oct;37(Pt 5):937-53.

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 72 -

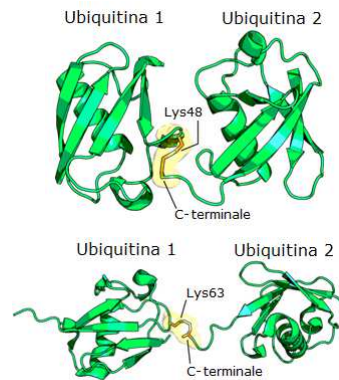
72

# Sette lisine!

- Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63

Abbiamo effetti diversi a seconda della lisina coinvolta nel legame isopeptidico

- Lys6 - Riparazione DNA
- Lys11 - Regolazione ciclo cellulare
- Lys27 - Degradazione
- Lys29 - Degradazione in lisosomi
- Lys33 - Modificazione kinasica
- Lys48 - Degradazione tramite proteasoma
- Lys63 - Signaling, Trafficking, risposta a Danno del DNA

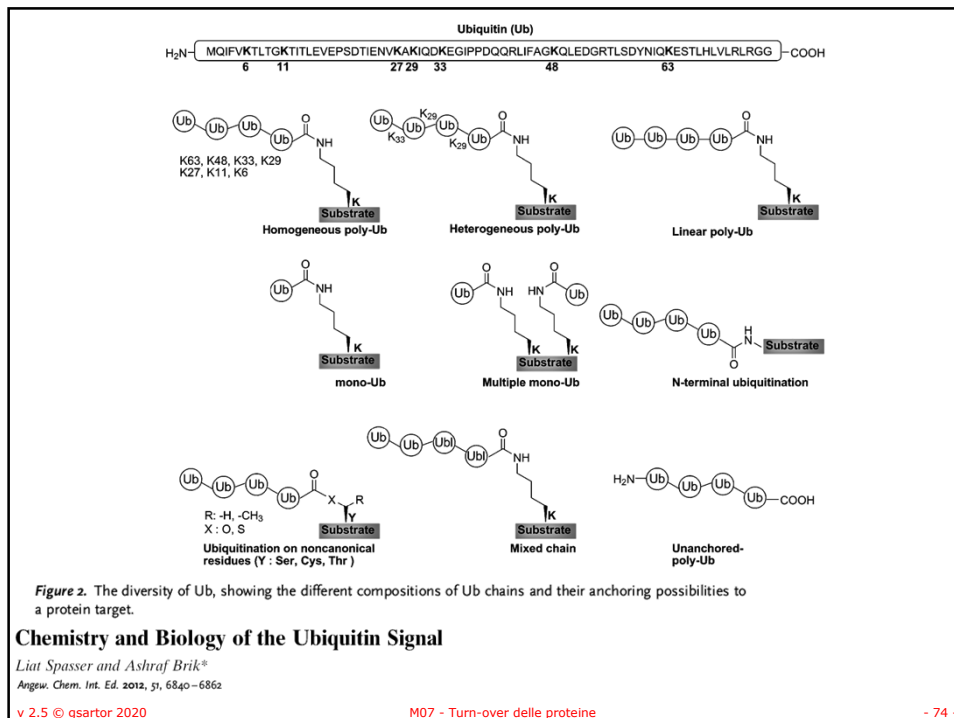


v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

73

73



74



# Struttura di poli-Uq

A. Struttura di tetra-Uq Lys48-linked. Proximale e distale indicano la posizione relativamente al substrato.

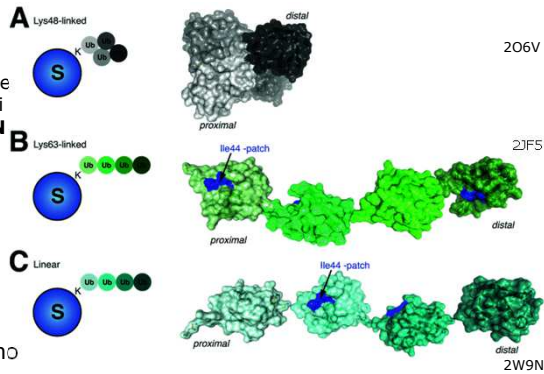
- Nelle catene Lys48-linked tutte le Uq interagiscono tra loro e i residui idrofobici di Ile44 **NON SONO** esposti.

B. Le catene Lys63-linked hanno conformazione aperta;

- I residui idrofobici di Ile44 **SONO** esposti e possono assumere diverse posizioni a causa della flessibilità della catena.

C. Le catene Lys63-linked possono assumere anche una struttura lineare

- La differenza nel linker può giustificare il diverso comportamento rispetto alla deubiquitinazione



Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. Biochem Soc Trans. 2009 Oct;37(Pt 5):937-53.

v 2.5 © gsartor 2020

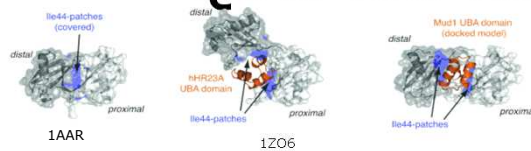
M07 - Turn-over delle proteine

- 75 -

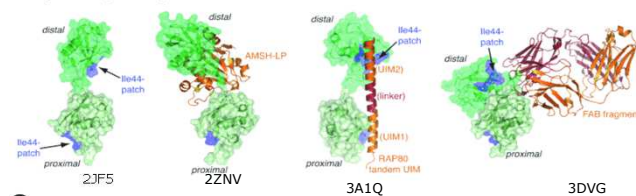
75

## A Lys48 diubiquitin complex

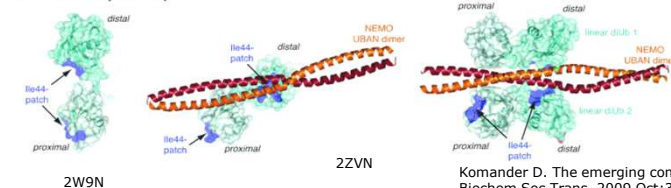
# Quante lisine!



B Lys63 diubiquitin complexes



C Linear diubiquitin complex



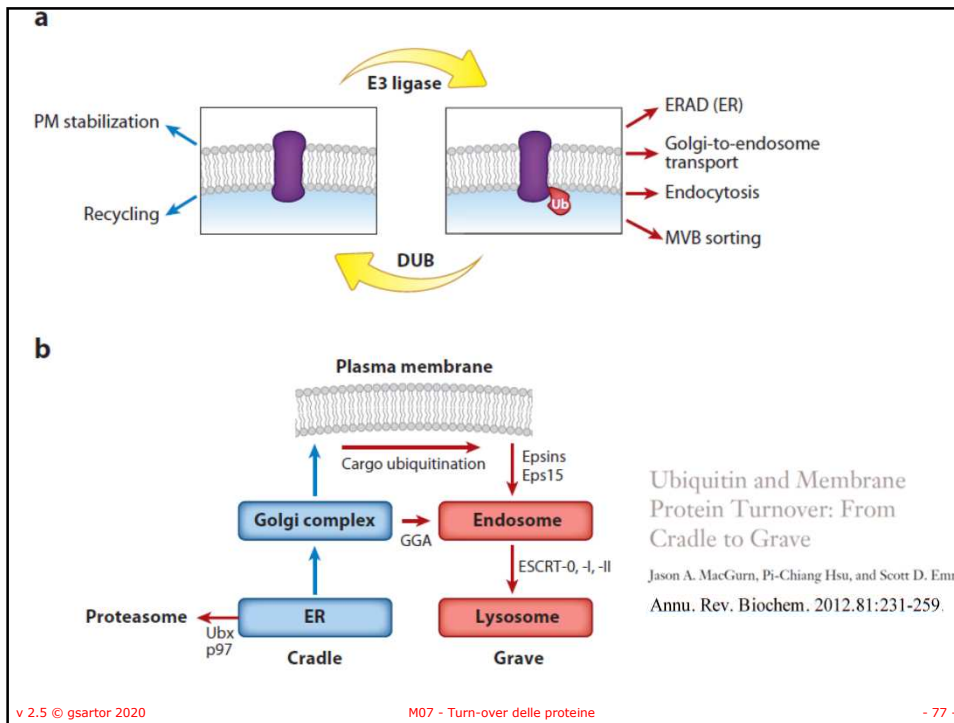
Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. Biochem Soc Trans. 2009 Oct;37(Pt 5):937-53.

v 2.5 © gsartor 2020

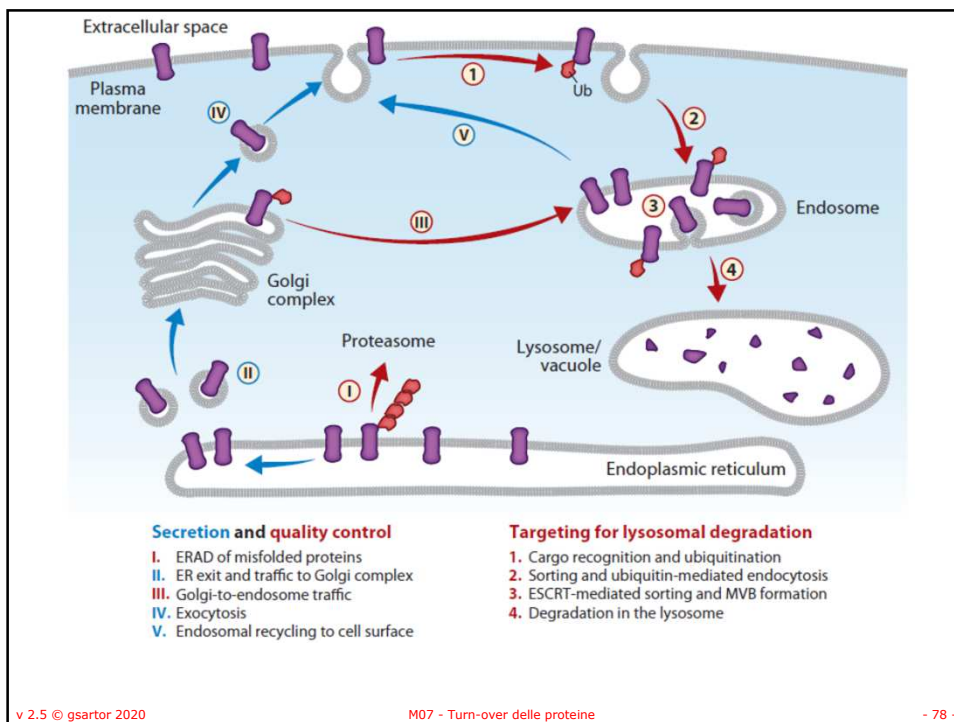
M07 - Turn-over delle proteine

- 76 -

76



77



78

## Ubiquitin-like protein - UBLs

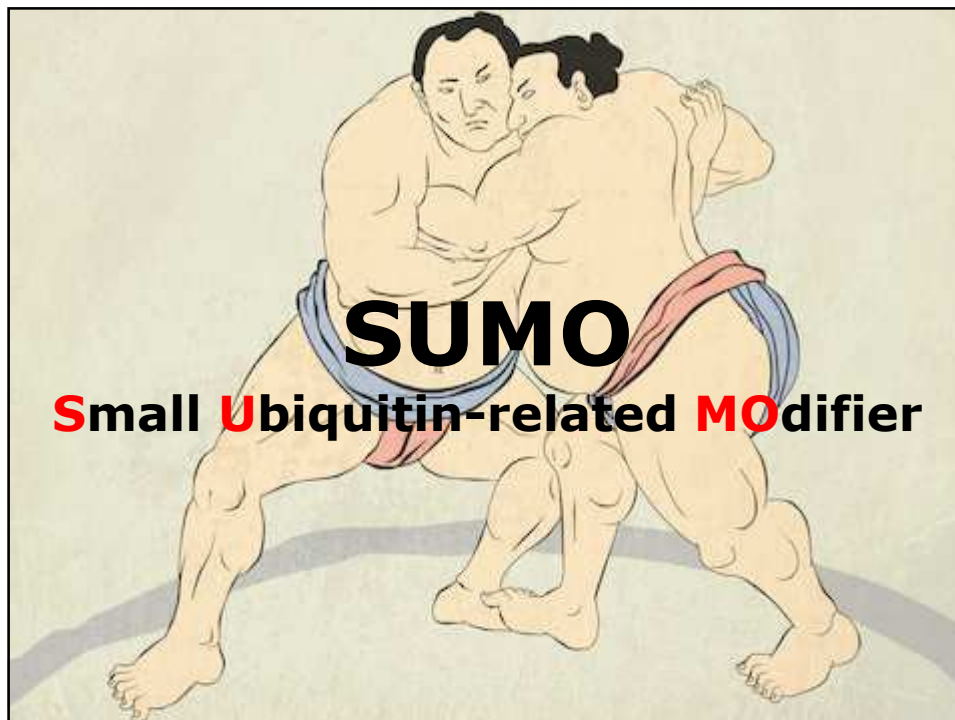
- Per molto tempo il meccanismo della ubiquitinazione è stato considerato come **IL** modo per etichettare le proteine per la degradazione via proteasoma.
- È però stato evidenziato anche un ruolo NON-proteolitico dell'ubiquitinazione:
  - Funzione delle proteine,
  - Localizzazione delle proteine,
  - Interazione proteina-proteina
- Oltre l'ubiquitina sono state identificate una serie di proteine ubiquitin-like (UBLs) con struttura simile all'ubiquitina:
  - **S**mall **U**biquitin Like **M**odifier (**SUMO**),
  - **N**eural precursor cell expressed **d**evelopmentally **d**own-regulated **8** (**NEDD8**)
  - **I**nterferon **s**timulated **g**ene **15** (**ISG15**)

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 79 -

79



80



# Small Ubiquitin-like Modifier

- Le SUMO appartengono alla superfamiglia dell'ubiquitina e ubiquitin-like;
- La maggior parte delle proteine SUMO contengono il tetrapeptide con motivo B-K-x-D/E (B = residuo idrofobico);
- C'è solo il 18% di identità di sequenza tra ubiquitina SUMO-1;
- SUMO e ubiquitina hanno una struttura terziaria estremamente simile;
- Contrariamente al sistema ubiquitina che etichetta le proteine bersaglio per il proteasoma le proteine SUMO svolgono funzioni cellulari diverse.

v 2.5 © gsartor 2020

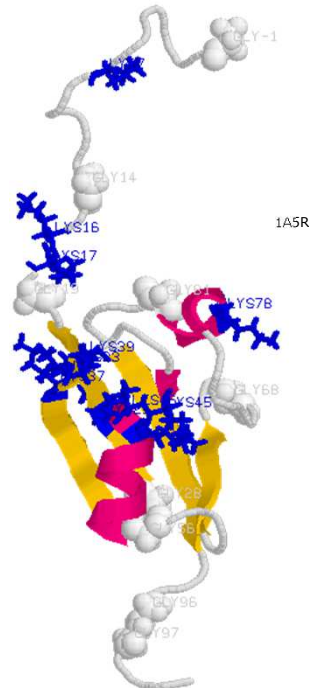
M07 - Turn-over delle proteine

- 81 -

81

## Struttura

- 100 aminoacidi, massa di circa 12 kDa;
- La dimensione esatta varia tra i diversi membri della famiglia e dall'organismo;
- Scarsa identità di sequenza con Uq ma pressoché identica struttura;
- SUMO1 è una proteina globulare con le estremità N-terminale e C-terminale che si estendono all'esterno della proteina
- Il core sferico è costituito da  $\alpha$ -eliche e un  $\beta$ -sheet.
- SUMO1 Umana: 101 aa; 11.6 kD.



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 82 -

82

# SUMO

- Nell'uomo sono presenti quattro isoforme di SUMO:
- SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 e SUMO-4
  - SUMO-2/3: presentato un alto grado di similarità e sono distinte da SUMO-1; durante la mitosi SUMO-2/3 si localizza sul centromero e sui cromosomi .
  - Uno dei maggiori prodotti di condensazione di SUMO-2/3 è con la topoisomerasi II che viene modificata solo da SUMO2/3 durante la mitosi
  - Le modificazioni di SUMO-2/3 sembrano essere specificatamente coinvolte nella risposta allo stress.
  - SUMO-1 si localizza nel fuso mitotico e forma catene miste con SUMO2/3
  - SUMO-4 mostra similarità con SUMO-2/3 ma ne differisce avendo una Pro invece di Gln in posizione 90 il che le permette di non essere processata e coniugata in condizioni normali ma è usata per modificare proteine in condizioni di stress.

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 83 -

83

# SUMOilazione

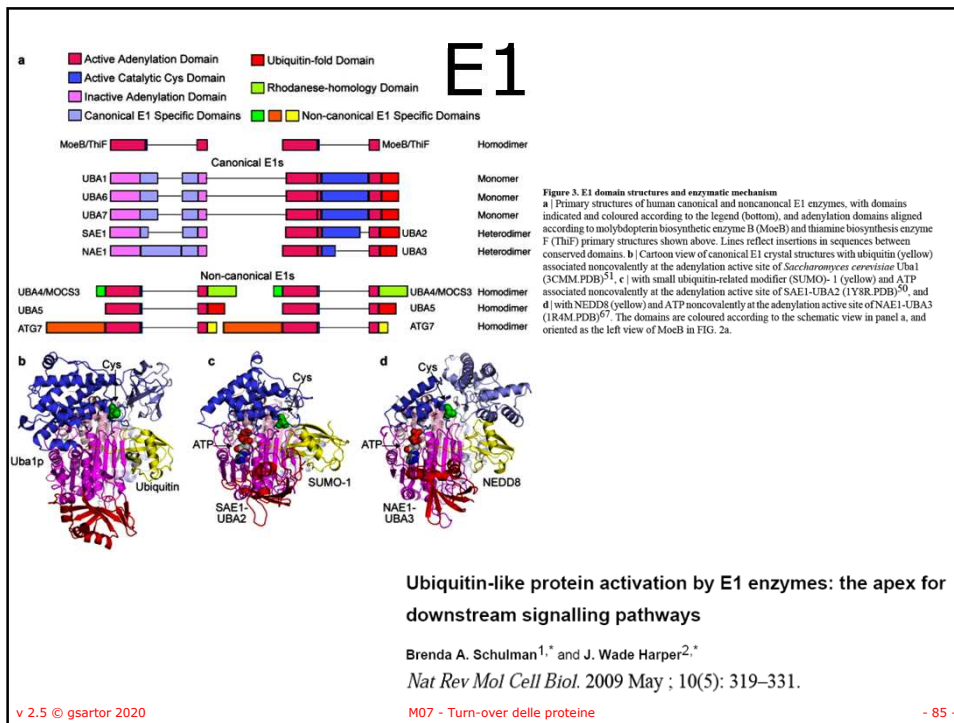
- La SUMOilazione di proteine bersaglio:
  - Aumenta la vita della proteina attraverso un aumento della stabilità;
  - Cambia la localizzazione cellulare della proteina: trasporto citosol-nucleo;
  - Regolazione trascrizionale;
  - Apoptosi;
  - Risposta allo stress;
- La SUMOilazione avviene con un meccanismo simile a quello dell'ubiquitinazione (E1-E2-E3).
- Contrariamente all'ubiquitinazione la SUMOilazione non porta alla degradazione delle proteine.
- Le SUMO vengono prodotte attraverso il clivaggio dei quattro aminoacidi al C-terminale permettendo il legame della Gly con la Lys della proteina da modificare attraverso un legame isopeptidico.
- Il legame **REVERSIBILE** di SUMO è controllato in modo analogo a quello di Uq.

v 2.5 © gsartor 2020

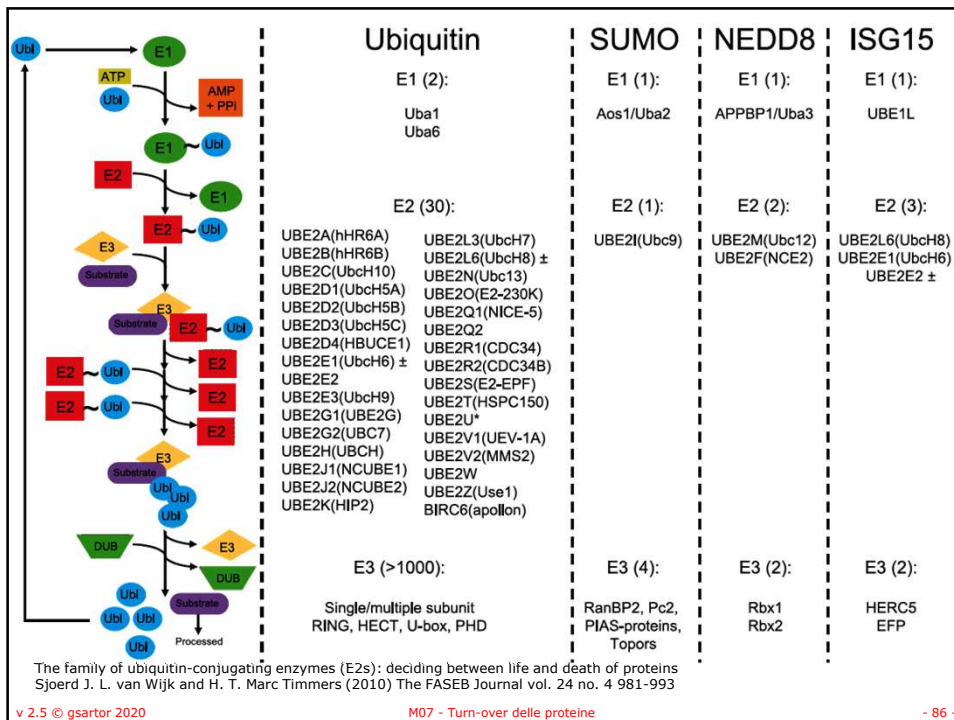
M07 - Turn-over delle proteine

- 84 -

84



85



86

# SUMOilazione

- Le conseguenze funzionali della SUMOilazione variano a seconda del substrato e non è ancora del tutto chiaro il meccanismo.
- SUMO altera le interazioni della proteina substrato con altre proteine o con DNA.
- La SUMOilazione può anche agire come blocco della ubiquitinazione.
- Solo una piccola frazione di una data proteina è SUMOilata e questa modificazione è rapidamente cancellata da enzimi deSUMOilanti.

v 2.5 © gsartor 2020

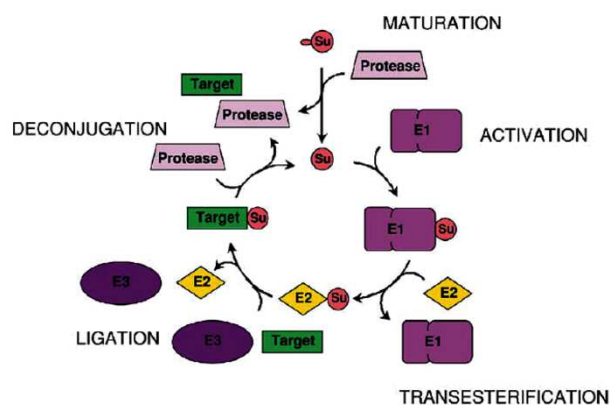
M07 - Turn-over delle proteine

- 87 -

87

# SUMO cycle

- Il precursore di SUMO è processato da una proteasi specifica che libera il C-terminale Gly-Gly che è attivato da E1.
- Dopo trans esterificazione su E2 SUMO viene coniugato con la proteina bersaglio e con E3 viene legato.
- SUMO può essere deconiugato dalla proteina bersaglio da specifiche proteasi.



Molecular Cell, Vol. 18, 1-12, April 1, 2005

**SUMO: A History of Modification**

Ronald T. Hay\*

v 2.5 © gsartor 2020

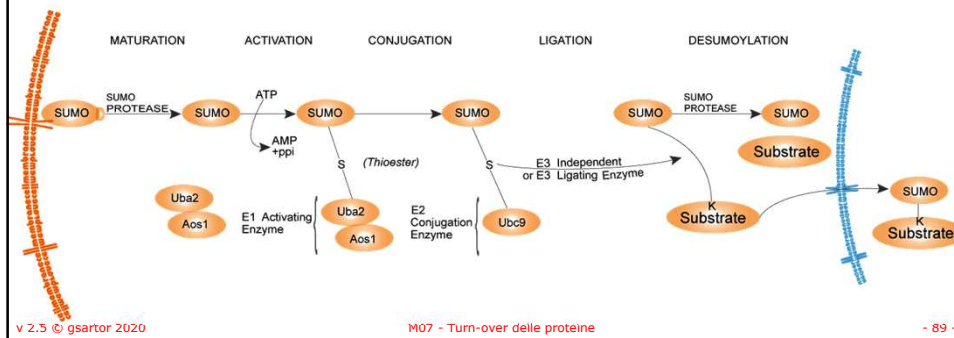
M07 - Turn-over delle proteine

- 88 -

88

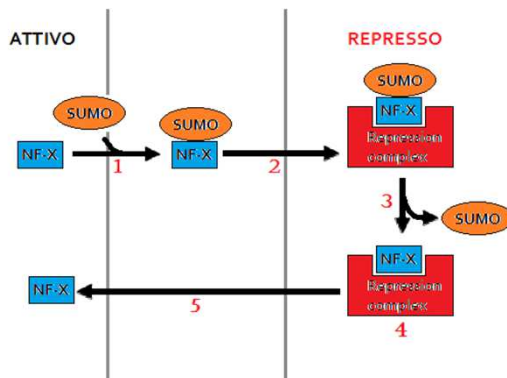
# SUMO cycle

- Il precursore di SUMO è processato da una proteasi specifica che libera il C-terminale Gly-Gly che è attivato da E1.
- Dopo trans tioesterificazione su E2, SUMO viene coniugato con la proteina bersaglio e con E3 viene legato.
- SUMO può essere deconiugato dalla proteina bersaglio da specifiche proteasi



89

## Un modello



1. Un fattore di trascrizione nucleare (NF-X) è modificato da SUMO ed
2. È assemblato in complesso formato da SUMO e un fattore di repressione da esso controllato.
3. Una volta che il complesso è formato SUMO può essere distaccato da una specifica proteasi.
4. Il fattore di trascrizione è mantenuto nella sua forma repressa anche in assenza di SUMO.
5. La lenta dissociazione del complesso riattiva il fattore di trascrizione e può essere indotta da modificazioni post-traduzionali del complesso o di NF-X. Come, per esempio, l'interazione con Uq o Uq-like che portano alla degradazione di parte del complesso di repressione liberando NF-X.

Molecular Cell, Vol. 18, 1-12, April 1, 2005

**SUMO: A History of Modification**

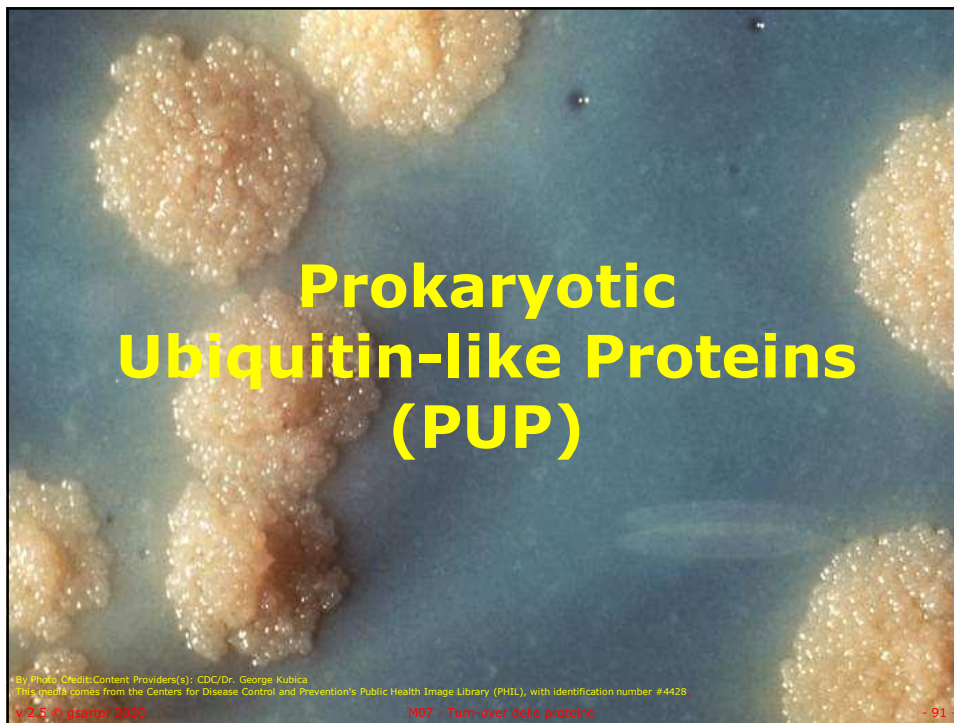
Ronald T. Hay\*

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 90 -

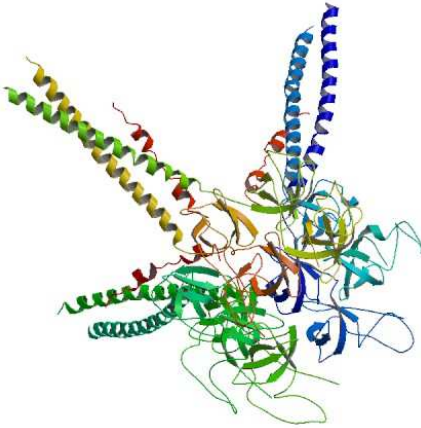
90



91

## Prokaryotic ubiquitin-like (PUP)

- PUP è la **Prokaryotic ubiquitin-like protein**, un analogo funzionale dell'ubiquitina nei procarioti trovata in *Mycobacterium tuberculosis*
- La **pupilazione** avviene in una reazione a due step invece che tre come con l'ubiquitina.
- PUP lega una Lisina bersaglio formando una caratteristica struttura ad  **$\alpha$  elica**
- Viene poi riconosciuta dal Mycobacterium proteasomal ATPase che fa parte di un complesso che include il proteasoma 20S, portando quindi la proteina alla degradazione

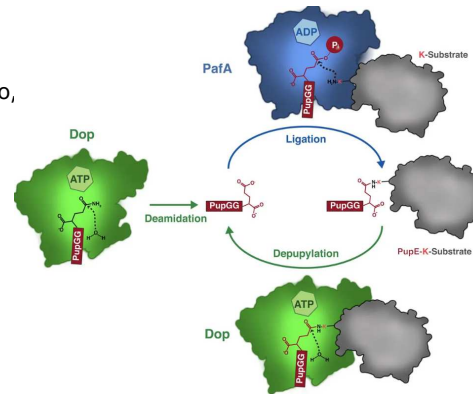


v 2.5 © gsartor 2020 M07 - Turn-over delle proteine 92

92

# PUP enzymes

- L'attivazione e il legame della PPU coinvolge due enzimi, rispetto ai tre dell'ubiquitinazione: **Dop e PafA**
- **Dop** è la *Deamidase of Pup*, che serve probabilmente per esporre il C-terminale GGE, il cui glutammato, che viene così deamidato, serve a legare la Lisina della proteina bersaglio.
- **Dop** può anche funzionare depupilando la proteina
- **PafA** è invece la Pup ligase, che segue **Dop** e permette il legame vero e proprio della PUP sulla proteina bersaglio
- La proteina PUPilata è riconosciuta dal Mycobacterial proteasome ATPase in quanto la PUP forma una struttura ad elica coiled coil con il N-terminale dell'ATPasi.



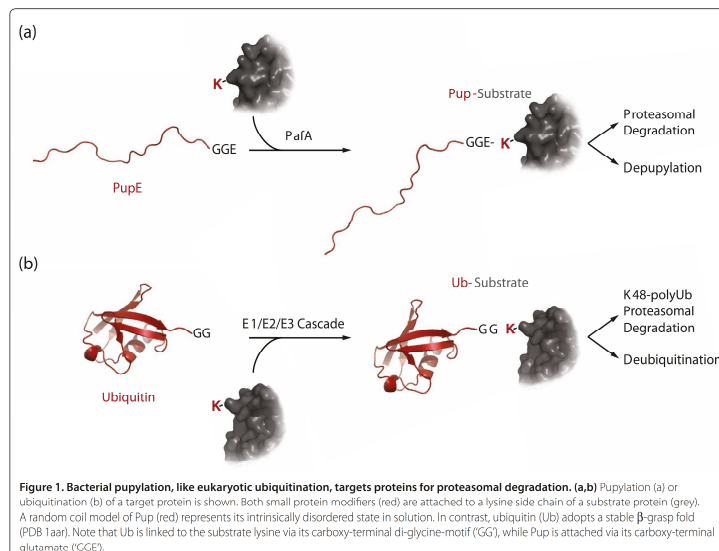
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

93

93

# PUP vs Uq



Barandun et al. BMC Biology 2012, 10:95  
<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/95>

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

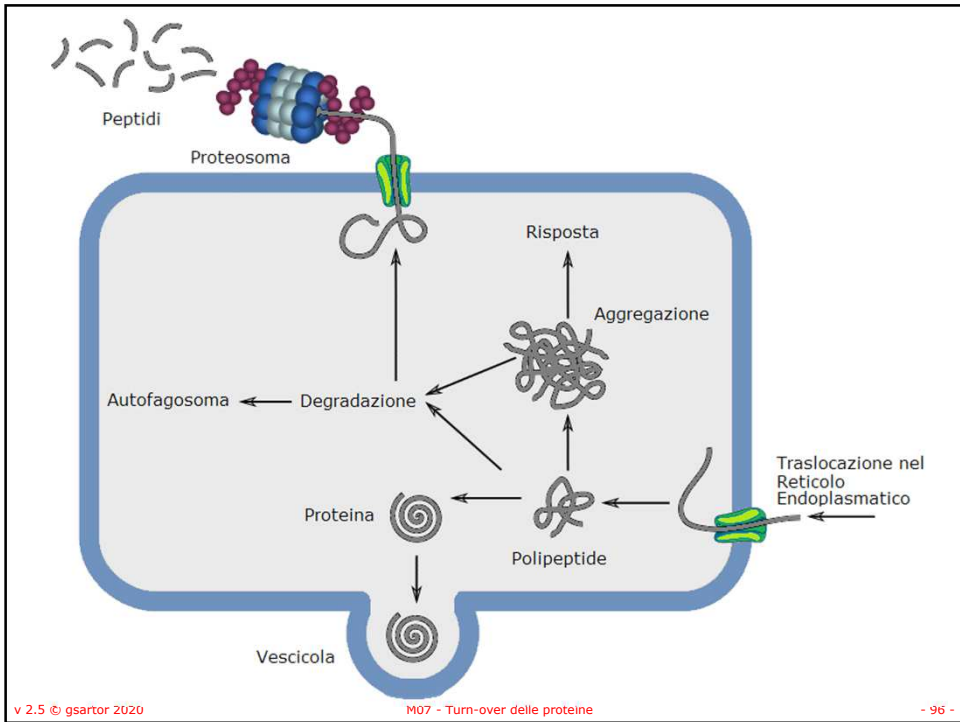
- 94 -

94

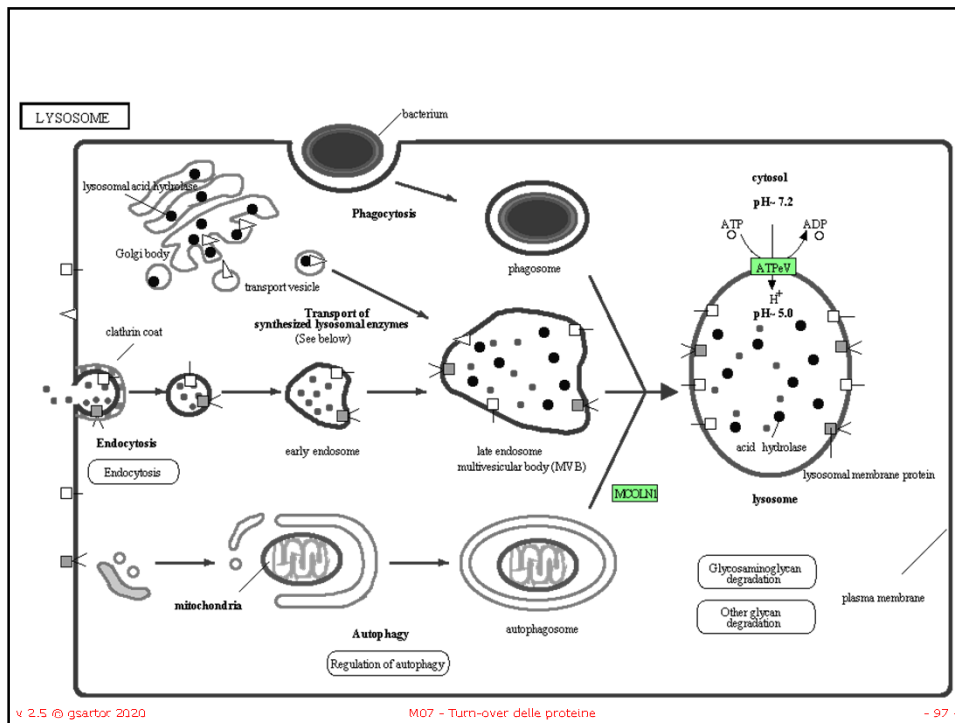




95



96



97

## Lisosomi

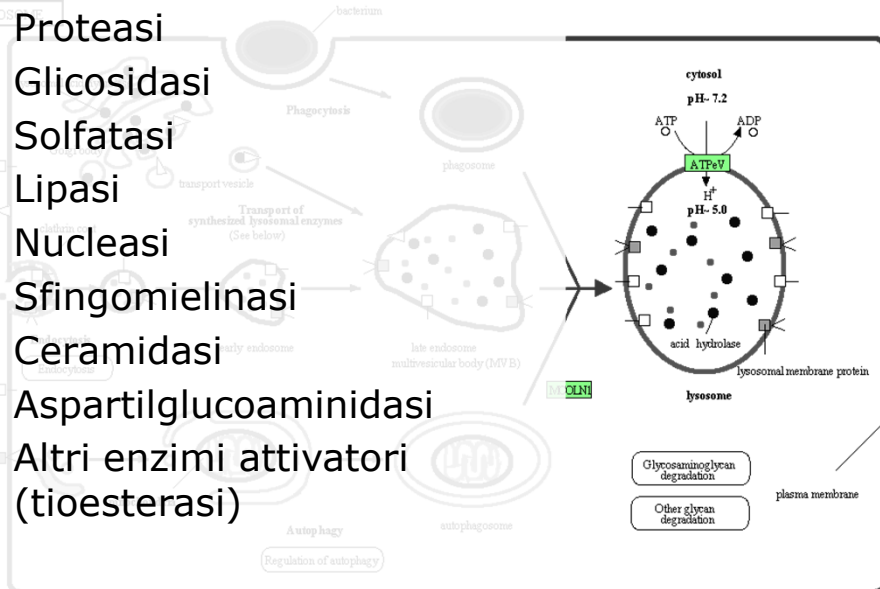
- I lisosomi contengono enzimi idrolitici che degradano le proteine e altre sostanze catturate per endocitosi.
- I lisosomi hanno un valore di pH acido a causa di un trasporto di protoni pilotato da una **ATPasi**.
- Tutti gli enzimi idrolitici lisosomali hanno un optimum a pH acido.
- Le catepsine sono attivate dalla scissione di proenzimi che può essere catalizzata da altri enzimi lisosomali o dall'ambiente acido.

v 2.5 © gsartor 2020 M07 - Turn-over delle proteine - 98 -

98

# Enzimi lisosomali

- Proteasi
- Glicosidasi
- Solfatasi
- Lipasi
- Nucleasi
- Sfingomielinasi
- Ceramidasi
- Aspartilglucoaminidasi
- Altri enzimi attivatori (tioesterasi)



v 2.5 © gsartor 2020

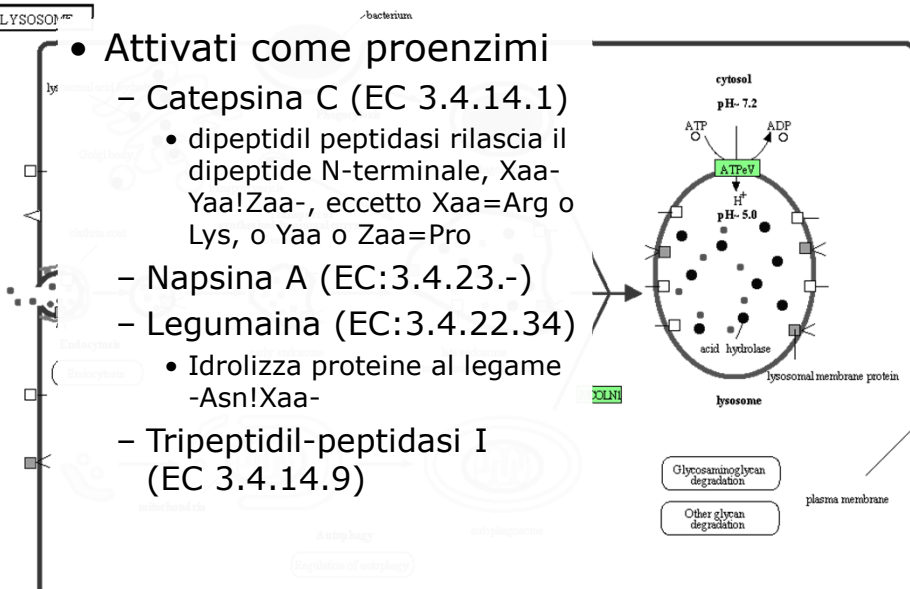
M07 - Turn-over delle proteine

- 99 -

99

# Enzimi lisosomali - Proteasi

- Attivati come proenzimi
  - Catepsina C (EC 3.4.14.1)
    - dipeptidil peptidasi rilascia il dipeptide N-terminale, Xaa-Yaa!Zaa-, eccetto Xaa=Arg o Lys, o Yaa o Zaa=Pro
  - Napsina A (EC:3.4.23.-)
  - Legumaina (EC:3.4.22.34)
    - Idrolizza proteine al legame -Asn!Xaa-
  - Tripeptidil-peptidasi I (EC 3.4.14.9)



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 100 -

100

# Catepsine

Proteasi a Serina	Proteasi a Cisteina	Proteasi ad Aspartato
Catepsina A Catepsina G	Catepsina B <b>Catepsina C</b> Catepsina F Catepsina H Catepsina K Catepsina L1 Catepsina L2 Catepsina O Catepsina S Catepsina W Catepsina Z (X)	Catepsina D Catepsina E

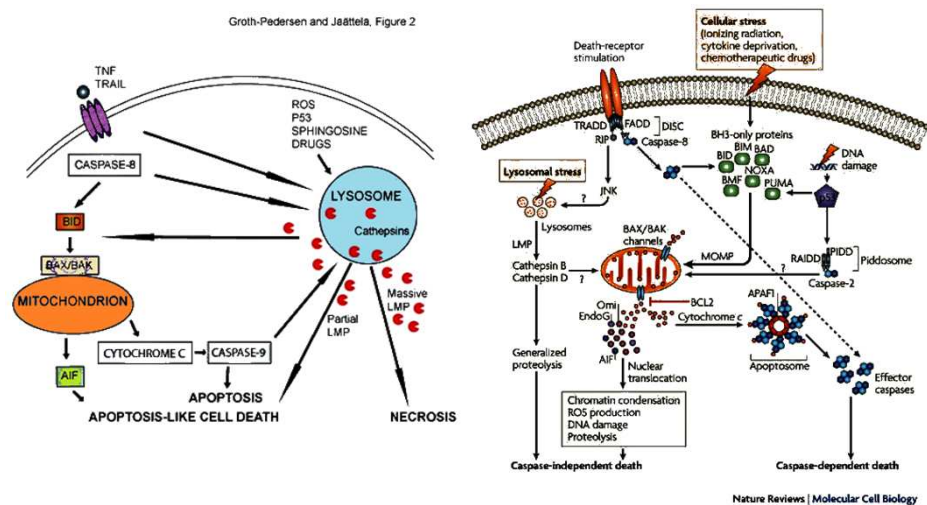
v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 101 -

101

# Lysosome Membrane Permeabilization



v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 102 -

102

## Lisosomi: sistemi di protezione

- Le cistatine inibiscono le catepsine lisosomiali. Sono presenti nel citosol e nello spazio extracellulare.
- Le cistatine si legano al sito attivo delle catepsine competendo con il substrato e proteggono la cellula dalle catepsine eventualmente uscite dai lisosomi.
- Autofagia: se una porzione del citoplasma viene incapsulata dai lisosomi si ha la degradazione delle proteine.
- Questo meccanismo non è il meccanismo di elezione per la degradazione selettiva delle proteine.

v 2.5 © gsartor 2020

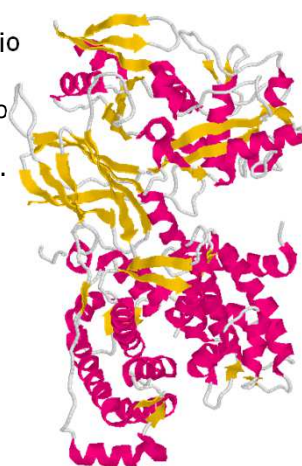
M07 - Turn-over delle proteine

- 103 -

103

## Calpaine

- Proteasi attivate da calcio nel citosol della cellula
  - I differenti isomeri sono attivati da differenti concentrazioni di calcio.
- Non c'è una specifica sequenza che viene riconosciuta in modo univoco dalle Calpaine, viene piuttosto riconosciuti elementi di struttura terziaria



$\mu$ -Calpaine



Calpaina II

v 2.5 © gsartor 2020

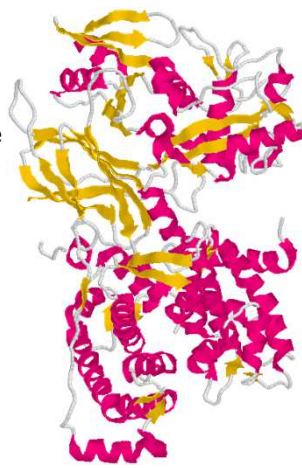
M07 - Turn-over delle proteine

- 104 -

104

# Calpaine

- Il ruolo fisiologico delle calpaine è ancora da definire nei dettagli.
- Partecipano ai processi di mobilità cellulare, progressione del ciclo cellulare
- Sono sensibili alla concentrazione, anche transiente, di calcio quando essa cambia nelle vicinanze di canali ionici, provocando la proteolisi selettiva di alcune proteine in zone specifiche della cellula.
- Un altro ruolo è quello del controllo della coagulazione e sul diametro dei vasi.
- Sono implicate nell'apoptosi e sembrano essere essenziali per i processi di necrosi cellulare.



$\mu$ -Calpaina



Calpaina II

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 105 -

105

## Referenze sul WEB

- Vie metaboliche
  - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
    - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
  - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
  - Hexpasy
    - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
    - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
    - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
  - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
  - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
  - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

v 2.5 © gsartor 2020

M07 - Turn-over delle proteine

- 106 -

106

## Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
  - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
  - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
  - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
  - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
  - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
  - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>

- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

**Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**  
Università di Bologna

Giorgio Sartor  
Ufficiale: [giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)  
Personale: [giorgio.sartor@gmail.com](mailto:giorgio.sartor@gmail.com)

Aggiornato il 30/01/2020 12:30:08