

La via di degradazione delle proteine controllata dall'ubiquitina

GIOVANNI CERCIGNANI*

Riassunto

Col Premio Nobel per la Chimica 2004 sono stati insigniti Avram Hershko, Aaron Ciechanover e Irwin Rose scopritori delle funzioni di una piccola e stabile proteina (76 residui) ubiquitaria nelle cellule eucariote, chiamata ubiquitina. Questi tre scienziati, insieme ad altri, hanno trovato che l'ubiquitina viene legata covalentemente a proteine-bersaglio per segnalare la loro successiva degradazione da parte di una proteasi multicompartimentalizzata detta proteasoma 26S. L'ubiquitina si lega in una reazione dipendente da ATP a un enzima che attiva l'ubiquitina (E1), ed è trasferita da questo a un enzima che coniuga l'ubiquitina (E2) il quale, col concorso di una ubiquitina-proteina ligasi (E3), attacca specificamente l'ubiquitina a una proteina-bersaglio tramite il gruppo ϵ -amminico di un residuo di lisina. La catena di ubiquitina è allungata da E2 ed E3 fino ad almeno quattro ubiquitine attaccate in sequenza, il che è sufficiente a far sì che la proteina-bersaglio sia riconosciuta e degradata dal proteasoma 26S; nel corso di tale degradazione, le molecole di ubiquitina intatta sono rimosse da specifiche attività enzimatiche e riciclate nella cellula. L'intero processo è un meccanismo di notevole importanza fisiologica e patologica, ed ha un ruolo centrale nel rapido turnover di molte proteine cellulari in tutti gli organismi eucarioti.

Abstract

The 2004 Nobel Prize in Chemistry was awarded to Avram Hershko, Aaron Ciechanover and Irwin Rose for the discovery of the functions of a small (76-residue), stable, ubiquitous, eukaryotic cellular protein called ubiquitin. These scientists, along with others, found that ubiquitin is covalently attached to target proteins to signal them for subsequent degradation by a multicompartimentalized protease called the 26S proteasome. Ubiquitin binds in an ATP-dependent manner to a ubiquitin-activating enzyme (E1), which transfers it to a ubiquitin conjugating enzyme (E2) that, with the help of a ubiquitin-protein ligase (E3), specifically attaches ubiquitin to a target protein through the ϵ -amino group of a lysine residue. The ubiquitin chain is lengthened by the E2 and E3, to at least four sequentially attached ubiquitins, which is sufficient to allow the target protein to be recognized and degraded by the 26S proteasome; in the meanwhile, intact ubiquitin molecules are removed by specific enzymes and recycled in the cell. The whole mechanism is of considerable physiological and pathological importance, and is central to the rapid turnover of many cellular proteins in all Eukaryotes.

“Il paragone [dell'organismo] con una macchina a combustione interna delineava un flusso stazionario di combustibili entro una struttura fissa, e la conversione dei combustibili in prodotti di scarico. Questi nuovi risultati implicano che si trovano in uno stato stazionario di flusso non solo i combustibili, ma gli stessi materiali strutturali. La visione classica deve essere sostituita da una nuova concezione che tenga conto dello stato dinamico della struttura dell'organismo”.

(Da **The Dynamic State of Body Constituents**, di R. Schoenheimer, 1942).

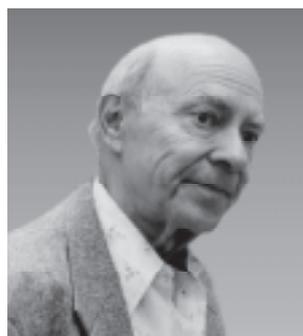
La citazione da Schoenheimer si attaglia molto bene a introdurre queste righe di commento ai temi della ricerca biochimica portata avanti da parecchi scienziati in tutto il mondo su come le proteine siano continuamente distrutte e risintetizzate nelle cellule; tre di questi scienziati (I. Rose, A. Hershko e A. Ciechanover) hanno ricevuto nel 2004 il Premio Nobel per la Chimica per le loro scoperte che hanno dato inizio a un filone di ricerca dalle importanti ricadute in tutti i campi della biologia e anche in quello delle applicazioni cliniche.



Aaron Ciechanover



Avram Hershko



Irwin Rose

1. Le proteine come operatori delle funzioni nel vivente¹

Le proteine sono gli strumenti molecolari che operano nelle molteplici funzioni dei viventi. Sono proteine gli enzimi che catalizzano le migliaia di reazioni chimiche incanalate nei flussi metabolici e nelle vie di segnalazione e di regolazione dell'organismo, i trasportatori che convogliano varie sostanze nei fluidi biologici e attraverso le membrane cellulari, diversi tipi di ormoni prodotti da importanti ghiandole a secrezione interna, le strutture fibrose dei tegumenti cutanei, dei tendini, dei legamenti e dei muscoli, gli anticorpi che neutralizzano gli antigeni nelle reazioni immunitarie, ecc.

Le proprietà funzionali specifiche di ogni proteina sono associate alla struttura tridimensionale altamente complessa di questi polimeri biologici, i cui elementi costitutivi di base sono gli amminoacidi; tale complessa struttura deriva dal modo in cui le proteine sono costruite a partire dal programma genetico scritto nel DNA. Una sequenza caratteristica di basi nel DNA (*gene*) codifica infatti una determinata catena polipeptidica (*sequenza amminoacidica*), la cui produzione avviene con meccanismi altamente sofisticati (*espressione del gene*) e dispendiosi. La decodifica prevede infatti il processo di sintesi di un RNA messaggero (*trascrizione*); questo è una copia operativa del gene, che viene poi usato dai ribosomi (nel processo detto *traduzione*) per sintetizzare la proteina secondo la corrispondenza (*codice genetico*) fra triplette di basi (*codoni*) e singoli amminoacidi. Ciascun nucleotide inserito in una molecola di RNA messaggero costa due molecole di ATP, mentre l'inserimento di ciascun amminoacido in una proteina ha un costo doppio (ma ciascuna molecola di RNA messaggero può permettere la sintesi di parecchie molecole della stessa proteina, per cui il costo della trascrizione è ammortato in misura notevole).

Dopo la sintesi del polipeptide, la molecola proteica assume una conformazione tridimensionale (*struttura terziaria*) che ne determina il modo di interagire con altre molecole nell'organismo: in altre parole, tale struttura esplica una precisa funzione, finché non intervengono processi che alterano le sue *proprietà native*.

Una proteina può perdere funzionalità perché acquista strutture conformazionali incompatibili con la sua funzione (*denaturazione*) o perché è soggetta a un processo di scomposizione che attacca molti legami covalenti nelle sue catene polipeptidiche (*degradazione*). Il principale processo di questo tipo, l'idrolisi dei *legami peptidici* catalizzata da *proteinas*, prende il nome di *proteolisi*.

2. Il turnover proteico

Può essere sorprendente scoprire che alcune proteine vanno incontro a un destino degradativo assai prima che possano perdere la propria funzionalità per la spontanea denaturazione alla quale sono destinate sul lungo periodo. Le proteine hanno una struttura primaria costituita da una catena lineare di amminoacidi uniti da legami peptidici tra il gruppo α -COOH di un amminoacido e il gruppo α -NH₂ dell'amminoacido successivo. Questa struttura polimerica può essere degradata dopo un certo tempo dalla sua sintesi, tramite l'idrolisi dei legami peptidici, una reazione termodinamicamente favorevole in ambiente acquoso. Ciò determina il fenomeno del turnover proteico (vedi INSERTO n. 1), che consiste nel bilanciamento (di solito in stato

¹ A partire da questo paragrafo i termini in *corsivo-grassetto* rimandano al Glossario.

stazionario) tra la velocità di degradazione della proteina e quella della sua sintesi: questo bilanciamento determina la concentrazione di quella proteina nella cellula.

Il significato regolatorio di un turnover proteico rapido

[INSERTO n. 1]

È possibile apprezzare meglio il significato dei meccanismi di degradazione rapida e selettiva delle proteine (come quelli legati all'ubiquitina e al proteasoma) considerando i seguenti fatti:

- la velocità alla quale una proteina viene sintetizzata dipende in larga misura dalla frequenza con cui viene trascritto il suo gene, anche se in qualche caso interviene un controllo sullo stadio di traduzione (sui ribosomi) che agisce sulla sintesi vera e propria dopo la trascrizione del gene;
- se la cellula (o il compartimento subcellulare) in cui si trova la proteina non subisce rilevanti cambiamenti di volume, anche interrompendo del tutto l'espressione del gene, il livello di attività della proteina calerà solo in dipendenza della spontanea instabilità della struttura proteica; per una proteina stabile, un calo apprezzabile di concentrazione in assenza di nuova sintesi si avrà invece nel caso di proliferazione rapida delle cellule (diluizione);
- per abbassare rapidamente il livello di attività di una proteina, occorre perciò che la sua velocità di degradazione sia molto alta; di conseguenza, dovrà anche essere elevata la sua velocità di sintesi, affinché il livello stazionario di attività rimanga elevato;
- un meccanismo di questo tipo consente perciò, se esistono segnali di controllo che influiscono sulle velocità di sintesi e/o di degradazione, di variare prontamente il livello di attività della proteina e modularlo in risposta alle esigenze cellulari; anche nel caso in cui il livello aumenti, la velocità di adattamento a un nuovo stato stazionario è proporzionale alla velocità del processo di degradazione; e) come tutti i processi chimici irreversibili che avvengono ad elevata velocità, questo sistema dissipa energia in misura notevole.

Per fornire un'idea quantitativa, consideriamo che ogni giorno un uomo di 70 kg ingerisce in media 100 g di amminoacidi sotto forma di proteine; parallelamente, effettua l'escrezione di una quantità equivalente di composti azotati (bilancio azotato in pari, che è la norma). Dallo studio del turnover proteico tramite marcatura radioisotopica, risulta però che nello stesso periodo l'organismo distrugge 500 g di proteine e ne risintetizza 400 g. In altre parole, l'entità del turnover proteico è circa quattro volte superiore al metabolismo degli alimenti proteici.

Studi sui tassi del turnover proteico hanno dimostrato che le singole proteine presentano emivite di lunghezza diversa. Quelle a vita lunga costituiscono la maggioranza delle proteine cellulari. Quelle a vita breve sono in genere proteine regolatorie con ruoli strategici o proteine anomale (spesso a causa di ripiegamenti errati o errori di sintesi che le destinano a rapida degradazione).

Molte proteine hanno in realtà una vita assai lunga: ad esempio, l'emoglobina che trasporta O₂ e si trova nei globuli rossi, viene custodita e mantenuta con ogni cura dai sistemi eritrocitari; queste cellule vivono al più 4 mesi, nell'organismo umano. La distruzione dei globuli rossi "vecchi" da parte di cellule specializzate avviene prima che le loro molecole di emoglobina (presenti in essi fin dalla loro immissione nel circolo sanguigno) raggiungano il termine della loro potenziale esistenza come trasportatori di ossigeno pienamente funzionanti. Alcune proteine del cristallino sono probabilmente le più durature, poiché restano in quest'organo dalla nascita fino alla più tarda età.

Altre proteine hanno invece esistenze assai più corte rispetto alla durata di vita delle cellule che le contengono e le sintetizzano. Il problema che si sono posti i ricercatori insigniti del Premio Nobel per la Chimica 2004 è in che modo vengono riconosciute queste proteine e quali sono i meccanismi che operano nella loro efficace degradazione.

Il turnover delle proteine cellulari fu scoperto negli anni '30 del XX secolo grazie alle indagini di Rudolf Schoenheimer, ma solo trent'anni dopo cominciarono ad emergere prove che tale processo è altamente selettivo. Alla fine degli anni '70, due gruppi indipendenti stavano lavorando su due differenti linee di ricerca. Nel laboratorio di Avram Hershko ad Haifa (Israele), lo stesso Hershko e Aaron Ciechanover (in collaborazione con Irwin Rose, dell'Università della California a Irvine) lavoravano sulla dipendenza da ATP della degradazione della tirosina transaminasi (uno degli enzimi con un turnover abbastanza rapido); essi isolarono una proteina coinvolta nel processo, denominandola *ATP-dependent proteolysis factor 1* (APF-1). A Boston, negli Stati Uniti, Alexander Varshavsky era invece interessato a capire come mai la proteina che stava studiando (in grado di legarsi al DNA) contenesse un amminoacido C-terminale e due diversi amminoacidi N-terminali. Essa risultò essere composta dall'istone 2a (che lega il DNA) e dall'ubiquitina; questa proteina era stata descritta (come proteina libera) da Gideon Goldstein e coll. nel 1975. Nel 1980, K. Wilkinson, M. Urban e A. Haas dimostrarono che APF-1 e ubiquitina erano la stessa molecola.

Vale la pena di ricordare che Ciechanover, Hershko e Varshavsky avevano ricevuto nel 2000 il premio Albert Lasker alla Ricerca Medica di Base "per aver scoperto e riconosciuto il significato rilevante del sistema basato sull'ubiquitina nella degradazione proteica regolata, un processo fondamentale che influenza eventi cellulari vitali, tra cui il ciclo cellulare, la trasformazione maligna e le risposte infiammatoria e immunitaria".

3. Il sistema dell'ubiquitina

L'ubiquitina (Ub) è una piccola proteina composta da 76 amminoacidi. Essa si trova solo negli organismi eucarioti, mentre è assente negli organismi procarioti. Tra gli Eucarioti, Ub è altamente conservata, nel senso che la sequenza amminoacidica mostra solo poche differenze tra organismi anche lontani evolutivamente. Per esempio, esistono solo tre residui differenti tra Ub di

lievito e Ub umana. Questa forte conservazione suggerisce che la gran parte degli amminoacidi di Ub sono essenziali, dal momento che quasi tutte le mutazioni intervenute nel corso dell'evoluzione risultano essere state rimosse dalla selezione naturale.

Ub è una proteina termostabile con una struttura globulare compatta (Fig. 1A). Essa si trova nel nucleo, nel citoplasma e nel reticolo endoplasmatico di ogni tipo cellulare (da cui il suo nome), in forma libera o legata covalentemente con altre proteine. Nel secondo caso, Ub è *coniugata* a un'altra proteina tramite un legame isopeptidico² tra il carbossile della glicina C-terminale di Ub e il gruppo ϵ -amminico di una lisina sull'altra proteina (Fig. 1B).

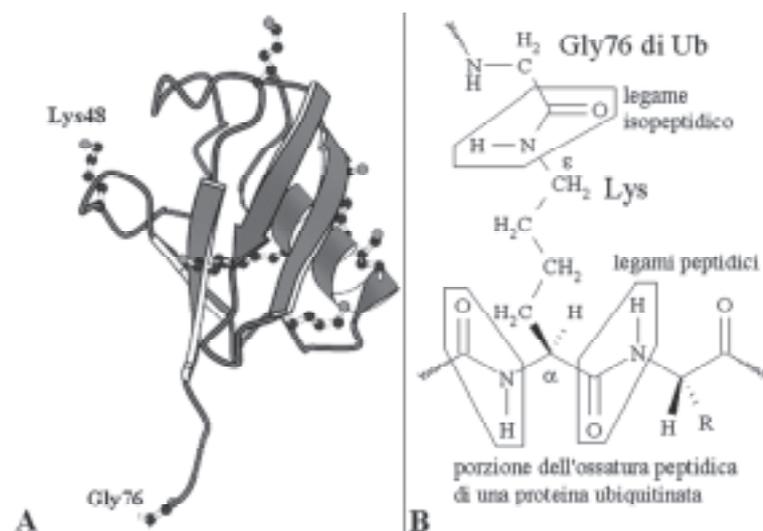


Figura 1 – A. La caratteristica struttura terziaria dell'ubiquitina (detta *ubiquitin fold*) presenta una sola elica α e quattro filamenti β ; nel modello sono esplicitate le catene laterali delle lisine, tra le quali spicca, per la sua posizione esposta, la Lys48. Come in tutti i modelli a nastro, l'impressione che la proteina sia "trasparente" è ingannevole: in realtà, l'*ubiquitin fold* è piuttosto compatto, ma un modello a sfere di van der Waals non consentirebbe di apprezzare l'andamento della catena.

B. Il legame isopeptidico è un gruppo ammidico che, nelle proteine ubiquitilate, coinvolge la catena laterale di una lisina (che ha un gruppo amminico in posizione 6, o ϵ) e il gruppo carbossilico terminale di una molecola di ubiquitina, il cui ultimo amminoacido è una glicina. Un polipeptide ubiquitilato è perciò un polimero ramificato, con due estremità amminiche (la propria e quella dell'ubiquitina) e una sola estremità carbossilica (la propria).

Di solito non c'è una sola molecola di Ub su queste proteine, più spesso vi si trovano attaccate catene di almeno quattro Ub, tra loro legate tramite legami isopeptidici che coinvolgono (di regola) la lisina in posizione 48 di Ub. La formazione di ciascun legame isopeptidico è un processo che richiede l'idrolisi di ATP.

Ub è codificata da una famiglia di geni i cui prodotti di traduzione sono proteine di fusione. Le sequenze geniche di Ub si trovano infatti tipicamente in due forme: A) fuse con quelle di un'altra proteina, dando origine a un unico prodotto di traduzione Ub-proteina; B) le sequenze di Ub si trovano come ripetizioni lineari in tandem, e il prodotto di traduzione comprende una catena lineare di molecole di Ub fuse tra loro (molecola di poliubiquitina). Dopo la sintesi delle proteine di fusione, un enzima specifico, detto *idrolasi C-terminale di Ub*, scinde le proteine di fusione all'estremità C-terminale di Ub, liberando singole molecole di Ub e dell'altra proteina (nel caso A) o un certo numero di monomeri di Ub dall'ubiquitina polimerica (nel caso B).

² Questo termine, introdotto dai biochimici che studiano l'ubiquitina, non vuole indicare che il legame ammidico in questione sia chimicamente diverso dagli altri che si trovano in un polipeptide. Sta ad indicare la diversa relazione posizionale che esso istituisce nel biopolimero, creando una ramificazione. Con un parallelo, si può dire che il prefisso *iso* è stato sfruttato per come è usato nella nomenclatura comune dai chimici organici (*isobutano* è un isomero con catena ramificata del butano).

Ub è implicata in molti processi cellulari di controllo delle attività proteiche: la sua funzione più studiata è la degradazione di proteine non funzionali (perché di composizione erranea o perché hanno strutture tridimensionali non funzionali) o soggette fisiologicamente a un rapido turnover. Per esempio, Ub viene coniugata alle proteine (dette *ciclina*) che controllano il *ciclo cellulare* eucariotico; la degradazione delle cicline consente l'andamento tipico dei loro livelli (che mostra picchi in determinate fasi del ciclo) affinché la cellula possa progredire verso la duplicazione e compiere la *mitosi*. La coniugazione con Ub, oltre che nella degradazione delle proteine, è implicata anche nella riparazione del DNA, in diversi stadi dell'embriogenesi, nella regolazione della trascrizione e nell'apoptosi; in questi casi, avviene di solito una singola reazione di ubiquitinazione, che non determina la distruzione della proteina, ma ne modifica la localizzazione o l'interazione con altre macromolecole cellulari.

I processi proteolitici nell'organismo umano: dove – come – perché.

[INSERTO n. 2]

1. Digestione delle proteine alimentari: avviene in un ambiente extracorporeo (quindi extracellulare), il lume del tratto gastrointestinale, ad opera di varie proteasi che idrolizzano le proteine (denaturate dai succhi gastrici) in peptidi e poi in amminoacidi, liberando questi nutrienti in modo che possano essere assorbiti dalla mucosa dell'intestino tenue e utilizzati dall'organismo per produrre le proprie proteine.

2. Proteolisi limitata per l'attivazione di enzimi e proteine in processi di rilevanza fisiologica: avviene di solito in un ambiente intracorporeo extracellulare, ossia nei fluidi interstiziali dei tessuti; coinvolge l'idrolisi di pochi legami peptidici ad opera di enzimi selettivi, la cui azione produce la conversione di precursori inattivi in sostanze attive. Il sistema di coagulazione del sangue ne è un esempio tipico, ma diversi altri sistemi operano in modo simile. Nel caso dei precursori degli enzimi digestivi (punto 1), la proteolisi limitata avviene nel lume del tratto gastrointestinale, quindi in ambiente *extracorporeo*.

3. Processi di proteolisi cellulare: avvengono in ambiente intracorporeo e intracellulare; sono di due tipi principali:

3a. Sistemi contenuti nei lisosomi (organuli subcellulari racchiusi da una membrana): diverse proteasi che idrolizzano soprattutto materiali proteici inglobati dalle cellule per endocitosi, al fine di distruggerli e in certi casi apprenderne l'identità (meccanismi di riconoscimento delle proteine estranee da parte del sistema immunitario);

3b. Il sistema dell'ubiquitina (presente nel citosol, nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico) che "etichetta" proteine destinate alla degradazione da parte di un complesso enzimatico detto proteasoma; le proteine bersaglio di questo sistema sono molecole i cui livelli devono essere variati prontamente per regolare importanti processi cellulari, oppure molecole riconosciute inadatte attraverso un "controllo di qualità" che sorveglia i prodotti proteici cellulari; questo sistema attua un processo di scomposizione della proteina che (pur essendo basato sulla proteolisi) richiede il consumo di energia sotto forma di ATP.

4. Coniugazione dell'ubiquitina a proteine-bersaglio

Poiché la proteolisi è un processo spontaneo (vedi INSERTO n. 2), il consumo di energia durante la degradazione regolata da Ub è l'aspetto meno intuitivo di questo processo: infatti, il sistema di degradazione regolato da Ub agisce in maniera dipendente da ATP. Anche se l'idrolisi delle proteine è di per sé un processo spontaneo, ATP è richiesto in due fasi di questo processo: 1) per coniugare Ub alle proteine (sintesi di legami isopeptidici); 2) durante il processo di trasferimento della proteina ubiquitinata al proteasoma 26S (descritto in seguito), poiché questo richiede la denaturazione della proteina (perdita della struttura tridimensionale stabile).

Almeno tre tipi di enzimi sono richiesti per il processo di ubiquitinazione di una proteina: essi sono detti per brevità E1, E2 ed E3. E1 è l'*enzima che attiva l'ubiquitina*, tramite una reazione tipica di attivazione del gruppo carbossilico (come quelle che attivano gli acidi grassi per legarli al Coenzima A; nel caso dell'ubiquitina, il carbossile attivato è quello della glicina C-terminale). E1 fa reagire ubiquitina e ATP, formando un intermedio ubiquitinil-adenilato e liberando pirofosfato inorganico; un tiolo (-SH) di E1 attacca poi il residuo ubiquitinile, liberando AMP. Infine, E1 cede il residuo ubiquitinile a un enzima E2 (*ubiquitinil trasferasi*) sempre su un gruppo -SH. In tal modo, E1 viene riciclato e può attivare una nuova molecola di ubiquitina. L'ubiquitinil-S-E2 di solito si lega a uno degli E3 (*ubiquitina ligasi*) che è in grado di associarsi anche con la proteina-bersaglio (esistono diversi enzimi E2 ed E3, dotati di specificità per diverse proteine da degradare; alcune proteine possono essere ubiquitinate direttamente da E2). Il trasferimento dell'ubiquitinile da E2 (che così viene riciclato) a un residuo di lisina della proteina bersaglio (formazione del legame isopeptidico) conclude il ciclo. Queste reazioni si ripetono per più volte, con la sola differenza che i successivi residui di ubiquitinile sono trasferiti (almeno dai sistemi enzimatici coniuganti che indirizzano le proteine alla degradazione nel proteasoma) alla Lys48 dell'ubiquitina già coniugata alla proteina-bersaglio (Fig. 2).

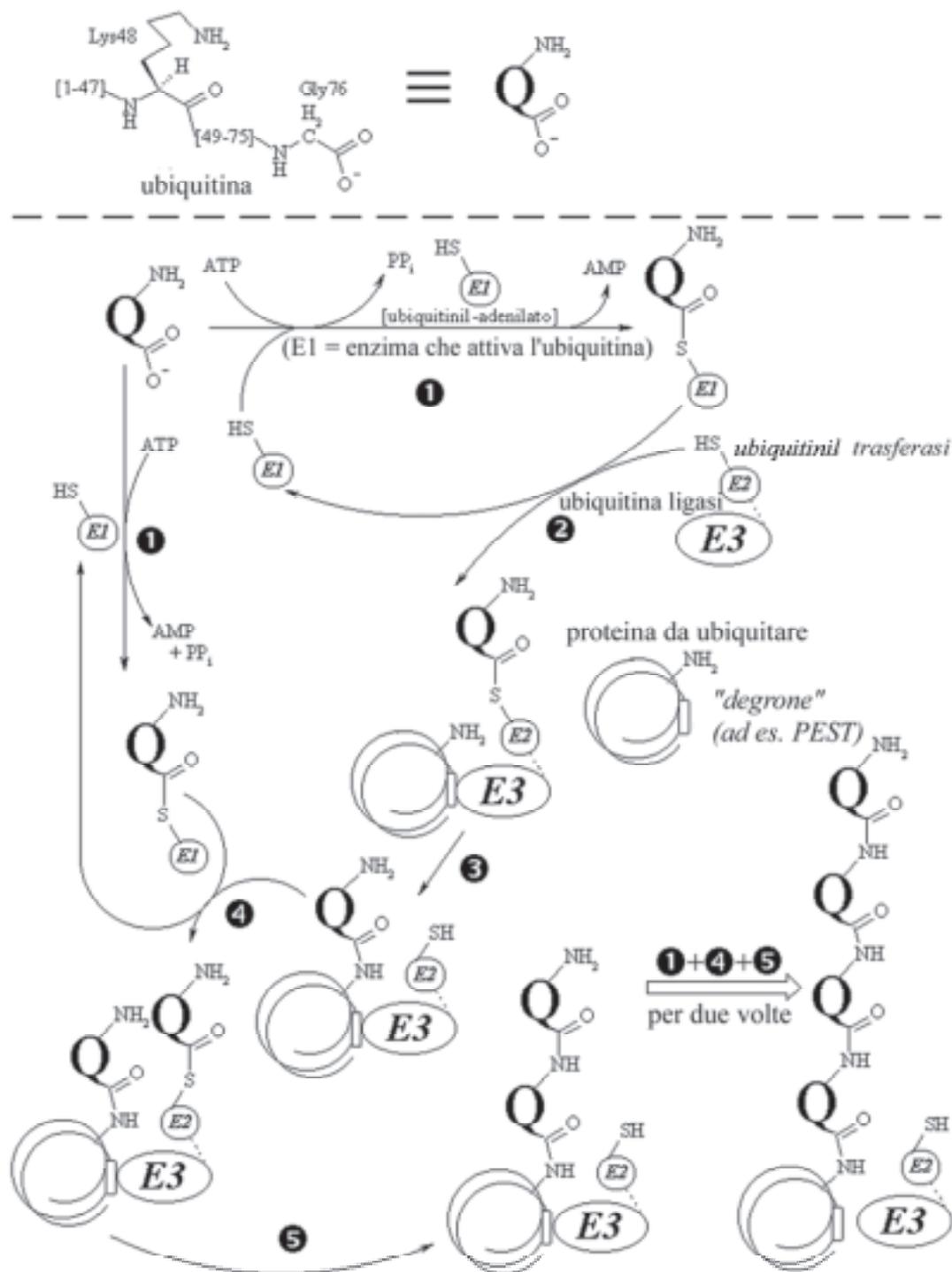


Figura 2 – In alto: la molecola dell'ubiquitina contiene due gruppi importanti per la sua funzione, il gruppo carbossilico terminale e il gruppo amminico della Lys48, che sono messi in evidenza nella rappresentazione abbreviata della sequenza (gli altri residui sono indicati dall'intervallo dei numeri che ne indicano la posizione nel polipeptide). Nel resto della figura, ogni molecola di ubiquitina è simboleggiata da una Q con attaccati questi due gruppi funzionali.

Il processo che coniuga l'ubiquitina a una proteina da degradare richiede di solito tre diversi enzimi. E1 è l'enzima che attiva l'ubiquitina, legandola a un proprio gruppo -SH, E2 è un enzima in grado di interagire con E1 per trasferire a un proprio gruppo -SH il residuo ubiquitile, E3 è un enzima che trasferisce l'ubiquitile dall'E2 al gruppo amminico di una lisina sulla proteina-bersaglio; per questa funzione, i vari enzimi E3 hanno struttura più complessa degli altri due tipi, contenendo siti che si associano a proteine-bersaglio specifiche o quanto meno alle loro sequenze con proprietà di *degroni*.

5. I segnali che indirizzano alla degradazione

Quali sono le caratteristiche di una proteina che la indirizzano alla degradazione? Anche se non vi sono risposte per tutti i casi, sono stati scoperti alcuni “segnali” cifrati nella struttura primaria delle proteine che sembrano di significato generale e sono indicati col neologismo “*degrone*”:

1. *L'amminoacido N-terminale*. Nel 1986, Alexander Varshavsky mostrò una correlazione tra l'emivita di una proteina e il suo residuo N-terminale. Tale osservazione portò a formulare la cosiddetta “regola dell'amminoacido N-terminale” (“*N-end rule*”), secondo cui si può in generale predire la durata di una proteina conoscendo il suo amminoacido N-terminale. Ad esempio, proteine con Met, Ser, Ala, Cys, Pro, Thr, Val, o Gly all'N-terminale hanno emivite superiori a 20 h. Al contrario, proteine con Phe, Leu, Asp, Lys, o Arg all'N-terminale hanno emivite di soli 3 min; con gli altri amminoacidi all'N-terminale, il tempo di emivita non supera i 30 min. Il meccanismo che lega il riconoscimento del residuo N-terminale all'emivita della proteina non è ancora noto. È però interessante notare che la “*N-end rule*” vale anche per i batteri, organismi privi di ubiquitina.

2. *Sequenze amminoacidiche particolari*. Risulta che sequenze ricche di prolina, glutammato, serina e treonina (*degroni* PEST, dalle sigle a una lettera dei quattro amminoacidi) indirizzano la proteina alla rapida degradazione, come nel caso del fattore di trascrizione del lievito Gcn4p. Questa proteina di 281 amminoacidi ha un *degrone* PEST tra le posizioni 91 e 106; la sua emivita è di circa 5 min. La rimozione del *degrone* PEST (ma non la rimozione di altre sequenze) fa salire l'emivita a 50 min. Se invece una sequenza PEST viene inserita artificialmente in una proteina con emivita lunga, questa risulta abbreviata.

3. *Modificazioni covalenti di PEST*. Per le proteine con *degroni* PEST, si riscontra spesso che la fosforilazione dei residui di serina o treonina contenuti nel *degrone* accelera la coniugazione all'ubiquitina (e quindi la degradazione), mentre la glicosilazione degli stessi residui con N-acetilglucosamina la rallenta.

6. La poliubiquitinazione conduce le proteine alla degradazione nel proteasoma

La poliubiquitinazione è molto spesso l'etichetta che segnala il destino degradativo di una proteina. L'istruzione data da questa etichetta viene portata a termine da una struttura complessa, detta *proteasoma* (particella subcellulare con attività di proteasi). Infatti, la maggior parte delle proteine possono interagire col proteasoma, ma se ne dissociano senza iniziare la via degradativa (in qualche caso, si sa che proteine a vita molto breve possono essere degradate dal proteasoma senza essere ubiquitilate). L'ubiquitinazione rallenta la dissociazione e allunga il tempo di contatto tra proteina e proteasoma, aumentando la probabilità che essa venga degradata. Si potrebbe dire che Ub agisce come una specie di guinzaglio che vincola la proteina-substrato al proteasoma.

La struttura di base del proteasoma, detto proteasoma 20S (dal valore del suo coefficiente di sedimentazione, che corrisponde a una $M_r = 7 \times 10^5$), contiene due copie per ciascuna delle 14 subunità differenti: due anelli centrali sovrapposti, ciascuno costituito da 7 subunità β (molto simili tra loro, ma leggermente differenti), formano la parte

centrale di questa struttura cilindrica; due anelli posti alle estremità di tale cilindro sono formati ciascuno da 7 tipi di subunità α . Gli anelli α sono la porta di accesso e di uscita dei substrati e dei prodotti che sono elaborati dagli anelli β . Questi contengono tre siti dotati di attività proteolitica, con diverse specificità per classi di residui amminoacidici. Il meccanismo catalitico di questi tre siti attivi si basa sulla presenza di un residuo N-terminale di Treonina in tre delle subunità β (vedi INSERTO n. 3).

Le proteinasi possono essere classificate in base al meccanismo catalitico. [INSERTO n. 3]

I biochimici collocano gli enzimi proteolitici (proteinasi) in classi definite dal tipo di meccanismo catalitico: in tutti i casi, la catalisi della reazione sfrutta un attacco nucleofilo sul carbonile del legame ammidico che subisce l'idrolisi. Il nucleofilo dell'enzima è diverso nelle varie classi, e diversi sono anche i residui che hanno ruoli di catalisi basica generale, elettrostatica o acida generale. In alcuni meccanismi si formano legami covalenti tra l'enzima e il prodotto intermedio.

1. *Proteinasi a serina*. Esempi tipici: tripsina, chimotripsina e alcuni fattori della coagulazione del sangue (ad es., plasmina e trombina). Il gruppo alcolico primario di una serina è il nucleofilo che inizia l'attacco sul carbonile, grazie al trasferimento del suo protone all'imidazolo di un'istidina che è stabilizzato nella forma cationica dal carbossilato di un aspartato. La formazione di un intermedio acil-enzima (estere con la serina) libera il prodotto col gruppo amminico libero, mentre una molecola di H_2O idrolizza in seguito l'acil-enzima e rigenera i gruppi catalitici nella forma iniziale.

2. *Proteinasi a cisteina (o a tiolo)*. Esempi tipici: la papaina (estratta dal frutto della papaya) e le caspasi, enzimi intracellulari coinvolti nell'attivazione della morte cellulare programmata. Qui il nucleofilo è il gruppo $-SH$ di una cisteina, che trasferisce il protone all'imidazolo di un'istidina; si forma un intermedio covalente tiol-estere, successivamente idrolizzato da una molecola di H_2O .

3. *Proteinasi aspartiche*. Esempi tipici: la pepsina e le proteinasi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Il sito catalitico contiene due residui aspartici: il primo, non ionizzato, forma un legame a idrogeno con l'ossigeno del carbonile del substrato; ciò assiste la catalisi basica generale dell'altro aspartato (in forma ionizzata) su una molecola di H_2O , generando un OH^- che compie l'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico. In questo caso, non si formano intermedi covalenti tra enzima e prodotti, i quali si dissociano dopo la reazione d'idrolisi.

4. *Metalloproteinasi*. Esempi tipici: la termolisina (una proteinasi batterica) e le metalloproteinasi della matrice extracellulare, importanti nel rimodellamento tessutale, nell'angiogenesi e in altri processi che avvengono nei compartimenti extracellulari. Il sito catalitico contiene tre residui di istidina: i gruppi imidazolici coordinano uno ione metallico di transizione (quasi sempre Zn^{2+} , per cui questi enzimi sono anche detti zincoproteinasi), al quale è legata, nel complesso tetradentato, anche una molecola di H_2O ; questa tende a ionizzarsi, grazie alla catalisi di Lewis del complesso metallico, e il suo ossidrile attacca il carbonile del legame ammidico. Altri gruppi (di solito un residuo di glutammato) intervengono con ruoli di acidi o basi genera-

li per assistere la migrazione di protoni nella reazione. Anche in questo meccanismo, non si formano intermedi covalenti.

5. *Il proteasoma costituisce una quinta classe di meccanismo catalitico per le proteinasi.* Nei siti attivi interni al proteasoma, si trova un unico residuo aminoacidico con azione catalitica: si tratta della treonina in posizione N-terminale, che dispone del nucleofilo (gruppo -OH secondario sul carbonio 3) e di una base generale (gruppo -NH₂ sul carbonio 2) per catalizzare l'idrolisi dei legami ammidici. Come nella classe delle proteinasi a serina, il meccanismo di reazione prevede la formazione di un intermedio covalente (estere o acil-enzima) fra il gruppo carbossilico del substrato e il gruppo alcolico della treonina. Nel proteasoma 20S, le subunità α non consentono l'ingresso alle proteine-substrato (Fig. 3)

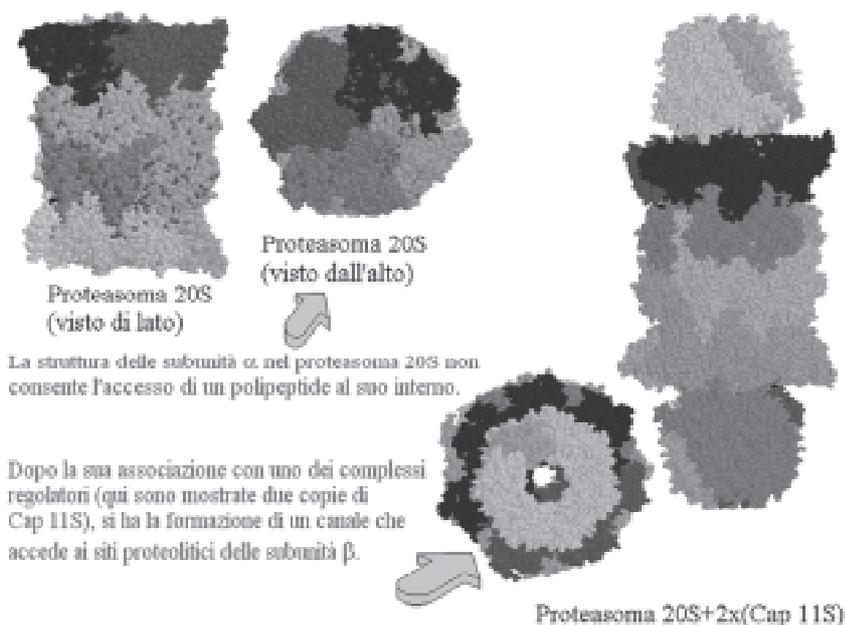


Figura 3 – Modelli con sfere a contorno di van der Waals di due forme del proteasoma, basati su dati cristallografici. **A sinistra**, sono mostrate due proiezioni del proteasoma 20S: nella vista di lato, si possono notare i due anelli β centrali e i due anelli α agli estremi del cilindro, che è diviso a metà nella direzione di osservazione da un piano di simmetria (le due metà superiore e inferiore sono specularmente uguali); nella vista lungo l'asse del cilindro, che è un asse di pseudosimmetria settenaria, si può osservare come non vi siano accessi all'interno della struttura (nonostante che in essa vi siano delle cavità). **A destra**, sono mostrate due proiezioni del complesso tra un proteasoma 20S e due Cap11S: nella vista lungo l'asse del cilindro, si può notare la presenza di un ampio canale che attraversa il proteasoma.

Perché il proteasoma 20S divenga completamente funzionante, si deve associare a un elemento regolatorio con M_r simile (coefficiente di sedimentazione 19S), detto **Cap Complex** o **PA700**, per formare il proteasoma 26S. PA700 interagisce con le subunità α del proteasoma 20S, in modo da aprire il canale di accesso alla parte centrale del proteasoma (subunità β proteolitiche). PA700 è formato da due anelli, uno di 8 subunità all'esterno e uno di 6 subunità all'interno (cioè associato al proteasoma 20S). L'anello esterno (chiamato *lid* = "coperchio") lega le proteine poliubiquitinate e le trasporta verso l'anello interno: al confine tra i due anelli si trova almeno un sito con attività di *isopeptidasi*, che rimuove le molecole di ubiquitina (così riciclate) per idrolisi dei legami isopeptidici. Infine, le sei subunità dell'anello interno, con attività di *ATPasi*, svolgono la catena polipeptidica della proteina-substrato, introducendola progressivamente all'interno del proteasoma, dove avviene la degradazione proteolitica. All'altra estremità del proteasoma, si associa in genere il complesso regolatorio detto "**Cap 11S**", che mantiene pervio il canale per l'uscita dei prodotti d'idrolisi. Cap 11S non contiene attività ATPasi,

quindi la sua azione non prevede consumo di energia (**Fig. 4**).

Si osserva sperimentalmente che i peptidi derivanti dall'azione del proteasoma hanno lunghezze da 3 a 22 aminoacidi (in media tra 7 e 8); questi prodotti proteolitici non hanno ovviamente più alcuna attività collegabile con la funzione della proteina-substrato; essi possono in seguito essere scomposti da peptidasi intracellulari nei singoli aminoacidi, che vengono riciclati nel metabolismo cellulare. Un'ultima considerazione per concludere: anche se il ruolo principale dell'ubiquitinazione, che è stato anche il primo ad essere indagato, sta nell'innescare la via degradativa di molte proteine, serve sottolineare ancora che questa modificazione covalente ha anche altri ruoli nella cellula. Inoltre, si trova scritto spesso che l'ubiquitina serve a far eliminare le proteine mal riuscite: come spero di aver indicato, questa è meno di metà dell'intera faccenda.

Glossario

Apoptosi = Processo di morte cellulare innescato all'interno della stessa cellula destinata a morire (*morte cellulare programmata*). Può essere un evento dovuto a danni irreparabili che la cellula ha subito (come in certe patologie), oppure legato al normale avvicendamento di nuovi elementi (ad es., la crescita dell'epidermide) o a dinamiche di sviluppo morfogenetico delle strutture anatomo-funzionali (tipica l'apoptosi delle cellule linfoidi nel timo o quella dei neuroni nello sviluppo della retina). I meccanismi che mediano l'apoptosi sono complessi e molteplici.

Ciclo cellulare = La successione di fasi alle quali va incontro una cellula per riprodursi. Si distinguono un'*interfase* (fase di crescita e preparazione) e una *mitosi* (fase di divisione); l'interfase si divide in tre fasi, G1 (crescita della cellula), S (sintesi del DNA nel nucleo, in cui viene duplicato il corredo genomico della cellula) e G2 (montaggio e preparazione dell'entrata in mitosi); la mitosi si articola in diverse fasi, durante le quali i due corredi genomici vengono separati e ripartiti fra le due metà della cellula, e termina con la divisione

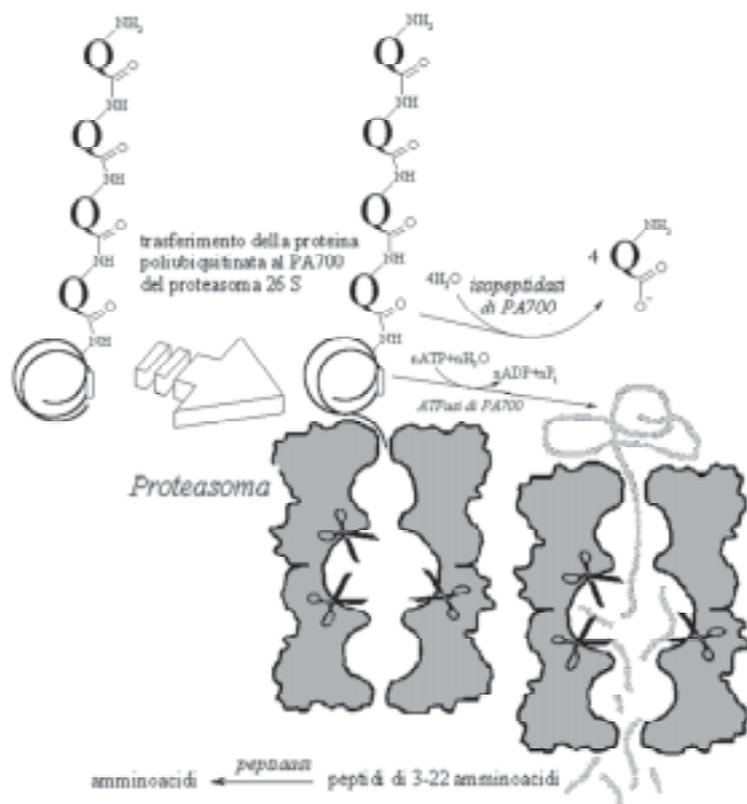


Figura 4 – Disegno che illustra il processo di degradazione di una proteina poliubiquitinata da parte di un proteasoma completo. Per semplicità, questo è mostrato come uno spaccato della porzione 20S (le tre forbici simboleggiano i tre siti proteolitici), mentre non sono stati disegnate le porzioni PA700 (che sovrasta il 20S) e Cap11S (che può trovarsi associato alla parte inferiore del 20S).

vera e propria, in cui il plasmalemma si chiude al centro, delimitando due nuove cellule ciascuna dotata di un proprio nucleo. Mentre la mitosi è la parte più appariscente della riproduzione cellulare (quella in cui si vede che due cellule si formano da una sola), l'osservazione al microscopio ottico nell'interfase non mostra che un cambiamento nelle dimensioni della cellula, ma è nella successione G1-S-G2 che operano i principali meccanismi di controllo del ciclo cellulare.

Citoplasma = Tutto quanto è racchiuso dalla membrana cellulare (*plasmalemma*), ad eccezione del nucleo; se si vuole indicare la porzione del citoplasma che non fa parte degli organuli citoplasmatici, si usa il termine *citosol*.

Degradazione = Con questo termine si indicano tutti quei processi chimici o biochimici che alterano (scomponendola) la struttura covalente di una proteina; quasi sempre, questo avviene tramite la scissione in peptidi e la loro successiva idrolisi in amminoacidi, ma possono verificarsi anche processi di degradazione che staccano progressivamente i residui amminoacidici da una delle estremità del polipeptide. La scissione di pochi **legami peptidici** (*q.v.*) all'interno di un polipeptide può invece essere un processo che porta all'esplicazione di proprietà funzionali della proteina; non si parla in questo caso di degradazione, ma di **proteolisi limitata**.

Degrone = elemento strutturale di una proteina che consente il suo riconoscimento nel sistema di degradazione cellulare, come quello formato da ubiquitina, E1, E2, E3 e proteasoma.

Denaturazione = Con questo termine si intende genericamente la perdita della struttura nativa di una proteina. Più precisamente, se tale perdita non comporta rottura di legami covalenti, essa è indicata col termine anglosassone **unfolding** (perdita di ripiegamento). Questo processo può avvenire nella cellula per varie cause (come un innalzamento di temperatura) o può

essere studiato in vitro dal biochimico per capirne la dinamica. Se il polipeptide, al momento della sua sintesi nella cellula, o nella provetta dello sperimentatore, acquista un avvolgimento che non è quello della struttura nativa, si parla di **misfolding**. Se (nella cellula o in provetta) operano processi che consentono un nuovo tentativo di ripiegamento (corretto) del polipeptide, si parla di **refolding**.

Enzima che attiva l'ubiquitina (E1) = Catalizza la reazione tra ubiquitina e ATP, e l'intermedio ubiquitinil-adenilato che si forma finisce con l'ubiquitinilare un tiolo dell'enzima, per cui l'azione catalitica non può procedere se non interviene un enzima E2.

Espressione del gene = Processo in più stadi, nel quale la sequenza nucleotidica di un gene viene prima ricopiata in una molecola di RNA messaggero (**trascrizione**), che poi viene usata dai ribosomi come istruzione codificata per sintetizzare il polipeptide (**traduzione**) unendo un amminoacido all'altro secondo la corrispondenza (**codice genetico**) fra triplette di basi (**codoni**) e singoli amminoacidi. L'espressione del gene diviene completa quando il polipeptide acquista la sua struttura tridimensionale dotata di funzione. Spesso tale fase è completata, ad opera di enzimi che catalizzano reazioni specifiche, dalla modificazione di alcuni residui amminoacidici con vari tipi di gruppi chimici (dal metile, fosforile, acile, glicosile, ecc.); queste modificazioni covalenti della proteina prendono complessivamente il nome di **modificazioni post-traduzionali**, poiché avvengono dopo la fase di traduzione operata dai ribosomi.

Gene = Singolo elemento del corredo ereditario (genoma) che contiene l'informazione per un determinato prodotto macromolecolare cellulare (RNA o proteina). I geni che servono a produrre proteine codificano la **sequenza amminoacidica** (*q.v.*) che è specifica di ogni proteina.

Legame isopeptidico = Con questo termine è stato designato il gruppo ammidico tra il carbossile della glicina C-terminale di Ub e il gruppo ϵ -amminico di una lisina su un'altra molecola proteica (che può essere la proteina bersaglio di Ub, oppure un'altra molecola di Ub). La ragione per usare un termine alternativo a "legame peptidico" è nella diversa posizione del gruppo amminico che forma il legame (si trova all'estremità di una catena laterale di un amminoacido e non sul suo carbonio α), oltre che nella struttura covalente ramificata che essa genera nel composto ubiquitinilato.

Legame peptidico = Il gruppo ammidico [-C(O)-N(H)-] che unisce due residui amminoacidici in una proteina (o in un

peptide di qualunque lunghezza). Il nome, dovuto al fatto che esso viene idrolizzato durante la digestione (*pepsis*) delle proteine, è riservato ai legami ammidici che uniscono due residui aminoacidici tramite i gruppi funzionali dei rispettivi carboni α . L'idrolisi dei legami peptidici in condizioni blande è catalizzata da enzimi, che possono essere detti *peptidasi* o *proteinas* a seconda della struttura chimica del composto di cui catalizzano la scissione.

Organismi eucarioti = Organismi (riuniti nei quattro Regni di Animali, Piante, Funghi e Protisti) la cui struttura di base è la cellula eucariota, dotata di un nucleo circondato da un involucro a doppia membrana (entro cui si trova il DNA del genoma nucleare) e di organuli citoplasmatici, quali i mitocondri, il reticolo endoplasmico e il citoscheletro.

Organismi procarioti = Organismi di norma unicellulari (Eubatteri e Archebatteri) la cui unità strutturale è una cellula priva del nucleo a doppia membrana e di organuli citoplasmatici; il DNA genomico di questi organismi (di norma costituito da un'unica molecola circolare a doppia elica) è presente nel citoplasma in un ammasso che prende il nome di *nucleoide*. Hanno quasi sempre una parete cellulare esterna alla membrana plasmatica, di struttura polimerica caratteristica e diversa da quelle delle pareti vegetali (cellulosa) e fungine (chitina).

Proprietà native = Si indica con questo termine l'insieme delle caratteristiche fisiche, chimiche e biochimiche (funzionali) che una proteina (o in genere una macromolecola biologica) possiede al momento del suo isolamento in condizioni blande dall'ambiente cellulare. Esse, per una proteina, risiedono principalmente nell'integrità della sua catena polipeptidica e nella preservazione della sua struttura tridimensionale, associate con la sua funzione biologica. Poiché le proprietà native sono associate a elementi strutturali della proteina, il loro insieme è detto *struttura nativa*.

Proteina di fusione = Il prodotto di un gene la cui sequenza nucleotidica codifica un polipeptide unico, ma che si avvolge in due strutture tridimensionali proteiche funzionalmente distinte, che possono essere separate per idrolisi tramite una proteolisi limitata (nel caso di Ub, dalla *idrolasi C-terminale di Ub*). In altri contesti, si usa il termine analogo di *poliproteina*. Proteine di fusione sono state ottenute, a scopo di ricerca, in modo artificiale, ricorrendo alle tecniche del DNA ricombinante (ad es., tra la *proteina fluorescente verde* e una proteina di cui si vuole studiare la localizzazione o la mobilità nella cellula con indagini di microscopia a fluorescenza).

Proteinas = Termine (a volte si trova *proteasi*) che designa gli enzimi dotati di azione catalitica per l'idrolisi di legami peptidici all'interno di una catena polipeptidica, ossia tra due residui che non abbiano libero l'altro gruppo funzionale del loro carbonio α perché impegnato anch'esso in altro legame (di solito peptidico). Le proteinas sono perciò delle *endopeptidasi*, mentre gli enzimi proteolitici che attaccano legami peptidici in cui è impegnato un residuo con gruppo α -amminico o α -carbossilico libero sono detti *esopeptidasi* (rispettivamente, *ammino-* e *carbossipeptidasi*).

Proteolisi = Processo di scissione idrolitica di una proteina. Può essere confinato all'idrolisi di un solo, o pochissimi, legami peptidici: in questo caso si parla di *proteolisi limitata* ed ha di solito significato in relazione all'attività funzionale della proteina che la subisce (come la conversione del fibrinogeno in fibrina, che polimerizza nella

coagulazione del sangue). È invece estesa a parecchi legami peptidici quando la proteina substrato deve essere degradata in maniera che perda *anche* le sue proprietà funzionali native.

Reticolo endoplasmico (R.E.) = uno dei principali organuli della cellula eucariota. È formato da un labirinto di cisterne appiattite e tra loro comunicanti, delimitate da una membrana di struttura assai simile a quella che racchiude l'intera cellula (*plasmalemma*). Tali cisterne sono per lo più disposte in maniera concentrica intorno al nucleo: la porzione più vicina a questo presenta parecchi ribosomi sul lato esterno della membrana (*reticolo endoplasmico ruvido*, o *R.E.R.*) che sintetizzano proteine destinate alle vescicole di secrezione, ai lisosomi o ai vacuoli (organuli citoplasmatici avvolti da membrana e ricchi di enzimi digestivi, con pH interno acido) o a far parte del plasmalemma (proteine integrali di membrana). La porzione più esterna del R. E. è anch'essa in comunicazione col R.E.R., ma è priva di ribosomi (*reticolo endoplasmico liscio*, o *R.E.L.*) ed è sede di importanti processi metabolici, tra cui la sintesi dei lipidi di membrana e l'elaborazione iniziale delle proteine destinate a varie destinazioni, oltre che a produrre vescicole di membrana che vanno all'apparato di Golgi (altro organulo formato da cavità circondate da membrana, di vitale importanza per la cellula eucariota).

Sequenza aminoacidica, o struttura primaria della proteina = La disposizione polimerica lineare di residui aminoacidici in un polipeptide (codificata in un *gene*), in cui ogni aminoacido, tramite il suo gruppo α -carbossilico, forma un *legame peptidico* (*q.v.*) col gruppo α -amminico dell'amminoacido successivo; il primo residuo di un polipeptide ha perciò il gruppo α -amminico libero, e l'ultimo ha libero il gruppo α -carbossilico.

Struttura terziaria = l'organizzazione tridimensionale della catena polipeptidica derivata dalla sintesi proteica ribosomale. Si distinguono almeno due livelli di questa organizzazione, legati alla possibilità di variazione conformazionale del polipeptide: la *struttura secondaria*, formata da elementi ordinati della catena polipeptidica che si strutturano in *eliche α* o in *foglietti β* , entrambi inframezzati da segmenti non regolari (detti *anse*), e la struttura terziaria, appunto, data dal raccordo reciproco degli elementi di struttura secondaria a costituire un insieme relativamente compatto (*dominio strutturale*). I polipeptidi meno complessi si avvolgono spesso in un solo dominio, ma diverse grandi proteine si organizzano in più domini dotati di una certa mobilità reciproca. La struttura terziaria è il livello strutturale della proteina al quale emerge la sua funzione biologica, e per molte proteine è il livello più alto di organizzazione strutturale e funzionale.

Ubiquitina (Ub) = Proteina di basso peso molecolare, che si trova in tutte le cellule eucariote; il suo nome deriva infatti dall'avverbio latino *ubique* (ovunque) proprio per la sua diffusione quasi universale nel mondo vivente. Essa è stata la prima proteina della sua famiglia ad essere scoperta, infatti oggi si conoscono proteine simili a Ub che sono coniugate ad altre proteine per modularne le proprietà funzionali. La struttura terziaria tipica dell'ubiquitina è detta *ubiquitin fold* (ripiegamento ubiquitinico) e si ritrova in tutti i membri di questa "famiglia proteica", oltre che in domini inglobati in proteine più grandi che interagiscono con la rete di fattori connessi con Ub e simili (questi domini sono stati battezzati "ubiquitoni"). Ub è una proteina molto stabile e, dopo essere stata denaturata, riacquista

facilmente la struttura nativa. Essa è anche molto stabile alla maggior parte delle proteinasi a pH neutro, proprietà vantaggiose per una proteina che deve consegnare altre proteine alle pericolose cure delle proteinasi.

Ubiquitina ligasi (E3) = Enzimi di notevole complessità strutturale, in grado di associarsi con la proteina-bersaglio e con un E2 ubiquitilato. Gli enzimi E3 sono tipicamente dotati di siti di legame che riconoscono i **degroni**.

Ubiquitinil trasferasi (E2) = Enzima che accetta un residuo di ubiquitinile da un enzima E1. Di solito, gli E2 ubiquitilati interagiscono con un enzima E3, ma si conoscono casi di E2 che sono in grado di trasferire Ub direttamente a una proteina-bersaglio.

Siti internet utili per raccogliere altre notizie.

Nota: I primi cinque siti sono in lingua inglese, gli altri in lingua italiana.

<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004/> (seguire i link nel rettangolo grigio a destra, per saperne di più sui Premi Nobel per la Chimica 2004).

http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_12/Page1.htm (ci sono altre due pagine, oltre questa).

<http://www.nottingham.ac.uk/biochemcourses/students/ub/ubindex.html> (soli i primi tre link in fondo alla pagina funzionano).

<http://www.yale.edu/crews/research/pdfs/>

MyungReview.pdf (articolo di rassegna su aspetti vari del proteasoma, con meccanismo catalitico della reazione di proteolisi e diversi inibitori proposti come potenziali farmaci che interferiscono con tale attività enzimatica).

<http://www.biochemweb.org/proteins.shtml> (un sito ricco di link sulle proteine).

http://www.itisnatta.it/chimica/mol_mese_2004/12_Ubiquitina/Ubiquitina_1_ita.htm (pagine con modelli a sfere piene dei vari componenti molecolari della via degradativa ubiquitina-proteasoma).

<http://users.unimi.it/poletti/biologia/TESTI/ciclocellulare/ciclocell1.html> (in diverse pagine successive sono spiegate le proteine che regolano il ciclo cellulare e le varie fasi della mitosi).

<http://magazine.enel.it/boiler/arretrati/arretrati/boiler44/html/articoli/Ercole-Medicina.asp> (che cosa succede se il sistema funziona male, come in alcune patologie neurodegenerative).

